

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2016 年 2 月 4 日 (04.02.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/015349 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2014/083596
- (22) 国际申请日: 2014 年 8 月 1 日 (01.08.2014)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 深圳华大基因科技有限公司 (BGI SHEN-ZHEN CO., LIMITED) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼 11F-3, Guangdong 518083 (CN)。
- (72) 发明人: 吴靛 (WU, Liang); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。李贵波 (LI, Guibo); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。杨欢 (YANG, Huan); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。吴建 (WU, Kui); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。侯勇 (HOU, Yong); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。徐讯 (XU, Xun); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。
- (74) 代理人: 北京清亦华知识产权代理事务所 (普通合伙) (TSINGYIHUA INTELLECTUAL PROPERTY LLC); 中国北京市海淀区清华园清华大学照澜院商业楼 301 室, Beijing 100084 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING WHETHER NUCLEIC ACIDS IN VESSEL ARE DERIVED FROM SINGLE CELL AND APPARATUS AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 确定容器中核酸是否来源于单个细胞的方法及其装置和用途

(57) Abstract: Provided are a method for determining whether the nucleic acids in a vessel are derived from a single cell and an apparatus and use thereof. In the invention, the method for determining whether the nucleic acids in a vessel are derived from a single cell comprises: (i) adding fluorescent markers to a vessel containing the nucleic acids, and performing a real-time fluorescent quantitative PCR in order to obtain data about fluorescence changes in the vessel; and (2) determining whether the nucleic acids contained in the vessel are derived from a single cell based on the data about the fluorescence changes in the vessel.

(57) 摘要: 提供了确定容器中核酸是否来源于单个细胞的方法及其装置和用途。其中, 确定容器中核酸是否来源于单个细胞的方法包括: (1) 在含有核酸的容器中添加荧光标记, 并进行实时荧光定量 PCR, 以便获得所述容器的荧光变化数据; 以及(2)基于所述容器的荧光变化数据, 确定所述容器中所包含的核酸是否来源于单个细胞。



WO 2016/015349 A1

确定容器中核酸是否来源于单个细胞的方法 及其装置和用途

优先权信息

5 无

技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体而言，涉及确定容器中核酸是否来源于单个细胞的方法及其装置和用途，更具体的，本发明涉及确定容器中核酸是否来源于单个细胞的方法、
10 确定容器中核酸是否来源于单个细胞的装置、获取单细胞核酸的方法、构建单细胞核酸测序文库的方法、构建单细胞核酸测序文库的系统以及确定单细胞核酸的序列的方法。

背景技术

生物功能或者疾病的研究需要数以千计的单细胞的信息的累积和分析。然而，目前大
15 量单细胞的测序成本非常高，尤其是样品的前期处理成本一直无法有效降低。

为了降低样品处理费用，减小样品反应体积成为目前采取的主要方法之一，例如，微流控芯片技术。

Fluidigm 的 C1 平台就是利用微流控芯片和微阀控制自动获取 96 个单细胞，并在芯片上完成细胞裂解，反转录及 PCR 的过程，获得扩增好的 cDNA,其反应体积为百纳升级，大
20 大的降低了试剂消耗成本，但其成本仍要 20 美金/细胞。

因此，单细胞的处理手段仍有待改进。

发明内容

本发明旨在至少解决现有技术中存在的技术问题之一。

25 在本发明的第一方面，本发明提出了一种确定容器中核酸是否来源于单个细胞的方法。根据本发明的实施例，该方法包括：（1）在含有核酸的容器中添加荧光标记，并进行实时荧光定量 PCR，以便获得所述容器的荧光变化数据；以及（2）基于所述容器的荧光变化数据，确定所述容器中所包含的核酸是否来源于单个细胞。由于实时荧光定量 PCR 的结果是与容器中的核酸数目呈正相关的，因此，通过对实时荧光定量 PCR 的结果进行分析，能够
30 有效地确定容器中的核酸是否是来源于单个细胞。由此，根据本发明的实施例，能够实现快速地原位确定容器中的核酸是否来源于单个细胞。进而，可以实现同时分析多个容器中的核酸来源，进一步降低容器中核酸悬浮液的体积，从而可以显著降低单细胞核酸分析的成本。根据本发明的实施例，可以同时分析超过 500 个容器，进而可以同时分析超过 500 个单细胞，并且处理对象的体积只需要 200 纳升，显著地降低了单细胞核酸分析例如单细
35 胞核酸测序的成本，例如可以降低至目前成本的十分之一。

根据本发明的实施例，上述确定容器中核酸是否来源于单个细胞的方法还可以具有下

列附加技术特征：

根据本发明的实施例，所述荧光标记为 SYBR GreenI。由此可以进一步提高实时荧光定量 PCR 的效率，提高确定容器中核酸是否来源于单个细胞的效率，进而提高单细胞核酸分析的效率。

5 根据本发明的实施例，所述核酸为 cDNA。本发明的发明人发现，本发明的确定容器中核酸是否来源于单个细胞的方法能够有效地应用于对 cDNA 的分析。

根据本发明具体的实施例，所述核酸是通过下列步骤获得的：提供细胞悬浮液，所述细胞悬浮液含有 2~5 个细胞/微升；在容器中添加 50 纳升所述细胞悬浮液；在所述容器中添加细胞裂解液，以便裂解所述容器中的细胞，并释放所述细胞中的 mRNA；以及在所述容
10 器中添加反转录试剂，以便对所述 mRNA 进行反转录，获得 cDNA。由此，本发明确定容器中核酸是否来源于单个细胞的方法能够有效地对 mRNA 进行分析，另外，发明人发现，当细胞悬浮液的细胞含量为含有 2~5 个细胞/微升时，50 纳升体积的悬浮液中仅存在一个细胞的概率非常大，可以达到 90%以上，例如当细胞含量不超过 4 个细胞/微升时，该概率超过 98%。由此，可以进一步提高容器中核酸来源于单细胞的概率。

15 根据本发明的实施例，所述容器为多孔板中的至少一个，优选所述多孔板为 5124 孔板。由此，根据本发明的实施例，可以实现同时对多孔板中的多个孔（即将每个孔看作一个容器）进行分析，由此，显著地降低了分析成本，提高了分析通量。

根据本发明的实施例，在步骤（2）中进一步包括：（2-1）基于所述容器的荧光变化数据，建立扩增曲线，并且基于所述扩增曲线，确定所述容器的 Ct 值；以及（2-2）将所述容器的 Ct 值与预定的第一 Ct 阈值进行比较，其中，所述容器的 Ct 值高于所述预定的第一 Ct
20 阈值是所述容器中所包含的核酸来源于单个细胞的指示。由此，可以进一步提高确定容器中核酸是否来源于单个细胞的效率，提高单细胞核酸分析的效率。

根据本发明的实施例，所述预定的第一 Ct 阈值是通过对照容器进行实时荧光定量 PCR 而确定的，其中，所述对照容器含有已知量的核酸，优选地，所述对照容器含有 10pg
25 核酸。由此，可以进一步提高确定容器中核酸是否来源于单个细胞的效率，提高单细胞核酸分析的效率。

根据本发明的实施例，所述预定的第一 Ct 阈值是通过下列步骤确定的：（a）对多个所述对照容器进行实时荧光定量 PCR，以便确定各所述对照容器的 Ct 值；以及（b）确定这样一个数值作为所述预定的第一 Ct 阈值，其中，全部所述多个对照容器的 Ct 值中至少 1.75%
30 小于所述数值。发明人发现，通过这些步骤获得的第一 Ct 阈值能够有效地用于判断是否容器中核酸是否来源于单个细胞的效率，提高单细胞核酸分析的效率。

根据本发明的实施例，所述预定的第一 Ct 阈值是通过下列公式确定的：预定的第一 Ct 阈值=（平均 Ct 值-a）其中，所述平均 Ct 值是所述多个对照容器的 Ct 值中至少一部分的平均值，a 是在 0.1~1 之间的常数，优选 a=0.5。发明人发现，通过这些步骤获得的第一 Ct 阈
35 值能够有效地用于判断是否容器中核酸是否来源于单个细胞的效率，提高单细胞核酸分析的效率。

根据本发明的实施例，在步骤（2-2）中，所述容器的 Ct 值高于所述预定的第一 Ct 阈值但小于预定的第二 Ct 阈值是所述容器中所包含的核酸来源于单个细胞的指示，其中，所述预定的第二 Ct 阈值是通过下列公式确定的：预定的第二 Ct 阈值=预定的第一 Ct 阈值+2a，a 是在 0.1~1 之间的常数，优选 a=0.5。发明人发现，通过这些步骤获得的第二 Ct 阈值结合第一 Ct 阈值能够有效地用于判断是否容器中核酸是否来源于单个细胞的效率，提高单细胞核酸分析的效率。

根据本发明的实施例，所述预定的第一 Ct 阈值为 12.78，所述预定的第二 Ct 阈值为 13.78。发明人发现，利用由该第二 Ct 阈值与第一 Ct 阈值限定出的范围，能够有效地通过判断 Ct 值是否落入该范围内，来判断是否容器中核酸是否来源于单个细胞的效率，提高了单细胞核酸分析的效率。

根据本发明的实施例，进一步包括：（3-1）基于所述容器的荧光变化数据，确定所述容器的荧光变化曲线；（3-2）将所述容器的荧光变化曲线与预定曲线进行比较，以便确定所述实时荧光定量 PCR 是否有效，其中，所述预定曲线是通过含有已知预定量核酸的容器进行实时荧光定量 PCR 而获得的，并且所述容器的荧光变化曲线与所述预定曲线平行表示所述实时荧光定量 PCR 是有效的。根据本发明的实施例，进一步包括：（4-1）基于所述容器的荧光变化数据，确定所述容器的溶解曲线；以及（4-2）基于所述容器的溶解曲线，排除不合格容器，其中，所述不合格容器的溶解曲线中仅有引物二聚体峰，或者存在引物二聚体峰异常。由此，根据本发明的实施例，可以有效地排除容器内存在异常的容器，从而可以有效地改善后续分析核酸的结果。

在本发明的第二方面，本发明提出了一种确定容器中核酸是否来源于单个细胞的装置。根据本发明的实施例，该装置包括：实时荧光定量 PCR 单元，所述实时荧光定量 PCR 单元用于在含有核酸的容器中添加荧光标记后，进行实时荧光定量 PCR，以便获得所述容器的荧光变化数据；以及判断单元，所述判断单元与所述实时荧光定量 PCR 单元相连，用于基于所述容器的荧光变化数据，确定所述容器中所包含的核酸是否来源于单个细胞。利用该装置，能够有效地分析容器中核酸是否来源于单个细胞。由于实时荧光定量 PCR 的结果是与容器中的核酸数目呈正相关的，因此，通过对实时荧光定量 PCR 的结果进行分析，能够有效地确定容器中的核酸是否是来源于单个细胞。由此，根据本发明的实施例，能够实现快速地原位确定容器中的核酸是否来源于单个细胞。进而，可以实现同时分析多个容器中的核酸来源，进一步降低容器中核酸悬浮液的体积，从而可以显著降低单细胞核酸分析的成本。根据本发明的实施例，可以同时分析超过 500 个容器，进而可以同时分析超过 500 个单细胞，并且处理对象的体积只需要 200 纳升，显著地降低了单细胞核酸分析例如单细胞核酸测序的成本，例如可以降低至目前成本的十分之一。

根据本发明的实施例，确定容器中核酸是否来源于单个细胞的装置还可以具有下列附加技术特征：

根据本发明的实施例，所述荧光标记为 SYBR GreenI。由此可以进一步提高实时荧光定量 PCR 的效率，提高确定容器中核酸是否来源于单个细胞的效率，提高单细胞核酸分析的

效率。

根据本发明的实施例，所述核酸为 cDNA。本发明的发明人发现，本发明的确定容器中核酸是否来源于单个细胞的方法能够有效地应用于对 cDNA 的分析。

5 根据本发明的实施例，进一步包括核酸制备单元，所述核酸制备单元与所述实时荧光定量 PCR 单元相连，用于通过下列步骤制备获得所述核酸：提供细胞悬浮液，所述细胞悬浮液含有 2~5 个细胞/微升；在容器中添加 50 纳升所述细胞悬浮液；在所述容器中添加细胞裂解液，以便裂解所述容器中的细胞，并释放所述细胞中的 mRNA；以及在所述容器中添加反转录试剂，以便对所述 mRNA 进行反转录，获得 cDNA。由此，本发明确定容器中核酸是否来源于单个细胞的方法能够有效地对 mRNA 进行分析，另外，发明人发现，当细胞
10 悬浮液的细胞含量为含有 2~5 个细胞/微升时，50 纳升体积的悬浮液中仅存在一个细胞的概率非常大，可以达到 90% 以上，例如当细胞含量不超过 4 个细胞/微升时，超过 98%。由此，可以进一步提高容器中核酸来源于单细胞的概率。

根据本发明的实施例，所述容器为多孔板中的至少一个，优选所述多孔板为 5124 孔板。由此，根据本发明的实施例，可以实现同时对多孔板中的多个容器进行分析，由此，显著
15 地降低了分析成本，提高了分析通量。

根据本发明的实施例，所述判断单元进一步包括：Ct 值确定模块，所述 Ct 值确定模块用于基于所述容器的荧光变化数据，建立扩增曲线，并且基于所述扩增曲线，确定所述容器的 Ct 值；以及第一判断模块，所述第一判断模块中设置有预定的第一 Ct 阈值，所述第一判断模块与所述 Ct 值确定模块相连，用于将所述容器的 Ct 值与预定的第一 Ct 阈值进行比较，其中，所述容器的 Ct 值高于所述预定的第一 Ct 阈值是所述容器中所包含的核酸来源于
20 单个细胞的指示。由此，可以进一步提高确定容器中核酸是否来源于单个细胞的效率，提高单细胞核酸分析的效率。

根据本发明的实施例，所述预定的第一 Ct 阈值是通过对照容器进行实时荧光定量 PCR 而确定的，其中，所述对照容器含有已知量的核酸，优选地，所述对照容器含有 10pg
25 核酸。由此，可以进一步提高确定容器中核酸是否来源于单个细胞的效率，提高单细胞核酸分析的效率。

根据本发明的实施例，所述预定的第一 Ct 阈值是通过下列步骤确定的：(a) 对多个所述对照容器进行实时荧光定量 PCR，以便确定各所述对照容器的 Ct 值；以及 (b) 确定这样一个数值作为所述预定的第一 Ct 阈值，其中，全部所述多个对照容器的 Ct 值中至少 1.75%
30 小于所述数值。发明人发现，通过这些步骤获得的第一 Ct 阈值能够有效地用于判断是否容器中核酸是否来源于单个细胞的效率，提高单细胞核酸分析的效率。

根据本发明的实施例，所述预定的第一 Ct 阈值是通过下列公式确定的：预定的第一 Ct 阈值 = (平均 Ct 值 - a) 其中，所述平均 Ct 值是所述多个对照容器的 Ct 值中至少一部分的平均值，a 是在 0.1~1 之间的常数，优选 a=0.5。发明人发现，通过这些步骤获得的第一 Ct 阈
35 值能够有效地用于判断是否容器中核酸是否来源于单个细胞的效率，提高单细胞核酸分析的效率。

根据本发明的实施例,所述容器的 Ct 值高于所述预定的第一 Ct 阈值但小于预定的第二 Ct 阈值是所述容器中所包含的核酸来源于单个细胞的指示,其中,所述预定的第二 Ct 阈值是通过下列公式确定的: 预定的第二 Ct 阈值=预定的第一 Ct 阈值+2a, a 是在 0.1~1 之间的常数,优选 a=0.5。发明人发现,通过这些步骤获得的第二 Ct 阈值结合第一 Ct 阈值能够有效地用于判断是否容器中核酸是否来源于单个细胞的效率,提高单细胞核酸分析的效率。

根据本发明的实施例,所述预定的第一 Ct 阈值为 12.78,所述预定的第二 Ct 阈值为 13.78。发明人发现,利用由该第二 Ct 阈值与第一 Ct 阈值限定出的范围,能够有效地通过判断 Ct 值是否落入该范围内,来判断是否容器中核酸是否来源于单个细胞的效率,提高了单细胞核酸分析的效率。

根据本发明的实施例,所述判断单元进一步包括: 荧光变化曲线确定模块,所述荧光变化曲线确定模块用于基于所述容器的荧光变化数据,确定所述容器的荧光变化曲线; 以及第二判断模块,所述第二判断模块中设置有预定曲线,所述第二判断模块与所述荧光变化曲线确定模块相连,用于将所述容器的荧光变化曲线与预定曲线进行比较,以便确定所述实时荧光定量 PCR 是否有效,其中,所述预定曲线是通过含有已知预定量核酸的容器进行实时荧光定量 PCR 而获得的,并且所述容器的荧光变化曲线与所述预定曲线平行表示所述实时荧光定量 PCR 是有效的。根据本发明的实施例,所述判断单元进一步包括: 熔解曲线确定模块,所述熔解曲线确定模块用于基于所述容器的荧光变化数据,确定所述容器的熔解曲线; 以及去杂模块,所述去杂模块与所述熔解曲线确定模块相连,用于基于所述容器的熔解曲线,排除不合格容器,其中,所述不合格容器的熔解曲线中仅有引物二聚体峰,或者存在引物二聚体峰异常。

在本发明的第三方面,本发明提出了一种获取单细胞核酸的方法。根据本发明的实施例,包括: 提供细胞悬浮液,所述细胞悬浮液含有 2~5 个细胞/微升; 在容器中添加 50 纳升所述细胞悬浮液; 在所述容器中添加细胞裂解液,以便裂解所述容器中的细胞,并释放所述细胞中的 mRNA; 在所述容器中添加反转录试剂,以便对所述 mRNA 进行反转录,获得 cDNA; 以及根据前面所述的方法,确定所述容器中所包含的 cDNA 是否来源于单个细胞。正如前面所述,由于实时荧光定量 PCR 的结果是与容器中的核酸数目呈正相关的,因此,通过对实时荧光定量 PCR 的结果进行分析,能够有效地确定容器中的核酸是否是来源于单个细胞。由此,根据本发明的实施例,能够实现快速地原位确定容器中的核酸是否来源于单个细胞。进而,可以实现同时分析多个容器中的核酸来源,进一步降低容器中核酸悬浮液的体积,从而可以显著降低单细胞核酸分析的成本。根据本发明的实施例,可以同时分析超过 500 个容器,进而可以同时分析超过 500 个单细胞,并且处理对象的体积只需要 200 纳升,显著地降低了单细胞核酸分析例如单细胞核酸测序的成本,例如可以降低至目前成本的十分之一。

根据本发明的实施例,在确定所述容器中所包含的 cDNA 是否来源于单个细胞之后,进一步包括,利用毛细管获取实时荧光定量 PCR 产物。

在本发明的第四方面,本发明提出了一种构建单细胞核酸测序文库的方法。根据本发

明的实施例，该方法包括：根据前面所述的方法获取单细胞核酸；以及针对所述单细胞核酸，构建核酸测序文库。正如前面所述，由于实时荧光定量 PCR 的结果是与容器中的核酸数目呈正相关的，因此，通过对实时荧光定量 PCR 的结果进行分析，能够有效地确定容器中的核酸是否是来源于单个细胞。由此，根据本发明的实施例，能够实现快速地原位确定容器中的核酸是否来源于单个细胞。进而，可以实现同时分析多个容器中的核酸来源，进一步降低容器中核酸悬浮液的体积，从而可以显著降低单细胞核酸分析的成本。根据本发明的实施例，可以同时分析超过 500 个容器，进而可以同时分析超过 500 个单细胞，并且处理对象的体积只需要 200 纳升，显著地降低了单细胞核酸分析例如单细胞核酸测序的成本，例如可以降低至目前成本的十分之一。

根据本发明的实施例，可以基于选自 HISEQ2000、SOLiD、454 和单分子测序平台的至少一种构建所述核酸测序文库。

在本发明的第五方面，本发明提出了一种构建单细胞核酸测序文库的系统。根据本发明的实施例，该系统包括：前面所述的确定容器中核酸是否来源于单个细胞的装置；以及文库构建装置，所述文库构建装置用于针对所述单细胞核酸，构建核酸测序文库。

在本发明的第六方面，本发明提出了一种确定单细胞核酸的序列的方法。根据本发明的实施例，该方法包括：根据前面所述的方法，构建单细胞核酸测序文库；以及对所述单细胞核酸测序文库进行测序，以便获得测序结果，确定所述单细胞核酸的序列。正如前面所述，由于实时荧光定量 PCR 的结果是与容器中的核酸数目呈正相关的，因此，通过对实时荧光定量 PCR 的结果进行分析，能够有效地确定容器中的核酸是否是来源于单个细胞。由此，根据本发明的实施例，能够实现快速地原位确定容器中的核酸是否来源于单个细胞。进而，可以实现同时分析多个容器中的核酸来源，进一步降低容器中核酸悬浮液的体积，从而可以显著降低单细胞核酸分析的成本。根据本发明的实施例，可以同时分析超过 500 个容器，进而可以同时分析超过 500 个单细胞，并且处理对象的体积只需要 200 纳升，显著地降低了单细胞核酸分析例如单细胞核酸测序的成本，例如可以降低至目前成本的十分之一。

根据本发明的实施例，该方法可以利用选自 HISEQ2000、SOLiD、454 和单分子测序平台的至少一种进行所述测序。

本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出，部分将从下面的描述中变得明显，或通过本发明的实践了解到。

附图说明

本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解，其中：

图 1 显示了根据本发明一个实施例的确定容器中核酸是否来源于单个细胞的方法的流程图示意图。

图 2 显示了根据本发明一个实施例的确定容器中核酸是否来源于单个细胞的方法的流

程示意图。

图 3 显示了根据本发明一个实施例的确定容器中核酸是否来源于单个细胞的装置的结构程示意图。

图 4 显示了根据本发明一个实施例的构建单细胞核酸文库的系统的结构程示意图。

5 图 5 显示了根据本发明一个实施例，不同起始量下的荧光曲线、熔解曲线图。

图 6 显示了根据本发明一个实施例，样品孔产物的 Agilent 2100 检测结果。

图 7 和图 8 显示了根据本发明一个实施例，文库测序数据质量检测结果图。

图 9 显示了根据本发明一个实施例，文库测序数据的基因覆盖情况与常规流程的检测
结果比较图。

10 图 10 显示了根据本发明一个实施例，文库测序数据的基因组不同碱基位置上的覆盖情况
况分析图。

发明详细描述

下面详细描述本发明的实施例，所述实施例的示例在附图中示出，其中自始至终相同
15 或类似的标号表示相同或类似的元件或具有相同或类似功能的元件。下面通过参考附图描
述的实施例是示例性的，仅用于解释本发明，而不能理解为对本发明的限制。

需要说明的是，术语“第一”、“第二”仅用于描述目的，而不能理解为指示或暗示相
对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此，限定有“第一”、“第二”的特征
可以明示或者隐含地包括一个或者更多个该特征。进一步地，在本发明的描述中，除非另
20 有说明，“多个”的含义是两个或两个以上。

确定容器中核酸是否来源于单个细胞的方法

在本发明的第一方面，本发明提出了一种确定容器中核酸是否来源于单个细胞的方法。
参考图 1，根据本发明的实施例，该方法包括：

S100：实时荧光定量 PCR

25 在该步骤中，在含有核酸的容器中添加荧光标记，并进行实时荧光定量 PCR，以便获
得所述容器的荧光变化数据。

S200：确定核酸是否来源于单细胞

基于所述容器的荧光变化数据，确定所述容器中所包含的核酸是否来源于单个细胞。
由于实时荧光定量 PCR 的结果是与容器中的核酸数目呈正相关的，因此，通过对实时荧光
30 定量 PCR 的结果进行分析，能够有效地确定容器中的核酸是否是来源于单个细胞。由此，
根据本发明的实施例，能够实现快速地原位确定容器中的核酸是否来源于单个细胞。进而，
可以实现同时分析多个容器中的核酸来源，进一步降低容器中核酸悬浮液的体积，从而可
以显著降低单细胞核酸分析的成本。根据本发明的实施例，可以同时分析超过 500 个容器，
进而可以同时分析超过 500 个单细胞，并且处理对象的体积只需要 200 纳升，显著地降低
35 了单细胞核酸分析例如单细胞核酸测序的成本，例如可以降低至目前成本的十分之一。

根据本发明的实施例，可以应用于本发明的荧光标记的类型并不受特别限制，只要能

够与核酸发生非特异性结合，并且能够有效地实施实时荧光定量 PCR 即可。根据本发明的实施例，在本发明中所采用的荧光标记为 SYBR GreenI。发明人发现，利用该荧光标记能够有效地针对微量的核酸，例如来自于单细胞的核酸进行实时荧光定量 PCR。由此可以进一步提高实时荧光定量 PCR 的效率，提高确定容器中核酸是否来源于单个细胞的效率，提高单细胞核酸分析的效率。

根据本发明的实施例，在本发明中，可以应用根据本发明实施例的方法来进行核酸来源判断的核酸类型并不受特别限制。即可以是 DNA 也可以是 RNA，只要能够有效地进行实时荧光定量 PCR 即可。根据本发明的实施例，所述核酸为 cDNA。本发明的发明人发现，本发明的确定容器中核酸是否来源于单个细胞的方法能够有效地应用于对 cDNA 的分析。

并且由于 cDNA 通常具有相同的核酸序列，例如 polyT 序列，因此能够非常方便地实施荧光定量 PCR，从而提高确定核酸是否来源于单个细胞的方法。

参考图 2，根据本发明具体的实施例，核酸是通过下列步骤获得的：

S110：提供并分配细胞悬浮液

在该步骤中，首先准备细胞悬浮液，并且该细胞悬浮液含有 2~5 个细胞/微升，之后，将所准备的细胞悬浮液添加至有待进行分析的容器中，根据本发明的具体实例，在容器中添加 50 纳升细胞悬浮液。

本发明的发明人惊奇地发现，当细胞在液体中均匀分布，将其分成微小体积，则每份微小体积中含有的细胞的个数符合泊松分布。泊松分布的概率质量函数为： $P(X=k) = e^{-\lambda} \lambda^k / k!$ ，其中 k 代表细胞个数， λ 代表每份小体积包含的细胞数目的期望， P 为微小体积中包含的细胞个数为 k 时的概率。根据本发明的实施例，当所分配的细胞悬浮液为 50nL 时，如果细胞密度为 1~5 个细胞/微升，优选 2~4 个细胞/微升时，98% 以上的微孔中细胞数是不多于 1 个。需要说明的是，当细胞密度为 4 个/微升时，由于在细胞进行分离时，每孔的细胞悬浮液的体积是 50nL，所以平均每个孔含有细胞的个数为 $4 / (1000nL / 50nL) = 4 / 20 = 0.2$ 个，即 $\lambda = 0.2$ 。细胞数是不多于 1 个，表示细胞数为 0 和 1 时的概率和。进而，该概率 $= P(0) + P(1) = e^{-0.2} (0.2)^0 / 0! + e^{-0.2} (0.2)^1 / 1! = e^{-0.2} + e^{-0.2} (0.2) = 0.81873075307798 * 1.2 = 0.982476903693576 > 98\%$ 。

另外，根据本发明的实施例，配置细胞悬浮液优选采用将 Percoll 原液与 10X PBS 按照体积比 9:1 的比例所得到的等渗溶液进行配置细胞悬浮液。这是因为，Percoll 原液是低渗溶液，如果直接用于悬浮细胞会导致细胞直接破裂，因此需要与 10X PBS 按照体积比 9:1 的比例所得到的等渗溶液，才可用于悬浮细胞。并且，发明人惊奇地发现该等渗溶液的比重适当，能够保证进行分散时细胞是均匀分布的。

根据本发明的实施例，利用等渗溶液配置细胞含量为 1~5 个细胞/微升的细胞悬浮液的方法并不受特别限制。根据本发明的具体实施例，可以采用梯度稀释的方法。

根据本发明的具体实施例，可以采用下列步骤进行：

步骤 1：根据样品的差异，分别用胰酶对贴壁型细胞，胶原酶对组织进行细胞消化，将已消化的细胞取 1mL，并用 1.5mL EP 管装好。

步骤 2: 将前面所得到的细胞在 1000 rpm 条件下离心 5min, 并用 1×PBS 重悬浮, 重复一次。

步骤 3: 用 40/70 μm 的细胞滤网对步骤 2 细胞溶液进行过滤以去除细胞团。

步骤 4: 将 Percoll 原液 (PHARMACIA, 货号 17-0891-01) 与 10×PBS 按体积比 9:1 混合成细胞的等渗溶液。吸取一定量的等渗溶液与步骤 3 所得到的经过过滤的细胞溶液按体积比 1:4 混合成新的细胞悬浮液。

步骤 5: 按照梯度稀释 (例如 1: 2 或者 1: 10) 将步骤 4 中新配置的细胞悬浮液的细胞密度调节至 1~5 个细胞/微升, 优选 2~4 个细胞/微升。

确定细胞密度的方法是本领域技术人员公知的, 例如可以采用显微镜对 5~10 微升细胞悬浮液进行 3 次计数来确定细胞密度。

根据本发明的实施例, 进行悬浮液分配的方式并不受特别限制。根据本发明的实施例, 可以采用商用的微量分液平台 (SmartChip™ MultiSample NanoDispenser(MSND), Wafergen Biosystems) 进行加样, 以微孔芯片 (Smartchip 200nL, Wafergen) 为容器, 荧光定量 PCR 仪 (SmartChip™ Real-Time PCR Cycler, Wafergen Biosystems) 辅助监测, 选用合适的细胞密度, 配合优化的反应体积, 可一次完成 >500 个单细胞的处理。

根据本发明的实施例, 容器为多孔板中的至少一个, 所述多孔板为 5124 孔板。由此, 根据本发明的实施例, 可以实现同时对多孔板中的多个容器进行分析, 由于本发明的方法所处理的细胞样品的体积可以非常小, 因此, 可以采用 5124 孔板进行高通量处理。由此, 显著地降低了分析成本, 提高了分析通量。

20 S120: 裂解细胞

在将细胞悬浮液分配至相应的容器中后, 在容器中添加细胞裂解液, 以便裂解容器中的细胞, 并释放细胞中的 mRNA。

根据本发明的实施例, 可以采用的细胞裂解液并不受特别限制, 只要能够裂解细胞同时释放 mRNA 即可。根据本发明的具体实例, 以 4μL 裂解液为例, 可以采用的裂解液的组成如下表所示:

成分	体积
10% Triton X-100	0.04μl
40U/ul RNA 酶抑制剂 (RNase Inhibitor)	0.1μl
无 核 酸 酶 水 (NF-Water)	1.86μl
10uM Oligo-dT Primer	1μL
10mM dNTP	1μl

S130: 反转录

在完成对细胞裂解，并将细胞内所含有的 mRNA 释放之后，可以向容器中添加反转录试剂，以便对所述 mRNA 进行反转录，获得 cDNA。

根据本发明的实施例，通过上述操作，可以原位直接进行反转录。根据本发明的实施例，进行反转录的条件为：42℃ 90min, (50℃ 2min, 42℃ 2min) 10 个循环，70℃ 15 min, 4℃ 保存。由此，本发明确定容器中核酸是否来源于单个细胞的方法能够有效地对 mRNA 进行分析。

根据本发明的实施例，可以用于判断核酸是否来源于单个细胞的实时荧光定量 PCR 的结果并不受特别限制，只要能够反应荧光的变化即可。根据本发明的实施例，步骤 S200 包括：

首先，基于容器的荧光变化数据，建立扩增曲线，并且基于扩增曲线，确定容器的 Ct 值；

接下来，将所述容器的 Ct 值与预定的第一 Ct 阈值进行比较，其中，所述容器的 Ct 值高于所述预定的第一 Ct 阈值是所述容器中所包含的核酸来源于单个细胞的指示。由此，可以进一步提高确定容器中核酸是否来源于单个细胞的效率，提高单细胞核酸分析的效率。

根据本发明的实施例，所述预定的第一 Ct 阈值是通过对照容器进行实时荧光定量 PCR 而确定的，其中，所述对照容器含有已知量的核酸，优选地，所述对照容器含有 10pg 核酸。由此，可以进一步提高确定容器中核酸是否来源于单个细胞的效率，提高单细胞核酸分析的效率。

根据本发明的实施例，所述预定的第一 Ct 阈值是通过下列步骤确定的：(a) 对多个所述对照容器进行实时荧光定量 PCR，以便确定各所述对照容器的 Ct 值；以及 (b) 确定这样一个数值作为所述预定的第一 Ct 阈值，其中，全部所述多个对照容器的 Ct 值中至少 1.75% 小于所述数值。发明人发现，通过这些步骤获得的第一 Ct 阈值能够有效地用于判断是否容器中核酸是否来源于单个细胞的效率，提高单细胞核酸分析的效率。

根据本发明的实施例，所述预定的第一 Ct 阈值是通过下列公式确定的：预定的第一 Ct 阈值 = (平均 Ct 值 - a) 其中，所述平均 Ct 值是所述多个对照容器的 Ct 值中至少一部分的平均值，a 是在 0.1~1 之间的常数，优选 a=0.5。发明人发现，通过这些步骤获得的第一 Ct 阈值能够有效地用于判断是否容器中核酸是否来源于单个细胞的效率，提高单细胞核酸分析的效率。

根据本发明的实施例，所述容器的 Ct 值高于所述预定的第一 Ct 阈值但小于预定的第二 Ct 阈值是所述容器中所包含的核酸来源于单个细胞的指示，其中，所述预定的第二 Ct 阈值是通过下列公式确定的：预定的第二 Ct 阈值 = 预定的第一 Ct 阈值 + 2a，a 是在 0.1~1 之间的常数，优选 a=0.5。发明人发现，通过这些步骤获得的第二 Ct 阈值结合第一 Ct 阈值能够有效地用于判断是否容器中核酸是否来源于单个细胞的效率，提高单细胞核酸分析的效率。

根据本发明的实施例，所述预定的第一 Ct 阈值为 12.78，所述预定的第二 Ct 阈值为 13.78。发明人发现，利用由该第二 Ct 阈值与第一 Ct 阈值限定出的范围，能够有效地通过判断 Ct 值是否落入该范围内，来判断是否容器中核酸是否来源于单个细胞的效率，提高了

单细胞核酸分析的效率。

根据本发明的实施例，还可以通过荧光变化数据来排除异常的容器，例如实时荧光定量 PCR 不合格的容器等。具体地，根据本发明的实施例，可以进一步包括：

首先，基于所述容器的荧光变化数据，确定所述容器的荧光变化曲线。

- 5 接下来，将所述容器的荧光变化曲线与预定曲线进行比较，以便确定所述实时荧光定量 PCR 是否有效，其中，所述预定曲线是通过含有已知预定量核酸的容器进行实时荧光定量 PCR 而获得的，并且所述容器的荧光变化曲线与所述预定曲线平行表示所述实时荧光定量 PCR 是有效的。

根据本发明的另一些实施例，还可以进一步包括：

- 10 首先，基于所述容器的荧光变化数据，确定所述容器的熔解曲线；以及

接下来，基于所述容器的熔解曲线，排除不合格容器，其中，所述不合格容器的熔解曲线中仅有引物二聚体峰，或者存在引物二聚体峰异常。由此，根据本发明的实施例，可以有效地排除容器内存在异常的容器，从而可以有效地改善后续分析核酸的结果。

- 15 需要说明的是，这里所使用的表达方式“引物二聚体峰异常”是指明显引物二聚体的量超出应有的比例。

确定容器中核酸是否来源于单个细胞的装置

- 在本发明的第二方面，本发明提出了一种确定容器中核酸是否来源于单个细胞的装置。利用该装置，能够有效地分析容器中核酸是否来源于单个细胞。由于实时荧光定量 PCR 的结果是与容器中的核酸数目呈正相关的，因此，通过对实时荧光定量 PCR 的结果进行分析，
- 20 能够有效地确定容器中的核酸是否是来源于单个细胞。由此，根据本发明的实施例，能够实现快速地原位确定容器中的核酸是否来源于单个细胞。进而，可以实现同时分析多个容器中的核酸来源，进一步降低容器中核酸悬浮液的体积，从而可以显著降低单细胞核酸分析的成本。根据本发明的实施例，可以同时分析超过 500 个容器，进而可以同时分析超过
- 25 500 个单细胞，并且处理对象的体积只需要 200 纳升，显著地降低了单细胞核酸分析例如单细胞核酸测序的成本，例如可以降低至目前成本的十分之一。

根据本发明的实施例，参照图 3，该装置 1000 包括：实时荧光定量 PCR 单元 100 和判断单元 200。具体地：

- 实时荧光定量 PCR 单元 100，用于在含有核酸的容器中添加荧光标记后，进行实时荧光
- 30 光定量 PCR，以便获得所述容器的荧光变化数据。根据本发明的实施例，所述荧光标记为 SYBR GreenI。由此可以进一步提高实时荧光定量 PCR 的效率，提高确定容器中核酸是否来源于单个细胞的效率，提高单细胞核酸分析的效率。根据本发明的实施例，所述核酸为 cDNA。本发明的发明人发现，本发明的确定容器中核酸是否来源于单个细胞的方法能够有效地应用于对 cDNA 的分析。

- 35 判断单元 200，与所述实时荧光定量 PCR 单元 100 相连，用于基于所述容器的荧光变化数据，确定所述容器中所包含的核酸是否来源于单个细胞。

需要说明的是，判断单元 200 的具体选择不受特别限制，可以设计计算机处理模块，与实时荧光定量 PCR 单元 100 相连，以便从实时荧光定量 PCR 单元 100 中接收所述容器的荧光变化数据，并基于计算机处理模块的功能，对所述容器的荧光变化数据进行处理，并作出判断，以便确定所述容器中所包含的核酸是否来源于单个细胞。本领域技术人员可以理解的是，上述的计算机处理模块也可以设置于实时荧光定量 PCR 单元 100 内，或者当采用实时荧光定量 PCR 仪作为实时荧光定量 PCR 单元 100 时，该实时荧光定量 PCR 仪所包含的计算装置，就可以直接或经人工改造后作为判断单元 200。当然，判断单元 200 也可以是人工，即不借助机器、装置，而直接由方法实施者作为判断主体，充当判断单元，基于实时荧光定量 PCR 单元 100 中所述容器的荧光变化数据，人工判断确定所述容器中所包含的核酸是否来源于单个细胞。

根据本发明的实施例，进一步包括核酸制备单元（图中未示出），所述核酸制备单元与所述实时荧光定量 PCR 单元 100 相连，用于通过下列步骤制备获得所述核酸：提供细胞悬浮液，所述细胞悬浮液含有 2~5 个细胞/微升；在容器中添加 50 纳升所述细胞悬浮液；在所述容器中添加细胞裂解液，以便裂解所述容器中的细胞，并释放所述细胞中的 mRNA；以及在所述容器中添加反转录试剂，以便对所述 mRNA 进行反转录，获得 cDNA。由此，本发明确定容器中核酸是否来源于单个细胞的方法能够有效地对 mRNA 进行分析，另外，发明人发现，当细胞悬浮液的细胞含量为含有 2~5 个细胞/微升时，50 纳升体积的悬浮液中仅存在一个细胞的概率非常大，可以达到 90% 以上，例如当细胞含量不超过 4 个细胞/微升时，超过 98%。由此，可以进一步提高容器中核酸来源于单细胞的概率。

根据本发明的实施例，所述容器为多孔板中的至少一个，优选所述多孔板为 5124 孔板。由此，根据本发明的实施例，可以实现同时对多孔板中的多个容器进行分析，由此，显著地降低了分析成本，提高了分析通量。

根据本发明的实施例，所述判断单元 200 进一步包括：Ct 值确定模块（图中未示出），所述 Ct 值确定模块用于基于所述容器的荧光变化数据，建立扩增曲线，并且基于所述扩增曲线，确定所述容器的 Ct 值；以及第一判断模块（图中未示出），所述第一判断模块中设置有预定的第一 Ct 阈值，所述第一判断模块与所述 Ct 值确定模块相连，用于将所述容器的 Ct 值与预定的第一 Ct 阈值进行比较，其中，所述容器的 Ct 值高于所述预定的第一 Ct 阈值是所述容器中所包含的核酸来源于单个细胞的指示。由此，可以进一步提高确定容器中核酸是否来源于单个细胞的效率，提高单细胞核酸分析的效率。

根据本发明的实施例，所述预定的第一 Ct 阈值是通过对照容器进行实时荧光定量 PCR 而确定的，其中，所述对照容器含有已知量的核酸，优选地，所述对照容器含有 10pg 核酸。由此，可以进一步提高确定容器中核酸是否来源于单个细胞的效率，提高单细胞核酸分析的效率。

根据本发明的实施例，所述预定的第一 Ct 阈值是通过下列步骤确定的：（a）对多个所述对照容器进行实时荧光定量 PCR，以便确定各所述对照容器的 Ct 值；以及（b）确定这样一个数值作为所述预定的第一 Ct 阈值，其中，全部所述多个对照容器的 Ct 值中至少 1.75%

小于所述数值。发明人发现，通过这些步骤获得的第一 Ct 阈值能够有效地用于判断是否容器中核酸是否来源于单个细胞的效率，提高单细胞核酸分析的效率。

根据本发明的实施例，所述预定的第一 Ct 阈值是通过下列公式确定的：预定的第一 Ct 阈值=（平均 Ct 值-a）其中，所述平均 Ct 值是所述多个对照容器的 Ct 值中至少一部分的平均值，a 是在 0.1~1 之间的常数，优选 a=0.5。发明人发现，通过这些步骤获得的第一 Ct 阈值能够有效地用于判断是否容器中核酸是否来源于单个细胞的效率，提高单细胞核酸分析的效率。

根据本发明的实施例，所述容器的 Ct 值高于所述预定的第一 Ct 阈值但小于预定的第二 Ct 阈值是所述容器中所包含的核酸来源于单个细胞的指示，其中，所述预定的第二 Ct 阈值是通过下列公式确定的：预定的第二 Ct 阈值=预定的第一 Ct 阈值+2a，a 是在 0.1~1 之间的常数，优选 a=0.5。发明人发现，通过这些步骤获得的第二 Ct 阈值结合第一 Ct 阈值能够有效地用于判断是否容器中核酸是否来源于单个细胞的效率，提高单细胞核酸分析的效率。

根据本发明的实施例，所述预定的第一 Ct 阈值为 12.78，所述预定的第二 Ct 阈值为 13.78。发明人发现，利用由该第二 Ct 阈值与第一 Ct 阈值限定出的范围，能够有效地通过判断 Ct 值是否落入该范围内，来判断是否容器中核酸是否来源于单个细胞的效率，提高了单细胞核酸分析的效率。

根据本发明的实施例，所述判断单元 200 进一步包括：荧光变化曲线确定模块（图中未示出），所述荧光变化曲线确定模块用于基于所述容器的荧光变化数据，确定所述容器的荧光变化曲线；以及第二判断模块（图中未示出），所述第二判断模块中设置有预定曲线，所述第二判断模块与所述荧光变化曲线确定模块相连，用于将所述容器的荧光变化曲线与预定曲线进行比较，以便确定所述实时荧光定量 PCR 是否有效，其中，所述预定曲线是通过含有已知预定量核酸的容器进行实时荧光定量 PCR 而获得的，并且所述容器的荧光变化曲线与所述预定曲线平行表示所述实时荧光定量 PCR 是有效的。根据本发明的实施例，所述判断单元进一步包括：熔解曲线确定模块，所述熔解曲线确定模块用于基于所述容器的荧光变化数据，确定所述容器的熔解曲线；以及去杂模块，所述去杂模块与所述熔解曲线确定模块相连，用于基于所述容器的熔解曲线，排除不合格容器，其中，所述不合格容器的熔解曲线中仅有引物二聚体峰，或者存在引物二聚体峰异常。

用途

在本发明的第三方面，本发明提出了一种获取单细胞核酸的方法。根据本发明的实施例，包括：提供细胞悬浮液，所述细胞悬浮液含有 2~5 个细胞/微升；在容器中添加 50 纳升所述细胞悬浮液；在所述容器中添加细胞裂解液，以便裂解所述容器中的细胞，并释放所述细胞中的 mRNA；在所述容器中添加反转录试剂，以便对所述 mRNA 进行反转录，获得 cDNA；以及根据前面所述的方法，确定所述容器中所包含的 cDNA 是否来源于单个细胞。正如前面所述，由于实时荧光定量 PCR 的结果是与容器中的核酸数目呈正相关的，因此，通过对实时荧光定量 PCR 的结果进行分析，能够有效地确定容器中的核酸是否是来源于单

个细胞。由此，根据本发明的实施例，能够实现快速地原位确定容器中的核酸是否来源于单个细胞。进而，可以实现同时分析多个容器中的核酸来源，进一步降低容器中核酸悬浮液的体积，从而可以显著降低单细胞核酸分析的成本。根据本发明的实施例，可以同时分析超过 500 个容器，进而可以同时分析超过 500 个单细胞，并且处理对象的体积只需要 200 纳升，显著地降低了单细胞核酸分析例如单细胞核酸测序的成本，例如可以降低至目前成本的十分之一。

根据本发明的实施例，在确定所述容器中所包含的 cDNA 是否来源于单个细胞之后，进一步包括，利用毛细管获取实时荧光定量 PCR 产物。

在本发明的第四方面，本发明提出了一种构建单细胞核酸测序文库的方法。根据本发明的实施例，该方法包括：根据前面所述的方法获取单细胞核酸；以及针对所述单细胞核酸，构建核酸测序文库。正如前面所述，由于实时荧光定量 PCR 的结果是与容器中的核酸数目呈正相关的，因此，通过对实时荧光定量 PCR 的结果进行分析，能够有效地确定容器中的核酸是否是来源于单个细胞。由此，根据本发明的实施例，能够实现快速地原位确定容器中的核酸是否来源于单个细胞。进而，可以实现同时分析多个容器中的核酸来源，进一步降低容器中核酸悬浮液的体积，从而可以显著降低单细胞核酸分析的成本。根据本发明的实施例，可以同时分析超过 500 个容器，进而可以同时分析超过 500 个单细胞，并且处理对象的体积只需要 200 纳升，显著地降低了单细胞核酸分析例如单细胞核酸测序的成本，例如可以降低至目前成本的十分之一。

根据本发明的实施例，核酸文库的构建方法不受特别限制，可以根据后续测序要采用的测序平台选择相应的测序文库构建策略。根据本发明的实施例，可以基于选自 HISEQ2000、SOLiD、454 和单分子测序平台的至少一种构建所述核酸测序文库。具体地，例如，当目的核酸测序文库要用于 HISEQ2000 测序平台时，则可以根据 HISEQ2000 测序仪的文库构建操作规程构建所述核酸测序文库。

在本发明的第五方面，本发明提出了一种构建单细胞核酸测序文库的系统。根据本发明的实施例，该系统 10000 包括：前面所述的确定容器中核酸是否来源于单个细胞的装置 1000；以及文库构建装置 2000，所述文库构建装置用于针对所述单细胞核酸，构建核酸测序文库。

根据本发明的实施例，文库构建装置 2000 的种类不受特别显著，可以根据后续要采用的测序平台作出相应选择。根据本发明的具体示例，文库构建装置 2000 与选自 HISEQ2000、SOLiD、454 和单分子测序平台的至少一种相适应，即能够构建适于选自 HISEQ2000、SOLiD、454 和单分子测序平台的至少一种的核酸测序文库。具体地，例如，当目的核酸测序文库要用于 HISEQ2000 测序平台时，文库构建装置 2000 适于按照 HISEQ2000 测序仪的文库构建操作规程构建所述核酸测序文库。

在本发明的第六方面，本发明提出了一种确定单细胞核酸的序列的方法。根据本发明的实施例，该方法包括：根据前面所述的方法，构建单细胞核酸测序文库；以及对所述单细胞核酸测序文库进行测序，以便获得测序结果，确定所述单细胞核酸的序列。正如前面

所述，由于实时荧光定量 PCR 的结果是与容器中的核酸数目呈正相关的，因此，通过对实时荧光定量 PCR 的结果进行分析，能够有效地确定容器中的核酸是否是来源于单个细胞。由此，根据本发明的实施例，能够实现快速地原位确定容器中的核酸是否来源于单个细胞。进而，可以实现同时分析多个容器中的核酸来源，进一步降低容器中核酸悬浮液的体积，从而可以显著降低单细胞核酸分析的成本。根据本发明的实施例，可以同时分析超过 500 个容器，进而可以同时分析超过 500 个单细胞，并且处理对象的体积只需要 200 纳升，显著地降低了单细胞核酸分析例如单细胞核酸测序的成本，例如可以降低至目前成本的十分之一。

根据本发明的实施例，该方法可以利用选自 HISEQ2000、SOLiD、454 和单分子测序平台的至少一种进行所述测序。

下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。本领域技术人员将会理解，下面的实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件的，按照本领域内的文献所描述的技术或条件（例如参考 J.萨姆布鲁克等著，黄培堂等译的《分子克隆实验指南》，第三版，科学出版社）或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品，例如可以采购自 Illumina 公司。

实施例 1:

本实施例利用商用的微量分液平台（SmartChip™ MultiSample NanoDispenser(MSND), Wafergen Biosystems）进行加样，以微孔芯片(Smartchip 200nL, Wafergen)为容器，荧光定量 PCR 仪（SmartChip™ Real-Time PCR Cycler, Wafergen Biosystems）辅助监测，对 HeLa S3 细胞进行单细胞核酸处理。具体如下：

1 样品准备

1.1 根据样品的差异，分别用胰酶对贴壁型细胞，胶原酶对组织进行细胞消化，将已消化的细胞取 1mL，并用 1.5mL EP 管装好。

1.2 将步骤 1.1 中的细胞在 1000rpm 条件下离心 5min，并用 1×PBS 重悬浮，重复一次。

1.3 用 40 或 70 μm 的细胞滤网对步骤 1.2 细胞溶液进行过滤以去除细胞团。

1.4 将 Percoll 原液（PHARMACIA，货号 17-0891-01）与 10×PBS 按体积比 9:1 混合成细胞的等渗溶液，命名为溶液 1。吸取一定量的溶液 1 与经步骤 1.3 的细胞溶液按体积比 1:4 混合成新的细胞悬浮液。

1.5 将步骤 1.4 中新配置的细胞悬浮液的细胞密度调节至 2~4 个/μL，完成细胞样品制备，称为样品 1。细胞计数的进行是在细胞初步计数后，梯度稀释，并用显微镜对 5~10μL 细胞悬浮液进行 3 次计数确定细胞密度。

1.6 将溶液 1 与 1×PBS 按体积比 1:4 配成阴性对照溶液，称为对照 1；准备好浓度为 0.2 ng/μL 的总 RNA，作为阳性对照，称为对照 2。

2 单细胞 mRNA 的处理过程

2.1 将微量加样平台（MSND 平台）中的纯水和 0.2%的次氯酸钠置换成无核酸酶水和

用其配置的 0.2% 的次氯酸钠，并用 RNA Zap 擦洗平台，最大限度的减少环境中的 RNA 酶对实验造成的影响。

2.2 将要用到物品（如 384 孔板等）放入超净台中，打开超净台风机，用 DNA off 擦拭超净台桌面及器械，10min 后关闭风机，开启紫外照射 30min，然后打开风机，并用 RNA Zap 5 擦拭台面及仪器。

2.3 在经步骤 2.2 处理的超净台中准备裂解液，用无核酸酶水、Oligo-dT Primer、dNTP、RNA 酶抑制剂和 Triton X-100 等制备细胞裂解液 750 μ L，根据实际需求将裂解液分装到 384 孔板对应的位置（以 36 个孔位为例，每孔 20 μ L），用膜封好，在 2600rcf，12 $^{\circ}$ C 条件下离心 5min，去气泡，并将其放入 MSND 平台指定位置。

其中，以 4 μ L 裂解液为例，其组成如下表所示：

成分	体积
10% Triton X-100	0.04 μ l
40U/ μ l RNA 酶抑制剂 (RNase Inhibitor)	0.1 μ l
无 核 酸 酶 水 (NF-Water)	1.86 μ l
10uM Oligo-dT Primer	1 μ L
10mM dNTP	1 μ l

2.4 将一张新的 200nL 的芯片放置在 MSND 平台指定位置，选择并启动对应加样程序 (36sample*144assay)，该程序会完成将裂解液每孔 50nL 的量分装在芯片中（即将 384 孔板中的裂解液以每孔 50nL 的量分装到芯片中 5124 个孔中），该过程耗时 15min。程序完成后，用滤纸将芯片上可能存在的液体吸掉，并封上膜，在 2600rcf，12 $^{\circ}$ C 的条件下离心 5min。

2.5 将 1.5 中样品 1、1.6 中准备的对照 1 和对照 2，轻柔的颠倒混匀后在超净台中分装在一个新的 384 孔板中，样品 1 分装在 34 个孔中，对照 1 和对照 2 分别分装在 1 个孔中，每孔 20 μ L。孔位与步骤 2.3 提及的 36 个孔位置对应。

2.6 将 2.5 中准备的 384 孔封好膜，移到 MSND 仪器中后将膜揭开。将步骤 2.4 准备的芯片放置在 MSND 芯片区，揭开膜，开启加样程序 (36sample*144assay)，将细胞悬液及对照溶液分到芯片中（每孔 50nL）。

2.7 分液完毕后，用滤纸将芯片上可能存在的液体吸掉封上膜在 2600rcf，12 $^{\circ}$ C 的条件下离心 5min，转移至可放置芯片的热循环仪中，72 $^{\circ}$ C 反应 3min 进行细胞裂解。裂解后将芯片在 2600rcf，12 $^{\circ}$ C 条件下离心 5min，去膜后转移到 MSND 平台。

2.8 在超净台中配置逆转录混合液 (RT Mix)，并分装在 384 孔板中如 2.5 中涉及的 36 个孔中，每孔 20 μ L。在 2600rcf，12 $^{\circ}$ C 条件下离心 5min，并将其放入 MSND 平台指定位置，将膜撕开，启动加样程序 (36sample*144assay)。

2.9 分液完毕后，用滤纸将芯片上可能存在的液体吸掉封上膜在 2600rcf, 12℃的条件下离心 5min，转移至可放置芯片的热循环仪中，42℃ 90min, (50℃ 2min, 42℃ 2min) 10 个循环，70℃ 15 min, 4℃ 保存。反应后将芯片在 2600rcf, 12℃ 条件下离心 5min，去膜后转移到 MSND 平台。

5 2.10 在超净台中配置 PCR 反应液（内有 SYBR Green I，其终浓度为 0.5×），并分装在 384 孔板中如 2.5 中涉及的 36 个孔中，每孔 20μL。用膜封好，在 2600rcf, 12℃ 条件下离心 5min，并将其放入 MSND 平台指定位置，将膜撕开，启动加样程序（36sample*144assay）。

2.11 分液完毕后，用滤纸将芯片上可能存在的液体吸掉封上膜在 2600rcf, 12℃ 的条件下离心 5min，转移至荧光定量 PCR 仪中，进行 PCR 反应及溶解曲线测定。

10

3 目标样品的确定及提取

3.1、根据 Smartchip cycling 仪器界面监测的芯片中 5184 个孔中的荧光信号，CT 值和溶解曲线情况，对比对照 2 样品并结合细胞密度分布，确定目标单细胞孔位，并进行记录。

15 3.2、用酒精灯加热，将巴氏玻璃管吸嘴拉成直径小于 200μm 的毛细管。利用该毛细管的毛细作用将目标孔位的样品吸出，并转移到装有 6μL TE/ddH₂O 的 1.5mL EP 管中，混合后，写好标签。反复三次用 ddH₂O 清洗毛细管内外壁，进行一个样品的提取。

3.3、从步骤 3.2 中的 6μL 样品中取出 1μL 用 Qubit® 2.0 荧光定量仪（Invitrogen）或 Agilent 2100 生物分析仪进行定量。

20 3.4、根据定量结果，取 1ng 产物用 Nextera XT sample Prep Kit 或者 5ng 产物用 TruePrep Mini DNA Sample Prep Kit 进行文库构建。

3.5、将文库用 Agilent 2100 生物分析仪和荧光定量 PCR 仪（SmartChip™ Real-Time PCR Cycler, Wafergen Biosystems）进行质检，检测其片段分布和浓度是否符合测序上机标准，质控合格后，定量后在 Hiseq 2000 上进行测序。

25 测序后数据可用于单细胞 RNA 表达量的分析，细胞异质性的分析及 RNA editing 等信息的分析。本实施例获得的数据具有较好的质量，如图 7 和图 8 所示，不同位置的碱基的波动比较小且 90% 以上的数据质量都大于 30，对后期信息分析提供了很好的基础。同时，测序数据分析表明，其结果与常规流程（即手动挑单个细胞，在 PCR 管中进行反应的过程）的数据在基因的覆盖情况（如图 9 所示）及数据的偏向性上（如图 10 所示）都基本一致。说明通过本实施例进行的反应在数据分布与常规流程一致且未引入其他影响反应的因素。

30 且本实施例获得信息覆盖了 11 个管家基因，说明信息比较完整。

当细胞密度为 2~4 个/μL 时，芯片中 5184 个孔中约 470-850 个孔中只包含单个细胞，其他的孔中为空或 2 个及以上细胞。本实施例采用 SYBR 染料法和标准品对照比较法结合起来区分哪些孔是需要的含有细胞的孔，并且剔除明显为多个细胞的孔。用于选取目标孔的主要的三个参数为孔内荧光变化情况，CT 值及溶解曲线。Smartchip cycling 是一台与本流程中芯片相匹配的 qPCR 仪。SYBR Green I 能够特异性的与双链 DNA 结合，定量指示 DNA 含量。在本流程采用 SYBR Green I 标记 DNA，Smartchip cycling 检测芯片孔中荧光变化情

35

况，该荧光曲线可用于显示芯片孔内 cDNA 扩增状况，即 qPCR 反应。同时对照 2 样品为浓度 0.2ng/μL，以每孔 50nL 的量分布在 144 个微孔，即每孔中平均 RNA 含量为 10pg，与一个细胞中 RNA 的含量相当。在 SYBR Green I 标记的 PCR 反应中，CT 值可用于表征模板的起始量，也就是 CT 值越小，其起始量越大，因此可以将对照 2 样品中上百个反应的平均 CT 值作为挑选只含有单个细胞的孔的参数之一，同时将溶解曲线用于剔除引物二聚体比较严重的

5 不合格样品，若产物为引物或引物较多，则其溶解曲线中溶解温度的峰出现在 80℃ 之前，如图 5 所示。除此之外根据细胞密度能够计算得到芯片中含有单细胞和多细胞的比例，（比如细胞密度为 4 个/μL 时，理论上多细胞孔占有细胞悬浮液样品孔的 1.75%，即其中 CT 值最小的 1.75% 为多细胞孔。根据实验对单细胞要求的严格程度，可以去除一定比例 CT 较高，即多细胞的孔位。

根据孔内荧光变化情况，CT 值及溶解曲线 3 个参数确定好目标孔位，再用玻璃毛细管将目标孔中的样品提取出来至内有 6μL ddH₂O 的 EP 管中。混合后取其中的 1μL 用 Qbit 或 2100 定量，剩余的标记好浓度即可以用于后期的文库制备等。2100 检测图如图 6 所示，其片段主要集中在 500bp-2k 之间，且在 1.5-2k 之间有个峰，符合常规流程中判断该样品是否

15 完整的要求。

不同起始量下的荧光曲线、熔解曲线如图 5 所示。不同起始量的 CT 值的情况如表 1 所示。

表 1 同浓度起始样品的 CT 值分布

起始样品	统计个数	CT 平均值
160pg	144	8.34984
40pg	133	11.92661
10pg (对照 2)	138	13.28530
细胞上清液	280	15.9756
对照 1	129	17.39323

细胞上清液是指细胞悬浮液离心后上层溶液基本不包含细胞，可能存在一些游离的 RNA。由图 5 可以看出对照 1（阴性对照）和细胞上清液在 22 轮扩增下，其荧光变化曲线明显区别于其他 RNA 样品起始的荧光变化曲线。而内为细胞悬浮液的孔其荧光变化曲线可以分为两种，一种和细胞上清液的类似，一种与以 RNA 为样品的相似，如图 5 目标孔曲线所示。按照表 1 结果，我们将细胞悬浮液为样品的孔 CT 值按从小到大的顺序排列，选取 CT 在 13.28±0.5 范围内的挑选出来，作为备选目标孔，同时结合荧光曲线及溶解曲线，剔除荧光曲线变化与 RNA 起始的荧光曲线不平行的及引物比较明显的孔，剩余的孔被确认为

20 目标孔。

25

反应体系

溶液名称	加入体积
裂解液	50nL
细胞悬浮液（2~4 个/ μ l）	50nL
反转录反应溶液	50nL
PCR 反应溶液	50nL

工业实用性

- 5 本发明的确定容器中核酸是否来源于单个细胞的方法及其装置，能够实现快速地原位确定容器中的核酸是否来源于单个细胞，进而，可以实现同时分析多个容器中的核酸来源，进一步降低容器中核酸悬浮液的体积，从而可以显著降低单细胞核酸分析的成本。

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导，可以对那些细节进行各种修改和替换，这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

- 10 在本说明书的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示意性实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语的示意性表述不一定指的是相同的实施例或示例。而且，描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任何的一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。

权利要求书

1、一种确定容器中核酸是否来源于单个细胞的方法，其特征在于，包括：

(1) 在含有核酸的容器中添加荧光标记，并进行实时荧光定量 PCR，以便获得所述容器的荧光变化数据；以及

(2) 基于所述容器的荧光变化数据，确定所述容器中所包含的核酸是否来源于单个细胞。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述荧光标记为 SYBR GreenI。

3、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述核酸为 cDNA。

4、根据权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述核酸是通过下列步骤获得的：

提供细胞悬浮液，所述细胞悬浮液含有 2~5 个细胞/微升；

在容器中添加 50 纳升所述细胞悬浮液；

在所述容器中添加细胞裂解液，以便裂解所述容器中的细胞，并释放所述细胞中的 mRNA；以及

在所述容器中添加反转录试剂，以便对所述 mRNA 进行反转录，获得 cDNA。

5、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述容器为多孔板中的至少一个，优选所述多孔板为 5124 孔板。

6、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，在步骤 (2) 中进一步包括：

(2-1) 基于所述容器的荧光变化数据，建立扩增曲线，并且基于所述扩增曲线，确定所述容器的 Ct 值；

(2-2) 将所述容器的 Ct 值与预定的第一 Ct 阈值进行比较，其中，所述容器的 Ct 值高于所述预定的第一 Ct 阈值是所述容器中所包含的核酸来源于单个细胞的指示。

7、根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述预定的第一 Ct 阈值是通过对对照容器进行实时荧光定量 PCR 而确定的，其中，所述对照容器含有已知量的核酸，优选地，所述对照容器含有 10pg 核酸。

8、根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于，所述预定的第一 Ct 阈值是通过下列步骤确定的：

(a) 对多个所述对照容器进行实时荧光定量 PCR，以便确定各所述对照容器的 Ct 值；以及

(b) 确定这样一个数值作为所述预定的第一 Ct 阈值，其中，全部所述多个对照容器的 Ct 值中至少 1.75% 小于所述数值。

9、根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述预定的第一 Ct 阈值是通过下列公式确定的：

预定的第一 Ct 阈值 = (平均 Ct 值 - a)

其中，所述平均 Ct 值是所述多个对照容器的 Ct 值中至少一部分的平均值，a 是在 0.1~1 之间的常数，优选 a=0.5。

10、根据权利要求 9 所述的方法，其特征在于，在步骤（2-2）中，所述容器的 Ct 值高于所述预定的第一 Ct 阈值但小于预定的第二 Ct 阈值是所述容器中所包含的核酸来源于单个细胞的指示，其中，所述预定的第二 Ct 阈值是通过下列公式确定的：

预定的第二 Ct 阈值=预定的第一 Ct 阈值+2a，a 是在 0.1~1 之间的常数，优选 a=0.5。

5 11、根据权利要求 10 所述的方法，其特征在于，所述预定的第一 Ct 阈值为 12.78，所述预定的第二 Ct 阈值为 13.78。

12、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，进一步包括：

（3-1）基于所述容器的荧光变化数据，确定所述容器的荧光变化曲线；

（3-2）将所述容器的荧光变化曲线与预定曲线进行比较，以便确定所述实时荧光定量

10 PCR 是否有效，

其中，

所述预定曲线是通过对含有已知预定量核酸的容器进行实时荧光定量 PCR 而获得的，

并且所述容器的荧光变化曲线与所述预定曲线平行表示所述实时荧光定量 PCR 是有效的。

15 13、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，进一步包括：

（4-1）基于所述容器的荧光变化数据，确定所述容器的熔解曲线；以及

（4-2）基于所述容器的熔解曲线，排除不合格容器，

其中，所述不合格容器的熔解曲线中仅有引物二聚体峰，或者存在引物二聚体峰异常。

14、一种确定容器中核酸是否来源于单个细胞的装置，其特征在于，包括：

20 实时荧光定量 PCR 单元，所述实时荧光定量 PCR 单元用于在含有核酸的容器中添加荧光标记后，进行实时荧光定量 PCR，以便获得所述容器的荧光变化数据；以及

判断单元，所述判断单元与所述实时荧光定量 PCR 单元相连，用于基于所述容器的荧光变化数据，确定所述容器中所包含的核酸是否来源于单个细胞。

15、根据权利要求 14 所述的装置，其特征在于，所述荧光标记为 SYBR GreenI。

25 16、根据权利要求 14 所述的装置，其特征在于，所述核酸为 cDNA。

17、根据权利要求 16 所述的装置，其特征在于，进一步包括核酸制备单元，所述核酸制备单元与所述实时荧光定量 PCR 单元相连，用于通过下列步骤制备获得所述核酸：

提供细胞悬浮液，所述细胞悬浮液含有 2~5 个细胞/微升；

在容器中添加 50 纳升所述细胞悬浮液；

30 在所述容器中添加细胞裂解液，以便裂解所述容器中的细胞，并释放所述细胞中的 mRNA；以及

在所述容器中添加反转录试剂，以便对所述 mRNA 进行反转录，获得 cDNA。

18、根据权利要求 14 所述的装置，其特征在于，所述容器为多孔板中的至少一个，优选所述多孔板为 5124 孔板。

35 19、根据权利要求 14 所述的装置，其特征在于，所述判断单元进一步包括：

Ct 值确定模块，所述 Ct 值确定模块用于基于所述容器的荧光变化数据，建立扩增曲线，

并且基于所述扩增曲线，确定所述容器的 Ct 值；以及

第一判断模块，所述第一判断模块中设置有预定的第一 Ct 阈值，所述第一判断模块与所述 Ct 值确定模块相连，用于将所述容器的 Ct 值与预定的第一 Ct 阈值进行比较，其中，所述容器的 Ct 值高于所述预定的第一 Ct 阈值是所述容器中所包含的核酸来源于单个细胞的指示。

20、根据权利要求 19 所述的装置，其特征在于，所述预定的第一 Ct 阈值是通过对对照容器进行实时荧光定量 PCR 而确定的，其中，所述对照容器含有已知量的核酸，优选地，所述对照容器含有 10pg 核酸。

21、根据权利要求 20 所述的装置，其特征在于，所述预定的第一 Ct 阈值是通过下列步骤确定的：

(a) 对多个所述对照容器进行实时荧光定量 PCR，以便确定各所述对照容器的 Ct 值，以及

(b) 确定这样一个数值作为所述预定的第一 Ct 阈值，其中，全部所述多个对照容器的 Ct 值中至少 1.75% 小于所述数值。

22、根据权利要求 19 所述的装置，其特征在于，所述预定的第一 Ct 阈值是通过下列公式确定的：

预定的第一 Ct 阈值 = (平均 Ct 值 - a)

其中，所述平均 Ct 值是所述多个对照容器的 Ct 值中至少一部分的平均值，a 是在 0.1~1 之间的常数，优选 a=0.5。

23、根据权利要求 22 所述的装置，其特征在于，所述容器的 Ct 值高于所述预定的第一 Ct 阈值但小于预定的第二 Ct 阈值是所述容器中所包含的核酸来源于单个细胞的指示，其中，所述预定的第二 Ct 阈值是通过下列公式确定的：

预定的第二 Ct 阈值 = 预定的第一 Ct 阈值 + 2a，a 是在 0.1~1 之间的常数，优选 a=0.5。

24、根据权利要求 23 所述的装置，其特征在于，所述预定的第一 Ct 阈值为 12.78，所述预定的第二 Ct 阈值为 13.78。

25、根据权利要求 14 所述的装置，其特征在于，所述判断单元进一步包括：

荧光变化曲线确定模块，所述荧光变化曲线确定模块用于基于所述容器的荧光变化数据，确定所述容器的荧光变化曲线；以及

第二判断模块，所述第二判断模块中设置有预定曲线，所述第二判断模块与所述荧光变化曲线确定模块相连，用于将所述容器的荧光变化曲线与预定曲线进行比较，以便确定所述实时荧光定量 PCR 是否有效，

其中，

所述预定曲线是通过对含有已知预定量核酸的容器进行实时荧光定量 PCR 而获得的，

并且所述容器的荧光变化曲线与所述预定曲线平行表示所述实时荧光定量 PCR 是有效的。

26、根据权利要求 14 所述的装置，其特征在于，所述判断单元进一步包括：

熔解曲线确定模块，所述熔解曲线确定模块用于基于所述容器的荧光变化数据，确定所述容器的熔解曲线；以及

去杂模块，所述去杂模块与所述熔解曲线确定模块相连，用于基于所述容器的熔解曲线，排除不合格容器，

5 其中，所述不合格容器的熔解曲线中仅有引物二聚体峰，或者存在引物二聚体峰异常。

27、一种获取单细胞核酸的方法，其特征在于，包括：

提供细胞悬浮液，所述细胞悬浮液含有 2~5 个细胞/微升；

在容器中添加 50 纳升所述细胞悬浮液；

在所述容器中添加细胞裂解液，以便裂解所述容器中的细胞，并释放所述细胞中的

10 mRNA；

在所述容器中添加反转录试剂，以便对所述 mRNA 进行反转录，获得 cDNA；以及

根据权利要求 1-13 任一项所述的方法，确定所述容器中所包含的 cDNA 是否来源于单个细胞，

任选地，在确定所述容器中所包含的 cDNA 是否来源于单个细胞之后，进一步包括，

15 利用毛细管获取实时荧光定量 PCR 产物。

28、一种构建单细胞核酸测序文库的方法，其特征在于，包括：

根据权利要求 27 所述的方法，获取单细胞核酸；以及

针对所述单细胞核酸，构建核酸测序文库。

29、根据权利要求 28 所述的方法，其特征在于，基于选自 HISEQ2000、SOLiD、454
20 和单分子测序平台的至少一种构建所述核酸测序文库。

30、一种构建单细胞核酸测序文库的系统，其特征在于，包括：

权利要求 14-26 所述的确定容器中核酸是否来源于单个细胞的装置；以及

文库构建装置，所述文库构建装置用于针对所述单细胞核酸，构建核酸测序文库。

31、根据权利要求 30 所述的系统，其特征在于，所述文库构建装置适于基于选自
25 HISEQ2000、SOLiD、454 和单分子测序平台的至少一种构建所述核酸测序文库。

32、一种确定单细胞核酸的序列的方法，其特征在于，包括：根据权利要求 28 所述的方法，构建单细胞核酸测序文库；以及

对所述单细胞核酸测序文库进行测序，以便获得测序结果，确定所述单细胞核酸的序列。

30 33、根据权利要求 32 所述的方法，其特征在于，利用选自 HISEQ2000、SOLiD、454 和单分子测序平台的至少一种进行所述测序。

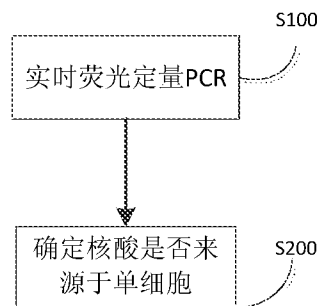


图 1

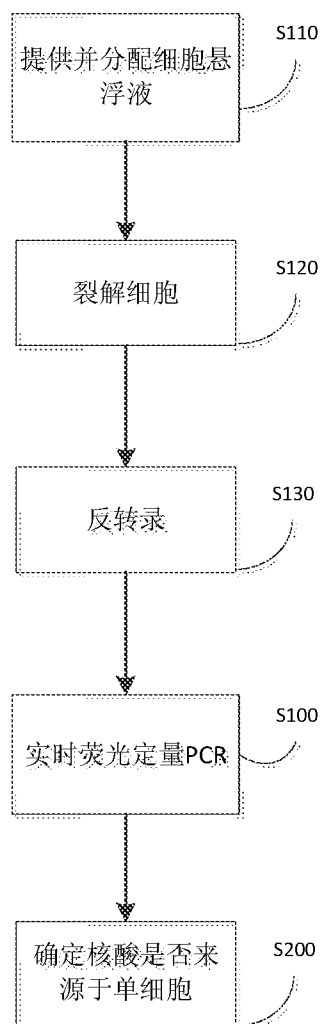


图 2

1000

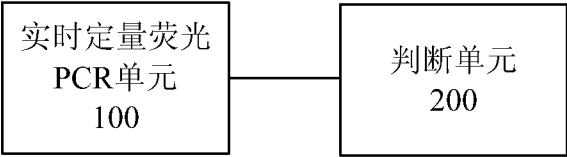


图 3

10000

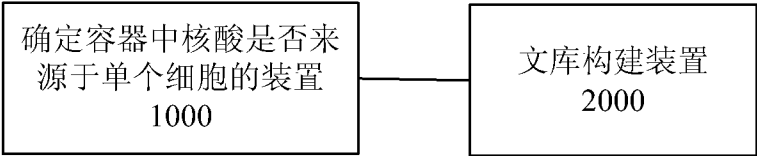


图 4

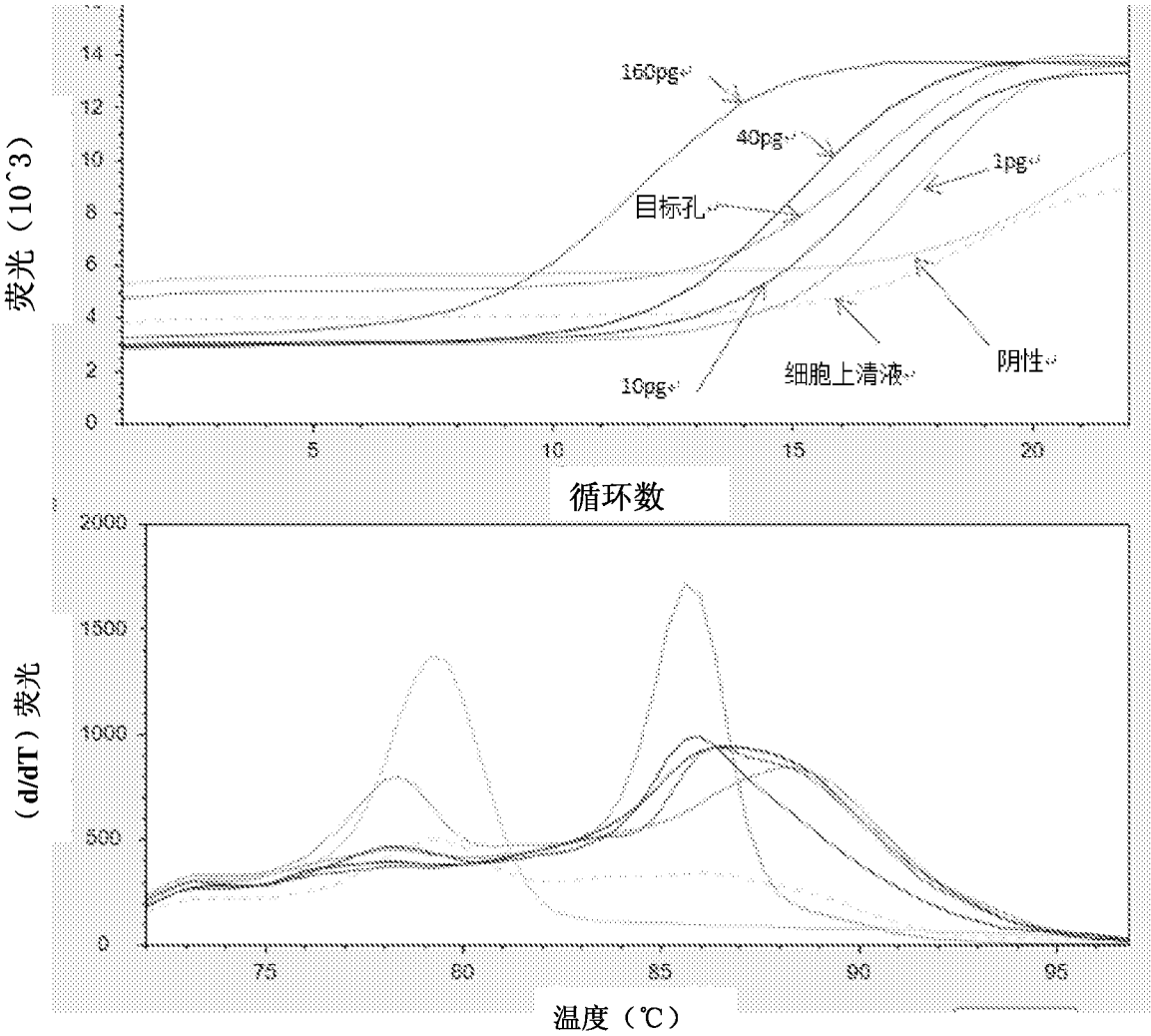


图 5

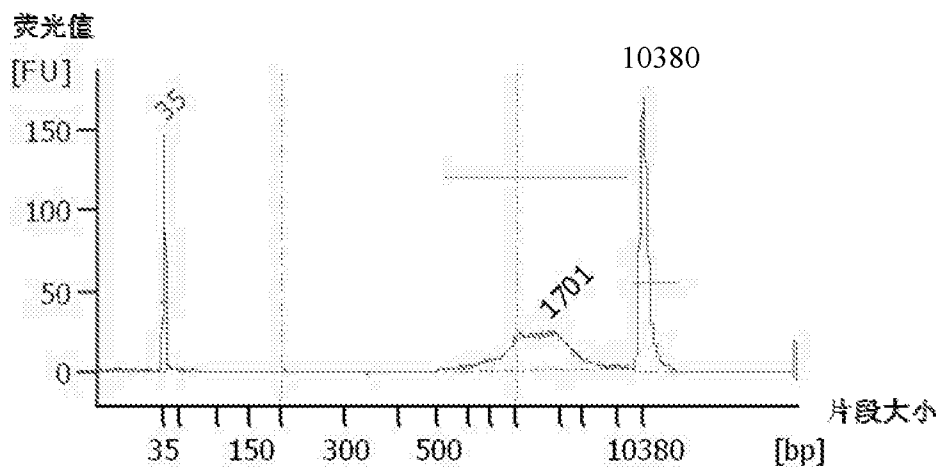


图 6

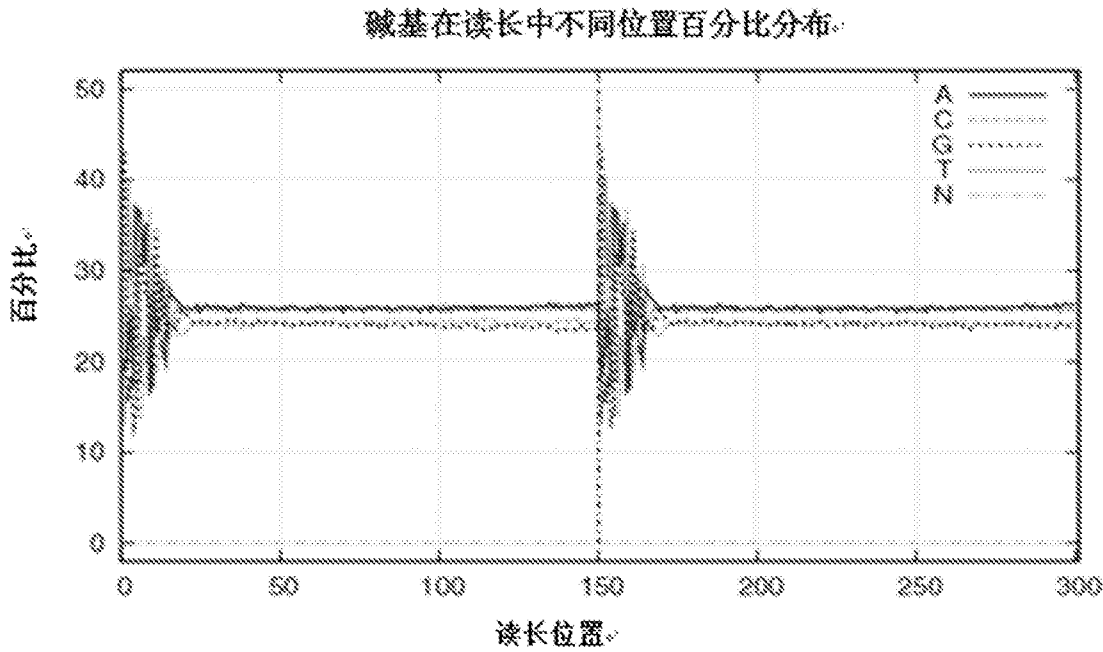


图 7

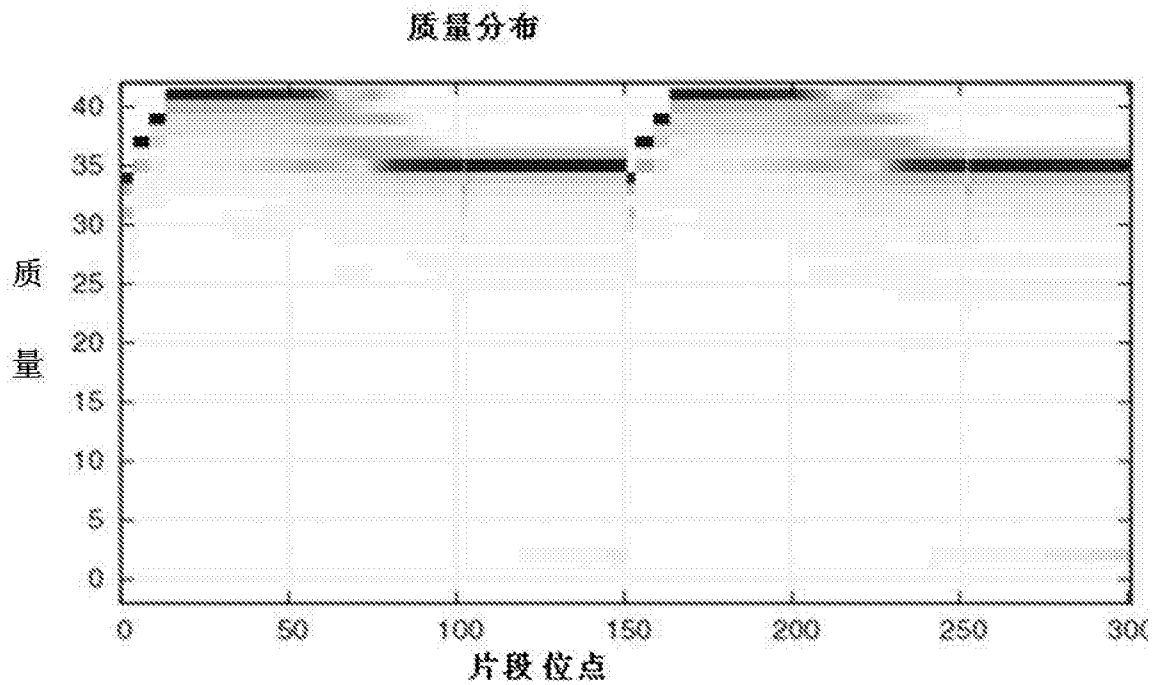


图 8

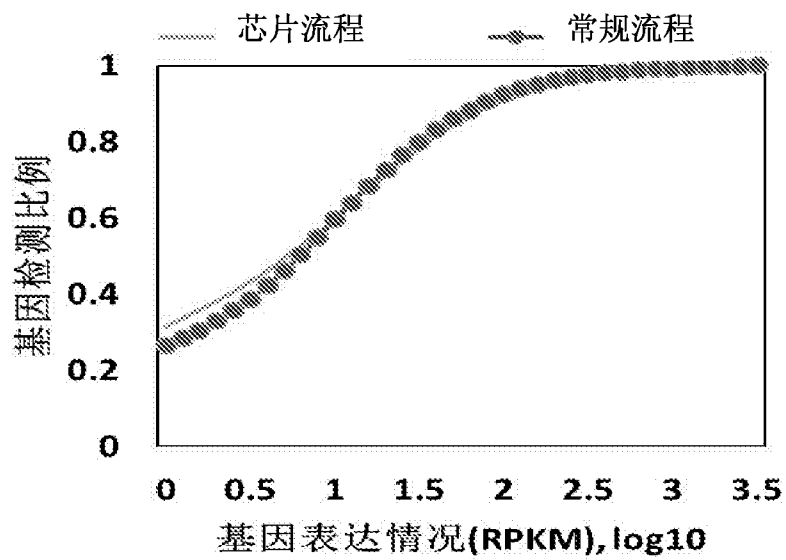


图 9

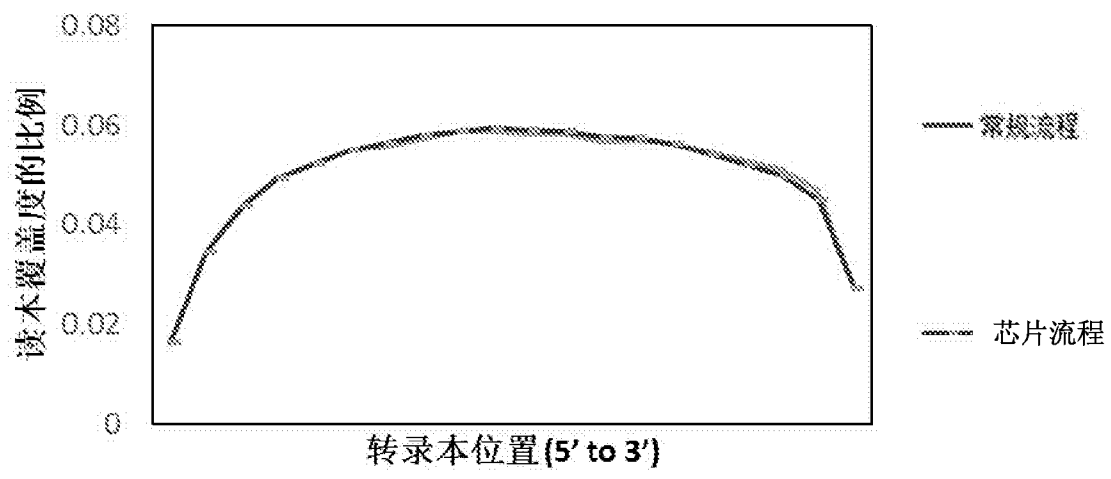


图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/083596**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C12Q 1/68 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CPRSABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, GOOGLE SCHOLAR, Elsevier Science, PubMed: quantitative analysis, the same cell, fluorescence in situ RNA-Seq technology, DNA, RNA, fluoresc+, quantified PCR, quantitativ+, qPCR, com+ from, source?, orgin+, Single-Cell, nucleic acid, nucleotide, polynucleotide, Cell heterogeneity, Fluorescent in situ RNA sequencing, FISSEQ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 101208421 A (OXFORD GENE TECHNOLOGY INTELLECTUAL PROPERTY LTD.), 25 June 2008 (25.06.2008), see the whole document	1-33
A	CN 101495650 A (ADVANCED CELL DIAGNOSTICS, INC.), 29 July 2009 (29.07.2009), see the whole document	1-33
A	CN 101842159 A (CELULA, INC.), 22 September 2010 (22.09.2010), see the whole document	1-33

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
20 April 2015 (20.04.2015)

Date of mailing of the international search report
29 April 2015 (29.04.2015)

Name and mailing address of the ISA/CN:
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer
ZHAO, Yanhao
Telephone No.: (86-10) **62411043**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2014/083596

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101208421 A	25 June 2008	GB 0508983 D0	08 June 2005
		AT 461268 T	15 April 2010
		JP 5222723 B2	26 June 2013
		EP 1883693 B1	17 March 2010
		EP 2156888 A2	24 February 2010
		US 2009098541 A1	16 April 2009
		AU 2006243057 B2	24 February 2011
		KR 20080014974 A	15 February 2008
		CA 2606698 A1	09 November 2006
		JP 2008539711 A	20 November 2008
		EP 1883693 A1	06 February 2008
		AU 2006243057 A1	09 November 2006
		US 8372629 B2	12 February 2013
		DE 602006012964 D1	29 April 2010
		US 2013190202 A1	25 July 2013
		WO 2006117541 A1	09 November 2006
CN 101495650 A	29 July 2009	EP 2500439 A1	19 September 2012
		US 2011059866 A1	10 March 2011
		WO 2007001986 A2	04 January 2007
		US 7709198 B2	04 May 2010
		EP 2711434 A1	26 March 2014
		EP 1910572 A4	20 January 2010
		WO 2007001986 A3	16 April 2009
		WO 2007002006 A2	04 January 2007
		WO 2007002006 A3	07 May 2009
		ES 2511218 T3	22 October 2014
		US 2007015188 A1	18 January 2007
		DK 2500439 T3	10 November 2014
		EP 2460893 B1	28 August 2013
		EP 2500439 B1	13 August 2014
		US 8604182 B2	10 December 2013
		EP 1913158 A2	23 April 2008
		US 8951726 B2	10 February 2015
		US 2008038725 A1	14 February 2008
		US 2011059442 A1	10 March 2011
		EP 1913158 A4	11 November 2009
		CA 2612577 A1	04 January 2007
		CN 101495650 B	04 February 2015
CN 101842159 A	22 September 2010	EP 2460893 A1	06 June 2012
		ES 2434915 T3	18 December 2013
		EP 1910572 A2	16 April 2008
		EP 2178641 A1	28 April 2010
		WO 2009021215 A1	12 February 2009
		EP 2178641 A4	30 October 2013
		JP 2010535511 A	25 November 2010
		CN 104307581 A	28 January 2015
		JP 5547071 B2	09 July 2014
		CN 101842159 B	24 September 2014
		US 2009042737 A1	12 February 2009

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2014/083596

A. 主题的分类

C12Q 1/68(2006.01) i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12Q

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, CPRSABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, GOOGLE SCHOLAR, Elsevier Science, PubMed: 核酸, 荧光, 定量PCR, 定量分析, 来自, 来源, 单个细胞, 同一细胞, 单细胞, 细胞异质性, 荧光原位RNA-Seq 技术, DNA, RNA, fluoresc+, quantified PCR, quantitativ+, qPCR, com+ from, source?, orgin+, Single- Cell, nucleic acid, nucleotide, polynucleotide, Cell heterogeneity, Fluorescent in situ RNA sequencing, FISSEQ

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 101208421 A (牛津基因技术知识产权有限公司) 2008年 6月 25日 (2008 - 06 - 25) 参见全文	1-33
A	CN 101495650 A (领先细胞医疗诊断有限公司) 2009年 7月 29日 (2009 - 07 - 29) 参见全文	1-33
A	CN 101842159 A (赛路拉公司) 2010年 9月 22日 (2010 - 09 - 22) 参见全文	1-33

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2015年 4月 20日

国际检索报告邮寄日期

2015年 4月 29日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
北京市海淀区蓟门桥西土城路6号
100088 中国

传真号 (86-10)62019451

授权官员

赵彦豪

电话号码 (86-10)62411043

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2014/083596

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	101208421	A	2008年 6月 25日	GB	0508983	D0	2005年 6月 8日
				AT	461268	T	2010年 4月 15日
				JP	5222723	B2	2013年 6月 26日
				EP	1883693	B1	2010年 3月 17日
				EP	2156888	A2	2010年 2月 24日
				US	2009098541	A1	2009年 4月 16日
				AU	2006243057	B2	2011年 2月 24日
				KR	20080014974	A	2008年 2月 15日
				CA	2606698	A1	2006年 11月 9日
				JP	2008539711	A	2008年 11月 20日
				EP	1883693	A1	2008年 2月 6日
				AU	2006243057	A1	2006年 11月 9日
				US	8372629	B2	2013年 2月 12日
				DE	602006012964	D1	2010年 4月 29日
				US	2013190202	A1	2013年 7月 25日
				WO	2006117541	A1	2006年 11月 9日
CN	101495650	A	2009年 7月 29日	EP	2500439	A1	2012年 9月 19日
				US	2011059866	A1	2011年 3月 10日
				WO	2007001986	A2	2007年 1月 4日
				US	7709198	B2	2010年 5月 4日
				EP	2711434	A1	2014年 3月 26日
				EP	1910572	A4	2010年 1月 20日
				WO	2007001986	A3	2009年 4月 16日
				WO	2007002006	A2	2007年 1月 4日
				WO	2007002006	A3	2009年 5月 7日
				ES	2511218	T3	2014年 10月 22日
				US	2007015188	A1	2007年 1月 18日
				DK	2500439	T3	2014年 11月 10日
				EP	2460893	B1	2013年 8月 28日
				EP	2500439	B1	2014年 8月 13日
				US	8604182	B2	2013年 12月 10日
				EP	1913158	A2	2008年 4月 23日
				US	8951726	B2	2015年 2月 10日
				US	2008038725	A1	2008年 2月 14日
				US	2011059442	A1	2011年 3月 10日
				EP	1913158	A4	2009年 11月 11日
				CA	2612577	A1	2007年 1月 4日
				CN	101495650	B	2015年 2月 4日
				EP	2460893	A1	2012年 6月 6日
				ES	2434915	T3	2013年 12月 18日
				EP	1910572	A2	2008年 4月 16日
CN	101842159	A	2010年 9月 22日	EP	2178641	A1	2010年 4月 28日
				WO	2009021215	A1	2009年 2月 12日
				EP	2178641	A4	2013年 10月 30日
				JP	2010535511	A	2010年 11月 25日
				CN	104307581	A	2015年 1月 28日
				JP	5547071	B2	2014年 7月 9日
				CN	101842159	B	2014年 9月 24日
				US	2009042737	A1	2009年 2月 12日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)