2015年 第45卷 第11期:1090~1101

SCIENTIA SINICA Chimica

www.scic

www.scichina.com chem.scichina.com



评 述

化学生物学和纳米生物学专刊

集成微流控芯片在单细胞测序样品制备中的应用

虞之龙¹⁰,黄岩谊^{10334*}

① 北京大学生物动态光学成像中心,北京 100871
② 北京大学工学院,北京 100871
③ 北京大学-清华大学生命科学联合中心,北京 100871
④ 北京大学化学与分子工程学院,北京 100871
*通讯作者, E-mail: yanyi@pku.edu.cn

收稿日期: 2015-06-19; 接受日期: 2015-07-15; 网络版发表日期: 2015-09-30 doi: 10.1360/N032015-00100

摘要 近年来,单细胞测序技术的飞速发展,从更精细的水平上揭示了细胞在遗传物质上的异质性.微流控技术作为操纵微量液体的新兴技术,尤其适合单细胞这样的微观物体操纵.本文着重介绍了集成微流控芯片在单细胞测序样品制备领域中的应用,包括单细胞全基因组测序样品制备、单细胞转录组测序样品制备和少量细胞的表观遗传组测序样品制备.相比传统方法,集成微流控芯片不仅在单细胞的操纵和俘获上有着独特的优势,也更容易进行高通量的并行实验,结果也显示了高度的平行性和重复性.集成化微流芯片在单细胞测序样品制备领域显示出了巨大的应用前景.

关键词 微流控 集成化 単細胞测序 样品制备

1 引言

细胞是生物活动的基本功能单位,也是生命科 学的重要研究对象^[1].绝大多数传统的研究方法都是 针对混合的大量细胞而设计的,在取得总体的观察 值后,通常还借助严格的统计平均来进行定量研究. 因此,对于测量值或者推算的物理量,获取的是其系 统的平均值^[2,3].这一套观察、分析和处理方法,从统 计学的角度出发既严格也合理,作为经典方法主导 目前生命科学的定量研究.

但单个细胞作为生命活动的独立单元,实际上 并不是完全等同的.即使是同一组织、同一类型的细 胞,相互之间也会存在一定的差异^[4,5].近些年随着 技术的不断发展,研究者已经发现,在越来越多的生 命活动中,细胞与细胞之间的行为存在差异.特别是 在一些关键的生命过程中,如胚胎的发育、细胞的分 化以及癌症等疾病的产生和发展中,单个细胞所表 现出来的性质和行为,以及各种细胞之间所产生的 差异性,对于整个系统的发展,往往起到关键的作 用^[3,6-8].例如,生命个体的发育过程,是由单个细胞 开始,经过不断的分裂和分化,最终形成一个复杂的 有机体.其中所包含的无数单细胞的行为和决定,是 决定整个生命进程的关键所在^[9,10].癌症作为一种特 殊的疾病,其组织具有很强的异质性特征.在癌症组 织中,癌症干细胞和其他后期产生的癌症细胞之间, 存在本质区别.而导致癌症扩散的转移细胞,又与其 他癌症细胞存在共同点和差异.这其中的各个细胞, 内部的染色体数目、基因拷贝数、点突变、基因表达 量和基因的表观修饰之间,也会有显著差异^[11,12].一 系列的研究均显示,这些单细胞之间的差异性,具有 重要的意义,与病情的产生、发展以及病理的状态有 密切的联系^[13].

与生物体的发育和癌症疾病类似,在其他的生 命功能系统中,也体现着单细胞异质性^[14,15].例如, 在神经系统中,单个神经元之间均存在差异,研究表 明,每个神经细胞中都会存在一些独特的拷贝数变 异^[16].而正是这一系列特异性的神经细胞,它们通过 相互连接构成神经网络,形成精巧而复杂的结构,赋 予了生物体感受、认知、学习和思考等能力^[17,18].也 正是其复杂性,使得我们对神经网络的研究相对困 难.通过在单细胞水平进行研究,从理解单细胞的功 能入手,定将有助于逐渐揭示和解开这个复杂系统 的奥秘.又如,免疫系统也是通过单个细胞水平上高 度随机的基因重组,来高效地应对种类各异的入侵 物.但是每个细胞之间的重组在高度相似的基础上 又存在精确细微的不同,这大大增加了研究的难度, 使得传统的基于大量细胞系综考察的生物分析方法 难以适用^[19,20].只有通过对单个细胞进行分析研究, 才有希望定量地解析这些细微的差别.

新一代测序技术的出现和发展,使得单个细胞 内基因组信息的测定成为可能.通过对单个细胞的 遗传信息进行全面的测定和分析,可以提供整个细 胞基本的全局状态表述,同时也有希望揭示出单细 胞水平上的遗传物质的异质性和随机性.

通过对单细胞进行测序, 多个生命医学领域有 了重要的突破. 例如, 通过测定单细胞的基因组序列, 发现乳腺癌中肿瘤的生长是通过断续克隆表达来实 现,而非通过持久中间体.这种发现与传统的癌症发 展模型存在本质的不同,为癌症的诊断和治疗提供 了新的思路[21]. 又如, 通过单细胞全基因组扩增测序, 分析了肿瘤的异质性,为研究和治疗提供了指导^[22,23]; 通过对单个染色体进行分离和扩增测序,获得了精 确完整的全基因组序列,大大改善了单倍型分析的 精度[24~26]. 而通过不断发展的新型、低偏向性的扩增 技术,可以获得之前所没有的高精度结论.例如,使 用多次退火环状循环扩增的全基因组扩增新技术对 一名男子的近百个精子进行单细胞全基因组测序, 首次获得了高精度的个人遗传图谱,成功解释了基 因起始区重组率降低的原因^[27,28],这些结论依靠之 前的群体遗传学是无法获得的.

目前,采用的新一代测序技术中,绝大多数方法 都需要对样品进行特定的前处理,制备"测序文库". 通过将遗传物质的末端修饰上特定序列,制作成符 合要求片段大小的核酸,才能利用各种方法对每个 小片段核酸进行测序,进一步使用计算机程序进行 比对、拼接和数目定量^[29,30].而单个细胞所含有的遗 传物质太少,还需要在制备文库前进行一次扩增.在 这一过程中,遗传物质容易降解丢失或者受到外源 污染,使操作的困难程度大大增加,为我们进一步了 解单细胞层次上的异质性及其生物医学意义带来了 挑战.因此,单细胞测序的方法学研究,关键集中在 测序样品的前期制备上.

尽管单细胞研究的新方法新技术不断涌现,但 在实验操作上, 还是极大地依赖于人工操作, 并高度 依赖于操作者的熟练与细致程度. 特别是在单细胞 俘获阶段,通常需要显微镜下的微操作,包括操作者 利用嘴进行吸吮或者利用液动微操作器进行控制; 或是利用激光显微切割进行特定细胞选取和俘获; 或是利用光镊进行细胞洗取和转移. 对于一些数量 稀少混杂于组织当中的特殊样品,如一些癌症细胞, 还需要利用肉眼在大量已经经过预富集与染色标记 的细胞中进行识别, 通过手动检索获取细胞. 此外, 单细胞小体积的酶反应操作与富集操作,也对操作 者提出了很高的要求.这些操作虽然可行,但是缺点 明显: 大多数操作不仅需要经过长期的训练, 而且还 导致了大量的实验不平行现象,减缓了实验进度;大 量操作都是在开放环境中进行的,操作过程时间长, 极难进行污染控制;而对于单细胞实验而言,由于起 始原料极少(pg 量级),极其微量的污染将导致严重的 结果错误; 大量的操作极其耗时, 不仅导致实验通量 无法上升,同时还导致很多对操作时间要求较高的 实验(如转录组的动态调控)等无法实现;常规实验操 作的耗材很难监测实验的进度或确定单细胞的俘获 状态,导致较高的空载率和假阳性与假阴性结果;常 规实验器具的精度很难适合单细胞的操控,导致较 大的系统误差, 使得精细的定量结果掩盖在设备和 方法带来的实验噪声中.

微流控技术(microfluidics)是一种用于精确控制 微量液体的技术.微流控芯片是实施该技术的平台, 通常通过细微的管道对液体实施操控,管道至少有 一维的尺度在微米或者微米以下,其控制液体的体 积在 10⁻⁹~10⁻¹⁸ L. 微流控芯片很多时候也被称为微 全分析系统(micro total analysis system, μTAS)^[31]. 早 期的微全分析系统以芯片毛细管电泳为代表.相比 传统电泳,芯片毛细管电泳的样品和试剂量大大减 小,变得更加经济,同时灵敏度得以提升,分析速度 也大大加快.由于在一个芯片上集成样品的引入、预 处理、反应、检测等功能,原本大量装置需要的工作, 现在只需一个微型化的器件就可以完成.通过这项 技术的发展诞生出一系列便携的检测装置,使得快 速的现场检测也成为可能.

微流控对液体的操控尺度, 刚好适合于单细胞 样品的处理操作.相比传统的人工试管操作,使用微 流控体系对单细胞测序的样品进行前处理,有一系 列的优点: (1) 微流控芯片的特征体积单位是纳升 (nL), 与单个细胞的特征体积单位皮升(pL)匹配, 可 以大大减少实验体积, 提升局部有效浓度, 增加特异 性反应的效率. (2) 微流控芯片减少了对所需反应液 以及相关缓冲液的使用,将等比例地减少潜在的试 剂污染,大大提高单细胞测序的质量和数据有效率. 微流控芯片可以使用自动化的仪器进行操作,并且 由于根据模板制作的高度一致的反应容积,可以大 大增加实验的可控性与平行性,减少人为误差与操 作失误. 通过设计大规模集成化微流控芯片, 可以大 大增加单个器件/仪器上实验的通量, 使得单细胞测 序的结果在样本间的可比较性增加. (3) 通过与光学 显微成像装置配合,单个细胞的操作可以加以显微 监控与分析, 做到实时监控和反馈, 大大减少假阳性 或者假阴性结果的产生. 由此开始, 一部分单细胞测 序处理的新方法在微流控芯片上得到了尝试和应用, 都获得了良好的效果,其中不乏出现了一些基于微 流控芯片的商用化的仪器.

2 集成微流控芯片在单细胞全基因组测序 样品制备中的应用

单细胞全基因组测序是针对单个细胞内仅有的 一对(以二倍体细胞为例)基因组 DNA 进行完整定量 测序的应用.在人体细胞中,遗传信息被编码在 46 条染色体上.这些染色质存在各种变异,如单核苷酸 变异(single nucleotide variation, SNV)和拷贝数变异 (copy number variation, CNV)^[32].在进化和癌症等生 物过程中,这些变异是重要的驱动力.由于这些变异 的动态过程起始于单个细胞中,从大量细胞的整体 看来,则体现为基因的异质性.要对其进行详细的分 析,就需要从单细胞的层面进行入手^[27,33-35].

除了对细胞异质性的研究外,还有一些研究由 于研究样品的细胞数量有限,无法获取到大量细胞 进行全基因组测序,这时也需要使用单细胞测定.典 型的例子包括疾病的病理样本^[36,37]、胚胎发育的早期 阶段^[38~41]、癌症研究中的循环肿瘤细胞^[42,43];此外, 还包括一些珍贵样品,如法医证据样品^[44].对于这些 难以获得的样品,必须使用单细胞或者是少量细胞 进行基因组的分析.

由于二代测序技术的快速发展,已经有一些使用单细胞进行全基因组测序的报道.单个细胞的基因组 DNA 含量很少,因此这些方法均需要通过全基因组扩增(whole-genome amplification, WGA),将基因组 DNA 复制至数千甚至数十万倍,以产生足够多的用于测序建库的 DNA.

传统的单细胞全基因组测序样品制备是在试管 中进行的.利用口吸管的方法人工挑选单个细胞吹 入到试管中,对细胞进行裂解处理释放出其中的 DNA. 之后选择合适的 WGA 方法, 对基因组 DNA 进行扩增.而利用微流控芯片进行单细胞的俘获和 全基因组扩增,可以在实时观察的情况下更方便地 俘获单细胞,同时也可以提升单细胞全基因组扩增 的质量. Quake 研究组^[45]发现, 在微流控芯片的纳升 级别反应器中能有效地提升单细胞全基因组扩增的 质量.利用微流控芯片,他们对大肠杆菌(Escherichia coli)的单细胞进行了分离,并在 60 nL 的反应体积中 使用多重置换扩增(multiple displacement amplification, MDA)方法对全基因组 DNA 进行了扩增. 芯片的结 构和实验过程如图1所示. 通过将反应体系从微升级 别降低到纳升级别,他们发现, MDA 扩增的非特异 性产物得到了降低. 这些非特异性产物可能来自于 污染的 DNA 模板, 以及引物之间的相互作用. gPCR 的检测结果也显示,相比传统的 50 µL 体积的试管反 应, 微流控芯片反应产物扩增的偏向性也大大降低, 序列与序列之间的读取深度表现得更加均匀.

在此基础上, Quake 研究组^[26]通过反应单元的大 规模集成化, 进一步在微流控芯片上提高了反应的 通量. 他们利用如图 2 所示的自动化微流控装置, 对 人类精子单细胞进行了高通量的全基因组扩增, 同 时尽可能地减少了非特异性的产物. 通过对 91 个精 子单细胞进行 MDA 扩增, 利用获得的基因型数据, 他们首次获得了个人精子细胞中的重组图谱. 实验 结果在低分辨率上与已有的大范围数据相吻合, 而 在更高的分辨率上获得了与传统的血统数据不一样 的结论. 通过对 31 个精子进行高通量测序, 他们对 大范围内的基因变异频率进行了测量. 进一步利用 8 个细胞的深度测序数据, 他们首次获得了新生突变

1092



图 1 用于大肠杆菌单细胞分离俘获和 MDA 扩增的芯片^[45]. (a) 芯片实物图, 上面有并行的 9 个反应体系, 使得一个芯片可以同时处理 9 个单细胞样品(图中流体层充满了蓝色染料, 控制层充满了红色染料, 标尺为 5 mm); (b) 单细胞俘获流程 (关闭的阀门显示为红色, 打开的阀门显示为透明; 细胞标识为绿色. 通过芯片上集成的蠕动泵将细胞推到俘获位置, 关闭阀门俘获细胞, 并在垂直方向打开从阀门, 将细胞冲入到反应室); (c) 一次典型的实验中的俘获结果(图片为相差图像 (灰色)和荧光图像(绿色)的结合, 标尺为 100 μm. 每个单元在俘获细胞后的照片都展示在图中, 绿色框内为俘获的细胞; 红色带叉的框表示该单元没有俘获到细胞) (网络版彩图)



图 2 用于人类精子单细胞 MDA 全基因组扩增微流控芯 片^[26]. (a) 芯片设计图(部分),其中红色为流体层管道,蓝 色为 MDA 扩增反应室,绿色为控制层管道;(b) 在交叉区 域被俘获的精子单细胞;(c) 芯片实物图(控制层充满了绿 色染料,流体层充满了红色染料.每个芯片包括 48 个独立 的反应单元.将合理稀释的细胞悬液通入到管道后,进行 细胞俘获,根据泊松分布,约有一半的反应腔室包含 1 个 精子.这些单细胞经过裂解、中和,最后进行 MDA 全基因 组扩增.整个扩增反应体系仅 50 nL,经过 16 h 的扩增后获 得产物)(网络版彩图)

概率的一系列特征.

多次退火环状循环扩增技术(multiple annealing and looping-based amplification, MALBAC)是近年来

新发展的一种全基因组扩增技术^[27]. 它通过引入一 个准线性的预扩增过程来降低指数扩增带来的偏向 性. 我们最近报道了一种微流控芯片用于实现并行 化的哺乳动物单细胞 MALBAC 全基因组扩增反应^[46]. 实验者还可以对细胞载入和全基因组扩增的整个过 程进行监控.芯片的结构和实验过程如图 3 所示.测 序结果显示, 经过 MALBAC 扩增的测序覆盖深度无 论在同一芯片的不同单元之间或在不同芯片之间, 都具有高度的重复性. 基于这个特点, 我们以标准样 品作为参照,对其他样品进行校正处理,获得了高准 确度的 CNV 检测结果. 同时发现, 测序覆盖深度与 序列的 GC 含量存在正相关, 提出了在缺乏标准样品 的情况下使用序列 GC 含量进行校正提升 CNV 检测 准确度的可能. 该微流控装置为单细胞全基因组测 序样品的前处理提供了一种简便的办法,在尽可能 减少手工操作的时间内,降低对操作者经验的需求 的同时,也降低了样品被污染的风险.这些优势使得 该技术非常适用于医疗检测等应用中.

3 集成微流控芯片在单细胞全转录组测序 样品制备中的应用

单细胞全转录组测序是测定单个细胞内所有基因的表达量.对于来自相同器官组织的细胞,尽管它们在遗传物质上是一致的,但任何两个细胞其实并



图 3 用于哺乳动物单细胞的 MALBAC 全基因组扩增微流控芯片^[46]. (a) 芯片示意图, 其中紫色为流体层管道, 洋红色为 控制层管道; (b) 操作流程(细胞在磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)中分散后, 通过手动控制相应的阀门将单 细胞俘获到特定区域中, 之后对细胞进行裂解, 并最终进行两步的 MALBAC 扩增反应); (c) 与微流控芯片配套的热循环 系统和成像系统(PDMS 芯片与硅片结合后, 放置于帕尔贴器件上; 装置的底部为水冷); (d) 芯片上单个细胞的散射成像 (网络版彩图)

非完全相同^[6,47]. 在这些细胞中, 基因表达的差异性 会始终存在, 即使是相同组织来源的细胞, 甚至完全 同类型的细胞, 它们个体之间基因表达的丰度依旧 会有所不同. 更进一步地, 在同一个细胞的不同时期, 基因表达量也会有所差异. 基因表达的异质性普遍 存在于大量细胞群体中, 并对各种生命过程产生着 重要的影响. 一系列的生命活动, 包括细胞周期和凋 亡的调控^[48,49]、癌症的产生和复发^[21,50]、组织分化和 胚胎发育^[38,39]、免疫反应^[51]以及神经活动^[52]等, 都与 基因表达量的差异有着密切的关系. 然而, 传统的基 于大量细胞的系综测量会掩盖掉这种异质性, 为了 揭示这种差异性, 就必须使用单细胞技术对转录组 进行研究.

单细胞的全转录组测序分析(RNA-Seq)是用于 定量分析大量细胞中基因表达的异质性的强力工 具^[53].在典型的单细胞转录组测序实验中,数十乃至 成百上千的单细胞从组织或者培养液中分离出来, 每个细胞的转录子都逆转录成 cDNA.这些 cDNA 经 过扩增和进一步处理后,进行二代测序^[53].由于单细 胞样品往往具有含量极少的 RNA,要获得这些样品 之间存在的微妙的生物学差异信息,对于实验方法的准确度和灵敏度会有较高的要求.

对单细胞的基因表达进行大规模的调查有助于 发现一些罕见的细胞,并获得它们之间的谱系关 系^[54]. 然而这种调查需要一系列高效的手段用于细 胞的俘获和 mRNA 的测序样品制备. Kriegstein 研究 组与Fluidigm公司合作^[54],利用图4中基于微流控技 术的C1仪器俘获了大脑皮质中11类总计301个单细 胞,对其转录组进行了样品制备和测序分析.结果显 示,对单细胞的转录组进行较浅深度的测序,就已经 足够用于细胞种类的区别和生物标记的识别. 通过 这一方法,研究者识别出了发育中的大脑皮质中各 种细胞,包括多种祖细胞和神经细胞的亚型.同时研 究者发现,在人类的放射状胶质细胞的 Notch 信号通 路中存在着两个新的靶点,即 EGR1 和 FOS,这点不 同于小鼠. 该方法显示出基于微流控芯片的单细胞 俘获结合较浅深度的转录组测序可以有效地用于组 织中细胞种类的分析和比较.

最新的研究发现,在微流控芯片中进行从单细 胞转录组样品的制备,可以使转录组测序结果具有



图 4 使用 C₁系统俘获单细胞并进行转录组样品制备^[54]. (a) C₁系统的结构图(其中的关键部件包括用于控制微流控集成芯片的气动部件,以及用于样品制备化学反应的温控部件); (b) 从左到右依次为包含夹具的完整的微流控集成芯片(试剂和 细胞分别从夹具中的对应位置引入,反应产物从夹具的其他口中导出)、集成化微流控芯片的结构示意图(粉色圆圈为 PDMS 芯片和夹具之间的接口,红色为控制层,蓝色为流体层,绿色为连接控制层的管线)、一个单细胞被俘获在 4.5 nL 的 俘获区域示意图(每个集成微流控芯片有 96 个俘获区域,平均的俘获数量为 72±5 个细胞); (c) C₁系统的反应流程(网络版 彩图)

更高的准确度和灵敏度.我们设计了一个可用于单 细胞转录组样品制备的微流控芯片,使用了具有较 高灵敏度的 Tang2009 方法^[55]进行逆转录, 如图 5 所 示^[56]. 单细胞在微流控器件中被俘获和裂解后, 其中 具有多聚腺苷(poly(A))尾巴的 mRNA 被逆转录为 cDNA. 双链的 cDNA 经过收集后, 在二代测序平台 上完成测序. 我们对总计 94 个样品进行了实验和分 析,其中包括小鼠的胚胎干细胞单细胞样品和提取 后的 RNA 技术重复. 结果显示, 相比传统的试管实 验,微流控芯片上的单细胞转录组样品制备显示出 了更高的检测灵敏度和更优秀的测量精度. 我们认 为,这是由于微流控芯片平台针对单细胞转录组测 序应用有几个显著的优势: (1) 纳升级别的微反应器 均通过光刻确定了形状, 消除了试管实验中因为移 液和人为操作引入的错误和随机误差, 使得反应的 平行性有了保证. (2) 将细胞俘获、筛选和裂解在一 个封闭的微流控器件内完成,可以最大程度地减少 外源性 RNA 和 RNA 酶造成的污染. 而在传统的试管 实验中,由于体系开放且人工操作繁多,引入污染的 可能性大大增加. (3) 在一个微小体系内进行扩增反 应,相对地提升了原始模板的浓度,使得反应的效率 和特异性得以提升[45].利用这一方法,对 10 个单细 胞样品,每个测序 0.2M 序列,就可以基本重构出大 量细胞样品的转录组分布信息.可见,在大规模的单 细胞转录组分析中,利用微流控技术和高通量测序

相结合,能创造出非常大的价值.



图 5 用于单细胞转录组样品制备的微流控芯片^[56].单个芯片可同时进行 8 个单细胞的转录组样品制备.(a)芯片实物照片.管道内充满了染料,蓝色的是控制管道,紫色的是流体管道;单细胞分散的悬液从细胞入口出注入,反应试剂从试剂入口中注入,双链的 cDNA 从产物出口处收集. (b)单个细胞转录组样品制备的反应流程.在单细胞被俘获区域(0.86 nL)所俘获后,被推入到选择腔(S; 1.35 nL),进一步进行细胞裂解(1; 3.82 nL)、逆转录(2; 3.82 nL)、polyA 加尾(3; 2.70 nL)、引物消化(4; 10.1 nL),最后进行第二链 cDNA 合成(5; 128 nL)(网络版彩图)

上述的两个研究均在微流控平台上实现了 RNA-Seq,细胞数量众多而单个细胞的测序数据量较少.通过对大量的单细胞进行较浅深度的测序,不仅能获得与大量细胞 RNA-Seq 一致的结论,相比对单个细胞进行总深度相同的测序,也能获得更多有效的信息^[53,56].因此,对大量细胞进行深度较浅的转录组测序,将是利用 RNA-Seq 对异质性组织中细胞进行分类研究的一个趋势,也为来自复杂组织或者人工受激后的细胞动态响应研究提供了新的思路^[53].微流控技术在样品处理上提供高度自动化、可重复、高通量的优势,非常适用于该方面的研究.

4 集成微流控芯片在少量细胞表观遗传组测序样品制备中的应用

表观遗传组测序是针对基因组上的表观遗传修 饰(包括组蛋白修饰和核酸修饰)进行定量精确测定 的应用.一个细胞需要产生和保持它的特性,在这个 过程中表观遗传调控十分重要.近期的研究显示,转 录过程与多种组蛋白修饰有关^[57].同时,对于基因功 能信息的识别解释,也需要对不同类型细胞在不同 阶段的表观遗传信息进行系统性的测序分析^[58].

染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)是一项用于研究复杂的 DNA-蛋白相互作 用的重要方法^[59]. 通过和微阵列芯片(ChIP-on-chip) 或高通量测序(ChIP-Seq)结合,这个方法成为一项研 究细胞表观基因调控的重要工具. ChIP 处理的过程, 由于抗体抓取的效率有限,产生的 DNA 总量很少, 同时由于 DNA 片段化和 DNA 蛋白分离过程中产生 的 DNA 损伤, 容易对下游的进一步分析造成不良影 响^[60]. 传统的 ChIP 实验需要大量的样品(常达到 106~107个细胞数量)来克服这一低效的过程,从而获 得可靠的结果[61]. 但是对于一些数量非常有限的样 品,如早期胚胎细胞或者罕见的肿瘤干细胞,无法获 得足够数量的细胞,这就大大限制了 ChIP 的应用. 一些新近发展的技术将 ChIP-Seq 的样品量减少到 10000 个甚至 5000 个细胞^[60], 但都是在数十微升体 积的传统的试管体系中.利用微流控能很好地解决 这一问题. 在操纵少量细胞样品上, 微流控芯片是一 个理想的平台.

Quake 研究组^[62]设计了一种微流控器件用于对 少量细胞进行高灵敏的 ChIP 分析. 该装置如图 6 所 示,它具有快速、自动化的特点,同时也保留了该方 法所具有的特异性.对于2个修饰组蛋白作为目标进 行 ChIP,结果显示,用 2000 个细胞通过微流控芯片 获得的结果,与用 50000~500000 个细胞利用传统方 法获得的结果可以相比较.这一技术实现了高灵敏 度、快速和自动化的 ChIP 反应,有助于将 ChIP 应用 到更多有趣和有价值的领域.

上述的微流控芯片尽管以 2000 个细胞作为起始 样品完成 ChIP 过程, 但后期仅限于通过 qPCR 对特 定位点进行分析^[62],并没有通过测序进行全面详细 的分析. 最近本研究组[63]设计了一个微流控器件, 为 ChIP-Seq 服务. 图 7 所示的这个芯片可以完成 ChIP 反应的主要过程,包括将少量细胞悬液从数十微升 浓缩到纳升级别,进一步固定、穿透、对染色质进行 片段化,最终将目标染色质片段俘获到微珠上,并对 富集后的染色质片段进行洗脱.之后,在不需要进行 任何预扩增的情况下, 纯化后的 DNA 片段利用一个 单管反应依次进行末端修复、腺苷酰化, 连接和 PCR 后, 变成测序文库. 最终的结果显示, 利用微流控芯 片制作 ChIP-Seq 样品的制备,可以可靠地从低至 1000 个哺乳动物细胞获得高质量的 ChIP-Seq 数据. 我们从 1000 个细胞获取的 H3K4me3 表观遗传图谱 获得了与利用大量细胞的传统方法相类似的结果. 3 种细胞的生物重复实验数据也显示,利用微流控芯 片进行 ChIP-Seq 样品制备,其实验结果具有高度的 可重复性.这一进展有助于推动对于细胞数量有限 的样品,特别是早期胚胎样品的表观遗传学图谱 研究.

5 总结与展望

微流控技术作为新生事物,虽然在近 10 年不断 发展完善,但是应用在单细胞测序样品处理的领域, 依然有不足之处和需要改进的地方:(1) 芯片的制作 加工需要相应的微加工设备,对于大多数实验室来 说初期投入较大;(2) 芯片的设计和制作需要一系列 的专业知识,对于化学和生物学实验室技术门槛较 高;(3) 尽管利用自动化的仪器设备,使用一款成熟 的芯片,操作者可以相对容易地完成实验,但要针对 某一个特定的应用将芯片和实验方法完善成熟,还 需要相对较大的时间与资源投入.例如,在微流控芯 片中,微小体系下的化学反应会与常规实验存在

1096



图 6 用于 2000 个单细胞 ChIP 反应的微流控芯片^[62]. (a) 芯片实物照片; (b) 芯片的 AutoCAD 设计图. 流体层为蓝色, 控制层为红色. 固定后的细胞在 Ring 1 中被俘获和裂解, 其中的 DNA 被片段化. 载有抗体的微珠被导入到 Ring A~D, 与片段化后的 DNA 混合,在蠕动泵的作用下实现免疫共沉淀反应. 之后,微珠在筛漏阀 SV6、SV7 和 SV8 处被拦截成柱,样品被洗脱后,从芯片收集取出(网络版彩图)



图 7 用于实现 1000 个哺乳动物细胞 ChIP 过程的芯片^[63]. (a) 芯片实物图(单个芯片包括 4 个并行的反应单元); (b) 微流控芯片上 ChIP-Seq 实验流程(第1步, 染色质碎片进入 到一端封闭的流体管道中; 接着在第 2 步, 染色质碎片和 磁珠混合并进行免疫沉淀反应; 第 3 步, 利用筛漏阀截获 表面具有抗体修饰的珠子, 形成一段小柱子; 完成后进行 第 4 步, 将 DNA 从染色质-抗体-珠子复合物上释放下来; 第 5 步是对 DNA 片段进行末端修复、腺苷酰化、连接; 最 后一步进行建库扩增测序)

一定差异,同时也要考虑比表面积以及芯片材料表 面化学特性的影响.这就要求对原始的化学反应的 参数进行一定的修改,以及对芯片内部表面进行必要的化学修饰.(4)由于芯片体积微小,也给反应过程中芯片内部各种物理量的直接测量带来了困难,进而增加了反应优化的难度.(5)由于芯片内部的管路和阀门非常微小,容易造成堵塞,也对实验环境的洁净程度提出了要求.

尽管设计并完善一款芯片需要一定的投入,微 流控技术在单细胞测序样品制备上还是有着传统实 验方法难以替代的巨大优势,并获得越来越广泛的 应用. 这些优点中, 最重要的是, 由于体系体积的大 大减少而带来的局部有效浓度提升,以及因此提高 了的反应效率和质量.同时,封闭体系和微量试剂使 得各方面可能引入的污染大大减少. 通过芯片上反 应单元大规模的集成化和仪器控制的自动化,利用 微流控技术在提高反应通量的同时,减少了人为操 作的引入, 使得实验操作一致可控. 而显微成像装置 的引入, 也使得微流控体系下对样品的整个操作可 控性和准确度大大增加. 新一代的芯片在通量规模 不断提高的同时,也将进一步提高集成度,通过自身 集成或者与其他设备连用,来整合反应前期的筛选、 富集和后期的处理、检测等各个步骤.例如,将其与 非标记光学成像等技术手段相结合在前期对各个样 品进行筛选和记录, 通过自身集成片上的传感器对 产物进行在线监测,或者进一步与质谱等仪器进行 联用进行产物检测.

综合来看,集成微流控芯片在单细胞全基因组测序样品、单细胞全转录组测序样品、少量细胞的表 观遗传组测序样品的前处理上,都有着其独特的优 势. 在单细胞测序样品的前处理应用中, 微流控技术 非常适用于对大量单个细胞样本进行平行化的处理, 从而获得大量的平行准确的高质量数据. 微流控技 术不仅提供了方法的集成和实现, 更是提供了一套 技术平台, 为单细胞测序研究提供了新的思路.

后记

英人 William Blake 有诗云: To see a World in a Grain of Sand And a Heaven in a Wild Flower Hold Infinity in the palm of your hand And Eternity in an hour 诸多前辈曾译此诗,而我认为弘一法师之译作实为信 达雅之完美体现:

一花一世界, 一沙一天国; 君掌盛无边, 刹那含永劫.

我们利用微流控技术对单细胞的研究,所追求的也是 这样的境界,期望能够在最基本的尺度上更加精细地了解 生命活动的关键过程.

科学家对生命精妙过程的探索是永不停息的,而生命 本身却又含有许多不确定性,不论是在单个细胞水平,还 是拓展到个体.科学家的个体生命,亦无法摆脱随机性.

本文应中国科学院上海应用物理研究所樊春海研究 员邀请而写,以纪念英年早逝的优秀分析化学家、我们的 好朋友黄庆研究员.

致谢 本工作得到国家自然科学基金(91313302)资助,特此致谢.此外,感谢黄岩谊课题组现在和以往参与微流控 技术在单细胞测序应用研究的如下人员:庞玉宏博士、Aaron Streets博士、耿爽博士、赵亮博士、申洁博士、 门诵帆博士、郑春红博士、张先念、傅语思、曹晨、李春梅、姜冬青、周文雄、吕晓庆;感谢北京大学生物 动态光学成像中心汤富酬研究员和谢晓亮教授的合作.

参考文献 _

- 1 程介克. 单细胞分析. 北京: 科学出版社, 2005
- 2 Leslie M. The power of one. Science, 2011, 331: 24–26
- 3 Fritzsch FS, Dusny C, Frick O, Schmid A. Single-cell analysis in biotechnology, systems biology, and biocatalysis. *Annu Rev Chem Biomol Eng*, 2012, 3: 129–155
- 4 Cai L, Friedman N, Xie XS. Stochastic protein expression in individual cells at the single molecule level. Nature, 2006, 440: 358–362
- 5 Elowitz MB, Levine AJ, Siggia ED, Swain PS. Stochastic gene expression in a single cell. Science, 2002, 297: 1183–1186
- 6 Li GW, Xie XS. Central dogma at the single-molecule level in living cells. Nature, 2011, 475: 308-315
- 7 Kalisky T, Quake SR. Single-cell genomics. Nat Methods, 2011, 8: 311-314
- 8 Tang F, Lao K, Surani MA. Development and applications of single-cell transcriptome analysis. Nat Methods, 2011, 8(4 Suppl): S6-11
- 9 Spiller DG, Wood CD, Rand DA, White MR. Measurement of single-cell dynamics. Nature, 2010, 465: 736-745
- 10 Snijder B, Pelkmans L. Origins of regulated cell-to-cell variability. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011, 12: 119–125
- 11 Marusyk A, Almendro V, Polyak K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? Nat Rev Cancer, 2012, 12: 323–334
- 12 Bendall SC, Nolan GP. From single cells to deep phenotypes in cancer. Nat Biotechnol, 2012, 30: 639-647
- 13 Almendro V, Marusyk A, Polyak K. Cellular heterogeneity and molecular evolution in cancer. Annu Rev Pathol, 2013, 8: 277-302
- 14 Schulz DJ, Goaillard JM, Marder E. Variable channel expression in identified single and electrically coupled neurons in different animals. *Nat Neurosci*, 2006, 9: 356–362
- 15 Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. Nat Rev Immunol, 2005, 5: 953-964
- 16 McConnell MJ, Lindberg MR, Brennand KJ, Piper JC, Voet T, Cowing-Zitron C, Shumilina S, Lasken RS, Vermeesch JR, Hall IM, Gage FH. Mosaic copy number variation in human neurons. *Science*, 2013, 342: 632–637
- 17 Padmanabhan K, Urban NN. Intrinsic biophysical diversity decorrelates neuronal firing while increasing information content. *Nat Neurosci*, 2010, 13: 1276–1282
- 18 Scaglione A, Moxon KA, Aguilar J, Foffani G. Trial-to-trial variability in the responses of neurons carries information about stimulus location in the rat whisker thalamus. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108: 14956–14961
- 19 Ma C, Fan R, Ahmad H, Shi Q, Comin-Anduix B, Chodon T, Koya RC, Liu CC, Kwong GA, Radu CG, Ribas A, Heath JR. A clinical microchip for evaluation of single immune cells reveals high functional heterogeneity in phenotypically similar T cells. *Nat Med*, 2011, 17:

738–743

- 20 Newell EW, Sigal N, Bendall SC, Nolan GP, Davis MM. Cytometry by time-of-flight shows combinatorial cytokine expression and virus-specific cell niches within a continuum of CD8(+) T cell phenotypes. *Immunity*, 2012, 36: 142–152
- 21 Navin N, Kendall J, Troge J, Andrews P, Rodgers L, McIndoo J, Cook K, Stepansky A, Levy D, Esposito D, Muthuswamy L, Krasnitz A, McCombie WR, Hicks J, Wigler M. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature*, 2011, 472: 90–94
- Hou Y, Song L, Zhu P, Zhang B, Tao Y, Xu X, Li F, Wu K, Liang J, Shao D, Wu H, Ye X, Ye C, Wu R, Jian M, Chen Y, Xie W, Zhang R, Chen L, Liu X, Yao X, Zheng H, Yu C, Li Q, Gong Z, Mao M, Yang X, Yang L, Li J, Wang W, Lu Z, Gu N, Laurie G, Bolund L, Kristiansen K, Wang J, Yang H, Li Y, Zhang X, Wang J. Single-cell exome sequencing and monoclonal evolution of a JAK2-negative myeloproliferative neoplasm. *Cell*, 2012, 148: 873–885
- 23 Xu X, Hou Y, Yin X, Bao L, Tang A, Song L, Li F, Tsang S, Wu K, Wu H, He W, Zeng L, Xing M, Wu R, Jiang H, Liu X, Cao D, Guo G, Hu X, Gui Y, Li Z, Xie W, Sun X, Shi M, Cai Z, Wang B, Zhong M, Li J, Lu Z, Gu N, Zhang X, Goodman L, Bolund L, Wang J, Yang H, Kristiansen K, Dean M, Li Y, Wang J. Single-cell exome sequencing reveals single-nucleotide mutation characteristics of a kidney tumor. *Cell*, 2012, 148: 886–895
- 24 Fan HC, Wang J, Potanina A, Quake SR. Whole-genome molecular haplotyping of single cells. Nat Biotechnol, 2011, 29: 51–57
- 25 Xu X, Nagarajan H, Lewis NE, Pan S, Cai Z, Liu X, Chen W, Xie M, Wang W, Hammond S, Andersen MR, Neff N, Passarelli B, Koh W, Fan HC, Wang J, Gui Y, Lee KH, Betenbaugh MJ, Quake SR, Famili I, Palsson BO, Wang J. The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 735–741
- 26 Wang J, Fan HC, Behr B, Quake SR. Genome-wide single-cell analysis of recombination activity and de novo mutation rates in human sperm. *Cell*, 2012, 150: 402–412
- 27 Zong C, Lu S, Chapman AR, Xie XS. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell. Science, 2012, 338: 1622–1626
- 28 Lu S, Zong C, Fan W, Yang M, Li J, Chapman AR, Zhu P, Hu X, Xu L, Yan L, Bai F, Qiao J, Tang F, Li R, Xie XS. Probing meiotic recombination and aneuploidy of single sperm cells by whole-genome sequencing. *Science*, 2012, 338: 1627–1630
- 29 Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. Nat Biotechnol, 2008, 26: 1135–1145
- 30 Metzker ML. Sequencing technologies-the next generation. Nat Rev Genet, 2010, 11: 31-46
- 31 Manz A, Graber N, Widmer HM. Miniaturized total chemical-analysis systems: a novel concept for chemical sensing. *Sensor Actuat B-Chem*, 1990, 1: 244–248
- 32 Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability—an evolving hallmark of cancer. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010, 11: 220–228
- 33 Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, Kamiyama M, Hruban RH, Eshleman JR, Nowak MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Iacobuzio-Donahue CA. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature*, 2010, 467: 1114–1117
- 34 Campbell PJ, Yachida S, Mudie LJ, Stephens PJ, Pleasance ED, Stebbings LA, Morsberger LA, Latimer C, McLaren S, Lin ML, McBride DJ, Varela I, Nik-Zainal SA, Leroy C, Jia M, Menzies A, Butler AP, Teague JW, Griffin CA, Burton J, Swerdlow H, Quail MA, Stratton MR, Iacobuzio-Donahue C, Futreal PA. The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature*, 2010, 467: 1109–1113
- 35 Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. Nature, 1998, 396: 643-649
- 36 Kitzman JO, Snyder MW, Ventura M, Lewis AP, Qiu R, Simmons LE, Gammill HS, Rubens CE, Santillan DA, Murray JC, Tabor HK, Bamshad MJ, Eichler EE, Shendure J. Noninvasive whole-genome sequencing of a human fetus. *Sci Transl Med*, 2012, 4: 137ra76
- 37 Lo YM, Chan KC, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FM, Zheng YW, Leung TY, Lau TK, Cantor CR, Chiu RW. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med*, 2010, 2: 61ra91
- 38 Marks H, Veenstra GJ, Stunnenberg HG. Insightful tales from single embryonic cells. Cell Stem Cell, 2010, 6: 397–398
- 39 Tang F, Barbacioru C, Bao S, Lee C, Nordman E, Wang X, Lao K, Surani MA. Tracing the derivation of embryonic stem cells from the inner cell mass by single-cell RNA-Seq analysis. *Cell Stem Cell*, 2010, 6: 468–478
- 40 Yan L, Yang M, Guo H, Yang L, Wu J, Li R, Liu P, Lian Y, Zheng X, Yan J, Huang J, Li M, Wu X, Wen L, Lao K, Li R, Qiao J, Tang F. Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20: 1131–1139
- 41 Xue Z, Huang K, Cai C, Cai L, Jiang CY, Feng Y, Liu Z, Zeng Q, Cheng L, Sun YE, Liu JY, Horvath S, Fan G. Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA[thinsp]sequencing. *Nature*, 2013, 500: 593–597
- 42 Ni XH, Zhuo ML, Su Z, Duan JC, Gao Y, Wang ZJ, Zong CH, Bai H, Chapman AR, Zhao J, Xu LY, An TT, Ma Q, Wang YY, Wu MN, Sun Y, Wang SH, Li ZX, Yang XD, Yong J, Su XD, Lu YY, Bai F, Xie XS, Wang J. Reproducible copy number variation patterns among

single circulating tumor cells of lung cancer patients. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110: 21083-21088

- 43 Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, Smith MR, Kwak EL, Digumarthy S, Muzikansky A, Ryan P, Balis UJ, Tompkins RG, Haber DA, Toner M. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*, 2007, 450: 1235–1239
- 44 Hanson EK, Ballantyne J. Whole genome amplification strategy for forensic genetic analysis using single or few cell equivalents of genomic DNA. Anal Biochem, 2005, 346: 246–257
- 45 Marcy Y, Ishoey T, Lasken RS, Stockwell TB, Walenz BP, Halpern AL, Beeson KY, Goldberg SM, Quake SR. Nanoliter reactors improve multiple displacement amplification of genomes from single cells. *PLoS Genet*, 2007, 3: 1702–1708
- 46 Yu Z, Lu S, Huang Y. Microfluidic whole genome amplification device for single cell sequencing. Anal Chem, 2014, 86: 9386–9390
- 47 Kalisky T, Blainey P, Quake SR. Genomic analysis at the single-cell level. Annu Rev Genet, 2011, 45: 431-445
- 48 Losick R, Desplan C. Stochasticity and cell fate. Science, 2008, 320: 65-68
- 49 Guo G, Huss M, Tong GQ, Wang C, Li Sun L, Clarke ND, Robson P. Resolution of cell fate decisions revealed by single-cell gene expression analysis from zygote to blastocyst. *Dev Cell*, 2010, 18: 675–685
- 50 Dalerba P, Kalisky T, Sahoo D, Rajendran PS, Rothenberg ME, Leyrat AA, Sim S, Okamoto J, Johnston DM, Qian D, Zabala M, Bueno J, Neff NF, Wang J, Shelton AA, Visser B, Hisamori S, Shimono Y, van de Wetering M, Clevers H, Clarke MF, Quake SR. Single-cell dissection of transcriptional heterogeneity in human colon tumors. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 1120–1127
- 51 Zhu J, Paul WE. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. Cell Res, 2010, 20: 4–12
- 52 Ståhlberg A, Andersson D, Aurelius J, Faiz M, Pekna M, Kubista M, Pekny M. Defining cell populations with single-cell gene expression profiling: correlations and identification of astrocyte subpopulations. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: e24
- 53 Streets AM, Huang Y. How deep is enough in single-cell RNA-seq? Nat Biotech, 2014, 32: 1005–1006
- 54 Pollen AA, Nowakowski TJ, Shuga J, Wang X, Leyrat AA, Lui JH, Li N, Szpankowski L, Fowler B, Chen P, Ramalingam N, Sun G, Thu M, Norris M, Lebofsky R, Toppani D, Kemp Ii DW, Wong M, Clerkson B, Jones BN, Wu S, Knutsson L, Alvarado B, Wang J, Weaver LS, May AP, Jones RC, Unger MA, Kriegstein AR, West JAA. Low-coverage single-cell mRNA sequencing reveals cellular heterogeneity and activated signaling pathways in developing cerebral cortex. *Nat Biotech*, 2014, 32: 1053–1058
- 55 Tang F, Barbacioru C, Wang Y, Nordman E, Lee C, Xu N, Wang X, Bodeau J, Tuch BB, Siddiqui A, Lao K, Surani MA. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods*, 2009, 6: 377–382
- 56 Streets AM, Zhang X, Cao C, Pang Y, Wu X, Xiong L, Yang L, Fu Y, Zhao L, Tang F, Huang Y. Microfluidic single-cell wholetranscriptome sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 7048–7053
- 57 Berger SL. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*, 2007, 447: 407–412
- 58 Shen Y, Yue F, McCleary DF, Ye Z, Edsall L, Kuan S, Wagner U, Dixon J, Lee L, Lobanenkov VV, Ren B. A map of the cis-regulatory sequences in the mouse genome. *Nature*, 2012, 488: 116–120
- 59 O'Geen H, Nicolet CM, Blahnik K, Green R, Farnham PJ. Comparison of sample preparation methods for ChIP-chip assays. *Biotechniques*, 2006, 41: 577–580
- 60 Adli M, Zhu J, Bernstein BE. Genome-wide chromatin maps derived from limited numbers of hematopoietic progenitors. *Nat Methods*, 2010, 7: 615–618
- 61 Park PJ. ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. Nat Rev Genet, 2009, 10: 669-680
- 62 Wu AR, Hiatt JB, Lu R, Attema JL, Lobo NA, Weissman IL, Clarke MF, Quake SR. Automated microfluidic chromatin immunoprecipitation from 2000 cells. *Lab Chip*, 2009, 9: 1365–1370
- 63 Shen J, Jiang D, Fu Y, Wu X, Guo H, Feng B, Pang Y, Streets AM, Tang F, Huang Y. H3K4me3 epigenomic landscape derived from ChIP-Seq of 1000 mouse early embryonic cells. *Cell Res*, 2015, 25: 143–147

Sample preparation for single cell sequencing on integrated microfluidic devices

Zhilong Yu^{1,2}, Yanyi Huang^{1,2,3,4*}

1 Biodynamic Optical Imaging Center, Peking University, Beijing 100871, China

2 College of Engineering, Peking University, Beijing 100871, China

3 Peking-Tsinghua Center for Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China

4 College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China

*Corresponding author (email: yanyi@pku.edu.cn)

Abstract: Recently, single cell sequencing has become the cutting-edge technology to reveal the complexity of biological processes at the finest scale. However, it is not easy to handle single cells precisely, nor to perform the small scale reactions accurately. Microfluidics offers a ready solution to control the liquid delivery at the picoliter scale, matching the accuracy requirements for single cell analyses. We review the recently reported applications that using integrated microfluidic devices to facilitate the sample preparation for single cell sequencing. Various sequencing approaches with very limited starting materials, such as single cell whole-genome sequencing, single cell whole-transcriptome sequencing, and 1,000-cell chromatin immunoprecipitation sequencing, have been successfully performed with microfluidic assistance. Compared to conventional methods, integrated microfluidic devices exhibit unique advantages in manipulation and capturing single cells, and provide flexible tools for performing high throughput experiments in parallel. The results are highly repeatable and reproducible, showing great potential in sample preparation for single cell sequencing.

Keywords: microfluidics, integration, single cell sequencing, sample preparation