

单细胞RNA测序技术及其在胚胎发育中的应用进展

林 华¹, 谭秋培^{2*}

¹桂林市人民医院, 司法鉴定所, 广西 桂林

²桂林市人民医院, 检验科, 广西 桂林

Email: *472310647@qq.com

收稿日期: 2021年5月28日; 录用日期: 2021年6月17日; 发布日期: 2021年6月24日

摘 要

胚胎发育是一个复杂的过程, 其受一系列细胞行为所调控。细胞是生物体结构和功能的基本单位, 细胞命运的决定属于单细胞水平的过程。胚胎发育早期细胞数量有限, 这是研究早期基因调控机理的一个重要问题。单细胞RNA测序是一种在单细胞水平上进行高通量测序分析的新技术, 其显著提高了人们对细胞、组织与器官复杂性的认识。早期胚胎发育是胚胎发育的关键阶段, 单细胞RNA测序技术的应用, 不仅可发现胚胎发育早期的一些关键基因, 而且还可构建器官发育的基因表达图谱, 阐明各种细胞类型及其在细胞分化过程中的相互关系。同时单细胞RNA测序技术的广泛应用能够反映细胞间的异质性, 从而有利于揭示疾病发生发展机制。本文综述了该技术与其近年来在胚胎发育中的应用进展, 这有助于今后胚胎发育的基础研究以及指导临床相关疾病的诊治。

关键词

单细胞RNA测序, 胚胎发育, 细胞异质性, 基因表达, 疾病

Single-Cell RNA Sequencing Technology and Its Application in Embryonic Development

Hua Lin¹, Qiupei Tan^{2*}

¹Forensic Laboratory, Guilin People's Hospital, Guilin Guangxi

²Department of Clinical laboratory, Guilin People's Hospital, Guilin Guangxi

Email: *472310647@qq.com

Received: May 28th, 2021; accepted: Jun. 17th, 2021; published: Jun. 24th, 2021

*通讯作者。

Abstract

Embryonic development is a complex process which is regulated by a series of cellular behaviors. Cell is the fundamental unit of the structure and function of lives. The cell fate is a process that is decided at the single-cell level. The limited number of cells in the early stages of embryonic development is a challenge for studying early gene regulation. Single-cell sequencing is a new technology for high-throughput sequencing analysis at the single-cell level. It has significantly increased the understanding of the complexity of cells, tissues and organs. Early embryonic development is the key stage of embryonic development. The application of single cell RNA sequencing technology can not only discover some key genes in early embryonic development, but also construct gene expression maps of organ development, and clarify various cell types and their relationships in the process of cell differentiation. The widespread application of single-cell RNA sequencing technology is reflecting the heterogeneity between cells, which is conducive to revealing the occurrence of disease development mechanism. This article reviews the technology and the application of single-cell RNA sequencing in embryonic development in recent years. It benefits embryonic development basic scientific research and guides the diagnosis and treatment of clinical diseases with embryonic development.

Keywords

Single-Cell RNA Sequencing, Embryonic Development, Cell Heterogeneity, Gene Expression, Diseases

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

胚胎发育是一个复杂的过程,其受到基因与环境两个因素所调控,而细胞为人体结构与功能的基本单位。系统而深入地研究人体内细胞的类型、功能与分化途径,对于人们了解人体的生长发育、相关疾病的发生发展具有着重要的临床意义。在人体胚胎发育的早期,受精卵经转录调控、表观遗传重编程等过程,形成了外胚层、内胚层和中胚层[1]。在后续胚胎发育进程中,这三类胚层细胞只需较短时间便可分化成上百种的细胞类型,继而发育成人体各种组织与器官。目前,由于研究人员可能忽略了单个细胞的生物学功能,研究一般所采用的技术手段不能详细地研究人体器官中各种细胞的分化途径,同时也难以识别各类细胞亚群的异质性,也较难解释细胞异质性对人体各类基因表达的影响[2]。而单细胞 RNA 测序技术(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)可对机体单个细胞进行转录分析,并详细阐释细胞的异质性,同时发现新的标记基因与细胞类型,能够从单个细胞水平对组织和器官进行系统研究。这项技术具有高分辨率与高通量的特点。本文主要介绍了 scRNA-seq 技术及其近年来在胚胎发育中的应用进展情况,可为人体胚胎发育的深入研究与其相关疾病的诊断治疗提供科学依据。

2. scRNA-seq 技术

单细胞测序是一种从单细胞水平研究细胞基因组、转录组或表观遗传组的技术,它从不同的角度揭示细胞在不同阶段的功能和特点。而 scRNA-seq 技术在揭示细胞类型、明确细胞亚群、鉴别细胞异质性

和绘制细胞命运谱系等方面起到了重要作用[3] [4]。单细胞转录组对细胞活性要求较高, 细胞处理时间要尽可能短, 避免 mRNA 的降解。研究人员发现 scRNA-seq 可揭示新的免疫前体细胞, 如 CD4+ 细胞毒性 T 淋巴细胞前体细胞[5]。细胞亚群分类可鉴别细胞异质性, 找到差异表达基因。ScRNA-seq 可对组织中各种细胞类型及其相应的转录谱进行分析, 结合分层聚类等技术, 鉴别亚群中和亚群间差异表达或高表达的基因, 更好地理解细胞异质性。细胞异质性指来自同一细胞系或个体的细胞呈现出不同的基因组、转录组和表观基因组。ScRNA-seq 能够在单个实验中捕捉不同发育阶段的细胞, 通过观察各阶段基因表达变化, 揭示出驱动发育的关键基因, 阐明发育途径[6] [7]。ScRNA-seq 相比单细胞 DNA 测序更容易操作, 每个细胞都包含很多 RNA 分子, 但 DNA 分子拷贝数却极少[8]。在胚胎发育早期, 如原始生殖细胞时, 由于细胞数量很少, scRNA-seq 具有极大的优势。

目前, scRNA-seq 主要平台有: Drop-seq、InDrop、10 × Genomics、Smart-seq2、MARS-seq、CEL-seq 和 SPLIT-seq 等[9]。Drop-seq 是基于微滴的方法, 其优势为低成本, 快速文库准备, 有单细胞高通量分析及多组学分析的可能性, 但需要微流控平台, 单细胞基因的敏感性低。InDrops 方法则可捕获 60%~90% 的细胞, 适用于细胞数量少的样本。10×Genomics 由于其成本低、通量高的特点, 成为主流 scRNA-seq 技术之一[10]。Smart-seq2 是一种通过模板置换扩增单细胞全长转录本的方法, 可获取单个细胞 1 万多个基因表达, 该方法已广泛改良并用于多种 scRNA-seq 中[11]。CEL-seq 是一种采用线性扩增的测序方法, 采用体外转录法进行扩增, 其样本间的污染被大大降低, 但扩增和 PCR 都存在序列偏好, 有强烈的 3' 偏好[12]。SPLIT-seq 可对数十万个细胞直接捕获, 不需要将单个细胞用油滴包裹形成独立的单元后再捕获, 极大简化了步骤和节约了成本[13]。ScRNA-seq 主要包括几个步骤: 单细胞悬液的制备、细胞捕获及裂解、反转录、cDNA 扩增和测序文库的构建与数据分析。单细胞悬液中细胞状态与细胞内 RNA 的完整性直接决定单个细胞的有效捕获与研究结果真实性。目前, 分离单个细胞的主要方法有荧光激活细胞流式分选法、磁激活细胞分选法和激光捕获显微切割法和微流控技术等[14]。荧光激活细胞流式分选法能大量获得单个细胞, 技术较成熟, 是目前应用较广泛的方法, 但不利于分离数量较少的细胞种群[15]。激光捕获显微切割通过显微操作, 利用激光束熔化覆盖于组织切片上的热塑聚合物薄膜, 冷却后将细胞固定于膜上从而实现细胞分离, 是一种非接触技术, 但人为操控细胞的选取和分离严重限制了通量[16]。微流控技术在微尺水平上分选目的细胞, 芯片精密的几何学技术有效减少移液误差, 间接降低了微流控装置所需底物含量[17]。在数据分析中, 可根据特征基因的表达来确定细胞的类型和来源。ScRNA-seq 数据在进行分析前需要良好的质量控制, 应注意排除双细胞、红细胞污染、细胞碎片干扰等数据。根据测序获得的转录物长度, 可分为全长转录组测序技术, 3'或 5'-端转录组测序技术。一般进行常规基因表达分析时选择基因的 3'端测序, 而当进行免疫克隆相关研究时, 则应选择 5'端测序。ScRNA-seq 主要平台中 Smart-seq2 可获得全长的 mRNA 序列, 而 CEL-seq、MARS-seq、inDrop、Drop-seq 和 10 × Genomics 是将标签整合到 cDNA 中[18]。ScRNA-seq 数据分析获得多个细胞的基因表达谱, 可通过细胞多个基因的表达水平来进行细胞聚类。随着 scRNA-seq 技术的发展和不断完善, 它已广泛应用于胚胎发育、免疫细胞发育和人类疾病的治疗[19]。

3. scRNA-seq 在早期胚胎发育中的应用

早期胚胎发育是胚胎发育的关键阶段, 期间胚胎中基因的转录和表达活跃, 如基因组激活、细胞分化、表观遗传转换和 X 染色体失活等[20]。了解胚胎发育过程最直接的方法是测量每个细胞的基因转录组图谱, 并根据细胞的相互关系和空间位置构建一个整体的三维调控关系。目前, scRNA-seq 技术的应用, 不仅发现了胚胎发育早期的一些关键基因, 而且构建了器官发育的基因表达图谱, 阐明了各种细胞类型及在细胞分化过程中的相互关系。

哺乳动物早期胚胎发育是一个复杂的过程, 包括卵母细胞的成熟、受精和着床前胚胎发育一系列重要的发育阶段。2009年, scRNA-seq 首次应用于哺乳动物胚胎发育研究[21]。随后, Peng 等[22]对中期妊娠小鼠胚胎外胚层单个细胞进行转录组分析, 描述了小鼠胚胎发育早期的转录组特征和信号通路的调控网络。Cao 等[23]对小鼠胚胎 207211 个单细胞进行 scRNA-seq, 鉴定出 38 种细胞类型和 655 种细胞亚型, 揭示哺乳动物器官形成过程中各种细胞类型的发育过程。来自斑马鱼早期胚胎发育的 scRNAseq 研究结果发现并记录了每种细胞类型的初转录情况, 并识别细胞间差异表达的基因, 记录每个谱系的基因表达变化及每个细胞的特定标记基因[24]。Yan 等[25]利用 scRNA-seq 分析了人着床前胚胎和人胚胎干细胞中 124 个基因的表达状态, 成功检测到 22,687 个表达基因, 其中非编码 RNA 8701 个。Petropoulos 等[26]利用 scRNA-seq 系统阐明了人类胚胎着床前发育的转录组图谱。研究结果深入了解人类胚胎着床的复杂分子机制, 也为多能干细胞的体外诱导和定向分化提供了有价值的依据。另外, 在胚胎发育过程中, 细胞经过增殖分化, 形成各种器官并逐渐发育成完整的个体。近年来, scRNA-seq 被广泛应用于组织器官发育领域, 极大地促进了发育生物学的研究。Zhong 等[27]利用 scRNA-seq 分析了妊娠 8-26 周人类前额叶皮质发育过程中 2300 多个单细胞, 绘制了单细胞转录组图谱, 揭示了细胞的多样性和不同细胞类型之间的发育关系, 并进一步深入挖掘每种细胞类型的关键基因表达特点及其重要的生物学意义。Gao 等[28]利用 scRNA-seq 分析了妊娠 6~25 周人类胚胎消化道器官的 5227 个单细胞, 识别出 40 种细胞类型。这项研究系统地揭示了器官的基因表达特点和重要生物学特性, 包括发育过程、信号转导途径、细胞周期和营养物质消化吸收代谢等。因此, 研究胚胎发育过程中组织器官的发育调控机制, 有助于分析各种器官在整个胚胎发育过程中的重要功能。

4. scRNA-seq 与胚胎器官发育相关疾病

心脏是胚胎最早形成的功能器官之一, 其正常发育对维持机体生命至关重要。而先天性心脏病是由多种病因引起的, 了解其病因有助于临床治疗。Cui 等[29]利用 scRNA-seq 分析了妊娠 5~25 周 4000 个人心脏细胞的基因表达状态, 鉴定出 4 种主要细胞类型, 为阐明心脏发育机制提供了潜在的理论依据。Li 等[30]对小鼠胚胎心肌细胞 E8.5、E9.5 和 E10.5 的心脏区进行 scRNA-seq, 分析不同发育时间段心肌细胞的基因表达特征, 发现了小鼠胚胎发育过程中的细胞异质性与细胞亚群发生的明显变化。DeLaughter 等[31]对人干细胞诱导心肌和胚胎期小鼠心脏在不同分化时间点进行了 scRNA-seq, 对比了不同时间段内心房心室细胞、左心室和右心室细胞亚群的发育谱系, 并将人和鼠多能干细胞与鼠胚胎期的细胞群相对应, 验证了多能干细胞衍生心肌细胞的成熟度与培养时间成正相关。

肝脏是人体中代谢和免疫反应的主要器官, 也是早期胚胎发育的主要造血器官, 但人们对早期胚胎造血和免疫系统发育过程尚未完全了解。Zeng 等[32]选取胚胎胸腺的细胞进行 scRNA-seq, 研究结果对早期人 T 淋巴细胞的产生提供了依据。在胸腺形成过程中, Kernfeld 等[33]应用 scRNA-seq 绘制了胸腺细胞的基因表达图谱, 揭示了其细胞异质性, 将图谱与人全基因组研究数据和自身免疫性疾病相关基因结合起来, 发现胚胎胸腺驻留细胞与自身免疫病的发生有关。Segal 等[34]利用 scRNA-seq 技术, 探索人胎儿和成年肝脏的转录组, 在人胎儿肝脏中发现了肝胆双能祖细胞, 这为胚胎发育或肝脏受损修复过程中人肝实质组织细胞的来源提供了依据。

肾脏在维持人体酸碱平衡、调节水盐代谢、排泄代谢废物等方面发挥着重要作用, 而肾脏细胞的形态与功能存在较大异质性。临床研究表明, 胎儿肾发育不良和先天性肾脏病可直接影响胎儿的生存和生长发育。Brunskill 等[35]对小鼠早期肾脏进行 scRNA-seq 检测, 建立了肾脏发育中的细胞表达图谱。单细胞基因表达谱表明肾脏在发育过程中存在多谱系启动, 肾祖细胞表现出与多种潜在分化谱系相关基因的随机表达[36]。Menon 等[37]通过选取人正常的胚胎肾细胞群, 对 6414 个细胞进行了 scRNA-seq, 发

现了与肾脏发育相关的关键信号通路,为在单细胞水平上的人类肾脏发育研究提供了全面的基因表达谱。肾脏 scRNA-seq 研究使人们对于肾脏细胞的认知与分类从形态学逐渐发展到了分子水平。

卵巢是女性重要的生殖器官,卵巢衰老和女性生育能力下降的分子机制尚不清楚。Wang 等[38]通过 scRNA-seq 鉴定出 7 种具有不同基因表达特征的灵长类卵巢细胞,同时通过深入分析卵母细胞的基因表达动态,充分了解了动物卵巢细胞衰老的特异性机制,获得了与卵巢疾病相关的新的诊断标志物和潜在治疗靶点。

5. 展望

单细胞测序技术的更新和发展将提供给研究者更多维度更精准的研究角度,去系统、全面地揭示和解析细胞的功能。目前,在胚胎发育早期,由于细胞过少,不能很好的研究其特性;胚胎期细胞异质性明显;胚胎形成过程中控制细胞分化的机制尚不清楚。但随着 scRNA-seq 技术的发展,这些问题得到了深入研究,极大地促进了发育生物学的发展,其应用范围包括:1) 绘制细胞谱系;2) 揭示细胞异质性;3) 发现新的细胞类型和标记基因;4) 研究不同细胞的基因表达特征和发育分化机制。总之,从单细胞水平分析不同胚胎发育阶段重要组织器官中细胞的生物学特性,有助于分析细胞异质性和细胞在发育过程中的分化机制,进一步加深对胚胎发育的认知。此外,scRNA-seq 技术在胚胎发育领域的研究进展,为先天性心脏病、神经和免疫功能缺陷和先天性肾脏病等疾病的防治提供理论依据,具有重要的临床意义。

参考文献

- [1] Hedlund, E. and Deng, Q. (2018) Single-Cell RNA Sequencing: Technical Advancements and Biological Applications. *Molecular Aspects of Medicine*, **59**, 36-46. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.07.003>
- [2] Yasen, A., Aini, A., Wang, H., Li, W., Zhang, C., Ran, B., et al. (2020) Progress and Applications of Single-Cell Sequencing Techniques. *Infection, Genetics and Evolution*, **80**, Article ID: 104198. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104198>
- [3] Wang, Y. and Navin, N.E. (2015) Advances and Applications of Single-Cell Sequencing Technologies. *Molecular Cell*, **58**, 598-609. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.005>
- [4] Papalexi, E. and Satija, R. (2018) Single-Cell RNA Sequencing to Explore Immune Cell Heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*, **18**, 35-45. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.76>
- [5] Patil, V.S., Madrigal, A., Schmiedel, B.J., Clarke, J., O'Rourke, P., de Silva, A.D., et al. (2018) Precursors of Human CD4⁺ Cytotoxic T Lymphocytes Identified by Single-Cell Transcriptome Analysis. *Science Immunology*, **3**, eaan8664. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aan8664>
- [6] Haghverdi, L., Büttner, M., Wolf, F.A., Buettner, F. and Theis, F.J. (2016) Diffusion Pseudotime Robustly Reconstructs Lineage Branching. *Nature Methods*, **13**, 845-848. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3971>
- [7] Trapnell, C., Cacchiarelli, D., Grimsby, J., Pokharel, P., Li, S., Morse, M., et al. (2014) The Dynamics and Regulators of Cell Fate Decisions Are Revealed by Pseudotemporal Ordering of Single Cells. *Nature Biotechnology*, **32**, 381-386. <https://doi.org/10.1038/nbt.2859>
- [8] Qi, Z., Barrett, T., Parikh, A.S., Tirosh, I. and Puram, S.V. (2019) Single-Cell Sequencing and Its Applications in Head and Neck Cancer. *Oral Oncology*, **99**, Article ID: 104441. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.104441>
- [9] Stuart, T. and Satija, R. (2019) Integrative Single-Cell Analysis. *Nature Reviews Genetics*, **20**, 257-272. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0093-7>
- [10] 杨明鑫, 魏鸿擎, 谢静远. 单细胞转录组测序及其在肾脏疾病研究中的应用进展[J]. 诊断学理论与实践, 2019, 18(4): 475-478.
- [11] Picelli, S., Faridani, O.R., Björklund, A.K., Winberg, G., Sagasser, S. and Sandberg, R. (2014) Full-Length RNA-seq from Single Cells Using Smart-seq2. *Nature Protocols*, **9**, 171-181. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.006>
- [12] Hashimshony, T., Wagner, F., Sher, N. and Yanai, I. (2012) CEL-Seq: Single-Cell RNA-Seq by Multiplexed Linear Amplification. *Cell Reports*, **2**, 666-673. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.003>
- [13] Rosenberg, A.B. and Roco, C.M. (2018) Single-Cell Profiling of the Developing Mouse Brain and Spinal Cord with Split-Pool Barcoding. *Science*, **360**, 176-182. <https://doi.org/10.1126/science.aam8999>

- [14] Hwang, B., Lee, J.H. and Bang, D. (2018) Single-Cell RNA Sequencing Technologies and Bioinformatics Pipelines. *Experimental & Molecular Medicine*, **50**, 1-14. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0071-8>
- [15] 李彤, 徐家伟, 孙莹璞. 单细胞转录组测序在生殖发育领域应用进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2019, 38(3): 217-221.
- [16] Gross, A., Schoendube, J., Zimmermann, S., Steeb, M., Zengerle, R. and Koltay, P. (2015) Technologies for Single-Cell Isolation. *International Journal of Molecular Sciences*, **16**, 16897-16919. <https://doi.org/10.3390/ijms160816897>
- [17] Kim, S., De Jonghe, J., Kulesa, A.B., Feldman, D., Vatanen, T., Bhattacharyya, R.P., *et al.* (2017) High-Throughput Automated Microfluidic Sample Preparation for Accurate Microbial Genomics. *Nature Communications*, **8**, Article No. 13919. <https://doi.org/10.1038/ncomms13919>
- [18] See, P., Lum, J., Chen, J. and Ginhoux, F. (2018) A Single-Cell Sequencing Guide for Immunologists. *Front Immunol*, **9**, Article No. 2425. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02425>
- [19] Fu, Q., Liu, C.J., Zhai, Z.S., Zhang, X., Qin, T. and Zhang, H.W. (2018) Single-Cell Non-coding RNA in Embryonic Development. In: Gu, J. and Wang, X., Eds., *Single Cell Biomedicine*, Vol. 1068, Springer, Singapore, 19-32. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0502-3_3
- [20] Alizadeh, Z., Kageyama, S. and Aoki, F. (2005) Degradation of Maternal mRNA in Mouse Embryos: Selective Degradation of Specific mRNAs after Fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, **72**, 281-290. <https://doi.org/10.1002/mrd.20340>
- [21] Tang, F., Barbacioru, C., Wang, Y., Nordman, E., Lee, C., Xu, N., *et al.* (2009) mRNA-Seq Whole-Transcriptome Analysis of a Single Cell. *Nature Methods*, **6**, 377-382. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1315>
- [22] Peng, G., Suo, S., Chen, J., Chen, W., Chen, W., Yu, F., *et al.* (2016) Spatial Transcriptome for the Molecular Annotation of Lineage Fates and Cell Identity in Mid-Gastrula Mouse Embryo. *Developmental Cell*, **36**, 681-697. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.02.020>
- [23] Cao, J., Spielmann, M., Qiu, X., Huang, X., Ibrahim, D.M., Hill, A.J., *et al.* (2019) The Single-Cell Transcriptional Landscape of Mammalian Organogenesis. *Nature*, **566**, 496-502. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0969-x>
- [24] Briggs, J.A., Weinreb, C., Wagner, D.E., Peshkin, L., Kirschner, M.W. and Klein, A.M. (2018) The Dynamics of Gene Expression in Vertebrate Embryogenesis at Single-Cell Resolution. *Science*, **360**, eaar5780. <https://doi.org/10.1126/science.aar5780>
- [25] Yan, L., Yang, M., Guo, H., Yang, L., Wu, J., Li, R., *et al.* (2013) Single-Cell RNA-Seq Profiling of Human Preimplantation Embryos and Embryonic Stem Cells. *Nature Structural & Molecular Biology*, **20**, 1131-1139. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2660>
- [26] Petropoulos, S., Edsgård, D., Reinius, B., Deng, Q., Panula, S.P., Codeluppi, S., *et al.* (2016) Single-Cell RNA-seq Reveals Lineage and X Chromosome Dynamics in Human Preimplantation Embryos. *Cell*, **165**, 1012-1026. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.023>
- [27] Zhong, S., Zhang, S., Fan, X., Wu, Q., Yan, L., Dong, J., *et al.* (2018) A Single-Cell RNA-seq Survey of the Developmental Landscape of the Human Prefrontal Cortex. *Nature*, **555**, 524-528. <https://doi.org/10.1038/nature25980>
- [28] Gao, S., Yan, L., Wang, R., Li, J., Yong, J., Zhou, X., *et al.* (2018) Tracing the Temporal-Spatial Transcriptome Landscapes of the Human Fetal Digestive Tract Using Single-Cell RNA-Sequencing. *Nature Cell Biology*, **20**, 721-734. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0105-4>
- [29] Cui, Y., Zheng, Y., Liu, X., Yan, L., Fan, X., Yong, J., *et al.* (2019) Single-Cell Transcriptome Analysis Maps the Developmental Track of the Human Heart. *Cell Reports*, **26**, 1934-1950.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.079>
- [30] Li, G., Xu, A., Sim, S., Priest, J.R., Tian, X., Khan, T., *et al.* (2016) Transcriptomic Profiling Maps Anatomically Patterned Subpopulations among Single Embryonic Cardiac Cells. *Developmental Cell*, **39**, 491-507. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.10.014>
- [31] DeLaughter, D.M., Bick, A.G., Wakimoto, H., McKean, D., Gorham, J.M., Kathiriya, I.S., *et al.* (2016) Single-Cell Resolution of Temporal Gene Expression during Heart Development. *Developmental Cell*, **39**, 480-490. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.10.001>
- [32] Zeng, Y., Liu, C., Gong, Y., Bai, Z., Hou, S., He, J., *et al.* (2019) Single-Cell RNA Sequencing Resolves Spatiotemporal Development of Pre-Thymic Lymphoid Progenitors and Thymus Organogenesis in Human Embryos. *Immunity*, **51**, 930-948.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.09.008>
- [33] Kernfeld, E.M., Genga, R.M.J., Neherin, K., Magaletta, M.E., Xu, P. and Maehr, R. (2018) A Single-Cell Transcriptomic Atlas of Thymus Organogenesis Resolves Cell Types and Developmental Maturation. *Immunity*, **48**, 1258-1270.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.04.015>
- [34] Segal, J.M., Kent, D., Wesche, D.J., Ng, S.S., Serra, M., Oulès, B., *et al.* (2019) Single Cell Analysis of Human Foetal

-
- Liver Captures the Transcriptional Profile of Hepatobiliary Hybrid Progenitors. *Nature Communications*, **10**, Article No. 3350. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11266-x>
- [35] Brunskill, E.W., Park, J.S., Chung, E., Chen, F., Magella, B., Steven Potter, S. (2014) Single Cell Dissection of Early Kidney Development: Multilineage Priming. *Development*, **141**, 3093-3101. <https://doi.org/10.1242/dev.110601>
- [36] Magella, B., Adam, M., Potter, A.S., Venkatasubramanian, M., Chetal, K., Salomonis, N., *et al.* (2018) Cross-Platform Single Cell Analysis of Kidney Development Shows Stromal Cells Express Gdnf. *Developmental Biology*, **434**, 36-47. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.11.006>
- [37] Menon, R., Otto, E.A., Kokoruda, A., Zhou, J., Zhang, Z., Yoon, E., *et al.* (2018) Single-Cell Analysis of Progenitor Cell Dynamics and Lineage Specification in the Human Fetal Kidney. *Development*, **145**, dev164038. <https://doi.org/10.1242/dev.164038>
- [38] Wang, S., Zheng, Y., Li, J., Yu, Y., Zhang, W., Song, M., *et al.* (2020) Single-Cell Transcriptomic Atlas of Primate Ovarian Aging. *Cell*, **180**, 585-600.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.009>