一、检测项目：全外显子测序、10x Genomics单细胞5’转录组和免疫组库（TCR和BCR）测序+数据分析

二、技术要求：本项目采购服务均用于科学研究，完成 30例人PBMC样品深度全外显子测序、完成 125 例人PBMC样品10X Genomics单细胞5’转录组测序和免疫组库（TCR和BCR）测序，全外显子文库测序数据量不低于50 Gb Clean data（平均有效测序深度不低于500×），每个转录组文库测序数据量不低于100 Gb Clean data，免疫组文库TCR和BCR每个文库数据量不低于6Gb Clean data。

三、具体参数要求：

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **项目名称** | **参数要求** | | | **采购量（年）** |
| 全外显子测序、10x Genomics单细胞5’转录组和免疫组库（TCR和BCR）测序+数据分析 | 项目服务要求 | 1、供应商应针对本项目提出的具体的工作实施方案、技术方案、应急方案、售后服务方案。 | | 预计完成 30例人PBMC样品深度全外显子测序、完成 125 例人PBMC样品10X Genomics单细胞5’转录组测序和免疫组库（TCR和BCR）测序，以实际为准。 |
| 2、供应商应具有类似项目的实施经验。 | |
| 3、供应商应具有完善的质量管理体系。 | |
| 4、供应商应具备与检测分析相关的仪器设备和服务资质。 | |
| 5、供应商应组建具有相关经验的项目服务实施团队。 | |
| 技术服务要求 | 1、深度全外显子捕获和建库 | 基因组DNA提取质检合格后随机打断成150-200bp大小片段，使用SureSelect XT Target Enrichment System for Illumina Paired-End Multiplexed Sequencing Library(Agilent)进行外显子DNA捕获和文库构建。 |
| 2、单细胞悬液制备和上机标记、建库 | （1）细胞悬液制备：供应商提供上门制备细胞悬液的服务，根据临床取样实际情况，及时安排实验人员到场或安排定期入驻。 |
| （2）单细胞悬液质量要求：单细胞悬液细胞浓度≥800 个/ul，总量≥10万个，细胞活性＞85%，悬液背景干净、成团率和碎片率＜5%，镜检合格和计数满足再上机。 |
| （3）单细胞悬液上机标记：可以一次上机标记一个样本，使用10X Genomics Single Cell Chromium仪器标记，按细胞捕获不少于8000个细胞的要求进行上机标记。 |
| （4）cDNA扩增和质检：标记实验结束，确认样本形成均一乳浊液状态后进行PCR 反转录扩增，并对扩增的cDNA进行质检，通过不同质量等级评估样本后续建库的风险和分析数据的有效性。 |
| （5）建库：按照Chromium Single Cell 5′Library Construction Kit、Chromium Single Cell V(D)J Enrichment Kit（Human T Cell）、Chromium Single Cell V(D)J Enrichment Kit（Human B Cell）建库试剂盒进行建库，库检合格则安排上机测序。 |
| 3、上机测序 | （1）文库均使用Ilumina测序平台进行PE150上机测序； |
| （2）全外显子文库测序数据量不低于50 Gb Clean data（平均有效测序深度不低于500×），测序reads碱基质量值Q20≧90%；Q30≧80%； |
| （3）每个单细胞转录组文库测序数据量不低于100Gb Clean data，TCR和BCR免疫组文库数据量不低于6Gb Clean data，测序碱基Q30 质控不低于85%。 |
| （4）样本的细胞捕获数量过多（大于1.5万个）导致细胞的平均reads数低于30K的则需免费补测数据量。 |
| 4、深度全外显子测序数据分析 | （1）下机测序数据通过低质量数据过滤后使用比对软件  Burrows - Wheeler Aligner进行人的参考基因组比对，使用bedtools进行比对目标区域覆盖度统计，比对目标区域测序深度为1X以上的碱基覆盖率不低于99%，比对目标区域的平均有效测序深度不低于500×。 |
| （2）变异检测：使用软件GATK来寻找 SNP 和 Indel 位点，ANNOVAR 软件将检测到的SNP、Indel等基因组变异与外部数据库进行注释分析，包括人群数据库千人基因组计划、HAMAP、ESP6500、dbSNP、gnomAD等和疾病数据库Clinvar、OMIM、COSMIC等；变异有害性预测至少使用SIFT、Polyphen-2、MutationTaster、CADD、PROVEAN等5种以上方法进行分析，并对变异所在基因进行Gene Ontology、KEGG、Reactome数据库功能注释。通过突变类型属于框移突变或无义突变、人群频率小于0.01、至少有三个软件预测结果为有害和在Clinvar数据库收录为致病或可能致病等条件筛选潜在的候选低频有害突变位点信息。 |
| 5、单细胞数据分析 | （1）提供单细胞转录组的基本标准流程分析，包括cellranger质控、多胞细胞和低质量细胞过滤、Scanpy大样本细胞分群和细胞类型注释等，可结合文献和数据库针对项目进行细胞类型注释，可自配参考数据库，使用singleR等不同软件来辅助对细胞亚群进行细胞鉴定，并增加疾病相关数据库和生物学通路数据库注释，辅助对新的细胞亚群定义和功能判定； |
| （2）个性化分析1：单细胞免疫组库（TCR和BCR）利用10x Genomics 官方分析软件 Cell Ranger进行Clonotype分型鉴定，比较CDR3特征、V/J基因特征、V-J paired特征等，结合单细胞转录组的T细胞和B细胞的分群注释，比较不同淋巴细胞的克隆型特征变化如克隆频率、共享克隆、克隆演化关系等。 |
| （3）个性化分析2：进行500X深度WES测序，寻找目标体细胞变异位点，并根据选定位点，在单细胞测序数据中进行靶向分析和细胞谱绘制。根据全外显子测序得到的突变VCF文件作为比对参考，使用VarTrix软件对单细胞转录组中每个细胞的测序reads进行变异识别和鉴定，完成单细胞水平的变异位点分配，比较相同或不同类型的免疫细胞携带的变异位点差异对细胞基因转录表达的影响。 |
| （4）个性化分析3：基于测序组学的原始数据 所有定制化分析服务到文章发表 不限定数据分析次数 不限定文章发表篇数； |
| （5）提供功能全面的单细胞转录组在线报告系统和组学数据分析工具云平台，可供客户实时交互式在线分析和处理数据，包括细胞注释、亚群再分群、亚群间上调基因分析、目标细胞组间差异分析、拟时序分析、PAGA细胞分化分析、细胞通讯分析、SCENIC转录因子分析、细胞状态分析等数据处理和图表绘制； |
| （6）具备单细胞转录组和免疫组库、全外显子的多组学关联分析和个性化分析能力，基于项目的实验设计，协助客户完成个性化分析方案定制，定制化生物信息学分析一直服务到文章发表，不限定生物信息学分析次数和文章发表篇数。 |
| 6、其他要求 | （1）项目经验：供应商具有10x Genomics单细胞测序项目经验，发表过10x单细胞测序高影响因子文章，提供合作客户发表IF＞30的文献证明。提供前期实验和质控的指导，符合质量的测序数据，完善的流程分析结果，对项目提出的生物学问题，对方能以专业生物信息学的逻辑给出建议，共同讨论数据分析方案。针对文章审稿过程中生物信息学部分给出相应的答复。 |
| （2）供应商均具有相关测序和生物信息服务资质，提供实施本检测项目的实验室情况，包括地址、实验室设备配置等，满足本检测服务的实施要求。 |
| （3）质量控制：整体项目实验和标准数据分析按SOP文件进行样本质控、文库质控和数据质控，提供各步骤质控报告，质控和分析结果沟通24小时实时响应。 |
| （4）售后服务：基于本项目实际需求，组建售后服务团队，免费提供相关的技术咨询及售后服务包括上门解决生信分析问题和需求、提供必要的测序数据的解读和相关培训等。为本项目课题组成员提供不少于10个名额的生物信息学培训服务，提供配套的培训视频课程及出版的生物信息学书籍。 |
| （5）数据储存和交付：供应商确保交付符合规定的测序数据量和所有分析数据，保证所提供的资料和数据真实可靠。在项目结束后（即数据交付后）存储时间不少于1年，采用移动硬盘或云盘进行数据传输。 |