



· 综述 ·

## 单细胞 RNA 测序技术在水产养殖动物上的应用

于红<sup>1,2</sup>, 林茜<sup>1</sup>, 李琪<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国海洋大学, 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266237)

**摘要:** 单细胞 RNA 测序技术是生命科学领域中的革命性技术, 为动植物的细胞异质性图谱构建、细胞谱系追踪、免疫响应机制解析等研究提供了强有力的工具。近年来, 单细胞 RNA 测序技术在水产养殖动物中也得到了广泛应用。本文就单细胞 RNA 测序技术的发展、原理及其在水产养殖动物研究中的应用进行综述, 并对其目前存在的问题及未来发展趋势进行分析与展望, 以期推动该技术在水产养殖动物研究中更广泛的应用, 加速水产养殖动物单细胞水平生命活动的调控机制研究进程。

**关键词:** 水产养殖动物; 单细胞 RNA 测序; 细胞异质性; 细胞谱系

**中图分类号:** S 917.4

**文献标志码:** A

单细胞 RNA 测序 (single cell RNA sequencing, scRNA-seq) 是对单个细胞内 RNA 进行高通量测序的一种技术。自 2009 年问世以来<sup>[1]</sup>, 该技术不断更新迭代, 已被证明是生命科学领域中的革命性技术, 广泛应用于发育生物学、神经生物学、免疫学、微生物学等研究领域<sup>[2-5]</sup>, 并在药物研发、疾病治疗等方向展现出广阔的应用前景<sup>[6]</sup>, 成为揭示单个细胞内 RNA 转录本的异质性和复杂性, 挖掘生物体不同细胞类型及其功能的有效技术手段。目前, 单细胞 RNA 测序技术已向多维度、空间化方向发展, 成为研究复杂生命现象的利器。

近年来, 随着测序成本的不断降低, 测序技术的稳定性不断提高, scRNA-seq 技术的应用迅速扩展到非模式物种的研究中, 包括农作物、畜禽、水产动物等, 为非模式物种的细胞异质性和功能研究带来了变革性的进展<sup>[7-9]</sup>。近几年, scRNA-seq 技术在水产动物中的应用日益广泛,

并取得众多成果, 人们对水产动物的认知也逐步转移到了细胞水平。本文就 scRNA-seq 技术在水产养殖动物中的应用及相关研究成果进行简要综述, 探讨 scRNA-seq 在水产动物应用中的难点及潜在应用前景, 以期在水产养殖动物细胞功能解析等研究提供依据。

### 1 单细胞 RNA 测序技术概况

#### 1.1 单细胞 RNA 技术的发展

单细胞转录组学是基于高通量测序原理测定基因表达的组学技术。Eberwine 等<sup>[10]</sup>第一次使用体内反转录和体外转录的方法对单个细胞的单个基因的表达进行测定, 为后续微阵列全转录组分析技术的开发与应用奠定了基础<sup>[11]</sup>, 促进了单细胞测序技术的出现。单细胞测序技术出现于 2009 年, Tang 等<sup>[1]</sup>将高通量 DNA 测序与微阵列

收稿日期: 2023-12-15 修回日期: 2024-03-16

资助项目: 国家自然科学基金 (42276111); 山东省自然科学基金 (ZR2022MC171)

第一作者: 于红 (照片), 从事海洋贝类遗传育种研究, E-mail: hongyu@ouc.edu.cn

通信作者: 李琪, 从事海洋贝类遗传育种研究, E-mail: qili66@ouc.edu.cn



全转录组分析技术结合, 通过单细胞 RNA 测序生成第一个单细胞转录组。随后单细胞 RNA 测序技术取得了飞速发展, 近年来相继出现 Smart-seq、MARS-seq (massively parallel single-cell RNA sequencing)、Drop-seq (droplet microfluidics-based platform)、10×Chromium 等高通量单细胞转录组测序技术, 为构建单细胞基因表达图谱提供了重要的技术支持<sup>[7, 12]</sup>。

随着技术的不断成熟, 单细胞 RNA 测序技术逐步走向商业化<sup>[13]</sup>, 测序成本不断下降, 测序深度和细胞分辨率逐渐提升。10×Genomics、BD Biosciences、Illumina 等公司相继推出了单细胞测序平台。其中 10×Genomics 的应用最为广泛。该平台开发的 10×Chromium 具有较高的一致性和灵敏度<sup>[14]</sup>, 具有细胞捕获高效、测序周期短、成本低且操作简便等优点<sup>[10-11]</sup>。该技术利用分选、扩增、建库接合一体的方式加强自动化水平从而使操作更为便捷, “双十字”的通道可一次性捕捉 500~80 000 个细胞, 相比于其他平台 30% 左右甚至 3% 的细胞捕获率, 该技术中油包水的微液滴体系单细胞捕获率可达 65%<sup>[12, 15]</sup>。

## 1.2 单细胞 RNA 测序的步骤

**样品制备和测序文库构建** 样品制备是单细胞 RNA 测序技术中至关重要的步骤, 细胞悬液的制备质量直接影响后续测序效果<sup>[16]</sup>。单细胞 RNA 测序根据样品制备方法的不同可以分为两种: 单细胞 RNA 测序 (scRNA-seq) 和单细胞核 RNA 测序 (single nuclei RNA sequencing, snRNA-seq)。scRNA-seq 需要将目标组织解离为单细胞悬液, 对细胞的存活率有较高的要求, 一般用于新鲜组织样本的制备。snRNA-seq 是对目标组织进行细胞核抽提<sup>[17]</sup>, 对细胞核的完整性有较高的要求, 一般用于冷冻组织样本的制备。这两种样品制备方法各有优劣, scRNA-seq 仅适用于新鲜组织样本, 且不适用于含大细胞 (直径大于 40  $\mu\text{m}$ ) 的样本类型, 此外在解离过程中会诱导应激基因的表达。snRNA-seq 冷冻样本可以弥补细胞解离时激活基因表达的问题<sup>[18]</sup>, 适用样本类型丰富, 但是无法捕捉细胞质中的 mRNA。有研究对 scRNA-seq 和 snRNA-seq 结果进行比较评估<sup>[18-19]</sup>, 证实二者虽然在核内小部分基因之间具有差异性<sup>[20]</sup>, 但是在读数的结构与排列, 多重态的灵敏度以及测序范围等方面保持较高的一致性, 因此可以根据

研究对象组织特点选择合适的样本制备方法<sup>[21]</sup>。

样品制备后的细胞分选分为非特异性分选和特异性分选。非特异性分选是随机将样本中的细胞捕获进行直接测序, 例如微流控技术<sup>[22]</sup>利用微米级的微管道来实现精准分选细胞; 特异性分选是将样本中特定的细胞挑选出来再测序, 如流式细胞术通过检测细胞的特异性荧光信息达到分选细胞的目的<sup>[23]</sup>。相较于特异性分选所需特异性标记具有局限性、测序通量较低且干扰信号较多等问题, 非特异性的细胞捕获方法应用更为广泛<sup>[24]</sup>。

10×Genomics 测序技术中, 利用微流控、油包水和 barcode 标记等非特异性分选技术, 实现高通量的单细胞分离和捕获 (图 1)。文库的构建利用微流体装置生成液滴, 带有条形码的微珠和细胞一起包裹进液滴, 形成油包水结构 (GEM)。GEMs 形成后进行反转录反应, 每个细胞的 cDNA 文库都带有自己独特的分子标识 (unique molecular identifier, UMI)。然后将所有细胞的 cDNA 文库混合构建测序文库, 上机测序<sup>[25]</sup>。

**数据分析** 高通量测序后产生大量短读序列, 质量控制和过滤后将原始数据中相同 barcode 的片段进行聚类, 将有效序列片段映射到参考基因组, 进而确定每个基因的表达水平, 获得每个细胞的基因表达矩阵。再根据基因数、mRNA 分子数、线粒体基因占比等参数进行质控, 去除质量差的细胞进行标准化和归一化, 便于下游的分析 (图 1)。数据分析中一般采用降维聚类图将基因表达相似的细胞聚集在一起, 进行细胞分群, 利用 maker 基因对细胞群进行类型鉴定, 并进行后续的拟时序分析、细胞通讯分析、细胞周期分析等。

## 2 单细胞 RNA 测序技术在水产养殖动物上的应用

该应用主要集中在鱼类、甲壳类和贝类 (表 1), 所用组织包括头肾、淋巴、肝胰脏、鳃、性腺组织以及血液、胚胎等。较多的研究聚焦于细胞图谱的绘制、描述图谱特征、解析前人未曾研究或未知的细胞图谱。随着分析策略的不断开发, 研究者借助拟时序分析、细胞通讯分析等方法, 使得解析组织、胚胎分化发育过程也成为水产动物单细胞研究的方向之一。另外, 单细胞 RNA 测序技术也应用于水产动物的免疫机制和环境响应机制研究中, 凭借着单细胞分辨率, 单细胞 RNA 测序

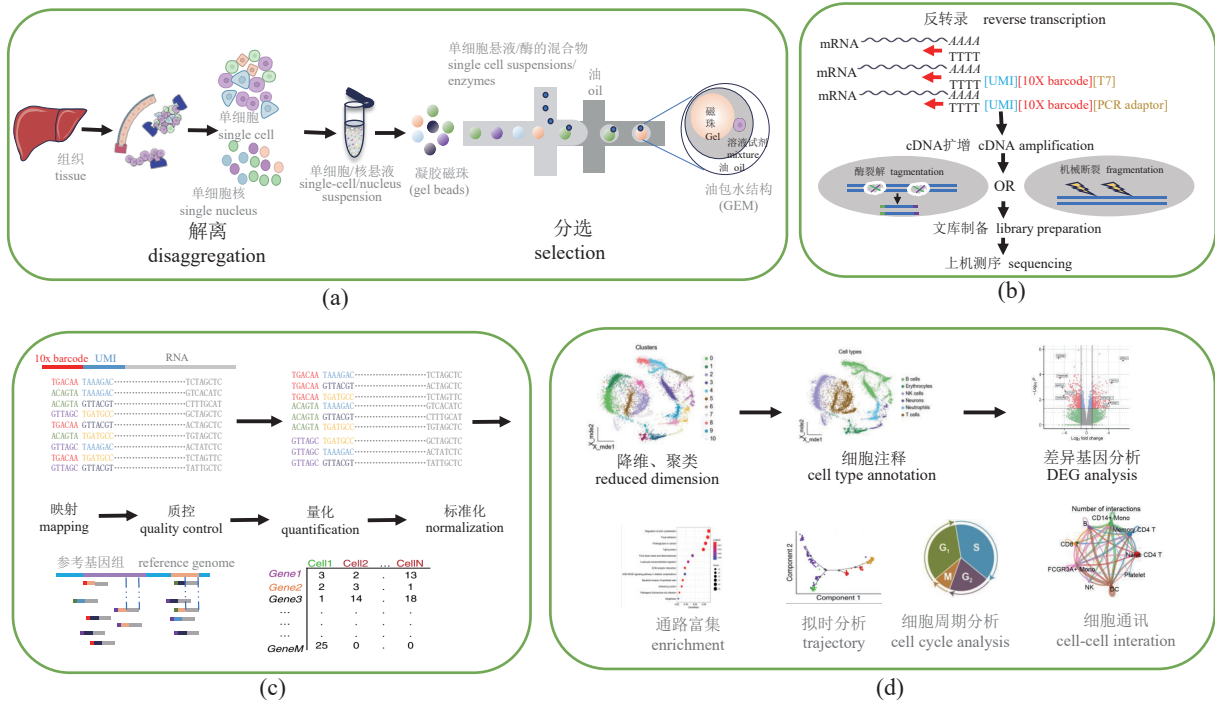


图 1 单细胞 RNA 测序流程图<sup>[25]</sup>

(a) 样品制备, (b) 文库构建, (c) 数据处理, (d) 数据分析。

Fig. 1 Schematic diagram of single cell RNA sequencing<sup>[25]</sup>

(a) sample preparation, (b) library construction, (c) data processing, (d) data analysis.

表 1 单细胞 RNA 测序技术在水产养殖动物上应用

Tab. 1 Applications of single-cell RNA sequencing in aquaculture animals

动物分类 animal classification	物种 species	组织 organization	研究方法/平台 approach/platform	研究方向 research direction	参考文献 references
脊椎动物 Vertebrata	尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	头肾	scRNA-seq; 10× platform	免疫细胞图谱	[26]
	尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	前肾	scRNA-seq; 10× platform	病毒感染后的免疫细胞图谱	[27]
	半滑舌鲷 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	精巢	scRNA-seq; DNBelab C4	雄性和伪雄性精巢细胞图谱	[28]
	半滑舌鲷 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	卵巢	scRNA-seq; DNBelab C4	卵巢细胞图谱	[29]
	斜带石斑鱼 <i>Epinephelus coioides</i>	脑	scRNA-seq; 10× platform	感染神经坏死病毒的中脑细胞图谱	[30]
	斜带石斑鱼 <i>Epinephelus coioides</i>	精巢	scRNA-seq; 10× platform	成体精巢细胞图谱	[31]
	大菱鲆 <i>Scophthalmus maximus</i>	鳃、后肠、肝、脾、头肾	scRNA-seq; 10× platform	免疫细胞图谱	[32]
	大菱鲆 <i>Scophthalmus maximus</i>	头肾、脾脏、鳃、后肠	scRNA-seq; 10× platform	免疫细胞图谱	[33]
	大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	鳃	snRNA-seq; 10× platform	鳃细胞图谱	[34]
	大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	肝脏	snRNA-seq; 10× platform	宿主对细菌感染反应的肝细胞图谱	[35]
	大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	头肾	scRNA-seq; 10× platform	病毒感染后的免疫细胞图谱	[36]
	大西洋鲑 <i>Gadus morhua</i>	淋巴细胞	scRNA-seq; Drop-seq	淋巴细胞图谱	[37]
	海龟、红耳龟、红腿象龟和中华鳖 <i>Chelonia mydas, Trachemys scripta elegans, Chelonoidis carbonaria and Pelodiscus sinensis</i>	免疫细胞	scRNA-seq; 10× platform	免疫细胞图谱	[38]
	虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	血细胞	scRNA-seq; 10× platform	B细胞抗体基因多样性分析	[39]
	虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	血液B细胞	scRNA-seq; 10× platform	不同类型 B细胞异质性图谱	[40]
	黄鳝 <i>Monopterus albus</i>	性腺	scRNA-seq; 10× platform	卵精巢的单细胞发育图谱	[41]

动物分类 animal classification	物种 species	组织 organization	研究方法/平台 approach/platform	研究方向 research direction	参考文献 references
脊椎动物 Vertebrata	牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	头肾	scRNA-seq; 10× platform	细菌感染后头肾细胞图谱	[42]
	非洲肺鱼 <i>Protopterus annectens</i>	肺、鳃	scRNA-seq; DNBelab C和10× platform	肺、鳃细胞图谱	[43]
尾索动物 Urochorda	亚洲鲈鱼 <i>Lates calcarifer</i>	卵巢	scRNA-seq; Drop-seq	卵巢细胞图谱	[44]
	玻璃海鞘 <i>Ciona intestinalis</i>	精巢细胞	scRNA-seq; DNBelab C4	精巢图谱	[45]
	玻璃海鞘 <i>Ciona intestinalis</i>	胚胎	scRNA-seq; 10× platform	胚胎发育谱系图	[46]
	萨氏海鞘 <i>Ciona savignyi</i>	胚胎	scRNA-seq; Smart-seq2	胚胎发育谱系图	[47]
棘皮动物 Echinodermata	海星 <i>Patiria miniata</i>	胚胎	scRNA-seq; Drop-seq	胚胎发育谱系图	[48]
	紫海胆 <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	胚胎	scRNA-seq; Drop-seq	胚胎细胞异质性响应	[49]
	紫海胆 <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	胚胎	scRNA-seq; 10× platform	胚胎发育谱系图	[50]
节肢动物 Arthropoda	紫海胆 <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	幼虫	scRNA-seq; 10× platform	幼虫细胞图谱	[51]
	脊尾白虾 <i>Exopalaemon carinicauda</i>	鳃组织	scRNA-seq; 10× platform	鳃细胞图谱及异质性响应	[52]
	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	肝胰腺	scRNA-seq; 10× platform	低温胁迫下肝胰腺细胞图谱	[53]
	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	血淋巴	scRNA-seq; 10× platform	血淋巴细胞图谱	[54]
	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	血淋巴	scRNA-seq; 10× platform	亚硝酸盐暴露下血淋巴细胞图谱	[55]
	日本囊对虾 <i>Marsupenaeus japonicus</i>	血淋巴	scRNA-seq; Drop-seq	血淋巴细胞图谱	[56]
	斑节对虾 <i>Penaeus monodon</i>	胰腺细胞和血淋巴	scRNA-seq; 10× platform	氨氮胁迫下肝胰腺、血细胞图谱	[57]
软体动物 Mollusca	香港牡蛎 <i>Crassostrea hongkongensis</i>	血淋巴	scRNA-seq; 10× platform	铜暴露下血细胞图谱	[58]
	香港牡蛎 <i>Crassostrea hongkongensis</i>	血淋巴	scRNA-seq; 10× platform	血细胞图谱	[59]
	虾夷扇贝 <i>Patinopecten yessoensis</i>	闭壳肌细胞	scRNA-seq; 10× platform	闭壳肌细胞图谱	[9]
腔肠动物 Coelenterata	半球美螅水母 <i>Clytia hemisphaerica</i>	水螅水母中间态	scRNA-seq; 10× platform	整个生物体细胞图谱	[60]

技术具有精准揭示响应病毒感染或环境胁迫的主要细胞类型及其分子机制的绝对优势。

## 2.1 鱼类

单细胞转录组测序技术在鱼类中的应用主要集中在经济物种尼罗罗非鱼、半滑舌鳎和大西洋鲑, 研究方向包括免疫机制和生殖发育调控等<sup>[26-29, 34-36]</sup>。

在免疫机制研究方面, Niu 等<sup>[26]</sup>首次利用 scRNA-seq 绘制了尼罗罗非鱼头肾的免疫细胞转录组图谱, 鉴定出 B 细胞、T 细胞、非特异性细胞毒性细胞 (NCC) 和单核/巨噬细胞 (Mo/MΦ) 4 种细胞类型, 并根据细胞异质性和基因表达特性将 NCC 进一步划分为 4 个亚群, 这是硬骨鱼中 NCC 细胞第一次完整描述, 为未来研究鱼类 NCC 的分化及其在低等脊椎动物免疫系统中的功能研究提供了重要信息。该研究还发现 *hvcn1* 基因作为转录因子在 NCC 自发性的细胞异质性中的驱动作用。Wu 等<sup>[27]</sup>利用 scRNA-seq 对尼罗罗非鱼头肾白细胞进行分析, 共鉴定出 5 种免疫细胞群 (B 细胞、T 细胞、粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞), 其中 T 细胞检测到 4 种亚型, 该亚群的多样性为人们探究鱼类 T 细胞及免疫细胞的成熟和分化提供了新线索。Wang 等<sup>[30]</sup>利用 scRNA-seq 绘制了斜

带石斑鱼脑组织的细胞图谱, 得到 5 种细胞类型: 神经细胞、少突胶质细胞、星形胶质细胞、免疫细胞和内皮细胞, RGNNV 病毒感染后, 免疫细胞中的巨噬细胞数量明显增加且大多数促炎因子基因表达发生显著变化, 神经细胞中 *GLU1* 和 *GLU3* 细胞数量减少最多, 被证实是 RGNNV 病毒的易感细胞。该研究利用 scRNA-seq 技术成功破译了宿主的病毒易感细胞和免疫反应机制, 为解析鱼类病原宿主互作反应研究提供了新思路。

在动物的繁殖和配子发生机制方面, Liu 等<sup>[29]</sup>利用 scRNA-seq 构建了半滑舌鳎卵巢的单细胞转录组图谱, 鉴定出 3 种不同发育状态的生殖细胞及 5 种体细胞, 细胞通讯分析结果显示, 半滑舌鳎与哺乳动物卵子发生相似, 其生殖细胞与颗粒细胞间存在双向作用, 与膜细胞间仅存在单向作用。单细胞转录组分析结果显示, 半滑舌鳎与食蟹猴 (*Macaca fascicularis*) 卵子发生进化的生物过程非常保守。此外, 研究者利用单细胞测序技术解析了半滑舌鳎雄鱼和伪雄性精子发生的调控机制<sup>[28]</sup>, 鉴定出 5 种生殖细胞和 6 种体细胞, 发现伪雄鱼精原细胞中  $Ca^{2+}$  信号通路相关基因表达降低, *CaSR* 基因和 *MAPK* 信号因子表达上调, 精母细胞中减数分裂启动不足, 为探索鱼类精子发生机制和脊椎动物生殖系统进化提供了重要线索。

## 2.2 甲壳类

虾蟹类是重要的水产养殖经济品种, 虾类是水生甲壳动物中单细胞测序应用最多的类群, 包括凡纳滨对虾、斑节对虾、日本囊对虾等, 主要涉及环境胁迫应答机制和免疫调控机制等。先天免疫系统是无脊椎动物的唯一防御系统, 无脊椎动物的先天免疫系统一直是研究者关注的重点, 但无脊椎动物先天免疫细胞的多样性和功能在很大程度上是未知的<sup>[52]</sup>, 单细胞测序技术的出现促进了无脊椎动物免疫系统功能研究, 近3年研究者利用单细胞转录组测序技术对虾类的免疫系统进行了深入研究, 通过绘制虾类的淋巴、血细胞在不同机制下细胞表达图谱, 筛选出潜在的标记基因, 揭示了虾类免疫防御系统的组成和功能。

在日本囊对虾中, Koiwai等<sup>[56]</sup>根据单细胞转录谱结果鉴定出6种血细胞类型, 将日本囊对虾血细胞进行了统一分类, 并推测了参与血细胞成熟的分化途径和发挥关键作用的细胞生长因子。Yang等<sup>[54]</sup>借助scRNA-seq确定了凡纳滨对虾血淋巴中3种主要免疫细胞: 原血细胞、单核血细胞和粒细胞, 定义了一种新的巨噬细胞样亚群(单核细胞血细胞2, MH2), 该细胞群能够吞噬入侵的副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*), 与哺乳动物巨噬细胞标记基因存在一致性, 说明该细胞类群可能是哺乳动物巨噬细胞的祖先细胞。这也提示研究者, 一些高度保守的哺乳动物的细胞标记基因可以用于无脊椎动物的细胞类型鉴定。此外, 该研究还结合分子细胞生物学验证, 建立了凡纳滨对虾血细胞新的分型方法, 解决了长期以来困扰凡纳滨对虾不同分类血细胞功能不清、细胞亚群界限模糊等问题。

环境胁迫会对虾类的免疫系统造成影响, 血细胞在环境胁迫下会发生相应的应答反应, 以适应不断变化的环境<sup>[61]</sup>。研究者利用scRNA-seq绘制了凡纳滨对虾的血细胞图谱, 发现半颗粒细胞和颗粒细胞是凡纳滨对虾在亚硝酸盐胁迫下异质性反应的主要细胞类型<sup>[51]</sup>。Li等<sup>[57]</sup>构建了斑节对虾肝胰腺和血细胞的单细胞转录图谱, 鉴定出7个细胞类群, 在氨胁迫下, 对虾的抗氧化系统和proPO系统被激活, AMPs、proPO、GST等重要应答基因不仅可以作为对虾细胞群的标记基因, 也在对虾细胞分化和功能可塑性中发挥着重要作用。此外, 研究发现凡纳滨对虾在低温胁迫下,

肝胰腺细胞中两种细胞类群分别参与信号转导、感觉器官发育和代谢过程, 为凡纳滨对虾抗寒性的分子机制研究提供了重要线索<sup>[51]</sup>。

## 2.3 贝类

为了探究贝类肌肉组织的细胞组成及其特征, Sun等<sup>[9]</sup>对虾夷扇贝闭壳肌的横纹肌和平滑肌分别进行了单细胞转录组测序, 鉴定出四大类细胞类型(间充质干细胞、神经元细胞、肌肉细胞和淋巴细胞)共20个细胞亚群, 结合BrdU-PCNA双免疫荧光检测、神经元特异性染色和电镜超微结构观察, 查明了扇贝横纹肌中间充质干细胞和神经元的空间分布特征。研究结果不仅揭示了扇贝闭壳肌组织高度的细胞异质性, 而且为贝类肌肉和神经细胞发生和功能研究提供了重要信息。研究者利用scRNA-seq技术对香港牡蛎血细胞进行分析, 共鉴定出13个细胞亚群, 分为3种主要类型: 透明细胞、半颗粒细胞和粒细胞, 通过各细胞簇的基因表达分析, 推断粒细胞主要参与免疫应答和自噬过程<sup>[59]</sup>。随后, 研究者利用单细胞转录组测序分析香港牡蛎在铜胁迫下血细胞的异质性反应, 证实粒细胞是最主要的铜胁迫响应细胞, 粒细胞负责铜积累, 并将其转运到其他部位<sup>[58]</sup>, 这为香港牡蛎铜胁迫响应机制研究提供了重要信息, 也为单细胞水平的铜污染物检测提供了标志物信息。

## 2.4 棘皮动物

棘皮动物中, scRNA-seq主要应用于海胆和海星的胚胎分化发育研究, 借助拟时分析重构细胞谱系, 解析胚胎分化发育过程。研究者鉴定了紫海胆胚胎发育过程中的细胞类型, 并利用DAPT和C59抑制剂发掘出影响胚胎发育的重要信号通路: Wnt和Delta/Notch通路<sup>[49]</sup>。随后, 又阐明了海胆从8细胞期至原肠胚晚期的细胞类型及表达变化, 提出了Veg2谱系的细胞会代替原始生殖细胞(primordial germ cells, PGC)转化为生殖细胞谱系的假设<sup>[50]</sup>。此外, Foster等<sup>[48]</sup>分析了海星8细胞期至原肠胚6个不同胚胎发育时期的单细胞转录组, 共鉴定出20种细胞状态, 对比紫海胆桑椹期和原肠胚中期的细胞状态, 揭示了胚泡孔周围的细胞经历快速的细胞状态变化, 为海洋生物发育调控机制的深入研究提供了数据支持。

## 2.5 其他水产动物(海鞘、水母)

除了上述水产动物类群之外, 单细胞RNA

测序技术还应用于海鞘和水母的研究中, 揭示其细胞类群以及胚胎分化发育调控机制等。Li 等<sup>[45]</sup>对玻璃海鞘精巢的生殖细胞进行了单细胞 RNA 测序, 鉴定了 6 个不同状态的精原细胞群体, 揭示了精子发生过程中的动态基因表达和转录调控, 获得 4 种精母细胞亚型和玻璃海鞘减数分裂的关键基因。Zhang 等<sup>[47]</sup>利用 scRNA-seq 构建了萨式海鞘从受精卵到原肠胚的单细胞转录组图谱, 共鉴定出 47 种细胞类型, 通过细胞谱系分析, 追踪各细胞类群的发生时间。该研究为脊索动物胚胎发育和细胞谱系分化研究奠定重要基础。

## 2.6 水产动物细胞 marker 基因的研究现状

在单细胞转录组测序中, 利用 marker 基因对测序获得的细胞群进行类型鉴定, 是数据分析中最核心的环节。如何找到合适的 marker 基因成为单细胞测序分析中的关键问题。人和小鼠的细胞 marker 基因信息是目前动物中最多的, 其中 Cell-Marker 数据库就收录了人和小鼠 656 种组织、2 578 种细胞类型、26 915 个细胞 marker 基因<sup>[62]</sup>。与人和小鼠相比, 水产动物的细胞 marker 基因还十分有限, 尤其是甲壳类和贝类等目前研究瓶颈较多、功能研究尚比较欠缺的物种。除了综合数据库 ZFIN (the zebrafish information network) 之外, Zebrahub 和 FishSCT 数据库是斑马鱼的两个重要单细胞转录组数据库, 其中归纳了斑马鱼多种细胞类型的 marker 基因及潜在的 marker 基因, 为研究者提供了开放全面的信息资源<sup>[63-64]</sup>。其中 FishSCT 是中国科学院大学建立的以斑马鱼为中心的鱼类单细胞转录组数据库, 整理了 8 种鱼类 59 种细胞类型的 116 个 marker 基因和 13 165 个潜在 marker 基因以及大量的单细胞表达谱数据。这些数据库不仅给斑马鱼的单细胞转录组研究提供了重要基础信息, 也为其他水产动物提供了重要参考信息。目前绝大部分的水产动物都缺乏各自物种的细胞 marker 基因数据库或单细胞转录组数据库, 已知的细胞 marker 基因很少, 主要是一些高度保守的 marker 基因。例如生殖细胞的 marker 基因 *vasa*、*nanos*、*dead*、*end* 等<sup>[65-68]</sup>, 免疫细胞 marker 基因 *DLT15*、*WCL38*、*CD8* 等<sup>[69]</sup>。因此, 许多水产动物单细胞转录组数据分析时, 常采用脊椎动物的细胞 marker 基因进行细胞类型辅助分析, 对于一些同源性比较高的 marker 基因, 研究者可结合普通转录组数据或者荧光定量 PCR、原位杂交等技术进行 marker 基因验证, 再进行细胞

类型鉴定。目前这种方法对于一些相对保守细胞类型 (如 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞等) 的鉴定还是十分有效的, 但对一些近期进化的细胞类型鉴定效率较低。

## 3 前景展望

单细胞转录组测序技术的出现为水产动物的细胞异质性图谱构建、细胞谱系追踪、免疫响应机制等研究提供了强有力的工具, 但目前应用的物种类群还相对较少, 尤其在海洋无脊椎动物 (如虾蟹类、贝类等) 中的应用还十分有限。目前海洋动物的单细胞测序技术应用仍然面临着一些问题和挑战<sup>[70]</sup>, 主要的限制因素有: ①细胞和分子基础研究较少, 细胞标记基因的匮乏增加了细胞类群注释的难度<sup>[71]</sup>。对于海洋无脊椎非模式物种, 由于自身物种的限制, 细胞和分子基础实验难以开展, 细胞标记基因的获得主要通过脊椎动物的标记基因进行同源性比较、qPCR 或原位杂交验证。②海洋动物种类繁多, 但参考基因组相对较少且已发表的基因组质量参差不齐。另外, 有的物种基因组 (如甲壳类) 的简单序列重复比例较高, 使得单细胞测序的短 reads 映射基因组不准确。针对这些情况, 目前常用的解决方法是利用三代全长转录组测序技术构建目标物种的参考转录本信息, 在此基础上进行单细胞转录组分析。③高质量单细胞悬液或核悬液的制备方法仍需要大量的实验积累。淡水动物的单细胞制备与哺乳动物类似, 而海洋动物由于生存环境特殊, 细胞渗透压与哺乳动物差异很大, 无法参照哺乳动物的方法进行单细胞悬液制备, 且海水中钙镁离子的浓度也会影响逆转录酶的活性, 因此单细胞悬液的制备难度较大, 需要兼顾细胞活性、渗透压稳定、酶的活性等多方面因素。对于海洋动物而言, 核悬液制备可能更容易。

近几年, 随着单细胞测序技术的不断进步, 单细胞分析也迈入了多组学时代, 通过整合单细胞转录组学、空间组学、表观基因组学、代谢组学等多尺度数据, 多层次、多角度精准解析细胞的异质性, 有助于全面描绘细胞的遗传景观, 并实现细胞的空间分辨<sup>[72]</sup>。目前单细胞多组学分析已经在高等动物中有所应用, 例如研究者使用 scRNA-seq、单细胞空间代谢组学和免疫荧光结合的方法, 解析人肾脏分化中的代谢细胞命运轨

迹<sup>[73]</sup>。scRNA-seq 结合蛋白组学表征 30 种细胞类型的状态和变化, 绘制小鼠肺细胞图谱<sup>[74]</sup>。利用单细胞 ATAC+单细胞转录组+bulk RNA-seq+GWAS 解析了人类慢性肾病的发生发展机制, 鉴定出细

胞类型依赖的 eQTL, 挖掘出肾功能和高血压调控关键基因<sup>[75]</sup>。单细胞测序技术不断取得突破, 利用单细胞多组学技术从更多维度探索生命过程, 为生命科学研究带来一场新的变革。(图 2)。

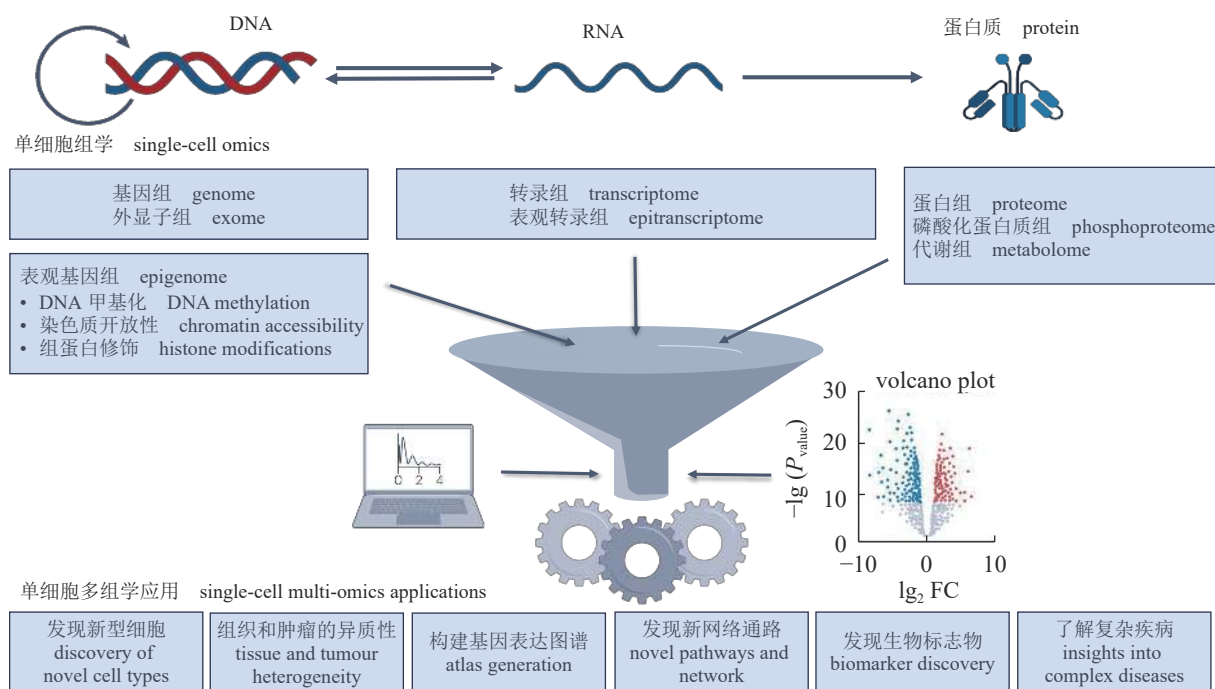


图 2 从单细胞组学到多组学及其应用<sup>[72]</sup>

Fig. 2 From single omics to multi-omics and their broad applications<sup>[72]</sup>

单细胞测序技术的迅猛发展为水产动物从单个细胞水平解析生命活动的调控机制提供了新的契机。未来研究中单细胞测序技术将在水产动物的组织细胞异质性、重要经济性状解析、特定细胞类型的物种进化、细胞分化与发育等研究领域发挥更大的作用。随着测序技术的改进和革新, 一些高效、低成本、适于水产动物尤其是海洋动物的单细胞解离、测序技术体系将不断涌现, 相信单细胞转录组测序及单细胞多组学联合分析会在水产动物中得到更广泛的应用, 推动水产动物研究领域的快速发展。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

[1] Tang F C, Barbacioru C, Wang Y Z, *et al.* mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 377-382.

- [2] Farrell J A, Wang Y Q, Riesenfeld S J, *et al.* Single-cell reconstruction of developmental trajectories during zebrafish embryogenesis[J]. *Science*, 2018, 360(6392): eaar3131.
- [3] Li Q Y, Cheng Z L, Zhou L, *et al.* Developmental heterogeneity of microglia and brain myeloid cells revealed by deep single-cell RNA sequencing[J]. *Neuron*, 2019, 101(2): 207-223. e10.
- [4] Chen H D, Ye F, Guo G J. Revolutionizing immunology with single-cell RNA sequencing[J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2019, 16(3): 242-249.
- [5] Moon J H, Roh D H, Kwack K H, *et al.* Bacterial single-cell transcriptomics: recent technical advances and future applications in dentistry[J]. *Japanese Dental Science Review*, 2023, 59: 253-262.
- [6] Jovic D, Liang X, Zeng H, *et al.* Single-cell RNA sequencing technologies and applications: a brief overview[J]. *Clinical and Translational Medicine*, 2022, 12(3): e694.

- [7] Liao R Y, Wang J W. Analysis of meristems and plant regeneration at single-cell resolution[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2023, 74: 102378.
- [8] Liu Y, Liang S M, Wang B, *et al.* Advances in single-cell sequencing technology and its application in poultry science[J]. *Genes*. 2022, 13 (12): 2211-2211.
- [9] Sun X J, Li L, Wu B, *et al.* Cell type diversity in scallop adductor muscles revealed by single-cell RNA-Seq[J]. *Genomics*, 2021, 113(6): 3582-3598.
- [10] Eberwine J, Yeh H, Miyashiro K, *et al.* Analysis of gene expression in single live neurons[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(7): 3010-3014.
- [11] Kamme F, Salunga R, Yu J X, *et al.* Single-cell microarray analysis in hippocampus CA1: demonstration and validation of cellular heterogeneity[J]. *Journal of Neuroscience*, 2003, 23(9): 3607-3615.
- [12] 寇佳怡, 王玉玲, 曾睿琳, 等. 单细胞转录组测序技术及在哺乳动物上的应用 [J]. *生物技术通报*, 2022, 38(11): 41-48.  
Kou J Y, Wang Y L, Zeng R L, *et al.* Application of single-cell transcriptome sequencing in mammalian[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(11): 41-48 (in Chinese).
- [13] Stuart T, Satija R. Integrative single-cell analysis[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2019, 20(5): 257-272.
- [14] Ding J R, Adiconis X, Simmons S K, *et al.* Systematic comparison of single-cell and single-nucleus RNA-sequencing methods[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(6): 737-746.
- [15] Xie Y, Chen H M, Chellamuthu V R, *et al.* Comparative analysis of single-cell RNA sequencing methods with and without sample multiplexing[J]. *bioRxiv*, 2023, 06.28. 546827.
- [16] Zheng Z H, Chen E G, Lu W G, *et al.* Single-cell transcriptomic analysis[J]. *Comprehensive Physiology*, 2020, 10(2): 767-783.
- [17] Grindberg R V, Yee-Greenbaum J L, McConnell M J, *et al.* RNA-sequencing from single nuclei[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(49): 19802-19807.
- [18] Wu H J, Kirita Y, Donnelly E L, *et al.* Advantages of single-nucleus over single-cell RNA sequencing of adult kidney: rare cell types and novel cell states revealed in fibrosis[J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2019, 30(1): 23-32.
- [19] Wu H J, Humphreys B D. The promise of single-cell RNA sequencing for kidney disease investigation[J]. *Kidney International*, 2017, 92(6): 1334-1342.
- [20] Thrupp N, Frigerio C S, Wolfs L, *et al.* Single-nucleus RNA-seq is not suitable for detection of microglial activation genes in humans[J]. *Cell Reports*, 2020, 32(13): 108189.
- [21] Denisenko E, Guo B B, Jones M, *et al.* Systematic assessment of tissue dissociation and storage biases in single-cell and single-nucleus RNA-seq workflows[J]. *Genome Biology*, 2020, 21(1): 130.
- [22] Zhu Z, Yang C J. Hydrogel droplet microfluidics for high-throughput single molecule/cell analysis[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2017, 50(1): 22-31.
- [23] Scheyltjens I, Van Hove H, De Vlaminck K, *et al.* Single-cell RNA and protein profiling of immune cells from the mouse brain and its border tissues[J]. *Nature Protocols*, 2022, 17(10): 2354-2388.
- [24] Barea J S, Lee J, Kang D K. Recent advances in droplet-based microfluidic technologies for biochemistry and molecular biology[J]. *Micromachines*, 2019, 10(6): 412.
- [25] Lafzi A, Moutinho C, Picelli S, *et al.* Tutorial: guidelines for the experimental design of single-cell RNA sequencing studies[J]. *Nature Protocols*, 2018, 13(12): 2742-2757.
- [26] Niu J Z, Huang Y, Liu X C, *et al.* Single-cell RNA-seq reveals different subsets of non-specific cytotoxic cells in teleost[J]. *Genomics*, 2020, 112(6): 5170-5179.
- [27] Wu L T, Gao A L, Li L, *et al.* A single-cell transcriptome profiling of anterior kidney leukocytes from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 783196.
- [28] Wang H Y, Liu X, Chen J Y, *et al.* Single-cell-resolution transcriptome map revealed novel genes involved in testicular germ cell progression and somatic cells specification in Chinese tongue sole with sex reversal[J]. *Science China Life Sciences*, 2023, 66(5): 1151-1169.
- [29] Liu X, Huang Y Y, Tan F J, *et al.* Single-cell atlas of the Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) ovary reveals transcriptional programs of oogenesis in fish[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022, 10: 828124.
- [30] Wang Q, Peng C, Yang M, *et al.* Single-cell RNA-seq landscape midbrain cell responses to red spotted grouper nervous necrosis virus infection[J]. *PLoS Pathogens*, 2021, 17(6): e1009665.



- [31] Wu X, Yang Y, Zhong C Y, *et al.* Single-cell atlas of adult testis in protogynous hermaphroditic orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(22): 12607.
- [32] Mu D, Yang J, Jiang Y, *et al.* Single-cell transcriptomic analysis reveals neutrophil as orchestrator during  $\beta$ -glucan-induced trained immunity in a teleost fish[J]. *The Journal of Immunology*, 2022, 209(4): 783-795.
- [33] Chen W J, Huang J C, Wang W, *et al.* Multi-tissue scRNA-seq reveals immune cell landscape of turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. *Fundamental Research*, 2022, 2(4): 550-561.
- [34] West A C, Mizoro Y, Wood S H, *et al.* Immunologic profiling of the atlantic salmon gill by single nuclei transcriptomics[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 669889.
- [35] Taylor R S, Daniels R R, Dobie R, *et al.* Single cell transcriptomics of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) liver reveals cellular heterogeneity and immunological responses to challenge by *Aeromonas salmonicida*[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 984799.
- [36] Gervais O, Peñaloza C, Gratacap R, *et al.* Understanding host response to infectious salmon anaemia virus in an Atlantic salmon cell line using single-cell RNA sequencing[J]. *BMC Genomics*, 2023, 24(1): 161.
- [37] Guslund N C, Krabberød A K, Nørstebø S F, *et al.* Lymphocyte subsets in Atlantic cod (*Gadus morhua*) interrogated by single-cell sequencing[J]. *Communications Biology*, 2022, 5(1): 689.
- [38] Guo R, Ma G W, Zhai X F, *et al.* Comparison of the single-cell immune landscape of testudines from different habitats[J]. *Cells*, 2022, 11(24): 4023.
- [39] Perdiguero P, Morel E, Díaz-Rosales P, *et al.* Individual B cells transcribe multiple rearranged immunoglobulin light chains in teleost fish[J]. *iScience*, 2021, 24(6): 102615.
- [40] Perdiguero P, Morel E, Tafalla C. Diversity of rainbow trout blood b cells revealed by single cell RNA sequencing[J]. *Biology*, 2021, 10(6): 511.
- [41] Wang X, Lai F L, Shang D T, *et al.* Cellular fate of intersex differentiation[J]. *Cell Death & Disease*, 2021, 12(4): 388.
- [42] Tian H F, Xing J, Tang X Q, *et al.* Single-cell transcriptome uncovers heterogeneity and immune responses of leukocytes after vaccination with inactivated *Edwardsiella tarda* in flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Aquaculture*, 2023, 566: 739238.
- [43] Zhang R H, Liu Q, Pan S S, *et al.* A single-cell atlas of West African lungfish respiratory system reveals evolutionary adaptations to terrestrialization[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 5630.
- [44] Liu X L, Li W, Yang Y P, *et al.* Transcriptome profiling of the ovarian cells at the single-cell resolution in adult Asian seabass[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 647892.
- [45] Li Y N, Liu X, Zhang X H, *et al.* Single-Cell RNA Sequencing of the testis of *Ciona intestinalis* reveals the dynamic transcriptional profile of spermatogenesis in protochordates[J]. *Cells*, 2022, 11(24): 3978.
- [46] Chen C, Lemaire L A, Wang W, *et al.* Comprehensive single-cell transcriptome lineages of a proto-vertebrate[J]. *Nature*, 2019, 571(7765): 349-354.
- [47] Zhang T J, Xu Y C, Imai K, *et al.* A single-cell analysis of the molecular lineage of chordate embryogenesis[J]. *Science Advances*, 2020, 6(45): eabc4773.
- [48] Foster S, Oulhen N, Fresques T, *et al.* Single-cell RNA-sequencing analysis of early sea star development[J]. *Development*, 2022, 149(22): dev200982.
- [49] Foster S, Teo Y V, Neretti N, *et al.* Single cell RNA-seq in the sea urchin embryo show marked cell-type specificity in the Delta/Notch pathway[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2019, 86(8): 931-934.
- [50] Foster S, Oulhen N, Wessel G. A single cell RNA sequencing resource for early sea urchin development[J]. *Development*, 2020, 147(17): dev191528.
- [51] Paganos P, Voronov D, Musser J M, *et al.* Single-cell rna sequencing of the *strongylocentrotus purpuratus* larva reveals the blueprint of major cell types and nervous system of a non-chordate deuterostome[J]. *eLife*, 2021, 10: e70416.
- [52] Ge Q Q, Wang J J, Li J T, *et al.* Effect of high alkalinity on shrimp gills: histopathological alternations and cell specific responses[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2023, 256: 114902.
- [53] Zhu W L, Yang C L, Chen X L, *et al.* Single-cell ribonucleic acid sequencing clarifies cold tolerance mechanisms in the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. *Frontiers in Genetics*, 2022, 12: 792172.
- [54] Yang P, Chen Y H, Huang Z Q, *et al.* Single-cell RNA sequencing analysis of shrimp immune cells identifies macrophage-like phagocytes[J]. *eLife*, 2022, 11: e80127.
- [55] Liang Q J, Dong B B, Li A, *et al.* scRNA-seq analysis

- reveals toxicity mechanisms in shrimp hemocytes subjected to nitrite stress[J]. *Chemosphere*, 2023, 316: 137853.
- [56] Koiwai K, Koyama T, Tsuda S, *et al.* Single-cell RNA-seq analysis reveals penaeid shrimp hemocyte subpopulations and cell differentiation process[J]. *eLife*, 2021, 10: e66954.
- [57] Li Y D, Zhou F L, Yang Q B, *et al.* Single-cell sequencing reveals types of hepatopancreatic cells and hemocytes in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and their molecular responses to ammonia stress[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 883043.
- [58] Meng J, Wang W X. Highly Sensitive and specific responses of oyster hemocytes to copper exposure: single-cell transcriptomic analysis of different cell populations[J]. *Environmental Science & Technology*, 2022, 56(4): 2497-2510.
- [59] Meng J, Zhang G F, Wang W X. Functional heterogeneity of immune defenses in molluscan oysters *Crassostrea hongkongensis* revealed by high-throughput single-cell transcriptome[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 120: 202-213.
- [60] Chari T, Weissbourd B, Gehring J, *et al.* Whole-animal multiplexed single-cell RNA-seq reveals transcriptional shifts across *Clytia* medusa cell types[J]. *Science Advances*, 2021, 7(48): eabh1683.
- [61] Gu M M, Kong J R, Huang D, *et al.* Molecular characterization and function of the Prohibitin 2 gene in *Litopenaeus vannamei* responses to *Vibrio alginolyticus*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2017, 67: 177-188.
- [62] Hu C X, Li T Y, Xu Y Q, *et al.* CellMarker 2.0: an updated database of manually curated cell markers in human/mouse and web tools based on scRNA-seq data[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(D1): D870-D876.
- [63] Lange M, Granados A, Kumar S V, *et al.* Zebrahub-multipodal zebrafish developmental atlas reveals the state transition dynamics of late vertebrate pluripotent axial progenitors. *bioRxiv*, 2023, 1-23.
- [64] Guo C, Ye W D, Shi M J, *et al.* FishSCT: a zebrafish-centric database for exploration and visualization of fish single-cell transcriptome[J]. *Science China Life Sciences*, 2023, 66(9): 2185-2188.
- [65] Li S Z, Liu W, Li Z, *et al.* Molecular characterization and expression pattern of a germ cell marker gene *dnd* in gibel carp (*Carassius gibelio*)[J]. *Gene*, 2016, 591(1): 183-190.
- [66] Yang X G, Yue H M, Ye H, *et al.* Identification of a germ cell marker gene, the *dead end* homologue, in Chinese sturgeon *Acipenser sinensis*[J]. *Gene*, 2015, 558(1): 118-125.
- [67] Xiao Q, Sun Y Q, Liang X, *et al.* Visualizing primordial germ cell migration in embryos of rice field eel (*Monopterus albus*) using fluorescent protein tagged 3' untranslated regions of *nanos3*, *dead end* and *vasa*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2019, 235: 62-69.
- [68] Fabioux C, Pouvreau S, Le Roux F, *et al.* The oyster *vasa*-like gene: a specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 315(4): 897-904.
- [69] Randelli E, Buonocore F, Scapigliati G. Cell markers and determinants in fish immunology[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(4): 326-340.
- [70] Li J, Wang H, Li C L. Single-cell sequencing on marine life: application and future development[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2022, 9: 906267.
- [71] Daniels R R, Taylor R S, Robledo D, *et al.* Single cell genomics as a transformative approach for aquaculture research and innovation[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2023, 15(4): 1618-1637.
- [72] Baysoy A, Bai Z L, Satija R, *et al.* The technological landscape and applications of single-cell multi-omics[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2023, 24(10): 695-713.
- [73] Wang G Q, Heijs B, Kostidis S, *et al.* Spatial dynamic metabolomics identifies metabolic cell fate trajectories in human kidney differentiation[J]. *Cell Stem Cell*, 2022, 29(11): 1580-1593. e7.
- [74] Angelidis I, Simon L M, Fernandez I E, *et al.* An atlas of the aging lung mapped by single cell transcriptomics and deep tissue proteomics[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 963.
- [75] Sheng X, Guan Y T, Ma Z Y, *et al.* Mapping the genetic architecture of human traits to cell types in the kidney identifies mechanisms of disease and potential treatments[J]. *Nature Genetics*, 2021, 53(9): 1322-1333.

## Applications of single-cell RNA sequencing in aquaculture animals

YU Hong<sup>1,2</sup>, LIN Xi<sup>1</sup>, LI Qi<sup>1,2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Mariculture, Ocean University of China, Ministry of Education, Qingdao 266003, China;

2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China)

**Abstract:** Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) is a revolutionary technology for high-throughput sequencing of RNA within individual cells. Since its introduction in 2009, this technique has undergone continuous updates and iterations, proving to be a transformative tool in the field of life sciences. It has found wide-ranging applications in developmental biology, neurobiology, immunology, microbiology, pharmaceutical research, disease treatment, among other fields, demonstrating broad prospects. The versatility of scRNA-seq lies in its ability to unravel the intricate heterogeneity and complexity of RNA transcripts within cells, thereby facilitating the exploration of different cell types and their functions in organisms. As scRNA-seq technology continues to evolve, with advancements towards multidimensionality and spatial resolution, it has emerged as a powerful tool for dissecting complex biological phenomena at the cellular level. In recent years, the widespread adoption of scRNA-seq has been facilitated by reduced sequencing costs and enhanced technology stability. This has led to its rapid expansion beyond model organisms to non-model species like crops, livestock, and aquatic animals. The extension of scRNA-seq to these organisms has yielded transformative insights into cell heterogeneity and function, marking a paradigm shift in our understanding of these species. Notably, within the realm of aquatic animals, scRNA-seq has gained substantial traction, driving a profound exploration of cellular dynamics and mechanisms underlying various physiological processes. This paper provides a comprehensive overview of scRNA-seq technology, its sequencing methodologies, and its applications in aquaculture animals, alongside a synthesis of relevant research findings. It encapsulates the breadth of scRNA-seq applications in aquaculture, encompassing diverse sample preparation techniques and sequencing platforms while highlighting its inherent advantages in studying aquatic animal biology. Furthermore, it delves into the challenges encountered in applying scRNA-seq to aquatic animals. These challenges include the scarcity of marker genes, limited availability and inconsistent quality of reference genomes, and the need for further experimental refinement in single cell suspension or single nucleus preparation methods. Moreover, this paper offers a forward-looking perspective on potential applications of scRNA-seq in aquaculture, envisaging its role in advancing our understanding of cellular function and regulatory mechanisms in aquatic organisms. By illuminating unexplored avenues for research and innovation, it seeks to inspire further investigations leveraging scRNA-seq to unravel the complexities of cellular dynamics in aquaculture animals. Through interdisciplinary collaboration and technological advancements, scRNA-seq stands poised to catalyze transformative discoveries that will shape the future of aquaculture and contribute to sustainable practices in food production and environmental conservation.

**Key words:** aquaculture animals; single-cell RNA sequencing; cell heterogeneity; cell lineage

**Corresponding author:** LI Qi. E-mail: [qili66@ouc.edu.cn](mailto:qili66@ouc.edu.cn)

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (42276111); Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2022MC171)