

离心参数对流式分选后样本的影响研究

黄莹莹^{1*} 邢月婷¹ 孟晓瑜² 桑文华² 李艳伟¹ 宋兴辉¹ 郭春¹ 王佳佳¹

(¹浙江大学医学院公共技术平台, 杭州 310058; ²浙江大学基础医学院, 杭州 310058)

摘要 流式分选术是对细胞或生物颗粒进行无菌筛分的技术, 因具有检测速度快、通量高、灵敏度高优势, 故在医学及生命科学领域有广阔的应用前景。离心是流式分选后富集细胞的常用技术, 直接影响流式分选后样本的细胞活性和得率。该文以KPC细胞系(即小鼠胰腺组织特异性kras缺失p53突变成胰腺癌分离的癌细胞, 简称KPC)和小鼠原代脾脏细胞为例, 利用FACS SORP Aria II分选仪进行分选。对离心力、离心时间等参数进行优化, 结果表明KPC细胞分选后, 300 ×g、4 °C离心25 min, 能获得高得率高活性的细胞用于下游实验, 而小鼠原代脾脏细胞则300 ×g、4 °C离心15 min最为合适。该方法解决了流式分选后细胞离心难、离心损失大的问题, 可提高分选实验实际得率, 为流式分选术的应用提供技术参考。

关键词 流式分选; 离心时间; 离心力; 得率; 细胞活性

Study on the Influence of Centrifugal Parameters on the Samples Sorted by Flow Cell Sorting

HUANG Yingying^{1*}, XING Yueting¹, MENG Xiaoyu², SANG Wenhua², LI Yanwei¹,
SONG Xinghui¹, GUO Chun¹, WANG Jiajia¹

(¹Core Facilities, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

²School of Basic Medical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Flow cytometry is a kind of aseptic screening technology for cells or biological particles. Due to its advantages such as high speed, high flux, high sensitivity, etc, which has broad applications in medicine and life sciences. Centrifugation is a common technique for cell enrichment after flow cell sorting, which directly affects the cell viability and yield of samples sorted by flow cytometry. In this paper, based on FACS SORP Aria II cell sorter, KPC cell line (i.e. mouse pancreatic tissue-specific kras deletion p53 mutant cancer cells isolated from pancreatic cancer, KPC) and mouse primary spleen cells are sorted. The experimental conditions such as centrifugal time and centrifugal force are optimized. The results show that KPC cells with high yield and viability can be obtained by centrifugation at 300 ×g, for 25 min at 4 °C, while for mouse primary spleen cells, centrifugation at 300 ×g, for 15 min at 4 °C is the most appropriate. This method can solve the problems of difficult centrifugation and large centrifugation loss, then improve the actual yield of cell sorting experiments and provide technical reference for the application of flow cytometry.

Keywords flow cell sorting; centrifugal time; centrifugal force; yield; cell viability

收稿日期: 2021-04-20

接受日期: 2021-06-13

浙江省教育厅一般科研项目(批准号: Y202044997)和中央高校基本科研业务费专项资金(青年科研创新专项)(批准号: 2021QNA7018)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-88981951, E-mail: risa929@126.com

Received: April 20, 2021

Accepted: June 13, 2021

This work was supported by Zhejiang Provincial Education Department Fund (Grant No.Y202044997) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Grant No.2021QNA7018)

*Corresponding author. Tel:+86-571-88981951, E-mail: risa929@126.com

流式细胞术(flow cytometry, FCM), 是利用流式细胞仪同时对单个细胞或颗粒的多个参数进行定性/定量(相对/绝对)分析的生物学分析技术。FCM具有检测速度快、通量高、灵敏度高、采集数据量大、节约样本及成本等特点, 因此广泛应用于免疫学、血液学、病理学、药理学、肿瘤学、细胞生物学、分子生物学及植物育种等学科领域^[1-4]。分选型流式细胞仪一般还有筛分的作用, 并且, 如果整个分选的过程是在无菌条件下进行的, 分选下来的细胞还可以用来继续培养或用于后续功能实验。

利用流式细胞分选仪进行分选实验, 纯度、得率和活性是评估分选后细胞的主要指标, 尤其单细胞研究的进一步发展, 对分选的得率和活性提出了更高的要求。然而分选后样本活性和得率往往会受很多因素的影响, 如仪器状态、样品状态、仪器调试的情况、上样参数设置等^[5]。其中, 样本分选后离心是非常重要的却被常被忽略的一项指标。前人关于流式分选实验得率的计算是取的分选后、离心前的细胞量^[6], 忽略了离心这一步的损失。而在流式分选实验中, 目前国内外实验室大多采用电荷式分选。电荷式分选即在分选过程中, 给予液流高频振荡(15~100 kHz), 使液流断裂为大小均匀的液滴, 液滴在喷嘴下面与液流分离, 瞬间加电, 带正电荷或负电荷的液滴经过电场作用后会发生偏转, 利用此原理就可以将感兴趣的细胞分选出来。如果分选100万个细胞, 就会有100万个包裹细胞的鞘液液滴, 需要离心去除鞘液液滴后, 样本才能用于下游实验。然而分选后细胞表面都带有一定的电荷, 同种电荷互相排斥, 不易于离心。分选后的细胞经离心后, 一般都损失较大, 其最终的得率和活性会影响很多下游实验的开展, 比如近期热门的单细胞测序实验^[7-9]。因此, 如何找到合适的分选后离心条件, 是完成一个流式分选实验迫切需要解决的问题。

熊静等^[10]研究发现, 分离离心力在 $600 \times g \sim 900 \times g$ 及洗涤离心力在 $300 \times g \sim 600 \times g$ 时分离外周血单个核细胞较合适, 离心力增加, 凋亡细胞数亦增加。李晓亮等^[11]认为, 适宜大小的周期性机械离心力刺激可促进兔骨髓细胞、骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)体外增殖和矿化。李飞等^[12]采用三因素三水平正交实验探讨了不同离心力转速、时间、升降因素等对外周血单个核细胞

分离结果的影响, 结果表明, 分离离心时转速为主要影响因素, $600 \times g$ 为最佳离心转速。蒋斌等^[13]研究发现, 较低转速(200 r/min与500 r/min)的离心力可促进BMSCs增殖, 而过高转速(800 r/min)的离心力可抑制BMSCs增殖, 且在500 r/min干预5天时细胞的生长活性最强。可见, 离心对细胞的得率、活性等影响较大^[14]。然而前人对离心方法的研究大多关于非分选样本方面, 对于流式分选后样本的离心研究, 国内外尚无报道。

因此, 本研究拟以一种细胞系细胞和一种原代细胞为例, 利用FACS SORP Aria II分选仪进行分选, 通过比较不同离心力、不同离心时间条件下, 分选后细胞的实际得率及存活力, 找到最佳的适合流式分选后细胞的离心条件, 从而为相关研究提供技术参考, 提高分选实验效率和实际的得率, 使流式分选术的应用及与其他技术的交叉应用更加广阔、深入。

1 材料方法

1.1 主要试剂与材料

磷酸盐PBS缓冲液购自瑞典Medicago公司。凋亡检测试剂盒(PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I, 货号559763)购自美国BD公司。RPMI-1640培养基购自Genview公司。DMEM培养基、胎牛血清和胰酶Trypsin-EDTA购自Gibco公司。KPC细胞系(即小鼠胰腺组织特异性kras缺失p53突变形胰腺癌分离的癌细胞, 以下简称KPC)来源于安德森癌症研究中心, 细胞系被检测并证实无支原体。C57BL/6品系小鼠均为6~8周龄, 饲养于浙江大学医学院动物中心SPF无菌级环境中。无菌细胞筛、15 mL离心管购自Corning公司。

1.2 方法

1.2.1 KPC细胞的培养及其单细胞悬液的制备 KPC细胞培养于高糖DMEM培养基中, 添加10%(V/V)胎牛血清及100 U/mL青霉素G和100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素(Solarbio), 然后放置在 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养。在细胞消化前用PBS清洗1次, 添加含0.25% EDTA胰蛋白酶消化2 min, 用含10%(V/V)胎牛血清的DMEM培养基终止消化, 收集细胞悬液 $300 \times g$ 离心3 min, PBS重悬进行后续实验。

1.2.2 小鼠原代脾脏单细胞悬液制备 (1) 取6~8周龄小鼠脾脏置于含4 mL PBS的60 mm平皿中; (2) 使

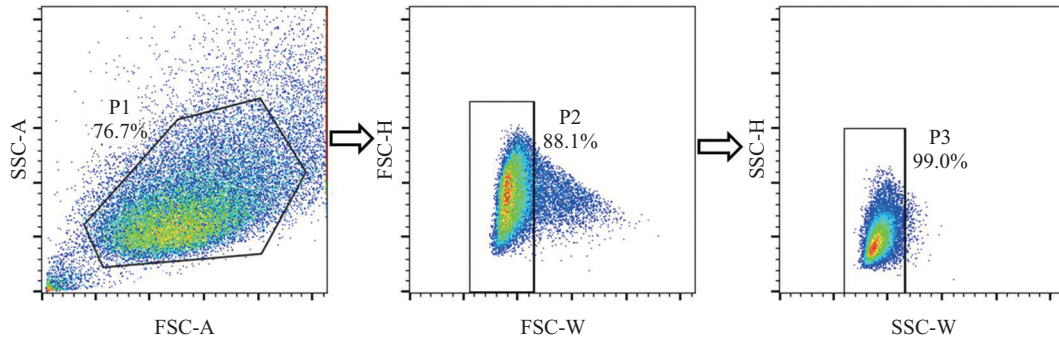


图1 KPC细胞分选策略图

Fig.1 Cell sorting strategy of KPC

用毛玻璃片将脾脏研磨成细胞悬液; (3) 将研磨碎的细胞悬液通过200目滤膜过滤到15 mL离心管中; (4) 将过滤后的脾脏单细胞悬液置于离心机中400 ×g离心5 min; (5) 离心结束后, 小心弃掉上清, 用1 mL红细胞裂解液重悬细胞, 室温放置7 min; (6) 再加入5 mL PBS, 终止红细胞裂解过程; (7) 将终止后的液体置于离心机中400 ×g离心5 min; (8) 离心结束后小心弃上清, 用PBS重悬细胞, 然后对细胞进行计数后用于后续实验。

1.2.3 目的细胞的分选 利用BD FACS SORP Aria II对上述样本分别进行分选。样本分选前均用40 μm 无菌细胞筛过滤后上样。分选选用85 μm喷嘴, 鞘液压力为45 psi, purity模式, flow rate设1.0, 分选策略如图1所示。以15 mL离心管为收集管, 每个收集管预加5 mL含10%(V/V)胎牛血清的培养基(KPC细胞培养基用DMEM、小鼠脾脏细胞培养基用RPMI-1640)。每个样收30万P3门events(事件数), 3个重复。收集管提前于冰上放置, 收集时用4 °C冷凝收集器。

1.2.4 分选后细胞离心, 不同离心时间及不同离心力的摸索 离心条件的摸索均使用Thermo ST 16R离心机, 离心机转子型号为Thermo Fisher 75003629。

1.2.1、1.2.2获得的KPC细胞、小鼠原代脾脏细胞经1.2.3方法分选后分别分成两组。第一组, 以300 ×g离心力, 4 °C为固定条件, 置于水平转子中离心, 离心时间分别为5 min、15 min、25 min、35 min。第二组, 以5 min、4 °C为固定条件, 置于水平转子中离心, 离心力分别为100 ×g、300 ×g、500 ×g、700 ×g。

1.2.5 离心后细胞的计数实验 离心后的细胞, 弃上清, 加入500 μL PBS重悬, 吹打混匀, 于CytoFLEX LX流式细胞仪进行计数。

1.2.6 Annexin-V PE/7-AAD双染流式细胞术检测离

心后细胞凋亡情况 凋亡检测参照凋亡检测试剂盒(PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I)说明书进行。离心后的细胞, 弃上清, 加100 μL 1×结合缓冲液, 向每管样本中加5 μL Annexin V PE和5 μL 7-AAD。混匀后, 室温避光放置15 min。再加400 μL 1×结合缓冲液, 轻柔混匀后用于流式检测。检测仪器为BD Fortessa和CytoFLEX LX。

1.2.7 统计学处理 使用SPSS 16.0软件进行统计学分析, 计量资料以均数±标准误($\bar{x}\pm s$)表示, 采用 t 检验, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 为差异有统计学意义。流式数据使用FlowJo V10软件分析。

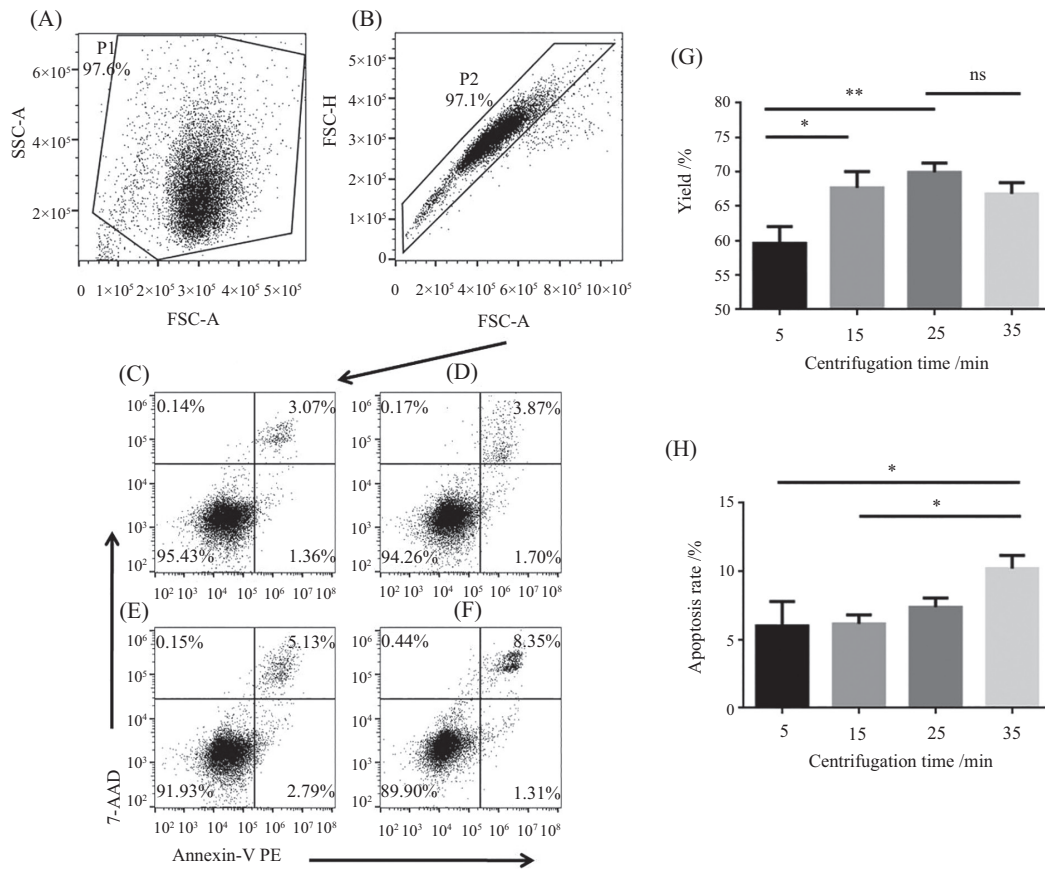
2 结果

2.1 离心时间对细胞系流式分选后的细胞得率及活性的影响

细胞系是实验室常用的实验材料, 因此本文以KPC细胞为例, 考察了不同离心时间对流式分选后的细胞系来源细胞的影响。从图2G可知, 离心力为300 ×g时, 25 min离心的细胞得率最高, 为69.92%, 但时间再增加, 得率变化并不显著。另外, 根据实验方案, 研究了4种不同离心时间对细胞活性的影响。实验结果如图2H所示, 5 min、15 min、25 min时, 细胞凋亡情况差异不显著, 但当离心时间为35 min时, 细胞凋亡率显著增高($P<0.05$)。综上, 对于KPC细胞, 流式分选后, 当离心力为300 ×g时, 离心25 min最合适, 此时得率高, 细胞凋亡率仅为7.38%(即细胞存活率为92.62%), 符合单细胞测序等很多下游实验的需要。

2.2 离心力对细胞系流式分选后的细胞得率及活性的影响

离心力考察了100 ×g、300 ×g、500 ×g、700 ×g 4个条件, 细胞得率如图3E所示, 当离心力为500 ×g



A: FSC-A与SSC-A圈选除碎片以外的活细胞。B: FSC-A与FSC-H, 圈定单个细胞排除黏连体。C~F: 分别为5 min、15 min、25 min、35 min离心对KPC细胞分选后活性的影响研究。Annexin-V PE阳性细胞群为早调细胞, Annexin-V PE和7AAD双阳性细胞群为晚调细胞, 以下同。G: 不同离心时间对KPC细胞分选后得率的影响研究。H: 不同离心时间对分选后的KPC细胞的凋亡率影响。ns: 差异不显著。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, $n=3$ 。

A: only live cells were gated in the "cell" on dot-plot of FSC-A and SSC-A. B: single cells were then gated in "single cells" on dot-plot of FSC-A and FSC-H from region "cell". C-F: the effects of centrifugation for 5 min, 15 min, 25 min and 35 min on the viability of KPC cells after sorting, respectively. Annexin-V PE positive cells were early apoptosis cells, Annexin-V PE and 7AAD double positive cells were late apoptosis cells. G: the effect of different centrifugation time on the yield of KPC cells after sorting. H: the effect of different centrifugation time on apoptosis rate of KPC cells after sorting. ns: not significant. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, $n=3$ 。

图2 离心时间对KPC细胞系分选后的细胞得率及活性的影响

Fig.2 The effect of centrifugal time on the yield and viability of KPC cell line after sorting

时, 得率为66.32%, 显著高于100 $\times g$ ($P<0.05$), 但和300 $\times g$ 、700 $\times g$ 的差异不显著。但使用500 $\times g$ 离心力获得细胞, 其凋亡率显著高于使用100 $\times g$ 的离心力($P<0.05$)(图3F), 而使用300 $\times g$ 离心力, 其凋亡率为8.00%, 略低于使用500 $\times g$ 离心力。用于下游实验的细胞活性越高越好, 因此, 离心时间一定时, 离心力选用300 $\times g$ 较适合分选后的KPC细胞系的离心, 既能获得较高得率又能保证细胞的高活性。

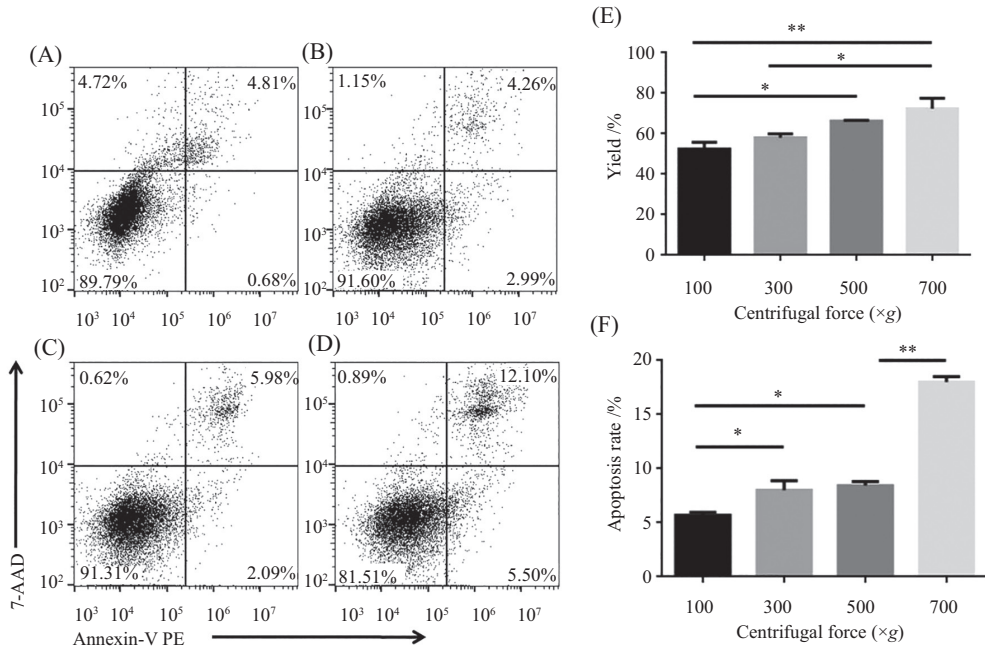
2.3 离心时间对原代细胞流式分选后的细胞得率及活性的影响

许多细胞的功能研究, 均需要首先从小鼠原代组织中分选出目的亚群^[15]。因此, 本文以小鼠原

代脾脏细胞为例, 研究了不同的离心时间对原代细胞分选后, 其细胞得率及活性的影响。从图4E可知, 300 $\times g$ 、4 $^{\circ}C$ 、离心5 min时的得率仅为27.67%, 显著低于15 min、25 min及35 min($P<0.01$)。但15 min和25 min及35 min的差异并不显著。图4F数据显示, 离心15 min, 细胞凋亡率和5 min的差异不显著, 25 min及35 min的凋亡率均超过10%, 显著高于前两者($P<0.05$)。可见, 300 $\times g$ 、4 $^{\circ}C$ 离心小鼠原代脾脏细胞时, 15 min为最佳离心时间。

2.4 离心力对原代细胞流式分选后的细胞得率及活性的影响

5 min、4 $^{\circ}C$ 、离心力设为100 $\times g$, 离心分选后

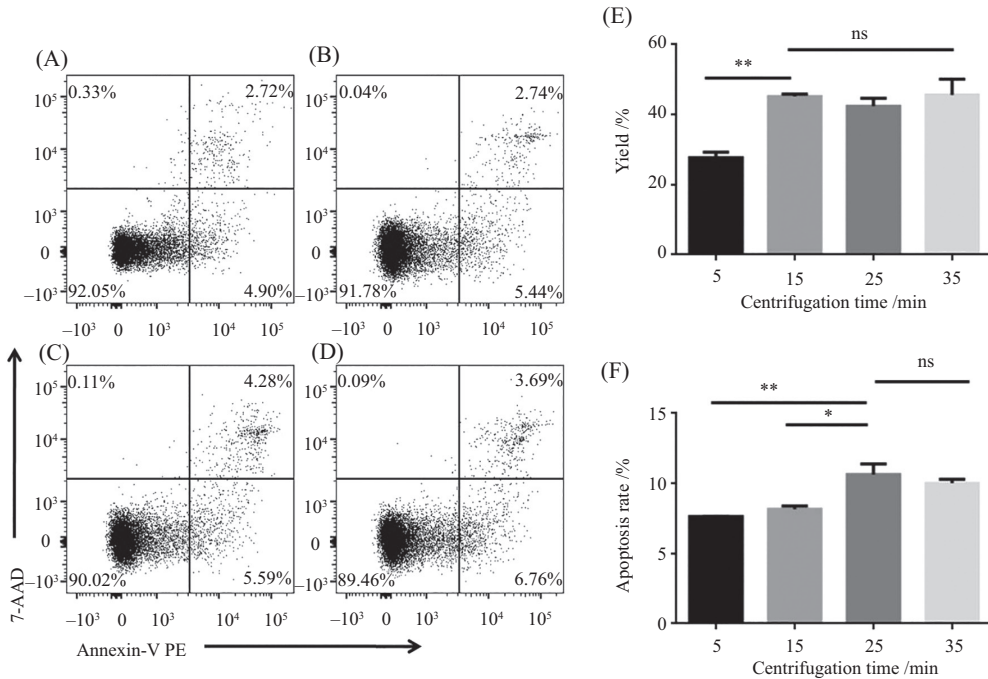


A~D: 离心力分别为100 ×g、300 ×g、500 ×g、700 ×g对KPC细胞分选后活性的影响研究。E: 不同离心力对KPC细胞分选后得率的影响研究。F: 不同离心力对分选后的KPC细胞的凋亡率影响。*P<0.05, **P<0.01, n=3。

A~D: the effects of centrifugation for 100 ×g, 300 ×g, 500 ×g, 700 ×g on the viability of KPC cells after sorting, respectively. E: the effect of different centrifugal forces on the yield of KPC cells after sorting. F: the effect of different centrifugal forces on apoptosis rate of KPC cells after sorting. *P<0.05, **P<0.01, n=3。

图3 离心力对KPC细胞系分选后的细胞得率及活性的影响

Fig.3 The effect of centrifugal force on the yield and viability of KPC cell line after sorting

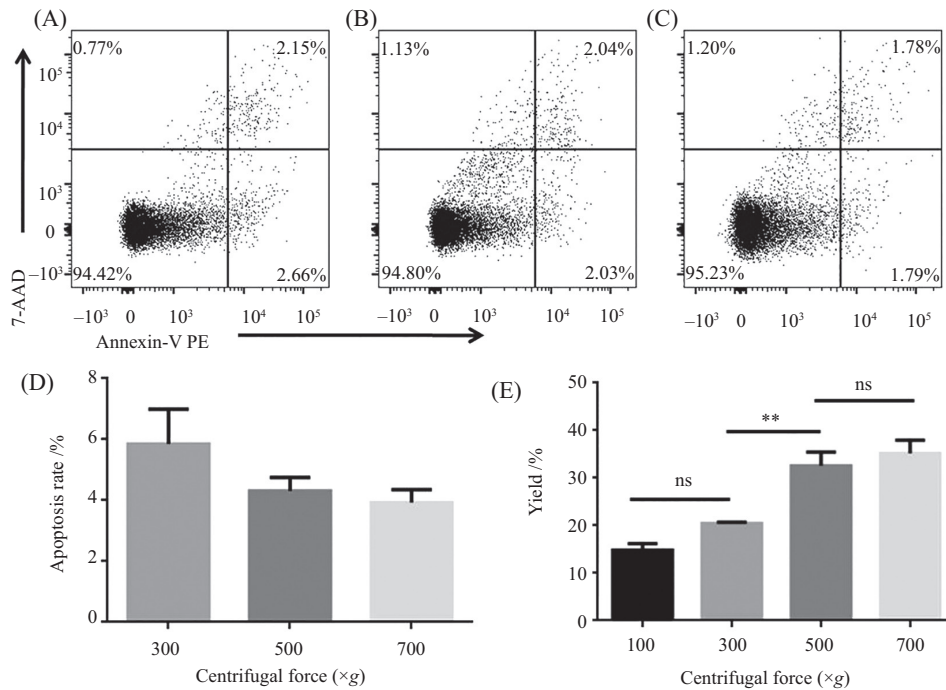


A~D: 离心分别5 min、15 min、25 min、35 min对小鼠原代脾脏细胞分选后活性的影响研究。E: 不同离心时间对小鼠原代脾脏细胞分选后得率的影响研究。F: 不同离心时间对分选后的小鼠原代脾脏细胞的凋亡率影响。ns: 差异不显著。*P<0.05, **P<0.01, n=3。

A~D: the effects of centrifugation for 5 min, 15 min, 25 min and 35 min on the viability of mouse primary spleen cells after sorting, respectively. E: the effect of different centrifugation time on the yield of mouse primary spleen cells after sorting. F: the effect of different centrifugation time on apoptosis rate of mouse primary spleen cells after sorting. ns: not significant. *P<0.05, **P<0.01, n=3。

图4 离心时间对小鼠原代脾脏细胞分选后的细胞得率及活性的影响

Fig.4 The effect of centrifugal time on the yield and viability of mouse primary spleen cells that after sorting



A~C: 离心力分别为300 ×g、500 ×g、700 ×g对小鼠原代脾脏细胞分选后活性的影响研究。D: 不同离心力对分选后的小鼠原代脾脏细胞的凋亡率影响。E: 不同离心力对小鼠原代脾脏细胞分选后得率的影响研究。ns: 差异不显著。** $P < 0.01$, $n = 3$ 。

A~C: the effects of centrifugation for 300 ×g, 500 ×g, 700 ×g on the viability of mouse primary spleen cells after sorting, respectively. D: the effect of different centrifugal force on apoptosis rate of mouse primary spleen cells after sorting. E: the effect of different centrifugal forces on the yield of mouse primary spleen cells after sorting. ns: not significant. ** $P < 0.01$, $n = 3$ 。

图5 离心力对小鼠原代脾脏细胞分选后活性的影响

Fig.5 The effect of centrifugal force on the viability of mouse primary spleen cells that after sorting

的小鼠原代脾脏细胞, 得率仅为14.82%(图5E)。可能离心力过低, 小鼠原代脾脏细胞直径又较小(一般7~12 μm), 不利于离心沉淀。离心力为500 ×g时, 得率为32.61%, 显著高于300 ×g、100 ×g的($P < 0.01$)。100 ×g离心下来的细胞数太少, 无法检测凋亡实验。本组实验考察了300 ×g、500 ×g、700 ×g 3个条件, 图5D结果表明离心后, 3种离心力对小鼠脾脏细胞的活性影响差异不显著。不过500 ×g、700 ×g时, 完全坏死的裸核细胞群(即7AAD单阳性细胞群)数量均超过了1%(图5B和图5C), 高于300 ×g的(图5A)。离心力越大, 细胞裂解死亡的可能性随之增高, 导致坏死的裸核细胞群增多。综合考虑, 离心分选后的小鼠原代脾脏细胞, 以300 ×g较为合适。

3 讨论

流式分选后细胞均带有同种电荷, 同种电荷互相排斥, 相比普通细胞样本, 较难离心。非分选后细胞的离心, 一般是4 °C、5 min^[16], 然而流式分选后的样本若以相同离心条件(4 °C、5 min)处理, 损失较大,

很多细胞无法成功离心(图2G和图4E)。一些稀有珍贵样本靶细胞群比例较低, 需要高得率地获得离心后的细胞以用于下游实验。因此, 选择何种合适的离心参数, 对提高流式分选后样本的实际得率尤为重要。目前, 实验室分选较多的样本主要有两大类, 原代组织细胞和细胞系。本文选取KPC细胞系和小鼠原代脾脏细胞为代表, 设计并讨论了不同离心时间、不同离心力对流式分选后样本的得率及活性的影响。

样本的得率的计算方式偏差会影响实验结果的判断, 而样本的精确计数与得率的计算有极大关系。本研究细胞计数使用Beckman Coulter CytoFLEX LX流式细胞仪进行。仪器软件设定每个样吸取100 μL, 上样结束, 软件自动计算出100 μL细胞样品含细胞数目, 记为 N_1 。为使计数精准, 本研究每次计数前都对仪器进行了计数体积校准。校准步骤为: 准备干净的1.5 mL EP管, 加500 μL ddH₂O, 使用精密天平进行称重, 精确到小数点后4位, 重量记为 G_1 。将该EP管在CytoFLEX LX流式细胞仪上样, 软

件设定吸取体积为100 μL (记为 V_1)。上样结束,再次称量该EP管,重量记为 G_2 。 G_1-G_2 即为实际上样的 ddH_2O 重量,通过 ddH_2O 的密度,可换算出实际上样的体积,记为 V_2 (该校准步骤重复3次, V_2' 为3次重复平均值)。离心后细胞的实际数量 $N_2=500\times N_1/V_2'$ 。

本文首先探讨了不同离心力及离心时间对细胞系流式分选后的细胞得率及活性的影响。当离心力为 $300\times g$ 时,离心25 min, KPC细胞的得率最高,后续时间再增加,得率变化并不显著,表明离心25 min可能大部分目的细胞已经离心下来。另外,时间小于或等于25 min时,细胞活性变化不显著,但时间大于25 min后,细胞凋亡率显著增加,说明离心时间过长,细胞在体外离心力较长时间作用下,受到的机械损伤增加,这与前人报道一致^[10,13]。因此,对于KPC细胞系,离心力固定为 $300\times g$ 时,离心25 min最合适。另外,本文研究发现,随着离心力增加, KPC细胞得率也随之增加,但大于 $300\times g$ 后,变化差异就不显著了,然而,当离心力增加时,虽然得率逐步升高,但大的离心力容易使细胞活性变差,最终导致实际活细胞的获得率降低。因此对KPC细胞系而言, $300\times g$ 为最优的离心力。

本研究又考察了实验室常用的原代细胞——小鼠脾脏细胞,其分选后细胞最佳离心力和KPC细胞一致,但离心时间大于15 min后,其凋亡率显著增加。所以,离心分选后的小鼠原代脾脏细胞, 15 min为最佳离心时间。

综上所述, KPC细胞分选后, $300\times g$ 、 4°C 离心25 min,能获得高得率高活性的细胞用于下游实验;而小鼠原代脾脏细胞 $300\times g$ 、 4°C 离心15 min最合适。这比一般的非分选实验收细胞的离心时间都要长,但离心后的活性均大于90%,符合单细胞测序等下游实验的要求。不过,原代细胞可能制样步骤多,导致分选前细胞活性就差一些,因此,分选后离心时间不宜过长,否则细胞活性不强、死细胞碎片增多。细胞系细胞则可适当延长离心时间,从而获得更高得率的细胞。另外,同样在优化后的条件下,小鼠原代脾脏细胞(直径小于12 μm)的得率(45.17%)是低于KPC细胞系(直径12~20 μm)(69.92%)的,由此推测,直径越小的细胞离心得率越低,若需足够量分选离心后的细胞用于下游实验,需要准备更多的样本进行分选。该实验结论为各流式分选实验提供了一定的指导作用。本文优化后的离心参数可应用于其他

原代细胞或细胞系的分选后离心,有助于获得高得率、高活性的分选后细胞,从而为流式分选后样本能成功应用于单细胞测序、质谱等后续功能实验提供有力的技术支撑。

参考文献 (References)

- [1] 金亮, 徐伟伟, 李小白, 等. DNA流式细胞术在植物遗传及育种中的应用[J]. 中国细胞生物学学报(JIN L, XU W W, LI X B, et al. Application of DNA flow cytometry to plant genetics and breeding [J]. Chinese Journal of Cell Biology), 2016, 2: 225-34.
- [2] 程小艳, 武会娟. 流式细胞术最新进展及临床应用[J]. 中国免疫学杂志(CHENG X Y, WU H J. Latest progress and clinical application of flow cytometry [J]. Chinese Journal of Immunology), 2019, 10: 1271-6.
- [3] 张月霞, 张立营, 赵权. 流式细胞术的医学应用现状与前景[J]. 中国当代医药(ZHANG Y X, ZHANG L Y, ZHAO Q. Current status and prospects of medical application of flow cytometry [J]. China Modern Medicine), 2019, 26(34): 28-30.
- [4] XUE Z H, GUO J, MA R Y, et al. The DDB1-DCAF2 complex is essential for B cell development because it regulates cell cycle progression [J]. Cell Mol Immunol, 2020, 18(3): 758-60.
- [5] 刘锡娟, 丁慧荣, 田志华, 等. FACS Aria流式细胞仪无菌操作分选高纯度细胞亚群[J]. 安徽医科大学学报(LIU X J, DING H R, TIAN Z H, et al. Sorting sterile cell subpopulation with high purity on FACS Aria [J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui), 2014, 49(12): 1811-5.
- [6] 郭陈智, 史桂英. 流式分选仪FACS Aria II分选GFP阳性乳腺癌MCF-7细胞株的条件优化研究[J]. 上海交通大学学报(医学版)(GUO C Z, SHI G Y. Study on favorable setup of flow cytometry sorter FACS Aria n in sorting GFP positive population of breast cancer cell line MCF-7 [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University, Medical Science), 2013, 33(1): 127-30.
- [7] 张强, 顾明亮. 单细胞测序技术及其在乳腺癌研究中的应用[J]. 遗传(ZHANG Q, GU M L. Single-cell sequencing and its application in breast cancer [J]. Hereditas), 2020, 42(3): 250-68.
- [8] 过冬冬, 孙芬, 贺轩昂, 等. 单细胞测序技术在肝脏疾病的应用与展望[J]. 生物技术通报(GUO D D, SUN F, HE X A, et al. Application and prospects of single-cell sequencing in liver disease [J]. Biotechnology Bulletin), 2021, 37(1): 137-44.
- [9] JACKSON K, MILNER R J, DOTY A, et al. Analysis of canine myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) utilizing fluorescence-activated cell sorting, RNA protection mediums to yield quality RNA for single-cell RNA sequencing [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2021, doi: 10.1016/J.VETIMM.2020.110144.
- [10] 熊静, 王思雨, 张云惠, 等. 不同离心力分离外周血单个核细胞的条件优化[J]. 检验医学与临床(XIONG J, WANG S Y, ZHANG Y H, et al. Condition optimization of different centrifugal force on separating peripheral blood mononuclear cells [J]. Laboratory Medicine and Clinic), 2019, 16(3): 289-91.
- [11] 李晓亮, 林成, 王巧云, 等. 机械离心应力对骨膜细胞与骨髓间充质干细胞体外增殖和矿化的影响[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志(LI X L, LIN C, WANG Q Y, et al. Effects of mechanical centrifugal stress on the proliferation and mineralization of periosteal cells and bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro* [J]. Chinese Journal of Conservative Dentistry), 2018(1):

- 6-13.
- [12] 李飞, 潘妍, 张建平. 人外周血单个核细胞分离优化[J]. 生物化工(LI F, PAN Y, ZHANG J P. Study on optimization of human peripheral blood mononuclear cell isolation [J]. *Biological Chemical Engineering*, 2019, 5(5): 68-70.
- [13] 蒋斌, 郑明辉, 张斌, 等. 三维载体培养下离心力对骨髓间充质干细胞增殖的影响[J]. 解剖学杂志(JIANG B, ZHENG M H, ZHANG B, et al. Effects of centrifugal force on proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells in the three-dimensional carrier [J]. *Chinese Journal of Anatomy*, 2018, 41(1): 1-4.
- [14] WU X Y, BAI Z Y, WANG L, et al. Magnetic cell centrifuge platform performance study with different microsieve pore geometries [J]. *Sensors*, 2019, doi:10.3390/s20010048.
- [15] CAO W Q, GUO J, WEN X F, et al. CXXC finger protein 1 is critical for T-cell intrathymic development through regulating H3K4 trimethylation [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11687.
- [16] 张晓茹, 张明英, 刘怡宁, 等. 抗体滴定在血液细胞流式细胞术中的应用[J]. 生物技术进展(ZHANG X R, ZHANG M Y, LIU Y N, et al. Application of antibody titration in flow cytometry of hematopoietic cells [J]. *Current Biotechnology*, 2020, 10(3): 284-91.