

教学研究

“小鼠脾脏单细胞悬液不同制备方法及其流式细胞术检测”综合实验的建立与探索

黄莹莹* 邢月婷 阿依西布·萨吾提 杨丹 李艳伟 王佳佳 郭春 周南
(浙江大学医学院公共技术平台, 杭州 310058)

摘要 由于流式细胞术应用中涉及的样品制备、仪器使用和数据解读均比较复杂, 该文对流式实验教学的内容和形式进行了有益的探索, 建立了“小鼠脾脏单细胞悬液不同制备方法及其流式细胞术检测”的综合性实验。新方法不仅包含小鼠原代组织取材、单细胞悬液不同制备方法(手动解离、自动解离)、流式细胞仪计数、显微观察等步骤, 而且能涵盖流式抗体的配色与标记、流式细胞仪操作、数据分析(T淋巴细胞亚群的分群)等多个知识点, 并围绕不同解离方法对实验结果的影响进行了探讨, 极大地改善了实验教学效果和质量, 充分发挥了流式细胞术在高校教学和科研中的重要支撑作用, 使学生学会完整的流式技术链条, 并提升了其科研能力与创造力, 从而为培养复合型科研人才提供助力。

关键词 单细胞悬液; 手动解离; 自动解离; 流式检测; 实验教学

Establishment and Preliminary Study of Comprehensive Experiment of “Different Preparation Methods and Flow Cytometry Detection of Mouse Spleen Single Cell Suspension”

HUANG Yingying*, XING Yueting, Sawuti Ayixibu, YANG Dan, LI Yanwei, WANG Jiajia, GUO Chun, ZHOU Nan
(Core Facilities, School of Medicine Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Due to the complexity of sample preparation, instrument manipulation and data analysis involved in FCM (flow cytometry) applications, beneficial explorations on the content and form of FCM experimental teaching were conducted. Accordingly, a comprehensive experiment of “different preparation methods and FCM detection of mouse spleen single cell suspension” has been established. The new method can not only include sampling of mouse primary tissue, different preparation methods of single-cell suspension (manual dissociation, automatic dissociation), flow cytometer counting, microscopic observation, etc., but also cover many knowledge points, such as color matching and labeling of antibodies in FCM, operation of flow cytometer, data analysis (cluster of T lymphocyte subsets), etc. The influences of different dissociation methods on the experimental results were discussed. It greatly improves the effectiveness and quality of experimental teaching, gives full play to the important

收稿日期: 2023-02-02

接受日期: 2023-02-22

浙江大学实验技术研究项目(批准号: SYBJS202209)资助的课题

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

Received: February 2, 2023

Accepted: February 22, 2023

This work was supported by the Experimental Technology Research Project of Zhejiang University (Grant No.SYBJS202209)

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

supporting role of FCM in teaching and scientific research in colleges and universities. Based on these lessons, students can learn the complete technology chain of FCM, which enhances their scientific research ability and creativity. The comprehensive experiment would provide impetus for the cultivation of compound scientific research talents.

Keywords single cell suspension; manual dissociation; automatic dissociation; flow cytometry; experimental teaching

随着科学与技术的发展,流式细胞术(flow cytometry, FCM)已成为生物学、医学等基础研究及临床诊断的重要技术之一^[1]。随着流式技术的普及和日益增长的科研需求,各高等医学院校陆续开展了流式细胞术相关实验课程。但流式作为一门新型的细胞分析和分选技术,涉及仪器参数众多,对检测样本处理方法及操作人员要求较高。未接触过流式的初学者在短时间内掌握此技术有一定难度,因此,流式教学实验往往局限于理论讲解或简单的上机操作演示,缺乏系统又高效的综合实验示例^[2-3]。免疫学、肿瘤学、病理学及神经生物学等众学科关于细胞的功能研究,均需要先从小鼠或斑马鱼等模式生物原代组织中分离出高纯度高活性的目的亚群,但在传统流式教学中,因操作困难而较少涉及原代细胞的解离,学生缺少样品制备相关知识技能的锻炼^[4];而有些细胞分离技术的实验课程,往往只采用机械分离法、差速离心法或密度梯度离心法^[5],缺乏新技术的引入。小鼠原代脾脏单细胞悬液制取步骤相对较少,学生较易掌握,符合有限实验课学时的要求。为此,本研究拟以小鼠脾脏组织为材料,引入最新的组织处理系统,结合自动和手动两种不同的原代细胞解离方法,建立一个综合性的流式细胞术检测分析实验,以期帮助学生了解流式细胞术的基本原理及前沿应用、不同样本制备方法对流式实验结果的影响、流式抗体标记、流式细胞仪常规操作等,从而最大程度地调动学生的主动性和创造性,提高学生科研实践能力和解决实验问题的能力,使流式细胞术能够更广泛深入地应用于各科研领域。

1 实验原理

1.1 流式细胞术

流式细胞术是利用流式细胞仪对快速流动的单个细胞或生物颗粒的多个参数进行定性/定量(相对/绝对)分析或分选的生物医学技术^[4]。流式细胞仪采集的光信号包括散射光和荧光两种,液流中悬浮的细胞或待测颗粒能够使激光束发生散射,散

射光信号包括正对激光方向接收的前向角散射光(forward scatter, FSC, 可以反映细胞大小)和与激光方向在同一水平面并于激光成90度角的侧向角散射光(side scatter, SSC, 可以反映内部颗粒度)^[6]。细胞上结合的荧光素、染料分子或表达的荧光蛋白被激光激发后能够发射波长高于激发光的荧光,流式细胞仪通过信号检测器接收信号,并由电子系统将光信号转换为电流信号,再由信号处理系统将电信号转变成脉冲信号、数字信号并最终传送至计算机系统进行处理,计算机系统分析相关信号来反映细胞表达抗原、合成细胞因子等理化特征^[6]。FCM具有检测速度快、参数多、灵敏度高、采集数据量大、节约样本及成本等优势^[4],因此广泛应用于免疫学^[7]、发育和生殖生物学^[8]、神经生物学^[9]、临床诊断^[10]、药理学^[11]、肿瘤学^[12]及植物育种^[13]等学科领域。

1.2 倒置荧光显微镜

倒置荧光显微镜法是一种快速、敏感、简单、经济、准确的细胞形态鉴定方法。倒置荧光显微镜一般由倒置显微镜和落射荧光装置组成,是近代发展起来的新式荧光显微镜,具有在培养瓶或培养皿内进行显微观察的特点,可以实现组织、细胞、沉淀物或流质等的明场、相差、荧光观察,是科学研究工作中的有效支撑工具^[14]。因此,在生物、医学等学科的实验教学中,使学生掌握倒置荧光显微镜的使用就很有必要。只有正确、规范地使用倒置荧光显微镜,才能发挥它的最大功能,使之更好地为实验教学和科学研究服务。

1.3 组织处理系统

组织是进行细胞学与分子生物学研究的重要材料。目前将原代组织分离为单个细胞的传统方法有机械法、酶消化法或两者组合等^[15]。不同的处理方法对细胞的得率、活性等均有不同程度的影响。gentleMACS™组织处理系统是一款全自动的单细胞制备仪,具有标准化的组织解离程序,可提高下游分析的重复性和可靠性;具有全封闭的系统,可保证样本无菌性;具有配套的解离试剂盒,操作相对简单

方便^[15]。该系统配套的组织解离管由隔膜、转子和定子组成,目前主要是两种,一种是C管,可将组织制备成单细胞悬液,用于细胞生物学研究,另一种是M管,可将样本制备成组织匀浆,用于分子或微生物学研究。本研究拟获得符合流式实验需要的单细胞悬液用到的是C管。

2 实验课程的设计

2.1 实验目的

本课程的实验目的包括:①掌握小鼠脾脏单细胞的不同制备方法,了解手动解离与自动解离系统对获得的样本活性、得率的差异;②了解倒置荧光显微镜的原理,学会用倒置荧光显微镜观察细胞形态;③了解流式细胞分析技术的原理,学会简单的流式样本上机操作(包括电压调试、荧光补偿调试、数据获取与分析过程中的设门等);④学会用流式细胞仪对单细胞样本进行计数;⑤学会流式细胞术检测结果的解读和分析方法。

2.2 实验材料与仪器

实验材料:磷酸盐缓冲液(PBS)购自瑞典Mediatech公司;流式抗体CD4、CD8 α 和死活染料FVD(fixable viability dye)购自Biolegend公司;TCR β 购自eBioscience公司;C57BL/6品系小鼠为6~8周龄,由浙江大学医学院动物中心提供。自动解离用的C管购自德国Miltenyi公司。无菌细胞筛、无菌流式管、15 mL离心管购自Corning公司。

实验仪器:离心机Thermo ST 16R购自美国Thermo Fisher Scientific公司;流式细胞仪ACEA NovoCyte™购自美国Agilent technologies公司;流式细胞仪CytoFLEX LX购自美国Beckman Coulter公司;倒置荧光显微镜(IX53)购自日本Olympus公司;gentleMACS™组织处理系统购自德国Miltenyi公司。

2.3 实验方法

2.3.1 脾脏单细胞悬液制备 小鼠原代脾脏单细胞悬液制取,参照实验室原有方法^[4]进行,即(1)取6~8周龄小鼠脾脏置于含4 mL PBS的60 mm平皿中。(2)将该脾脏组织剪成大小均一的小块,于分析天平上称重,记录每份脾脏组织样本重量。(3)上述称重后的样本分成2组,一组进行手动解离,即使用毛玻璃片将脾脏研磨成细胞悬液;另一组进行自动解离。(4)将研磨好的细胞悬液通过70 μ m细胞筛过滤到15 mL离心管中。(5)过滤后的样本置于离心机中

400 \times g、4 °C离心5 min。(6)取出离心管,弃掉上清,用1 mL红细胞裂解液重悬细胞,室温放置7 min。(7)加入5 mL PBS,终止红细胞裂解过程。(8)将终止红细胞裂解后的样本置于离心机中400 \times g、4 °C离心5 min。(9)弃上清,细胞沉淀用含2%血清的PBS重悬后用于后续实验。

自动解离步骤,参考文献[15]方法进行,即将样本装入C管,加入5 mL PBS,旋紧C管,使组织块落在解离管的底部,避免黏附在管壁上。随后将待解离的C管倒置插入gentleMACS™组织处理系统的样本通道上。在参数界面选择“m-spleen-01-01”为解离程序,运行2次。解离结束后将样品经过70 μ m滤膜过滤到15 mL离心管中;加入5 mL PBS清洗滤膜和解离管,以免细胞残留。后续处理同上述步骤(5)~(9)。

2.3.2 样本管设置与编号 每个学生小组取6支流式管并编号,自动解离设3个重复;手动解离设3个重复。一个学生小组做手动解离实验的同时,另一个小组可进行自动解离实验;结束后两组同学互相交换,从而提高上课效率。

2.3.3 细胞计数 上述2.3.1第(8)步离心后的细胞,弃上清,加入6 mL PBS重悬,吹打混匀;每份样本吸取100 μ L于流式细胞仪ACEA NovoCyte™进行计数,并计算1 mg小鼠脾脏组织中细胞的数量。

2.3.4 显微镜形态学观察 吸取1 mL上述制备好的单细胞悬液至12孔板中,分别于0 h、0.5 h时将12孔板(不带盖子)置于Olympus IX53倒置荧光显微镜下观察细胞形态并拍照。

2.3.5 流式抗体标记 流式实验以小鼠脾脏T淋巴细胞亚群(TCR β 、CD4、CD8 α)检测为例,并同时标记死活细胞鉴定染料FVD。取上述制备好的脾脏单细胞悬液(1×10^6 个/样本)进行表面标志物染色(100 μ L染色体系,抗体稀释比为1:1 000),室温避光反应30 min。FACS缓冲液液[1 \times PBS+0.5%(V/V) FBS+2 mmol/L EDTA]洗2次,500 \times g、4 °C离心5 min,弃上清。FACS缓冲液洗2次后,重悬,备用。

2.3.6 流式上机分析实验 标记好的流式样本于流式细胞仪CytoFLEX LX上进行检测。在实验开始前,建议学生预习观看提前录制好的仪器培训视频,使学生对仪器基本操作有一定了解。然后,由带课教师演示上机分析步骤,重点讲解流式分析实验中关键参数(电压、补偿、阈值、流速及门控等)的调试、设置;仪器的开关机流程及注意事项等。最后,学生分组在

老师指导下进行上机实操练习,巩固并掌握相关知识。

2.3.7 统计学处理 全部实验数据经GraphPad Prism 9.0软件进行统计学分析并作图,采用 t 检验。流式数据使用FlowJo V10.7.1软件分析并作图。

3 实验结果分析

3.1 两种解离方法对细胞数量的影响

为使学生了解原代组织手动解离和自动解离两种不同的方法,本实验对同一小鼠来源的脾脏样本分别进行了手动研磨解离和组织处理系统自动解离,实验步骤如图1所示。首先,考察了两种解离方法对获得的细胞数量的影响,由图2可知,1 mg

小鼠脾脏组织中,自动解离获得的样本细胞数量为 5.40×10^8 个,而手动解离获得的样本细胞数量为 7.42×10^8 个,两者差异不显著。

3.2 两种解离方法对细胞形态学的影响

从图3A、图3B可知,将重悬的小鼠脾脏单细胞悬液加样至孔板中,细胞呈悬浮状态,因此,加样0 h,在倒置荧光显微镜下观察时,可观察到细胞在溶液中有漂移现象,细胞呈圆形,且大小不一,手动解离和自动解离的细胞形态基本一致。加样0.5 h再观察时,可见较多圆形、均一、状态良好的细胞,且背景干净,基本无死细胞或碎片杂质,两种解离方法获得的细胞形态无显著差异(图3C和图3D)。

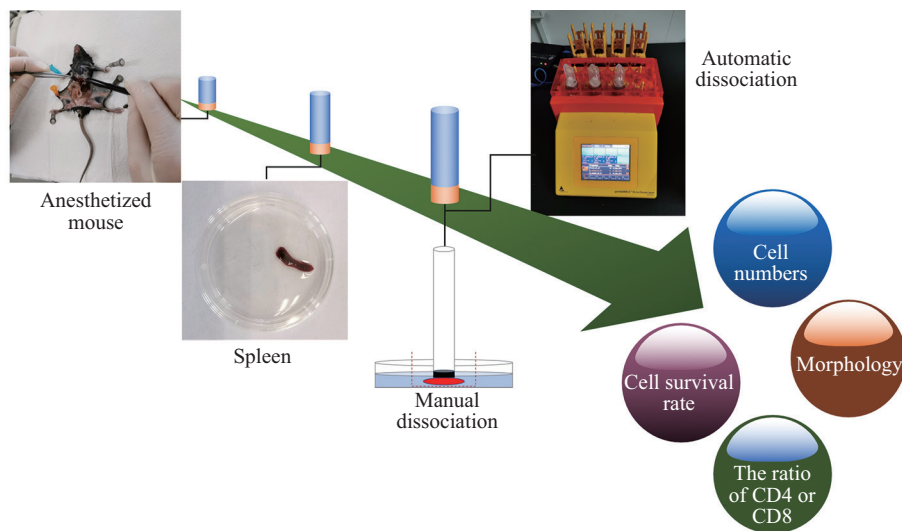
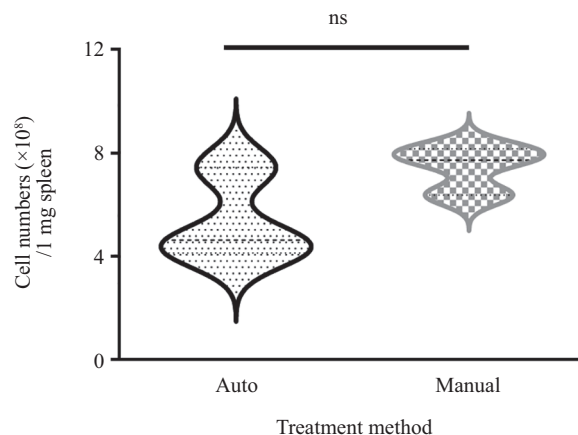


图1 实验流程图

Fig.1 Workflow as a schematic description

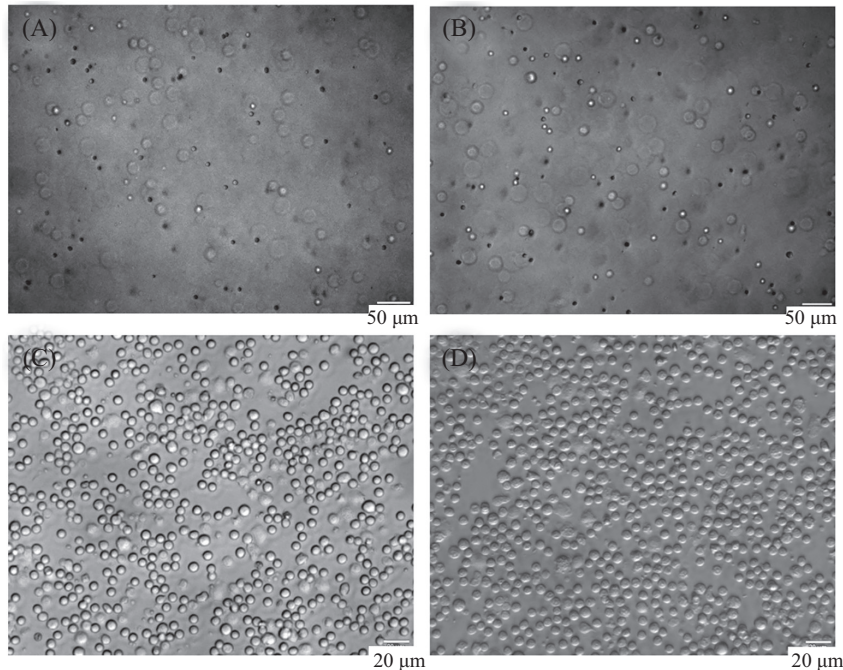


Auto: gentleMACS™组织处理系统自动解离样本; manual: 手动研磨解离样本。ns: 差异不显著。

Auto: samples dissociated by gentleMACS™ system; manual: samples dissociated by manual grinding. ns: not significant.

图2 不同解离条件下细胞数量的比较

Fig.2 Comparison study of cell numbers under different dissociation conditions

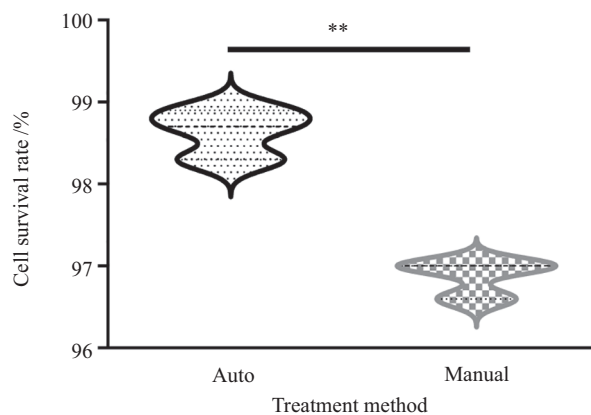


A: 手动解离样本, 于加样0 h时观察; B: 自动解离样本, 于加样0 h时观察; C: 手动解离样本, 于加样0.5 h时观察; D: 自动解离样本, 于加样0.5 h时观察。

A: the sample obtained by manual dissociation, and observed at 0 h after loading; B: the sample obtained by automatic dissociation, and observed at 0 h after loading; C: the sample obtained by manual dissociation, and observed at 0.5 h after loading; D: the sample obtained by automatic dissociation, and observed at 0.5 h after loading.

图3 不同解离方法后的细胞形态学观察

Fig.3 Morphological observation of cells after different dissociation methods



Auto: gentleMACS™组织处理系统自动解离样本; manual: 手动研磨解离样本。 ** $P < 0.01$, $n = 3$ 。

Auto: samples dissociated by gentleMACS™ system; manual: samples dissociated by manual grinding. ** $P < 0.01$, $n = 3$ 。

图4 不同解离条件下细胞存活率的比较

Fig.4 Comparison study of cell survival rate under different dissociation conditions

3.3 两种解离方法对细胞存活率的影响

解离后的样本分别用死活细胞鉴定染料FVD标记, 用流式细胞仪检测阳性细胞百分比, 阳性率越高说明解离后的细胞活力越低。从图4可知, 组织处理系统自动解离样本的存活率为98.63%, 显著高于手动研磨解离样本($P < 0.01$)。这说明对于原代组织

细胞, 用自动解离的方法可能更有利于获得高活性的细胞。

3.4 两种解离方法对CD4、CD8比例的影响

本实验参考文献[7,16]的报道, 结合现有免疫学知识建立了小鼠脾脏T淋巴细胞亚群分析方案, 主要包含了死活细胞鉴定染料FVD和T淋巴细胞亚

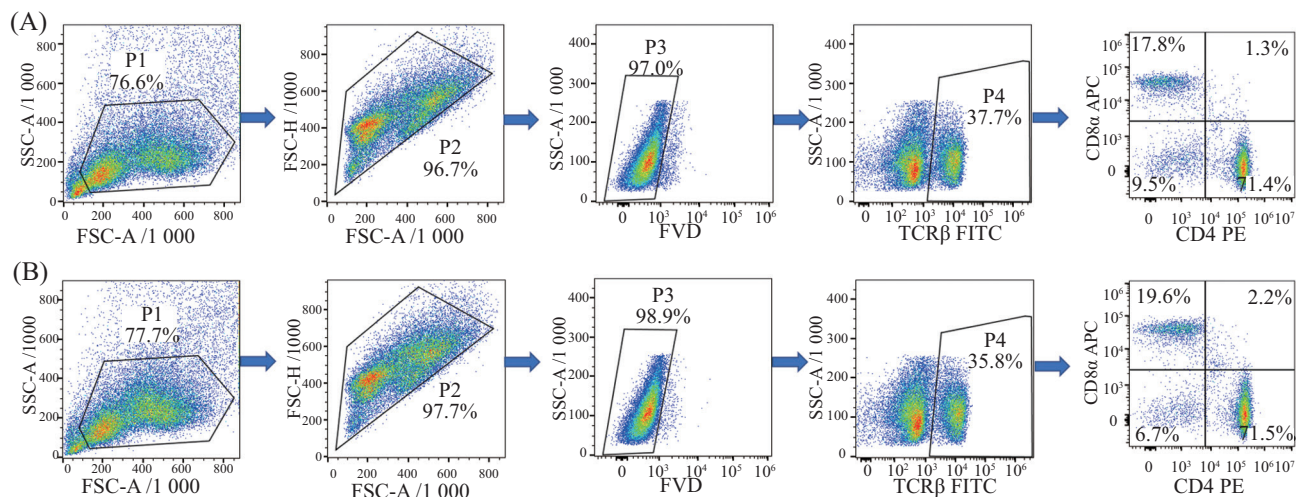
表1 流式分析方案

Table 1 The panel for flow cytometry

标志物 Markers	反应种属 Reactive species	荧光素 Fluorochrome	用途 Purpose	最大激发波长 Excitation max /nm	最大发射波长 Emission max /nm	克隆号 Clone No.
FVD	Mouse	BV421/Pacific Blue	Live/dead	404	446	—
TCR β	Mouse	FITC	T-cell	498	518	H57-597
CD4	Mouse	PE	T-cell	565	576	GK1.5
CD8 α	Mouse	APC	T-cell	651	660	53-6.7

—代表没有。

— means there is no clone.



A: 手动解离样本; B: 自动解离样本。先圈选除碎片或死细胞以外的淋巴细胞亚群, 然后圈定单个细胞排除黏连, 再圈出活细胞群。最后分析 TCR β^+ 细胞中 CD4 $^+$ 、CD8 $^+$ T 细胞亚群的情况。

A: the sample obtained by manual dissociation; B: the sample obtained by automatic dissociation. Aggregate gates were used to exclude cell and/or dye aggregates prior to identification of lymphocytes. Following identification of singlets, viable cells were differentiated from nonviable cells. Afterward, TCR β^+ CD4 $^+$ and TCR β^+ CD8 $^+$ T cell subsets were identified.

图5 小鼠脾脏T淋巴细胞亚群分析策略图

Fig.5 Analysis strategy of T lymphocytes subsets in mouse primary spleen

群分群的表型分子(TCR β 、CD4、CD8 α)(表1)。通过该4色方案, 向学生全面演示了多色流式分析策略, 具体如图5所示, 先用FSC-A与SSC-A圈出除碎片以外的活细胞; 再用FSC-A与FSC-H排除黏连体, 圈出单个细胞; FVD阴性细胞群为活细胞亚群; 然后利用TCR圈出总的T细胞; 最后在TCR β^+ 细胞中区分CD4 $^+$ 和CD8 $^+$ T淋巴细胞亚群, 即CD4辅助T淋巴细胞(TCR β^+ CD4 $^+$ T)和CD8杀伤性T淋巴细胞(TCR β^+ CD8 $^+$ T)。流式分析图右下象限为CD4 $^+$ T淋巴细胞亚群的百分比例, 左上象限为CD8 $^+$ T淋巴细胞亚群的百分比例。由图6可知, 两种解离条件下, CD4 $^+$ 、CD8 $^+$ T淋巴细胞亚群比例无显著差异。

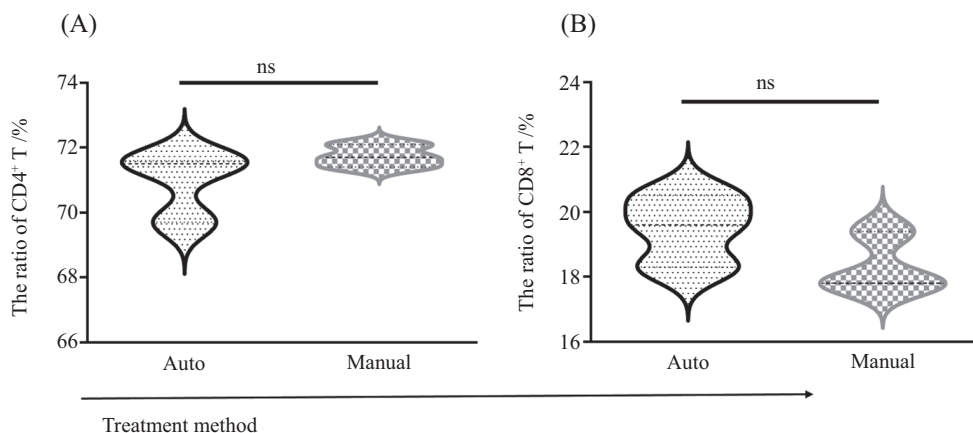
3.5 新综合实验与传统流式实验的比较

从表2可知, 与传统流式上机实验相比, 本课程实验综合性强, 涵盖多个流式相关知识, 内容丰

富, 呈现了相对完整的流式技术链条。

4 讨论

由于流式细胞术应用中涉及的样品制备、仪器使用和数据分析均比较复杂, 因此, 结合某一项具体的细胞生物学实验进行流式教学, 合并讲解、演示流式相关的多个知识点, 则更容易让学生在实操中理解、掌握该科研技能^[17]。本课程对流式实验教学的内容和形式进行了有益的探索, 综合取材、单细胞悬液不同制备方法、计数、显微观察、流式抗体标记、流式细胞仪操作、数据分析等环节, 建立了“小鼠脾脏单细胞悬液不同制备方法及其流式细胞术检测”的综合性实验, 着力于使学生掌握完整的流式技术链条, 可以与他们的课题更好整合, 开拓视野, 提升他们的科研能力与创造力。



A: CD4⁺ T细胞比例; B: CD8⁺ T细胞比例。Auto: gentleMACS™组织处理系统自动解离样本; manual: 手动研磨解离样本。ns: 差异不显著。

A: the ratio of CD4⁺ T cells; B: the ratio of CD8⁺ T cells. Auto: samples dissociated by gentleMACS™ system; manual: samples dissociated by manual grinding. ns: not significant.

图6 不同解离条件下CD4⁺、CD8⁺ T细胞比例的比较

Fig.6 Comparison study of the ratio of CD4⁺, CD8⁺ T cells under different dissociation conditions

表2 新综合实验与传统流式实验的比较

Table 2 Comparison between new comprehensive experiment and the traditional flow cytometry experiments

项目 Items	传统流式实验 Traditional flow cytometry experiments	新综合实验 New comprehensive experiment
学时数	1.5 h	3 h
知识点	流式细胞术基本原理 与上机操作流程	小鼠原代组织取材, 单细胞悬液不同制备方法, 流式细胞仪计数, 倒置显微镜原理及使用, 流式抗体的配色与标记, 流式细胞术基本原理与上机操作流程, T淋巴细胞亚群的分群
呈现形式	单一、抽象	多个知识点、相对完整的流式技术链

由图2可知,每毫克小鼠脾脏组织中,自动解离获得的样本细胞数量和手动解离获得的差异不显著;但手动解离的细胞数量是略高于自动解离的,有可能是因为样本从解离管转移到离心管过程中有部分损失。另外,本实验由于课时限制,选用了gentleMACS™组织处理系统的标准内置程序进行的解离,后续学生科研过程中可以优化仪器设置程序,探索更佳的实验方案(protocol),这也有助于激发学生的实验兴趣与创造性,培养学生的积极主动性与思考设计能力。

将重悬的小鼠脾脏单细胞悬液加样0 h时进行观察,细胞尚处于悬浮状态,在显微镜下很难聚焦,因此,拍照时会呈现大小不一(图3A和图3B),这大小不一的圆点可能是处于不同聚焦平面的脾脏细胞。而加样静置0.5 h后再进行观察,大部分细胞已沉降

到孔板底部,此时观察到的细胞数量多且状态良好(图3C和图3D)。通过本实验,学生不但了解了倒置荧光显微镜的基本操作,也明白了悬浮细胞的显微观察应在加样静置一段之后采集图像较佳。

从图4可知,对于原代组织细胞,用自动解离的方法可能更有利于获得高活性的细胞,这是因为相较于人工手动解离,组织处理系统在解离温度、强度方面均具有标准化的程序,这与文献报道基本一致^[15]。这也提示学生今后课题实验若是遇到难解离的原代组织,可利用大型仪器辅助制备流式样本。

浙江大学医学院公共技术平台自2014年起,陆续在本科生和研究生的生物技能课中开设了流式细胞仪上机实验课^[2,18],但原课程为传统教学方法,仅讲解流式上机流程,而且上机演示无样本或用荧光微球代替,形式单一且抽象,学生理解和掌握均有难

度。本实验建立的新方法综合性强,虽然学时数比传统流式实验多了1.5 h(表2),但包含的流式相关知识点多达7个,明显多于传统实验,有利于提高学生的参与度,形成完整的实验理念。

综上所述,本课程实验为探索性的流式综合实验,发挥了公共平台现有的大型仪器资源优势和师资特长,使实验课与学生的课题研究紧密连接起来,紧跟技术发展,极大地提高了学生的学习热情和学习的主观能动性,增强了学生独立思考、分析问题、解决问题的能力。同时其也提升了实验教学效果和质量,充分发挥了流式细胞术在高校教学和科研中的重要支撑作用,从而为培养合格的复合型科研人才提供助力。

参考文献 (References)

- [1] 张英, 李莉, 任林柱, 等. 开设“流式细胞术”实验课提高研究生实践能力[J]. 实验室研究与探索(ZHANG Y, LI L, REN L Z, et al. Setting flow cytometry experiment lesson to raise graduates' practice ability [J]. Research and Exploration in Laboratory), 2015, 34(5): 182-5.
- [2] 宋兴辉, 刘双双, 黄莹莹, 等. 高校大型仪器共享平台人才培养模式路径探析—基于浙江大学医学院公共技术平台的实践与探索[J]. 实验技术与管理(SONG X H, LIU S S, HUANG Y Y, et al. Study on talent training model and path of large-scale instrument sharing platform in colleges and universities: based on practice and exploration of public technology platform of Medical School of Zhejiang University [J]. Experimental Technology and Management), 2022, 39(4): 232-5.
- [3] 汪洪涛, 唐洁, 姚春艳, 等. 《流式细胞术》课程分层次教学探索与实践[J]. 蚌埠医学院学报(WANG H T, TANG J, YAO C Y, et al. The exploration and practice of stratified teaching of flow cytometry [J]. J Bengbu Med Coll), 2018, 43(7): 970-2.
- [4] 黄莹莹, 邢月婷, 孟晓瑜, 等. 离心参数对流式分选后样本的影响研究[J]. 中国细胞生物学学报(HUANG Y Y, XING Y T, MENG X Y, et al. Study on the influence of centrifugal parameters on the samples sorted by flow cell sorting [J]. Chinese Journal of Cell Biology), 2021, 43(10): 2001-8.
- [5] 任华, 张红锋, 尹尉翰, 等. 免疫学技术在细胞生物学教学中的应用[J]. 中国细胞生物学学报(REN H, ZHANG H F, YIN W H, et al. Immunological techniques in teaching cell biology [J]. Chinese Journal of Cell Biology), 2014, 36(3): 400-2.
- [6] 权丽娟, 张敏. 流式细胞术在神经细胞研究中的应用进展[J]. 中国细胞生物学学报(QUAN L J, ZHANG M. Advances in the application of flow cytometry in nerve cells research [J]. Chinese Journal of Cell Biology), 2022, 44(9): 1822-9.
- [7] CUI Z J, ZHAO F, CHEN X P, et al. NPAT supports CD8⁺ immature single-positive thymocyte proliferation and thymic development [J]. J Immunol, 2022, 209(5): 916-25.
- [8] CHEN L, WANG W J, LIU Q, et al. NAT10-mediated N4-acetylcytidine modification is required for meiosis entry and progression in male germ cells [J]. Nucleic Acids Res, 2022, 50(19): 10896-913.
- [9] CHEN P X, WANG W, LIU R, et al. Olfactory sensory experience regulates gliomagenesis via neuronal IGF1 [J]. Nature, 2022, 606(7914): 550-6.
- [10] ZHANG Q, MAO Y, LIN C, et al. Mass cytometry-based peripheral blood analysis as a novel tool for early detection of solid tumours: a multicentre study [J]. Gut, 2022, doi: 10.1136/gutjnl-2022-327496.
- [11] HUANG, ZHANG T Y, JIANG X C, et al. Iron oxide nanoparticles augment the intercellular mitochondrial transfer-mediated therapy [J]. Science Advances, 2021, 7(40): eabj0534.
- [12] ZHENG H L, ZOU W B, SHEN J Y, et al. Opposite effects of coinjection and distant injection of mesenchymal stem cells on breast tumor cell growth [J]. Stem Cells Transl Med, 2016, 5: 1216-28.
- [13] CÁPAL P, ENDO T R, VRÁNA J, et al. The utility of flow sorting to identify chromosomes carrying a single copy transgene in wheat [J]. Plant Methods, 2016, 12: 24.
- [14] 莫倩珍, 刘静. 倒置荧光显微镜在医学研究生实验教学中的应用与管理[J]. 教育教学论坛(MOU Q Z, LIU J. Application and management of inverted fluorescence microscope in experimental teaching of medical graduate students [J]. Education Teaching Forum), 2016, 16: 261-2.
- [15] 宋兴辉, 沈浩, 陈瑾. 自动化神经组织单细胞悬液制备探索性实验教学实践[J]. 中国细胞生物学学报(SONG X H, SHEN H, CHEN J. Exploratory experimental teaching practice on automatic neural tissue dissociation to viable single cells [J]. Chinese Journal of Cell Biology), 2020, 42(8): 1374-80.
- [16] JIN X X, XU Q, PU C F, et al. Therapeutic efficacy of anti-CD19 CAR-T cells in a mouse model of systemic lupus erythematosus [J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(8): 1896-903.
- [17] 沈筱芸, 郭杏, 黎远东, 等. 流式细胞术检测金花茶水提物作用于T淋巴细胞亚群实验设计[J]. 实验技术与管理(SHEN X Y, GUO X, LI Y D, et al. Experimental design for effect of aqueous extract of Camellia chrysantha on T lymphocyte subsets by flow cytometry [J]. Experimental Technology and Management), 2021, 38(11): 39-44.
- [18] 黄莹莹, 杨晨, 丁巧灵, 等. 利用多模式培训提高大型仪器使用效益的探索[J]. 实验室研究与探索(HUANG Y Y, YANG C, DING Q L, et al. Exploration and practice of improving application effect of large-scale instruments by using multi-mode training program [J]. Research and Exploration in Laboratory), 2020, 39(8): 283-6.