

# 百迈客单细胞产品

## 送样指南



百迈客生物科技  
BIOMARKER TECHNOLOGIES

为 世 界 创 造 新 的 可 能

## 目录

1、前言 .....	4
1.1 适用范围 .....	4
1.2 声明 .....	4
2、送样要求 .....	5
2.1 送样量要求 .....	5
2.2 样本质量要求 .....	5
3、样本采集与运输 .....	6
3.1 单细胞转录组/单细胞免疫组库 .....	6
3.1.1 新鲜组织样本 .....	6
3.1.2 血液样本 .....	8
3.1.3 PBMC/细胞悬液样本 .....	9
3.1.4 穿刺样本 .....	9
3.2 动物单细胞核转录组/单细胞 ATAC .....	10
3.2.1 冷冻组织样品 .....	10
3.2.2 冻存细胞样本 .....	10
3.2.3 其他类 .....	11
3.3 植物单细胞核转录组 .....	11
3.3.1 新鲜组织样品 .....	11
3.3.2 冷冻组织样品 .....	12
3.4 单细胞多组学 ATAC+GEX .....	13
4、项目流程 .....	13
4.1 悬液制备方案评估 .....	13
4.2 正式实验 .....	13
4.2.1 上门服务 .....	14
4.2.2 组织寄送 .....	14
4.2.3 仪器耗材清单 .....	16
4.3 风险提示与评估 .....	17

5、单细胞悬液制备方法.....	17
5.1 解离酶选择.....	17
5.2 重悬溶液选择.....	21
5.3 单细胞悬液制备流程参考.....	21
5.3.1 常规组织解离.....	21
5.3.2 全血分离 PBMC.....	22
5.3.3 培养细胞.....	23
5.3.4 CD3 <sup>+</sup> 免疫细胞分选.....	23
5.3.5 脑组织核悬液制备.....	23
5.3.6 其它文献参考.....	24

# 1、前言

## 1.1 适用范围

本指南介绍百迈客医学实验平台单细胞产品的送样要求及制备方法，采集送样前请仔细阅读。

## 1.2 声明

我国法定的传染病分为三大类：甲类（一类）传染病包括霍乱和鼠疫；乙类（二类）传染病包括传染性非典肺炎、新型冠状病毒 (2019-nCoV)肺炎、艾滋病、病毒性肝炎、人感染高致病性禽流感、脊髓灰质炎、麻疹、流行性出血热、狂犬病、登革热、流行性乙型肝炎、细菌性和阿米巴性痢疾、肺结核、伤寒和副伤寒、炭疽、流行性脑脊髓膜炎、白喉、百日咳、新生儿破伤风、猩红热、布鲁士病、梅毒、淋病、钩端螺旋体病、血吸虫、疟疾。丙类（三类）传染病包括流行性感冒、流行性腮腺炎、流行性和地方性斑疹、伤寒、风疹、麻风病、急性出血性结膜炎、黑热病、丝虫病、包虫病、还有除了霍乱、细菌、阿米巴性痢疾、伤寒和副伤寒以外的感染性腹泻。

涉及上述传染病的科学研究需符合国家的相关规定，为严格遵守国家法律法规，本着对社会及相关操作人员负责的态度，我司要求客户方真实准确地提供样品的生物安全性信息，对样品是否含有上述感染性病原体进行事先说明。样品中含有上述感染性病原体时，客户方需要提供符合生物安全等级要求的实验室以便开展相关实验，实验进行时，客户方有义务协助我方实验员做好实验安全防护。客户方不得隐瞒样品的生物安全性信息，若出现样品含有感染性病原体而客户事先未告知我司的情况，一经发现我司将停止进行相关项目，已产生的费用由客户方承担。如因客户方提供的生物安全性信息不实、隐瞒样品感染性等有关情况等造成实验员及相关人员被感染、疾病传播等严重后果的，我司将按规定报告国家相关部门，并将通过法律等手段追究相关责任。

## 2、送样要求

### 2.1 送样量要求

目前百迈客单细胞产品包含：单细胞转录组、单细胞核转录组、单细胞免疫组库、单细胞 ATAC、单细胞多组学 ATAC+GEX，不同类型单细胞产品具体送样量要求如下表：

产品	样本类型	样本量要求
单细胞转录组 单细胞免疫组库	常规新鲜组织	≥200mg
	脊髓、皮质、脑胶质瘤	≥300mg
	关节滑膜	≥400mg
	冠状动脉、主动脉、椎间盘、脂肪、软骨、硬骨、坐骨神经	≥500mg
	穿刺样本	≥3 条
	外周血	≥3mL
	脑脊液	≥10mL
	腹水	5-10mL
	肺泡灌洗液	≥50mL
	流式分选细胞	≥5*10 <sup>5</sup> 个
	原代/培养/冻存细胞	≥1*10 <sup>6</sup> 个
单细胞核转录组 单细胞 ATAC	组织	≥100mg (RNA 提取另算)
	穿刺样本	≥3 条 (长度大于 1 cm)
	外周血	≥3mL
	流式分选细胞	≥5*10 <sup>5</sup> 个
	原代/培养/冻存细胞	≥1*10 <sup>6</sup> 个
单细胞多组学 ATAC+GEX	组织	≥200mg
	血液	> 5mL
	流式分选细胞	≥5*10 <sup>5</sup> 个
	原代/培养/冻存细胞	≥1*10 <sup>6</sup> 个

### 2.2 样本质量要求

产品名称	质控标准
单细胞转录组 单细胞免疫组库	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 细胞总数：&gt;5×10<sup>5</sup> 个；</li> <li>➤ 活性：&gt; 85%；</li> <li>➤ 直径：&lt;40μm；</li> <li>➤ 体积：&gt; 100μl；</li> <li>➤ 浓度：700~1200 cell/μl；</li> <li>➤ 结团率：&lt;15%；</li> <li>➤ 不含 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup></li> </ul>

<p>单细胞 ATAC 单细胞核转录组</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 细胞总数: <math>&gt;5 \times 10^5</math> 个 (最少为 <math>1 \times 10^5</math> 个);</li> <li>➤ 细胞活性: <math>&lt;5\%</math>;</li> <li>➤ 体积: <math>&gt;100 \mu\text{l}</math>;</li> <li>➤ 浓度: 700~1200 nucleus/<math>\mu\text{l}</math>;</li> <li>➤ 结团率: <math>&lt;10\%</math>;</li> <li>➤ 核膜完整性: 将细胞核分为 ABCD 级, 要求 A 级细胞核 <math>&gt;80\%</math></li> </ul>
<p>单细胞多组学 ATAC+GEX</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 细胞总数: <math>&gt;5 \times 10^5</math> 个 (最少为 <math>1 \times 10^5</math> 个);</li> <li>➤ 细胞活性: <math>&lt;5\%</math>;</li> <li>➤ 体积: <math>&gt;60 \mu\text{l}</math>;</li> <li>➤ 浓度: 2000~3000 nucleus/<math>\mu\text{l}</math>;</li> <li>➤ 结团率: <math>&lt;5\%</math>;</li> <li>➤ 核膜完整性: 将细胞核分为 ABCD 级, 要求 A 级细胞核 <math>&gt;80\%</math></li> </ul>

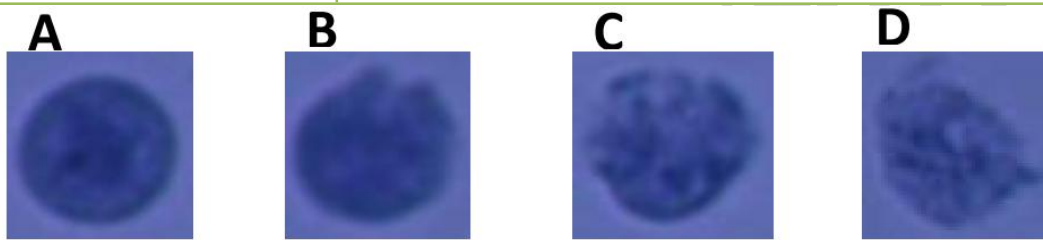


图 1 细胞核膜完整性分级标准

### 3、样本采集与运输

#### 3.1 单细胞转录组/单细胞免疫组库

##### 3.1.1 新鲜组织样本

###### 1) 采集前准备:

实验前分别提前 24 小时  $4^{\circ}\text{C}$  预冷 4 个冰袋,  $-20^{\circ}\text{C}$  预冷 2 个冰袋。

###### 2) 组织处理:

- A. 新鲜组织从活体取下, 要求组织量至少为 **200mg** (黄豆粒大小);
- B. 去除周围的脂肪、结缔组织或者坏死组织, 用预冷的无菌 PBS 或者生理盐水清洗 2 遍, 清洗掉血水等杂质;
- C. 将清洗干净的目标组织样本切割成 **0.5cm-1cm** 左右的组织块, 尽量不要超过 1cm, 保证组织块能够充分接触组织保存液, 完全浸没在组织保存液中, 快速转移到解离实验室进行单细胞悬液制备, 或者寄送到百迈客实验室进行解离。

###### 3) 样本寄送与运输:

A. 离心管用 Parafilm 封口膜密封好，在每个样品管上清晰、简明地标记样品名称（采用质量较好的油性笔，并避免与乙醇等有机溶剂接触），样品名称请避免出现汉字，采用字母和数字表示，长度控制在 8 个字符以内；

B. 样本管用气泡膜包裹，**避免样品管直接接触冰袋而导致组织冰冻而坏死**，请根据运输时间确认冰袋的数量，确保样本运输到达目的地时，样本温度保持在 **2-8°C**。

#### 4) 注意事项：

A. 取样时用无菌手术刀或剪刀进行取样，如必须用电刀取样请避免电刀灼烧部位，取样避免坏死部位，取样不能有血凝块；

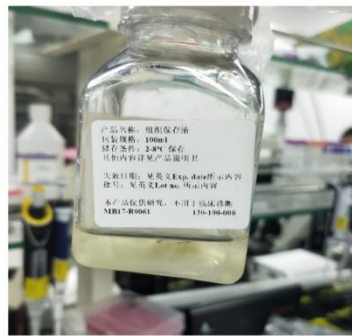
B. 胃癌、胰腺、脑组织等样本不建议用组织保存液寄送，建议预约上门实验，组织保存液适用的具体样本类型参见第 4.2.2 部分；

C. 采样前可以提前联系百迈客当地销售经理获取组织保护液，由百迈客实验室寄送分装好的组织保存液（美天旋，货号 130-100-008），组织保护液在 **2-8°C** 保存，不建议过多囤放以防滋生细菌，使用前观察试剂状态是否为无色透明液体，无沉淀、无异样；

D. 组织在组织保护液中的最佳储存时间为 **48h**，可维持组织样本的细胞活性及完整细胞表位，具体操作方法可参考《百迈客组织保存液寄样指南》视频，可以联系百迈客当地销售经理获取。

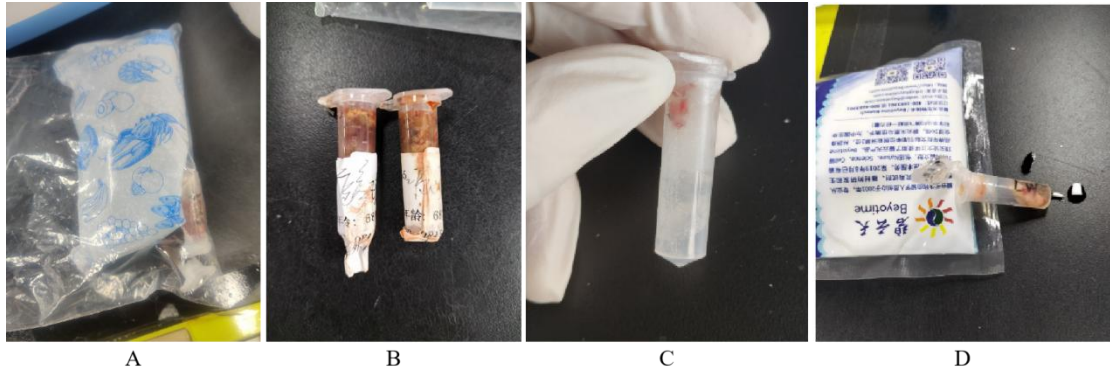


美天旋组织保存液



保存不当的组织保存液

#### ◇ 送样不规范示例：



- A. 样本没有纱布包裹，与冰袋直接接触，导致样本结冰，解离活率不足；
- B. 组织太多，占满整个管子，组织与保护液接触面积很少，使保护液无法有效的保持组织活性；
- C. 样本结冰，组织被完全冻住，解离活率很低；
- D. 未将管口包裹住，样本运输过程中管口打开，保护液和部分组织洒落在管外。

### 3.1.2 血液样本

#### 1) 样本采集：

- A. 采集新鲜外周血至少 **3mL**，迅速置于 **EDTA 抗凝管（紫色）** 中保存，取样完成后需要立即轻柔管上下颠倒采血管 4-6 次，保证 EDTA 抗凝效果；
- B. 4°C、24h 内转移到实验室，分离 PBMC 后进行后续实验；
- C. 或者利用淋巴细胞分离液分选出外周血单核细胞 PBMC（分选步骤可参考第 5.3.2 部分），加入细胞冻存液梯度冻存，具体操作见第 3.1.3 部分（**推荐上门服务**）；

#### 2) 样本寄送与运输：

- A. 离心管用 Parafilm 封口膜密封好，在每个样品管上清晰、简明地标记样品名称（采用质量较好的油性笔，并避免与乙醇等有机溶剂接触），样品名称请避免出现汉字，采用字母和数字表示，长度控制在 8 个字符以内；
- B. 样本管用气泡膜包裹，避免样品管直接接触冰袋而导致组织冰冻而坏死，请根据运输时间确认冰袋的数量，确保样本运输到达目的地时，样本温度保持在 2-8°C。

#### 3) 注意事项：

- A. 取样前需要确认 EDTA 抗凝管在保质期范围内，只能用 EDTA 紫色抗凝管；



- B. 百迈客可以提供 PBMC 分离服务；
- C. 血液离体时间不超过 24h。

### 3.1.3 PBMC/细胞悬液样本

PBMC 样本与细胞悬液样本，如果没有预约上门服务，需要按细胞梯度冻存的方式冻存起来，干冰寄送，细胞梯度冻存操作步骤如下：

- A. 冻存前准备：提前 30min 从-80℃冰箱取出梯度降温盒并恢复至室温备用；
- B. 准备好 900μL 血清+100μL DMSO 的细胞冻存液；
- C. 收集 PBMC 或细胞，用预冷的无菌 PBS 清洗 1-2 遍，将配好的冻存液进行细胞重悬；
- D. 将重悬好的细胞悬液分装到细胞冻存管中，并在冻存管侧壁做好标记；
- E. 将冻存管放入梯度降温盒中，放入-80℃冰箱，冻存的细胞在梯度降温盒中放置 24h 后可取出放置在液氮保存，或者直接放置在干冰上进行冷冻运输，寄送到百迈客实验室。



细胞梯度冻存盒



细胞冻存管

### 3.1.4 穿刺样本

1) **样本采集**: 对于穿刺样本，在采集样本过程中，使用粗针(穿刺针管外径 $\geq 1.2\text{mm}$ )穿刺采集 3 条样本。

2) **注意事项**:

- A. 组织处理、样本寄送与运输参考第 3.1.1 部分；
- B. 采集时需注意的是不能用真空针采样；
- C. 穿刺样品量较少，建议送样量 $\geq 3$  条，通过增加穿刺样本数可以提高成功率。

## 3.2 动物单细胞核转录组/单细胞 ATAC

### 3.2.1 冷冻组织样品

1) 样本采集前准备: 配置 4°C 预冷保护试剂 2 mL/sample: 1.4 mL 1x DPBS+0.6mL 甘油, 可以减少速冻对细胞核质量的影响;

#### 2) 样本采集与寄送:

- A. 新鲜组织从活体取下, 要求组织量至少为 **200mg**;
- B. 去除周围的脂肪、结缔组织或者坏死组织, 用预冷的无菌 PBS 或者生理盐水清洗 2 遍, 清洗掉血水等杂质;
- C. 将清洗干净的目标组织样本放置在预冷的保护试剂中剪碎, 剪切成约芝麻大小的小颗粒;
- D. 用移液枪移除保护试剂, 将组织分成**两个备份**, 各 100mg, 一份提取细胞核, 一份直接提取 RNA (要求 **RIN $\geq$ 7.0**);
- E. 立即液氮速冻 30min 以上, 再转移到 -80°C 保存或**干冰寄送**, 确保组织寄送到实验室后为冷冻状态。

#### 3) 注意事项:

**心脏、肌肉、皮肤、肺癌、子宫、病变纤维化和器官硬化类组织**, 提核后会产生较多的碎片, 需要进行流式分选去碎片; 如果涉及到以上样本, 请送样前提前告知, 以便开始提核实验前预约好流式细胞仪, 以免耽误实验进度。

### 3.2.2 冻存细胞样本

1) 冻存前细胞质检: 冻存前对细胞质量进行检测, 要求细胞活性大于 90%、细胞结团率小于 10%, 样品无细胞碎片等杂质; 原代细胞或培养细胞总数大于  $1 \times 10^6$  个, 流式分选细胞大于  $5 \times 10^5$  个, **并提供质检结果**。

#### 2) 细胞梯度冻存:

- A. 冻存前准备: 提前 30min 从 -80°C 冰箱取出梯度降温盒并恢复至室温备用;
- B. 准备好 900 $\mu$ L 血清+100 $\mu$ L DMSO 的细胞冻存液;
- C. 收集 PBMC 或细胞, 用预冷的无菌 PBS 清洗 1-2 遍, 将配好的冻存液进行细胞重悬;

- D. 将重悬好的细胞悬液分装到细胞冻存管中，并在冻存管侧壁做好标记；
- E. 将冻存管放入梯度降温盒中，放入-80℃冰箱，冻存的细胞在梯度降温盒中放置 24h 后可取出放置在液氮保存，或者直接放置在干冰上进行冷冻运输，寄送到百迈客实验室。

### 3.2.3 其他类

血液样本参考第 3.1.2 部分，PBMC/细胞悬液样本参考第 3.1.3 部分，**推荐直接上门服务。**

## 3.3 植物单细胞核转录组

### 3.3.1 新鲜组织样品

#### 1) 活体植株 (**优先推荐**)

- A. 幼嫩植株：种子培育的低龄幼苗（7-14 天）、组培苗——叶片、幼嫩茎、茎尖、根尖；
- B. 成熟植株：茎尖组织及靠近茎尖的第 1-2 片幼嫩叶片、发育中的花或者花序；
- C. 取样量：保证每一个单细胞核转录组文库的理论用量 0.5-2g；
- D. 其它：特殊贵重活体样品需要客户提供样品的种植、保存条件（温度、光照、营养液、浇水条件、PH 等等），以保证样品的正常生长；
- E. 每一个根部保留少量土壤，利用锡箔纸或者塑料薄膜将植株根部包裹起来，植株部分需要利用小铁环或者丝带缠绕，保证枝条茎叶不分散，但不需要捆绑非常紧实，防止机械对茎枝叶的损伤。
- F. 外面用纸箱或者泡沫包裹，防止植株碰撞，并用塑料薄膜缠绕固定。
- G. 一般活体植株常温运输培养，如果有特殊培养条件（需要做相应的处理，例如，低温用冰袋运输，冰袋与密封袋之间放置泡沫板）。

#### 2) 离体枝条

- A. 枝条选择：枝条顶端有待萌发叶芽，且叶芽周边有几片幼叶；枝条中下端保留部分成熟叶片；
- B. 枝条预处理：剪断枝条，自底端往上约 5 cm 用浸透水的吸水纸包裹好，放

入自封袋，袋中喷水，填充部分空气，密封袋口；

C. 枝条运输：自封袋放入泡沫箱，箱体内侧壁放部分冰袋（保证低温运输），冰袋与自封袋间放置泡沫板，防止冰袋积压样品或因冰袋与样品直接接触导致样品被冻伤；

D. 运输时间：保证 **24 h** 内到样，最多不得超过 3 天；

E. 取样量：保证每一个单细胞核转录组文库的理论用量 0.5-2g；

F. 其它：取“离体枝条”仅限比较难以获得幼嫩活体植株的项目，如野外采样、植株过大等导致的取样或运输比较困难的项目；离体枝条到样后如有损伤等将不再用于实验；离体枝条如果保存、运输不善会存在部分潜在风险：即得到的实验效果可能会比活体植株检测结果稍差（理论上的潜在风险）。

### 3) 注意事项

A. 建议一次送样量  $\geq 2g$ ；

B. 所有待取的幼嫩组织长势必须正常（无病虫害、无营养缺失）；

C. 对于需要保留茎尖的特殊情况，取样时不取茎尖组织，只取紧靠近茎尖的第 1-2 片嫩叶；



白菜植株



打包后的白菜植株

### 3.3.2 冷冻组织样品

1) 样本采集前准备：配置 4°C 预冷保护试剂 5 mL/sample：1.5 mL 水+2.5 mL 甘油+1 ml FBS，可以减少速冻对细胞核质量的影响；

2) 样本采集与寄送：

A. 新鲜组织从活体取下，要求组织量至少为 **400 mg**；

- B. 去除周围的非目标组织，用预冷的无菌 PBS 或者生理盐水清洗 2 遍，清洗掉杂质；
- C. 将清洗干净的目标组织样本放置在预冷的保护试剂中剪碎，剪切成约 0.5 cm<sup>3</sup>，不足 0.5 cm 的从中间切开即可；
- D. 用移液枪移除保护试剂，将组织分成**两个备份**，其中 300 mg 用来提取细胞核，100 mg 用来提取 RNA（要求 **RIN≥7.0**）；
- E. 立即液氮速冻 30min 以上，再转移到-80℃保存或**干冰寄送**，确保组织寄送到实验室后为冷冻状态。

### 3.4 单细胞多组学 ATAC+GEX

单细胞多组学 ATAC+GEX 样本采集、寄送与运输参考第 3.2 部分，但注意送样量要求和样本质量要求，具体见**第 2 部分**。

## 4、项目流程



图 1 百迈客单细胞测序服务流程

### 4.1 悬液制备方案评估

由于不同物种和组织类型的解离条件差异较大，百迈客提供单细胞悬液制备预实验服务，会对目标组织类型的单细胞悬液制备方案进行评估。**提前预约好样本寄送时间**，保证到样后尽快开展单细胞悬液制备实验，组织冻存液寄送样本最好在**48h内**完成解离；确定好细胞悬液制备方案后，即可正式开展项目。

### 4.2 正式实验

目前百迈客提供两种类型的正式实验服务模式：

## 4.2.1 上门服务

老师只需提供组织样本，预约上门后实验工程师上门，按照预实验评估的解离方案进行解离、单细胞分选上机、反转录成 cDNA 后低温暂存，后续在百迈客实验室完成建库测序。

或者老师完成单细胞悬液制备实验，实验工程师进行单细胞悬液质量评估，评估合格后进行后续实验操作，单细胞质量要求见第 2.2 部分。

**备注：**单细胞悬液制备好后，建议在 **30 分钟** 内质检上机，建议老师提前做好时间；仪器设备要求详情见第 4.3.3 部分。

## 4.2.2 组织寄送

百迈客单细胞组织保存液寄送方式(**推荐**)，采用组织保存液储存组织样本，既可以保持样本最原始组织活性状态，又可以解决样本难以获取以及批次性效应等问题，老师寄送组织到百迈客实验室，实验工程师进行解离、单细胞分选上机、反转录、建库、测序。大部分组织样本比较合适采取种该方式，但对于一些特殊组织样本经过测试无法通过组织保存液储存保持组织原始状态，详细样本类型说明见下表：

序号	物种	组织	是/否邮寄	序号	物种	组织	是/否邮寄
1	人/鼠	肺癌	是	21	人/鼠	心脏	是
2	人/鼠	胆管癌	是	22	人/鼠	肝脏	是
3	人/鼠	胆管癌癌旁	是	23	人/鼠	肺	是
4	人/鼠	结直肠癌肝转移	是	24	人/鼠	脾脏	是
5	人/鼠	结直肠癌	是	25	人/鼠	肠	是
6	人/鼠	食管癌癌旁	是	26	人/鼠	肾脏	是
7	人/鼠	食管癌	是	27	人/鼠	膀胱	是
8	人/鼠	肾癌	是	28	人/鼠	皮肤	是
9	人/鼠	骨巨细胞瘤	是	29	人/鼠	淋巴结	是
10	人/鼠	垂体瘤	是	30	人/鼠	脂肪	是
11	人/鼠	室管膜瘤	是	31	人/鼠	肌腱	是
12	人/鼠	宫颈癌	是	32	人/鼠	脐带	是
13	人/鼠	小肠癌	是	33	人/鼠	静脉血管	是
14	人/鼠	黑色素瘤	是	34	人/鼠	食管	是
15	人/鼠	肝癌	是	35	人/鼠	胎盘	是
16	人/鼠	乳腺癌	是	36	人/鼠	气道	是
17	人/鼠	成骨	是	37	人/鼠	骨骼肌	是
18	人/鼠	蜕膜	是	38	人/鼠	胫骨	是
19	人/鼠	胫骨前肌	是	39	人/鼠	滑膜	是
20	人/鼠	颈总动脉	是	40	人/鼠	软骨	是

序号	物种	组织	是/否邮寄	序号	物种	组织	是/否邮寄
1	人/鼠	胶质瘤	否	11	人/鼠	下丘脑	否
2	人/鼠	甲状腺癌	否	12	人/鼠	胃粘膜	否
3	人/鼠	前列腺癌	否	13	人/鼠	性腺	否
4	人/鼠	胰腺癌	否	14	人/鼠	前列腺	否
5	人/鼠	胃癌	否	15	人/鼠	甲状腺	否
6	人/鼠	胃	否	16	人/鼠	胰腺	否
7	人/鼠	卵巢癌	否	7	人/鼠	胸腺	否
8	人/鼠	腹水	否	18	人/鼠	脑	否
9	人/鼠	眼	否	19	人/鼠	大脑皮层	否
10	人/鼠	视网膜	否	20	人/鼠	海马体	否

#### ◇ 注意事项

- 根据组织类型选择服务模式：适用于组织保存液寄送的组织推荐组织，寄送，其他不适用寄送的组织类型、细胞、血液样本推荐上门服务；
- 一些特殊样本由于组织结构、细胞大小等限制，在不适用单细胞转录组测序的情况下，可以进行单细胞核转录组测序。

细胞类型	说明
神经元细胞	4~120 $\mu$ m, 常见星形、锥体形、梨形和圆球形状, 长突起细胞
巨噬细胞	~50 $\mu$ m, 多突起的星形细胞
皮下脂肪细胞	60~120 $\mu$ m, 粒径过大
心肌细胞	3~100 $\mu$ m, 类型复杂非规则球形, 移行细胞细长型, 特别心肌肿大时细胞粒径会达 100 $\mu$ m
肾脏细胞	系膜细胞、内皮细胞、上皮细胞(足细胞)、肾小管上皮细胞, 类型复杂, 足细胞丰度低
骨骼肌纤维	长柱形的多核细胞, 长 1~40mm, 直径 10~100 $\mu$ m
卵细胞	>0.1mm, 成熟卵泡直径 18-25mm

### 4.2.3 仪器耗材清单

设备及描述	仪器要求	用途
冰箱	-80°C、-20°C	暂存试剂
4°C水平离心机*	支持 1.5ml/15ml 离心管	解离液分离; 细胞收集
制冰机和冰盒	--	解离中提供低温环境
PCR 仪*	支持 100 μL 反应体系; 热盖温度可调节	用于反转录反应
漩涡振荡器*	--	混匀试剂
微型离心机*	兼容 0.2mL、八连排和 1.5mL 离心管	瞬时离心
震荡水浴锅*	37°C恒温	酶解离组织
生物安全柜	无菌环境	组织解离
PH 计	任意型号	任意厂家
光学显微镜	至少 200x	观察形态
75%乙醇	如果是无水乙醇, 同时准备去离子水	消毒
无尘纸	--	--
手术剪刀	~10cm	剪碎组织
手术镊子	~15cm	夹取/转移组织
无酶吸头	1mL/200uL/10uL 多种规格无酶吸头	--
离心管架	可放置 15ml、50ml 离心管	放置离心管
离心管	0.2/1.5/ 2.0/15/ 50 mL 灭菌离心管	--

#### 注意事项:

- 1) 标记\*的设备需放置在同一房间;
- 2) 实验台大小要求能满足两名实验员操作;
- 3) 三孔仪器电源插座大于 3 个;
- 4) 生物安全柜可用常规实验台代替。



## 4.3 风险提示与评估

1) 组织保存液寄送样本尽量保证 48h 内寄送到实验室开展实验，时间过长会影响细胞活率及细胞表达状态；

2) 单细胞核转录组组织样本一定要备份进行质检 (RIN 值 $\geq$ 7.0)，RNA 完整性会影响数据结果；

3) 细胞活率低于 85%，可能引起 mRNA 部分降解导致基因检出减少，细胞内线粒体基因比例偏高，占用有效数据量；

4) 细胞直径 $<$ 40  $\mu\text{m}$ ，细胞过大容易堵塞芯片，无法形成油包水，过大的细胞利用细胞筛过滤；

5) 细胞结团 $<$ 15%，组织解离不充分，会看到细胞悬液中 2 个或多个细胞粘连在一起的情况，可能会导致最终数据中双细胞占比偏多，占用有效数据量，结团过高还可能会堵塞芯片，无法形成油包水；

6) 解离过程中可能由于解离条件过于剧烈而产生大量碎片，可能会导致背景噪音高，占用有效数据量，也会引起有效细胞数偏离预期。

## 5、单细胞悬液制备方法

### 5.1 解离酶选择

酶的类型	适用解离组织
胶原酶 1	上皮、肝、肺、脂肪、肾上腺组织
胶原酶 2	肝脏、心脏、骨骼、肌肉、甲状腺、软骨
胶原酶 3	乳腺组织
胶原酶 4	表面受体要求高的细胞
胰蛋白酶	贴壁细胞或者培养的细胞系
DNase I	消化解离过程中产生的 DNA，防止样本细胞聚团

根据具体组织类型选择对应的酶或酶的组合进行解离：

一些常见样本可以采用商业化的试剂盒进行解离：人肿瘤解离试剂盒，

MACS Human Tumor Dissociation kit DS\_130-095-929；小鼠肿瘤解离试剂盒，

MACS Mouse Tumor Dissociation kit DS\_130-096-730。

目前文献已报到单细胞组织解离相关酶推荐:

Species	Cells	Enzyme(s)	Reference
Human	脂肪细胞	2 型胶原酶: 0.01-0.5%	Effect of Collagenase Concentration on The Isolation of Small Adipocytes from Human Buccal Fat Pad., J Oral Sci , 2018
Human	脂肪细胞	Collagenase Type 1: 0.1%	Epigenome-wide Association Study of Body Mass Index, and the Adverse Outcomes of Adiposity, Nature541, 81, 2017
Human	基质细胞	胶原酶 2 型: 0.075%	Ultrasound-Assisted Liposuction Provides a Source for Functional Adipose-Derived Stromal Cells., Cytotherapy 19, 1491-1500, 2017
Human	骨髓基质细胞	胶原酶 1 型: 0.075%	Mesenchymal Stromal Cells Protect Human Cardiomyocytes from Amyloid Fibril Damage, Cytotherapy 19, 1426-1437, 2017
Human	间充质干细胞	胶原酶 2 型: 0.2%	Adipogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Alters Their Immunomodulatory Properties in a Tissue-Specific Manner., Stem Cells 35, 1636-1646, 2017
Human	脂肪源内皮细胞	胶原酶 1 型: 0.1%	Autologous Cell Sources in Therapeutic Vasculogenesis: In Vitro and In Vivo Comparison of Endothelial Colony-Forming Cells from Peripheral Blood and Endothelial Cells Isolated from Adipose Tissue., Cytotherapy 18, 242-52, 2016
Human	脂肪干细胞	胶原酶 1 型: 0.1%	High Glucose-Induced Reactive Oxygen Species Generation Promotes Stemness in Human Adipose-Derived Stem Cells, Cytotherapy 18, 371-83, 2016
Human	骨髓基质细胞	胶原酶 4 型: 0.2%	Effect of Mild Heat Stress on the Proliferative and Differentiative Ability of Human Mesenchymal Stromal Cells., Cytotherapy17,

			359-68, 2015
<b>Human</b>	脂肪干细胞	胶原酶 2 型: 0.1%	Expression Analysis of Human Adipose-Derived Stem Cells During In Vitro Differentiation to an Adipocyte Lineage., BMC Med Genomics 8, 41, 2015
<b>Human</b>	脂肪基质	胶原酶 1 型: 0.075%	Therapeutic Potential of Adipose-Derived SSEA-3-Positive Muse Cells for Treating Diabetic Skin Ulcers., Stem Cells Transl Med 4, 146, 2015
<b>Human</b>	脂肪组织细胞	胶原酶 1 型: 0.1%	Differential Effects of Processing Time and Duration of Collagenase Digestion on Human and Murine Fat Grafts., Plast Reconstr Surg 136, 189e-199e, 2015
<b>Human</b>	脂肪基质血管细胞	中性蛋白 酶: 2.4 u/ml、胶原 酶: 250 u /ml	Human White and Brite Adipogenesis is Supported by MSCA1 and is impaired by Immune Cells., Stem Cells 33, 1277-91, 2015
<b>Human</b>	脂肪源性间充质干细胞	胶原酶 2 型: 0.1%	Defined Serum-Free Media for In Vitro Expansion of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells., Cytotherapy 16, 915, 2014
<b>Human</b>	脂肪提取干细胞	胶原酶 1 型: 0.15%	Choosing the Right Type of Serum for Different Applications of Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells: Influence on Proliferation and Differentiation Abilities., Cytotherapy 16, 789, 2014
<b>Human</b>	间充质基质	胶原酶 1 型: 0.1%	Proliferative and Phenotypical Characteristics of Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells: Comparison of Ficoll Gradient Centrifugation and Red Blood Cell Lysis Buffer Treatment Purification Methods., Cytotherapy 16, 1220-8, 2014
<b>Human</b>	脂肪间质干细胞	动物游离 胶原酶: 200u/ml	Xenofree Enzymatic Products for the Isolation of Human Adipose-Derived Stromal/Stem Cells., Tiss Eng 19, 473-8, 2013

<b>Human</b>	基质血管成分	胶原酶 1 型: 0.075%	Stromal Vascular Fraction Isolated from Lipo-Aspirates Using an Automated Processing System: Bench and Bed Analysis., J Tissue Eng Regen Med 7, 864, 2013
<b>Human</b>	脂肪干细胞	胶原酶 1 型: 0.1%	Platelet-Rich Plasma Greatly Potentiates Insulin-Induced Adipogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells Through a Serine/Threonine Kinase Akt-dependent Mechanism and Promotes Clinical Fat Graft Maintenance., Stem Cells Transl Med 1, 206-20, 2012
<b>Human</b>	血管周围干细胞	胶原酶 2 型: 0.1%	An Abundant Perivascular Source of Stem Cells for Bone Tissue Engineering., Stem Cells Transl Med 1, 673, 2012
<b>Human</b>	脂肪来源的间质血管	胶原酶 1 型: 0.1%	Concise Review: Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells and Platelet-Rich Plasma: Basic and Clinical Implications for TissueEngineering Therapies in Regenerative Surgery., Stem Cells Transl Med 1, 230-6, 2012
<b>Mouse</b>	脂肪基质	胶原酶 1 型: 0.1%	Adipose Stromal Vascular Fraction-Mediated Improvements at Late-Stage Disease in a Murine Model of Multiple Sclerosis., Stem Cells 35, 532-544, 2017
<b>Mouse</b>	脂肪间质细胞	胶原酶 2 型: 0.2%	Adipose Mesenchymal Stromal Cells Minimize and Repair Radiation-Induced Oral Mucositis.,Cytotherapy18, 1129-45, 2016
<b>Mouse</b>	脂肪基质	胶原酶 1 型: 0.1%	Improved Mobilization of Exogenous Mesenchymal Stem Cells to Bone for Fracture Healing and Sex Difference., Stem Cells 34, 2587-2600, 2016
<b>Mouse</b>	脂肪细胞	胶原酶: 0.1%	The Effects of A Single Developmentally-Entrained Pulse of Testosterone in Female Neonatal Mice On Reproductive and Metabolic Functions in Adult Life., Endocrinology 156, 3737, 2015

<b>Mouse</b>	间质血管 细胞	胶原酶 2 型: 0.2%	Natural Killer T Cells in Adipose Tissue are Activated in Lean Mice., Exp Anim 62, 319, 2013
<b>Mouse</b>	脂肪干细 胞	胶原酶 2 型: 0.1%	Biological and Clinical Availability of Adipose-Derived Stem Cells for Pelvic Dead Space Repair., Stem Cells Transl Med 1, 803, 2012

## 5.2 重悬溶液选择

推荐使用含有 0.04% BSA (400 $\mu$ g/ml)的 1x PBS 溶液(无 Ca<sup>2+</sup>和 Mg<sup>2+</sup>) , 原代细胞、干细胞等敏感细胞类型需要另选择溶液以保持细胞活力。已确定以下溶液对人 293T/17 和小鼠 NIH/3T3 细胞系的单细胞解离操作无影响:

- ❖ Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)
- ❖ Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)

如果在上述溶液中不能维持细胞活力, 可以用常见的细胞培养基洗涤重悬细胞。以下培养基已确定对人 293T/17 和小鼠 NIH/3T3 细胞系的单细胞解离操作无影响:

- ❖ Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) + 10% FBS
- ❖ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + 10% FBS
- ❖ Iscove's Modified Eagle Medium (IMEM) + 10% FBS
- ❖ Roswell Park Memorial Institute (RPMI) + 10% FBS
- ❖ Ham's F12 + 10% FBS
- ❖ 1:1 DMEM/F12 +10% FBS
- ❖ M199

## 5.3 单细胞悬液制备流程参考

### 5.3.1 常规组织解离

- a. 将拿到的组织样品在 4 $^{\circ}$ C 预冷的 DPBS 中清洗 2-3 次, 转移到 1.5mL 离心管中, 用 10cm 的手术剪刀剪成小块;

- b. 用自配酶解液或酶解试剂盒在 37°C 恒温水浴锅或者摇床中孵育, 一般样品解离时间不超过 1h; 解离过程中每隔 30min 观察组织块的大小、细胞数量和活性; 一般细胞数量达到  $10^6$  个, 消化液浑浊, 组织块消失即可终止孵育;
- c. 取 40 $\mu$ m 细胞筛过滤, 组织块较大也可以先用 100 $\mu$ m/70 $\mu$ m 的细胞过滤器;
- d. 一般将细胞悬液 4°C, 300rcf, 离心 5min (根据细胞大小和数量调整离心力和时间);
- e. 弃上清, 向上述离心管中加入 1mL 重悬液重悬细胞; 再加入 3mL 预冷的红细胞裂解液, 吹吸均匀;
- f. 4°C 孵育 5-10min, 结束后立即 4°C, 300rcf, 离心 5min;
- g. 去上清, 加入 1mL 重悬液充分重悬细胞;
- h. 用细胞计数仪质检, 根据质检结果调整浓度, 目标浓度是 700 - 1200 cell/ $\mu$ L, 细胞活性大于 85%, 结团小于 15%;
- i. 一旦达到最终的细胞浓度和活性, 将细胞置于冰上, 30min 内进行 10x 上机实验。

#### 注意事项:

- 如果红细胞较多可以增加裂红次数和时间;
- 杂质较多可以用去碎片试剂盒去除杂质;
- 活率较低可以用去死试剂盒移除死细胞。

### 5.3.2 全血分离 PBMC

- ◇ **所需试剂耗材:** PBS、Ficoll 或者其他密度梯度分离液、不含钙镁离子的 1 $\times$ PBS + 0.04% BSA、15 或 50ml 离心管
- ◇ **实验步骤:** 将全血用 PBS 1:1 在锥形管中稀释; 在稀释的样本上面加入等体积的 Ficoll; 1000g 离心 20min; 将位于 PBS 和 Ficoll 层间的 PBMC 转移到一个新的管中; 加入 PBS 清洗细胞; 4°C, 300-400g 离心细胞悬液 4-5min, 去除上清液; 用不含钙镁的 1 $\times$ PBS + 0.04%BSA 缓冲液重悬沉淀细胞并做计数和活力分析; 检测合格后, 重复上述离心去上清过程, 将细胞用不含钙镁离子的 1 $\times$  PBS + 0.04% BSA 缓冲液重悬至细胞浓度为 700~1200cell/ $\mu$ l。

### 5.3.3 培养细胞

- ◇ **所需试剂耗材:** Gibco 0.25% Trypsin-EDTA (1X)、不含钙镁离子的 1× PBS + 0.04% BSA、15 或 50ml 离心管、细胞过滤器
- ◇ **实验步骤:** 对于悬浮生长的细胞, 将细胞转移至离心管中, 进行计数和活力分析; 对于贴壁生长的细胞系, 推荐用 0.25% Trypsin-EDTA 酶将细胞从培养皿中消化下来并分离聚集细胞; 将细胞转移至离心管中进行计数和活力分析; 检测合格后, 离心去上清, 将细胞用不含钙镁离子的 1× PBS + 0.04% BSA 重悬至细胞浓度为 700~1200cell/μl。

### 5.3.4 CD3<sup>+</sup>免疫细胞分选

- ◇ **所需试剂耗材:** 0.5% v/v FBS + 2 mM EDTA+不含钙镁的 1× PBS (PH 7.2)、含 10% FBS DMEM、含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基、Miltenyi 富集分选试剂盒
- ◇ **实验步骤:** 从肿瘤组织中解离的肿瘤细胞在 DMEM (10%FBS) 中重悬, 进行 CD3 细胞富集实验, 流程针对的样本大小适用于 Miltenyi Biotec MS columns; 4°C, 300rcf 离心 10min, 去除上清液, 加入预冷 PBS 溶液混匀; 加 CD3 MicroBeads 混匀, 4-8°C 孵育 15min; 重复离心重悬过程; 将细胞悬液加入到准备好的 MS columns 中, 2ml 试管收集滤液, 阳性 CD3<sup>+</sup>细胞被留在柱子上, 而阴性 CD3<sup>-</sup>被收集到试管中; 拆下柱子, 加入 1ml 预冷 PBS 溶液, 利用柱塞将 CD3<sup>+</sup>细胞冲洗下来, 收集到 2ml 试管中; 离心去除上清液, 加入含 10% FBS RPMI 1640 培养基, 重悬至细胞浓度为 700~1200cell/μl。

### 5.3.5 脑组织核悬液制备

- ◇ **所需试剂耗材:** 裂解液 (10 mM Tris-HCl+10 mM NaCl+3 mM MgCl<sub>2</sub>+0.1% Nonidet P40 +无核酸酶水)、核清洗&重悬 buffer (1%BSA+0.2U/μl RNA 酶抑制剂+1 x PBS、缓冲液 (1xPBS + 0.5% BSA)、蔗糖缓冲液 (含 300μl Nuclei PURE Sucrose Cushion Buffer 的 2.7 ml Nuclei PURE 2M 蔗糖缓冲液) )。
- ◇ **实验步骤:**

a. 组织裂解&核清洗 (约 45min)

将组织放置在 HEB 培养基中并覆盖完全，加入 5ml 预冷裂解液，冰上裂解组织 15min，裂解期间轻柔旋涡摇晃混匀；加入 5ml 的 HEB 培养基，并使用硅化巴斯德移液管将裂解后的组织转移至新的试管中，并吹吸组织 10-15 次，将组织磨碎；使用 30 $\mu$ m 细胞滤器除去细胞碎片和团块；4 $^{\circ}$ C，500rcf 离心 5min，除去上清液；加入 10ml buffer，重悬、离心，重复 2-3 次；使用 30 $\mu$ m 细胞滤器除去细胞碎片和团块；4 $^{\circ}$ C，500rcf 离心 5min，除去上清液；加入 1080 $\mu$ l 核清洗&重悬 buffer，轻柔混匀 8-10 次。

b. 去除髓磷脂 myelin (约 45min)

加入 120 $\mu$ l myelin Myelin Removal Beads II 重悬核，使用宽口枪头轻轻混匀；4 $^{\circ}$ C 孵育 15min；孵育同时准备两个 LS 柱子和 3ml 缓冲液；孵育完成后，加入 5ml buffer 稀释核悬液，轻轻吹吸 5 次；4 $^{\circ}$ C，500rcf 离心 10min；吸取上清液，加入 2ml buffer 重悬；将重悬液分别加入 1ml 到两个 LS 柱子中，加入 1ml buffer 洗涤柱子两次，将过柱液体收集到 5 ml Eppendorf 试管中；4 $^{\circ}$ C，500rcf 离心 5min；除去上清液；加入 500 $\mu$ l 重悬 buffer，轻轻混匀直至核重悬；使用 Countess II FL Automated 细胞计数仪或者血球计数板。

c. 密度梯度离心 (约 1h)

将装有 500 $\mu$ l 核重悬液的试管，每管加入 900 $\mu$ l 蔗糖缓冲液，轻柔混匀 10 次；加入 500 $\mu$ l 蔗糖缓冲液到 2ml 试管中；小心将 1400 $\mu$ l 核重悬液加入试管溶液的表面，不要混匀；4 $^{\circ}$ C，13000rcf 离心 45min；除去上清液，每管留下 100 $\mu$ l，重悬；加入 1ml buffer，轻柔吹吸 8-10 次直至完全混匀；最终理想浓度为 1000 个/ $\mu$ l (1 x 10<sup>6</sup> 个/ml)；使用 40 $\mu$ m 细胞滤器除去细胞碎片和团块；达到理想浓度后，将核悬液置于冰上放置，可用于 10x 上机操作。

### 5.3.6 其它文献参考

➤ Single-Cell RNA-Seq Reveals the Transcriptional Landscape and Heterogeneity of Aortic Macrophages in Murine Atherosclerosis

正常小鼠和动脉粥样硬化小鼠，收集小鼠**主动脉的 CD45+细胞**，将小鼠安乐死后 5min 内，注射 2 $\mu$ g 偶联的大鼠抗小鼠 CD45.2-APC 或



CD45.2-APCefluor780 (eBioscience, clone 104), 并收集小鼠器官。灌注预冷 PBS, 将血液从主动脉冲出, 分离主动脉与血管周围脂肪组织。切碎动脉组织, 37°C下 RPMI 消化 40min (RPMI 包括 450U/ml 胶原酶 I, 125U/ml 胶原酶 XI 和 60U/ml 透明质酸酶 (Sigma Aldrich))。将消化的主动脉通过 40 $\mu$ m 细胞滤器以获得单细胞悬液, 10 $\mu$ g/ml 纯化的大鼠抗小鼠 CD16/ CD32 (Biolegend) 抗体 4°C 孵育 10min, 阻断非特异性结合 Fc 受体的抗体。随后用大鼠抗小鼠 CD45-PE 或 CD45-APC(1 $\mu$ g/ml, eBioscience, clone 30-F11)和 Fixable Viability Dye eFluor450 或 eFluor780(1/1000, eBioscience)在 4°C 处理 30min。洗涤后重悬, 使用流式细胞仪 FACS Aria III (BD Biosciences) 分选 CD45 + 细胞后, 4%BSA 的 PBS 重悬细胞。

➤ Developmental diversification of cortical inhibitory interneurons

收集小鼠胚胎脑组织, 使用木瓜蛋白酶酶解体系 (Worthington Biochemical), 按照说明书将胚胎脑组织解离成细胞悬液。加入 1mg/ml 的链霉蛋白酶 (Roche, # 10 165 921 001) 后, 放置在预冷的人造脑脊液中, 静置 25min。利用 Sony SY3200 sorter 分选细胞, 制备单细胞悬液, 准备上机建库测序。

➤ Long-term correction of diabetes in mice by in vivo reprogramming of pancreatic ducts

流式分选肝细胞: 通过多步胶原酶 (XI 型, D 型) 灌注法从 MIP-GFP 小鼠中分离出肝细胞, 并用抗体进行标记。酶灌注后, 50g 低速离心 2min 收集肝细胞, 300g 离心 5min 收集肝非实质细胞 (NPC)。抗体标记分离的肝细胞和 NPC, 利用 CD31 和 CD45 去除血细胞和内皮细胞。使用 OC2-2F8 和 OC2-2G9 作为肝细胞表面标记物, 将 MIC1-1C3 作为肝内导管细胞表面标记物。利用 InFlux 细胞计数器 (BD Biosciences), 基于 GFP 表达, 分选细胞。

胰腺细胞的分离: 解剖胰脏, 预冷 HBSS 洗涤一次, 剪碎, 10ml 1mg/ml 的 Collagenase P (Sigma-Aldrich) 37°C 消化 15min, 加入 0.1mg/ml 胰蛋白酶抑制剂, 降低腺泡细胞裂解诱导的细胞死亡率。分离的细胞用预冷 DMEM 培养基洗涤 3 次, 70 $\mu$ m 过滤器过滤, 300g 离心 5min。利用偶联抗体, 4°C, 孵育 30min。使用碘化丙啶染色去除死细胞。利用 FACSCantoII 分析仪或 InFlux 细胞分选仪

(BD Biosciences) 分选细胞。

➤ Graded Arrays of Spinal and Supraspinal V2a Interneuron Subtypes Underlie Forelimb and Hindlimb Motor Control

分离子宫和腰椎,置于人工脑脊液(aCSF)中,加入 5% Trehalose, 50 $\mu$ M APV 和 800 $\mu$ M KA(Worthington Biochemical), 解离细胞。通过 FACS (FACSDIVA, BD), 将宫颈细胞和腰椎细胞收集到 500  $\mu$ L FACS 缓冲(DMEM w/o 酚红; 1 mM EDTA; 25 mM HEPES, pH 7.0; 5% FBS)中。离心, 60  $\mu$ L FACS 缓冲液重悬, 制成单细胞悬液。

➤ Conserved properties of dentate gyrus neurogenesis across postnatal development revealed by single-cell RNA sequencing

过量的异氟烷处死小鼠, 人工脑脊液(aCSF)从左心室进行心脏灌注。根据采样年龄调整 CaCl<sub>2</sub> 和 MgSO<sub>4</sub> 的浓度: 小于 P18, 每只 2mM; 大于 P18, 1mM CaCl<sub>2</sub> 和 7mM MgSO<sub>4</sub>。aCSF 在使用前在 95%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub> 中平衡。除酶消化步骤外, 细胞始终 4 $^{\circ}$ C或冰上保存。取出脑部, 300 $\mu$ m 震荡切片器切片, 并显微切割脑齿状回区。使用木瓜蛋白酶试剂盒(Worthington)消化 25-35min, 利用涂上 BSA 的 p1000 移液管进行人工研磨, 制备单细胞悬液。

➤ Single-cell profiling of human gliomas reveals macrophage ontogeny as a basis for regional differences in macrophage activation in the tumor microenvironment

手术切除神经胶质瘤, 用解剖刀将组织在培养基(Leibovitz 的 L-15 培养基, 4mg/mL 葡萄糖, 100u/mL 青霉素, 100ug/mL 链霉素)中切碎。加入木瓜蛋白酶(Worthington Biochem.Corp)、含有 2000 units/ mL DNA 酶 I 的 EBSS, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min, 解离细胞。300g, 5min 离心后, 重悬于 PBS 中。上下移液 10 次研磨悬浮液, 70 $\mu$ m 过滤器(BD Falcon)过滤。300g 离心 5min, PBS 中重悬后, 40 $\mu$ m 过滤器(BD Falcon)过滤。300g 离心 5min, 加入 GNS (Neurocult NS-A)、2 mM 左旋谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素、100 ug/mL 链霉素、N2/B27 添加剂

(Invitrogen) 和丙酮酸钠重悬细胞，制成单细胞悬液。

➤ Molecular Classification and Comparative Taxonomics of Foveal and Peripheral Cells in Primate Retina

用 200 单位的木瓜蛋白酶(Worthington, LS003126)消化猴子视网膜中央凹样品。M1 和 M2 中央凹在 37°C 消化；在 22°C 下消化中央凹 M3 和 M4。消化后，视网膜分离，在 Ames 溶液中加入 0.04% 的牛血清白蛋白 (BSA) 制成单细胞悬液。