论 著

适用于单细胞测序的肾脏消化及CD45⁺单细胞分离方法

贾　建，谭睿陟，王　丽
西南医科大学附属中医医院 中西医结合研究中心（泸州 646000）

【摘　要】**目的** 比较Ⅳ型胶原酶和胰蛋白酶在不同时间对肾脏组织的消化效果，探讨磁珠分离法所得细胞对单细胞测序的适用性。**方法** 采用Ⅳ型胶原酶和胰蛋白酶消化肾脏组织，消化时间分别为15 min、30 min和15 min+15 min。比较两种消化酶在不同时间对肾脏组织的消化效果，选择消化效果最佳的方法进行消化，所得肾脏细胞悬液通过用磁珠法分离CD45⁺细胞。检测分离后所得细胞数量、活力、成团率并根据单细胞测序结果评价细胞状态。**结果** 肾脏组织在经酶作用30 min后基本被消化完全，在相同消化时间和方法下，Ⅳ型胶原酶消化效率明显优于胰蛋白酶。与直接消化30 min相比，15 min+15min消化所得细胞状态更好，细胞碎片少且背景干净。通过Ⅳ型胶原酶15 min+15min消化方式所得细胞悬液分离出的CD45⁺细胞的细胞总量、存活率、成团率等各项指标均符合单细胞测序要求。通过单细胞测序结果发现，细胞均表达CD45⁺，线粒体基因表达比例低，说明细胞在外界环境中被刺激的比例小。**结论** 在相同消化时间条件下与胰蛋白酶相比，Ⅳ型胶原酶对肾脏组织的消化效果好，有利于减少细胞碎片的产生，经磁珠分离所得CD45⁺肾脏单细胞悬液各项指标均符合单细胞测序要求且纯度高，有利于后续测序结果分析的准确性。

【关键词】单细胞测序；CD45⁺；肾脏
【中图分类号】R-331　　文献标志码 A　　DOI：10.3969/j.issn.2096-3351.2023.03.007

A kidney digestion and CD45⁺ single cell isolation method suitable for single cell sequencing

JIA Jian, TAN Ruizhi, WANG Li
Research Center, The Affiliated Hospital of T.C.M, Southwest Medical Univwrsity, Luzhou 646000, China

【**Abstract**】**Objective** To compare the digestive efficiency of collagenase Ⅳ and trypsin on renal tissue at different time points and explore the applicability of magnetic bead separation for single cell sequencing. **Methods** The renal tissues were digested with collagenase Ⅳ and trypsin for 15 min, 30 min and 15 min+15 min, respectively. The digestive efficiency of the two enzymes on renal tissue at different time points were compared, and the best digestion method was selected. CD45⁺ cells were separated from the renal cell suspension using magnetic beads. The number, activity and clumping rate of isolated cells were detected, and cell status was evaluated according to single cell sequencing results. **Results** The renal tissue was almost completely digested after 30 min of enzyme treatment. Under the same digestion time and method, the digestive efficiency of collagenase Ⅳ was obviously better than that of trypsin. The 15 min+15 min digestion method resulted in fewer cell fragments and a cleaner background compared to the 30 min digestion method. CD45⁺ cells isolated from the cell suspension obtained by the 15 min+15 min digestion with collagenase IV met the requirements for single-cell sequencing, including the total number of cells, survival rate, and agglomeration rate. Single cell sequencing results showed that all cells expressed CD45⁺, and the proportion of mitochondrial gene expression was low, indicating that the cells were less stimulated by external factors. **Conclusion** Compared to trypsin, collagenase IV had a better digestive efficiency on renal tissue under the same digestion time, which reduced the production of cell fragments. The CD45⁺ renal single-cell suspension obtained by magnetic bead separation met the requirements for single-cell sequencing and had high purity, which contributed to the accuracy of subsequent sequencing results analysis.

【**Key words**】Single cell sequencing; CD45⁺; Kidney

单细胞测序（single-cell sequencing，SCS）是指在单个细胞水平上对其携带的遗传信息进行测序，可深层次了解同类细胞不同亚群的分布状态、作用过程及协作机制等[1-2]。由于单细胞测序的特殊性，要求单细胞悬液中有活性的细胞总数大于10万个，此外单细胞悬液中细胞成团率、细胞活性状态及细胞内RNA的完整

基金项目：四川省应用基础研究项目（2020YJ0442）；泸州市人才引进专项项目（蓝辉耀团队）；西南医科大学附属中医医院青年苗圃项目（2020XYLH-080）
通信作者：王　丽，E-mail: wangli120@ swmu.edu.cn
引用本文：贾建，谭睿陟，王丽. 适用于单细胞测序的肾脏消化及CD45⁺单细胞分离方法[J]. 西南医科大学学报，2023，46（3）：217-221. DOI：10.3969/j.issn.2096-3351.2023.03.007

性也直接决定了研究结果的准确性[3-4]，不同组织解离单细胞所需要的消化酶、消化时间、温度和浓度不同[5]。然而肾脏组织结构复杂，肾脏细胞线粒体比例高，因此肾脏组织消化程度难以把控，目前尚没有成熟的肾脏单细胞悬液制备方法，导致肾脏CD45⁺单细胞分离更加困难。胰蛋白酶和Ⅳ型胶原酶是目前研究中的两种动物组织消化的常用试剂，包括小鼠的脑、肝脏组织等[6-7]。本文旨在比较胰蛋白酶和Ⅳ型胶原酶在不同消化条件下对小鼠肾脏组织的消化效果，以确定最佳消化方案，然后对最佳消化方案消化所得肾脏细胞悬液中的CD45⁺细胞进行磁珠分离后送单细胞测序并评估测序结果，为今后肾脏组织消化或肾脏其它重要细胞的单细胞测序前处理提供技术参考。

1 实验与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 实验动物选用雄性6～8周龄SPF级C57BL/6小鼠，体重约为18～20 g，共6只，购于成都达硕实验动物有限公司[SCXK（川）2020-030]，饲养于西南医科大学实验动物中心[SYXK（川）2020-065]，饲养温度20～24 ℃，饲养相对湿度50%～60%，12 h光照12 h黑暗循环交替。本研究通过西南医科大学动物伦理委员会审核同意（审批号：2021DW027）。

1.1.2 主要试剂与仪器 抗体生物素化试剂盒（Thermo Fisher Scientific，11060D）、磁珠分选试剂盒（Thermo Fisher Scientific，2232848）、Ⅳ型胶原酶（Worthington Biodchemical Corporation，LS004188）、胰蛋白酶（Beyptime，C0201）、DMEM培养基（Gibico，812044）、CD45抗体（Biolegend，103101）、恒温水浴锅（HHS-11，中国）、离心机（Eppendorf，美国）、倒置显微镜（Nikon，日本）。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 实验分为胰蛋白酶消化组和Ⅳ型胶原酶消化组，每种消化酶作用时间分别设置15、30 min和先消化15 min收集上清液后再加入新的消化液继续消化15 min（15min+15min组）。

1.2.2 取材及前处理 按照50 mg/kg腹腔注射浓度为10 mg/mL的戊巴比妥钠溶液麻醉小鼠，75%酒精消毒小鼠皮肤，心脏采血法抽净小鼠血液，沿腹腔中线剖开小鼠腹腔，钝性分离双肾并去除肾脏包膜，将6只小鼠肾脏取出后，统一在冰上用手术刀片剁碎至肉泥状，最后将其平均分成6份待消化处理。

1.2.3 肾脏组织消化 将剁碎后的肾脏组织用10 mL PBS重悬，随后在50 g离心力作用下离心5 min后弃去上清液以除去红细胞，随后将组织用10 mL DMEM培养基（含5% FBS）重悬，各组分别加入Ⅳ型胶原酶（10μ/mL）和胰蛋白酶（30μ/mL）于37 ℃水浴消化，消化过程中均加入50U脱氧核糖核酸酶Ⅰ以去除死亡细胞释放的DNA减少细胞聚集。消化完成后用70 μm细胞筛过滤去除未消化完全组织，1200 rpm/min离心5 min后收集上清液，加入红细胞裂解液重悬细胞沉淀破除红细胞，40 μm细胞筛过滤去除红细胞碎片，1 200 rpm/min离心5 min弃去上清，加入1 ml PBS重悬洗涤细胞沉淀并重复两次。最终将细胞沉淀重悬收集于500 μl DMEM培养基中。

1.2.4 形态学观察 各组分别取消化完成的细胞悬液10 uL涂于载玻片上，在Nikon倒置光学显微镜下采集图片，观察组织消化后所得细胞混悬液状态，比较组织消化完全度、单细胞数量、细胞成团情况和细胞状态。

1.2.5 消化效果比较 取各组消化完成后的肾脏单细胞悬液稀释10倍，后取稀释后的细胞悬液9 μL与1μL 0.4%浓度的台盼蓝溶液混匀，再取1 μL混合液加到细胞计数板上，在倒置显微镜下计数4个大方格内的细胞数和台盼蓝着色细胞数，各组单细胞总数目=（4个大方格细胞数之和/4）×10^4×细胞原液量（mL）×10；细胞活力=4个大方格台盼蓝着色细胞总数/4个大方格细胞总数；细胞成团率=4个大方格成团细胞总数/4个大方格细胞总数。比较各组细胞计数差异性。

1.2.6 CD45⁺单细胞分选 根据肾脏消化效果比较结果，选择消化所得细胞存活率高、细胞总数多和成团率低的消化方案进行消化，并对肾脏细胞悬液中的CD45⁺细胞进行分离。提前参照DSB-X™Biotin Protein Labeling Kit使用说明将CD45⁺抗体生物素化，再根据Dynabeads® FlowComp™ Flexi试剂盒将生物素化后的抗体与磁珠结合，然后将消化所得肾脏细胞悬液与结合了CD45⁺抗体的磁珠共同孵育30 min使肾脏CD45⁺细胞与磁珠结合，最后在磁力作用下可将结合了磁珠的CD45⁺细胞分离。分离完成后500 rpm/min离心1 min收集上清液以去除较大细胞团。

1.2.7 分离后的CD45⁺细胞计数、活力及成团率测定 选择消化效果最好的消化方案所得肾脏细胞悬液CD45⁺单细胞悬液9 uL与1 μL 0.4%浓度的台盼蓝溶液混匀，再取1 μL混合液加到细胞计数板上，在倒置显微镜下计数4个大方格内的细胞数、成团细胞数以及台盼蓝着色细胞数。

1.2.8 单细胞测序结果质控 根据单细胞测序结果分析各组细胞线粒体基因表达量，CD45⁺细胞阳性率以及各种免疫细胞亚群分群情况评价细胞状态。

1.3 统计学分析

使用GraphPad Prism 9软件进行数据统计学分析，组间比较采用t检验，$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞状态观察

随消化时间的增加，肾脏组织消化程度越明显，在消化时间达30 min时，所有组织均已被消化完全，溶液呈悬浊液状。光镜下，相同消化时间内胰蛋白酶消化能力明显弱于Ⅳ型胶原酶，并且消化过程中产生大量细胞碎片，不利于后续分选及测序。Ⅳ型胶原酶消化能有效减少细胞碎片的产生，并且优化后的15 min+15 min消化法与30 min直接消化法相比所得细胞数量多、产生的细胞碎片少、细胞形态更完整（见图1）。

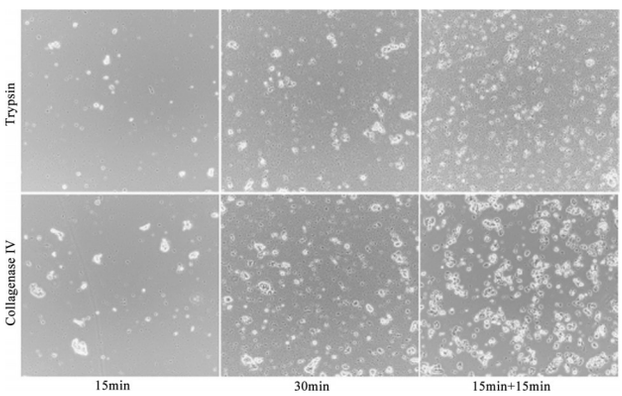


图1 不同消化条件消化所得肾脏细胞悬液（×100）

Figure 1 The suspension of kidney cells was digested under different digestive conditions（×100）

2.2 不同消化方法所得细胞差异性比较

各组消化所得单细胞数量见图2所示：不论胰蛋白酶还是Ⅳ型胶原酶组，消化时间为30 min所得单细胞数量均明显高于15 min，消化更为完全，Ⅳ型胶原酶在各时间段消化所得单细胞数均高于胰蛋白酶，而15 min +15 min的消化方式相对直接消化30 min所得细胞总数显著增加（$P < 0.001$），所得死亡细胞数明显减少（$P < 0.05$），并且单细胞悬液中成团细胞数显著降低（$P < 0.01$），为后续CD45$^+$细胞的进一步分选提供了足够的细胞数量和质量保障。

2.3 CD45$^+$单细胞分离

经磁珠分选后所得CD45$^+$单细胞悬液细胞形态完整，但混有很多体积较大细胞碎片和细胞团（见图3A），通过300 rpm/min离心1 min弃沉淀取上清液能够有效去除较大的组织碎片和成团细胞（见图3B），可防止测序过程中对仪器设备造成损害，和提高测序结果的准确性，最终所得单细胞悬液各项指标均符合单细胞测序标准（见表1）。

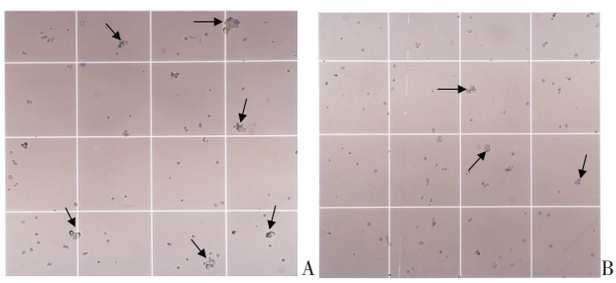


图3 CD45$^+$单细胞悬液细胞状态

Figure 3 Cell state of CD45$^+$ single cell

注：A.磁珠分选后细胞碎片和细胞团较多；B.低速离心后成团细胞和碎片明显减少。

表1 磁珠分选细胞后细胞状态

Table 1 Cell status after magnetic beads sorting

项目	细胞总量	细胞活性（%）	细胞成团率（%）
单细胞测序标准	$>1\times10^5$	>70	<15
细胞状态	2×10^5	82	6.7

2.4 单细胞测序结果

线粒体基因表达量通常反应了细胞状态的好坏，由单细胞测序报告我们发现各组测序所用细胞的线粒体基因表达量大部分处于5%左右（见图4A）。将各组用于测序细胞共计85 924个统一纳入分析，结果显示CD45$^+$细胞为81 254个，阳性率为94.56%（见图4B，绿色即为CD$^+$细胞），并且其中的T细胞、B细胞、巨噬细胞等重要免疫细胞均能够根据细胞的种类分为明显的亚群，对后续单细胞结果分析有利（见图4C）。

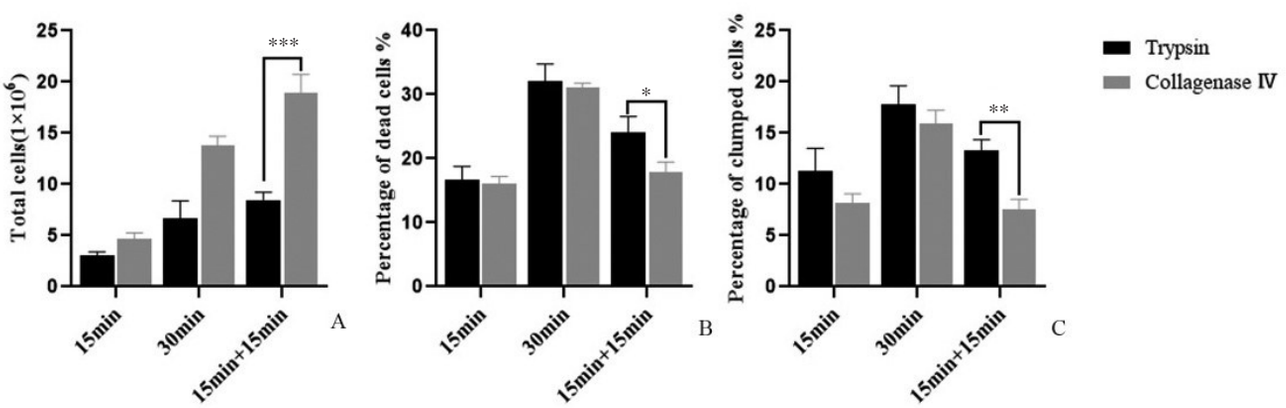


图2 不同消化方式所得细胞状态比较

Figure 2 Comparison of cell states obtained by different digestion methods

注：A.各消化方式所得细胞总数统计（***P <0.001，胰蛋白酶组与Ⅳ型胶原酶组比较）；B.各消化方式所得细胞死亡率统计（*P <0.05，胰蛋白酶组与Ⅳ型胶原酶组比较）；C.各消化方式所得细胞成团率统计（**P <0.01，胰蛋白酶组与Ⅳ型胶原酶组比较）。

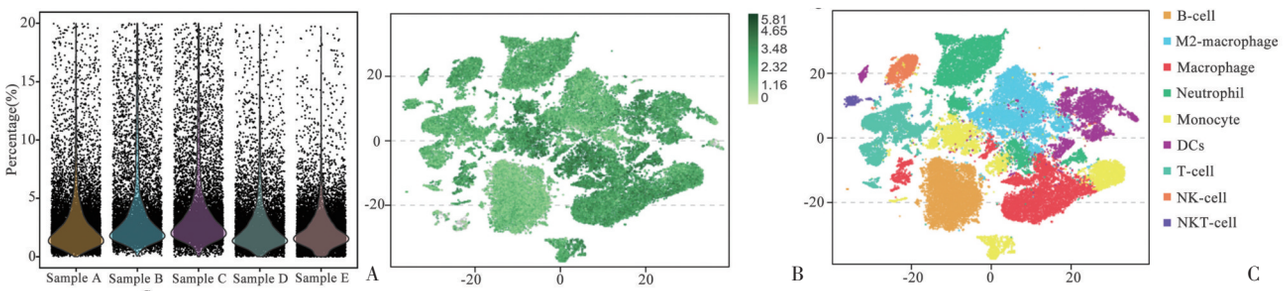


图4　CD45⁺单细胞悬液细胞状态

Figure 4　Cell state of CD45⁺ single cell

注：A.各组细胞线粒体基因表达百分比；B.CD45⁺细胞分布；C.各免疫细胞亚群分布情况。

3　讨论

近年来肾脏疾病已成为全球公共卫生问题，越来越受到研究者的关注，通过单细胞测序技术对其进行研究能够让我们更深层次了解肾脏中同类细胞不同亚群的分布及状态，作用过程及协作机制等，对挖掘新的研究思路和寻找新的药物作用靶点起到积极的作用[8-10]。FUJ[11]等构建糖尿病小鼠模型开展单细胞测序，比较模型组与正常组巨噬细胞细胞表型变化的差异性发现M_1型巨噬细胞比例明显增加，揭示了M_1型巨噬细胞在糖尿病炎症反应过程中起重要作用，此外研究者们还在急性肾损伤和纤维化、狼疮肾炎和肾脏肿瘤反应等方面开展单细胞测序，均揭示了重要的研究价值[12-15]。肾脏疾病发生过程中大多伴随着炎症反应的发生，通过单细胞测序研究CD45⁺细胞在疾病中遗传信息的变化情况有助于更深入了解其发病机理和开发新的药物治疗作用靶点[16-20]。单细胞悬液制备情况的好坏直接影响单细胞测序结果，由于肾脏结构复杂，消化存在一定难度，并且肾脏组织内所含细胞种类繁多，导致CD45⁺阳性细胞分离更为困难，目前尚无用于单细胞测序的肾脏单细胞悬液制备方法的报道，更无有效的肾脏CD45⁺细胞分离方法，因此在目前肾脏单细胞测序需求日益增加的情况下，摸索肾脏单细胞悬液制备方法尤为重要。

不同种酶对不同组织消化效果不尽相同，常用的组织消化酶有胰蛋白酶、胶原酶、弹力蛋白酶等[21-22]，胰蛋白酶是目前使用最广泛的消化试剂，通过作用于与赖氨酸或精氨酸相连接的肽键，除去细胞间粘蛋白及糖蛋白，影响细胞骨架，从而使细胞分离[23-24]，胶原酶通过水解细胞间质的脯氨酸使细胞离散，对于细胞间质胶原的消化作用很强，消化能力不受血清蛋白影响[25]。本研究发现在相同消化时间内Ⅳ型胶原酶对肾脏组织的消化效率优于胰蛋白酶，肾脏组织结构的复杂性，胰蛋白酶单一的消化机理是其消化能力不如Ⅳ型胶原酶的重要原因，所以选用Ⅳ型胶原酶对肾脏进行消化有利于提高所得单细胞数量及细胞状态。消化前将剁碎后的肾脏组织用PBS洗涤再低速离心弃掉上清液能除去大量红细胞，从而减少细胞碎片的产生。采用15 min+15 min的消化方式能够减少消化酶对已经消化下来的细胞的作用时间，对细胞状态起保护作用，并且能够减少细胞碎片的产生。在组织消化过程中难免有细胞死亡，死亡细胞裂解释放的DNA具有较强粘附性，是导致细胞聚集成团的主要原因，通过在消化液中加入脱氧核糖核酸酶Ⅰ后能够有效减少单细胞悬液细胞成团现象[26-27]。消化完成后用PBS重悬洗涤细胞沉淀两次能够有效去除消化产生的组织、细胞碎片，有助于排除对单细胞测序结果的影响。

在组织消化或细胞分离过程中细胞常因外界刺激导致出现应急反应和线粒体基因的大量释放，线粒体基因表达量常用于评价细胞状态好坏的标准，一般线粒体基因表达量低于20%的细胞可视为正常细胞[28-30]。所以单细胞悬液的制备要求快速准确，以避免RNA降解或细胞相关基因活化导致测序结果出现偏差[31]，尽可能缩短单细胞悬液制备时间尤为重要。免疫磁珠分选法是一种通过磁珠从细胞群中分离目的细胞的技术，通过抗体、生物素或亲和素与目标细胞上特定的细胞表面蛋白结合后在磁力的作用下起到将目标细胞与非目标细胞分离的目的[32-34]，分离完成后通过300 rpm/min离心1min弃掉沉淀取上清能够有效去掉较大的细胞团，能够有效降低细胞成团率。该方法相对流式分选法操作更为简单，所需时间短，并且能够避免仪器对细胞造成的损伤。由单细胞测序结果可以看出磁珠分离法分离所得CD45⁺细胞纯度高且细胞状态好，各重要免疫细胞亚群分布明显，说明磁珠分离法不仅操作简单，并且能够有利于保护细胞状态，分离所得细胞适用于单细胞测序。

4　结论

在相同消化时间条件下，Ⅳ型胶原酶相对胰蛋白酶消化所得细胞悬液中细胞数量更多，细胞存活率更高，更适合应用于肾脏组织消化，所得细胞悬液通过磁

珠分离法所得CD45⁺单细胞悬液各项指标均符合单细胞测序要求，表明本肾脏单细胞悬液制备方法适用于单细胞测序。

5 参考文献

[1] SEE P, LUM J, CHEN JM, *et al*. A single-cell sequencing guide for immunologists[J]. Front Immunol, 2018, 9: 2425.
[2] YAMADA S, NOMURA S. Review of single-cell RNA sequencing in the heart[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(21): 8345.
[3] BRESCIANI E, BROADBRIDGE E, LIU PP. An efficient dissociation protocol for generation of single cell suspension from zebrafish embryos and larvae[J]. MethodsX, 2018, 5: 1287-1290.
[4] SEGEREN HA, ANDREE KC, OOMENS L, *et al*. Collection of cells for single-cell RNA sequencing using high-resolution fluorescence microscopy[J]. STAR Protoc, 2021, 2(3): 100718.
[5] LAFZI A, MOUTINHO C, PICELLI S, *et al*. Tutorial: guidelines for the experimental design of single-cell RNA sequencing studies[J]. Nat Protoc, 2018, 13(12): 2742-2757.
[6] 康杨婷，王丽琨，伍国锋. 胰酶稀释法提取乳鼠原代海马神经元[J]. 贵州医科大学学报，2019，44(1): 59-63.
[7] 李洁，翟克超，刘永达，等. 小鼠肝组织经胶原酶Ⅳ不同时长原位消化后Kupffer细胞的分选效果及其肿瘤细胞吞噬功能观察[J]. 山东医药，2022，62(24): 35-39.
[8] WU HJ, HUMPHREYS BD. Single cell sequencing and kidney organoids generated from pluripotent stem cells[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2020, 15(4): 550-556.
[9] RUDMAN-MELNICK V, ADAM M, POTTER A, *et al*. Single-cell profiling of AKI in a murine model reveals novel transcriptional signatures, profibrotic phenotype, and epithelial-to-stromal crosstalk[J]. J Am Soc Nephrol, 2020, 31(12): 2793-2814.
[10] 钟霞，张宇韦，谭睿陟，等. 肾痿复方对糖尿病肾病大鼠肾组织MMP-9/TIMP-1表达的影响[J]. 西南医科大学学报，2019，42(5): 413-418.
[11] FU J, AKAT KM, SUN ZG, *et al*. Single-cell RNA profiling of glomerular cells shows dynamic changes in experimental diabetic kidney disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2019, 30(4): 533-545.
[12] DO VALLE DURAES F, LAFONT A, BEIBEL M, *et al*. Immune cell landscaping reveals a protective role for regulatory T cells during kidney injury and fibrosis[J]. JCI insight, 2020, 5(3): 130651.
[13] DER E, RANABOTHU S, SURYAWANSHI H, *et al*. Single cell RNA sequencing to dissect the molecular heterogeneity in lupus nephritis[J]. JCI insight, 2017, 2(9): 93009.
[14] YOUNG MD, MITCHELL TJ, VIEIRA BRAGA FA, *et al*. Single-cell transcriptomes from human kidneys reveal the cellular identity of renal tumors[J]. Science, 2018, 361(6402): 594-599.
[15] 王梦洁，董伟，梁馨苓. 单细胞RNA测序在肾脏疾病研究中的应用与前景[J]. 临床肾脏病杂志，2021，21(8): 681-684.
[16] WEN S, DENG F, LI LL, *et al*. VX-765 ameliorates renal injury and fibrosis in diabetes by regulating caspase-1-mediated pyroptosis and inflammation[J]. J Diabetes Investig, 2022, 13(1): 22-33.
[17] WU K, ZHENG XY, YAO ZX, *et al*. Accumulation of CD45RO+CD8+ T cells is a diagnostic and prognostic biomarker for clear cell renal cell carcinoma[J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(10): 14304-14321.
[18] 谢礼波，卢一平. 骨髓间充质干细胞治疗肾脏缺血-再灌注损伤的 研究进展[J]. 西南医科大学学报，2017，40(5): 511-514.
[19] 廖雨滋. LncRNA Gm2115调控糖尿病肾病骨髓间充质干细胞迁移的机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学，2020.
[20] 唐巧，李怡，李贵森，等. 急性肾损伤有关生物标志物的研究进展[J]. 实用医院临床杂志，2022，19(2): 225-228.
[21] HU DS, YIN CJ, MOHANTA SK, *et al*. Preparation of single cell suspensions from mouse aorta[J]. Bio Protoc, 2016, 6(11): e1832.
[22] 张远圆，张杉杉，常旭，等. 机械法与机械-酶消化法制备大鼠膈肌组织单细胞悬液的比较[J]. 中国组织工程研究，2020，24(8): 1213-1217.
[23] SAKAI Y, MURAKAMI E, KATO H, *et al*. Feasibility of trypsin digestion as a sample preparation for daptomycin quantification in murine skeletal muscles[J]. Biol Pharm Bull, 2019, 42(5): 751-757.
[24] 赵娟，詹冬梅，杨默迟，等. 组织块联合胰酶消化法培养兔角膜缘干细胞的初步探索[J]. 国际眼科杂志，2018，18(4): 626-629.
[25] KWAK K, PARK JK, SHIM J, *et al*. Comparison of islet isolation result and clinical applicability according to GMP-grade collagenase enzyme blend in adult porcine islet isolation and culture[J]. Xenotransplantation, 2021, 28(4): e12703.
[26] CHEN MJ, ZHOU X. VIPER: variability-preserving imputation for accurate gene expression recovery in single-cell RNA sequencing studies[J]. Genome Biol, 2018, 19(1): 196.
[27] H RING M, FATT M, KUPARI J. Protocol to prepare single-cell suspensions from mouse vagal sensory ganglia for transcriptomic studies[J]. STAR Protoc, 2020, 1(1): 100030.
[28] GUDISEVA HV, VRATHASHA V, HE J, *et al*. Single cell sequencing of induced pluripotent stem cell derived retinal ganglion cells (iPSC-RGC) reveals distinct molecular signatures and RGC subtypes[J]. Genes (Basel), 2021, 12(12): 2015.
[29] KOENITZER JR, WU HJ, ATKINSON JJ, *et al*. Single-nucleus RNA-sequencing profiling of mouse lung. reduced dissociation bias and improved rare cell-type detection compared with single-cell RNA sequencing[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2020, 63(6): 739-747.
[30] 肖明威. 高通量单细胞测序的数据分析与质量控制[D]. 武汉: 江汉大学，2021.
[31] VAN DEN BRINK SC, SAGE F, V RTESY, *et al*. Single-cell sequencing reveals dissociation-induced gene expression in tissue subpopulations[J]. Nat Methods, 2017, 14(10): 935-936.
[32] HU L, CHEN XR, CHEN M, *et al*. Enrichment and detection of circulating tumor cells by immunomagnetic beads and flow cytometry[J]. Biotechnol Lett, 2021, 43(1): 25-34.
[33] LI M, LIU LQ, XIAO XB, *et al*. Viscoelastic properties measurement of human lymphocytes by atomic force microscopy based on magnetic beads cell isolation[J]. IEEE Trans Nanobioscience, 2016, 15(5): 398-411.
[34] BEASLEY AB, ACHEAMPONG E, LIN WT, *et al*. Multimarker immunomagnetic enrichment of circulating melanoma cells[J]. Methods Mol Biol, 2021, 2265: 213-222.

（利益冲突：无）

（收稿日期：2022-07-05；修回日期：2022-09-21）