ICS 07.080
CCS C 04

中华人民共和国国家标准

GB/T 43776—2024

单细胞测序样本采集与处理规范

Technical specification of sample collection and processing for single cell sequencing

2024-03-15 发布　　2024-03-15 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会　发布

目　　次

前言 …… Ⅰ
1　范围 …… 1
2　规范性引用文件 …… 1
3　术语和定义 …… 1
4　缩略语 …… 2
5　总体原则和要求 …… 2
6　样本采集 …… 2
6.1　采集前的准备 …… 2
6.2　采集 …… 3
7　样本处理 …… 4
7.1　处理前的准备 …… 4
7.2　处理 …… 4
8　质量验证 …… 7
附录 A（资料性）　组织细胞酶解法 …… 8
附录 B（资料性）　细胞群富集方法 …… 9
附录 C（资料性）　台盼蓝染色操作流程 …… 10
C.1　仪器 …… 10
C.2　试剂耗材 …… 10
C.3　检测步骤 …… 10
参考文献 …… 11

前　言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则　第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国生物样本标准化技术委员会(SAC/TC 559)提出并归口。

本文件起草单位：深圳华大生命科学研究院、上海芯超生物科技有限公司、复旦大学、中国计量科学研究院、广东省中医院(广州中医药大学第二附属医院)、上海生物芯片有限公司、青岛华大智造科技有限责任公司、上海国际人类表型组研究院、深圳大学、唐颐控股(深圳)有限公司、上海亿康医学检验所有限公司、中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所)、上海水大技术转移有限公司。

本文件主要起草人：徐讯、李启沅、郜恒骏、吴静静、张小燕、杨亚军、王晶、陈曲波、傅博强、蔡贤杵、倪鸣、丁国徽、刘姗姗、郭云峰、王博、陈力群、王江新、曾庆想、张立、徐绍坤、蒋跃明、马士卉、王萌萌、李曼莉、任程、胡鹏。

单细胞测序样本采集与处理规范

1 范围

本文件规定了单细胞测序样本采集与处理的基本要求及质量验证。

本文件适用于人和动物血液与组织、植物组织、细胞系及其他特殊单细胞测序待检样本的采集与处理。

本文件不适用于微生物样本的采集与处理。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 35892 实验动物 福利伦理审查指南

GB/T 38576 人类血液样本采集与处理

GB/T 38736 人类生物样本保藏伦理要求

GB/T 40352.1 人类组织样本采集与处理 第1部分：手术切除组织

ISO/TS 20388：2021 生物技术 生物样本库 动物生物样本保藏要求(Biotechnology—Biobanking—Requirements for animal biological material)

ISO/TS 23105：2021 生物技术 生物样本库 研究和开发用的植物生物样本保藏要求(Biotechnology—Biobanking—Requirements for the biobanking of plant biological material for research and development)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

单细胞测序 single cell sequencing

利用单细胞基因组扩增技术，通过高通量测序得到单个细胞中所有的基因组、转录组等序列的技术，反映细胞间的异质性。

3.2

细胞系 cell line

由原代细胞或细胞群经传代培养而获得的具有非均质性特征的细胞群。

[来源：ISO 21427-2：2006，3.1]

3.3

密度梯度离心 density gradient centrifugation

用一定的介质(如氯化铯、蔗糖和多聚蔗糖)在离心管内形成一连续或不连续的密度梯度，将细胞混悬液或匀浆置于介质的顶部，通过重力或离心力场的作用使细胞分层、分离的方法。

3.4

解离　dissociation

通过破坏掉细胞间隙中维系细胞关联的蛋白质，使细胞分离开的过程。

3.5

富集　enrichment

从稀有细胞或珍贵样本中通过流式或磁珠分选等技术方法，提高目标细胞群含量的操作过程。

3.6

采集　collection

获取所需要的生物样本及其相关数据的过程。

[来源：GB/T 40364—2021，3.20，有修改]

3.7

细胞活率　cell viability

在细胞群体中除死细胞和细胞碎片外，总细胞中活细胞所占的百分比。

4　缩略语

下列缩略语适用于本文件。

PBMC：外周血单个核细胞（Peripheral Blood Mononuclear Cell）

PBS：磷酸缓冲盐溶液（Phosphate Buffered Saline）

5　总体原则和要求

5.1　样本处理环境应符合 GB 19489 的要求。

5.2　人类生物样本的采集与处理应符合 GB/T 38736 的要求，应获得伦理委员会审批，采集前应在充分告知、尊重捐献者权利的前提下签署知情同意书，确保不会对捐献者的健康和诊断治疗产生不利的影响。

5.3　动物生物样本的采集与处理应符合 GB/T 35892 的要求，应获得伦理委员会审批。在采集前保定动物时，宜尽可能减少动物的不适及痛苦和应激反应。

5.4　应根据样本类型、预期用途、技术路线、相关标准、客户要求等确定样本采集与处理方案，制定合理的工作流程，明确相关人员职责，并予以执行。

5.5　应对样本采集与处理的各个过程进行记录，确保能够对处理过程进行溯源。

5.6　应对样本采集和处理中可能出现的偏离情况形成文件化的程序，并予以执行。

5.7　样本的采集和处理应由培训合格的工作人员进行。

5.8　处理后的单细胞样本应进行合理的保存，避免影响后续的单细胞测序。

6　样本采集

6.1　采集前的准备

样本采集前，应根据研究的内容，制定采集方案并形成文件，确定以下内容，包括但不限于：

a）　采集目的，可包含研究计划、研究意义、技术路线和单细胞测序分析类型等内容；

b）　样本的生物安全等级、传染性及相应的个体防护要求；

c）　样本的物种和类型；

d）　采集时间；

e) 采集场所；
f) 采集人员及其资质；
g) 采集的例数，每例样本采集的数量；
h) 采集容器、设备、保存液(必要时)、保存时限；
i) 可明确追溯到原始样本的标记方式；
j) 采集后的处理、存储、运输条件和包装要求；
k) 样本必要信息记录表，如名称、编号、来源、物种、类型、数量以及其他必要信息(例如样本是否与肿瘤有关、样本的传染性等)；
l) 样本采集过程所用采集器材、耗材及废弃物的安全处理方式等。

6.2 采集

6.2.1 人和动物血液样本采集

6.2.1.1 人类血液样本的采集应符合 GB/T 38576 的要求。

6.2.1.2 动物血液样本的采集应符合 ISO/TS 20388:2021 中 5.2.3 的要求。

6.2.1.3 宜使用抗凝采血管作为采集容器。

6.2.1.4 宜采用以下保存和运输方案：

——置于 4 ℃保存和运输，采血至血样处理时间应不超过 6 h；

——置于 4 ℃保存，2 h 内制备成 PBMC 悬液，进行程序性降温后保存于液氮或－80 ℃，需要时再进行复苏。运输时应全程保持足量干冰，冻存的 PBMC 可用干冰运输。

6.2.2 人和动物组织样本采集

6.2.2.1 人类组织手术切除样本的采集应符合 GB/T 40352.1 的要求，人类组织活检样本的采集应由有资质的人员负责。

6.2.2.2 动物组织样本的采集应符合 ISO/TS 20388:2021 中 5.2.4 的要求。

6.2.2.3 采集的组织类型可包括正常组织、肿瘤组织和癌旁组织等。应根据采集方案准确采集目标组织部位，弃去与样本无关的组织、血渍或污物。

6.2.2.4 组织样本采集后宜切割为小块的组织块进行多管分装，并根据运输时间、单细胞测序分析类型等制定合适的保存和运输方案，包括但不限于：

——4 ℃保存，并在组织离体 2 h 内进行样本处理；

——放入装有预冷组织保存液的样本管中，4 ℃保存和运输，并在组织离体 48 h 内进行样本处理；

——放入装有预冷组织保存液的冻存管中，进行程序性降温后保存于液氮或－80 ℃，需要时再进行复苏；冻存的组织可用干冰运输，运输时应全程保持足量干冰；

——放入冻存管中直接进行液氮速冻，液氮或－80 ℃保存；冻存的组织可用干冰运输，运输时应全程保持足量干冰；

——按照商业组织保存液的试剂说明书进行保存和运输。

6.2.3 植物组织样本采集

6.2.3.1 植物组织的采集应符合 ISO/TS 23105:2021 第 5 章的要求。

6.2.3.2 宜选取生长状态良好的活体植株，采集新鲜离体的植物组织后宜立即进行样本处理。

6.2.4 细胞系样本采集

6.2.4.1 宜选取生长状态良好的细胞系以确保细胞活性。

6.2.4.2 应根据细胞系类型、运输时间、单细胞测序分析类型等制定合适的保存和运输方案，包括但不限于：

——4 ℃保存和运输，并在 24 h 内进行样本处理；

——加入细胞冻存液，进行程序性降温后液氮或－80 ℃保存，需要时再进行复苏；冻存的细胞系可用干冰运输，运输时应全程保持足量干冰；

——按照商业细胞冻存液的试剂说明书进行保存和运输。

6.2.5 特殊样本采集

针对其他特殊类型的样本，如类器官、尿液、胸腹水、脑脊液等的采集，应根据预期用途和后续具体的单细胞测序分析类型及方案等，选择并验证适宜的采集方案。

注：采集方案优先选择来自国内外行业公认的标准或指南，公认/权威的教科书或已发表的相关文章中的程序。

6.2.6 标签标示

应对样本进行编码，打印不易脱落、标注清晰的标签。仔细核对样本信息，确认无误后将标签粘贴在样本采集容器上。

7 样本处理

7.1 处理前的准备

7.1.1 应形成文件化的样本接收要求和偏离情况处置方案。接收要求应包括但不限于样本管完整性、运输温度有效性、标记的可追溯性和可识别性（如样本的有效性、结冰、冻融等情况）。

7.1.2 应建立满足预期要求的接收程序，根据接收程序要求对样本的接收状态进行检查并记录。若样本状态不符合接收要求，应按照偏离的文件要求执行。

7.1.3 应根据不同的样本类型和预期目的，制定文件化的处理方案，形成详细的作业指导书，明确各个步骤的具体要求。

7.1.4 应明确样本处理后所用处理器材、耗材及废弃物的安全处理方式。

7.2 处理

7.2.1 一般要求

7.2.1.1 样本处理应建立符合研究目的的操作规程，并使用不含核酸酶的试剂和耗材。

7.2.1.2 样本处理操作应减少对细胞的损伤，如减少吹吸次数、采用大口径枪头、轻柔缓慢地移液等。

7.2.1.3 应对样本处理的各个过程及样本的状态进行详细记录，记录应能够还原处理过程。记录的过程文件应得到适当的保存。

7.2.1.4 如在各处理过程遇到偏离情况，应予以记录，并通知所有相关方。

7.2.2 细胞群悬液制备

7.2.2.1 解离

7.2.2.1.1 一般要求

7.2.2.1.1.1 应根据不同样本类型选取适合的解离方案，以确保样本细胞完整性。

7.2.2.1.1.2 解离方案包括但不限于：

——机械法：通过切割、切块、移液器吹打等方法机械剪切和破坏组织；

——酶解法：使用胶原酶、胰蛋白酶、中性蛋白酶、弹性蛋白酶等多种酶消化组织，解离蛋白键；

——结合方案：机械法和酶解法依次或同时进行，实现更广泛的解离。

7.2.2.1.1.3 应选择适宜的解离方案，组织细胞酶解法可参考附录 A 或根据商业细胞提取试剂盒说明书进行操作。

注：解离不充分或解离过度均会影响单细胞测序的质量。

7.2.2.1.2 人和动物血液样本解离

7.2.2.1.2.1 血液样本处理前不应剧烈摇晃，避免发生溶血。

7.2.2.1.2.2 血液样本应采用离心法收集细胞，并使用缓冲液清洗得到悬浮液。

7.2.2.1.2.3 若细胞沉淀中有红细胞，应立即裂解并去除。

7.2.2.1.2.4 若先分离出 PBMC，可将其进行程序性降温后保存于液氮或－80 ℃，需要时再进行复苏，复苏后应进行活细胞计数。

7.2.2.1.3 人和动物组织样本解离

7.2.2.1.3.1 新鲜离体 2 h 内、4 ℃保存的组织样本，或离体 48 h 内使用组织保存液、4 ℃保存的组织样本，可直接进行解离；组织保存液中保存，并经程序性降温后保存于液氮或－80 ℃的组织样本应先复苏再进行解离；直接进行液氮速冻的组织样本应分离细胞核进行单细胞核测序。

7.2.2.1.3.2 组织样本应通过机械法、酶解法或组合方案解离。应根据不同组织的细胞外基质选择适宜的方案：

——采用机械法。用物理切割或刀片切碎的方式使组织分开，分离过程宜在冰上操作。应使用锋利的解离器械，尽可能减少对细胞的机械损伤，切碎组织时应避免组织干燥；

——采用酶解法。酶解应完全充分，应根据组织类型等摸索合适的酶浓度，浓度过低起不到较好消化效果，浓度过高对细胞有毒性。不同组织所采用的特定酶和消化时间参照附录 A。当细胞活率低时，应适当降低酶浓度或缩短解离时间；

——采用组合方案。先切割分离，再酶解消化。

7.2.2.1.3.3 若消化后的悬液中有红细胞，应立即裂解并去除。

7.2.2.1.3.4 应避免长时间操作产生细胞团块，细胞分离过程中可加入脱氧核糖核酸酶(DNase)等辅助酶，以减少细胞团块的产生。

7.2.2.1.4 植物组织样本解离

7.2.2.1.4.1 应采用新鲜离体的植物组织。

7.2.2.1.4.2 植物组织应采用酶解法软化或去除细胞壁。应根据不同植物组织类型和细胞壁成分选择最适孵育时间和酶解法。

注：酶解法中常用的植物组织酶解液主要由纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶等组成。

7.2.2.1.4.3 应使用细胞过滤器对消化后的悬液进行过滤，得到原生质体悬液。

7.2.2.1.4.4 对于某些组织样本(如含有次生细胞壁的成熟组织样本)，细胞壁消化困难，应分离细胞核进行单细胞核测序。

7.2.2.1.5 细胞系样本解离

7.2.2.1.5.1 新鲜细胞系或离体 24 h 内、4 ℃保存和运输的细胞系可直接解离；使用细胞保护液保护并经程序性降温后保存于液氮或－80 ℃的细胞系应先复苏再进行解离。

7.2.2.1.5.2 贴壁细胞系样本应先进行消化和悬浮，得到细胞悬浮液。

7.2.2.1.5.3 当出现大量明显的细胞团块或细胞残骸时，应进行上下吹打，温和混匀，并用合适孔径的

细胞过滤器过滤细胞。

7.2.2.1.5.4 不同类型的细胞系应采用不同的离心条件获得细胞。对于较小的细胞(如原代细胞),宜在室温条件下,300 *rcf* 离心 5 min;对于较大的细胞(如永生细胞),宜在室温条件下,150 *rcf* 离心 3 min。

注:离心速度过快或离心时间过长会损害细胞的完整性和活力。

7.2.2.1.6 特殊样本解离

7.2.2.1.6.1 针对不易获得完整单细胞的样本,可考虑收集细胞核进行单细胞核测序,如神经元组织样本或直接进行液氮速冻的样本等。

7.2.2.1.6.2 针对其他特殊类型样本的解离,如类器官、人类尿液、胸腹水、脊髓液等,应根据预期用途和后续单细胞测序分析类型及具体方案等,选择并验证适宜的解离方案,如离心法、酶解法等。

注:解离方案优先选择来自国内外行业公认的标准或指南,公认/权威的教科书,参考发表的相关文章等。

7.2.2.2 细胞群富集

7.2.2.2.1 对稀有细胞或珍贵样本,应富集特定的细胞群,或去除不需要的细胞群(包括死细胞)。

7.2.2.2.2 应针对各种特定的组织类型对不同的方法进行优化,包括但不限于离心、磁珠、流式细胞荧光分选技术、微流体细胞分选等,各类方法说明参见附录 B。

7.2.2.3 细胞清洗和重悬

7.2.2.3.1 细胞制备完成后宜尽快进行清洗和重悬,在 30 min 内完成,以保证细胞活性。

7.2.2.3.2 细胞清洗和重悬前,应根据细胞类型选择适当的清洗次数、清洗缓冲液成分、离心条件或滤器类型,以减少单细胞制备的污染成分。

7.2.2.3.3 宜采用不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的磷酸盐缓冲液作为细胞清洗和重悬液。特定类型的细胞,如原代细胞、干细胞等,应采用特定的缓冲液。

7.2.2.3.4 清洗和重悬时,应根据样本的情况选取适当体积的细胞悬液以减少细胞聚集和结块。

7.2.2.4 细胞群悬液过滤

7.2.2.4.1 应采用合适的细胞过滤器对细胞悬液进行过滤,避免细胞残骸或细胞团块影响测序。

7.2.2.4.2 应选择合适的滤器孔径,宜比样本的最大细胞直径稍大。

7.2.2.4.3 应选择合适的细胞过滤器,以最大限度地减少样本细胞数量的损失,特别是小体积悬浮液。

7.2.2.5 细胞群悬液保存

细胞群悬液制备完成后,宜置于冰上保存,30 min 内用于下一步骤。若冷冻保存,应进行分装,避免多次冻融,并保存于液氮或−80 ℃。进行下一步前应重新评估细胞群悬液质量。

7.2.3 单细胞分离

应根据研究目的、样本类型、文库构建方式、测序方法和分析方案等,选择合适的单细胞分离方法。常用的单细胞分离方法包括:

——梯度稀释法:梯度稀释细胞悬液至每孔一个细胞;

——口吸移液法:用玻璃毛细管分离单细胞;

——自动显微操作法:使用自动微量移液管分离单细胞;

——激光显微切割法:用激光从组织切片中分离单细胞;

——流式细胞分选技术:使用电荷分离含有单细胞的微滴;

——微流控系统法：采用微流控芯片分离流动槽中单细胞；
——微液滴平台法：利用微液滴制备装置将单细胞分离到微液滴中；
——微孔法：通过芯片中的微孔捕获单细胞；
——组合法：多种方法结合。

8 质量验证

8.1 应在完成细胞清洗和过滤后，通过细胞活率、细胞碎片或聚集情况、细胞浓度的检测来确定细胞群悬液制备是否成功。

8.2 细胞存活率宜采用台盼蓝染色法，通过手动计数或自动细胞计数仪进行检测。手动计数检测细胞存活率参考附录C；自动计数仪检测细胞存活率根据仪器检测说明书进行。复苏后的细胞活率宜不低于80%，细胞浓度宜为700个/μL～1 200个/μL。特殊样本应根据实际样本类型和状态确定具体的质量控制要求。

8.3 应在显微镜下对细胞群悬液进行目视检查，以快速识别可能会使下游步骤变得复杂的碎片、细胞双联体和细胞聚集物。悬液背景应干净，无大量碎片及杂质，粘连细胞的比例宜不超过10%。

8.4 可采用细胞计数设备（如血球计数器或自动细胞计数仪）对细胞群悬液进行准确的细胞计数。

8.5 可采用流式细胞术、自动细胞计数仪等同时评估多种指标，包括细胞大小、活率和双联体或聚集物比例。此外，还可将抗体标记作为分析的一部分，评估是否存在目标细胞群及其比例是否适当。

注：流式细胞术指对悬液中的单细胞或其他生物粒子，通过检测标记的荧光信号，实现高速、逐一的细胞定量分析和分选的技术。

附 录 A
（资料性）
组织细胞酶解法

常用的组织细胞酶解法见表 A.1。

表 A.1 组织细胞酶解方法

组织类型	消化酶	酶解温度/℃	酶解浓度
肝脏	胶原酶 Ⅳ	37	0.16 mg/mL
肺	中性蛋白酶和弹性蛋白酶	37	0.33 U/mL 和 3 U/mL
皮肤	胰蛋白酶	32	1×
脾脏	胶原酶 D	37	2 mg/mL
消化道	中性蛋白酶	37	0.4 mg/mL
胰腺	胰蛋白酶	37	1×
肾脏	低嗜热菌蛋白酶(Liberase TL)	37	2 mg/mL
视网膜	木瓜蛋白酶	37	4 U/mL

附 录 B
（资料性）
细胞群富集方法

常用的细胞群富集方法及其描述见表 B.1。

表 B.1 细胞群富集方法

方法	描述
离心	通过密度梯度离心，根据细胞大小、形状或密度，富集目标细胞群
磁珠	通过磁珠结合抗体的阳性/阴性筛选，富集目标细胞群
流式细胞荧光分选技术	通过荧光基团/荧光素结合抗体的阳性/阴性筛选，富集目标细胞群
微流体细胞分选	利用基于荧光基团/荧光素结合抗体的阳性/阴性筛选的低压微流体，富集目标细胞群

附 录 C
（资料性）
台盼蓝染色操作流程

C.1 仪器

显微镜。

C.2 试剂耗材

0.4%台盼蓝染液、生理盐水、玻片、盖玻片、滴管、细胞计数板。

C.3 检测步骤

C.3.1 对于悬浮细胞，离心收集细胞，充分清洗后，用适当缓冲液（如 PBS）重悬制成单细胞悬液；对于贴壁细胞，先用胰酶消化细胞，再按照悬浮细胞的方法制备成单细胞悬液。

C.3.2 取 0.5 mL 单细胞悬液，按照 1∶1 比例与 0.5 mL 浓度为 0.4%的台盼蓝染色液充分混匀，室温染色 3 min～10 min。

注 1：因台盼蓝具有细胞毒性，染色时间过久会导致部分死细胞染色，干扰计数。

注 2：若细胞密度比较高，可取 0.2 mL 单细胞悬液，经适当缓冲液稀释到 0.5 mL，再用 0.5 mL 浓度为 0.4%的台盼蓝染色液染色。

C.3.3 取少量上述染色细胞加入自动细胞计数仪，计算着色细胞（即损伤细胞和死细胞）和总细胞。

注 1：用移液枪加染色细胞时，沿着盖玻片的边缘轻轻加液使其完全覆盖整个小室。

注 2：1 mm^2 方格内细胞数通常控制在 20 个～50 个，若细胞数超过 200 个，需重新调整稀释倍数。

C.3.4 细胞数目的计算见式(C.1)和式(C.2)。

$$N = C \times V \qquad \cdots\cdots(C.1)$$

其中：

$$C = M \times D \times 10^4 \qquad \cdots\cdots(C.2)$$

式中：

N ——细胞数目，单位为个；

C ——细胞浓度，单位为个每毫升(个/mL)；

V ——细胞悬液体积，单位为毫升(mL)；

M ——细胞计数板单个方格的平均细胞数，单位为个；

D ——稀释倍数。

C.3.5 细胞活率的计算见式(C.3)。

$$V_i = \frac{N_{总} - N_{着色}}{N_{总}} \times 100\% \qquad \cdots\cdots(C.3)$$

式中：

V_i ——细胞活率；

$N_{总}$ ——总细胞数，单位为个；

$N_{着色}$——总着色细胞数，单位为个。

参 考 文 献

[1] GB/T 39729 细胞纯度测定通用要求 流式细胞测定法

[2] GB/T 39730 细胞计数通用要求 流式细胞测定法

[3] GB/T 40364—2021 人类生物样本库基础术语

[4] DB4403/T 122 人源肿瘤细胞系建立技术规范

[5] ISO 21427-2:2006 Water quality—Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei—Part 2: Mixed population method using the cell line V79

[6] 中华人民共和国人类遗传资源管理条例(中华人民共和国国务院令〔2019〕717 号).

[7] 全国科学技术名词审定委员会审定.生物物理学名词[M].2 版.北京:科学出版社,2018.

[8] 全国科学技术名词审定委员会审定.化工名词(六)生物化工[M].北京:科学出版社,2021.

[9] 全国科学技术名词审定委员会审定.细胞生物学名词 [M].2 版.北京:科学出版社,2009.

[10] 全国科学技术名词审定委员会审定.光学名词[M].北京:科学出版社.2021.

[11] Lafzi,A.,Moutinho,C.,Picelli,S. et al. Tutorial: guidelines for the experimental design of single-cell RNA sequencing studies[J/OL]. Nat Protoc,2018,13,2742-2757 [2018]. https://doi.org/10.1038/s41596-018-0073-y.