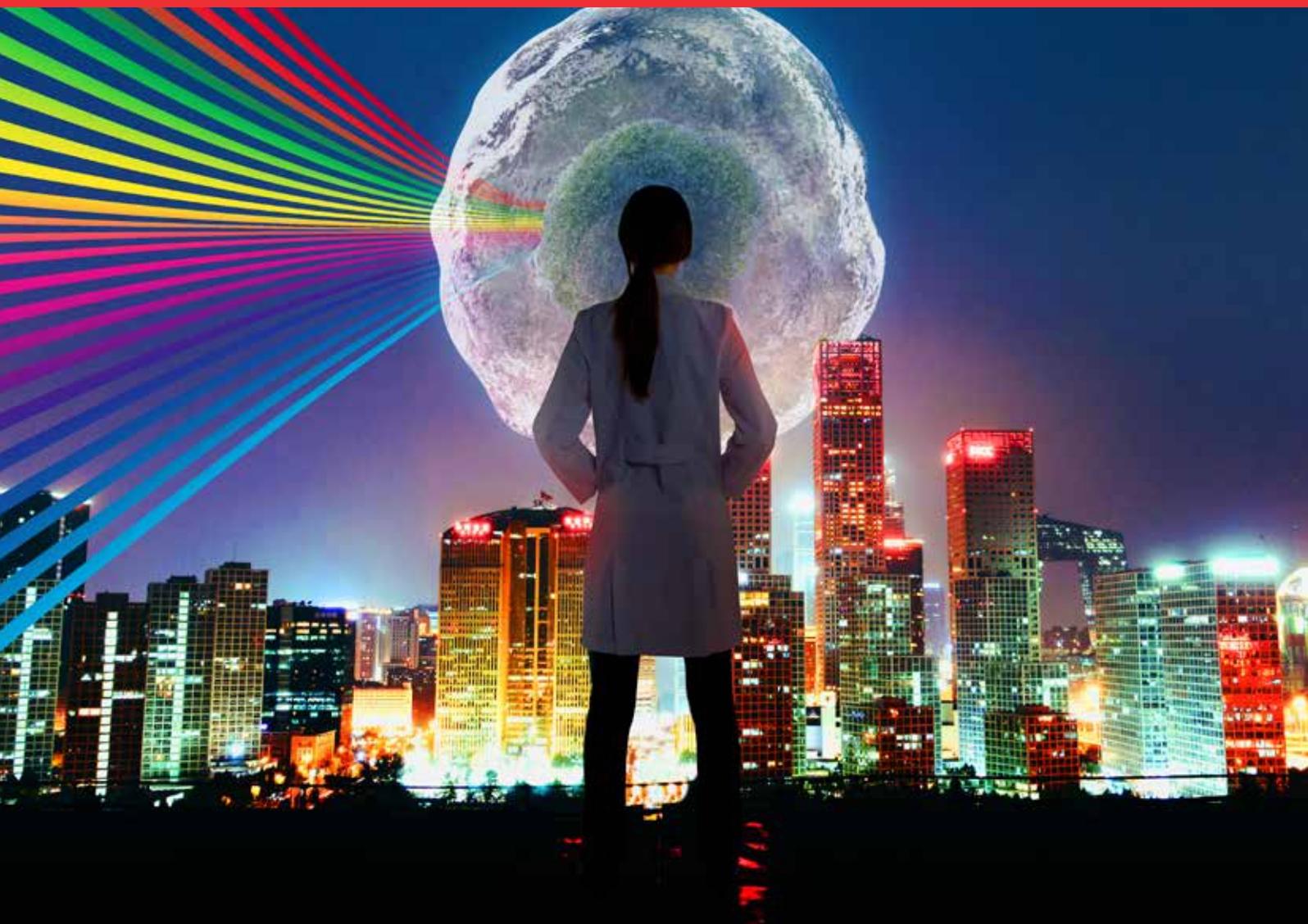


invitrogen



# 免疫肿瘤学研究技术手册



刺激抗体



结合抗体



细胞健康



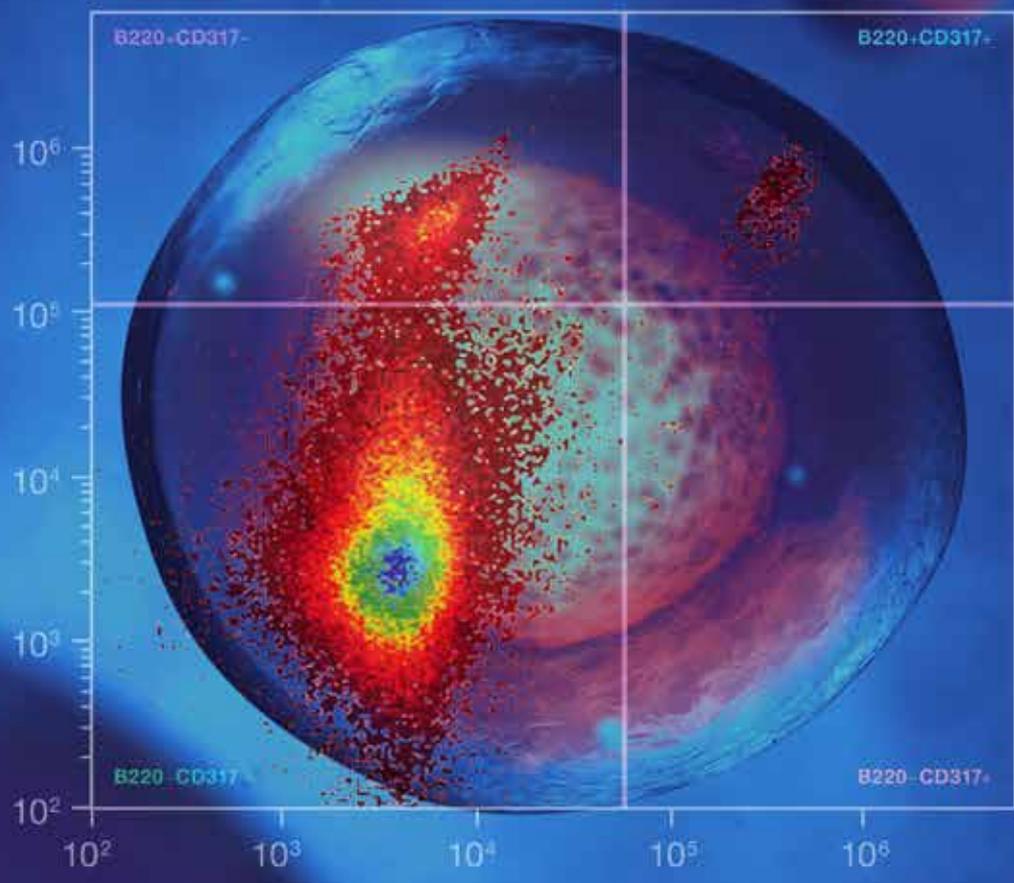
RNA流式  
细胞术



流式细胞仪

利用简化的流式细胞术、生物标志物图谱分析和  
细胞成像工作流程加速研究

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC



# 目录

深入了解免疫肿瘤学	4
肿瘤微环境	4
细胞检查点	5
基因修饰的T细胞用于癌症治疗	6
细胞因子释放综合征 (CRS)	6
Attune NxT 声波聚焦流式细胞仪	7
<b>应用聚焦: 用于癌症研究的流式细胞术抗体和试剂</b>	9
流式细胞术抗体和功能试剂	10
<b>应用聚焦: 分析全血样本</b>	14
细胞成像	15
高内涵成像用于免疫肿瘤学	16
<b>应用聚焦: 肿瘤成像</b>	17
利用免疫分析进行细胞因子表达谱分析	18
细胞治疗系统(CTS)产品	20
免疫治疗工作流程解决方案	22
服务与支持	23

# 深入了解免疫肿瘤学

近期免疫治疗研究领域的突破带来了一种不同的癌症治疗方法。对生成靶向细胞检查点蛋白抑制剂以及基因修饰方法的探索推动了治疗相关知识的进步[1-3]。免疫治疗以长期的肿瘤退化为目标，各种创新和发现都至关重要。

免疫肿瘤学领域的研究正在不断深入，不时涌现突破性创新。目前研究人员正在进行进一步研究，以靶向并揭秘细胞通路中的更多蛋白质，还对数据集进行了全方位的分析，以构建癌症生物标志物检测模块。用于特异性靶向的细胞表面抗原鉴别的提升扩展了T细胞治疗的应用。我们的最终目标是充分利用免疫系统，帮助对抗癌症。

Thermo Fisher Scientific可提供许多研究平台和产品，有助于更好地了解免疫系统和癌症之间的相互作用。利用我们的仪器和试剂拓展实验性能，推动未来癌症免疫治疗的发展。

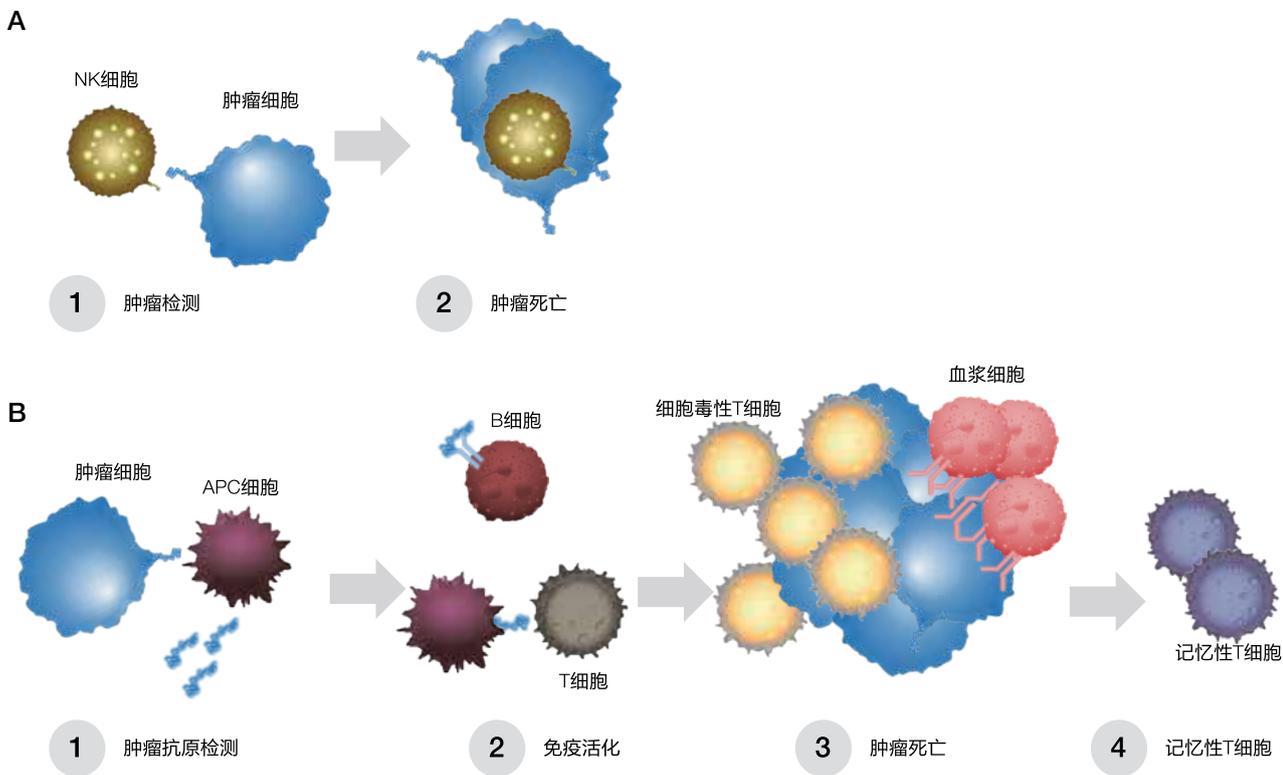
## 肿瘤微环境

实体瘤的微环境包括癌症细胞、基质细胞和免疫细胞[4]。细胞通过直接细胞接触或间接信号(如配体或生长因子)发生相互作用。各种细胞都相互影响并参与执行特定的过程，如癌症进程、肿瘤浸润和免疫侵袭[5]。

肿瘤微环境中的免疫细胞可形成复杂的网络(表1) [6-12]。各种细胞类型都具有特定的功能，识别并清除肿瘤细胞或外来异物(图1)。共刺激和抑制信号之间的平衡可调控正常、病原体或异常细胞的识别。其中一些信号直接由肿瘤细胞分泌，提供宿主免疫，并促进抵抗治疗。

**表1. 免疫细胞类型。效应细胞直接清除外来病原体和癌症细胞。非效应细胞通过调控细胞毒性效应T细胞的应答间接影响癌症细胞死亡。**

效应细胞	非效应细胞
自然杀伤(NK)细胞为固有免疫系统提供了针对肿瘤转移的快速免疫。NK细胞的活化和抑制受体筛查外来或改变的自体蛋白表达谱。	如树突状细胞等抗原提呈细胞(APC)通过显示细胞表面的主要组织相容性复合体(MHC)分子，提呈抗原至T细胞。
细胞毒性T细胞是适应性免疫的效应细胞。通过细胞毒性介导的细胞凋亡杀死病原体或提呈非自身抗原的细胞。	调节性T (Treg)细胞通过调控T细胞应答抑制免疫进程。
记忆性T细胞是适应性免疫应答的一部分，在病原体应答或疫苗接种后形成免疫性。记忆性T细胞通过在体内循环以及在检测到抗原后快速增殖发挥长期免疫效应。	肿瘤相关的巨噬细胞(TAM)抑制活化的免疫效应细胞，如T细胞、B细胞和NK细胞。这些巨噬细胞表达抑制因子，如程序性细胞死亡蛋白-1 (PD-1)和细胞毒性T淋巴细胞相关的抗原-4 (CTLA-4)。



**图1. 肿瘤细胞与免疫系统细胞之间的相互作用。(A)** 固有免疫利用免疫细胞(如NK细胞)直接靶向并杀死肿瘤细胞。**(B)** 适应性免疫需要APC细胞提呈抗原至未活化的T细胞, 激活免疫系统。这提供了长期免疫性。抑制性细胞(如TAM)可以对肿瘤微环境中的免疫活化产生负面影响。

### 细胞检查点

免疫检查点是维持正常的免疫应答以及在免疫系统激活时保护组织不受损伤的重要细胞通路[4,5]。肿瘤细胞可使免疫检查点失调, 并利用它作为一种免疫耐受机制。了解NK细胞和T细胞的免疫检查点是免疫肿瘤学研究的重点, 这些细胞负责调控肿瘤周围的适应性和固有免疫(表2) [4,5,7,8,11]。

**表2. 免疫检查点通路中的药物治疗靶点。**

免疫细胞	效应细胞	功能
细胞毒性T淋巴细胞相关的抗原-4 (CTLA-4)	T细胞	肿瘤细胞利用CTLA-4通路下调T细胞活化以及增殖为记忆性T细胞的能力
程序性细胞死亡蛋白(PD-1)	T细胞	T细胞上的PD-1表达表示细胞耗竭以及无法发挥免疫应答作用
OX40	T细胞	OX40活化可刺激T细胞分化和细胞毒性功能, 从而提升抗肿瘤免疫效应
糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白 (GITR)	T细胞	GITR活化可促进细胞繁殖, 形成抗肿瘤活性
吲哚胺-2,3-双加氧酶(IDO)	Tregs	肿瘤细胞可以通过分解色氨酸上调IDO活性, 抑制T细胞功能
CD73	Tregs	肿瘤细胞使用CD73生成腺苷, 抑制T细胞活性
淋巴细胞活化基因(LAG)	T细胞和 Tregs	LAG表达可导致T细胞耗竭, 抑制长期免疫应答的发展
CD137	T细胞和 NK细胞	CD137可刺激NK细胞和T细胞的抗肿瘤应答以及免疫记忆
SLAM家族成员7 (SLAMF7)	NK细胞	SLAM7活化在长期免疫应答发展过程中刺激NK细胞及其他免疫细胞
杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)	NK细胞	肿瘤细胞表达KIR, 逃避NK细胞
程序性细胞死亡蛋白配体(PD-1)	肿瘤细胞	PDL-1

免疫肿瘤学的一个重要研究目标是通过阻断免疫系统的负调控因子，激活抗肿瘤免疫应答。许多免疫检查点由膜结合配体和受体之间的相互作用引发，可轻易被靶向这些配体或受体的抗体阻断。包括CTLA-4、PD-1和PD-L1在内的关键检查点调控因子是研究最广泛的药物制剂。这些检查点蛋白对多种癌症中的免疫系统具有负调控作用，包括转移性黑色素瘤、非小细胞肺癌(NSCLC)、肾癌和淋巴瘤。检查点抑制可在一部分患者中形成长期持久的应答。

### 基因修饰的T细胞用于癌症治疗

过继细胞治疗(ACT)是一种个性化的治疗方法[13,14]。ACT的方法是通过基因修饰患者自身的T细胞，选择性地靶向癌症细胞上表达的抗原。ACT的成功应用包括表达受体或嵌合抗原受体(CAR)的T细胞，用于癌症治疗(图2)。

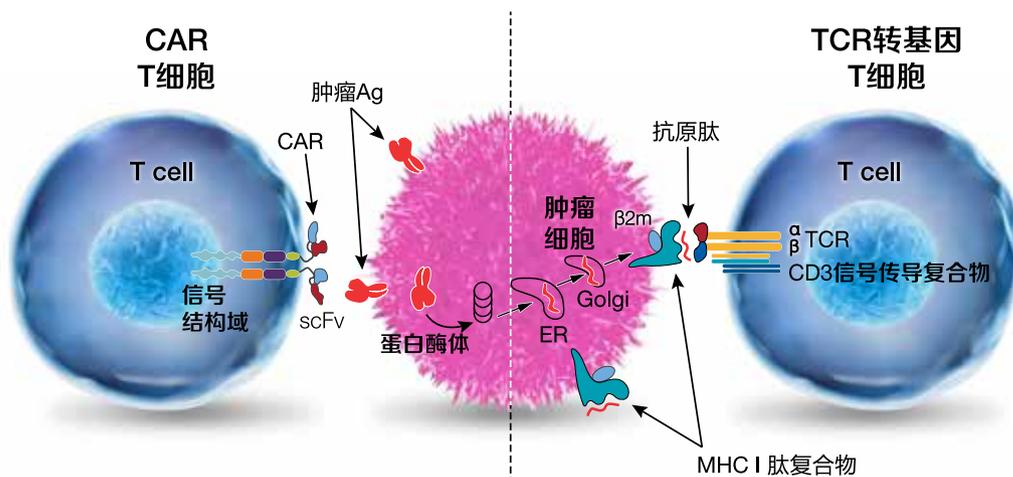
T细胞受体(TCR)参与了T细胞的活化[15]。其所受刺激由表达MHC分子的细胞及抗原触发。

肿瘤特异性的TCR可经过基因改造，识别特定的癌症细胞群体。TCR技术具有独特性，它可以识别细胞内和细胞表面蛋白，形成各种抗原靶点。其限制包括患者特异性的人类白细胞抗原(HLA)限制以及缺乏独特的肿瘤特异性抗原。

CAR是结合细胞内T细胞组分和来源于单克隆抗体的细胞外抗原识别结构域的融合蛋白[13-15]。它们可通过将抗体重链和轻链的可变区域(如CD3-zeta、CD28、41BB)与其他信号因子相连而形成。经过改造后表达CAR的T细胞不受HLA限制，因为CAR分子可识别癌症细胞表面的完整细胞抗原。但是，它们无法识别突变的细胞内蛋白。

### 细胞因子释放综合征(CRS)

外来或改造细胞有时可诱导免疫系统的强烈应答。CRS是患者体内释放出的大量细胞因子，可形成全身性炎症级联反应。目前正在进行活性研究来检测细胞因子的来源——从白细胞到巨噬细胞[13]。



**图2. TCR和CAR特异性地识别并靶向肿瘤细胞。抗原识别机制各不相同。TCR包括一条 $\alpha$ 链和一条 $\beta$ 链，可识别MHC分子加工和提呈的抗原。CAR由膜远侧单链可变区(scFv)组成，包括可变的重链和轻链，由连接分子结合而成。**

# Attune NxT流式细胞仪

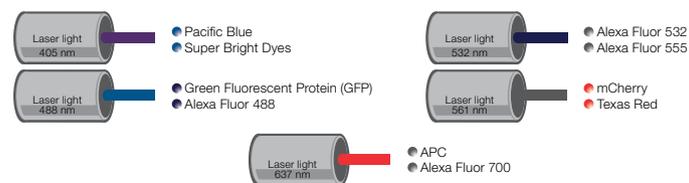
## 抗堵和极速上样专利设计

### Attune NxT流式细胞仪的性能优势

Invitrogen™ Attune™ NxT流式细胞仪(图3)是一款高性能的仪器，其特点、性能和参数可满足那些处于免疫肿瘤学前沿对抗癌症的研究人员的要求。主要优点包括：

- **最高水平的数据保真度** — 液流系统采用声波辅助流体动力学聚焦的专利设计，上样速度比传统流式细胞仪快10倍，可高达35000个细胞/秒、1ml/分钟
- **全新应用，检测难以处理的样本** — 可研究复杂样本，包括消化的肿瘤样本，无需担心浪费珍贵样本，采用防堵塞设计，重合率和丢失率超低
- **对已知体积样本的精确细胞计数** — 无需绝对计数微球，注射泵上样系统可精确计算上样体积，并可稳定激光延迟，减少基于温度的速度差异，并能在仪器运行过程中获取稳定且准确的数据
- **全面的补偿工具包** — 支持自动、手动模式的全矩阵补偿，补偿手型工具-支持在散点图上进行精细调整，并对常用染料组合都适用
- **简化样本制备步骤，优化实验流程** — 能够对几乎未处理的样本进行免疫表型分析，将耗时的传统10步样本制备实验方案缩短至3个步骤
- **操作简便且灵活** — 在几秒内完成试管和微孔板的转换，只需一键操作即可

更多信息，请登录 [thermofisher.com/attune](http://thermofisher.com/attune)



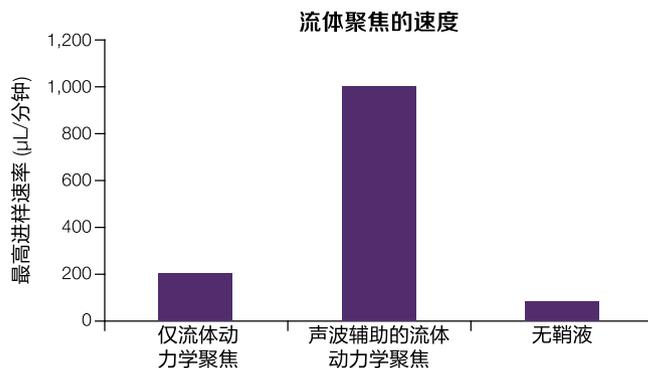
**全光谱荧光检测** — 最先进的光纤元件，平顶光斑激光器，可配备4种不同的激光器，可以检测各种不同强度的荧光信号



图3. Attune NxT流式细胞仪。



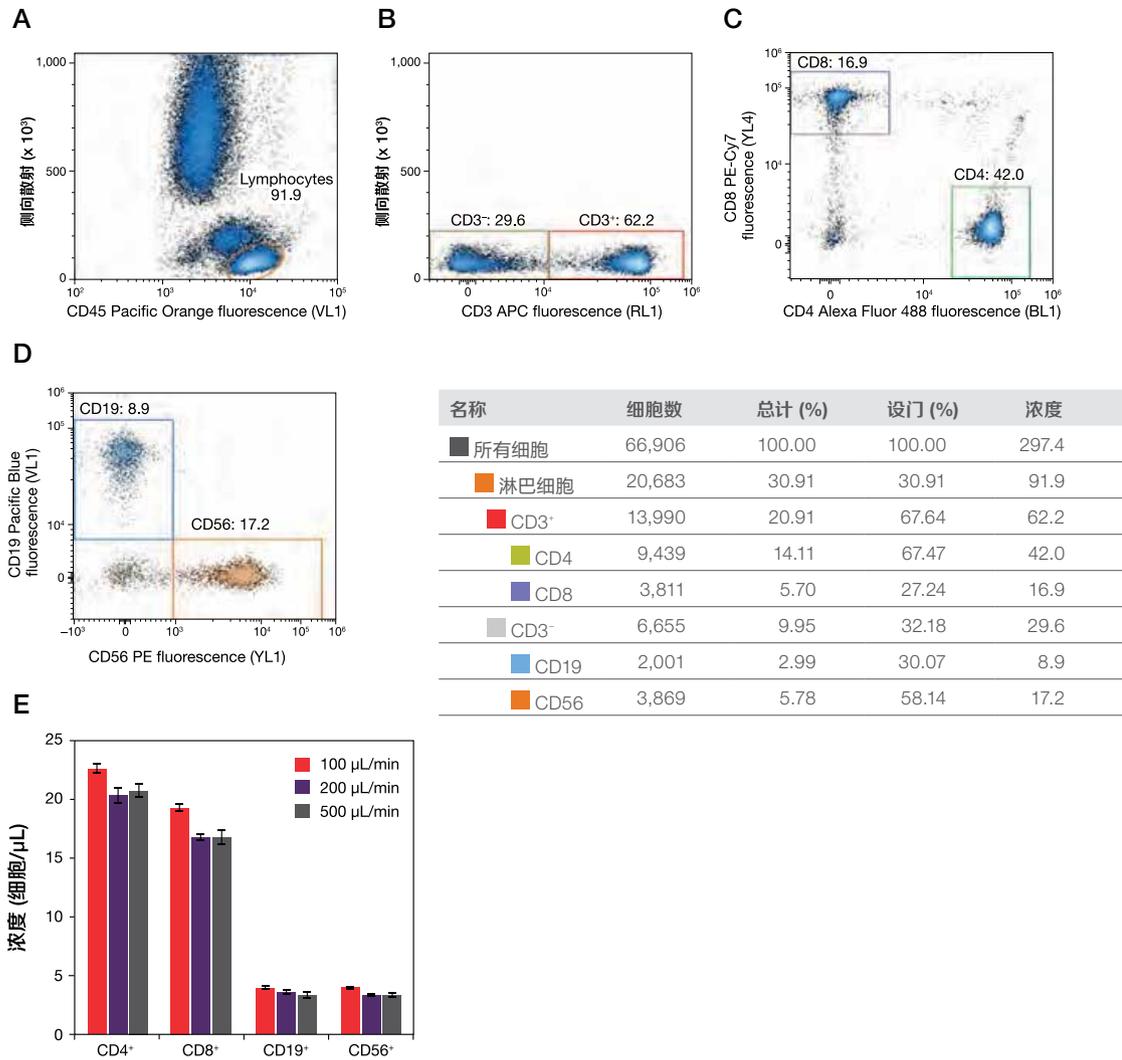
**自动化机械手臂** — 可与Thermo Scientific™ Orbitor™ RS微孔板移动机械臂和温度稳定的SmartStor™设备兼容，提高检测效率。



名称	细胞数	总计 (%)	设门 (%)	浓度
所有事件	66,906	100.00	100.00	297.4
淋巴细胞	20,683	30.91	30.91	91.9
CD3 <sup>+</sup>	13,990	20.91	67.64	62.2
CD4	9,439	14.11	67.47	42.0
CD8	3,811	5.70	27.24	16.9
CD3 <sup>-</sup>	6,655	9.95	32.18	29.6
CD19	2,001	2.99	30.07	8.9
CD56	3,869	5.78	58.14	17.2

**准确的细胞计数** — 细胞绝对计数功能是基于精确计算上样体积，无需使用计数微球

快速获取数据，并且丝毫不影响准确性。下面是采用Attune NxT流式细胞仪检测肿瘤和血液样本的范例(图4)。Attune NxT流式细胞仪采用可以精确计算上样体积、声波辅助的流体动力学聚焦的液流系统，不仅上样速度极高，而且可以精确计算细胞的绝对浓度。



**图4. 淋巴细胞亚群分析。**使用特异性CD表面标志物的荧光抗体标记100  $\mu$ L的正常人全血，然后使用2 mL Invitrogen™不含固定液的高产量裂解液(货号: HYL250)裂解红细胞，生成1:21的血液稀释液。**(A)** 在CD45 vs. 侧向角散射光密度图上区分淋巴细胞，在淋巴细胞(CD45+)群体周围设椭圆形门。**(B)** 淋巴细胞门内的细胞在CD3 vs. 侧向角散射光密度图上显示。在CD3<sup>+</sup> T细胞、CD3<sup>-</sup> B和自然杀伤(NK)细胞群体周围设长方形门。**(C)** CD3<sup>+</sup>门内的细胞在CD4 vs. CD8密度图上显示，统计CD4<sup>+</sup>辅助性T细胞(CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>和CD45<sup>+</sup>)及CD8<sup>+</sup>细胞毒性T细胞(CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>和CD45<sup>+</sup>)的比例。**(D)** CD3<sup>-</sup>细胞在CD56 vs. CD19密度图上显示，区分CD56<sup>+</sup> NK细胞与CD19<sup>+</sup> B细胞。统计表显示了设门情况和检测浓度(细胞/ $\mu$ L)。**(E)** 在Attune NxT流式细胞仪上以三种上样速度重复采集样本。使用三种不同的流速检测细胞浓度: 100、200和500  $\mu$ L/分钟。不论上样速度如何，Attune NxT流式细胞仪检测各种淋巴细胞亚群的浓度结果都一致。柱形图显示以标示流速获取的三个样本中每个细胞亚群的平均细胞数/ $\mu$ L  $\pm$ 标准差。

# 用于癌症研究的流式细胞术抗体和试剂

## 防堵塞且速度快

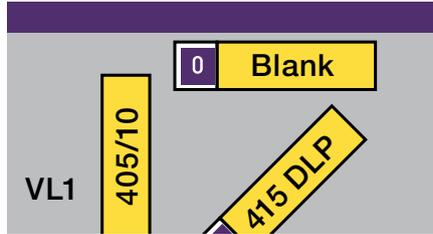
1



- 标志物类别:
- 谱系标志物
  - 检查点抑制剂
  - 肿瘤干细胞

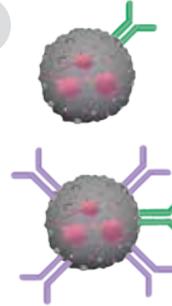
列出鉴别靶细胞的标志物

2



检测板中的荧光基团数取决于激光和滤光片的数量

3

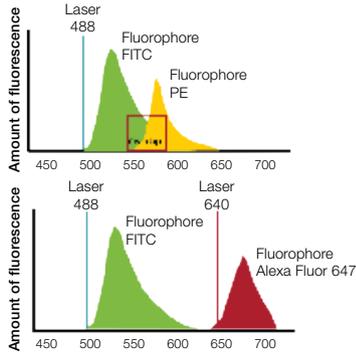


明亮的荧光基团匹配低抗原群体

微弱的荧光基团匹配高抗原群体

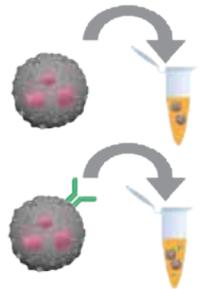
了解表达抗原

4



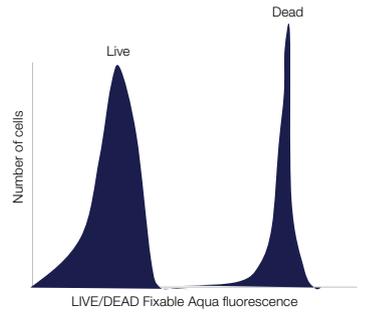
挑选单独的发射光谱，最大程度地减少发射荧光重叠

5



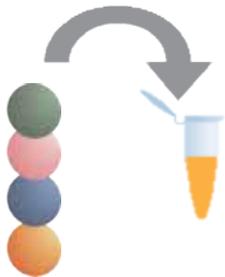
包括未染色的对照细胞、单色染色对照

6



加入活细胞/死细胞染料，以便只研究健康细胞

7



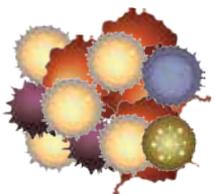
若无足够的样本或抗原表达不佳时，使用荧光补偿微珠帮助进行细胞设门

8



在Attune NxT声波聚焦流式细胞仪上检测并运行您的检测板

构建多参数荧光检测板用于流式细胞实验的考虑因素。



操作难以处理的样本 — 高质量的流体学装置和较大的流动池有助于防止珍贵样本堵塞



可靠的服务与支持 — 全方位的应用、操作和维修服务与支持，以及完整的培训

# 流式细胞术抗体和功能试剂

## 利用多重分析更好地了解单细胞

利用我们品种齐全的试剂研究肿瘤中的异质性细胞群体。从抗体到优化的分析产品，全方位的Invitrogen™流式细胞术抗体和试剂系列旨在为研究应用提供便捷性和灵活性。同时对蛋白水平、基因表达和细胞功能进行多重分析变得更加简单。使用单重或多重分析试剂的优点包括：

- **缩短分析开发时间** — 种类丰富的验证抗体，可满足任何多色检测板或实验的需要
- **生成更复杂的信息** — 可结合不同试剂和抗体来检测同一样本中的不同参数
- **提高认知深度** — 品种繁多的细胞功能分析，包括细胞周期、增殖、存活率和细胞凋亡

### 试剂资源



细胞分离

试剂信息	重点包括:
<p>从肿瘤、血液和培养样本制备单细胞悬液。通过使用创新性的高质量试剂，避免了繁琐的分离和扩增步骤。</p> <p>如需了解更多详情，请登录 <a href="https://thermofisher.com/cellisolation">thermofisher.com/cellisolation</a></p>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 先进的Invitrogen™ Dynabeads™磁珠活化和扩增技术可模拟体内T细胞活化</li><li>• 固定试剂盒可与大部分细胞抗原分析兼容</li><li>• 经过验证的实验方案，从培养物和体内样本中制备细胞</li></ul>



细胞活性

<p>死细胞会与许多试剂非特异性地结合，导致假阳性结果。去除死细胞是获得准确的流式细胞分析结果的关键步骤。Invitrogen™细胞存活分析试剂利用最少的步骤检测活细胞和死细胞的百分比。</p> <p>请登录 <a href="https://thermofisher.com/cellviability">thermofisher.com/cellviability</a>，选择细胞存活分析染料</p>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 覆盖光谱的各种染料可用于多种荧光通道，满足多色流式实验的要求</li><li>• 能够检测细菌和酵母的活性</li><li>• 可固定和不可固定方案</li></ul>
---	--

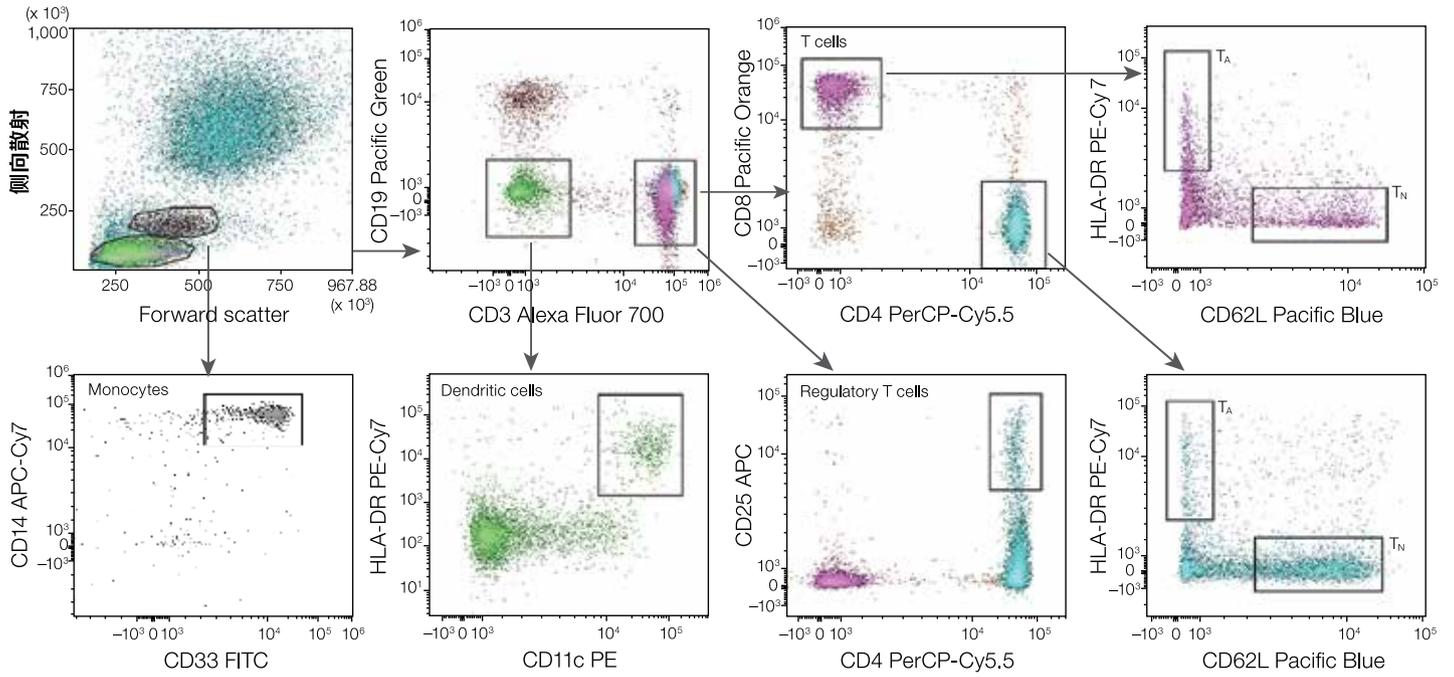


抗体

<p>结合Invitrogen™ eBiosciences™产品系列，我们可提供超过10,000种偶联一抗，用于流式细胞术(图5)。品种齐全的荧光标记抗体可以鉴别人、小鼠、大鼠或非人类灵长动物细胞抗原，并可与其他Invitrogen™试剂和分析产品结合使用进行多重分析。</p> <p>如需了解更多详情，请登录 <a href="https://thermofisher.com/ebioflow">thermofisher.com/ebioflow</a></p>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 专为流式细胞术而开发、验证并生产</li><li>• 结合常用染料的各种抗体，包括FITC、APC、Invitrogen™ Alexa Fluor™染料、eBiosciences™ eFluor™染料和最新开发的Invitrogen™ Super Bright聚合物染料系列</li><li>• 技术支持和在线工具，帮助构建多色流式方案</li></ul>
---	--

## 试剂资源 (续)

	Reagent information	Highlights include:
 <p>细胞增殖</p>	<p>一般根据DNA合成或细胞代谢参数进行增殖检测。分析可以在药物开发过程中报告细胞健康、遗传毒性和肿瘤细胞生长抑制。Invitrogen™ CellTrace™ 分析(图6)和 Invitrogen™ Click-iT™ EdU分析(图7)提供了灵敏的试剂,可检测多种细胞类型中的细胞增殖。</p> <p>如需了解更多详情,请登录 <a href="http://thermofisher.com/flow-cellproliferation">thermofisher.com/flow-cellproliferation</a></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 新合成DNA的定量</li> <li>• 无需DNA变性即可检测</li> <li>• 与灵敏的R-PE串联物和荧光蛋白的兼容性</li> <li>• 快速检测 一只需60分钟</li> <li>• 替代繁琐的BrdU分析</li> </ul>
 <p>细胞凋亡</p>	<p>了解细胞死亡和存活的机制是毒理学分析和药物发现的关键。Invitrogen™试剂和分析可高效地研究细胞凋亡后,质膜、线粒体、caspase活性以及DNA片段化和染色质凝集的变化。</p> <p>如需了解更多详情,请登录 <a href="http://thermofisher.com/flow-apoptosis">thermofisher.com/flow-apoptosis</a></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 利用多种分析检测早期至晚期事件的不同靶点</li> <li>• 使用多激发光源激发的荧光方案</li> <li>• 适用于多重分析实验</li> </ul>
 <p>RNA</p>	<p>Invitrogen™ PrimeFlow™ RNA分析适用于单个细胞中的RNA和蛋白表达分析。这种全新的分析采用了专利的原位荧光杂交(FISH)和(bDNA)信号放大技术,可以在标准流式细胞仪上同时检测单细胞中的多至4种RNA转录本,也可与流式抗体染色相结合。</p> <p>如需了解更多详情,请登录 <a href="http://thermofisher.com/primeflow">thermofisher.com/primeflow</a></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 对细胞随时间的变化或在细胞受到刺激后进行前所RNA及蛋白的相关性分析</li> <li>• 高通量,利用优化试剂盒和探针用于不同的RNA靶点</li> <li>• 无适用抗体的替代分析</li> </ul>
 <p>仪器</p>	<p>当在一个实验中使用两种或更多荧光染料时,特定荧光染料的一部分发射光谱可能会落入另一种荧光染料的检测器范围内。利用指导软件和产品简化补偿,帮助设置适当的对照。</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Attune NxT声波聚焦流式细胞仪提供了两种不同的软件指南,帮助设置阴性和单对照补偿</li> <li>• 为计算需要多少补偿,必须在各实验中运行单色对照样本。微珠(如Invitrogen™ UltraComp eBeads™或OneComp eBeads™、AbC™总抗体补偿微珠或使用实验抗体染色的细胞)可用作单色对照</li> </ul>
 <p>检测板构建工具</p>	<p>构建用于多种抗原和细胞功能的分析并不复杂。提供多种工具和试剂,帮助简化设计需要。</p> <p>如需了解更多详情,请登录 <a href="http://thermofisher.com/readyflow">thermofisher.com/readyflow</a></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 技术支持专员帮助指导检测板构建并查找试剂</li> <li>• 无移液和滴定分析,检测如细胞存活率或凋亡等细胞功能</li> <li>• 利用在线工具挑选荧光基团并查找抗体</li> </ul>



**图5. Invitrogen抗体可方便地用于免疫表型分析。**采用Attune NxT声波聚焦流式细胞仪对人PBMC进行10参数免疫表型分析。根据前向和侧向散射谱对淋巴细胞和单核细胞设门。在淋巴细胞设门内,可根据CD3表达分离T细胞,并进一步分为CD4和CD8亚群。此外,调节性T细胞(主要的外周耐受介导因子)表达CD4和CD25。CD62L可以识别初始( $T_N$ )  $CD4^+$ 和 $CD8^+$  T细胞,HLA-DR由活化T细胞( $T_A$ )表达。外周血中传统的树突状细胞一般为T和B细胞谱系标志物阴性,共表达整合素CD11c和HLA-DR。根据散射图谱,单核细胞刚好落在淋巴细胞之上,同时表达CD14和CD33。

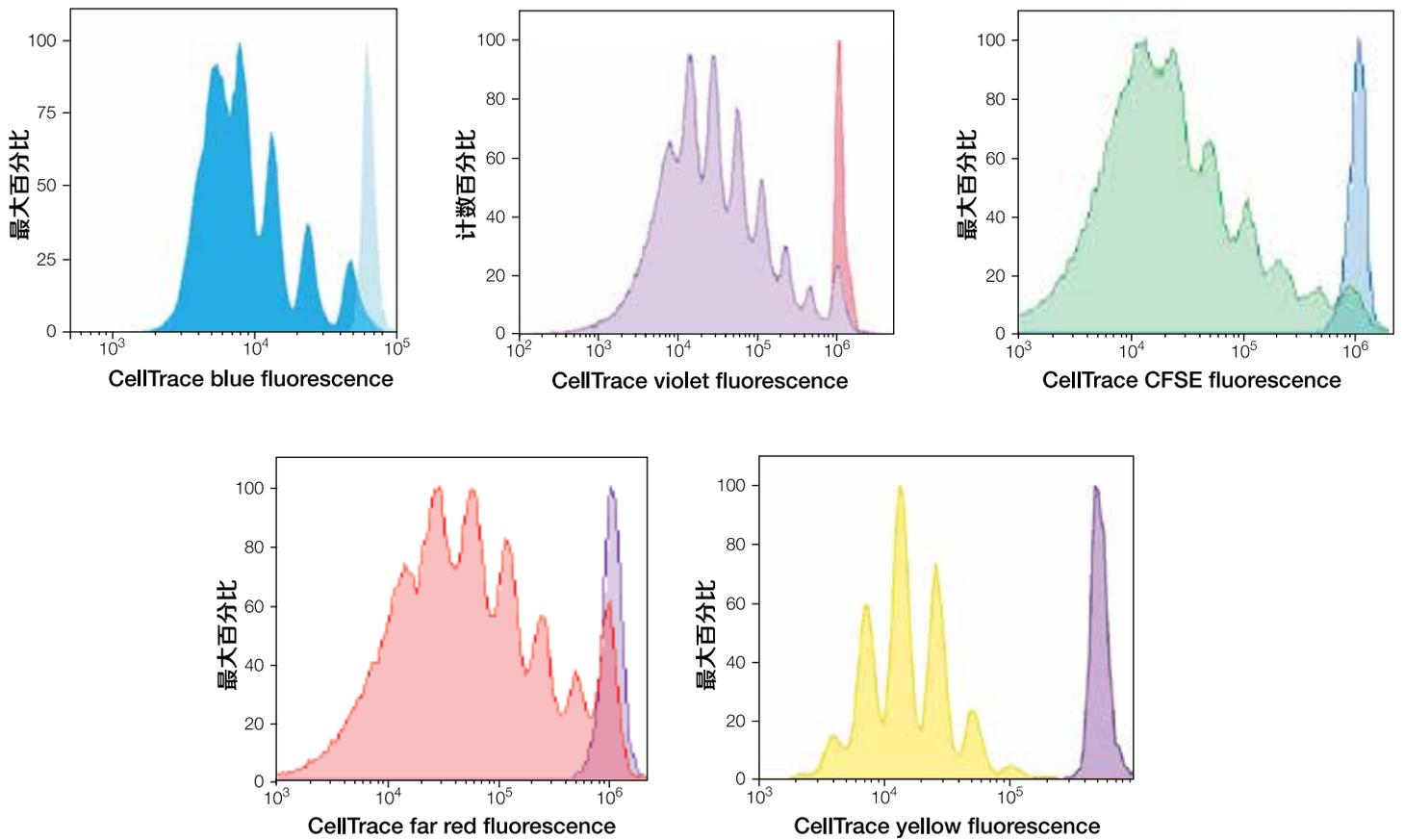


图6. 采用Invitrogen™试剂对人T淋巴细胞增殖进行细胞标记。采用(A) CellTrace violet试剂、(B) CellTrace CFSE试剂、(C) CellTrace yellow试剂或(D) CellTrace far red试剂染色样本。未经刺激的亲代细胞在各直方图的最右侧显示为最明亮的峰。追踪7代细胞。

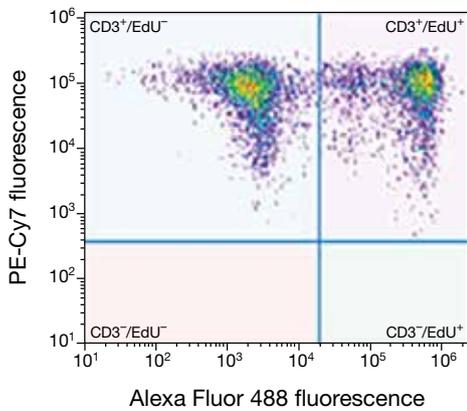
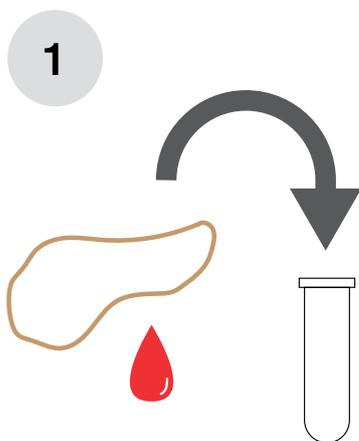


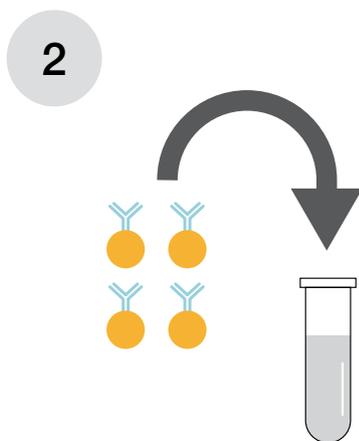
图7. 用于CD3和DNA链断裂的人T细胞分析双参数散点图。采用PE-Cy7<sup>®</sup>7标记的抗CD3抗体检测CD3。采用Invitrogen™ Click-iT™ Plus EdU Alexa Fluor™ 488流式细胞分析试剂盒检测DNA链断裂。

# 分析全血样本

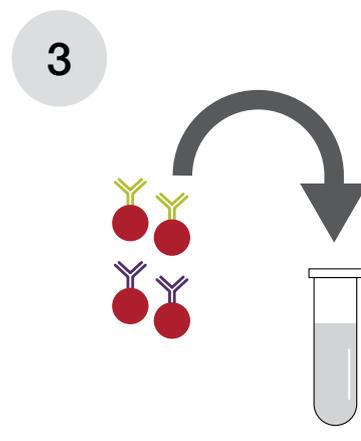
利用“无需冲洗、无需裂解”的实验方案简化工作流程



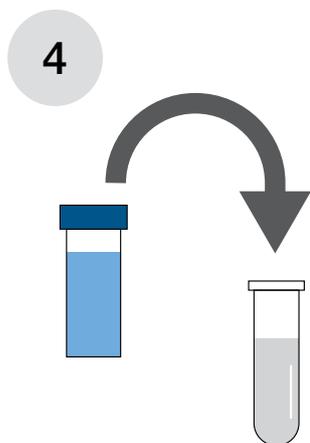
采集血液或消化组织



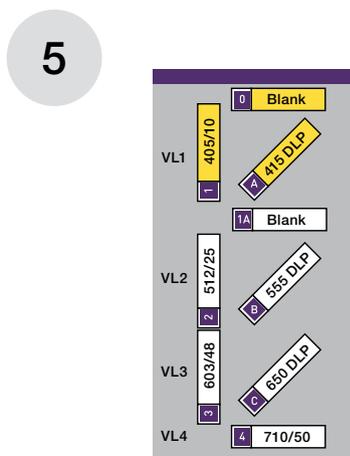
加入活细胞/死细胞染料



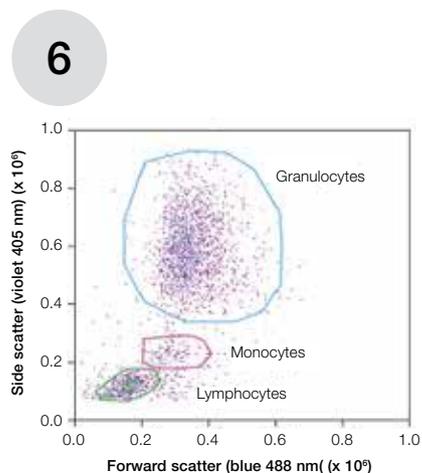
将标记抗体加入全血样本中



稀释



更换滤光片配置，添加紫色激光的其他侧向散射



在Attune NxT声波聚焦流式细胞仪上运行样本，对细胞群体设门

利用“无需冲洗、无需裂解”的实验方案进行全血分析。

# 细胞成像

多色细胞成像可提供大量的细胞和生物系统信息。除各种蛋白质水平外，细胞成像还可提供空间识别信息和其他细胞读数。其中之一是缺氧状态。细胞对氧气减少(缺氧状态)的反应与人类各种病理学状态相关，包括肿瘤发展、动脉粥样硬化、炎症和异常血管发生。尽管缺氧在诱导上述过程中的重要性众所周知，但构建模式系统以准确地控制缺氧条件对大多数研究人员而言极其困难。要高效地完成上述目标，需要能在实验过程中精确控制并维持温度、湿度和气体(CO<sub>2</sub>和O<sub>2</sub>)的复杂成像系统。带有载物台式培养箱的Invitrogen™ EVOS™ FL Auto 2成像系统提供了针对上述情况的解决方案。该恒温恒湿箱能够精确控制氧气含量，可为研究人员提供了一款高效的系统，利用长期活细胞荧光成像评估细胞对缺氧的反应(图8)。

## EVOS FL Auto 2活细胞成像系统

带有载物台式培养箱的EVOS FL Auto 2成像系统无需复杂的长期活细胞成像，可使研究人员将重点放在数据生成，而非仪器操作和维护上。它可实现连续动态细胞成像，用于细胞培养物的长期监控。这种灵活、高性能且经济实惠的活细胞成像解决方案使您能够：

- **控制参数** — 轻松控制环境和图像采集参数
- **了解更多** — 创建96孔板中每个孔的连续动态图像
- **节省空间** — 紧凑且流畅的设计节省了宝贵的实验室空间
- **节省成本** — 经济实惠的系统有助于节省成本，拥有成本和操作成本低

更多信息，请登录 [thermofisher.com/evos](http://thermofisher.com/evos)

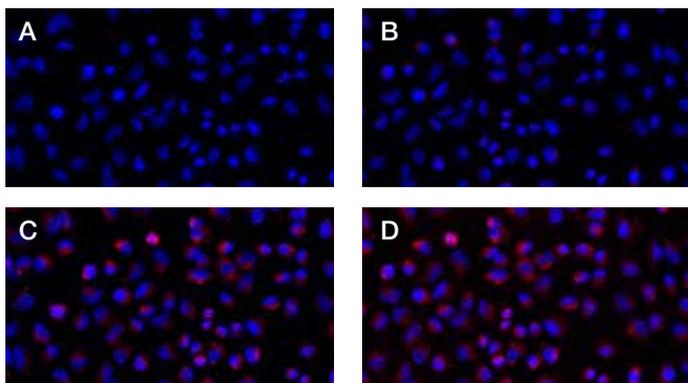


图8. 采用Invitrogen™ Image-iT™ Hypoxia试剂对A549细胞进行染色，细胞暴露于不同的氧含量下。(A) 20% O<sub>2</sub> (B) 5% O<sub>2</sub> (C) 2.5% O<sub>2</sub> (D) 1% O<sub>2</sub>



# 高内涵成像用于免疫肿瘤学

## 消除了细胞分析的复杂性

### 高内涵分析(HCA)可提供:

- 应用多色荧光通道成像, 获得群体细胞中每个细胞的定量检测数据
- 每个细胞的空间形态学数据

利用细胞成像鉴别免疫肿瘤学研究中的关键作用机制。该技术的重要应用包括了解细胞信号通路和细胞毒性。基于细胞的分析越来越多地用于监测细胞应答, 除传统的生物化学分析外还可反映细胞的复杂状况。

### 细胞成像的优点包括:

- 7通道LED激发, 适用于几乎所有荧光标记探针
- 在同一分析中使用宽场、明场和共聚焦模式
- 适用于从显微镜载玻片到1,536孔板在内的各种样本
- 高灵敏度检测和激光自动聚焦, 有助于减少光漂白和细胞毒性
- 智能软件可以缩短扫描时间
- 在图像采集过程中进行数据分析, 可以最快速地获得结果

缩短分析时间并获取更多细节。在本例中, 采用Thermo Scientific™ CellInsight™ CX7 HCA平台检测不同的嵌合抗原受体(CAR) T细胞治疗的细胞效率和脱靶副作用 (图10)。



图9. CX7高内涵分析平台。这是唯一一款结合了4色比色法成像、明场、7色荧光和共聚焦成像的高内涵筛选(HCS)平台。系统提供了所有HCS工作流程所需的灵活性和可靠性, 可与现有的信息基础设施兼容。

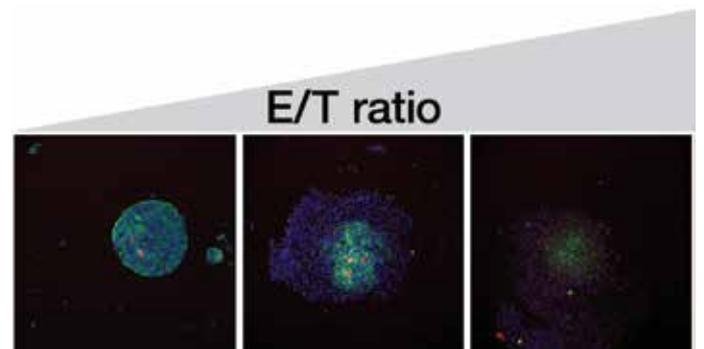


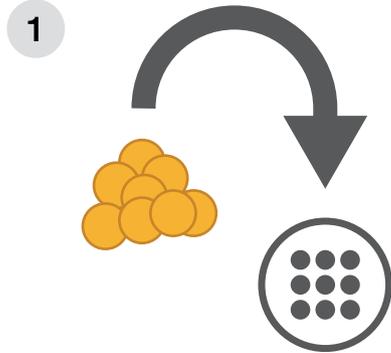
图10. CAR T浸润癌症球体。使用球形微孔板形成HCC827球体48小时。加入EGFR scFv-CD28-CD3 CAR T细胞(ProMab Biotechnologies)后24小时, 对球体的细胞角蛋白7 (绿色)和CD3 (蓝色)进行染色, 并使用Hoescht进行核复染(蓝色)。效应分子与靶点(E/T)的比例从10:1升至40:1, CAR T细胞浸润HCC827肿瘤球体, 然后可以观察到肿瘤细胞裂解。图片由Corning Inc.提供, 在CellInsight CX7 HCA平台的共聚焦模式下使用10x物镜获取。

# 肿瘤成像

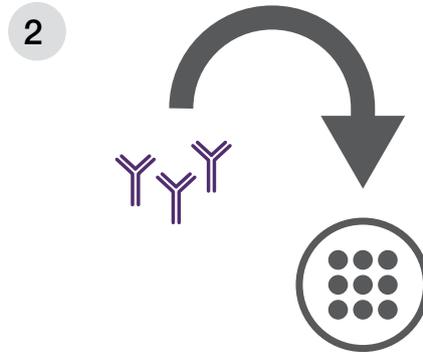
快速扫描实体瘤样本



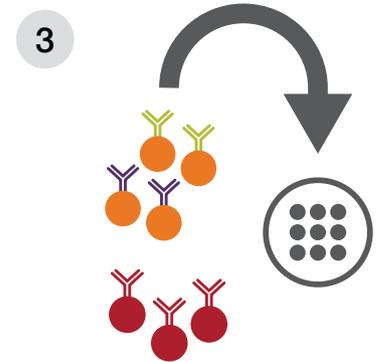
应用聚焦



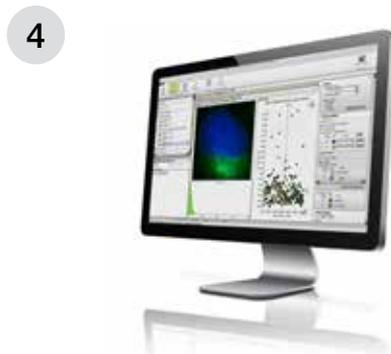
接种细胞



使用抗体、小分子、siRNA或CRISPR处理细胞



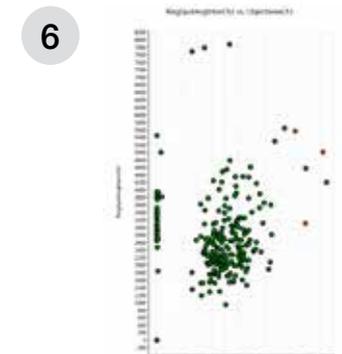
加入标记物或染料



图像采集和目标鉴定(分割)



扫描反应板



数据显示和分析

使用CellInsight CX7 HCA平台进行高通量成像，用于CAR T细胞工程。

# 利用免疫分析 进行细胞因子表达谱分析

## 节省时间并优化

样本的细胞因子表达谱是免疫肿瘤学研究中的一个重要部分，可用于细胞因子释放综合征(CRS)和CAR T细胞本身效率的监测。目前尚未可知的是释放的细胞因子及其来源。CRS的监测是免疫肿瘤学治疗的最常见脱靶副作用。

各种生物学样本中蛋白质分析物的检测和定量可以表示多种生物学和病理学事件。ELISA、Luminex®多重分析平台和新一代免疫分析常用于可溶性蛋白的定量评估，如细胞因子、趋化因子、生长因子和其他免疫学标记物。

采用Luminex® xMAP®技术进行Invitrogen™免疫分析，可以同时定量多至80种不同的分析物，只需使用25–50 μL样本。

免疫学和生物学系统由分泌型蛋白网络组成，包括细胞因子、趋化因子、生长因子和其他蛋白质，多重免疫分析是一种高效且省时的方法，可用于较少样本中大量蛋白质的生物标记物图谱分析。因此，多重免疫分析已被证明是适用于生物学系统综合研究的宝贵工具。

- **快速** — 在3小时内定量蛋白质，只需少量的手工操作时间
- **定量** — 可同时定量多至80种蛋白质
- **简单** — 与ELISA一样简单
- **扩展** — 可随着研究的发展，扩展或更改您的生物标记物图谱

如需进一步了解我们的免疫分析产品，包括Invitrogen™ ProcartaPlex™多重分析产品和服务，请登录 [thermofisher.com/immunoassays](http://thermofisher.com/immunoassays)

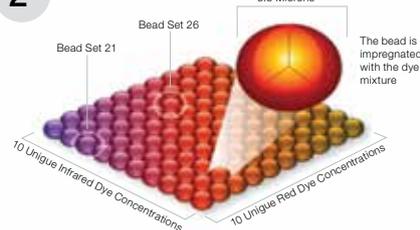
1



使用少量血液或血清

**多重免疫分析应用聚焦蛋白定量。**

2



在ProcartaPlex检测板上采集并标记蛋白

3



在Luminex®仪器上分析结果；从FLEXMAP 3D® (如上所示)、MAGPIX®或Luminex® 200™系统中选择

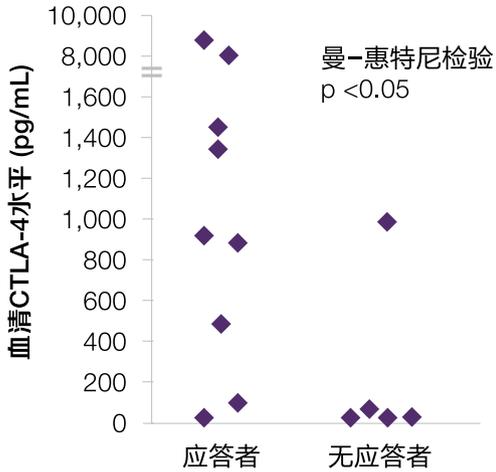


图11. 利用ELISA检测sCTLA-4水平，根据对单克隆抗体ipilimumab的临床反应绘制单个数值。

### 使用ELISA试剂盒检测生物标志物

速度、灵敏度、可靠性及与标准临床实验设备的兼容性使得诸如Invitrogen™包被的ELISA试剂盒等免疫分析成为生物标志物评估的理想选择。

利用ELISA定量可溶性CTLA-4 (sCTLA-4)水平的方法即将问世，它可以区分ipilimumab应答者与无应答者，因为sCTLA-4血清水平的升高与ipilimumab的临床受益相关(图11)，sCTLA-4升高的患者相比低sCTLA-4水平的患者生存率明显提高(图12) [16]。

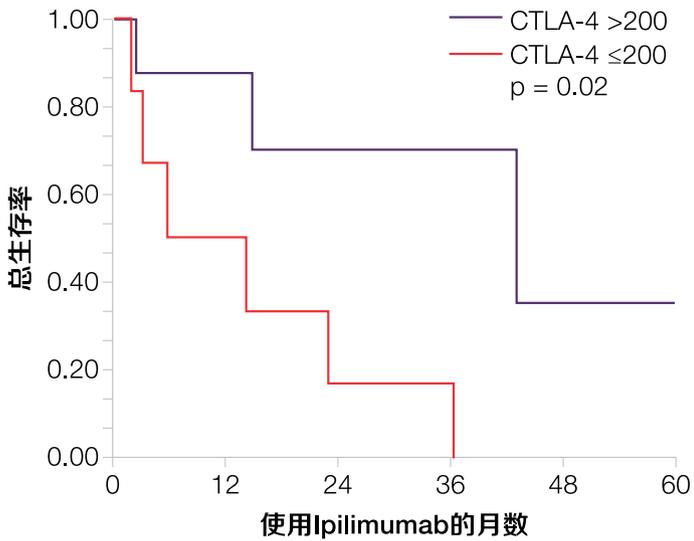


图12. 使用ipilimumab治疗的患者的总生存率(5年) — 比较>200 pg/mL血清sCTLA-4与≤200 pg/mL。

# 细胞治疗系统产品

## 利用高质量试剂实现从实验室到临床的无缝转换

### 细胞工程解决方案

我们可提供全套细胞工程解决方案，满足您的基因编辑和细胞输送需要，包括转染试剂、慢病毒转导、电穿孔以及备受赞誉的基因编辑工具和解决方案。

#### 慢病毒生产

不论您使用贴壁还是悬浮载体生产系统，我们都可以帮助您生成高滴度、经济高效的慢病毒载体。

- **任意规模的悬浮慢病毒生产** — Gibco™ LV-MAX™慢病毒生产系统是我们的最新创新产品，它是第一套完整的用于悬浮细胞培养的慢病毒生产系统，已经过优化，可以在无血清系统中无缝并高效地扩大您的慢病毒生产，且无需浓缩即可达到  $10^8$  TU/ml 滴度。



- **先进的脂质纳米微粒技术可以在贴壁培养物中实现出**众的慢病毒生产 — Invitrogen™ Lipofectamine™ 3000转染试剂是一种经济高效的慢病毒生产工具。即便是较大或难以包装的基因，这种通用试剂都可以获得高病毒滴度。



如需进一步了解我们的慢病毒解决方案，请登录 [thermofisher.com/lentiviral](http://thermofisher.com/lentiviral)

### CAR T细胞治疗培养基和试剂

除鉴定工具外，我们还能够提供涵盖从分离到基因编辑和细胞扩增的免疫治疗工作流程的各种产品。我们的产品、服务和支持有助于从研究到商品化的无缝转换，旨在缩短您从初始研究到批准治疗的时间。

Gibco™ CTS培养基、添加剂及试剂遵循医疗器械cGMP标准、21 CFR Part 820的要求进行生产，旨在帮助您将细胞治疗转向临床应用，其获得了大量安全测试和可追溯性文档的支持，便于监管审批，您可以放心地将细胞治疗转换到临床应用。

- **细胞扩增** — Gibco™细胞培养产品在深厚的科学细胞培养知识应用方面拥有50多年的历史。我们品种齐全的CTS培养基和试剂适用于临床细胞治疗应用，可为您提供支持。



- **Gibco™ CTS™免疫细胞血清替代物** — 成分确定的无外源配方，已经过FDA临床使用510(k)认证，可作为添加剂加入基础细胞培养基(如CTS OpTmizer T细胞扩增SFM或Gibco™ AIM V™培养基)，支持体外培养的人T细胞的扩增。



如需进一步了解我们的CAR T细胞治疗培养基和试剂，请登录 [thermofisher.com/ctsimmunotherapy](http://thermofisher.com/ctsimmunotherapy)

我们通过进一步了解癌症、开发功能强大的治疗方法并将其推向市场来推动免疫肿瘤学研究。您的团队或公司可以使用我们的Gibco™ CTS™产品，开发出从细胞培养到生产的精确治疗产品(图13)。

使用CTS™ Dynabeads™磁珠和DynaMag™磁体开发精确治疗产品。这项温和且高效的技术提供了一款值得信赖的

### 选择CTS产品，您可以期待：



#### 符合cGMP要求的生产

- 遵循医疗器械cGMP标准、21 CFR Part 820的要求进行生产
- FDA注册的生产工厂，采用经过ISO 13485认证的质量管理体系



#### 无缝过渡至临床

- 可追溯性文档，包括分析证书、原产地证明和药物主文件
- 大部分产品经过了广泛的QC测试，包括无菌、内毒素、外来物质和支原体

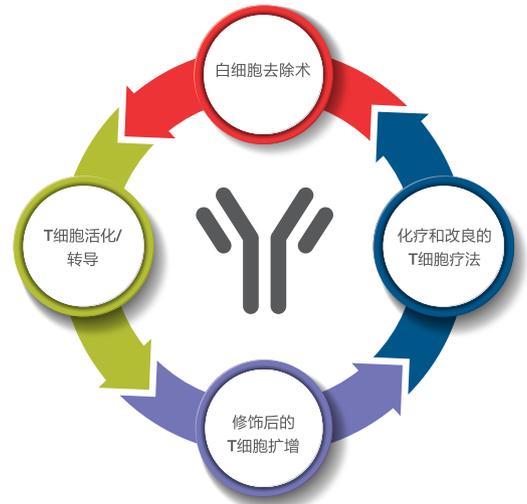


#### 专家支持

- 经验丰富的专业人士帮助您完成从研究到商品化阶段的监管过程
- 细胞治疗专家，帮助解答您的问题

图13. Gibco CTS研究为临床研究带来的益处。

技术平台，可利用磁珠分离T细胞并提供活化和扩增所需的原始和共刺激信号。应用包括CAR T和T细胞受体(TCR)细胞扩增。



CAR T细胞治疗工作流程——从白细胞去除术到CAR T生产再到病人输液。

#### CTS细胞扩增的优点包括：

- 分离和活化的T细胞可实现高效基因转导
- 扩增的T细胞具有中枢记忆性T细胞表型，能够在9-14天内内在体内扩增100-1,000倍
- 规模可调且高效的细胞分离，扩增后去除磁珠

#### 使用说明和产品信息

- 适用于经过认证的新药研究 (IND) 应用中的临床试验
- 供研究使用或临床研究中基于细胞的产品非商品化生产
- 遵循cGMP的要求生产；生产工厂已通过FDA注册且经ISO13485认证

如需了解更多详情，请登录 [thermofisher.com/us/en/home/clinical/clinical-translational-research/cell-therapy.html](http://thermofisher.com/us/en/home/clinical/clinical-translational-research/cell-therapy.html)

# 免疫治疗工作流程解决方案

从研究到临床以及更大范围的应用，  
我们都可提供解决方案帮助您实现细胞治疗目标



## 细胞分离与活化

产品可用于移植研究中的人T细胞的体外分离、活化和扩增，具有最佳的纯度、产量和功能。



## 细胞工程

全套细胞工程解决方案，满足您的T细胞输送需要，包括载体构建、生产和纯化、载体输送、电穿孔以及基因编辑工具。



## 细胞扩增

品种繁多的细胞扩增培养基和试剂，包括无血清培养基、血清替代物、生长因子、冲洗缓冲液和冻存溶液。我们还可提供生物反应器、培养器皿、细胞培养袋和定制培养基，用于全套细胞扩增解决方案。



## 细胞分析

用于细胞计数、全细胞分析、蛋白质分析和基因分析以及安全测试(包括内毒素和支原体)的多种设备、工具和试剂。先进的细胞鉴定工具，可满足您的流程中和批次出厂测试需要。



## 细胞输送

临床试验物流支持、符合cGMP要求的全球生物库、冻存分布专业知识 and 全套供应链管理，用于自体 and 同种异源细胞治疗。



# 服务与支持

我们致力于推动免疫肿瘤学细胞通路调控因子、基因修饰的T细胞及其他基于免疫的细胞治疗策略的研究。流式细胞术产品 — 从样本制备到开展实验 — 旨在促进高级免疫治疗的研究和开发。

如需了解更多详情，请登录 [thermofisher.com/flowcytometry](http://thermofisher.com/flowcytometry)



## 资源



- 流式细胞仪支持中心
- 流式细胞仪资源中心
- 流式细胞仪学习中心
- T细胞增殖和刺激电子教学课程



- 抗体和免疫分析资源中心
- 荧光光谱查看器
- 高内涵分析试剂



- 流式细胞仪实验方案
- Molecular Probes™手册
- 高内涵应用和实验方案



- 构建多色检测板的建议
- 构建高内涵成像的资源
- 免疫荧光选择指南

## 参考文献:

1. Corrigan-Curay J, Kiem HP, Baltimore D et al. (2014) T-cell immunotherapy: looking forward. *Mol Ther* 22:1564-1574.
2. Grupp SA, Kalos M, Barrett D et al. (2013) Chimeric antigen receptor–modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Eng J Med* 368:1506-1518.
3. Batlevi CL, Matsuki E, Brentjens RJ et al. (2016) Novel immunotherapies in lymphoid malignancies. *Nat Rev Clin Oncol* 13:25-40.
4. Junttila MR, de Sauvage FJ (2013). Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* 501:46-354.
5. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM (2015) Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer cell* 27(4):450-461.
6. Guillerey C (2016) Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nat Immunol* 17:1025-1036.
7. Maher J, Davies ET (2004) Targeting cytotoxic T lymphocytes for cancer immunotherapy. *Br J Cancer* 91(5):817-821.
8. Golubovskaya V, Wu L (2016) Different subsets of T cells, memory, effector functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers (Basel)* 8:3.
9. Mok SC et al. (2016) *Cancers* 8:36.
10. Laidlaw BJ (2016) The multifaceted role of CD4<sup>+</sup> T cells in CD8<sup>+</sup> T cell memory. *Nat Rev Immunol* 102-111.
11. Pardoll DM (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12:252-264.
12. Roy N, Pollard JW (2014) Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 41:49-61;
13. Wesolowski R, Markowitz J, Carson WE (2013). Myeloid derived suppressor cells – a new therapeutic target in the treatment of cancer. *J Immunother Cancer* 1:10.
14. Rosenberg SA, Restifo NP (2015) Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* 348:62-68.
15. Grupp SA, Kalos M, Barrett D et al. (2013) Chimeric antigen receptor–modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Eng J Med* 368:1506-1518.
16. Leung AM et al. (2014) Clinical benefit from ipilimumab therapy in melanoma patients may be associated with serum CTLA4 levels. *Front Oncol* 4:110.
17. Maus MV et al. (2014) Adoptive immunotherapy for cancer or viruses. *Annu Rev Immunol* 32:189-225.
18. Rapoport AP et al. (2015) NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. *Nat Med* 21:914-921.
19. Qasim W et al. (2007) Lentiviral vectors for T-cell suicide gene therapy: preservation of T-cell effector function after cytokine-mediated transduction. *Mol Ther* 15:355-360.

## 赛默飞世尔科技

---

### 上海

上海市浦东新区新金桥路27号3,6,7号楼  
邮编 201206  
电话 021-68654588\*2570

#### 生命科学产品和服务业务

上海市长宁区仙霞路99号21-22楼  
邮编 200051  
电话 021- 61453628 / 021-61453637

### 成都

成都市临江西路1号锦江国际大厦1406室  
邮编 610041  
电话 028-65545388\*5300

### 南京

南京市中央路201号南京国际广场南楼1103室  
邮编 210000  
电话 021-68654588\*2901

### 北京

北京市安定门东大街28号雍和大厦西楼F座7层  
邮编 100007  
电话 010-84193588\*3229

#### 生命科学产品和服务业务

北京市朝阳区东三环北路2号南银大厦1711室  
邮编 100027  
电话 010-84461802

### 沈阳

沈阳市沈河区惠工街10号卓越大厦3109室  
邮编 110013  
电话 024-31096388\*3901

### 武汉

武汉市东湖高新技术开发区高新大道生物园路  
生物医药园C8栋5楼  
邮编 430075  
电话 027-59744988\*5401

### 广州

广州国际生物岛寰宇三路36、38号合景星辉广场北塔204-206单元  
邮编 510000  
电话 020-82401600

### 西安

西安市高新区科技路38号林凯国际大厦  
1006-08单元  
邮编 710075  
电话 029-84500588\*3801

### 昆明

云南省昆明市五华区三市街6号柏联广场写字  
楼908单元  
邮编 650021  
电话 0871-63118338\*7001

欲了解更多信息，请扫描二维码关注我们的微信公众号

赛默飞世尔科技在全国有共21个办事处。本资料中的信息，说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。



赛默飞  
官方微信



赛默飞  
生命科学官方微信

热线 800 810 5118  
电话 400 650 5118  
[www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC