

流式细胞术整体解决方案

Attune流式细胞仪|16,000+种流式抗体|60+种荧光染料|
明星样品制备试剂|细胞功能试验|PrimeFlow 流式RNA分析

前言

流式细胞术能够从单细胞水平同时分析细胞样本中的基因表达和蛋白表达，还可以检测细胞活性、细胞周期、细胞凋亡、细胞增殖和细胞氧化等细胞功能。该技术不仅能获得在单个细胞水平上具有统计学意义的海量数据，还可以更加深入地了解异质性细胞群的详细信息。无论进行细胞亚群鉴定还是细胞功能研究，流式细胞术都发挥着重要作用，大大推动了科学研究的发展。

完成流式实验通常需要将多种抗体搭配成多色流式实验方案。这本流式细胞术整体解决方案手册不仅介绍了Invitrogen™ eBioscience™ 流式抗体和Invitrogen™ 流式细胞功能检测试剂，还展示了Invitrogen™ Attune™ 流式细胞仪在以下不同研究领域中的应用：

- 免疫学
- 炎症
- 肿瘤免疫
- 实体肿瘤
- 神经炎症
- 基因编辑
- 微生物学

流式细胞术整体解决方案实验流程

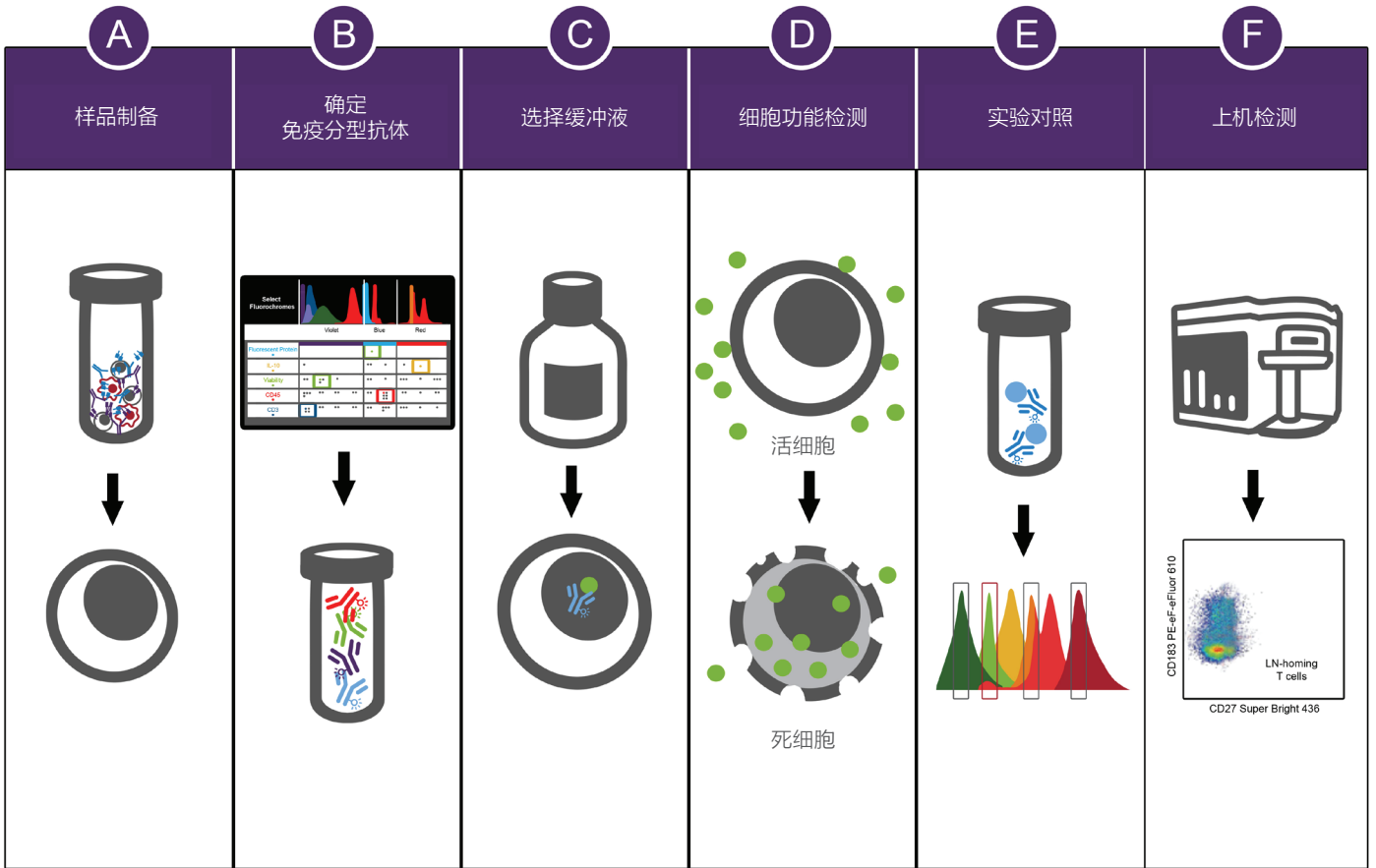


图1. 流式细胞术实验流程。合理进行实验设计是保证流式实验成功的关键。

了解更多多色流式实验相关信息，请访问 thermofisher.cn/flowcytometry

样品制备: 免疫细胞刺激试剂

免疫细胞通常需要刺激活化后才能快速增殖或分化为成熟细胞(图2)。处于活化状态的细胞经常高表达转录因子、细胞因子、趋化因子以及其他调节因子, 这些指标均可通过流式细胞术进行检测。选择合适的激活剂/刺激剂需要根据细胞类型、目的蛋白的表达水平和表达动力学以及具体实验条件而定。

我们提供多种高品质的细胞刺激试剂, 包括:

- **Invitrogen™ eBioscience™ 细胞刺激剂**
- **不含防腐成分的细胞刺激试剂:** 内毒素水平极低, 可用于细胞培养
- **功能级抗体:** 能够刺激多种类型的免疫细胞

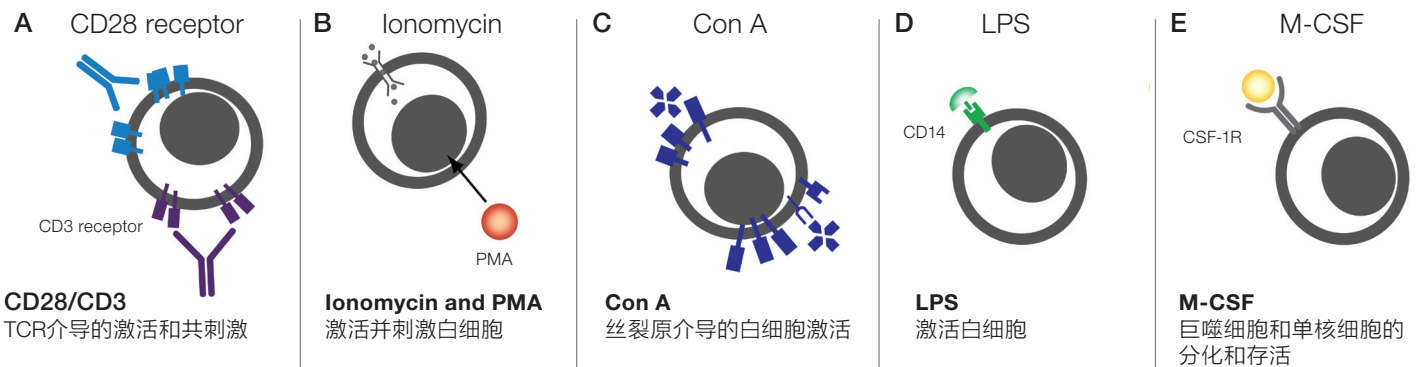


图2. 各种免疫细胞刺激试剂。(A) 功能级抗体(如CD3抗体和CD28抗体)可用于T细胞的活化和扩增。(B) eBioscience 细胞刺激剂(Cell stimulation cocktail), 包括PMA和离子霉素(ionomycin), 可刺激T细胞产生 γ -干扰素(IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素-2(IL-2)和白介素-4(IL-4)。(C) 刀豆蛋白A(Con A)可诱导T细胞活化和增殖。(D) 脂多糖(LPS)能够激活单核细胞, 并分泌白介素-6(IL-6)、白介素-10(IL-10)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)。(E) 巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)是一种生长因子, 可调节单核细胞的增殖、分化, 并促进单核细胞分化为巨噬细胞。

示例: T细胞活化

T细胞从静息状态开始分化和增殖需要外部信号的介导(图3)。推荐使用PMA和离子霉素或CD3/CD28功能级抗体刺激细胞, 可上调胞内转录因子的表达水平, 以便进行流式检测。由于各种细胞因子的表达水平不同, 且它们具有不同的表达动力学, 建议使用细胞刺激试剂时, 对细胞在不同时间点进行细胞因子的表达进行监测。

在CD4⁺ T 细胞群内鉴定人类Th17细胞

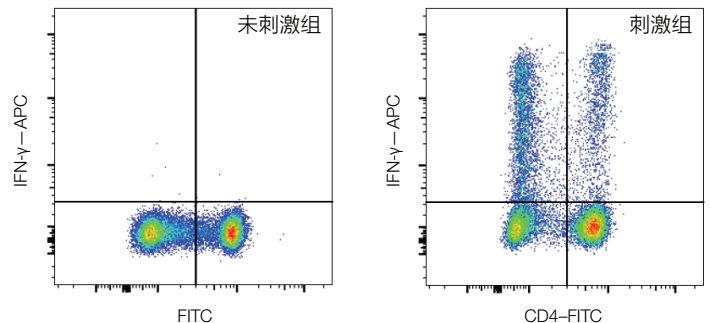


图3. 从人CD4⁺ T细胞群内鉴定Th17细胞亚群。用eBioscience 细胞刺激剂(+蛋白转运抑制剂, 500 \times)对正常人外周血细胞进行刺激(右图), 并设置未刺激组(左图)。两组细胞同时使用Invitrogen™ eBioscience™ 固定破膜缓冲液进行固定和破膜后, 用Invitrogen™ 抗人 CD4 APC和Invitrogen™ eBioscience™ PE-eFluor™ 610标记的抗人 IFN- γ 进行染色, 最终对淋巴细胞进行设门分析。

了解更多多色流式实验相关信息, 请访问
thermofisher.cn/flow-assays

16,000+种流式抗体, 用于免疫细胞表型鉴定

在多色流式实验中, 激光激发出最强的荧光信号, 而荧光染料结合着的抗体能识别各种抗原, 从而使流式细胞术直观地鉴定出不同的细胞亚群。利用这份产品手册轻松选择您所需要的抗体。

Invitrogen™ 流式抗体有:

- CD 标志物
- 转录因子
- 细胞因子、趋化因子和生长因子
- 信号通路标志物, 包括磷酸化蛋白

选择靶标抗原

我们提供16,000多种Invitrogen™ 流式抗体产品。在赛默飞网站上流式抗体的搜索结果中包含内部抗体验证*测试数据和线上可检索到的已发表文献中的结果图。使用下方在线检索工具, 选择适用于目的细胞群的流式抗体(图4)。

为了满足一管20+色要求, Invitrogen™ 流式抗体连接了60+种荧光染料。这些荧光染料使您从容地优化配色方案, 充分利用更多荧光通道, 减少光谱重叠或补偿调节。

选择荧光染料, 基于:

- 流式细胞仪的激光器和滤光片配置
- 目标蛋白的表达水平或丰度
- 荧光染料亮度
- 荧光激发光谱和发射光谱

示例: 选择正确的荧光染料

选择荧光染料对于找到目标细胞至关重要。将亮度更高的荧光染料对应低丰度靶标, 而亮度较低的荧光染料匹配高丰度靶标, 从而更好地区分荧光信号。而且, 荧光染料之间光谱重叠越少, 能够更加清楚地确定目标细胞群(图5)。



图4. 抗体检索工具: 查看流式资源和浏览流式抗体。Step2中可查找您的抗体, 直接购买或者保存分享。在其左侧有抗体应用数据, 如发表文献及测试数据。*“验证”的使用或其他类似表述仅指将研究用抗体通过其功能性测试, 确认该抗体用于指定研究技术或实验方法。它不能确定该产品经过临床或诊断用途验证。

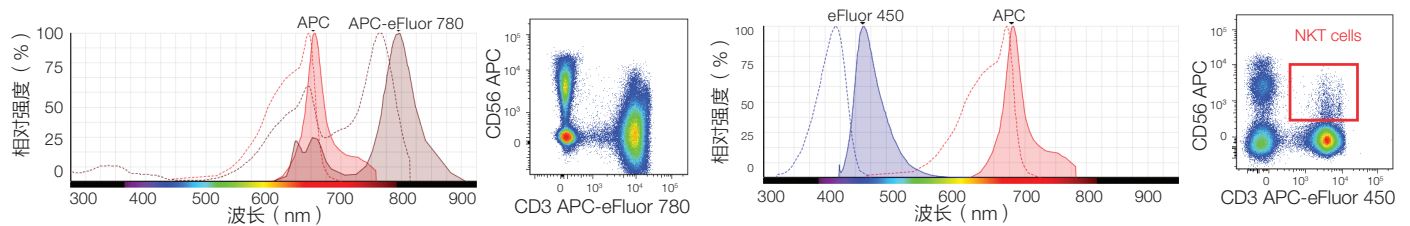


图5. 正常人外周血流式分析结果。分别用Anti-human CD3抗体(左图为Invitrogen™ eBioscience™ APC-eFluor™ 780 标记; 右图为Invitrogen™ eBioscience™ eFluor™ 450 标记)和Anti-human CD56-APC抗体染色正常人外周血样本后, 设门分析淋巴细胞。

查找Invitrogen™ 流式抗体, 请访问 thermofisher.cn/flowantibodies

表1. Invitrogen™ 荧光染料详细列表 (包含其特点、优势以及合适应用)

染料家族	类型	优势	Invitrogen™ 荧光染料			
有机染料: 稳定小分子	天然染料	<ul style="list-style-type: none"> • 性价比高 	FITC			
	Invitrogen™ Pacific 系列染料	<ul style="list-style-type: none"> • 部分染料的亮度很低 	Pacific Blue			
			Pacific Orange			
	Invitrogen™ Alexa Fluor™ 系列染料	<ul style="list-style-type: none"> • 以其激发光波长命名 • 覆盖整个光谱的稳定染料 • 可用于流式细胞术和成像实验 	Alexa Fluor 405			
			Alexa Fluor 488			
			Alexa Fluor 532			
			Alexa Fluor 561			
			Alexa Fluor 647			
			Alexa Fluor 660			
	Invitrogen™ eBioscience™ eFluor™ 有机染料	<ul style="list-style-type: none"> • 以其发射光波长命名 • 用于流式细胞术 	Alexa Fluor 700			
eFluor 450						
eFluor 506						
大分子蛋白染料	天然染料	<ul style="list-style-type: none"> • 性价比高 • 部分染料的亮度很高 	APC			
	偶联染料	<ul style="list-style-type: none"> • 供体染料与受体染料的发射光谱不同, 可用于构建更大的实验方案 	PE			
			PerCP			
			APC-Cyanine5			
			APC-Cyanine7			
			PE-Cyanine5 (TRI-COLOR dye)			
			PE-Cyanine5.5			
			PE-Cyanine7			
			PE-Texas Red dye			
			PerCP-Cyanine5.5			
			PE-Alexa Fluor 610			
			PE-Alexa Fluor 700			
			APC-Alexa Fluor 750			
			PE-eFluor 610			
			PerCP-eFluor 710			
			APC-eFluor 780			
			紫光聚合物染料	Invitrogen™ eBioscience™ Super Bright系列染料	<ul style="list-style-type: none"> • 由405 nm紫激光激发 • 荧光溢漏更少 • 使用两种或两种以上SB染料时需加入Invitrogen™ eBioscience™ Super Bright Complete Staining Buffer (货号 SB-4401-42), 以降低背景噪音 	Super Bright 436
						Super Bright 600
						Super Bright 645
Super Bright 702						
Super Bright 780						
紫外光聚合物染料	Invitrogen™ eBioscience™ Brilliant Ultra Violet™ 系列染料	<ul style="list-style-type: none"> • 由紫外激光激发 • 使用两种或两种以上BUV染料时需加入Invitrogen™ Brilliant Stain Buffer (货号 00-4409-75), 以降低背景噪音 	Brilliant Ultra Violet 737			
			Brilliant Ultra Violet 805			
纳米晶体	Invitrogen™ Qdot™ 系列染料	<ul style="list-style-type: none"> • 发射光谱窄 • 荧光共振能量转移 (Fluorescence resonance energy transfer, FRET 也称为斯托克斯位移) 很宽 	Qdot 605			
			Qdot 655			
			Qdot 705			
			Qdot 800			
DNA结构创新染料	Invitrogen™ eBioscience™ NovaFluor™ 系列染料	<ul style="list-style-type: none"> • 独特的光谱特征 • 同一荧光染料, 不同荧光亮度 • 减少不同激光器交叉激发同一染料 • 以其激发光和发射光波长命名 • 在使用NovaFluor染料标记细胞时, 使用Invitrogen™ CellBlox™ 单核-巨噬细胞封闭缓冲液 (货号 B001T03F01) 封闭非特异性标记, 减少背景噪音 	NovaFluor Blue 510			
			NovaFluor Blue 530			
			NovaFluor Blue 555			
			NovaFluor Blue 585			
			NovaFluor Blue 610-30S			
			NovaFluor Blue 610-70S			
			NovaFluor Blue 660-40S			
			NovaFluor Blue 660-120S			
			NovaFluor Yellow 570			
			NovaFluor Yellow 590			
			NovaFluor Yellow 610			
			NovaFluor Yellow 660			
			NovaFluor Yellow 690			
			NovaFluor Yellow 700			
			NovaFluor Yellow 730			
			NovaFluor Red 660			
			NovaFluor Red 685			
			NovaFluor Red 700			
			NovaFluor Red 710			

流式配色方案设计

Invitrogen™ Panel Builder是一款免费的流式配色工具，整体五步选择设备、抗原、染料、克隆到产品，解决您的流式配色烦恼（图6）。通过使用Panel Builder，它能给您更多空间去思考、去验证以及去优化您的流式实验方案。

有了Panel Builder，您可以：

- 设计您的免疫分型方案，或者在已有方案中添加抗体
- 同时使用光谱查看器，方便查看荧光染料的发射光谱及光谱重叠
- 将完成的实验方案导出Excel™文件保存，或直接订购满意的抗体



图6. Invitrogen™ Panel Builder 简单5步轻松设计流式配色方案

即刻开始设计多色流式配色方案，请访问 thermofisher.cn/order/panel-builder

NovaFluor 流式荧光染料

NovaFluor流式荧光染料具有更窄的发射光谱, 因此能够避免荧光溢漏或补偿调节, 更是减少多个激光器的交叉激发, 从根本上使细胞分群更加清晰。因其很窄的发射光谱, 仅仅利用单个检测通道, 不仅可以使用空白未用的通道, 还可以替换占据多个通道的染料, 从整体上检测更多标志物、提高流式检测能力。

CellBlox封闭缓冲液的作用是避免NovaFluor染料与部分细胞发生非特异性结合, 减少很强的背景噪音。CellBlox封闭缓冲液不是蛋白类封闭液, 可与NovaFluor染料、Cyanine染料及其偶联染料结合使用, 减少这些染料与单核细胞、巨噬细胞这些细胞之间的非特异性结合, 从而降低背景荧光信号。

NovaFluor流式荧光染料的优势包括:

- **光谱更窄**—NovaFluor染料的激光光谱和发射光谱很窄, 减少了荧光溢漏, 避免由不同激光器引起的交叉激发
- **亮度可选**—NovaFluor创新原理允许同一荧光染料有着不同的荧光强度, 如NovaFluor Blue 660/40S和NovaFluor Blue 660/120S
- **荧光稳定**—与偶联染料相比, NovaFluor染料在固定和染色后仍然稳定, 且在4°C下保存两周, 荧光强度和光谱特征不变
- **特异性强**—CellBlox封闭缓冲液可减少NovaFluor染料与单核细胞或巨噬细胞的非特异性结合, 降低背景荧光信号

表2. NovaFluor 流式荧光染料及其他染料详细信息列表*

这里的荧光染料详细信息包括有荧光扩散 (该荧光标记在所有非主要检测通道中的光谱荧光扩散总和计算得出) 和分离指数 (即染色指数或亮度, 使用抗人CD4-SK3对所有荧光染料检测计算得出)

荧光标记	最大激发 (nm)	最大发射 (nm)	主要检测器 (nm)	激光器 (nm)	荧光扩散	分离指数
NovaFluor Blue 510	496	511	B1 (498-518)	488	727	55
FITC	494	520	B2 (516-533)	488	1,856	31
NovaFluor Blue 530	509	530	B2 (516-533)	488	1,128	12
NovaFluor Blue 555	494	555	B3 (533-550)	488	691	21
NovaFluor Blue 585	494	585	B4 (571-590)	488	1,527	9
NovaFluor Blue 610/30S	509	614	B6 (605-625)	488	2,343	30
NovaFluor Blue 610/70S	509	614	B6 (605-625)	488	3,384	71
NovaFluor Blue 660/40S	509	665	B7 (652-669)	488	3,418	37
NovaFluor Blue 660/120S	509	665	B7 (652-669)	488	5,971	119
PerCP-Cy5.5	482	695	B9 (688-707)	488	4,992	41
NovaFluor Yellow 570	552	568	YG1 (567-587)	561	1,878	52
PE	496	578	YG1 (567-587)	488; 561	11,709	421
NovaFluor Yellow 590	552	590	YG2 (588-608)	561	810	254
NovaFluor Yellow 610	552	612	YG3 (605-625)	561	4,257	117
NovaFluor Yellow 660	552	663	YG4 (652-669)	561	6,824	96
PE-Cy5	496	667	YG5 (669-687)	488; 561	41,773	540
NovaFluor Yellow 690	552	690	YG6 (687-706)	561	3,123	190
NovaFluor Yellow 700	552	700	YG7 (706-735)	561	3,299	214
NovaFluor Yellow 730	552	731	YG7 (706-735)	561	5,775	120
PE-Cy7	496	785	YG9 (765-795)	488; 561	12,059	352
APC	650	660	R1 (652-669)	640	9,844	231
NovaFluor Red 660	637	659	R2 (669-687)	640	3,789	192
NovaFluor Red 685	637	685	R3 (688-707)	640	3,734	270
NovaFluor Red 700	639	700	R3 (688-707)	640	3,301	363
NovaFluor Red 710	639	710	R4 (707-727)	640	4,256	108

*光谱流式数据均由5激光Cytek™ Aurora™光谱流式细胞仪上生成, 并使用SpectroFlo™软件分析。

立即选购NovaFluor染料抗体, 请访问 thermofisher.cn/novafluor-dyes

明星流式缓冲液: 细胞固定和破膜试剂

细胞固定液主要用于样品的长期保存以及胞内/核内靶标的检测。Invitrogen™ 固定破膜染色缓冲液根据流式实验而优化, 其优势包括:

- 细胞染色方法取决于目的蛋白的位置, 即胞内蛋白还是核内蛋白
- 细胞经过固定和破膜处理后, 仍然保持完整的形态及其散射光特点
- 流式实验缓冲液能最大程度地降低背景染色

表3. 细胞染色实验流程

	细胞表面染色 (CD标记物)	胞浆染色 (细胞因子)	核内染色和胞浆染色 (细胞因子和转录因子)
表面蛋白染色	✓	✓	✓
细胞固定		✓	✓
细胞破膜		✓	✓
胞浆蛋白染色		✓	✓*
核内蛋白染色			✓

*胞浆蛋白也可采用核内染色试剂盒进行染色, 但不一定是最佳方案。

表4. 流式实验缓冲液选择指南

染色缓冲液	描述	位置
eBioscience流式染色缓冲液 (货号00-4222)	细胞表面标记物通常用于区分细胞亚群, 细胞破膜会使细胞表面抗原受损或变性, 并且使抗体很难结合到细胞的抗原表位上。建议单独进行细胞表面抗体染色, 或者先对细胞表面标记物进行染色, 然后进行胞浆或核内染色。	细胞表面
eBioscience细胞内固定破膜剂套装(货号88-8824)	胞浆蛋白包含细胞因子、细胞器和胞浆内转录因子, 这些蛋白通过温和地固定和破膜便可以检测到。固定胞浆蛋白通常需要交联剂来使蛋白保留在细胞内。	细胞胞浆
eBioscience Foxp3/转录因子固定破膜剂套装 (货号00-5523)	核蛋白主要包括转录因子、DNA结合蛋白和修饰蛋白。快速固定加上深度破膜可以使抗体穿过细胞膜和核膜到达核内。固定液为交联剂或有机溶剂。此方法同样适用于在胞浆*和核内都有表达的蛋白。	细胞核

*胞浆蛋白也可采用核内染色试剂盒进行染色, 但不一定是最佳方案。

查找更多流式缓冲液相关信息, 请访问 thermofisher.cn/flow-sample

细胞功能检测试验: 染料和试剂

流式实验方案通常不仅有流式抗体, 还包括细胞功能检测相关的荧光染料, 比如检测细胞活性、细胞周期、细胞凋亡、细胞增殖和细胞氧化等。

这些试剂如同流式抗体一样可添加到流式配色方案中。使用下表, 确定哪些细胞功能性检测试验可以整合到您的流式实验方案中(图7)。

细胞功能检测试验流程

利用流式可以检测哪些方面的应用?

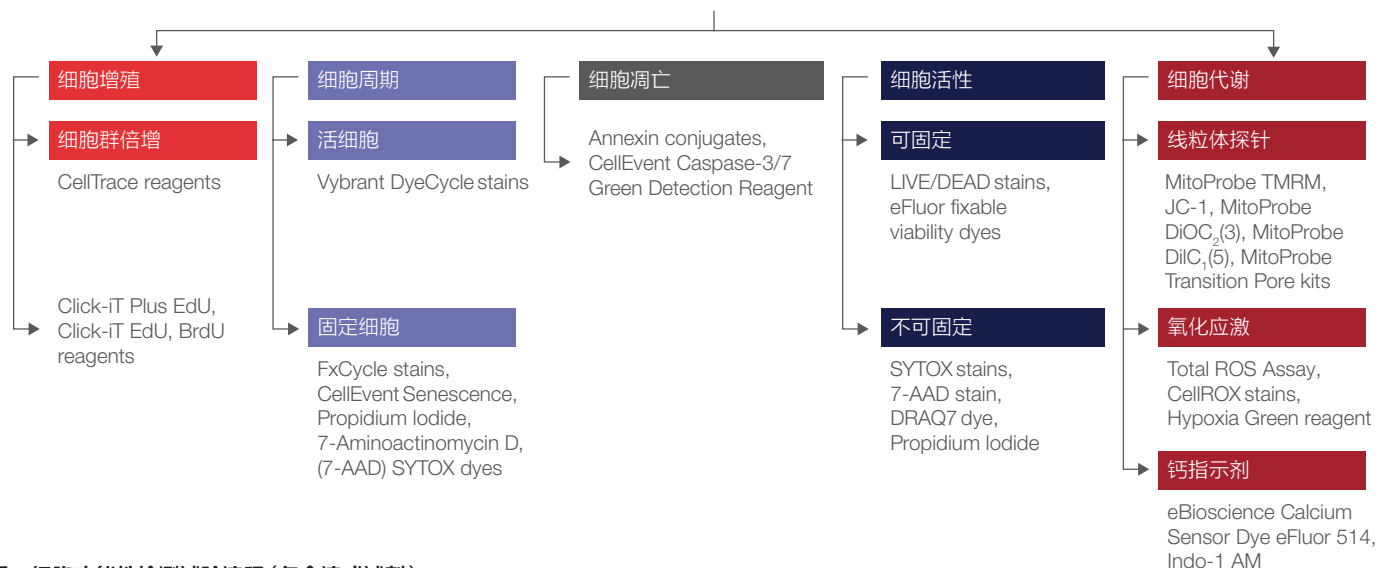


图7. 细胞功能性检测试验流程 (包含流式试剂)

细胞活性

细胞活性检测试验可用于简单区分出活细胞与死细胞, 确定其他细胞功能或细胞处理的关联性, 或者在流式分析时去除死细胞。Invitrogen™ 细胞活性检测试剂均采用一步法或二步法, 并可用于细胞分选实验或细胞分析实验。

鉴定外泌体 (EV) 的细胞膜染料

下列这些试剂对脂类进行染色, 可以用于标记细胞培养物中的外泌体。

- 亲脂苯乙烯染料: Invitrogen™ FM™ dye
- 长链亲脂性羧花青染料: Invitrogen™ DiI, Vybrant™ CM-DiI (fixable)、DiO和DiD dyes, 或Vybrant™多色细胞标记试剂盒
- Invitrogen™ Di-8-ANNEPS dyes

表5. 细胞活性染料选择指南

激光器	非固定染料	可固定染料
UV	DAPI (470)	LIVE/DEAD Fixable Blue (450)
405 nm	SYTOX Blue (480)	LIVE/DEAD Fixable Violet (451)
		LIVE/DEAD Fixable Lime (506)
		LIVE/DEAD Fixable Aqua (526)
		LIVE/DEAD Fixable Yellow (575)
488 nm	SYTOX Green (523)	LIVE/DEAD Fixable Green (520)
		LIVE/DEAD Fixable Olive (557)
561 nm	SYTOX AADvanced (647)	LIVE/DEAD Fixable Red (615)
		LIVE/DEAD Fixable Orange (602)
633/5 nm	SYTOX Red (660/20*)	LIVE/DEAD Fixable Far Red (665)
		LIVE/DEAD Fixable Scarlet (723)
		LIVE/DEAD Fixable Near IR (775)
		LIVE/DEAD Fixable Near IR (780)
808 nm		LIVE/DEAD Fixable Near IR (876)

*最大发射波长(nm)

查看更多细胞功能检测试验相关信息, 请访问 thermofisher.cn/flow-assays

示例: 使用LIVE/DEAD染料使流式结果更准确

在使用细胞活性染料去检测固定后的细胞时, 请选择LIVE/DEAD可固定活性染料, 将死细胞在实验数据中去除干扰, 从而使细胞分群更清晰、更好地鉴定细胞亚群。Invitrogen™ LIVE/DEAD™ 可固定细胞活性染料在细胞固定和/或破膜后仍能准确地评估细胞活性(图9); Invitrogen™ Attune™ CytPix™ 成像型流式细胞仪收集的明场图像确认设门是否准确, 增加数据结果的可信度(图8)。

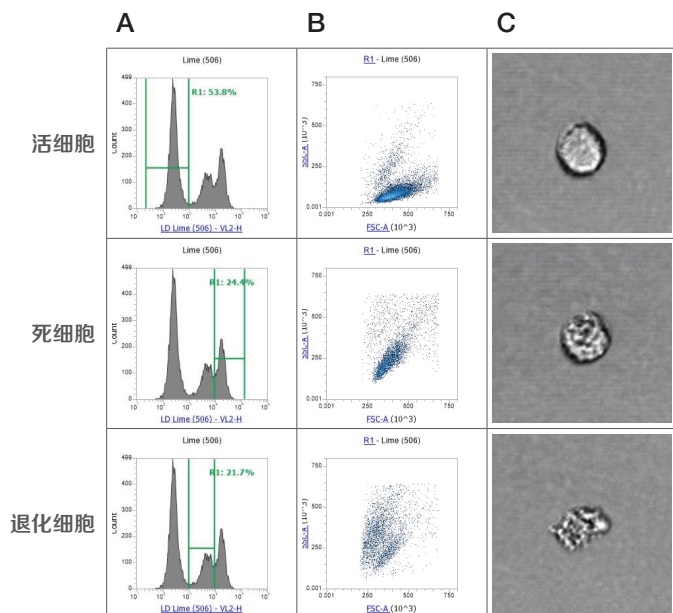


图8. 使用LIVE/DEAD染料的设门策略。(A)Jurkat细胞用LIVE/DEAD Lime 506染色后的直方图。(B)对直方图每个峰设门, 分别显示活细胞、死细胞和退化细胞群。(C) B图中三种细胞的典型明场图像结果。图像结果和流式数据均在Attune CytPix成像型流式细胞仪上获得。

应用亮点—细菌活性试验流程

流式细胞术能够缩短细菌分型和计数时间。

- 将饮料和固体食品进行称重、匀浆后获得单个细菌悬液
- 无需梯度稀释——只需进行样品染色、稀释、上机分析
- Invitrogen™ LIVE/DEAD™ BacLight™试剂盒可用于快速检测细菌活性

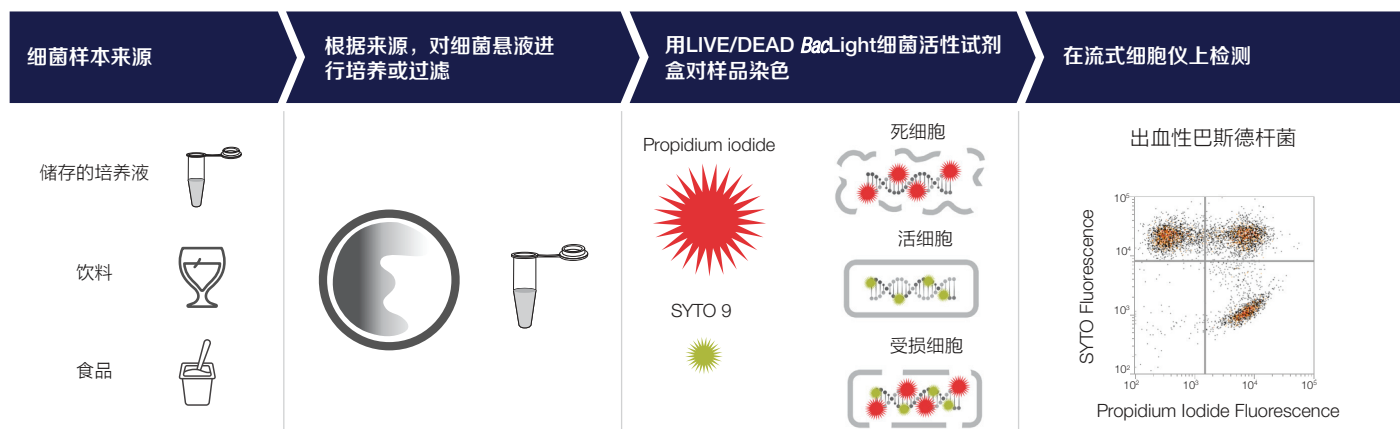


图9. 使用LIVE/DEAD BacLight试剂盒对出血败血性巴斯德杆菌染色15分钟后, 在Attune流式细胞仪上进行样品分析。

查看更多细胞活性染料相关信息, 请访问 thermofisher.cn/flow-cellviability

细胞增殖

细胞增殖分析是新药研发和细胞示踪研究的重要环节。细胞增殖分析实验通常检测平均DNA含量或者细胞代谢指标，最终会报告活细胞总数或单个细胞中的DNA含量。这里有各种细胞增殖相关的染料、试剂盒和抗体，请使用下列指南选择适合的染料或试剂。

示例：使用CellTrace试剂进行传代追踪

Invitrogen™ CellTrace™试剂通过分析在连续传代后细胞亚群中的染料稀释浓度来追踪细胞分裂代数(图10)。当细胞发生增殖时，子细胞的荧光亮度是上一代母细胞的一半。CellTrace试剂能够监测到处于不同代数的增殖细胞，观察到在每一代细胞中有相同标记的细胞群。

表6. 细胞增殖相关流式试剂选择指南

产品	检测原理	可固定	活细胞分析	应用
Click-iT Plus EdU流式检测试剂盒	掺入到新合成的DNA中	是	是	细胞增殖
BrdU	掺入到新合成的DNA中	是	是	细胞增殖
CellTrace细胞增殖试剂盒	含赖氨酸的蛋白质	是	是	传代分析
Ki-67抗体	增殖细胞中表达的核蛋白	是	是	细胞增殖和细胞周期
微小染色体维持蛋白(MCM2)抗体	增殖细胞中表达的核蛋白	是	否	细胞增殖和细胞周期
增殖细胞核抗原(PCNA)抗体	增殖细胞中表达的核蛋白	是	否	细胞增殖和细胞周期

“CellTrace Violet 是细胞增殖检测的最佳试剂，适用于任何细胞类型，可通过荧光染料稀释和流式细胞仪进行检测。相比于在高浓度下有细胞毒性的CFSE，CellTrace Violet标记细胞的亮度很高，毒性低，且在传代细胞中持续存在，所以各代细胞的流式分群结果很好。”

-Andrew Filby, 纽卡斯尔大学流式实验室主管兼
ISAC SRL新兴技术经理

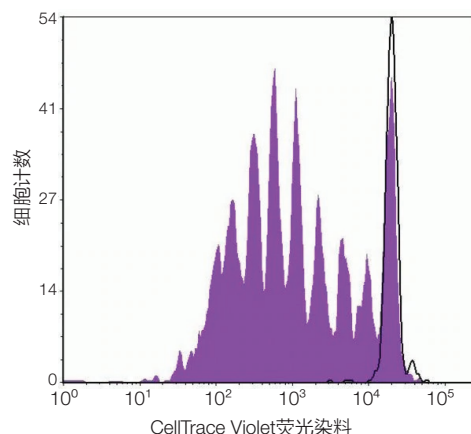


图10. 使用CellTrace试剂检测细胞增殖。收集培养的人外周血淋巴细胞，使用Invitrogen™ CellTrace™ Violet细胞增殖试剂盒进行染色。紫色波峰显示了使用Invitrogen™小鼠抗人CD3抗体和IL-2抗体刺激培养7天后的细胞连续传代结果。黑色圈出的峰形为未经刺激且培养7天后的细胞。

查看更多细胞活性染料相关信息，请访问
thermofisher.cn/flow-cellproliferation

PrimeFlow RNA流式检测

Invitrogen™ PrimeFlow™ RNA流式检测允许流式细胞术同时检测数百万个单细胞内的RNA和蛋白表达动力学(图11)。PrimeFlow技术原理将荧光原位杂交(FISH)和分支链DNA(bDNA)信号放大专利技术(图12)相结合,分别用Invitrogen™ Alexa Fluor™ 488、Alexa Fluor™ 568、Alexa Fluor™ 647和Alexa Fluor™ 750进行标记,通过流式细胞仪同时检测单个细胞中多达4种RNA转录本。同时,再结合细胞表面抗原和细胞内抗原染色,更加深入地揭示生物学现象。

创新应用:

- 同时分析多达四种RNA转录本
- 同时检测单个细胞中的RNA和蛋白水平
- 揭示单细胞水平上基因表达的异质性
- 抗体选择受限时分析mRNA的表达
- 检测非编码RNA、微小RNA(miRNA)和长链非编码RNA(lncRNA)
- 评估感染细胞中的病毒RNA载量
- 检测端粒DNA

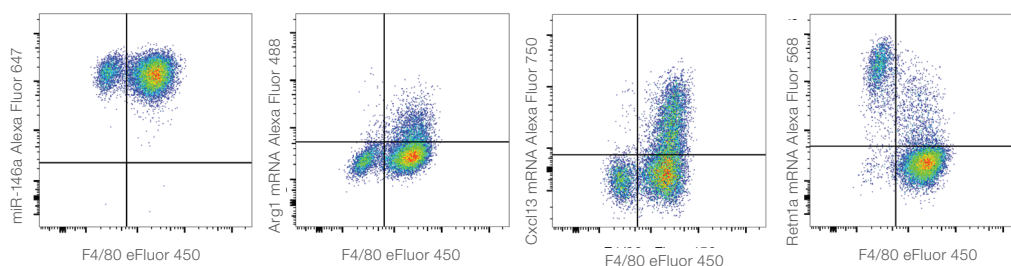


图11. 使用PrimeFlow RNA试剂盒检测小鼠腹膜细胞中的miR-146 α mRNA、Arg1 mRNA、Cxcl13 mRNA和Retn1a mRNA。使用PrimeFlow RNA试剂盒对C57Bl/6小鼠残留的腹膜渗出细胞进行分析。首先使用Invitrogen™ eBioscience™ 抗小鼠F4/80 eFluor 450和抗小鼠CD11b PE-Cyanine7抗体进行细胞表面染色;然后根据实验流程,使用PrimeFlow RNA试剂盒中的缓冲液进行细胞固定和破膜;接下来使用Invitrogen™ 人类/小鼠miR146 α Alexa Fluor 647(1型探针)、小鼠Arg1 Alexa Fluor 488(4型探针)、小鼠Cxcl13 Alexa Fluor 750(6型探针)以及小鼠Retn1a Alexa Fluor 568(10型探针)4种不同的探针标记细胞中的RNA;最后分析CD11b+ 活细胞。数据显示腹膜小巨噬细胞(SPM, F4/80-)和腹膜大巨噬细胞(LPM, F4/80+)均为miR-146 α 阳性,SPM高表达Retn1 α mRNA,而LPM中Cxcl13 mRNA为阳性且低表达Arg1 mRNA。

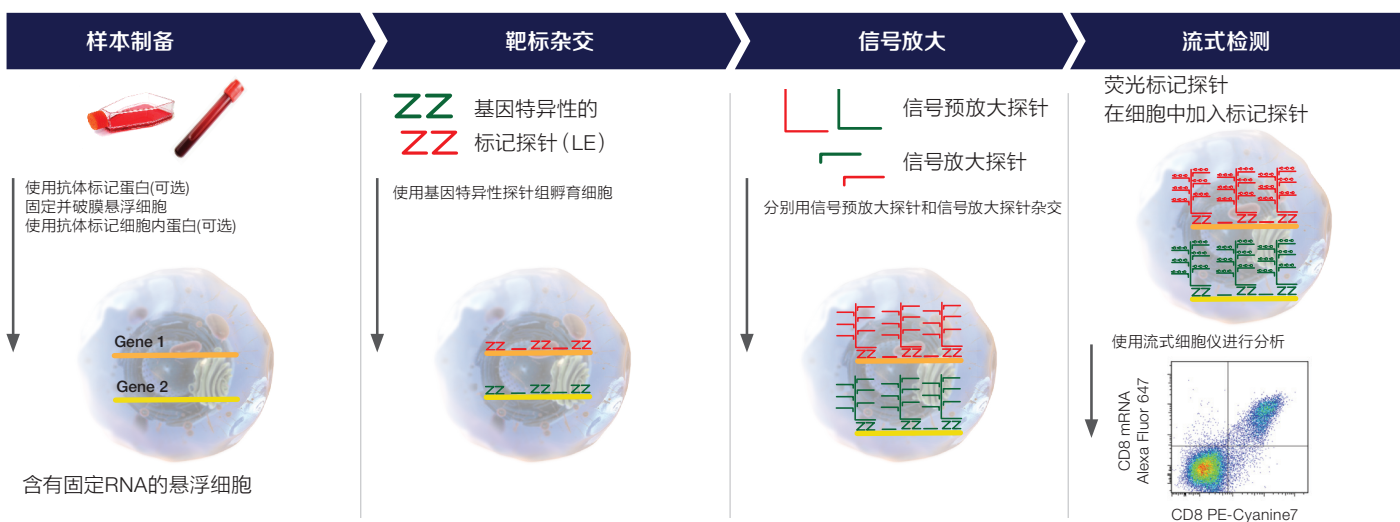


图12. PrimeFlow RNA流式检测实验流程。该实验流程包括以下几个步骤: 抗体染色; 固定和破膜, 如需可加细胞内染色; 然后是与含有20-40个寡核苷酸对的靶点特异性探针组进行杂交。

查看更多PrimeFlow RNA检测相关信息, 请访问 thermofisher.cn/primeflow

流式微球：补偿微球、计数微球、校准微球

流式专用补偿微球

单个荧光染料的发射光谱通常占用到多个检测通道，这时会有光谱重叠现象，因此需调节补偿来校准目标荧光信号，保证实验结果准确性。特别是在细胞样品非常稀少或者待测靶标没有明显的阳性细胞群时，补偿微球尤为重要。

新一代补偿微球

使用Invitrogen™ UltraComp eBeads™ Plus补偿微球可以使流式实验结果有着更加精准的补偿调节。当荧光标记的抗体添加到微球中，可以观察到阳性细胞群和阴性细胞群清晰地分开，使实验结果更加可信。

UltraComp eBeads Plus补偿微球的优势包括：

- 适用更多的抗体物种来源，包括兔源和人源抗体（图13）
- 兼容多数激光器，即由紫外光（355 nm）、紫色（405 nm）、蓝色（488 nm）、绿色（532 nm）、黄绿色（561 nm）和红色（633-640 nm）激光器激发的荧光染料
- 调节Invitrogen™ eBioscience™ Super Bright 780、Brilliant Violet 711或Brilliant Violet 786标记抗体的补偿允许实现更加清晰的细胞分群



图13.使用14种不同种属和亚型的抗体对UltraComp eBeads Plus补偿微球进行染色的结果。使用每种抗体（0.25 μg）对微球进行染色，并在流式细胞仪上进行分析。

表7. Invitrogen™补偿微球

	UltraComp eBeads™ Plus补偿微球	UltraComp eBeads™补偿微球	OneComp eBeads™补偿微球	AbC™总抗体补偿微球试剂盒*	ArC™胶反应补偿微球试剂盒	GFP BrightComp eBeads™微球
应用	免疫表型分析				细胞活性检测	GFP表达；微球有3种不同强度的类GFP表达
种属反应性	人、兔、仓鼠、小鼠和大鼠抗体	仓鼠、小鼠和大鼠抗体，同时识别κ和λ链		仓鼠、小鼠、兔和大鼠抗体	LIVE/DEAD™可固定细胞活性染料*	GFP亚型
产品形式	单管预混形式；每次使用一滴			1管阳性微球；1管阴性微球		单管预混形式；每次使用一滴
激光器兼容性	兼容多数标准激光器，从紫外光到633 nm；并根据SB染料和BV染料进行补偿调节优化	兼容多数标准激光器，从紫外光到633 nm	兼容多数标准激光器，但不兼容紫外或紫激光	可兼容多数标准激光器，从紫外光到633 nm		488 nm
规格	25 Tests 或100 Tests					25 tests
货号	01-3333-41 01-3333-42	01-2222-41 01-2222-42	01-1111-41 01-1111-42	A10513 A10497	A10628 A10346	A10514

*同样适用于其它胶反应染料。

绝对计数微球

细胞绝对计数是一种定量检测样品中的细胞浓度或绝对数量的方法。

Invitrogen™ 绝对计数微球的优势包括:

- 荧光染料覆盖了整个光谱 (图14)
- 能兼容绝大多数不同大小的细胞类型, 增加了更小细胞检出比例

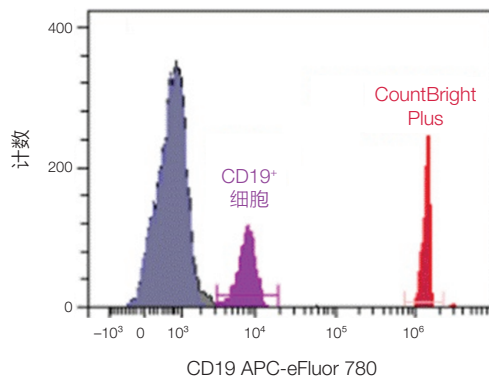


图14. CountBright Plus微球可兼容更宽光谱范围的荧光染料。 CountBright Plus微球 (红色) 可以与裂解全血中Invitrogen™ CD19 APC-eFluor™ 780染色的细胞 (紫色) 同时检出 (使用808nm 红外激光器及840/20nm 滤光片进行检测)。

表8. Invitrogen™绝对计数微球

	CountBright™ Plus微球*	AccuCheck™微球		LIVE/DEAD™ BacLight™细菌活性及计数试剂盒**
测量参数	样品细胞浓度	<ul style="list-style-type: none"> • 样品细胞浓度 • 移液准确度 		<ul style="list-style-type: none"> • 细菌活性 • 样品中的细菌浓度
样品类型	任何类型	全血样本		细菌
微球大小	4 μm	微球 A 6.40 μm	微球 B 6.36 μm	6 μm
光谱范围	激发光: UV-800 nm 发射光: 385-860 nm	微球A 激发光: 488 nm 发射光: 575-585 nm	微球B 激发光: 635 nm 发射光: 660-680 nm	激发光: 488 nm 发射光: 617 nm, 498 nm
货号	C36995	PCB100		L34856

*第一代Invitrogen™ CountBright™绝对计数微球仍可订购, 但与红外光激发的荧光染料不兼容。

**所有细胞均可染色, 所以需要制备高纯度细菌样品, 以获得准确结果。

仪器质控校准微球和细胞大小校准微球

仪器的质控校准是获得准确实验结果的前提, 这里的质控校准微球正是适用于确定稳定且可靠的流式细胞仪性能。

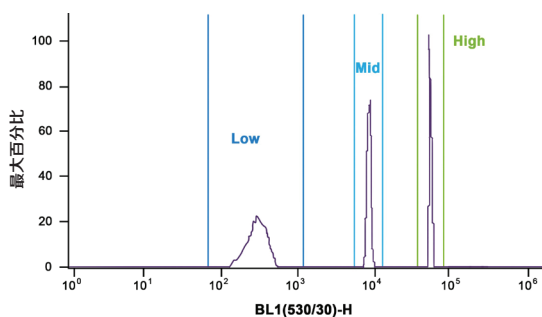


图15. ERF微球有3种不同的荧光强度。

表9. Invitrogen™质控校准微球

	仪器质控校准	激光校准	荧光标准化	细胞大小校准	
产品	彩虹校准微球	Alignflow™流式校准微球	AccuCheck ERF参考颗粒	流式细胞大小校准试剂盒	流式亚微米颗粒大小参考试剂盒
用途	流式细胞仪日常质控	激光光路校准	仪器间和仪器内数据对比的标准化和校准	细胞大小对照	细胞大小对照
发射光	400-680 nm	3种类型: 400-470 nm (紫外光), 515-660 nm (蓝激光), 或 645-680 nm (红激光)	415-910 nm	无荧光	绿色荧光
微球大小	3.0 μm-3.4 μm	2种尺寸: 直径2.5 μm或6.0 μm	3.2 μm	6种尺寸: 1.0 μm-15 μm	6种尺寸: 0.02 μm-2.0 μm
货号	A34305	2.5 μm: A16502, A16500, A16501 6.0 μm: A16505, A16503, A16504	A55950	F13838	F13839

查看更多微球相关信息, 请访问 thermofisher.cn/flow-controls

样品分析: Attune流式细胞仪、CytKick自动进样器以及流式自动化工作站

Attune流式细胞仪搭配Invitrogen™ CytKick™ 或 CytKick™ Max自动进样器, 将精度与性能完美结合。上样速度更快的同时, 能达到更高灵敏度, 且无需担心因仪器堵塞而造成的样本损失。配置多达4种激光和16个检测参数; Attune CytPix流式细胞仪还搭载了高速明场相机, 可以直观地确定设门是否包含所有目的细胞, 并探索相关的细胞形态学特征。

- **创新的仪器配置:** 流式细胞仪全新升级, 实现高速明场成像功能; 不仅能获得多色流式数据, 还能提供细胞形态学等图像信息, 从而丰富了流式分析数据
- **紫激光多达6个荧光通道:** 扩展了多色流式方案的应用
- **简化样品制备流程:** 免清洗免裂解样品制备方案, 可简化您的实验流程



- **软件操作简单灵活:** 一键切换试管和微孔板上样
- **智能的自动化方案:** 采用抗堵设计的液流系统和稳定可靠的数据分析软件实现无人值守的自动化仪器运行
- **兼容多种样本类型:** 能够分析哺乳动物细胞、藻类、细菌、酵母、寄生虫和植物细胞

表10. Attune 流式细胞仪参数

属性	参数	Attune CytPix 成像型流式细胞仪	Attune NxT 流式细胞仪
光学系统: 荧光	激光器 (nm)	紫激光405, 蓝激光488, 黄激光561, 红激光637	紫激光405, 蓝激光488, 绿激光532, 黄激光561, 红激光637
	滤光片	最多可达14色通道, 基于波长的光电倍增管 (PMT); 用户可调的键控滤光片	
光学系统: 成像	激光器	405 nm	N/A
	脉冲激光功率	无预热延迟; 光纤性能不受“开关”影响	N/A
	脉冲宽度	<50 ns	N/A
液流系统	流动室	石英杯凝胶连接1.2数值孔径 (NA) 集光镜, 200×200 μm	
	样品分析体积	20 μL至4 mL	
	自定义进样速率	12.5-1,000 μL/分钟	
	样品进样模式	正向位移注射泵, 可精确分析样品体积	
性能: 荧光检测	荧光灵敏度	FITC≤80 等量可溶性荧光分子 (MESF), PE≤30 MESF, APC≤70 MESF	
	荧光分辨率	碘化丙啶染色鸡红细胞核 (CEN) 单峰的变异系数 (CV) <3%	
	数据采集率	最高35,000 个细胞/秒; 34个参数; 按照每个参数泊松统计数据10%重合率进行计算	
	最大光电转化速度	65,000 个细胞/秒, 全部参数	
	残留率	单管残留率: <1%	
	前向角和侧向角散射光灵敏度	能够从噪声中鉴别出血小板	
	最小粒径	侧向角散射光可检测0.2 μm微粒, 由Bangs Laboratories亚微米微粒校准试剂盒。在下列条件下, 侧向角散射光可检测0.1 μm微粒: 使用Attune NxT流式细胞仪中标准0.5 mm封闭配置、Invitrogen Attune NxT 488/10滤光片 (货号 100083194), 并使用经过0.025 μm过滤的Attune鞘液 (货号: 4488621、4449791或A24904)。	
性能: 成像	像素分辨率	0.3 μm/像素	N/A
	物镜放大倍率	20x	N/A
	物镜数值孔径 (NA)	0.45	N/A
	理论分辨率	0.6 μm	N/A
	仪器检出限	直观观察到800 nm微粒	N/A
	图像采集速率	3,000-6,000张图像/秒 (与图像尺寸相关)	N/A
	图像尺寸	96 × 96像素至248 × 248像素	N/A
	仪器视野	29 × 29 μm至74 × 74 μm	N/A

查看Attune 流式细胞仪相关信息, 请访问 thermofisher.cn/attune

细胞分选: Bigfoot全光谱超高速流式细胞分选仪

Invitrogen™ Bigfoot™全光谱流式细胞分选仪内含Sasquatch软件 (SQS) 实现超高速细胞分选。Bigfoot全光谱细胞分选仪可配置多达9个激光器和60个检测器, 用于标准荧光检测和光谱数据解析 (表11, 图17)。

- **高速:** 分选速度 >70,000 个事件/秒 (eps), 分析速度 >100,000 eps
- **灵活分选:** 可6路分选到试管、4路分选到96孔板、8路分选到384孔板或直接分选到1536孔板, 并提供多种上样选项和温控装置, 并可灵活地应用到所有分选实验中
- **精准光谱解析:** 基于流式分选应用定制开发的程序化硬件系统和逻辑算法, 可出色地完成流式分选的挑战; 在 >70,000 eps 的高速分选的同时实时进行补偿设置或光谱解析
- **安全:** 定制化设计的集成式II类生物安全柜可保证操作人员和样品的安全, 且占地面积小
- **操作方便—**自动化软件采用直观的界面和实验向导, 可进行快速启动、自动校准、自动质控和快速关机; 通过远程访问功能, 实现在您到实验室之前启动仪器; 系统状态信息报告和电子邮件通知可帮助您节约时间并简化实验流程



表11. Bigfoot全光谱超高速流式细胞分选仪参数

指标	参数
激光器	349 nm, 405 nm, 445 nm, 488 nm, 532 nm, 561 nm, 594 nm, 640 nm, and 785 nm
光学功率	349 nm (100 mW)、405 nm (100 mW)、445 nm (200 mW)、488 nm (125 mW)、532 nm (100 mW)、561 nm (100 mW)、594 nm (100 mW)、640 nm (100 mW) 和785 nm (100 mW), 空间立体激发
光束校准	固定光束, 7个空间独立的小孔
检测器参数	55个荧光通道+5个散射光通道
散射光参数	标准FSC和SSC (488 nm); 小颗粒FSC (405 nm); 偏振光FSC和SSC (488 nm)
散射光分辨率	小颗粒检测器背景下, 散射光分辨率 < 0.2 μm
脉冲测量	在样本上样分析时和分选后, 每个通道可同时检测颗粒的峰值、面积和宽度
荧光灵敏度	FITC、PE、APC均 < 100 MESF

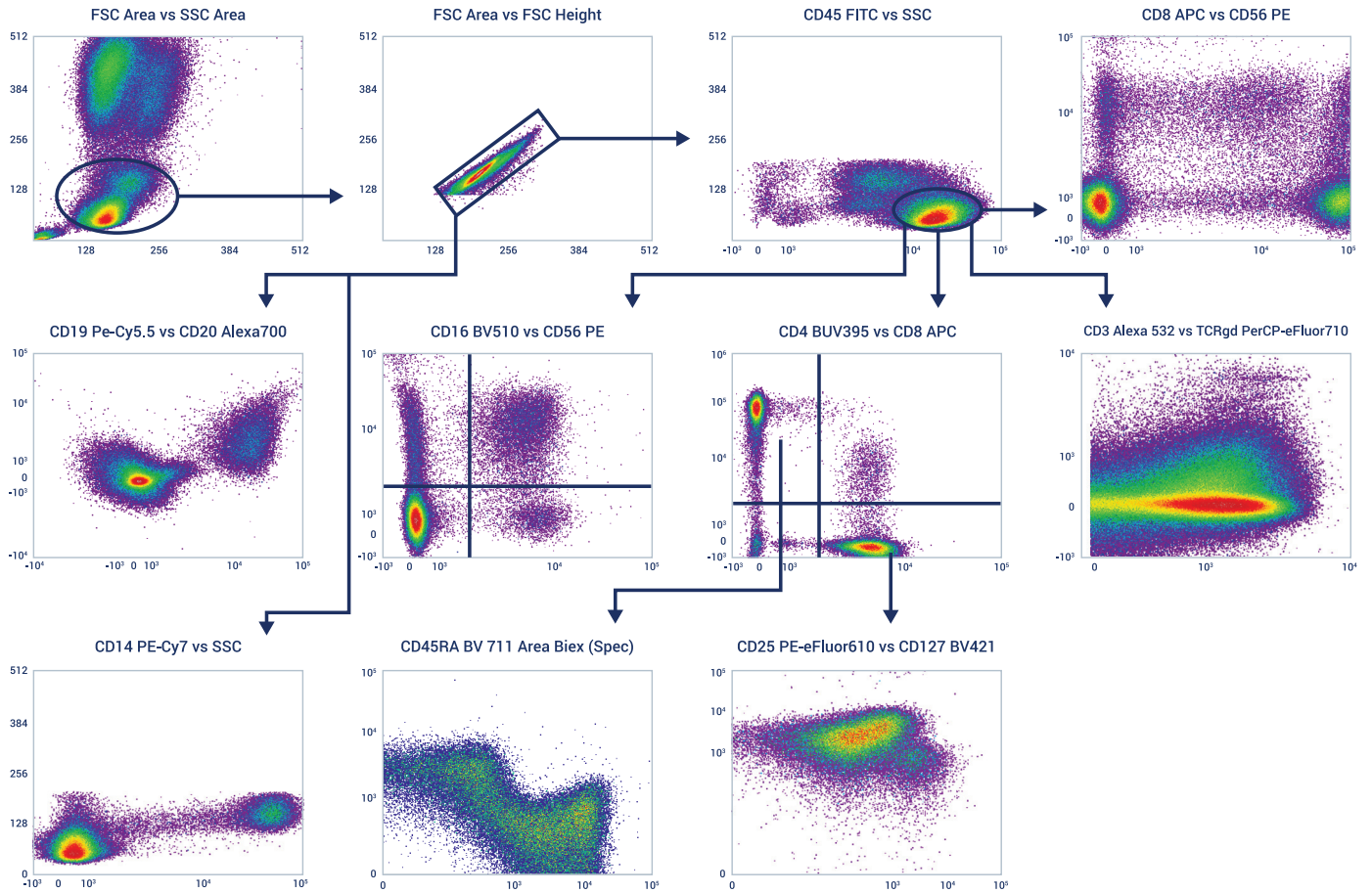


图17. 人外周全血样本免疫表型分析。以上数据是在9激光Bigfoot全光谱流式细胞分选仪上完成的多色实验方案，主要分析正常人裂解全血样本中的T细胞亚群。所用抗体包括CD45 FITC、CD3 Alexa Fluor™ 532、CD4 BUV395、CD8 APC、CD16 BV510、CD56 PE、CD19 PE-Cy5.5®、CD20 Alexa Fluor™ 700、CD25 PE-eFluor™ 610、CD127 BV421、TCRgd PerCP-eFluor™ 710、CD14 PE-Cy7®和CD45RA BV711。在全光谱特征解析后，实验结果由双指数轴显示分析。

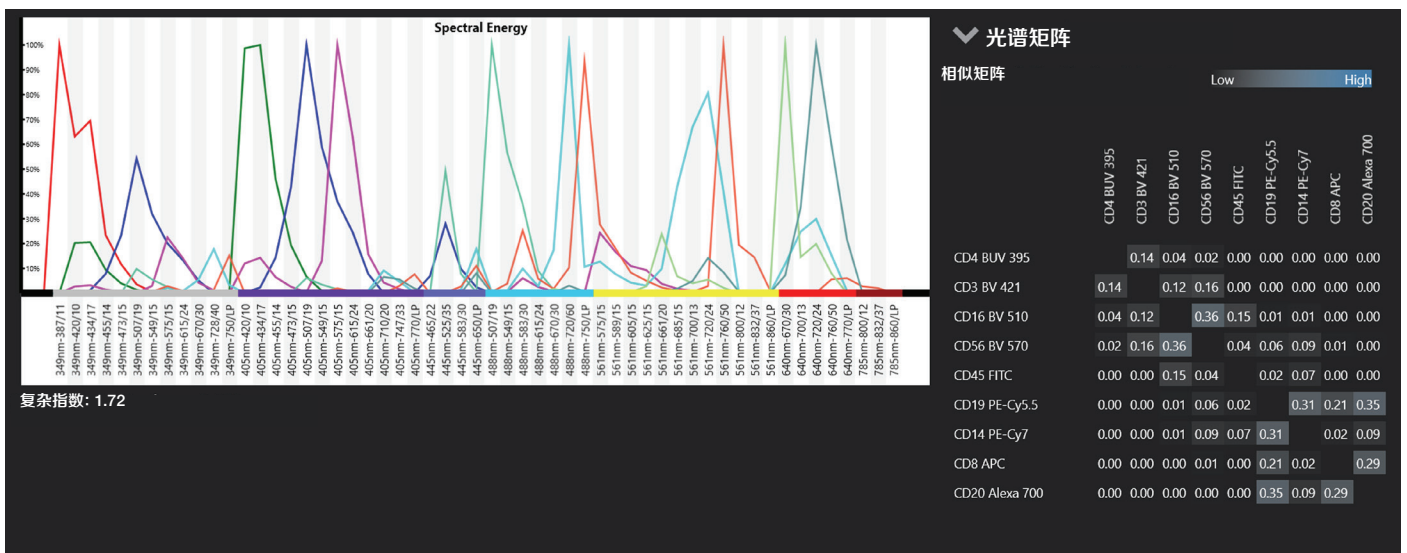


图18. 上述实验方案中所有荧光染料的光谱特征图。在Sasquatch软件中，能直观地看到本次实验方案中所选荧光染料的光谱图。该光谱图清楚地显示了哪里可添加荧光染料，且不与当前所选的荧光染料有光谱重叠。在“Selected Fluorescent List”（已选的荧光染料列表）中选中某个荧光染料，在光谱图中可突出显示其发射光谱曲线。

查看Bigfoot全光谱流式细胞分选仪相关信息，请访问 thermofisher.cn/bigfoot

超多色流式实验方案: 流式仪器和试剂

全光谱流式细胞仪打破硬件壁垒, 允许同一管中检测更多靶标, 实现了超多色流式实验方案。使用全光谱流式细胞仪、高质量流式抗体和流式试剂, 去发现细胞上更多基因和蛋白表达, 去探索细胞亚群精细分群和检测功能。

全光谱流式实验方案的优势包括:

- 在一管中, 同时使用更多流式抗体和功能染料, 从而节省样本用量, 尤其是珍贵样本
- 更广阔的、更深入地鉴定免疫细胞表型, 从而发现稀有细胞亚群
- 利用卓越的全光谱流式细胞仪, 轻松设计一管20+色免疫分型实验方案

设计超多色实验方案的流式配色工具

在设计15色以上流式实验方案时, 这对荧光染料的光谱特征和发射光谱提出很高要求; Invitrogen™ Panel Builder 流式配色工具结合光谱流式特征和流式配色原理, 直观呈现光谱重合和荧光溢漏, 5步选择设备、抗原、荧光、产品到总结, 成为您设计30色50色配色方案的最佳帮手!

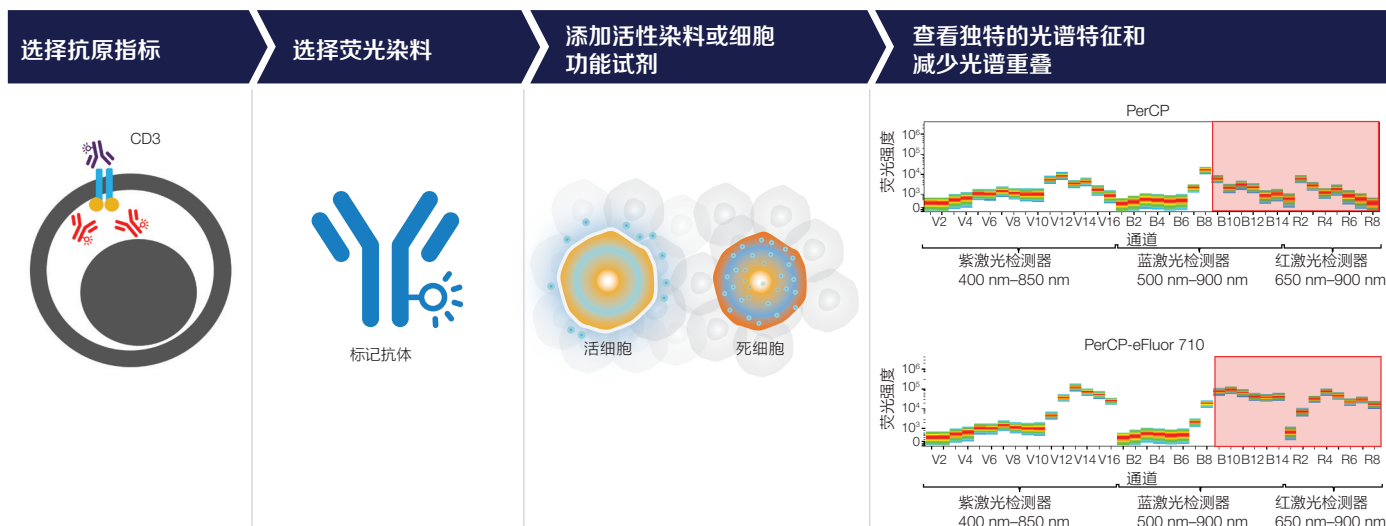


图19. Invitrogen™ Panel Builder 光谱流式配色工具。在Panel Builder的第3步, 利用相似指数和复杂指数, 选择独特光谱特征的荧光染料。

开始使用在线流式配色工具, 请访问 thermofisher.cn/order/panel-builder

流式应用亮点——利用光谱流式进行免疫表型分析

- 流式配色原理同样适用
- 60+种Invitrogen™ 荧光染料中有很多光谱特征独特的流式染料, 如 NovaFluor染料、Alexa Fluor 561染料和Alexa Fluor 660染料, 满足光谱流式在内的所有流式细胞仪的配色需求
- 很多流式染料和功能试剂在传统流式细胞仪上不能同时使用, 如PerCP和PerCP-eFluor 710, 但全光谱流式允许它们同时使用, 实现超多色流式实验方案
- 推荐将Alexa Fluor 532、Pacific Orange、eFluor 450和Super Bright 436添加到您的流式实验方案中
- 在全光谱流式配色时, 不建议将多个抗原靶标共用同一染料 (Dumpchannels), 因为仪器能够精准鉴定流式抗体上细微的光谱特征变化



服务与支持

仪器售后服务计划和保修服务

在购买仪器时可选择扩大仪器售后服务计划的覆盖范围。这些服务计划将延长仪器的正常使用时间, 降低总体维修成本, 得到经过认证的现场服务工程师 (FSE) 快速响应, 还可延长仪器使用寿命, 并保持其最佳性能。您可根据, 预算水平、工作量、仪器正常运行时间和监管要求, 选择合适的售后服务项目。服务计划涵盖了从最基本的维修, 扩展到高级技术支持和合规性服务等优质服务。

流式实验技术支持

赛默飞技术科学家和应用科学家团队不仅帮助您选择合适的抗体和完成流式配色方案, 还可以解决实验困难和解答产品性能相关问题。我们可以通过电话或邮件远程协助您完成复杂的流式配色实验 (>30色)。该服务适用于全球范围。

“在我们的支持团队中, 很多科学家有着丰富的经验, 平均拥有14年的科研经历。我们不仅以技术为导向, 而且特别重视客户的成就和满意度, 这也是我们衡量是否成功的标准。”

-Ricky Williams, 赛默飞世尔科技有限公司

全球商业服务和支持团队

订购信息

产品	货号
细胞刺激试剂	
细胞刺激混合物 (含有/不含蛋白转运抑制剂)	00-4970/ 00-4975
刀豆球蛋白A (Con A) 溶液 (500×)	00-4978
脂多糖 (LPS) 溶液 (500×)	00-4976
功能级抗人CD3纯化抗体 (克隆号OKT3)	16-0037
功能级抗人CD28纯化抗体 (克隆号CD28.2)	16-0289
巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF)	PHC9504
流式抗体	
eBioscience流式抗体	thermofisher.cn/flowantibodies
固定破膜剂	
eBioscience流式染色缓冲液	00-4222-57
FIX & PERM固定破膜剂试剂盒	GAS003
eBioscience细胞内固定破膜剂套装	88-8824-00
eBioscience Foxp3/转录因子固定破膜剂套装	00-5523-00
活性染料	
LIVE/DEAD Fixable Blue (450) 细胞活性试剂盒, UV激发	L34961
LIVE/DEAD Fixable Violet (451) 细胞活性试剂盒, 405 nm激发	L34963
LIVE/DEAD Fixable Lime (506) 细胞活性试剂盒, 405 nm激发	L34989
LIVE/DEAD Fixable Aqua (526) 细胞活性试剂盒, 405 nm激发	L34965
LIVE/DEAD Fixable Yellow (575) 细胞活性试剂盒, 405 nm激发	L34967
LIVE/DEAD Fixable Green (520) 细胞活性试剂盒, 488 nm激发	L34969
LIVE/DEAD Fixable Olive (557) 细胞活性试剂盒, 488 nm激发	L34977
LIVE/DEAD Fixable Orange (602) 细胞活性试剂盒, 561 nm激发	L34983
LIVE/DEAD Fixable Red (615) 细胞活性试剂盒, 488或561 nm激发	L34971
LIVE/DEAD Fixable Far Red (665) 细胞活性试剂盒, 633 nm激发	L34973
LIVE/DEAD Fixable Scarlet (723) 细胞活性试剂盒, 633 nm激发	L34986
LIVE/DEAD Fixable Near IR (775) 细胞活性试剂盒, 633 nm激发	L34975
LIVE/DEAD Fixable Near IR (780) 细胞活性试剂盒, 633 nm激发	L34992
LIVE/DEAD Fixable Near IR (876) 细胞活性试剂盒, 808 nm激发	L34980
微球对照品	
UltraComp eBeads补偿微球	01-2222-41
UltraComp eBeads Plus补偿微球	01-3333-42
AbC总抗体补偿微球试剂盒	A10497
ArC胺反应补偿微球试剂盒	A10346
GFP BrightComp eBeads补偿微球	A10514
CountBright Plus绝对计数微球	C36995
AccuCheck计数微球	PCB100
AccuCheck ERF参考颗粒	A55950
LIVE/DEAD BacLight细菌活性及计数试剂盒	L34856
流式细胞仪	
Attune NxT 流式细胞仪	thermofisher.cn/attune
Attune CytPix 成像型流式细胞仪	thermofisher.cn/cytpix
Bigfoot 全光谱超高速流式细胞分选仪	thermofisher.cn/bigfoot
CytKick 自动进样器	A42901
CytKick Max自动进样器	A42973

查看更多流式产品与流式资源, 请访问 thermofisher.cn/flow



赛默飞
官方微信



赛默飞
生命科学小助手

免费服务电话: 800 820 8982/400 820 8982

信息咨询邮箱: cnbidmarketing@thermofisher.com

www.thermofisher.cn

ThermoFisher
SCIENTIFIC

仅供研究使用。不可应用于诊断程序。不得转售。© 2019, 2021 Thermo Fisher Scientific Inc.保留所有权利。除非另有说明, 所有商标均为Thermo Fisher Scientific及其子公司所有。Cy是Cytiva的注册商标。Cytek、Aurora和SpectroFlo是Cytek Biosciences的商标。DRAQ7是BioStatus Limited的商标。Excel是Microsoft Corp的商标。Super Bright Polymer染料在Becton, Dickinson and Company的许可下销售。COL34460 1121