



创新声波聚焦流式细胞技术及特色应用

Attune[®] NxT Flow Cytometer

Life Technologies Attune Business: 郭陈智

2015-4-28 海口

2014年1月，ThermoFisher以136亿美元并购Life Technologies

ThermoFisher 公司四大业务集团

加速生命科学研究，解决复杂分析难题，改善疾病诊断，提升实验室效率。通过四大著名品牌的强强联合，我们提供无与伦比的创新技术，产品购买的方便性和综合性用户支持。



technologies

...includes the most cited brands in the industry.

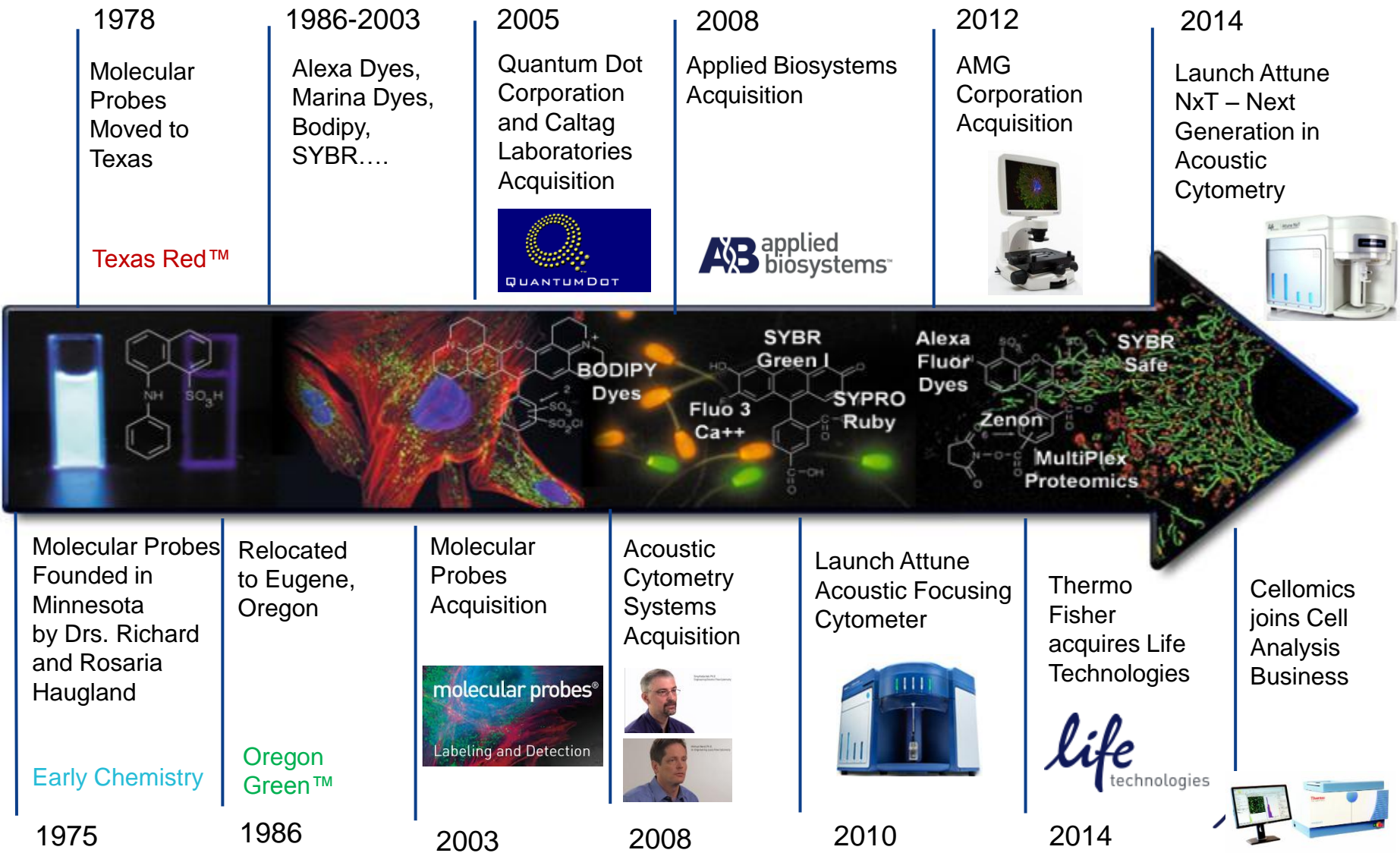


- ✓ **Invitrogen** : DNA consumables, most cited
- ✓ **Applied Biosystems®** : High quality instruments
- ✓ **GIBCO®** : Cell culture consumables, most cited
- ✓ **TaqMan®** : Real-time PCR assays
- ✓ **Novex®** : Protein separation and blotting
- ✓ **Molecular Probes®** : Fluorescent & imaging
- ✓ **Ambion®** : RNA consumables, most cited
- ✓ **Ion Torrent™** : Semi conductor sequencing

Over 600,000
citations across the
product portfolio

life
technologies

History Line: Cell Analysis Business Unit



1978

Molecular Probes Moved to Texas

Texas Red™

1986-2003

Alexa Dyes, Marina Dyes, Bodipy, SYBR....

Relocated to Eugene, Oregon

Oregon Green™

2005

Quantum Dot Corporation and Caltag Laboratories Acquisition



Molecular Probes Acquisition



2008

Applied Biosystems Acquisition



Acoustic Cytometry Systems Acquisition

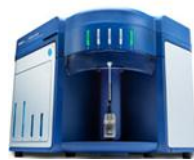


2012

AMG Corporation Acquisition

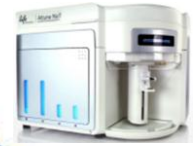


Launch Attune Acoustic Focusing Cytometer



2014

Launch Attune NxT – Next Generation in Acoustic Cytometry



Thermo Fisher acquires Life Technologies



Cellomics joins Cell Analysis Business



1975

Molecular Probes Founded in Minnesota by Drs. Richard and Rosaria Haugland

Early Chemistry

1986

2003

2008

2010

2014

2010年6月上市：Attune™ 声波聚焦流式细胞分析仪

- 获2010年生命科学十大创新产品奖，全球销售超过500台；
- BBC新闻：Google X实验室正在使用第一代Attune® 声波聚焦流式细胞仪做癌症领域研究。



<http://www.bbc.com/news/technology-29802581>

life
technologies

2014年9月：第二代Attune™ NxT声波聚焦流式细胞仪

- 保留了声波聚焦技术，液流系统、光学系统、软件系统全面升级；
- 第二代Attune™ NxT声波聚焦流式细胞仪亮相全国免疫大会。



主要内容：

- **流式细胞术基本原理**
- **Attune NxT声波聚焦流式细胞仪特色介绍**
- **声波聚焦流式技术与稀有细胞分析**

一、流式细胞术基本原理

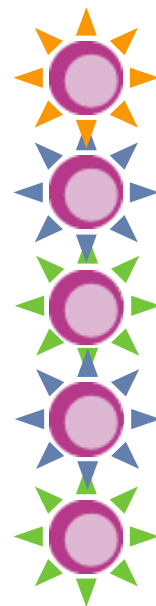
- **流式细胞术 (Flow CytoMetry , FCM)** :
 - 细胞在**流动**的过程中检测细胞的各项指标。
- **荧光素偶联抗体，让细胞特异性的带上荧光** :
 - 通过收集的光信号间接的反应各项指标的含量。



流式抗体标记



单细胞悬液



单细胞流

- **流式细胞仪的原理和结构：**

- **液流系统**

- 流动室
- 液流驱动系统

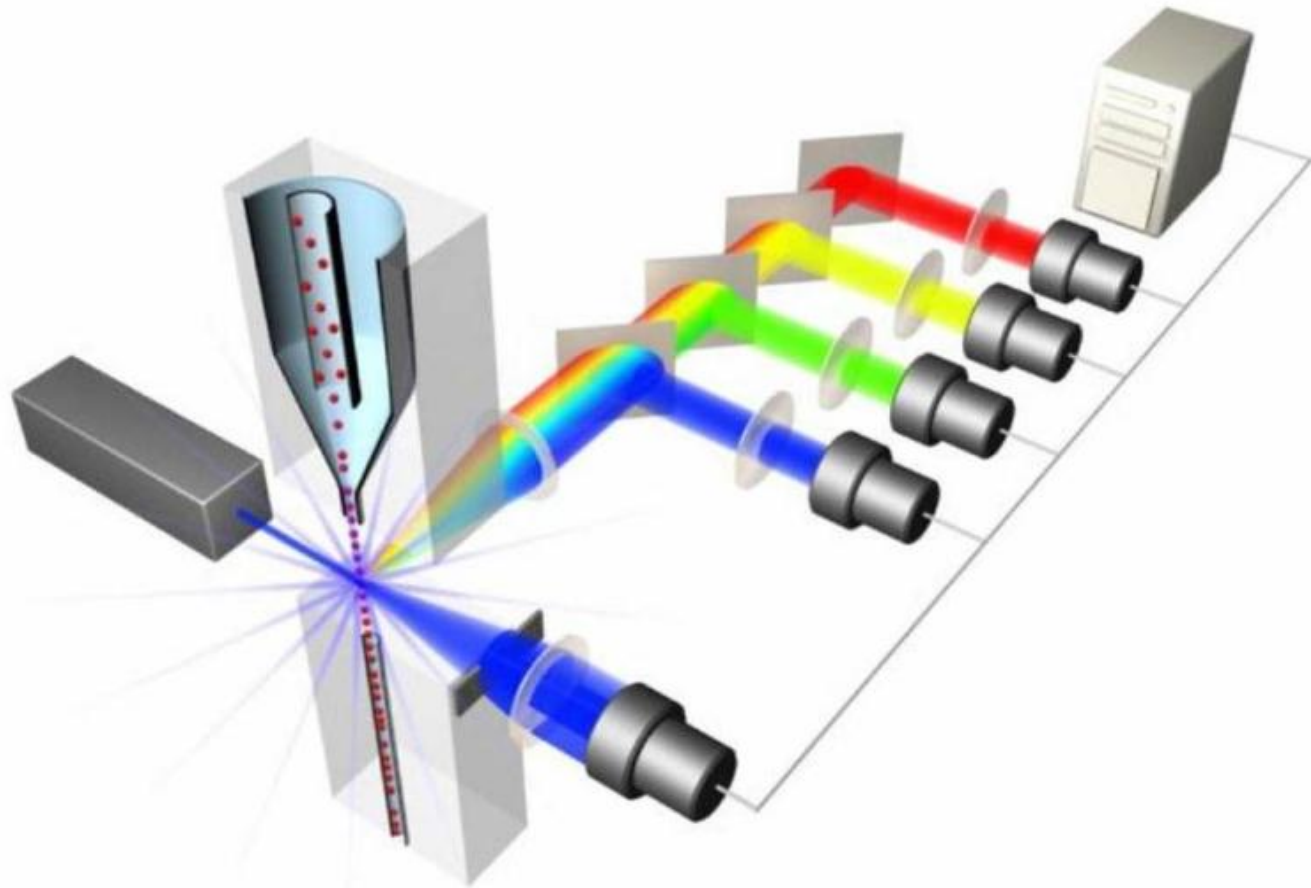
- **光学系统**

- 激发光源
- 光束收集系统

- **电子系统**

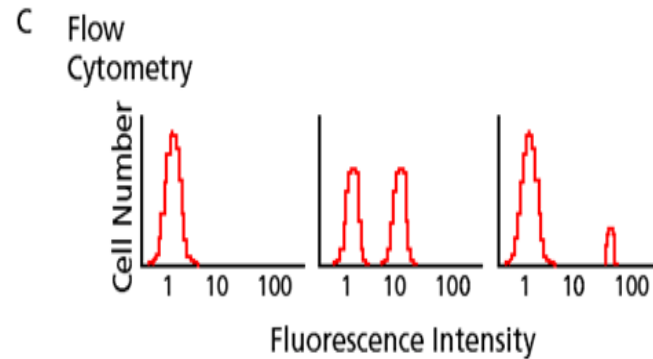
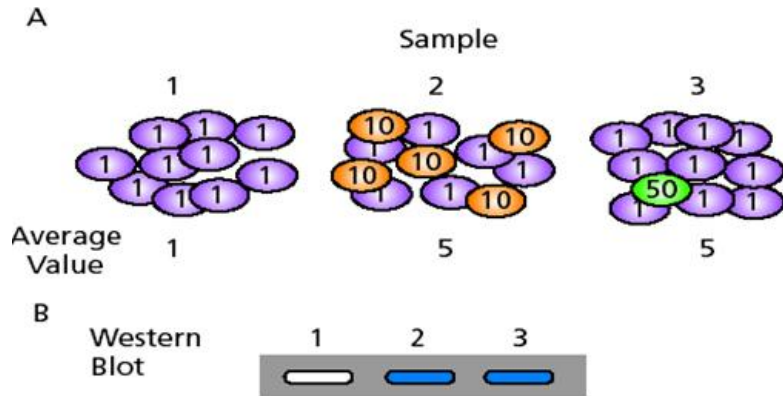
- 光电转换器
- 数据处理系统

- **细胞分选系统**



为什么选择流式细胞术？

- 检测对象：单细胞悬液或生物颗粒(细菌和血小板等) (0.5-50 μm) ；
- 多参数特性：一个样本检测多项指标 (最高14色) ；
- 单细胞水平分析优越性；
- 检测速度快，上万个细胞/秒，结果准确性好 (35000 events/s) ；
- 可对目标细胞进行分选。

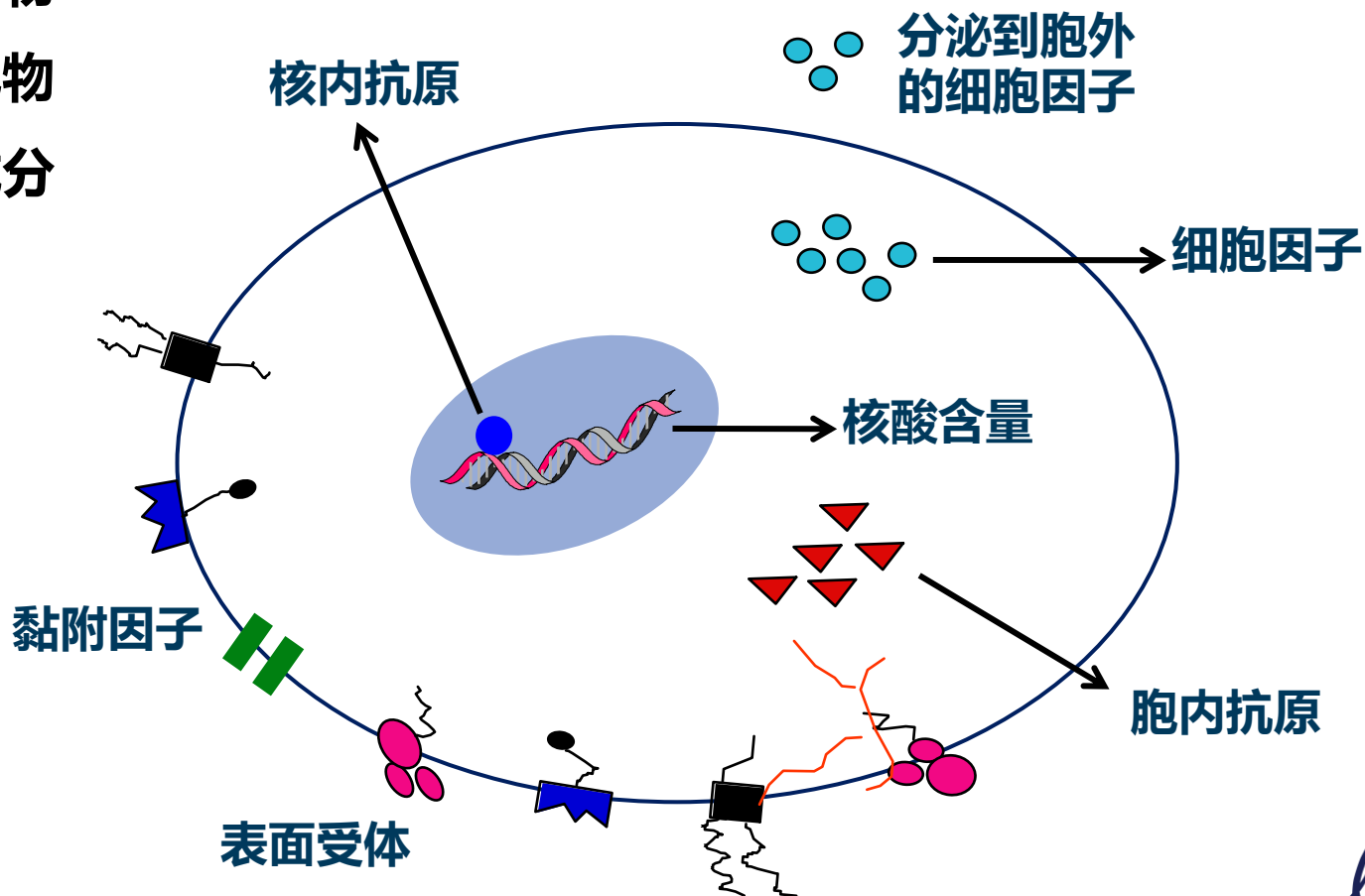


流式细胞仪分类

- **分析型流式细胞仪(Analyzer)**
 - 细胞样本分析后最终进入废液桶，不能回收利用。
- **分选型流式细胞仪(Sorter)**
 - 既能流式分析，还能对分析的目的细胞进行分选；
- **买一台流式分选仪既可以做检测，需要时也能分选细胞？**
 - 绝大部分流式实验为流式分析实验；
 - 分选仪操作更复杂，比较昂贵；
 - 进样管道较长，还需要保持无菌状态。

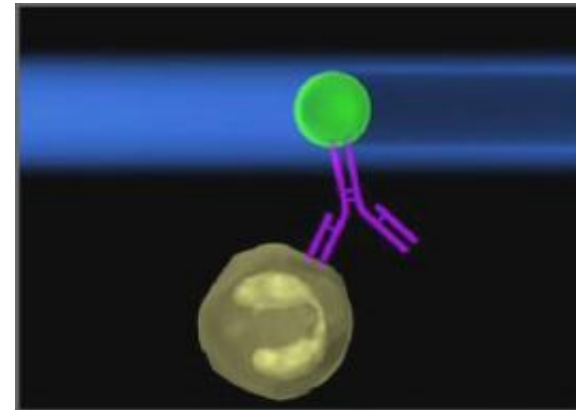
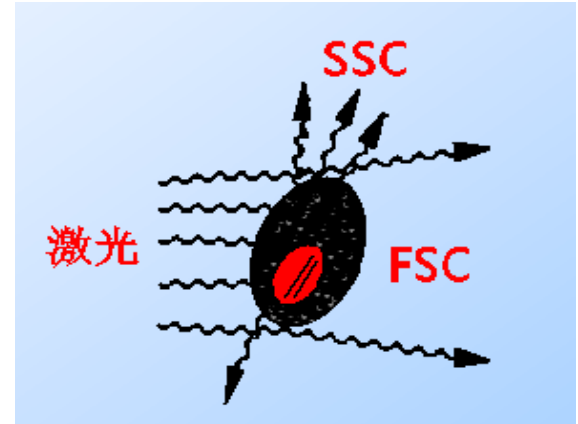
流式细胞术能干什么？

- 表面标记物(CD分子)
- 胞浆标记物
- 核内标记物
- 可溶性成分



流式光信号的类型：

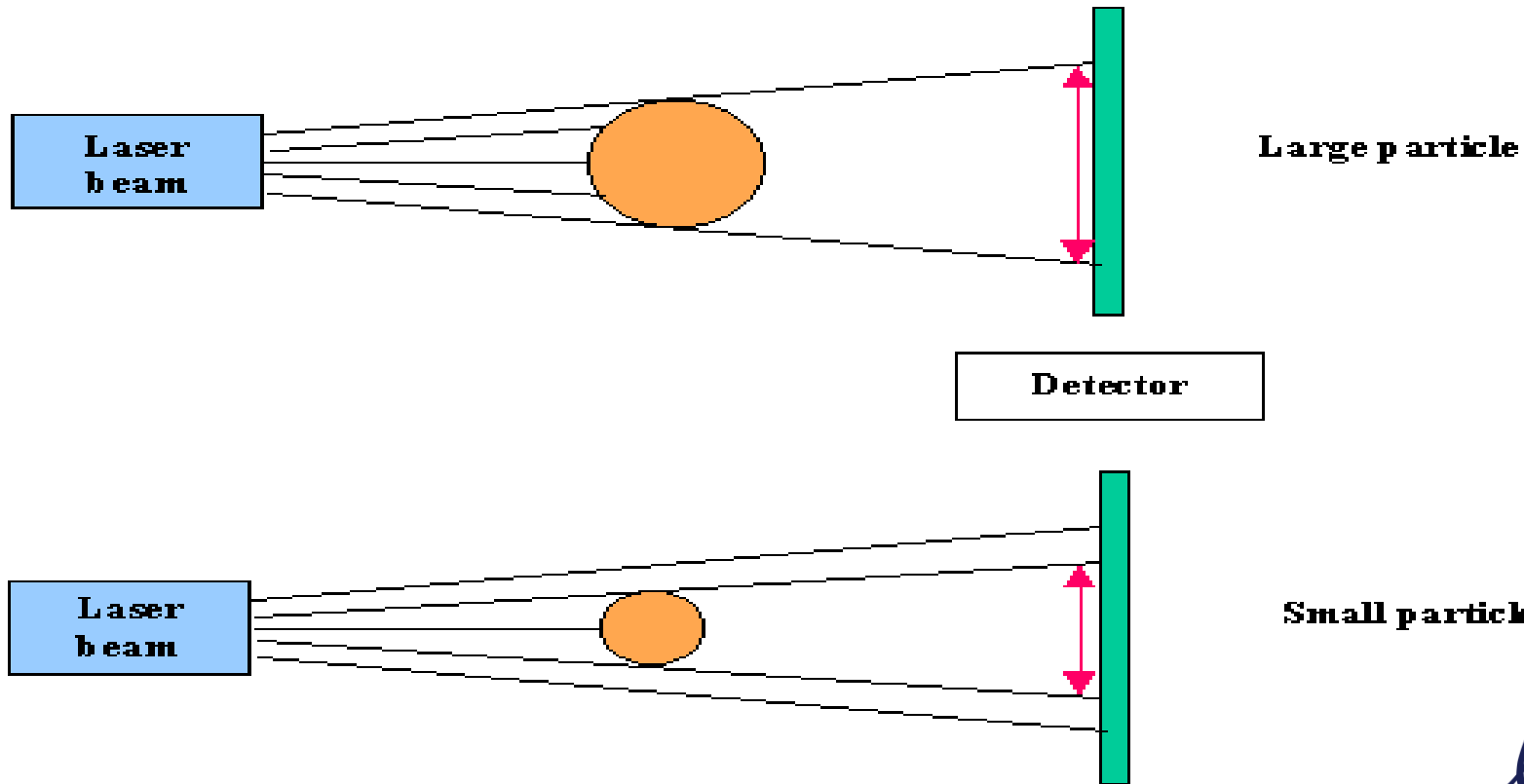
- **散射光信号**：与标记荧光素无关，
是细胞的固有参数。
 - 前向散射光(forward scatter, **FSC**)；
 - 侧向散射光(side scatter, **SSC**)。
 - 几乎所有的流式细胞都会检测FSC和SSC这两个散射光参数。
- **荧光信号**
 - 自发荧光：微弱（核黄素、色素分子等）；
 - 特异荧光：荧光素分子发出的的荧光比自发荧光强很多倍。



life
technologies

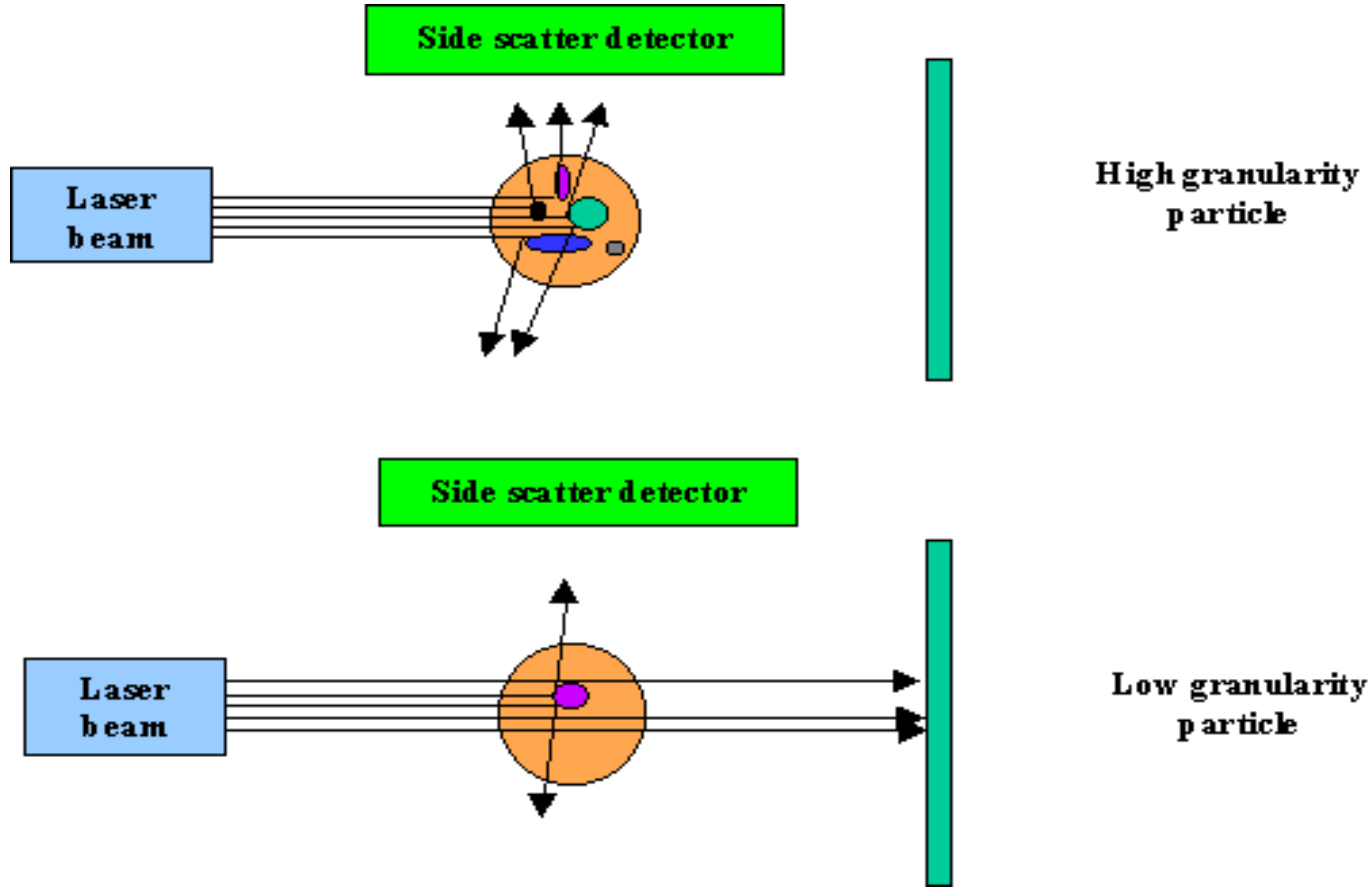
前向散射光FSC：

- 激光器正前方1 -6度方向上有比较强的衍射光，即前向散射光，FSC强度是 d/λ 的函数(λ 表示波长， d 指细胞大小)，所以FSC反映被测细胞的**体积大小和活力**。



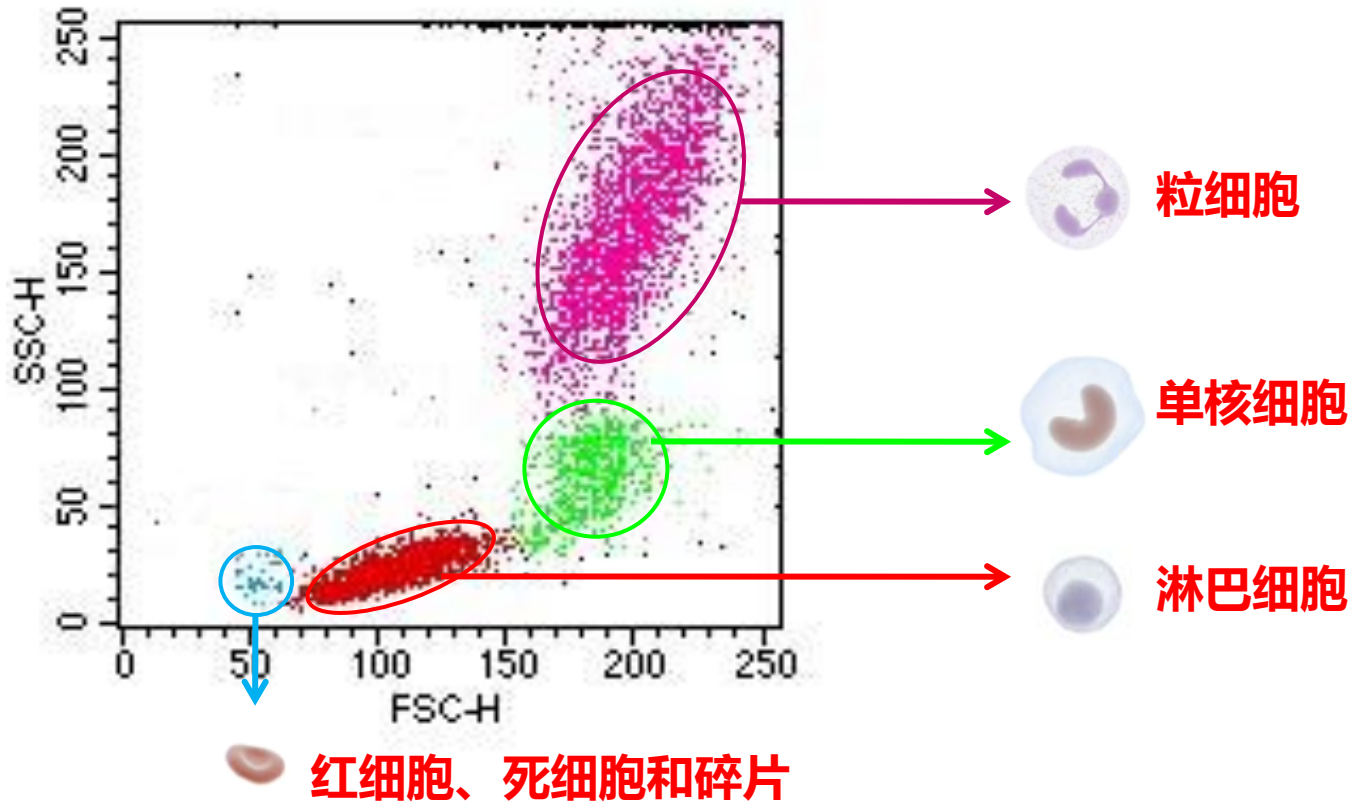
侧向散射光SSC :

- SSC方向与激光束和液流形成的平面相垂直，亦称90度散射光，其信号强度反映**细胞内部颗粒度和精细结构的变化**。



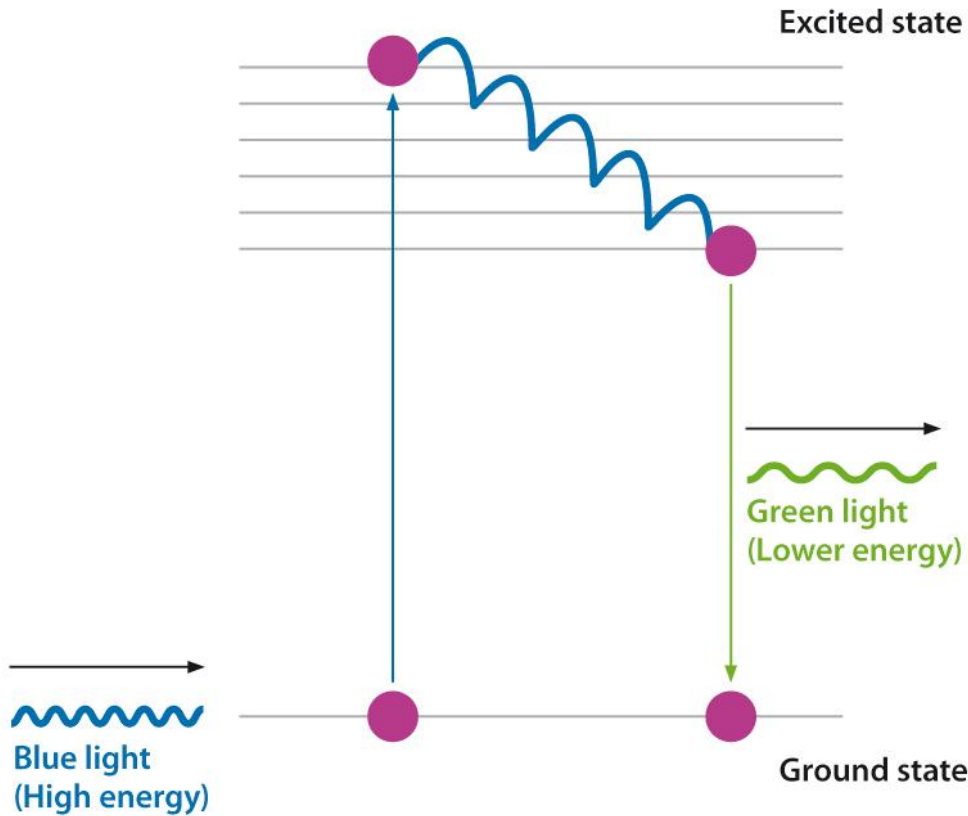
散射光的作用：

- 实验中，常利用FSC和SSC这两种参数的组合，区分不同的细胞群体，去除碎片、死细胞和粘连细胞的干扰。



荧光素和荧光信号：

- **荧光**：荧光素的电子吸收光的能量由低能态转变为高能态，再回到低能态时释放出的光。



激发波长
Excitation wavelength



发射波长(荧光波长)
Emission wavelength

常用荧光素：

<499nm：蓝色荧光（Blue）；
550-584nm：黄色荧光（Yellow）；
616-700nm：红色荧光（Red）；
500-549nm：绿色荧光（Green）；
585-615nm：橙色荧光（Orange）；
≥700nm：远红外荧光（Far-Red）。

标记抗体的荧光素

| 荧光素分子 | 激发光波长 (nm) | 发射光波长 (nm) | 中文名 |
|------------------------|----------------|---------------|-----------|
| FITC | 490 | 520 | 异硫氰酸荧光素 |
| PE | 488 | 575 | 藻红蛋白 |
| PerCP | 490 | 675 | 多甲藻叶绿素蛋白 |
| APC | 650 | 660 | 别藻青蛋白 |
| PE-Cy5 | 496/546 | 670 | 藻红蛋白-花青素5 |
| PE-Cy7 | 496/546 | 767 | 藻红蛋白-花青素7 |
| Alexa Flour 488 | 495 | 519 | |
| Alexa Flour 647 | 650 | 665 | |

life
technologies

(一) 液流系统：传统的流体动力学聚焦，形成单细胞流

细胞在激光检测光斑中的位置对于结果的准确性至关重要

低进样速率 Low

(e.g. 12.5 $\mu\text{L}/\text{min}$)

高进样速率 High

(e.g. 100 $\mu\text{L}/\text{min}$)

流体动力学轴流层

激光通过的
样品液切面

激光通过的
样品液切面

鞘液流

鞘液流

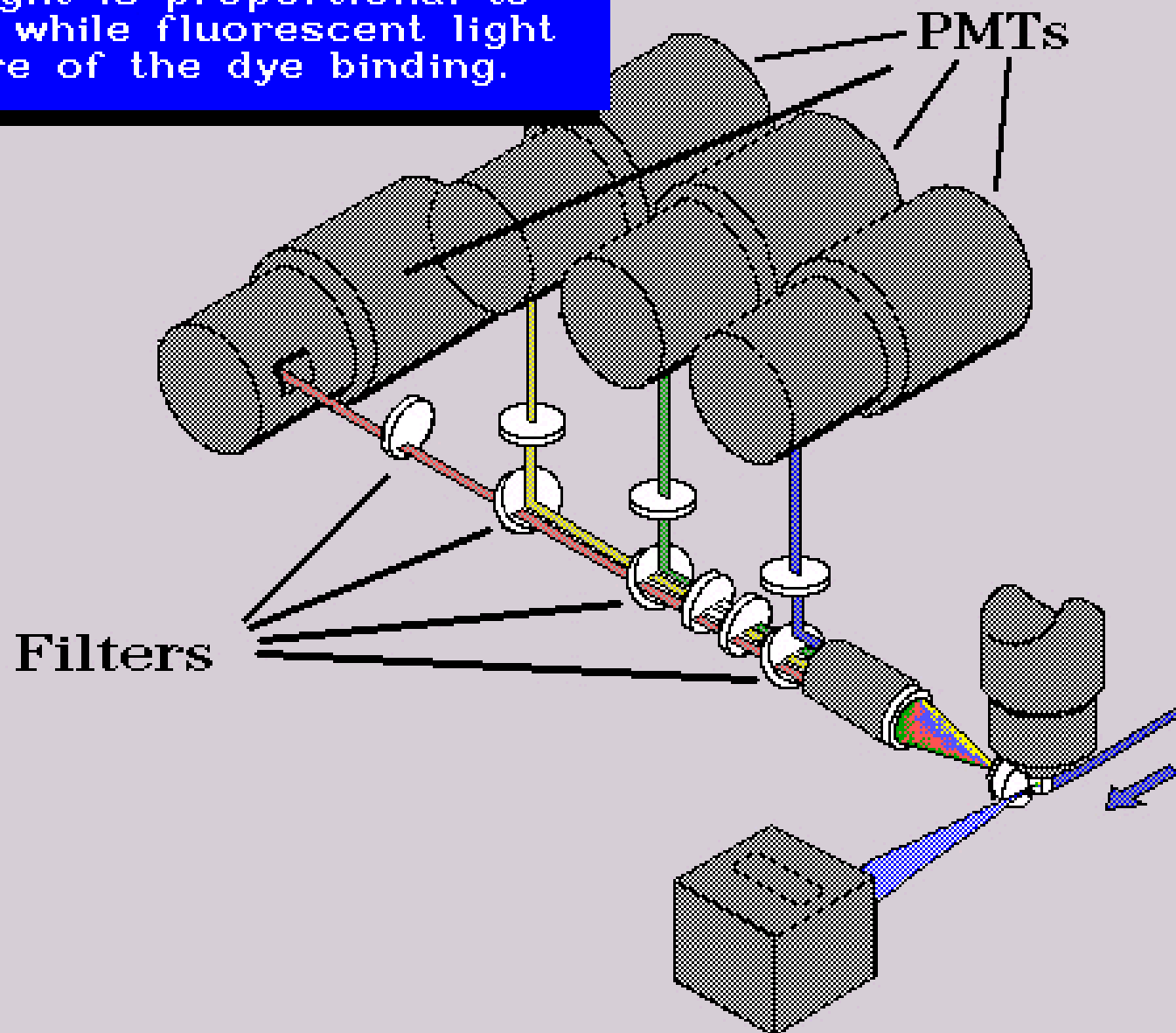
鞘液流

鞘液流

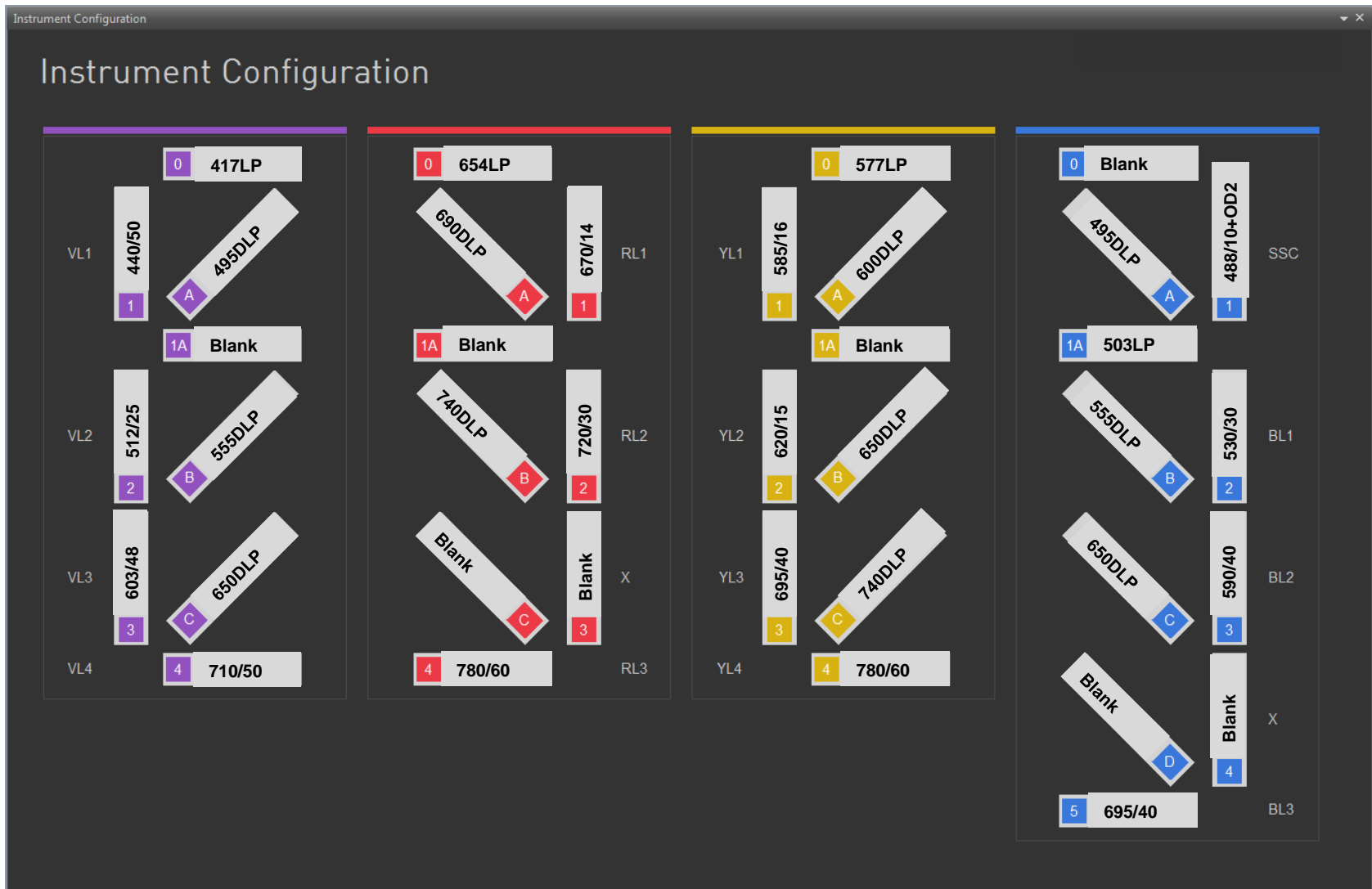
(二) 光学系统

- **目的**：提供光源，收集荧光和散射光信号。
- **1. 激发光源**：
 - 弧光灯；
 - 气体激光器、染料激光器；
 - 固体/半导体激光器：体积小，价格低，使用寿命长。
- **2. 光收集系统：滤光片**
 - 长通long pass(LP)、短通short pass(SP)、带通band pass(BP)
- **现在仪器常配有2-4根激光器，波长多为488nm、640nm、561nm、405nm和355nm UV。**

The multicolored light is separated using filters, then directed to the photomultiplier tubes (PMT) for sensing. The intensity of the blue scattered light is proportional to granularity, while fluorescent light is a measure of the dye binding.



Optical Configuration



流式细胞术科研应用（主要免疫和干细胞领域）

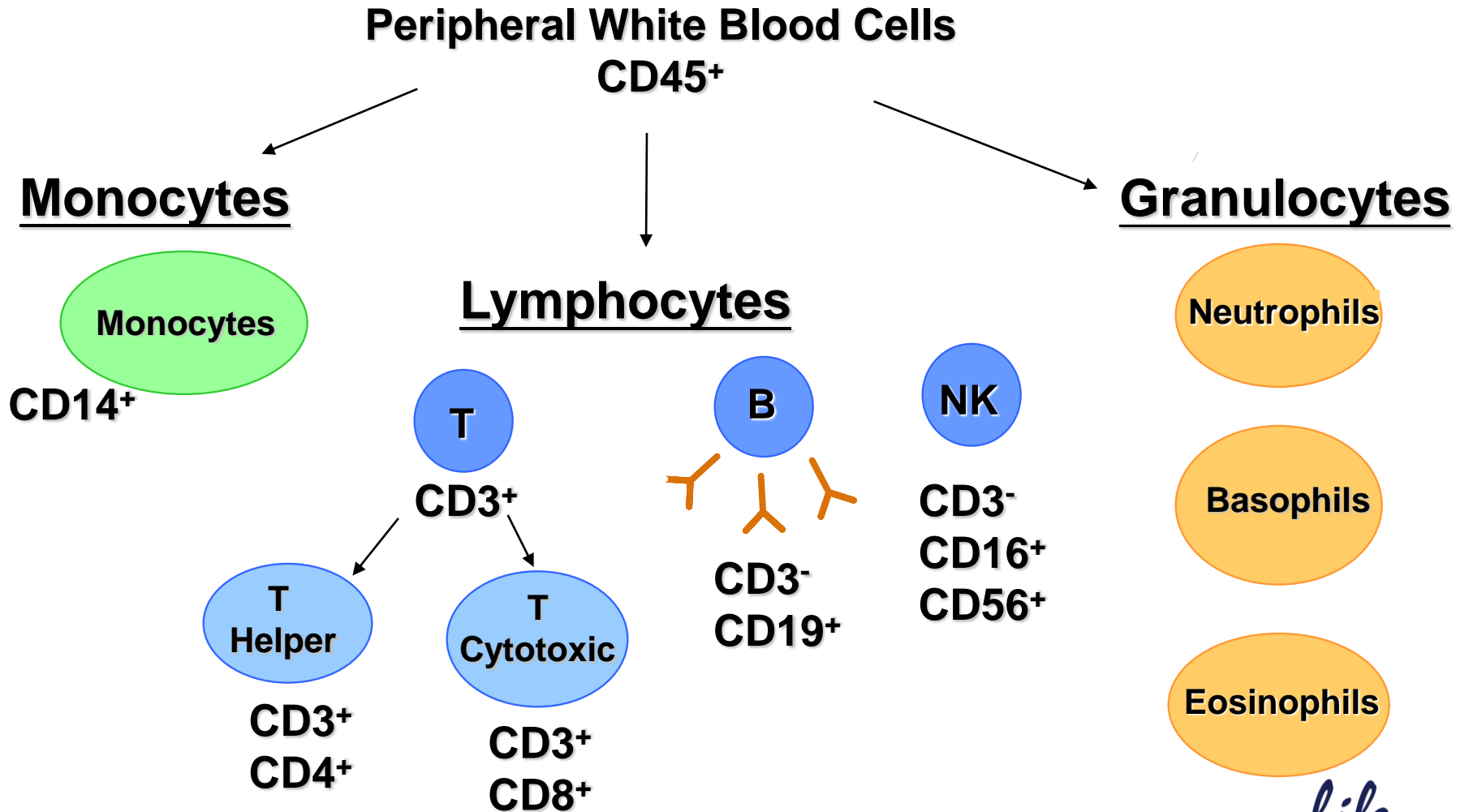
- 表面抗原 如：各种荧光标记的抗体；
- 细胞周期 如：PI/AO；
- 脂质检测 如：Nile Red；
- 胞内抗原 如：胞内因子，转录因子；
- 细胞活性 如：PI/7AAD；
- 细胞凋亡 如：Annexin V；
- DNA合成 如：BudU掺入染色；
- 细胞增殖 如：CFSE；
- 酶的活性 如：aldefluor；
- 细胞计数

•

流式细胞术临床应用（主要血液科、检验科、细胞治疗）

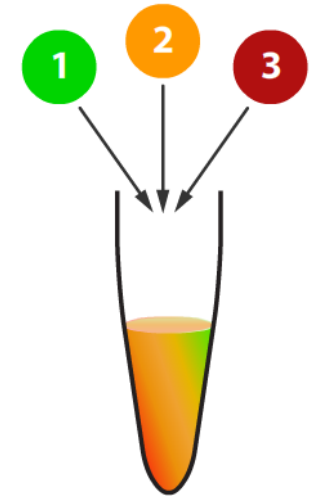
- 淋巴细胞亚群分析(CD3/CD4/CD8/CD19/CD16+56);
- 白血病免疫分型；
- 白血病微小残留病灶MRD检测；
- 多发性骨髓瘤MM检测；
- 骨髓增生异常综合征MDS检测；
- 血红蛋白尿PNH检测；
- 造血干细胞移植CD34干细胞检测；
- 强直性脊柱炎HLA-B27检测；
-

应用举例一：淋巴细胞亚群分析（表面标记Marker）



Three Color Experiment

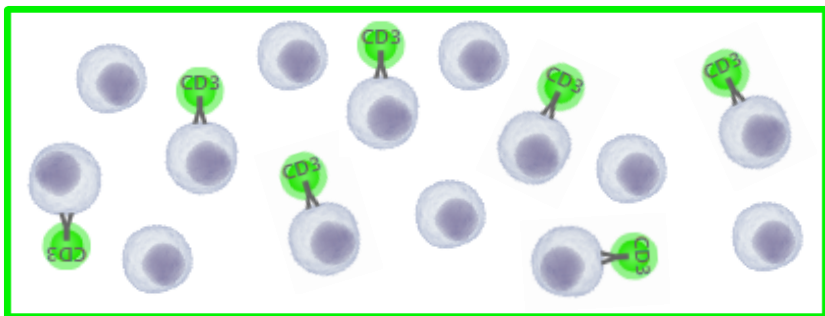
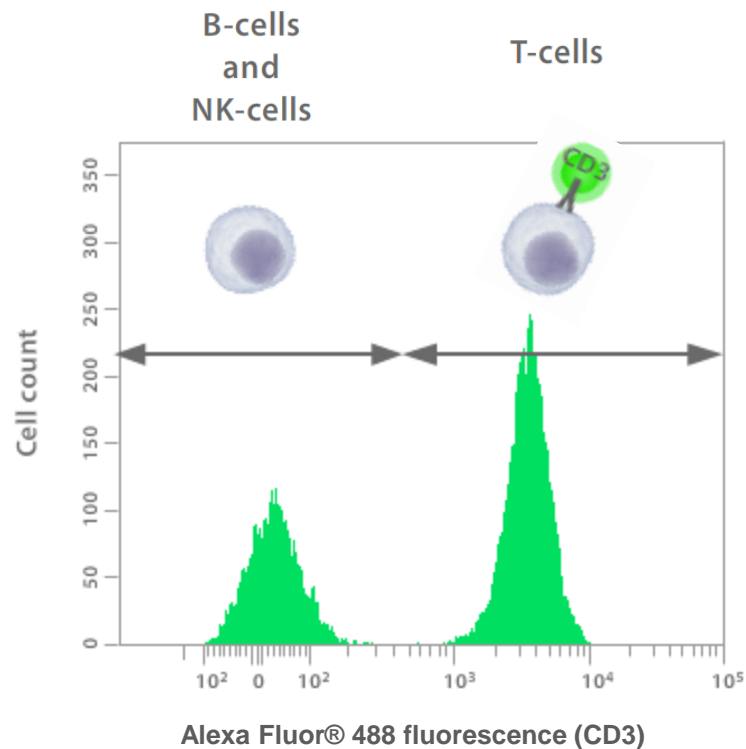
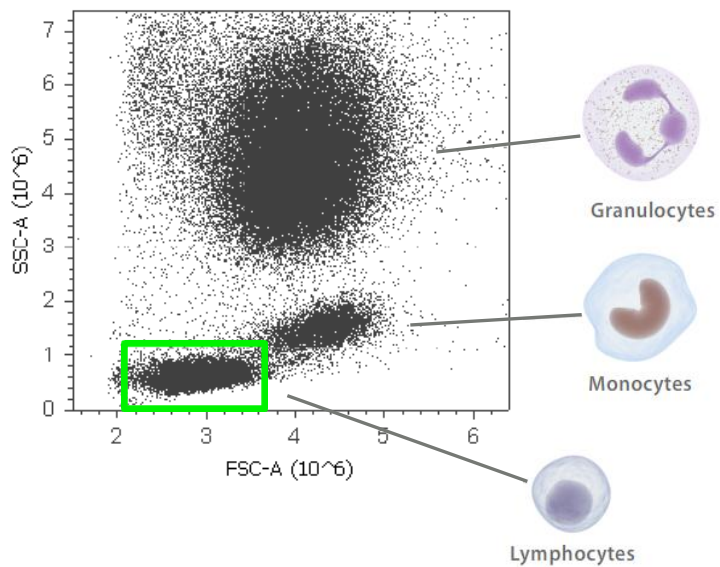
Sample: PBMCs from Human Blood
Measure: % T-lymphocytes CD4+
 % T-lymphocytes CD8+



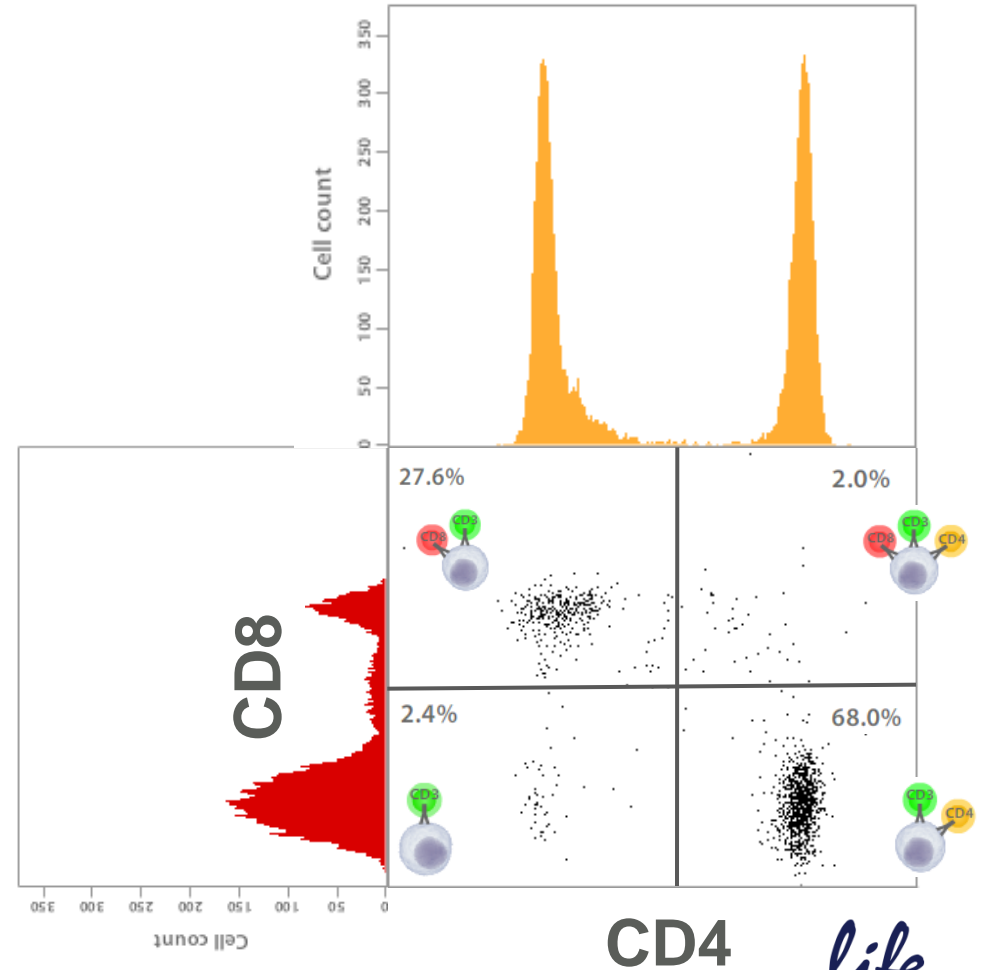
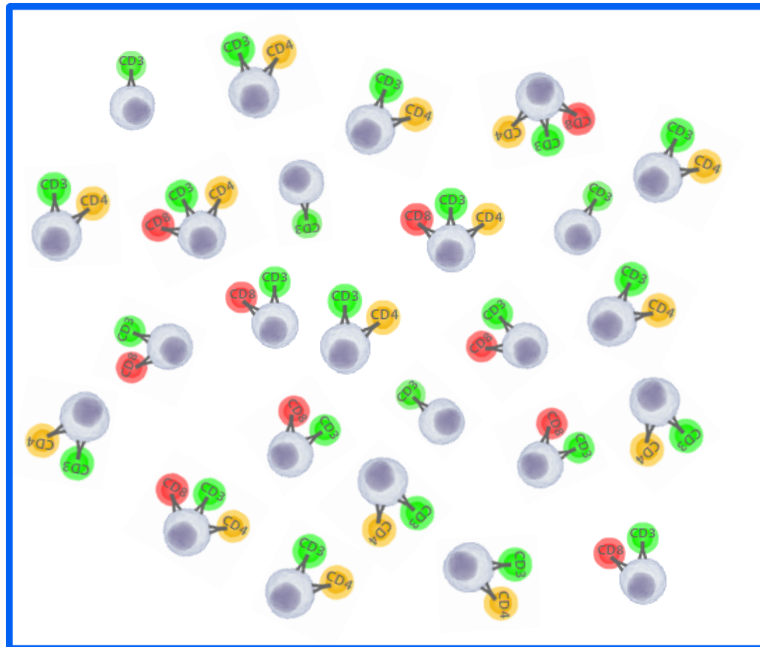
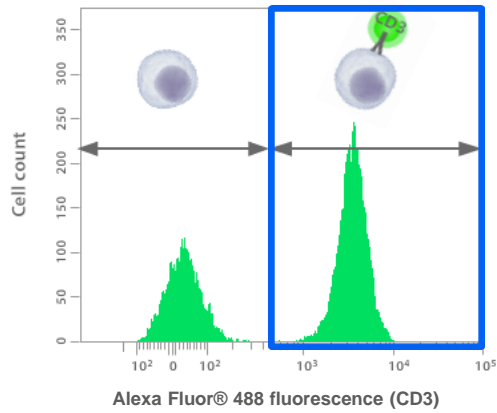
| | Antibody | Fluorescent Probe |
|---|-----------------|-------------------------------------|
| 1 | Anti-CD3 | Alexa Fluor® 488 |
| 2 | Anti-CD4 | R-PE |
| 3 | Anti-CD8 | R-PE Alexa Fluor® 700 dye tandem |

→ T-lymphocytes specific

Three Color Experiment – Data representation



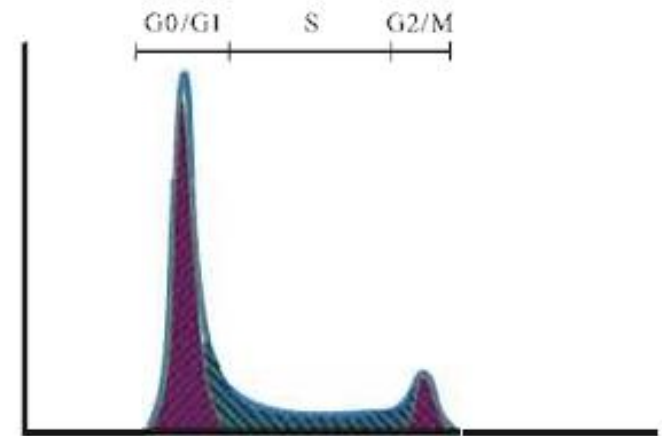
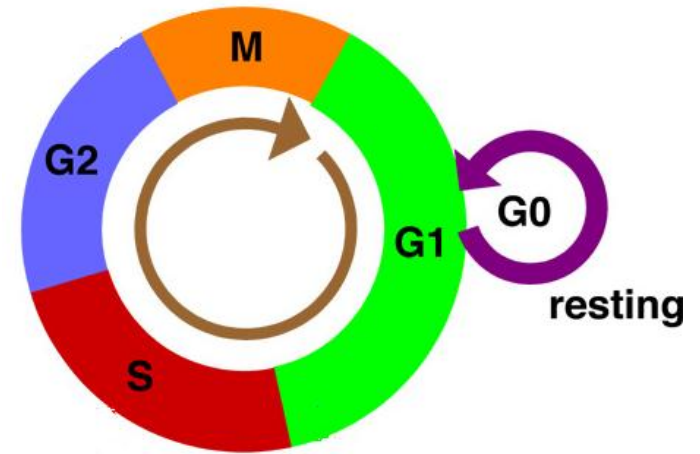
Three Color Experiment – Data representation



life
technologies

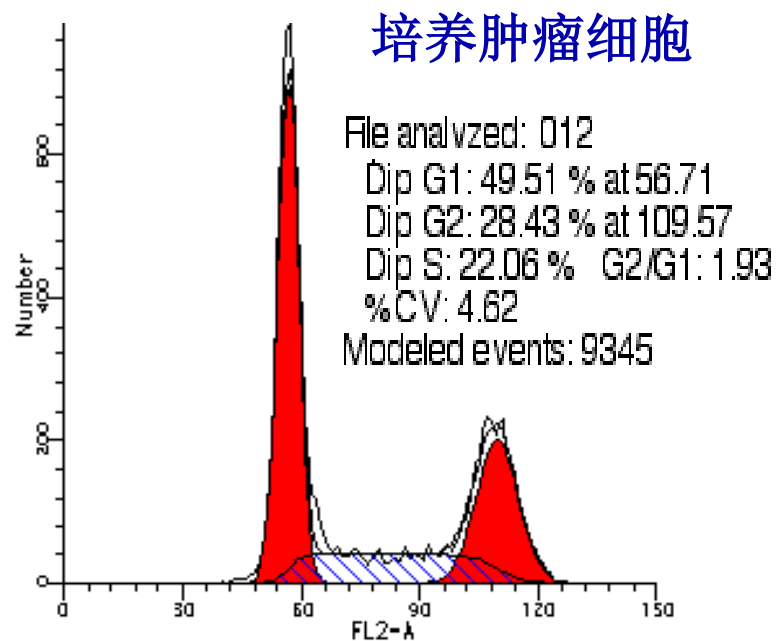
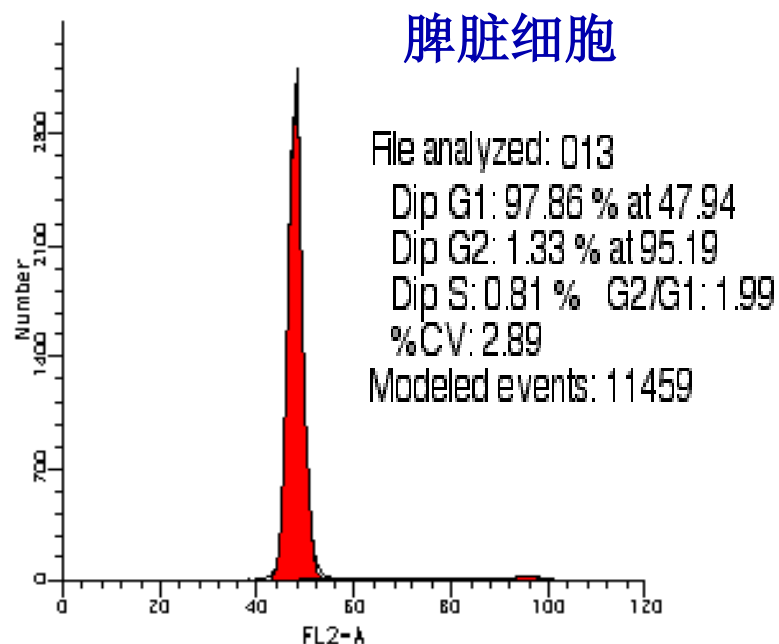
应用举例二：细胞周期分析

- 处于不同细胞周期的细胞DNA含量不同，G0/G1期细胞含有二倍体量的DNA，G2/M期细胞含有四倍体量的DNA，而S期细胞DNA含量处于二倍体和四倍体量之间。
- DNA荧光染料（如碘化丙啶PI）能与DNA结合，DNA含量的多少与荧光染料的结合量成正比，荧光强度反应了DNA吸收荧光分子的多少。通过流式检测就能反映细胞内DNA的含量，区分细胞周期的G0/G1、S和G2/M期细胞比例。



life
technologies

检测结果(ModFit/FlowJo/Multicycle) :



- 通过流式检测，能得出G0/G1期、S期和G2/M期细胞比例。
- 增殖指数(proliferous index)：指处于S期和G2/M期细胞之和占总细胞的比例，反映了细胞的增殖能力。
- CV值(变异系数)：衡量仪器测量分辨率和精度的指标。

二、Attune® NxT特色介绍

让您的灵感成为现实



- 创造性的声波聚焦技术
- 全新的高端激光应用
- 独特的模块化设计
- 卓越的结果均一性
- 快速检测稀有细胞
- 独特的采集和分析软件
- 灵活的进样模式
- 体积小巧方便

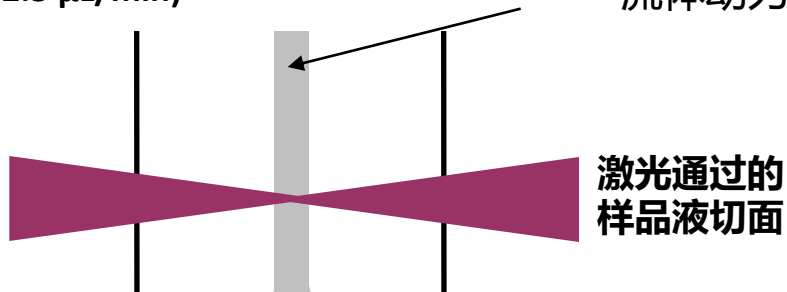
life
technologies

Traditional Hydrodynamic Focusing 传统的流体力学聚焦

细胞在激光检测光斑中的位置对于结果的准确性至关重要

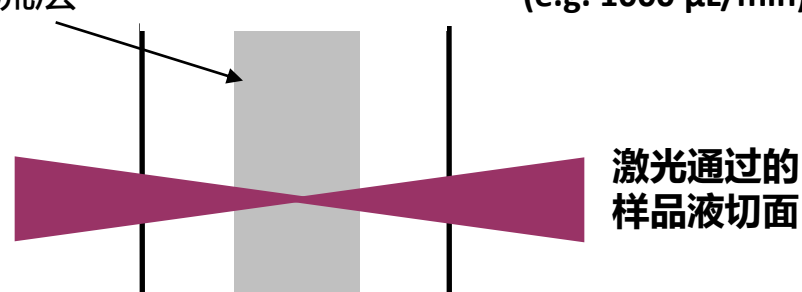
低进样速率 Low

(e.g. 12.5 $\mu\text{L}/\text{min}$)

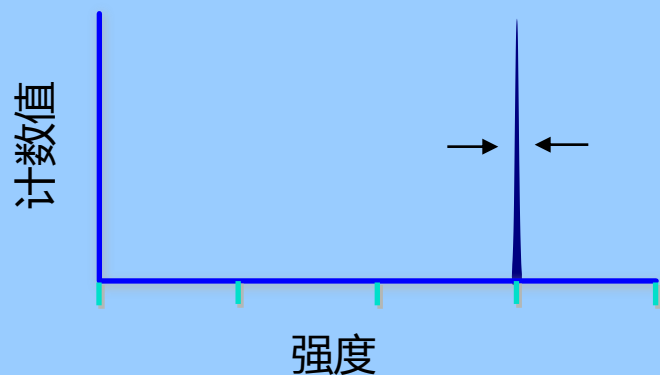


高进样速率 High

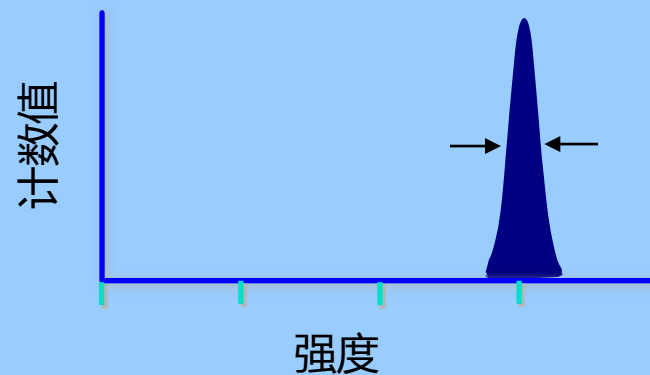
(e.g. 1000 $\mu\text{L}/\text{min}$)



紧密的单细胞流聚焦 = 紧密分布



分散的单细胞流聚焦 = 分散分布



鞘液流

鞘液流

鞘液流

鞘液流

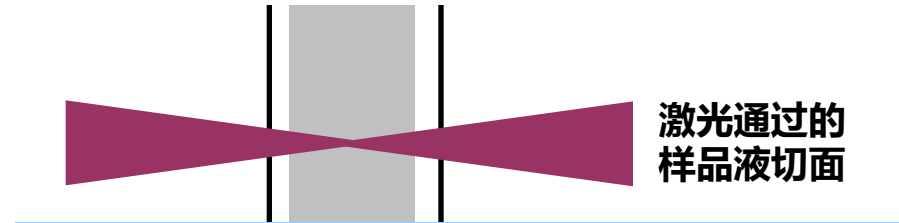
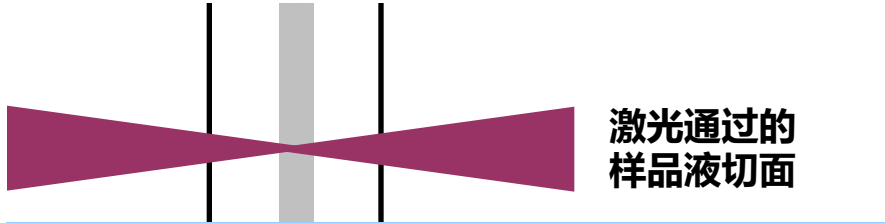
life
technologies

Acoustic Focusing 声波聚焦

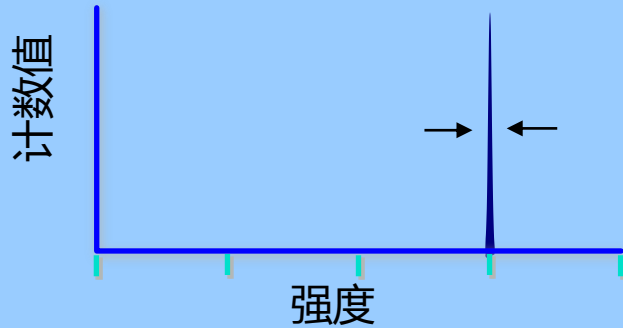
低进样速率 Low
(e.g. 12.5 $\mu\text{L}/\text{min}$)

声波聚焦技术：高进样速率时保持高灵敏度

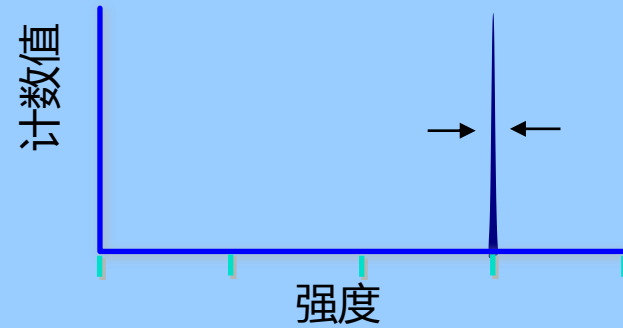
高进样速率 High
(e.g. 1000 $\mu\text{L}/\text{min}$)



紧密的单细胞流聚焦 = 紧密分布



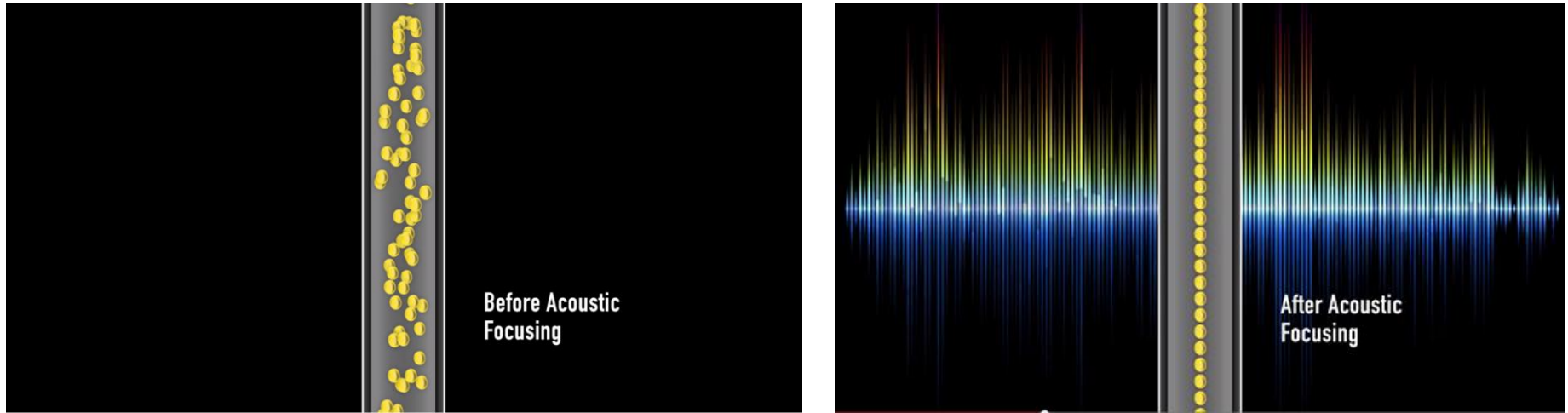
紧密的单细胞流聚焦 = 紧密分布



进入鞘液包裹前

life technologies

Acoustic Focusing 声波聚焦

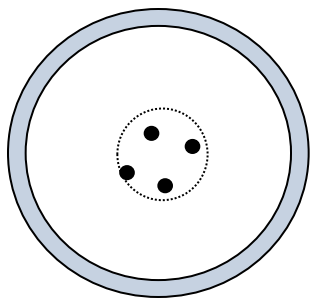
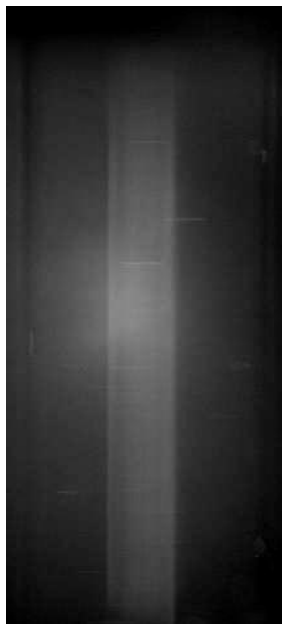


- **检测速度**：高达3,500events/sec；
- **样本流速**：12.5-1000 μ l/min，宽动态范围可调节；
- 全流速范围内保证较小的CV值，更好的分辨率；
- 声波聚焦，类似于医学中的聚焦成像，对细胞没有任何损伤。

Acoustic Focusing 声波聚焦

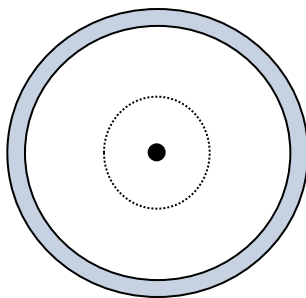
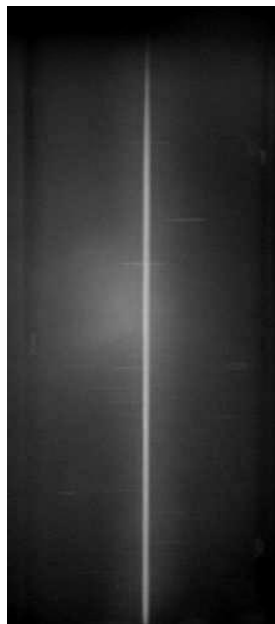
a. 传统的流体动力聚焦，增大轴流直径，导致细胞流排列分散

传统流体动力聚焦

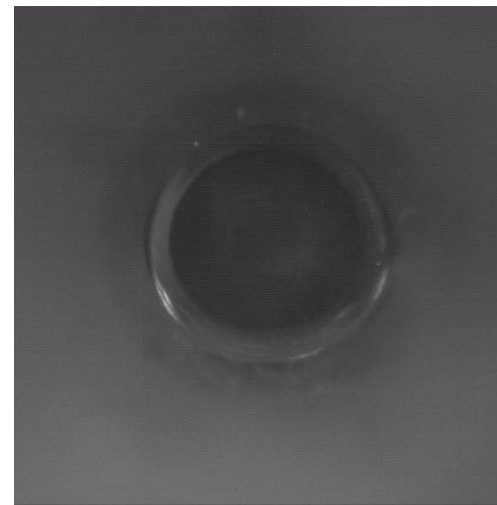


b. 声波聚焦技术，增大轴流直径，不影响细胞流紧密排列

声波聚焦

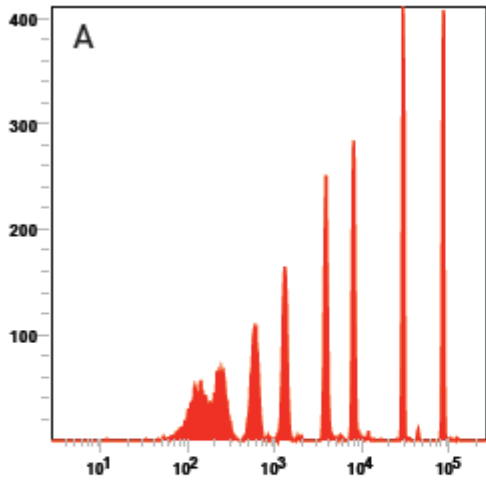


c. 进样毛细管内实拍图像

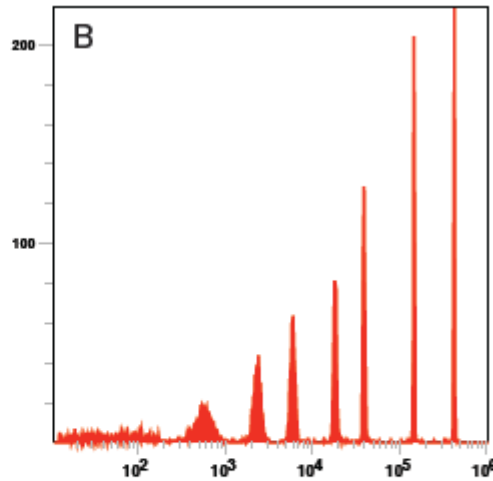


声波聚焦的技术优势

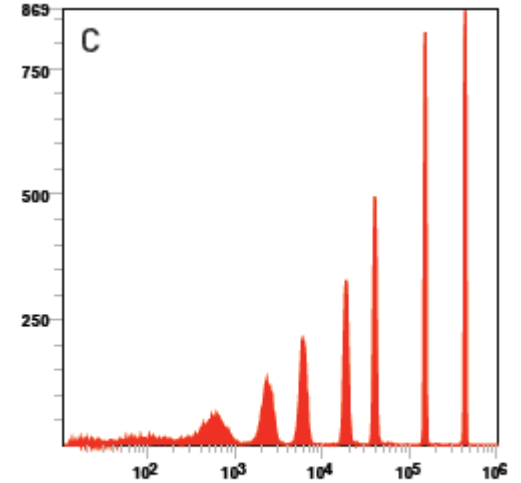
- 超高流速下，也能保持优越的灵敏度和精确度；
- 既节约了检测时间，也保证了结果的精度。



Conventional flow cytometer
(Highest sensitivity = ~12.5 µL/min)



Attune[®] NxT cytometer
(12.5 µL/min)

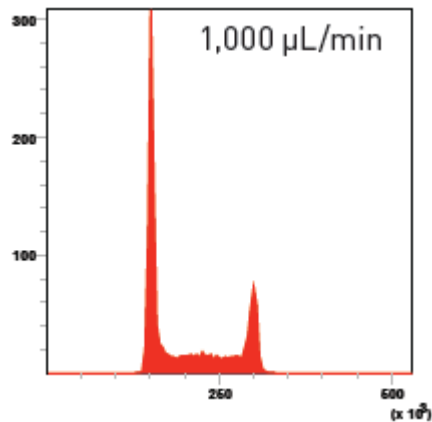
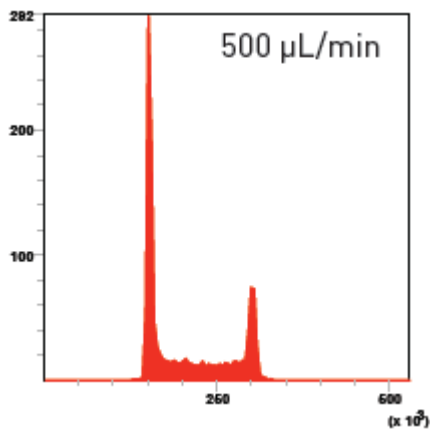
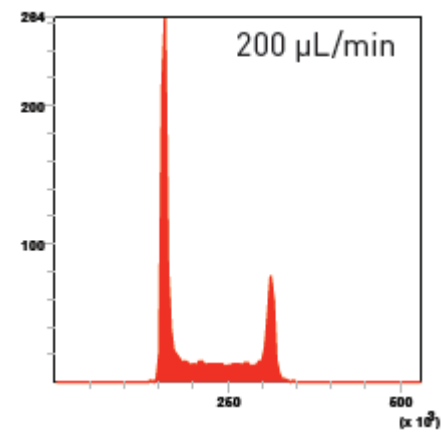
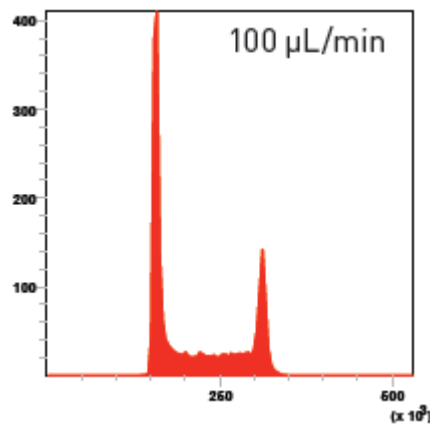
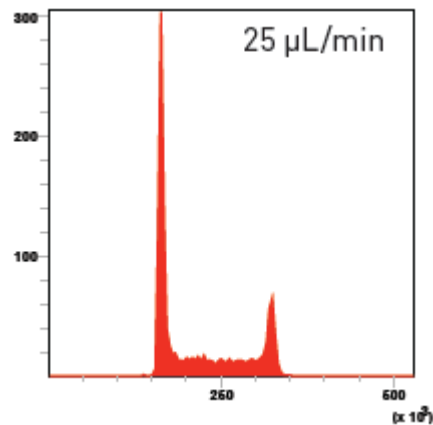
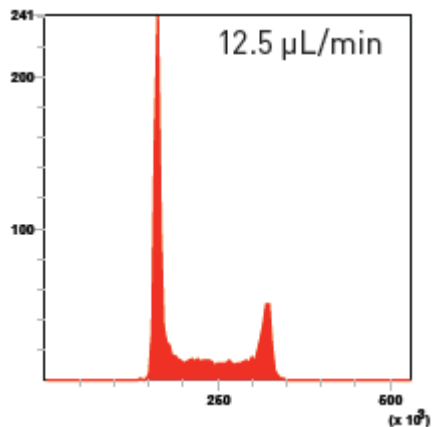


Attune[®] NxT cytometer
(500 µL/min)

不同流速下，传统流式细胞仪和声波聚焦流式细胞仪Attune NxT检测荧光微球（Spherotech Rainbow校准微球，3.2µm）结果比较。561 nm激光激发，接收通道为(A)610/20、(B, C)610/15。

声波聚焦的技术优势

- 更快的检测速度，更小的数据差异性(CV)，更准确的结果。

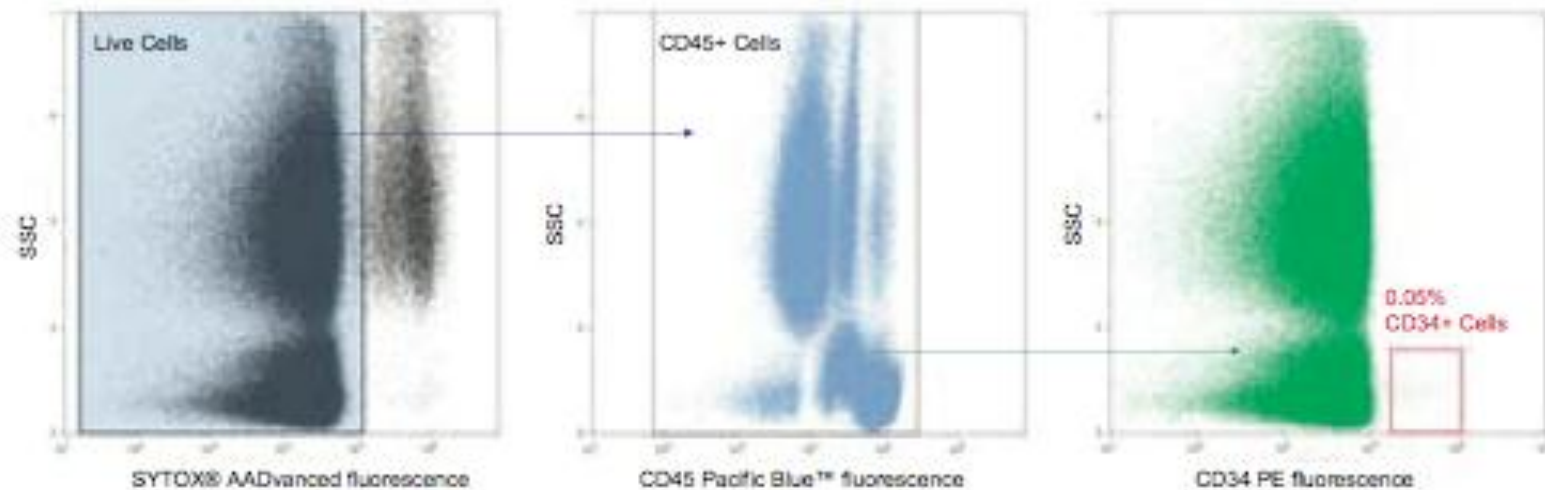


| Sample rate (μL/min) | 12.5 | 25 | 100 | 200 | 500 | 1,000 |
|--------------------------------|------|------|------|------|------|-------|
| G ₁ CV% | 2.99 | 3.03 | 2.76 | 2.94 | 2.70 | 2.96 |
| G ₂ /G ₁ | 1.99 | 1.99 | 1.99 | 2.05 | 2.05 | 2.03 |

Jurkat细胞固定后RNase处理、碘化丙啶(PI)染色，1×10⁶个细胞/mL浓度，Attune NxT声波聚焦流式以不同进样速度分析样本。

声波聚焦的技术优势-稀有细胞分析

- 稀有细胞流式分析需要获取大量样本，检测时间长、结果精度差；
- Attune NxT分析速度高达1000 μ L/min，比传统流式快10倍，单个样本可记录 2×10^7 个细胞的数据。

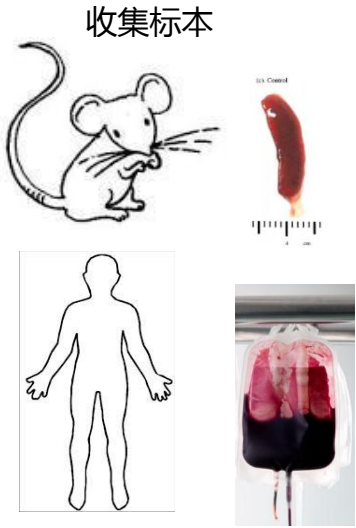


“我的实验室的主要研究目标之一是描述固有淋巴细胞的特性并进行功能分析。这些细胞在血液和组织中的含量极少。我们采用Attune[®]声波聚焦流式细胞仪进行流式细胞分析。Attune[®]流式细胞仪具有高进样速率，有助于减少离心步骤，从而可以保留更多细胞，加快了检测稀有细胞的速度。若采用其他仪器，我们则无法完成上述研究。”

David Cousins教授，莱斯特大学

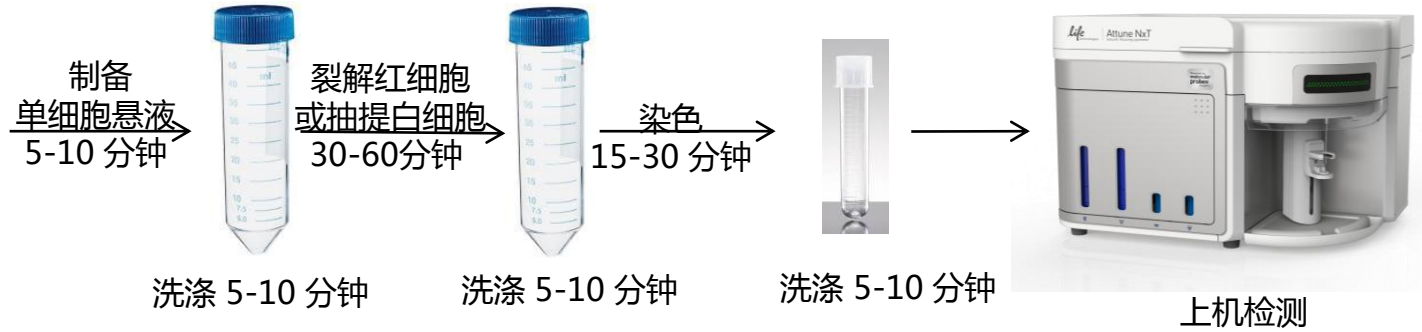
life
technologies

声波聚焦的技术优势-No Wash/No lyse assays



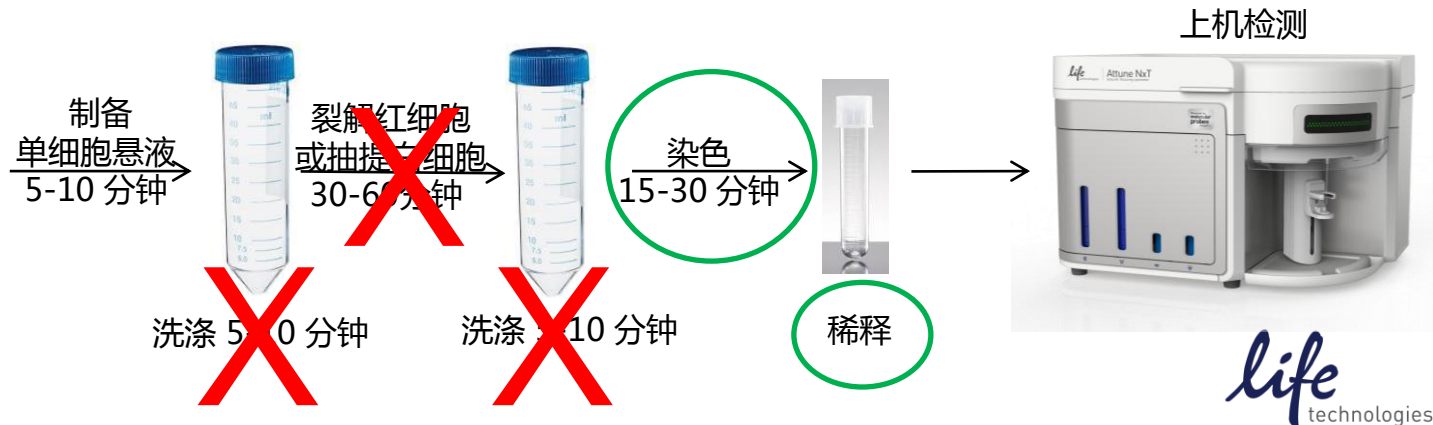
传统的标本处理流程

标本处理时间 ~1.5-2.5小时



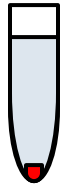
胞内染色需增加1-2小时

无需洗脱/裂解标本处理流程

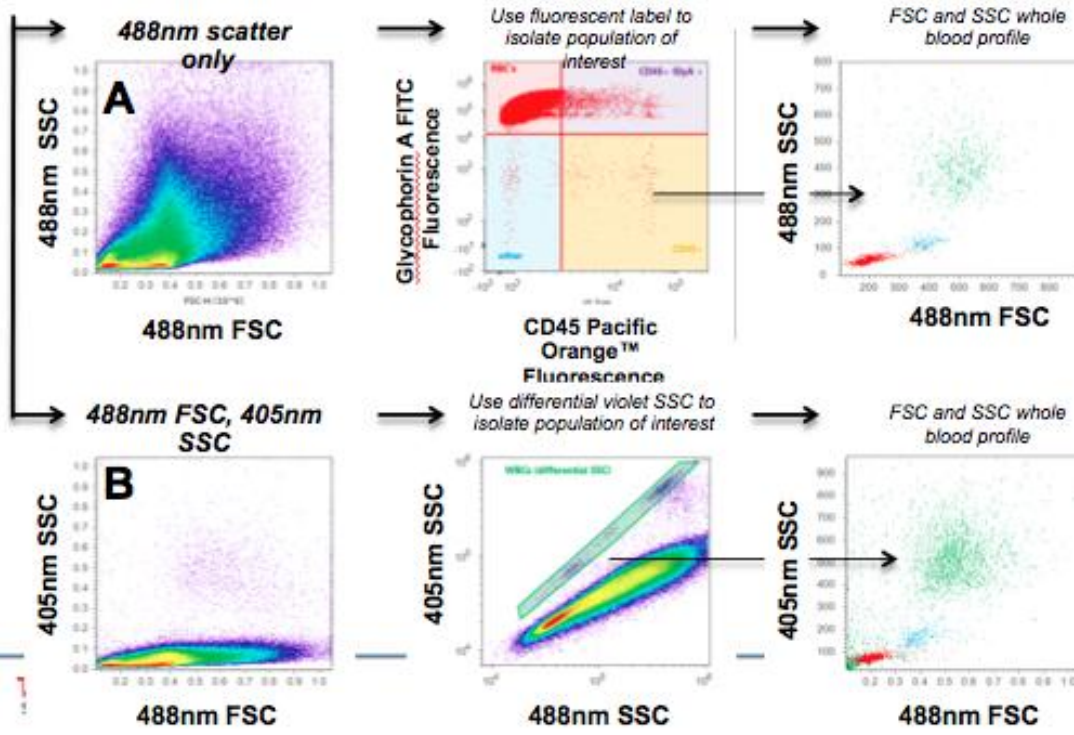


声波聚焦的技术优势-No Wash/No lyse assays

- 声波聚焦优势，减少背景噪音的干扰；
- 简化样本制备流程，减少稀有亚群的损失；
- 无需磁珠预富集，高速、高灵敏地分析稀有细胞。



5 μ L whole human blood \rightarrow +/- Ab \rightarrow dilute in 3mL DPBS/1% BSA \rightarrow acquire \sim 900K events (FSC trigger)



Antibody labeling is required to resolve blood populations

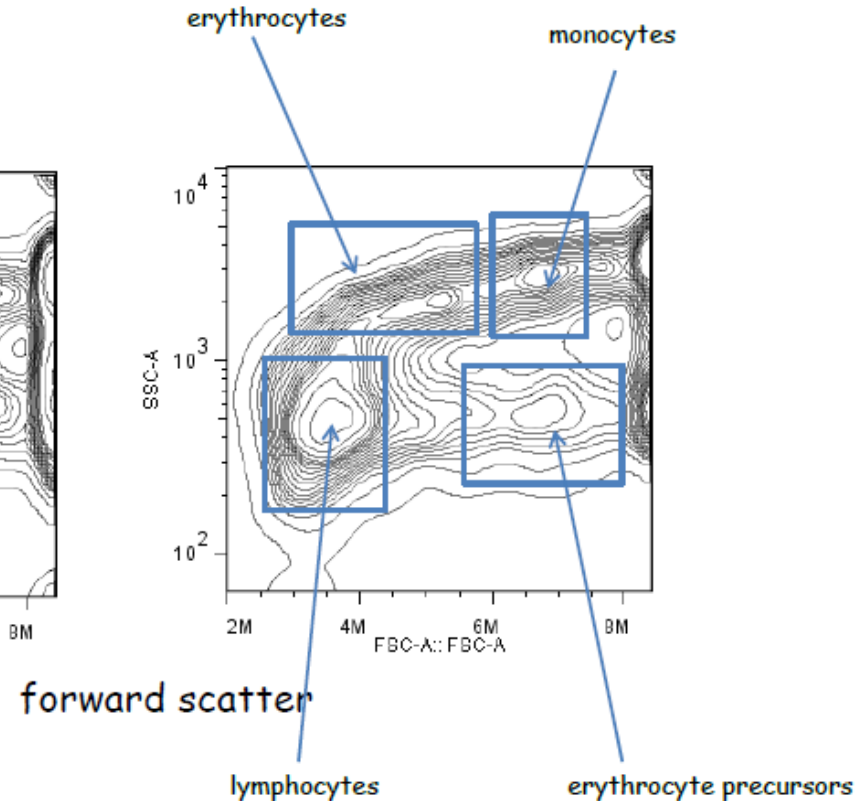
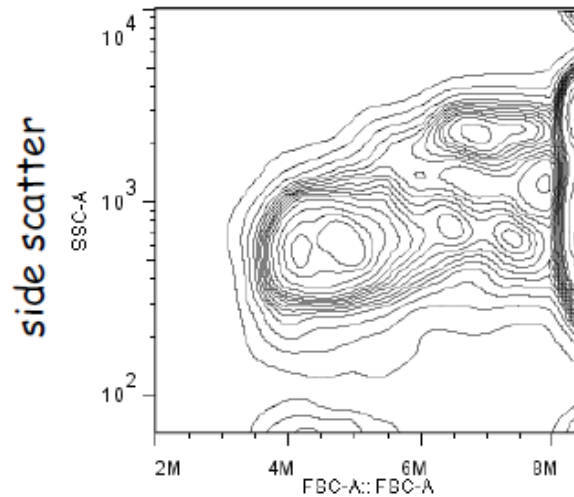
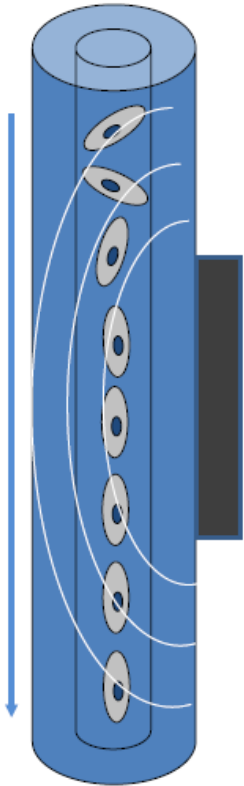
No antibodies required



声波聚焦的技术优势-不规则细胞的分析

- 很多藻类、微生物等不规则细胞形态；
- 声波聚焦技术使所有细胞按长轴排列通过检测点。

Analyzing zebrafish leukocytes on the Attune™



体积小、更少的鞘液消耗



尺寸小巧，不受实验室狭窄空间限制

尺寸 (高 x 宽 x 长) : 40 cm x 58 cm x 43 cm
重量 : 29 Kg

标准溶液槽: 1.8 L 聚焦液槽
额定液体消耗量: 1.8 L/天

更少的鞘液需求，更少的废液产生



life
technologies

模块化设计、升级灵活

- 可选配1-4根激光器，最多可同时检测14种荧光；

- 蓝色激光: 488 nm, 50 mW
- 紫色激光: 405 nm, 50 mW
- 黄色激光: 561 nm, 50 mW
- 红色激光: 637 nm, 100 mW

- 激光器升级，滤光片可自由更换，现场操作 < 4h。

| 激光配置 | <u>1 Laser</u> | <u>2 Laser</u> | <u>3 Laser</u> | <u>4 Laser</u> |
|------|----------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------|
| 激光波长 | 488 | 488/638 488/561 488/405 | 405/488/638 405/488/561 | 405/488/561/638 |
| 荧光通道 | 4 | 7 or 8 | 10 or 11 | 14 |

应用：多参数分析

- 兼容市场上常见的荧光素和荧光基团。

| 激光 | 激发光 | 发射光 | 常用染料 | 荧光蛋白 |
|----|--------|---------|----------------------|--------------------------------------|
| 紫色 | 405 nm | 440/50 | Pacific Blue™ | ECFP |
| | | 512/25 | Pacific Green™ | |
| | | 603/48 | Pacific Orange™ | |
| | | 710/50 | Qdot® 705 | |
| 蓝色 | 488 nm | 488/10 | FSC | |
| | | 488/10 | SSC** | |
| | | 530/30 | FITC | EGFP, Emerald GFP |
| | | 574/26* | Propidium iodide | EYFP |
| | | 695/40 | PerCP-Cy®5.5 | |
| 黄色 | 561 nm | 583/22 | PE | RFP |
| | | 620/15 | PE-Texas Red® | mCherry, dTomato, DsRed, mStrawberry |
| | | 695/40 | PE-Cy®5.5 | |
| | | 780/60 | PE-Cy®7 | |
| 红色 | 638 nm | 660/20 | APC | |
| | | 720/30 | Alexa Fluor® 700 | |
| | | 780/60 | APC-Alexa Fluor® 750 | |

*不包括适用于PE的黄色激光 (590/40)。

**可以任选各色激光进行侧向散射分析 (默认为蓝色激光)。紫色激光侧向散射推荐用于无洗脱/裂解应用。



应用：多参数分析

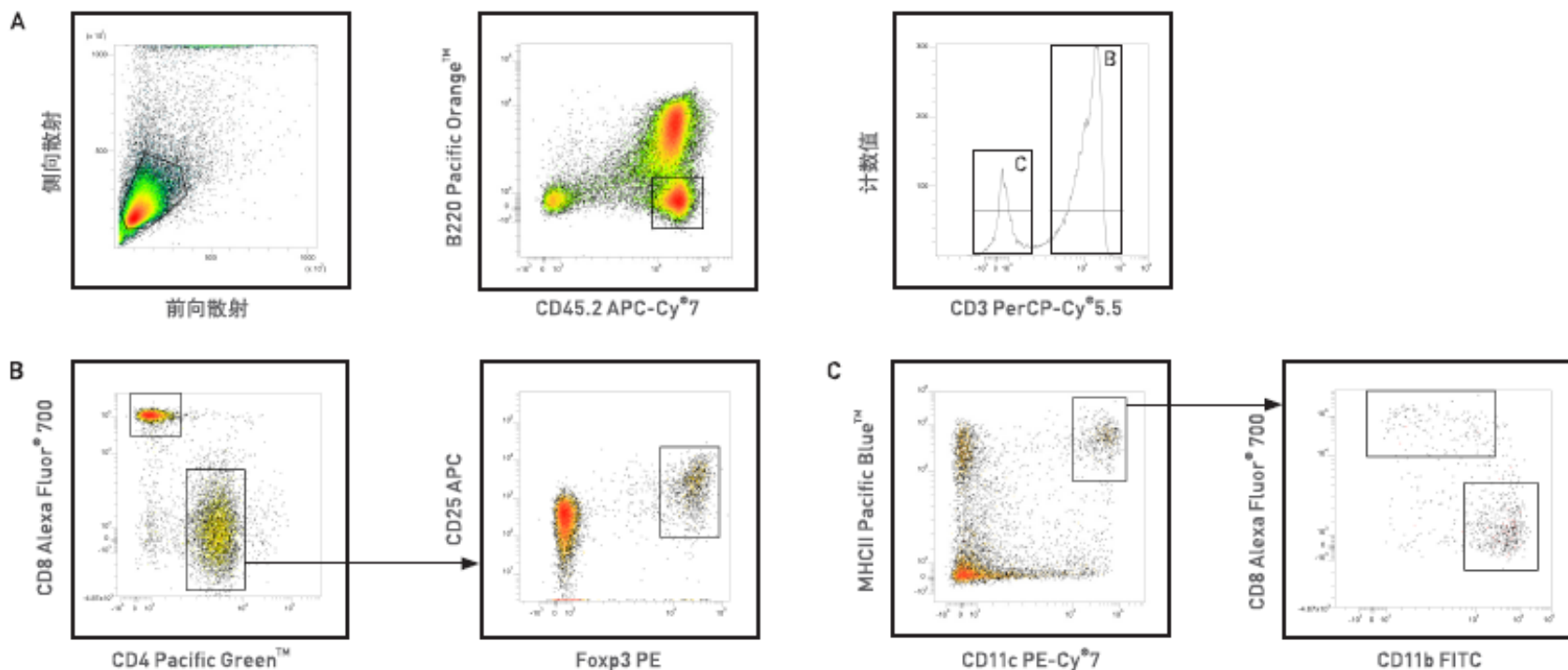
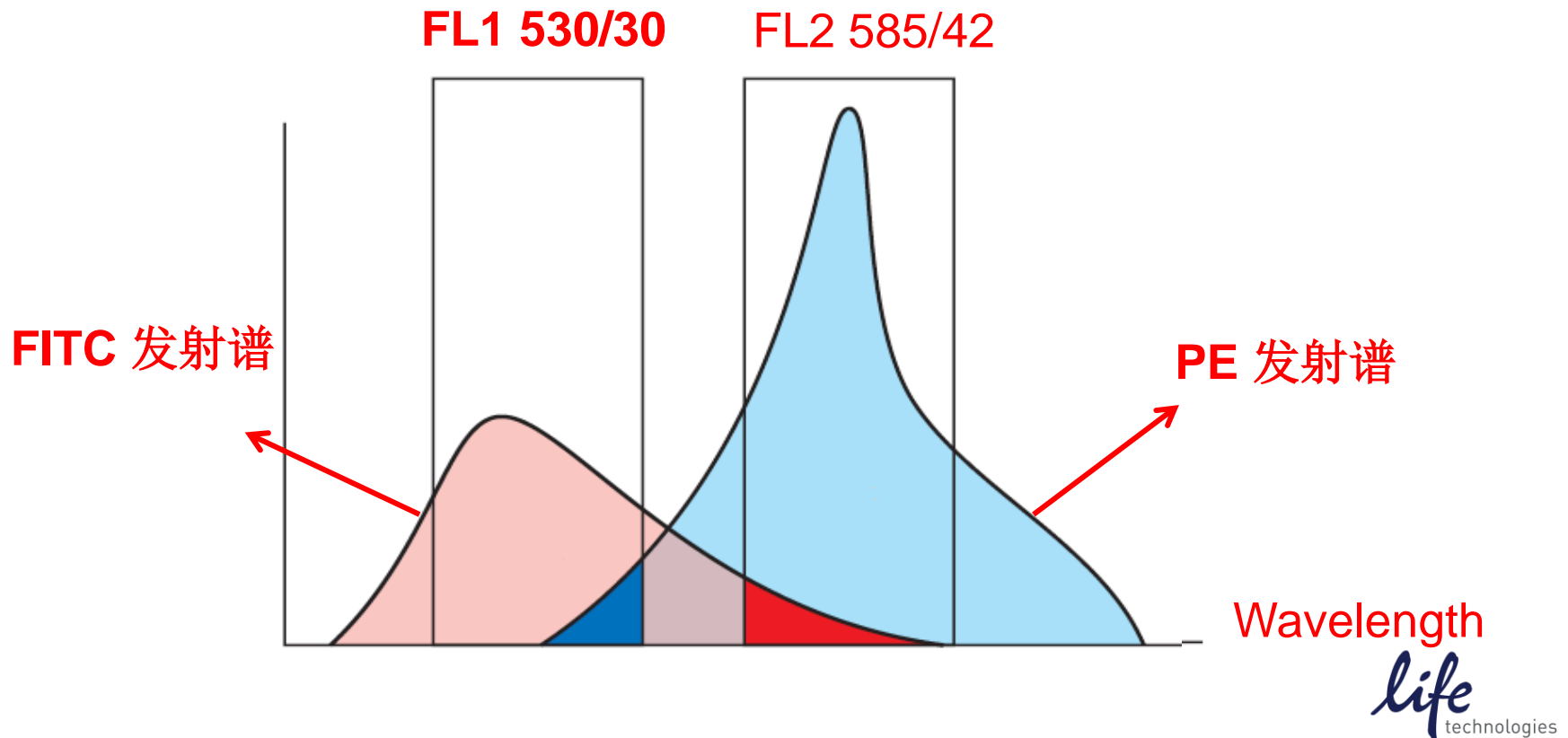


图1. 采用Attune[®] NxT声波聚焦流式细胞仪对小鼠调节性T细胞和树突状细胞进行多参数(10色)分析。采用FSC/SSC参数(A, 左)对淋巴细胞设门, 在后续分析中除去表达B220的B细胞(A, 中)。在B220⁻、CD45.2⁺设门范围内, 根据CD3表达水平分析T细胞(A, 右)。根据辅助受体CD4或CD8 (B, 左)的表达水平将CD3⁺ T细胞分成两个群体。在CD4⁺ T细胞中, 有一种抑制性调节性T细胞亚群可以表达转录因子Foxp3和细胞表面标记物CD25 (IL-2Ra) (B, 右)。CD3⁻细胞中有少量CD11c⁺ MHCII⁺群体, 它们是专业的抗原提呈树突状细胞(C, 左)。脾脏树突状细胞可以进一步分为CD11b⁺和CD8⁺树突状细胞亚群(C, 右), 分别具有不同的抗原提呈特性。

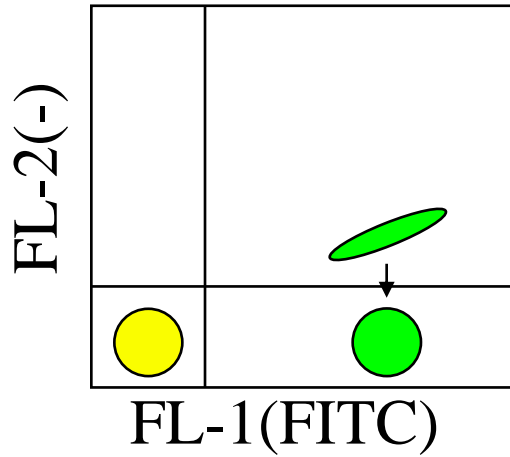
多参数分析、光谱重叠与补偿调节

- 由于荧光素的宽发射谱特点，荧光通道间有**光谱重叠**现象。
- 多色流式实验的时候需要通过**补偿调节**消除光谱重叠影响。

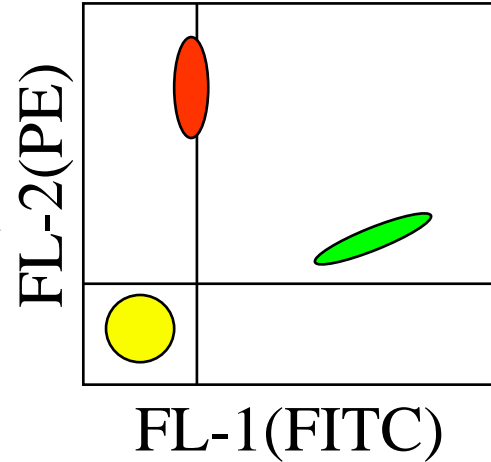


光谱重叠与补偿调节

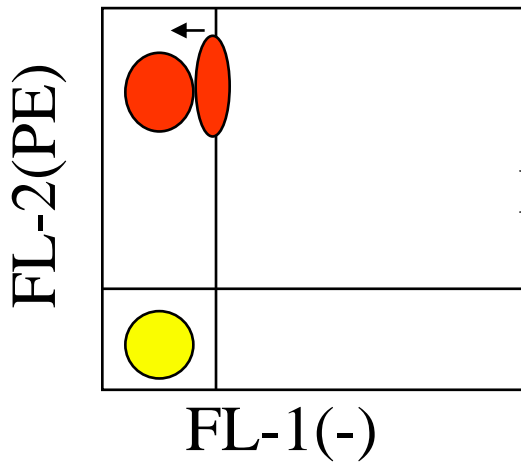
**FITC
单标**



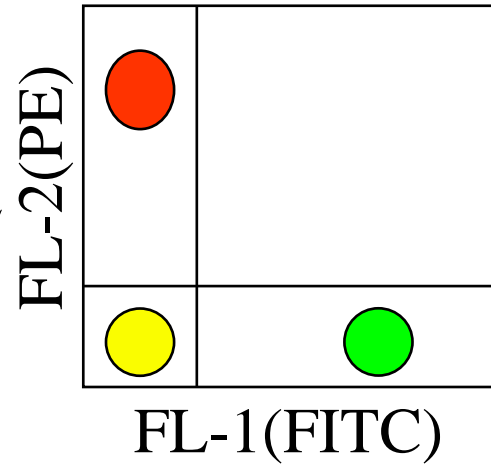
**Before
Compensation**



**PE
单标**



**After
Compensation**

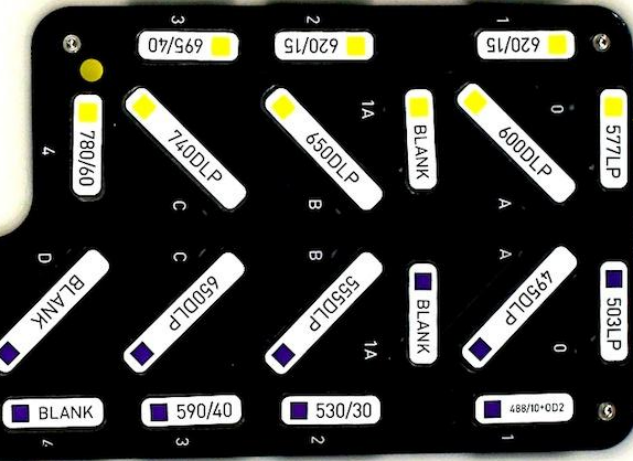
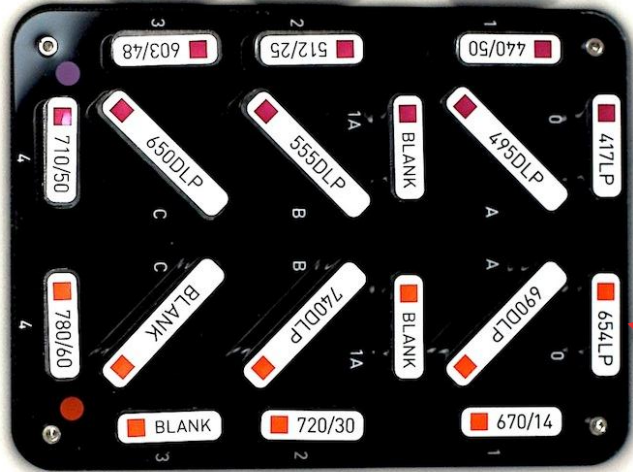
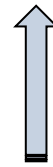


life
technologies

平行排列激光器 vs 共线排列激光器

- Emission is separated for each laser
- Dedicated PMT per collection channel
- Gain is adjusted for the unique label in the channel

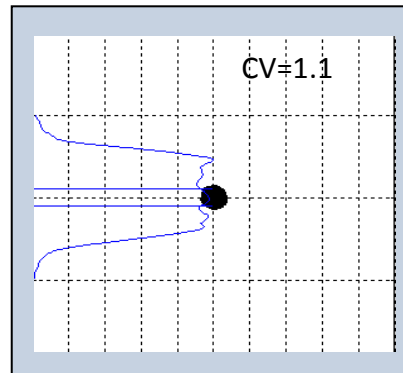
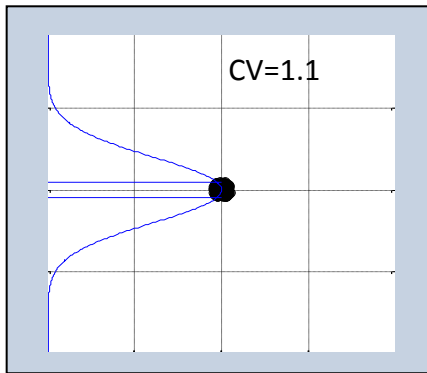
Flow



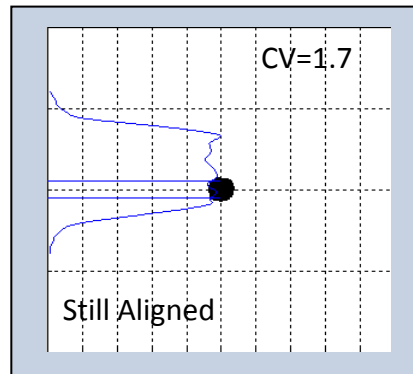
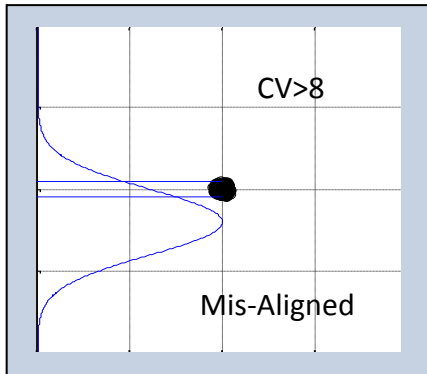
Spatially Separated Lasers w/Pinholes

平顶光斑激光器、更稳定的光路

- 搭载以往只有在高端分选流式细胞仪（MoFlo Astrios）上使用的高端平顶光斑激光器（flat top laser）；
- 传统激光器：高斯分布，能量最强位于最中心点，激光偏离影响大；
- 平顶激光器：中心区域能量最强，激光微弱偏离无影响。



Beam shift 15 μm

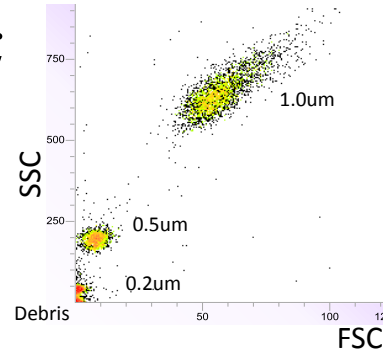


可定制不同波长和不同功率的激光器（2015年）

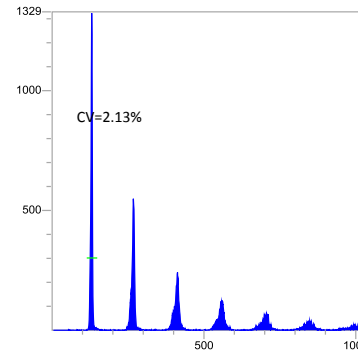
life technologies

卓越的性能参数

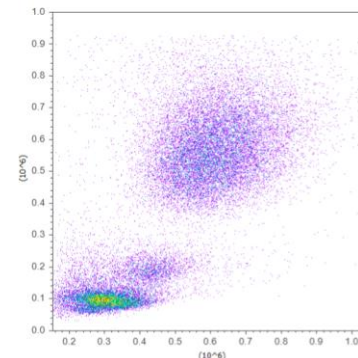
- **数据采集频率**：高达35,000 events/秒；
- **可调节的样本流速**：12.5-1000 μ l/min；
- **检测颗粒范围**：0.5-50 μ m；
- **检测样本体积**：20 μ l-4ml；
- **荧光灵敏度**：
 - ≤ 80 MESF FITC
 - ≤ 30 MESF PE
 - ≤ 70 MESF APC
- **荧光分辨率**：
 - CV < 3% (PI染色的鸡红细胞核)
- **前向和侧向散射光**
 - 可清晰区分全血裂解红细胞后的淋巴细胞、单核细胞和粒细胞
 - 可清晰区分未裂解全血样本中的血小板和背景噪音信号



Fluorescent Beads
Ranging from 0.2-1.0 μ m



Chicken Erythrocyte Nuclei
stained with propidium iodide run at 100 μ l/min

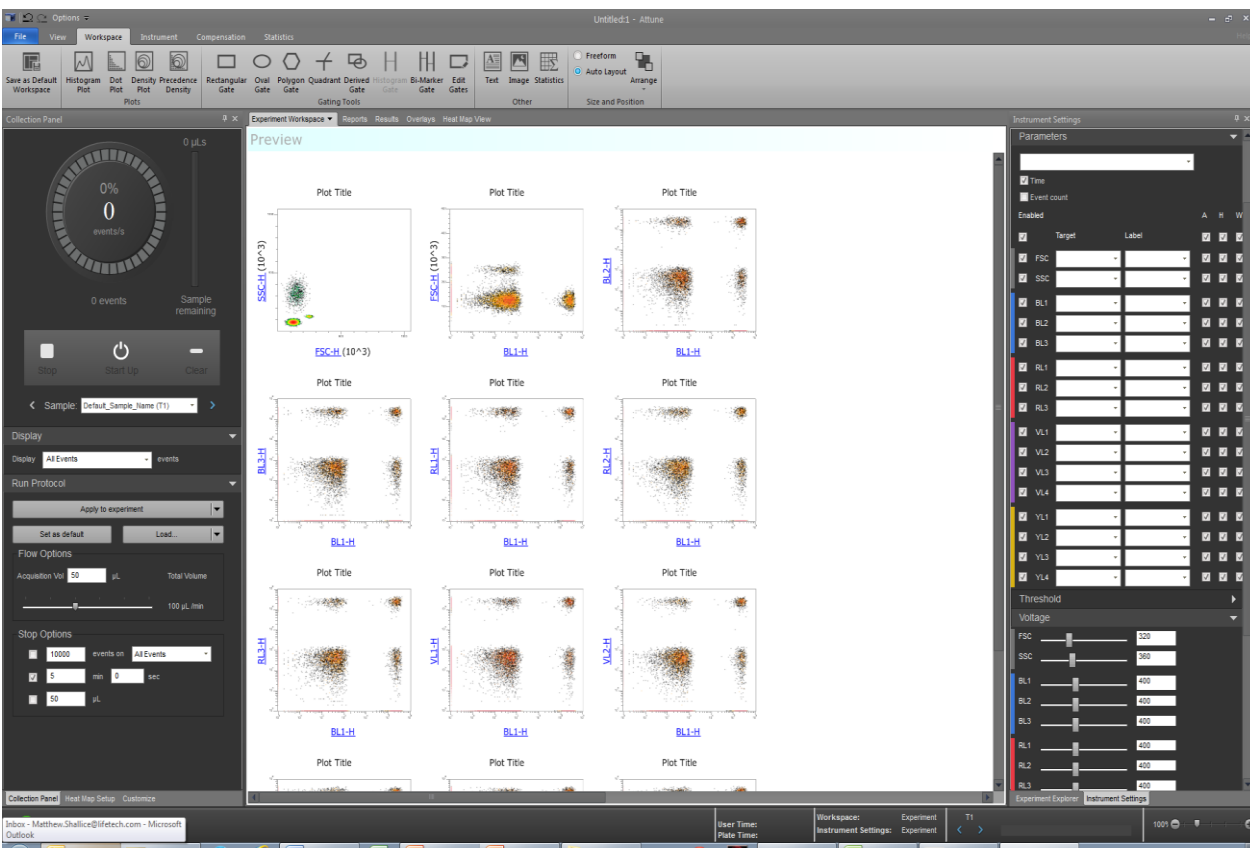


Ammonium Chloride
Lysed Whole Blood



简洁的软件、全面的功能

- 直观友好的用户界面，简单明了的分析流程；
- 多种设门工具、批量分析功能、多种输出方式、数据和其他软件兼容；
- 自动补偿、实时补偿、离线补偿功能...



Software Features:

Compensation: Fully automated and manual compensation

Instrument Tracking: Automated baseline and performance test for all channels and linearity

Automated Maintenance- <15 minutes start up and shutdown, rinse, wash, de-bubble, deep clean

Maximum Event File: 20 million

SmartGate™ Label: for Quad and Bi-marker plots

Parameter math calculator: create customized statistics i.e. Stain Index, Signal/Noise, Concentration calculations

File Formats: FCS 3.1

Filter Configuration: Easy Reagent Selection for Instrument Configuration

Graphics Resolution: Publication quality images
User Account Maintenance: Administrative and Individual accounts with user log

Gates: Standard and customizable gates

Plot Previews: Easy Workspace Set Up

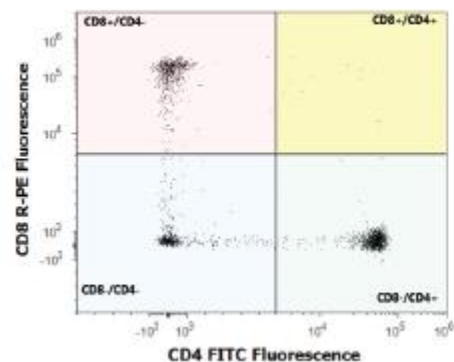
Zoom Filmstrip Viewer- easy visualization and navigation of plots to set gates and plot attributes

自动进样器

- 兼容96孔、384孔板，适合大样本量分析；
- 智能探针设计最大限度减少堵塞和残留；
- 抽吸方式混匀样本，不影响其他样本活性；
- 仪器关闭前自动进行管路清洗；
- 自动进样器和单个试管间可方便地切换；
- 可在不同采集速率下获得一致的结果。



A. Tube



Tube statistics

| | |
|------------------------------------|-------|
| CD8 ⁺ /CD4 ⁻ | 24.5% |
| CD8 ⁺ /CD4 ⁺ | 0.6% |
| CD8 ⁻ /CD4 ⁻ | 25.6% |
| CD8 ⁻ /CD4 ⁺ | 49.4% |

B. Plate

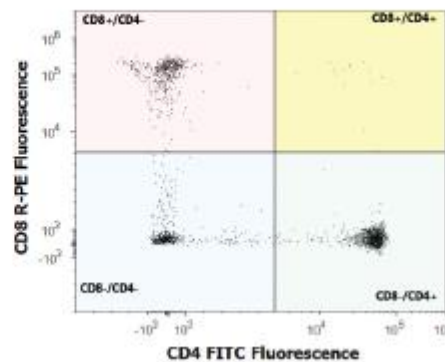


Plate statistics

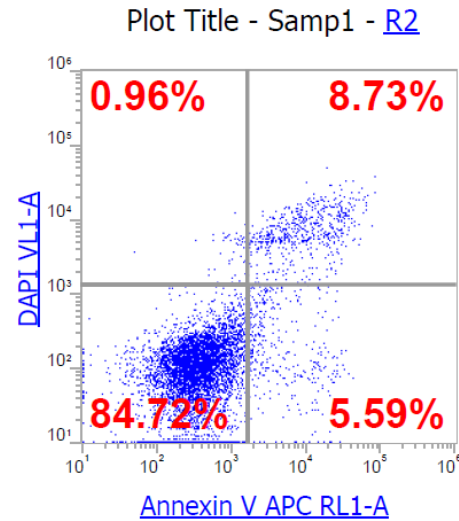
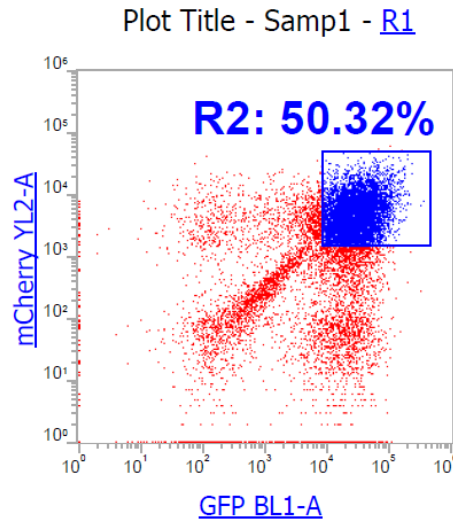
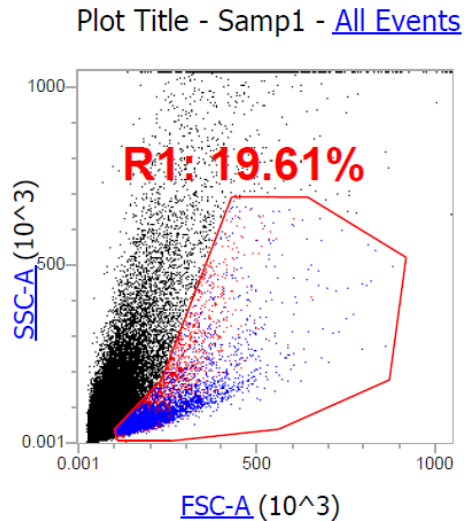
| | |
|------------------------------------|-------|
| CD8 ⁺ /CD4 ⁻ | 24.6% |
| CD8 ⁺ /CD4 ⁺ | 0.6% |
| CD8 ⁻ /CD4 ⁻ | 24.7% |
| CD8 ⁻ /CD4 ⁺ | 50.1% |

单个试管进样和自动进样比较，无论采用何种进样方法，均可获得一致性的结果。

life
technologies

561nm激光器技术优势：

- 检测PE、PE复合荧光染料效率更高
- 561nm激光能更有效的激发各种红色类荧光蛋白，如DsRed、RFP、mCherry、dTomato、tdTomato、mKate、mKate2等



总结：传统流式细胞术的局限性（如何颠覆）

- **进样速度的限制，10-100 μ l/min；**
 - 无法分析稀有细胞，对样本浓度要求高。
- **鞘液聚焦的局限性：速度越快，灵敏度下降；**
 - 为什么检测细胞周期样本时要低速进样？
- **多色流式实验时补偿的调节；**
 - 传统荧光素宽发射谱的性质，相邻荧光通道间会有光谱重叠，需要调节补偿，复杂的补偿调节过程限制着多色流式技术的发展。
- **如何保证光路的稳定性；**
 - 固定光路？微弱震荡、热胀冷缩等，如何保证激光始终在中心点？
- **机器的维护保养**
 - 复杂的开机、质控程序；
 - 每天结束需半小时时间冲洗机器？

三、流式分析稀有细胞

© 1993 Wiley-Liss, Inc.

Cytometry 14:519–526 (1993)

Detection of Rare Cells at a Frequency of One Per Million by Flow Cytometry

Hans-Joachim Gross¹, Ben Verwer, David Houck, and Diether Recktenwald
Monoclonal Research Center, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, California 95131

Received for publication July, 20, 1992; accepted December 21, 1992



Clin Lab Med 27 (2007) 627–652

CLINICS IN
LABORATORY
MEDICINE

Rare-Event Analysis in Flow Cytometry

**Albert D. Donnenberg, PhD*,
Vera S. Donnenberg, PhD**

*University of Pittsburgh School of Medicine, Hillman Cancer Research Center Suite 2.42c,
5117 Center Avenue, Pittsburgh, PA 15213-2582, USA*



什么是稀有细胞？

- 目标细胞含量在0.1%以下，称为稀有细胞，也有文献认为比例0.00001% ($1/10^7$) 以下的细胞为稀有细胞。



Rare-event analysis **is the art of finding a needle in a haystack**

临床/科研中有广泛的应用

- 循环肿瘤细胞CTC (Circulating tumor cells)
- 循环内皮细胞和内皮祖细胞
- 肿瘤干细胞 (CD133, EpCAM等)
- 造血干细胞(CD34+)
- 抗原特异性的 T 细胞
- NKT 和 iNKT 细胞
- 特定的淋巴细胞亚型 (Treg/Breg/IL-17/IL-22等)
-

稀有细胞分析的关键：

- Acquisition of a large number of events---获取时间长
- High signal-to-noise ratio（信噪比）---速度越快，灵敏度下降

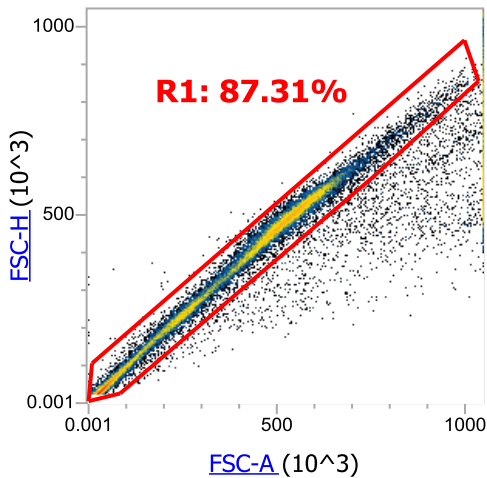
| CV(%) | | 1 | 2.5 | 5 | 10 | 20 |
|-------------------------|------------------------|--------------------------------|-------------|------------|------------|-----------|
| Positive cells required | | 10,000 | 1,600 | 400 | 100 | 25 |
| Frequency | | ? | | | | |
| | | EVENT NUMBER TO ACQUIRE | | | | |
| 10% | 10 ^{1/n} | 100,000 | 16,000 | 4,000 | 1,000 | 250 |
| 1% | 100 ^{1/n} | 1,000,000 | 160,000 | 40,000 | 10,000 | 2,500 |
| 0.1% | 1,000 ^{1/n} | 10,000,000 | 1,600,000 | 400,000 | 100,000 | 25,000 |
| 0.01% | 10,000 ^{1/n} | 100,000,000 | 16,000,000 | 4,000,000 | 1,000,000 | 250,000 |
| 0.001% | 100,000 ^{1/n} | 1,000,000,000 | 160,000,000 | 40,000,000 | 10,000,000 | 2,500,000 |



Attune NxT 技术优势：

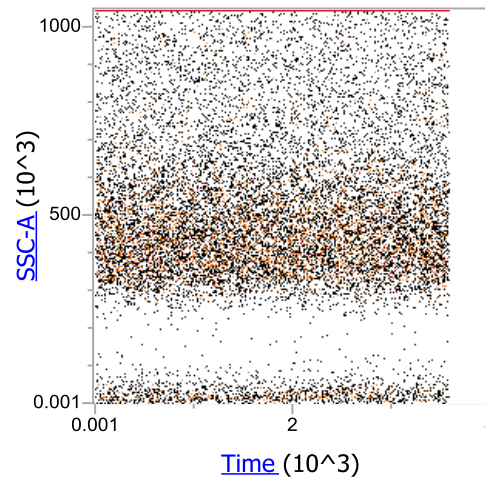
- 高达3,5000 events/秒的获取速度，12.5-1,000 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速；
- 高速检测时CV值保持不变，不影响检测结果的灵敏度；
- 多达4激光14色配置，配色灵活，自动补偿、离线补偿功能；
- 单个样本可存储20 million events数据。

Sample - [All Events](#)



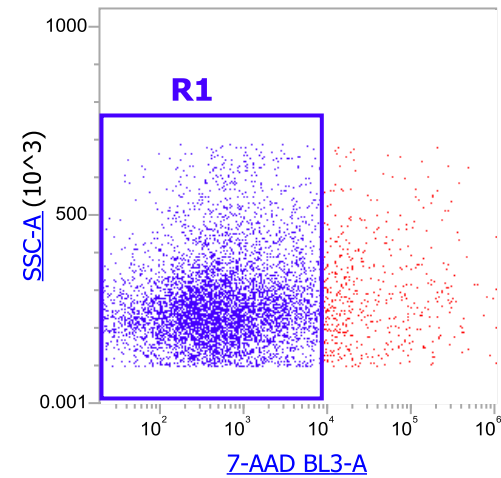
去除粘连细胞

Sample11 - [All Events](#)



时间参数-液流稳定性

Sample(1)111 - [Lym](#)



去除死细胞



实例：肿瘤组织中调节性B细胞检测

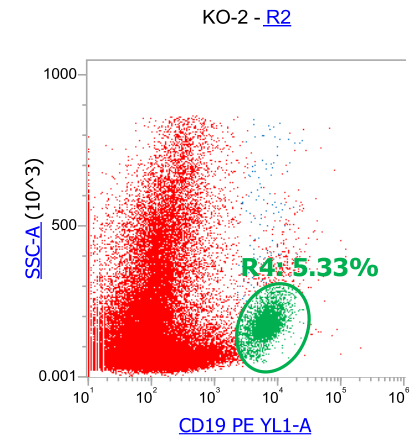
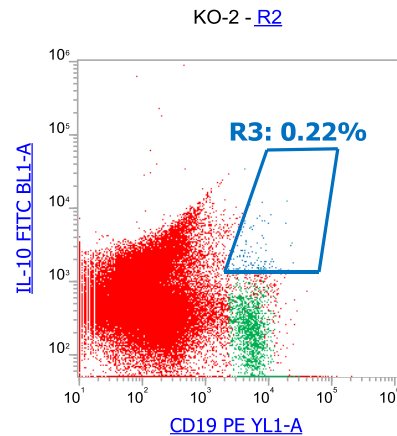
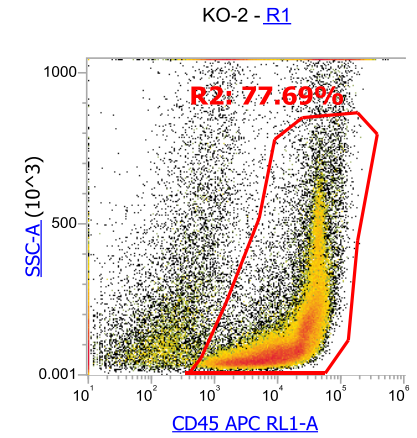
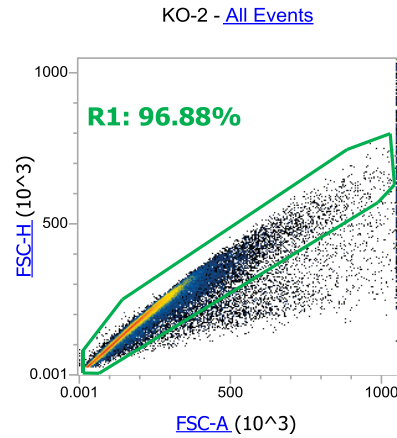
- 人肿瘤组织来源细胞

- IL-10 secreting Breg检测

- CD45-APC
- CD19-PE
- IL-10 FITC

- 传统仪器检测问题：

- 检测时间长(获取50万events)
- 组织来源，易堵塞机器
- 高速检测，结果不准确



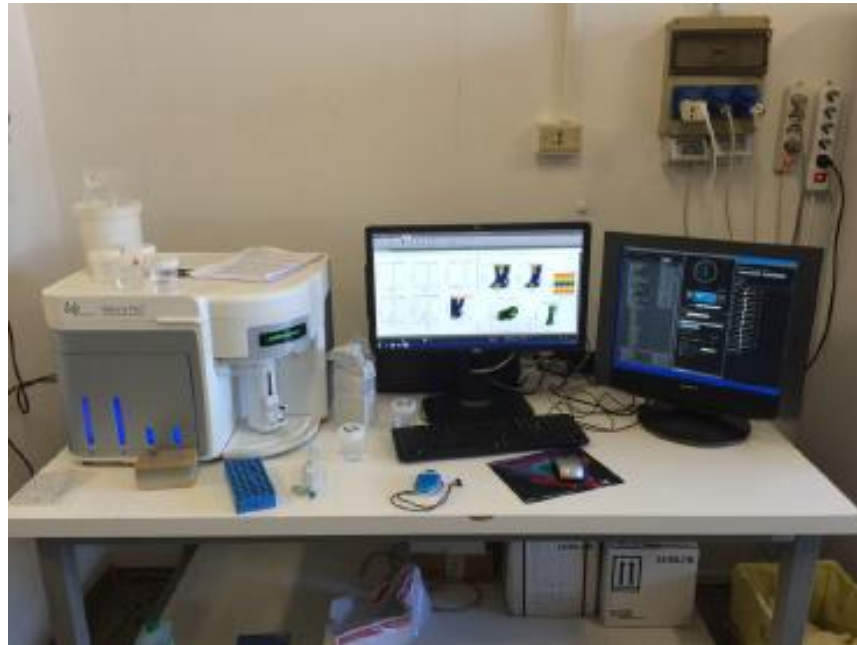
实例：iNKT细胞分析

DIFFERENT CHARACTERISTICS OF INKT AND MAIT CELLS

| | iNKT cells | MAIT cells |
|---|---|---|
| Frequency (% among human PBMCs) | 0.01-1% | 1-10% |
| Receptors | semi-invariant Vα24-Jα18 TCR, NK receptors | semi-invariant Vα7.2-Jα33 TCR, high levels of CD161, IL-18R α . |
| Antigen recognized | glycolipid antigens presented by CD1d | microbial antigens presented by MR1 |
| Subsets | CD4+, CD8+, and CD4-CD8- | CD4+, CD8+, and CD4-CD8- |
| Function | Regulatory | Effector-memory phenotype |

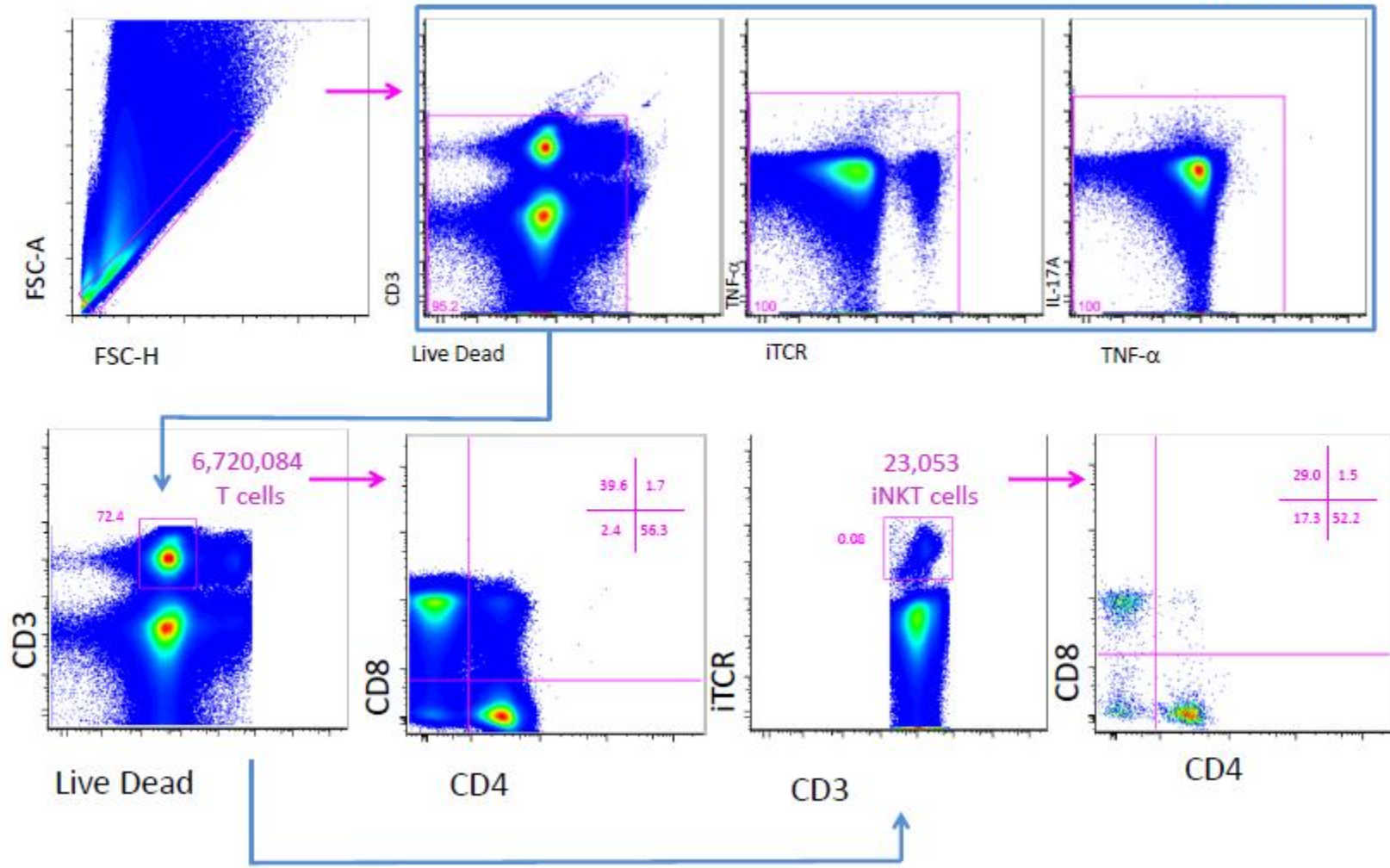
方法：

- **PBMCs isolation from > 30 mL of blood**
- **Stimulation with PMA (100ng/mL) plus ionomycin (1 μ g/mL) for 4 hrs**
- **ICS with following markers:**
 - Live Dead (Aqua)
 - CD3 PE-Cy5
 - CD4 Alexa Fluor 700
 - CD8 APC-Cy7
 - iTCR(V α 24-J α 18) PE
 - IFN-gamma FITC
 - IL-4 APC
 - IL-17 BV421
 - TNF-alpha BV605



Gating Strategy :

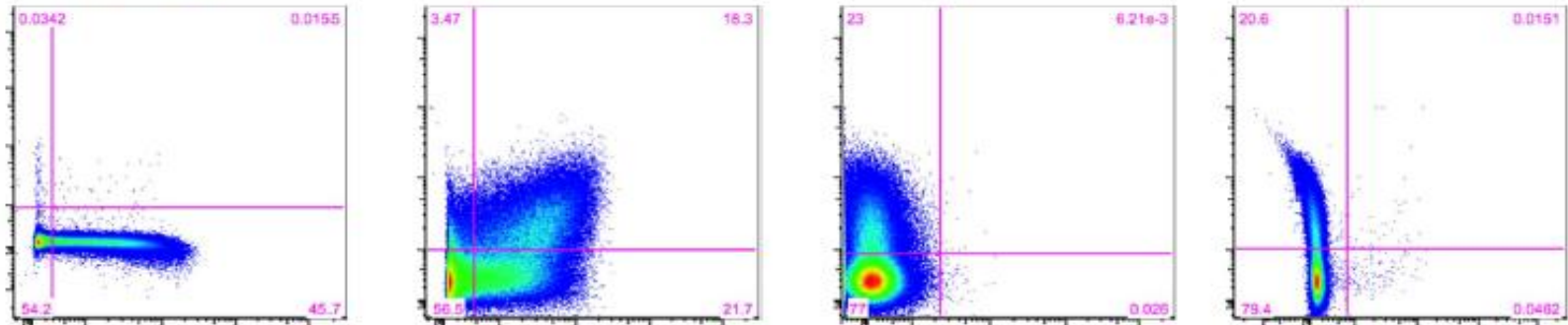
Junk removal



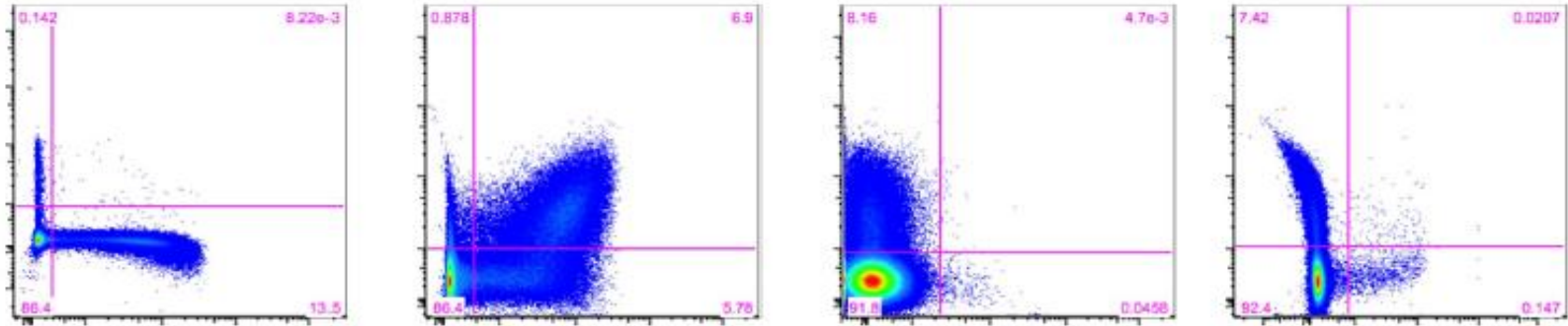
Technologies

Analysis of CD3+ T cells

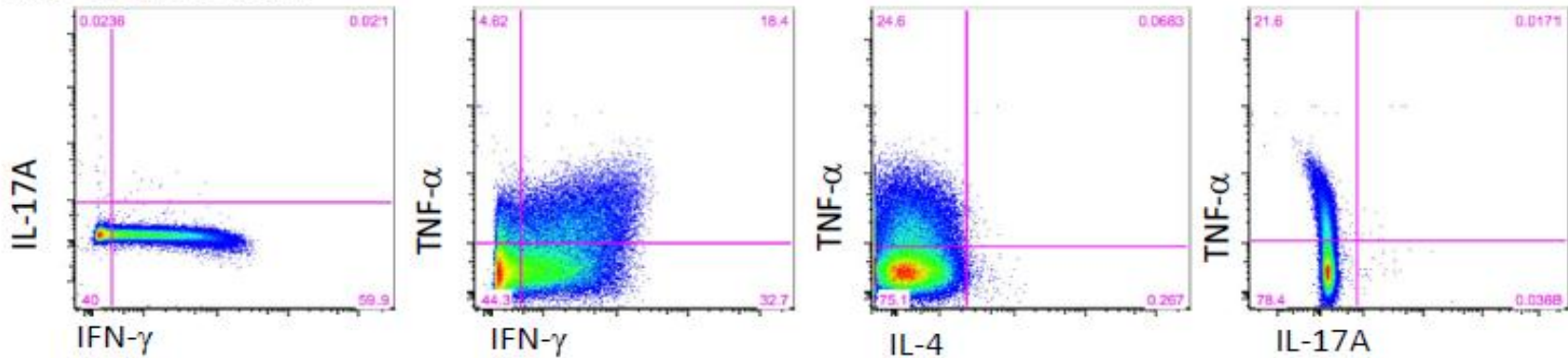
GATED ON CD8+ T CELLS



GATED ON CD4+ T CELLS

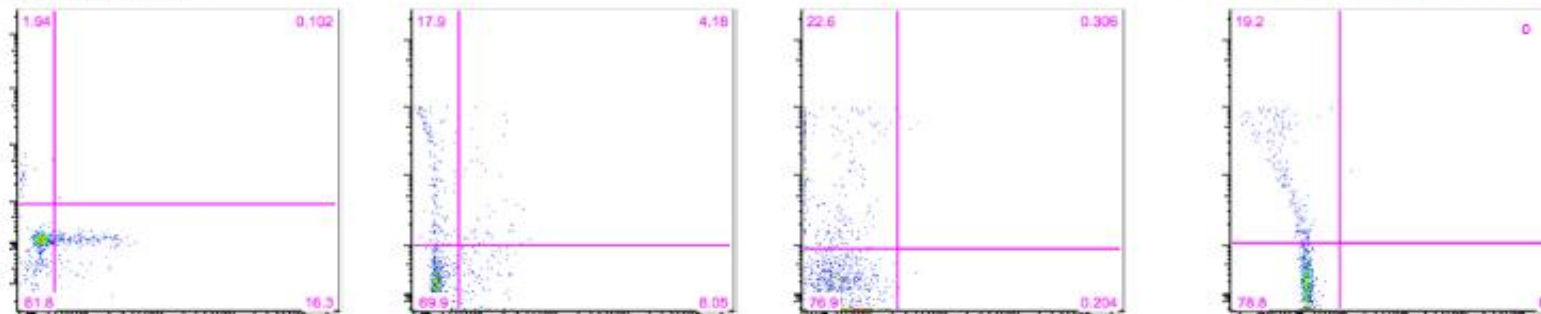


GATED ON CD4-CD8- T CELLS

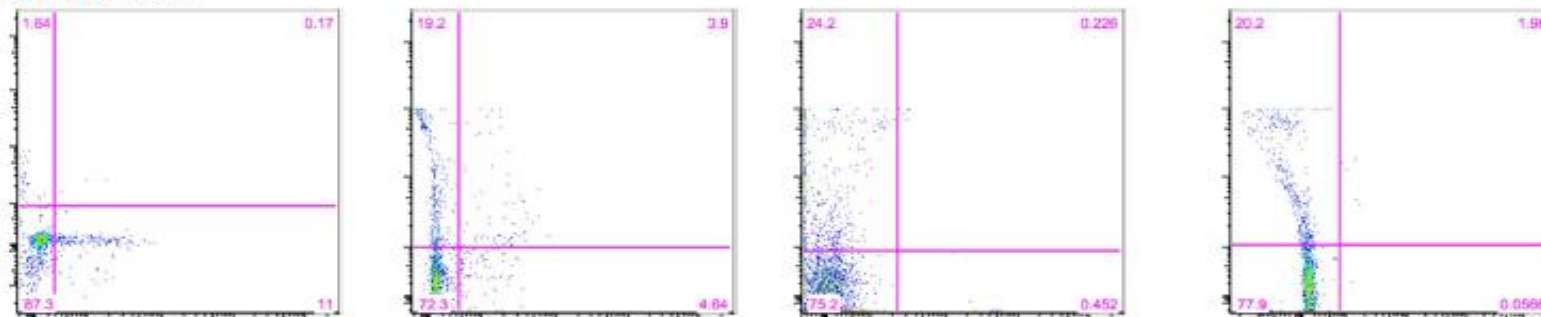


Analysis of iNKT cells

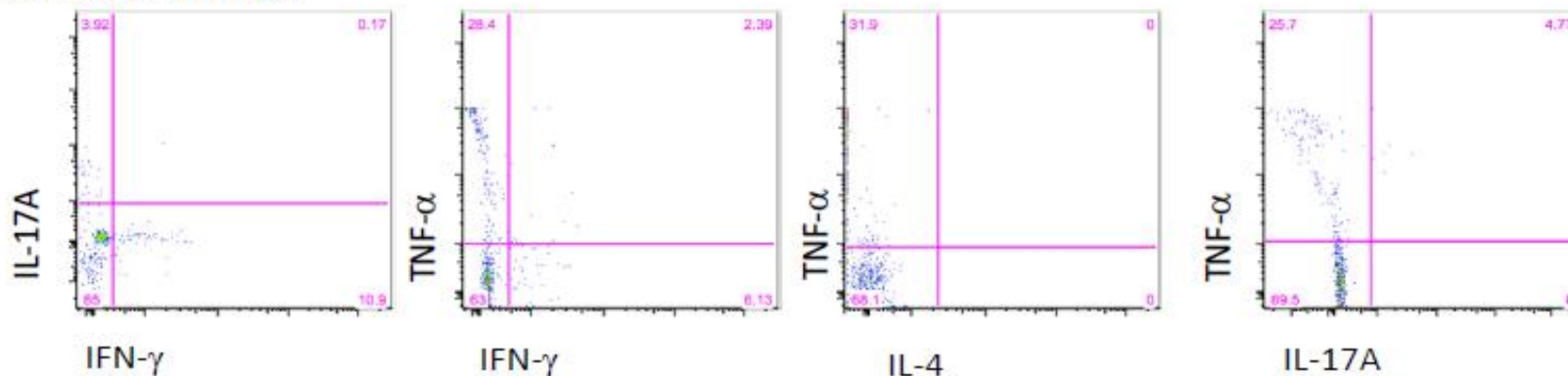
GATED ON CD8+ iNKT CELLS



GATED ON CD4+ iNKT CELLS



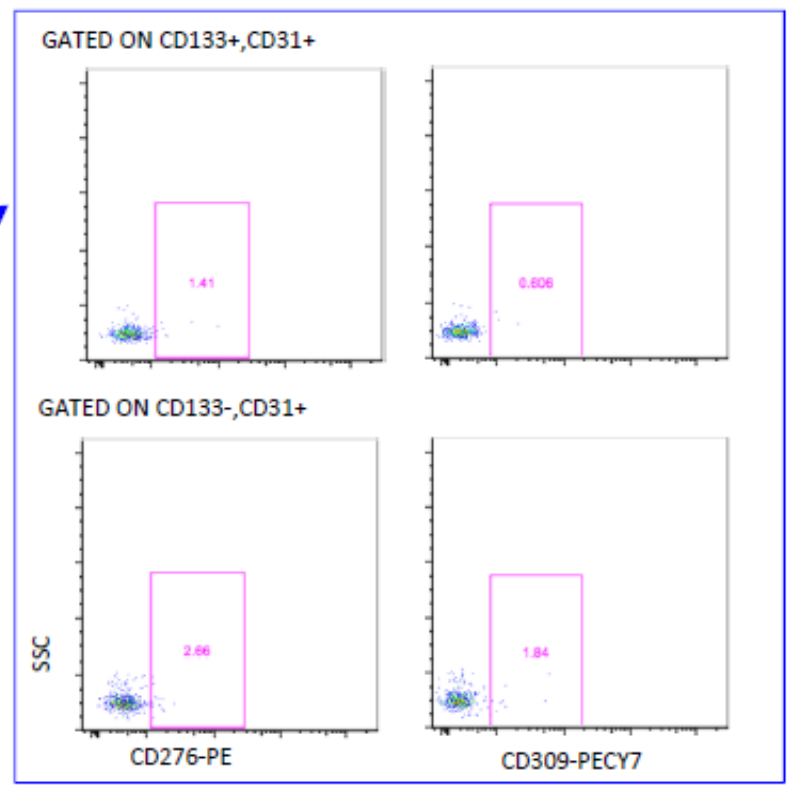
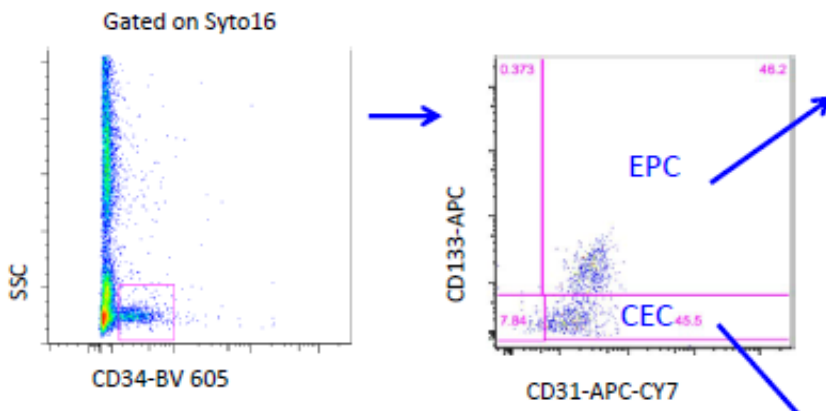
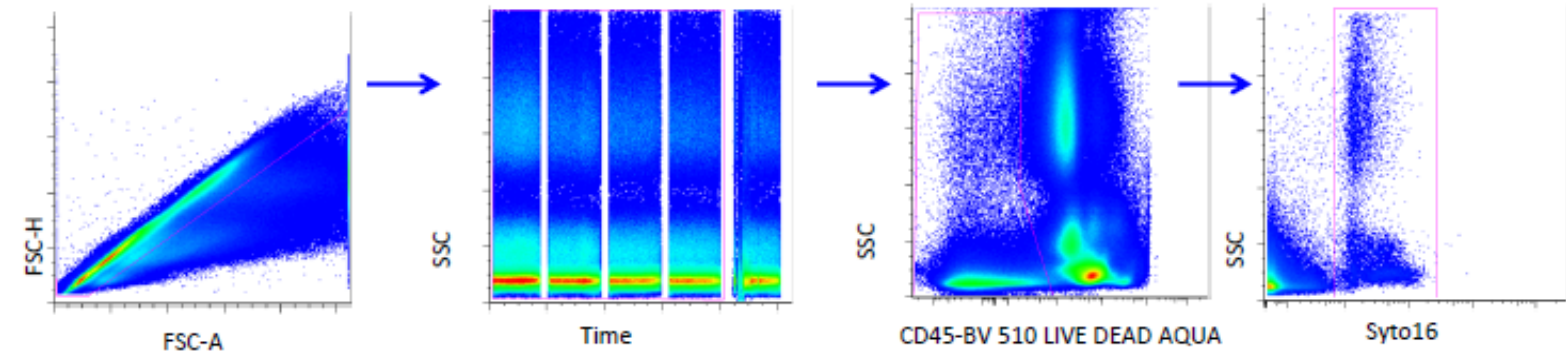
GATED ON CD4-CD8- iNKT CELLS



实例：循环内皮细胞和内皮祖细胞

- **Circulating Endothelial Cells (CEC)**
- **Circulating Endothelial Cell Precursor (EPC)**
- **CECs and EPCs are extremely rare events (0.1-0.0001% in buffy coat)**
- **Lack of unique markers:**
 - Live Dead (Syto16)
 - CD45 BV510
 - CD34 BV605
 - CD133 APC
 - CD31 APC-Cy7
 - CD276 PE
 - CD309 PE-Cy7

Gating strategy for their identification



Questions ?

www.lifetech.com/attune

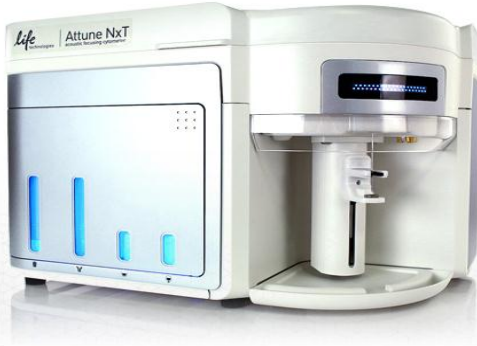
The screenshot shows the product page for the Attune® NxT Acoustic Focusing Cytometer. At the top, there is a navigation bar with links for Order Support, Sign In, Register, Quick Order, and Cart. The main header features the life technologies logo and a search bar. Below the header, there are navigation tabs for Life Sciences, Applied Sciences, Clinical, Shop All Products, and Technical Resources. The breadcrumb trail indicates the path: Home > Life Sciences > Cell Analysis > Flow Cytometry > Flow Cytometers > Attune® NxT Acoustic Focusing Cytometer.

Attune® NxT Acoustic Focusing Cytometer

Flow Cytometers

Attune® NxT Acoustic Focusing Cytometer

- Benefits of Acoustic Focusing
- Attune® NxT Autosampler
- Attune® Cytometer Testimonials
- Acoustic Focusing Technology Overview
- Research Applications
- Reagent Selection Guide for the Attune® Cytometer
- Specifications
- Attune® Cytometer Software
- Accessories & Reagents
- Service Plan
- Video Room
- Attune® Publications & Posters
- Attune® Autosampler



See what you've inspired

- Modular design
- Fast detection speed
- Distinctive acquisition and analysis software
- Convenient size

Now with the flexibility to create a customized 4-laser, 14-color system, the new Attune® NxT cytometer is designed to accommodate existing experimental protocols and lab budgets.

[Request a demo](#)

Quick Attune® NxT information

- [Attune® Brochure](#)
- [Download specification sheet](#)
- [What is acoustic focusing?](#)

Attune® NxT cytometer software

A Journey Through Innovation, The Discovery o... < |

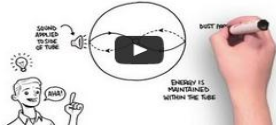



Diagram illustrating the principle of acoustic focusing: SOUND APPLIED TO SIZE OF TUBE, ENERGY IS TRANSDUCED WITHIN THE TUBE.

Changing flow cytometry

Changing flow cytometry < |



SEE IT USE IT LOVE IT