

# CytoFLEX 應用手冊

[www.beckmancoulter.com.tw](http://www.beckmancoulter.com.tw)



美商貝克曼庫爾特有限公司台灣分公司  
生命科學事業部



# 目錄

## CytoFLEX 流式細胞儀簡介

一． 9 色人類白血球細胞免疫表型分析 .....	5
二． 12 色人類白血球細胞免疫表型分析 .....	6
三． 小鼠脾臟細胞表型分析 .....	7
四． 小鼠脾臟細胞的細胞因子分析 .....	8
五． 雞紅血球細胞核 (CEN)、牛胸腺細胞核 (CTN) 細胞周期 品管控制 DNA 含量檢測 .....	9
六． 皮膚纖維組織母細胞 (skin fibroblast) 細胞周期檢測 .....	10
七． CFSE 細胞增殖檢測 .....	11
八． BrdU 檢測細胞增殖 .....	12
九． 植物葉片 DNA 倍體數檢測 .....	13
十． 細菌周期倍體數檢測 .....	14

十一． 藉由側向角散射光 (SSC) 分析細菌的死活 .....	15
十二． 藻類分類絕對計數檢測 (一) .....	16
十三． 藻類分類絕對計數檢測 (二) .....	17
十四． E.coli 絕對計數檢測 .....	18
十五． 陳舊血液中紅血球細胞微顆粒、過渡細胞和完整紅血球 細胞檢測 .....	19
十六． 小顆粒檢測 - 囊泡 .....	20
十七． 奈米顆粒的檢測 .....	21

## CytoFLEX 流式細胞儀簡介

CytoFLEX 先進的檢測技術，推動前驅探索，使您處於細胞研究領域的最前端。CytoFLEX 創新的設計，使它具有卓越的檢測性能，從單雷射四色至三雷射十三色，讓您在多色分析中獲取珍貴結果。CytoFLEX 精巧的尺寸，極低的維護成本，超高的靈敏度和解析度，全方位引領市場流式細胞儀的創新發展，CytoFLEX 陪伴您在研究道路上輕鬆前進。

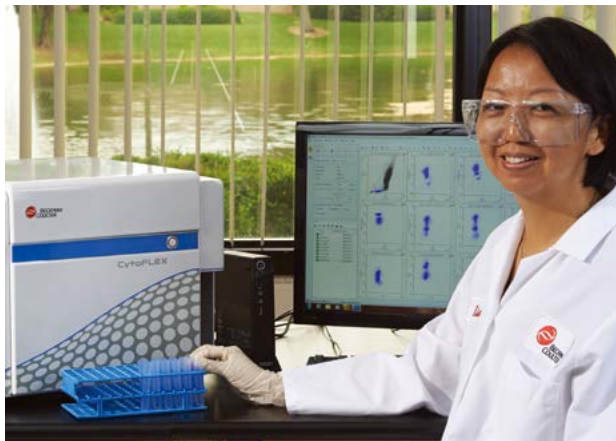
捨棄傳統光電倍增管（PMT）檢測器，採用固態、高效能、低雜訊光纖二極體管陣列檢測器（Fiber optical Array of Photo Detectors-FAPD）設計而成的多波長光分配檢測模組（Wavelength Division Multiplexor-WDM），這一個創新改變，帶來的是無以倫比的訊號分辨率及更為精確的數據，使稀有細胞族群和微顆粒的檢測水準有了突破性的發展。

即使您對實驗檢測標準的要求非常高，CytoFLEX 在任何光學配置下均能展現強大的檢測能力，儀器升級的便捷性，確保您在研究道路上不斷前進。優越的檢測能力以及探索複雜研究的表現——高達 15 個參數的設計確保您最先進的檢測水準。

多達 21 種靈活的儀器光學配置充分滿足您的研究需求。

CytoFLEX 流式細胞儀設計簡潔，用戶可自行安裝。其精巧的機身，能夠置放於大部分的生物安全櫃。

CytoFLEX 系統能夠支援各類螢光染劑的搭配選擇。



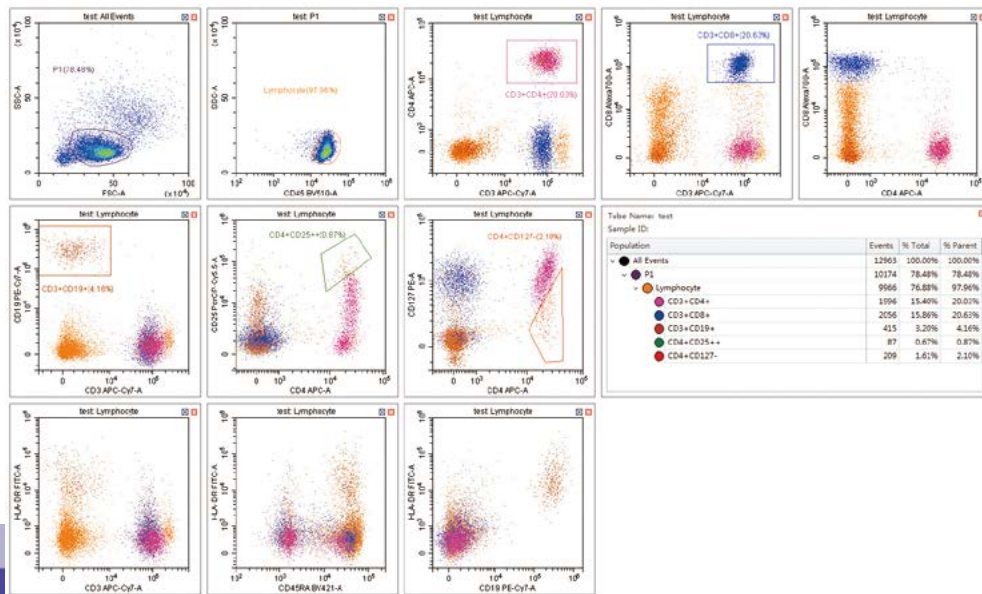
## 9 色人類白血球細胞免疫表型分析

**儀器配置：** 配備 12 個參數和 9 個螢光偵測器，以及增強型側向角散射光訊號偵測器 (VSSC)。

**實驗介紹：** 樣本為人類週邊血，標記抗體如下，抗體標記染色後，室溫避光培養 15 min，紅血球細胞裂解液移除紅血球細胞後離心沉澱，回溶後上機分析。

FITC	PE	PC5.5	PC7	APC	APC-A700	APC-A750	PB	KrO
HLA-DR	CD127	CD25	CD19	CD4	CD8	CD3	CD45RA	CD45

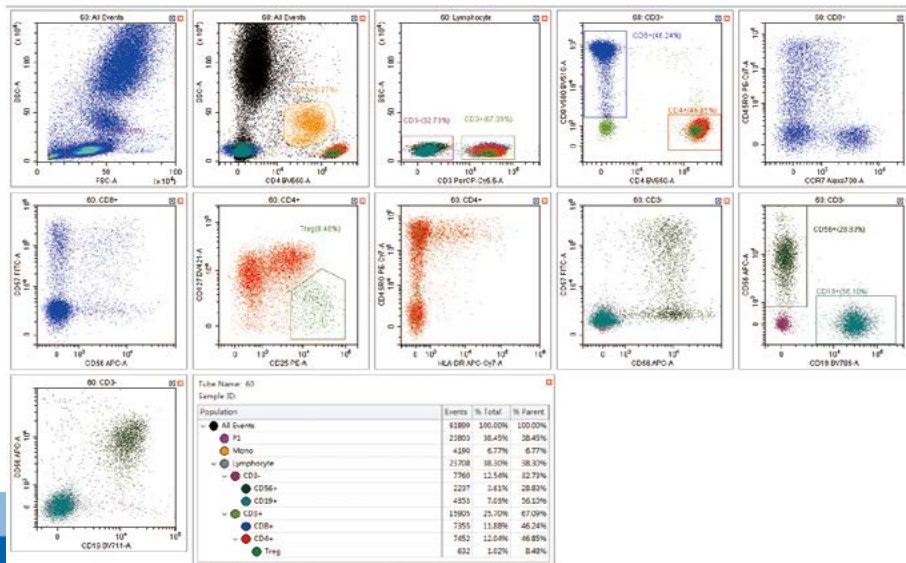
**實驗結果：**



**實驗介紹：**樣本為人類週邊血，標記抗體如下，抗體標記染色後，室溫避光培養 15 min，紅血球細胞裂解液除去紅血球細胞後離心沉澱，回溶後上機分析。

**抗體：**

FITC	PE	PerCP-CY5.5	PC7	APC	APC-A700	APC-CY7	BV421	BV500	BV650	BV711	BV786
CD57	CD25	CD3	CD45RO	CD56	CCR7	HLA-DR	CD127	CD8	CD4	CD16	CD19





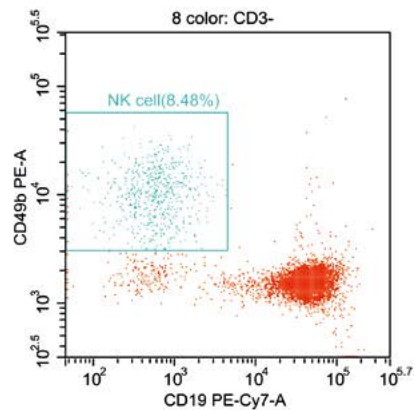
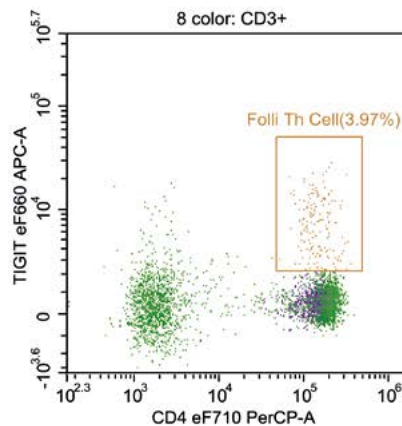
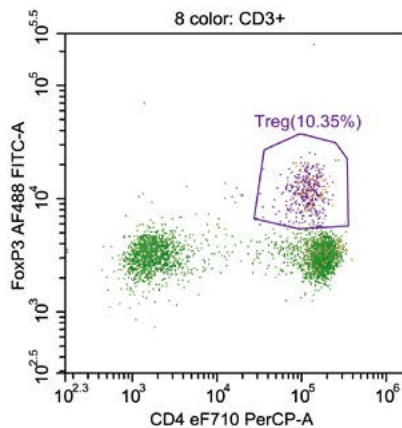
## 小鼠脾臟細胞表型分析

**實驗簡介：**小鼠脾臟細胞經研磨（使用 PBS+1%FBS+2mMEDTA 溶液）、過濾、裂解紅血球細胞後獲得，進行染色。

**抗體：**

AF488	PE	PerCP-eF710	PC7	eF660	APC-eF780	eF450	eF506
FoxP3	CD49b	CD4	CD19	TIGIT	CD8	CD3	FVD

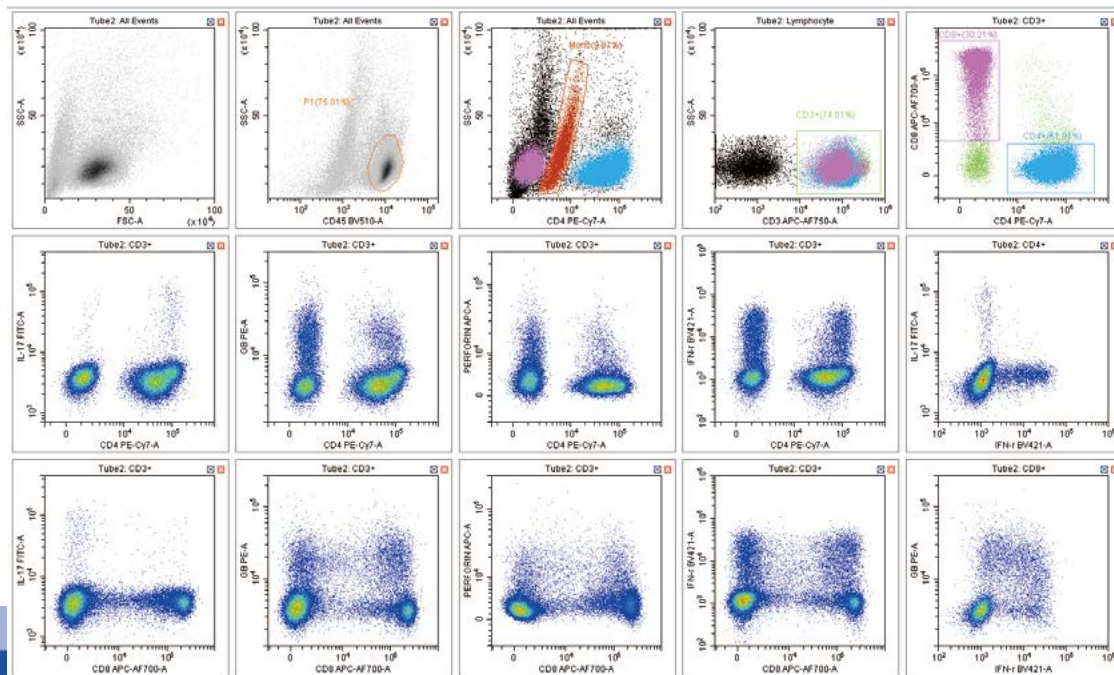
**實驗結果：**



## 小鼠脾臟細胞的細胞因子分析

**實驗簡介：**小鼠脾臟細胞經研磨 (使用 PBS+1%FBS+2mMEDTA 溶液)、過濾、裂解紅血球細胞後獲得，並進行表面染色。周邊血單核細胞 (PBMC) 使用 Ficoll 經過梯度密度離心獲得。PBMC 加 cocktail 刺激 4-5 小時，收集並表面染色；使用 IntraPrep Permeabilization Reagent (Beckman Coulter) 對細胞固定及細胞內染色。

**實驗結果：**

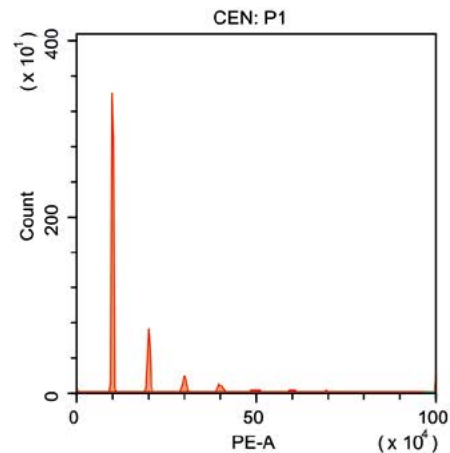
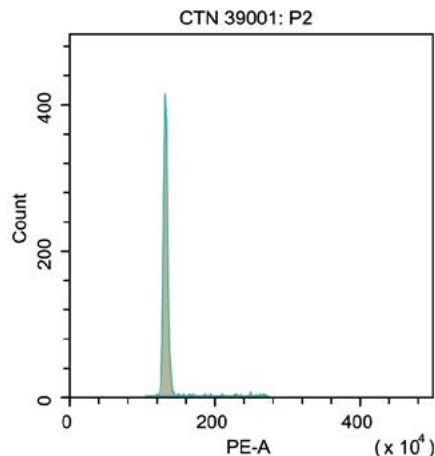
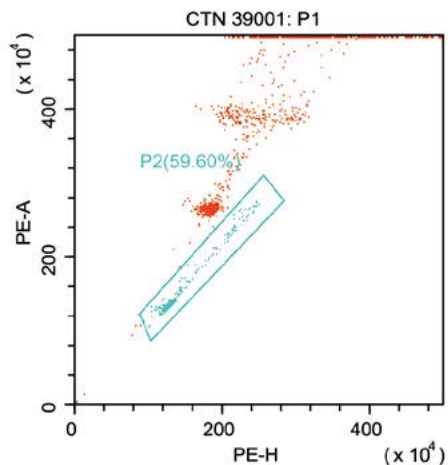




## 雞紅血球細胞核 (chicken erythrocyte nuclei-CEN)、牛胸腺細胞核 (calf thymocyte nuclei-CTN) 細胞周期品管控制 DNA 含量檢測

**實驗簡介：** 在上樣管中分別加入 40  $\mu$ l CEN 和 40  $\mu$ l CTN；每管中加入 1ml 的 PI 染色液；室溫避光培養 10min；將檢測管放於 2-8 $^{\circ}$ C 於 4 小時內上機檢測。

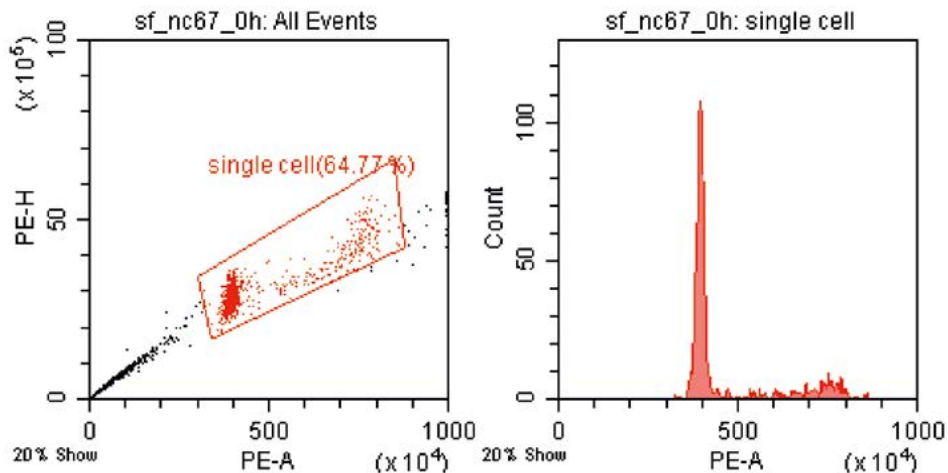
**實驗結果：**



## 皮膚纖維組織母細胞 (skin fibroblast) 細胞周期檢測

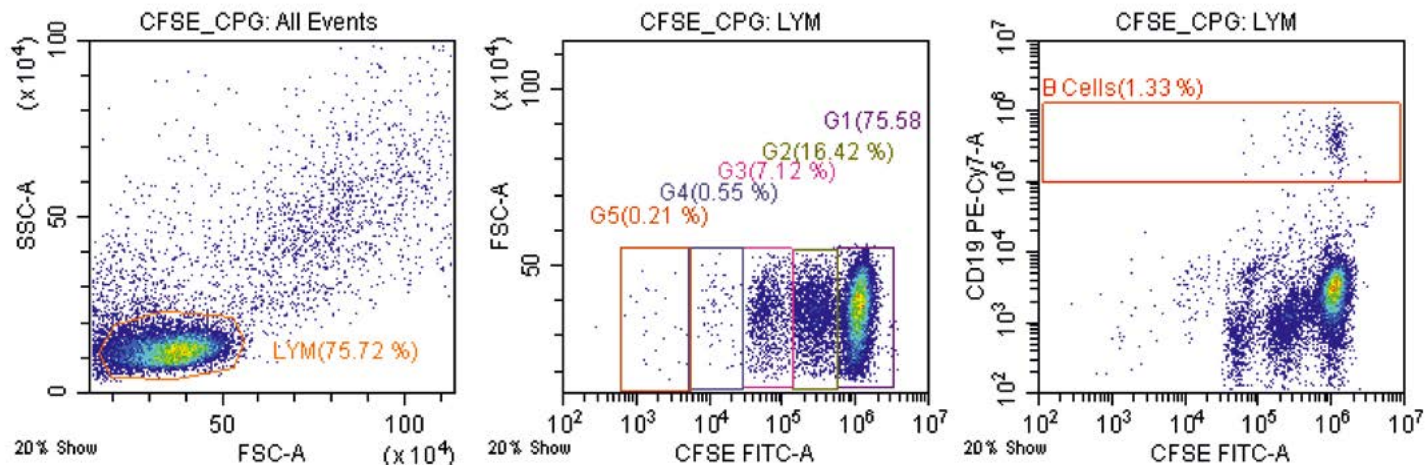
**實驗簡介：**皮膚纖維組織母細胞經 collagenase 裂解、篩網過濾獲得。Pancreatin 消化製備單細胞懸浮液，使用 NP40/PI 染液（含有 sodium citrate、NaCl、Nonidet P-40、PI），加 RNase，37°C 水浴 30 分鐘，上機檢測。

**實驗結果：**



**實驗簡介：**淋巴細胞在 IL-2 的維持下可以增殖，培養三天，其中，B 細胞在 CpG 的刺激下增殖更多。

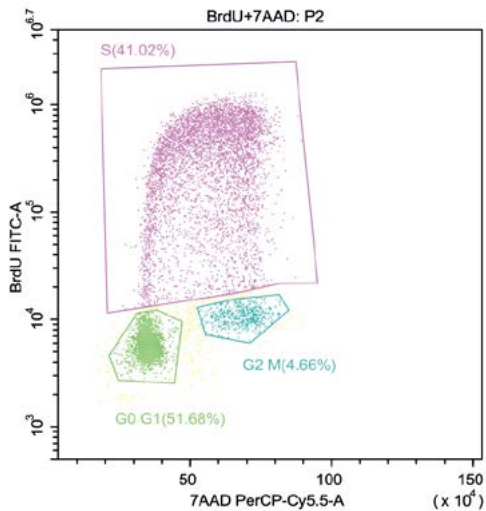
**實驗結果：**



## BrdU 檢測細胞增殖

**實驗簡介：**用 PBMC 樣本，作 BrdU-FITC, 7-AAD 檢測。樣本離心沉澱後加入 200  $\mu$ l PBS 回溶細胞；將樣本轉移到檢測管中，待測樣本中包含 BrdU-FITC 和 7-AAD 雙染；每個檢測樣本管中再加入 300  $\mu$ l PBS 輕輕震盪，上機檢測。

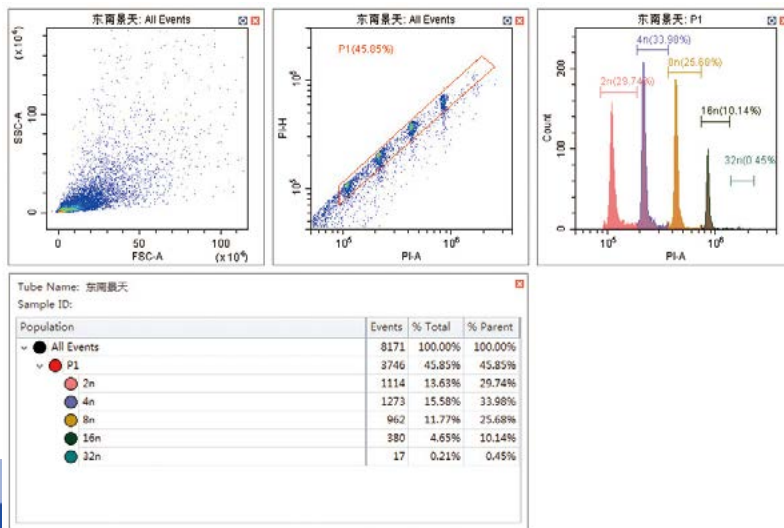
**實驗結果：**



## 植物葉片 DNA 倍體數檢測

### 實驗簡介：

- 配製溶液： 溶液 I：0.1 mol/L 檸檬酸 4.2 g, 0.5% Tween-20，最終體積 200 mL, 4°C 下保存備用；  
溶液 II：0.4 mol/L 磷酸氫二鈉 28.65 g，PI 20mg，最終體積 200 mL, 室溫下保存備用；
- 取 20 mg 洗淨去除中脈的新葉置於塑膠培養皿中，以刀片將葉片切碎；
- 吸取切好的樣品經 350 meshes 尼龍篩網過濾到 1.5 mL Eppendorf 管中；
- 將所得濾液在 13000 rpm 的條件下離心 30 秒；
- 移除上清液到剩餘 0.1 mL，加入新鮮的溶液 I 200  $\mu$ L 回溶沉澱；上機分析前，再在樣品中加入 600  $\mu$ L 溶液 II。



## 細菌周期倍體數檢測

**實驗簡介：**培養後的 E.coli，以 70% 冰酒精固定 4 小時，以 DAPI 染劑（含 0.1% Triton-X100）染色 30 分鐘，經 300 meshes 濾網過濾後待測。

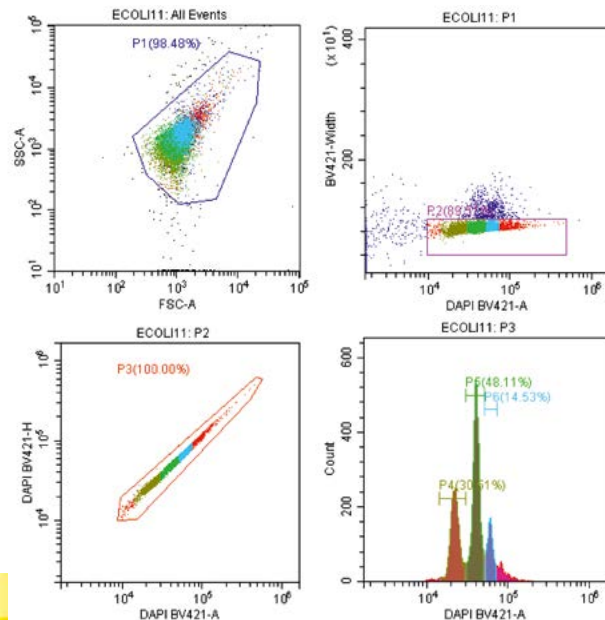
**實驗結果：**在 FSC-A vs SSC-A 散點圖上圈選 P1 Gate，排除雜訊及碎片小顆粒。再經由 FL8-A vs FL8-W、FL8-A vs FL8-H 雙參數散點圖圈選單顆細胞，最後由 FL8-A 直方圖對各倍體進行分析，在統計中勾選“體積”、“events/ul (V)”、“FL8 的 CV 值和 Mean 值”即可對樣本倍體比例、CV 值、各群體濃度等進行統計。

实验名称： Exp\_20140821\_DAPI

试管名称： ECOLI11

体积(微升)： 3.9

群体	颗粒数	%总数	%父群	CV DAPI BV421-A	Mean DAPI BV421-A	颗粒数/uL(V)
● All Events	10305	100....	100....	79.82%	41519.4	2645.25
● P1	10148	98.4...	98.4...	58.73%	41438.4	2604.95
● P2	9083	88.1...	89.5...	52.78%	41435.4	2331.57
● P3	9083	88.1...	100....	52.78%	41435.4	2331.57
● P4	2771	26.8...	30.5...	12.81%	22404.1	711.30
● P5	4370	42.4...	48.1...	10.03%	40774.5	1121.76
● P6	1320	12.8...	14.5...	8.32%	60836.1	338.84

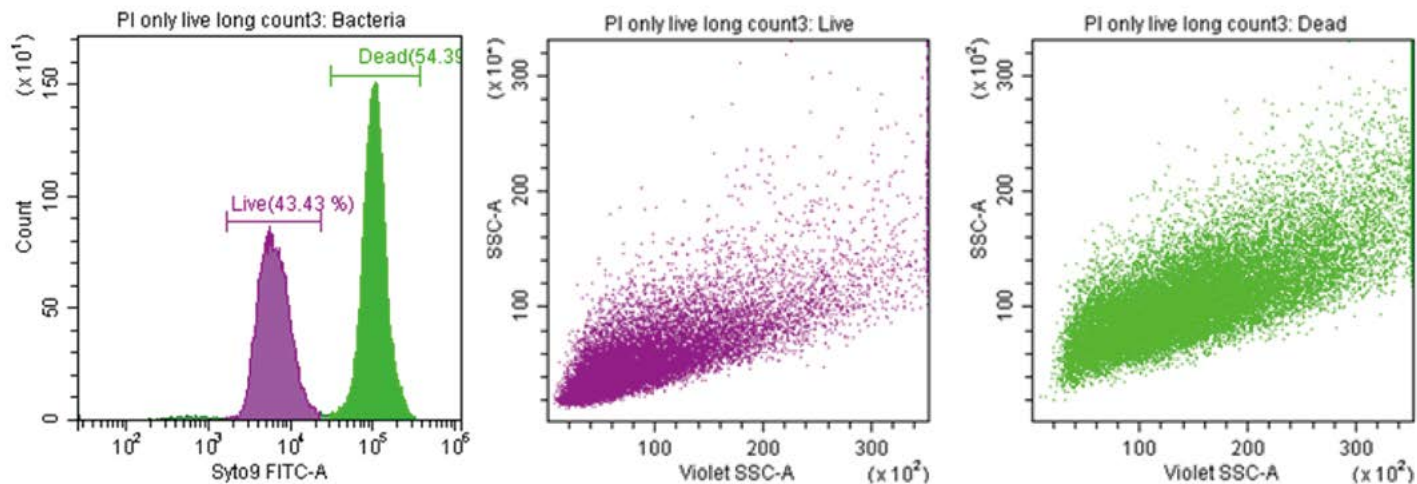




## 藉由紫光側向角散射光 (VSSC) 鑑別細菌死活

**實驗介紹：**培養隔夜，均質後的英諾克李斯特菌 (*Listeria innocua*)， $0.5\ \mu\text{m}$  寬度和長度  $1 - 1.5\ \mu\text{m}$  的杆狀細菌，使用 PI 和 Syto9 染色。

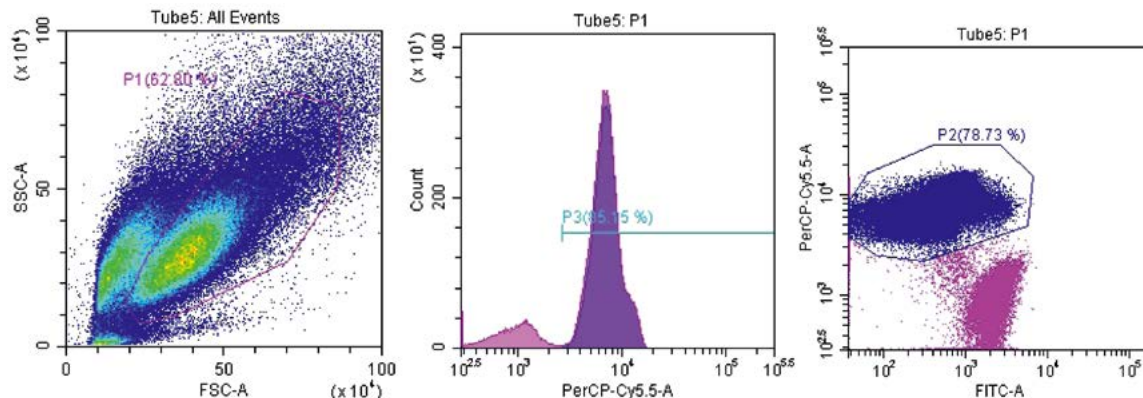
**實驗結果：**增強型紫光側向角散射光訊號偵測器 (VSSC) 可以反映死細菌與活細菌的訊號差別。



## 藻類分類絕對計數檢測（一）

**實驗簡介：**環境水質中的藍藻，直接或經過培養後，經 300 meshes 濾網過濾後待測。

**實驗結果：**



試管名稱：Tube5

樣本ID：

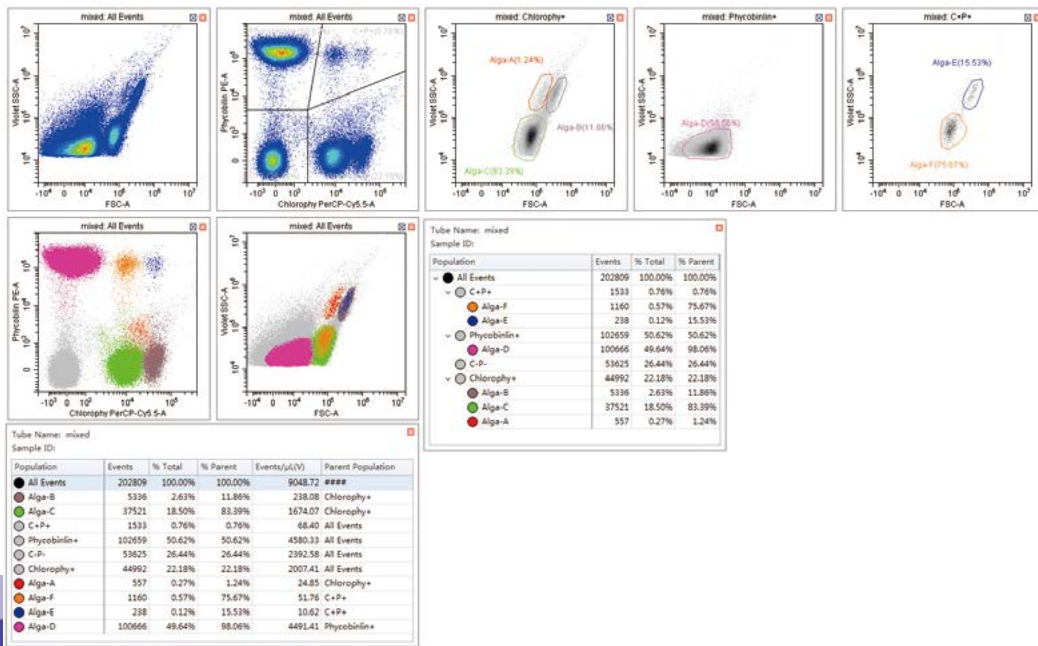
體積(微升)：3.6

群體	顆粒數	%总数	%父群	顆粒數/uL(V)	Mean FITC-A	Mean PerCP-Cy5....
● All Events	158744	100....	100.00 %	43579.06	958.0	4897.8
● P2	78491	49.4...	78.73 %	21547.67	549.3	7435.9
● P3	84891	53.4...	85.15 %	23304.63	501.7	7306.2
● P1	99697	62.8...	62.80 %	27369.23	751.8	6363.4

## 藻類分類絕對計數檢測 (二)

**實驗簡介：** A,B,C,D 四種藻類調整濃度至  $10^4$ - $10^7$  顆/ml，經 300 meshes 濾網過濾後待測；0.3um，0.5um，3um，6um，10um 標準微球混合後待測。

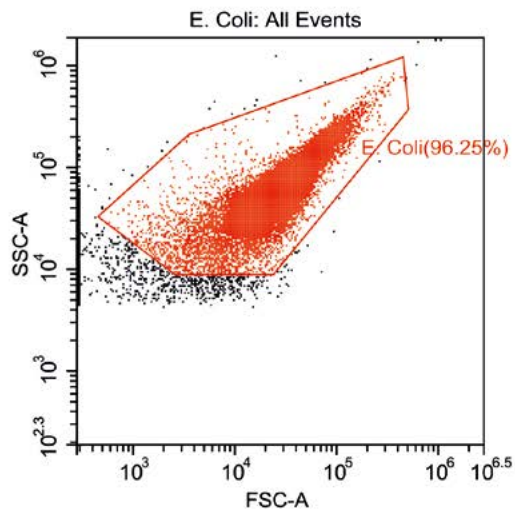
**實驗結果：** 上樣混合微球，以 0.3um 為界限設定閾值排除 0.3um 以下顆粒，並圈選每群微球命名以示區別；分別上樣 A,B,C,D 四種藻類，以確定葉綠素 chlorophyll (FL3) 和藻膽素 phycobilin (FL2) 陽性範圍，圈選陽性區域並設 gate 至複製的兩個 FSC-A vs Violet SSC-A 雙參數散點圖；上樣混合樣本，模擬自然海水中樣本情況，上樣分析混合樣本區分情況及計數。



## E.coli 絕對計數檢測

實驗簡介：用 PBS 進行稀釋 E.coli；記錄稀釋倍數。

實驗結果：



Tube Name: E. Coli

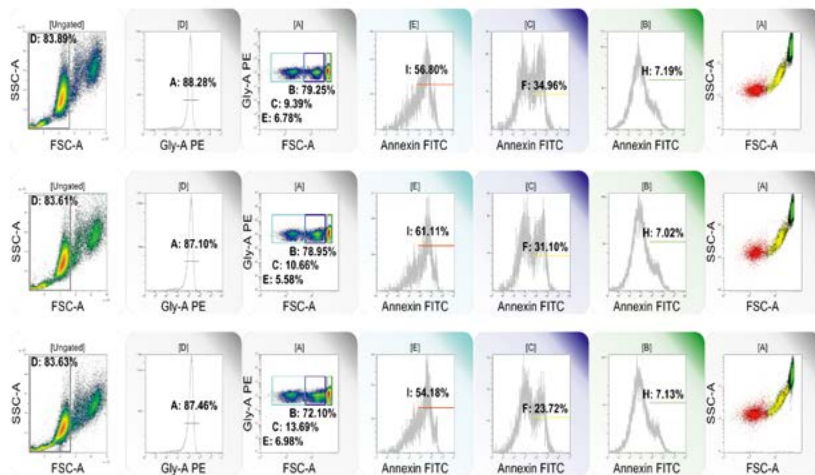
Sample ID:

Population	Events	% Total	% Parent	Cells/ $\mu$ L(V)
● E. Coli	46645	96.25%	96.25%	27344.41

## 陳舊血液中紅血球細胞微顆粒、過渡細胞和完整紅血球細胞檢測

**實驗介紹：**放置3個月的人類陳舊血液樣本，標準血庫儲存條件。Annexin V 染色檢測。閾值設置在 Gly-A+ 上以排除紅血球細胞碎片和白血球細胞。

**實驗結果：**前向角散射光和側向角散射光組合中顯示出紅血球細胞微顆粒，過渡細胞和完整的紅血球細胞。



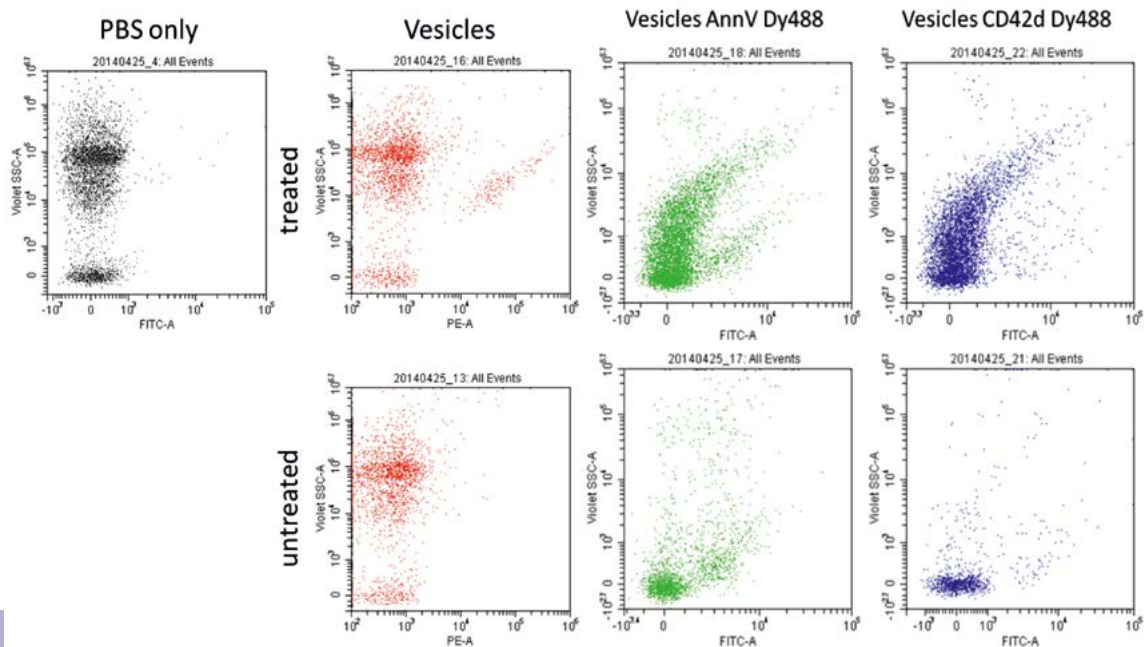
### Sample W086114，三重覆 (Triplicate) 的檢測結果

從左到右：紅血球細胞群被排除，Gly-A 陰性被排除，Gly-A 陽性細胞群在前向散射光訊號從無到弱，中間值和強表現；Annexin V 檢測到低 (E，紅色)，中 (C，黃色)，高 (B，綠色)。顏色表示 Annexin V 在前向散射光和側向散射光顯示紅血球細胞膜微顆粒 (紅)，過渡型細胞 (黃)，和完整紅血球細胞 (綠)。

Sample	Total clean events (A)				Microparticles		Transitional	Intact RBC
		FS_Low	FS_Int	FS_Hi	AnnexP_FS_Low	AnnexP_FS_Int	AnnexP_FS_Hi	
W084514A	84010	11.2%	1.0%	86.4%	63.0%	18.9%	7.6%	
W084514B	83365	11.7%	2.6%	83.7%	59.0%	19.6%	7.4%	
W084514C	82680	11.0%	4.4%	81.8%	61.9%	17.5%	7.2%	
Mean	83352	11.3%	2.7%	84.0%	61.3%	18.7%	7.4%	
SD	665	0.4%	1.7%	2.3%	2.1%	1.1%	0.2%	
CV	0.8%	3.2%	64.1%	2.7%	3.4%	5.7%	2.5%	
W085315A	84586	9.7%	1.8%	86.2%	55.9%	15.6%	5.2%	
W085315B	82371	9.2%	0.4%	88.5%	57.0%	31.0%	5.7%	
W085315C	85298	8.6%	1.9%	87.1%	54.8%	15.1%	4.8%	
Mean	84085	9.2%	1.4%	87.3%	55.9%	20.6%	5.2%	
SD	1526	0.5%	0.9%	1.1%	1.1%	9.0%	0.4%	
CV	1.8%	5.8%	62.6%	1.3%	2.0%	43.8%	8.4%	
W086114A	79488	6.8%	9.4%	79.3%	56.8%	35.0%	7.2%	
W086114B	73871	5.6%	10.7%	79.0%	61.1%	31.1%	7.0%	
W086114C	79430	7.0%	13.7%	72.1%	54.2%	23.7%	7.1%	
Mean	77596	6.4%	11.2%	76.8%	57.4%	29.9%	7.1%	
SD	3226	0.8%	2.2%	4.0%	3.5%	5.7%	0.1%	
CV	4.2%	11.7%	19.6%	5.3%	6.1%	19.1%	1.2%	

**實驗介紹：**從大鼠的 Plasma 中製備囊泡。對比治療前後，使用 Annexin V 和 CD42d Dye 488 雙染。使用 VSSC 和螢光訊號區別儀器背景訊號的干擾。

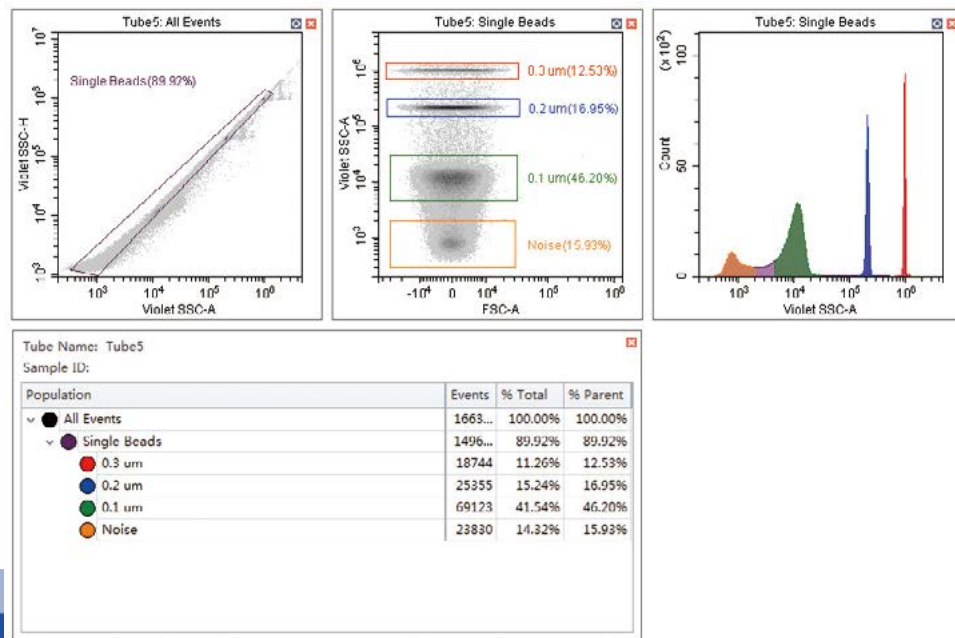
**實驗結果：**藉由紫光 VSSC 增加了散射光訊號的敏感度。



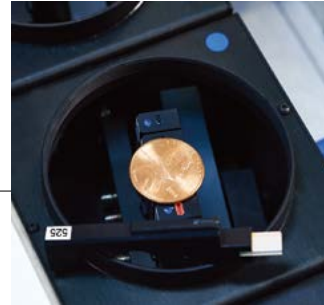
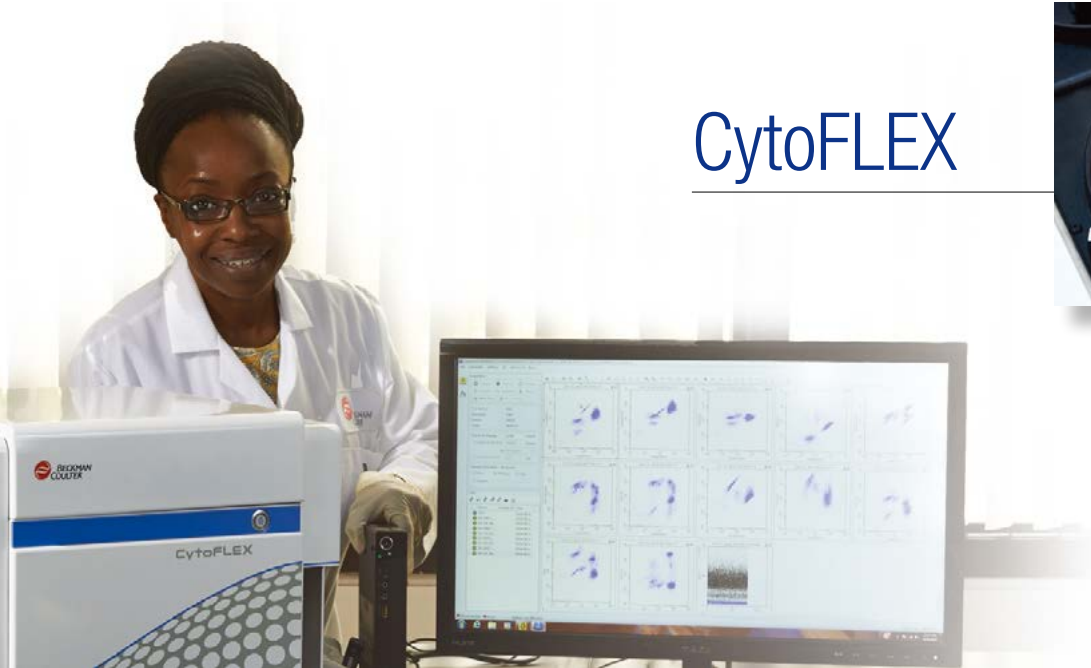


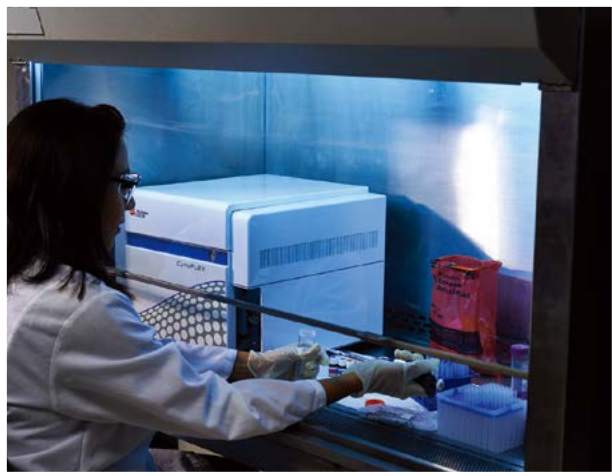
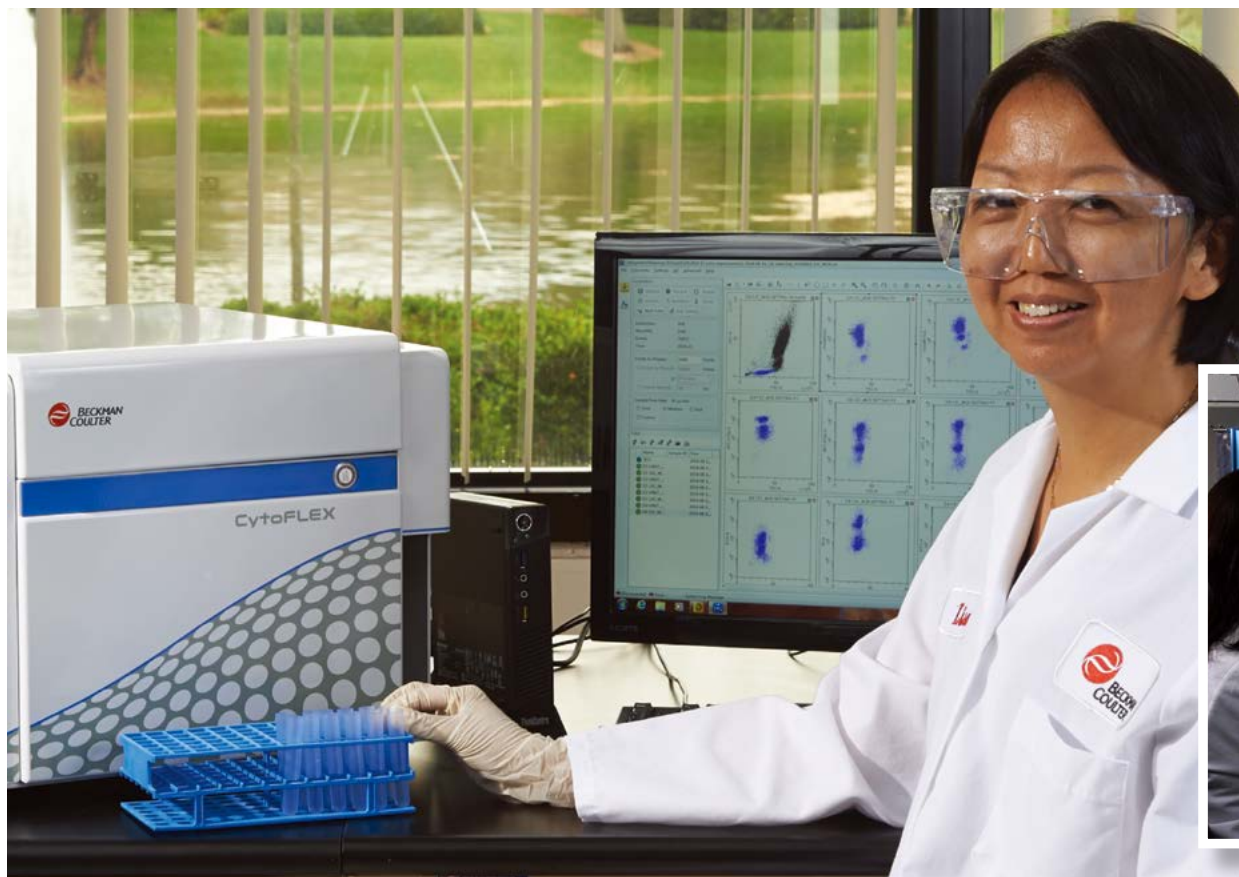
**實驗簡介：**採用 PCS Control Mixed Kit ( Beckman Coulter, 6602336)：包括 50, 100, 200, 300 和 500nm 的五種單獨包裝，大小不同的乳膠微球和 Multimodal Particle Size Standards (Thermo, MM-010)：一瓶中含有 81nm, 203nm 和 498nm 三種大小不同的微球，用過濾的去離子水稀釋微球（50nm 微球除外）至終濃度約為  $10^7$  顆 /ml 待測（過濾的去離子水作為陰性對照）。

**實驗結果：**



# CytoFLEX







**美商貝克曼庫爾特有限公司台灣分公司**

台北市 106 敦化南路二段 216 號 8 樓

電話：0800212134

網址：<http://www.beckmancoulter.com.tw>