



Miltenyi Biotec



# 流式細胞 分析工具

REAfinity™ Antibodies

ISOTYPE CONTROL

流式 PANEL 推薦

REA 抗體其他應用

VIO® 螢光染劑

Realease Fluorochrome Technology

MACSQuant® Flow Cytometers

Express Modes

CAR Detection Reagent

The MACSQuant® Tyto® Cell Sorter

# REAfinity Antibodies



30 年來，Miltenyi Biotec 一直致力於提供您可以信賴的優質抗體

Miltenyi Biotec 抗體無論是用於領先市場的 MACS®MicroBead 技術還是流式細胞儀應用，都採用嚴格的生產和質量控制標準，以確保提供可靠的產品。

在過去幾年，科學界越來越關注實驗的可重複性

這已反映在多個出版物和文章中<sup>1-5</sup>。在這種情況下，抗體被認為是結果不一致的關鍵之一。Miltenyi Biotec 非常重視這一主題，並認為我們有責任提供經過驗證的一致工具為科學界服務。

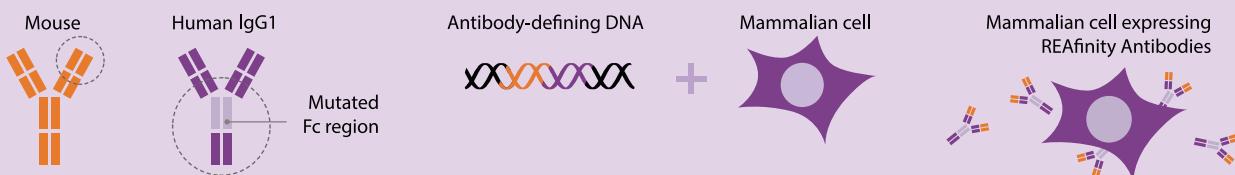


## REAfinity Antibodies

REAfinity 抗體設計是從傳統融合瘤獲得的小鼠或大鼠單克隆抗體的克隆抗基因結合區 (Fab) 與人 IgG1 Fc 區衍生而產生。這兩個遺傳區域利用基因重組技術，形成一個基因重組抗體。

為了在分析期間消除背景信號，將該融合基因的人 IgG1 Fc 區做突變，消除基因重組工程抗體與 Fc $\gamma$ Rs 的任何結合。

### Manufacturing workflow for REAfinity Antibodies

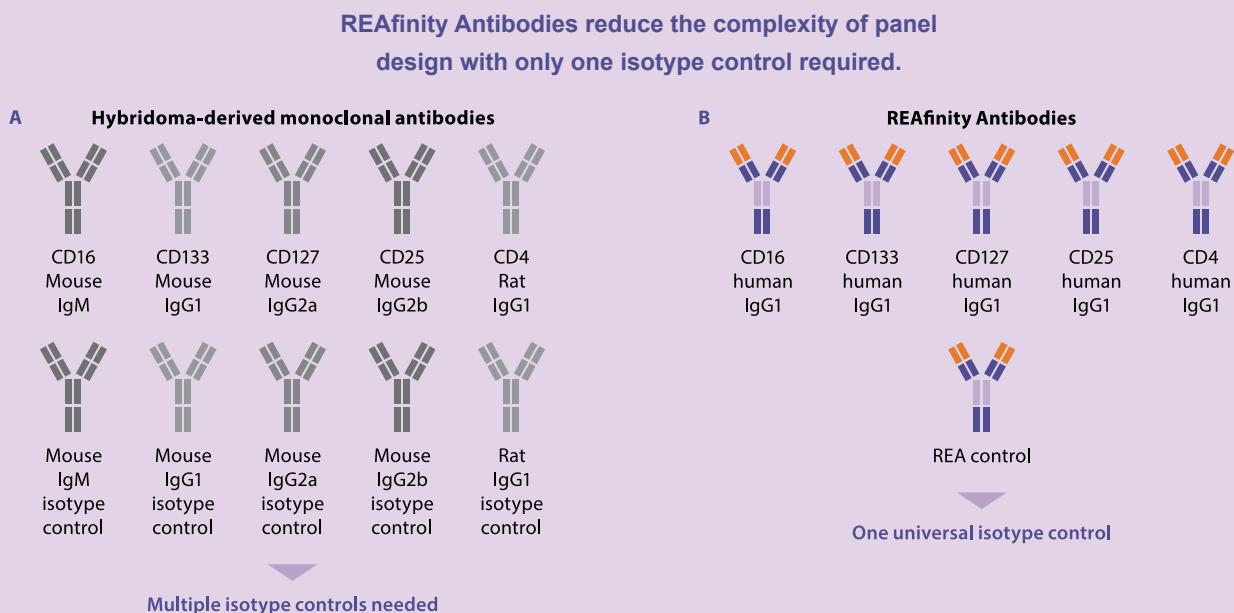


### Selected references

1. Goodman, S.L. (2018) The antibody horror show: an introductory guide for the perplexed. *N Biotechnol.* 45: 9-13.
2. Baker M., (2015) Reproducibility crisis: Blame it on the antibodies. *Nature* 521(7552): 274-6.
3. Bradbury A. and Plückthun A., (2015) Reproducibility: Standardize antibodies used in research. *Nature* 518(7537): 27-9.
4. Journals unite for reproducibility. (2014) *Nature* 515(7525): 7.
5. Bradbury A.R.M. et al., (2018) When monoclonal antibodies are not monospecific: Hybridomas frequently express additional functional variable regions. *Mab* 10(4): 539-546.

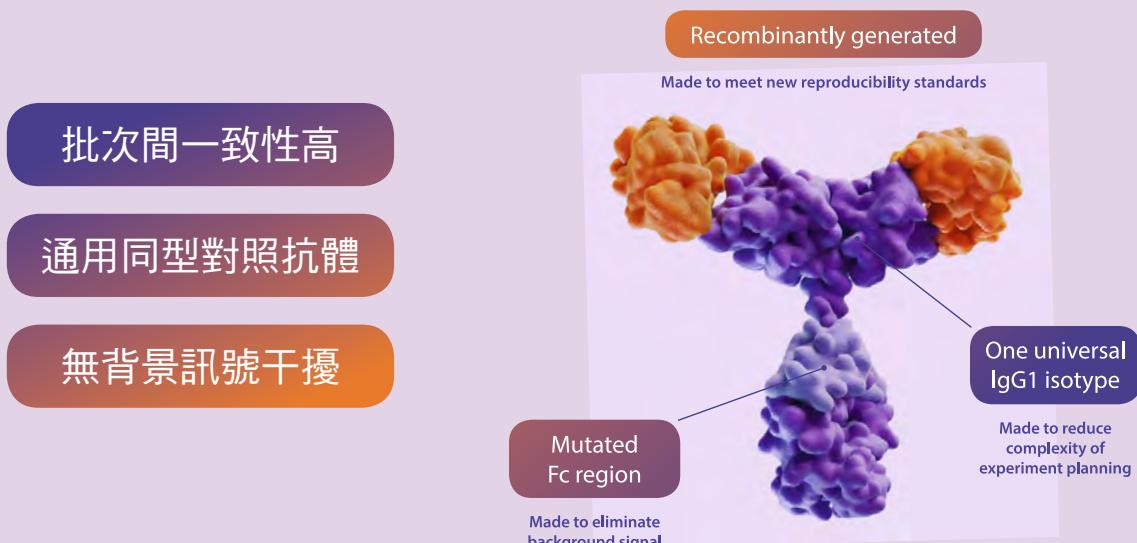


為了保證最大純度和批次之間的一致性，使用生物學和化學定義的體外表達系統來產生 REAfinity 抗體。工程化的遺傳序列在哺乳動物細胞系中表達，該細胞系在標準化的無血清條件下培養。為了確保批次之間的一致性，使用相同的細胞係來產生所有 REAfinity 抗體，這消除了由於表達系統的差異而導致的變異性。



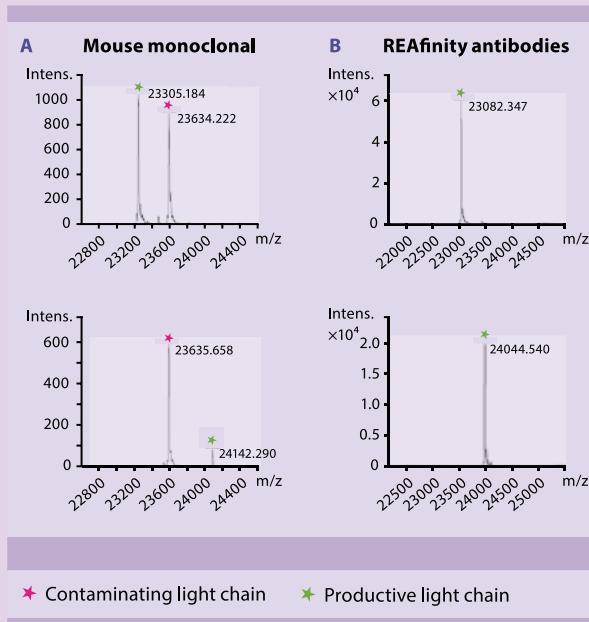
## 重組抗體 REAfinity™ Recombinant Antibodies

- \* 高純度和批次之間的一致性，提供更高的再現性
- \* 消除繁瑣且昂貴的 **Fc** 受體阻斷 (**Fc receptor blocking**) 步驟
- \* 單一通用的同型控制 (**Isotype control**)，大幅節省成本



# REAfinity Antibodies

## 抗體的再現性與一致性



### 高純度抗體

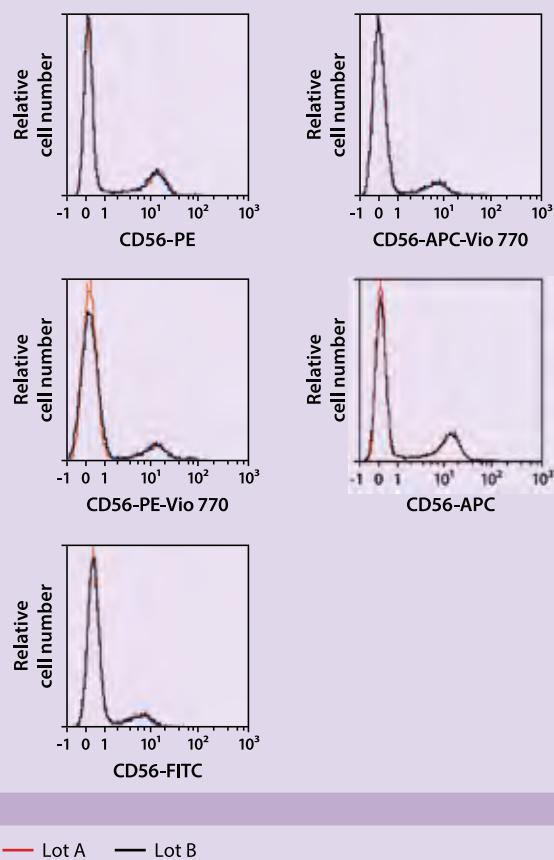
與傳統的融合瘤技術相比，重組抗體確保了很高的批次一致性。純化的重組抗體經過質譜分析證實了抗體產物的純度提高。

Mass spectrometry analysis of purified antibodies shows that REAfinity Antibodies are defined products, while hybridoma generated antibodies can be a mixture. (A) Mass spectrometry analysis of two examples of hybridoma-generated monoclonal antibodies shows that both contain a second light chain with a molecular weight of approx. 23,635 Da. In one example bottom left, the amount of contaminating light chain was by far exceeding the productive light chain of approx. 24,142 Da. (B) Two examples of recombinant REAfinity Antibodies show pure light chain populations.

## 批次間一致性高

此外，我們也會在抗體原料生產以及螢光染料結合過程中，經過兩個階段測試所有抗體的批次間一致性，這包括從混合物中去除未結合的螢光染料和抗體的純化步驟，以及與先前批次的相似度比較。

Human PBMCs from a single donor were stained with CD56 antibodies conjugated to FITC, PE, APC, APC-Vio® 770, or PE-Vio® 770 from two different production lots, and analyzed on the MACSQuant® Analyzer. The overlayed histograms represent the different lots. Tandem Signal Enhancer, human, was used to increase stain indices of tandem dye-conjugated antibodies. Cell debris and dead cells were excluded from the analysis based on scatter signals and PI fluorescence. In case of staining with CD56 conjugated to tandem dyes, DAPI was used to exclude dead cells from the analysis.





## 抗體的專一性 驗證 REAfity 抗體與其靶抗原的特異性結合的方法

### 結合位競爭試驗 (Epitope competition assay)

為了比較 REAfity clones 與市場上其他已知 clones 的結合位特異性，進行競爭測定。將細胞與過量的純化的未接合螢光的 REAfity 抗體一起染色，然後用針對相同標記的其他已知 clones 的螢光抗體做二次染色。基於獲得的螢光信號，鑑定 clones 識別標記分為完全重疊 (++)，部分重疊 (+) 或完全不同的表位 (-)。

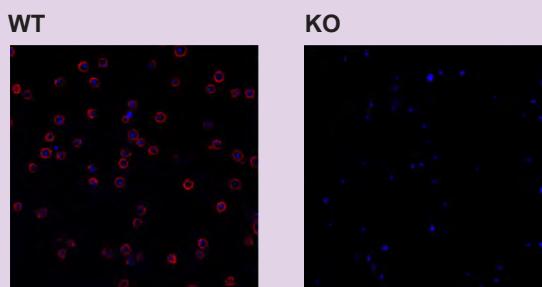
#### 以 CD56(REA196) 為例

在針對不同已知 clones 的競爭測定中測試 REAfity clones CD56 (REA196) 有以下程度不同的識別，包含：完全重疊 (++)，部分重疊 (+) 或完全不同的表位 (-)。

Other clones	Overlap in epitope recognition with REA196
NCAM16.2	++
TULY56	++
5.1H11	++
AF12-7H3	-
C5.9	++
N901/NKH1	++
CMSSB	+
B159	-
HCD56	-
MEM188	-

### 通過靶向基因組編輯進行敲除驗證 (Knockout validation via targeted genome editing)

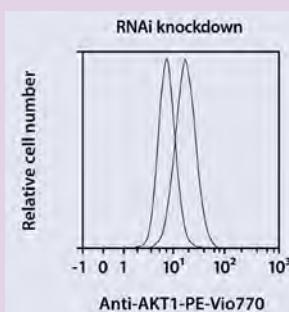
對於該方法，使用位點特異性核酸酶在合適的細胞系中敲除靶基因，並通過靶基因座的測序確認敲除。如果無法檢測到抗體與敲除細胞結合，則認為抗體與預期表位有特異性結合。



Fluorescence microscopy image of CD53 knockout cells. Wild type (WT, left) and knockout cells (KO; right) were stained with CD53-PE (REA259, red) and counterstained with DRAQ5 (blue) as DNA stain.

### RNA 干擾調控 (RNAi knockdown)

在該方法中，使用 RNA 干擾或 RNAi 敲除靶抗原。通過用小的非編碼 RNA 寡核苷酸轉染細胞來抑制靶 RNA 的轉譯。轉染細胞與對照細胞之間的比較揭示了測試抗體對其抗原的特異性。



Knockdown of the target antigen by RNAi. The left peak indicates HeLa cells transfected with AKT1 RNAi, the right peak is the non-transfected control. Cells were fixed, permeabilized, stained with Anti-AKT1 antibody-fluorochrome conjugates, and analyzed by flow cytometry using the MACSQuant Analyzer 10. Cell debris was excluded based on scatter signals.

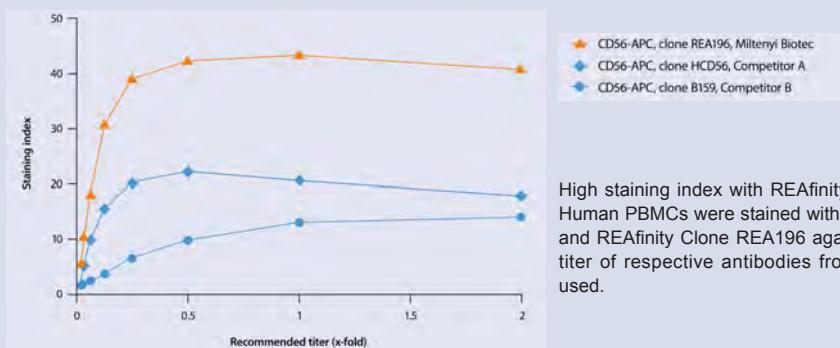
# REAfinity Antibodies

## 抗體的靈敏性

抗體本身的靈敏度對於目標細胞的鑑定可靠性是很重要的。Miltenyi Biotec 採用以下方法確保只有確效過的抗體才能應用於流式細胞儀組合的一部分。

### 產品發布前進行功能測試

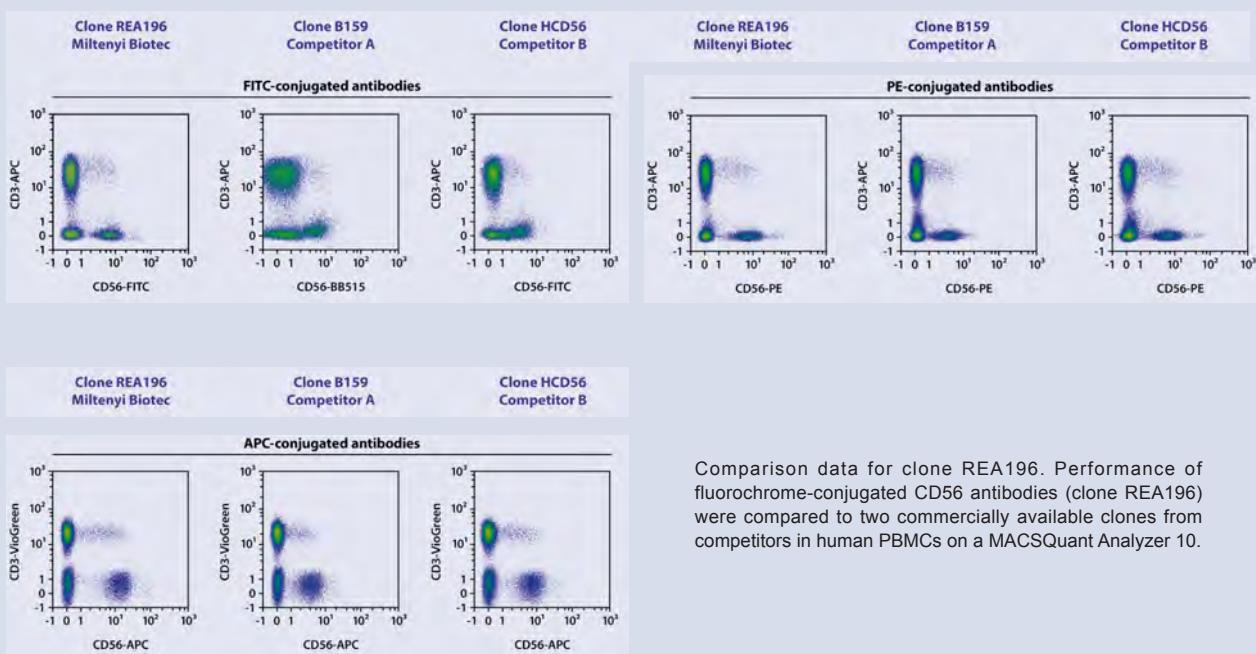
在原始樣品上測試所有接合後的抗體，包括相同克隆但接不同螢光。並且盡可能，在多色染中測試新生產的抗體。另外，使用來自組織經過酵素處理的細胞進行常規抗體測試。這可以去驗證抗體對經歷酵素處理的細胞抗原表面結合位的敏感性。



High staining index with REAfinity Recombinant Antibodies. Human PBMCs were stained with different hybridoma clones and REAfinity Clone REA196 against CD56. Recommended titer of respective antibodies from different suppliers was used.

### 與他牌進行性能比較

我們常規比較來自 Miltenyi Biotec 的接合抗體與來自其他供應商的接合抗體的性能，以確保 MACS 所生產的抗體在流式細胞術應用中具有相似或更好的性能。



Comparison data for clone REA196. Performance of fluorochrome-conjugated CD56 antibodies (clone REA196) were compared to two commercially available clones from competitors in human PBMCs on a MACSQuant Analyzer 10.



## 原廠實驗數據

### 採用 REA 抗體進行多色染色，分析小鼠脾臟細胞中的 NK cell

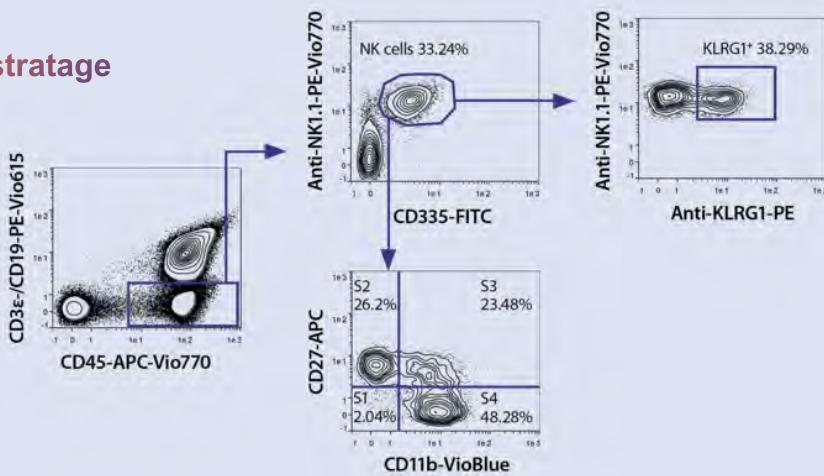
使用下列所述抗體組合對來自 C57BL / 6 小鼠的脾細胞進行染色，以分析 NK 細胞。小鼠 NK 細胞在 CD45 + / lineage (CD3 / CD19) 陰性群體中被鑑定為 NK1.1 + 和 CD335 + 細胞。小鼠 NK 細胞上 KLRG1 的表達與成熟 NK 細胞相關。根據 CD27 和 CD11b 的表達，NK 細胞可分為四個成熟階段。從少到大依次排列的階段是：S1 < S2 < S3 < S4。

#### Configuration of the panel

Laser	Antibody specificity	Fluorochrome	Clone
Violet	CD11b	VioBlue®	REA592
		Viability 405/520 Fixable Dye	
Blue	CD335 (NKp46)	FITC	REA815
	Anti-KLRG1	PE	REA1016
	CD3*	PE-Vio® 615	REA606
	CD19*	PE-Vio 615	REA749
	Anti-NK1.1	PE-Vio 770	PK136
Red	CD27	APC	REA499
	CD45	APC-Vio 770	REA737

\* Exclusion channel containing lineage markers to exclude T cells (CD3) and B cells (CD19) from the analysis.

#### Gating strategy



Splenocytes from C57BL/6 mice were stained using the described antibody panel to analyze NK cells. Mouse NK cells are identified within the CD45+/lineage (CD3/CD19) negative population as NK1.1+ and CD335+ cells. Expression of KLRG1 on mouse NK cells correlates with mature NK cells. NK cells can be divided into four maturation stages based upon the expression of CD27 and CD11b. Stages in order from less to more mature are: S1 < S2 < S3 < S4.



更多 REA 抗體

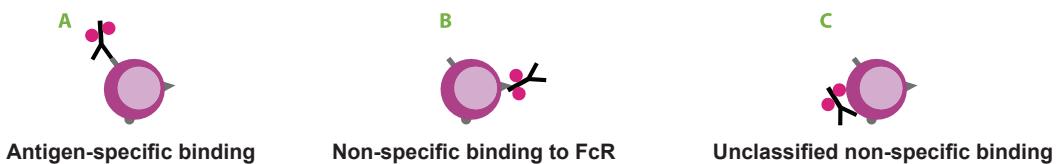
# ISOTYPE CONTROL

同種型對照抗體 (Isotype control) 適用於評估流式細胞術細胞分析的背景染色水平。它們可用於鑑定流式細胞術實驗中的假陽性染色，例如區分螢光抗體與細胞的接合是因為特異性的抗原抗體反應結合還是通過 Fc 受體所產生的非特異性結合。同種型對照抗體的選擇是依據匹配一抗的宿主物種以及螢光染料結合物和抗體亞類，例如 IgG1, IgG2a。

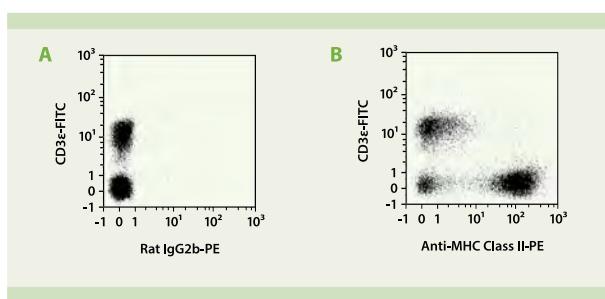
通常，我們很難完全阻斷流式染色時，細胞所產生的非特異性的抗體結合。因此，為了評估背景信號的幅度，需要執行不同類型的對照實驗，其中包含了使用同種型對照抗體 (Isotype control)。此同種型對照抗體除了要與原本使用的染色抗體來源一致外，還必須不會去辨識細胞上的任何抗原標記。

然後，將得到的陽性訊號評估為該同種型的非特異性背景標記。至關重要的是同種型對照抗體與染色抗體的生產過程要相同，任何差異都可能改變抗體的結合行為，無法對背景標記進行可靠的估計。因此，同種型對照抗體應來自與染色抗體相同的製造商。

## 細胞所產生的非特異性抗體結合



## 範例：陰陽界線應該使用經由同種型對照抗體 (Isotype control) 染色的樣本而非未染色 (unstain) 樣本去界定



Splenocytes from BALB/c mice were stained with a PE-conjugated Anti-MHC Class II antibody (B) or with the corresponding Rat IgG2b antibody (A).

## ISOTYPE CONTROL 數值過高時，建議使用 FcR blocking reagents

FcR 阻斷劑會使 FcR 飽和，從而使抗體不能與細胞的恆定部分結合，避免非專一性訊號產生。非 REA 系列抗體可透過此產品降低背景值。

### FcR blocking reagents

130-059-901	FcR Blocking Reagent, human	2 mL
130-092-575	FcR Blocking Reagent, mouse	2 mL



## REA 系列抗體同型對照選擇

Name	clone	size	conjugate	application
REA Control Antibody, human IgG1, REAfinity™	REA293	30 µg in 200 µL or 150 µg in 1 mL	APC, APC-Vio 770, Biotin, FITC, PE, PE-Vio 615, PE-Vio 770, PerCP-Vio 700, VioBlue, VioGreen, Vio B515, Vio Bright B515, Vio Bright FITC	細胞表面染色的同型對照 (依據抗體使用濃度選擇)
REA Control Antibody (I), human IgG1, REAfinity™	REA293	100 tests in 200 µL or 100 tests in 1mL	APC, APC-Vio 770, Biotin, FITC, PE, PE-Vio 615, PE-Vio 770, PerCP-Vio 700, VioBlue, Vio B515, Vio R667	細胞內染抗體的同型對照
REA Control Antibody (S), human IgG1, REAfinity™	REA293	100 tests in 200 µL	APC, APC-Vio 770, Biotin, FITC, PE, PE-Vio 615, PE-Vio 770, PerCP-Vio 700, VioBlue, VioGreen, Vio Bright B515, Vio Bright FITC, Vio Bright R667, Vio Bright R720	細胞表面染色的同型對照 (依據抗體使用濃度選擇)

## 一般抗體系列同型對照選擇

Name	clone	size	conjugate	application
Isotype Control Antibody, rat IgM	ES26-13D3.4	9 µg in 300 µL or 30 µg in 1 mL	APC-Vio 770, APC, Biotin, FITC, PE-Vio 770, PE, PerCP-Vio 700, Vio Bright FITC	FC
Isotype Control Antibody, mouse IgG2a	S43.10	30 tests in 60 µL or 100 tests in 200 µL	APC-Vio 770, APC, FITC, PE-Vio 615, PE-Vio 770, PE, PerCP-Vio 700, PerCP, VioBlue, VioGreen, Vio Bright FITC, pure	FC, FA*
Isotype Control Antibody, mouse IgG1	IS5-21F5	30 tests in 60 µL or 100 tests in 200 µL	APC-Vio 770, APC, Biotin, FITC, PE-Vio 615, PE-Vio 770, PE, PerCP-Vio 700, PerCP, VioBlue, VioGreen, Vio B515, Vio Bright B515, Vio Bright FITC, pure	FC, FA*
Isotype Control Antibody, rat IgG2a	ES26-15B7.3	9 µg in 300 µL or 30 µg in 1 mL	APC-Vio 770, APC, Biotin, FITC, PE-Vio 770, PE, PerCP-Vio 700, PerCP, VioBlue, VioGreen, Vio Bright FITC, Vio R667, pure	FC, FA*
Isotype Control Antibody, rat IgG2b	ES26-5E12.4	9 µg in 300 µL or 30 µg in 1 mL	APC-Vio 770, APC, Biotin, FITC, PE-Vio 770, PE, PerCP-Vio 700, VioBlue, VioGreen, Vio Bright FITC, Vio R667, pure	FC, FA*
Isotype Control Antibody, mouse IgM	IS5-20C4	30 tests in 300 µL or 100 tests in 1mL	APC, Biotin, FITC, PE, PerCP-Vio 700, PerCP, VioBlue, VioGreen	FC
Isotype Control Antibody, mouse IgG2b	IS6-11E5.11	30 tests in 60 µL or 100 tests in 200 µL or 100 tests in 1mL	APC-Vio 770, APC, Biotin, FITC, PE-Vio 615, PE-Vio 770, PE, PerCP-Vio 700, PerCP, VioBlue, VioGreen, Vio Bright FITC, pure	FC, FA*
Isotype Control Antibody, rat IgG1	ES26-14D1.11	9 µg in 300 µL or 30 µg in 1 mL	APC-Vio 770, APC, Biotin, FITC, PE-Vio 770, PE, PerCP-Vio 700, PerCP, VioBlue, VioGreen, Vio Bright FITC, Vio R667, pure	FC, FA*

\*functional assays

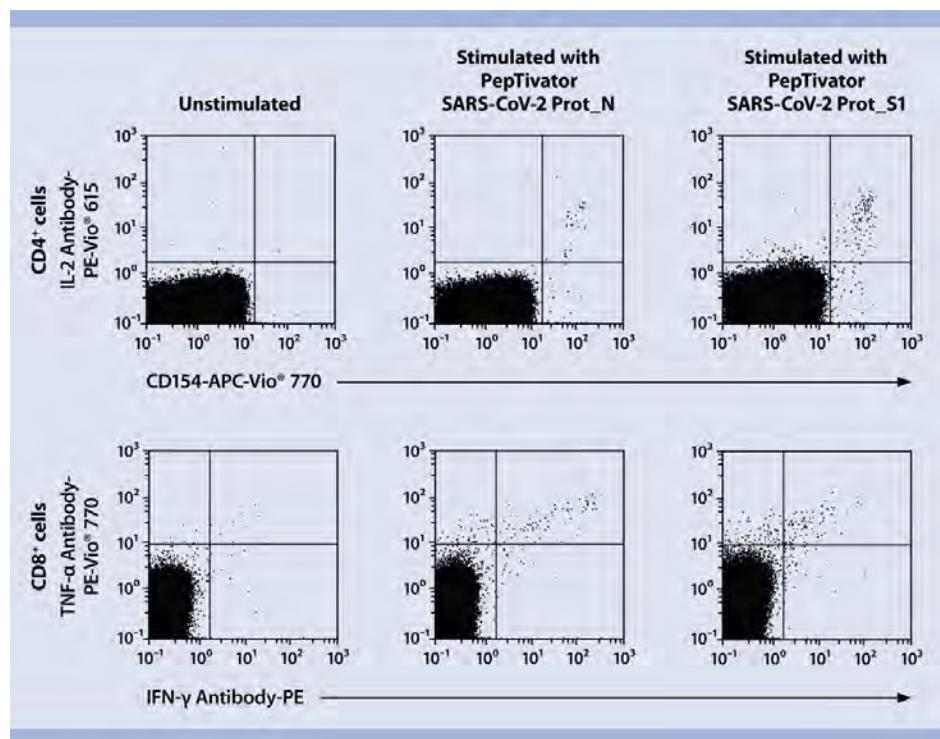
# 流式 PANEL 推薦

## SARS-CoV-2-reactive T cells

COVID-19 的流行加深了對稀有抗原和病毒特異性 T 細胞進行可靠研究的重要需求。研究針對 SARS-CoV-2 的持久性 T 細胞應答對於了解感染和疫苗接種後的免疫應答至關重要。

### SARS-CoV-2-reactive T cells

Marker	Clone	Fluorophore	Cat. No.	Size	Vio dye 偵測通道
CD3	REA613	APC	130-113-697	30 tests in 60 µL	
			130-113-135	100 tests in 200 µL	
CD4	REA623	Vio® Bright B515	130-115-298	30 tests in 60 µL	與 FITC 同通道
			130-115-199	100 tests in 200 µL	與 FITC 同通道
CD8	REA734	VioGreen™	130-110-822	30 tests in 60 µL	與 V500 同通道
			130-110-684	100 tests in 200 µL	與 V500 同通道
IFN- $\gamma$	REA600	PE	130-114-024	30 tests in 60 µL	
			130-113-498	100 tests in 200 µL	
TNF- $\alpha$	REA656	PE-Vio® 770	130-127-550	30 tests in 60 µL	與 PE-Cy7 同通道
			130-127-531	100 tests in 200 µL	與 PE-Cy7 同通道
CD14	REA599	VioBlue®	130-110-582	30 tests in 60 µL	與 V450 同通道
			130-110-524	100 tests in 200 µL	與 V450 同通道
CD20	REA780	VioBlue	130-110-582	30 tests in 60 µL	與 V450 同通道
			130-110-524	100 tests in 200 µL	與 V450 同通道
CD154	REA238	APC-Vio 770		30 tests in 60 µL	與 APC-Cy7 同通道
				100 tests in 200 µL	與 APC-Cy7 同通道
IL-2	REA689	PE-Vio 615	130-111-493	30 tests in 60 µL	與 PE-CF594 同通道
			130-111-307	100 tests in 200 µL	與 PE-CF594 同通道



Human whole blood samples (1 mL) from a SARS-CoV-2-reactive donor were incubated for 8 hours with Brefeldin A and the SARS-CoV-2 PepTivator Prot\_N (130-126-700) or Prot\_S1 (130-127-041), or left unstimulated (negative control). Blood samples were lysed, fixed, and permeabilized. Subsequently, cells were stained with the flow panel included in the SARS-CoV-2 T Cell Analysis Kit (Whole Blood), human. Cells were analyzed using a MACSQuant Analyzer 16. Doublets, debris, and dead cells as well as CD14+ and CD20+ cells were excluded. After pre-gating on CD3 as well as CD4 and CD8, respectively, activation marker and cytokine expression were assessed, e.g., CD154 and IL-2 for CD4+ T cells and TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  for CD8+ T cells.



## MSC Phenotyping Kit, human

ISCT 的間充質和組織幹細胞委員會提出了標準，以定義基於實驗室的科學研究和臨床前研究的人類 MSC。

<b>MSC 定義標準</b>	正常培養情況下須為貼附型生長	流式細胞儀檢測細胞須符合 CD73、CD90 和 CD105 陽性 ( $\geq 95\%$ 的細胞群體) 且而缺 乏 CD34、CD45、CD11b 的表達或 CD14、CD19 或 CD79 $\alpha$ 和 HLA-DR ( 陽性 $\leq 2\%$ ) 等條件。	有能力分化為脂肪細胞、軟骨細胞與成骨細胞
---------------------	----------------	---	----------------------

### MSC Phenotyping KIT 標記細胞種類

本試劑是根據國際細胞治療學會 (ISCT) 的定義標準，通過流式細胞術快速，標準化地表徵和定量培養的人間充質基質細胞 (MSC) 的。MSC 表型分析試劑盒採用重組工程設計的 REAfinity™ 抗體

Marker	Expressed by
MSC-positive marker	
CD73, CD90, CD105	MSCs
MSC-negative marker	
CD14	Monocytes and macrophages
CD19	Pan B cells
CD34	Primitive hematopoietic progenitors and endothelial cells
CD45	Pan-leukocyte cells
HLA-DR	Dendritic cells, B cells, monocytes, macrophages

### MSC Phenotyping Kit, human

130-125-285	50 test	Vio dye 偵測通道
0.5 mL Isotype Control Cocktail, human		
0.1 mL CD73-APC, human		
0.1 mL CD73-PE, human		
0.1 mL CD90-FITC, human		
0.1 mL CD105-VioBlue®, human		與 V450 同通道
0.1 mL CD73-Biotin, human		
0.1 mL Anti-Biotin-VioGreen, human		與 V500 同通道
0.5 mL MSC Phenotyping Cocktail, human 包含以下標記		
negative marker CD14-PE /CD19-PE /CD34-PE /CD45-PE /Anti-HLA-DR-VioGreen		
positive marker CD73-APC /CD90-FITC /CD105-VioBlue		

# 流式 PANEL 推薦

## MDSC 鑑定試劑

髓樣來源的抑制細胞（MDSC）是具有不同免疫抑制和促進疾病功能的異種單核和多形核髓樣細胞。在健康的志願者中，他們的數量很少，但在病理條件下會大量擴張。根據疾病的類型和階段，MDSC 群體可能會出現在不同的成熟階段。

在人類中，可以識別出三個主要的 MDSC 子集

1. 低密度多形核 MDSC (PMN-MDSC)，也稱為粒細胞 MDSC (G-MDSC)
2. 單核 MDSC ( M-MDSC )
3. 早期 MDSC ( e-MDSC )

目前仍然缺乏針對 MDSC 的經過驗證的明確表型標記，因此使用各種特異性組合來鑑定它們。

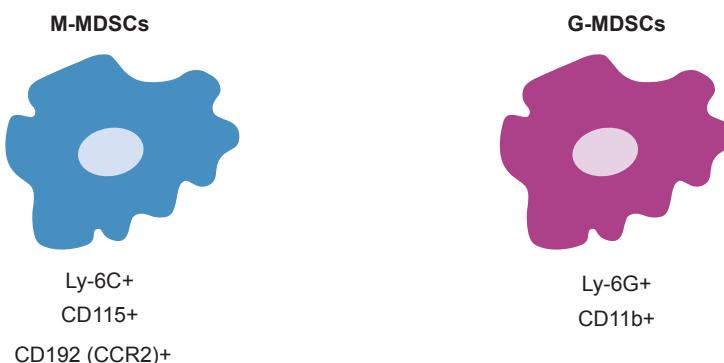
### Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) 細胞標記

M-MDSC	HLA-DR-CD11b+CD14+CD33 <sup>high</sup>
PMN-MDSC	HLA-DR-CD11b+CD14-CD33 <sup>Mid</sup>

### MDSC Detection Kit human

130-126-233	50 tests
1 mL MDSC Staining Cocktail, human 包含以下抗體	
7-AAD /CD11b-VioBlue (clone: REA713)/CD45-VioGreen™ (clone: REA747)/HLA-DR FITC(clone: REA805)/CD33-PE (clone: REA775)/CD16-PE-Vio® 770(clone: REA423) /CD14 -APC-Vio 770(clone: REA599)	
1 mL MDSC Control Cocktail, human 包含以下抗體	
7-AAD and CD11b -VioBlue (clone: REA713)/ CD45-VioGreen (clone: REA747)/ REA Control (S)-FITC(clone: REA293)/REA Control (S)-PE(clone: REA293)/CD16-PE-Vio 770(clone: REA423)/CD14-APC-Vio 770(clone: REA599).	
預留 APC 偵測通道	
可依據實驗需求加入 CD66b-APC, human (clone: REA306), CD15-APC, human (clone: VIMC6), Anti-LOX-1-APC, human (clone: REA1188), CD10-APC, human (clone: REA877), REA Control (S)-APC.	
0.1 mL CD16 antibody, anti-human, PE-Vio 770, REAfinity:for compensation control	
0.1 mL CD14 antibody, anti-human, APCVio 770, REAfinity:for compensation control	

### Mouse MDSC detection maker



### Mouse

品項	clone
Ly-6C Antibody, anti-mouse, REAfinity™	REA796
CD115 Antibody, anti-mouse, REAfinity™	REA827
CD192 (CCR2) Antibody, anti-mouse, REAfinity™	REA538
Ly-6G Antibody, anti-mouse, REAfinity™	REA526
CD11b Antibody, anti-mouse, REAfinity™	REA592



# 調節性 T 細胞 (Treg)

調節性 T (Treg) 細胞是 T 細胞的一個亞群，其特徵在於其免疫抑制功能。它們對於維持對自身抗原的耐受性和抑制針對病原體的過度免疫反應是必不可少的。



RUO=Research Use Only

\* For complete regulatory and legal notices please refer to the back page of the brochure.

# REA 抗體其他應用

## REAfinity™ Antibodies for mass cytometry

為了提高質譜細胞術 (mass cytometry) 的數據質量，Miltenyi Biotec 開發了專門用於 CyTOF® 應用的重組工程抗體。我們提供的質譜細胞術的 REAfinity™ 重組抗體產品，是針對同位素結合條件而優化的純抗體。

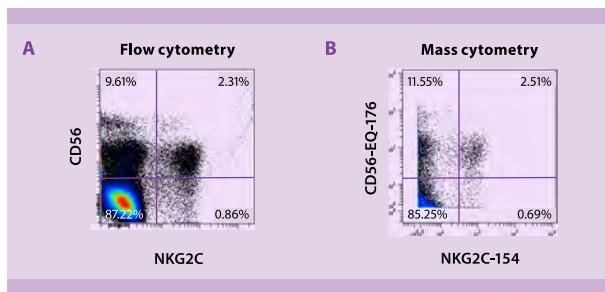
### 廣泛的重組工程抗體組合，具有高重複性和一致的共軛 (conjugation) 性能

# 抗體保存在不含穩定劑的水性緩衝液中，提供適合直接進行同位素共軛 (conjugation) 的環境

# 抗體濃度為最適合共軛 (conjugation) 的  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$

### 流式細胞術和質譜流式細胞術 (mass cytometry)

流式細胞術和質譜流式細胞術 (mass cytometry) 是具有獨特優點和局限性的方法。為了最大化收集的信息量，通常使用兩者相互補充。對兩種測定使用相同的重組抗體克隆有助於標準化工作，提供高度相符的結果



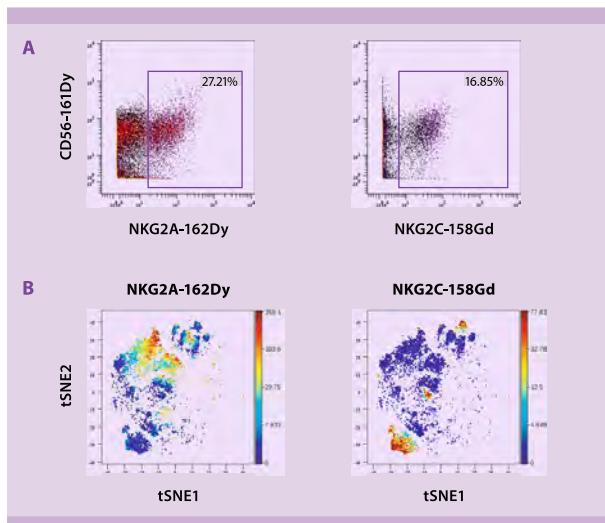
#### Comparison between flow and mass cytometry.

(A) Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were stained with CD159c (NKG2C)-PE (REA205) and analyzed using flow cytometry

(B) The same sample was stained with the metal-conjugated pure version of CD159c (NKG2C) (REA205) and analyzed using mass cytometry. Data courtesy of Prof. Karl Johan Malmberg, Oslo University Hospital, Norway.

### 使用 REAfinity 抗體鑑定自然殺傷 (NK) 細胞

顯示 NK 標記 NKG2A 和 NKG2C 的良好分離 (A) 和通過 viSNE 準確區分它們的互斥表達模式 (exclusive expression) 分析 (B)



#### Expression pattern of NKG2A and NKG2C on NK cells.

(A) Representative mass cytometry plots show NK cell marker expression including NKG2A and NKG2C counterstained with CD56.

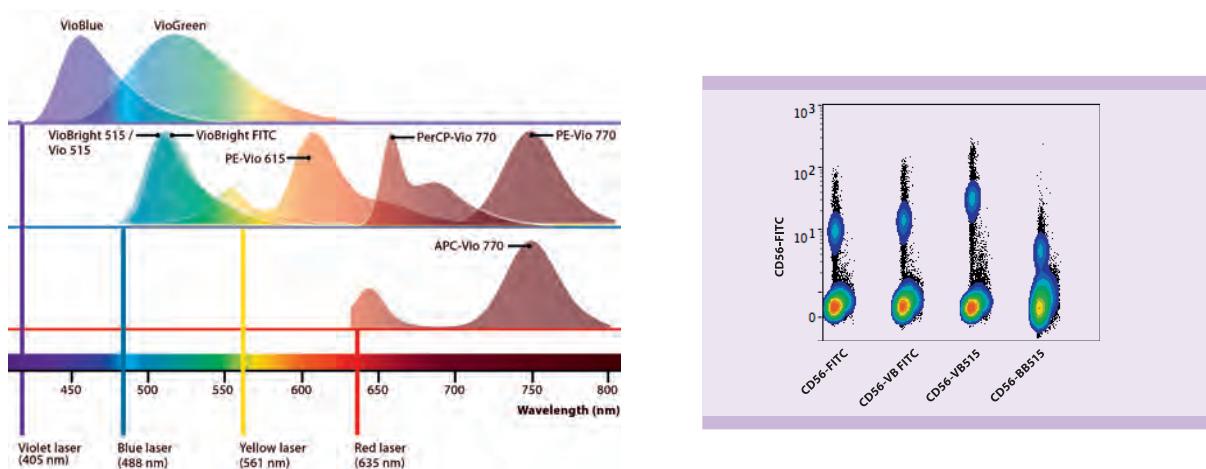
(B) Additionally, viSNE analysis was performed by clustering 20,000 NK cells according to the expression of 13 different markers. The following REAfinity Recombinant Antibodies were used for staining: CD56 (REA196), CD122 (IL-2R  $\beta$ ) (REA167), CD38 (REA671), CD39 (REA739), CD366 (TIM-3) (REA635), TIGIT (REA1004), CD226 (DNAM-1) (REA1040), CD159a (NKG2A) (REA110), CD159c (NKG2C) (REA205), CD158a (KIR2DL1) (REA284), CD158a/h (KIR2DL1/DS1) (REA1010), CD158b (KIR2DL2/DL3) (REA1006), and CD158e (KIR3DL1) (REA1005). Data courtesy of Dr. Amir Horowitz, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, United States.

# Vio® 螢光染劑



Vio® 染料系列由 Miltenyi Biotec 獨家開發的，為可用於流式細胞術和螢光顯微術的螢光染料家族，成員包含 VioBlue®, VioGreen™，VioBright™ FITC，PE-Vio® 615，PE-Vio® 770，PerCP-Vio® 700，Vio® 515，VioBright™ 515，APC-Vio® 770 具有高螢光強度和低溢出 (spillover) 特性，是多色應用的理想選擇。搭配傳統的螢光染料，如 FITC，PE，PerCP 和 APC，新的 Vio Dyes 擴展了 Miltenyi Biotec 的抗體產品線，並允許研究人員在多色配色上有更多的抗體選擇去進行多參數細胞分析。

## 高亮度的 VB515 具有較好的解析度



同一個抗體接上不同螢光，對相同樣品進行染色，結果顯示高亮度的染劑 VB515 能有較好的解析度。

## MACS Vio dye 與它牌染劑對照表

Fluorochrome	Excitation laser (nm)	Exmax (nm)	Emmax (nm)	Other dyes( 相同偵測通道 )
VioBlue	405	400	452	Alexa Fluor® 405, BD™ Horizon™ V450, BV 421™, Calcein Violet 450 AM, Cascade Blue®, DAPI, Vybrant®, DyeCycle™ Violet, eBFP, eFluor® 450, Hoechst Dyes, Pacific Blue™, Zombie Violet™
VioGreen	405	388	520	Alexa Fluor® 430, AmCyan, BD™ Horizon™ V500, BV510™, Cascade Yellow™, Krome Orange™, Pacific Orange™, Qdot® 525 Zombie Aqua™
VioBright 515	488	488	514	Alexa Fluor® 488, Calcein AM, DyLight® 488, CFSE, GFP, SYTOX® Green, Vybrant® DyeCycle™ Green, YFP, Zombie Green™, BD Horizon™ Brilliant Blue 515
Vio 515	488	488	514	
VioBright FITC	488	496	522	
FITC	488	495	520	
PE	488 or 561	565	578	Cy™ 3, Vybrant® DyeCycle™ Orange
PE-Vio 615	488 or 561	565	619	ECD, PE-Texas Red®, PE-CF594, PE/Dazzle™ 594, PE-eFluor® 610
PerCP	488	482	675	PE-Cy™ 5, PE-Cy™ 5.5, Per-Cy™ 5.5,
PerCP-Vio 700	488	482	704	Per-CP-eFluor® 710, Propidium iodide, 7-AAD
PE-Vio 770	488 or 561	565	775	PE-Alexa Fluor® 750, PE-Cy™ 7
APC	561 or 635	652	660	Alexa Fluor® 647, Alexa Fluor® 700, APC-Alexa Fluor® 700, Cy™ 5, DRAQ5®, eFluor® 660
APC-Vio 770	561 or 635	652	775	APC-Alexa Fluor® 750, APC-Cy™ 7, APC-eFluor™ 780, APC-H7, Zombie NIR™

# REAl ease® Fluorochrome Technology



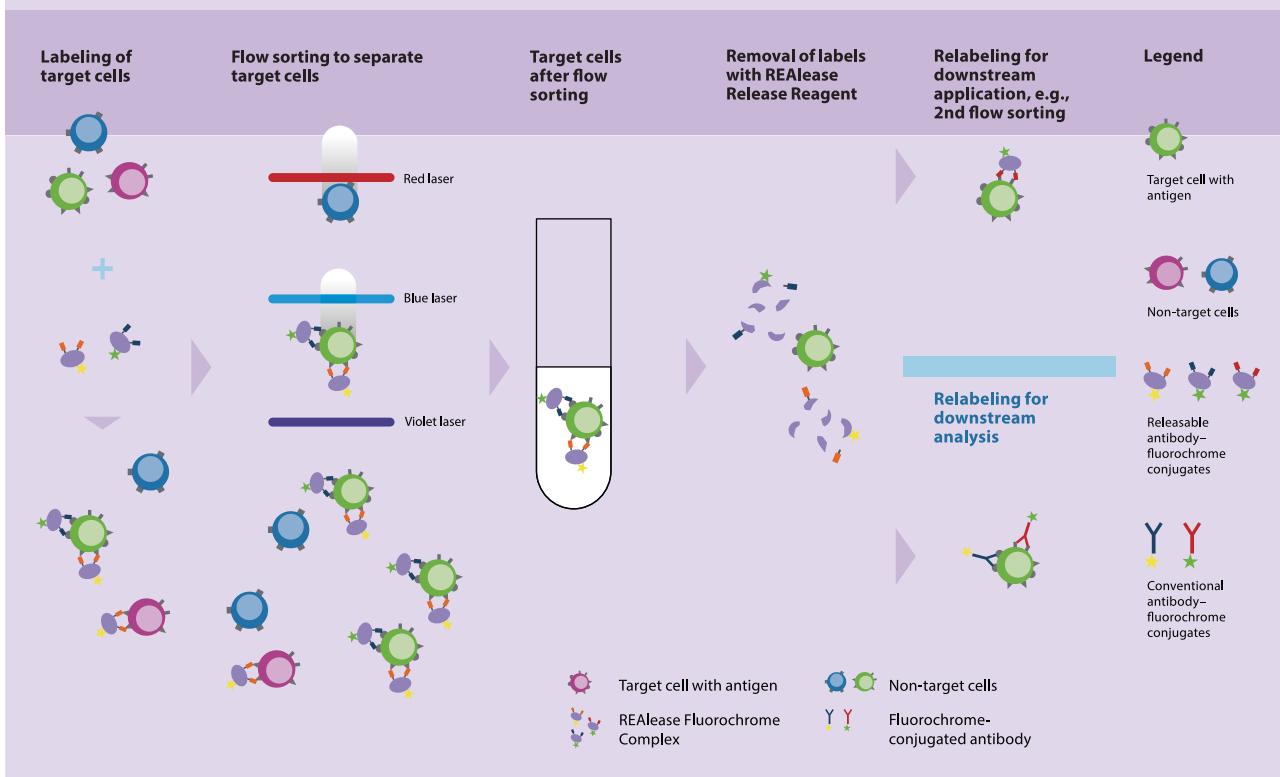
## REAl ease 螢光染料技術屢獲殊榮

2018 年於英國斯蒂夫尼奇 (Stevenage, UK) 舉行的製藥流式細胞儀和成像會議上榮獲技術獎。

榮獲歐洲實驗室研究與創新小組 (ELRIG) 的代表提名，強調其對生物技術和藥物研究的重要性。

只需一個簡單的步驟，REAl ease 螢光染料技術  
可以在細胞分選後去除細胞上任何標記。

該技術依賴於重組工程化的抗體片段，與常規抗體不同，其特徵在於對抗原表位結合親和力低。若將這些片段接合在一個可被解離的基質並接上螢光標記，即可形成所謂的 REAl ease 融光染料複合物，其具有高親和力的細胞抗原結合能力，而且 REAl ease 融光染料複合物結合力與常規螢光抗體相當。這種新穎和創新的基質允許在細胞分選後添加 REAl ease 釋放試劑，使複合物被破壞形成抗體片段的單體化，導致抗體片段對抗原表位的親和力下降，自發地從細胞表面解離，讓細胞表面快速去除 REAl ease 融光染料複合物。因此，細胞分選後可以獲得無標記細胞，為細胞的各種後續應用提供最大的靈活性。

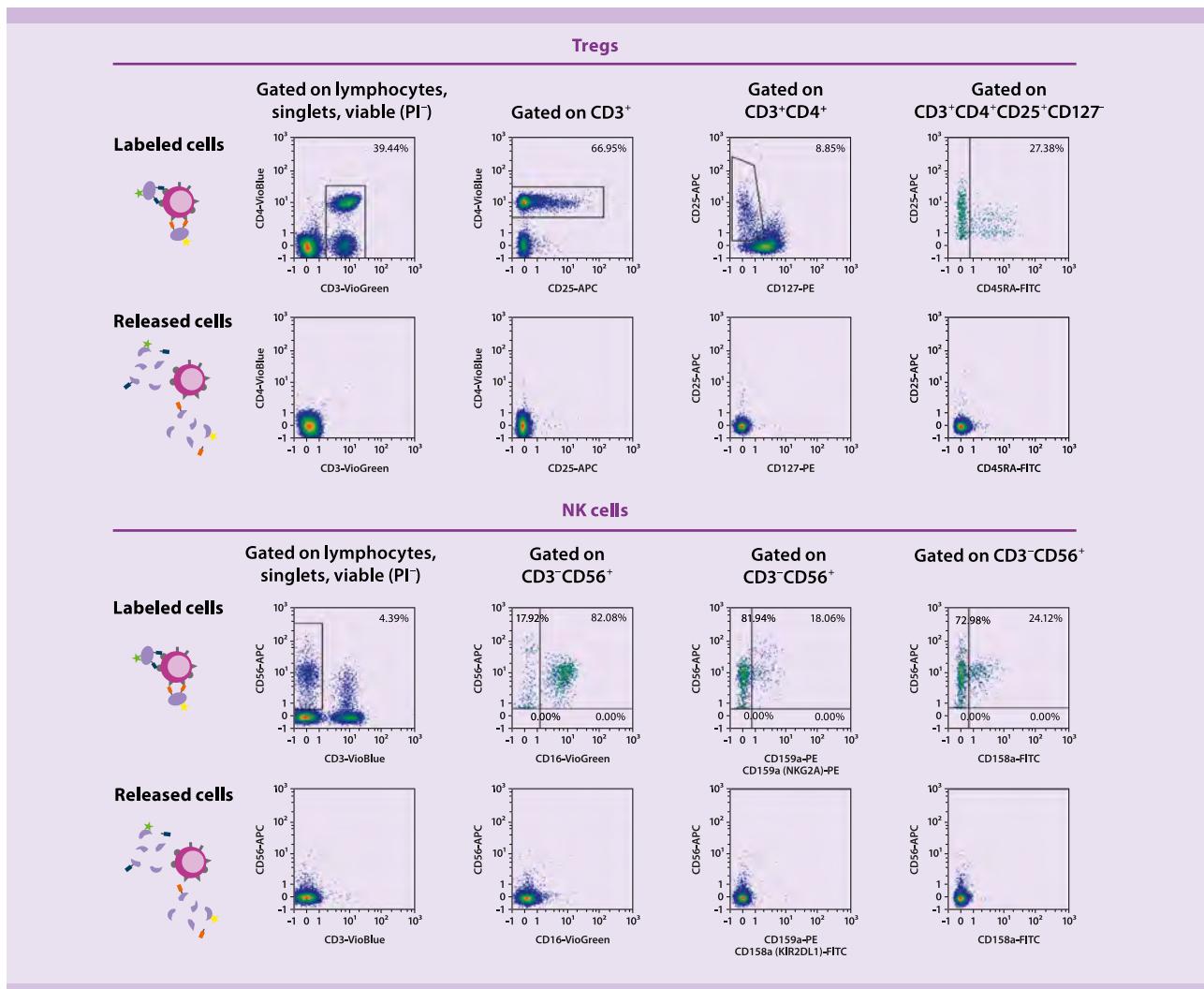




## 可達成多參數染色並釋放抗體，獲得不帶任何標記的細胞

由於大多數目標細胞群是由多種抗原的表達定義，因此與磁珠分選方式相比，通過流式分選直接分離目標細胞的優點是可達成同時標記多種標記的可行性。 REAlease® 技術可以允許重複使用單個螢光通道，從而實現可逆的多參數細胞標記。

下圖展示該技術的多功能性，我們開發了可釋放的螢光染料抗體，用於多種細胞標記，可用於例如調節性 T (Treg) 細胞或天然殺傷 (NK) 細胞的多參數 panel 染色。



Product	Order No.
REAlease CD4-FITC, human	130-112-071
REAlease CD4-PE, human	130-117-725
REAlease CD4-VioGreen, human	130-115-434
Treg cell panel	
REAlease CD3-VioGreen, human	130-115-972
REAlease CD4-VioBlue, human	130-118-942
REAlease CD25-APC, human	130-116-230
REAlease CD127-PE, human	130-116-559
REAlease CD45RA-FITC, human	130-112-079
Pan T cell panel	
REAlease CD3-VioBlue, human	130-118-941
REAlease CD4-APC, human	130-112-089
REAlease CD8-VioGreen, human	130-115-197
REAlease CD62L-PE, human	130-117-728
REAlease CD45RA-FITC, human	130-112-079

Product	Order No.
NK cell panel	
REAlease CD3-VioBlue, human	130-118-941
REAlease CD56-APC, human	130-116-548
REAlease CD16-VioGreen, human	130-115-975
REAlease CD159a-PE, human	130-118-926
REAlease CD158a-FITC, human	130-114-948
Other	
REAlease Support Kit	130-120-675

品項持續更新中，最新產品資訊請至官網查詢或聯繫當區業務。

# MACSQuant® Flow Cytometers



Simplicity



Automation



Colorful

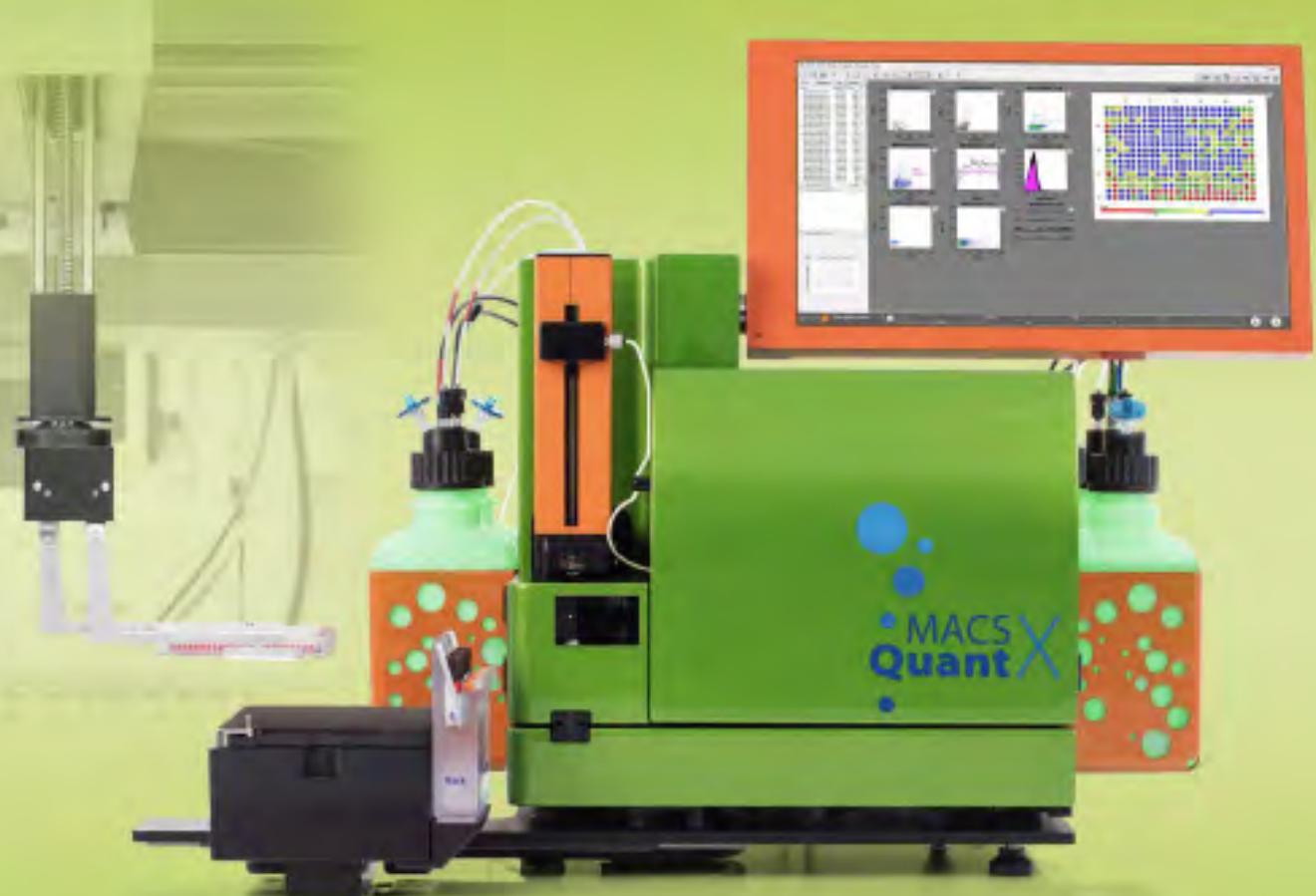
全自動細胞標記功能

無珠的自動細胞計數

自動儀器校準，補償和多樣品上樣

自動化的啟動，清潔和關閉程序

快速分析模式 加速報告與分析流程





#### Automation features

Automated acquisition

Automated labeling



Automated start up, shutdown, cleaning



Automated compensation



#### Optics

10 parameter



16 parameter



405 nm laser



488 nm laser



561 nm laser



640 nm laser



Violet 405 nm side scatter



#### Sample processing

Needle-arm vibration mixing



Orbital sample mixing



Pipette sample mixing



24-tube rack processing



96-well plate processing



384-well plate processing



High-throughput plate screening



Sample cooling (chill racks)



Low carryover: standard mode <0.01%



#### Unique features

Absolute cell counting



Rare cell enrichment



Remote support



Multi-instrument alignment



21 CFR Part 11 compliant software



## 統一儀器設置，統一結果

### Samrt Gain 技術，提供標準化結果

獲得穩定且重複的結果，不因日期、儀器和操作人員而改變。利用 MACSQuantify 軟件的 Samrt Gain 技術，您可以將分析從一台儀器轉移至另一台儀器上，同時傳遞所有必需的信息，以確保設置相同。這樣，MACSQuant 操作系統可以隨時隨地生成相當標準化的結果。

值得信賴的穩定性  
可靠的數據結果  
不因用戶 / 儀器而改變  
在不同地點間轉移

### 遵循 21 CFR Part11 的要求

通過可選購的 21 CFR Part11 功能，您可以確保數據符合監管機構的提交標準，包含：

審計追蹤  
包含電子簽名的分析報告  
遵循 21 CFR Part11 的要求的用戶管理系統

# MACSQuantify™ Express Modes

## 簡化流式細胞儀分析，並確保可重複的數據分析

快速模式是 MACSQuantify™ 軟件的獨特附加組件，旨在簡化流式細胞儀分析。他們通過預定義的實驗設置以及採集和自動分析功能，自動進行流量實驗的測量和分析。將自動為每個數據文件自動調整對結果的門控，以實現最佳結果。

快速模式包含分析的模板，這些模板基於大量的實際數據。它們包含已驗證的圈選範圍，該圈選範圍是從針對特定應用程序分佈的不同算法得出的。對每個單獨的數據文件進行自動調整可實現最佳分析，而無需人工干預。該數據分析可提供一致的結果和可靠的分析，可以輕鬆地將其集成到標準化操作程序（SOP）中。

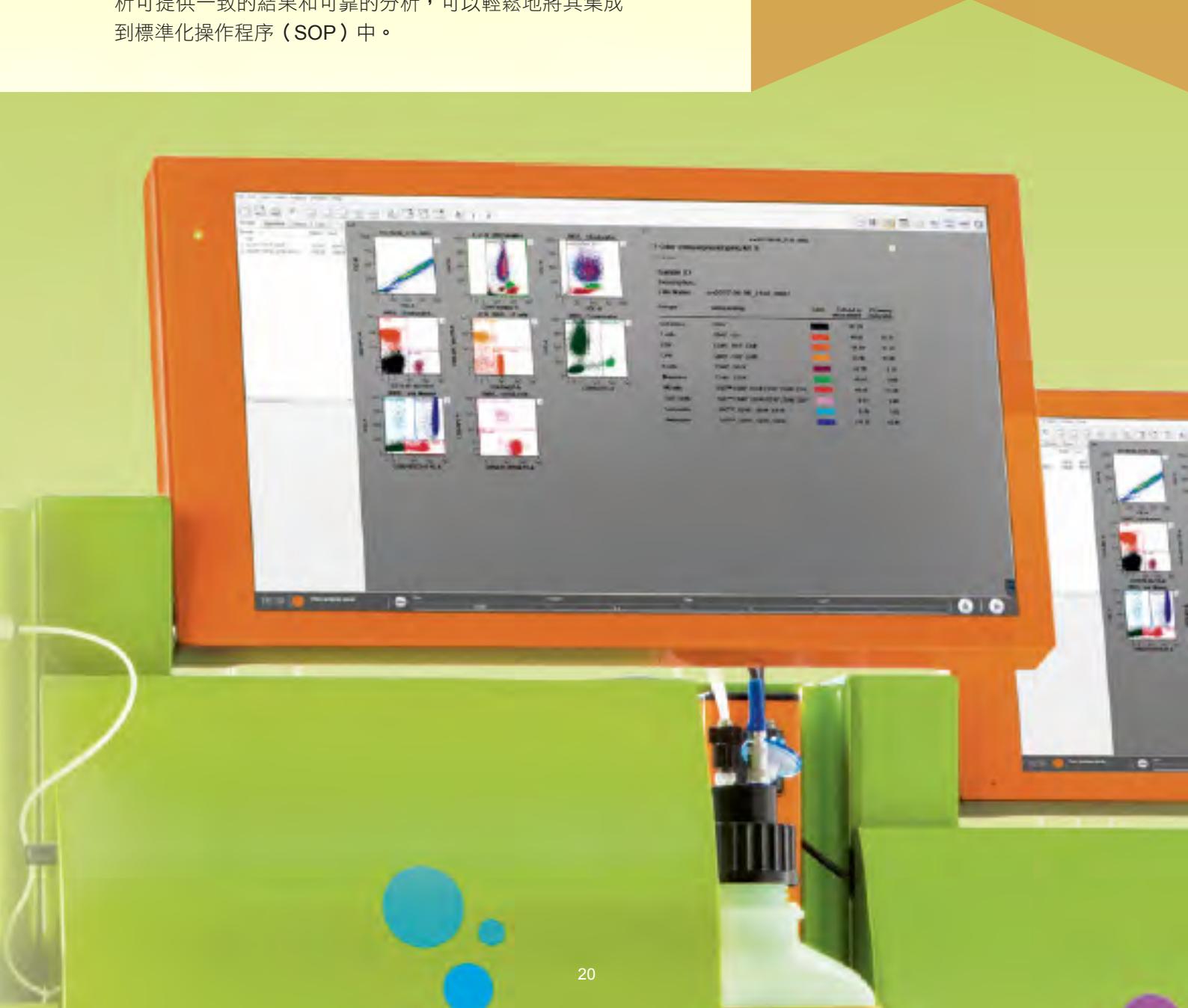
## Automated features of the MACSQuant Family

Startup, cleaning,  
and shutdown

Compensation

Labeling

Calibration and  
quality control (QC)



## Express Mode Master Package (Cat. No. 160-002-425)

CD19 CAR T Cell Express Mode Package	
Immune_Cell_Composition_h_02	鑑定免疫細胞存活率與組成
CAR_T_Cell_Transduction_h_02	鑑定 CART 轉導效率
B_Malignant_Cells_h_01	鑑定惡性 T 細胞
B_Regulatory_Cells_h_01	鑑定調節型 B 細胞亞群
B_Cell_Differentiation_h_02	鑑定 B 細胞分化
CAR_T_Cell_Tscm_h_01	鑑定 stem memory T cells (Tscm)
CAR_T_Cell_Persistence_h_01	鑑定 CART 持續性
CAR_T_Cell_Differentiation_h_01	鑑定 CAR+ and CAR- T cells 細胞分化
CAR_T_Cell_Exhaustion_h_01	鑑定 CAR+ and CAR- T cells 細胞衰老
CAR_T_Cell_Activation_h_01	鑑定 CAR+ and CAR- T cells 活化
CAR_T_Cell_Staining_Control_h_01	染色對照組
TCR $\alpha$ $\beta$ /CD45RA Express Mode Package	
TCR $\alpha$ $\beta$ _CD45R_depletion_h_02	鑑定 CD45RA+, TCR $\alpha$ / $\beta$ +, and CD34+ cells 比例
Immune_Cell_Composition_human	鑑定免疫細胞存活率與組成
Virus-Specific T Cell CCS Express Mode Package	
RCI_CD4CD8_h_02	鑑定 IFN- $\gamma$ 表達的目標細胞
CCS_Immune_Cell_Composition_h_01	鑑定細胞組成與目標細胞比例
CCS_Purity_h_01	鑑定目標細胞純度

## CAR T Cell Essential Express Mode Package (Cat. No. 160-002-759)

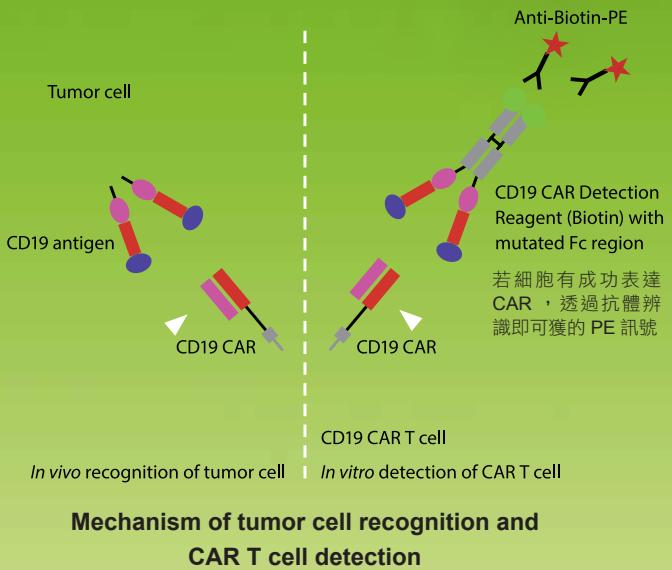
Express mode	Purpose	V1 VioBlue®	V2 VioGreen™	B1 FITC	B2 PE	B3 7AAD Per-CP- Vio® 700	B4 PE- Vio® 770	R1 APC	R2 APC- Vio® 770
CAR T cell immune composition	For the determination of cell viability and composition of immune cells	CD45	CD4	CD3	CD56/ CD16	7AAD	CD19	CD14	CD8
CAR T cell transduction	For the determination of transduction efficiency of CAR T cells	CD45	CD4	CD3	CAR detection reagent	7AAD	-	CD14	CD8
CAR T cell persistence	For the determination of CAR T cell persistence	CD45RA	CD4	CD3	CAR detection reagent	7AAD*	CD62L	CD45RO	CD8

\*For immunomonitoring, exclusion markers such as CD14 and CD15 conjugated to PerCP-Vio® 700 can be added

## CAR T Cell Essential Express Mode Package

# CAR Detection Reagent

流式細胞儀是用於 CAR T 細胞產品的生產過程和質量控制，  
以及監測接受治療的患者中 CAR T 細胞持久性的理想工具



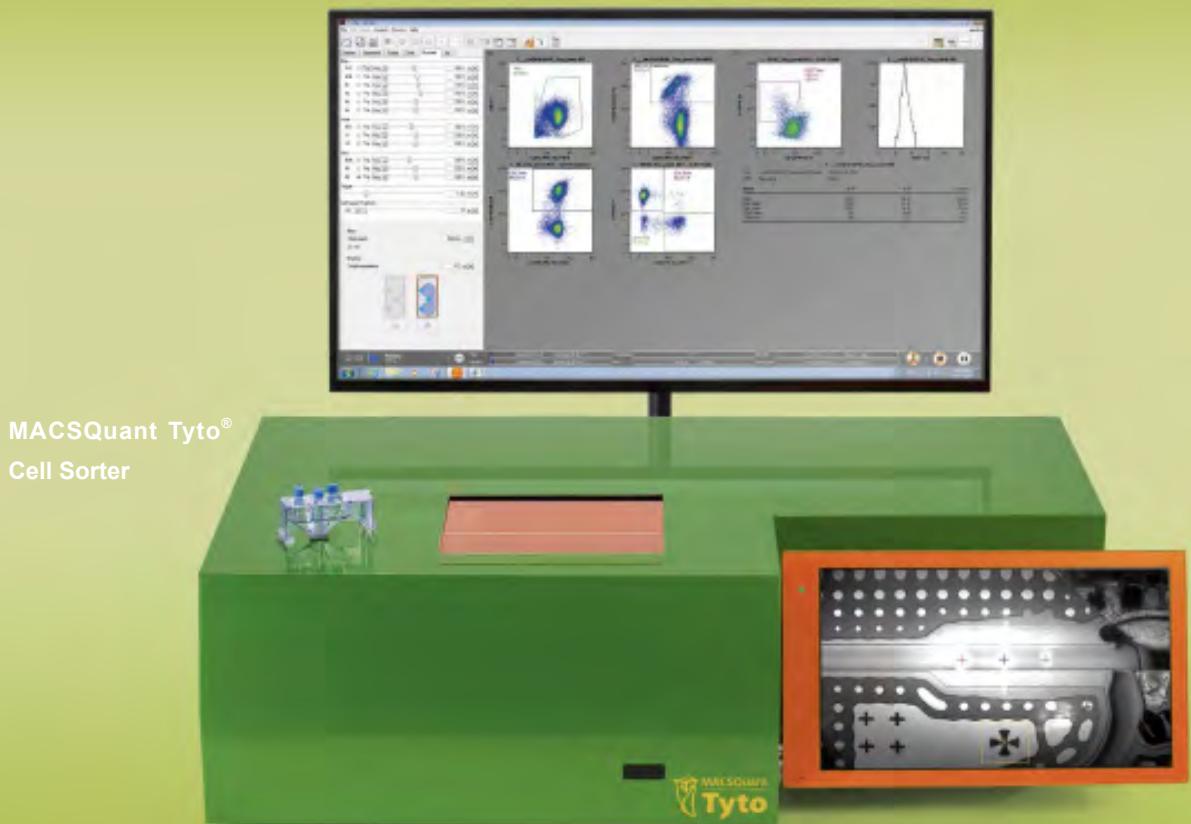
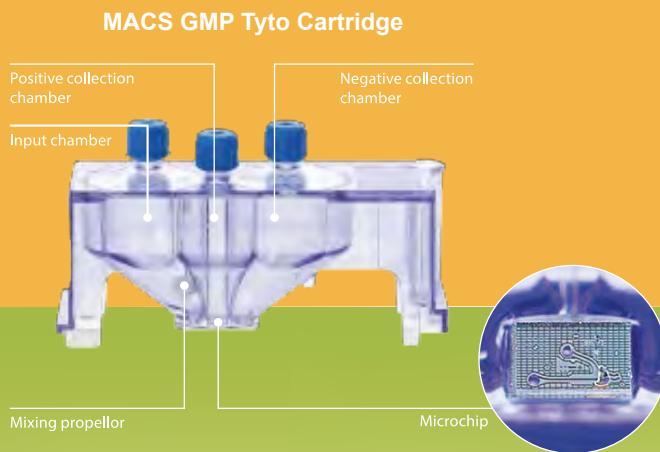
Cat.no.	Name	Size
130-115-965	CD19 CAR Detection Reagent, human, Biotin	10 tests in 100 µL
130-126-727	CD22 CAR Detection Reagent, human, Biotin	30 tests in 60 µL
130-126-090	BCMA CAR Detection Reagent, human, Biotin	30 tests in 60 µL
130-113-853	Biotin Antibody, PE	30 tests in 60 µL
130-113-291	Biotin Antibody, PE	100 tests in 200 µL



# The MACSQuant<sup>®</sup> Tyto<sup>®</sup> Cell Sorter

GMP

- 全封閉：一次性使用的全封閉 **MACSQuant Tyto Cartridge**，使樣品保持無菌，獨立的卡匣設計可避免樣品間相互污染的風險
- 快速、簡便：無需 **Drop delay** 或激光校準，只要插入分選盒，圈選要收集的細胞即可進行分選
- 絕對安全：完全密閉的濾芯可防止氣溶膠和液滴形成，為操作員和樣品提供安全的環境
- 對細胞溫和：經由革命性的微芯片的分選原理，在低壓下對細胞進行分選，讓細胞不再暴露於充電且高壓力環境，保全了細胞活力與功能





Miltenyi Biotec