

第 2 章 FACSCalibur 儀器原理

流式細胞技術是一個定量分析的技術。定量測量在細胞生物學中之所以重要，是因為要想鑒別出一個細胞群體，主要是依據細胞特殊標記物的數量，而不僅是依據標記物的存在與否。多參數相關分析可以對細胞固有的性質，例如光散射的測量與定量測定細胞的特徵如表面受體、和 DNA 同時進行。當然，必要時還可同時再測定胞漿內抗原、核內抗原等等。這樣，就有可能從一個複雜的細胞混合體中，識別出某一個特定的細胞亞群。由於只有對大量的細胞進行測量才能發現稀有的亞群並把它分選出來，所以快速測量是必需的。這裡所謂分選即流式細胞分選術，是根據所測定的各種細胞性質的不同組合，從細胞群體中將某個亞群分選出來，以對它進行功能研究、形態學研究、進一步培養或做其他的分析。

本公司是生產流式細胞儀的主要廠家，我們生產出一系列桌上型和落地型的流式細胞儀，並研發生產了 FCM 所用的各種單株抗體和螢光試劑。桌上型的儀器（FACScan, FACSort, FACSCalibur 等）易于操作，穩定性好，分析速度快，適合在臨床實驗室中應用。落地型流式細胞儀（如 FACStar Plus, FACS Vantage SE, FACS Vantage Diva 等）具有快速分選功能，功能齊全，分析靈活，適合基礎科學與生物醫學研究。我們在此先介紹桌上型細胞儀。

2.1 流式細胞儀的工作原理

流式細胞儀包括液流系統、光學系統、分選系統和電子系統。待測樣本中的細胞經液流系統傳送依序地通過流式細胞儀中雷射照射的區域，細胞受雷射的激發產生信號，被信號接收器接受並放大，這些放大的信號經電腦分析處理，並以圖表的形式直觀地顯示出來；通過分選系統還可以將某些類型的細胞群體篩選出來。流式細胞儀產生並分析的信號主要有光散射信號和螢光信號。光散射信號的強弱可以反映細胞的大小、形態及胞漿顆粒化的程度等。依螢光素的不同，用不同波長的光激發，發射出不同波長的光，可顯示不同的顏色，在不同的實驗體系中，這些螢光信號就可以反映不同的細胞生物學特性。

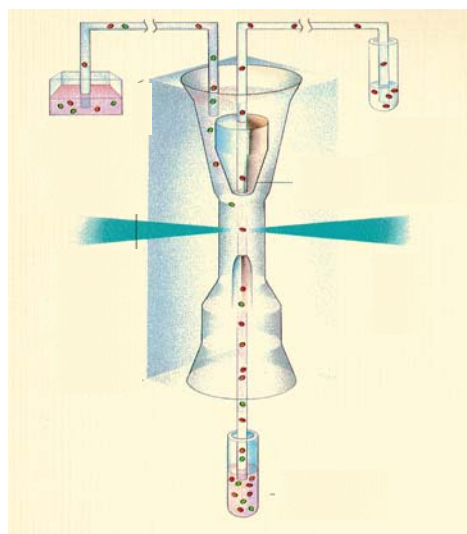
2.1.1 分析原理

將待測細胞染色後製成單細胞懸液。用一定壓力將待測樣品壓入流動室，不含細胞的平衡緩衝液在高壓下從鞘液管噴出，鞘液管入口方向與待測樣品流成一定角度，這樣，鞘液就能夠包繞著樣品高速流動，組成一個圓形的流束，待測細胞在鞘液的包被下單行排列，依次通過雷射照射區（液柱與入射的雷射束垂直相交點稱為檢測區），被螢光染色的細胞受強烈的雷射照射後發出各色螢光，同時產生光散射。螢光信號的收集可在雷射光束垂直的 90 度方向放置光學系統（透鏡、光欄、和濾片等）用以收集螢光信號，投向檢測器。螢光檢測器是光電倍增管，散射光檢測器是光電二極管，用來收集前向角散射光。

光散射信號在前向小角（2-10 度）進行深測，這種測量稱“前向角散射”或“前方散射”。在這種情況下產生的光散射信號基本上反映了細胞體積的大小。細胞發出的螢光信號和光散射信號同時被呈 90 度角方向的螢光光電倍增管和前向光電二極管接收，被放大積分後轉換為電子信號輸入多道（1024 道）脈衝高度分析儀，並在電腦螢幕上，以一維直方圖、二維點陣圖、或三維圖形顯示出來。或將圖形和數據直接輸入聯機專用的電腦，或存入磁碟以備分析。電腦快速而精確地將所測數據計算出來，結合多參數分析，從而實現了細胞定量分析。

2.1.2 分選原理

新一代的桌上型細胞儀，如 FACSCalibur 細胞儀可加裝一分選系統，它的分選是應用「通道選擇式」的設計原理（passageway selection, 如圖?）。如設計圖中所示，水道可區分成三段：細胞分析區、分析前區、與分析後區，在水道中裝置一可動式捕捉管（catcher tube），捕捉管開口處可在「細胞分析區」與「分析後區」間快速切換，開口處位於細胞分析區時，可抓取欲分選的細胞，開口處位於分析後區則不分選。為了方便操控，該捕捉管可被一串連的電訊調節器控制，並適時地移動以捕捉有用的細胞，而拋棄不相干的細胞雜質。這一類桌上型細胞儀可以亦可進行螢光激發細胞分選（Fluorescence Activated Cell Sorting），將一特定族群細胞從複雜細胞族群中分選出來，以對它進行功能研究，形態學研究，或培養以從事進一步分析。下面依次介紹儀器各部分的原理。



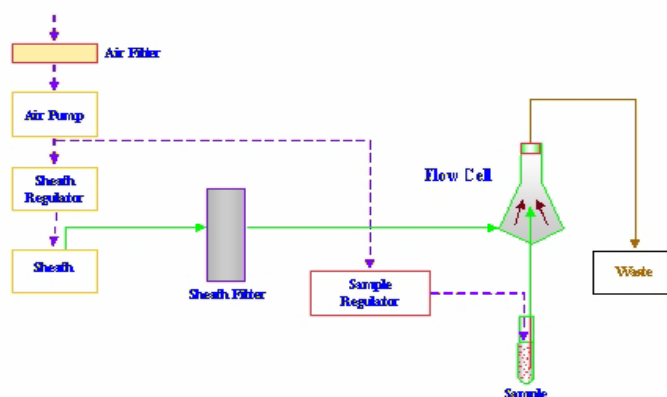
2.2 液流系統

液流系統的主要功用，是將細胞依序送到測量區受檢（運送細胞之水路與入射的雷射光束垂直相交點為測量區）。

2.2.1 密閉式流動室

桌上型細胞儀多採用密閉式液流系統，因為此一系統的液流壓力、與鞘液流（sheath flow）流速皆為原廠預設，毋需要人為調整，故而操作簡單。加上儀器內之雷射光路亦為原廠預先調設，因此較適用於臨床檢驗與基礎科研。

流動室內充滿鞘液，樣品試管中的細胞被一高於整個液流系統的壓力推入流動室中，形成一微細水路，細胞可於其內向上游動。藉由流體動力聚焦原理（hydrodynamic focusing），可使水路固定於流動室中央，周圍之鞘液形成一包被水路之鞘膜，使細胞能以單一細胞之形態，逐一流經最窄的水路到達測量區，而與雷射光交會。常使用的鞘液流為等張溶液如 phosphate-buffered saline，若配合特殊實驗可改用無菌的細胞培養液。

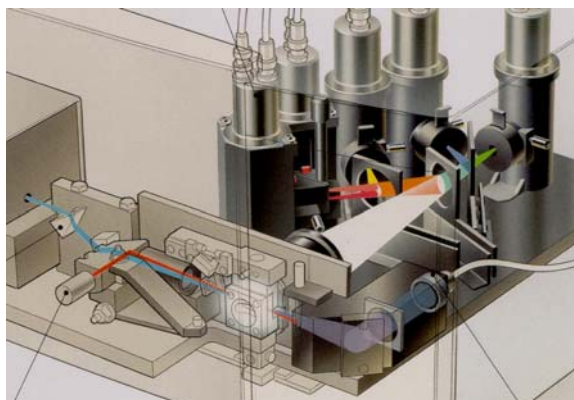


2.2.2 控制樣品的流速

實驗樣品的流速可以藉由改變樣品試管中的壓力來控制，儀器面板中有三種預設樣品的流速；高流量(HI)為 60 μ l/min，中流量(MED)為 35 μ l/min，低流量(LO)為 12 μ l/min。改變樣品的流速會影響細胞向上游動之水路的直徑大小，同時影響實驗數據的變異常數。高流量時，水路的直徑大，受測細胞可偏離水路中軸，或左或右移動而增加變異常數，適合用於定性分析以得陰性或陽性結果。一般做淋巴球表面抗原分析時，為定性分析，且因細胞間表現抗原量的差異程度較大，因此建議使用高流速收集樣品，可於數秒內即收集到數千至上萬個細胞數據。然而於要求低變異常數的實驗中，亦即偵測螢光強度差異小的細胞時必須使用低流速，例如做 DNA 分析時，控制在每秒兩百個細胞左右可達到較佳的結果，即是細胞濃度維持在 10⁶ cells/ml。

2.3 光學系統

儀器中一系列光學系統，包括光源、透鏡、光闌、和濾片等，它們的主要功用是產生並收集螢光、光散射等信號。



2.3.1 雷射與普通光線不同

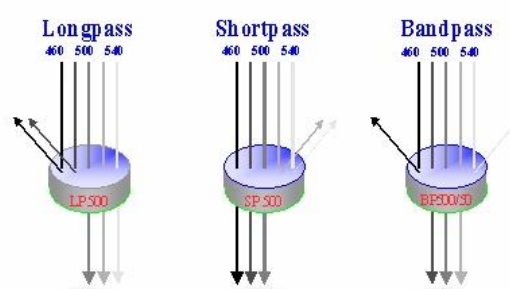
雷射是受激輻射，普通光線是自發輻射。雷射基本是沿著直線傳播，發散角很小，必要時很容易聚焦到與細胞同一數量級。雷射的亮度高，即在單位面積、單位立體角內輸出功率特別大。雷射還具有良好的單色性，這些特點使雷射成為細胞儀光源的首選。FACS Calibur 基本配有一支波長 488 nm 的氬離子雷射 (Argon-ion laser)。氬離子雷射也是目前最常被使用在流式細胞儀的光源。就臨床檢驗或臨床研究而言，可進行單色螢光或雙色螢光分析(e.g. , FITC/PE , FITC/PI) 。若另使用 PerCP、Cychrome、PharRed 或 7-ADD，則可做三色螢光之分析。

2.3.2 雙雷射光源

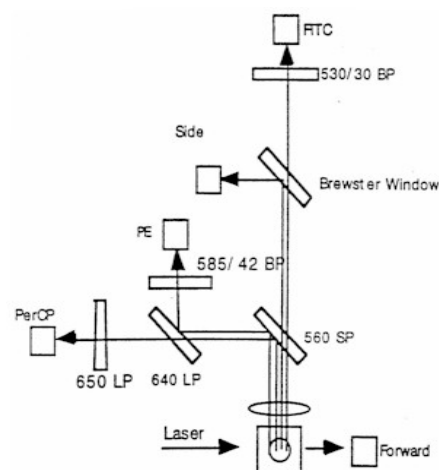
本公司更發展出第二種氣冷式雷射：Red Diode Laser，應用於新型的 FACS Calibur 系統中，藉其產生之 635 nm 波長之紅色光束，配合 APC、TOTO-3、TO-PRO-3 等紅光激發染料的使用（見表一），可應用於四色螢光之分析。用雙雷射光源的儀器擴大了其分辨的標記信號範圍和種類。

2.3.3 濾片

流式細胞術中所用濾片有很多種，有帶通濾片、長波通濾片、短波通濾片、長波通二色性反射片、中性濾片。帶通濾片的應用則正好相反，它只允許某一特定波長的光線通過，例如一 530 nm 帶通濾片只允許 FITC 發射的 530 nm 綠色螢光通過，而其他波長的光線全部被阻斷。長波通濾片只允許某一波長以上的光線通過而將此波長以下的光線濾掉，如 650nm 長波通濾片只允許 PerCP 發射的紅色螢光通過，而 488nm 的激發光及 FITC 發射的 525nm 綠光全部被阻。長波通二色性反射鏡只允許某一波長以上的光線通過而將此波長以下的另一特定波長的光線反射。例如讓 620nm 以上的紅光通過而將 525nm 綠光反射，其他的光線則由鏡片吸收。中性濾片無頻率特性，它對各波長的光線均勻衰減，常用光線過強需要均勻衰減的地方。



FACS Calibur 基本配備有 (1) 帶通濾片：488 /10, 530/30, 585/42 Bandpass (四色機型：661/16)。(2) 長波通濾片：650 Longpass (四色機型：670 LP)。(3) 長波通二色性反射鏡：DM640 LongPass。(4) 短波通二色性反射鏡：DM560 ShortPass。同時，測定側方散射光時，加用雙向分色濾片 (Dichromic 90/10 beam splitter)。圖示 FACS Calibur 流式細胞儀中濾片的基本設置。



2.4 電子系統

電子系統的主要功用有三：(1) 將光學訊號轉換成電子訊號。(2) 分析所輸出的電流訊號，以脈衝高度(H)、寬度(W)、積分面積(A)顯示。(3) 量化訊號並傳至電腦。

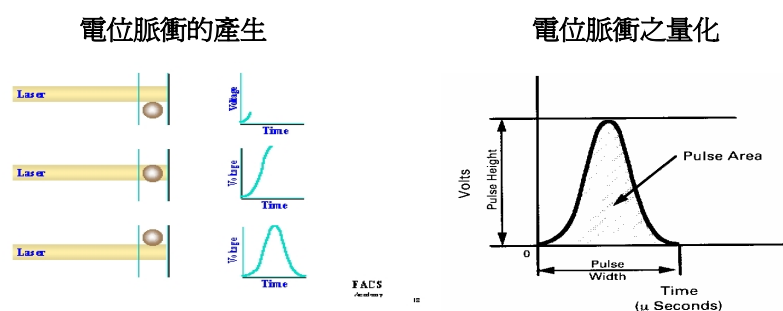
2.4.1 光子偵測器 (Photodetectors)

光子偵測器的用途是將光學訊號轉換成電子訊號。FACS Calibur 細胞儀使用兩類偵測器：矽晶光電二極體 (silica photodiode) 及光電倍增管 (photomultiplier tube)。光電二極體與光電倍增管各有其優點，光電倍增管在光線較弱時有很好的穩定性，而當光線很強時光電二極體就比光電倍增管穩定，所以 FACS Calibur 在探測 FSC 時用光電二極體；在探測螢光與 SSC 時，由於光訊號較 FSC 弱得多，所以偵測器靈敏度是主要考量，必須使用光電倍增管。

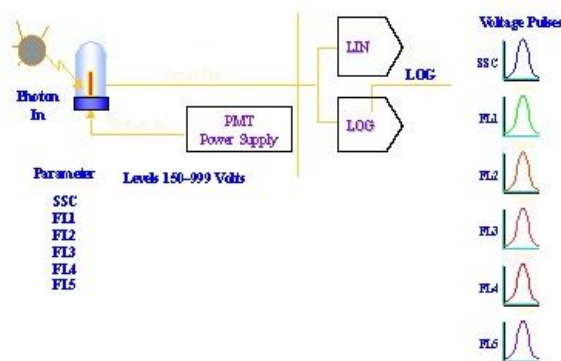
光電倍增管接收外來的光子訊號並釋出光電子，利用磁場將光子撞擊到倍增電極上釋出電子，再撞擊到下一個倍增電極產生更多的電子，經過這一連串的撞擊能放大並產生相當多的電子，最後再以陽極收集最終所有的電子，並產生輸出電流訊號。典型的光電倍增管具有十個倍增電極，其最終能放大的倍數為 10^6 。使用光電倍增管的優點除了可提高光訊號之外，真正訊號與雜訊之比值也較高 (high signal-to-noise ratio)。

2.4.2 訊號之產生及處理

細胞通過雷射光區時，偵測器便會偵測每個參數的光學訊號並將之轉換成電流訊號，以電位脈衝示之。當雷射偵測到細胞前緣時，即開始產生光學信號；偵測到整個細胞體時，信號達最高；而後，當細胞離開雷射區時，雷射偵測到細胞的尾端，信號也降至最低。如此，每個參數即形成一鐘形信號圖形，橫軸為細胞通過雷射區所需之時間，縱軸為信號強度。螢光之電位脈衝高度，與細胞散發之平均螢光強度成正比，以「FLx-H」表示，一般表面抗原或是蛋白分子表現量多以平均螢光強度表示；細胞散發之總螢光強度，則以圖形之積分面積表示，代號為「FLx-A」，多用於細胞週期/DNA 分析；而細胞通過雷射區所需之時間，則以寬度表示，即為「FLx-W」，可用來區分單一個細胞與雙細胞或多細胞聯連體，因為較大物件通過雷射區的時間較單個細胞所需之時間來得長的原故。



光電二極體及光電倍增管所輸出的電流訊號，經由初步放大器（pre-amplifier）轉換成電壓，再經由主波放大器（main pulse amplifier）將所需之訊號放大與處理（參見圖）。訊號的放大可以使用線性（LIN）或對數（LOG）兩種型態，一般前向及側向散射光的訊號使用線狀放大，因為散射光變異範圍較小；而由於螢光訊號變異範圍較大，所以多使用對數放大，唯一例外的是 DNA 分析時是使用線性放大，因為希望維持螢光訊號與 DNA 含量的正比關係。



2.5 散射光的測量

在流式細胞術中，從光的散射信號可以得到非常有價值的數據，因為細胞對光的散射是細胞在未遭受任何破壞情況下固有的特性，所以可以用散射光的信號對未染色的活細胞進行分析。細胞在液流中通過測量區時，經雷射照射，細胞向空間 360 度角的所有方向發射光線，散射的信號與細胞的大小、形狀、質膜、和細胞內部的折射率有關。在流式細胞術中常用的有前向散射（FSC）和側向散射（SSC），前者亦稱 0 度角散射，後者亦稱 90 度角散射。



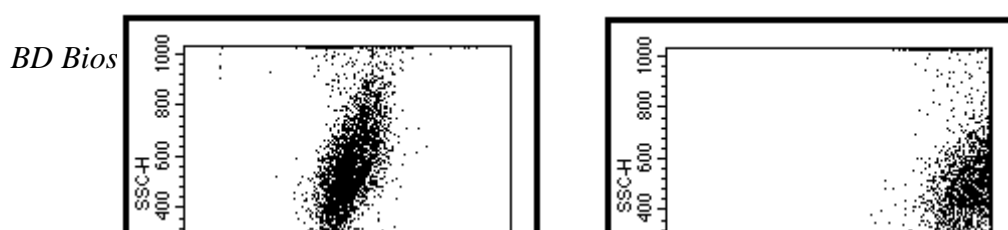
2.5.1 前向散射（FSC）

前向散射亦稱小角散射或 0 度角散射。一般我們僅能說前向散射光的強度與細胞的大小有關。對同一個細胞群體，散射光強的，其細胞大一些；而散射光弱的，其細胞小一些。究竟更準確的關係是什麼，因細胞不同、處理方法不同、固定方法不同，以致我們無法講出更精確的結論。甚至當細胞是非球形的如雞紅血球、扁平狀的精子時，由於細胞在液流中空間取向的不同，也可導致對同型細胞測得的前向散射光信號完全不同，這是必須注意的。

2.5.2 側向散射（SSC）

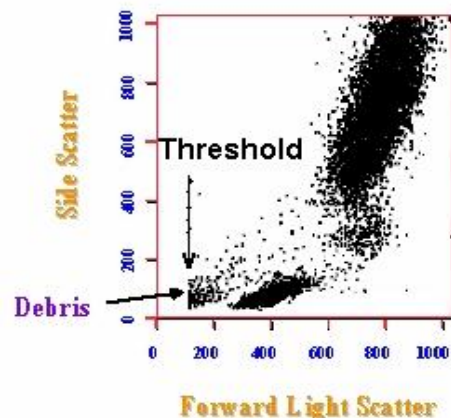
側向散射亦稱 90 度角散射或大角散射，收集到的是細胞通過測量區時側方向的散射光。側向散射的強度與有關細胞內部的精細結構和顆粒性質有關。當然，側向散射光也與細胞形狀、大小有關，但這不屬於側向散射獲取數據的主要方面。

以上所有的散射光波長與入射光一致，這是散射光與螢光的最大不同之點，在使用中務須牢記。散射光的探測器可以是矽光電管，也可以是光電倍增管，前者多用於探測前向角散射光，後者用於探測側向散射光。在實際使用中，儀器首先是對光散射信號進行測量。因為通過測量區的每個細胞不管它是否已被染色都能散射光線，所以光散射分析與螢光探針聯合使用時，可鑒別出樣品中被染色的細胞和未染色的細胞，光散射測量最有效的用途，是從非均一的群體中鑒別出某些亞群。用前向角散射和側向散射雙參數測定，可從不加任何染料的小鼠全骨髓中鑒別出若干個亞群。舉例而言，流式細胞儀可依據光散射信號將人白血球分成三個族群，淋巴球，單核球與顆粒性球：淋巴球 FSC 與 SSC 都小，單核球 FSC 大與 SSC 中等，而顆粒性球 FSC 與 SSC 都大。



2.5.3 電壓閾值

由於流式細胞儀的高敏感度，只要溶液中稍有雜質就很容易產生一微小電壓訊號，所以必須設定電壓閾值（**threshold voltage**），所有進入的訊號必須高於此閾值才被接收為一訊號，操作者一般藉前向散射光閾值之設定，來排除雜質或細胞碎片或體積變小的死細胞。宛如新兵入伍前接受體檢，身高或體重不達預定標準者，不予接受。



2.5.4 線性測量和對數測量

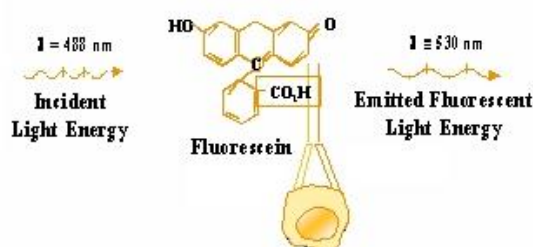
散射光測量時通常使用線性放大器，即放大器的輸出與輸入是線性關係，輸入增大 1 倍，輸出也增大 1 倍。線性放大器適用在較小範圍內變化的信號以及代表生物學線性過程的信號。前向角散射光和 DNA 測量即屬於這一類。但測量中有時需要用對數放大器，它的輸出與輸入是對數關係。如果原來輸出為 1，當輸入增大到原來的 10 倍時，輸出是 2；當輸入又增大 10 倍時，輸出為 3，等等。如側向散射光由於信號大小變化範圍較大，有時用對數放大器可能好一些。

2.6 螢光測量

當一個物體受到光能激發後，物體中的電子達到高的能階（激發狀態），當它回復到

BD Biosciences, COE

原有的狀態時，多餘的能量就以光的形式輻射出來。這就是說當一個物體吸收了紫外光或者短波光的能量，它能發射出比原來吸收的波長更長的光的特性，這種現象稱為“螢光”。



2.6.1 螢光測量的意義

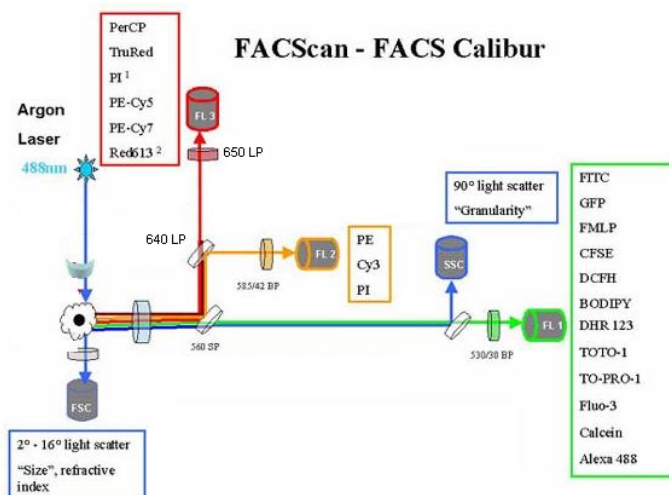
螢光信號可以反映不同的細胞生物學特性。如用螢光染料標記的單株抗體特異性地與細胞表面的抗原、受體或膜糖蛋白結合，在雷射的激發之下，發出一定波長的螢光。螢光信號的強度反映了膜抗原、受體或糖蛋白的相對數量，對螢光信號進行收集分析，就可以實現對細胞亞群和功能等的分析。用 DNA 染料對 DNA 進行染色，染料通過一定方式與 DNA 鏈結合，在雷射的激發下，染料發出螢光，測定螢光的強度，就可得出相對 DNA 的含量，進而可對細胞周期時相進行分析。用特定的螢光染料還可對細胞鈣離子濃度、細胞內 pH 值以及細胞膜電位等進行測定。

2.6.2 螢光染劑的選擇

選擇螢光染料的依據就是要了解 FACS 儀器的光源系統，同時考慮染料的激發光譜。激發光波長應盡可能接近螢光染料的激發光譜峰值。

2.6.3 檢測器的選擇

儀器在同時檢測多種螢光時，每個螢光檢測器只允許一種指定波長的螢光信號進入而被檢測，因此使用者必須選用適當的螢光信號接收器，才能收到最佳的信號。選擇檢測器的依據就是要了解螢光染料的發射光譜。以三色之 FACS Calibur 為例，如果螢光光譜峰值落在綠色範圍（515-545 nm 波長），選用第一螢光檢測器；如果光譜峰值落在橙紅色範圍（564-606nm），選用第二螢光檢測器；如果螢光光譜峰值落在深紅色範圍（>650nm），選用第三螢光檢測器。

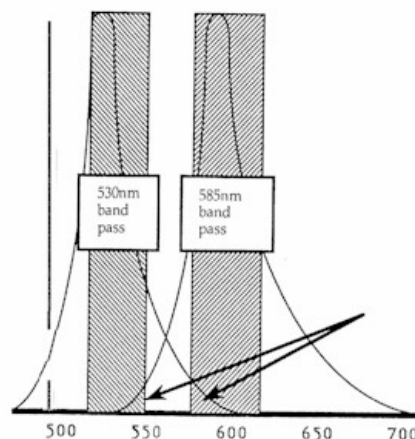


2.6.4 線性測量和對數測量

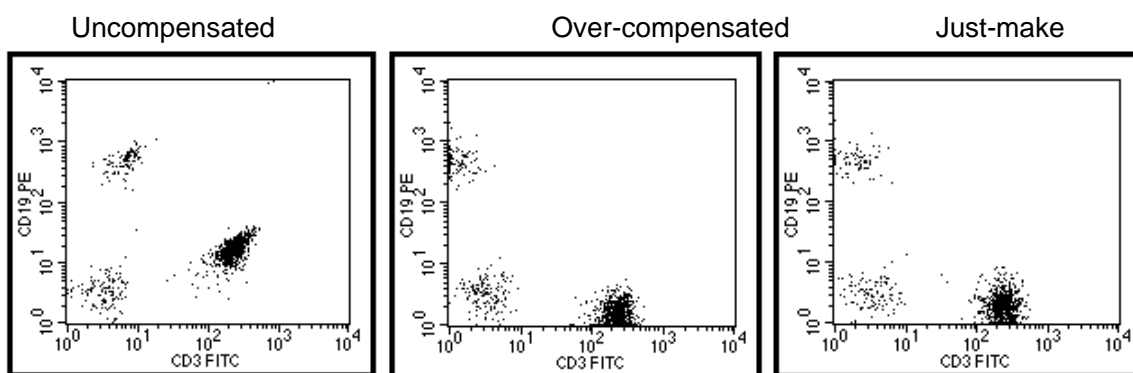
螢光測量常使用對數放大器。因為在免疫學的一個樣品中、可能有的細胞未被染色僅有自發螢光，為陰性群體；被染上色的細胞特异性螢光可能比自發螢光強數倍到數十倍，是為陽性群體；有時還會有一些被染色的細胞，其螢光比自發螢光強數百倍。是為強陽性群體、對同時具有以上數種亞群的樣品，當需要同時顯示時，如用線性放大器，三個群體的螢光將難同時顯示，而用適當對數放大器則同時可分辨出這些亮度差異極大的三個或更多個亞群。此外，在使用對數放大器時，被染色的細胞群體有傾向於對稱性分布的趨勢，這對於選定不同亞群間的分界點十分有利，這對於使用流式細胞儀進行分析和分選都不無好處。只有少數特殊螢光的測量，會建議使用線性放大器，如 DNA 分析。

2.6.5 光譜重疊的校正

用一種雷射束激發兩種螢光染料而發射多種不同波長的螢光時，從理論上講可選擇濾片系統僅使一種螢光被一個光電倍增管檢測，此光電倍增管不會檢測到另外一種螢光。但實際上由於兩種螢光的發射光譜的重疊，因而少量不需要的另一種螢光也會為此光電倍增管所檢測，所以每一個光電倍增管實際上檢測到的都是兩種螢光之總和，只不過各以某一個為主而已。



如何從所接收的螢光信號中，把不需要測定的部分減去，使光電倍增管輸出的信號真正只代表指定欲檢測的信號，這可用電子補償線路來完成。即在放大線路中加進一個補償電路。使之能減去進入光電倍增管不需要測定的螢光信號。補償的深淺程度，可用雙螢光同時測定的儀器條件來決定。補償時先測定一種染料的螢光，此時除了應該接收該螢光的光電倍增管例如 PMT1 有信號輸出外，另一光電倍增管 PMT2 也常會有微弱的輸出，調節補償器使 PMT2 輸出為 0，然後再測另一種染料，再調 PMT1 補償器使之輸出亦為 0，如此反覆調節，則 PMT1 和 PMT2 就可全獲補償。此後如 PMT 的高壓改變、雷射波長變動，濾片系統有變化時需重新調正，實際調節時用的是一種標準螢光微球，微球上標有已知量的特定螢光染料，如 10,000 個 Fitc 分子。利用標有不同螢光染料的微球，FACS Calibur 可自動校正、補償不同的螢光測量通道。



表一、常用螢光染劑之光學特性

測量參數	螢光染劑	吸光波長 (nm)	螢光波長(nm)
標示抗體用染劑	Fluorescein, FITC	490	520
	Phycoerythrin-R, PE	480	578
	Peridinin-chlorophyll, PerCP	490	677
	PerCP-Cy5.5	490	680
	Cy-Chrome	495	670
	PE-Cyanine 5	480	670
	Allophycocyanine, APC	650	660
	APC-Cy7	650	770
核酸含量分析	Ethidium Bromide	510	595
	Propidium Iodide	536	617
	Acridine Orange	480 (+ DNA) 450 (+ RNA)	520 650
	Thiazole Orange	509	533
細胞存活率	Propidium Iodide	536	617
	7-Amino Actinomycin D	545	647
	YOYO-1, YO-PRO-1	491	509
	Ethidium Monoazide	493	620
	TOTO-3, TO-PRO-3	642	661
報導基因	GFP S65A, S65C	475	506
	GFP S65L, S65T	486	510
細胞膜電位	DiO-C6(3)	485	525
粒腺體膜電位	Rhodamine 123	485	546
細胞內 pH 值	BCECF-AM	488	Ratio 520/620
	SNARF1-AM	514	Ratio 587/640
細胞內鈣濃度	Fluo3-AM	506	528
	Calcium Green-1	488	530
	Fura Red	488	660
H ₂ O ₂ sensitive	Dihydrorhodamine 123	505	534
	DCFH-DA	505	535
O ₂ -radical sensitive	Hydroethidine	518	605
Esterase sensitive	Fluorescein -DA	495	525