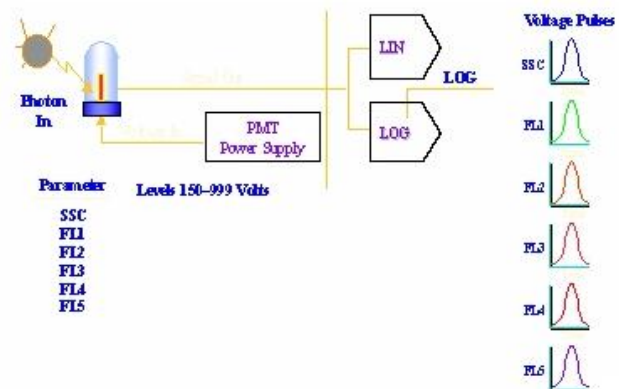


## 第 4 章 流式實驗數據分析

流式細胞技術，顧名思義就是細胞在流動狀態下的檢測。流動的懸浮液體中分散細胞一個個地依次通過測量區，該測量區是雷射與液流交會之處，帶有特異性螢光標記抗體的細胞當暴露於雷射光束時，染色的細胞發出螢光，螢光染劑受到雷射激發，釋放一定波長的光，這些光信號轉化為電流信號，再進一步被測量、儲存、顯示，細胞的一系列重要的物理特性和生化特徵，如大小、內部結構、DNA、RNA、蛋白質、抗原等就被快速地測定。由於流式細胞儀對細胞可進行大量快速準確的測定，每秒可測數千至上萬個細胞，並可同時進行單一細胞的多參數多抗原的分析，短時間內即可得到大量相關資訊，因此流式細胞技術在各學科領域越來越受到人們的重視。

### 4.1 信號之產生及處理

光信號被光電倍增管所偵測，並被轉換成一個正比例於原來光信號強度的電壓。光電倍增管所輸出的電流信號，經由轉換變成 0-10.23 伏特的電壓，再經由主波放大器將所需之訊號放大（參見圖），最後再將這些連續性的電壓訊號，經由一個類比全數位計數器轉換成 0-1023 的整數型數據。



訊號的放大可以使用線性（linear）或對數（logarithmic）兩種型態；線性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。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。對數放大器適用於大多數螢光測量，因為大多生物學信號變異範圍較大。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。常見的範例是 DNA 分析與鈣離子流動測量，使用線性放大是因為希望維持螢光訊號與 DNA 含量的正比關係。前向及側向散射光的訊號也常使用線性放大，因為散射光變異範圍較小。

獲取實驗數據之前，先決定訊號放大的型式是相當重要的，選用不同的放大器型式，將影響實驗數據的分佈，且不易再更改。

#### 4.1.1 條列式數據格式 Listmode Data

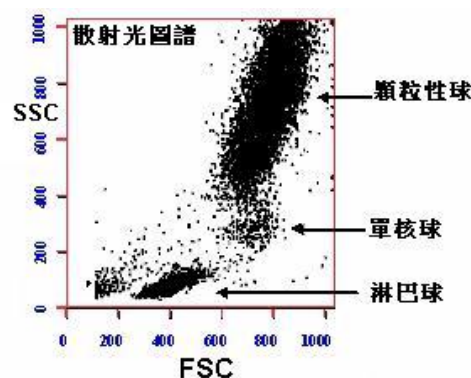
細胞儀收集下來的原始數據檔，一般稱之為 Listmode 檔案，意指該檔案是以列表或矩陣方式儲存。如果用特殊軟體如 FCS Assistant 與 EXCEL 軟體開啓，可見到如下圖中條列式的數據。所有細胞儀的數據檔都會依據國際公定的 Flow Cytometry Standard File 格式儲存，稱為 FCS 檔案。換言之，各廠牌儀器所得之實驗數據可相互轉換。

Cell #	FSC-H	SSC-H	FL1-H	FL2-H	FL3-H
1	359	367	155	134	200
2	433	228	116	71	167
3	367	376	274	257	356
4	228	229	68	0	248
5	376	304	180	191	255
6	229	334	0	65	111
7	304	367	182	131	283
8	334	543	136	143	88
9	367	468	205	199	324
10	543	375	349	311	426
11	468	448	245	215	275
12	375	237	132	169	182
13	448	233	285	218	304
14	237	469	0	92	186

儲存的資料檔案雖然易於加工、處理、分析，但由於資料筆數大，不利於觀察各參數及其相互的關係。因此將資料用圖形顯示，然後再進行統計分析，是流式結果分析中最常用、也較客觀的分析方法。圖形顯示通常用一維直方圖、二維散點圖、或三維密度圖、三維等高圖、假三維圖等，以下簡述。

#### 4.2. 散射光圖譜分析與圈選

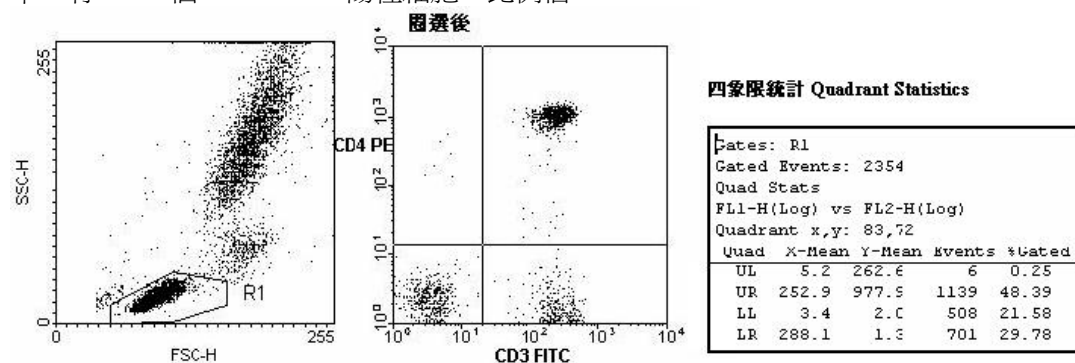
在製備好的細胞檢品中，常含有大小不同、形態相異的細胞群體。對於不同的細胞群，我們常用前方散射與側方散射的二維散點圖，即散射光圖譜（Scatter Plot），來畫出不同細胞群的範圍，選擇有興趣的細胞群體。如右圖為人周邊血經紅血球溶裂處理後，存活之白血球，用雙參數散射光圖譜，可區分出顆粒性球、單核球、與淋巴球三群不同的細胞群。圖中亦可清楚地看出，未被溶解的紅細胞和一些細胞渣滓，由於不同的體積和緻密度，明顯地與淋巴細胞區別，從而能把它們分開。



##### 4.2.1 圈選 Gating

流式用戶可以自行設定分析檔案中的部分數據。配合使用滑鼠在顯示圖上畫定的一個或數個區域（Region），用戶可圈選出原始檔中的部分數據，或族群中的部分亞群，進行資料分析。

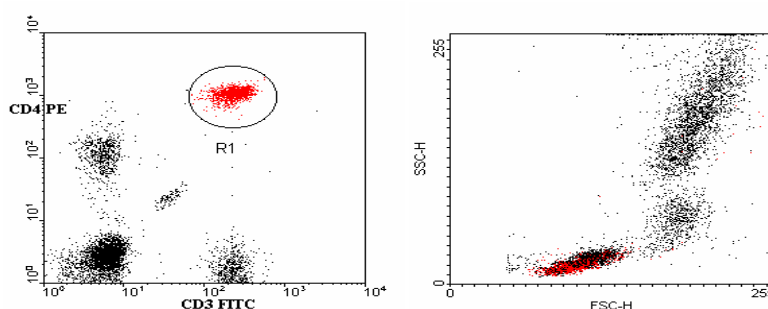
圈選可以限定分析的細胞群，而細胞群的界定可以由一個或多個區域組合而成。如從圖上看到清楚的細胞分群以後，可以在電腦顯示幕上將所要分析的細胞，如淋巴細胞畫線框出，並通過圈選指令指示軟體，以後就可只對框出部分做各種資料分析。例圖中以散射光圖譜中的區域來圈選淋巴細胞，所得到之螢光二維散點圖與圈選前不同。圈選前細胞數 6000，圈選後細胞數變少為 2354，這是因為單核球與顆粒性球不列入統計。圖中用戶想知道多少比例的淋巴細胞是 CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> 雙陽性，分析軟體會自動算出在 2354 個淋巴細胞中，有 1139 個 CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> 陽性細胞，比例佔 48%。



#### 4.2.2 反向圈選 Back-Gating

如從散射光圖譜中無法清楚分群，有時需藉助已知反應之免疫螢光，如 Anti-CD3 染 T 淋巴細胞，來顯示淋巴細胞在另一圖（通常是 FSC/SSC 散射光圖譜）上的位置，用於圈選該群細胞群的位置，並盡量避開其他不相干細胞的干擾，此謂「反向圈選」。反向圈選常被使用在凌亂的散射光圖譜時，例如：病理情況（如血癌）、或因疾病療程（如化放療）、或藥物激活（PHA or Con A），做法簡述如下：

1. 例圖中在 FL1/FL2 散點圖中，在 CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> 細胞群上畫 R1。
2. 啟動 FSC/SSC 散點圖，從 Plot 功能表上選擇 Format Dot Plot
3. 在對話方框中選擇 Multiple Color 顯示，點擊 OK，可觀察在 FSC/SSC 上 R1 細胞所在位置。在 R1 紅色細胞群的位置上畫 R2，盡量避開其他不相干細胞，回到 FL1/FL2 散點圖，再以 G2=R2 進行圈選。



### 4.2.3. 邏輯組合門

在 CellQuest 中，預設  $G1=R1$ ， $G2=R2$ ，但可以根據需要設定合適的邏輯組合門。多個 Region 組合而成複雜的門可以用來統計分析。有以下 3 種主要邏輯門。

**R1 and R2 (或  $R1 \cdot R2$ )**：同時在 R1 和 R2 內的細胞才是滿足該門的要求。

**R1 or R2 (或  $R1+R2$ )**：在 R1 內或 R2 內的細胞都滿足該門的要求。

**Not R1 (或  $\neg R1$ )**：所有不在 R1 內的細胞群都滿足該門的要求。

注意：1· 限定邏輯門時，在 and、or、及 region 之間需空格。

2· 邏輯運算關係：先 Not，然後 and，其次 or。或用括弧表示。例如：

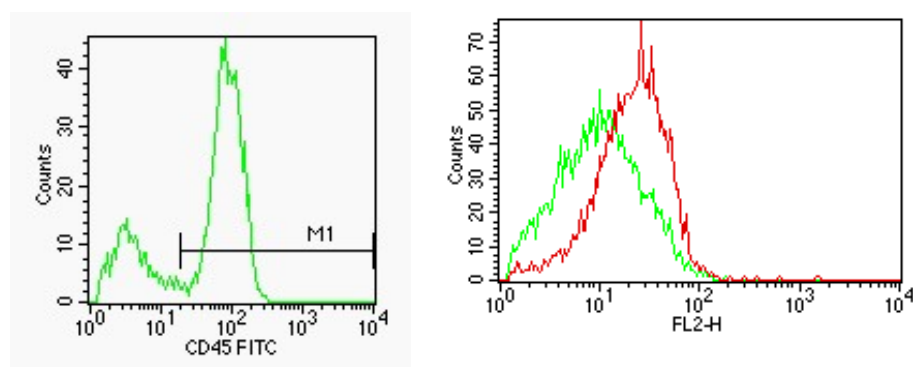
<b>Not R1 and R2</b>	正確	所有不在 R1 且在 R2 內的細胞
<b>R1 and Not R2</b>	正確	所有不在 R2 且在 R1 內的細胞
<b>R1 Not R2</b>	錯誤	不成立
<b>Not (R1 and R2)</b>	正確	所有在 R1 和 R2 交集以外的細胞
<b>R1 or R2 and R3</b>	正確	所有在 R2 和 R3 交集內或在 R1 內的細胞
<b>(R1 or R2) and R3</b>	正確	所有在 R1 或 R2 內且在在 R3 內的細胞
<b>R1 or R2 or Not R3 and R4</b>	正確	首先 not R3，然後 and R4，其次或 R1 或 R2 內的細胞
<b>(R1 or R2 or Not R3) and R4</b>	正確	首先括弧內，然後 and R4

### 4.3. 直方圖分析報告

一維直方圖又稱單參數直方圖，用於定性和定量分析，是最簡單的分析方式。在圖中，橫坐標X軸為螢光或散射光強度的相對值，單位是道數 (channel number)。縱坐標Y軸則通常表示細胞出現的頻率，即相對細胞數。在直方圖中，每個峰表示某些性質相同的一群細胞，若用“Marker”把各峰分開成區間，即可統計分析出各個區間中具有多少相同性質細胞，占總收獲細胞的百分比及散射光或螢光強度的峰值、平均值、標準差、變異係數等結果。

### 4.3.1 兩個例子

最簡單的實驗類型是淋巴球的免疫分型，研究者使用一個免疫標記來測量陽性細胞所佔的比例。在這例子裡，陽性細胞所佔的比例可以輕易地經由設定一陰陽界限 M1，來決定陽性細胞的頻率分布，至於 X 軸的道數值則並不重要。



第二個例子便複雜些，因為我們想要了解受測細胞螢光強度的呈現情形。在這例子裡，兩群細胞螢光強度的分布不同，那麼這些不同差別該如何來呈現或是定量的呢？當開始想要量化螢光強度，我們便需要注意該如何來呈現一個細胞族群的常態分布。在生物統計學我們最常使用的有平均數、中間數、與眾數（the mean, the median, the mode）。

"平均數"在流式分析中最常被使用，又分"算術平均數"和"幾何平均數"兩種。假如獲取實驗數據時採用線性放大，則直方圖 X 軸呈現螢光強度的尺度應是顯示頻道數字，例如 0-1023，此時宜用"算術平均數"，它的算法為  $\text{Sigma}(X)/N$ 。假如獲取實驗數據時採用對數放大，則直方圖 X 軸呈現螢光強度的尺度應是顯示對數數值，例如 10<sup>0</sup>-10<sup>4</sup>，此時宜用"幾何平均數"，它的算法為  $(a_1 \times a_2 \times a_3 \dots a_N)$  連乘積，再開 N 次方根。

另一種統計方式為"中間數"，即百分之 50th 數，細胞族群螢光強度的分布一半比"中間數"大，而另一半比"中間數"小。"平均數"和"中間數"兩種方式，都是流式學者常用以量化細胞螢光強度的顯示方式。

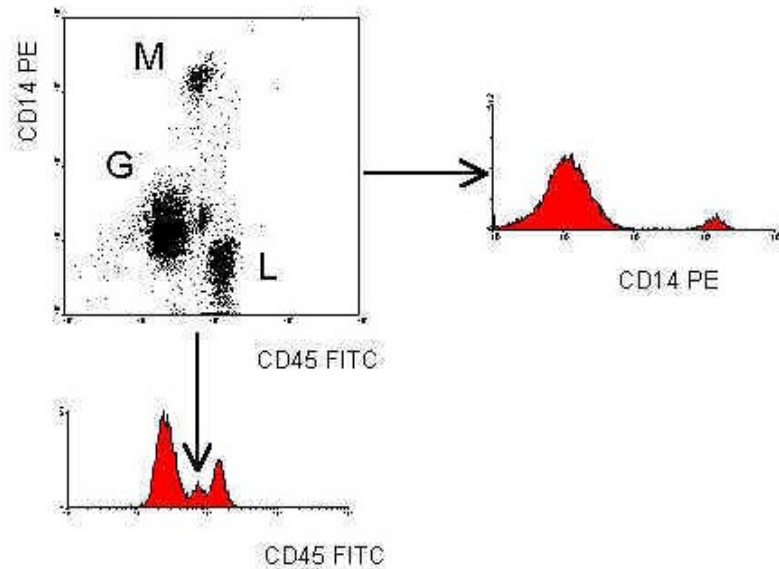
### 4.3.2 如何量化細胞螢光強度

假如獲取實驗數據時採用線性放大，則直方圖 X 軸呈現的尺度與細胞螢光強度直接成正相關，"平均數"的算法簡單、意義明瞭。一個位於頻道數字 800 的細胞，其螢光強度為一個位於頻道數字 80 細胞群的十倍。兩個族群之比較則以"平均數"和"中間數"兩種方式。

假如獲取實驗數據時採用對數放大，則我們建議以直方圖 X 軸的對數數值來呈現螢光強度的尺度，一個位於絕對數字顯示  $10^2$  的細胞群，其螢光強度為一個顯示數字  $10^1$  細胞群的十倍。兩個族群之比較，則以“幾何平均數”來顯示。

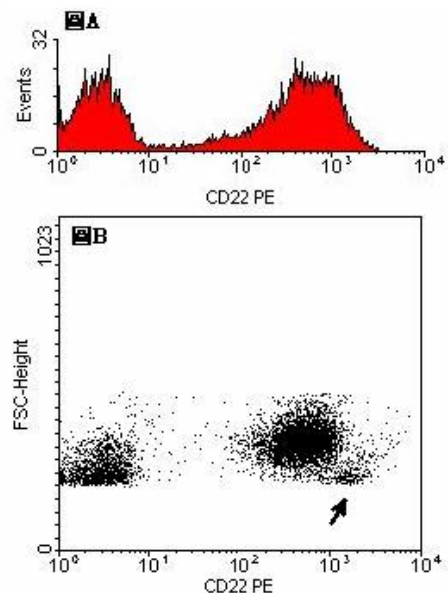
#### 4.4. 二維散點圖

一維直方圖只能表明一個參數與細胞數量之間的關係，不能顯示兩個獨立參數與細胞的關係，當需要研究兩個或更多測量參數之間的關係時，用戶可以採用二維散點圖、或二維密度圖來顯示實驗數據。採用二維散點圖的另一特色，是運用兩個相關的參數，更加清楚地呈現稀有族群。這樣的特色在右方散點圖和它的直方圖之間清楚可見。請注意在散點圖上離散、清晰的族群，在直方統計圖上可能重疊。



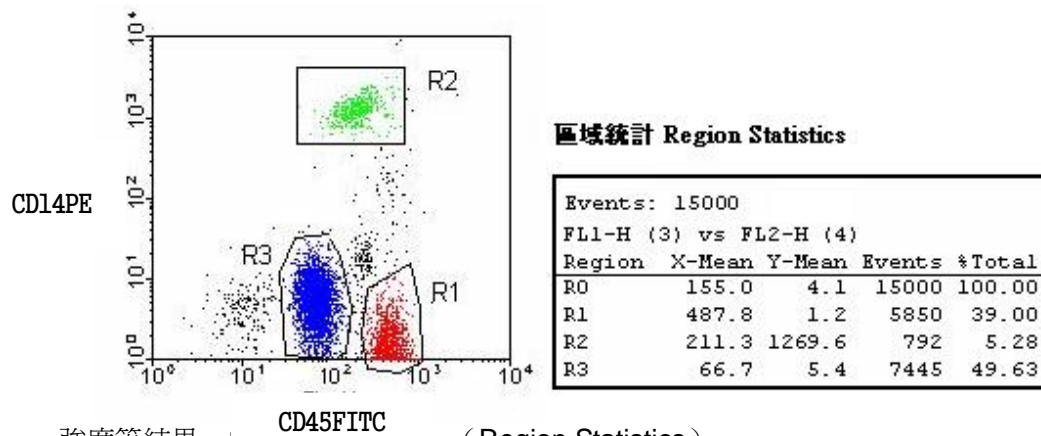
##### 4.4.1 單螢光二維散點圖分析

使用單螢光分析時，可以搭配散射光進行雙參數分析，有助於解析次要的細胞族群，如例圖中 CD22 陽性細胞有兩族群，CD22 強陽性細胞族群(箭頭所示)的平均體積比 CD22 陰性族群相對較小，而 CD22 陽性細胞族群的平均體積則相對較大。



#### 4.4.2 如何進行二維散點圖的統計

上圖的數據來自人類周邊血經紅血球溶裂處理後，所得到的白血球懸液。白血球懸液與有標示的 CD45 FITC 與 CD14 PE 單株抗體結合作用後，經流式細胞儀檢測後，根據細胞性質的不同，可清楚地 FL1 對應 FL2 二維散點圖上出現多群細胞，這些群體稱為“亞群”，如圖中之淋巴球(R1)、單核球(R2)、與顆粒性球(R3)。若使用滑鼠在圖上畫定“區域 (Region)”，把各亞群細胞分開並進行統計分析，可得各亞群所占百分比、平均螢光



強度等結果，此為「區域統計」 (Region Statistics)。

#### 4.4.3 四象限統計

研究者可以自行設定分析檔案中的一部分數據。配合使用在圖上畫定的一個或數個區，研究者可圈選 (Gate) 出原始檔中的部分數據，或族群中的特定亞群，進行分析。圈選的動作有如過篩網，合於條件的數據留下，不合者放棄，最後只顯示研究者有興趣的數據。

雙螢光分析是最常被使用的分析方法，細胞的 FITC 信號置放 X 軸 (Log FITC Fluorescence)，PE 信號置放 Y 軸 (Log PE Fluorescence)，散點圖顯示出來後，使用者可自訂十字線界限來定義分成四個象限，將細胞分成“陰性”、“Fitc 陽性”、“Pe 陽性”、與“雙陽性”四個族群 (P4.如 2.1 中間圖)。使用者可進行四象限統計 (Quadrant Statistics)，如圖中，使用者想知道多少比例的淋巴細胞是 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>雙陽性，分析軟體會自動算出在第一象限 UL 佔 0.25%，第二象限 UR T Helper (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) 佔 48.39%，第三象限 LL 陰性佔 21.58%，第四象限 LR 佔 29.79%。

## 4.5. 陽性細胞界限設定原則

### 4.5.1 陰性對照組很重要

眾所周知，免疫染色過程中，陰性和陽性對照組是必不可少的。在準備流式分析的細胞時，對照標本的製備顯得格外重要，因為一次用流式分析的樣品可能會很多，甚至多達上百個試管。每一個病人都要有相對應的陰性對照（**isotype controls**），這是因為對同一病人也可能會用到 20~30 種不同的單株抗體。陰性對照主要用於測試細胞標本是否容易產生非特異性染色，並在分析數據時，指導陰陽性的分界線。

在上機分析時，陰性對照是必不可少的。首先用非染色細胞，根據前面介紹的散射光圖譜，將某一細胞群框定；然後分別選用綠色螢光或紅色螢光單色直方圖。在直方圖上所出現的細胞均為陰性，可用改變 **FL1** 或 **FL2** 電壓的辦法，將細胞恰好調節到左側第一格（**first decade**）並設立標記。然後再測試 **Mslg isotype** 染色的陰性對照。某些細胞，由於膜上的 **Fc** 受體可以與對照組抗體鼠 **Ig** 非特異性結合，因而有一定的背景染色，不過這種陽性百分率不應超過 **5%**。在符合上述標準下（**< 5%**），可以用 **Mslg isotype** 的分界標記為陰陽性的分界線，來分析後來所測試的標本。

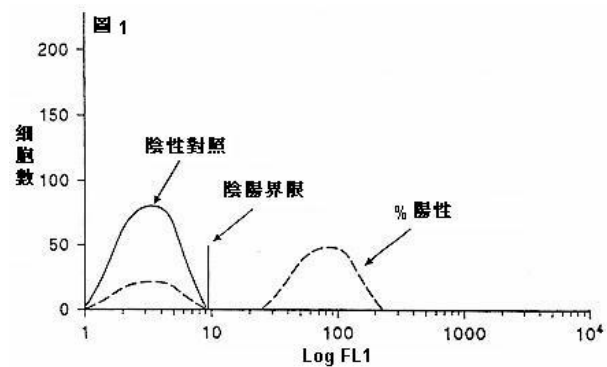
**Mslg** 的紅、綠螢光陰陽性分界標記確立以後，可以分析測試標本。首先檢查細胞分群情況，然後檢查淋巴細胞群是否落在電腦螢幕上淋巴細胞框定的範圍裏。若染色及流式的工作性能都正常，則框定的位置不會改變。然後轉換成螢光直方圖。若為 **FITC** 標記的細胞，則 **FL1** 為 **X** 軸；若為 **PE** 標記的細胞，則用 **FL2** 為 **X** 軸。由於陰陽性分界標記已確立，細胞陽性率及圖像均顯示於電腦螢幕上。

### 4.5.2 界限/十字線設定原則

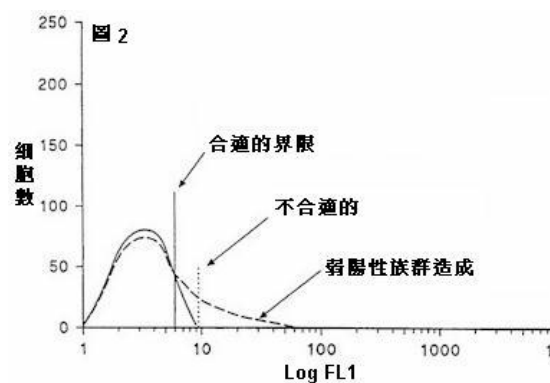
下面介紹了幾種常見的界限與十字線設定原則，希望對大家有所幫助，使實驗中由此帶來的假陽性與假陰性率降至最低。



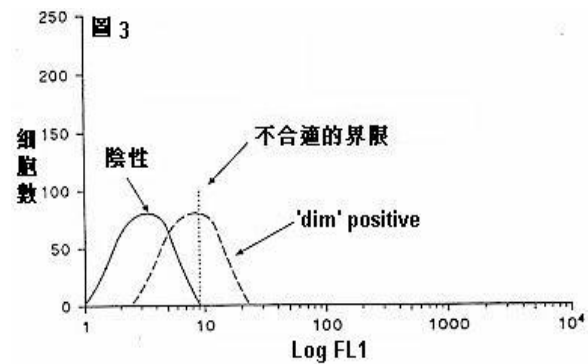
1、圖 1 所示兩種情況 (1) 實驗組只有一個峰，與陰性群體區分明顯。(2) 實驗組在陰性對照相應位置有一個小峰，其染色強度與陰性對照組重疊，第一峰先回到基線後，才出現第二個峰與陰性群體區分明顯。分析此情況，需用陰性對照設一個分析界限，陽性細胞界限可設在陰性對照組的右緣，超出此線的細胞即算陽性。如用相同的標準界限來分析陰性對照組數據，可能仍會有少數假陽性細胞，一般假陽性比例須低於 2%。此種反應模式下，應記錄陽性細胞百分比，記錄某些相對強度值，可以是“強陽性”定性描述，或者陽性群體平均值。



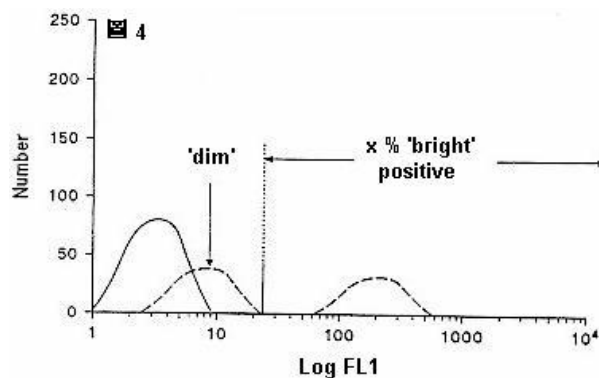
2、實驗組直方圖左側與對照重合，但卻很明顯地多出一塊‘肩帶’而對照沒有。此情況下，陽性細胞的標準應設置在兩個曲線分離之處，所得到陽性細胞比例，須扣除該標準在陰性對照組之中假陽性率（多半都會超過 2%）。此結果值不準且只能代表真正陽性細胞的近似值。這些粒子的相對強度一般報告為“弱陽性”。分析報告中也應說明陽性細胞為弱陽性。如用定量方法，可報告道數平均值或中位數。（圖中虛線界限不合適，不能以此計算陽性細胞百分比。）



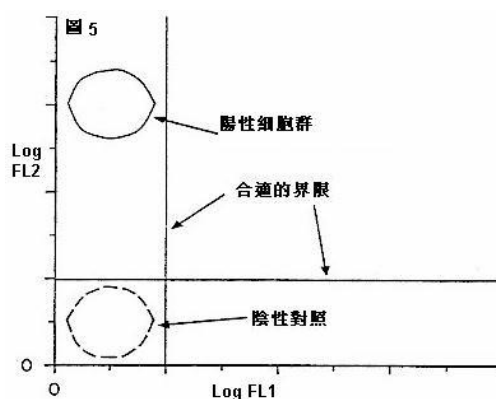
- 3、實驗組的波形與陰性對照完全相同，但實驗組直方圖右移數道。分析此情況，不能設界限，亦無法得到陽性細胞百分比的定量值。結果可記為“弱陽性”或用定量方法報告平均螢光強度（mean fluorescent intensity）的道數、或中位數。最難確定的是實驗組直方圖右移數道是代表抗原低表達還是非特異染色。判斷抗原低表達的條件是（1）儀器條件設置可分辨可能的差別。（2）實驗組直方圖平均道值顯著高於同組實驗中其他抗體非特異染色（3）得到此陽性結果的抗體通過與已知陽性細胞和陰性細胞的反應調整合適的滴度，確知其陰性位置且與圖中虛線圖重疊。



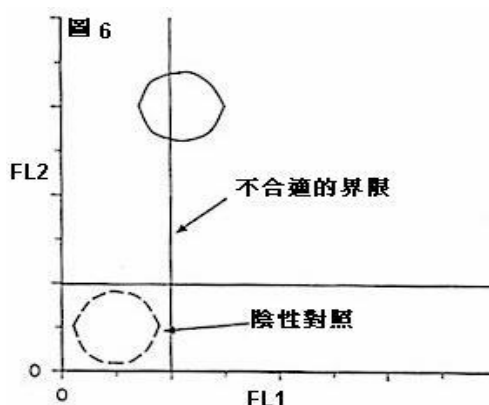
- 4、圖 4 出現圖 1 和圖 3 圖形組合。分析此情況，需設定一個分析界限。此界限不是設在陰性對照處而是設在弱陽性群返回基線處，如圖 1 情況時。基線右側粒子可記為強陽性，算出其所佔比例，並報告螢光平均值。若分析弱陽性的群體則應與陰性比較其分佈，分析原則見圖 2、3，亦算出其比例，報告螢光平均值。



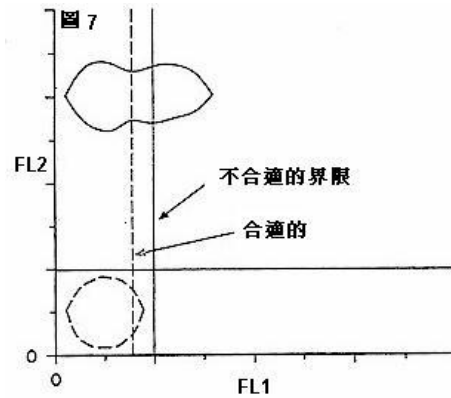
5、圖 5 中陽性細胞群與陰性對照組區分明顯，且全部位於十字線設定的左下象限內。分析此狀況，只須以陰性對照組設十字線分四象限，使得其他三象限（左上、右上、與右下）總和陽性率小於 2%。對實驗組樣本應記錄各區內細胞所佔比例。可描述為“強陽性”或用定量方法記錄平均道值。



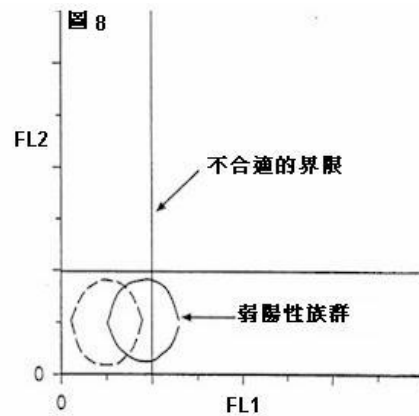
6、圖 6 的陽性細胞群體與陰性對照組區分明顯，但部分與十字線重疊，落在 FITC+PE 象限。此狀況分析較為複雜，在與對照區分明顯的 FL2 區間可應用圖 5 原則，即實驗組的細胞在 FL2 軸上為強陽性，而要確定雙陽性部分，則要依群體的形狀，應用圖 7 或圖 8 原則，比較其在 X 軸 (FL1) 的趨勢、及與陰性對照組的差別。分析雙陽性部分最困擾處，仍是要確認圖形右移真的是反映所有細胞都有低階的抗原表達，而不是因為色差補償不足所引起 (Under-compensation)，還必須確認曲線右移不是非特異性染色所致。



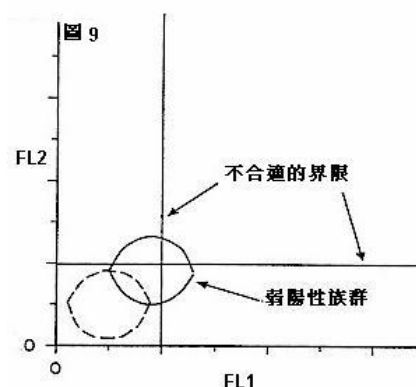
7、圖 7 的陽性群體左邊部分與陰性對照平行或重合，而右側有明顯的尾部，與 X 軸平行。分析此圖可應用圖 2 中單色分析的原則，將標記設在與陰性對照圖形分離處（等高圖比點圖更易區分），所得到陽性細胞比例，須扣除該標記在陰性對照組中得到的假陽性率（多半都會超過 2%）。結果應只能作真值的近似值，可描述為“FL1 弱陽性”或用定量方法記錄平均道值。



8、圖 8 的陽性群體形狀與對照一致（等高圖顯示更明顯），且與對照重疊，沿 X 軸平移數道。分析此圖可應用圖 3 中單色分析的原則。分析此圖時，無法設定陽性細胞標準，所有的細胞都可描述為“FL1 弱陽性”，或用定量方法記錄平均道值。分析這類圖形之困難處，在於研究者必須確認直方圖曲線右移，真的是反映所有細胞都有低階的抗原表達，而不是非特異性染色所致。某些商品化 PE 染料較 FITC 更易出現弱的非特異結合，因此在將弱 PE 染色定為陽性時要更加謹慎。



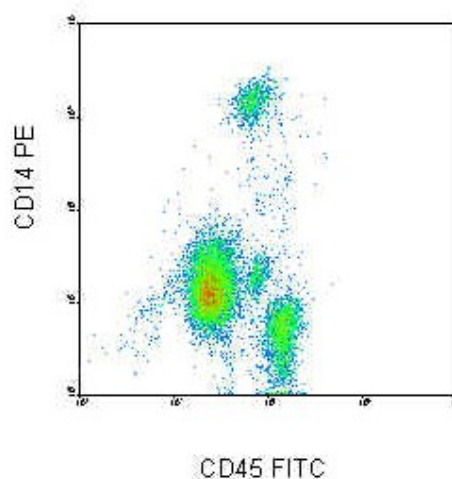
9、圖 9 的分析是圖 7 與圖 8 的延伸，圖形 45 度角向上向右都出現平均道數位移（如圖 8），或者在 45° 方向多出一條明顯的尾部（如圖 7）。析此圖原則與圖 7 或 8 相同。標誌設定正確可報告“雙色弱陽性”，通過伸向 X 軸或 Y 軸群體計算其陽性比率。但以此分析要謹慎，因為此種情況下多見的是非特異染色，應慎選抗體組合儘量避免出現此種情況。



#### 4.6. 密度圖

在二維散點圖上，每個點代表一個細胞，若兩個細胞在同一位置則相互重疊。同樣的標記表現的細胞群，在散點圖上如重覆出現在同一位置，看起來像是一小群細胞，容易誤判其分布頻率。流式用戶在遇到這類問題可考慮使用密度圖、等高線圖。假三維圖等進階圖形來顯示，以增加圖表的可讀性。

二維密度圖一般採用不同色彩來呈現不同的分布頻率（如右圖）。例圖中所用的資料，同前圖 CD45 FITC/CD14 PE 散點圖。部分用戶發表論文時喜歡用單色，運用不同明暗色階來呈現不同的分布頻率，顏色愈淡者（近乎白色），表示分布頻率愈高。

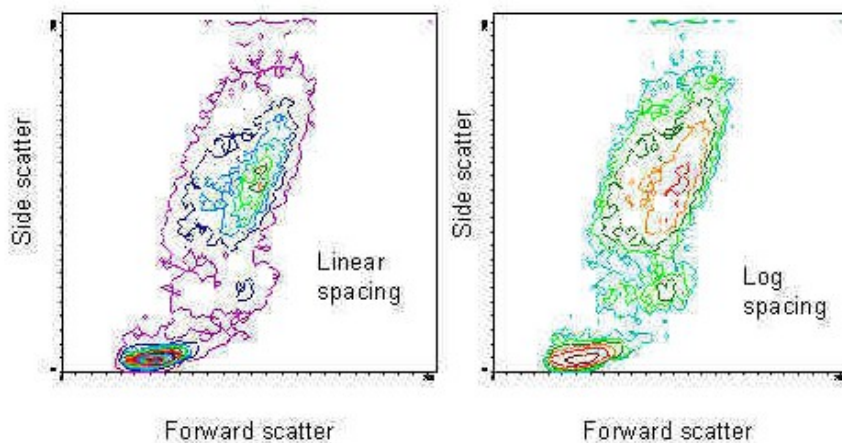


#### 4.7. 等高線圖

等高線圖是運用傳統地圖中描述小山丘的技法，以不同色彩的交疊環來連接分布頻率相同的區點，愈往裏面線上的點所代表得細胞數愈多。

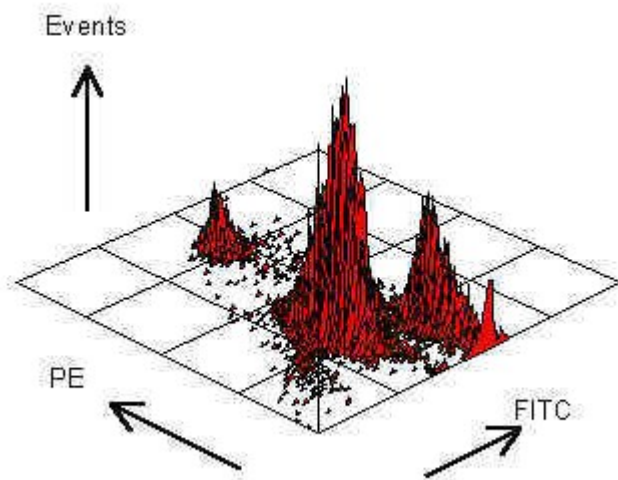
等高線圖實際上是一個二維圖，對觀察細胞元得分佈趨勢優於二維散點圖。因為等高線圖能顯示出同一位置點之出現頻率，將出現圖頻率相同的點全部連串在一起，不但能判讀出實際點數，也可以由此分辨出是否有不同族群出現。等高圖的另一特色，是用戶可依需要更改地圖上等高線的呈現方式，即更改不同色彩等高線間之頻率差異，來凸顯或隱晦細胞族群。常見之呈現方式有（繪等高線的資料同前例中之 FSC/SSC 散點圖）：

1. 零到最大的密度平均分配 (如下圖左)
2. 以對數方式分布以凸顯低密度區域 (如下圖右)
3. 用戶可自定或然率間隔來分開細胞的區域



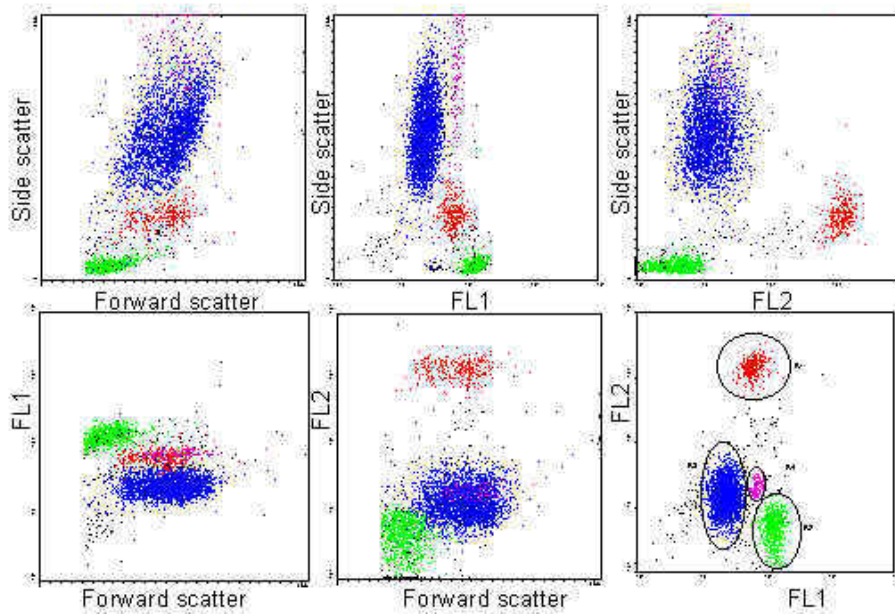
#### 4.8. 假三維圖

假三維圖的呈現來自等高線圖之具象化呈現。在 FSC、SSC、FL1(綠色螢光)、FL2(橙色螢光)、FL3(紅色螢光)中的任選兩個參數為 X、Y 軸，再以相對細胞數為 Z 軸，這樣就構成一個三維圖，由於 Z 軸為細胞數，並非測量參數，實際上仍是二維圖，故稱假三維圖。稱假三維圖的特色是用戶可自定 X-Y 平面的旋轉角度與對 Z 軸的傾斜度，來凸顯特殊的細胞族群。前例中之 CD45 FITC/CD14 PE 散點圖於逆時針轉 45 度角並加大傾角後的圖型如下圖。

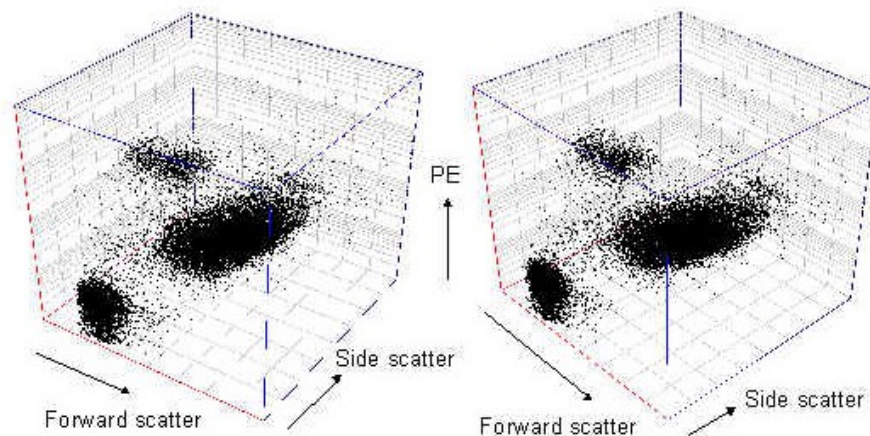


#### 4.9. 二個以上參數之呈現

呈現二個以上的參數在概念上較為困難，所以一般用流式用戶在從事三色或四色螢光分析，常會考慮以雙參數散點圖來呈現，將四色資料以四至六個散點圖來統計分析（如下圖），來考慮任何有意義的組合。



本公司亦有進階程式，如 WinList 與 Isometric，可在 FSC、SSC、FL1、FL2、FL3 中的任意選三個參數為 X、Y、Z 軸，構成一個三維圖。在三維空間中，每一群細胞各處於獨立的空間位置。三維圖對複雜的細胞亞群分析更為客觀、清晰，但對其資料的統計分析較難。例圖中，同時呈現 FSC、SSC、與 PE (FL2)。類似這樣的圖形亦可旋轉視角，或以不同色階來強化呈現效果。



**參考文獻：**

1. 摘自 Clinical Application of Flow Cytometry :Immunophenotyping of Leukemic Cells ;  
Approved Guideline , NCCLS Vol 18 No. 8 1998 June 9, 37-45.