

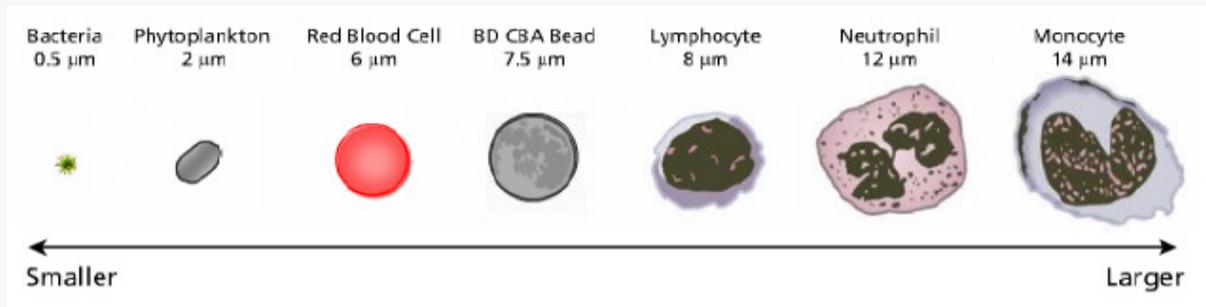
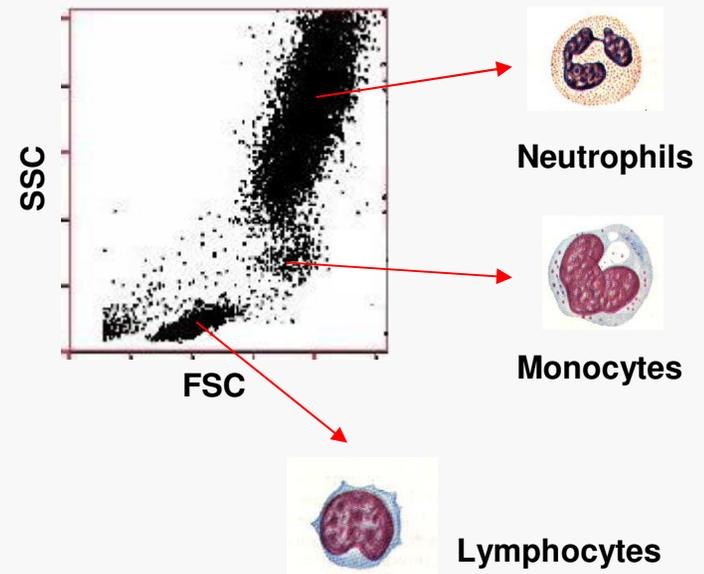
流式細胞核心設施

流式細胞儀

地點：醫學院基礎醫學大樓R1434

流式細胞分選儀

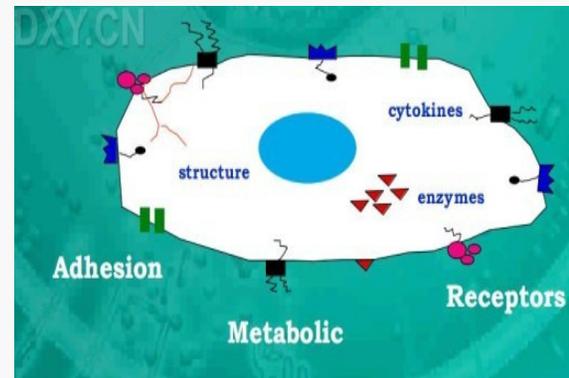
地點：醫學院基礎醫學大樓R1436



簡介

流式細胞核心實驗室為一個提供流式細胞儀相關分析與細胞分選服務之核心單位。本核心亦提供流式細胞儀相關應用知識與教育訓練課程，以期讓研究者能擁有更完善的研究環境。

本核心實驗室目前配備有三台 FACSCalibur 流式細胞儀與一台 FACSAria 高速流式細胞分選儀供研究人員使用。



I. FACSCalibur 流式細胞儀



管理人員	李學良技士、王靜嫻
地點	基礎醫學大樓1434室

流式細胞儀的功能與特色:

- (1) 可以單一細胞，細胞胞器或其他懸浮性物體為基礎來進行分析
- (2) 可在每秒鐘內對上千個細胞進行高速檢測
- (3) 毋需進行細胞分離的步驟即可篩選出目標細胞進行分析
- (4) 可同時進行多種參數的分析，譬如配合各種抗體與染劑的使用來標定細胞，並以雷射進行激發後來辨識與分析標定有特殊螢光的細胞族群

流式細胞儀可以告訴我們關於細胞的參數有:

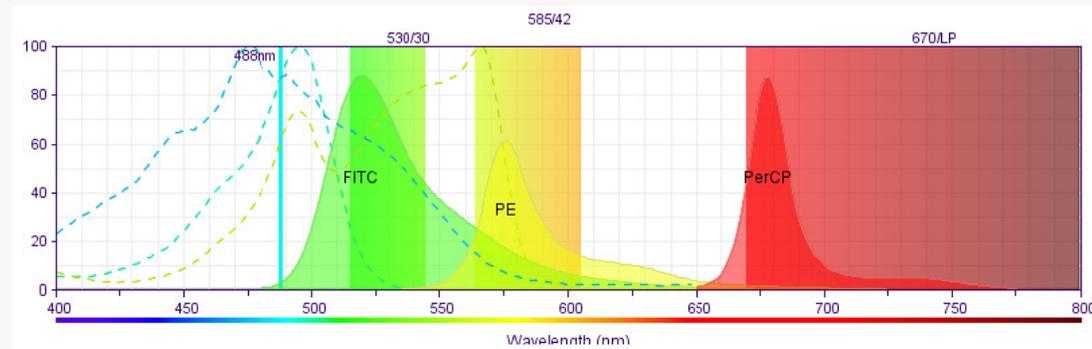
- (1) 細胞的相對大小 (Forward Scatter—FSC)
- (2) 細胞內部的相對顆粒密度或複雜度 (Side Scatter—SSC)
- (3) 細胞帶有的螢光種類與相對亮度

並藉此區別細胞族群進行分析。

FACSCalibur 流式細胞儀的裝置配備

目前本核心實驗室共有三台FACSCalibur，各配有兩支雷射 (488nm Laser及635nm Laser)，與4支偵測器 (FL1~4)，可同時偵測四種螢光物質。各偵測器所偵測的螢光種類與常用的螢光染劑種類列舉如下表：

Laser	Detector(nm)	Detector	Filter	Color	Fluorochrome
488		FL1	530/30nm	Green	FITC
		FL2	585/42nm	Yellow/Orange	PE
		FL3	670nm LP	Dark Red	PerCP,PerCP-Cy5.5
635		FL4	661/16nm	Red	APC



流式細胞儀的申請使用資格：

欲使用本儀器者，必須參加過操作訓練課程，具備該儀器操作知識及能力，並經第一共研認證通過方可使用。

預約方式：

使用本儀器者須於使用日前之二週內向第一共研管理人員登記預約（例：1月1日可預約至1月15日），請勿提前預約。同一實驗室一日內限預約一次，每次至多二小時為限。

收費標準：

150元/小時。上機時間未滿一小時以一小時計算。

開放時間：

日間: 8:00~17:00

夜間(僅供已經認證者以刷卡進出): 16:30~22:30

分析軟體：

- (1) CellQuest Pro
- (2) ModFit LT-進行細胞週期分析的軟體

II. FACS Aria IIIu 流式細胞分選儀



操作員	王靜嫻
E-mail	sorter01@ntu.edu.tw
電話	(02) 2312-3456分機88356
地點	基礎醫學大樓1436室
指導老師	伍安怡、李建國教授

流式細胞分選儀功能與特色：

- (1) 高速細胞分選儀是一種以流式細胞儀的功能為基礎，再結合了細胞分選功能而成的高階儀器。
- (2) 高速細胞分選儀利用細胞被不同螢光物質標定的差異，可同時且快速地分選出標定有特定螢光的細胞族群，協助研究人員取得特定族群的細胞以進行更進一步的分析。
- (3) 細胞分選時的速度最高可達每秒 70,000 顆細胞，但為了得到最佳的分選結果，我們通常設定分選速度為每秒 3,000 –10,000 顆細胞。
- (4) 每次最多可同時分選出四種細胞族群。
- (5) 細胞上樣區與收集區的溫度可視需要控制於 4~42°C 間。

FACSAria IIIu 流式細胞分選儀的裝置配備

目前本儀器配有三支雷射 (488nm、561nm 與 633nm Laser) 與 8支偵測器可收取八種不同的螢光訊號。每次可同時分選四種不同特性的細胞族群。搭配Windows作業系統，操作軟體為FACSDiva。各偵測器所偵測的螢光種類與常用的螢光染劑種類列舉如下表：

Laser Detector(nm)	Dichroic mirror	Bandpass Filter	Fluorochrome	
488nm	A	655LP	695/40	PerCP,PerCP-Cy5.5
	B	502LP	530/30	FITC,GFP
	C	-	488/10	SSC
561nm	A	735LP	780/60	PE-Cy7
	B	630LP	670/14	PE-Cy TM 5
	C	600Lp	610/20	mCherry, PE-Texas Red, PI
	D	-	582/15	PE(yellow-green), DsRed
633nm	A	735LP	780/60	APC-H7,APC-Cy7
	B	-	660/20	APC

服務項目：

- 本核心之流式細胞分選儀由專業操作員進行操作與服務，不開放予使用者自行操作。

- 服務內容以無菌分選為主，目前提供分選的細胞種類如下：

Human and murine primary cells

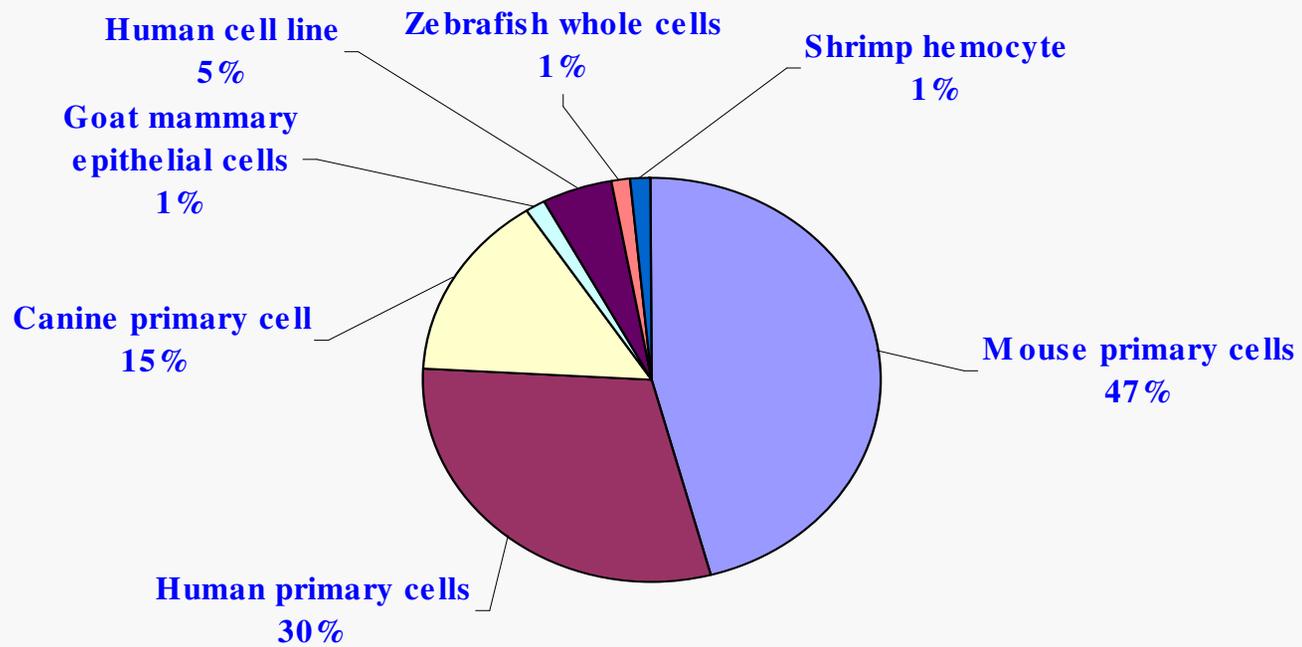
Tissue culture cell lines

Single-cell suspension from tumors

Cells from other animals

- 為避免污染細胞，本核心不接受細菌、酵母菌的分選。

本核心分選過的細胞種類



收費方式及罰則：

1. 計費方式：750 元 / 2小時，每次預約一個時段為兩小時。
2. 預約時間：
 - (1) 每周一早上 9：30 開始開放預約下一周的時段，預約開放的期限為1周。
 - (2) 預約排定時間後，因故未能使用者請於前一天取消預約，否則仍將收開機費750元。
 - (3) 一個月內取消預約次數不能超過2次，第3次開始就要收750元。
3. 上機時，若因樣品製備的問題而導致無法進行分選，仍將收取開機費750元。
4. 沒附上預約申請表者，一律在前一天取消預約資格。
5. 收費由預約時間起算，請謹慎預估時間，避免遲到。

常見問題及應注意事項：

1. 細胞上機分選的流程包含三個步驟：設定分選區域、分選及分選後的分析。
一般而言，其所花費的時間如下：
 - (1) 設定分選區域約需 15-20 分鐘。
 - (2) 分選的時間取決於細胞數目及細胞種類，雖然機器的分選速度最高可達 70,000 細胞/sec，但為得到最佳分選結果，我們通常設定分選速度為 3,000 – 10,000 細胞/sec。因此，如欲分選 1×10^7 細胞，其所需分選時間約為 30-100 分鐘。
 - (3) 分選後約需 10 分鐘去分析、列印及存檔結果。
因此，分選 1×10^7 顆細胞約需 1-2 小時。
2. 如果欲分選的細胞佔細胞總數的 1% 以下，雖然仍可進行分選，但常導致低純度及低回收率，故建議使用者盡量先 enrich 欲分選的細胞。

3. 上樣區請使用 5 mL Falcon tube (BD #352003)，收集細胞時可使用 15 ml 離心管 (單或雙向分選時使用)或5 mL Falcon tube (四向分選使用)。
4. 細胞染色後請先用 nylon mesh 過濾後再上機以避免塞機。若同時有很多管樣品要進行分選，請於前一管樣品分選快結束前，再以 nylon mesh 過濾下一管樣品，以避免細胞凝聚成團造成塞機影響分選。
5. Sorting Buffer 配方:
 - 1 × Phosphate Buffer Saline
 - 1 mM EDTA
 - 25 mM HEPES, 調整至pH 7.0
 - 1 % Fetal Bovine Serum (Heat-inactivated)
 - sterile filtered with 0.2 mm filter, store at 4°C
6. 細胞的濃度:

Lymphocytes, thymocytes or splenocytes (直徑8-12 μ m)	2×10^7 /ml
Activated lymphocytes, small cell lines (直徑12-20 μ m)	$1-2 \times 10^7$ /ml
Large adherent cell line (直徑 > 20 μ m)	1×10^7 /ml