

流式細胞分析暨分選核心

流式細胞分析儀：基礎醫學大樓 R1434

流式細胞分選儀：基礎醫學大樓 R1436

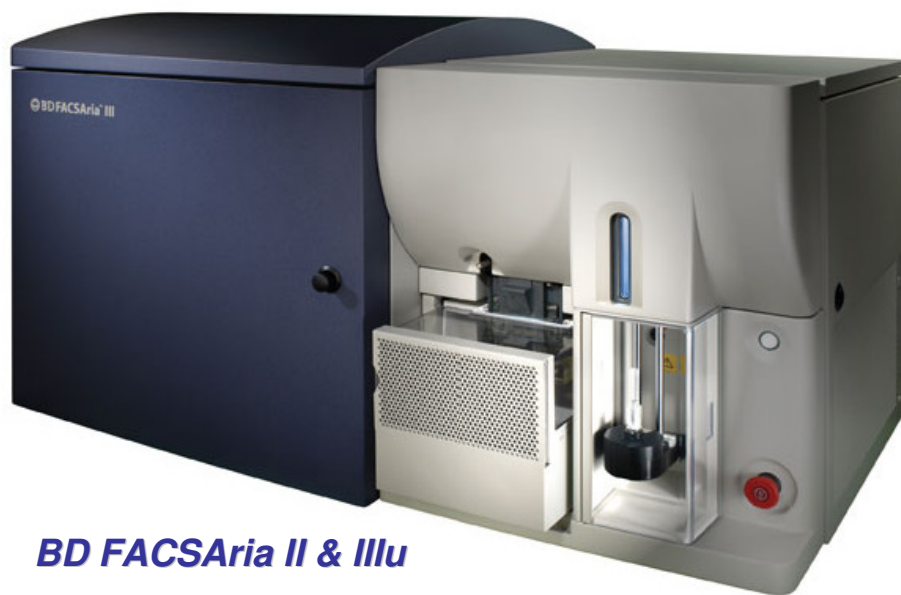
管 理 人 員：王靜嫻副技師 / 黃志成博士

辦 公 室 位 置：基礎醫學大樓 R1436

分機：23123456 ext. 88356



BD LSRFortessa



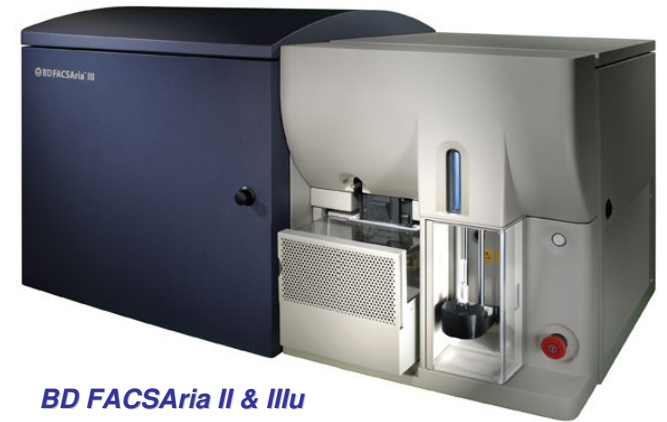
BD FACSAria II & III



BD FACSCalibur

第一部分：本核心現有儀器介紹

本核心目前配備有六台流式細胞儀，其各自配備之激發光雷射與集光濾鏡組合表詳列於表1-4，欲使用本核心儀器者，請務必前往台大醫學院研發分處第一共研網頁下載參考。



BD FACSAria II & III

兩台流式細胞分選儀

BD FACSAria III

4-laser, 13 colour cells sorting cytometer, Interchangeable emission filter set-up

BD FACSAria II (101年10月15日正式上線服務)

3-laser, 9 colour cells sorting cytometer, Interchangeable emission filter set-up

一台高階多色流式細胞分析儀

BD LSRFortessa (102年1月7日正式上線服務 2月1日加裝561nm雷射)

4-laser, 18 colour analyzer, Interchangeable emission filter set-up



BD LSRFortessa

三台低階流式細胞分析儀

BD FACSCalibur

2-laser, 4 colour analyzer,
Fixed emission filter set-up



BD FACSCalibur

表1. BD FACS Aria II 流式細胞分選儀激發光雷射與集光濾鏡組合表

Excitation Laser (nm)	Dichroic mirror	Longpass Filter (nm)	Bandpass Filter (nm)	Fluorophores
488	A	735 LP	780/60	PE-Cy7 (61.8/60.5), Qdot® 800, PE-Alexa Fluor® 750 (787/42)*
	B	655 LP	695/40	PerCP (87.4/63.3), PerCP-Cy5.5 (98.4/68.1), PE-Cy5.5 (76.9/38.5), Qdot705, PE-Alexa Fluor 700
	C	610 LP	616/23	PE-Texas Red (94.6/35), PE-Alexa Fluor® 610
	D	556 LP	585/42	DsRed (40/59.7), PE (61.6/70.4)
	E	502 LP	530/30	Alexa Fluor 488, FITC, GFP, Fluo-3 or Fluo-4, Qdot525, Calcein, TO-PRO®-1, YO-PRO®-1, CFSE, Rhodamine123...
	F	-	488/10	SSC
633	A	735 LP	780/60	APC-Cy7, APC-H7, Qdot800, Alexa Fluor® 750
	B	-	660/20	APC, Alexa Fluor® 647, Qdot655
375 (NUV)	A	670LP	610LP	Hoechst Red, PI
	B	-	450/40	Hoechst Blue33258 (57.9/38.3), DAPI (79.8/36.9)
	-	502LP	530/30	未使用
	-	-	450/20	未使用

** PerCP (87.4/63.3): 螢光染劑名稱 (雷射激發效率% / 集光濾鏡收集到之發射光含量%)

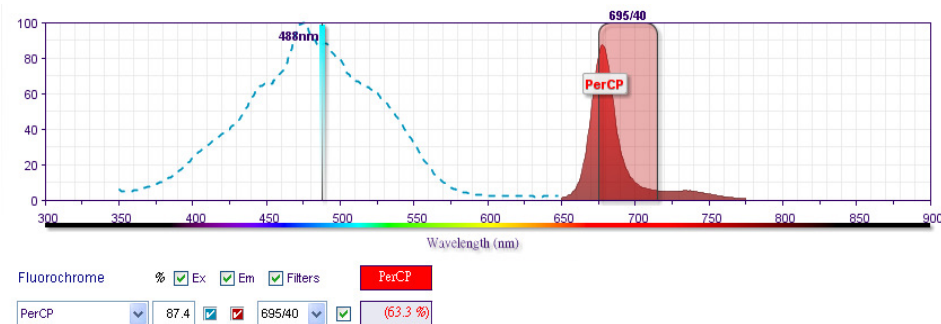


表2. BD FACS Aria IIIu 流式細胞分選儀激發光雷射與集光濾鏡組合表

Excitation Laser (nm)	Dichroic mirror	Longpass Filter (nm)	Bandpass Filter (nm)	Fluorophores
488	A	655 LP	695/40	PerCP (87.4/63.3), PerCP-Cy5.5 (98.4/68.1), PE-Cy5.5 (76.9/38.5), PE-Cy5 (53.7/30.7) Qdot705, PE-Alexa Fluor 700
	B	502 LP	530/30	Alexa Fluor 488, FITC, GFP, Fluo-3 or Fluo-4, Qdot525
	C	-	488/10	SSC
561	A	735 LP	780/60	PE-Cy7 (94.9/60.5)
	B	630 LP	670/14	PE-Cy5 (91.9/29.2),
	C	600 LP	610/20	PE-Texas Red (94.6/30), DsRed (85.8/20.1) mCherry,
	D	-	582/15	dTomato, PE (94.3/~30) DsRed (85.8/22.3),
633	A	735 LP	780/60	APC-Cy7, APC-H7, Qdot800, Alexa Fluor® 750
	B	-	660/20	APC, Alexa Fluor® 647, Qdot655, MitoProbe™ DiIC1(5), CellTrace™ Far Red DDAO-SE, SYTOX® Red
405	A	630 LP	660/20	Brilliant Violet650, Qdot 655
	B	600 LP	610/20	Brilliant Violet605, Qdot 605
	C	556 LP	585/42	Brilliant Violet570, Qdot565
	D	502 LP	510/50	Brilliant Violet510, AmCyan, Horizon V500,
	E	-	450/40	Pacific Blue, Brilliant Violet421, DAPI, Alexa Fluor® 405

** 加註刪除線者表示儀器組態中可能有2個或2個以上的位置可以收集到該螢光訊號，加註刪除線的位置非最佳位置，不建議以該位置收集其螢光訊號。

表3. BD LSRFortessa 流式細胞分析儀激發光雷射與集光濾鏡組合表

Excitation Laser (nm)	Dichroic mirror	Longpass Filter (nm)	Bandpass Filter (nm)	Fluorophores and other useful dyes
488	A	750LP	780/60	PE-Cy7 (61.8/60.5), Qdot® 800, PE-Alexa Fluor® 750
	B	685LP	695/40	PerCP (87.4/63.3), PerCP-Cy5.5 (98.4/68.1), PE-Cy5.5 (76.9/38.5), PE-Cy5 (53.7/30.7), Qdot705, PE-Alexa Fluor 700
	C	600LP	610/20	PE (61.6/12.6), PE-Texas Red (55.4/30), DsRed (40/20.1)
	E	505LP	530/30	Alexa Fluor 488, FITC, GFP, Fluo-3 or Fluo-4, Qdot525, Calcein, TO-PRO®-1, YO-PRO®-1, CFSE, Rhodamine123...
	F	-	488/10	SSC
640	A	750LP	780/60	APC-Cy7, APC-H7, Qdot800, Alexa Fluor® 750
	B	710LP	730/45	Alexa Fluor 700
	D	-	670/14	APC, Alexa Fluor® 647, Qdot655, MitoProbe™ DiIC1(5), CellTrace™ Far Red DDAO-SE, SYTOX® Red
405	A	685LP	710/50	Brilliant Violet711
	B	630LP	655/8	Brilliant Violet650, Qdot 655
	C	595LP	605/12	Brilliant Violet605, Qdot 605
	D	545LP	560/20	Brilliant Violet570, Qdot565
	E	475LP	525/50	Brilliant Violet510, AmCyan, Horizon V500, Qdot525, Indo-1 (low Ca2+), SYTOX® Blue,
	F	-	450/50	Pacific Blue, Brilliant Violet421, DAPI, Horizon V450, Marina Blue, Alexa Fluor 405, DyeCycle™ Violet, Calcein Violet
561	A	750LP	780/60	PE-Cy7 (94.9/60.5)
	B	685LP	710/50	PE-Cy5.5 (97.9/38.1), PerCP-Cy5.5(20.3/69.4)
	C	635LP	670/30	PE-Cy5 (91.9/55.2), 7-AAD (93.8/25.1), PerCP(17.7/67.4)
	D	600LP	610/20	PE-Texas Red (94.6/30), mCherry, DsRed (85.8/20.1), PE (94.3/12.6)
	E		582/15	dTomato, PE (94.3/~30) DsRed (85.8/22.3),

表4. BD FACSCalibur 流式細胞分析儀激發光雷射與集光濾鏡組合表

Excitation Laser (nm)	Fluorescence Channel	Bandpass Filter (nm)	Color	Fluorophores	other useful dyes
488	FL1	530/30	Green	Alexa Fluor 488, FITC, GFP, Qdot525	Fluo-3 or Fluo-4, Calcein, CFSE, GFP, Rhodamine123, TO-PRO®-1, YO-PRO®-1, Click-i EdU Alexa Fluor 488, JC-1 or DiOC2(3), SYTOX® Green, DyeCycle™ Green LIVE/DEAD® Fixable Green Dead Cell Stain
	FL2	585/42	Yellow/ Orange	PE Alexa Fluor 546, Qdot565, Qdot585	PI, Fura Red, DyeCycle™ Orange, JC-1 or DiOC2(3), SNARF® (low pH), pHrodo™ dye
	FL3	670LP	Dark Red	PE-Cy5.5, PE-Cy7 PerCP, PerCP-Cy5.5, PE-Alexa Fluor 700, Qdot705, Qdot800	PI, 7-AAD, SNARF® (high pH), JC-1 or DiOC2(3), LIVE/DEAD® Fixable Red Dead Cell Stain
635	FL4	661/16	Red	APC, Alexa Fluor 647, Qdot655	Click-i EdU Alexa Fluor 647, LIVE/DEAD® Fixable Far Red Dead Cell Stain, TO-PRO®-3, SYTOX® Red, MitoProbe™ DiIC1(5), CellTrace Far Red DDAO-SE

** 若需要，本表所列出的螢光試劑當然亦可適用於其他具有類似激發光雷射/集光濾鏡組態的流式細胞儀

各儀器可供選擇的雷射與集光濾鏡種類並不相同，使用者應先確認儀器的配備後再選用螢光染劑為佳

第二部分：本核心新購儀器介紹

高階多色流式細胞分析儀 **BD LSRFortessa**

本核心所購置之 **LSRFortessa** 為台大總區暨醫學院區所擁有的第一台高階多色流式細胞分析儀。本儀器具有五個激發光雷射 (excitation laser) 裝設位置，讓購買者可以視整體實驗的需求選配或訂製適用的客製化雷射，在搭配合適的光學濾鏡組合下，最多可同時分析達18種螢光參數。

由於本儀器的濾鏡採用可抽換式設計，若必要，使用者亦可視個人所使用之螢光染劑的發射光光譜範圍 (emission spectrum) 訂製與使用特殊的客製化濾鏡模組，以增加擷取到的螢光訊號或降低色差補償調整的需求，讓實驗數據的擷取更為簡易與可信。

綜合來說，由於本儀器在進行分析時，可同時啟動多種雷射激發光源，搭配上多樣化的濾鏡組合，讓使用者有更大的彈性選擇合適的螢光染劑組合，有效減少螢光染劑間的干擾。

目前本核心所購置之儀器裝有 **405**、**488**、**561**與**640nm** 四支激發光雷射，其各自搭配的集光濾鏡組合與相對應適用之螢光染劑種類請參閱第一部分本核心現有儀器介紹之表3與下頁圖1，或前往台大醫學院研發分處第一共研網頁下載。



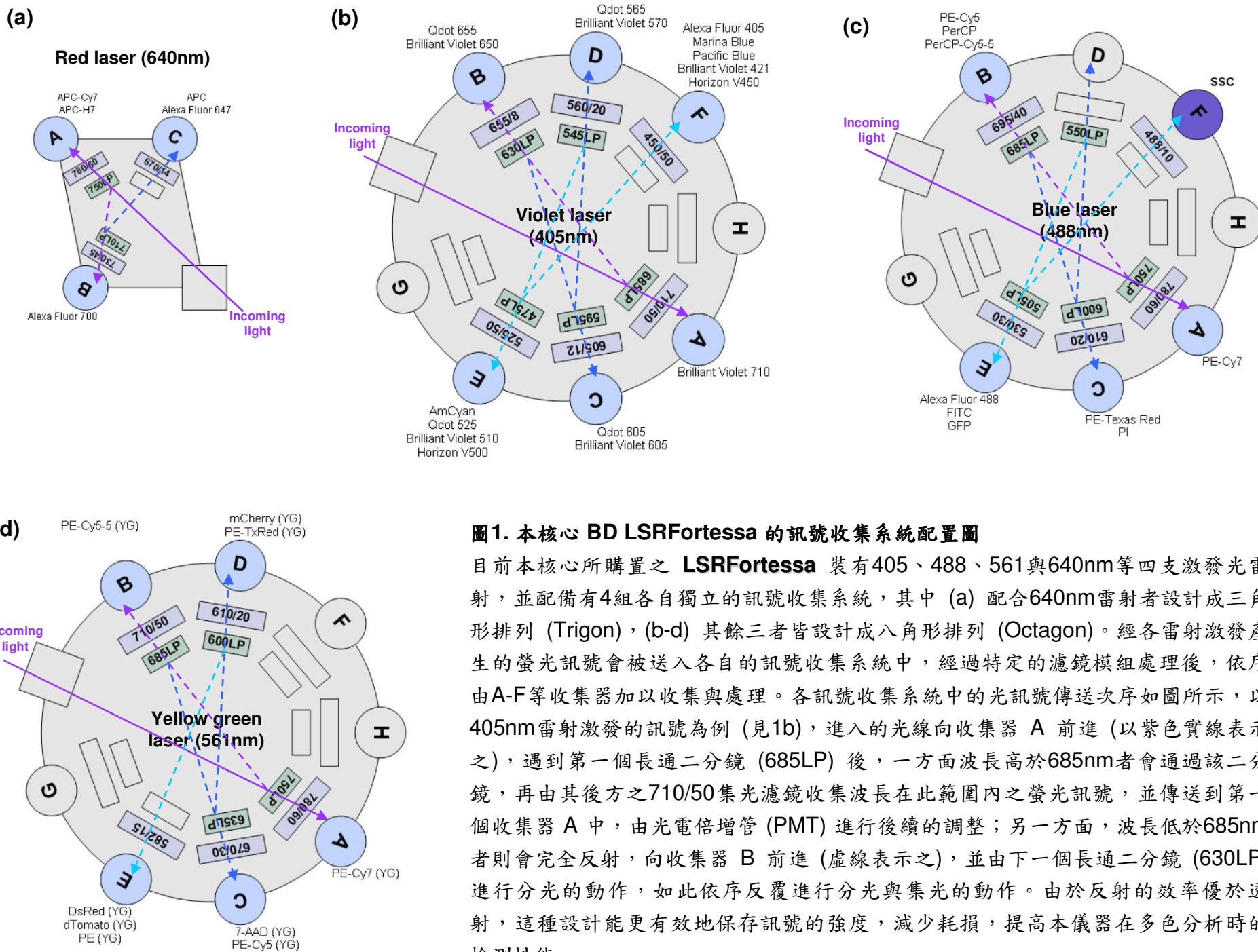


圖1. 本核心 BD LSRFortessa 的訊號收集系統配置圖

目前本核心所購置之 **LSRFortessa** 裝有405、488、561與640nm等四支激發光雷射，並配備有4組各自獨立的訊號收集系統，其中 (a) 配合640nm雷射者設計成三角形排列 (Trigon)，(b-d) 其餘三者皆設計成八角形排列 (Octagon)。經各雷射激發產生的螢光訊號會被送入各自的訊號收集系統中，經過特定的濾鏡模組處理後，依序由A-F等收集器加以收集與處理。各訊號收集系統中的光訊號傳送次序如圖所示，以405nm雷射激發的訊號為例 (見1b)，進入的光線向收集器 A 前進 (以紫色實線表示之)，遇到第一個長通二分鏡 (685LP) 後，一方面波長高於685nm者會通過該二分鏡，再由其後方之710/50集光濾鏡收集波長在此範圍內之螢光訊號，並傳送到第一個收集器 A 中，由光電倍增管 (PMT) 進行後續的調整；另一方面，波長低於685nm者則會完全反射，向收集器 B 前進 (虛線表示之)，並由下一個長通二分鏡 (630LP) 進行分光的動作，如此依序反覆進行分光與集光的動作。由於反射的效率優於透射，這種設計能更有效地保存訊號的強度，減少耗損，提高本儀器在多色分析時的檢測性能。

由於不少螢光染劑的激發光和/或放射光 (excitation and/or emission) 光譜範圍極廣，故在進行激發與收集螢光訊號時需小心選擇激發光雷射之種類及相對應之訊號收集器的位置，以期能夠收集到最強的螢光訊號，並將螢光訊號間的干擾降到最少。本核心所購置之 **LSRFortessa** 由於同時配備有 **488nm** 與 **561nm** 兩支雷射，故能夠 (1) 有效提高某些螢光染劑的激發強度，(2) 更簡單地降低僅能以單一 **488nm** 雷射來激發螢光染劑時，螢光訊號間所產生的干擾與色差補償 (compensation) 調整等問題，讓儀器的參數調整更為容易。圖2及圖3以本核心之 **FACSCalibur** 與 **LSRFortessa** 兩種分析儀，以及常見的FITC或EGFP與PE的並用為例做進一步說明。

此外，有許多常見的螢光染劑或螢光蛋白必須以 **561nm** 雷射來激發才能獲取足夠的訊號來進行後續的分析 (如圖4)，本核心購置之高階流式細胞儀 **LSRFortessa** 亦能充分滿足此需求。

相關基礎原理說明請參考第三部分流式細胞儀基本運作原理介紹

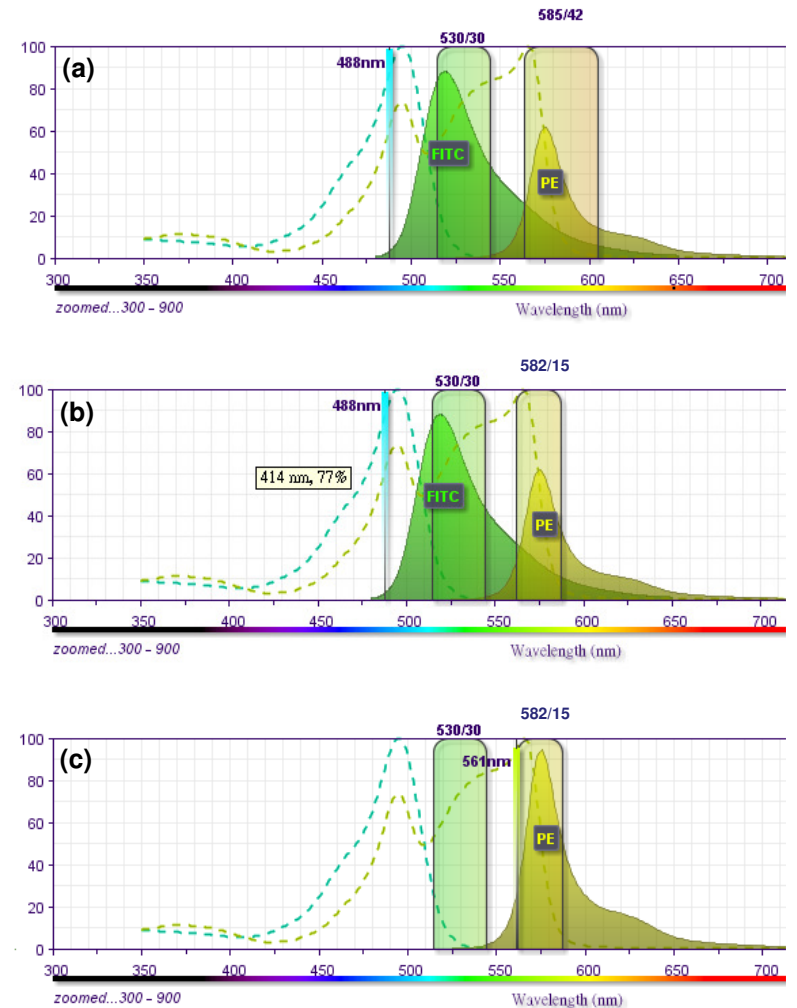


圖2. FITC與PE的激發光光譜範圍 (分別以藍色與黃綠色虛線表示) 與放射光光譜範圍 (分別以綠色與黃綠色區域表示)。本核心 **FACSCalibur** 僅配備有 **488nm** 但無 **561nm** 雷射，且分別以 **530/30nm** 與 **585/42nm** 兩組集光濾鏡 (即FL1與FL2) 來收集FITC與PE的螢光訊號 (圖2a)。至於 **LSRFortessa** 則配備有 **488nm** 與 **561nm** 雷射，並分別以 **530/30nm** 與 **582/15nm** 兩組集光濾鏡來收集FITC與PE的螢光訊號 (圖2b與c)。如圖2a所示，若單以 **488nm** 雷射來激發FITC與PE時，主要用以收集FITC螢光訊號的 **530/30nm** 集光濾鏡僅會收集到微量來自PE的干擾，但主要用以收集PE螢光訊號的 **585/42nm** 集光濾鏡則會收集到大量來自FITC的干擾訊號，故需小心進行色差補償的調整。但若我們能夠以 **561nm** 雷射來激發PE，一方面PE受激發後放射出來的發射光訊號會比以 **488nm** 雷射激發時更強 (比較圖2b與c)，另一方面由於FITC並無法被 **561nm** 雷射激發，故並無FITC的干擾訊號會被 **582/15nm** 集光濾鏡所收集 (若換成 **585/42nm** 濾鏡亦然)，因此無進行色差調整的需要 (圖2c)。

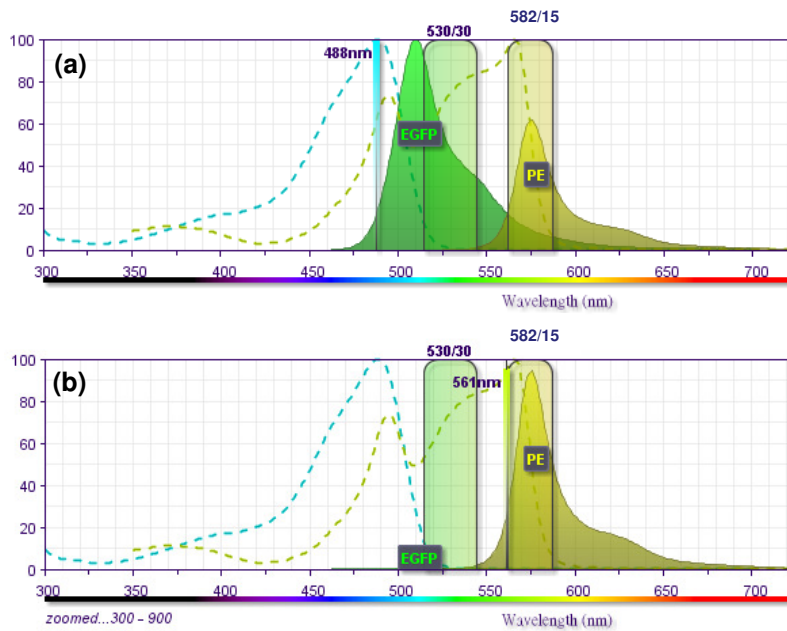


圖3. EGFP與PE的激發光光譜範圍 (分別以藍色與黃綠色虛線表示) 與放射光光譜範圍 (分別以綠色與黃綠色區域表示)。與圖2做比較，我們可以發現EGFP與FITC的激發光與放射光範圍其實相當類似，若單以 **488nm** 雷射來激發EGFP與PE時，主要用以收集PE螢光訊號的 **582/15nm** 集光濾鏡同樣會收集到大量來自EGFP的干擾，故需小心進行色差補償的調整 (圖3a)。但若以 **561nm** 雷射來激發PE，由於EGFP並無法被 **561nm** 雷射激發，故並無EGFP的干擾訊號會被 **582/15nm** 集光濾鏡所收集，因此無進行色差調整的需要 (圖3b)。

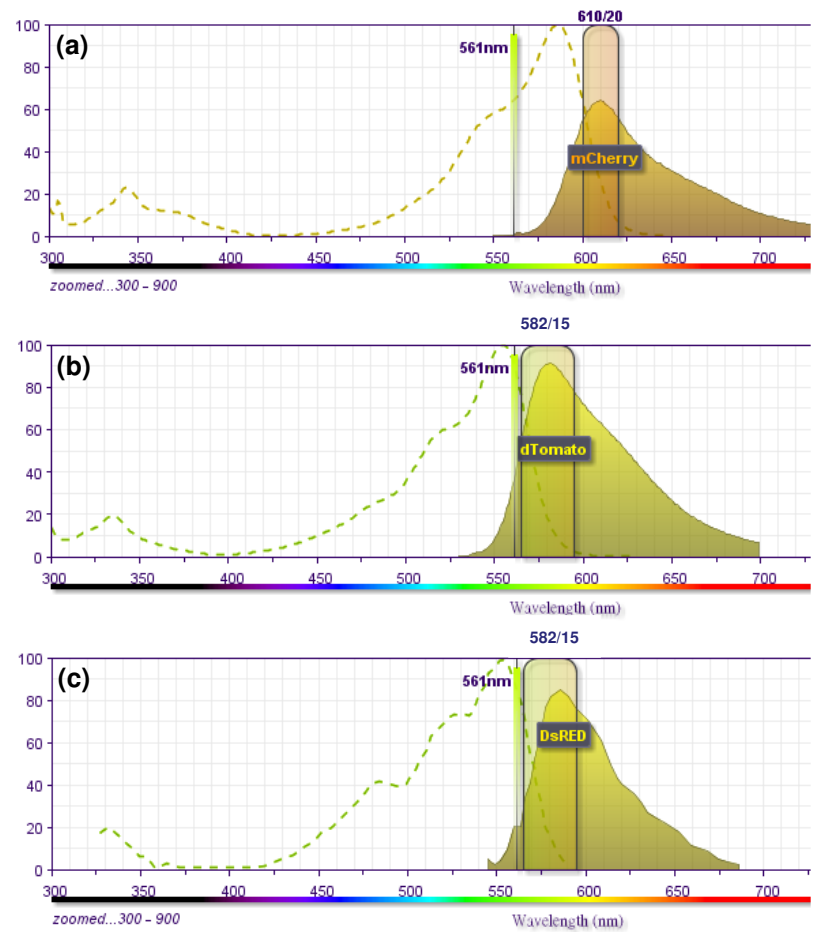
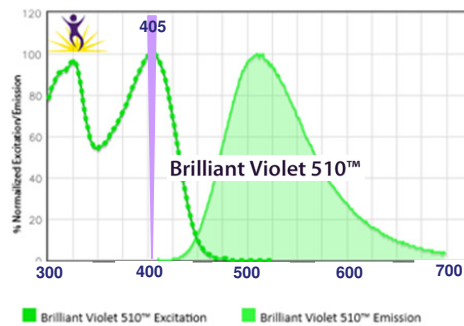


圖4. (a) mCherry (b) dTomato 以及 (c) DsRED 的激發光光譜範圍 (分別以橘紅色、黃綠色與黃綠色虛線表示) 與放射光光譜範圍 (分別以橘紅色、黃綠色與黃綠色區域表示)。雖然 dTomato 與 DsRED 亦能被 **488nm** 雷射激發，但就實際操作的經驗來說，其訊號仍屬偏弱，常造成分析上的困難。故此三種螢光蛋白最好能以 **561nm** 雷射進行激發，方能獲取最佳的訊號。



較須注意的是，由於EGFP亦會被**405nm**雷射所激發，故若有螢光分子是以**405nm**雷射激發，並以收集EGFP發射光光譜範圍內的集光濾鏡來收集訊號時，就須小心來自EGFP的干擾，並需進行色差補償的調整，譬如 BV510 (左圖)。

如有儀器或螢光染劑使用等相關問題，歡迎來電或至本核心一起討論

第三部分：流式細胞儀基本運作原理介紹

流式細胞分析儀 (analyzer) 基本上是由液流系統、光學系統與電子系統等三大系統所組合而成的分析儀器；流式細胞分選儀 (sorter) 則是除了前述三項系統外，再加裝細胞分選相關組件，讓儀器可以進行細胞分選與收集的工作。

待測細胞或檢體以進樣針吸入管路，經過液流系統的傳送進入細胞室 (Flow cell)，並在此處通過光學系統中的雷射照射區，細胞與標定於其上的螢光分子經過雷射光激發後產生相對應的訊號，這些訊號經過一連串的透鏡與濾鏡模組篩選後再通過光電倍增管 (PMT) 將光學訊號轉換成電子訊號並加以處理與放大，然後送入電腦，於螢幕上呈現出相對應之圖形以利使用者做後續的調整、分析或細胞分選。

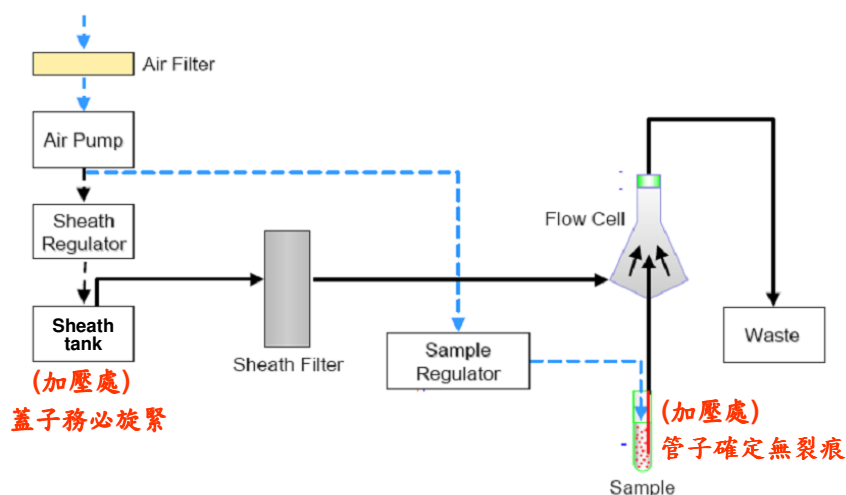


圖1. BD FACSCalibur 分析儀的液流系統配置圖。

流式細胞儀的液流系統是經由空氣幫浦的加壓來進行驅動的。以BD FACSCalibur的系統為例，空氣幫浦分別對鞘液桶 (黑色虛線) 及上樣區的樣品管 (藍色虛線) 進行加壓，將鞘液 (sheath, 即PBS等張溶液) 及樣品液 (sample) 送進輸送管路，並於細胞室匯合，樣品液會依流體聚焦的原理在鞘液中形成細胞液柱，依序通過雷射照射區 (如圖2)，分析後的樣品即直接流入廢液桶。

** 操作注意事項：整個液流系統需完全封閉才能順利加壓，慎防漏氣

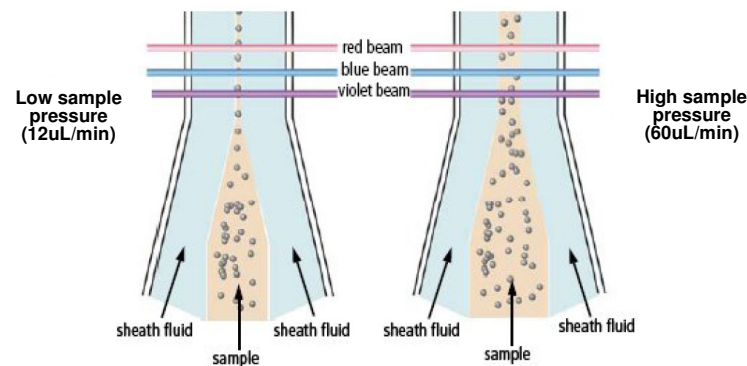


圖2. 流動室中樣品流在鞘液中產生之流體聚焦現象。

流入流動室中央的樣品液在被鞘液環繞的狀況下會依流體聚焦 (hydrodynamic focusing) 的原理形成細胞液柱，並始終保持著分層鞘流的狀態。由於樣品液的壓力總是高於鞘液的壓力，故可透過改變樣品壓力來控制樣品流速。低流速 (左圖) 適用於解析度要求較高或數值差異少的定量分析 (如DNA分析)，因此時樣品流較窄，可讓單一細胞依次通過雷射光束並得到較精確的數值 (CV值較佳)。高流速 (右圖) 較適用於定性分析，此時液柱變寬，雖單位時間內通過的細胞數增加，可縮短分析時間，但受測細胞容易偏離水路中軸或左右晃動讓增加測量值變異度 (CV值較差)。

** 操作注意事項：慎選流速控制項，欲分析DNA含量者務必選低流速

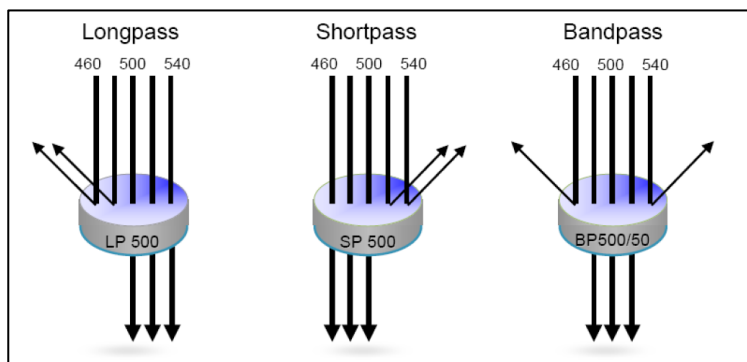


圖3. 流式細胞儀中常用的光學濾鏡基本上分為三種。

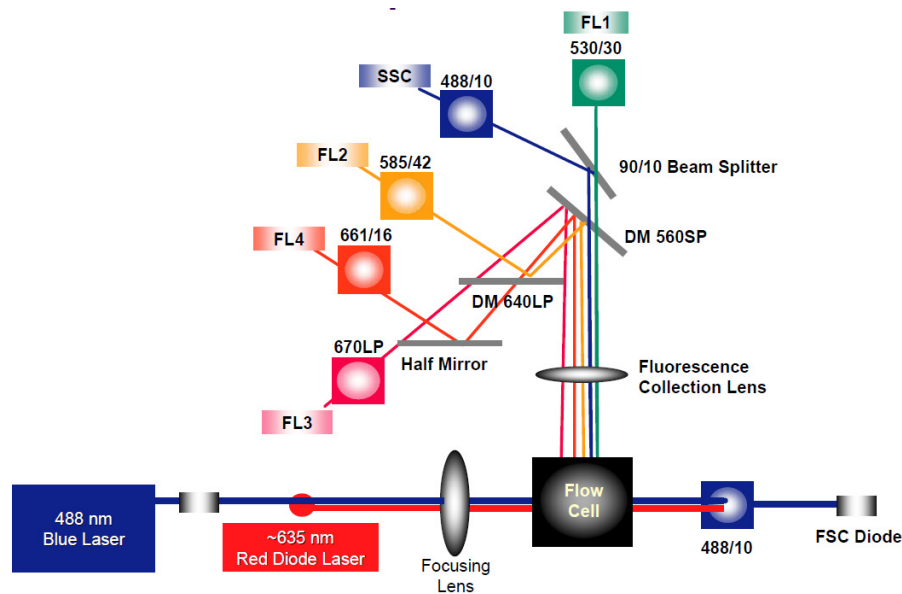
(1) **長波通 (Longpass)**：可讓高於特定波長的光穿透過去；(2) **短波通 (Shortpass)**：可讓低於特定波長的光穿透過去；(3) **帶通 (Bandpass)**：可讓特定波長範圍內的光穿透過去，其餘波長的光則被阻斷。譬如 **LP500** 表示可讓波長超過 500nm 的光穿透過去；**SP500** 表示可讓波長低於 500nm 的光穿透過去；**BP500/50** (或簡單以 **500/50** 表示) 表示可讓波長介於 475~525nm 間的光穿透過去。此外，尚有其他類型的濾鏡，譬如 (4) **長波通 (或短波通) 二分鏡 (Dichromic mirror)**：可允許某一波長以上 (或以下) 的光線通過而將此波長以下 (或以上) 的光線反射。譬如 **DM640LP** 表示可讓波長超過 640nm 的光穿透過去，但將低於 640nm 的光反射回去。(5) **中性濾片** 則無頻率特性，各波長的光線會均勻衰減，常用於光線過強需均勻衰減的地方。濾鏡的使用實例可參考圖4。

圖4. BD FACSCalibur 的光學系統配置圖。

流式細胞儀的光學系統主要用來產生與收集螢光及散射光訊號。以 BD FACSCalibur 的系統為例，波長為 488nm 和/或 635nm 之雷射激發光精確且穩定地通過光束形成稜鏡後，在細胞室與細胞液柱呈垂直方向交會並激發出訊號。直行的前向散射光由FSC發光二極體接收 (並參考圖6)，側向散射光與螢光訊號則呈90度角方向傳送，依序通過各種短波通或長波通二分鏡後，再由帶通濾鏡收集特定波長的光線，送入光電倍增管做後續處理。

流式細胞儀的光學系統包含了各種雷射光源、透鏡與濾鏡。雷射經過透鏡聚焦匯集成束，照射細胞後所產生的螢光與光散射訊號則由各種透鏡與濾鏡組合加以篩選與收集，並進行後續處理。

雷射基本上是沿著直線傳輸，發散角很小，必要時能夠聚焦至細胞直徑的大小。雷射亦具有良好的單色性且亮度極高，因此當其照射到細胞時能夠產生足夠的折射光及螢光讓偵測器捕捉到訊號，並進行後續分析。這些特點讓雷射成為流式細胞儀光源的首選。在流式細胞儀中，不同波長之雷射光源皆有其各自獨立的光路與集光濾鏡組合，如此將可有效降低多色分析時各種螢光訊號間重疊訊號的干擾。



散射光與螢光的測量

細胞經雷射照射後所產生的訊號主要可分為光散射訊號與螢光訊號兩種。散射光的波長與入射波一樣，其強弱可以反映出細胞的大小及胞漿內部顆粒的複雜度，分別由前向散射光 (forward scatter, **FSC**) 及側向散射光 (side scatter 或 right-angle scatter, **SSC**) 的數值來表示，數值愈高者，分別表示細胞愈大或細胞內的顆粒愈複雜。據此，可對未染色的細胞進行初步的分群與分析。

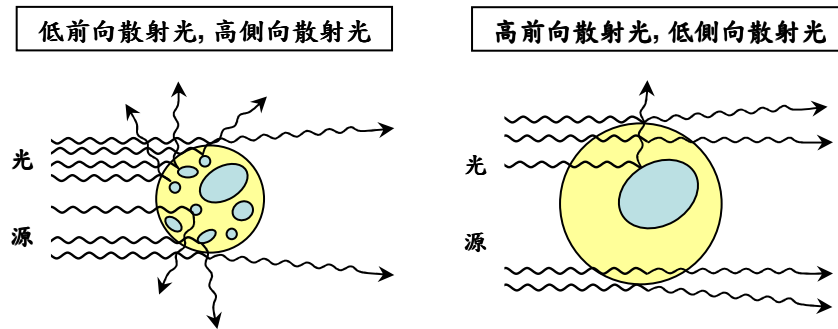


圖5. 散射光測量原理

細胞經雷射光激發會產生前向散射光 (小角度散射, 以偵測繞射光為主) 及側向散射光 (大角度散射, 以偵測折射與反射光為主)。前向散射光的多寡與細胞的大小和面積有關。側向散射光與細胞內的顆粒數和內部結構有關。至於各以何種角度範圍內的散射光被收集與分析則視各廠牌流式細胞儀的設置方式而異。

圖6. BD FACSCalibur 中前向與側向散射光的偵測方式 (另參照圖7)

在流式細胞儀中，細胞的前向與側向散射光皆來自488nm雷射的激發，並以488/10濾鏡來收集及分析。FSC偵測器與濾鏡前方的遮光板可擋住正向的直行光線，讓偵測器能對2至10度角偏折繞射過去之前向散射光進行收集與分析，細胞愈大，收集到的繞射訊號就越多。由於前向散射光的訊號較強，故以光電二極體來接收之。至於側向散射光與螢光訊號則被與雷射光束正交90度角方向的光電倍增管來接收之，細胞結構愈複雜，收集到的訊號就越多。

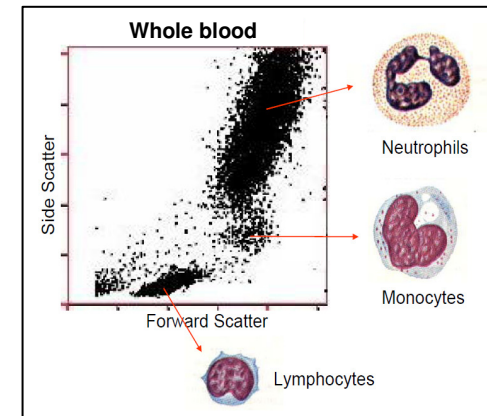
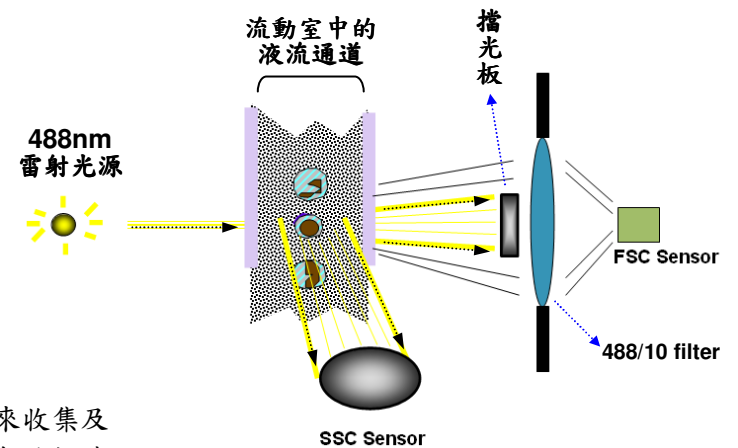


圖7. 全血之散射光分析圖例

嗜中性球與單核球的細胞直徑較大 (約各為12與14um)，故分布在圖形右側；淋巴球直徑相對較小 (約8um)，故分布在圖形左側。顆粒複雜性依序為嗜中性球、單核球與淋巴球，故依序分布在圖形的上、中與下方。



螢光分子則需要經過特定波長範圍的光激發後，才能發射出特定波長範圍的螢光，據此，經過不同螢光分子標定的細胞在通過不同波長雷射光的激發後，可以放射出各種相對應的螢光，進而反映出不同的生物學特性。

當螢光分子吸收了與它所具有的特徵頻率相一致的光子時 (excitation light)，會從基態躍升到激發態，然後再快速地降回其電子基態的各個不同振動能級，並依物質本身的能階特性，以較長波長之光的形式釋放出多餘的能量 (emission light)。若釋放出來的光在可見光範圍內，便是我們眼中所見到的螢光。

圖8以7-AAD為例子做進一步說明。螢光分子可被激發的**激發光波長**與其受激發後放射出來的**放射光波長**通常都具有特定的**波長範圍**。當我們用單一波長雷射進行激發時，其激發效率會隨著激發光波長的不同而有差異。舉例來說，當我們以不同波長雷射來激發7-AAD時，可以發現**561nm**雷射的激發效率其實優於**488nm**雷射(圖4a和b)。因此，在僅需要分析單一螢光訊號的狀況下，我們可以根據儀器所配備的**雷射種類**來選擇最合適的激發光源，激發出最大的訊號，再配合選用能收集到最多放射光的**集光濾鏡**來加以收集，以獲取最佳的訊號。

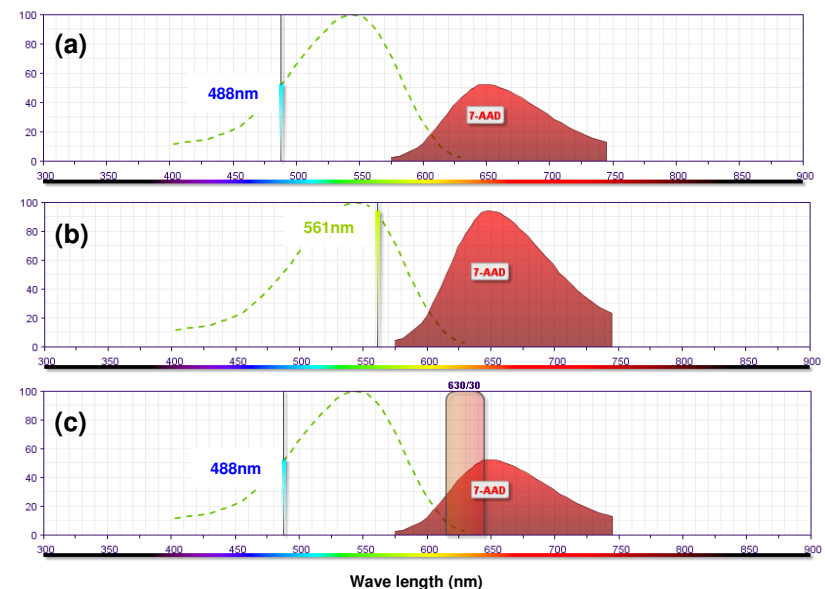


圖8. 7-AAD 的激發光光譜範圍 (excitation, 黃綠色虛線範圍) 與放射光光譜範圍 (emission, 紅色區域)。(a) 當7-AAD以 488nm 雷射進行激發時，其激發效率約為最大激發值的52%，(b) 但以 561nm 雷射進行激發時，其激發效率可達93.8%，(c) 若以可收集 630/30nm 波長範圍 (615~645nm) 的集光濾鏡來收集發射光時，能收集到約36%的總發射光。

各儀器可供選擇的激發光雷射與集光濾鏡種類並不見得相同，使用者在選用螢光染劑前，應先確認儀器的配備後再設計實驗為佳。

但分析兩種或兩種以上的螢光訊號時就需要考慮到不同螢光分子間可能產生的干擾與是否進行色差補償的調整以得到正確的訊號值與圖形。干擾的多寡與下列幾點有關：(1) 不同螢光分子間之激發光光譜的重疊狀況，(2) 螢光分子受激發後放射出來之放射光光譜的重疊狀況，(3) 儀器所配備的激發光雷射種類，與 (4) 儀器所配備之集光濾鏡的集光波長範圍。

螢光分子的激發光光譜範圍與可選用的激發光雷射種類有關，受激發後放射出來的放射光光譜範圍則與可選用的集光濾鏡的集光波長範圍有關。雖然流式細胞儀在設計上已使用單一光源雷射與各種分光鏡及集光濾鏡組合來盡量降低不同螢光分子間的干擾，但我們需瞭解到市面上販售的螢光分子種類繁多，每台機器既定的光學系統組態不容易將所有螢光分子皆納入考慮，因而不容易將各種螢光分子間的干擾百分之百去除。故強烈建議使用者先確認欲使用儀器的相關配備後，再挑選適用的螢光染劑，才能獲取最佳的數據與結果。部分範例請參考第二部分本核心新購儀器介紹之圖2至4。

在下一次的流式細胞分析暨分選核心電子報中，我們將對多重螢光染色的方法、注意事項及常見的問題做進一步的介紹，以期能夠幫助研究者順利設計與完成實驗。下面亦列出幾家有提供 Fluorescence Spectrum Viewer 之廠商的網址，使用者可根據欲使用之螢光分子自行與流式細胞儀之激發光雷射與集光濾鏡組態做模擬配對測試，檢視螢光分子的適用性。

1. http://www.bdbiosciences.com/research/multicolor/spectrum_viewer/index.jsp
2. <http://www.ebioscience.com/resources/fluorplan-spectra-viewer.htm>
3. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cell-Analysis/Labeling-Chemistry/Fluorescence-SpectraViewer.html>

第四部分：流式細胞分析儀使用及管理辦法 (摘錄)

本辦法已於今年1月做進一步的修正，欲使用流式細胞分析儀 (包含 **FACSCalibur** 與 **LSRFortessa**) 的同仁請自行進入研發分處第一共研網頁詳讀相關內容，並請確實遵守相關規定。此處僅摘錄部分較重要的注意事項，如有任何疑問，歡迎來電洽詢或至本核心辦公室做進一步的討論。

國立臺灣大學醫學院研究發展分處第一共同研究室 流式細胞儀使用及管理辦法

民國 98 年 11 月 2 日本院 98 學年度第 2 次學術整合委員會會議通過

民國 98 年 11 月 6 日本院 98 學年度第 3 次院務會議核備

民國 101 年 12 月 10 日本院 101 學年度第 3 次學術整合委員會會議修正通過

民國 102 年 1 月 4 日本院 101 學年度第 5 次院務會議核備

壹、儀器設備

本辦法所適用之設備為設於國立臺灣大學醫學院研究發展分處第一共同研究室 (以下簡稱第一共研) 之流式細胞儀及其周邊設備 (以下簡稱本儀器)。

貳、申請使用資格

- 一、本儀器開放使用對象為國立臺灣大學 (以下簡稱本校) 各單位。
- 二、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。

參、預約方式

一、欲使用本儀器者須於使用日前二週內向第一共研管理人員登記預約。

二、使用者需以本人名義預約及上機，不得利用他人名義。

三、每次預約最少一小時，上限不管制。

注意事項(1)：收費以小時為單位，未滿一小時者以一小時計算。

注意事項(2)：預約時間長度需將下列幾項因素考慮進去，以避免上機時間不足：

(a) 開機暖機時間與收集數據前的前置作業 (5~10 分鐘)，

(b) 實際上機收集數據的時間，

(c) 清洗機器、雷射冷卻與關機等後續處理 (20~30 分鐘，視清洗難易度而定)，

(d) 使用者本身對實驗與儀器操作的熟練度。

四、視實驗需要，在不影響下一位使用者的使用權益下，得向管理員申請延長使用的時間。

五、取消預約的相關規定

(1) 經管理人員同意與確認後，方能取消預約。

(2) 擬取消預約者，最後的取消時間為預約使用日當日上午 8:30。

(3) 規定時間前未完成取消動作者視同使用該時段。

(4) 若因非抗力因素造成無法使用者，由管理人員酌情處置。

伍、收費標準

一、收費價格：

儀器設備	自行操作	操作員操作
FACSCalibur	新台幣 150 元/小時	新台幣 650 元/小時
LSRFortessa	新台幣 300 元/小時	新台幣 800 元/小時

- (1) 收費以小時為單位，未滿一小時者以一小時計算。
 - (2) 使用時間未達預約時間長度時，以預約時間長度為基準進行收費。
 - (3) 超過預約時間仍未前來使用者，按照原預約時間長度收費。
 - (4) 若需要，在不影響下一位使用者的使用權益下，經管理人員同意得延長使用時間，但需補繳超時使用費用。未滿一小時者以一小時計算。
 - (5) 若需要，在不影響其他使用者的使用權益下，得提前進行實驗，但以預約時間長度為基準進行收費，超過預約時間長度者需加收超時使用的費用。未滿一小時者以一小時計算。
 - (6) 非因儀器故障導致實驗結果不良，使用者仍須依收費標準付費。
- ** 請小心評估完成實驗所需要的時間以決定預約時間的長度！！**

二、收費標準每半年重新計算成本，需要調整時另行公告。

陸、使用規定

一、請確實遵守公告之儀器使用規定與流程，並**嚴禁配戴手套**接觸相關設備。

二、使用儀器時請遵守下列規定與流程：

(一) **上班時間 (週一至週五 9:00~17:00)** 欲使用本儀器：

(1) 請先至 1436 室登記開機時間與繳交繳費單後始可進入 1434 室使用。

(2) 使用完畢後請回到 1436 室登記關機時間，管理人員將蓋章確認。

(二) **夜間或假日**欲使用本儀器：

(1) 請於上班時間至 1405 室繳交繳費單與開卡 (教職員證、助理證或學生證皆可)，始可於預約時段刷卡進入 1434 室使用。

(2) 使用前後仍請於記錄本上記錄開機與關機時間，管理人員將蓋章確認。

(三) **分析電腦僅在上班時間內開放**，但不另外收費。欲使用者請至 1436 室登記後，始可進入 1434 室使用，使用完後仍請回到 1436 室登記離開時間。

三、請準時於預約時間內到達，並於時段內使用完畢，**遲到者不得要求順延時段**。

但在不影響下一位使用者的使用權益下，經管理員同意得延長使用時間，但需補繳超時使用的費用。未滿一小時者以一小時計算。

四、上機時請自備專用試管 (BD REF352052)，第一共研會提供上機用的 PBS (BD FACSTFlow, cat. no 342003) 及清洗用的 FACS CLEAN、FACS RINSE 及二次水。