

流式細胞儀 在雲苔屬小孢子培養研究之應用

農試所生技組 夏奇鋐 陳威臣 曹進義

一、流式細胞儀的原理與種類

流式細胞分析技術 (Flow cytometry) 之原理為將細胞先經螢光染色後，以液流技術引導單一細胞通過特定感應器，並以不同波長之雷射光激發細胞上所攜帶之螢光，將偵測到的光學訊號放大後轉換成電子訊號，再由電腦加以紀錄分析。儀器每秒可分析數千個細胞，舉凡細胞的大小、數量、分裂週期、凋亡以及DNA的含量、染色體的倍體數以及染色體選別等，都能藉由流式細胞儀以細胞為單位進行多參數分析，進階機型因配備有篩選 (sorting) 功能，還能針對不同特性之細胞進行選別，提供更進一步研究之用 (Robinson 2004)。流式細胞儀與傳統純粹利用光學原理之顯微鏡相較，在細胞處理數量、速度及精準度方面更勝一籌，可以節省人力並提高效率，是近代生物科學進行細胞研究不可或缺的利器。

目前較常見的流式細胞儀是以螢光染色作為分析基礎的流式細胞儀 (fluorescence-activated flow cytometers, FACS)，主要應用於醫學基礎研究以及臨床檢測，較著名的生產者為美國 BD (Becton- Dickinson) 公司、Beckman - Coulter 公司以及德國的Partec 公司（現已被日商Sysmex公司併購）。此類流式細胞儀以雷射光作為分析元件，需有精密之校正技術配合，儀器價格較昂貴，且細胞必須透過各種螢光染劑標定後才能加以偵測，耗材所費不貲，使用者主要為醫學研究及醫療機構。有別於前兩家公司，Partec 公司生產的FACS，尤其是檢測染色體倍性分析儀（配備UV燈），具有體積小、易操作、價格相對較低之優點，適合於植物學研究之用。此外，近年來另有一類型稱之為電阻抗式流式細胞儀 (impedance-based flow cytometer, IFC) 被發展出來，其原理為以多頻波之交流電通過單細胞，並將各個細胞產生之電阻抗訊息加以收集，取代FACS以雷射光激發螢光染劑產生的光學訊息 (Xu et al. 2016)。IFC使用之頻波範圍從100 kHz至30 MHz，偵測細胞在不同頻波電

作者：夏奇鋐研究員
連絡電話：04-23317327

流下產生之變化，一般以低於500 kHz測量細胞體積，介於500 kHz–6 MHz測量細胞膜電位，以及介於6–20 MHz測量細胞漿（cytoplasma）的密度。IFC以微流體晶片取代傳統石英管元件，只需少量樣品即足夠分析之用，由於IFC未使用任何昂貴之光學元件，因此不須精密之校正系統，儀器體積變小甚至為可攜式設計，有利田野調查即時偵測之用，且機器僅以交流電頻波變化偵測細胞狀態的改變，可節省螢光染劑耗材支出。綜合來說，IFC價格較FACS親民，也讓流式細胞儀的利用更加普及化（Cheung *et al.* 2010）。

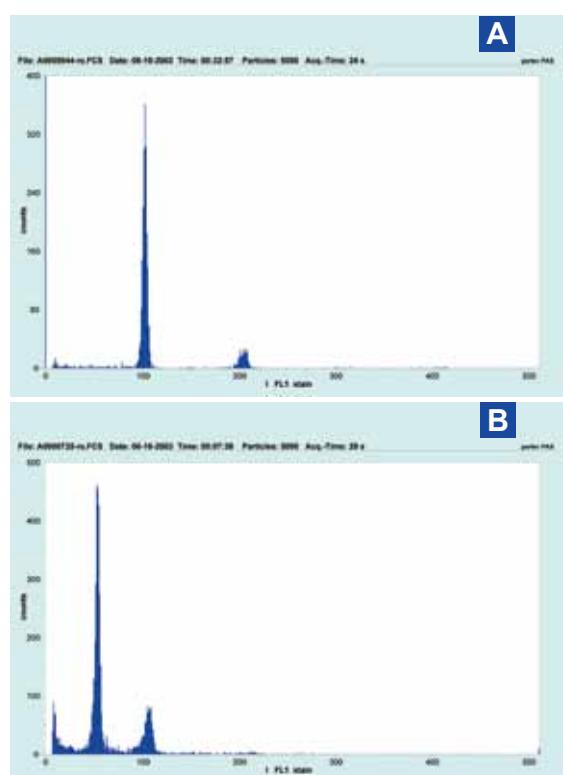
二、流式細胞儀在植物研究之應用

流式細胞儀於1980年代開始應用於植物之研究範疇，主要作為檢測植物細胞核DNA的含量以及植物染色體倍體數的鑑定。生物體其單倍體基因組所含DNA總量稱為C值，是一個很重要的植物學特徵，植物學家依據植物細胞核DNA的含量作為研究演化、分類與生態學的分析工具。此外，植物染色體的多倍化是促進物種形成及演化的重要因素，目前存在的大部分開花植物其祖先大都經歷過一輪或多輪的染色體倍加，因此鑑別植物種群的染色體倍體數，對研究其系統進化及物種起源模式具有重要的價值。此外，育種上用於創造種質及加速育種流程的人工多倍體化誘導、花藥培養以及小孢子培養所育成之單倍體或雙單倍體（doubled haploid, DH）植株的染

色體倍性鑑定（圖一），都可藉由流式細胞儀快速加以判別，相較於早期必須藉由氣孔大小、氣孔所含之葉綠體數以及計算根尖染色體數等方法，在效率上大為提高。

三、流式細胞儀在薹苔屬小孢子培養研究之應用

薹苔屬植物從Lichter (1982) 自油菜發展出小孢子培養技術開始，多年來已建立有成功率相當高的DH育成方法，薹苔屬植物的育種流程因此得以大幅縮短，但對於一些小孢子培養低反應或不反應的品種研究卻遭遇到瓶頸，除了



圖一、以流式細胞儀檢測由花椰菜小孢子培養分化而來植株之染色體倍體數。（A）雙單倍體，（B）單倍體。

品種本身基因型的差異外，原因在小孢子培養過程必須在培養4週後才能根據產胚數來判斷處理的有效性，唯此時可能已錯過最佳之花期，且十字花科植株開花需低溫處理，大多於生長箱內種植以提供生長及開花條件，植株栽培成本很高，若開花後未能及時找到適當之培養條件，在植物材料的供應上遂產生問題。此外，對於一些珍貴種原受限於數量稀少，也必須尋找可快速修正小孢子培養條件的方法。

Deslauriers *et al.* (1991) 利用流式細胞儀追蹤油菜小孢子培養期間細胞的變化，指出最先被覺察的改變是細胞增大，針對細胞增大且伴有較高螢光反應之細胞，利用流式細胞儀細胞選別功能提高其比例後，發現小孢子胚分化的比率亦隨之增加，首次證明了流式細胞儀確實具有區別胚性小孢子的可行性。Deslauriers *et al.* 亦指出，以流式細胞儀分析溫度處理3天後小孢子的變化情形與小孢子培養4週後所呈現之胚誘導率，兩者間具有顯著之相關性。Schulze and Pauls (1998, 2002) 更進一步將流式細胞儀中不同群之細胞找到其在光學顯微鏡下對應之細胞分化形態，且發現代表胚性細胞的小孢子數目在溫度處理48h後即不再增加，亦即溫度處理對胚性細胞誘導的效果，在處理後2-3天內即已確定，而流式細胞儀可清楚區別已誘導及未被誘導兩種分化型態之細胞群，不需等待4週的培養時間即可預測處理之效果。上述兩篇研究報告顯示，流式細胞儀具有區分不同發育狀態小孢子的功能外，並

可在小孢子處理後48-72h內依據細胞的改變預測胚誘導的效果，在改進小孢子培養效率方面，提供了更及時且高效率的研究工具。一般而言，胚分化僅占整體培養小孢子總數的0.05-1%或更低之比率，因此以產胚數作為評估處理效果之指標，必須培養大量小孢子方有機會獲得足夠之胚數，用以驗證處理的差異性，但因為流式細胞儀具有分析大量細胞的能力，對小孢子處理效果的評估，會比傳統僅能依據少量胚數或以顯微鏡觀察少數細胞作為判斷標準的方式更為大量、精確及有效率外，還能提早評估的時間。

農試所組織培養研究室自104年開始進行甘藍類（花椰菜、青花菜、甘藍）蔬菜小孢子培養技術的建立，研究室配備有 Partec 公司之 Ploidy Analyser (PA) 用以檢測小孢子再生株之倍體數，只需取少量葉片(1 cm^2)即可進行分析，且檢測速度及精準度較傳統以顯微鏡計算根尖染色體數或量測葉片氣孔保衛細胞大小等方法為高，但PA因僅配備UV燈，因此只具備倍體數分析功能（圖二A）。研究室於107年購入電阻抗式流式細胞儀Amphα™ Z30 (Amphasy, Switzerland)（圖二B），規劃用於小孢子細胞發育階段的區分及追蹤小孢子胚分化過程中的變化，希望藉由IFC區別不同發育階段小孢子以及追蹤各種處理條件對小孢子細胞造成之變化，乃至於不同發育階段小孢子以及處理條件與DH表現比例的關聯性，作為提升小孢子培養效率之依據。

四、展望

所謂工欲善其事，必先利其器，無論是多倍體育種或利用小孢子培養技術育成DH，流式細胞儀的應用大大提高上述兩項技術的實施效率。十字花科作物是世界性的重要蔬菜，國際間早已建立有小孢子培養方法，用於加速育種工作的進行。台灣種苗業者在耐熱、早熟品種的育成上具有利基，但對於新技術的利用則相對保守，小孢子培養技術可以快速生產純系親本，加速F₁育種流程的進行，希望藉由流式細胞儀的普及應用，讓這些技術的建立更為精確且有效率。



圖二、兩種型式之流式細胞儀。(A)以光學偵測作為分析基礎的流式細胞儀Ploidy Analyser (Partec, Garman)，(B)電阻抗式流式細胞儀Ampha™ Z30 (Amphasys, Switzerland)。

五、參考文獻

- Cheung, K. C., M. Di Berardino, G. Schade-Kampmann, M. Hebeisen, A. Pierzchalski, J. Bocsi, A. Mittag, and A. Tárnok. 2010. Microfluidic impedance-based flow cytometry. *Cytom. Part A*. 77A: 648-666.
- Deslauriers, C., A. D. Powell, K. Fuchs, and K. P. Pauls. 1991. Flow cytometric characterization and sorting of *cultured Brassica napus* microspores. *Biochim. Biophys. Acta*. 1091: 165-172.
- Lichter, R. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Z. Pflanzenphysiol.* 105: 427-434.
- Robinson, J. P. 2004. Flow Cytometry. Enc. Biomater. Biomed. Eng. 630-640.
- Schulze, D. and K. P. Pauls. 1998. Flow cytometric characterization of embryogenic and gametophytic development in *Brassica napus* microspore cultures. *Plant Cell Physiol.* 39: 226-234.
- Schulze, D. and K. P. Pauls. 2002. Flow cytometric analysis of cellulose tracks development of embryogenic *Brassica* cells in microspore cultures. *New Phytol.* 154: 249-254.
- Xu, Y., X. Xie, Y. Duan, L. Wang, Z. Cheng, and J. Cheng. 2016. A review of impedance measurements of whole cells. *Biosens. Bioelectron.* 77: 824-836.