

電阻抗式流式細胞儀 (Impedance flow cytometry) 在農業上的應用

▲ 農試所生技組 杜元凱 陳涵葳 林新祐

一、前言

流式細胞儀 (Flow cytometer) 是一種快速且高通量的細胞分析儀器，其利用特殊的液流系統能讓待測細胞在鞘液 (sheath buffer) 中單行排列，單行排列之單顆細胞藉由氬雷射 (Argon laser) 或氦氖雷射 (HeNe laser) 激發細胞膜上或細胞質內標定之螢光散射訊號，再由偵測器收集待測細胞之數量、大小、顆粒性、螢光特徵等訊號，配合分選系統可進一步針對目標細胞進行捕捉與收集；然而，傳統的流式細胞儀對待測細胞樣品的前處理極具破壞性，降低樣品後續的再利用性。近幾年發展出新穎的電阻抗式流式細胞儀 (Impedance flow cytometry, IFC)，工作原理與傳統流式細胞儀大不相同，IFC無配備高價的雷射光源，改以庫爾特計數器 (Coulter counter) 原理為基礎，不

需利用螢光染劑標定樣品，待測樣品只需簡單的前處理即可上機分析，降低操作過程破壞細胞完整性的可能性。

二、電阻抗式流式細胞儀之原理

IFC是一種無標記技術、非破壞性方式的細胞分析系統 (Caselli et al., 2018)。IFC利用微流體芯片 (microfluidic chip) 技術，以介電電泳 (Dielectrophoresis, DEP) 聚焦細胞，使細胞依序通過帶有交流電 (Alternating Current, AC) 的電場，由於細胞與導電液間導電性的差異，會改變阻抗訊號的強度，再由檢測模組收集阻抗訊號。阻抗訊號分為實際訊號和虛擬訊號兩部分，訊號經過轉換後，可獲取相位角以及振幅數值資料，分別可代表細胞特性與相對大小，一般IFC分析結果會將相位角資料呈現於Y軸，振幅資料呈現於X軸，供研究人員進行結果判讀。另外，研究人員可調整頻率的強弱，以得到不同細胞特性之資料，例如於0.5-20 MHz區段，細胞膜因極化形成對電流的阻礙屏障，由此可獲取待測細胞之相對大小訊息，通常在低於0.5 MHz時，可達到不錯的極化效果；於中頻率區段 (介

作者：杜元凱助理研究員
連絡電話：04-23317321

於0.5-6 MHz)，因細胞膜的極化減少，此時IFC可測得細胞膜電容度 (membrane capacitance) 資訊；在高頻率區段 (介於6-20 MHz)，細胞極化程度極低，使電流完全穿透細胞，此時可獲取細胞質導電度 (cytoplasm conductivity) 之相關訊息 (Cheung *et al.*, 2010) (圖一)。

三、電阻抗式流式細胞儀之應用

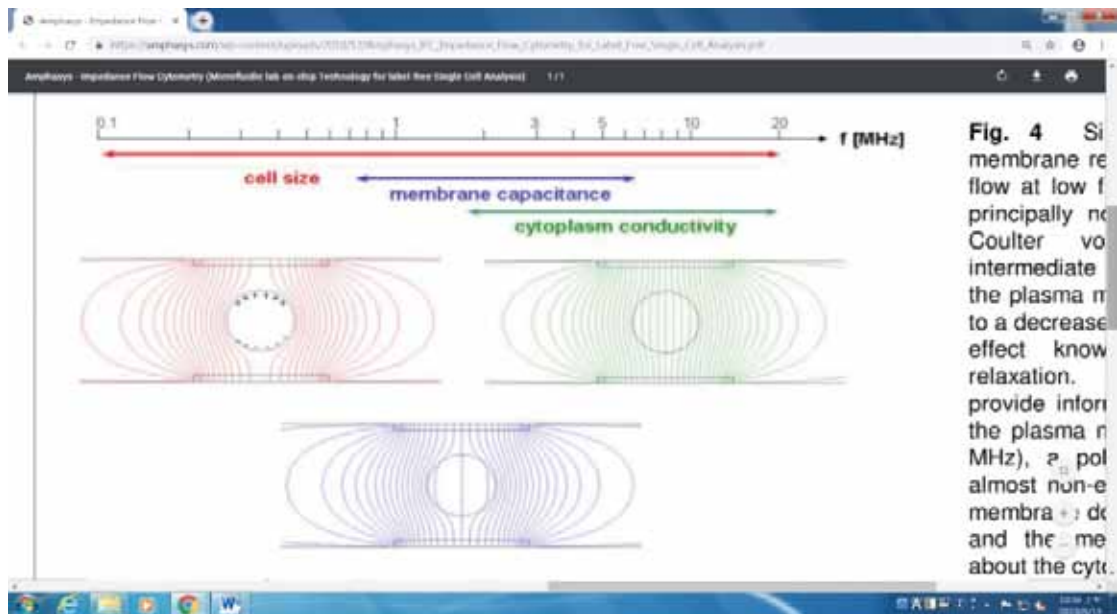
1. 花粉數量之估算

植物花粉細胞的數量為繁殖能力、結果率之重要的因素，於基改作物生物安全評估項目中，亦能反應出基改作物對環境的適應力和競爭力。當含有細胞

顆粒的流體通過電場時，單一細胞引起的短暫阻抗訊號變化可被轉換成通過之細胞數，並以XY散點圖 (dot plots) 來呈現樣品測得的細胞量，IFC可快速、高通量進行植物花粉數量之估算。

2. 檢測花粉樣品之細胞活力

植物花粉活力檢測常利用雙醋酸螢光染色法 (Fluorescein diacetate, FDA) 或離體萌芽 (In vitro germination) 來進行。我們以常見的小油菜品種「農興80天」為材料，分別取用新鮮的花粉與加熱處理(去活力)之花粉進行活力檢測，說明IFC是如何呈現花粉細胞活力的界定範圍。因花粉活力的高低在微流體芯片電場中導電性的差異，所以在分析新鮮花



圖一、電流頻率的強弱對細胞的穿透力能反應出細胞的不同特性。於0.1-20 MHz區段，細胞膜因極化形成對電流的阻礙屏障，可得到待測細胞之相對大小訊息；於中頻率時 (介於0.5MHz-6 MHz)，因細胞膜的極化減少，IFC可測得細胞膜電容度 (membrane capacitance) 資訊；在高頻率 (介於6-20 MHz)，細胞極化程度極低，使電流完全穿透細胞，可獲取細胞質導電度 (cytoplasm conductivity) 相關資訊。https://amphasys.com/wp-content/uploads/2018/12/Amphasys_IFC_Impedance_Flow_Cytometry_for_Label_Free_Single_Cell_Analysis.pdf

粉活力時出現相位角不相同的花粉細胞群；因此，藉由加熱處理的花粉，來定義無活力花粉細胞的相位角範圍，並作為分析新鮮花粉樣品的活力界定標準（圖二）。

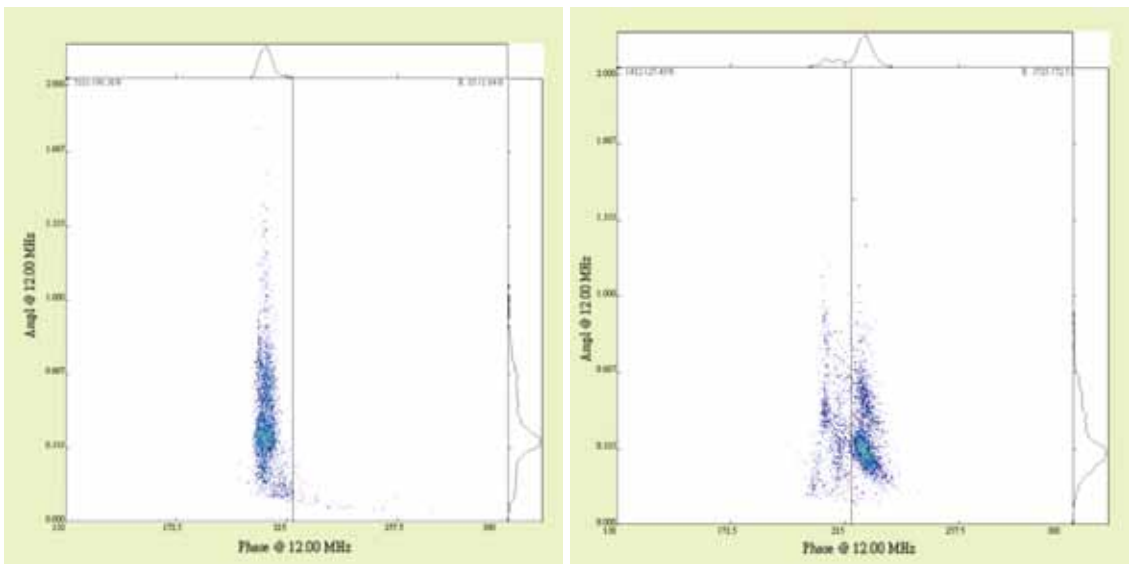
3. 檢測花粉樣品之細胞發育階段

花粉發育過程包括四分體期、單核期、雙核期…等，目前常用DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) 染劑來鑑定不同發育階段，但DAPI染色法對生物體具有毒性和致癌性，且操作耗時費力。Heidmann *et al.* (2016) 為驗證IFC可檢測花粉發育階段的差異，以菸草為材料，並同時進行DAPI染色，在不同發育時期從IFC的XY散點圖中可發現花粉群呈現相位角和振幅大小的差異變動，隨著成熟度的提升，花粉群分離的程度更加明顯（圖三）。此外，在Amphasys公司的技術研究上也提供出小麥、玉米和馬鈴薯

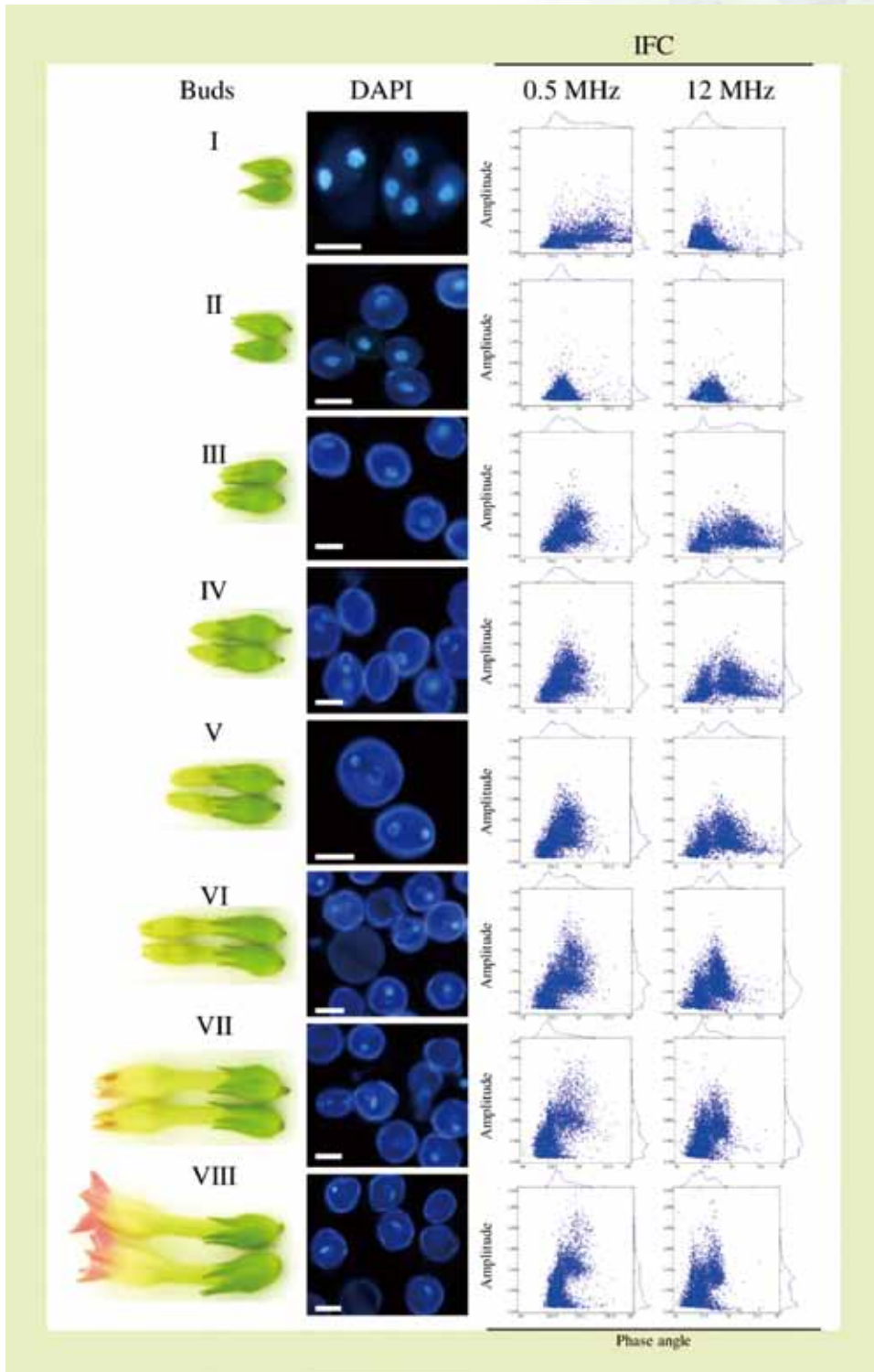
的花粉發育階段測試，並建立出發育階段的XY散點圖。

4. 檢測細胞樣品之倍體數

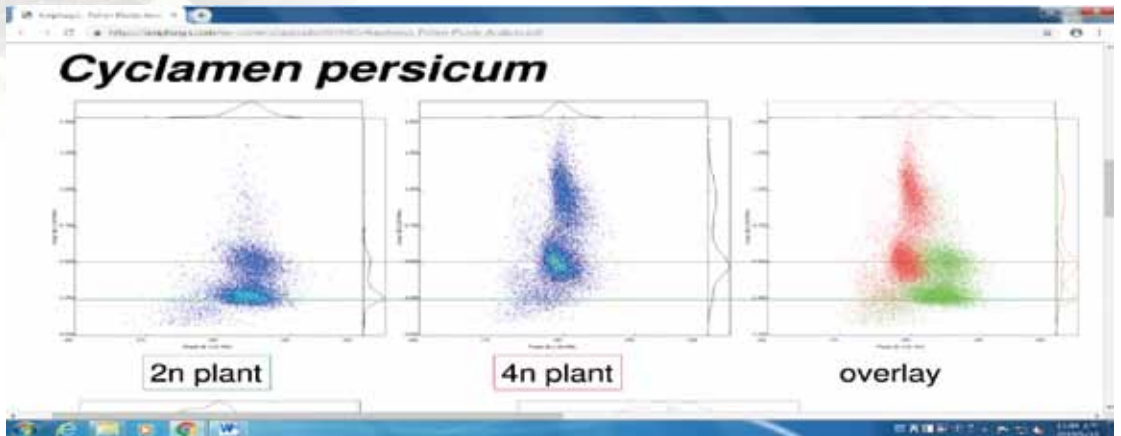
流式細胞儀在細胞倍體數檢測的應用已廣為使用，但須配合PI (propidium iodide) 或DAPI染色，但在不染色的情況下，IFC也具有細胞倍體數檢測能力。植物的倍體數特徵，常通過植株器官，如葉、花、果實的大小來判斷，或是利用顯微鏡觀察花粉、氣孔或保衛細胞之大小進行區分（夏等人，2010）；IFC則可利用花粉大小和花粉活力，與已知倍體數的樣品進行比較，判別倍體數間的差異，圖四顯示四倍體的細胞相較於二倍體細胞具有較高的振幅（Y軸），但相位角（X軸）則較低，由此可確認不同倍體數的位置差異，並可套用在未知樣品的倍體數檢測結果的判斷。



圖二、IFC以頻率12 MHz檢測小油菜品種「農興80天」花粉活力之XY散點圖。橫軸與縱軸分別為相位角與振幅，其數值差異表示細胞的相對大小和特性，左:加熱去活力處理的花粉；右:新鮮花粉。



圖三、菸草花粉各生長階段的DAPI染色與IFC分析結果圖。生長階段(I- VIII) 代表I:四分體；II:單核；III:晚單核；VI-VII:雙核；VIII:成熟花粉粒 (Heidmann et al., 2016)。比例尺:20 μm 。



圖四、IFC以頻率2 MHz檢測仙客來 (*Cyclamen persicum*)花粉倍體數之XY散點圖。橫軸與縱軸分別為相位角與振幅，其數值差異表示細胞的相對大小和特性，左:二倍體；中:四倍體；右:二倍體(綠色)與四倍體(紅色)疊圖。

https://amphasys.com/wp-content/uploads/2019/03/Amphasys_Pollen_Ploidy_Analysis.pdf

四、結論

在IFC的使用上，已經可以明確地運用在細胞活力、發育階段和倍體數的檢測，該方法以單細胞懸浮液在交流電場產生的阻抗訊號，來辨別細胞間的種類差異，可在單次分析過程檢測出有活力和無活力的花粉群。在無標記步驟和操作快速的優點下，具有標準化且不侷限物種的操作流程，對於大量樣品的檢測非常的適合，可為細胞分析提供一種新穎的檢測技術。

五、參考文獻

夏奇鋳、陳威臣、曹進義 (2010)。多倍體植物的產生、利用與展望。農業試驗所技術服務，84:p14-17。

Caselli, F., De Ninno, A., Reale, R., Businaro, L., and Bisegna, P. 2018. A novel wiring scheme for standard chips enabling high-accuracy impedance cytometry. *Sensors*

and Actuators B: Chemical. 256:580-589.

Cheung, K. C., Di Berardino, M., Schade-Kampmann, G., Hebeisen, M., Pierzchalski, A., Bocsí, J., Mittag, A., and Tárnok, A. 2010. Microfluidic impedance-based flow cytometry. *Cytometry Part A*. 77 (7):648-666.

Heidmann, I., Schade-Kampmann, G., Lambalk, J., Ottiger, M., and Di Berardino, M. 2016. Impedance Flow Cytometry: A Novel Technique in Pollen Analysis. *PLOS ONE*, 11(11): e0165531.

https://amphasys.com/wp-content/uploads/2018/12/Amphasys_IFC_Impedance_Flow_Cytometry_for_Label-Free_Single_Cell_Analysis.pdf (visit on 05/13/2019)

https://amphasys.com/wp-content/uploads/2019/03/Amphasys_Pollen_Ploidy_Analysis.pdf (visit on 05/13/2019)