

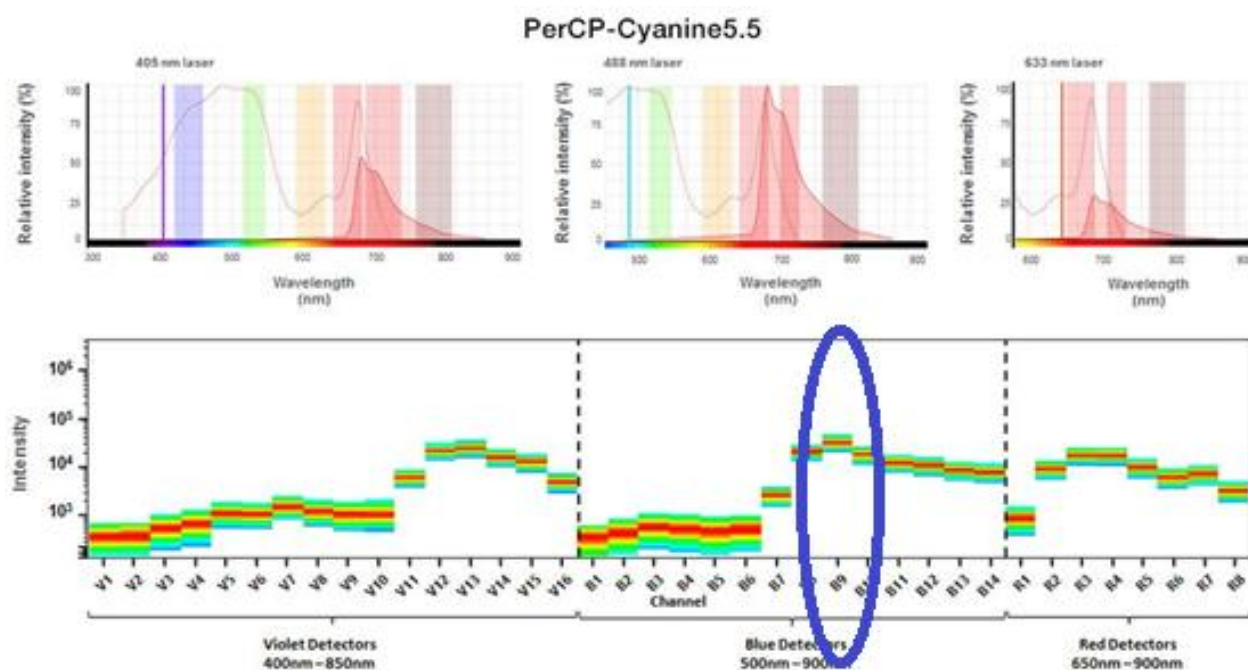
【今更聞けない、、、スペクトル型フローサイトメーターで何？_その2】

フローサイトメリー実験に関する、今更聞けない質問にお答えする「今更聞けない、、、」ですが、今回はスペクトル型フローサイトメーターの、「Unmix」についてお話ししたいと思います。また、前々回コラム（第23回：[今更聞けない、、、スペクトル型フローサイトメリーって何？](#)）にいただいた、「スペクトル型フローサイトメリーに関してコンペンセーションが必要無いのではないか？」というご指摘について回答させていただきます。

従来型のフローサイトメーターの測定では、フィルターによって特定の波長のみを抽出しています。測定時、検出器に混入した、別の蛍光色素の波長を引く（＝コンペンセーション）ことにより、特定の蛍光色素の波長の蛍光強度を測定していました。それに対し、スペクトル型フローサイトメーターでは、多重染色サンプルの波長を測定後、「Unmix（アンミックス）」によって、各蛍光色素の波長へと分解し、各色素の強度を算出します。

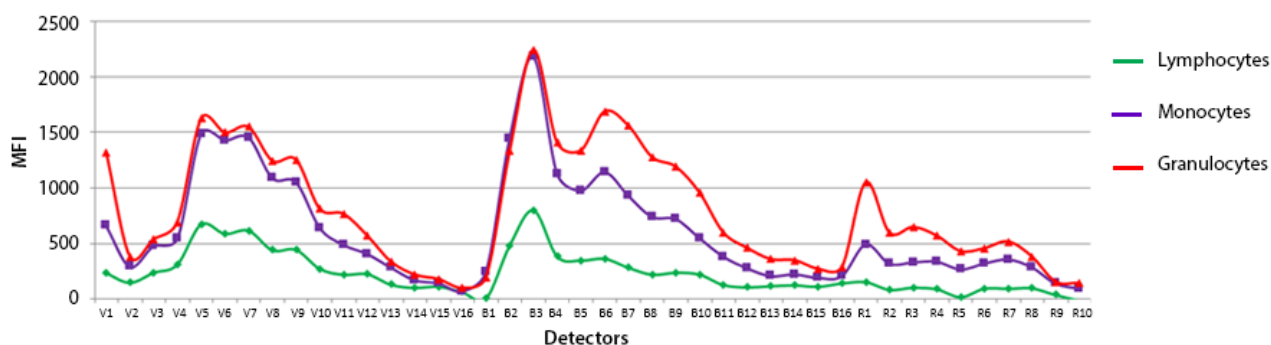
この手法は、実は蛍光顕微鏡では10年以上前から用いられています

（<https://www.microscopyu.com/techniques/confocal/spectral-imaging-and-linear-unmixing>）。



ピークの蛍光強度＝その色素の蛍光強度

アンミックスを正しく行うには、各蛍光色素のスペクトル情報を得るために単染色の測定データ、リファレンスコントロールの測定が必要です。単染色のスペクトル情報を元に、多重染色したサンプルの蛍光波形を各蛍光色素の波形へと分解するためです。また、細胞の自家蛍光の波形を測定するため、無染色サンプルの測定データも必要になります。自家蛍光は細胞の種類によりかなり異なるため、実際のサンプルと同じ細胞を用意する必要があります。このように自家蛍光の波長を差し引くことができるため、自家蛍光の高いサンプルを測定するのに有利です。



リファレンスコントロールを用いて、測定した波長を各色素へ分解してから、その波長のピークの蛍光強度を算出するため、正しくアンミックスが行われていれば基本的には、特定の蛍光色素の波長に別の蛍光色素の波長は混じらず、コンペンセーションは必要ありません。

■お題大募集中■

フローサイトメトリー実験についての「今更聞けない、、」なことを大募集しています。
TDB News に採用された方にはオリジナル USB メモリーをプレゼントします。
お題お申込み、過去の記事は[こちら](#)からご確認ください。