



顯微鏡學與影像學

曾麗慧·蘇怡寧

摘要

本章主要將介紹顯微鏡的基本構造、顯微鏡的實際操作，以及螢光顯微鏡、相位差顯微鏡、倒立顯微鏡的原理和實際操作方法。最後再教您如何拍出高品質的染色體相片，包括底片敏感度、對比、顆粒、銳利度等，以及顯微鏡的疑難排解、暗房工作的流程和注意事項。

此外，隨著影像處理技術的進步，在細胞遺傳學上，利用電腦輔助之染色體快速處理的數位化系統已經取代了傳統的照相技術，所以於本章之第二部分，將進一步介紹電腦影像之處理，包括影像品質的改善、顯微鏡放大功能、焦距調整和影像的擷取。對於一個細胞遺傳實驗室而言，要將染色體排序成功地從照像系統，轉型到利用電腦處理影像系統，則高品質電腦影像處理技術是必備，於本章會介紹其和傳統照相系統之差異。



6.1 顯微鏡學與影像

細胞遺傳學家花了無數的時間與顯微鏡為伍，卻很少真正去了解顯微鏡的內部構造，顯微鏡是實驗室裡頭不可或缺的儀器，顯微鏡學與光學的基本知識對細胞遺傳學家不但是寶貴而且也是必須的。

6.1.1 標準顯微鏡的構造

顯微鏡的基本構造包括：

(1) 光源：

在早期，顯微鏡的光源來自日光，必須靠鏡子的反射將光投射在視野裡。隨著科技進步，人工光源讓科學家可以不受日夜和天氣的限制使用顯微鏡。現代的顯微鏡都已配有內建的鎢絲燈，因為鎢絲燈會帶點黃色光，所以通常會再加上藍色的濾光鏡來校定顏色，若發生光線不均勻的情形，可以在燈泡前加一片毛玻璃。

(2) 反光鏡：反光鏡可以將光線反射到光圈中。

(3) 副座聚光鏡：可以將光束聚集在目標物中。

(4) 載物台：載物台可以置放玻片。

(5) 物鏡：目標物在物鏡下被聚焦且放大。

(6) 旋轉盤：大部分的顯微鏡可以在旋轉盤上裝載好幾支不同倍數的物鏡。

(7) 顯微鏡鏡筒：接連物鏡和目鏡的部分。

(8) 目鏡：目鏡可以更進一步放大影像。

(9) 顯微鏡鏡身：為顯微鏡的主要骨架。

(10) 細調節輪與粗調節輪：可以起降鏡身或者載物台，以達到對焦的效果。

(11) 聚光鏡調節器：通常是利用齒輪進行光圈的起降。

(12) 光圈：

是顯微鏡一個很重要的構造：所有的顯微鏡有兩個或更多個光圈，通常具有一個 filed stop diaphragm 以及一個 aperture stop diaphragm（可調式光圈裝置），這兩者的使用是獲得良好的呈像的重要關鍵。Field stop diaphragm 通常位於聚光鏡下方，而 aperture stop diaphragm 則位在副座聚光鏡，這些光圈看起來外觀相仿但功能完全相異。Field stop diaphragm 是用來調整 Koehler 照明，這個光圈限制了光束的半徑，可以得到



均勻的照明，不能改變照明的強度，這個光圈應該要開得比所需視野稍大。Aperture stop diaphragm 可以改變入射光束的角度，可以用來調整解析度和對比，並可以改變視野深度，不過不能用來改變明亮度，明亮度的調整只能靠光源調節器或者外掛的濾光鏡。

1. 光線的行徑

光束由光源發出後，藉由反光鏡的反射投入聚光鏡中，聚光鏡可以改變錐形光束進入物鏡的入射角。光源打入物鏡後聚焦出的影像會進入顯微鏡鏡筒，稱之為第一影像 (the primary image)，隨後目鏡會再聚焦並放大第一影像進入觀察者眼中。

2. 放大倍率、孔值與解析度

初學者總會問顯微鏡的放大倍率。雖然我們可以將影像放大兩千倍，卻會喪失細微與銳利度以致於讓影像無法派上用場。理論上，當我們愈接近銀幕時，影像會愈大，但是過度接近時，光點卻會變得更大，影像也越模糊，這種無效的放大就叫做“空放大” (empty magnification)。

當點狀光源 P 發射出的光線經過物鏡時，只有部分的光線會經由孔隙進入，當孔隙愈大時，P 點發射的光有愈多的部分可以進入，P 點的影像就可以有愈多愈精準的部分被呈現。因此，解析度可以說是被鏡子所允許進入的光線多寡的程度，而這個進入光線的分率，我們就稱為孔值 (numeric aperture)。當孔值 (NA) 愈大，解析能力愈好。NA 值被刻印在每一座物鏡上，並且扮演著非常重要的角色，它決定了辨析物體的能力以及照明的強度。

從顯微鏡玻片上的檢體透出的光線，穿過介質（空氣或油）再進入物鏡，進入物鏡的光線愈多，所看到的影像愈清楚。但是光線經由密度較高的玻片進入密度較低的介質（空氣），會產生折射與反射的現象，因此進入物鏡的光線量必須再乘以折射係數 n ，所以我們得到

$$NA = n \times \sin u \quad (2u \text{ 是入射光線的角度})$$

入射角的正弦值不會超過 1，所以孔值最大只會等於折射係數 n 。因此，乾的物體不會有大於 1 的孔值，而浸在油裡的物體不會有超過 1.52（油的折射係數）的孔值。假如我們讓折射係數等於 1，我們可以發現當孔值增加，經由物鏡的光線入射角





也會增加。

有效的放大倍數被物鏡的解析度所限制。解析度是指能辨別兩個很靠近的點的能力，而這個最小的距離是由孔值與入射光波長來決定

$$r = \lambda / 2 NA$$

λ 是指入射光線波長， r 是指可以辨別兩點的最小距離，因此，當孔值增加時， r 會減小，同理，當入射光波長增加時，解析度會變大。

光的繞射是指當一束平行光線通過一開口狹縫時會出現互相干擾的現象。若兩股波都在同一波相，則波峰跟波峰相融合，波谷跟波谷相融合，彼此互相增強，因此光強度增加。反之，若兩股波不在同一相，則波峰與波谷相合併而抵消，彼此相互干擾的結果造成光強度下降。當透鏡有較大的孔隙時，可以允許高度繞射的光進入，因此，高的孔值可以得到較好的影像。

聚光鏡的孔值也同等重要。聚光鏡的孔值必須大於或等於物鏡的孔值，細胞遺傳學家使用顯微鏡時要求又有高消色差與平面的光線，若是聚光鏡的孔值小於物鏡的孔值，光波會變得較不獨立而互相干擾，致使解析度下降。因此，顯微鏡的解析度有賴於物鏡的孔值，物鏡的品質，介質以及聚光鏡的孔值。

解析度不是顯微鏡唯一重要的指標，對比也很重要。光有解析度沒有好的對比，影像也是沒有利用價值，例如，在最好的解析度下，透明的物體仍舊看不清。因此，最好的情形是能在解析度與對比之間取得平衡。

6.1.2 透鏡的特性

1. 視野彎曲

由於透鏡表面呈球形，因此在觀察一個平坦的標本，若將焦點定在視野中央時，其視野的邊緣就沒有被聚焦到，結果視野中央的影像很清楚，而邊緣的影響逐漸模糊，稱為“視野彎曲”，當球像差很大時，視野彎曲的缺陷會特別顯著。

2. 視野深度

所有的透鏡會聚焦在某一個特定的距離範圍之中，這個可以讓物體不需微調就能



好好呈相的距離範圍就稱為該透鏡的視野深度。當孔值愈大時，視野深度就愈小。視野深度幾乎在高倍的油鏡透鏡中是不存在的。視野深度可以藉由關閉聚光鏡虹彩光圈 (condenser iris diaphragm) 而增加，有效地降低工作孔值，但會犧牲掉解析度。

3. 工作距離

透鏡的工作距離是指物體的最低點和物體對焦後的距離。當透鏡的放大倍率增加時，工作距離就會減小。在使用高倍顯微鏡時就必須特別注意不要讓物鏡和載玻片發生碰撞。此外，在使用低倍物鏡尋找目標時，也不要把距離調得太小，以免當你旋轉物鏡台時，讓其他的物鏡也沾到油，因此，在每一次使用完油鏡後，都應將物鏡及載物台擦拭乾淨。當工作距離很小，小到蓋玻片的厚度超過工作距離時，是不可能將物體聚焦的。

4. 放大倍率

透鏡的放大倍率是由鏡筒長度（物鏡後面的焦點平面到第一影像的距離）以及焦距（透鏡表面到光線聚焦的點）。

$$\text{放大倍率} = \text{鏡筒長度} / \text{焦距}$$

一般顯微鏡鏡筒長度為 160 mm，標準的十倍物鏡 (10X) 的焦距為 160/10 或者 16 mm，而對一個焦距為 4 mm 的透鏡而言，其放大倍率就是 160/4 或者說是 40 倍。大部分的消色差油鏡的焦距為 1.8 到 2.0 mm。

5. 固定物鏡焦點 (Parfocal lenses)

大部分現代化的顯微鏡在轉換物鏡時，僅需要以細調節輪作微調，焦距相同的透鏡就稱為“parfocal lenses”，若顯微鏡的焦距沒有都同調，可以請顯微鏡廠商作調整。

6. 油鏡透鏡

先前已經討論過，透鏡的解析度會隨著孔值增加而增加，根據 $NA = n \times \sin u$ 的公式，空氣的 n 值為 1，若我們能增加 n 值，就可以增加孔值及解析度，要增加折射率 n 值的方法就是在蓋玻片和鏡子之間加上一滴的油或水。

光線在穿過不同折射係數的介質時會發生繞射，所以當光線穿過玻片進入空氣





時，光線會生繞射而遠離透鏡，孔值其實就是光波進入透鏡的比例，所以如果我們可以想辦法讓入射光波增加，孔值和解析度就會隨著增加，這一點可以藉著在蓋玻片和物鏡中間添加一些折射率相仿的物質來達成目的，蓋玻片的折射率為1.51~1.56，而油鏡油的折射率在23°C時為1.515~1.520。就實際操作時，油鏡在沒有油鏡油的輔助時，解析度會因為空氣的低折射係數而不好；同樣地，若使用的油鏡油其折射係數太高或太低，解析度也是會被犧牲掉。所以，在使用油鏡時，務必遵守鏡頭上的標示，使用合適的油及載玻片。

6.1.3 透鏡標示

一般的物鏡上頭通常會有以下的標示。

- (1) 放大倍率：可能是一個完整的數字或是比例，例如100或100:1。
- (2) 鏡筒長度（以mm表示）：焦點平面到第一影像的距離。
- (3) 蓋玻片的厚度：

通常可以在鏡筒長度後面看到這個數字，例如“17”表示應該使用厚度0.17 mm +/- 0.01的蓋玻片；“0”則表示不需要使用蓋玻片；“-”表示不管有無使用蓋玻片都不會改變解析度。

- (4) 孔值：通常標示在放大倍率之後，例如1.30。
- (5) 對顏色及平坦度的校正值：

舉例而言，一個標示為170/0.17 Pl Apo Oel 100/1.32的透鏡代表它是用在長170 mm的鏡筒，要使用厚度0.17 mm的蓋玻片，具平面視野 (flat field)，是個高消色差油鏡，配合油鏡油使用時，可以有100倍的放大效果以及1.32的孔徑值。其他的符號代表廠牌名稱、透鏡序號及透鏡焦距長。HI表示應浸入油中，WI表示浸入水中，Ph後頭加一個數字表示鏡子可作相位對比；數字表示相對應在聚光鏡環上的數字。Ultrafluor (Zeiss) 表示該透鏡針對UV光波長作過校正，Fluotar (Leitz) 及Neofluor (Zeiss) 表示氟石透鏡。若透鏡上沒有特別註明是消色差或是高消色差透鏡，就表示為消色差透鏡。

6.1.4 聚光鏡

聚光鏡若使用得當，可以將光線聚焦在目標物上，使得週邊的光線不會互相干擾；可調式光圈設置 (iris diaphragm) 可以調整聚光鏡的工作孔徑，這不是用來加強照



明，也不該被過度調整以至於離它的最高點太遠。如同物鏡一樣，聚光鏡的透鏡上通常會標明它是消色差物鏡還是高消色差物鏡，也會註明它的孔值。此外，不同的照明有不同的聚光鏡透鏡可用（明視野透鏡、暗視野透鏡以及相位差透鏡）。明視野聚光鏡通常有一個主要的區域以及一個 swing-in lens，swing-in lens 會校正聚光鏡在使用油鏡時的孔值，因為使用油鏡時會需要不同的孔值以獲得足夠的光源。有些顯微鏡還具有專為油鏡設計的聚光鏡，不過效果並沒有很顯著的差異，除非是要做非常精密的觀察。

調控聚光鏡的孔值是個很重要的步驟。大的孔值可以有高的解析度，但會犧牲掉對比值，在兩者當中取得協調才能獲得最佳的影像。當目鏡和聚光鏡的孔值一樣時，可以讓光線各自獨立而得到最好的解析度，如果物體具有高對比性，那麼可以把孔徑調大，如果物體的對比性不高，例如染色不佳的玻片，就必須把孔徑調小以增加對比性，如此一來就會犧牲掉部分的解析度。當孔徑調到最小的時候，沒有被染色的染色體說不定也可以被看到，可以觀察它的分散及分裂係數，但是解析度就會太低以至於無法分析該染色體的品質。同樣地，當聚光鏡調到最低時，沒有被染色的部份也可以看到，雖然對比增加了，但解析度也跟著降低了。

6.1.5 目鏡

由物鏡在顯微鏡筒中形成的第一影像會由目鏡再更進一步放大，目鏡是由兩個平凸透鏡所組成，一個是物透鏡 (field lens)，一個是目透鏡 (eye lens)。物透鏡 (Field lens) 的目的是減少進入目透鏡 (eye lens) 的光線的斜角，這樣一來，目透鏡 (eye lens) 就不用很大片，在兩者之間的是一個固定的調節鈕 (field stop)，這個調節鈕必須把目透鏡 (eye lens) 的螺絲鬆開往裡頭看才看得到。這個調節鈕可以和物鏡同步對焦，並且，就如同在顯微鏡底部的調節鈕一般，這個調節鈕也會限制視野。最簡單的目鏡有兩個平凸透鏡以及一個 field diaphragm，這樣組合稱為“惠更斯目鏡 (Huygens eyepieces)”。另外有一些比較複雜的目鏡是專門設計來配合高消色差物鏡，這些叫做補償目鏡 (compensating eyepieces)，這種目鏡可以矯正散光以及側邊的相差。

使用顯微鏡時還有一些目鏡特別是聚焦在比較高的位置，目的是方便戴眼鏡的人使用。擁有某些眼疾的人使用顯微鏡時必須配戴眼鏡，Zeiss 有一套簡單的方法可以評估你是否需要帶著眼鏡來看顯微鏡：你先用手拿著你的眼鏡，在一個手臂的距離透過你的眼鏡觀察一個物體，如果你轉動眼鏡時物體的影像不會變形，那就不需要帶





著眼鏡看顯微鏡，因為目鏡自然會幫你對焦；反之，若你發現物體的長度和形狀會改變，那麼你就需要帶著你的眼鏡觀察顯微鏡。目鏡有所謂的“眼點”（eyepoint），這是光線匯聚的點，我們應該把眼鏡擺在這個點上。在目鏡上方拿一張白紙，上下移動時會看到一圈光，當這圈光縮到最小時，就是所謂的眼點。如果你有散光的話，使用顯微鏡時你就必須配帶你的眼鏡。

目鏡也有許多不同的放大倍率，但細胞遺傳學家最常使用的倍率是 8x, 10x, 以及 12.5x。物體的總放大倍率是將目鏡及物鏡的放大倍率相乘所得到的。舉例而言，一個 100 倍的物鏡配合一個 10 倍的目鏡使用時，物體就會被放大 1000 倍。有些細胞遺傳學家會使用特殊的目鏡來放大物體，這種稱為“optovar magnification changer”或“tubal factor”，在這上頭的數字（例如 1.0, 1.25, 1.6, 2.0 等）就必須再乘上去才能得到真正的放大倍數。為了避免空放大，要記住物體的放大倍數不可以超過物鏡孔值的 1000 倍。舉例而言，一個 100 倍的油物鏡擁有 1.25 的孔值的話，就不應該使用會讓放大倍數超過 1250 的目鏡，也就是不可以使用 12.5 或以上的目鏡，否則影像不但會不清楚，還可能會出現人為誤差。

在目鏡上頭的標示包括有放大倍率（8x, 12.5x, 等）；C, K 或是 comp (compensating eyepieces for flat-field objectives)；一個符號像是一對眼鏡（表示聚焦位置較高的目鏡，適合戴眼鏡的觀察使用，不過其他人也可以使用）；pl (plat field)；W (wide field, 在低倍數下掃描物體時很方便)；以及 field-of-view 數字（看得見的視野直徑），在以前，目鏡可以用來調整物鏡的不足，但現今，使用 infinity-corrected lenses 即可。

6.1.6 同源系統 (Homogenous)

除了物鏡、目鏡以及聚光鏡外，時常被忽略的載玻片、封片膠、蓋玻片及油鏡油等等都應該被視為在這個系統裡頭。就像先前提過的，光線穿過較緻密的介質進入較不緻密的介質時，會發生折射與繞射。因為 $NA = n \times \sin u$ ，而正弦值又不會大於一，所以孔值 NA 最大就是等於 n 值，也就是介質的折射係數。Cedarwood 油的折射係數是 1.515，水是 1.33，空氣是 1，因此，當油鏡在空氣中或不適當的介質中被使用時，孔值就會被限制，而它的解析度和清晰度就被犧牲掉了。油鏡油的使用應該根據使用手冊上的建議，通常使用折射係數 1.515~1.520 的油，而封片膠的折射係數約在 1.44~1.515 間，之所以會這樣是因為被切片的物質容易消失在和它本身折射係數 (1.530~1.540) 相仿的介質中。然而，被染色的染色體並不會像組織一樣，通常都夠緻密以至於封片膠的介質可以被允許和鏡片相仿。



6.1.7 機械載物台

機械載物台對細胞遺傳學的研究而言很重要，它可以將玻片緩慢地水平或垂直移動，讓細胞遺傳學家可以做一個系統性地預覽及掃描細胞中間期 (metaphase)。載物台上應有刻度的記號以便於以後可以再找到已知的細胞中間期 (metaphase)，並可以再照像或分析。現今的顯微鏡都會附有游標尺，有些載物台是可以移動的，但是游標尺不該被移動，否則下一次使用時，原本的座標都會被改變，那麼就失去做紀錄的意義了。

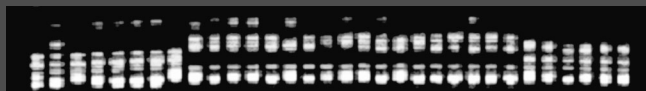
6.1.8 顯微鏡的實際操作

顯微鏡通常置放在桌上，配合使用者的高度調整座椅高低，使用者不應該彎腰駝背，或者可以使用專門的橡膠墊墊高顯微鏡。放置顯微鏡的房間應該盡可能地保持無塵並避免震動，如果顯微鏡可以放在門窗緊閉的房間裡，將可以減少顯微鏡的清洗次數。房間內光線應該要充足，燈光的強度最好能有在顯微鏡附近的旋鈕以調控光線強度，方便螢光顯微鏡的操作。如果可能的話，顯微鏡室最好與染色體準備室分開來，因為在進行染色體配置時所需的冰醋酸具有腐蝕性，會傷害鏡頭以及顯微鏡上金屬的部分。

6.1.9 顯微鏡的清潔

顯微鏡不使用時應套在防塵套裡頭，灰塵容易跑進顯微鏡裡頭，或者和聚光鏡或載物台調節鈕的潤滑劑混在一起，這些情況都需要昂貴的專業清潔費用。灰塵通常不會對物鏡造成影響，除非灰塵跑進鏡頭裡，物鏡平時應該裝在附上的專用塑膠瓶裡頭。目鏡應保持遠離灰塵及油漬，視野光圈 (field diaphragm) 也要時常清潔，因為它的開口也在視野裡頭，並且會跟著影像一起對焦。顯微鏡其他部分的灰塵對影像的影響較小，不過顯微鏡仍應該常常清潔，周圍的工作環境也應該用濕布或酒精清洗，以免在拍打時揚起的灰塵會跑進顯微鏡裡頭。

物鏡的清潔只有在被弄髒或者有指紋時才建議進行，錯誤的清潔方法只會把鏡頭弄得更糟。在物鏡上的髒汙會讓影像嚴重變形，此時應該取一片拭鏡紙沾上一點綠皂溫和水或是二甲苯等溶劑，就可以輕易地拭去鏡頭上的髒汙。不要在拭鏡紙上沾過多的二甲苯，否則二甲苯可能會滲入透鏡內部而傷害到複合透鏡的膠合層，有時候用棉棒較容易進行清潔工作，但是一般市售的棉花棒大都是採用短纖維棉花為材料，很容



易掉落棉絮，應使用指定購買的長纖維棉花，自行捻製棉棒較佳。使用有溶劑清潔時，不要使用塑膠棉棒，溶劑可能溶解塑膠棒而汙染鏡頭。

目鏡經常接觸使用者的眼部以及承接空氣中的灰塵，檢查目鏡是否乾淨可以在觀察顯微鏡時，用拇指和食指旋轉目鏡，目鏡上的髒汙和指紋會隨著旋轉。清潔目鏡可先用吹球吹去灰塵，再以拭鏡紙擦拭目鏡上方的透鏡，若仍無法擦去汙物，需將目鏡取出，用拭鏡紙擦拭目鏡底部的透鏡，並用吹球吹去灰塵或棉絮。請特別注意，當你抽出目鏡時，必須立刻在鏡筒開口處覆蓋一張拭鏡紙，以避免灰塵或棉絮掉入鏡筒內。

聚光鏡上層經常會積聚灰塵，也必須常常用吹球吹去灰塵或以拭鏡紙擦拭。盡量不要試著拆卸顯微鏡以進行內部的清潔，實驗室用的顯微鏡應該由專業人員每年或每兩年進行專業的清潔工作。

6.1.10 寇培勒 Kohler 照明 (Kohler Illumination)

Kohler 照明是將光源燈絲影像聚焦在聚光器底下的光圈開口處，然後經過聚光鏡和物鏡，將燈絲影像投射到物鏡的後方焦面，由於燈絲影像的焦面不是在檢體平面上，因此顯微鏡的觀測也不會出現照明不均勻的情況。目前含有內建光源裝置的顯微鏡，都採用此種照明，並使用低電壓高亮度的鹵素鎢絲燈；並且兩片聚光透鏡之一，採用毛玻璃表面，在各種不同的放大倍數中都能得到均勻的照明。

使用高級顯微鏡時，Kohler 照明系統和聚光條件必須調整在適當的位置，才能發揮最大的放大效果。

- (1) 將玻片檢體放在載物台上，並調整焦距使影像清晰。
- (2) 將光源出口的視野光圈調到接近最小的位置。
- (3) 轉動載物台底下的聚光鏡焦距調節鈕，使視野光圈的開口呈現清楚的邊緣。
- (4) 調整聚光鏡的兩個中心調節螺絲，使視野光圈影像位於物鏡視野的中央。
- (5) 打開視野光圈，使光圈邊緣接觸到目鏡視野的邊緣，若光圈影像尚未完全調中，可重複步驟 (4)。
- (6) 將視野光圈打開到正好超過目鏡視野的範圍，並注意不要將視野光圈開得太大，否則多出來的散亂光線會使影像模糊。



- (7) 調整聚光鏡底下的光圈，控制光束進入物鏡的光錐角度 (N.A)，視野的亮度隨之改變，找出最適當的明暗對比和亮度。
- (8) 平常使用之教學顯微鏡可能沒有視野光圈裝置，可以將聚光鏡調整在距離玻片下 1~2 mm 的位置，使聚光鏡的孔值接近最大，然後用聚光鏡的可調光圈調整適當的光強度。

6.1.11 濾片

爲了觀察經由傑姆沙 (Giemsa) 染色後的玻片，我們建議使用綠色的濾片，它可以增加對比性並且加強染色的部分。有許多種的綠色濾片可供選擇，除了傳統的 Wratten 綠色濾片外，還有專供螢光顯微鏡使用的濾片，像是 530 nm 或 500 nm，546 nm 干擾性濾片，它們可以單獨或合併使用。

6.1.12 浸漬油 (Immersion oil)

一般來說，使用顯微鏡所附的油，一個例外是，當一個光學很好的油會加速未加蓋玻片染色的褪色。很多的實驗室使用 Cargille A 型或 B 型的油或兩者的混合，混合常可得到最令人滿意的厚度，然而，有些油的混合，尤其是不同廠商的，常會太混濁反而無法使用。解析油是另一種不會引起褪色的油，一個合適的油是很關鍵的，在同一個顯微鏡下因鏡頭不同使用的油可能不同，不可使用含 PCBs (Polychlorinated biphenyls) 的油。

6.1.13 蓋玻片 (coverglass)

大部分實驗室，使用厚度 1 或 1~1/2 品質佳的蓋玻片，和封片膠形成的膜要越薄越好，有些人建議在封片膠乾掉前加一點壓力，蓋玻片和封片膠加起來要 0.17 mm 比較偏好，不用蓋玻片下分析及照像的實驗室需要確定他們的目標物在未用蓋玻片下有最佳的解析度。

6.1.14 載玻片 (slides)

就像蓋玻片對於目標物在光學上很重要，載玻片的厚度對於聚光鏡也是很重。High- NA 無色聚光鏡通常需要 1 mm \pm 0.05 的厚度。



6.1.15 目鏡調整

目鏡需依使用者調整，調整瞳孔間距使得視野只有一個而不是兩個，如果焦距在兩個目鏡下不同，找出有調焦距的目鏡，使用另一個目鏡調整微調來聚焦。沒有調焦距功能的目鏡聚焦後，再調整有調焦距的目鏡的焦距，要使用顯微鏡照像的話需要調整目鏡上的標線，來讓影像在片子上有適當的焦距，標線的線需在目鏡上對焦，使用者的眼睛才能適應照像機，這在鏡臺上沒有標本時最簡單達到。

6.1.16 螢光顯微鏡 (Fluorescence Microscope)

許多現代的染色體染色及探針 (probe) 檢測技術需大量使用螢光，它們在使用波長較短的光如紫外線時會放出螢光。這些光源，如高壓汞蒸氣光、鎢鹵素燈、氬燈等，刺激螢光物質放出肉眼可看到範圍的螢光（紫外線顯微鏡並不屬於螢光顯微鏡）。實際作用如下：當光的量子打到螢光物質的原子，會作成電子的改變，一個或多個電子從一階跳至比較高能量的一階，再回到原來的基態時，會以光和熱的方式放出能量。因為有些能量以熱的方式流失，它放出光的能量比較低，因此比給予能量的光的波長短，所以肉眼便可見。

螢光顯微鏡和光學顯微鏡主要的相異處是光源不同，螢光顯微鏡是以波長較短的光源系統以及波長較長的接收系統，另外螢光顯微鏡需要刺激及隔絕濾片，刺激濾片只讓所要的短波光經過標本來刺激；隔絕濾片則過濾掉紫外線及藍光，只讓所要的光至肉眼或照片。每種螢光質有特有的刺激及隔絕濾片來到最佳的可見度，螢光顯微鏡可用發射光或投射光 (incidental light)，發射光順者一樣的光路徑如同光學顯微鏡，但是視野聚光器以暗視野聚光器取代。

這個聚光器，造成光線以銳角打到載玻片，使它們照亮標本但不通過標本，因此分開刺激及放出的光。投射光 (incidental light) 又稱做白光照明 (Epi-illumination) 或 Ploem illumination，使用目標物放出的光從一個目標物經過另一個目標物，然後刺激螢光物質，放出的光就會反射回來到肉眼或照像機。放出的光並不反射回來，而是穿過標本，白光照明的好處是喪失較少的光（曝光時間少，照片品質佳），排列較容易（沒有聚光器，不用一直重新對焦）以可以使用發射光或投射光 (incidental light) 而不用換聚光器。



6.1.17 光源

螢光顯微鏡有多種光源，也可能不會放出真的紫外線；許多物質會放出藍或綠放射線，紫外線的波長是300-400 nm，紫光自400 nm開始，是可見光波長最短的，當波長較長，光變成藍、綠、黃、橘、紅(700 nm)；在紅色光之後是紅外線，奎納克林(quinacrine)最大的螢光落在460-500 nm，所以是以藍光來刺激它。

最常使用為螢光的光源是高瓦數鹵素鎢、水銀蒸氣和氙燈，每個用不同的瓦數，一些用交流電和其他採取直流電，那些使用直流電有比較長生命。以下是螢光的光源：氙XBO75、150及450；汞HBO 50、100及200；及鹵素鎢12 V、100 W，汞100 W是常用的螢光顯微鏡光源，汞50 W也是常用。雖然這些光源在紫外光範圍很強，熱反射鏡可減慢因此而造成的褪色，鎢鹵素燈泡，是標準的透過光可被使用。氙光源現在是罕見的，並且被認為過時，螢光燈泡的一個共同的問題一閃爍；這通常是一次燈泡使用時燃燒不全造成，新燈泡應該至少被燃燒2個小時。當放一個新燈泡入顯微鏡，將腐蝕完全除去和一絲不苟地保持燈泡乾淨，不要以手指碰觸燈泡；燈泡如果看起來油油的，可以以酒精清洗。螢光燈是高壓下使用，應該小心對待，水銀溢出應該被立刻清乾淨。

6.1.18 濾片

螢光顯微和攝影的成功取決於適當的選擇濾片，激發濾片及隔絕濾片選擇取決於讓特殊染色螢光的波長，並且由染色發散的波長。例如奎納克林(quinacrine)由在460和500 nm之間波長激發螢光，發散在500和550 nm間的黃綠光，要激發需通過所有在460和500 nm之間的波長，或在範圍內的波長應該被使用。由標本散發的光，可能可以通過在黃綠範圍(510和550 nm)但完全阻隔在500 nm以下波長的隔絕濾片，從不需要的短波激發被分離。吡啶橘(Acridine)需要在500 nm和發散在530 nm。霍氏特(Hoechst)在365 nm被激發，發散在480 nm。

濾片由描述什麼部分的光譜是被吸收，或部份地被吸收的傳輸曲線所表示，多頻率的濾片，過濾大部分的光譜。帶濾光器設計為隔絕在一個指定的波長之下或之上的波長，譬如波長在546 nm的隔絕濾光器，短波通行濾光器(切斷濾光器)，允許在有些波長之下的波長通過，但並且同樣完全地阻隔了波長之上的長波長濾片(也是一種切斷濾片，通過在有些波長之上的波長和完全地阻隔了波長之下的波長)。



當激發濾片被使用，而通常長波濾片當隔絕濾片被使用。三色濾片允許同時三種不同的波長的光，和使用雙重顏色探針和對比染劑時被觀看。

Epifluorescence 需要在激發濾片及隔絕濾片外的第三種濾片，雙向色性的反射器 (dichroic reflector)，這是一種干涉鏡，類似於干涉過濾器，因為它反射指定的光譜範圍大部分光譜，並且幾乎完全地傳送其他光譜。這個反射器在透鏡之上，它反射需要的光下來至標本，和允許不需要的波長不被反射的通過它。

使用過濾輪與一部單色照相機，解決許多捉住小或微弱的螢光信號的問題。過濾輪控制刺激波長和放在顯微鏡與燈泡之間，這個雙向色性的鏡子及三向放射濾片通常放在標本之上的曲球和立方體之上，狹窄的放射允許各種染劑單獨地散發並且因為雙向色性的鏡子停留在一個位置，只有輪子中的刺激濾光器在動，圖像的排列是正確的。例如單色照相機調整每種光的亮度，分開地記錄三種不同顏色像三倍曝光。

6.1.19 實用忠告

在一間暗室工作，和使用高孔徑的物鏡〔高消色差物鏡 (apochromats)〕，螢光強度隨著孔徑的大小以指數地增加。低倍目鏡因為放大的的倍數而螢光強度指數地減少，因為螢光是發散的光而不是被折射的光，載玻片上的培養基及油的折射度不比 brightfield 重要。然而這些培養基的總厚度很重要，因為微弱的發散光不會穿過玻璃或流體，使用一個膜浸在油中的透鏡將減少光。

6.1.20 相位差顯微鏡 (Phase Contrast Microscopy)

薄的、未染色或染得很失敗的標本，可以以相位差顯微鏡看得更清楚。它們可以裝設在目前大部分的顯微鏡，在細胞遺傳學上有很大的用處，它們可以被用在培養組織實驗室的轉位 (inverted) 顯微鏡上看正在成長的培養以找玻片上的分布及分裂指數，相位 (Phase) 也可用在照得很淡的目標，如過度處理 C 色帶，傑姆沙染液 (Giemsa stain) 染得很淡的 R 色帶，相位差顯微鏡利用透明的物體因厚度的不同而造成光穿透時相位 (phase) 的變化，而這些變化當它的光徑被改變了四分之一波長時，可以被轉化成可見的強度的差異。



相位差需要在聚光鏡上放個相位環 (phase annulus)，它像黑色的玻璃中的透明圓環以及需要放在物鏡的一個相位板，它是一個玻璃盤有個環狀的地方的厚度和別的地方不同，這個透鏡中的環需要和聚光鏡放在同條線上，這可以用特殊望遠鏡的目鏡或是特別的裝備，蔡司氏 (Zeiss optovar)，讓它們聚焦在環及環形物 (annulus)，一旦它們聚焦後，調整聚光鏡或特別的扳手讓它們能符合聚光鏡的槽來排列它們，透鏡需個在聚光鏡上放不同的環，透鏡通常被做記號，指示聚光鏡上環上的位置。

在顯微鏡上加個相位需要買一個特殊的聚光鏡，一個或多個特別的 phase 透鏡，但物超所值，一個 10 倍物鏡來掃描及一個 100 倍物鏡來照像就很有用。

6.1.21 倒立顯微鏡 (Inverted Microscope)

Inverted microscope 有把標本放置物鏡之下的好處以便看培養瓶及培養皿的組織縱使有距離在細胞和容器蓋之間，倒立顯微鏡從下面看細胞，這樣會讓細胞乾掉，所以只能看一下，一個不昂貴的倒立顯微鏡在細胞遺傳學的實驗室很好用，尤其是維持長時間培養，在倒立顯微鏡，一個低倍物鏡對於正確審視培養的健康。和分裂活性及未染色的玻片就很有用。

6.1.22 記錄顯微鏡的圖片

分析染色體上的染色帶 (band) 的細節是細胞遺傳學照像的目標，因為最好的顯微鏡的最高解析度是 $0.2 \mu\text{m}$ ，需要在使用顯微鏡及照像來產生一個可以分析的染色體。

所有以上建議，在使用顯微鏡的狀況對記錄影像都很重要，以下 Kohler 照光法的步驟在曝光及拍攝都很關鍵。

- (1) 關視野光圈 (field diaphragm)，及檢查各聚光鏡的焦距及置於中心。
- (2) 打開視野光圈 (field diaphragm) 直到邊緣在視野中消失，這兩個步驟對於控制閃耀，刺眼及光線不均很有效。其他重要的元素包括調整 substage diaphragm 的安裝，調整目鏡的標線，使用和目標折射率一樣的浸漬油，適合的蓋玻片、厚度、管長、透鏡。



6.1.23 亮視野照相 (Brightfield Photography)

1. 濾光鏡

在 brightfield photography 中濾片有兩個用途：在彩色照片中改變光的顏色溫度，及在黑白相片中增加染色體的染色帶 (band) 的對比，在使用彩色顯微照像時，需注意光源的色溫，選擇適合的濾光鏡。

Davidson 建議在使用均染 G 帶時使用黃綠濾片 (560 nm)，在淡染時使用深綠濾片 (500 nm)，干擾濾片在這方面使用起來還不錯但是需要比較長的曝光時間。對於相位差顯微鏡 (phase contrast photomicrography)，建議使用 Kodak Wratten 濾光器 13、58、61，它們都是綠色，61 號是深綠色，深綠色濾光器建議使用於記錄 C banding，觀察目標通常無色的，最好以綠光調整，因此綠色濾光器是最好的選擇。

2. 照像機

對於內建照像機，顯微鏡的物鏡就是照像機的鏡頭。使用內建鏡頭的照像機，鏡頭需對準 eyepoint 來對焦目標，這個距離是很重要的。隨照像機和目標改變，許多照像機的製造商，有特定適應的器具來正確地裝設照像機。然後照像機就使用最大的 f-stop aperture 被調整無限遠，這種系統通常需降低放大倍率。

如果相機有移動式鏡頭，那個透鏡需移除，相機直接裝在顯微鏡上。這會改善影像因為它並沒有穿過很多東西，適合的光束分裂鏡 (splitter)，照像用目鏡，輔助的對焦望遠鏡都可接在照像機上來創造更清晰的照片。

傳統上大部分細胞遺傳實驗室使用 35 mm 的照像機，可以是和照像機是一體也可以是外加的。有可調式貝羅 (bellow) 的照像機，可以接受高品質顯微照相 (photomicrography) 4 × 5 英吋的底片。有可調式貝羅 (bellow) 的照像機，可以有很廣的放大倍率，4 × 5 英吋的底片有個好處是可以照拍立得，它們可以馬上用，不需要暗房或影像處理系統。

6.1.24 黑白相片特色

1. 顏色敏感度

顏色敏感度，是軟片不受處理過程改變的本身的特性。正色的底片對於綠和藍色



敏感，但不對紅色敏感。所以它可以對全部顏色敏感的紅色，全色底片處理來記錄所有的色調。大部分細胞遺傳實驗室使用全色底片，所以在沖洗及固定以前不需曝光於安全燈。

2. 對比

黑白相片，對比是黑白之間的範圍。在照染色體的帶需要高對比，所以很多實驗室使用 Kodak Technical Pan2415，一種可因顯影而有不同對比的細質底片。

3. 顆粒

顆粒是對光敏感銀鹽結晶在底片藥水的體積，結晶越大，顆粒越大，對光越敏感愈大，細粒底片的解析度較高。

解析度是分辨兩點的能力，它可以照表中的平行線來決定。一般來說，慢底片的解析度高。Kodak T Max 100 和 Agfapan25 是解析度很高的底片，有 65 lines/mm 的解析度，Kodak Technical Pan 2415 有 55 lines/mm 的解析度。

4. 銳利度

這個詞指底片的清晰度，在亮暗之間，黑白的梯度越窄，越敏銳。光的敏感度是在測量底片的速度，快速的底片對光敏感，白慢底片敏感度低。速度以 ASA，或 DIN number 表示。

照有條紋的染色體最好有高解析度，高銳敏度，小顆粒及高對比，這些通常有低的 ASA/DIN 值。

5. 容量

新鮮的底片結果最好，使用前可以被儲存在冰箱或冷凍庫。在拆封前先在室溫下放幾個小時，避免濕氣聚集在底片上，讓底片發揮它最大的功用。

6. Daylight bulk film loader

Daylight bulk film loader 很便宜而且物超所值的儲底片 35 mm 的底片夾可以重複使用，但最後還是在被彎曲時會漏光，而且會從光隔板透過灰塵。



7. Bracketing Exposures

要以不同的顯影劑和底片而得到有最佳的照片，需用自己的照像機以 Bracketing Exposures 方式測試。

對於一體成形的相機，改變 ASA 來測試；對於外加的相機，使用定時曝光。

- (1) 設定製造商推薦的 ASA。
- (2) 設定高一階的 ASA，曝光一個鏡頭，其他設定都一樣。這樣曝光是之前的一半。
- (3) 設定低一階的 ASA，曝光一個鏡頭，這樣曝光時間是兩倍。
- (4) 在推薦的時間沖洗，找這三個最佳的曝光。

6.1.25 螢光顯微照相底片 (Fluorescence Photomicrography Films)

1. 黑白底片

因為在螢光顯微照相時曝光時間要夠久，所以底片要選 ASA 值高的。相互作用的失敗（當底片在某種程度的長曝光下沒有產生深色調）只在光量不足的狀況下。很多實驗室偏好在螢光下使用 Kodak TP 2145——一種中等 ASA 的細顆粒底片。7 個實驗室中有 5 個使用這種底片用來做 Q banding。另一個使用 Agfapan APX25，另一個使用 Ektachrome P 1600。

黑白底片的 ASA 可以用某些顯影劑加強，如 Diafine，它把 400ASA 加強至 1600。這可以降低曝光時間。

2. 彩色底片

彩色底片可以使用各種不同的顏色，當染色體以吡啶橙 (acridine orange) 染來記錄原位探子 (in situ probe) 的結果。它可以拿來做教育用的片子，一般建議先試照幾張來找到最佳的效果及調整設定。

柯達建議使用專業的底片因為如果好好處理，這會有最佳的色彩平衡。底片要冷凍到使用的前兩小時，然後在拆封前放在室溫。然後很快使用完來保持最佳的結果。全部的專業底片可能需 push-processed，這樣可以增加速度和對比。尤其是長曝光時間更需要，如螢光顯微照相 (Fluorescence photomicrography)。要增加片子的速度，調高 ASA 或高一階，然後如平常般照相。要處理已 pushed 的彩色照片，要告訴處理的



實驗室它們是如何曝光的。在很微弱的螢光下，ASA 要高兩階。這樣濃度會下降，不過如果能增加很弱的螢光就可被接受。在微弱螢光下可以手工曝光 20-90 秒。

在配合照片的色彩、平衡和光源有許多變數，如中性濾片、電壓、燈泡瓦數，曝光時間。可以詢問顯微鏡代表關於燈泡的資訊，然後試各種不同底片和濾光器組合的結果，來達到最好的結果。另一個方法是，有人建議使用彩色的投影片這樣的顏色最真，甚至在需要印出來時，使用原投影片的彩色對比的指示來印，可以有最好的效果。

3. 測光尺

內建式照相機有三種測光尺：photomultiplier，photodiodes，硫化鎘。因為 Photomultiplier 對弱光相當敏感，最適合用於螢光顯微照相。有時候需要比平均量尺超負載一些，因為平均量尺是將全部的顯微鏡視野的光度平均，再依據曝光時間計算的測試值，有些系統是僅僅使用中央的小區域點測光。

如果在使用螢光顯微攝影時要有理想的結果，可將亮的染色體置於這個點上。Zeiss Axiophot 及 Leitz MPS 4652 有這種具有點測光的 photomultiplier 測光尺，Leitz Orthomat E 具有移動式點測光。

6.1.26 處理黑白底片之補給，儀器及反應劑顯影槽

各種尺寸的塑膠或金屬槽可處理二到六捲三十五釐米的底片，柯達公司製造一種底片 apron，可以簡單而不出錯的不用片捲就可以沖洗底片。

1. 顯影劑 (Developer)

底片的鹵化銀曝光後會形成隱形的影像，顯影劑打斷曝光的晶粒，使氧化銀的黑色顆粒聚集在一起，將影像顯現出來。

2. 停止浴 (Stop Bath)

以水浸洗，將顯影劑稀釋洗掉。商品化的洗劑內含醋酸及指示劑，實驗室也可自行調製百分之一濃度的醋酸備用。醋酸可以中和顯影劑，如果不使用洗劑，鹼性的顯影劑會提高定影劑的 pH 值，使之壽命縮短。





3. 定影劑 (Fixer)

乾性定影劑含 sodium thiosulfate，油性定影劑又稱快速定影劑，含硫代硫酸氨 (ammonium thiosulfate) 及一種乳劑硬化劑。顧名思義，快速定影劑可以迅速的移除為顯影劑的鹵化銀。底片定影劑的混製濃度應為相紙定影劑的兩倍，Resin-coated 相紙的定影時間比普通相紙快很多。如果相片定影過久，thiosulfate 會破壞相紙，使之難以移除。定影劑可以重複使用 10 或 11 次。加入已商品化的 hypocheck 溶劑後如果形成沈澱物，則表示定影劑的藥劑用罄，另外請向製造商洽詢消耗率。

4. 沖洗 (Washing Aid)

Hypoclear、Orbit Bath、Perma Wash 等可縮短沖洗時間，因他們可以和一些化合物鉗合，使之容易被洗去，讓負片更能保存。

5. 濕化劑 (Wetting Agent)

正確的使用 Kodak Photo-Flo 或其他廠牌的产品，可以讓底片乾燥時不會形成條紋。

6. 貯存溶劑的器皿

可使用聚乙烯或棕色玻璃瓶，有些聚乙烯瓶會隨著內容物的使用而壓扁，避免溶劑氧化。同一個瓶子不可以交替盛裝顯影劑及定影劑，因為即使很少量殘存的定影劑也會污染顯影劑，混製一加侖的顯影劑，要分裝成四個夸特瓶，排除空氣後蓋緊瓶蓋。

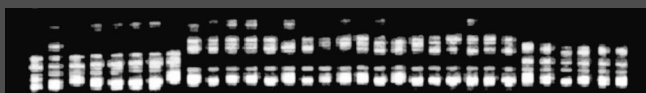
6.1.27 處理黑白膠捲設備及反應劑處理槽

不管是塑膠製或是金屬製的處理槽，都至少要能放置 2-6 捲 35 mm 的底片，柯達甚至有一種特殊的 apron，可以降低將底片放置在不鏽鋼捲軸的技巧要求。

1. 化學藥品

顯影劑 (developer) 鹵化銀是底片中主要顯影成分，顯影劑打破其中的結晶並使得氧化銀的黑粒子聚在一起。

停止浴 (stop bath) 利用水沖洗將顯影劑稀釋並沖淡，商用販售的产品中有醋酸跟一個指示劑 (indicator)，或用實驗室裡自行備製的 1% 醋酸溶液，這些成分可以中和顯



影劑的成分。如果不使用沖洗劑，固定劑的壽命將會因為酸鹼值的上升而縮短。

定影劑 (fixer) 乾式固定劑中含有硫代硫酸鈉，而水狀固定劑又稱快速固定劑，含硫代硫酸銨及一種乳狀硬化劑。可以快速地移除未暴露的鹵化銀，底片所需要的固定劑濃度可藉由混合而達到印在紙上的兩倍。除此之外有樹脂附著的紙張所需的時間較普通紙短；如果固定時間太長將會使鹵化銀更難由紙張中移除，一般來說固定劑可重複使用 10-11 次，內含的低濃度顯示液將會在使用盡時就產生沉澱來顯示或洽廠商來確定其壽命已盡。

2. 沖洗 (Washing aid)

Hypoclear，Orbit bath Perma Wash 或者是其他沖洗液都可以增加負電性，以利螯合劑與化合物結合之後再順利被洗出。

3. 濕化劑 (Wetting agent)

4. 溶液的儲存

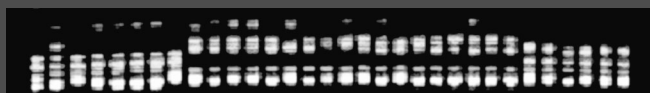
聚乙烯瓶或黑玻璃瓶皆可，有些聚乙烯瓶會在內含物用盡時扁掉，以確定不會有氧化的現象，這種瓶子不利於重複使用因為殘存的固定劑會污染處理槽。

6.1.28 底片顯影的步驟

在全暗房（不開安全燈）狀況下，將底片由膠捲中移出放在捲軸上，先開燈練習之後在暗房裡才能熟練的操作此動作。稍微轉一下好確定底片被適當地捲在不鏽鋼捲軸上，如果邊緣凸出來代表捲得不夠好。此時要將突出的部分抽出再重新繞到不鏽鋼捲軸上，這個動作可以避免底片上有未被顯影出來的部分，使用柯達特殊的 apron 可減少這樣的情形。

1. 顯影

好的顯影需要適當的溫度，正確的時間控制及標準化的晃動液體步驟。理想的溫度是華氏 68 度（最高是 75 最低是 65 度），合適的溫度是決定性的關鍵。提高晃動頻率可以增加顯影度但降低解析度，因為光學放大器 (photomultiplier) 對低光度相當敏感所以最適合用於螢光攝影必須要使用一平均分光器 (averaging meter) 才能將光線平均分布於整個視野，不論如何，有些系統中在視野中心仍有一中心點，置於其中的亮





染色體適合螢光攝影，Zeiss Axionphot及Leitz MPS4652就擁有中心點的光學放大器，Leitz Orthomat E甚至擁有一個可移動的中心點衡量。

最適於顯影的步驟如下：

- (1) 將處理過的不鏽鋼捲軸，置於一乾淨乾燥的處理槽中並將蓋子移開，倒入同溫度的先洗液 (prewash)，至少一分種後將先洗液倒掉，並很快地關掉計時器。使用此液體的目的，是爲了使溫度一致，並先濕潤乳膠感光劑，好讓顯影過程順利。如果未先處理過，大部分攝影書籍會建議先將捲軸置入含顯影劑的處理槽中，或稍維持處理槽的角度，再慢慢倒入顯影劑馬上計時，並按照選用之顯影劑上的指示操作。
- (2) 如果使用的是不鏽鋼附防水蓋的處理槽，可以翻轉混合後再慢慢移除泡泡，每30秒重複同樣的動作並持續5分鐘。搖動可以確保顯影劑均勻地跟底片接觸，搖動的方式有很多種，但搖晃太少或太多都會造成泡泡的形成，太多會使得底片邊緣處過度顯影。輕輕地以鐘擺狀移動可以避免過度顯影的情形，在計時器響前15秒要快速倒掉顯影劑，再於處理槽內注入水，並輕輕搖動然後再慢慢倒掉，或加入停止液約10秒後再流掉。

2. 定影

按照選用底片的指示時間進行定影，千萬不要留置於定影劑中太久，以免負像會被漂掉。底片將因結合物飽和，而無法移除定影劑，通常固定所需的時間是水浴的兩倍，可先測試確定。

3. 洗劑

加入洗劑前，先將底片放在流動的水中沖洗，可增加固定劑的移除，同樣地按照指示時間來操作。

4. 最後濕潤

底片將置於一華氏68-72度間的大量清水中濕潤，因爲固定劑比重比水大，所以每次潤濕的動作都要將水完全倒出後，固定劑才不會殘留處理槽底。市面上有不少速成底片的洗劑可用，此外也有底部含出水孔的聚乙烯槽可用，如果不用特殊洗劑30分鐘的反覆清水沖洗是必要的，但過度濕潤會造成粒子變大或聚成塊，使得影像的銳利度下降。



5. 濕化劑 (Wetting agent)

使底片的乾燥不產生紋痕，Kodak Photo-Flo 在最後濕潤後，加入處理槽不超過 60 秒即可。之後將底片移出處理槽，小心地操作因為此時乳化顯影劑很軟，用橡膠滾軸輕輕地移除多餘的水分。

6. 底片的乾燥

在無塵區晾起底片，此時若黏到灰塵，如果不把乳化顯影劑刮掉就很難移除，所以可用乾燥櫃，不要讓水由底片濕處流過乾燥處，因為可能造成礦物沉澱而使得沖印時影像的扭曲。

6.1.29 沖印、暗房設備

放大器：

利用透鏡將底片影像聚焦並投射在感光紙上，可分成聚集 (condensor) 跟分散 (diffusion) 兩種，分散型放大器 (diffusion enlarger) 是一片霧面透鏡可使光線穿射過負片，折射度會使光線分散成不同的方向，所以有的光線不會穿過底片，而有的會造成光線散失，這種沖洗出的照片比較適合人像攝影而不是染色體攝影。而聚焦型放大器 (condensor enlarger) 是由兩片圓弧面相對的透鏡構成，聚集並控制光線完全穿透過底片幾乎沒有散失。通常使用 75-1000 瓦的 Tungso 燈源，對於科學實驗來說較為適合，放大器的規格必需與相機鏡頭配合才能維持品質，同時要和相片尺寸一致，通常用染色體攝影顯微鏡頭來拍攝。有的放大器有好多組透鏡可供使用，這時即可以依照上述所言來選用，此外最強的光源必須集中在底片正中央。

1. 底片載體

通常必須要跟底片尺寸一致，常用的就是 35 mm。

2. 放大架

放大架是用來放置代沖印相紙的架子，價格不一，有固定的外框結構與可調式葉片，可單一或多次沖洗，甚至可以在同一張相紙上列印多張，8 × 10 英吋是最大的尺寸。如果放大器有自動對焦功能，放大架高度至少要維持一英吋才能進行自動對焦。



3. 放大對焦器

20倍放大是最適合的。

4. 計時器

如果選用光密度計 (densitimer) 可針對不同底片及光度條件做設定。

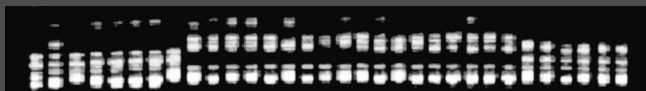
5. 安全燈

因為相紙是與天然色調相近的，通常需要用紅、黃、黃綠光安全燈，通常要隔4呎以避免相紙變霧。可以拿一個硬幣放在未曝光的相紙，然後放在安全燈下曝光3-4分鐘，之後以正常程序處理，如果硬幣下相紙變白而其餘部分仍是灰色的，那麼這個安全燈就不可以使用。安全燈通常不是絕對安全的，特別是使用不正確的濾光鏡時，或燈泡瓦數太高，或光源太靠近相紙，或曝光時間過長都可能造程過度曝光。用於黑白相紙的安全燈通常是紅黃光，或是黃綠光源，或淡黃色15瓦的鎢絲燈泡。但黃燈泡是最好的，不過通常依照說明書指示，選擇燈泡比較恰當。通常暗房的濾光鏡會耗損，所以一段時間就必須再重新檢查。

鈉蒸氣燈可以持續的作為暗房光源，因為它會持續地發出黃光。附近的單一光源一對黑白顯影比較不敏感而不會造成曝光，但肉眼下仍可看得很清楚。濾光鏡也可換成X-光機使用的燈源，吊在天花板上的燈通常會比固定的燈花費多5-6倍，但卻更方便也比較安全。

6.1.30 穩定步驟器

將放到處理槽中的捲軸，與濃縮的活化劑接觸，快速地造成顯影之後。再以捲軸使得中和停止，及穩定的步驟均勻化，變得對光不再敏感，有的甚至有晾乾的裝置。每種穩定步驟的操作，都會建議選用的相紙或化學藥物，好讓沖洗的工作更順利。通常處理步驟會充分清洗並皂化捲軸，或以專用清潔劑清洗 (Kodak Liquid System Cleaner)，捲軸幾乎是整個過程的重心，必須置於乾淨無塵環境，避絕指印及化學殘留物。不平整的捲軸會使得沖印成果不佳，亮面或半暗面的紙張，可以使用在處理器中，而半暗面紙不適於染色體沖印。



1. 化學藥物處理劑

特殊處理染色體用的藥劑是必要的，Kodak Dektol 是很好的選擇，通常都必須儲存在避光褐色瓶中，再將每次所需的量取出稀釋即可。不然若氧化了，會變成暗褐色的，過期的處理劑也是如此。

2. 停止浴

通常必須要以同批的化學藥劑，配合使用為佳，停止浴主要在藉著中和作用停止鹼化反應，Kodak stop bath 會在完成作用時變成紫色。

3. 定影劑 (Fixer / Hypo)

定影劑通常含過硫化鈉 (sodium thiohyposulfate)，好的快速沖洗對於永久沖印是必要的，快速固定劑使用固然方便；但也有其他作者指出過硫化氫會過度漂白，而過硫化鈉比較不會，好的固定包含：

- (1) 新鮮的停止浴及固定劑。
- (2) 固定時持續的晃動。
- (3) 避免過度固定。
- (4) 雙重洗浴原理。
- (5) 避免過度使用的固定劑。

測試定影劑是否過期的方法，是以一片 tri X 底片放在其中，直到底片變乾淨，無法在一分鐘內完成就該丟棄。

4. 雙重洗浴原理

使用兩種洗浴可以去除未還原的銀離子，定影劑一，通常一加崙可用 200 張 8 × 10 照片。以固定劑一使用 4 分鐘後再適當晃動，這兩種固定劑必須分別儲存。

5. Hypocleaning

必須使用廠商提供的容易進行 hypocleaning，主要是為了省水，增加殘餘化學劑跟溶液的嵌和。



6. 爲了持久性的沖洗

適當的沖洗，可以使得沖洗效果更持久，通常必須以專用沖洗器均勻沖洗。用虹吸管同時清洗6張片子，是目前商業機型最常見的。機器中必須以水壓或電力維持流動的水，而清洗水每五分鐘就必須要更換掉，柯達 (Kodak) 建議水溫必須維持在華氏65-70度間，水溫過高會洗出銀離子過粗的片子。所需要的時間以蒸餾水最長，軟水次之而硬水最短，以下步驟可用來檢查固定劑是否完全被清除。

- (1) 用一張未曝光的的紙來測試，依正常程序進行曝光及固定後再沖洗。
- (2) 剪下2×2平方英吋大小的紙片，用Kodak HT2測試。
- (3) 如果染色看來偏黃，再多沖洗幾次。
- (4) 如果要重新檢查，再從測試用紙剪下一樣大小的紙片。
- (5) 重複測試，直到找出最適合的沖洗時間、紙、定影劑、沖洗時間、水質跟溫度。

如果以上所言的條件有變，則重複找出適合的配方。利用Kodak hypotest solution (由24盎司的水加上4盎司28%醋酸及1/4盎司的硝化銀)，可以更省沖洗用水及時間。利用一小滴此試劑，滴在紙的邊緣測試，沖洗乾淨再觀察，如果點看來很淡，則表示固定劑殘留得很少。

7. 乾燥

有許多方法可以利用空氣蒸發的原理乾燥，如將紙張晾起，平放桌上、或放在塑膠片上、或放在吸墨紙上，非RC材質的紙張可以鼓風器。而RC材質的紙可以熱空氣直接乾燥，最簡單的是把紙張一張張晾在繩上，像曬毛巾一樣，底部用兩個晾衣夾固定。對RC材質紙來說，如果沒有特別額外的經過固定程序的處理，放在光滑平面利用空氣乾燥，同時也有穩定處理步驟的功效。

除非空間很大，也不一定要用這種方式。利用塑膠片上乾燥法，通常會有一個比吸墨紙大小(19×24英吋)略小的邊框固定，這個方法比吸墨紙乾燥法略快。當以吸墨紙作爲乾燥工具時，注意只能選用沖洗照片專用的紙張，不然上面的化學物質可能會破壞我們所沖洗出的影像。將相紙放在上面後，以一個軟橡皮擠壓器將多餘的水分去除，再輕輕蓋上一張乾的吸墨紙，這樣每張相片間便不會直接接觸。重複這步驟一張張堆疊後再重複，將因吸水濕掉的吸墨紙一張張按順序抽換，第二次改放三張吸墨紙堆成一疊後，在上面施以均勻向下的壓力，這樣的方法至少要耗上半天。第五種



方法，也是最快的就是用鼓風乾燥機 (drum dryer)，操作方式要依機型而定。

6.1.31 列印步驟

在沖洗之前要用放大鏡確定負片上沒有指印或其他灰塵，可以用專用吹球或小針筒去除附著其上的灰塵，為避免濕氣而不用嘴巴直接吹；最好在暗房內裝置空氣清靜機以減少灰塵。可用底片清潔劑將指印去除，相同地，再使用之前也要將顯微鏡鏡頭跟集光器上的灰塵清除。以小毛刷及專用吸球去除灰塵，若是指印或使用油鏡過的底片，則以沾少許清潔劑的拭布以相同方向輕輕去除油汙。所有的攝影原則都可以使用於染色體沖洗的步驟，因為我們希望能加強不同染色帶 (bands) 的對比，所以會以許多對比鏡頭或紙張，通常暴露時間介於 10-15 秒間，有時我們會印出不同濃淡的染色體，在其中選出最明顯的部分剪貼成對底強烈的圖。

1. 列印用紙

有許多種不同材質、色調及表面，影像可因選用紙張的不同而表現出不同的感覺，如新鮮乾脆的、金屬色系或柔軟的感覺，通常列印用紙都會覆以一層感光物質，但又不如底片的感光程度，因為選用的 silver halide 對紅綠光較不敏感，所以可選用紅橘綠光燈作為安全燈源。列印用紙有六種特性，分別是色調。基調色彩、表面光澤、速度、重量以及對比，通常褐黑色調是比較偏暖的，通常由氯化銀感光。藍黑調稱為冷色調，通常是由溴化銀感光。通常科學報告比較適合用後者。

通常表面材質選用光面的比較好。而重量有單一 (single)、中等 (medium) 及雙倍 (double) 三種，因為單一重量比較快乾便宜且裁切容易，所以比較適合。而對比通常是指黑與白中間漸層灰階的分別，高對比紙通常會造成色調分離而低對比紙不會，可分成 0 級 (軟性、低對比) 到 2 級 (正常) 到 5 或 6 級 (強烈對比)，高對比級數紙通常比較適合用於螢光攝影。像柯達複合對比紙就有不同的對比鏡，由 0-6 編號可製造出不同對比效果，而為曝光的底片或負片可以 3 或 4 號濾光片增加對比。

2. RC 紙

這是一種中等重量有樹脂附著的防水紙張，可縮短處理及乾燥時間，通常在單黃色光源下使用為佳，可表現多種對比層級，最好以雙履式乾燥法且溫度勿超過華氏 190 度，成品必須儲放在黑暗乾燥且恆溫的地方。



6.1.32 影像、相關設備、及數位影像

過去許多實驗室，利用電腦影像取代35 mm相片來做細胞核型分析，中間期找尋器也比以往更多人使用，大部分影像處理系統配置於蘋果電腦、IBM、UNIX介面上，所以選用軟體會造成不同，影像需求上，記憶體及儲存大小是最重要的關鍵考量，而各實驗室應考慮所需影像的品質、使用容易度及經費多寡，來選用影像處理軟體。

相機可用來製造依亮度及色彩上類比的影像，由像素構成之後，再以類比數位轉換器以灰階圖片的方式儲存。但如果用數位相機就可以省略這步驟，錄影機是用影像管來處理，而CCD則是以固定介面的感應器來擷取影像。通常比較適合用來處理暗淡的影像，如螢光攝影通常可利用加上彩色，好增強其對比性，類比影像可以利用數位處理（如改變其明暗度）提高品質，之後儲存起來又可以用不同的方式來處理，像是快照、紀錄照、搶取或冷凍法，然後顯示在螢幕上或以雷射輸出，可以磁片長期保存。影像處理通常也可以藉著數位過濾去除雜訊，強化背景而增強對比，使得影像變得更銳利，而比傳統影像表現更佳。

1. 印表機

印表機品質通常會影響成品的品質，有些會利用熱轉印技術製造出相片般的品質，但缺點是花費較高。通常注意染色體的深色帶可被完全印出且尾端的淺色帶也不漏失即可，通常可放在顯微鏡下校正以求最佳的解析度及對比。

2. 中間期 (metaphase) 尋找及分析器

像骨髓或絨毛標本因中間期細胞較少，所以需要以此為輔助。

3. 數位影像及FISH探頭

數位影像的應用，對於像FISH這類的微弱訊號處理特別有助益。



6.1.33 亮視野顯微鏡的疑難排解

問題	可能的原因	解決方法
高光源下對焦不清楚	沒用蓋玻片 用錯面 不需要用蓋玻片 太多油 蓋兩張蓋玻片 / 太厚 蓋玻片下有雜質	用蓋玻片 將玻片翻正 移去並重新對焦 擦乾淨後再重新滴油鏡油 移去全部 移除並清乾淨
找不到目標物	物鏡位置不對 物鏡位置沒固定好 微調扭轉到極限	重新固定鏡片 先以大轉輪對焦好後再微調
影像模糊	玻片放反了 表面有油汙 鏡頭表面有刮痕 有氣泡 滴錯油鏡油 放大倍數太大 錯誤的物鏡高度 接目鏡 接目鏡未裝好 用螢光顯微鏡的調光器	轉正 用拭淨紙清潔鏡頭 用放大鏡檢查 新滴油鏡油或重新放蓋玻片 選擇折射度 1.515 的油 不超過 1000 倍 以管徑長度來決定合適高度 換眼看必須重新對焦 請供應商檢查處理 要完全打開調光器
橢圓視野	鏡片位置未裝好 縮小器或濾光片或 分光器位置不對	調整位置
有移動的小黑點	通常高放大倍數或 完全關起調光器常見	打開調光器或選用低倍鏡片
光線不足	分光器位置不對 調光器關閉 光線受阻	調整位置 打開調光器 移除障礙物
視野看起來有顆粒	對焦在光源之前	將聚光鏡往下調
高度光源下無法顯影	聚光鏡的孔徑太大 玻片太厚 (>1 cm)	選用高光源鏡片 調低光源
光源分布不均	光源不在中心點 聚光鏡或鏡片位置不對	調整光源中心 調整位置
影像對比太強而解析度下降	視野跟裂縫不對稱 聚光鏡位置不對	選用合適的光圈 (diaphragm) 調整位置





1. 螢光顯微鏡

問題	可能的原因	解決方法
螢光太暗	分光器位置不對 聚光鏡需調整 濾光器使用過度或錯誤 視野或光源器關閉 目鏡放大倍數太高 鏡片 NA 值太低 外在光源太亮 未使用油鏡油	調整位置 選用合適濾光器 打開所有光源器 選低一點的倍數 選 NA 值高一點的鏡片 將燈光調暗
螢光太亮	鏡片 NA 值太高	將光源器調小或選用適當鏡片
低倍下找不到目標	難以對暗目標對焦 野尋找目標觀察物	以蓋玻片邊緣背景對焦在調整視
燈源閃爍	燈泡太舊	更換新燈泡

2. 照片

問題	可能的原因	解決方法
負片 未曝光 (顯影太淡)	ASA/f-Stop 太高	調低 ASA 或增加曝光時間
過度曝光 (太深)	ASA/f-Stop 太低	增加 ASA 或縮短曝光時間
顯影不足	顯影劑不足或時間太短	延長顯影時間檢查顯影劑狀態 (溫度華氏 68 最佳或適當搖晃)
過度顯影	顯影劑太多時間太長 或搖晃過度	減短顯影時間
G bands 顯影對比太強 太強	濾光器 底片	在 Giemsa 染色下選用紅橘綠光鏡 選用 Kodak Panatomic-X, Pliis-X, TP2415 而呈現灰色階

問題	可能的原因	解決方法
對比 G band 不夠	顯影劑 相紙 染色劑 濾鏡 顯影劑 相紙	Kodak D-76 或 HC-100 對比適中 使用一或二號紙。當使用對比變 異性紙時，則不要用濾鏡或用一 或二號多對比濾鏡 試用較紅而非較藍 (調整酸鹼值) 的 Giemsa stain 使用深綠色濾鏡 Acufine, UFG-1, D-19 是高對比的 顯影劑 使用高數字的相紙 (例如三、四 、五)。當使用對比變異性紙時， 則用 2-1/2 到四號濾鏡



問題	可能的原因	解決方法
雙重曝光或重疊曝光	底片未正確捲片	確定每次曝光後都有捲片或檢查自動捲片系統
失焦	相機接目鏡內的十字標線未對焦	對焦染色體之前一定要檢查十字標線。可試著戴上眼鏡拍一卷底片，看看對焦有無改善
	拍攝者未戴上眼鏡	試著戴上眼鏡拍一卷底片，看看對焦有無改善
	曝光時間的改變	將顯微鏡架在吸震墊上。曝光時不可觸摸相機，顯微鏡或桌子。轉緊細調節輪以免滑動
一側過度曝光另一邊曝光不足	未使用 Köhler 照明	每次曝光時使用視野光圈 (field diaphragm) 將光線對焦集中。
	不平均的洗照片	調整洗底片時的試劑搖動方式
沖印 灰色的背影	染色體太淡或太藍 底片固定時間不夠	延長染色時間 底片放回固定器
照片洗得不均勻	染色體太淡或太藍 底片固定時間不夠	延長染色時間並重攝 底片放回固定器
	自動沖片機的溶劑不夠	確定 Rollers 隨時溶劑上都有一薄層
	Roller 壓力不均	檢查帶子的張力，換帶子
	使用殘餘藥劑沖洗照片	將 Roller 浸水以溶解藥劑。定期維護檢查
	溶劑耗盡	換新溶劑
	相紙半曝光	檢查使用新開封的相紙
	濾鏡架的陰影	用光線檢查界面
沖洗負片時產生泡泡 沖片槽攪拌過度或不足	拍打水槽一到兩下使泡泡脫離 建立攪拌的常規步驟	
對比不足	顯影劑過盡	換新溶劑
	低對比相紙	使用多一號的相紙或多對比濾鏡
	相紙老舊或破損	檢查熱源、濕度、放射源或光源
	暗房中的安全燈不安全	用紙檢查安全燈的方向
顆粒太多	底片	使用低、細顆粒底片
	顯微鏡	目鏡的放大倍率調小
	放大器 (Enlarger)	放大器 (Enlarger) 的放大倍率調小
	顯影劑	使用細顆粒顯影劑
相紙	使用高光面相紙	
鬼影	相紙重複曝光	曝光時固定好相紙和框架
失焦	震動影響	放大器 (Enlarger) 之下使用避震架或搬暗房
	對焦不良	使用顆粒放大器。每次移動負片時檢查對焦



問題	可能的原因	解決方法
顏色透光性 太藍 藍色的背影	鎢絲光使用日光濾鏡 對底片而言，光源的色溫過高	移開濾鏡並調整色彩平衡 降低光源的電壓
黃色的背影	對底片而言光源的色溫過低 聚光鏡未對焦 聚光鏡未對色差調整	提高光源的電壓 重新依照 Köhler 照明對焦聚光鏡 聚光鏡應使用無色差，接物鏡應消色差
橘色的背影	底片和鎢絲光不平衡	使用 80A (3200°K) 鏡或 80B (3500°K) 校色濾鏡
COLOR PRINTS (螢光)		
訊號太暗	曝光太短 因為新燈泡使探針訊號燒光	調整曝光時間 新燈泡增用中性密度濾鏡 調暗燈光
訊號有閃光	曝光太長 探針重複	調整曝光時間 亮訊號時間要短；使用亮的對比染色
背影非黑色	Antifade 過期 聚光鏡太靠近玻片	對比染色要用好的 antifade 降低或蓋上聚光鏡

(1) CCD 相機

CCD 相機能捕捉看不見的訊號，探針 (probe) 小於 2kb 也能使用。

(2) 共焦顯微鏡

共焦雷射掃描顯微鏡大幅降低螢光失焦，並常使用於拍攝三度空間的結構。雖然不比 CCD 相機敏銳，但能拍攝探針良好的訊號。但限於綠、紅螢光。

6.1.34 暗房步驟 (Protocols)

1. 原則

在細胞遺傳學的領域中，暗房的目的是為了產生良好的照片，來反映及記錄染色體分析的結果。

2. 暗房工作的優先順序

底片的處理要根據檢體重要性及接收的順序，例如羊水要比血液或組織先處理。



原則上羊水、絨毛膜取樣及血液急件要優先處理。即時照片要立即處理並直接交給技術員。技術員提供一本標明細胞號碼順序的相片登記本，最適合核型分析的細胞要註明。這類細胞有最長的染色體、最佳的顯帶、拍攝時對焦的最準。除非技術員要求更多，暗房將沖洗兩個細胞的照片。暗房會多拍一張細胞來呈現所有的染色體，所有多倍體、單倍體及人工產物的細胞都會沖洗，處理完底片後，將照片給技術員。照片洗好後，將底片剪裁好、放入底片袋，並貼上病人的姓名、處理號碼、片卷號碼，及技術員的姓名，歸檔於暗房內。

3. 沖洗底片

照片的完成有三個步驟：曝光、沖洗及放大。曝光由技術員以顯微鏡為之；第二步驟為沖洗底片，溫度及攪拌方法都會影響解析度、顆粒、及負片的對比，因此每一卷底片的沖洗時間及溫度要維持一定。

正確及恆定的溫度，精確的時間控制，適當的攪拌是沖洗底片成功的關鍵。沖洗過程中，所有的溶劑必須保持相同的溫度。劇烈的溫度變化使負片的顆粒過多，甚至使乳劑出現裂痕及皺紋，底片的理想沖洗溫度是華氏 72 度，如果溫度是華氏 75 度，則減少沖洗一分鐘。

沖洗使重要部位在負片上為暗色，但不可過暗而喪失細節，正常曝光、沖洗的負片及因之產生的正片，應有完整範圍的灰階及良好的細節。

- (1) 將底片放入片匣，確定每張底片都在片軸上。
- (2) 將底片浸水攪拌一分鐘，這將使顯影劑能均勻地在底片上流動，將水倒掉。
- (3) 倒入 HC 110 顯影劑，預先泡好顯影劑以保持恆溫，每卷底片使用 400 毫升。
- (4) 第一分鐘要持續攪拌底片，之後的五分鐘內每三十秒攪拌一次，倒掉顯影劑。
- (5) 倒入停止液，持續攪拌三十秒，以中和顯影劑，可重複使用於三十卷底片，停止液的用盡時呈藍紫色。
- (6) 倒入定影劑，整整攪拌兩分鐘，再靜止兩分鐘，總共四分鐘，不可超過。泡太久會洗掉曝光的銀粉而喪失影像細節，且使影像不易保存，藥劑能重複使用四十次，使用次數要登記。
- (7) 以華氏 68 到 75 度的流水浸泡，倒掉。



- (8) 加入泡水的 Photo-Flo 並攪拌三十秒，倒掉。
- (9) 將底片浸水，倒掉，晾乾。
- (10) 將片匣及片軸移到乾燥處晾乾，不可將它們放在水槽裡以免汙染，下次使用時，需完全乾燥並沒有化學藥劑在上面。

4. 列印

本實驗室使用自動照片處理機，它必須依照既定的時間表清洗並添加新鮮的藥劑，以確保最佳的列印品質。

- (1) 負片除塵，將底片輕輕地拉過橘色的 Ilford 抗靜電布來降低靜電。以 Beseler dust gun 22 吹除負片上任何殘存的灰塵，避免搖晃除塵槍，噴的動作要快且只能直立時使用。
- (2) 我們使用變異性對比相紙，此物在使用濾鏡下擁有寬廣的灰階，大部份的底片適用 1-1/2 及 2-1/2 濾鏡。
- (3) 將負片以亮面朝上，乳劑面朝下放在片架上，放大直到最高的銳利度，以細粒對焦器對到銳利的焦距。對焦時將光圈調大，再降低至少三格以確保最大的銳利度，銳利度不只受到負片尺寸及放大倍率的影響，也受到光圈的左右。
- (4) 決定最佳曝光時間：最佳曝光需有好的對比，乾淨的白色及均勻的灰階。這需要“閃躲”及“燒入”的技巧，曝光時，將手在底片太黑的地方前後移動可“閃躲”。在正常曝光時間後，若有曝光不足的部份，可用手在鏡頭前圈成杯狀，將光線導入這些地方。
- (5) 對比不足的負片要拿給技術員檢討拍攝的問題，對比不足時需要高階的濾鏡 (3-5)，對比太過則反之 (0-1)。

5. 暗房的維護

- (1) 每星期五下午清理沖片機。
- (2) 每週擦拭各櫃臺面。
- (3) 每兩天清洗水槽。
- (4) 使用後及添加前浸洗藥瓶。
- (5) 每週清洗除溼機。



(6) 使用後浸洗所有的片架。

6. 拍攝

- (1) 裝上底片並用馬克筆標示。
- (2) 關閉光圈。
- (3) 調整聚光器直到邊緣也都對焦。
- (4) 以聚光器上的兩個螺絲將之集中。
- (5) 打開光圈使整個視野變亮。
- (6) 以相機對焦並拍攝。
- (7) 選擇五個擁有未對摺且顯帶完整的染色體的細胞拍攝。

7. 底片顯影

- (1) 依照相機種類使用 50-100% Dektol 顯影，三到五分鐘。
- (2) 以自來水浸洗十分鐘。
- (3) 以柯達定影劑，定影三到五分鐘。
- (4) 以自來水浸洗。
- (5) 以Hypo clear浸洗三分鐘。
- (6) 流水浸洗五分鐘。
- (7) 風乾。
- (8) 底片標明患者姓名，登記號碼及底片號碼。

8. 手動列印

- (1) 將負片放上負片架。
- (2) 調整放大器，使最長的染色體約長一吋。
- (3) 關上光圈，並對焦到最銳利的影像，再打開光圈一格。
- (4) 設定對焦時間。
- (5) 關閉定時器，放好相紙。
- (6) 打開定時器曝光。



- (7) 以Dektol定影到影像清晰為止。
- (8) 以自來水快速浸洗。
- (9) 定影劑處理三分鐘。
- (10) 流水浸洗。
- (11) 以Hypo clear浸洗三分鐘。
- (12) 流水浸洗三分鐘。
- (13) 烘乾器乾燥。
- (14) 背面標明病例號。

9. 機器列印

- (1) 檢查活化劑，定影劑及水面的高度。不可用光並隨時補充。
- (2) 開機。（如果二十四小時內未使用，要按一下更新補充 (replenishment) 按鈕）
- (3) 執行手動列印的步驟一到六。
- (4) 曝光後，將相紙置於盤子中央，光面朝下，與盤面垂直。
- (5) 待紅燈熄滅才能置入下一張相紙。
- (6) 結束後關機。

10. 清洗印片機

- (1) 移出水瓶。打開烘乾機及印片機蓋。溼布擦拭。移除滾筒，溫水沖洗，烘乾再依序放回原位。
- (2) 將四個水槽滑到右側，移開上架。
- (3) 移開第一個水槽的導板及加熱器，加熱器的塑膠部份不可弄溼。
- (4) 將水槽的排水閥轉左，拉出水管，排空水槽並擦拭。

11. 清洗烘乾器

- (1) 拉開栓蓋，以溼布擦拭內導片，烘乾器不可進水。
- (2) 拔出滾筒，以溫水清洗，裝回去。
- (3) 關機。



12. 注意

不潔的容器會造成相機上的黑點，如果發生這種狀況，立即排空並清洗水槽及水瓶。

6.1.35 核型分析 (Karyotyping)

1. 原則

從相片或電腦化的影像來核型分析 (karyotyping)，可提供細胞遺傳學家放大的染色體排列，從而簡化染色體分析。相片或電腦的核型分析 (karyotype) 是病人永久的紀錄，而玻片卻會淡化使得在隔了一段時間後就不易再進行顯微分析。核型分析 (Karyotype) 是細胞遺傳學實驗室的最終產物。細胞遺傳學家可由之鑑定各種異常，將染色體數目與結構的變化記錄在最後的報告裡。

2. 檢體

選擇最好的有絲分裂分佈來分析 (karyotype)，其標準為長的染色體、少重疊及清晰的染色帶。羊水、絨毛膜取樣及組織的染色帶 (bands) 要在四百以上，血液要五百以上。任何染色體數目及結構上的變化都要在紙本以清楚地描述。

3. 材料及儀器

- (1) Katie computer 與雷射印表機
- (2) 膠水
- (3) 牛皮紙袋
- (4) 剪刀
- (5) 馬克筆
- (6) 迴紋針

4. 以照片核型分析 (karyotyping) 的步驟

- (1) 選擇最佳的照片。
- (2) 將照片劃分出三到四個特定的區域，且不會劃到染色體。





- (3) 計算每個區域染色體的數目，再加總其數。
- (4) 檢查總數，確定與計算紙上的記錄相同。
- (5) 分別剪下每個染色體，依照標準分群及序列成對排列。至少要分析兩張高品質的照片，每張照片要有兩份，背面要註明登記號碼及照片號碼並記錄在計算紙上。

6.1.36 顯微照相術 (Photomicrographic Procedure)

1. 原則

病人細胞分裂中期的製片標本，必須被選出及照相照下來。目標是獲得最好解析度及清晰度的相片，這樣染色體可以被精確的分析及定型。

2. 樣本：根據細胞收成步驟 (Harvesting procedure) 製作診斷細胞基因玻片

3. 試劑及藥劑

Cargille 浸泡油

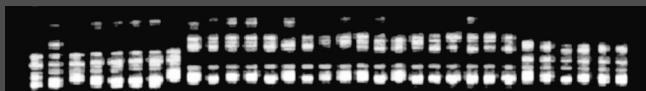
- (1) Type A cat. #16482
- (2) Type B cat. #16484

4. 材料及設備

- (1) Lens tissue °
- (2) Kodak Technical Pan 2415 底片 °
- (3) BH-2 Olympus BHTU microscope with model PM-10AD photomicrograph system °
- (4) 10x 接物鏡 °
- (5) S-Planapo 100 油鏡 °
- (6) Lens cleaner °
- (7) Photography worksheet °

5. 程序

- (1) 裝入可照 10 次、15 次、25 次或 36 次之 Kodak Technical Pan 2415 底片夾入底片箱 °
- (2) 壓 “time-off / winding” 鍵讓底片前進三次 °



- (3) 每次使用後、清潔光圈 (diaphragm)、聚光器 (condenser) 及物件。
- (4) 根據每個人不同的雙目距離調整接目鏡距離。
- (5) 將 10 倍接物鏡對準玻片標本、再使用 100 倍接物鏡，並使用混和好的礦物油（一半 type B + 一半 type A）。
- (6) 轉動右邊接目鏡來對焦接物鏡，直到在視野中心的兩條交叉線變得銳利清楚。（請見注意事項 1 及 2）
- (7) 調整 Kohler 光源
 - a. 關掉光圈。
 - b. 調節聚光器高度調節鈕，來使光圈的影像清楚。
 - c. 使用聚光器中央鈕，將光圈影像放到視野中央。
- (8) 輕輕的打開光圈，讓光經過視野。
- (9) 將細胞中期玻片放入號碼五的框架內。如果整個細胞中期玻片不能剛好放入框架內，要照兩次以上（記錄所有相片在工作單上）。
- (10) 選擇合適的濾片或是合併使用的濾片（請見注意事項 3）。
- (11) 調整曝光時間在 3.4 秒。
- (12) 推綠色曝光鈕（記得照相時連續看細胞中期玻片，確保相片清晰度）。
- (13) 在病人工作單上用紅筆寫“photo”以標明照相的位置。
- (14) 記錄資訊在相片工作單上（請見連結樣本的光顯微鏡程序）。
- (15) 照下 4 個 G-band 細胞中期玻片，並為其中三個染色體組型，如果發現兩個以上的細胞株，每個細胞株都要有兩個細胞中期玻片的相片及染色體組型。
- (16) 移除底片夾（如使用手冊上記載）。

6. 注意事項

- (1) 除非交叉線已經調整清楚，要不然就算標本已經對好焦，影像還是有可能模糊。為了調好交叉線的焦距，可能有需要定期讓你的眼睛看向窗外的遠方，讓你的眼睛定焦在不同距離的遠方，然後再看回顯微鏡來做調整。
- (2) 交叉線必須在 10 倍接物鏡下做調整。
- (3) 可用的濾片包括一個干涉濾片，VG-9（綠色濾片），藍色濾片（玻片的細胞質照相時使用），和一個黃色濾片（在暗的細胞中期推片中看到染色帶）。



6.1.37 顯微鏡暗房程序

1. 原則

相片照完後，底片必須被沖洗並在暗房印出。

2. 樣本：照完的KODAK TECHNICAL PAN FILM 2415

3. 試劑和藥劑

- (1) 顯影劑 (Kodak HC-110)。
- (2) 顯影劑 (Kodak D-19)。
- (3) Kodak 快速固定劑（一個月後失效）。
- (4) 催化劑 Rapidoprint 6182B（兩週後失效）(Rapidoprint DD5400)。
- (5) 定影劑 Rapidoprint QS04（兩週後失效）(Rapidoprint DD5400)。
- (6) 催化劑 Rapidoprint 6180B（一週後失效）(Ektamatic)。
- (7) 安定劑 Rapidoprint G380B（一週後失效）(Ektamatic)。

4. 材料及設備、畫架

- (1) 放大器 Besler 23C II。
- (2) 放大器 Besler 45 MXII。
- (3) 處理機 Kodak Ektamatic。
- (4) 處理機及烘乾機 Rapidoprint DD5400。
- (5) 安全燈。
- (6) 可聽 (Besler) 及重複放大器計時器。
- (7) 相紙

Rapitone P 1-2 Paper

Rapitone P 1-3 Paper

5. 程序：顯影底片

(1) HC-110 方式

- a. 在全暗室下，移除 Kodak Technical Pan 2415 的可重複使用外殼，將底片裝好在沖片槽的滾輪。



b. 以下所有程序可在白光下進行：

- (a) 依據HC-110稀釋表混和HC-110工作液。G和C帶以1:7的比例進行，Q和R帶以1:3的比例進行。
- (b) 注入稀釋的HC-110至沖片槽至滿，設定計時器，調整合適的時間以達HC-110合適的溫度（參考下面溫度調整表）。從你開始注入HC-110入沖片槽時開始計時。持續搖動、倒出、丟棄。
- (c) 用冷水注入沖片槽至滿，搖晃一分鐘後丟棄。
- (d) 加入快速定影液入沖片槽至滿，並搖晃2分鐘。然後將快速定影液倒回快速定影瓶。打開沖片槽。
- (e) 用水濕潤底片，讓兩面風乾並吊著數分鐘。用揮發性墨水筆標明每個底片是哪一個工作單上的號碼，底片已經可以沖印出。

(2) D-19 方式

a. 在全暗室下，移除Kodak Technical Pan 2415的可重複使用外殼，將底片裝好在沖片槽的滾輪。

b. 以下所有程序可在白光下進行：

- (a) 注入D-19顯影液至沖片槽至滿，設定計時器，調整合適的時間以達D-19合適的溫度（參考下面溫度調整表）。從你開始注入D-19入沖片槽時開始計時。持續搖動、倒出、丟棄。
- (b) 用冷水注入沖片槽至滿，搖晃一分鐘後丟棄。
- (c) 加入快速定影液入沖片槽至滿，並搖晃2分鐘。然後將快速定影液倒回快速定影瓶。打開沖片槽。
- (d) 用水濕潤底片，讓兩面風乾並吊著數分鐘。用揮發性墨水筆標明每個底片是哪一個工作單上的號碼，底片已經可以沖印出。

6. 溫度調整表

對負片對比來說，溫度是很重要的。顯影時間必須要調整來補償溫度高於或低於華氏68度。





HC 110 (min)	Temp.	D19 (min)
5.00	74 °F (23 °C)	降低溫度
5.20	72 °F (22 °C)	降低溫度
5.40	70 °F (21 °C)	降低溫度
6.00	68 °F (20 °C)	4.00
6.20	66 °F (19 °C)	4.20
6.40	64 °F (18 °C)	4.40
7.00	62 °F (17 °C)	5.00

7. HC 110 稀釋表

比例	庫存	水	總體積	
1:3 1個	45 ml	135 ml	180 ml	高對比
2個	110 ml	330 ml	440 ml	Q&R 帶
	(將顯影時間增加到7分鐘)			
1:7 1個	25 ml	150 ml	175 ml	正常對比
2個	55 ml	385 ml	440 ml	G&C 帶

8. 沖印相紙

- (1) 在印出第一張之前先，打開處理機和烘乾機 Rapidoprint 5400 10分鐘。設定烘乾機在3-4。
- (2) 將底片的乳劑面朝下（較鈍的那一面），放在更大的負片匣。
- (3) 除了安全燈以外的燈全關掉。
- (4) 將相紙光滑的一面朝上。使用相紙 (Rapitone P1-2) 一般相紙來印相正常對比的負片。使用高對比相紙 (Rapitone P1-3) 來印相較低對比的負片。
- (5) 根據負片的對比設定 F-stop 在較大。
- (6) 印相：曝光時間會隨著負片對比而有所不同。使用第一號染色體作為大小的指引，並放大到約1英寸長。
- (7) 將相紙光滑的一面朝下放入處理機。
- (8) 在每張相片的背面標明工作單上病人的號碼，這個號碼和負片上的號碼必須一致，將相片按照次序排好。
- (9) 如果使用 Kodak Ektamatic 處理機，重複程序2-8並在烘乾架上烘乾相片。



9. 清洗處理機

(1) Rapidoprint DD 5400 和 DR 5400 烘乾機 (參考使用手冊)

- a. 拔掉電源插頭。
- b. 讓盤子的水排出。
- c. 移開穩定桿和滾筒，洗淨並放一旁使其乾燥。
- d. 移開馬達的前面面版，關掉所有輸送線上的瓣膜，弄鬆所有快速行動的連結器。
- e. 移開盤子並洗淨。
- f. 從烘乾的地方移開所有滾筒，洗淨，並讓它自然風乾。絕對不要將滾筒濕濕的放入烘乾的地方。
- g. 再組裝機器。(記得弄緊所有快速行動的連結器及打開所有瓣膜)
- h. 至少每兩個禮拜換一次藥劑。

(2) Kodak Ektamatic Processor (參考使用手冊)

- a. 拔掉電源插頭。
- b. 至少一個禮拜一次將活化劑及穩定劑放入母槽。(注意不要將活化劑及穩定劑混和在一起)適當地處理化學藥劑。
- c. 洗淨所有的瓶子、盤子和水槽。
- d. 風乾後再組裝。
- e. 加入新的藥劑。

6.1.38 暗房程序

1. 試劑和提供者

(1) 底片顯影劑的瓶子

- a. 顯影劑
 - (a) 16 盎司瓶的顯影劑 (Kodak HC-110)。(先用最舊的)
 - (b) 注入玻璃加侖瓶 (glass gallon stock bottle)。
 - (c) 放入磁性攪拌器，確認攪拌棒在罐底旋轉。





(d) 用 120 ml 水洗淨塑膠顯影瓶後，倒入玻璃加侖瓶。

(e) 加入 1.2L 純水，讓總體積變成 1/2 加侖，並攪拌至少兩個小時。

b. 停影劑

(a) 將 120 ml 濃縮液倒入玻璃加侖瓶。

(b) 放入磁性攪拌器，確認攪拌棒在旋轉。

(c) 加入純水讓總體積變成 1 加侖並攪拌。

c. 定影劑

(a) 從 1.9L 水開始

(b) 加入整瓶 a 溶液

(c) 一邊混合一邊加入整瓶 b 溶液

(d) 加入 900 ml 的水

(e) 攪拌 1/2 小時

(2) 棕色 1-L 瓶

a. 顯影劑

(a) 儲存液 (stock solution) 在棕色瓶裡。

(b) 稀釋顯影劑，用 1:19 的水或 100 ml 顯影劑加 1900 mL 水。

b. 停影

Use straight from stock bottle 850-900 mL

c. 定影

Use straight from stock bottle 850-900 mL

2. 程序

處理 Kodak Technical Pan film：

(1) 將底片放置處理槽。

(2) 調整水至可用溫度並讓它流動。

(3) 將水裝滿水槽並稀釋 HC-110 儲存液，讀取工作液上的溫度。

(4) 將水倒出並加入稀釋後的顯影液。(丟棄的水是黑色的，這是底片基底的染料。)



(5) 根據時間溫度表來顯影，每30秒搖晃一次。

最佳條件			
66°F	68°F	70°F	73°F
8-3/4 min	6 min	7-1/3 min	6-3/4 min
不要低於65°F或者高於72°F顯影，否則會有不可預期之結果發生			

- (6) 在停影液內洗淨約15-30秒。
- (7) 搖晃2-4分鐘混合。
- (8) 用清水洗約30秒。
- (9) 用Hypo-Clear液洗30秒。
- (10) 用流動的水在68-70°F洗五分鐘。
- (11) 加幾滴Photoflo進入水，搖晃並吊起來風乾。

3. 注意事項

- (1) 顯影時穿著保護衣和手套，照相化學藥劑會傷害免疫系統。
- (2) 在對焦放大器時，要打開鏡頭並將濾片移開。
- (3) 底片顯影時每30秒搖晃底片，不要太多也不要太少，搖晃使顯影劑上可以均勻的分佈於顯影底片，使相片品質均勻。務必閱讀細胞診斷從業人員相片沖印的安全資訊。

6.1.39 顯微照相術

1. 目的、顯影並準備細胞基因分析印相、程序與照相

黑白照相在例行使用是足夠的，但是在某些演講場合，彩色照相（印相紙或幻燈片）是比較被偏愛的。染色體分析使用拍立得照相很快速，但是標準照相程序可以獲得更好的品質。照相、顯影以及印相是細胞診斷的一部分，最好是由技術員自己照相並在暗房沖洗。

2. 顯微照相機

- (1) 最後的相片可能不會比原始的情形好，因此，最好是能夠知道染色程度及胰蛋白





酶消化程度，這些都是產生染色體上帶狀型態的主因，是最能夠提供訊息的。

- (2) 顯微照相系統應該有效率、穩定及適用各種顯微鏡。任何震動可能降低影像品質，最好的顯微照相系統是由大廠製造的 35 mm 顯微鏡。他們都配備有可信賴的自動曝光系統及自動送片。
- (3) 顯微鏡必須要配備有合適的 planapochromate 或 planfluorite。爲了得到最大的光圈解析度，每次照相時，顯微鏡必須使用 Kohler 照明。
- (4) 染色體影像必須被精準的對焦，染色體影像被使用者對準焦距在底片上是重要的，最好的顯微鏡系統提供一個可信賴的方法，讓使用者可以調節系統，讓影像可以同時對焦在眼睛及底片上。
- (5) 確認所有鏡頭都是乾淨的。最容易被忽略的就是底片下相機內的鏡頭，任何在鏡頭上的污垢或灰塵都會對焦在底片上，如果未清除，這個汙染點就會持續出現在曝光的底片上。

3. 使用 Hope Model 152 底片處理機處理 Kodak TP 2415 底片

底片用 Kodak Duraflo RT，顯影劑在 24°C 下、50% 基底速度顯影，用 Kodak 快速定影劑定影，然後在 72-74 °F 下水洗。

4. 在攝影，S-8 軸台上處理 Kodak TP2415 底片

在一般使用上顯微鏡下曝光底片，S-8 底片處理機的速度應該是 2 ft/min。

5. 手動處理 Kodak TP2415 底片

- (1) 用 Kodak 顯影液 D-19 在 22°C 下顯影 5 分鐘，稀釋 1:2，每 30 秒搖晃 1-2 秒，倒掉顯影劑。
- (2) 用停影劑（1% 冰醋酸溶液）終止顯影，倒掉停影劑。
- (3) 混合 Kodak 快速定影劑約 3 分鐘。每 30 秒的間隔搖晃 5-10 秒鐘，定影劑可以保留並使用好幾次。
- (4) 用去離子水清洗底片五次，去離子水可以避免礦物質在底片上留下印痕。
- (5) 在無塵環境吊底片直到全乾。



6. 使用 Kodak HC-110，稀釋溶液 B（22°C 下 1 份顯影劑加 7 份水）手動處理 Kodak TP2415 底片

- (1) 每 30-60 秒搖晃 1-2 秒，倒掉顯影劑。
- (2) 如同用 D-19 顯影劑處理 Kodak TP 2415 底片的步驟 2-6。

7. 使用 Ilforspeed RC 相紙及 Ilford 相紙處理機處理相片

- (1) 我們極力推薦這類自動相片處理機來做細胞診斷用途。他們比 Tray 處理機更簡單、更快也更乾淨。
- (2) Ilforspeed 2400 RC 相紙處理機容易操作，說明書也很容易執行。基本上，只要將曝光的相紙放入機器、乳劑面朝上，60 秒後處理好的相片就可以在機器的另一頭拿到。
- (3) Ilforspeed RC 相紙是一種不含顯影劑的分級相紙，其他含顯影劑或不含顯影劑，分級或多反差的相紙，像是 Kodak Kodabromide II RC、Agfa Rapitone 或是 Ilford 多反差相紙都可以使用。Ilford 機器可以顯影相紙乳劑面的銀粒子，相紙上的影像被固定住，沒有曝光的銀粒子變得可溶而被除去。過多的不溶銀粒子及相紙上的銀粒子在清洗過程中會被移除，最後機器會風乾相片。

8. 相片品質控制指引

- (1) 相片必須要有足夠的濃度，能夠合適的解析染色體上的淺條紋、端粒及衛星染色體。
- (2) 相紙必須清潔而且在無可見汙點或條紋下風乾，如果有任何的缺損，要採取必要的矯正措施。
- (3) 底片必須要乾淨，而且沒有灰塵，指印和汙點。
- (4) 底片上可見的灰塵可以在暗房用吸球吹氣移除。
- (5) 將底片放在放大器上，乳劑面朝下，選擇最好的負片來印相。
- (6) 使用微粒對焦器將放大器對焦。
- (7) 放置一個灰階合適的放大相紙，乳劑面朝上放在畫架上（高濃度的負片需要低灰階的相紙，而低濃度的負片需要高灰階的相紙）。
- (8) 先試用中度光圈，曝光 4 秒。





- (9) 處理曝光過的相紙。
- (10) 評估相紙使用的濃度，依此來做必要的調整，如選擇較大或較小的光圈、增加或減少曝光時間、或同時調整光圈和曝光時間。
- (11) 只要達到合適的曝光組合，其他相似濃度的負片可以依此類推，減少調整曝光時間的舉動。
- (12) 4個細胞中期都印出兩張相片。兩個細胞中期將會被用來作病人的染色體檢查。當多組細胞群落 (clones) 存在時，另外的染色體檢查是必要的。

9. 反應劑

- (1) 注意所有反應劑都是可能有危險的。處理這些材料時使用合適的安全步驟，避免和皮膚及黏膜接觸。
 - a. Agfa Rapitone RC 分階相紙 (Agfa-Gevaert)。
 - b. 冰醋酸 (儲藏室)，反應劑符合 ACS 規格。5 磅，一年內使用。
 - c. Ilford Ilfospeed RC 分階相紙 (Ilford photo 公司)。
 - d. Ilford RC 多階相紙 (Ilford photo 公司)。
 - e. Kodak D-19 (Easeman Kodak) 根據柯達公司建議泡製，兩年內使用。
 - f. Kodak Duraflo RT 顯影劑 (Easeman Kodak) 根據柯達公司建議泡製。兩年內使用。
 - g. Kodak HC-110 (Easeman Kodak) 根據柯達公司建議泡製，兩年內使用。
 - h. Kodak Kodabromide II RC 相紙 (Easeman Kodak)。
 - i. 快速定影劑 (Easeman Kodak) 根據柯達公司底片或相紙的建議泡製，兩年內使用。
 - j. Kodak TP 2415 底片 (Easeman Kodak)。

(2) 停影劑

1% 冰醋酸溶液 (1 ml 的冰醋酸加上 99 ml 的蒸餾水) 融入自來水。每次準備新鮮溶液使用。



6.2 電腦影像之處理

隨著影像處理技術的進步，在細胞遺傳學上，利用電腦輔助之染色體快速處理的數位化系統已經取代了傳統的照相技術，由於顯微處理系統、顯像技術、偵測系統與印表機的進步，目前已經可以獲得極佳的影像品質，加上近來電腦科技的日新月異，相信不久的將來，在影像解析度上可以達到更完善的境界。

傳統細胞遺傳實驗室，利用照相技術的處理方式，通常得花些時間來完整地保存底片，並且需要在暗房洗照片，再將照片中的染色體剪下來做排序。所謂電腦輔助影像處理系統，是指取得顯微鏡下的細胞分裂中期的染色體經由數位影像處理後，利用電腦螢幕顯示從事加工的動作。技術員可以先將影像從顯微鏡中捕捉下來，儲存在電腦中，再利用時間完成染色體的排序，這一過程對熟練電腦操作的技術員來說，通常不需要一個小時即可以完成。這一個系統最大的好處是除了節省時間外，還可降低照相成本與減少檔案儲存的空間，並利於長期保存。

影像品質的改善：

為了取得更好的影像，必須兼顧細胞分裂中期染色體取得的技術，配合電腦操作技術、顯微鏡和影像的擷取與處理。

6.2.1 細胞分裂中期染色體的準備 (包括染色體長度、染色技術、顯帶的解析度)

要達到較佳的染色體判讀結果，首先須熟悉染色體長度、染色技術與顯帶的解析度。相較於長的染色體，短的染色體通常是較緻密、染色較深、其中較細微的顯帶不易查看；至於深染的顯帶雖易於鏡檢下做判讀，為了達到相同解析度，相對地會因電腦處理系統下使用加強對比的功能而導致判讀的困難度。染色方式、技術與時間不同會有不一樣的結果，所以實驗室必須調整染色技術來配合電腦處理系統以達到最佳的染色體判讀結果。染色體的高解析度，同時與染色技術和染色體的長度有關，對於相同長度的染色體，可利用顯帶解析系統來建立染色體顯帶的解析度。如果解析度無法利用降低染色時間來改善，那就要拉長染色體的長度，這必須靠取得細胞分裂前期染色體或利用高染色體解析度技術來達成，光靠延長染色體的長度是無法改善顯帶的解析度。





6.2.2 顯微鏡

擷取適切的影像有賴於適當的 Kohler 照明，而 Kohler 照明系統和聚光條件必須調整在適當的位置，才能發揮最大的放大效果。

6.2.3 放大功能

染色體經由高倍放大後，可以增加染色體的解析度，但若合併使用照像轉接器則會降低影像解析度，而這不具放大倍數的功能雖會增加染色體的實際大小，卻不會改善解析度，所以爲了產生鮮明且高解析度的影像，可以顯微鏡配合 100x 油鏡的使用。

6.2.4 焦距調整

正確焦距的使用可以大幅度改善影像的銳利度，有時候要讓全部的染色體達到銳利的影像是很困難的，主要是因爲全部染色體並不是位在同一焦距的平面上，這時如果利用傳統的照相技術則通常需要花多餘的時間去找另一個焦距以取得較清楚的影像，而若是採用電腦處理系統就可以同時處理全部的染色體。

6.2.5 影像的擷取

合併適當的照明系統與調整適宜的焦距，細胞分裂中期染色體是可以很容易地被拍下來，再經由電腦數位化的影像處理，可以將顯微鏡照像系統的訊號轉爲數位影像，這些數位影像分別是由行與列所組成的柵狀系統，這些格子樣交錯的點稱爲映像點 (pixel)，每一個映像點 (pixel) 或是圖片元素組成一個灰值，這些灰值組合成的視野，包括染色體、雜質、細胞質和細胞分裂間期的細胞核。

指標染色體的運用：

位於 X、第 10 號、第 11p 號、第 12q 號和第 17q 號染色體的黑色顯帶被用來當成指標染色體，如果這幾條染色體被適當地顯現出來，則其他細微的顯帶就可以很容易的被區別出來。若是過度染色的染色體，易導致細微的顯帶融合在一起，形成更深更厚的顯帶而使得顯帶數目相對變少。



6.2.6 加強系統

1. area / window 對比功能

很多實驗室發現染色體的終端與衛星處很不容易去區分，也容易在電腦影像處理後不見了，若是利用影像增強銳利度的處理後，染色體中顯示白灰階至中階的顯帶會因此變得較白，就像染色體的終端與衛星處，加上白底的紙張而使得印出來的結果不清楚，看起來像是不見了。

基於這個因素，有些電腦影像處理系統具有 area / window 對比功能以作為影像的加強，這個功能使得染色體的終端與衛星處，可以在使用加強銳利度的功能之前，先提高影像的顯現，這個技術可以使原本很淡的灰階變得稍微深一點。缺乏中心體的染色體與 4p、9q、17q、19 和 22 號染色體有很淡的終端區域，這些區域可以在暗房中經由將 G 顯帶染色法的染色體過度曝光，或是降低 Q 顯帶染色法的染色體曝光，就可以使它們容易在照片裡被辨識出來，同樣地，電腦中 area/window 對比功能就是具備這樣增加辨識的能力。

2. 銳利度 (sharpening)

在執行 area / window 對比後，建議使用增強銳利度的功能，它可以使所有的影像變得較深，稍微增加銳利度的運用勝於過度的使用，若過度使用則容易使影像變成有缺口或是點狀化，就會像細胞經過胰蛋白酶過度處理的結果。

3. 對比 (contrast)

影像經過銳利化後，對比的使用可以調整影像中淡色與深色的層次，較深色的區域會因為強度的增強使細微的灰色顯帶會更易判讀，不過要避免使用過多對比功能的處理，這樣會使黑色顯帶彼此連在一起而導致解析度的降低。

6.2.7 電腦系統整合處理

對於一個細胞遺傳實驗室而言，要將染色體排序，成功地從照像系統轉型到利用電腦處理影像系統，有幾個重要的關鍵因素需要考量，設備好的實驗室利用電腦影像處理技術，將有助於培養未來更有能力的專家。



1. 傳統照相系統與電腦處理系統的比較

選擇實驗室中一、二位熟悉暗房技術與染色體顯帶法的技術員，先給予足夠的時間讓他們完全熟悉電腦系統的操作，並提供好的工作環境，以減少不必要的焦慮。電腦系統處理影像的結果，必需先以傳統高品質的照相技術作為比對的標準，這樣可使學習者依據傳統照相品質來調整電腦影像處理的結果，加上先前已熟悉電腦的操作指令，相形之下，可以加速品質的提升。一旦建立好一套典型的影像提升系統，留下正確操作流程的記錄以備未來參考之用。當第一位使用者熟練這套系統，並能生產出高品質的影像結果時，接著由他將技術傳給實驗室其他的人，當不同人使用時，會漸漸發現其他的問題，再針對不同的問題加以討論以尋求改善之道，希望以達成高品質的影像為最終目的。

2. 品質控制

實驗室主持人與技術員必須定期的開會，討論電腦處理影像的品質與操作過程中所遭遇的問題，彼此間充分的互動有助於提升電腦處理系統的運用。最終目的是希望實驗室每一位技術員都能熟悉這一套新的系統，並將它列入為實驗室品質控制的一個項目，不但用以提升工作效率外，更要維持高品質的水準。

