

How to Use Flow Cytometer and Cell Sorter (Practice in English/Japanese)

幾尾 真理子、大家 吉泰 (ウォーターズバイオサイエンス)、実験実習支援センタースタッフ
Mariko Ikuo, Yoshiyasu Ooie (Waters Biosciences), CRL staff

フローサイトメーターは個々の細胞の分子の発現を半定量的に測定できる装置である。装置は解析専用のアナライザーと解析分取が可能なセルソーターの 2 機種があり、分子の発現の同定には蛍光色素で認識された抗体がよく用いられる。更に標識抗体以外の蛍光物質を測定する事も試みられている。今回は実習として、機器更正用ビーズを用いて、FACS にて検出する。

機器更正用ビーズを用いて、FACS にて検出します。

アナライザーの BD LSRFortessaX-20、BD FACSCanto II とセルソーターの BD FACSAria Fusion の 3 機種を用いて解析を行います。

Flow cytometer is a device that can semi-quantitatively measure the expression of individual cell molecules. There are two types of devices, an analyzer and a cell sorter. Antibodies recognized by fluorescent dyes are often used to identify the expression of molecules. It has also been attempted to measure fluorescent substances other than labeled antibodies.

As a practical training, we detected with FACS using beads for flow cytometer setup.

* FACS (fluorescence activated cell sorter) is a trademark of Becton, Dickinson and company. Beads for flow cytometer setup are detected with FACS.
We will analyze using three instrument, analyzer BD LSRFortessaX-20 and BD FACSCanto II, and cell sorter BD FACSAria Fusion.

【Practice】 Time schedule

1. 17:00 – 18:20 **Practice**（細胞工学実験室2、4）

Explanation of instrument

Data acquisition and analysis

Practice will be done in 3 groups and 2 instruments in turn.

Group A; LSRFortessa (17:00–17:40) → AriaFusion (17:40–18:20)

Group B; AriaFusion (17:00–17:40) → LSRFortessa (17:40–18:20)

Group C; AriaFusion (17:00–17:40) → Canto II (17:40–18:20)

The aim for today's practice is to learn about the settings and analysis for FACS.

We want you to know that FACS is a useful and easy instrument.

■ Practice

Samples to measure;

Samples are prepared in the tubes as shown below.

Adjust the voltage/compensation for settings.

Analyze the percentage of PE positive Beads.

Tube NO.	1	2	3	4	5
label	Unlabeled	Unlabeled FITC	Unlabeled PE	Unlabeled APC	Unlabeled FITC PE APC
Unlabeled	○	○	○	○	○
FITC		○			○
PE			○		○
APC				○	○



BD LSRFortessa™ X-20 フローサイトメーター 簡易マニュアル

Ver1.2

日本ベクトン・ディッキンソン株式会社

BD Life Sciences-Biosciences

機器シリアル番号：



BD LSRFortessa™ X-20 フローサイトメーター システム使用上の注意

1. サンプルは測定直前にメッシュを通してください。

FACS のトラブルの多くは凝集塊をそのまま流してしまうことによる、流路の詰まりが主な原因です。サンプルは必ず測定直前にメッシュを通してください。Falcon #352235 を使用してください。

2. サンプルは測定直前によく攪拌してください。

これも前項と同じく、流路のつまりを防止するために必須の作業です。FACS のサンプルはチューブ内を加圧して本体に入っていきます。吸引をしているわけではありません。したがって、サンプルがチューブの底に沈殿した状態でサンプルを流すと、大量の細胞が一度に流路内に入るため詰まりを誘発します。

3. 測定データはその都度持ち帰る。

データを HD に放置しておくことは、データ保全の問題のみならず、機器の正常作動にも影響を及ぼします。

PC に USB ポートを搭載していますので、フラッシュメモリー（必ずウイルスチェック済の物）などをご利用いただくと便利です。ただし貴施設のルールに従ってください。

4. 機器洗浄を徹底する。

FACS は流路にサンプルを流して、そこにレーザー光を照射して、得られる蛍光を検出する機械です。したがって流路内の汚れ(蛋白吸着等)が測定感度の低下に直結します。使用後は必ず所定の方法で洗浄を実施してください。

機器・試薬の使用法および学術に関するサポート： 0120-4890-77

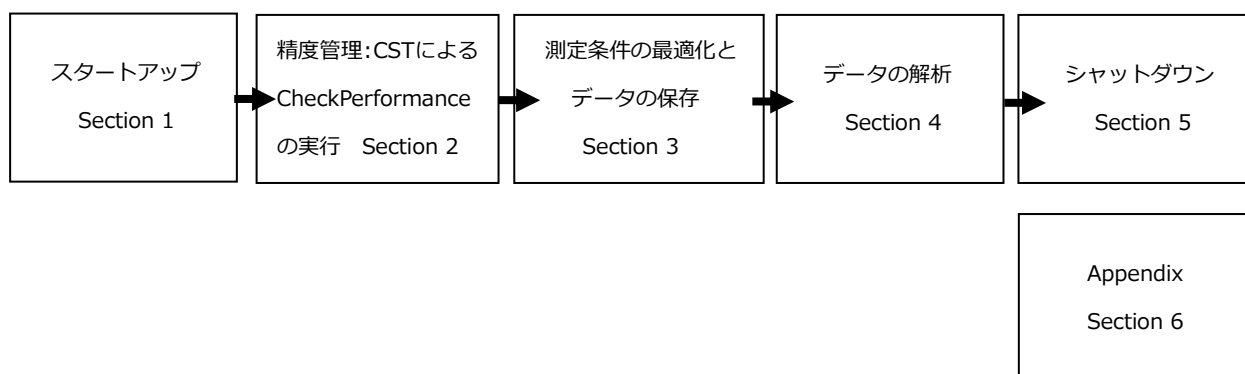
機器のトラブルに関するサポート： 0120-7099-12

上記電話にてオペレーターが対応いたします。

また、機器・試薬の使用法および学術に関するご質問は tech_cell@bd.com にても承ります。

BD LSRFortessa™ X-20 フローサイトメーターシステム

簡易取り扱いガイド



Section1-1 : スタートアップ（本体および PC の起動）

- ① PC 電源を入れます。
- ② PC が **Windows 10** の場合（BD FACSDiva™ software Ver 9.0 以降）
 - 起動後、キーボードの「Ctrl+Alt+Delete」にて画面ロックを解除します。
 - User name に「**BDAdmin**」を、Password に「**BDIS#1\$\$**」（大文字）を入力し、Enter キーを押します。

PC が **Windows 7** の場合（BD FACSDiva™ software Ver 8.0 以降）

 - Log On 画面において、**Admin** アイコンを選択、Password に「**BDIS#1**」（大文字）を入力し、Enter キーを押します。
- ③ 本体右側面上部の電源(緑)を入れます。
- ④ 2 分後、Diva ソフトウェア起動
 - Diva ソフトのアイコンを右クリックしプルダウンメニューの Open を選択します。
 - Log in 画面が表示されます。パスワードは必要ありません。
 - OK を押すと Diva ソフトが立ちあがります。
- ⑤ Cytometer ウィンドウの下部分が「Cytometer Connecting」から「Cytometer Connected」に切り替わります。

*レーザーのウォームアップは 30 分程度かかりますので、それまでは測定をお控え下さい。
- ⑥ Diva ソフトと本体の接続終了後、CST Mismatch ウィンドウが表示された場合には、「Use CST Settings」を選択します。

Section1-2 : スタートアップ (送液系の起動)

- ① シースタンク、廃液タンクの液量の確認を行って下さい。必要に応じて溶液の補充などを行います。
- ② シースフィルターを気泡を除く為、コネクタの先端部分を押し、気泡を出します。
- ③ シースラインの気泡を除く為、LSRFortessa™ X-20 本体右側面にあるピンチコックローラーを緩め、気泡を出します。



- ④ Sample Injection Port (SIP)にセットしてある滅菌水のチューブを外します。
- ⑤ 本体パネルの「PRIME」ボタンを押して流路の気泡除去を行います。

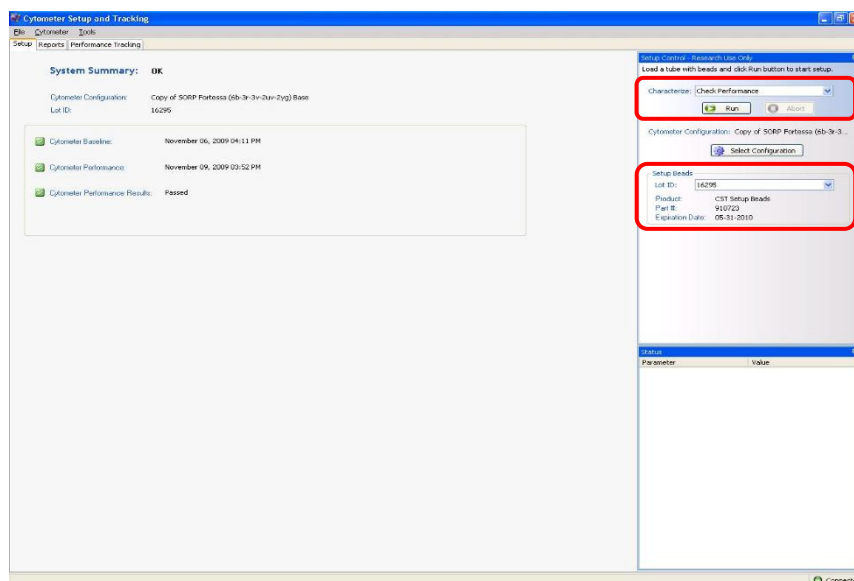


- ⑥ 同様に PRIME を繰り返し、3 回程度行います。
- ⑦ SIP に FACSFlow 2ml が入ったチューブをセットし、Flow Rate「HIGH」にして「RUN」ボタンを押します。
- ⑧ 5 分後 SIP から FACSFlow 入りチューブを外し、滅菌蒸留水入りチューブを取り付け「STANDBY」ボタンを押します。

Section2 : 精度管理 (CST による Check Performance の実行)

- ① メニューバーの「Cytometer」→「CST」をクリックします。
- ② Diva ソフトの connection が切断され CST 画面が起動します。
- ③ CST 画面が起動後、Characterize より「Check Performance」を選択します。
- ④ Setup Beads の Lot ID が正しく選択されているか確認します。

* 前回の Check Performance から 24 時間以上経過の場合メッセージは赤字で表示されます。

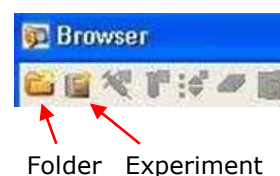


- ⑤ 5ml の測定チューブに **350 μ L** の **FACSFlow** と 1 滴の CST Beads を混和します。
- ⑥ Beads の入ったチューブを SIP に取り付け、本体パネルの Flow Rate を「LOW」に設定し「RUN」ボタンを押します。
* 本体パネルの **SAMPLE FINE ADJ** は中央に設定してください。
- ⑦ Cytometer Setup and Tracking 画面の「Run」をクリックし、確認のメッセージが出ますので「OK」をクリックします。
- ⑧ Setup Tasks が表示され、すべての項目に  が表示されると終了です。
- ⑨ CST が終了するとチューブ取り外しの Information が表示されますので、チューブを取り外した後、滅菌蒸留水入りチューブを SIP にセットし、本体パネルの「STANDBY」ボタンを押します。「View Report」をクリックすると Cytometer Performance Report が表示されます。赤字（エラー）が無ければ問題ありません。
* Fail が出た場合はフローセルの洗浄等を行います。詳細は BD LSRFortessa™ X-20 Flow Cytometer Training Manual (Section2. 精度管理におけるトラブルシューティング) をご覧ください。
- ⑩ CST 終了後メニューバーの「File」→「Exit」を選択します。Diva ソフトが起動し本体の接続終了後、CST Mismatch ウィンドウが表示されますので、「Use CST Settings」を選択します。その後データの取り込み操作を行います。

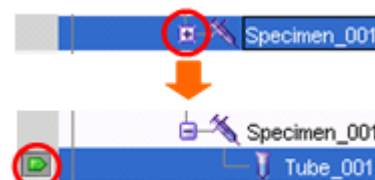
Section3-1 : 測定条件の最適化とデータの保存

<Experiment およびプロットの作成>

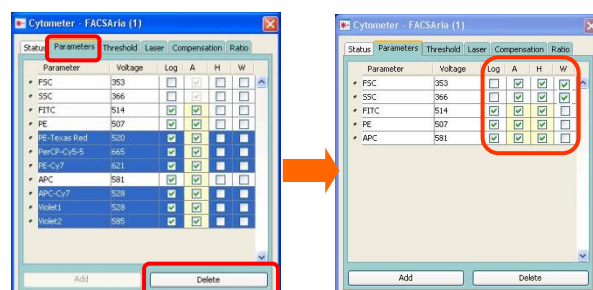
- ① Browser ウィンドウに新しいフォルダおよび Experiment を作成します。既存のデータを開く場合はアイコンをダブルクリックします。  → 



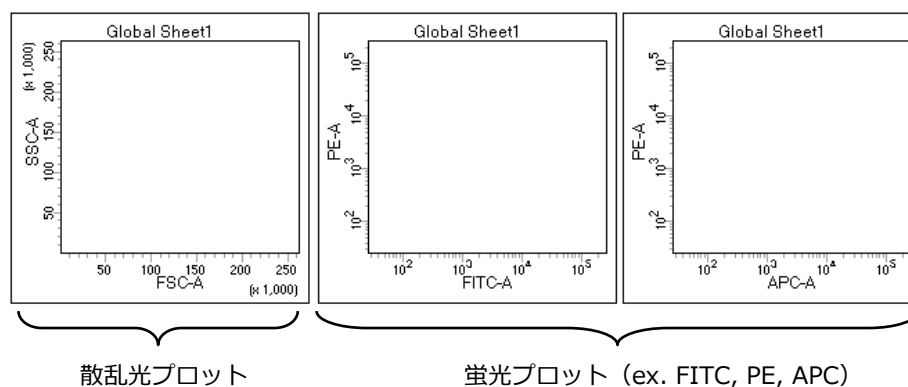
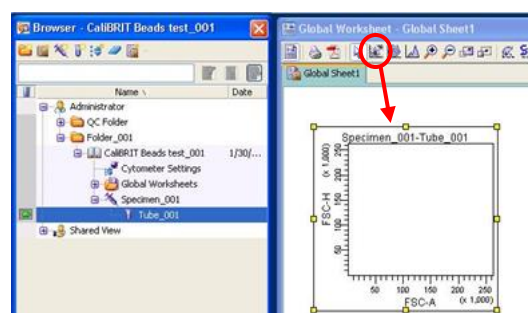
- ② Specimen(注射器のマーク)の「+」をクリックして開き、下層にある Tube の「Acquisition Pointer」をクリックします。Acquisition Dashboard および測定に必要なウィンドウが使用可能になります。



- ③ Cytometer ウィンドウの Parameters タブを開き、Delete ボタンで不要なパラメーターを削除します。一般的な解析の場合、FSC 及び SSC は log のチェックを外し、蛍光パラメーターは log にチェックを入れます。A(Area)の欄にチェックが入っていることを確認します。必要に応じて H(Height)と W(Width)にもチェックを入れます。



- ④ ワークシート上部のアイコンを選択し、ワークシート上にデータを表示するプロットを作成します。プロットは散乱光プロット (FSC-A vs SSC-A)、蛍光プロット (ex : FITC-A vs PE-A) を作成します。蛍光プロットは使用する蛍光色素に準じて作成します。必要に応じて Area Scaling Factor 調整用のプロットも用意します (Section6: Appendix 参照)。

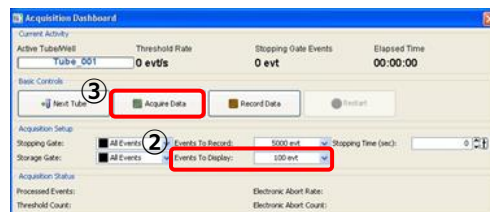


<散乱光および蛍光の電圧調整>

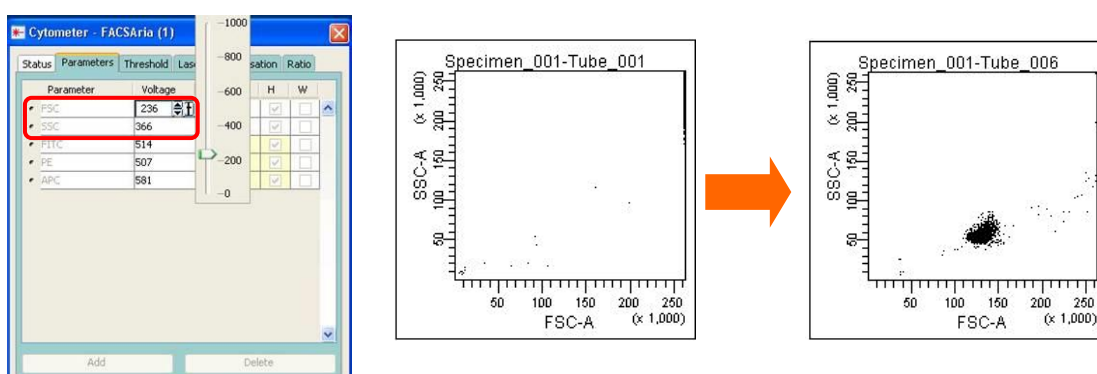
- ① ネガティブサンプルを SIP に取り付け、本体パネルの「RUN」 ボタンを押します。

- ② Events to Display を 1000 に設定します。

- ③ Acquisition Dashboard の「Acquire Data」 ボタンをクリックします。



- ④ Cytometer ウィンドウの Parameters タブから、散乱光(FSC, SSC)の Voltage を目的細胞集団が測定できるように、適切に調整します。



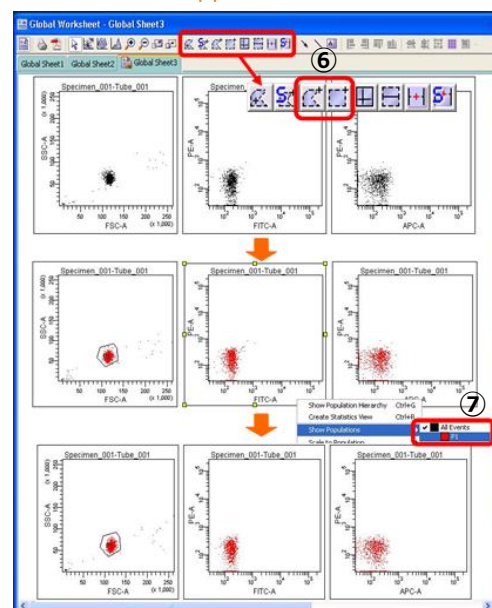
- ⑤ 必要に応じて Cytometer ウィンドウの「Threshold」タブでデブリのカット、「Laser」タブで Area Scaling Factor の調整をおこないます。

* Threshold および Area Scaling Factor の調整に関しては Section6 : Appendix をご覧下さい。

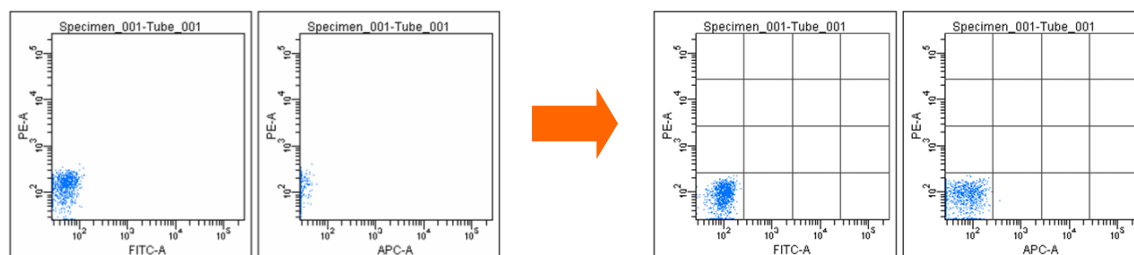
- ⑥ 散乱光プロットで目的細胞集団をゲーティングします。

- ⑦ ポピュレーションを展開したい蛍光プロットを右クリックし、「Show Population」で P1 ゲートを選択します。

- ⑧ 散乱光プロット上で右クリックし、「Show Population Hierarchy」を選択します。Hierarchy ウィンドウにはポピュレーションのイベント数、パーセンテージ等が表示されます。



- ⑨ ネガティブサンプルを使用して、蛍光プロット上での陰性領域を決定します。Cytometer ウィンドウの「Parameters」タブを選択し、各蛍光色素の Voltage を調整します。



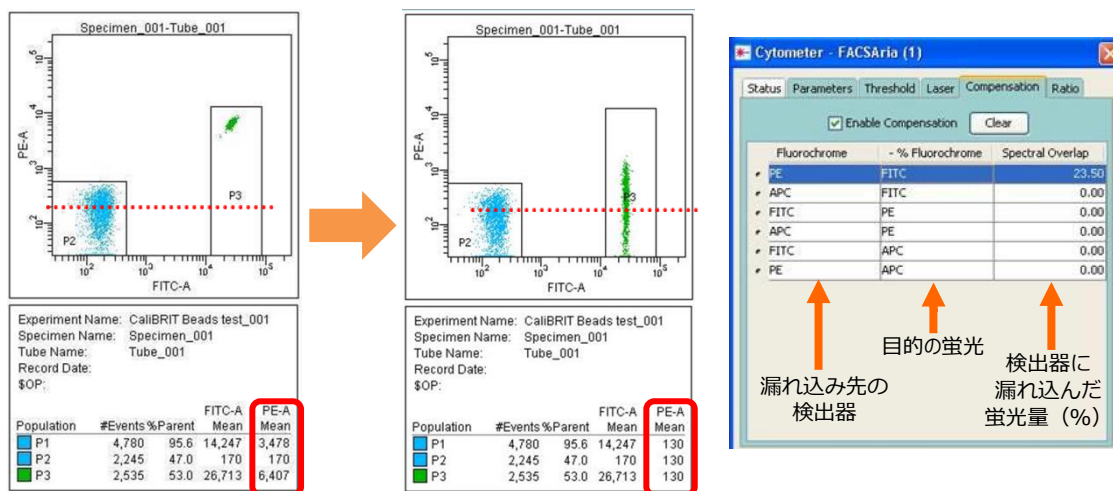
- ⑩ ネガティブ領域調整後、Acquisition Dashboard の「Stop Acquiring」をクリックし、サンプルチューブを SIP から取り外します。
- ⑪ 最後にポジティブサンプルを測定し、プロット上にポジティブポピュレーションが表示されていることを確認します。サンプルチューブを SIP から取り外し、滅菌水が 1ml 入ったチューブをセットし、本体パネルの「STANDBY」ボタンを押します。

<蛍光補正: Compensation>

蛍光色素を 2 色以上使用しており蛍光の漏れ込みがある場合、単染色サンプルを使用して蛍光補正を行います。Manual compensation と Auto compensation の 2 通りがあります。

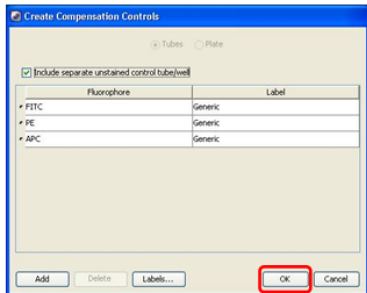
Manual compensation

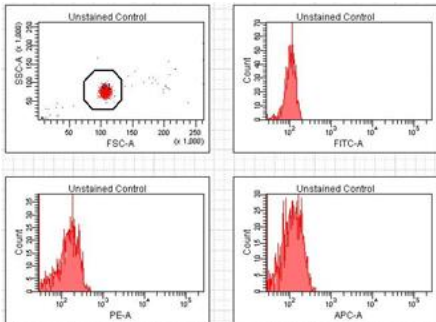
- ① SIP に蛍光補正用の単染色サンプルをセットし本体パネルの「RUN」ボタンを押して、「Acquire Data」ボタンをクリックします。データ表示後、「Stop Acquiring」を選択し、サンプルチューブを取り外して本体パネルの「STANDBY」ボタンを押します。
- ② ゲートメニューから四角形ゲートを選択し、ネガティブとポジティブポピュレーションにゲートを設定します。
- ③ 目的の蛍光プロットを右クリックし、「Create Statistics View」を選択して、統計データを表示します。
- ④ Cytometer ウィンドウの「Compensation」タブを開き、蛍光補正を行います。FITC→PE への漏れ込みを調整する場合は、統計データの PE-A の Mean がポジティブポピュレーションとネガティブポピュレーションでほぼ同じになるよう Spectral Overlap の値を調整します。

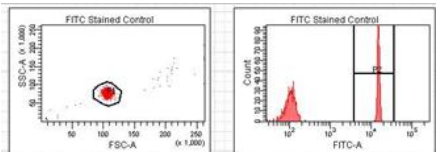


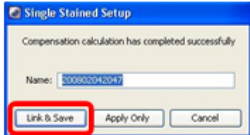
- ⑤ 他の蛍光補正も同様に行います。

Auto Compensation

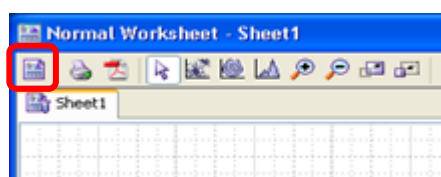
- ① メニューバーの「Experiment」→「Compensation Setup」→「Create Compensation Controls」を選択します。Create Compensation Controls ウィンドウが開きますので、「OK」をクリックします。


The 'Create Compensation Controls' dialog box is shown. It has a 'Tubes' tab selected. A table lists controls: FITC, PE, and APC, each with a 'Generic' label. The 'Include separate unstained control tube(s)' checkbox is checked. At the bottom right, the 'OK' button is highlighted with a red box.
- ② Compensation Controls の+をクリックして、下の階層の Unstained Control の Acquisition ポインターを選択します。ネガティブサンプルを SIP に取り付け、本体パネルの「RUN」ボタンを押し「Acquire Data」をクリックし、目的集団に P1 のゲートを移動します。


Four flow cytometry plots for an 'Unstained Control' are shown. Top-left: SSC-A (x 1,000) vs FSC-A (x 1,000) with a P1 gate. Top-right: Count vs FITC-A. Bottom-left: Count vs PE-A. Bottom-right: Count vs APC-A. All histograms show a single peak at low intensity.
- ③ Acquisition Dashboard の「Record Data」をクリックし、データの保存を開始します。ネガティブサンプルの取込み終了後、本体パネルの「STANDBY」ボタンを押しサンプルを SIP から外します。
- ④ P1 ポピュレーションを選択し、マウスを右クリックし「Apply to Compensation Controls」を選択します。
- ⑤ Acquisition Dashboard 上の「Next Tube」をクリックし、次の Tube に切り替え、サンプルを SIP に取り付けます。本体パネルの「RUN」ボタンを押し「Acquire Data」→「Record Data」をクリックし、データの保存を開始します。保存終了後、本体パネルの「STANDBY」ボタンを押しサンプルを SIP から外します。必要に応じて、P2 ゲートを適切に設定します。


Two flow cytometry plots for a 'FITC Stained Control' are shown. Left: SSC-A (x 1,000) vs FSC-A (x 1,000) with a P1 gate. Right: Count vs FITC-A. The histogram shows a peak shifted to the right compared to the unstained control.
- ⑥ 同様の操作を繰り返します。
- ⑦ メニューバーの「Experiment」→「Compensation Setup」→「Calculate Compensation」を選択します。蛍光補正値が適切に計算された場合、Single Stained Setup ウィンドウが現れるので名称を入力をし、「Link & Save」を選択します。


The 'Single Stained Setup' dialog box is shown. It says 'Compensation calculation has completed successfully'. There is a 'Name:' field with '2006020204' entered. At the bottom, the 'Link & Save' button is highlighted with a red box.
- ⑧ Acquisition ポインターを Tube_001 に切り替えます。Worksheet 画面を Sheet から Global Worksheet に切り替えます。Cytometer ウィンドウの「Compensation」タブの Spectral Overlap に、蛍光補正値が入っていることを確認します。



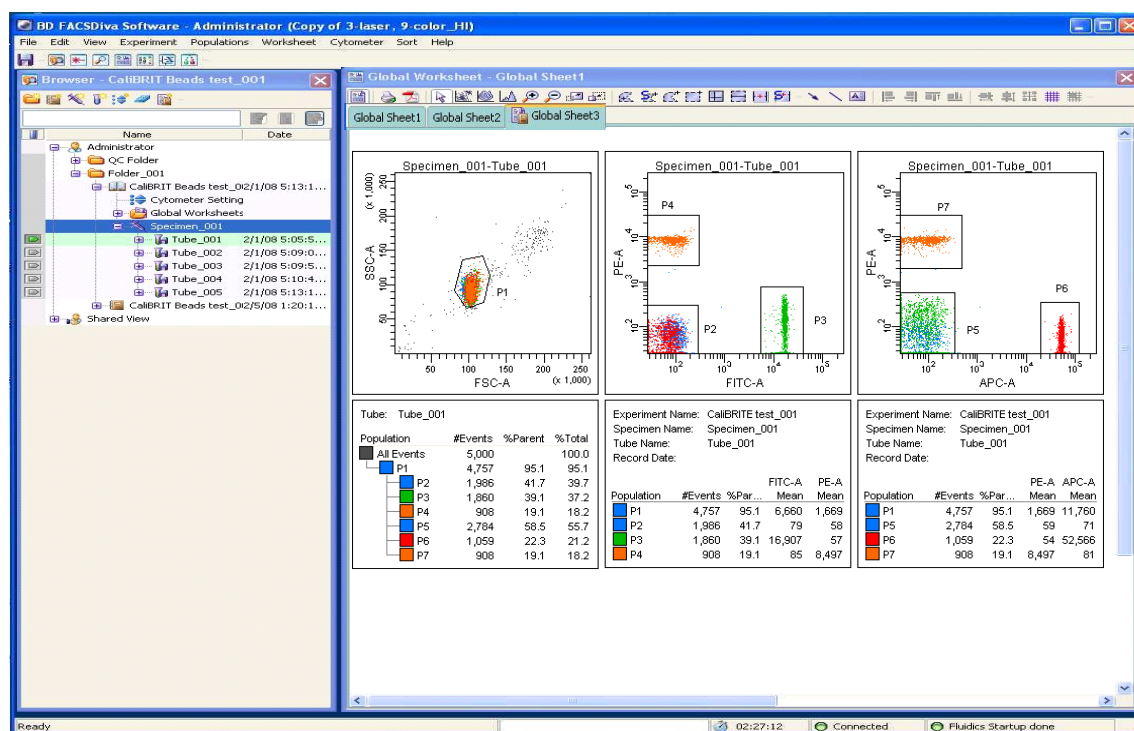
<データの保存>

- ① 電圧調整や蛍光補正などの機器設定後、サンプルのデータ保存を行います。
Acquisition Dashboard の「Events To Record」で細胞の保存個数を設定します。
- ② サンプルを SIP にセットし、本体パネルの「RUN」ボタンを押し「Acquire Data」をクリックします。「Record Data」をクリックするとデータの保存が開始されます。データ保存終了後、サンプルを SIP から外します。
- ③ 次のサンプルを測定する場合は、Acquisition Dashboard の「Next Tube」をクリックし、データを保存する新しい tube を作成します。②と同様の操作を行います。
- ④ 測定終了後、滅菌水 1ml が入ったチューブをセットし、本体パネルの「STANDBY」ボタンを押します。

Section4 : データの解析

- ① 新しく解析用の Global Worksheet を作成します。Browser ウィンドウの Global Worksheets を右クリックし「New Global Worksheet」を選択します。
- ② 解析目的チューブの「Acquisition Pointer」を選択します。Global Worksheet 上で解析の目的に応じたプロットを作成します。
- ③ 散乱光プロットにおいて、解析する細胞集団にポピュレーション (P1 ゲート) を設定します。
- ④ プロットを右クリックし、「Show Population Hierarchy」ウィンドウを表示させます。
- ⑤ ポピュレーションを展開する蛍光プロットを右クリックし、「Show Population」より目的ポピュレーションを選択して展開します。
- ⑥ 各プロットにおいて、適切なポピュレーションを選択、ゲートなど作成し解析します。

* 死細胞やダブルレットを除去した解析を行うことを推奨します。Section6 : Appendix をご覧下さい。



- ⑦ バックアップを取る場合、あるいは他の FACS 用ソフトウェアで解析する場合は、Experiment を右クリック→Export→Experiment もしくは FCS file データを選択し、Export してください。
- ⑧ 次回、Experiment を複製して使う場合は、Experiment を右クリック→Duplicate Without Data を選択します。

* Cytometer ウィンドウの Laser タブ内の数値は複製されません。特に Area Scaling Factor の数値を調整した場合は、次回の測定直前に同じ数値を再入力してください。

Section5 : シャットダウン

- ① FACSClean 3mL 入ったチューブを SIP にセットし、サポートアームを横位置で本体パネルの Flow Rate を「HIGH」にし「RUN」ボタンを押し、1 分間洗浄します。
- ② サポートアームを中央位置にし、5 分間ラインを洗浄します。
*PI を用いての細胞周期解析を行った場合、ラインの汚れが激しい場合がありますので 10 分間洗浄を行って下さい。
- ③ サンプルチューブを取り外し、同様に FACSRinse 3mL、滅菌蒸留水 3ml の順番で洗浄を実施します。
*PI を用いての細胞周期解析を行った場合は 10 分間洗浄を行ってください。
*この洗浄作業は必ず実施して下さい。
これを怠ると SIP の詰まりを招き、機器トラブルの原因になります。
- ④ 本体パネルの「STANDBY」ボタンを押し、洗浄を終了します。
- ⑤ メニューバーの「File」→「Quit」をクリックし Diva ソフトを終了します。
- ⑥ 本体電源を切り、PC をシャットダウンします。
- ⑦ SIP の乾燥を防止するため、滅菌蒸留水 1mL の入ったチューブを SIP にセットします。
*1ml 以上の場合には、レギュレータに逆流し、装置を破損する可能性があります。
- ⑧ 貴施設のルールに従い、廃液を処理します。
- ⑨ シースタンクにシース液を補充します。

Section6 : Appendix

① 死細胞およびダブルット細胞の除去：

目的細胞の割合を正確に測定するために推奨される解析方法です。

② Area Scaling Factor の調整：

Area Scaling Factor の調整により、Area と Height の表示位置をそろえる事ができます。

これは両者のダイナミックレンジ（測定範囲）をそろえる意味でも非常に重要です。

通常の細胞でも調整が必要ですが、特に大きな細胞を正確に測定する場合の重要な設定です。

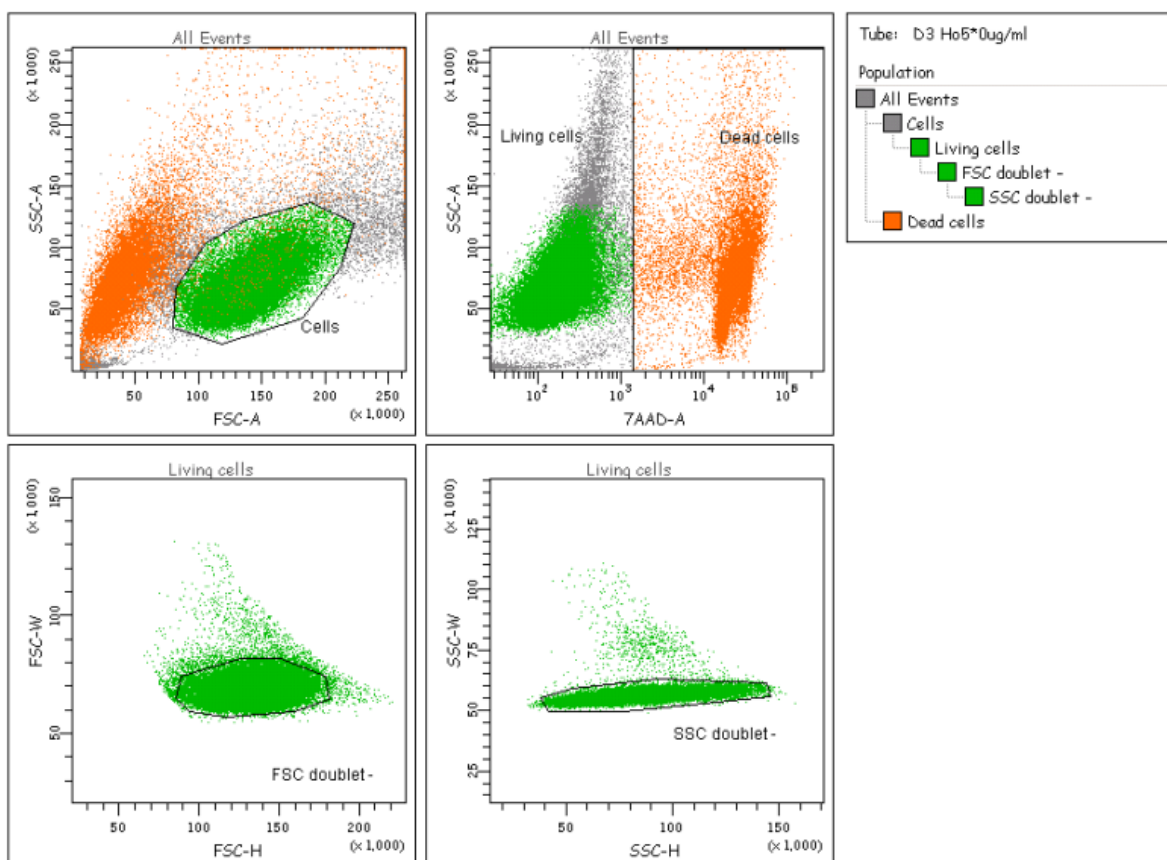
③ Threshold の調整：

散乱光プロットでデブリや電氣的なノイズをカットする機能です。

① 死細胞およびダブルット細胞の除去：

死細胞除去プロット：SSC-A vs 死細胞判定試薬（PI, 7AAD など）

ダブルット除去プロット：FSC-W vs FSC-H, SSC-W vs SSC-H

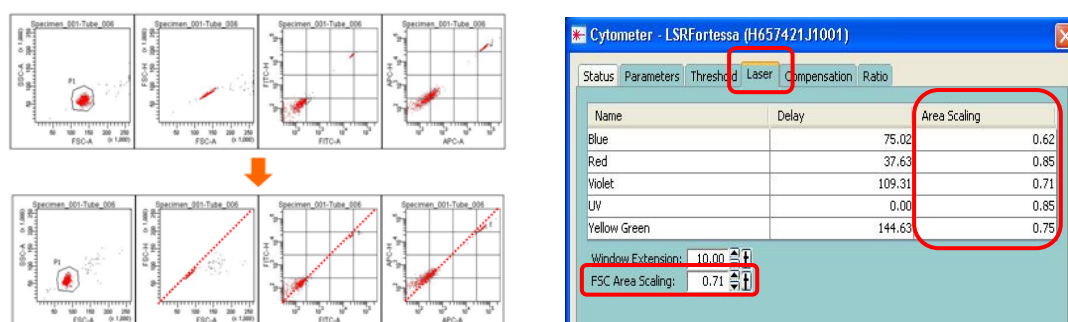


② Area Scaling Factor の調整 :

1. Cytometer ウィンドウの「Parameters」タブを選択し、「Area」と「Height」にチェックを入れておきます。
2. FSC-A vs SSC-A、FSC-A vs FSC-H、ex. FITC-A vs FITC-H、ex. APC-A vs APC-H のプロットを作成します。
3. ポジティブサンプルを測定し、各蛍光のプロットで蛍光陽性集団が対角線に分布するように、Cytometer ウィンドウの「Laser」タブ内にある Area Scaling の値を調整します。

* Area Scaling の値を調整した場合は、数値をメモしておいてください。

今後、同じ細胞を使った実験系であれば、同じ数値を入力して測定することができます。



③ Threshold の調整 :

Cytometer ウィンドウの「Threshold」タブを選択し、値を調整することでデブリやノイズデータをカットできます。* 初期値は FSC : 5000 です。

操作の詳細は BD LSRFortessa™ X-20 Flow Cytometer Training Manual をご覧下さい。



***BD FACSCanto™ II* フローサイトメーター 簡易マニュアル**

Ver1.2

日本ベクτονディッキンソン株式会社

BD Biosciences

BD FACSCanto II フローサイトメトリーシステム使用上の注意

1. サンプルは測定直前にメッシュを通してください。

FACS のトラブルの多くは凝集塊をそのまま流してしまうことによる、流路の詰まりが主な原因です。サンプルは必ず測定直前にメッシュを通してください。BD Falcon #352235 を使用してください。

2. サンプルは測定直前によく攪拌してください。

これも前項と同じく、流路のつまりを防止するために必須の作業です。FACS のサンプルはチューブ内を加圧して本体に入っていきます。吸引をしているわけではありません。したがって、サンプルがチューブの底に沈殿した状態でサンプルを流すと、大量の細胞が一度に流路内に入るため詰まりを誘発します。

3. 測定データはその都度持ち帰る。

データを HD に放置しておくことは、データ保全の問題のみならず、機器の正常作動にも影響を及ぼします。PC 前面に USB を搭載していますので、フラッシュメモリーなどをご利用いただくと便利です。

4. 機器洗浄を徹底する。

FACS は流路にサンプルを流して、そこにレーザー光を照射して、得られる蛍光を検出する機械です。したがって流路内の汚れ (蛋白吸着等) が測定感度の低下に直結します。使用後は必ず所定の方法で洗浄を実施してください。

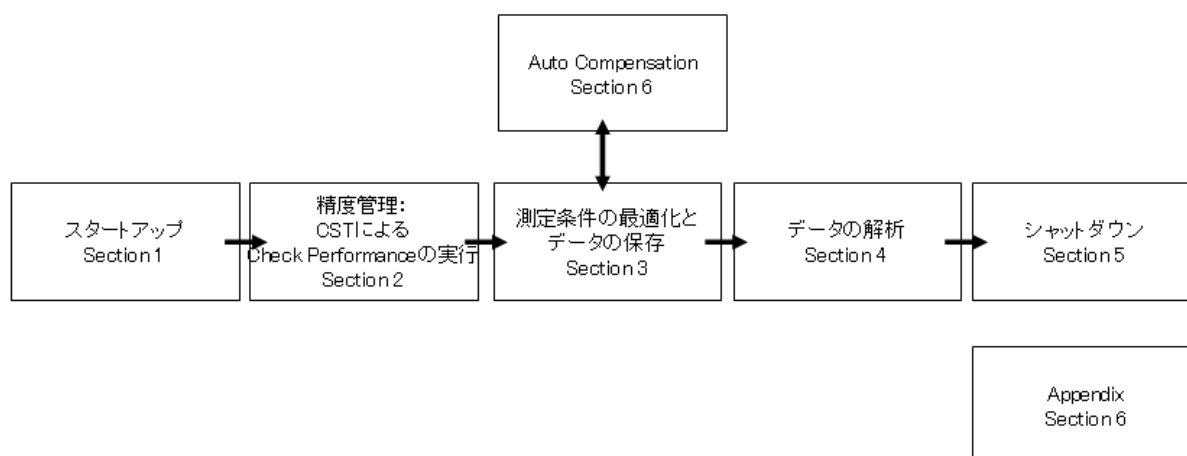
サンプル調製法、試薬、機器操作に関するお問い合わせは：0120-4890-77

機器の故障、トラブル発生時は：0120-7099-12

上記電話にてオペレーターが対応いたします。

また、サンプル調製法、試薬、機器操作に関するご質問は tech_cell@bd.com にても承ります。

BD FACSCanto II フローサイトメトリーシステム簡易取り扱いガイド



Section1-1: スタートアップ (機器及び PC の起動)

PC が Windows XP の場合 : BD FACSDiva™ software Ver 7.0 以前

- ① 本体左側面のメイン電源（緑）を入れます。
- ② **2 分後**、PC 電源を入れます。
- ③ Windows の Log On を実施します。（パスワードは **BDIS** 大文字です。）
- ④ Diva ソフトウェア起動
 - Diva ソフトのアイコンを右クリックし、プルダウンメニューの「Open」を選択します。
 - Log in 画面が表示されます。パスワードは必要ありません。
- ⑤ Cytometer ウィンドウの下部分が「Cytometer Connecting」から「Remaining warm-up time」もしくは「The system is ready」に切り替わります。画面上にレーザーウォームアップの時間が表示され、レーザーウォームアップが終了するとシステムスタートアップが完了します。
- ⑥ Diva ソフトと本体の接続終了後、CST Mismatch ウィンドウが表示されますので、「Use CST Settings」を選択します。

PC が Windows 7 の場合 : BD FACSDiva™ software Ver 8.0 以降

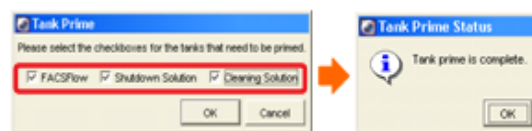
- ① 初めに PC 電源を入れます。
- ② Windows の Log On を実施します。（**Admin** アイコンを選択: パスワードは **BDIS#1** 大文字です）
- ③ 本体左側面のメイン電源（緑）を入れます。
- ④ **3 分後**、Diva ソフトウェア起動
 - Diva ソフトのアイコンを右クリックし、プルダウンメニューの「Open」を選択します。
 - Log in 画面が表示されます。パスワードは必要ありません。
- ⑤ Cytometer ウィンドウの下部分が「Cytometer Connecting」から「Remaining warm-up time」もしくは「The system is ready」に切り替わります。画面上にレーザーウォームアップの時間が表示され、レーザーウォームアップが終了するとシステムスタートアップが完了します。
- ⑥ Diva ソフトと本体の接続終了後、CST Mismatch ウィンドウが表示されますので、「Use CST Settings」を選択します。

*Diva ソフトを立ち上げた後、5 分程度経過しても「Cytometer Connecting」のまま切り替わらない場合、もしくは「Cytometer Disconnected」が表示された場合はコネクトエラーを起こしています。その場合お手数ですが「File」メニューから Diva ソフトを「Quit」して、コンピューターおよび FACSCanto II 本体の電源を切って下さい。その後 1 分程度お待ちいただき、再度スタートアップを行ってください。

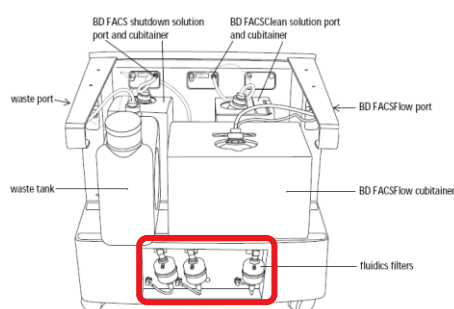
Section1-2 : スタートアップ (送液系の起動)

① Fluidics Cart の液量の確認をして下さい。必要に応じて溶液の補充を行います。

② メニューバーの「Cytometer」→「Cleaning Modes」
→「Prime After Tank refill」を選択し、チェックボックス全てにチェックを入れた後、OK をクリックします。終了のメッセージが出たら OK をクリックします。



③ Fluidics Cart 前面の各フィルターのエア抜きを行います。



④ SIT にセットしてある滅菌水のチューブを外します。

⑤ メニューバーの「Cytometer」→「Fluidics Startup」をクリックします。画面上に「Confirm」が現れますので、「OK」をクリックすると Fluidics Startup が開始されます。Fluidics Startup 完了後、画面上に「Fluidics Startup Complete. The System is Ready」のメッセージが出ますので「OK」をクリックします。

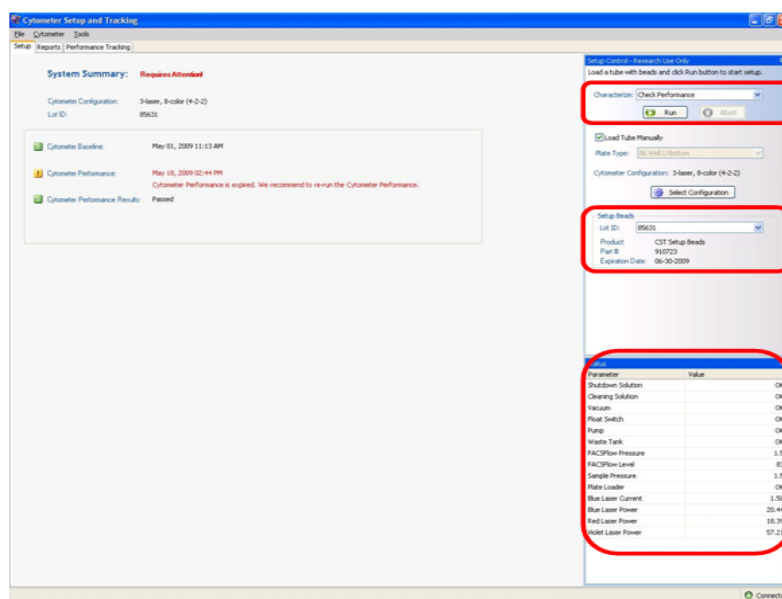
⑥ 本体上部のアクセスドアを開け、フローセルに空気が混入していないことを確認してください。気泡がある場合、メニューバーの「Cytometer」→「Cleaning Modes」→「De-gas Flow Cell」をクリックします。

＊この際、Cytometer ウィンドウ画面上「Status」タブ内に「Red Laser Power Low」のメッセージが現れますが無視して「Clear」をクリックして下さい。これは本体アクセスドアを開けることによるメッセージで、故障ではありません

Section2：精度管理（CSTによる Check Performance の実行）

- ① Fluidics Startup の終了後、メニューバーの「Cytometer」→「CST」をクリックします。
- ② Diva ソフトの Connection が切断され CST 画面が起動します。
- ③ CST 画面が起動後、Characterize より「Check Performance」を選択します。
- ④ Setup Beads の Lot ID が正しく選択されているか確認します。
- ⑤ Status 画面から現在の機器状態を確認します。

＊前回の Check Performance から 24 時間以上経過の場合メッセージは赤字で表示されます。



- ⑥ 5ml の測定チューブに 0.35ml の FACSFlow と 1 滴の CST Beads を混和します。
- ⑦ Beads の入ったチューブを SIT に取り付け、「Run」をクリックします。確認のメッセージが出ますので「OK」をクリックします。

＊Beads は希釈後冷暗所で保管し、8 時間以内に使用ください。

- ⑧ Setup Tasks が表示され、すべての項目に緑が表示されると終了です。
- ⑨ CST が終了するとチューブ取り外しの Information が表示されるのでチューブを取り外します。SIT が自動洗浄されます。「View Report」をクリックすると Cytometer Performance Report が表示されます。各検出器に Pass が表示されていれば問題ありません。

＊Fail が出た場合はフローセルの洗浄を行います。

- ⑩ CST 終了後メニューバーの「File」→「Exit」を選択します。Diva ソフトが起動し本体の接続終了後、CST Mismatch ウィンドウが表示されますので、「Use CST Settings」を選択します。その後データの取り込み操作を行います。

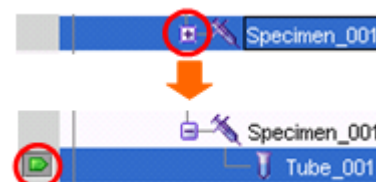
Section3-1：測定条件の最適化とデータの保存

<Experiment およびプロットの作成>

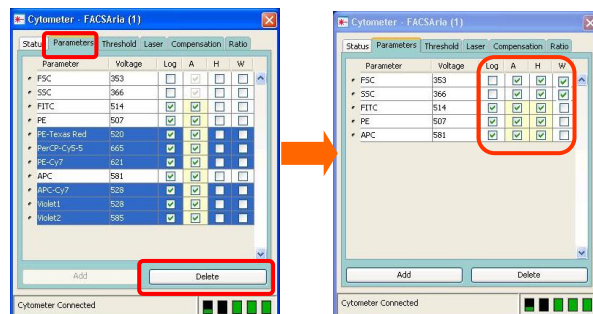
- ① Browser ウィンドウに新しいフォルダおよび Experiment を作成します。
既存のデータを開く場合はアイコンをダブルクリックします。



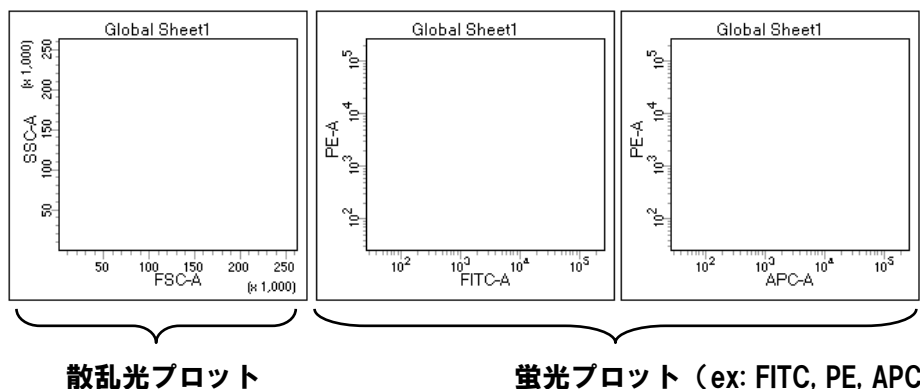
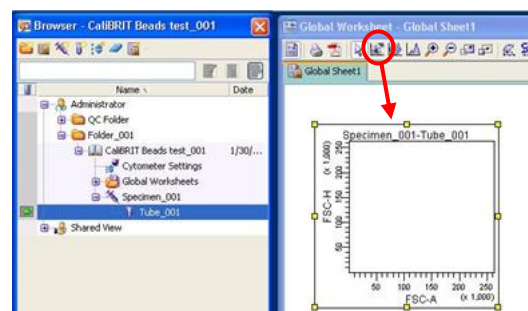
- ② Specimen (注射器のマーク) の「+」をクリックして開き、
下層にある Tube の「Acquisition Pointer」をクリックします。
Acquisition Dashboard および測定に必要なウィンドウが使用可能になります。



- ③ Cytometer ウィンドウの Parameter タブを開き、
Delete ボタンで不要なパラメーターを削除します。
一般的な解析の場合、FSC 及び SSC は log のチェック
を外し、蛍光パラメーターは log にチェックを
入れます。
A (Area) の欄にチェックが入っていることを確認します。
必要に応じて H (Height) と W (Width) にもチェックを
入れます。

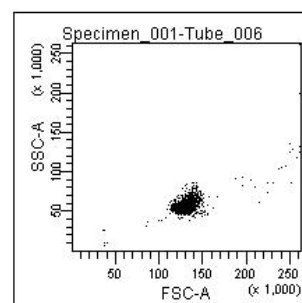
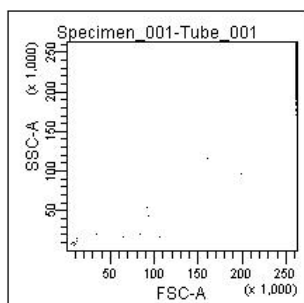
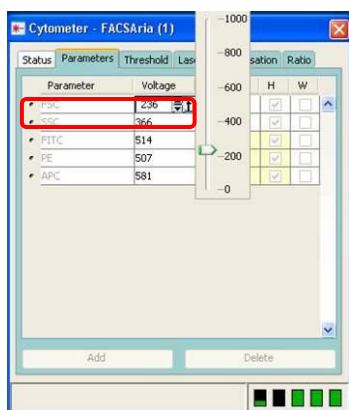


- ④ ワークシート上部のアイコンを選択し、ワークシート上
にデータを表示するプロットを作成します。
プロットは散乱光プロット (FSC-A vs SSC-A)、
蛍光プロット (ex: FITC-A vs PE-A) を作成します。
蛍光プロットは使用する蛍光色素に準じて作成します。
必要に応じて Area Scaling Factor 調整用のプロットも
用意します (Section6: Appendix 参照)。



<散乱光および蛍光の電圧調整>

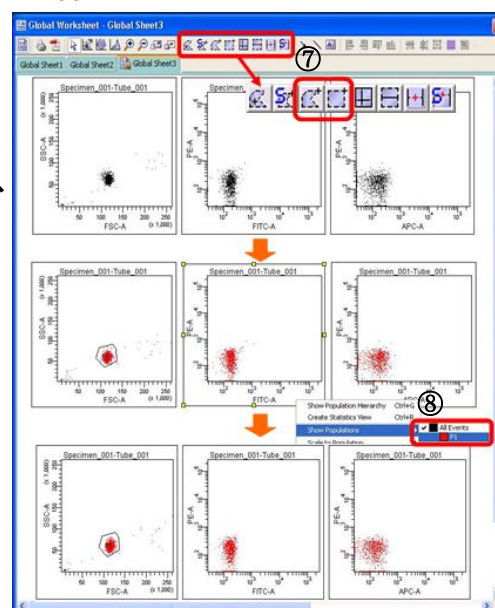
- ① ネガティブサンプルを SIT にセットします。
- ② Acquisition Dashboard の「Acquire Data」 ボタンをクリックします。
- ③ FlowRate を調節します。(Low、Medium、High)
- ④ Event to Display を 1000 に設定します。
- ⑤ Cytometer ウィンドウの Parameter タブから、散乱光 (FSC, SSC) の Voltage を目的細胞集団が測定できるように、適切に調整します。



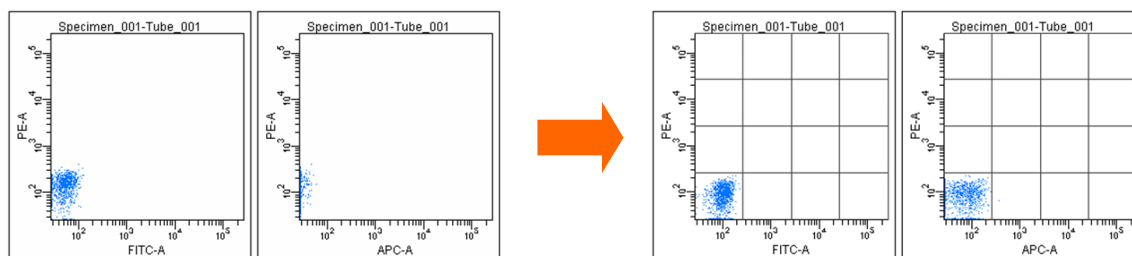
- ⑥ 必要に応じて Cytometer ウィンドウの「Threshold」タブでノイズのカット、「Laser」タブで Area Scaling Factor の調整をおこないます。

*Threshold および Area Scaling Factor の調整に関しては Section6 : Appendix をご覧下さい。

- ⑦ 散乱光プロットで目的細胞集団をゲーティングします。
- ⑧ ポピュレーションを展開したい蛍光プロットを右クリックし、「Show Population」で P1 ゲートを選択します。
- ⑨ 散乱光プロット上で右クリックし、「Show Population Hierarchy」を選択します。
Hierarchy ウィンドウにはポピュレーションのイベント数、パーセンテージ等が表示されます。



- ⑩ ネガティブサンプルを使用して、蛍光プロット上での陰性領域を決定します。
Cytometer ウィンドウの「Parameters」タブを選択し、各蛍光色素の Voltage を調整します。

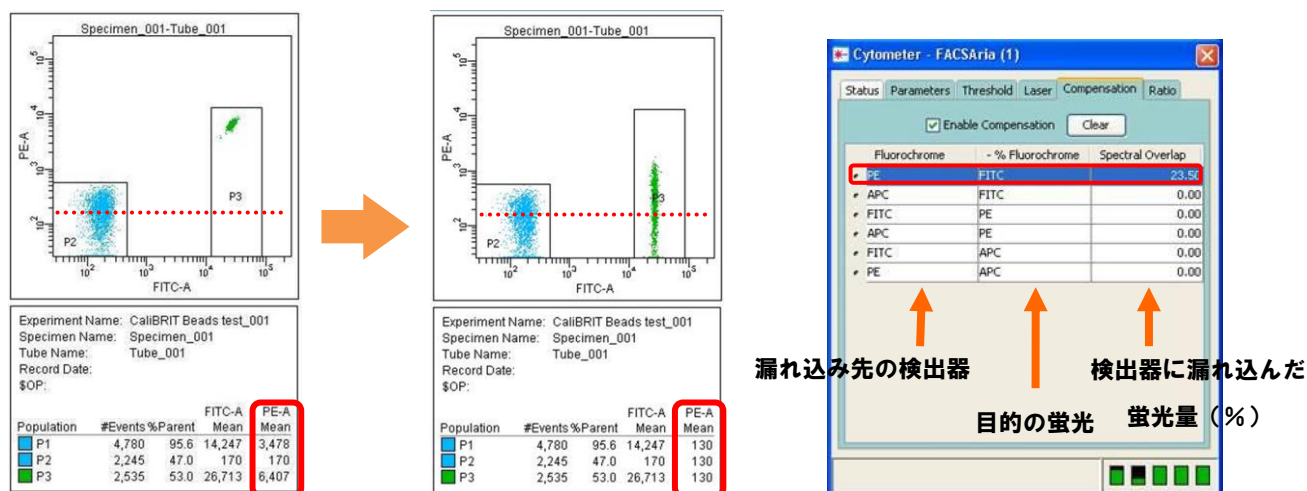


- ⑪ ネガティブ領域調整後、Acquisition Dashboard の「Stop Acquiring」をクリックして SIT からサンプルチューブを取り外します。
- ⑫ 最後にポジティブサンプルを Acquire し、プロット上にポジティブポピュレーションが表示されていることを確認します。

<蛍光補正: Compensation>

蛍光色素を 2 色以上使用しており蛍光の漏れ込みがある場合、単染色サンプルを使用して蛍光補正を行います。

- ① SIT に蛍光補正用の単染色サンプルをセットして「Acquire Data」ボタンをクリックします。データ表示後、「Stop Acquiring」をクリックして SIT からサンプルチューブを取り出します。
- ② ゲートメニューから四角形ゲートを選択し、ネガティブとポジティブポピュレーションにゲートを設定します。
- ③ 目的の蛍光プロットを右クリックし、「Create Statistics View」を選択して、統計データを表示します。
- ④ Cytometer ウィンドウの「Compensation」タブを開き、蛍光補正を行います。
FITC の場合は、統計データの PE-A の Mean がポジティブポピュレーションとネガティブポピュレーションでほぼ同じになるよう Spectral Overlap の値を調整します。



- ⑤ 他の蛍光補正も同様に行います。

*Auto Compensation に関しては Section6 : Appendix をご覧下さい

<データの保存>

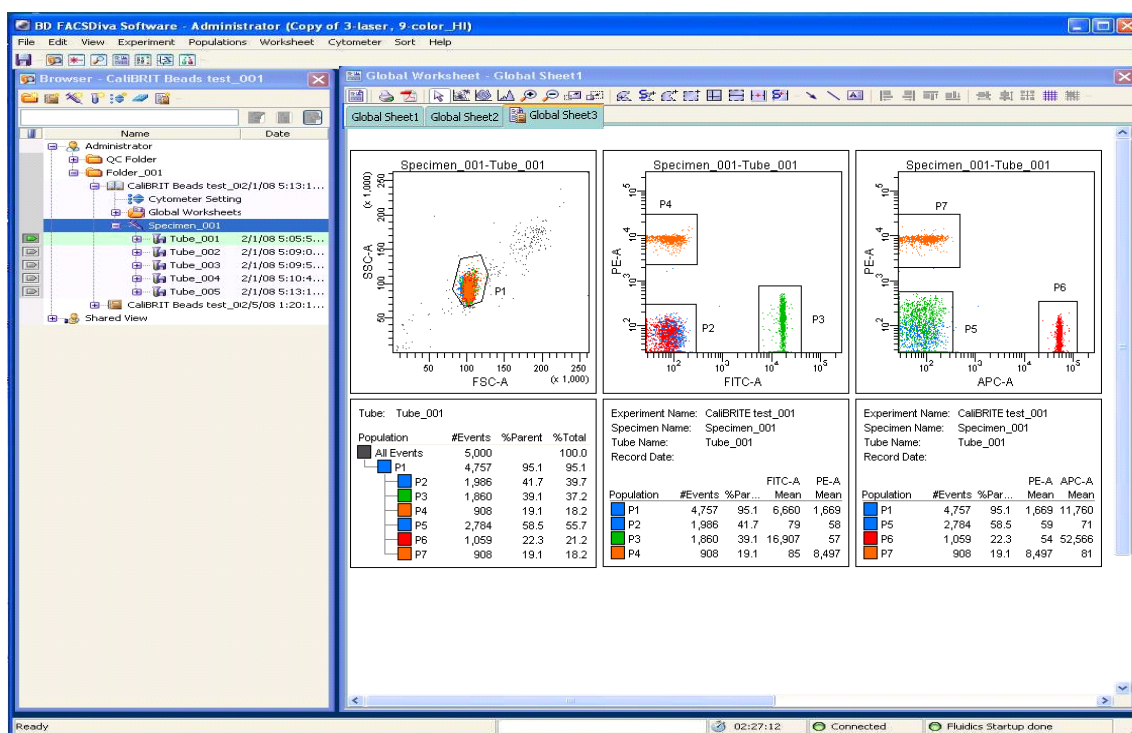
- ① 電圧調整や蛍光補正などの機器設定後、サンプルのデータ保存を行います。
Acquisition Dashboard の「Events To Record」で細胞の保存個数を設定します。
- ② サンプルを SIT にセットし、「Acquire Data」をクリックします。
「Record Data」をクリックするとデータの保存が開始されます。
データ保存終了後、SIT からサンプルを取り外します。
- ③ 次のサンプルを測定する場合は、Acquisition Dashboard の「Next Tube」をクリックし、データを保存する新しいチューブを作成します。②と同様の操作を行います。

Section3-2：データの解析

- ① 新しく解析用の Global WorkSheet を作成します。Browser ウィンドウの Global Worksheets を右クリックし「New Global Worksheet」を選択します。
- ② 解析目的チューブの「Acquisition Pointer」を選択します。Global Worksheet 上で解析の目的に応じたプロットを作成します。
- ③ 散乱光プロットにおいて、解析する細胞集団にポピュレーション(P1 ゲート)を設定します。
- ④ プロットを右クリックし、「Show Population Hierarchy」ウィンドウを表示させます。
- ⑤ ポピュレーションを展開する蛍光プロットを右クリックし、「Show Population」より目的のポピュレーションを選択して展開します。
- ⑥ 各プロットにおいて、適切なポピュレーションを選択、ゲートなど作成し解析します。

＊死細胞やダブレットを除去した解析を行うことを推奨します。

Section6：Appendix をご覧下さい



- ⑦ 他の FACS 用ソフトウェアで解析する場合、あるいはバックアップを取る場合は Experiment を右クリック→Export→Experiment もしくは FCS file データを Export してください。
- ⑧ 次回、Experiment を複製して使う場合は、Experiment を右クリック→Duplicate Without Data を選択します。

＊Cytometer ウィンドウの Laser タブ内の数値は複製されません。

特に Area Scaling Factor の数値を調整した場合は、次回の測定直前に同じ数値を再入力してください。

Section5 : シャットダウン

- ① FACSClean 2mL の入ったチューブを SIT にセットし、「Acquire Data」をクリックします。
- ② Flow Rate を「High」に設定し、5 分間ラインを洗浄します。
*PI を用いての細胞周期解析を行った場合、ラインの汚れが激しい場合がありますので 10 分間洗浄を行って下さい。
- ③ サンプルチューブを取り外し、同様に滅菌蒸留水 2mL の入ったチューブをセットします。Flow Rate を High に設定し、5 分間ラインを洗浄します。
*PI を用いての細胞周期解析を行った場合は 10 分間洗浄を行ってください。
*この洗浄作業は必ず実施して下さい。これを怠ると SIT の詰まりを招き、機器トラブルの原因になります。
- ④ SIT から滅菌蒸留水の入ったチューブを外します。
- ⑤ メニューバーの「Cytometer」→「Fluidics Shutdown」をクリックします。画面上に Confirm が現れますので、「OK」をクリックすると Fluidics Shutdown が開始されます。5 分程度で終了のメッセージが出ますので、「OK」をクリックします。
- ⑥ メニューバーの「File」→「Quit」をクリックし Diva ソフトを終了します。
- ⑦ 本体電源を切り、PC をシャットダウンします。
- ⑧ SIT の乾燥を防止するため、滅菌蒸留水 2mL の入ったチューブを SIT にセットします。
- ⑨ Fluidics Cart の Condensation Trap に溜まった液を廃棄し、廃液タンク内の廃液を処理します。
*外した廃液タンクの蓋は逆さにしないで下さい。
*廃液は、施設の処理規定に従い廃棄して下さい。

Section6 : Appendix

① 死細胞およびダブレット細胞の除去：

目的細胞の割合を正確に測定するために推奨される解析方法です。

② Area Scaling Factor の調整：

Area Scaling Factor の調整により、Area と Height の表示位置をそろえる事ができます。

これは両者のダイナミックレンジ（測定範囲）をそろえる意味でも非常に重要です。通常の細胞でも調整が必要ですが、特に大きな細胞を正確に測定する場合の重要な設定です。

③ Threshold の調整：

散乱光プロットでデブリスや電気的なノイズをカットする機能です。

④ Application Setting：

マルチカラー解析及び弱陽性を測定する場合の検出器の最適化です。Application Setting を実施することにより細胞集団の分離が良くなります。

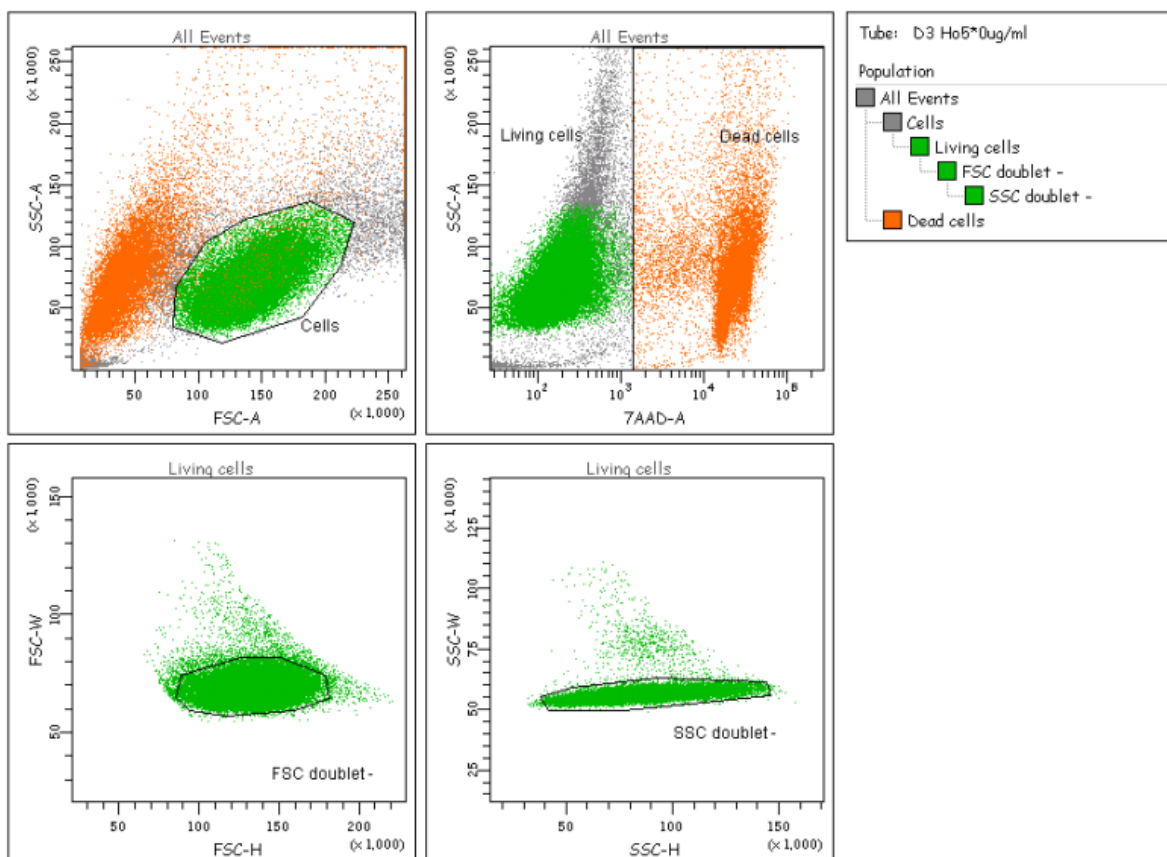
⑤ Auto Compensation：

マルチカラー解析時等、蛍光補正を自動的に設定する方法です。

①死細胞およびダブレット細胞の除去：

死細胞除去プロット：SSC-A vs 死細胞判定試薬（PI, 7AAD など）

ダブレット除去プロット：FSC-W vs FSC-H, SSC-W vs SSC-H

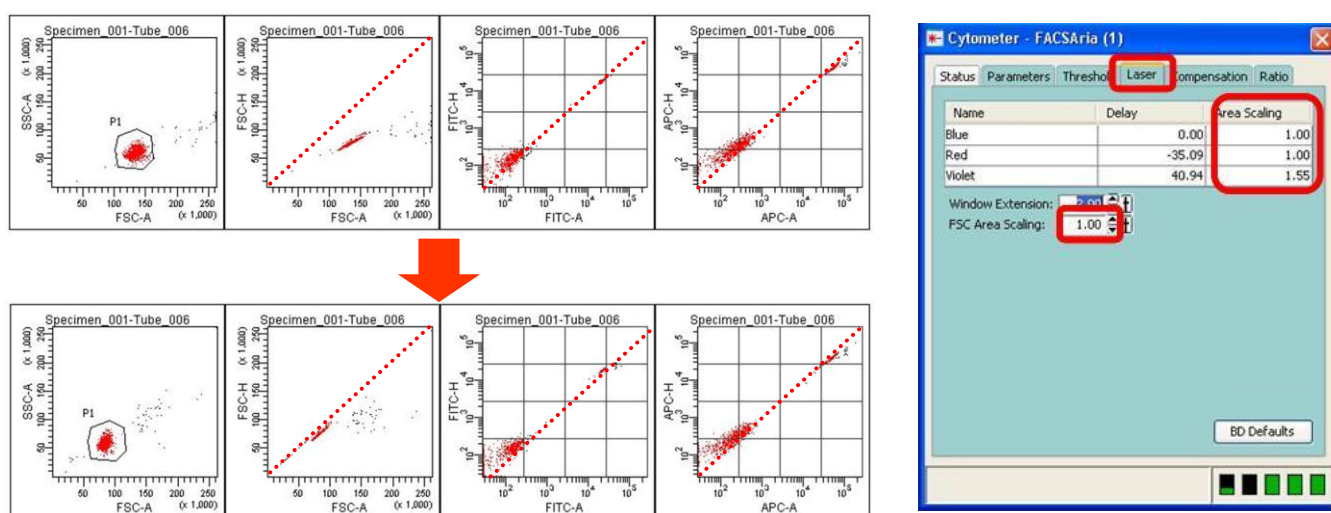


② Area Scaling Factor の調整 :

1. Cytometer ウィンドウの「Parameter」タブを選択し、「Area」と「Height」にチェックを入れておきます。
2. FSC-A vs SSC-A、FSC-A vs FSC-H、ex.FITC-A vs FITC-H、ex.APC-A vs APC-H のプロットを作成します。
3. ポジティブサンプルを測定し、各蛍光のプロットで蛍光陽性集団が対角線に分布するように、Cytometer ウィンドウの「Laser」タブ内にある Area Scaling の値を調整します。

*Area Scaling の値を調整した場合は、数値をメモしておいてください。

今後、同じ細胞を使った実験系であれば、同じ数値を入力して測定することができます。

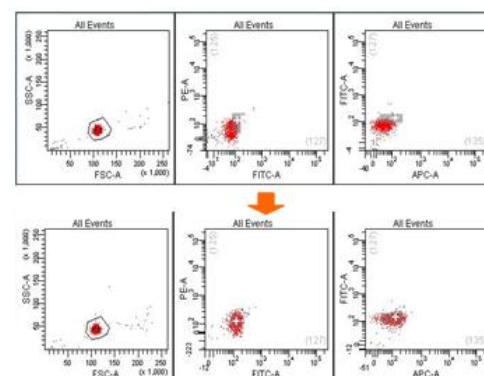


③ Threshold の調整 :

1. Cytometer ウィンドウの「Threshold」タブを選択し、値を調整することでデブリスやノイズデータをカットできます。*初期値は FSC : 5000 です。

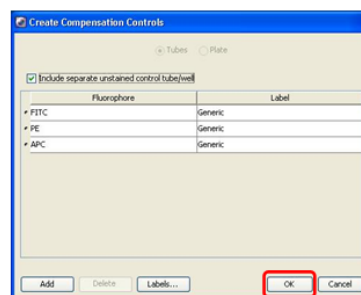
④ Application Setting :

1. 使用する Experiment を開き Experiment の下に表示されている Cytometer Settings を右クリックし、「Application Settings」→「Create Worksheet」を選択します。
2. ネガティブサンプルを測定し、目的細胞集団に P1 ゲートを設定します。
3. 目的とする集団が各パラメーターのグレー領域に入るように蛍光パラメーターの Voltage を設定します。

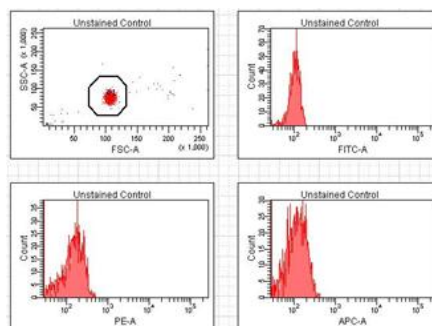


⑤ Auto Compensation :

1. メニューバーの「Experiment」→「Compensation Setup」→「Create Compensation Controls」を選択します。Create Compensation Controls ウィンドウが開きますので、「OK」をクリックします。



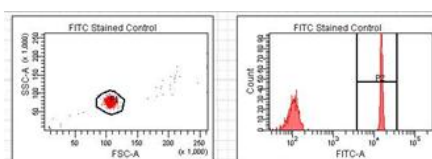
2. Compensation Controls の+をクリックして、下の階層の Unstained Controls の Acquisition ポインターを選択します。ネガティブサンプルを SIT に取り付け「Acquire Data」をクリックし、目的集団に P1 のゲートを移動します。



3. Acquisition Dashboard の「Record Data」をクリックし、データの保存を開始します。ネガティブサンプルの取込み終了後、サンプルを SIT から外します。

4. P1 ポピュレーションを選択し、マウスを右クリックし「Apply to Compensation Controls」を選択します。

5. Acquisition Dashboard 上の「Next Tube」をクリックし、次の Tube に切り替え、サンプルを SIT に取り付けます。「Acquire Data」→「Record Data」をクリックし、データの保存を開始します。保存終了後、サンプルを SIT から外します。

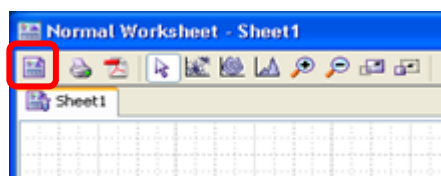


6. 同様の操作を繰り返します。

7. メニューバーの「Experiment」→「Compensation Setup」→「Calculate Compensation」を選択します。蛍光補正值が適切に計算された場合、Single Stained Setup ウィンドウが現れるので名称入力をし、「Link & Save」を選択します。



8. Acquisition ポインターを Tube_001 に切り替えます。Worksheet 画面を Sheet から Global Worksheet に切り替えます。Cytometer ウィンドウの「Compensation」タブの Spectral Overlap に、蛍光補正值が入っていることを確認します。



各項目における操作の詳細は BD FACSCanto II™ Cell Sorter Training Manual をご覧下さい。