
第一章、BD LSR II 系統組成部分

BD LSR II 流式細胞儀



BD LSR II 是世界上第一台可配備四支固定校準的、氣冷式雷射的桌上型流式細胞儀，它能同時分析多過 10 色螢光參數。集靈活易用、UV 雷射、數字化電子系統於一身的 BD LSR II，可滿足更廣泛的多色流式分析，使您最大限度地集中精力於科學研究，而不是複雜的軟硬體操作。

儀器的設計核心是其新式數位化數據處理系統，使 BD LSR II 成為唯一真正的數位化流式細胞儀。BD LSR II 的數位化系統可實現每秒鐘處理一千萬次的高速分析，同時儀器革新化的脈衝處理技術，通過分析信號脈衝的面積、寬度，區分實體組織標本中的粘連細胞群體，最大程度地減少假陽性，是實體組織 DNA 分析的終極解決之道；對兩種螢光信號比率的計算亦可用於鈣離子流動的檢測。

BD LSR II 的光導纖維系統將每一支雷射光束精確、穩定地匯聚在光束形成稜鏡上，再通過稜鏡，將雷射光束投射至聚焦透鏡上。信號收集系統被設計成八角形排列，這種設計可最大程度地從每一個雷射器中檢測光信號。每一個 PMT 之前的帶通濾光片，允許用戶對所需收集的光譜範圍做精細調節。由於反射比透射的效率更高，所以這種設計提高了該儀器在多色分析時的檢測性能。

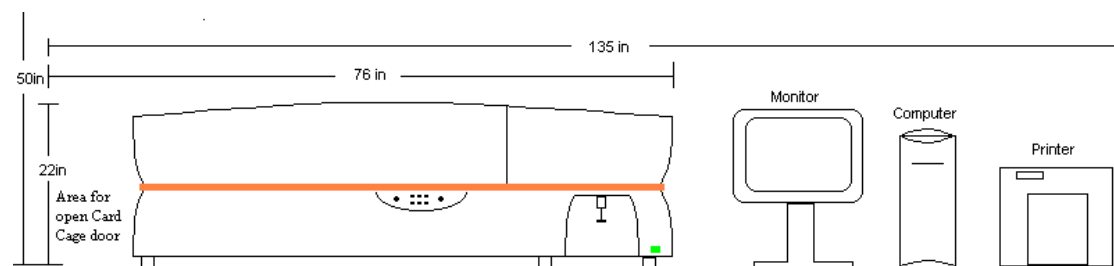
- ✓ **靈活性：**BD LSR II 可容納 1 至 4 根雷射。所有雷射器都是氣冷且帶固定校準，並配備動態範圍相適、優越功能的 PMT。
- ✓ **UV 雷射：**首次配置於桌上型流式細胞儀，固定校準，容易使用。可常規用於 Indo-1 測定、Ca⁺ 通量、DAPI 或 Hoechst 分析活細胞 DNA。
- ✓ **多色分析：**螢光染劑選擇範圍增加。除了標準 488nm 激發的螢光染劑之外，還有 UV 激發的螢光染劑如 DAPI、Hoechst 33342、Indo-1、GFP；HeNe 激發的螢光染劑如 APC 等。

1.1 BD LSR II 系統基本結構：

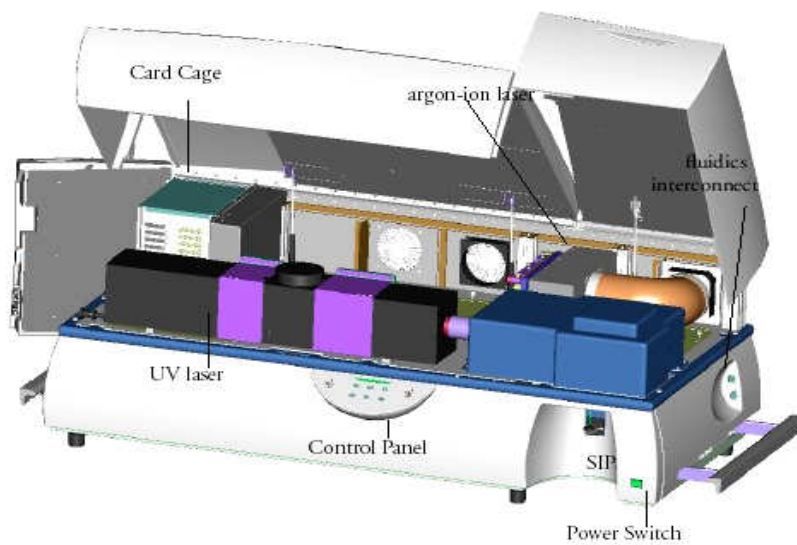
- BD LSR II 細胞分析儀主體
- BD FACSDiva 電腦工作站

流式細胞儀包括液流系統、光學系統、和電子系統。待測樣本中的細胞經液流系統傳送依序地通過細胞儀中雷射照射的區域，細胞受雷射的激發產生信號，被信號接收器接受並放大，這些放大的信號經電腦分析處理，並以圖表的形式直觀地顯示出來。流式細胞儀產生並分析的信號主要有光散射信號和螢光信號。光散射信號的強弱可以反映細胞的大小、形態及胞漿顆粒化的程度等。依螢光素的不同，用不同波長的光激發，發射出不同波長的光，可顯示不同的顏色，在不同的實驗體系中，這些螢光信號就可以反映不同的細胞生物學特性。

LSR II 細胞儀主體：



正面示意圖



BD LSR II 主機組成分

1.2 Fluidics 液流系統

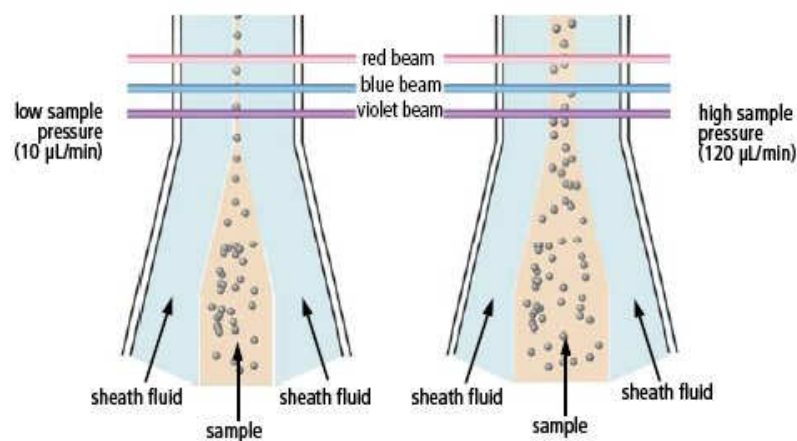
液流系統包含 Sample injection tube 樣品上樣針(SIT)、flow cell 流動室、兩個儲液筒、及一系列液體輸送管線。液流系統的主要功用，是將細胞依序送到測量區受檢。

1.2.1 流動室 Flow Cell

LSR II 細胞儀採用密閉式液流系統。此一系統的液流壓力與鞘液流速皆為原廠預設，毋需人為調整，故而操作簡單。加上儀器內之雷射光路亦為原廠預先調設，因此適用於臨床檢驗與基礎科研。

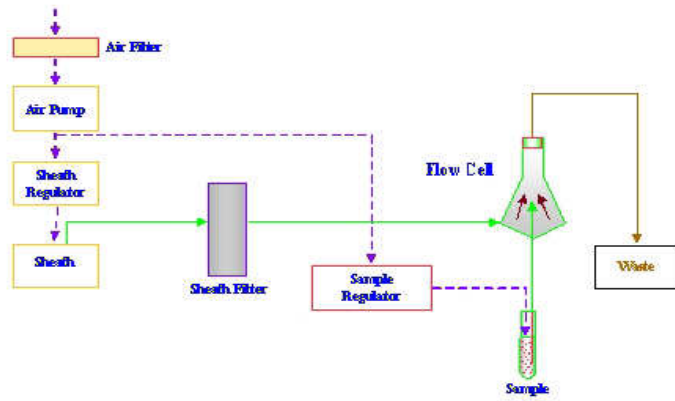
你將安裝樣品管在 SIT 上，液流系統裡一個幫浦會加壓鞘液鋼筒，提供鞘流到流動室中。在這同時，樣品試管也被充氣加壓，而樣品便會順著 SIT 被送進流動室。一旦樣品進入流動室，細胞或粒子將形成一路縱隊向雷射光束移動。來自這些粒子的散射光和發出的各色螢光將提供關於它們的尺寸、形狀、顆粒性、和生化生理特性的訊息。在流動檢測室中，透鏡將雷射光束聚焦在樣品流軸心位置。雷射光束聚焦在樣品流上產生最佳的光信號。由於光學通路和樣品流軸心的位置固定，所以此種最佳化狀態一直保持穩定。

流動室剖面圖：



流動室內充滿鞘液，樣品試管中的細胞被一高於整個液流系統的壓力推入流動室中，形成一微細水路，細胞可於其內向上游動。藉由流體動力聚焦原理（hydrodynamic focusing），可使該水路固定於流動室中央，周圍之鞘液液形成一包被水路之鞘膜，使細胞能以單一細胞之形態，逐一流經最窄的水路到達測量區，而與雷射光交會。

液流系統示意圖



1. 電源開關：電源在儀器右前下方。



2. 儀器面板：



在儀器前方面板中只有3個流速控制鍵（LO/MED/HI）及3個功能控制鍵。

流速控制：

LO： 樣品流速：12 μl /min

MED： 樣品流速：35 μl /min

HI： 樣品流速：60 μl /min

流速微調旋鈕：左方之 Sample Fine Adjust 旋鈕可微調現有樣品流速，從50%-200%。

LO： 樣品流速：6 - 24 μl /min

MED： 樣品流速：17.5 - 70 μl /min

HI： 樣品流速：30 - 120 μl /min

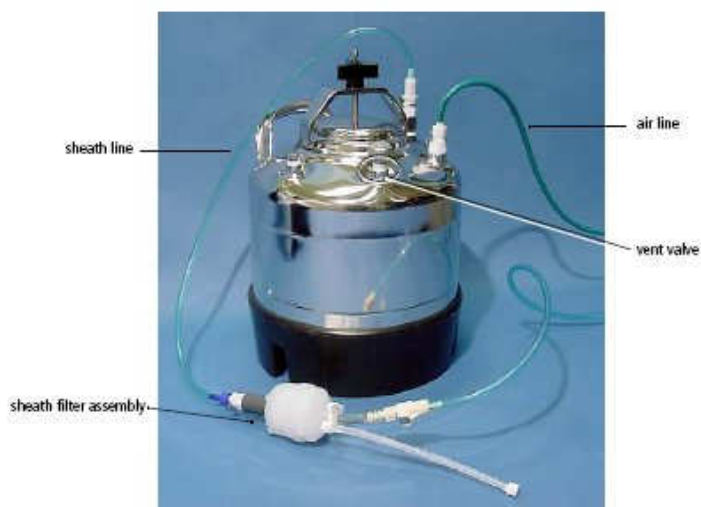
液流系統功能控制：

- **RUN**：綠色時表示樣品開始輸注。(橘紅色時表示儀器不正常，請檢查是否漏氣)
- **STANDBY**：無樣品或暖機時之正常位置，此時雷射功率會自動降低以延長雷射壽命。
- **PRIME**：Prime 操作能排除流動室內的氣泡，用於日常常見問題的解決。首先鞘液停止流動，壓力反向將鞘液排出流動室流入廢液桶。在預設的一定時間後，系統以一定的速度自動將流動室充滿鞘液阻止氣泡的形成。上述程式完成後，儀器會進入 Standby 模式。使用時機如：新裝機開機、更換 PBS、內部管路有氣泡、清洗儀器或清洗進樣針等。

3. 儲液鋼筒：

- **鞘液筒**：鞘液鋼筒容積約8升，以綠色管線與主機相連。裝滿鞘液筒，儀器可以運行大約 8小時。鞘液筒蓋上有金屬環扣，保證鞘液筒密閉。鞘液筒有串聯鞘液過濾器Sheath Filter，0.22um過濾器，去除鞘液中的雜質，保證進入流動室的鞘液是乾淨的。請注意氣路減壓閥之位置。這一型的設計沒有裝液面傳感器，所以無法從儀器軟體上預知鞘液即將用完。只能用手搖動鞘液筒，憑重量感來判斷。

Figure 1-2 Sheath Tank



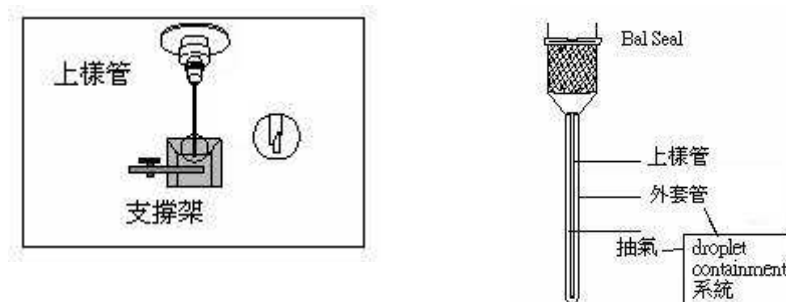
- **廢液筒**：容積約 16 升，塑膠材質，以橘色管線與主機相連。筒上裝有液面感應器，廢液充滿時會發聲警告。用戶可以目視估算廢液筒的佔滿量，來推算鞘液的剩餘量。

Figure 1-3 Waste Tank



4. 上樣品區：

上樣品區是樣本管的上樣位置。它包括三個部分，一個是進樣針 SIT，還有支撐架 Tube Support Arm、和液滴存留系統 Droplet Containment Module。



- 進樣針：是一根不鏽鋼管，將細胞從樣本針中吸入流動室。進樣管外有一套管，是液滴保留系統的一部分。
- 支撐架：負責啟動液滴存留系統。支撐架位於左側或右側時啟動液滴存留系統；支撐架在上樣狀態為關閉。
- 液滴存留系統：系統由支撐架、真空幫浦和外套管組成。當支撐架位於左側或右側位置時，真空幫浦就會啟動，將液體從外管吸入廢液筒內。上樣時，須迅速將支撐架位於中位，以避免過多樣品被抽吸到廢液筒內，當支撐架位於中位，真空幫浦停止工作。更換樣品時，讓儀器保持 **RUN** 的模式，使得進樣針可以即刻反沖上樣。



啓動 DCM

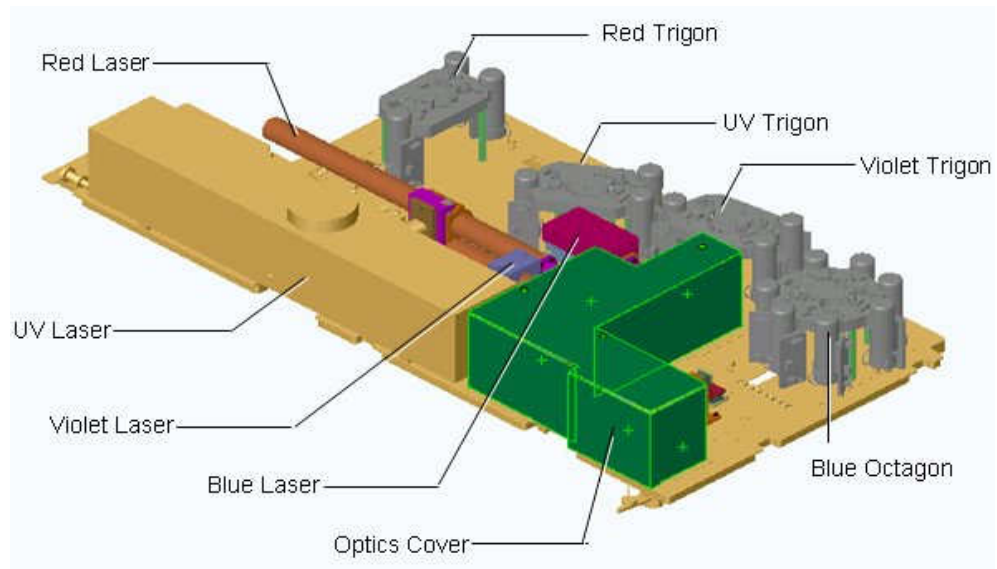


關閉 DCM

1.3 Optics 光學系統

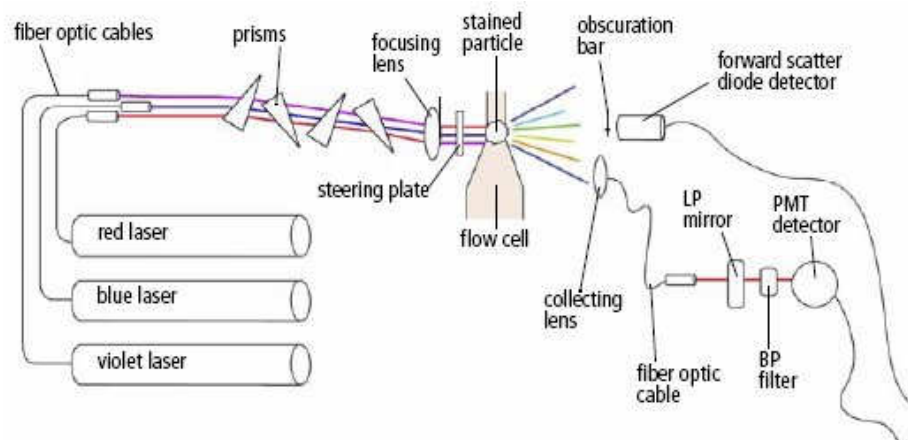
BD LSR II 分析儀的光學系統是由激發光學系統和收集光學系統所組成。激發光學系統為流動的細胞帶來光能；收集光學系統則收集從細胞或粒子發出的螢光信號或者散射光。

光學系統剖面圖：



1.3.1 Excitation Optics 激發光學系統

光信號激發系統由雷射器、光導纖維、形成光束的稜鏡和一個高透光性聚焦透鏡組成。光導纖維系統將雷射光束精確、穩定地匯聚在光束形成稜鏡上，再通過稜鏡，將雷射光束投射至聚焦透鏡上，見下圖所示。



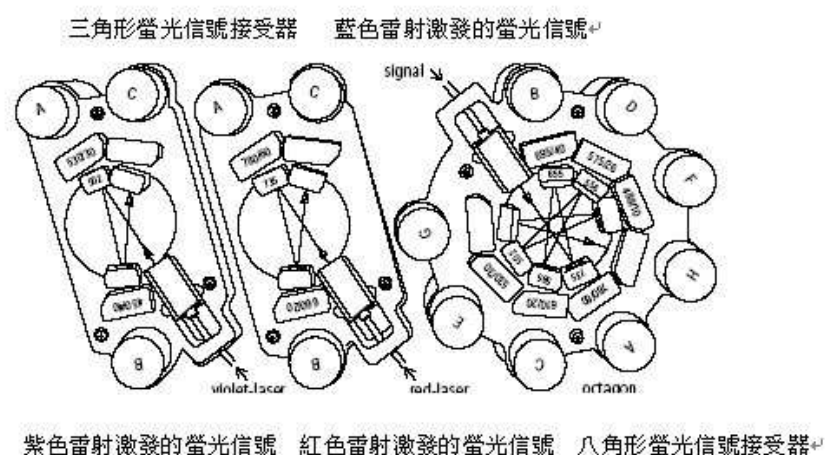
LSR II 雷射：

BD LSR II 儀器使用低功率、氣冷式固態雷射器，這樣一來，該儀器就不需要特殊電源和冷卻設備了。

雷射	波長 (nm)	最小功率 (mW)	常用螢光染料
Coherent ^R Sapphire TM 固態雷射	488 (藍光)	20	FITC, PE, PE-Texas Red, PerCP, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, PI
JDS Uniphase TM HeNe	633 (紅光)	17	APC, APC-Cy7
Coherent Vioflame 固態	405 (紫光)	25	Cascade Blue, Alexa 430
Kimmno HeCd	325 (紫外光)	8	Indo-1, DAPI, Hoechst
Lightwave X-Cyte 固態	355 (紫外光)	20	Indo-1, DAPI, Hoechst

1.3.2 Collection Optics 收集光學系統

聚焦透鏡系統則引導雷射光進入流動室核心的樣品動線上。以 6-2 規格設計 LSR_II 為例，收集光學包括兩個檢測器陣列，由如圖中所示的一個八角形和一個三角形排列的光電管組成。

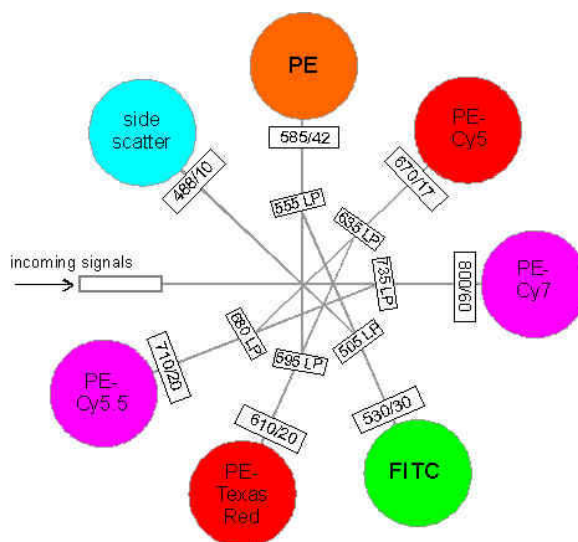


八角形檢測器陣列包含七個光電管，它負責檢測來自藍光雷射的信號。其中有一個光電管，它負責檢測 90 度側方散射光信號。三角形檢測器陣列包含兩個光電管，它負責檢測來自紅光雷射的信號。

光學訊號接收器圖示 (圖 6-2 規格)：

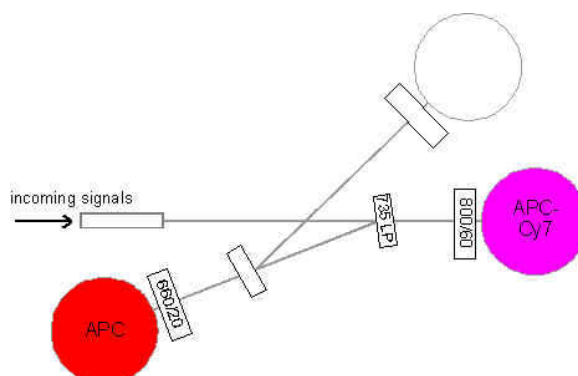
信號收集系統被設計成八角形和三角形的排列，這種設計可有效地從每一個雷射器中檢測光信號。具體如下：通過一組長通二分鏡 Longpass DM，先將螢光信號中波長最長的傳輸到第一個光電管（PMT）上，反射回來的較短波長的光信號則向下一個 PMT 方向發射。每一個 PMT 之前的帶通濾光片 bandpass 允許對所需收集的光譜波長做精細調節。由於反射比透射的效率更高，所以這種設計提高了該儀器在多色分析時的檢測性能。如圖示，Blue A（750~810 nm）、Blue B（675~715nm）、Blue C（650~670nm）、Blue D（600~620nm）、Blue E（562~588nm）、Blue F（515~545nm）、Blue G（488nm）。

Octagon：

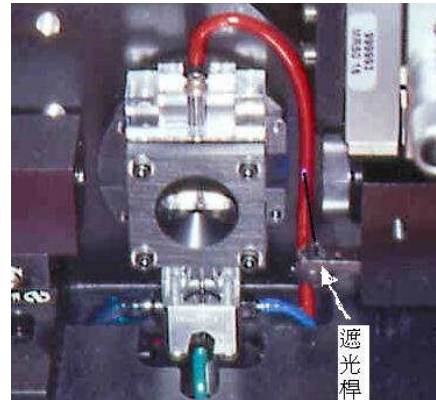


Trigon：

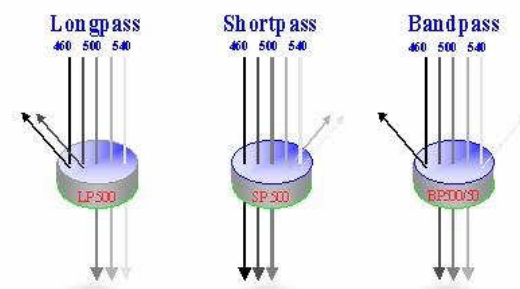
如圖示，Red A（770~830 nm）、Blue B（650~670nm）



除光電管檢測器之外，與雷射平行方向有放置一高敏度光電二極體 photodiode，用以收集強大的前方散射光信號。這個二極體前方有個遮光棒，可以防止正向直射的雷射光進入，只接收繞射光。



濾片



流式細胞術中所用濾片有很多種，有帶通濾片、長波通濾片、短波通濾片、長波通雙色性反射片、中性濾片。帶通濾片的應用則正好相反，它只允許某一特定波長的光線通過，例如一 530 nm 帶通濾片只允許 FITC 發射的 530 nm 綠色螢光通過，而其他波長的螢光全部被阻斷。長波通濾片只允許某一波長以上的光線通過而將此波長以下的光線濾掉，如 650nm 長波通濾片只允許 PerCP 發射的紅色螢光通過，而 488nm 的激發光及 FITC 發射的 525nm 綠光全部被阻。長波通二色性反射鏡只允許某一波長以上的光線通過而將此波長以下的另一特定波長的光線反射。例如讓 620nm 以上的紅光通過而將 525nm 綠光反射，其他的光線則由鏡片吸收。中性濾片無頻率特性，它對各波長的光線均勻衰減，常用光線過強需要均勻衰減的地方。

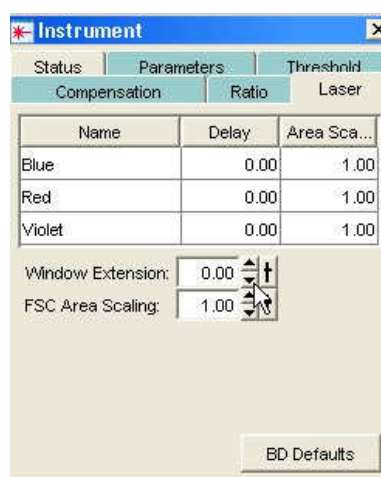
雷射光源及對應接收器螢光波長表 (6-3-3 規格)：

	PMT Position	LP Filter (nm)	BP or LP Filters (nm)	Fluorochromes
488 Laser	Blue A:	755	780/60	PE-Cy7
	Blue B:	685	695/40	PerCP, 7-AAD, PerCP-Cy5.5
	Blue C:	655	660/20	PE-Cy5
	Blue D:	600	610/20	PE-TexasRed
	Blue E:	550	575/26	PE
	Blue F:	505	530/30	FITC, Alexa 488
	Blue G:	Blank filter	488/10	SSC
633 Laser	Red A:	735	780/60	APC-Cy7
	Red B:	710	730/40	Alexa 700
	Red C:	Blank filter	660/20	APC, Cy5, Alexa 647
405 Laser	Violet A:	575	585/42	Qdot 585
	Violet B:	475	530/30	AmCyan
	Violet C:	Blank filter	450/50	Pacific blue, Alexa 405

1.4 Electronics 電子系統

電子系統負責把光子信號轉化成電子信號，並將之數位化為後續電腦分析作準備。在二極體和 PMTs 光電管所產生的信號，會與他們偵測到光子的數量成正比。細胞儀的電子系統會接著待這些連續電壓的類比信號放大，然後轉換成分離的數字化數值。在信號放大和數字化轉換後，從染色細胞粒子的特色螢光信號就會落到特定的通道，因而允許分群分析。

BD LSR II 電子系統部件由電源控制、連接器和板槽中的處理板、和液流系統控制單元、收取指示燈等元件所組成。本章節僅簡短介紹在 Instrument 儀器視窗 Laser tab 活頁中，有幾個關於雷射、可供使用者調節重要參數，如下圖 Delay、Window Extention、與 Area Scaling Factors；想瞭解有關電子系統的完整資訊，可以參考《BD LSR II User's Guide》中的 Signal detection 章節。



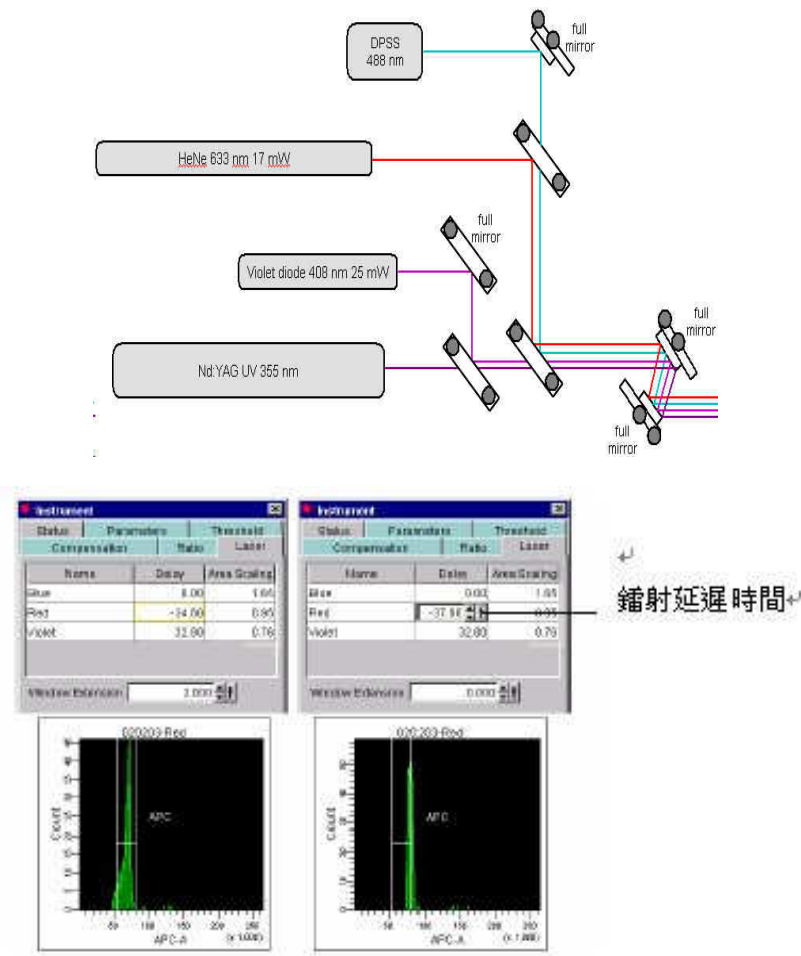
這幾個關於雷射的重要參數影響整個儀器系統運作。一般的生醫研究用戶不需要更改 Laser Delay 與 Window Extention 兩項預設條件，請勿擅自更改。只有少數情況下可以因應特殊細胞外型、尺寸，來修改 FSC Area Scaling，但請在每日關機前，請找回 Default 原廠設定，以免影響他人的實驗結果。

每日關機時，這些參數會自動儲存，隔日開機時，則是昨日的最終設定。以下簡單介紹操作原則，請管理員視實際需要自行規範。

1.4.1 Laser Delay 雷射延遲時差

為了降低不同雷射間產生螢光信號之相互干擾，提高檢測靈敏度，LSR II 採用立體空間激發系統。也就是不會雷射在不同時間，與細胞粒子交會，所產生的信號再彙整呈現。此一設計的優點每一支雷射所收集螢光信號，以獨立的光纖輸入，可減低相互干擾。一般的設計是以藍

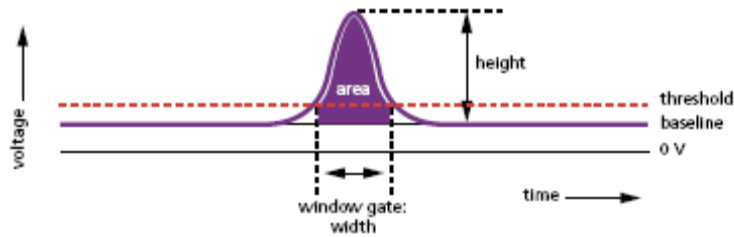
光鐳射為 t_0 ，所以只有紅色、紫色、和紫外雷射有需要確認雷射延遲時間。



1.4.2 Window Extension 加寬窗

Window gate「窗門」是一個信號脈衝高於閾值的時間窗；而「Window Extension (加寬窗)」則代表儀器處理脈衝信號的時間是否延長。將「Window Extension」調至「0」，可在最窄的時間窗內捕捉到脈衝變化，但缺點是部份脈衝未納入積分。BD LSR II 原廠預設的「加寬窗」為 7 微秒，即脈衝前後各延長 3.5 微秒，適用於 0.2~12.0 微米大小的細胞粒子。一般的哺乳類動物細胞皆適用。

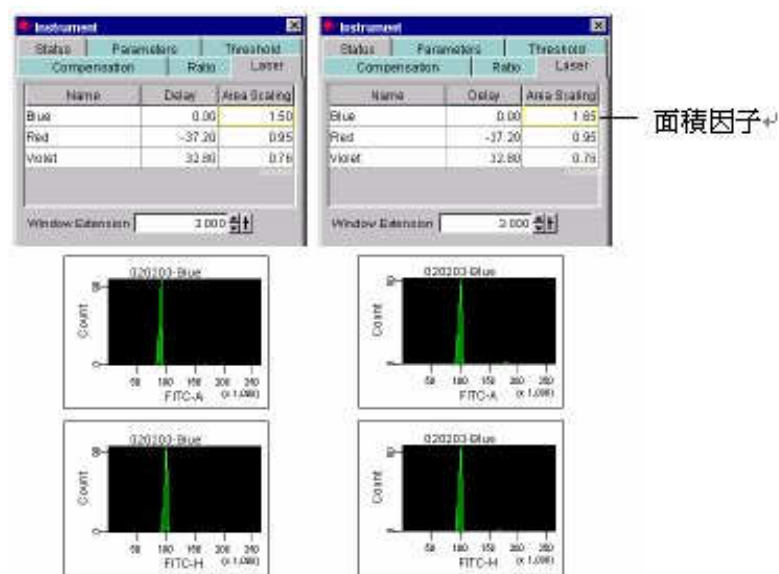
如需測量大於 20 微米的細胞粒子請與系統管理員接洽，適度地提高「加寬窗」。過度放大「加寬窗」會使信號碰撞 (electronic aborts) 的機率增加，使樣本流速受到侷限。



1.4.3 Area scaling factors 調整面積換算因子

許多因素可能會影響螢光信號的面積 A 和高度 H 的相對比值，如細胞大小、鞘液流速等。為了確保每一個脈衝信號的 A 和 H 的數值相當，即比值等於 1，可以調整面積換算因子。以 FSC 信號的光電二極體為例，調節“FSC Voltage”，使螢光微球座落於 FSC-H 直方圖刻度約 100x1,000 處。觀察 FSC-A 與 FSC-H 直方圖之螢光強度，如果相同，則不需調整藍光雷射的面積換算因子。如果 FSC-A 與 FSC-H 螢光強度不相同，於“Instrument”視窗中點選“Laser”表格調試“FSC Area Scaling”。如 FSC-A 小於 FSC-H 之螢光強度，調高 FSC Scaling Factor；反之則調低。

每一支雷射各有各獨立的面積換算因子，如有需要可個別調整或確認。如下。



1.5 BD LSR II 工作站



資料的獲取與分析，以及 BD LSR II 儀器的絕大部分功能，均是 LSR II 工作站上，由 FACSDiva 軟體控制操作。

該工作站包括以下部分：

- BD 原廠規格配置的 PC 電腦（含滑鼠、鍵盤）
 - 用於獲取資料的工作站必須配置有一個 Pentium^R IV 或是更高級的處理器，有一個至少 1GB 的 RAM，一個 40GB 的可用的硬碟空間，以及 Windows XP Professional (US-English) 作業系統。
- 17 吋螢幕
- 彩色印表機
- BD FACSDiva 軟體 version 5.0 or above
 - 資料的獲取與分析
 - 液流系統的自動啟動，關閉和清洗模式
- BD FACSDiva Data Manager
 - 資料的備份與儲存

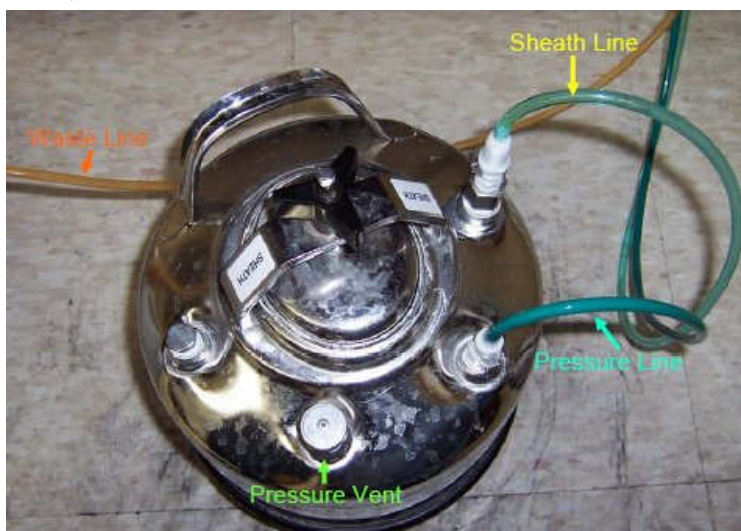
第二章、BD LSR II 常規操作



2.1 充填鞘流液鋼筒

建議每日開動儀器前，依下列步驟充填鞘流液鋼筒：

1. 拆下加壓線（深綠線）和鞘流液管，通過在適當的接頭上的金屬壓桿上按壓，並拉起白色連接器。



2. 將鞘液鋼筒帶到水槽，並拉起壓力通風孔來洩氣
3. 旋鬆頂蓋，取下頂蓋，並加入適量的FACSFlow鞘流液。
4. 放回頂蓋，確保其黑色墊片與鞘液鋼筒密合，然後旋緊蓋子進位置。
5. 重新接回加壓線和鞘流液管，由於接頭不同規格，理應不會接錯。

2.2 倒除廢液

容積約16升，塑膠材質，以橘色管線與主機相連。建議每日開動機器前，依下列步驟倒除廢液。用戶可以目視估算廢液筒的佔滿量，來推算鞘液的剩餘量。

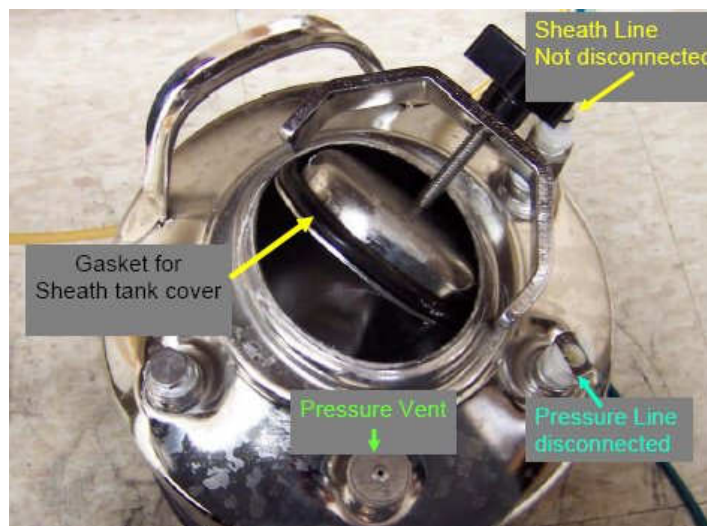
1. 拆下廢液管線（橘色管線），通過在適當的接頭上的金屬壓桿上按壓，並拉起白色連接器。



2. 旋鬆，並拆下廢液溢滿傳感警報器。
- 3 將廢液筒帶到水槽，旋開筒蓋，倒除廢液。
4. 加約500 mL漂白水。
5. 旋回頂蓋。重新接回廢液管線和廢液溢滿傳感警報器。

2.3 上機到一半時，充填鞘流液

如果主機已啟動，那用戶必需依下列步驟充填鞘流液，以避免管路中產生氣泡。主要區別在需確認主機在Standby狀態，另外不要拆下鞘流液管，並在地板上原位操作。



1. 拆下加壓線。
- 2 拉起壓力通風孔來洩氣。
3. 旋鬆頂蓋，取下頂蓋，並加入適量的FACSFlow鞘流液。
4. 放回頂蓋，確保其黑色墊片與鞘液鋼筒密合，然後旋緊蓋子進位置。
5. 重新接回加壓線。

2.4 儀器開機程序

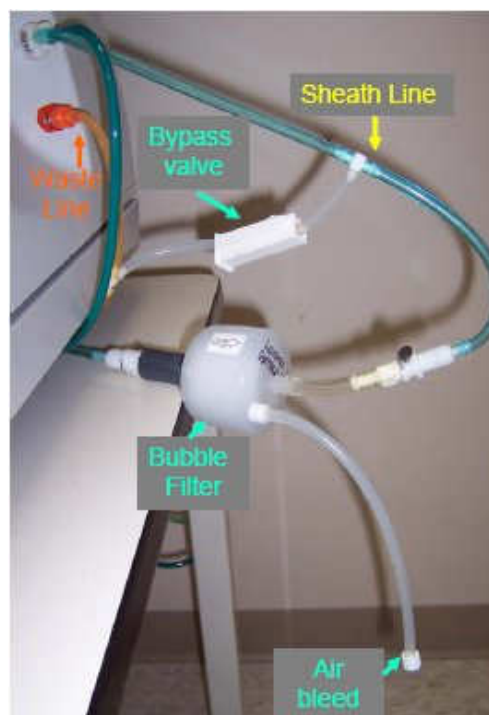
1. 開啓細胞儀電；開啓電腦。
2. 手搖以確認鞘流液筒有八分滿的FACSFlow，並確認：確實蓋緊、管路通暢。
3. 將廢液倒掉，在廢液筒中加入約500 c.c. 漂白水。
4. 排除液流過濾器中的氣體。
5. 如只使用單一雷射，需暖機十五分鐘；如使用雙雷射搭配紅光，需暖機廿分鐘；如使用雙雷射搭配UV光，需暖機六十分鐘。
6. 執行 PRIME 功能兩次。換上PBS管，HIGH RUN 兩分鐘，Standby；你現在可開始分析樣品。

2.5 排除液流過濾器中氣體

一般而言，鞘液過濾器會有氣體多是由鞘液筒跑乾所導致。這個問題會引起的異常現象，是用戶在上機時沒看見任何信號在獲取繪圖上，不論是用什麼收集速度都一樣。用戶目視檢查可見鞘流液線將是空的。再仔細看發現鞘液過濾器裡也沒有液體。

一旦發生上述現象，請即刻將取下檢品，換上DI水，並將液流系統放Standby。

檢查鞘液筒是否容量正常，如果是，請依下列指示排除氣體。



1. 將液流系統放RUN。
2. 打開支路閥門。將一輪狀開關向左側移可打開它，會允許鞘流液直接進入廢液管（橘色）
3. 關閉支路閥門。看到鞘液流入即可關閉。
4. 用左手指尖捏緊洩氣管，用右手取下白色蓋子。
5. 放手左手指尖即可排氣，將溢流的鞘液存放到適當容器，小心勿亂噴。
6. 用左手指尖再次捏緊洩氣管，用右手放回白色蓋子。
7. 一旦鞘液正常流動時，可取下樣品管，然後按 High、按 Prime。
8. 重覆步驟 7

9. 取 2 c.c. dH₂O 上樣品，以正常方式 Prime。

10. HI RUN 五分鐘。



2.6 儀器關機程序

關機前必要動作：清洗進樣管與外套管，防止進樣管堵塞、或有染料殘留。

1. 取 2 c.c. FACSClean 上樣品。
2. 將樣品支持架左移約 30 秒鐘，讓儀器的真空系統抽取約1 c.c. 的液體。
3. 將樣品支持架回正，按 HI RUN，然後讓 FACSClean 清洗管路 5 分鐘。
4. 取 2 c.c. FACS Rinse上樣品，重覆上述步驟1-3。
5. 取 2 c.c. dH₂O上樣品，重覆上述步驟1-3。
6. 按Standby，執行PRIME功能二次。
7. 注意最後只留約 1 c.c. dH₂O 在試管中。
8. 按Standby 以冷卻雷射，Standby五分鐘後關閉細胞儀。
9. 請倒掉廢液，並回填足夠量的漂白水。
10. 將鞘流液筒充填至八分滿。
11. 關閉程式；關閉電腦。

第三章、儀器設置 Surface Markers

在本章中，您將學習如何進行六色免疫螢光分析之儀器設置。在您記錄一個樣品的資料之前，必須先根據所使用的樣品類型和螢光染料的不同，對光電倍增管電壓值，補償值和閾值設置進行最優化設置；經過最優化設置後，不同螢光參數下的目標細胞都能分佈在圖形刻度上。



啟動系統 進行品質控制 最優化設置 記錄資料 分析資料 關閉系統

對流式細胞儀的最優化設置包括幾個步驟：

1. 登錄進入BD FACSDiviva軟體
2. 新建一實驗 Experiment
3. 螢光參數選擇
4. 說明獲取功能鍵
5. 最優化流式細胞儀的設置（含AutoComp）
6. 設計Global Sheet獲取版面
7. 記錄實驗數據
8. 輸出、匯入FCS文件、備份實驗檔案

本節將敘述如何利用” Instrument Setting (儀器設置)” 功能，對LSR II儀器進行 6 色分析設置最優化。對您而言，您在操作這些步驟時，請盡可能按照順序進行。

3.1 登錄進入 BD FACSDiva 軟體

- 1 開啓主電源。主電源綠色鍵位於細胞儀右前方。



- 2 開啓電腦。桌面註冊號是Administrator，密碼登錄框中輸入BDIS，按ENTER。
- 3 開啓 BD FACSDiva 軟體。在軟體登錄框中，輸入使用者名稱及密碼。（記得先跟管理員申請到授權密碼，例如 PName_Yourname）



NOTICE：你的所有實驗資料都將被保留在你自己的硬碟空間裡，其他用戶不能進入。

- 4 確定軟體與細胞儀完成連線。完成連線後，在 Instrument 視窗下方會顯示 Instrument Connected。如有必要，可點擊 Instrument () 視窗，觀察軟體與細胞儀是否完成連線。

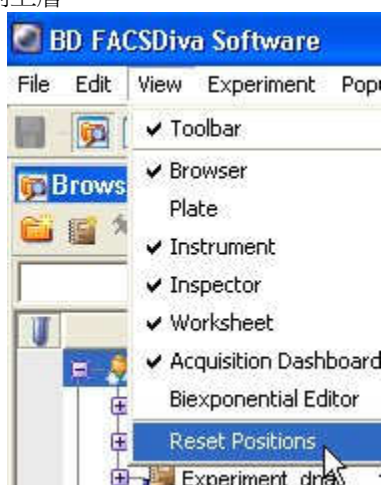


工作視窗工具欄

- 5 如有需要，可單擊工作視窗工具欄上的工具圖示 () 來瞭解相應的單元組成，如「 Browser (瀏覽器)」、「 Instrument (儀器)」、「 Inspector (資訊查看)」、「 Workset (工作圖)」和「 Acquisition Dashboard」。

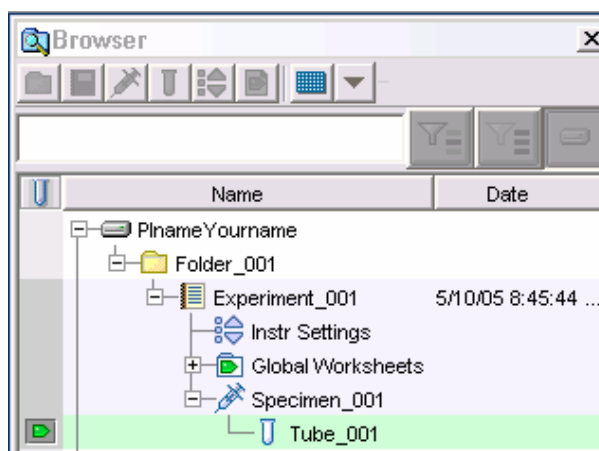


- 6 在軟體中工作時，視窗可能會隱藏。可到 **View** 下拉功能欄看是否所有必需工具皆已開啓。如仍未見特定視窗，可用 **View>>Reset positions** 回復軟體預設視窗位置。或雙擊相應視窗標誌，將該視窗移到上層。



3.2 新建一實驗 Experiment

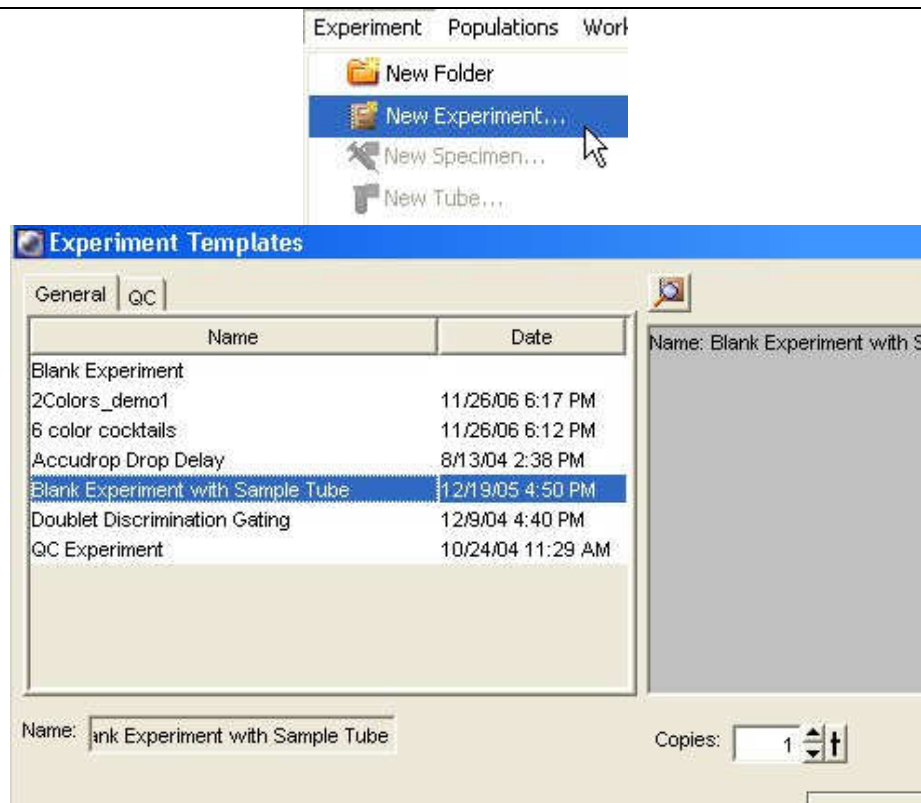
- 7 介紹 **Browser** (瀏覽器) 的單元組成。你今天的實驗會在瀏覽器視窗用層級的形式來組織，Folder(📁)>>Experiment(📁)>>Specimen(🧴)>>Tube(🧴)。參考下圖。



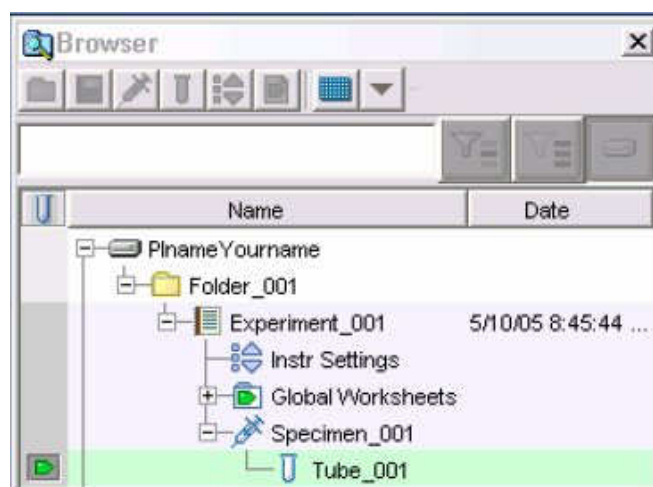
- 8 要產生一個 **Folder**，先以滑鼠點選瀏覽器視窗內專屬你的硬碟，然後點擊 **Folder** 標誌。或按滑鼠右鍵選 **New folder**。

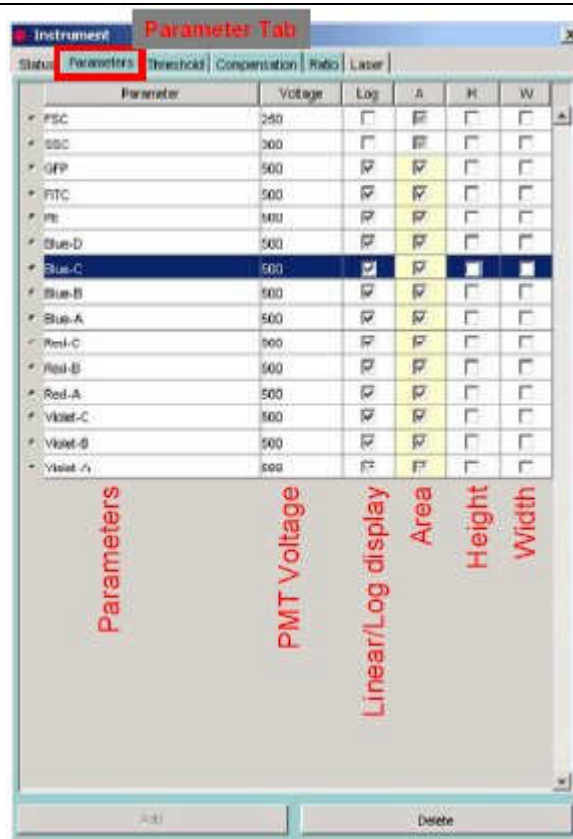


- 9 要產生一個 **Experiment**，先以滑鼠點選你新增的 **Folder**，然後點擊 **Experiment** 標誌。或從螢幕上方選擇 “**Experiment>>New Experiment**” 來新增實驗。並在隨後出現的「**Experiment templates**」方框中，選用「**Blank Experiment with Sample Tube**」。



- 10 "Blank Experiment with Sample Tube" 檔夾已含有一 Specimen_001，如果你的實驗檔夾中沒有 Specimen，點擊 Specimen 標誌新增之。
- 11 每個 Specimen 應至少有一試管 Tube_001，可點擊 Specimen_001 前「+」號展開之，使可見，如下圖。每個空白 Tube 左方有一相對應「指示箭頭」()，等一下分析樣品時，必須用滑鼠點擊，使其呈綠色 ()，才能進行儀器參數設置，否則看不到任何儀器參數。





3.3 螢光參數選定、刪減

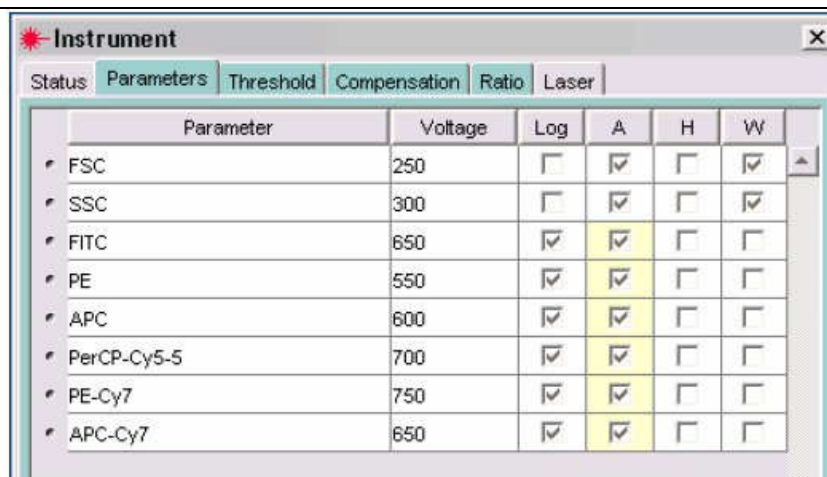
- 12 在 Instrument 儀器視窗裏，單擊“Parameters”頁面。用戶可在 Parameters 頁面上，選取刪除刪除任何你不使用的參數。這一步對要使用自動光學補償的用戶非常重要。

NOTICE：請確認用滑鼠點擊 Tube_001 左方一「指示箭頭」()，使其呈綠色()，才能進行儀器參數設置。

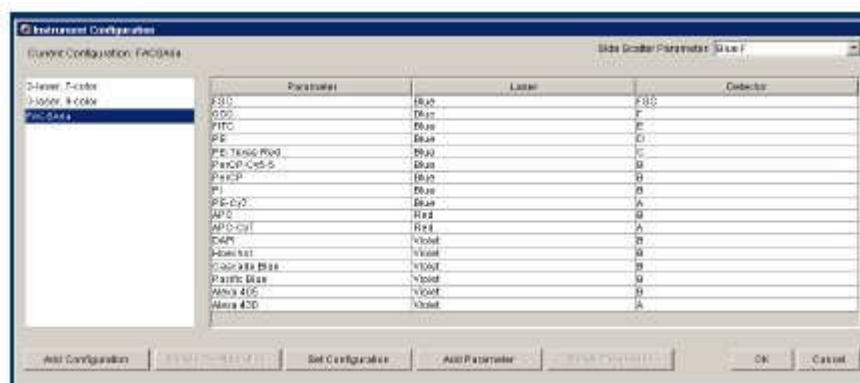
- 13 Parameters 頁面如下。單擊視窗裏的” Add or Delete” 鍵來增加或刪除參數。如需更改參數，可點擊參數方格中右側箭頭，如 FITC 可改成 EGFP 或 Alexa 488。PerCP-Cy5-5 可改成 PerCP 或 PI。

NOTICE：我們建議點選 FSC-W 與 SSC-W，用來排除雙聯體。

- 14 我們在此練習要用 FITC、PE、PerCP-Cy5-5，PE-Cy7，APC，APC-Cy7 等六個螢光參數。儀器視窗裏”Parameters”頁面應該如下圖。



NOTICE : 請不要使用 Instrument > > Instrument Configuration 視窗刪除參數!



3.4 獲取控制鍵 (Acquisition Dashboard)

15 獲取操縱組件包含操縱主機、進行獲取和記錄數據資料。可按工作空間上工具鈕中 (), 來顯示該組件。只有當電腦工作站有連接到細胞計數儀時, 獲取操縱組件才能被顯示。獲取操縱組件功能如下:

- Next Tube : 分析下一管檢品。或增加一管檢品。
- Acquire Data : 獲取, 開始在螢幕上顯示測量到的細胞資料; 但並不記錄。
- Record Data : 記錄, 開始依指令記錄資料成 list mode data。記錄完成時, 樣品管的圖示會從 () 變成 ()。
- Restart : 在 Acquire 或 Record 模式時, 要求中止重測。

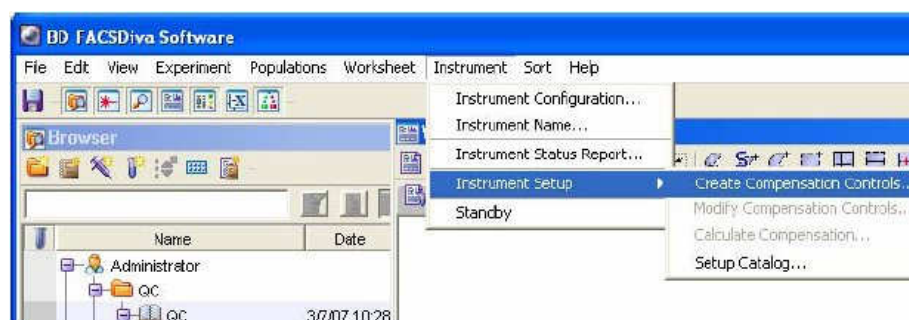


- **Storage Gate**：儲存設門，會確定哪些細胞群將包含在你的數據檔案裡。通常你會想要留下'All Events'所有事件；使用 P1 設門則只儲存 P1 細胞群。
- **Stopping Gate**：停止門，想獲取一特定數量的細胞亞群，可使用 P1 停止門 10,000 的功能，將收集全部事件的數據直到 P1 達到 10,000 才停止。
- **Events to display**：這功能確定圖上在收取期間將持續展示多少個事件。

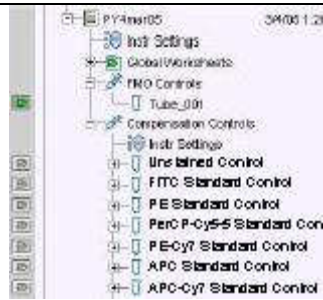
3.5 最優化儀器設置（Auto-Compensation）

NOTICE：如果你喜歡手動補償你的樣品，可以略過這個段落。

- 16 使用自動光學補償的用戶，你需要準備一支沒染色空白對照、和一組強染色的單色對照組，即 CD4、B220、CD3、CD8、等等高表達量抗原標記。
- 17 去儀器選單，選擇儀器設定，並且選擇 Instrument >> Instrument Setup >> Create Compensation Tubes。

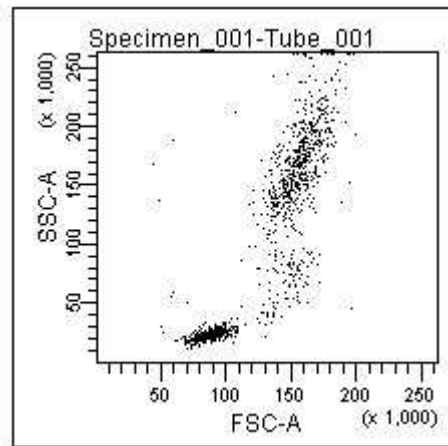
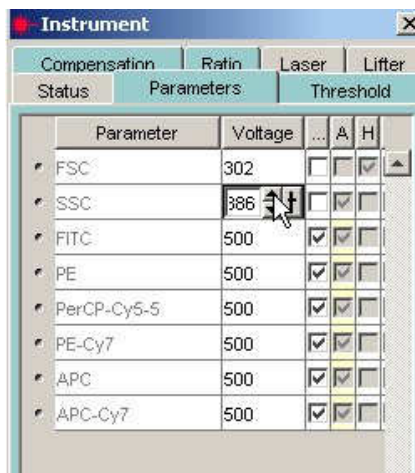


- 18 在 Worksheet 視窗裡，預置光學補償面板將出現一支 Unstained 空白對照、和六支你選擇的單色對照組。這些 Worksheet 表和我們即將使用來獲得樣品的 Global Sheet 長像有些不同，而且不可重編。

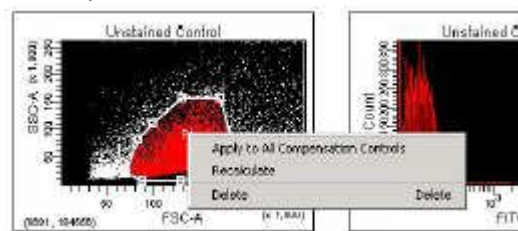


NOTICE：如果你沒刪除未使用的參數，你必須從 sectionte 3.3 重新開始!

- 19 首先放上空白對照組，調節 FSC 和 SSC 電壓值，使能夠適當地顯示目標細胞群，要點在使有意義的族群能獨立成群，使能在後續圈選時得到百分百的單一族群（如圖，全血中三個白血球細胞群）。完成後，再按一次 Acquire 鍵可中止獲取。



- 20 你將需要在散射光圖譜上把 P1 門移動到你的目標族群上 o 移動 P1 門後記得滑鼠右擊 P1 並選擇'Apply to all Compensation Tubes', 可鎖定 P1 門的新座標。

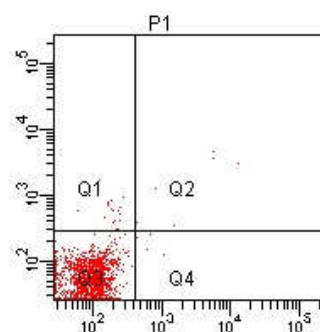


- 21 現在可以調整光電倍增管了。單擊 "Instrument" 視窗中的 "Parameter" 頁面。參考附錄二，將各個光電倍增管相對應的標準電壓值直接鍵入。你只需在陽性族群信號超過上限 off scale 時，才能向下調整 (-50) 該螢光參數的電壓。完成後，再次單擊 "Acquisition Dashboard" 視窗裡的 "Acquire" 鍵來中止獲取。

NOTICE：完成 AutoCompensation 光學補償後，系統將不允許你改變你的螢光電壓，不過，你可以改變 FSC 和 SSC 電壓。

22 空白對照樣本管 FITC-A vs PE-A 圖形。

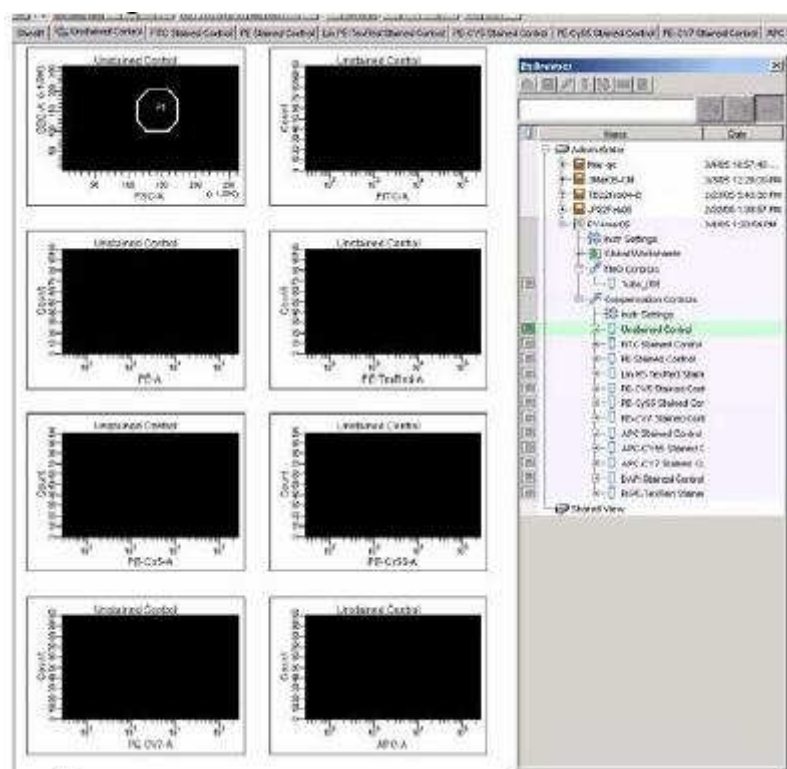
將陰性對照的每種螢光參數信號均調整在第一級對數區域內（如圖），在如 LSR II、FACSCanto 等機型已不合時宜。



23 在不 **Record** 的情形下，逐一上樣六支單色對照。你有適當地滴定抗體濃度，你應該能看一個陽性峰，它與陰性峰至少要分開一個對數級。

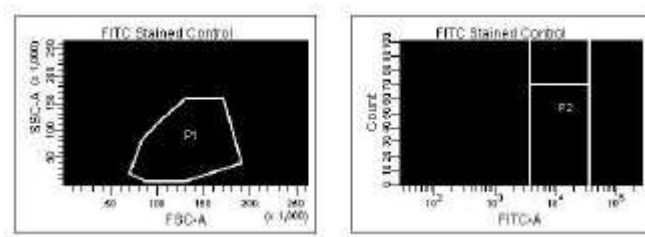
24 我們現在已經可以儲存所有對照試管的原始數據了。先點擊緊挨著合適試管的指標箭。確認瀏覽器中，綠色的獲取指示（) 位於 “Unstained Control”。這將為每個對照管提供預設的面版。

25 記錄事件的預設數目是 5,000，這對於計算光學補償應已足夠。

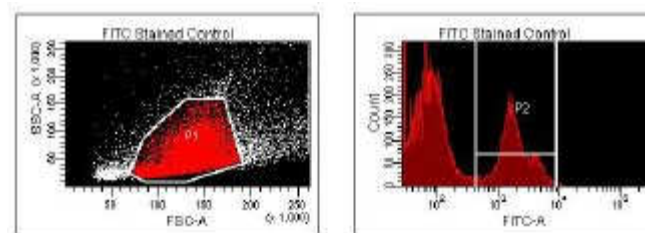


26 首先 SIT 放上空白對照組，單擊” Acquisition Dashboard” 視窗裏的” **Record**” 鍵。完成後，再按一次 **Record** 鍵可中止記錄。

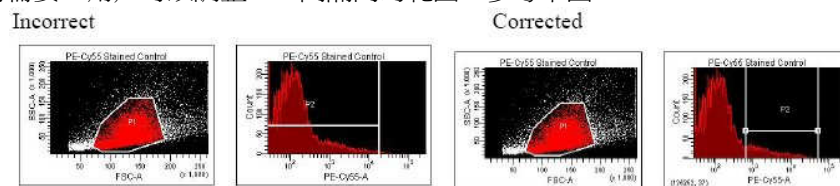
- 27 接著單擊” Acquisition Dashboard” 視窗裏的” Next Tube” 鍵。你會看到一個 FSC_vs_SSC 的圖，和一個有 P2 間隔門的直方圖，如下。依序上樣 FITC 單色對照組，按 Record。



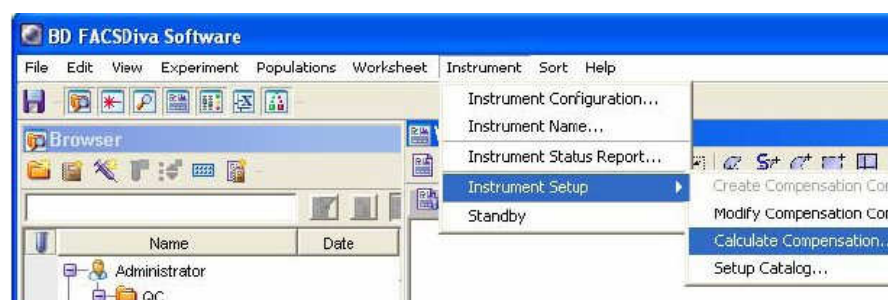
- 28 P2 間隔門將自動去尋找你的陽性族群。



如果有需要，用戶可以調整 P2 間隔門的範圍。參考下圖。



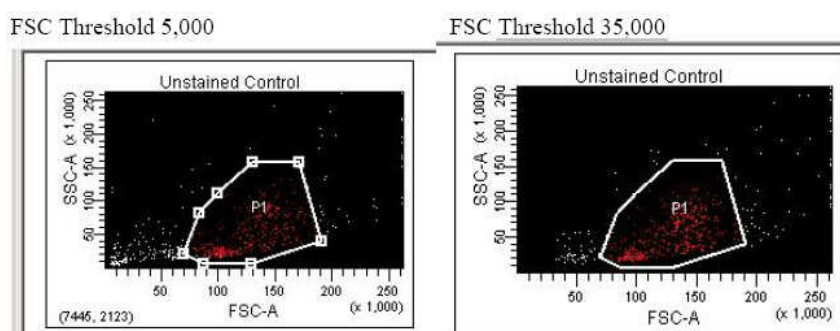
- 29 在收集七支對照組數據，並確定每一個單色對照組 P2 間隔門有涵蓋陽性族群後，回到 Instrument>>Instrument setup>>選擇 Calculate Compensation。



NOTICE：軟體將要求你儲存此一光學補償矩陣，建議使用與你的實驗相同的檔名。

調節閾值

- 30 一般用戶不注意閾值的設置。閾值的設置是爲了排除非目標信號的干擾。如有需要，可在上樣時，單擊”Instrument” 視窗中的” Threshold” 頁面，並在此設定 FSC 閾值。下圖中可見在不同閾值時，有效事件的比率之不同。



- 31 去儀器視窗並點擊光學補償活頁，目前這個實驗的光學補償數值將會顯示在那裡。
NOTICE: 請確認有用滑鼠點擊 Tube_001 左方「指示箭頭」()，使其呈綠色()，才能看到儀器參數。確認有啟動'Enable Compensation'。
- 32 您已完成六色免疫分析的儀器設置。可列印” Experiment ” 檔夾下的儀器設置。滑鼠右鍵單擊實驗文件夾中” Instr Settings” 圖示，並在 Inspector 視窗中，選擇 “Print” 列印設置，可貼到實驗筆記本中。

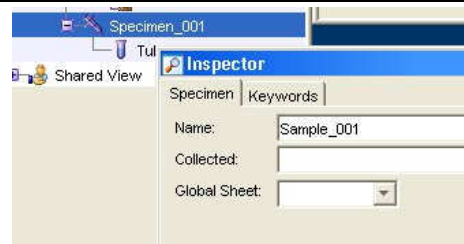
3.6 設計 Global Sheet 獲取範本

- 33 為你即將進行的實驗建立你的 Global Sheet1 版面，首先雙擊 Global Sheet1 得到一個空白的版面。
- 34 在空白”Global Sheet1”上，先選擇上方” Dot Plot” 工具選項，並在獲取範本點繪製兩個散點圖。(1) FSC-A vs SSC-A (2) FSC-A vs FSC-W。
NOTICE: 想要固定大小，輕點一下即可；亦可用滑鼠任何頂點並且拖放來改變大小。
- 35 可視實驗需要加繪散點圖。
- 36 右鍵單擊圖形坐標軸參數上，可以從目錄中選取或修改圖形上的坐標參數。

選擇螢光參數和抗體標籤

- 37 命名樣品與試管名。預設輸出檔名為 Specimen_001_Tube_001。可依此原則為您的樣品系統化命名。

- 38 以滑鼠點選 Specimen_001，並在 Inspector 方框中輸入新名，如 Sample_0831，按 Enter。



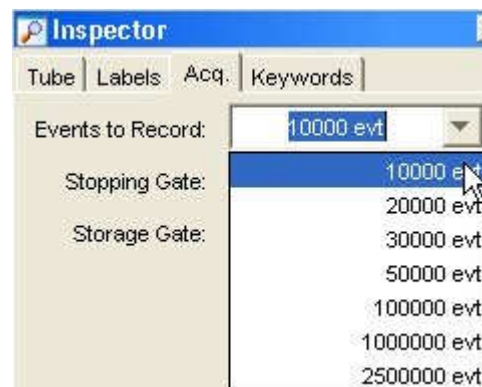
- 39 以滑鼠點選 Tube_001，並應用滑鼠右鍵更名 Rename 功能，然後輸入新名，如 CD3_CD4_001，按 Enter。注意：Diva 軟體不可採用句點當參數名或檔案名。



- 40 在” Acquisition Dashboard” 視窗裏按” Next Tube” 鍵，所得的下一試管將被命名為試管名 _002，然後試管 _003，等等。

標記 Labels

- 41 以滑鼠點選 Tube_001，並 Inspector 在” Lable (標記)” 頁面上，為各個螢光參數輸入標記字元。以滑鼠點選 FITC 參數格，在 Label 欄位上鍵入標示文字，如 CD3。依序將所有的螢光參數標示明白。

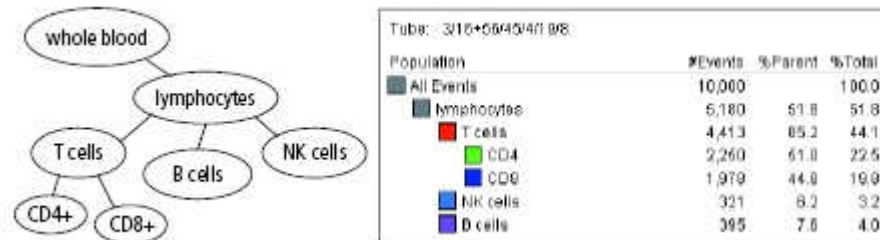


NOTICE：軟體在標籤名裡不允許用小數點。

- 42 在” Acq. (獲取)” 頁面上，可依實驗需求自行設定「Events to record」、「Stopping gate」、「Storage gete」。

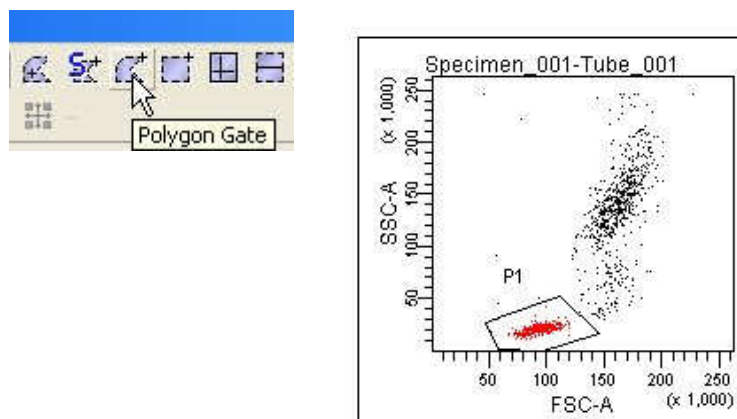
為目標細胞群圈選設門

- 43 在 FACSDiva 中引進階層式圈選，嘗試讓圈選門的建立更直覺、易懂。不必像在 CellQuest 一樣做布林式運算的門，像是 $R1 \cdot R2$ 。

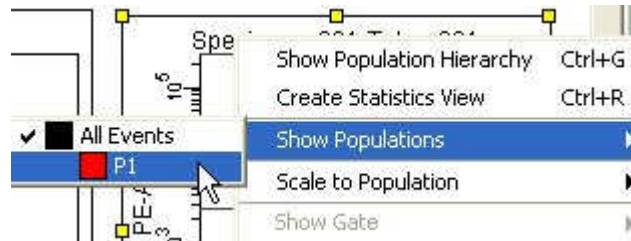


階層式圈選 Hierarchical Gating 的基本設計，是 A 扇門中所產出的另一扇門 B，可以想成是 A 扇門的一個的小孩（子集）。在使用 FACSDiva 軟體時，當用戶在一個已被圈選定義過，如「活的細胞」的圖譜上再編繪新的區域或門，這新產出的門自動成為「活的細胞」門的小孩（子集）。用戶可以從 Population Hierarchial View 功能中觀察到你目前定義出來所有門的家族樹形圖。如圖。Hierarchial View 中顯示出「T cells」、「B cells」、與「NK cells」，都是「lymohocytes」門的小孩。所以在實際上分選操作時，用戶只要用「NK cells」門，他實際上是定義在「lymphocytes 交集 NK cells」。

- 44 先確認瀏覽器中，綠色的獲取指示（）位於“CD3_CD4_001”；在”Acquisition Dashboard”視窗中，按“Acquire”。
- 45 在 Global Sheet1 工作圖上，選擇多角形圈選工具，並在 FSC-A vs SSC-A 圖上繪圈出「目標細胞」位置，形成「P1 門」。「P1 門」選定後，門內細胞會自動呈色。您可以移動它，或是拖曳“門”上的任何一控制點，來改變“門”的大小和形狀。練習看看。

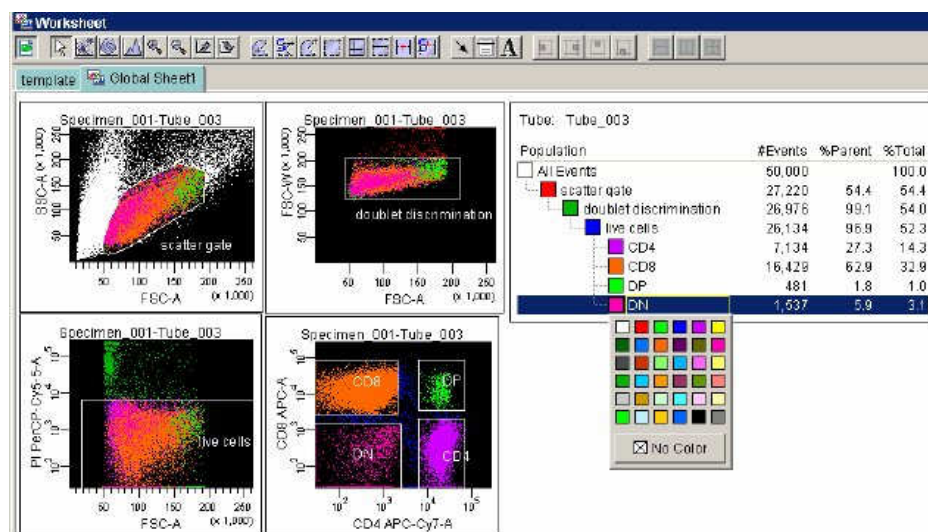


- 46 下一個圖譜通常是 FSC-A_v_FSC-W，這個圖譜的作用在于區別、排除雙聯體。用滑鼠右鍵單擊選中 FSC-A_v_FSC-W 圖譜，選擇” Show Population ” 命令；接著選擇 “P1”，如圖。這樣一來，所有選中的圖形上就只顯示 P1 淋巴細胞群體。。



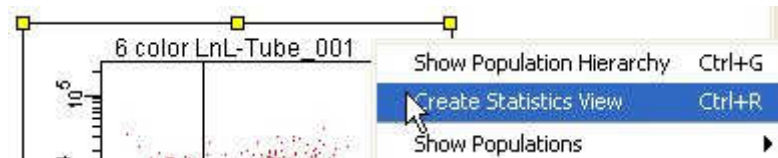
- 47 下一步是在 FSC-A_v_FSC-W 圖譜繪圈出「單一細胞」位置，排除雙聯體。在主要的細胞族群周圍拉一扇門，這將是 P2。如下圖。
- 48 接下來，我們想要用這 P2 門來對全部螢光圖譜進行圖選。按住 “Shift” 鍵，用滑鼠連續點選所有螢光參數散點圖。用滑鼠右鍵單擊選中其中一個圖形，選擇” Show Population ” 命令；接著選擇 “P2”，如圖。這樣一來，所有選中的圖形上就只顯示 P2 細胞群。
- 49 如有必要，可在有興趣的圖形上加設族群區域（populations）、陰陽界限（marker）、或四象限（quadrants）、及相關統計表，以便觀察。

如果想觀看現有的族群階層，可以從 Population>>選擇 Show Population Hierarchy。每個族群的名稱可以用 Rename 功能重新標記，如下圖中 CD4, CD8。



-
- 50 如果想改變各個族群的預設顏色，雙擊在該族群前方有色方框可選色，如上圖。
- 51 在 Population Hierarchy 視窗所提供的統計有：各個族群的數量、它們佔父母門的百分比、和它們總事件的百分比。

如果想要產出 Mean、CV 等統計，以滑鼠點擊任意圖譜，並在圖上空白處，單擊右鍵選擇「Create statistics View」。



- 52 如需編輯統計產出項目，以滑鼠右擊統計表空白處，選「Edit Statistics View」。

3.7 記錄實驗數據

- 53 將裝有 6 色螢光染色的 Sample_001 樣品管裝入載樣埠。在瀏覽器中，確認綠色的獲取指示 () 位於 “CD3_CD4_001”。可先單擊” Acquisition Dashboard” 視窗上的” Acquire ” 鍵，待細胞開始在圖形上出現，並確認 P1/P2 位置正確後，單擊” Acquisition Dashboard” 視窗上的” Record ” 鍵。
- 54 記錄完 10,000 個細胞後，將樣品管從載樣埠上取下。
- 55 在” Acquisition Dashboard” 視窗上單擊” Next”，新建第二個” Tube”。注意：此時新建的” Tube” 自動被命名為 “CD3_CD4_002”。
- 56 在瀏覽器中，確認綠色的獲取指示 () 位於 “CD3_CD4_002”。將裝有第二支樣品管裝入載樣埠。可先單擊” Acquisition Dashboard” 視窗上的” Acquire ” 鍵，待細胞開始在圖形上出現，並確認 P1/P2 位置正確後，再單擊” Record ” 鍵開始記錄。
- 57 重覆上述分析步驟，至分析完所有檢品。

3.8 輸出 FCS 文件、備份實驗檔案

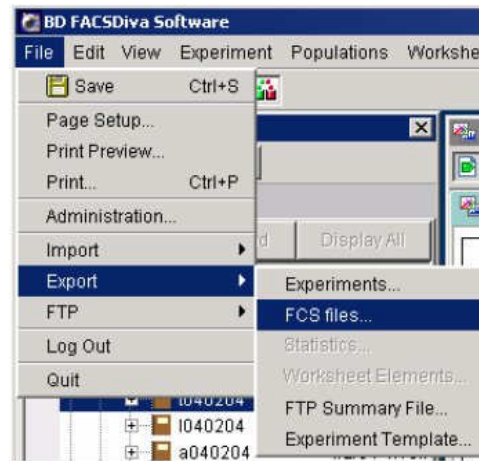
- 58 文件夾內的數據資料都能夠以“FCS 文件”的形式輸出，這種文件形式能夠被 BD 軟體和其他應用軟體讀取。這些文件可以“FCS 2.0”或“FCS 3.0”版本形式輸出；也就是說，這些資料能夠以 1,024 或 262,144 兩種解析度輸出。如果您希望在 BD CellQuest，BD CellQuest Pro 或 Modfit LT 軟體中重新分析這些資料，那麼您需要將資料以 1,024 的解析度（FCS 2.0）的格式輸出。

NOTICE : 在 BD CellQuest Pro 軟體中分析輸出的資料之前，首先需要使用 BD FACSCONVERT 軟體，將文件轉換成能被 Macintosh 電腦讀取的文件格式。

NOTICE : 如果您輸出文件是為了在 FACSDiva 或 FlowJo 軟體中對其重新進行分析，那麼您可以選擇“FCS 3.0”版本。使用這種解析度和文件版本，所有的參數都將被保留原始線性設置。在 FACSDiva 或 FlowJo 軟體中，可以將這些信號通過對數轉換，再以對數形式顯示在圖形中。

59 在瀏覽器中，雙點擊打開想輸出的實驗文件夾 Experiment()。

60 選擇“File>>Export>>Export FCS”命令。



61 在“Export Parameter”窗口中選擇 “FCS 2.0”格式。或“FCS 3.0”格式。



62 如有必要，可選 None 來縮小資料檔。單擊“OK”。

63 如有必要，可在目錄路徑“硬碟 D：”，加上新建的文件夾的名字。單擊“Save”即可。

64 NOTICE：單擊“Details”，您可以查閱有關這些輸出文件的詳細資料。

65 您已經成功地將資料輸出至“硬碟 D：”上的“BD Export”文件夾中，你可以用隨身碟複製帶走。或者單擊“Start”，選擇“Program > Hewlett-Packard > hp dvd writer > hp dvd writer”。選擇“HP Record Now”命令，將資料轉錄至 CD 光碟上。



第四章、儀器設置 DNA Analysis

在本章中，您將學習如何進行簡易DNA分析之儀器設置最優化。在您記錄一個樣品的資料之前，必須先根據所使用的樣品類型和螢光染料的不同，對光電倍增管電壓值，補償值和閾值設置進行最優化設置。經過最優化設置後，不同螢光參數下的目標細胞都能分佈在圖形刻度上。



啓動系統 進行品質控制 最優化設置 記錄資料 分析資料 關閉系統

對流式細胞儀的最優化設置包括幾個步驟：

- 登錄進入BD FACSDiva軟體
- 新建一實驗 DNA Analysis
- 螢光參數選擇
- 設計Global Sheet獲取範本
- 最優化流式細胞儀的設置
- 記錄實驗數據
- 輸出FCS文件，ModFit LT分析

本節將以從事 DNA 單色分析為例，敘述如何利用” Instrument Setting (儀器設置)” 功能，對該儀器進行設置最優化。對您而言，您在操作這些步驟時，必須盡可能按照順序進行。

4.1 登錄進入 BD FACSDiva 軟體

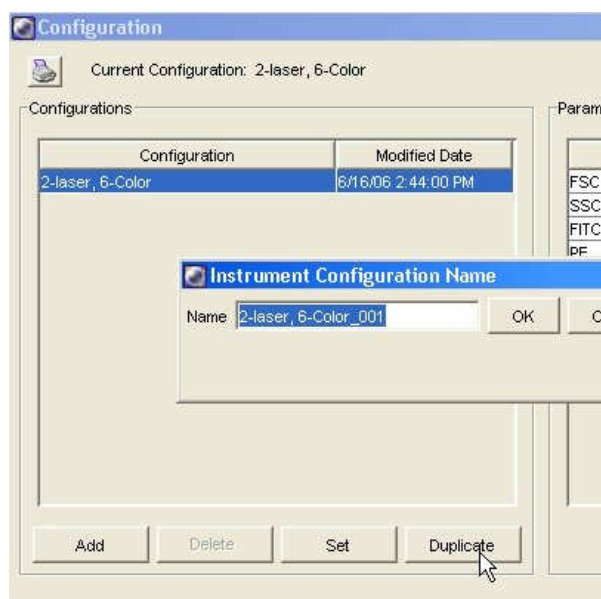
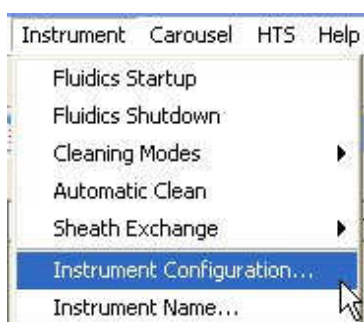
- 1 開啓主電源。主電源綠色鍵位於細胞儀右前方。
- 2 開啓電腦。桌面註冊號是Administrator，密碼登錄框中輸入BDIS，按ENTER。
- 3 開啓 BD FACSDiva 軟體。在軟體登錄框中，輸入使用者名稱及密碼。（記得先跟管理員申請到授權密碼，例如 Pname_Yourname）

NOTICE：你的所有實驗資料都將被保留在你自己的硬碟空間裡，其他用戶不能進入。

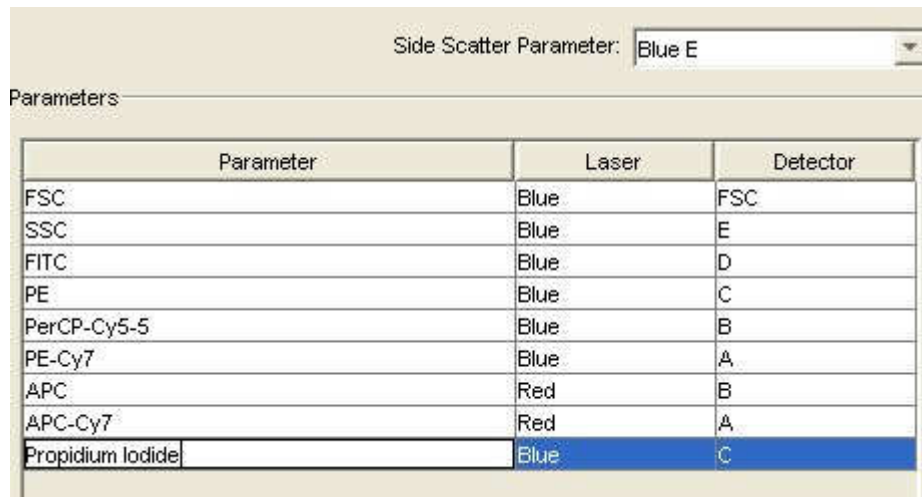
- 4 確定軟體與細胞儀完成連線。完成連線後，在 Instrument 視窗下方會顯示 Instrument Connected。如有必要，可點擊 Instrument () 視窗，觀察軟體與細胞儀是否完成連線。



- 5 選擇 “Instrument>Instrument Configuration” 命令，查看現存儀器配置。我們在此要將 DNA 分析時需增加參數，如 PI、DAPI 加到現有儀器配置中。請先 Duplicate 一新儀器配置、以 DNA_001 或其他代號命名之，按 OK 後。

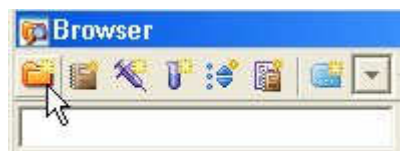


- 6 再在 **Parameter** 方框中，按 **Add** 增加參數，建議 **PI** 用 **Blue (Laser)**、**C(Detector)**來偵測，如下圖。完成後，按 **OK**。



4.2 新建一實驗 DNA Analysis

- 7 要產生一個 **Folder**，先以滑鼠點選你的資料槽，然後點擊 **Folder** 標誌。



- 8 要產生一個 **Experiment**，先以滑鼠點選你新增的 **Folder**，然後點擊 **Experiment** 標誌。或從螢幕上方選擇 "**Experiment>>New Experiment**" 來新增實驗。並在隨後出現的「**Experiment templates**」方框中，選用「**Blank Experiment with Sample Tube**」。



- 9 更名功能。對 FACSDiva 軟體預設的檔夾名稱，皆可重新命名。在瀏覽器中應用滑鼠點擊”Blank Experiment with...” 實驗檔夾，然後在 Inspector 方框中輸入”DNA_001”字元，按 Enter 來命名此新建的實驗檔夾。



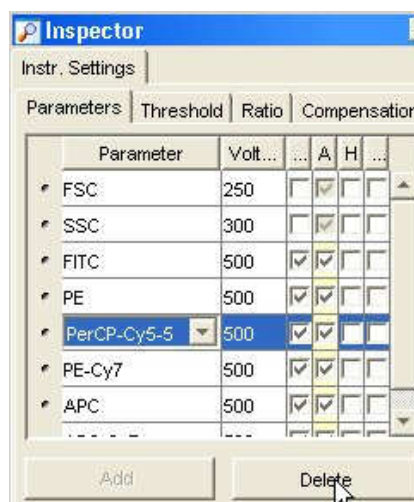
- 10 ” DNA_001” 檔夾已含有一 Specimen_001，如果你的實驗檔夾中沒有 Specimen，點擊 Specimen 標誌新增之。

每個 Specimen 應至少有一試管 Tube_001，可點擊 Specimen_001 前+號展開，使可見，如下圖。每個空白 Tube 左方有一相對應「指示箭頭」，等一下分析樣品時，必須用滑鼠點擊，使其呈綠色，才能進行儀器參數設置。



4.3 螢光參數選擇

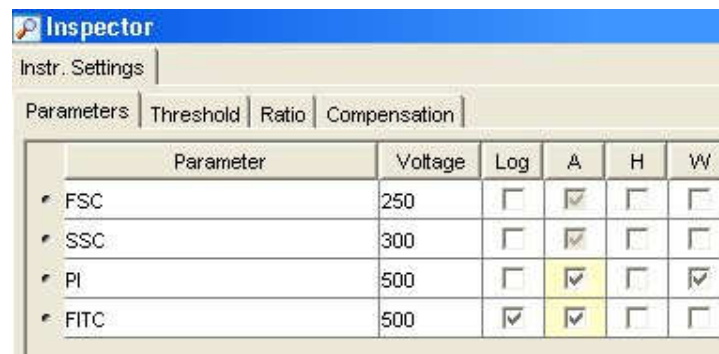
- 11 在瀏覽器中以滑鼠選擇此”DNA_001”檔夾下的”Instr Settings”（儀器設置）。單擊”Inspector”視窗裏的”Parameters”頁面。用戶可在 Parameters 頁面上，去除多餘的參數，我們在此練習去除 PerCP-Cy5-5，PE-Cy7，APC，APC-Cy7 等四個螢光參數，留下 FITC 和 PE 螢光參數。



- 12 Parameters 頁面如右。單擊視窗裏的” Add or Delete” 鍵來增加或刪除參數。如需更改參數，可點擊參數方格中右側箭頭，如 PerCP-Cy5-5 可改成 PerCP 或 PI。

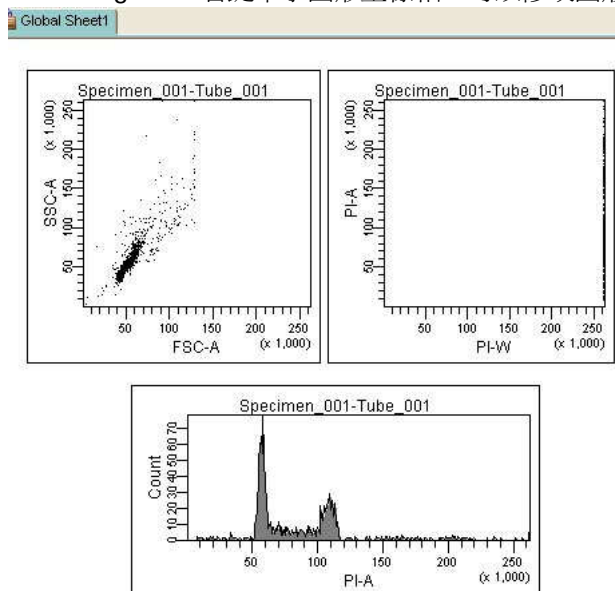


- 13 在此設定 PI 為 LIN 呈現方式，並增加 PI-W 參數，如下圖。



4.4 設計 Global Sheet 獲取範本

- 14 在空白“Global Sheet1”上，先選擇” Dot Plot” 工具選項，並在獲取範本點繪製兩個散點圖。(1) FSC-A vs SSC-A (2) PI-W vs PI-A，選擇” Histogram” 工具，並在範本點繪製一個散點圖 (3) PI-A histogram。右鍵單擊圖形坐標軸，可以修改圖形上的坐標參數。



4.5 最優化儀器設置 (Optimize Settings)

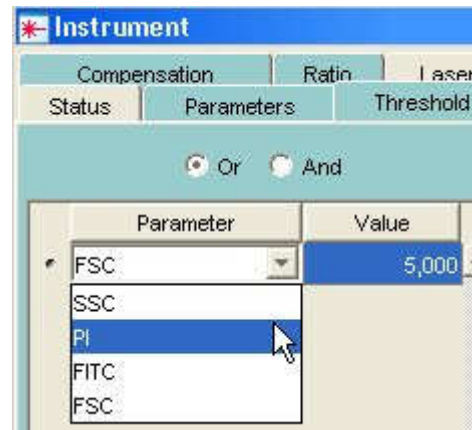
本節中，將通過以下五個步驟，學習儀器的最優化設置。

- 調節閾值，設置 PI=5,000
- 為特定的 DNA 螢光參數調節光電倍增管電壓值
- 為單細胞群體設門
- 調節 FSC 和 SSC 設置
- 其他螢光染料參數調節光電倍增管電壓值 (optional 雙色)

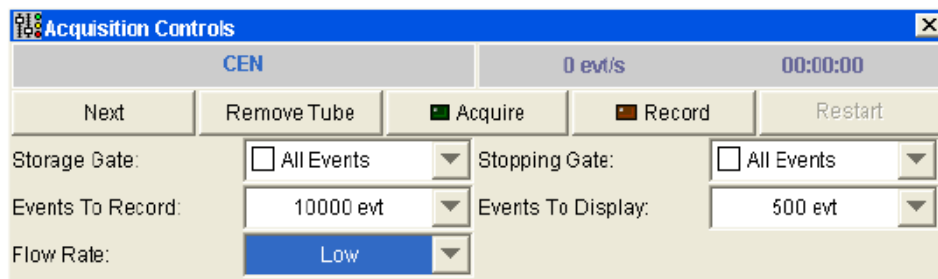
以從事 DNA 雙色分析為例，將使用以下螢光染料對照樣品管：(1) Unstimulated 對照，PI 單染，(2) Stimulated Positive 對照，PI 單染，(3) Stimulated Positive 對照，PI and Anti-H3 FITC 雙染。

決定設閾參數 PI

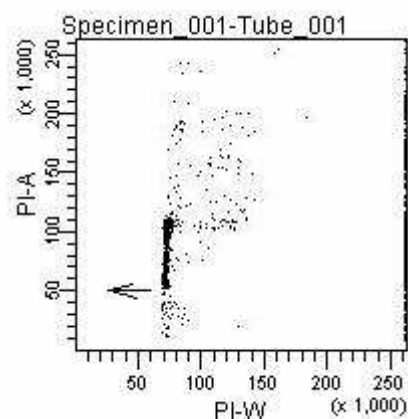
- 15 先確認瀏覽器中，綠色的獲取指示 () 位於 “Tube_001”；單擊 “Instrument” 視窗中的” Threshold” 頁面。在此設定閾值參數 PI，並調節 PI 閾值 5,000。閾值的設置是爲了排除非目標信號的干擾。



- 16 DNA 分析採 Low 流速。

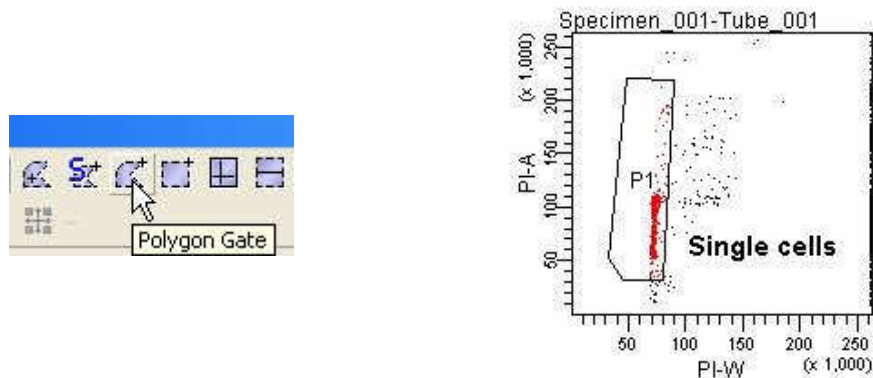


- 17 將陰性對照管裝入載樣埠。單擊” Acquisition Dashboard” 視窗裏的” Acquire” 鍵。此指令會使軟體即時呈現儀器所測得的細胞資料，但不作記錄（Record）。調節 PI 電壓值 Voltage，使 G0 細胞的 PI-A 值約在 50（X1000）位置。



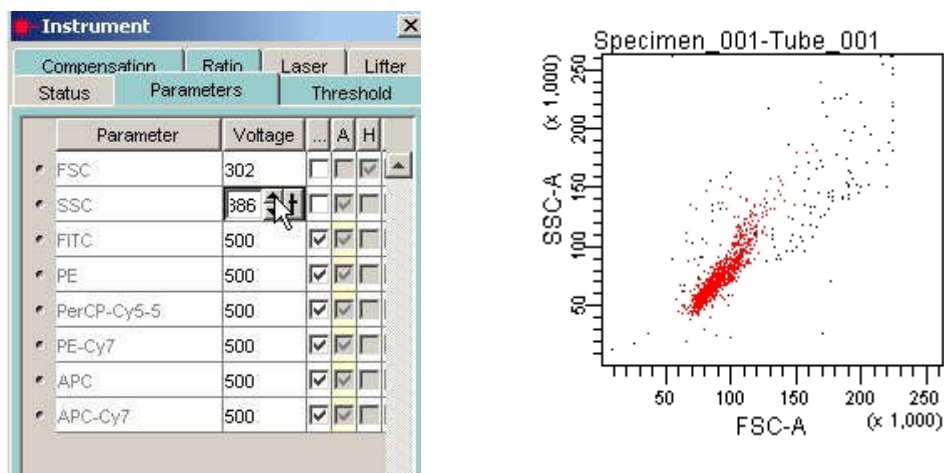
為單細胞群體設門

- 18 在 Global Sheet1 工作圖上，選擇多角形圈選工具，並在 PI-W vs PI-A 圖上繪圈出「Single Cells」位置，形成「P1 門」。「P1 門」選定後，門內細胞會自動呈色。您可以移動它，或是拖曳“門”上的任何一控制點，來改變“門”的大小和形狀。練習看看。

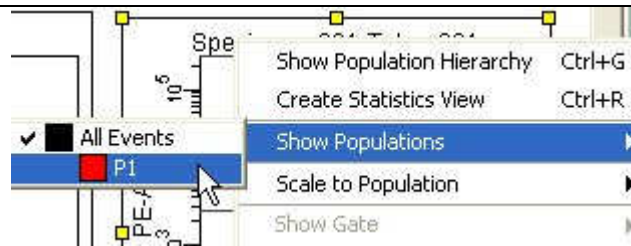


調整 FSC 與 SSC 電壓

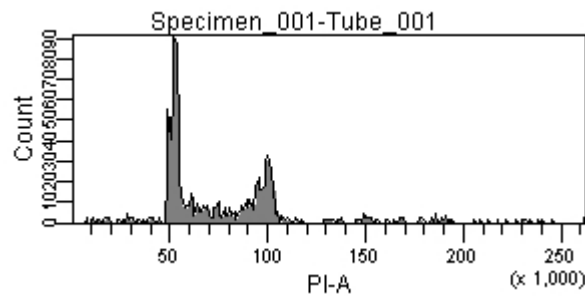
- 19 單擊 "Instrument" 視窗中的 "Parameters" 頁面。調節 FSC 和 SSC 電壓值，通常先調節 FSC，再調節 SSC。調節 FSC 和 SSC 電壓值 Voltage，使 Jurkat 單細胞族群（即紅色細胞群）能獨立成群，如下圖。完成後，再按一次 Acquire 鍵可中止獲取。



- 20 用滑鼠點選 PI-A 直方圖。按滑鼠右鍵選擇 "Show Population" 命令；接著選擇 "P1"，如圖。這樣一來，PI-A 直方圖形上就只顯示 P1 Jurkat 單細胞族群。

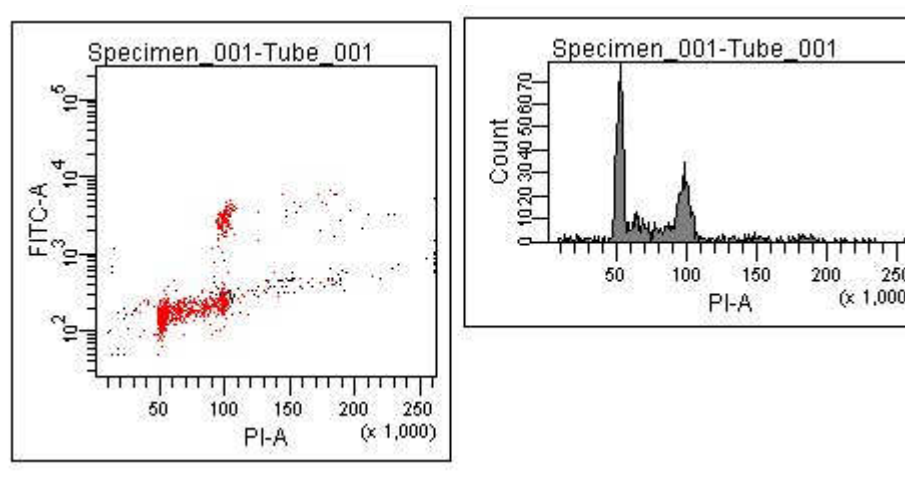


- 21 **微調節閾值**。單擊“Acquisition Dashboard”視窗裡的 **Acquire** 鍵。需要時，單擊“Instrument”視窗中的“Threshold”頁面。在此適當地提高 PI 閾值，以排除細胞碎片的干擾。

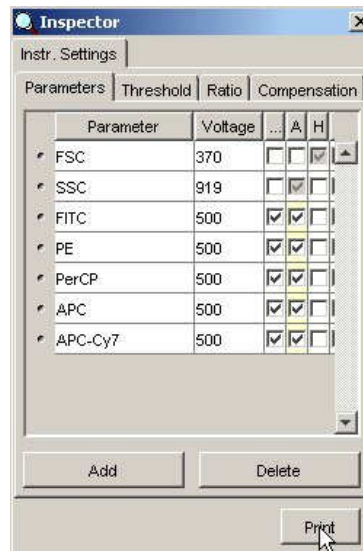


調節 FITC 螢光光電倍增管(optional for FITC/PI)

- 22 您可以在運行「空白對照管」時，調整在“Instrument”視窗的光電倍增管電壓值 **Voltage**，以檢查 FITC 自發螢光。將空白對照管裝入載樣埠。先確認瀏覽器中，綠色的獲取指示() 位於“Tube_001”單擊“Acquisition Dashboard”視窗裏的“Acquire”鍵。
- 23 需要時，單擊“Instrument”視窗中的“Parameter”頁面。調整 FITC 光電倍增管的電壓值，使得陰性細胞的 FITC 螢光參數信號顯示在第一級對數區域內（如圖）。完成後，再次單擊“Acquisition Dashboard”視窗裡的“Acquire”鍵來中止獲取。



- 24 您已完成簡易 DNA 雙色分析的儀器設置。可列印” Experiment ” 檔夾下的儀器設置。右鍵單擊實驗文件夾中” Instr Settings” 圖示，並在 Inspector 視窗中，選擇 “Print” 列印設置，可貼到實驗筆記本中。

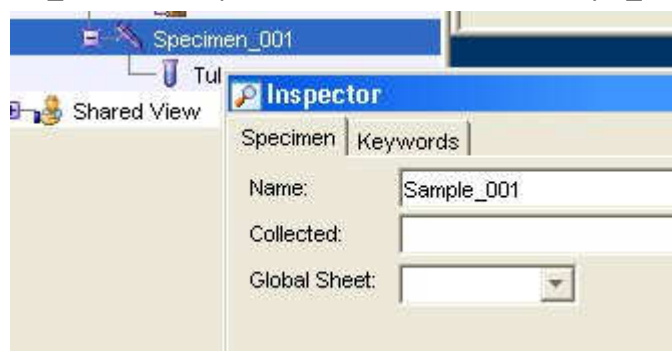


4.6 記錄實驗數據

準備工作

- 25 命名樣品與試管名。預設輸出檔名為 Specimen_001_Tube_001。可依此原則為您的樣品系統化命名。

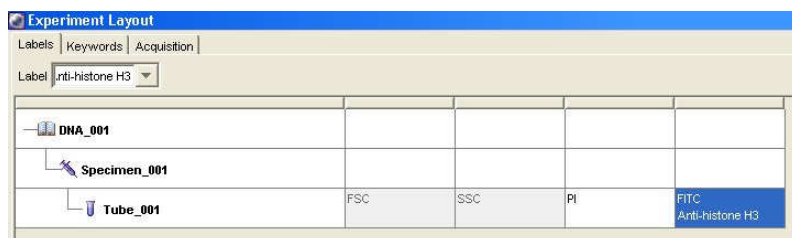
以滑鼠點選 Specimen_001，並在 Inspector 方框中輸入新名，如 Sample_0831，按 Enter。



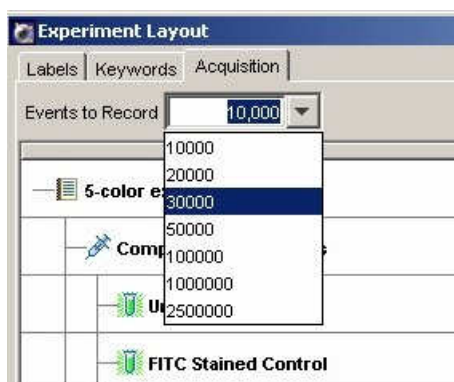
- 26 同理，以滑鼠點選 Tube_001，並在 Inspector 方框中輸入新 Name 名，如 AntiH3_PI_001，按 Enter。注意：Diva 軟體不可採用小數點當檔名。



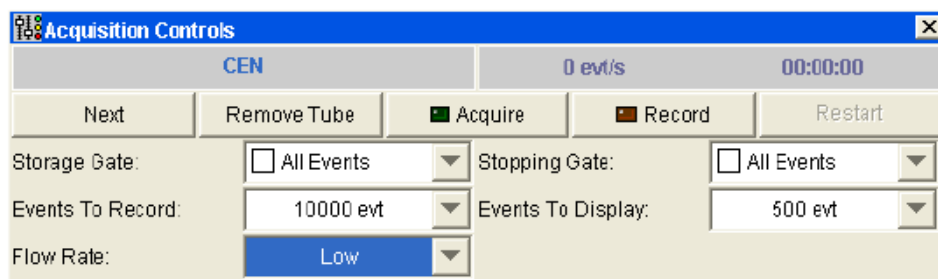
- 27 **標記 Labels**。選擇“Experiment>Experiment Layout”命令。在“Experiment Layout”視窗上，您可以設置參數名稱，如下圖。這些名稱將出現在圖形的坐標軸，以及所有統計結果中。在“Label (標記)”頁面上，為各個螢光參數輸入標記字元。以滑鼠點選 FITC 參數格，在 Label 欄位上鍵入標示文字，如 Anti_Histone H3。依序將所有的螢光參數標示明白。



- 28 在“Experiment Layout”視窗裡“Acquisition (獲取)”頁面上，為“CD3_CD4_001”採集管，決定記錄細胞總數。在“Events to Record”的下拉功能表中選擇“20,000”，或手工鍵入特定數字後，單擊“OK”。



- 29 在 AcquisitionDashboard 視窗，確認採用 Low 流速。並依實驗需求自行選定「Stopping gate」及「Storage gate」。



開始記錄資料

- 30 資料獲取過程中，請觀察 Global sheet1 中 PI-W/PI-A 圖形 P1 門圈選適當與否。如有必要，可移動 P1 門位置。
- 31 將裝有 Anti-H3 FITC/PI 螢光染色的 Sample_001 樣品管裝入載樣埠。在瀏覽器中，確認綠色的獲取指示 () 位於 “AntiH3_PI_001”。可先單擊” Acquisition Dashboard” 視窗上的” Acquire ” 鍵，待細胞開始在圖形上出現，並確認 P1 位置正確後，單擊” Acquisition Dashboard” 視窗上的” Record ” 鍵。

記錄完 20,000 個細胞後，將樣品管從載樣埠上取下。

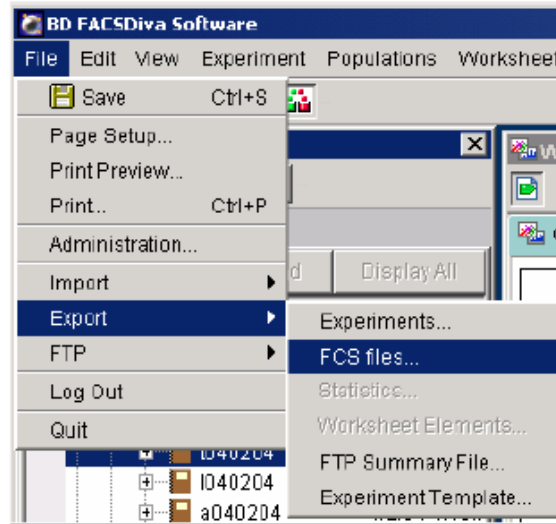
- 32 自動升冪試管名。在” Acquisition Dashboard” 視窗上單擊” Next”，新建第二個” Tube”。注意：此時新建的” Tube” 自動被命名為 “AntiH3_PI_002”。

在瀏覽器中，確認綠色的獲取指示 () 位於 “AntiH3_PI_002”。將第二個樣品管裝入載樣埠。可先單擊” Acquisition Dashboard” 視窗上的” Acquire ” 鍵，待細胞開始在圖形上出現，並確認 P1 位置正確後，再單擊” Record ” 鍵開始記錄。

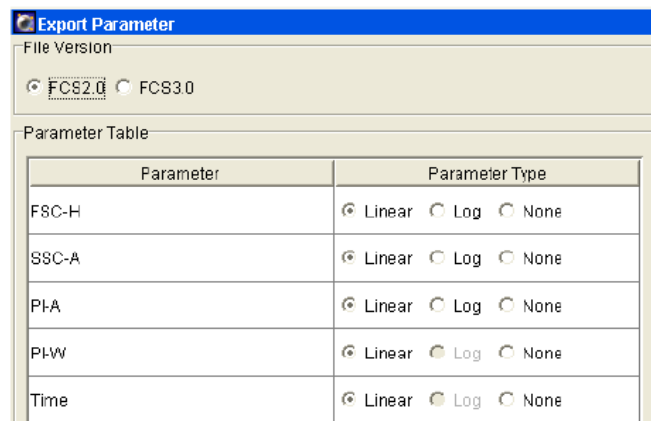
- 33 重覆上述分析步驟，至分析完所有檢品。

4.7 資料輸出

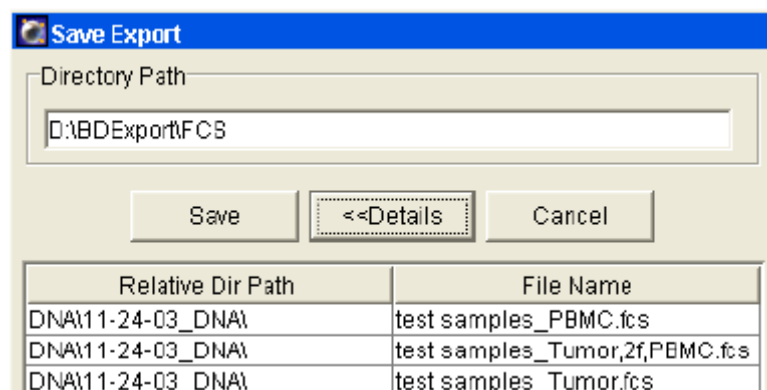
- 34 DNA 數據一般建議輸出原始資料，再用 ModFit LT Cell Cycle 分析軟體處理。用滑鼠點擊 DNA_001 檔夾，執行 File>>Export>>FCS files。



- 35 選 FCS2.0 格式。



- 36 選擇匯出路徑。



NOTICE：分析 G0/1-S-G2/M 位相比例，請參考本公司網站 ModFit LT 中文使用手冊。

第五章、用 FACSDiva 分析數據

用 FACSDiva 分析數據



在本練習中，可以學習如何使用 BD FACSDiva 軟體，敘述了如何利用” Global sheet” 作為分析範本來建立圖形、門、和統計結果來分析已記錄的資料。練習之後，你將會產生像本手冊的範例分析圖形。

- 為目標細胞群體設門。
- 建立統計結果。
- 進行分析物件的品質管制（例如，確認“門”已合理設置完畢）。
- 如果需要，列印或輸出結果。

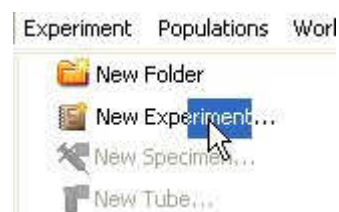
開啓電腦。在出現的密碼登錄框中，輸入BDIS，按Enter。

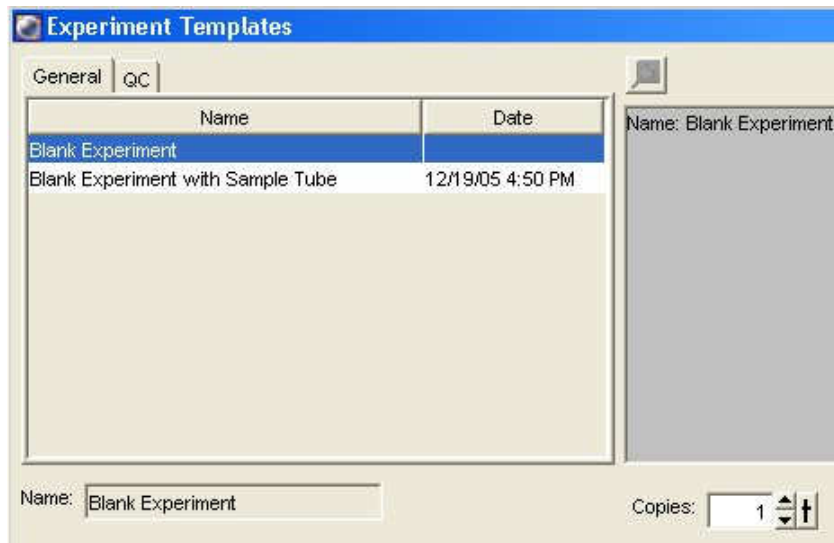
開啓 BD FACSDiva 軟體。在登錄對話框中，輸入使用者名稱及密碼。



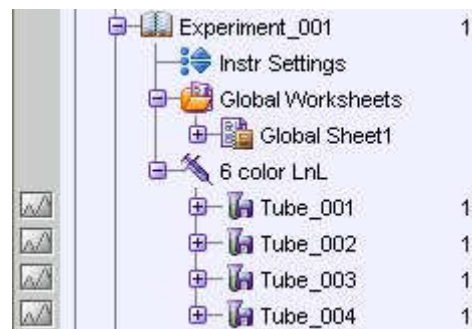
5.1 新建一實驗

- 1 從螢幕上方選擇“Experiment>>New Experiment”來新增實驗。並在隨後出現的「Experiment templates」方框中，選用「Blank Experiment」。





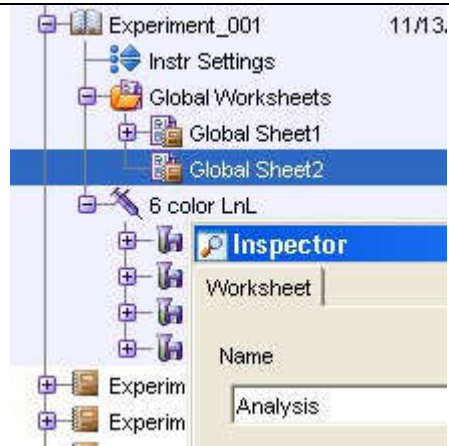
- 2 我們匯入四個血液檢查檔案來練習雙色分析。從螢幕上方選擇 “File>>Import>>FCS Files” 來匯入檔案。檔案路徑在 D:/BD EXPORT/EXPERIMENT/6 Color cocktails，請匯入前 4 個檔案。如已有收集過實驗數據，亦可依此程序練習分析你自己的檔案。
匯入完成後



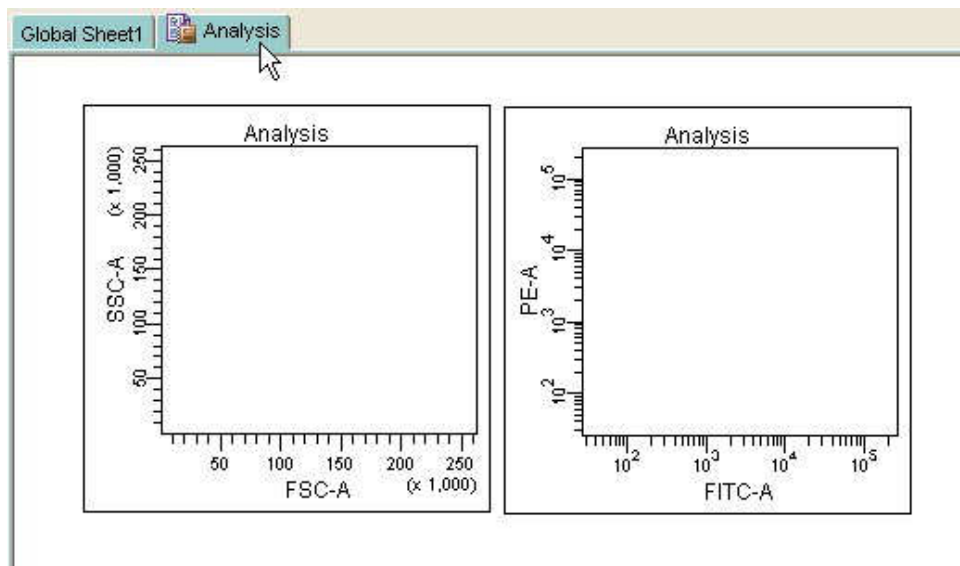
5.2 新建“分析範本” Global Worksheet

- 3 在瀏覽器上方，按” New Global Worksheet” 工具選項。並點選 Global Sheet2，重新命名成”Analysis”。





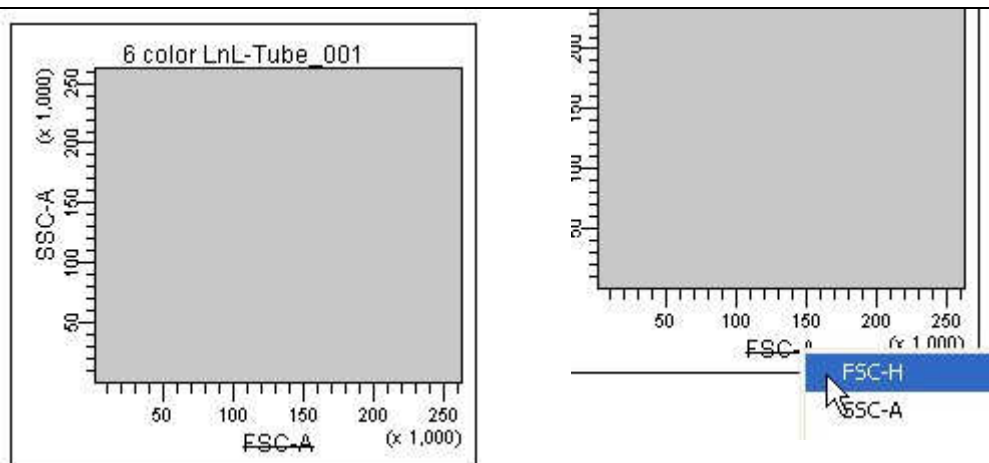
- 4 在 Analysis 範本點繪製兩個散點圖。(1) FSC-A vs SSC-A (2) FITC-A vs PE-A。以右鍵單擊圖形坐標軸，可以修改圖形上的坐標參數。



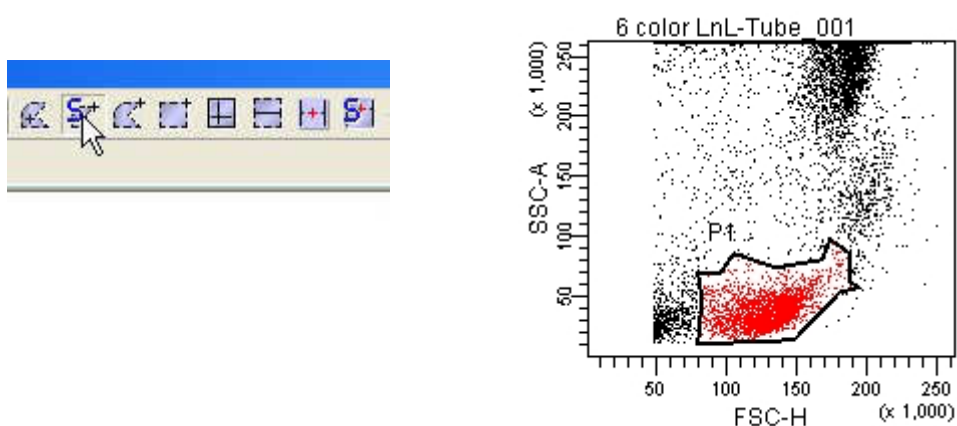
- 5 以滑鼠點擊 tube_001 左側的指示箭頭，Analysis 面板上的散點圖上便會出現細胞分佈圖。



第一個圖形出現全灰圖形，是因為所選檔案中沒有 **FSC-A** 參數。以右鍵單擊圖形坐標軸，可以修改圖形上的 X 坐標參數成 **FSC-H**，便會出現正常細胞分佈圖。



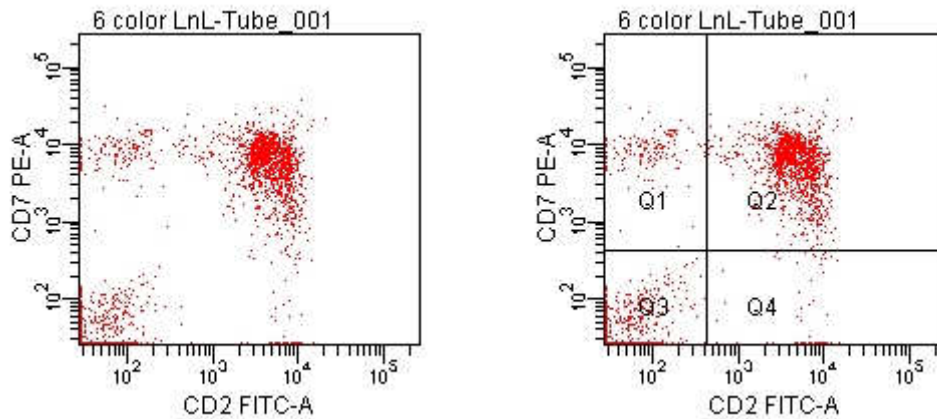
- 6 點擊螢幕上方 snap-to-gate 功能鈕，並在 FSC-A 對 SSC-A 圖上淋巴球位置上單擊一下，Diva 軟體會自動繪出該族群的輪廓，如下圖。



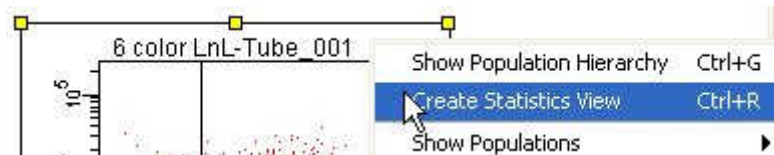
- 7 以滑鼠選 FITC-A 對 PE-A 圖，並在圖上空白處單擊右鍵，選擇「Show Populations」，再選「P1」。



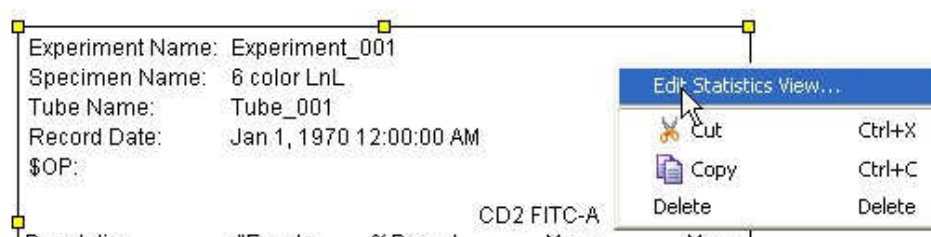
- 8 FITC-A 對 PE-A 圖現只呈現淋巴球 P1，如下圖。如需進一步統計，可利用螢幕上方四象限標記工具，並在該圖劃出陰陽界限。



- 9 現在我們要產出上圖例的四象限統計，以滑鼠點擊該圖，並在圖上空白處，單擊右鍵選擇「Create statistics View」。



- 10 如需編輯統計產出項目，以滑鼠右擊統計表空白處，選「Edit Statistics View」。



- 11 選擇欲輸出統計的有意義族群，P1，Q1~4 勾選處在左前方格。

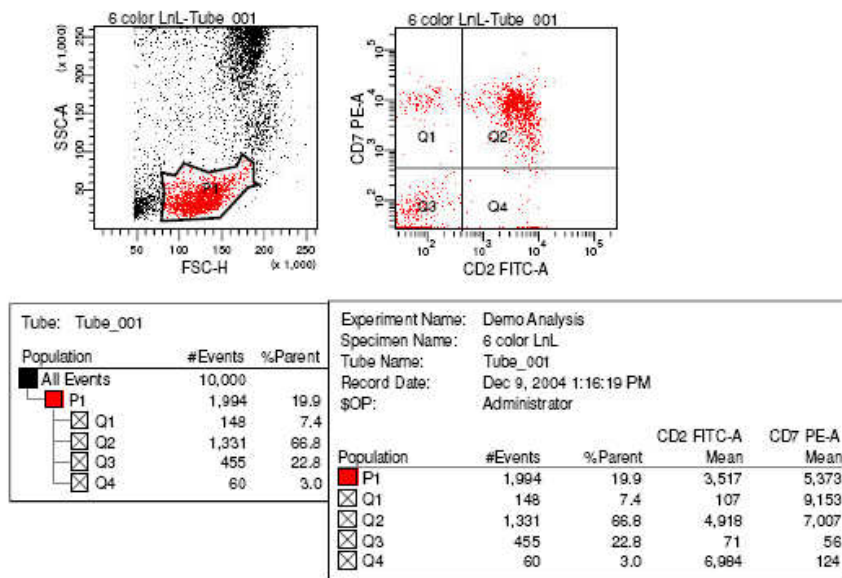
Edit Statistics View							
Header Populations Statistics							
Show Population	Populations	All	Parent Na...	#Events	%Parent	%Grand P...	%Total
☐	All Events	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☒	P1	☐	☐	☒	☒	☐	☐
☒	Q1	☐	☐	☒	☒	☐	☐
☒	Q2	☐	☐	☒	☒	☐	☐
☒	Q3	☐	☐	☒	☒	☐	☐
☒	Q4	☐	☐	☒	☒	☐	☐
Decimal Places					1	1	1

12 在 Statistics 頁面可增刪輸出的項目及針對那些參數自由勾選。

Parameters	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	All	Median	Geometri...	Mean	CV	Max	Min	SD	Mode
FSC-H	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
SSC-A	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
CD2 FITC-A	☐	☐	☐	☒	☐	☐	☐	☐	☐
CD7 PE-A	☐	☐	☐	☒	☐	☐	☐	☐	☐
CD3 PerCP-Cy5-5-A	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
CD4 PE-Cy7-A	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
CD5 APC-A	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
CD8 APC-Cy7-A	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
FSC-A (disabled)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Time	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Decimal Places	☐	0	0	0	1	0	0	0	0

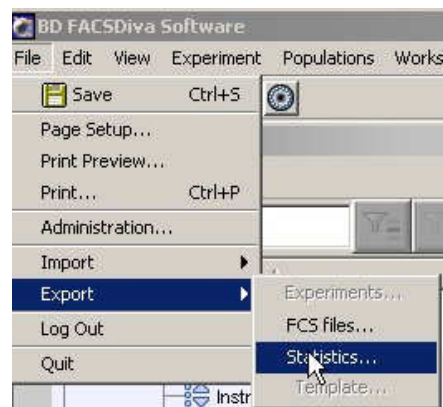
5.3 列印結果

13 最後產生的 Analysis 報告如下圖，如需列印，從螢幕上方 File >> Print 即可

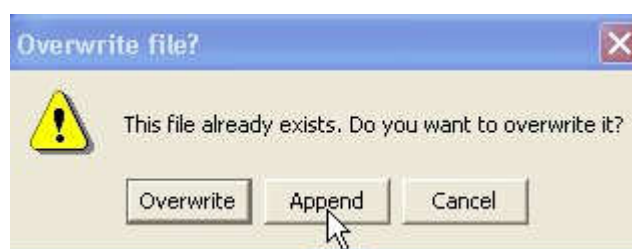
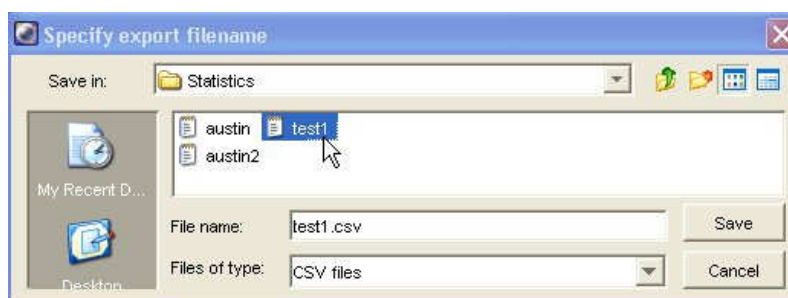


5.4 輸出統計值

14 輸出統計值到 CSV 檔。先點選欲輸出統計值表，選擇 File >> Export >> statistics...

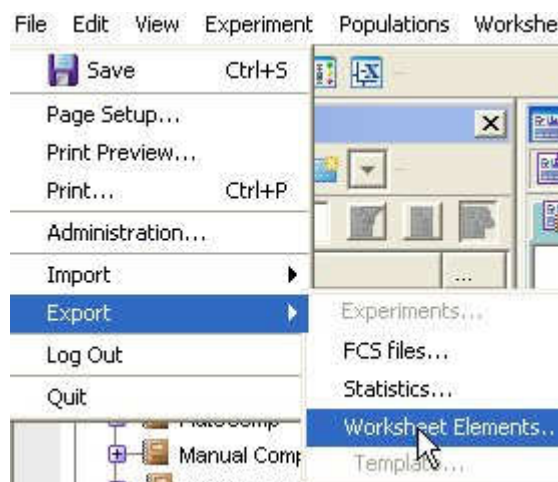


- 15 在出現的對話框中，鍵入適當檔名，如 **test1**，按 **Save**。

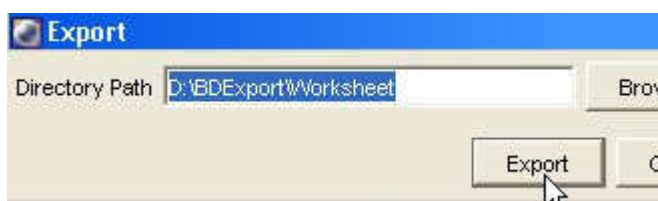


5.5 輸出圖譜

- 16 如需輸出圖像檔，可先選到適當檔案，然後可按著 **Shift** 鍵，然後以滑鼠連續點選有意輸出的圖譜。
- 17 選完圖譜後，執行 **File >> Export >> Worksheet Elements**。

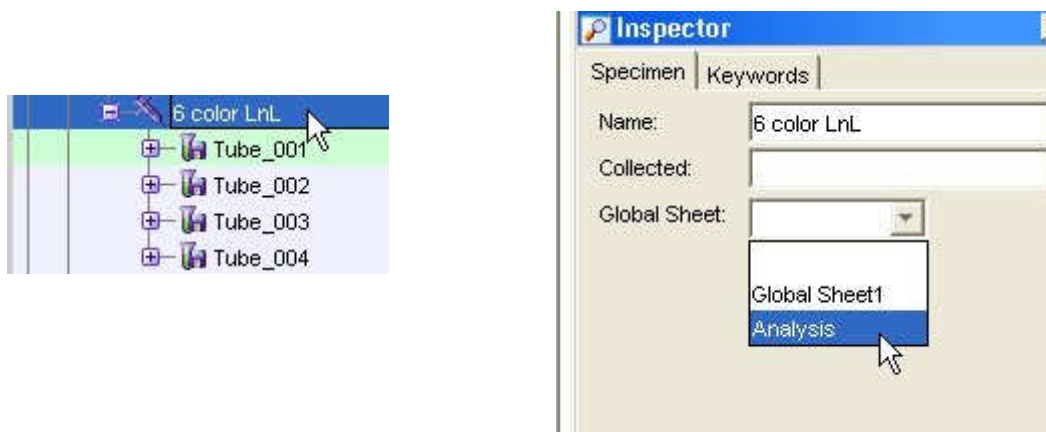


- 18 在出現的方框中，指定輸出路徑或接受預設路徑後，按 **Export**。

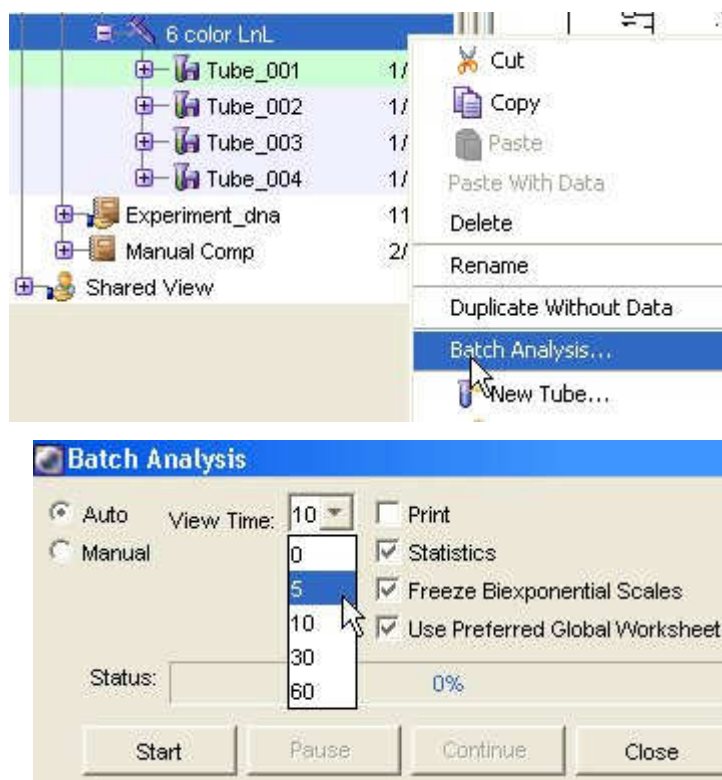


5.6 批次分析

- 19 您必須很快掃讀整圖實驗，檢查您的圖形，看細胞群體級別是否適當、確認“P1 門”是否已設置妥當，細胞群體是否正確、並確認需要輸出的統計結果項目。
- 20 選定欲進行批次分析的檔案夾，在此為 6 Color LnL，然後在 Inspector 方框中，選「Analysis」當範本。



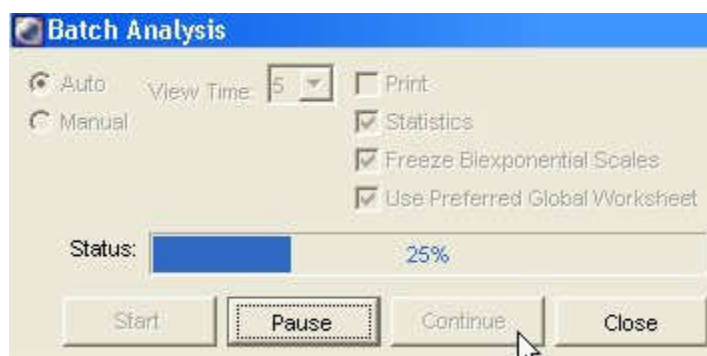
- 21 以滑鼠右 6 Color LnL，然後選「Batch Analysis」，並在出現的方框中選擇要不要 Print，要不要 Statistics，如下圖。然後按 START。



22 在隨後出現的方框中，填寫統計表列的檔名，如 **test 1**，然後按 **Save**。



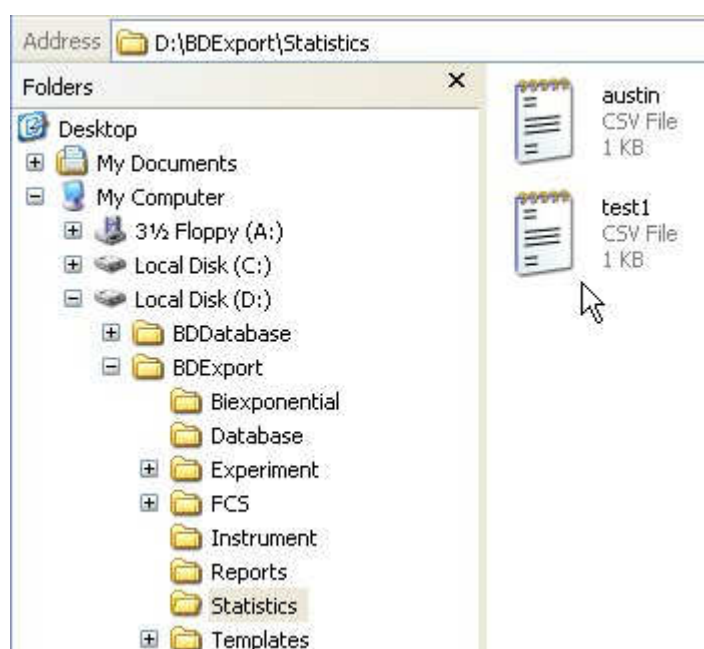
執行過程



程式完成通知



統計列表的預設儲存處

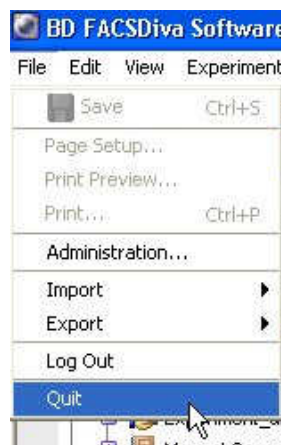


5.7 Log Out 退出軟體

- 23 在瀏覽器中關閉所有實驗，以滑鼠點擊實驗檔夾前的「-」號即可。FACSDiva 軟體會自動儲存所有變更。



- 24 從螢幕上方執行 File >> Quit 或 File >> Log Out，並在隨後出現的方框中選 Quit 便可離開軟體。



5.8 用微軟 Excel 讀取已輸出統計表

- 25 執行 Excel。程式集 >> Microsoft Excel。

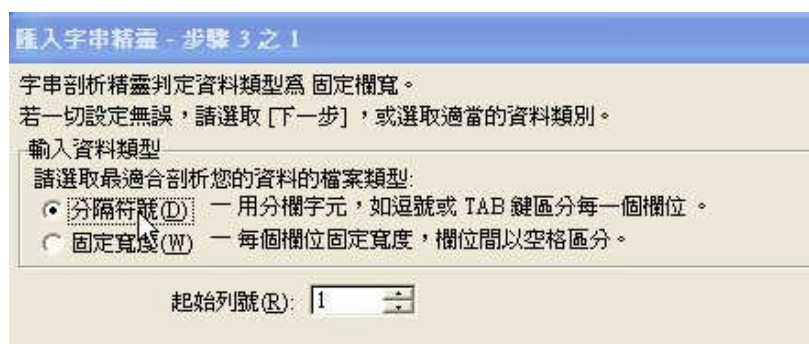


- 26 執行開啓舊檔，並在已知的路徑中 D:\BD Export\Statistic 尋找有意義的 CSV 檔。





27 以分隔符號號，選取下一步。



30 完成圖。可進一步處理繪圖。

	A	B	C	D	E	F	G
1	Experiment	Specimen I	Tube Name	Record Date	\$OP	P1 #Events	P1 %Paren
2	Experiment	6 color LnI	Tube_001	1970/1/1 00:00		1941	19.4
3	Experiment	6 color LnI	Tube_002	1970/1/1 00:00		2228	22.3
4	Experiment	6 color LnI	Tube_003	1970/1/1 00:00		2418	24.2
5	Experiment	6 color LnI	Tube_004	1970/1/1 00:00		2289	22.9
6							

附錄一、常用螢光染劑 (PMTs 以標準 6-2 規格為例)

測量參數	螢光染劑	吸光波長(nm)	螢光波長(nm)
標示抗體用染劑	Fluorescein, FITC	490	520 (Blue D)
	Phycoerythrin-R, PE	495	578 (Blue C)
	Peridinin-chlorophyll, PerCP	490	677 (Blue B)
	PerCP-Cy5.5	490	(Blue B)
	Cy-Chrome	495	670 (Blue B)
	PE-Texas Red	495	620 (B or C)
	PE-Cy5	495	670 (Blue B)
	PE-Cy7	490	781 (Blue A)
	Allophycocyanine	650	660 (Red B)
	APC-Cy7	650	781 (Red A)
核酸含量分析	Ethidium Bromide	510 (+ds DNA)	595 (Blue C)
	Propidium Iodide	536 (+ds DNA)	623 (B or C)
	Acridine Orange	480 (+ DNA)	520 (Blue D)
		440-70 (+ RNA)	650 (Blue B)
	Thiazole Orange	509 (+ RNA)	533 (Blue D)
細胞 Viability	Propidium Iodide	536	623(B or C)
	YOPRO-1	480	515 (Blue D)
	Acridine Orange	480	520 (Blue D)
	7-AAD	488	670 (Blue B)
細胞膜電位	DiO-C6 (3)	485	510 (Blue D)
Mitochondrial 膜電位	Rhodamine 123	485	546 (Blue D)
細胞內 pH 值	BCECF-AM	488	Ratio 520/620
	SNARF1-AM	514	Ratio 587/640
細胞內鈣濃度	Fluo4-AM	488	528 (Blue D)
	Calcium Green-1	488	530 (Blue D)
	Fura Red	488	660 (Blue B)
H2O2 sensitive	Dihydrorhodamine 123	505	534 (Blue D)
	DCFH-DA	505	535 (Blue D)
O2- radical sensitive	Hydroethidine	505	600 (Blue C)
Esterase sensitive	Fluorescein -DA	495	525 (Blue D)

附錄二、PMTs 最適電壓

雷射光源及對應接收器螢光波長表 (6-3-3 規格)：

	PMTs	BP Filters	Fluorochromes	Optimal Voltage
488 Laser	Blue A:	780/60	PE-Cy7	700 Volts
	Blue B:	695/40	PerCP-Cy5.5	700 Volts
	Blue C:	660/20	PE-Cy5	600 Volts
	Blue D:	610/20	PE-TexasRed	600 Volts
	Blue E:	575/26	PE	550 Volts
	Blue F:	530/30	FITC	600 Volts
	Blue G:	488/10	SSC	Not applied
633 Laser	Red A:	780/60	APC-Cy7	670 Volts
	Red B:	730/40	Alexa 700	600 Volts
	Red C:	660/20	APC	600 Volts
405 Laser	Violet A:	585/42	Qdot 585	Not available
	Violet B:	530/30	Indo-1(blue)	550 Volts
	Violet C:	450/50	Pacific blue, Alexa 405	500 Volts

附錄三、月保養

在上機時發現光敏感度下降，或發現 CV 值比平日高許多，表示整個液流系統需清洗。如果你的樣本量比較大，每月至少一次對整個液流系統作徹底的清洗。如遇超過一個月以上長假期，如暑休，建議在休假前執行月清潔程序，並讓儀器在充滿去離子水時關機，可防止鹽類結晶阻塞液流管路。

1. 卸下液流過濾器（避免 Bleach 損壞過濾器）。
2. 啟動流式細胞儀。
3. 將鞘液鋼筒倒空，充填至少 3 公升的 FACSClean，或 10% Bleach。
4. 上樣埠放一試管，內含 3 mL FACSClean，或 10% Bleach。
5. 設定液流控制鈕到 HI RUN 位置，運轉 30 分鐘。
6. 設定液流控制鈕到 Standby 位置，並解除鞘液鋼筒內的正壓力。
7. 用 FACSRinse 取代 FACSClean，重覆步驟 3~6。
8. 用去離子水取代 FACSRinse，重覆步驟 3~6。
9. 將卸下的液流過濾器裝好，在鞘液鋼筒內重新充填 FACSTFlow。
10. 上樣埠放一試管，內含 1 mL 去離子水。
11. 您可接著進行常規開機，或者關機。

清除流動室阻塞物 De-Clog Flow Cell

如果您的細胞容易黏連成團，或破裂後形成DNA，便可能阻塞流動室。這個問題會引起的異常現象，是用戶上機時發現事件速率逐漸下降。一旦發生上述現象，請即刻將取下檢品，清除流動室阻塞物，並將檢品過濾待檢。

1. 取下樣品管，支撐架放側邊，放吸水性紙巾墊著下方。
2. 在沒有樣品管狀態下，按Prime。這時鞘液停止流動，壓力反向將鞘液排出流動室流入廢液桶、SIT。在預設的一定時間後，系統以一定的速度自動將流動室充滿鞘液。上述程式完成後，儀器進入Standby模式。
3. 重覆步驟2。
4. 取 2 c.c. dH₂O上樣品，支撐架回位，以正常方式Prime。
5. 這樣就可以了。

附錄四、BD LSR II 耗材清單

品項	供應商	目錄號
儀器品管用		
BD FACS 7-color setup beads	騰達行	Cat. No. 335775
Rainbow fluorescent particles	騰達行	Cat. No. 556288
Nile Red fluorescent particle	騰達行	Cat. No. 347240
消耗性溶液		
BD FACSThrow sheath fluid	騰達行	Cat. No. 342003
BD FACS cleaning solution	騰達行	Cat. No. 340345
House hold bleach for waste		
專用試管：5mL polystyrene test tubes (BD Falcon™)		
uncapped, 125 per bag	騰達行	Cat. No. 352052
capped, 125 per bag	騰達行	Cat. No. 352054
capped, 25 per bag	騰達行	Cat. No. 352058
with cell-strainer cap	騰達行	Cat. No. 352235