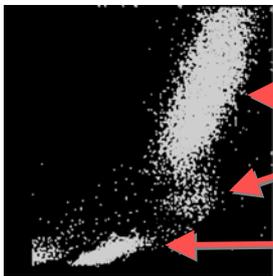


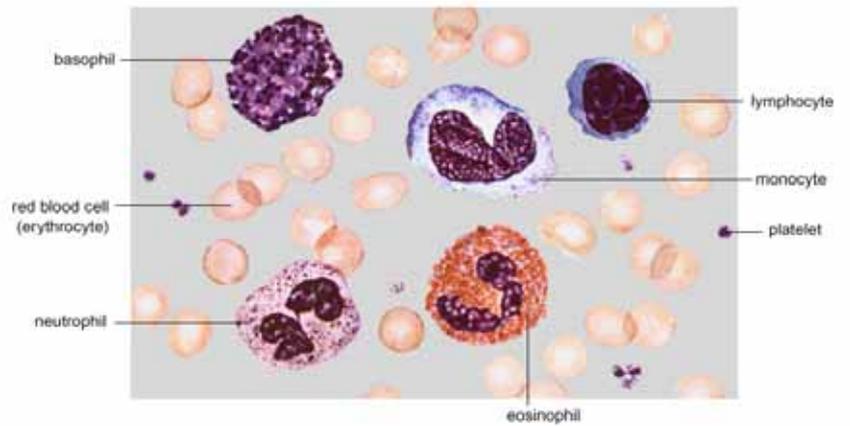
ふあくすきやりば〜



Granulocyte

Monocyte

Lymphocyte



2008/02/05

Isoiso作

図解編

FACSCalibur仕様

488nmアルゴンレーザー 3カラーアナライザー

FL1-530/30 FITC・GFP・alexa488など

FL2-585/42 PE・Cy3・PIなど

FL3-650LP Percp・PC5・PI・PE-Cy7など

注) Redレーザーは、装着されてませんのでAPCなどの色素を使用することは、出来ません

必要消耗品

ラウンドチューブFalcon社

キャップ	滅菌	包装単位	単位	カタログNo.	単価
ツープोजションキャップ	滅菌済	1	500	352003	66
ツープोजションキャップ	滅菌済	25	500	352058	58
ツープोजションキャップ	滅菌済	125	1000	352054	43
キャップなし	滅菌済	125	1000	352052	30
キャップなし	非滅菌	1000	1000	352008	12
セルストレナーキャップ	滅菌済	25	500	352235	120
キャップのみ		500		352032	14

キャリブレーション用ビーズ

・BD Calibrite 3

BD社 No.340486

・Flow-Cheak(10um)

BeckmanColter社 6605359

・DNA QC particles

BD社 No.349523

・Flow-Set(3.6um)

BeckmanColter社 6607007

HIスペックでの調整の場合

SPHEROTM UltraRainbow Fluorescent Particles

A single population of Rainbow Fluorescent Particles with enhanced UV and Far Red fluorescence intensity.

URFP-30-2 ; UltraRainbow Fluorescent Particles, 10⁷/mL, 2 mL, 3.0-3.4 μ m, \$215.00

URFP-38-2 ; UltraRainbow Fluorescent Particles, 10⁷/mL, 2 mL, 3.6-4.0 μ m, \$215.00

URFP-100-2 ; UltraRainbow Fluorescent Particles, 10⁷/mL, 2 mL, 8.1-12.0 μ m, \$250.00

URFP-300-5 ; UltraRainbow Fluorescent Particles, 1% w/v, 5 mL, 25.0-35.0 μ m, \$255.00

Spherotech

Rainbow Beads-8peek

簡易手順

FACSCallibur スタートアップ手順

0. 廃液タンク(スライドボックス内・右側)が空であることを確認した後、ハイター原液を適量入れ、シースタンクにシース液が満たされていることを確認。
1. FACSCalliburの電源をON。
2. コンピュータの電源をON
3. シースタンク圧力スイッチON(圧の確認)、シースフィルターに気泡が入っていないことを確認。
4. FACSCalliburから蒸留水の入っている試験管を取り外し、PRIMEボタンを押す。
5. STANDBYボタンが点灯するまで待ち、もう1～2回PRIMEボタンを押す。
6. STANDBYボタンが点灯後、再び蒸留水の入った試験管をセットし、サポートアームを中央に
7. (本来はここでFACSCompを実行)

FACSCallibur シャットダウン手順

1. サンプルインジェクションポート(SIP)を以下の手順で洗浄。

<ドロップレット吸引チューブ(DCM)洗浄>

Runボタンを押す。

- ・希釈ハイター2 mlの吸引 (サポートアームを右か左の位置) 1分間
- ・蒸留水2 mlの吸引 (サポートアームを右か左の位置) 1分間

<サンプルインジェクションチューブ(SIT)洗浄>

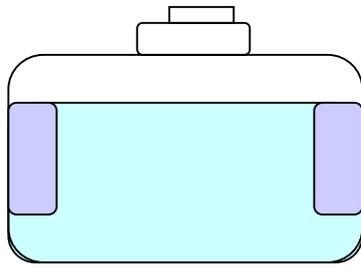
サンプル流量をHI

- ・希釈ハイター2 mlで、(サポートアームを中央の位置) 10分間
- ・蒸留水2 mlで、(サポートアームを中央の位置) 10分間

2. 蒸留水が1 ml入った試験管をFACScanにセットし、つまみをSTANDBY。
3. シースタンクの圧を抜く。
4. シースタンクにシース液を補充し、廃液タンクを空にした後、ハイターを50 ml入れる。
5. standbyにして10分以上経過後FACSCalliburの、電源をOFF。

ハイターは主成分の次亜塩素酸ナトリウムが効果成分です。
次亜塩素酸ナトリウムを使用する場合は1%溶液にて使用します。

シース量確認・廃液処理確認



MAX

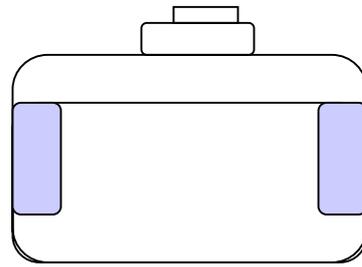
これ以上入れない事
約3/4

シースタンク

満タンで、約2時間

MAXまで、補充する

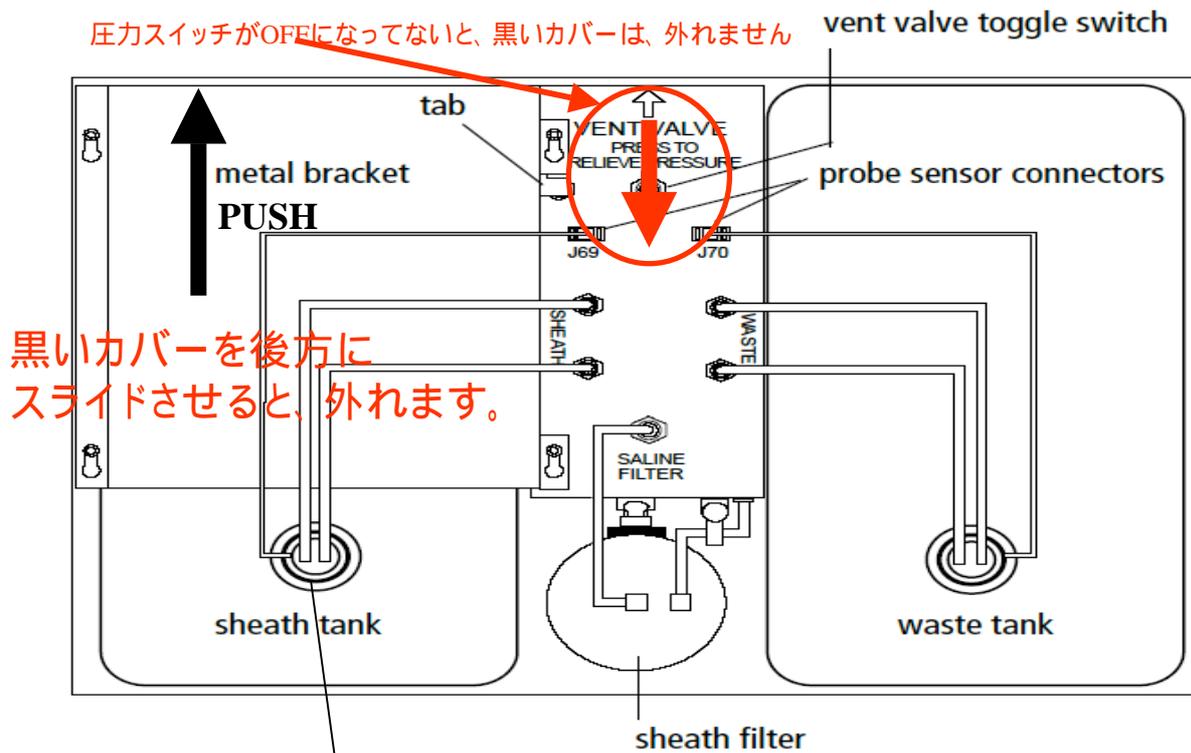
(シースの量不足は、コンタミの原因になります)



廃液タンク

使用前に原液ハイターをキャップ1杯入れる。

終了時・シース液補充時には、必ず処理してください。



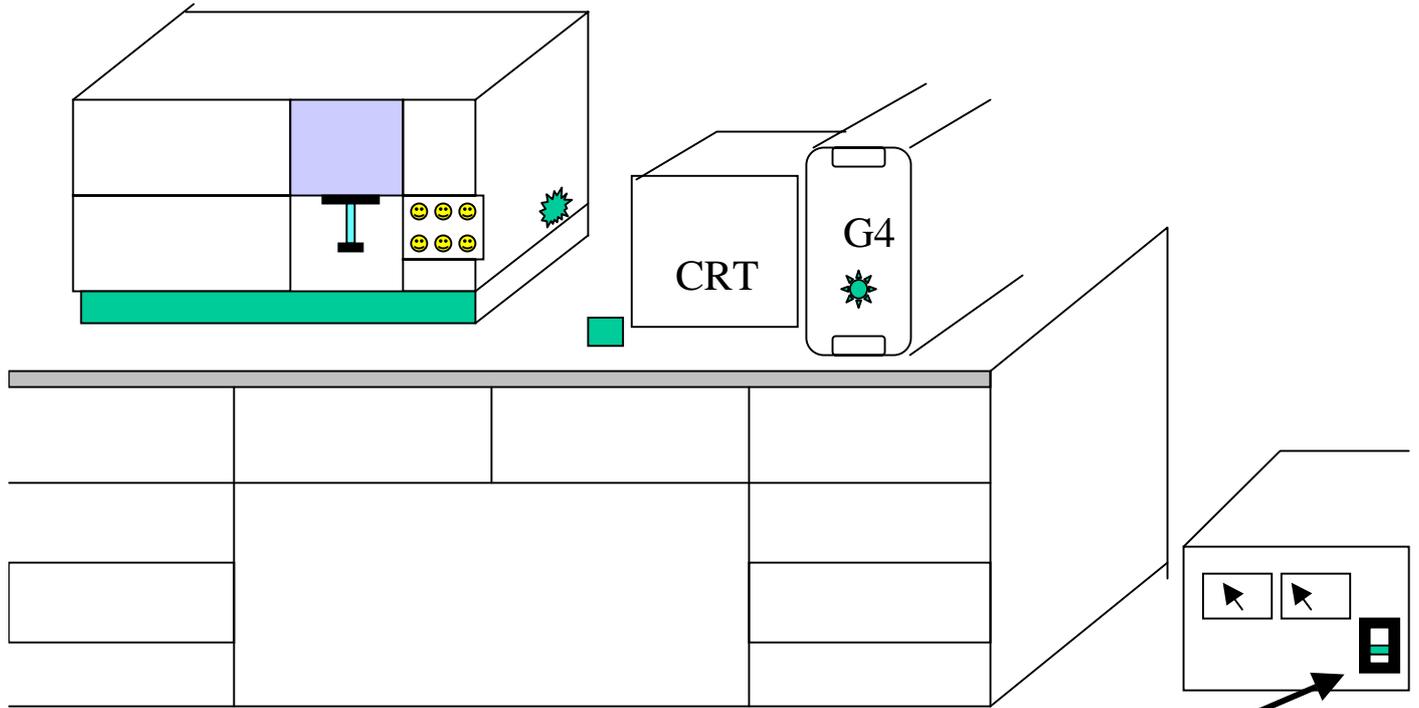
圧カスイッチがOFFになってないと、黒いカバーは、外れません

黒いカバーを後方に
スライドさせると、外れます。

センサーの着脱は、タンクを置いた状態で。
(施設によっては、コネクターを外す。)

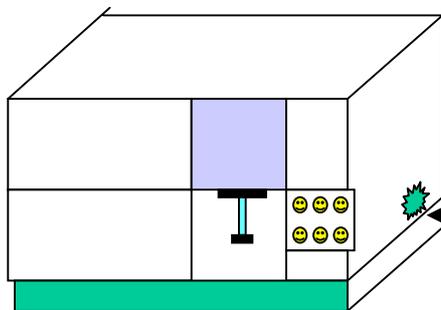
**センサー装着時には、しっかり閉める
Lineがねじれたり、よれてない事**

電源スイッチ

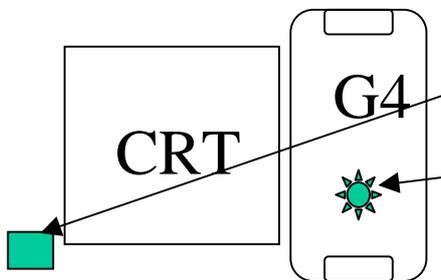


1.安定化電源ON

床に転がってます。(機械の右側)



2.calibur電源ON



3.コンピューター主電源ON

4.MAC ON

キーボードからは立上らない事があります。

10秒ほど待て！！

下の様なコメントが出た場合、すべての電源を切って、1からやり直してください



すぐ、測定しない場合、圧力スイッチOFFを確認後、退出してください。

始動前確認

1. 黒のカバーが装着されているか確認

2. 圧カスイッチON

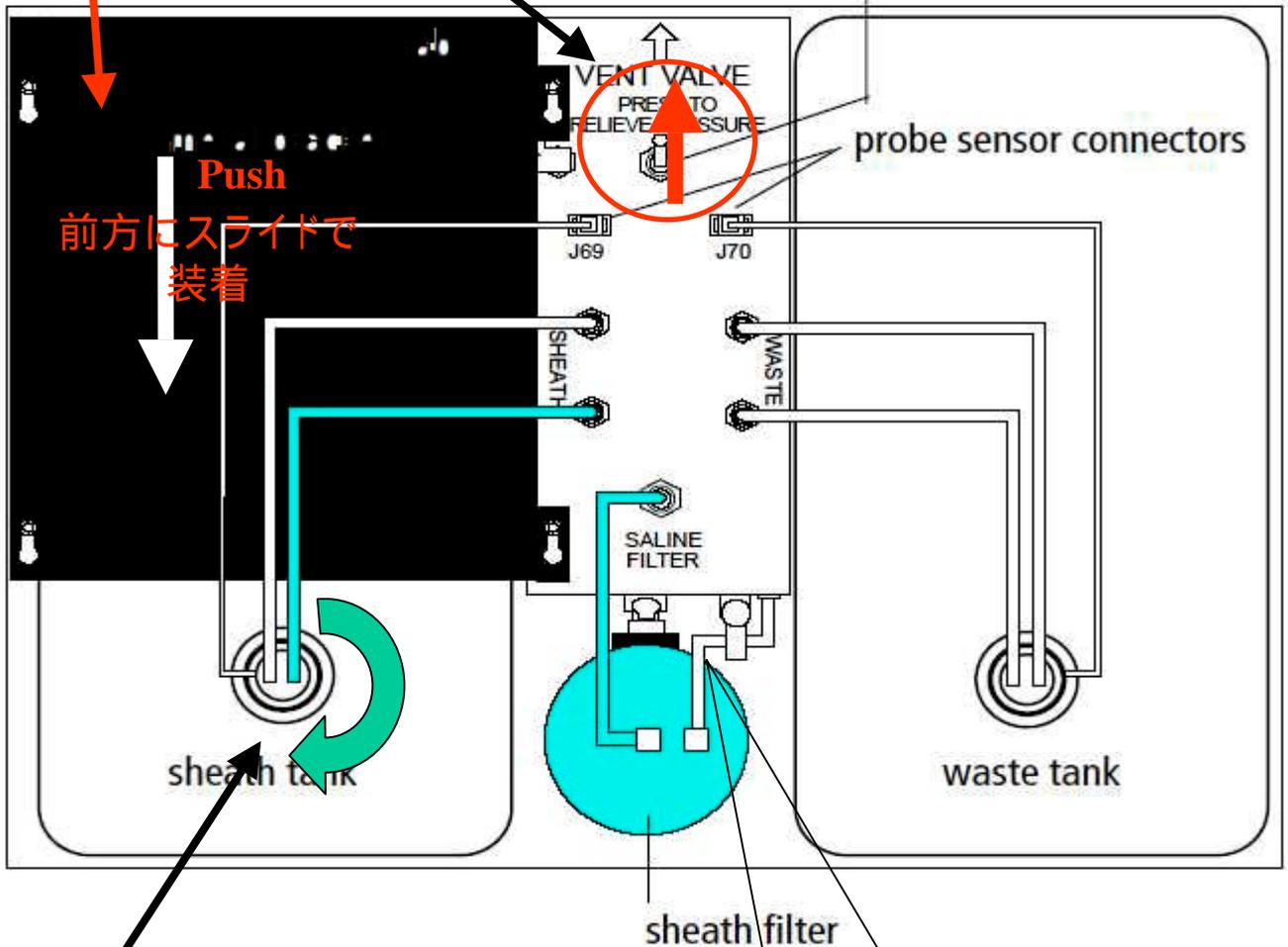
Run側(奥)に倒す。

指で押して硬くなっているか確認

リーク音がないか確認

シース

valve toggle switch



3. キャップがしっかり閉まっているか確認

4. シースLINEに気泡がないことを確認。

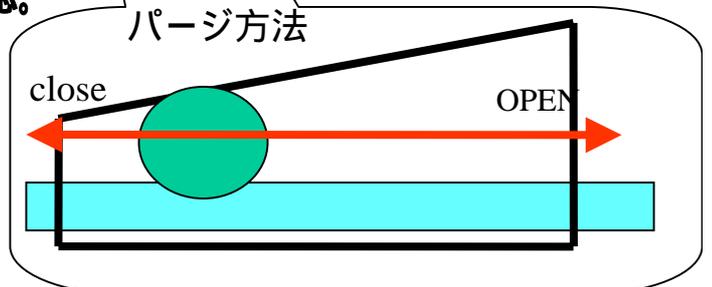
シースフィルター上部に気泡がある場合、パーズする

パーズ後、必ずCloseにする。

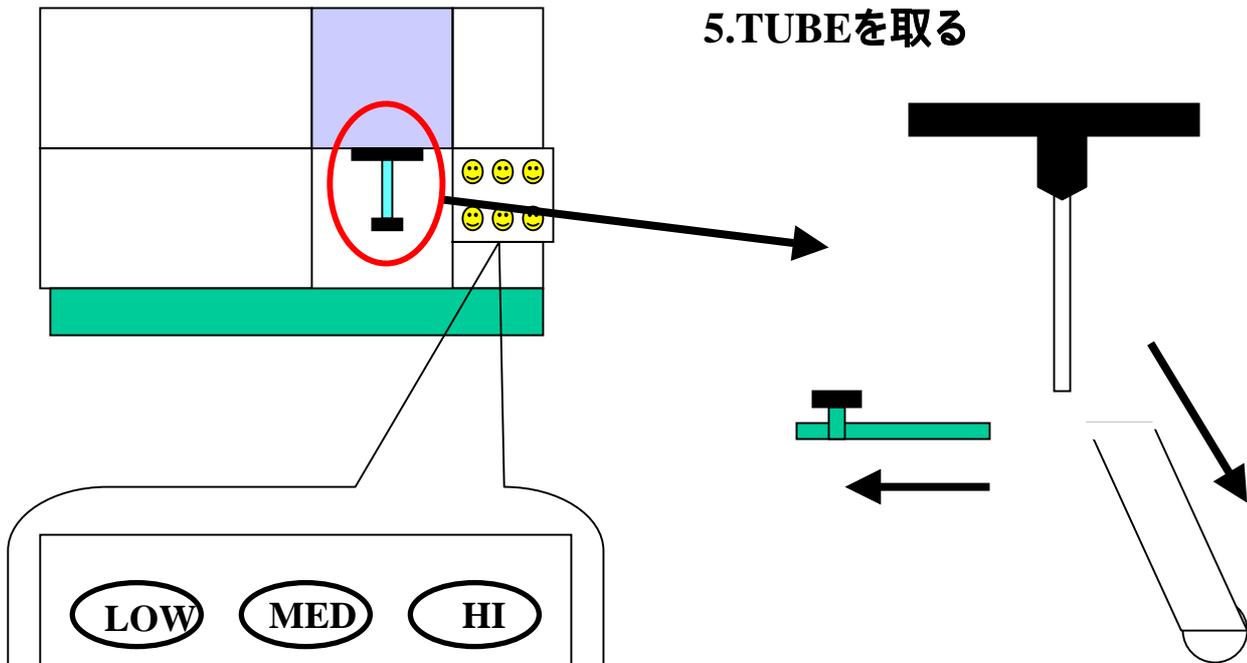
パーズ方法

close

OPEN



5.TUBEを取る



LOW MED HI
RUN STANDBY PRIME

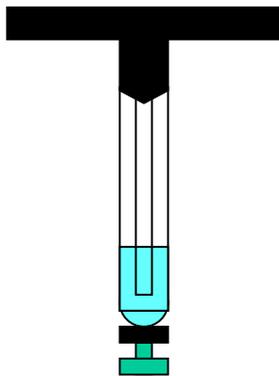
6-1.Primeを押す

6-2.Standby点灯後、再度Prime

6-3.Standby点灯後、再度Prime

計3回Primeする

7.Standby点灯後蒸留水1mlのTUBEを付け、
チューブサポートアームを中央にする。



レーザーの安定には、
30分以上のWarmUpが必要です。

10分以上放置する場合は、圧カスイッチをOFFにする

8.CellQuest起動し、STATASがStandbyになるまで待つ。

.Mac cellQuest起動

USBメモリーによっては、SOFTが起動できない事がありますので、USBメモリーを装着しないでください



コマンド+Bを押す。 コンピューターとcaliburの接続

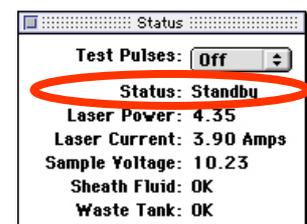


+1を押す。 Detectors/Ampsの表示

+2を押す。 Thresholdの表示

+3を押す。 Compensationの表示

+4を押す。 Statsの表示



装置の準備完了

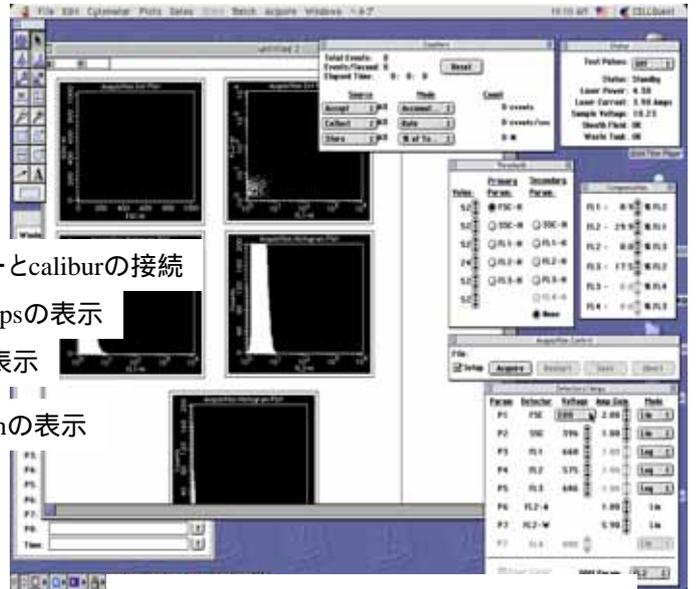
CellQuestの操作に関して、

USBメモリーによっては、SOFTが起動できない事がありますので、USBメモリーを装着しないでください



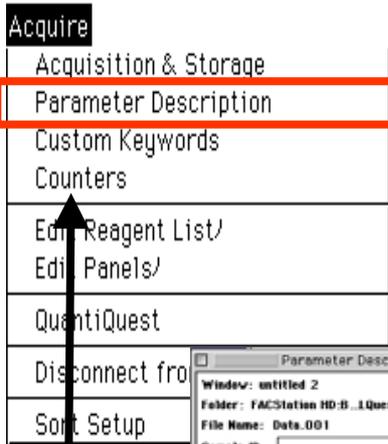
Mac cellQuest起動

- コマンド+Bを押す。 コンピューターとcaliburの接続
- ⌘+1を押す。 Detectors/Ampsの表示
- +2を押す。 Thresholdの表示
- +3を押す。 Compensationの表示
- +4を押す。 Statsの表示



シートが見えるように整理整頓する。

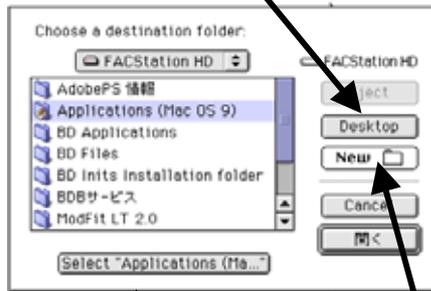
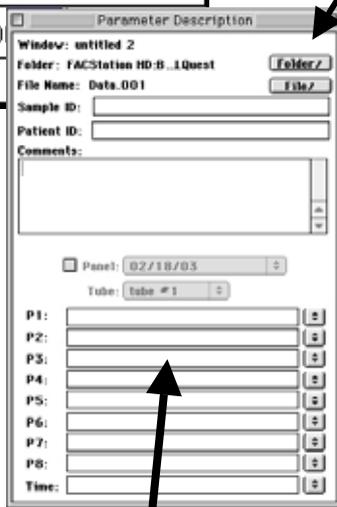
1.dataFolderの作成



1-1.選択

1-2.Folderを押す

1-3.DeskTopを押す



USB・MOに直接書き込み禁止
終了時に、COPYしてください

COPY保存時、USB・WindowsMOは、
dataが、壊れることがあります。

WIN-MAC両方での使用は、ご遠慮だ
さい。Fileの関連付けがなくなります。
(MAC書式・関連付けSOFTを使用すると、使用できます)

FACS専用ですれば、Fileは、壊れにく
いです。

1-4.Newを押す

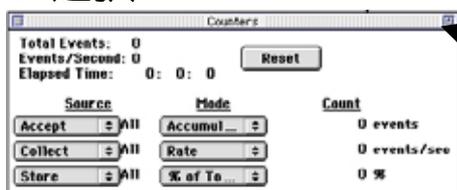


1-5.名前年月日を入力しCreateを押す

1-6.Selectを押す

1-7.Parameter Descriptionを閉じる。

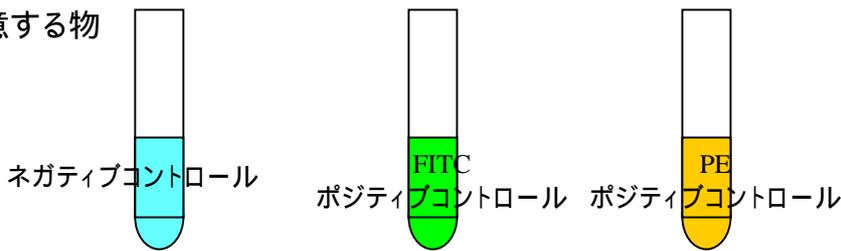
2.Counter選択



クリックすると全表示

表面抗原の場合 2カラー測定に関して

用意する物



抗体の非特異反応が多い場合 IsoType コントロール 使用すること
 ポジコンは、タイトレーションを確認した抗体を使用してください
 染まりがわからない場合、必ず蛍光顕微鏡で確認すること
 一度は、蛍光顕微鏡で、観察してください、染めた浮遊細胞を、
 スライドグラスに落とし、カバーグラスをすれば、すぐ見れます。
 撮影したい場合は、グリセロールなどの粘度の高いものを混ぜると、
 撮影しやすいです。



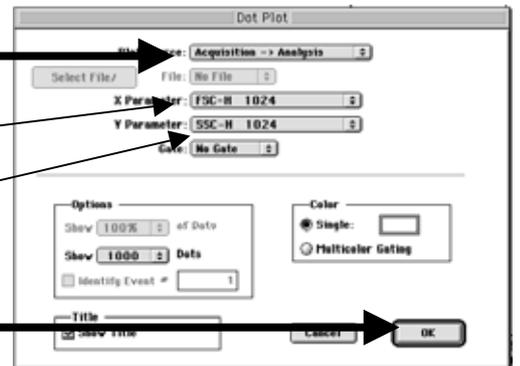
を押す (DotPlot)
 シートに任意の大きさにドラックする。
 (約5cm X 5cm)

Acquisit**->Analysis選択

FSC-H選択

SSC-H選択

Okを押す

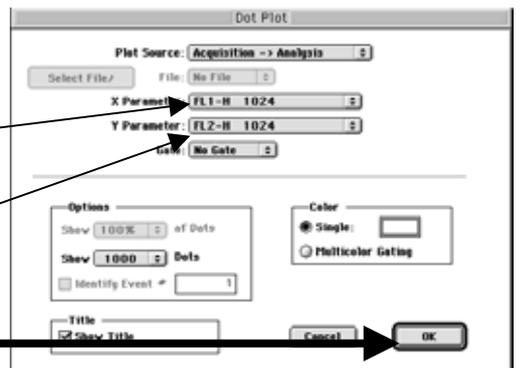


を押す (DotPlot)
 シートに任意の大きさにドラックする。
 (約5cm X 5cm)

FL1-H選択

FL2-H選択

Okを押す

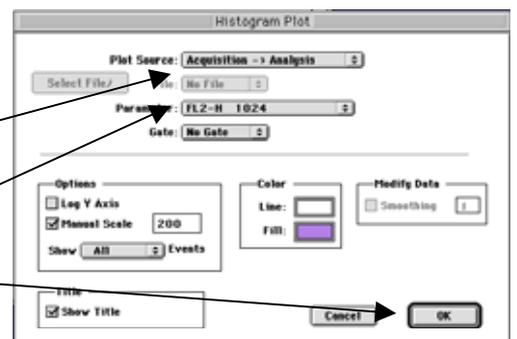


を押す
 シートに任意の大きさにドラックする。
 (約5cm X 5cm)

Acquisit**->Analysis選択

FL1-H選択

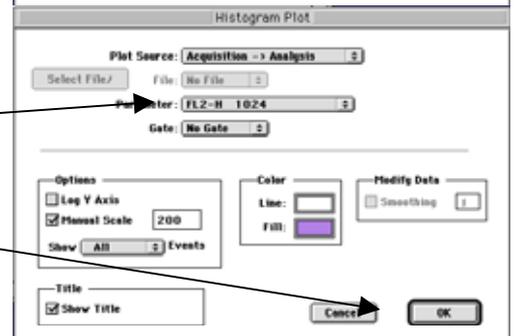
Okを押す



を押す
 シートに任意の大きさにドラックする。
 (約5cm X 5cm)

FL2H選択

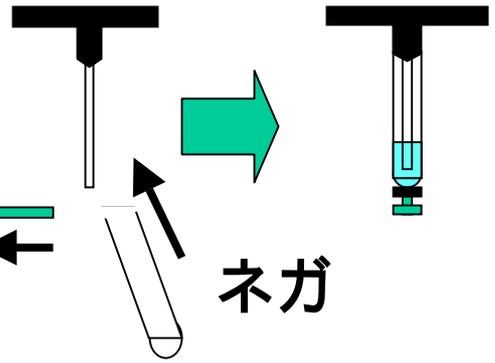
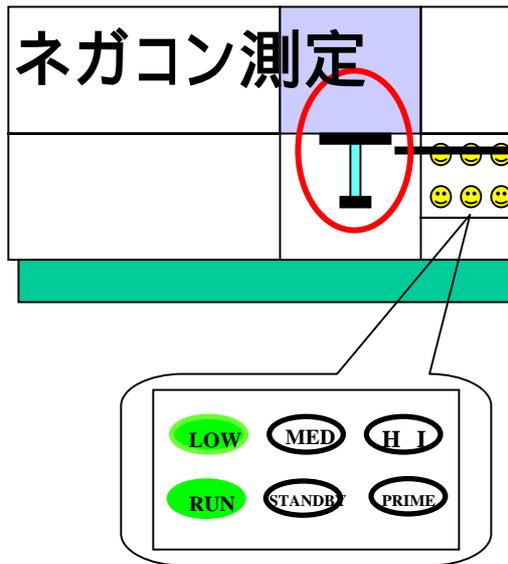
Okを押す



1.ステータスがSTANDBYになっている事を確認

2.Detectors/Ampsの調整法

注意: サンプル装着後、速やかに、サポートアームを中央にしてください。
中央以外の位置では、吸引されてますので、サンプルを失います



Mode	Rate
LO	12uL/min
MED	35uL/min
HI	60uL/min

3.Run・Lowを押す。

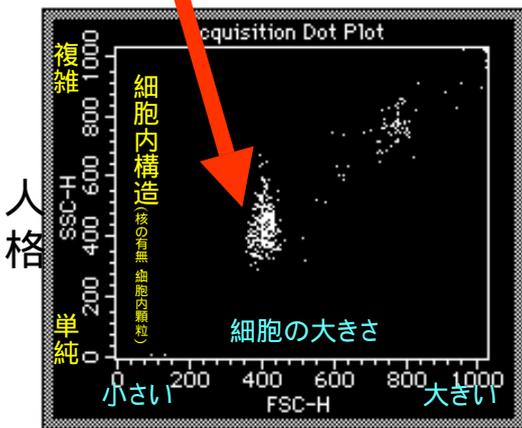
(サンプル数が少ない場合HIに)



4.Acquireを押し、調整を行う



5.FSC/SSCのdotで、目的サンプルが、表示されるように



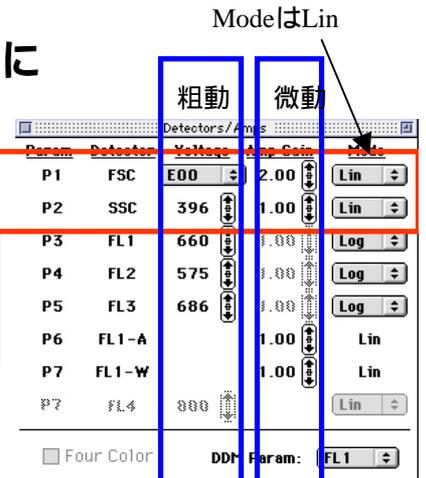
外見

6.調整

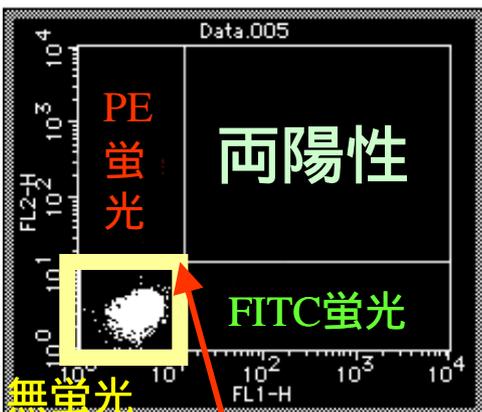
E-1	大きいセル	20 ~ 35
E00	標準(リンパ球)	4 ~ 20
E01	小さいセル	
E02		

リンパ球設定です。
(微調整する) CaliburE0427のみ

FSC	E00	2.00	Lin
SSC	400	1.00	Lin
FL1	650		Log
FL2	550		Log



Voltageは、300 ~ 800が正常値です。
800以上は、注意しながら操作してください。

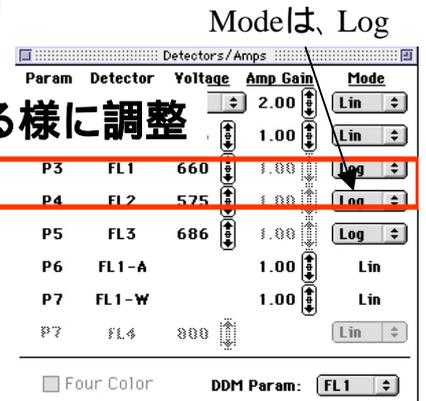


7.FL1/FL2で、黄色内にくる様に調整

10¹以下に

7.調整

FL1	515 ~ 545nm	FITC/GFP
FL2	564 ~ 606nm	PE/PI
FL3	650nm以上	PerCP/PC5/PI/7AAD



Voltageは、300 ~ 800が正常値です。
800以上は、注意しながら操作してください。



を押し、10¹をクリック

FL1/FL2dotPlotのみ デブリが多い場合は、Thresholdを、上げる

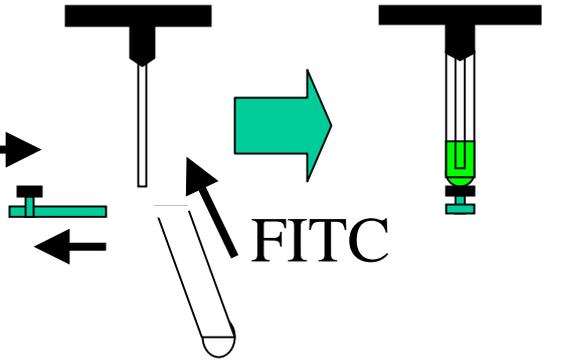
FITCポジコン測定

1. サンプルをセットする

Mode	Rate
LO	12uL/min
MED	35uL/min
HI	60uL/min

Control Panel:

LOW MED HI
RUN STANDBY PRIME



Acquisition Control

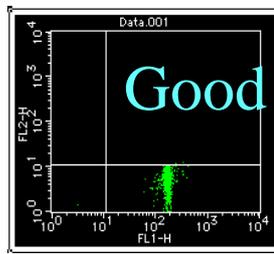
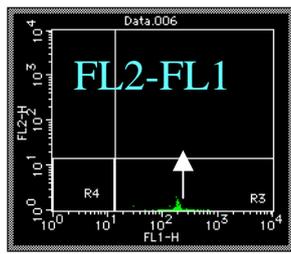
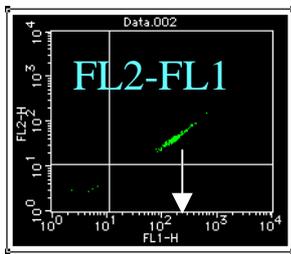
File: Setup

2. Run・Lowを押す。

(サンプル数が少ない場合HIに)

3. Acquireを押す

Pause Abort **Acquire** させて、dataを更新



調整

Compensation

FL1	-	0.9	%	FL2
FL2	-	29.9	%	FL1
FL2	-	0.0	%	FL3
FL3	-	17.5	%	FL2
FL3	-	0.0	%	FL4
FL4	-	0.0	%	FL3

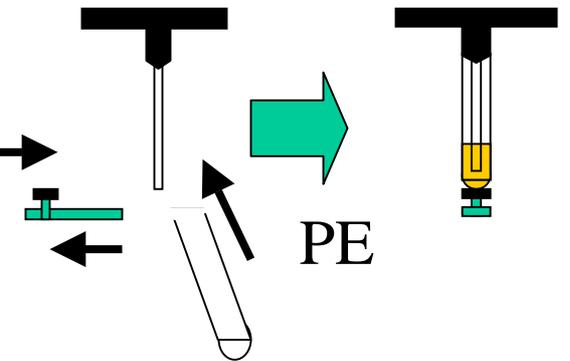
PEポジコン測定

1. サンプルをセットする

Mode	Rate
LO	12uL/min
MED	35uL/min
HI	60uL/min

Control Panel:

LOW MED HI
RUN STANDBY PRIME



Acquisition Control

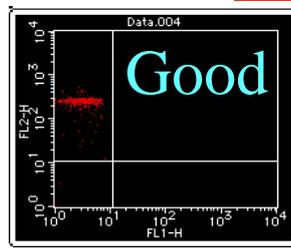
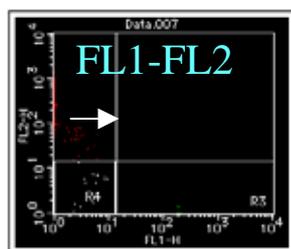
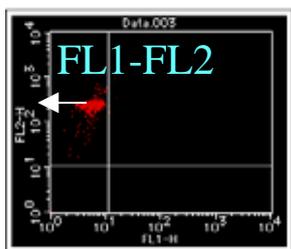
File: Setup

2. Run・Lowを押す。

(サンプル数が少ない場合HIに)

3. Acquireを押す

Pause Abort **Acquire** させて、dataを更新



調整

Compensation

FL1	-	0.9	%	FL2
FL2	-	29.9	%	FL1
FL2	-	0.0	%	FL3
FL3	-	17.5	%	FL2
FL3	-	0.0	%	FL4
FL4	-	0.0	%	FL3

設定がOKでしたら、data取り込みします。

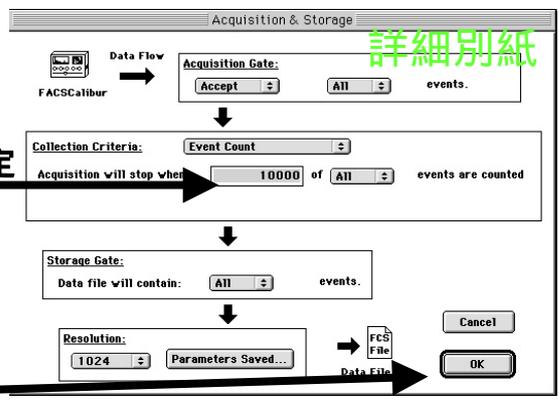
Acquire	
Acquisition & Storage	
Parameter Description	
Custom Keywords	
Counters	
Edit Reagent List/ Edit Panels/	
QuantiQuest	
Disconnect from Cytometer	⌘B
Sort Setup	

1. 選択

2. 取り込み細胞数の設定

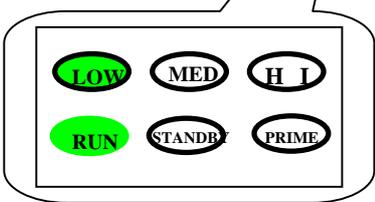
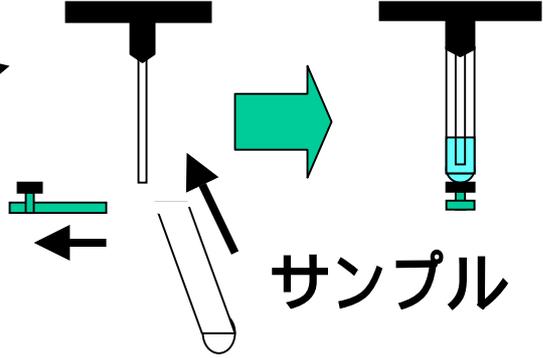
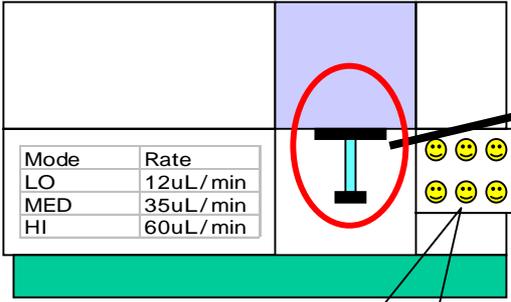
通常10,000個

3. OKを押す



4. サンプルをセットする

注意: サンプル装着後、速やかに、サポートアームを中央にしてください。中央以外の位置では、吸引されてますので、サンプルを失います



ネガコン・ポジコンもdata保存したほうが良い

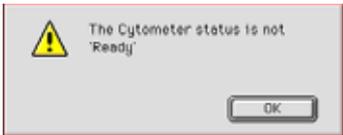
5. Run・Lowを押す。(サンプル数が少ない場合HIに)

6. チェックを外す



7. Acquireを押すと、dataを取り込みます。

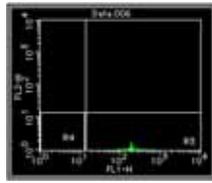
10,000個data保存すると、勝手に止まります。



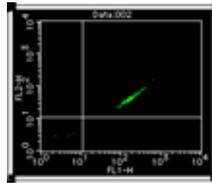
測定中にメッセージが出た場合

使用中での注意を参考にしてください

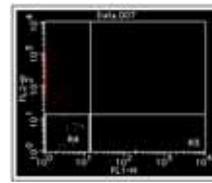
解析方法ただ今作成中



アクティブ



選択



未選択



FCS2.0形式data

Data.005



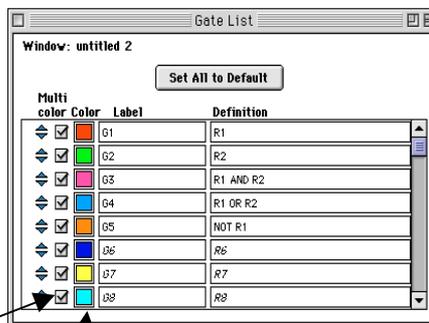
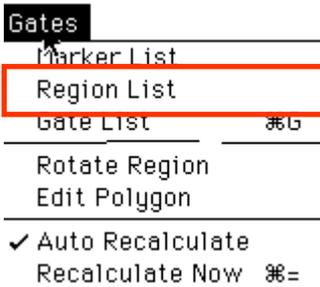
untitled

雛形 (Plot・ゲート情報) です、dataは、入ってません。

雛形が無い場合は、Cell Quest起動後、File---Newで、新しく作成する

Gate List (ロジカルゲートの編集)

何種類かのリージョンをAND、OR、NOTを使用した論理式により組み合わせたものを、ロジカルゲートと呼びます。ロジカルゲートの編集は、**Gates**メニューの**Gate List**において行います



Definitionの部分でリージョンを編集します。

AND: 組み合わせたリージョンのいずれもの条件をみたくゲート。

・R1 AND R2 または、R1 * R2

OR: 組み合わせたリージョンのどちらか一方でも条件をみたくゲート。

・R1 OR R2 または、R1 + R2

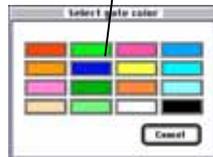
NOT: 設定されたリージョンに含まれるイベント以外を指定するゲート。

・NOT R1 または、- R1

その他: R1 OR R2 OR NOT R3 AND R4 の場合は、NOT、AND、ORの順に処理されます。

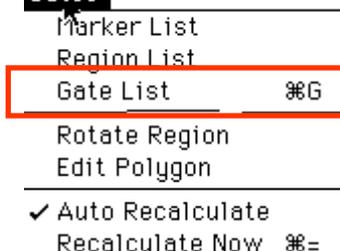
AND、OR、NOTの記号の間には必ず半角スペースを入れます。書式が認識されると、Definitionの表示がイタリック体から標準の書式に変わります。

チェックを外すことでドットプロット上のカラー指定が解除されます(マルチカラー指定時)。



任意のカラーを選択することも可能です。

Gates



不要なゲートは、Gate Listより削除する。

Gateの回転は、Rotate Regionまたは、commandを押す

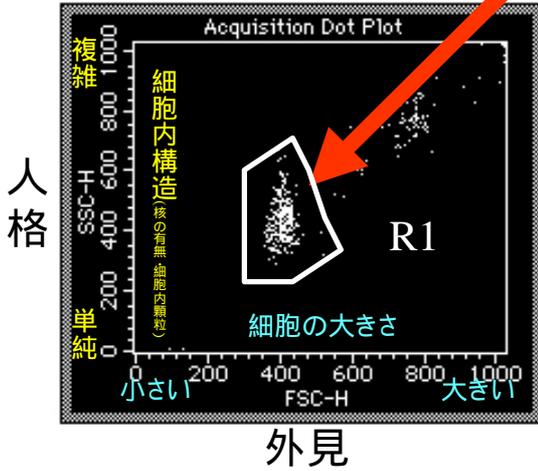
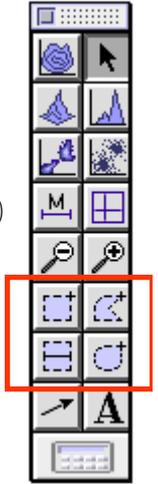
Overlay/stats/

表面抗原解析方法(基本形)

1. 目的細胞をゲートする。

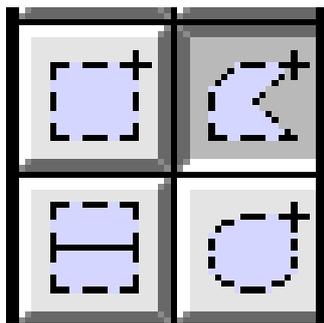
ゲートをすることにより、目的の細胞のみの蛍光分布を正確に解析できます。(特に汚いサンプル)

注意: 全の蛍光分布を見ると、非特異・自家蛍光などにより、綺麗な蛍光分布にはなりません。



ゲートをするコツ!!

- ・細胞のサイズ・形態を把握して判断する。
- ・純化された細胞 (Control) を測定しGateを決める。
- ・蛍光抗体などで、標識してる場合は、蛍光部位をゲートし、バックゲートを行う。



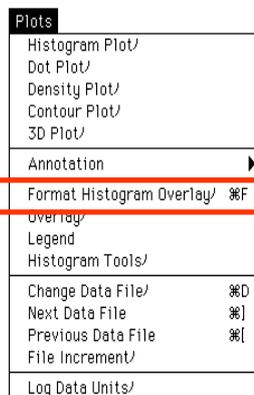
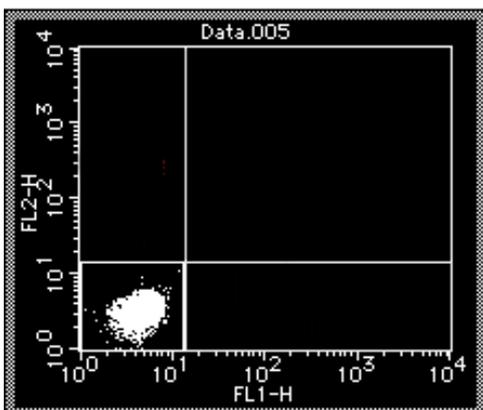
1.Rectangular-Region tool(四角形リージョンの作成): ツールを選択後、ドットプロット、デンシティプロット、コンタープロット内でドラッグしてリージョンのサイズを設定する。

2.Polygonal-Region tool(多角形リージョンの作成): ツールを選択後、ドットプロット、デンシティプロット、コンタープロット内でクリック-移動-クリックを繰り返し、リージョンを作成する。

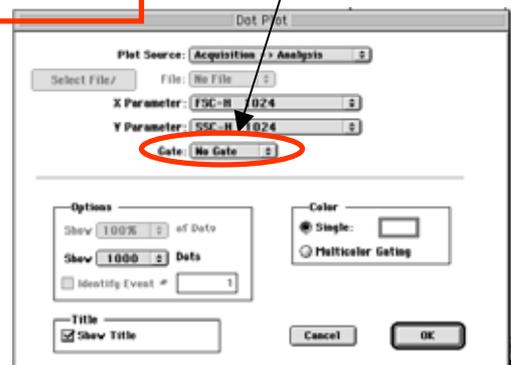
3.Histogram-Region tool(ヒストグラムリージョンの作成): ツールを選択後、ヒストグラムプロット内をドラッグしてリージョン位置を設定する。

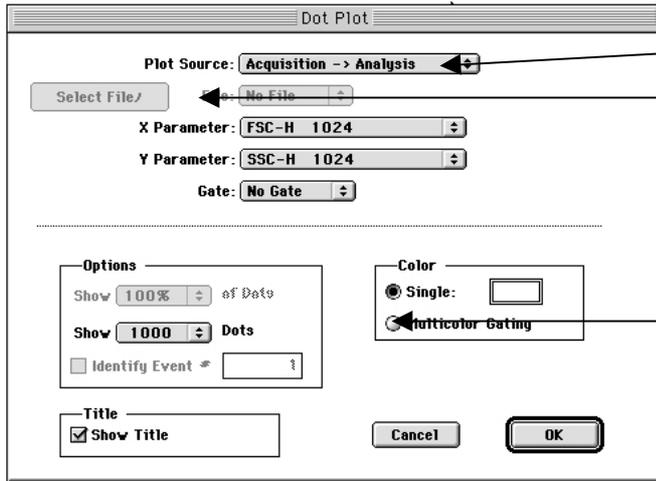
4.Elliptical-Region tool(楕円形リージョンの作成): ツールを選択後、ドットプロット、デンシティプロット、コンタープロット内でドラッグしてリージョンのサイズを設定する。

Gate設定を行いたい、表をアクティブにして、Plotより、Formatを選ぶ。



Gateの選択

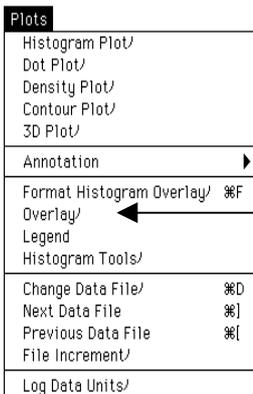




解析のみ時は、Analysis

Selectで、dataを指定する

マルチカラー表示時



Overlay--ヒストグラムの重ね合わせ

Stats

Histogram Stats

Histogram解析

ヒストグラム時使用

K-S Stats/

K-S統計解析

重ね合わせヒストグラム時使用

Region Stats

Region解析

Gate Stats

Gate解析

ドットplot時使用

Quadrant Stats

4分割解析

Edit/

解析結果の表示方法選択

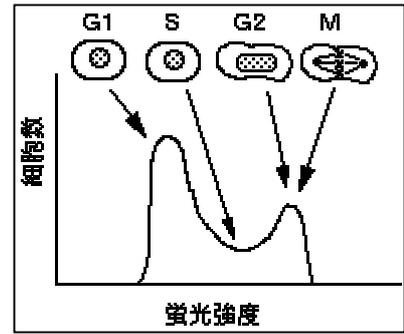
DNA・CellCycle時のPlot (PI染色時)

7AADでの測定はFL2をFL3に変更する
PIでも、FL3で、測定する事もあります

Param	Detector	Voltage	Ampl Gain	Mod
P1	FSC	EOB	2.00	Lin
P2	SSC	396	1.00	Lin
P3	FL1	660	1.00	Lin
P4	FL2	575	1.00	Lin
P5	FL3	606	1.00	Lin
P6	FL2-A		1.00	Lin
P7	FL2-W		5.90	Lin
P7	FL4	800		Lin

1. 全てLinにする。

2. FL2を選択

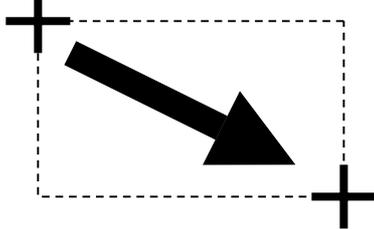


3. Plotの作成



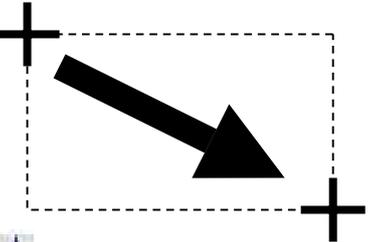
を押す (DotPlot)

シートに任意の大きさにドラックする。



を押す (DotPlot)

シートに任意の大きさにドラックする。

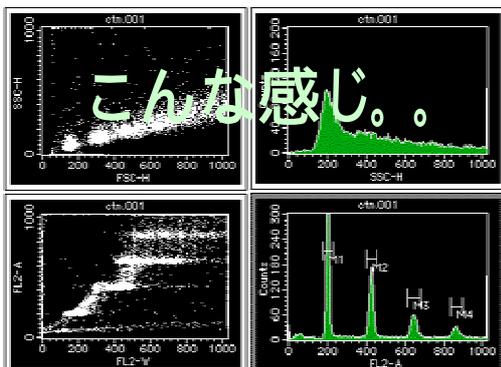


を押す

シートに任意の大きさにドラックする。 Acquisit**->Analysis選択

を押す

シートに任意の大きさにドラックする。

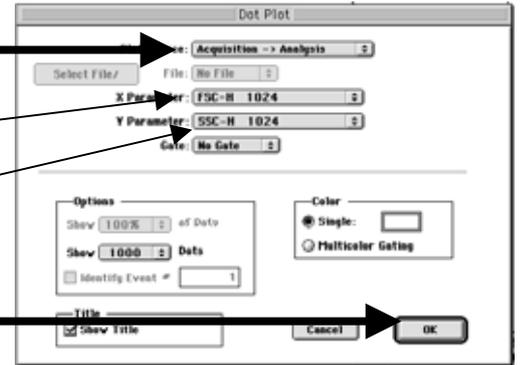


Acquisit**->Analysis選択

FSC-H選択

SSC-H選択

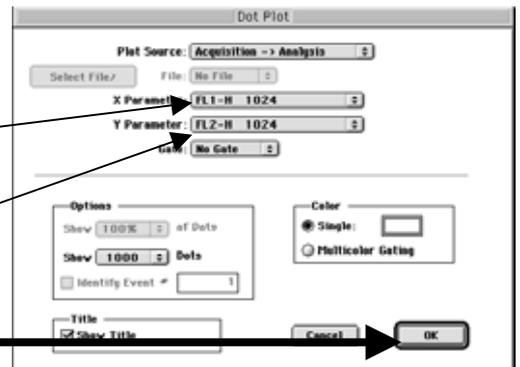
Okを押す



FL2-W選択

FL2-A選択

Okを押す



シートに任意の大きさにドラックする。 Acquisit**->Analysis選択

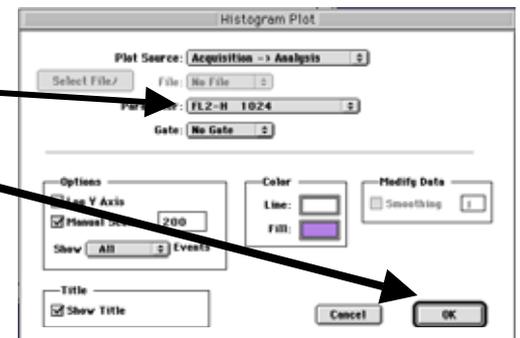
SSC-H選択

Okを押す



FL2A選択

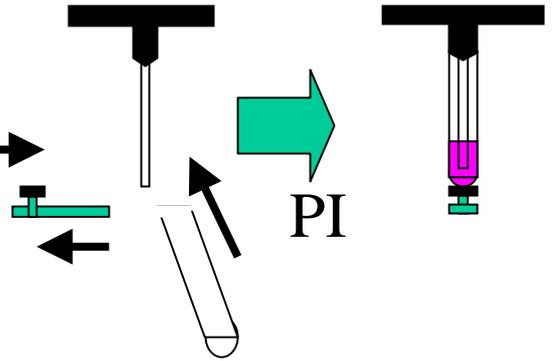
Okを押す



標準Cell cycle測定

1. サンプルをセットする

Mode	Rate
LO	12uL/min
MED	35uL/min
HI	60uL/min



2. Run・Lowを押す。
必ずLOWで測定
MAX400cells/sec

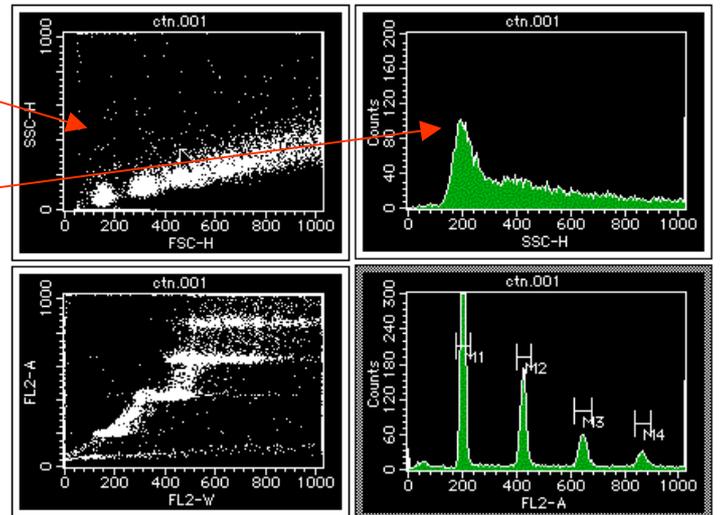
3. Acquireを押す

Acquisition Control

File: Setup

させて、dataを更新

Cellが全体表示されるよう調整
SSCのピークを200にする。



Detectors / Amps

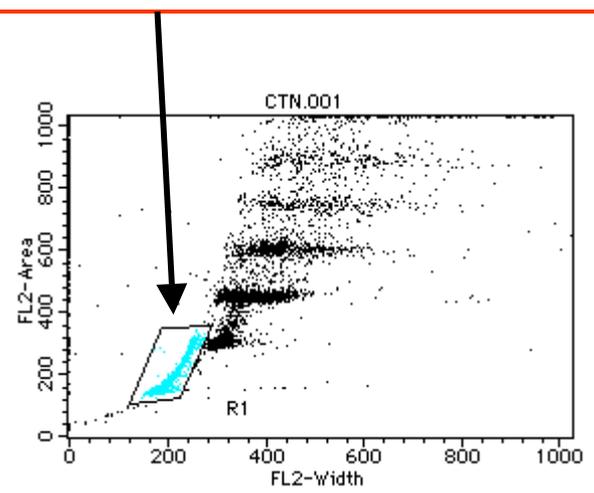
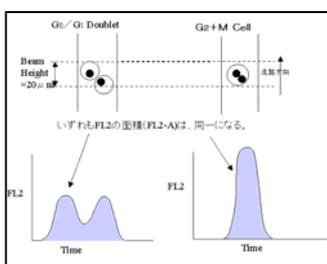
Param	Detector	Voltage	Amp Gain	Mode
P1	FSC	E00	2.00	Lin
P2	SSC	396	1.00	Lin
P3	FL1	660	1.00	Lin
P4	FL2	575	1.00	Lin
P5	FL3	686	1.00	Lin
P6	FL2-A		1.00	Lin
P7	FL2-W		5.90	Lin
P7	FL4	800		Lin

Four Color DDM Param: FL2

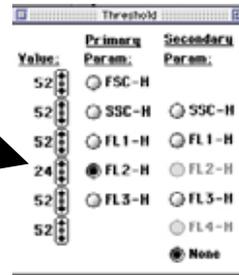
FL2を調整、

FL2-Aに、G0/G1ピークを200に

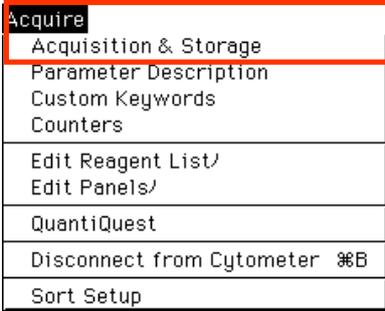
A-Wをsingleが判断出来る様に調整



Thresholdを、FL2を24にする。



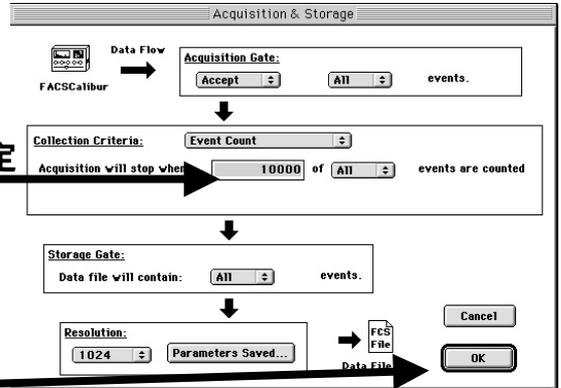
設定がOKでしたら、data取り込みします。



1.選択

2.取り込み細胞数の設定

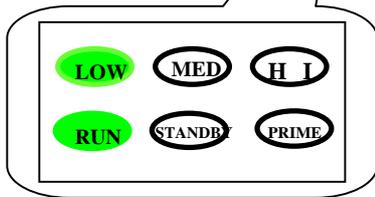
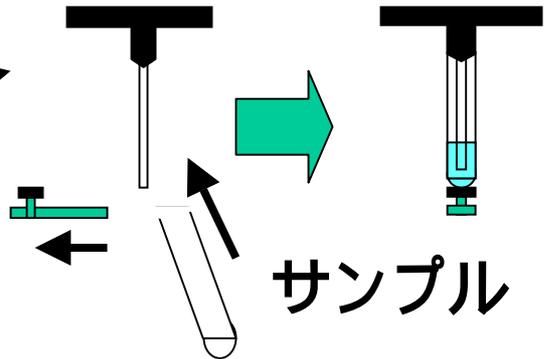
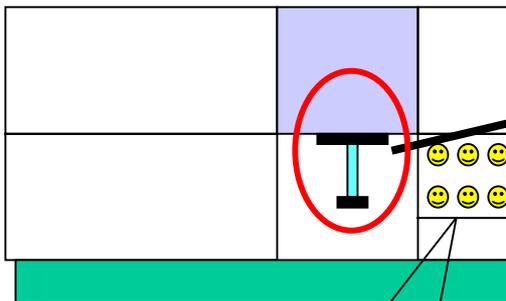
通常20,000個



3.OKを押す

4.サンプルをセットする

注意: サンプル装着後、速やかに、サポートアームを中央にしてください。中央以外の位置では、吸引されてますので、サンプルを失います



ネガコン・ポジコンもdata保存したほうが良い

5.Run・Lowを押す。(サンプル数が少ない場合HIに

6.チェックをとる

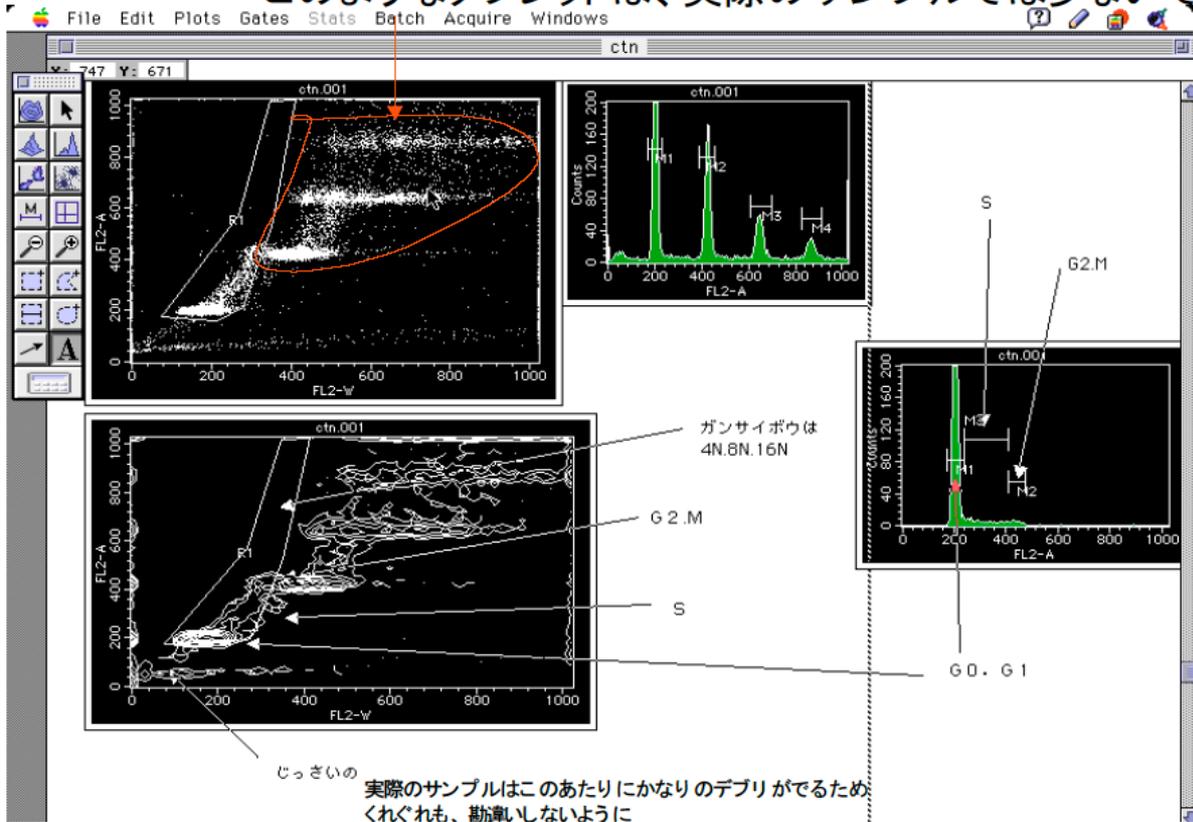


7.Acquireを押すと、dataを取り込みます。

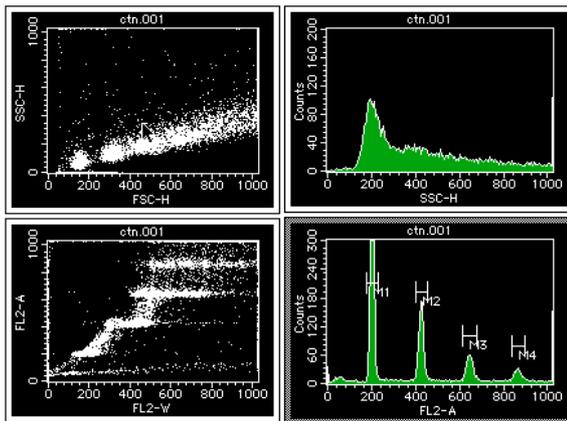
20,000個data保存すると、勝手に止まります。

解析方法は、色々あるため、解説できません、
試薬説明、参考文献より判断してください

このようなダブレットは、実際のサンプルでは少ないです



解析は、FL2A/Wでのゲート内のみを解析します



Histogram Statistics

File: ctn.001
Sample ID:
Patient Name:
Acquisition Date: 4-Mar-98
Gated Events: 0
X Parameter: FL2-A (Linear)

Log Data Units: Linear Values
Patient ID:
Case Number:
Gate: No Gate
Total Events: 20000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	0, 1023	20000	***	***	456.97	358.29	68.13	407.00	1023
M1	178, 231	8701	***	***	201.96	201.85	3.35	202.00	202
M2	404, 453	3463	***	***	423.39	423.28	2.19	423.00	421
M3	613, 680	1653	***	***	642.06	641.91	2.16	641.00	644
M4	839, 900	867	***	***	863.53	863.41	1.69	862.00	863

精度管理

装置が、正常かどうか、解らない場合、
初心者の方は、実行してください。

用意する物

BD社
カタログNo.340486
BD Calibrite 3



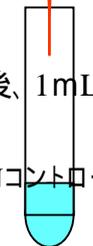
バイアルは、転倒混和させてから使用してください。
ボルテックス禁止(ビーズが壊れます。) <希釈後はOK>

試薬に、TAgelValueはが、同時時には、共同実験室までお知らせください。



1滴滴下後、1mLシース

UNコントロール



各1滴

各1敵滴下後、3mLシース

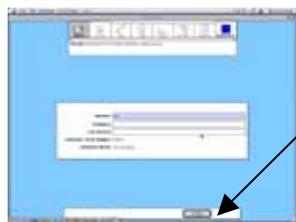
MIXコントロール



全てのsoftを、終了させる、ハングリます。



1.FACSCOMP実行



2.Runを押す

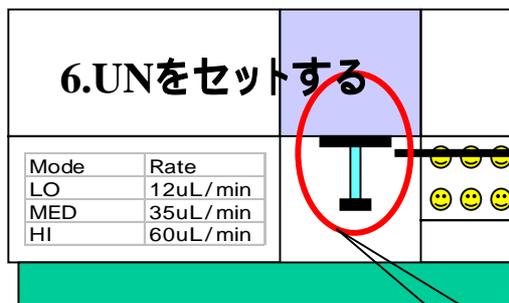


4.試薬添付のLotIDを入力

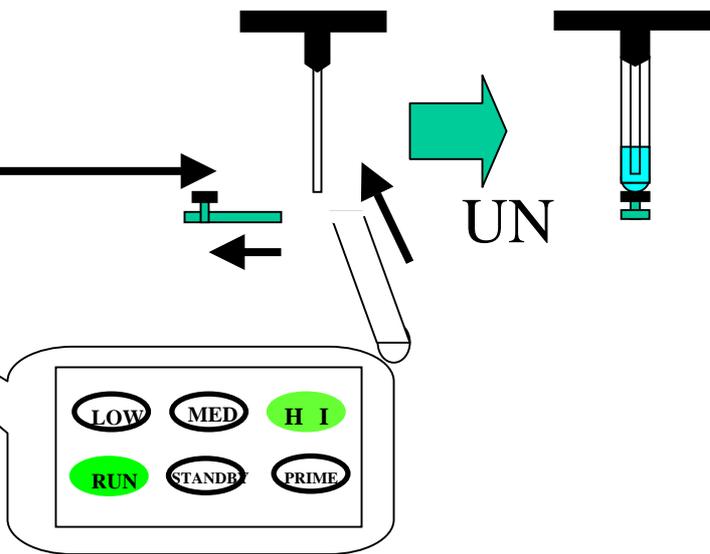
IDを間違えると結果がFailになります。

3.Lyse/Washを選択

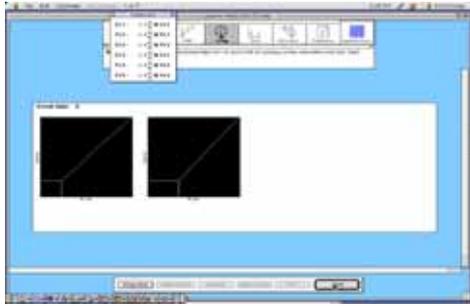
5.Runを押す



7.Run・HIを押す。
必ずHIで測定

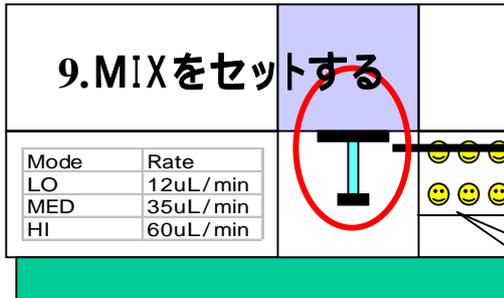


8.Startを押す。



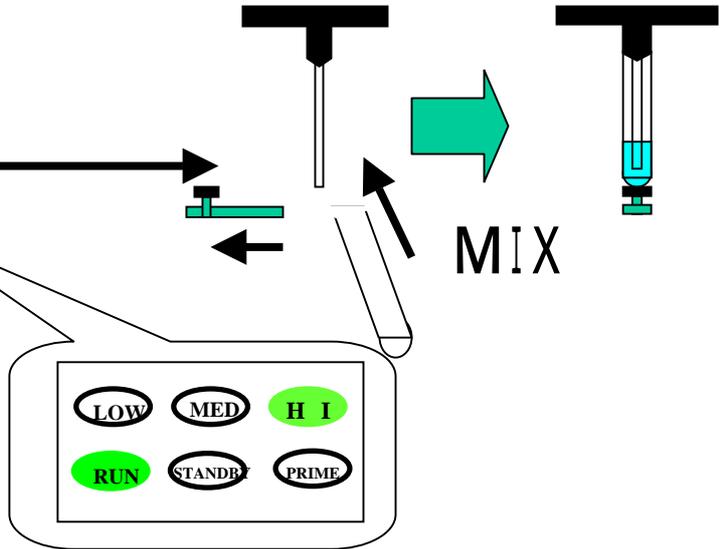
ビーズRateが400無いと、エラーメッセージを出します。

左画面が、表示されたら、次

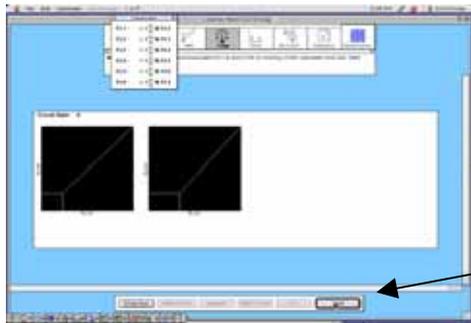


9.MIXをセットする

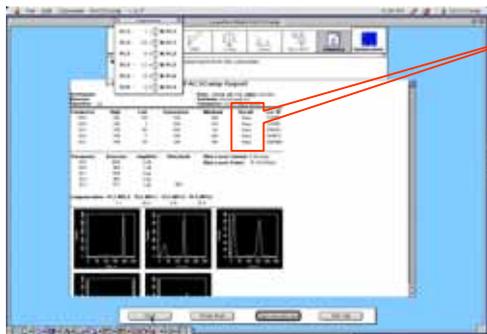
Mode	Rate
LO	12uL/min
MED	35uL/min
HI	60uL/min



10.Run・HIを押す。
必ずHIで測定



11.Startを押す



全てPASSしないと、装置に異常がある可能性があります。

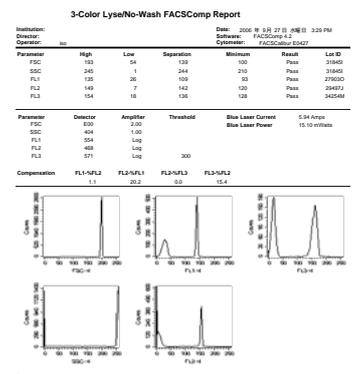
PASSしない原因

- ビーズ有効期限
 - ビーズロットID入力ミス
 - 圧力不良 → Lineに気泡がないか確認
 - シースにコンタミがある → シースを全て廃棄し、新しいシースを補充する。必要に応じてフィルター交換
- その他は、故障の可能性がありますので、結果を持って、共同実験室まで

12.Quitする 2部、自動に印刷されます。

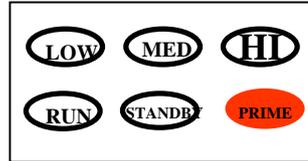
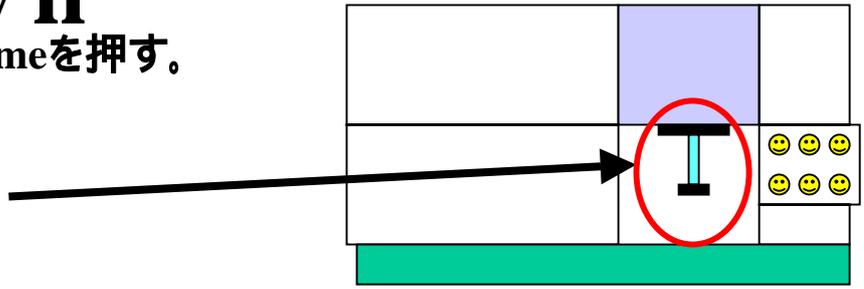
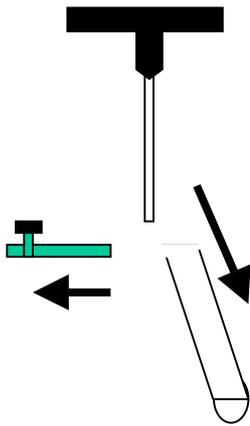
DNA QCに関しては、したのURLに、説明があります。

<http://www6.tok2.com/home/yukiso/kyo3/facs/dna/cyc.htm>

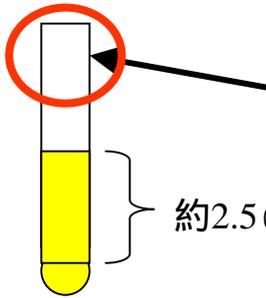


Shutdown

1. チューブを外し、Primeを押す。



2. 希釈液ハイター (10%) を2.5ml(約2.5cm) を用意



傷・クラックがある場合、使用禁

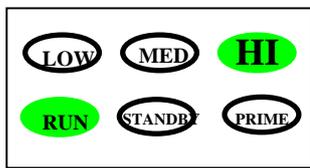
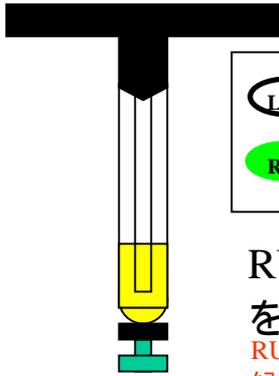
(新しいチューブを用意してください)

約2.5cmで、半分の位置です。(沢山入れると壊れます。)

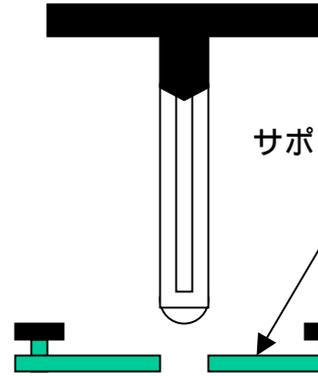
2-1ハイター洗浄

10分

約1分



RUN--HIのボタン
を押す
RUNボタンが、
緑色になっていることを確認

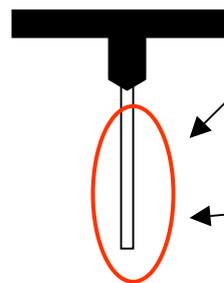
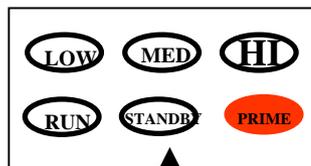
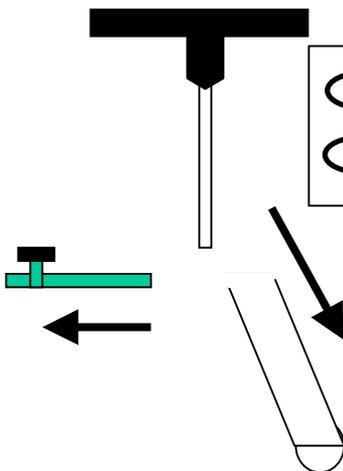


サポートアームをサイドにする

全量を吸引させる

3. チューブを取り外し、Primeを押す。

3-1 サンプルインジェクションチューブを、



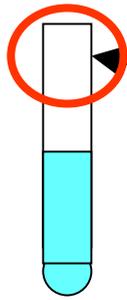
アルコールで拭く

ワイプで拭く

アルコール・ワイプ無い時、省略

Standbyが点灯したら次へ

4.蒸留水を2.5ml(約2.5cm)を用意

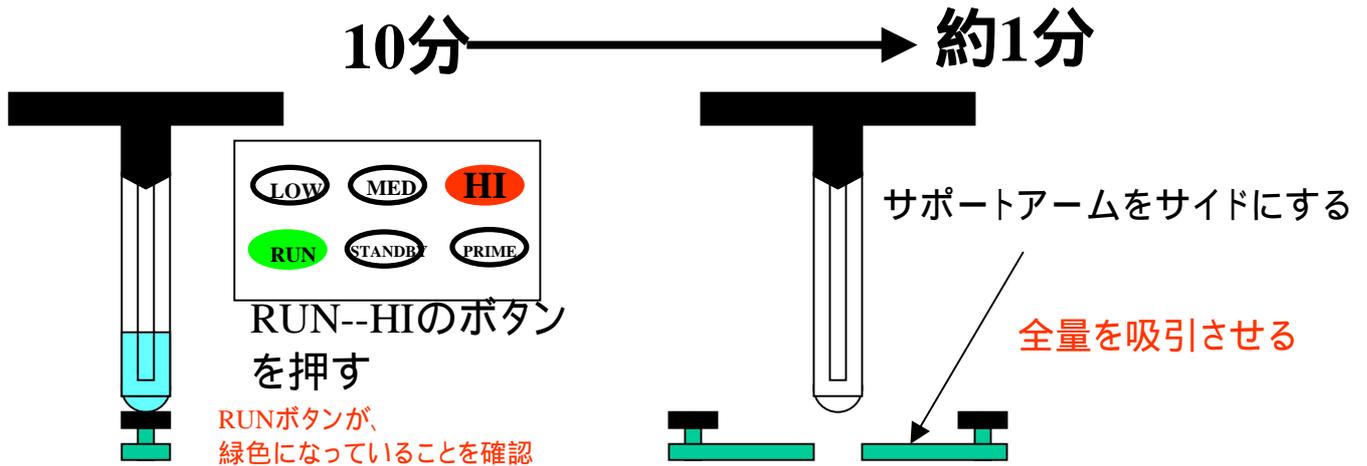


傷・クラックがある場合、使用禁

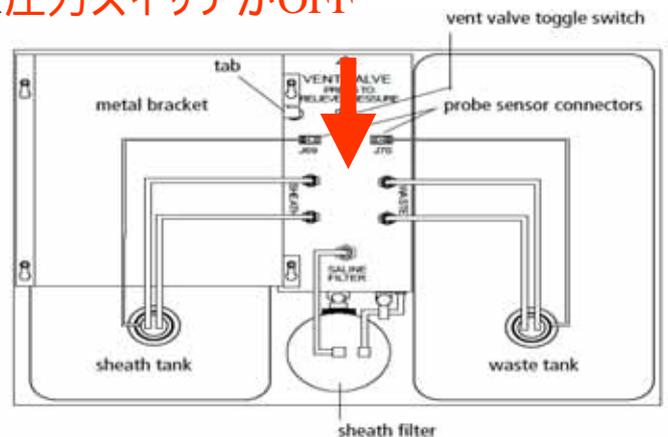
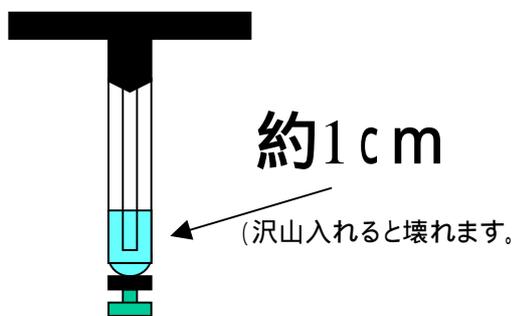
新しいチューブを用意してください

約2.5cmで、半分の位置です。(沢山入れると壊れます。)

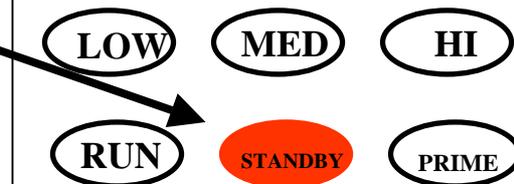
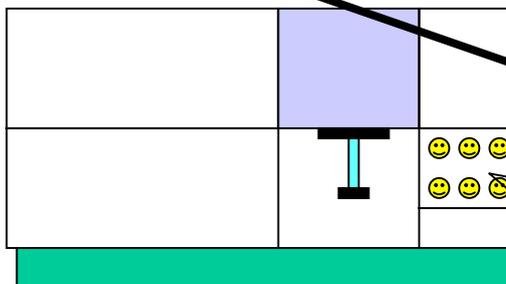
4-1.蒸留水洗浄



5. 蒸留水1ml(約1cm)をセットする 5-1圧カスイッチがOFF



6.STANDBYを押す



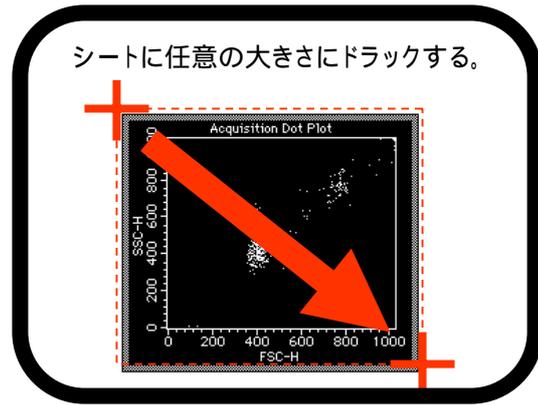
7.廃液を規制に従い処理する。・シース液の補充

8.Stand Byにして10分以上放置後、電源を切る。

ただ今作成中

便利な機能1

Plotは、最初に、



シートに任意の大きさにドラックする。

Plots

Histogram Plot/
Dot Plot/
Density Plot/
Contour Plot/
3D Plot/

その後、Plotメニューから、
各プロット同一の大きさのPlotを作ることができます。
(最後に、ドラックして書いた大きさになります。)

Annotation

Format Histogram Overlay/ %F
Overlay/
Legend
Histogram Tools/

Change Data File/ %D
Next Data File %]
Previous Data File %[
File Increment/

Log Data Units/

Fig画像の取り込み方。

⌘ + shift + 3

画面全体が画像ファイルとして保存
されます。

⌘ + shift + 4

画面中の選択した領域が画像ファ
イルとして保存されます。(この組み
合わせでキーを押した後、画像ファ
イルにする領域をポインタでドラッ
グします。)

⌘ + shift + 4 + capslock

特定のウィンドウが画像ファイルと
して保存されます。(この組み合わ
せでキーを押した後、画像ファイル
にするウィンドウにポインタを重ね
てクリックします。)

取り込まれた画像は、HDの中にスクリーンとして保存されます。
File形式はPICTです。(拡張子.pctを、記述してください。)

機械の設定値の保存・呼び出しに関して

Cytometer	
Detectors/Amps	⌘1
Threshold	⌘2
Compensation	⌘3
Status	⌘4
Instrument Settings/	
Sort Counters	
Time-Delay Calibration	

Instrument Settings

Cytometer Type: BD LSR

Param	Detector	Voltage	AmplGain	FineGain	Laser
P1	FSC-H		1	Off	1
P2	SSC-H	630	4	Off	1
P3	FL1-H	640	Log	Off	1
P4	FL2-H	560	Log	Off	1
P5	FL4-H	590	Log	Off	2
P6	FL5-H	340	Log	Off	2
P7	FL2-H	630	Log	Off	1

Displaying: Current Status

Buttons: Print, Save, Open, Set, Done, Revert

設定値を印刷します。



設定値をFile保存します (必ず、年月日名前で保存してください)。

Instrument Settings

Save as: yymmdd-cd4.crl

Buttons: Print, Save, Open, Set, Done, Revert, Cancel, Save

設定Fileを呼び出します・呼び出しは、instrumentもしくは、dataファイルを選択しても、呼び出せます。

Instrument Settings

Cytometer Type: BD LSR

Param	Detector	Voltage	AmplGain	FineGain	Laser
P1	FSC-H		1	Off	1
P2	SSC-H	630	4	Off	1
P3	FL1-H	640	Log	Off	1
P4	FL2-H	560	Log	Off	1
P5	FL4-H	590	Log	Off	2
P6	FL5-H	340	Log	Off	2
P7	FL2-H	630	Log	Off	1

Displaying: Current Status

Buttons: Print, Save, Open, Set, Done, Revert



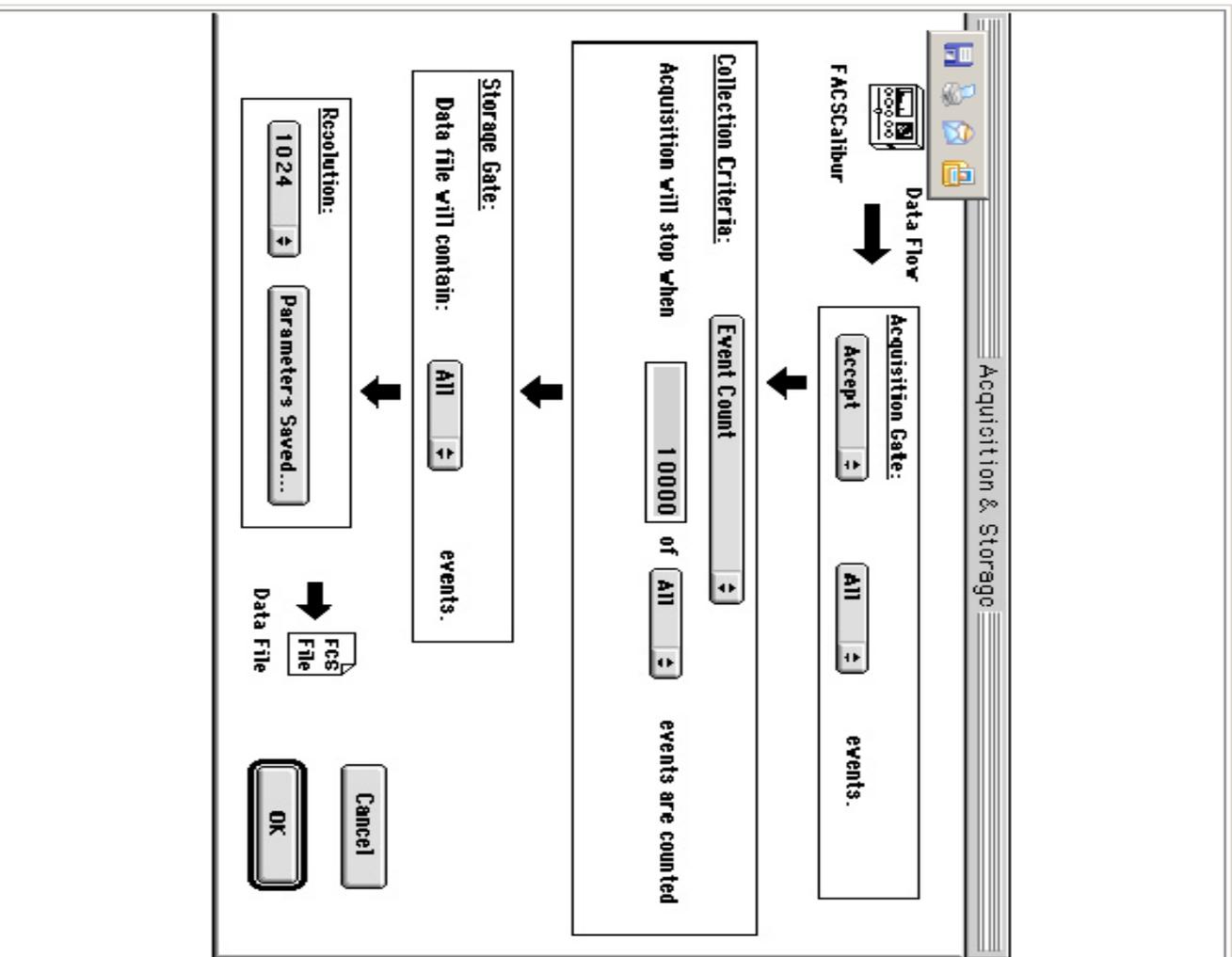
Instrument Settings

Data files: Data.001, Data.002, Data.003, Data.004

Buttons: Print, Save, Open, Set, Done, Revert, Cancel, Open

機械の設定値を反映させるには、Setを必ず押して、Doneをしてください。

<p>File</p> <table border="1"> <tr><td>New</td><td>⌘N</td></tr> <tr><td>Open</td><td>⌘O</td></tr> <tr><td>Close</td><td>⌘W</td></tr> <tr><td>Save</td><td>⌘S</td></tr> <tr><td>Save As</td><td></td></tr> <tr><td>Save FCS File</td><td></td></tr> <tr><td>Export Statistics</td><td></td></tr> <tr><td>Append Statistics</td><td>⌘'</td></tr> <tr><td>Document Size</td><td></td></tr> <tr><td>Page Setup</td><td></td></tr> <tr><td>Print</td><td>⌘P</td></tr> <tr><td>Print One</td><td></td></tr> <tr><td>Quit</td><td>⌘Q</td></tr> </table>	New	⌘N	Open	⌘O	Close	⌘W	Save	⌘S	Save As		Save FCS File		Export Statistics		Append Statistics	⌘'	Document Size		Page Setup		Print	⌘P	Print One		Quit	⌘Q	<p>Fileメニュー *エクスペリメントデータの 新規作成 呼び出し、終了、 保存、サイズの変更、 印刷 *FCSファイルの保存 *統計計算結果 転送用ファイルの作成 *用紙設定 *ソフトウェアの終了</p>	<p>Plots</p> <table border="1"> <tr><td>Histogram Plot</td><td></td></tr> <tr><td>Dot Plot</td><td></td></tr> <tr><td>Density Plot</td><td></td></tr> <tr><td>Contour Plot</td><td></td></tr> <tr><td>3D Plot</td><td></td></tr> <tr><td>Annotation</td><td>▶</td></tr> <tr><td>Format Histogram Overlay</td><td>⌘F</td></tr> <tr><td>Overlay</td><td></td></tr> <tr><td>Legend</td><td></td></tr> <tr><td>Histogram Tools</td><td></td></tr> <tr><td>Change Data File</td><td>⌘D</td></tr> <tr><td>Next Data File</td><td>⌘]</td></tr> <tr><td>Previous Data File</td><td>⌘[</td></tr> <tr><td>File Increment</td><td></td></tr> <tr><td>Log Data Units</td><td></td></tr> </table>	Histogram Plot		Dot Plot		Density Plot		Contour Plot		3D Plot		Annotation	▶	Format Histogram Overlay	⌘F	Overlay		Legend		Histogram Tools		Change Data File	⌘D	Next Data File	⌘]	Previous Data File	⌘[File Increment		Log Data Units		<p>Plotsメニュー *各種プロットの作成、修 正 *保存済み情報の呼び出 し *ヒストグラムの重ね表示 *呼び出しファイルの変 更、 ファイルの更新 *スケール変更</p>
New	⌘N																																																										
Open	⌘O																																																										
Close	⌘W																																																										
Save	⌘S																																																										
Save As																																																											
Save FCS File																																																											
Export Statistics																																																											
Append Statistics	⌘'																																																										
Document Size																																																											
Page Setup																																																											
Print	⌘P																																																										
Print One																																																											
Quit	⌘Q																																																										
Histogram Plot																																																											
Dot Plot																																																											
Density Plot																																																											
Contour Plot																																																											
3D Plot																																																											
Annotation	▶																																																										
Format Histogram Overlay	⌘F																																																										
Overlay																																																											
Legend																																																											
Histogram Tools																																																											
Change Data File	⌘D																																																										
Next Data File	⌘]																																																										
Previous Data File	⌘[
File Increment																																																											
Log Data Units																																																											
<p>Edit</p> <table border="1"> <tr><td>Canat Undo</td><td>⌘Z</td></tr> <tr><td>Cut</td><td>⌘X</td></tr> <tr><td>Copy</td><td>⌘C</td></tr> <tr><td>Paste</td><td>⌘V</td></tr> <tr><td>Clear</td><td></td></tr> <tr><td>Select All</td><td>⌘A</td></tr> <tr><td>Show Clipboard</td><td></td></tr> <tr><td>Text Settings</td><td>⌘T</td></tr> <tr><td>Color Palette</td><td></td></tr> <tr><td>Banner</td><td></td></tr> </table>	Canat Undo	⌘Z	Cut	⌘X	Copy	⌘C	Paste	⌘V	Clear		Select All	⌘A	Show Clipboard		Text Settings	⌘T	Color Palette		Banner		<p>Editメニュー *やり直し、カット、コピー 、ペースト、消去 *画面全体の選択 *クリップボード表示 *文字の書体や色の変更 *カラーパレットの表示 *バナーの作成</p>	<p>Stats</p> <table border="1"> <tr><td>Histogram Stats</td><td></td></tr> <tr><td>K-S Stats</td><td></td></tr> <tr><td>Region Stats</td><td></td></tr> <tr><td>Gate Stats</td><td></td></tr> <tr><td>Quadrant Stats</td><td></td></tr> <tr><td>Edit</td><td></td></tr> </table>	Histogram Stats		K-S Stats		Region Stats		Gate Stats		Quadrant Stats		Edit		<p>Statsメニュー *各種統計計算結果表 示、 修正</p>																								
Canat Undo	⌘Z																																																										
Cut	⌘X																																																										
Copy	⌘C																																																										
Paste	⌘V																																																										
Clear																																																											
Select All	⌘A																																																										
Show Clipboard																																																											
Text Settings	⌘T																																																										
Color Palette																																																											
Banner																																																											
Histogram Stats																																																											
K-S Stats																																																											
Region Stats																																																											
Gate Stats																																																											
Quadrant Stats																																																											
Edit																																																											
<p>Cytometer</p> <table border="1"> <tr><td>Detectors/Amps</td><td>⌘1</td></tr> <tr><td>Threshold</td><td>⌘2</td></tr> <tr><td>Compensation</td><td>⌘3</td></tr> <tr><td>Status</td><td>⌘4</td></tr> <tr><td>Instrument Settings</td><td></td></tr> <tr><td>Sort Counters</td><td></td></tr> <tr><td>Time-Delay Calibration</td><td></td></tr> </table>	Detectors/Amps	⌘1	Threshold	⌘2	Compensation	⌘3	Status	⌘4	Instrument Settings		Sort Counters		Time-Delay Calibration		<p>Cytometerメニュー *機器調整用ウインドウの 表示 *装置作動状況の確認 *機器設定の保存、呼び 出し、印刷</p>	<p>Acquire</p> <table border="1"> <tr><td>Acquisition & Storage Parameter Description Custom Keywords Counters</td><td></td></tr> <tr><td>Edit Reagent List</td><td></td></tr> <tr><td>Edit Panels</td><td></td></tr> <tr><td>QuantiQuest</td><td></td></tr> <tr><td>Disconnect from Cytometer</td><td>⌘B</td></tr> <tr><td>Sort Setup</td><td></td></tr> </table>	Acquisition & Storage Parameter Description Custom Keywords Counters		Edit Reagent List		Edit Panels		QuantiQuest		Disconnect from Cytometer	⌘B	Sort Setup		<p>Acquireメニュー *データ取込準備用ウインドウの 表示 * Keywordの指定 * Countersウインドウの表示 * 装置との接続</p>																														
Detectors/Amps	⌘1																																																										
Threshold	⌘2																																																										
Compensation	⌘3																																																										
Status	⌘4																																																										
Instrument Settings																																																											
Sort Counters																																																											
Time-Delay Calibration																																																											
Acquisition & Storage Parameter Description Custom Keywords Counters																																																											
Edit Reagent List																																																											
Edit Panels																																																											
QuantiQuest																																																											
Disconnect from Cytometer	⌘B																																																										
Sort Setup																																																											
<p>Gates</p> <table border="1"> <tr><td>Marker List</td><td></td></tr> <tr><td>Region List</td><td></td></tr> <tr><td>Gate List</td><td>⌘G</td></tr> <tr><td>Rotate Region</td><td></td></tr> <tr><td>Edit Polygon</td><td></td></tr> <tr><td>✓ Auto Recalculate</td><td></td></tr> <tr><td>Recalculate Now</td><td>⌘=</td></tr> </table>	Marker List		Region List		Gate List	⌘G	Rotate Region		Edit Polygon		✓ Auto Recalculate		Recalculate Now	⌘=	<p>Gatesメニュー *マーカー、リージョン、 ゲートリストの表示 *リージョンの修正 統計計算結果 再計算機能</p>	<p>Windows</p> <table border="1"> <tr><td>Show Palette</td><td></td></tr> <tr><td>Show Acquisition Control</td><td></td></tr> <tr><td>Show Page Break</td><td></td></tr> <tr><td>Snap to Grid</td><td></td></tr> <tr><td>Grid</td><td></td></tr> <tr><td>No Window</td><td></td></tr> </table>	Show Palette		Show Acquisition Control		Show Page Break		Snap to Grid		Grid		No Window		<p>Windowsメニュー * 画面表示されている ウインドウを隠す * 隠れたウインドウの表示 * 開いているウインドウ名の表示</p>																														
Marker List																																																											
Region List																																																											
Gate List	⌘G																																																										
Rotate Region																																																											
Edit Polygon																																																											
✓ Auto Recalculate																																																											
Recalculate Now	⌘=																																																										
Show Palette																																																											
Show Acquisition Control																																																											
Show Page Break																																																											
Snap to Grid																																																											
Grid																																																											
No Window																																																											



Acquisition Gate

70-サトトキターのレーザーを通過したデータをどのような条件でプロットに表示させるかを選択する

1. レザーを通過した全データの表示 (AcceptとAll)
2. レザーを通過したゲートに含まれるデータの表示
(例:AcceptとG1=R1)
3. レザーを通過したゲートに含まれないデータの表示 (RejectとG1=R1)

Collection Criteria

Acquisition Gateを通過したデータの取込条件の設定

1. Event Count (取込細胞数)
2. Event Count or Time(取込時間)
の選択が可能

Acquisition will stop when

取込細胞数または、取込時間を指定する。
また、ゲート内データの取込細胞数の設定も行える。

Storage Gate

取込んだデータの保存方法

- 1: 取込んだデータをすべて保存 (All)
- 2: 取込んだデータの内、特定のゲートのデータのみ保存
(例: G1=R1)が選択可能

Resolution(あまり使用しない)

取込んだデータの解像度の選択

Defaultは、1024 (256への変更可)

Parameters Saved to the data file

FSC-H,SSC-H,FL1-H,FL2-H,FL3-H,FL2-A,FL2-W

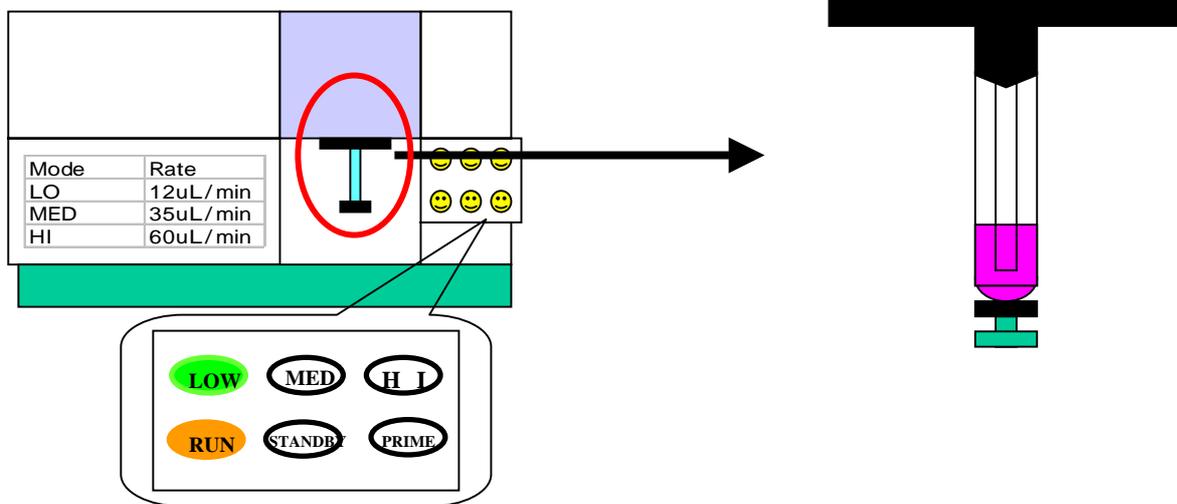
保存選択が可能

主に、データを刊-節約時などに使用

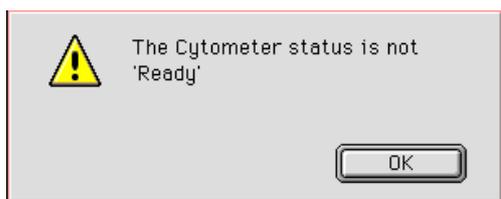
data型式は、国際規格FOS2.0での保存です。

使用中での注意

機械の異常時



サンプルをセットして、runボタンを押しても、緑にならないときは、異常です。

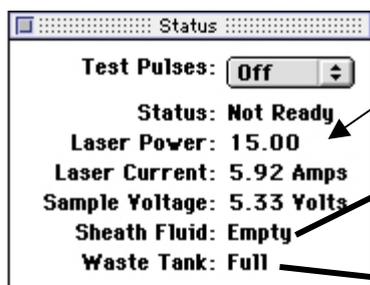


右のようなメッセージが出た場合

対処方法。

- ・黒いプレートが装着されているか確認
- ・シースタンクに、圧力が掛かっているか確認
- ・リークがないか確認
- ・シースフィルターに気泡が無いことを確認

Statusを開いて



レーザーが15mWでない場合Not Ready時

試験管が割れてないか確認

Sheath Fluid:Empty時シース液の補充

フィルタのパージを行う

Waste Tank:full時、廃液処理

わからない場合、共同実験室に電話してください。

その他、不明な点は、使用簿・備考に必ず記入してください

サンプルに関して、(注意事項)

凝集しやすいサンプルは、必ず、直前にフィルターを掛けて測定してください。

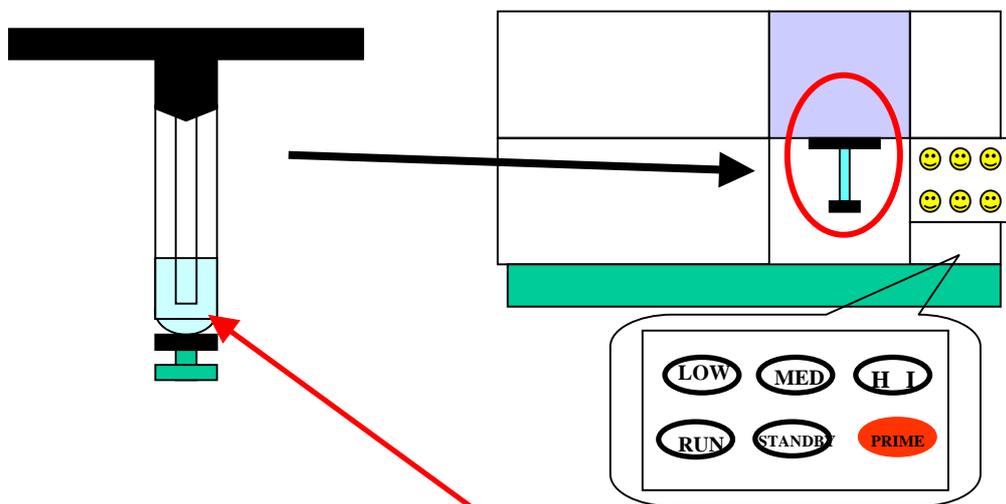
推奨フィルターFalcon352235もしくは、35umのメッシュを使用してください。

ノズル径は、100umですので、約1/3が限界の細胞になります。

細胞の条件によっては、大きな細胞を流す事がある場合は、下の対処策を共同実験室で、説明しますのでお尋ねください。

対処策A

蒸留水1cm以下を入れて、サンプルSIPにつける。(多く入ると壊れます)



Primeを押し、ノズル先から、気泡が出てきたら、つまりは、解消されてます
(FACScanの場合、Drin--Fillを繰り返すまたは、backfrashを行う)

繰り返し行う場合、必ず蒸留水が2cm以下か確認すること

10%ハイターを装着し、10分、RUN(速度HI)で、洗浄を行う。

一度、詰まったサンプルは、再度詰まる可能性があるため、再度、フィルターに掛けない限りは、測定しない事

上の対処で、解決しない場合、分解清掃が必要です。
早急に、共同実験室まで、連絡してください。

対処B(機器に詳しい方のみ)

ピアノ線を、サンプルノズルに、刺し込みます。

対処C

全てのラインを、10%ハイターで、置換・洗浄を行う

尚、連絡無く、放置され細胞が固着した場合フローセルの交換になります。(68万円)

サンプルの調整方法

失敗しても、責任は取れません。
十分検討してください。

ただ今作成中

The image displays a collection of software menu items, likely from a flow cytometry analysis application. The items are organized into several distinct menu categories, each with a title in a black box:

- File**: New (⌘N), Open (⌘O), Close (⌘W), Save (⌘S), Save As, Save FCS File, Export Statistics, Append Statistics, Document Size, Page Setup, Print, Print One, Quit.
- Edit**: Can't Undo (⌘Z), Cut (⌘X), Copy (⌘C), Paste (⌘V), Clear, Select All (⌘A), Show Clipboard, Text Settings (⌘T), Color Palette, Banner.
- Stats**: Histogram Stats, K-S Stats, Region Stats, Gate Stats, Quadrant Stats, Edit.
- Plots**: Histogram..., Dot Plot, Density Plot, Contour Plot, 3D Plot, Annotation, Format Histogram Overlay (⌘F), Overlay, Legend, Histogram Tools, Change Data File (⌘D), Next Data File (⌘]), Previous Data File (⌘[), File Increment, Log Data Units.
- Acquire**: Acquisition & Storage, Parameter Description, Custom Keywords, Counters, Edit Reagent List, Edit Panels, QuantiQuest, Disconnect from Cytometer (⌘B), Sort Setup.
- Gates**: Marker List, Region List, Gate List (⌘G), Rotate Region, Edit Polygon, Auto Recalculate (checked), Recalculate Now (⌘=).
- Cytometer**: Detectors/Amps (⌘1), Threshold (⌘2), Compensation (⌘3), Status (⌘4).
- Windows**: Show Palette, Show Acquisition Control, Show Page Break, Snap to Grid, Grid, No Window.

CELLQuest: 蛍光補正 (Compensation)

Compensation (蛍光補正) とは?

