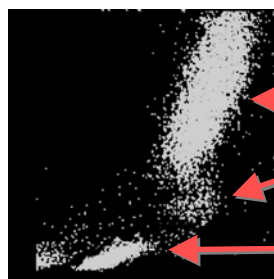


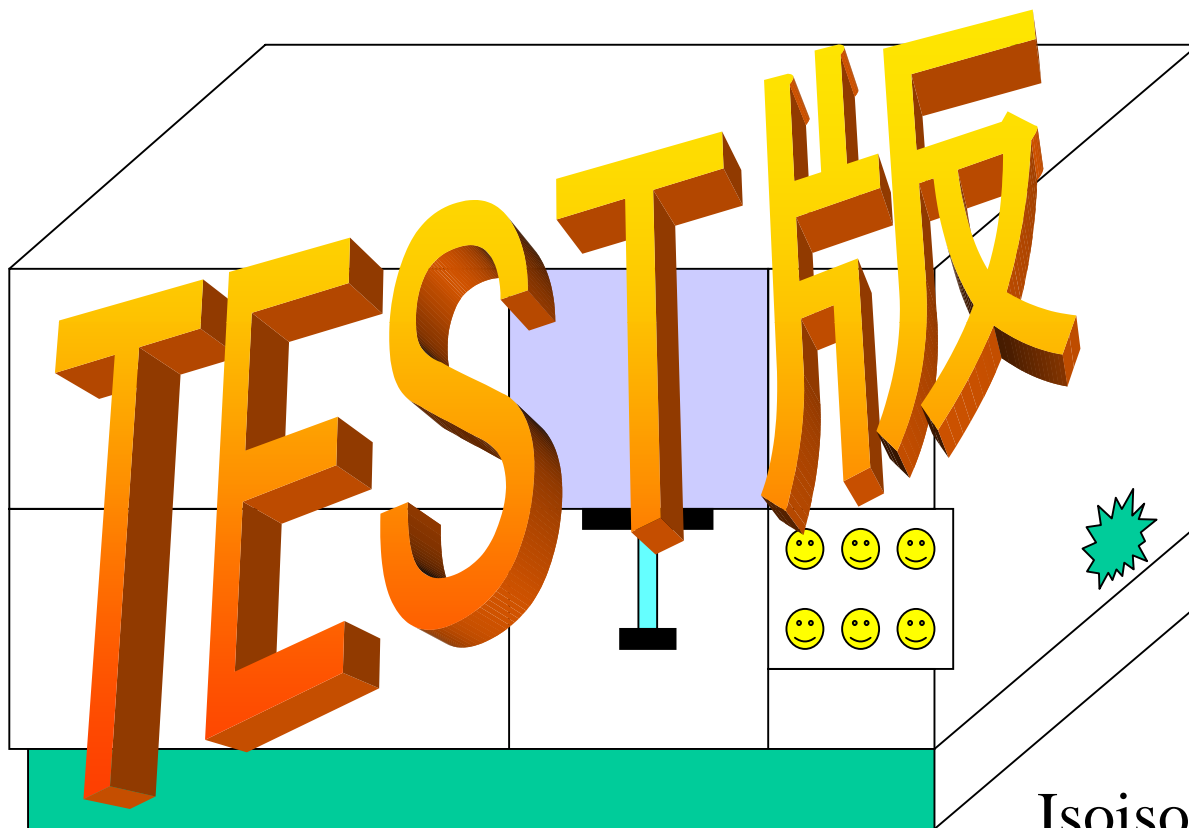
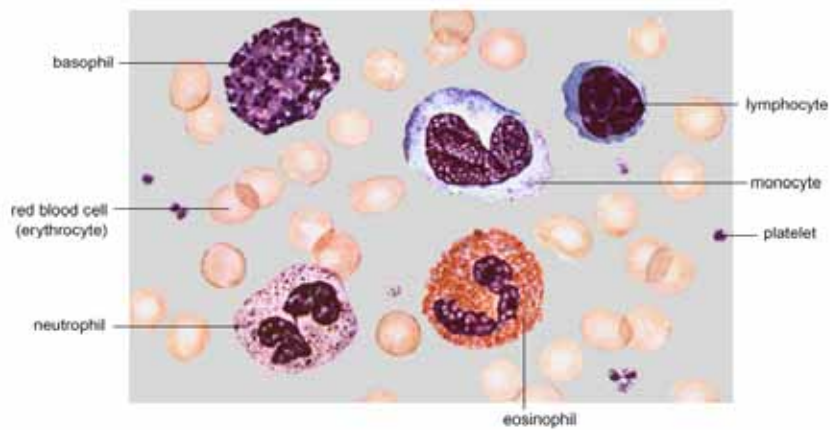
ふあくすきやりば～



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-ボジションキャップ	滅菌済	1	500	352003	66
ツ-ボジションキャップ	滅菌済	25	500	352058	58
ツ-ボジションキャップ	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
セルストレーナーキャップ	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 μm, \$215.00

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

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

URFP-300-5 ; UltraRainbow Fluorescent Particles, 1% w/v, 5 mL, 25.0-35.0 μm, \$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>

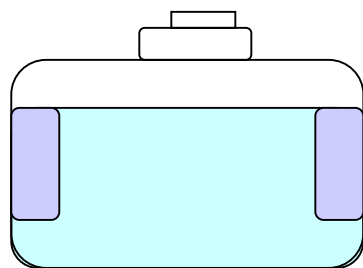
サンプル流量をHI

- ・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

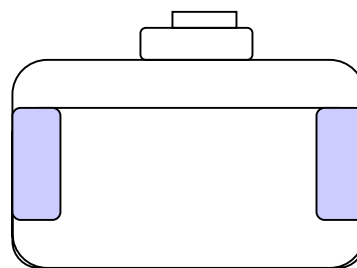


シースタンク

満タンで、約2時間

MAXまで、補充する

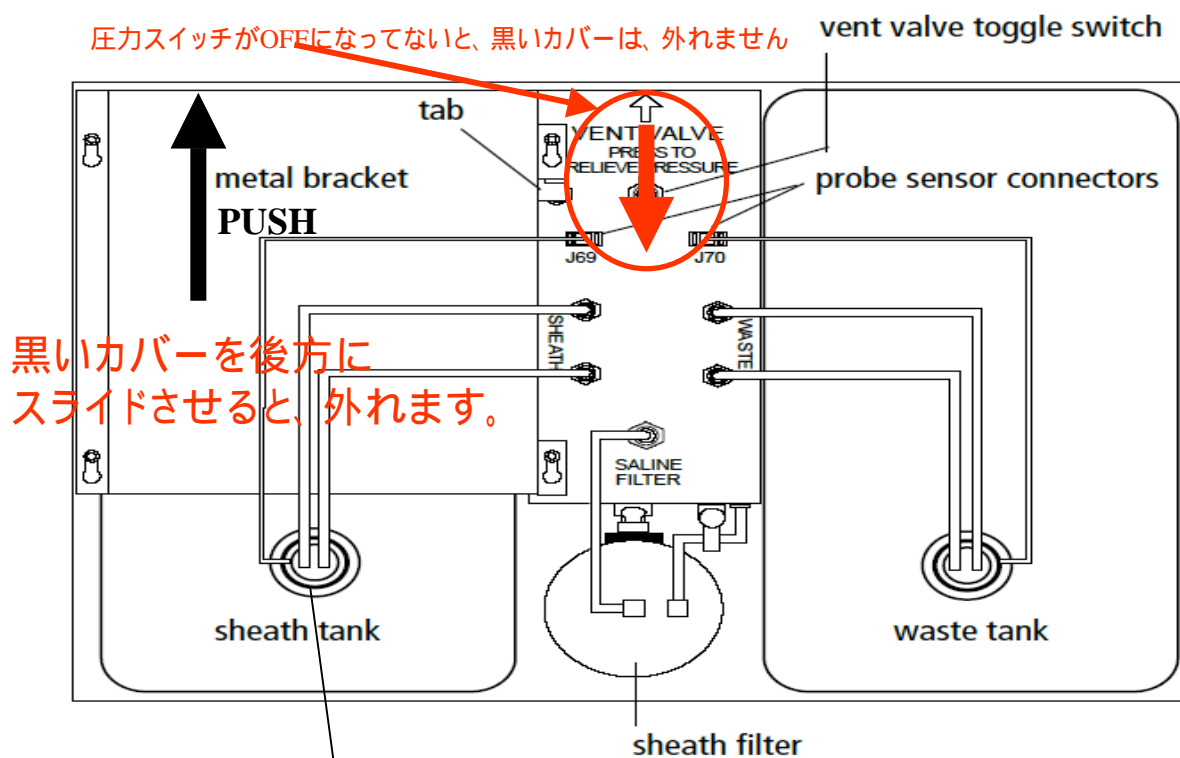
(シースの継ぎ足しは、コンタミの原因になります)



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。



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**

床に転がってます。(機械の右側)

A 2D environment diagram showing a robot (a small black circle) on a green floor. The environment is divided into a grid of white and light blue squares. A purple square block is in the center. To the right of the block is a goal area marked with a green star and a double-headed arrow. The goal area contains a 2x2 grid of yellow smiley faces.

4.MAC ON

キーボードからは立上らない事があります。

Error in connecting to the selected customer:
Check the hardware connections and
the configuration setup in the BOPAC Control
Panel. If the problem persists, call Section
Bioscience customer support.

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

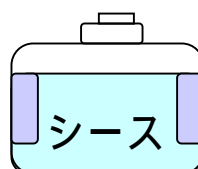
1. 黒のカバーが装着されているか確認

2. 圧力スイッチON

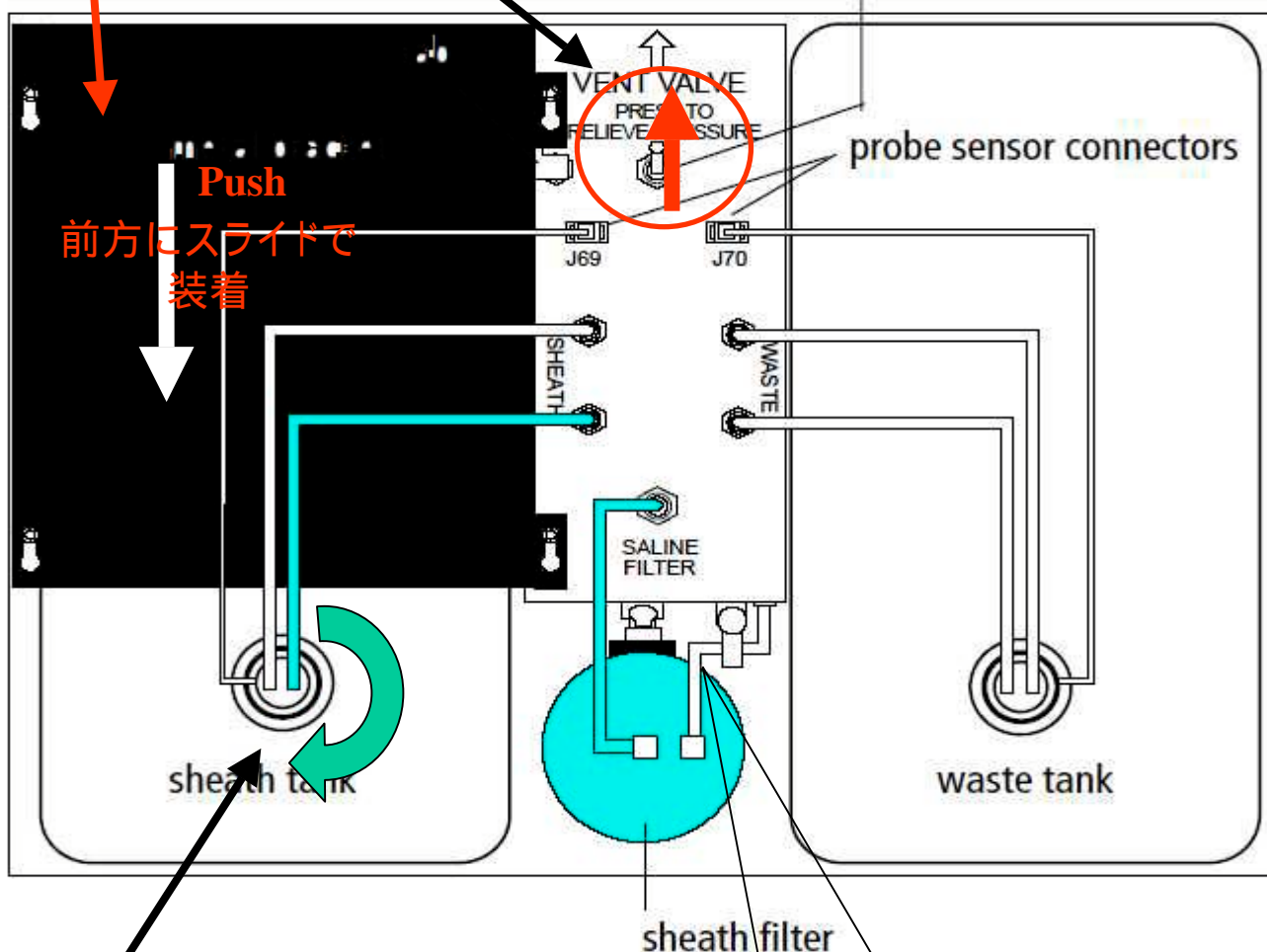
Run側 (奥) に倒す。

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



valve toggle switch



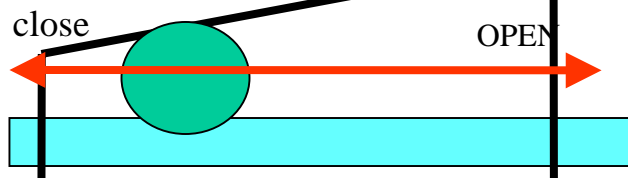
3. キャップがしっかり閉まっているか確認

4. シースLINEに気泡がないことを確認。

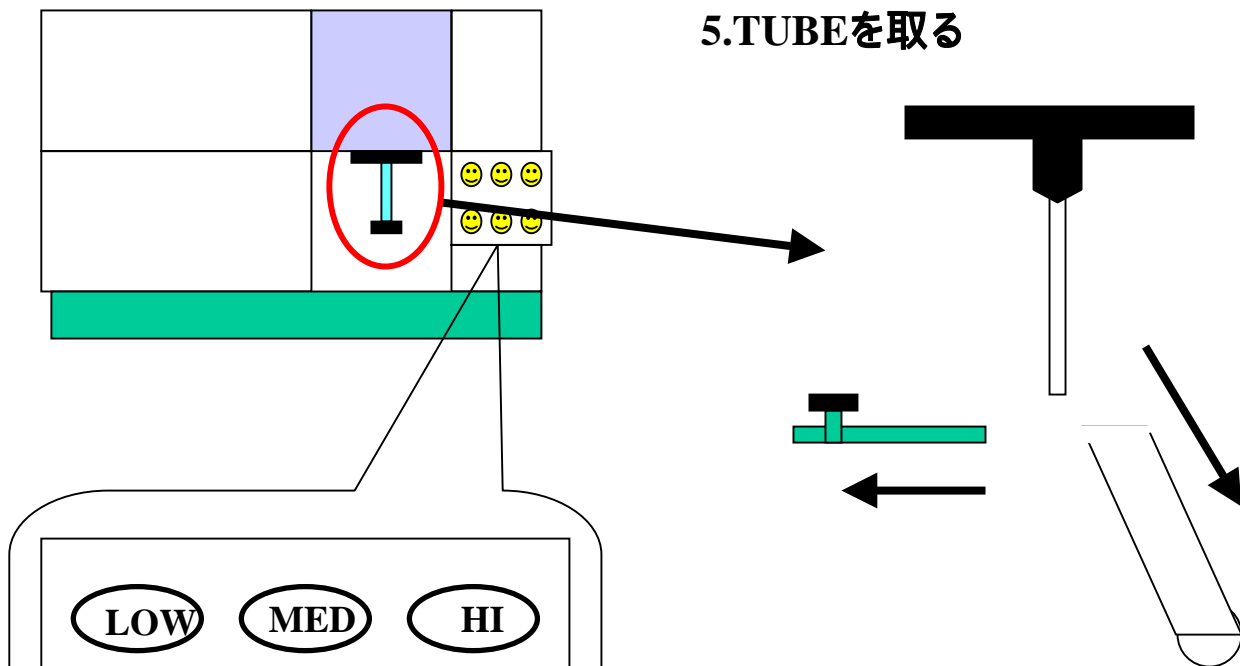
シースフィルター上部に気泡がある場合、パージする

パージ後、必ずCloseにする。

パージ方法



5.TUBEを取る



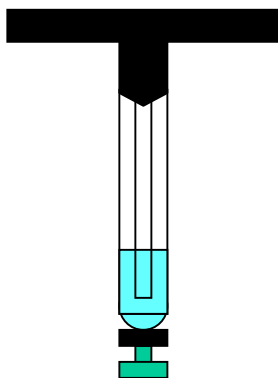
6-1.Primeを押す

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、圧力スイッチを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

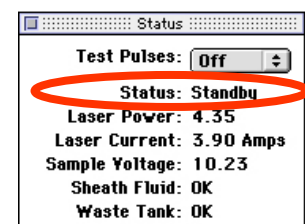


+1を押す。 Detectors/Ampsの表示

+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



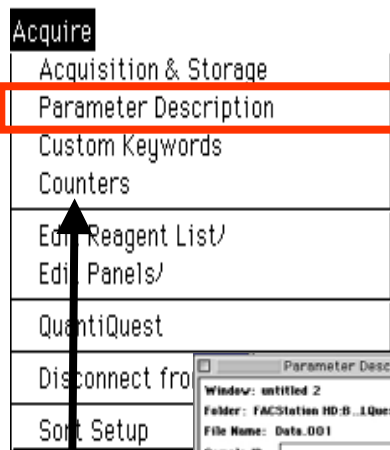
Mac cellQuest起動

- 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。

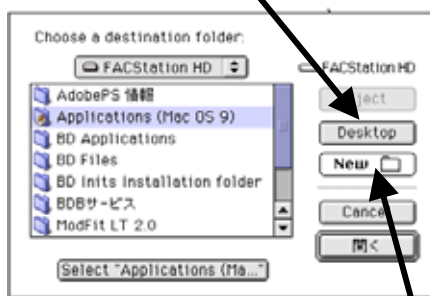
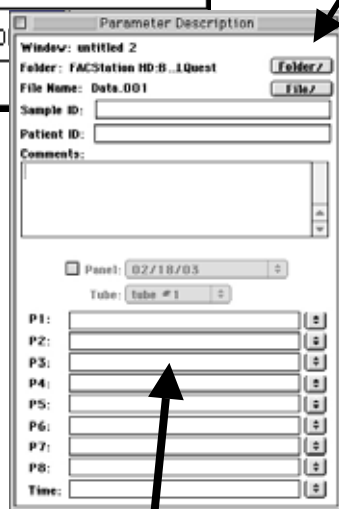
1.dataFolderの作成



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、ご遠慮く
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専用になれば、Fileは、壊れにく
いです。

1-4.Newを押す

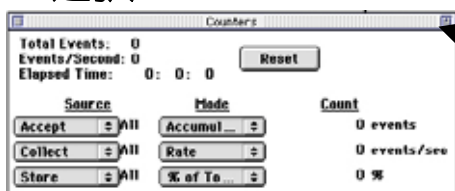


1-5.名前年月日を入力しCreateを押す

1-6.Selectを押す

1-7.Parameter Descriptionを閉じる。

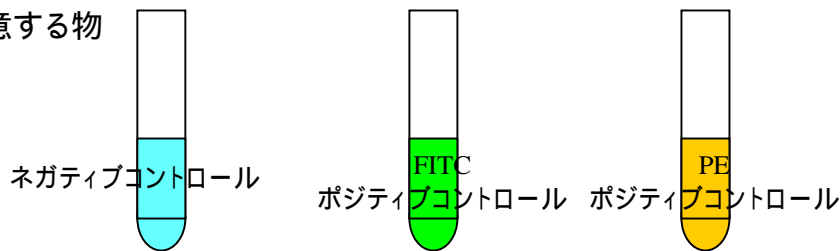
2.Counter選択



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

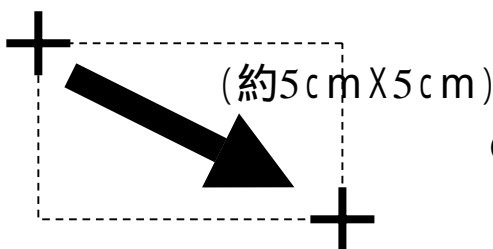
染まりがわからない場合、必ず蛍光顕微鏡で確認すること

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。



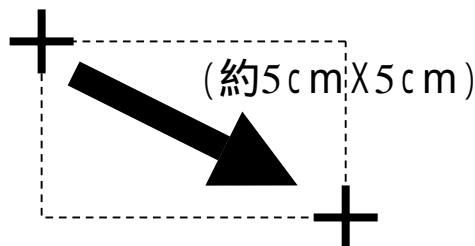
を押す (DotPlot)

シートに任意の大きさにドラックする。



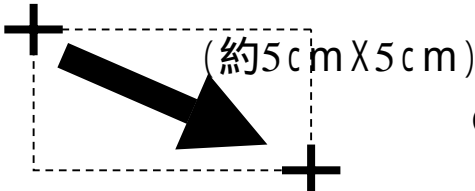
を押す (DotPlot)

シートに任意の大きさにドラックする。



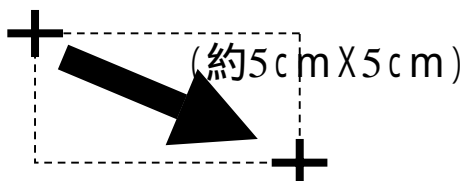
を押す

シートに任意の大きさにドラックする。



を押す

シートに任意の大きさにドラックする。

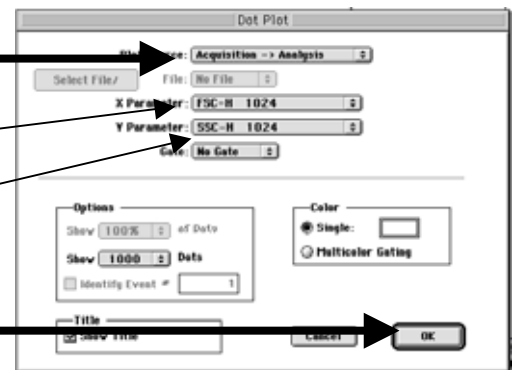


Acquisit**->Analysis選択

FSC-H選択

SSC-H選択

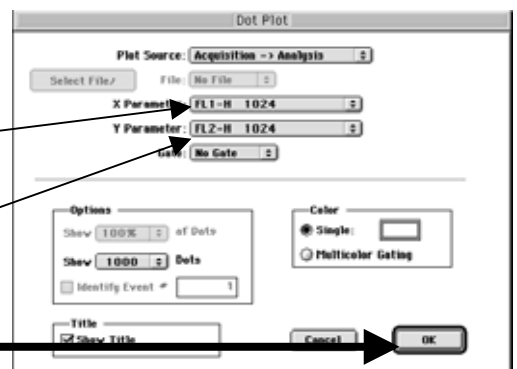
Okを押す



FL1-H選択

FL2-H選択

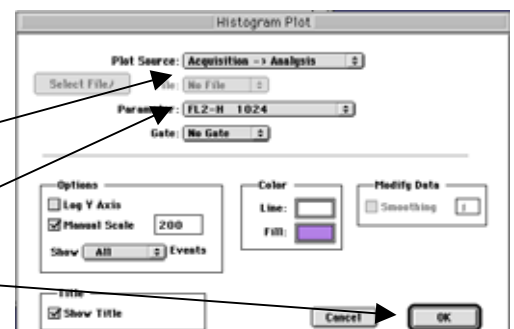
Okを押す



Acquisit**->Analysis選択

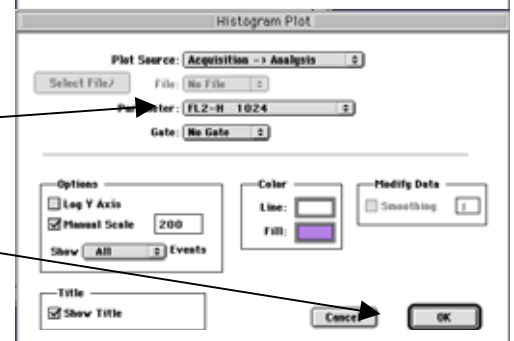
FL1-H選択

Okを押す



FL2H選択

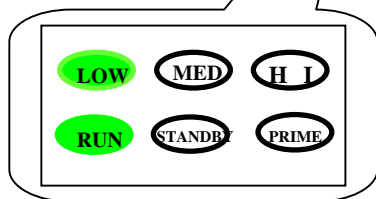
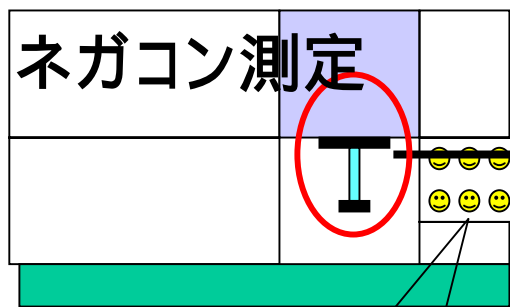
Okを押す



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。

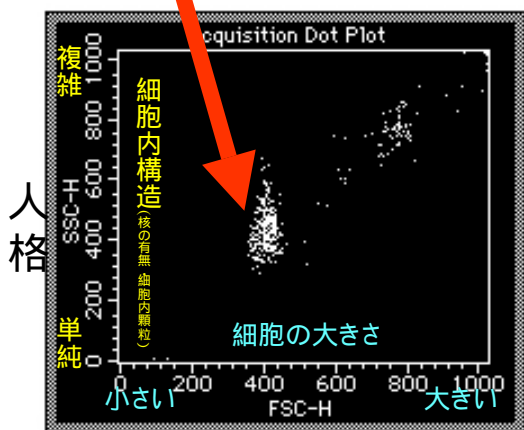
(サンプル数が少ない場合HIに)



4.Acquireを押し、調整を行う

Pause Abort Acquire させて、dataを更新

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

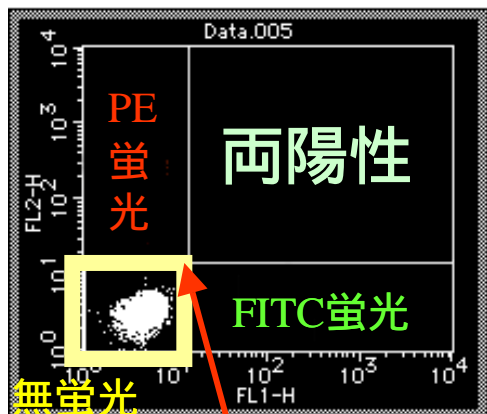
FSC	E00	2.00	Lin
SSC	400	1.00	Lin
FL1	650		Log
FL2	550		Log

ModeはLin

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

Four Color DDI Param: FL1

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

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

Modeは、Log

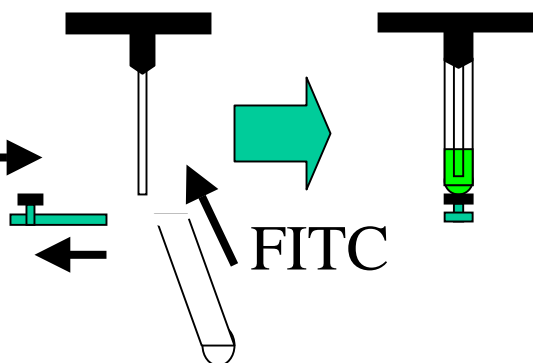
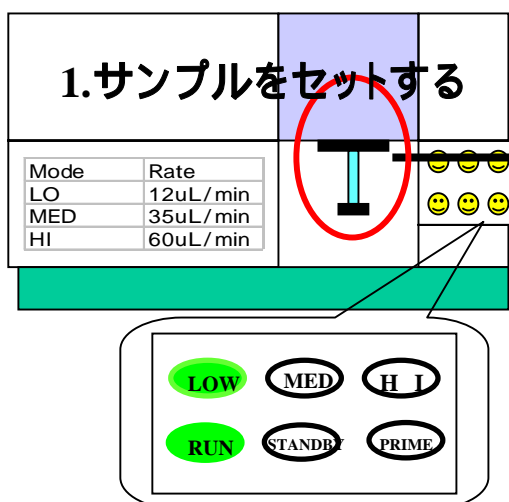
Param	Detector	Voltage	Amp Gain	Mode
P1	FSC	E00	2.00	Lin
P2	SSC	396	1.00	Lin
P3	FL1	660	1.00	Log
P4	FL2	575	1.00	Log
P5	FL3	686	1.00	Log
P6	FL1-A		1.00	Lin
P7	FL1-W		1.00	Lin
P7	FL4	800		Lin

Four Color DDI Param: FL1

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。

デブリが多い場合は、Thresholdを、上げる

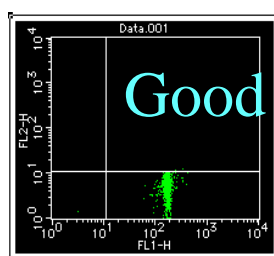
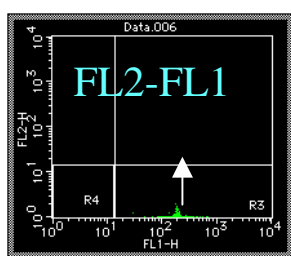
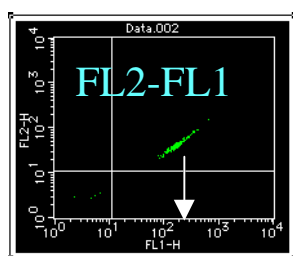
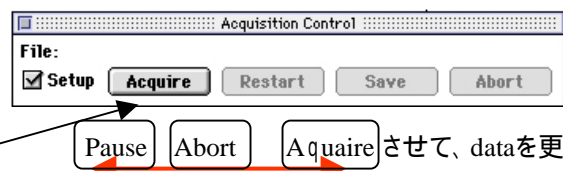
FITCポジコン測定



2.Run・Lowを押す。

(サンプル数が少ない場合HIに)

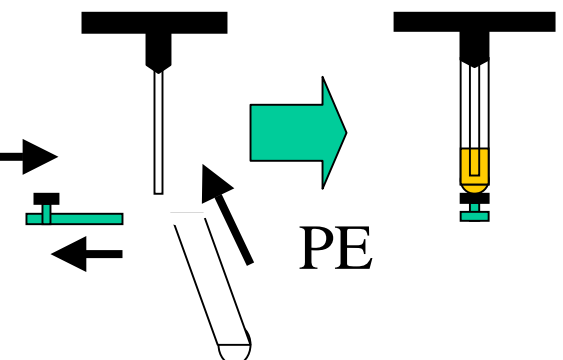
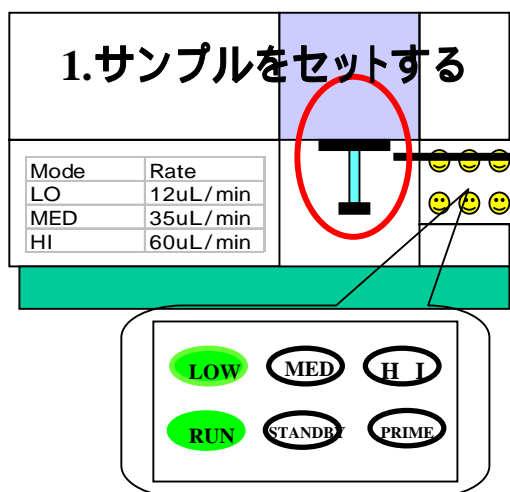
3.Acquireを押す



調整

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

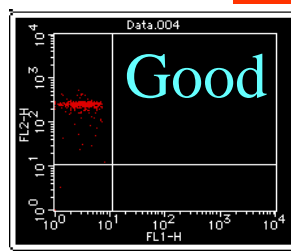
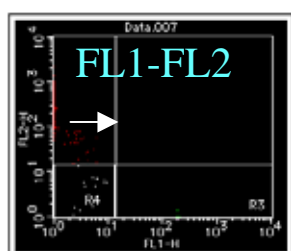
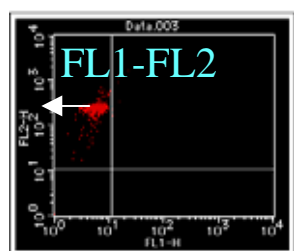
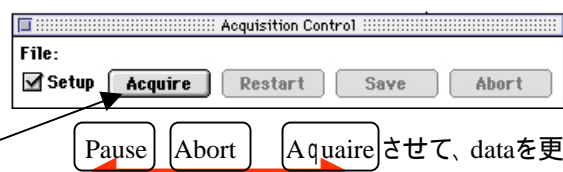
PEポジコン測定



2.Run・Lowを押す。

(サンプル数が少ない場合HIに)

3.Acquireを押す



調整

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

Acquisition & Storage

Data Flow

FACSCalibur

Acquisition Gate: Accept All events.

Collection Criteria: Event Count

Acquisition will stop when 10000 of All events are counted

Storage Gate: Data file will contain: All events.

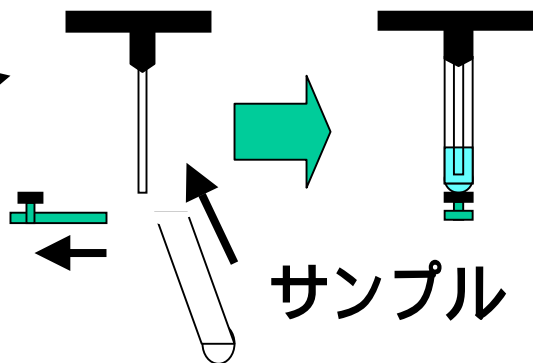
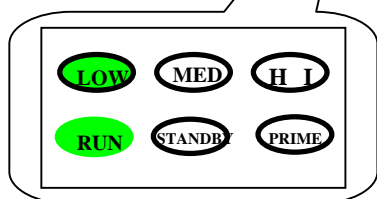
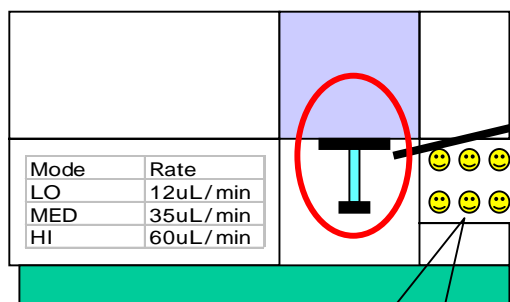
Resolution: 1024 Parameters Saved...

Cancel OK

詳細別紙

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

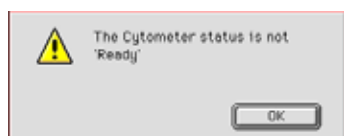
Acquisition Control

File

☒ Setup

7.Acquireを押すと、dataを取り込みます。

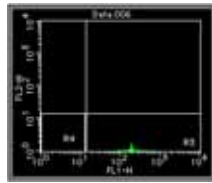
10.000個data保存すると、勝手に止まります。



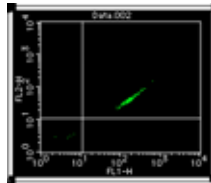
測定中にメッセージが、出た場合

使用中での注意を参考にしてください

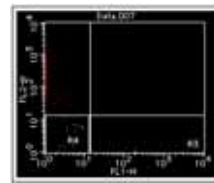
解析方法ただ今作成中



アクティブ



選択



未選択



FCS2.0形式data

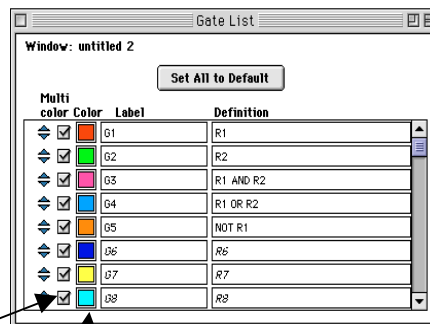
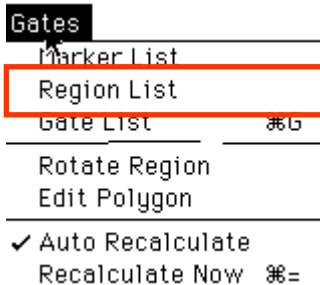


雛形 (Plot・ゲート情報) です、dataは、入ってません。

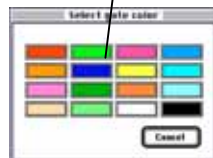
雛形が無い場合は、Cell Quest起動後、File---Newで、新しく作成する

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



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。

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すゲート。

・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すゲート。

・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表示が変わります。

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/

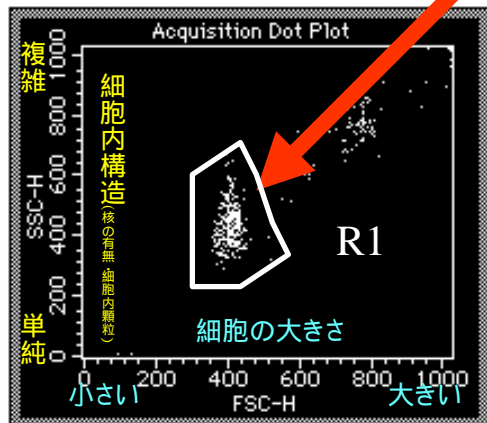
表面抗原解析方法(基本形)

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。

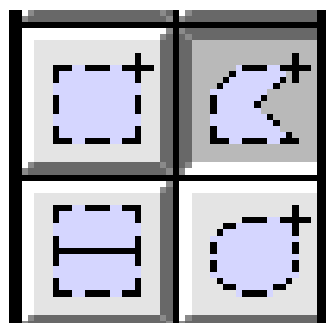
人格



外見

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。



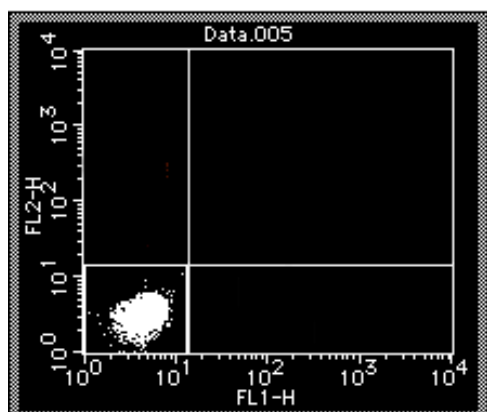
1.Rectangular-Region tool(四角形リージョンの作成): ツールを選択後、ドットプロット、デンシティプロット、コンタープロット内でドラッグしてリージョンのサイズを設定する。

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。

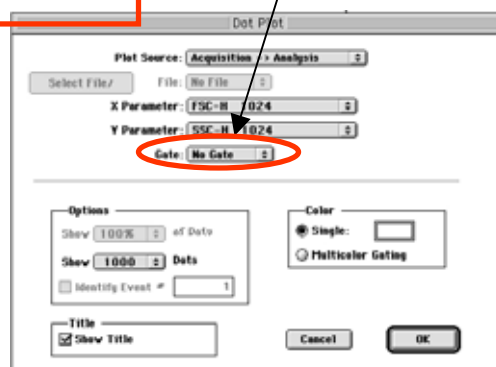
4.Elliptical-Region tool(楕円形リージョンの作成): ツールを選択後、ドットプロット、デンシティプロット、コンタープロット内でドラッグしてリージョンのサイズを設定する。

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。



Plots	
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/	

Gateの選択



Dot Plot

Plot Source: Acquisition -> Analysis

Select File/ No File

X Parameter: FSC-H 1024

Y Parameter: SSC-H 1024

Gate: No Gate

Options

Show 100% of Data

Show 1000 Dots

☐ Identify Event

Color

☒ Single

☒ Multicolor Gating

Title

☒ Show Title

Cancel OK

解析のみ時は、Analysis

Selectで、dataを指定する

マルチカラー表示時

Plots

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/

Overlay--ヒストグラムの重ね合わせ

Stats

Histogram Stats

K-S Stats/

Region Stats

Gate Stats

Quadrant Stats

Edit/

Histogram解析

ヒストグラム時使用

K-S統計解析

重ね合せヒストグラム時使用

Region解析

Gate解析

4分割解析

ドットplot時使用

解析結果の表示方法選択

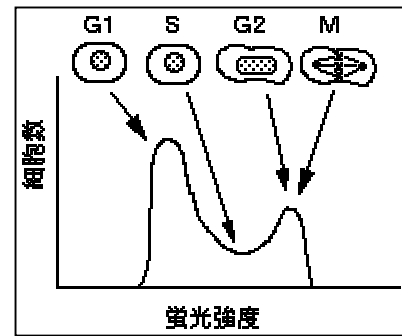
DNA・CellCycle時のPlot (PI染色時)

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	Amplifier	Mode
P1	FSC	500	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	000		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)

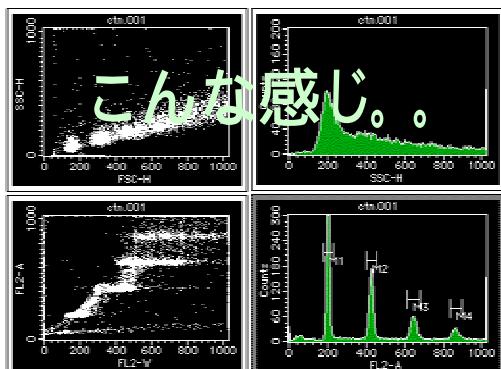
シートに任意の大きさにドラックする。

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。



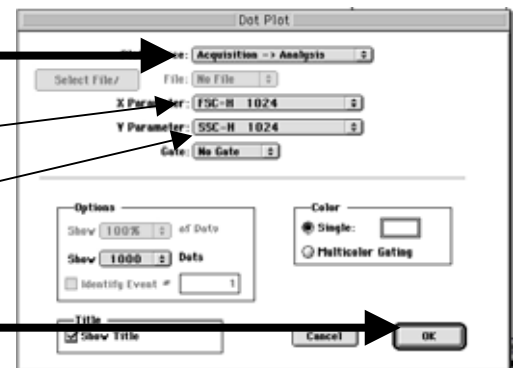
こんな感じ。。

Acquisit**->Analysis選択

FSC-H選択

SSC-H選択

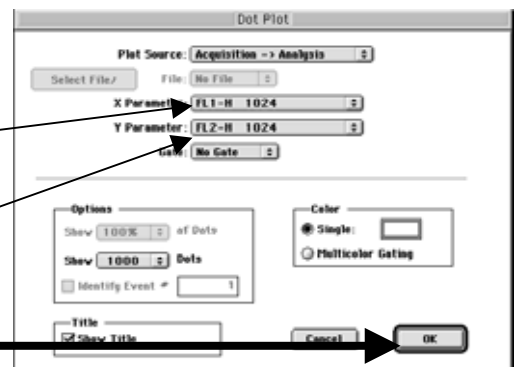
Okを押す



FL2-W選択

FL2-A選択

Okを押す



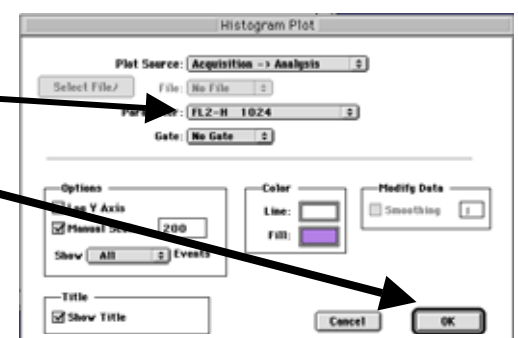
SSC-H選択

Okを押す

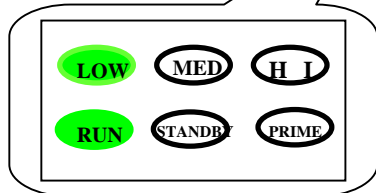
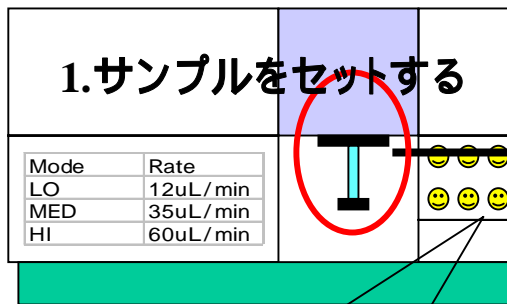


FL2A選択

Okを押す

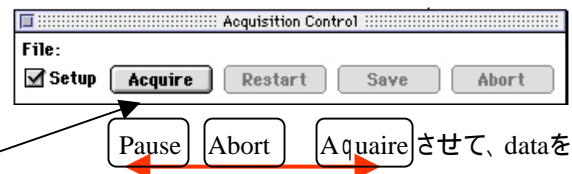
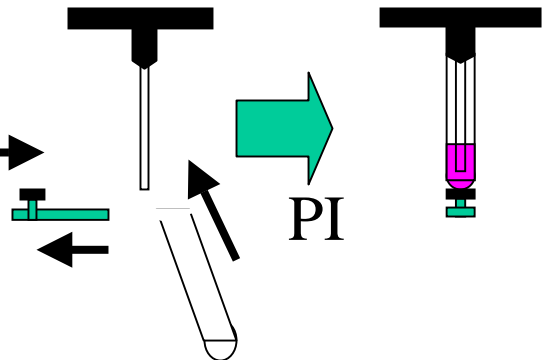


標準Cell cycle測定



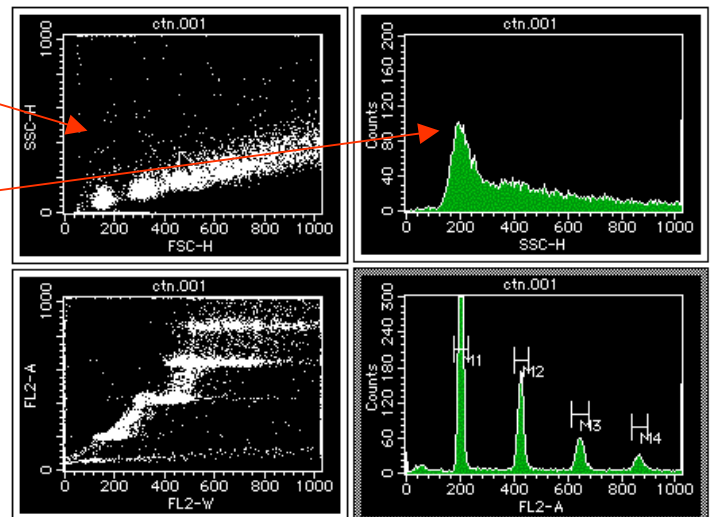
2.Run・Lowを押す。
必ずLOWで測定
MAX400cells/sec

3.Acquireを押す



Cellが全体表示されるよう調整

SSCのピークを200にする。

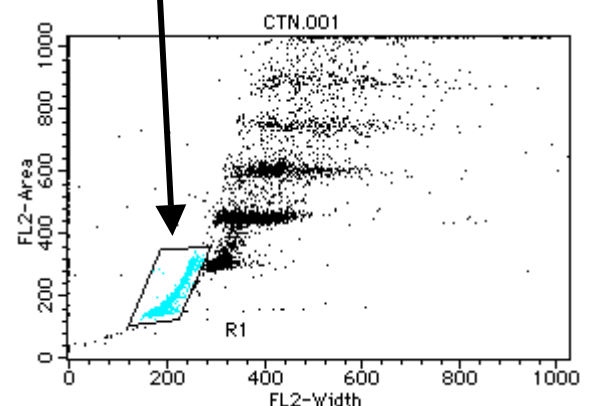
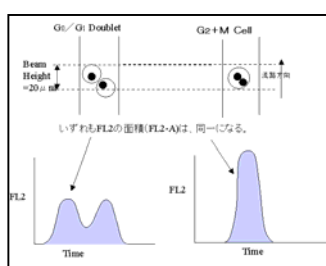


Detectors/Amps				
Param	Detector	Voltage	Amp Gain	Mode
P1	FSC	E00	2.00	Lin
P2	SSC	396	1.00	Lin
P3	FL1	660	1.00	Lin
P4	FL2	575	1.00	Lin
P5	FL3	686	1.00	Lin
P6	FL2-A		1.00	Lin
P7	FL2-W		5.90	Lin
P7	FL4	800		Lin

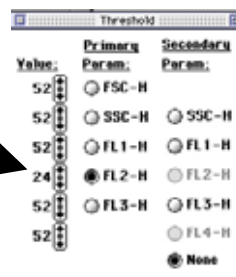
FL2を調整、

FL2-Aに、G0/G1ピークを200に

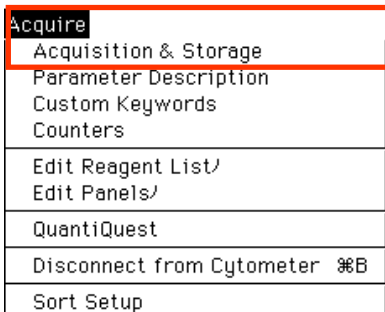
A-Wをsingleが判断出来る様に調整



Thresholdを、FL2を24にする。



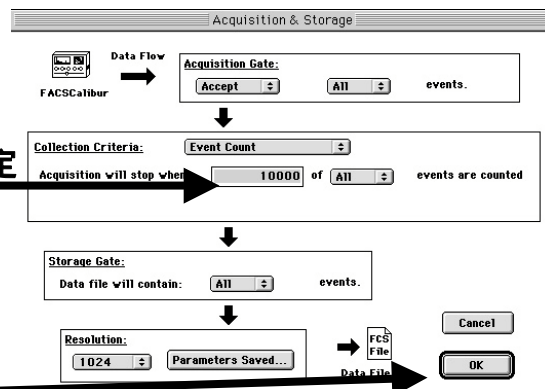
設定がOKでしたら、data取り込みします。



1.選択

2.取り込み細胞数の設定

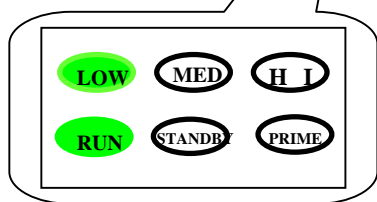
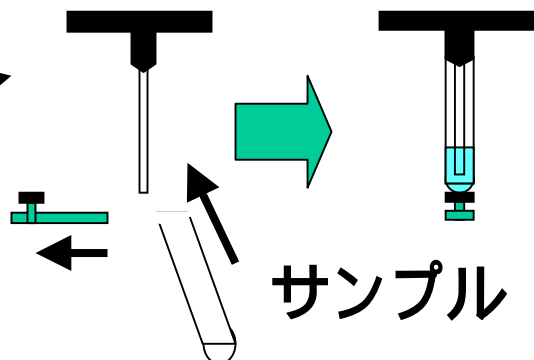
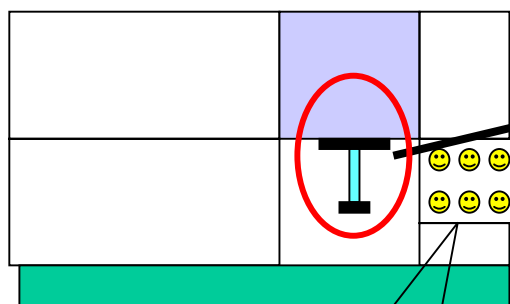
通常20.000個



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

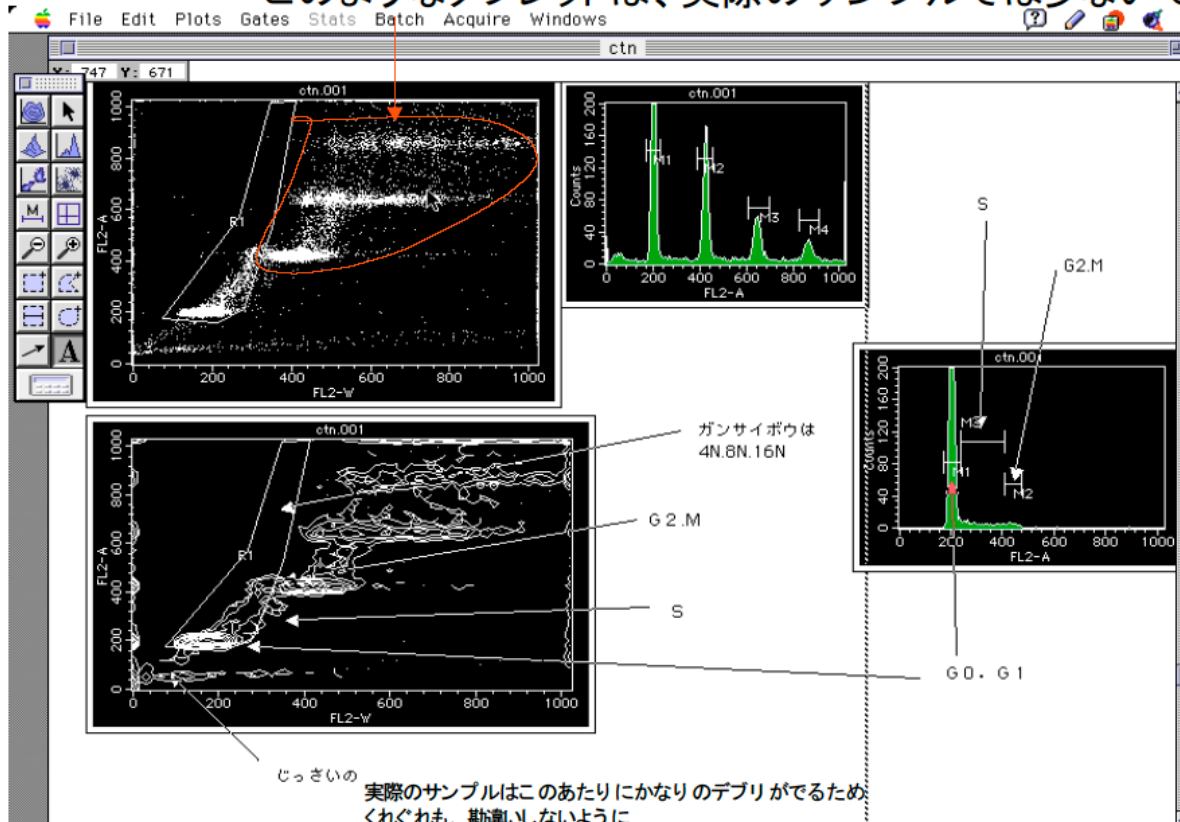


7.Acquireを押すと、dataを取り込みます。

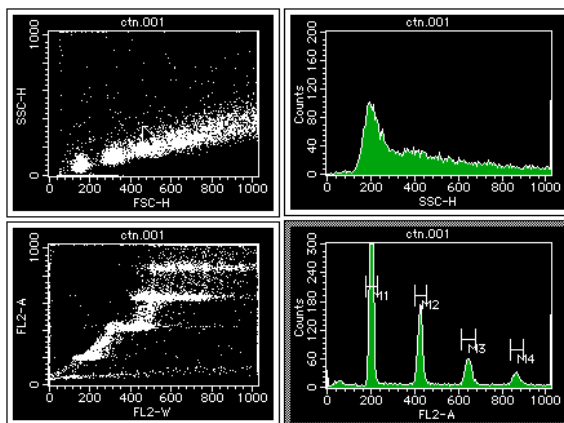
20.000個data保存すると、勝手に止まります。

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		Log Data Units: Linear Values							
Sample ID:		Patient ID:							
Patient Name:		Case Number:							
Acquisition Date: 4-Mar-98		Gate: No Gate							
Gated Events: 0		Total Events: 20000							
X Parameter: FL2-A (Linear)									
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



1滴滴下後、1mLシース

UNコントロール



各1滴

各1滴滴下後、3mLシース

MIXコントロール

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、同封時には、共同実験室までお知らせください。

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



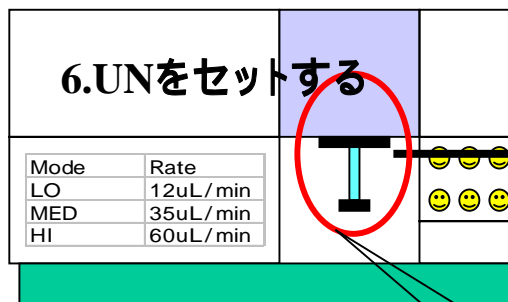
4.試薬添付のLotIDを入力

IDを間違えると結果がFailになります。

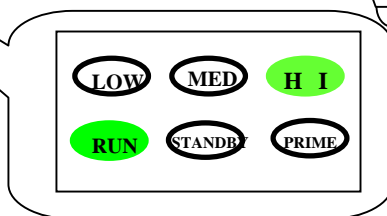
3.Lyse/Washを選択

5.Runを押す

6.UNをセットする

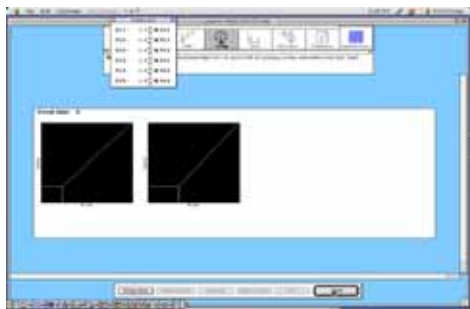


7.Run・HIを押す。 必ずHIで測定



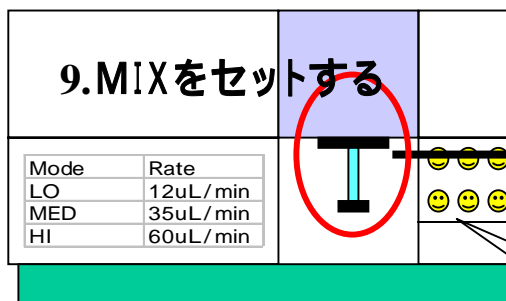
8.Startを押す。



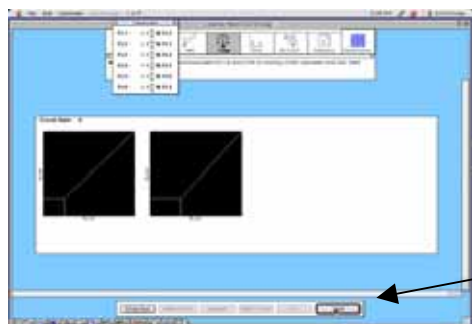
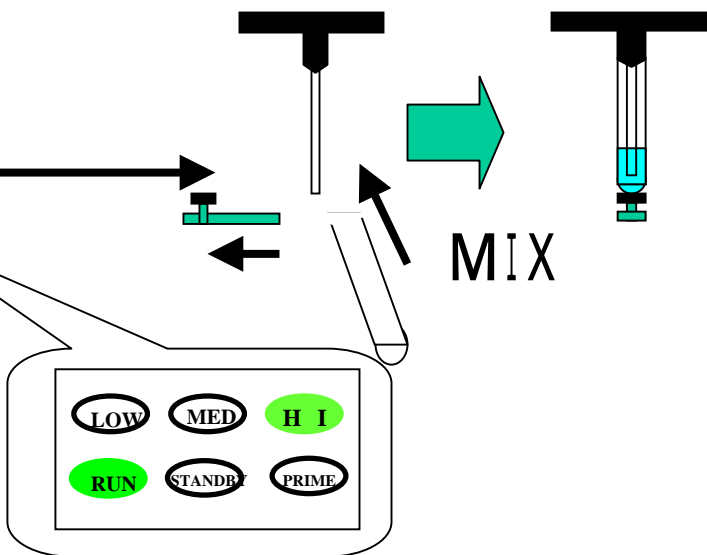


ビーズRateが400無いと、エラーメッセージを出します。

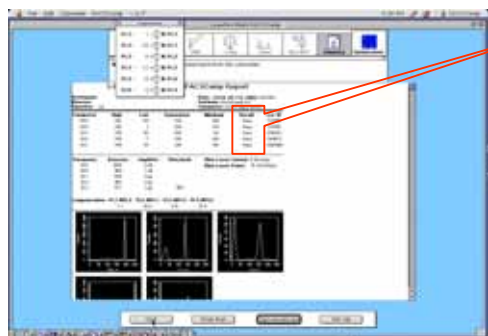
左画面が、表示されたら、次



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

シースにコンタミがある

Lineに気泡がないか確認

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

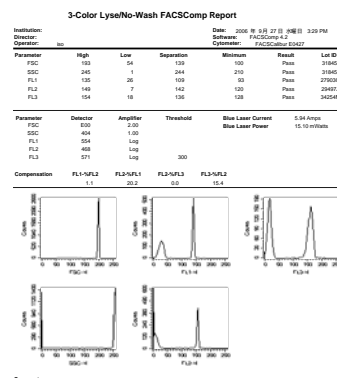
その他は、故障の可能性がありますので、結果を持って、共同実験室まで

12.Quitする

2部、自動に印刷されます。

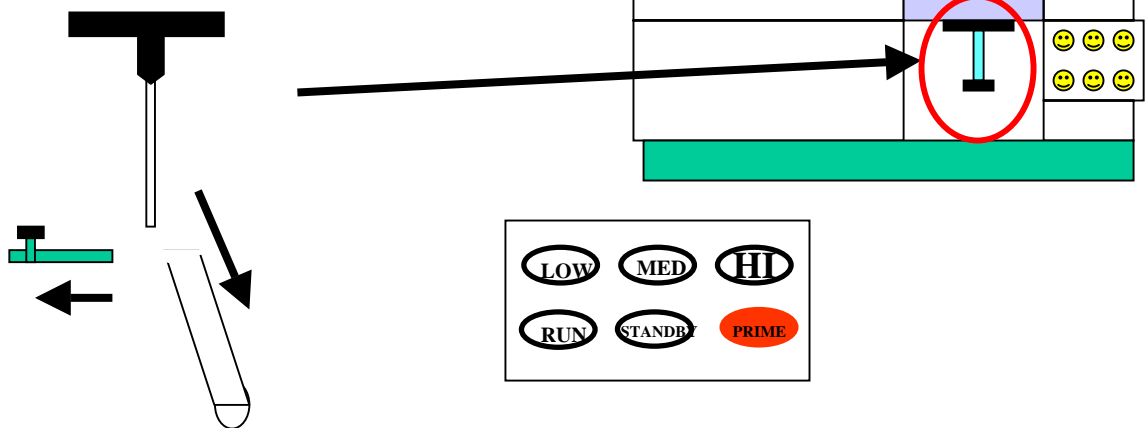
DNA QCに関しては、したのURLに、説明があります。

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

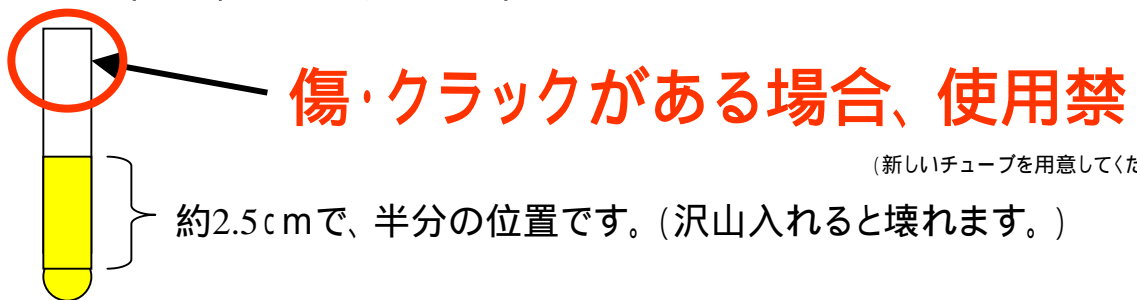


Shutdown

1. チューブを外し、Primeを押す。



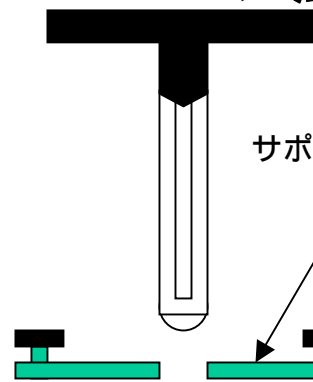
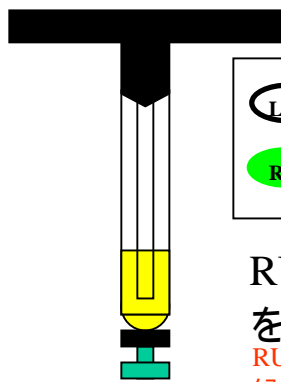
2. 希釈液ハイター (10%) を2.5ml(約2.5cm)を用意



2-1 ハイター洗浄

10分

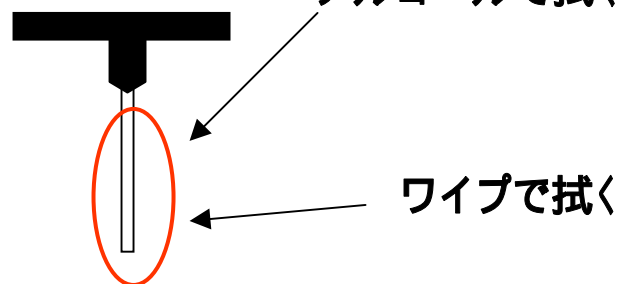
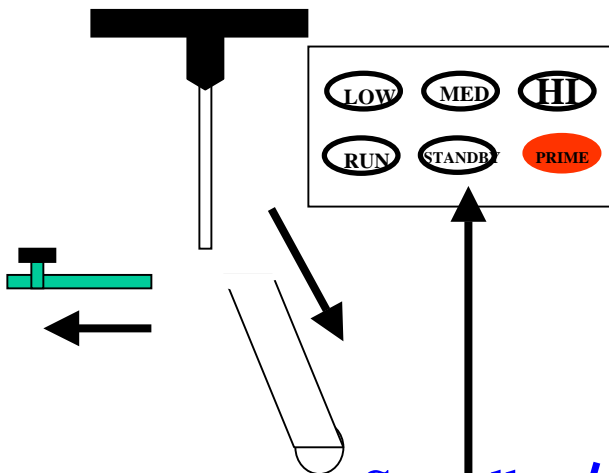
約1分



全量を吸引させる

3. チューブを取り外し、Primeを押す。

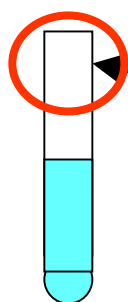
3-1 サンプルインジェクションチューブを、アルコールで拭く



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

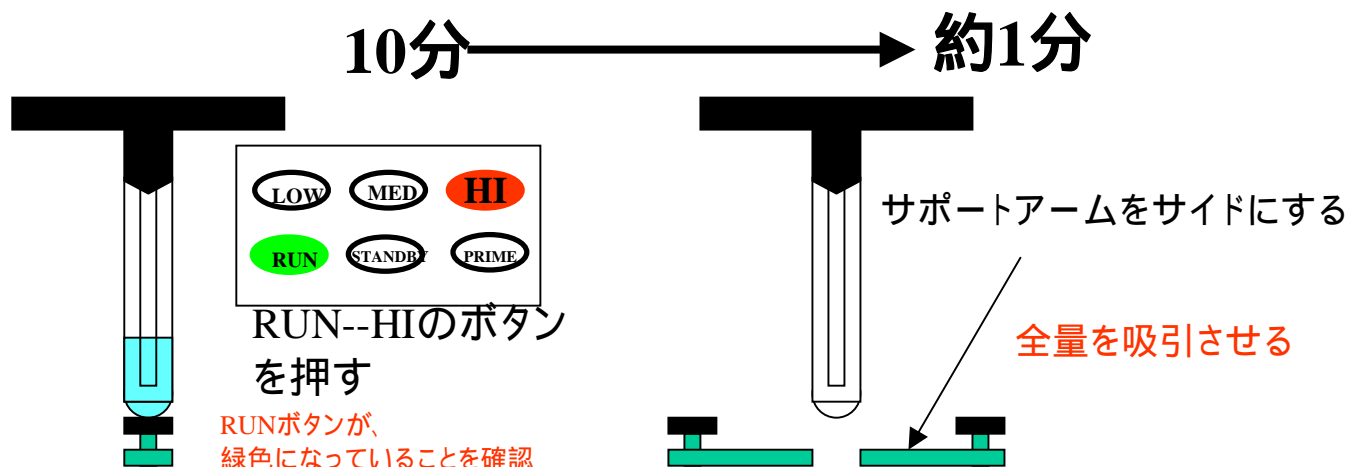


傷・クラックがある場合、使用禁

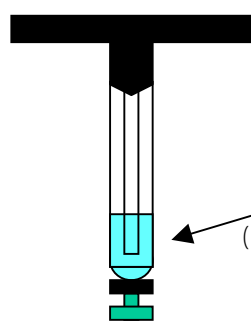
新しいチューブを用意してください

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

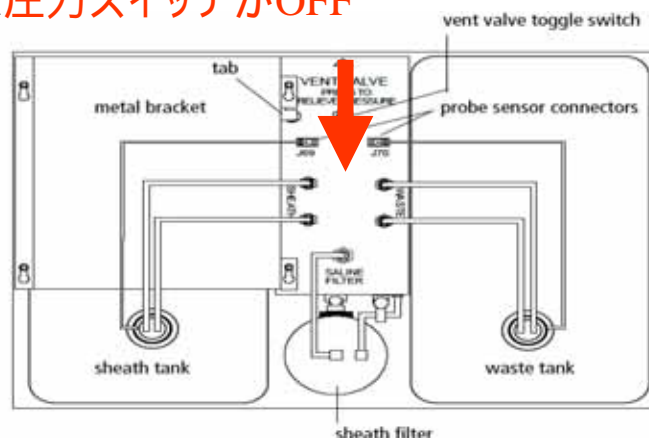


5. 蒸留水1ml(約1cm)をセットする 5-1圧力スイッチがOFF

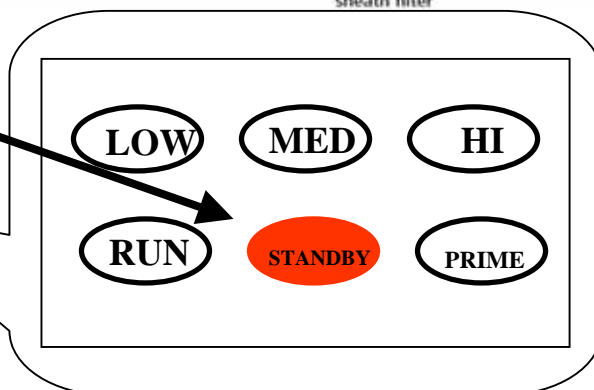
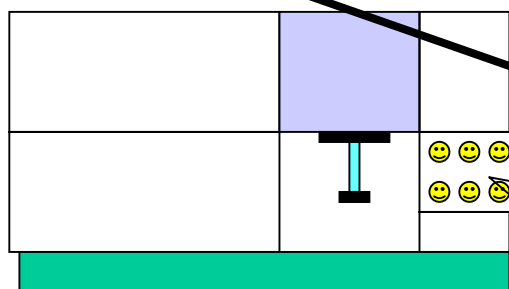


約1cm

(沢山入れると壊れます。)



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。

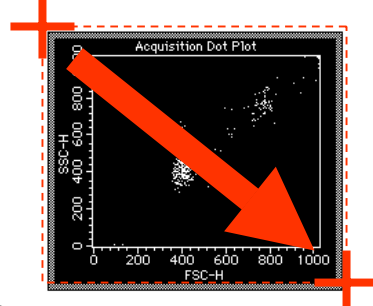
ただ今作成中

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/

Annotation

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

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

Log Data Units/

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。)

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

特定のウイ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
にするウイ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	AmpGain	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

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	AmpGain	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



File Selection

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

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。

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

Acquisition Gate

フローサイトメー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

取り込んだデータの保存方法

- 1: 取り込んだデータをすべて保存 (All)

- 2: 取り込んだデータの内、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)

取り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

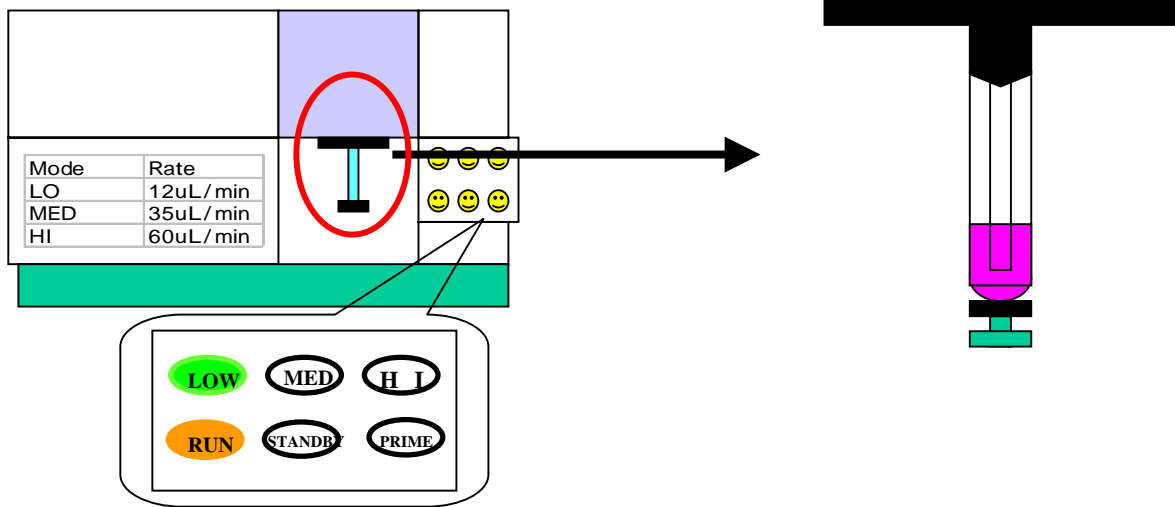
保存選択が可能

主に、データをメモリー節約時などに使用

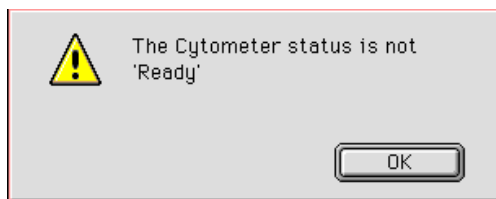
data型式は、国際規格FCS2.0での保存です。

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。

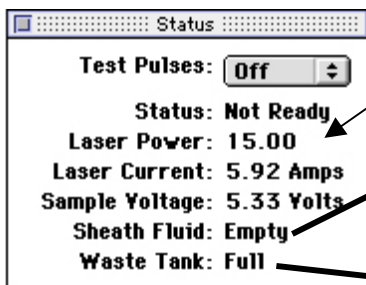


右のようなメッセージが出た場合

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。

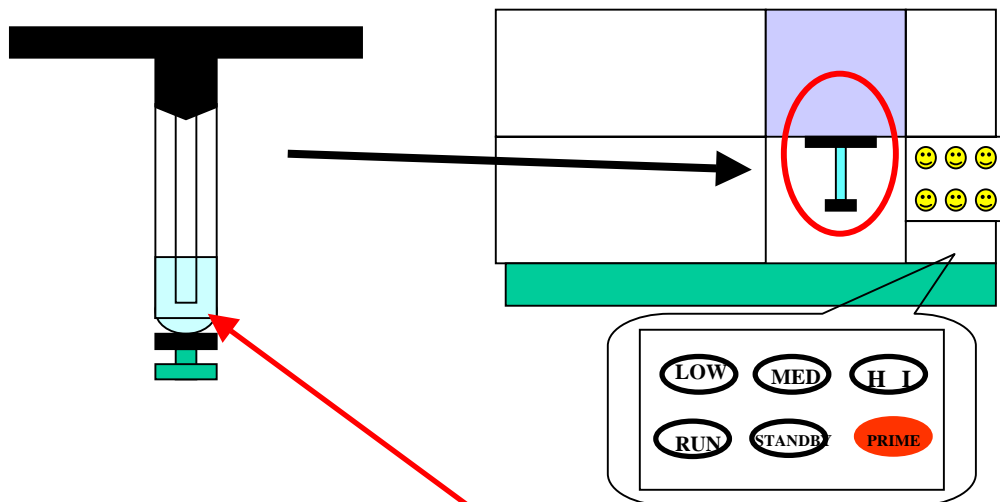
推奨フィルターFalcon352235もしくは、35umのメッシュを使用してください。

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

Edit		Gates	
Can't Undo	⌘Z	Marker List	
Cut	⌘X	Region List	
Copy	⌘C	Gate List	⌘G
Paste	⌘V	Rotate Region	
Clear		Edit Polygon	
Select All	⌘A	✓ Auto Recalculate	
Show Clipboard		Recalculate Now	⌘=
Text Settings/	⌘T	Cytometer	
Color Palette		Detectors/Amps	⌘1
Banner		Threshold	⌘2
File		Compensation	⌘3
New	⌘N	Status	⌘4
Open/	⌘O	Windows	
Close	⌘W	Instrument Settings	Show Palette
Save	⌘S	Plot Counters	Show Acquisition Control
Save As/		One-Delay Calibration	Show Page Break
Save FCS File/			Snap to Grid
Export Statistics/			Grid/
Append Statistics/			No Window
Document Size/		Acquire	
Page Setup/		Acquisition & Storage	
Print/		Parameter Description	
Print One		Custom Keywords	
Quit		Counters	
Stats		Edit Reagent List/	
Histogram Stats		Edit Panels/	
K-S Stats/		QuantiQuest	
Region Stats		Disconnect from Cytometer	⌘B
Gate Stats		Sort Setup	
Quadrant Stats			
Plots			
Histogram...	Edit/		
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/			

CELLQuest: 蛍光補正 (Compensation)

Compensation (蛍光補正) とは?

