

FACSCalibur 流式細胞儀

FACS101 Handbook Pro

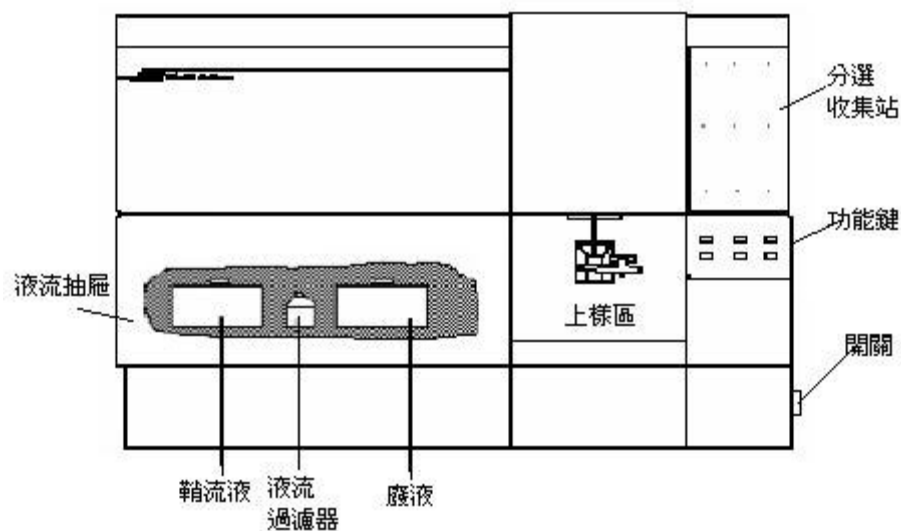
本課程介紹「表面抗原流式分析」有關之基礎工作原理

一、FACS Calibur 基本結構

1.1 儀器本體：

1. 儀器外觀：

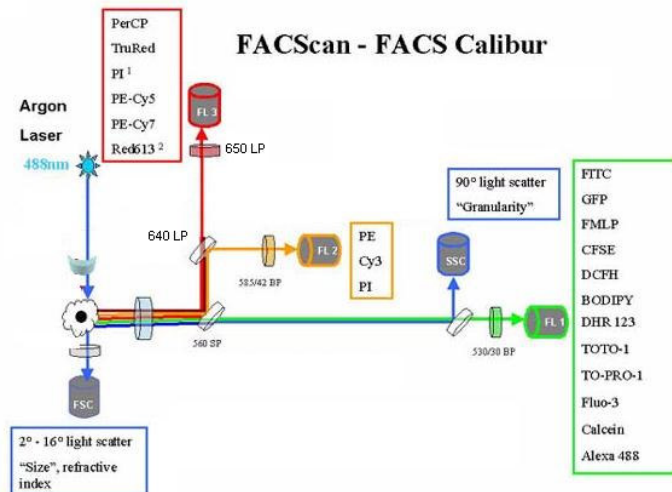
電源開關在FACSCalibur儀器右側下方，先啟動儀器本體，再打開電腦。



2. 光學系統：FACS Calibur 基本配有一支波長488 nm 的氬離子雷射

以FACS Calibur 基本型為例

- FSC Diode 只收488 nm波長散射光
- SSC PMT 只收488 nm波長散射光
- FL1 PMT 螢光光譜峰值落在綠色範圍（波長515-545 nm）
- FL2 PMT 螢光光譜峰值落在橙紅色範圍（波長564-606 nm）
- FL3 PMT 螢光光譜峰值落在深紅色範圍（波長 >650 nm）



3. 儀器面板：

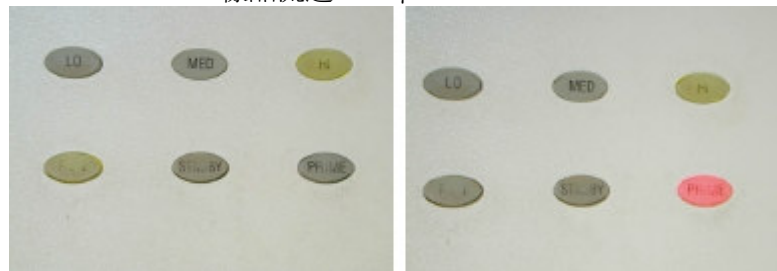
儀器前方面板的右下方有三個流速控制鍵、及三個功能控制鍵。

流速控制：

LO： 樣品流速：12 $\mu\text{l}/\text{min}$

MED： 樣品流速：35 $\mu\text{l}/\text{min}$

HI： 樣品流速：60 $\mu\text{l}/\text{min}$



功能控制：

RUN：此時上樣管加壓，使細胞懸液從進樣針進入流動室。（正常顯示綠色；黃色時表示儀器不正常，請檢查是否失壓。）

STANDBY：無樣品或暖機時之正常位置，此時鞘液停止流動，雷射功率自動降低。

PRIME：去除流動室中的氣泡，流動室施以反向壓力，將液流從流動室沖入樣品管，持續一定時間後，以鞘液回注滿流動室。**PRIME** 結束，儀器恢復 **STANDBY** 狀態。

4. 儲液箱抽屜：

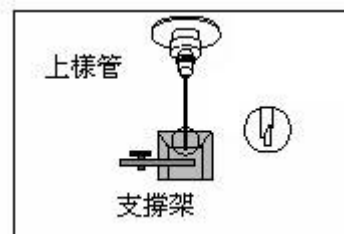
在主機左下方之儲液箱抽屜。可向前拉開，內含鞘液筒、廢液筒、鞘液過濾器 Sheath Filter，及空氣濾網 Air filter。請注意氣路減壓閥 VENT TOGGLE 之位置。



- 鞘液筒：位於抽屜左側，容積 4 升。裝滿鞘液筒，儀器可以運行大約 3 小時。筒上裝有液面感應器，鞘液用完時，儀器軟體上會有顯示。鞘液筒蓋上有金屬環扣，保證鞘液筒密閉。
- 廢液筒：位於抽屜右側，容積 4 升。筒上裝有液面感應器，鞘液用完時，儀器軟體上會有顯示。注意廢液可能有潛在的生物傳染性。
- 鞘液過濾器：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。
- 氣路減壓閥：沿箭頭方向移動閥門開關，鞘液筒減壓，氣壓恢復正常。在鞘液筒裝鞘液時，需要減壓。
- 空氣過濾網：用於過濾冷卻雷射的空氣。

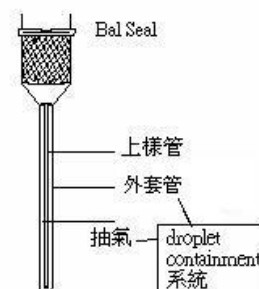
5. 上樣品區：

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 Sample Injection Tube，將樣本輸入流動室，還有就是支撐架 Tube Support Arm、和液滴存留系統 Droplet Containment System。



- 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：用於支撐樣本管、並負責啓動液滴存留系統。支撐架有三個位置：位於樣本管之下的中位，樣本管左側或右側。

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，真空幫浦就會啓動，將液體從外管吸入廢液筒內。上樣時，須注意將支撐架位於中位，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，使得進樣針可以反沖；切換到 STANDBY 模式前，確保液路已沖洗徹底以免碎片沈積到流動室中。



1.2 Macintosh 電腦與印表機：



準備您的細胞樣品

1. 理想樣品濃度調至 $1-10 \times 10^5$ cells/ml？一般實驗只需 0.5 ml 的樣品。
2. 細胞樣品務必放至 FALCON 2052 試管中，否則無法上機。
3. 上機前務必去除樣品中之細胞團塊，以防止管路堵塞？可使用附濾網 FALCON 試管 (Cat. No.2235) 或 $35-55 \mu\text{m}$ 的尼龍篩網。
4. 供流式分析的樣品是單細胞懸浮液，而且大部分樣品都需經螢光染色。表面抗原螢光染色的方法大致有兩種：直接免疫螢光、間接免疫螢光染色。本公司備有以下染色方法：

Lysed - No - Wash Procedure

Lysed - And - Wash Procedure, SimulTEST & HLA-B27

Peripheral Blood Mononuclear Cell Procedure

Leukemia and Lymphoma Procedure 1

Leukemia and Lymphoma Procedure 2, B-cell Clonality Assay

間接免疫螢光染色

滴定抗體濃度

常用試劑配製方法

如有上述實驗方法之需求，請 e-mail：daisy_kuo@bd.com 或 Kenny_liu@bd.com。

二、開機、關機標準操作

2.1 FACS Calibur 開機

1. 開啓細胞儀電源。
2. 開啓其他周邊配備電源，如印表機及MO機。
3. 開啓電腦。
4. 確認鞘流液筒有八分滿的FACS Flow，確實旋緊 (鞘液筒容量爲4L)。
5. 將廢液倒掉，並在廢液筒中加入200 ml 家用漂白水 (廢液筒容量爲4L)。
6. 將減壓閥方向調在加壓 (Pressurize) 位置。
7. 排除液流管路與過濾器中的氣泡。
8. 執行 PRIME 功能兩次。
9. 使用1ml PBS，HIGH RUN 兩分鐘。
10. 可開始分析樣品。

2.2 FACS Calibur 關機

關機前必要動作：清洗進樣管和外套管，防止進樣管堵塞、或有染料殘留。

1. 將樣品支持架左移，取 2 ml FACSClean (10%Bleach) 上樣品，讓儀器的真空系統抽取約 1 ml 的液體。
2. 將樣品支持架回正，按 HI RUN，然後讓 FACSClean 清洗管路10分鐘。
3. 按 Standby，執行 PRIME功能兩次。
4. 取 2 ml dH₂O，重覆上述步驟1-3。
5. 注意最後只留約 1 ml dH₂O 在試管中。
6. 按 STANDBY 五分鐘，使風扇冷卻雷射後，關閉細胞儀 (必要動作，以保護雷射光源。)
7. 倒掉廢液，並回填 200 ml漂白水。
8. 將減壓閥放在「VENT 漏氣」位置。將鞘流液筒充填至八分滿。
9. 退出軟體 “File” → “Quit” (如有對話選項，選擇 “Don't save”)。確認退出電腦中所有BD應用軟體，所有數據資料已儲存備份。
10. 關閉電腦。“Special” → “Shutdown”。

三、上機分析流程

建議首次試機避免進行大量試驗，僅需準備下列樣品。

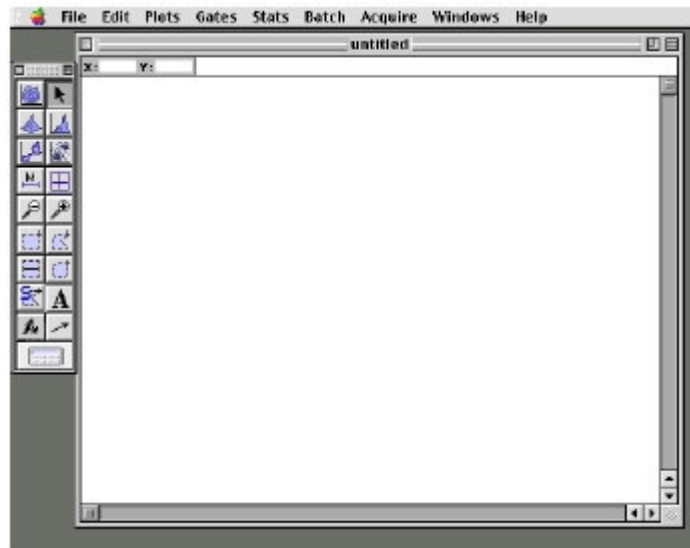
- (1) Auto-fluorescence Control (不加任何抗體)。
- (2) CD3-FITC (FL1 單染)。
- (3) CD19-PE (FL2 單染)。
- (4) CD3-FITC /CD19-PE (FL1/FL2 雙染)。

3.1 Calibur 開機

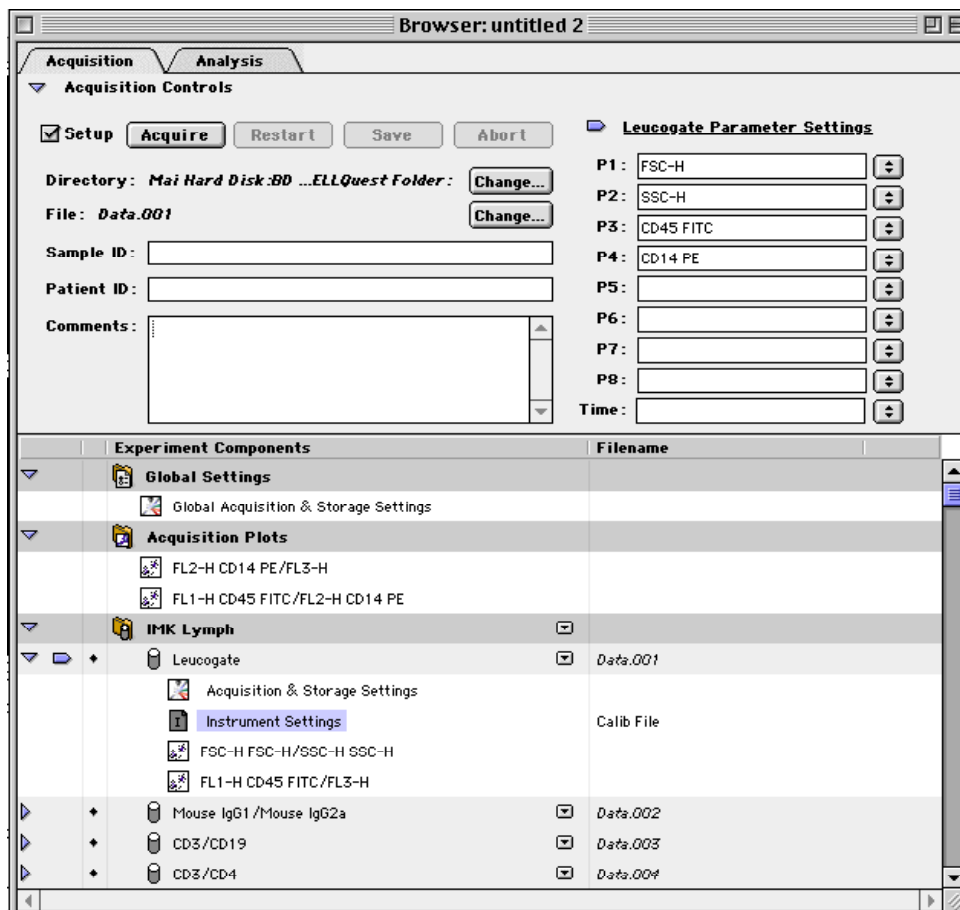
1. 先開啓細胞儀本體再打開電腦。*秘技 1：如順序相反，儀器和電腦之間無法建立正常通訊，無法執行“*connect to cytometer*”。解決之道，兩者都關機、然後以正確方式重開。
2. 向前拉開儲液箱抽屜，檢查鞘液筒、廢液筒水量，如需充填鞘液，將減壓閥方向調在 VENT 位置（箭頭方向）。儀器會對鞘流液筒打氣加壓，請確認筒蓋確實旋緊。
*秘技 2：將減壓閥方向調在加壓（向前）位置。減壓閥如在 VENT（箭頭方向）位置，按 RUN 功能鍵時將顯示橙黃色（表示儀器不正常，請檢查是否失壓），正常為綠色顯示。

3.2 開啓 CellQuest Pro 軟體、編輯實驗文件

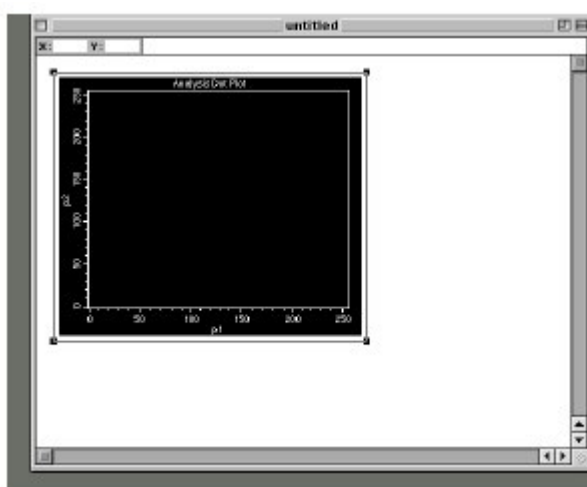
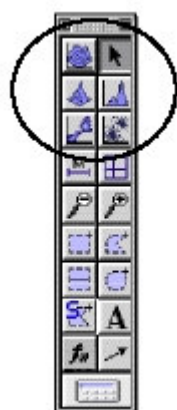
3. 在蘋果功能表下點擊 CELLQuest Pro 啓動軟體。桌面會出現一‘Untitled’ 實驗文件，可點擊實驗文件的右上角的放大鈕，將實驗文件視窗放大。



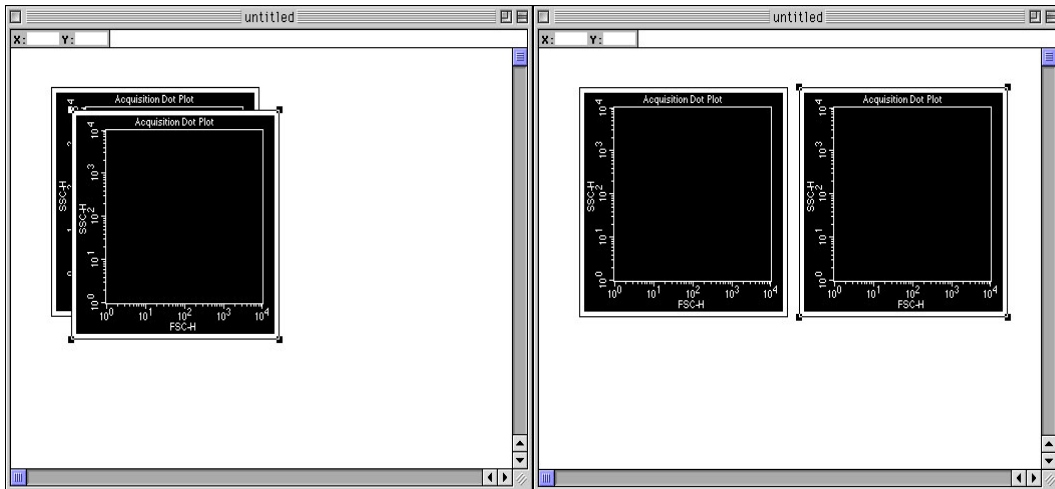
4. 從 Acquire 功能表中選擇 Connect to Cytometer，建立儀器和電腦之間通訊。此時會出現 Browser 方框。將之移至適當位置。



5. 從工具板中點擊散點圖圖示。在實驗文件的空白區點擊，拖曳對角線至適當大小，然後放開滑鼠。此時應可以在右方看到 Inspector : Dot Plot 對話框。



6. 從螢幕上方 **Edit** 功能表中選擇 **Duplicate** 功能，可複製一個同樣大小的散點圖，完成後可將重製圖移至原圖右方。

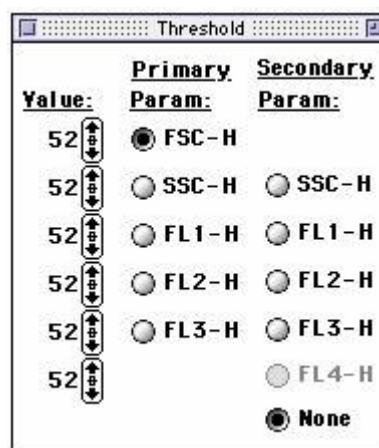
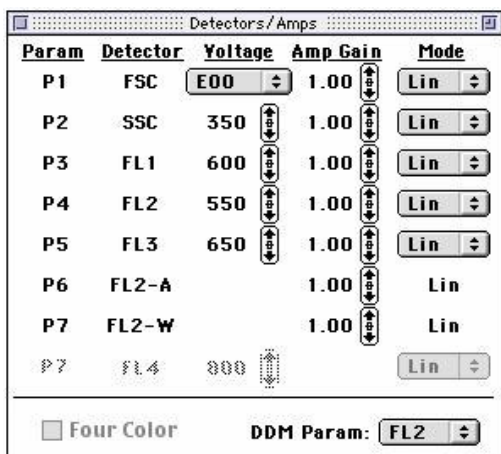


7. 從螢幕上方 **Edit** 功能表中選擇 **Select All** 功能，文件中所有圖譜的四角會出現黑色方塊，表示活化。可在出現之 **Inspector : 2 Objects** 方框中將 **Plot Type** 改成 **Acquisition**。
8. 因應實驗需求來修改所有圖譜中顯示之參數。第一圖 X 和 Y 軸參數分別設為 **FSC-H 1024**、**SSC-H 1024**；第二圖 X 和 Y 軸參數分別設為 **FL1-H 1024**、**FL2-H 1024**。修改動作為輕擊圖譜，並在出現之 **Inspector** 方框依需要選擇。

FSC：細胞大小
SSC：細胞折射率
FL1：FITC 綠色螢光
FL2：PE 橙色螢光
FL3：PerCP 紅色螢光

儀器設定文件

注意：實驗數據品質，取決於最適化儀器設定文件。儀器設定文件不能在數據收取後再更改，研究人員必須在第一次就使用正確的儀器設定文件。儀器設定文件（**Instrument settings**），含信號器高壓（**Detector/ Amps**），閾值（**Threshold**），螢光補償（**Compensation**）等儀器條件的組合。一般而言，儀器設定的順序為 **Detector/Amps -- Threshold -- Compensation**。



9. 從 Cytometer 功能表中選擇 Detectors/Amps。出現 Detectors/Amps 視窗，將其拖至空白區。
10. 在 Detectors/Amps 視窗確認 FSC 與 SSC 為 LIN（線性放大），其他參數 FL1、FL2、FL3 改選為 LOG（對數放大）。
11. 從 Cytometer 功能表中選擇 Threshold，出現 Threshold 視窗，將其拖至空白區。在 Threshold 視窗：確認 FSC 為設閾參數，初步確認預設閾值 52。

3.3 上樣品、設定儀器

12. 使儀器處於 High RUN，支撐架左移，上第一管陰性對照，支撐架回位。確認 Browser 視窗中 Setup 前需打勾 (即不儲存資料)，點擊 Acquire。

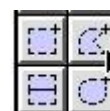
調節 FSC/SSC 探測器（電壓）

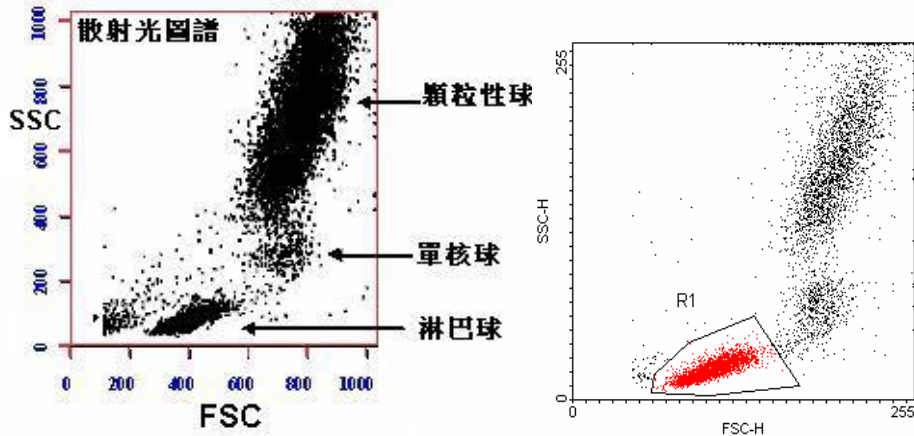
13. 觀察 FSC/SSC 圖的變化。FSC 電壓(Voltage)預設為 E00，可調節 Amp Gain 從 1.00—9.99 使主要細胞群得以清楚顯示（如細胞較大，將 FSC 電壓設置於 E-1；較小細胞，將 FSC 電壓設置於 E01）。調節 SSC 電壓使主要細胞群得以清楚呈現（調整 FSC/SSC 圖的原則，在於能得到一獨立離散的細胞族群，該細胞群不與其他族群、細胞碎片有重疊現象。）。

Gating 圈選

說明：細胞檢品中，常含有大小不同、性質相異的細胞群體。流式細胞分析的特色，在於可針對有意義的細胞群體，以圈選方式來選擇性顯示，並達到選擇性統計分析的目的。如以下圖例中，運用淋巴細胞 $FSC^{low} SSC^{low}$ 的特性來圈選該細胞族群。

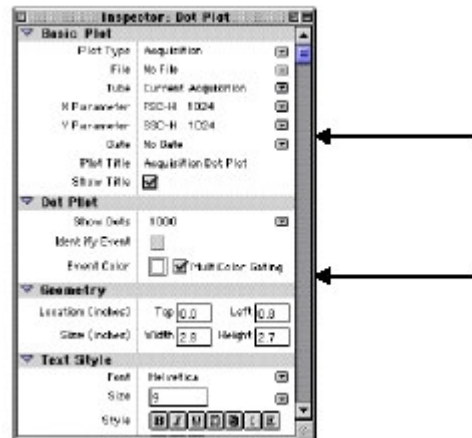
14. 在工具板中選擇多邊形的 Region。在 FSC/SSC 散點圖上劃定淋巴細胞 Region。如果要刪除 R1 區域，您可以在工具列中點選 Gates → Region list，以滑鼠點選 R1，再按 Delete 鍵刪除 R1 區域。刪除 R1 區域後，可用繪圖工具板，重畫 R1。





15. 在Inspector方框中點擊Multicolor Gating以使樣品收取時，門內細胞將出現預設彩色（在FSC/SSC散點圖上已設有一R1細胞區域，如上圖，區域內細胞應會呈現紅色，可移動或改變形狀來圈選有意義的細胞。）。

16. 輕擊以選取希望 Gate 的 FL1/FL2 散點圖，從 Inspector 方框中將 No Gate 改選成 G1=R1。



調節 FL1、FL2 的探測器（電壓）

17. 在 Detector/Amps 視窗中調節 FL1、FL2 的電壓，使 Negative Control 細胞群著落在所選直方圖或散點圖之 10^0 -- 10^1 處。

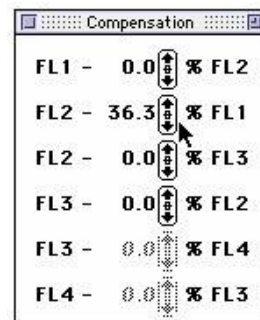
18. 在 Threshold 視窗，適當地提高 FSC 閾值 >52 ，以去除碎片或低階噪音。唯需注意不要切掉主要細胞族群。

19. 關閉 Detector/Amps 視窗，我們已設定好有意義細胞群之自體螢光。移去陰性對照管，點擊 Acquisition Control 視窗中的 Pause、Abort。

調節螢光補償

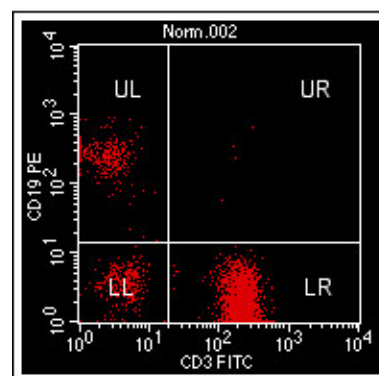
說明：最適化的最後一步是調節光譜重疊。（如是單色螢光實驗可跳過此步驟）如是 2 色樣本，必要時需調節 FL2-%FL1，FL1-%FL2（若 3 色樣本，必要時需調節 FL2-%FL1、FL1-%FL2、FL3-%FL2、FL2-%FL3 的補償）。

20. 從 Cytometer 功能表中選擇 Compensation，將所有數值皆歸零。High RUN，上單染 CD3-FITC 管。點擊 Browser 視窗中的 Acquire。調節 FL2-%FL1 使 FITC 陽性細胞在 FL1/FL2 散點圖的右下象限。補償調節可通過點擊↑↓來選擇或直接拖動滑標上下移動。調節完畢，點擊 Browser 視窗中的 Pause。



21. 移去此管，上單染 CD19-PE 管。點擊 Browser 視窗中的 Restart。調節 FL1-%FL2 使 PE+細胞在 FL1/FL2 散點圖的左上象限。調節完畢，點擊 Browser 視窗中的 Pause。

22. 最後以 CD3-FITC/CD19-PE 雙染樣本上機，點擊 Browser 視窗中的 Restart，確定三群細胞工整垂直。當您已完成 2 色螢光之最適化時，點擊 Browser 視窗中的 Pause、Abort。關閉 Detectors/Amps, Threshold, Compensation 視窗。

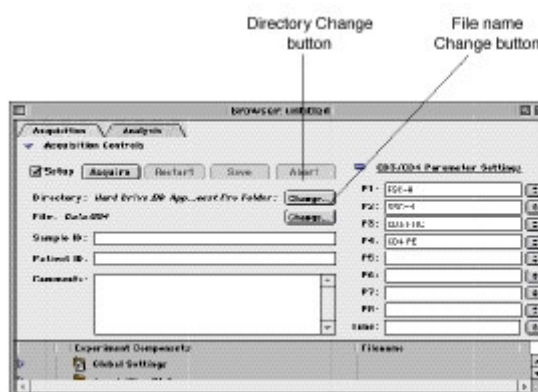


23. 移去樣本管，插上二次蒸水管，讓儀器暫且處於 Standby 狀態。

3.4 收集實驗數據

24. 在 Browser 方框中 Directory 處，點擊 Change 鈕，並依目錄表去找到自定的檔案匣 Your Folder，來預設檔案匣準備儲存數據。找到後，按 Select 'Your Folder'。

25. 在 Browser 方框中 File 處，點擊 Change 鈕，以修改檔案名稱。可在此命名即將儲存之檔案名稱。



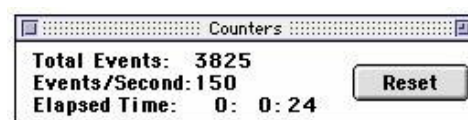
26. 在 Parameter Settings P1-P5 後的空格中選取或輸入所有參數名稱，使圖譜中各軸有其相對應的參數。輸入參數名會存入實驗檔案中，顯示在圖譜上。如 P1：Size, P2：Granularity, P3：CD3 FITC 等。

27. 輕擊 **Browser** 方框中之 **Global Settings** 前之三角形標記，並輕擊隨後出現之 **Acquisition & Storage Settings**，查看 **Inspector** 方框中之數據儲存條件是否正確。預設之「**Collection Criteria**」為10000，即儲存細胞總數。如需修改可在此將 **All** 改成 **G1**，並修改數字成5000，再按鍵盤上 **Return** 鍵確認。



計數器 Counters

28. 從螢幕上方 **Acquire** 功能表中選擇 **Counters**。視窗會顯示樣品分析速率、與總數進度。



收集實驗數據

29. 你可以開始收集實驗數據了。HIGH RUN，將第一管樣品放到檢測區，在 **Acquisition Control** 視窗中，將 **Setup** 改成 **Setup**，此時 **CellQuest Pro** 會自動顯示 **Your Folder:20021231.001** 為資料檔名。點擊“**Acquire**”便可啟動樣品之分析測定與資料儲存。當電腦成功地收取足夠數據，會自動儲存資料檔 **20021231.001**，並會以“嘟”聲告知，**CellQuest Pro** 會自動升冪附加檔名成 **20021231.002**。等待下一指示。
30. 你可以換上下一管樣品，點擊“**Acquire**”啟動樣品之分析測定與資料儲存。可繼續分析直到所有檢品都分析完畢。

3.5 實驗資料之儲存與備份：

31. 不建議長期使用硬碟儲存數據資料，可考慮以燒光碟（如配有 **CD-RW**）、口袋硬碟（**Flash Drive**）來備份大量實驗數據，以免佔用原有硬碟的記憶體，影響數據處理速度。可將備份後之數據，拿到另一蘋果電腦或個人 **PC** 進行離機分析。確認備份後請以滑鼠圈選欲刪除數據資料，將其拖拉至 **Trash** 垃圾筒。

3.6 退出軟體

32. 檢品分析完畢後用，記得從螢幕上方 **File** 指令欄選擇 **Save Document As**，儲存實驗文件，以備日後使用，不需每次重新編輯。



33. 從螢幕上方 **Cytometer** 指令欄，選擇 **Instrument Setting**，出現 **Instrument Setting** 視窗。點擊 **print** 列印此次實驗條件，可貼入實驗筆記留底，再點擊 **Save** 以儲存一實驗的儀條件，可日後再使用。點擊 **SAVE** 後會出現文件保存對話方框，選擇文件目錄及檔案名（例：**Your Folder : /Your Setting1**），點擊 **Save**。點擊 **Done**。



34. 用滑鼠從螢幕上方 **Acquire** 指令欄中，選取 **Disconnect to Cytometer** 以斷絕電腦與儀器間之連線。之後如不分析數據，您可退出軟體 **File** → **Quit** (遇有選項永遠選擇 **Don't save**)，進行關機程序。或接著分析已儲存的資料，列印圖表與報告。

管路清洗

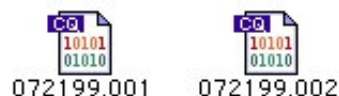
33. 以 2 ml 5% 漂白水取代樣品，將樣品架置於左位以外管吸除約 1 ml，再將樣品架置於中位 HI RUN 十分鐘。改用 2 ml DI water。重複上述程序，樣品架上留約 1 ml DI water。按 **STANDBY** 五分鐘。

關主機、關電腦

四、數據分析

FCS list mode 資料檔案

說明：FCS list mode 資料檔案是流式細胞儀的標準格式檔案（FCS2.0）。該文件含有從流式細胞儀收取的平均 10000 個細胞的資料，一般含有 4-6 參數。一般軟體無法打開 list mode 資料檔案，需藉助如 CellQuest Pro, WinList, 或 WinMDI 等 Flow Cytometry 分析軟體，才可開啓、繪圖、並進行分析統計。

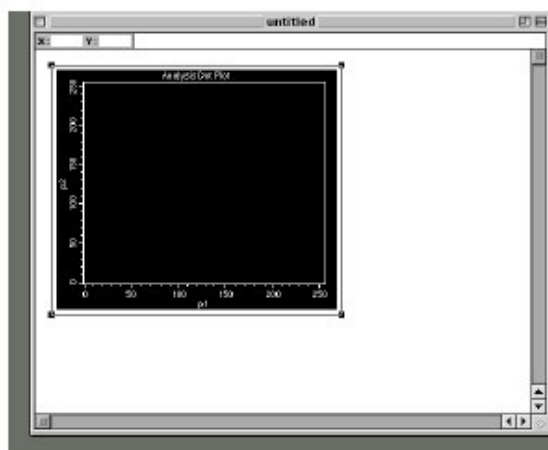
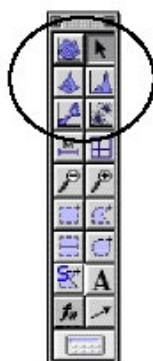


4.1 開啓— CellQuest 實驗文件

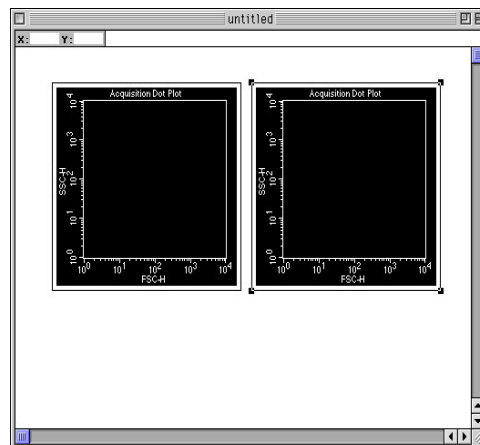
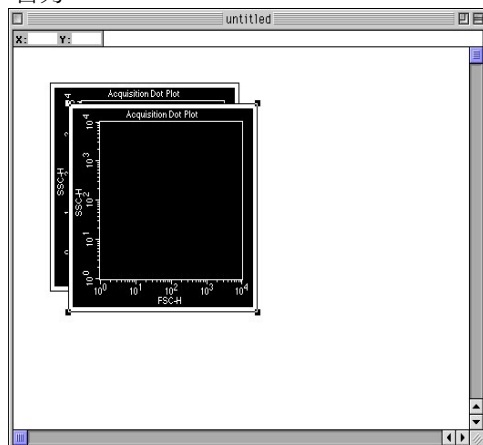
1. 從螢幕上方 File 功能表中選擇 New Document。桌面會出現一'Untitled' 實驗文件，可點擊實驗文件的右上角的放大鈕，將實驗文件視窗放大。

4.2 散點圖之統計分析（雙色）

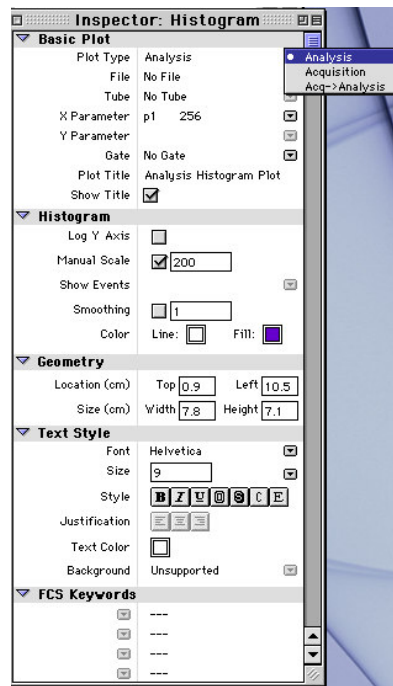
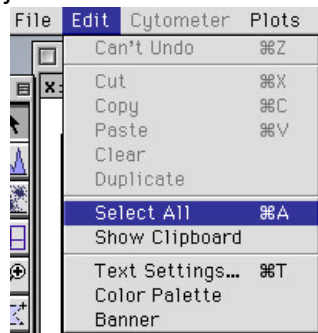
2. 從工具板中點擊散點圖圖示。在實驗文件的空白區點擊，然後拖動對角線至適當大小。Plot 拖曳完成後可以在右方看到對話框 Inspector : Dot Plot。



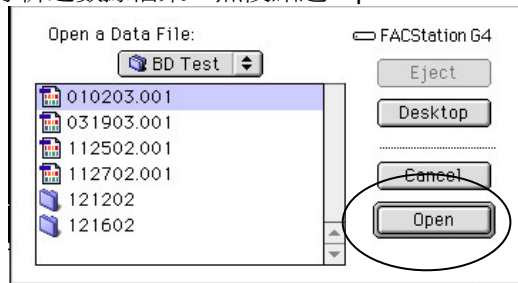
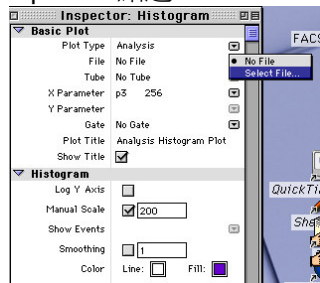
- 3 從 Edit 功能表中選擇 Duplicate 可複製一個同樣大小的散點圖，可將複製圖移至原圖右方。



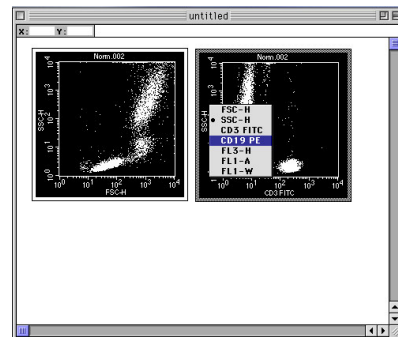
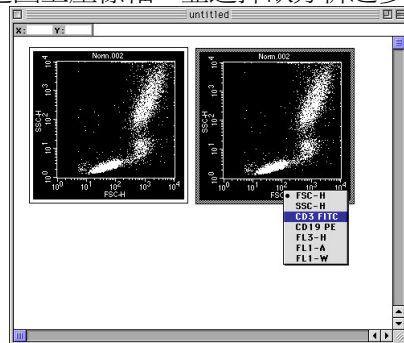
4. 從螢幕上方 Edit 功能表中選擇 Select All 功能，文件中所有圖譜的四角會出現黑色方塊，表示被選擇上。可在出現之 Inspector : 2 Objects 方框中將 Plot Type 改成 Analysis。



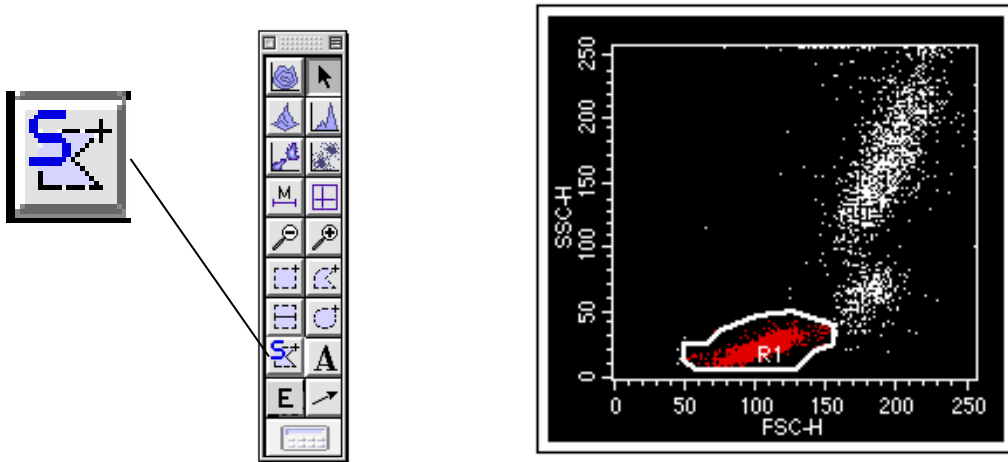
6. 從 Inspector 點選 Select File，並選擇欲分析之數據檔案，然後點選 Open。



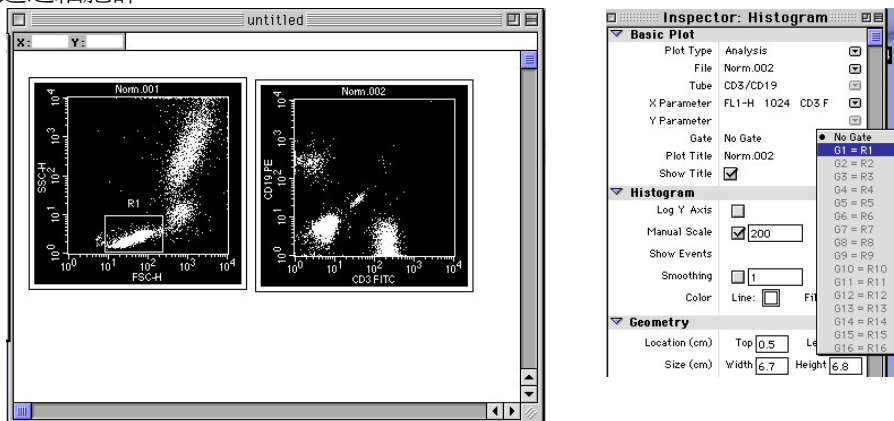
7. 點選圖上座標軸，並選擇欲分析之參數。



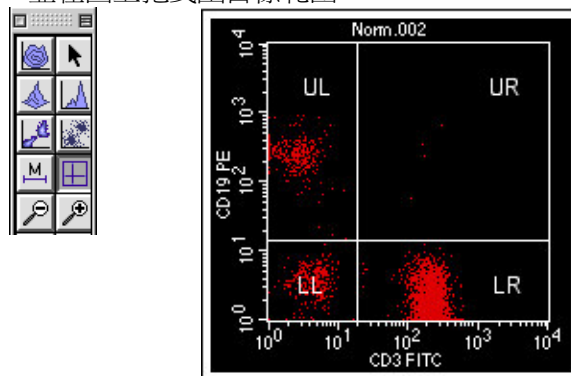
8. 點選 FSC vs SSC 圖，並在該圖 Inspector 方框中點擊 Multicolor Gating。按一下 Snap-To-Region 工具，並從 FSC vs SSC 圖中點選目標細胞群，軟體會自動圈定 R1 目標細胞群，如下圖，區域內細胞應會呈現紅色。)



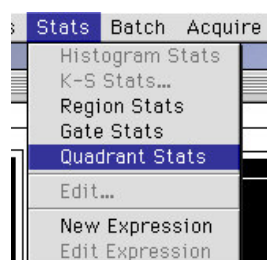
9. 點選 FL1 vs FL2 圖，並從 Inspector 中點選 Gate 選擇 G1=R1 使得該圖僅出現 R1 圈選之細胞群。



10. 點選 Quadrant 工具，並在圖上拖曳出目標範圍。



11. 從螢幕上方 **Stats** 功能表中選擇 **Quadrant Stats**, 可以得到該圖之四象限統計結果。



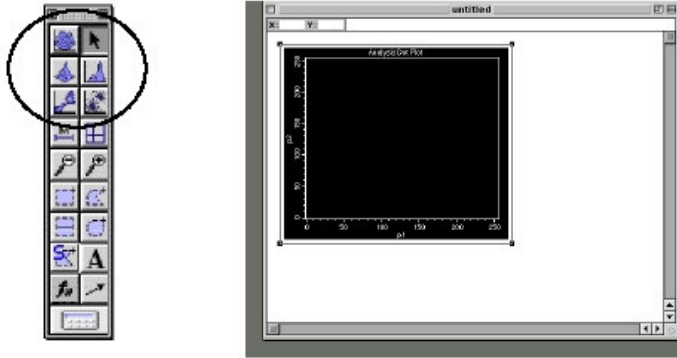
Quadrant Statistics							
File: Norm.002	Log Data Units: Linear Values						
Sample ID: Sample 1	Patient ID:						
Tube: CD3/CD19	Panel: 2 Color Panel						
Acquisition Date: 08-Sep-00	Gate: G1						
Gated Events: 2861	Total Events: 6000						
X Parameter: CD3 FITC (Log)	Y Parameter: CD19 PE (Log)						
Quad Location: 13, 12							
Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	296	10.35	4.93	2.77	2.42	274.28	244.26
UR	7	0.24	0.12	180.18	168.05	192.17	72.99
LL	294	10.28	4.90	4.65	4.30	3.92	3.58
LR	2264	79.13	37.73	227.32	215.13	2.18	1.81

列印報告、輸出統計數值

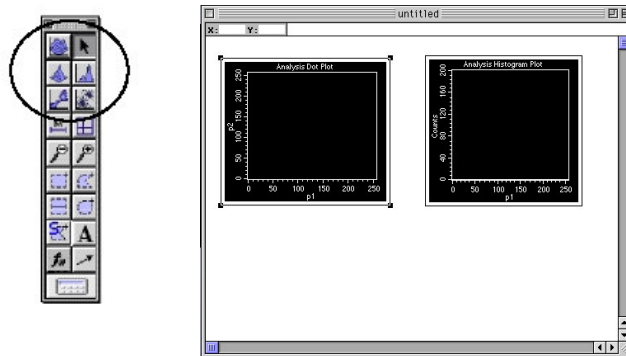
12. 從螢幕上方 **File** 功能表中選擇 **Print One**, 可以列印工作中實驗文件。
13. 點選四象限統計表, 從螢幕上方 **File** 功能表中選擇 **Export Statistics** 可輸出統計數值至 **Excel** 檔案。
14. 分析其他資料檔: 對於存在同一檔案匣之系列檔案, 可在從螢幕上方 **Edit** 功能表中選擇 **Select All** 以選取所有圖譜後, 從 **Plots** 指令欄中選擇 **Next Data File**, 軟體會自動以新檔案來替換現有檔案, 您只要確認圈選範圍、與 **Quadrant Marker** 的位置是否恰當, 即可列印報告、或輸出統計數值。
15. 如您所見, 在設定好一個分析用實驗文件之後 (內含散點圖、圈選區格、四象限分界、以及統計報告), 分析其他資料檔便輕而易舉。我們建議您將新的分析用實驗文件另存新檔 **File – Save Document As**, 以備後需。

4.3 直方圖之統計分析（單色）

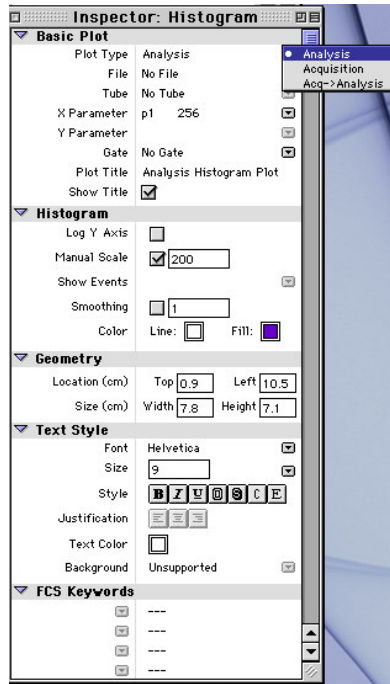
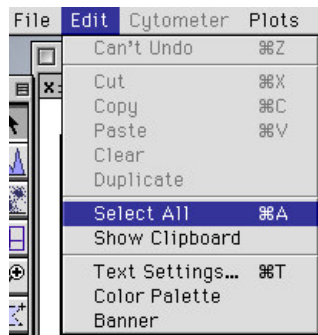
1. 從螢幕上方 File 功能表中選擇 New Document。桌面會出現一'Untitled' 實驗文件，可點擊實驗文件的右上角的放大鈕，將實驗文件視窗放大。
2. 從工具板中點擊散點圖圖示。在實驗文件的空白區點擊，然後拖曳對角線至適當大小。Plot 完成後可以在右方看到對話框 Inspector : Dotplot。



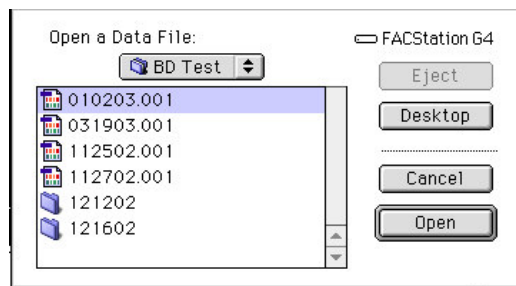
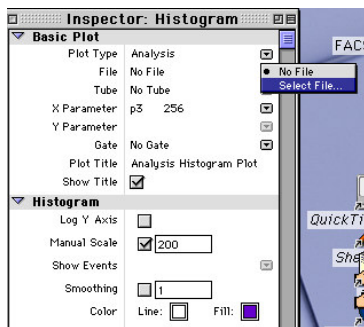
3. 從工具板中點擊“直方圖”圖示。在實驗文件的空白區點擊，然後拖動對角線至適當大小。Plot 完成後可以在右方看到對話框 Inspector : Histogram。



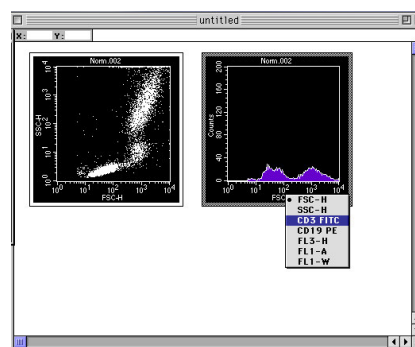
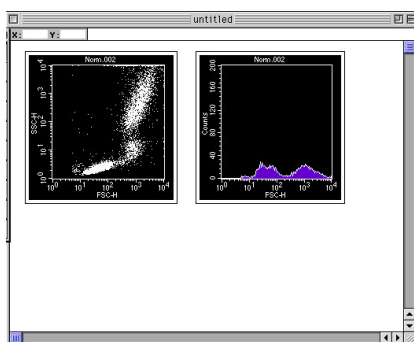
4. 從螢幕上方 Edit 功能表中選擇 Select All 功能，文件中所有圖譜的四角會出現黑色方塊，表示被選擇上。可在出現之 Inspector : 2 Objects 方框中將 Plot Type 改成 Analysis。



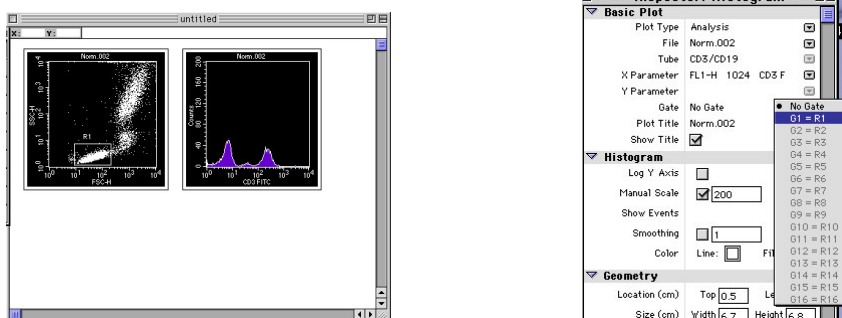
5. 從 Inspector 方框點選 Select File。選擇欲分析之數據檔案然後點選 Open。



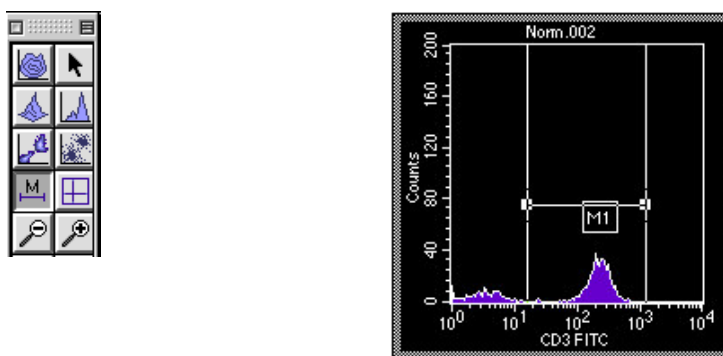
6. 點選圖上座標軸，並選擇欲分析之變數。



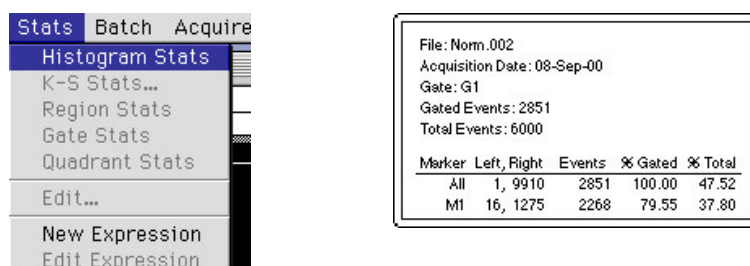
7. 點選 FSC vs SSC 圖，並在該圖 Inspector 方框中點擊 Multicolor Gating。按一下 Snap-To-Region 工具，並從 FSC vs SSC 圖中點選目標細胞群，軟體會自動圈定 R1 目標細胞群，如下圖，區域內細胞應會呈現紅色。）。然後點選 FL2 直方圖，並從 Inspector 中點選 Gate 選擇 G1=R1，使得該圖僅出現 R1 圈選之細胞群。



8. 點選 Mark，並在圖上拖曳出目標範圍。



9. 由螢幕上方 Stats 功能表中點選 Histogram Stats。

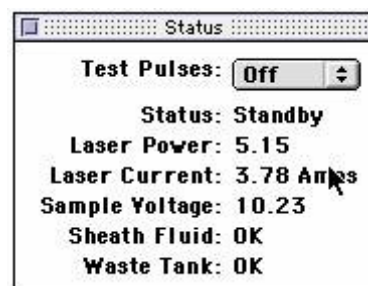


10. 列印報告、輸出統計數值 (請參考 Section 4.2 Step12-15)

五、錯誤信號、疑難排除

5.1 儀器狀態 (Status) :

在 CELLQuest 功能表位於 Cytometer 功能表中。
用來在收取的任何時候查看流式細胞儀的運行狀態，以利解決儀器運行中出現的問題。



狀態：顯示儀器運行模式

Not Ready：雷射器正在預熱、鞘液桶空、廢液桶滿。

Ready：樣本管放置在進樣區，且支撐臂位於中位，樣本管加壓，儀器在 RUN 狀態。

Standby：儀器在 Standby 狀態、或儀器在 Run 狀態而無樣本管在進樣區上、或支撐架位於側位、或樣本管未完全加壓。Standby 時儀器的雷射電源降低。

5.2 常見故障排除程序

5.2.1 樣品試管上不去

- 誤用不適合的試管。(請用 Falcon 2052)
- 試管支持架需調整。旋轉調整試管支持架(順時鐘向下、逆時鐘向上)。
- Bal Seal 磨損。(汰換 Bal seal)

5.2.2 儀器處於 NOT READY 狀況

檢查以下情況：

- 鞘液筒中的鞘液是否用完。
- 廢液筒中的廢液是否已裝滿。
- 開機需要 5 分鐘時間預熱。
- 鞘液筒的液面檢測器連接是否鬆動、或未連接。

5.2.3 儀器處於 STANDBY 狀況 (儀器失壓)

如果儀器未加壓，上樣管放好後，雖然控制面板處於 RUN 模式，但儀器仍未能達到 READY 狀況，此時儀器仍處於 STANDBY 狀況。這可能是由於鞘液筒蓋漏氣、壓力閥未加壓，樣本管不能被加壓等原因造成的壓力問題。此時，樣本不能良好地進入流動室，無法檢測。

此時，檢查以下情況：

- 壓力閥未加壓。
- 鞘液筒是否漏氣（蓋緊鞘液筒蓋）。
- 樣本管是否有破損。
- 上樣針上的 **Bal seal** 是否已磨損。
- 鞘液筒上的藍色接頭是否連接好。

5.2.4 儀器噪音過大

鞘液過濾器中有氣泡，儀器記錄了氣泡產生的信號，造成了雜訊數據的干擾。氣泡還可以改變樣本流，造成檢測結果不理想；此時，儀器需要做 **PRIME**，排除液路中的氣泡干擾。如果鞘液筒吸乾了，應該重新裝滿鞘液，先用加入蒸餾水的上樣管中 **RUN 5-10** 分鐘，待鞘液流中的氣泡排除之後，再進行樣本測定。

5.2.5 電腦螢幕上見不到細胞顯示

檢查以下情況：

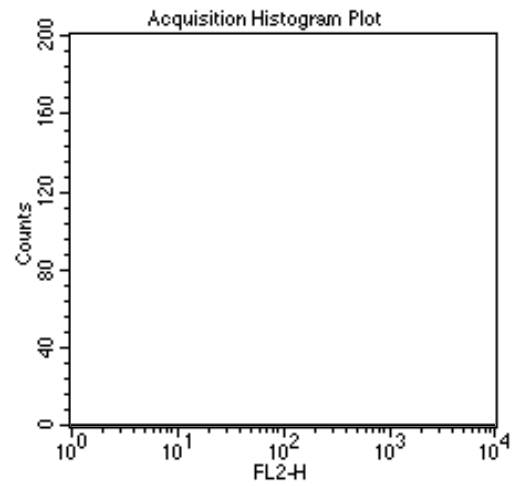
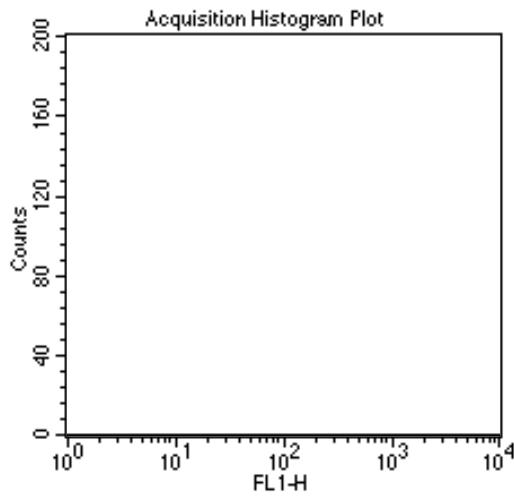
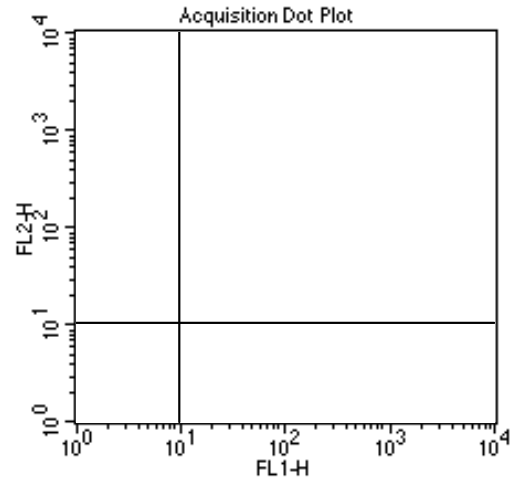
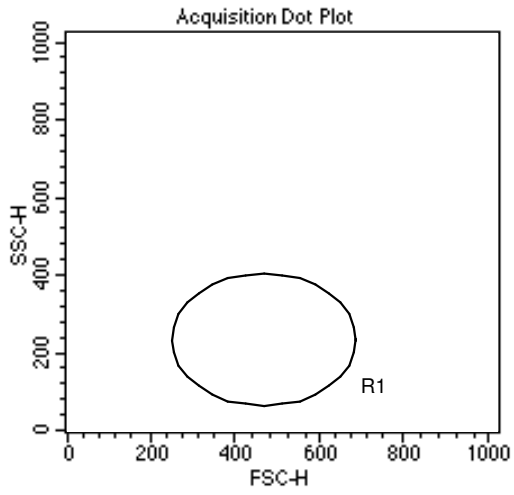
- 如果儀器一直處於 **STANDBY** 狀態，則檢查 **System Status**。
- 如果 **STATUS** 窗日顯示 **READY**，則檢查樣本管中細胞濃度是否夠，上樣前是否混勻了。
- 檢查實驗的 **Instrument Settings** 是否正確。
- 檢查閾值是否設置過高，導致無法檢測目標細胞群。
- 檢查 **CELLQuest** 軟體 **Cytometer** 目錄下的 **Status** 視窗，是否已被更新。如果未更新，說明儀器與電腦之間的通訊發生了故障，此時，應關閉電腦和 **FACSCalibur**，重新打開儀器，繼續實驗。
- **PRIME** 儀器液流，去除流動室中可能存在的氣泡。若流動室中存在氣泡，可能使樣本流的位置偏離雷射光束，導致無細胞信號。

5.2.6 加樣針有鞘液反流

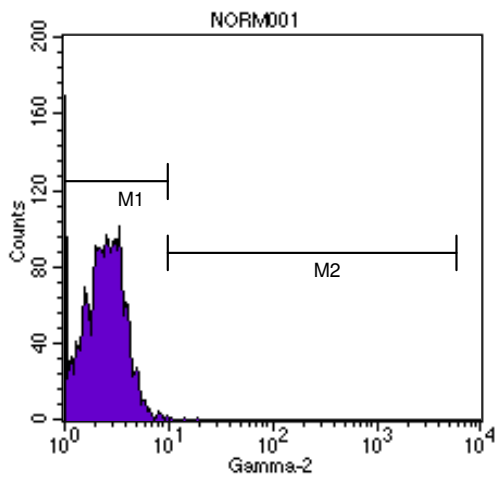
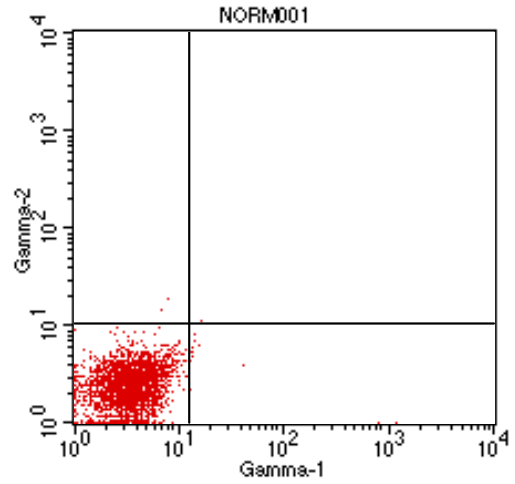
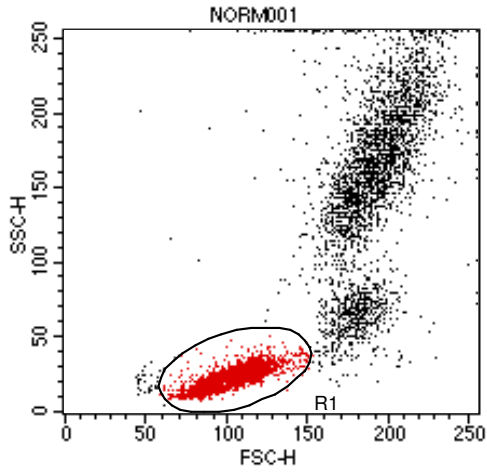
檢查以下情況：

- 檢查上樣針外管是否安好，可以將外管旋下，向上推動，重新擰緊。
- 更換上樣針上部的 **O** 型膠環。
- 檢查液流保存系統的真空幫浦是否工作。如果樣本管支撐架位於旁位時，听不到真空幫浦的工作聲音，可能是真空幫浦停了，關閉 **FACSCalibur**，再打開，如果馬達仍然不動，請致電 **BD** 客戶服務部門尋求幫助。

實驗文件 1 : 2 Color ACQ



實驗文件 2 : 2 Color ANA



File: NORM001
 Gate: G1
 Gated Events: 2916
 Total Events: 6000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	2	0.07	0.03
UR	1	0.03	0.02
LL	2903	99.55	48.38
LR	10	0.34	0.17

File: NORM001
 Gate: G1
 Gated Events: 2916
 Total Events: 6000

Marker	Events	% Gated	% Total
All	2916	100.00	48.60
M1	2913	99.90	48.55
M2	3	0.10	0.05

表一、常用螢光染劑

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
	Phycoerythrin-R, PE	495	578
	Peridinin-chlorophyll, PerCP	490	677
	Cy-Chrome	495	670
	PE-Texas Red	495	620
	PE-Cyanine 5	495	670
	Allophycocyanine	650	660
核酸含量分析	Ethidium Bromide	510 (+ds DNA)	595
	Propidium Iodide	536 (+ds DNA)	623
	Acridine Orange	480 (+ DNA)	520
		440-70 (+ RNA)	650
	Thiazole Orange	509 (+ RNA)	533
Pyronine Y	560-562 (+ds RNA) 497 (+ss RNA)	565-574 563	
細胞 Viability	Propidium Iodide	536	623
	YOPRO-1	480	515
	Acridine Orange	480	520
	7-AAD	488	670
細胞膜電位	DiO-C6 (3)	485	510
Mitochondrial 膜電位	Rhodamine 123	485	546
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
	Calcium Green-1	488	530
	Fura Red	488	660
H2O2 sensitive	Dihydrorhodamine 123	505	534
	DCFH-DA	505	535
O2- radical sensitive	Hydroethidine	505	600
Esterase sensitive	Fluorescein -DA	495	525

表二、典型的儀器設定

	Single Color		Two Color	Three Color
	FITC	PE	FITC/ PE	FITC/ PE/ PerCP
Threshold	FSC	FSC	FSC	FSC
Value	52	52	52	52
FSC Voltage	E00 (Lin)	E00 (Lin)	E00 (Lin)	E00 (Lin)
SSC Voltage	350 (Lin)	350 (Lin)	350 (Lin)	350 (Lin)
FL1 Voltage	600 (Log)	-	600 (Log)	600 (Log)
FL2 Voltage	-	540 (Log)	540 (Log)	540 (Log)
FL3 Voltage	-			650 (Log)
FL1 – % FL2	0.0 %	0.0 %	0.7 %	0.7 %
FL2 – % FL1	0.0 %	0.0 %	25.0 %	25.0 %
FL2 – % FL3	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %
FL3 – % FL2	0.0 %	0.0 %	0.0 %	17.0 %

表三、需定期更換耗材

需定期更換耗材	更換時機	BD目錄號
Falcon 2052 試管	上機專用試管。	Falcon 2052
Falcon 2235 試管	附濾網FALCON試管，上機前去除樣品中之細胞團塊，防止管路堵塞。	Falcon 2235
FACS Flow	上機用平衡緩衝液。體積 20公升。	342003
FACS Clean	專為細胞儀日常清潔設計。體積 5 公升。	340345
FACS Rinse	專為細胞儀日常除污設計。體積 5 公升。	340346
Mesh Filter	以尼龍篩網去除樣品中之細胞團塊，防止管路堵塞。	Hydro-Bios 55 μ m