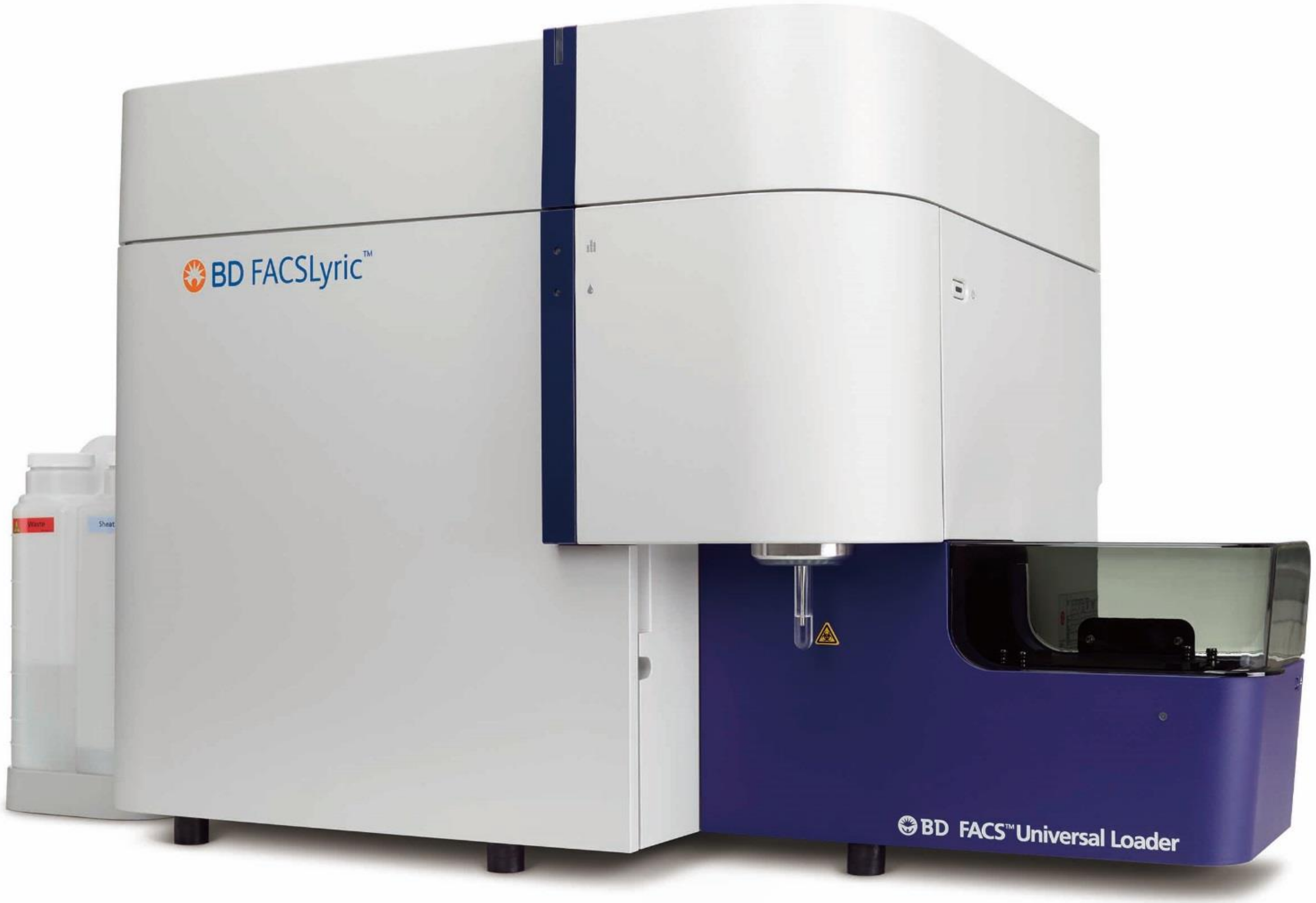


BD FACSLyric™ フローサイトメーター
簡易マニュアル Ver.1.0

BD FACSuite™ software version 1.3

BD Lifescience – Biosciences

機器シリアル番号：______________________________

BD FACS Lyric 使用上の注意

1. サンプルは測定直前にメッシュを通してください。

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

2. サンプルは測定直前によく攪拌してください。

これも前項と同じく、流路のつまりを防止するために必須の作業です。サンプルがチューブの底に沈殿した状態でサンプルを流すと、大量の細胞が一度に流路内に入るため詰まりを引き起こします。

3. 測定データはその都度持ち帰る。

データを HD に放置しておくことは、データ保全の問題のみならず、機器の正常作動にも影響を及ぼします。
測定データはすぐに外部メディアにバックアップを取り、ソフト上から Delete してください。
また、外部保存メディアをご使用の際は、必ずウイルスセキュリティーソフトでウイルス感染のないことを確認した上で接続してください。

4. 機器洗浄を徹底する。

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

サンプル調製法、試薬、機器操作に関するお問い合わせは ：0120-4890-77（平日 9 時～17 時）

機器の故障、トラブル発生時は ：0120-7099-12（平日 9 時～18 時）
上記電話にてオペレーターが対応いたします。

サンプル調製法、試薬、機器操作に関するメールでのご質問は tech_cell@bd.com で承っております。

BD FACSLyric™ フローサイトメーターシステム簡易取り扱いガイド

Section 1：スタートアップ

＜機器および PC の起動＞

① 溶液タンクを確認します。シース液の補充、廃液の廃棄は本体電源を入れる前に行ってください

② ユニバーサルローダー搭載機の場合はローダーのカバーが閉まっていることを確認します。

③ 本体右側面部の電源ボタンを ON にします(ボタン表示： オレンジ→グリーン)。
数分後、本体右上のインジケーターが黄色に点滅を始めます。

④ PC 電源を入れます。

⑤ Windows10 の場合：User name は「**BDAdmin**」Password:は「**BDIS#1$$**」。
Windows7 の場合:ユーザーアカウント"Admin"を選択し、Password は「**BDIS#1**」。

⑥ BD FACSuite Software のアイコンをダブルクリックします。ソフト立ち上げ確認のメッセージは Yes をクリックします。

⑦ ログイン画面で User ID と Password を入力し、OK を押します。
「User ID: **BDAdministrator**, Password: **bdadministrator**」

⑧ ウインドウの左下が"Connected "と表示されていることを確認します。

⑨ ウインドウの右下の"Remaining Laser Warmup Time"のカウントが 0 になるまで待ちます。

＊ FACSLyric は本体電源投入後、20 分間のレーザーウォームアップのためのカウントを行います。
この間、精度管理やサンプル測定を行うことができませんのでご注意ください。
残り時間は FACSuite の画面下部"Remaining Laser Warmup Time"に表示されます。

＜流路系の気泡除去＞

⑩ Cytometer メニュー＞Fluidics より Purge Sheath Filter を実行します。この時、本体左側面のドアを開き、シースフィルターに気泡が残っていないか確認します。もし残っている場合は本操作を繰り返します。

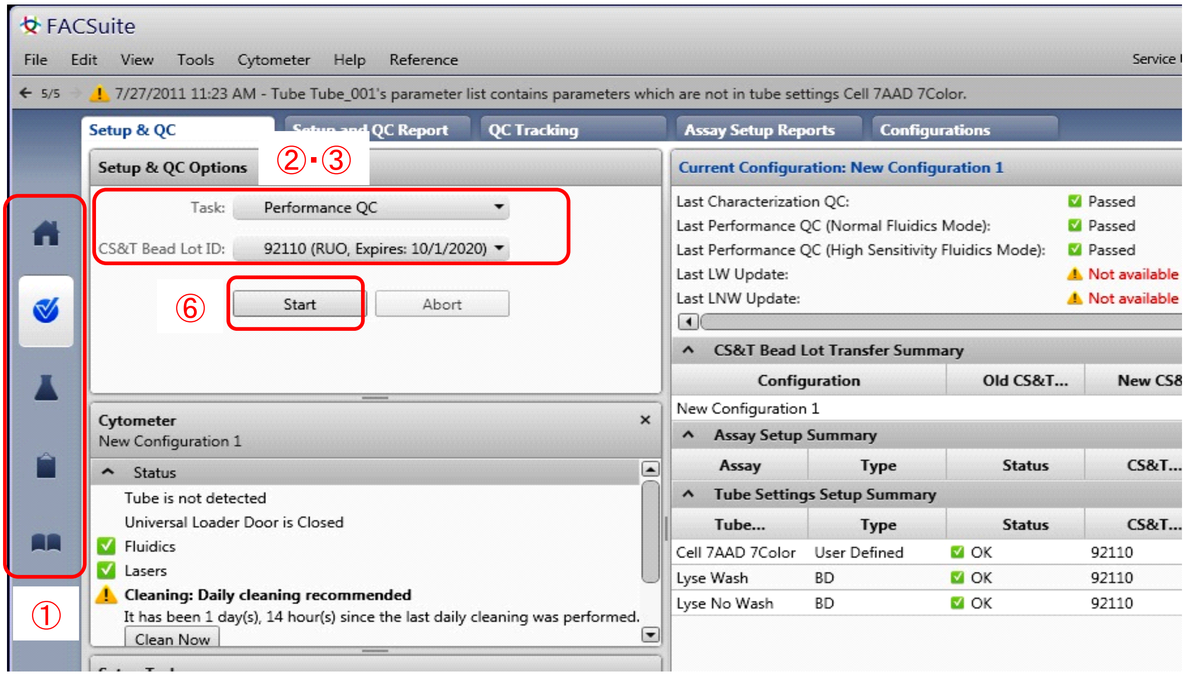
⑪ 本体右下部分より 5mL チューブを取り外します。

⑫ Cytometer メニュー＞Fluidics より SIT Flush を実行します。

⑬ 本体右下部分のチューブポートに 2mL DW を入れた 5mL チューブを取り付けます。

⑭ Cytometer メニュー＞Fluidics より Drain and Fill Flow Cell を実行します。

Section 2：精度管理（Performance QC の実行）



① Navigation Bar（画面左）より上から二番目の Setup & QC を選択します。

② 画面左上のウインドウの Task より Performance QC を選択します。

③ CS&T Beads Lot ID の設定が正しく選択されているか確認します。（ビーズボトルに記載されている ID）

④ 5mL の測定チューブに FACSFlow 0.5mL を分注し、CS&T Beads 2 滴を加えます。
＊ビーズボトルは使用直前に 10 秒間ボルテックスしてよく攪拌してください。
＊希釈後のビーズは暗所で保管し、2-8℃で 24 時間、室温で 8 時間以内に使用ください。

⑤ 希釈したビーズ溶液を機器にセットします。

⑥ Start ボタン（オレンジ）をクリックし、続くメッセージで Continue を選択し、Performance QC を実行します（約 7 分間）。Setup Tasks のすべての項目にレが表示されると終了です。

⑦ Performance QC が終了すると結果レポートの表示についてメッセージが出るので、Yes を選択します。

レポートは毎回 Normal Fluidics Mode と High Sensitivity Mode の 2 通作成されます。

表示画面のリストの、Status で Passed と表示されていれば問題ありません。
＊Failed の場合は、流路の再確認（Section 1 の⑩以降）、ビーズの再調製、フローセルの洗浄（Clean Cuvette，詳細は下記および BD FACSLyric Training Manual 参照）を行ってください。

⑧ CS&T ビーズのチューブを外します（自動的に SIT の洗浄が行われます）。

⑨ 乾燥防止のため 2mL 程度の DW を入れた 5mL チューブをセットします。

CST が Fail した場合の洗浄方法：**<Clean Cuvette>**

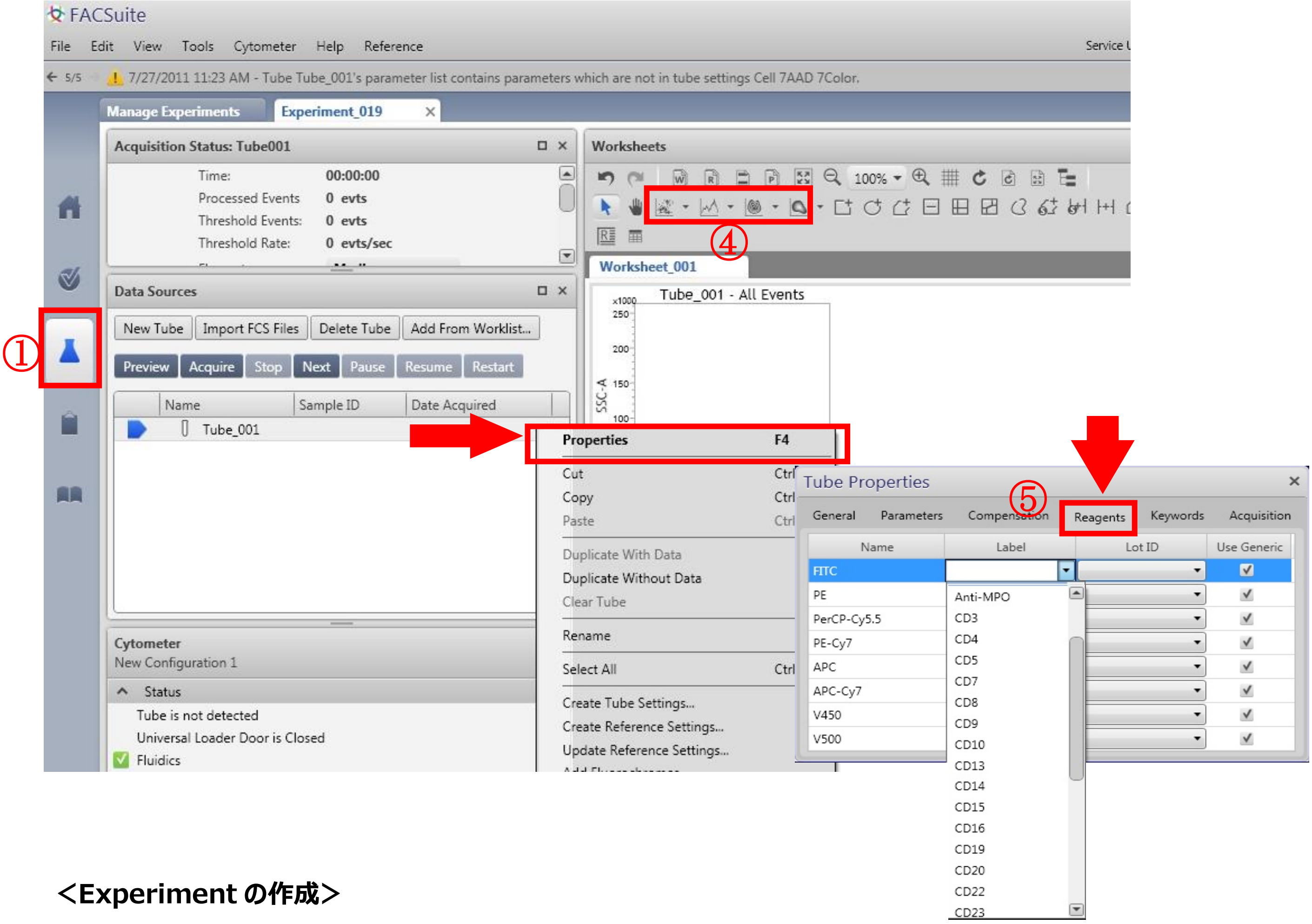
① Cytometer メニュー＞ Fluidics より Clean Cuvette を選択します。

② FACSClean 2mL を入れたチューブを SIT にセットします。

③ 表示されているゲージが 100%になったあと、5 分間漬け置き洗いします。

④ DW 3mL を入れたチューブをセットし、Cytometer メニュー＞ Fluidics より Drain and Fill Flow Cell を 2 回以上実施します。

Section 3：サンプル測定



<Experiment の作成>

① Navigation Bar より上から三番目の Experiment を選択します（画面が切り替わります）。

② データを管理するフォルダーを作成します。適切な階層のフォルダーを右クリック> New Folder より新しく作成します。フォルダーを右クリック> Rename より適切な名前に変更します。

③ 新しく作成したフォルダーを選択し、右クリック> New Experiment より新しい Experiment を作成します（画面が切り替わります）。File メニュー> Rename より、新しい Experiment の名前を変更します。

<Experiment の設定>

④ プロットの作成：

Worksheet ウインドウ上部のプロットボタンより作成したいプロットの種類を選択し、ワークシート上にプロットを作成します。プロットを複製する場合はプロットを右クリック> Duplicate を選択します。

プロット上のパラメーターを右クリックし、表示したい測定パラメーター名に変更します。

⑤ マーカー名の追加：

Data Sources ウインドウの Tube_001 の右クリック> Properties の Reagents タブを選択し、各色素のマーカー名を入力します。＊データ保存後に変更することはできません。

<測定・感度調整>

⑥ 流速・表示の設定：

Acquisition Status ウインドウより Flow Rate、Event to Display, Number of SIT Flushes を設定します。

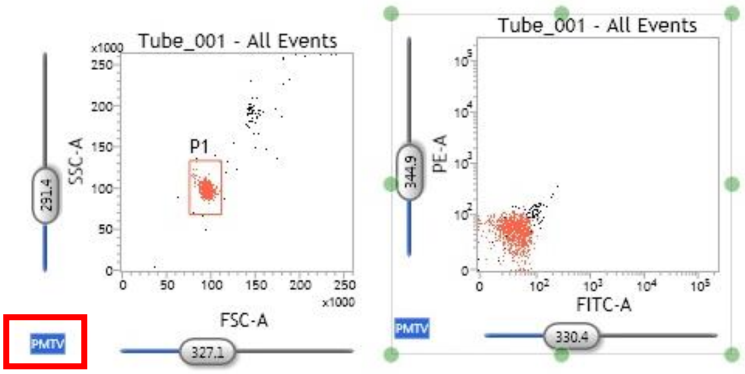
・Flow Rate: High=120 μL/min、 Med=60 μL/min、 Low=12 μL/min、

High Sensitivity=50 μL/min

⑦ 感度（PMTVoltage）調整：

測定したいサンプルを機器にセットし、細胞データがプロット内に表示されるよう確認および調整します。
測定開始: Data Sources ウインドウの Preview ボタン
測定停止: Data Sources ウインドウの Stop ボタン
（チューブを外すと SIT Flush が開始されます、動作が終了してから次のサンプルをセットしてください）

- 測定感度の変更が必要な場合は、Preview しながらプロットの PMTV ボタンをクリックし、表示されたスライダーから測定感度を調整します。
- FSC-SSC プロットにてデブリやノイズが大量に表示される場合は、Cytometer ウインドウの PMT Voltage のリストより、FSC（場合によっては SSC）の Threshold の値を上げてください。



⑧ 蛍光補正の確認：

もし蛍光補正値の変更を行いたい場合は、Data Sources ウインドウの Tube を右クリック> Properties の Spillover Values タブより適切な箇所の数値を調整してください。＊データ保存後でも調整可能です。

<データの保存>

⑨ 保存個数の設定：

データ記録開始の前に、Tube アイコン右クリック> Properties の Acquisition タブでデータの保存個数等の条件を設定します。Create Acquisition Criteria にて対象ゲート・データ保存個数を変更し、Add Criteria ボタンをクリックします。その後 Combine Gate Criteria and Apply Rule より適用したい条件をクリックし、Apply Rule ボタンをクリックします。

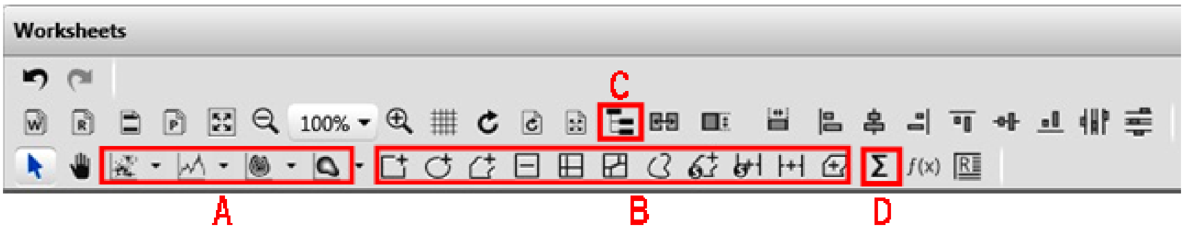
⑩ チューブ名の変更:

保存するチューブを右クリック→Rename で名称を変更します。＊データ保存後では変更できません

⑪ 全ての設定が終わったら、サンプルを“Preview”で流し、サンプルパターンを確認したら”Acquire”ボタンよりデータの保存を開始します。

⑫ 同じ測定条件でサンプル測定を続ける場合、Data Sources ウインドウの Next ボタンをクリックし、新しい Tube を作成します。以降同じ操作を繰り返します。

Section 4：データの解析



<Worksheet ツールバー>

A: プロット

作りたい種類のボタンを ON にして、ワークシート上をクリックまたはドラッグします。ドットプロット、ヒストグラム、等高線プロット、デンシティプロットなどがあります。

B: ゲート/ポピュレーション

作りたい種類のボタンをONにし、プロット上をクリックまたはドラッグしてください。マニュアルゲート、オートゲート、4分割ゲートなどがあります。

C: データ階層性管理

ボタンをクリックすると、Gate Hierarchy ウインドウが表示されます。階層上のゲートの Properties よりドットや線の色、ゲートの名称、表示設定を変更できます。

D：統計情報の表示

ボタンをクリックしてからワークシート上をクリックすると、統計情報が表示されます。表示内容を変更する場合は、右クリック> Edit Population または Edit Statistics より変更します。

表示ポピュレーションを選択する場合は Edit Population、表示パラメーターや統計情報の種類を選択する場合は Edit Statistics を選択してください。

<Plot Editor> ＊ プロットの右クリック> Properties から呼び出します

・General タブ

Run Pointer: ON の状態では表示データを Run Pointer で選択したものにします。

特定のデータで表示したい場合は OFF にして Tube のリストから表示したいデータを選択します。

Parent Population: 表示ポピュレーションを指定できます。表示したいもののチェックを ON にします。

・Parameter タブ

データの表示スケールを Linear / Log / BiExponential より選択できます。

・Overlay タブ（ヒストグラム、ドットプロットのみ表示）

複数の測定データの重ね書きを表示することができます。重ね合わせたい測定データ、ポピュレーション、ドットや線の色を編集します。

<蛍光補正:Compensation>

Data Sources ウインドウの Tube を右クリック> Properties の Spillover Values タブにて蛍光補正を手動で調整できます。

Section 5：測定条件の登録

FACSuite では、用途に応じて 3 種類のデータ測定条件の登録を行うことができます。また、Section 6 の Universal Loader を使用する場合は、設定の登録が不可欠です。

<Tube Settings の登録>

特定のサンプル専用の測定感度を登録することができます。

〈Tube Settings で規定される設定〉
測定感度（PMT Voltage）、Threshold、Flow Rate など　＊蛍光補正は機器の初期値が適用されます。

① Tube アイコンを右クリックし、Create Tube Settings を選択します。

② 登録用ダイアログが表示されるので、ウインドウ上で選択されている Lot ID を確認し、精度管理と同じ CS&T ビーズをセットしてください。

③ 取り込み終了後、ダイアログが表示されるので、設定に名前を付けて OK をクリックします。登録した設定は、Tube Properties の Tube Settings の Select より選択できます。
＊登録した設定を使用する前に、Assay & Tube Settings Setup (Section 6)を実施してください。

<Reference Settings の登録>

特定のサンプル専用の測定感度と蛍光補正の設定を登録することができます。

設定の登録には単染色コントロールが必要です。

〈Reference Settings で規定される設定〉
測定感度（PMT Voltage）、Threshold、Flow Rate，蛍光補正データなど

① Tube アイコンを右クリックし、Create Reference Settings を選択します。

② 登録用ダイアログが表示されるので、ウインドウ上で選択されている CS&T ビーズの Lot ID を確認します。

③ 画面下方に単染色コントロールのリストが表示されるので、色素の種類を確認します。

④ Control Type（単染色コントロールが細胞→FC、CompBeads→CompBeads）を選択します。

⑤ ウインドウの Next をクリックします。

⑥ 精度管理と同じ CS&T ビーズをセットし、Acquire ボタンをクリックします。

⑦ 取り込みが終わったら CS&T ビーズを外し、以降単染色コントロールサンプルをセットし、Acquire ボタンでデータ取り込みを実行します。

⑧ 単染色コントロールのデータがプロットに表示されるので、左のドットプロットに表示されている P1 ゲートを細胞の表示位置に合わせます。

⑨ 続いて右のヒストグラムの二つのゲートを合わせます。P2 ゲートを蛍光色素の陽性集団、P3 ゲートを陰性集団に合わせます。

⑩ データ取り込みの終了後、次の Tube が選択されるので、以降順番に単染色のデータを取り込みます。

⑪ 取り込み終了後、ダイアログが表示されるので、設定に名前を付けて OK をクリックします。登録した設定は、Tube Properties の Tube Settings の Select より選択できます。
＊登録した設定を使用する前に、Assay & Tube Settings Setup (Section 6)を実施してください。

＜Assay の登録・編集＞

Experiment の形式を登録することができます。Universal Loader を使用する場合、測定テンプレートとして登録が必要です。Assay を作成するためには、Experiment 内の Tube に登録済みの測定設定（Tube Settings や Reference Settings）が変更点なく適用されていることが必要です。

〈Assay で規定される設定〉

Tube 本数、Tube 名、Tube Settings の種類、マーカーラベル、保存データ個数条件、ワークシート上のプロット配置、ゲート設定

① テンプレートとして登録したい Experiment の内容を編集します。
*Universal Loader で測定した結果を PDF で出力したい場合は、プロット表示を Worksheet ではなく Report（ワークシートツールバーの R のマーク）で作成してください。
*Universal Loader で測定した結果の統計情報を一括で CSV ファイルとして出力したい場合は、Statistics 表示の右クリック>Properties で Include in Auto-Export のチェックボックスを ON にしてください。

② File メニューより Create Assay を選択します。

③ 登録用ダイアログが表示されるので、Assay に名前をつけて保存します。
作成した Assay は Section 6 Universal Loader の測定テンプレートおよび、Experiment テンプレートとして（Manage Experiment タブのフォルダーの右クリック> New Experiment From Assay）使用できます。

＜測定結果を PDF で自動出力する場合＞

④ Library 画面（Navigation Bar の本のマーク）をクリックし、Assay>User-Defined を選択し、登録した Assay 名をクリックします。

⑤ 画面下部に Assay の詳細が表示されるので、Report タブを選択します（プロット表示で Report を使用した場合のみ表示されます）。

⑥ Export Report to のチェックボックスを ON にし、PDF ファイルの保存先を指定します。

⑦ Save ボタン（画面右端）をクリックして設定内容を保存します。

＜Assay & Tube Settings Setup の実施＞

本操作は、Assay や Tube Settings で規定された測定条件を再現する重要なステップです。登録された設定を使用する場合、特に Universal Loader の操作を開始する前に必ず実施してください。

① Setup & QC 画面の Task より Assay & Tube Settings Setup を選択し、Select ボタンをクリックします（画面右側の表示が変わります）。

② 表示された Assay または Tube Settings のリストより、サンプル測定に必要な設定のチェックボックスを ON にします（複数の設定が必要な場合は一括でチェックを入れます）。

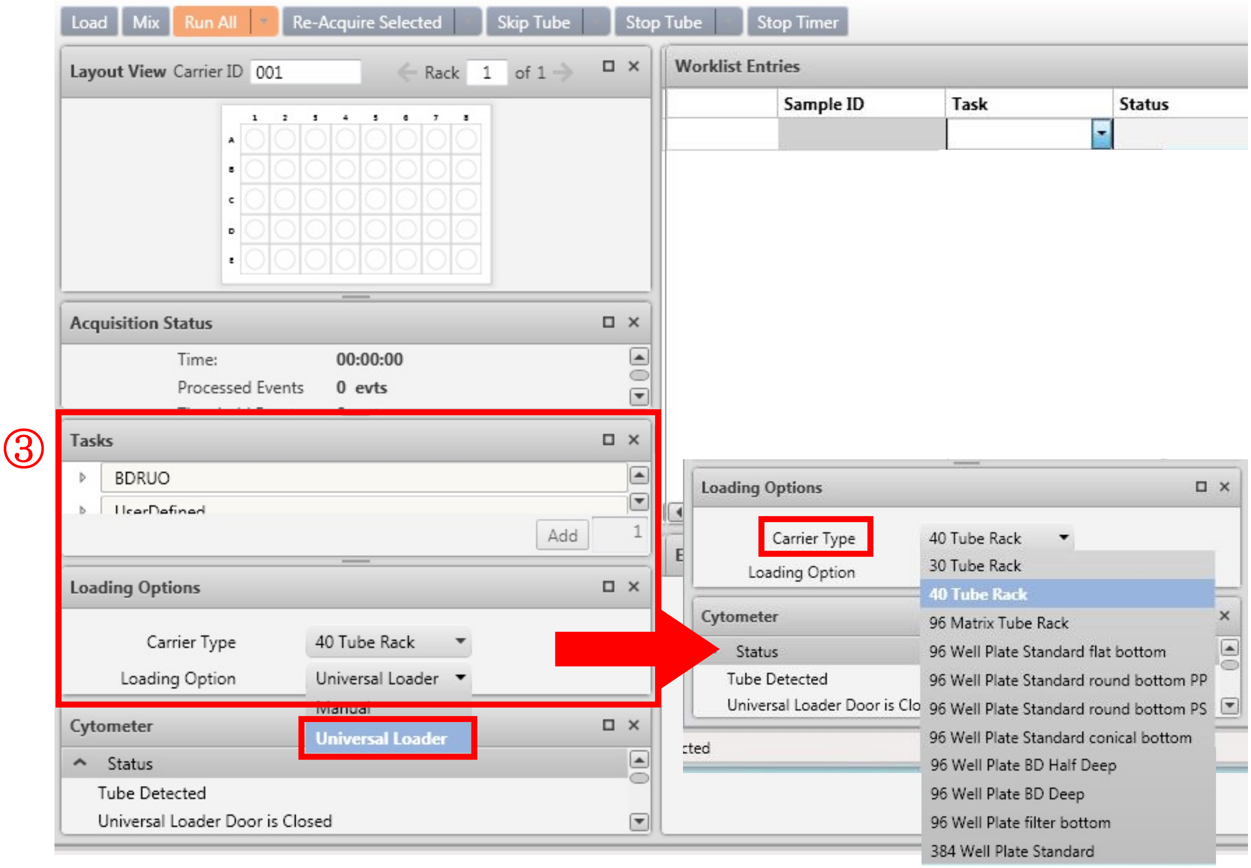
③ CS&T ビーズの Lot ID を確認後、CS&T ビーズを機器に取り付け、Start ボタンをクリックします。

④ 終了のメッセージが表示されたら Yes を選択し、チェックの可否を確認します。

⑤ CS&T ビーズのチューブを外し、2mL 程度の DW を入れた 5mL チューブをセットします。

Section 6：Universal Loader の使用方法

Universal Loader オプションが搭載された機器では、チューブラックやプレートからの自動サンプリングによる測定が可能です。測定を開始する前に、測定テンプレートにあたる Assay を作成・設定し、Assay & Tube Settings Setup を実施しておいてください。
Universal Loader では、Assay を Worklist によって呼び出し、測定します。



<Worklist の作成・設定>

① Navigation Bar より上から 4 番目の Worklist を選択します。

② Manage タブが表示されるので、File メニューより New Worklist を選択します。

新しい Worklist がタブとして開くので、下記の設定を行います。

③ プレートの選択：

Loading Options ウインドウの Loading Option より Universal Loader を選択します。

同じく Carrier Type より使用したラック・プレートの種類を選択します。

④ Assay の設定：

Tasks ウインドウの User-Defined より、使用する Assay を選択し、繰り返し回数を入力して Add ボタンをクリックします。

Layout View ウインドウおよび Worksheet Entries ウインドウに設定が反映されます。

＊Layout View ウインドウを右クリック→Properties を開くと測定方向や撹拌条件などを変更できます。

＜サンプル測定＞

⑤ 測定したいラック・プレートを Universal Loader にセットします。
カバーを開き、サンプル取り付け位置の右側のレバーを開いたら、正しい向きで容器をセット（左上が A1）します。セット完了後、カバーを閉じます。

⑥ 画面左上の Load ボタンをクリックし、ラック・プレートを機器に認識させます（電子音が鳴ります）。

⑦ Run All をクリックして測定を開始します（プルダウンより Run Selected / From Pointer が選択可能）。
＊測定開始時、PQC のエラー、Reference Settings の期限切れ、Assay & Tube Settings Setup 未実施があれば警告として表示されます。中断の必要がなければ Skip を選択して測定を続けてください。

⑧ 最初のデータを測定する際、preview time が入ります。カウントが 0 になる前にクリックすると、レコードしないモードになります

⑨ 測定が終了したらサンプルを取り出してください。必要に応じて事前に設定したデータ出力が実施されていることを確認してください。

Section 7：データ出力・バックアップ

データ測定が終了したら、すみやかに測定データと Experiment のバックアップを行ってください。

＜測定データの出力＞

- ワークシート表示全体のデータ出力
  File メニュー＞Export to PDF より、表示しているワークシートを PDF として出力することができます。
- 統計情報の出力
  統計情報表示の右クリック＞Export Statistics より、数値を CSV ファイルで出力できます。

＜測定データのバックアップ＞

① 測定データが保存されている Tube アイコンを選択します（複数データを同時に選択する場合は、Shift ボタンまたは Ctrl ボタンを押しながらクリックします）。

② 右クリック＞Export FCS Files を選択します。

③ 表示されたウインドウでデータ保存先を指定します。

④ OK ボタンを選択すると、データのバックアップが実行されます。

選択した測定データの数だけ「.fcs」の拡張子のついたファイルが出力されます。

＜Experiment データのバックアップ＞

① 測定・解析を終えた Experiment を閉じます（タブのバツマークをクリックします）。

② Manage Experiment タブにて、バックアップを取りたい Experiment を選択します。

③ 右クリック＞Export Experiment にカーソルを合わせます。

④ 表示された選択肢のうち With Data を選択します。

⑤ 保存先を指定します。

⑥ OK ボタンを押すと、データのバックアップが実行されます。

- 選択した Experiment の数だけ「.Experiment」の拡張子がついたファイルが出力されます。　　この
  ファイルは FACSuite ソフトで読み込むことができます。

＜Experiment 設定の別名保存（同じ実験を繰り返し行う場合）＞

① Experiment を右クリック＞Save as を選択します。Save as のダイアログが表示されます。

② 保存する名前を編集し、Save as without data のチェックボックスをオンにします。

③ OK ボタンを押します。元の Experiment と同じフォルダーにデータの入っていない Experiment が作成されます。

ソフト動作をスムーズに保つため、出力・別名保存を終えた Experiment データはソフトから Delete してください。

Section 8：シャットダウン

PI を用いた細胞周期測定を行った後は、使用後のサンプルラインに汚れが残る場合がありますので、FACSClean と滅菌蒸留水を各 10 分間流してから、下記の洗浄を行って下さい。

① Cytometer メニューより Daily Clean を選択します。

② FACSClean 2mL 入ったチューブを SIT にセットします（約 2 分間）。

③ 自動的に次のステップの画面が出るので、滅菌蒸留水 3mL の入ったチューブに交換します。

④ 終了後、新しい滅菌蒸留水 3mL の入ったチューブに交換します。

⑤ Cytometer メニューの Shutdown をクリックし、確認のメッセージに Yse を選択します（数秒後に本体電源が切れるので、本体の電源ボタンは押さないでください）。

⑥ FACSuite ソフトを終了し、PC 電源を OFF にします。

⑦ 御施設の規則に従い、廃液を処理します。

シースタンクにシース液を補充します。