



BD FACSLyric™ Flow Cytometer Training Manual

Ver 2.2

機器シリアル番号



本著作物に関する権利は全て日本ベクトン・ディキンソン株式会社が保有します。
本著作物の一部または全部を無断で複写、複製、転載、改変または流布することを禁じます。
©Nippon Becton Dickinson Co., Ltd. 2021

Section

1. 機器概要
2. スタートアップ・シャットダウン
3. 精度管理
4. 測定のセットアップ・サンプル測定
5. データ解析
6. Libraryへのテンプレート登録
7. Universal Loader測定 (オプション)
8. メンテナンス
9. トラブルシュート

下記溶液の取り扱い時には白衣、ゴーグル、マスクおよびグローブの着用をお願いいたします。

342003 FACSFlow Sheath Fluid :
リン酸緩衝生理食塩水、フッ化ナトリウム0.064%

340345 FACSClean :
次亜塩素酸ナトリウム1%、水酸化ナトリウム0.8%

FACSCleanは一般情報として皮膚、粘膜や目の炎症を引き起こす可能性があるため直ちに大量の水で洗い流し、医師の診察を受けてください。

詳細に関しては下記サイトからそれぞれのSDS(SafetyDataSheet)を取得してください。
<https://regdocs.bd.com/regdocs/sdsSearch>

目次

Section 1 : 機器概要

FCMの原理	8
BD FACSLyric™の特徴	13
BD FACS™で使用可能な蛍光色素	24
BD FACS™シリーズ - 蛍光の特性	26
FCM サンプル調製	29
FCMのアプリケーション代表例	31

Section 2 : スタートアップ・シャットダウン

・ BD FACSLyric™のスタートアップ	
システム起動前の確認	46
BD FACSLyric™の起動	47
BD FACSuiteソフトウェア Home画面の確認	49
流路系のスタートアップ	50
・ BD FACSLyric™のシャットダウン	51

Section 3 : 精度管理

・ 精度管理の実施	
精度管理 (Performance QC)の実施	54
Performance QC reportの確認	55
Performance QC reportの解説	56
Performance QC トラブルシュートについて	57
【参考資料】 Setup & QCタブ	58
【参考資料】 QC Trackingタブ	59
【参考資料】 Configurationの確認と編集	60

Section 4 : 測定の設定アップ・サンプル測定

新規Experimentの作成	62
測定パラメーターの編集	63
プロットの作成	64
サンプルパターンの確認と測定感度調整	65
Threshold、Area scaling factorの調整	67
Tube Properties	68
サンプルデータの保存	70
蛍光補正 (Compensation) の調整	71

Section 5 : データ解析

Worksheetsのツールバー機能	74
プロットの作成と編集	76
オーバーレイプロットの作成	82
ポピュレーション（ゲート）の作成と編集	83
Gate Hierarchyの管理	85
統計情報の表示・編集	87
データの管理（データのバックアップと消去）	89
ユーザーアカウントの管理	91

Section 6 : Library へのテンプレート登録

機器設定と測定テンプレートの関係について	94
Tube settingsの登録方法	96
Reference settingsの登録方法	97
Modify reference setting: 蛍光補正の微調整	101
Update reference setting	102
Add Fluorochrome	103
測定テンプレート（Assay）の登録	104
Assay & Tube Settings Setup	106
Libraryによる登録設定の管理	107
【参考資料】オプションフィルターの登録方法	111

Section 7 : Universal Loader 測定

Loader測定概要・測定テンプレート（Assay）の登録①	114
測定テンプレート（Assay）の登録②	115
Auto Export設定（PDF、CSVファイル）	116
Auto Export設定（FCSファイル）	117
測定開始前の準備	118
Worklistの作成と設定	119
Worklistによる測定の実施	124
測定結果の確認と再出力	127
Worklistのデータ管理	131
FDA 21 CFR Part 11およびER/ES指針への対応	132

Section 8 : メンテナンス

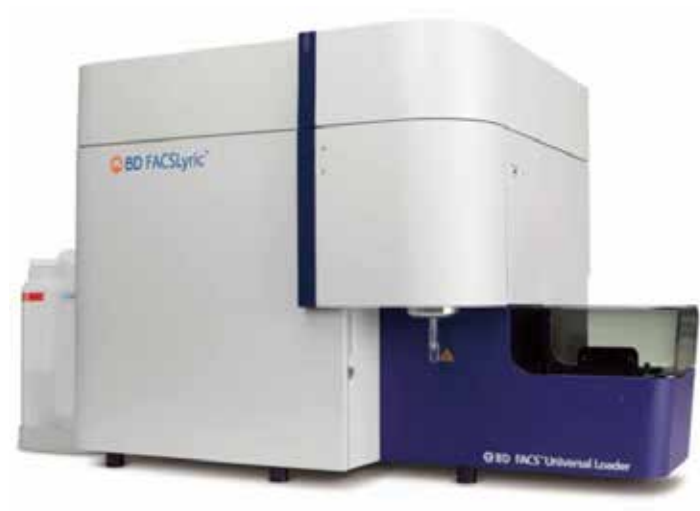
BD FACSLyric™のメンテナンススケジュール	134
Beads管理の概要	135
CS&T BeadsおよびFC BeadsのLot IDの登録 CS&T Beadsの Bead Lot Transfer	136
Characterization QCの実施	137
FC Beads の調製	138
FC Beads を用いたUpdate Reference Settings	139
データベースのメンテナンス	141
流路系トラブルシュートの全体像	142
流路系のメンテナンス	143
Monthly cleanの実施方法	144
シースフィルター/シースサブライラインフィルターの交換	148
サンプルラインの交換	149
Laser Setup (レーザー光軸調整)	151
FACSLyric™ 消耗品リスト	152

Section 9 : トラブルシュート

System Health Reportの作成	154
BD FACSLyric™本体のトラブルシューティング	155
BD FACSuite™ソフトウェアのトラブルシューティング	159
Universal Loaderのトラブルシューティング	164

Section 1

機器概要



項目	ページ
FCMの原理	8
BD FACSLyric™の特徴 - 流路系	13
BD FACSLyric™の特徴 - 光学系	14
BD FACSLyric™の特徴 - データ処理	17
BD FACSLyric™の原理 - 蛍光補正	21
BD FACSLyric™の特徴 - 精度管理	22
BD FACSLyric™の特徴 - データ標準化	23
BD FACS™で使用可能な蛍光色素	24
BD FACS™シリーズ - 蛍光の特性	26
FCM サンプル調製	29
FCMのアプリケーション代表例	31

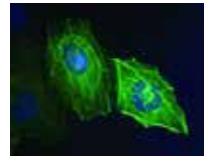
FCMの原理 - フローサイトメトリーとは

フローサイトメーター (FCM) の特徴

<蛍光顕微鏡>

顕微鏡視野に入った細胞を観察する。

- データを画像で残すことができる
- 細胞内の局在がわかる

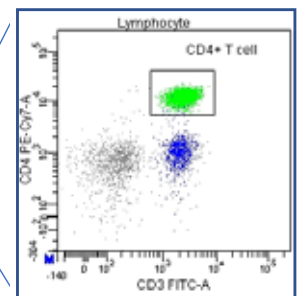


<フローサイトメーター>

流体中の細胞がレーザーを横切ることによって発生したシグナルにより細胞の状態を解析する。

- 短時間に大量の細胞を処理できる
- 同時に多様なマーカーを解析できる (マルチカラー)
- サンプル中の細胞の割合を数値化できる

レーザー



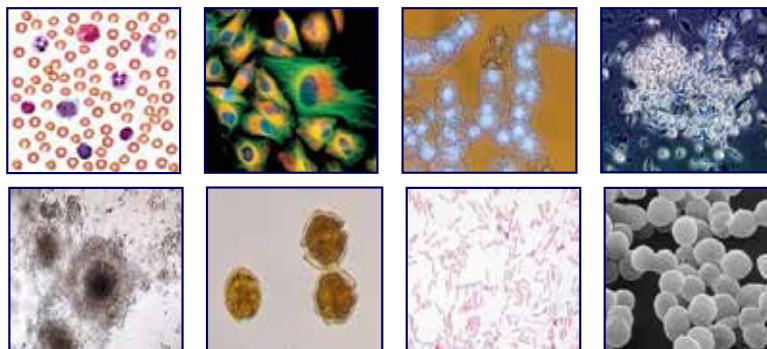
フローサイトメーターで測定できるサンプル例

血球細胞
接着細胞 (剥離したもの)
幹細胞
植物細胞
昆虫細胞

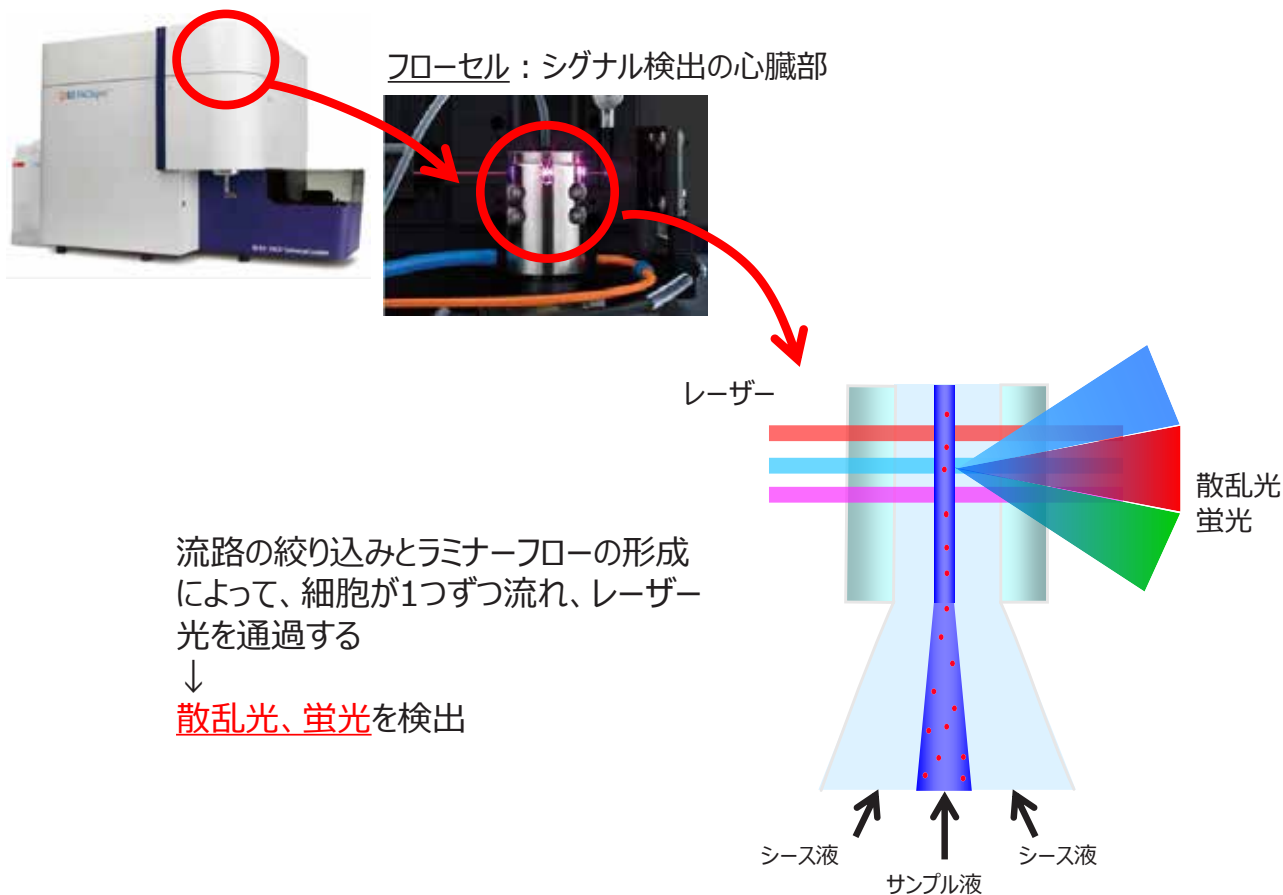
精子
プランクトン
大腸菌
球菌

• サンプル条件

- ① 細胞が一つ一つ単離状態であること
- ② 均一な細胞浮遊液であること
- ③ 直径0.2 μm ~ 40 μm

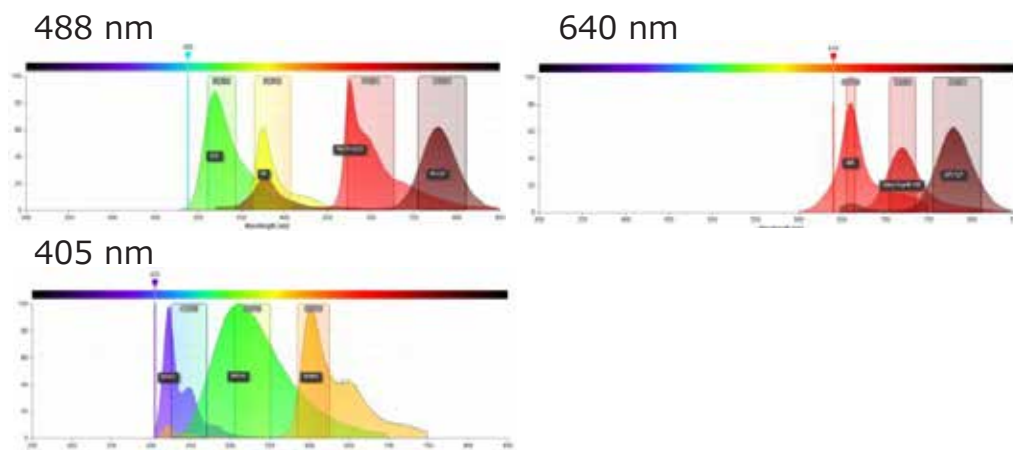


FCMの原理 - シグナル発生の仕組み



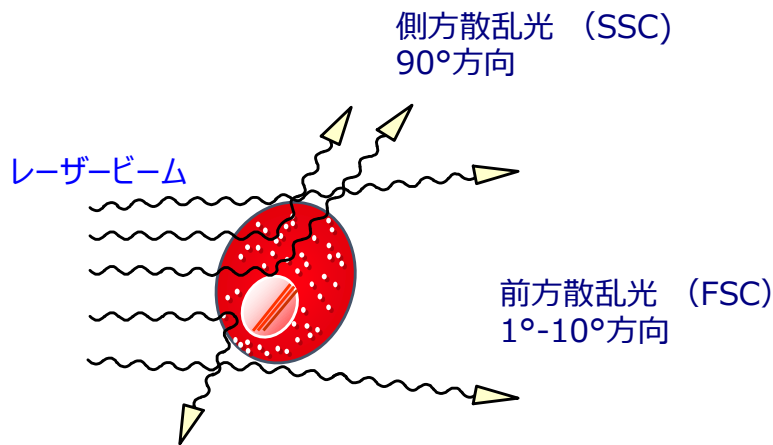
FCMによって得られる情報

- 散乱光 (Scatter)
 - ・前方散乱光 (Forward Scatter, FSC) 細胞の大きさ
 - ・側方散乱光 (Side Scatter, SSC) 細胞内の複雑さ
- 蛍光 (Fluorescence)
 - 蛍光標識された細表面抗原や細胞内抗原、DNA、RNA含量など



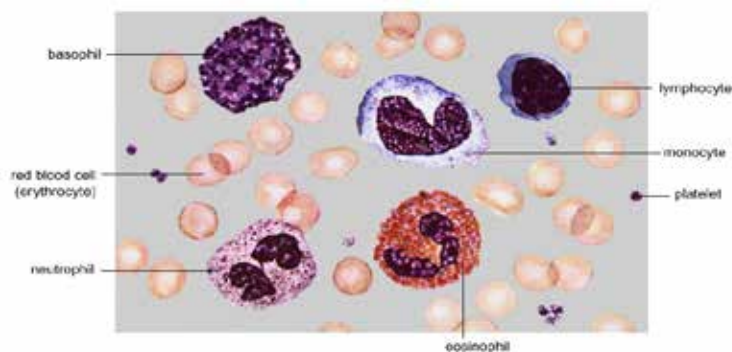
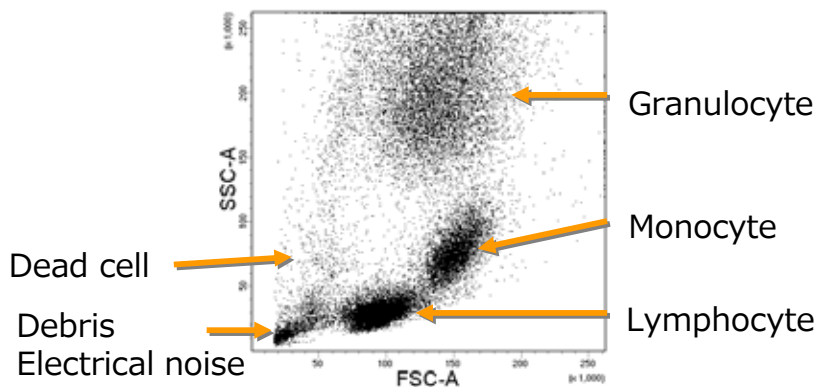
- 時間軸 (Time)

FCMの原理 - 散乱光の特徴

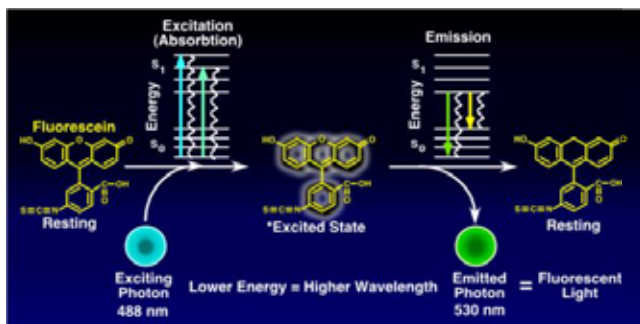


- 前方散乱光 (Forward Scatter :FSC)
: 細胞の大きさや表面積を反映する
- 側方散乱光 (Side Scatter :SSC)
: 内部構造の複雑さ、細胞内顆粒などを反映する

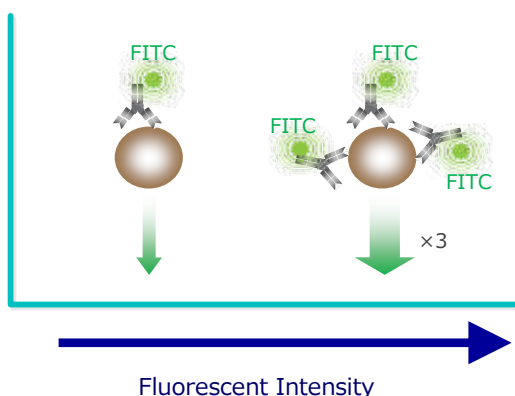
散乱光による血液細胞の解析例



FCMの原理 - 蛍光の特性(1)



蛍光物質に励起光を照射すると蛍光が放出されます

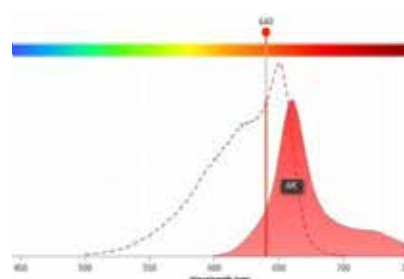
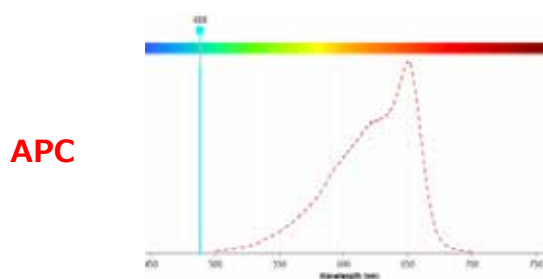
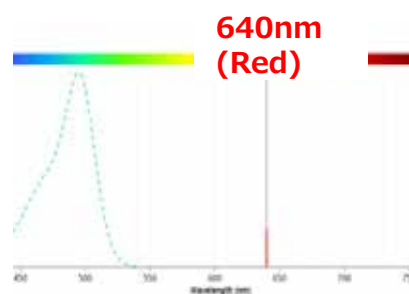
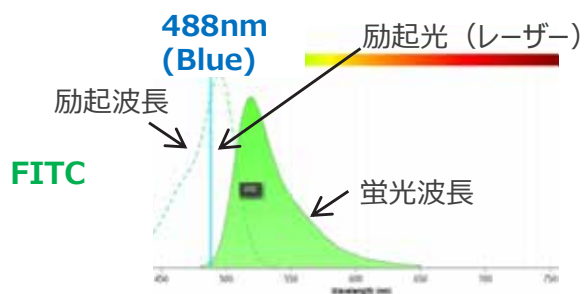


フローサイトメーターでは粒子ごとの蛍光物質質量を見分けられます※

※フローサイトメーターで得られるシグナルの値は絶対値ではなく、同条件で測定した際の相対的な違いを示します

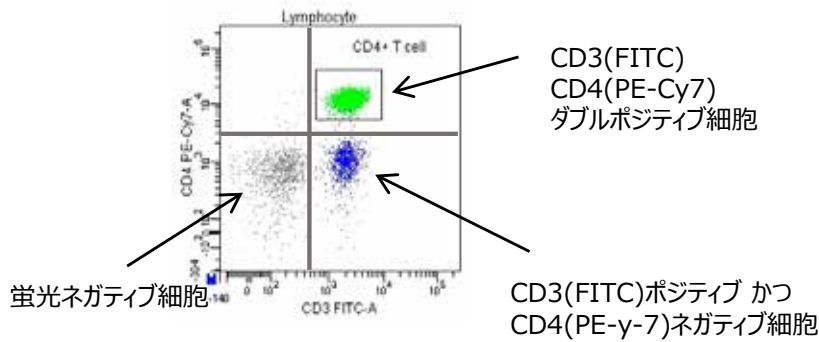
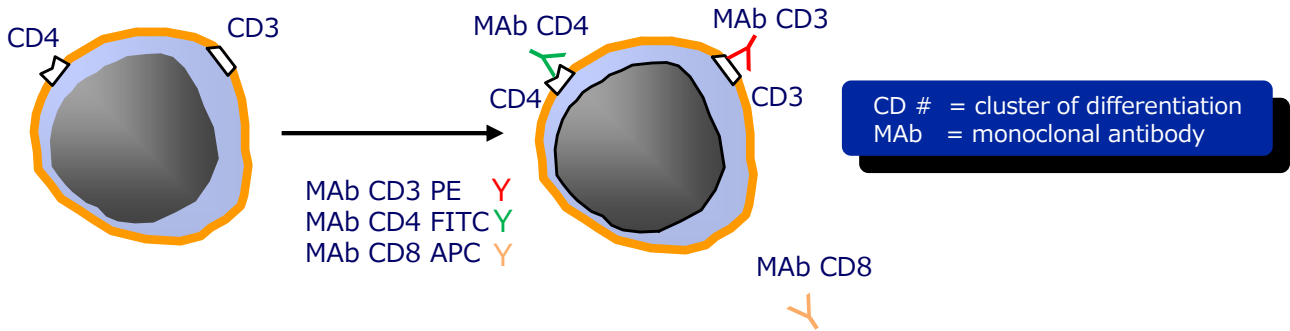
励起波長と蛍光波長

- 各蛍光色素には、それぞれに適した励起光の波長があります
- 使用予定の蛍光色素が、測定予定のフローサイトメーターで使用可能かどうかを事前に確認する必要があります

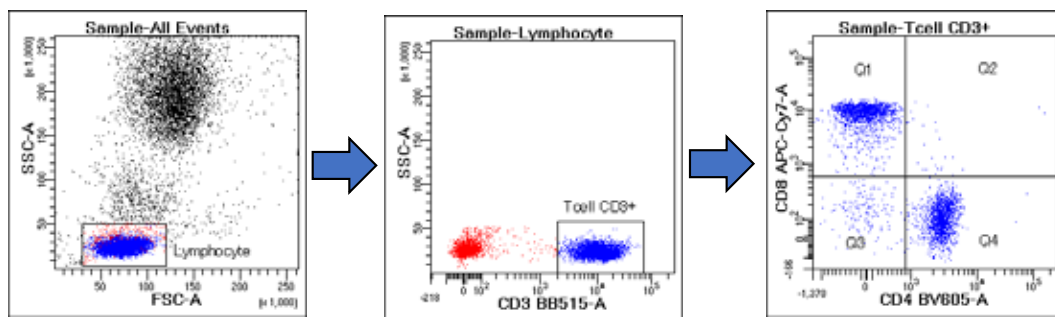


FCMの原理 - 蛍光の特性(2)

モノクローナル抗体による蛍光標識



FCMのデータ例



① 散乱光で目的集団に
囲いを掛ける

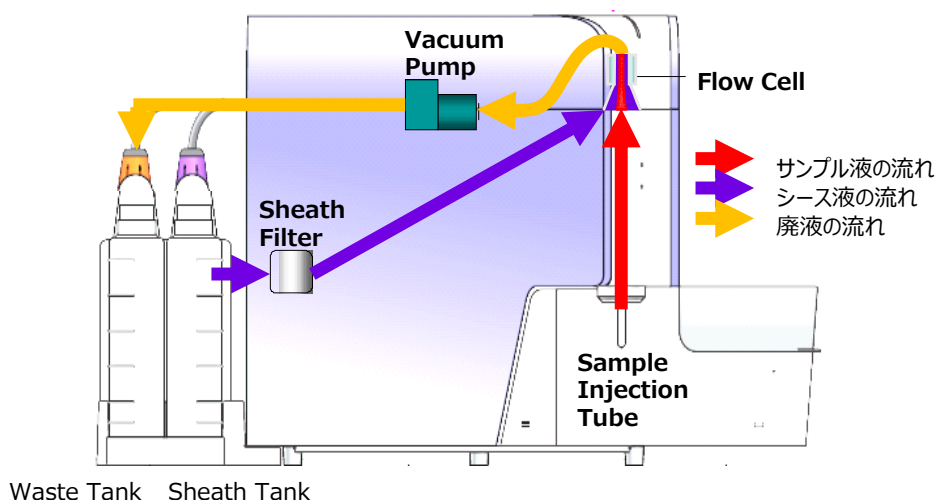
② 目的の蛍光集団に囲
いを掛ける

③ 蛍光ポジティブ、ネガ
ティブを四分画マーカ
で分ける

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	11,023	###	100.0
Lymphocyte	5,083	46.1	46.1
Tcell CD3+	3,570	70.2	32.4
Q1	1,813	50.8	16.4
Q2	27	0.8	0.2
Q3	152	4.3	1.4
Q4	1,578	44.2	14.3

④ 各集団の割合(%)を表示させる

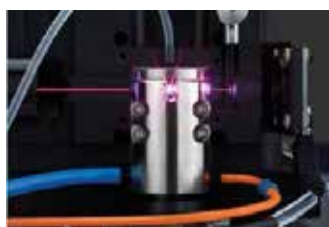
BD FACSLyric™の特徴 - 流路系



FACSLyric™は、従来のFACSとは全く異なる流路系システムを用いています。従来の流路駆動系では圧力をかけて液体を押し流していましたが、FACSLyric™ではバキュームポンプによって、サンプル液、シーズ液を吸引しています。これにより、安定した圧力で流路を形成することが可能になりました。

さらに、機器に使用できるサンプルチューブや溶液タンクも様々な種類を用いることができるようになりました。

Universal Loader (UAL)オプション はチューブラックからプレートまで測定が可能です。



FACSLyric™のフローセル

Sample Injection Tube(SIT)から吸引されたサンプルは、フローセル下部のチャンバーでシーズ液とラミナフローを形成します。

FACSLyric™ではレーザーヒット部以外のフローセル素材にステンレスを採用しています(写真)。これにより従来のフローセルより気泡が付きにくくなりました。

FACSLyric™のサンプルの流量は、Normal Fluidics Mode (3段階)とHigh sensitivity modeから選択できます。

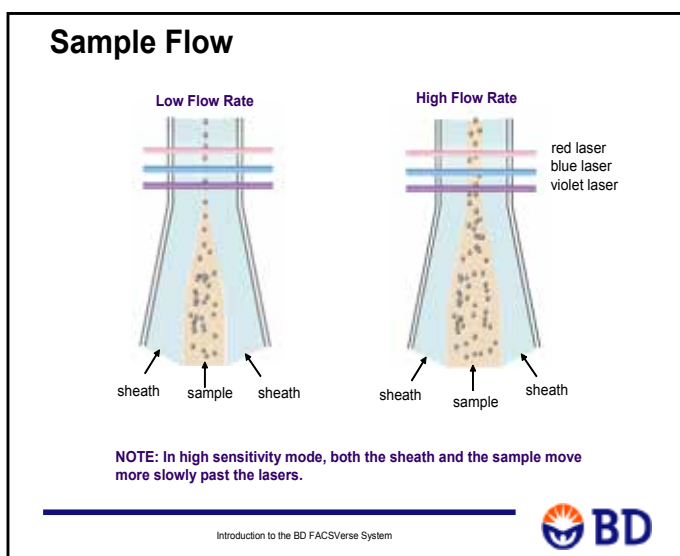
〈Normal Fluidics Mode〉

High=120 μ L/min Med=60 μ L/min Low=12 μ L/min

High, Medモードは短時間で大量のサンプルを流すことができますが、反面サンプルの流路の幅が広く、測定値のばらつきが大きくなりがちです。よって表面抗原、蛋白の発現解析には問題ありませんが細胞周期解析等には不向きです。細胞周期解析など、測定データの直線性が重要となるアプリケーションでは、Lowモードを使用してください。

〈High Sensitivity Mode〉 50 μ L/min

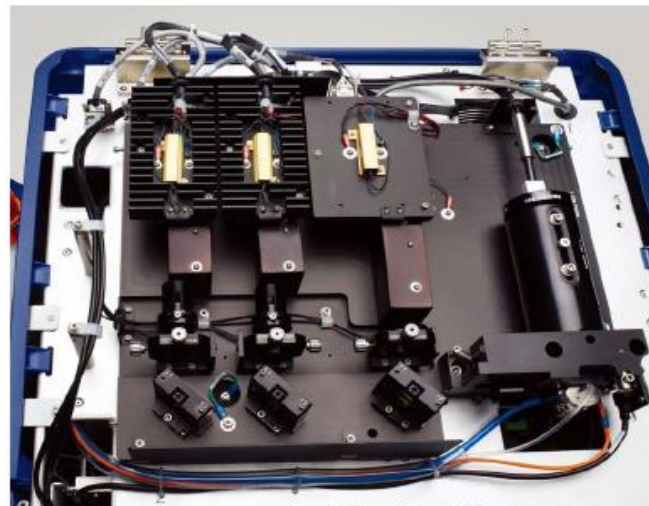
このモードではNormal Fluidics Modeと比べてシーズ液の速度を半分に下げています。これにより細胞がレーザーに当たる時間が長くなり、より高いシグナルを得ることができます。しかし、レーザー通過時のサンプル溶液の幅が広いいため、測定値のばらつきが大きくなる可能性があります。そのため細胞周期解析には不向きです。



BD FACSLyric™の特徴-光学系① レーザー・検出器構成

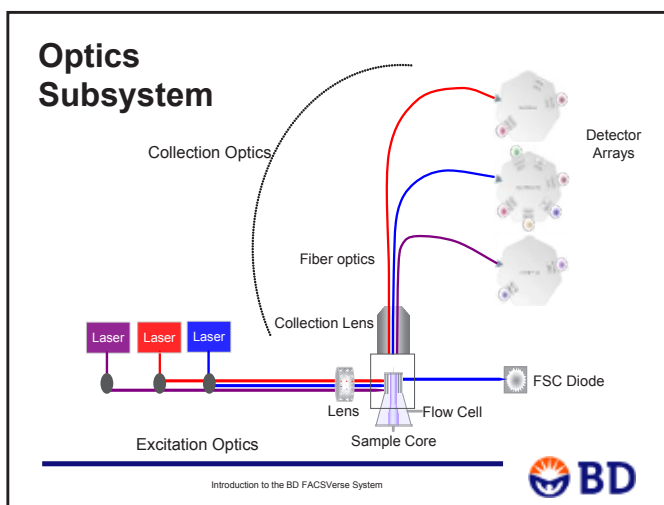
使用可能な蛍光色素とレーザー・検出器構成

蛍光色素	フィルター	ミラー	651164	651165	654587	659180	663029
			2レーザー 4カラー	2レーザー 6カラー	3レーザー 8カラー	3レーザー 10カラー	3レーザー 12カラー
Blue Laser (488nm)							
SSC	488 / 15	none	●	●	●	●	●
FITC, Alexa Fluor® 488	527 / 32	507 LP	●	●	●	●	●
PE, PI	586 / 42	560 LP	●	●	●	●	●
PerCP, PerCP-Cy™ 5.5	700 / 54	665 LP	●	●	●	●	●
PE-Cy™ 7	783 / 56	752 LP		●	●	●	●
Red Laser (640nm)							
APC, Alexa Fluor® 647	660 / 10	660 / 10	●	●	●	●	●
BD Horizon™ APC-R700, Alexa Fluor® 700	720 / 30	705 LP				●	●
APC-Cy™ 7, APC-H7	783 / 56	752 LP		●	●	●	●
Violet Laser (405 nm)							
BD Horizon™ V450, BD Horizon Brilliant™ Violet 421	448 / 45	448 / 45			●	●	●
BD Horizon™ V500-C, BD Horizon Brilliant™ Violet 510	528 / 45	500 LP			●	●	●
BD Horizon Brilliant™ Violet 605	606 / 36	606 / 36				●	●
BD Horizon Brilliant™ Violet 711	715 / 50	715 / 50					●
BD Horizon Brilliant™ Violet 786	755 LP	755 LP					●



Laser	Wavelength(nm)	Power(mW)
Solid State	488 (blue)	20
Solid State	640(red)	40
Solid State	405(violet)	40

BD FACSLyric™の特徴-光学系② 集光系・光学フィルター

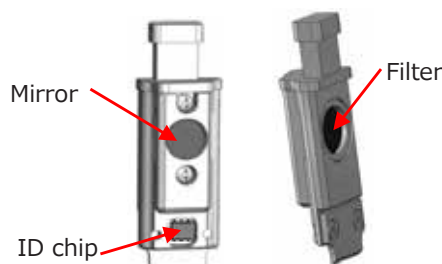


FACSLyric™の検出器

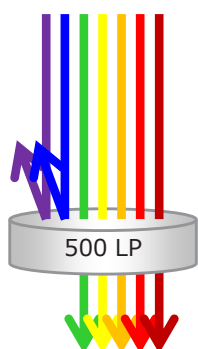


Blue, Red, Violet レーザーで励起された蛍光のシグナルは、各レーザーで励起されたシグナルごとにFiber Opticsで各検出器に運ばれます。

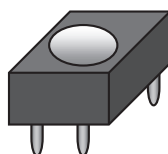
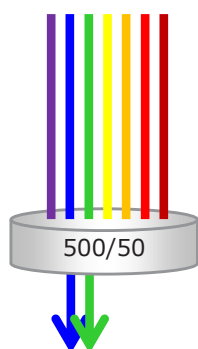
FACSLyric™の光学系では光学ミラーとバンドパスフィルターが一体型の光学チップを用いています。各チップにはIDチップがセットされており、機器はセットされた光学チップを認識し、その設定 (Configuration) を自動的に認識します。



Long Pass Mirror



Band Pass Filter



Detector

Long Pass Filter :

フィルターに記載されている数値よりも長い波長の蛍光を通過させ、数値以下の短い波長の蛍光を反射します。また機器にセットされているフィルターは表面がダイクロイックミラー加工されています。これにより透過しなかった光シグナルは一定方向に反射されます。

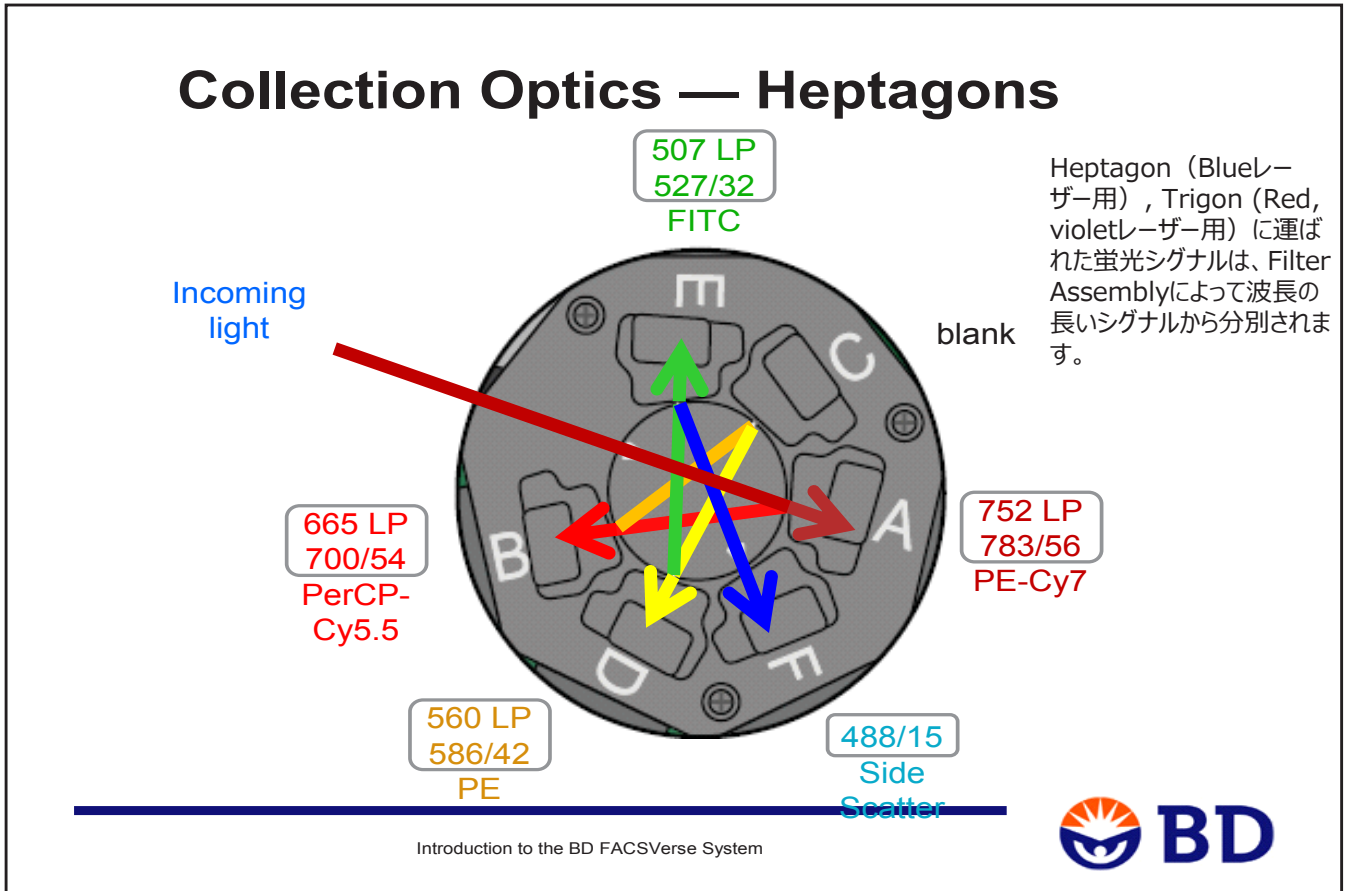
Band Pass Filter:

フィルターに記載されている数値の範囲の蛍光波長のみを通過させます。
Ex) 500/50: 500±25nmの蛍光のみを通過

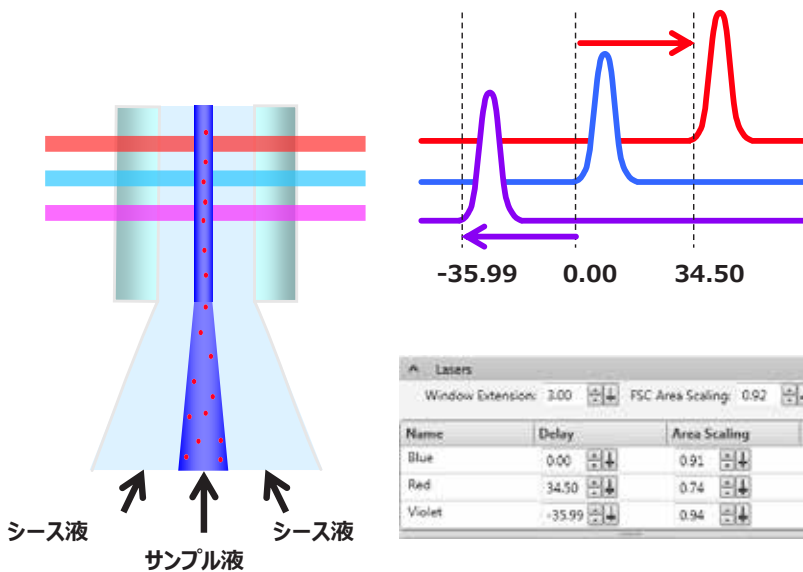
Filter Assembly :

Long Pass Filterで選別した蛍光シグナルをさらにBand Pass Filterで再選別できるような2つの光学フィルターを組み合わせたものです。これらのフィルターで選別された蛍光シグナルがPMT(検出器) に運ばれます。

BD FACSLyric™の特徴-光学系③ 検出器・Laser Delay



Laser Delay

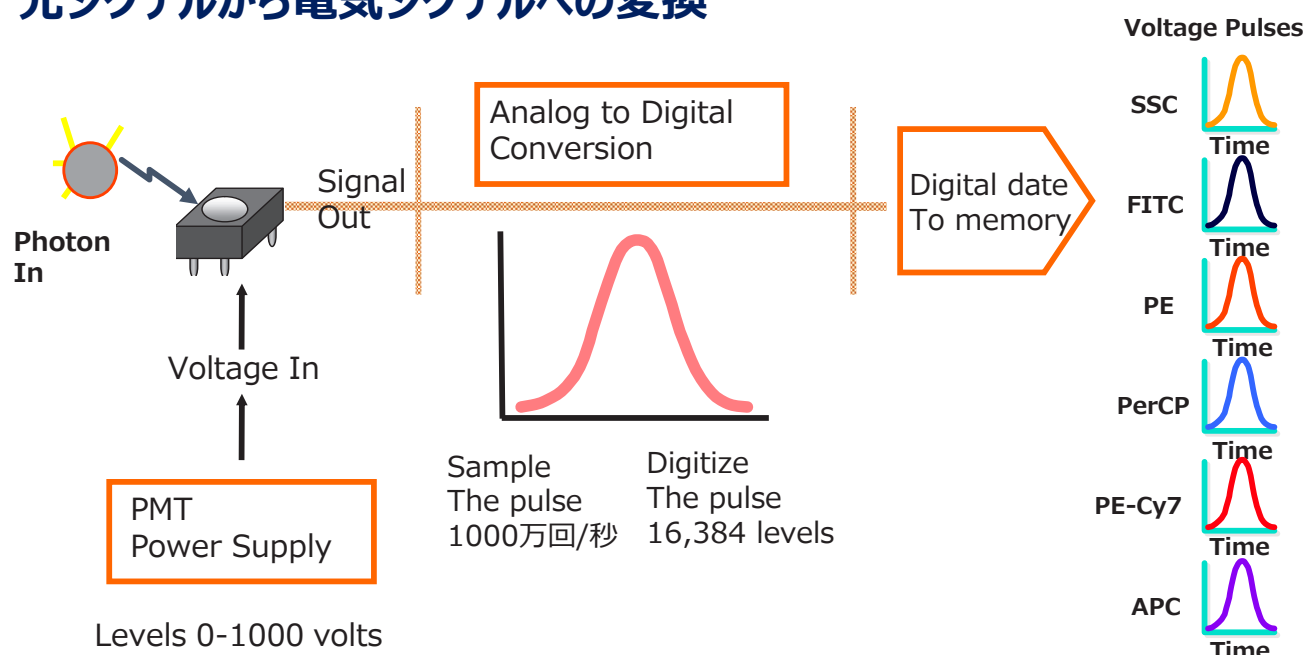


Performance QCにおいては Laser Delayの設定を自動的に行います。Laser Delayが適切に設定されていない場合には、測定結果に大きな影響を与える結果となります。

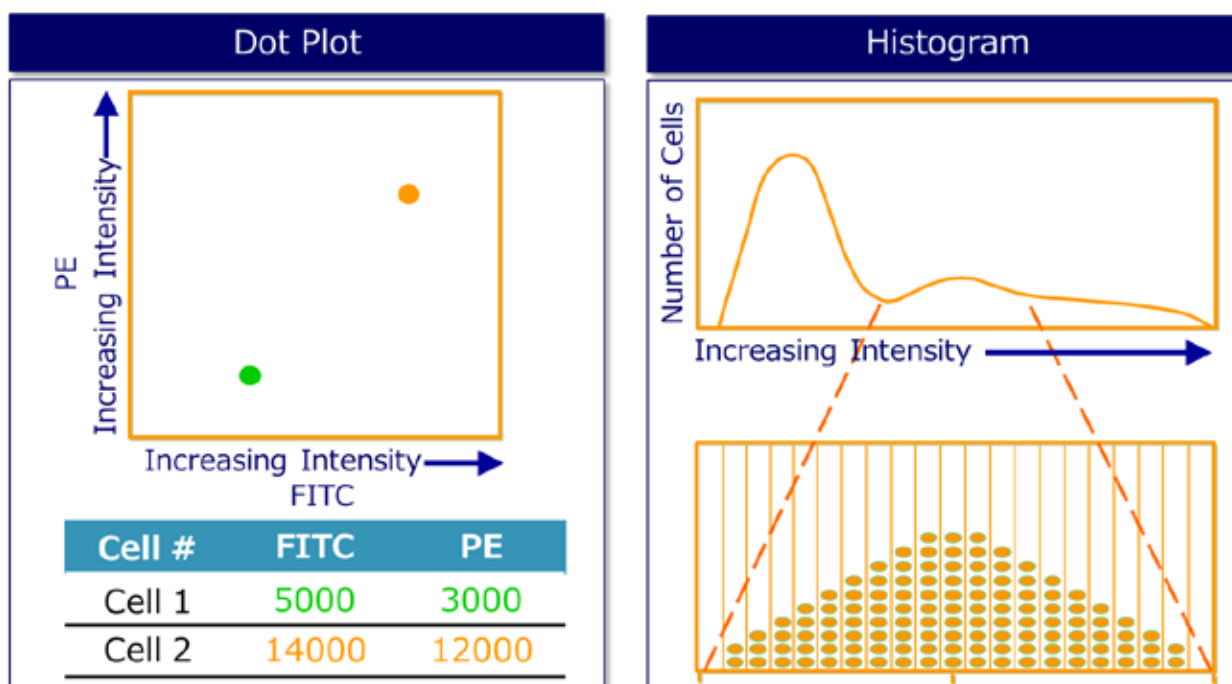
Laser Delayは、Blueが基準となります。BD FACSLyric™の場合、細胞にレーザーが照射される順位から、Violet→Blue→Redとなります（単位：μsec）。

BD FACSLyric™の特徴 - データ処理①

光シグナルから電気シグナルへの変換

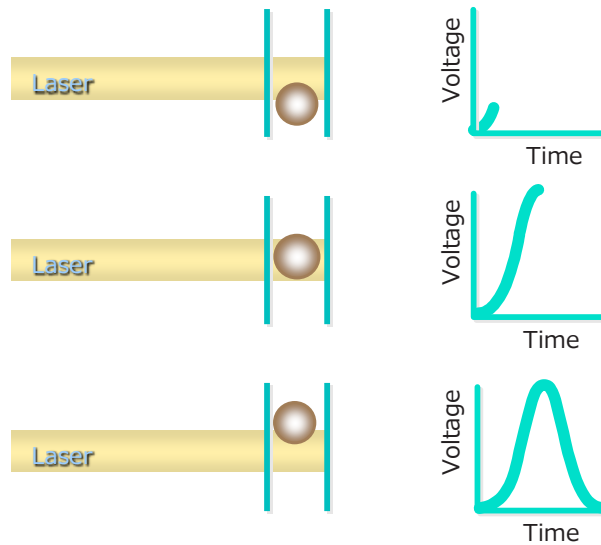


データ表示

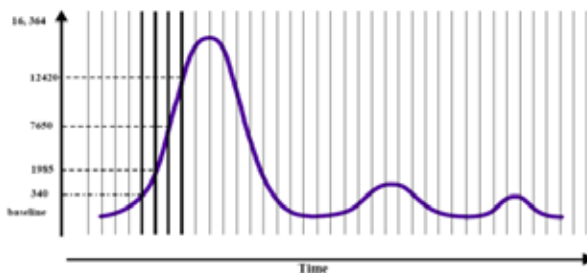


BD FACSLyric™の特徴 - データ処理②

パルス形成

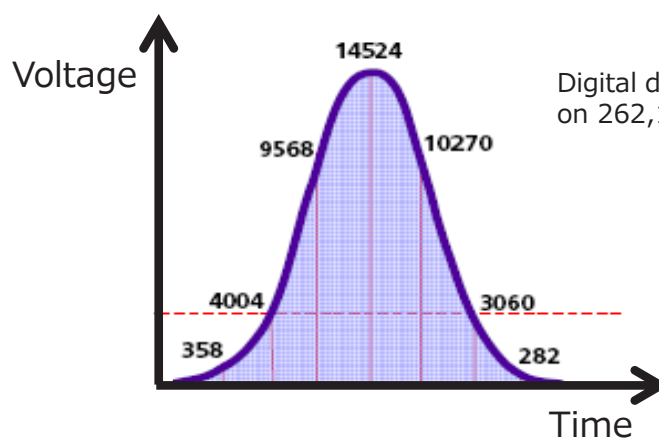


アナログ-デジタル変換



Sampled 10 Million Times Per Second
Digitize in 16,384 (14bit) Levels

電圧パルス処理

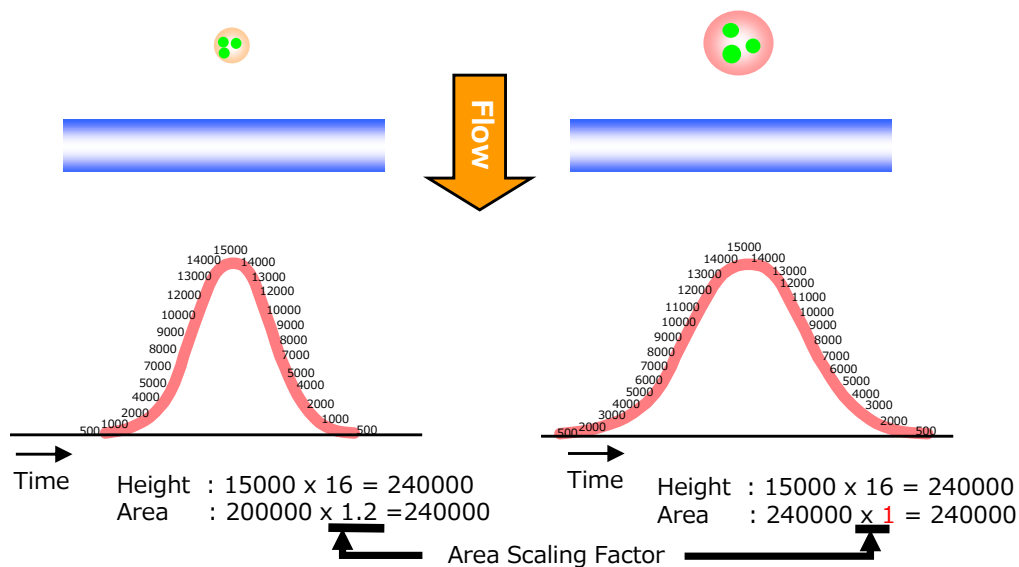


Digital date is displayed
on 262,144 scale

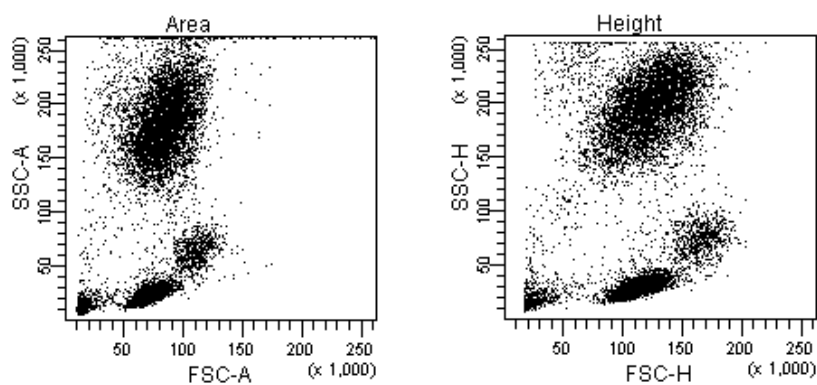
- Area: 高さの積分値
- Height: デジタル化した値の最大値
- Width (幅) : 面積/高さ x 64K (定数)

BD FACSLyric™の特徴 - データ処理③

Area scaling factor (1)



Area scaling factor (2)

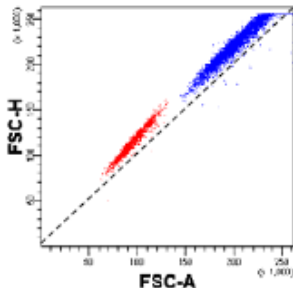


Area scaling factorの調整

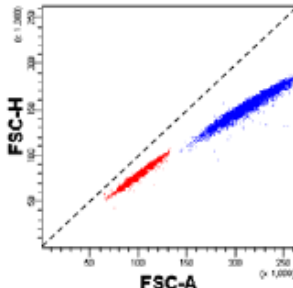
- AreaとHeightの表示位置をそろえる
- AreaとHeightのダイナミックレンジ (測定範囲) をそろえる
- Area, Height, Widthの測定値を正確に計算するために重要

BD FACSLyric™の特徴 - データ処理④

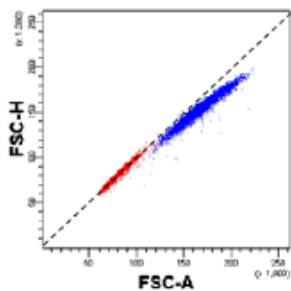
Area scaling factor (3)



Area Scaling Factorが低すぎる
→Height値が飽和する



Area Scaling Factorが高すぎる
→ Area値が飽和する



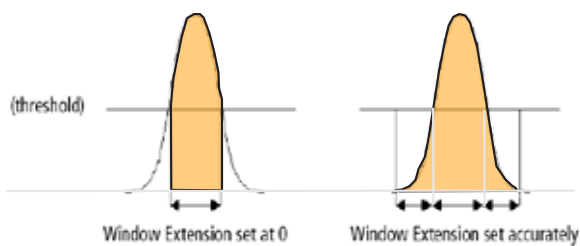
適正表示

Area Scaling Factorは、細胞の大きさによってその最適値が異なります。

初期状態ではリンパ球細胞に合わせて設定されているため、そのまま大型の細胞を測定するとArea Scaling Factorの設定が合わなくなり、測定値の直線性が失われます。

リンパ球よりも大きな細胞を測定する実験では、各レーザーとFSCに関してArea Scaling Factorを調整することが望ましいです。

Window extension



パルスの検出範囲は、Thresholdの設定により、その閾値が規定されます。

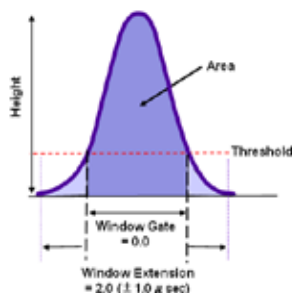
Window ExtensionはThresholdで切られているパルスの両端の検出を行うために設定します。

Window Extension=2に設定されている場合には、Thresholdで規定されたパルスの検出範囲に対して、±1μsecの範囲のパルスデータを拡張して取得します。

大型細胞の場合、パルスの両端の広がり、±1μsecより長い場合がありますので、プロットの表示位置が動かない範囲でWindow Extensionの値を上げます。

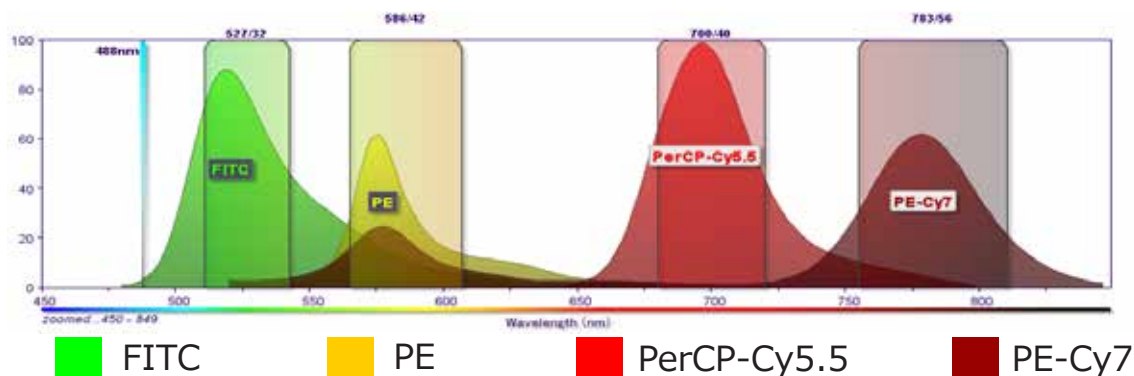
ただし、必要以上に長いWindow Extensionは、処理におけるElectronic Abortレートを上昇させます。

FACSLyric™の標準値は3.0です。

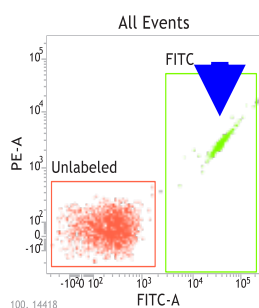
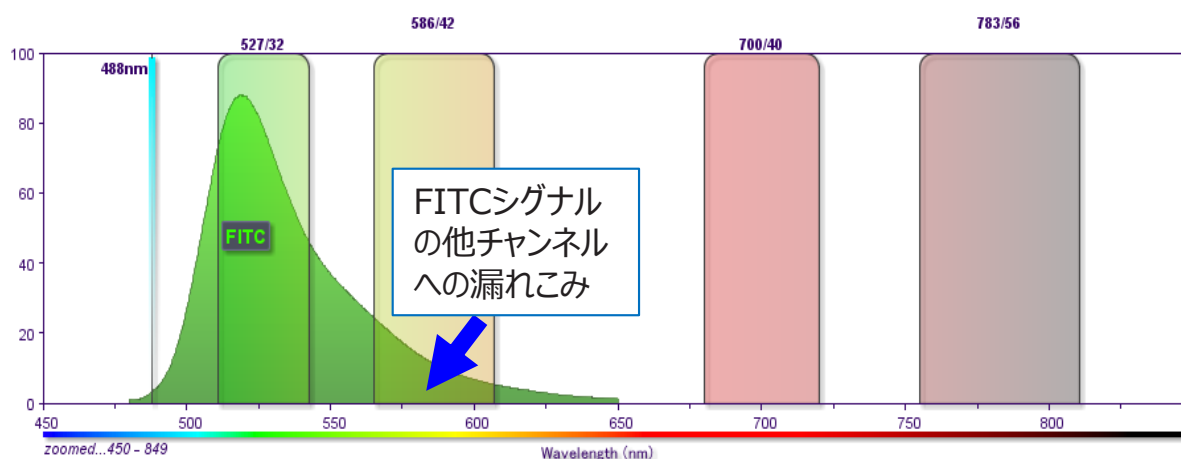


BD FACSLyric™の原理 – 蛍光補正

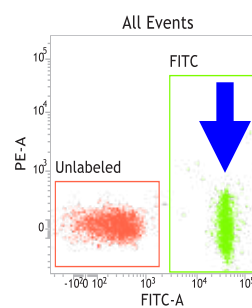
蛍光波長のオーバーラップ



蛍光スペクトルの漏れ込み



蛍光補正
(Compensation)



Statistics	
Name	PE-A Median
FITC Stained Control:Unlabeled	55
FITC Stained Control:FITC	2,691

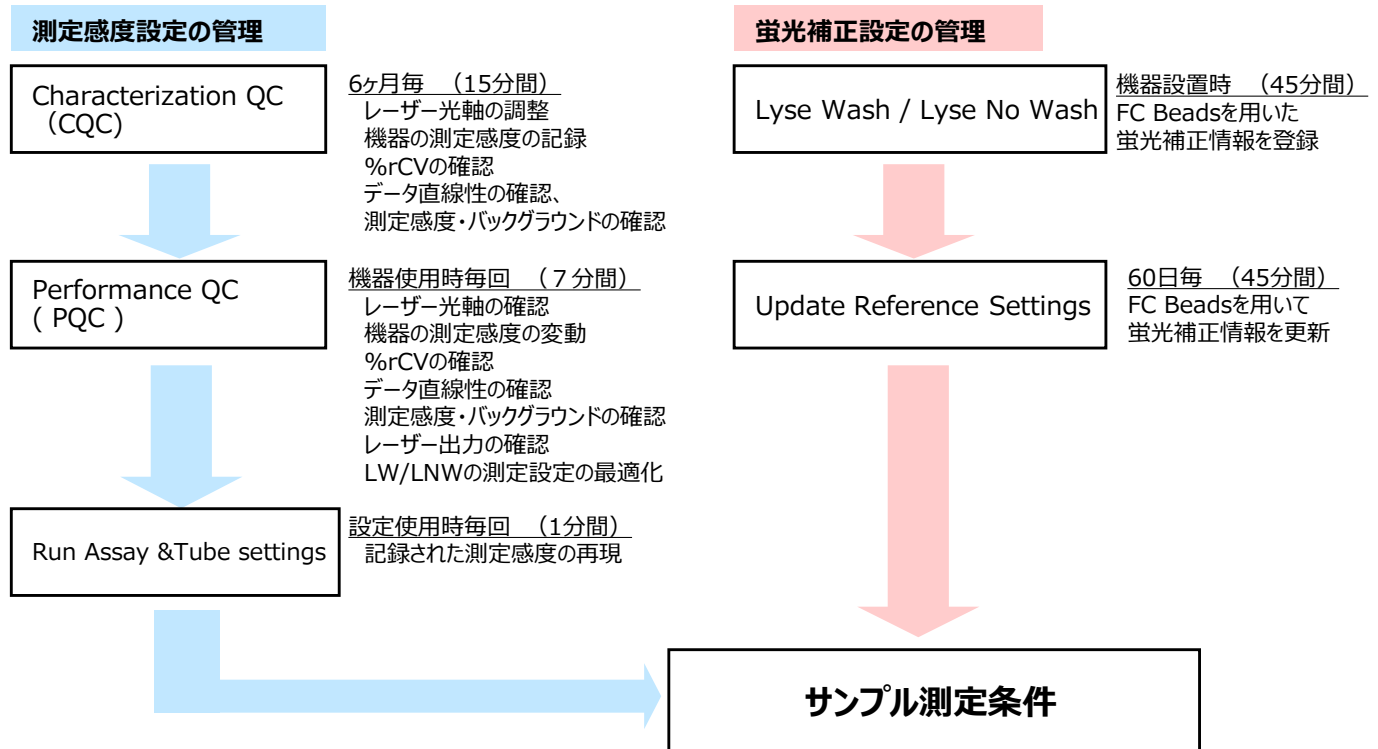
補正前

Statistics	
Name	PE-A Median
FITC Stained Control:Unlabeled	34
FITC Stained Control:FITC	35

補正後

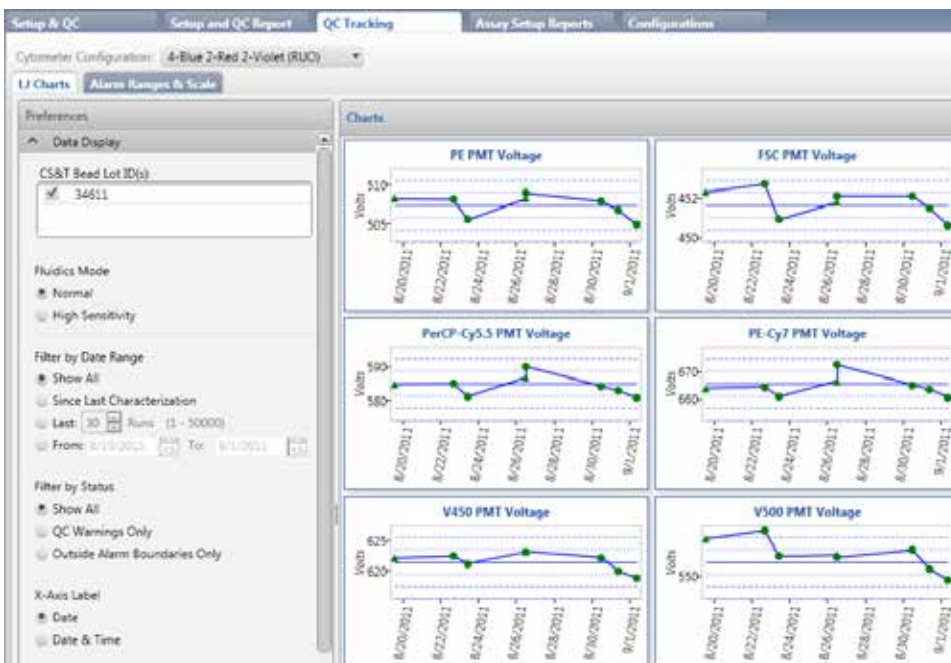
BD FACSLyric™の特徴 - 精度管理

精度管理 種類と機能



機器性能のトラッキング

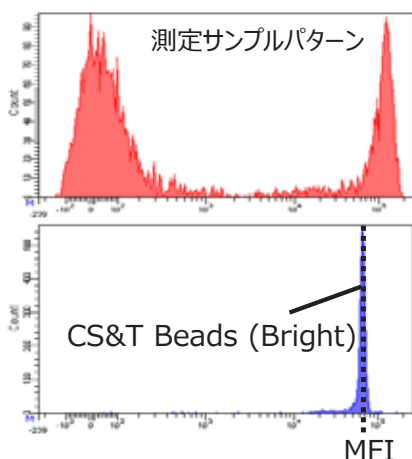
QCの各項目に関して日々のQC 結果のtracking結果をグラフで表せます。このグラフから機器状況を確認できます。



BD FACSLyric™の特徴 - データ標準化

測定強度の数値化 (Create Tube Settings)

FACSLyric™はサンプルの測定条件（シグナル検出の強度）をTTVs（Tube Target Values）として数値化することができます。このTTVsが、以降の実験で同じ測定感度を再現するための基準となります。

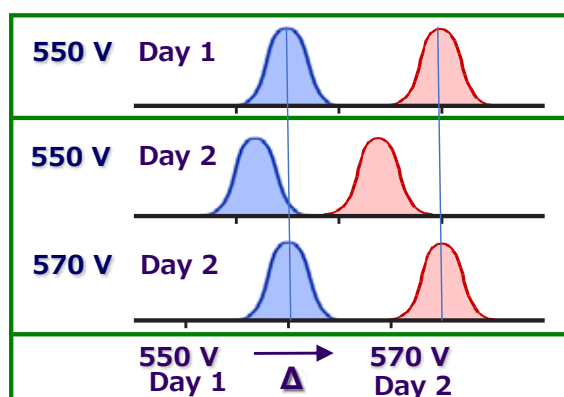


Parameter	Tube Target Value (TTV)	Threshold (D)
FSC	0.2052329	25000
SSC	4.350843	
FTC	0.2169303	
PE	0.9327728	
PerCP-Cy5.5	0.3084997	
PE-Cy7	0.6287922	
APC	0.3289055	
APC-H7	0.1895378	

Target Value 例

TTVsはサンプルの測定条件におけるCS&T BeadsのBright集団のMFIによって求められます。TTVsはBDがFACSuiteのシステムに対して定めた独自の値であり、CS&T BeadsのMFIとABC unit（CS&T Beadsの蛍光量単位）で換算された値です。

測定感度の再現 (Run Assay&Tube Settings Setup)



Performance QC実行後、Assay & Tube Settings Setupを行うことで、保存されたTube settingsの測定感度を再現するために、PMT voltageが調整されます。

別個体機での再現

FACSLyric A



FACSLyric B



1. Performance QCの実行
2. サンプルに合わせた測定感度設定
3. Tube Settings もしくは Reference Settingsの登録
4. Settingsファイルのエクスポート
5. Settingsファイルのインポート
6. Performance QCの実行
7. Run Assay and Tube Settings Setup
8. <Reference settings 移植の場合> Reference Settingsの登録
9. サンプル測定

BD FACSTMで使用可能な蛍光色素 (1)

* Lyricで使用できない色素も含まれます。

Analyzers		Sorters		Excitation Laser Line	Filter	Relative Brightness 488 / 561	Blue Laser (488 nm) / Yellow-Green Laser (561 nm)
BD Accuri ⁺	BD FACSCalibur ⁺	BD LSRIIFortessa ⁺ Product Family ⁺	BD FACSymphony ⁺ Product Family ⁺				
●	●	●	●	488 nm	530/30	■	BD Horizon Brilliant™ Blue 515 (BB515) (Ex _{max} 490 nm/Em _{max} 515 nm) is a dye that was exclusively developed by BD Life Sciences as an additional bright dye for the blue laser. This dye is significantly brighter than FITC and has less spillover into the PE channel. Due to similar excitation and emission properties, BD Horizon BB515 and FITC/Alexa Fluor [®] 488 cannot be used simultaneously.
●	●	●	●	488 nm	530/30	■	Alexa Fluor[®] 488 (A488) (Ex _{max} 495 nm/Em _{max} 519 nm) conjugates are highly photostable and remain fluorescent over a broad pH range. Alexa Fluor [®] 488 tends to be brighter than FITC and more optimal for intracellular applications. Due to nearly identical excitation and emission properties, FITC and Alexa Fluor [®] 488 cannot be used simultaneously. Alexa Fluor [®] 488 exhibits extraordinary photostability, which makes it highly suitable for fluorescence microscopy.
●	●	●	●	488 nm	530/30	■	FITC (Ex _{max} 494 nm/Em _{max} 520 nm) Fluorescein isothiocyanate (FITC) is a fluorochrome with a molecular weight of 389 Da. FITC is sensitive to pH changes and photobleaching. Due to nearly identical excitation and emission properties, FITC and Alexa Fluor [®] 488 cannot be used simultaneously. FITC is relatively dim and should be reserved for highly expressed markers whenever possible.
●	●	●	●	488 nm 532 nm 561 nm	575/26	■	PE (Ex _{max} 496 nm/Em _{max} 578 nm) R-phycoerythrin (PE) is an accessory photosynthetic pigment found in red algae. It exists in vitro as a 240-kDa protein with 23 phycoerythrin chromophores per molecule. This makes PE the brightest fluorochrome for flow cytometry applications, but its photobleaching properties make it unsuitable for fluorescence microscopy.
●	●	●	●	488 nm 532 nm 561 nm	610/20	■	BD Horizon™ PE-CF594 (PE-CF594) (Ex _{max} 496 nm/Em _{max} 612 nm) is a tandem conjugate, developed exclusively by BD Life Sciences, that combines PE and CF594. PE-CF594 is a brighter alternative to PE-Texas Red [®] with improved spectral characteristics.
●	●	●	●	488 nm 532 nm 561 nm	670/14	■	PE-Cy™5 (Ex _{max} 496 nm/Em _{max} 667 nm) is a tandem conjugate that combines phycoerythrin and the cyanine dye Cy5. Because of its broad absorption range and the fact that its emission spectra are equivalent to APC, PE-Cy5 is not recommended for simultaneous use with APC. The Cy5 molecule has been shown to exhibit nonspecific binding to Fc receptors, which is most apparent on monocyte populations.
●	●	●	●	488 nm 532 nm	695/40	■	PerCP (Ex _{max} 482 nm/Em _{max} 678 nm) is a component of the photosynthetic apparatus found in the dinoflagellate <i>Glenodinium</i> . PerCP is a protein complex with a molecular weight of ~35 kDa. Due to its photobleaching characteristics, PerCP conjugates are not recommended for use on flow cytometers with high-power lasers (>25 mW).
●	●	●	●	488 nm	695/40	■	BD Horizon Brilliant™ Blue 700 (BB700) (Ex _{max} 485 nm/Em _{max} 693 nm) is a dye that was exclusively developed by BD Life Sciences as a brighter alternative to PerCP-Cy5.5. This dye also has less cross-laser excitation off the 405-nm laser, resulting in less spillover into the violet channels compared to PerCP-Cy5.5. Due to similar excitation and emission properties, BD Horizon BB700 and PerCP-Cy5.5 cannot be used simultaneously.
●	●	●	●	488 nm 532 nm	695/40	■	PerCP-Cy™5.5 (Ex _{max} 482 nm/Em _{max} 678 nm) is a tandem conjugate that combines PerCP with the cyanine dye Cy5.5. PerCP-Cy5.5 is not subject to photobleaching like PerCP and can be used with stream-in-air flow cytometers. Additionally, the PerCP-Cy5.5 tandem conjugate is not as susceptible to fixative or light instability compared to APC-Cy™7 and PE-Cy7.
●	●	●	●	488 nm 532 nm 561 nm	780/60	■	PE-Cy™7 (Ex _{max} 496 nm/Em _{max} 785 nm) is a tandem fluorochrome that combines PE and the cyanine dye Cy7. PE-Cy7 is sensitive to photo-induced degradation, resulting in loss of fluorescence and changes in spillover. Extreme caution must be taken to avoid light exposure and prolonged exposure to paraformaldehyde fixative. Fixed cells should be analyzed within 4 hours of fixation in paraformaldehyde or transferred to a paraformaldehyde-free buffer for overnight storage.



Analyzers		Sorters		Excitation Laser Line	Filter	Relative Brightness	Red Laser (640 nm)
BD Accuri ⁺	BD FACSCalibur ⁺	BD LSRIIFortessa ⁺ Product Family ⁺	BD FACSymphony ⁺ Product Family ⁺				
●	●	●	●	633 nm 635 nm 640 nm	660/20	■	APC (Ex _{max} 650 nm/Em _{max} 660 nm), Allophycocyanin (APC), is an accessory photosynthetic pigment found in blue-green algae. Its molecular weight is approximately 105 kDa. Due to nearly identical excitation and emission properties, APC and Alexa Fluor [®] 647 cannot be used simultaneously.
●	●	●	●	633 nm 635 nm 640 nm	660/20	■	Alexa Fluor[®] 647 (A647) (Ex _{max} 650 nm/Em _{max} 668 nm) conjugates are highly photostable and remain fluorescent over a broad pH range. Due to nearly identical excitation and emission properties, APC and Alexa Fluor [®] 647 cannot be used simultaneously. APC tends to be brighter while Alexa Fluor [®] 647 is more optimal for intracellular applications. This fluorochrome exhibits uncommon photostability, making it an ideal choice for use in fluorescence microscopy.
●	●	●	●	633 nm 635 nm 640 nm	730/45	■	BD Horizon™ APC-R700 (A700) (Ex _{max} 652 nm/Em _{max} 704 nm) is a tandem fluorochrome that combines APC with R700, a proprietary organic dye. This dye has been developed exclusively by BD Life Sciences as a brighter alternative to Alexa Fluor [®] 700. Due to similar excitation and emission properties, APC-R700 and Alexa Fluor [®] 700 cannot be used simultaneously.
●	●	●	●	633 nm 635 nm 640 nm	730/45	■	Alexa Fluor[®] 700 (Ex _{max} 696 nm/Em _{max} 719 nm) is a far-red dye that can be excited with a 633–640-nm laser. This enables multicolor analysis in conjunction with APC or Alexa Fluor [®] 647 and APC-H7 or APC-Cy7 reagents.
●	●	●	●	633 nm 635 nm 640 nm	780/60	■	APC-Cy™7 (Ex _{max} 650 nm/Em _{max} 785 nm) is a tandem fluorochrome that combines APC and the cyanine dye Cy7. Special precautions must be taken with APC-Cy7 conjugates, and cells stained with them, to protect the fluorochrome from long-term exposure to light. Fixed cells should be analyzed within 4 hours of fixation in paraformaldehyde or transferred to a paraformaldehyde-free buffer for overnight storage. Due to nearly identical excitation and emission properties, APC-Cy7 and APC-H7 cannot be used simultaneously.
●	●	●	●	633 nm 635 nm 640 nm	780/60	■	APC-H7 (Ex _{max} 650 nm/Em _{max} 785 nm) is an APC-cyanine tandem fluorochrome which uses an analog of Cy7 and has similar spectral properties to APC-Cy7. APC-H7 conjugates provide greater stability in light and paraformaldehyde fixatives and have less spillover into the APC channel than APC-Cy7 conjugates. Due to nearly identical excitation and emission properties, APC-Cy7 and APC-H7 cannot be used simultaneously.



BD FACS™で使用可能な蛍光色素 (2)

* Lyricで使用できない色素も含まれます。

Analyzers						Sorters						Excitation Laser Line	Filter	Relative Brightness	Description											
BD Accuri™	BD FACSCalibur™	BD LSRII™	BD FACSVersar™	BD FACSymphony™	BD FACSAria™	BD Accuri™	BD FACSCalibur™	BD LSRII™	BD FACSVersar™	BD FACSymphony™	BD FACSAria™															
												Violet Laser (405 nm)														
													405 nm	450/40		BD Horizon Brilliant™ Violet 421 (BV421) (Ex _{max} 407 nm/Em _{max} 421 nm) is a polymer-based dye excited by the violet laser and is one of the brightest fluorochromes offered by BD Life Sciences. Conjugates are typically 10 times brighter than Pacific Blue™ conjugates and are often as bright as or brighter than PE conjugates. Due to similar excitation and emission properties, BD Horizon BV421 and BD Horizon V450 cannot be used simultaneously.										
													405 nm	450/40		BD Horizon™ Violet V450 (V500) (Ex _{max} 404 nm/Em _{max} 448 nm) is a coumarin dye excited by the violet laser. Due to similar excitation and emission properties but different spillover characteristics, BD Horizon BV421 and BD Horizon V450 cannot be used simultaneously.										
													405 nm	525/40		BD Horizon Brilliant™ Violet 480 (BV480) (Ex _{max} 436 nm/Em _{max} 478 nm) is a polymer-based dye that can be excited by the violet laser and detected in the BD Horizon BV510 (525/40-nm) filter set. Due to its emission profile, BV480 has less spillover into the BV605, BV650 and BV711 channels and, in general, is brighter than BV510. Due to its excitation profile, BV480 will also have less cross-laser excitation with the UV laser, resulting in less spillover into UV channels compared to BV510. Due to similar excitation and emission properties, BV480, BV510 and V500 cannot be used simultaneously.										
													405 nm	525/40		BD Horizon Brilliant™ Violet 510 (BV510) (Ex _{max} 405 nm/Em _{max} 510 nm) is a polymer-based dye that is brighter than BD Horizon™ V500. Due to similar excitation and emission properties, BD Horizon BV510 and BD Horizon V500 cannot be used simultaneously.										
													405 nm	525/50		BD Horizon™ V500 (Ex _{max} 415 nm/Em _{max} 500 nm) is a novel organic dye excited by the violet laser. This dye offers improved brightness over Pacific Orange™ and reduced spillover into the FITC channel when compared to AmCyan. BD Horizon V500 cannot be used simultaneously with BD Horizon BV510 or Pacific Orange™.										
													405 nm	610/20		BD Horizon Brilliant™ Violet 605 (BV605) (Ex _{max} 407 nm/Em _{max} 602 nm) is a tandem fluorochrome that combines BD Horizon BV421 and an acceptor dye with emission at 602 nm. These conjugates are very bright, exhibiting similar brightness to equivalent PE conjugates. Due to the excitation of the acceptor dye by the green (532-nm) and yellow-green (561-nm) lasers, there will be significant spillover of the BD Horizon BV605 signal into the PE and BD Horizon PE-CF594 detectors off the green or yellow-green lasers.										
													405 nm	660/20		BD Horizon Brilliant™ Violet 650 (BV650) (Ex _{max} 407 nm/Em _{max} 650 nm) is a tandem fluorochrome of BD Horizon™ BV421 and an acceptor dye with an Em Max at 650 nm. Due to the excitation and emission characteristics of the acceptor dye, there will be spillover into the APC and Alexa Fluor® 700 detectors. BD Horizon BV650 will have moderate spillover into the BD Horizon™ BV711 detector.										
													405 nm	710/50		BD Horizon Brilliant™ Violet 711 (BV711) (Ex _{max} 407 nm/Em _{max} 711 nm) is a tandem fluorochrome of BD Horizon BV421 and an acceptor dye with an Em Max at 711 nm. This dye offers a very bright choice for the violet laser. Due to the excitation and emission characteristics of the acceptor dye, there may be moderate spillover into the Alexa Fluor® 700 and PerCP-Cy™5.5 detectors. BD Horizon BV711 will also have moderate spillover into the BD Horizon™ BV786 detector.										
													405 nm	750/30		BD Horizon Brilliant™ Violet 750 (BV750) (Ex _{max} 405 nm/Em _{max} 745 nm) is a tandem fluorochrome that combines BD Horizon BV421 and an acceptor dye with an emission max at 745 nm. BV750 is designed for instruments equipped with a 405nm Violet laser and a 750/30 filter. Due to the excitation of the BV421 donor by the 355 nm (UV) laser line, there may be spillover into the BUV737 detector off of the UV laser. Due to the dose proximity of their emission spectra, there will be significant spillover from BV750 into BV786. BV750 has been exclusively developed by BD Life Sciences.										
													405 nm	780/60		BD Horizon Brilliant™ Violet 786 (BV786) (Ex _{max} 407 nm/Em _{max} 786 nm) is a tandem fluorochrome of BD Horizon BV421 and an acceptor dye with an Em Max at 786 nm. BD Horizon BV786 offers a bright choice for the sixth detector off the violet laser.										

Analyzers						Sorters						Excitation Laser Line	Filter	Relative Brightness	Description											
BD Accuri™	BD FACSCalibur™	BD LSRII™	BD FACSVersar™	BD FACSymphony™	BD FACSAria™	BD Accuri™	BD FACSCalibur™	BD LSRII™	BD FACSVersar™	BD FACSymphony™	BD FACSAria™															
												Ultraviolet Laser (355 nm)														
													355 nm	379/28		BD Horizon Brilliant™ Ultraviolet 395 (BUV395) (Ex _{max} 348 nm/Em _{max} 395 nm) is a polymer-based dye with an emission max at 395 nm. BUV395 is designed for instruments equipped with a 355 nm UV laser and a 379/28 filter. This dye is optimal for multicolor flow cytometry because it has minimal spillover into other detectors. BUV395 has been exclusively developed by BD Life Sciences.										
													355 nm	515/30		BD Horizon Brilliant™ Ultraviolet 496 (BUV496) (Ex _{max} 351 nm/Em _{max} 491 nm) is a tandem fluorochrome that combines BD Horizon™ BUV395 and an acceptor dye with an emission max at 491 nm. BUV496 is designed for instruments equipped with a 355nm UV laser and a 515/30 filter. BUV496 has been exclusively developed by BD Life Sciences.										
													355 nm	585/15		BD Horizon Brilliant™ Ultraviolet 563 (BUV563) (Ex _{max} 351 nm/Em _{max} 560 nm) is a tandem fluorochrome that combines BD Horizon BUV395 and an acceptor dye with an emission max at 560 nm. BUV563 is designed for instruments equipped with a 355nm UV laser and a 585/15 filter. Due to the excitation of the acceptor dye by other laser lines, there may be spillover into channels detecting PE (eg, 575/26-nm filter) and PE-CF594 (eg, 610/20-nm filter). BUV563 has been exclusively developed by BD Life Sciences.										
													355 nm	610/20		BD Horizon Brilliant™ Ultraviolet 615 (BUV615) (Ex _{max} 350 nm/Em _{max} 616 nm) is a tandem fluorochrome that combines BD Horizon BUV395 and an acceptor dye with an emission max at 616 nm. BUV615 is designed for instruments equipped with a 355nm UV laser and a 610/20 filter. Due to the excitation of the acceptor dye by the 561nm (Yellow-Green) laser line, there may be significant spillover into the PE-CF594 detector from the Yellow-Green laser. BUV615 has been exclusively developed by BD Life Sciences.										
													355 nm	670/25		BD Horizon Brilliant™ Ultraviolet 661 (BUV661) (Ex _{max} 351 nm/Em _{max} 657 nm) is a tandem fluorochrome that combines BD Horizon BUV395 and an acceptor dye with an emission max at 657 nm. BUV661 is designed for instruments equipped with a 355nm UV laser and a 670/25 filter. Due to cross laser excitation of the acceptor dye, there may be significant spillover into the APC detector. BUV661 has been exclusively developed by BD Life Sciences.										
													355 nm	740/35		BD Horizon Brilliant™ Ultraviolet 737 (BUV737) (Ex _{max} 350 nm/Em _{max} 732 nm) is a tandem fluorochrome that combines BD Horizon BUV395 and an acceptor dye with an emission max at 732 nm. BUV732 is designed for instruments equipped with a 355nm UV laser and a 740/35 filter. Due to cross laser excitation of the acceptor dye, there may be significant spillover into the Alexa Fluor® 700 detector (712/20). BUV737 has been exclusively developed by BD Life Sciences.										
													355 nm	820/60		BD Horizon Brilliant™ Ultraviolet 805 (BUV805) (Ex _{max} 351 nm/Em _{max} 797 nm) is a tandem fluorochrome that combines BD Horizon BUV395 and an acceptor dye with an emission max at 797 nm. BUV805 is designed for instruments equipped with a 355nm UV laser and a 820/60 filter. BUV805 has been exclusively developed by BD Life Sciences.										

BD FACS™ シリーズ - 蛍光の特性 (1)

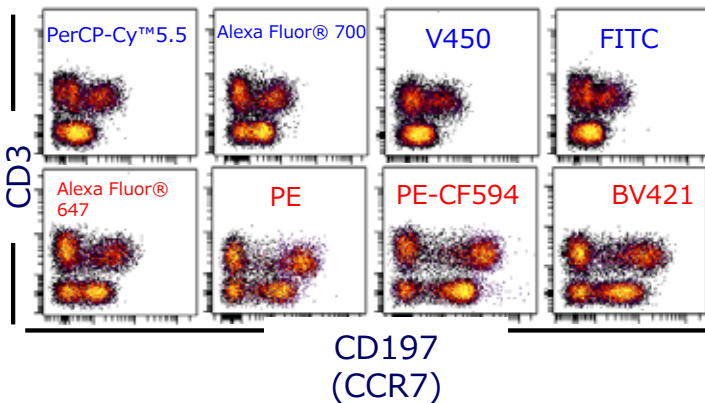
蛍光色素の明るさ (蛍光強度)

Laser	Fluorochrome			
	Very Bright	Bright	Moderate	Dim
Ultraviolet (355 nm)		BD Horizon™ BV563 BD Horizon™ BV661 BD Horizon™ BV737	BD Horizon™ BV395 BD Horizon™ BV496	BD Horizon™ BV805
Violet (405 nm)	BD Horizon™ BV421 BD Horizon™ BV550 BD Horizon™ BV711	BD Horizon™ BV480 BD Horizon™ BV605 BD Horizon™ BV786	BD Horizon™ BV510	BD Horizon™ V450 BD Horizon™ V500
Blue (488 nm)	BD Horizon™ BB515 BD Horizon™ BB700 BD Horizon™ PE-CF594 PE-Cy™5	PE PE-Cy™7	FITC Alexa Fluor® 488 PerCP-Cy™5.5	PerCP
Yellow/Green (561 nm)	PE BD Horizon™ PE-CF594 PE-Cy5 PE-Cy7			
Red (640 nm)		APC Alexa Fluor® 647 BD Horizon™ APC R700		Alexa Fluor® 700 APC-H7 APC-Cy7

蛍光色素の選択基準

- 使用するFACSのレーザーおよび検出器構成
- 色素の蛍光強度
- 蛍光漏れ込みが少ない組合せ

蛍光色素の選択によって分離度が変わる

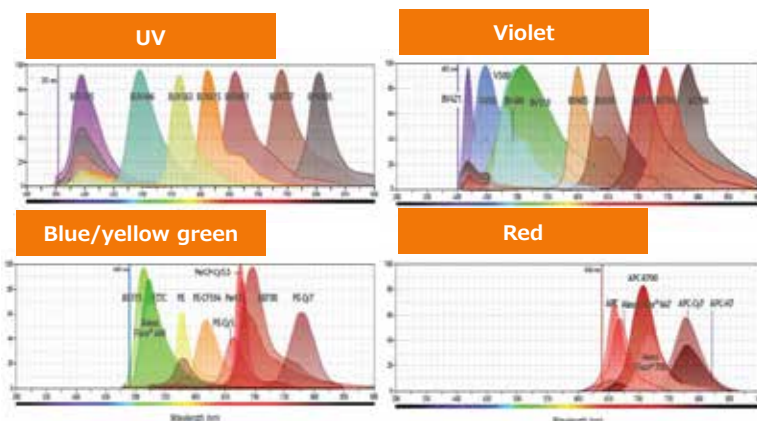


低輝度

高輝度

- 特に低発現の抗原を測定する際に、色素の選択によっては明確な結果が得られない場合がある
- 低発現の抗原には高輝度の蛍光色素を使用する

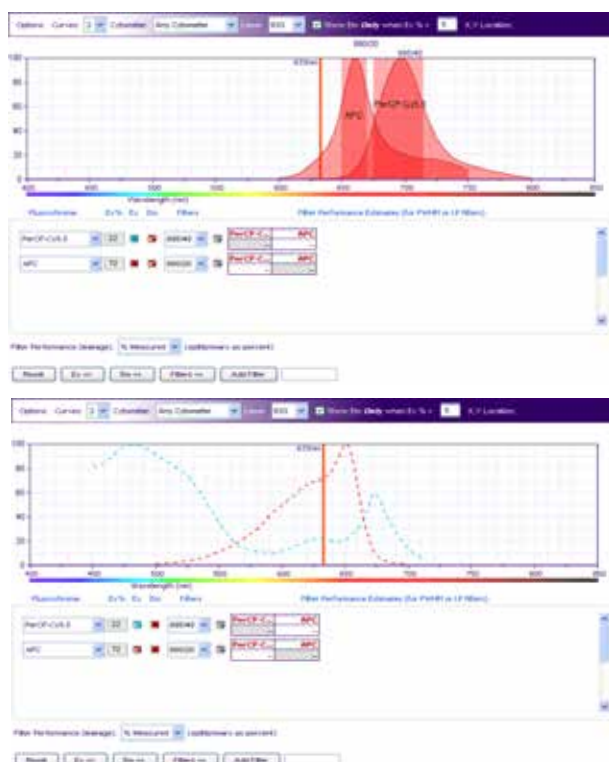
複数のレーザーによる励起



- マルチカラー解析においては、1本のレーザーで複数の蛍光色素を励起する必要があります。その際には、各蛍光スペクトルのオーバーラップがおこり、多重な蛍光補正が必要となります。
- 蛍光スペクトルの近接する色素を用いた場合には、蛍光のオーバーラップが特に大きくなりますので、その選択には注意が必要となります。また、FACSDivaソフトウェアのAuto Compensation機能は、マルチカラー解析における複雑な蛍光補正をより簡便にすることができます。

BD FACS™シリーズ - 蛍光の特性 (2)

異なるレーザーで励起する蛍光①



PerCP-Cy5.5とAPCの場合：

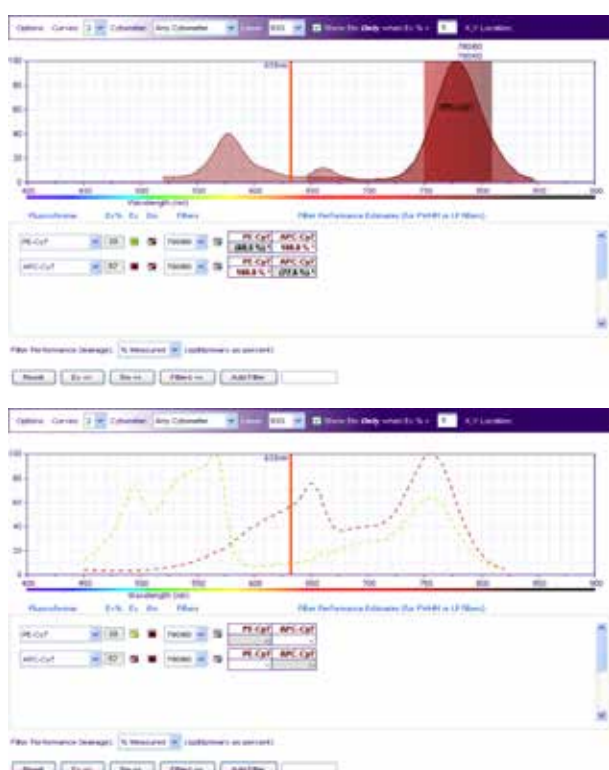
PerCP-Cy5.5とAPC蛍光スペクトルは、非常に近接していますが、PerCP-Cy5.5を励起する488nmのレーザーとAPCを励起する633nmのレーザーには照射位置に間隔があり、両者の蛍光が重なることはありません。

また、それぞれ励起光は、別々のピンホールへ集光される光学システムであるため、互いの蛍光の漏れ込みはほとんどありません。

注意する点は、APCは488nmのレーザーにより励起されませんが、PerCP-Cy5.5は633nmのレーザーでわずかに励起されることです。そのため、PerCP-Cy5.5はAPCに対しての蛍光補正が必要となります。

同様に複数のレーザーで励起される特性がある色素に、PE-Texas Red、PE-Cy5、PE-Cy7、APC-Cy7などがあります。

異なるレーザーで励起する蛍光②



PE-Cy7とAPC-Cy7の場合：

PE-Cy7とAPC-Cy7の場合は、蛍光波長特性はCy7によるため、蛍光波長はほとんど重なっています。

蛍光スペクトルは重なりますが、PE-Cy7は488nmレーザー、APC-Cy7には633nmレーザーにより励起され、それぞれ別々のピンホールに集光されるため、互いの蛍光の漏れ込みは最小となり、同時に使用することが可能です。

APC-Cy7は488nmレーザーで励起されませんが、PE-Cy7は633nmのレーザーでわずかに励起されるため、APC-Cy7に対する蛍光補正が必要となります。

BD FACS™シリーズ - 蛍光の特性 (3)

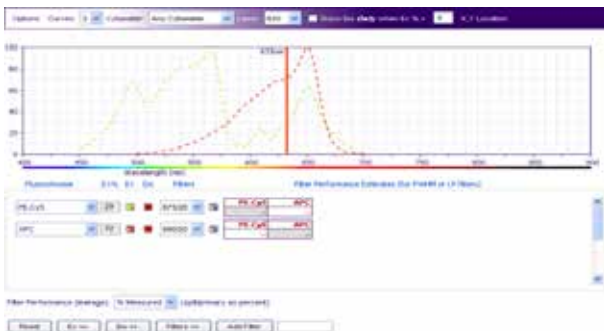
2種類のレーザーにより励起される蛍光の場合、色素の組み合わせによってはコンペンセーションが難しい



PE-Cy5の場合：

PE-Cy5は488nmのレーザーでも633nmレーザーでも効率良く励起されてしまいます。PE-Cy5の650nm付近のピークは、633nmにて励起されるCy5の蛍光特性に由来します。

よって、633nmでAPCを用いようとした場合には、同様に励起されたPE-Cy5の蛍光と重なってしまい、蛍光補正が困難となります。



このように同じレーザーで同一スペクトルを持つ複数の蛍光色素が励起されてしまう場合には、蛍光補正をかけることが難しくなります。

これら複数のレーザーで励起される色素は、マルチカラー解析において、抗原の発現率が低い場合やネガティブセレクション等に用いることは可能です。

BD Horizon Brilliant シリーズ

Brilliant Blue: 515, 700

- BB515はFITCに、BB700はPerCP-Cy™5.5に代わる、Blue laserで励起される高輝度色素
- 安定性に優れた色素（光安定性、固定膜透過剤への安定性）
- BB515 はFITC に比べてPEへの漏れ込みが少ない

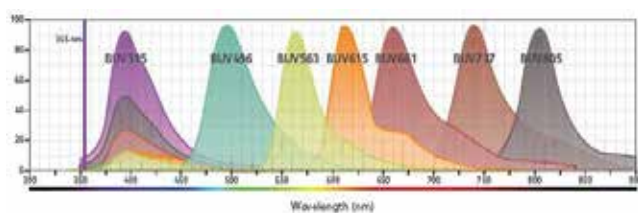
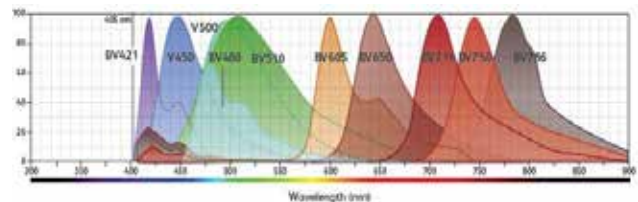
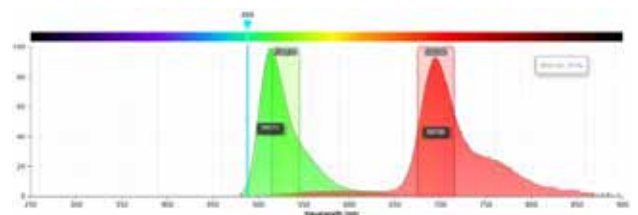
Brilliant Violet: 421, 480, 510, 605, 650, 711, 750, 786

- Violetレーザーで励起される高輝度色素
- 他レーザーへの漏れ込みが少ない
- 安定性に優れた色素（光安定性、固定膜透過剤への安定性）
- 各色素のフィルターセットが別途必要

Brilliant Ultraviolet:

395, 486, 563, 615, 611 737, 805

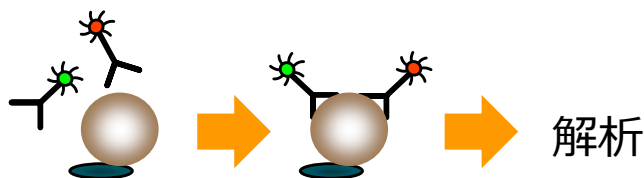
- UVレーザーで励起される史上初の色素
- 他レーザーへの漏れ込みが少ない
- 安定性に優れた色素（光安定性、固定膜透過剤への安定性）
- 各色素のフィルターセットが別途必要



FCM サンプル調製 (1)

基本的なサンプル調製

1. Unstained control (or ISOTYPE stained control)
2. Single stained control
3. All stained sample



例) CD3-FITC, CD4-PE 2重染色, 各IgG ISOTYPEあり

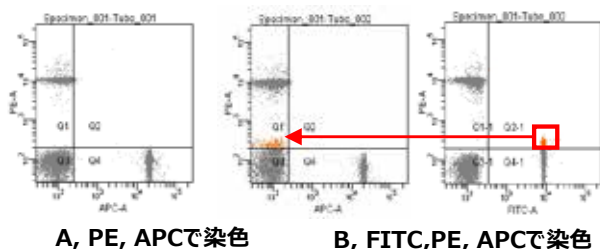
①	Unstained control	IgG ₁ -FITC	IgG ₁ -PE
②	FITC stained control	CD3-FITC	IgG ₁ -PE
③	PE stained control	IgG ₁ -FITC	CD4-PE
④	All stained sample	CD3-FITC	CD4-PE

FMO(Fluorescence Minus One):Back groundの設定

マルチカラー解析において陰性集団と陽性集団を正確に区別するためには、陰性コントロールと単染色コントロールだけでは十分なコントロールにならない場合があります。

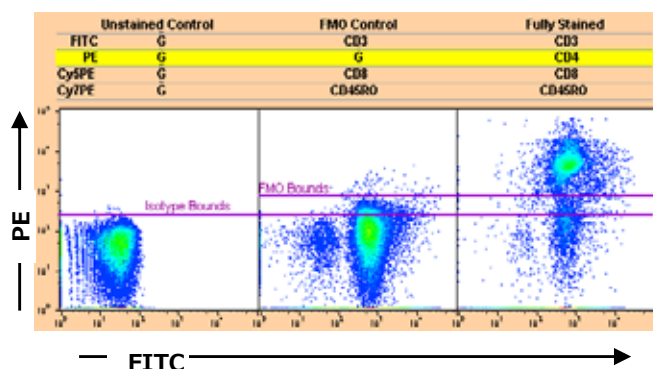
マルチカラー解析では陰性集団と陽性集団の境界線は他に染色している蛍光色素によって変わってくるためです。Compensationの調整はMeanの値を用いて行います。

FMOコントロールとは、正確に陰性集団と陽性集団を区別したい目的の蛍光色素以外の色素で染色したサンプルになります。例えば、FITC, PE, PE-Cy5, PE-Cy7でのマルチカラー解析を予定しており、PEの染色性が重要であるならば、FITC, PE-Cy5, PE-Cy7とPE isotype controlで染色したサンプルになります。



上図では、AとBでは陰性領域のPEの蛍光が違うため、陰性集団と陽性集団の境界線が変わってきてしまいます。これは、BのFITCの一部が弱PE陽性の位置に出てきてしまうためです。

そのため、正確に陰性集団と陽性集団を区別するには上記のコントロールに加えて、**Fluorescence minus one (FMO)** コントロールを作成することで適切に境界線を引くことができます。



上図では、unstained controlで設定された境界線は適切な陰性集団を区別できていません。FMO controlを使用することにより、陽性集団を正確に区別することができるようになります。

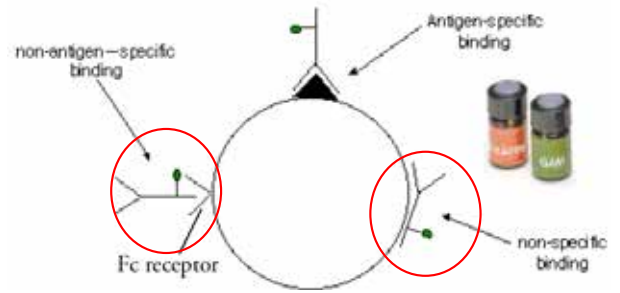
参考：

- L.A.Herzenberg, Nature Immu Vol7 Number7 July 2006 681-685
- L.A.Herzenberg, Clin Immu 110 277-283 (2004)
- M.Roederer, Cytometry 45:194-205 (2001)

FCM サンプル調製 (2)

抗体非特異結合の評価

モノクローナル抗体は細胞の抗原に特異的に結合しますが、非特異的に付着する場合があります。この場合、目的の抗体と同タイプのISOTYPE抗体で染色したサンプルを使用する事で非特異反応の有無を確認することができます。

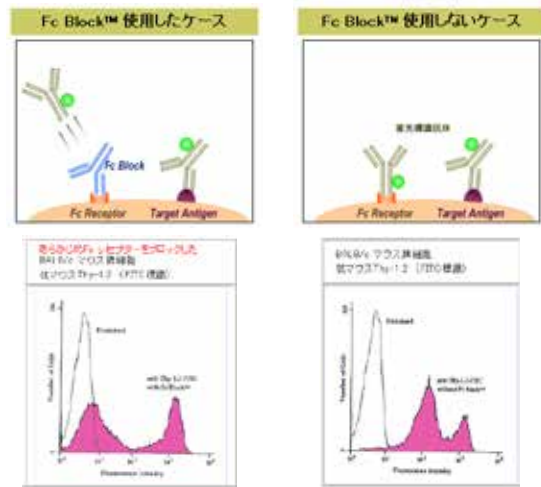


Fc レセプターブロック

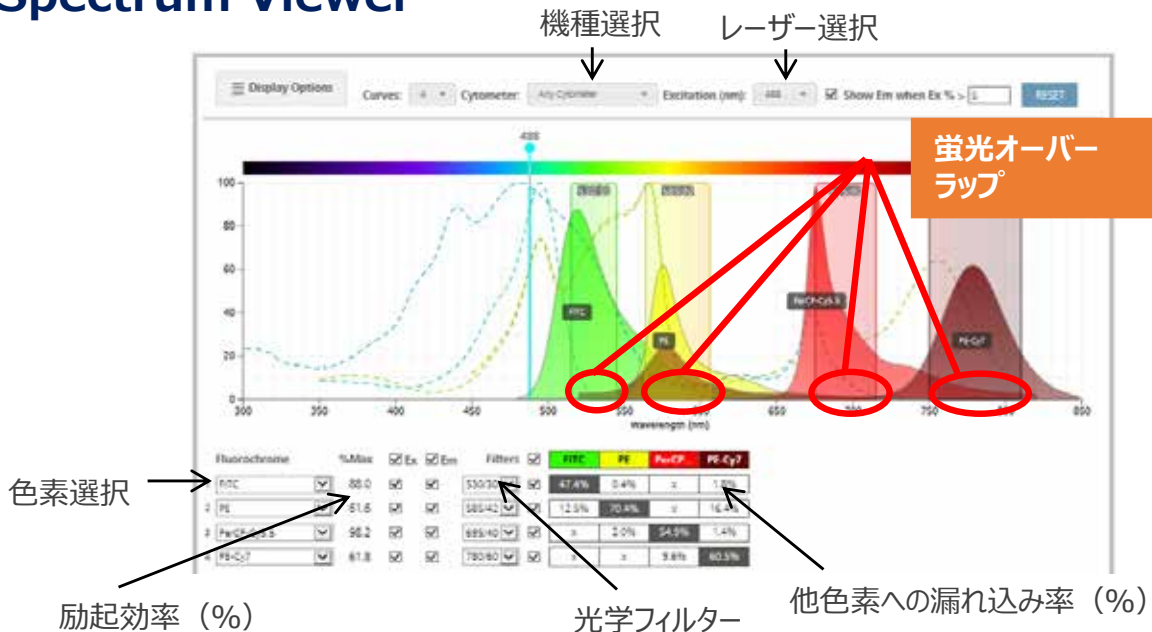
特定の細胞は抗体のFc部位が結合するFc レセプターを保有しています。その場合、抗体染色の前にFcブロックを行う必要があります。

Fc γ レセプターが存在する細胞：
B リンパ球、NK 細胞、顆粒球、単球、マクロファージ、血小板 など

- Mouse BD FcBlock™, CD16/CD32
Cat# 553141 and 553142
- Rat BD FcBlock™, CD32
Cat# 550270 and 550271
- Human FcBlock™
Cat# 564219 and 564220

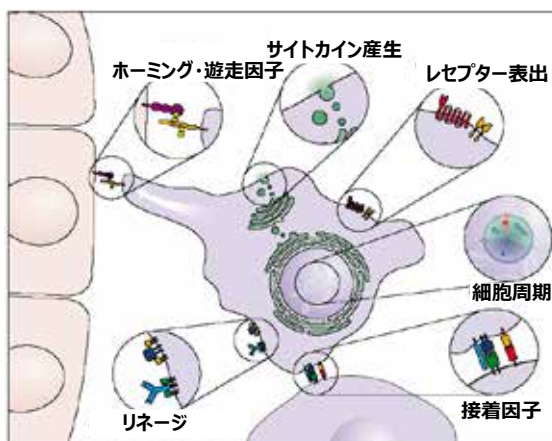


Spectrum Viewer



FCMのアプリケーション代表例

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量



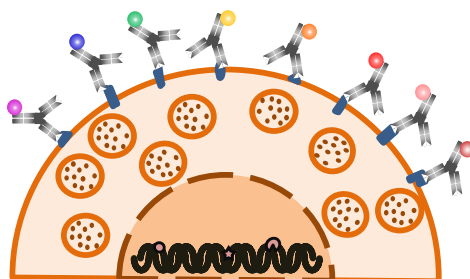
細胞表面抗原の解析

主な細胞表面抗原

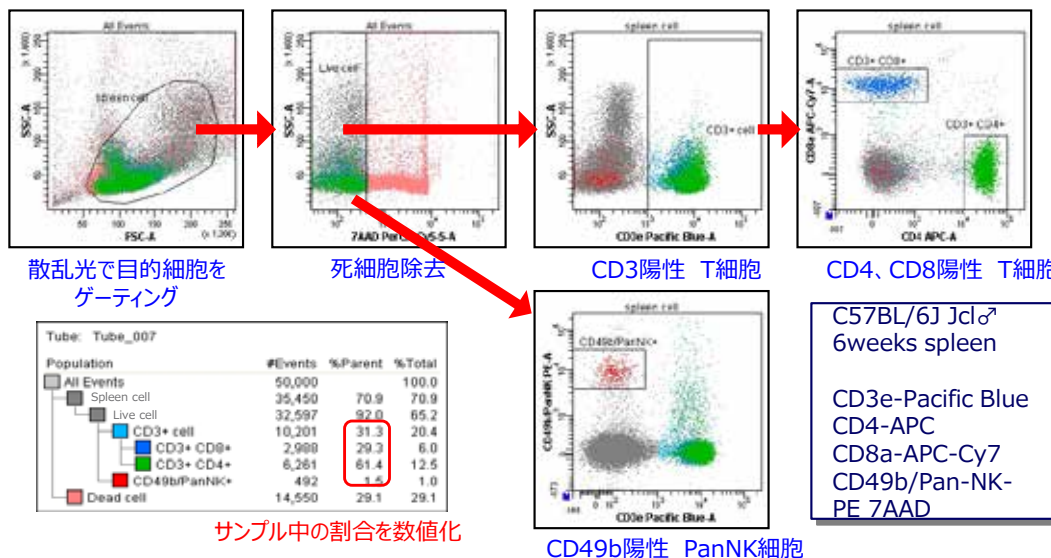
- ✓ 細胞膜構成タンパク
- ✓ レセプター
- ✓ 接着因子
- ✓ トランスポーター

Cluster of Differentiation (CD分類)

細胞表面抗原解析に多用されるモノクローナル抗体の国際分類。同一抗原に対する複数の抗体クローンが存在するため、現在では多くの場合分類名をそのまま抗原名として使用する。HLDAおよびHCDMワークショップ（1982年～）により決定された。

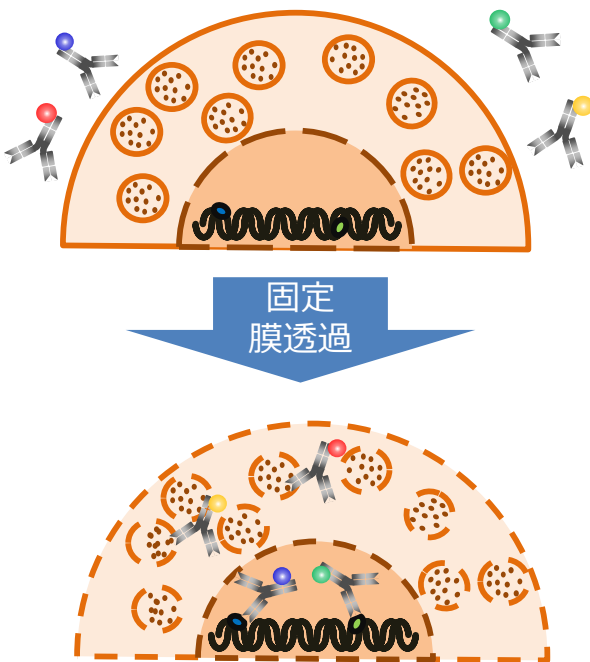


リンパ球サブセットの解析例



C57BL/6J Jcl♂
6weeks spleen
CD3e-Pacific Blue
CD4-APC
CD8a-APC-Cy7
CD49b/Pan-NK-
PE 7AAD

細胞内抗原の解析

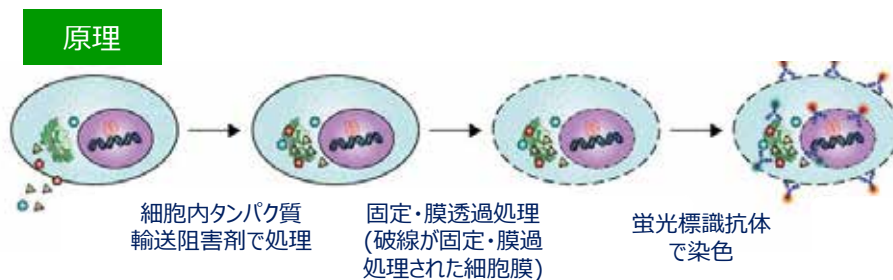


- 細胞内抗原の種類
 - サイトカイン
 - 転写因子
 - リン酸化タンパク質 など

細胞を固定し、細胞膜の透過処理をすることで、抗体や核染色剤が細胞内抗原にアクセスできるようになる

- 固定剤
 - エタノール
 - メタノール
 - パラホルムアルデヒドなど
- 膜透過剤
 - サポニン
 - Triton-X など

細胞内サイトカインの解析

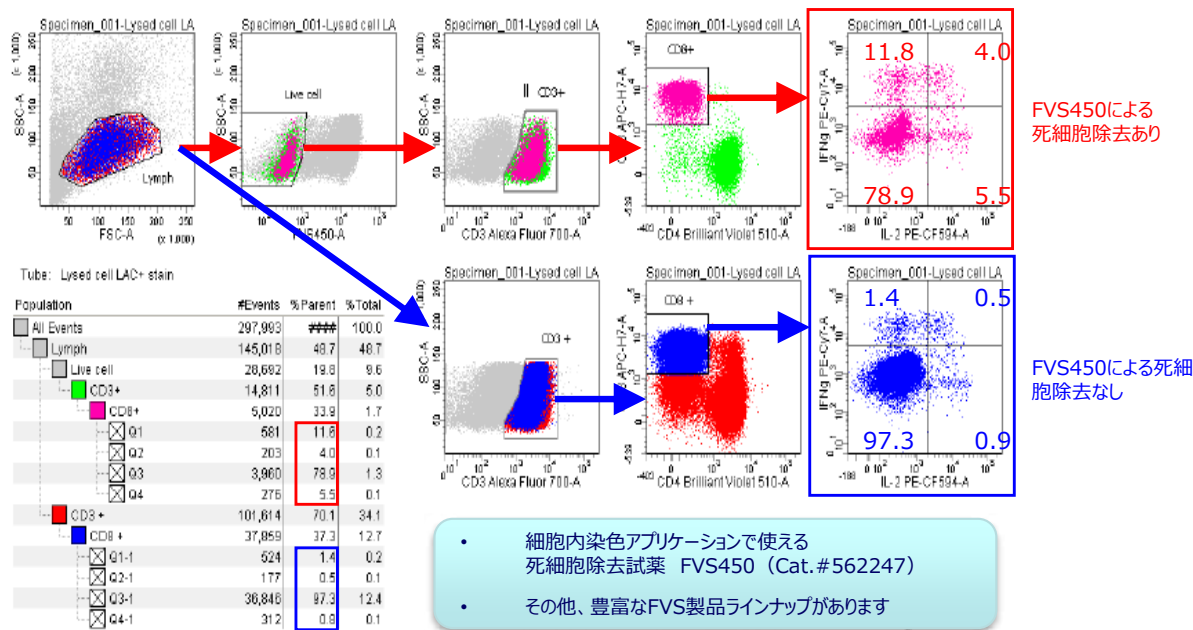


動物種	サイトカイン	細胞内タンパク輸送阻害剤
ヒト	IL-1α, IL-6, IL-8, TNF-α	Monensin (Cat. #554724 BD GolgiStop™)
ヒト	IFN-γ, IL-2, IL-10, IL-12, MCP-1, MCP-3, MIG, MIP-1α, RANTES	Monensinまたは Brefeldin A (Cat. #555029 BD GolgiPlug™)
マウス	IL-6, IL-12, TNF-α	Brefeldin A
マウス	GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-5, IL-10	Monensin
マウス	IFN-γ, IL-2	Monensin またはBrefeldin A

細胞表面抗原染色との併用により、サイトカイン産生細胞のPhenotypeを解析することができます
細胞が希少な場合でもサイトカイン産生を検出できます

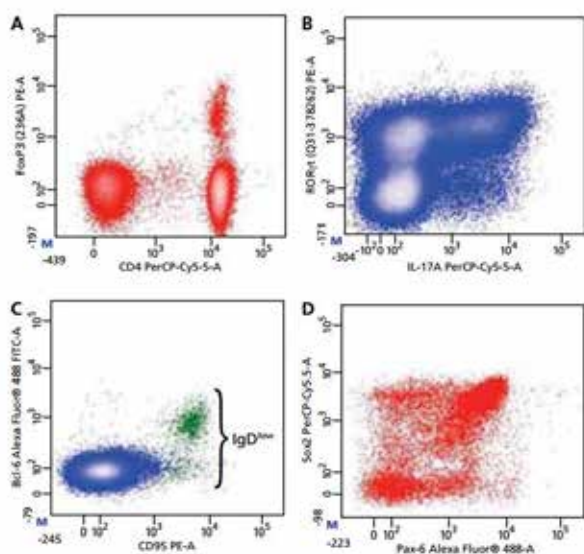
細胞内サイトカイン/転写因子

アミン結合性の死細胞除去試薬(FVS製品)は固定サンプルでも使用可能。死細胞への抗体の非特異結合による分離低下を回避できる。



- 細胞内染色アプリケーションで使える死細胞除去試薬 FVS450 (Cat.#562247)
- その他、豊富なFVS製品ラインナップがあります

転写因子及びサイトカインは同時測定が可能です



Transcriptional factor Buffer
 Cat# 562725 25tests ¥9,000
 Cat# 562574 100tests ¥30,000

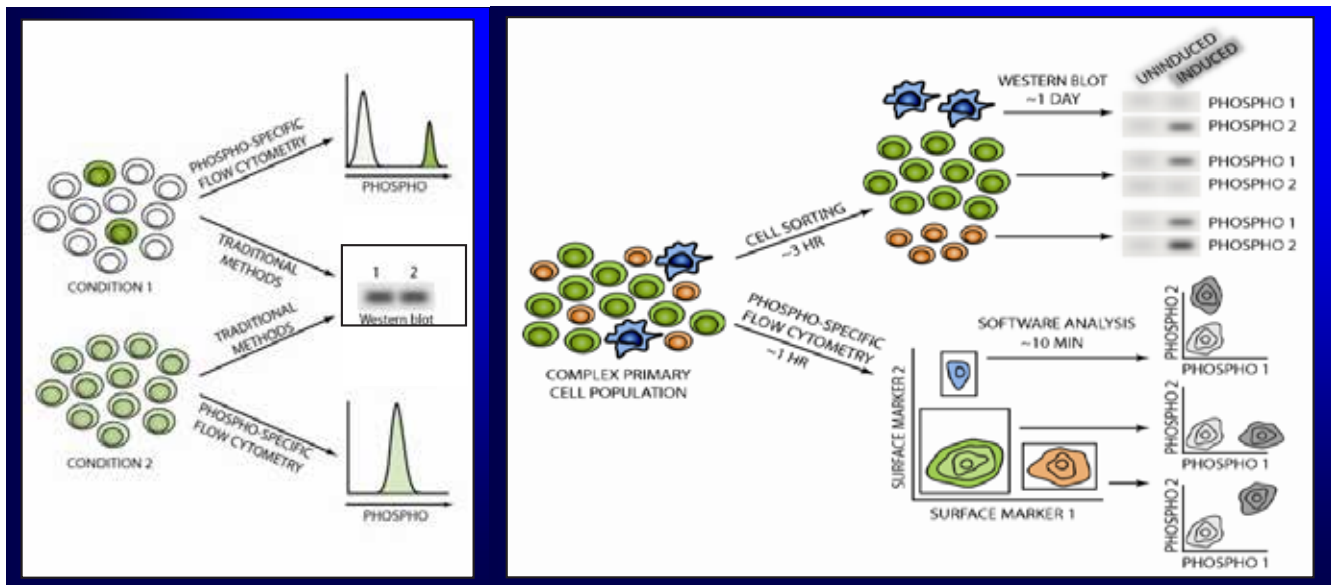
- 特長**
- フローサイトメーターによる細胞質内及び、核内のタンパク検出に最適化された固定膜透過処理用バッファー
 - 転写因子と細胞内サイトカインの同時検出も可能
 - 転写因子検出の改善
 - FoxP3, RORγt, T-betなどの転写因子で改善
 - 様々な条件に対応
 - 様々な細胞の種類、細胞表面マーカー染色やタンデム色素にも対応
 - ハイスループット解析へ対応
 - 大容量で固定可能・保存可能

(A) ヒト制御性T細胞におけるFoxP3の発現
 (B) Th17細胞極性下のBALB/CマウスにおけるRORγt及びIL-17Aの発現
 (C) マウスリンパ節におけるBcl-6の発現及び、CD4-B200+IgDloCd95hiを用いた胚中心B細胞の同定
 (D) H9 (WiCell, Wi) ヒト胚性幹細胞から分化誘導した神経細胞におけるPax6とSox2の発現

細胞内リン酸化タンパク質解析

BD™ Phosflow Technologyによる細胞内リン酸化タンパク質解析

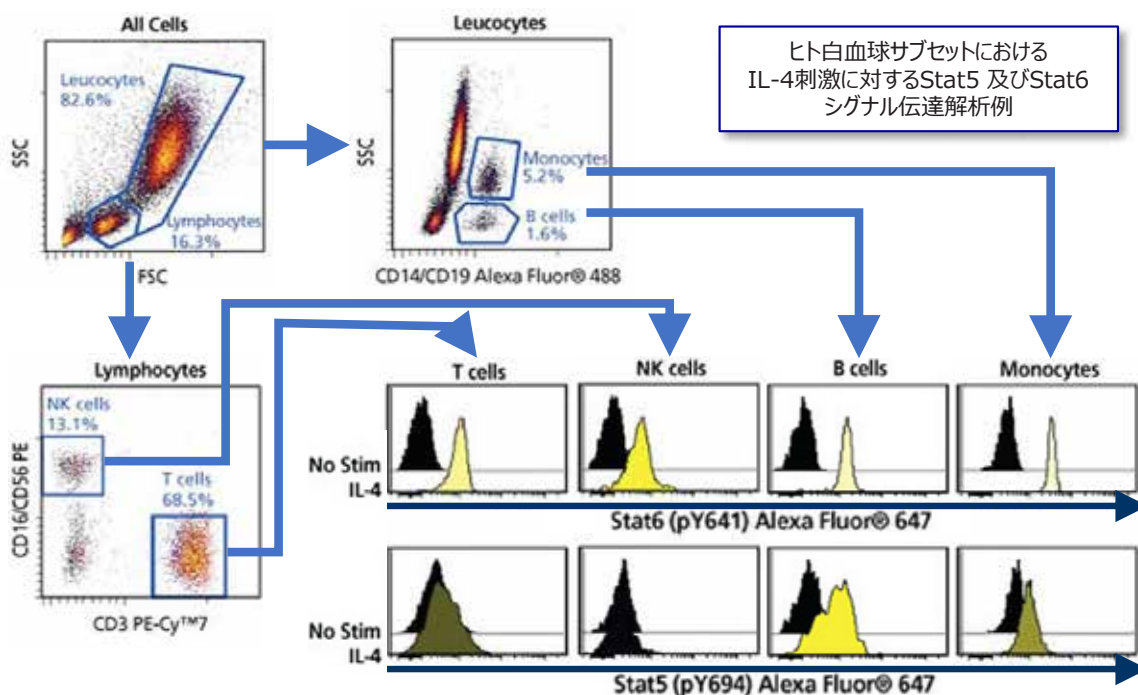
- 単一細胞レベルでのリン酸化タンパク質解析が可能です。表面マーカーと組み合わせ、目的の細胞集団の中のリン酸化タンパク質解析ができます。
- WB 法よりも操作が簡便、測定時間短縮、少数の細胞で測定可能です



SINGLE-CELL RESOLUTION

MULTIPARAMETRIC DATA ANALYSIS

細胞ポピュレーションごとのリン酸化解析例



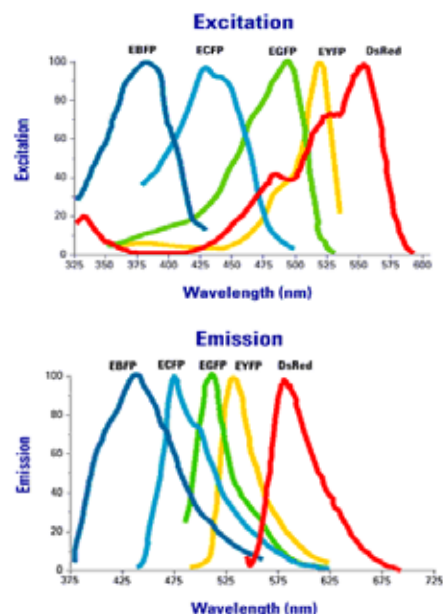
蛍光タンパク質の発現

用途

- 導入遺伝子発現の確認
- 移植細胞の残存確認
- 導入遺伝子間相互作用 (FRET) の確認 など

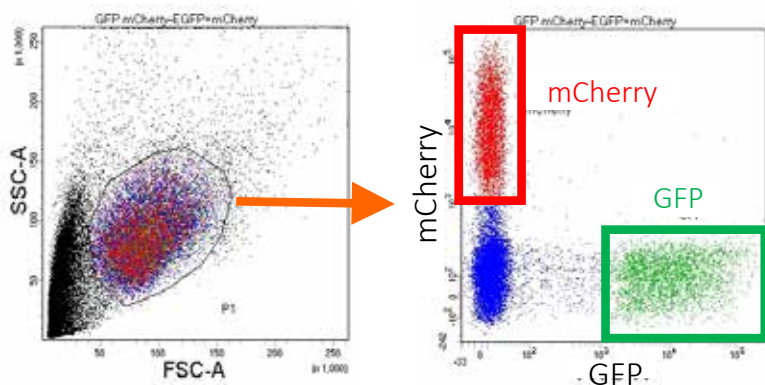
蛍光タンパク質の種類

- **GFP系蛍光タンパク質**
 - GFP, YFP, CFP, RFP, BFP など
- **フルーツ系蛍光タンパク質**
 - mCherry, mPlum, mStrawberry, mBanana など
- **CoralHue系蛍光タンパク質**
 - Midoriishi-Cyan, Kusabira-Orange, Azami-Green, Keima-Red, Kaede, Doronpa-Green など

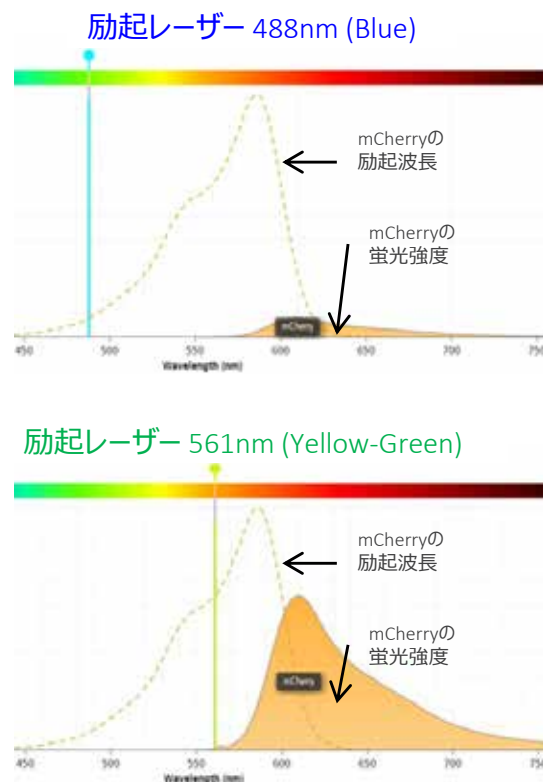


YGLレーザーを用いたGFP/mCherryの同時解析例

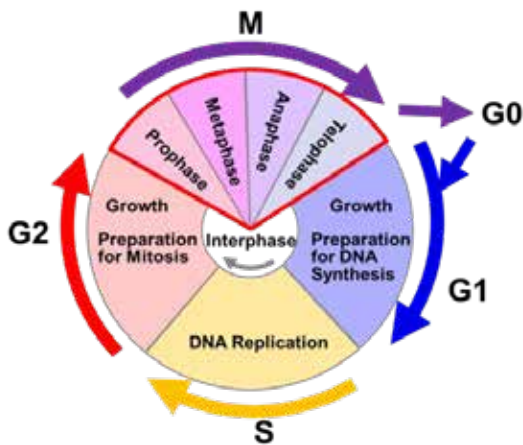
BlueレーザーでGFPを、Y-GレーザーでmCherryを測定することで、二種の蛍光タンパク質を同時に解析できる



注) mCherryの測定にはYellow-Green Laser搭載の機種が望ましい



細胞周期

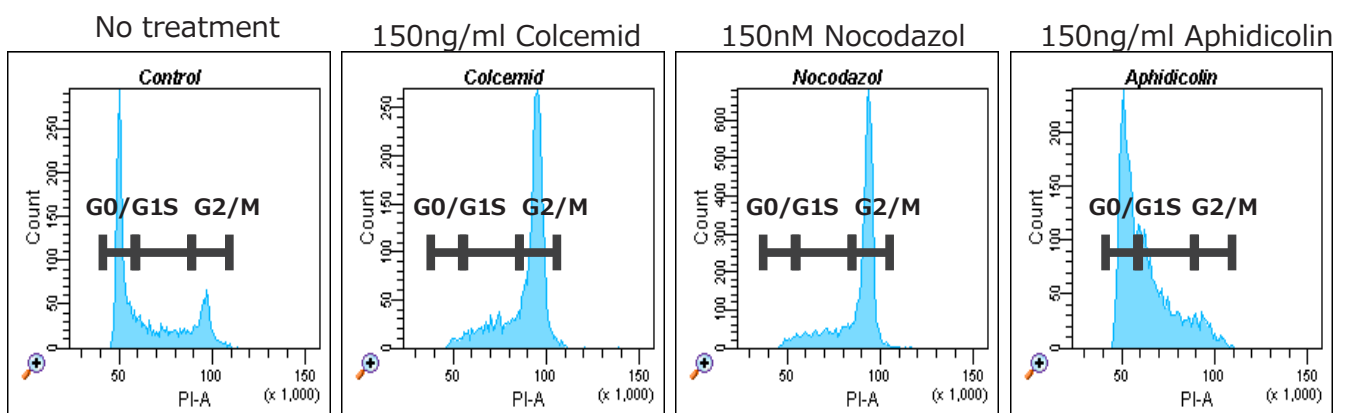


G0: 分裂停止、休止期
 G1: DNA合成準備期
 S: DNA合成期
 G2: 分裂準備期
 M: 分裂期

マーカー	細胞周期
核酸染色剤 (DNA)	全体
Pyronin Y (RNA)	G0/G1
BrdUの取り込み	S
Under Phosphorylated-Rb	G0/G1
Cyclin A	S-G2/M (G2で最大、Mで減少)
Cyclin B	G2/M
Cyclin D	G0/G1
Cyclin E	G0/G1-S
Phospho-Histone H3	M

PIによる細胞周期解析例

PI染色により細胞周期全体を解析できます



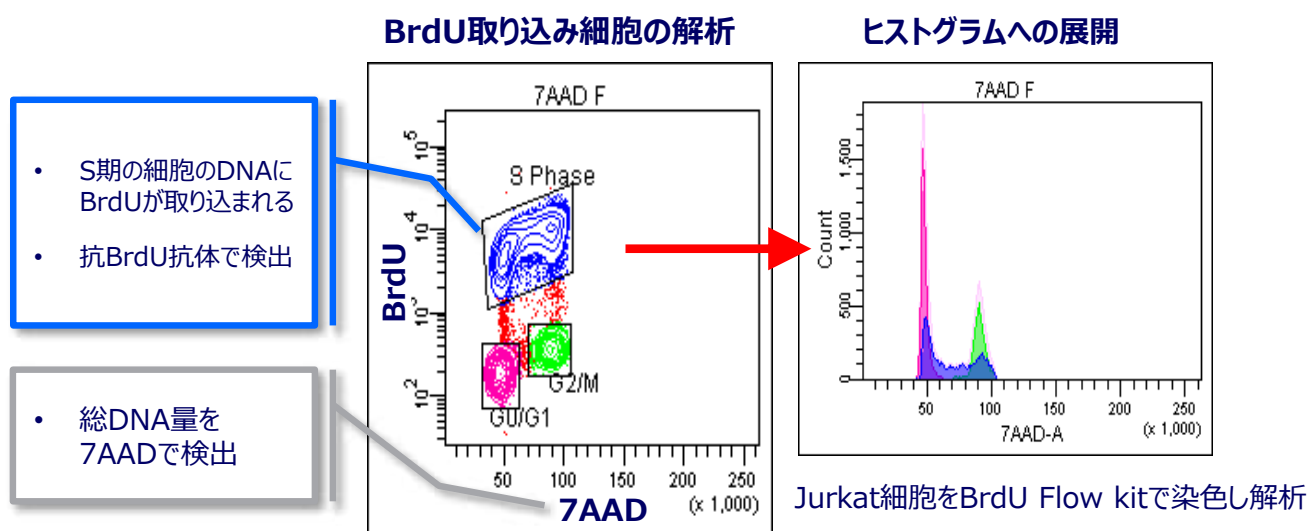
48時間0.5%FCS添加DMEMで培養したHeLa細胞に種々の薬剤を添加し、16時間培養後、細胞周期を解析

細胞周期

BrdU/7-AADによるS期解析

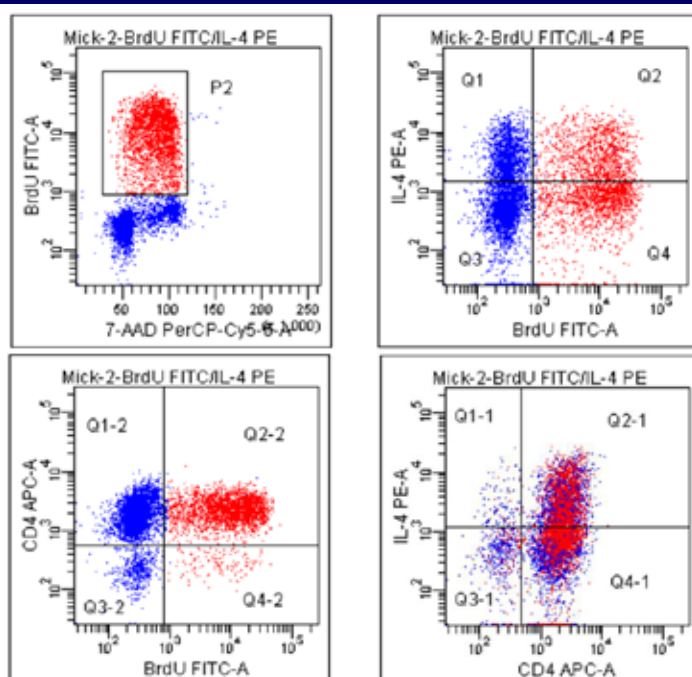
BrdUによりS期、7AADにより細胞周期全体を解析できます

- BD Pharmingen™ FITC BrdU Flow Kit (Cat#559619) 使用



BrdU/7-AADによるS期解析例

細胞周期と細胞表面抗原・細胞内サイトカインの同時解析の例

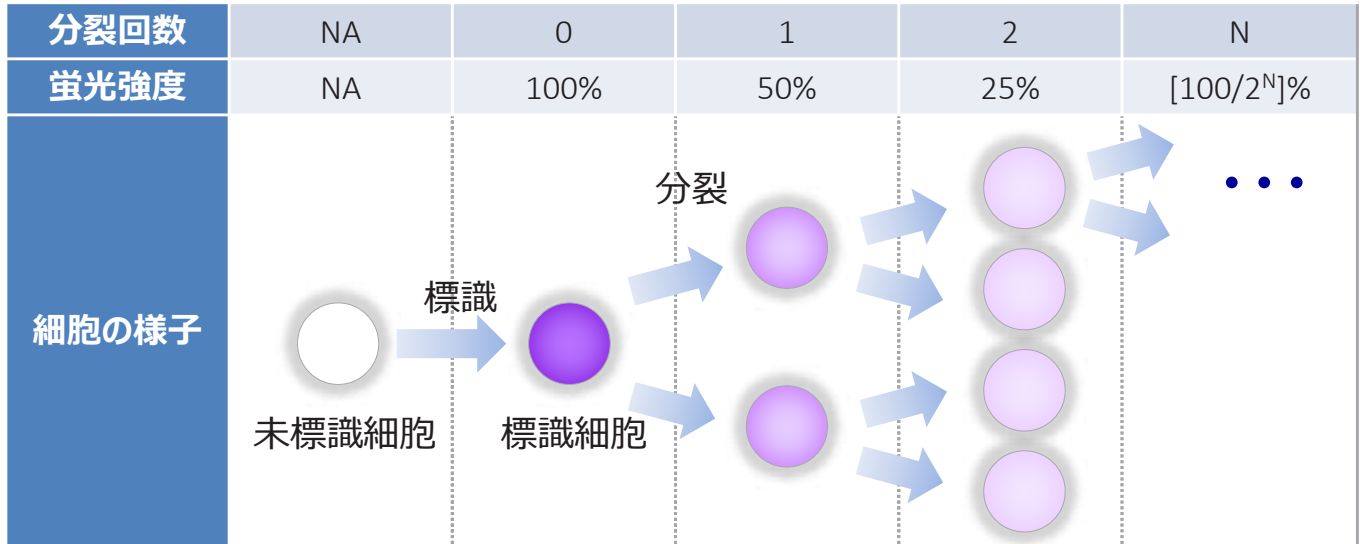


- *in vitro*、*in vivo*のサンプルをBrdUラベルすることが可能です。
- BrdU Flow Kitは細胞表面・細胞内抗原染色との併用が可能です。
- 各細胞周期に発現する特定のサイトカインの解析も可能です。
- 休止期の細胞集団をマイトゲンで刺激後、細胞分裂過程を継続的に解析することもできます。

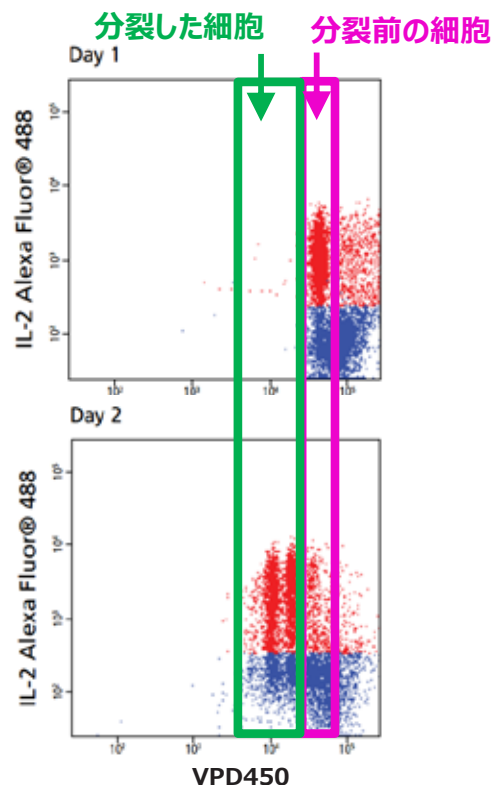
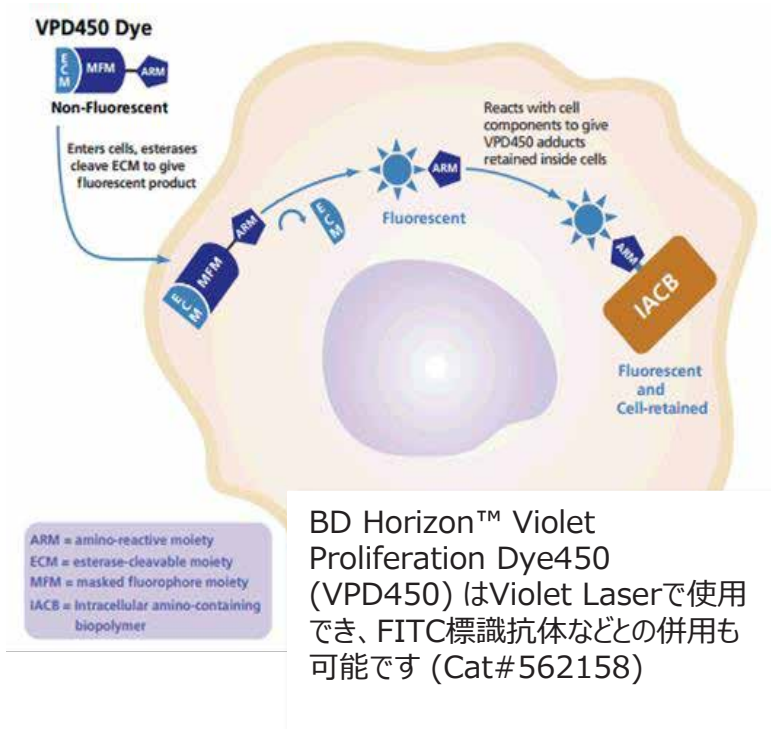
マウス脾臓細胞をPMA、Ionomycin、BrefeldinAで処理し、培養の最後の1時間にBrdUを添加した。細胞を回収後、各種抗体および7AADで染色しフローサイトメーターで測定した。

細胞増殖解析

細胞内にとどまる蛍光色素で細胞をラベルし、細胞増殖にともなう蛍光強度の変化から、細胞の分裂回数を測定できます。細胞特異的マーカーとの併用も可能です。

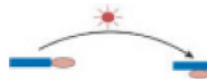


VPD450による細胞増殖解析

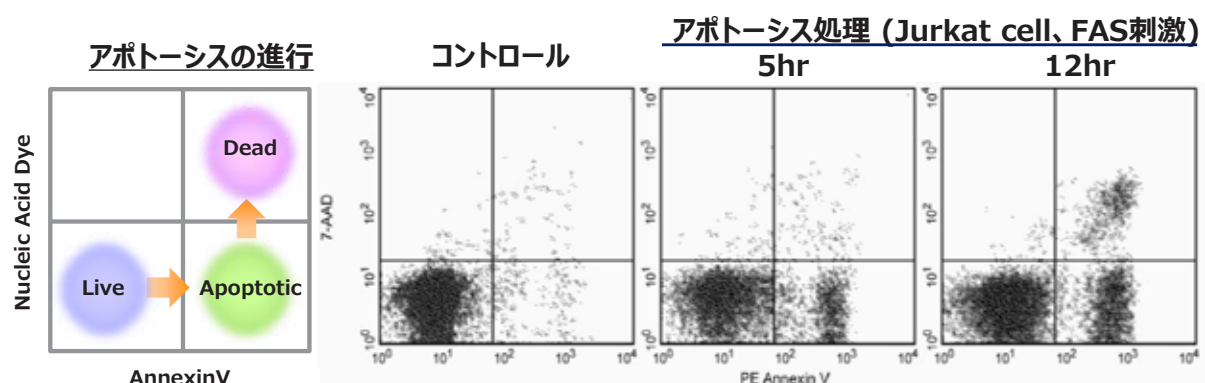


アポトーシス解析

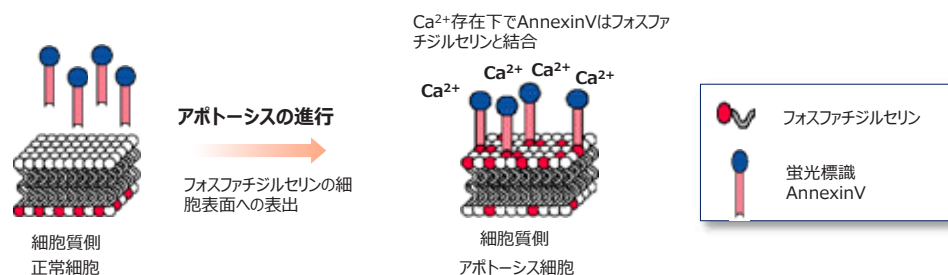
様々なアポトーシス解析が可能です

測定対象	アッセイ	製品の特徴
フォスファチジルセリンの露出 	Annexin V binding assay • 標識抗体(シングルターゲット) • Annexinキット	• アポトーシス初期のマーカーを検出 迅速、簡易 • フローサイトメトリーまたは 蛍光顕微鏡に適用
ミトコンドリアの変化 	• BD Mitoscreenキット	• 迅速、簡易、フローサイトメトリー または蛍光顕微鏡による単細胞解析
Caspaseの活性化 	• Caspase Activityアッセイ キット および試薬	• 迅速、簡易、蛍光分光分析
	• Active Caspase-3 イムノアッセイ (ELISA)	• ELISAに適用
DNAの断片化 	• APO-BrdUTM TUNELアッセイ • APO-DIRECT™ TUNELアッセイ	• 接着細胞への適用、 フローサイトメトリーでの 細胞周期解析との併用による 単細胞解析

AnnexinVを用いたアポトーシス解析



- アポトーシスの初期には細胞表面にフォスファチジルセリンが出現します。
- AnnexinVはフォスファチジルセリンに特異的に結合します。

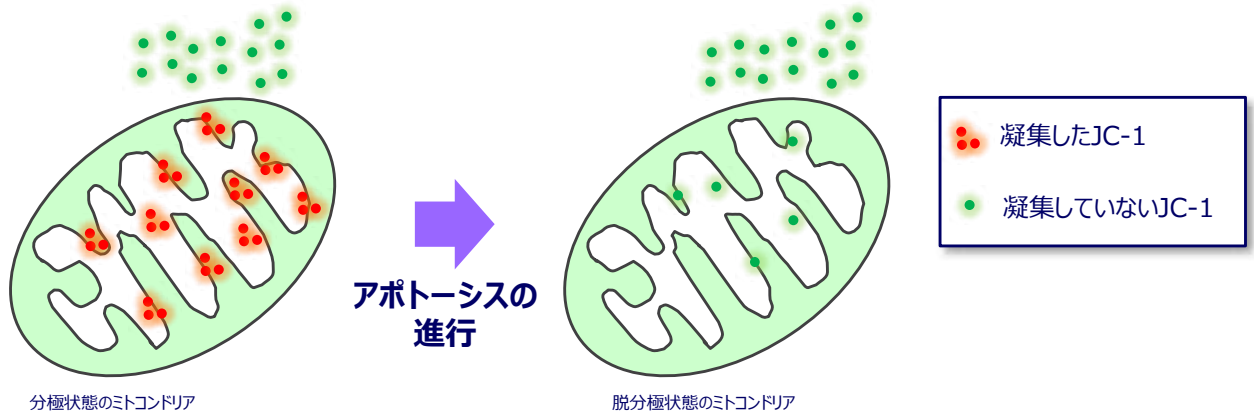


アポトーシス解析

JC-1を用いたアポトーシス解析

ミトコンドリアはアポトーシスの過程で重要な役割を持ちます

ミトコンドリア依存性アポトーシスの指標であるミトコンドリア膜電位の変化をJC-1を用いて検出できます



JC-1は正常細胞においては、ミトコンドリア中に凝集塊として蓄積し、赤色の蛍光を発します

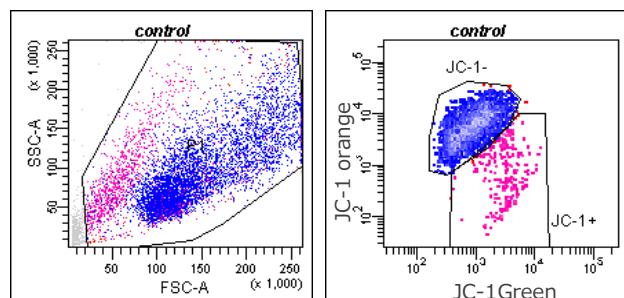
アポトーシス細胞において、ミトコンドリアが分極状態から脱分極状態に推移すると、JC-1は単量体として細胞質内に分散し、赤色蛍光強度が低下します

JC-1を用いたアポトーシス解析例

BD™ MitoScreen (Cat#551302) を用いると、ミトコンドリアが変化しアポトーシスを起こしている細胞を特異的に検出できます

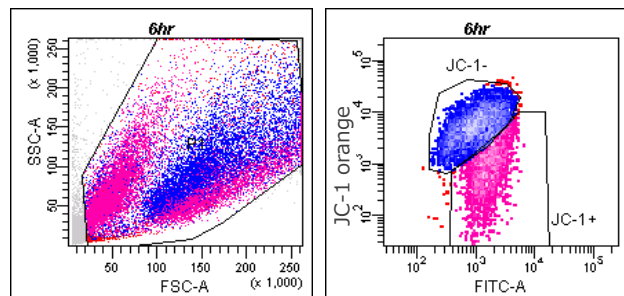
Control 細胞

ほとんどの細胞がPEと同様の波長の蛍光（縦軸）に陽性の集団として検出されています。



Camptothecin処理後6時間

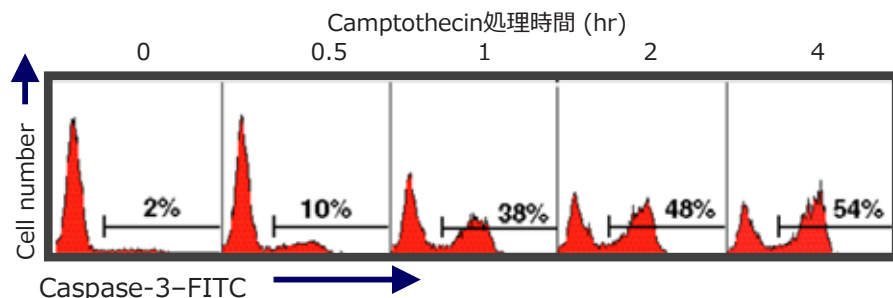
アポトーシスを起こした細胞のPEのパラメーター（縦軸）で検出される蛍光が低くなっています。



Jurkat細胞

アポトーシス解析

抗Caspase-3抗体を用いたアポトーシス解析

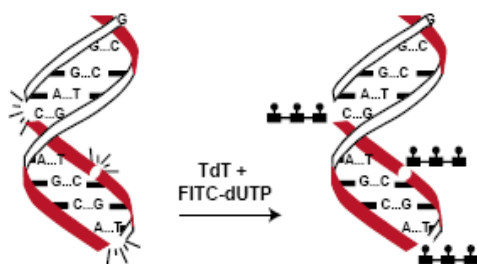


5 μ M Camptothecinを表記の時間処理したJurkat細胞中のApoptosis細胞の割合を抗Active Caspase-3抗体を用いて測定した。

- Caspase-3はアポトーシスの初期段階で活性化されます。
- 活性化されたCaspase-3は他のCaspase及び細胞内での標的タンパク質、核内の標的タンパク質を切断し、活性化しアポトーシスの最終段階へと導きます。
- Caspase-3はアポトーシス発生の指標の一つとして用いられています。

DNA損傷の検出によるアポトーシス解析

アポトーシス細胞におけるDNAの損傷をAPO-DIRECT™ Kit (Cat# 556381) を用いて検出できます



- 固定した細胞にTdT (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase) とFITC-labeled dUTPを加えると損傷部位の3'-hydroxyl endにdUTPが付加されます
- DNAの損傷に応じてFITC-labeled dUTPの結合量が増加します
- この方法はTUNNEL法に準ずるものです

DNA Strand Breaks

FITC Labeled Break Sites

目的細胞の回収

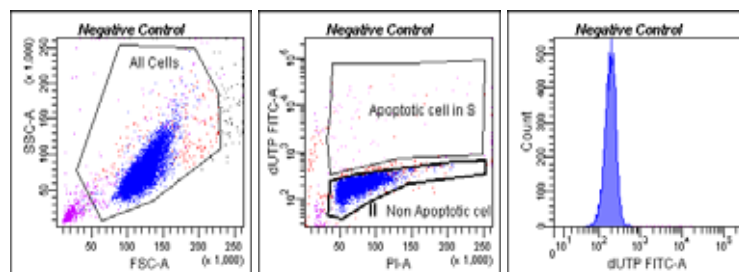
エタノール固定

Staining solutionで染色

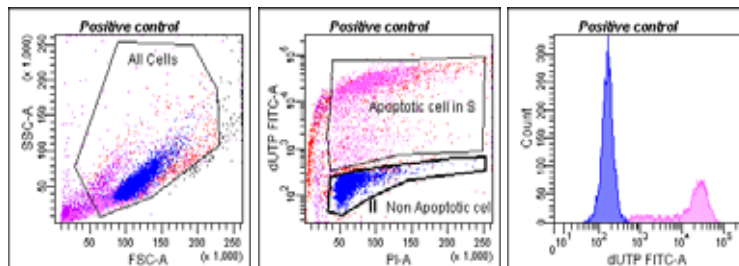
PI/RNase添加

フローサイトメーターで測定

Negative Control



Positive Control



サイトカイン定量

FCMを用いて、溶液試料中のサイトカイン濃度を定量することができます

サイトカイン産生・分泌細胞の測定

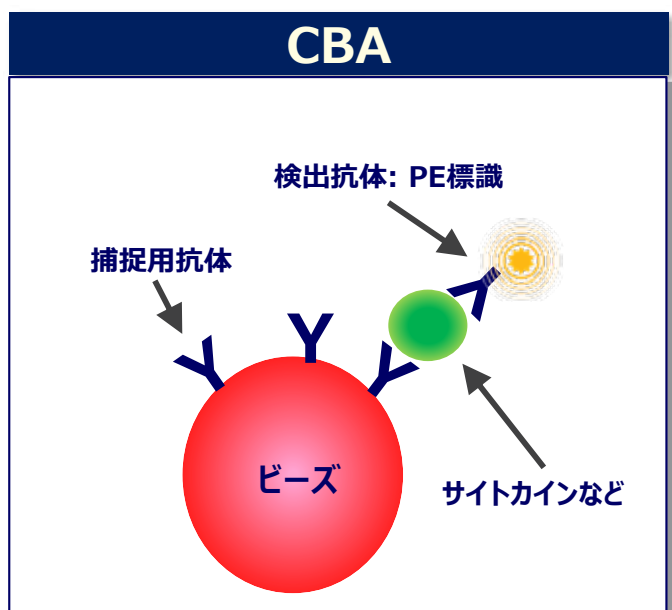
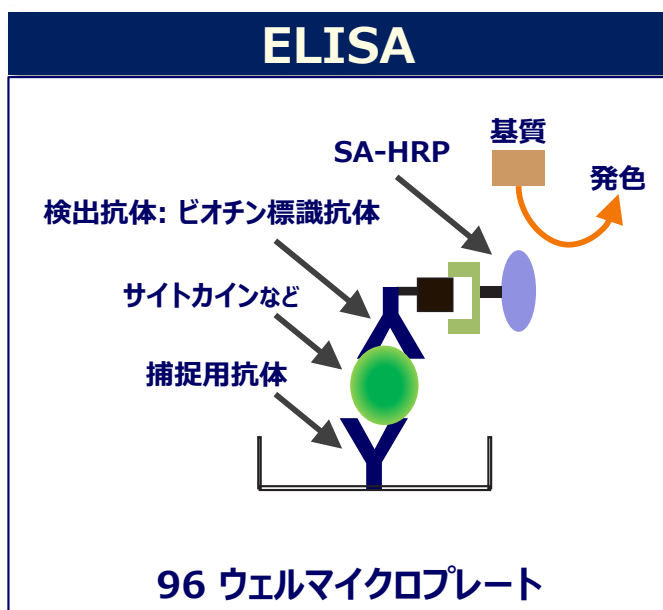
手法	測定対象	検出方法	検出機器
Intracellular Cytokine	刺激条件下で、細胞内で産生されたサイトカイン (サイトカインを細胞内で産生している細胞を検出できる)	細胞内を抗サイトカイン抗体で染色する	FCM
ELISPOT	サイトカインを分泌している細胞	ELISPOT用の96-well Plateを用いた抗原抗体反応と、酵素反応による発色により、サイトカインを分泌した細胞を検出する	目視、顕微鏡などの画像取得・処理する機器

溶液中のサイトカインの濃度の定量

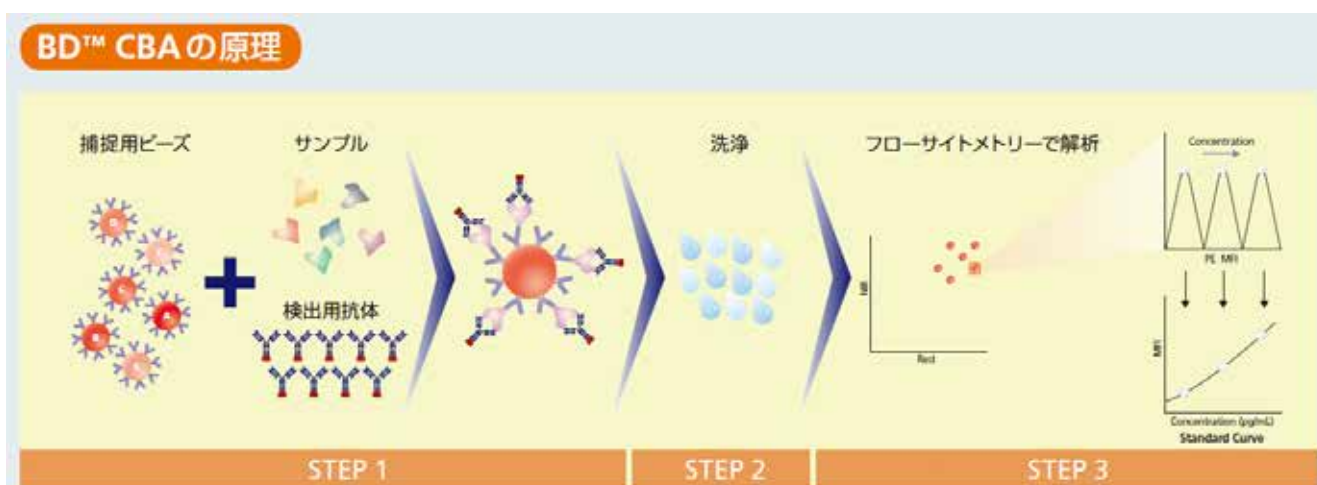
手法	測定対象	検出方法	検出機器
ELISA (OptEIA)	溶液中のサイトカイン濃度	ELISA用の96-well Plateを用いた抗原抗体反応と、酵素反応による発色によりサイトカインを定量する	分光光度計
Cytometric Beads Array (CBA)	溶液中のサイトカイン濃度	サイトカインを検出可能なビーズを用いてサイトカインを定量する。複数のサイトカインの同時定量も可能である。	FCM

Cytometric Beads Array (BD™ CBA)

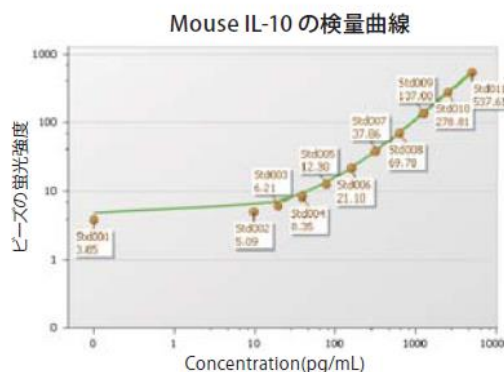
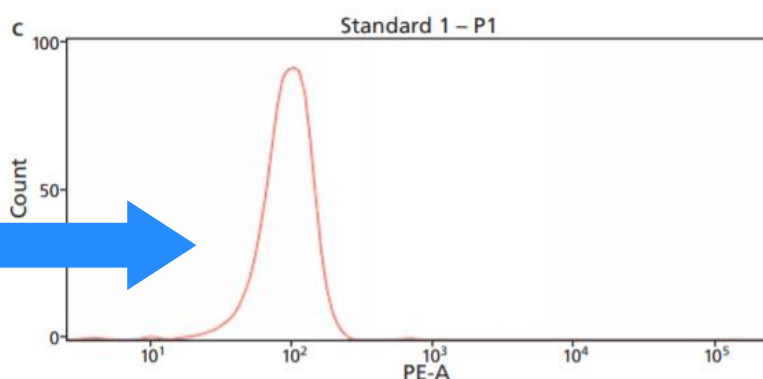
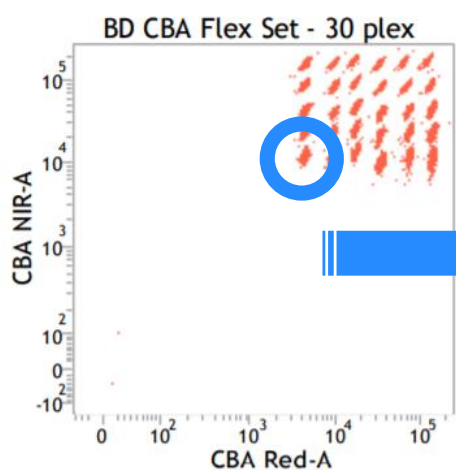
BD™ CBAは、FCMを用いてサンプル溶液中の多種類のタンパク質を、同時に測定・定量解析するための製品です



サイトカイン定量



	BD™ CBA	ELISA
同時測定項目数	約30種類/サンプル	1種類/サンプル
操作	洗浄1回	洗浄約10回以上
サンプル量	50uL	100uL程度
測定形式	試験管1本から測定可能	96 ウェルプレート
測定機器	フローサイトメーター	プレートリーダー

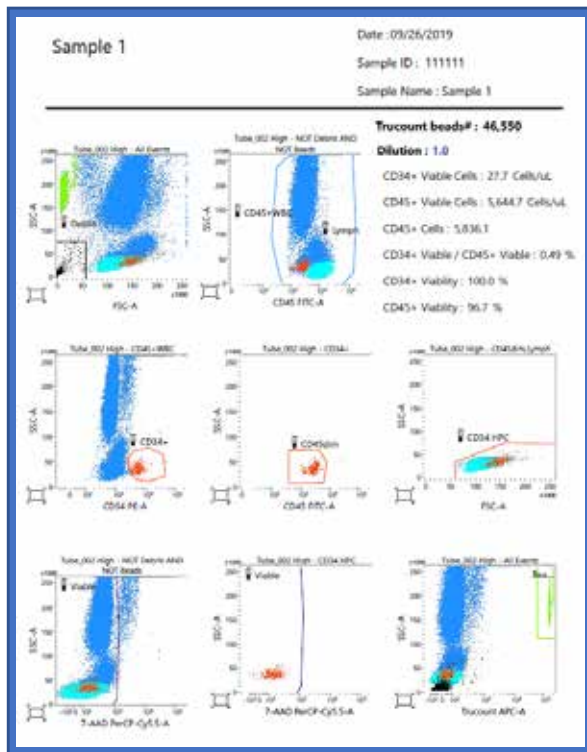


多項目のサイトカインを同時測定し、
スタンダードサイトカインによる検量線を元に
サンプル中のタンパク量をpg/mL単位で算出

※データ解析には専用のソフトウェアを用品です。
Cat#652099 FCAP Array™v3.0ソフトウェア

FCM アプリケーション例

絶対数測定 (CD34陽性細胞)



CD34陽性細胞の絶対数測定に必要な試薬・
TrucountチューブがセットになっているBD Stem Cell Enumeration Kit (Cat.344563)

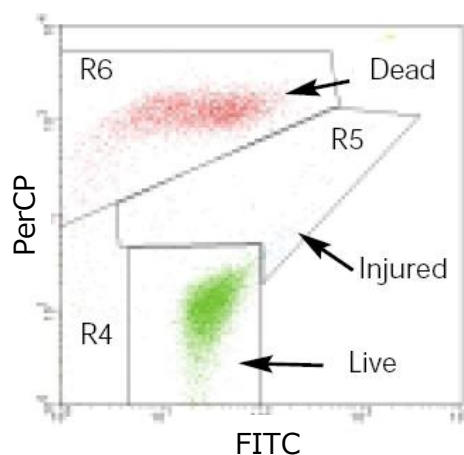
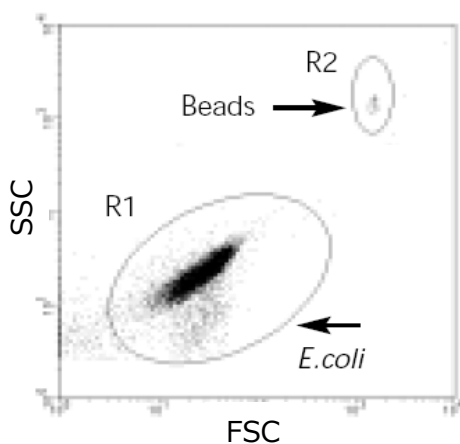
※キットに含まれている絶対数カウント専用チューブ、BD Trucount チューブは、単品製品も販売しています。
(Cat.340334)

用途

- ・動員末梢血中の造血前駆細胞のモニター
- ・末梢血幹細胞移植物などの造血幹細胞移植物中のCD34陽性細胞数の計測

Suiteソフトウェアによる解析レポート例

微生物測定



Bacterial Detection and Live/Dead Discrimination by Flow Cytometry

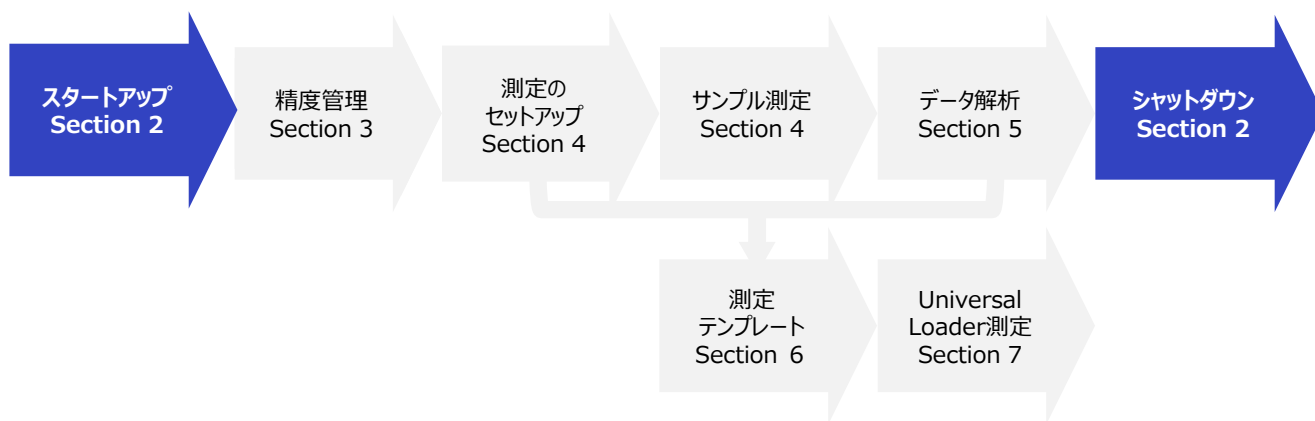
Sample : E.coli
Stain : Thiazole orange
Propidium Iodide

Analysis: BD FACSCalibur

for All Cells
for Dead Cells

Section 2

スタートアップ・シャットダウン



項目	ページ
・ BD FACSLyric™のスタートアップ	
システム起動前の確認	46
BD FACSLyric™の起動	47
BD FACSuiteソフトウェア Home画面の確認	49
流路系のスタートアップ	50
・ BD FACSLyric™のシャットダウン	51

システム起動前の確認

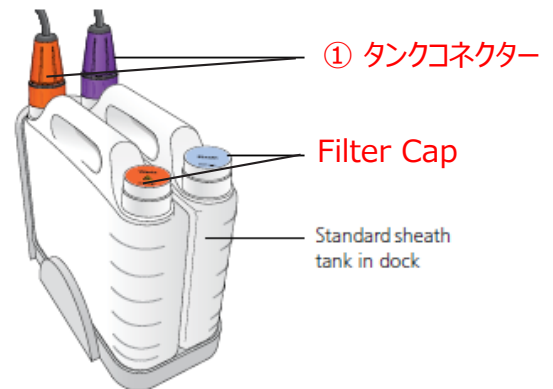
BD FACSLyric™の起動を行う前に、必ず毎回確認するポイントについて紹介します。

① 機器を起動する前に、溶液タンクを確認します。

- ・シース液の補充、廃液の廃棄
- ・タンクコネクター(右図①)が接続されている事を確認

⚠ 注意

- ・タンクコネクターが正しく接続されていないと、機器のスタートアップが正常に行われません。タンクコネクターを外した後は、必ず取り付け直してください。
- ・シースタンクをFACSLyric™本体より高い位置に設置しないでください。溶液が逆流して液漏れを起こします。



紫のコネクターのタンク：シースタンク
オレンジのコネクターのタンク：廃液タンク

② <ローダーオプションがある場合>

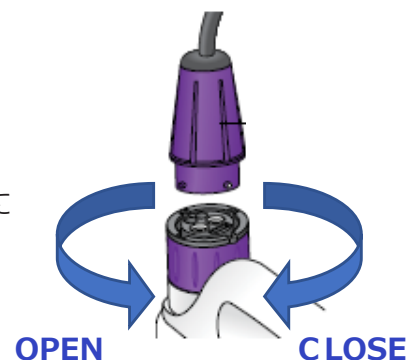
ローダー(Universal loader)のカバーが閉じていることを確認します。起動時にカバーが開いていると、エラーが表示されシステムが起動しません。



<シースタンクと廃液タンクの取り扱い方法>

- ① タンクコネクター上部を反時計回りに回して外します。
- ② Filter Capを外し、シース液の補充や廃液の処理を行います。
- ③ Filter Capを戻し、コネクター上部を時計回りに回しながらタンクに取り付けます。

- ・ 廃液タンクのタンク側コネクターには廃液量を検知するための液面センサーがあります。
- ・ シース液のレベルセンサーはFACSLyric™本体内部にあります。
- ・ 液量の限界に近づくと、動作をストップする10分前にメッセージが表示されます。



BD FACSLyric™の起動

BD FACSLyric™本体とワークステーション・ソフトウェアを起動します。

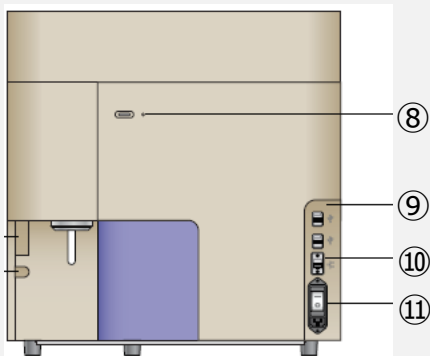
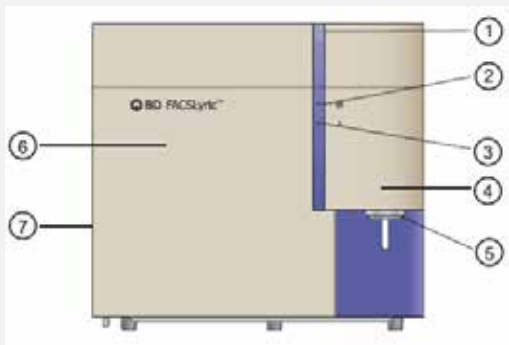
- ① 本体右側面のパワーボタン（右図①）を押して、本体を起動します。
（ボタンの色がオレンジからグリーンに変わります）

*システムを起動すると、ビープ音が鳴り、約5分間の本体イニシャライズがスタートします。

Cytometer Status Indicator



<FACSLyric™ 各部の名称、インジケータ>



	インジケータ	表示	機器の状態
①	Cytometer Status	グリーン	測定可能
		黄色	測定不能
		黄色点滅	Warming up
		赤	システム異常
②	Acquisition Status	消灯	サンプルが流れていない
		グリーン点滅	サンプルが流れている
③	Fluidics Status	消灯	測定可能
		オレンジ点滅	廃液タンクレベルが上昇 シースレベルが低下
		赤	廃液タンクが満タン
		赤	廃液ラインが接続されていない シース液の供給が必要
⑤	Manual Tube Port	グリーン	サンプルチューブ接続可能
		オレンジ点滅	SIT Flush実行中
		消灯	サンプルチューブ接続中
⑧	Cytometer Power Bottom	オレンジ	システム停止時
		グリーン	システム起動時
		グリーン点滅	シャットダウン開始
⑪	AC power circuit breaker		常時ONの状態

② ワークステーション（PC）を起動します。

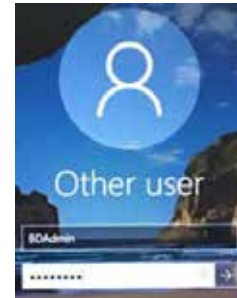
③ ログインします。

<Win10の場合>

(1) キーボードのCtrl+Alt+Delキーを押してロックを解除します。

(2) アカウント名に**BDAdmin**、パスワードに**BDIS#1\$\$**を入力し、Enterキーを押します。

Windows10
User ID : BDAdmin
Password : BDIS#1\$\$



<Win7の場合>

ユーザーアカウントのAdminを選択後、パスワード**BDIS#1**を入力し、Enterキーを押します。

Windows7
User ID : Admin
Password : BDIS#1



④ 本体電源を入れてから約4分後に、Cytometer Status Indicator（前頁の写真の**青枠**）が**黄色に点滅します**。点滅後、次のステップに進みます。

⑤ デスクトップのBD FACSuiteソフトウェアのアイコンをダブルクリックします。
* ソフト立ち上げに関する確認画面が出た場合は、Yesを選択します。

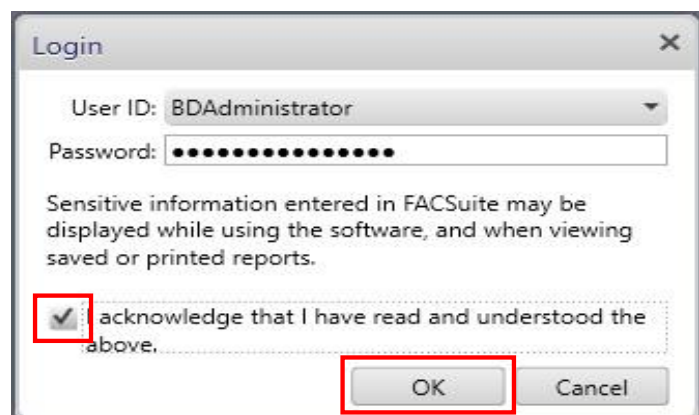


User ID : BDAdministrator
Password : badministrator

⑥ ログイン画面に下記を入力します。

User ID : **BDAdministrator**
(大文字+小文字)
パスワード : **badministrator**
(全て小文字)

⑦ (Windows 10のみ) データ管理に関する同意のチェックをオンにします。



【推奨】

FACSuiteソフトウェアを長時間使用する場合は、24時間ごとにログインし直してください。

BD FACSuiteソフトウェア Home画面の確認

BD FACSuiteソフトウェアのHome画面にて、本体との接続状況を確認します。

- ① FACSuiteソフトウェアと本体の接続に問題がないこと、Warningなどが表示されていないことを確認します。

本体とソフトウェアの接続状況

A: Connected

B: Connected

* ConnectingやDisconnectedの時には本体と接続されていません。この状態が数分以上続く場合は、機器本体のパワーボタンを長押しして、システムを再起動してください。

* [Ver1.3以降の場合] BD FACSLinkとの接続状況も表示されます。Disconnectedと表示されていても、本体とソフトウェアの接続に問題はありません。

レーザーウォーミングアップ中のステータス

本体電源を入れてから約20分間、レーザーのウォーミングアップが行われます。

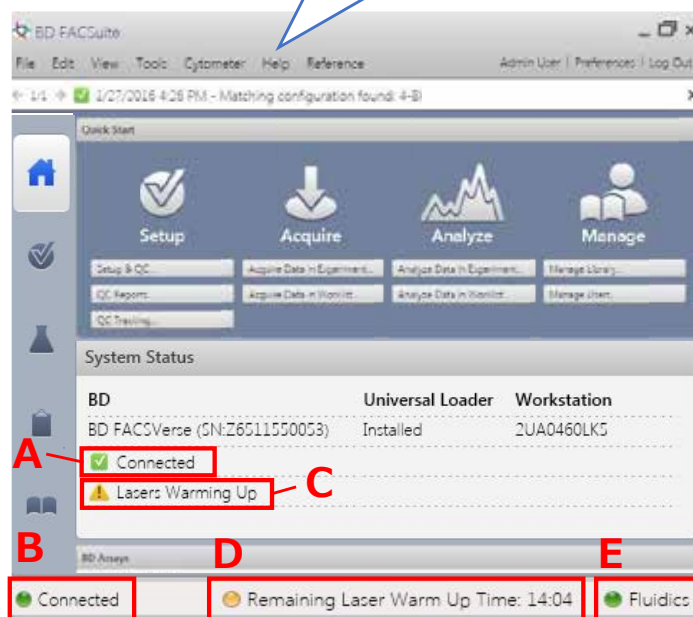
ウォーミングアップ中は流路系のスタートアップや測定を実施できません。

C: Laser Warming Up

D: Remaining Laser Warm Up Time

*測定しない状態が10分以上続くと、レーザーは低出力状態に移行します（測定時に5秒以内に復帰）。

ソフトウェアのVerを確認したい場合は、Helpメニュー> About BD FACSuiteを選択



溶液タンクの液量ステータス

E: Fluidics (グリーン)

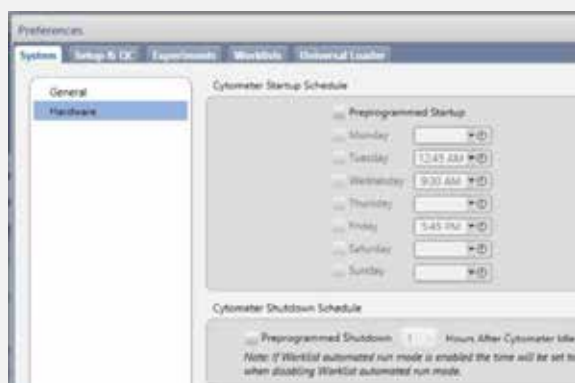
*シースタンの残量低下、または廃液タンクが満水の場合、インジケータが赤色表示になります。

<スタートアップ・シャットダウンのタイマー設定>

Toolsメニュー> Preferences> Systemタブ> Hardwareより、タイマー設定が可能です。

【スタートアップ】 Preprogrammed StartupのチェックをONにして、曜日や時間を設定します。

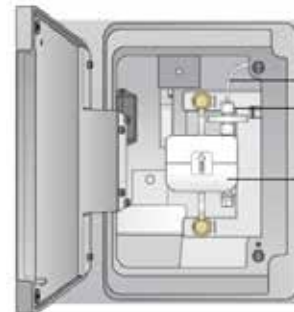
【シャットダウン】 Preprogrammed ShutdownのチェックをONにします。どれくらいの時間操作をしなかった場合に本体をOFFにするのか設定します。



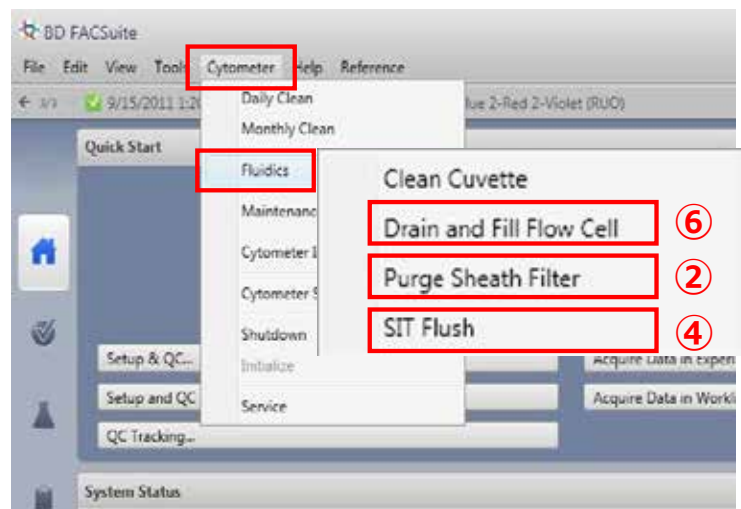
流路系のスタートアップ

流路から気泡を除去するため、測定操作を開始する前に下記の操作を実施します。

- ① 本体左側面の扉を開き、シースフィルター(右図①)内部の気泡を確認します。
- ② Cytometerメニュー->Fluidicsより**Purge Sheath Filter**を選択します。(シースフィルターの気泡抜きが行われます。)
シースフィルターに大量の気泡が入っていた場合は、繰り返し行ってください。
- ③ 機器本体のSITから5mLチューブを取り外します。
- ④ Cytometerメニュー->Fluidicsより**SIT Flush**を選択します。
- ⑤ 滅菌イオン交換水(DI水) 2mLを入れた5mLチューブを機器に取り付けます。
- ⑥ Cytometerメニュー->Fluidicsより**Drain and Fill Flow Cell**を選択します(約1分で終了)。



①シースフィルター



<SIT: Sample Injection Tube>



- サンプルを取り付ける時
カチッと音がするまでチューブを押し込みます (LEDがグリーン→消灯)。
サンプル取り込み時は、内部より細いラインが出てサンプル液を吸引します。
- サンプルを取り外す時
サンプルの取り込みが終了し内部の細いラインが収納されたら、チューブを取り外します。
絶対に途中でチューブを取りはずさないで下さい。
チューブを外すと自動的にSIT Flushが行われます (LED: オレンジ)。
- マイクロチューブ用の専用のアダプターも使用できます。

使用可能なチューブ製品

カタログ番号	製品名
コーニング社 352003	Falcon®ラウンドチューブ (5mL) ツーポジションキャップ付 (滅菌済) 500tube×1bag
コーニング社 352052	Falcon®ラウンドチューブ (5mL) キャップなし (滅菌済) 125tube×8bag
コーニング社 352054	Falcon®ラウンドチューブ (5mL) ツーポジションキャップ付 (滅菌済) 125tube×8bag
コーニング社 352058	Falcon®ラウンドチューブ (5mL) ツーポジションキャップ付 (滅菌済) 25tube×20bag
コーニング社 352235	Falcon®ラウンドチューブ (5mL) セルストレナーキャップ付き (滅菌済) 25tube×20bag、細胞浮遊液メッシュ用
BD 340334	BD Trucount Tubes 25tube×2bag
エッペンドルフ社 22363352	Eppendorf 2mL Tube (アダプターを使用)

BD FACSLyric™のシャットダウン

測定が終了したら、必ず下記の洗浄操作を行います。

接着細胞、未洗浄の血液などの汚れやすいサンプルを使用した場合は、下記手順を数回繰り返すことをおすすめします。

- ① Cytometerメニュー->Daily Cleanを選択します。
- ② Daily Cleanメッセージ画面が表示されます。手動で実施する場合はUniversal LoaderのチェックをOFF、ローダーを使用する場合はONにします。
- ③ 下記の手順でDaily Cleanを実行します。

● 手動の場合

SITにFACSClean 2mLを入れたチューブを取り付け洗浄
↓ (約2分後)

滅菌イオン交換水(DI水) 3mLを入れたチューブに交換 (約2分間)

● ローダーの場合

使用するラックタイプ (30/40) を選択

↓

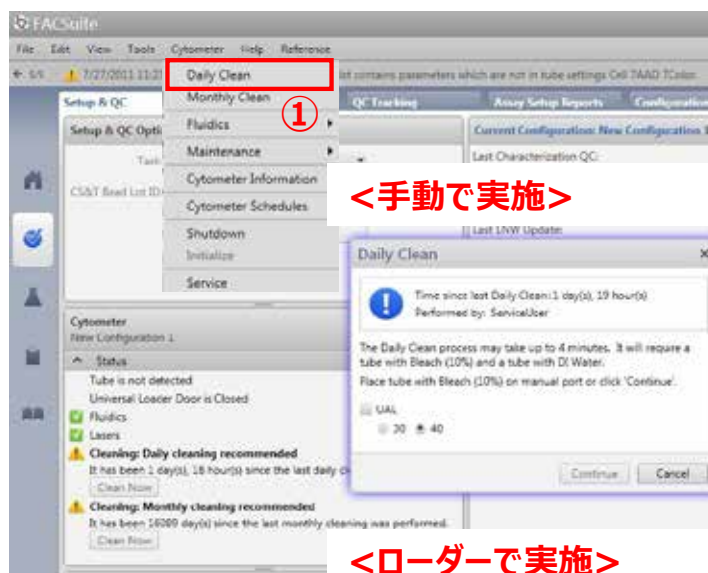
ラックに下記のようにチューブをさしてローダーにセットする

A1: FACSClean 2 mL

A2: 滅菌イオン交換水(DI水) 3mL

↓

Continueをクリック (約4分後に終了)。



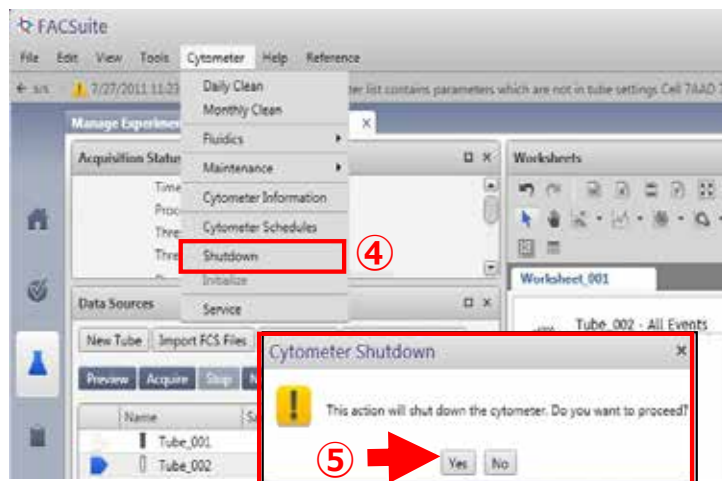
<ローダーで実施>



* 全ての洗浄が終了すると、自動的にメッセージ画面が消えます。

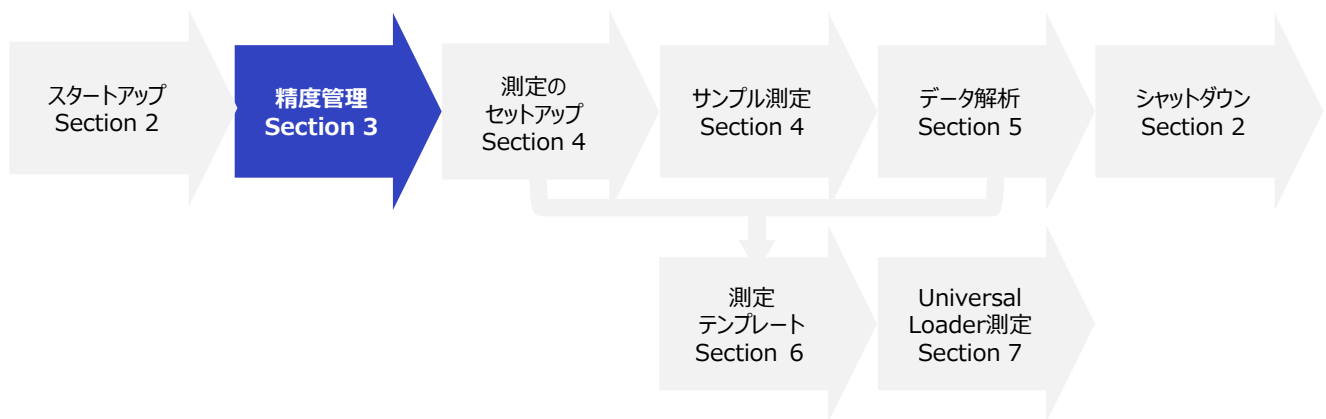
* Daily cleanは必ず最後まで完了させてください。中断すると、その履歴が残り、サンプルを保護するために測定操作ができなくなります。その場合は、一旦Daily cleanを実行し完了させると測定が可能になります。

- ④ Cytometerメニュー->Shutdownを選択します。
- ⑤ Yesをクリックします。
FACSLyric™本体のShutdownが行われ、
パワーボタンがグリーンからオレンジに変わります。
- ⑥ 新しい滅菌イオン交換水(DI水) 2 mLを入れたチューブをSITにセットします。
- ⑦ Fileメニュー->Exitを選択し、ソフトを終了します。
- ⑧ 廃液の処理、シース液の補充を行います。
* 廃液は、施設の規則に則り適切に処理してください。



Section 3

精度管理



項目	ページ
精度管理の実施	
精度管理（Performance QC)の実施	54
Performance QC reportの確認	55
Performance QC reportの解説	56
Performance QC トラブルシュートについて	57
【参考資料】 Setup & QCタブ	58
【参考資料】 QC Trackingタブ	59
【参考資料】 Configurationの確認と編集	60

精度管理 (Performance QC)の実施

FACSLyric™を使用する際、サンプル測定の前に必ずPerformance QCを実施します。これにより安定した測定条件を継続して使用することができます。

① 画面左のNavigation barからSetup & QCのアイコン(右図①)を選択します。

② Setup & QCのタブのTask : [Performance QC]を選択します。

③ CS&T beadsのLot番号を選択します。
* Lot番号はCS&T beadsのボトルに書いてあり、箱に書いてある番号ではありませんのでご注意ください。

* 新しいLotの使用方法に関しては p.135-137をご参照ください。

④ 5mLチューブに下記を加えて攪拌します。

- BD FACFlow 500 μ L
- BD CS&T Beads 2滴

*CS&T Beadsは使用前に十分攪拌してください。

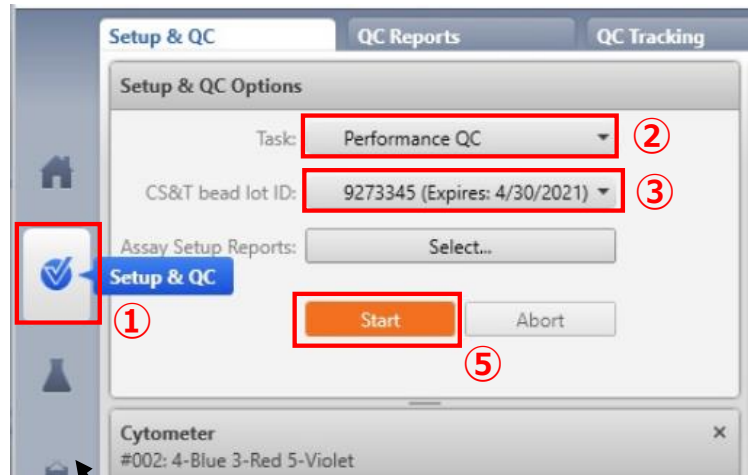
*希釈後のビーズは調製後20分以内にご使用ください。

⑤ [Start]を選択します。(ソフトのVerによっては自動的にSIT Flushが行われます)

⑥ 調製したチューブをSITにセットします。Performance QCが開始されます(約6~8分間)。

⑦ ビーズをSITから外します(自動的にSITの洗浄が行われます。)

⑧ 乾燥防止のため、滅菌イオン交換水(DI水)を入れたチューブを取り付けます。

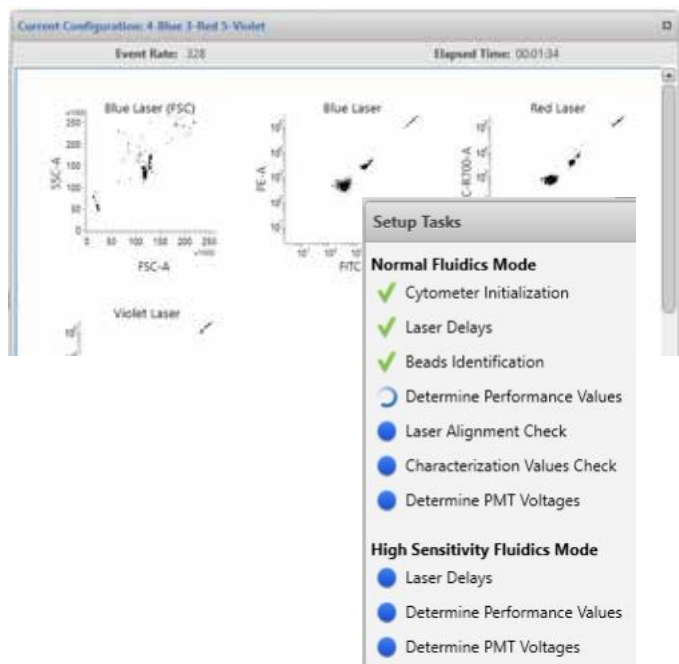


Navigator Bar

<BD CS&T CE-IVD beads>





Cat No.	テスト数	希望小売価格
656504	50	¥25,000
656505	150	¥60,000

調製後20分以内に使用せず保存する場合は、2-8℃(遮光下)では24時間、15-25℃(遮光下)では8時間安定です。



Performance QC reportの確認

Performance QC終了後、QC reportを確認します。

- ① QC 終了後、レポート確認についてのメッセージが表示されるので[Yes]をクリックします。
- ② リストのDateとFluidics Mode（下図②）より、該当するレポートを参照します。
* 一度のチェックで2通のレポート（Normal、High Sensitivity）が作成されます。
（NormalモードとHigh Sensitivityモードの解説はp.13に記載しています。）
- ③ Status（下図③）を確認します。
* “Passed”    と表示されていれば問題ありません。
“Failed”  だった場合は、Failした項目を確認し、トラブルシュート（p.57参照）を実施してください。

Configuration	Task	Status	Date	CS&T Bead Lo	Fluidics Mode	User	Report Name
New Configuration 1	Performance QC	Passed	27/2011 10:18:07 A	92110	Normal	Service User	PQC Report 26511551
New Configuration 1	Performance QC	Passed	27/2011 10:18:07 A	92110	High Sensitivity	Service User	PQC Report 26511551
New Configuration 1	Performance QC	Passed	25/2011 10:51:11 A	92110	Normal	Service User	PQC Report 26511551
New Configuration 1	Performance QC	Passed	25/2011 10:51:11 A	92110	High Sensitivity	Service User	PQC Report 26511551
New Configuration 1	Performance QC	Failed	22/2011 4:03:40 PM	92110	Normal	Service User	PQC Report 26511551

*全てのレポート内容はPDFファイル、CSVファイルとして、下記の場所に保存されています。
¥C/BDExport/Setup/Report

Detector	Units	Target	Actual	U	Number of Use
Blue-FLC	10000	10000	10000	0	10000
Blue-FLC	10000	10000	10000	0	10000
Blue-FLC	10000	10000	10000	0	10000
Blue-FLC	10000	10000	10000	0	10000
Blue-FLC	10000	10000	10000	0	10000
Blue-FLC	10000	10000	10000	0	10000
Blue-FLC	10000	10000	10000	0	10000
Blue-FLC	10000	10000	10000	0	10000
Blue-FLC	10000	10000	10000	0	10000
Blue-FLC	10000	10000	10000	0	10000

Parameter	Value	Range	Message
Blue-FLC-Cy7 Sensitivity	74	>= 100	Value is below allowable minimum of 100

- ④ 事前に登録したAssayやTube/Reference settingなどの設定を使用する場合には、Assay & Tube Settings Setup（p.106）を実施します。

3

【参考資料】Performance QC reportの解説

QCLレポートのDETECTOR SETTINGSの項目についての説明です。

DETECTOR SETTINGS

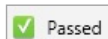
Lot Info	Detector				PMTV at LW Settings		Bright Bead			Linearity (±2%)		Resolution			
	Name	Mirror	Filter	Position	Actual	Δ	Median at LW Settings	Median at QC Settings	% rCV	Min Channel	Max Channel	Sensitivity		Qr (x10 ³)	Br
												Actual	% Diff		
LASER: Blue (Wavelength = 488nm)															
X	FSC	-	-	FSC	231.4	-2.6	17,898	120,629	0.9	N/A	N/A	82	45	N/A	N/A
X	SSC	10	488/15	E	444.2	-1.0	125,980	123,106	2.0	N/A	N/A	1,615	1	N/A	N/A
X	FITC	507LP	527/32	D	529.8	-3.1	15,133	101,082	1.6	93	222,519	484	-10	82.1	121
X	PE	560LP	586/42	C	483.9	-1.9	23,170	101,527	1.2	167	227,944	1,297	3	751.0	152
X	PerCP-Cy5.5	665LP	700/54	B	603.9	-2.4	38,141	98,985	2.5	155	223,467	466	10	18.4	20
X	PE-Cy7	752LP	783/56	A	598.0	-2.9	20,299	99,274	4.0	42	225,484	2,704	3	33.4	0
LASER: Red (Wavelength = 640nm)															
X	APC	660/10	660/10	C	567.0	-2.2	41,413	101,062	1.8	167	223,183	567	2	45.6	27
X	APC-R700	705LP	720/30	B	511.7	-2.6	27,412	100,532	1.9	121	224,500	185	3	19.0	35
X	APC-Cy7	752LP	783/56	A	518.7	-1.4	98,787	100,641	2.6	139	225,928	150	18	29.3	199
LASER: Violet (Wavelength = 405nm)															
X	V450	448/45	448/45	E	525.1	-0.7	8,899	101,198	2.0	137	221,289	193	-2	90.1	896
X	V500-C	500LP	528/45	D	440.8	-1.2	32,900	101,128	1.3	130	226,864	166	-14	121.7	1,309
X	BV605	606/36	606/36	C	463.3	-1.2	6,406	101,102	2.3	195	220,359	2,190	-16	437.0	32
X	BV711	715/50	715/50	B	549.8	-0.3	37,769	99,730	2.7	127	235,096	1,796	3	105.5	9
X	BV786	755LP	755	A	597.5	-19.0	56,069	101,213	3.4	175	229,392	1,539	-1	73.2	2

カテゴリ	項目	詳細
Detector	Name	測定パラメーター名
	Mirror	検出器のLong passミラーの設定波長
	Filter	検出器のBand passフィルターの設定波長
	Position	検出器の設置位置
PMTV	Actual	Bright Beadsを各検出器で規定のシグナル強度で測定した際の、PMTV値
	Δ	直近のCharacterization QCのPMTV Actualとの差
Bright Beads	Median	Bright Beadsの測定中央値
	% rCV	Bright Beadsの測定値のばらつき (rCV=Robust CV)
Linearity	Min. channel	直線的に測定可能な範囲の下限值
	Max. channel	直線的に測定可能な範囲の上限値
Resolution	Sensitivity: Actual	Bright Beads MFI / 2SD of Noise
	Sensitivity: % Diff.	Characterization QCからのSensitivityの変化 (%)
	Qr (x10 ³)	蛍光検出効率
	Br	バックグラウンドシグナル (ノイズ)

* Robust CV : 中間値より75%の範囲にある集団をターゲットとして算出したばらつき、通常のCVよりメインの集団のばらつきを反映した値が表示されます

<Statusのアイコン表示について>

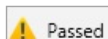
Suite v1.4



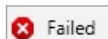
Passed 全ての測定値が基準を満たしている。



Passed 基準を満たしており異常ではないが、±3SD以上の変動がある場合など。

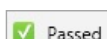


Passed 基準を満たしており異常ではないが、CQC実施時に比べて測定値の変動が大きい。



Failed 一部の測定値に異常が認められる。(該当項目は赤字で表示)

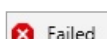
Suite v1.3より以前



Passed 全ての測定値が基準を満たしている。



Passed 基準を満たしており異常ではないが、±3SD以上の変動がある。



Failed 一部の測定値に異常が認められる。(該当項目は赤字で表示)

Performance QC トラブルシュートについて

Performance QCの結果がFailの場合、Failした項目に応じて下表の左から順にトラブルシュートを実施してください。再度Performance QCを実施してエラーが解消される事を確認します。

		トラブルシューティング 実施順							
		気泡除去	CS&T beadsの再調製	サンプルライン洗浄	フローセル洗浄	再起動	シース流路洗浄	レーザー光軸調整	シースフィルター交換
Failedの項目	Bright Beads / % rCV	○	○	○	○	○	○	○	○
	PMTV / Δ	○	○	○	○	○	○	○	○
	Linearity / Min&Max channel					○			
	Resolution / Sensitivity Actual					○	○		
	Resolution / Br	○	○	○		○	○		○

◆ 気泡除去

: Purge sheath filter→SIT flush
→Drain and Fill Flowcell p.50
流路の気泡を除去します。

◆ CS&T Beadsの再調製 p.54

ビーズは使用前に十分攪拌してください。

◆ サンプルライン洗浄 (Daily Clean p.51)

サンプルラインに残留したサンプル由来の汚れを除去します。

◆ フローセル洗浄 (Clean Cuvette p.143)

FACSCleanを使って、フローセルに付着した汚れを除去します。

◆ 再起動

再起動時に行われるシース流路のフラッシングによって、流路中の気泡、汚れを洗い流します。

◆ シース流路洗浄 (Monthly Clean p.144)

FACSCleanを使って、流路やフローセルに付着した汚れを除去します。

◆ レーザー光軸調整 (Laser Setup p.151)

Laser setup(またはCharacterization QC)によって、レーザー光軸を最適位置に調整します。

◆ シースフィルター交換 p.148

新しいシースフィルターに交換することで、シース液の流れを正常化します。

上記対応方法でエラーが解消されない場合は、下記窓口にご相談ください。

機器のトラブルに関するサポート 0120-7099-12 (フリーダイヤル)

対応時間 9:00~18:00 (日祝日、年末年始、弊社設定の臨時休業日を除きます)

【参考資料】 Setup & QCタブ

Setup & QCタブでは、各種QCメニュー実施のほか、直近のQCLレポートのステータスを一覧できます。

Taskでは下記のメニューを選択できます。

Add Fluorochrome:

登録済みのReference Settingの既存のパラメーターに、新しい蛍光色素の補正情報を登録します（マニュアル p.103）

* 蛍光チャンネルを追加する機能ではありません。

Assay / Tube Settings Setup:

AssayやTube Settingの登録当時の測定感度を再現するPMTVを決定します。蛍光補正値もそのPMTVに応じて最適化されます。（マニュアル p.106）

Characterization QC:

レーザー光軸の再調整をしたうえで、日々行うPerformance QCの基準を作成します（マニュアル p.137）

Create LW/LNW Reference Settings:

初期設定LW/LNWの蛍光補正情報を作成します（関連：マニュアル p.139）

CS&T Bead Lot Transfer:

CS&T Beadsのロット情報の引継ぎを行います（マニュアル p.136）

Laser Setup:

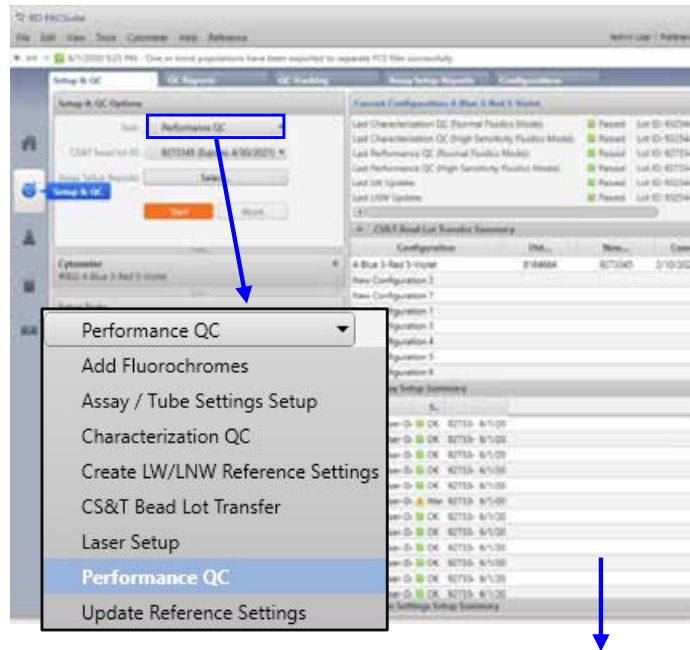
レーザー光軸の再調整をして、Performance QCを行います（マニュアル p.151）

Performance QC:

サンプルの測定前の機器のセットアップとQCLレポートの作成を行います（マニュアル p.54）

Update Reference Settings:

登録済みのReference Settingの蛍光補正情報を更新します（マニュアル p.102,p.139）



Configuration	Old...	New...	Comple...
4-Blue 3-Red 5-Violet	8164664	9273345	2/10/2020 11:04 AJ
New Configuration 2			
New Configuration 7			
New Configuration 1			
New Configuration 3			
New Configuration 4			
New Configuration 5			
New Configuration 6			

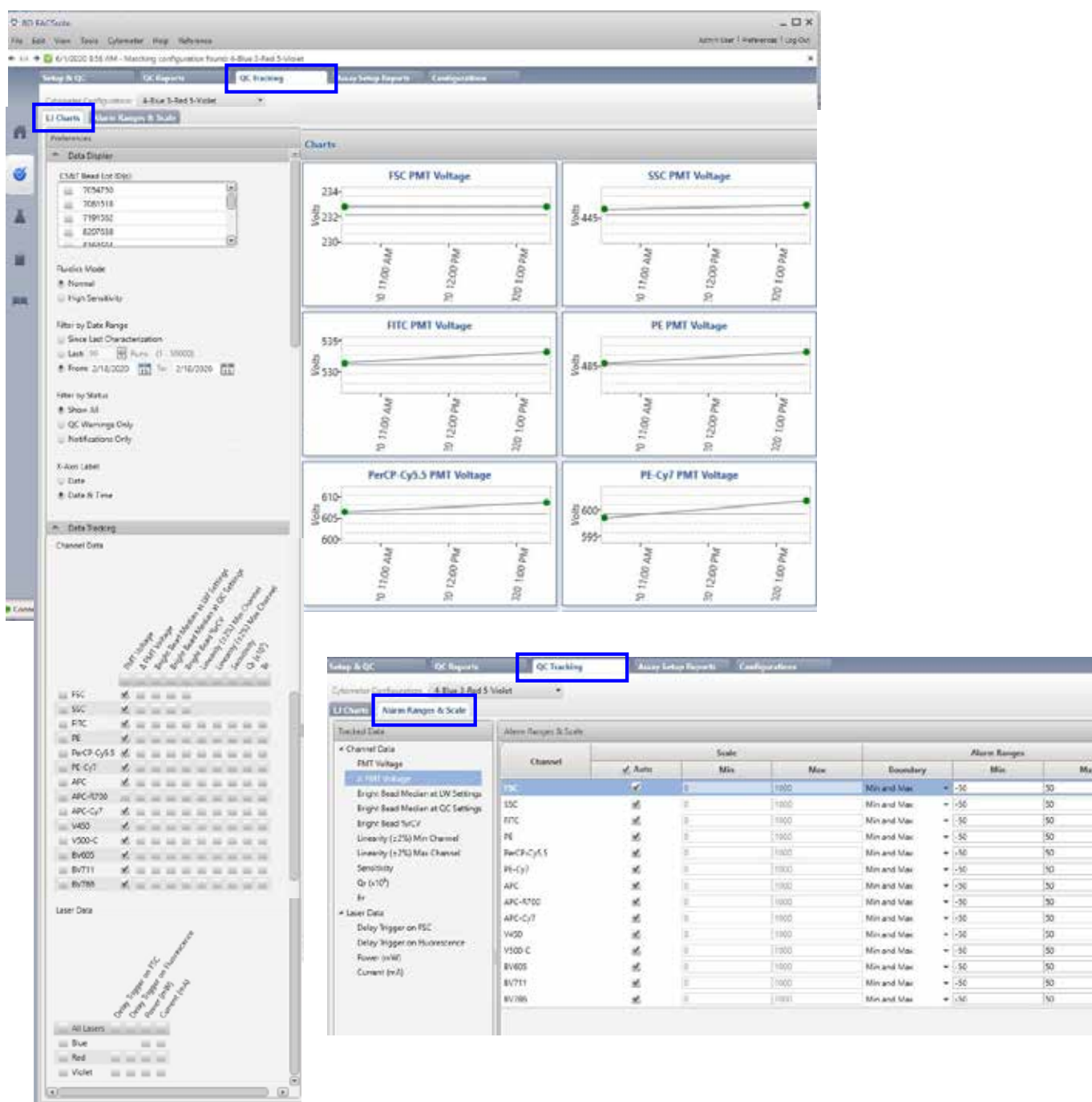
Configuration	Old...	New...	Comple...
20200: User-D	OK	927334	6/1/20
Experit User-D	OK	927334	6/1/20
3/8/45 User-D	OK	927334	6/1/20
20200: User-D	OK	927334	6/1/20
20022: User-D	OK	927334	6/1/20
18080: User-D	War	927334	6/1/20
Subset User-D	OK	927334	6/1/20
10 tub User-D	OK	927334	6/1/20
Experit User-D	OK	927334	6/1/20
NR UA User-D	OK	927334	6/1/20
20200: User-D	OK	927334	6/1/20
Lvmoh User-D	OK	927334	6/1/20

【参考資料】QC Trackingタブ

QC trackingタブでは、すべての測定項目の日間変動について管理しています。

LJ Chartタブでは、QCLレポート上のすべての項目をグラフ化することができます。

Alarm Ranges & Scaleタブでは、各測定項目の基準範囲の規定が記載されています。



3

【参考資料】 Configurationの確認と編集

Configurationは、測定を行う検出器とパラメーター名の組み合わせを定義する設定です。必要に応じて変更することができます。

Configuration画面では、測定パラメーターとしてプロット上に表示可能な蛍光色素名を管理しています。

表示可能な蛍光色素名を増やしたい場合や、新しい蛍光色素名を追加したい場合は下記の手順で可能です。

*FC Beads(詳細:p.138)でカバーしていないパラメーターに対して自動的な蛍光補正を設定したい場合は、Reference settingの登録(p.97)もしくは、Add Fluorochrome(p.103)を実施してください。

Configurationの確認

Setup & QC 画面でConfigurationタブ (A) をクリックします。一部のレーザーの設定を拡大する場合、イラスト (B) をダブルクリックします。

測定パラメーターの追加

Fluorochromesのリスト (C) から、追加したいパラメーター名を選択し、適切な検出条件のチャンネル (D) にドラッグします。

測定パラメーターの削除

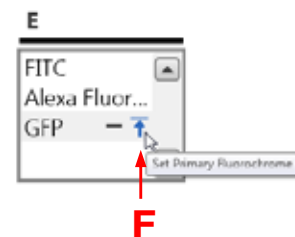
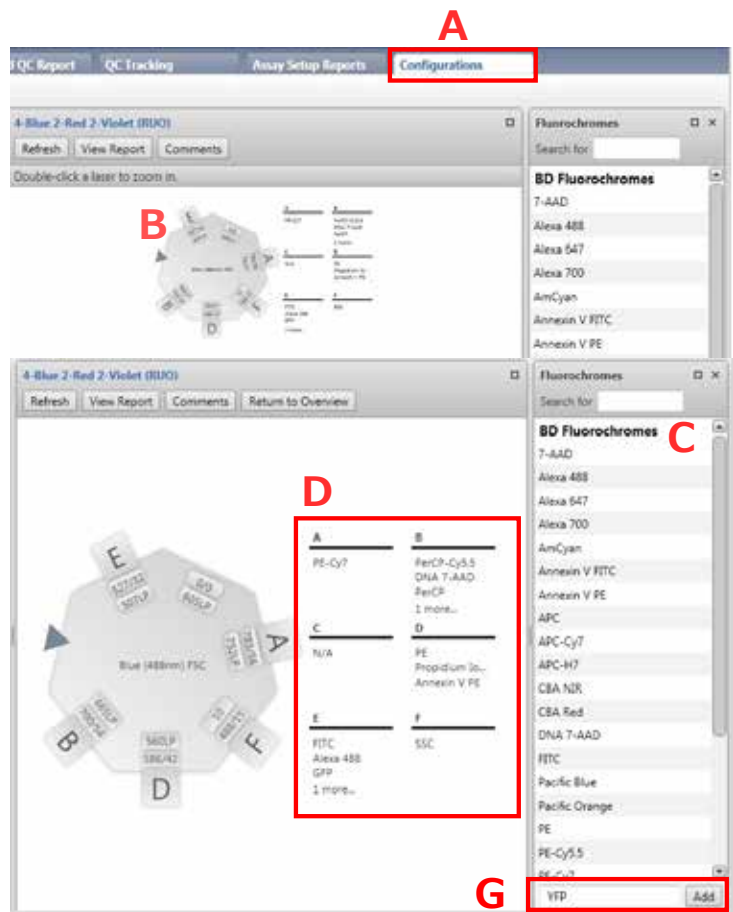
検出器にセットされたパラメーター名にカーソルをあわせ、- (E) をクリックすると、パラメーターの削除ができます。

測定パラメーターの順番の編集

検出器にセットされたパラメーター名にカーソルをあわせ、↑ (F) をクリックすると先頭へ移動させることができます。

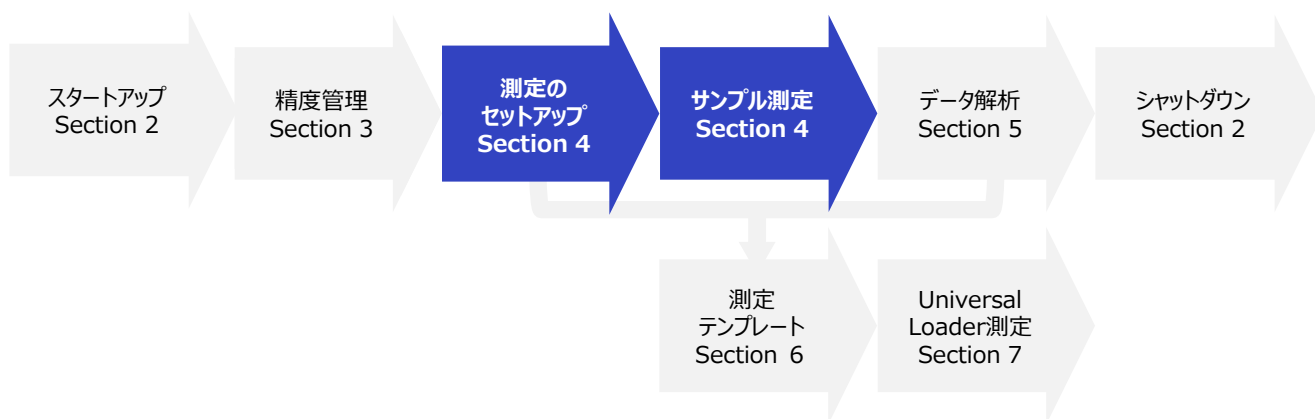
新しいパラメーター名の登録

Fluorochromesの下に、追加したい蛍光色素名を入力してAddをクリックします (G)。



Section 4

測定のセットアップ・サンプル測定



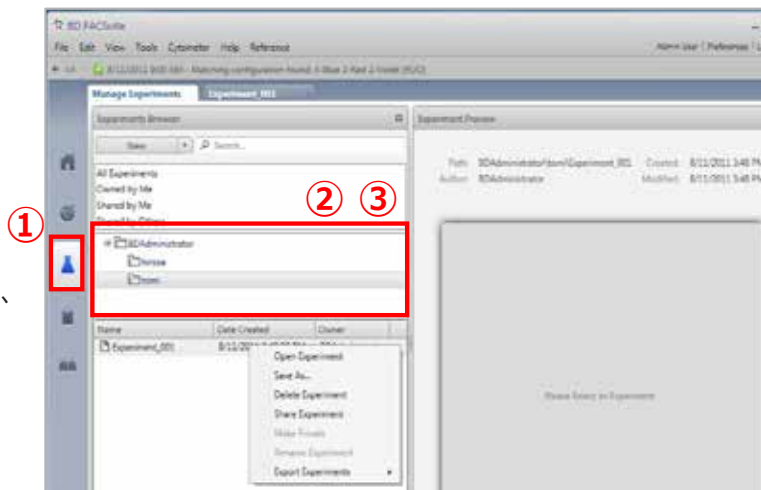
このセクションでは、FACSuiteソフトウェアを使用したサンプル測定の基本的な手順を説明します。FACSLyricでは用途に応じて測定フローが異なるため、Section4-7は目的に応じてページを参照してください。（参考:p.112「サンプルの測定フロー」）

項目	ページ
新規Experimentの作成	62
測定パラメーターの編集	63
プロットの作成	64
サンプルパターンの確認と測定感度調整	65
Threshold、Area scaling factorの調整	67
Tube Properties	68
サンプルデータの保存	70
蛍光補正（Compensation）の調整	71

新規Experimentの作成

データファイルを管理するフォルダと、実験データを保存するExperimentファイルを作成します。

- ① Navigator BarのExperiment（三角プラスコのマーク）をクリックします。
- ② 新たにフォルダを作成する場合は、フォルダを作成したい階層で右クリック>**New Folder**を選択します。フォルダを右クリック>**Rename Folder**より、名前を変更します。
- ③ データを保存したいフォルダを選択して、右クリック>**New Experiment**より、新しいExperimentを作成します。
- ④ 作成したExperimentファイルに名前を付けます。



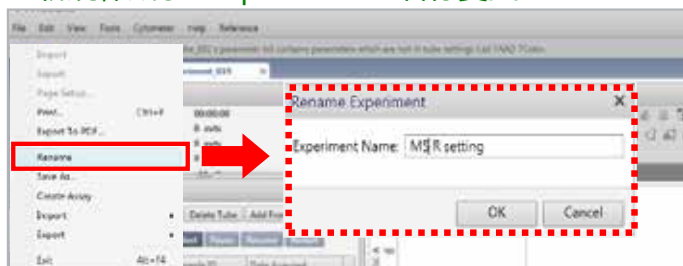
<新規作成したExperiment>

メインメニューのFile>**Rename**より新しい名前を入力します。

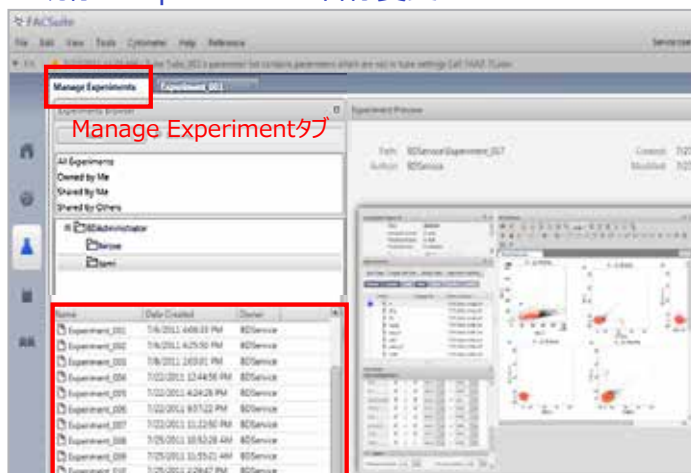
<既存のExperiment>

Manage ExperimentタブのExperiment一覧画面から、名前を変更したいExperimentを右クリックし、[Rename Experiment]より新しい名前を入力します。

<新規作成したExperimentの名称変更>



<既存のExperimentの名称変更>



Experiment一覧画面

*既存のExperimentアイコンを1クリックすると、Experiment Previewに前回使用時の結果のスクリーンショットが表示されます。ダブルクリックでExperimentを開きます。

*他のユーザー（FACSuiteへログインする際の別アカウント）とExperimentを共有したい場合は、Experimentを右クリック>Share Experimentを選択します。この操作によって他のユーザーも編集可能になりますが、ファイルの消去が可能なのはAdministratorと作成したアカウントのみです。共有を中止したい場合は右クリック>Make Privateを選択します。

測定パラメーターの編集

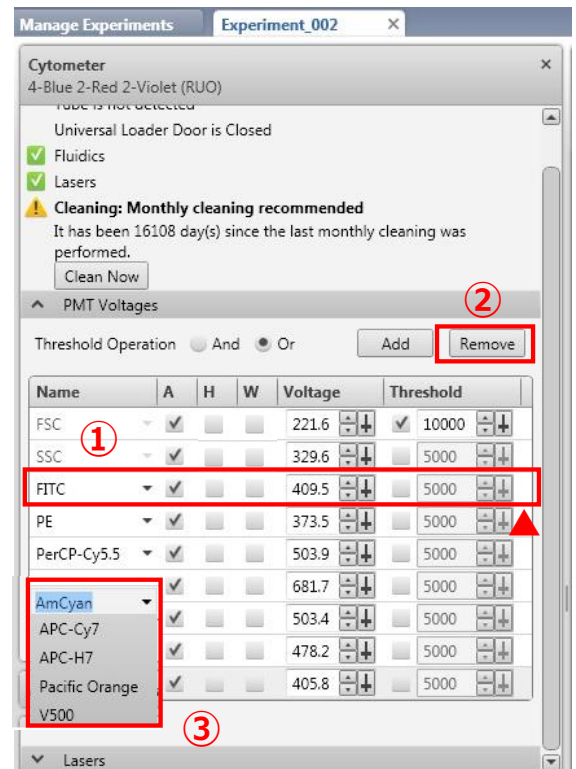
初期設定の状態では全てのパラメーターのデータを保存します。実験内容に応じてパラメーターを編集します。

- ① CytometerウインドウのPMT Voltagesのリストから、測定に不要な蛍光パラメーターを一つ選択します（▲で示した空白部分をクリック）。
- ② [Remove]をクリックすると、選択したパラメーターが削除されます。
*パラメーターを追加する場合は、隣のAdd をクリックします。
- ③ パラメーター名と実際に使用する蛍光色素が異なる場合は、Name列のプルダウンから変更します。
- ④ ダブルレット除去（詳細：次ページ）をする場合は、FSCとSSCのHとWに追加でチェックを入れておきます。

⚠ 注意

・蛍光パラメーターは必ず3つ以上をリストに残してください。
2つ以下にすると、ソフトウェアの不安定化を招きます。

・SuiteのVerが1.3以前であり“Update Reference Setting” (p.102) を使用予定の場合は、パラメーターの並び順をデフォルトから変更しないようにしてください。蛍光補正値が適切でなくなる恐れが生じます。



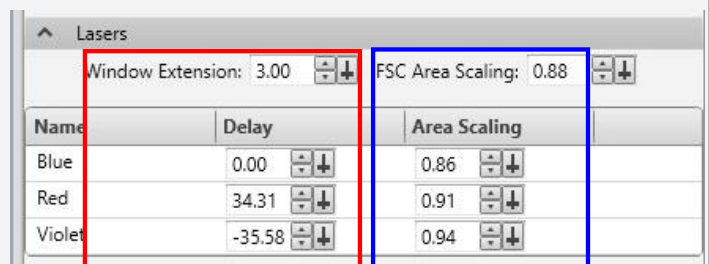
*選択した色素に対する蛍光補正が登録されていない場合は、そのパラメーターに関する蛍光補正値は全てゼロになります。登録する場合は、Reference settingの登録(p.97)もしくはAdd Fluorochrome(p.103)を実施します。

*測定パラメーターとして未登録のパラメーターは表示されません。追加する場合は、Configurationの編集(p.60)を実施します。

<Lasersタブの設定値について>

CytometerウインドウのLasersタブには、データ測定の根幹にかかわる重要な設定値が含まれます。Area Scaling以外の項目は、通常のサンプルの測定では基本的に変更しない項目のため、誤って変更されないようご注意ください。もし不適切な値で測定を実施した場合は、正しい測定パターンが得られなくなります。

誤って変更してしまった場合は、直近のPerformance QCのレポートを参照し設定値を戻してから測定してください。



変更しない

必要に応じて変更

*Area Scalingの設定方法は、p.67に記載。

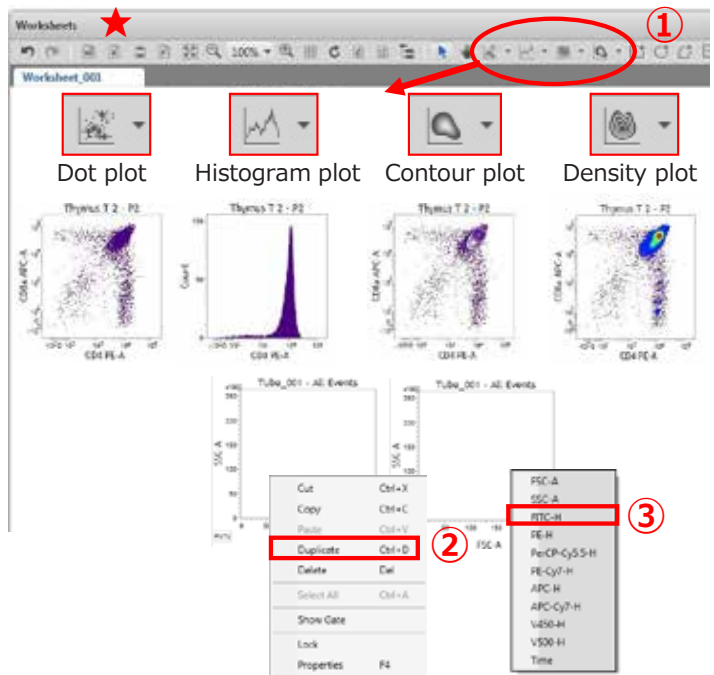
プロットの作成

データを表示するプロットを作成します。

Part 11に必要


* Reportタブを使用してください。

- ① 新しいプロットを作成する場合は、ツールバー上のプロット作成ボタンをクリックし、Worksheetウインドウ上でドラッグします。
- ② 既存のプロットを複製する場合は、プロットを右クリック>**Duplicate** (またはCtrl+D) を選択します。
- ③ プロットの表示パラメーターは、**各軸のパラメーター名を右クリック**して、表示されたリストから選択します。



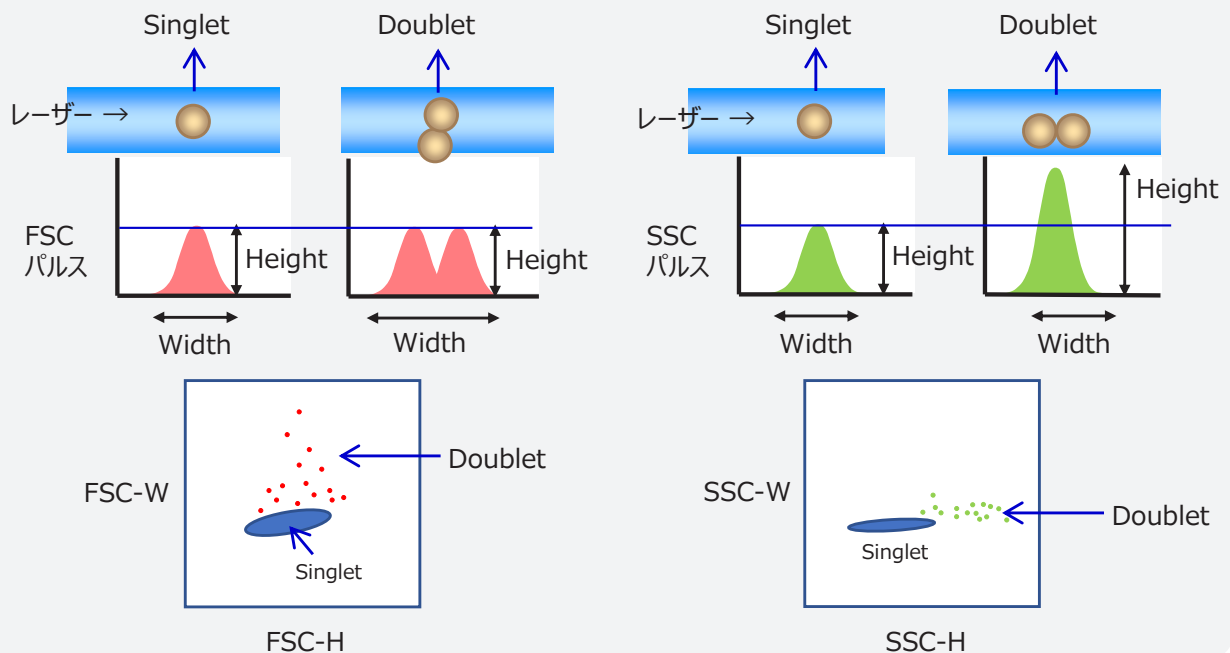
⚠ 注意

*ローダー測定の設定 (Assay) を作成する場合は、Worksheetタブではなく、Reportタブでプロットを作成してください。

Reportを追加するには  (右図★) をクリックします。

<ダブルレット除去>

細胞の凝集や複数の細胞が同時にレーザーを通過すると、ダブルレットデータが生じます。ダブルレットを含んだデータは、解析精度が下がる可能性があるため、下記のゲーティング法で除去します。



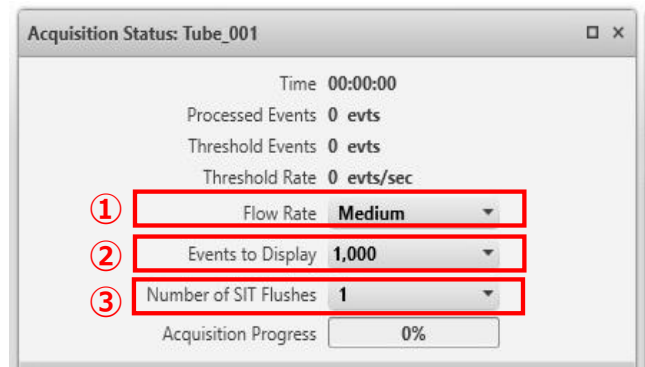
サンプルパターンの確認と測定感度調整 (1)

サンプルを流しながら、測定感度の調整を行います。

- ① Acquisition Statusウインドウより、**Flow rate**を選択します。

High : 120 μ L/min
 Medium : 60 μ L/min
 Low : 12 μ L/min
 High sensitivity : 50 μ L/min

(各Modeについての詳細 : p.13)



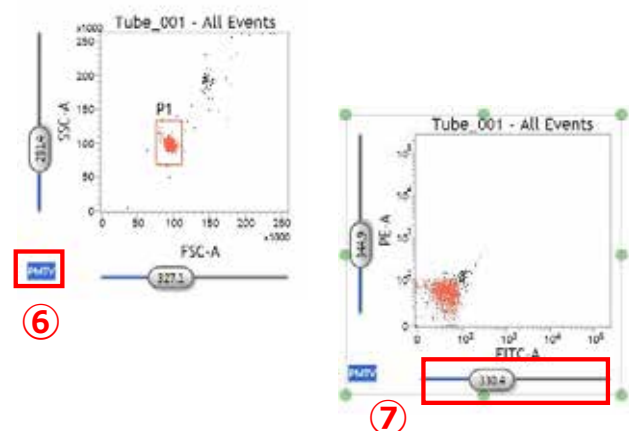
- ② **Events to Display**にて、preview時に画面に表示する最大イベント数を設定します。
- ③ Number of SIT Flushesより、測定終了後に行う**SIT洗浄の回数**を設定します (1~6回まで)。
- ④ サンプルチューブをSITにセットします。

- ⑤ **Previewボタン**をクリックして、サンプリングを開始します。



- ⑥ プロットの左下にある**PMTVボタン**をクリックします。軸の外側にPMTVスライダーが表示されます。

- ⑦ データが適切な位置に表示されるよう、スライダーを用いて測定感度の調節を行います。



- ⑧ 必要に応じて、ThresholdとArea scaling factorの調整を行います。(p.67参照)

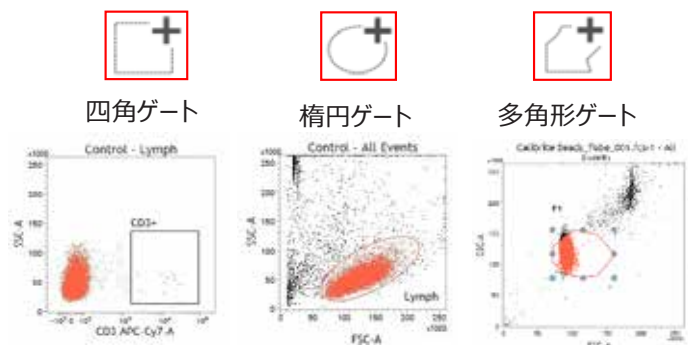
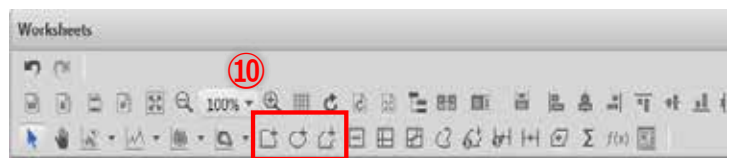
サンプルパターンの確認と測定感度調整 (2)

- ⑨ 調整終了後、**Stopボタン**でサンプリングを止め、SITからサンプルを外します。

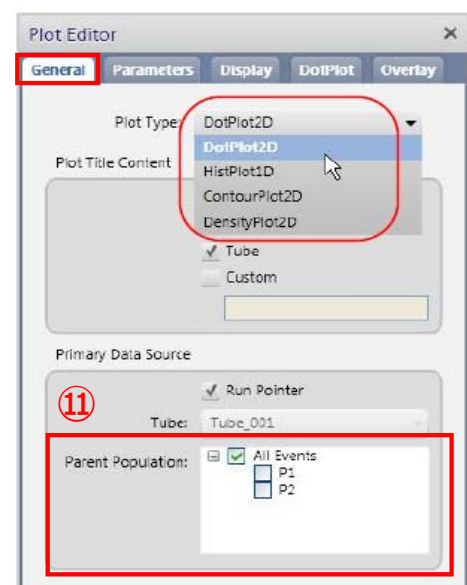
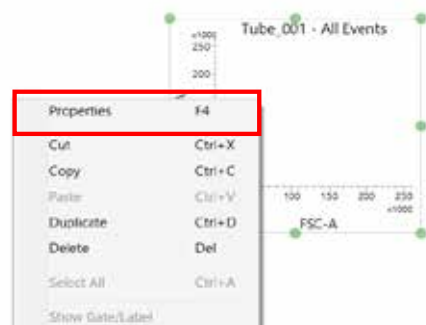
(チューブを外すとSIT Flushが行われます。次のサンプルを続けて測定する場合には、SIT Flush動作終了後にサンプルチューブをセットしてください。)



- ⑩ ツールバーのゲート作成ボタンをクリックし、プロット中で目的集団を囲います。集団の形状に応じてゲートの種類を使い分けてください。



- ⑪ ゲートした集団だけをプロットに表示したい場合は、プロットを右クリック>**Properties**を選択し、表示された画面の**Generalタブ**>**Parent Populations**にて、表示したい集団にチェックを入れます。



必要に応じて実施

<Thresholdの調整>

- ① FSC-SSCプロットにおい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を上げます。

Cytometer
4-Blue 2-Red 2-Violet (RUO)

Status

PMT Voltages

Threshold Operation **2** And **6** Or **1** Remove Add

Name	A	H	W	Voltage	Threshold
FSC	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	221.6	<input checked="" type="checkbox"/> 10000
SSC	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	329.6	<input type="checkbox"/> 5000
FITC	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	409.5	<input type="checkbox"/> 5000
PE	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	373.5	<input type="checkbox"/> 5000
PerCP-Cy5.5	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	503.9	<input type="checkbox"/> 5000
PE-Cy7	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	681.7	<input type="checkbox"/> 5000
APC	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	503.4	<input type="checkbox"/> 5000
V450	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	478.2	<input type="checkbox"/> 5000

Lasers **4**

Window Extension: 3.00 FSC Area Scaling: 0.95

Name	Delay	Area Scaling
Blue	0.00	0.94
Red	35.26	0.90
Violet	-35.46	0.96

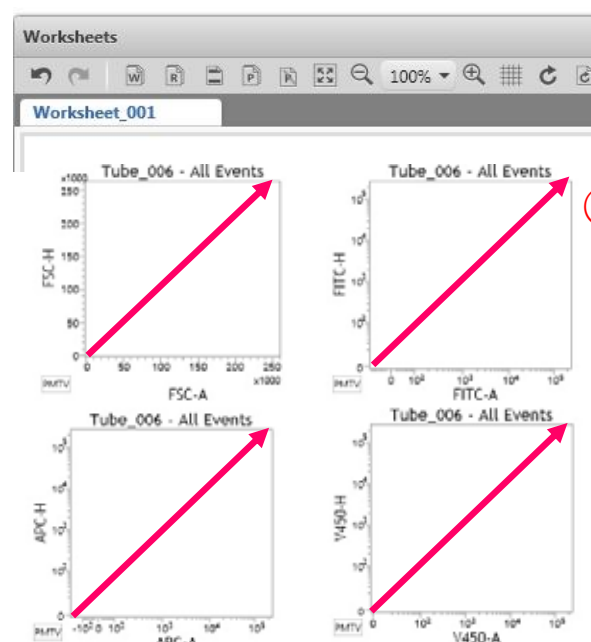
<Area scaling factorの調整>

Area Scaling Factor調整の意義については、
p.19-20に記載しています。

- ② CytometerウインドウのPMT Voltagesのリストにて、測定したいパラメーターのHのチェックボックスをONにします。
- ③ Experimentのワークシート上に、下記の測定パラメーターのAとHを組み合わせたドットプロットを作成します。
 - ・ FSC
 - ・ Blue レーザー いずれか 1 つ(SSC含む)
 - ・ Redレーザー いずれか 1 つ
 - ・ Violetレーザー いずれか 1 つ

*Red, Violetレーザーは、測定に使用するパラメーターがある場合のみ設定します
- ④ CytometerウインドウのLasersをクリックします。
- ⑤ サンプルを流しながら、FSC Area Scaling およびBlue, Red, Violet のArea Scalingの数値を調整し、解析したい集団が各プロットの対角線上に表示されるように設定します。

* 蛍光パラメーターのプロットでは、蛍光陽性集団が対角線上に位置するように調整します。
- ⑥ FSCとBlueレーザーのArea scalingの調整によって、FSC, SSCのプロット上の表示位置が変わるため、再度FSC, SSCのVoltageもしくはゲートの位置を調整します。



Tube Properties (1) - 抗体名追加など

データの保存条件や付随情報を管理するTube Propertiesを編集します。



注意

データ保存後に変更できない項目があるため、データを保存する前に必ず確認、設定してください。

- ① Data Sourcesウィンドウにて、Tubeアイコンを右クリック>**Properties**を選択します。
- ② Generalタブ > **Tube Name**にて、データ名を入力します。

*データの保存後はTubeの名称を変更することはできないため、必ずデータ保存の前に名前を付けます。

- ③ 同じGeneralタブの**Tube Settings**を確認します。

- ・Lyse Wash / Lyse No Wash: FACSuiteの初期設定であり、ヒト血球細胞の測定に最適化された測定感度の機器設定です。
- ・既に登録済みの設定を呼び出す場合は、[Select]をクリックし、表示されたリストから選択します。

* Tube Settingsの説明はp.94にも記載しています。

- ④ 次に **Reagents**タブでサンプルのマーカ情報を入力します。主要なヒト白血球マーカは登録されており、[Label]のプルダウンより選択可能です。

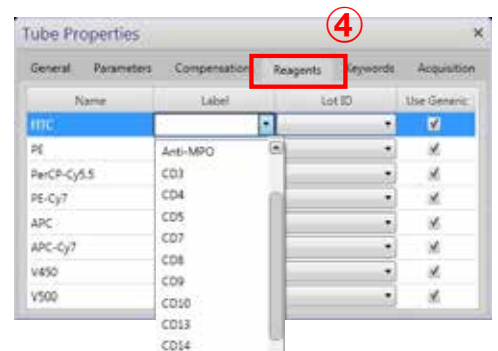
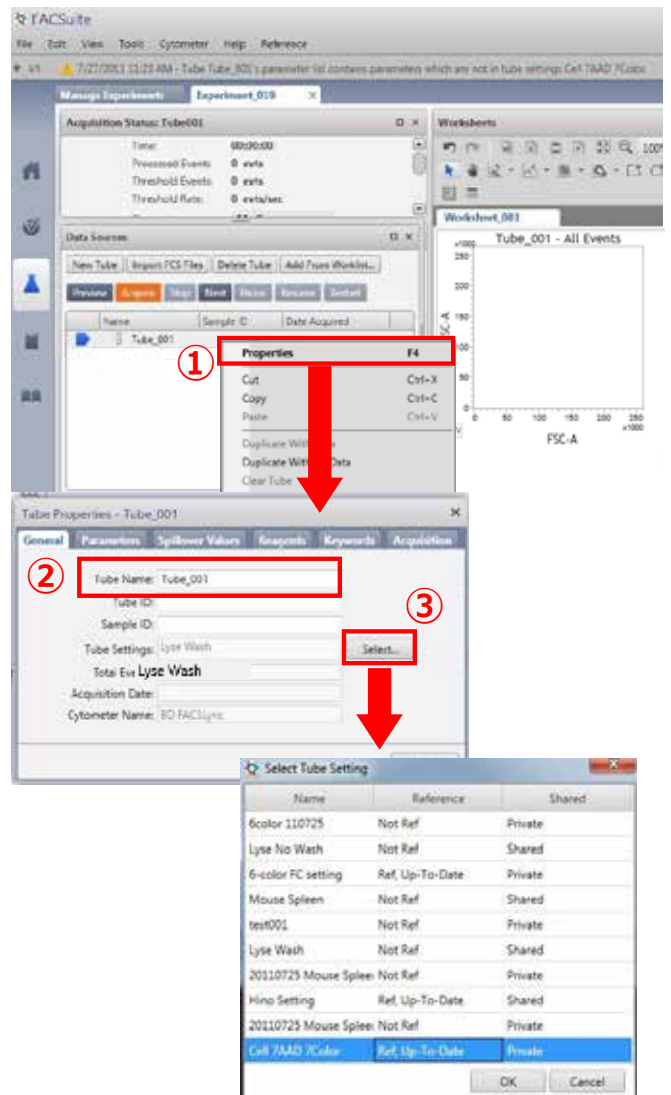
*マーカ登録方法は、p.109 (Libraryによる登録設定の管理「Label」の項目) をご覧ください。



注意

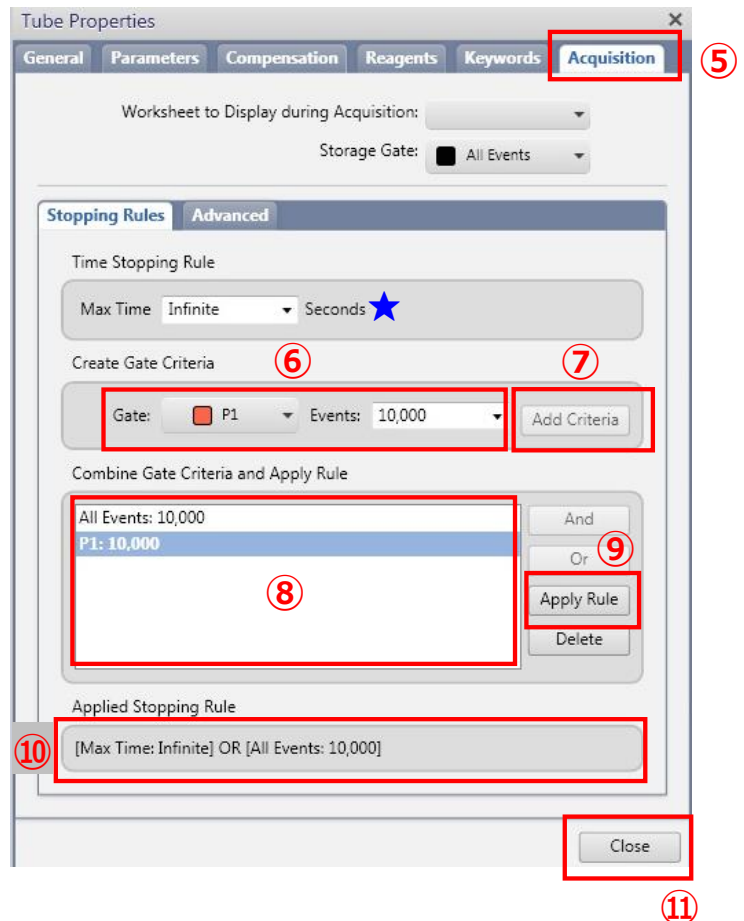
***Reagent Label**はデータ保存後には編集できません。必ず保存前に入力してください。

*これから新しい機器設定のテンプレート (Tube setting、Reference setting、Assay) を作成する場合は、**Tube/Reference settingの登録後にReagents Labelを入力してください。** (つまり、Tube/Reference settingの登録→Reagent Label入力→データ保存 or Assayの登録・・・という順序で実施。) 登録時にマーカ名が入力されていると、その蛍光補正は同じマーカ名の設定時にしか適用できなくなります。



Tube Properties (2) – 保存細胞数の設定

- ⑤ **Acquisition**タブを選択します。
ここでは保存個数の設定を行います。
- ⑥ Stopping Rulesタブの[Create Gate Criteria]にて、ゲート・データ保存個数を設定します。
*FACSuiteでは、一度保存したチューブに後からデータを追加することはできないため、必要十分なデータが保存できる設定にします。
- ⑦ [Add Criteria]をクリックします。
- ⑧ [Combine Gate Criteria and Apply Rule]にて、使用したいデータ保存基準を選択します。
- ⑨ [Apply Rule]をクリックします。
- ⑩ [Applied Stopping Rule]にて、設定した保存条件が表示されていることを確認します。
*Universal loaderを使用する場合は、Max Timeに測定最大時間（秒）を設定してください（★）
- ⑪ [Close]をクリックします。



サンプルデータの保存

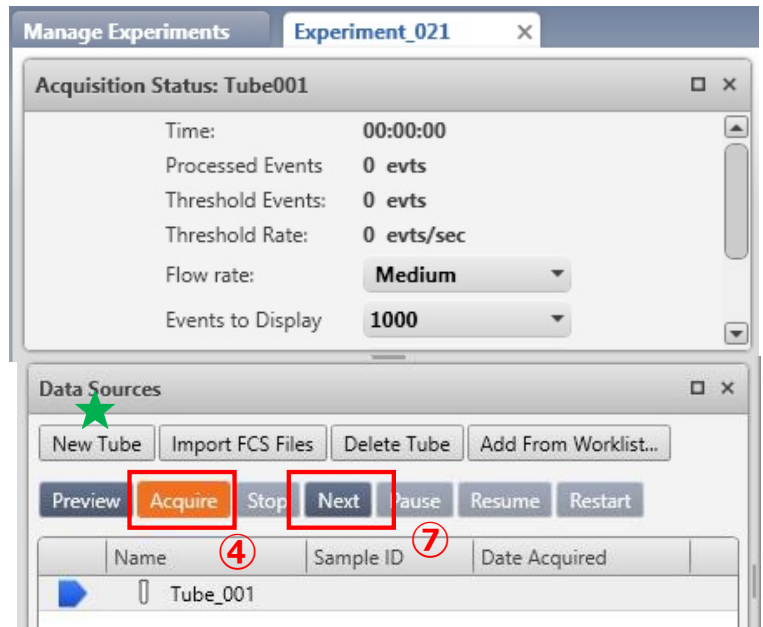
ここまでの手順で設定した保存条件を使って、サンプルデータの保存を行います。

- ① データを保存したい測定サンプルが入ったチューブをSITに取り付けます。
- ② **Preview**ボタンをクリックして、サンプリングを開始します。
- ③ プロット上の測定パターンに問題がないことを確認します。
- ④ **Acquire**ボタンをクリックしてデータの保存を開始します。
*Acquireを押さないとデータは保存されません。
- ⑤ 設定した保存個数の条件を満たしてサンプリングが停止したのち、サンプルをSITから外します。
*測定中はサンプルを外さないでください。途中で停止する場合は、Stopボタンで動作を停止します。
- ⑥ 設定された回数のSIT Flushが実施されます (LED : オレンジ→終了後グリーン) 。
- ⑦ 同じ条件で引き続き測定する場合は、**Next**ボタンをクリックして、新しいチューブ(同一の機器条件)を追加します。
*途中でマーカ名を変更する必要がある場合は、データを保存する前に変更してください。

⚠ 注意

New Tube (図中★マーク) をクリックすると、機器設定が初期状態のTubeが追加されてしまいます。

- ⑧ 作成したTubeの名称を変更します。
*データ保存後は変更できません
- ⑨ 他のサンプルも同様に測定します。



↓ ⑦ [Next]で同じ設定のTubeができる

Name	Sample ID	Date Acquired
▶ Tube_001		1/28/2016 11:15 AM
▶ Tube_002		

蛍光補正 (Compensation) の調整 (1)

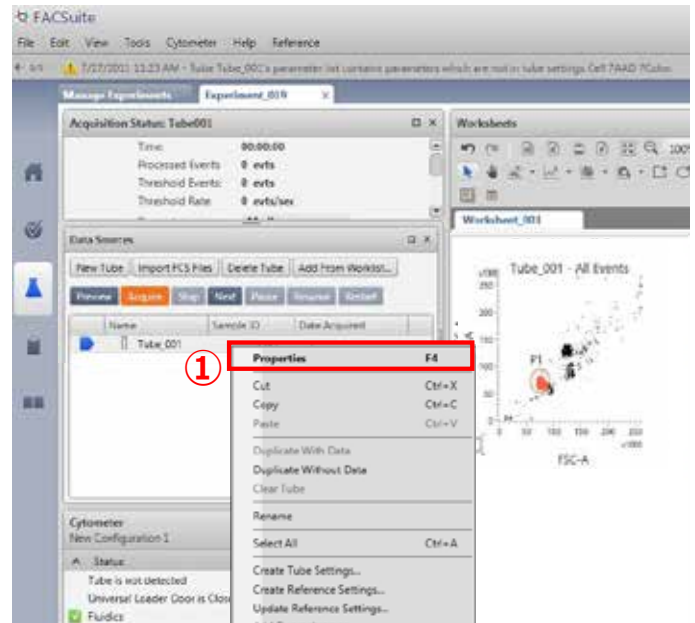
単染色コントロールなどの適切なコントロールサンプルを用いて、サンプルに応じた蛍光補正を設定します。

FACSuiteは独自の精度管理システムによって、あらかじめ主要な蛍光色素の蛍光補正情報を持っており、使用する測定感度に応じた補正值が自動計算されます。

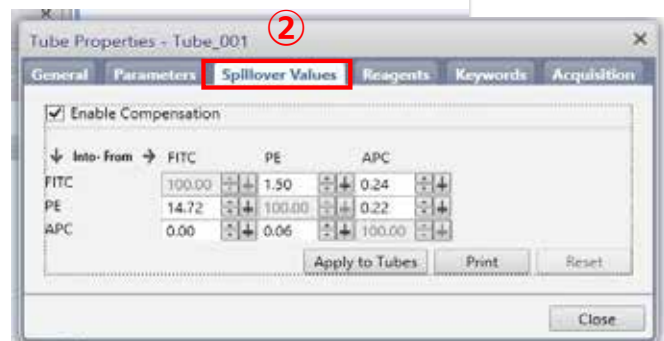
ただし、試薬の状態やメーカー、蛍光色素が異なる場合や培養細胞などを測定する場合は、補正にずれが生じる可能性があります。その場合、下記の手順により手動で調整することができます。

手動ではなく、サンプルの状態にマッチした自動計算蛍光補正を使用したい場合は、Reference settingsの登録 (p. 97) を実施します。

- ① 蛍光補正值を変更したいTubeのRun pointerをON ()にして、チューブを右クリック>Propertiesを選択します。



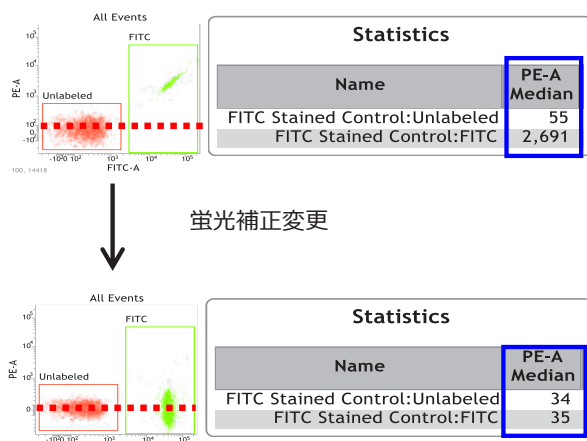
- ② Tube Properties画面の **Spillover Values** タブを選択します。



- ③ サンプルに合わせて蛍光補正の値を変更します。

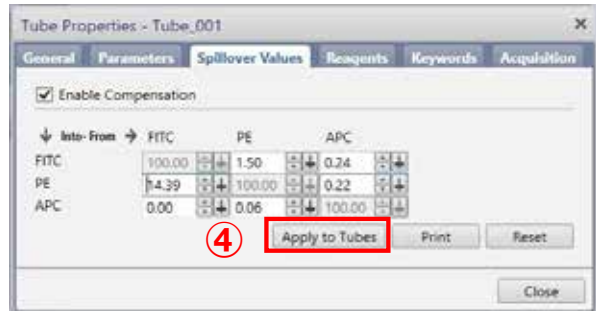
* 蛍光補正は、ポジティブ集団の平均値 (MedianあるいはMean) がネガティブ集団と同じ値になるように行います。

* Statisticsの表示方法はp.87をご覧ください。

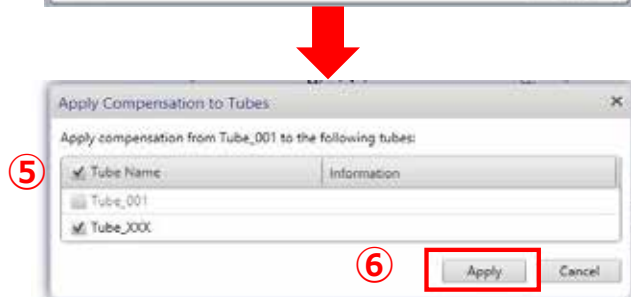


蛍光補正 (Compensation) の調整 (2)

- ④ 他のデータにも同じ蛍光補正を反映する場合は、**[Apply to Tubes]**をクリックします。



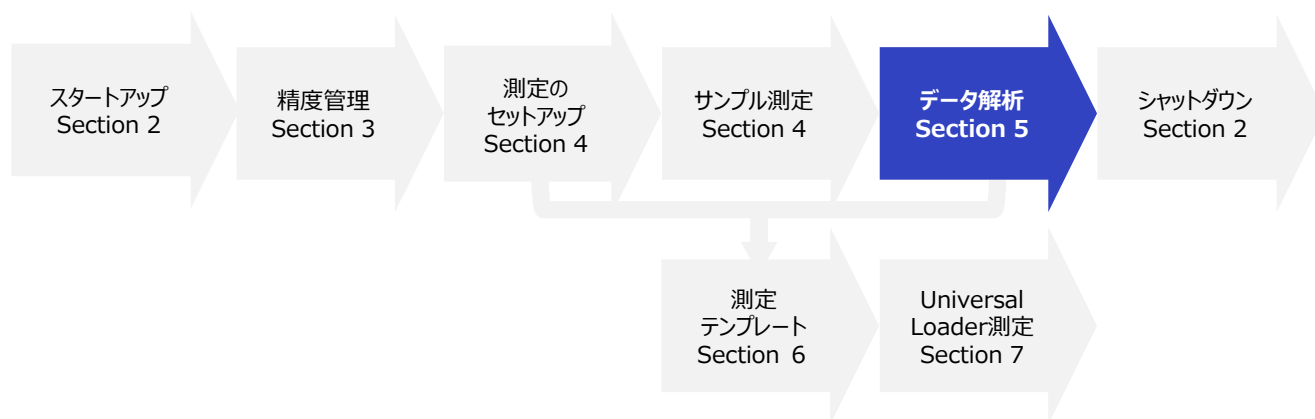
- ⑤ リストから同じ蛍光補正を反映するTubeを選択します。



- ⑥ **[Apply]**を選択すると、新しい蛍光補正值に統一されます。

Section 5

データ解析



項目	ページ
Worksheetsのツールバー機能	74
プロットの作成と編集	76
オーバーレイプロットの作成	82
ポピュレーション（ゲート）の作成と編集	83
Gate Hierarchyの管理	85
統計情報の表示・編集	87
データの管理（データのバックアップと消去）	89
ユーザーアカウントの管理	91

Worksheetsのツールバー機能

Part 11に必要

Reportタブを使用してください。



① プロット画面の追加編集ボタンです。ワークシート、レポートの追加や、ヘッダー・フッターの表示、ページの追加が可能です。



新しいワークシートの追加



新しいレポートの追加



表示中のワークシート・レポートの削除



ヘッダー・フッターの作成



新しいページの追加

② プロット表示画面の書式設定を変更できます。画面の拡大・縮小、グリッド線の表示、ページの配置や、用紙の向き、用紙設定を変更できます。



表示倍率をウインドウサイズに最適化



ページ全体の拡大・縮小

100%

ページの拡大率の設定



グリッド線の表示



複数ページの並べ方の縦・横の切替え



ページの向きの縦・横に切替え



用紙設定のLetter/A4の切替え
(初期設定はLetter)

③ 画面上の表示オブジェクトのサイズ合わせ、整列を行います。



サイズ合わせ



左右位置の整列



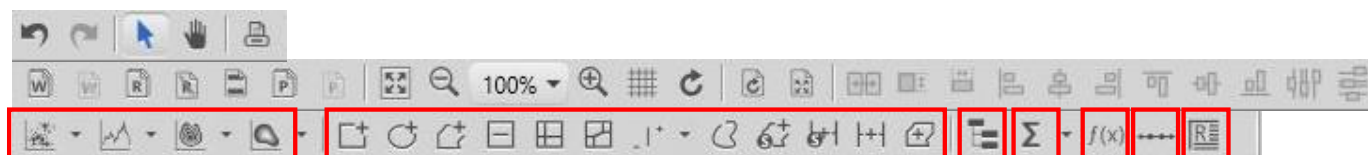
上下位置の整列



上下・左右位置の中央揃え



上下・左右位置の均等配置



④

④ 画面上にプロットを作成できます。



ドットプロット



ヒストグラムプロット



等高線プロット



デンシティプロット

⑤

⑤ プロット内にゲートを作成できます。



四角ゲート



フリーハンドゲート



楕円ゲート



Snap-to
多角形ゲート



多角形ゲート



Snap-to
インターバルゲート



インターバルゲート



オートインターバル
ゲート



4分割ゲート



オート
多角形ゲート



4分割ゲート



スプリットゲート

⑥

⑥ データの階層性を管理する、Gate Hierarchyを表示できます。



⑦

⑦ 統計情報を表示します。



⑧

⑧ データの数値情報で計算を行う Expressionを表示します。



⑨

⑨ ポジ・ネガ判定の機能であるRange Expressionを作成します（Suite v1.4以降の機能）。



⑩


⑩ 画面上にテキストボックスを作成できます。作成したテキストボックスを右クリック >[Insert]より、各種のKeywordや Expressionを入力する事も可能です。



プロットの作成と編集

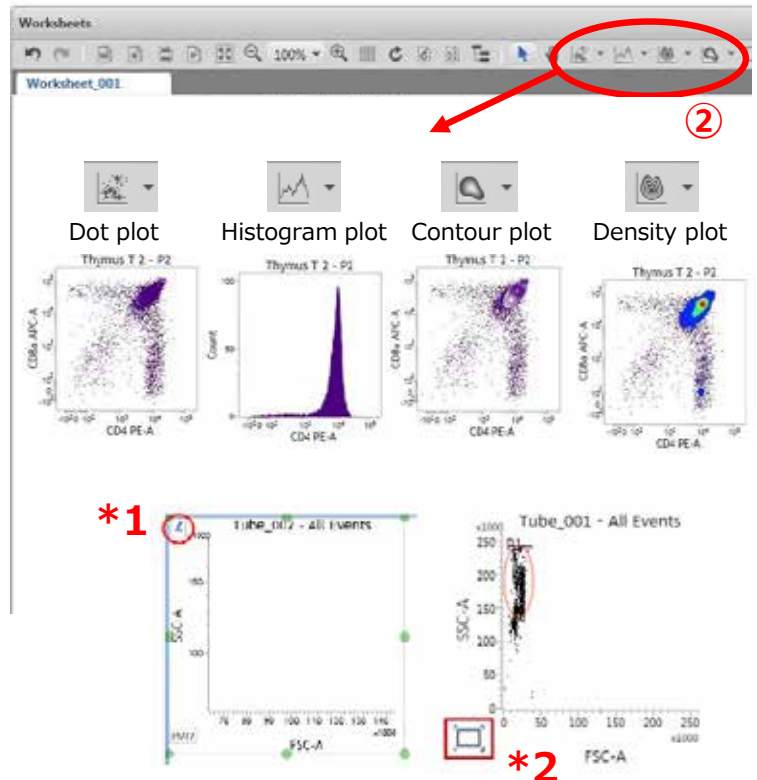
プロットの作成、表示方法の編集について紹介します。

<新しいプロットを作成する>

- ① 表示したいデータのTubeのRun pointerをONにします。
- ② ツールバーのプロット作成ボタン(右図②)をクリックし、Worksheetウィンドウ上でクリックします。

*1 プロットを右クリック> Zoom In Scale>選択>範囲を選択で、ズーム表示ができます。(プロット左上にZマークが表示されます。)
元の表示に戻したい場合は、プロットを右クリック> Zoom Resetを選択します。

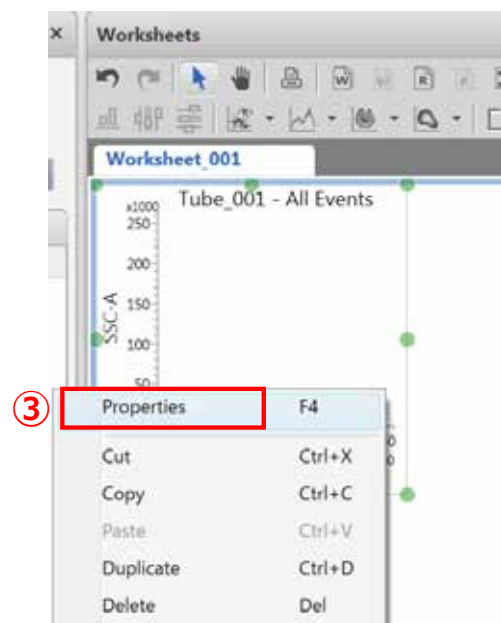
*2 データ測定後のプロットでは、左下の拡大表示のマークをクリックしてプロット全体を大きく表示できます。



<Plot Editorによる編集>

- ③ プロットをさらに編集する場合、プロットを右クリック>**Properties** を選択し、Plot Editor画面を呼び出します。(キーボードのF4キーでも可。)

* 複数のプロットをまとめて選択し、編集することも可能です。



Generalタブを用いた編集について紹介します。

プロットの種類を選択可能

Plot type: DotPlot2D

Plot Title Content

- Sample
- Tube
- Populations
- Custom

Primary Data Source

- Run Pointer
- Tube: Tube_001
- Parent Population: All Events

Plot type dropdown menu:

- DotPlot2D
- DotPlot2D
- HistPlot1D
- ContourPlot2D
- DensityPlot2D

Plot title content options in plot:

Harako Dickinson | Tube_003 | All Events

*「Sample」の項目は、Tube Propertiesで変更可能

プロットに表示するデータを選択可能

Run Pointer

- Run Pointer Run Pointerで選択しているデータを表示。
- Run Pointer Run Pointerでの選択に依存せず、Tubeタブで選択しているデータを表示。

プロットに表示するポピュレーションを選択可能

Plot type: DotPlot2D

Plot Title Content

- Sample
- Tube
- Populations
- Custom

Primary Data Source

- Run Pointer
- Tube: Tube_002
- Parent Population: All Events, P1

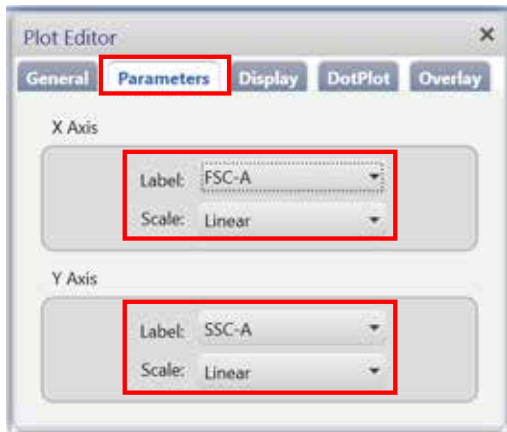
Parent Population selection in plot:

- All Events
- P1

Plot results:

- All eventが表示される
- P1のみが表示される

Parametersタブを用いた編集について紹介します。



X軸・Y軸のパラメーター、スケール(Linear, Log, Biexponential)を選択可能。

※一般的にFSCとSSCはLinear、蛍光はLogまたはBiExponentialで表示します。

BiExponential (Automatic)



BiExponential (Manual)



R Value : マイナス側の表示スケールを任意の数値に設定できる

補足 (各表示の特徴)

Log

- ・X軸やY軸に集団が張り付いて見えることがある
- ・枠内に収まっている集団が少なく見えることがある

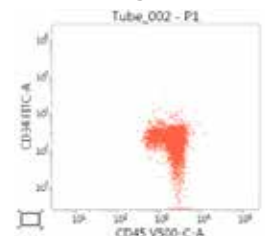
BiExponential (Automatic)

- ・X軸やY軸に張り付かなくなる
- ・X軸やY軸のマイナス側の表示が過剰になることがある
- ・表示するデータによってマイナス側の表示スケールが変わる

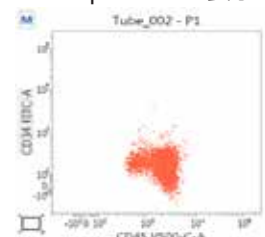
BiExponential (Manual)

- ・X軸やY軸に張り付かなくなる
- ・X軸やY軸のマイナス側の表示を任意で設定できる
- ・表示するデータに関わらずマイナス側の表示スケールが一定

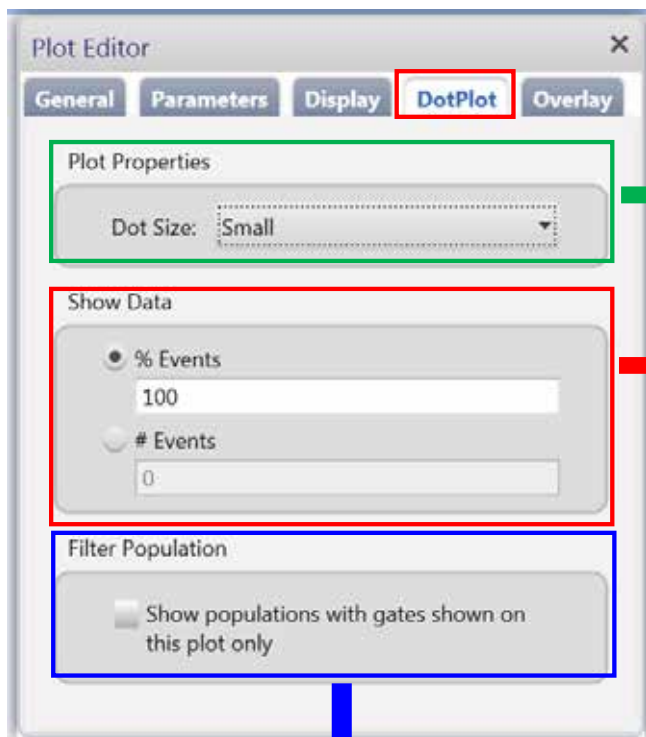
Log表示



Biexponential表示

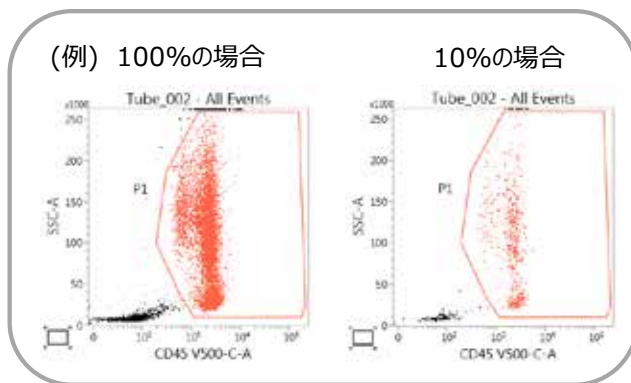


Dot plotタブを用いた編集について紹介します。



ドットプロットのドットサイズをSmall, Medium, Largeから選択できます。

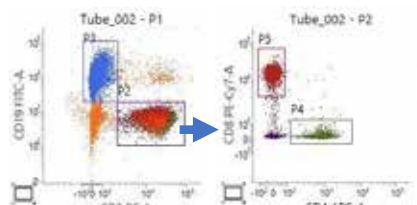
表示するドットプロットの数/割合を変更できます



他のプロット上のドットの色が反映されないようにする設定です。

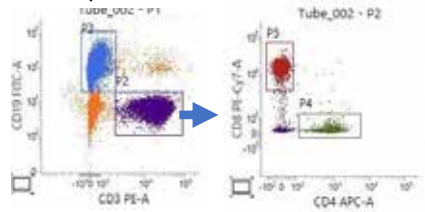
* FACSuite v1.3以降の機能です。

(例) Filter Population: OFFの場合



他のプロット上のドットの色が反映される

Filter Population: ONの場合



他のプロット上のドットの色が反映されない

各種プロットタブでは下記の項目の編集が可能です。

[Histogramタブ](#) (ヒストグラムプロットのみ)

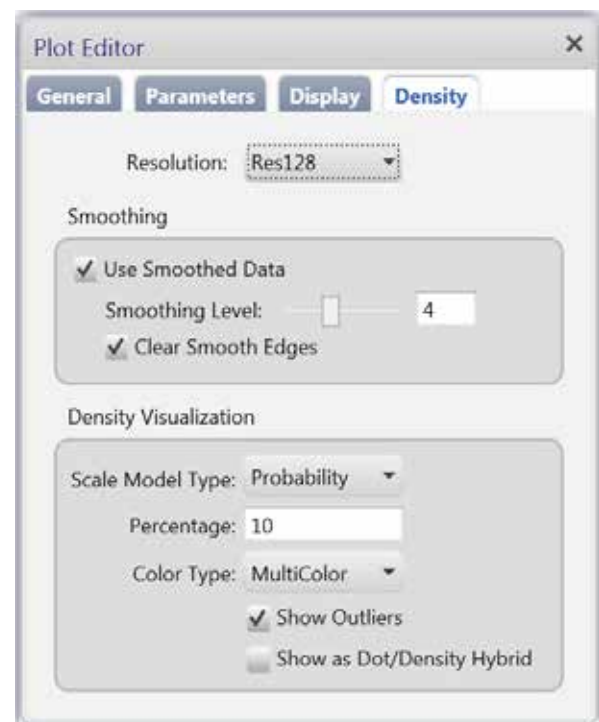
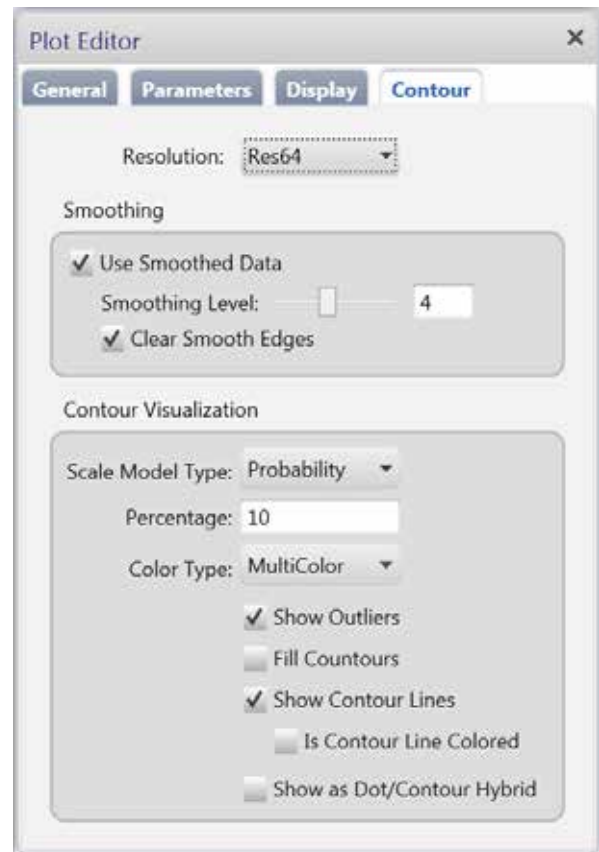
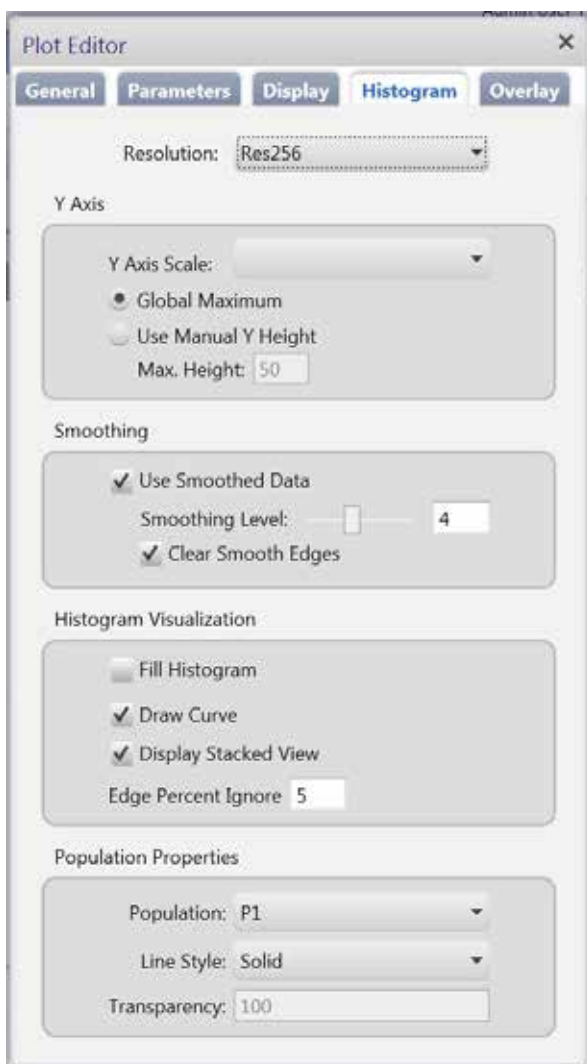
全体の解像度、Y軸の表示設定、スムージング設定、表示形式の選択、線の表示

[Contourタブ](#) (Contourプロットのみ)

全体の解像度、スムージング設定、密度表示設定と表示形式の選択

[Densityタブ](#) (Densityプロットのみ)

全体の解像度、スムージング設定、密度表示設定と表示形式の選択



Markerタブ (ヒストグラムプロットのみ、Ver1.4以降)

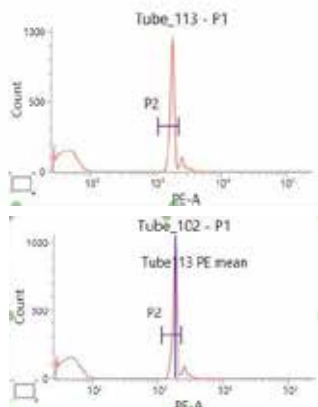
特定のデータの数値に基づいたマーカー (ライン) を、目印のようにプロット上に表示する機能です。

Add Markerのツリーより、数値マーカーを表示したいデータを選択し、Addボタンで表示します。

Markersで選択し、Edit Markerで表示方法などを編集できます。

例)

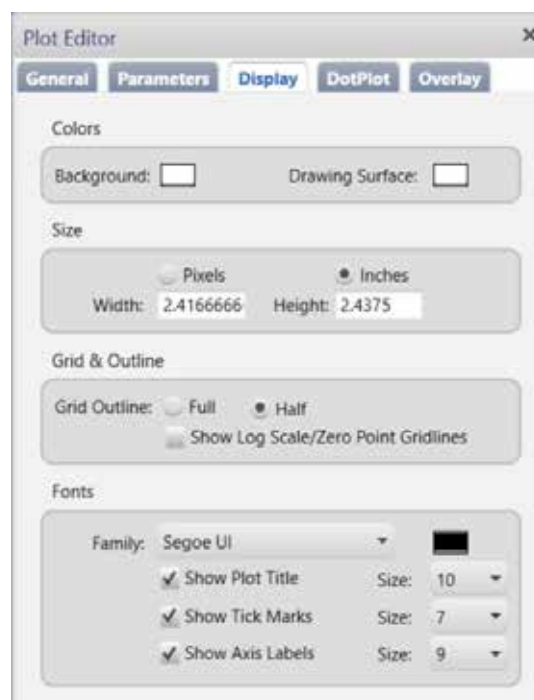
Tube_113のP2集団のPEのマーカーのMeanを、Tube 102のヒストグラムに表示した例。異なるサンプル間において、P2集団のPEのMeanが同じくらいであることを視覚的に表現できています。



Displayタブ

プロット図の表示方法を変更できます。

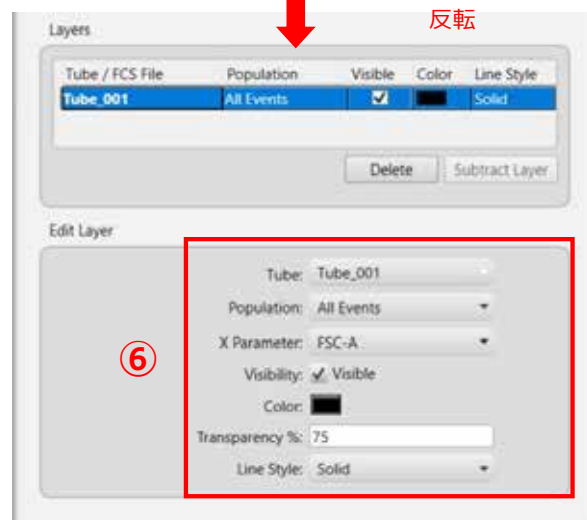
- ・プロット図 (background、プロットエリア) の色の変更
- ・プロット図のサイズ
- ・外枠のグリッド線表示
- ・文字のフォント・色・サイズの変更、
プロットタイトル・軸の目盛り・軸ラベルの表示/非表示



オーバーレイプロットの作成

オーバーレイプロットでは、複数のデータを同じプロット上にに表示することができます。FACSuiteでは、Dot plotおよびHistogram でOverlayが可能です。

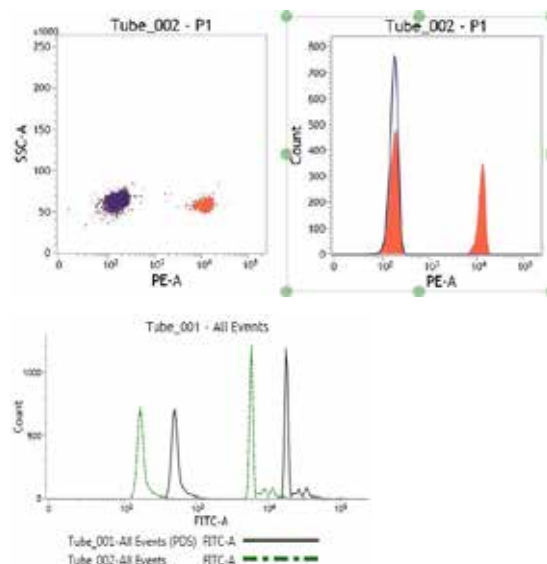
- ① ドットプロットまたはヒストグラムプロットを右クリックし、[Properties]を選択します。
(Plot Editor画面が表示されます。)
- ② Overlayタブ (右図▼) をクリックします。
- ③ [Sources]でプロットに追加したいTubeを選択します。
- ④ [Add]をクリックします。
- ⑤ [Layers]に追加したデータが表示されるので、クリックし反転させます。
- ⑥ [Edit Layer]の表示が追加されます。
ポピュレーション、色、透過度
(Transparency %) などを変更できます。
* 追加したデータ表示を削除したい場合、
[Layers]で消したいデータを選択しDeleteを選択します。



⚠ 注意

* オーバーレイ作成後は、スケール、表示方法の変更を行わないでください。表示内容のずれが生じます。変更が必要な場合は新しく作り直してください。

*ヒストグラムの場合、Resolutionを512以下で使用してください（ソフトウェアの予期せぬエラーが生じる場合があります）。

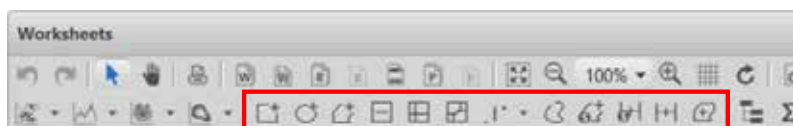


ポピュレーション（ゲート）の作成と編集

データを解析するためのゲートの種類と機能について紹介します。

<ゲートの新規作成>

ツールバー上のゲート作成ボタンより行います。



マニュアルゲート:

手動でゲート設定範囲を決定するゲートです。



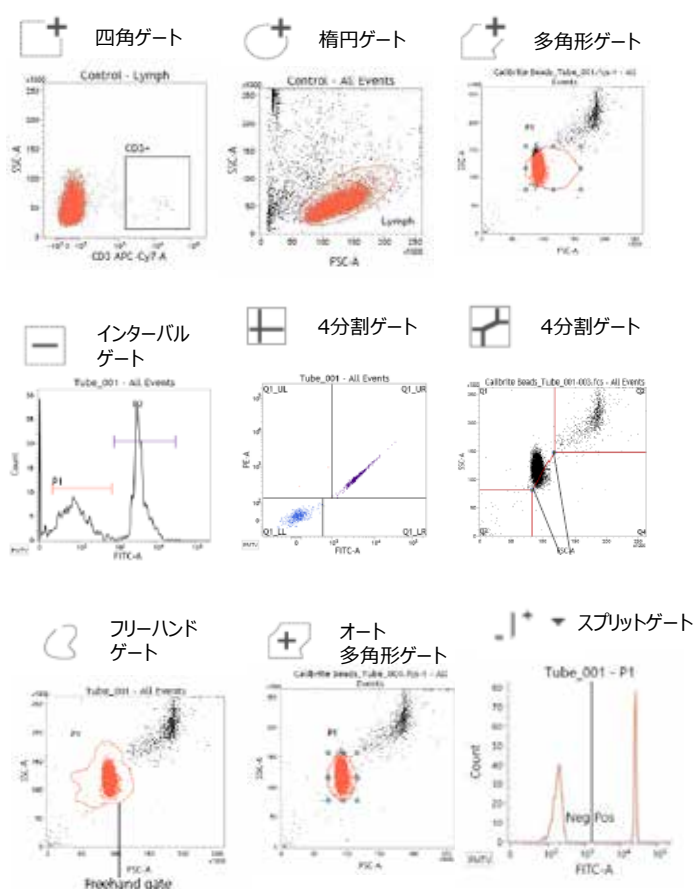
Snap-to-gate:

表示されているデータ分布に合わせて、ゲートの形が変わるゲートです。プロット上に表示されるデータが変わると、それにに応じてゲート形状も変化します。

*ゲートの形を編集した後で元に戻したい場合は、ゲートを右クリック>Recalculateを選択します。

オートゲート:

ゲート設定時のデータ分布に合わせてゲート形状が決定されるゲートです。



<Gate Propertiesの編集>

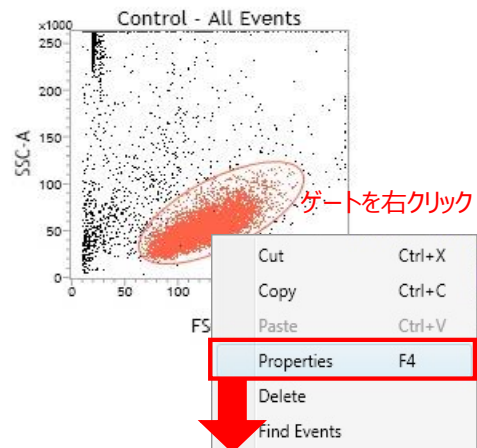
ゲートを右クリック>**Properties**を選択します。
(Properties画面が開きます)

下記の項目を編集できます。

Name:

ゲート名を変更できます。

ゲート名の右横の■をクリックすると、**ドットの色**を変更できます。



その他



Statistics Only:

- ON ポピュレーションに新しい配色を行いません。
- OFF ポピュレーションにそれぞれ異なる配色を行います。


Strict Parameter Match:

- ON マーカー名の異なるサンプルではゲートを共有しません。
- OFF マーカー名が違って同じゲートを使用します。

Show Outline:

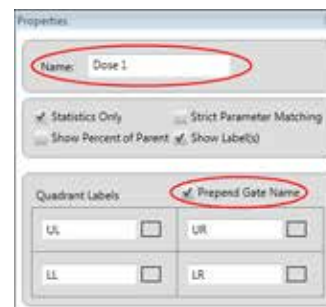
- ON ゲートを選択するとOutlineが表示されます。 
- OFF ゲートのOutlineを表示しません。 

Show Label:

- ON プロット内にポピュレーション名を表示します。 
- OFF ポピュレーション名を表示しません。

Show Percent of Parent (Quadrant gateなどの場合)

- ON 各領域の母集団に対する割合を表示します。
- OFF 各領域の割合を表示しません。



Gate Hierarchyの管理

データを階層的に解析するためのGate Hierarchyの機能と編集方法について紹介します。

① ツールバーのGate Hierarchyボタンをクリックします。

② Hierarchyウィンドウが表示されます。

・**Show Statistical Gates/Population:**

Quadrant gateをHierarchy画面に表示したい場合にはチェックを入れます。

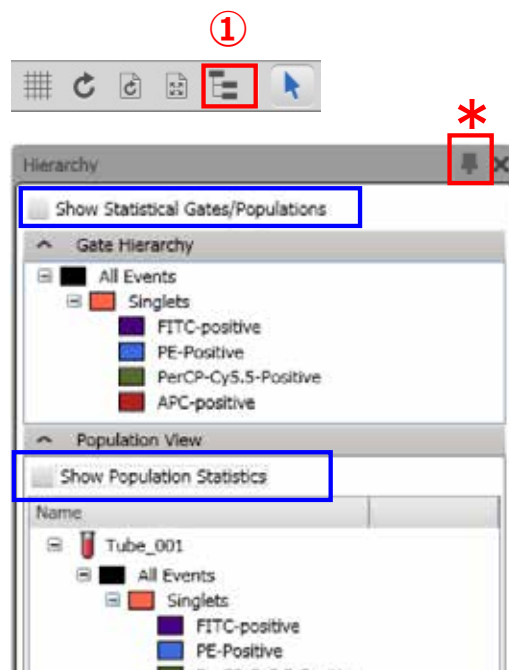
・**ゲートの階層性を変更する場合**

Gate hierarchy上でドラッグアンドドロップすると階層性を変更できます。

・Population Viewでは各データのHierarchyが表示されています。

・**Show Population Statistics:**

個々のデータの数値情報(イベント数、%)を表示できます。



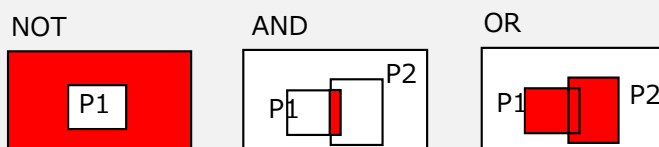
* Hierarchyの情報を出力レポート (PDF、印刷物) に表示したい場合は、画面右上のPush pinボタン (図 * マーク) をクリックします。(ワークシート上の印刷オブジェクトとして変換されます。)

・Hierarchyウィンドウがワークシート上からはみ出ていると、push pinボタンを押しても印刷オブジェクトに変換されません。

・印刷オブジェクトとして変換したあとに再度編集する場合は、ツールバーのGate HierarchyボタンからHierarchyウィンドウを呼び出します。

<ロジカルゲート>

下記の図のようなロジカルゲートを作成したい場合は、Gate Hierarchyで対象のゲートを選択して右クリックし、[NOT], [OR], [AND]から選択します。



<参考 : Find Events および Highlight機能>

* Gateを右クリック> [Find Events]を選択すると、Gate内のイベントがpopulation color表示となり、Gate外のイベントが灰色表示になります。

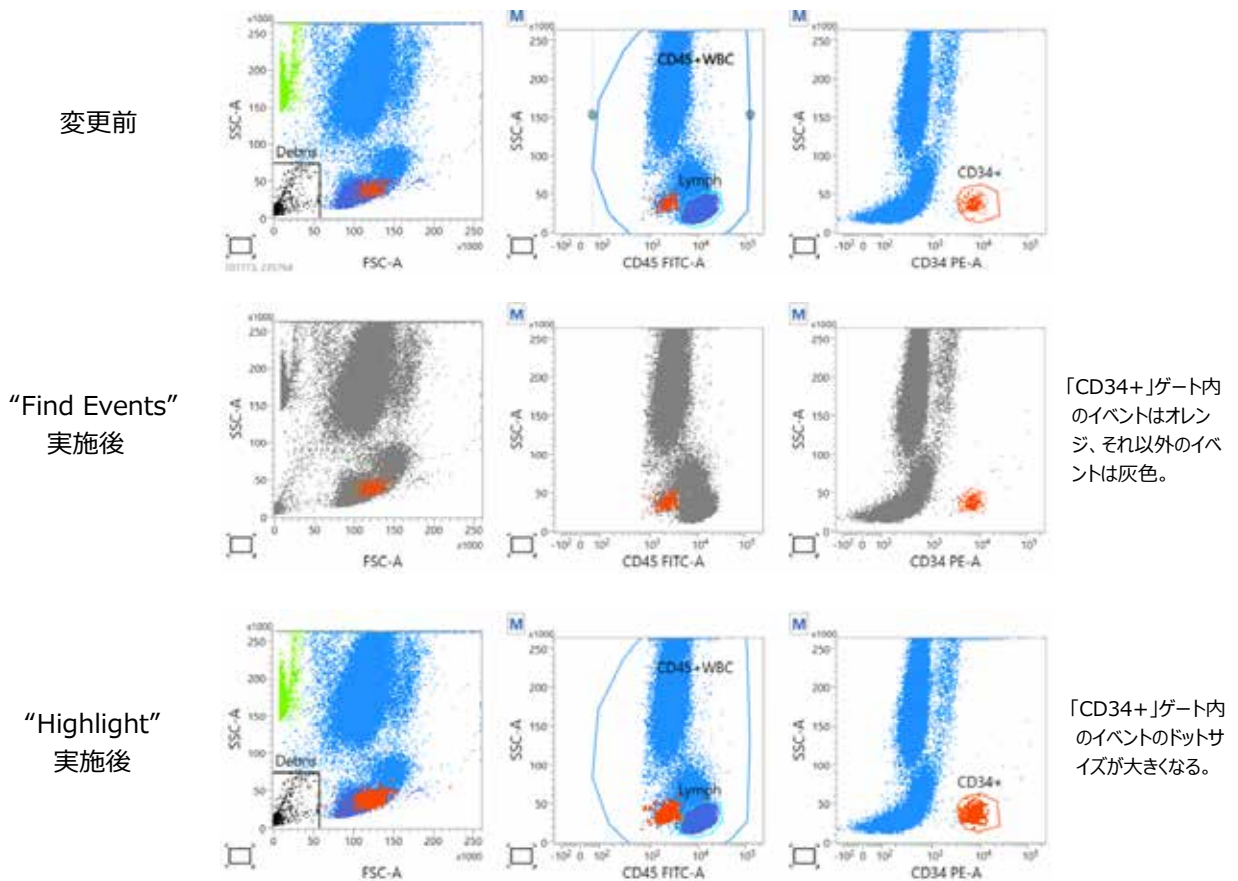
解除方法は下記の通りです。

- ・Ver1.3以降の場合・・・Gate hierarchy上でGateを右クリック> [Turn Off Find Events]を選択。
- ・Ver1.2以前の場合・・・キーボードでCtrlキー+[Z]を押す、もしくはツールバーの戻るボタンを選択。

* Gateを右クリック> [Highlight]を選択すると、Gate内のイベントがハイライト表示されます。

解除方法 : Gate hierarchy上でGateを右クリック> [Turn Off Highlight]を選択。

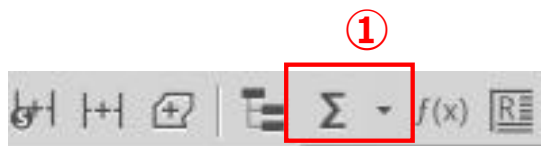
(例) 「CD34+」ゲート内のイベントについて、「Find Events」もしくは「Highlight」の機能を使用した場合。



統計情報の表示・編集

統計表示を作成すると、測定データの数値情報を表示することができます。
数値情報以外の付随情報（測定日や時間、ユーザー名など）も表示可能です。

- ① ワークシートツールバーのStatistics のプルダウンをクリックします。



- ② 統計情報の表示形式を選択します。

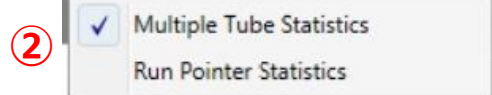
Multiple Tube Statistics:

複数データの統計表示。表示内容は固定。

* ローダーの測定結果のCSVファイルが必要な場合は、こちらを選択します。

Run Pointer Statistics:

単一データの統計情報の表示。Run Pointerでのデータ選択によって、データ表示が切り替わる。



Multiple Tube Statistics

Statistics						
Name	Events	% Parent	% Grandparent	% Total	FSC-A Mean	SSC-A Mean
Tube_007:All Events	20,912	###	###	100.00	133,085	58,215

Run Pointer Statistics

Tube_001 RunPointerStatistics		
Name	All Events	P1
Events	10,000	9,251
% Total	100.00	92.51
FSC-A Mean	81.677	77,958
SSC-A Mean	68,782	65,305
CD14 FITC-A Mean	2,550	2,523
CD3 PE-A Mean	2,898	2,895
CD19 APC-A Mean	6,987	6,483
Time Mean	495	494



My Experiment Stats

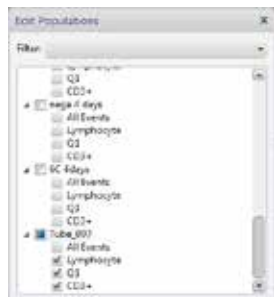
タイトルをダブルクリックすると、
タイトル名変更可能

- ③ ワークシートの空白部分をクリックすると統計情報が表示されます。

- ④ 統計情報を右クリックし、Edit...メニューより、表示内容を編集できます。

Edit Populations:

表示するチューブやポピュレーションを選択することができます。



Multiple Tubeの場合



Run Pointerの場合

Edit Statistics:

統計情報の種類を選択することができます。



Multiple Tubeの場合

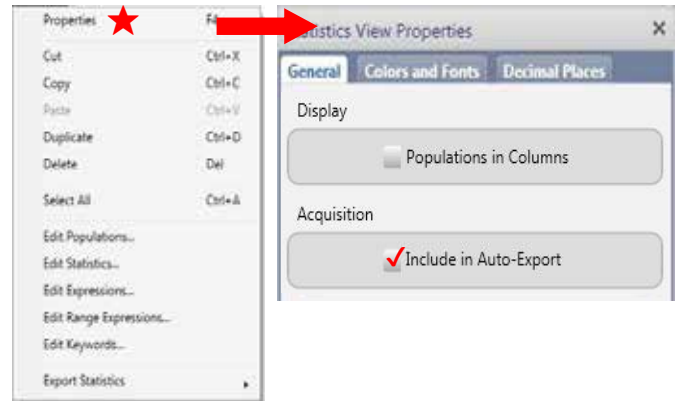


Run Pointerの場合

<Include in Auto-Exportの設定>

ローダーの測定結果のCSVファイルが必要な場合は、Statisticsを
右クリック> PropertiesよりGeneral タブのAcquisition>
Include in Auto-ExportのチェックをONにします。

*Multiple Tube statisticsのみ自動出力に対応しています。

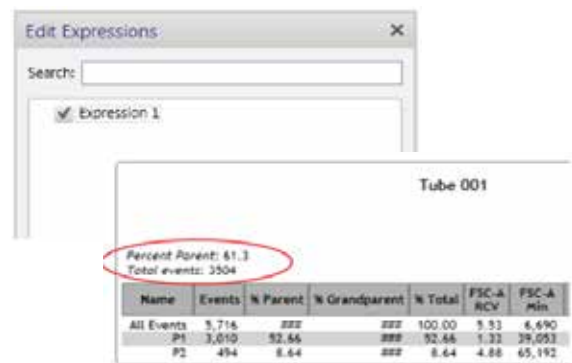


その他の機能

<Edit Expressions>

Expressionによって算出された結果を表示できます。

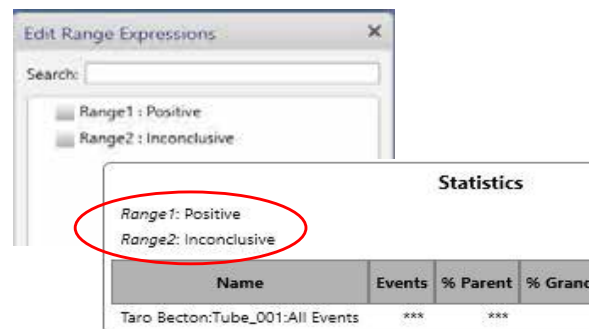
*あらかじめ、Expressionを使った算出結果を作成しておく必要があります。
ツールバーの[Create Expression]アイコン $f(x)$ を選択し、worksheet
上でドラッグすると、Expression Properties画面が表示されます。この画
面の[Advanced Search]より項目を選択します。詳細な操作方法につい
てはBD FACSLyric Reference Manual(英語版)の「Expressions」
の章をご参照ください。



<Edit Range Expressions>

Range Expressionによる、指定基準によるポジ・ネガ判定の結果を表示
できます。

*あらかじめRange Expressionを使った判定結果を作成しておく必要があ
ります。ツールバーの[Range Expression]アイコン $++++$ を選択し、
worksheet上でドラッグすると、Range Expression Properties画面が
表示されます。操作方法の詳細についてはBD FACSLyric Reference
Manual(英語版)の「Building range expressions」の項をご参照くだ
さい。



<Edit Keywords>

データの付随情報をキーワードとして選択することができます。(関連：マ
ニュアルp.109ページ)



データの管理（データのバックアップと消去）

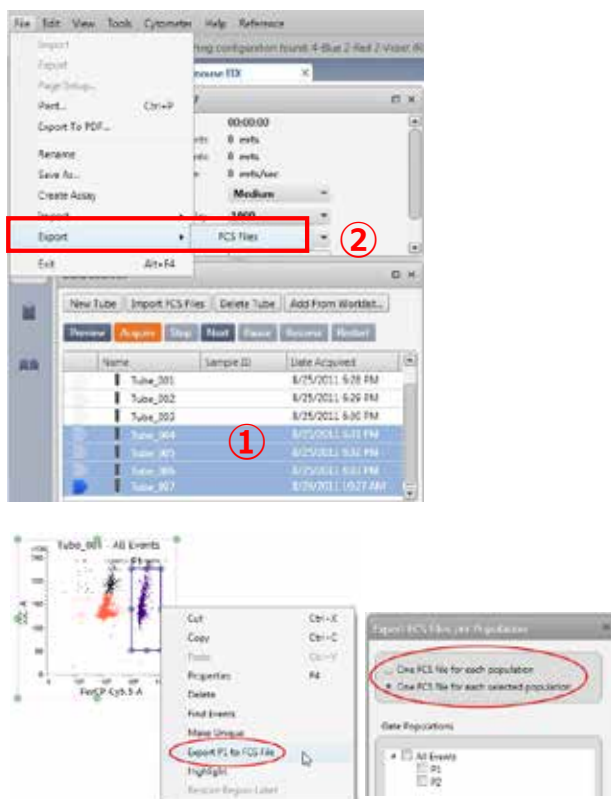
データ測定・解析が終了したら、速やかにバックアップデータを作成してください。
また、不要なデータの蓄積はソフトウェアのトラブルを招きます。速やかに消去してください。

<FCSファイルのバックアップ>

- ① データが保存されたTubeを選択します。
- ② FileメニューよりExport> FCS filesを選択します。
- ③ データの保存先を設定し、OKをクリックします。

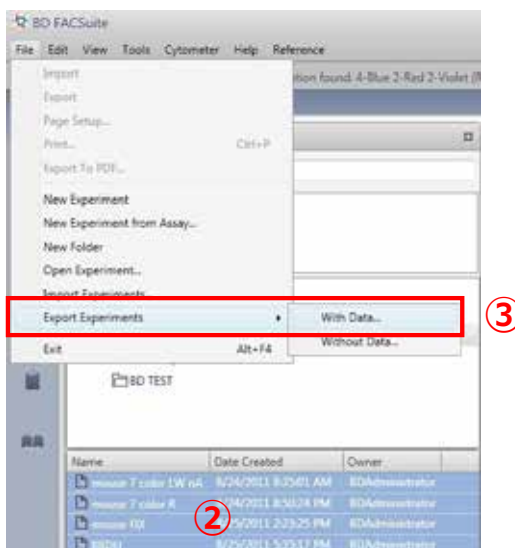
*特定のポピュレーションのFCSファイルをエクスポートする場合は、ゲートを右クリック>Export XX to FCS Filesを選択します。

- Exportされるファイル形式は、
FACSuite v1.2までは、FCS3.0、
v1.3以降ではFCS3.1です。
Suite以外のソフトウェアでデータを解析する場合は、そのソフトウェアの対応可能なファイル形式を確認してください。



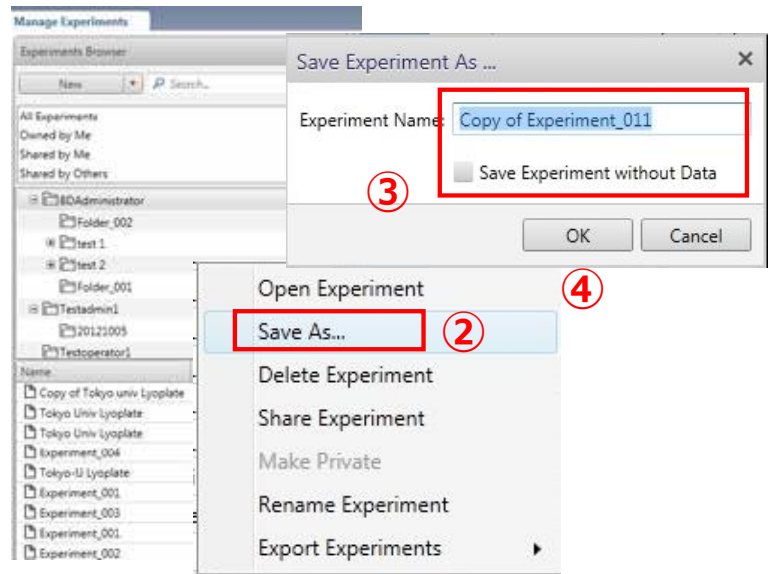
<Experimentファイルのバックアップ>

- ① バックアップを取りたいExperimentを閉じます。
- ② Manage Experimentタブより、バックアップを取りたいExperimentファイルを選択します（複数選択可能）。
- ③ FileメニューよりExport Experimentsを選択し、With dataを選択します。
- ④ データの保存先を設定し、OKをクリックします。



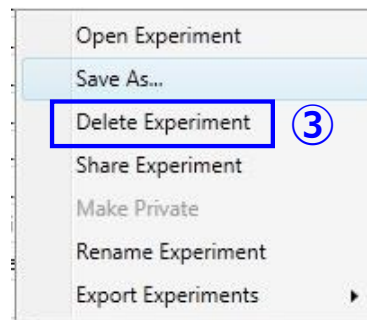
<同じ測定を繰り返し行う場合>

- ① 別名保存をしたいExperimentを閉じます。
- ② Manage Experimentタブより、対象のExperimentファイルを右クリックし、[Save As...]を選択します。
- ③ 表示された画面で、保存ファイルの名前を入力し、Save Experiment without DataのチェックボックスをONにします。
- ④ OKボタンをクリックします。



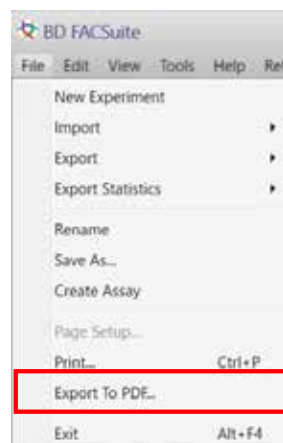
<Experimentファイルの消去>

- ① 消去したいExperimentを閉じます。
- ② Manage Experimentタブより、対象のExperimentファイルを選択します。
- ③ 右クリックよりDelete Experimentを選択します。
- ④ 確認のウィンドウが表示されるので、Yesを選択します。



<解析シート画面のPDF出力>

Fileメニュー> Export To PDFを選択し、保存先を指定します。



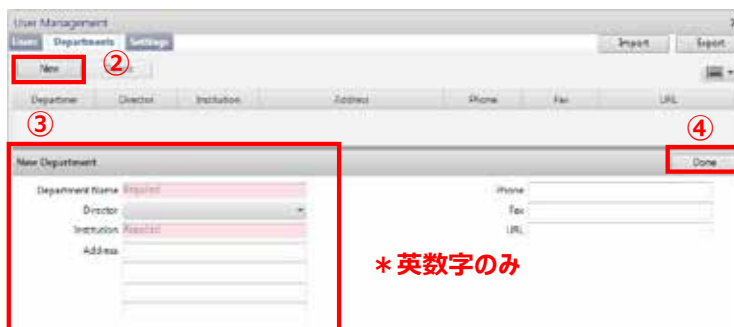
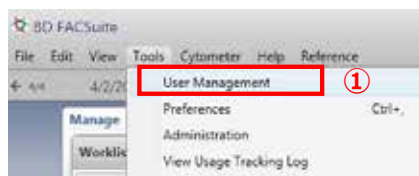
ユーザーアカウントの管理

FACSuiteへのログインアカウントを追加する方法です。

Part 11に必要

電子署名のために個人の
User IDが必要です。

- ① Toolsメニュー>User Managementを選択します。
- ② User Managementウインドウ>Departmentタブ>Newをクリックし、新しい所属を作成します。
*登録したDepartmentは、その情報を使用中のアカウントがなければ消去できます。
- ③ New Departmentのピンクの枠に必須事項を入力します。
- ④ Doneボタンをクリックします。
- ⑤ Usersタブ(赤矢印)に切り替え、Newをクリックします。
- ⑥ New Userのピンクの枠に必須事項を入力します。
*Temporary Passwordは初回ログイン時の仮パスワードです。任意入力のほか自動作成のランダムパスワードが使用可能です。
- ⑦ Role▲で権限を選択します。
Administrator:
全てのユーザーアカウントのデータ（設定、測定データ）へアクセスすることができます。システムのすべての機能を使用することができます。
Operator:
他のユーザーアカウントのデータ（設定、測定データ）にアクセスすることはできません。CQC、Laser Setup、Configurationの変更、Add Fluorochrome、パスワードの再設定などの操作を実施することができません。
- ⑧ 入力が終了したらDoneをクリックします。
*一度作成したUser IDは消去できません。

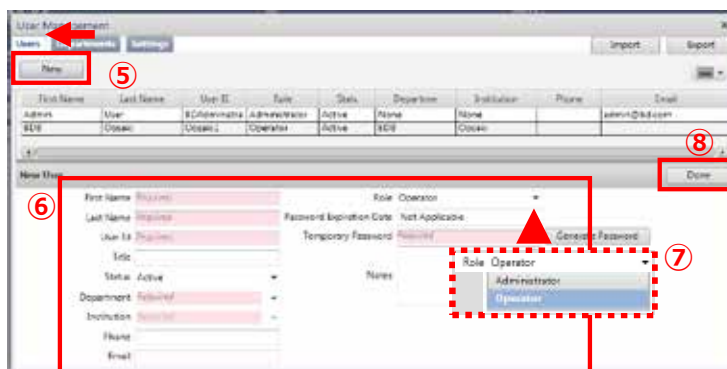


Department Name: 30文字まで

Institution: 30文字まで

Address: 40文字まで

URL: 200文字まで



First Name: 1~20文字

Last Name: 1~20文字

User ID: 1~25文字

* 登録後の変更・消去不可、重複名の使用不可

Temporary Password: 8~16文字

*スペース不可、小文字・大文字、数字、特殊文字のうち1文字以上必要

Part 11に必要

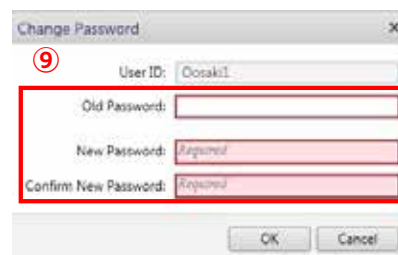
User IDのパスワード管理設定が必要です。

<Operatorの権限設定の変更について>

Suite v1.4以降では、OperatorのWorklistとExperimentへの編集権を変更できます。Operatorがデータを消去できない設定にしたい場合は、Operator Permissionを変更してください。



- ⑨ 新しいアカウントの初回ログインの後は、表示されたメッセージでOKボタンをクリックし仮パスワードと、新しいパスワードを入力します（同じパスワードは使用できません）。
- ⑩ Settingsタブではパスワードの管理について設定できます。



Lockout Attempt:

ログイン時のパスワード入力回数の上限

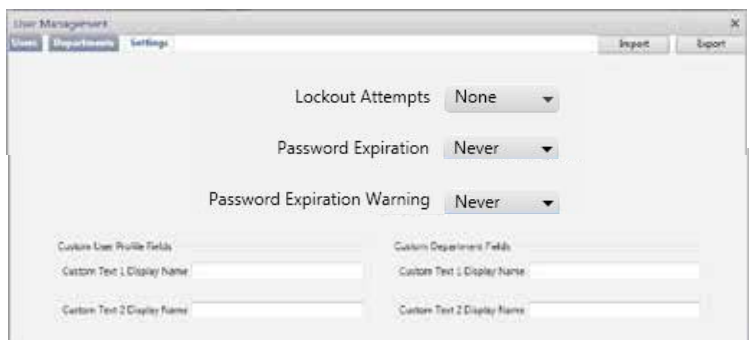
Password Expiration:

パスワードの有効期限

Password Expiration Warnings:

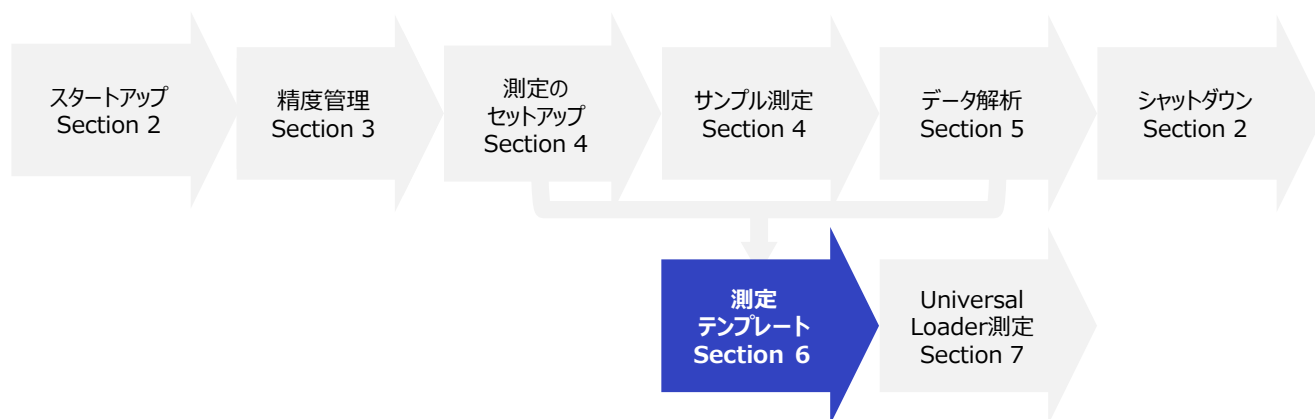
パスワード有効期限前の警告開始の日数

*初期アカウントであるBDAdministratorはパスワード管理規定は適用されません。



Section 6

Libraryへのテンプレート登録



項目	ページ
機器設定と測定テンプレートの関係について	94
Tube settingsの登録方法	96
Reference settingsの登録方法	97
Modify reference setting: 蛍光補正の微調整	101
Update reference setting	102
Add Fluorochrome	103
測定テンプレート (Assay) の登録	104
Assay & Tube Settings Setup	106
Libraryによる登録設定の管理	107
【参考資料】 オプションフィルターの登録方法	111
【参考資料】 サンプルの測定フロー	112

機器設定と測定テンプレートの関係について

FACSuiteのシステムでは、測定方法に応じて下記設定の保存が可能です。本ページでは各種設定の有効範囲と関係性について紹介します。

Part 11に必要

Assayを登録してください。

登録できる設定は、下記の3種類です。

Tube Settings

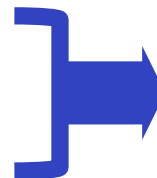
サンプルに応じた測定感度の条件です。蛍光補正はソフトウェアの初期値を使用します。

Reference Settings

サンプルの測定感度条件と蛍光補正情報を含みます。

Assay

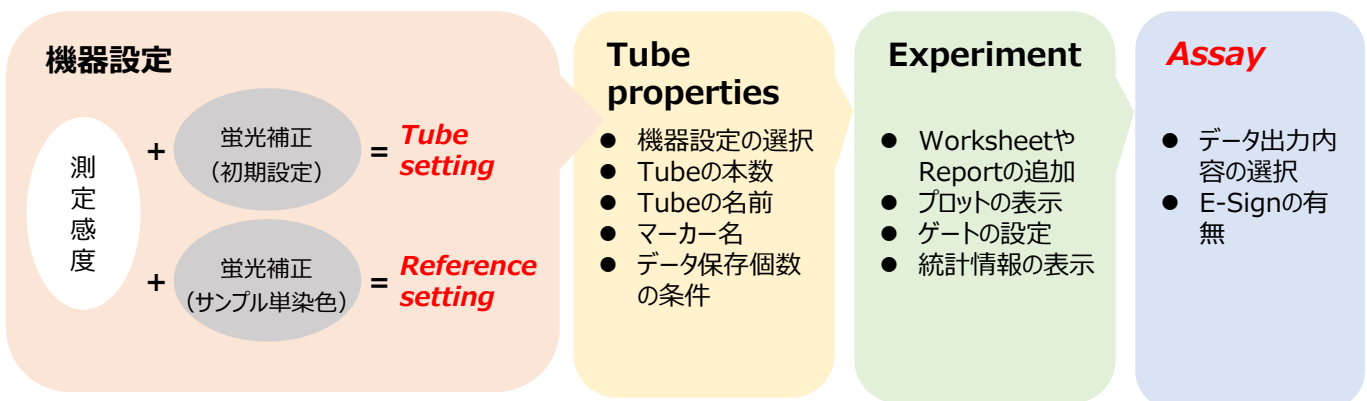
Experiment全体のテンプレートです。主にUniversal Loaderの動作設定として使用します。



- 長期的な機器設定の維持に必要
- Assayの登録に必要



- Universal Loaderでの測定に必要
- Part11対応に必要



※ Tube setting、Reference settingには、ほかにもThreshold、Area scaling factor、Window extension、Flow rateの情報が含まれます。

操作段階ごとの機器設定と選択可能な測定方法を下記に示します。

		測定設定の構成要素				測定方法		
		測定感度	蛍光補正	データ表示	Tube設定 (本数、マーカー名)	マニュアル	ローダー	
操作段階	初期状態	初期設定	初期設定	任意に変更	必要に応じて変更	○	×	
	PMT Voltageを変更		サンプルに合わせた設定	初期設定	任意に変更	必要に応じて変更	○	×
	機器設定を登録	Tube setting	サンプルに合わせた設定	初期設定	任意に変更	必要に応じて変更	○	×
		Reference setting	サンプルに合わせた設定	サンプル単染色	任意に変更	必要に応じて変更	○	×
	Assayを登録	Tube setting	サンプルに合わせた設定	初期設定	登録時の状態	登録時の状態	○	○
Reference setting		サンプルに合わせた設定	サンプル単染色					

<FACSLyric™の初期状態について>

新規Experimentを作成した状態では、あらかじめ選択されたLyse No-Washもしくは、Lyse WashのどちらかのReference settingが選択されています。どちらもヒトの白血球に最適化された測定感度、蛍光補正を備えています。

Lyse No-Wash:

血液サンプルを溶血後、洗浄せずに測定する場合の設定です。

Lyse Wash:

血液を溶血後、洗浄した細胞を測定する場合の設定です。培養細胞や溶血のない組織由来のサンプル、溶血処理を行っていない血液サンプルは、こちらの設定を使用してください。

<Tube settingとReference Settingの使い分けについて>

初回の測定では、測定したいサンプルに初期状態の蛍光補正值が適切かどうかは測定してみるまでわかりません。どちらの設定を登録すべきかは、サンプル染色に使った蛍光色素の種類、状態によって判断できます。

下記に該当するサンプルを測定する場合は、実際の細胞もしくは試薬の単染色コントロールを用意して、Tube settingではなくReference settingの登録を実施してください。

- **初期設定には登録されていない蛍光色素を使用する場合**
 蛍光補正の初期設定は、機器のメンテナンス用試薬であるBD FC Beads kitに含まれる蛍光色素が対象です。この製品には、FITC, PE, PerCP-Cy5.5, PerCP, PE-Cy7, APC, APC-Cy7, APC-R700, APC-H7, V450, V500-C, BV605, BV711, BV786の蛍光補正情報が登録されています。
- **タンデム色素を使用する場合**
 タンデム色素の標識抗体は、試薬のロットごとに適切な蛍光補正值が異なる可能性があります。
- **通常のヒト白血球よりも大型の細胞、自家蛍光の強い細胞、培養細胞を測定する場合**
 蛍光補正值は測定の基準となる細胞の自家蛍光レベルによって、適切な設定が変わります。

■ Tube settingsの登録方法 → p.96

■ Reference settingsの登録方法 → p.97

Tube settingsの登録方法

FACSLyric™では、サンプルに最適化した測定条件(Tube settings)を登録することができます。

Part 11に必要

TubeまたはReference Setting登録が必要です。

Tube settingsには以下の測定条件が含まれます。

- 全パラメーターの測定感度
- Flow rate
- FSC、各レーザーのArea scaling factor
- Threshold
- Window extension

* 蛍光補正值は、Lyse WashまたはLyse No Wash(詳細 : p.95)の補正データを元に算出されます。正しく補正できない色素やサンプルの場合は、Reference Settingsによる設定(p.97)を実施してください。

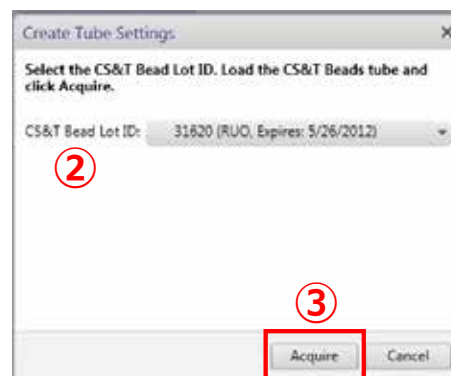
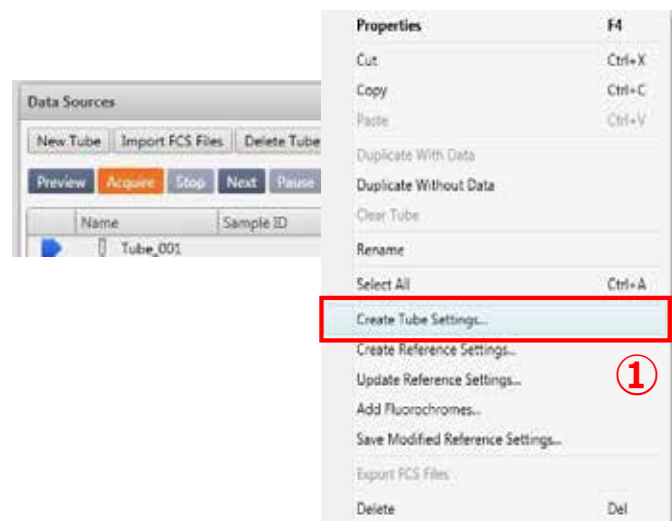
* 下記の①の手順は、サンプルの測定条件を調整した後、データが保存されていないTubeアイコンを選択して行ってください。データ保存をあらかじめ行っている場合は、Nextボタンをクリックし、測定条件が同じでデータが保存されていないTubeを作成してから行います。

Tube setting登録に必要なもの

- CS&T Beads

- ① 測定感度やFlow rateなどの条件の設定後、データが保存されていないTubeを右クリックし、**Create Tube Settings**を選択します。
- ② CS&T Beadsのロット確認の画面が表示されます。現在使用しているロット番号を選択します。
- ③ PQCと同じように調製したCS&T Beads入りチューブをセットし、Acquireボタンから測定を開始します(約1分間)。
- ④ メッセージが表示されるので、新たに作成した設定に名称を入力し、Finishをクリックします。

*登録したTube settingsを次回使用する場合は、Performance QCの後にAssay & Tube Settings Setup (p.106)を行ってから、サンプルを測定してください。



Reference settingsの登録方法

測定感度とサンプル独自の蛍光補正をもつ機器設定である Reference settingの登録方法を紹介します。設定の維持には最大60日間ごとの更新（Update reference setting）が必要です。

Part 11に必要

TubeまたはReference Setting登録が必要です。

Reference settingsには、単染色コントロールの測定により設定する蛍光補正の情報のほかに、以下の測定条件が含まれます。

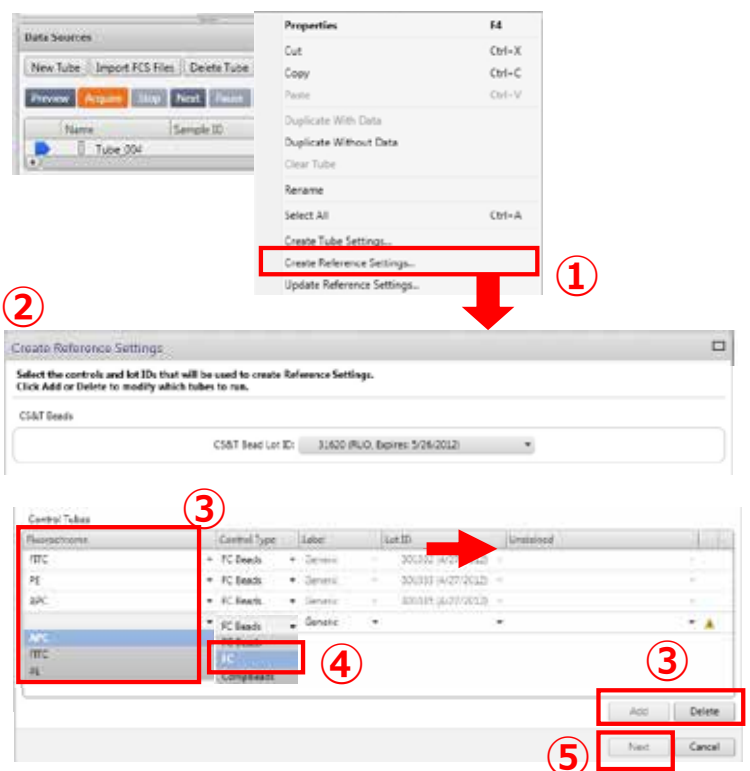
- 全パラメーターの測定感度
 - Flow rate
 - FSC、各レーザーのArea scaling factor
 - Threshold
 - Window extension
- 設定の登録を開始する前に、サンプルの測定感度やFlow rateなどの測定条件を確認しておいてください。
 - 設定開始時は、データが保存されていないTubeアイコンを選択しておきます。
 - 登録時にマーカー名が入力されていると、その蛍光補正は同じマーカー名の設定時にしか適用できなくなります。マーカー名はReference Settingの登録後に入力してください。
 - 操作手順がソフトウェアのバージョンによって異なります。（Verを確認したい場合は、Helpメニュー> About BD FACSuite）

Reference setting登録に必要なもの

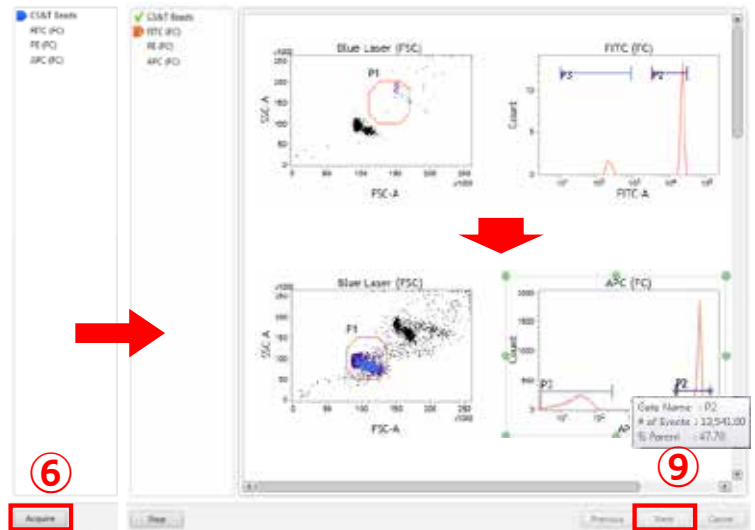
- CS&T Beads
- 単染色コントロール

<Suite v1.3までの場合>

- ① 測定感度やFlow rateなどの条件設定後、データが保存されていないTubeを右クリックし、**Create Reference Settings**を選択します。
- ② CS&T Beads Lot IDにて、現在使用しているLot IDを選択します。
- ③ 登録する蛍光色素を確認します。必要に応じて、Add・Deleteボタンより編集します（FC Beads非対応色素はAddから追加してください）。
- ④ Control Typeにて、**FC**を選択します。
 - FC Beads: 実験では使用しません
 - CompBeads: BD CompBeads用の設定ですが、ビーズのダブレットによってエラーが発生することがあるためあまり使いません。
- ⑤ Nextをクリックします。



- ⑥ PQCと同じように調製したCS&T Beads入りのチューブを機器にセットし、Acquireボタンから測定を開始します（約1分間）。
- ⑦ CS&T Beadsの測定が終了したら、続けて表示されているリスト内の単染色コントロールを測定します。測定順はリスト左端のRun pointerで指定できます。
- ⑧ 測定後は、各データの解析集団（P1）、陽性（P2）と陰性（P3）をゲートで指定します。
* 手順④でFC以外を選択した場合はゲートは表示されず、自動でデータが認識されます。
- ⑨ Nextをクリックします。
- ⑩ Reference settingの名前を入力しFinishをクリックします。



*登録したReference settingsを次回使用する場合は、Performance QCの後にAssay & Tube Settings Setup (p.106) を行ってから、サンプルを測定してください。

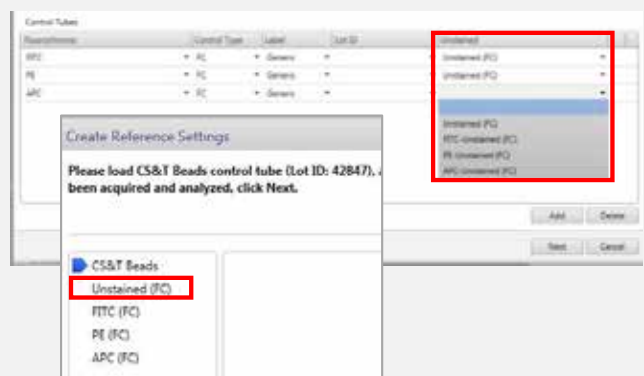
*蛍光補正值は60日毎の更新が必要です。P.102記載のUpdate Reference Settingsを実施してください。

<単染色コントロールに陰性が少ない場合>

Reference Settingsの登録には、補正の基準となる蛍光陰性集団のデータが一定数必要です。準備した単染色コントロールがすべて陽性になってしまう場合は、Control Tubesの右端のUnstainedより、全パラメーターでUnstained (FC)を選択します。

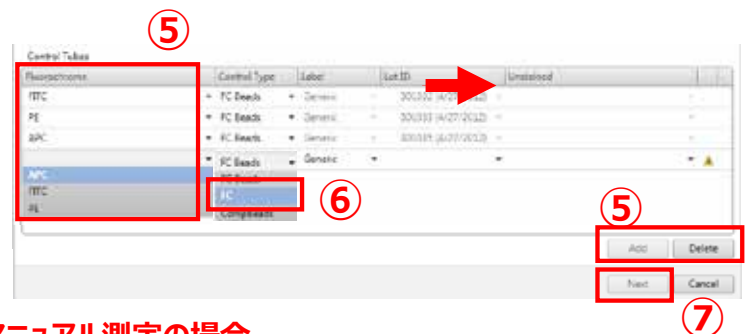
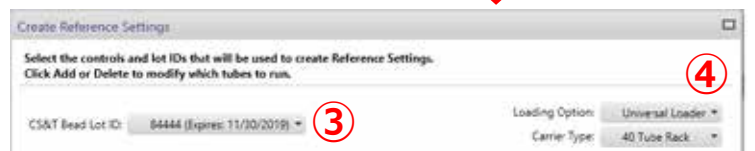
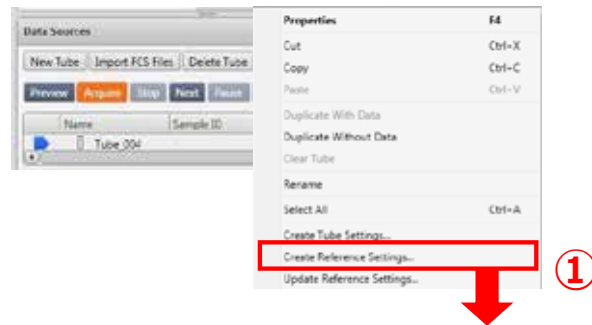
CS&T Beadsの後で、Unstained (FC)の項目が追加されます。

陰性集団のゲート設定は必要ないため、P3ゲートは表示されません。

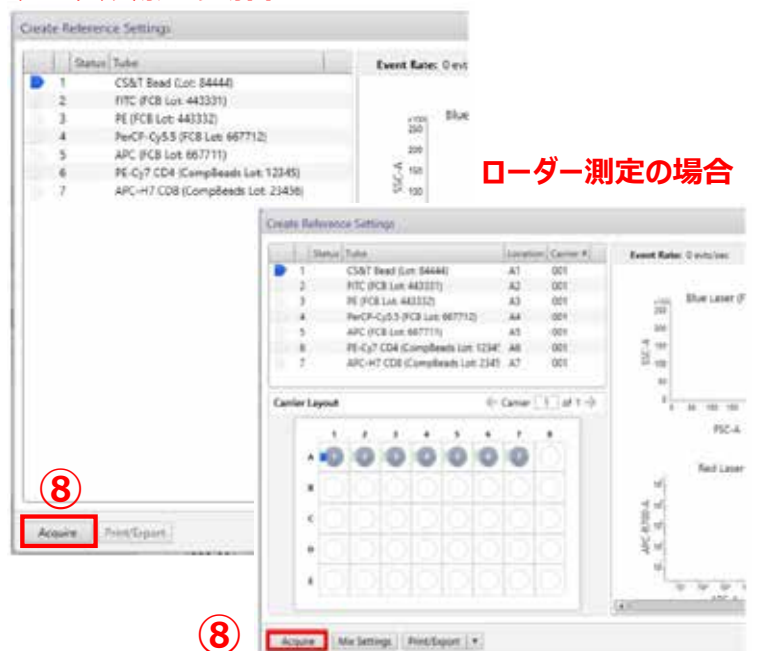


<Suite v1.4以降の場合>

- ① 測定感度やFlow rateなどの条件設定後、データが保存されていないTubeを右クリックし、**Create Reference Settings**を選択します。
- ② 新しく登録する設定名を入力します。
- ③ CS&T Beads Lot IDにて、現在使用しているLot IDを選択します。
- ④ 単染色コントロールの登録方法（ManualまたはUniversal loaderおよびラックタイプ）を選択します。
- ⑤ 登録する蛍光色素を確認します。必要に応じて、Add・Deleteボタンより編集します。（FC Beads非対応色素はAddから追加してください。）
- ⑥ Control Typeより、**FC**を選択します。
 - ・FC Beads: 実験では使用しません
 - ・CompBeads: BD CompBeads用の設定ですが、ビーズのダブレットによってエラーが発生することがあるためあまり使いません。
- ⑦ Nextをクリックします。
- ⑧ マニュアル測定の場合



マニュアル測定の場合



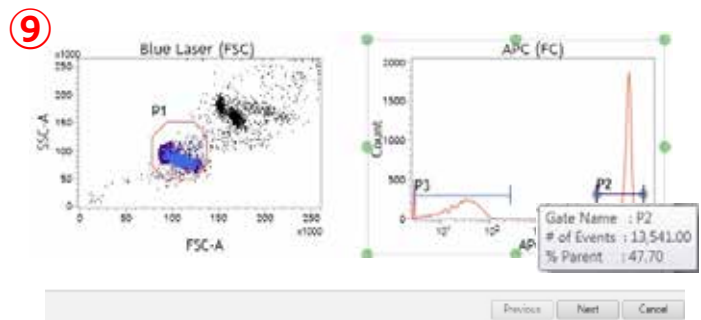
ローダー測定の場合

PQCと同じように調製したCS&T Beads入りのチューブをSITにセットし、Acquireボタンから測定を開始します。CS&T Beadsの測定が終了したら、次の単染色コントロール入りのチューブをセットします。測定順はリスト左端のRun pointerで指定できます。

ローダー測定の場合

表示されたCarrier Layoutに従って、CS&T Beadsと単染色コントロールを配置してください。ラックをローダーにセットしたらAcquireボタンから測定をスタートします。

- ⑨ 測定後は、各データの解析集団 (P1)、陽性 (P2)と陰性(P3)をゲートで指定します。
* 手順⑥でFC以外を選択した場合はゲートは表示されず、自動でデータが認識されます。



- ⑩ Finishをクリックします。

⑩

*登録したReference settingsを次回使用する場合は、Performance QCの後にAssay & Tube Settings Setup (p.106) を行ってから、サンプルを測定してください。

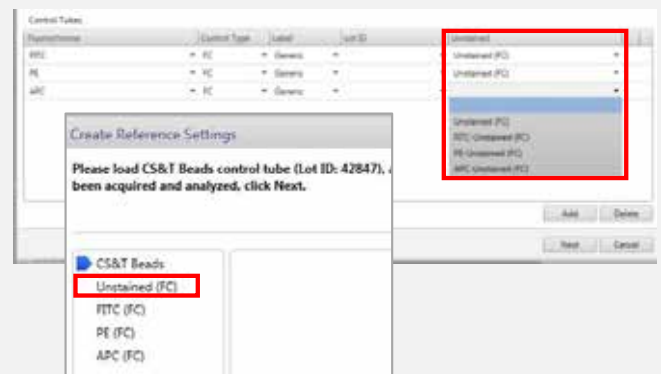
*蛍光補正值は60日毎の更新が必要です。
p.102記載のUpdate Reference Settingsを実施してください。

<単染色コントロールに陰性が少ない場合>

Reference Settingsの登録には、補正の基準となる蛍光陰性集団のデータが一定数必要です。準備した単染色コントロールがすべて陽性になってしまう場合は、Control Tubesの右端のUnstainedより、全パラメーターでUnstained (FC)を選択します。

CS&T Beadsの後で、Unstained (FC)の項目が追加されます。

陰性集団のゲート設定は必要ないため、P3ゲートは表示されません。



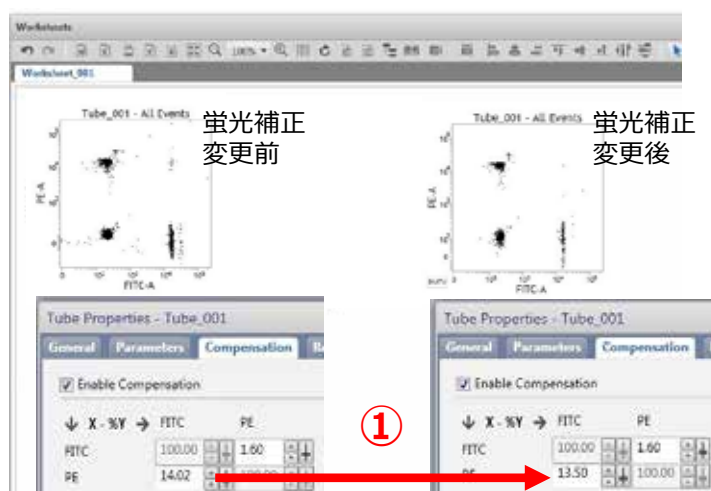
Modify reference setting: 蛍光補正の微調整

作成したReference settingの蛍光補正を微調整することができます。

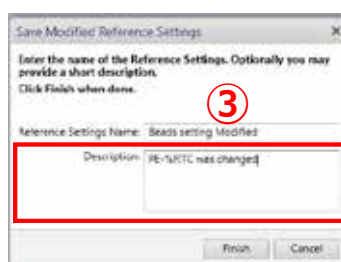
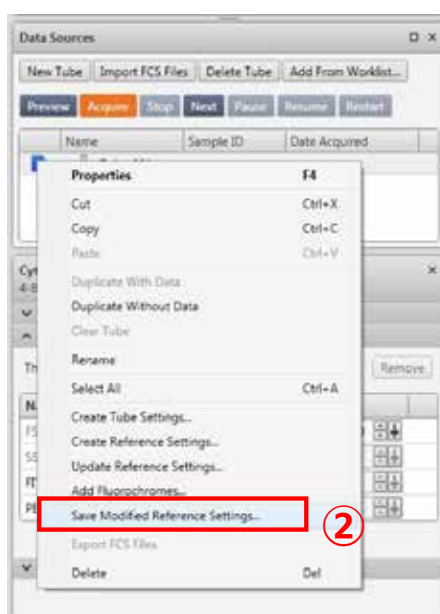
Reference settingを作成しても蛍光補正がずれる場合は、Modify reference settingを実施することにより、蛍光補正を手動で微調整し、別途登録することができます。この時、測定感度やFlow rateなどは変更できません。

*登録時にマーカー名が入力されていると、その蛍光補正は同じマーカー名の設定にしか適用できなくなります。マーカー名はModify Reference Settingの登録後に入力してください。

*Reagent nameが入っているExperimentやAssayからModify Reference settingsを行う場合は、Tube propertiesからReagent nameを消してModify Reference settingsを実施してください。



- ① サンプルに合わせて蛍光補正值を変更します。
(Tubeを右クリック>Properties
>Spillover value入力画面)
- ② ①で使用したTubeアイコンを右クリックし、**Save Modified Reference Settings**を選択します。
- ③ 登録名を入力し、保存します。必要な場合はDescriptionにメモを残します。



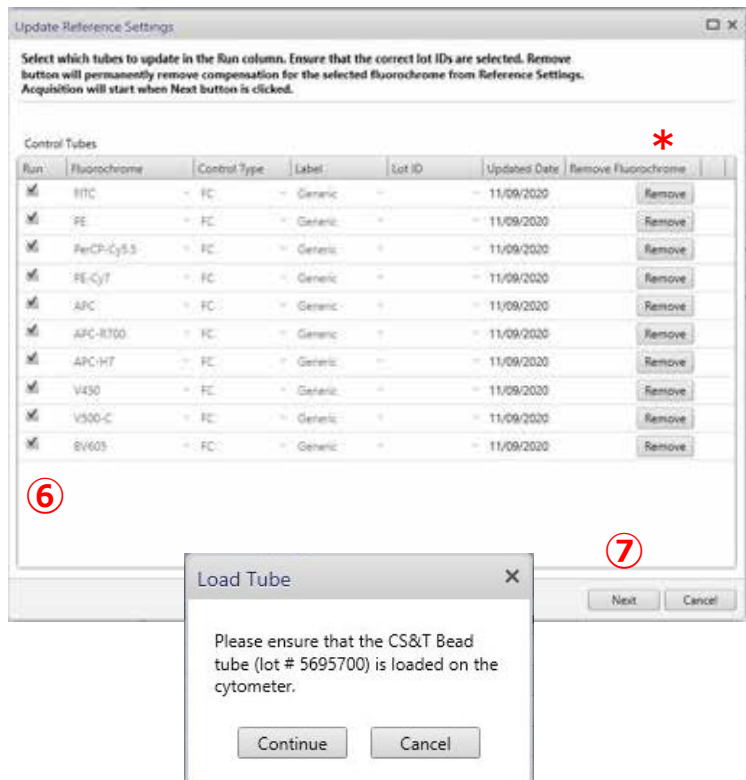
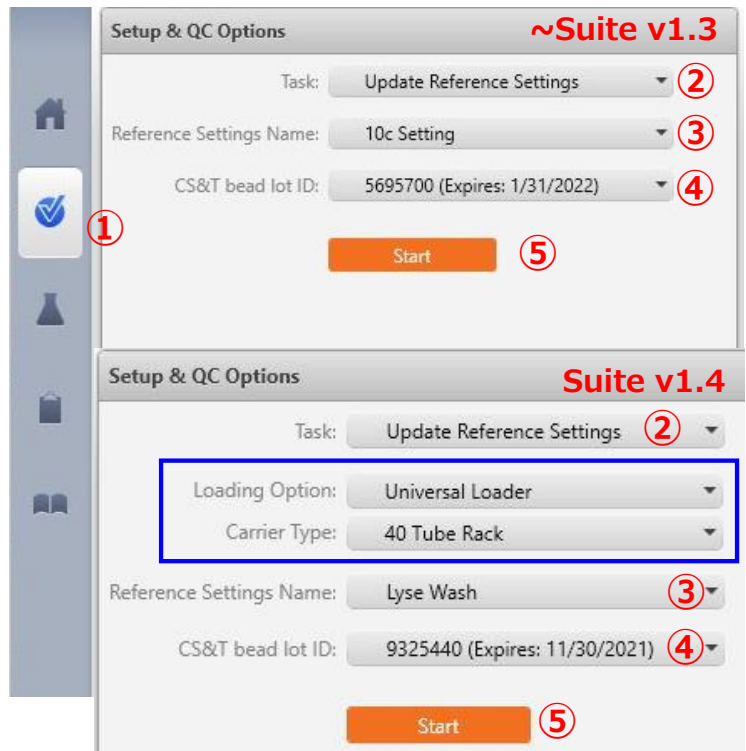
Update reference setting

蛍光補正のバランスは、機器の経時的な変化によって影響を受けて変化します。登録した Reference settingの蛍光補正を正しく保つためには、最長60日ごとの更新作業が必要です。この更新にはCS&T Beadsと全色分の単染色コントロール（作成時と同じ条件）が必要です。

⚠ 注意

SuiteのVerが1.3以前であり本機能を使用予定の場合は、CytometerウインドウのPMT Voltagesのリスト（詳細:p.63）にて、パラメーターの並び順をデフォルトから変更しないようにしてください。“Update Reference Setting”実施後に蛍光補正值が適切でなくなる恐れが生じます。

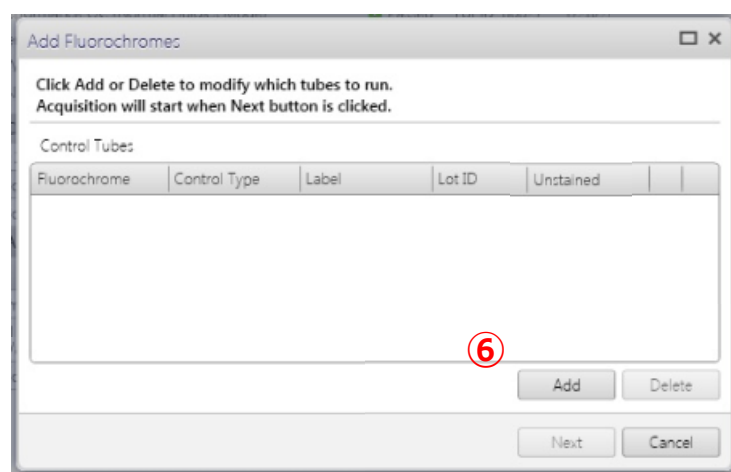
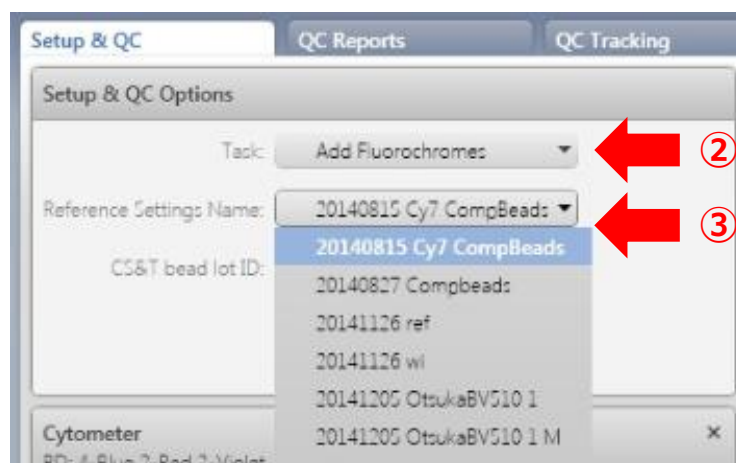
- ① Setup&QC画面を表示します。
- ② Taskにて、[Update reference settings]を選択します。*** Suite v1.4の場合は測定方法も選択してください。**
- ③ 更新したいReference Settingを選択します。
- ④ CS&T Beads lot IDを選択します。
- ⑤ Startボタンをクリックします。
- ⑥ 表示されたウインドウで、アップデートする蛍光色素の種類を確認します。
***スキップしたい色素がある場合は、その色素のチェックを外します。**
***削除したいパラメーターがある場合は、画面の右列のRemoveより削除します。（後から元に戻すことはできません。）**
- ⑦ Nextをクリックします。
- ⑧ CS&T Beadsのに入ったチューブをセットします。
*** Loaderを選択した場合は画面の指示通りチューブをさしたラックをローダーにセットします。Acquireをクリックします。**
- ⑨ 単染色コントロールを測定します。
- ⑩ Finishをクリックして終了します。



Add Fluorochrome

Lyse/WashやLyse no wash, Reference settingについて、既存の測定パラメーターに新たな蛍光色素の補正情報を登録する方法です。

- ① Setup&QC画面を表示します。
- ② Taskより[Add Fluorochromes]を選択します。* Suite v1.4の場合は測定方法も選択してください。
- ③ 設定を追加したいReference settingを選択します。
- ④ CS&T Beads Lot IDタブで、現在使用しているLot IDを選択します。
- ⑤ Startボタンをクリックします。
- ⑥ Control Tubesの**Add**をクリックします。
- ⑦ Fluorochromes のプルダウン▼から追加したい蛍光パラメーター名を選択します。
* 選択できるパラメーターは元々選んだReference settingに含まれているパラメーターで測定可能な蛍光色素のみです。新たなパラメーターの蛍光色素を追加したい場合は、設定を新しく作成してください。
- ⑧ Control Typeを選択します。単染色コントロールをCompBeadsで調製した場合はCompBeads、細胞で調製した場合はFCをそれぞれ選択してください。
- ⑨ Nextをクリックします。
- ⑩ メッセージに従い、CS&T Beadsを調製したチューブを測定します。
- ⑪ メッセージに従い、用意した単染色コントロールを測定します。
- ⑫ すべてのコントロールの測定が終了したら、Finishをクリックします。



測定テンプレート (Assay) の登録

測定に使用したExperimentの設定をAssayとして保存します。

Part11対応の場合は、このページを参照してください。

Loader測定の場合はp.115を参照してください。

Part 11に必要

Assayを登録してください。

- ① Assayとして登録したいExperimentの設定を行います。下記について設定漏れがないか確認してください。

Tube Properties設定内容

- Tube name
- Tube Settingsの選択
- データ取得Parameterの選択
- Reagent Label
- Acquisition (保存個数) の条件

ワークシート、レポート表示内容

- 画面内のオブジェクト配置
- ゲート設定
- オブジェクト設定

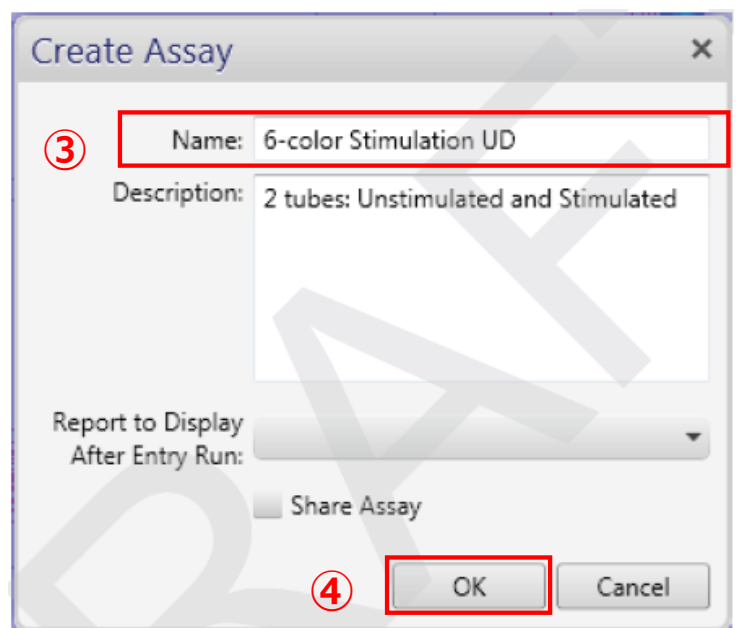
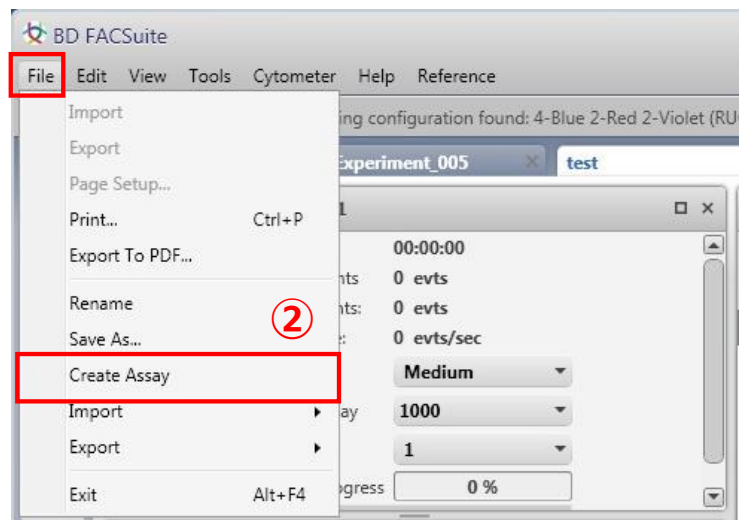
- ② Fileメニュー>Create Assayを選択します。
- ③ 表示されたCreate Assayダイアログに名前を入力します。

Share Assay:

ユーザーアカウント間で登録したAssayを共有したい場合はONにします。ただし、共有したAssayとその設定に含まれているTube Settingsは、今後一切消去することができなくなりますのでご注意ください。

- ④ OKをクリックします。

次回の実験でこの条件を使用する場合、Performance QCの後にAssay & Tube Settings Setup (p.106) を行ってから、サンプルを測定してください。



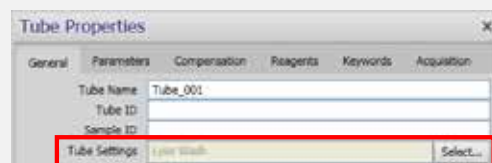
<Create Assayでエラーが表示される場合>

Create Assayを実施するには、いくつかのルールがあります。

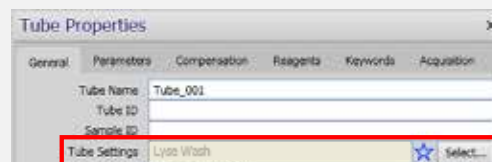
- 登録した機器条件のみ使用すること

Assayに選択した機器条件（TubeまたはReference Settings）に少しでも変更が加わると、Assayとして登録することができません。

変更が加えられたTube Settingsには目印（青い星マーク）がつくため、登録時にエラーが表示されたら、Tube Settingsに目印がないかどうか確認します。



登録可能



登録不可

- 機器設定とTubeの測定パラメーターが一致すること

Assayに登録するExperimentのすべてのTubeのデータ取得パラメーターは、そのTubeで使用しているTube Settingsで設定されているパラメーターと一致する必要があります。Tube PropertiesのParameterで不要なパラメーターが残っている場合は、そのパラメーターを削除してください。

Name	A	H	W	Voltage	Threshold
FSC	▼	☑	☐	247.1	☑ 10000
SSC	▼	☑	☐	347.1	☐ 5000
FITC	▼	☑	☐	426.8	☐ 5000
PE	▼	☑	☐	389.2	☐ 5000
PerCP-Cy5.5	▼	☑	☐	506.0	☐ 5000
PE-Cy7	▼	☑	☐	546.0	☐ 5000
APC	▼	☑	☐		
V500	▼	☑	☐		

Name	A	H	W	Voltage	Threshold
FSC	▼	☑	☐	247.1	☑ 10000
SSC	▼	☑	☐	347.1	☐ 5000
FITC	▼	☑	☐	426.8	☐ 5000
PE	▼	☑	☐	389.2	☐ 5000
APC	▼	☑	☐	505.6	☐ 5000

Assay & Tube Settings Setup

登録済みのAssayやTube Settings、Reference Settingsを使用する前に、登録した設定を再現するステップです。精度管理でPerformance QCを実施したあと、続けて実行します。

① Performance QC終了後、Setup & QCタブのTaskのプルダウンから、[Assay & Tube Settings Setup]を選択します。

② Selectボタンをクリックします。

③ 画面右側に表示されたリストより、これから使用するTube Settings/Assayの[Run Setup]のチェックボックスをONにします。

④ Reportが必要な場合は、[Report]のチェックボックスをONにしてください。

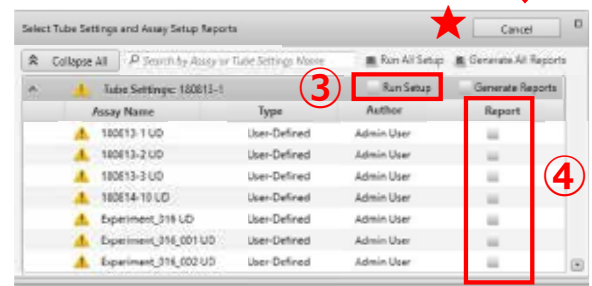
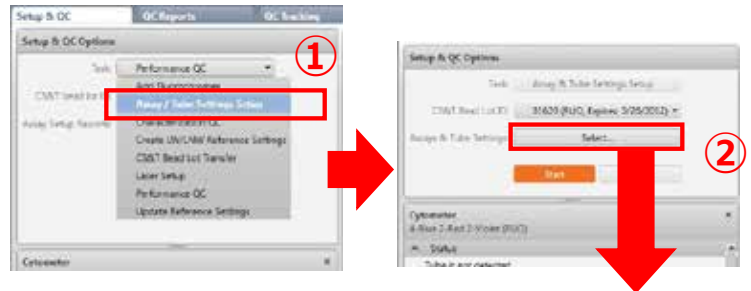
⑤ Performance QCで使用したCS&T Beads入りのチューブをSITにセットします。

⑥ Startボタンをクリックします。続けて表示される確認メッセージで、Continueボタンをクリックします。

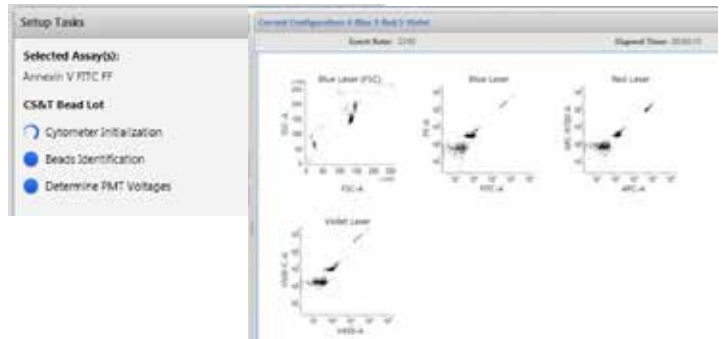
Setup Tasksが表示されCS&T Beadsの取り込みが行われます（約1分間）。

⑦ Setup 終了後、終了及び設定レポートの表示についてメッセージが表示されます。

* 再びTaskを選択したい場合は、Closeか Cancel (★) をクリックします。



⑥




⑦



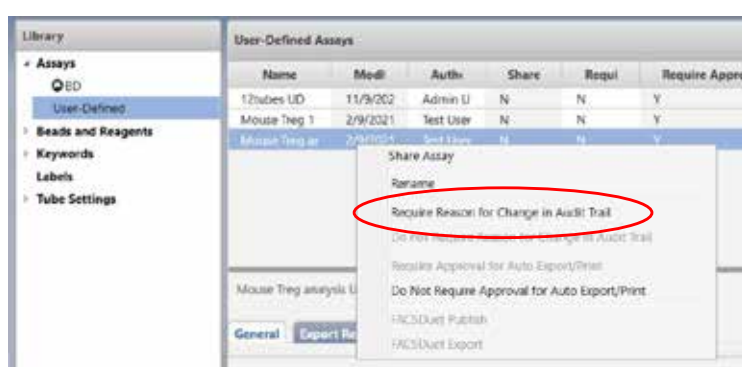
Libraryによる登録設定の管理

登録したTube settingやReference setting、Assayなどの設定は、Library画面で管理されます。

画面左のNavigation barのLibrary（本のマーク  より、システムに登録された様々な設定を管理・編集できます。

Assays>User-Defined

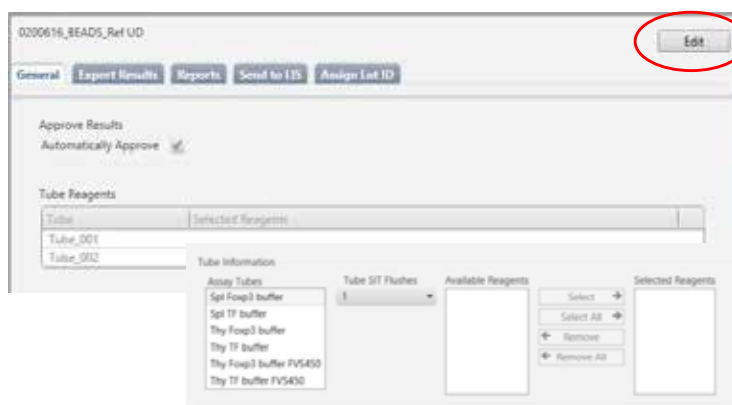
登録したAssayの確認と編集が可能です。*Suite v1.4ではAudit Trailにおける、Reason入力の有無を設定できます。リストより設定したいAssayを右クリックして表示されたリストよりRequire Reason for Change in Audit Trailをクリックします。



Generalタブ

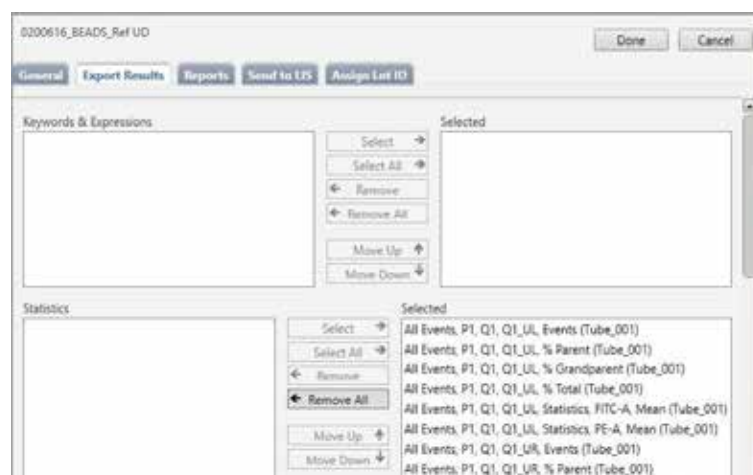
- 測定後の自動承認機能の確認（E-Sign設定時は無効）、測定Tubeの本数を表示します。

*Suite v1.4では、Editをクリックすると、個々のTubeについてSIT Flushの回数を設定することができます。



Export resultsタブ

- CSVファイルの出力項目の選択ができます。



Part 11に必要

E-Signを設定してください。

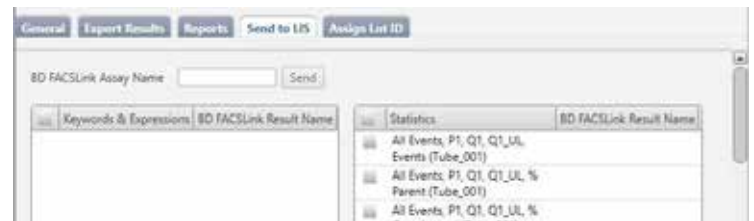
Reportタブ

- ReportのPDF保存（Worklist使用時）
- E-Signの入力
Include e-SignatureのチェックをON
*FACSuite v1.4以降は最大3名まで電子署名を設定できます



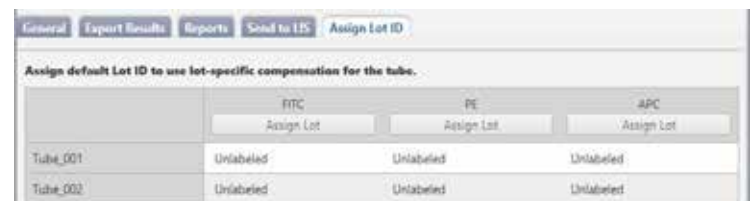
Send to LISタブ

- 臨床検査などで使用される自動結果出力の項目を設定できます。



Assign Lot IDタブ

- Tubeに紐づけた試薬ロットの確認・編集ができます。



Beads and Reagents:

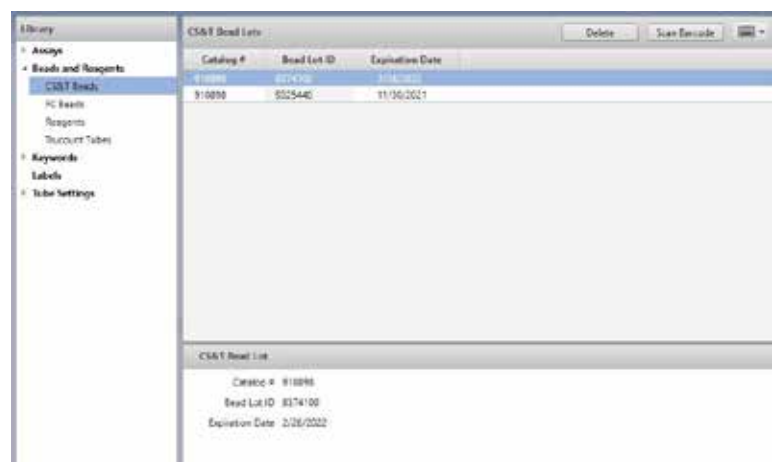
システムのメンテナンスに必要なビーズ製品や、測定試薬のロット情報の管理を行います。管理対象の項目は以下の通りです。

CS&T Beads: p.136に記載

FC Beads: p.136に記載

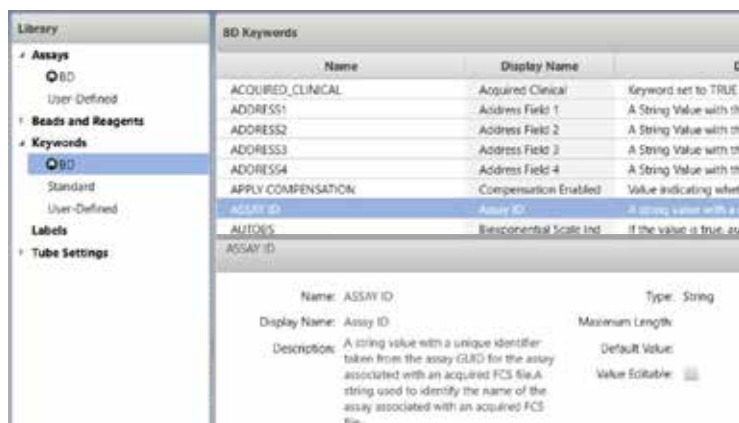
Reagents: 抗体などの試薬のロット情報の登録ができます

Trucount Tubes: 細胞数カウント用のビーズのロット情報/ビーズ数の登録ができます



Keywords:

データと共に記録される様々なキーワードの確認ができます。測定画面では、必要に応じて測定結果とともに、統計情報やExpressionとして表示することができます。



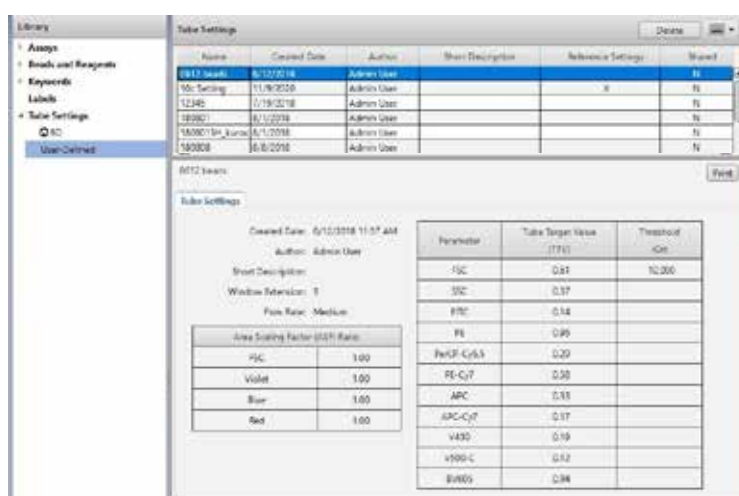
Labels:

ExperimentやWorklistで編集するTube propertiesのReagentタブで、マーカー名としてあらかじめ登録されている抗原名称です。新しく登録することも可能です。



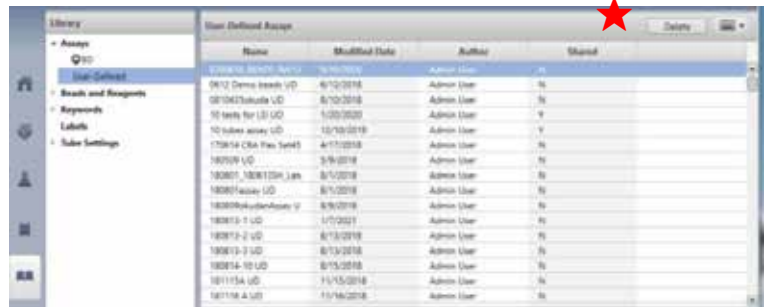
Tube settings>User-defined:

登録したTube settingsとReference settingsの確認と編集が可能です。



<登録した設定の共有設定>

登録したTube SettingやAssayは、他のアカウントと共有することができます。ただし、Assayは右クリックより共有をON (Share Assay) やOFF (Make Private) に切り替えられますが、Tube Settingは一旦Shareにすると、Privateに戻すことはできませんので、ご注意ください。



<設定のエクスポート>

リストよりTube settingやAssayを選択し、Fileメニュー>Exportをクリックし、保存先を指定してファイルを作成します。

<設定の削除>

リストよりTube settingやAssayを選択し、★Deleteボタンをクリックして削除します。

*AssayやWorklistで使用中的の設定は消去できません。先に同じ設定を使用しているWorklist、Assay、Tube settingsの順番で消去してください。

<設定のインポート>

外部から設定ファイルを読み込んで使用することができます。インポートしたい設定ファイルを、ワークステーションに移し、Libraryを表示した状態で、Fileメニュー>Importより設定を登録します。

*インポートした設定がReference settingの場合は、Update reference setting (マニュアル p.102) を実施してください。

*インポートした設定を使用する前は、必ずAssay & Tube Settings Setup (マニュアルp.106) を実施してください。

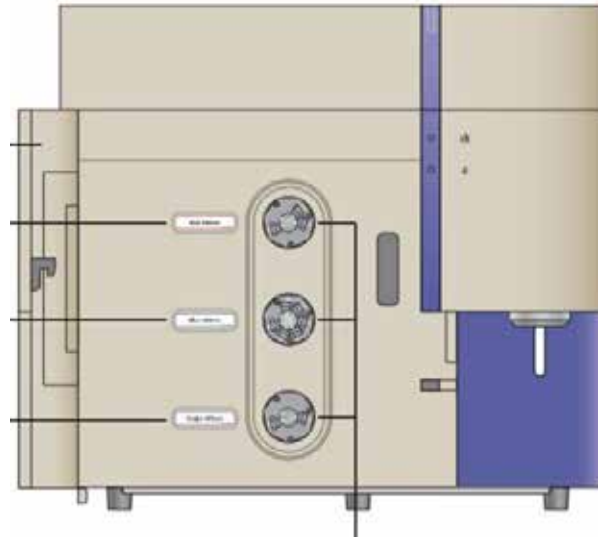
【参考資料】オプションフィルターの登録方法

FACSLyric™では、検出器に新しい光蛍光学フィルターを差し込むことで、これまで測定に対応していなかった色素の測定が可能になります。

オプションフィルターを使用することで、表中の蛍光色素の測定に対応することができます。

新たなフィルターを検出器にセットする場合は、下記手順を実施してください。

- ① Setup & QCの画面を表示し、Configurationタブをクリックします。
- ② FACSLyric™本体のフロントドアを開きます（留めネジを緩めてください）。
- ③ 既存のフィルターを引き抜き、使用したいオプションフィルターを差し込みます。
*必ず正しい位置にセットしてください。
- ④ 新しいフィルター構成によるConfigurationが自動作成されます。表示された内容と、実際のフィルター構成が合っているか確認してください。*名称変更可能です。
- ⑤ フロントドアを閉じます（ネジも締めてください）。
- ⑥ 測定したい蛍光名が登録されていない場合は、Parameterに新しい名前をAddし、新しい測定パラメーターに適切な蛍光色素名を登録します（リストよりドラッグ&ドロップ）。
- ⑦ Setup & QCタブで、Characterization QCを実施します。
- ⑧ 続いてPerformance QCを実施します。
- ⑨ FC Beadsや登録したパラメーターの単染色コントロールを用いて、Create Reference Settingを実施します。これにより、既存の設定と同様に自動蛍光補正がかかるようになります。



検出器ユニット: ヘプタゴン



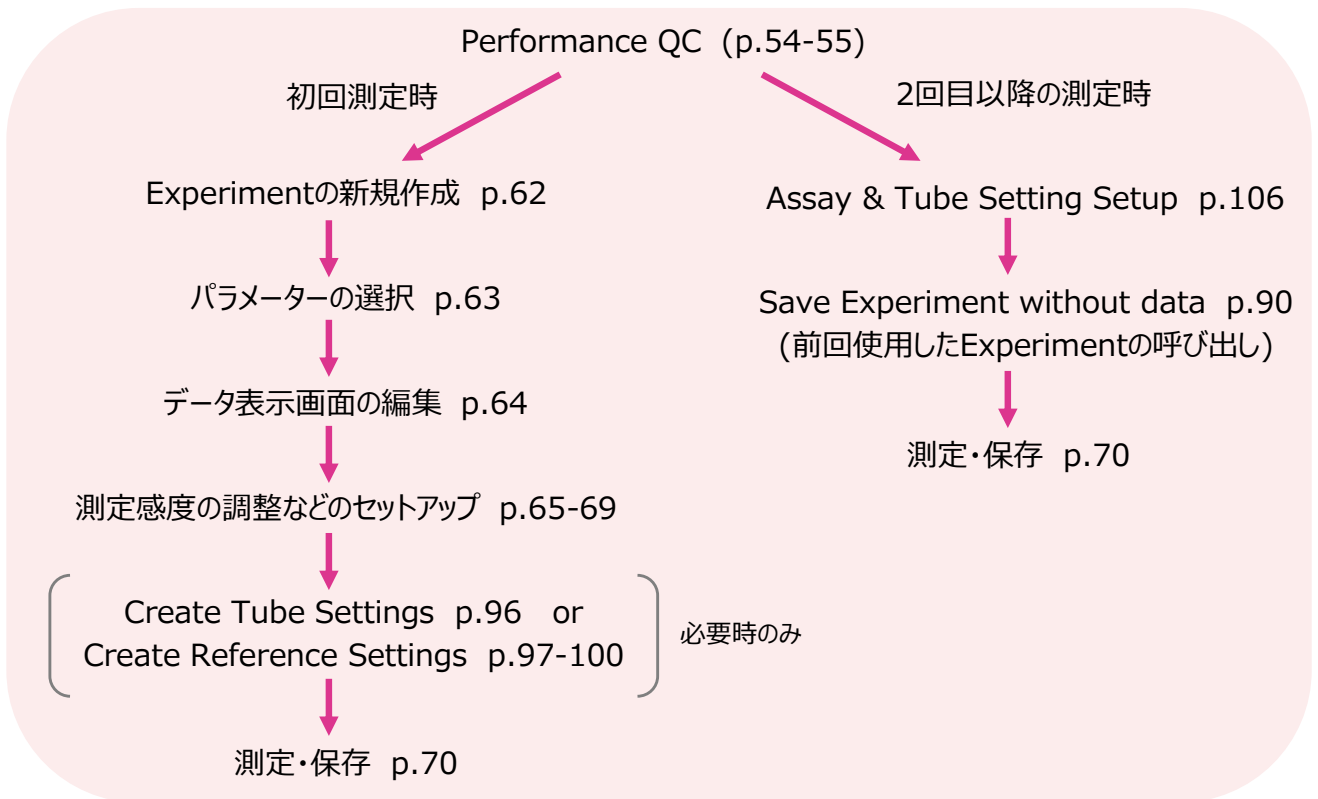
光学フィルター



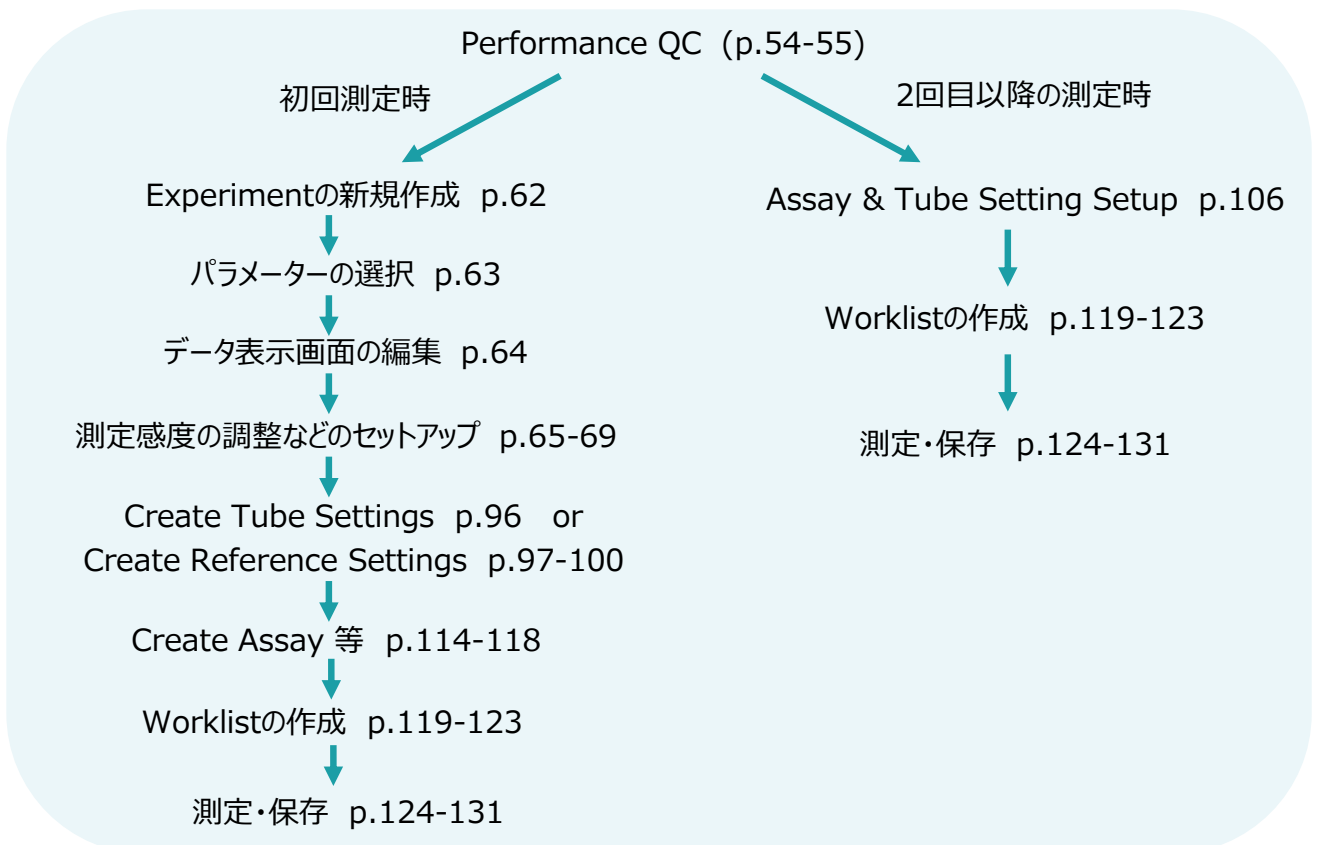
Laser	Fluoro-chrome	Mirror	Filter	Optional detector by configurations				
				3-1	4-2	4-2-2	4-3-3	4-3-5
Blue	PE-CF594, PE-Texas Red®	605LP	613/18	B	B	B	B	B
Red	Alexa Fluor® 700	705LP	720/30	C	C	C	Built-in	Built-in
Blue	YFP	535LP	545/20	C	C	C	C	C
Blue	GFP	510/10	510/10	D	D	D	D	D

【参考資料】データ保存までのサンプル測定フロー

マニュアル（手差し）測定

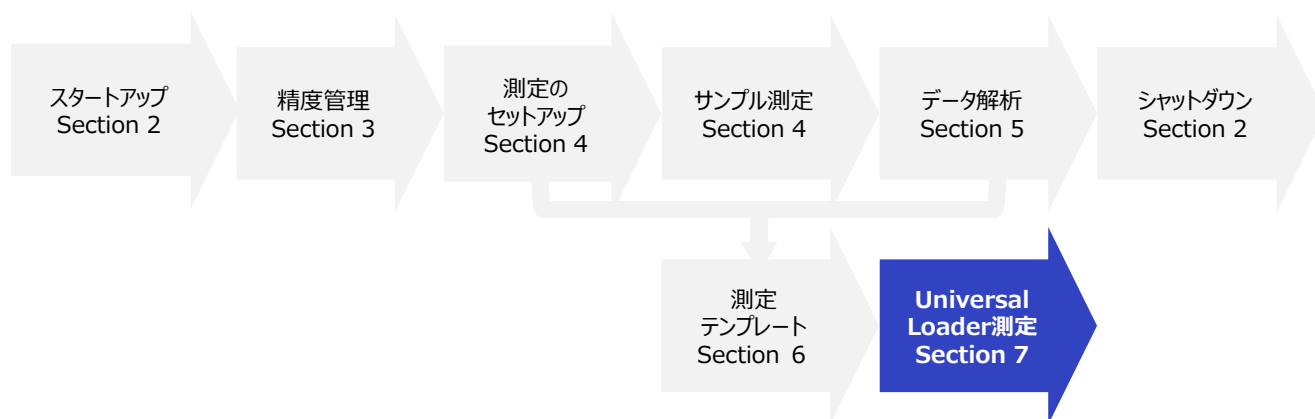


Universal Loader 測定



Section 7

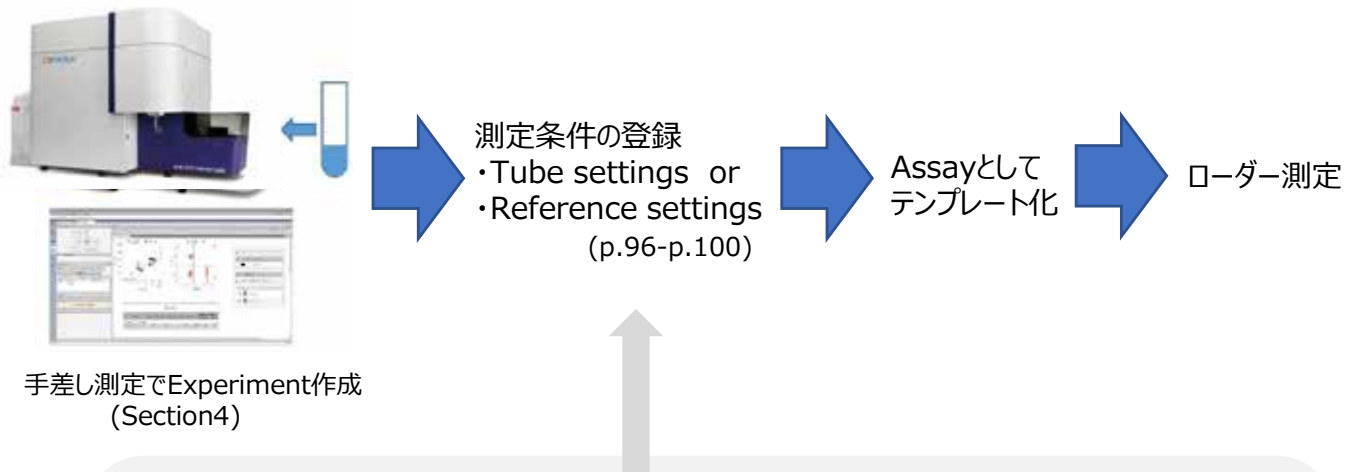
Universal Loader測定



項目	ページ
Loader測定概要・測定テンプレート (Assay) の登録①	114
測定テンプレート (Assay) の登録②	115
Auto Export設定 (PDF、CSVファイル)	116
Auto Export設定 (FCSファイル)	117
測定開始前の準備	118
Worklistの作成と設定	119
Worklistによる測定の実施	124
測定結果の確認と再出力	127
Worklistのデータ管理	131
FDA 21 CFR Part 11およびER/ES指針への対応	132

Loader測定概要・測定テンプレート(Assay)の登録①

測定に使用したExperimentの設定をAssayとして保存します。**Universal Loaderを使用するための必須の設定です。**作成したAssayは次回以降テンプレートとして使用できます。



Voltageや蛍光補正值を初期値から変更した場合は、測定条件を登録しなければAssayが作れません。

- ・Tube settingsに含まれる主な設定
Voltage、Threshold、Flow Rate
- ・Reference settingsに含まれる主な設定
Voltage、Threshold、Flow Rate、**蛍光補正值**


- ① Assayとして登録したいExperimentの設定を行います。
下記の項目がAssayに含まれるので、設定漏れがないか確認してください。

- ・ Tube Properties設定内容 (p.68-69)
 - Tube name、Tube Settingsの選択
 - データ取得Parameterの選択
 - Reagent Label
 - Acquisition (保存個数) の条件
- ・ Tubeの本数
1本のみでも構いませんが、全サンプルのPDFやCSVをまとめてAuto Exportしたい場合はNextボタンで測定したいサンプルの本数分作成します。
- ・ プロットやゲートの表示内容や配置
PDFをAuto Exportしたい場合は、次頁②参照。
- ・ Statisticsウィンドウの内容
CSVをAuto Exportしたい場合は、次頁②参照。

測定テンプレート(Assay)の登録 ②

② 画像データ(PDF)や統計情報(CSV) を自動で出力する場合は、Assay作成前に下記の項目を確認します。

・画像データ (PDF) のAuto Exportのための準備

1. Assayを作成する際、解析シートはWorksheetではなくReportで作成してください。Report画面は「R」のアイコンで作成できます。 
2. プロット図を作成します。* Assayで設定するTube本数分の図を全て作成してください。

・統計情報 (CSVファイル) のAuto Exportのための準備

3. Statisticsウィンドウを編集します。
ウィンドウを右クリック> Edit population or Edit statistics
* Assayで設定するTube本数分の情報を全て表示してください。
4. Statisticsウィンドウを右クリック> Properties> Generalタブの Include in Auto-Exportにチェックを入れます。

③ Fileメニュー->Create Assayを選択します。

④ 表示されたCreate Assayダイアログに名前を入力します。

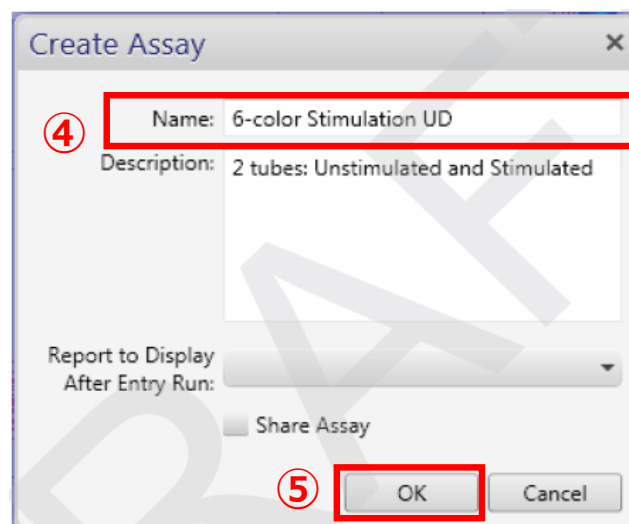
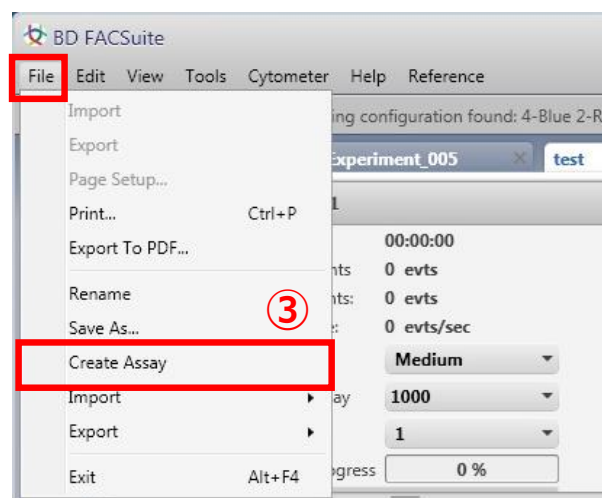
Share Assay:

ユーザーアカウント間で登録したAssayを共有したい場合はONにします。ただし、共有したAssayとその設定に含まれているTube Settingsは、今後一切消去することができなくなりますのでご注意ください。

⑤ OKをクリックします。

(エラーが生じた場合はp.105 <Create Assay でエラーが表示される場合>を参照ください。)

次回の実験でこの条件を使用する場合、Performance QCの後にAssay & Tube Settings Setup (p.106) を行ってから、サンプルを測定してください。

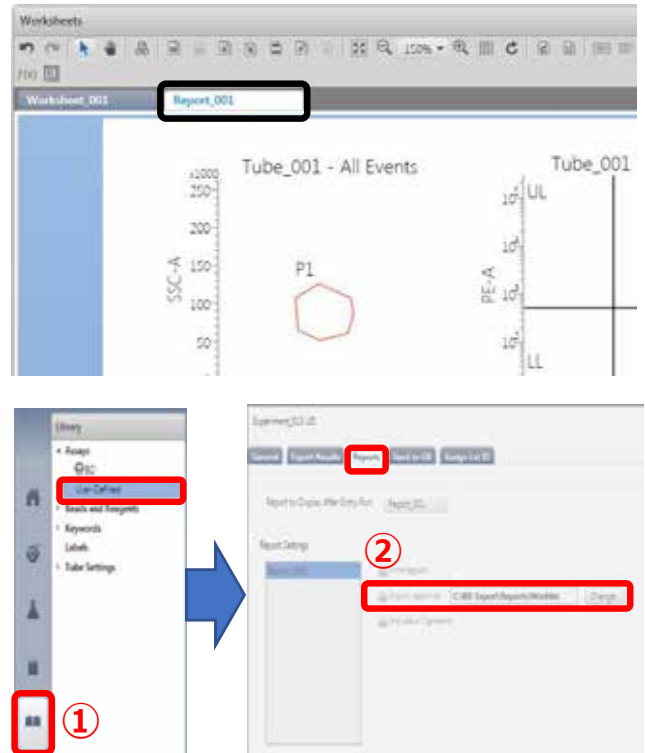


Auto Export設定 (PDF、CSVファイル)

画像データ(PDF)や統計情報(CSV) を自動で出力する場合は、下記の実施します。

・画像データ (PDF) のAuto Export設定

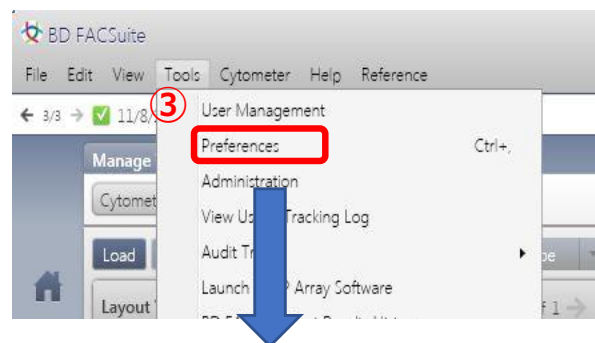
- ① Assay作成後、画面左のLibraryからAssays> User-Defined> 目的のAssayを選択。
- ② Reportsタブを開き、Export Report toにチェックを入れ、保存先のフォルダを指定します。
* ソフトのバージョンによってはEditボタンを押し変更し、DoneあるいはSaveボタンを押して完了です。



・統計情報 (CSVファイル) のAuto Export設定

- ③ ToolsメニューのPreferencesを選択
- ④ WorklistタブのExportからResultsを選択し、Automatically export resultsにチェックを入れ、保存先のフォルダを指定します。

* 保存先で日付のフォルダを作成する場合は、Create dated subfolderのチェックもONにします。



*** 保存先の設定は全てのユーザーに適用されるため、毎回確認してください。**

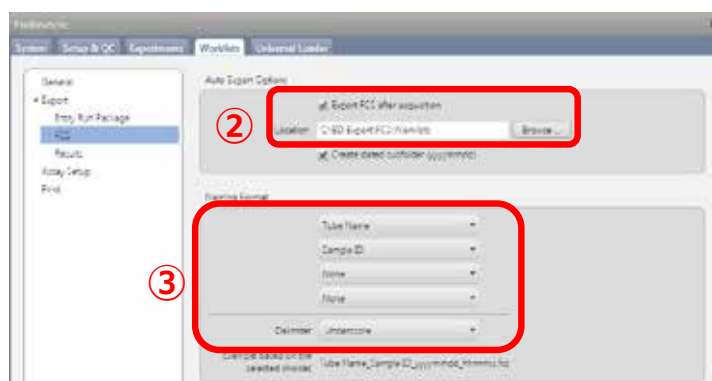


Auto Export設定 (FCSファイル)

FCSファイル（測定したサンプルデータ）を自動で出力する場合は、下記の設定を実施します。
1 サンプルにつき 1 ファイル作成されます。

・FCSファイルのAuto Export設定

- ① ToolsメニューのPreferencesを選択
- ② WorklistタブのExportからFCSを選択し、Export FCS after acquisitionにチェックを入れ、保存先のフォルダを指定します。
* 保存先で日付のフォルダを作成する場合は、Create dated subfolderのチェックもONにします。
- ③ Naming FormatではFCSファイルの名称を編集できます。



*** 保存先の設定は全てのユーザーに適用されるため、毎回確認してください。**

*FACSuite v1.2までのシステムではFCS3.0形式で出力されますが、v1.3以降のシステムではFCS3.1形式で出力されます。解析用ソフトウェアのバージョン対応にご注意ください。

測定開始前の準備

Universal loaderの測定開始前に、測定前のPreviewの設定や、測定データ出力に関する設定をしておきます。Preview設定は、前のサンプルのキャリーオーバーや流速の変化によるデータの乱れを阻止するのに有効です。

- ① ToolsメニューよりPreferencesを選択します。
- ② Worklistsタブをクリックします。
- ③ Acquisition(VerによってはGeneral) を選択します。
- ④ Acquisition delay timerで、測定時のPreviewの秒数を設定します。

Preview for Seconds:

サンプルのPreview時間
(通常測定5秒間以上)

Use Acquisition Delay Timer :

Preview実施のタイミングを選択します。

- ⑤ “Export”にてWorklistでの測定時におけるデータの自動出力についての設定を行います。既に設定確認済みであればスキップして構いません。

Entry Run Package:

1 Entry当たりの設定 + サンプルデータです。サンプルグループ (Entry) につき 1 ファイル作成されます。

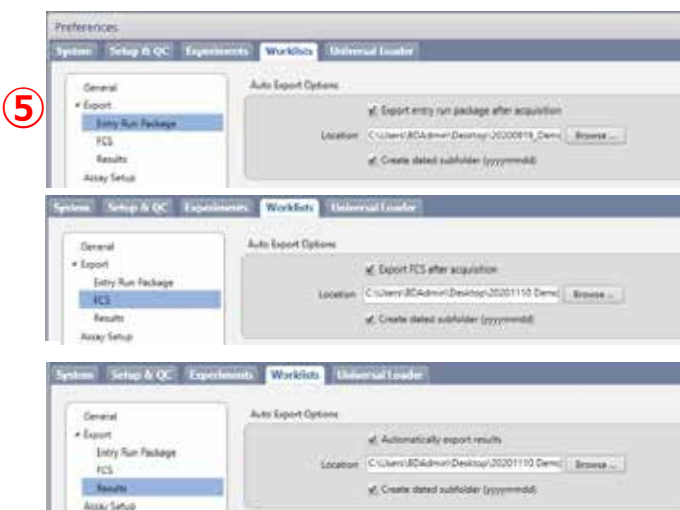
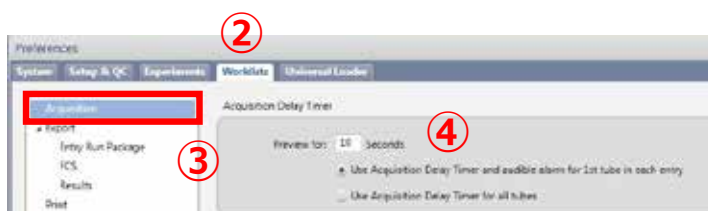
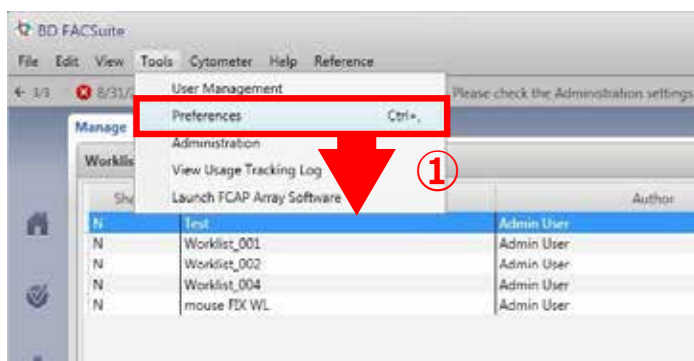
FCS:

測定したサンプルデータです。1 サンプルにつき 1 ファイル作成されます。

Results:

Assayで自動出力をONに設定したStatisticsのCSVファイルが作成されます。

- ⑥ 出力したい項目について、Export…のチェックボックスをONにし、Locationでデータの保存先を設定します。保存先で日付のフォルダを作成する場合は、Create dated subfolderのチェックもONにします。



Worklistの作成と設定

Worklistはあらかじめ設定された測定を実施するモードです。

Universal Loader (UAL) を使用する測定や、Part 11の規定に沿った測定を行う場合は、必ずこのモードを使用します。

① Navigation BarのWorklistsをクリックします。

② Manage WorklistのNewボタンをクリックすると、新しいWorklistタブが開きます。既存のWorklistはダブルクリックで開きます。

*一度に開くWorklistは5個以内にします。

*Worklistを他のユーザーと共有したい場合は、右クリック>Shareで設定できます。ただし、Privateに戻すことはできませんのでご注意ください。

③ Loading OptionウィンドウのLoading Optionを選択します。

Universal Loader:

ラック・プレートを用いた測定の場合

Manual:

手差しでPart11対応の測定の場合

④ Universal loaderを選択した場合は、Carrier Type の▼より、使用するチューブラックあるいはプレートのタイプを選択します。

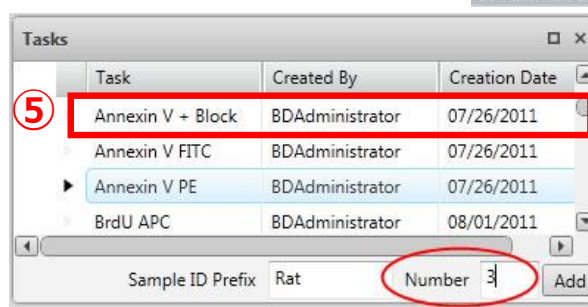
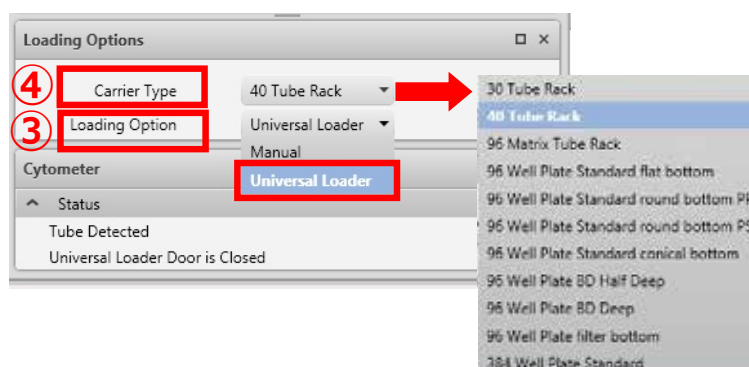
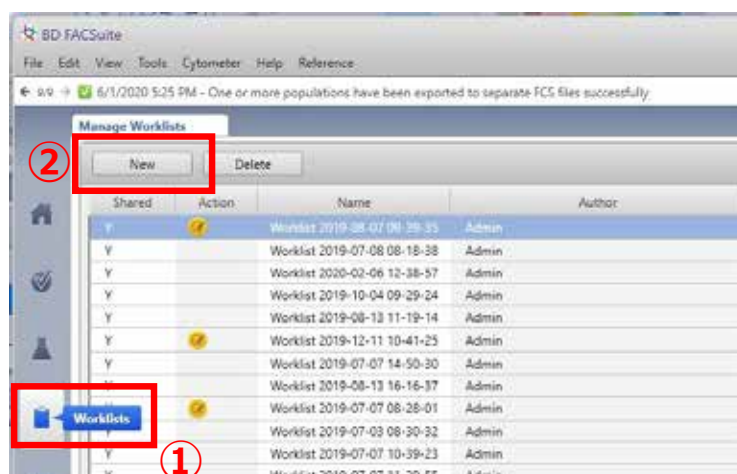
⑤ TasksウィンドウのUser Definedより、測定に使用するAssayを選択します（複数選択可）。

⑥ Numberに測定を繰り返したい回数を入力し、Addボタンをクリックします。

*登録の最後にTasksウィンドウ>Fluidicsより、測定後の自動洗浄（ラックでの測定のみ、プレート不可）とシャットダウンを設定することができます。Suite v1.2ではシャットダウンがDefectしているため、Suite v1.3以降のシステムで使用してください。

Worklist:

あらかじめ登録したAssayを呼び出し、多検体を連続的に測定できるモードです。事前に使用するAssayの登録が必要です。



Carrier:

チューブラックやプレートなど、多検体をセットする容器タイプを指します。

Assay:

Experiment画面より登録された、測定条件の雛形です。

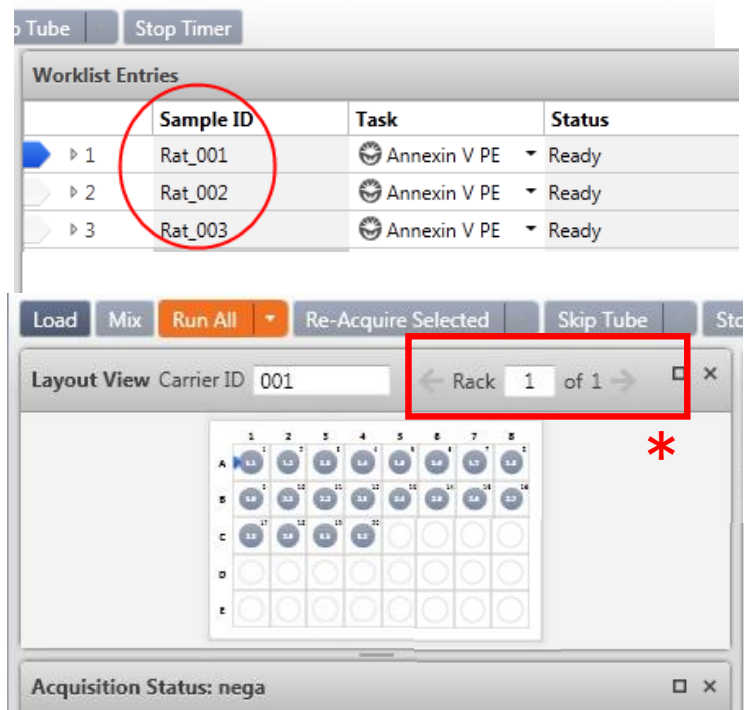
Entry:

Worklist上で設定された測定の1グループを指します。

⑦ Worklist Entriesに指定した設定が呼び出され、Layout viewにも反映されます。

*呼び出したサンプル個数が、ラック・プレートのサンプル数を上回った場合は、自動的に2個目のCarrierが設定されます。

*複数のAssayを使用する場合は、Fluidics modeを統一することを推奨します。異なるモードが混在すると、測定中モード切替が頻繁に必要となり、測定の遅延につながります。



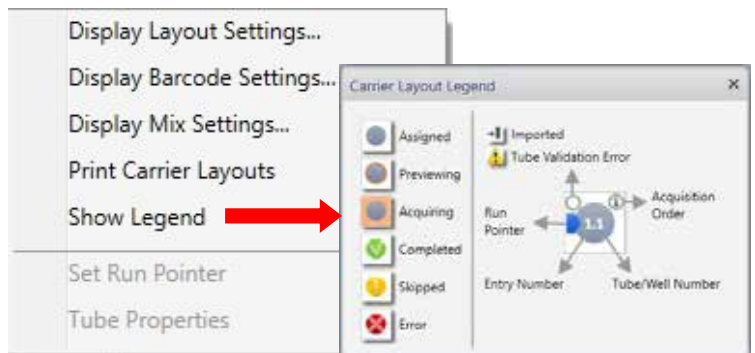
<Layout Viewの編集と確認>

サンプル配置が反映されたLayout Viewでは、測定に関する様々な設定を行うことができます。

Layout ViewのメニューはSuite v1.3までと、v1.4で異なるためご注意ください。

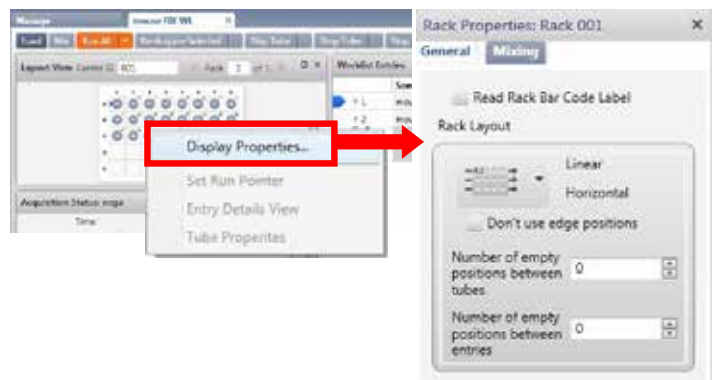
Suite v1.4の場合

Layout Viewを右クリックし、表示されるリストより設定したい項目を選択します。



~Suite v1.3の場合

Layout Viewを右クリックし、Display Propertiesからサンプル配置ルール、Mixing設定を行います。

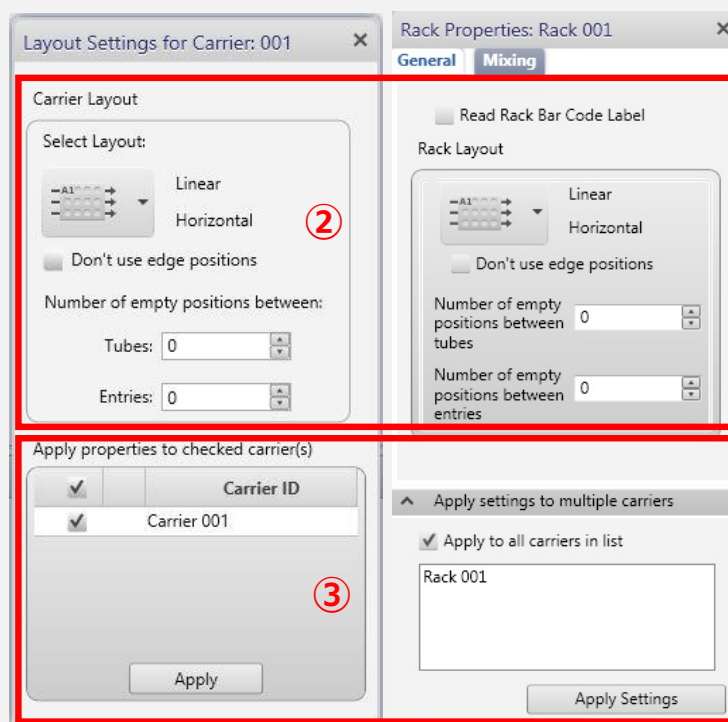


Part 11に必要

Audit trailを設定してください。

<サンプルの並ぶ向きを変更したい場合>

- ① Layout viewを右クリックし、Display Layout Setting (Suite v1.4) または、Display propertiesのGeneralタブ (Suite v1.3までの場合) を選択します。
- ② 表示されたウィンドウよりサンプルの並び方を変更します。
*外縁部を使用しない設定 (Don't use edge position) や、サンプルやAssayごと間隔を空ける設定も追加できます。
- ③ ウィンドウ下部より、設定を適用させるRackやCarrierを選択し、Apply SettingsまたはApplyをクリックして、続けてバツマークでウィンドウを閉じます。

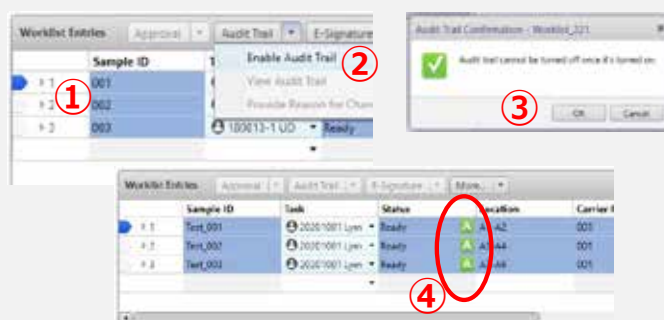


<Audit trail (監査証跡) のについて① 記録スタート>

Audit trail (監査証跡) は作成したデータの作成・編集の履歴記録です。この記録は一旦スタートすると中止、消去することはできません。また、解析データをパッケージ化して出力するため、バックアップデータにも記録が残ります。

FACSuite v1.4以降のバージョンでは、自動的に記録が開始されるため、測定開始のための操作は必要ありません。

- ① Worklist entriesでAudit trailの対象となるEntryを選択します (複数可)。
- ② Audit TrailよりEnable Audit Trailを選択します。
- ③ 確認のメッセージのOKをクリックします。
- ④ 記録がスタートすると、Statusにマークが表示されます。



< サンプルの攪拌設定を変更したい >

サンプル測定中は、サンプルの沈殿を防ぐため、攪拌機能が動作します。設定を変更したい場合は、Display propertiesより設定します。

Initial Mixing:

測定開始時の攪拌条件

Interim Mixing:

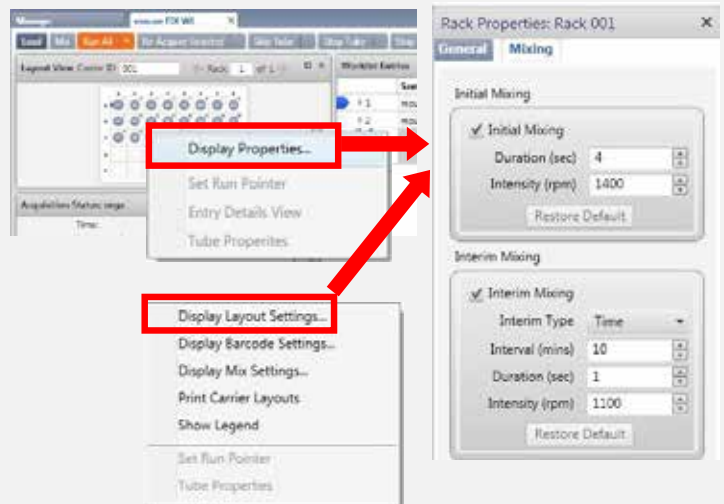
測定中の攪拌頻度、条件

Duration : 攪拌時間 (秒)

Intensity : 攪拌回転数 (rpm)

Interval :

時間あるいはサンプル数ごとの攪拌タイミグ



< ローダー使用時の各種測定容器からの測定について >

測定に使用するチューブやプレートには、その形状ごとに溶液の最小および最大容量が規定されています。

Carrier type for tubes ^a	Recommended minimum volume (µL)	Maximum volume (µL)
30-tube rack (12 x 75 mm)	100	2,000
40-tube rack (12 x 75 mm)	100	2,000

Carrier type for plates	Bottom geometry	Material ^a	Recommended minimum volume (µL)	Maximum volume (µL)
BD 96 standard height	Round	PS	55	200
BD 96 standard height	Flat	PS	55	200
BD 96 standard height	Round	PP	55	200
BD 96 standard height	Conical	PP	55	200
384 standard height	Flat	PS	40	75
96 half deep	Conical	PP	55	500
96 deep	Conical	PP	55	1,000
96 matrix tube rack	N/A	N/A	55	700
96 filter bottom	Filter	PP	150	200

a. PS = polystyrene, PP = polypropylene

＜測定に使用できる容器製品＞

各種サンプルキャリアの設定で右記の製品との互換性を確認しています。

黒いプレートはローダーが認識できないため使用できません。

Tray Type	Material	Bottom Geometry	Tray PN for RUO v1.1	Tray PN for IVD v1.1
30 Tube Rack (with PP, TC and PS tubes)	N/A	N/A	651314	651314
40 Tube Rack (with PP, TC and PS tubes)	N/A	N/A	651319	651319
96 st height	PS	Round	353910	353910, Corning 3797
96 st height	PS	Flat	351172	351172, Corning 9017
96 st height	PP	Round	351190	351190, Corning 3265
96 st height	PP	Conical	353263	353263, Corning 3363
384 st height	PS	Flat	Greiner 781101*	Greiner 781101*, Corning 3680
96 half deep (1mL)	PP	Conical	353964	353964**, Corning 3959 or Eppendorf 0030 501 209, 0030 501 217, 0030 501 233, or 0030 501 241
96 deep (2mL)	PP	Conical	353966, Corning 3961 or Eppendorf 0030 501 306, 0030 501 314, 0030 501 330, or 0030 501 349	353966***, Corning 3961 or Eppendorf 0030 501 306, 0030 501 314, 0030 501 330, or 0030 501 349
Matrix Tube Rack	N/A	N/A	Tube Rack: Thermo PN 4247 Tube: Thermo PN 4140	Tube Rack: Thermo PN 4247 Tube: Thermo PN 4140
96 filter bottom	PS	Filter	Milipore MABVN1250	Milipore MABVN1250, Milipore MSBVN1250

＜測定時のMixing設定＞

使用するサンプルキャリアによって、Mixingの初期設定は異なります。

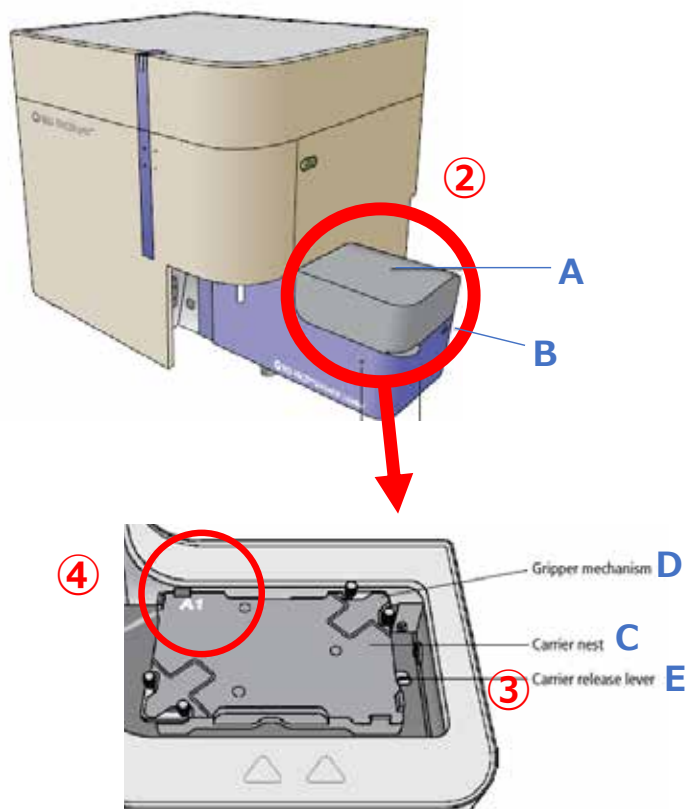
rpmを上げすぎるとサンプルが飛散する可能性があるため、攪拌が不足している場合は攪拌時間の方を延ばしてください。

Sample carrier	Initial mixing		Interim mixing			
	Duration (sec)	Intensity (rpm)	Type	Interval (min)	Duration (sec)	Intensity (rpm)
30-tube rack	4	1,400	Time	4	10	1,100
40-tube rack	4	1,400	Time	4	10	1,250
96-well plate, standard height, flat/round/conical bottom	10	1,400	Time	5	5	1,400
96-well plate, filter bottom						
BD 96-well plate, half deep	30	1,400	Time	5	5	1,400
Corning/Eppendorf 96-well plate, deep, 1mL						
96-matrix tube rack	50	1,500	Time	5	5	1,500
BD 96-well plate, deep	50	1,700	Time	5	5	1,700
Corning/Eppendorf 96-well plate, deep, 2mL						
384-well plate, standard	20	2,300	Time	5	5	2,300

Worklistによる測定の実施 ①

これまでに作成した測定条件に従って、Universal loaderの測定を実施します。

- ① SITには滅菌イオン交換水(DI水) を取り付けておきます。
*ローダー使用中、何もつけないとSITのLEDがサンプルに当たって蛍光が減弱する可能性があるため、常に滅菌イオン交換水(DI水)を入れたチューブを取り付けておきます。
- ② Loader coverを開きます。
- ③ Ver1.2以前の場合
Carrier release lever を奥側に押し、Gripper mechanismを開きます。
* FACSuite v1.3以降は、ローダーカバーを開くと自動でGripperが開きます。
- ④ プレートあるいはラックのA1とCarrier nestのA1をあわせて、UALにサンプルをセットします。
- ⑤ サンプル容器がGripperによってしっかりと固定されていることを確認し、Loader coverを閉じます。



< Universal Loader (UAL)各部名称>

A Loader cover

このカバーを閉じないとUALは動作しません。本体起動時や、手差しでの測定も同様です。システムで何らかの操作を行う場合、必ずLoader coverを閉じて行ってください。

B Eject button

UAL内のCarrierを強制的に取り出します。UAL使用中にトラブルが原因で、サンプルが閉じ込められた場合、緊急的にCarrierの取り出しが必要な場合に使用します。

C Carrier nest

サンプルラックまたはプレートを設定する部分です。A1の位置を合わせてセットしてください。

D Gripper mechanism

サンプルラックまたはプレートをCarrier nestに固定するためのグリップです。

E Carrier release lever

Gripper mechanismの開閉を行うレバーです。サンプルラック・プレート取り付け時には、必ず奥まで押してください。

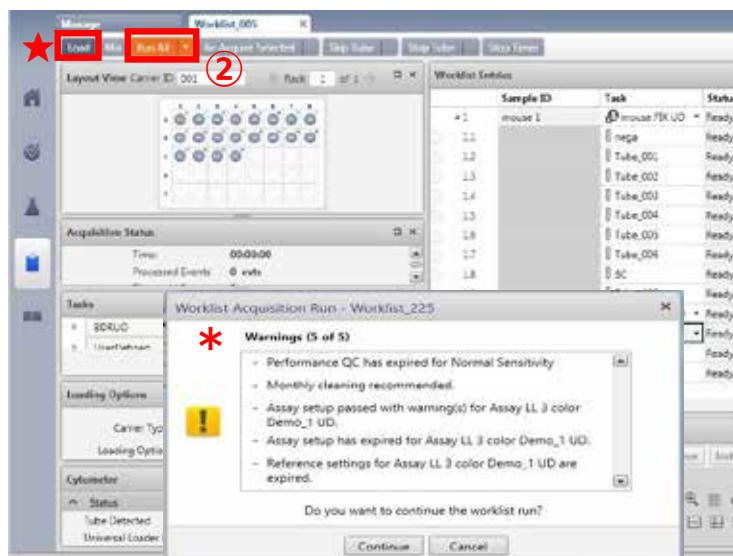
Worklistによる測定の実施 ②

これまでに作成した測定条件に従ってUniversal loaderの測定を実施します。

- ① Acquisition Statusにて、SIT Flushの回数を設定します。
- ② Runメニューから測定動作に移行します。
Run All:
 すべてのチューブ/ウェルを測定
Run Selected:
 Worklist Entriesで選択した（反転させた）箇所のみ測定
Run from pointer:
 Worklist Entriesで選択した（反転させた）箇所以降のすべてを測定

*測定に適さない状態のラックやプレートを使用した場合は、Ejectされ測定できません。

*測定開始までにQCなどの実施条件を満たしていない場合は、QC Messageが表示されます。内容に応じて測定の中止、スキップをしてください。



<ウェル表示の種類>

- 測定前
- 測定条件達成
- 測定条件未達（ターゲットイベント数に達する前に制限時間に達した）
- 測定スキップ

<ラック/プレートの認識について>

FACSLyric™では、セットされたラック/プレートが適切な状態かをカメラで判断しています。選択した設定と、セットされたデバイスの状態にミスマッチがある場合、測定に進むことができません。手持ちのラック/プレートをセットし、メニューバーの [Load] ★を選択すると、ミスマッチでないか確認できます。

測定に適さない状態

- ・ラックやプレート表面にペンなどで書き込みがある、ラベルが貼ってある（側面はOK）
- ・プレートのウェルサイズや配置が通常の96・384ウェルプレートと異なっている
- ・プレート素材が設定にマッチしていない

プレート認識の確認・編集方法

- ① Loading optionより使用したいCarrierを選択します。
- ② Display propertiesのGeneralタブより、プレートのイラストを確認します。四隅のうち黒い部分がプレートの切り欠きとして認識されるので、実際に使用するプレートの形状と一致している事を確認します。一致していない場合は、四隅をクリックすると切り欠き認識が切り替わります。



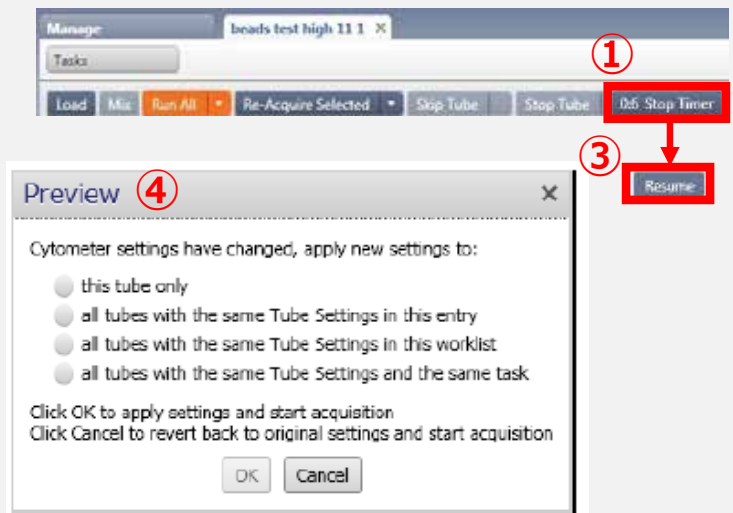
<機器設定を一時的に変更したい場合>

サンプルの測定を開始すると、指定の秒数のPreviewの後、データ保存が開始されます。Previewの段階で、測定感度やゲート位置の微調整が必要だと判断した場合は、下記の操作で変更できます。

- ① メニューバーの右端のPreviewのカウントダウンをクリックします。（Preview時間が短くて、パターンの確認ができない場合はマニュアルp.118で変更します）
- ② プロットのPMTVスライダーやゲート位置を調整します。
- ③ Resumeボタンをクリックします。
- ④ Previewウインドウより、変更の適用範囲を選択します。

*この方法による変更は一時的な手段です。継続的な変更が必要な場合は、新しくTube Settingsと、Assayを作り直して下さい。

*設定中はサンプルは流れ続けています。サンプル残量に注意してください。



this tube only:

測定中のTubeにのみ、変更を適用します。

all tubes with the same Tube Settings in this entry:

測定中のTubeと同じEntry内かつ、同じTube Settingsを使っているTubeにのみ変更を適用します。

all tubes with the same Tube Settings in this worklist:

測定中のTubeと同じTube Settingsを使っているTubeにのみ変更を適用します。

all tubes with the same Tube Settings and the same task:

測定中のTubeと同じTube Settingsを使っている同じTask（Assayの種類）のTubeにのみ、変更を適用します。

測定結果の確認と再出力

Worklistでの測定後、測定結果を確認します。
必要に応じてApproveすることで、出力データを得ることができます。

- ① 測定が終了すると、サンプルラック/プレートがローダーからEjectされます。画面に表示されたメッセージのContinueをクリックします。
- ② 測定したTaskのStatusを確認します。データの内容を確認する場合は、TaskのRun pointerをクリックします。

Approved:

Entryに含まれるすべてのTubeで測定条件を満たした場合です。事前に設定したデータが出力されています。個々のデータのStatusはComplete、Layout viewの表示はグリーンです。

Incomplete:

測定されていないTube（またはWell）が含まれている場合です。事前に設定したデータは出力されません。個々のデータのStatusはReady To Acquire、Layout viewの表示はイエローです。

Needs Review:

Entryに測定条件を達成していない（制限時間以内に目標のイベント数が保存できなかった）Tubeが含まれる場合。事前に設定したデータは出力されません。個々のデータのStatusはStopping Criteria Not Met、Layout viewの表示はRedです。

Ready for Approval:

E-Sign設定時やApprovedを解除した場合。全てのTubeで測定条件を達成していても事前に設定したデータは出力されません。個々のデータのStatusはComplete、Layout viewの表示はグリーンです。

Sample ID	Task	Status	Location	Carrier ID
# 1 001	B-ALL + cyt + k/1 0623 UD	Needs Review	A1-A7	001
# 2 002	BLymph+HCL+CLL+MCL 0623 UD	Incomplete	B8-B7	001
# 3 003	BLymph+HCL+CLL+MCL 0623 UD	Incomplete	B8-C7	001
# 4 004	T Cell lymphoma +cyCD3 0623 UD	Ready For Approval	B8-D6	001

Status	
Needs Review	要確認
Incomplete	測定未実施
Ready For Approval	承認待ち

Layout viewの表示

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Red
B	Green	Red	Red	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Green
C	Green	Green	Green	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Green
D	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
E	White	White	White	White	White	White	White	White

Part 11に必要

ReportにE-Signを実施
してください。

<TaskのStatusがIncompleteやNeeds reviewの場合：再測定>

TaskのStatusがIncompleteやNeeds reviewの場合は、Layout viewでの表示がイエローまたはレッドの部分で設定どおりのデータが保存されていません。必要に応じて再測定を行います。

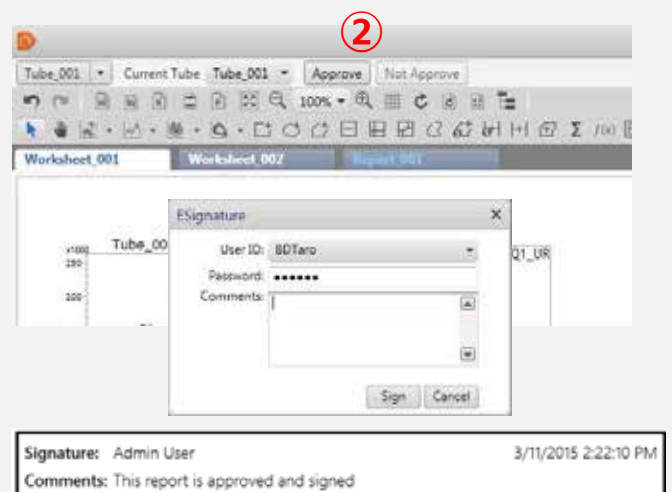
- ① Worklist entriesのリストでRun pointerをクリックし、該当のサンプルデータを確認します。
- ② 再測定が必要な場合は、サンプルを再度セットし、対象のウェルに相当するリストの段をクリックしてハイライトさせ、Re-acquireをクリックします。
*再測定に必要なサンプルが十分残っていることを確認して実施してください。
*再測定ができない・不要の場合は“TaskをApproveする”に進みます。



<TaskをApproveする、E-Signを記入する>

TaskをApproveすることでデータを出力できます。Reportに電子署名を設定している場合は、測定後はデータ個数を満たしていてもReady for Approvalのため、手動でApproveを行います。

- ① 承認したいTaskのRun pointerをONにします。
- ② WorksheetまたはReportの上部にある、Approveボタンをクリックします。
*E-Signを使用している場合は、ID/Passwordの入力が必要です。
- ③ データが出力されます。



*E-Sign実施後にレポートの内容が変更されると、サインは自動的に消去されます。再度Approveします。

<Reportの再出力について>

測定後の出力データに変更が必要な場合に実施します。

- ① 測定結果の再出力が必要なTaskのRun pointerをクリックします。
- ② 必要に応じてゲートの調整、蛍光補正の変更を行います（Run pointerを右クリック>Tube propertiesより変更可能）。また、再測定が必要な場合は、該当のデータを選択してRe-acquire selectedのボタンをクリックします。
*蛍光補正を変更した場合は、他のデータと補正値を統一するかを選択する画面が表示されます。
- ③ Approveボタンをクリックし、データ出力を実行してください。



Part 11に必要

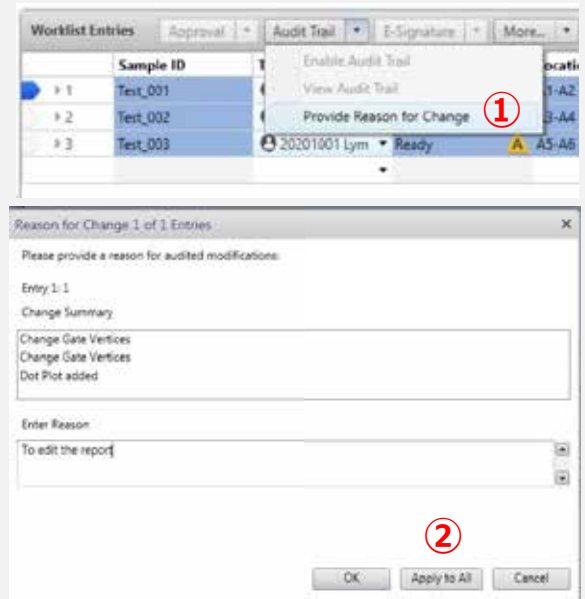
Audit trailにReasonを入力してください。

<Audit trail（監査証跡）について② 変更理由の入力>

Audit trail（監査証跡）では、記録をスタートしてから、レポート上のあらゆる変更操作について、変更理由の入力が必要です。

FACSuite v1.3までのバージョンでは、変更理由の入力もマニュアルで実施します（下記手順）。FACSuite v1.4以降では、変更理由も自動入力されます。

- ① Worklist entriesのAudit Trail> Provide Reason for Changeをクリックします。
- ② Enter Reasonに各操作を理由を入力し、ウィンドウのOKボタンをクリックします（日本語入力できません）。



Worklistのデータ管理

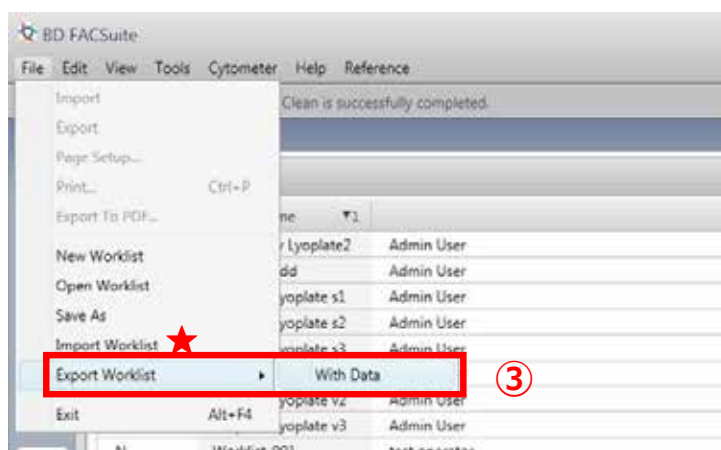
測定を終えたWorklistのファイルは適切にバックアップ・消去してください。

測定後のWorklistは必ずデータのバックアップをとってください。

- ① 保存したいWorklistを開いている場合は、タブを閉じます。
- ② Manage Worklistタブより、バックアップを取りたいWorklistを選択します。
- ③ Fileメニュー→ Export Worklistsより、指定したWorklistを出力します。

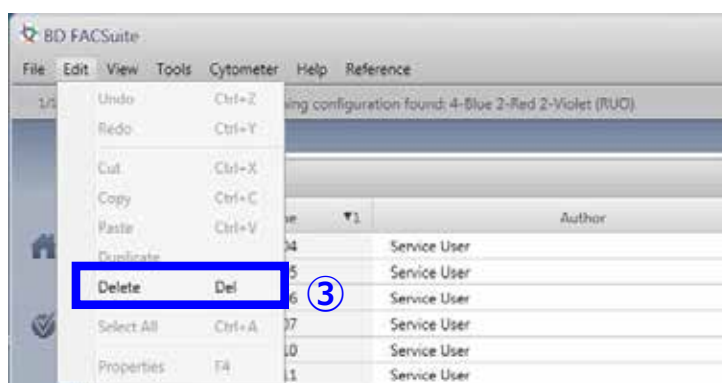
*消去したWorklistを再び読み込む場合は、Import Worklist (★) を選択してください。

*Worklistをインポートする場合、そのWorklistに含まれるAssayも必要です。インポート先のワークステーションに先にAssayをImportしてください。



不必要なWorklistをため過ぎると、ソフトのパフォーマンスが低下する場合がありますので、バックアップ終了後に消去してください。特に、WorklistファイルはExperimentよりも大量のデータが保存される可能性があるため、データ管理は定期的の実施してください。

- ① 消去したいWorklistが開いている場合は、タブを閉じます。
- ② Manage Worklistタブより、消去したいWorklistを選択します（複数選択可能）。
- ③ Editメニュー→ Deleteを選択します。



FDA 21 CFR Part 11およびER/ES指針への対応

Part 11およびER/ES指針は、医薬品申請に電磁的記録を用いる場合のガイドラインです。FACSuiteソフトウェアは、これらのガイドラインに求められるデータ管理要件を満たしうる機能を備えています。

本マニュアルでは、これまでの操作手順の中に、Part 11に対応するために必要な項目に目印をつけて表示しています。実際にPart 11に対応する運用方法を行う場合は、下記の手順で操作を行ってください。

- ① 個々のユーザーアカウントを作成する
- ② 新しいExperimentを作成し、測定サンプルに見合った測定感度に調整する
- ③ 測定設定（Tube settingまたはReference setting）を登録する
- ④ 測定結果の表示はReportに作成する
- ⑤ データ表示に必要なプロット、測定マーカ名の入力、測定データ数条件、測定Tube本数などを設定する
- ⑥ 測定テンプレートとしてAssayを登録する
- ⑦ E-Signの実施を設定する
- ⑧ Report内容のPDF出力を設定する
- ⑨ Assay & Tube settings setupを実施する
- ⑩ Worklistを作成し、測定したいAssayを呼び出す
- ⑪ Audit trailを開始する（FACSuite v1.4以降は不要）
- ⑫ Worklistによる測定を実施する（ローダーでも手差し測定でも可）
- ⑬ Audit trailにReasonを入力する（FACSuite v1.4以降は不要）
- ⑭ ReportにE-Signを記載する
- ⑮ Audit trailにReasonを入力する（FACSuite v1.4以降は不要）
- ⑯ Audit trail reportを確認、出力する

Part 11に必要な

Section 5 p.91
ユーザーアカウントの管理

①

Section 6 p.96-100
Tube settingsの登録方法
Reference settingsの登録方法

③

Section 4 p.76
プロットの作成

④

Section 5 p.74-75
Worksheetsのツールバー機能

Section 6 p.94,104
機器設定と測定テンプレートの関係について
測定テンプレート（Assay）の登録

⑥

Section 6 p.107
Libraryによる登録設定の管理

⑦

Section 7 p.119
Worklistの作成と設定

⑪

Section 7 p.127
測定結果の確認と再出力

⑬～⑯

Section 8

メンテナンス

項目	ページ
BD FACSLyric™のメンテナンススケジュール	134
Beads管理の概要	135
CS&T BeadsおよびFC BeadsのLot IDの登録 CS&T Beadsの Bead Lot Transfer	136
Characterization QCの実施	137
FC Beads の調製	138
FC Beads を用いたUpdate Reference Settings	139
データベースのメンテナンス	141
流路系トラブルシュートの全体像	142
流路系のメンテナンス	143
Monthly cleanの実施	144
シースフィルター/シースサブライラインフィルターの交換	148
サンプルラインの交換	149
Laser Setup (レーザー光軸調整)	151
FACSLyric™ 消耗品リスト	152

BD FACSLyric™のメンテナンススケジュール

FACSLyric™を適切に運用するために、下記の表のメンテナンス操作を実施頂く事を推奨します。

機器適正温湿度

温度：15℃～30℃

湿度：15%～85%(結露がないこと)

メンテナンスに必要な物品は以下の通りです。

- BD FACSTFlow (Cat# 342003)
- 滅菌イオン交換水(DI水)
- FACSClean
- CS&T Beads
- FC Beads kit
- Sheath filter
- Sheath supply line filter
- Sample line 一式

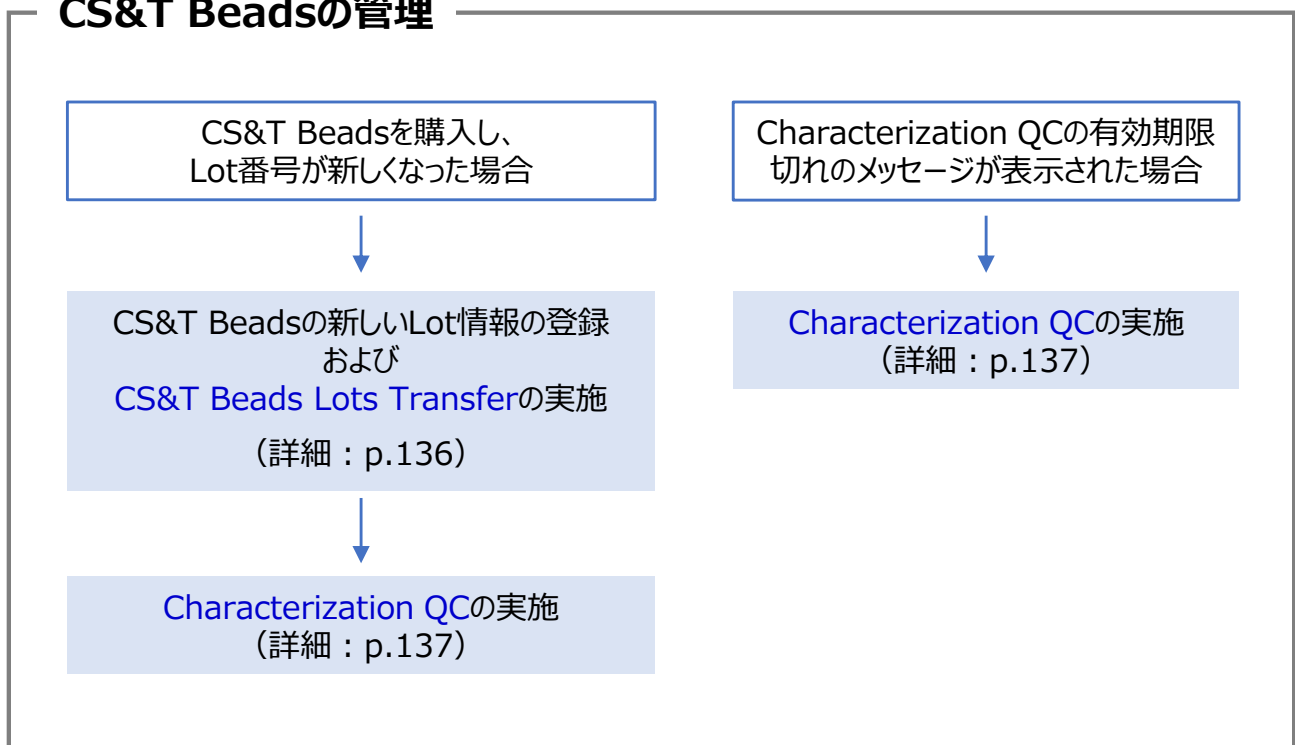
* BD FACSTFlowの代わりとしてFACS Sheath solution with surfactantを使用する事はできません。

頻度	メンテナンス項目	実施内容	ページ
毎回	Purge Sheath Filter	機器内部のシーすフィルターの気泡を排出します。	143
	SIT Flush	サンプルラインにシーす液を逆流させます。	143
	Drain and Fill Flow Cell	フローセル内の気泡を取り除きます。	143
	Daily Clean	サンプルライン・フローセルに付着した軽度の汚れを除去します。	51
	Performance QC	測定実施前に機器のQCを実施します	54
	Assay & Tube settings setup	使用時の機器の状態に合わせて、登録した測定条件を再現する機器設定を最適化します。	106
毎週	不要なWorklistの削除	必要のないWorklistを削除します	131
毎月	Monthly Clean	シーすラインに付着した汚れを除去します。	144～
	データベースのメンテナンス	不要なデータの消去を行います。	141
60日毎	Update reference settings	初期設定であるLyse Wash/Lyse No Washや、サンプル用に作成したReference Settingの蛍光補正情報を更新します。FC Beadsもしくはサンプルの単染色を使用します。	102 139
3ヶ月毎	本体内シーすフィルターの交換	定期的交換します。	146
	シーすサプライラインフィルターの交換	定期的交換します。	146
180日毎	Characterization QC	Performance QCの基準を作成します。CS&T Beads Lot ID変更時にも実施します。	137
必要に応じて	Clean Cuvette	精度管理でCV値の上昇がみられた場合に、フローセル内の汚れを除去します。	143
	Laser Setup	CV値の上昇がClean Cuvetteで解決しない場合に、レーザー光軸の最適化を行います。	149
	サンプルラインの交換	詰まりや折れによりサンプルが流れなくなった場合に交換します。	147～
	シーすタンクふたの交換	ふた（キャップ）がカビ等で汚れているようであれば交換します。	—

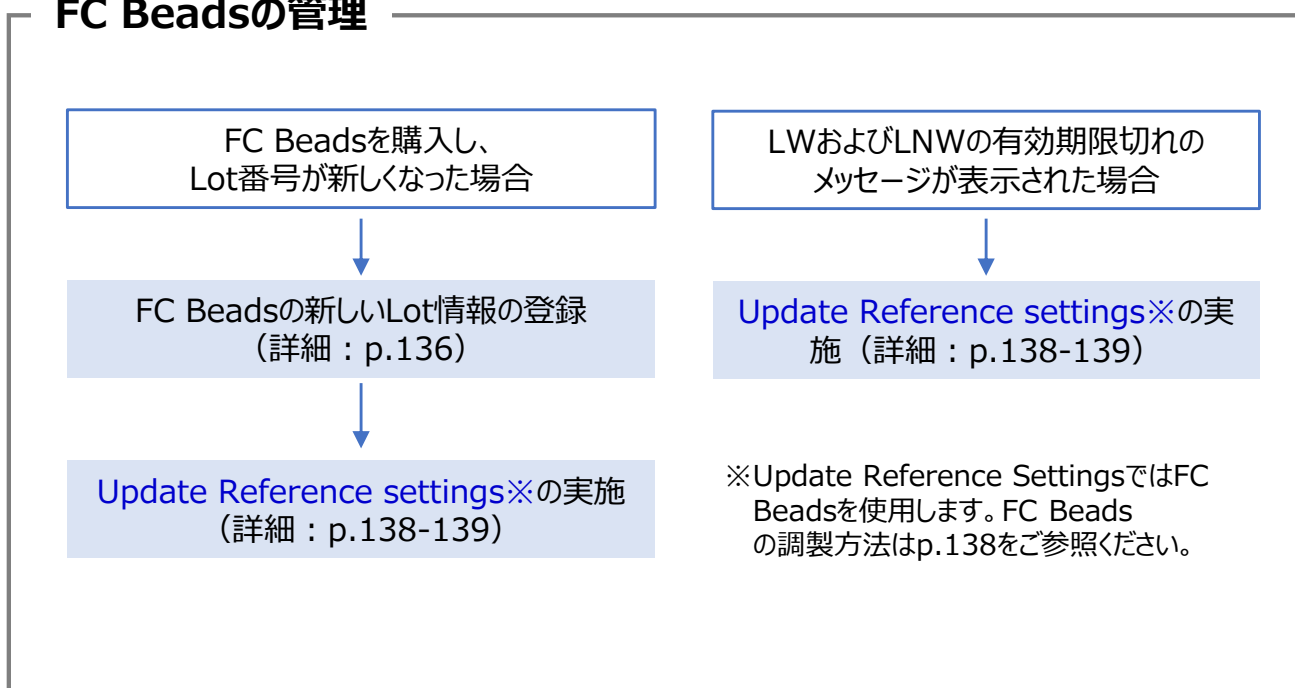
Beads管理の概要

CS&T BeadsやFC Beadsを購入しLot番号が新しくなった場合や、作成した既存の設定の有効期限が切れた場合には、下記の操作を実施します。

CS&T Beadsの管理



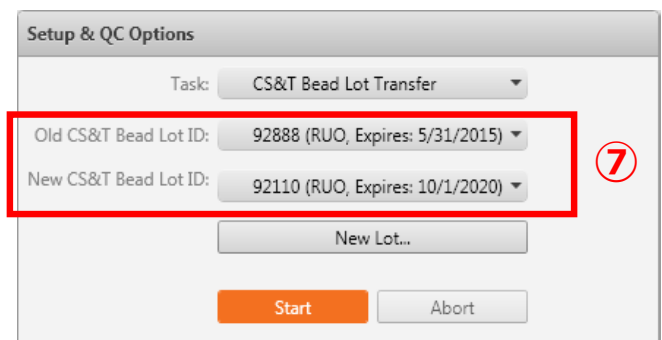
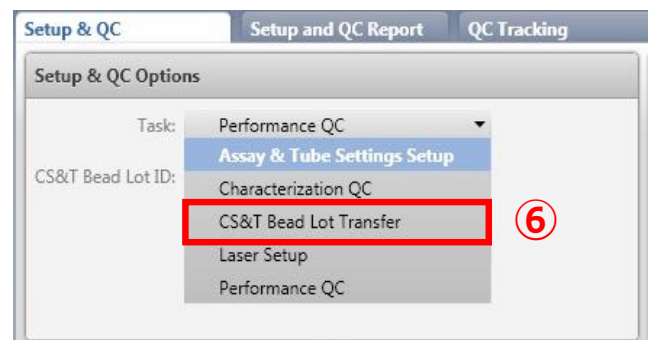
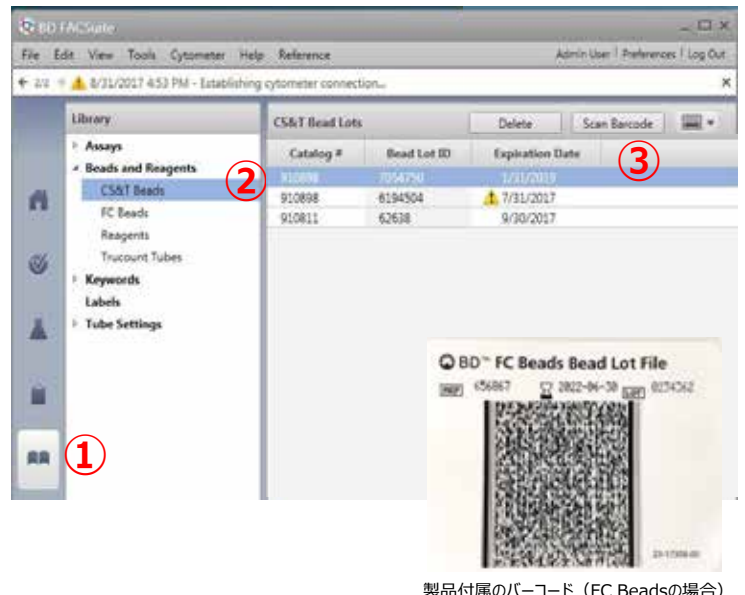
FC Beadsの管理



CS&T BeadsおよびFC BeadsのLot IDの登録 CS&T Beadsの Bead Lot Transfer

新しいLot IDのCS&T BeadsやFC Beadsを使う前に、Lot情報を登録する必要があります。

- ① Navigation bar のLibraryをクリックします。
- ② Library画面の[Beads and Reagents]タブを開き、CS&T BeadsもしくはFC Beadsをクリックします。
- ③ Scan Barcodeボタンをクリックします（Scan Barcodeウィンドウが表示されます）。
- ④ 付属のバーコードリーダーで製品付属の二次元バーコードを読み取ります（正常に読み取るとウィンドウに情報が表示されます）。
- ⑤ OKボタンをクリックして登録完了です。
* [CS&T Beadsの場合は、以下⑥～⑩のBeads Lot Transferを実施してから、Characterization QC \(p.137\) を実施してください。](#) ⑥～⑩の操作を行わないと、登録したTube/Reference settingの感度を正しく維持できなくなります。
* [FC Beadsの場合は、p.138-139に進んでください。](#)
- ⑥ Setup & QCのアイコンを選択し、Taskの右端にある▼をクリックします。プルダウンメニューから[CS&T Bead Lot Transfer]を選択します。
- ⑦ Old およびNew CS&T Bead Lot IDが表示されるので、それぞれのLot IDを選択します。
- ⑧ SITにOld LotのCS&T Beads入りチューブをセットし、Startをクリックします（通常のQCと同じ濃度で希釈してください）。
- ⑨ Old LotのBeadsの設定終了後、New lot のbeads入りチューブをセットします。チューブをSITにセットすると自動的に取り込みを開始します。
- ⑩ 設定終了後、レポート確認のメッセージが表示されます。



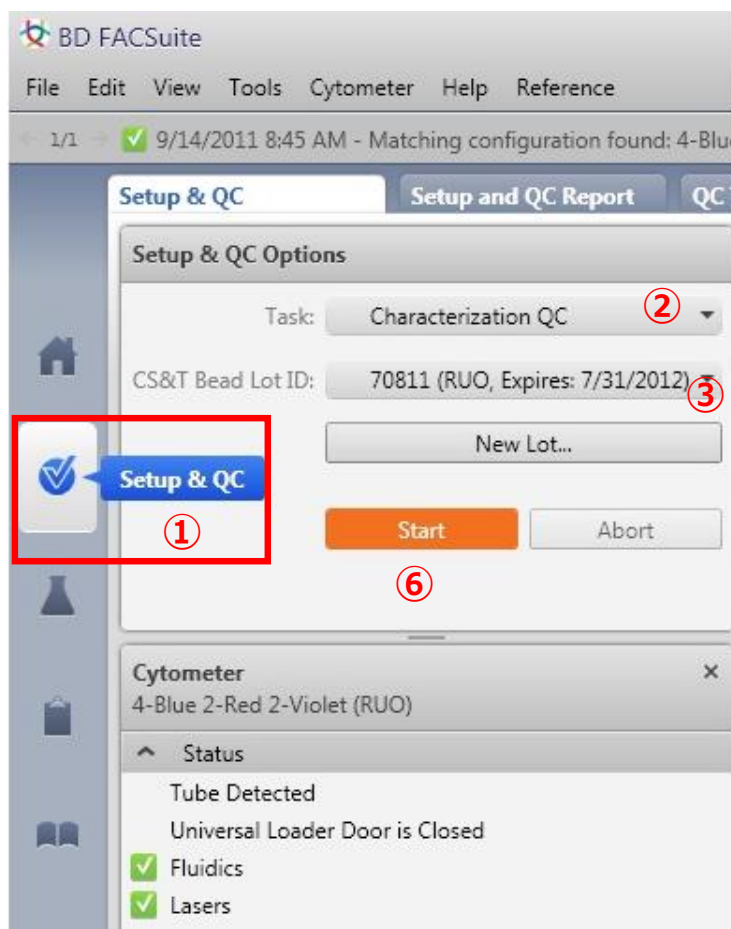
Characterization QCの実施

前回のCharacterization QCから180日間以上経過している場合や、新しいロットのCS&T Beadsを使用し始める場合は、Characterization QCを実施します。

* 日々の精度管理であるPerformance QCでは、Characterization QCの結果に基づいて機器の状態を判断します。Beads Lot間の違いを機器の異常と誤認させないため、新しいLot IDのCS&T Beadsの初回使用時や、同じLotを半年以上使用した場合は、下記の手順を実施してください。

- ① Set up & QCのアイコンをクリックします。
- ② Setup & QC OptionsのTaskメニューから [Characterization QC]を選択します。
- ③ CS&T Bead Lot IDタブから、ビーズボトルに記載されているLot IDを選択します。
- ④ 5mLチューブに下記を加えて攪拌します。
 - ・ BD FACSFlow 1.0 mL
 - ・ BD CS&T Beads 4滴

*CS&T Beadsは使用前に十分攪拌してください
*希釈後のビーズは冷暗所保存で24時間、15-25℃(遮光下)で8時間安定です
- ⑤ 調製したチューブをSITにセットします。
- ⑥ Startをクリックし、続く確認のメッセージで Continueを選択すると開始されます（約12~16分間）。
- ⑦ QC 終了後、レポート確認のメッセージが表示されたら、Yesをクリックします。
- ⑧ ビーズをSITから外します。乾燥防止に滅菌イオン交換水(DI水)を入れたチューブを取り付けます。
- ⑨ 表示されたレポートにて結果を確認します。
* 測定結果にErrorがある場合は、マニュアル p.57のトラブルシュートを実施してください。



FC Beads の調製

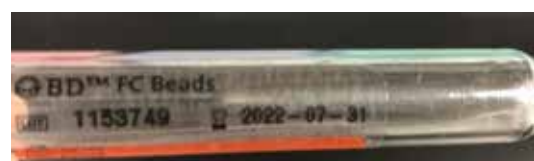
BD FC Beadsは、FACSLyric™における自動的な蛍光補正システムの維持のために使用するビーズです。P.139「FC Beads を用いたUpdate Reference Settings」にて使用します。

各キットには、下記の蛍光色素と結合したFC Beadsおよび希釈用のBeads Diluentが含まれています。

ご使用のFACSLyric™の仕様によって必要な試薬が異なります。

Cat. No	製品名	対応色素	価格	2レーザー 4/6カラー	3レーザー 8/10カラー	3レーザー 12カラー
656867	BD FC Beads 7-Color Kit	FITC, PE, PerCP-Cy5.5, PerCP, PE-Cy7, APC, APC-Cy7	¥70,000	○	○	○
661564	BD FC Beads 5-Color Kit	APC-R700, APC-H7, V450, V500-C, BV605	¥65,000		○	○
662996	BD FC Beads 2-Color Kit	BV711, BV786	¥38,000			○

- ① 製品を冷蔵庫から取り出し、室温に戻してから開封します。1本ずつチューブを取り出し、以降は遮光下で管理します（チューブのバッグは15秒以内に閉じ、速やかに冷蔵庫に保管します）。
*FC Beadsは吸湿により劣化すると、蛍光補正情報のずれが生じます。必ず1種類ずつ作業をしてください。
- ② 全てのチューブに**Beads Diluentを10滴（約0.5 mL）**添加します。
- ③ 3~5秒間Vortexをかけ、ビーズを均一に懸濁します。
- ④ 調製後のビーズは速やかに使用してください。保管する場合でも室温では暗所で1時間、2-8℃では暗所で4時間以内に使用してください。



FC Beads を用いたUpdate Reference Settings

BD FACSLyric™では、自動的な蛍光補正システムの維持のために60日間に1度のアップデートが必要です。前述のFC Beadsを使用したアップデート方法を紹介します。

* FC BeadsのLotが新しいLotに切り替わる場合は、FC BeadsのLot IDの登録(p.136)を実施してから、下記手順に進んでください。

- ① Setup&QCの画面を選択します。
- ② Setup&QC OptionのTaskより、[Update Reference Settings]を選択します。
*(v1.4以降の場合) Loading Optionより、測定方法を選択します。ローダーオプションを使用する場合は、Universal Loaderを選択し、Carrier Typeを適切に選択してください。
- ③ 更新したいReference Setting Name (Lyse WashまたはLyse No Wash) を選択します。
- ④ CS&T BeadsのLot IDを選択します。
- ⑤ Startボタンをクリックします。(ウインドウが表示されます。)
- ⑥ FC BeadsのLot IDを確認します。
- ⑦ Nextをクリックします。
- ⑧ CS&T Beadsを調製したチューブをセットします (サンプリングが始まります)。
* Suite v1.4でローダーを使用する場合は、表示されたレイアウト通りにチューブをセットしたラックをローダーにセットし、Acquireをクリックします。

登録に必要なもの

- CS&T Beads
- FC Beads

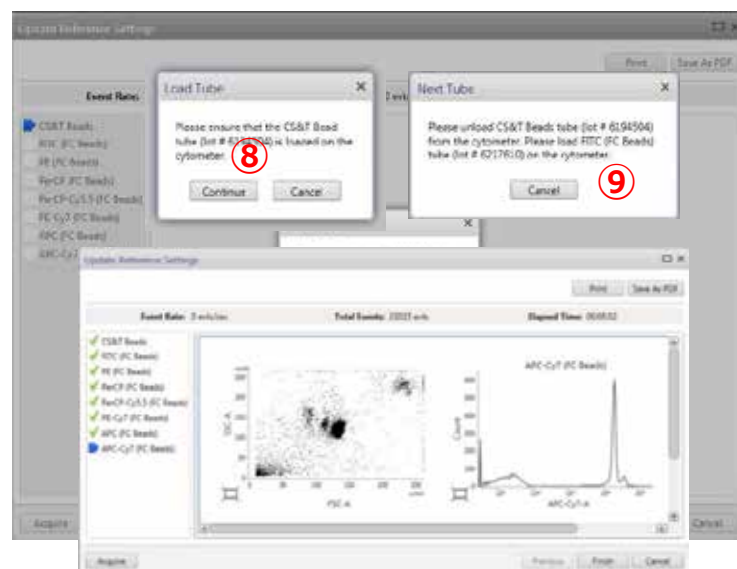
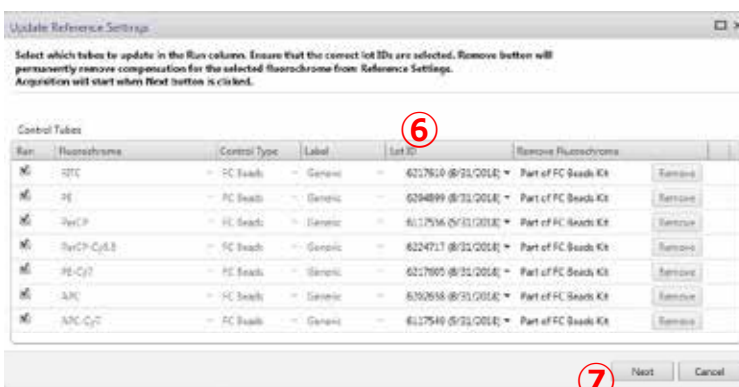
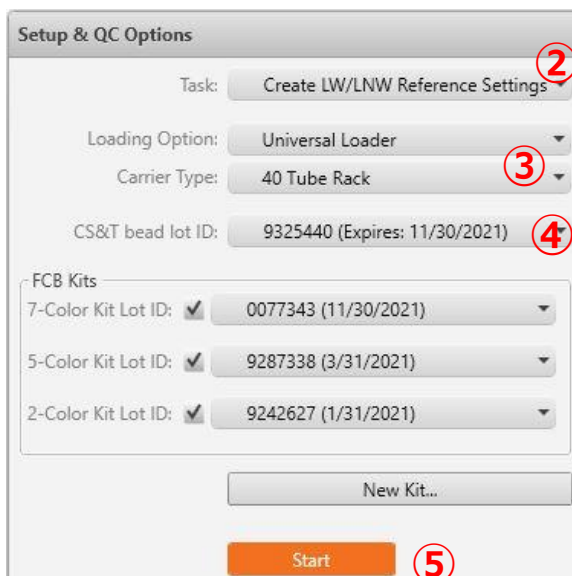
Run	Fluorescence	Control Type	Label	Lot ID	Remove Fluorescence
NC	QC	FC Beads	Generic	4217610 (8/31/2018)	Part of FC Beads Kit
NC	DE	FC Beads	Generic	6294899 (8/31/2018)	Part of FC Beads Kit
NC	WCP	FC Beads	Generic	4117536 (5/31/2018)	Part of FC Beads Kit
NC	WCP-Cy5.5	FC Beads	Generic	4224713 (8/31/2018)	Part of FC Beads Kit
NC	W-Cy7	FC Beads	Generic	6217605 (8/31/2018)	Part of FC Beads Kit
NC	APC	FC Beads	Generic	4102618 (8/31/2018)	Part of FC Beads Kit
NC	APC-Cy7	FC Beads	Generic	4117540 (5/31/2018)	Part of FC Beads Kit

- ⑨ (マニュアル測定の場合) CS&T Beads測定終了後は、FC Beadsをセットするようメッセージが表示されるので、メッセージ記載の蛍光色素名のチューブをセットします。
- ⑩ 順番にすべてのFC Beadsを機器で流します。
*FC Beadsを使ったUpdateではゲートは表示されません。
- ⑪ Finishをクリックして終了します。続けて残るもう1つ (LWまたはLNW) をアップデートします。

<FACSuite v1.3以降>

Update Reference SettingでLW/LNWのアップデートが失敗する場合は、更新期日がアップデートされない場合は、Create LW/LNW Reference Settingsで登録することが可能です。

- ① Setup&QCの画面を選択します。
- ② Setup&QC OptionのTaskより、Create LW/LNW Reference Settingsを選択します。
- ③ (v1.4以降) Loading Optionより、登録時のセット方法を選択します。ローダーオプションがある場合はUniversal Loaderと、Carrier Typeを適切に選択してください。
- ④ CS&T Beads Lot IDでは現在使用しているLot IDを選択します。
* (v1.4以降) FC Beadsのロット情報も確認、変更します。
- ⑤ Startボタンをクリックします
- ⑥ 表示されたウィンドウで、FC BeadsのLot IDを確認します。
- ⑦ Nextをクリックします。
- ⑧ CS&T Beadsを調製したチューブをセットするか、ローダーの場合はラックをセットしてAcquireをクリックします。
- ⑨ CS&T Beadsの測定終了後、FC Beadsをすべて流します。
*FC Beadsの場合はゲートは表示されません。
- ⑩ Finishをクリックして終了します。
* LWとLNWの二つの設定が同時にアップデートされます。



データベースのメンテナンス

FACSuiteのワークステーションでは、不要なデータが蓄積するとパフォーマンスの低下が起こる可能性があります。適切なデータベース管理を行ってください。

毎週 不要なWorklistをExportし、削除してください (p.131)

必要に応じて

- BD FACSuite Backup and Restore Utilityを使用してデータベースのバックアップを作成します。

* BD FACSuite Backup and Restore Utilityを用いたバックアップは、あくまでも補助的な機能です。まれに予期しない事象が発生した場合、バックアップデータが復元できない可能性があることをご了承ください。通常のバックアップ作業として、各種のファイル (Experiment, FCS file, worklist, assay, Tube setting, Reference setting) ごとのExportを必ず実施してください。

* 一括のバックアップ及びリストアを行うソフトのため、以下の注意点があります。

1. 個別のデータのみを戻す事はできません。戻すにはリストアを行う必要があり、その場合、バックアップを行った時点で全てのデータがリストアされますので、それ以降に取得したデータは全て消去されてしまいます。
2. データベース全体のバックアップであるため、リストアを行うと精度管理やTube Settingsなども全てバックアップを行った時点の状態に戻ります。

- ① FACSuiteソフトウェアが起動していない状態で、デスクトップにあるBD FACSuite Backup and Restore Utilityのアイコンをダブルクリックします。
- ② 表示されたウィンドウで[Back Up]をクリックします。
*データの保存先を変更する場合は、[Change Settings]より任意の場所を指定します。
- ③ 続けて表示された画面でも[Back Up]をクリックします。
- ④ バックアップ完了後、BD FACSuite Backup Utilityを終了します。
*古いデータは適宜消去してください。
*バックアップファイルのファイル名は変更しないでください。

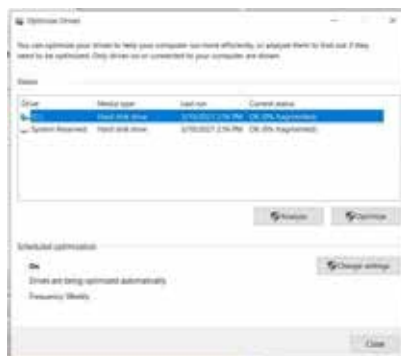


- ハードディスクのデフラグを実施します。

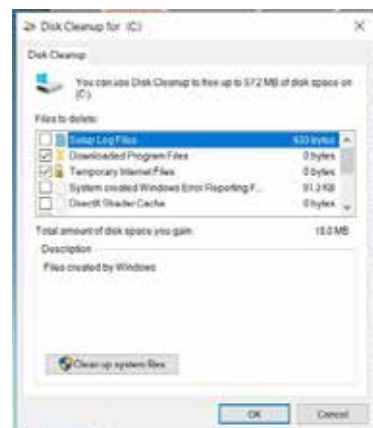
Windowsボタンをクリックして、“Defragment and Optimize Drives”と入力します。AnalyzeとOptimizeによって、ハードディスクを最適化します。

- Disk Cleanupを実施します。

Windowsボタンをクリックして、“Disk Cleanup”で検索し、選択します。Temporary fileのチェックがONの状態です。[OK]をクリックします。



Defragment and Optimize Drives



Disk Cleanup

流路系トラブルシュートの全体像

FACSuiteの流路系では、サンプルによる汚れや詰まりの発生、流路全体の汚染などにより、トラブルが起こる可能性があります。トラブルシュートの際は、症状に応じた対処方法を実施してください。



測定パターンがふらつく、ノイズが発生する

原因: フローセルへの気泡付着

対処法: 測定パターンの変化、ノイズの増加を認識したらただちに測定を中断し、Drain and fill flowcellを実施する。解消しない場合は本体再起動（流路シース液が大量に流れる）。



さらに

気泡の付着が頻発する

原因: フローセルの汚れ

対処法: Clean cuvette, Monthly cleanを実施する。

サンプルの流れが遅い、流れない

原因: サンプルラインの詰まり

対処法: サンプル速度の低下を感じたら、Daily cleanを実施する。定期的に速度低下が起こる場合は、普段からDaily cleanを2回実施する。解決しない場合はMonthly cleanを実施する。それでも改善しない場合や、完全に閉塞している場合はサンプルラインを交換する。

SIT Flush時に液漏れ

原因: 洗浄液吸引ラインの詰まり

対処法: SIT部分にClean液を触れさせながら、SIT Flush数回実施（その後滅菌イオン交換水(DI水)で同様にすすぐ）

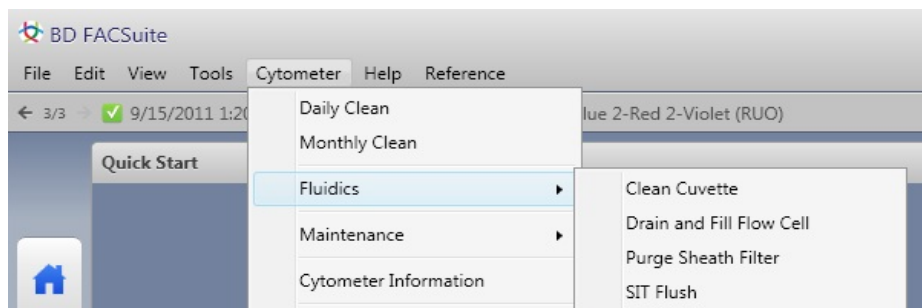
SIT Flushが動作が鈍い

原因: チューブセンサーの固着

対処法: 動作の鈍さを感じたらチューブを強く着脱するのを繰り返す
*防止策: 原因はサンプルチューブ内溶液の液はねによる塩析なので、溶液を入れすぎない、取り付け時は垂直にゆっくりと行い、液がはねないようにします。

流路系のメンテナンス

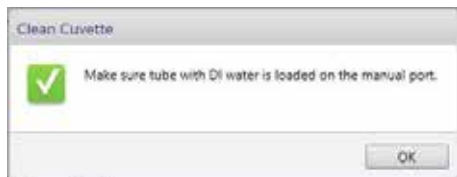
FACSLyric™を適切な状態で使用するには、流路系の洗浄操作が必要です。



< Clean Cuvette > 12分間

FACSCleanでフローセル内の汚れを除去します。

- ① CytometerメニューからFluidics > Clean Cuvetteをクリックします。
- ② FACSClean 2mLを入れたチューブをセットし、メッセージのOKをクリックします。



- ③ 約2分後、洗浄液の吸引が終わります。更に5分間待ち、内部のつけ置きをします。
- ④ Drain and Fill Flow Cellを2回実施して洗浄液を除去します。

< Drain and Fill Flow Cell > 2分間

フローセル内部の気泡を除去します。

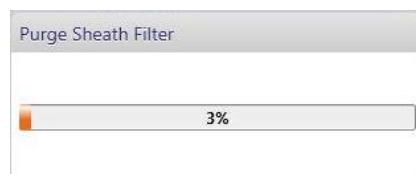
- ① CytometerメニューからFluidics > Drain and Fill Flow Cellをクリックします。
- ② DW 2mLを入れたチューブをセットし、OKをクリックします。



< Purge Sheath Filter > 2分間

機器内部のシースフィルターの気泡を除去します。

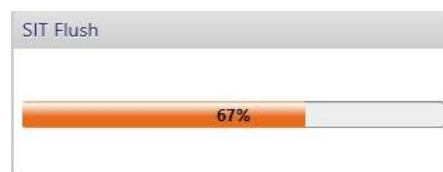
- ① DW 2mLを入れたチューブをセットします。
- ② CytometerメニューからFluidics > Purge Sheath Filterをクリックします。



< SIT Flush > 数秒間

シース液を逆流させ、ライン内の洗浄を行います。サンプルが流れなくなったとき、付着しやすいサンプルを流した後に行います。

- ① SITにチューブがついている場合は取り外します。
- ② CytometerメニューからFluidics > SIT Flushをクリックします。

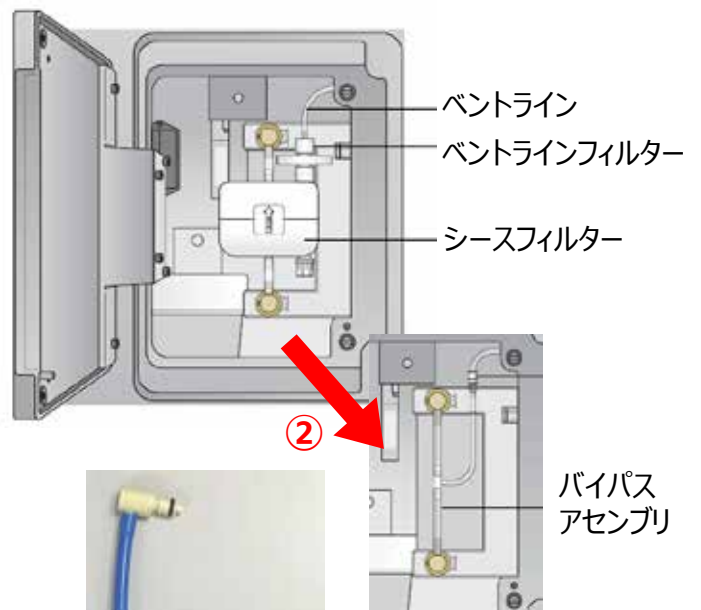
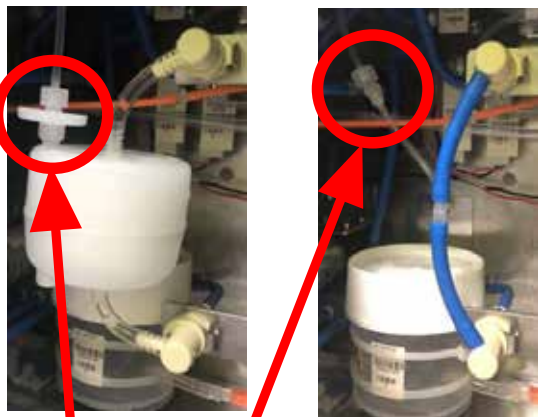
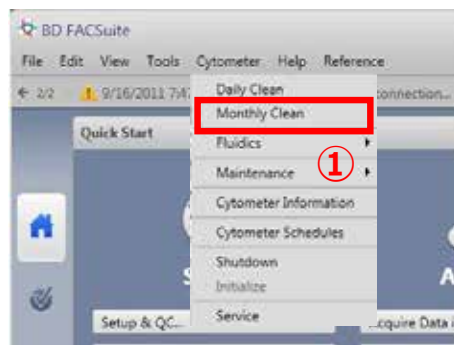


Monthly cleanの実施① (シースタックを使用している場合)

Monthly cleanでは、シーズ液が流れる流路とフローセルを洗浄することができます。月に一度の頻度での洗浄を推奨しています。準備も含めて30分必要です。

Monthly cleanの方法は、シーズ液の供給方法の違いにより2通りの方法があります。以下では、シーズ液の供給方法が「シースタックを使用している場合」と「FACSFlowの箱から直接シーズ液を供給している場合」のそれぞれのMonthly clean実施方法について記しますので、適合する方法で実施してください。

- ① CytometerメニューのMonthly Cleanを選択します。
- ② 本体のシーズフィルターをバイパスしてください。
 - ・ シーズフィルター上下のコネクター、ベントライン（ベントラインフィルターの上から）を外します。フィルターからシーズ液が漏れないようご注意ください。
 - ・ バイパスアセンブリを取り付けます。



バイパスアセンブリの細いチューブをベントラインに確実に取り付けてください。取り付けが緩い場合、液漏れが発生し機器の破損が生じます。

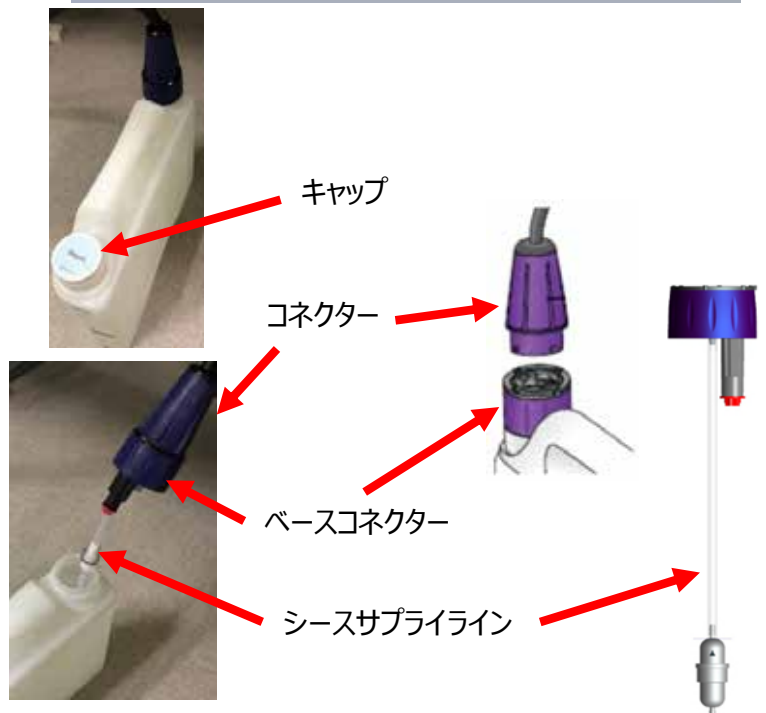
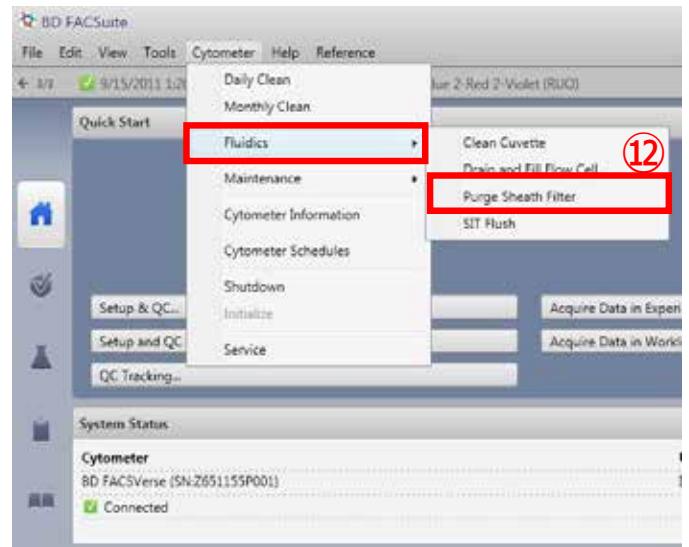
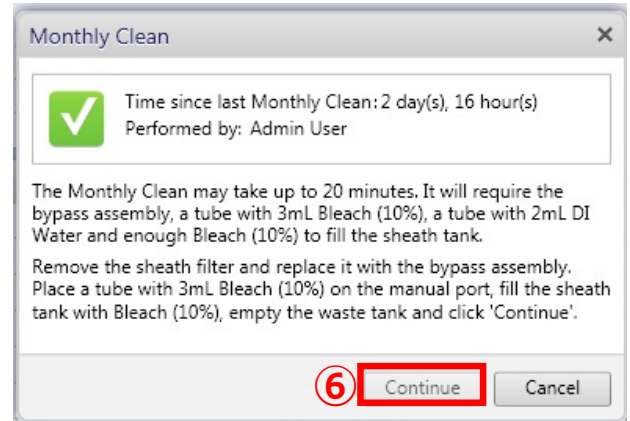
- ③ 2 mLのFACSCleanを入れたチューブをSITに取り付けます。
- ④ シースタンク内のシーズ液を廃棄します。
- ⑤ シースタンクにFACSCleanを2L以上入れます。FACSCleanは最低でも2Lは必要です。



- ⑥ 表示されたメッセージのContinueをクリックします。(FACSCleanのステップには約10分間かかります)
- ⑦ FACSCleanのサイクルの終了後、SITのチューブを滅菌イオン交換水(DI水)3mL入りのチューブに交換します。
- ⑧ シースタンクに残ったFACSCleanを廃棄し、下記手順にてシースタンク内およびシースサプライラインを洗浄します。

洗浄手順

1. シースタンクからコネクタを外します。(ベースコネクタは外しません)
 2. シースタンクのキャップを外し、残ったFACSCleanを廃棄します。
 3. シースタンクにDI水を1L以上入れ、キャップを取り付け、こぼれないように注意しながらシースタンクを振り、すすぎます。
 4. キャップを外し、シースタンクを空にします。
 5. 3、4の手順を2回繰り返します。
 6. ベースコネクタを取り外し、DI水にてシースサプライラインを30秒以上流し洗います。
- ⑨ シースタンクにシース液を入れ、ベースコネクタ、コネクタを取り付けます。
 - ⑩ メッセージ画面のContinueをクリックして洗浄操作を再開します(約10分間、終了後Monthly Cleanのメッセージが消えます)。
 - ⑪ 手順②で取り付けしたシースフィルターのバイパスアセンブリを外し、シースフィルターを取り付けます。
 - ⑫ メインメニューのCytometerからFluidics>Purge Sheath Filterを2回実施し、シースフィルターに気泡が無いことを確認します。

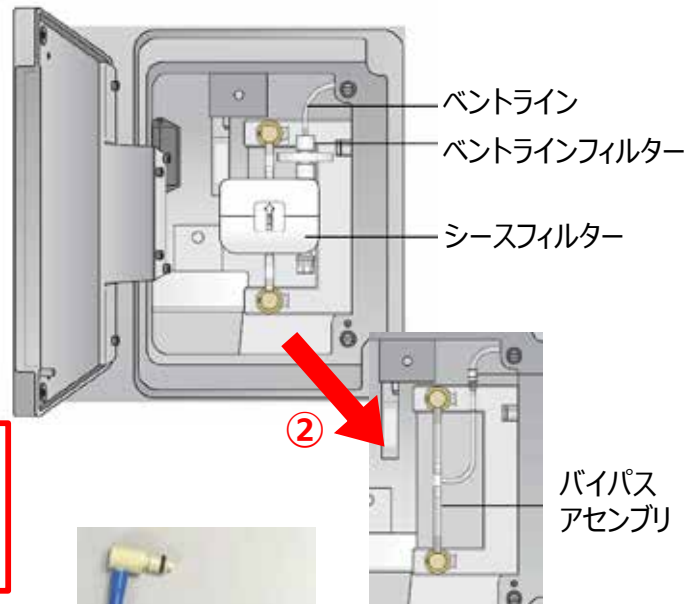
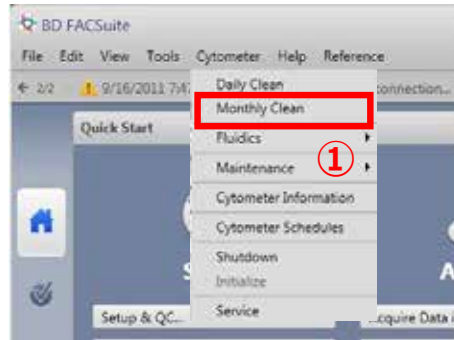


* **Monthly clean**の操作は必ず最後まで完了させてください。中断した場合は未完了の履歴が残り、測定ができなくなります。一旦Monthly cleanを呼び出し、完了させると可能になります。

* 機器を長期間使用しない場合は、シース液補充のステップを、滅菌イオン交換水(DI水)に変えてください。使用していない期間に塩析してしまう事を防ぎます。

Monthly cleanの実施② (FACSFlowの箱から直接シース液を供給している場合)

- ① CytometerメニューのMonthly Cleanを選択します。
- ② 本体のシースフィルターをバイパスしてください。
 - ・ シースフィルター上下のコネクター、ベントライン（ベントラインフィルターの上から）を外します。フィルターからシース液が漏れないようご注意ください。
 - ・ バイパスアセンブリを取り付けます。

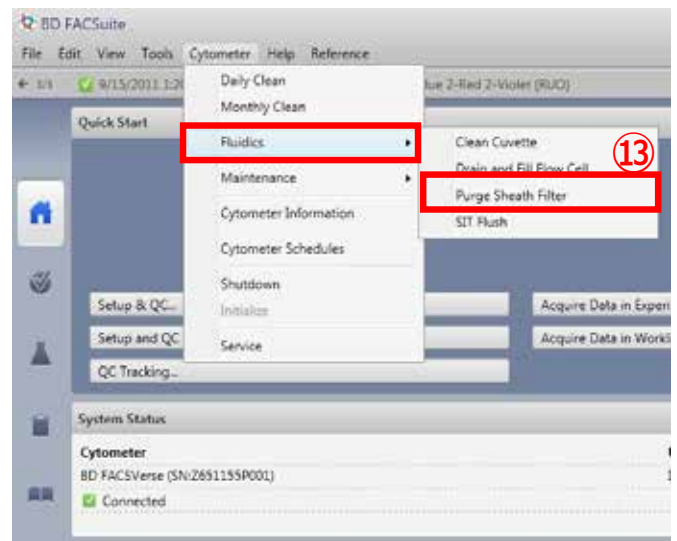
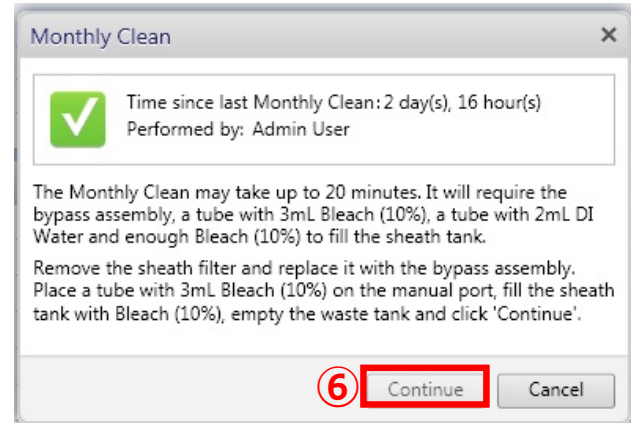


バイパスアセンブリの細いチューブをベントラインに確実に取り付けてください。取り付けが緩い場合、液漏れが発生し機器の破損が生じます。

- ③ 2 mLのFACSCleanを入れたチューブをSITに取り付けます。
- ④ FACSFlowの箱からベースコネクターを取り外し、FACSCleanの箱にベースコネクターを取り付けます。（FACSCleanは最低でも2Lは必要ですのでFACSCleanの残量を事前に確認します）



- ⑥ 表示されたメッセージのContinueをクリックします。(FACSCleanのステップには約10分間かかります)
- ⑦ FACSCleanのサイクルの終了後、SITのチューブを滅菌イオン交換水 (DI水) 3mL入りのチューブに交換します。
- ⑧ コネクターとベースコネクターを分離し、FACSCleanの箱からベースコネクターを取り外します。
- ⑨ 取り外したベースコネクター下部のシースサプライラインを、DI水にて30秒以上洗い流します。
- ⑩ ベースコネクターをFACSFlowの箱に取り付けます。
- ⑪ メッセージ画面のContinueをクリックして洗浄操作を再開します (約10分間、終了後 Monthly Cleanのメッセージが消えます)。
- ⑫ 手順②で取り付けしたシースフィルターのバイパスアセンブリを外し、シースフィルターを取り付けます。
- ⑬ メインメニューのCytometerからFluidics> Purge Sheath Filterを2回実施し、シースフィルターに気泡が無いことを確認します。



* Monthly cleanの操作は必ず最後まで完了させてください。中断した場合は未完了の履歴が残り、測定ができなくなります。一旦Monthly cleanを呼び出し、完了させると可能になります。

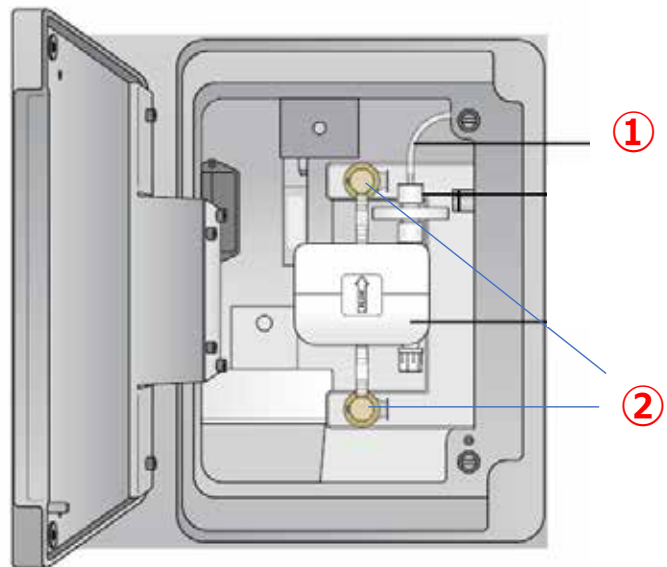
* 機器を長期間使用しない場合は、シース液補充のステップを、滅菌イオン交換水(DI水)に変えてください。使用していない期間に塩析してしまう事を防ぎます。

シースフィルター/シースサプライラインフィルターの交換

シースフィルター、シースサプライラインフィルターの交換方法です。
使用頻度にもよりますが、交換頻度の目安は3か月ごとです。

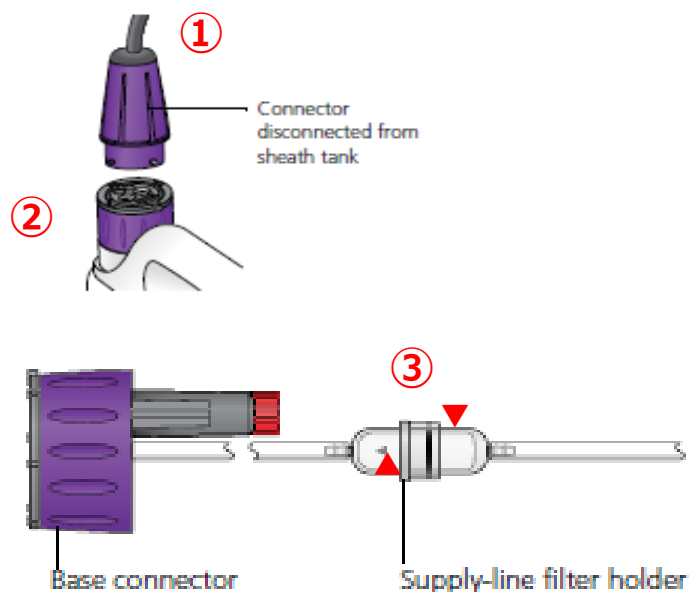
<シースフィルターの交換>

- ① 周囲をペーパータオルで覆いながら、シースフィルターの上部のベントラインをベントラインフィルターの上で外します。
- ② 上下のコネクターを外してシースフィルターを取り外します。
- ③ 新しいシースフィルターを、シールが↑の向きになるように接続します。
- ④ ベントラインを接続します。
- ⑤ CytometerメニューからFluidics> Purge Sheath Filterを2回実施します。
- ⑥ 上下のコネクターのみを外し、シースフィルターをたたいて気泡を上部に集めます。
- ⑦ 上下のコネクターを接続し、Purge Sheath Filterを実施します。これを気泡が出なくなるまで繰り返します。
- ⑧ 全てのコネクタを正しく接続して終了します。



<シースサプライラインフィルターの交換>

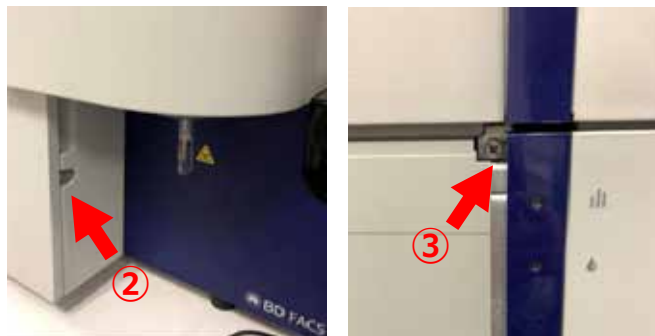
- ① 紫のシースタンクコネクターを反時計回りに回して本体から取り外します。
- ② シースタンクについているBase Connectorをはずします。
- ③ 手袋をした状態で、フィルターホルダーの左右を持ち、▲▼の向きに回転させ、左右に引っ張り、ホルダーを開きます。
- ④ 白いフィルターを取り出します。
- ⑤ 新しいサプライラインフィルターをセットし、ホルダーやコネクタを元に戻します。



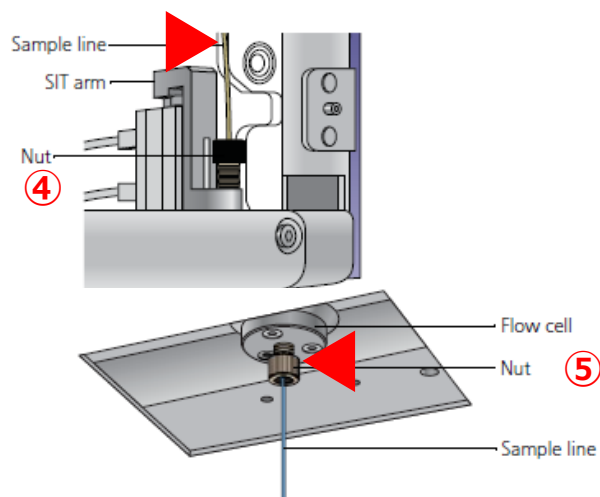
サンプルラインの交換

測定時のサンプリングを行うラインの交換方法です。サンプルラインが汚れで詰まったり、サンプルの流れが遅くなって洗浄でも解消しない場合は、サンプルライン自体を交換します。

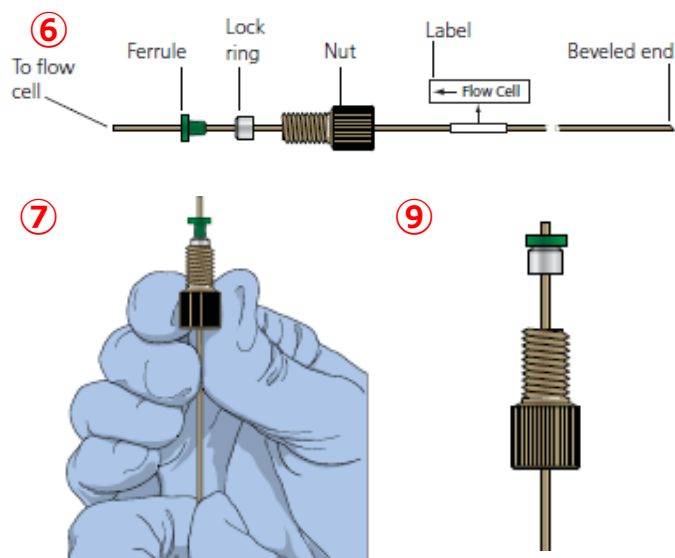
- ① FACSLyric™をシャットダウンし、本体右後方のCircuit BreakerをOFFにします。
- ② FACSLyric™の正面のドアを固定しているネジを緩め、扉を開きます。
- ③ 更に内側のSIT doorのネジを完全に緩め、SIT doorを開きます。本体内のsample lineが見えます。
- ④ Nutを緩めSample line (▼) をSIT armから取り除きます。
- ⑤ フローセルの底部からNut(▼) を緩めてsample lineを引き抜いてください。古いSample lineは医療廃棄物として廃棄してください。
- ⑥ 新しいsample lineにNut, Lock ring, Ferruleの順に取り付けます（操作は清潔な作業スペースで行ってください）。Sample lineには向きを示すシールが貼ってあるため、向きを間違えないでください。
- ⑦ Ferruleからsample lineの先端が少し出るようにします。
- ⑧ Sample lineをFlow cellの下部に軽く当たるまで差し入れ、Nutを締めます。
- ⑨ Nutを緩めてFerruleの先にLock ringがセットされていることを確認します。
- ⑩ 再度Nutを締め、フローセル底部にサンプルラインをしっかり固定します。



<古いサンプルラインの取り外し>

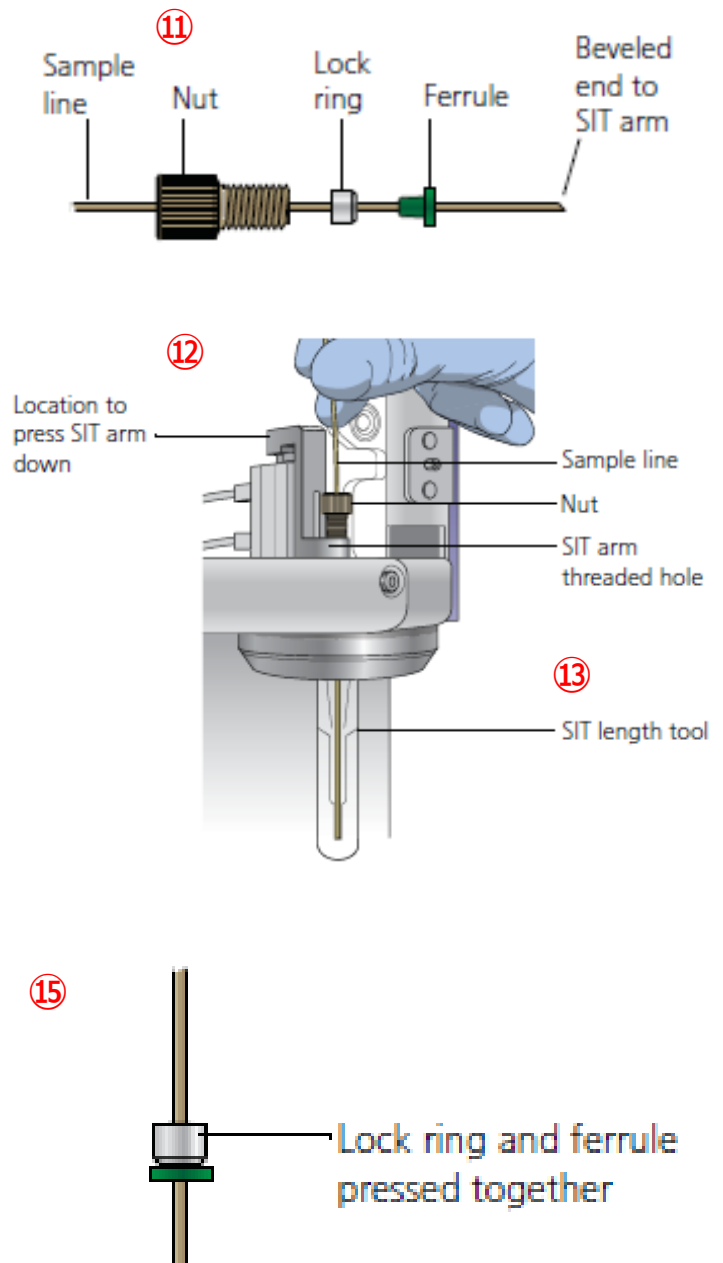


<サンプルラインの構造: フローセル側>



- ⑪ SIT arm側のSample LineにNut, Lock ring, Ferruleをセットします。
- ⑫ Sample lineを下端をSIT armに差し込みます。
- ⑬ SIT length toolをManual tube portに取り付けます。
- ⑭ Sample lineをSIT length toolの底に当たるまで差し込み、SIT armを下げた状態でNutを締めます。
- ⑮ 一旦Nutを緩めSample lineを引き抜き、Ferrule, Lock ringが正しく装着されているか確認します。
- ⑯ 再度Nutを締め、SIT length toolを取り外します。
- ⑰ SIT doorと正面ドアを閉めます。
* 次回本体を起動する場合は、本体右後方にあるCircuit BreakerをONにして、電源を入れて下さい。

<サンプルラインの構造: SIT側>



Laser Setup (レーザー光軸調整)

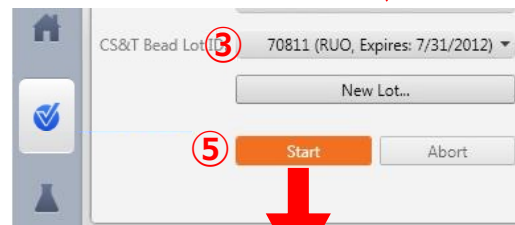
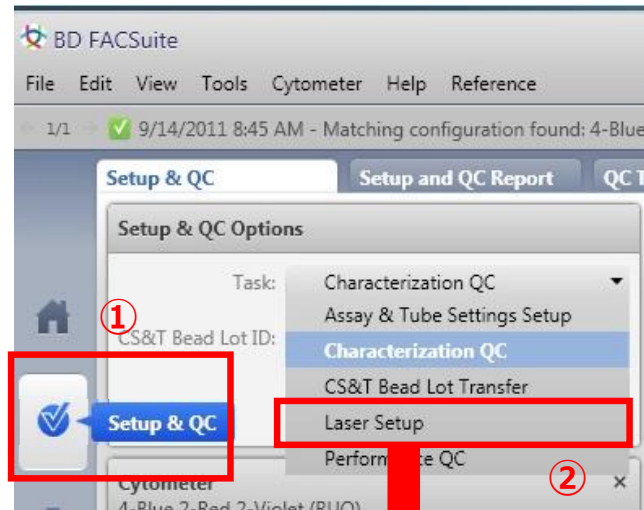
Laser setup はPerformance QCが%rCV値の上昇によりFailした際に、フローセル・流路の洗浄等を行っても改善しなかった場合に行います。この操作によりレーザー光軸の調整が実施されます。

【重要】Laser Setupは、Monthly Cleanを行ってもQCに関するエラーが解決しない場合に実施してください。

- ① 画面左のNavigation barからSetup & QCを選択します。
- ② Setup & QC画面のTaskからLaser setupを選択します。
- ③ CS&T Beads Lot IDが使用するCS&T Beadsと一致することを確認します。
- ④ CS&T Beadsを下記のようにチューブに調製し、SITにセットします。
 - ・ BD FACSSlow 1.0 mL
 - ・ BD CS&T Beads 4滴
- ⑤ Start をクリックし、Laser setupを開始します。(約8分間)

チェック終了後、pQCと同様にレポートを確認し、問題が解消したか確認してください。

*この操作では、光軸調整後にpQCが続けて行われます。結果がPassの場合は、サンプル測定に進んでください。



FACSLyric™ 消耗品リスト

Cat No.	製品名
	溶液
342003	BD FACFlow (20L)
340345	BD FACSClean (5L)
	QC Beads
656504	BD CS&T CE-IVD Beads (50 test)
656505	BD CS&T CE-IVD Beads (150 test)
656867	BD FC Beads 7-Color Kit (5 test)
661564	BD FC Beads 5-Color Kit (5 test)
662996	BD FC Beads 2 -Color Kit (5 test)
	メンテナンス用品
651451	BD FACSLyric™ シースフィルター (1個)
652531	シースサブラインフィルター (1個)
654366	シースラインサブライコネクタ (BD FACFlow, BD FACSClean用)
652468	サンプルライン (1個)
649760	Ferrule / Lock ring (1個、サンプルライン-本体固定用)
648287	シースタンク 5L
648895	シースタンク 10L
651535	シースタンク用ふた
650647	シースタンクふた用シール (シース)
650646	シースタンクふた用シール (廃液)

* 価格、納期につきましてはご利用の代理店にお問い合わせください。

Section 9

トラブルシューティング

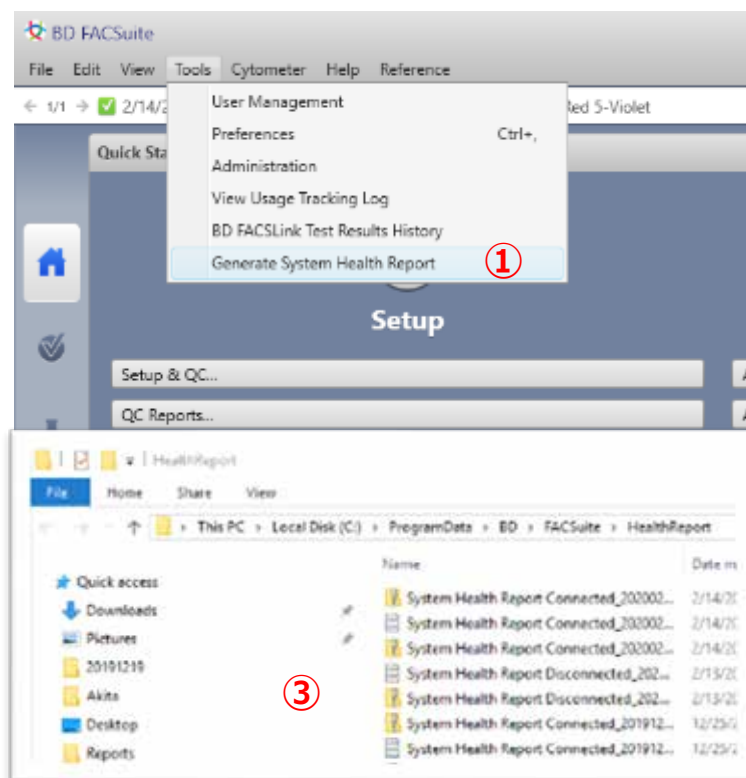
項目	ページ
System Health Reportの作成	154
BD FACSLyric™本体のトラブルシューティング	155
BD FACSuite™ソフトウェアのトラブルシューティング	159
Universal Loaderのトラブルシューティング	164

System Health Reportの作成

FACSLyric™使用中のシステムのログを出力する方法です。機器トラブルの確認のために、弊社ホットラインよりレポートファイルの作成と共有をお願いする可能性があります。

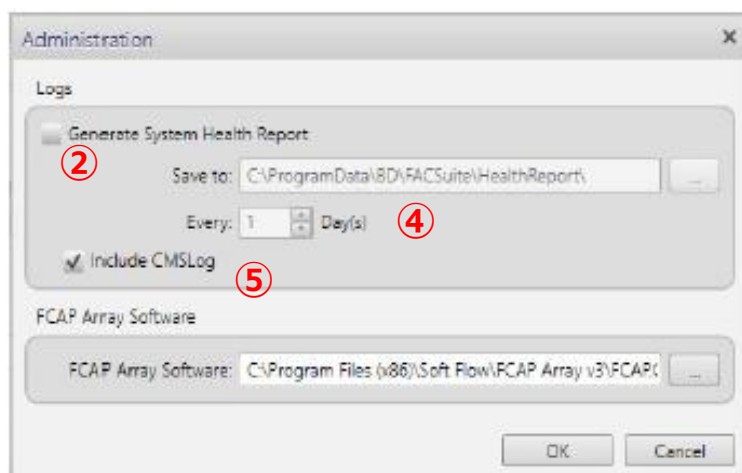
FACSuiteソフトウェアでは、ソフト動作中の様々なログを残し、必要時に出力することができます。このレポートは機器使用中のトラブルの解析に非常に重要なデータです。緊急時には、機器状態を把握するために必要になるため、下記方法でレポートを作成してください。

- ① Toolsメニューをクリックし、Generate System Health Reportを選択します。
- ② 保存先フォルダーが自動表示されます。
- ③ 出力されたレポート（.txtファイルと.zipフォルダー）をポータブルメディアにコピーします。




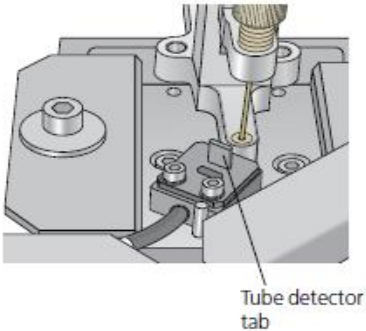
定期的な自動出力の設定も可能です。

- ① Toolsメニューより、Administrationを選択します。
- ② 表示されたウィンドウで、Generate System Health ReportのチェックをONにします。
- ③ Save toで保存先を指定します。
- ④ Everyで保存頻度を設定します（初期設定は30日間）。
- ⑤ Include CMSLogのチェックもONにします。
*CMS Logは機器本体のログです。このチェックを入れることにより、システムと本体両方のログが自動保存されるようになります。
- ⑥ OKをクリックします。



BD FACSLyric™本体のトラブルシューティング

症状	考えられる原因	解消方法
サイトメーターの電源がONにならない	電源コードが抜けている	本体右後方の電源コードの接続を確認してください。
	Circuit BreakerがOFFになっている	本体右後方にある白いスイッチをONにしてください。
サイトメーターがソフト操作に反応しない	キーボードやマウスが外れている	PCへの接続を確認してください。
	ソフトとサイトメーター間で通信ができていない	① PCとサイトメーターの電源をOFFにします。サイトメーターの電源を切る場合は、本体右側面の電源スイッチを長押ししてください。 ② LANケーブルを差し直します。 ③ サイトメーター、PCを再起動します。 上記の方法でも接続しない場合は、弊社テクニカルサポートホットライン(0120-7099-12)にご相談ください。
	ファイアウォールが作動している	機器をネットワークに繋いでいる場合は、御施設のシステム管理者にご相談のうえ、サイトメーター用にファイアウォールを開いてください。 詳細については弊社のテクニカルサポートホットライン(0120-7099-12)にご相談ください。
	サイトメーターのイニシャライズが失敗している	CytometerメニューのInitializeをクリックします。
Pre-programed Startupを設定しているのに、サイトメーターが起動していない	FACSuiteソフトを終了している	Pre-programed Startupを使用する場合は、前回の機器使用終了時にソフトを起動したままにしてください。
	Circuit BreakerがOFFになっている	本体右後方にある白いスイッチをONにしてください。
Manual Tube Portに測定チューブをセットできない	形状の合わないチューブを使用している	機器に使用可能なチューブをセットしてください。FACSLyric™で使用可能なチューブについては、p.50をご参照ください。
	チューブがしっかり固定されていない	チューブの取り付けの際は、Manual Tube Portに向けて、カチッと音がするまで押し上げてください。
	チューブアダプターをつけていない、割れている	1.5 mL、15mL、50mLチューブには付属のチューブアダプターが必要です。もし接続部などが割れている場合は、新しいものをご用意ください。
Manual Tube Portに測定チューブをセットできない	Manual Tube Portが汚れている	水で湿らせたキムワイブや綿棒で、Manual Tube Portの Inner Recessed Areaをクリーニングしてください。 

症状,	考えられる原因	解消方法
チューブを外しているのに、Manual Tube Portのランプが付かない	チューブセンサーが固着している	<p>機器内部のチューブセンサーをクリーニングしてください。</p> <ol style="list-style-type: none"> ① サイトメーターをOFFにし、Circuit BreakerをOFFにします。 ② 本体前面ドアと、ドライバーでSITドアを開きます。 ③ Tube Detector Tabを上から押します。周りに塩析がある場合は、湿らせた綿棒などで除去してください。  <p style="text-align: center;">Tube detector tab</p>
サンプルラインが降りてくるのに時間がかかる	レーザーがアイドル状態になっていた可能性がある	レーザーウォーミングアップ終了後、もしくは最後に測定を行ってから10分以上経過すると、レーザーの出力状態は、低出力のアイドル状態に移行します。測定時には5秒以内にフルパワーの測定可能な状態に戻ります。ただし、この5秒間を終了する前に、センサーがレーザー出力を計測するとLaser power out of rangeの警告を発することがあります。その後同じメッセージが続かなければ問題ありません)
測定しようとするLaser power out of rangeの警告が表示される		
サンプルが吸引されない	Daily/Monthly cleanが完了のステータスになっていない	前回起動時にDaily/Monthly cleanの操作が中断された場合は、サンプルをセットしてAcquireしても、サンプルは吸引されません。一旦クリーニングメニューを呼び出し、完了させる必要があります。
イベントレートが低い	Thresholdが高すぎる	Thresholdを下げてください。
	サンプルが沈殿している	サンプルをよく混和してから機器に取り付けてください。
	サンプルが薄すぎる	サンプルを一旦遠心して濃縮するか、Flow Rateを上げてください。
	サンプルラインが折れているか詰まっている	<p>下記の方法をお試しください。回復しない場合はサンプルラインの交換を行ってください。(Section 8参照)</p> <ul style="list-style-type: none"> • SIT Flushを数回行ってください。 • Drain and Fill Flow Cellを行って下さい。 • Daily Cleanを実施してください。 • Monthly Clean を実施してください。

症状	考えられる原因	解消方法
イベントレートが高い	Thresholdが低すぎる	Thresholdを上げて下さい。
	複数のThresholdを設定している場合に、ORの設定になっている	複数のパラメーターでThresholdを設定する場合は、ANDの設定にしてください。
	サンプルが濃すぎる、Flow Rateが高すぎる	サンプルを希釈するか、Flow Rateを下げてください。
イベントレートが安定しない	フローセルに気泡が入っている	SIT Flushを数回行ってください。 Drain and Fill Flow Cellを行って下さい。
	シースフィルターが汚れている	シースフィルターを交換してください（Section 8参照）
	サンプルラインが折れているか詰まっている	下記の各方法でイベントレートが回復するかお試しください。回復しない場合はサンプルラインの交換を行ってください。（Section 8参照） <ul style="list-style-type: none"> • SIT Flushを数回行ってください。 • Drain and Fill Flow Cellを行って下さい。 • Daily Cleanを実施してください。 • Monthly Clean を実施してください。
CV値が高い	フローセルに気泡が入っている	SIT Flushを数回行ってください。 Drain and Fill Flow Cellを行って下さい。
	Flow Rateが高すぎる	Flow Rateを下げてください。
	フローセルが汚れている	下記の方法をお試しください。 <ul style="list-style-type: none"> • Clean Cuvetteを行ってください • Daily Cleanを行って下さい • Drain and Fill Flow Cellを行って下さい。 • Monthly Clean を実施してください。
	ビーズ調製が間違っている	ビーズ調製方法をご確認ください。
	シースフィルターに気泡がたまっている	Purge Sheath Filterを数回実施してください。
	シース圧に問題がある	もしMonthly Cleaning後にバイパスチューブを外していない場合は、シースフィルターに戻して下さい。
	レーザーの光軸がずれている	Laser Setupを実施してください（Section 8参照）。
Low Laser Powerと表示される	レーザー出力が必要出力を下回っています	弊社テクニカルサポートホットライン(0120-7099-12)にご相談ください。

症状	考えられる原因	解消方法
Laser power out of rangeと表示される	前回の測定から10分以上経過したことで、レーザーが低電力状態になっている	サンプルを流し始めると低電力状態から回復します。5秒以上サンプリングしてからデータを保存してください。
	低電力状態が、5秒以上サンプルを流す前に記録された	レーザーの状態は15秒ごとに更新されます。それ以上待つとエラーが続かなければ問題ありません。
Monthly Cleanの後にpQC, cQCがFailになる	バイパスチューブを外していない	シースフィルターに戻して下さい (Section 8参照)。
	Monthly CleanでシースタンクにFACSCleanを入れ替えた場合や、タンク内アダプターを共有している場合は、すすぎ不足によりFACSCleanが流路に残っている	シースタンクやタンク内アダプターをよくDWで洗浄してください。
シース液の補充、廃液処理の後で、Fluidicsにエラーが出る	ソフトがタンクコネクタの再接続を検知していない	ソフトウェアの表示が切り替わるまでお待ち下さい。また、コネクタがきちんと接続されていることを確認してください。
SITの先端から液が漏れてくる	フローセルに気泡が入っている	下記の方法をお試しください。 ・ SIT Flushを数回行ってください。 ・ Drain and Fill Flow Cellを行って下さい。
チューブを外したとき、SITの表面に水滴がついている	チューブの取り付け時に、サンプルがはねた	サンプルを取り付ける際は、ゆっくり行って下さい。SITの外側についた水滴は、ペーパータオルで拭き取ってください。
サイトメーター下部から液がもれている	シースフィルターがしっかり接続されていない	シースフィルター上下のコネクタやパーズラインとの接続を確認してください。
	機器内部のバルブが故障した	サイトメーターの電源を切り、弊社テクニカルサポートホットラン (0120-7099-12) にご相談ください。漏れ出した液は拭き取ってください。

BD FACSuite™ソフトウェアのトラブルシューティング

症状	考えられる原因	解消方法
FACSuiteがサイトメーターと接続しない	サイトメーターの電源が入っていない	サイトメーターの電源を入れてください。
	サイトメーターのイニシャライズが失敗している	CytometerメニューのInitializeをクリックします。
	PCのファイアーウォールが作動している	機器をネットワークに接続している場合は、御施設のシステム管理者にご相談のうえ、サイトメーター用にファイアーウォールを開いてください。詳細については弊社のテクニカルサポートホットライン(0120-7099-12)にご相談ください。
	廃液タンクのコネクタが外れている	廃液タンクのコネクタが接続されているか確認してください。
	原因が特定できない場合	ソフトウェアとサイトメーターを一旦シャットダウンし、再起動してください。それでも問題が解決されない場合は、至急弊社テクニカルサポートホットライン(0120-7099-12)にご相談ください。
Security key not accessibleとメッセージが表示される	Security keyが外れている	USBポートにSecurity keyを接続し、ソフトウェアを再起動してください。
	Security keyが壊れている	弊社のテクニカルサポートホットライン(0120-7099-12)にご相談ください。
ソフトウェアの反応が遅い	表示負荷の大きなデータを表示している	画面に表示するオブジェクト（プロット、統計情報、ゲート、イベント数、パラメーター数）が増加すると、ソフトウェアのパフォーマンスが低下します。そのため、大量のデータを含むExperimentやWorksheetは複数同時に開かないようにしてください。また、ExperimentのImportでは、Importしたファイルを自動的にOpenしますので、大量のExperimentを同時にImportしないようにしてください。
ソフトウェアが反応しない	非常に大きなサイズのデータを保存している、操作している	画面が全く動かない場合、そのまま1～2分間お待ちください。それでも動作しない場合は、ソフトウェアを再起動します。
	非常に大きなデータの統計情報を計算している	操作を追加せず、数分お待ちください。
	サイトメーターの反応を待っている	サイトメーターの反応が終わるまでお待ち下さい。二分以上経過し、タイムアウトになった場合は、サイトメーターとソフトウェアを再起動してください。
	ソフトウェアがフリーズしている	Ctrl+Shift+Escよりタスクマネージャーを起動して、BD FACSuiteのタスクを終了します（保存されていないデータは失われます）。その後ソフトウェアを再起動してください。

症状	考えられる原因	解消方法
パスワードが違っているとメッセージが表示される	パスワードを忘れた	BAdministratorでログインし、Toolメニュー> User Managementよりパスワードを変更してください。
光学フィルターを認識しない	光学フィルターが奥までセットされていない	光学フィルターを押し、一番奥までセットしてください。
	フィルターホルダーが壊れている	弊社のテクニカルサポートホットライン(0120-7099-12)にご相談ください。
プロット上に大量のノイズが表示される	Thresholdが低すぎる	Thresholdを上げて下さい。
	染色サンプルが古い	サンプル調製方法、手技をご確認ください。
サンプルパターンに異常がみられる	機器設定が正しくない	散乱光、蛍光の測定感度をご確認ください。
	フローセルに気泡が入っている	SIT Flushを数回行ってください。 Drain and Fill Flow Cellを行ってください。
	フローセルが汚れている	下記の方法をお試しください。 ・ Clean Cuvetteを行ってください ・ Daily Cleanを行って下さい ・ Drain and Fill Flow Cellを行ってください。 ・ Monthly Clean を実施してください。
	Flow Rateが低すぎる	Flow Rateを一段階上げて下さい。パターンが見え始めたら元に戻します。
	Flow Rateが高すぎる	Flow Rateを下げてください。
	蛍光補正值が適切ではない	正しいTube SettingsやReference Settingを選択しているか確認してください。
	ゲートの設定が正しくない	ゲート設定を見直してください。
サンプリングを開始してもプロットにイベントが表示されない	TubeのRun Pointerの設定が間違っている	適切なTubeのRun Pointerを選択してください。
	異なるTubeに対応したプロットを見ている	プロットのPropertiesより、プロットに表示するデータ (Primary Data Source) を確認してください。
	Thresholdに設定しているパラメーターが適切でない	実験に合ったThresholdパラメーターを選択してください。
	測定Voltageが低すぎる、または高すぎる	測定パラメーターのVoltageを調整し、プロットのスケール内にサンプルデータをあわせてください。
	サンプル調製に失敗	サンプル調製方法を確認してください。

症状	考えられる原因	解消方法
蛍光シグナルが検出されない	Area Scalingの設定が正しくない	Performance QCを再度行って下さい。
	Laser Delayがずれている	Performance QCを再度行って下さい。
	サンプルが染色されていない	サンプルを作り直して下さい。
Electronic Abortが多い（全検出データの10%以上）	イベントレートが高すぎる	Flow Rateを下げてください。
	サンプルが濃すぎる	サンプルを希釈してください。
	Thresholdが低すぎる	Thresholdを上げてください。
	Window Extensionの設定が高すぎる	Window Extensionを下げてください。
Areaシグナルが低下し検出イベントが上昇する	Window Extensionの設定が低い	Window Extensionを上げてください。
AreaシグナルとHeightシグナルの片方がプロットスケールから外れる	Area Scalingがずれている	AreaデータとHeightシグナルが一致するように、Area Scalingを調整してください。
登録したTube settingを使用しても測定パターンが以前と異なる	Assay and Tube settings setupを実施していない	過去に登録したTube settingを使用する場合は、pQC後に過去の設定を再現する手順であるAssay and Tube settings setupを必ず実施してください。登録時から使用時までの期間に生じた機器自体の感度の変化によって、測定パターンがずれます。
	CS&T BeadsのLot変更時にBeads lot transferを実施していない	Tube settingの正確な再現には、CS&T Beadsのロットによる違いを移行するBeads lot transferの実施が必要です。新しいLot IDの登録後、Beads lot transferを実施してからCQCを実施する前に進んでください。
インポートしたAssayの機器設定が失敗する	データベース内のAssay Setup設定が見つからない	Assayをインポートした場合、Assay & Tube Settings Setupを実施してから使用してください。
多角形ゲートの頂点のポインターを動かさない	ゲートを選択できていない	キーボードのCtrlキーを押しながらゲートをクリックすると、ゲート頂点のポインターを表示することができます。
ゲートされたイベント数が少ない	プロットの軸に張り付いたデータがゲートに含まれていない	ゲートを再調整して、プロット軸上のデータも含めるようにしてください。
	ゲートの設定が正しくない	ゲートの階層性などを見直して下さい。

症状	考えられる原因	解消方法
ゲートされたイベント数が少ない	データ保存個数の設定 (Stopping Criteria) が正しくない	Tube PropertiesのAcquisitionより、Stopping Criteriaを確認してください。
	フローセルが汚れている	下記の方法をお試しください。 <ul style="list-style-type: none"> ・ Clean Cuvetteを行ってください ・ Daily Cleanを行って下さい ・ Drain and Fill Flow Cellを行ってください。 ・ Monthly Clean を実施してください。
	シースフィルターが汚れている	シースフィルターを交換してください (Section 8参照)。
	サンプル調製が適切でない	サンプル調製方法を確認してください。
Worklistでの測定後、FCSファイルや、ERPなどの自動出力データが出力されない	出力設定がされていない	ソフトのToolメニュー> Preference> WorklistよりExportの項目で、自動出力設定を有効にしてください。また、データの保存先も設定してください。
	測定したEntryのStatusがApprovedになっていない	EntryのStatusを確認してください。Approvedになっていない場合は、該当のEntryのワークシート画面に表示されるApproveのボタンをクリックし、自動出力を開始することができます。
Worklistで統計表示のCSVファイルが自動的に出力されない	様々な原因が考えられます	登録したAssayにて、出力したい統計表示の設定を確認します。統計表示のProperties> Generalタブ> Auto-Exportのチェックボックスをオンにしてください。
		ソフトのToolメニュー> Preference> Worklist> Export> Resultで、自動出力設定をオンにし、保存先を指定してください。
		EntryのStatusを確認してください。Approvedになっていない場合は、ワークシート画面のApproveのボタンをクリックし、自動出力を開始することができます。自動的にApprovedに設定する場合は、Library> Assay> User-Definedより、使用したいAssayの設定画面中にあるAuto-Approveをオンにしてください。

症状	考えられる原因	解消方法
FCSファイルをインポートするとFailed CRC value checkのエラーメッセージが表示される	FACSuiteでは、FCSファイルがファイルの移動によって変更されないことを保証するため、FCS3.0 standardに定められたCRC(巡回冗長検査)値メカニズムを使用しています。	FACSuiteのFCSファイルが変更されると、FACSuiteで読み込むことができません。オリジナルのFCSファイルに戻して下さい。
	FCSファイルがデータとともに書き込まれたCRC値を必要とするFCS3.0 standardを順守していない。	FCS3.0 を遵守したアプリケーションからFCSファイルを出力してください。

Universal Loaderのトラブルシューティング

症状	考えられる原因	解消方法
UALで測定できない	UALの故障	<p>ローダーの接続を無視して本体の測定動作ができるモードを実行できます。ただし、ローダーの機能を復旧するには弊社エンジニアによる訪問作業が必要ですので、必ず弊社テクニカルサポートホットライン (0120-7099-12)にご相談のうえ実施してください。</p> <p><Reconfigure without Loader></p> <ol style="list-style-type: none"> FACSuiteにAdministrator権限のあるアカウントでログインする。 CytometerメニューよりOptions > Reconfigure without Loaderを選択する。 ダイアログが表示されるので、Reconfigureをクリックする。 本体が再起動するので、起動動作が終了するまで待つ。 SIT length tool (サンプルラインの高さ調整用ツール) を使用し、手動測定に適した位置に調整する。
キャリアをロードできない	UALカバーが開いている	UALカバーを完全に閉じて下さい
	ラックの途中にチューブが引っかかっている	引っかかったチューブにUALカバーがぶつかり、完全に閉じていない可能性があります。チューブをセットしなおしてください。
	ネスト（黒い台）にラックやプレートがしっかり固定されていない	ラックやプレートを取り付け直し、ネストのグリップでしっかり固定してください。
	プレートが汚れている	プレートの汚れをきれいにしてください。
	ラックやプレートのバーコードに汚れがある	バーコードの汚れを除去するか、ラベルを乾燥させてください。
機器起動時にネストが初期位置に戻っていない	ラックやプレートなどがUAL内部に残っているため、システムのInitializeに失敗した	UALの内部にラック、プレート、チューブなどが入っていないか確認してください。
チューブを認識しない	チューブラックの表面が汚れている	ラックの表面をクリーニングしてください。
	チューブの上部が汚れている	チューブの口に汚れがついていないか確認してください。
	測定可能なチューブではない	ラックには12×75mmのチューブをセットしてください。
サンプルを全て吸い切ってしまう、または次のサンプルに進まない	サンプルが薄い	測定時間の最大時間、最大イベント数を下げてください。
	フローセルに混入した気泡がサンプルの流れを乱している	フローセルの気泡を抜くために、Drain & Fill Flow Cellを実施してください。

日本ベクトン・ディッキンソン株式会社

本社：〒107-0052 東京都港区赤坂4-15-1 赤坂ガーデンシティ
カスタマーサービス BD-eDial@bd.com

(ご注文・納期・資料請求)

bdbiosciences.com/ja-jp/

機器・試薬の使用方法および学術に関するサポート

 **0120-4890-77** Email:tech.cell@bd.com

機器のトラブルに関するサポート

 **0120-7099-12**



BD, the BD Logo and all other trademarks are trademarks of Becton, Dickinson and Company or its affiliates.

© 2023 BD. All rights reserved.

02-001-49