

フローサイトメーターによる血清中抗HLA抗体の検出
FlowPRA™(株式会社ベリタス <http://www.veritastk.com/index.html>)

BD FACSCanto II 測定プロトコール

1.機器のスタートアップおよびシャットダウン

<スタートアップ>

- ① 本体の電源を入れます
 - ② 本体に接続されているコンピューター (FACStation) とプリンターの電源を入れます。
 - ③ Diva ソフトウェアを立ち上げます。
 - ④ 本体との接続が完了したら、試験管を外し、Cytometer メニューから Fluidics Startup を選択し、本体のラインの置換 (Shutdown Solution から FACSFlow へ)を行います。
 - ⑤ フローセル等に気泡がある場合は、気泡除去の操作を行います。
- ※ 詳細については、FACSCantoII スタートアップ編 を参照してください。

<シャットダウン>

- ① Experiment が開いている状態で、FACSClean 2mL入りの試験管をセットし、いずれかの tube を選択して、High のサンプル速度で5分間流します。
- ② 同様に FACSRinse あるいは蒸留水 2mL 入りの試験管をセットし、5分間流します。
- ③ 試験管を外し、Cytometer メニューから Fluidics Shutdown を選択し、本体のラインをシース液から shutdown Solution へ置換します。
- ④ 本体の電源を切ります。

2. 毎日の機器精度管理 (Divaソフトウェア CST プログラム)

- ① Divaソフトウェアを立ち上げます。
- ② 機器精度管理用プログラム Cytometer Setup&Tracking CST プログラムを Cytometer メニューの CST を選択して立ち上げます。
- ② 専用ビーズ, CST ビーズ(カタログ番号 641319) を調製します。
※0.35mL の FACSFlow に CST ビーズを1滴加えます。
- ③ CST ビーズ試験管をセットし、サポートアームを中央に移動させます。
- ④ CST プログラムの中の Performance プログラムを実行します。
- ⑥ 結果レポートをファイルし、異常の有無を確認します。

3. 機器セットアップ

3-1. FLOWPRA SCREENING TEST 機器セットアップ

<使用サンプル>

- a. Class I ビーズ + Negative Control Serum
- b. Class I ビーズ + Positive Control Serum
- c. Class II ビーズ + Negative Control Serum

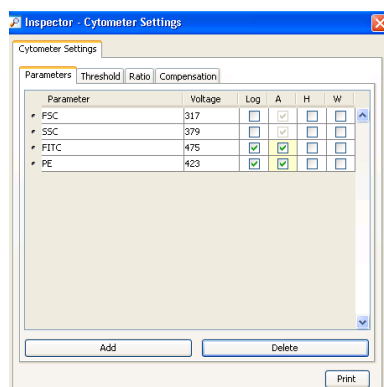
上記 a, b, c を使用前に混合し使用します。

① データ取り込み・解析用ソフトウェアDivaソフトウェアの立ち上げ

- ・ Diva Software を立ち上げます。

② PMT 電圧値の設定

- ・ Experiment メニューより New Experiment をクリックし, Blank Experiment を選択します。
- ・ Cytometer Inspector画面の Parameter 内で, FITC, PE 以外の不要なパラメーター PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, APC, APC-Cy7 等を Delete ボタンで削除します。
- ・ Cytometer Inspector画面の Threshold を表示し, FSC から SSC へ変更します。



Cytometer Inspector

③ Global Worksheet の作成

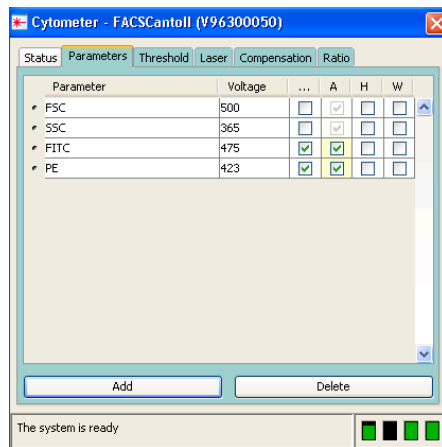
- ・ Global Sheet 1に FSC/SSC, FSC/PE, FITC/PE, FITCヒストグラム の4つのプロット作成します。

※ Analysis Template がある場合は、Browser 内 Blank Experiment のアイコン下の Global Worksheets をクリックし、Global Sheet 1 を右クリック、Apply Analysis Template より FlowPRA Screening setup を選択、OKをクリックし、テンプレートを表示させます。

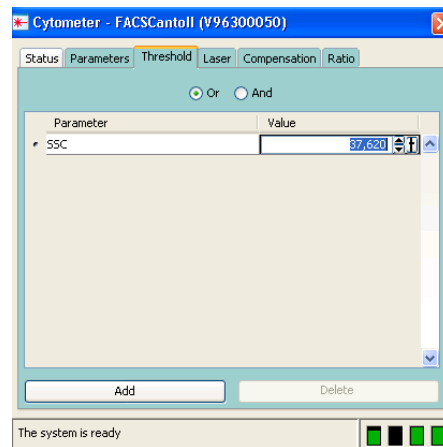
④ FSC, SSC のPMT微調整、SSC Thresholdの微調整

- ・ Browser 内 Blank Experiment 内 Specimen の下、Tubeをアクティブにします。
- ・ サンプルをセットし、Acquisition Dashboard の Acquire Dataボタンをクリックします。
- ・ Global Worksheet 1 の FSC/SSC プロットに表示されるイベントを確認しながら、Cytometer ウィンドウ内の Parameter メニューの FSC および SSCVoltage を微調整しビーズの集団が中央部に表示されるようにします。

- ・ 続けて、Cytometer ウィンドウ内の Threshold メニューの SSC の Value を調整し、デブリを削除します。



Cytometer ウィンドウ Parameter



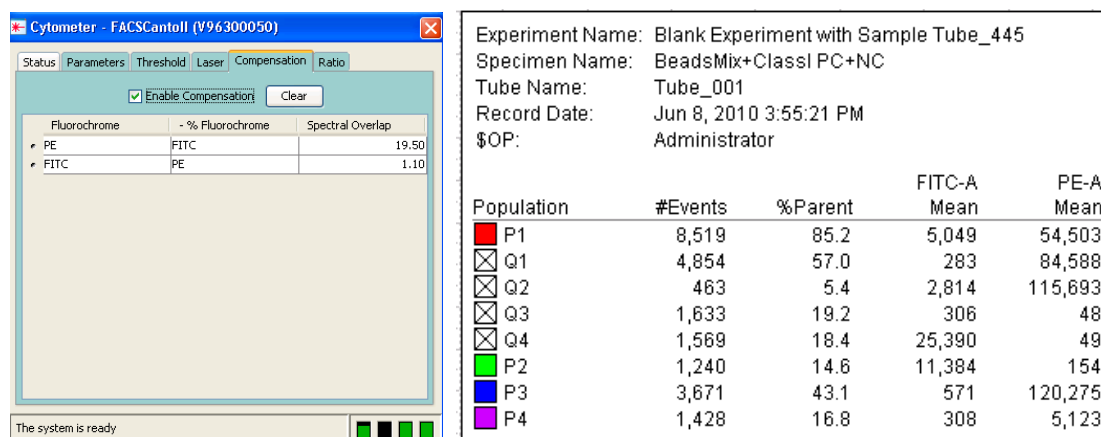
Cytometer ウィンドウ Threshold

⑤ ゲーティング設定

- ・ Global Sheet 1 の FSC/SSC プロット内のビーズ集団に Global Worksheet 上部のツールバーより多角形ゲートを選択し、Population1を作成します。
- ・ Global Sheet 1 の FSC/PE プロット内を右クリックし、Show Population を選択、P1 をクリックします。
- ・ 同様にFITCヒストグラム内を右クリックし、Show Population を選択、P1をクリックします。

⑥ 蛍光補正值の設定

- ・ FITC/PE プロットをクリックし、ツールバーより四分画マーカーを選び設定します。
- ・ さらにプロット内を右クリック Create Statistics View を選択します。
- ・ Statistics View内を右クリックし、Edit Statistics view を選択します。
- ・ Edit Statistics view の Statisticsメニューを表示し、FITC, PEの Meanにチェックマークを入れます。不要なパラメーター、項目のチェックを外します。
- ・ サンプルをセットし、Acquisition Dashboard の Acquiew Dataボタンをクリックします。
- ・ Global Sheet 1 の FITC/PE プロットに表示されるイベントを確認しながら、Statistics View の Q3, Q1 の FITC Mean 値が同じレベルになるようにCytometer ウィンドウ Compensation メニューの FITC-%PE の Compensation 値を調整します
- ・ 同様に、Q3, Q4 の PE Mean 値が同じレベルになるようにCytometer ウィンドウ内の Compensation メニューの PE-%FITC の Compensation 値を調整します。



Cytometer ウィンドウ Compensation Statistics view

⑦ 機器設定の保存

上記設定した機器セッティング条件を保存します。

- Browser 内 Blank Experiment のアイコン下の Cytometer Settings を右クリックし、Save to Catalog を クリックし、機器設定の名称を設定して保存します。

※機器の状態は、いつも一定であるとは限らないため、測定毎に上記機器セッティングを行うことを推奨しますが、一度設定した機器設定条件 (Catalog) を Cytometer Settings を右クリックし、Apply from Catalog で呼び出し、使用することもできます。

3-2. FLOWPRA SPECIFIC DETECTION TEST 機器セットアップ

<使用サンプル>

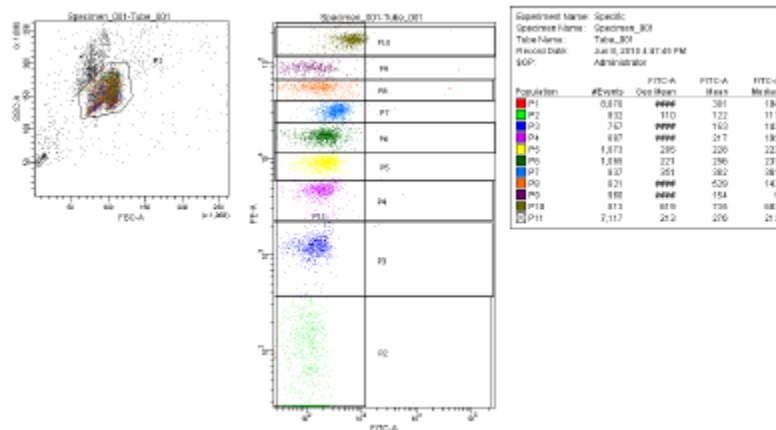
- Specific ビーズ + Negative Control Serum

- ① Canto Clinical Software Setup プログラムの実行
- ② データ取り込み・解析用ソフトウェアDivaソフトウェアの立ち上げ
- ③ 使用パラメーター, PMT 電圧値の設定
(Screening test と同様)

④ Global Worksheet の作成

- Global Sheet 1 に FSC/SSC, FITC/PE,プロットを作成します。

※ Analysis Template がある場合は、Browser 内 Blank Experiment のアイコン下の Global Worksheets をクリックし、Global Sheet 1 を右クリック、Apply Analysis Template より FlowPRA Specific setup をクリック、OKをクリックし、テンプレートを表示させます。



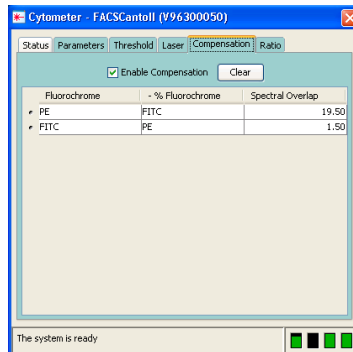
- ⑤ FSC, SSC のPMT微調整、SSC Thresholdの微調整
 (Screening test と同様)

⑥ ゲーティング設定

- Global Sheet 1 の FSC/SSC プロット内のビーズ集団に ツールバーより多角形ゲートを選択し、Population 1を作成します。
- Global Sheet 1 の FSC/PE ロット内を右クリックし、Show Population を選択、P1 をクリックします。

⑦ 蛍光補正值の設定

- FITC/PE プロットをクリックし、ツールバーより四角形のゲート、あるいは四分画マーカーを選び、(PE 蛍光強度の一番弱いビーズ集団が左下 Q3 になるように設定) ゲートを作成します。
- さらにプロット内を右クリック Create Statistics View を選択します。
- Statistics View内を右クリックし、Edit Statistics view を選択します。
- Edit内の Statisticsメニューを表示し、FITCの Geo Mean と Mean, Median にチェックマークを入れます。不要なパラメーター、項目のチェックを外します。
- サンプルをセットし、Acquisition Dashboard の Acquiew Dataボタンをクリックします。
- Global Worksheet 1 の FITC/PE プロットに表示されるイベントを確認しながら、Statistics Viewの Q3, Q1 の FITC Mean 値が同じレベルになるようにCytometer ウィンドウ内の Compensationメニューの FITC-%PE の Compensation 値を調整します
- PE-%FITC の Compensation 値については Screening test の値を使用します。



Cytometer ウィンドウ

4. サンプルの測定・解析

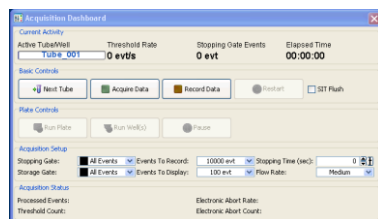
i① Specimen の作成

- Browser メニューの Specimen アイコン(注射器)をクイック, あるいは Experiment メニューより、New Specimen をクリックして、新しい Specimen を作成します。



② 検体サンプルの測定

- 取り込み数の設定: Specimen の下の Tube1 をクリックし、Acquisition Dashboard の Events to Record の数値を 20000 から 40000 に設定します。



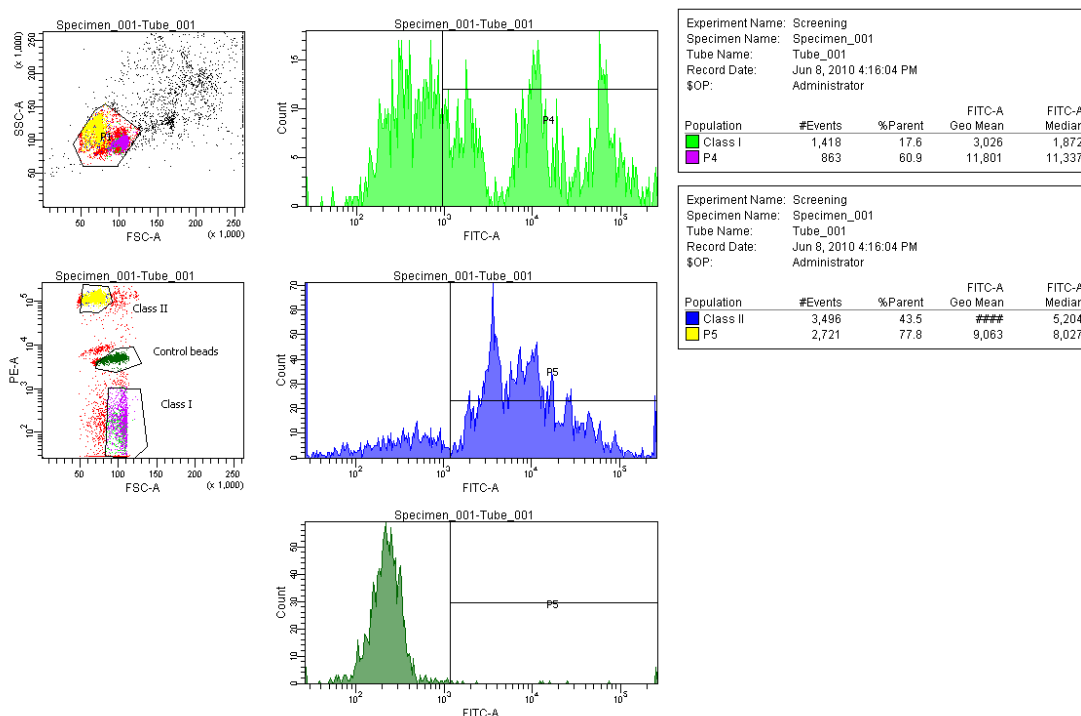
Acquisition Dashboard

- Specimen の下の Tube1 をクリックし、サンプルをセットします。
- Acquisition Dashboard の Acquire Data ボタンをクリックし、ビーズの表示が安定したら、Record Data をクリックし、データを取り込みます。
- 次のサンプルをセットし、新しい Tube を Acquisition Dashboard の Next ボタンをクリックするか、Browser メニューのチューブアイコンをクリックして作成し、クリックしてアクティブにします。
- Acquisition Dashboard の Acquire Data をクリックし、ビーズの表示が安定したら、Record Data をクリックし、データを取り込みます。

③ データ解析

取り込んだデータを予め作成している解析専用の Analysis template を呼び出し、解析します。

- Global Worksheet のメニュー左上の Work Sheet のアイコンをクリックし、白紙の Sheet を表示させます。
- Browser 内の解析するデータ取り込みTubeをアクティブにします。
- Tube アイコンを右クリックし Apply Analysis Template を選択し、解析用テンプレートを呼び、表示させます。
- 必要に応じて、population (P) の位置や四分画マーカ位置などを調整します。



FlowPRA Screening test 解析例

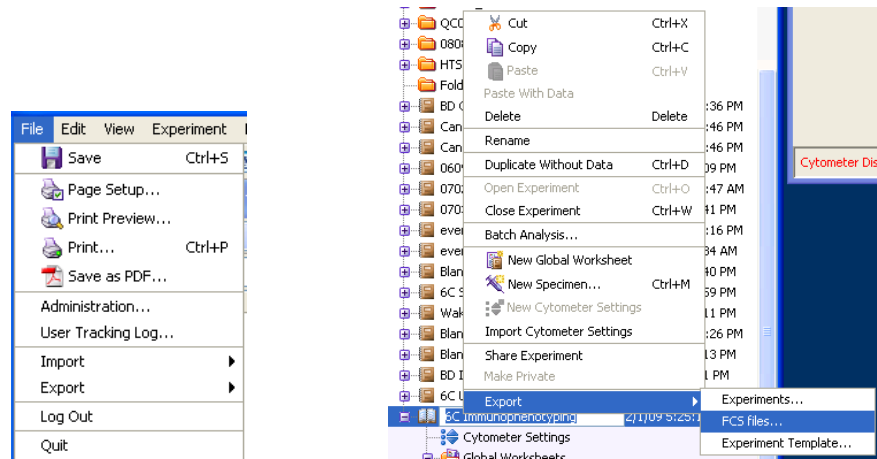
④ データの保存

- Fileメニューより Print をクリックし、解析データをプリントします。
- ※PDFファイルを作成したい場合は、File メニューの Save as PDF をクリックし作成します。
- データを他のメディアにコピーし保存したい場合は、Export を選択し保存することができます。

<Experiment アイコンを右クリック Export 可能な内容>

- Experiment 全内容
- Experiment template (FCS ファイルを含まないその他の Experiment 内容)
- 全測定サンプルの FCS ファイル

※サンプルを限定してFCSファイルを保存する場合は、そのSpecimen
あるいはTubeをアクティブにして右クリックし、Exportを選択します。



File メニュー

データの保存 Browser Experimentアイコンからの Export

FACS Diva ソフトウェア Tips

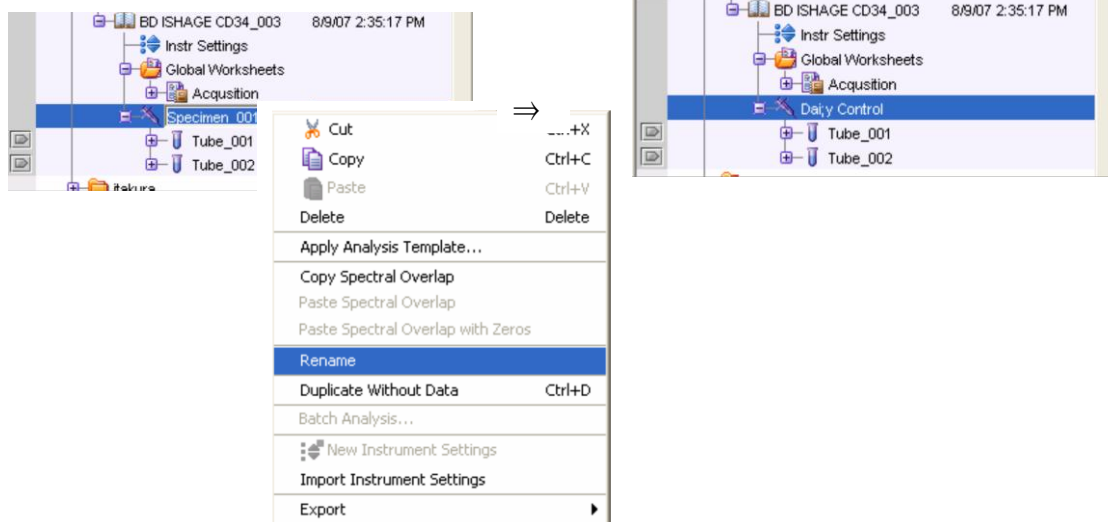
<Worksheet の名称の変更>

Work Sheet の名称を設定したい場合は、Work Sheet をアクティブにし、Work Sheet の Inspector で名称を変更することができます。

<Rename 方法>

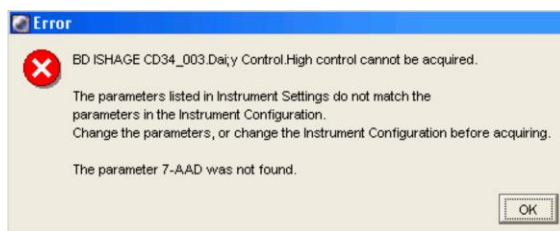
必要に応じて Specimen や Tube 名を変更することができます。 Specimen, Tube をアクティブにし、右クリック、Rename で変更します。

Specimen_001 を Dayly Control に変更した例:

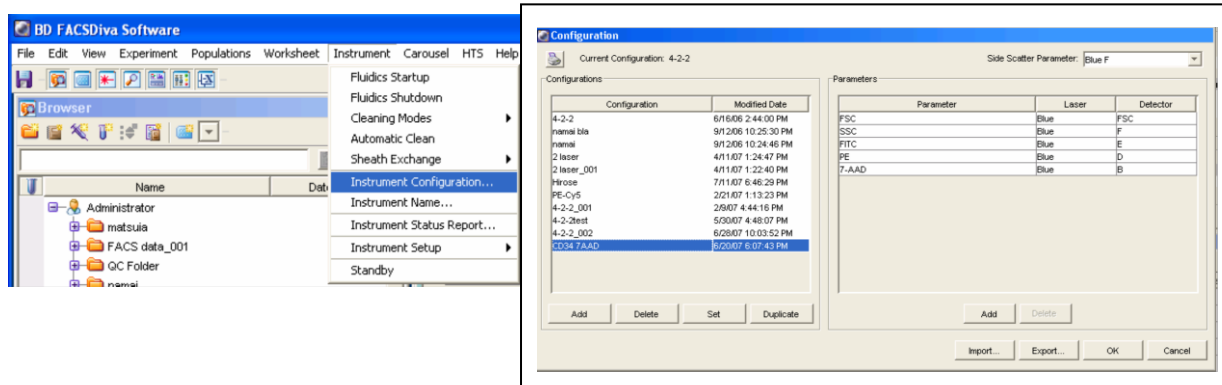


<Configuration 変更方法>

注意: Instrument Configuration が合っていない場合は下記のような Error メッセージが表示されます。 Configuration を変更し、合致させる必要があります。

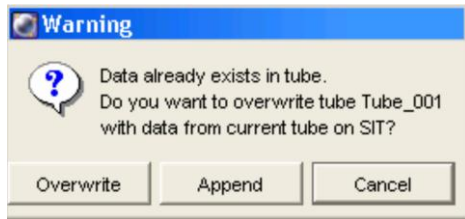


- 14-1. Instrument メニューから、Instrument Configuration を選択します。
- 14-2. 適合する Instrument Configuration に変更し、Set をクリック
引き続き OK をクリックします。



<チューブを外した後、引き続き新たにチューブをセットしデータ取り込みを追加する方法>

- ①Acquisition Dashboard の Stop Recording をクリック、続けて Stop Acquiring をクリックする
- ②チューブを外す
- ③新たにチューブを再セットする
- ④これまで取り込んだイベント数を取り込み最終イベント数(Event to Record) より引いた数値を Acquisition Dashboard の Event to Record に入力しなおす
- ⑤Acquisition Dashboard の Acquire Data をクリック、続けて Record Data をクリックする
- ⑥次のような Warning が表示されるので、Append をクリックする



※ BD FACSCanto II の詳しい操作方法については、FACSCantoII User's guide あるいはトレーニングマニュアルをご参照ください。