

## 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 FACSCalibur 測定プロトコール

#### 1. 機器のスタートアップ

- 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 シースタンクに適切な圧がかかっていることとシースフィルターに気泡がないことを確認します。
- ④ FACS Rinse あるいは蒸留水の入った試験管を取り外し、流路調節ボタンの PRIME を押します。(2回繰り返します。)
- ⑤ 試験管を取り付け、サポートアームを中央にセットします。

#### 2. 毎日の機器精度管理

- ① 機器精度管理プログラムの BD FACSCComp™ ソフトウェアを立ち上げます。
- ② 専用機器精度管理用リファレンスビーズ BD Calibrite™ ビーズを調製します。
- ③ FACSCComp を実行します。(Assay mode は LyseWashを選択)
- ④ 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

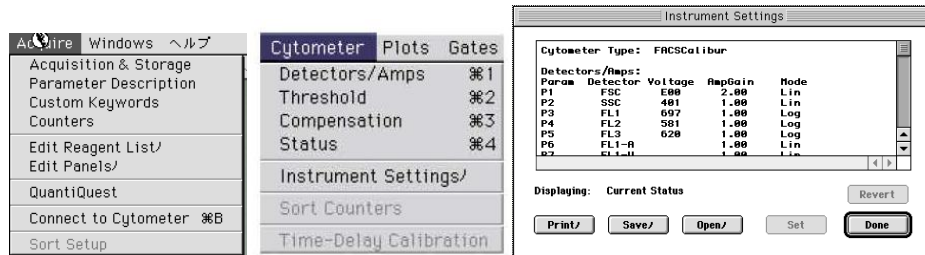
上記 a, b, c を使用前に 1 チューブに 1:1:1 に混合します。

##### ① データ取り込み・解析ソフトウェアCellQuest, CellQuestPROの立ち上げ

- ・データ取込み & 解析用ソフトウェア BD CellQuest™ ソフトウェアあるいは BD CellQuest™ PRO ソフトウェアを Open します。
- ・Untitleの白紙のエクスペリメントファイルに FCS/SSC, FL1/FL2, FL1 ヒストグラムを作成します。
- ・Acquire メニューより、Connect to Cytometer を選択し、機器とソフトウェアを連動させます。

## ② FACSCComp 機器設定の呼び出し

- Cytometer メニューより, Detector/Amps, Threshold, Compensation を選択し、画面に表示させます。
- Cytometer メニューより Instrument Settings を開き、Open ボタンをクリック、BD Files フォルダ内、Instrument settings フォルダ内にある Calib File を選択し、Set ボタンをクリック、続いて Done ボタンをクリックします。



Acquire メニュー

Cytometer メニュー

Instrument Settings パネル

※Acquire メニューから Connect to Cytometer

※Cytometer メニューから Detector/Amps, Threshold, Compensation

※Instrument Settings パネルで機器設定を選択、セット、保存等を行う

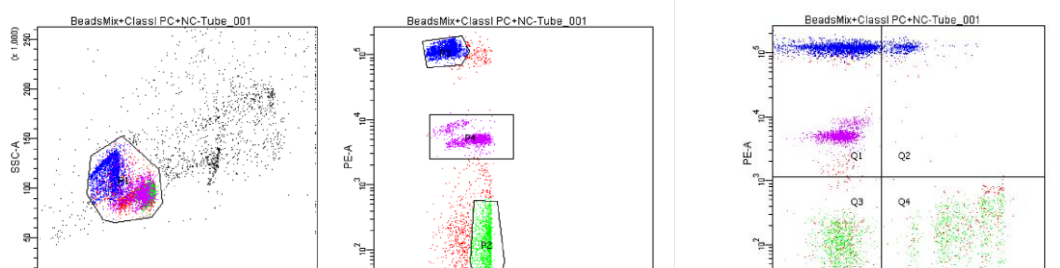
## ③ 機器条件の設定変更

- Detector/Amps パネルの FSC Voltage を E00 から E01へ変更します。
- Detector/Amps パネルの SSC の Mode を Lin から Logへ変更します。
- Threshold パネルの設定の FSCから SSCへ変更します。

## ④ PMT 電圧の調整

- 本体の流路調節ボタンを LOW のままにし、RUN ボタンを押して、STANBY から RUN に変えます。
- サンプルをサンプル吸引ポート(SIP)にセットし、アームをチューブの下にセットします。
- 画面の Acquisition Control パネルの Setup ボタンにチェックマークを入れた状態で、Acquire ボタンをクリックします。
- FSC/SSC プロットのピーズの位置を確認しながら、必要に応じて FSC の Amp gain、SSC の PMT voltage を微調整します。
- さらに、FSC/SSC プロットを確認しながら、必要に応じてThresholdレベルを調整します。

- FSC/SSC プロット上に ビーズの集団ヘゲート(R1)を設定します。



⑤ 蛍光補正值の調整

- ・ FL1/FL2 プロット上をクリックし、アクティブにします。
- ・ PLOT メニューより Format Dot Plot を選択し、Gate を G1=R1 にします。
- ・ ツールパレットより4分画マーカ―を選び、FL1/FL2 プロット上にマーカ―を設定します。
- ・ FL1/FL2 プロットをクリックしアクティブにした状態で、Stats メニューより Quadrant Stats (四分画統計計算データ)を選択します。
- ・ サンプルを流しながら、蛍光補正值を調整します。

※ 陰性集団、陽性集団のある Quadrant (陰性領域:LL, 陽性領域:UL および LR) の Quadrant Stats の Meanを確認しながら調整します。

〈X 軸が FL1(FITC), Y 軸が FL2(PE)のプロットの場合〉

FL2-%FL1 : FITC 蛍光スペクトラムの PE 検出器への漏れこみ調整

陰性集団 LL の Y Mean と 陽性集団 LR の Y Mean の数値を近づける

FL1-%FL2 : PE 蛍光スペクトラムの FITC 検出器への漏れこみ調整

陰性集団 LL の X Mean と 陽性集団 UL の X Mean の数値を近づける

⑥ 機器設定の保存

上記設定した機器セッティングを Instrument Setting ファイルに保存します。

※機器の状態は、いつも一定であるとは限りませんので、測定毎に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 Instrument Settingを再度呼び出し、使用することも可能です。

- ・ Cytometer メニューより Instrument Settings を選択し、機器設定名称を入力(例: Instrument Settings 20062010)し、保存場所を指定して、Save ボタンをクリックします。

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

〈使用サンプル〉

- a. ビーズ+Negative Control Serum

① データ取り込み・解析ソフトウェアCellQuest, CellQuestPROの立ち上げ

- ・データ取込み & 解析用ソフトウェア BD CellQuest™ ソフトウェアを Open します。
- ・空白のエクスペリメントファイルに FCS/SSC, FL1/FL2 プロットを作成します。
- ・Acquire メニューより、Connect to Cytometer を選択し、機器とソフトウェアを連動させます。

② FACSComp 機器設定の呼び出し

③ 機器条件の設定変更

④ PMT 電圧の調整

(Screening test と同様)

⑤ 蛍光補正值の調整

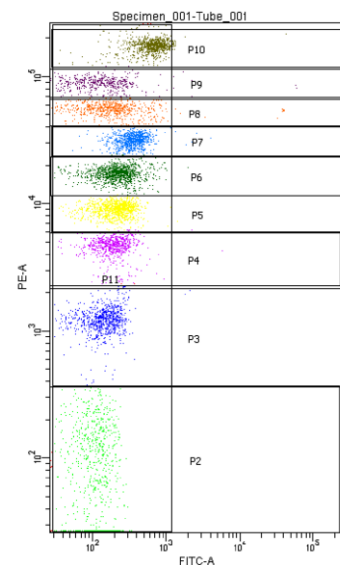
- ・ FL1/FL2 プロット上をクリックし、アクティブにします。
- ・ PLOT メニューより Format Dot Plot を選択し、Gate を G1=R1 にします。
- ・ ツールパレットより4分画マーカースを選び、FL1/FL2 プロット上にマーカを設定します。
- ・ FL1/FL2 プロットをクリックしアクティブにした状態で、Stats メニューより Quadrant Stats (四分画統計計算データ)を選択します。
- ・ サンプルを流しながら、FL1-%FL2 の蛍光補正值を調整します。 FL2-%FL1 の蛍光補正值については、Screening Panel の設定値を使用します。

⑥ 機器設定の保存

上記設定した機器セッティングを Instrument Setting  
ファイルに保存します。

※ 機器の状態は、いつも一定であるとは限り  
ません。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  
Instrument Setting を再度呼び出し、  
使用することも可能です。

- ・ Cytometer メニューより Instrument Settings を選択  
し、機器設定名称を入力（例:Instrument Settings  
20062010）し、保存場所を指定して、Save ボタンを  
クリックします。



#### 4. 測定および解析

① データ取り込み・解析ソフトウェアCellQuest, CellQuestPROの立ち上げ

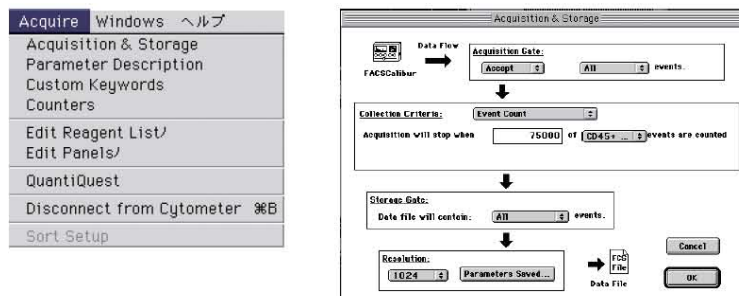
- ・データ取込み & 解析用ソフトウェア BD CellQuest™ ソフトウェアを Open します。
- ・空白のエクスペリメントファイルに FCS/SSC, FL1/FL2, FL1 ヒストグラムを作成します。
- ※ データ取込み専用テンプレート(エクスペリメントドキュメントファイル)が予め作

成されている場合は、テンプレートをダブルクリックしソフトウェアを立ちあげることができます。

・Acquire メニューより、Connect to Cytometer を選択し機器とソフトウェアを連動させます。

### ③ データの取り込み

- ・ Acquire メニューの Acquisition & Storage を選択し、最終取り込みイベント数を設定します
  - ⑦ SCREENING PANEL ; 20000 から 40000
  - ⑧ SPECIFIC ANTIBODY DETECTION TEST : 20000 から 40000
- ・ Acquire メニューの Parameter Description で、取り込みデータの保存先<Folder>を新規作成、あるいは選択し、さらに保存データのファイル<File>名を入力します。
- ・ Acquisition control パネルの Set up のチェックを解除し、サンプルチューブをセットします。
- ・ ドットの表示が安定したら、Acquire ボタンをクリックしデータ取り込みを開始します。



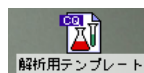
Acquireメニュー & Acquisition & Storage



Acquisition control パネル

## 5. データ解析

- ① CellQuest の解析用エクスペリメントドキュメントファイルをダブルクリックします。



- ② Edit メニューより Select All をクリック あるいは解析したいプロットをアクティブにします
- ③ Prot メニューより Format Dot plot を選択します
- ④ Select File よりリストモードデータファイルを指定します
- ⑤ Region (Gate)の微調整、Stats の作成等を行います
- ⑥ 解析結果のプリント(Print)、エクスポート(Export)を File メニューより行います。
- ⑦ 解析エクスペリメントドキュメントの保存を File メニューの Save A を選択して、必要に応じて行います。

## 6. 機器のシャットダウン

- ① FACSClean (次亜塩素酸入り洗浄液)を 2mL 入れた試験管をセットし、サポートアームを外した状態で、1分間 FACSClean を流します。
- ② 続けて、サポートアームを試験管の下にセットし5分間 FACSClean を流します。
- ③ FACSRinse (界面活性化剤入り洗浄液)を 2mL 入れた試験管をセットし、サポートアームを外した状態で、1分間 FACSRinse を流します。
- ④ 続けて、サポートアームを試験管の下にセットし5分間 FACSRinse を流します。
- ⑤ FACSRinse あるいは蒸留水を入れた試験管をセットし、STANBY のボタンを押して、シースタンクの圧を抜きます。
- ⑥ 本体およびコンピューターの電源を OFF にします。

※FACS Calibur の詳しい操作方法については、FACSCalibur 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。