

FlowPRA サンプル測定のための

フローサイトメーター設定操作手順

for EPICS XL / XL-MCL (EXP032) ユーザ & Cytomics FC500 ユーザ

ベックマン・コールター株式会社

【はじめに】

FlowPRA サンプルから正しいデータを取得するためには、フローサイトメーター（以下、FCM）を正しく設定することが重要です。この資料では、そのための各種操作について順を追ってご説明します。

ベックマン・コールターの FCM では、この設定をプロトコル（Protocol）として保存できますので、測定のたびごとに設定操作を繰り返す必要はありません。

ただし、使用する FlowPRA 関連試薬（特に、蛍光ビーズ）のロットが変更になった場合には、ビーズ自体の蛍光強度や蛍光の漏れ込み度合いが異なることがありますので、それに合わせた感度、およびコンペンセーション（Compensation、蛍光の漏れ込み補正）の微調整が必要です。

<資料内で使用する略称>

NC・・・Class I & II Negative Control serum

PC1・・・Class I Positive Control serum

PC2・・・Class II Positive Control serum

CB・・・Control beads

Class I・・・Class I beads

Class II・・・Class II beads

【FlowPRA Screening Test の FCM 設定】

1. サンプル調製

FCM 設定のために、以下のサンプルを調製します。

- a) 未染色 Class I, Class II & CB 混合サンプル
- b) NC 染色 Class I, Class II & CB 混合サンプル
- c) PC1 染色 Class I, Class II & CB 混合サンプル
- d) PC2 染色 Class I, Class II & CB 混合サンプル

a) は 1 × Wash Buffer または PBS に

- ・ Class I 5uL
- ・ Class II 5uL
- ・ CB 1uL

を添加するだけです。

b) ～ d) は FlowPRA Screening Test の染色プロトコル

「FlowPRA Screening TEST 日本語マニュアル」

に従って調製します。

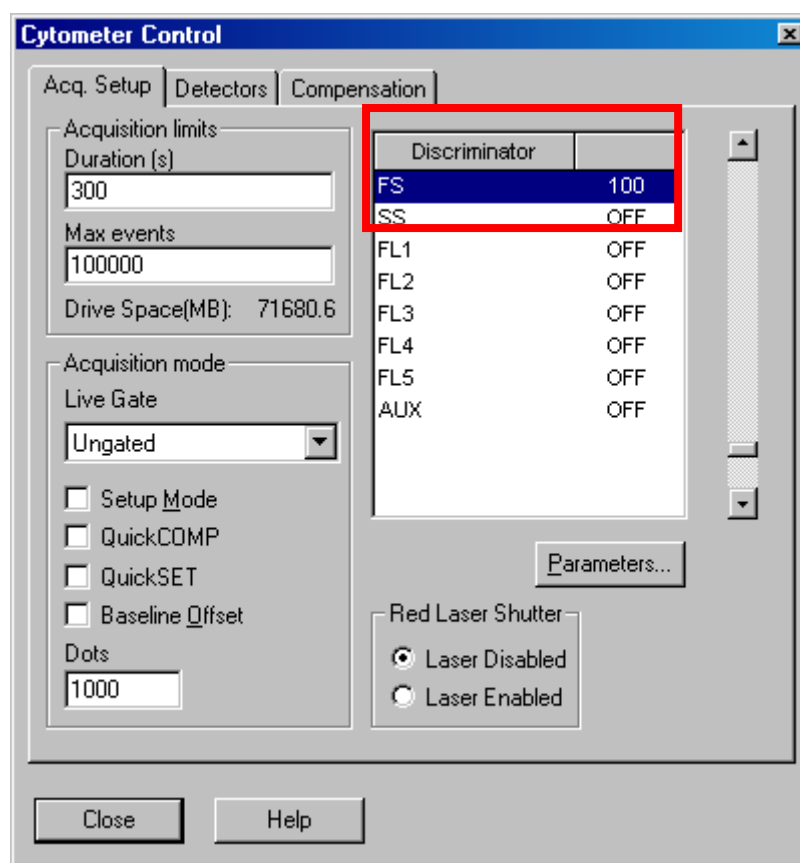
2. 機器設定

a) ディスクリミネーション調整

Cytometer Control 画面を出して、ディスクリミネータ (Discriminator) の設定を行います。

FS (Forward Scatter, 前方散乱光) を選択して “100” に設定します。

【図 1】 Discriminator 設定 (Cytometer Control 画面)



b) 感度調整

サンプル a) を測定しながら、感度の調整を行います。

1) FS Lin / SS Lin

FS / SS サイトグラムを見ながら、FlowPRA ビーズの集団がほぼ中央に分布するように FS Lin と SS Lin の感度 (Gain と Volts) を調整します。

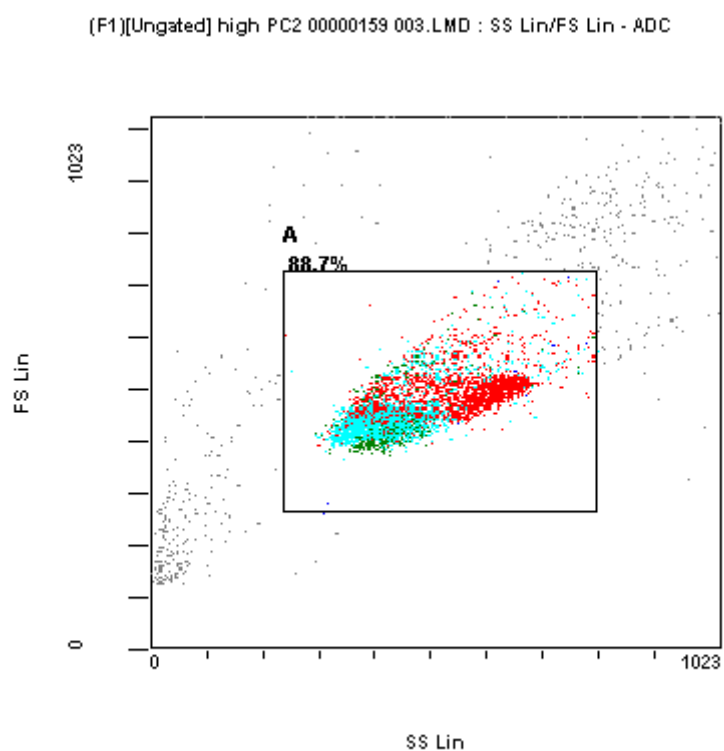
<設定値の目安>

FS Lin : Gain = 20, Volts = 200

SS Lin : Gain = 20, Volts = 365

(FC500 の場合)

【図2】FS, SS の感度調整 (FS / SS サイトグラム)



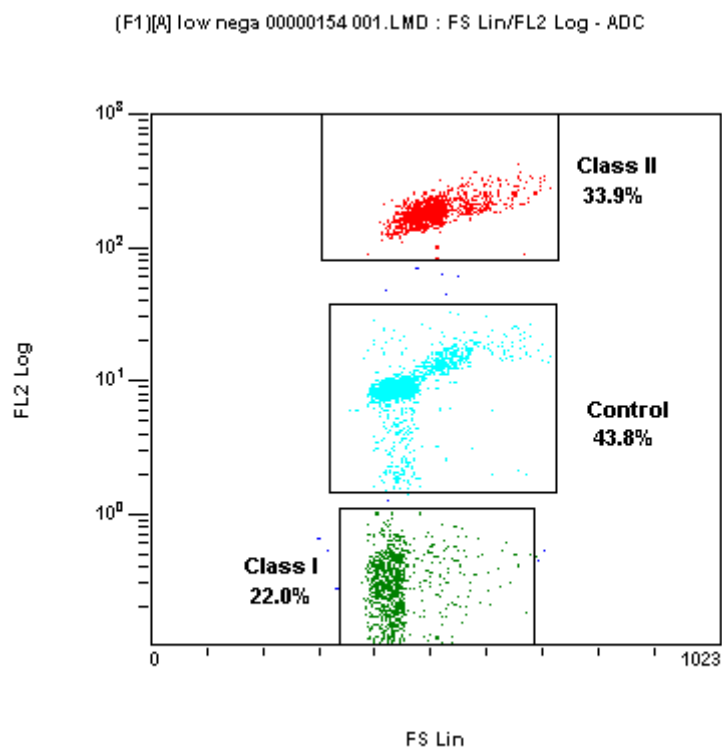
2) FL2 Log

FL2 / FS サイトグラムを見ながら、FL2 蛍光強度の異なる 3 種類の FlowPRA ビーズ (Class I < Control < Class II) の集団が相互に分離するように FL2 Log の感度 (Volts) を調整します。

<設定値の目安>

FL2 Log : Gain = 1.0, Volts = 527
(FC500 の場合)

【図 3】 FL2 の感度調整 (FL2 / FS サイトグラム)



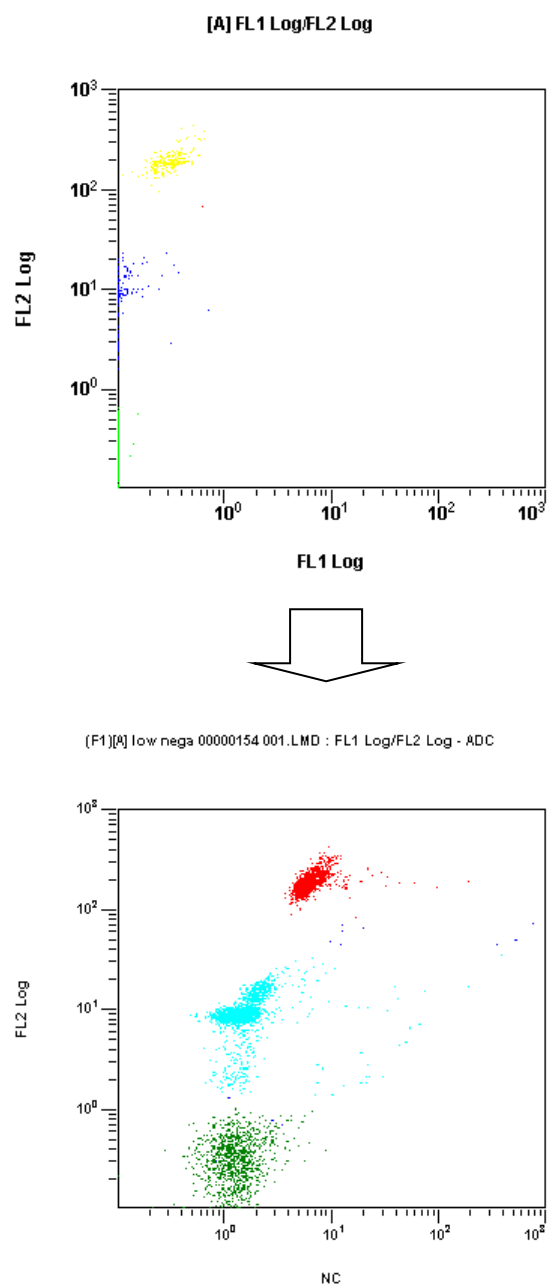
3) FL1 Log

FL2 / FL1 サイトグラム、および FL2 蛍光強度のもっとも低い FlowPRA Class I ビーズの FL1 Log ヒストグラムを見ながら、Class I ビーズの集団が FL1 Log スケールの 1.0 付近に分布するように FL1 Log の感度 (Volts) を調整します。

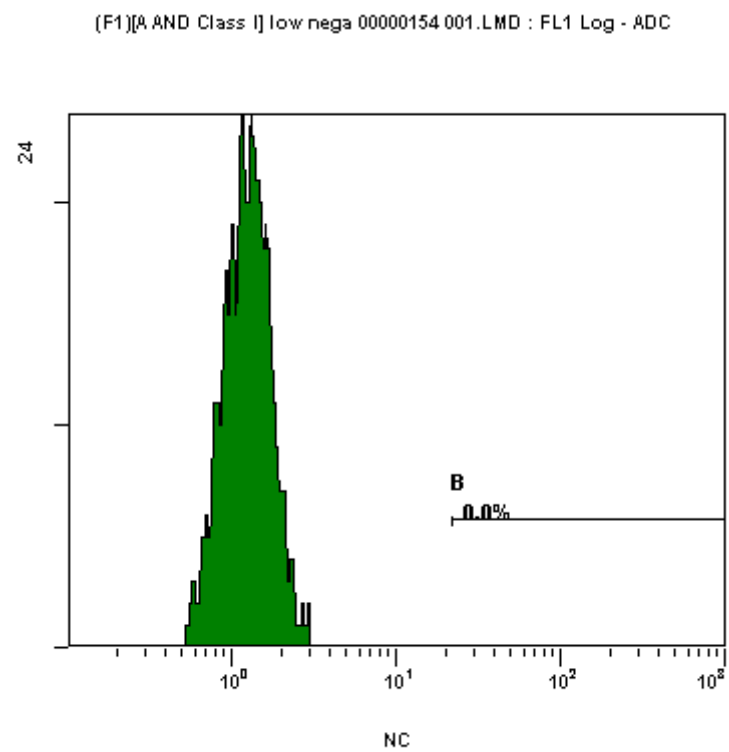
<設定値の目安>

FL1 Log : Gain = 1.0, Volts = 694
(FC500 の場合)

【図 4】FL1 の感度調整 (FL2 / FL1 サイトグラム)



【図5】FL1 の感度調整 (Class I ゲートした FL1 Log ヒストグラム)



c) コンペンセーション調整

FlowPRA におけるコンペンセーション (Compensation) は、

- ・ FL2 蛍光の FL1 への漏れ込み補正 (FL1 - % FL2)
- ・ FL1 蛍光の FL2 への漏れこみ補正 (FL2 - % FL1)

が必要です。

1) FL1 - % FL2

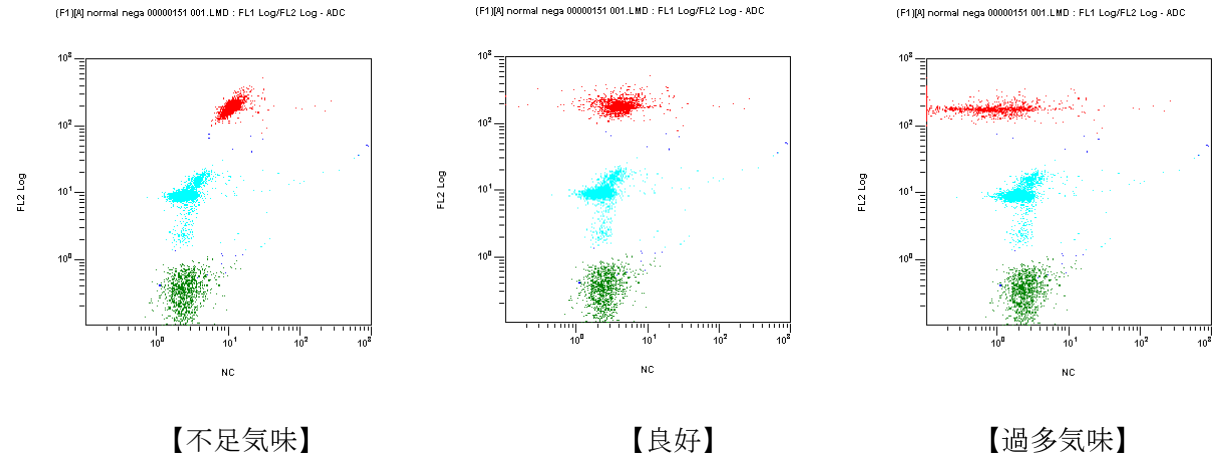
サンプル a) を測定し FL2 / FL1 サイトグラムを見ながら、
FL1 - % FL2 を調整します。(図 1)

<設定値の目安>

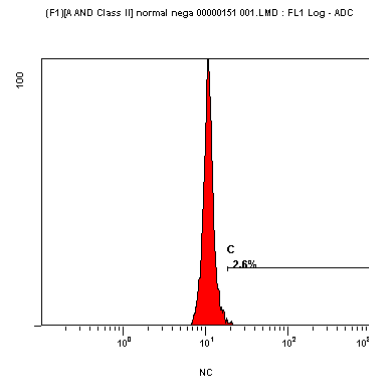
$$\text{FL1} - \% \text{ FL2} = 3.6$$

コンペンセーションの過不足は、Class II ゲートの FL2
Log ヒストグラムでも確認できます。(図 2)

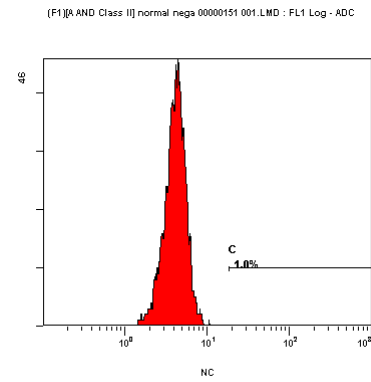
【図6】 コンペンセーション（FL1 - % FL2）の調整と FL2 / FL1 サイトグラムの違い



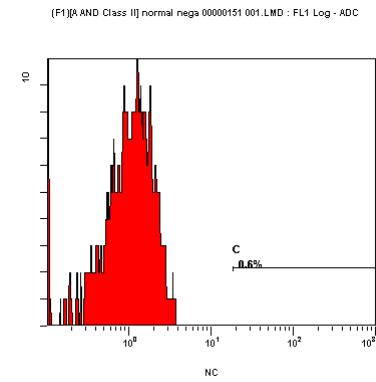
【図7】 コンペンセーション（FL1 - % FL2）の調整と FL1 Log ヒストグラム（Class II ゲート）の違い



【不足気味】



【良好】



【過多気味】

2) FL2 - % FL1

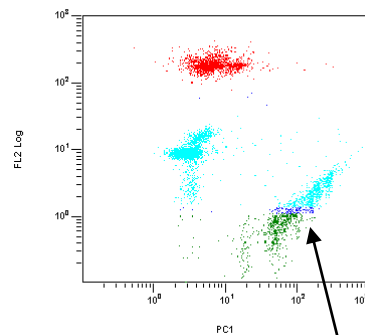
サンプル c) を測定し FL2 / FL1 サイトグラムを見ながら、
FL2 - % FL1 を調整します。(図 3)

<設定値の目安>

$$\text{FL1} - \% \text{FL2} = 5.7$$

【図 8】 コンペンセーション (FL2 - % FL1) の調整と FL2 / FL1 サイトグラムの違い

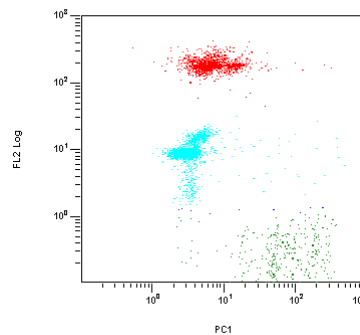
(F1) [M] normal PC1 00000152 002.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



【不足気味】

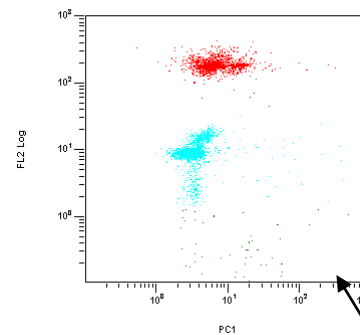
この状態では、
Class I ビーズ (緑色) が Control ビーズ (水色) と
区別できなくなる。

(F1) [M] normal PC1 00000152 002.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



【良好】

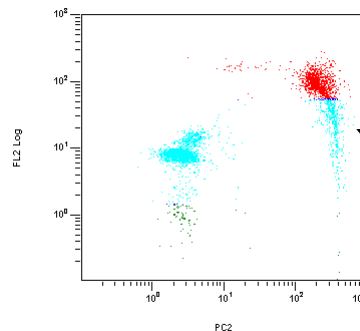
(F1) [M] normal PC1 00000152 002.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



【過多気味】

この状態では、Class I ビーズ (緑色) が見えない。
極度に過剰な場合は、Class II 陽性のサンプル
(サンプル d など) で Class II ビーズ (赤色) が
Control ビーズ (水色) と区別できなくなる恐れ
がある。(下図)

(F1) [M] normal PC2 00000153 003.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



FL2 - % FL1 が極度に過剰な例
(サンプル d)

【FlowPRA Specific Test および Single antigen Test の FCM 設定】

Specific Test ならびに Single antigen Test では、プロット（サイトグラム、ヒストグラム）の展開の仕方が Screening Test と異なりますが、FCM 機器の設定（ディスクリミネータ、感度、コンペンセーション）の概要値はそのまま、もしくは微調整程度で流用できます。

1. Screening Test から設定値をもらうには

- 1) **Cytometer** メニュー から **Get Cytosettings from Protocol ...** を選択
- 2) Screening Test 用のプロトコルを選択
- 3) **Open** をクリック
- 4) **File** メニュー から **Save Protocol** を選択

2. 機器設定確認・微調整のためのサンプル調製

FCM 設定の確認・微調整のために、以下のサンプルを調製します。

- a) 未染色サンプル
- b) NC 染色サンプル
- c) PC 染色サンプル

PC 染色に使用する検体（血清）は、FL2 蛍光強度のレベルの低いビーズに特異的な抗 HLA 抗体を含むものを使用するのが望ましい。

a) は 1 × Wash Buffer にビーズ 5uL を添加するだけです。

b) および c) は FlowPRA キットの染色プロトコルに従って調製します。

3. 機器設定

a) ディスクリミネーション調整

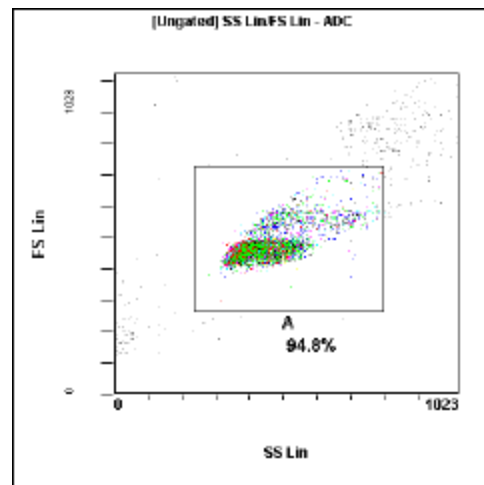
Specific および Single antigen の FlowPRA ビーズの大きさは、Screening のものと大差がありませんので、特に再調整の必要はありません。(3 ページを参照)

b) 感度調整

FS, SS の感度設定は変更必要がありません。

Specific および Single antigen で使用する FlowPRA ビーズは、種類ごとに大きさがあまり変わらないので Screening よりも集団としてまとまって見えます。

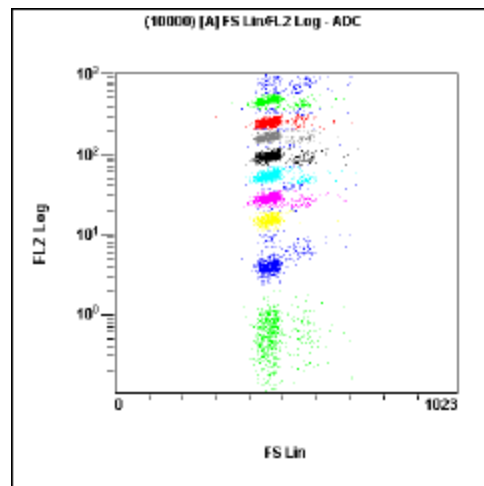
【図9】 Specific および Single antigen の FS / SS プロット例



蛍光（FL1, FL2）の感度設定も Screening と大きな隔たりはありませんが、Screening よりもビーズの種類が多いので、すべてのビーズがプロット上で確認できるよう FL2 の感度については確認・微調整を行います。

サンプル a) を測定しながら図のような分布が得られるように FL2 の感度（ボルテージ）を微調整します。

【図 10】 Single antigen の FL2 / FS プロット例
(9 種類のビーズを確認)

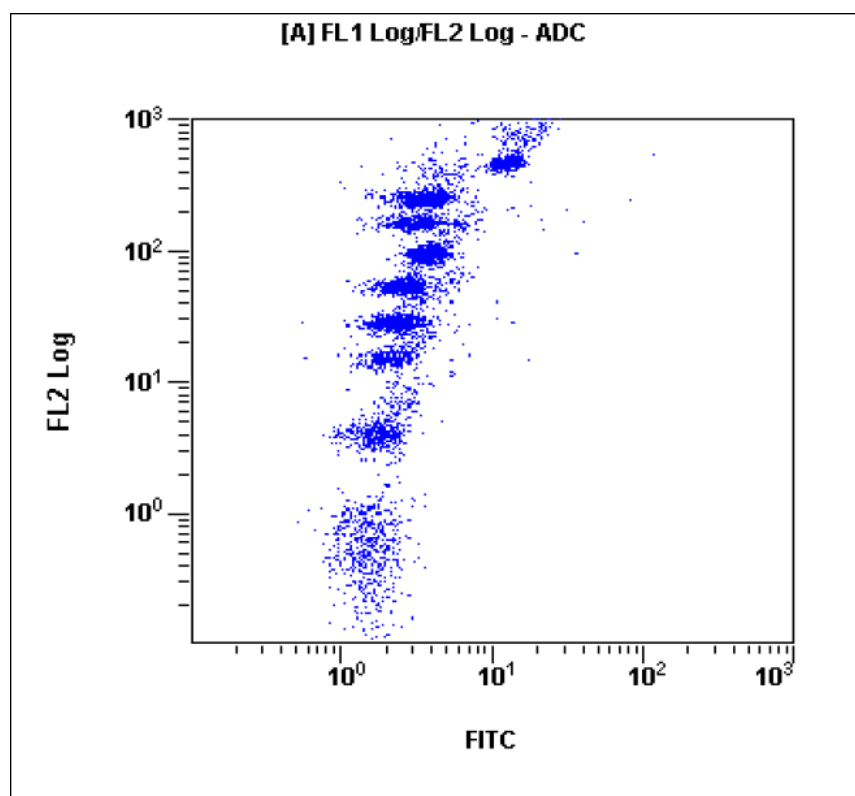


c) コンペンセーション調整

1) FL1 - % FL2

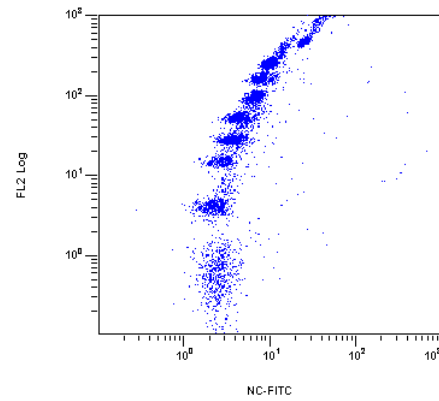
サンプル a) を測定し FL2 / FL1 サイトグラムを見ながら、FL1 - % FL2 を調整します。(図 11)

【図 11】 FL2 / FL1 のプロット例



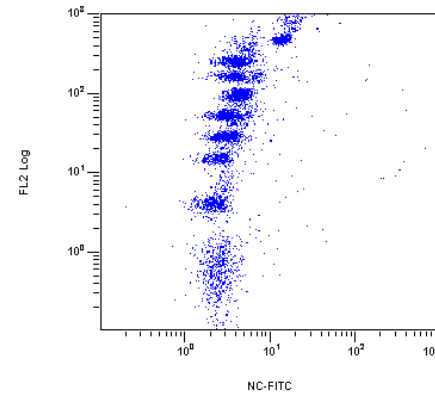
【図 12】 コンペンセーション (FL1 - % FL2) の調整と FL2 / FL1 サイトグラムの違い

(F1)[A] Class 1 Group 2 Negative Control 00000164 001.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



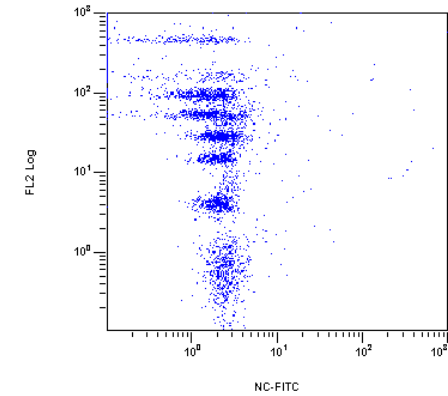
【不足気味】

(F1)[A] Class 1 Group 2 Negative Control 00000164 001.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



【良好】

(F1)[A] Class 1 Group 2 Negative Control 00000164 001.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



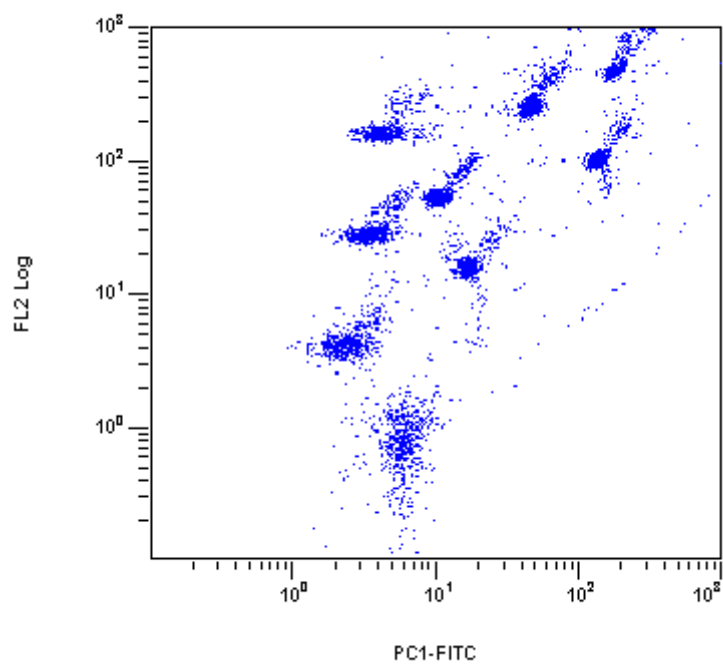
【過多気味】

2) FL2 - % FL1

サンプル c) を測定し FL2 / FL1 サイトグラムを見ながら、FL2 - % FL1 を調整します。(図 13)

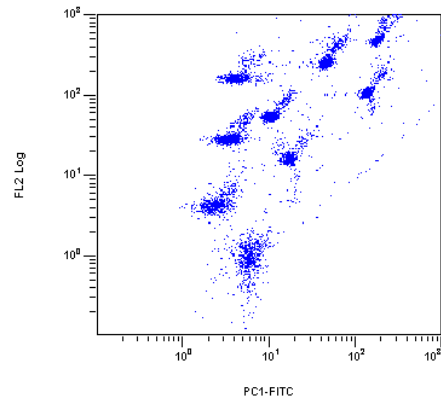
【図 13】 FL2 / FL1 プロット例

(F1)[A] Class I Group 2 Positive Control 1 00000165 002.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



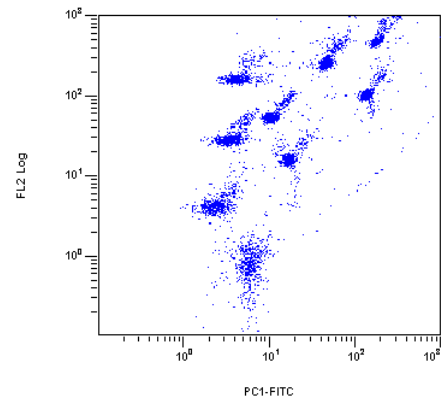
【図 14】 コンペンセーション (FL2 - % FL1) の調整と FL2 / FL1 サイトグラムの違い

(F1)[M] Class 1 Group 2 Positive Control 1 00000165 002.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



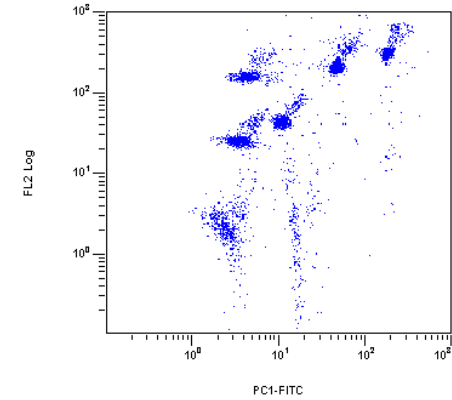
【不足気味】

(F1)[M] Class 1 Group 2 Positive Control 1 00000165 002.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



【良好】

(F1)[M] Class 1 Group 2 Positive Control 1 00000165 002.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



【過多気味】

ベックマン・コールター株式会社

本 社：〒135-0063 東京都江東区有明3-5-7 TOC有明ウエストタワー 製品・消耗品に関して ☎ 0120-566-730 ☎ 03-6745-4704
操作・修理・保守に関して ☎ 0120-826-777 ☎ 03-6745-4705
URL <http://www.beckmancoulter.co.jp> (日) **URL** <http://www.beckmancoulter.com> (英) **e-mail** bckkcas@beckman.com