



<u>Software</u>

CytExpert 儀器操控軟體,與機器連線收取 Flow Data 及進行數據分析

目 錄

- `	CytoFLEX Flow Cytometer 儀器外觀	. 2
二、	CytoFLEX 使用之 Channels 及對應螢光染劑	. 3
三、	[Semi-Automatic sample 模式] 開機步驟與軟體主畫面說明	. 5
四、	流式細胞儀品管流程	15
五、	[Semi-Automatic sample 模式] 設定新的 Experiment	20
六、	[Plate Loader 模式] 開機步驟與軟體主畫面說明	38
七、	[Plate Loader 模式] 設定新的 Experiment	53
八、	建立新的使用者	75
九、	數據輸出	77
+ 、	關機流程	80
+-	、 簡易故障排除	83
附錄	1: Surface Marker 樣品之製備及染色	85
附錄	2: 常用的 Cell Cycle 固定染色法(酒精固定法及 PI 染色)	86
附錄	3: CytoFLEX 常用耗材貨號	87

1

-、CytoFLEX Flow Cytometer儀器外觀

[CytoFLEX & CytoFLEX S]



[CytoFLEX LX]



(1) Fluid Containers(藍色管路Sheath Fluid, 黃色管路Waste Bottle), (2) Cytometer and (3) Workstation.

二、CytoFLEX使用之Channels及對應螢光染劑

[CytoFLEX]

Laser	Filter	Channel Names	Dyes
	525/40	FITC	FITC, AlexaFluor [™] 488, CFSE, Fluo-3
	585/42	PE	PE, PI
488nm	610/20	ECD	ECD, PE-Texas Red®, PE-CF594, PI
	690/50	PC5.5	PerCP, PerCP-Cy5.5, PE-Cy5, PE-Cy5.5
	780/60	PC7	PE-Cy7
	660/20	APC	APC, AlexaFluor [™] 647, eFluor [™] 660
638nm	712/25	APC-A700	APC-A700, AlexaFluor [™] 700
	780/60	APC-A750	APC-A750, APC-Cy7, APC-H7, APC-eFluor™ 780
	450/45	PB450	Pacific Blue, V450, eFluor 450, BV421, DAPI, Hoechst
	525/40	KO525	Krome Orange, AmCyan, V500, BV510
405nm	610/20	Violet610	BV605, <u>Qdot</u> ® 605, eF605
	660/20	Violet660	BV650, Qdot® 655
	780/60	Violet780	BV786, <u>Qdot</u> ® 800

[CytoFLEX S] 375 Laser

Laser	Filter	Channel Names	Dyes
	525/40	FITC	FITC, AlexaFluor™ 488, CFSE, Fluo-3
	585/42	PE	PE, PI
488nm	610/20	ECD	ECD, PE-Texas Red [®] , PE-CF594, PI
	690/50	PC5.5	PC5, PC5.5, PerCP, PerCP-Cy5.5, PE-Cy5, PE-Cy5.5
	780/60	PC7	PC7, PE-Cy7
	660/20	APC	APC, AlexaFluor™ 647, eFluor™ 660, Cy®5
638nm	712/25	APC-A700	APC-A700, <u>AlexaFluor</u> ™ 700, Cy [®] 5.5
	780/60	APC-A750	APC-A750, APC-Cy7, APC-H7, APC-eFluor [™] 780
	450/45	PB450	Pacific Blue, V450, eFluor™450, BV421, DAPI, Hoechst
405nm	525/40	KO525	Krome Orange, AmCvan, V500, BV510
	610/20	Violet610	BV605, <u>Qdot</u> [®] 605, eF605
27Emm	450/45	DAPI	DAPI, HoechstBlue
375nm	675/30	HoechstRed	HoechstRed

[CytoFLEX S] 561 Laser

Laser	Filter	Channel Names	Dyes
400	525/40	FITC	FITC, AlexaFluor™ 488, CFSE, Fluo-3
488nm	690/50	PC5.5	PC5, PC5.5, PerCP, PerCP-Cy5.5, PE-Cy5, PE-Cy5.5
	585/42	PE	PE, PI
E61nm	610/20	ECD	ECD, PE-Texas Red [®] , PE-CF594, PI
301mm	690/50	PC5.5	PC5, PC5.5, PerCP, PerCP-Cy5.5, PE-Cy5, PE-Cy5.5
	780/60	PC7	PC7, PE-Cy7
	660/20	APC	APC, AlexaFluor™ 647, eFluor™ 660
638nm	712/25	APC-A700	APC-A700, AlexaFluor TM 700
	780/60	APC-A750	APC-A750, APC-Cy7, APC-H7, APC-eFluor [™] 780
	450/45	PB450	Pacific Blue, V450, eFluor [™] 450, BV421, DAPI, Hoechst
405nm	525/40	KO525	Krome Orange, AmCvan, V500, BV510
4051111	610/20	Violet610	BV605, <u>Qdot</u> [®] 605, eF605
	660/20	Violet660	BV650, <u>Qdot</u> [®] 655

[CytoFLEX LX]

Laser	Filter	Channel Names	Dyes
	450/45	V450-PB450	Pacific Blue, V450, eFluor [™] 450, BV421, DAPI, Hoechst
	525/40	V525-KrO	Krome Orange, AmCyan, V500, BV510
405nm	610/20	V610	BV605, <u>Qdot</u> [®] 605, eF605
	660/20	V660	BV650, Qdot [®] 655
	763/43	V763	BV785, <u>Qdot</u> [®] 800
	525/40	B525-FITC	FITC, AlexaFluor™ 488, CFSE, Fluo-3
488nm	690/50	B690-PC5.5	PC5, PC5.5, PerCP, PerCP-Cy5.5, PE-Cy5, PE-Cy5.5
	610/20	B610-ECD	ECD, PE-Texas Red [®] , PE-CF594, PI
	610/20	Y610-Mcherry	Mcherry, ECD, PE-CF594
	585/42	Y585-PE	PE, <u>DsRed</u>
561nm	675/30	Y675-PC5	PC5, mPlum
	710/50	Y710-PC5.5	PC5.5, PE-AF680
	763/43	Y763-PC7	PC7
	660/20	R660-APC	APC, AlexaFluor™ 647, <u>eFluor</u> ™ 660, Cy®5
638nm	712/25	APC-A700	APC-A700, AlexaFluor [™] 700, Cy [®] 5.5
	763/43	R763-APC-A750	APC-A750, APC-Cy7, APC-H7, APC-eFluor™ 780
000	840/20	IR840-A790	Alexa Fluor®790
808 nm	885/40	IR885	PromoFluor-840, IR fixable viability dye

三、[Semi-Automatic sample模式] 開機步驟與軟體主畫面說明

- 1. 開啟 CytoFLEX 背面(左側)電源。
- 2. 確認 Sheath Fluid 足夠,並且清空廢液筒,不要鎖緊蓋子。
- 3. 開啟電腦主機以及螢幕電源,依常規模式進入 Windows 系統。



- 4. 點選桌面上 CytExpert 軟體 CytExpert, 進入操作軟體。
- 5. 點選 Cytometer,選擇 Sample Injection Mode,點選 Semi-Automatic 單管式 自動上樣,再開啟 CytoFLEX 背面(左邊)電源,使儀器自動校正上樣區位置:



6. Cytometer 儀器上樣區開關旋鈕模組①Switch module knob 旋轉至 T 位置,如



7. ※若有開啟[User Management功能],此時可見以下畫面:



- 8. ※選取專屬的Username,接著在Password欄位輸入密碼並按下 >> 繼續。
- 9. 此時進入軟體歡迎主畫面,確認左下方 Connected 及 Ready 和右下方 Sheath 及 Waste 為綠燈,表示電腦與機器連線完成。



3. Laser status.

10. 由 Cytometer 進入"System Start Up Program", 放上 2 mL 去離子水, 點擊 Start, CytoFLEX 執行 Priming、沖洗去離子水及 Warm Up, 約 10 分鐘完成開 機及暖機動作, 點擊 Close。



11. 由 File 進入(或起始頁面),點選 New Experiment 並儲存實驗檔案名稱,即可 見到軟體的工作區,如下圖:

File	Cytometer Settings QC Advanced Help		
	Acquisition		Ŧ
1	🏠 Initialize 🔵 Record 🔘 Restart		-
M	🖒 Standby 👫 Backflush 👔 Boost		
<u>/</u>	📲 Next Tube 🗶 Acq. Setting		
	Events/Sec: 0.0		
	Abort(%): 0.00		
	Events: 1戊 伯 1米1工 四 1 Time: 00:00:00		
	Collection		
	Events to Display: 1000 Events		
	V Events to Record: 10000 Events	綸 圖區	
	in All Events 👻		
	Time to Record: 600 Sec	Plot Area	
	Sample Flow Rate: 10 µL/min		
	● Slow		
	Tube		
	V V V V V P 🖉		
	Name Sample ID Time		
	O Tubel		
	工作清單編輯區		
	Test Tubes		
		4	1

- **1. Collection.** Establishes control over data recording options and displays the acquisition status.
- **2. Test tubes.** Allows you to configure and duplicate sample tubes, set display attributes, manage experimental data and compensation.
- **3. Plot area.** Includes plot and gating controls, as well as an area for drawing plots and generating graphs.

機器操控區(Collection)



- **1. Acquisition control.** Controls sample loading/unloading and data acquisition and recording.
- **2. Acquisition status.** Displays such information as the acquisition rate (Events/Sec), cell count, duration and abort (%).
 - Acquisition Sets the necessary conditions for recording data.

conditions.

3.

- Events to Record. Used to set the number of events to record in the specified population.
- **Time to Record.** Used to set the collection time duration in seconds.
- **4. Sample flow rate.** Sets the acquisition rate for data collection.
 - **Slow** : 10 μL/min **Medium** : 30 μL/min **High** : 60 μL/min
 - Custom : 10 240 µL/min

🔯 Initialize	Put the instrument in initialized state.
() Standby	Put the instrument in standy state.
Run	Start acquisition or continue an acquistion if previosly stop.
Stop	Stop the acquistion of the current sample and output the results.
Record	Used to set the collection conditions for sample recording.
O Restart	Reset the current acquired events to zero and clear the current data in memory. Acquisition restarts at zero events.
Backflush	Flush the sample line and flow cell with sheath fluid to remove bubbles.
🗊 Boost	To transfer the sample to the flow cell.
+) Next Tube	Switch to the next sample tube.
🔀 Acq. Setting	Display the acquisition setting dialog box to adjust the Cytometer settings.

※ ▲ Acq. Setting... Acquisition Setting 為儀器條件設定操控視窗,包含:

1. Gain:調整偵測器訊號放大程度。

Acq. Sett	Acq. Setting 🛛			
Gain	Threshold	Width		
FSC	[50	0 ‡ ⊧	(1~3000)
SSC	[50	0 ‡ ⊧	(1~3000)
FITC		50	0 ‡ ⊧	(1~3000)
PE		50	0 ‡ ⊧	(1~3000)
ECD		50	0 ‡ ⊧	(1~3000)
PC5.5		50	0 ‡ ⊧	(1~3000)
PC7		50	0 ‡ ⊧	(1~3000)
APC		50	0 ‡ ⊧	(1~3000)
APC-A	700	50	0 ‡ ⊧	(1~3000)
APC-A	750	50	0 ‡ ⊧	(1~3000)
PB450) [50	0 ‡ ⊧	(1~3000)
KO52	5	50	0 ‡ ⊧	(1~3000)
Violet	610	50	0 ‡ ⊧	(1~3000)
Violet	660	50	0 ‡ ⊧	(1~3000)
Violet	780	50	0 ‡ ⊧	(1~3000)
Set As	Default	Default	Ree	commended
Import from File Import from Catalog				
Expo	rt to File	Export	to Cata	alog Close

Note:

電壓值須注意不要過低,不要低於個位數。 一般細胞樣本 Background 建議設定在 $10^2 - 10^4$ 之間。 2. Threshold:排除雜訊的門檻,建議使用 Automatic 設定。

Acq. Setting	23				
Gain Threshold Width					
Primary Threshold (Trigger Level)	Primary Threshold (Trigger Level)				
Channel: FSC 🔻					
◎ Manual 10000 (>0) ● Height ◎ Area	711				
O Automatic					
Logic Operator:					
Secondary Threshold (Trigger Level)					
Channel:					
◎ Manual 1 (>0) ◎ Height ◎ Area					
O Automatic					
	-11				
Default					

3. Width:訊號通過的時間參數,可選擇所要偵測的參數值時間。



工作清單編輯區(Test Tubes)

0	Tube	
0 8	Name Sample ID Time	
		 Tube1 Tube2 Tube4

- 1. Test tube management controls. Manages sample tubes. Used to add, copy, or delete attributes, open the tube property, and open the compensation matrix.
- 2. Test tube status Displays a colored symbol in front of each tube indicating the status of the tube processing.

3. Test tube list.	Displays the sample tubes used in the experiment. Right-click a
	tube in the list to perform additional operations.

U†	New Tube	Create a new tube.
M	Duplicate without data	Create a blank row at the end of the current experiment.
V	Delete Tube	Delete one currently selected tube.
w it	Delete Multiple Tubes	Delete the multiple selected tubes.
u¢	Property	Sample tube basic information.
	Open the folder	Open the experiment folder.
<i>L</i> ∕≙	Compensation Matrix	Open the compensation matrix.

O _白	Indicates that the tube data was not collected.
●藍	Indicates that the tube data was acquired by selecting Run but not saved, and the tube data can be overwritten.
●綠	Indicates that the tube data was saved by selecting Record and that this data cannot be overwritten.

繪圖區(Plot area)

	Histogram	Create a Histogram Plot and specify the plot properties.
<u></u>	Dot Plot	Create a Dot Plot and specify the plot properties.
-	Density Plot	Create a Density Plot and specify the plot properties.
	Pseudo Color Plot	Create a Pseudo Color Plot and specify the plot properties.
0	Contour Plot	Create a Contour Plot and specify the plot properties.
· 🔟	New Histograms	Create multiple Histogram Plots and specify the plot properties.
	New 2-D Plots	Create multiple Dot Plots and specify the plot properties.
	Statistics	Create Statistical charts.
Ŀ	Population Hierarchy	Create Hierarchical charts.
Ι	Line Segment	Insert a Linear gating of plots.
Ι	Vertical	Insert a Vertical gating of plots.
P	Lasso	Insert a Lasso gating into a dual parameter plots.
\bigcirc	Polygon	Insert a Polygon gating into a dual parameter plots.
	Rectangle	Insert a Rectangle gating into a dual parameter plots.
+	Four Quadrant	Insert a Four Quadrant gating into a dual parameter plots.
-1	Hinged	Insert a Hinged gating into a dual parameter plots.
A	Auto Line Segment	Creat an Auto Line Segment around the selected population on a plot.
Ð	Auto Polygon	Creat an Auto Polygon around the selected population on a plot.
•	Zoom In	For Zooming in.
Θ	Zoom Out	For Zooming out.
<i>ধ</i> শ্য	Pan	For scaling axis ranges in the plots.
ধন্য	Single Side Pan	For scaling single axis range in the plots.
50	Adjust Gain	For increasing and lowering gain adjustments on the plots.
3	Adjust	For adjusting compensation of either of the parameters
A	Threshold	For setting the minimum particle size limit or flurescence intensity that acquisition will allow.
•	Undo	For undoing an action in the drawing area.
e	Redo	For redoing an action in the drawing area.

1	Align Left	Align all the selected items to the left of the selection area.
<u> </u>	Align Right	Align all the selected items to the right of the selection area.
T	Align Top	Align all the selected items to the top of the selection area.
<u>h</u>	Align Bottom	Align all the selected items to the bottom of the selection area.
Ŧ	Vertical Distribute	Align all the selected items to the vertical distribution.
н	Horizontal Distribute	Align all the selected items to the horizontal distribution.
	Make Same Width	Resize the selected items to all be the same width as the reference item.
	Make Same Hight	Resize the selected items to all be the same hight as the reference item.
[+] [+]	Make Same Size	Resize the selected items to all be the same size as the reference item.
	Rearrange	For restoring the plots to the default positions.
- 1	Print	For printing and previewing the plot area.
Q	Print Preview	Used to access the Preview screen.
¢	Page Setup	Used to adjust the page settings.
D	Batch Print	Used to print data for multiple tubes.
	Batch Export to PDF File	Used to print a PDF of the data for multiple tubes.

四、流式細胞儀品管流程

1. CytoFLEX Daily QC Fluorospheres 螢光品管微球

意義與目的:

CytoFLEX Daily QC Fluorospheres (Part # B53230)是一種大小和 螢光強度均一而穩定的螢光球懸浮液。用於 CytoFLEX 流式細胞儀每日 光學系統(散射光及螢光)及液流系統的調校與確效。

本產品為約 3 µm 大小的螢光球,可被 488 nm 藍光雷射、638 nm 紅光雷射及 405 nm 紫光雷射所激發,發射 410 nm 至 800 nm 波長的 螢光,用來評估前向散射光(Forward Scatter, FSC)、側向散射光(Side Scatter, SSC)以及 FL1 - FL13 的螢光參數。

CytoFLEX Daily QC 品管液所測得的前向散射光、側向散射光以及每個螢光參數 FL1 - FL13 都會依照下列原廠規範條件作檢測:

- The gain differences must must be ≤20% from the target gain.
- The median fluorescense intensity (MFI) differences must be≦5% from the target MFI.
- The rCV must be≦5%.

每次開機後,分析樣品前,務必先分析 CytoFLEX Daily QC 品管液 以確認儀器處於穩定狀態,或是當懷疑儀器故障或不穩定時,也可先分 析一管 CytoFLEX Daily QC 品管液進行初步檢查。 下載及輸入 CytoFLEX Daily QC Fluorospheres 的 Target Value。
 購買新一批 CytoFLEX Daily QC Fluorospheres,需到下列網址下载其
 Target Value 並輸入 CytoFLEX 軟體中。
 https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/page/softwareDownloadSearch

(1). 如下圖選擇後點擊 Search。

Technical Documents	My Technical Docum	ents Safety Data Sheets	(SDS/MSDS) Software Do	wnload	*Indicates required fields
Search By Proc	luct				
Market Segment* Research & Discovery	Product Line* Flow Cytometry	Product Series	CytoFLEX	Software Nat	me Fluorospheres 1
Lot Number All Search	English	×			

(2). 選擇購買 CytoFLEX Daily QC Fluorospheres 的批號(例如:A555F), 下載存在行動裝置中(A555.tgt)。

Software Name *	Product	Lot No.	Version	Item/REF NO.	Release Date	Language
CytoFLEX GC Fluorospheres Target Values	CytoFLEX	44137		B53230		English
CytoFLEX QC Fluorospheres Target Values	CytoFLEX	ASSSF		B53230		English

(3). 由 QC 進入 Start QC, 再由 Settings 進入 Target Library, Import 下载 的 Target Value。

	r 1								
Lot No. 4555	2015-09-30	Lot No.: A555 Expires: 2015-09-30							
		Channel		Mode	Value				
		FSC(Heig	ht)	Manual	5	50000			
		Signal							
		Laser	Filte	r	Gain	Median	Median Tolerance(rCV(%)	
			FSC		119	242482.7	5.00		
		Blue	488	/8	71	601799.5	5.00	5.1	
		Blue	525	/40	155	3313982.0	5.00	5.0	
		Blue	585,	42	108	1145402.0	5.00	5.1	
		Blue	690	/50	288	1545660.0	5.00	5.(
		Blue	780,	/60	466	262014.1	5.00	5.1	
		Red	660,	20	522	483724.0	5.00	5.1	
		Red	712	25	534	1892327.0	5.00	5.1	
		Red	780,	60	543	689351.1	5.00	5.1	

- 3. 執行 QC 流程,建議每天完成開機暖機後即進行此步驟,以瞭解儀器狀態。
 - (1). 將 CytoFLEX Daily QC Fluorospheres 自冰箱取出,先震盪讓沉澱的 QC Fluorospheres 均匀混合。
 - (2). 製備 CytoFLEX Daily QC Fluorospheres 品管液:

[Semi-Automatic sample 模式]

滴 3 滴於 tube 中(12 x 75 mm tube 或 1.5/2 mL 離心管),再加入 1 mL 去離子水均匀混合(此製備好的品管液可於 4℃ 冰箱避光保存 5 天),放置於上樣架準備上機。

[Plate Loader 模式]

滴1滴於well中,再加入200µL去離子水均勻混合,放置於盤式上樣 架準備上機,點擊Load。



(4). 選擇 CytoFLEX Daily QC 的 Lot No.例如: A555(Expires: 2015-09-30)。

QC	ngs neip	
Start	* Backflush	Boost
Lot No.: A555	(Expires: 2015-09	-30)
Current Detect	tor Configuration	:

(5). 點擊 Initialize ☆ Initialize 啟動儀器,再點擊 Start ▶ Start 即執行 CytoFLEX 的 QC 步驟,開始品管液分析。

如下圖顯示:



(6). 檢視 QC Report 結果, CytoFLEX Daily QC 品管液所測得的前向 散射光、側向散射光以及每個螢光參數 FL1 - FL13 是否都通過原廠規 範條件呈現綠色打勾 Pass ♥。此時表示機器穩定無問題,可繼續進行樣 品分析。

QC Report 結果如下:

QC Report

Bead Lot No.:	A555		
Bead Expires:	2015-09-30	QC Date:	2015-01-28 14:38
Cytometer Name:	DxFLEX	Cytometer SN:	A\$05034
Detector Configurati	on: Default-Configuration		
Loader Type:	Semi Automatic		

Threshold

Channel: FSC(Height) Mode: Manual Value: 50000

Laser

Laser	Delay(µs)	Power(mW)	Target Power(mW)	Result
Blue laser	0.48	52	40-60	0
Red laser	-40.00	44	40-60	0
Violet laser	44.16	84	70-120	0

Signal Value

Parameter	Gain	Target Gain	%Difference Target Gain	Median	Target Median	%Difference Target Median	rCV(%)	Target rCV(%)	Width	Result
FSC	80	80	0.00	245720.7	242482.7	1.34	-	-	980.0	9
SSC	202	202	0.00	624664.8	601799.5	3.80	-		1067.0	0
FITC	165	165	0.00	3344234.0	3313982.0	0.91	1.00	5.00	1090.3	0
PE	134	134	0.00	1155391.0	1145402.0	0.87	0.90	5.00	1095.0	0
ECD	196	196	0.00	624280.3	620159.8	0.66	1.02	5.00	1085.3	0
PC5.5	322	322	0.00	1562936.0	1545660.0	1.12	1.04	5.00	1091.9	0
PC7	419	419	0.00	263379.3	262014.1	0.52	1.32	5.00	1085.6	0
APC	479	500	-4.20	483638.6	483724.0	-0.02	1.45	5.00	1611.5	0
APC-A700	500	500	0.00	1857151.0	1892327.0	-1.86	1.32	5.00	1613.1	9
APC-A750	475	475	0.00	694970.5	689351.1	0.82	1.58	5.00	1613.7	0
PB450	94	94	0.00	725048.2	718632.1	0.89	2.52	5.00	1260.5	0
KO525	53	53	0.00	143906.7	143298.4	0.42	2.61	5.00	1261.1	0
Violet610	324	324	0.00	93317.3	92769.6	0.59	2.87	5.00	1262.9	0
Violet660	253	253	0.00	45540.2	45071.9	1.04	3.06	5.00	1260.4	0
Violet780	296	296	0.00	68841.3	68488.8	0.51	3.17	5.00	1264.6	0

Result

QC Passed.

當儀器穩定時呈現綠色打勾 Pass ♥,當儀器異常時呈現紅色交叉 Failed ⊗。

(7). 可進一步檢測第二頁面的 Levey-Jennings Charts [№], CytoFLEX Daily QC 品管液是否落於信賴區間內。如下圖顯示:



(8). 離開 QC Report 可由 File 進入,點擊 Close QC。

le	Cytometer	Settings	Advanced	Hel				
	New Experim	ment	Ctrl+N					
	New Experim	ment from	Template					
	New Compensation							
	Open Exper	iment	Ctrl+O					
	Open Compensation							
	Recent			•				
	Recent Template							
	Recent Com	pensation		•				
	Close QC							
	F. 34							

- (9). 若品管結果超出範圍顯示紅色交叉 Failed[◎],必須執行 Prime 以及 Deep Clean 步驟進行管路阻塞排除,或者執行 Daily Clean 管路清洗 流程,再重新分析一管 CytoFLEX Daily QC 品管液。
- (10). 若品管結果還是超出範圍, 請通知原廠工程師或者產品專員。

五、[Semi-Automatic sample模式] 設定新的Experiment

<u>雙染(FITC/PE)Surface Markers設定</u>

- ◆ 以CD3-FITC / CD4-PE為示範,需準備四管樣品用以調整儀器的設定值:
 - 1. 陰性樣品:未染色的細胞,或以lsotype抗體染色的細胞
 - 2. 單染FITC的陽性樣品
 - 3. 單染PE的陽性樣品
 - 4. 雙染的陽性樣品
- ▶ 操作步驟:
 - a. 開啟一個新的Experiment:

由File進入(或歡迎頁面),點選New Experiment並儲存實驗檔案名稱。



b. 選擇希望收取的參數:
 點擊Settings,選擇Set Channel,勾選Channels及標示抗體染劑名稱,
 點擊Close。

		Set Channel		-	1		
-	Acquisition	Set Chamera.		Use	Channel	Label	
۲,	100 100	Set Label		1	FITC	CD3-FITC	
_	44 mil	Set Customized Parameter		V	PE	CD4-PE	
	U Sta	Compensation Matrix		10	ECD		
M	•laf Net	Companying Library		13	PC5.5		
		Compensation Library		10	PC7		
	Events/S	Events Display Setting		12	APC		
	Abort(%)	Options		10	APC-A700		
	Events:	0 -	1 1	100	APC-A750		
	Time	00-00-00		12	PB450		
	- inne.			13	KO525		
	1		÷	10	Violet610		
				10	Violet660		
				10	Violet780		
				-		Analyta	Class

C. 利用已勾選的參數繪製希望分析的圖形:

在繪圖工具列中點選Dot Plots,於圖形上的X/Y軸點滑鼠左鍵,選擇想要標示的抗體螢光參數。



d. 確認Threshold是否設定完成:

在繪圖工具列中點選Threshold ,此時會於FSC/SSC圖形上出現 automatic的藍色虛線,Surface Marker的實驗中,建議將Threshold設 於FSC第一個刻度位置。



- e. 分析陰性樣品(可使用未染色的樣品,或以lsotype抗體染色的陰性樣品),依下列方式調整各個偵測器的Gain值:
 - 左下角Tube表格雙擊Name欄位,輸入樣品名稱(例如Unstain / Isotype)



2. 按下儀器操控區中的Run Pun ,此時機器開始收集樣品數據 (此時所收集的數據會於樣品名稱顯示閃爍的藍色圓圈,表示暫存, 圖形中的數據呈現動態的變動),並顯示在剛才畫好的圖形上,使 用繪圖區的Gain 翻點FSC/SSC的Gain值,或使用Pan 20 或 Single Side Pan 20 調整X/Y的Scale,找到FSC/SSC中想要分析 的細胞族群。使用圈選工具列,對FSC/SSC的細胞群以多邊形 Polygonal Gate 圖選P1 Gate。



3. 接著調整FL1、FL2的Gain值,於螢光圖上方點選左鍵,選擇P1 Gate觀察,接著以十字象限 定義Negative位置,使FL1/FL2雙參 數圖形的細胞落在左下角第一個Log位置。



- f. 分析單染的陽性樣品調整螢光補償值(Compensation):
 使用兩管樣品:以FL1單染樣品調整FL2-%FL1
 以FL2單染樣品調整FL1-%FL2
 - 上樣CD3-FITC單染樣品,左下角Tube表格新增1管 [▶],雙擊 Name欄位輸入樣品名稱(例如CD3)。點擊Run ▶^{Run},接著使 用繪圖區的Compensation [№],調整螢光補償。直接在Plot上拖拉 細胞群即可設定螢光補償。



 2. 上樣CD4-PE單染樣品,左下角Tube表格再新增1管 ♥,雙擊 Name欄位輸入樣品名稱(例如CD4)。點擊Run ▶ Run ,調整螢 光補償Compensation ♥,直接在Plot上拖拉細胞群即可設定螢光 補償。



3. 分析雙染樣品,左下角Tube表格再新增1管 [▶],雙擊Name欄位輸入樣品名稱(例如CD3-CD4)。點擊Run ^{▶ Run},即以設定好的條件分析樣品,點擊Record ^{● Record}正式收取樣品數據(此時所收集的數據會於樣品名稱顯示閃爍的綠色圓圈)。

<u>將Experiment儲存為Template</u>

- ◆ 如將已設定好的Experiment,之後需再進行使用時可以儲存此Template。
- ▶ 操作步驟:
 - 1. 於已設定好的Experiment中,點選File,選擇Save as Template並 儲存實驗檔案名稱。

		Save as						×
		₩	證禮→	文件	، ۲	4 提尋 CytExp	ert Data	Q
File	Cytometer Settings QC Advanced	組合管理 ▼ 新	首資料	夾			855 💌	0
	New Experiment Ctrl+N New Experiment from Template	 ▲ ☆ 我的最愛 ▶ 下載 	Î	文件 媒體櫃 CytExpert Data		排列	方式: 資料夾	•
	New Compensation	重 桌面		名稱		修改日期	類型	
	Open Experiment Ctrl+O Open Compensation	≝ 最近的位置 ↓ bit (Svtwtaifile)	e)) Compensation		2016/6/20 下午1 1		
	Save Ctrl+S Save As	▲ 词 媒體櫃 → 🖹 文件	-					
	Save As Template	→ 小 音英			選擇儲存	路徑及存	檔名稱	ĥ
	Import FCS File Export FCS File	▶ 📷 視訊 ▶ 📷 圏片	-	•				•
		檔案名稱(N):	Exp te	est Template				•
		存檔類型(T):	Temp	late File				•
		● 陽職資料夾				存櫙(S)	取消	

2. 之後需進行相同Experiment時,由File進入(或歡迎頁面),點選New Experiment from Template。



3. 點選New Experiment的Browse Browse... 儲存新實驗檔案名稱。

👬 New Experime	nt from Template	e		23
New Experiment:				Browse
Template:				Browse
			ОК	Cancel
New				6
) 🖉 🚽 « ycher	109 ▶ 我的文件 ▶ 0	lytExpert Data	▼ 4] / 提尋 Cyi	tExpert Data
組合管理 ▼ 新増算	E科夾			800 - (
☆ 我的最愛 ● 下載 ■ 桌面 ◎ 最近的位置 ● MIS Software ● BIT (svbit001) ● RolesMatrix (svb	E	沒养	1964日的 19行会授导的項目。	79 ad
> 媒體櫃 ■ 文件		選擇	尾储存路徑 2	及存檔名稱
→ 音樂	+ -	ii.	1	
	p_Test			
檔案名稱(N): Ex 存檔頻型(T): Ex	p_Test periment File			

4. 再點選Template的Browse選擇之前儲存的Template.xitm檔。

New Experime	ent from Template		23	
New Experiment:	C:\Users\ychen09\Documents\C	tExpert Data\Exp_test.	Browse	
Template:			Browse	
		ОК	Cancel	
Open			F	×
🕽 🔵 🗢 🕌 « 文件 🕨 我	的文件) CytExpert Data)	▼ 49 複尋 Cyti	Expert Data	\$
組合管理 ▼ 新増資料夾			III - 🔟	0
★ 我的最爱 ▲ 下載	文件 媒體櫃 CytExpert Data	ł	非列方式: 資料夾·	•
重桌面	名稱	修改日期	類型	
🗐 最近的位置	Compensation	2016/6/20下午	1 檔案資料夾	
N			The second s	
▶ bit (Svtwtaifile) 無體櫃 文件 ♪ 音樂	□ Exp test Template.xitm 選擇之前	^{2016/8/21下} 年 前儲存的 Temp	olate.xitm	檔
 ▶ bit (Svtwtaifile) 目 原 煤麺種 文件) 音振 観視 副片 	■ Exp test Template.xitm 選擇之育	^{2016/8/21 下年} 行儲存的Temp	a xm 福震 late.xitm;	檔
 ▶ bit (Svtwtaifile) ○ 媒題種 ○ 文件 ◆ 音樂 ○ 視訊 ○ 副片 ● 電燈 	Exp test Template.xitm 選擇之育	^{2016/8/21 下午} 	a xtm 楣案	檔
 ▶ bit (Svtwtaifile) ○ 媒體種 ○ 文件 ◆ 百芸 ○ 視訊 ○ 副片 ○ 電腦 ○ 電腦 ○ 電腦 	Exp test Template.xitm 選擇之育 (□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	2016/8/21 下午 行儲存的Temp ″ ▼	oxtm 福震	檔
 ▶ bit (Svtwtaifile) ○ 旗鐙櫃 ○ 文件 ♪ 音談 ■ 視訊 ■ 圖片 ● 電腦 ● 電腦 ● 電腦 	Exp test Template.xitm 選擇之育 (2016/8/21下午 可儲存的Temp " Template File 關範黃篇(0)	o… xitm 編奏 plate.xitm;	は
 ▶ bit (Svtwtaifile) ○ 烘麵種種 ○ 文件 ♪ 音獎 ○ 視訊 ○ 副片 ○ 電腦 ○ 電腦 ○ 電腦 	Èxp test Template.xitm 選擇之育 (2016/8/21下午 行储存的Temp 「 「Template File 願欽舊囉(○)	olate.xitm plate.xitm	
 ▶ bit (Svtwtaifile) ○ 媒體種 ○ 文件 > 言樂 副月 副月 ■ 電腦 ● 電腦 	〕Exp test Template.xitm 選擇之育 痛(N): Exp test Template.xitm	2016/8/21下午 行儲存的Temp " 「Template File 開飲舊種(O)	o… xitm 編素 plate.xitm;	は
 ▶ bit (Svtwtaifile) ○ 烘麵種 ○ 文件 ♪ 音獎 ● 潮州 ● 副片 ● 電燈 ● ● 電燈 ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ●	Exp test Template.xitm 選擇之育 (□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	2016/8/21下年 可儲存的Temp " ▼ Template File 關致黃燭(O)	o… xitm 編奏 plate.xitm; ▼ ■取満	
▶ bit (Svtwtaifile) 原 媒體種 ○ 文件 ● 言类 副 視訊 ● 圖片 福葉名	□ Exp test Template.xitm 選擇之方 嗎(N): Exp test Template.xitm ■ mt from Template C:\Users\ychen09\Documents\C)	2016/8/21下午 前儲存的Temp 「 「Template File 開設產備(O) rtExpert Data\Exp_test.	≥	
 ▶ bit (Svtwtaifile) 無 旗題恒 ○ 文件 ● 音獎 ● 視見 ● 電腦 ● ■ ■ □ ● ■ ■ □ ● ■	□ Exp test Template.xitm 選擇之育 編(N): Exp test Template.xitm mt from Template C:\Users\ychen09\Documents\C) C:\Users\ychen09\Documents\C)	2016/8/21下午 行儲存的Temp 「 「Template File 「開設蓋幅(O) /tExpert Data\Exp_test. /tExpert Data\Exp_test.	≥	

5. 選擇完成後點擊OK,開啟既有Template。

自動螢光補償設定

以CD3-FITC / CD4-PE / CD19-PC5.5 / CD16-PC7及CD56-PC7 / CD8-APCA700 / CD45-KO 6色染色為示範,共有8管樣品分別為Unstained / Isotype、各抗體單色染色和6色染色樣品。

1. 由File進入(或起始頁面),點選New Compensation並儲存實驗檔案名稱。

	New New					×
	〇〇〇 - <mark>】</mark> « 我	的文件	ensation 👻 🐓	· 授尋 Compe	ensation	٩
	組合管理 ▼ 新:	増資料夾			• ==	0
File Cytometer Settings QC Advanced New Experiment Ctrl+N New Experiment from Template New Compensation Open Experiment Ctrl+O Open Compensation	 ★ Favorites ■ Desktop ▶ Downloads ♥ Recent Places ♥ Libraries ■ Documents ■ Music ■ Pictures ♥ Videos ♥ Videos ♥ Computer ▲ Local Disk (C:) Persentia Pick (C:) 	Name Comp_20150318_6 colors Comp_20150319_Ruby pai Comp_20150318_6 colors.xitc Comp_20150319_Ruby.xitc pai.xitc	Date modified 3/18/2015 3:39 PM 3/19/2015 4:48 PM 3/25/2015 4:22 PM 3/18/2015 3:39 PM 3/19/2015 4:48 PM 3/25/2015 4:22 PM	Type File folder File folder File folder XITC File XITC File XITC File	Size 210 KB 209 KB 354 KB	
	檔案名稱(N): 存檔類型(T): ▲ 陽藏資料夾	Comp_20150517 6 color Compensation Experiment File		存榴(S)	取消	

2. 依照軟體導引,勾選使用細胞或珠子以及使用染劑,點擊OK。

Use	Tube	Label	Lot No.	Sample Type
1	Unstained_Cell			🔘 Cell 🔘 Bead
	Unstained_Bead			🔘 Cell 🔘 Bead
\checkmark	FITC			O Cell ◎ Bead
V	PE			🧿 Cell 🛛 🔘 Bead
	ECD			🔘 Cell 🔘 Bead
V	PC5.5			🔘 Cell 🔘 Bead
1	PC7			🧿 Cell 🔘 Bead
	APC			🧿 Cell 🔘 Bead
V	APC-A700			💿 Cell 🛛 🔘 Bead
	APC-A750			🧿 Cell 🔘 Bead
	PB450			🧿 Cell 🔘 Bead
1	KO525			🧿 Cell 🛛 🔘 Bead
	Violet610			🧿 Cell 🛛 🔘 Bead
	Violet660			🧿 Cell 🔘 Bead
	Violet780			💿 Cell 🔘 Bead

3. 此時軟體會根據所勾選染劑自動畫圖,並且左下角Tube表格自動設定準備上 樣之Unstained / Isotype及單色染色樣品管。



4. 先上Unstained / Isotype樣品管,點擊Run。



5. 調整FSC/SSC設定(使用Scale ⁽⁾ ⁽⁾, FSC/SSC五角型圈選, Threshold





6. 分別再上樣單色FITC、PE、PC5.5、PC7、APC-A700及Krome Orange,並 且調整單色染色的Positive區域中的Linear Rang。







7. 再Double Check並微調各個單色染色的Positive區域中的Linear Rang。點擊

快捷工具列Compensation Calculation 6色Compensation Matrix計算完成。

✓ Use	S	show Au	tofluor	escence	•							A	rea 🔻
Cha	-FIT	-PE%	-EC	-PC	-PC	-AP	-AP	-AP	-PB	-KO	-Vio	-Vio	-Viole.
FITC		1.08	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.66	0.00	0.00	0.00
PE	19.06		0.00	2.34	2.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.46	0.00	0.00	0.00
ECD	22.23	148		3.32	3.54	0.00	0.00	0.00	0.00	0.76	0.00	0.00	0.00
PC5.5	1.33	9.97	0.00		0.84	0.00	1.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PC7	0.34	2.16	0.00	63.64		0.00	0.97	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
APC	0.00	0.00	0.00	2.55	0.06		15.18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
APC	0.00	0.00	0.00	33.23	0.06	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
APC	0.00	0.00	0.00	33.41	13.54	0.00	107		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PB4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		6.07	0.00	0.00	0.00
KO5	1.37	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00
Viol	0.81	12.56	0.00	0.00	0.22	0.00	0.00	0.00	0.00	253		0.00	0.00
Viol	0.09	1.46	0.00	0.19	0.02	0.00	0.59	0.00	0.00	38.29	0.00		0.00
Viol	0.08	0.28	0.00	6.31	10.17	0.00	4.31	0.00	0.00	8.60	0.00	0.00	

8. 點擊Save to Compensation Library, 給予檔名後點擊OK。

Keywords: 6 colors						
Compensation Librar	у					
Keywords	Calculation Date					
20150202-5c	2015-02-02 11:39:44	-				
20150318-6c	2015-03-18 15:39:18					
20150319_6C_Ruby	2015-03-19 16:46:54					
APC-A750	2015-01-23 10:58:55 2015-03-02 15:11:38 2015-01-23 10:58:55					
CGU-3 colors						
FITC						
ко	2015-01-23 10:58:55					
PC5.5	2015-01-23 10:58:55					
PC7	2015-01-23 10:58:55					
DE	201E 01 21 16.44.54	¥				

- 9. 點擊Save As,儲存此Compensation Matrix,此Matrix可以套用於其後相同 染色的 Experiment,例如以下例子。
- 10. New Experiment, 在Tube表格上的工具列點擊Compensation Matrix DDL後, 再點擊Import。

Use	Sł	low Aut	ofluore	scence		Area and Height in Sync Area							
Cha	-FIT	-PE%	-EC	-PC	-PC	-AP	-AP	-AP	-PB	-KO	-Vio	-Vio	-Viole
FITC		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PE	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ECD	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PC5.5	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PC7	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
APC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
APC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
APC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PB4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00
KO5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00
Viol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00
Viol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00
Viol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

11. 選擇已經儲存的Compensation Matrix, 勾選"Import compensation matrix and gain", 再點擊OK。



12. 先針對這個Experiment畫圖(Dot Plots、Histogram)再跑樣品,此實驗會使用這個Compensation Matrix所設定的電壓(Gain)及螢光補償值跑樣品。



Cell Cycle 設定

- ▶ 操作步驟:
 - a. 開啟一個新的Experiment: 由File進入(或起始頁面),點選New Experiment並儲存實驗檔案名稱。



b. 選擇希望收取的參數:
 點擊Settings,選擇Set Channel,勾選Channels及標示染劑名稱,點擊Close。

File C	Cytometer Setti	ngs QC Advanced Help		Set Chan	nel - Tube1		23
	Acquisitio	Set Channel		Use	Channel	Label	
ᢣ	The Init	Set Label			FITC		
		Set Customized Parameter			PE		
Λ.	U Sta	Compensation Matrix		V	ECD	PI	
<u>/~~</u>	•] Ne:	Compensation Library			PC5.5		
		compensation cionary			PC7		
	Events/S	Events Display Setting			APC		
	Abort(%)	Options			APC-A700		
	Events:	0			APC-A750		
	Time:	00:00:00	-		PB450		
					KO525		
					Violet610		
					Violet660		
					Violet780		
						Apply	to Close

C. 利用已勾選的參數繪製Cell Cycle所需分析的圖形如下:

在繪圖工具列中點選Dot Plots 及Histogram ,於圖形上的X/Y軸點滑鼠左鍵,選擇想要標示的染劑螢光參數Pl-A/Pl-H,並點選圖形的 右上角螺絲圖,將Pl X/Y軸選為線性Linear。



d. 確認Threshold是否設定完成:

在繪圖工具列中點選Threshold ,此時會於FSC/SSC圖形上出現 Automatic的藍色虛線, Cell Cycle的實驗中,建議將Threshold設於FSC 第一個刻度位置。



- e. 分析陽性樣品(已固定且以PI染色的健康細胞),依下列方式調整各個偵 測器的Gain值:
- 1. 左下角Tube表格雙擊Name欄位, 輸入樣品名稱(例如Control)。



 按下儀器操控區中的Run ▶ Run ,此時機器開始收集樣品數據(此時所 收集的數據會於樣品名稱顯示閃爍的藍色圓圈,表示暫存,圖形中的數 據呈現動態的變動),並顯示在剛才畫好的圖形上。



使用繪圖區的 Gain ⁽³⁾,調整 FSC/SSC 的 Gain 值或使用 Pan ⁽⁷⁾ ⁽⁷⁾調整 X/Y 軸的 Scale, 找到 FSC/SSC 要分析的主要細胞族群,以多 邊形 Polygonal Gate 〇 圈選 Cell Gate。



調整雙參數點圖 PI-A/PI-H Gain ³⁰⁰,使單顆 細胞分佈在由左下到右上的 45 度角,以多邊 形 Polygonal Gate ^〇 圈選 Single cells Gate。


最後檢視單參數 PI-A 微調 Gain 值[₩],使 G0/G1 Phase 主要位於第二或第三個刻度位 置,此時即可得到 Cell Cycle 最後圖形。

3. 以Line Segment ── 圈選Cell Cycle Phase

後點選統計圖表Statistics 🔟,出現統計數值表後點選滑鼠右鍵,選擇 Statistics Setting,選取第二頁面Statistic,即可勾選PI CV統計參數。



Note :

- 步驟中切記觀察細胞是否有群聚現象,若細胞無法拍散,則需過篩或重新置 備樣品。
- 結果評估:數據收取後,通常會檢視 GOG1 Phase 的變異係數(CV 值),用以 評估細胞的固定、染色過程是否完善。一般來說,會要求 Control 組的 GO/G1 Phase 的 <u>CV 值必須小於 8</u>,代表細胞的固定過程良好,並具有均一的染色 結果,如下圖。CV 值大於 8 的數據,必須捨棄不用。



Population	Events	% Total	% Parent	Mean PI ECD-A	CV PI ECD-A
All Events	14468	100.00%	100.00%	3991389.3	50.05%
😑 subG1	49	0.34%	0.50%	1367337.4	21.42%
O G0G1	5036	34.81%	50.99%	1980746.5	2.56%
S S	2166	14.97%	21.93%	2844225.8	18.90%
G2M	2625	18.14%	26.58%	3803745.5	3.02%
🔴 P1	12404	85.73%	85.73%	2911448.8	33.56%
P2	9876	68.26%	79.62%	2651626.5	14.94%

- 3. CV 值不好的結果可能肇因於:
 - 細胞固定步驟不良 → 改善固定步驟,請教有經驗者。
 - 使用了不當的固定試劑 → 更換固定試劑。
 - 染色時間不足 → 增加染色時間。
 - RNase 處理時間不足 → 增加 RNase 處理時間。有時候可將 CV 值太 高的樣品再放入 37℃中反應 10 分鐘,即可改善結果。

六、[Plate Loader模式] 開機步驟與軟體主畫面說明

- 1. 開啟 CytoFLEX 背面(左側)電源。
- 2. 確認 Sheath Fluid 足夠,並且清空廢液筒,不要鎖緊蓋子。
- 3. 開啟電腦主機以及螢幕電源,依常規模式進入 Windows 系統。



- 4. 點選桌面上 CytExpert 軟體 CytExpert, 進入操作軟體。
- 5. 點選 Cytometer,選擇 Sample Injection Mode,點選 Plate Loader 盤式上樣, 再開啟 CytoFLEX 背面(左邊)電源,使儀器自動校正盤式上樣區位置:



6. Cytometer 儀器上樣區開闢旋鈕模組①Switch module knob 旋轉至 P 位置,如下圖顯示:



7. ※若有開啟[User Management功能],此時可見以下畫面:



- 8. ※選取專屬的Username,接著在Password欄位輸入密碼並按下 繼續。
- 9. 此時進入軟體歡迎主畫面,確認左下方 Connected 及 Ready 和右下方 Sheath 及 Waste 為綠燈,表示電腦與機器連線完成。



3. Laser status.

 由 Cytometer 進入"System Start Up Program", 放上 3 wells (250 µL/well)去 離子水,選擇盤子形式,點擊 Load 及 Start, CytoFLEX 執行 Priming、沖洗去 離子水及 Warm Up,約 10 分鐘完成開機及暖機動作,點擊 Close。



11. 由 File 進入(或起始頁面),點選 New Experiment 並儲存實驗檔案名稱,即可 見到軟體的工作區,如下圖:



- **4. Collection.** Establishes control over data recording options and displays the acquisition status.
- **5. Test tubes.** Allows you to configure and duplicate sample tubes, set display attributes, manage experimental data and compensation.
- **6. Plot area.** Includes plot and gating controls, as well as an area for drawing plots and generating graphs.

機器操控區(Collection)



1. Acquisition control.

Controls sample loading/unloading and data acquisition and recording.

2. Acquisition status. Displays such information as the acquisition rate (Events/Sec), cell count, duration and abort (%).

3. Act	quisition	Sets the necessary conditions for recording data.
- Events to R	ecord.	Used to set the number of events to record in the specified population.
- Time to Rec	ord.	Used to set the collection time duration in seconds.

4. Sample flow rate.

Sets the acquisition rate for data collection.

- Slow : 10 $\mu L/min$ Medium : 30 $\mu L/min$ High : 60 $\mu L/min$
- **Custom :** 10 240 µL/min

🔯 Initialize	Put the instrument in initialized state.
U Standby	Put the instrument in standy state.
► Run	Start acquisition or continue an acquistion if previosly stop.
Stop	Stop the acquistion of the current sample and output the results.
Record	Used to set the collection conditions for sample recording.
O Restart	Reset the current acquired events to zero and clear the current data in memory. Acquisition restarts at zero events.
Backflush	Flush the sample line and flow cell with sheath fluid to remove bubbles.
🖞 Boost	To transfer the sample to the flow cell.
+]∎ Next Tube	Switch to the next sample tube.
🔀 Acq. Setting	Display the acquisition setting dialog box to adjust the Cytometer settings.
Eject	Open the plate holder.
Auto Record	Sample acquisition occurs in the order indicated by the numbers

※ ▲ Acq. Setting... Acquisition Setting 為儀器條件設定操控視窗,包含:

1. Gain:調整偵測器訊號放大程度。

Acq. Sett	ing			23
Gain	Threshold	Width		
FSC	[50	0 ‡ ⊧	(1~3000)
SSC	[50	0 ‡ ⊧	(1~3000)
FITC		50	0 ‡ ⊧	(1~3000)
PE		50	0 ‡ ⊦	(1~3000)
ECD		50	0 ‡ ⊧	(1~3000)
PC5.5		50	0 ‡ ⊧	(1~3000)
PC7		50	0 ‡ ⊧	(1~3000)
APC		50	0 ‡ ⊧	(1~3000)
APC-A	700	50	0 ‡ ⊧	(1~3000)
APC-A	750	50	0 ‡ ⊧	(1~3000)
PB450) [50	0 ‡ ⊧	(1~3000)
KO52	5	50	0 ‡ ⊧	(1~3000)
Violet	610	50	0 ‡ ⊧	(1~3000)
Violet	660	50	0 ‡ ⊧	(1~3000)
Violet	780	50	0 ‡ ⊧	(1~3000)
Set As Default Default Recommended				
Import from File Import from Catalog				
Export to File Export to Catalog Close				

Note:

電壓值須注意不要過低,不要低於個位數。 一般細胞樣本 Background 建議設定在 $10^2 - 10^4$ 之間。 2. Threshold:排除雜訊的門檻,建議使用 Automatic 設定。

Acq. Setting	23						
Gain Threshold Width							
Primary Threshold (Trigger Level)	Primary Threshold (Trigger Level)						
Channel: FSC -							
◎ Manual 10000 (>0) ● Height ○ Area	711						
O Automatic							
Logic Operator:							
Secondary Threshold (Trigger Level)							
Channel:							
	-11						
(>0) O Height O Area	-11						
Automatic							
Default							

3. Width:訊號通過的時間參數,可選擇所要偵測的參數值時間。



工作清單編輯區(Test Tubes)

A .	Tube	
	🔰 🗤 🗗 🗤 🕼 🖆 油	
0	Name Sample ID Time	
3		
		O Tube1
		🔵 Tube2
		O Tube4

1. Test tube management Manages sample tubes. Used to add, copy, or delete attributes, controls. open the tube property, and open the compensation matrix.

status Displays a colored symbol in front of each tube indicating the 2. Test tube indication. status of the tube processing.

3. Test tube list.	Displays the sample tubes used in the experiment. Right-click a
	tube in the list to perform additional operations.

• • • •	Plate	Open the plate window.	
•+	Add Plate	Add one new plate.	
+	Add Plate from Template	Add a plate template with preset settings.	
	Duplicate Current Plate without Data	Creat a copy of the selected plate without data.	
••	Delete Plate	Delete one plate.	
•	Save Plate Template	Save the plate condition as a template.	
L.	Set As Sample Wells	Set selected wells as sample wells.	
Ы	Set As Cleaning Agent Wells	Set selected wells as cleaning wells.	
Ĩ	Set As Deionized Water Wells	Set selected wells as Deionized Water wells.	
П	Set As Empty Wells	Reset selected wells as empty.	
419	Set Acquisition Condition	Select the desired acquisition settings.	
	Set Auto Acquisition	Set the selected wells for auto record.	
×	Cancel Auto Acquisition	Remove the auto record setting from the selected wells.	
	Heat Map	Open Heat Map window.	
•+	New Heat Map	Add one new plate with Heat Map.	

	Duplicate	Duplicate current Heat Map.		
	Modify Current Heat Map Setting	Modify existing Heat Map settings.		
• X • •	Delete Current Heat Map	Delet a single Heat Map from the list of Heat Map window.		
×.	Delete Multiple Heat Maps	Delet multiple Heat Maps from the list of Heat Map window.		
٢2	Refresh	Refresh a single Heat Map from the list of Heat Map window.		
Q	Refresh All	Refresh all Heat Maps from the list of Heat Map window.		
Ð	Export to Graphic File	Export a Heat Map as a Graphics File(.bmp or .emf)		
-	Export to Clipboard	Export a Heat Map to a Clipboard file(.bmp)		

✔藍勾	A blue check mark means the data is acquired, not recorded.
< <p>✓ 線勾</p>	A green check mark means the data is recorded.
∞紅叉	A red cross mark means the data is recorded. But the acquisition is terminated abnormally. For example, the well is skipped or the acquisition is manually stopped.

■ Set As Sample Wells 為儀器設定操控視窗,包含:

1. Naming Rules、Mix/Backflush 及 Group

Acq. Se	etting:調整 Ga	ain 、	Threshold 及 Width。		
Set As Sample W	ells				
Naming Rules		Mi	ix/Backflush Group		
Prefix: Tub	pe <mark>.</mark>		Mix 3 sec (0.1~100) Name:		✓ Apply to Sa
Example: 01-T	Tube-A1	V	Backflush 3 sec (0.1~100) Color:		
Acq.Setting	Channel Compensation Matrix	Stopping	Rules		
Gain			Threshold	Width	
FSC	500 1~3000)		Primary Threshold (Trigger Level)	Channel: FSC	Ŧ
SSC	500 🗘 🕨 (1~3000)		Channel: FSC +		
FITC	500 ⁺ + (1~3000)		○ Manual 10000 (>0) ○ Height ○ Area]	
PE	500 + (1~3000)	=	 Automatic 		
ECD	500 ÷ + (1~3000)		Logic Operator:		
PC5.5	500 ÷ + (1~3000)		Secondary Threshold (Trigger Level)		
PC7	500 1~3000)		Channel:		
APC	500 🗘 🕨 (1~3000)		◯ Manual 1 (>0) ◯ Height ◯ Area		
APC-A700	500 + (1~3000)		⊚ Automatic		

Default

2. Channel: 勾選 Channels 及標示抗體染劑名稱。

Default Recommended

Set As Sample Wells			83
Naming Rules	Mix/Backflush		Group
Prefix: Tube	Mix 3	sec (0.1~100)	Name: 📝 Apply to Sample ID
Example: 01-Tube-A1	✓ Backflush 3	sec (0.1~100)	Color:
Acq.Setting Channel Compensation Matrix Stop	oping Rules		
Use Channel		Label	
✓ FITC			
PE			
ECD ECD			
PC5.5			
PC7			
APC APC			
APC-A700			
APC-A750			
✓ PB450			
KO525			
Violet610			
Violet660			
Violet780			
			Import Acquisition Conditions from FCS File
			OK Cancel

23

nple ID

Default

OK Cancel

Import from File... Import from Catalog... Import Acquisition Conditions from FCS File...

3. Compensation Matrix:設定 Compensation 數值。

et As Sample	e Wells											23
Naming R	ules				Mix	/Backflusł	ı			(Group	
Prefix:	Tube					Лix	3	sec	(0.1 ~ 10	0) N	ame:	✓ Apply to Sample ID
Example:	01-Tube-A1	I I E	☑ Backflush 3 sec (0.1~100) Color:			0) C	olor:	· ·				
Acq.Setti	ng Channe	Comp	ensation N	Natrix St	opping R	ules						
🔽 Use	Show Aut	ofluoresco	ence									Area and Height in Sync Area 💌
Autofl.	Channel	-FITC%	-PE%	-PC5.5%	-PC7%	-APC%	-APC- A700%	-APC- A750%	-PB45 0%	-KO52 5%	-Violet 610%	
0.00 ‡	FITC		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	0.00	
0.00	PE	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	0.00	
0.00	PC5.5	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	0.00	
0.00	PC7	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	0.00	
0.00	APC	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.0	0.00	
0.00	APC-A700	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.0	0.00	
0.00	APC-A750	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.0	0.00	
0.00	PB450	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.0	0.00	
0.00	KO525	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	
0.00	Violet610	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	0	
												Import from Library Import
												Import Acquisition Conditions from FCS File
												OK Cancel

4. Stopping Rules:設定儲存條件。

Set As Sample Wells		23
Naming Rules	Mix/Backflush	Group
Prefix: Tube	✓ Mix 3 sec (0.1~100)	Name: Apply to Sample ID
Example: 01-Tube-A1	✓ Backflush 3 sec (0.1~100)	Color:
Acq.Setting Channel Compensation Matrix Stop	oping Rules	
Events to Record: 10000 Events		
in P1 -		
▼ Time to Record: 600 sec		
		Import Acquisition Conditions from FCS File
		OK Cancel

🔲 Heat Map 設定操控視窗,包含:

5. Heat Map Window •

Heat Map	23



6. New Heat Map •

New Heat Map	83
Name:	🗇 Display Name Plate: 01 💌
Parameter	
No. Expression Label Use Custom Range	Min Max Actual Range
Display Value	Add Delete
Wall	Color
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 A O O O O O O O O O O O O O O O O O O O	Base Color: Bands: 5 ; (2-10) Percentile Fixed Range No Maximum Limit No Minimum Limit
	100 2 %
	80 ⁺ %
	40 * %
	20 ‡ %
Include Exclude	0 ‡ %
	OK Cancel

繪圖區(Plot area)

LA.	Histogram	Create a Histogram Plot and specify the plot properties.								
<u></u>	Dot Plot	Create a Dot Plot and specify the plot properties.								
-	Density Plot	Create a Density Plot and specify the plot properties.								
	Pseudo Color Plot	Create a Pseudo Color Plot and specify the plot properties.								
0	Contour Plot	Create a Contour Plot and specify the plot properties.								
· 🔟	New Histograms	Create multiple Histogram Plots and specify the plot properties.								
	New 2-D Plots	Create multiple Dot Plots and specify the plot properties.								
	Statistics	Create Statistical charts.								
Ŀ	Population Hierarchy	Create Hierarchical charts.								
Ι	Line Segment	Insert a Linear gating of plots.								
Ι	Vertical	Insert a Vertical gating of plots.								
P	Lasso	Insert a Lasso gating into a dual parameter plots.								
\bigcirc	Polygon	Insert a Polygon gating into a dual parameter plots.								
	Rectangle	Insert a Rectangle gating into a dual parameter plots.								
+	Four Quadrant	Insert a Four Quadrant gating into a dual parameter plots.								
-1	Hinged	Insert a Hinged gating into a dual parameter plots.								
A	Auto Line Segment	Creat an Auto Line Segment around the selected population on a plot.								
Ð	Auto Polygon	Creat an Auto Polygon around the selected population on a plot.								
•	Zoom In	For Zooming in.								
Θ,	Zoom Out	For Zooming out.								
<i>ধ</i> শস	Pan	For scaling axis ranges in the plots.								
ধশ্য	Single Side Pan	For scaling single axis range in the plots.								
50	Adjust Gain	For increasing and lowering gain adjustments on the plots.								
3	Adjust	For adjusting compensation of either of the parameters								
A	Threshold	For setting the minimum particle size limit or flurescence intensity that acquisition will allow.								
•	Undo	For undoing an action in the drawing area.								
*	Redo	For redoing an action in the drawing area.								

<u>–</u>	Align Left	Align all the selected items to the left of the selection area.
-=1	Align Right	Align all the selected items to the right of the selection area.
T	Align Top	Align all the selected items to the top of the selection area.
<u>h</u>	Align Bottom	Align all the selected items to the bottom of the selection area.
Ŧ	Vertical Distribute	Align all the selected items to the vertical distribution.
н	Horizontal Distribute	Align all the selected items to the horizontal distribution.
÷•••	Make Same Width	Resize the selected items to all be the same width as the reference item.
‡	Make Same Hight	Resize the selected items to all be the same hight as the reference item.
[+] +=+ L+J	Make Same Size	Resize the selected items to all be the same size as the reference item.
	Rearrange	For restoring the plots to the default positions.
	Print	For printing and previewing the plot area.
Q	Print Preview	Used to access the Preview screen.
¢	Page Setup	Used to adjust the page settings.
Ď	Batch Print	Used to print data for multiple tubes.
ß	Batch Export to PDF File	Used to print a PDF of the data for multiple tubes.

七、[Plate Loader模式] 設定新的Experiment

<u>雙染(FITC/PE)Surface Markers設定</u>

◆ 以CD3-FITC / CD4-PE為示範,需準備四管樣品用以調整儀器的設定值:

- 1. 陰性樣品:未染色的細胞,或以lsotype抗體染色的細胞
- 2. 單染FITC的陽性樣品
- 3. 單染PE的陽性樣品
- 4. 雙染的陽性樣品
- ▶ 操作步驟:
 - a. 開啟一個新的Experiment: 由File進入(或起始頁面),點選New Experiment並儲存實驗檔案名稱。



b. 點選Plate [■]並新增一個空白Plate [■]。



 選擇96 well盤式規格(平底、V底或U底)及Sample跑的方向順序,點擊 OK。

Add Plate	23								
Plate Type: 96-well flat-bottom	-								
Sampling Sequence for the Plate									
OK Cance	el								

2.選擇指定well,點擊 ■ Set As Sample Wells,選擇Set Channel,勾選 Channels及標示抗體染劑名稱。

ample: 01-Tube-Acq.Setting Chan Use C	A1 IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII	✓ Mix 3 ✓ Backflush 3 g Rules	sec (0.1~100) sec (0.1~100)	Name: Color: •	Apply to Sample
Acq.Setting Chan Use C V FI	nel Compensation Matrix Stopping	g Rules	sec (0.1~100)		
Acq.Setting Chan Use C I Fi	nnel Compensation Matrix Stopping	g Rules			
Use C	hannel				
₩ FI			Label		
	ITC		CD3 FITC		
P P	E		CD4 PE		
E	CD				
P P	C5.5				
Pi	C7				
A	PC				
A	PC-A700				
A	PC-A750				
E P	B450				
E K	:0525				
	/iolet610				
	riolet660				
	fiolet780				

C. 利用已勾選的參數繪製希望分析的圖形:

在繪圖工具列中點選Dot Plots ,於圖形上的X/Y軸點滑鼠左鍵,選擇想要標示的抗體螢光參數。



d. 確認Threshold是否設定完成:

在繪圖工具列中點選Threshold ,此時會於FSC/SSC圖形上出現 automatic的藍色虛線,Surface Marker的實驗中,建議將Threshold設 於FSC第一個刻度位置。



- e. 分析陰性樣品(可使用未染色的樣品,或以isotype抗體染色的陰性樣品),依下列方式調整各個偵測器的Gain值:
- 1. 輸入樣品名稱(例如Unstain / Isotype)

Se	Set As Sample Wells								
	Naming R	ules							
	Prefix:	Blank							
	Example:	01-Blank-A1							

2. 按下儀器操控區中的Run 此時機器開始收集樣品數據(此時所收集的數據會於樣品名稱顯示閃爍的藍色圓圈,表示暫存,圖形中的數據呈現動態的變動),並顯示在剛才畫好的圖形上,使用繪圖區的Gain 罰點 FSC/SSC的Gain值,或使用Pan 愛或Single Side Pan 認調 整X/Y的Scale,找到FSC/SSC中想要分析的細胞族群。使用圈選工具列,對FSC/SSC的細胞群以多邊形Polygonal Gate 圈選P1 Gate。



 接著調整FL1、FL2的Gain值,於螢光圖上方點選左鍵,選擇P1 Gate觀察,接著以十字象限定義Negative位置,使FL1/FL2雙參數 圖形的細胞落在左下角第一個Log位置。



f. 分析單染的陽性樣品調整螢光補償值(Compensation): 使用兩管樣品:以FL1單染樣品調整FL2-%FL1

以FL2單染樣品調整FL1-%FL2

 於Blank well按右鍵,點選Apply Well Setting to上樣CD3-FITC單 染樣品well,點擊OK,左下Name欄位輸入樣品名稱(例如CD3)。

點擊Run ▶ Run ,接著使用繪圖區的Compensation ,調整 螢光補償。直接在Plot上拖拉細胞群即可設定螢光補償。

Plate		23
•+ - •× •≡ 01 - 9	6-well flat-bottom 🔻 🗮 🖌 🔛 🕼 🔕 🗭	
1	2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12	
A 🔵	0000000000	
в	Select Group	
c	Select Same Acquisition Conditions Wells Set As Sample Wells	
Þ	Set Acquisition Condition	
E	Set Mix/Backflush	
F	Apply Well Settings to	
G	Copy Cut	
н	Paste Paste (Renaming Rules and Reset the Group)	
Name	Move Location Mix Backflush Time Set Auto Acquisition	
01-Tube-B1	Cancel Auto Acquisition 3 sec 3 sec	

Select Items to Apply		Plate:	01	*										
✓ Group ✓ Naming Rules			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
✓ Sample ID		A	\bigcirc											
✓ Channel ✓ Label		в	\bigcirc											
Acq.SettingCompensation Matrix		с	\bigcirc	$\overline{\bigcirc}$	$\overline{\bigcirc}$	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	$\overline{\bigcirc}$	$\overline{\bigcirc}$	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc
 Stopping Rules Mix 		D	$\overline{\bigcirc}$	$\overline{\bigcirc}$	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	$\overline{\bigcirc}$	$\overline{\bigcirc}$	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	$\overline{\bigcirc}$
✓ Backflush		E	$\overline{\bigcirc}$	$\overline{\cap}$										
		_	$\overline{\bigcirc}$											
✓ Select All			$\overline{\bigcirc}$	$\overline{\bigcirc}$	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	$\overline{\bigcirc}$	$\overline{\bigcirc}$	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\square
Apply to		G	\bigcirc	\square										
◉ Customize 💿 All Empty Wells 💿 All Sampl	e Wells	н	\bigcirc											



<u>將Experiment儲存為Template</u>

- ◆ 如將已設定好的Experiment,之後需再進行使用時可以儲存此Template。
- ▶ 操作步驟:
 - 1. 於已設定好的Experiment中,點選File,選擇Save as Template並 儲存實驗檔案名稱。

		Save as						×			
		G → *	證櫃→	文件) CytExpert Data	• •	↓ 提尋 CytExpe	ert Data	م			
File	Cytometer Settings QC Advanced	組合管理 ▼ 新	增資料	夾			888 💌	0			
	New Experiment Ctrl+N New Experiment from Template	▲ 🚖 我的最爱 <mark>〕 ↓</mark> 下載	Â	文件 媒體櫃 CytExpert Data		排列方式: 1					
	New Compensation	三 桌面		名稱		修改日期	類型				
	Open Experiment Ctrl+O Open Compensation	>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>	le)	🎉 Compensation		2016/6/20下午1	檔案資料夾				
	Save Ctrl+S Save As	▲ 🧊 煤體櫃	_			存路徑及存檔名					
	Save As Template	→ 👌 音英			選擇儲存			é.			
	Import FCS File Export FCS File	▷ 🛃 視訊 ▷ 🔛 圖片		•	-217 PB 11			•			
		檔案名稱(N):	檔案名稱(N): Exp test Template								
		存檔類型(T):	Temp	emplate File							
		● 陽藏資料夾				存檔(S)	取満				

2. 之後需進行相同Experiment時,由File進入(或歡迎頁面),點選New Experiment from Template。



3. 點選New Experiment的Browse Browse... 儲存新實驗檔案名稱。

👬 New Experime	nt from Temp	olate		23
New Experiment:				Browse
Template:				Browse
			ОК	Cancel
		$\overline{\mathbf{v}}$		
New				
) 🕖 🕘 « ychen	109 》我的文件	 CytExpert Data 	▼ 49 / 授尋 CytE	xpert Data
組合管理 ▼ 新増資	[料夾			811 -
★ 我的最愛 下載 ■ 桌面 ■ 最近的位置 ● MIS Software ● BIT (svbit001) ● RolesMatrix (svb	A 名稱 E Ditt(沒有	修改日期 1符合搜尋的項目。	頭型
□ 媒體櫃 ○ 文件		選擇	星儲存路徑及	存檔名稱
			1	
_ 音樂				
→ 音樂 横案名稱(N): Ex	p_Test			
▲ 音樂 檔案名稿(N): Ex 存檔類型(T): Ex	p_Test			

4. 再點選Template的Browse選擇之前儲存的Template.xitm檔。

Mew Experim				
New Experiment	: C:\Users\ychen09\Documents\Cy	tExpert Data\Exp_test.	Browse	
Template:			Browse	
		ОК	Cancel	
Open			, ``_	×
🌏 🔵 🗢 📕 « 文件 🖡 💈	我的文件) CytExpert Data)	▼ 49 授尋 Cytt	Expert Data	۶
組合管理 ▼ 新増資料3	ह		BII • 🔟	0
★ 我的最爱 ↓ 下載	文件 媒體櫃 CytExpert Data	444	非列方式: 資料夾 🔹	
三 桌面	名稱	修改日期	類型	
過 最近的位置 bit (Sytwtaifile) =	Compensation	2016/6/20下午	1 檔案資料夾	
	Exp test Template.xitm	2016/8/21下午	- 0 XITM 檔案	
○ 煤體櫃 ○ 文件	選擇之前	前儲存的 Temp	late.xitm	當
 深 煤體極 文件 ♪ 音瑛 酬 視訊 ■ 圖片 	選擇之前	f储存的Temp	olate.xitm	凿
 深 煤醴価 文件 〕 言葉 【 視訊 ■ 圖片 (● 電腦 	選擇之前	∫儲存的Temp	olate.xitm∤	凿
 深 保證值 文件 〕 音樂 證 視訊 ■ 圖片 ● 圖片 4 4 編業名 	選擇之育 < 編(N): Exp test Template.xitm	可儲存的Temp	olate.xitm∤	當
 深 保證 文件 〕 音樂 圖 消訊 圖 所 副 所 2 電腦 【 福窯名 	選擇之前 《「 (M): Exp test Template.xitm	竹儲存的Temp file Template File Itemplate	olate.xitm≉	當
 深 保證優 文件 介 音樂 聞 視訊 圖 片 陳 電腦 【 檔案名 	選擇之前 <[竹儲存的Temp	olate.xitm	當
 深 煤體優 文件 〕 方供 』 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一	選擇之方 《 稱(N): Exp test Template.xitm ent from Template	可儲存的Temp	olate.xitm	★
 深 保證優 文件 〕 文件 』 音獎 圖 州 ■ 圖 川 ■ 電腦 【 福葉名 	選擇之前 《 『 編(N): Exp test Template.xitm ent from Template : C:(Users\ychen09\Documents\C)	竹儲存的Temp ' ▼ Template File 開缸蓄描(O)	plate.xitm 、 取満 Browse	省
 ○ 保證 ○ 文件 ○ 音樂 ● 雷兴 ● 雷兴 ● 電腦 <	選擇之方 《 『 編(N): Exp test Template.xitm ent from Template : [C:\Users\ychen09\Documents\C) C:\Users\ychen09\Documents\C)	f)儲存的Temp · · · · · · · · · · · · ·	Dlate.xitm	*

5. 選擇完成後點擊OK,開啟既有Template。

自動螢光補償設定

以CD3-FITC / CD4-PE / CD19-PC5.5 / CD16-PC7及CD56-PC7 / CD8-APCA700 / CD45-KO 6色染色為示範,共有8管樣品分別為Unstained / Isotype、各抗體單色染色和6色染色樣品。

1. 由File進入(或起始頁面),點選New Compensation並儲存實驗檔案名稱。

	New New					×
	〇〇〇 - 📜 « 我的	文件) CytExpert Data) Comper	nsation 👻 🐓] 搜尋 Compen	sation	٩
	組合管理 ▼ 新増	資料夾			8≡≡ ▼	0
File Cytometer Settings QC Advanced New Experiment Ctrl+N New Experiment from Template New Compensation Open Experiment Ctrl+O Open Compensation	Favorites Desktop Downloads Recent Places Documents Music Pictures Videos Videos Videos Local Disk (Cc) Removable Disk	Name Comp_20150318_6 colors Comp_20150319_Ruby pai Comp_20150318_6 colors.vite Comp_20150319_Ruby.vite pai.vite	Date modified 3/18/2015 3:39 PM 3/19/2015 4:48 PM 3/25/2015 4:22 PM 3/18/2015 3:39 PM 3/19/2015 4:48 PM 3/25/2015 4:22 PM	Type File folder File folder XITC File XITC File XITC File	Size 210 KB 209 KB 354 KB	
	檔案名稱(N): C	Comp_20150517 6 color				•
	存檔類型(T): C	Compensation Experiment File				•
	▲ 陽藏資料夾			存福(S)	取満	

2. 選擇盤子類型,依照軟體導引,勾選使用細胞或珠子以及使用染劑,指定 sample位置,點擊Set As Sample Well設定Location位置,點擊OK。

Compensa	tion Setup					83
Compens	ation on:					Plate Type: 96-well flat-bottom 🔻 Sampling Sequence: 🗮 🔻
Area	🔘 Height					Set As Sample Well Set the Sample Well As Empty
Use	Tube	Label	Lot No.	Sample Type	Location	Set Tube KO525 to Well
V	Unstained_Cell			⊚ Cell ⊚ Bead	A1	
	Unstained_Bead			🔘 Cell 🧕 Bead		
V	FITC			🧿 Cell 🔘 Bead	B1	
V	PE			🧿 Cell 🔘 Bead	C1	
V	ECD			🧿 Cell 🔘 Bead	D1	
V	PC5.5			🧿 Cell 🔘 Bead	E1	
\checkmark	PC7			🧿 Cell 🔘 Bead	F1	
V	APC			🧿 Cell 🔘 Bead	G1	
	APC-A700			🧿 Cell 🔘 Bead		
	APC-A750			🧿 Cell 🔘 Bead		
	PB450			🧿 Cell 🔘 Bead		F O O O O O O O O O
1	KO525			🧿 Cell 🔘 Bead	H1	
	Violet610			🧿 Cell 🔘 Bead		
	Violet660			🧿 Cell 🔘 Bead] + O OOOOOOOOOOOOOO
	Violet780			🧿 Cell 🔘 Bead		
						Mix 3 sec (0.1~100.0) Ø Backflush 3 sec (0.1~100.0)
						OK Cancel

3. 此時軟體會根據所勾選染劑自動畫圖,並且左下角Tube表格自動設定準備上 樣之Unstained / Isotype及單色染色樣品管。



4. 先上Unstained / Isotype樣品管,點擊Run。



5. 調整FSC/SSC設定(使用Scale ⁽⁾ ⁽⁾, FSC/SSC五角型圈選, Threshold





6. 分別再上樣單色FITC、PE、PC5.5、PC7、APC-A700及Krome Orange,並 且調整單色染色的Positive區域中的Linear Rang。







7. 再Double Check並微調各個單色染色的Positive區域中的Linear Rang。點擊

快捷工具列Compensation Calculation 6色Compensation Matrix計算完成。

✓ Use	S	show Au	tofluor	escence	•							A	rea 🔹
Cha	-FIT	-PE%	-EC	-PC	-PC	-AP	-AP	-AP	-PB	-KO	-Vio	-Vio	-Viole
FITC		1.08	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.66	0.00	0.00	0.00
PE	19.06		0.00	2.34	2.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.46	0.00	0.00	0.00
ECD	22.23	148		3.32	3.54	0.00	0.00	0.00	0.00	0.76	0.00	0.00	0.00
PC5.5	1.33	9.97	0.00		0.84	0.00	1.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PC7	0.34	2.16	0.00	63.64		0.00	0.97	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
APC	0.00	0.00	0.00	2.55	0.06		15.18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
APC	0.00	0.00	0.00	33.23	0.06	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
APC	0.00	0.00	0.00	33.41	13.54	0.00	107		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PB4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		6.07	0.00	0.00	0.00
KO5	1.37	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00
Viol	0.81	12.56	0.00	0.00	0.22	0.00	0.00	0.00	0.00	253		0.00	0.00
Viol	0.09	1.46	0.00	0.19	0.02	0.00	0.59	0.00	0.00	38.29	0.00		0.00
Viol	0.08	0.28	0.00	6.31	10.17	0.00	4.31	0.00	0.00	8.60	0.00	0.00	

8. 點擊Save to Compensation Library, 給予檔名後點擊OK。

Calculation Date 2015-02-02 11:39:44 2015-03-18 15:39:18 2015-03-19 16:46:54	
Calculation Date 2015-02-02 11:39:44 2015-03-18 15:39:18 2015-03-19 16:46:54	
2015-02-02 11:39:44 2015-03-18 15:39:18 2015-03-19 16:46:54	
2015-03-18 15:39:18 2015-03-19 16:46:54	
2015-03-19 16:46:54	
	_
2015-01-23 10:58:55	_
2015-03-02 15:11:38	
2015-01-23 10:58:55	
2015-01-23 10:58:55	
2015-01-23 10:58:55	
2015-01-23 10:58:55	
01E 01 01 16.44.EC	
	2015-03-02 15:11:38 2015-01-23 10:58:55 2015-01-23 10:58:55 2015-01-23 10:58:55 2015-01-23 10:58:55 2015-01-23 10:58:55 2015-01-23 10:58:55 2015-01-24 10:58:55

- 9. 點擊Save As,儲存此Compensation Matrix,此Matrix可以套用於其後相同 染色的 Experiment,例如以下例子。
- 10. New Experiment,在Tube表格上的工具列點擊Compensation Matrix 通後,再點擊Import。

Use	Sł	now Aut	ofluore	scence				A	rea and	l Heigh	t in Syn	c Are	a
Cha	-FIT	-PE%	-EC	-PC	-PC	-AP	-AP	-AP	-PB	-KO	-Vio	-Vio	-Viole.
FITC		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0
PE	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0
ECD	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0
PC5.5	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0
PC7	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0
APC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0
APC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0
APC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.0
PB4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.0
KO5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.0
Viol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.0
Viol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.0
Viol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

11. 選擇已經儲存的Compensation Matrix, 勾選"Import compensation matrix and gain", 再點擊OK。



12. 先針對這個Experiment畫圖(Dot Plots、Histogram)再跑樣品,此實驗會使 用這個Compensation Matrix所設定的電壓(Gain)及螢光補償值跑樣品。



Heat Map功能設定

- ◆ 欲開啟Heat Map功能,需有一組含有至少2 wells以上盤式數據:
- ▶ 操作步驟:
 - a. 在已知盤式數據的Experiment中,點選Heat Map ^Ⅲ 開啟Heat Map Window。



b. 點選New Heat Map 🖬 開啟新Heat Map設定視窗。

v Hea	at Map														
ame:											🔲 Display	y Nan	ne Plate:	01	
Parar	meter														
No.	Expression		Label			Use	Custo	om Range	Min	I	Max	A	ctual Range	e	
1							[
Dis	splay Value											А	dd	Delete	e
Well									C	Color					
									в	ase Col	or:	-	Bands:	5 (2-1	10)
	1 2 3 4	5	6	78	9	10	11	12	(Perce	ntile 🔘	Fixed	d Range		
A	0000		\mathbf{O}		\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc			No M	laximum L	imit	🔲 No M	inimum Li	im
B						$\overline{\bigcirc}$	$\overline{\bigcirc}$			_	100	÷ %)		
								$\overline{}$							
										_	80	\$ %)		
D (
E					\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc			_	60	\$ %)		
F						\bigcirc	\bigcirc								
G										-	40	\$ %			
						_	<u> </u>	_							
[[-	20	\$ %			
				Include			Exclu	de			0	\$ %)		

c. 輸入欲命名Heat Map名稱:

Name: Heat Map1 Isplay Name Plate: 01 -

d. 點選Add Add 新增欲分析的參數欄位(最多可選擇6組參數):
 1. 點選[…],顯示欲表現參數數據視窗:

Expression		23
Statistics Const + - * / In log ^ () Backspace	Clear	
		•
		Cancel
		Cancel

2. 點選Statistic Statistic ,選擇欲分析的參數數據後,點選OK:

Select Statistics		23
Population:	Enter text to search	-
Statistics Type:	Enter text to search	-
Parameter:	Enter text to search	-
	OK	

Select Statistics		23
Population:	CD3+	
Statistics Type:	%Parent	-
Parameter:	Mean Median	
	rCV	
	rSD	Ľ
	CV	I
	SD	I
	Count	I
	%Total	
	%Parent	

- ➢ Population:選擇分析族群
- ➢ Statistic Type: 選擇統計數值
- ➢ Parameter:選擇統計參數

_	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	\bigcirc											
в	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc			(((((
c	(()	()	()	()	(()		((()	(
D	0	0	0	0	0		0	0	((0	(
E	()	0	0	0	0				((0	\bigcirc
F	((0	0	0	0	0		((0	\bigcirc
G	()	(0	0	0	0	0	((((\bigcirc
н	0	0	0	0	0							
							-					

e. 選擇欲分析的well個數,可點選Include或Exclude增減well數:

f. 選擇Heat Map顯示的顏色及色澤百分比表現:



- Heat Map 23 Heat Map1 2 4 5 6 8 9 10 11 12 3 7 1 4 1 Heat Map2 3 2 A Parameter В 1: PctParent(Live) 2: PctParent(CD3+) с 3: PctParent(CD3+CD4+) 4: PctParent(CD3+CD8+) D Е -100.00% F -80.00% -60.00% G -40.00% н -20.00% -0.00% Heat Map1
- g. 設定完成後點選OK,即呈現欲分析的Heat Map,如下圖:

h. 若欲直接呈現Heat Map單一參數數值,選擇欲分析的單一參數後, 勾 選Display Value。

Parameter						
No.	Expression	Label	Use Custom Range	Min	Max	Actual Range
1	PctParent(CD3+) ····					0.65-0.96
Image: Display Value Add Delete						

- Heat Map 23 Heat Map1 Parameter: 4 6 8 9 10 11 12 Heat Map2 PctParent(CD3+) 68.88 31.49 48.21 24.96 23.94 62.85 (0.32) 45.07 7.73 51.63 67.20 (16.11) А 78.35 55.78 96.02 21.09 64.83 59.53 193 49.72 11.97 41.92 в 28.43 29.28 55.43 70.00 17.71 73.53 55.97 95.85 14.98 67.76 с 53.25
 (31)
 (37)
 (37)
 (32)
 (74)
 (34)
 (35)
 (34)
 (32)
 (32)
 60.99 D 38.31 95.10 35.22 66.54 0.00 50.15 7.82 76.63 60.98 Е 57.78 -100.00% 27.10 50.71 72.27 18.90 70.98 78.21 56.81 96.47 20.84 50.17 69.01 F -80.00% -60.00% 39.59 40.84 G 71.98 61.27 49.44 64.60 66.96 81.26 44.57 83.12 -40.00% 85.16 100.00 70.52 н 75.34 -20.00% -0.00% Heat Map2
- i. 設定完成後點選OK,即呈現單一參數數值Heat Map,如下圖:

j. 將 Heat Map 輸出,點選Export to Graphic File [▲] 或Export to Clipboard [▲],可將Heat Map輸出成圖檔(.bmp or .emf)。


輸出和輸入樣品資訊

a. 點擊Save Plate Layout...並選擇檔案存取路徑,例如:001.csv。

輸出



b. 使用記事本或Excel來開啟001.csv檔進行檢視。

WellLabel,TubeName,SampleID,Group,Name1,Name2,Name3 A1,01-Tube-A1,SampleIDA1,Group1,Value1,Value2,Value3 A2,01-Tube-A2,SampleIDA2,Group1,Value1,Value2,Value3 A3,01-Tube-A3,SampleIDA3,Group1,Value1,Value2,Value3 A4,01-Tube-A4,SampleIDA4,Group1,Value1,Value2,Value3 А5,,,,,, А6,,,,,, А7,,,,,, В С E F Α D G Н А8,,,, WellLabel TubeName SampleID Group Name1 Name2 Name3 1 А9,,, 2 A1 01-Tube-A1 SampleIDA1 Group1 Value1 Value2 Value3 A10., 01-Tube-A2 SampleIDA2 Group1 Value1 Value2 Value3 3 A2 A11,, A12, 4 A3 01-Tube-A3 SampleIDA3 Group1 Value1 Value2 Value3 5 01-Tube-A4 SampleIDA4 Group1 Value1 Value2 Value3 A4 6 A5 7 A6 8 A7 9 **A**8 10 A9 11 A10 12 A11 13 A12 14 01

輸入

- a. 使用記事本或Excel來開啟CSV檔進行以下資訊編輯: 例如:001.csv
 - 1. 更改Tube name
 - 2. 更改Sample ID和Group
 - 3. 更改Custom metadata
 - 4. 在A5位置增加一個新樣品
 - 5. 增加新的Custom metadata, 例如: Name4

Well A1,0 A2,0 A3,0 A4,0 A5,, A6,, A6,, A7,, A8,, A10, A11, A11,	Label,TL 1-Tube-/ 1-Tube-/ 1-Tube-/ 1-Tube-/ ,, ,, ,, ,,	ubeName, A1,Samp1 A2,Samp1 A3,Samp1 A4,Samp1	SampleID eIDA1,Gr eIDA2,Gr eIDA3,Gr eIDA4,Gr	,Grou oup1, oup1, oup1, oup1,	p,Nam Value Value Value Value	el,Nar 1,Valı 1,Valı 1,Valı 1,Valı	ne2, Na 1e2, Va 1e2, Va 1e2, Va 1e2, Va	me3 lue3 lue3 lue3 lue3		VellLab. 1, A1Ch. 2, A2Ch. 3, A3Ch. 4, A4Ch. 5, NewA. 5, NewA. 8,, 10,, 11,, 11,,	el, TubeNa anged, Sam anged, Sam anged, Sam dded, NewS ,, ,, ,, ,, ,, ,,	me,SampleI pleIDAlc,G pleIDAlc,J pleIDA3c,G pleIDA4c,G ampleID,Ne	D, Group, roupA, Va roupB, Va roupB, Va wGroup, N	Namel,Nar luelc,Va luelc,Va luelc,Va luelc,Va ewValuel	ne2,Name3 ue2c,Val ue2c,Val ue2c,Val ue2c,Val ue2c,Val NewValue	,Name4 ue3c,Valu ue3c,Valu ue3c,Valu ue3c,Valu 2,NewValu	ie4 ie4 ie4 ie3 , NewVa	lue4
	A	В	С	D	E	F	G	Н										
1	WellLabel	TubeName	SampleID	Group	Name1	Name2	Name3		A	A	В	С	D	E	F	G	Н	I
2	A1	01-Tube-A1	SampleIDA1	Group1	Value1	Value2	Value3		1	WellLabe	TubeName	SampleID	Group	Name1	Name2	Name3	Name4	
3	A2	01-Tube-A2	SampleIDA2	Group1	Value1	Value2	Value3		2	A1	A1Changed	SampleIDA1c	GroupA	Value1c	Value2c	Value3c	Value4	
4	A3	01-Tube-A3	SampleIDA3	Group1	Value1	Value2	Value3		3	AZ	A2Changed	SampleIDA2c	GroupA	Value1c	Value2c	Value3c	Value4	
5	Δ4	01-Tube-44	SampleIDA4	Group1	Value1	Value2	Value3		4	A3	Aschanged	SampleIDA3c	Groups	value1c	value2c	value3c	value4	
	45								3	A6	NowAdded	NewSampleID	Можетоно	NouMaluot	NowVolug2	NouMoluo2	Nou Malue4	
7	A6								7	A5	NewAdded	Newsampreib	Newdroup	Newvalue1	New Value2	Newvalues	Newvalue4	
	47								8	Δ7								
	A7								9	A8								
9	Að								10	A9								
10	A9								11	A10								
11	A10								12	A11								
12	A11								13	A12								
13	A12																	
17	D1																	

b. 點擊Add Plate from Layout...,選擇已修改過的001.csv檔並點選Open。



C. 軟體會依據001.csv檔於New Plate中呈現新的樣品資訊。



八、建立新的使用者

※開啟[User Management 功能]

在 CytExpert 軟體中,使用者可以設定自己專屬的帳號,藉由:

- 1. 點選桌面 CytExpert 軟體 CytExpert 。
- 輸入程式管理員"Admin",接著在 Password 欄位輸入密碼"password1234"後, 按下▶繼續進入管理員模式 Administrator。



			ē	23
		Adn	ninistra	ator
11	<u>h</u>	Ξ	+ı	-

軟體右上方會呈現 Administrator 模式

3. 點選左上 Menu 中的 Account Account >User Manager,出現以下畫面:

Advanced	Account Log Help	▶ New:新增一個使用者
	User Manager	➢ Modify:修改已經存在的使用者
tart	Role Manager	➢ Delete:删除一個使用者
	Account Policies	➢ Unlock:將系統鎖住的使用者解鎖
	Change Password	➢ Reset Password:重新設定使用者密碼

User Manager		23
Enter text to search	Card View	-
User [1 of 2]		
Image: Wight of the second		
New Modify Delete Unlock Reset Passwo	ord Close	

- 點選"New"按鍵,可看到以下畫面: 4. 23 \geq **Username**:在此輸入使用者名稱 New Full Name:在此輸入使用者名稱 Username: User \geq Full Name: User (可相同) Password: password Password:系統預設為 password \geq Role: Operator Ŧ Role: 選擇使用者 Operator \triangleright Enabled: **V** Enabled: 勾選, 選擇啟用此新使用者 \geq ОК Cancel
- 5. 點選 OK 後,點選 Close。
- 選擇軟體右上方 Administrator,選擇 Log out 登出,輸入新使用者名稱及系統 預設密碼"password",按下▶繼續。



使用者密碼, 輸入

Old Password:系統預設密碼"password",設定新密碼"必須含有英文及數字", 確認後點選 OK 完成。

Confirm	
?	Please change the initial password before proceeding. Do you want to change the password now?
	Yes No

Change Password	23
Username:	User
Old Password:	
New Password:	
Confirm New Password:	
	OK Cancel

九、數據輸出

- A. 轉換成PDF檔案格式
 - 實驗結果分析完成後可點擊Print □ 右側箭頭中的Page Setup □ , Size 可選擇A4頁面輸出方式,點選Portrait以直式方式輸出,並勾選Show page breaks,使繪圖區顯示A4大小頁面排列。

Paper				
Size: A4(2	210x297mm):	210mm X 29)7mm	
Orientation	Marg	jins(millimete	rs)	
🧿 Portrait	Left:	5.08	Right:	5.08
🔘 Landscape	Тор:	5.08	Bottom:	5.08
Display Optic	ons			
Show page	breaks			
		ОК	Cancel	Apply

 於繪圖區排列好欲輸出圖形格式,再點擊Batch Export to PDF File [□]→, 勾 選欲輸出的樣品管後,點選OK。



(※如欲輸出多檔案可勾選多筆樣品資料,但檔案輸出會以單一筆樣品數據 為一個PDF File) 3. 選擇欲儲存的資料夾路徑後,點選確定,則檔案會依路徑自動儲存成PDF



瀏覽資料夾	×
CitEvenat Data	
Solution State	
15.0701peritoneal macr.Doa	a
> 🔒 2016.01.28 whole blood-RC	S-P
Þ 퉲 12345	
> 퉬 150701 peritoneal mac.stain	ing
▶ 150701 peritoneal mac.stain	ing ▼ ▶
建立新資料夾(M) 確定 取	消

- B. 數據輸出CSV檔案格式
 - 1. 於實驗結果分析完成的統計數值表Statistics ,點選滑鼠右鍵,選擇Export to CSV File。

Population	Events		Export All Samples to CSV File	
All Events		50	Export Samples to Graphic File	.00
P 1		29	Export to Clipboard	.16
Q1-UR			Export All Samples to Clipboard	.33
🔵 Q1-UL			Statistics Setting	.10
Q1-LL		16		
🔵 Q1-LR		13	Сору	.24
			Delete	
		_		_

2. 選擇存檔名稱及路徑位置,點選存檔,則檔案會依路徑自動儲存成單一個



(※如欲輸出多筆樣品檔案可選擇Export All Samples to CSV File,檔案輸出會以多筆樣品數據為一個CSV File)

Tube Name: Tube2			Ε
Sample ID:	Export to CSV File		
Population	Export All Samples to CSV File		% Parent
All Events	Export Samples to Graphic File	10%	100.00%
🔴 P1	Export to Clipboard	. <mark>6%</mark>	59.16%
O Q1-UR	Expert All Samples to Cliphoard	:0%	0.33%
🔵 Q1-UL	Export All samples to Clipboard	16%	0.10%
🔵 Q1-LL	Statistics Setting	3%	55.32%
O Q1-LR	Сору	.7%	44.24%
	Delete		
		_	
	-		

十、關機流程

[Semi-Automatic sample模式]

- 在收取Data的Experiment裡,新增1 tube,上1管2 mL 10%漂白水以最高 流速240 µL/min進行上樣,沖洗5分鐘
- 2. 執行Daily Clean。由左上方Cytometer進入,點擊Daily Clean。



 先洗1管FlowClean Cleaning Agent (3 mL蛋白質水解酵素,藍色液體),15 分鐘;再洗1管去離子水,15分鐘。點擊Close。



 關閉CytExpert軟體,放置樣品試管架會自動收回機器內,關閉儀器左後方 的電源鍵即完成關機。

[Plate Loader模式]

1. 執行Daily Clean。由左上方Cytometer進入,點擊Daily Clean。



2. 放上6 wells (250 µL/well) 10%漂白水、12 wells (250 µL/well) FlowClean Cleaning Agent及12 wells ((250 µL/well)去離子水,選擇盤子形式,將儀器



e Type:	96-well	flat-bo	ttom	-	Set As	Cleanin	ng Ager	t Well	Set A	As Deior	nized V	Vater W	ell	Set As Empty V
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	A	•			\bigcirc	C								
	в						\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	C)
	c	\bigcirc	C)										
	D	\bigcirc	C)										
	E	\bigcirc	C)										
	F	\bigcirc	C)										
	G	\bigcirc	C)										
	н	\bigcirc	C)										



3. 關閉CytExpert軟體,關閉儀器左後方的電源鍵即完成關機。

十一、 簡易故障排除

1. Prime:當機器在收集樣品數據時,如果收集的速度越來越慢,可能有堵塞 情況,此時請執行 Prime。

(1)先點選 Acquisition 之中的指令 Standby。

►	Run	Record	O Restar
心	Standby	* Backflush	Boost

(2)由 Cytometer 進入,點擊 Prime。



(3)點擊 Yes 即開始執行 Prime。

Confirm	CytExpert	
Are you sure to start prime?	Priming	
Yes No		

- **2.** Deep Clean:發現機器嚴重塞管時,執行 Prime 也無法排除,請執行 Deep Clean。
 - (1)由 Cytometer 進入,點擊 Deep Clean



(2)點擊 Yes 後即以 Contrad 70 Cleaning Solution (diluted KOH)清洗管路 及 Flow Cell。



(3)浸泡至少 30 分鐘後再執行 Prime,完成 Deep Clean 動作。



附錄1: Surface Marker樣品之製備及染色

《方法一》取白血球再染色

- 1. 取得含抗凝劑(EDTA or HEPARIN)的血,放置室溫。
- 2. 用等量的 PBS 和 Blood 混合來稀釋 (最大稀釋比 PBS:Blood = 2:1)
- 3. 取 3 c.c Ficoll-Hypaque(density 1.077) 放入 15 mL tube (or 取 12 c.c Ficoll-Hypaque 放入 50 mL tube)
- 4. 慢慢放入稀釋血 8mL (or 30mL)在 Ficoll-Hypaque 之上方,不要混淆到下層。
- 5. 小心 balance 後, 離心 400g, 25min, RT
- 6. 小心取得 mononuclear layer cells
- 7. 加入 2 倍量的 PBS 來稀釋 mononuclear layer cells
- 8. 200g, 10min, 去上清液
- 9. 重複 Step7、8
- 10. 計算細胞數 and resuspend (細胞濃度調整到接近 1x10⁷ cells/ mL)
- 11. 保存在 4℃, 一直到使用
- 12. \mathbb{R} 100uL cells+20uL mAb , Mix
- 13. Incubation 30 min
- 15. 分析 within 6 hours

《方法二》直接全血染色法

- 1. 100ul whole blood + 20ul mAb.
- 2. Incubation **15-20 min**
- 3. 500ul OptiLyse C, Mix
- 4. incubation 10 min, RT
- 5. 500ul PBS, Mix
- 6. After at least 10 min
- 7. 分析 on instrument

附錄2: 常用的Cell Cycle固定染色法(酒精固定法及PI染色)

方法一、

- 置備懸浮細胞液,最後濃度調整約為 2×10⁶ cells/ mL。若細胞株為 Attached cell Line,先以 Trypsin 將細胞打下,再調整濃度(注意 Trypsin 處理不可過頭)。
- 2. 取1mL 細胞液,以冰冷的 PBS 清洗細胞一次,離心後,倒除上清液。
- 3. 以剩餘的上清液將細胞打散(必須確定細胞已完全打散)。
- 在震盪器上(轉速不可開太快)一邊震盪一邊逐一滴入3mL70%冰冷的 酒精,(注意觀察細胞,不要讓細胞發生 aggregate 現象)。
- 5. 置於-20℃冰箱中固定至少一小時 (建議固定隔夜以上為佳)。
- 6. 染色前,將細胞從-20℃冰箱取出,300g離心5分鐘,去除上清液。
- 7. 以剩餘的上清液將細胞打散,加入5mLPBS,靜置3分鐘後離心,去除上 清液。
- 8. 重複步驟7,以5mL PBS 再清洗細胞一次。
- 加入 1 mL PI / Triton X-100 (Final Conc. PI = 20 µg /mL, Triton-X 100 = 0.1%, RNase A = 0.2mg/ml),均匀打散細胞,避光染色至少 30 分鐘。
- 10. 上機前打散細胞並以 30~40 µm 尼龍篩網過濾細胞樣本即可上機進行分析。

方法二、

Materials :

1. Propidium iodide (sigma) : 10 mg/ml in water, store at 4 degrees.

Note : solution made at RT will fall out of solution in fridge. No problem. Just mix it up and squirt the cloud into the staining mix. It will go into solution there.

- 2. RNaseA (Sigma), 10 mg/ml in water, store at 4 degrees (long term 20 degrees)
- 3. PBS : at 4 degrees
- 4. Ethanol (100%, store at -20 degress)

Fixation :

(1) Spin cells out of media – 1500 rpm x 5 minutes

- (2) Wash once with PBS
- (3) Collect 2 x 10^6 cells.
- (4) Pellet cells by spinning at 1500 rpm, 4° C for 5 minutes.
- (5) Resuspend cell pellet in 300ul of cold PBS. Vortex.
- (6) Fix cells by adding 700ul of -20°C absolute ethanol. (drop by drop initially)
- (7) Store cells at -20°C in this fixation buffer until ready for analysis. (No more than 2 weeks)

Staining :

- (1) Centrifuge (as above) fixed cells and resuspend pellet in 1 ml of PBS.
- (2) Add 100ul of 200 ug/ml DNase-free, RNase-A and incubate at 37°C for 30 minutes.
- (3) Add 100ul of 1 mg/ml propidium iodide (light sensitive) and incubate at room temperature for 5-10 minutes.
- (4) Place samples in 12x75mm tubes and read on Flow cytometry

Reference :

Experimental Cell Research 207, 142-151.

附錄3: CytoFLEX 常用耗材貨號

CytoFLEX 常用耗材	貨號
Flow tubes	2523749
Flow Clean (500ml)	A64669
Coulter Clenz (1L)	8448188
Coulter Clenz (5L)	8448222
CONTRAD® 70	81911
CytoFLEX Sheath Fluid	B51503
CytoFLEX Daily QC Fluorospheres	B53230