

## BD FACSCanto II フローサイトメトリーシステム使用上の注意

### 1. サンプルは測定直前にメッシュを通してください。

FACS のトラブルの多くは凝集塊をそのまま流してしまうことによる、流路の詰まりが主な原因です。サンプルは必ず測定直前にメッシュを通してください。BD Falcon #352235 を使用してください。

### 2. サンプルは測定直前によく攪拌してください。

これも前項と同じく、流路のつまりを防止するために必須の作業です。FACS のサンプルはチューブ内を加圧して本体に入っていきます。吸引をしているわけではありません。したがって、サンプルがチューブの底に沈殿した状態でサンプルを流すと、大量の細胞が一度に流路内に入るため詰まりを誘発します。

### 3. 測定データはその都度持ち帰る。

データを HD に放置しておくことは、データ保全の問題のみならず、機器の正常作動にも影響を及ぼします。PC 前面に USB を搭載していますので、フラッシュメモリーなどをご利用いただくと便利です。

### 4. 機器洗浄を徹底する。

FACS は流路にサンプルを流して、そこにレーザー光を照射して、得られる蛍光を検出する機械です。したがって流路内の汚れ(蛋白吸着等)が測定感度の低下に直結します。使用後は必ず所定の方法で洗浄を実施してください。

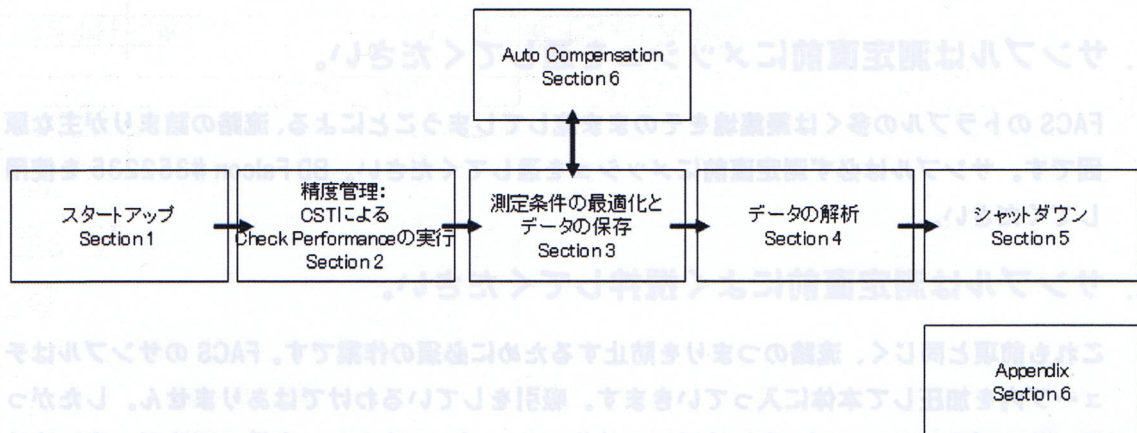
サンプル調製法、試薬、機器操作に関するお問い合わせは：0120-4890-77

機器の故障、トラブル発生時は：0120-7099-12

上記電話にてオペレーターが対応いたします。

また、サンプル調製法、試薬、機器操作に関するご質問は [tech\\_cell@bd.com](mailto:tech_cell@bd.com) にても承ります。

## BD FACSCanto II フローサイトメトリーシステム簡易取り扱いガイド



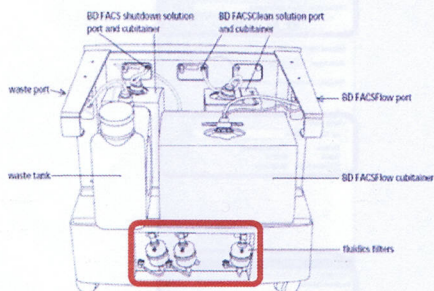
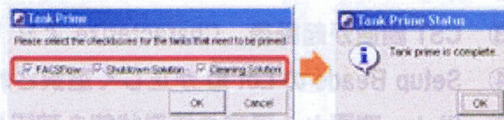
### Section 1-1: スタートアップ (本体およびPCの起動)

- ① 本体左側面の電源 (緑) を入れます。
- ② 2分後、PC電源を入れます。  
\*この間隔が短い場合、PCと本体がコネクトエラーを起こす事があります。
- ③ WindowsのLog Onを実施します。(パスワードはBDIS大文字です。)  
\*ディスプレイに表示される砂時計マークが消えてからDivaソフトを起動して下さい。
- ④ Divaソフトウェア起動
  - Divaソフトのアイコンを右クリックしプルダウンメニューのOpenを選択します。
  - Log in画面が表示されます。パスワードは必要ありません。
  - OKを押すとDivaソフトが立ちあがります。
- ⑤ Cytometerウインドウの下部分が「Cytometer Connecting」から「Remaining warm-up time」もしくは「The system is ready」に切り替わります。画面上にレーザーウォームアップの時間が表示され、レーザーウォームアップが終了するとシステムスタートアップが完了します。  
\*5分程度経過しても「Cytometer Connecting」のまま切り替わらない場合、もしくは「Cytometer Disconnected」が表示された場合はコネクトエラーを起こしています。その場合お手数ですが「File」メニューからDivaソフトをQuitして、コンピューターの電源を切るとともにFACSCanto II本体の電源を切って下さい。その後1分程度お待ちいただき本体電源を入れて、3分程度お待ちいただきPCの電源を入れてください。
- ⑥ Divaソフトと本体の接続終了後、CST Mismatchウインドウが表示されますので、「Use CST Settings」を選択します。



## Section 1-2 : スタートアップ (送液系の起動)

- ① Fluidics Cart の液量の確認をして下さい。必要に応じて溶液の補充などを行います。
- ② メニューバーの「Cytometer」→「Cleaning Modes」  
→「Prime After Tank refill」を選択し、チェックボックス全てにチェックを入れた後、OK をクリックします。終了のメッセージが出たら OK をクリックします。
- ③ Fluidics Cart 前面の各フィルターのエア抜きを行います。



- ④ SIT にセットしてある滅菌水のチューブを外します。
- ⑤ メニューバーの「Cytometer」→「Fluidics Startup」をクリックします。画面上に「Confirm」が現れますので、「OK」をクリックすると Fluidics Startup が開始されます。Fluidics Startup 完了後、画面上に「Fluidics Startup Complete. The System is Ready」のメッセージが出ますので「OK」をクリックします。
- ⑥ 本体上部のアクセスドアを開け、フローセルに空気が混入していないことを確認してください。気泡がある場合、メニューバーの「Cytometer」→「Cleaning Modes」→「De-gas Flow Cell」をクリックします。

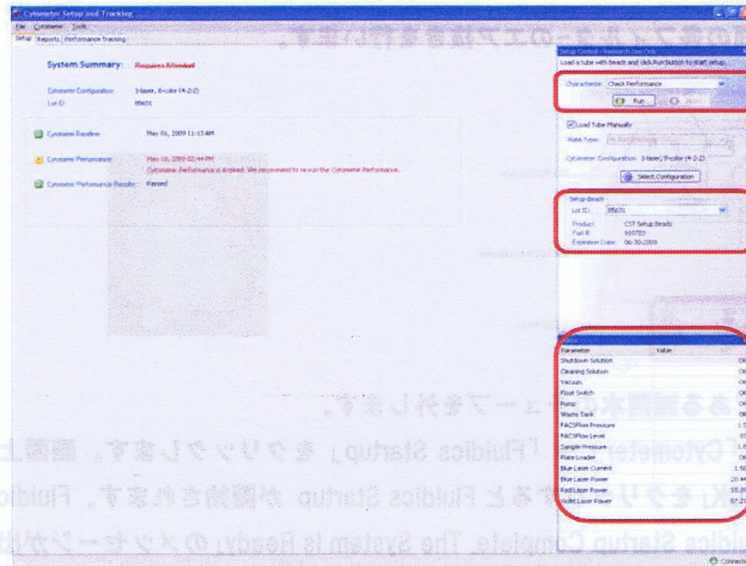
\*この際、Cytometer ウィンドウ画面上「Status」タブ内に「Red Laser Power Low」のメッセージが現れますが無視して「Clear」をクリックして下さい。これは本体アクセスドアを開けることによるメッセージで、故障ではありません



## Section2 : 精度管理 (CSTによる Check Performance の実行)


- ① Fluidics Startup の終了後、メニューバーの「Cytometer」→「CST」をクリックします。
- ② Diva ソフトの Connection が切断され CST 画面が起動します。
- ③ CST 画面が起動後、Characterize より「Check Performance」を選択します。
- ④ Setup Beads の Lot ID が正しく選択されているか確認します。
- ⑤ Status 画面から現在の機器状態を確認します。

\*前回の Check Performance から 24 時間以上経過の場合メッセージは赤字で表示されます。



- ⑥ 5ml の測定チューブに 0.35ml の FACSFlow と 1 滴の CST Beads を混和します。
- ⑦ Beads の入ったチューブを SITに取り付け、「Run」をクリックします。確認のメッセージが出ますので「OK」をクリックします。

\*Beads は希釈後冷暗所で保管し、8 時間以内に使用ください。

- ⑧ Setup Tasks が表示され、すべての項目に  が表示されると終了です。
- ⑨ CST が終了するとチューブ取り外しの Information が表示されるのでチューブを取り外します。SIT が自動洗浄されます。「View Report」をクリックすると Cytometer Performance Report が表示されます。各検出器に Pass が表示されていれば問題ありません。



\*Fail が出た場合はフローセルの洗浄を行います。

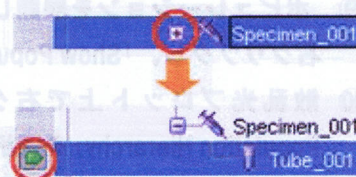
- ⑩ CST 終了後メニューバーの「File」→「Exit」を選択します。Diva ソフトが起動し本体の接続終了後、CST Mismatch ウィンドウが表示されますので、「Use CST Settings」を選択します。その後データの取り込み操作を行います。



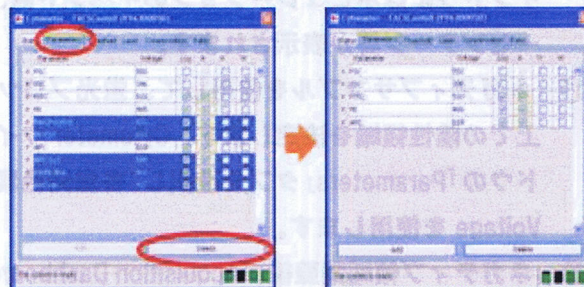
### Section3 : 測定条件の最適化とデータの保存

- ① Experiment を作成します。既存のものを使用する場合、アイコンをダブルクリックします。

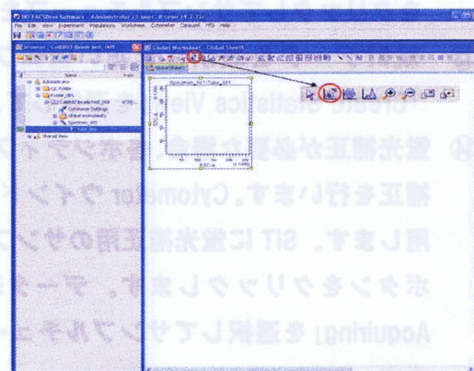
 →  その後 Specimen (注射器のマーク) の＋をクリックして開き、下層にある Tube の Acquisition pointer をクリックします。ボタンが緑色になれば Acquisition Dashboard および測定に必要なウィンドウが使用可能になります。



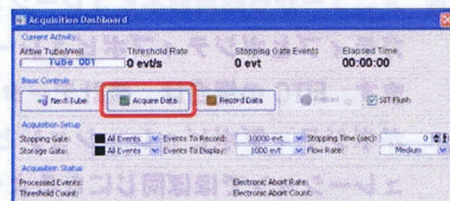
- ② Cytometer ウィンドウから不要なパラメータを削除します。一般的な解析の場合、FSC 及び SSC は log のチェックを外し、蛍光パラメータは log にチェックを入れます。A (Area) の欄にチェックが入っていることを確認します。



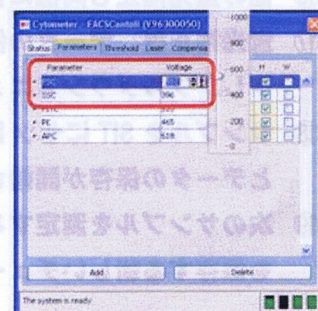
- ③ ワークシート上部のアイコンを選択し、ワークシート上にデータを表示するプロットを作成します。プロットは散乱光プロット (FSC vs SSC)、蛍光プロット (ex : FITC vs PE) を作成します。蛍光色素解析用のプロットは使用する蛍光色素に準じて作成します。



- ④ ネガティブサンプルを SIT に取り付けます。  
⑤ Acquisition Dashboard の「Acquire Data」ボタンをクリックします。



- ⑥ Cytometer ウィンドウから散乱光 (FSC, SSC) の Voltage を目的細胞集団が測定できるように、適切に調整します。  
⑦ Cytometer ウィンドウの「Threshold」タブを選択し、細胞以外のノイズとなる集団を Threshold の Value で削除します。





⑧ 散乱光プロットで目的細胞集団をゲーティングします。

⑨ ポピュレーションを展開したい蛍光プロットで右クリックし、「Show Population」を選択します。

⑩ 散乱光プロット上で右クリックし、「Show Population Hierarchy」を選択します。Hierarchy ウィンドウにはポピュレーションのイベント数、パーセンテージ等が表示されます。

⑪ ネガティブサンプルを使用して、蛍光プロット上での陰性領域を決定します。Cytometer ウィンドウの「Parameters」タブを選択し、各蛍光色素の Voltage を使用します。

⑫ ネガティブ領域調整後、Acquisition Dashboard の「Stop Acquiring」をクリックしてサンプルチューブを SIT から取り外します。

⑬ 統計データを表示させたい蛍光プロット上で右クリックし、「Create Statistics View」を選択して、統計データを表示します。

⑭ 蛍光補正が必要な場合、各ポジティブコントロールを使用して蛍光補正を行います。Cytometer ウィンドウの「Compensation」タブを使用します。SIT に蛍光補正用のサンプルをセットして Acquire Data ボタンをクリックします。データ表示後、「Stop Acquiring」を選択してサンプルチューブを取り出します。

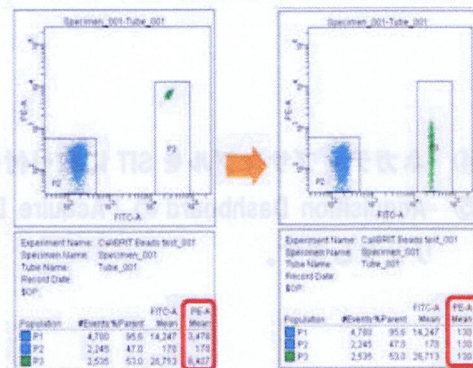
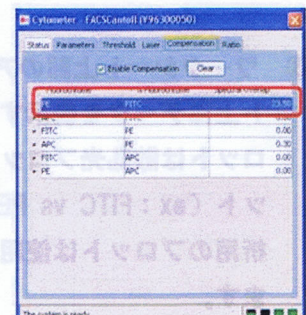
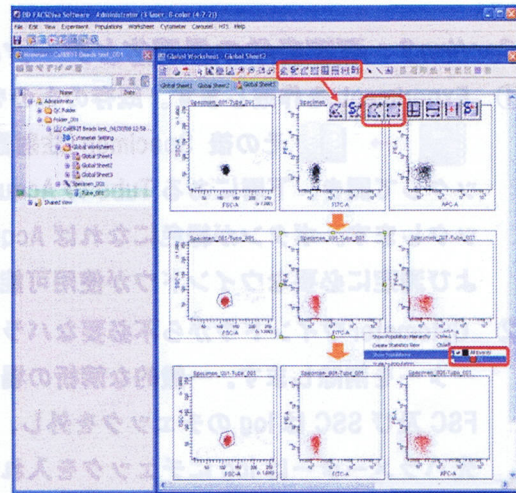
⑮ メニューから四角形ポピュレーションを選択し、ネガティブとポジティブポピュレーションを設定します。FITC の場合は、統計データの PE-A の Mean がポジティブポピュレーションとネガティブポピュレーションでほぼ同じになるよう調整します。

⑯ 他の蛍光補正も同様に行います。

⑰ 蛍光補正後、データの保存を行います。Acquisition Dashboard の「Events To Record」をクリックし、プルダウンメニューより、目的細胞の保存個数を選択します。

⑱ サンプルを SIT にセットし、Acquire Data をクリックします。「Record Data」をクリックするとデータの保存が開始されます。データ保存終了後、サンプルを SIT から外します。

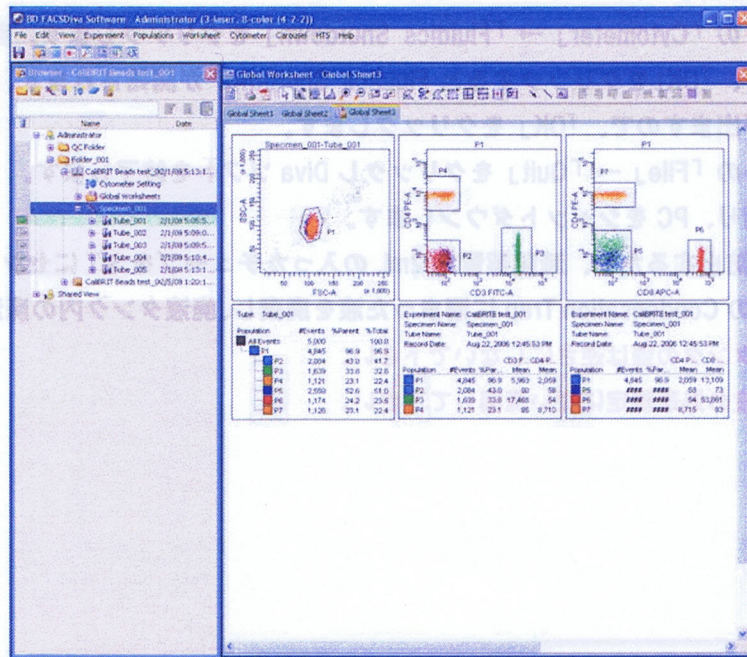
⑲ 次のサンプルを測定する場合は、Acquisition Dashboard の「Next Tube」をクリックし、データを保存する新しいチューブを作成します。⑱と同様の操作を行います。





## Section4 : データの解析

- ① 新しく測定用の Global Sheet を作成します。Browser ウィンドウの Global Worksheets で右クリックし「New Global Worksheet」を選択、解析用に新しい Global Worksheet を作成します。
- ② 解析目的の Tube にポインターを設定します。Global Worksheet 上で解析の目的に応じたプロットを作成します。
- ③ 散乱光プロットにおいて、解析する細胞集団にポピュレーションを設定します。
- ④ プロットを選択し、右クリックでメニューを開き、Show Population Hierarchy を選択します。
- ⑤ ポピュレーションを展開するプロットで右クリックし、「Show Population」より目的のポピュレーションを選択して展開します。
- ⑥ Worksheet ウィンドウより、適切なポピュレーションを選択、ゲートなど作成し解析します。



## Section5 : シャットダウン

- ① FACSClean 2mL の入ったチューブを SIT にセットし、「Acquire Data」をクリックします。
- ② Flow Rate を「High」に設定し、5 分間ラインを洗浄します。  
\*PI を用いての細胞周期解析を行った場合、ラインの汚れが激しい場合がありますので 10 分間洗浄を行って下さい。
- ③ サンプルチューブを取り外し、同様に滅菌蒸留水 2mL の入ったチューブをセットします。Flow Rate を High に設定し、5 分間ラインを洗浄します。  
\*PI を用いての細胞周期解析を行った場合は 10 分間洗浄を行ってください。  
**\*この洗浄作業は必ず実施して下さい。これを怠ると SIT の詰まりを招き、機器トラブルの原因になります。**
- ④ SIT から滅菌蒸留水の入ったチューブを外します。
- ⑤ メニューバーの「Cytometer」→「Fluidics Shutdown」をクリックします。画面上に Confirm が現れますので、「OK」をクリックすると Fluidics Shutdown が開始されます。5 分程度で終了のメッセージが出ますので、「OK」をクリックします。
- ⑥ メニューバーの「File」→「Quit」をクリックし Diva ソフトを終了します。
- ⑦ 本体電源を切り、PC をシャットダウンします。
- ⑧ SIT の乾燥を防止するため、滅菌蒸留水 2mL の入ったチューブを SIT にセットします。
- ⑨ Fluidics Cart の Condensation Trap に溜まった液を廃棄し、廃液タンク内の廃液を処理します。  
**\*外した廃液タンクの蓋は逆さにしないで下さい。**  
**\*廃液は、施設の処理規定に従い廃棄して下さい。**



## Section 6 : Appendix

### ① Area Scaling Factor の調整 :

Area Scaling Factor の調整により、Area と Height の表示位置をそろえる事ができます。これは両者のダイナミックレンジ（測定範囲）をそろえる意味でも非常に重要です。通常の細胞でも調整が必要ですが、特に大きな細胞を正確に測定する場合は重要な設定です。

### ② Application Setting :

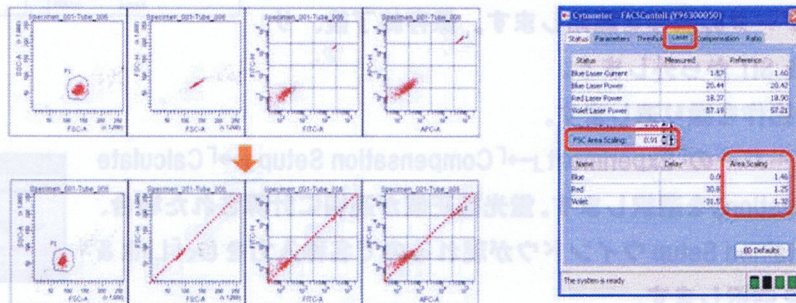
マルチカラー解析及び弱陽性を測定する場合の検出器の最適化です。Application Setting を実施することにより細胞集団の分離が良くなります。

### ③ Auto Compensation :

マルチカラー解析時等、蛍光補正を自動的に設定する方法です。

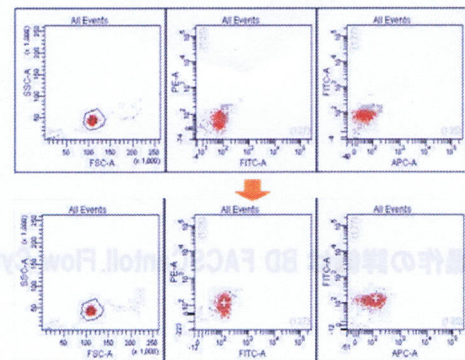
### ① Area Scaling Factor の調整 :

1. Cytometer ウィンドウの「Parameter」タブを選択し、Area と Height を選択します。
2. FSC-A vs SSC-A、FSC-A vs FSC-H、ex.FITC-A vs FITC-H、ex.APC-A vs APC-H のプロットを作成します。
3. ポジティブサンプルを測定し、各蛍光のプロットで蛍光陽性集団が対角線に分布するように、Cytometer ウィンドウの「Laser」タブ内にある Area Scaling の値を調整します。



### ② Application Setting :

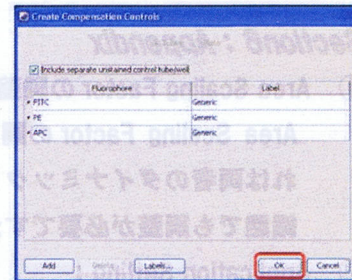
1. 使用する Experiment を開き Experiment の下に表示されている Cytometer Settings を右クリックし、「Application Settings」→「Create Worksheet」を選択します。
2. ネガティブサンプルを測定し、目的細胞集団に P1 ゲートを設定します。
3. 目的とする集団が各パラメーターのグレー領域に入るように蛍光パラメーターの Voltage を設定します。「Stop Acquiring」をクリックしてサンプルチューブを SIT から取り外します。



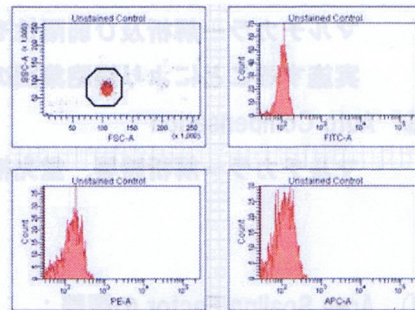


③ Auto Compensation :

1. メニューバーの「Experiment」→「Compensation Setup」→「Create Compensation Controls」を選択します。Create Compensation Controls ウィンドウが開きますので、「OK」をクリックします。



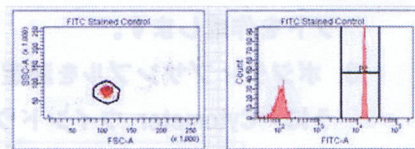
2. Compensation Controls の+をクリックして、下の階層の Unstained Controls の Acquisition ポインターを選択します。ネガティブサンプルを SIT に取り付け「Acquire Data」をクリックし、目的集団に P1 のゲートを移動します。



3. Acquisition Dashboard の「Record Data」をクリックし、データの保存を開始します。ネガティブサンプルの取込み終了後、サンプルを SIT から外します。

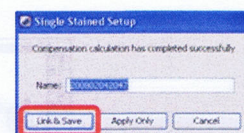
4. P1 ポピュレーションを選択し、マウスを右クリックし「Apply to Compensation Controls」を選択します。

5. Acquisition Dashboard 上の「Next Tube」をクリックし、次の Tube に切り替え、サンプルを SIT に取り付けます。「Acquire Data」→「Record Data」をクリックし、データの保存を開始します。保存終了後、サンプルを SIT から外します。



6. 同様の操作を繰り返します。

7. メニューバーの「Experiment」→「Compensation Setup」→「Calculate Compensation」を選択します。蛍光補正值が適切に計算された場合、Single Stained Setup ウィンドウが現れるので名称入力をし、「Link & Save」を選択します。



8. Acquisition ポインターを Tube\_001 に切り替えます。Worksheet 画面を Sheet から Global Worksheet に切り替えます。Cytometer ウィンドウの「Compensation」タブの Spectral Overlap に、蛍光補正值が入っていることを確認します。

操作の詳細は BD FACSCantoll Flow Cytometer Training Manual をご覧下さい。