

BD FACSLyric™

操作員課程練習簿



版權

© 2018 年，Becton, Dickinson and Company。保留所有權利。在未事先取得 BD Biosciences 書面許可下，不得複製、傳送、轉載或將本刊物的任一部分儲存於可叫出的系統或是以任何形式或任何方式翻譯成任何語言或電腦語言：電子、機械、電磁、光學、化學、手冊等。

商標

Alexa Fluor® 和 Texas Red® 為 Life Technologies Corporation 的註冊商標。

Cy™ 為 GE Healthcare 之商標。Cy™ 染料受 GE Healthcare 和 Carnegie Mellon University 所有權規範，並且僅能基於研究和體外診斷用途經 GE Healthcare 授權製造與銷售。任何其他用途均需取得 GE Healthcare 另外給予商業授權，地址為 800 Centennial Avenue, Piscataway, NJ 08855-1327, USA（美國）。

所有商標均屬其各自所有人財產。

© 2018 BD。BD、BD 標誌及其他商標均為 Becton、Dickinson 與 Company 之財產。

法規資料

第 1 級雷射產品。

僅供研究用途。不得用於診斷或治療程序。

聯絡

BD Biosciences
2350 Qume Drive
San Jose, CA 95131
USA（美國）
電話：877.232.8995
傳真：408.325.9637
ResearchApplications@bd.com

歐洲客戶支援
電話 +32.2.400.98.95
傳真 +32.2.401.70.94
help.biosciences@europe.bd.co

此份指南內所含資訊可在未經通知下進行變更。BD Biosciences 保留隨時變更其產品和服務，以結合最新科技發展的權利。雖然為確保其準確性已極為審慎地製作此份指南，但是 BD Biosciences 對於任何錯誤或疏漏以及因為應用或使用此資訊而導致的損害不予負責。BD Biosciences 歡迎客戶針對修正或改進建議提供意見。

修訂紀錄

修訂版本	日期	變更內容
23-20042-00	2018 年 4 月	BD FACSLyric system 初次發行

內容

關於此練習簿	vii
規章	viii
課程總覽	ix
第 1 單元： 系統基本要素	11
檢視：BD FACSLyric™ 系統總覽	12
啟用與關閉	16
練習：啟用系統	17
練習：設定細胞分析儀排程偏好	18
練習：確認啟用	19
練習：關閉系統	20
系統總覽	21
指示燈	22
手動管埠組件	24
選配的鏡子濾網組	25
BD FACS 萬用裝填裝置	26
練習：系統總覽	28
第 2 單元： 維護	31
細胞分析儀維護	32
系統技術協助	34
練習：略過鞘液濾網	35
第 3 單元： 萬用設置	37
練習：特徵化 QC	43
傳送 CS&T 微球批	45
檢視：萬用設置	47
第 4 單元： 補償與設定值	49
練習：進行中的補償	59
練習：準備 BD™ FC 微球	67
練習：更新裂解清洗設定值	68
檢視：設定值	70
第 5 單元： 性能 QC	73
練習：執行性能 QC	76
性能 QC 規格	78

設置與 QC 工作時程	79
檢視：性能 QC	80
第 6 單元：實驗設置	81
練習：新增螢光染料至裂解清洗設定值	89
練習：實驗設置.....	92
練習：分析	107
練習：從實驗建立試驗.....	115
檢視：實驗設置.....	117
第 7 單元：工作清單取得與分析：手動裝填試管	119
練習：取得工作清單內的數據	123
練習：分析工作清單內的數據	127
檢視：工作清單.....	129
工作清單輸入狀態	130
第 8 單元：工作清單取得與分析：萬用裝填裝置	131
練習：取得工作清單內的數據	135
練習：分析工作清單內的數據	139
檢視：工作清單.....	141
工作清單輸入狀態	142
第 9 單元：資料管理	143
資料管理.....	144
檔案位置.....	147
第 10 單元：流體指令與疑難排解	149
疑難排解情境	152
第 11 單元：每日工作流程	155
練習：執行試驗與試管設定值設置.....	159
練習：取得並分析數據.....	161
第 12 單元：設定值作法	163
選擇實驗室作法.....	167
練習：新增螢光染料至組態.....	168
練習：新增標示至資料庫	169
練習：新增 Reagent 至 Library	170
第 1 個選擇：新增螢光染料	171
第 2 個選擇：建立參考設定值	175
練習：分析數據並建立試驗.....	180

練習：更多設定值作法.....	183
附錄 A： 檢視問題	185
第 1 天檢視	186
第 2 天檢視	188
最後檢視	190
附錄 B： 其他須知	193
CS&T 微球製備.....	194
BD™ FC 微球	196
選擇對照類型和未染者.....	197
其他分析功能	198
練習：使用其他分析功能	199
標準化	204
修飾既有的試驗.....	209
附錄 C： 專有名詞	211

此頁刻意留白。

關於此練習簿

此練習簿包含 BD FACSLyric™ 操作員課程中採用的指示，僅供訓練用途。

如需有關細胞分析儀及其軟體以及使用說明的更多資訊，請見：

- *BD FACSLyric 臨床系統使用說明*
- *BD FACSLyric 參考系統*
- *BD FACSLyric 臨床參考系統*

規章

下列表格列出此練習簿中採用的規章。表 1 列出的是這本小冊中提醒您潛在危險的符號。有關內文和鍵盤的規章，顯示於表 2。

表 1 危險符號

符號	意義
	注意：可能導致實質損害、數據喪失、輕微或嚴重傷害或死亡的危害或不安全的作法。
	電氣危險
	雷射
	生物風險

表 2 內文與鍵盤規章

規章	用途
重要須知	重點提示不涉及危害或不安全作法的重要資訊。
備註	重點提示補充主題重點的資訊。
祕訣	重點提示可節省時間或避免難題的功能或暗示。
斜體字	斜體字用以重點提示書籍名稱、表示對話方塊內應打出來的內文，並釐清一些使用介面標示等。
>	箭頭表示功能表選項。舉例而言，「選擇 File > Print」表示從 File 功能表上選擇 Print。
Ctrl+X	搭配關鍵字使用時，「+」表示同時按兩個鍵。舉例而言，Ctrl+P 表示在按下 Control 鍵時也按下字母 P。

課程總覽

完成此課程後，您將能夠：

- 操作及維護 BD FACSLyric™ 細胞分析儀並解決基本的儀器問題。
- 使用 BD FACSuite™ 軟體執行品質控管和設定。
- 設定新的多色實驗。
- 使用練習表以 BD FACSuite 軟體獲得並分析多色數據，搭配或不搭配 BD FACS™ 萬用型裝填裝置（裝填裝置）。
- 完成設定工作，如建立參考設定值以及新增螢光染料至參考設定值。

Course Schedule

Day 1	Day 2	Day 3
• System basics • Maintenance • Universal setup • Compensation and settings	• Performance QC • Experiment setup • Worklist Acquisition and Analysis	• Data Management • Daily workflow • Settings practice • Fluidics Commands and Troubleshooting
Day 1 review	Day 2 review	• Final review



此頁刻意留白。

第 1 單元

系統基本要素

這個單元包含下列章節：

- 啟用與關閉
- 系統概述

檢視：BD FACSLyric™ 系統總覽

前來上課前，您有被分配到一個線上學習單元，作為訓練前的準備功課。下列簡報內容將包含檢視該線上訓練單元的一些核心概念。

What are the three main subsystems on the BD FACSLyric™?



Fluidics



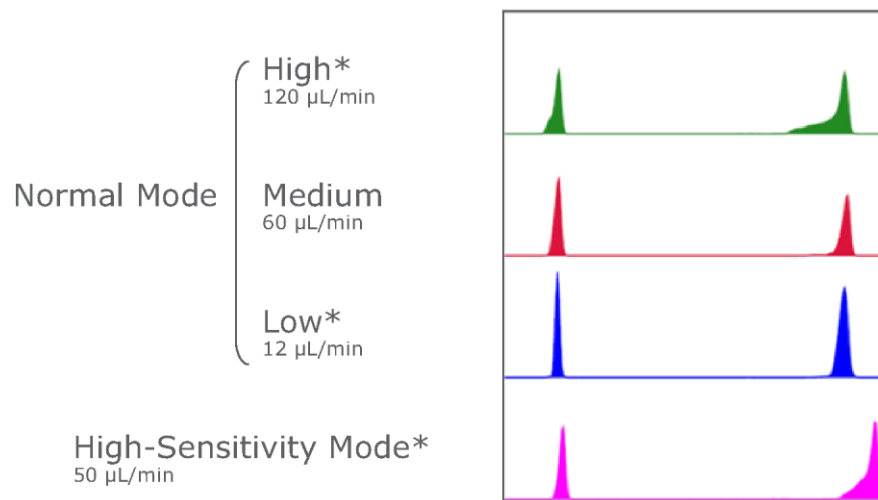
Optics



Electronics



In BD FACSuite™ software, how many fluidic modes are available?



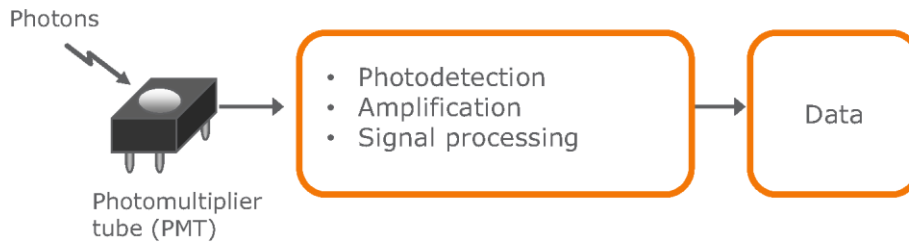
*For Research Use Only.



Where are the detector arrays?



What is the main purpose of the electronics subsystem?



Where can you perform quality control tasks in BD FACSuite?

Setup & QC

QC Reports

QC Tracking

Assay Setup Reports

Configurations

Current Configuration: 4-Blue 3-Red 3-Violet

Last Characterization QC (Normal Fluidics Mode): Passed Lot ID: 17884 1/26/2017 3:07 PM

Last Characterization QC (High Sensitivity Fluidics Mode): Passed Lot ID: 17884 1/26/2017 3:07 PM

Last Performance QC (Normal Fluidics Mode): Passed Lot ID: 17884 2/2/2017 10:35 AM

Last Performance QC (High Sensitivity Fluidics Mode): Passed Lot ID: 17884 2/2/2017 10:35 AM

Last LW Update: Passed Lot ID: 17884 1/30/2017 11:21 AM

Last LNW Update: Passed Lot ID: 17884 1/30/2017 11:21 AM

CS&T Bead Lot Transfer Summary

Configuration	Old CS&T...	New CS&T...	Completion...
4-Blue 3-Red 3-Violet			

Assay Setup Summary

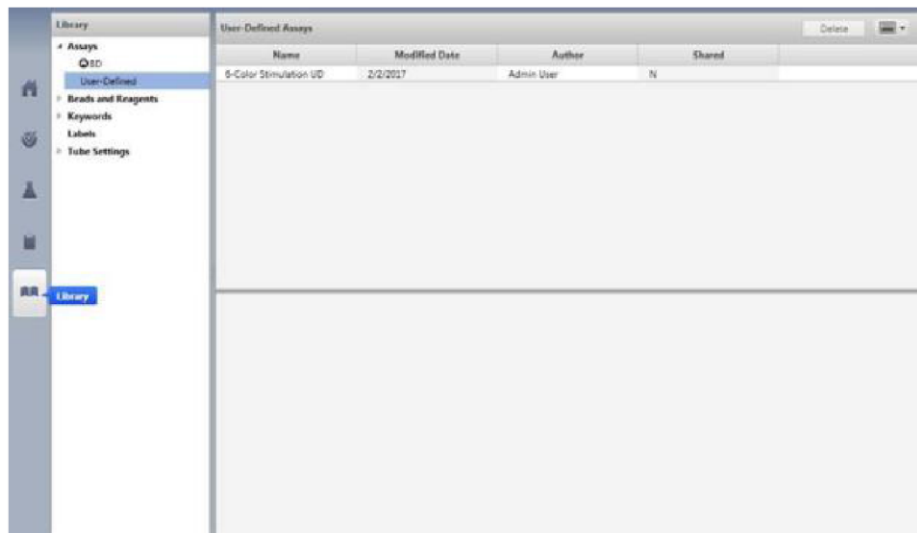
Assay	Type	Status	CS&T Bead...	Completion...
6-Color Stimulation UD	User-Defined	OK	17884	2/2/2017 10:45 AM

Tube Settings Setup Summary

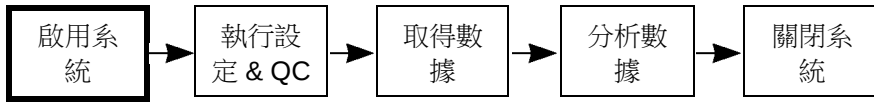
Tube Setting	Type	Status	CS&T Bead...	Completion...
6-Color Stimulation	User-Defined	OK	17884	2/2/2017 10:45 AM
Lyse No Wash	BD	OK	17884	2/2/2017 10:35 AM
Lyse Wash	BD	OK	17884	2/2/2017 10:35 AM



Which workspace allows you to import bead and reagent information?



啟用與關閉



這個章節完成後，您將能夠：

- 啟用和關閉 BD FACSLyric 細胞分析儀。
- 使用程式設定前的啟用功能。

練習：啟用系統

每天開始時，啟用系統，以確保液體線路已使用鞘液準備就緒並且取得數據前線路內的泡泡均已清空。

課堂上，您可在第 1 天手動啟用系統。之後幾天，則將使用 BD FACSuite 軟體內的程式設定前啟用功能。如需有關程式設定前啟用的相關資訊，請見第 18 頁的設定細胞分析儀時間表偏好。

執行手動啟用

1 檢查液體水位。

- a 需要時，注滿鞘液槽。
- b 淨空廢棄槽。

針對我們上課使用的 5 公升槽，將之與儀器重新連接前，請加入 500 毫升的漂白水。

2 請確認裝填裝置的門已關上。

3 按下電源鈕開啟系統電源。

- 電源鈕變綠色。
- 細胞分析儀狀態指示燈開始閃琥珀色。
- 鞘液流經系統。
- 雷射開始 20 分鐘的暖機。

4 需要時打開電腦。

視窗登入：管理員

視窗密碼：BDIS#1

5 開啟並登入 BD FACSuite 軟體。

帳號：student

密碼：lyric

6 透過查看工作區左下角處的綠色 **Connected** 狀態圖像 () 確認軟體已與細胞分析儀連線。

註 可能需要幾分鐘的時間軟體才會連上線，這不影響啟用順序。

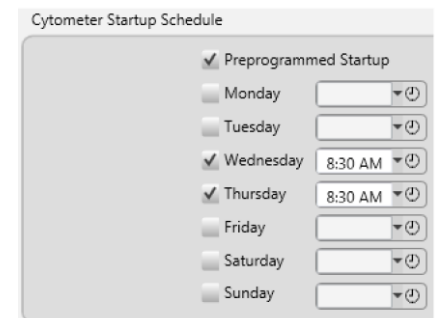
7 透過查看工作區右下角處的綠色 **Fluidics** 狀態圖示 () 確認流體系統已就緒。

練習：設定細胞分析儀排程偏好

在這項練習中，您必須使用細胞分析儀排程偏好設定程式設定前的啟用時程。

如需更多有關程式設定前的關閉排程資訊，請見 *BD FACSLyric 參考系統*。

- 1 從選單列，選擇 **Tools > Preferences**。
 - Preferences** 對話方塊開啟。
- 2 選擇左邊模板內的 **Hardware**。
- 3 在 **Cytometer Startup Schedule** 下方，選擇 **Preprogrammed Startup**。
- 4 明訂啟用時程。
 - a 選擇接下來兩天的課程。
 - b 明訂這兩天的啟用時間。針對正確的啟用時間，可以請教您的講師。
- 5 點選**確認**，儲存您的偏好並關閉對話方塊。
- 6 確認液體水位足夠支援啟用過程。

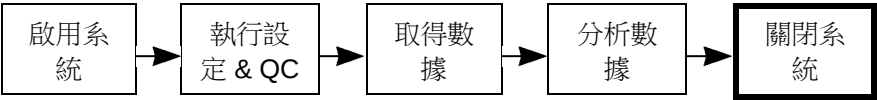


練習：確認啟用

細胞分析儀執行程式設定前啟用的那幾天，在取得數據前完成下列工作很重要。

- 1** 檢查液體水位。
- 2** 登入 BD FACSuite 軟體。
- 3** 確認軟體已連接至細胞分析儀並且流體系統已經就緒。
- 4** 執行性能 QC。

練習：關閉系統



當天使用完細胞分析儀後，請執行系統的每日清潔和關閉作業。

您也可以將系統的程式設定成自動關閉。如需詳細資料，請參見 *BD FACSLyric 參考系統*。

執行清潔和手動關閉

- 1 準備一個裝有 2 毫升 10% 漂白水的試管和一個裝有 3 毫升去離子（DI）水的試管。
- 2 從選單列，選擇 **Cytometer > Daily Clean**。
- 3 可以透過手動裝填試管或自動裝填試管等方式完成清潔作業。選擇您回到實驗室後最可能使用的方式。

針對手動裝填試管	針對自動裝填試管
- 將 10% 漂白水試管裝填在手動管埠上。 - 出現提示時，裝填 DI 水試管。提示後，點選 Continue。 - 整個過程完成後，對話方塊即關閉。	- 在 Daily Clean 對話方塊內，選擇 Universal Loader 以及 40。  - 將 10% 漂白水試管放入 40 支試管架上的位置 A1，而 DI 水試管放入位置 A2。 - 裝填試管架。提示後，點選 Continue。 - 整個過程完成後，對話方塊即關閉。

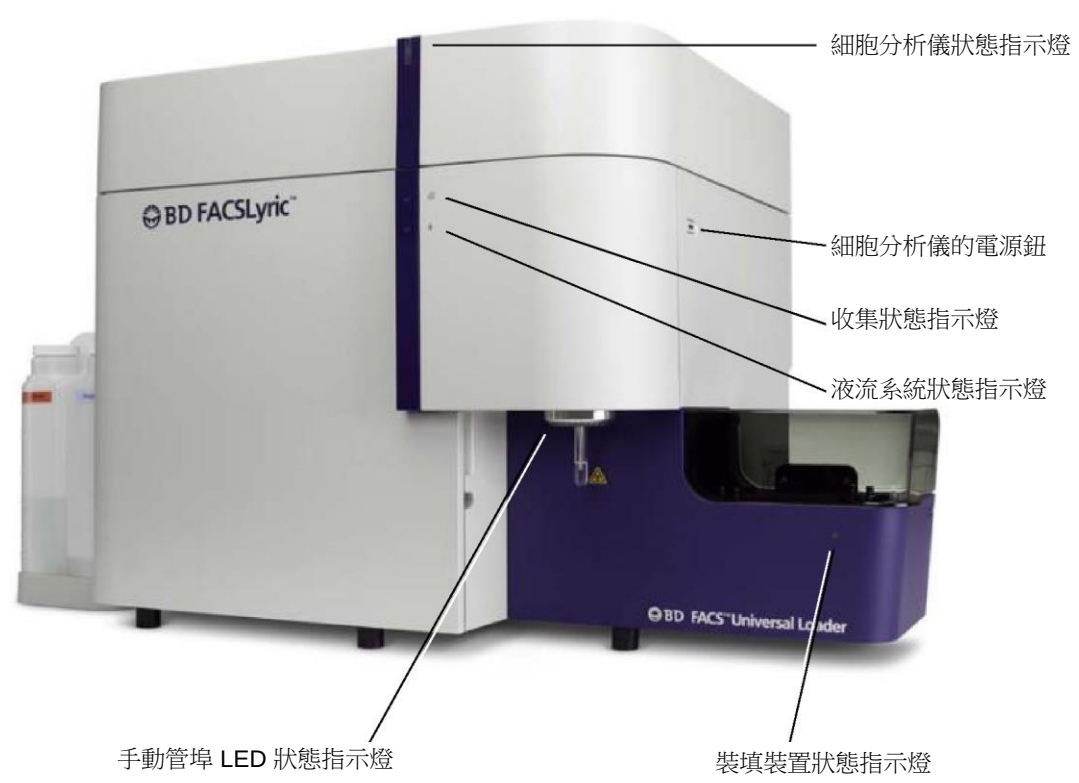
- 4 從選單列，選擇 **Cytometer > Shutdown**。
- 5 點選 **Yes**。
- 電源鈕會有幾秒鐘的時間閃綠色，然後系統電源關閉，電源鈕變成琥珀色。
- 6 將一個裝有 2 毫升的 DI 水試管放在手動管埠上。
- 7 離開 BD FACSuite 軟體，然後關閉電腦。

系統總覽

這個章節完成後，您將能夠：

- 認識 BD FACSLyric 系統組件與配件。
- 瀏覽 BD FACSuite 軟體。

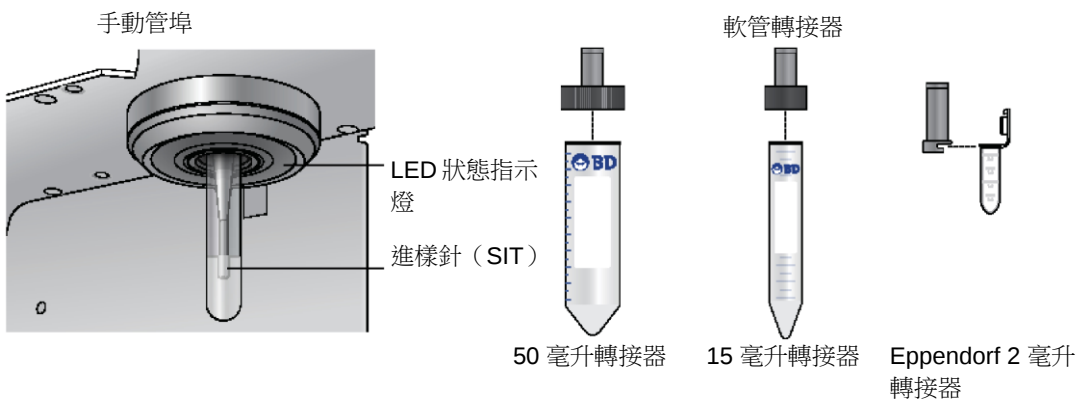
指示燈



指示燈	燈號	狀態
細胞分析儀狀態	綠色	可開始操作
	恆定琥珀色	故障情況
	閃琥珀色	暖機
	紅色	系統無法操作
細胞分析儀的電源鈕	琥珀色	所有主要附屬系統電源均已關閉
	綠色	電源開啟
	閃綠燈	已開始關閉過程
取得狀態	熄滅	不需要樣本
	藍色閃爍	需要樣本
流體狀態	熄滅	就緒
	閃琥珀色	- 鞘液水位低 - 廢棄槽幾乎滿位
	紅色	- 鞘液淨空 - 廢棄槽滿位 - 廢棄槽斷接

指示燈	燈號	狀態
手動管埠 LED 狀態	恆定綠色	已準備好接收試管
	閃琥珀色	進樣針正在沖洗中，請勿裝填試管
	熄滅	試管已裝填
裝填裝置狀態	熄滅	已可操作
	藍色	護蓋已鎖定且系統運作中
	藍色閃爍	上樣或卸樣中
	紅色	錯誤狀況

手動管埠組件



組件	功能
手動管埠	在軟管手動裝填時，將樣本導入流量槽內。
LED 狀態指示燈	顯示軟管是否已正確裝填或 SIT 是否已清乾淨。
進樣針（SIT）	取得過程中從手動管埠底部延伸。SIT 縮回並在樣本使用空檔間沖洗，減少殘留。
試管轉接器 ^a	固定在手動管埠上，適合各種試管大小。若無轉接器，系統只能處理 5 毫升、12 x 75-毫米的試管。

a. 僅供研究用途。

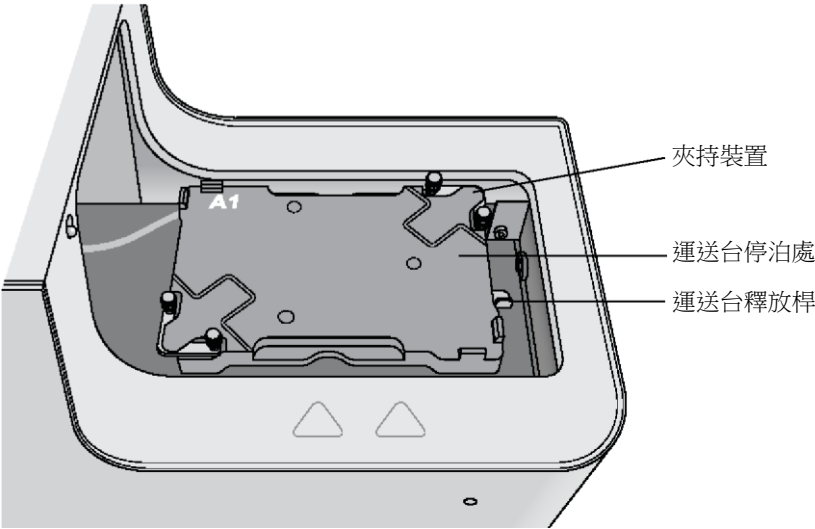
選配的鏡子濾網組

僅供研究用途。

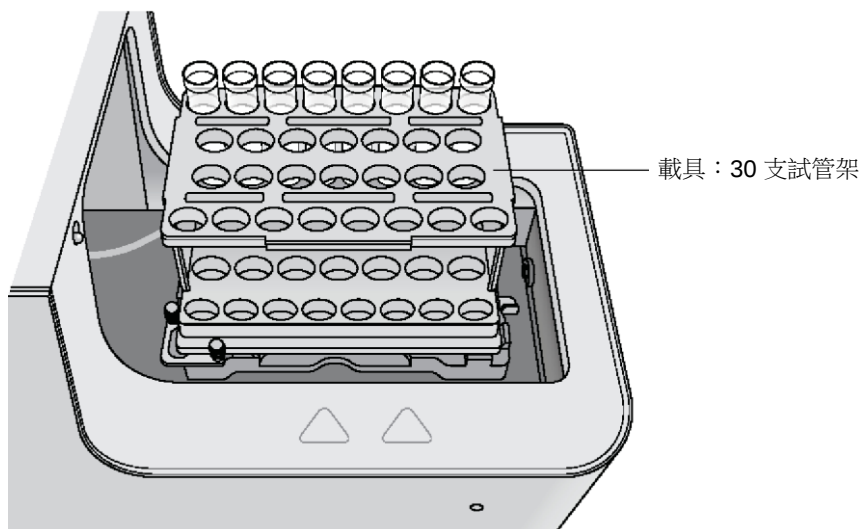


染料	濾網	鏡子
BD Horizon™ APC-R700	720/30	705 LP
BD Horizon™ PE-CF594, PE-Texas Red®	613/18	605 LP
GFP	510/10	510/10
YFP	545/20	535 LP

BD FACS 萬用裝填裝置



組件	功能
護蓋	系統運轉時會上鎖，以免使用者誤觸移動的零件。
退出鈕	停止取得並將載具移出至裝填位置。應於運轉過程中出現問題時使用。
夾持裝置	緊靠盤或管架邊緣固定，以便載具在運轉過程中穩固。
運送台停泊處	於運轉過程中抓住樣本載具。
運送台釋放桿	載入和卸下樣本載具時鬆開夾持裝置。



組件	功能
載具	固定在裝填裝置內，方便取得過程中自動裝填樣本。樣本載具包含 30 支試管架、40 支試管架、96 槽盤以及 384 槽盤 ^a 。

a. 96 和 384 槽盤僅供研究用途。

練習：系統總覽

找出組件所在位置並回答相關問題。

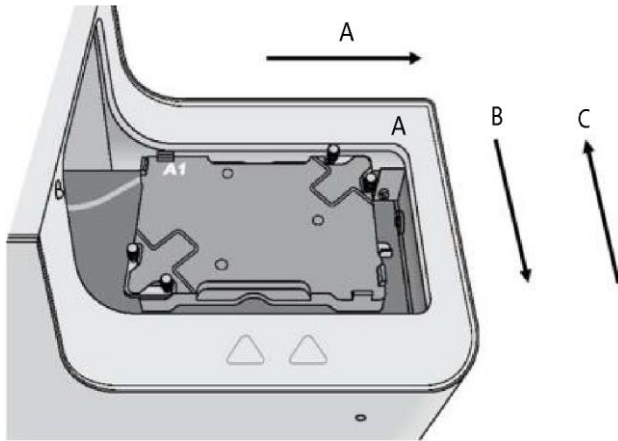
- 1** 找出鞘液槽所在位置。扭轉取下紫色接頭，然後重新接上。

對齊蓋子時，有提供您哪些指引給予協助？

- a 白點
- b 黑線
- c 橙色三角形

- 2** 打開裝填裝置的蓋子，然後找到右邊的釋放桿所在位置。使用該桿將樣本載具安裝在裝填裝置上。蓋上裝填裝置的蓋子。

應將桿子朝哪個方向移動才能鬆開夾持裝置，然後安裝樣本載具？



- 3** 在 BD FACSuite 軟體內，找到 Setup & QC 工作區所在位置。

您是使用哪個按鈕找到 Setup & QC 工作區？

- a 
- b 
- c 
- d a 或 c

- 4 在 **Setup & QC** 工作區內，點選 **Configurations** 索引標籤。開啟儀器前方的光學門，然後找到三個七邊形物所在位置。取下 FITC 濾網固定器。

BD FACSuite 軟體內藍色（488 奈米）FSC 七邊形物上的 PMT D 所在位置顯示什麼？

- a 空白標示
- b 「X」
- c 問號

- 5 更換光學濾網，然後關上光學門。將 DI 水試管從手動裝填埠上取下，然後放在儀器旁邊的架子內。

手動裝填埠附近的 LED 燈是什麼顏色？

- a 琥珀色
- b 綠色
- c 紅色

- 6 點選瀏覽列內的首頁圖像（），返回首頁。

點選 **Acquire Data in Experiment**。

新的實驗中建立了幾支試管？

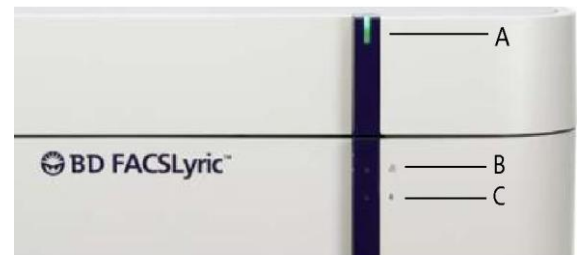
- a 一支
- b 兩支
- c 三支



- 7 將一支 DI 水試管裝填在裝填埠上，然後點選 **Preview**。

儀器上的哪個燈開始閃爍？

- a 細胞分析儀狀態指示燈
- b 收集狀態指示燈
- c 液流系統狀態指示燈



- 8 點選 **Stop**，然後將試管從儀器上取下。

裝填埠附近的 LED 是什麼顏色？

- a 琥珀色，然後綠色
- b 綠色，然後紅色
- c 紅色，然後綠色

將試管放回裝填埠上。

9 在實驗工作區內，您會選擇哪個功能表建立實驗所需的試驗？

- a 檔案
- b 工具
- c 細胞分析儀

10 返回首頁，然後點選 **Manage Library**。

視窗左邊的瀏覽列上反白的圖像是？

a



b



c



第 2 單元

維護

完成這個單元後，您將能夠：

- 說明 BD FACSLyric 的維護程序以及各自應執行的時機。
- 製作系統健康報告。

細胞分析儀維護

BD FACSLyric 儀器幾乎不需要維護。為了保留細胞分析儀的性能，部分建議執行的程序列於表 2-1 和表 2-2。

若要檢視維護程序和流體指令等詳細說明，請於 BD FACSLyric 參考系統的搜尋欄位內輸入程序或指令名稱。

排定的維護

下表顯示 BD FACSLyric 排定的維護程序。

表 2-1 排定的維護程序

程序	說明	頻率
執行每日清潔	使用 10% 漂白水 and DI 水去除 SIT 的髒汙。	每天
沖洗鞘液濾網	清除鞘液濾網上的氣泡。	每週
執行每月清潔	以 10% 漂白水去除細胞分析儀鞘液路徑內的髒汙。 重要 執行每月清潔程序前，先跳過鞘液濾網。	每個月
更換鞘液濾網	避免鞘液槽內的顆粒和氣泡進入細胞分析儀內。 註 選擇 Cytometer > Maintenance> Replace Sheath Filter，更新鞘液濾網詳細資料。	每 3 個月

未排定的維護

下表列出的是可視需要針對 BD FACSLyric 細胞分析儀執行的程序。

表 2-2 未排定的維護程序

程序	何時執行
注滿鞘液槽	• 啟用細胞分析儀前 • 接獲軟體警示前 10 分鐘內
淨空廢棄槽	• 啟用細胞分析儀前 • 接獲軟體警示前 10 分鐘內
清潔手動管埠	• 手動管埠周圍有樣本或食鹽水堆積時 • 試管感測器無法正常運作時
更換樣本線	• 樣本線阻塞時 • 樣本線糾結時

系統技術協助

針對解決問題的技術性問題或協助：

- 請閱讀此練習簿內針對您所執行的操作之使用指南章節。
- 查看使用指南內的移難排解章節。

如需額外協助，請洽當地 BD Biosciences 技術協助代表或供應商。聯絡 BD Biosciences 時，請備妥下列資訊：

- 產品名稱、零件編號和序號
- 任何錯誤訊息
- 最近的系統性能詳細資料
- 系統健康報告
- 事件時間和日期

針對美國境內的儀器協助，請撥 877.232.8995。

針對加拿大境內協助，請撥 888.259.0187。

美國與加拿大以外的客戶，請洽詢當地 BD 代表或經銷商。

製作系統健康報告

系統健康報告需包含一份含有系統目前狀態資訊的文字檔，也應包含一份含有記錄檔和其他技術協助代表可用以分析並解決系統問題的檔案之壓縮檔。

- 1 選擇 **Tools > Generate System Health Report**。

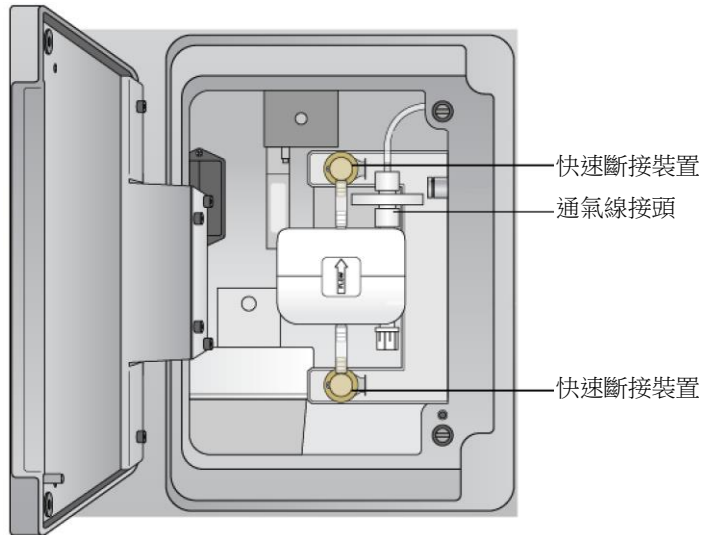
顯示即將儲存文字和壓縮檔位置的對話方塊開啟。

- 2 點選 **OK**，接受該位置或是點選瀏覽，選擇另一個位置，然後點選 **OK**。
- 3 請標註可能已經發生的任何事件時間和日期。

練習：略過鞘液濾網

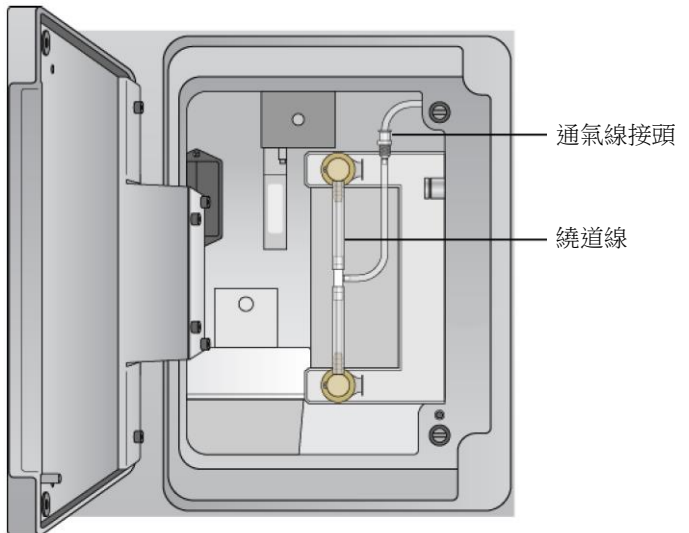
執行每月清潔程序前，需要跳過鞘液濾網。這樣可避免漂白水進入鞘液濾網，而因此影響儀器的性能。

- 1 從儀器的左邊模板內找到鞘液濾網所在位置。
您可能需要移動流體槽才能進入。
- 2 按下鞘液濾網頂部和底部的兩個快速斷接索引標籤，然後將鞘液濾網自儀器拆下。
- 3 鬆開接頭螺帽，將鞘液濾網頂部的通氣線斷接，
連接處可能會滴出一些鞘液。
- 4 將鞘液濾網直立放置，以免鞘液自通氣線滴出。
- 5 將兩個快速斷接裝置往下按至定位，直到扣住為止，裝上繞道線。
- 6 將通氣線與繞道線連接。



安裝鞘液濾網

- 1 將繞道線自儀器拆下。
- 2 重新將通氣線連接在鞘液濾網頂部。
- 3 安裝鞘液濾網時，將兩個快速斷接裝置往下按至定位，直到扣住為止，流量箭頭朝上。
- 4 選擇 **Cytometer > Fluidics > Purge Sheath Filter**。
- 5 至少重複第 4 步兩次，清除可能導入的任何氣泡。



此頁刻意留白。

第 3 單元

萬用設置

完成這個單元後，您將能夠：

- 定義萬用設置並說明如何運作。
- 說明特徵化 QC 的目的。
- 執行特徵化 QC。

What is universal setup?

An automated system that establishes and maintains instrument MFI target values on a single instrument using...

BD FACSuite™ Software



BD™ CS&T Beads



BD™ FC Beads

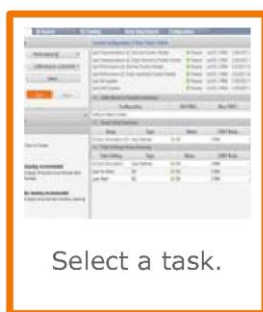


Why is it important?

- Allows for reproducible and consistent results.
- Eliminates the need for daily compensation.
- Creates settings that are easily transported from instrument to instrument.



How it Works



Characterization QC is the initial setup task. Other tasks ensure all settings are updated.



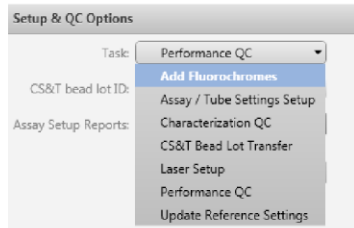
CS&T beads are used during setup tasks to establish PMT voltages that will place cells at the same target everyday.



FC Beads are used to measure spillover values that are used in reference settings.



Universal Setup: Setup and QC Tasks



Characterization QC (CQC)

Beads

- Determines initial cytometer performance.

CS&T

Performance QC (PQC)

- Measures daily cytometer performance.

CS&T

Assay and Tube Settings Setup (ATSS)

- Updates user-defined settings based on daily performance.

CS&T

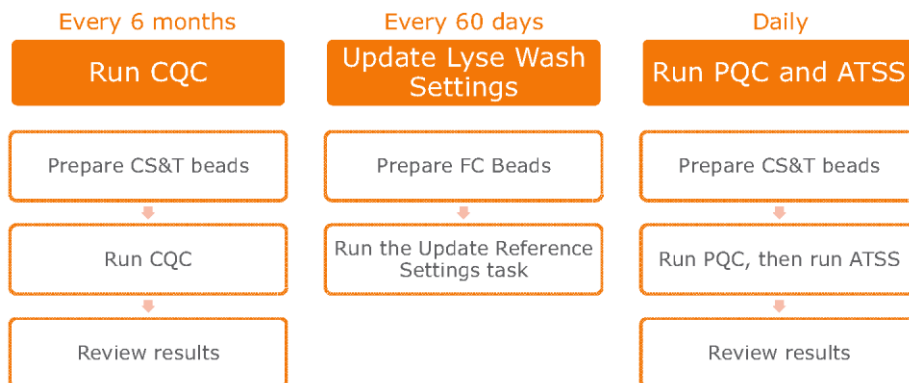
Update Reference Settings

- Re-measures spillover values.

CS&T
and
FC Beads



Universal Setup Workflow

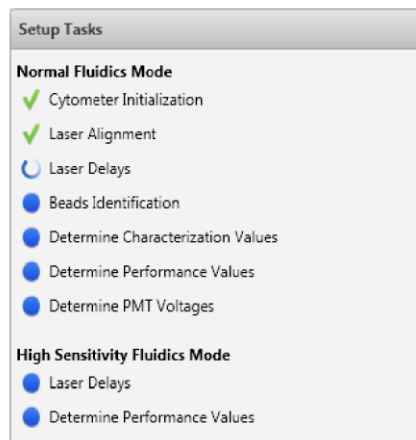


Characterization QC



Characterization QC (CQC)

What you see...



What the software does...

- Performs laser alignment
- Defines initial %rCV, linearity, and sensitivity values
- Determines initial PMT voltages to place the bright beads at the following MFIs:
 - ~120,000 for scatter channels
 - ~100,000 for fluorescent channels



CQC Report

Cytometer Characterization QC Report 4-Blue 3-Red 3-Violet

Cytometer:	BD FACSLytic	User:	Admin User
Cytometer Name:	Julia	Institution:	None
Serial Number:	826591800039		
Fluidics Mode:	Normal		
Last Characterization & QC:	6/8/2017 2:51 PM		
Configuration Name: 4-Blue 3-Red 3-Violet		Last Modified: 4/5/2017 4:38 PM	

SUMMARY: PASSED

Target MFI and %rCV values

Linearity and sensitivity values

DETECTOR SETTINGS

Laser	Detector				PMT		Bright Bead		Mid Bead		Dim Bead		Linearity (±2%)			Resolution		
	Name	Minor	Filter	Position	Voltage	Slope of Gain	Median	%rCV	Median	%rCV	Median	%rCV	Min Channel	Max Channel	Sensitivity	Electron Noise RSD	Qr (x10 ³)	Rr
LASER: Blue (Wavelength = 488nm)																		
X	FSC	-	-	-	FSC	421.4	0.0040	120.533	0.6	120.685	0.6	10.912	0.6	N/A	N/A	568	N/A	N/A
X	SSC	10	488/15	E	442.0	8.3267	121.880	1.6	123.300	1.6	56.473	0.9	N/A	N/A	1.514	N/A	N/A	N/A
X	FTTC	507LP	527/32	D	616.8	8.6613	101.118	1.6	2.663	9.2	438	26.7	126	329.625	422	19.5	77.3	160
X	PE	560LP	565/42	C	549.9	8.5635	100.910	1.2	2.626	6.3	498	18.8	155	229.944	1.290	18.2	636.6	142
X	PerCP-Cy5.5	668LP	700/54	B	579.2	8.7237	99.647	2.1	2.262	9.5	404	22.6	84	220.892	512	20.2	36.2	18
X	PE-Cy7	752LP	783/56	A	625.0	8.9846	99.903	3.8	1.253	19.3	259	42.2	34	229.470	2.054	19.5	48.1	1
LASER: Red (Wavelength = 640nm)																		
X	APC	660/10	660/10	C	528.6	8.4813	101.205	1.7	2.805	8.0	494	19.6	120	226.756	568	19.3	52.5	23
X	APC-4700	705LP	730/40	B	507.8	8.5629	100.416	1.9	1.916	6.1	366	14.4	152	226.249	334	20.6	29.7	75
X	APC-Cy7	752LP	783/56	A	498.6	8.6896	101.237	2.4	1.642	6.1	337	13.4	91	224.520	323	19.9	41.3	138
LASER: Violet (Wavelength = 405nm)																		
X	V450	448/45	448/45	E	731.6	8.6550	100.828	2.6	6.076	8.6	747	37.1	153	228.177	153	21.0	72.3	1.253
X	V500-C	500LP	528/45	D	460.5	8.8811	101.807	2.3	2.641	7.2	341	21.7	95	228.462	120	21.8	39.0	977
X	RV505	006/36	006/36	C	693.9	8.4959	100.511	3.2	2.518	14.8	372	50.3	134	228.104	1.888	22.5	373.5	42



CQC Timeline

Performed by field service engineer (FSE)



Re-run by Admin user

- Every 6 months
- Using CS&T beads



Exercise



1. Import bead lots.

- a. Download bead lot file(s) from the website.
- b. Import file(s) into the library.

2. Run CQC.

- a. Prepare CS&T beads.
- b. Run CQC.
- c. Review results.



練習：特徵化 QC

下表說明安裝儀器過程中通常會執行的工作。大部分的工作也可隨時視需要執行。

表 3-1 最初設置工作

工作	時機	負責人	地點
匯入一批 CS&T 微球	微球批次失效或是您接獲新一批微球時	所有使用者	資料庫
執行特徵化 QC	需要時、每 6 個月一次或是大型維修後	管理員	設置以及 QC 工作區
設定管理偏好	視需要	管理員	Tools > Administration
新增或管理使用帳號	視需要	管理員	Tools > User Management

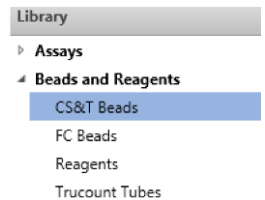
匯入一批 CS&T 微球

上課時，這個程序將已經替您做好。

祕訣 若要下載新批次的微球檔案，請前往 <http://www.bdbiosciences.com/resources/facsuite>。完成匯入程序前叫出資料夾。

- 1 在瀏覽列內，點選 **Library**。
- 2 點選兩次 **Beads and Reagents**，然後點選 **CS&T**。
- 3 選擇 **File > Import**。
- 4 瀏覽至 CS&T 微球批檔案，然後點選 **Open**。

新增微球批檔案至資料庫內。



特徵化 QC

特徵化 QC (CQC) 旨在找出測量特徵並建立測得的基期數值，以便用於追蹤細胞分析儀的性能。

- 特徵化 QC 工作僅得由 BD 維護和管理員等職務的使用者執行。
- 建議每六個月執行一次 CQC。

準備 BD FACSuite CS&T 研究微球

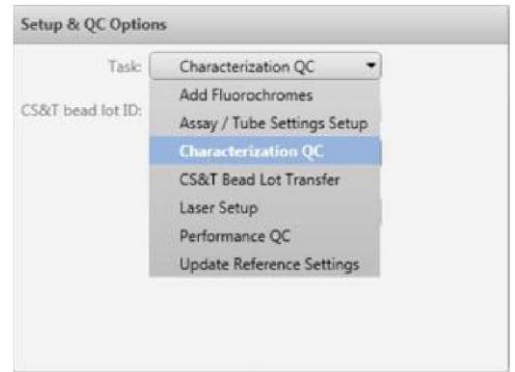
- 1 在 12 x 75 毫米的試管上寫下 CS&T。
- 2 徹底混合 CS&T 微球小瓶。
- 3 請根據第 194 頁上的表格準備微球。
- 4 使用前渦流處理試管。

執行特徵化 QC

- 1 在瀏覽列內，點選 **Setup & QC**。需要時，請選擇 Setup & QC 索引標籤。
- 2 在 **Task** 功能表上，選擇 **Characterization QC**。
- 3 確認 **CS&T 微球批次編號** 是否正確。
- 4 將準備好的 CS&T 微球試管裝填在手動管埠上，然後點選 **Start**。

BD FACSuite 軟體會將工作的詳細資料顯示在 **Setup Tasks** 模板內。綠色勾選記號表示已經完成該工作的其中一個步驟。

完成特徵化 QC 的工作後，完成的對話方塊開啟，內容顯示是否已經順利完成工作或是否有錯。



- 5 點選 **Continue**。
- 6 點選 **Yes**，檢視報告。否則，點選 **No**。
- 7 取下 CS&T 微球試管，然後將 DI 水試管放在手動管埠上。

傳送 CS&T 微球批

這個工作應在您改成新一批 CS&T 微球時執行。在使用新一批 CS&T 微球前執行這個工作讓您能夠繼續使用既有的試管設定值和溢出值，而不需要執行新的 CQC，直到現有的 CQC 失效為止。

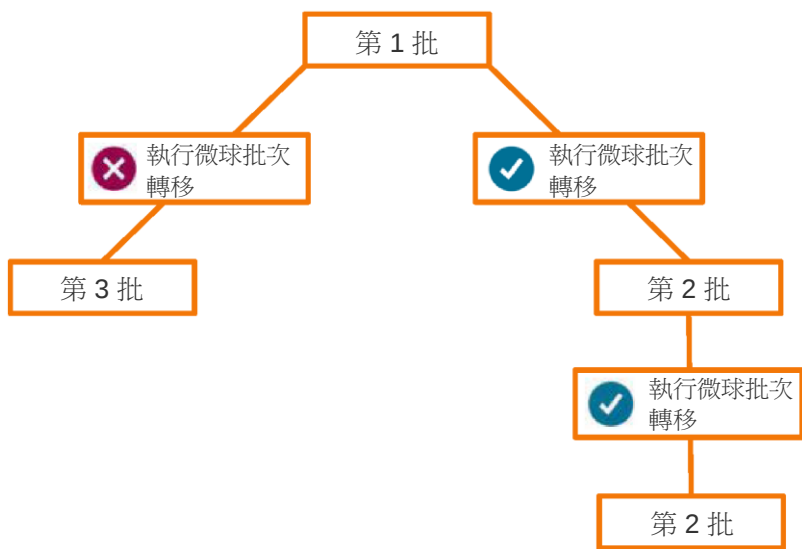
註 必須針對您的每個組態都完成這樣的動作。

在下方顯示的圖表中，您的實驗室是以第 1 批 CS&T 微球執行 CQC。CQC 失效前，您可以訂購更多的 CS&T 微球並取得第 2 批。



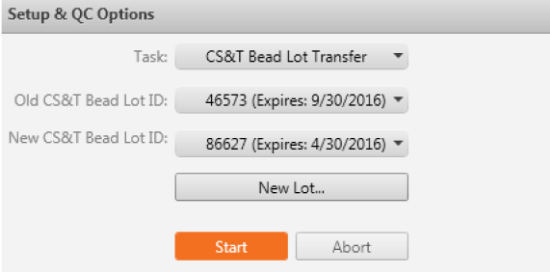
*兩批 CS&T 微球都必須在有效日期內。

註 僅得針對各批執行一批微球轉移。



執行 CS&T 微球批次轉移工作

- 1 在瀏覽列內，點選 **Setup & QC**。
- 2 在 **Task 功能表**上，選擇 **CS&T Bead Lot Transfer**。
- 3 確認舊的和新的微球批次編號正確，然後點選 **Start**。
- 4 將準備好的舊 CS&T 微球批次編號試管放在手動管埠上，然後點選 **Continue**。
- 5 出現提示時，將舊的試管卸下，然後將準備好的新 CS&T 微球批次編號試管放在手動管埠上。
裝填新試管後自動開始取得。
- 6 點選 **Yes** 或 **No**，檢視報告。



The screenshot shows a software window titled "Setup & QC Options". It contains the following elements:

- Task:** A dropdown menu currently showing "CS&T Bead Lot Transfer".
- Old CS&T Bead Lot ID:** A dropdown menu showing "46573 (Expires: 9/30/2016)".
- New CS&T Bead Lot ID:** A dropdown menu showing "86627 (Expires: 4/30/2016)".
- New Lot...:** A button located below the ID dropdowns.
- Start:** An orange button at the bottom left.
- Abort:** A grey button at the bottom right.

檢視：萬用設置

- 1** 您多常執行特徵化 QC？

- 2** 如果您需要在 CQC 失效前轉換 CS&T 微球批次，應該怎麼做？
 - a** 以新的微球批次執行新的 CQC。
 - b** 洽詢 BD。
 - c** 執行 CS&T 微球批次轉移工作。

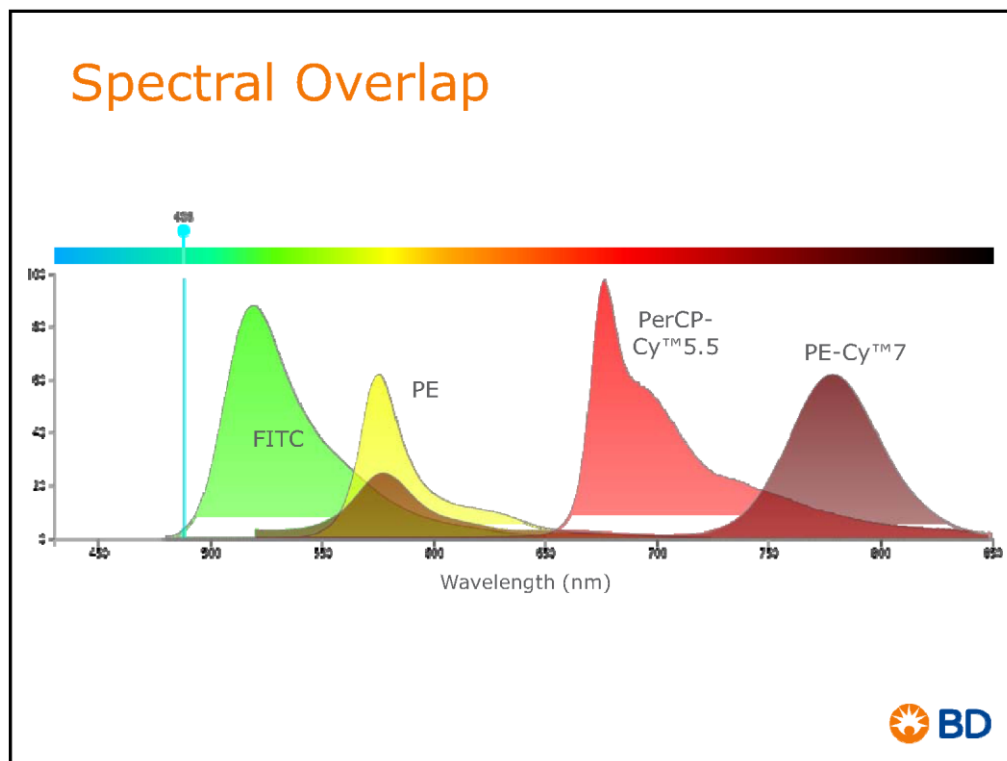
此頁刻意留白。

第 4 單元

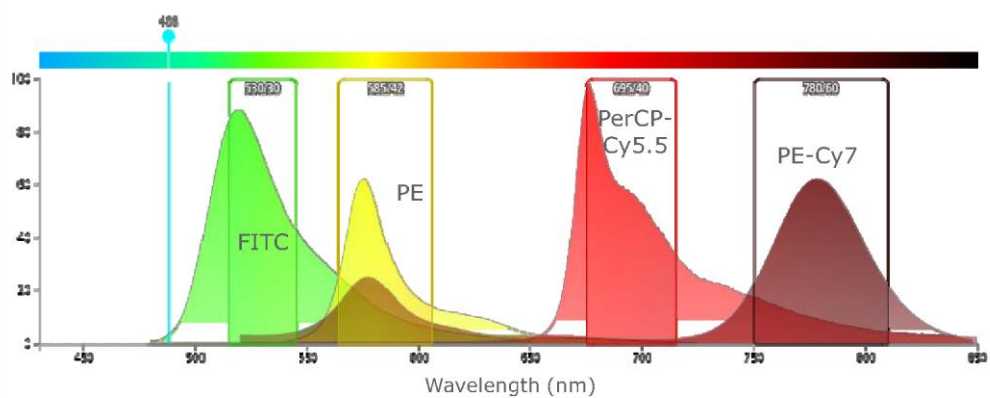
補償與設定值

完成這個單元後，您將能夠：

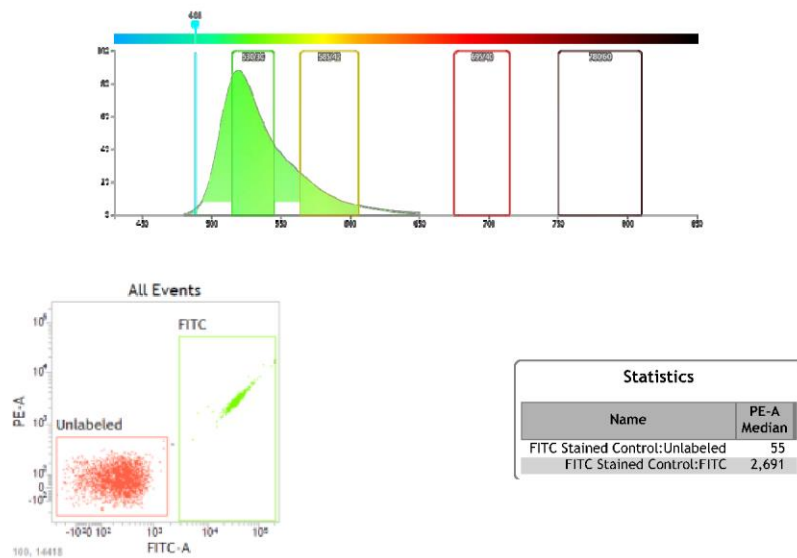
- 說明補償理論。
- 定義 BD FACSuite 軟體採用的設定值類型。
- 更新 Lyse Wash 參考設定值。



Spillover



FITC Spillover

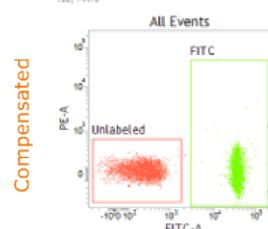


Compensation

The mathematical process by which the fluorescence values for the primary detector reflect only the fluorescence of the intended fluorochrome and the fluorescence from any other fluorochromes is removed.



Statistics	
Name	PE-A Median
FITC Stained Control: Unlabeled	55
FITC Stained Control: FITC	2,691

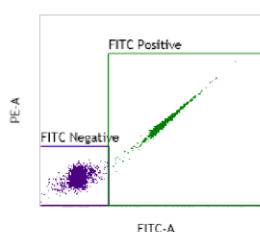


Statistics	
Name	PE-A Median
FITC Stained Control: Unlabeled	34
FITC Stained Control: FITC	35



Compensation Terminology

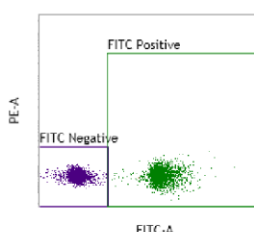
Undercompensated



Statistics	
Name	PE-A Median
Lyse Wash_FITC-FITC Negative	27
Lyse Wash_FITC-FITC Positive	707

FITC Negative	13
FITC Positive	3,119

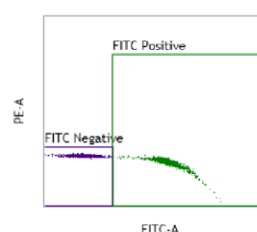
Correctly compensated



Statistics	
Name	PE-A Median
Lyse Wash_FITC-FITC Negative	19
Lyse Wash_FITC-FITC Positive	19

FITC Negative	9
FITC Positive	9

Overcompensated



Statistics	
Name	PE-A Median
Lyse Wash_FITC-FITC Negative	17
Lyse Wash_FITC-FITC Positive	-193

FITC Negative	8
FITC Positive	-250

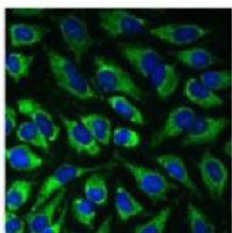


Tips for Accurate Compensation

- The fluorescence spectrum (% spillover) of the compensation control reagent should be identical to the reagent used in the experiment.
 - For example, do not use Alexa Fluor® 488 to compensate FITC.
- If a separate negative control tube is used, the cell/particle type must match that of the positive control tube.
 - For example, do not use lymphocytes for the negative tube and monocytes for the positive tube.
- Positive populations should be relatively bright and on scale.
- Collect enough events to get statistically accurate numbers.
 - In other words, do not use a rare marker as your compensation control.



Choosing a Compensation Control Type



Use cells if...

- Your cells are expressing a reporter protein, such as GFP.
- Your cells are stained with a fluorescent dye, such as PI or 7-AAD.
- The species of your antibody differs from available BD CompBead choices.



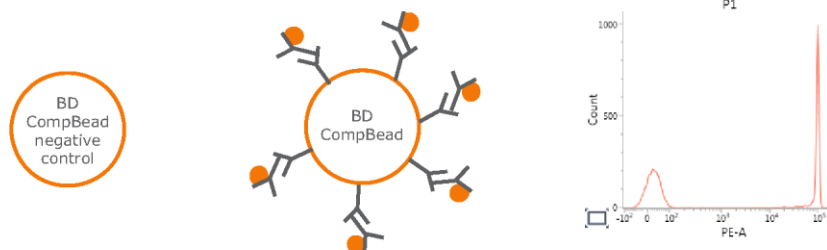
Use BD™ CompBeads if...

- You have low sample concentration.
- You are looking for antigens that are rare or variably expressed.

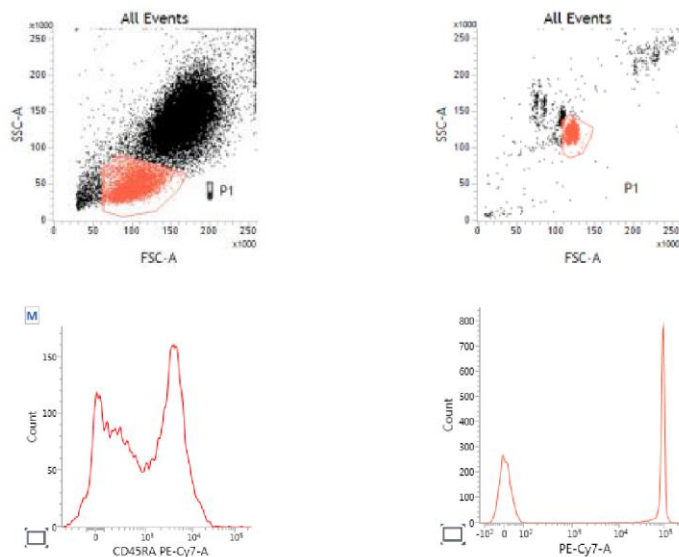


BD™ CompBead Particles

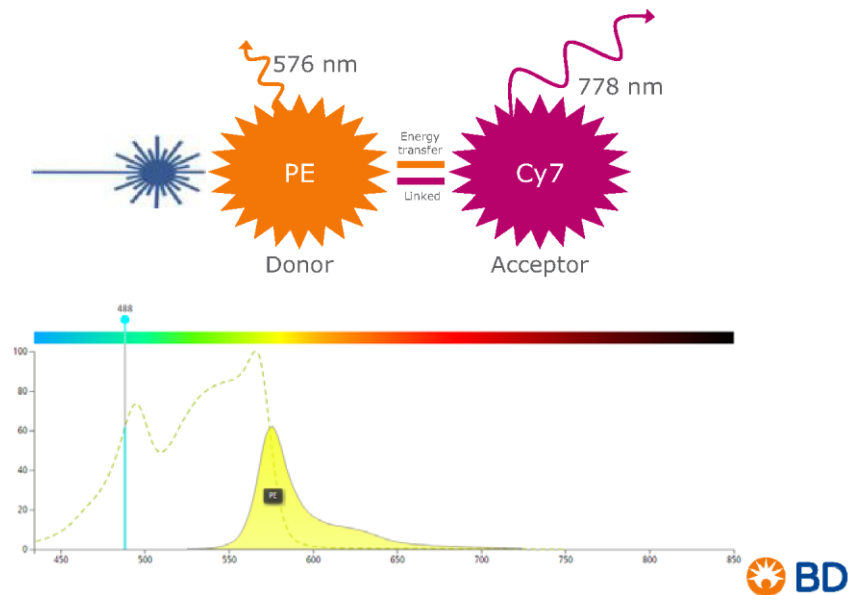
- Use the same antibodies as the experimental samples
- Conserve the experimental sample
- Create bright and uniform positive fluorescence peaks



Cells vs Beads



What is a tandem dye?

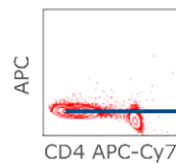
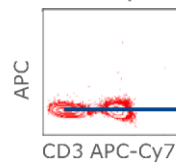
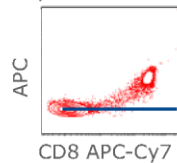


Tandem Dyes Are Special

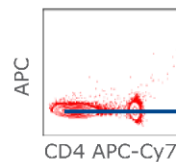
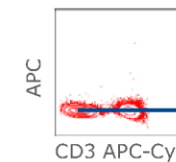
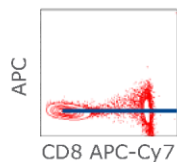
Experiment: 3 cocktails, 3 different APC-Cy7 conjugates

CD8 CD3 CD4

Compensation control: CD3 APC-Cy7 used for all cocktails



Compensation control: lot-specific controls



Lot-Specific Compensation

Lot-specific compensation can be assigned when creating new reference settings or adding a fluorochrome to an existing setting.

Create Reference Settings

Select the controls and lot IDs that will be used to create Reference Settings.
Click Add or Delete to modify which tubes to run.
Acquisition will start when Next button is clicked.

CS&T Beads

CS&T Bead Lot ID: 17884 (Expires: 2/28/2020)

Control Tubes

Fluorochrome	Control Type	Label	Lot ID	Unstained
FITC	▼ FC Beads	▼ Generic	443331 (9/30/2018)	▼
PE	▼ FC Beads	▼ Generic	443332 (9/30/2018)	▼
PerCP-Cy5.5	▼ FC Beads	▼ Generic	667712 (12/31/2018)	▼
PE-Cy7	▼ CompBeads	▼ CD45RA	546873 (5/11/2018)	▼
APC	▼ FC Beads	▼ Generic	667711 (12/31/2018)	▼
APC-H7	▼ FC Beads	▼ Generic	6084967 (4/30/2018)	▼

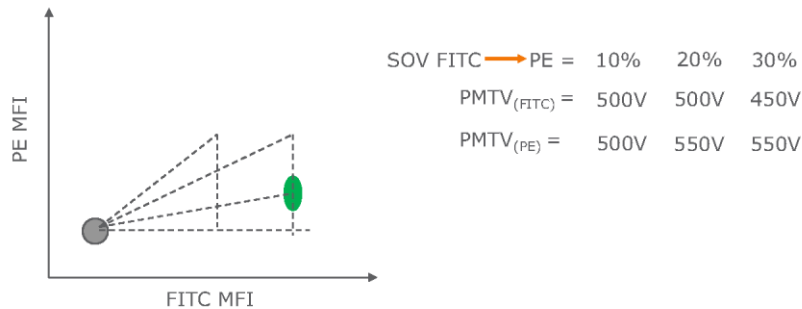


How does compensation work in FACSuite?

- Setup and QC tasks re-calculate compensation based on daily cytometer performance.
- When PMT voltages (PMTVs) are adjusted, compensation values are re-calculated.
- Spillover values (SOVs) need to be re-measured every 60 days.



Classical SOVs and PMTV



Classical SOVs calculated in median fluorescence intensity (MFI) are PMTV dependent because MFI values are dependent on the PMTV.



New Terminology

Assigned BD Unit (ABD Unit)

- A BD standard for fluorescence that is PMTV independent.
- Each CS&T bead lot has defined ABD units for each channel.
- One ABD unit is defined as 1/40,000th of the fluorescence of a lymphocyte stained with anti-CD4 for a particular detector or fluorochrome.

Measured SOV (MSOV)

- Generated when reference settings are created or updated by running compensation controls.

Normalized SOV (NSOV)

- The actual spillover in ABD units.
- Determined by the overlap into optical filters.

Calculated SOV (CSOV)

- Calculated from existing measured NSOVs and tube settings.

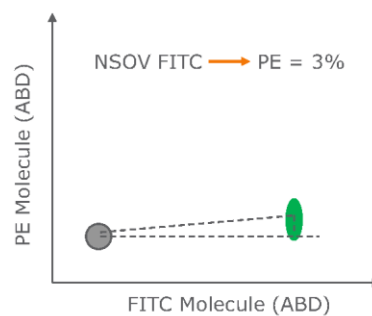


NSOVs and PMTV

Normalized SOVs are calculated in ABD units.

$PMTV_{(FITC)} = 450V \quad 500V \quad 500V$

$PMTV_{(PE)} = 550V \quad 550V \quad 500V$



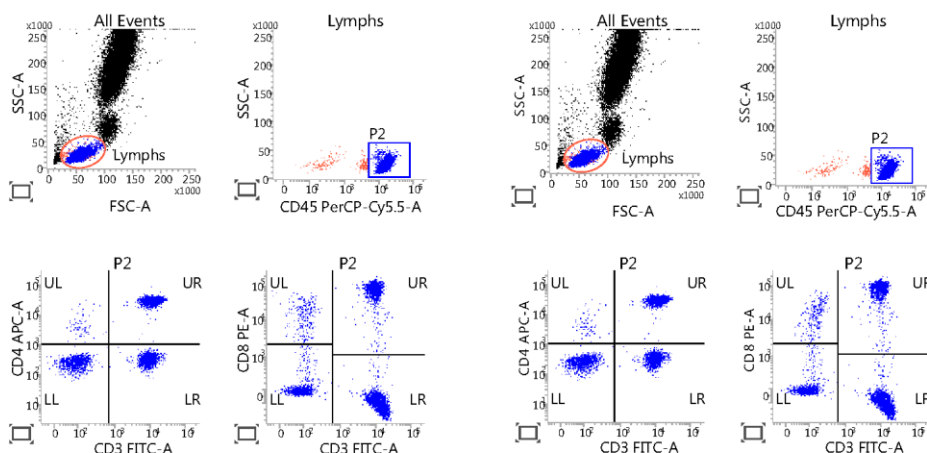
NSOVs calculated in ABD units are PMTV independent
because ABD units are PMTV independent.



Reproducibility of Setup

Day 1

Day 60



Exercise



1. Create a new experiment.
2. Change the PMTVs.
3. Compare spillover values.

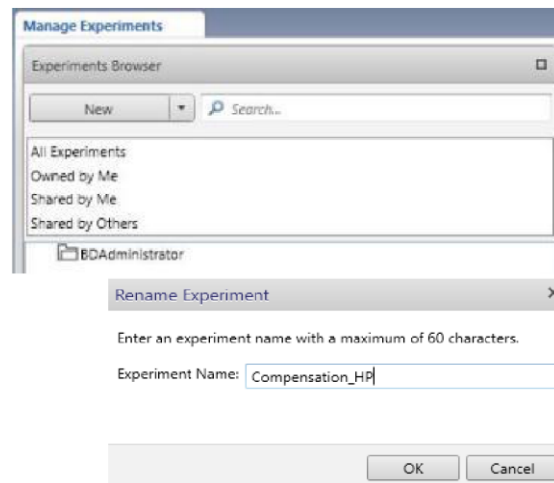


練習：進行中的補償

在這項練習中，您將在調整 PMT 電壓後觀察溢出矩陣圖出現的變化。

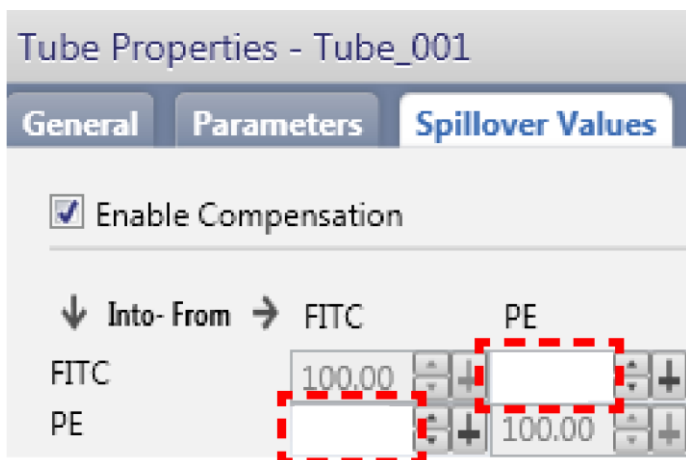
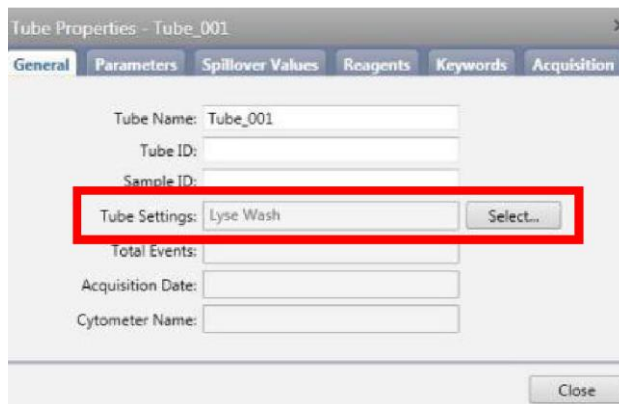
建立新的實驗

- 1 在瀏覽列內，點選 **Experiment**。
在 **Experiments** 工作區內，**Manage Experiments** 索引標籤開啟。
- 2 在 **Experiments Browser** 模板內，點選 **New**。
新實驗已新增至瀏覽器內，並在新的索引標籤內開啟。
- 3 選擇 **File > Rename**。
- 4 打入 **Compensation_<您的姓名縮寫>** 將實驗重新命名。
- 5 點選 **OK**。



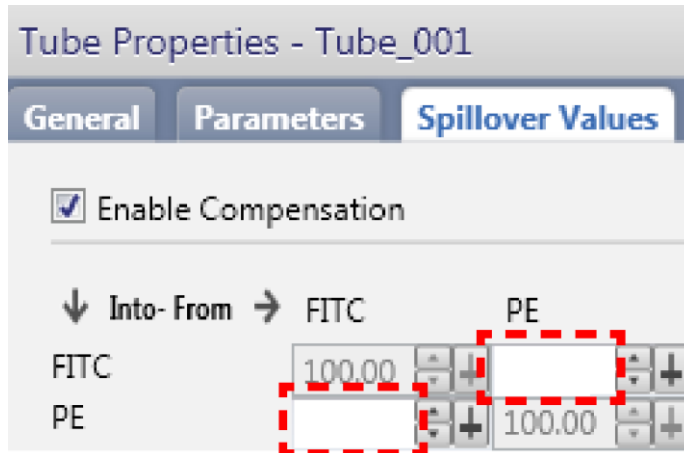
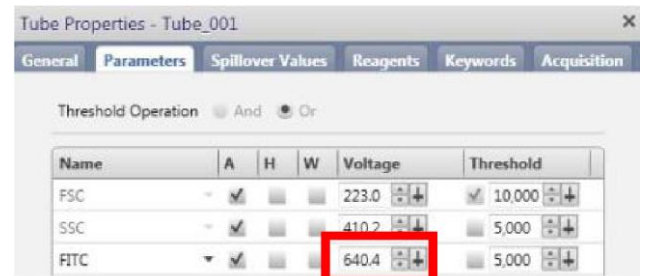
確認 Lyse Wash 設定值

- 1 點選兩次 **Tube_001**，開啟 **Tube Properties** 對話方塊。
- 2 確認針對 **Tube Settings** 欄位選取 **Lyse Wash**。需要時，點選 **Select**，變更試管設定值。
- 3 點選 **Spillover Values** 索引標籤。
- 4 在下方空白處寫下 FITC 和 PE 的溢出值。



變更 PMTV

- 1 點選 **Parameters** 索引標籤。
- 2 增加 FITC 電壓 100 伏特。
- 3 返回 **Spillover Values** 索引標籤。
- 4 在下方寫下 FITC 和 PE 的溢出值，然後與之前的數值進行比較。

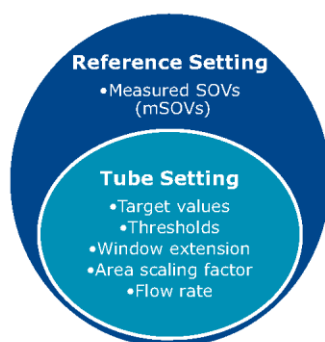


- 5 關閉 **Tube Properties**。

Settings



Building Blocks



BD-Defined

Start Here

Lyse/Wash and Lyse/No-Wash reference settings

User-Defined

Customize any or all of the following:

- Flow rate
- PMTV
- Threshold
- Area scaling
- Window extension
- Spillover values



Tube Settings

- A collection of values that place the positive population at the same position (MFI) whenever the tube settings are applied
- Do NOT contain spillover values
- Linked to lyse wash settings

Experiments using tube settings still have spillover values because they are calculated from a reference setting.



Tube Settings Contain...

- Tube target values (TTVs)
- Threshold value
- Flow rate
- Window extension
- Area scaling factor

NOTE: TTVs are only established for the parameters in the tube.

Tube Settings		
Created Date: 2/2/2017 10:45 AM		
Author: Admin User		
Short Description:		
Window Extension: 3		
Flow Rate: Medium		
Area Scaling Factor (ASF) Ratio		
FSC	1.00	
Violet	1.00	
Blue	1.00	
Red	1.00	

Parameter	Tube Target Value (TTV)	Threshold (Ov)
FSC	0.18	10,000
SSC	1.25	
FITC	0.22	
PE	0.95	
PerCP-Cy5.5	0.33	
PE-Cy7	0.73	
APC	0.24	
APC-H7	0.22	



Tube Target Values

- The ratio of median fluorescence intensity (MFI) to assigned BD unit (ABD) for a parameter
- Used to place CS&T beads at the target MFI during daily setup
- Instrument and bead lot independent
 - Transportable from one instrument to another.

$$\frac{\text{MFI}_{\text{CS\&T bright bead}}}{* \text{ABD}_{\text{PE}}} = \frac{2,000}{8,000} = 0.250 \text{ TTV}_{\text{PE}} \text{ for this assay}$$

*From the CS&T bead lot file



How it Works



1. Use your cells to adjust settings (flow rate, PMTV, threshold, etc.).
2. Create tube settings for your optimized tube using CS&T beads.
 - The MFI of the bright bead is recorded for each parameter in the tube.
 - TTVs are calculated by using the ratio of the MFI and the ABD value for each parameter.



Reference Settings

- A tube setting with associated measured SOVs
- Instrument dependent
- Updated during daily setup and QC tasks
- Spillover needs to be re-measured every 60 days

Tube Settings Spillover Values

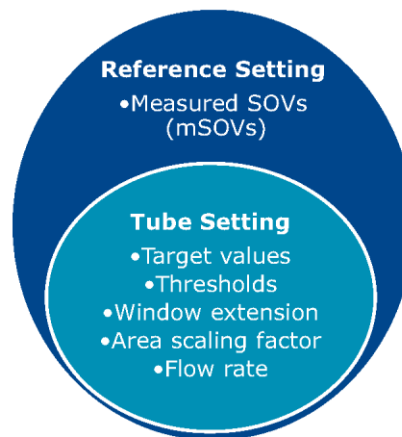
Updated Date: 2/8/2017 1:20 PM Expiration Date: 4/9/2017 1:20 PM Remove Fluorochrome

Measurement: Area Height

Fluorochrome	FMTV	Spillover Values							
		RTC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	BV421	BV510
		Generic	Generic	Generic	CD45RA 348273	Generic	Generic	Generic	Generic
RTC	642.5	100.00	1.18	0.03	0.17	0.01	0.06	0.02	1.87
PE	483.7	14.44	100.00	0.03	1.34	0.01	0.03	0.01	0.39
PerCP-Cy5.5	580.0	2.80	24.19	100.00	1.21	1.86	0.06	0.02	0.14
PE-Cy7	602.4	0.28	1.81	17.50	100.00	0.21	1.33	0.01	0.02
APC	551.0	0.00	0.01	1.28	0.03	100.00	2.05	0.00	0.00
APC-H7	553.9	0.00	0.00	6.64	9.12	13.96	100.00	0.00	0.00
BV421	536.5	0.17	0.03	0.08	0.03	0.03	0.19	100.00	1.73
BV510	487.7	14.04	1.51	0.30	0.17	0.10	0.54	0.75	100.00
FV557SV	518.9	0.61	13.18	0.05	0.14	0.06	0.06	0.90	4.95

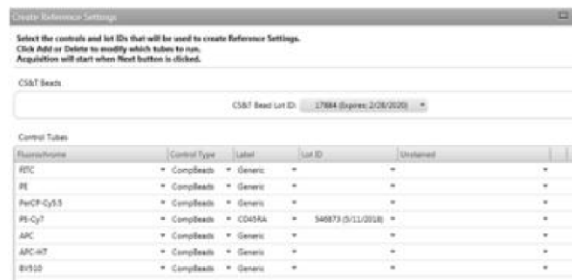


Reference Settings Contain...



How it Works

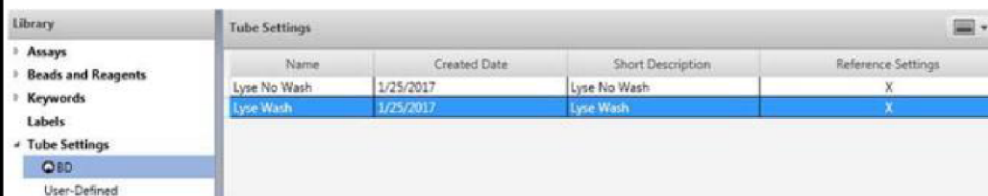
1. Use your cells to adjust settings (flow rate, PMTV, threshold, etc.).
2. Create reference settings for your optimized tube using CS&T beads and appropriate compensation controls.
 - The MFI of the bright bead is recorded for each parameter in the tube.
 - TTVs are calculated by using the ratio of the MFI and the ABD value for each parameter.
 - Spillover values are measured using your compensation controls.



BD-Defined Reference Settings

Lyse/Wash (LW) and Lyse/No-Wash (LNW) Settings

- Created at installation by the field service engineer
- Contain tube settings for normal human lymphocytes
- Updated daily with Performance QC
- Spillover needs to be re-measured every 60 days



BD™ FC Beads

- Fluorescent beads that enable the software to determine spillover values.
- Each tube has a mixture of positive and negative beads.



Exercise



1. Prepare BD FC Beads.
2. Update the lyse/wash settings.



練習：準備 BD™ FC 微球

在這項練習中，您將準備表 4-1 內列出的 BD FC 微球，以更新裂解清洗參考設定值。微球是以 3- μ m 聚苯乙烯連結至熒光團並乾燥處理。每一支試管混合了正負微球。

表 4-1 8 和 10 色 IVD/RUO 組態的 BD FC 微球

名稱	狀態
BD™ FC 微球 7 色套組	IVD
BD™ FC 微球 BV605	RUO
BD™ FC 微球 APC-R700	RUO
BD™ FC 微球 APC-H7	RUO
BD™ FC 微球 V500-C	RUO
BD™ FC 微球 V450	RUO

- 1 讓微球袋恢復到室溫，18°C-25°C。
- 2 從其中一個袋子內取出一支試管，應該會有 12 支試管。
- 3 重新封好每一個袋子，然後立即放回 2°C-8°C 儲存庫。
註 試劑對於濕氣很敏感。因此，請勿將鋁箔袋中的乾燥劑包取出。
- 4 在每支試管內加入 0.5 毫升（10 滴）BD FC 微球稀釋緩衝液。
註 使用其他稀釋緩衝液可能導致不正確的 SOV。
- 5 大力渦流處理試管 3-5 秒，補充微球水分。
- 6 若不立即使用，請將補好水份的微球以 2°C -8°C 存放在黑暗處。

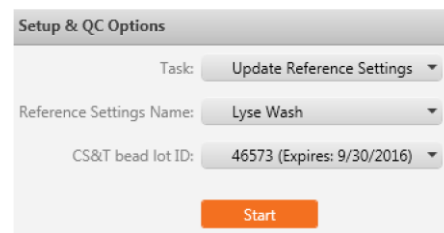
微珠在避光條件下再水化後，可維持穩定的時間長度：

- 8°C-25°C 下可達 1 小時
- 2°C-8°C 下可達 4 小時

練習：更新裂解清洗設定值

若要確保溢出值正確，建議您每 60 天更新您的裂解清洗設定值。

- 1 需要時，請瀏覽至 Setup & QC 工作區。
- 2 確認通過性能 QC。
- 3 在 Setup and QC Options 模板內：
 - a 選擇 Update Reference Settings 作為 **Task**。
 - b 選擇 Lyse Wash 作為 **Reference Settings Name**。
 - c 確認 **CS&T 微球批次編號** 是否正確。
 - d 點選 **Start**。



Setup & QC Options

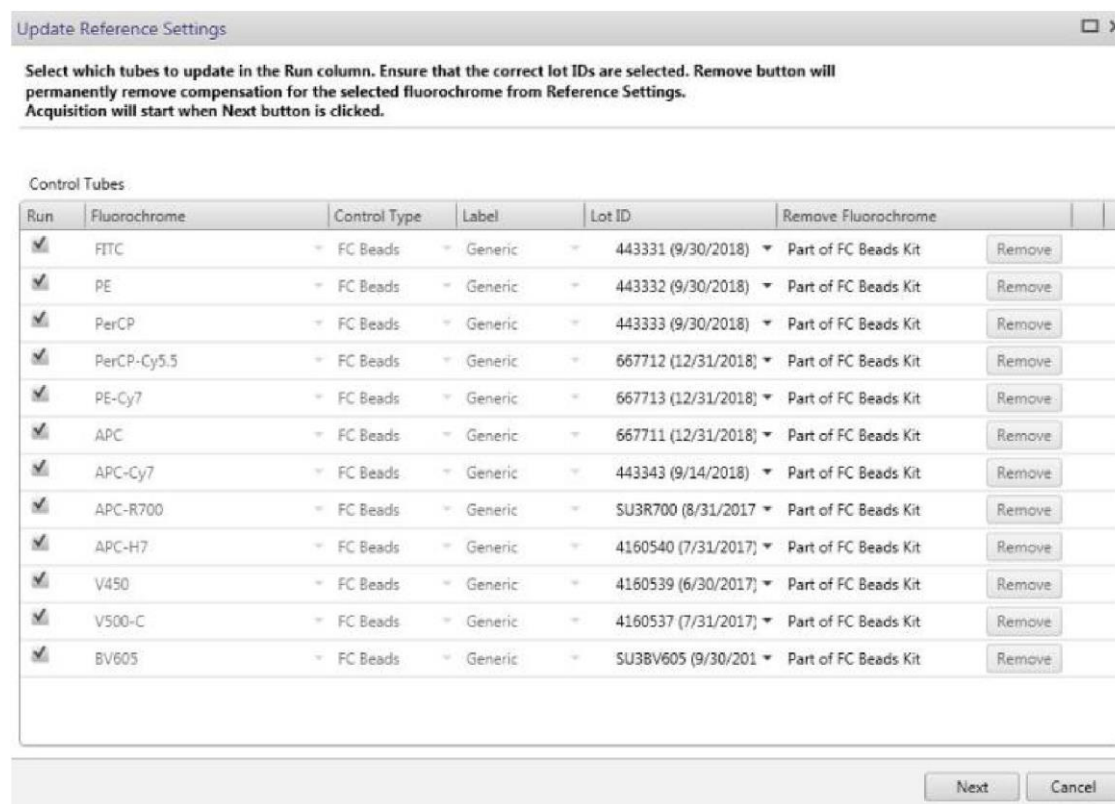
Task: Update Reference Settings

Reference Settings Name: Lyse Wash

CS&T bead lot ID: 46573 (Expires: 9/30/2016)

Start

Update Reference Settings 對話方塊開啟。



Update Reference Settings

Select which tubes to update in the Run column. Ensure that the correct lot IDs are selected. Remove button will permanently remove compensation for the selected fluorochrome from Reference Settings. Acquisition will start when Next button is clicked.

Run	Fluorochrome	Control Type	Label	Lot ID	Remove Fluorochrome
☒	FITC	FC Beads	Generic	443331 (9/30/2018)	Part of FC Beads Kit Remove
☒	PE	FC Beads	Generic	443332 (9/30/2018)	Part of FC Beads Kit Remove
☒	PerCP	FC Beads	Generic	443333 (9/30/2018)	Part of FC Beads Kit Remove
☒	PerCP-Cy5.5	FC Beads	Generic	667712 (12/31/2018)	Part of FC Beads Kit Remove
☒	PE-Cy7	FC Beads	Generic	667713 (12/31/2018)	Part of FC Beads Kit Remove
☒	APC	FC Beads	Generic	667711 (12/31/2018)	Part of FC Beads Kit Remove
☒	APC-Cy7	FC Beads	Generic	443343 (9/14/2018)	Part of FC Beads Kit Remove
☒	APC-R700	FC Beads	Generic	5U3R700 (8/31/2017)	Part of FC Beads Kit Remove
☒	APC-H7	FC Beads	Generic	4160540 (7/31/2017)	Part of FC Beads Kit Remove
☒	V450	FC Beads	Generic	4160539 (6/30/2017)	Part of FC Beads Kit Remove
☒	V500-C	FC Beads	Generic	4160537 (7/31/2017)	Part of FC Beads Kit Remove
☒	BV605	FC Beads	Generic	5U3BV605 (9/30/201)	Part of FC Beads Kit Remove

Next Cancel

- 4 確認下列：
 - 您執行的所有對照組試管都是從 **Run** 欄內挑選。
 - **Lot ID** 正確。

5 點選 **Next**。

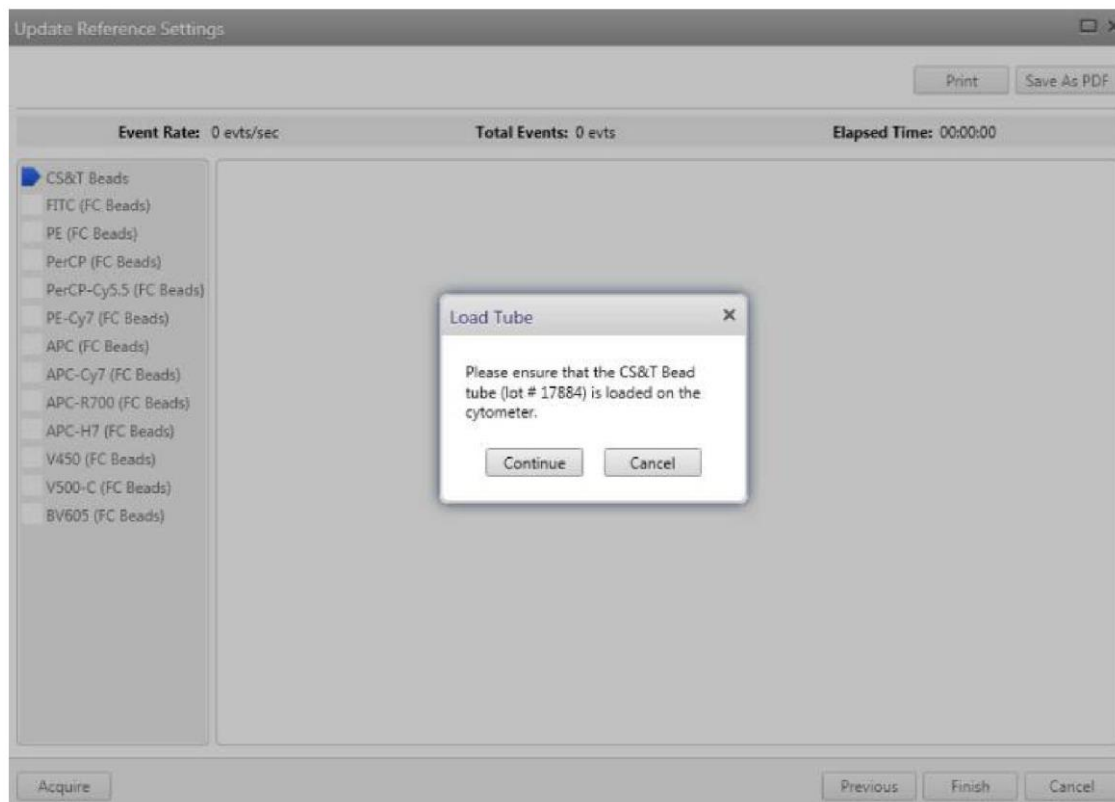
將 CS&T 試管裝填在手動管埠上。

綠色檢查記號將在完成取得後出現在 CS&T 旁邊。

6 繼續按照提示取得每一支試管。

7 （選擇性）點選 **Print** 或 **Save As PDF**，檢視更新摘要。

8 點選 **Finish**。



檢視：設定值

- 1 前往資料庫並檢視 Lyse Wash 設定值。

Library		Tube Settings		
		Name	Created Date	Short Description
Assays		Lyse No Wash	1/25/2017	Lyse No Wash
Beads and Reagents		Lyse Wash	1/25/2017	Lyse Wash
Keywords				
Labels				
Tube Settings				
BD				
User-Defined				

在 Tube Settings 索引標籤內，多少個螢光染料或染料有 TTV？_____

在 Spillover Values 索引標籤內，多少個螢光染料有測得的溢出值？提示：清點欄數。

為何 TTV 多於 SOV？

- 2 BD FC 微球用於：

- a 細胞分析儀 QC。
- b 絕對計數。
- c 更新 LW 和 LNW 設定值。

- 3 應多常更新 LW 和 LNW 設定值？

- 4 由 FSE 在安裝時建立 Lyse Wash 設定值。

T F

- 5 資料庫內儲存了哪些類型的設定值？

- a 參考設定值
- b 試管設定值
- c 以上皆是

6 試管設定值包含 TTV、視窗延伸、面積比例係數，以及：

- a** 電壓、閾值和流速。
- b** 閾值和流速。
- c** 電壓、補償值和閾值。

此頁刻意留白。

第 5 單元

性能 QC

完成這個單元後，您將能夠：

- 說明性能 QC 的功能。
- 執行性能 QC。
- 追蹤細胞分析儀性能。

Run Performance QC (PQC) Daily to...

Measure and track cytometer performance settings.



Running PQC

What you see...

Setup Tasks

Normal Fluidics Mode

- ✓ Cytometer Initialization
- ✓ Laser Delays
- ✓ Beads Identification
- Determine Performance Values
- Laser Alignment Check
- Characterization Values Check
- Determine PMT Voltages

High Sensitivity Fluidics Mode

- Laser Delays
- Determine Performance Values

What the software does...

- Checks laser alignment
- Measures %rCV, linearity, resolution, and laser power
- Compares PMT voltages to values established during characterization QC
- Updates the spillover matrix and PMTVs for the LW and LNW settings



Viewing the PQC Reports

Cytometer Performance QC Report
4-Blue 3-Red 3-Violet

Cytometer:	BD FACStyrac-R	User:	Admin User
Cytometer Name:		Institution:	None
Serial Number:	11134		
Fluidics Mode:	Normal		
Last Characterization QC:	1/26/2017 3:07 PM		
Configuration Name:	4-Blue 3-Red 3-Violet	Last Modified:	2/8/2017 9:03 AM

SUMMARY: PASSED

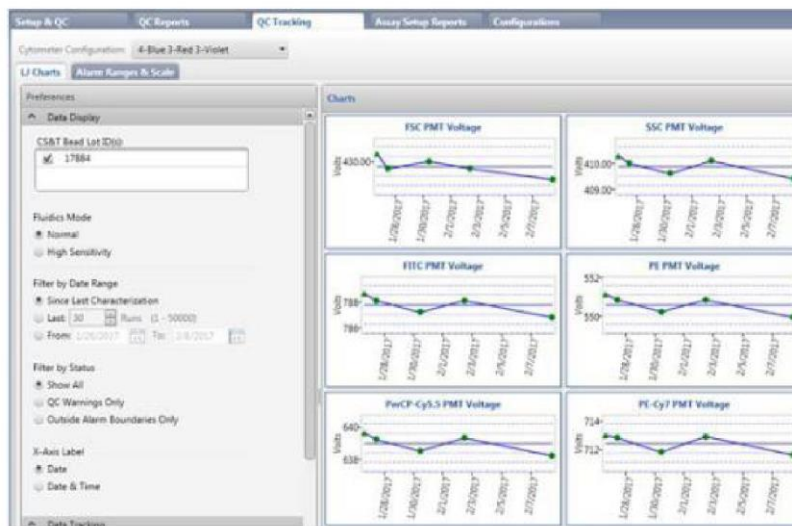
%rCV, linearity, sensitivity

DETECTOR SETTINGS

Laser Info	Detector				PMTV		Bright Bead		Linearity (±2%)		Resolution			
	Name	Mirror	Filter	Position	Actual	Δ	Median	% rCV	Min Channel	Max Channel	Sensitivity		Qr (x10 ³)	Br
LASER: Blue (Wavelength = 488nm)														
X	FSC	-	-	FSC	429.5	-0.7	119.982	1.9	N/A	N/A	300	0	N/A	N/A
X	SSC	10	488/15	E	409.4	-0.9	119.938	3.5	N/A	N/A	300	0	N/A	N/A
X	FTTC	507LP	527/32	D	786.8	-1.8	99.906	2.8	41	230.023	300	0	41.8	83
X	PE	560LP	586/42	C	549.9	-1.2	99.966	2.3	36	230.017	300	0	377.3	244
X	PerCP-Cy5.5	665LP	700/54	B	638.2	-1.4	99.929	3.0	29	229.872	300	0	26.2	116
X	PE-Cy7	752LP	783/56	A	711.6	-1.4	100.058	5.4	40	229.930	300	0	28.3	9
LASER: Red (Wavelength = 640nm)														
X	APC	660/10	660/10	C	603.6	0.4	100.154	2.6	38	229.625	300	0	40.9	186
X	APC-R700	705LP	720/30	B	560.0	0.3	100.072	3.1	5	229.691	300	0	15.3	0
X	APC-Cy7	752LP	783/56	A	543.6	0.1	99.917	4.3	41	230.057	300	0	18.4	0
LASER: Violet (Wavelength = 405nm)														
X	V450	448/45	448/45	E	699.5	-1.5	99.963	3.5	26	229.752	300	0	99.9	1.839
X	V500-C	500LP	528/45	D	463.7	-0.9	100.144	3.1	28	229.820	300	0	58.7	897
X	BV505	606/36	606/36	C	708.6	-1.6	99.981	3.4	51	229.828	300	0	285.9	41



Tracking Performance Settings



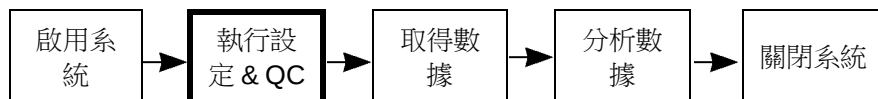
Exercise



1. Prepare the CS&T research beads.
2. Verify the bead lot ID and select the **Performance QC** task.
3. Run performance QC.
4. View the performance QC reports (normal and high-sensitivity fluidic modes).
5. View Levey-Jennings charts in the **QC Tracking** tab.



練習：執行性能 QC

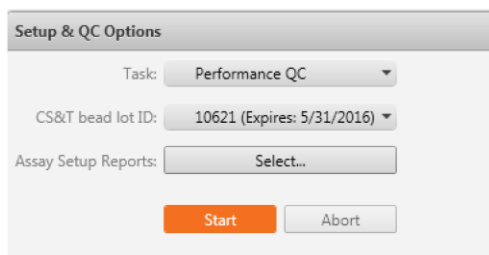


取得數據前，高度建議您執行性能 QC。性能 QC（PQC）是測量細胞分析儀每日運轉效率的自動軟體功能與計算集。

執行性能 QC

- 1 在瀏覽列內，點選 **Setup & QC**。
- 2 確認選擇的工作是 **Performance QC**。
- 3 在 **Setup & QC Options** 模板內，確認微球批次編號與您所使用的微球批次相符。

講師會在課堂上提供您批次編號資訊。



- 4 點選 **Start**。
- 5 渦流處理稀釋過的 CS & T 微球試管。
- 6 裝填試管，開始運轉。

BD FACSuite 軟體會將工作的詳細資料顯示在 **Setup Tasks** 模板內。綠色勾選記號表示已經完成該工作的其中一個步驟。

完成性能 QC 的工作後，完成的對話方塊開啟，內容顯示是否已經順利完成工作或是否有錯。

- 7 將裝有微球的試管卸下並以裝有 DI 水的試管取代。

檢視 QC 結果

每次完成性能 QC 後會做出兩份報告，各代表一個流體模式：正常和高靈敏模式。

- 1 出現提示時，點選 **Yes**，檢視報告。
- 2 檢視報告內的結果，然後處理任何警告或錯誤訊息。
- 3 （選擇性）列印報告。
 - a 點選 **Print** 圖像。
 - b 點選開啟的對話方塊內的 **Print**。



列印圖像

- 4 點選 **QC Tracking** 索引標籤並檢視其下圖形。

有關如何設定您希望顯示在 Levey-Jennings 圖表內的性能數值等詳細資料，請查閱 *BD FACSLyric 參考系統*。

檢視之前運轉的 QC 結果

您可以執行下列動作，檢視之前運轉的性能 QC 報告：

- 1** 需要時，選擇瀏覽列上的 **Setup & QC**。
- 2** 點選 **QC Reports** 索引標籤。
- 3** 在 **Reports Browser** 內，選擇您希望檢視的報告。

祕訣 可使用每一欄整理出報告清單。

性能 QC 規格

下表顯示 PQC 的通過／失敗條件。若未符合任何條件，即會在報告上標示紅旗，該報告摘要也會表明失敗。

偵測裝置	%rCV <	靈敏度 >	最小線性 <	最大線性 >
FSC		30		
SSC		300		
FITC ^a	6	90	500	180,000
PE		250	500	180,000
PerCP-Cy5.5		110	500	180,000
PE-Cy7		140	500	180,000
APC ^b	6	130	500	180,000
APC-R700		50	500	180,000
APC-Cy7		40	500	180,000
V450 ^c	6	55	500	180,000
V500		70	500	180,000
BV605		250	500	180,000

- a、藍雷射光主要偵測裝置
- b、紅雷射光主要偵測裝置
- c、紫雷射光主要偵測裝置

設置與 QC 工作時程

表 5-1 設置與 QC 工作時程

工作	何時執行 (BD 建議)	負責人
特徵化 QC	每 6 個月、需要時或是大型維修後	管理員
性能 QC	每 24 小時	任何操作員
試驗與試管設定值設置	以任何試驗或是試管設定值取得數據前	任何操作員
CS&T 微球批次轉移	目前批次的 CS&T 微球失效以及新批次使用前	任何操作員
雷射設置	雷射對齊檢查在性能 QC 時失效	管理員

檢視：性能 QC

1 應每週執行性能 QC。

T

F

2 執行性能 QC 的目的為何？

3 何種設置和 QC 索引標籤讓您能夠檢視之前執行的 PQC 結果？

- a** 組態
- b** QC 追蹤
- c** QC
- d** 試驗設置報告

第 6 單元

實驗設置

完成這個單元後，您將能夠：

- 新增螢光染料至參考設定值。
- 設置實驗工作區。
- 建立試管設定值。
- 從實驗建立試驗。

Workflow: Experiment Setup

Task	Location
Add any new fluorochromes to the configuration.	Setup & QC workspace
Add reagents and labels to the library.	Library
Add any new fluorochromes or tandems to the LW or LNW settings.	Setup & QC workspace
Set up the experiment workspace.	Experiment workspace
Optimize the settings.	Experiment workspace
Create tube settings.	Experiment workspace
Build an analysis report.	Experiment workspace
Create an assay.	Experiment workspace

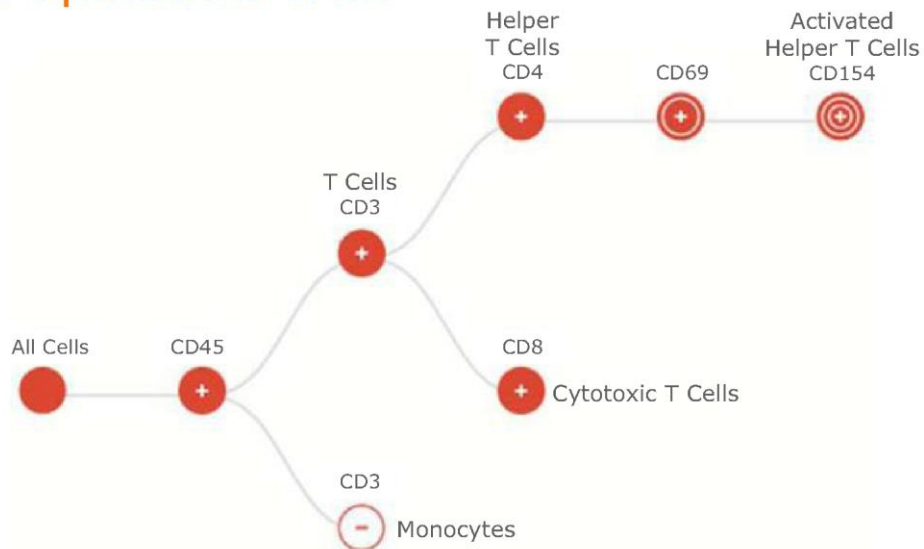


6-Color Stimulation Experiment

- Sample type: human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)
- 2 tubes
 - Unstimulated
 - Stimulated: 6-hour incubation with SEB (staphylococcal enterotoxin B)
- Samples are fixed



Population Tree



6-Color PBMC Samples

- CD3 FITC
- CD69 PE
- CD45 PerCP-Cy5.5
- CD4 PE-Cy7
- CD154 APC
- CD8 APC-H7

Cytometer
4-Blue 3-Red 3-Violet

▼ Status

▲ PMT Voltages

Threshold Operation ☐ And ☒ Or Add Remove

Name	A	H	W	Voltage	Threshold
FSC	✓			223.9	10,000
SSC	✓			411.9	5,000
FITC	✓			643.6	5,000
PE	✓			468.5	5,000
PerCP-Cy5.5	✓			580.9	5,000
PE-Cy7	✓			603.3	5,000
APC	✓			530.9	5,000
APC-H7	✓			553.8	5,000

What makes these special?



Add Fluorochrome

To apply lot-specific compensation, first add the fluorochrome to the library and then to the LW settings.

New Reagent

Reagent Info

Product Name: CD4 PE-Cy7

Single Color: ☒

Fluorochrome: PE-Cy7

Label: CD4

1

Add labels and reagents to the library.

Setup & QC Options

Task: Add Fluorochromes

Reference Settings Name: Lyse Wash

CS&T bead lot ID: 17884 (Expires: 2/28/2020)

Start

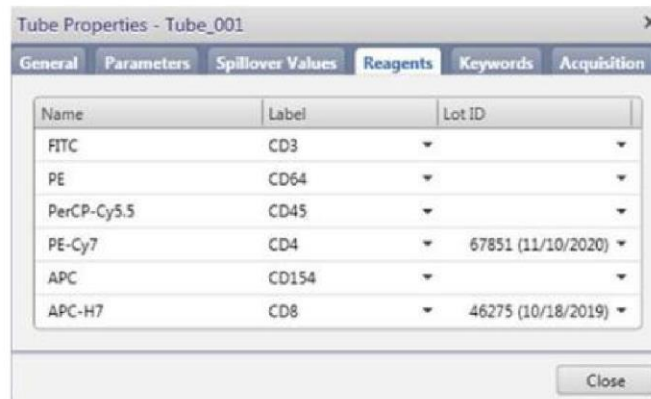
2

Add fluorochromes to the Lyse Wash reference settings.



Tube Properties

Lot-specific compensation part two: in order to ensure that the correct spillover values are used, select a label and a lot ID.



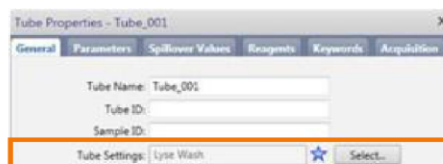
Name	Label	Lot ID
FITC	CD3	
PE	CD64	
PerCP-Cy5.5	CD45	
PE-Cy7	CD4	67851 (11/10/2020)
APC	CD154	
APC-H7	CD8	46275 (10/18/2019)



What next?

Adjust settings in your experiment, as needed.

- Flow rate
- Threshold
- PMTV
- Window extension
- Area scaling factor

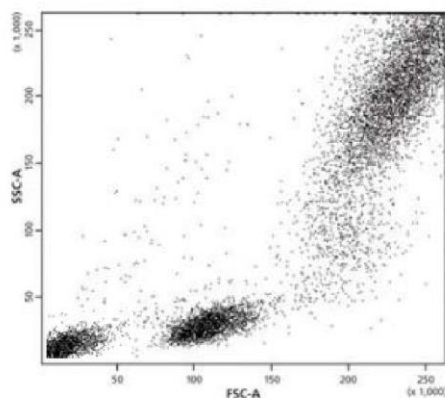


A blue star indicates that settings have been modified.

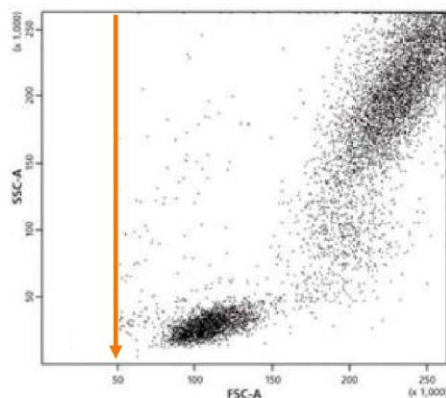


Threshold

Adjust the threshold to eliminate debris from the data.



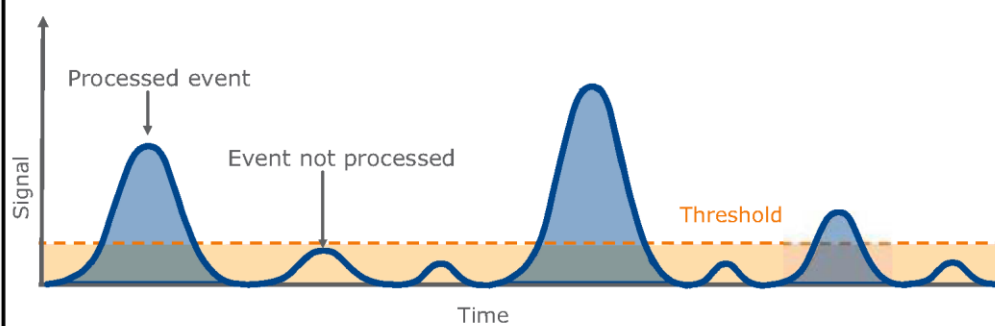
No Threshold



Threshold on FSC 50,000



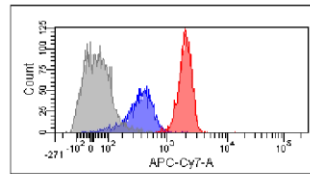
Threshold



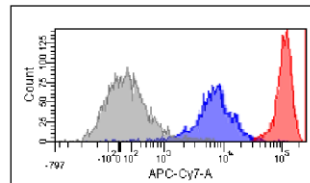
Threshold - - - - -
Processed events ———
Events not processed ·····



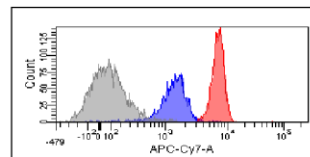
Placing the Populations on Scale



PMTV too low



PMTV too high



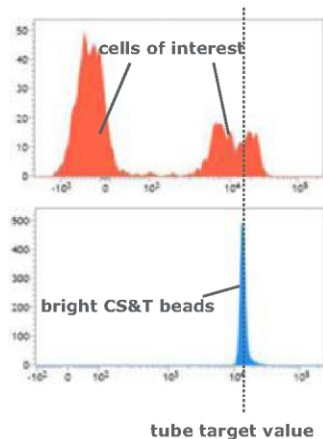
Optimized PMTV



How do you save the changes?

Create Tube Settings

- CS&T beads are run to determine new target values
- Include tube target values (TTVs), thresholds, flow rate, window extension, and area scaling factors
- Can be recalculated daily to ensure comparable results from day to day and from system to system



Where are the settings saved?

Tube settings are categorized in the library as BD or User-Defined. The BD settings are the LW and LNW settings.

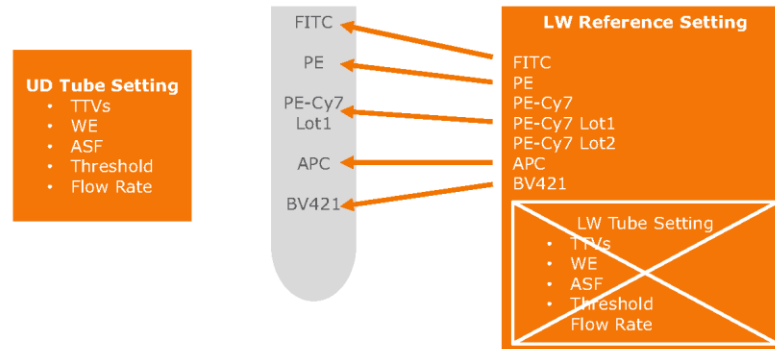
Library	Tube Settings					Delete	
	Name	Created Date	Author	Short Description	Reference Settings		
Assays	5-Color Stimulation	2/2/2017	Admin User			N	
Beads and Reagents	5-Color Stimulation.MI	2/28/2017	Admin User			N	
Keywords	IP Assay_HB	2/21/2017	Admin User			N	
Labels	Lab Practical_HB	2/9/2017	Admin User			N	
Tube Settings							
BD							
User-Defined							

If a tube setting has associated measured spillover values, (Reference Settings), then it is indicated in this column.



Where are the SOVs coming from?

Scenario: Applying a user-defined (UD) tube setting



Exercise



1. Add fluorochromes to the LW settings.
2. Set up the Experiment workspace.
3. Optimize settings.
4. Create tube settings.



練習：新增螢光染料至裂解清洗設定值

如第 4 單元所討論，使用連續染料時批次與標示之間存在溢出差異。因為您執行的 6 色模板含有連續染料，所以您需要針對這些染料新增批次特定的補償。在這項練習中，您必須針對 PE-Cy7 和 APC-H7 新增批次特定的螢光染料至裂解清洗設定值。Add Fluorochrome 的工作可針對試管設定值新增或更新一般或批次特定的 SOV 欄。

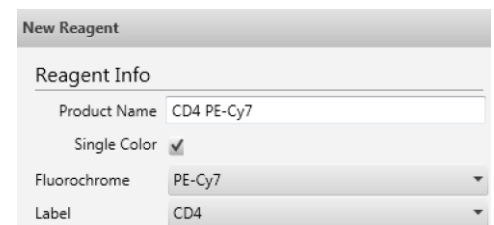
註 將螢光染料新增至參考設定值內只會針對該螢光染料新增溢出值，不會新增專屬的 TTV。相反的，該偵測裝置內預設螢光染料的 TTV 則為副本。舉例而言，如果您新增 BB515 至 LW 設定值，則 FITC 的 TTV 將套用於 BB515，因為兩種螢光染料都是由相同的 PMT 進行偵測。若要取得螢光染料專屬的 TTV，建議遵照下列工作流程。

工作	具備怎樣的功能
新增螢光染料至 LW 設定值。	- 針對新增的螢光染料，新增溢出欄至 LW 設定值。 - TTV 和該偵測裝置的預設螢光染料相同。
視需要針對新的螢光染料調整 PMTV。	將相關細胞放在理想的 MFI。
建立試管設定值。	- 根據 PMTV 的任何變更計算 SOV。 - 針對新的螢光染料計算專屬的 TTV。

新增 Reagent 至 Library

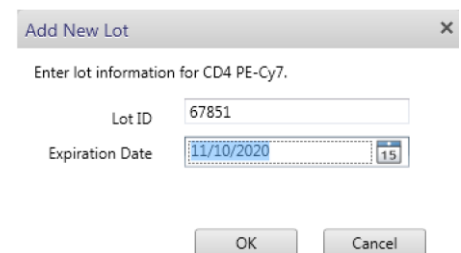
在這項練習中，您必須新增 CD4 PE-Cy7 和 CD8 APC-H7 試劑至資料庫。在您新增螢光染料至裂解清洗設定值前，您必須新增該試劑的批次資訊至資料庫。

- 1 在資料庫內，點選兩次 **Beads and Reagents**，然後選擇 **Reagents**。
- 2 點選 **Add Reagents**。
- 3 將試劑資訊新增至圖示的 **New Reagent** 模板內。
- 4 點選 **Done**。
- 5 點選 **Add Lot**。
- 6 在 **Add New Lot** 對話方塊內，輸入任何 5 位數的批次編號，然後選擇一個未來的有效日期。
- 7 點選 **OK**。
試劑已新增至資料庫。
- 8 重複第 2-7 步，新增 CD8 APC-H7 至資料庫。



The 'New Reagent' dialog box contains the following fields:

- Product Name:** CD4 PE-Cy7
- Single Color:** ☒
- Fluorochrome:** PE-Cy7 (dropdown menu)
- Label:** CD4 (dropdown menu)



The 'Add New Lot' dialog box contains the following fields:

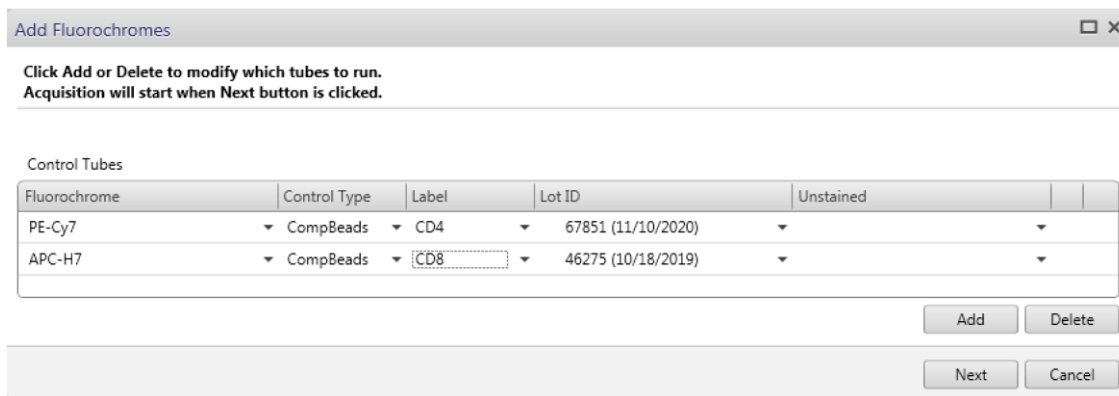
- Lot ID:** 67851
- Expiration Date:** 11/10/2020 (calendar icon)
- Buttons:** OK, Cancel

新增螢光染料至參考設定值。

- 1 請瀏覽至 **Setup & QC** 工作區。
- 2 在 **Setup & QC** 選項模板內的 **Task** 功能表上，選擇 **Add Fluorochromes**。
- 3 選擇 **Lyse Wash** 參考設定值以及目前的 **CS&T** 微球批次編號。
- 4 點選 **Start**。
- 5 在 **Add Fluorochromes** 對話方塊內，點選 **Add**。
- 6 進行下列挑選。

- 螢光染料：PE-Cy7
- 控制類型*：CompBeads
- 標示：CD4

批次編號會在您挑選標籤時自動補上。確認該批次編號是否正確。



Add Fluorochromes

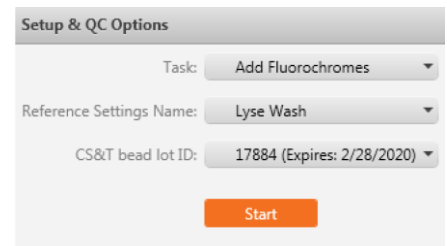
Click Add or Delete to modify which tubes to run.
Acquisition will start when Next button is clicked.

Fluorochrome	Control Type	Label	Lot ID	Unstained
PE-Cy7	CompBeads	CD4	67851 (11/10/2020)	
APC-H7	CompBeads	CD8	46275 (10/18/2019)	

Add Delete

Next Cancel

- 7 針對 CD8 APC-H7 重複步驟 5-6。
- 8 點選 **Next**。



Setup & QC Options

Task: Add Fluorochromes

Reference Settings Name: Lyse Wash

CS&T bead lot ID: 17884 (Expires: 2/28/2020)

Start

9 將 CS&T 微球試管裝填在手動管埠上。

10 出現提示時，裝填剩餘的試管。

11 點選 **Finish**。

針對 CD4 PE-C7 和 CD8 APC-H7 測得的溢出值新增至參考設定值中。

12 （選擇性）檢視資料庫內的 **Spillover Values** 索引標籤。

Lyse Wash Print

Tube Settings **Spillover Values**

Updated Date: 3/27/2017 3:25 PM Expiration Date: 3/31/2017 11:21 AM Remove Fluorochrome

Measurement: ☒ Area ☐ Height

Fluorochrome	PMTV	Spillover Values													
		FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PerCP	PE-Cy7		APC	APC-R700	APC-Cy7	APC-H7		V450	V500-C	BV605
		Generic	Generic	Generic	Generic	Generic	CD4 ▾ 67851 ▾	Generic	Generic	Generic	Generic	CD8 ▾ 46275 ▾	Generic	Generic	Generic
FITC	642.8	100.00	1.13	0.03	0.04	0.17	0.17	0.01	0.02	0.04	0.06	0.06	0.02	5.12	0.00
PE	467.9	15.31	100.00	0.03	0.08	1.47	1.34	0.01	0.01	0.02	0.03	0.03	0.01	1.00	1.87
PerCP-Cy5.5	580.3	3.13	23.22	100.00	100.00	1.13	1.21	1.45	4.95	0.11	0.09	0.09	0.02	0.45	3.94
PE-Cy7	602.7	0.28	1.77	16.79	6.35	100.00	100.00	0.21	1.51	1.56	1.44	1.33	0.01	0.06	0.56
APC	550.7	0.00	0.01	1.23	2.21	0.03	0.03	100.00	5.56	6.59	1.31	2.06	0.00	0.01	0.11
APC-R700	494.7	0.00	0.00	5.88	1.53	0.09	0.09	18.00	100.00	2.63	0.63	0.80	0.00	0.00	0.02
APC-Cy7	553.6	0.00	0.00	5.24	1.35	7.48	9.11	13.81	66.93	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00	0.02
V450	536.5	0.17	0.03	0.08	0.08	0.03	0.03	0.03	0.01	0.13	0.19	0.19	100.00	6.31	15.87
V500-C	409.6	3.96	0.47	0.10	0.14	0.05	0.05	0.03	0.00	0.12	0.17	0.17	17.18	100.00	1.26
BV605	519.9	0.66	11.08	0.05	0.13	0.14	0.14	0.07	0.01	0.04	0.06	0.06	0.80	15.63	100.00

練習：實驗設置

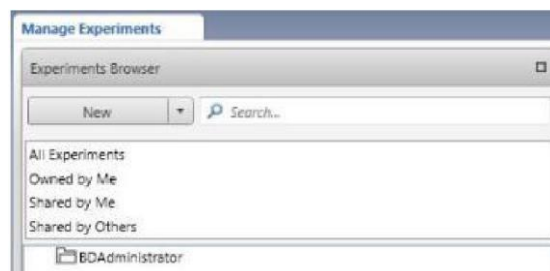
設置新的實驗需要您：

- 制訂參數以及將使用於各試管的試劑。
- 挑選設定值並將之最佳化。
- 建立圖表並定義取得條件。

設置實驗工作區

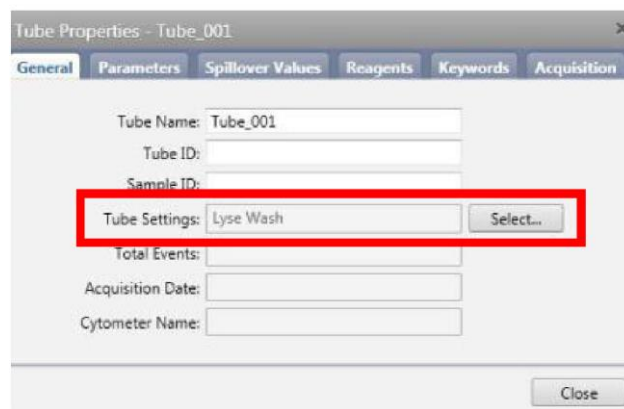
建立新的實驗

- 1 需要時，瀏覽至 Experiments 工作區內的 **Manage Experiments** 索引標籤。
- 2 在 **Experiments Browser** 模板內，點選 **New**。
- 3 選擇 **File > Rename**。
- 4 打入 6-色刺激 <您的姓名縮寫> 將實驗重新命名。
- 5 點選 **OK**。



修正試管屬性

- 1 點選兩次 **Tube_001**，開啟 **Tube Properties** 對話方塊。
- 2 確認針對 **Tube Settings** 欄位選取 Lyse Wash。需要時，點選 **Select**，變更試管設定值。



3 在 **Parameters** 索引標籤內，更新參數清單。

- a 點選 **APC-Cy7** 旁邊的箭頭，然後選擇清單上的 **APC-H7**。
- b 選擇未使用的螢光染料，然後點選 **Remove** 將之移除。

祕訣 點選 **Threshold** 欄右側的空白處，選擇一個參數。

4 在 **Reagents** 索引標籤內，輸入下列抗體標示。

名稱	標示
FITC	CD3
PE	CD69
PerCP-Cy5.5	CD45
PE-Cy7	CD4
APC	CD154
APC-H7	CD8

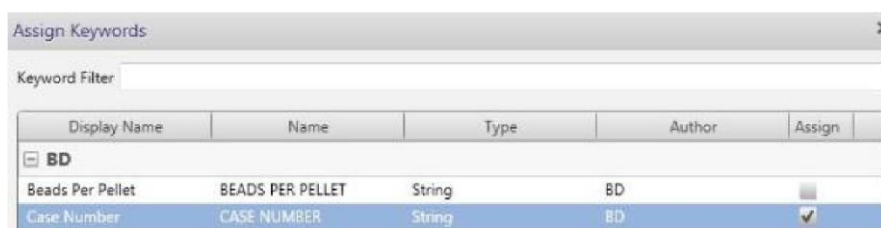
註 任何沒有出現在 **Label** 功能表內的標示均可手動輸入。

5 選擇您之前針對 **CD4 PE-Cy7** 和 **CD8 APC-H7** 輸入的批次編號，

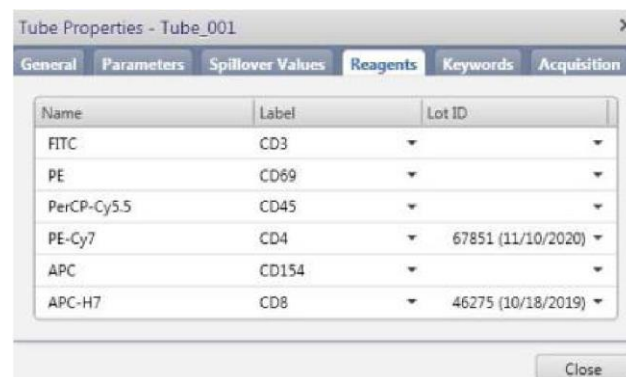
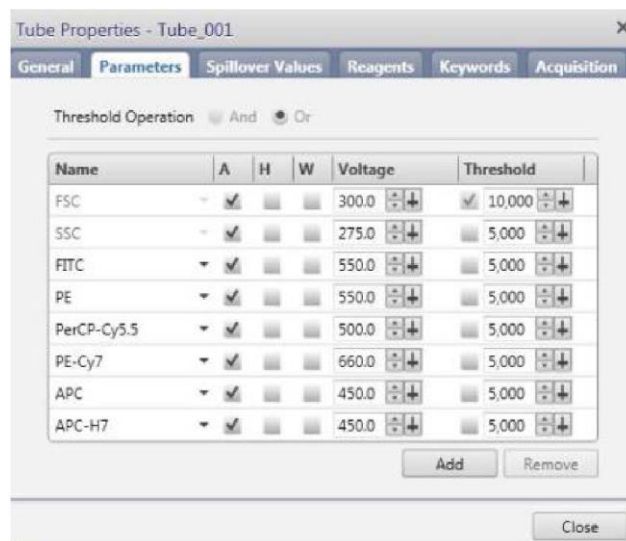
這可確保該試劑使用正確的溢出值。如果沒有分配批次編號，則使用各參數的一般值。

6 在 **Keywords** 索引標籤內，點選 **Assign Keywords**。

7 分配 **Case Number** 關鍵字，然後點選 **OK**。



8 關閉 **Tube Properties** 對話方塊。

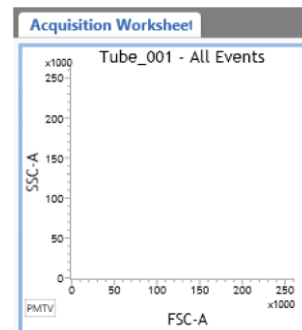


建立取得圖表

每個新的實驗都包含一個預設的 FSC 對比 SSC 之點陣圖。您必須建立其他圖表，以便在取得前預覽數據。

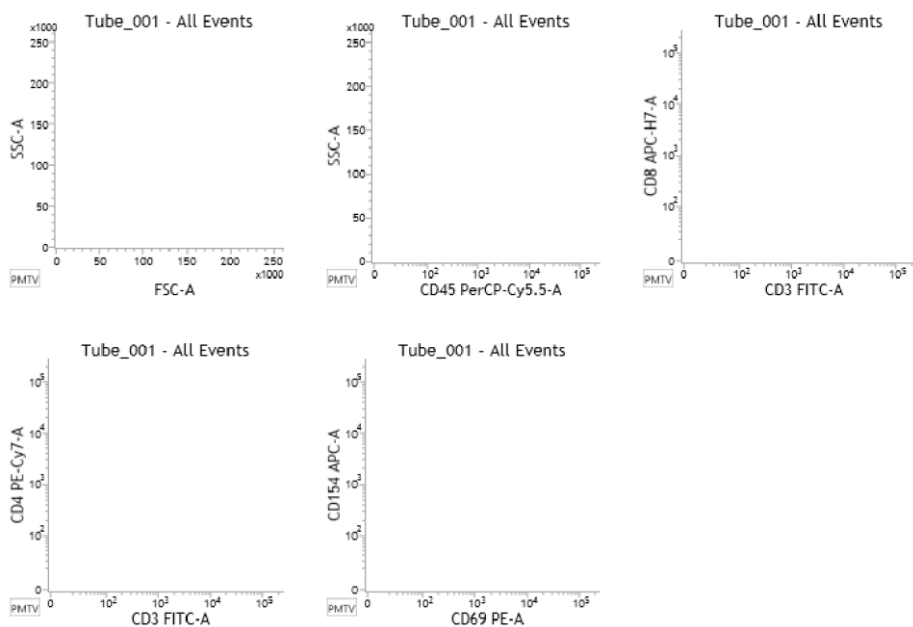
- 1 點選 **Worksheet_001** 索引標籤並打出 **Acquisition Worksheet**，將工作表重新命名。
- 2 在 **Worksheet** 工具列上，點選 **Create dot plot** 按鈕 ()。
- 3 在工作表內點選，建立第二個點陣圖。
- 4 針對圖表的 X 軸點選右鍵，然後挑選參數清單上的 **PerCP-Cy5.5-A**，建立一個 CD45 PerCP-Cy5.5 對比 SSC 的圖表。
- 5 重複第 2 至 4 步，建立下列三個點陣圖。
 - CD3 FITC 對比 CD8 APC-H7
 - CD3 FITC 對比 CD4 PE-Cy7
 - CD69 PE 對比 CD154 APC
- 6 選擇 FSC 對比 SSC 的圖表。
- 7 選擇 **Edit > Select All**。
- 8 在 **Worksheet** 工具列上，點選 **Make Same Size** 按鈕 ()。

這個工具將所有選定的圖表做成和原本選擇的圖表相同大小。原本選擇的圖表以黃色柄狀物表示。以這個個案而言，FSC 對比 SSC 的圖表是原本的圖表。



9 請視需要安排或對齊圖表。

祕訣 Ctrl+click 選擇多個圖表，然後使用 Worksheet 工具列()上的對齊工具。

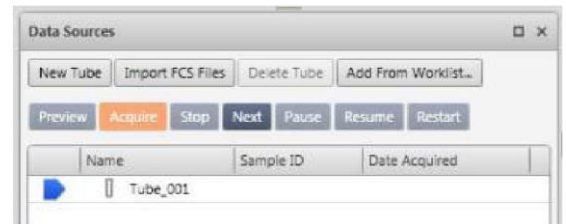


將設定值最佳化

在這項實驗中，您是使用 Lyse Wash 設定值作為您設定值的起始點。根據該點，您必須將這些設定值就您的試驗進行客製化。

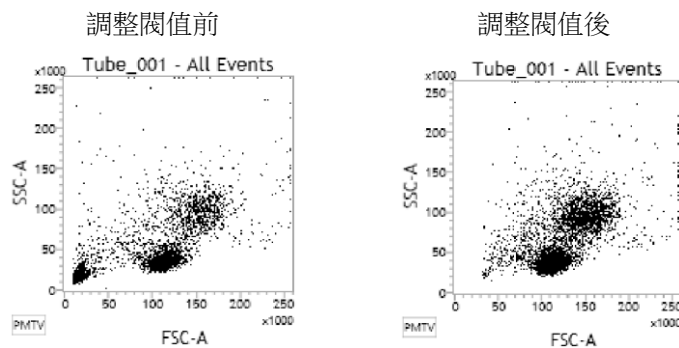
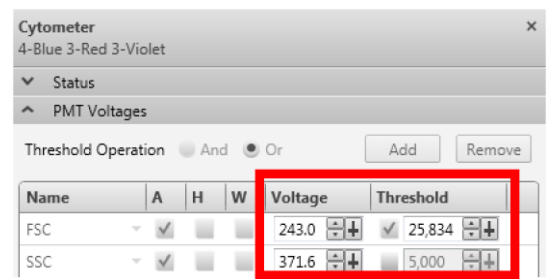
預覽數據

- 1 將未刺激過的樣本試管裝填在手動裝填埠上。
試管安裝正確時，綠色 LED 會熄滅。
- 2 在 **Data Sources** 模板內，確認該運轉指針設定在 Tube_001。
- 3 在 **Data Sources** 模板內，點選 **Preview**。
細胞分析儀會開始處理您的樣本，然後數據會出現在圖表內。



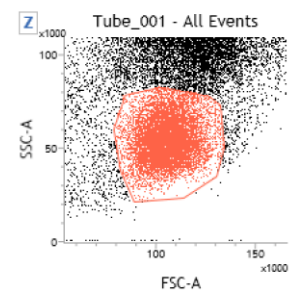
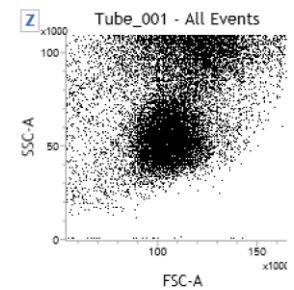
將前向散射、側散射和閾值最佳化

- 1 在 Cytometer 模板內，調整 FSC 和 SSC 電壓，將總數放在量表上。
- 2 點選上下箭頭，進行一伏特的調整或是將 Ctrl 鍵往下按住，然後點選箭頭，進行十伏特的調整。
- 3 需要時，調整 **PMT Voltages** 模板內的 FSC 閾值排除碎片。



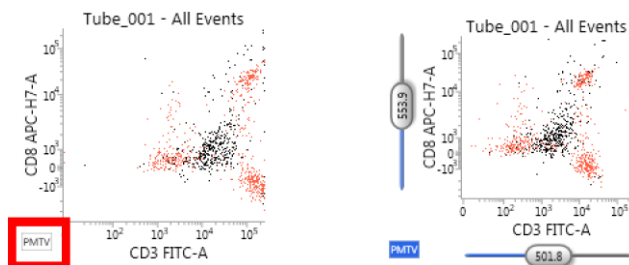
建立相關總數閘門

- 1 放大相關總數。
 - a 在 FSC 對比 SSC 的圖表上點選右鍵，然後選擇 **Zoom In Scale**。
在您的圖表上徘徊時，會出現交叉絲。
 - b 點選圖表上某個區域並拖曳放大。
- 2 在 **Worksheet** 工具列上，點選 **Create dot plot** 按鈕 ()。
- 3 點選 FSC-A 對比 SSC-A 圖表內的總數周圍，建立一個多邊形閘門。
- 4 點選兩次，完成該閘門。
祕訣 畫出該閘門後，您可以在閘門上點選兩次，修飾其頂點。
- 5 在圖表上點選右鍵，然後選擇 **Zoom Reset**。



將螢光染料參數的 PMT 電壓最佳化

- 1 確認各參數的所有總數均在剩餘圖表的量表上。
- 2 如有需要，請調整 PMT 電壓。
註 在您調整 PMT 電壓時會自動重新計算補償值。
 - a 拖曳滑塊調整圖表上各參數的電壓，以便將總數放在量表上。
滑塊上顯示的數值是指偵測裝置的電壓。
 - b 點選圖表上的 **PMTV** 按鈕，隱藏滑塊。



- 3 在 **Data Sources** 模板內點選 **Stop**，以停止樣本流量。
- 4 將未刺激過的樣本試管從手動裝填埠上取下。
- 5 SIT 沖洗完成後，裝填刺激過的樣本試管，然後點選 **Preview**。
- 6 確認各參數的所有總數均合規，並視需要調整 PMT 電壓。
CD154 APC 和 CD69 PE 為活化記號，因此在刺激過的試管上應比未刺激過的試管明亮。確認活化的總數合規。
- 7 點選 **Stop**，然後將試管從裝填埠取下。

建立試管設定值

如果您日後想要再次使用這些設定值或在試驗中使用，您必須建立試管設定值。建立後，可更新試管設定值，以確保結果一致。

註 無法從裝有數據的試管中建立試管設定值。有關如何在您取得數據後建立試管設定值的資訊，請參考 *BD FACSLyric 參考系統*。

- 1 請確認流速設定成 **Medium**。

流速是以試管設定值進行儲存，因此儲存設定值前確認其正確性很重要。

- 2 在 **Data Sources** 模板內針對 **Tube_001** 點選右鍵，然後選擇 **Create Tube Settings**。

- 3 確認選擇適當的 CS&T 批次編號。

- 4 將 CS&T 微球裝填在手動裝填埠上，然後點選 **Acquire**。

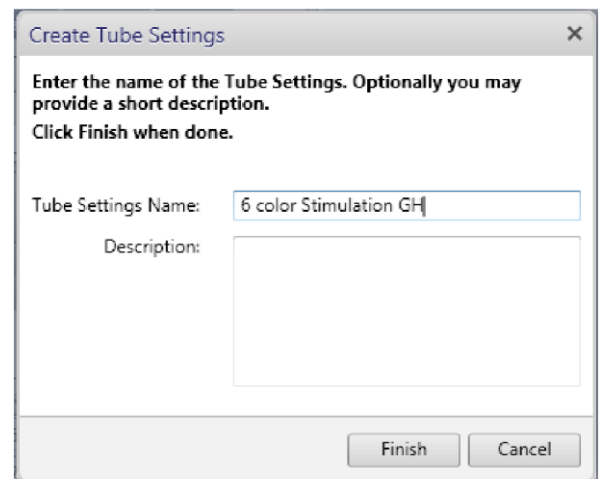
取得完成後，會出現提示，請您針對試管設定值進行命名。

- 5 在 **Tube Settings Name** 欄位內，打入 **6 色刺激_您的姓名縮寫**。

- 6 點選 **Finish**。

新的試管設定值會儲存在資料庫內。

- 7 移除 CS&T 微球試管，然後裝填 DI 水試管。



Create Tube Settings

Enter the name of the Tube Settings. Optionally you may provide a short description.
Click Finish when done.

Tube Settings Name: 6 color Stimulation GH

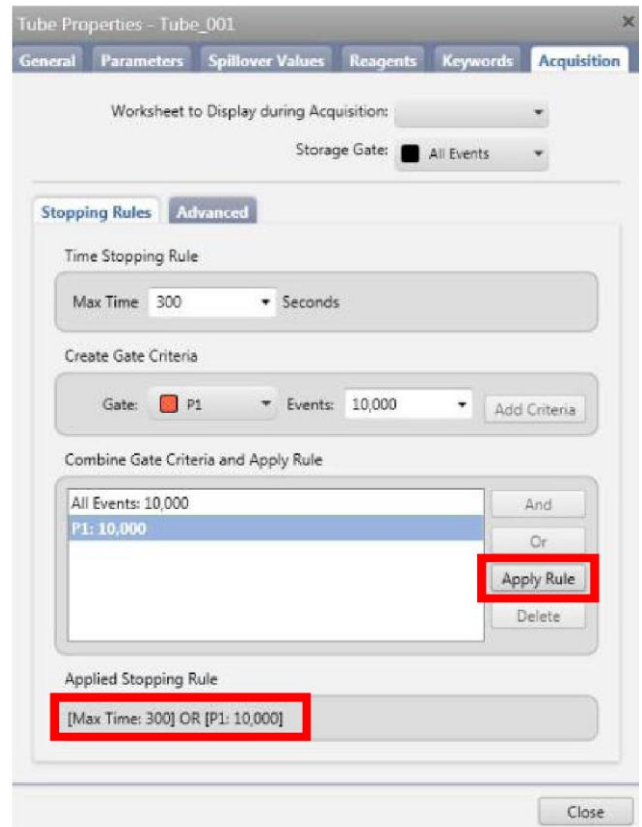
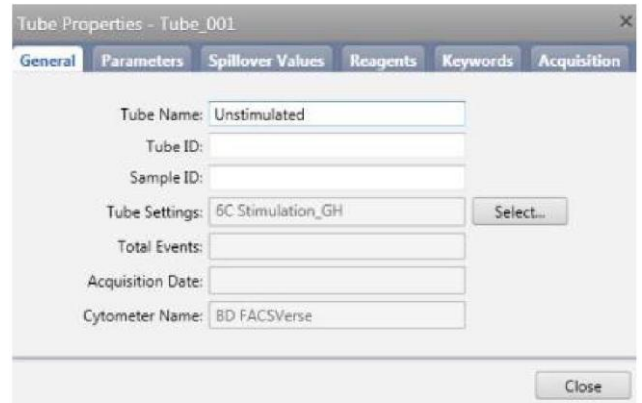
Description:

Finish Cancel

取得數據

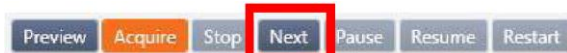
設定值取得數據

- 1 點選兩次 **Tube_001**，開啟 **Tube Properties** 對話方塊。
- 2 在 **Tube Name** 欄位內打入 *Unstimulated*，於 **General** 索引標籤內替試管重新命名。
- 3 在 **Acquisition** 索引標籤內，新增停止規則。
 - a 針對 **Max Time**，輸入 **300**。
 - b 在 **Create Gate Criteria** 下方，從 **Gate** 功能表選擇 **P1**。
 - c 點選 **Add Criteria**。新增規則至閘門條件清單內。
 - d 選擇 **P1:10,000**，然後點選 **Apply Rule**。
 - e 確認視窗最下方的 **Applied Stopping Rule** 顯示 **[Max Time:300]** 或 **[P1:10,000]**。
- 4 關閉 **Tube Properties** 對話方塊。



建立其他試管

- 1 在 **Data Sources** 模板內，點選 **Next**。



建立了一個屬於第一支試管副本的新試管，包含所有修飾後的試管屬性。

- 1 點選第二支試管，然後打出 *Stimulated*，將試管重新命名。

取得數據

- 1 確認運轉指針設定在 **Unstimulated** 試管。
- 2 將未刺激過的樣本試管裝填在手動裝填埠上。
- 3 在 **Data Sources** 模板內，點選 **Preview**。
- 4 看到圖表內出現數據時，在 **Data Sources** 模板內點選 **Acquire**。

監測 **Acquisition Status** 模板內的取得進度。

取得過程會持續，直到符合停止規則為止。完成取得後，試管圖像變成黑色（**Unstimulated**），即表示已經取得一個數據檔案。

5 將未刺激過的樣本試管從裝填埠上取下。

系統執行 SIT 沖洗。

6 SIT 沖洗完成後，裝填刺激過的樣本試管。

裝填埠的 LED 燈會在 SIT 沖洗進行過程中閃琥珀色，然後在準備好裝填下一支試管時變成綠色。

7 在 **Data Sources** 模板內點選 **Next**，以便將指針移至 **Stimulated** 試管。

8 點選 **Preview**，然後點選 **Acquire**。

9 在**取得**完成後，取下試管，然後裝填 DI 水試管。

Experiment Setup

Part 2

1. Build a report.
2. Create an assay.



Building a Report

- Create and format plots.
- Adjust gate properties.
- Analyze data from multiple tubes.
- Add statistics to the report.



Worksheets and Reports



Worksheets

- Contain plots, gates and statistics
- Can include headers and footers



Reports

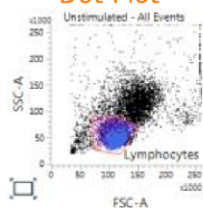
- Contain plots, gates and statistics
- Can include headers and footers
- Can be automatically exported
- Are associated with assays
- Can display an E-Signature



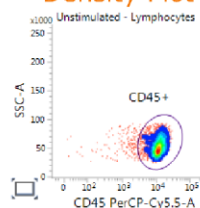
Plots and Gates



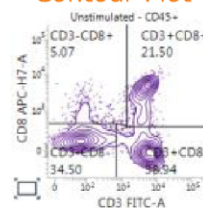
Dot Plot



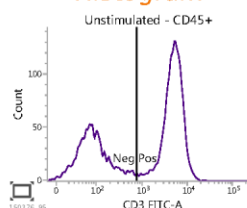
Density Plot



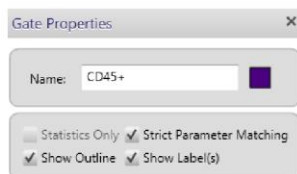
Contour Plot



Histogram



Gate Properties

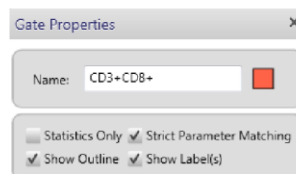
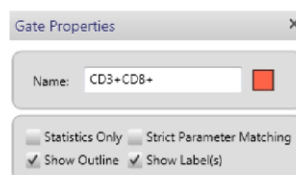
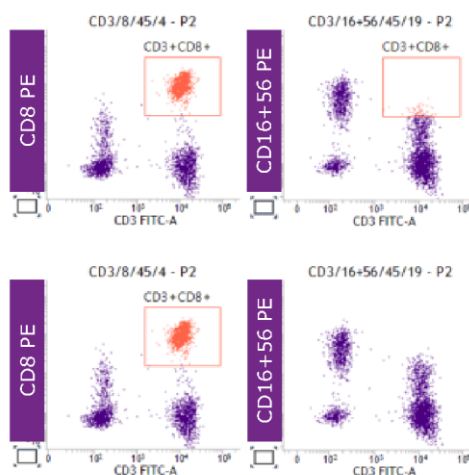


- Modify the name and color of a gate
- Display outlines, statistics or labels



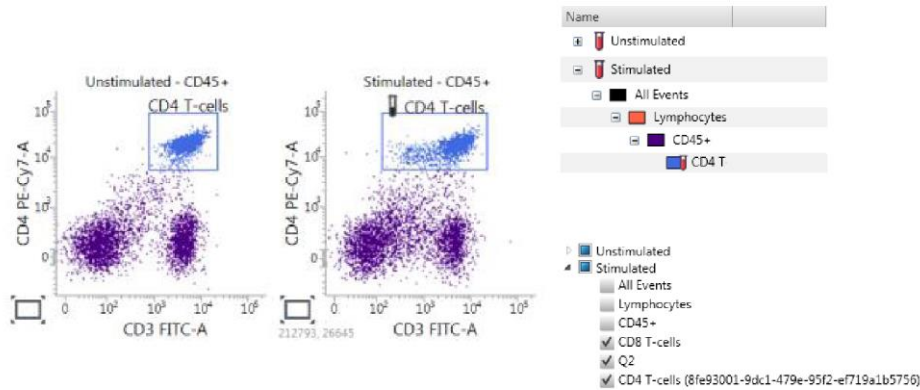
Strict Parameter Matching

When strict parameter matching is selected, the long parameter names must match in order for the gate to be displayed.



Unique Gates

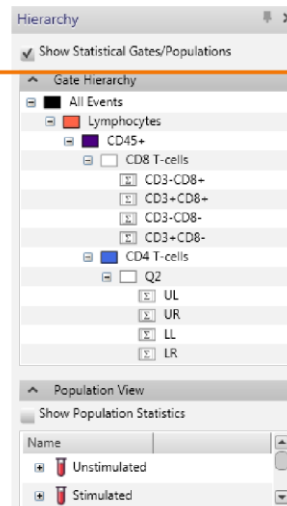
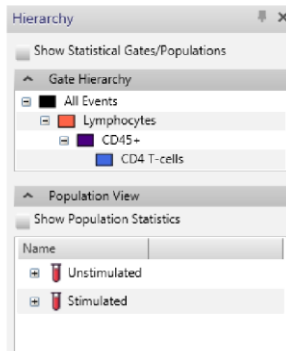
The unique gate feature allows gates to be tube specific. This allows changes to be made to a gate on one tube, but not affect the same gate on another tube.



Gate Hierarchy

The hierarchy shows the name, color and relationships with other gates.

Quadrants are considered statistical gates. They can be displayed by selecting the checkbox.

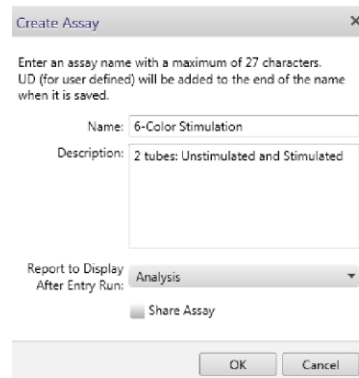


Statistics

- Statistics can be displayed for multiple tubes or can dynamically change based on the run pointer.
- Expressions and keywords can be added to statistics views.
- Among other attributes, the statistics properties can allow for the automatic export of statistics.



Create an Assay



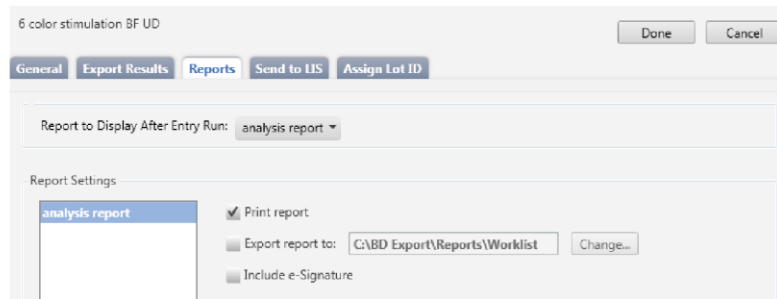
Assays

- Contain a set number of tubes that share the same tube settings, worksheets, and reports.
- Are run by worklists using the Loader.
- Have elements that can be exported automatically.



Edit Assay Properties

Assay properties control which results are sent to the laboratory information system (LIS), which reports are printed or exported, E-Signature properties, and automatic approval options, among other options.



Exercise



1. Build a report.
2. Create an assay.



練習：分析

在這項練習中，您必須製作一份可以在試驗中重複使用的報告。

製作報告

工作表和報告可包含相同資訊。但是取得工作清單內的數據時，報告的功能會比較多。報告額外具備的功能可當作試驗屬性使用（請參考第 115 頁的「編輯試驗屬性」）。可自動匯出報告且報告可包含電子簽章。

新增報告

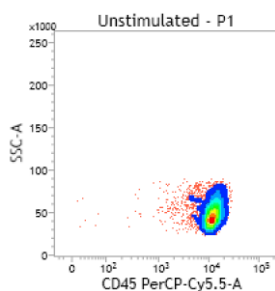
- 1 在 **Worksheet** 工具列上，點選 **Add Report** 按鈕（）。
- 2 點選 **Report_001** 索引標籤，並重新命名為 **分析報告**。
- 3 點選 **Acquisition Worksheet** 索引標籤，然後選擇所有圖表。
 - 按下 **Ctrl+A** 即可選擇所有圖表。
 - 或是拖曳方塊框住所有圖表，即可選擇所有圖表。
- 4 點選右鍵，然後選擇 **Copy**。
- 5 點選 **Analysis Report** 索引標籤，將報告帶至前側。
- 6 點選右鍵，然後選擇 **Paste**。
- 7 視需要調整報告上的圖表位置。



將圖表格式化

- 1 針對 **Unstimulated** 試管點選運轉指針。
- 2 在 **CD45 PerCP-Cy5.5** 對比 **SSC** 圖表上點選右鍵，然後選擇 **Properties**。
- 3 從 **Plot Type** 功能表上選擇 **DensityPlot2D**。
- 4 在 **Parent Population** 下方，選擇 **P1** 核取方塊。關閉 **Plot Editor**。

您的圖表應看起來類似下圖。

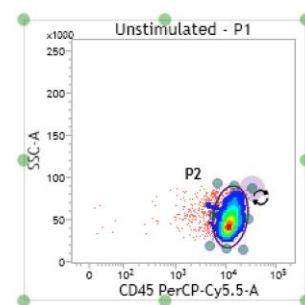


5 在 CD45+ 總數周圍建立一個橢圓形閘門。

a 在 **Worksheet** 工具列上，點選 **Ellipse Gate** 按鈕 ()。

b 在 CD45 PerCP-Cy5.5 對比 SSC-A 圖表上拖曳，以便在 CD45+ 總數周圍建立一個閘門。

c 若要旋轉橢圓形閘門，將游標在閘門的角落上方盤旋，直到出現雙箭頭為止。點選並旋轉閘門。



6 將 CD3 FITC 對比 CD8 APC-H7 圖表格式化，以便僅檢視 P2 事件。

a 在 CD3 FITC 對比 CD8 APC-H7 圖表上點選右鍵，然後選擇 **Properties**。

b 在 **Parent Population** 旁邊，選擇 **P2** 核取方塊。

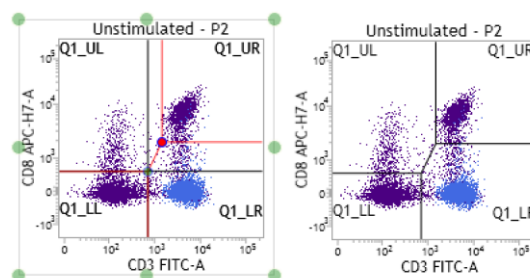
c 關閉 **Plot Editor** 對話方塊。

7 在 CD3 FITC 對比 CD8 APC-H7 圖表上建立一個交錯的象限閘門。

a 在 **Worksheet** 工具列上，點選 **Staggered Quad Gate** 按鈕 ()。

b 點選 CD3 FITC 對比 CD8 APC-H7 圖表，建立象限閘門。

c 若要讓象限閘門交錯，請拖曳其中心。

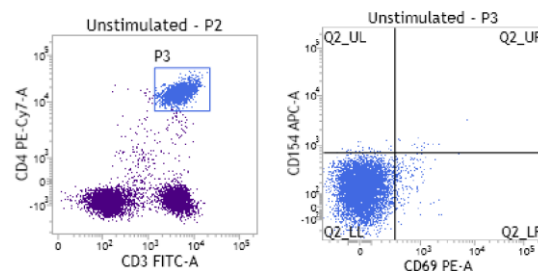


8 將 CD3 FITC 對比 CD4 PE-Cy7 圖表格式化，以便僅檢視 P2 事件。

9 在 CD3/CD4 雙重陽性總數周圍建立一個長方形閘門。

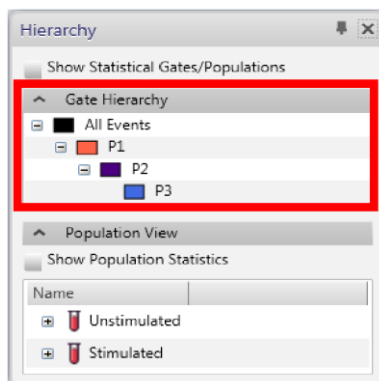
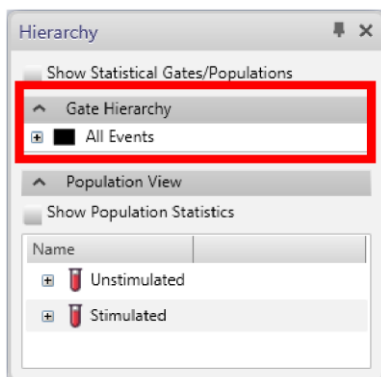
10 將 CD69 PE 對比 CD154 APC 圖表格式化，以便僅檢視 P3 事件。

11 在 CD69 PE 對比 CD154 APC 圖表上建立一個象限閘門。

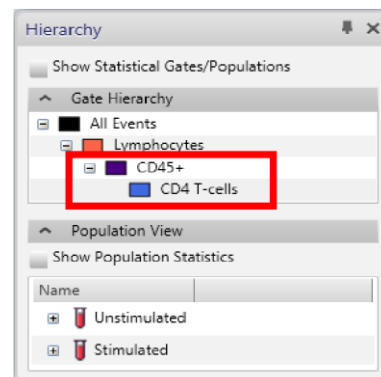
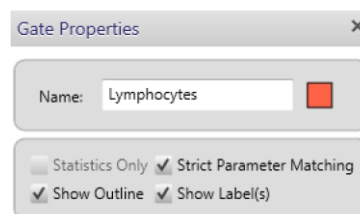


重新命名閘門

- 1 在 **Worksheet** 工具列上，點選 **Display Hierarchy** 按鈕 ()。
- 2 點選 **Gate Hierarchy** 下方各閘門旁邊的加 (+) 號，檢視所有閘門。



- 3 在 Hierarchy 內，於 **P1** 閘門點選右鍵，然後選擇 **Properties**。
- 4 在 **Name** 欄位內輸入 *Lymphocytes*，將閘門重新命名。
- 5 選擇 **Strict Parameter Matching**。
- 6 關閉 **Properties** 對話方塊。
- 7 按照所示重新命名 P2 和 P3 閘門，然後選擇兩者的 **Strict Parameter Matching**。
- 8 新增等級至報告 (請參考第 110 頁上的圖 6-1)。
 - a 將 **Hierarchy** 視窗移至報告上的空白處。
 - b 點選右上角的圖釘圖像，新增等級至報告。
 - c 視需要重新調整等級大小，以便能夠放在報告上。



變更象限標示

- 1 選擇 CD3 FITC 對比 CD8 APC-H7 圖表內的象限，然後點選右鍵並選擇 **Properties**。
- 2 按照下圖所述輸入屬性。
- 3 關閉 **Properties** 對話方塊。

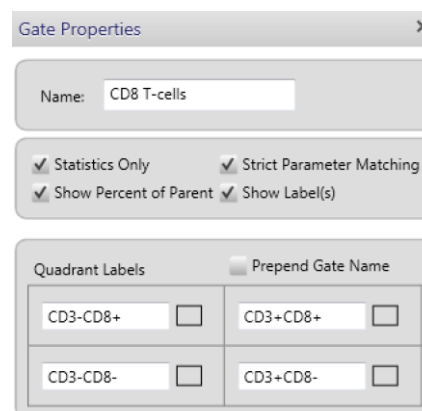
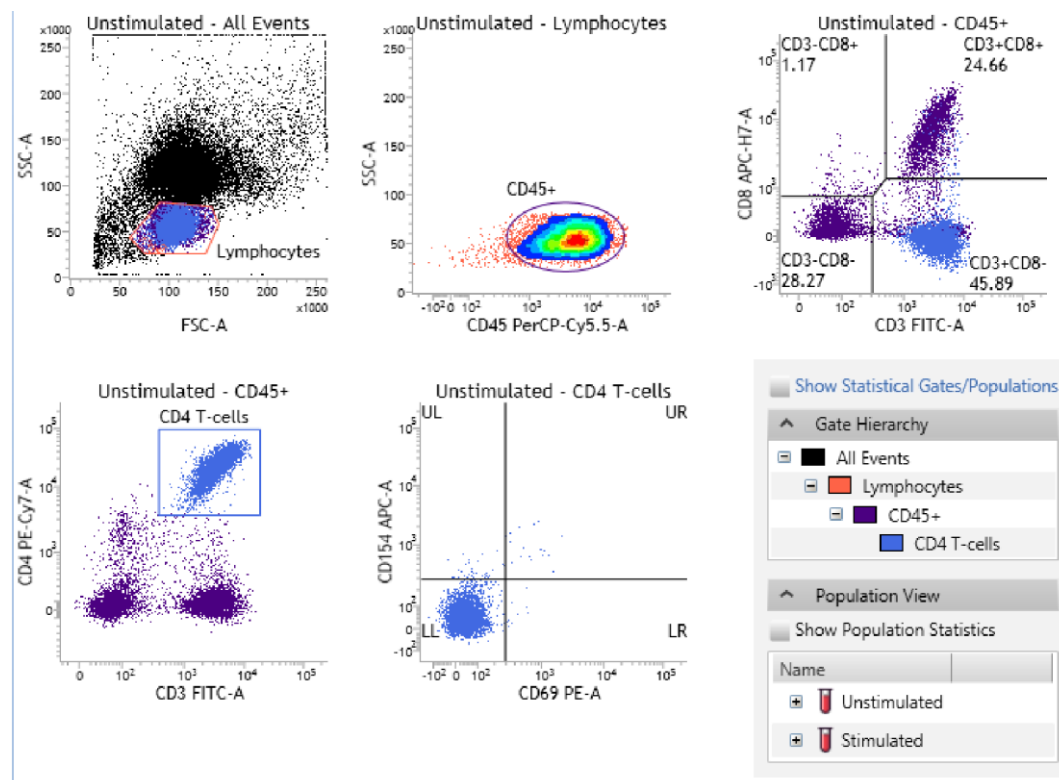


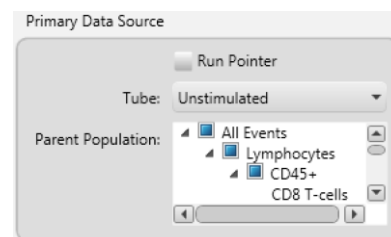
圖 6-1 含閘門等級的報告範例



分析來自多支試管的數據

在這項練習中，您必須將來自兩支不同試管的數據顯示在相同的報告內，以利並排比較。

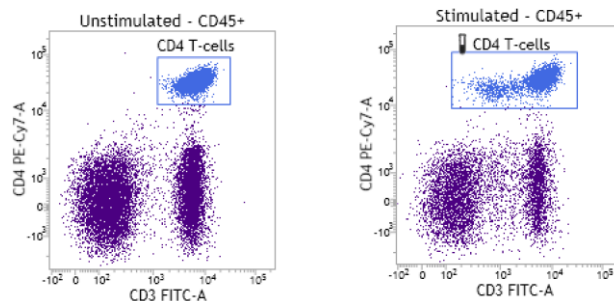
- 1 Ctrl+click 以選擇所有圖表。
- 2 點選右鍵，然後選擇 **Properties**。
- 3 在 **Primary Data Source** 下方，清除 **Run Pointer** 核取方塊，然後從 **Tube** 功能表選擇 *Unstimulated*。
圖表現在會顯示未刺激過的試管，不管試管指針在哪裡。
- 4 關閉 **Plot Editor**。
- 5 Ctrl+點選即可同時選擇 FITC 對比 PE-Cy7 以及 PE 對比 APC 圖表。
- 6 點選右鍵，然後選擇 **Duplicate**。
- 7 將新的圖表移至原本圖表下方淨空區域。
- 8 在 CD3 FITC 對比 CD4 PE-Cy7 圖表上點選右鍵，然後選擇 **Properties**。
- 9 從 **Tube** 功能表上，選擇 **Stimulated**。
- 10 針對 PE 對比 APC 圖表重複步驟 8 和 9。



採用獨特的閘門

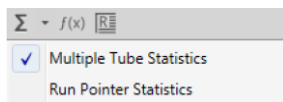
CD4 T 細胞總數會在 T 細胞接受刺激後變動。原本的閘門不再能夠圍住整個總數。因為兩支試管使用相同的閘門，所以您針對刺激過的試管所做的調整也會影響來自未刺激過的試管數據。可採用獨特的閘門功能調整個別試管的閘門。

- 1 比較未刺激過和刺激過試管之間的 CD4 T 細胞總數的數據。
總數會在 T 細胞活化後變動。
- 2 針對刺激過的試管之 CD4 T 細胞閘門點選右鍵，然後選擇 **Make Unique**。
- 3 調整刺激過的試管閘門，將整個 CD4 T 細胞總數納入。未刺激過的試管閘門應維持在原本位置。

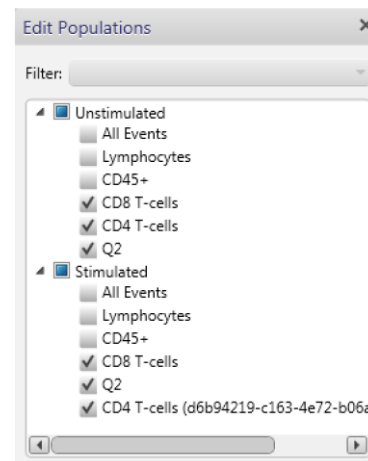


新增統計數字至報告

- 1 點選 **Statistics** 按鈕旁的箭頭，在 **Worksheet** 工具列上並確認已經選擇 **Multiple Tube Statistics**。



- 2 點選報告，新增統計方框。
- 3 針對 **Statistics** 方框點選右鍵並選擇 **Edit Populations**。
- 4 針對兩個數據檔均選擇 **CD8 T-cells**、**Q2** 和 **CD4 T-cells**。
- 5 關閉 **Edit Populations** 視窗。
- 6 針對統計方框點選右鍵並選擇 **Edit Statistics**。
- 7 清除所有核取方塊，最下方的 **Population Statistics** 除外。



- 8 關閉 **Edit Statistics** 視窗。

9 針對統計方框點選右鍵並選擇 **Properties**。

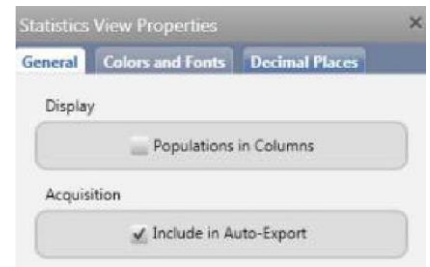
10 選擇 **Include in Auto-Export**。

統計數字和關鍵字以及表現內容均可在執行工作清單時自動匯出至結果檔。

11 關閉 **Statistics View Properties** 對話方塊。

12 移動統計方框，至報告的淨空位置。

您最終的報告應類似下圖（第 113 頁的圖 6-2）。



新增關鍵字

1 針對統計方框點選右鍵並選擇 **Edit Keywords**。

2 在 **Search** 欄位內輸入 *個案編號*。

3 選擇 **Case Number** 核取方塊。

4 關閉對話方塊。

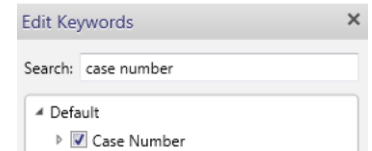
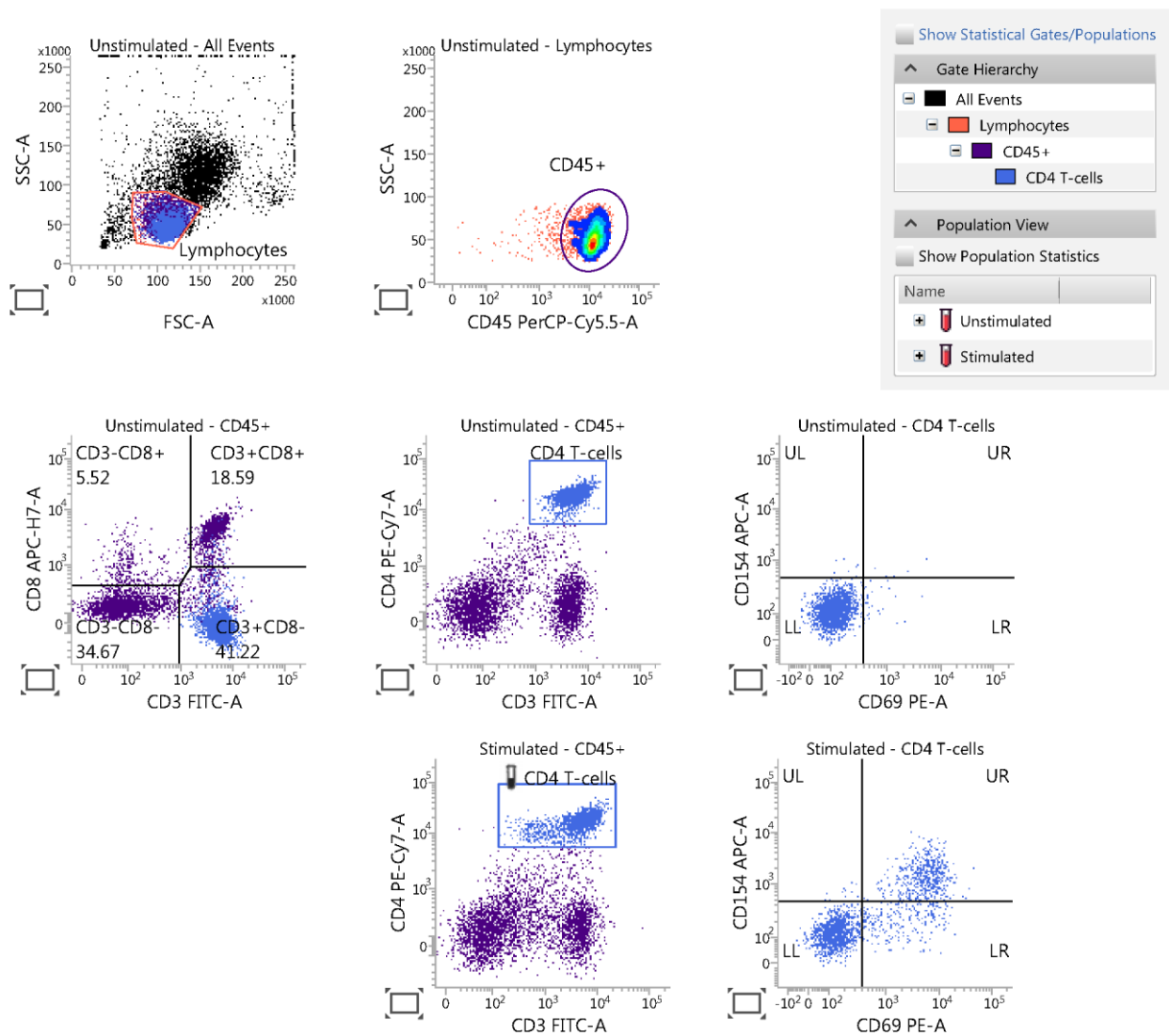


圖 6-2 分析報告範例



Statistics				
Case Number (Unstimulated, Stimulated): <no value>				
Name	Events	% Parent	% Grandparent	% Total
Unstimulated:CD3-CD8+	317	5.52	5.36	3.17
Unstimulated:CD3+CD8+	1,068	18.59	18.07	10.68
Unstimulated:CD3-CD8-	1,992	34.67	33.71	19.92
Unstimulated:CD3+CD8-	2,368	41.22	40.07	23.68
Unstimulated:CD4 T-cells	2,057	35.81	34.81	20.57
Unstimulated:UL	8	0.39	0.14	0.08
Unstimulated:UR	5	0.24	0.09	0.05
Unstimulated:LL	2,012	97.81	35.02	20.12
Unstimulated:LR	32	1.56	0.56	0.32
Stimulated:CD3-CD8+	621	10.70	9.86	6.21
Stimulated:CD3+CD8+	1,005	17.32	15.96	10.05
Stimulated:CD3-CD8-	2,065	35.59	32.80	20.65
Stimulated:CD3+CD8-	2,111	36.38	33.53	21.11
Stimulated:UL	11	0.56	0.19	0.11
Stimulated:UR	502	25.59	8.65	5.02
Stimulated:LL	1,203	61.31	20.73	12.03
Stimulated:LR	246	12.54	4.24	2.46
Stimulated:CD4 T-cells	1,962	33.82	31.16	19.62

匯出數據

匯出數據檔和／或實驗可將您的數據在 BD FACSuite 軟體資料庫外進行備份，這對於您的工作流程而言是重要的步驟，可方便傳送數據檔和／或實驗至其他工作站進行分析。

必須在 Experiment 工作區內手動匯出數據檔或實驗。

1 若要匯出 FCS 檔：

- a 選擇實驗中的所有試管（Ctrl+click）。
- b 選擇 **File > Export > FCS files**。
- c 視需要瀏覽至 C:\BD Export\FCS。
- d 點選 **OK**。

2 若要匯出實驗：

- a 關閉實驗。
- b 在 **Manage Experiments** 視窗內，針對 6 色刺激實驗點選右鍵，然後選擇 **Export Experiments > With Data**。
- c 視需要瀏覽至 C:\BD Export\BDFSExperiment。
- d 點選 **OK**。

練習：從實驗建立試驗

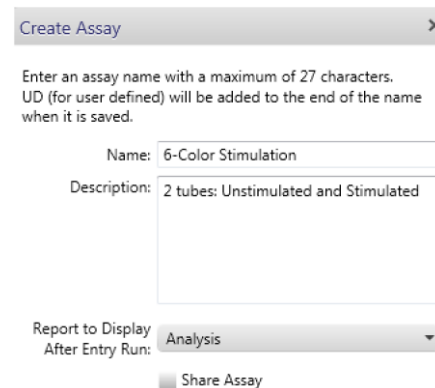
一旦建立實驗後，即可將之儲存成一種試驗，以利重複使用或是在工作清單上執行。建立試驗前，每一支試管都必須有分配到試管設定值或參考設定值。

1 視需要開啟 6 色刺激實驗。

2 選擇 **File > Create Assay**。

3 輸入一個名稱並描述，然後點選 **OK**

將試驗新增至資料庫，以利未來使用。



Create Assay

Enter an assay name with a maximum of 27 characters. UD (for user defined) will be added to the end of the name when it is saved.

Name: 6-Color Stimulation

Description: 2 tubes: Unstimulated and Stimulated

Report to Display After Entry Run: Analysis

Share Assay

編輯試驗屬性

1 瀏覽至 **Library** 工作區。

2 在 **Assays** 下方，選擇 **User-Defined Assays**。

3 選擇 **6-color Stimulation** 試驗。

4 在試驗屬性模板內，點選 **Edit**。



6 color stimulation BF UD

Edit

General Export Results Reports Send to LIS Assign Lot ID

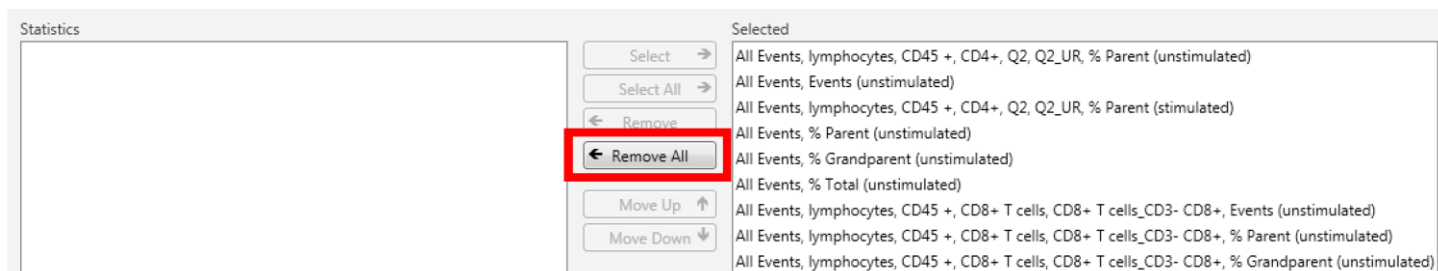
5 在 **General** 索引標籤內，清除 **Automatically approve results** 核取方塊。

批准結果前必須先檢視數據。

6 選擇欲匯出的結果。

a 選擇 **Export Results** 索引標籤。

b 卷軸滾至 **Statistics**，然後點選 **Remove All**，清除所有統計數字。



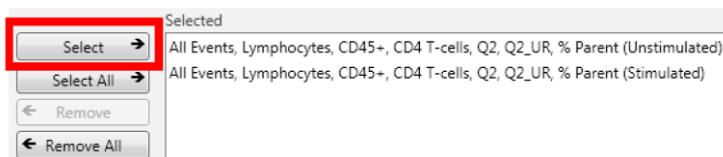
Statistics

Select Select All Remove Remove All Move Up Move Down

Selected

- All Events, lymphocytes, CD45 +, CD4+, Q2, Q2_UR, % Parent (unstimulated)
- All Events, Events (unstimulated)
- All Events, lymphocytes, CD45 +, CD4+, Q2, Q2_UR, % Parent (stimulated)
- All Events, % Parent (unstimulated)
- All Events, % Grandparent (unstimulated)
- All Events, % Total (unstimulated)
- All Events, lymphocytes, CD45 +, CD8+ T cells, CD8+ T cells_CD3- CD8+, Events (unstimulated)
- All Events, lymphocytes, CD45 +, CD8+ T cells, CD8+ T cells_CD3- CD8+, % Parent (unstimulated)
- All Events, lymphocytes, CD45 +, CD8+ T cells, CD8+ T cells_CD3- CD8+, % Grandparent (unstimulated)

c 從下圖中找出顯示的統計數字，然後點選 **Select**，將之新增至 **Selected** 欄位。



Select Select All Remove Remove All

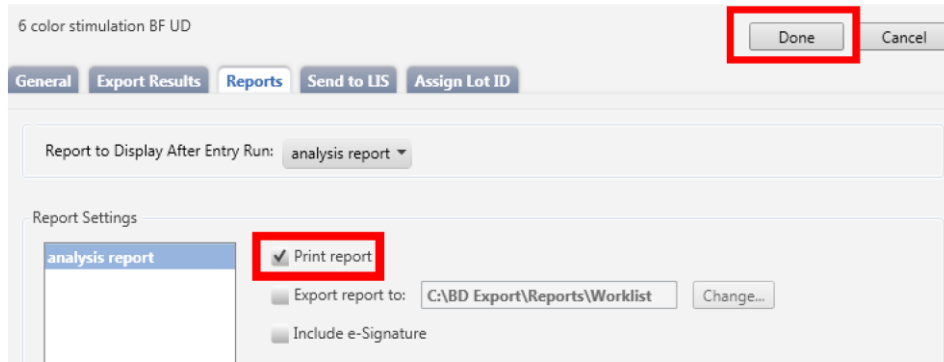
Selected

- All Events, Lymphocytes, CD45+, CD4 T-cells, Q2, Q2_UR, % Parent (Unstimulated)
- All Events, Lymphocytes, CD45+, CD4 T-cells, Q2, Q2_UR, % Parent (Stimulated)

7 在 **Reports** 索引標籤內，確認選擇了 **Print report** 核取方塊。

8 （選擇性）選擇 **Include e-Signature** 核取方塊。

您可以在取得數據後，在工作清單上的各細項附上電子簽章。簽名欄顯示在報告上。



9 點選 **Done**，儲存變更。

檢視：實驗設置

1 調整 PMTV 後自動重新計算溢出值。

T F

2 刺激過的 T 細胞 CD69 和 CD154 均呈陽性。此項實驗中刺激的 CD4 T 細胞百分比是？

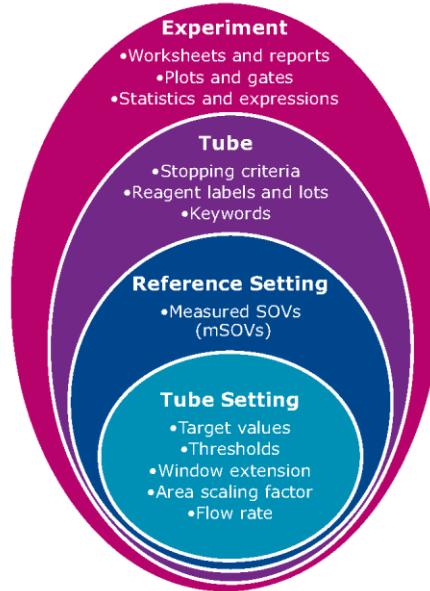
3 獨特的閘門功能用途是？

4 從實驗工作區取得後可自動匯出數據檔。

T F

5 建立試驗的用意是？

Putting the Pieces Together



第 7 單元

工作清單取得與分析：手動裝填試管

完成這個單元後，您將能夠：

- 編輯工作清單偏好。
- 取得工作清單內的數據。
- 分析工作清單內的數據。

Before You Begin

For User-Defined assays

1. Create tube settings.
2. Create an assay.
 - Can contain multiple tubes and tube settings
 - Create a report
 - Set assay properties



Worklist Preferences

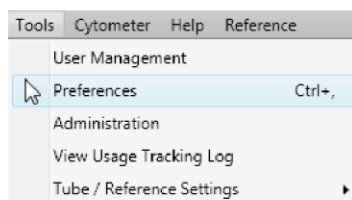
Acquisition

- Acquisition Delay Timer
- Report Delay Timer

Export

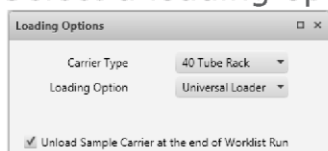
- Entry Run Package
- FCS
- Result

Print



Building a Worklist

1. Select a loading option.



2. Select tasks to be run.

3. Enter sample IDs.

Worklist Entries					
	Sample ID	Task	Status	Location	Sample Carrier
# 1	Donor 1	6-color Stimulation UD	Ready	A1-A2	001
1.1		Unstimulated	Ready To Acquire	A1	001
1.2		Stimulated	Ready To Acquire	A2	001

4. Rename the worklist.



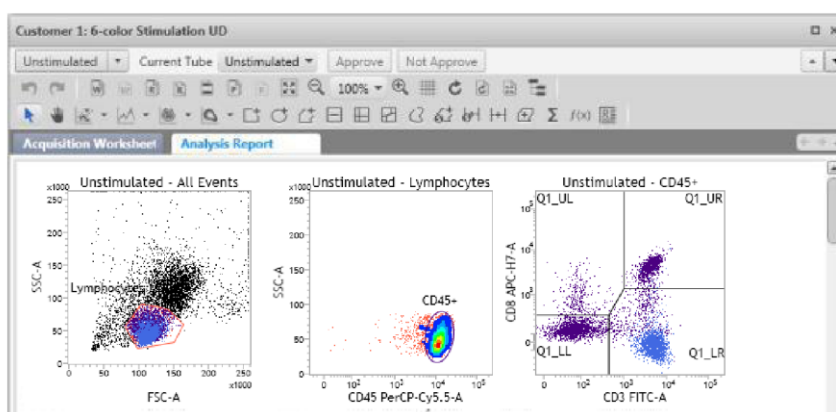
Acquiring Data

1. Edit carrier properties (optional).
2. Load the carrier.
3. Click **Run All**.
4. Verify gates and PMT voltages.
 - Use the stop timer, if necessary.

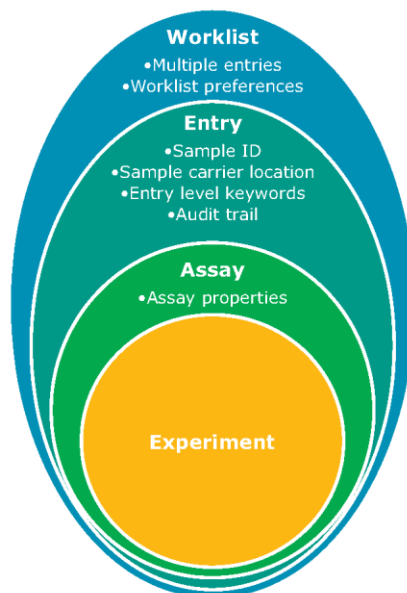


Analyzing Data

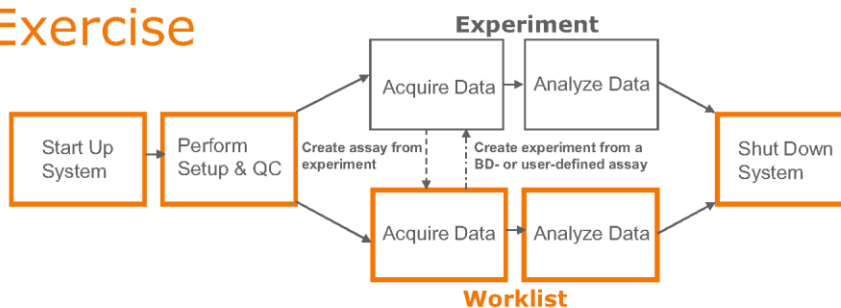
1. Verify gates and adjust them, if necessary.
2. Print the report.



Putting the Pieces Together



Exercise



1. Acquire data.

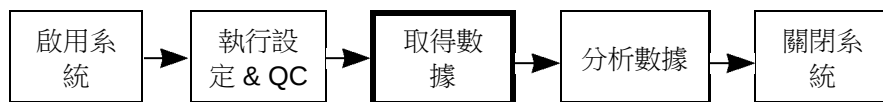
- Set worklist preferences.
- Build the worklist.
- Run samples.

2. Analyze data.



練習：取得工作清單內的數據

數據取得的過程包含了多重步驟。下圖列出的是牽涉到的主要步驟。



- a. 編輯工作清單偏好。
- b. 建立工作清單。
- c. 取得數據。

在下列練習中，您必須利用您在之前練習中建立的試驗取得工作清單內的數據。本章的重點在手動裝填試管，以利取得。如需有關使用裝填裝置取得的資訊，請參考工作清單取得與分析：第 131 頁的萬用裝填裝置。

編輯工作清單偏好

工作清單偏好包含設定取得和報告延遲計時器、定義匯出的檔名和地點，以及設定列印選擇等。這些偏好都是使用者專屬，所以可在不影響其他使用者下進行客製化。

- 1 選擇 **Tools > Preferences**。
- 2 選擇 **Worklists** 索引標籤。

設定一般偏好

- 1 需要時，選擇左邊模板內的 **General**。
- 2 變更 **Acquisition Delay Timer**，如此才能在取得前有 20 秒的時間可預覽所有試管。
- 3 清除 **Autonumber Sample ID** 選項。

清除這個選項將需要您在建立工作清單時手動輸入樣本編號。

Acquisition Delay Timer

Preview for 20 seconds

☒ Use timer for the first tube in each entry (audible alarm will sound)

☐ Use timer for all tubes

Trucount Acquisition Delay Timer

Preview for 17 seconds

Report Delay Timer

Preview for 10 seconds

Sample ID Assignment

☐ Autonumber Sample ID

設定匯出和列印偏好

- 1 需要時，擴充左邊模板內的 **Export** 偏好。
- 2 確認匯出選項和命名格式與下列各項相符：

輸入執行配套

Auto Export Options

☒ Export entry run package after acquisition

Location

C:\BD Export\ERP\Worklists

Browse ...

☒ Create dated subfolder (yyyyMMdd)

Naming Format

Worklist Name

Sample ID

None

None

Delimiter

Underscore

☒ Autonumber starting with

1

Example based on the selected choices

Worklist Name_Sample ID_001.AssayEntryRun

FCS

Auto Export Options

☒ Export FCS after acquisition

Location

C:\BD Export\FCS\Worklists

Browse ...

☒ Create dated subfolder (yyyyMMdd)

Naming Format

Worklist Name

Sample ID

Tube Name

None

Delimiter

Underscore

Example based on the selected choices

Worklist Name_Sample ID_Tube Name_yyyymmdd_hhmmss.fcs

結果

結果是指關鍵字、表現和統計數字。若要分配匯出用的特定結果，請在試驗偏好（資料庫）內進行選擇。

Auto Export Options

☒ Automatically export results

Location

C:\BD Export\Results\Worklists

Browse ...

☒ Create dated subfolder (yyyyMMdd)

3 確認列印偏好。

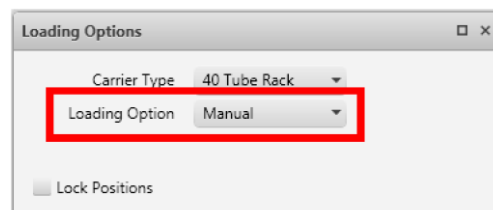
- 選擇左邊模板內的 **Print**。
- 應選擇 **Automatically print report for entries**。

針對取得後欲列印出的報告，必須選擇這個偏好以及 **Print report** 試驗偏好（在資料庫內分配）。

4 點選 **OK**，儲存偏好。

建立工作清單

- 在瀏覽列內，點選 **Worklists**。
- 在 **Manage Worklists** 索引標籤內，點選 **New**，建立新的工作清單。
- 在 **Loading Options** 模板內，從 **Loading Option** 功能表上選擇 **Manual**。
- 將資訊輸入 **Worklist Entries** 模板內。



- 從 **Task** 功能表選擇您的 6 色刺激 UD 試驗。
- 在 **Sample ID** 欄位內輸入 *Customer 1*。

Worklist Entries				
Approval Audit Trail E-Signature More...				
	Sample ID	Task	Status	Location
▶ 1	Customer 1	6-color Stimul.	Ready	-
▶ 2		Perform Daily	Ready	-

重要 建議工作清單內所有試驗均使用相同的流體模式。在高敏感度流體模式和任何其他流速（低、中或高）之間變換，可能因為細胞分析儀修飾流體時的流速穩定過程而導致取得試管的時間大幅受到耽擱。

- 新增 **Perform Daily Cleaning** 工作，作為您工作清單上的最後一項。

5 重新命名工作清單。

- 選擇 **File > Rename**。
- 命名工作清單為 *工作清單作法 <您的姓名縮寫>*。
- 點選 **OK**。

6 在 **Worklist Entries** 模板內，找出 **Case Number** 欄位，然後輸入一個數值。

個案編號是實驗設置過程中新增的關鍵字。

Worklist Entries							
Approval Audit Trail E-Signature More...							
	Sample ID	Task	Status	Location	Acquisition Time	Tube ID	Case Number
▶ 1	Customer 1	6-color Stimul.	Ready	-			DP1109
▶ 2		Perform Daily	Ready	-			

取得數據

1 點選 **Run All**。

2 將客戶 1 未刺激過的試管裝填在手動管埠上。

3 確認閘門和 PMT 電壓。



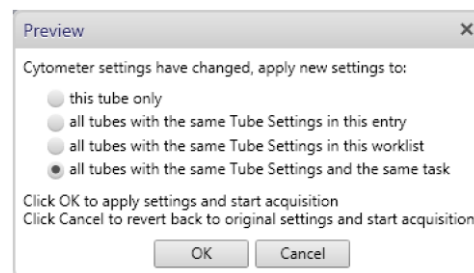
a 點選 **Stop Timer**。

停止計時器顯示的倒數計時是您指定取得延遲計時器偏好（20 秒）。點選 **Stop Timer** 按鈕，讓您有更多時間可預覽數據。

b 需要時，請調整閘門和 PMT 電壓。

c 點選 **Resume**。

註 如果您有調整 PMT 電壓，會提示您選擇如何應用這些調整。針對這項練習，選擇 **all tubes with the same Tube Settings and the same task**，然後點選 **OK**。



4 出現提示時，針對客戶 1 裝填刺激過的試管。

5 出現提示時，將刺激過的試管卸載，然後點選 **Stop Timer**。

此時啟動報告延遲計時器。請注意，您現在必須於分析報告上變更閘門。

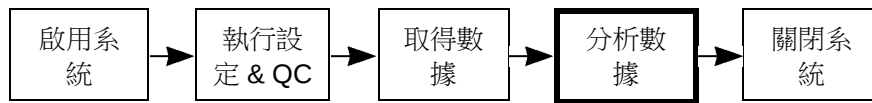
6 視需要調整閘門，然後點選 **Resume**。

7 針對客戶 2 重複步驟 2 至 6。

8 繼續按照提示裝填試管，直到取得工作清單內所有試管為止。

練習：分析工作清單內的數據

可利用批次分析功能，手動分析或自動分析工作清單內的數據。



a. 手動分析。

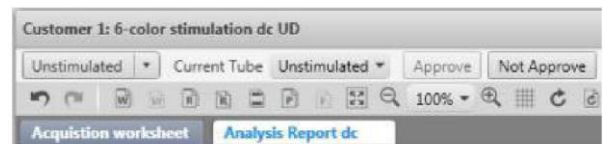
b. 批准項目。

手動分析

- 1 在 **Worklist Entries** 模板內，點選第 1 項旁邊的試管指針。

報告內會顯示客戶 1 未刺激過的試管數據。

- 2 選擇 **Analysis Report** 索引標籤。

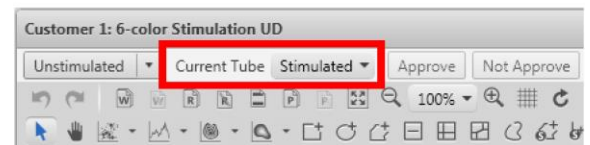


- 3 視需要確認閘門並進行調整。

- 4 從 **Current Tube** 功能表上，選擇 **Stimulated**。

- 5 視需要確認閘門並進行調整。

- 6 檢視過來自該項目的兩支試管後，點選 **Approved**。



批准一個項目會根據試驗屬性和偏好啟動自動匯出、列印和傳送結果至 LIS 等功能。

- 7 （選擇性）如果您選擇了電子簽章試驗屬性，會提示您輸入密碼。請輸入登入密碼和任何意見，然後點選 **Sign**。

簽名欄會新增至報告最下方。

- 8 若要針對第二項分析其數據，請重複步驟 1 至 7。

批次分析（選擇性）

註 僅得在批准所有項目後使用批次分析功能。

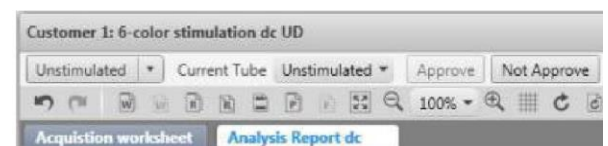
- 1 在 **Worklist Entries** 模板內，點選第 1 項旁邊的試管指針。

報告內會顯示客戶 1 未刺激過的試管數據。

- 2 在 **Worklist control** 列上，點選 **Run All**。

批次分析開始，分析各項目和帶有取得的數據之試管。

- 3 使用 **Stop Timer** 暫停分析並做任何必要的變更。



匯出工作清單

- 1 需要時，請關閉您想要匯出的工作清單。
- 2 選擇 **Manage Worklists** 索引標籤。
- 3 點選您想要匯出的工作清單，然後選擇 **File > Export Worklist > With Data**。
- 4 瀏覽至您想要儲存工作清單的地點，然後點選 **Save**。

匯出的工作清單預設儲存地點是：C:\BD Export\AssayWorklists。

檢視：工作清單

1 工作清單項目模板內有哪兩欄為必填？

2 可在取得和分析過程中使用停止計時器。

T F

3 將流體工作新增至工作清單需要樣本編號。

T F

4 將左邊的名詞與右邊的定義配對。

_____ 工作清單 A、可以是試驗或流體動作

_____ 輸入 B、欲執行的一連串工作

_____ 工作 C、工作清單內的一列

工作清單輸入狀態

表 7-1 工作清單輸入狀態定義

狀態	定義
就緒	表示該項目有樣本編號和工作。
未就緒	表示該項目並無樣本編號或工作。
已可取得	表示該試管已就緒，可取得並且具備所有規定的資訊。
完成	表示已經取得該項目或試管。
已可批准	表示已經取得該項目或試管並且需要批准，會在該試驗並未啟用自動批准功能時顯示。
已批准	表示已經批准該項目或試管，會在該試驗有啟用自動批准功能時顯示。
需要檢視	表示已變更稽核過的項目，會在啟用稽核記錄時顯示。

第 8 單元

工作清單取得與分析：萬用裝填裝置

完成這個單元後，您將能夠：

- 編輯工作清單偏好。
- 使用裝填裝置取得工作清單內的數據。
- 使用裝填裝置分析工作清單內的數據。

Before You Begin

For User-Defined assays

1. Create tube settings.
2. Create an assay.
 - Can contain multiple tubes and tube settings
 - Create a report
 - Set assay properties



Worklist Preferences

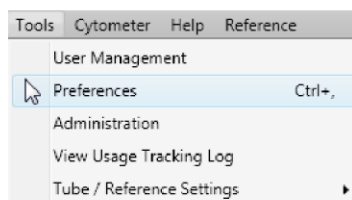
Acquisition

- Acquisition Delay Timer
- Report Delay Timer

Export

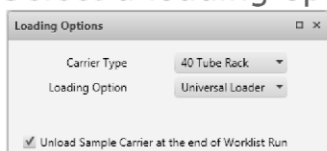
- Entry Run Package
- FCS
- Result

Print



Building a Worklist

1. Select a loading option.



2. Select tasks to be run.

3. Enter sample IDs.

Worklist Entries					
	Sample ID	Task	Status	Location	Sample Carrier
# 1	Donor 1	6-color Stimulation UD	Ready	A1-A2	001
1.1		Unstimulated	Ready To Acquire	A1	001
1.2		Stimulated	Ready To Acquire	A2	001

4. Rename the worklist.



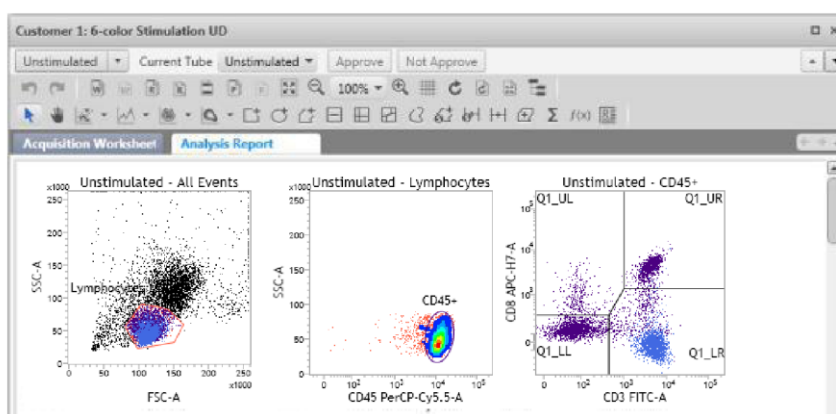
Acquiring Data

1. Edit carrier properties (optional).
2. Load the carrier.
3. Click **Run All**.
4. Verify gates and PMT voltages.
 - Use the stop timer, if necessary.

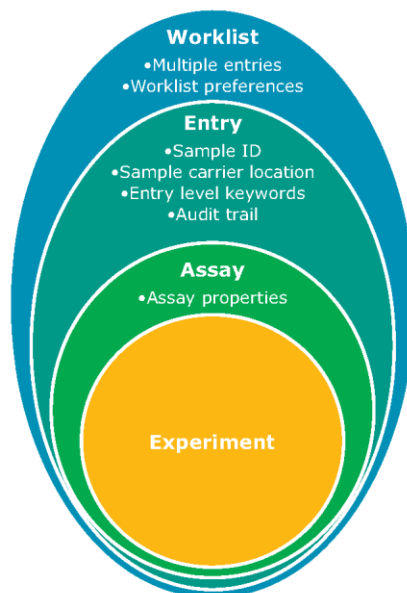


Analyzing Data

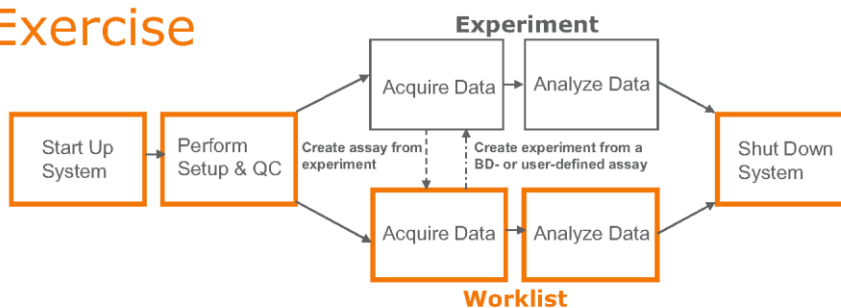
1. Verify gates and adjust them, if necessary.
2. Print the report.



Putting the Pieces Together



Exercise



1. Acquire data.

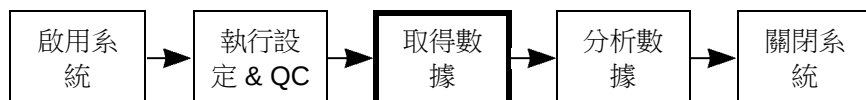
- Set worklist preferences.
- Build the worklist.
- Run samples.

2. Analyze data.



練習：取得工作清單內的數據

數據取得的過程包含了多重步驟。下圖列出的是牽涉到的主要步驟。



- a. 編輯工作清單偏好
- b. 建立工作清單
- c. 取得數據
- d. 分析數據

在下列練習中，您必須利用您在之前練習中建立的試驗取得工作清單內的數據。本章重點放在使用裝填裝置，以利取得。如需有關手動裝填試管的資訊，請參考工作清單取得與分析：第 119 頁的手動裝填試管。

雖然軟體內有很多的樣本載具可選，但是這堂課中，您只能選擇 **40 支試管架** 或是 **96 孔槽盤的標準圓底 PS**。

編輯工作清單偏好

工作清單偏好包含設定取得和報告延遲計時器、定義匯出的檔名和地點，以及設定列印選擇等。這些偏好都是使用者專屬，所以可在不影響其他使用者下進行客製化。

- 1 選擇 **Tools > Preferences**。
- 2 選擇 **Worklists** 索引標籤。

設定一般偏好

- 1 需要時，選擇左邊模板內的 **General**。
- 2 變更 **Acquisition Delay Timer**，如此才能在取得前有 20 秒的時間可預覽所有試管。
- 3 清除 **Autonumber Sample ID** 選項。

清除這個選項將需要您在建立工作清單時手動輸入樣本編號。

Acquisition Delay Timer

Preview for 20 seconds

☒ Use timer for the first tube in each entry (audible alarm will sound)

☐ Use timer for all tubes

Trucount Acquisition Delay Timer

Preview for 17 seconds

Report Delay Timer

Preview for 10 seconds

Sample ID Assignment

☐ Autonumber Sample ID

設定匯出和列印偏好

- 1 在左邊模板內，點選兩次 **Export** 。
- 2 確認匯出選項和命名格式與下列各項相符：

輸入執行配套

The screenshot shows the 'Auto Export Options' dialog box. Under 'Export entry run package after acquisition', the 'Location' is set to 'C:\BD Export\ERP\Worklists' and 'Create dated subfolder (yyyyMMdd)' is checked. In the 'Naming Format' section, the dropdowns are set to 'Worklist Name', 'Sample ID', 'None', and 'None'. The 'Delimiter' is 'Underscore' and 'Autonumber starting with' is '1'. An example filename is shown as 'Worklist Name_Sample ID_001.AssayEntryRun'.

FCS

The screenshot shows the 'Auto Export Options' dialog box. Under 'Export FCS after acquisition', the 'Location' is set to 'C:\BD Export\FCS\Worklists' and 'Create dated subfolder (yyyyMMdd)' is checked. In the 'Naming Format' section, the dropdowns are set to 'Worklist Name', 'Sample ID', 'Tube Name', and 'None'. The 'Delimiter' is 'Underscore'. An example filename is shown as 'Worklist Name_Sample ID_Tube Name_yyyyymmdd_hhmmss.fcs'.

結果

結果是指關鍵字、表現和統計數字。若要分配匯出用的特定結果，請在試驗偏好（資料庫）內進行選擇。

The screenshot shows the 'Auto Export Options' dialog box. Under 'Automatically export results', the 'Location' is set to 'C:\BD Export\Results\Worklists' and 'Create dated subfolder (yyyyMMdd)' is checked.

3 確認列印偏好。

- 選擇左邊模板內的 **Print**。
- 應選擇 **Automatically print report for entries**。

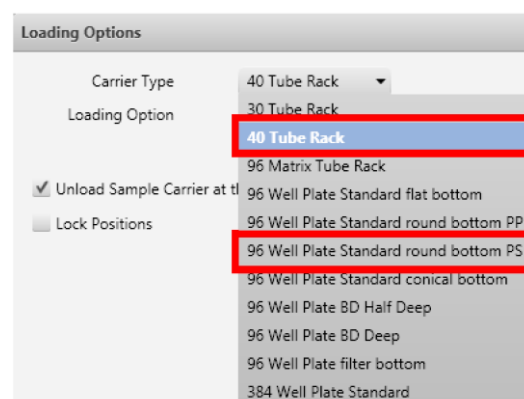
針對取得後欲列印出的報告，必須選擇這個偏好以及 **Print report** 試驗偏好（在資料庫內分配）。

4 點選 **OK**，儲存偏好。

建立工作清單

- 在瀏覽列內，點選 **Worklists**。
- 在 **Manage Worklists** 索引標籤內，點選 **New**，建立新的工作清單。
- 選擇裝填功能。

- 在 **Loading Options** 模板內，選擇 **Universal Loader**。
- 選擇您希望在這項練習中使用的**載具類型**。您可以選擇 **40 支試管架**或是 **96 孔槽盤標準圓底 PS**。



4 將資訊輸入 **Worklist Entries** 模板內。

- 從 **Task** 功能表選擇您的 **6 色刺激 UD** 試驗。
- 在 **Sample ID** 欄位內輸入 **Customer 1**。

Worklist Entries					
Approval Audit Trail E-Signature More...					
	Sample ID	Task	Status	Location	Carrier ID
▶ 1	Customer 1	6-color Stimulation	Ready	A1-A2	001
▶ 2		Perform Daily Clean	Ready	A3-A4	001

重要 建議工作清單內所有試驗均使用相同的流體模式。在高敏感度流體模式和任何其他流速（低、中或高）之間變換，可能因為細胞分析儀修飾流體時的流速穩定過程而導致取得試管的時間大幅受到耽擱。

- 新增 **Perform Daily Cleaning** 工作，作為您工作清單上的最後一項。

5 重新命名工作清單。

- 選擇 **File > Rename**。
- 命名工作清單為 **工作清單作法_<您的姓名縮寫>**。
- 點選 **OK**。

6 在 **Worklist Entries** 模板內，找出 **Case Number** 欄位，然後輸入一個數值。

個案編號是實驗設置過程中新增的關鍵字。

Worklist Entries								
Approval Audit Trail E-Signature More...								
	Sample ID	Task	Status	Location	Carrier ID	Acquisition Time	Tube ID	Case Number
▶ 1	Customer 1	6-color Stimul.	Ready	A1-A2	001			DP1109
▶ 2		Perform Daily	Ready	A3-A4	001			

取得數據

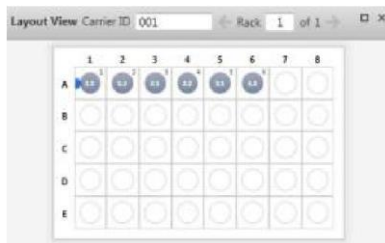
1 裝填載具。

您的樣本應放在 **Layout View** 模板內的指定位置。

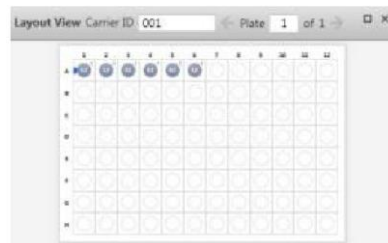
註 將樣本放在載具內以前務必將之徹底混合。

- 點選 **Load**。
- 將載具放在裝填裝置上。
- 點選 **Continue**。

40 支試管架



96 孔槽盤標準圓底 PS



2 確認 DI 水試管位在手動管埠上。

3 點選 **Run All**。

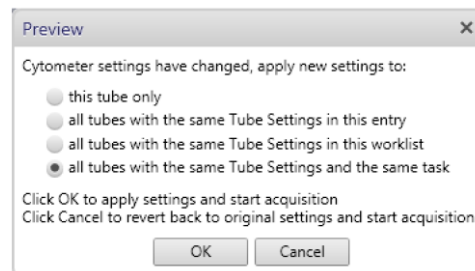
4 確認閘門和 PMT 電壓。

- 點選 **Stop Timer**。

停止計時器顯示的倒數計時是您指定取得延遲計時器偏好（20 秒）。點選 **Stop Timer** 按鈕，讓您有更多時間可預覽數據。

- 需要時，請調整閘門和 PMT 電壓。
- 點選 **Resume**。

註 如果您有調整 PMT 電壓，會提示您選擇如何應用這些調整。針對這項練習，選擇 **all tubes with the same Tube Settings and the same task**，然後點選 **OK**。



5 針對客戶 1 取得第二支試管後，點選 **Stop Timer**。

此時啟動報告延遲計時器。請注意，您現在必須於分析報告上變更閘門。

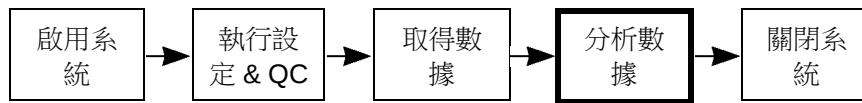
6 視需要調整閘門，然後點選 **Resume**。

7 針對客戶 2 重複步驟 4 至 6。

8 取得所有樣本後，取下載具並點選 **Continue**。

練習：分析工作清單內的數據

可利用批次分析功能，手動分析或自動分析工作清單內的數據。



a、手動分析。

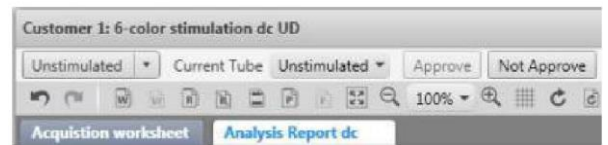
b、批准項目。

手動分析

- 1 在 **Worklist Entries** 模板內，點選第 1 項旁邊的試管指針。

報告內會顯示客戶 1 未刺激過的試管數據。

- 2 選擇 **Analysis Report** 索引標籤。

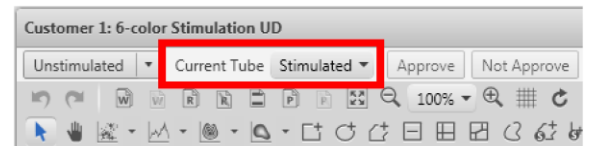


- 3 視需要確認閘門並進行調整。

- 4 從 **Current Tube** 功能表上，選擇 **Stimulated**。

- 5 視需要確認閘門並進行調整。

- 6 檢視過來自該項目的兩支試管後，點選 **Approved**。



批准一個項目會根據試驗屬性和偏好啟動自動匯出、列印和傳送結果至 LIS 等功能。

- 7 （選擇性）如果您選擇了電子簽章試驗屬性，會提示您輸入密碼。請輸入登入密碼和任何意見，然後點選 **Sign**。

簽名欄會新增至報告最下方。

- 8 若要針對第二項分析其數據，請重複步驟 1 至 7。

批次分析（選擇性）

註 僅得在批准所有項目後使用批次分析功能。

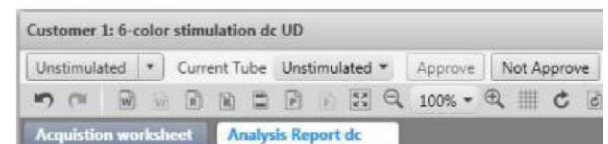
- 1 在 **Worklist Entries** 模板內，點選第 1 項旁邊的試管指針。

報告內會顯示客戶 1 未刺激過的試管數據。

- 2 在 **Worklist control** 列上，點選 **Run All**。

批次分析開始，分析各項目和帶有取得的數據之試管。

- 3 使用 **Stop Timer** 暫停分析並做任何必要的變更。



匯出工作清單

- 1 需要時，請關閉您想要匯出的工作清單。
- 2 選擇 **Manage Worklists** 索引標籤。
- 3 點選您想要匯出的工作清單，然後選擇 **File > Export Worklist > With Data**。
- 4 瀏覽至您想要儲存工作清單的地點，然後點選 **Save**。

匯出的工作清單預設儲存地點是：C:\BD Export\AssayWorklists。

檢視：工作清單

1 工作清單項目模板內有哪兩欄為必填？

2 可在取得和分析過程中使用停止計時器。

T F

3 將流體工作新增至工作清單需要樣本編號。

T F

4 將左邊的名詞與右邊的定義配對。

- | | |
|------------|--------------|
| _____ 工作清單 | A、可以是試驗或流體動作 |
| _____ 輸入 | B、欲執行的一連串工作 |
| _____ 工作 | C、工作清單內的一列 |

5 可將超過一種載體與工作清單連結。

T F

工作清單輸入狀態

表 8-1 工作清單輸入狀態定義

狀態	定義
就緒	表示該項目有樣本編號和工作。
未就緒	表示該項目並無樣本編號或工作。
已可取得	表示該試管已就緒，可取得並且具備所有規定的資訊。
完成	表示已經取得該項目或試管。
已可批准	表示已經取得該項目或試管並且需要批准，會在該試驗並未啟用自動批准功能時顯示。
已批准	表示已經批准該項目或試管，會在該試驗有啟用自動批准功能時顯示。
需要檢視	表示已變更稽核過的項目，會在啟用稽核記錄時顯示。

第 9 單元

資料管理

完成此章後，您將能夠完成資料管理工作。

除了維護硬體外，考慮資料管理和工作站維護也很重要。完成下列工作站維護時程有助於讓您的工作站性能最佳化。

每週

- 1 匯出不再需要用到的工作清單和實驗。
 - 有關匯出實驗的說明，請參考第 114 頁的「匯出數據」。
 - 有關匯出工作清單的說明，請參考第 128 頁的「匯出工作清單」。

- 2 將工作清單和實驗從 BD FACSuite 應用中刪除。

- 3 開啟磁碟清理。

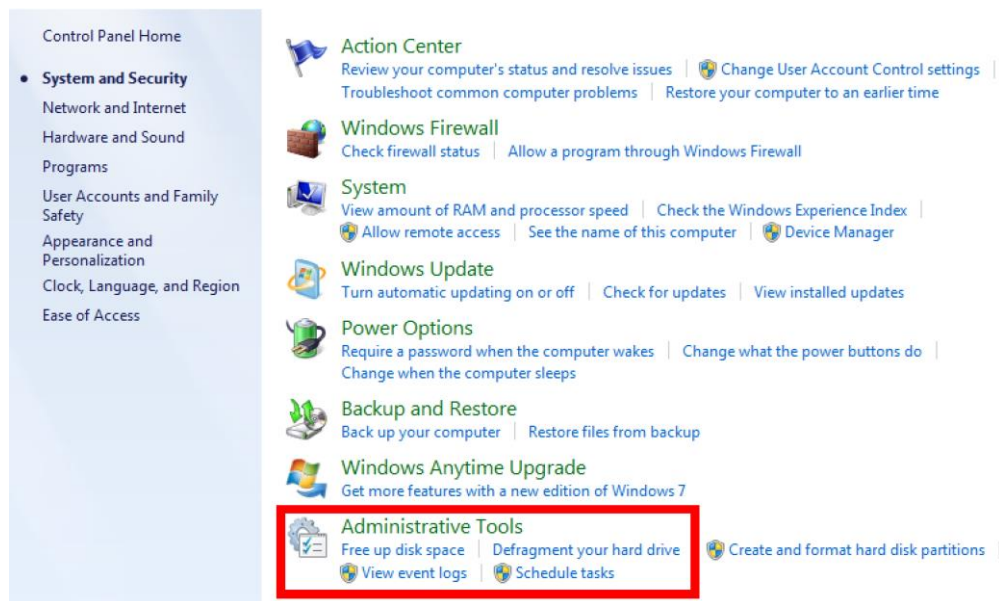
控制面板 > 系統與安全 > 清理磁碟空間

清理磁碟可移除暫存檔、淨空資源回收筒以及移除各項系統檔案和其他不再需要的項目。

- 4 重組硬碟。

控制面板 > 系統與安全 > 重組硬碟

磁碟重組可重新安排片狀數據，讓您的磁碟和硬碟都能更有效率地運作



每月

使用 BD FACSuite 備份和復原功能將資料庫備份。

使用備份和復原功能

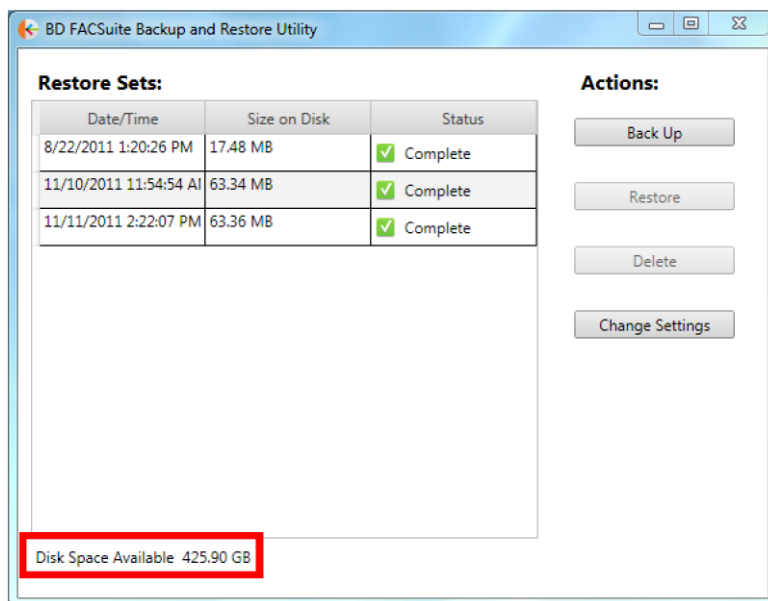
BD FACSuite 備份和復原功能讓您能夠建立一個資料庫備份，然後您在遇到系統故障或其他因素時即可復原備份的副本。備份檔案預設的儲存地點列於第 147 頁的表 9-1。

註 如欲使用備份和復原功能，您用於登入 Microsoft Windows 的帳號必須具備管理員權限。

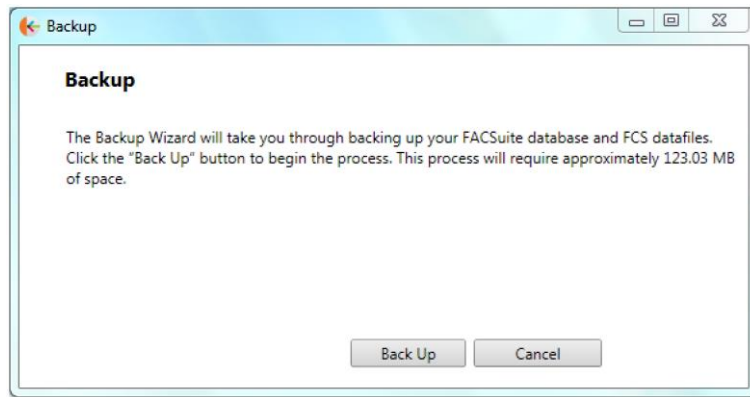
祕訣 建議保留備份和復原功能提供的預設儲存地點。選擇另一個地點儲存備份時，可能會出現拒絕存取的訊息。請確保針對您選擇備份的地點，您具備適當的存取權限。

備份資料庫

- 1 需要時，請關閉 BD FACSuite 軟體。
- 2 開啟 BD FACSuite 備份和復原功能。
- 3 注意可用的磁碟空間，然後選擇 **Back Up**。



- 在 **Backup** 對話方塊內，確認備份的規模小於可用的磁碟空間。



備份規模大於可用的磁碟空間時，您就必須刪除之前的備份或其他檔案。

- 點選 **Back Up**。
- 注意備份日期和時間印記，然後選擇 **Finish**。

復原資料庫

- 開啟 BD FACSuite 備份和復原功能。
- 請選擇您欲復原的資料庫，然後點選 **Restore**。

針對這項練習，您必須選擇和您在之前步驟中建立的備份日期和時間相符的資料庫。

- Restore** 對話方塊開啟後，點選 **Restore**。
- 點選 **Finish**。
- 關閉 BD FACSuite 備份和復原功能。

檔案位置

BD FACSuite 軟體可以製作許多不同的檔案類型。管理這些檔案及其位置對於維護您的系統而言很重要。

下表包含檔案類型、儲存位置以及各檔案內容等。

表 9-1 檔案位置

檔案	預設檔案位置	檔案描述
實驗 (.Experiment)	C:\BD Export\BDFSExperiment	實驗所含的全部資訊。可在涵蓋數據或不含數據下匯出。
工作清單 (.AssayWorklist)	C:\BD Export\AssayWorklists	工作清單所含的全部資訊，包括數據。
數據 (.fcs)	工作清單內的數據 • C:\BD Export\FCS\Worklists 實驗所含數據 • C:\BD Export\FCS	包含清單模式數據、設定值和關鍵字。
設置報告 (.pdf)	C:\BD Export\Setup\Reports	包含 CQC 或 PQC 相關結果。
輸入執行配套 (.AssayEntryRun)	C:\BD Export\ERP\Worklists	個別工作清單項目，含數據。
結果 (.csv)	C:\BD Export\Results\Worklists	來自工作清單項目的統計數字與關鍵字。
資料庫備份 (.bak, .zip)	C:\ProgramData\BD\FACSuite\BD Backup	BD FACSuite 軟體備份和復原功能建立的資料庫備份。
系統健檢報告 (.txt, .zip)	C:\ProgramData\BD\FACSuite\HealthReport	包含系統目前狀態的相關資訊。

此頁刻意留白。

第 10 單元

流體指令與疑難排解

完成這個單元後，您將能夠執行基本的疑難排解。

Fluidics Commands

SIT Flush

Backflushes sheath fluid through the SIT and removes bubbles from the flow cell.

Clean Cuvette

Runs cleaning solution through the flow cell.

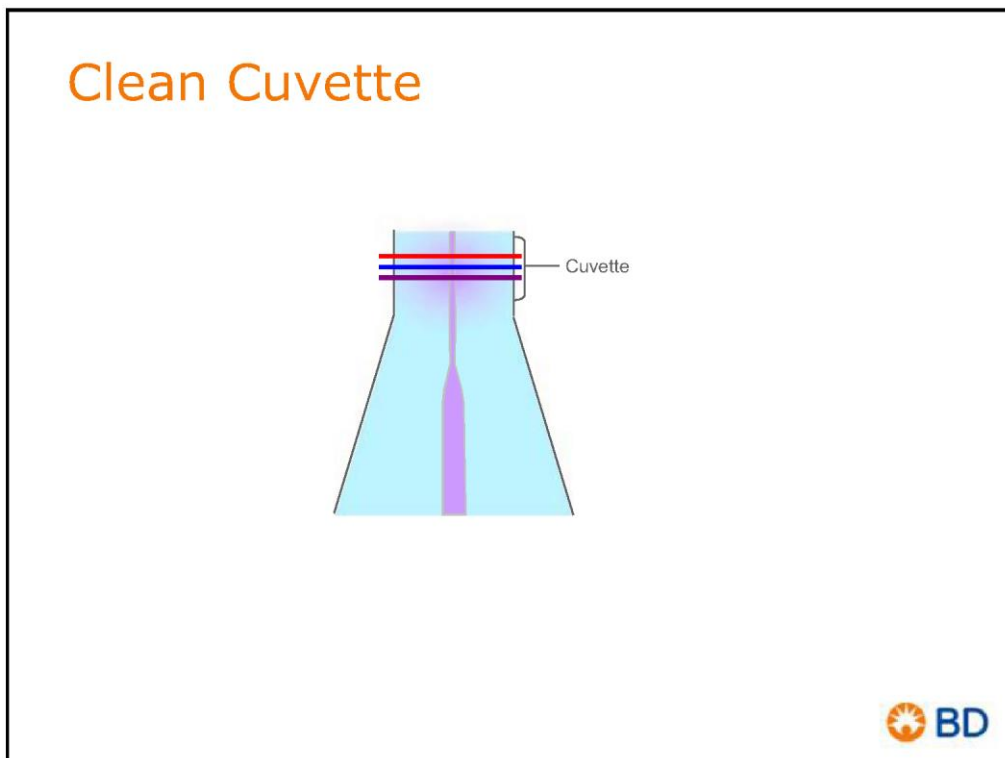
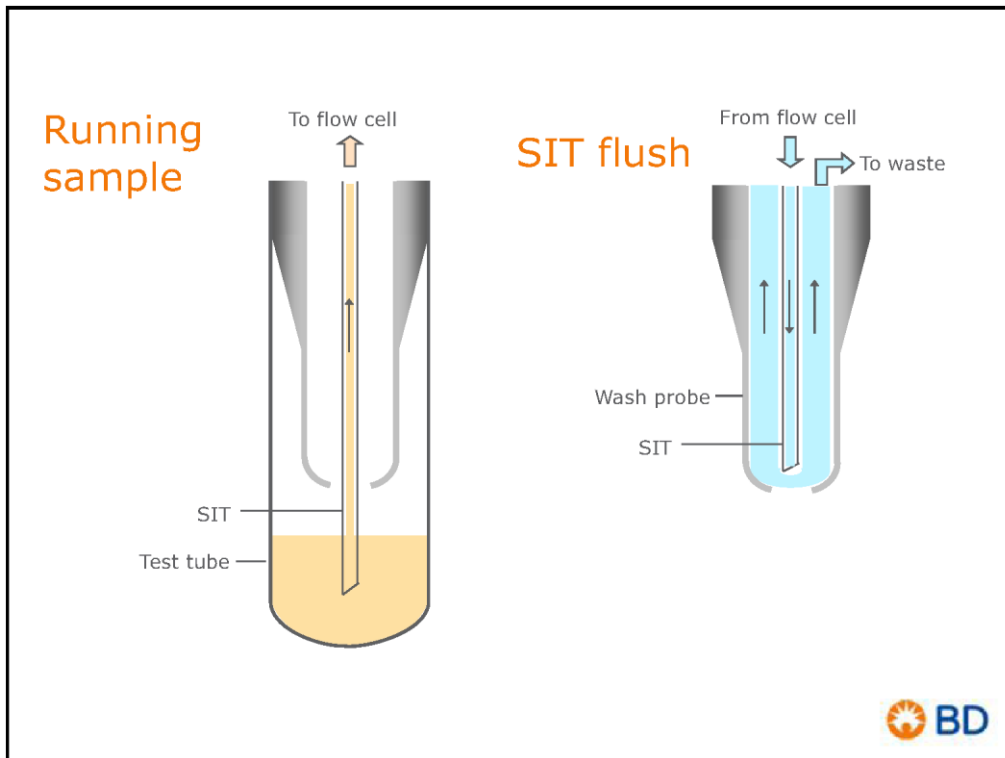
Drain and Fill Flow Cell

Removes persistent bubbles from the flow cell.

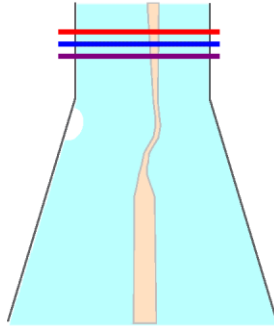
Purge Sheath Filter

Removes air from the sheath filter.

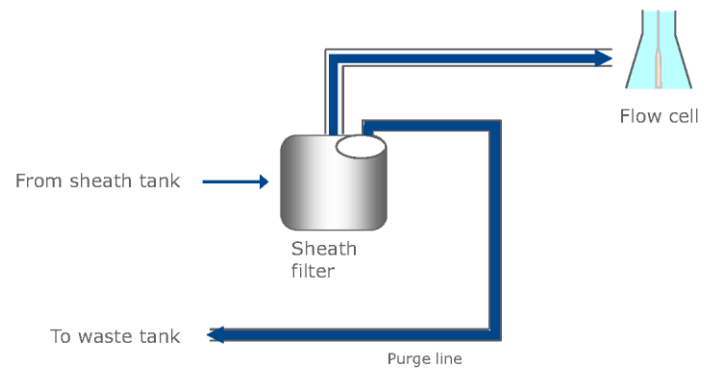




Drain and Fill Flow Cell



Purge Sheath Filter



疑難排解情境

1 找出下列流體指令中，何者是您會在各個情況下所採用。部分觀察可能會有不只一種解決方式。

- A、SIT 沖洗
- B、清潔光析槽
- C、排水和補充流量槽
- D、洗淨鞘液濾網

FSC 和 SSC 的總數已改變或是具備不尋常的形狀。_____

執行樣本時並未觀察到事件。_____

執行 PQC 後具備高 CV。_____

2 取得過程中，顯示下列錯誤訊息。列出其他兩處出現錯誤警示的地點。



3 執行試驗和試管設定值設置後，您可以檢視試驗設置報告和警語。您能如何處理這些警語？

Assay Setup Report
9-Color IP_HP UD

Cytometer Model	BD FACSLyric-R	Bead Product	BD CS&T Beads	User	Admin User
Cytometer Name		Lot ID	17884	Institution	None
Serial Number	L1234	Expiration Date	2/28/2020		
Configuration Name	4-Blue 3-Red 3-Violet				

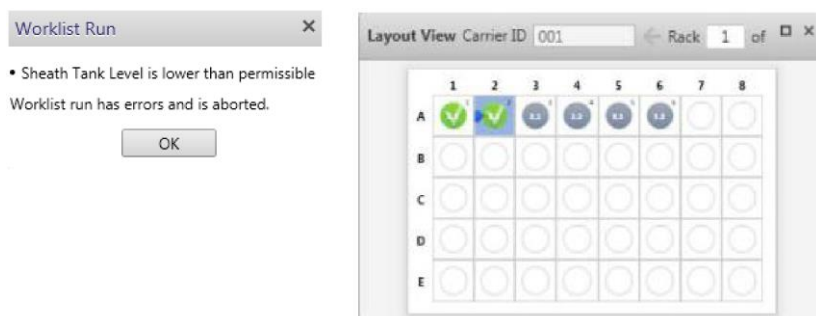
SUMMARY: PASSED

WARNINGS

Spillover values for one or more fluorochromes are not established

Associated reference settings expired

- 4 午餐前，您將某個架子放在裝填裝置上，然後點選了 Run All。吃完午餐後，您發現下列錯誤訊息。

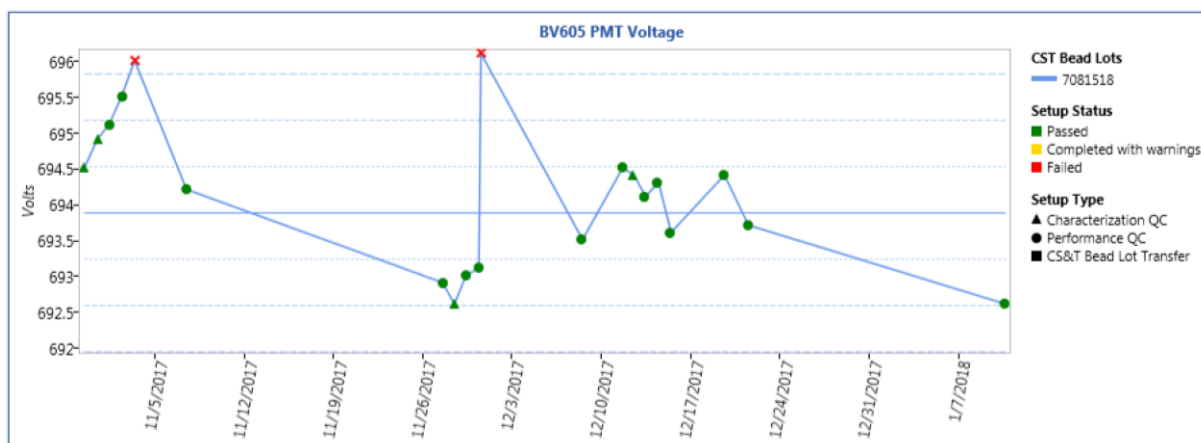


您會如何修復問題並繼續取得剩餘的樣本？

已經有匯出任何結果或報告嗎？_____

Worklist Entries					Approval	Audit Trail	E-Signature	More...
	Sample ID	Task	Status	Location				
1	Customer 1	6-color Stimulation_MP UD	Ready For Approval	A1-A2				
1.1		Unstimulated	Complete	A1				
1.2		Stimulated	Complete	A2				
2	Customer 2	6-color Stimulation_MP UD	Ready	A3-A4				
2.1		Unstimulated	Ready To Acquire	A3				
2.2		Stimulated	Ready To Acquire	A4				
3		Perform Daily Cleaning	Ready	A5-A6				

- 5 您正在檢視 QC 追蹤索引標籤並且發現下列：



紅色 x 表示什麼？_____

您能夠上哪裡查詢更多有關特定 QC 運轉的資訊？_____

此頁刻意留白。

第 11 單元

每日工作流程

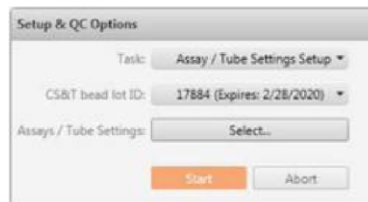
完成這個單元後，您將能夠：

- 執行試驗和試管設定值設置。
- 取得並分析數據。

Daily Workflow: Setup and QC

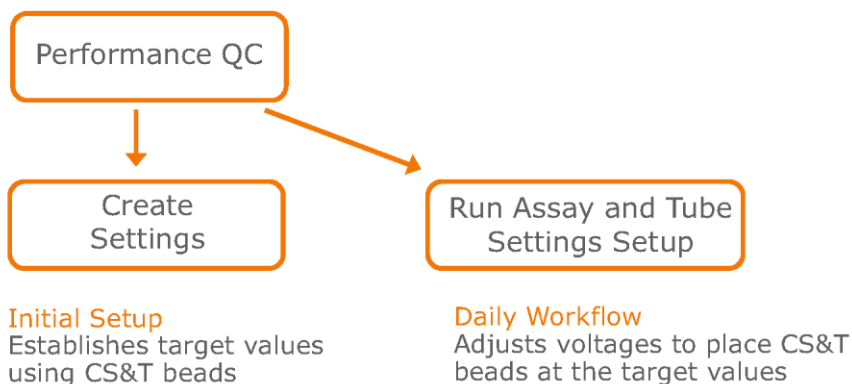


- Run Performance QC.
- Run Assay and Tube Settings Setup, if needed.



Setting up the System

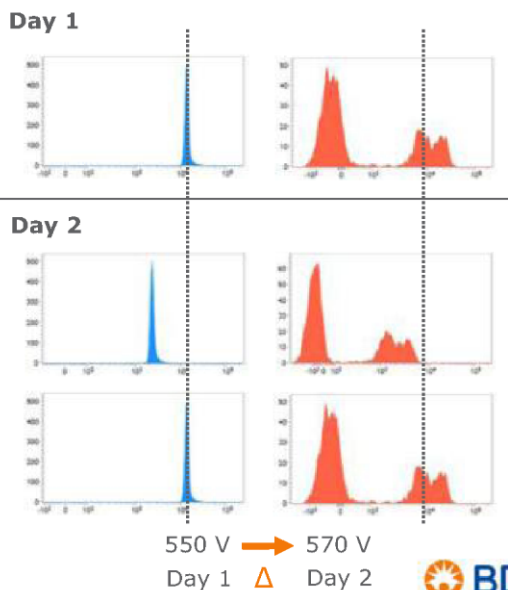
Assay and tube settings setup updates user-defined tube settings and assays to reflect the current cytometer performance.



Recalculating Tube Settings

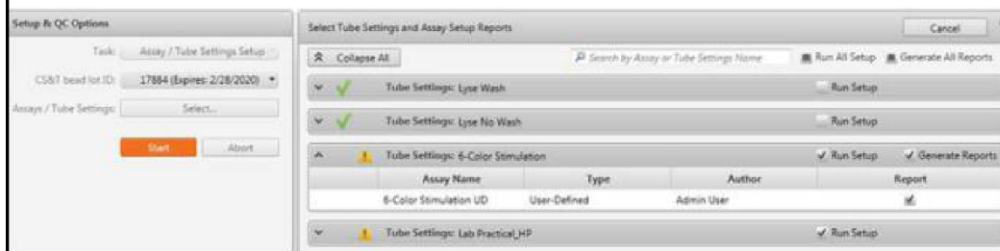
Assay and Tube Settings Setup

Voltages are adjusted to place the bright CS&T beads at the saved tube target values.



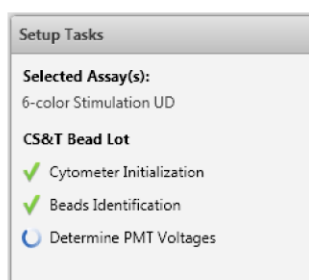
Assay and Tube Settings Setup

Select all assays or tube settings you would like to run that day.



Running Assay and Tube Settings Setup

What you see...



What the software does...

Uses CS&T beads to determine PMT voltages needed to reach user-defined settings.



Assay Setup Report

Assay Setup Report 6-Color Stimulation UD

Cytometer Model	BD FACSymyx-R	Bead Product	BD CS&T Beads	User	Admin User
Cytometer Name		Lot ID	17884	Institution	None
Serial Number	L1234	Expiration Date	2/28/2020		
Configuration Name	4-Blue 3-Red 3-Violet				

SUMMARY: **PASSED**

PMTV and Spillover Values - Stimulated (6-Color Stimulation)

Parameter	PMTV	Bright Bead Median		Spillover Values					
		Target	Actual	FTTC Generic	PE Generic	PerCP-Cy5.5 Generic	PE-Cy7 Generic	APC Generic	APC-H7 Generic
FSC	223.9	17,986	17,987	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
SSC	431.9	125,232	125,104	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
FTTC	643.6	16,983	16,955	100.00	1.13	0.03	0.17	0.01	0.06
PE	468.5	24,267	24,225	13.31	100.00	0.03	1.47	0.01	0.03
PerCP-Cy5.5	198.9	43,242	43,190	3.12	23.18	100.00	1.13	2.00	0.09
PE-Cy7	605.1	23,251	23,210	0.29	1.77	16.60	100.00	0.29	1.44
APC	530.9	32,199	32,631	0.00	0.01	0.89	0.02	100.00	0.95
APC-H7	553.8	117,659	117,799	0.00	0.00	5.26	7.49	19.10	100.00



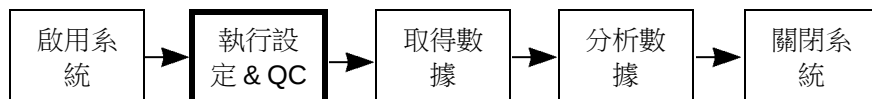
Exercise



1. Run performance QC.
2. Verify the CS&T bead lot ID and select the **Assay & Tube Settings Setup** task.
3. Select the assay(s) and/or tube settings you are running.
4. Run assay and tube settings setup.
5. View the **Assay Setup Report**.



練習：執行試驗與試管設定值設置



之前，您建立了試驗設定值，然後儲存了一項試驗。今天，您必須使用工作清單執行您儲存的試驗。為確保您在試驗中使用的設定值反應您細胞分析儀目前的性能，您必須在取得數據前執行試驗和試管設定值設置。

每天執行試驗時您必須：

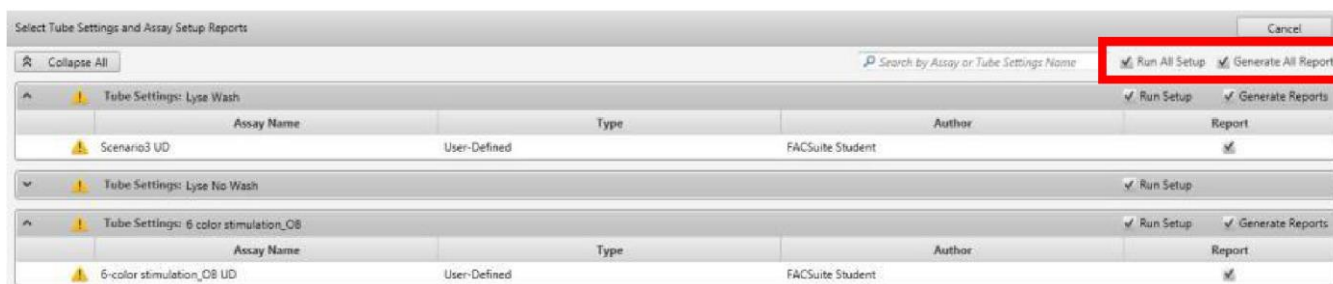
- 執行性能 QC。
- 執行試驗和試管設定值設置。

執行性能 QC

- 1 在瀏覽列內，點選 **Setup & QC**。
- 2 執行性能 Qc，然後檢視第 76 頁所述報告。

執行試驗與試管設定值設置

- 1 在 **Setup & QC** 選項模板內，選擇 **Assay/Tube Settings Setup**。
- 2 點選 **Select**。
- 3 選擇 **Run All Setup** 和 **Generate All Reports**。

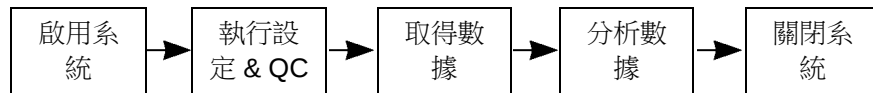


- 4 在 **Setup & QC** 選項模板內，點選 **Start**。
- 5 將準備好的 CS&T 微球試管裝填在細胞分析儀上，然後啟動運轉。
完成設置工作後，完成的對話方塊開啟，內容顯示是否已經順利完成工作或是否有錯。
- 6 將裝有微球的試管卸下並以裝有 DI 水的試管取代。

檢視設置結果

- 1** 出現提示時，點選 **Yes**，檢視報告。
- 2** 檢視報告內的結果。
- 3** （選擇性）列印或匯出報告。

練習：取得並分析數據



如欲完成這項練習，您需要採用您昨天取得的相同樣本取得並分析數據。參考練習簿內下列章節：

- 請參考第 125 頁（手動）或第 137 頁（裝填裝置）的「建立工作清單」。
- 請參考第 126 頁（手動）或第 138 頁（裝填裝置）的「取得數據」。
- 請參考第 127 頁（手動）或第 139 頁（裝填裝置）的「手動分析」。

此頁刻意留白。

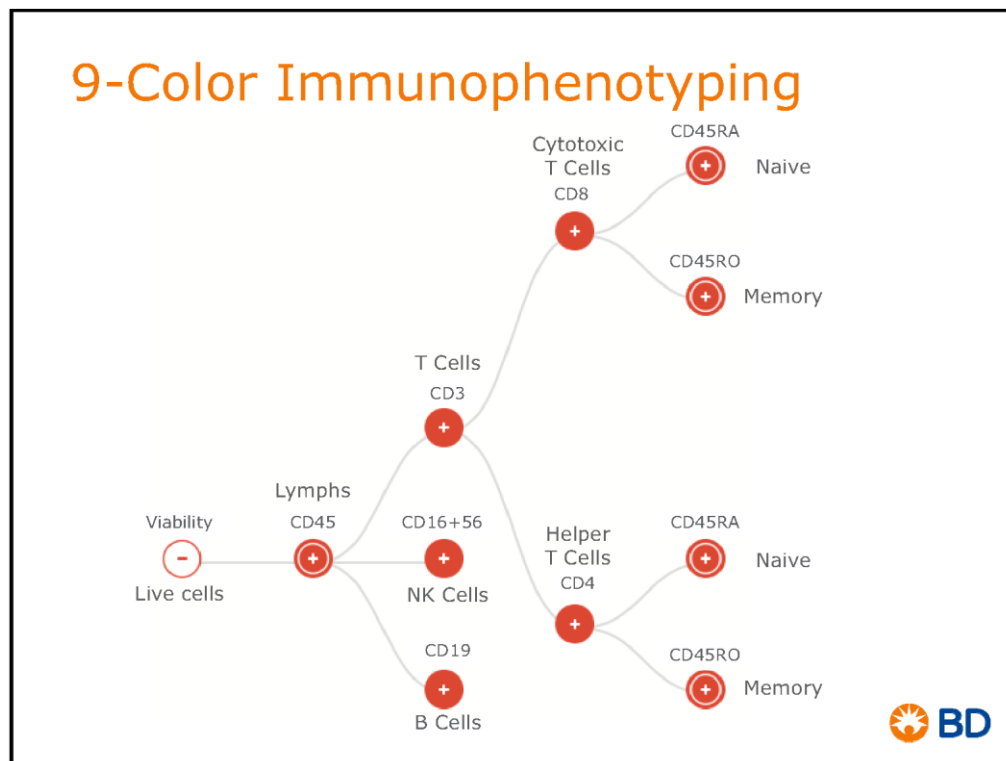
第 12 單元

設定值作法

這個單元提供利用 9 色模板作為範例練習建立使用者定義的設定值之機會。視您選擇的功能而定，您將必須完成下列工作：

- 新增螢光染料至裂解清洗設定值。
- 建立參考設定值。

此外，本單元最後處有一項練習，測驗您對於設定值作業方式的認知。



Lab Practice Options

Option 1: Add Fluorochromes

Add
Fluorochromes



Create Tube
Settings



Acquire and
Analyze Data

Option 2: Create Reference Settings

Create Reference
Settings



Acquire and Analyze
Data



Experiment Setup: Configuration

Label	Fluorochrome
CD3	FITC
CD16+56	PE
CD45	PerCP-Cy5.5
CD45RA	PE-Cy7
CD19	APC
CD8	APC-H7
CD45RO	BV421
CD4	BV510
Viability	FVS*575

Are all of the fluorochromes in
the configuration?

Where would you check?

*BD Horizon™ Fixable Viability Stain



Experiment Setup: SOVs

1. Do all of these fluorochromes exist in the LW spillover matrix?

Yes

Great! Proceed to question 2.

No

Add fluorochromes to the LW settings, then proceed to question 2.

2. Is the compensation adequate for your assay?

Yes

Continue using the LW settings.

No

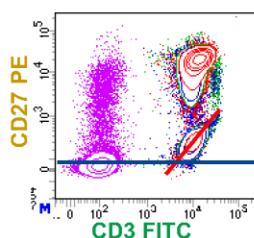
Create reference settings.



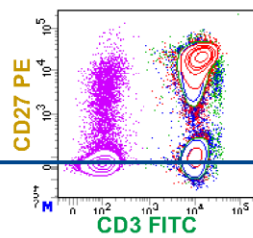
Checking Compensation



Potential Compensation Errors



Correctly Compensated



Exercise



1. Choose a lab practice option.
2. Add a fluorochrome to the configuration, and labels and reagents to the library.
3. Continue with your option.
4. Analyze data and create an assay.
5. More settings practice.



選擇實驗室作法

您的實驗室將例行地執行 9 色免疫分型檢驗。這是您即將執行的檢驗內容。

標示	螢光染料
CD3	FITC
CD16+56	PE
CD45	PerCP-Cy5.5
CD45RA	PE-Cy7
CD19	APC
CD8	APC-H7
CD45RO	BV421
CD4	BV510
存活能力	FVS575

對於您的實驗室作法，您有兩個選擇：

第 1 個選擇：新增第 171 頁的螢光染料

以這個選擇而言，您必須遵照您在第 6 單元設置的 6 色實驗類似的工作流程。這個實驗室作法將牽涉到將批次專屬的螢光染料新增至裂解清洗設定值，然後建立試管設定值。此外，您必須取得並分析來自該模板的數據，然後建立試驗。

第 2 個選擇：建立第 175 頁的參考設定值

以這個選擇而言，您會建立使用者定義的參考設定值，然後必須取得並分析來自模板的數據。最後，您必須建立試驗。

開始

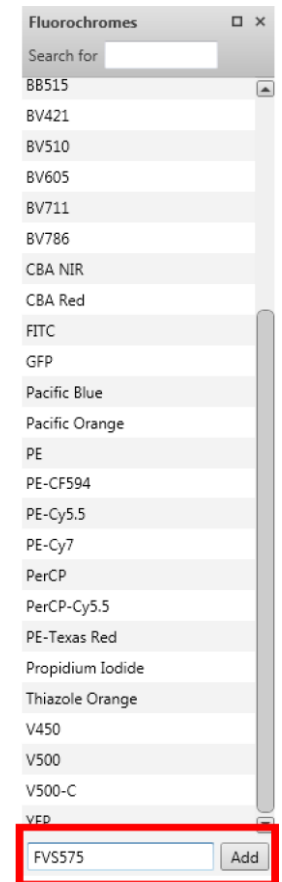
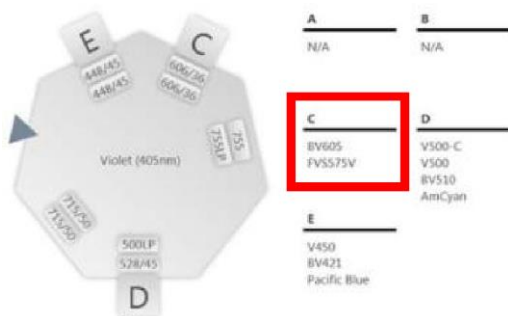
不管您選擇哪一個，您都必須先完成下列工作項目。完成這些工作後繼續您所選擇的實驗室作法。

- 新增第 168 頁的螢光染料至組態。
- 新增第 169 頁的標示至資料庫。
- 新增第 170 頁的試劑至資料庫。

練習：新增螢光染料至組態

此模板包含存活能力染料，BD Horizon™ 可固定的存活能力染料 575（FVS575）不屬於 BD 預設組態。在這項練習中，您將新增 FVS575 至組態。

- 1 在 **Setup & QC workspace** 內，點選 **Configurations** 索引標籤。
- 2 確認已經選擇 BD 預設組態 - 4 藍、3 紅、3 紫。
- 3 在 **Fluorochromes** 模板最下方，打入 **FVS575**，然後點選 **Add**。
螢光染料新增至 **User Fluorochromes** 下方。
- 4 新增 FVS575 至組態。
 - a 點選紫雷射多邊形兩次，放大視圖。
 - b 從 **Fluorochromes** 模板選擇 **FVS575** 並將之拖曳至偵測裝置 C 的螢光染料清單。
 - c 完成時點選 **Return to Overview**。



練習：新增標示至資料庫

這項練習的用意在於將 CD45RA、CD45RO 以及存活能力標示新增至資料庫。該標示成為資料庫一部分後，所有使用者均可使用。

- 1 在資料庫內，選擇 **Labels**。
- 2 點選 **Add**。
- 3 在 **User-Defined Label_001** 欄位內輸入 CD45RA。
該標示現已存入資料庫，所有使用者均可使用。
- 4 欲新增 **CD45RO** 和 **存活能力** 作為標示時，請重複步驟 2 和 3。

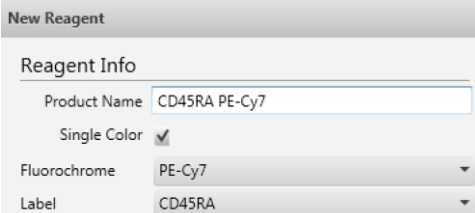
CD117	BD
FMC-7	BD
User-Defined Label_001	FACSuite Student

練習：新增 Reagent 至 Library

在這項練習中，您必須新增 CD45RA PE- Cy7 試劑至資料庫。因為 PE-Cy7 是一種連續染料，所以試劑會有批次機率的差異。若要取得最精準的補償數值，您需要使用批次專屬的補償。因此在您開始建立參考設定值前，您的試劑必須從資料庫內選取。

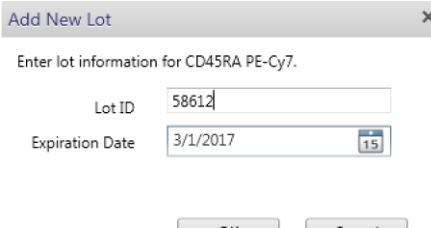
- 1 在資料庫內，點選兩次 **Beads and Reagents**，然後選擇 **Reagents**。
- 2 點選 **Add Reagents**。
- 3 將試劑資訊新增至圖示的 **New Reagent** 模板內。
- 4 點選 **Done**。
- 5 點選 **Add Lot**。
- 6 在 **Add New Lot** 對話方塊內，輸入任何 5 位數的批次編號，然後選擇任何有效日期。
- 7 點選 **OK**。

試劑已新增至資料庫。



The 'New Reagent' dialog box contains the following fields:

Reagent Info	
Product Name	CD45RA PE-Cy7
Single Color	☒
Fluorochrome	PE-Cy7
Label	CD45RA



The 'Add New Lot' dialog box contains the following fields:

Enter lot information for CD45RA PE-Cy7.

Lot ID	58612
Expiration Date	3/1/2017

Buttons: OK, Cancel

第 1 個選擇：新增螢光染料

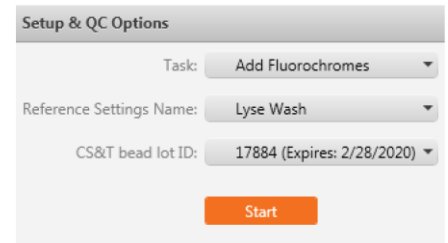
在這項練習中，您將新增螢光染料至裂解清洗設定值。還記得 **Add Fluorochrome** 的工作只是將溢出欄位新增至參考設定值嗎？為了針對這項練習採用的模板設定值最佳化，您必須建立試管設定值。這個過程會將各個螢光染料專屬的 TTV 新增至試管設定值。

重要 新增螢光染料前，執行性能 QC。

新增螢光染料至裂解清洗設定值

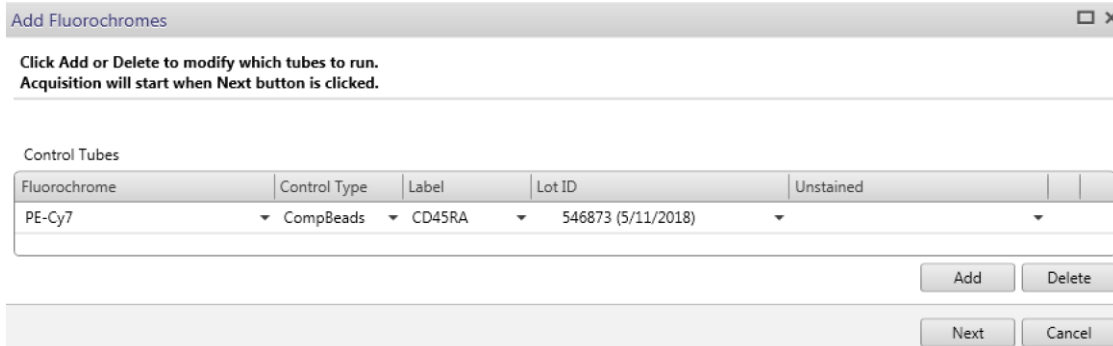
- 1 請瀏覽至 **Setup & QC** 工作區。
- 2 在 **Setup & QC Options** 模板內的 **Task** 功能表上，選擇 **Add Fluorochromes**。
- 3 選擇 **Lyse Wash** 參考設定值以及目前的 CS&T 微球批次編號。
- 4 點選 **Start**。
- 5 在 **Add Fluorochromes** 對話方塊內，點選 **Add**。
- 6 進行下列挑選。
 - 螢光染料：PE-Cy7
 - 控制類型*：CompBeads
 - 標示：CD45RA

批次編號會在您挑選標籤時自動補上。確認該批次編號是否正確。



The 'Setup & QC Options' dialog box shows the following configuration:

- Task:** Add Fluorochromes
- Reference Settings Name:** Lyse Wash
- CS&T bead lot ID:** 17884 (Expires: 2/28/2020)
- Start** button is highlighted in orange.



The 'Add Fluorochromes' dialog box contains the following information:

Click Add or Delete to modify which tubes to run.
Acquisition will start when Next button is clicked.

Fluorochrome	Control Type	Label	Lot ID	Unstained
PE-Cy7	CompBeads	CD45RA	546873 (5/11/2018)	

Buttons: Add, Delete, Next, Cancel.

- 7 新增 BV421 和 BV510 時請重複步驟 6，但是讓標示維持 **Generic**。
- 8 點選 **Next**。
- 9 將 CS&T 微球試管裝填在手動管埠上。
- 10 出現提示時，裝填剩餘的試管。

* 如需更多資訊，請參考第 197 頁的「選擇對照類型和未染選擇」。

11 點選 **Finish**。

將批次專屬的連續染料測得的溢出值新增至參考設定值中。

12 （選擇性）檢視資料庫內的 **Spillover Values** 索引標籤。

將設定值最佳化

1 開啟新的實驗並將之重新命名為 *Settings Practice_<您的姓名縮寫>*。

2 點選兩次 **Tube_001**，顯示試管屬性。

3 確認已選擇裂解清洗設定值。

4 在 **Parameters** 索引標籤內，進行下列變更。

- APC-Cy7 → APC-H7
- V450 → BV421
- V500-C → BV510
- BV605 → FVS575

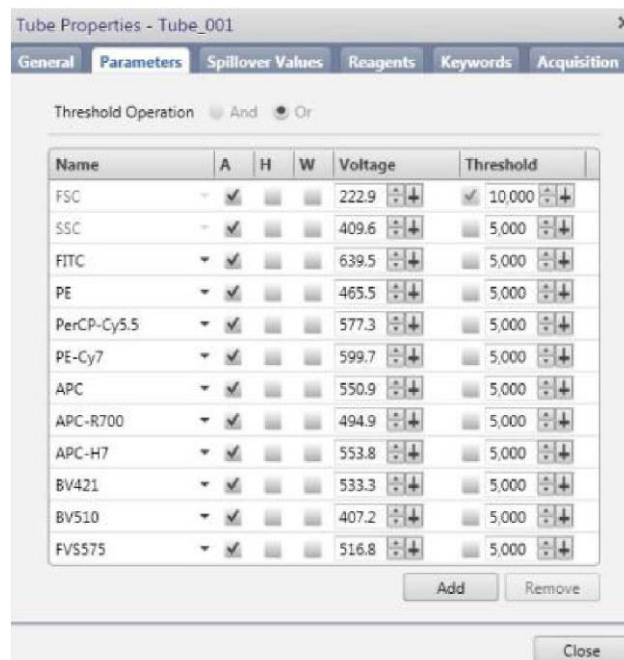
5 自參數清單移除 APC-R700。

6 在 **Reagents** 索引標籤內，輸入所有試劑的標示。

標示	螢光染料
CD3	FITC
CD16+56	PE
CD45	PerCP-Cy5.5
CD45RA	PE-Cy7
CD19	APC
CD8	APC-H7
CD45RO	BV421
CD4	BV510
存活能力	FVS575

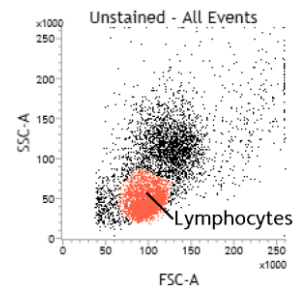
7 選擇 PE-Cy7 和 APC-H7 的批次編號。

8 點選 **Close**。



9 將淋巴球的設定值最佳化。

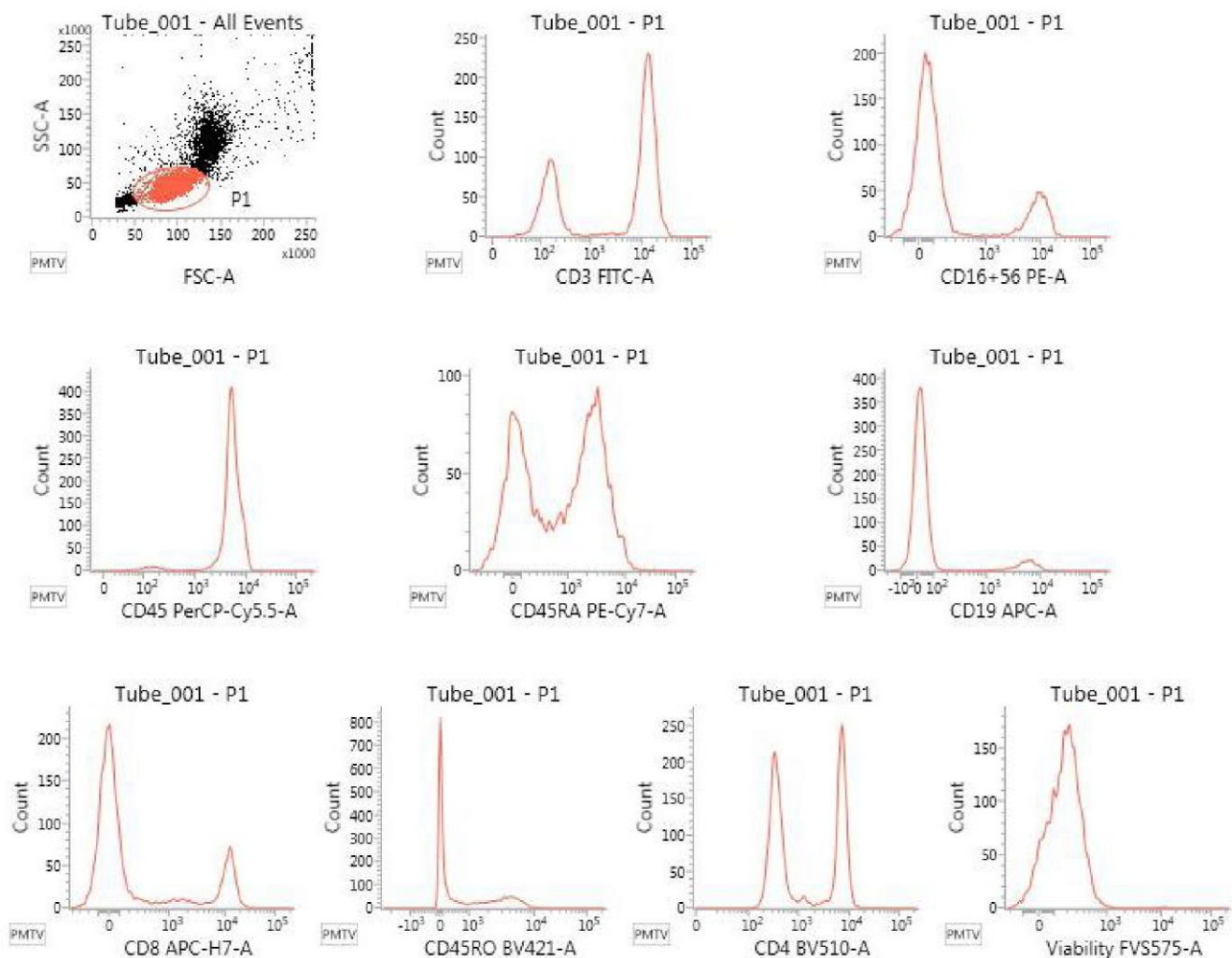
- 將未染試管裝填在手動裝填埠上，然後點選 **Preview**。
- 調整 FSC 和 SSC，以便將淋巴球放在量表上。
- 調整閾值，以排除大部分的瑣碎物。
- 點選 **Stop**，然後取下未染試管。



10 將 PMTV 最佳化。

- 在工作表上建立九個直方圖，檢驗模板上每個螢光染料各一個。相關範例，請參考圖 12-2。
- 將混合的試管裝填在手動裝填埠上，然後點選 **Preview**。
- 在淋巴球周圍勾勒出一個閘門，然後所有直方圖均僅顯示 P1。
- 需要時，請調整 PMTV，以確保所有陽性總數均合規。
- 點選 **Stop**，然後取下混合的試管。

圖 12-1 最佳化工作表



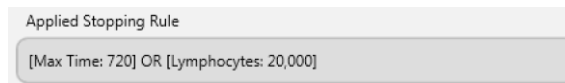
建立試管設定值

祕訣 流速屬於試管設定值的一部分。開始建立試管設定值前，請確保流速適用於取得數據。

- 1 針對 **Tube_001** 點選右鍵，然後選擇 **Create Tube Settings**。
- 2 遵照提示建立設定值。
- 3 將試管設定值命名為 *IPAssay_<您的姓名縮寫>*，然後點選 **Finish**。

取得數據

- 1 顯示 **Tube_001** 的試管屬性。
- 2 將試管重新命名為 *Unstained*。
- 3 新增取得數據。



- 4 關閉 **Tube Properties** 對話方塊。
- 5 在 **Data Sources** 模板內，選擇 **Next**，然後將試管重新命名為 *Mixed*。
- 6 同時取得兩支試管。

分析數據並建立試驗

繼續至第 180 頁，繼續該實驗室作法。

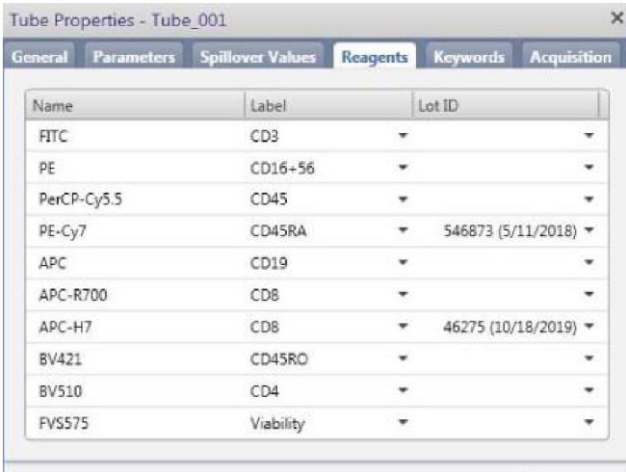
第 2 個選擇：建立參考設定值

在這項練習中，您必須將 PMTV 最佳化並測量您免疫分型檢驗所需的溢出值。這些最佳化的設定值之後會儲存在資料庫內，作為使用者定義的參考設定值。

重要 建立參考設定值前，執行性能 QC。

將設定值最佳化

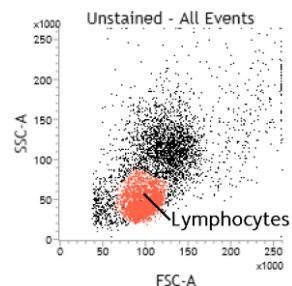
- 1 開啟新的實驗並將之重新命名為 *Settings Practice_<您的姓名縮寫>*。
- 2 點選兩次 **Tube_001**，顯示試管屬性。
- 3 確認已選擇裂解清洗設定值。
- 4 在 **Parameters** 索引標籤內，進行下列變更。
 - APC-Cy7 —————> APC-H7
 - V450 —————> BV421
 - V500-C —————> BV510
 - BV605 —————> FVS575
- 5 在 **Reagents** 索引標籤內，輸入所有試劑的標示，加上 PE-Cy7 和 APC-H7 的批次編號。
- 6 點選 **Close**。
- 7 為何 APC-R700 即使不在檢驗模板內，還是能夠留在參數清單上？



Tube Properties - Tube_001		
General Parameters Spillover Values Reagents Keywords Acquisition		
Name	Label	Lot ID
FITC	CD3	
PE	CD16+56	
PerCP-Cy5.5	CD45	
PE-Cy7	CD45RA	546873 (5/11/2018)
APC	CD19	
APC-R700	CD8	
APC-H7	CD8	46275 (10/18/2019)
BV421	CD45RO	
BV510	CD4	
FVS575	Viability	

8 將淋巴球的設定值最佳化。

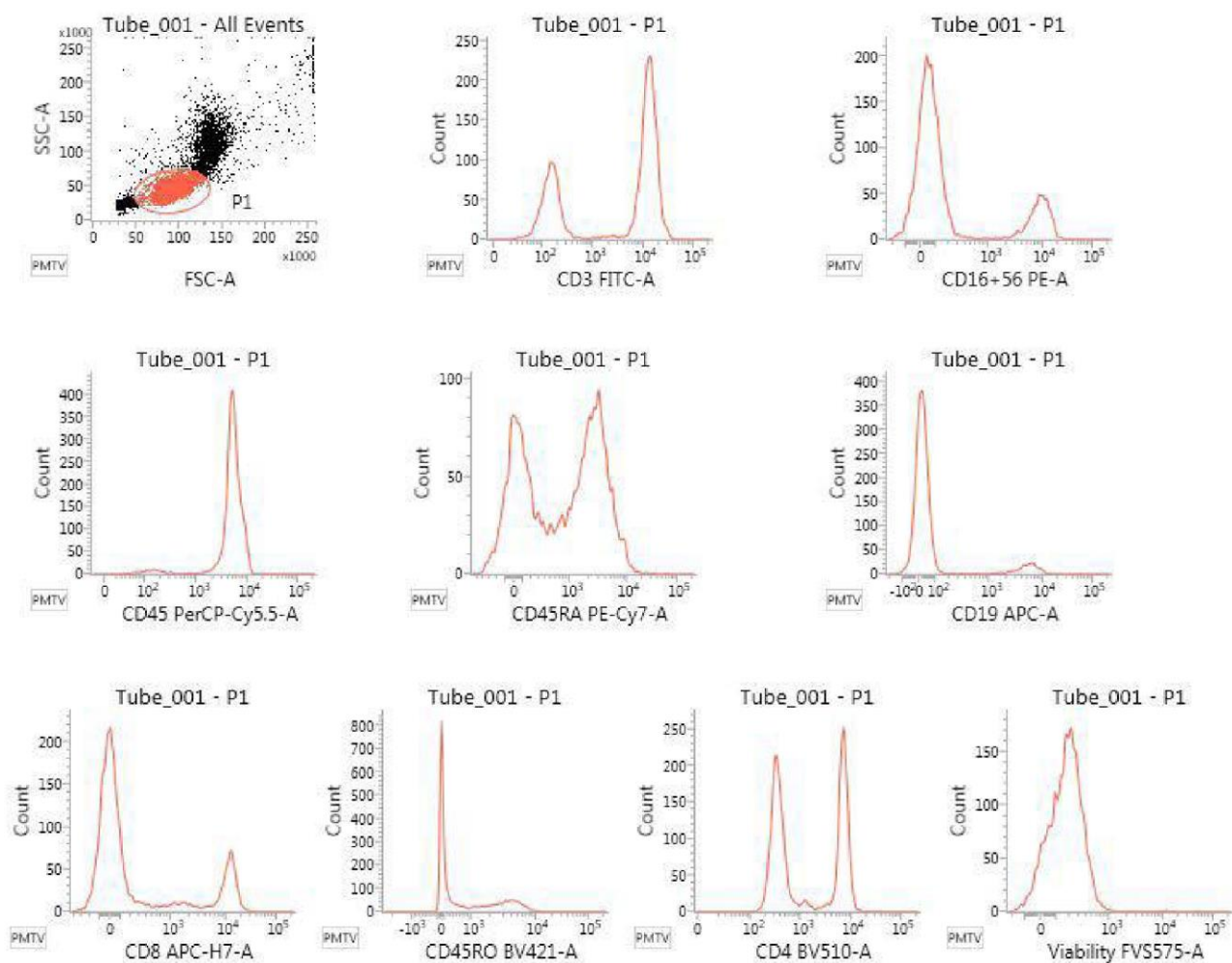
- 將未染試管裝填在手動裝填埠上，然後點選 **Preview**。
- 調整 FSC 和 SSC，以便將淋巴球放在量表上。
- 調整閾值，以排除大部分的瑣碎物。
- 點選 **Stop**，然後取下未染試管。



9 將 PMTV 最佳化。

- 在工作表上建立九個直方圖，檢驗模板上每個螢光染料各一個。相關範例，請參考圖 12-2。
- 將混合的試管裝填在手動裝填埠上，然後點選 **Preview**。
- 在淋巴球周圍勾勒出一個閘門，然後所有直方圖均僅顯示 P1。
- 需要時，請調整 PMTV，以確保所有陽性總數均合規。
- 點選 **Stop**，然後取下混合的試管。

圖 12-2 最佳化工作表



建立參考設定值

祕訣 流速屬於試管設定值的一部分。開始建立參考設定值前，請確保流速適用於取得數據。

- 1 針對 **Tube_001** 點選右鍵，然後選擇 **Create Reference Settings**。
- 2 在 **Create Reference Settings** 對話方塊內：
 - a 確認 **CS&T Bead Lot ID** 與您針對性能 QC 所使用的批次相符。
 - b 選擇 APC-R700，然後點選 **Delete**。
 - c 針對所有剩餘的螢光染料，將 **Control Type*** 變成 **CompBeads**。
 - d 分別將 PE-Cy7 和 APC-H7 的 **Label** 變成 **CD45RA** 和 **CD8**。
 - e 確認 PE-Cy7 和 APC-H7 的 **Lot ID**。
 - f 將 BV421 和 BV510 新增至 **Control Tubes** 清單。點選 **Add**。
 - g 針對新增的螢光染料選擇 BV421 和 CompBeads。
 - h 點選 **Add**，然後針對 BV510 重複步驟 g。
 - i 點選 **Next**。

Create Reference Settings

Select the controls and lot IDs that will be used to create Reference Settings.
Click Add or Delete to modify which tubes to run.
Acquisition will start when Next button is clicked.

CS&T Beads

CS&T Bead Lot ID: 17884 (Expires: 2/28/2020)

Control Tubes

Fluorochrome	Control Type	Label	Lot ID	Unstained
FITC	CompBeads	Generic		
PE	CompBeads	Generic		
PerCP-Cy5.5	CompBeads	Generic		
PE-Cy7	CompBeads	CD45RA	546873 (5/11/2018)	
APC	CompBeads	Generic		
APC-H7	CompBeads	CD8	46275 (10/18/2019)	
BV421	CompBeads	Generic		
BV510	CompBeads	Generic		

Add Delete

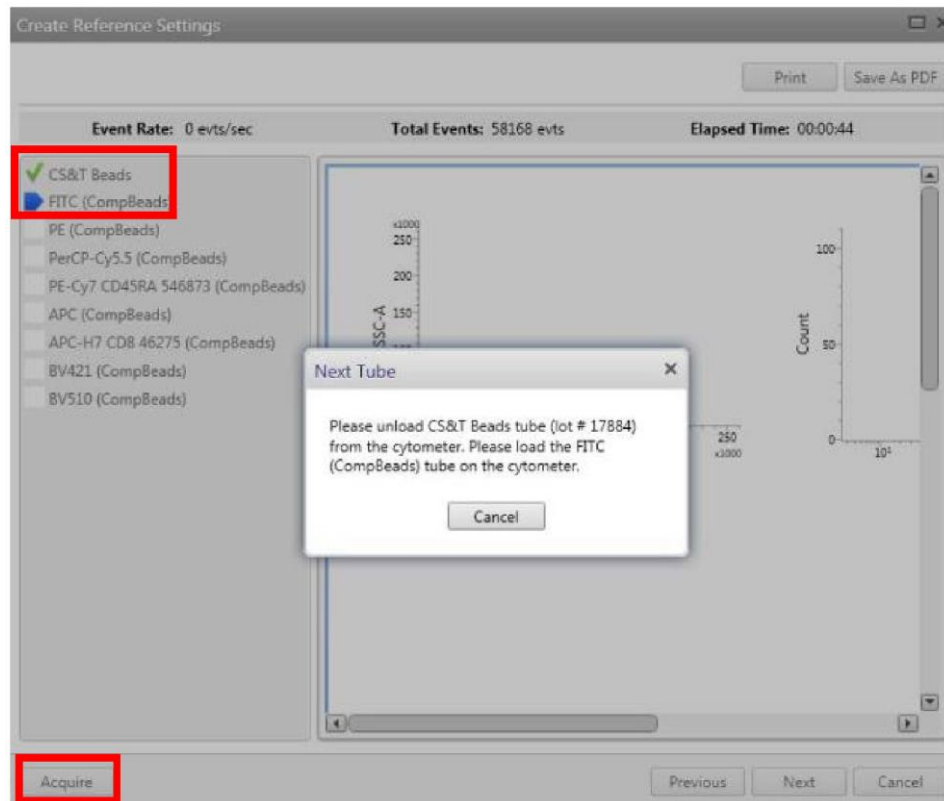
Next Cancel

* 如需更多資訊，請參考第 197 頁的「選擇對照類型和未染選擇」。

3 雖然 APC-R700 留在參數清單內，但是您不需要測量溢出值。然而，APC-R700 的溢出值依然存在。從哪裡來？

4 將 CS&T 試管裝填在手動管埠上。

CS&T 試管完成取得後，其在試管清單上的名稱旁邊會出現綠色的勾選記號。



5 繼續裝填剩餘的單色對照染料。取得所有試管後，點選 **Next**。

6 將參考設定值命名為 *IP Assay_<您的姓名縮寫>*。

7 點選 **Finish**。

參考設定值現已儲存在資料庫內，將在 60 天後失效。

8 60 天後您必須執行哪一項 **Setup & QC** 工作，而且需要哪些樣本才能完成該工作？

檢視參考設定值

- 1 在瀏覽列內，點選 **Library**。
- 2 點選兩次 **Tube Settings**，然後選擇 **User-defined**。
- 3 選擇您的 IP Assay 參考設定值。
- 4 （選擇性）列印設定值與溢出值。

取得數據

- 1 需要時，返回您的 Settings Practice 實驗。
- 2 顯示 Tube_001 的試管屬性。
- 3 將試管重新命名為 *Unstained*。
- 4 新增取得數據。



- 5 關閉 **Tube Properties** 對話方塊。
- 6 在 **Data Sources** 模板內，選擇 **Next**，然後將試管重新命名為 *Mixed*。
- 7 取得所有試管。

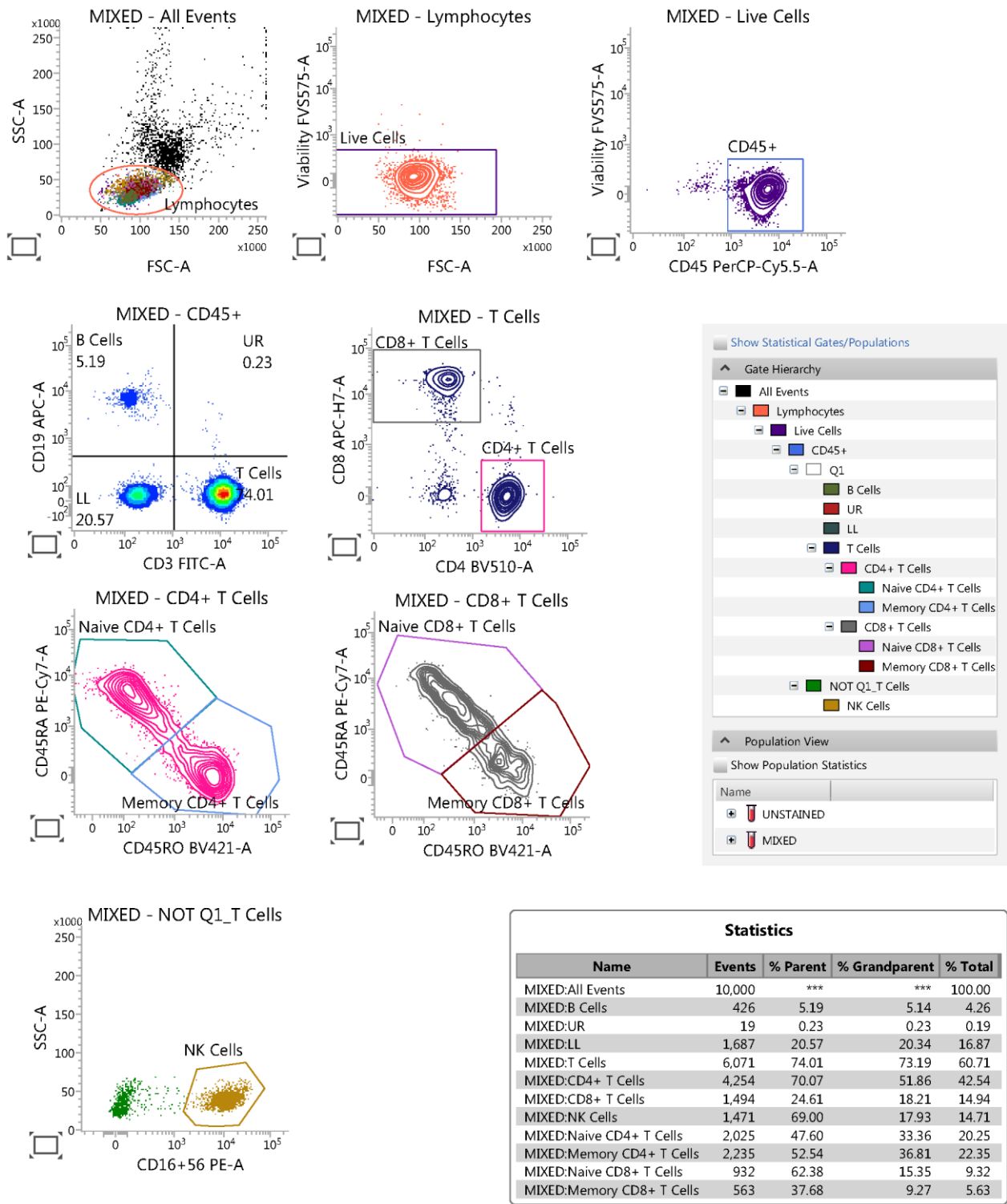
練習：分析數據並建立試驗

在這項練習中，您必須分析未染和混合（9 色）的試管，然後建立試驗。

分析數據

- 1 新增報告至實驗並將之重新命名為 *Analysis* 。
- 2 建立圖表和統計數字，和第 181 頁的圖 12-3 所示類似。
- 3 有百分之幾的 CD4+ T 細胞是...
無反應（CD45RA+）？ _____
有記憶（CD45RO+）？ _____
- 4 有百分之幾的 CD8+ T 細胞是...
無反應（CD45RA+）？ _____
有記憶（CD45RO+）？ _____
- 5 有百分之幾的 CD45+ 細胞是 B 細胞？ _____

圖 12-3 分析報告



建立試驗並確認屬性

- 1 選擇 **File > Create Assay**。
- 2 將試驗命名為 **9-Color IP_<您的姓名縮寫>**。
- 3 點選 **OK**。
- 4 在資料庫內，選擇 **Assays > User-Defined**。
- 5 選擇您的 9-Color IP 試驗。
- 6 點選 **Assign Lot ID** 索引標籤。
- 7 確認 CD45RA 和 CD8 有分配到專屬的批次編號。

在您新增 CD45RA PE-Cy7 和 CD8 APC-H7 批次時，您可以在這邊透過編輯屬性以及選擇 **Assign Lot** 分配相關批次。

9-Color IP_HP UD Edit

General Export Results Reports Send to LIS Assign Lot ID

Assign default Lot ID to use lot-specific compensation for the tube.

	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	BV421	BV510	FVS575
	Assign Lot	Assign Lot	Assign Lot	Assign Lot	Assign Lot	Assign Lot	Assign Lot	Assign Lot	Assign Lot
Unstained	CD3 Generic	CD16+56 Generic	CD45 Generic	CD45RA Lot 546873	CD19 Generic	CD8 Lot 46275	CD45RO Generic	CD4 Generic	Viability Generic

- 8 修飾任何其他試驗屬性，請參考第 115 頁的「編輯試驗屬性」。

練習：更多設定值作法

第 1 部分

建立新的實驗並將之命名為 **Scenario 2**。此實驗需要兩支連結 LW 設定值的試管。在 Tube_001，將 PerCP-Cy5.5 變更為 PerCP。在 Tube_002，請勿變更任何參數。

- 1 兩支試管的所有參數是否都有補償？若有，為什麼？

- 2 軟體允許您建立試驗嗎？為何允許或為何不允許？

第 2 部分

針對相同實驗，將 Tube_002 的 FITC 變更為 Alexa 488。

- 1 兩支試管的所有參數是否都有補償？若無，為何沒有？

- 2 軟體允許您建立試驗嗎？為何允許或為何不允許？

- 3 您如何能夠新增 Alexa 488 的補償？

第 3 部分

針對相同實驗，將 Tube_002 的 Alexa 488 變更為 BB515。

- 1** 兩支試管的所有參數是否都有補償？若無，為何沒有？

- 2** 軟體允許您建立試驗嗎？若無，為何沒有？

- 3** 您如何能夠解決問題 1 和 2？

附件 A

檢視問題

此附件包含檢視問題。

第 1 天檢視

1 電源開啟時細胞分析儀的電源按鈕呈什麼顏色？

2 您可以在 BD FACSuite 軟體視窗內的兩個地方找到有關細胞分析儀連接狀態的資訊。這些地方是？

3 如果手動管埠 LED 狀態指示燈呈現實心綠，您可以裝填試管。

T F

4 執行需要低 CV 的實驗（如：DNA 細胞週期分析）時，您會選擇的流速是？

- a 高
- b 中
- c 低
- d 高靈敏度

5 系統未使用時應將 DI 水試管裝填在手動管埠上。

T F

6 流體狀態指示燈呈紅色時代表什麼意思，而您又該採取怎樣的行動？

7 如果您在偏好方面選擇了程式設定前啟用細胞分析儀，則 BD FACSuite 軟體必須維持運轉狀態，以便完成自動啟用過程。

T F

8 建議您多常執行特徵化 QC？

9 一開始設置時，需要先完成什麼，您才能執行 CQC？

10 更新參考設定值的用意是？

11 可以使用哪些微球進行補償？

- a** BD Compbeads
- b** CS&T 微球
- c** FC 微球
- d** 校準微球
- e** A 和 C 都可

12 溢出和光譜重疊的差別在哪裡？

13 列出兩種 BD Compbeads 適合作為補償對照的情境。

第 2 天檢視

1 性能 QC 的三個通過／失敗條件為何？

2 應每天在取得數據前執行性能 QC。

T F

3 哪一個 Setup 和 QC 工作可以重新計算裂解清洗和裂解不清洗的設定值？

4 假設已經執行 PQC，請依序將下列建立試管設定值的步驟編號。

- _____ 執行 CS&T 微球。
- _____ 調整閾值和 PMT 電壓。
- _____ 建立新的實驗。
- _____ 針對試管點選右鍵，然後選擇 Create Tube Settings。
- _____ 預覽包含相關細胞的試管。

5 在工作清單內，*Not Ready* 的狀態代表什麼意思？

6 哪一個工作清單項目無法在取得後自動匯出？

- a 結果
- b 工作清單
- c 輸入執行配套
- d FCS 檔案電子報告
- e 報告

7 表示下列功能是否適用工作表（W）、報告（R）或兩者均適用。

_____ 包含圖表、閘門和統計數字

_____ 可能包括頁首與頁尾

_____ 可自動匯出

_____ 和實驗有關

_____ 和試驗有關

_____ 可顯示電子簽章欄

8 哪兩種圖表會彼此重疊？

9 針對下列情境，您應該使用實驗或試驗？

針對不在場的取得，您會想要使用來自 96 孔槽盤的樣本執行。

您會分多天使用同一組抗體或染料染色的試管執行。

針對新的樣本類型您會想要設置制式分析。

10 每日清潔和關閉可以是工作清單上的項目。

T

F

11 將各名詞（左欄）與其定義（右欄）配對。

___ 工作清單

1 應執行的一系列工作，包括試驗和流體指令。

___ 試驗

2 用以取得並分析數據的客製化要素群。

___ 實驗

3 可在工作清單上執行的一組試管、工作表和報告。

最後檢視

- 1 將手動管埠的 LED 狀態指示燈情況（左欄）與其狀態（右欄）配對。

_____ 恆定綠色	A、進樣針正在沖洗中，請勿裝填試管
_____ 閃琥珀色	B、試管已裝填
_____ 熄滅	C、已準備好接收試管

- 2 執行 **Assay and Tube Settings Setup** 的用意為何以及應多久執行一次？

- 3 試管設定值包含溢出值。

T F

- 4 運轉裝填裝置時，必須將裝有水的試管放在手動管埠上。

T F

- 5 您如何製作系統健檢報告？

- 6 您正在執行一項包含 2 支試管（同時包括 CD8 PE-Cy7 和 CD4 PE-Cy7）的試驗。您已經利用新增螢光染料程序建立了批次專屬的補償。在實驗中，您如何確保各試管應用正確的補償值？

- 7 CS&T 微球批次轉移工作應在您現有的微球批次執行結束後執行。

T F

- 8 CS&T 微球批次轉移工作的用意是？

- 9 哪一類型的設定值包含了測得的溢出值？_____

10 在計算出來的溢出值內建立試管設定值。

T **F**

11 下列何者在您新增螢光染料至參考設定值時不需要？

- a** 新增螢光染料至組態。
- b** 建立試驗。
- c** 新增螢光染料至資料庫。
- d** 確認該參數的 TTV 在參考設定值內。

12 BD FACSuite 軟體內，您可上何處找到執行 BD 試驗的說明？

- a** 參考選單
- b** 檔案選單
- c** 協助選單

13 您想要再次使用之前建立的實驗。您實驗中的試管已與使用者定義的參考設定值連結。您需要執行哪些步驟才能確保根據今日的儀器性能更新設定值？

14 列出兩個您應新增螢光染料至參考設定值的原因。

15 建立試管設定值時，所有電壓均儲存在資料庫內。

T **F**

16 裂解清洗和裂解不清洗的設定值是否已失效應於何處看出？

17 只有管理員能夠執行特徵化 QC。

T **F**

18 在您新增螢光染料時需要新的組態。

T **F**

19 更換鞘液濾網後應執行哪個流體指令？

- a 排水和補充流量槽
- b 洗淨鞘液濾網
- c 清潔光析槽
- d SIT 沖洗

20 您可上何處找尋更換樣本線的程序？

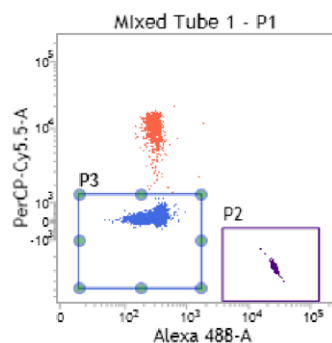
21 下列何者無法轉移至另一個 BD FACSLyric 系統？

- a 試驗
- b 試管設定值
- c 調整過的 PMT 電壓
- d 實驗

22 下列數據已正確補償。

T

F



Statistics	
Name	PerCP-Cy5.5-A Median
Mixed Tube 1:P2	-2,783
Mixed Tube 1:P3	118

附件 B

其他須知

本附件包含下列相關資訊：

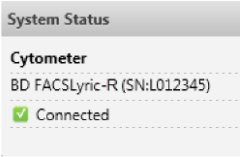
- CS&T 微球製備
- BD™ FC 微球
- 選擇對照類型和未染者
- 其他分析功能
- 標準化
- 修飾試驗

CS&T 微球製備

重要 根據您儀器的規範狀態，選擇正確版本的 CS&T 微球。遵照這些步驟找到正確的零件編號。

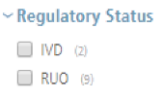
判定規範狀態

- 1 開啟 BD FACSuite 軟體。
- 2 在主頁面上，檢查 **System Status**。如果您的細胞分析儀的名稱結尾是「-R」，您的系統只能進行研究用途。



訂購 CS&T 微球

- 1 前往 bdbiosciences.com.
- 2 在搜尋欄位內打入 CS&T。
- 3 根據規範狀態篩選結果。



根據軟體選擇微球

BD FACSuite 軟體	BD FACSuite 臨床軟體
BD™ CS&T RUO 微球（BD CS&T RUO 微球）	BD™ CS&T 微球（BD CS&T 微球）
BD™ CS&T 微球（BD CS&T 微球）	

準備 CS&T 微球

請諮詢您講師的意見，以決定您某天將於課堂上執行的工作。請根據下表準備微球。

工作	BD FACSTFlow™ 溶液最少量（毫升）	微球（滴數）
特徵化 QC	1.0	4
性能 QC	0.5	2
試驗與試管設定值設置	0.5	2
建立試管設定值	0.5	2
建立參考設定值	0.5	2
新增螢光染料至參考設定值	0.5	2
更新參考設定值	0.5	2

若不立即使用，請將稀釋後的微球以 2°C 至 8°C 存放在黑暗處。稀釋後，避免光線照射，微球在 2°C 至 8°C 下可維持穩定達 24 小時或是在 15°C 至 25°C 下可達 8 小時。

重要 請避免稀釋後的微球接觸光線。部分用以製造微球的染料對光極度敏感。微球暴露在光線下，可能會改變螢光強度。

BD™ FC 微球

視您的組態而定，您必須有不同的 BD FC 微球庫存，才能維持您的裂解清洗和裂解不清洗的參考設定值。下表列出的是根據組態所需的微球。

表 B-1 4 和 6 色 IVD/RUO 組態

名稱	狀態
BD™ FC 微球 7 色套組	IVD

表 B-2 8 和 10 色 IVD/RUO 組態

名稱	狀態
BD™ FC 微球 7 色套組	IVD
BD™ FC 微球 BV605	RUO
BD™ FC 微球 APC-R700	RUO
BD™ FC 微球 APC-H7	RUO
BD™ FC 微球 V500-C	RUO
BD™ FC 微球 V450	RUO

表 B-3 12 色 RUO 組態

名稱	狀態
BD™ FC 微球 FITC	RUO
BD™ FC 微球 PE	RUO
BD™ FC 微球 APC	RUO
BD™ FC 微球 PerCP-Cy5.5	RUO
BD™ FC 微球 PE-Cy7	RUO
BD™ FC 微球 APC-Cy7	RUO
BD™ FC 微球 PerCP	RUO
BD™ FC 微球 APC-H7	RUO
BD™ FC 微球 V500-C	RUO
BD™ FC 微球 V450	RUO
BD™ FC 微球 BV605	RUO
BD™ FC 微球 APC-R700	RUO
BD™ FC 微球 RUO-BV711	RUO
BD™ FC 微球 RUO-BV786	RUO

選擇對照類型和未染者

建立參考設定值或是新增螢光染料至參考設定值時，您需要定義您將作為對照組使用的試管。本章節將提供有關可用的選擇等補充資訊，特別是 **Control Type** 和 **Unstained** 欄位的資訊。

Add Fluorochromes

Click Add or Delete to modify which tubes to run.
Acquisition will start when Next button is clicked.

Control Tubes

Fluorochrome	Control Type	Label	Lot ID	Unstained
PE-Cy7	CompBeads	CD4	67851 (11/10/2020)	
APC-H7	CompBeads	CD8	46275 (10/18/2019)	

Add

Delete

Next

Cancel

選擇對照類型

有三種對照類型可選：FC 微球（**FC Beads**）、螢光染料對照組（**FC**）以及 BD CompBead 顆粒（**CompBeads**）。

FC 微球

讓軟體能夠判定溢出值的螢光微球。每一支試管混合了正負微球。

FC

可以是細胞、微球或是任何其他東西（例如：DNA 染色所需的細胞核）的使用者定義之螢光對照顆粒。可能會有另外的未染色試管或是染色試管內包含未染色的試管。這在針對 FC 微球或 CompBeads 以外的特定顆粒進行螢光染料／相關染料染色時很實用。

CompBeads

包含兩種不同的微球，負微球和捕捉微球。這些微球需要以新增至參考設定值的特定螢光染料抗體染色。您可以選擇另外使用未染色的試管或新增負微球至正捕捉微球中。

未染者

選擇未染色總數所在位置。欄位空白時，未染色的對照組和螢光對照組位於相同試管內。該欄位若未染色，則系統會另外提示一個可用於多種螢光染料的未染色試管。該欄位未染 <螢光染料名稱>，則系統會另外提示一個可用於此螢光染料的未染色試管。

其他分析功能

這個章節完成後，您將能夠：

- 建立直方圖重疊。
- 利用表現編輯裝置建立表現。
- 新增頁首與頁尾至報告。

練習：使用其他分析功能

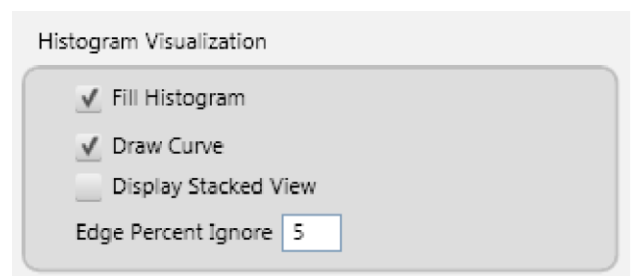
在這項練習中，您會練習使用重疊的直方圖和表現編輯裝置。

新增報告至實驗

- 1 在 **Experiment** 工作區內，開啟 6 色刺激實驗。
- 2 在 **Worksheet** 工具列上，點選 **Add Report** 按鈕 ()。
- 3 點選 **Report_002** 索引標籤，並將之重新命名為 *摘要報告*。
- 4 將運轉指針設定在未刺激過的試管旁邊。
- 5 在報告上建立一個直方圖。
- 6 將直方圖的 X 軸改成 CD69 PE。
- 7 針對直方圖點選右鍵，然後選擇 **Duplicate**，建立大小相同的第二個圖表。
需要時，將圖表移至工作表上淨空處。
- 8 將第二個直方圖的 X 軸改成 CD154 APC。

建立直方圖重疊

- 1 針對 CD69 PE 直方圖點選右鍵並選擇 **Properties**。
- 2 在 **General** 索引標籤內 **Parent Population** 的下方，選擇 **CD4 T-cells**。
此實驗內的所有工作表和報告均採相同的總數等級。在取得工作表上建立以母數出現的閘門。
- 3 清除 **Run Pointer** 核取方塊並確認顯示 *未刺激過的數據*。
- 4 在 **Histogram** 索引標籤內 **Histogram Visualization** 的下方，選擇 **Fill Histogram** 核取方塊。



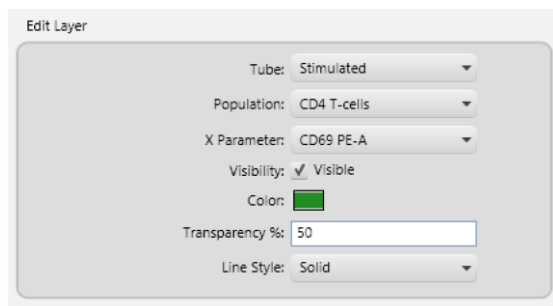
- 5 在 **Overlay** 索引標籤內，於 **Source** 欄位內選擇 *Stimulated*，然後點選 **Add**。

新增刺激過的試管至 **Layers** 下方清單。

- 6 在 **Layers** 下方，選擇 **Stimulated**。

Edit Layer 章節出現在最下方。

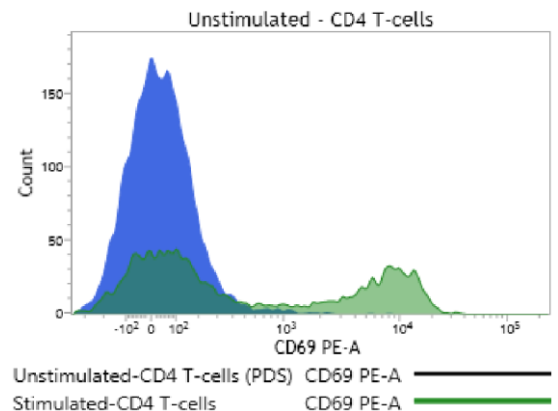
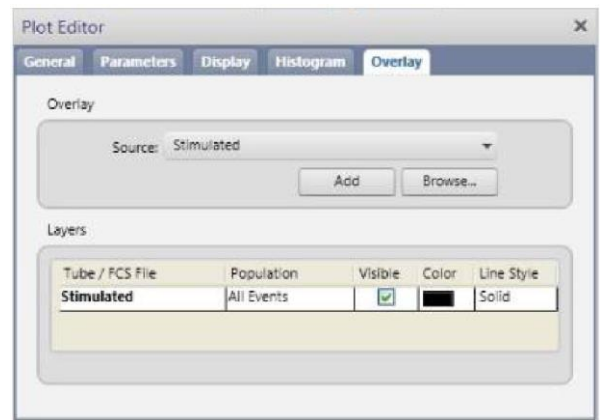
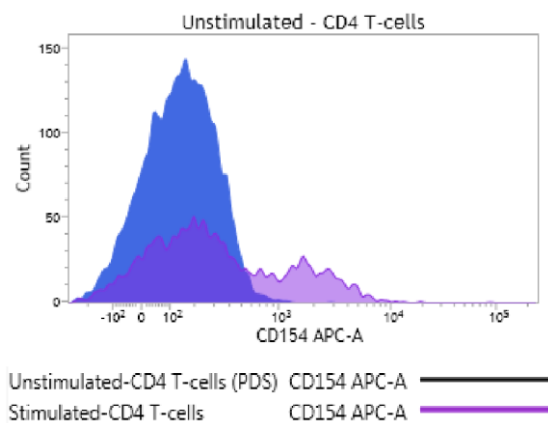
- 7 在 **Edit Layer** 下方，執行下列：
 - a 從 **Population** 功能表上，選擇 **CD4 T-cells**。
 - b 變更顏色。
 - c 於 **Transparency %** 欄位，輸入 **50**。



- 8 關閉 **Plot Editor** 對話方塊。

直方圖現在顯示刺激過的試管第二層。

- 9 在直方圖點選右鍵，然後選擇 **Show Legend > Bottom**。
- 10 針對 CD154 APC 直方圖重複步驟 1 至 9，建立第二個直方圖重疊。



使用表現編輯裝置

您必須建立表現，以判定活化的 CD4 T 細胞百分比。

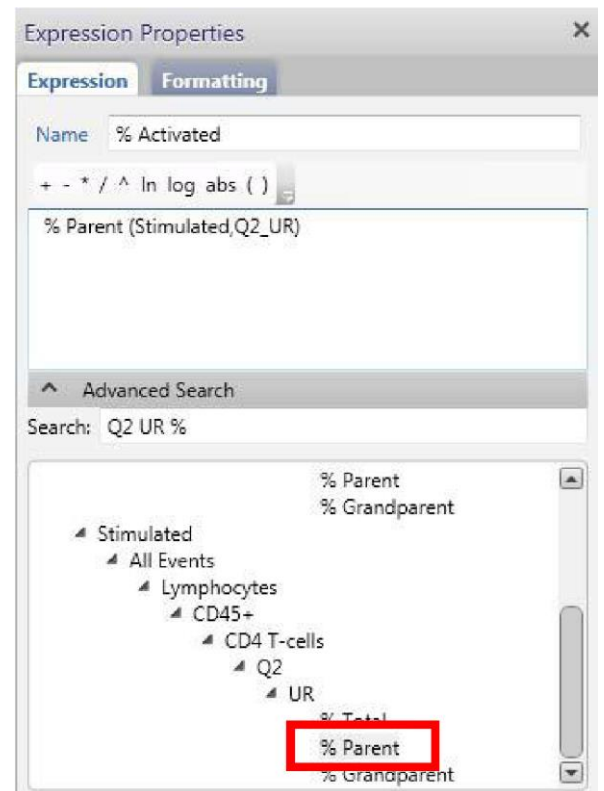
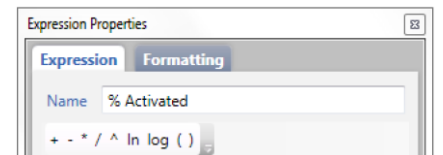
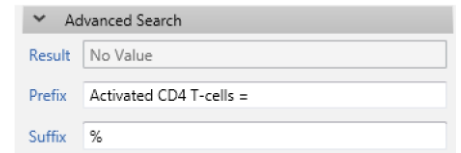
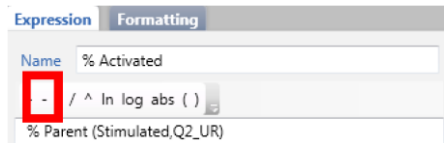
- 1 在 **Worksheet** 工具列上，點選 **Create Expression** 按鈕 ($f(x)$)。
- 2 在報告上拖曳。

Expression Properties 對話方塊開啟。

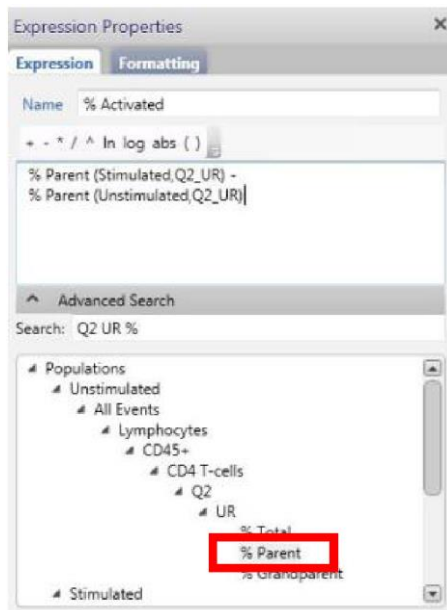
- 3 在 **Name** 欄位內輸入活化%
- 4 在 **Prefix** 欄位內，輸入活化的 CD4 T 細胞 = 並在 **Suffix** 欄位內輸入百分比符號 (%)。
- 5 點選 **Advanced Search** 旁邊的箭頭。

已經在取得工作表上建立閘門和統計數字。您可以使用搜尋功能快速找到正確的統計數字。

- 6 在 **Search** 欄位內輸入 Q2 UR %。
可在右上方第二象限內找到活化的 CD4 T 細胞。
- 7 瀏覽至 Stimulated > Q2 > UR 並點選 **% Parent**。
- 8 在 **Expression** 工具列上，點選 **Subtract** 按鈕。



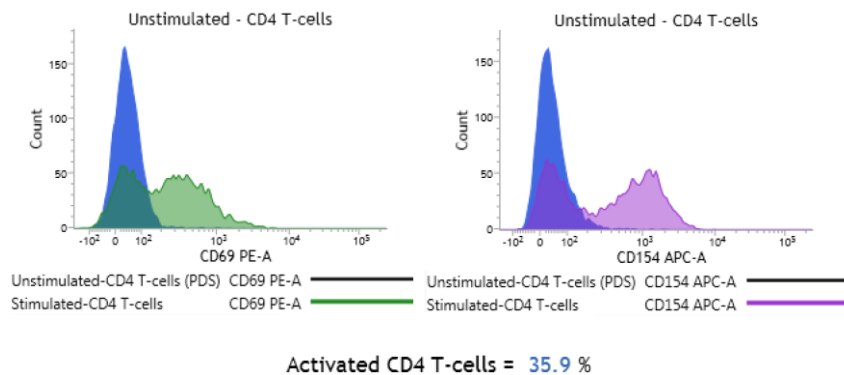
9 瀏覽至 Unstimulated > Q2 > UR 並點選 **% Parent**。



10 點選 **Formatting** 索引標籤並選擇 **18** 作為字形大小。

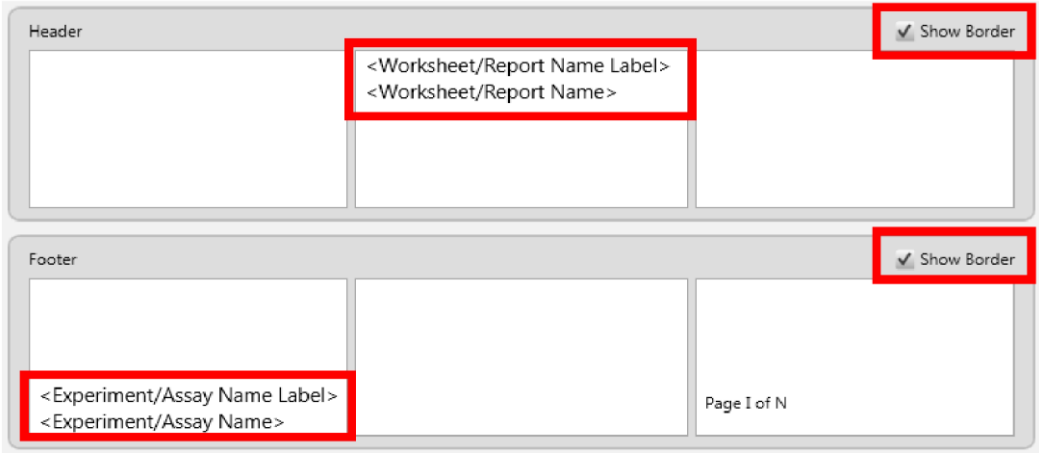
11 關閉 **Expression Properties** 對話方塊。

12 移動表現至報告的淨空位置。



將報告內的頁首與頁尾格式化

- 1 在 **Worksheet** 工具列上，點選 **Header & Footer** 按鈕 ()。
- 2 點選 **center section**，作為 **Header**。
- 3 在左邊的 **Elements** 清單內，點選兩次 **<Worksheet/Report Name>**。
- 4 點選 **left section**，作為 **Footer**。
- 5 在左邊的 **Elements** 清單內，點選兩次 **<Experiment/Assay Name>**。
- 6 頁首與頁尾均點選 **Show Border**。



The screenshot shows the 'Header/Footer' dialog box with two main sections: 'Header' and 'Footer'. Each section has a 'Show Border' checkbox checked. The 'Header' section contains two text boxes: the top one contains '<Worksheet/Report Name Label>' and '<Worksheet/Report Name>', and the bottom one is empty. The 'Footer' section contains two text boxes: the left one contains '<Experiment/Assay Name Label>' and '<Experiment/Assay Name>', and the right one contains 'Page 1 of N'. Red boxes highlight the text boxes in both sections and the 'Show Border' checkboxes.

- 7 點選 **OK**，關閉 **Header/Footer** 對話方塊。
- 8 需要時，重新編排圖表，讓頁首和頁尾顯示在報告上。

標準化

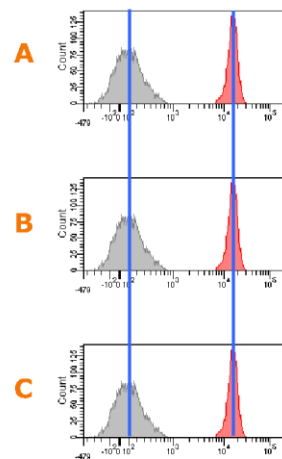
在這項練習中，您必須移轉細胞分析儀之間的試驗並將結果標準化。

Standardization



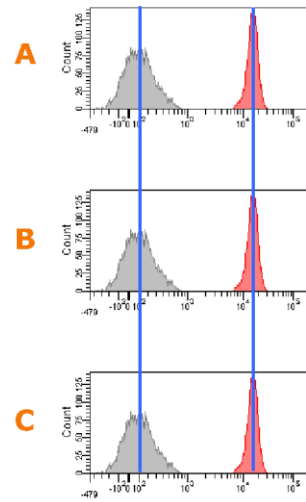
Standardization from Day to Day

Goal: To be able to compare results across multiple days and reduce user-to-user variation.



Standardization Across Cytometers

Goal: To be able to compare results across sites and cytometers.



Standardized Setup with BD FACSuite Software

One Cytometer—Day to Day

- Run performance QC daily.
- Create tube settings for all experiments and assays.
- Run Assay and Tube Settings Setup.

Multiple Cytometers

- Run performance QC on each cytometer.
- Import assays, experiments, or tube settings.
- Run Assay and Tube Settings Setup.



Transferring Assays



1. Run performance QC.
2. Create an assay with tube settings.
3. Export the assay from the library.
4. Import the assay into the library.
5. Run performance QC and assay and tube settings setup.
6. Run the assay.



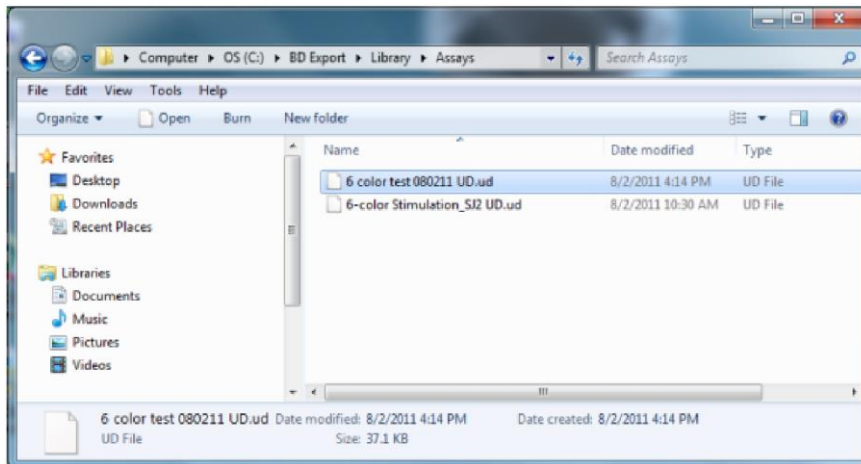
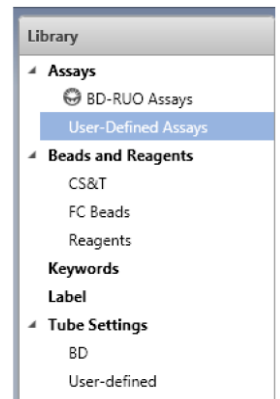
Tips

- Import any reagents from the library as well.
- Verify that you have added all new fluorochromes to the configuration and reference settings.
- You can also import experiments and tube settings on other BD FACSLyric systems.



匯出試驗

- 1 在 **Library** 工作區內，選擇 **Assays > User-Defined Assays**。
- 2 從 **User-Defined Assays** 模板內的清單選擇您的試驗。
- 3 選擇 **File > Export**。
需要時，瀏覽至預設位置：C:\BD Export\Library\Assays。
- 4 點選 **Save**。
- 5 瀏覽至檔案位置並將試驗檔（.ud）轉至 USB 隨身碟或燒錄成 CD。



匯入試驗

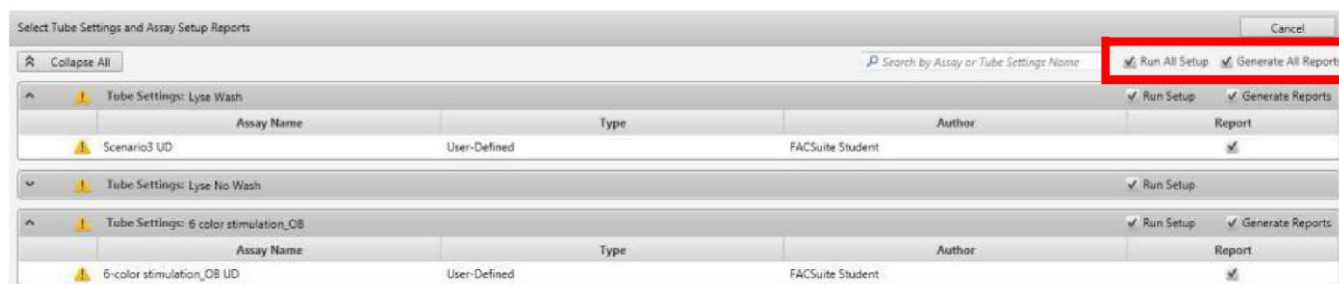
- 1 在不同的細胞分析儀上，瀏覽至資料庫。
- 2 選擇 **Assays>User-Defined Assays**。
- 3 選擇 **File > Import**。
- 4 在您可拆式的儲存媒體上找尋試驗檔位置並點選 **OK**。
新增該試驗至資料庫。

執行試驗與試管設定值設置

匯出試驗後，相關試管設定值也會自動新增至資料庫。但是，試管設定值需要先針對此細胞分析儀更新後才能執行試驗。

- 1 請瀏覽至 **Setup & QC** 工作區。
- 2 選擇 **Assay & Tube Settings Setup**，作為工作。
- 3 點選 **Select**。

4 選擇 **Run All Setup** 和 **Generate All Reports**。



5 點選 **Start**。

6 將 CS&T 微球試管裝填在細胞分析儀上，然後啟動運轉。

7 完成設置工作後，將 CS&T 微球試管卸載，然後裝填 DI 水試管。

執行試驗

1 點選瀏覽列上的首頁圖像，返回首頁。

2 選擇 **Acquire Data in a Worklist**。

新的、空白的工作清單開啟。

3 從 **Task** 清單選擇您的試驗。

4 將樣本編號輸入 **Worklist Entries** 模板內。

5 選擇您的裝填功能（手動或樣本載具）。

若使用裝填裝置，請將樣本載具安裝在裝填裝置上，然後關上門。

6 執行工作清單。

如需有關執行工作清單更詳細的說明，請參考第 6 章和第 7 章。

比較結果

1 列印最後的試驗報告。

2 將您新列印出的數據和之前在原本儀器上取得的數據進行比較。

修飾既有的試驗

建立試驗後，您可以在實驗工作區內將之開啟進行修飾。您也可以在此實驗工作區內修飾 BD 定義的試驗。

1 在 **Experiment 工作區** 內，選擇 **Manage Experiments** 索引標籤。

2 選擇 **File > New Experiment from Assay**。

3 選擇您的試驗並點選 **OK**。

4 針對實驗進行任何必要的變更。

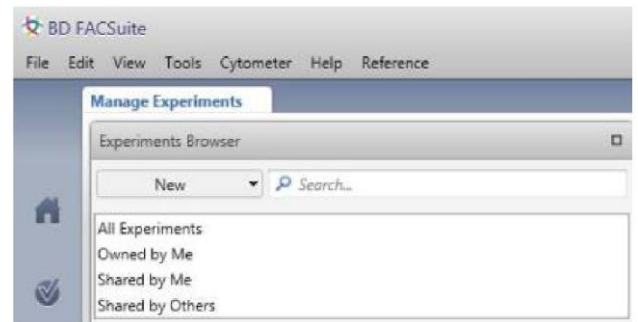
5 若要再次以試驗儲存，請選擇 **File > Create Assay**。

6 輸入名稱和說明。

若要覆寫既有的試驗，請輸入相同名稱。若要建立新的試驗，請輸入新的名稱。

7 點選 **OK**。

該試驗已儲存至資料庫。



附件 C

專有名詞

%rCV

總數的穩健變異係數百分比。

取得延遲計時器

預覽和取得工作清單內試管之間的設定時間差。該時間失效前，可使用停止計時器繼續預覽和調整設定值，如電壓和閾值等。延遲數值設定為工作清單的偏好。

調整面積換算因子 (ASF)

用以決定面積訊號規模的控制機制，通常用於將面積設定成等於相關顆粒的高度。設置過程中，調整面積換算因子是以 3- μ m 微球為依據。

稽核紀錄

追蹤各項變更紀錄的軟體功能。任何影響數據的變更（如：工作表、報告、圖表、閘門和統計變更等）都會以變更列在稽核紀錄表內。

BD CS&T 微球

以三種不同強度紮實染色，以期具備廣泛的發射光譜，可被 BD FACSLyric 細胞分析儀所有頻道偵測出來的顆粒。BD CS&T 微球和此軟體搭配使用，可自動設置試管設定值和試驗並找出細胞分析儀性能特點、予以追蹤。

BD FC 微球

用以建立或更新 BD 標準螢光染料參考設定值的顆粒。

特徵化 QC (CQC)

建立目標細胞分析儀設定值並設定線性、靈敏度和 %rCV 通過與否的數值之過程。

補償

一種讓主要偵測裝置的螢光染料數值僅反映想要的螢光染料之螢光並且將來自其他螢光染料的螢光移除的數學過程。

輸入

工作清單內的一列。每一筆各包含樣本編號、試管和一項工作。多筆可能包含一支或多支試管。

輸入執行配套 (ERP)

包含複製不同清單內某一筆資料所需的所有資訊之檔案，含取得的數據。可將各自的工作清單筆數匯出作為輸入執行配套 (ERP)。您可將 ERP 檔案匯入任何工作清單內，然後分析該筆檔案。

雷射設置

雷射設置會開始自動重新對齊雷射光，然後進行性能 QC 而更新設定值。若是在性能 QC 過程中雷射對齊檢查失敗或是明亮微球的 %rCV 超出範圍，請執行這項程序。

線性

可接受的線性範圍是偵測裝置反應內的明亮微球與黯淡微球比。如果平均比大於 2%，結果即不被視為具備線性。

裂解清洗 (LW) 參考設定值

利用 FSC 閾值針對 FSC、SSC 和螢光參數大略將正常裂解的全血淋巴球放在量表上的細胞分析儀設定值。

裂解未清洗 (LNW) 參考設定值

利用 PerCP 或 PerCP-Cy™5.5 閾值針對 FSC、SSC 和螢光參數大略將正常裂解、未清洗的全血淋巴球放在量表上的細胞分析儀設定值。

螢光強度中位數 (MFI)

定義具備和較高以及較低螢光強度相同事件數的總數內事件的螢光強度值。

多重試管統計數字

和工作表上的圖表內所有閘門和總數相關的統計數字。計算出來的統計數字以視圖顯示，包含一個或多個總數和／或參數的標題、關鍵字、表現和統計數字。

性能 QC (PQC)

用以測量和追蹤細胞分析儀操作並用以設置一致的裂解清洗和裂解不清洗的試管設定值之一套自動化軟體。

總數視圖 (等級)

根據閘門策略針對各試管定義的群組 (子集) 之間的關係。

參考設定值

試管設定值和已經使用螢光對照試管測得的相關溢出值。

報告

顯示結果和相關資訊。BD FACSuite 軟體會製作實驗室、醫師和補充報告。可儲存或匯出報告。

報告延遲計時器

為了檢視第一筆報告而取得工作清單內兩筆資料之間的設定時間差。時間失效前，利用停止計時器，繼續檢視報告並調整閘門和統計記號。這個數值設定為工作清單的偏好。

運轉指針統計數字

每次顯示和單一試管有關的統計數字。運轉指針的統計視圖以運轉指針圖像以及統計視圖頁首的試管名稱進行區分，因此無法修改，但是您可以點選兩次修改標題。

註 運轉指針統計視圖無法用以自動匯出 CSV 結果或是作為將結果傳送至 LIS 的依據。

靈敏度

明亮微球的 MFI 比是指定偵測裝置噪音標準偏差的兩倍。

光譜重疊

兩個螢光染料發射光譜重疊。

溢出

某個螢光染料被次要偵測裝置偵測到螢光。

溢出值 (SOV)

次要（亦即溢出）偵測裝置內的螢光 MFI 變化比（正總數 - 負總數）除以主要偵測裝置的 MFI 變化。SOV 是用在補償過程中的數學因數。

嚴格的參數配對

挑選這個屬性意味著只有選擇長參數名稱的圖表會顯示這個閘門。舉例而言，將只有在選擇 CD45 PerCP-Cy5.5（長參數名稱）作為參數時才會顯示淋巴球閘門。選擇短的或一般的參數名稱（PerCP-Cy5.5）的圖表不會顯示閘門。

工作

在您執行工作清單時細胞分析儀進行的動作。工作項目包括試驗（BD 定義或使用者定義）或流體動作。

閾值

排除不理想事件的觸發訊號和區別等級。將只會分析參數值高於閾值的事件。

試管設定值

運用試管設定值時將正總數放在相同位置（明亮處）的一組數值。試管設定值讓系統每天而且每個系統都能產出差不多的結果。

獨特閘門

可採用獨特的閘門功能調整個別試管的閘門。閘門具獨特性時，可更新總數等級並且以試管圖像標示該獨特閘門。圖表內相關的閘門也有獨特記號。

視窗延伸

新增於閾值以上的脈衝持續時間，以期在脈衝取樣時獲得總時間。

工作清單

欲執行的一連串工作。工作清單整齊列出多筆資料，含試管、工作、狀態和其他與樣本有關的資訊。

工作表

軟體內建立並修改圖表、閘門、統計數字和其他要素的區域。