

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ООО «БиоЛайн»



Семенов А.В.

«18» марта 2008 г



**Проточный цитофлюориметр для  
клинической лабораторной диагностики  
BD FACSCanto II**

производства компании Becton Dickinson, США

**Руководство пользователя**

## Введение

Система BD FACSCanto II устанавливает новый стандарт простоты, гибкости и допустимости в проточной цитометрии. С его устройством фиксированной оптики и цифровой электроникой, проточный цитофлуориметр BD FACSCanto II позволяет многокрасочный анализ до шести флуоресцентных маркеров и двух параметров светорассеивания одновременно.

Вы не нуждаетесь ни в каких специальных средствах: прибор работает от стандартной стенной розетки, использует лазеры с воздушным охлаждением, и обеспечивает его сам давлением воздуха и вакуумом для жидкостей и слива. Вы можете подготовить образцы на BD FACSTM Sample PrepAssistant и импортировать рабочие листы. Для дальнейшей автоматизации Вы можете использовать BD FACS Loader для сбора образцов.

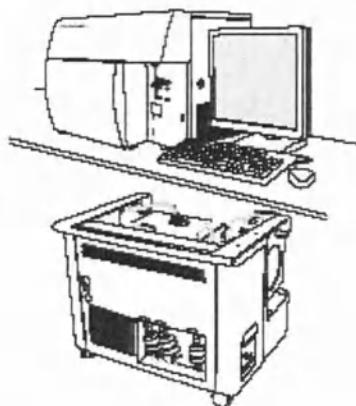
Эта глава содержит эти темы:

- системные компоненты
- системные требования.

### Системные Компоненты

Система BD FACSCanto II состоит из трех главных компонентов: настольный проточный цитофлуориметр, изолированная стойка с растворами и рабочая станция BD FACSCanto II (см. рис. 1-1). Дополнительная автоматизированная опция загрузки образца также доступна.

рис. 1-1 система BD FACSCanto II

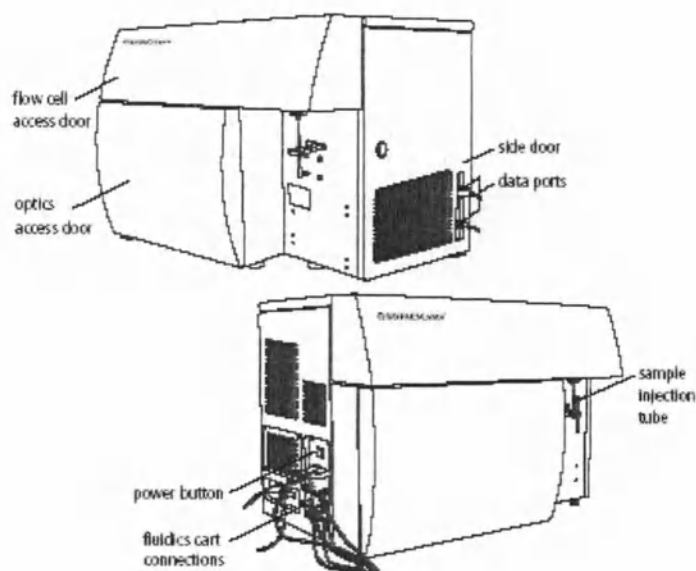


Для описания системных компонентов, см. следующие разделы.

- Проточный цитофлуориметр
- Стойка с растворами
- Рабочая станция
- Загрузчик (Дополнительный)

### Проточный цитофлуориметр

За исключением кнопки включения, Вы можете управлять проточным цитофлуориметром и функциями стойки с растворами из программного обеспечения BD FACSDiva.

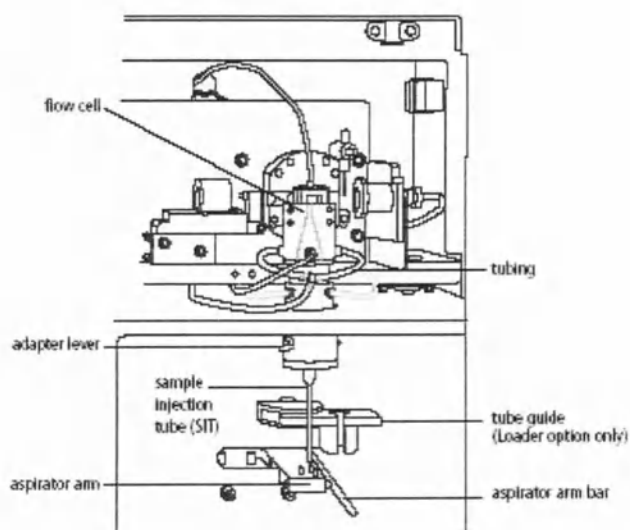


Проточный цитофлуориметр BD FACSCanto II состоит из подсистемы оптики, жидкостной подсистемы и подсистемы электроники. Для более всестороннего обсуждения жидкостной системы, оптики, электроники и проточной цитометрии см. Технический обзор.

### Жидкостная система

Жидкостная система состоит из пробирки подачи образца (SIT), плеча аспиратора, проточной кюветы, внутреннего резервуара под давлением и сетью трубок, которые обеспечивают проточной и промывочной жидкостями и удаляет слив из проточной кюветы.

Рис. 1-2 Пробирка подачи образца



Следующая таблица кратко описывает эти компоненты.

|                         |                                                                                 |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| <b>проточная кювета</b> | где лазерный луч пересекает частицы                                             |
| <b>линии</b>            | трубки проточной и промывочной жидкостей, а также слива к и от проточной кюветы |
| <b>SIT</b>              | полая металлическая труба, которая                                              |

|                                 |                                                                                                            |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Рычаг адаптера</b>           | приносит образец к проточной кювете рычаг, который изменяет SIT с режима ручной загрузки на автоматическую |
| <b>Рычаг аспиратора</b>         | подвижный порт аспирации слива                                                                             |
| <b>Затвор рычага аспиратора</b> | металлический затвор, использующийся, чтобы выдвинуть рычаг аспиратора из SIT при ручной загрузке          |

Вы устанавливаете пробирки в SIT. Насос стойки с растворами создает давление во внутреннем резервуаре, который обеспечивает подачу проточной жидкости в проточную кювету. В то же самое время, образец захватывается SIT и направляется в проточную кювету.

Когда Вы удаляете пробирки и проточный цитофлуориметр промывает SIT между пробирками, капли будут эвакуированы в порт рычага аспиратора. Чтобы активизировать промывку SIT, переместите рычаг аспиратора полностью налево при ручной разгрузке пробирки. Когда Вы используете Загрузчик, промывка SIT происходит автоматически.

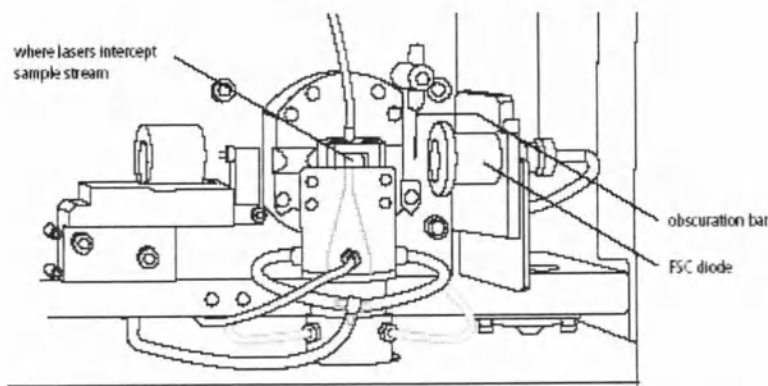
Вы не должны оставлять пробирку с дистиллированной водой в SIT между пробирками с образцом или после ежедневного выключения.

### Проточная кювета

Когда образец перемещается в проточную кювету, флуоресцентно меченые частицы перемещаются в один ряд через лазерный луч. Испускаемый от этих частиц луч обеспечивает информацию об их размере, форме, грануляции и интенсивности флуоресценции.

Вы найдете проточную кювету под крышкой проточной кюветы.

Рис. 1-3 Проточная кювета



Для получения дополнительной информации, см. Жидкостная система.

### Оптика

Компоненты Оптики возбуждения приносят луч к проточной кювете.

Оптика сбора – те компоненты, которые собирают лучи, испускаемые или рассеиваемые мечеными частицами и преобразовывают их электронные сигналы.

Проточный цитофлуориметр BD FACSCanto II использует инновационные решения как для оптики возбуждения, так и для оптики сбора. Часть оптики сбора можно увидеть, открыв крышку.

### Оптика Возбуждения

Оптика возбуждения состоит из лазеров, оптоволоконных кабелей, призм, формирующих луч, и ахроматических фокусирующих линз, как показано на рис. 1-4.

Прибор BD FACSCanto II использует малозатратные лазеры твердого тела с воздушным охлаждением, которые не имеют специальных требований по мощности и охлаждению. Лазерная (нитрометан) мин.. Powera (мВт) а. Измеренный из оптоволоконной кабеля

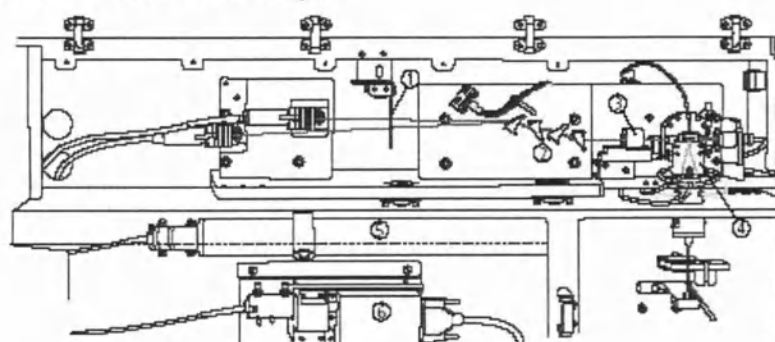
| Лазер                           | Длина волн, нм | Мин. мощность, мВ | Используемые флуорохромы                                              |
|---------------------------------|----------------|-------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Coherent® Sapphire™ Solid State | 488 (blue)     | 20                | FTTC, PE <sup>b</sup> , PE-Texas Red®, PerCP, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, PI |
| IDS Uniphase™ HeNe Air Cooled   | 633 (red)      | 17                | APC, APC-Cy7                                                          |

а. Измеренные на выходе оптоволоконного кабеля

б. Для списка пациентов.

Оптоволоконные кабели направляют лазерный луч на формирующие луч призм, которые в свою очередь передают лазерный луч к фокусирующей линзе. Линза направляет лазерный луч на поток с образцом в проточной кювете (рис. 1-4).

Рис. 1-4 Оптический путь



- ① interlock
- ② prisms
- ③ focusing lens
- ④ flow cell
- ⑤ red He-Ne laser
- ⑥ blue solid-state laser

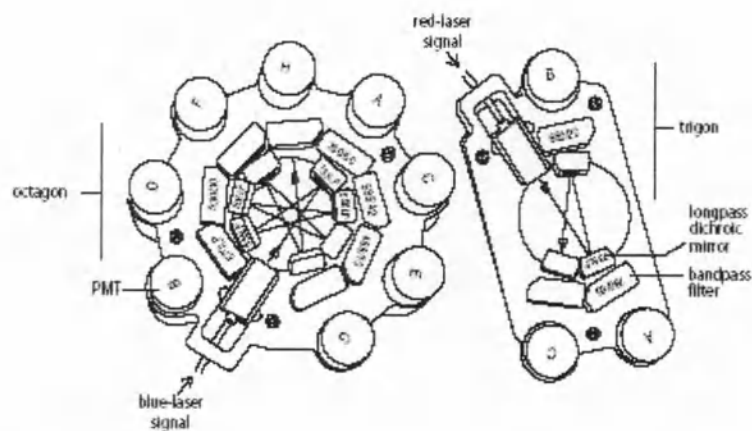
Когда крышка проточной кюветы открывается, шторка перекрывает лазерный луч и блокирует его из соображений безопасности.

## Оптика сбора

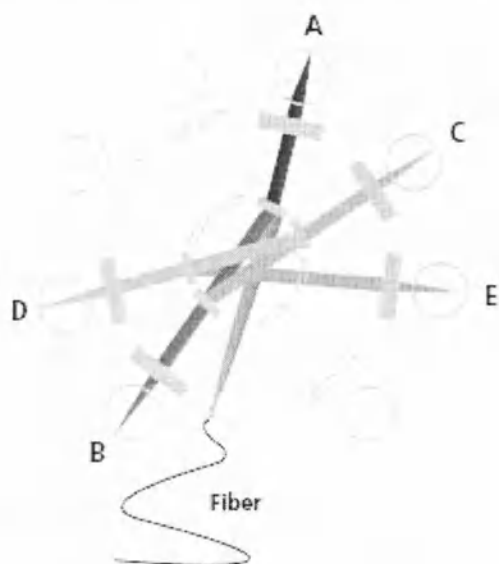
От проточной кюветы, лазерный луч направляется к оптике сбора, которая эффективно собирает сигналы от каждого лазера.

Оптика сбора прибора BD FACSCanto II включает два детекторных набора, каждый из которых состоит из нескольких трубок фотомножителя (PMT), расположенных в виде восьмиугольника или треугольника (рис. 1-5). Восьмиугольник, содержащий пять PMT, обнаруживает луч от 488 нм (синего) лазера. Треугольник, содержащий два PMT, обнаруживает луч от 633 нм (красного) лазера. Один PMT в восьмиугольнике считывает сигналы бокового светорассеивания (SSC).

Рис. 1-5 Наборы детекции в виде восьмиугольника и треугольника



Когда луч достигает набора, длинноволновое дихроическое зеркало передает более высокие длины волн к первому PMT в ряду и отражает более низкие длины волн к следующему PMT. Таким же образом, длинноволновое дихроическое зеркало второго PMT передаст оставшиеся наиболее высокие длины волн и отразит более низкие длины волн, и так далее по кругу набора. Полосовой фильтр перед каждым PMT экранирует нежелательный луч.



В дополнение к детекторам PMT, фотодиод собирает наиболее сильные сигналы прямого светорассеивания. Область затемнения препятствует остаточному лазерному лучу выйти из диода (рис. 1-3).

В разделе Оптические системы (см. далее) обсуждается набора детекторов и то, как работают дихроические зеркала и фильтры.

При инсталляции, восьмиугольные и треугольные наборы имеют комбинации фильтров и зеркал, которые показаны в Таблице 1-1.

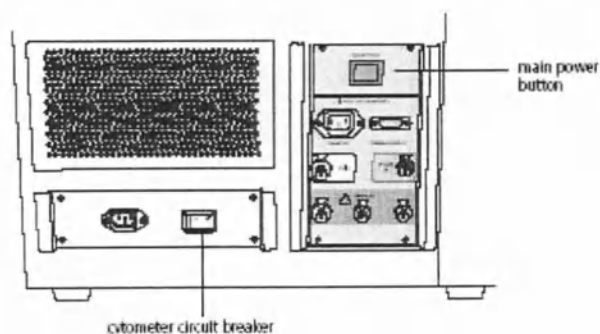
| Detector Array (Laser)      | PMT Position | LP Mirror            | BP Filter or LP Mirror | Intended Dye       |
|-----------------------------|--------------|----------------------|------------------------|--------------------|
| Octagon (488-nm blue laser) | A            | 735                  | 780/60                 | PE-Cy7             |
|                             | B            | 655                  | 670 LP                 | PerCP-Cy5.5, PerCP |
|                             | C            | 556                  | 585/42                 | PE                 |
|                             | D            | 502                  | 530/30                 | FITC               |
|                             | E            | blank optical holder | 488/10                 | Side scatter (SSC) |
|                             | F            | blank optical holder | blank optical holder   | —                  |
|                             | G            | blank optical holder | blank optical holder   | —                  |
|                             | H            | blank optical holder | blank optical holder   | —                  |
| Trigon (633-nm red laser)   | A            | 735                  | 780/60                 | APC-Cy7            |
|                             | B            | blank                | 660/20                 | APC                |

Пустые оптические держатели не содержат линз в центральном пространстве. Они нужны в восьмиугольнике и треугольнике, чтобы препятствовать нежелательному лучу интерферировать с вашим сигналом флуоресценции.

### Панель включения

Питание прибора, лазеров и стойки с растворами поставляется шнуром питания от проточного цитофлуориметра, подключенного непосредственно в стандартной электрической розетке. Основная кнопка включения включает прибор и стойку с растворами, и включение лазеров.

Рис. 1-6 Панель включения проточного цитофлуориметра

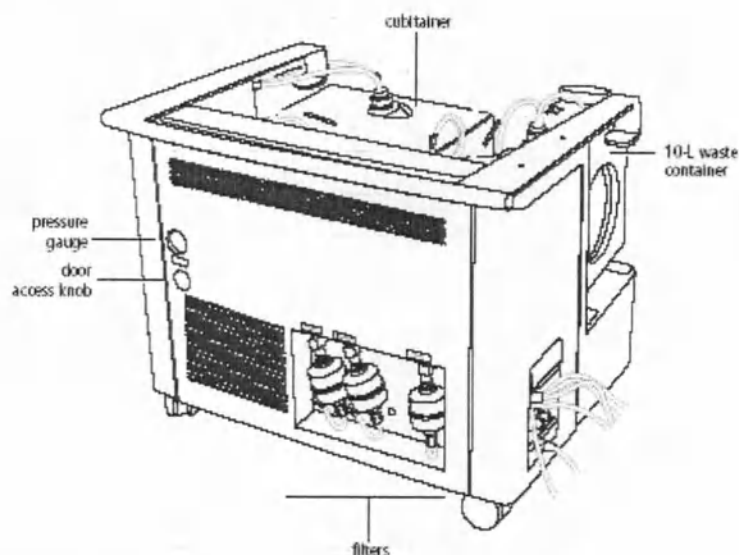


Автоматический выключатель прибора расположен рядом с шнуром питания (рис. 1-6). Выключатель будет необходимо снова включить, если в лаборатории был скачок напряжения.

### Стойка с растворами

Отдельную, замкнутая стойка с растворами обеспечивает нафилтрование проточной и промывочной жидкостей и собирает слив от прибора (рис. 1-7). Стойка с растворами предоставляет необходимое давление воздуха и вакуум, устраняя потребность во внешнем источнике (хотя стойка с растворами может быть присоединена к внутреннему источнику воздуха, если он доступен).

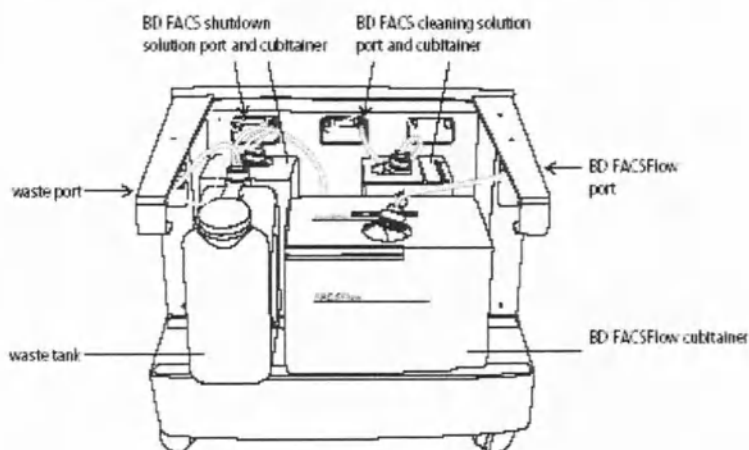
Рис. 1-7 Стойка с растворами



### Контейнеры и порты

Стойка с растворами вмещает один 10-L сливной контейнер, один 20-L BD FACSTFlow™ кубитейнер и два 5-L вспомогательных контейнера с промывочной жидкостью (рис. 1-8). Используйте сливной контейнер, входящий в состав системы; не заменяйте его другими контейнерами.

Рис. 1-8 Контейнеры и порты стойки с растворами



Каждый раствор имеет его собственный невзаимозаменяемый порт с подключенным детектором уровня. Оповещение об уровне жидкости производится программным обеспечением BD FACSDiva.

### Отключение

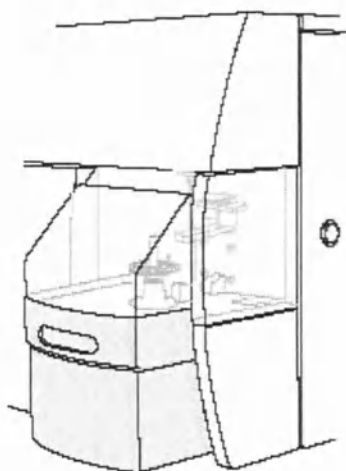
Чтобы выключить стойку с растворами (и проточный цитофлуориметр также) нажмите основную кнопку включения проточного цитофлуориметра. Во время отключения стойки с растворами. Вы должны услышать шипение, и из насоса может вытечь небольшое количество конденсата.

## Рабочая станция

Рабочая станция состоит из компьютера, совместимого с операционной системой Microsoft Windows XP Professional, плоского монитора и принтера.

## Загрузчик (Дополнительно)

Загрузчик автоматически вводит готовые образцы в проточный цитофлуориметр. Он состоит из ящика, крышки, двух оптических детекторов, модуля электроники, подъемника пробирки и карусели на 40 пробирок. Управляйте загрузчиком из программного обеспечения BD FACSDiva.



Вы можете добавить загрузчик к вашей системе в любое время. Обратитесь к руководству Опции BD FACSCanto II для получения информации относительно компонентов, использования и обслуживания.

## Системные требования

### Программное обеспечение

Программное обеспечение BD FACSDiva

### Рабочая станция

Рабочая станция BD FACSCanto II приобретается через BD Biosciences

### пробирки

- 12 x 75-mm BD Falcon полистирольные пробирки
- 12 x 75-mm BD Trucount пробирки

### Объемные жидкости

- BD FACST<sup>TM</sup> Flow раствор
- BD FACST<sup>TM</sup> Rinse промывочный раствор
- BD FACST<sup>TM</sup> Shutdown заключающий раствор
- неразбавленный хлор (сливной резервуар)

### Другие жидкости, необходимые для внешней очистки

- BD FACST<sup>TM</sup> промывочный раствор или 10 % хлор
- Деионизированная вода (ДИ)

## Работа с образцами с использованием программного обеспечения BD FACSDiva

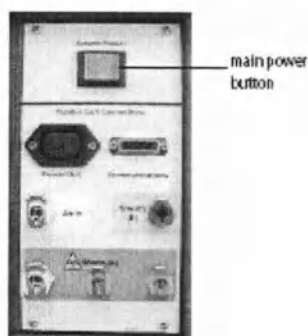
Следующие темы рассматриваются в этой главе:

- Запуск прибора
- Проверка качества прибора
- Оптимизация настроек прибора
- Запись данных и анализ
- Ежедневное отключение

## Запуск прибора

Следуйте этим шагам, чтобы запустить проточный цитофлуориметр BD FACSCanto II.

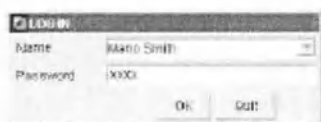
1 Включите основную кнопку прибора. Основная кнопка включения находится на левой стороне проточного цитофлуориметра. Кнопка включает подачу тока как на прибор, так и на стойку с растворами.



2 Запустите компьютер; откройте программное обеспечение BD FACSDiva. Дважды щелкните ярлык приложения на рабочем столе.



3 В окне Log In (Войти) выберите ваше имя пользователя, введите ваш пароль, и нажмите OK.

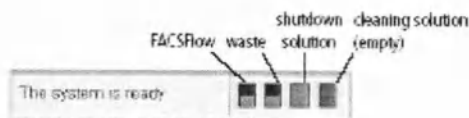


4 Удостоверьтесь, что программное обеспечение подключено к проточному цитофлуориметру; при необходимости выберите Instrument (Прибор) > Connect (Связь). Используйте основание Instrument frame (Приборная рамка), чтобы просмотреть состояние связи.



5 Проверьте уровни жидкости в Instrument frame.

Низкие уровни жидкости или полный сливной контейнер обозначены красным. Если нужно, проведите обслуживание контейнеров с жидкостями, как описано в разделе Замена кубитейнера или Опорожнение сливного контейнера.



6 Если автоматическая очистка не включена, выберите Instrument > Fluidics Startup (Запуск жидкости). Если автоматическая очистка включена, система выполнит запуск жидкости автоматически, когда проточный цитофлуориметр соединится с рабочей станцией.

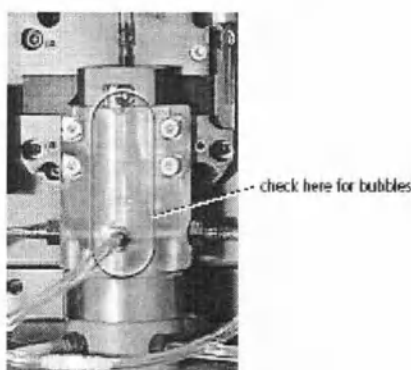
Не помещайте пробирки в SIT при запуске жидкости, так как промывочная жидкость и слив будет попадать в пробирку.

Запуск жидкости удаляет заключающий раствор BD FACS из жидкостных линий и заменяет его раствором BD FACSFlow.

7 Нажмите OK, когда Запуск жидкости закончен.

8 Проверьте проточную кювету на наличие воздушных пузырей.

Чтобы увидеть проточную кювету, снимите крышку проточной кюветы.

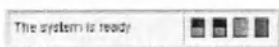


Если Вы видите пузырьки, удалите их как описано в разделе Удаление пузырьков из проточной кюветы.

Отметьте, что появляется сообщение об ошибке в закладке Status (Состояние), когда Вы открываете крышку проточной кюветы. Чтобы убрать сообщение, закройте крышку и подождите 30 секунд.

9 Проверьте, закончился ли прогрев лазеров.

Когда прогрев лазеров закончен, появляется сообщение "система готова" внизу Instrument frame.



Во время прогрева лазеров Вы можете выполнить запуск жидкости, создать или открыть Experiment (Эксперимент) и распечатать рабочий лист. Однако, Вы не можете настроить проточный цитофлуориметр или проанализировать образцы.

## Проверка конфигурации прибора и предпочтений пользователя

Удостоверьтесь, что конфигурация прибора и предпочтения пользователя установлены правильно прежде, чем оптимизировать Эксперимент.

1 Выберите Instrument > Instrument Configuration и проверьте, содержит ли текущая конфигурация соответствующие параметры.

Для получения точных результатов данных, восьмиугольные и треугольные наборы должны соответствовать текущей конфигурации прибора.

2 Проверьте, что фильтры соответствуют и можно использовать флуорохромы FITC, PE, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, APC и APC-Cy7.

Заданная по умолчанию конфигурация фильтров подходит для 6-ти цветного анализа.

3 Выберите Edit > User Preferences (Редактирование > Предпочтение пользователя) и проверьте, что выбраны следующие значения.



Для полного обсуждения Предпочтений пользователя, обратитесь к Руководству пользователя BD FACSDiva.

## Создание Эксперимента

Этот раздел описывает, как создать папку и Эксперимент, определить параметры исследования и добавить пробирки компенсации.

1 Нажмите соответствующие кнопки инструментов панели Workspace, чтобы отобразить Browser, Instrument (Прибор), Inspector (Инспектор), Worksheet (Рабочий лист) и Acquisition Controls frames (Рамки контроля сбора), если необходимо.

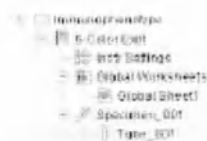
**Совет** Поскольку Вы работаете с программным обеспечением, рамки могут скрыться. Вы можете легко выдвинуть рамку на первый план, дважды щелкнув соответствующую кнопку инструментов панели Workspace.

2 (Необязательный) Создайте папку для вашего Эксперимента.

Выберите значок для вашей базы данных в Browser и нажмите кнопку Folder (Папка) инструментов панели Browser. Переименуйте папку соответственно, например *Иммунофенотип*.

3 Выберите значок папки (если присвоен), и нажмите кнопку Experiment, чтобы создать новый Эксперимент.

4 Переименуйте Эксперимент соответственно. Например, используйте *6-ти цветн Эксп* или ваши инициалы с соответствующим расширением.



5 Выберите Experiment-level instrument settings (Параметры настройки прибора на стадии эксперимента) в Browser; нажмите на закладку Parameters в Inspector и удалите любые ненужные параметры (рис. 3-3).

Нажмите кнопку выбора рядом с названием (ями) параметра, чтобы выбрать строки; нажмите кнопку Delete, чтобы удалить выбранные строки.

Рис. 3-3 Параметры для 6-ти цветной оптимизации



6 Выберите Instrument > Instrument Setup > Create Compensation Tubes (Создать пробирки компенсации). Образец компенсации добавлен к Эксперименту, наряду с Неокрашенной пробиркой Контроля и Окрашенной пробиркой Контроля для каждого параметра, который был определен в шаге 5. Рабочие листы, содержащие соответствующие графики добавлены для каждой пробирки компенсации.



7 (Необязательный) Создайте специфично меченые пробирки, если необходимо.

Специфично меченые пробирки требуются не всегда; они необходимы, когда ваш эксперимент содержит образцы, окрашенные тем же самым флуорофором, конъюгированным с различными антителами (метками), которые требуют разных значений компенсации. Это особенно заметно в тандемных конъюгатах из-за изменения от лота к лоту. Обратитесь к Руководству пользователя программного обеспечения BD FACSDiva для получения дополнительной информации об этой особенности.

### Оптимизация параметров настройки прибора

Когда Вы выполнили контроль качества работы QC прибора, параметры настройки напряжения были откорректированы, чтобы установить каждый параметр в заданном значении. Эти параметры настройки могут не подойти для окрашенных образцов, которые Вы планируете анализировать. Перед записью данных Вы должны скорректировать FSC, SSC и пороговые параметры настройки; гейтировать популяции, представляющие интерес (например, лимфоциты) и скорректировать напряжения, чтобы оптимизировать флуоресцентный сигнал. Для этих корректировок вам необходим неокрашенный образец контроля. Важно выполнить эти шаги по порядку, поскольку некоторые корректировки влияют на другие.

1 Установите неокрашенную пробирку контроля на проточный цитофлуориметр.

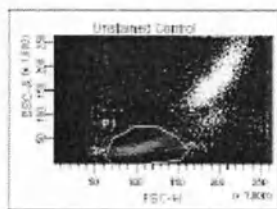
- Сместите рычаг аспиратора влево.
- Поместите пробирку в SIT и надавите, пока пробирка не встанет плотно.
- Выровняйте по центру рычаг аспиратора под пробиркой.

2 Проверьте, чтобы зеленый указатель Acquisition был перед Неокрашенной пробиркой Контроля в Browser; нажмите Acquire.

Никогда не кладите на проточный цитофлуориметр тяжелые предметы; это может привести к изменению данных.

3 Скорректируйте напряжения FSC и SSC, чтобы соответственно отобразить свойства светорассеивания для LWB образца (рис. 3-4).

Рис. 3-4 Скорректированные напряжения



4 Нажмите закладку Threshold (Порог) и скорректируйте FSC Threshold (Порог FSC), если необходимо.

Установите порог, чтобы удалить большинство дебриса, не вырезая популяции лимфоцитов (рис. 3-4). 5 Скорректируйте гейт P1 на рабочем листе Неокрашенного Контроля, чтобы окружить только популяцию лимфоцитов (рис. 3-4).

Выберите гейт, нажимая на его границу. Выбрав, Вы можете переместить гейт, чтобы передвинуть его, или перетащить любой из маркеров выделения, чтобы изменить размер и форму гейта.

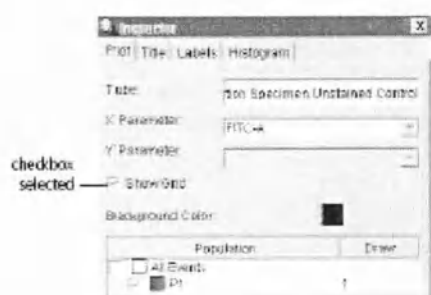
6 Как только гейт откорректирован, щелкните правой кнопкой мыши по границе гейта и выберите Apply to Compensation Controls (Применить к контролю компенсации).

Это применит ваши изменения к гейтам P1 на оставшихся рабочих листах компенсации.

7 Выделите все гистограммы флуоресценции на рабочем листе Неокрашенного Контроля.

8 В Plot Inspector (Графический инспектор) выберите переключатель Show Grid (Показать сетку) (рис. 3-5).

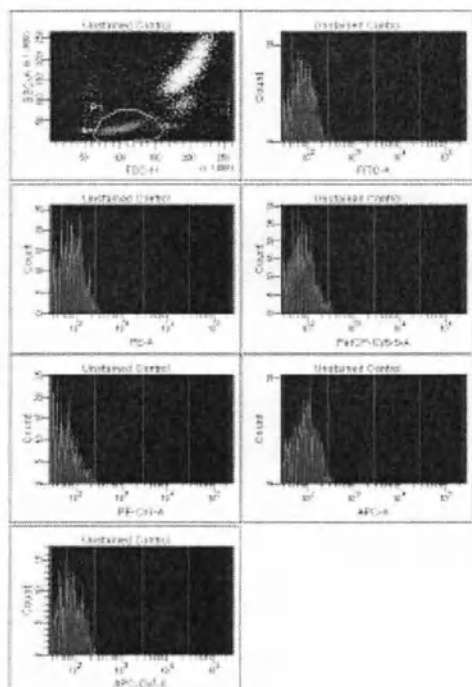
Рис. 3-5 Plot Inspector для графиков флуоресценции



Координатные сетки используются, чтобы очертить логарифмические декады на графиках. В 4-х логарифмическом изображении значения отображаются от 26 до 262,143. Таким образом, первая логарифмическая декада располагается от 26 до 262. Линии показаны только в графиках, которые показывают логарифмические параметры.

9 Оптимизируйте напряжения, чтобы разместить отрицательную популяцию для каждого флуоресцентного параметра в первую логарифмическую декаду (рис. 3-6).

Рис. 3-6 Неокрашенная пробирка Контроля после настройки PMT



10 Щелкните Record (Запись); когда все события зарегистрированы, удалите неокрашенную пробирку контроля из проточного цитофлуориметра.

**Важно, чтобы Вы точно следовали всем последовательностям удаления пробирки.** Отказ следовать этой последовательности может привести к проливию биологически опасного материала или переносу между образцами.

- Щелкните Remove Tube (Удалить пробирку).

Появится окно продвижения.

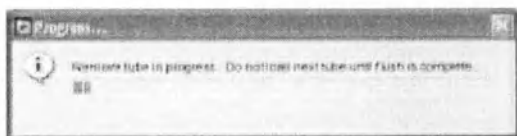
- Держите пробирку с образцом одной рукой, в то время как другой рукой Вы перемещаете рычаг аспиратора влево до упора.

**Всегда** придерживайте пробирку с образцом, когда Вы помещаете рычаг аспиратора в сторону. Если Вы перемещаете рычаг, не поддерживая пробирку, она може выпасть из SIT и потенциально подвергнуть Вас биологической опасности.

- Удалите пробирку из SIT.

- Отпустите рычаг аспиратора. Очистка SIT происходит, когда плечо аспиратора находится в центре.

**Не перемещайте** рычаг аспиратора или не устанавливайте другую пробирку в SIT, пока не исчезнет окно.



- Когда окно продвижения исчезает, Вы можете загрузить следующую пробирку в SIT.

Не изменяйте напряжения PMT после того, как первая пробирка компенсации была записана.

Чтобы вычислить компенсацию, все пробирки должны быть записаны с теми же самыми параметрами настройки напряжения PMT. Если Вы должны скорректировать напряжение PMT для последующей пробирки компенсации, Вы снова должны будете сделать запись для всех Пробирок компенсации.

## Вычисление компенсации

Прежде, чем Вы сможете вычислить компенсацию, Вы должны будете сделать запись данных для каждого единично окрашенного контроля.

1 Установите первую окрашенную пробирку контроля на проточный цитофлуориметр.

Удостоверьтесь сначала, что окно Remove tube исчезло.

2 В Acquisition Controls frame нажмите кнопку Next (Следующий).

Указатель Acquisition передвинется к следующей пробирке в Browser и начнется сбор.

Никогда не кладите на проточный цитофлуориметр тяжелые предметы; это может привести к изменению данных.

3 Проверьте, что гейт P1 все еще окружает популяцию, представляющую интерес.

4 Нажмите Ctrl на указатель Acquisition, чтобы сделать запись данных.

5 Когда запись закончена, нажмите Remove Tube.

Не устанавливайте следующую пробирку, пока не закончена очистка SIT и не исчезло окно Remove tube. Если Вы устанавливаете пробирку прежде, чем окно исчезает, промывка SIT может загрязнить, растворить или переполнить ваш образец или вызвать биологически опасное пролитие.

6 Установите следующую пробирку в SIT.

7 Повторите шаги 2 - 6 до пока не будут записаны данные для всех окрашенных пробирок контроля.

### Растягивание гейтов

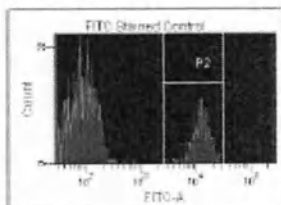
Теперь, когда данные записаны, Вы должны создать гейты вокруг положительных популяций на гистограмме для каждой окрашенной пробирки контроля.

1 Дважды щелкните первую Окрашенную пробирку Контроля (FITC Окрашенный Контроль), чтобы определить расположение соответствующих графиков на рабочем листе.

2 Создайте Интервальный гейт вокруг положительной по флуоресценции популяции на гистограмме (рис. 3-7).

**Совет** Используйте инструмент Auto-Interval (Автоматическое создание интервалов), чтобы быстро создать Интервальный гейт вокруг популяции. Чтобы сохранить инструмент выбранным, чтобы не нужно было нажимать инструмент для каждой оставшейся пробирки, удерживайте клавишу CTRL первый раз, когда Вы нажимаете инструмент. Инструмент остается выбранным, пока Вы не нажмете Esc или выберите другой инструмент.

Рис. 3-7 Гейтирование положительных популяций



3 Дважды щелкните следующую Окрашенную пробирку Контроля в Browser, чтобы определить расположение соответствующих графиков на рабочем листе.

4 Повторите шаги 2 и 3 для оставшихся Пробирок компенсации.

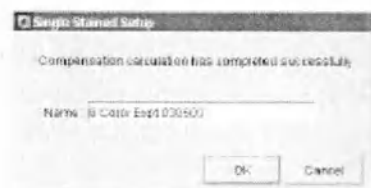
### Создание матрицы компенсации

Установив однажды все области, Вы можете вычислить компенсацию.

1 Выберите Instrument > Instrument Setup > Calculate Compensation (Вычислить компенсацию).

Если вычисление прошло успешно, появляется диалоговое окно, где Вы можете ввести название установки компенсации.

2 Введите название установки компенсации; нажмите ОК.



**Совет** Чтобы проследить установки компенсации, включите название Эксперимента, дату или и то, и другое, в название установки.

Названная установка автоматически связывается с параметрами настройки прибора для Эксперимента.

**Совет** Удалите Compensation Specimen (Образец компенсации), чтобы сохранить место в Browser.

BD Biosciences рекомендуют, чтобы Вы подтвердили установки компенсации, проведя контроль процесса прежде, чем Вы проведете анализ образцов.

## Запись данных и анализ

Как только Вы оптимизируете параметры настройки прибора для вашего типа образца, Вы можете сделать запись и анализировать данные.

Во время анализа записанные данные отображаются в графиках, используются гейты, чтобы определить популяции, представляющие интерес. Вы можете использовать полные рабочие листы, чтобы просмотреть и оптимизировать данные прежде, чем они записаны. Программное обеспечение BD FACSDiva анализирует гейтированные данные и вычисляет статистику, которую Вы можете распечатать или экспортировать.

Этот раздел описывает, как использовать особенности программного обеспечения BD FACSDiva, чтобы сделать запись и проанализировать образцы данных. В качестве примера будут записаны и проанализированы данные для двух образцов, окрашенных следующими реактивами: CD14 FITC/CD16+CD56 PE/CD8 PerCP-Cy5.5/CD19 PE-Cy7/CD3-APC/CD4 APC-Cy7.

Две стратегии показаны, чтобы можно было многократно использовать объекты анализа. Если Вы используете полный рабочий лист, чтобы анализировать данные, Вы можете многократно использовать стратегию анализа, отображая данные для различных пробирок на одном и том же рабочем листе. Альтернативно, Вы можете скопировать объекты анализа на множество пробирок одновременно.

## Настройка полного рабочего листа

Этот раздел показывает Вам, как использовать полный рабочий лист, чтобы предварительно просмотреть и сделать запись данных для множественных образцов. Чтобы переключиться между стандартным и полным представлением рабочего листа, нажмите кнопку Global Worksheets (Полный рабочий лист) панели инструментов Worksheet.

1 Создайте новый Образец; переименуйте в *LWB Образец*.

2 Создайте две пробирки под Образцом LWB; переименуйте пробирки соответственно. Например, *T/B/NK\_001* и *T/B/NK\_002*.

3 Создайте полный рабочий лист; переименуйте его в *Запись данных*.

• Если предпочтение *Default global worksheet* (Полный рабочий лист, заданный по умолчанию) отмечено в User Preferences (опция по умолчанию), полный рабочий лист уже присутствует.



Разверните папку Полные Рабочие листы, чтобы определить расположение и переименовать рабочий лист.

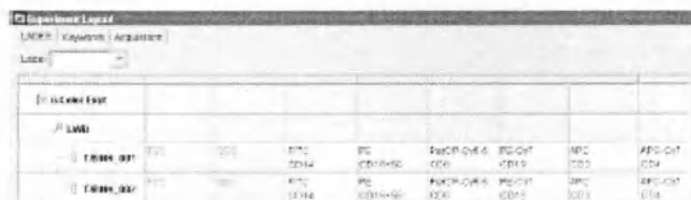
• Если *Default global worksheet* рабочего листа не включен, создайте рабочий лист, нажимая кнопку New Global Worksheet (Новый полный рабочий лист) в панели инструментов Browser. Вы можете создать до десяти полных рабочих листов на Эксперимент.

4 Используйте диалоговое окно Experiment Layout (План эксперимента), чтобы определить для каждой пробирки метки и число событий, для которых необходимо сделать запись.

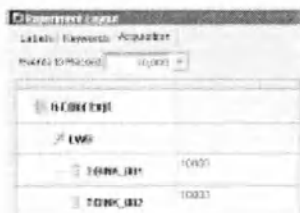
Метки параметров определяются в просмотре Experiment Layout. Метки появятся на графических осях и во всех просмотрах статистики.

• Выберите Experiment > Experiment Layout.

• На закладке Labels (Метки) введите соответствующие метки для пробирки. Например, введите CD4 в поле FITC; используйте клавишу Tab, чтобы перейти к следующему полю.



• На закладке Acquisition введите 10 000 событий для пробирок T/B/NK\_001 и T/B/NK\_002; нажмите OK. Обратите внимание, что закладка Acq. в Inspector модифицируется автоматически.



5 На полном рабочем листе создайте соответствующие графики, чтобы просмотреть данные. Например, создайте точечные графики FSC против SSC, FITC против PE, PerCP-Cy5-5 против PE и APC против APC-Cy7.

**Совет** Нажмите Ctrl на инструмент Plot (График), чтобы сохранить выбранный инструмент, пока Вы не создадите все графики. Нажмите любую другую кнопку, чтобы отменить выбор.

## Запись данных

Обратите внимание на то, что если Save Analysis After Recording (Сохранять анализ после записи) включен в User Preferences чтении, копия данных, отображенных в полном рабочем листе, будет сохранена для каждой записанной пробирки. Если Вы не хотите сохранять копию данных, отключите это предпочтение.

1 Установите первую пробирку с образцом на проточный цитофлуориметр.

2 Переместите указатель Acquisition на первую пробирку; нажмите Acquire.

Никогда не кладите на проточный цитофлуориметр тяжелые предметы; это может привести к изменению данных.

3 В то время, как данные собираются, растяните область вокруг лимфоцитов; настройте другие графики, чтобы показать данные по популяции Лимфоцитов.

4 Щелкните Record, чтобы сделать запись данных.

5 Когда все события записаны, следуйте этим инструкциям для удаления пробирки.

**Важно, чтобы Вы точно следовали всем последовательностям удаления пробирки.** Отказ следовать этой последовательности может привести к пролитию биологически опасного материала или переносу между образцами.

- Щелкните Remove Tube.

Появится окно продвижения.

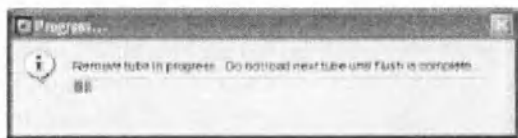
- Держите пробирку с образцом одной рукой, в то время как другой рукой Вы перемещаете рычаг аспиратора до упора влево.

**Всегда** придерживайте пробирку с образцом, когда Вы помещаете рычаг аспиратора в сторону. Если Вы перемещаете рычаг, не поддерживая пробирку, она може выпасть из SIT и потенциально подвергнуть Вас биологической опасности.

- Удалите пробирку из SIT.

- Отпустите рычаг аспиратора. Очистка SIT происходит, когда плечо аспиратора находится в центре.

**Не перемещайте** рычаг аспиратора или не устанавливайте другую пробирку в SIT, пока не исчезнет окно.



6 Когда окно продвижения исчезнет, Вы можете загрузить следующую пробирку в SIT.

7 Переместите указатель на соответствующую пробирку в Browser и нажмите Acquire.

8 Просмотрите данные в полном рабочем листе; нажмите Record, чтобы сделать запись данных.

9 Повторите шаги 5 - 8 пока не будут записаны данные для всех пробирок.

10 (Необязательный) Распечатайте Experiment-level instrument settings или отчет Instrument Status.

Чтобы напечатать параметры настройки, щелкните правой кнопкой мыши прибора по значку параметров настройки и выберите Print.

## Анализирование данных

Этот раздел описывает, как установить графики, гейты и просмотр статистики, чтобы проанализировать записанные данные. К концу этого раздела ваш анализ должен выглядеть как на рис. 3-8 .

1 Создайте новый полный рабочий лист; переименуйте его как *T/B/NK анализ*.

2 Выберите первую пробирку под LWB Образцом и создайте следующие графики на шаблоне анализа:

- FSC против SSC
- APC против PE
- APC против PE-Cy7
- APC против PerCP-Cy5-5
- APC против APC-Cy7
- гистограмму FITC.

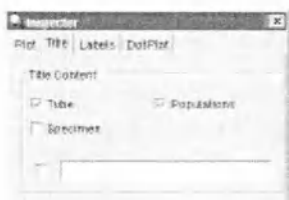
3 Измените размеры графиков так, чтобы они уместились на одной странице, как показано на рис. 3-8.

4 Растяните гейт вокруг лимфоцитов; используйте Population Hierarchy (Иерархию популяций), чтобы переименовать популяцию как *Лимфоциты*.

5 Выделите все графики кроме FSC против SSC и гистограммы FITC и определите, чтобы показывались только популяция лимфоцитов.

Удерживайте клавишу CTRL в то время как Вы выбираете следующие графики. Как только все графики выбраны, нажмите на переключатель рядом с Лимфоцитами в Plot Inspector.

6 Выделите все графики и нажмите закладку Title (Название) в Plot Inspector; отметьте переключатели, чтобы отобразить названия пробирки и Популяции в заголовках графиков.



7 Создайте Statistics view (Просмотр статистики); отредактируйте просмотр, чтобы показать популяцию Лимфоцитов и субпопуляций, отобразите среднее значение для всех флуорохромов. Для получения инструкций о том, как создавать и редактировать Statistics view, см. Руководство пользователя BD FACSDiva

8 Растяните область вокруг CD3+ популяции на графике CD3 APC против CD16+56 PE; назовите популяцию *Т-Клетками*.

**Совет** При растягивании областей убедитесь, что включили в гейт события на графических осях.

9 Растяните область вокруг CD16+56+ популяции на том же графике; назовите популяцию *НК-Клетками*.

10 Растяните область вокруг популяции CD19 на графике CD3 APC против CD19 PE-Cy7; назовите популяцию *В-Клетками*.

11 Выберите популяцию Т-клеток в просмотре Population Hierarchy; растяните область вокруг дважды позитивной популяции на графике CD3 APC против CD8 PerCP-Cy5-5 и назовите популяцию *Т-Цитостатической*.

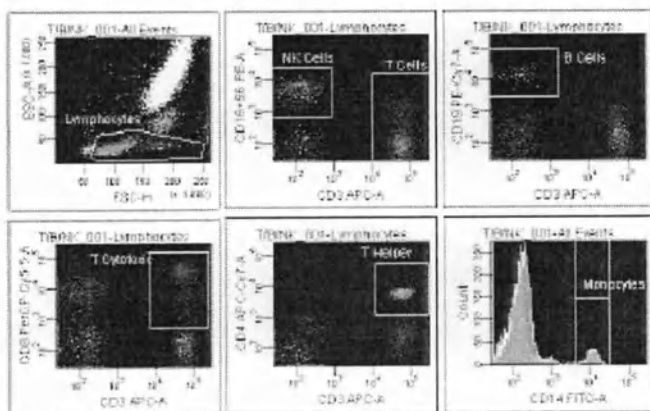
Поскольку популяция Т-клеток выбрана первой, Т-цитотоксические клетки становятся подмножеством всех Т-клеток.

12 Выберите популяцию Т-клеток в просмотре Population Hierarchy; растяните область вокруг дважды позитивной популяции на графике CD3 APC против /APCCy7 и назовите популяцию *Т-хелперы*. Клетки Т-хелперы добавляются как второе подмножество Т-клеток.

13 Выберите гистограмму CD14 FITC; растяните интервальный гейт вокруг моноцитов и назовите популяцией *Моноцитов*.

14 Распечатайте анализ. См. рис. 3-8 в качестве примера.

Рис. 3-8 Анализ лимфоцитов (пример)



|                                                 |         |         |        |
|-------------------------------------------------|---------|---------|--------|
| Tube: TBBK_001                                  |         |         |        |
| Population                                      | #Events | %Parent | %Total |
| <input type="checkbox"/> All Events             | 10,000  |         | 100.0  |
| <input checked="" type="checkbox"/> Lymphocytes | 2,194   | 21.9    | 21.9   |
| <input checked="" type="checkbox"/> T Cells     | 1,244   | 58.7    | 12.4   |
| <input checked="" type="checkbox"/> T Cytotoxic | 638     | 50.8    | 6.3    |
| <input checked="" type="checkbox"/> T Helper    | 517     | 43.2    | 5.4    |
| <input checked="" type="checkbox"/> Treg Cells  | 598     | 26.9    | 5.9    |
| <input type="checkbox"/> B Cells                | 96      | 4.2     | 1.0    |
| <input type="checkbox"/> Monocytes              | 605     | 6.0     | 6.0    |

|                  |                          |
|------------------|--------------------------|
| Experiment Name: | G-Color Expt             |
| Specimen Name:   | LWB                      |
| Tube Name:       | TBBK_001                 |
| Record Date:     | Nov 20, 2003 11:01:17 AM |
| \$OP:            | Administrator            |

| Population  | CD14 FITC-A | CD15+56 PE-A | CD8 PerCP-C | CD19 PE-Cy7-A | CD3 APC-A | CD4 APC-Cy7-A |
|-------------|-------------|--------------|-------------|---------------|-----------|---------------|
|             | Mean        | Mean         | Mean        | Mean          | Mean      | Mean          |
| Lymphocytes | 140         | 1,615        | 9,549       | 735           | 34,755    | 1,470         |
| T Cells     | 80          | 219          | 14,530      | -5            | 61,194    | 2,650         |
| T Cytotoxic | 80          | 346          | 28,706      | -45           | 58,460    | 1,60          |
| T Helper    | 78          | 64           | 163         | 38            | 60,881    | 5,857         |
| Treg Cells  | 161         | 5,519        | 4,767       | 58            | 94        | 40            |
| B Cells     | 84          | 95           | 198         | 15,988        | 90        | 6             |
| Monocytes   | 10,890      | 395          | 132         | 1,455         | 249       | 662           |

## Повторное использование анализа

Теперь, когда стратегия анализа определена, Вы можете использовать ее, чтобы проанализировать оставшиеся пробирки в Эксперименте. Полные рабочие листы позволяют Вам применять стратегию анализа к серии файлов данных, не сохраняя анализ каждый раз. После предварительного просмотра данных Вы можете распечатать анализ или сохранить его в Tube-specific

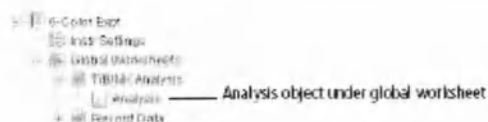
worksheet (Рабочий лист определенной пробирки) (см. следующий раздел Сохранение анализа).

- 1 Переместите указатель Acquisition на следующую пробирку под LWB Образцом.
- 2 Просмотрите данные полного рабочего листа; внесите изменения в гейт, если необходимо. Корректировки будут также применены к следующей пробирке, которая просматривается на полном рабочем листе. Если Вы не хотите изменять полный рабочий лист, сохраняйте анализ, как описано в следующем разделе и вносите изменения на рабочий лист пробирки.

## Сохранение анализа

После создания объектов анализа на полном рабочем листе, анализ не будет сохраняться для каждой пробирки. Если Вы хотите сохранить копию анализа какой-то пробирки, сделайте следующее.

- 1 Откройте полный рабочий лист T/B/NK в Browser.
- 2 Щелкните правой кнопкой мыши по объекту анализа и выберите Copy (Копировать).



- 3 На панели инструментов Worksheet нажмите кнопку Global Worksheets, чтобы переключиться к просмотру Рабочего листа.

- 4 Создайте новый рабочий лист для пробирки назначения; переименуйте рабочий лист соответственно.

- 5 Выберите пробирку в Browser; щелкните правой кнопкой мыши по значку Tube и выберите Paste (Вставить).

Элементы полного рабочего листа скопированы в новый рабочий лист. Вы можете просмотреть анализ, дважды щелкнув по пробирке в Browser.

**Совет** Применяйте анализ к нескольким пробиркам, выбирая более одной пробирки до того, как Вы выберите Paste. Удостоверьтесь, что Вы не выбрали никаких других объектов анализа

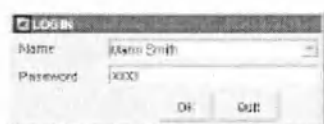
вместе с пробирками. Включите *Tube-specific worksheet*, чтобы автоматически создать новый рабочий лист для вставляемых объектов анализа.

Отметьте, что Вы можете автоматически сохранить копию анализа для каждой пробиркой, включая *Save Analysis After Recording* прежде, чем сделаете запись данных пробирки. В этом случае, графики анализа помещаются в рабочий лист, который является открытым во время записи. Чтобы контролировать, куда помещены графики, создайте новый рабочий лист прежде, чем записаны данные.

## Выход из системы

Когда Вы закончили использование программного обеспечения BD FACSDiva, но не готовы выключить систему, выберите *File> > Log Out* (Выход из системы).

Рабочее пространство BD FACSDiva скроется и появится окно *Log In* (Вход).



Это оставит систему доступной для входа следующего оператора. Чтобы завершить работу системы в конце дня, см. Ежедневное отключение.

## Работа с образцами с использованием программного обеспечения FACSCanto.

При открытии программы появляется рабочий лист. Рабочий лист позволяет вам анализировать группы образцов, настраивать параметры прибора и сохранять данные, получать автоматический анализ.

### Заполнение рабочего листа:

1. Введите имя пациента
2. номер пациента
3. номер пробирки
4. выберите панель
5. Выберите номер карусели если вы используете загрузчик Loader

### Анализ проб

1. Введите всю информацию в рабочий лист
2. Подготовьте Loader (опция)
3. Проверьте готовность прибора, используя окно *Status*
4. из меню выберите показывать *Detectors*
5. Сохраните рабочий лист
6. нажмите *Load tube*
7. последовательно вставляйте все пробирки, с помощью опции *Load tube*
8. Появится окно с результатами
9. Когда все пробы проанализированы, вы вернетесь в рабочий лист
10. В конце дня когда выполните процедуру выключения.

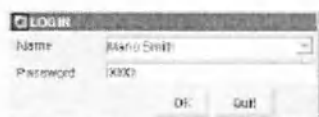
### Ежедневное отключение

В конце дня выполните процедуру Отключение жидкостей, чтобы удалить раствор BD FACSTFlow из всех линий и промыть их заключающим раствором BD FACS. Это препятствует солевым кристаллам забивать жидкостные линии.

1 Удалите пробирку с образцом, если она установлена в проточный цитофлуориметр.

Не оставляйте пробирку в SIT во время отключения жидкостей, поскольку промывочная жидкость и слив будет попадать в пробирку.

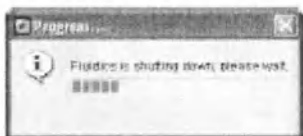
2 Выберите Instrument > Fluidics Shutdown (Прибор > Отключение жидкостей). Следующее сообщение появится.



3 Освободите слив и снова долейте жидкости, если запрошено. См. Опорожнение сливного контейнера или Замена кубитейнера. Если Вы отсоединили какой-либо жидкостный контейнер для долива, заправьте систему перед продолжением.

Чтобы сохранить жидкие линии от наращивания соли, не выходите из программного обеспечения или отключите прибор пока не закончится процедура отключения жидкостей.

4 Нажмите ОК когда увидите сообщение о том, что система может быть отключена.



5 Выключите основную кнопку прибора.

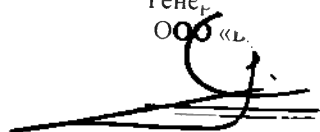
Выключайте подачу тока к проточный цитофлуориметр по крайней мере один раз в день. Выполнение этого приводит к опорожнению ловушки конденсата в стойке с растворами и препятствует переполнению избытка влаги.

Во время отключения Вы должны услышать шипение, вызванное удалением конденсата из насосов стойки с растворами.

6 (Необязательный) Выйдите из программного обеспечения BD FACSDiva и выключите компьютер.

Оставьте компьютер включенным, если Вы будете использовать проточный цитофлуориметр еще в течение дня или будете выполнять автономный анализ.

В насто  
прону  
Гене  
ООО «В.



менте прошито и

23

листов

гор

Семенов А.В.

