

### 【スタートアップ】

1. 本体右側上面のフローセルアクセスドアを開く。
2. PCの電源を入れ、WindowsのLog Inを行う。
3. Adminアイコンを選択し、パスワードを入力した後、Enterを選択(Password : BDIS#1)
4. Windows起動後、BD FACSAria™ 本体左側面にある緑色の本体メイン電源を入れる。
5. この状態でBD FACSAria™ 本体が起動するまで3分待つ。
6. BD FACSDivaソフトウェアのアイコンを選択して右クリック、メニューを開く。
7. メニューよりOpenを選択して起動。
8. Name : Administratorを選択、Password:なし
9. Cytometer connectedにて、接続が完了。
10. BD FACSDivaソフトウェアと本体の接続終了後、CST Mismatch ウィンドウが表示される → Use CST Settingsを選択。
11. 送液ラインの気泡抜き。CytometerメニューのCleaning ModesからPrime after Tank Refillを選択。
12. 全ての項目にチェックを入れ、Primeを実行することにより、送液ラインの気泡を除去。
13. シースフィルターバルブを半時計方向に一回転ほど回して開き、気泡を除去。
14. 流路系のスタートアップ。Cytometerメニューより、Fluidics Startupを選択。Fluidics Startupのウィンドウが出てくる。
15. シースタンクにエアコネクターとシースラインが接続されていることを確認し、“Done”をクリック。
16. Closed-loop ノズルが装着されていることを確認し、“Done”をクリック。※Fluidics Startupのプロセスが開始。約7分間。
17. スタートアッププロセス終了後、Closed-loop ノズルを取り外し、“Done”をクリック。“OK”をクリック。
18. Closed-loop ノズルを固定しているノズルレバーを反時計方向に回し、Closed-loop ノズルを開放する。
19. Closed-loop ノズル末端の両端をつまみ、Closed-loop ノズルを水平に取り外す（無理に力がかかる必要はない）。
20. O-ring がノズルに装着されていることを確認。
21. Closed-loop ノズル先端部分に洗ビンで蒸留水をかけ、キムワイブなどでO-ring周辺の水分を吸い取るように優しく取り除き、所定の場所に置く。
22. ノズル挿入口が乾いているか確認。濡れていれば綿棒でふき取る。
23. ノズルの先端部分に洗ビンで蒸留水をかける。
24. キムワイブなどでO-ring周辺の水分を取り除く（軽く当てる程度）。
25. 目的のノズルを挿入し、ノズルレバーを垂直に戻し固定する。

### 【送液の確認】

26. ディフレクションプレートの電圧が切れていること(OFF)を確認 (横の赤ランプ)。
27. ソートブロックを開け、クリーニング後のディフレクションプレートを取り付ける。
28. Sort メニューの Sort Setup より、装着しているノズルと同じ Sort Setup を選択。
29. Stream ボタンを On にする。



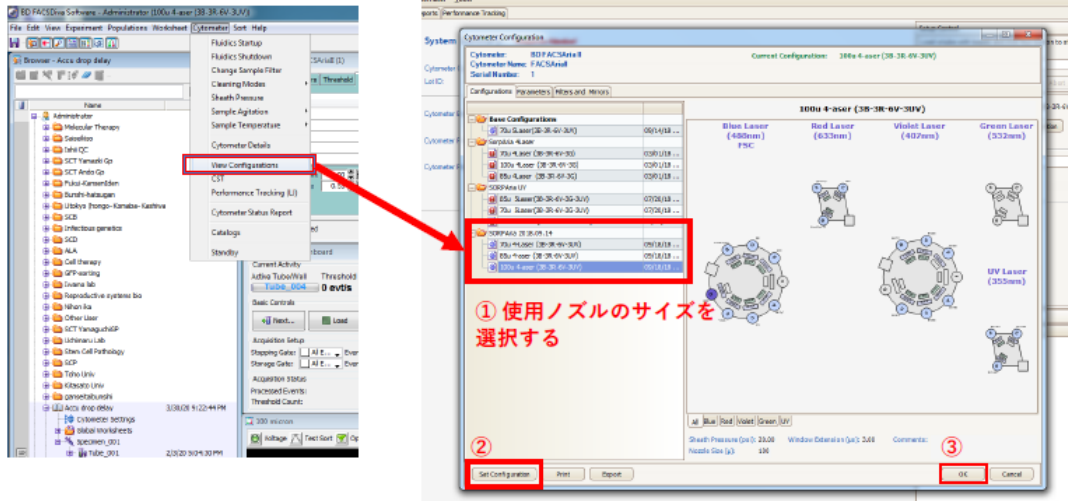
30. ストリームの状態を確認。適切にストリームが形成されていない場合には、ストリームを止めて、再度ノズルを取り付けなおす。
31. センターアスピレーターを中心にストリームが入っていない場合は、Adjustment Screw を緩め、ソートブロックを左右に動かすことで、センターアスピレーター的位置をストリームに合わせる。
32. センターアスピレーター、および、左右のアスピレーターポケットに FACSRinse を 10mL ずつ吸引させ、アスピレーターを洗浄。
33. 次に滅菌水を同様に 10 mL ずつ吸引させ洗浄。
34. ソートブロックのドアを閉じる。

### 【液滴形成の維持】

35. Drop1 の Actual Value が 100-350 前後に入るように、Ampl の値を微調整する。
36. Drop1 の Target Value に、実測値である Actual Value を入力。
37. Gap の Target Value を確認。100 micron では 10 が Target Value の初期値。
38. 「Sweet Spot」を On にし、液滴形成位置を維持する。
39. 以下に従ってノズルのサイズにあわせて CST 設定の変更を行う。

# CST設定の変更方法

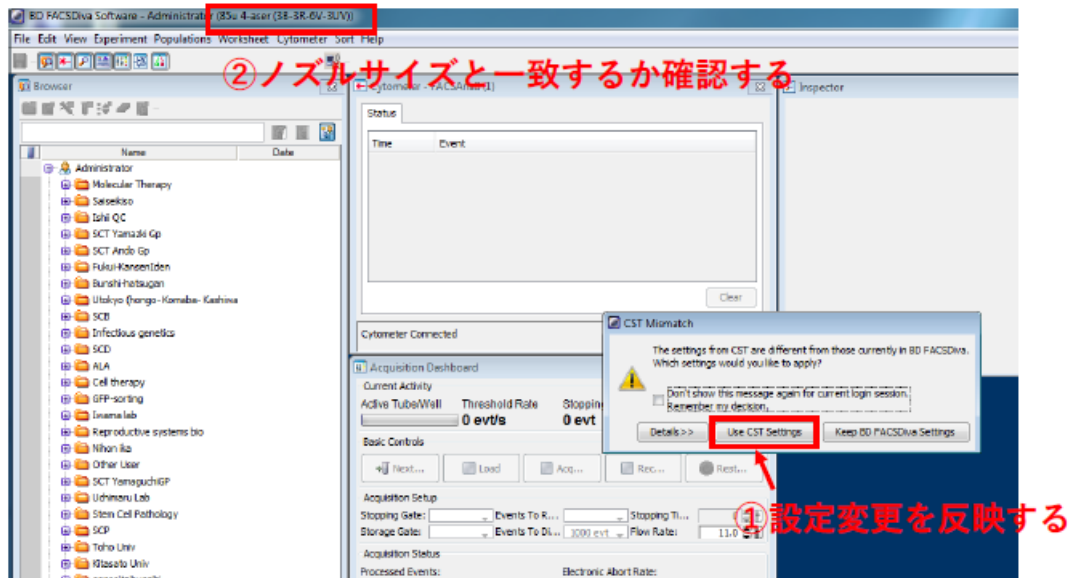
## Cytometer→View Configuration



① 使用ノズルのサイズを選択する

④ CST settingを終了する

## CST setting終了後



③ 設定変更を反映する

## 【CSTによるCheck Performanceの実行】

40. フローセルアクセスドアが閉じているか確認。(開いているとCST進まない)

41. Fluidics Control WindowのSweet SpotをOFF。



42. Cytometer メニューより CST..を選択。
43. Diva ソフトと本体との接続が切断され、(CST) 画面が起動。
44. Setup Control ウィンドウの Characterize より Check Performance を選択。
45. Setup Beads の Lot ID (CST ビーズ) が正しく選択されていることを確認。
46. 5ml の測定用チューブに CST ビーズを用意。
47. ビーズのボトルを Vortex Mixer などにかけてよく混和した後、0.35ml の FACSFlow あるいは PBS に対して 1 滴の CST ビーズを加える。
48. ビーズを Load するように指示があるので、ビーズを Loading Port にセットし、OK をクリック。
49. Setup Control ウィンドウの Run をクリック。
50. ビーズが Load され、Check Performance が開始される。
51. Running Cytometer Performance...の画面が表示され、ビーズの取り込みが自動的に行われる。
52. Check Performance の Setup Tasks の項目がすべて終了するとビーズが Unload される。
53. セットアップ終了のメッセージが表示されるので、View Report をクリックし、Cytometer Performance Report を表示。各 Laser の Primary Channel の Bright Bead % Robust CV が 6 以下であることを確認する。P/F のすべての項目が、Pass であることを確認。
54. Cytometer Setup and Tracking 画面の File メニューより Exit を選択。
55. Cytometer Setup & Tracking が終了し、Diva ソフトが立ち上がる。
56. CST Mismatch の information が表示。
57. Use CST Settings を選択。

### 【Drop Delay の設定(ソーティング)】

58. ストリームが適切に形成されていること(SweetSpot が On、Drop1 の値が左右同じである)、センターアスピレーターを中心にストリームが入っていること、ディフレクションプレートが装着され、濡れていないことを確認する。
59. Side Stream ウィンドウの「Voltage」ボタンを On 緑→赤にして、ディフレクションプレートに電圧をかける。
60. サイドストリームの確認を行うために、両端のスライダー(は中心に向かって絞り(0にする)、内側の左右のスライダーを中心から 1/3 程度(37 くらい?)に調整する。
61. 「Test Sort」ボタンを On にして、サイドストリームを形成させる。
62. センターとレフトストリームが最も明るくなる位置に、「Micrometer Dial」を調整する。
63. 「Optical Filter」ボタンを On にし数値が「0.0」になることを確認。もし、数値が 0.0 にならない場合には、Diode レーザーの照射位置を微調整する。

64. 「Optical Filter」を Off にする。このとき、Optical Filter の左枠に Left ストリームが入っていることを確認。ずれていた場合はスライダーを用いて位置調整する。
65. センターストリームが横に広がっていた場合には、Sort Control ウィンドウの 2nd, 3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup> Drop の値を調整する。
66. 「Test Sort」、「Voltage」を Off にする。
67. メニューバーの「Experiment」→「New Experiment」を選択し、Experiment Template より「Accudrop Drop Delay」を選択後、「OK」をクリック。
68. Tube\_001 をアクティブにする。
69. Tube\_001 の「+」をクリックし、下層にある「Sort Layout\_001」をダブルクリックし、Sort Layout を表示する。
70. Accudrop Beads を準備。チューブに FACSFlow を 0.7 mL 分注し、よく攪拌した Accudrop Beads 1 滴を滴下し、攪拌する。
71. チューブを Loding Port にセットし、フローセルアクセスドアを閉めて「Load」ボタンをクリック。
72. Breakoff ウィンドウにて Drop1 の Target Value に Actual Value と同じ数値を入力。
73. Flow Rate を 1.0~5.0 の範囲で調整し、Threshold Rate が下記の値になるように設定。  
70 micron=1,000 to 3,000、100 micron=600 to 1,500
74. Side Stream ウィンドウにある「Voltage」ボタンを On にし、Sort Layout ウィンドウにある「Sort」ボタンをクリック。Aspirator Drawer を開くか確認するウィンドウが出ますので、ここでは「Cancel」を選択。
75. Accudrop Beads がソーティングされるので、次に Drop Delay の設定を行う。
76. Cytometer ウィンドウの Laser タブを開き、Window Extension の数値を 0 にする。  
※初期値を忘れないようにメモする。
77. Optical Filter を On。
78. Sort Layout ウィンドウで Precision を「initial」に設定。
79. Side Stream ウィンドウを確認し、左側のソートゲートの%が、ほぼ 100%になるように、Drop Delay の値を調整する。
80. Initial モードでの設定終了後、Sort Layout の Precision を「Fine Tune」に切り替える。
81. 左側のソートゲートが、90%以上でかつ最大になるように Drop Delay を微調整する。
82. 設定が終了したら、Sort Layout ウィンドウの「Sort」ボタンをクリック。
83. Sort Report の保存確認画面が表示されるので、「Cancel」をクリック。
84. 「Voltage」を Off にし、「Unload」をクリック。
85. 最後に Cytometer ウィンドウの Laser タブの Window Extension の数値を初期値に戻す。

#### 【サイドストリームの角度設定(ソーティング)】

86. ソートブロック下部に Universal Top をセットする。(チューブをセットする土台)

87. 目的の Sort Collection Device に空のチューブをセットし、Universal Top に取り付ける。
88. ソートブロックのドアを開く。
89. Side Stream ウィンドウあるいは Sort Layout ウィンドウの Waste Drawer ボタンをクリックして Aspirator Drawer を開く。
90. Side Stream ウィンドウの「Voltage」ボタンをクリックし、電圧をかける。  
※4500V に帯電するので、絶対に触れない。
91. サイドストリームの位置を調整するために、使用しないサイドストリームのスライダは内側(数値を 0) に絞る。※目安として、内側のスライダを使用する場合は数値を 30 前後、外側のスライダを使用する場合は数値を 90 前後に設定しておく。
92. 「Test Sort」ボタンをクリックし、サンプルチューブにストリームが入るよう、各ストリームのスライダを調節する。※細胞へのダメージを軽減するために、サイドストリームがチューブ側面に衝突しない角度に調節する。
93. 設定後、「Test Sort」と「Voltage」を Off にする。
94. Waste Drawer をクリックし、Aspirator Drawer を閉じ、ソートブロックのドアも閉じる。

以上より、ソーティング実験のスタートアップは完了。

### 【ソートの実施】

1. 細胞を測定した Experiment をダブルクリックで開く。(本が開いた状態)
2. Specimen の「+」をクリックし、Tube の Acquisition Pointer を On にしアクティブにする。
3. Experiment 内の目的の Global Sheet を右クリックし、「New Sort Layout」を選択すると、Global Sheet の下層に Sort Layout が作成される。
4. Sort Layout をそれぞれ設定する。
  - Device: ソートするチューブ数は? Plate Type ?
  - Precision: 精度
  - Target Events: ソートしたい細胞数
  - Save Sort Reports: Ask User
  - Sort Window: ゲート情報の入力
5. Sort Collection Device のチューブを、培地に入れた回収用チューブに交換し、ソートブロックにセット。
6. フローセルアクセスドアを閉め、サンプルを「Load」する。
7. Sort Layout の「Sort」をクリックすると、Aspirator Drawer の開閉を確認してくるので、「OK」をクリックし、ソートを開始。
8. 目的細胞数に達した後、「Sort」ボタンをクリックしてソーティングを終了。
9. Sort Report の保存確認メッセージが表示されるので、必要に応じて保存。

10. 「Voltage」ボタンを Off にして、サンプルを「Unload」にする。
11. サンプルラインにサンプルの付着が考えられる場合には、メニューバーの「Cytometer」→「Cleaning Modes」→「Sample Line Back Flash」を行う。
12. Sort Report は sort メニューの Sort Report から表示できる。

【シャットダウン】

機器付近にある簡易マニュアル参照。

## 液滴形成における Sweet Spot の機能

**Sweet Spot** : は、Drop1 および Gap の値を一定に保ち、自動で液滴形成が開始される Breakoff Point の位置を維持します。目的細胞に荷電をかける上で、常時一定な液滴形成位置が維持されることは、高精度のソーティングにおいて必要不可欠な条件となります。

Sweet Spot は、液滴形成の画像を 600 Pixel で画像解析し、Drop1 と Gap の位置を Target value の値で維持するように、自動で振幅幅（Amplitude）の調整を行っています。

**Breakoff Point** : 連続した水流の最下部。水流が液滴に変わる液滴形成位置の起点を示します。

**Drop1** : 1 滴目の液滴の中心位置となります。Drop1 の値は、ノズルごとに異なりますが、同一のノズルでは前回の設定とほぼ同じ値となります。Drop1 の値は、送液開始後、30 分ほどで安定します。

※ Drop1 の変動は、 $\pm 10$  pixel までの差は許容されます。それ以上の場合は値を再入力します。また、室温の大きな変動は Drop1 の値に影響します。

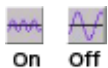
**Gap** : Breakoff point と Drop1 との間隔となります。Gap の値が増減すると液滴形成の位置が変わります。ソーティング中は  $\text{Gap} \pm 3$  以上に変動が起った際には、ソーティングが停止します。

**Ampl** : Amplitude 振幅幅であり、振幅幅の値の増減により Break off Point と Drop1 の位置を調節します。

Sweet Spot が On の際には、Drop1 と Gap を基準にして自動で Ampl の値が調整されます。

**Freq** : Frequency 振動数（kHz）であり、液滴形成数を示します。基本的には初期設定を使用しますが、目的に応じた変更は可能です。

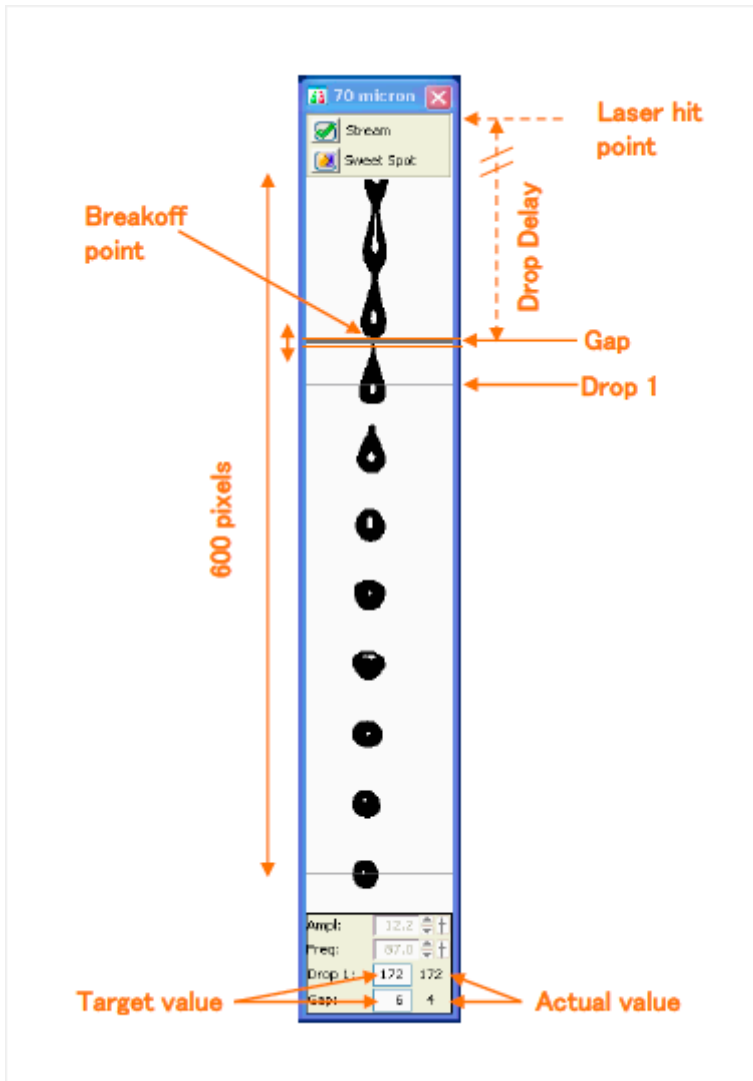
**Attenuation** : 振幅幅の粗調整を行います。On にすると振幅幅が減衰されます。70micron モードでは Attenuation を Off にします。85,100,130micron モードでは、個々のノズルに応じた切り替えが必要です。



**Laser hit point** : 細胞の解析が開始される基準点となります。

**Drop Delay** : Drop Delay は、Laser hit point で認識された細胞が水流中を流れ、Breakoff Point まで到達するまでの時間を示します。ソーティングにおいては、この Drop Delay を基準に目的の液滴に荷電をかけていきます。





## Sort Setup : 70, 85, 100, 130 micron モード

<Sort Setup>

ノズルと Sort Setup は、ソーティング時に使用する細胞の大きさと状態、ソーティングスピードにより適切に選択する必要があります。

**70 micronモード** : 70 $\mu$ m ノズル、87kHz、70psi の設定となり、一般的に圧力に強い一般的な血球細胞のソーティング時に使用します。70 micron モードでは、87,000 滴/秒の液滴を形成しており、最も高速でのソーティングが可能となります。

**85 micron モード** : 85 $\mu$ m ノズル、47kHz、45psi の設定となり、加圧の影響を受けやすい活性化細胞や付着系の細胞に適している高速ソートの設定です。また、解析を目的とする場合には、70 micron モードより流速が下がるため検出感度が若干上昇します。

**100 micron モード** : 100 $\mu$ m ノズル、30kHz、20psi の設定となり、大型の細胞や ACDU を使用する際に使用するソートモードです。100 micron モードは、圧力に弱い細胞にも適用することが可能です。

**130 micron:モード** : 130 $\mu$ m ノズル（オプション）、12kHz、10psi の設定となり、特に大型の細胞をソーティングするモードです。130 micron モードは、圧力に弱い細胞にも適用することが可能です。

