BD FACSAria™ Fusion セルソーター
簡易マニュアル

Ver. 1.3

日本ベクトン・ディッキンソン株式会社

BD Life Sciences-Biosciences

機器シリアル番号：_____

BD FACSAria™ Fusion セルソーターシステム使用上の注意

1. サンプルは測定直前にメッシュを通してください。

FACS のトラブルの多くは凝集塊をそのまま流してしまうことによる、流路の詰まりが主な原因です。サンプルは必ず測定直前にメッシュ（Falcon® セルストレーナー5mL チューブ用 35μm; Cat#352235 を推奨しています）を通してください。

2. サンプルは測定直前によく攪拌してください。

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

3. 測定データはその都度持ち帰ってください。

データを HD に放置しておくことは、データ保全の問題のみならず、機器の正常作動にも影響を及ぼします。PC に USB を搭載していますので、フラッシュメモリー（必ずウイルスチェック済の物）などをご利用ください。ただし、施設内にルールがある際にはそれにしたがってください。

4. 機器洗浄を徹底してください。

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

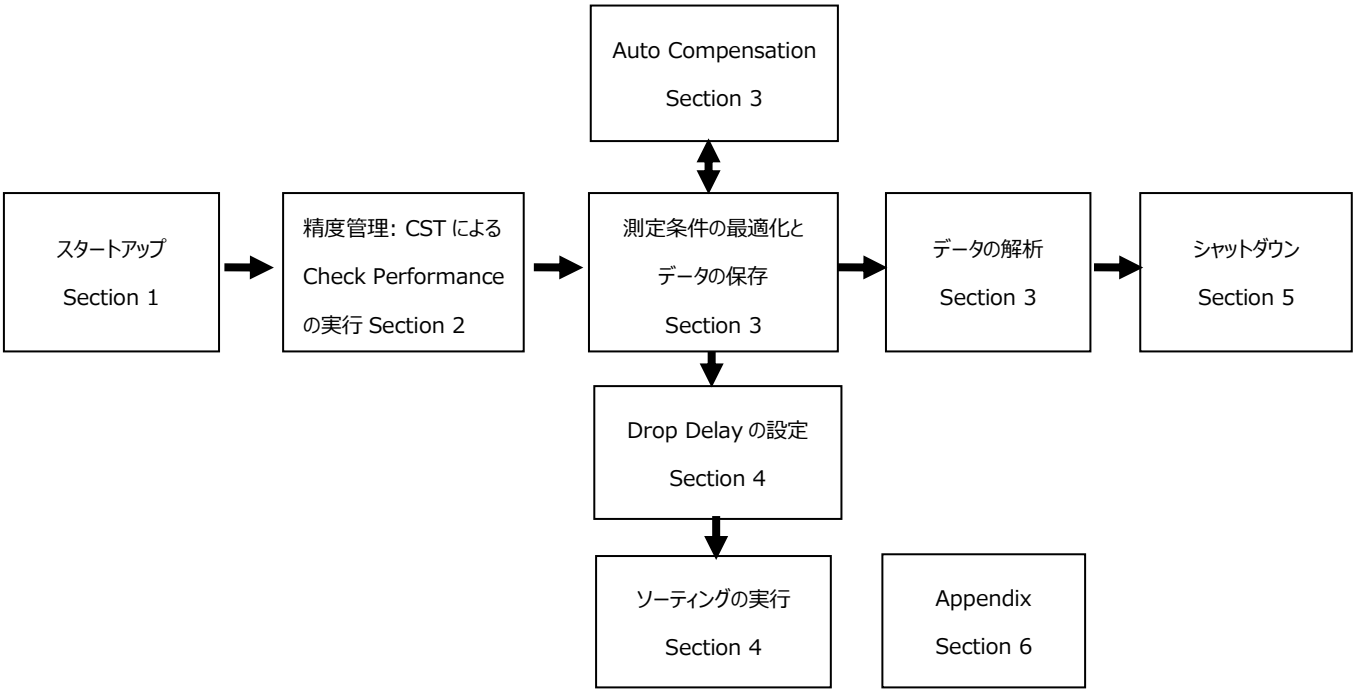
機器・試薬の使用方法および学術に関するサポート: 0120-4890-77 (平日 9:00-17:00)

機器のトラブルに関するサポート: 0120-7099-12 (平日 9:00-18:00)

上記電話にてオペレーターが対応いたします。

また、機器・試薬の使用方法および学術に関するご質問は tech_cell@bd.com にても承ります。

BD FACSAria™ Fusion セルソーターシステム簡易取り扱いガイド



Section1: スタートアップ

＜本体および PC の起動＞

① コンプレッサーの電源を入れます。

② PC の電源を入れます。

③ PC が **Windows7** の場合（BD FACSDiva™ software Ver.**8.0** 以降）

・ Windows の Log On を実施します（**Admin** アイコンを選択、パスワードは **BDIS#1** 大文字です)。

PC が **Windows10** の場合（BD FACSDiva™ software Ver.**9.0** 以降）

・ 起動後、キーボードの「Ctrl+Alt+Delete」にて画面ロックを解除します。

・ Windows の Log On を実施します（User Name は **BDAdmin**、パスワードは **BDIS#1$$** 大文字でそれぞれ入力します)。

④ 本体右側面のメイン電源（緑）と搭載されているレーザーの電源をすべて入れます。

⑤ **3 分後**、Diva ソフトウェアを起動

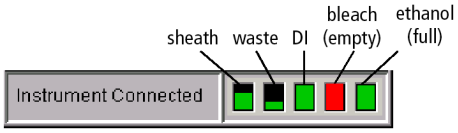
・ Diva ソフトウェアのアイコンを右クリックし、プルダウンメニューの「Open」を選択します。

・ Log In 画面が表示されます。パスワードは不要です。「OK」を押すと Diva ソフトウェアが立ち上がります。

⑥ Cytometer ウインドウの下部が「Cytometer Connecting」から「Cytometer Connected」に切り替わります。

⑦ Diva ソフトウェアと本体の接続終了後、CST Mismatch ウインドウが表示されますので、「Use CST Settings」を選択します。

＜流路およびフィルターの気泡の除去＞

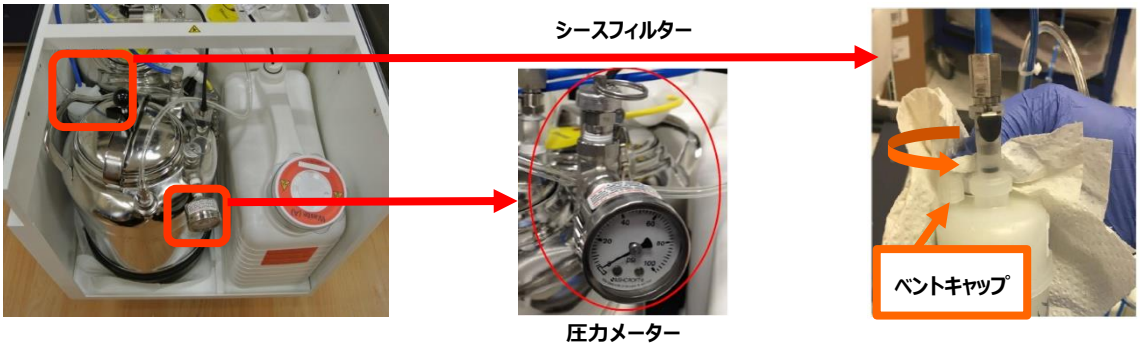


① Cytometer ウインドウから Fluidics Cart の液量の確認をしてください。必要に応じて溶液の補充を行います。※シースフィルターのベントキャップが閉まっていることを確認してください。

② メニューバーの「Cytometer」→「Cleaning Modes」→「Prime After Tank Refill」を選択し、チェックボックスすべてにチェックを入れた後、「OK」をクリックします。終了のメッセージがでたら「OK」をクリックします。

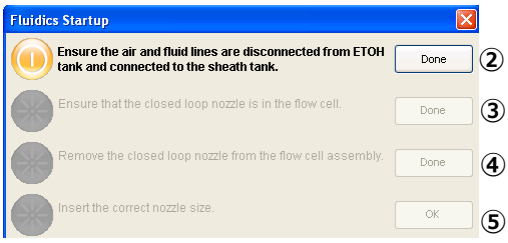
③ シースタンクに圧力がかかりますので、圧力メーターが上がっていることを確認します。

④ シースフィルターに気泡があるかを確認します。気泡がある場合にはベントキャップを反時計方向におよそ 1/4 回転させてシース液とともに気泡を除去します。**※シースフィルターには圧力がかかっているため、バルブはゆっくり緩めてください。**



＜送液系の起動＞

① メニューバーの「Cytometer」→「Fluidics Startup」をクリックします。画面上に Fluidics Startup ウインドウが表示されます。



② シースタンクにエアーラインとシースラインが接続されていることを確認し、「Done」をクリックします。

③ フローセルに Closed-loop ノズルが装着されていることを確認します。「Done」をクリックすると Fluidics Startup がはじまります（約 7 分間かかります)。

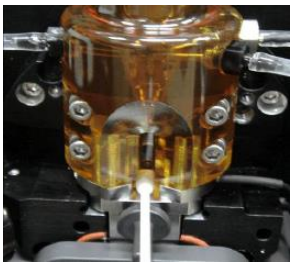
④ Fluidics Startup 終了後、ノズルレバーを反時計方向にまわして Closed-loop ノズルを取り外して洗浄しノズルホルダーにセットした後、「Done」をクリックします。

⑤ **ノズルを装着しない状態で**「OK」をクリックします。※ノズルを装着する前に次項にしたがってフローセルの洗浄を行います。

<フローセルの洗浄>

① Breakoff ウインドウの「Stream」ボタンをクリックし、フローセル内を数秒間フラッシングした後、「Stream」をクリックしてストリームを停止します。

② 小児用綿棒をフローセルに挿入します。※ノズルをつけたままフローセルの洗浄を行うと、ノズルの O-ring がはずれてしまうおそれがあります。



③ メニューバーの「Cytometer」→「Cleaning Modes」→「Clean Flow Cell」を選択します。

④ 50% Contrad 溶液 2mL が入ったチューブをよく撹拌して Loading Port にセットし、「OK」をクリックします。

⑤ 作業終了のメッセージが表示されたら「OK」をクリックし、**1 分間**静置します。※機器に不具合が生じるおそれがあるので 15 分以上放置しないでください。

⑥ 綿棒を取り外し、Breakoff ウインドウの「Stream」ボタンをクリックします。洗浄剤と汚れを洗い流します。

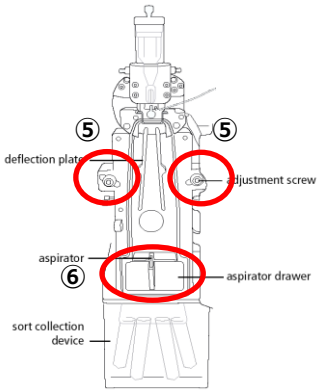
⑦ メニューバーの「Cytometer」→「Cleaning Modes」→「Sample Line Backflush」を選択します。「Start」ボタンを押し **30 秒以上**サンプルラインをフラッシングした後、「Stop」→「Cancel」ボタンを押して停止させます。

⑧ 「Stream」ボタンをクリックし、送液を停止します。

⑨ 綿棒やキムワイプを用いてノズルレバー、およびノズル挿入口、ソートブロック内部、ディフレクションプレート接続部、ディフレクションプレート、カメラウインドウのクリーニングを行います。

⑩ 測定する細胞に適したノズルを洗浄した後、フローセルに装着します。※ノズル選択の詳細は BD FACSAria™ Cell Sorter Training Manual (Section2 ノズルの選択: 70、85、100、130 micron) を参照してください。

<送液の確認>



① ソートブロックのドアを開きディフレクションプレートを装着します。

② メニューバーの「Sort」→「Sort Setup」より装着しているノズルと同じ Sort Setup を選択します。

③ 「Stream」ボタンを On にします。

④ ストリームの状態を確認します。適切な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します。※ストリーム形成の詳細は BD FACSAria™ Cell Sorter Training Manual (Section2 送液の確認: Stream の状態に関して) を参照してください。

⑤ センターアスピレーターの中心にストリームが入ってない場合には、ソートブロックの位置を調整します。

⑥ センターアスピレーターと左右のアスピレーターポケットにイオン交換水を約 10mL ずつ入れ吸引させます。

⑦ ソートブロックのドアを閉めます。

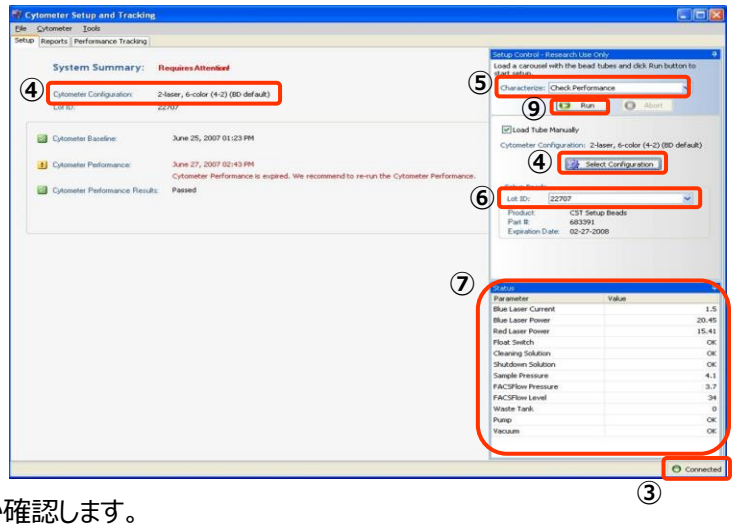
Section2: 精度管理（CST による Check Performance の実行）

① フローセルアクセスドアを開け、CST 設定用の ND フィルター（1.5）が装着されていることを確認します。

② メニューバーの「Cytometer」→「CST」をクリックします。

③ Diva ソフトの Connection が切断され、CST 画面が起動し接続されたことを確認します。

④ Setup Control ウインドウから現在セットされている Configuration が使用する Sort Setup、ノズルとあっているか確認します。※変更が必要な場合は「Select Configuration」から使用するノズルおよびレーザーの設定を選択し、「Set Configuration」をクリックしてください。



⑤ Setup Control ウインドウの Characterize より「Check Performance」を選択します。

⑥ Setup Beads の Lot ID が正しく選択されているか確認します。

⑦ Status ウインドウから機器状態を確認します。

⑧ 5mL の測定チューブに 350μL の FACSFlow とよく混和した CST Beads を 1 滴加えます。※調製後のビーズは遮光下で保存し、2-8°C では 24 時間以内に、15-25°C では 8 時間以内にご使用ください。

⑨ CST ビーズの入ったチューブをよく撹拌して Loading Port にセットし、フローセルアクセスドアを閉めて「Run」をクリックします。確認のメッセージが表示されますので「OK」をクリックします。

⑩ Setup Tasks 表示のすべての項目に✔が入り終了すると、チューブが Unload されます。「View Report」をクリックし Cytometer Performance Report を確認します。赤字（エラー）がなければ問題ありません。Fail が出た場合はフローセルの洗浄等を行います。※詳細は BD FACSAria™ Cell Sorter Training Manual (Section2 精度管理におけるトラブルシューティング) を参照してください。

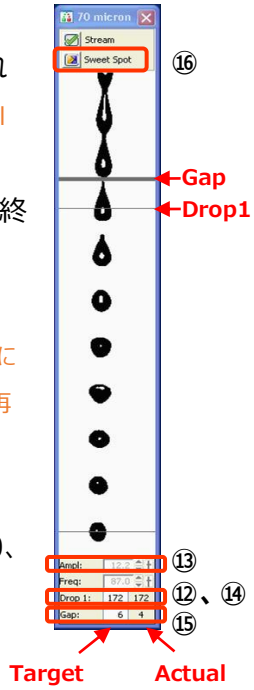
⑪ CST 終了後、メニューバーの「File」→「Exit」を選択します。Diva ソフトウェアが起動し本体の接続終了後、CST Mismatch ウインドウが表示されますので「Use CST Settings」を選択します。

⑫ ストリームの Drop1 の値が落ち着くまで 1 分程度待ちます。

⑬ Drop1 の Actual Value が 200 前後になるように Ampl の値を微調整します。※Ampl が最大値にしても液滴が形成されない場合には、Side Stream Control ウインドウの Attenuation を Off にし Ampl 値の再調整を行います。

⑭ Drop1 の Target Value に Actual Value の値を入力します。

⑮ Gap の Target Value を確認します。70 micron は 6、85 micron は 7、100 micron は 10、130 micron は 12 が初期値です。※初期値で Sweet Spot を On にすると、自動的に Gap の Actual Value が調整されます。



⑯ 「Sweet Spot」を On にし、液滴形成位置を維持します。

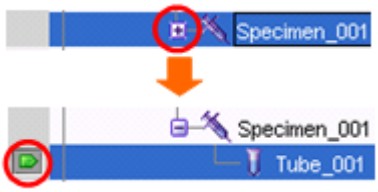
⑰ 必要に応じて、測定する細胞に適した ND フィルターを装着します。

Section3-1: 測定条件の最適化とデータの保存

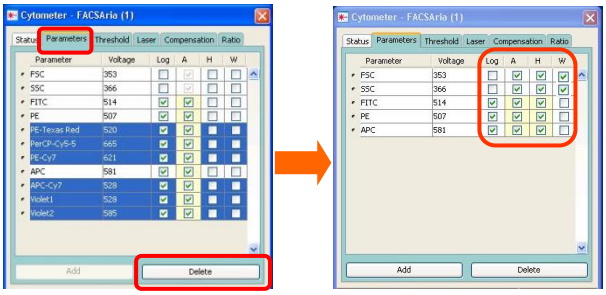
<Experiment およびプロットの作成>

① Browser ウインドウに新しいフォルダおよび Experiment を作成します。
既存のデータを開く場合はアイコンをダブルクリックします。 

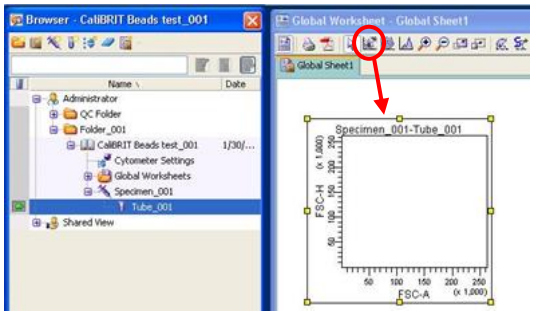
② Specimen (注射器のマーク) の「+」をクリックし下層にある Tube の「Acquisition Pointer」をクリックします。Acquisition Dashboard および測定に必要なウインドウが使用可能になります。

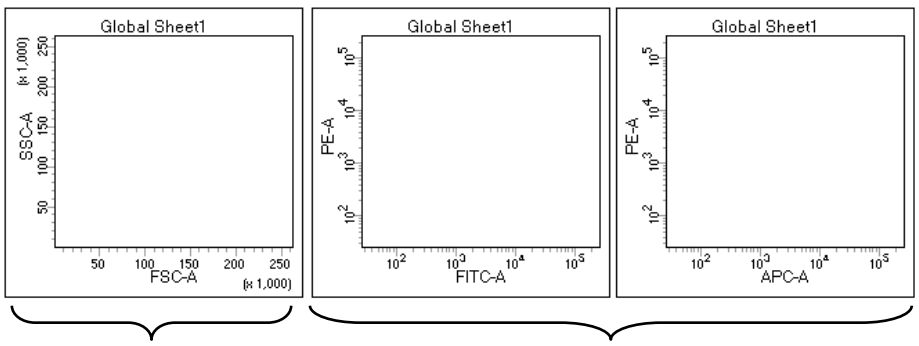


③ Cytometer ウインドウの Parameters タブを開き、Delete ボタンで不要なパラメーターを削除します。
一般的な解析の場合、FSC 及び SSC は log のチェックを外し、蛍光パラメーターは log にチェックを入れます。
A (Area) の欄にチェックが入っていることを確認します。
必要に応じて H (Height) と W (Width) にもチェックを入れます。



④ ワークシート上部のアイコンを選択し、ワークシート上にデータを表示するプロットを作成します。プロットは散乱光プロット (FSC-A vs SSC-A)、蛍光プロット (ex: FITC-A vs PE-A) を作成します。蛍光プロットは使用する蛍光色素に準じて作成します。必要に応じて Area Scaling Factor 調整用のプロットも用意します (Section6: Appendix 参照)。





散乱光プロット　　蛍光プロット (ex. FITC、PE、APC)

<散乱光および蛍光の電圧調整>

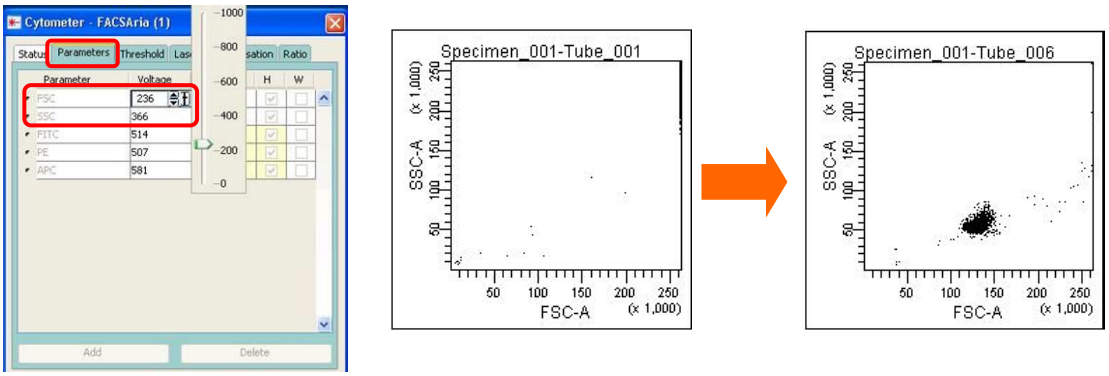
① ネガティブコントロールサンプルを Loading Port にセットします。

② Flow Rate を 1.0～3.0 の範囲で調節します。

③ Events to Display を 1,000 に設定します。

④ フローセルアクセスドアを閉め、Acquisition Dashboard の「Load」ボタンをクリックします。

⑤ Cytometer ウインドウの Parameters タブから、散乱光（FSC、SSC）の Voltage を目的細胞集団が測定できるように、適切に調整します。

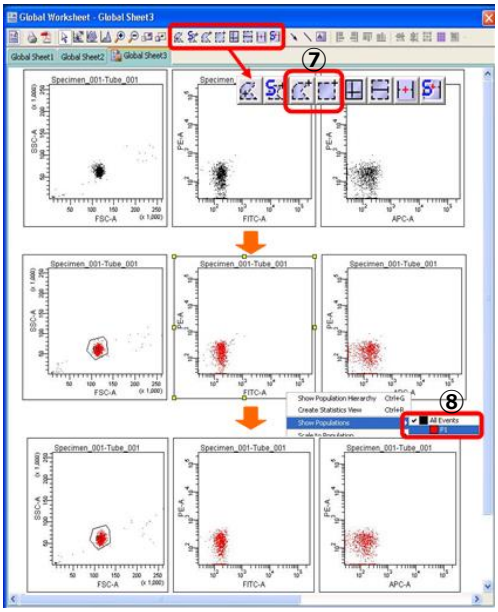


⑥ 必要に応じて Cytometer ウインドウの「Threshold」タブでデブリのカット、「Laser」タブで Area Scaling Factor の調整をおこないます。※Threshold および Area Scaling Factor の調整の詳細は Section6: Appendix を参照してください。

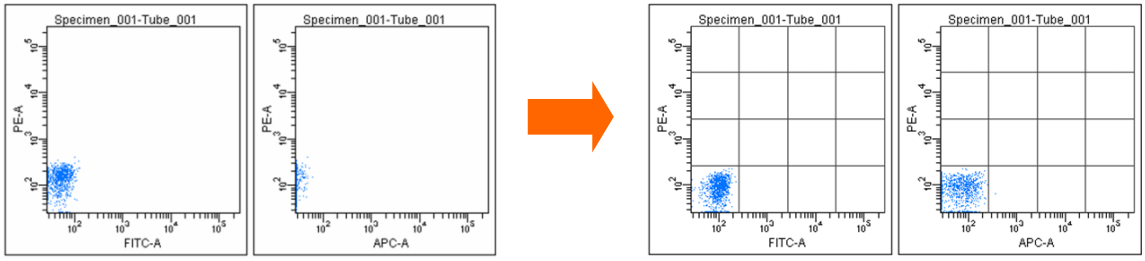
⑦ 散乱光プロットで目的細胞集団をゲーティングします。

⑧ ポピュレーションを展開したい蛍光プロットを右クリックし、「Show Population」で P1 ゲートを選択します。

⑨ 散乱光プロット上で右クリックし、「Show Population Hierarchy」を選択します。Hierarchy ウインドウにはポピュレーションのイベント数、パーセンテージなどが表示されます。



⑩ ネガティブコントロールサンプルを使用して、蛍光プロット上でネガティブ領域を決定します。Cytometer ウインドウの「Parameters」タブを選択し、蛍光色素の Voltage を調整します。



⑪ ネガティブ領域調整後、Acquisition Dashboard の「Unload」をクリックしてサンプルチューブを取り外します。

⑫ 最後に測定したいサンプル（ポジティブサンプル）を Load し、ポジティブポピュレーションがプロット内の適切な位置に表示されていることを確認します。

＜蛍光補正: Compensation＞

蛍光色素を 2 色以上使用しており蛍光の漏れ込みがある場合、単染色サンプルを使用して蛍光補正を行います。Manual Compensation と Auto Compensation の 2 通りがあります。

Manual compensation

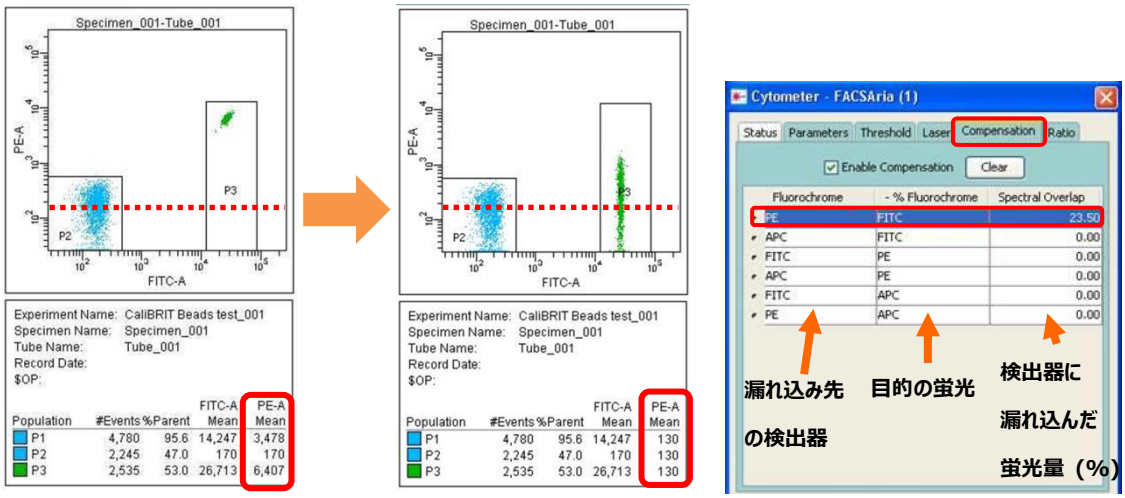
① Loading Port に蛍光補正用の単染色サンプルをセットし「Load」ボタンをクリックします。データ表示後、「Unload」をクリックしてサンプルチューブを取り外します。

② ゲートメニューから四角形ゲートを選択しネガティブとポジティブポピュレーションにゲートを設定します。

③ 目的の蛍光プロットを右クリックし「Create Statistics View」を選択して、統計データを表示します。

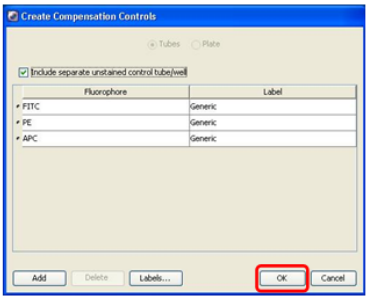
④ Cytometer ウインドウの「Compensation」タブを開き、蛍光補正を行います。PE 検出器への FITC の漏れ込みを調整する場合には、統計データの PE-A の Mean 値がポジティブポピュレーションとネガティブポピュレーションでほぼ同じになるように Spectral Overlap の値を調整します。

⑤ 他の蛍光補正も同様に行います。※Compensation 調整後、蛍光の検出器の Voltage は変更しないでください。Voltage を変更した場合は、Compensation を再調整してください。



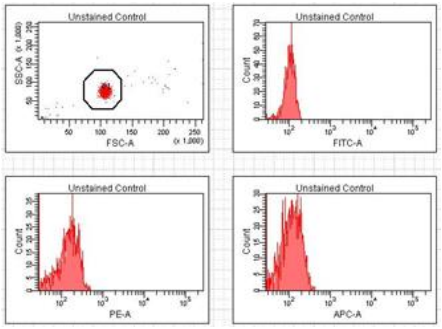
Auto Compensation

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



② Compensation Controls の「＋」をクリックして、下層の Unstained Control の Acquisition Pointer を選択します。ネガティブコントロールサンプルをセットして「Load」ボタンを押し、目的集団に P1 のゲートを移動します。

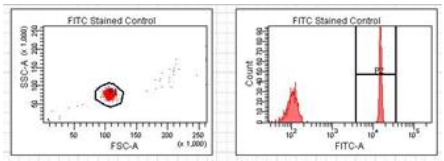
③ Acquisition Dashboard の「Record Data」をクリックし、データの保存を開始します。ネガティブコントロールサンプルの取込み終了後、「Unload」ボタンを押しサンプルをはずします。



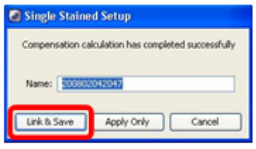
④ P1 ポピュレーションを右クリックし「Apply to Compensation Controls」を選択します。

⑤ Acquisition Dashboard 上の「Next Tube」をクリックし、次の単染色サンプルをセットします。「Load」→「Record Data」をクリックしてデータを保存した後、「Unload」ボタンをクリックしてサンプルをはずします。必要に応じて、P2 ゲートを適切に設定します。

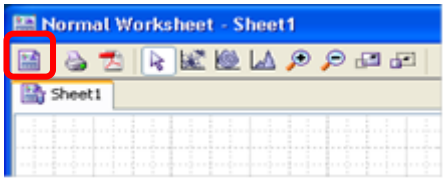
⑥ 同様の操作を繰り返します。



⑦ メニューバーの「Experiment」→「Compensation Setup」→「Calculate Compensation」を選択します。蛍光補正値が適切に計算された場合、Single Stained Setup ウインドウが表示されるのでファイル名を入力し、「Link & Save」を選択します。



⑧ Acquisition Pointer を Tube_001 に切り替えます。Worksheet 画面を Sheet から Global Worksheet に切り替えます。Cytometer ウインドウの「Compensation」タブの Spectral Overlap に、蛍光補正値が入っていることを確認します。※Compensation 調整後、蛍光の検出器の Voltage は変更しないでください。Voltage を変更した場合は、Compensation を再調整してください。



<データの保存>

① 電圧調整や蛍光補正などの機器設定後、サンプルのデータ保存を行います。Acquisition Dashboard の「Stopping Gate」をクリックし、プルダウンメニューから All Events もしくはポピュレーションを選択します。
※「Stopping Gate」で選択されたポピュレーションが、指定されたイベント数に達するまでデータが取得されます。

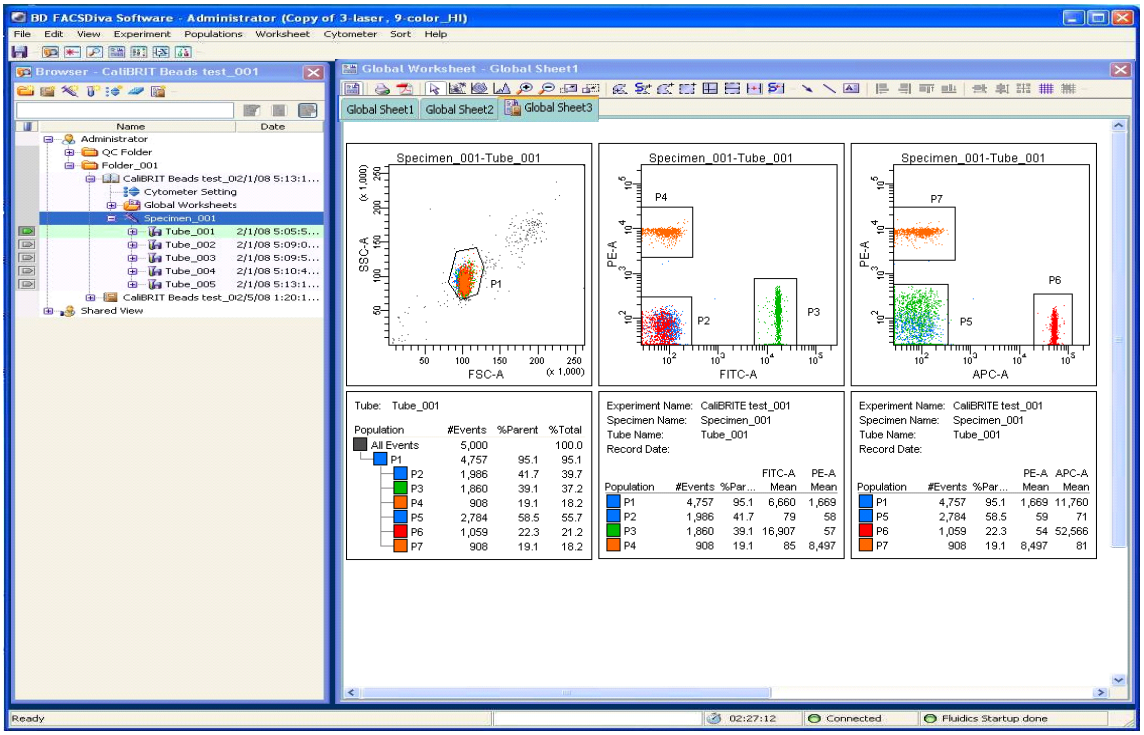
② Acquisition Dashboard の「Events To Record」で細胞の保存個数を設定します。

③ サンプルを Loading Port にセットし、「Load」をクリックします。「Record Data」をクリックするとデータの保存が開始されます。データ保存終了後、サンプルを「Unload」します。

④ 次のサンプルを測定する場合は、Acquisition Dashboard の「Next Tube」をクリックし、データを保存する新しい Tube を作成します。③と同様の操作を行います。

Section3-2: データの解析

① 新しく解析用の Global Worksheet を作成します。Browser ウインドウの Global Worksheets を右クリックし「New Global Worksheet」を選択します。
② 解析目的チューブの「Acquisition Pointer」を選択します。Global Worksheet 上で解析の目的に応じたプロットを作成します。
③ 散乱光プロットにおいて、解析する細胞集団にポピュレーション（P1 ゲート）を設定します。
④ プロットを右クリックし、「Show Population Hierarchy」ウインドウを表示させます。
⑤ ポピュレーションを展開する蛍光プロットを右クリックし、「Show Population」より目的ポピュレーションを選択して展開します。
⑥ 各プロットにおいて、適切なポピュレーションを選択、ゲートなど作成し解析します。
※死細胞やダブレットを除去した解析を行うことを推奨します。Section6: Appendix を参照してください。

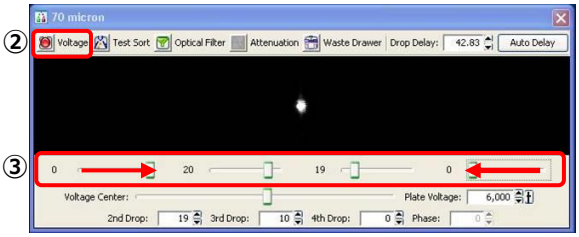


⑦ バックアップを取る場合、あるいは他の FACS 用ソフトウェアで解析する場合は、それぞれ Experiment を右クリック→Export→Experiment あるいは FCS file データを選択し、Export してください。
⑧ 次回 Experiment を複製して使う場合は、Experiment を右クリック→Duplicate Without Data を選択します。
※Cytometer ウインドウの Laser タブ内の数値は複製されません。特に Area Scaling Factor の数値を調整した場合は、次回の測定直前に同じ数値を再入力してください。
※予期しないエラーが起こる可能性がありますので、下記の点にご注意ください。
a) Tube データを保存していない Experiment を複製しないでください。
b) 複製した Experiment をさらに繰り返して複製することは避けてください。

Section４-1: ソーティング（Drop Delay の設定）

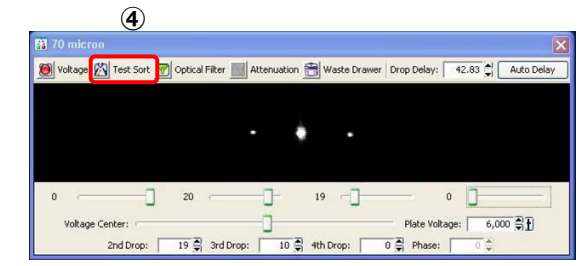
＜機器のセットアップ＞

① ストリームが適切に形成されていること（Sweet Spot が On、Drop1 の値が左右同じ）、センターアスピレーターの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します。



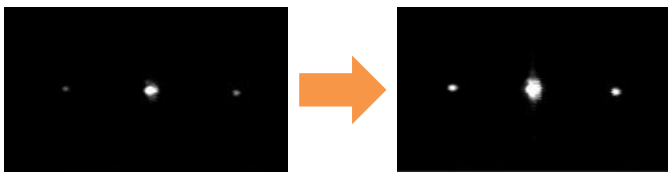
② Side Stream ウインドウの「Voltage」ボタンを On (緑→赤) にしてディフレクションプレートに電圧をかけます。

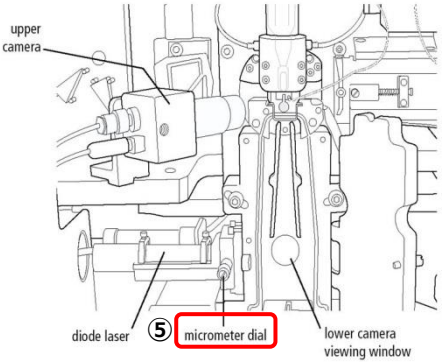
③ サイドストリームの確認を行うために、両端のスライダーは中心に向かって絞り、内側の左右のスライダーを中心から 1/3 程度 (数値を約 30) に調整します。



④ 「Test Sort」ボタンを On にして、サイドストリームを形成させます。※サイドストリームがシャワー状にばらつく場合には、BD FACSAria™ Cell Sorter Training Manual (Section4 サイドストリームの確認) を参照してください。

⑤ レフトストリームのスポットが最も明るくなる位置に「Micrometer Dial」を調整します。

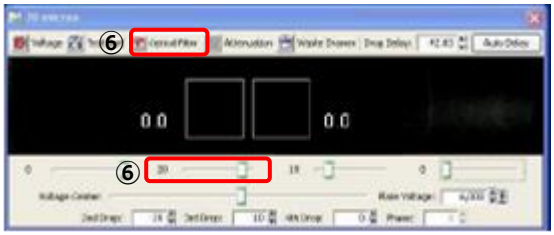


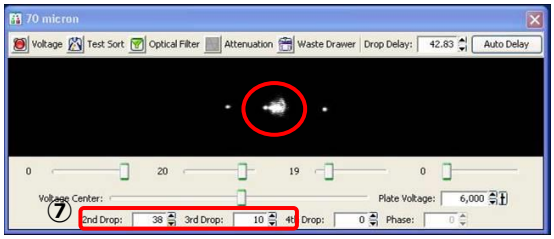


⑥ 「Optical Filter」ボタンを On にし、数値が「0.0」になることを確認後「Optical Filter」を Off にします。この時、Optical Filter の左の枠内に Left ストリームが入っていることを確認します。ずれていた場合はスライダーを用いて位置を調整します。

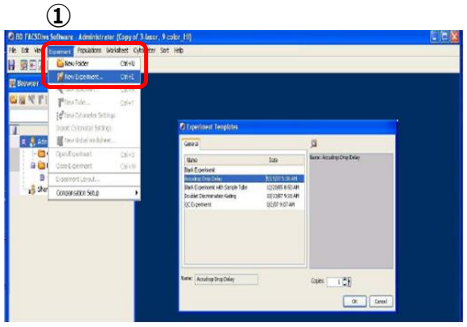
⑦ センターストリームが横に広がっている場合には、Side Stream ウインドウの 2nd、3rd Drop の値を調整します。

⑧ 「Test Sort」、「Voltage」を Off にします。





<Auto Drop Delay の実行>

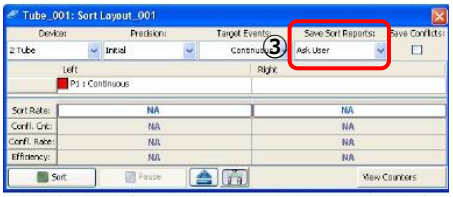


① メニューバーの「Experiment」→「New Experiment」を選択し、Experiment Template から「Accudrop Drop Delay」を選択後、「OK」をクリックします。※この Experiment は次回以降使いまわすことができます。その場合、Experiment をダブルクリックして開きます。

② Tube_001 の「Acquisition Pointer」をクリックします。

③ Tube_001 の「＋」をクリックし、下層の「Sort Layout_001」をダブルクリックして Sort Layout を表示します。

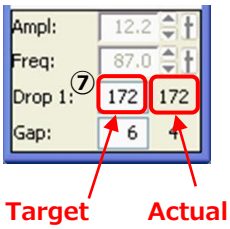
④ 「Save Sort Reports」のプルダウンから Save None を選択します。



⑤ Accudrop Beads を調製します。チューブに FACSFlow を 700µL 分注し、ボルテクスなどでよく混和した Accudrop Beads1 滴を滴下しチューブを撹拌します。※蒸留水やイオン交換水でビーズを調製すると消光しますので注意してください。

⑥ チューブを Loading Port にセットし、フローセルアクセスドアを閉めて「Load」ボタンをクリックします。

⑦ Breakoff ウインドウの Drop1 の Target Value に Actual Value と同じ数値を入力します。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します。※基準範囲の中央値よりも高めに設定してください。



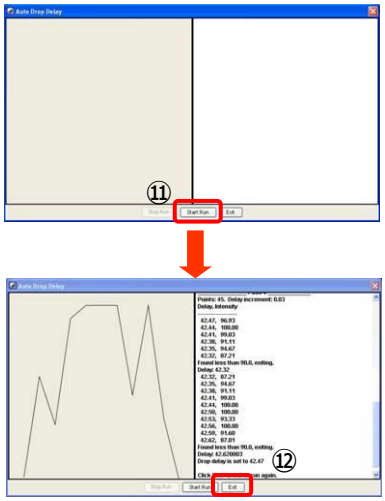
70 micron=1,000 to 3,000　　85 micron=800 to 2,000
100 micron=600 to 1,500　　130 micron=400 to 1,200

⑧ Side Stream ウインドウの「Voltage」ボタンを On にし、Sort Layout ウインドウの「Sort」ボタンをクリックします。Aspirator Drawer を開くか確認するウインドウが表示されますので、ここでは「Cancel」を選択します。

⑨ Side Stream ウインドウの「Optical Filter」ボタンをクリックします。

⑩ Side Stream ウインドウの「Auto Delay」ボタンをクリックします。

⑪ 表示されたウインドウの「Start Run」ボタンをクリックすると自動的に Drop Delay が調整されます。

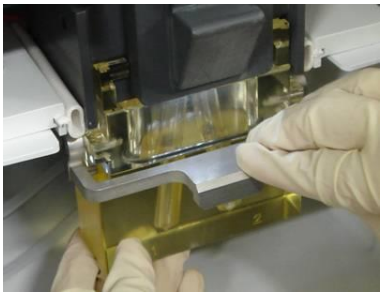


⑫ Auto Drop Delay 終了後、「Exit」をクリックします。
※Fail した場合には前項の機器のセットアップを再確認してください。

⑬ Sort Layout ウインドウの「Sort」ボタンをクリックします。

⑭ 「Voltage」を Off にし、「Unload」をクリックします。

Section 4 -2: ソーティング（サイドストリームの角度調整）



① ソートブロック下部に Universal Top をセットします。

② 目的の Sort Collection Device に空のチューブをセットし、Universal Top を取り付けます。

③ ソートブロックのドアを開きます。

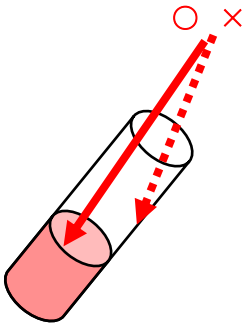
④ Side Stream ウインドウ、あるいは Sort Layout ウインドウの Waste Drawer ボタン 

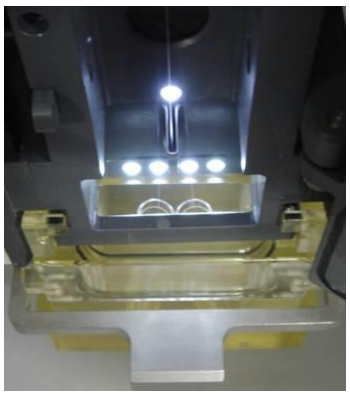
をクリックして Aspirator Drawer を開きます。※Aspirator Drawer のサイド部分に塩析などの汚れがある場合はクリーニングしてください。

⑤ Side Stream ウインドウの「Voltage」ボタンをクリックし、ディフレクションプレートに電圧をかけます。
ディフレクションプレートは最大 4,500V に荷電されるため、絶対に触れないでください。

⑥ サイドストリームの位置を調整します。使用しないサイドストリームのスライダーは内側（数値を 0）に絞ります。※目安として内側のスライダーを使う場合には数値を 30 前後、外側のスライダーを使う場合には数値を 90 前後に設定しておきます。

⑦ 「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に各ストリームのスライダーを調節します。※細胞への負担を軽減するために、サイドストリームがチューブ側壁に衝突しない角度に調整します。チューブの中央よりやや外側になるように調整します。





⑧ 設定後、「Test Sort」と「Voltage」を Off にします。

⑨ Waste Drawer ボタン 

をクリックして Aspirator Drawer を閉じます。ソートブロックのドアも閉めます。

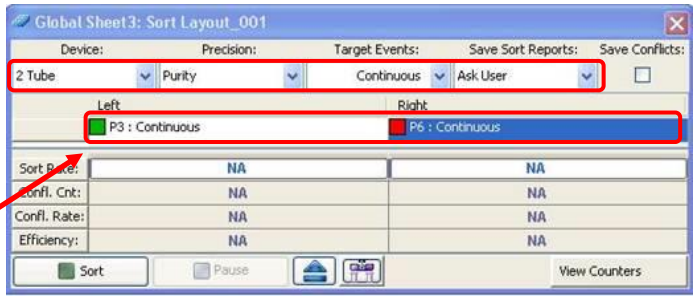
Section 4 -2: ソーティング（ソートの実行）

① 細胞を測定した Experiment をダブルクリックして開きます。 

② Specimen の「＋」をクリックして Tube の Acquisition Pointer を On にします。

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 が作成されます。

④ Sort Layout をそれぞれ設定します。
- ・Device: 2 Tube、4 Tube 、Plate Type
- ・Precision: Purity、Yield、4-Way Purity、Single Cell
- ・Target Events: ソーティングしたい細胞数
- ・Save Sort Reports: Save All
- ・Sort Window: ゲート情報の入力



⑤ Sort Collection Device に細胞に適した培地の入ったチューブをセットしてソートブロックに装着します。

⑥ フローセルアクセスドアを閉めて、サンプルを「Load」します。

⑦ Sort Layout の「Sort」をクリックすると、Aspirator Drawer の開閉を確認する表示がでますので「OK」をクリックしてソートを開始します。

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します。

⑨ 「Voltage」ボタンを Off にして、サンプルを「Unload」します。

⑩ ソートされたサンプルの再解析を行います。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 Backflush」を行います。
ソートサンプルを Loading Port にセットした後「Load」し、ソーティングの結果を確認、必要に応じてデータを保存します。

⑪ Sort Report は Sort メニューの Sort Reports から表示できます。Sort Report の File メニューより、Save as PDF を選択してソーティングの結果を PDF 化します。

Section5: シャットダウン

＜流路の洗浄＞

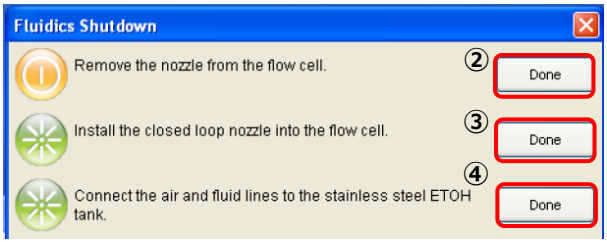
① FACSClean3mL が入ったチューブを Loading Port にセットし Flow Rate を 11.0 に設定して Load し、5 分間流路を洗浄します。
② イオン交換水 3mL が入ったチューブをセットし、同様に 5 分間流路を洗浄します。
※サンプルラインに付着しやすい細胞を測定した場合や色素を使用した場合には、FACSClean、およびイオン交換水を 10 分間ずつ流してください。
③ レーザーを停止し、「Stream」ボタンをクリックして送液を停止します。
④ フローセルからノズルを取り外し、ソートブロックからディフレクションプレートを取り外します。
※ノズル、ノズル挿入口、ノズルレバー、ソートブロック内部、カメラウインドウ、ディフレクションプレートのクリーニングをおこないます。
⑤ センターアスピレーターと左右のアスピレーターポケットにイオン交換水を約 10mL ずつ吸引させます。
⑥ 引き続き Daily Shutdown もしくは Weekly Shutdown をおこないます。

＜Daily Shutdown＞

① O-ring が取り付けられていることを確認した Closed-loop ノズルをフローセルに装着します。
② メニューバーの「Cytometer」→「Cleaning Modes」→「Clean Flow Cell」を選択します。
③ **滅菌イオン交換水** 3mL を入れたチューブを Loading Port にセットし、「OK」をクリックします。終了のメッセージが表示されたら「OK」をクリックします。
④ メニューバーの「File」→「Quit」をクリックし Diva ソフトウェアを終了します。
⑤ FACSAria™ 本体のメイン電源を切り、PC をシャットダウンします。
⑥ コンプレッサーの電源を Off にします。
⑦ Fluidics Cart の廃液タンクおよびコンプレッサーの廃液を処理します。
※はずした廃液タンクの蓋は逆さにしないでください。廃液は施設のルールに従って処理してください。
⑧ FACSFlow の補充をおこないます。
※シースタンク上限ラインを超えないようにしてください。

＜Weekly Shutdown＞

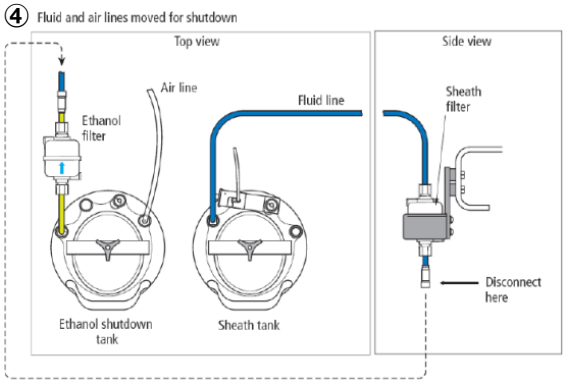
Weekly Shutdown では、70%エタノールを約 700mL 使用します。エタノールシャットダウンタンクには 2L 以上のエタノールが残っていることを確認してください。



① Cytometer から「Fluidics Shutdown」を選択します。

② フローセルからノズルが取り外されていることを確認して「Done」をクリックします。

③ O-ring が取り付けられていることを確認した Closed-loop ノズルをフローセルに装着し「Done」をクリックします。

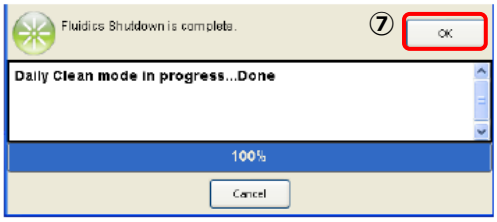


④ シースタンクのエアーラインおよびシースラインをエタノールシャットダウンタンクに接続し、「Done」をクリックします。
※シースフィルターの下部からシースラインを付け替えます。

⑤ シースタンクのベントバルブを引き上げて圧力を抜きます。「OK」をクリックします。

⑥ **滅菌イオン交換水** 3mL を入れたチューブを Loading Port にセットし、「Done」をクリックします。

⑦ 「OK」をクリックします。



⑧ メニューバーの「File」→「Quit」をクリックし Diva ソフトウェアを終了します。

⑨ FACSAria™ 本体のメイン電源を切り、PC をシャットダウンします。

⑩ コンプレッサーの電源を Off にします。

⑪ Fluidics Cart の廃液タンクおよびコンプレッサーの廃液を処理します。※はずした廃液タンクの蓋は逆さにしないでください。廃液は施設のルールに従って処理してください。

⑫ FACSFlow の補充をおこないます。※シースタンク上限ラインを超えないようにしてください。

※エタノールシャットダウンタンクに接続したラインは、次回「Prime After Tank Refill」をおこなう前にエタノールシャットダウンタンクの圧力を抜いた後に元に戻します。

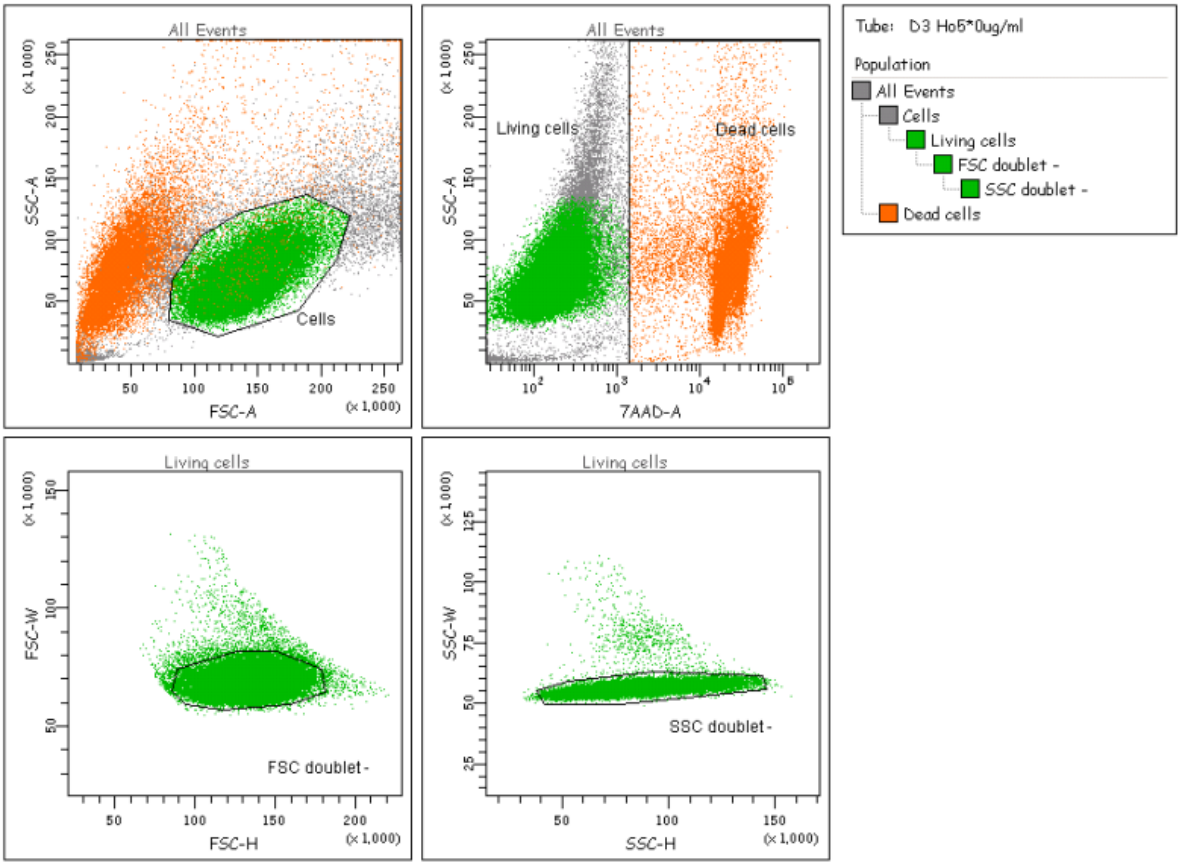
Section6: Appendix

① 死細胞およびダブレット細胞の除去:
目的細胞の割合を正確に測定するために推奨される解析方法です。

② Area Scaling Factor の調整:
Area Scaling Factor の調整により、Area と Height の表示位置をそろえる事ができます。これは両者のダイナミックレンジ（測定範囲）をそろえる意味でも非常に重要です。通常の細胞でも調整が必要ですが、特に大きな細胞を正確に測定する場合の重要な設定です。

③ Threshold の調整:
散乱光プロットでデブリや電気的なノイズをカットする機能です。

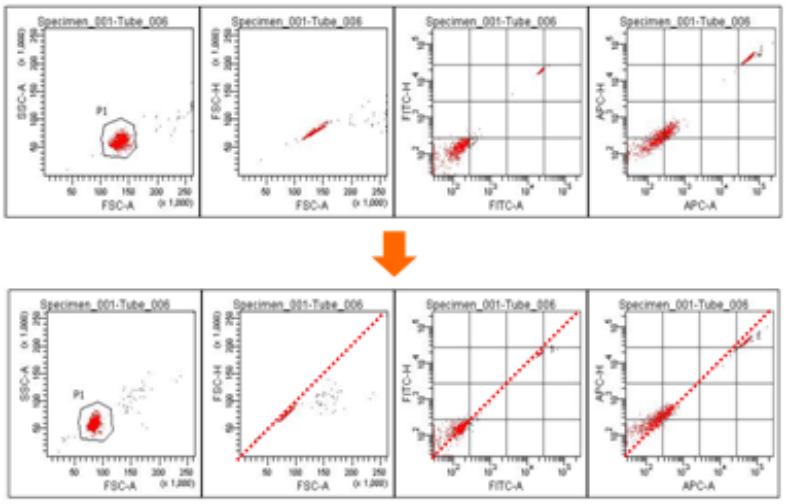
① **死細胞およびダブレット細胞の除去:**
死細胞除去プロット: SSC-A vs 死細胞判定試薬（PI、7AAD など）
ダブレット除去プロット: FSC-W vs FSC-H、 SSC-W vs SSC-H

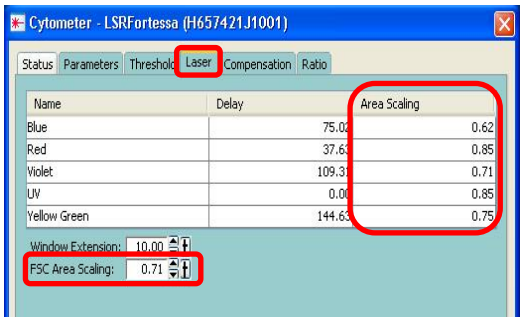


② **Area Scaling Factor の調整:**

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

※Area Scaling の値を調整した場合は、数値を記録しておいてください。今後、同じ細胞を使った実験系であれば、同じ数値を入力して測定することができます。





③ **Threshold の調整:**

Cytometer ウインドウの「Threshold」タブを選択し、値を調整することでデブリやノイズデータをカットできます。※初期値は FSC: 5,000 です。

※Threshold 以下のシグナルは、データとして完全に無視されます。よってソーティングをおこなう場合は、値を上げすぎるとソーティング純度の低下を起こす場合があります。

各項目における操作の詳細は BD FACSAria™ Fusion Cell Sorter training Manual をご覧下さい。

Memo

BD FACSAria™ 流路洗浄ガイド

Flow Cellの洗浄

CST BeadsテストでのCV%がスペックをクリアしない場合

・CSTビーズのLot ID、有効期限を確認。
・ビーズの再調製をおこなう。
・光学フィルターおよびNDフィルターに変更がないかを確認。
・Configurationを確認。

⇩ 上記項目に問題がない

50%Contrad溶液でClean Flow Cellをおこなう(15分漬け置き)。

⇩ 解消されない

FACS CleanでClean Flow Cellを行う(15分漬け置き)。

サンプルラインの洗浄

PIや接着系細胞を使用した場合

シャットダウン時に2ml FACS Cleanおよび2ml 蒸留水を
10分間ずつ、Loading portより流す(FlowRateは11)。

サンプルラインが詰まった場合

・ノズルおよびノズル周辺のクリーニングをおこなう。
・Sample Line Backflushをおこなう。
・サンプルライン中間のシリコンチューブをピンチバルブからはずしてほぐす。

⇩ 解消されない

サンプルラインの交換をおこなう。

シースラインの洗浄

シースラインに汚染あるいは詰まりが生じた場合

Weekly Shutdownをおこなう。

⇩ 解消されない

Prepare for Aseptic Sortをおこなう。

上記洗浄でも問題が解消されない場合には、下記にご連絡ください。
機器のトラブルに関するサポート　0120-7099-12

BD