

BD FACSuite 사용자 메뉴얼



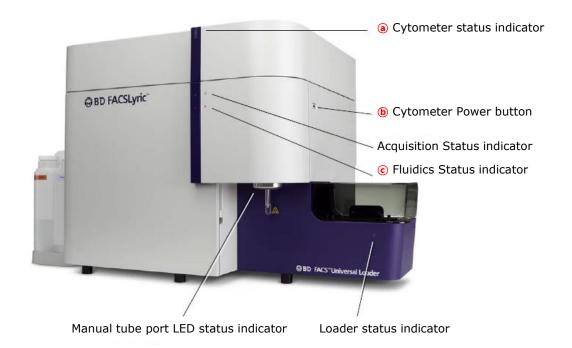
학술문의: bdbkorea_coe@bd.com 서비스콜: 080-340-3800

FACSuite Usage Workflow

Start Up System	 Cytometer 전원 켜기 Software 실행 장비 사용 전 Cleaning 수행 	3 4 5
Perform Setup & QC	• Performance QC 수행 ···································	6
Acquire Data	 Experiment Setup & Worksheet 설정 샘플 Reading Manual Compensation 	7 8 10
Analyze Data	 데이터 정리 및 리포트 만들기 ***********************************	11 13
Shutdown System	• Cleaning 수행 후 장비 전원 끄기 ***********************************	14
Additional Setting	 Tube Setting 저장 Reference Setting 저장 Modified Reference Setting 	16



1. BD FACSLyric Cytometer Startup



- ① Cytometer 전원을 켜기 전, Sheath buffer와 Waste tank의 상태를 확인한다.
 - BD FACSFlow™ (Cat#342003) Sheath buffer를 채워주고, Waste tank를 비워준다.
- ② Cytometer 본체 우측에 있는 전원 버튼 (ⓑ Cytometer Power button)을 눌러 장비의 전원을 켠다.
 - 전원 버튼을 누르면 전원 버튼의 LED가 녹색 으로 바뀐다.
 - a Cytometer Status indicator의 LED가 황색 으로 반짝거리며 20분간 Laser warm-up 및 Fluid line의 priming 이 진행된다. 이 과정 동안에는 Cytometer의 다른 기능들은 사용할 수 없다.
 - © Fluidics status indicator가 적색 LED로 바뀌면 Sheath buffer와 Waste tank의 상태를 확인한다.
- ③ Cytometer warm-up이 끝난 후 Cytometer status indicator 의 LED가 녹색으로 바뀐다.
 - ⓐ Cytometer status indicator 의 LED가 녹색 ●이 되면, 장비를 사용할 수 있다.
 - FACSuite 소프트웨어를 실행한 상태에서 Cytometer warm-up을 진행하면, 화면 우측 하단에 완료까지 남아 있는 시간 (Remaining Laser Warm Up Time) 을 확인할 수 있다.

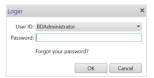


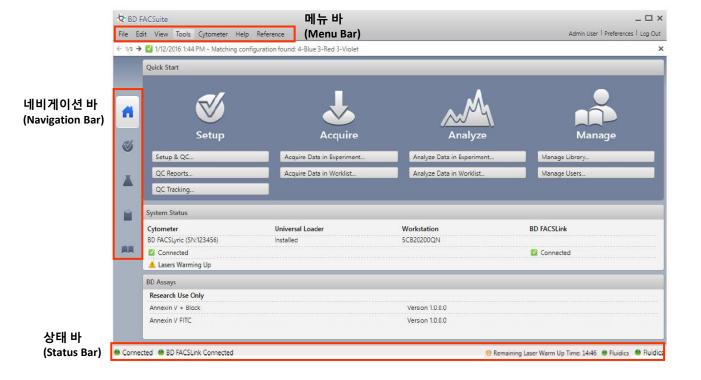
2. BD FACSuite 소프트웨어 실행

① 바탕화면의 BD FACSuite Software icon을 실행시킨다. 🎁



- User ID: BDAdministrator, Password: bdadministrator
- ③ 로그인 후 Home 화면이 나타나면 화면의 왼쪽 하단의 Connected 를 확인한다.



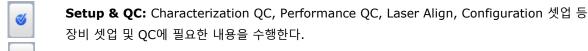


네비게이션 바(Navigation Bar) 설명



Home Page

- Quick Start: 많이 사용하는 기능들의 바로가기를 사용할 수 있다.
- **System Status:** 장비의 연결상태, 설치 옵션 및 Serial number를 볼 수 있다.
- **BD Assays:** BD-defined Assay 종류를 확인할 수 있다.



Experiment: 데이터 수집과 분석에 필요한 Experiment 및 Assay를 생성한다.

Worklist: 여러 종류의 Task를 Universal Loader를 이용하여 수행한다.

Library: Assay 정보, Bead 및 reagent 정보, Tube setting 정보가 저장된다.

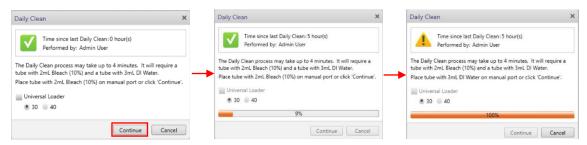


3. 장비 사용 전 Cleaning 과정 수행

Laser warm up이 끝나면 샘플 라인 및 Flow Cell의 Daily Cleaning 과정을 수행한다.

① 메뉴→ Cytometer → Daily Clean

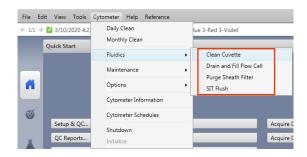
수행 명령 창이 나타난 후, 2ml BD FACSClean (Cat#340345) 을 꽂으면 자동 실행된다. 10% Bleach 로딩이 끝나면 3ml DW tube를 꽂는다.



* FACSClean 대체로 10% Bleach solution 사용 가능

장비 사용 중 Fluidics system의 상태에 맞게 추가적인 Cleaning 기능을 수행할 수 있다.

- ② 메뉴 → Cytometer → Fluidics
- Clean Cuvette: DW을 Flow cell 내에 채우기
- **Drain and Fill Flow Cell:** Flow Cell 내 air bubble 제거 및 DW로 채우기
- Purge Sheath Filter: Sheath filter내 bubble 제거
- SIT Flush: 샘플라인(Sample Injection Tube) Cleaning 수행



Manual Tube Port



• LED 색 변화:

녹색: Ready 상태

황색: SIT Flush 수행 중

Tube Adapter



Tube Adapter 사용시 15mL, 50mL, Eppendorf tube
 사용이 가능하다.(기본 구성에 포함)



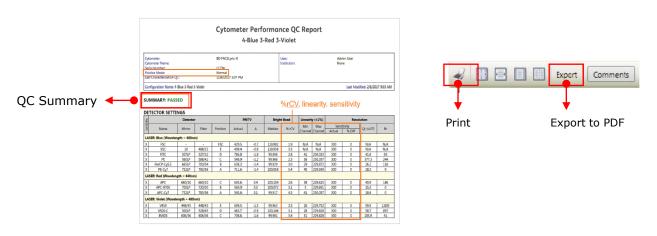
4. Setup & QC 수행

Flow cell의 Cleaning 과정이 끝나면, 장비의 상태를 점검하는 QC를 수행 한다.

- ① Navigation Bar에서 Setup & QC 탭 🍑 을 선택한다.
- ② Setup & QC Option 창의 @ Task에서 Performance QC 항목을 선택한다.
- ③ ⑥ CS&T Bead의 Lot 을 확인하고 일치하는 Lot을 선택한다.
- ④ c Start를 눌러 수행한다.



⑤ Task 수행이 끝나면, QC Report 또는 Assay setup Report를 확인하고, 출력 또는 PDF로 저장 가능하다.



Setup & QC Task 항목 및 권장 주기에 대한 자세한 내용은 아래 QR code를 통해 확인하실 수 있습니다.



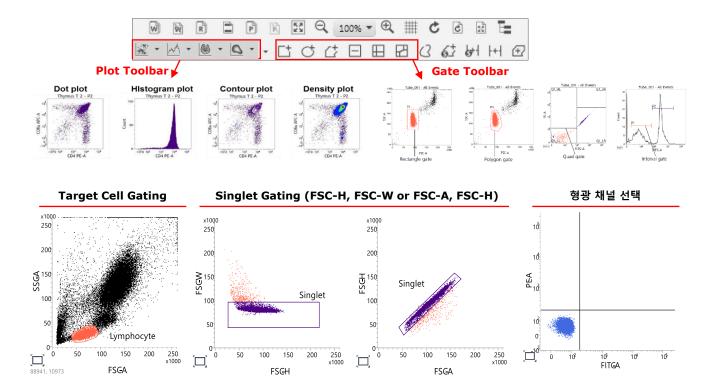


5. Experiment Setup & Worksheet 설정

- ① 측정하지 않을 형광 채널은 Parameter 리스트에서 미리 삭제한다. Ctrl키를 이용하여 삭제할 채널을 multi select를 하거나, Shift 키를 사용하여 삭제할 수 있다.
- ② Singlet gating이 필요한 경우 FSC-H와 FSC-W 항목을 체크한다.
- ③ 측정하고자 하는 형광의 이름을 선택한다. (ex. FITC 채널: FITC, AlexaFlour 488, BB515, GFP 중 선택)



Dot plot 그리기: Worksheet에서 plot을 그린 후 X,Y축에 parameter를 설정한다.



⑤ Population Hierarchy 📜 열기:

Gating의 순서와 관계를 확인하고 각 population의 %를 확인할 수 있다.

- Pin to Worksheet 🎩 를 클릭하여 Worksheet 안에 display 된다.



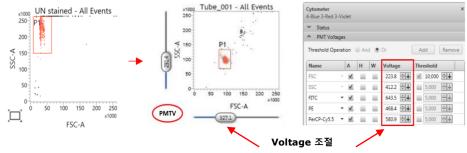


6. 샘플 Reading

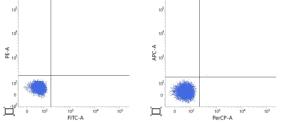
- ① Unstained 또는 Isotype을 걸고 Data Sources의 **Preview**를 클릭한다.
- Run Pointer > 가 Tube 001에 선택되어 있는 것을 확인한다.
- Tube 이름은 데이터 저장 전에만 변경이 가능하다.



② **FSC/SSC 조절:** Plot의 왼쪽 하단에 있는 **PMTV**를 클릭하여 Voltage slider를 움직이거나, Cytometer 창의 PMT Voltage panel에서 조절한다. Plot 내에 Cell population이 보이지 않는다면 우측 상단에 Population이 위치할 가능성이 크다.



- ③ Target population을 plot의 중간정도에 위치시킨 후 P1 gate를 만든다.
- ④ 형광 채널 조절: 각 형광 채널의 Voltage를 조절하여 Negative population을 102 안쪽으로 위치시킨다.



• P1을 형광 plot에 display 하기:

Plot 우클릭(단축키 F4)→ Properties→ Plot Editor→ Primary Data Source→ Parent population을 P1 선택

⑤ Multicolor로 염색한 mixture 샘플을 리딩하여 Positive population이 plot 안에 display 되는지 확인한다.

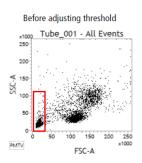


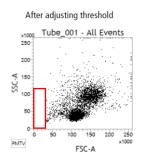
 ⑥ (Optional) 샘플의 Voltage optimization 후 Tube setting으로 저장하여 항상 동일한 Cytometer 조건으로 샘플을 분석할 수 있다. -> 15page, Tube setting 저장 참고

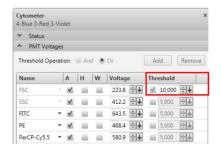


6. 샘플 Reading

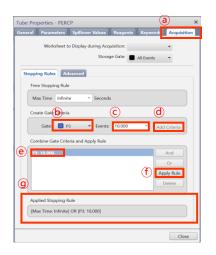
⑥ Threshold 조절: Cytometer 창의 Threshold 값을 올려 debris를 제거할 수 있다.







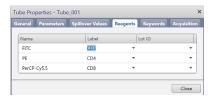
⑦ Recording 설정: Tube 우클릭(단축키 F4) → Properties → Acquisition 탭 설정
 지정된 population을 기준으로 설정된 갯수만큼 저장 후 샘플 리딩을 끝내도록 설정한다.



*저장정보 설정순서

- Tube Properties → Acquisition (a) → Stopping Rules → Create Gate Criteria → Gate 지정 (b) → 저장할 Event 수 입력
 (c) → Add Criteria (d)클릭 → 설정한 Criteria를 리스트에서 클릭 (e) → Apply Rule (f) 클릭
- Applied Stopping Rule(@)에 지정한 Criteria가 표시되었는지 확인한다.
- ⑧ 마커 이름 설정: Tube 우클릭 → Properties → Reagent 탭 설정

각 형광 채널에 마커 정보를 입력한다. 데이터 저장 전에만 설정이 가능하며 데이터 저장 후 에는 설정 할 수 없다.



⑨ Flow Rate 설정



- Flow Rate: 초당 Reading 되는 세포의 count를 조절
- Event to Display: Plot에 display되는 cell 수 설정. 타겟 세포가 rare한 population일 수록 10,000이상으로 설정한다.
- Number of SIT Flush: 샘플간 carryover를 줄이기 위한 Washing 횟수 설정



7. Compensation

* 소프트웨어 내 Compensation 조절 값 제공

- **LW(Lyse Wash)와 LNW(Lyse No Wash) Tube Setting**: Normal Human Lymphocyte에 해당하는 Voltage와 Compensation 조절 값(Spillover Value)이 저장되어 있다. 이들 셋팅값을 이용하여 Compensation 조절없이 Multicolor 분석이 가능하다.
- 제공된 Compensation 값이 맞지 않을 경우, Single-color stained tube를 준비하여 Manual로 조절하거나, Reference setting을 수행하여 Auto-compensation을 수행할 수 있다. -> 16page 참고
- **Compensation Auto Re-calculation**: Compensation 조절 후 Voltage를 변경하더라도, 변경된 voltage에 맞게 compensation 값이 재계산된다.

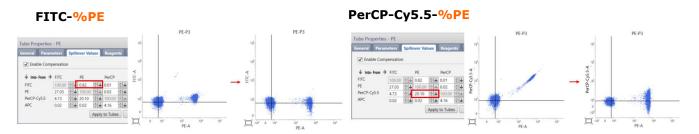
Manual Compensation 수행 (2 color 이상 염색시 수행)

- ① Compensation control 준비: 샘플과 동일한 Prep 과정을 거쳐 형광을 하나씩만 염색한 샘플을 준비한다.
- ② 측정하고자 하는 형광의 모든 Combination이 만들어지도록 Dot plot을 display 한다.
- ③ 하나의 형광만 염색된 Compensation Control을 걸고 Negative population 영역의 중심(MFI)에 Positive population 영역의 중심(MFI)이 맞춰지도록 Compensation 값을 조절한다.
 - ! 📗 Quad Gate를 이용하여 중심을 맞춘다.
- ④ 간섭하는 모든 형광 채널에서 Compensation을 수행한다.

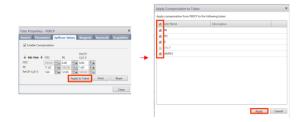
FITC Single stained Tube

PE-%FITC Tube Properties - FITC FITC-P3 UR UL UL Tube Properties - FITC FITC-P3 UR UL Tube Properties - FITC General Parameters Spillower Values Reagents V Enable Compensation V Inter-Fite - PRIC PE FITC PS FITC P

PE Single stained Tube



- Spillover values를 조절한 후 Apply to Tubes를 클릭하여, Spillover Value를 적용할 Tubes를 선택한다.





8. 데이터 정리

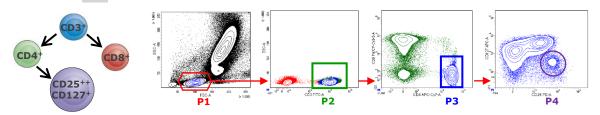
Plot 생성 및 Gate 그리기

- ① 새로운 Worksheet 또는 Report를 생성한다.
- ② Worksheet Tools에서 Plot icon을 클릭하여 plot을 생성한 후, 측정할 Parameter (FCS, SSC, FITC, PE 등)를 설정한다.
- *Plot의 속성 변경은 해당 Plot을 우클릭 또는 단축키'F4'를 눌러 Plot Editor 창에서 변경한다.
- ③ Run Pointer를 첫 번째 tube에 지정하면, plot에 해당 tube의 데이터가 display된다.
- ④ FSC/SSC plot에서 target cell population에 Polygon Gate tool을 이용하여 P1 gate를 만든다.
- ⑤ P1 gate를 두번째 Plot에 display할 수 있도록 Primary Data Source를 P1으로 지정한다.

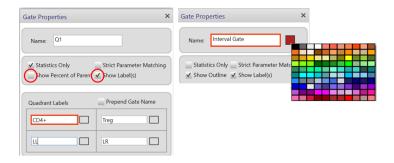
• **Primary Data Source 설정** Plot Editor → Primary Data Source → Plot에 display할 Gate 선택



- ⑥ P2 gate를 생성한다.
- ⑦ P2 gate를 세번째 Plot에 display한 후, P3 gate를 만든다.
- ⑧ Hierarchy 🄁 창을 열어 Gating 순서와 관계를 확인할 수 있다.



- ⑨ Gate 설정 변경
- Plot에 생성한 Gate 우클릭→ Gate Property에서 Gate의 이름, 색 등을 변경할 수 있다. Quadrant gate의 경우 Show Percent of Parent를 체크V하면 Plots내에 %Parent 수치가 display된다.
- Tube마다 다른 Gate 위치가 적용되도록 설정: Gate 우클릭→ Make Unique 선택: 해당 Tube에서만 Gate 위치가 적용되고 다른 Tube들은 적용되지 않는다.

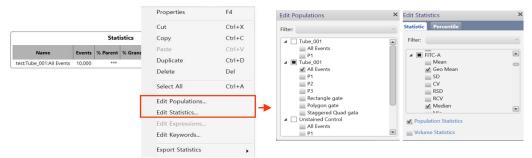




8. 데이터 정리

Statistics 생성

- ① Statistic icon을 클릭 후, Worksheet 또는 Report의 빈 공간에 클릭하여 Statistics 를 생성한다.
- ② Statistics 창을 우클릭후, Edit population과 Edit Statistics를 선택하여 display할 정보를 변경한다.

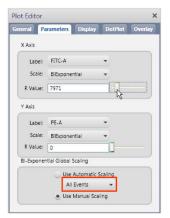


Statistics 설정 Tips

- MFI(Fluorescent Intensity)를 측정할 경우, Median 값으로 결과를 확인하기를 추천한다.
- Filter 영역에서 population 및 parameter를 입력하면 해당 정보만 아래에 display된다.
- Display할 정보를 순서대로 클릭하여 위에서 아래로 나열시킨다.
- ③ 정리된 Statistics view를 우클릭 → Export Statistics를 선택하여 csv파일로 export 한다.

Biexponential Scale 조절

- : X, Y축의 scale이 (-)값을 크게 가질 경우 아래의 두가지 방법으로 Biexponential scale을 최적화한다.
- ① **Use Automatic Scaling**: Plot Properties→ Parameter 탭→ Use Automatic Scaling에서 All Event를 Target Population으로 변경한다.
- ② **Use Manual Scaling**: Automatic Scaling을 Manual Scaling으로 변경 후, scale이 큰 채널의 R Value를 100-200정도로 조절한다.





Plot 위치 정렬 | 문 및 파 및 | 만 회 潴

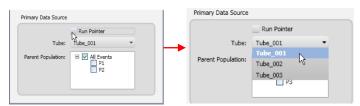
- ① Plot 사이즈를 동일하게 만들기: Plot들을 지정한 후 'Make same size(出)' 아이콘 선택
- ② Plot 간격 맞추기: 3개 이상의 Plot들을 지정한 후 'Distribute Horizontally(📅), Vertically(📙)' 선택
- ③ 윗선, 옆선 맞추기: Plot들을 지정한 후 'Align top(🛂), Align left(🗐)' 선택.



8. 데이터 정리

Report 만들기

- ① 위에서 생성한 Plot들을 전체 지정 후 Copy/Paste하여 붙인 뒤, 리포트 하고자 하는 tube들을 각 Plot에 지정한다.
- ② Page 생성 **P** , Worksheet 생성 **W** , Report 생성 **R** 등을 적절히 이용하여 display한다.
 - -Plot 우클릭→ Run Pointer 체크V 지우기→ Display할 Tube 선택하기
 - -각 Plot들은 Run Pointer 지정에 더 이상 변경되지 않는다



Overlay 수행

- ① Base로 display할 Tube를 Pointer로 지정후, Histogram Plot을 생성한다.
- ② Plot 우클릭→ Overlay 탭의 Source에서 Overlay 할 Tube를 선택 후 Add를 클릭한다.
- ③ Layers에 생성된 Tube를 클릭하면 Edit Layer가 나타난다. Population 및 Color 등을 변경한다.
- ④ 여러 개의 Tube를 추가하여 Overlay할 수 있다.

9. 데이터 Export 하기

① Worksheet 및 Report를 PDF로 Export하기

- File Menu에서 Export to PDF를 클릭한다.

2 FCS Files Export

- Experiment의 Data Sources panel에서 가져가려는 모든 tube들을 선택한다.
- File Menu에서 Export → FCS Files를 누르거나, 선택한 Tube에서 우클릭하여 Export to FCS를 한다.

3 Experiment Export

- Open되어 있던 Experiment를 닫는다.
- Experiments Browser에서 Experiment를 우클릭하여 Export Experiments를 한다. (with data or without data 선택이 가능하다.)



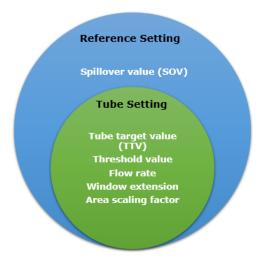
10. Cleaning 수행 후 장비 전원 끄기

장비를 끄기 전 아래의 과정으로 반드시 샘플라인 워싱을 수행한다.

- ① Washing: FACSClean (10% Bleach) 5분 Run, DW 5분 Run
- ② Menu에서 Cytometer > **Shutdown**을 클릭 한다.
 - Shutdown 클릭 후 Yes를 선택하면 Cytometer power button의 녹색 LED가 반짝거리다가 종료가 완료되면 황색 LED로 변한다.
- ③ Manual Tube Port에 2ml DW 가 들어있는 5ml FACS tube를 꽂아둔다.
- ④ BD FACSuite 소프트웨어 종료 후 PC를 종료한다.

11. FACSuite의 추가 셋팅 기능

FACSuite 소프트웨어에 제공되는 LW/LNW 셋팅 외에, 실험자의 샘플에 적합한 셋팅을 추가로 저장할 수 있으며, 필요시에 업데이트 후 셋팅값을 불러와 사용할 수 있다.



- Reference Setting: Tube Setting 을 구성하는 조건에 더하여 샘플의 Spillover value 도 함께 저장하는 기능
- Tube Setting: 사용자의 샘플에 적합한 Voltage 및 Cytometer 조건을 Tube setting 값으로 저장하는 기능

저장된 Tube Setting과 Reference Setting 은, 사용 전 Setup & QC 탭에서 Performance QC 수행 후 Assay/Tube Setting Setup 을 통해 사용할 Setting을 업데이트 진행 후 사용한다.





- ① Task: Assay/Tube Setting Setup 선택
- ② CS&T bead lot ID 선택
- ③ Assay/ Tube Setting > Select 선택 후 우측 Select Tube Setting and Assay Setup Report 창에서 오늘 실험에 사용하고자 하는 Setting의 Run Setup을 체크 (다중 선택 가능)
- ④ Start 를 눌러 업데이트 실행



11. Tube setting 저장

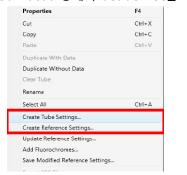
Tube setting

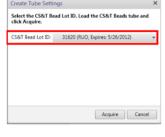
- 사용자의 샘플에 적합한 Voltage 및 Cytometer 조건을 Tube setting 값으로 저장하는 기능
- Tube setting 에는 Voltage, Threshold, Flow rate 조건을 함께 포함한다.
- 저장된 Tube setting은, Setup & QC 에서 CS&T bead를 이용한 Assay/Tube setting Setup 수행 후 불러오면 저장 시점과 동일한 장비 조건으로 샘플을 분석할 수 있다.
- ② FSC/SSC Plot을 포함, 준비한 샘플의 모든 형광의 combination을 확인 할 수 있는 Dot plot을 그린다.
- ③ 측정할 샘플의 'Unstained Control'을 리딩 하여 FSC/SSC PMTV를 적절하게 조절하고 모든 형광 조합의 Dot plot에 Unstained population이 10² 안쪽으로 위치할 수 있도록 PMTV를 조절한다.
- ④ Multicolor로 염색한 mixture 샘플을 리딩하여 Positive peak이 plot안으로 display 되는지 확인한다.

:Voltage 최적화 과정을 마치면 Tube Properties -> Tube setting 의 Lyse wash 우측에 별모양 💢 의 표시 가 나타나는데, 이것은 **'Lyse Wash tube setting 값으로 부터 voltage 조건이 변경되었다'**라는 의미로 **'현 재 설정된 값으로 새로운 Tube setting을 만들 수 있다'**는 의미이다.

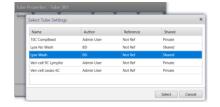


- ⑤ 빈 Tube 우클릭 -> Create Tube setting을 선택한다.
- ⑥ CS&T bead 창에서 **beads Lot을 확인**하고 Acquire을 눌러 새로운 이름을 지정하여 저장 한다.





⑦ 저장이 완료되면 Tube properties -> Tube settings -> Select 클릭-> Select tube settings에 생성된 것을 확인할 수 있으며, 다음 실험 시 저장된 Tube setting 값을 불러와 사용할 수 있다.



저장한 Tube setting을 선택하고 불러오면 저장한
 시점의 Voltage와 Cytometer 조건이 동일하게 적용된다.

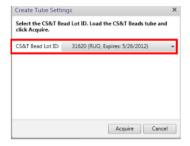


12. Reference Setting 저장

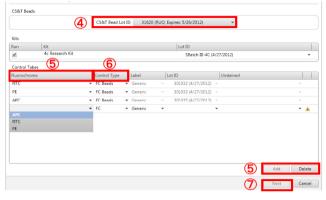
Reference Setting (Auto compensation) 수행

- ① CS&T Beads, Unstained 및 Single stained sample을 준비한다.
- ② FSC/SSC 및 각 형광채널의 Voltage 조절을 완료한 후, **빈 Tube**를 우클릭하여 **Create Reference Setting**을 선택한다.
- ③ CS&T Beads 창에서 Beads lot을 확인한다.

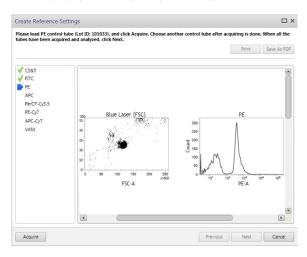




- ① 설정한 Parameter에 맞게 Fluorochrome을 Add하거나 Delete한다.
- ② Control Type 선택: FC (Fluorescent Control), Comp Beads (Compensation Beads)



- ③ Next 클릭 준비한 CS&T Beads를 꽂고 Acquire를 클릭한다.
- ④ Single stained sample을 순차적으로 Acquire 한다.
- ⑤ Gate의 위치를 조절하고 저장 완료 후 Reference Setting의 이름을 입력하고 Save 한다.



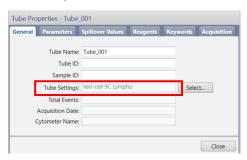
⑥ 생성된 Reference setting은 현재 지정된 tube에 반영되고, Reference setting 값을 가지는 새로운 Tube setting으로 생성된다.



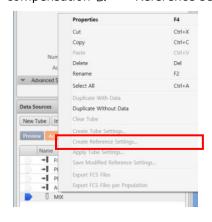
13. Reference Setting 수정

Modified Reference Setting

- Reference Setting을 통한 Auto compensation 값이 샘플에 적합하지 않은 경우, 그 값을 수정할 수 있고, 다시 저장할 수 있다.
- ① Tube Properties 창을 열어 수정하고자 하는 Reference setting을 포함하는 Tube setting을 불러온다.



- ② Multicolor 샘플, 또는 Single stained 샘플을 리딩하여, 현재 적용한 Reference setting 값이 샘플에 적합한지 검토한다.
- ③ 샘플에 최적화된 compensation 과정이 추가로 필요하다면, Spillover value 창을 통해 매뉴얼로 조절한다.
- ④ 검토 후 Tube 선택 > 우클릭 > **Save Modified Reference Setting**을 눌러, 검토하면서 재조절한 compensation 값으로 Reference setting을 저장할 수 있다.





14. Support

- ❖ BD Spectrum viewer: bdbiosciences.com/ko-kr/resources/bd-spectrum-viewer
- ❖ Bead Lot file: bdbiosciences.com/ko-kr/resources/bead-lot-files
- Training: <u>bdbiosciences.com/ko-kr/learn/training</u>

