

第 5 章 CELLQUEST 軟體使用手冊

學習本章後應能夠：

- 真實血樣之 3 色螢光染色技術
- 用 CellQuest 從流式細胞儀收取 3 色樣本
- 用 CellQuest 從流式細胞儀分析 3 色樣本
- 應用 Quadrant (象限) 產生統計
- 將統計結果輸出為試算表
- 應用 Region (區) 和 Gate (門) 產生統計

5.1. CELLQuest 軟體

1.1 概述

CELLQuest 軟體從流式細胞儀上進行收取和分析資料的通用軟體。使用者可藉由 CELLQuest 軟體來從事儀器之調整與設定，可用以進行細胞檢品之檢驗測量，CELLQuest 軟體同時是細胞儀的資料處理系統內的必要軟體。

在資料分析方面，CELLQuest 軟體提供使用者雙色或多色分析功能，可以定量各類細胞族群的百分比，細胞受染的螢光強度，也可以製作一維直方圖、二維散點圖、二維密度圖、二維等高線圖、及三度空間圖譜，並且可作文字處理之中間插圖，無需再剪貼拼湊，適用於論文發表，及會議報告使用。CELLQuest 軟體功能強大且靈活，並與 Macintosh 的多工環境完全相容。分析原始資料所得的統計資料，也可以輸出到 IBM-PC 相容的軟體，例如，EXCEL, PowerPoint, Lotus 123, SigmaPlot, 進行再統計分析或繪圖。

1.1.1 收取 (Acquisition)

即收取並儲存流式細胞儀上資料的過程。在收取前，需用您的樣本來最佳化儀器的條件。

1.1.2 分析 (Analysis)

將收取的資料進行進一步分析。在分析時，將讀取資料檔案，然後可畫 Region (區)、設置 Marker (界限)、和進行統計。在 CellQuest 中，可畫單參數直方圖、雙參數散點圖、密度圖和等高圖。

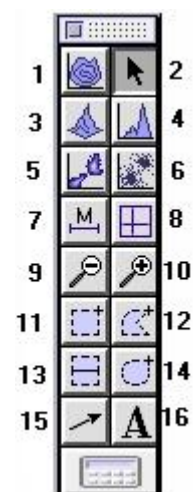
1.1.3 從收取到分析 (Acquisition→Analysis)

在 CellQuest 中，從收取到分析的功能允許在資料收取結束後可從收取圖轉換到分析圖。剛剛收取的資料及在收取時限定的格式出現在圖中，如 Region, Marker 等。

1.2 工具板

工具板可用來畫圖、Region, Marker 和文字等。點擊選擇。工具板按鈕

1. 等高圖：點擊，可畫等高圖，可自定義圖的大小。
2. 選擇：點擊，可選擇一個或多個目標，進行改大小或移動。
3. 3 維圖：點擊，可畫 3 維圖，可自定義圖的大小。
4. 直方圖：點擊，可畫直方圖，可自定義圖的大小。
5. 密度圖：點擊，可畫密度圖，可自定義圖的大小。
6. 散點圖：點擊，可畫散點圖，可自定義圖的大小。
7. 直方圖 marker：點擊，可在直方圖上定位 Marker 的左邊界和右邊界。
8. 象限 marker：點擊，可在散點圖、密度圖和等高圖上定位 marker。
9. 縮小：點擊，然後點擊圖，將放大圖縮小到原大小。
10. 放大：點擊，然後點擊圖，將縮小圖放大到原大小。
11. 矩形 region：點擊，然後在散點圖、密度圖和等高圖中點擊，然後拖動對角線至所需大小。
12. 多邊形 region：點擊，然後在散點圖、密度圖和等高圖中點擊形成起始點，然後拖動滑鼠畫出多邊形頂點並在起始點處點擊完成多邊形 region。
13. 直方圖 region：點擊，可在直方圖上定位 region 的左邊界和右邊界。
14. 橢圓形 region：點擊，然後在散點圖、密度圖和等高圖中點擊，然後拖動對角線至所需大小。
15. 箭頭：點擊，然後在實驗文件中點擊，拖出直線。
16. 文本：點擊，然後點擊定位插入點並編輯文字。
17. 計算器：如果自動重複計算關閉，點擊進行資料複計算。



1.3 CellQuest 的文件



1.3.1 FCS list mode 資料檔案：

是流式細胞儀的標準格式資料檔案 (FCS2.0)。當 Acquisition Control 視窗的 Setup 前未打 時，進行收取後自動保存的文件格式。該文件含有從流式細胞儀收取的平均 2000-10000 個細胞數的資料。一個含有 4 參數 10,000 細胞數的資料檔案若 256 道解析度則文件大小為 45kb，若 1024 道解析度則文件大小為 85kb。



1.3.2 CellQuest 實驗文件：

您設置的圖、region、gate、統計(statistics)、markers、文字、顏色等
都將保存。資料檔案不在實驗文件中保存。CellQuest 實驗文件的功能表由 File 功能表
下 New、Open、Close、Save 及 Save as 等 (類似 Microsoft Word)。

- 實驗文件可以後打開以恢復收取和分析。
- 實驗文件可以通用範本儲存以用於常規收取和分析。除資料檔案外所有條件 (包括 region、gate、statistics) 都可以通用範本儲存。
- 在實驗文件中，有 3 種圖：收取、分析和收收到分析。一個實驗文件可含上述 3 種圖的組合，但收取圖不能用來分析，分析圖不能用來收取。



1.3.3 InstrSetting 文件：

儀器調試實驗文件，可含 Detector, Threshold, Compensation 儀器條件的組合。

1.3.4 Statistic 文件：

統計輸出文件，可 Quadrant Stats (or Region Stats or Gate Stats) 方
框中之所有資料。



1.4 CellQuest 的儀器控制

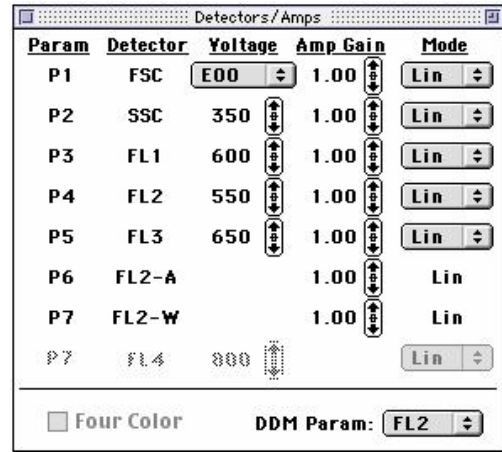
在 CellQuest 軟體中，儀器的控制選單位於 Cytometer 功能表中。用 CellQuest 進行 3
色分析中，應用陰性對照和調補償用對照進行儀器條件設置。陰性對照可用不加抗體組或同
型對照組。它將用於調節 FSC、SSC 探測器、FSC 閾值、設淋巴細胞區 region、確認
FL1/FL2/FL3 的設置及象限設置。調補償用對照包括單陽性螢光試劑，如包括下列試劑：
CD8 FITC 組、CD19 PE 組、CD3 PerCP 組。

調節探測器和放大器可使所需信號出現在資料圖的適當位置。細胞通過雷射束時產生光
信號，然後轉換成電信號，並在散點圖上相對應於一個道值。依據所選的解析度的不同，道
值有從 0-255、0-1023 不同範圍。

1.4.1 探測器 (Detector) :

在流式細胞儀中有二種探測器：光電二極體和光電倍增管(PMTs)。光電二極管對光的敏感度低於光電倍增管。光電二極體用於探測 FSC，因為 FSC 是強信號。可通過電壓而選擇對 FSC 信號的不同放大。

- E00：將信號放大 1 (10^0)倍。
- E01：將信號放大 10 (10^1)倍。
- E02：將信號放大 100 (10^2)倍。
- E03：將信號放大 1000 (10^3)倍。
- E-1：將信號放大 0.1 (10^{-1})倍。



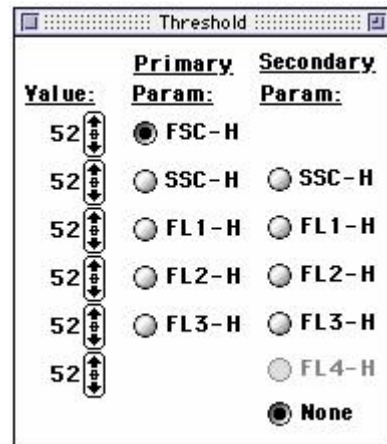
光電倍增管(PMTs)用於探測 SSC、FL1、FL2、FL3，因為它們是弱信號。PMTs 的電壓調節從 150-999。當電壓上升時，信號增加，資料出現在道值較高處。可通過點擊 ↑↓ 來選擇或直接拖動滑標上下移動。

放大器 (Amp Gain) :

可對信號進行微調。對 FSC、SSC、FL1、FL2、FL3 可設置放大模式和放大增益。若放大模式選擇 Lin (線性)，放大器的增益可在 1—9.99 之間調節。可通過點擊 ↑↓ 來選擇或直接拖動滑標上下移動。若放大模式選擇 Log (對數)，放大器的增益則不可調節。對數常用於分開陰性信號和弱陽性信號。

1.4.2 閾值 (Threshold) :

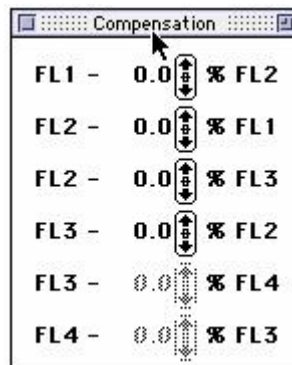
可用來設置低於該道值的資料信號不被處理，只有高於閾值道數的信號才傳送到電腦進行處理。每次只能有一個參數設置閾值 (FSC、SSC、FL1、FL2、FL3)。在免疫表型中，在 FSC 上設閾值。在 DNA 分析中，在 FL2 上設閾值。可通過點擊 ↑↓ 來選擇或直接拖動滑標上下移動。



1.4.3 螢光補償 (Compensation) :

當樣本用 2 色或 3 色螢光染色時需調節補償以消除光譜重疊。因為螢光素發射一定波段的螢光，因此在探測某種特定螢光素的探測器上有來源於另一種螢光素的螢光信號。FITC 主要出現在 FL1 探測器上，但也有部分重疊到 FL2 探測器上。PE 主要出現在 FL2 探測器上，但也有部分重疊到 FL1 和 FL3 探測器上。補償調節如下：

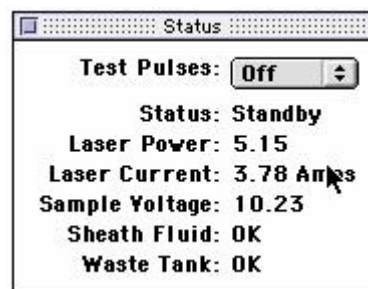
- FL1 - %FL2 : 從 FL1 探測器上減去重疊的 FL2
- FL2 - %FL1 : 從 FL2 探測器上減去重疊的 FL1
- FL2 - %FL3 : 從 FL2 探測器上減去重疊的 FL3
- FL3 - %FL2 : 從 FL3 探測器上減去重疊的 FL2



補償調節量依賴於探測器的電壓。當補償過後的群體與陰性群體一致時，補償調節正確。補償調節可通過點擊↑↓來選擇或直接拖動滑標上下移動。

1.4.4 儀器狀態 (Status) :

在功能表位於 Cytometer 功能表中。用來在收取的任何時候查看流式細胞儀的運行狀態，以利解決儀器運行中出現的問題。



測試脈衝：在 FACSCalibur 中可從 Status 功能表中選擇 FSC：僅 FSC 探測器上產生的信號、或 ALL：所有探測器上產生的信號、或 OFF。(注意：只在工程人員指示下可啟動此測試信號。)

狀態：顯示儀器運行模式

- Not Ready：**雷射器正在預熱、鞘液桶空、廢液桶滿。
- Ready：**樣本管插在 SIP 上且支撐臂位於中位(即管下)，樣本管加壓，儀器在 RUN 狀態。
- Standby：**儀器在 Standby 狀態或儀器在 Run 狀態而無樣本管在 SIP 上或支撐臂位於側位(即不在管下)或樣本管未完全加壓。Standby 時儀器的雷射器電源降低。

雷射器電源：以 mW 表示，在 RUN 時，為 15mW；在 Standby 時，為 4—6 mW。

雷射器電流：顯示雷射器電流值，當高於某值時，在顯示幕上會出現提示資訊。

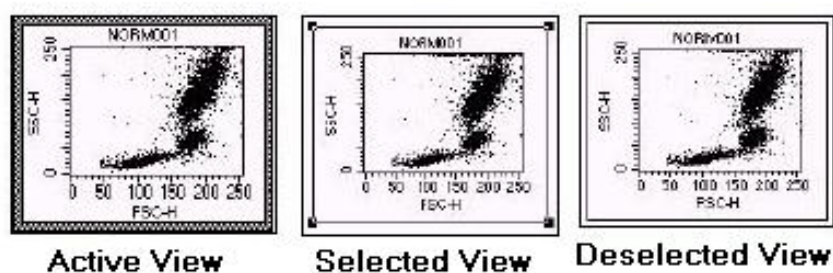
樣本電壓：顯示樣本壓力和鞘液壓力之間的差異。當插上樣本管于上樣區時，樣本壓力和鞘液壓力之間的差異增加，該樣本電壓降低。

鞘液：顯示鞘液桶是空或 OK。

廢液：顯示廢液桶是滿或 OK。

1.5 CellQuest 的視圖

在實驗文件中，可畫圖和作統計圖。它們在顯示上有三種形式：



1.5.1 啟動 (Activated)：

外方框呈灰色。點擊除方框以外的任何地方即可啟動。每次只能啟動一個圖。任何命令只針對此啟動的圖。

1.5.2 被選擇 (Selected)：

在每個角出現黑色方框。點擊圖方框即可選擇該圖。一次可選擇多個圖。任何命令可影響被選擇的圖。可通過下列 2 種方式選擇多個圖：揷 Shift 鍵同時點擊多個圖方框或在實驗文件中點擊任何對角線拖方框包繞欲選的圖。若需全選，可從 Edit 功能表中選擇 select all。只要被選圖才可以更改大小、刪除和移動。

1.5.3 去選擇 (Deselected)：

圖方框的每個角無黑色方框。點擊圖外的任何地方即可去選擇。去選擇的圖不受任何命令影響。

5.2. 調試 FACS Calibur 細胞儀

在此練習中，您將：

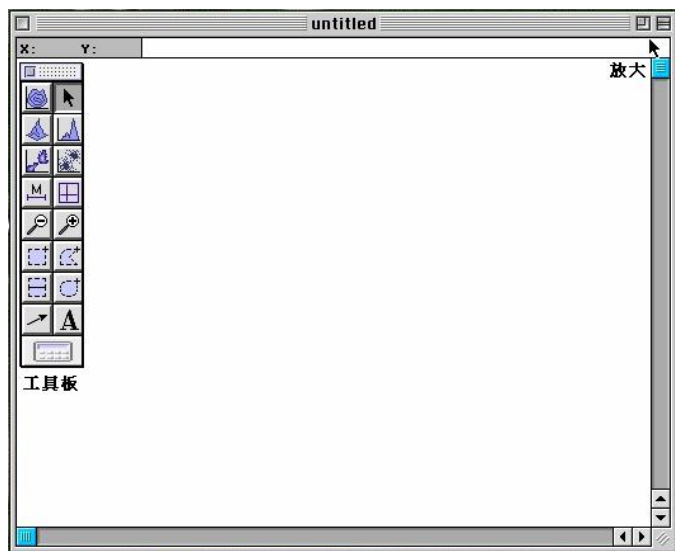
- 建立 CellQuest 實驗文件。
- 調節 FSC、SSC 探測器和 FSC 閾值。
- 畫淋巴細胞區、設門。
- 調節 FL1、FL2、FL3 探測器。
- 調節螢光補償。

2.1 調試最佳化儀器設置

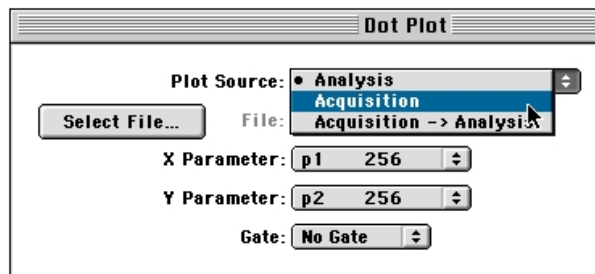
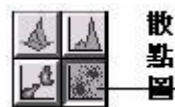
為按上述步驟進行最佳化，需準備下列樣本：

- (1) Autofluorescence Control（不加任何抗體）
- (2) IgG1-FITC/IgG1-PE/IgG1-PerCP。
- (3) CD8-FITC。
- (4) CD19-PE。
- (5) CD3-PerCP。

1. 先開儀器後開電腦，以確保儀器和電腦之間的正常通訊。
2. 在蘋果功能表下點擊 CellQuest 啓動軟體。
3. 點擊實驗文件的右上角的放大鈕，將實驗文件視窗放大。
4. 從工具板中點擊散點圖圖示。



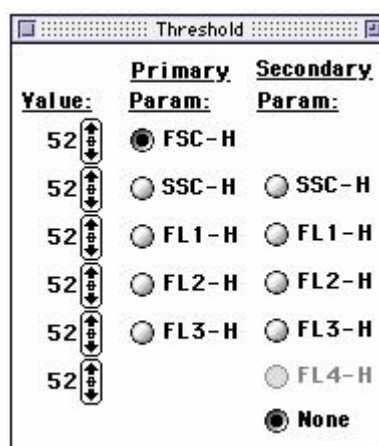
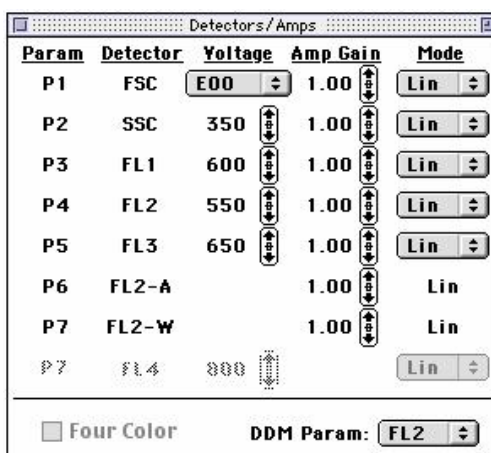
5. 在實驗文件的空白區點擊，然後拖動對角線至所需大小。出現散點圖對話方框。



6. 點擊 Plot source (散點圖來源)，選擇 Acquisition (收取)。
7. 確認 X 和 Y 軸參數預設為 FSC-H 1024 · SSC-H 1024。
8. 在顏色方框中點擊 Multicolor Gating.。(收取樣品時，門內細胞將出現顏色)。
9. 點擊 OK。出現 FSC/SSC 散點圖。
10. 從 Acquire 功能表中選擇 Connect to Cytometer。出現 Acquisition Control 對話方框。將其拖至空白區。



11. 從 Cytometer 功能表中選擇 Detectors/Amps。出現 Detectors/Amps 視窗。將其拖至空白區。
12. 從 Cytometer 功能表中選擇 Threshold。出現 Threshold 視窗。將其拖至空白區。
13. 確認 Threshold 參數為 FSC。
14. Detectors/Amps 視窗中之放大模式 Mode 之選擇，一般之設定如下：
FSC 及 SSC 為 LIN；螢光參數 FL1 – FL3 點選 LOG。



2.2 調節 FSC/SSC 探測器（電壓）及 FSC 閾值

在 FSC/SSC 散點圖上調節 FSC 放大器增益和 SSC 電壓是爲了將所感興趣的細胞顯示在圖中。調節 FSC 閾值是爲了去除碎片和噪音。所有樣本管都可用來調節，一般用陰性對照管來調。

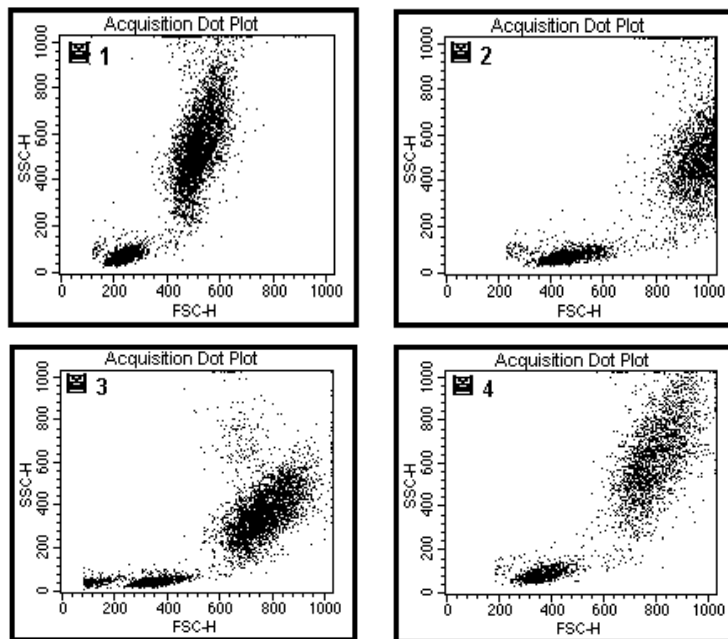
1. 使儀器處於 RUN，插上陰性對照管。



2. 點擊 Acquisition Control

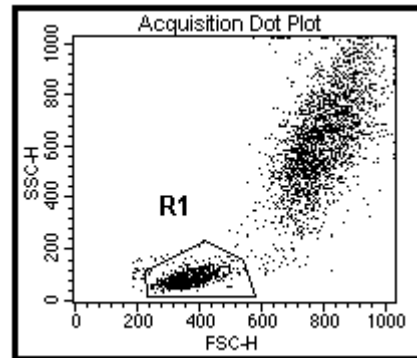
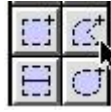
視窗中的 Acquire（注意 Setup 前需打叉或打勾，即不儲存資料）

3. 選擇 FSC/SSC 爲 Lin（線性放大），將 FSC 電壓置於 E00，調節 FSC 放大器增益(Amp Gain)；調節 SSC 電壓(Voltage)；調節 FSC 閾值(Threshold)，觀察圖的改變。
4. 如下圖 1，FSC 放大增益不足；圖 2，FSC 增益太高；圖 3，SSC 電壓太低；圖 4 則理想。



2.3 設置淋巴細胞 Region

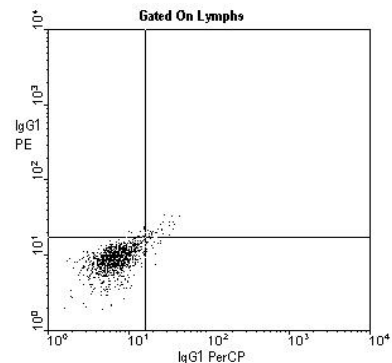
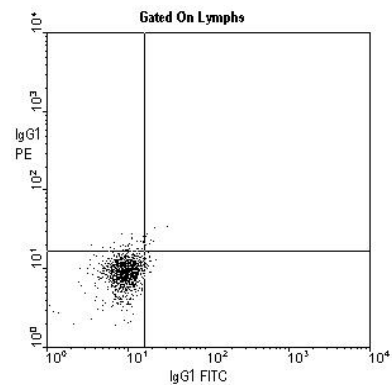
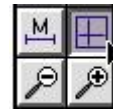
1. 在工具板中選擇多邊形的 Region。
2. 在 FSC/SSC 散點圖上設淋巴細胞 Region，在 Region 外點擊，將 R1 拖至空白區。該 Region 將在調節螢光探測器時使用。
3. 移去陰性對照管，點擊 Acquisition Control 視窗中的 Pause。



2.4 調節 FL1、FL2、FL3 的探測器（電壓）

用陰性對照管，在所有螢光散點圖上調節 FL1/2/3 的電壓來調節背景螢光。

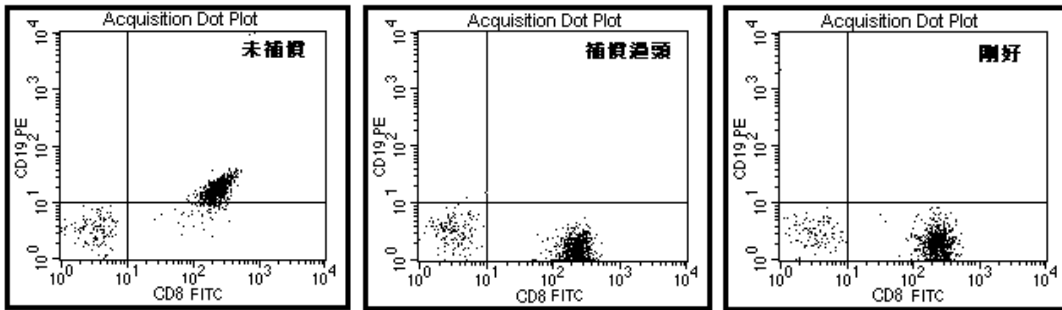
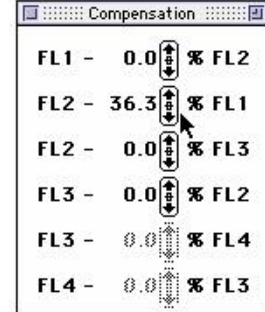
1. 選擇散點圖。
2. 在出現的對話方框內選擇 X 軸：FL1-H 1024，Y 軸：FL2-H 1024。
3. 選擇 G1=R1。
4. 點擊 OK，FL1/FL2 的散點圖出現。
5. 點擊 FL1/FL2 散點圖的邊方框並將之拖至 FSC/SSC 圖的右側。
6. 同樣建立一個 FL3/FL2 的散點圖，並選擇 G1=R1。
7. 在工具板中選擇象限界限，在 FL1/FL2 散點圖上以陰性對照管的門內細胞畫象限，這些象限將指定陰性/陽性區域。
8. 點擊 FL1/FL2 散點圖，拖動 Marker 的柄將它設定在 10^1 處。
9. 從 Stats 視窗選擇 Quadrant Stats（象限統計）。
10. 在 FL3/FL2 散點圖上，重複 7-9 步。
11. 插上陰性對照管。
12. 點擊 Acquisition Control 視窗中的 Restart。
13. 若必要，調節 FL1、FL2 的電壓（在 Detector/Amps 視窗中），使這群細胞調在所有圖的左下角（如右圖）。
14. 若必要，調節 FL3 的電壓（在 Detector/Amps 視窗中），使這群細胞調在所有圖的左下角。
15. 點擊 Acquisition Control 視窗中的 Pause。
16. 移去陰性對照管。
17. 關閉 Detector/Amps 和 Threshold 視窗。



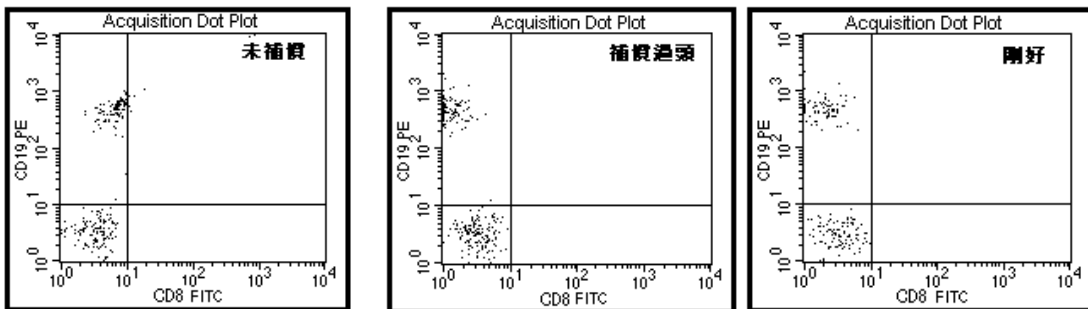
2.5 調節螢光補償

最佳化的最後一步是調節光譜重疊。若 3 色樣本，必要時需調節 FL2-%FL1，FL1-%FL2，FL3-%FL2，FL2-%FL3 的補償。補償的調節依賴於由陰性對照管設定的探測器電壓。一旦電壓設定，補償用單陽性管調節。

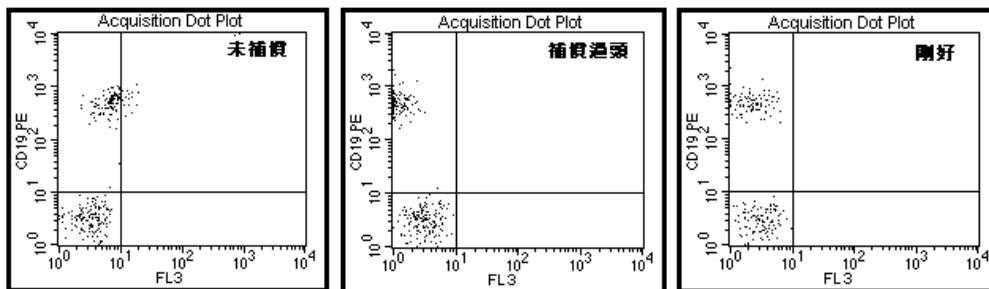
1. 從 Cytometer 功能表中選擇 Compensation。
2. 插上 CD8-FITC 管。
3. 點擊 Acquisition Control 視窗中的 Restart。
4. 若必要，調節 FL2-%FL1 使 FITC+細胞在 FL1/FL2 散點圖的右下象限。



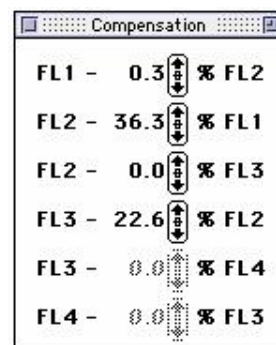
5. 移去此管，插上小鼠 CD19-PE 管。
6. 點擊 Acquisition Control 視窗中的 Pause、Restart。
7. 若必要，調節 FL1-%FL2 使 PE+細胞在 FL1/FL2 散點圖的左上象限。



8. 若必要，調節 FL3-%FL2 使 PE+細胞在 FL3/FL2 散點圖的左上象限



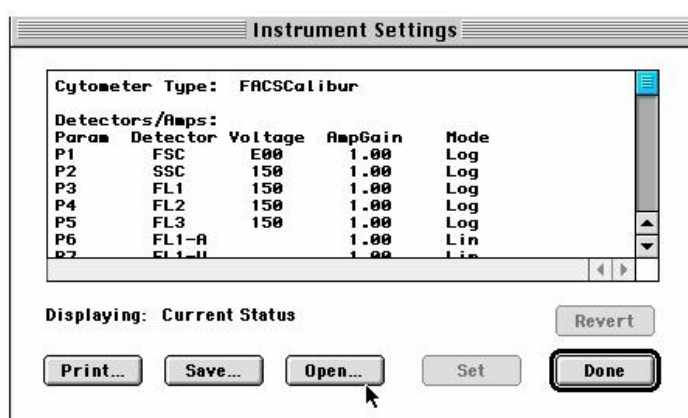
9. 移去此管，插上 CD3-PerCP 管。
10. 查看 FL2-%FL3 的補償，應為 0.0%，若必要，調節該補償。
11. 關閉 Compensation 視窗。
12. 點擊 Acquisition Control 視窗中的 Pause、Abort。
13. 移去樣本管，插上雙蒸水管。將儀器處於 Standby 狀態。
14. 您已完成 3 色螢光之最佳化。



2.6 調出由 FACSComp 產生儲存的儀器條件

若已有儀器條件儲存檔，則可調出儀器條件設定檔並作微調即可。

1. 從 Cytometer 功能表中選擇 Instrument Settings，出現對話方框
2. 點擊 Open，選擇目錄及文件
(如：Mac HD : / BD Files : / Instrument Setting Files : / Calib File)，點擊 Open。
3. 點擊 Set、點擊 Done。



5.3 收取細胞資料

在此練習中，您將：

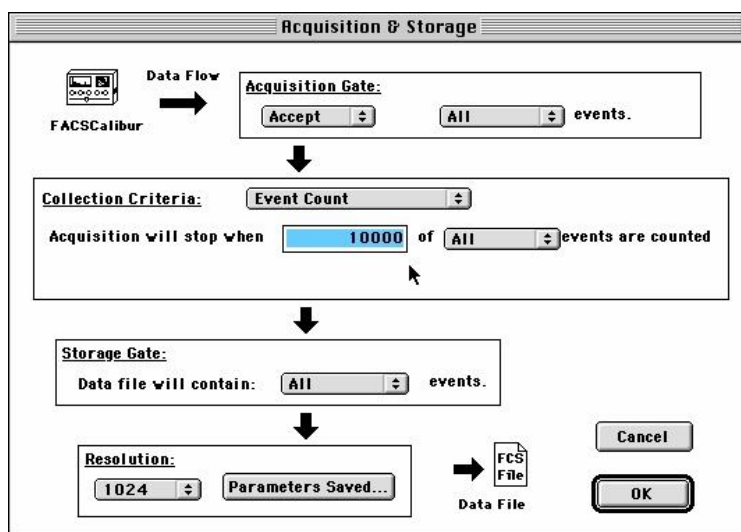
- 設定 Acquisition (收取) 和 Storage (儲存) 的條件。
- 設定文件儲存參數
- 儲存實驗模板文件。
- 儲存儲存、恢復儀器設置
- 收取細胞資料
 - 小鼠 IgG1-FITC/小鼠 IgG1-PE/CD45-PerCP
 - CD3-FITC/CD4-PE/CD45-PerCP
 - CD3-FITC/CD8-PE/CD45-PerCP



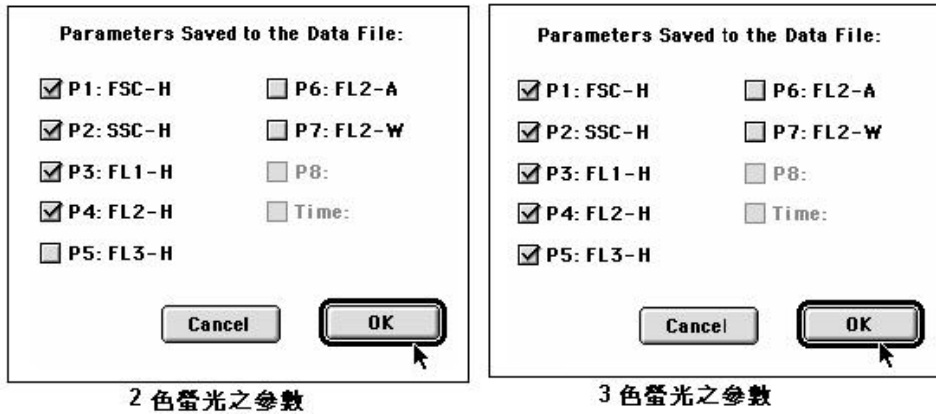
3.1 設置 Acquisition & Storage 視窗

在此視窗可設定收取和儲存的細胞數及類型。也可設定儲存的參數及其解析度。

1. 從 Acquire 功能表中選擇 Acquisition & Storage，出現 Acquisition & Storage 視窗
2. 在 Acquisition Gate 中選擇預設設置：Accept、All。亦即是螢幕上接受所有細胞的資料。
3. 在 Collection Criteria 中選擇定時設置：預設值為 10000 of All，即每一樣品收取 10000 個細胞後存檔，10000 個細胞含其它非細胞雜訊。如



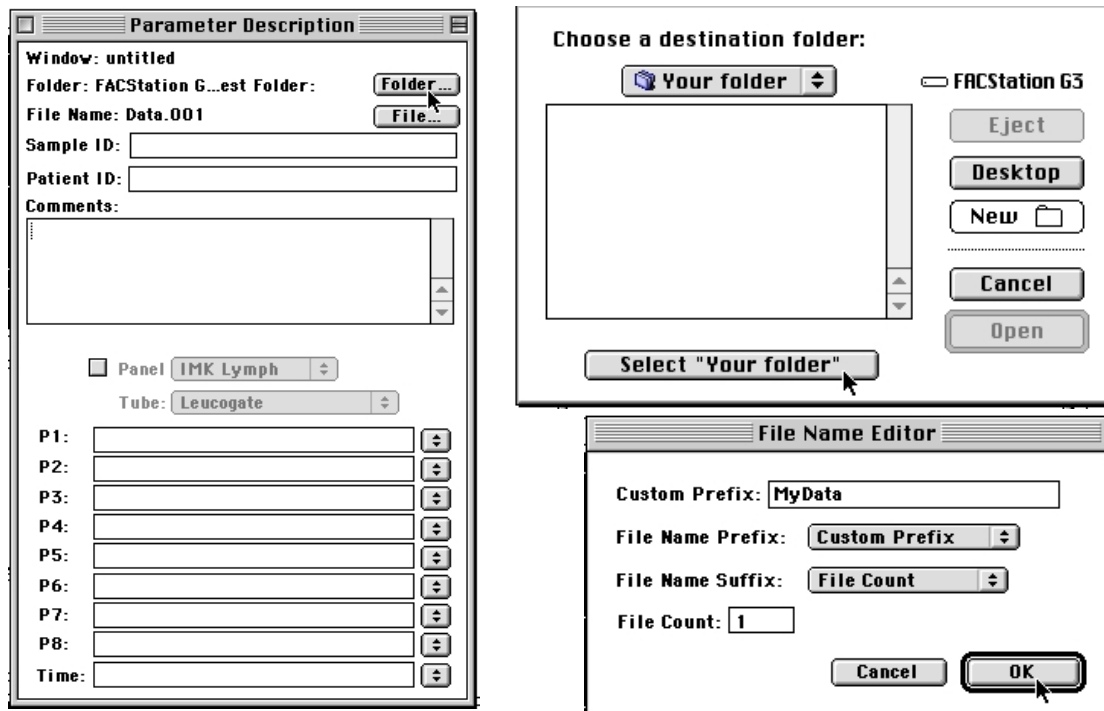
- 改為 10000 of G1=R1，即收取 10000 個位於 R1 區域中細胞，不計算氣泡与其它非細胞雜訊。
4. 在 Storage Gate 中選擇預設設置：預設值為 All，即收取儲存所有細胞的資料。
 5. 在 Resolution (解析度) 中選擇預設設置：1024
 6. 點擊 Parameter Saved，出現對話方框。
 7. 只有被選參數才儲存在 Data file 中。若 3 色分析，FSC-H、SSC-H、FL1-H、FL2-H、FL3-H 需儲存。



8. 點擊此對話方框的 OK。
9. 點擊 Acquisition & Storage 視窗的 OK。

3.2 設置 Parameter Description

1. 從 Acquire 功能表中選擇 Parameter Description，出現 Parameter Description 對話方框。



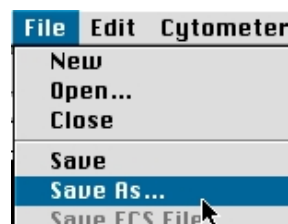
2. 點擊 Folder，出現對話方框，選擇或新建文件夾「Your Folder」。
3. 點擊此對話方框的 Select「Your Folder」。
4. 點擊 Parameter Description 對話方框的 File，出現檔案名編輯視窗。
5. 在 Custom Prefix 中：輸入檔案名 MyData。
6. 在 File Name Suffix 中選擇 File Count。

7. 在 File Count 中：確認輸入的為 1（如此 CellQuest 會依序以 .001, .002 為附加檔名）
8. 點擊此對話方框的 OK。
9. 在 Parameter Description 對話方框中可輸入您想保存的 Patient ID, Sample ID, Comments 等資訊。
10. 選擇或輸入所有參數名
 - 選擇：如需要，可點擊右側的箭頭，選擇已設定的參數名。
 - 輸入：或在 P1-P5 後的空格中輸入參數名。

3.3 儲存實驗範本文件

準備工作：在麥金塔硬碟中建立一檔案匣，以暫存各類檔案。在 Macintosh HD 上輕按兩下，可見硬碟中主目錄，如下圖，欲新增檔案匣時，可自 File 指令欄中選取 New Folder，並將隨後出現之 Untitled Folder 更改為 Your Folder。儘可能根據實驗相關資料命名檔案，如計畫主持人姓名，技術員姓名，檢測項目，或當天日期等，並儘量要求系統化。

在 CellQuest 中，您設置的含有圖、門、界限（Marker）和統計的實驗文件可以範本文件形式儲存，以後可打開進行資料收取和分析。範本文件也包含使用者在 **Acquisition & Storage** 與 **Parameter Description** 方框中的設置。從 File 功能表中選擇 Save，出現文件保存對話方框，選擇或新建文件目錄及檔案名（例：Your Folder : /3C Acquire），點擊 Save。



3.4 儲存、恢復儀器設置

收取完樣品後，別忘了儲存和列印最佳化後的儀器設置條件，以備日後重新設置。

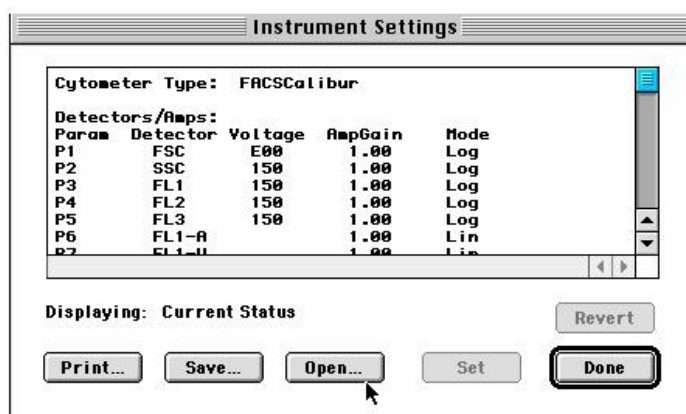
3.4.1 儲存儀器設置

1. 從 Cytometer 功能表中選擇 Instrument Setting。出現 Instrument Setting 視窗。
2. 點擊 Save，出現文件保存對話方框，選擇文件目錄及檔案名（例：Your Folder : /3C Setting1），點擊 Save。
3. 點擊 Print，列印儀器設置條件 3C Setting1。
4. 在 Instrument Setting 視窗中點擊 Done。

3.4.2 恢復儀器設置

1. 從 Cytometer 功能表中選擇 Instrument Setting。出現 Instrument Setting 視窗。

2. 點擊 **Open**，出現文件打開對話方框，選擇文件目錄及檔案名（例：Your Folder : /3C Setting1），點擊 **Open**。
3. 在 **Instrument Setting** 視窗中點擊 **Set**，待地球轉完消失後，點擊 **Done**。



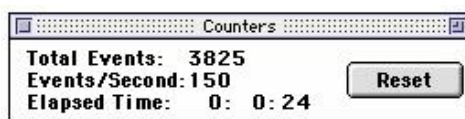
3.5 用預設之實驗文件來分析檢品、收取資料

在此將用實驗範本文件收取資料。此前已用樣本細胞最佳化條件，收取和儲存的門及細胞數已設定、文件的儲存已設定。

1. 從蘋果選單中啓動CellQuest。從螢幕上方 **File** 指令欄中，選取 **Open**，開啓硬碟中已建立之 **Your Folder : /3C Acquire** 收取用實驗文件。點擊 **Open** 即可。
2. 從螢幕上方 **Acquire** 指令欄中，選取 **Connect to Cytometer**，進行電腦與儀器間之連線。有一 **Acquisition Control** 方框顯示出來，將此視窗移至右下方。
3. 從 **Cytometer** 指令欄中，開啓 **Detectors/Amps** 與 **Threshold** 兩個對話方框，並將它們移至螢幕的右方，以便利收取資料時可即時調整儀器設定。
4. 從 **Cytometer** 指令欄中，選取 **Instrument Settings**，在對話方框中，選擇 **OPEN** 以調出儲存之儀器設定，**Your Folder : /3C Setting1**，點擊 **Open** 則方框中會出現先前儲存之儀器設定，確認無誤後，點擊 **SET**，螢幕上 **Detectors/Amps** 與 **Threshold** 兩個對話方框中之條件應會隨之改變成 **3C Setting1**，確認無誤後，點擊 **DONE**。
5. 在 **Acquisition Control** 視窗中確認 **Setup**。用陰性對照組樣品上機分析，**HIGH RUN**。點擊 **Acquire** 以進行微調。調整完畢後，點擊 **Pause**，取下樣品換 **PBS**，儀器設定在 **Standby**。
6. 從 **Acquire** 指令欄中，選擇 **Acquisition & Storage**，會出現一對話方框，可確認 **Acquisition & Storage** 儲存細胞資料之設置，點擊 **OK** 以確認。
7. 從 **Acquire** 指令欄中，選擇 **Parameter Description** 以確認檔案儲存處與檔案名稱。
8. 最後 **Acquisition Control** 視窗中，將 **Setup** 改成 **Setup**。此時 **CellQuest** 會自動顯示 **Your Folder:MyData.001** 為資料檔名。
9. 將第一管樣品放到檢測區，快速將支撐臂重定。**HIGH RUN**，點擊“**Acquire**”便可啓動樣品之分析測定與資料儲存。當第一管收取完成後，會自動儲存資料檔 **MyData.001**，並會出現“嘟”聲，**CellQuest** 會自動升幕附加檔名成 **MyData.002**。

10. 插上下一管，可繼續分析下一個樣品，直到所有檢品都分析完畢。

11. 您可在 **Acquire** 指令欄中，選擇「Counters」，
移放在右下方，便可觀察分析樣品之進度。



12. 分析完畢後用，用滑鼠從螢幕上方 **Acquire** 指令欄中，選取 **Disconnect to Cytometer** 以斷絕電腦與儀器間之連線。之後您可進行關機程序或接著分析已儲存的資料，列印圖表與報告。

13. 檢品分析完畢後，必須再執行下列步驟：

- (1) 以 2 ml 5% 漂白水取代樣品，將樣品架置於左位以外管吸除約 1 ml，再將樣品架置於中位 **HI RUN** 五分鐘。
- (2) 同上，改用 2 ml **DI water**。
- (3) 按 **STANDBY**，樣品架上留約 **1 ml DI water**。
- (4) 退出軟體 “File” → “Quit” (永遠選擇 “Don't save”)
- (5) 關電腦 “Special” → “Shutdown”。
- (6) 務必等五分鐘後再關 **FACSCalibur** 電源，以延長雷射光源壽命。

3.6 典型的儀器設定

	Single Color		Two Color	Three Color
	FITC	PE	FITC/ PE	FITC/ PE/ PerCP
Threshold	FSC	FSC	FSC	FSC
Value	52	52	52	52
FSC Voltage	E00 (Lin)	E00 (Lin)	E00 (Lin)	E00 (Lin)
SSC Voltage	350 (Lin)	350 (Lin)	350 (Lin)	350 (Lin)
FL1 Voltage	600 (Log)	-	600 (Log)	600 (Log)
FL2 Voltage	-	540 (Log)	540 (Log)	540 (Log)
FL3 Voltage	-			650 (Log)
FL1 – % FL2	0.0 %	0.0 %	0.7 %	0.7 %
FL2 – % FL1	0.0 %	0.0 %	25.0 %	25.0 %
FL2 – % FL3	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %
FL3 – % FL2	0.0 %	0.0 %	0.0 %	17.0 %

5.4 CELLQUEST 資料分析範例

4.1 概述

以下之範例練習可讓您熟悉 CELLQuest 軟體的基本功能，我們將以12個已儲存之資料檔案來示範一維直方圖及二維散點圖之資料分析。這12個資料檔案都是白血球表面抗原分析之實例，利用本公司 SimulTest 系列單株抗體，以免疫螢光染色技術來同時標記兩個白血球表面 CD 抗原，使其一個 CD 抗原發綠色螢光，另一個 CD 抗原發紅色螢光，再以流式細胞儀定量有表現各類 CD 抗原之淋巴球細胞之百分比。這12個資料檔案之檔名及樣品資料如下：

CD 抗原染色	病人甲	病人乙	病人丙
同型對照組	NORM001	NORM005	NORM009
CD3/CD19	NORM002	NORM006	NORM010
CD3/CD4	NORM003	NORM007	NORM011
CD3/CD8	NORM004	NORM008	NORM012

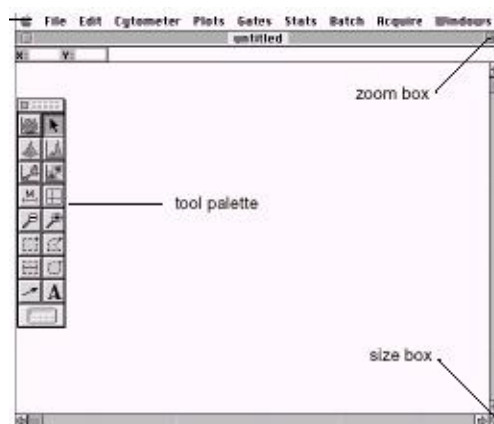
4.2 二維散點圖之資料分析

在此練習中，您將：

- 用 FSC/SSC 二維散點圖設淋巴細胞門。
- 在同型對照組 FL1/FL2 散點圖上設象限界限 Quadrant Marker。
- 用 FL1/FL2 散點圖分析 2 色資料。
- 列印結果報告。
- 以 Next Data File 指令依序分析其他資料。
- 將分析文件以範本形式保存。

4.2.1 顯示一個二維散點圖

1. 從蘋果選單中選擇 **CellQuest**，放手後儀器會啓動該軟體，可見一「Untitled」未命名文件，以及工具板。您將利用工具板在「Untitled」文件上編輯一分析用範本文件 (Analysis Template)。

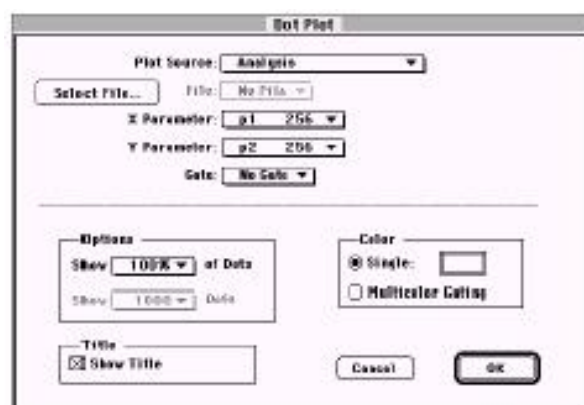


2. 在「Untitled」文件右上角點擊一下以顯示整頁大小。

3. 從螢幕左列工具板中，選取二維散點圖，在“Untitled”文件中，自左上到右下繪出一個適當大小的方格，螢幕上會出現一對話方框。



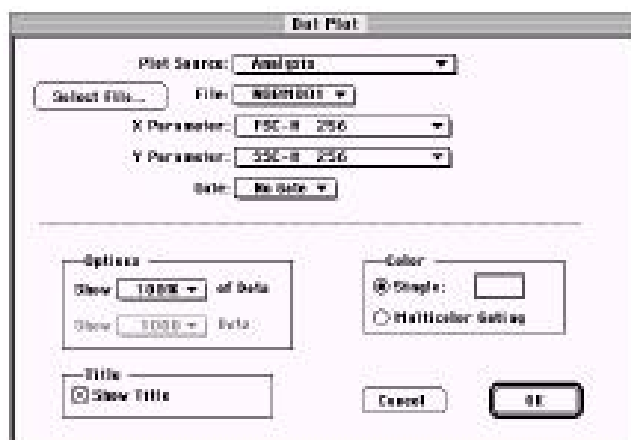
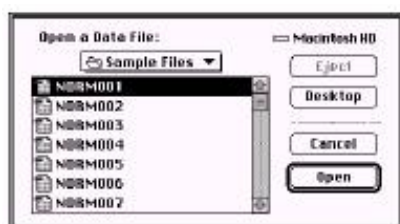
4. 點擊 **Select File** 鈕，螢幕上會出現一 **Data File** 對話方框，應用此方框來下載軟體中已存之 **Sample Files**，它們的路徑位於 **Mac HD:/BD Applications:/CellQuest Folder:/Sample Files**。



5. 點擊 **Open** 來開啓 **Sample Files** 檔案匣。

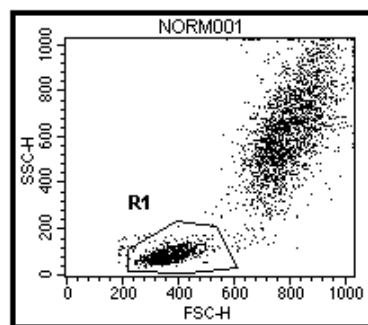
6. 再點擊 **Open** 一次來顯示 **NORM001** 檔案。

7. 圖中的 **X** 與 **Y** 參數項會出現預設值—**FSC-H 256** 與 **SSC-H 256**，確認無誤之後，點擊 **OK** 便完成了一個 **NORM001** 的 **FSC/SSC** 二維散點圖。



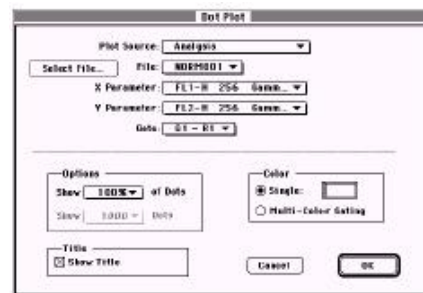
4.2.2 繪出淋巴細胞所著落之區格

8. 工具板中選擇多角形區隔工具，將Cursor 移至散點圖上，並沿著淋巴球聚落周邊畫出範圍，連點擊兩次可關閉該區域，在區域外空白處點擊一下，然後點擊並將區域標號 R1 拖至區域外，以免被遮蓋住。你已完成 R1區域的界定，我們稍後將以此區域來圈選淋巴細胞。



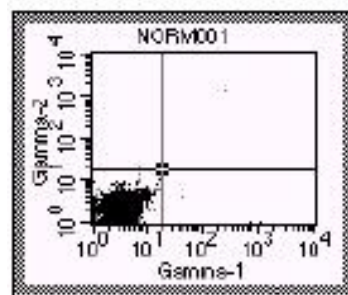
4.2.3 利用繪出之區格來進行圈選

9. 從螢幕左列工具板中，選取二維散點圖，在「Untitled-2」文件中，自左上到右下繪出一個適當大小的方格，放手後螢幕上會出現一對話方框。
10. 點擊 Select File 鈕，螢幕上會出現一 Data File 對話方框。
11. 點擊 Open 來顯示 NORM001 檔案。
12. 點擊 Parameter 鈕來顯示 NORM001 檔案中所有的參數項 (FSC, SSC, FL1, FL2) 將 X 參數項改成「FL1-H 256 Gamma-1」，Y 參數項改成「FL2-H 256 Gamma-2」。
13. 從Gate輸入欄中將 NoGate 改成G1= R1。
14. 點擊 OK 便完成了一個以 G1 圈選的 FL1/ FL2 散點圖，NORM001 檔案為本組實驗之陰性對照組，我們將以之來界定陰性與陽性之界限。



4.2.4 界定象限分隔線

15. 在 FL1/ FL2 二維散點圖空白處點擊一下以選擇該圖。
16. 從螢幕左列工具板中，選取 Quadrant Marker 工具，然後在 FL1/ FL2 二維散點圖中心處點擊並拖曳至定點，一般而言是緊挨著左下方細胞聚落。
17. FL1/ FL2 二維散點圖現在被區隔出四個象限，欲計算各象限中細胞的資料資料，可從 Stats 指令欄中選擇 Quadrant Stats。

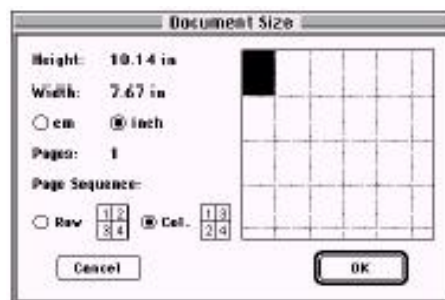


- UL Upper-Left FL2+ only 左上象限
- UR Upper-Right FL1+and FL2+ 右上象限
- LL Lower-Left FL1-and FL2- 左下象限
- LR Lower-Right FL1+ only 右下象限

Quadrant Statistics							
File:	NORM001	Log Data Units:	Linear Values				
Sample ID:	481A	Patient ID:	27413				
Protocol Name:	S. Clean	Case Number:					
Tube:	Control	Panel:					
Acquisition Date:	24-Sep-99	Gate:	No Gate				
Gated Events:	1000	Total Events:	6000				
X Parameter:	FL1-H Gamma-1 (Log)	Y Parameter:	FL2-H Gamma-2 (Log)				
Gate Location:	51, 52						
Quadrant	Events	% Gated	% Total	X Mean	R Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	1	0.02	0.02	25.22	25.22	25.22	25.22
UR	5	0.10	0.10	1280.98	148.99	313.21	320.04
LL	3457	99.78	99.78	4.63	3.92	4.39	3.69
LR	5	0.10	0.10	498.25	305.05	2.42	2.73

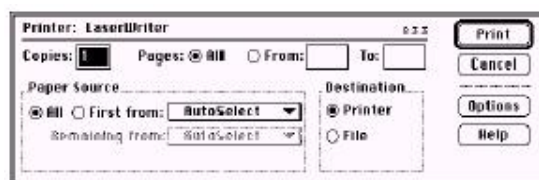
4.2.5 繼續分析其他三個檔案

18. 如欲將四個檔案之分析結果，顯示在同一份報告上，您就需要增加報告之頁數，並決定各頁如何編排。
19. 從 File 指令欄中選擇 Document Size。
20. 在黑格子右方之白格子上點擊一下，使之變黑，然後點擊 OK，此份報告現在包含兩頁。
21. 重覆步驟 9- 14，為 NORM002 檔案再增畫一個以 G1 圈選的 FL1/ FL2 散點圖。
22. 在 NORM001 的 FL1/FL2 散點圖上，Quadrant marker 的交叉點點擊一下，可見一個反白方格，然後從 Edit 指令欄中選擇 Copy。
23. 在 NORM002 之 FL1/ FL2 散點圖空白處點擊一下以選擇該圖，從 Edit 指令欄中選擇 Paste，可將先前在 NORM001 界定之陰陽界限複製到 NORM002。
24. 從 Stats 指令欄中選擇 Quadrant Stats 以計算各象線中細胞的數據資料。
25. 重覆步驟 21-24，來統計分析 NORM003 and NORM004 的資料。



4.2.6 列印報告

26. 從 File 指令欄中選擇 Print，螢幕上會出現一 Print 對話方框。
27. 點擊 Print。到此為止，您已經學會如何繪出一亞群細胞所著落之區格，並利用繪出之區格來進行圈選;如何界定象限分隔線，並利用象限分隔線來分析四個檔案;然後列印出分析報告。由於軟體容許您同時標選多個二維散點圖，所以如要分析其他病人之相同順序之資料檔，只需標選甲病人之所有散點圖，將檔案遞增數改成4，即可以把目前之報告轉變成乙病人之分析報告。

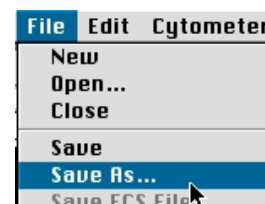


4.2.7 分析病人乙的資料檔

28. 在實驗文件中空白處輕點一下以 Deselect 所有視窗，然後從 Edit 指令欄中選擇 Select All，所有視窗皆會出現反白方格。
29. 從 Plot 指令欄中選擇 File Increment，螢幕上會出現一 File Increment 對話方框。
30. 鍵入 4 然後點擊 OK。



- 從 Plot 指令欄中選擇 Next Data File，軟體會自動以病人乙的 NORM005-NORM008 檔案來替換病人甲的檔案，您只要確認圈選的範圍與 Quadrant Marker 的位置是否恰當即可。如您所見，在設定好一個分析用實驗文件之後 (內含散點圖、圈選區格、象限分線、以及統計報告)，分析其他病人之相同順序的資料檔便輕而易舉。我們建議您將此分析用實驗文件儲存起來，以利日後相似實驗之資料分析。
- 從 File 指令欄中選擇 Save，螢幕上會出現一 Save 對話方框。
- 將實驗文件存入 “Your Folder” 中，鍵入 “Lymph Subset Analysis” 檔名，然後點擊 Save 即可。



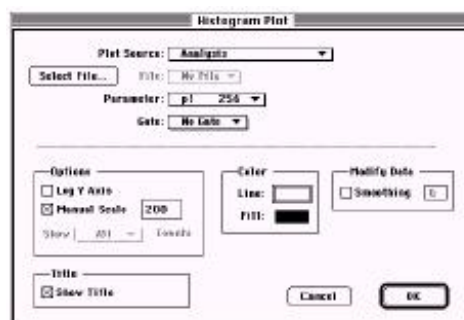
4.3 一維直方圖之資料分析

4.3.1 顯示 FSC/SSC散點圖、設定淋巴細胞之區域

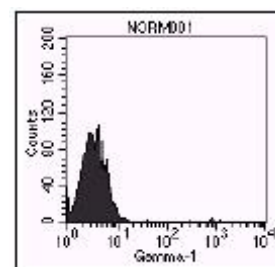
- 從 File 指令欄中選擇 New，以開啓一新的實驗文件，螢幕上會出現一「Untitled-2」的文件。
- 重覆散點圖資料分析部份之步驟 1-8，以設定淋巴細胞之圈選區域 R1。

4.3.2 顯示一維直方圖


- 從螢幕左列工具板中，選取直方圖，在「Untitled-2」文件中，自左上到右下繪出一個適當大小的方格，放手後螢幕上會出現一對話方框。

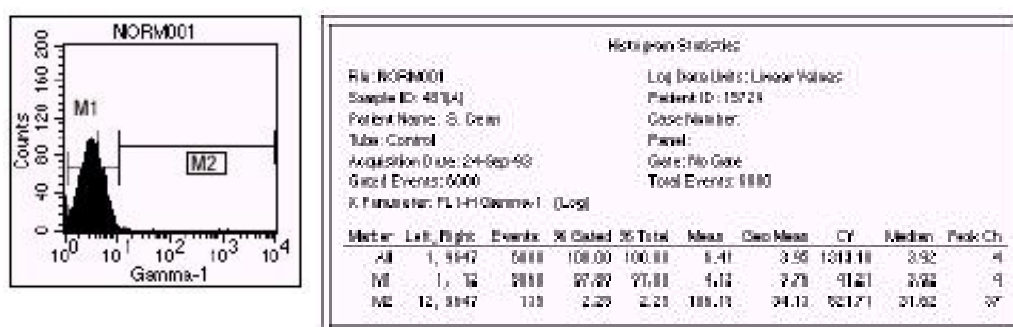


- 點擊 Select File. 螢幕上會出現一 Data File 對話方框。
- 點擊 Open 來選擇 NORM001 檔案。
- 點擊 Parameter 鈕來顯示 NORM001 檔案中所有的參數項 (FSC, SSC, FL1, FL2) 將參數項改成 “FL2-H 256 Gamma-2”。
- 從 Gate 輸入欄中將 No Gate 改成 G1 = R1。
- 點擊 OK 便完成了一個以G1圈選的 FL2直方圖，圖形的 X 軸為綠色螢光強度，Y 軸為細胞頻率，NORM001 檔案為本組實驗之陰性對照組，我們將以之來界定陰性與陽性之界限。



4.3.3 設定直方圖界限 Histogram Marker

- 在 FL2 直方圖空白處點擊一下以選擇該圖。
- 從螢幕左列工具板中，選取 Histogram Marker 工具，然後在圖的左緣處點擊並拖曳至定點，一般而言是陰性信號的右緣。
- 放開滑鼠後完成了 Marker 1 (M1)。
- 重覆步驟 9-11 以增畫另一 Marker，一般而言 Marker 2 始自 Marker 1 的右緣，終於圖的右緣。
- FL2 直方圖現在被區隔出兩個區域，欲計算各區域中細胞的數據資料，可從 Stats 指令欄中選擇 Histogram Stats。

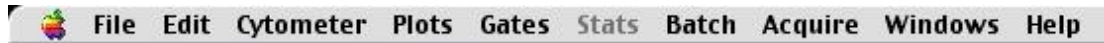


4.3.4 繼續分析其他資料檔案

- 重覆步驟 3-8 以顯示 NORM002 FL2 直方圖。
- 在 NORM001 FL2 直方圖空白處點擊一下以選擇該圖，一邊手按 Shift 鍵，一邊以滑鼠點擊 M1 and M2, 然後從 Edit 指令欄中選擇 Copy。
- 在 NORM002 FL2 直方圖空白處點擊一下，然後從 Edit 指令欄中選擇 Paste, 將 M1 and M2 copy 到 NORM002直方圖。
- 可從 Stats 指令欄中選擇 Histogram Stats以得各區域中細胞的數據資料。
- 從 Plot 指令欄中選擇 File Increment，螢幕上會出現一 File Increment 對話方框。鍵入 2 然後點擊 OK。
- 從 Plot 指令欄中選擇 Next Data File，軟體會自動以 NORM003-NORM004 檔案來替換NORM001-NORM002 的檔案，您只要確認圈選的範圍與 Quadrant Marker 的位置是否恰當即可。
- 可依序遞增直至分析完所有資料檔。

5.5 附 錄

5.1 功能表介紹



5.1.1 Apple 功能表

包括 About CELLQUEST，CELLQUEST 及其它應用軟體命令。從 About CELLQUEST 中可得知 CELLQUEST 這個軟體的版本和系列號。

5.1.2 File 功能表

- ☞ **New** 每次打開 CELLQUEST 軟體是都會產生一個新的未命名實驗文件，若當前狀態下沒有實驗文件，你可通過這個命令打開一個新的實驗文件。
- ☞ **Open** 打開一個已經存在的並已被保存的實驗文件。
- ☞ **Close** 關閉當前的的實驗文件 或 Lab Report。
- ☞ **Save** 保存實驗文件。
- ☞ **Save As** 將當前的實驗文件換一個名字保存或保存到另外的文件夾中。
- ☞ **Save FCS File**
- ☞ **Export Statistics..**
- ☞ **Append Statistics..**
- ☞ **Document Size**
- ☞ **Page Setup** 選擇列印模式。
- ☞ **Print** 列印報告。
- ☞ **Print One** 列印一份報告。
- ☞ **Quit** 退出軟體。

5.1.3 Edit 功能表

- ☞ **Undo** 刪除當前的文本編輯命令，回到原來的狀態。
- ☞ **Cut** 從 document 中剪切所選的文本內容，並將其保存在剪貼板上。
- ☞ **Copy** 複製所選的文本內容，並將其保存在剪貼板上。
- ☞ **Paste** 將剪貼板中被剪切或複製的文本內容粘貼在游標所在的位置。
- ☞ **Clear** 刪除所選的文本內容。
- ☞ **Select All** 選擇所有的文本內容。
- ☞ **Show Clipboard** 顯示剪貼板上的內容。

5.1.4 Cytometer 功能表

- ☞ **Detector/Amps** 調節 PMT 的電壓以及放大器的倍數。
- ☞ **Threshold** 調節閾值。
- ☞ **Compensation** 調節補償，減少螢光信號之間的重疊。
- ☞ **Status** 顯示儀器的當前狀態。
- ☞ **Instrument Setting** 查看、列印當前的儀器設置，保存當前的設置，或打開並下載原有的設置。

5.2 編輯 Reagent Panel 試劑組

編輯試劑組允許您將所定義的試劑進行組合，以便為實驗的每管自動選擇參數名。

可編輯 3 色 的 Panel 。

小鼠 IgG1-FITC/小鼠 IgG1-PE/CD45-PerCP
CD3-FITC/CD8-PE/CD45-PerCP
CD3-FITC/CD16+56-PE/CD45-PerCP

1. 從 **Acquire** 功能表中選擇 **Edit Panel**，出現 **Edit Panel** 對話方框
2. 點擊 **Panel** 上的 **Add, new panel** 就出現在 **Panel list** 中，輸入 **panel** 名
3. 選擇該 **panel** (變黑)，點擊 **Tube** 上的 **Add, Tube1** 就出現在 **tube list** 中，輸入 **tube** 名。
4. 選擇該 **tube** (變黑)，在 **label list** 中為該管選擇參數名：

如：P1：FSC
P2：SSC
P3：Mouse IgG1-FITC
P4：Mouse IgG1-PE
P5：CD45-PerCP

5. 點擊 **Tube** 上的 **Add, Tube2** 就出現在 **tube list** 中，輸入 **tube** 名 (如：3/8/45)
6. 重復第 4 步。點擊 **OK**
7. 可在 **Parameter Description** 對話方框中選擇剛剛編輯的試劑 **Panel**。

5.3 批次分析其餘資料

1. 從 Batch 功能表中選擇 Setup，出現 Batch Setup 對話方框。
2. 在 Plot and Stats to Process 方框中選擇 ALL
在 Pause after each file increment 方框中選擇 for ---seconds，輸入 5
選擇 Print after each file increment
選擇 Export Statistic—new file（選擇或新建目錄及檔案名）
選擇 File increment : 1
3. 點擊 OK，從 Batch 功能表中選擇 RUN，出現 Batch Control 方框。

5.3.1 將統計改為試算表

將在分析中儲存的輸出文件改為試算表。

1. 從 Apple 功能表中選擇 Microsoft Excel，一張空白表格將出現。
2. 從 File 功能表選擇 Open，出現對話方框。
3. 選擇統計文件的目錄及檔案名，並打開。
4. 在 Text Import Wizard 視窗，點擊 finish，查看結果。
5. 從 File 功能表選擇 Quit

5.4 Regions 和 Gating (設門)

Region 是將某一群體細胞區分開以分析或分選。由 4 種 Region：長方形、橢圓形、多邊形及直方圖 Region。

5.4.1 設置 Region

1. 選擇文件目錄及檔案名
2. 在工具板中選擇適當形式的 Region，在 FSC/SSC 散點圖上將淋巴細胞圈上。
3. 將 Region 的符號 R1 移至 Region 旁。

5.4.2 改變 Region

必須首先選擇 Region（在 Region 邊界上任何處點擊），然後才能改。

重新定義 Region 大小：在 Region 邊界上點擊一次，在 Region 的 4 角各出現一個柄點，點擊並沿 X 或 Y 軸拖動即可。

重新定位 Region：點擊並拖動 Region 的邊界即可

旋轉 Region：先選擇 Region，然後從 Gate 功能表中選擇 Rotate Region，拖動 Region 的柄點即可旋轉。從 Gate 功能表中選擇 Stop Rotate Region 即可停止。

重新定位頂點：改變多邊形 Region 的一種方法。在 Region 邊界上雙擊，或在 Region 邊界上點擊一次、然後從 Gate 功能表中選擇 Edit Polygon。點擊並拖動 Region 的頂點即可。從 Gate 功能表中選擇 Stop Edit Region 即可停止。

刪除 Region：在散點圖上選擇 Region，然後按 DEL 鍵或從 Edit 功能表中選擇 clear 即可。但要真正刪除 Region，必須從 Gate 功能表中選擇 Region List 中刪除。Region 的複製、粘貼也從 Region List 中進行。

5.4.3 用 Region 統計來分析資料

1. 在 FSC/SSC 散點圖上設一多邊形淋巴細胞 Region，為 R1
2. 設一橢圓形單核細胞 Region，為 R2
3. 設一長方形粒細胞 Region，為 R3
4. 啟動散點圖，從 Stats 功能表選擇 Region Stats（Region 統計）。

5.4.4 設門

圈選可以由一個或多個 Region 組合而成。圈選可以限定分析或分選的細胞群。在 CellQuest 中，預設 G1=R1，G2=R2，但可以根據需要設定合適的門。

反向設門：

反向圈選可以用於顯示在某一圖上的細胞群在另一圖上的位置。在螢光圖上畫一 Region，用該 Region 在另一圖（常常是 FSC/SSC）上的位置。

1. 在 FL1/FL2 散點圖中，在 CD3⁻CD4⁺細胞群上畫 R4。
2. 啓動 FSC/SSC 散點圖，從 Plot 功能表上選擇 Format Dot Plot
3. 在對話方框中選擇 G4=R4，點擊 OK，可觀察在 FSC/SSC 上 R4 細胞所在位置。

5.4.5 多色門

1. 啓動 FSC/SSC 散點圖，從 Plot 功能表上選擇 Format Dot Plot
2. 在對話方框中選擇 Multicolor Gating，選擇 No gate，點擊 OK，
3. 在另外二個散點圖上重復 1、2 步，散點圖上淋巴細胞呈紅色、單核細胞呈綠色、粒細胞呈橘黃色。
4. 從 Gate 功能表中選擇 Gate list，為 G1 選擇黃色，關閉此對話方框，可見淋巴細胞呈黃色。

更改 Gate list 中門的次序：

門內細胞群的顏色是依 Gate list 中的門的次序而定，可更改 Gate list 的次序，而改變門內細胞群的顏色。

1. 在 FL3/SSC 散點圖上，在嗜城粒細胞群上畫 R5，可見嗜城粒細胞群呈紅色，即使 G5=R5 的顏色是鏽色，因為嗜城粒細胞群落在 R1 內。
2. 為將嗜城粒細胞群落顯示鏽色，在 Gate list 中將 G5 移至首位。
3. 此時在 FL3/SSC 上在嗜城粒細胞群顯示鏽色。

5.4.6 邏輯組合門

多個 Region 組合而成複雜的門可以用來分析或分選。由以下 3 種邏輯門。

R1 and R2 (或 R1*R2) : 同時在 R1 和 R2 內的細胞才是滿足該門的要求。

R1 or R2 (或 R1+R2) : 在 R1 內或 R2 內的細胞都滿足該門的要求。

Not R1 (或-R1) : 所有不在 R1 內的細胞群都滿足該門的要求。

注意：1· 限定邏輯門時，在 and 、or、region 之間需空格。

2· 邏輯運算關係：先 **Not**，然後 **and**，其次 **or**。或用括弧表示

Not R1 and R2 : 正確 (所有不在 R1 且在 R2 內的細胞)

R1 and Not R2 : 正確 (所有不在 R2 且在 R1 內的細胞)

R1 Not R2 : 錯誤

Not (R1 and R2) : 正確 (所有在 R1 和 R2 交集以外的細胞)

R1 or R2 and R3 : 正確 (所有在 R2 和 R3 交集內或在 R1 內的細胞)

(R1 or R2) and R3 : 正確 (所有在 R1 或 R2 內且在 R3 內的細胞)

R1 or G2 or Not R3 and R4 : 正確 (首先 not R3，然後 and R4，其次或 R1 或 R2 內的細胞)

(R1 or G2 or Not R3) and R4 : 正確 (首先括弧內，然後 and R4)