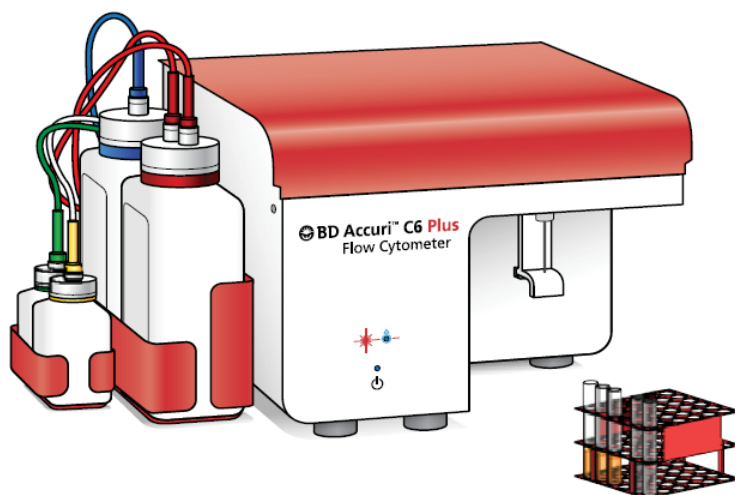


BD 生物科学 上海 COE 培训中心

2018

BD Accuri C6 Plus™ 培训手册



Sky Kong

地址：上海市徐汇区建国西路 445 号 3 楼（中科院上海生科院院内）

电话：400-819-9900

邮箱：COE_BDB_China@bd.com

网址：www.bdbiosciences.com/cn

1/1/2018

目录

BD Accuri C6 Plus 辅助设备及试剂耗材	2
BD Accuri C6 Plus 日常操作流程.....	3
第一章. BD Accuri C6 Plus 软件介绍	8
第二章. 质控流程	11
第三章. 收集数据	14
第四章. 分析数据	49
第五章. 查看统计数据	55
第六章. 仪器日常维护	59
第七章. 常见问题及解答	64
附录 A. 软件增强分析功能	67
附录 B. 高级液流设置.....	73
附录 C. CSampler 安装及使用指南	75
附录 D. BD Accuri C6 Plus 培训日程	79

BD Accuri C6 Plus 辅助设备及试剂耗材

1. 随仪器提供试剂耗材

试剂名称	用法
Detergent solution	用 197mL DI water 稀释 3mL 去污液，混匀后放入体积为 0.25L 去污瓶中（瓶口为黄色）
Cleaning Concentrate Solution	用 197mL DI water 稀释 3mL 清洗液，混匀后放入体积为 0.25L 清洗瓶中（瓶口为绿色）
Bacteriostatic Concentrate Solution	用 995mL DI water 稀释 5mL 抑菌液，混匀后放入体积为 1L 鞘液瓶中（瓶口为蓝色）
Extended Flow Cell Clean	详见仪器日常维护部分（第六章）
Sheath bottle filter and Decon/Cleaner Bottle Filters 鞘液瓶过滤器，去污瓶/清洗瓶过滤器	详见仪器日常维护部分（第六章）
In-line Sheath Filter 内置过滤器	详见仪器日常维护部分（第六章）
Peristaltic Pump Tubing 蠕动泵管路	详见仪器日常维护部分（第六章）

2. 自行准备试剂耗材

1. ddH₂O
2. 次氯酸钠溶液（工作液有效氯浓度约 0.5%）
3. 低速水平离心机
4. 多种规格移液器及枪头（20ul，50ul，100ul，1ml 等）
5. 旋涡混匀器
6. 12x75mm 的 5ml 流式管，或 EP 管
7. 流式管架，或 EP 管架
8. 记号笔

BD Accuri C6 Plus 日常操作流程

1. 开机流程

- (1) 开电脑，开软件，放置一管 ddH₂O 在上样针处
- (2) 检查所有液流瓶中的液面高度，确认可以维持仪器正常运行。
- (3) 按下电源键开启机器，仪器自动执行启动流程，时间大约 5min。

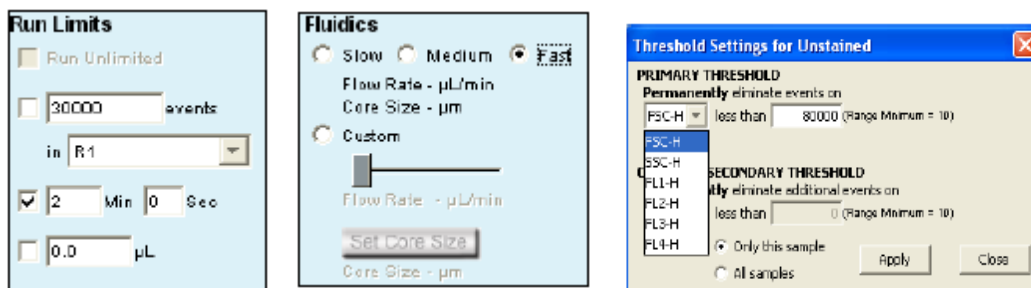
注意：当 C6 启动时，不要打开仪器的盖子，因为打开盖子会干扰激光预热的过程，并延长启动时间。

- (4) 启动流程完成后，仪器状态显示 “Cytometer Connected and ready”。
- (5) 推荐上样前运行 ddH₂O 15min。

注意：上样前，确认样本是否已过滤去除细胞团块，以防止管路堵塞；上样时需要混匀样本。

2. 采集样品

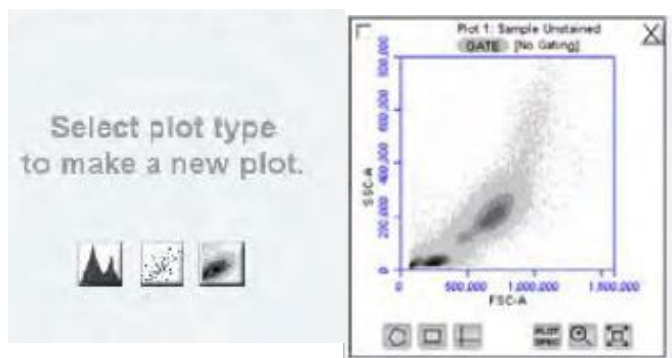
- (1) 放置样品于上样针处；
- (2) 设置采样条件，包括采样数目或时间或体积，上样速度和阈值；



- (3) 选择样品位置，命名样品名称，点击 “run”，开始采样，采样结束后数据会自动保存。Accuri C6 的存储文件后缀为.C6，该文件包含 FCS 文件、Instrument Settings 以及分析模板。如需输出 FCS 文件，可点击 File 下 Export FCS Files。

3. 画图

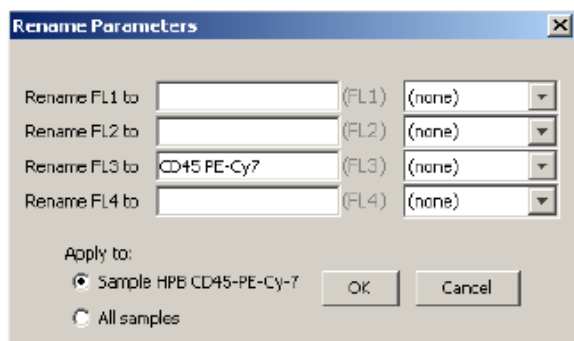
- (1) 点击 “Histogram” 或 “Dot Plot” 或 “Density Plot”，该图形将显示获取的样品；



- (2) 点击坐标轴参数，从下拉菜单选择需要的参数（如“FSC-A”，“FL1-A”）；
- (3) 点击“Plot Spec”，选择“linear”或“log”，设置坐标轴显示范围；

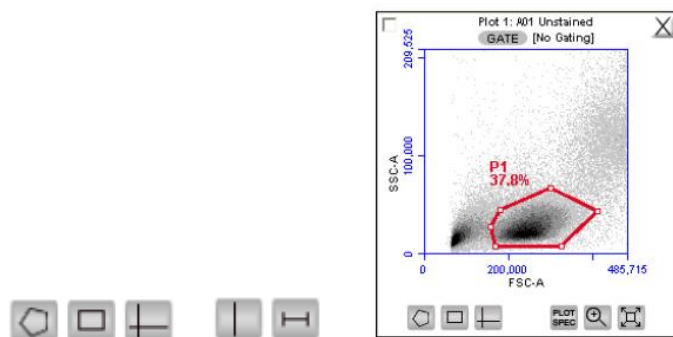


- (4) 右击坐标轴参数，选择“Rename Parameters”，输入新的坐标轴名称；

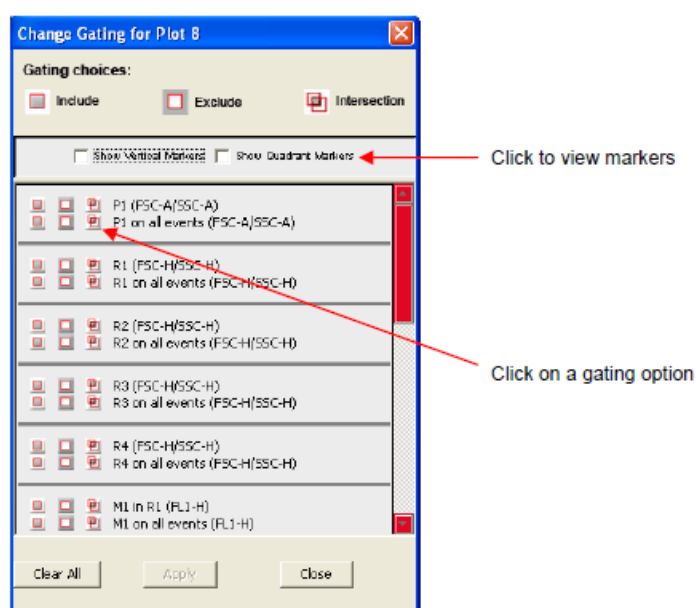


4. 设门

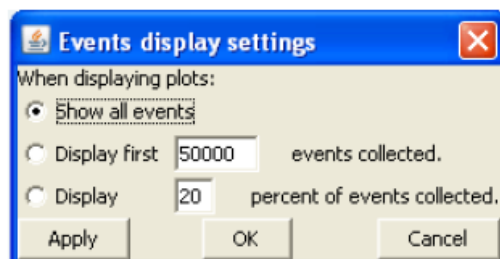
- (1) 点击任一设门工具，圈定特定的区域，设置为门；
- (2) 点击图形上的“Gate”，选择该图形需要应用的门；



- (3) 在“Gate”对话框内，选择多重门的逻辑关系，“Include”或“Exclude”或“Intersect”，然后点击“Apply”。

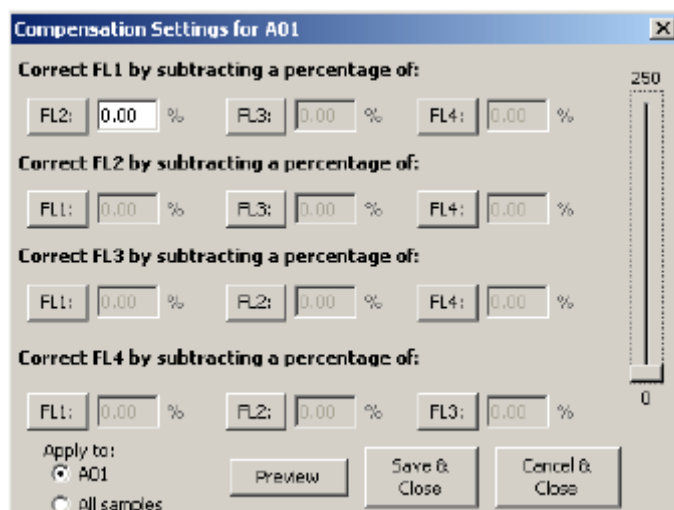


- (4) 选择需要显示的细胞数



5. 设置补偿

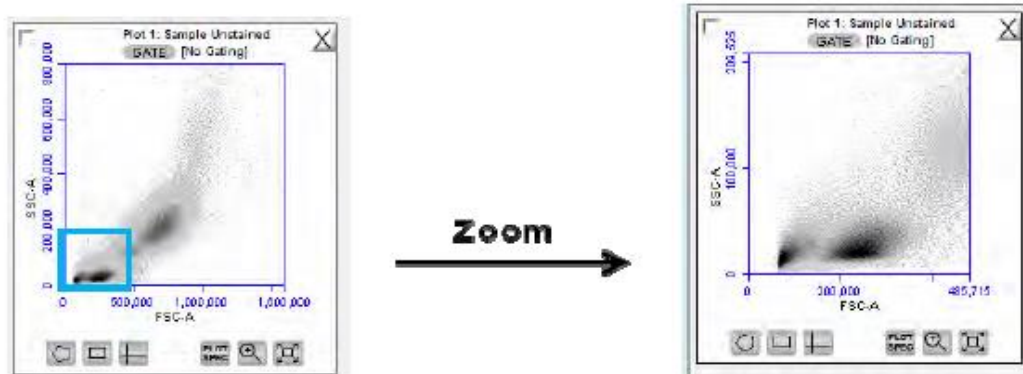
- (1) 点击 “Set Color Compensation” ；
- (2) 选择需要补偿的荧光参数，输入补偿值，点击 preview 查看补偿效果；




- (3) 点击左下角选项，应用该补偿至当前样品管或所有的样品管；
- (4) 点击 “Save & Close” 。

6. 图像放大缩小

- (1) 点击  “Zoom In” ，可放大指定区域；



- (2) 点击  “Zoom Out” ，可返回之前的区域大小。

7. 关机流程

- (1) 放置一管 ddH₂O，高速运行 2 分钟
- (2) 放置一管有效氯浓度 0.5%-1%的次氯酸钠溶液，高速运行 5 分钟；

- (3) 放置一管 ddH₂O，高速运行 10 分钟，运行结束后，将 ddH₂O 保留在上样针处；
- (4) 退出软件，关闭电脑；
- (5) 按下电源键，仪器会自动执行关机清洗流程，时间约为 13min，完成后仪器会自动关机。

注意：关机时，按住电源键时间不要超过 5 秒钟，否则会跳过自动关机清洗程序。当您用这种方式关闭 C6，下次 C6 启动时会显示警告信息，用更长的时间来恢复到绿灯准备完毕状态。

第一章. BD Accuri C6 Plus 软件介绍

BD Accuri C6 Plus 软件控制 BD Accuri C6 Plus 流式细胞仪，实现数据获取，生成统计数据以及分析结果等操作。BD Accuri C6 Plus 软件具有以下特性：

- 有质控、收集，分析，统计，批量分析五个查看页面。
- 可以随时进行数字信号处理和荧光补偿。
- 可以拖拉图。
- 以 FCS 3.0 格式输出文件。
- C6 格式数据可以准确无误的转换为 FCS 格式数据。
- 拖拉更高分辨率的图，群体颜色显示，动态门。
- 对样本数据的批量处理功能。

1.1 启动 BD Accuri C6 Plus 软件

这样打开 BD Accuri C6 Plus 软件：

双击计算机桌面上的 BD Accuri C6 Plus 图标，会打开一个新的空白的工作页面。

注意：如果 BD Accuri C6 显示信息 *由于执行长清洗程序或者不当关机，需要更长的启动时间*，C6 会比平时多用几分钟完成恢复，然后回到绿灯准备完毕状态。当对仪器进行首次安装时，您可能会遇到这种情况。如果不小心的运行过程中关闭仪器电源，也会出现这种情况。

1.2 BD Accuri C6 Plus 软件工作页面

BD Accuri C6 Plus 软件的主工作窗口叫做 BD Accuri C6Workspace 工作页面，这个工作页面包含获取和分析数据所需的所有控制以及显示功能页面。BD Accuri C6 工作页面分为四个控制页面：

- 质控页面 (Instrument QC) — 进行仪器质控 (第 2 章有详细说明)。
- 收集页面 (Collect) — 包括设定数据收集以及数据获取条件的控制命令 (第 3 章有详细说明)。
- 分析页面 (Analyze) — 包含数据分析的控制命令 (第 4 章有详细说明)。
- 统计页面 (Statistics) — 显示统计学信息 (第 5 章有详细说明)。

- 批量分析页面 (Batch Analysis) — 包含批量分析样本数据的控制命令。

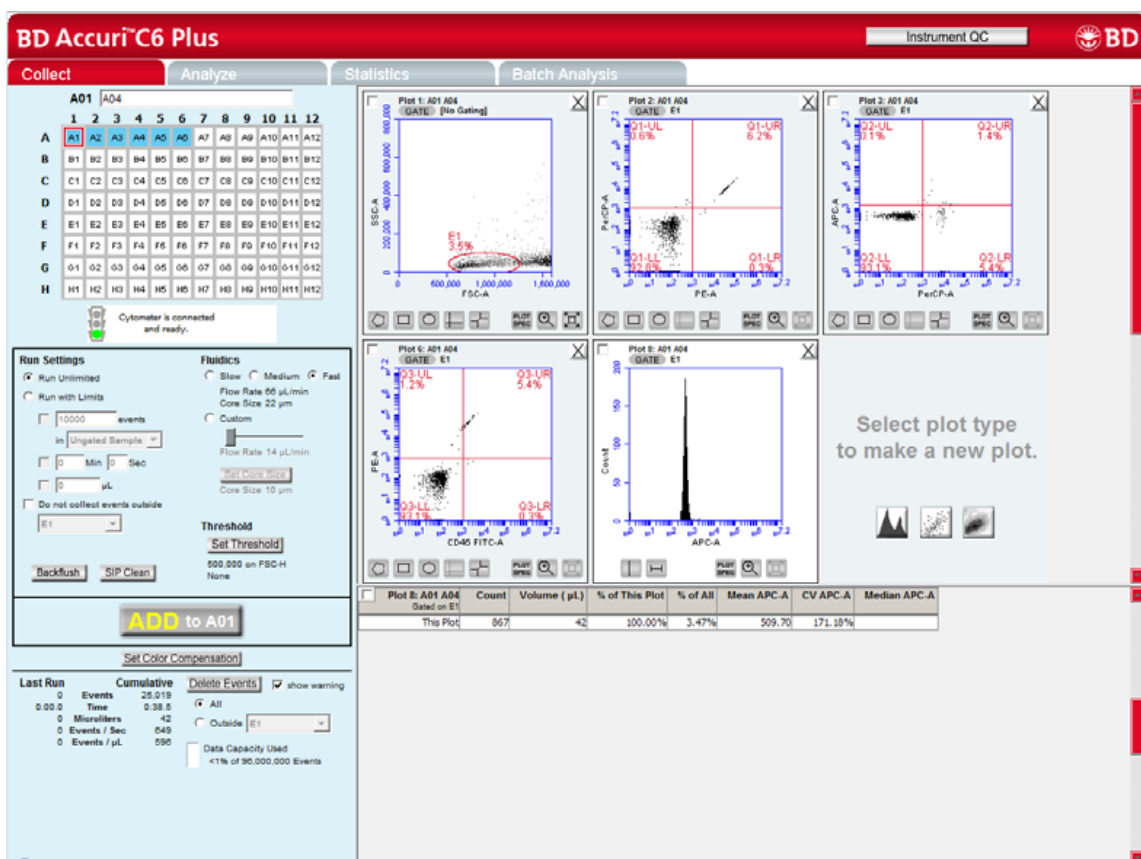


图 1-1.收集工作页面。

1.3 打开一个新的 BD Accuri C6 Plus 工作页面

当打开一个新的工作页面，会显示一张横纵坐标分别为 FSC-A 和 SSC-A 的密度图，并预设放大方式为横坐标 1,600,000，纵坐标 800,000。运行设置为无限获取，阈值设定为 FSC-H 通道 80,000，没有设定荧光补偿值。您可以创建新的工作页面来建立自己的分析模板或者收集一组新的数据。

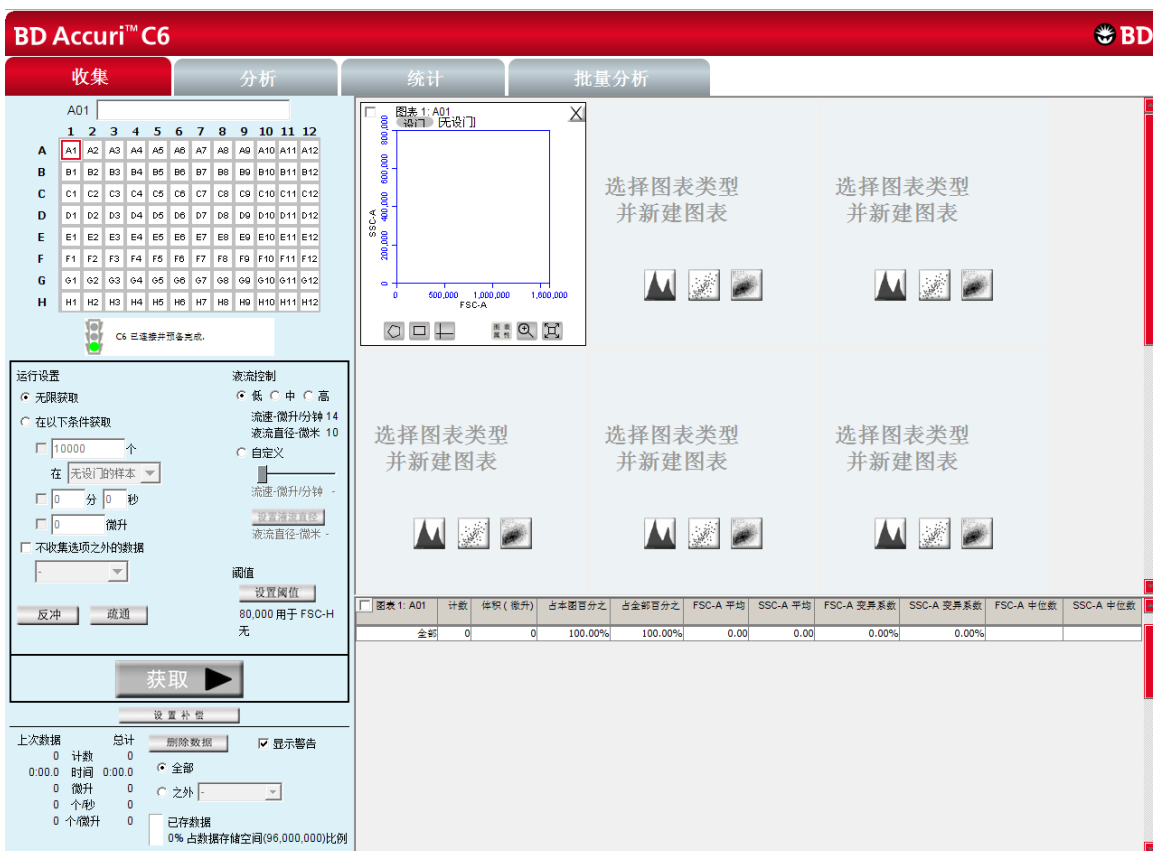


图 1-2. 新的 BD Accuri C6 软件工作页面

做下列操作之一，打开新的工作页面：

- 如果 BD Accuri C6 Plus 软件还没打开，双击计算机桌面上的 BD Accuri C6 Plus 图标。
- 如果 BD Accuri C6 Plus 已经打开了，选择文件>新工作页面。如果需要，保存对之前工作模板所做的任何未保存的改动。

1.4 退出 BD Accuri C6 Plus

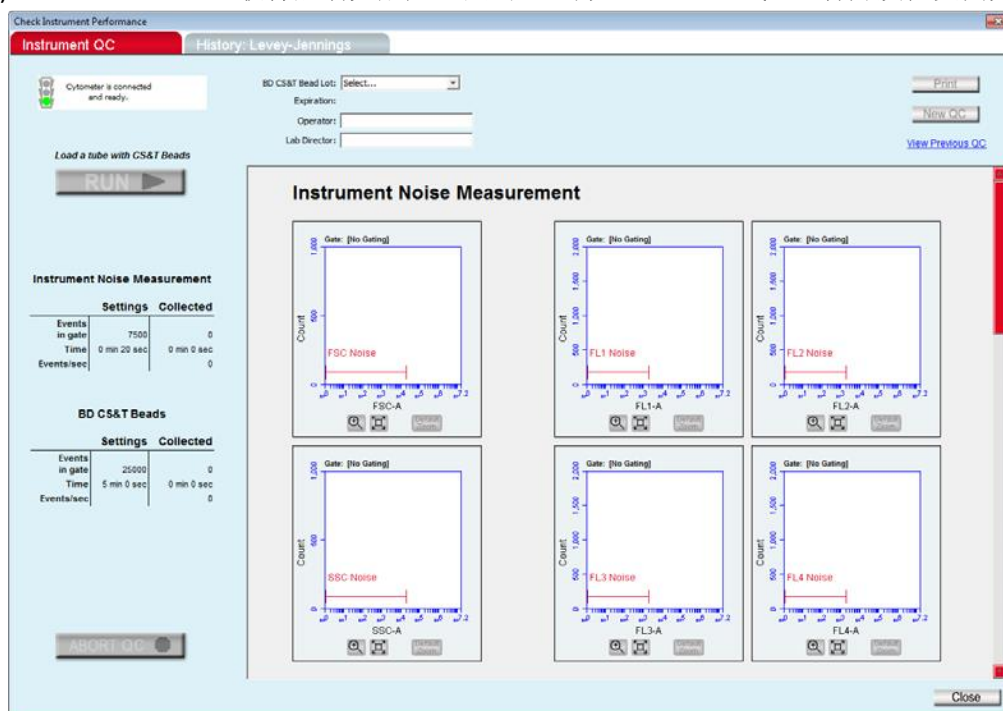
1. 选择文件>退出。
2. 如果被提示保存对 BD Accuri C6 Plus 工作模板所做的改动，做下列操作之一：
 - 点击 **是** 按键保存改动。
 - 点击 **否** 按键关闭 BD Accuri C6 Plus 软件，不做改动。
 - 点击 **取消** 按键，取消操作，保持 BD Accuri C6 Plus 软件打开状态。

第二章. 质控流程

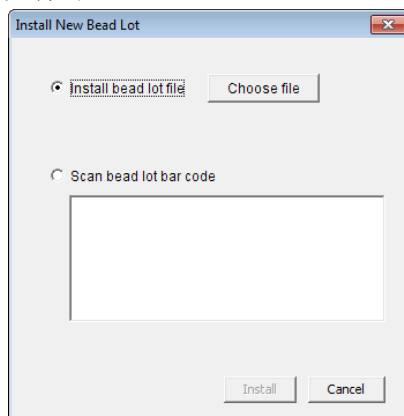
每天至少保证校准一次仪器，这样可以确保在进行实验样本检测时 C6 工作状态正常。每天使用同样的 BD Accuri C6 文件来收集校准小球的数据，这样您就可以比较机器状态随时间的变化。

2.1 运行校准小球

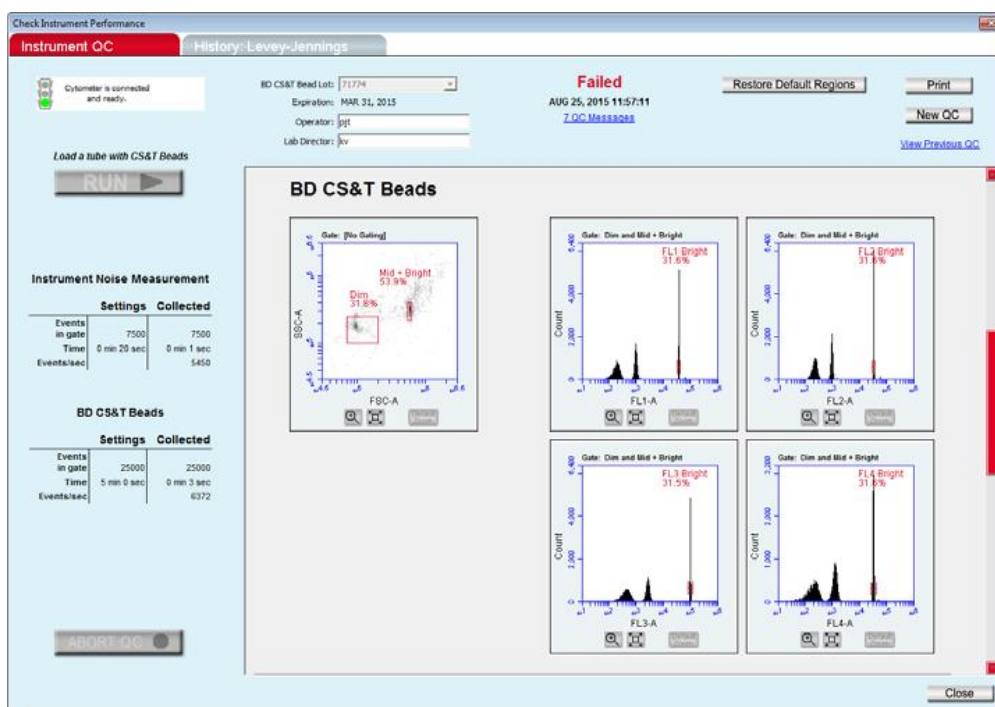
- 1) BD Accuri C6 Plus 软件启动完成后，点击右上方“Instrument QC”，打开质控页面如下：



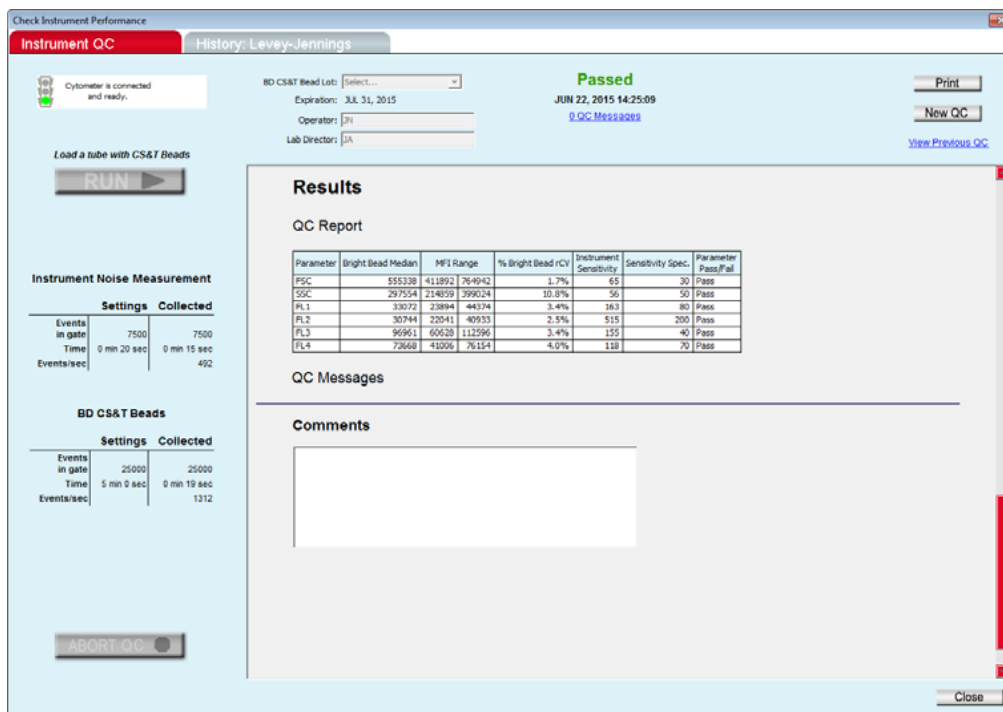
- 2) 选择“BD CS&T Bead Lot”微球批号，如是新批号微球，点击“Install”导入下载的 CST 微球批号文件（.bls 文件）；



- 3) 将配好的质控微球 (500ul DI Water+2 滴微球) 放置在上样位置, 点击页面左上“RUN”, 运行质控程序;



- 4) 运行完成后, 优化各群设门的位置;



2.4 校准疑难解答

CST 质控 Failed 解决方法：

1. 如果不是用低速收集的数据，选择低速，重悬小球，重新收集数据。
2. 如果小球距被稀释已经超过 1 个星期，或者放在室温，或者被光长时间照射，它们的表现会达不到标准。制备新的小球悬液，重新收集数据。
3. 在流动室可能存在气泡或堵塞物。做下列一项或多项操作：
 - 再跑一次小球样本。
 - 从上样针移去样本管，放上空管子，点击 Backflush 按键。Backflush cycle 结束(BD Accuri C6 显示绿灯)，再跑一次小球样本。

第三章. 收集数据

收集面板 (Collect) 可以设定数据的收集标准, 开始和停止数据获取, 以及查看已收集样本的数据。收集面板包括可以实现以下功能的按键和控制组件:

- 获取数据。
- 制图 (直方图, 散点图, 或者密度图) 用以查看获取的数据。
- 设定停止收集数据的标准和阈值。
- 控制液流速度。
- 使用 regions 和 markers 命令来设置门 (gates), 并得到统计学数据。
- 保存和打印图形以及数据。
- 设定荧光补偿。
- 导入导出数据。

3.1 查看收集面板

当打开 BD Accuri C6 软件时, 会自动显示收集面板 (Collect), 您可以通过点击收集 (Collect), 分析 (Analyze), 统计 (Statistics) 或者批量分析 (Batch Analysis) 来看不同的控制面板。

收集面板由两个主要部分组成:

- 仪器控制面板——位于窗口左侧的面板, 包括控制收集数据的各按键。
- 数据展示面板——位于窗口右侧的大区域, 以图形和统计表格形式显示收集的样品数据。

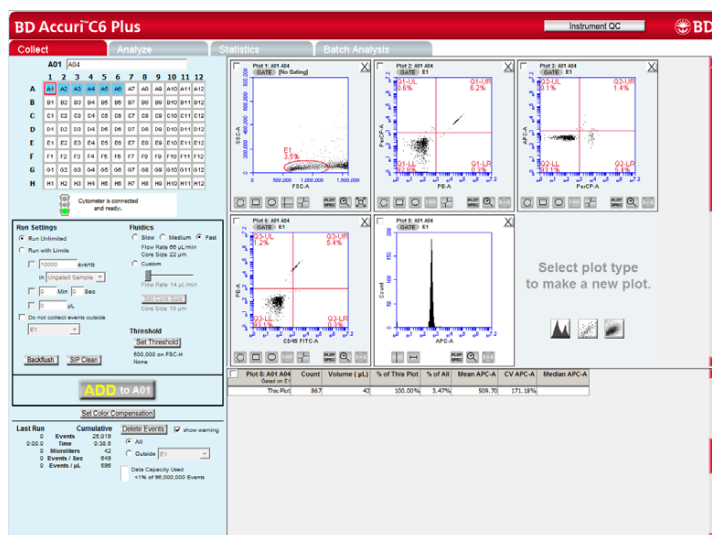



图 3-1 收集面板

下面的表格描述了收集面板上每个控制按键和指示器具体功能：

表 3-1 收集面板控制按键

控制按键	功能描述
Sample Naming Field 样品命名区	输入您所收集样品的名称。
Sample Grid 样品格	<p>为了方便给实验样品编组和收集数据，样品格以 96 孔板的矩阵形式显示，BD Accuri C6 会获取每个样品的数据并放在 96 孔样品格对应的孔中，您可以以任意顺序收集每个样品孔的数据。</p> <p>样品孔是以颜色编码的：</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 白色——不包含数据。 ● 蓝色——包含数据。 ● 红色边框——目前选定以查看或者收集数据。
Traffic Light and Message 显示灯和提示信息	<p>是显示 BD Accuri C6 准备情况以及系统信息的指示器，如果要收集数据，BD Accuri C6 指示灯必须显示为绿色 ，并且出现提示信息：C6 和 BD Accuri C6 已经连接并准备完毕 (<i>C6 and BD Accuri C6 are connected and ready</i>)。</p> <p>指示灯的状态是以颜色编码的：</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 绿色——BD Accuri C6 已经准备好，可以收集数据，或者正在收集数据。 ● 黄色——C6 正在准备进行操作，或者发生了一个非关键性错误。 ● 红色——发生了一个关键性错误。

控制按键	功能描述
RUN Limits 运行限制	包括一组控制按键，您可以设置自动停止收集数据的标准，请看 3.2.3 章节的详细描述。
Fludics 液流	包括一组控制按键，您可以设置流速和收集核心样本的大小，请看 3.2.3 章节详细描述。
Backflush 反冲	进行反冲操作，可以从上样针中冲出样品。
SIP Clean 清洗	清除 SIP 内部的样品残余。
Threshold 阈值	设置阈值，可以排除细胞样品中碎片和本底噪音的影响，默认设置阈值是 FSC-H 设定为 80,000，请看 3.2.2 章节的详细描述。

RUN/PAUSE/ADD TO 运行/暂停/加至	<p>点击按键实现下列功能：</p> <ul style="list-style-type: none"> ● RUN——开始获取样本。 ● PAUSE——暂停获取样本，点击 ADD TO 继续获取样本。 ● ADD TO——您可以在已存在数据的样品孔中继续收集更多数据。
Set Color Compensation 设定补偿	打开补偿对话框，进行荧光补偿，请看 3.12 章节的详细描述。
Acquisition Counters 获取操作平板	<p>以实时形式显示所选择样本孔最近一次获取数据的信息 (last run)，以及所选择样本孔所有获取的数据信息 (Cumulative)。</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Events——样本获取数据的量。 ● Time——已运行样本获取时间。 ● Microliters——获取样本体积 (微升)。 ● Events/sec——每秒获取数据量，当运行结束后，显示的是平均值。 ● Events/μl——每微升获取数据量，当运行结束后，显示的是平均值。
Delete Sample Data 删除样本数据	永久删除目前样本所收集的所有数据，在执行删除数据命令前，会有提示框显示警告信息。提示信息还包含已用存储数据容量尺，显示 BD Accuri C6 目前已使用的数据存储容量。
Plots Pane 图形窗口	此区域可以显示两个制图栏，以方便通过图表分析目前样本所获取的数据，通过拉上或拉下边条可以看到其他图形。您可以为每个样本作多张图，在每个图栏下方包括控制按键，可以分别制作直方图，散点图和密度图。请看 3.4 章节的详细描述。
Statistics Table 数据统计表格	图下方的表格显示每张图的统计学信息。

3.2 收集样本数据

每个数据孔最多可以容纳 1,000,000 个数据，您可以随时向每个数据孔添加更多的数据（最多 1,000,000 个数据），即便数据孔内已经存在数据。当数据孔中已经存在数据时，RUN 按键会显示 ADD TO

注：BD Accuri C6 Plus 必须显示绿色提示灯，以及“C6 Plus 已连接并预备完成”的提示信息后，才可以进行数据的收集。

图 3-2 展示了一个新的工作窗口，显示了一张 FSC-A 和 SSC-A 线性坐标的密度图，FSC-A 的线性范围是 0 – 1,600,000，SSC-A 的线性范围是 0 – 800,000。

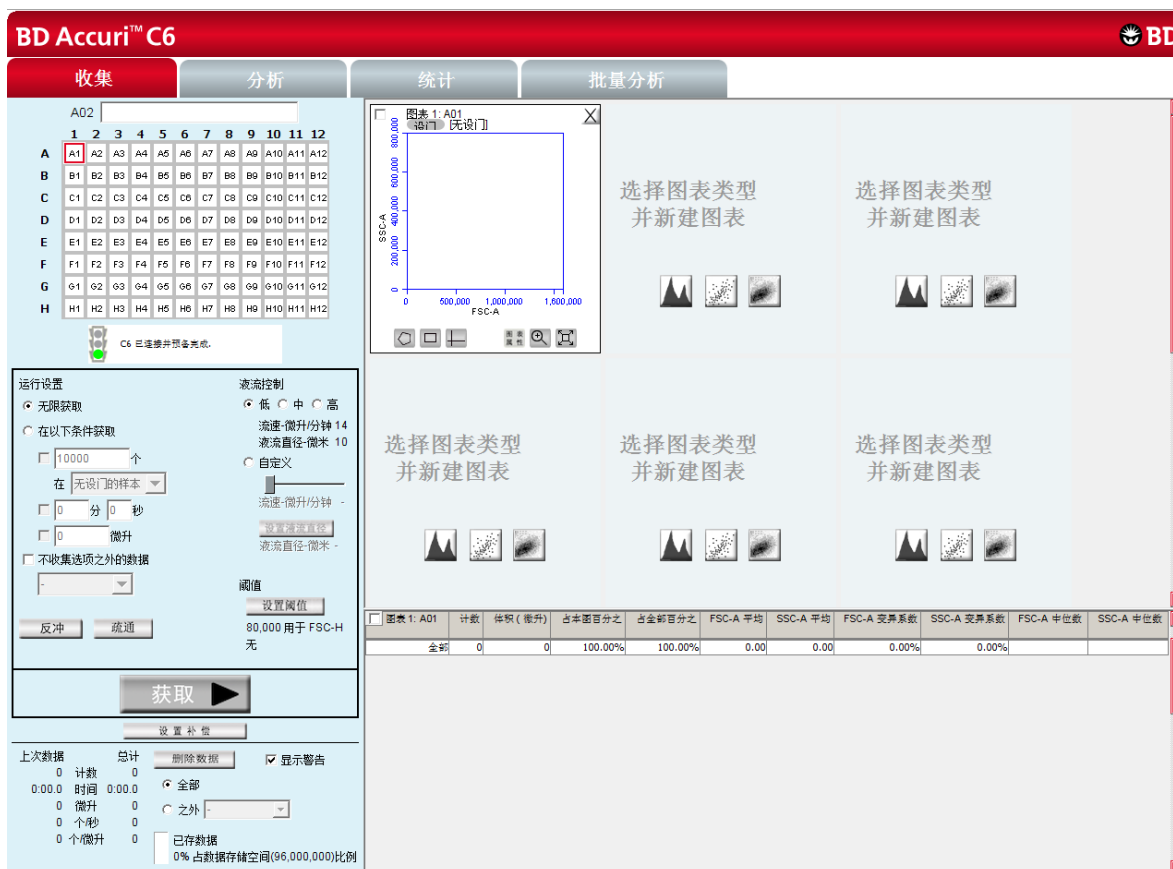


图 3-2 新 BD Accuri C6 Plus 工作窗口

这样收集样本数据：

- 在收集页面，做下列操作之一：
 - 选择板的类型，为板命名（可选）。
 - 打开一个模板。
- 画一张新的图。
- 确定获取条件。
- 如果需要，获取一些数据，画门，区域，以及进行其他设置。
- 在 收集 或者 分析 页面分析样本数据。

3.2.1 设定流速

系统最高可以每秒钟收集 10,000 个数据，但是推荐以每秒 2500 个或者更低的速度进行收集，以保证最佳数据分辨率。

这样设置流速：

1. 在收集面板的液流板块点击低速（Slow），中速（Medium）或者高速（Fast）按键。

注意：推荐以低速开始收集数据并观察收集的速度，如果需要，您可以再将速度调整为中速或者高速。如果以低速收集，仍然接近或者超过 10,000 个/秒的速度，按以下方法解决：

- 提高第一阈值，注意不要删掉目的细胞数据。
- 设置第二阈值，注意不要删掉目的细胞数据。
- 稀释样本。

3.2.2 设定阈值

设定阈值可以排除细胞样本中的碎片和本底噪音的影响，以保证样本数据的可靠性。当阈值设置合适的时候，样本颗粒或者细胞的散射光以及荧光信号的分辨率会显著提高，同时通常会减小数据大小。BD Accuri C6 软件的默认设置是第一阈值 FSC-H 设置为 80,000。

设置阈值的注意事项：

- 您可以在获取数据前/中/后随时改变阈值的设定，通常在最后的数据收集完成前完成阈值设置，这样可以保证数据的一致性和可预测性。第一阈值（Primary threshold）是控制数据收集的主要参数，您还可以选择设置第二阈值（Secondary threshold）来过滤掉更多的背景数据。

注意：如果在收集数据前或者收集数据过程中设定阈值，要特别小心，任何未达到阈值标准的数据都不会被获取或者保存。如果在收集数据之后进行阈值调整，当新设置的阈值会导致永久性数据损失时，BD Accuri C6 会显示警告信息。

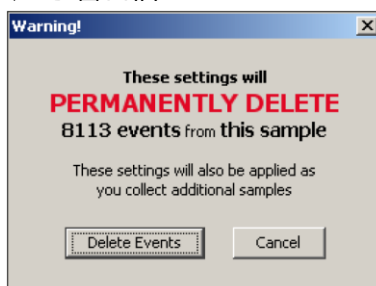


图 3-3 阈值设定警告信息

这样设置阈值：

1. 做下列操作之一：
 - 选择 *Instrument> Set threshold*。
 - 在仪器控制面板中点击 Set Threshold 按键。
2. 在设置阈值对话框的主阈值（Primary Threshold）下拉菜单中选择第一阈值参数。

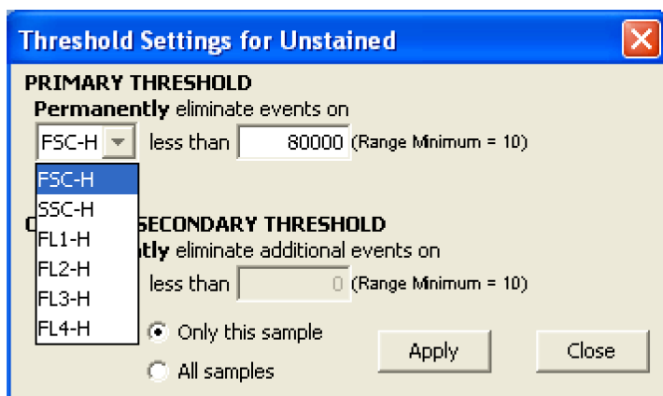


图 3-4 第一阈值下拉菜单

3. 在 less than 编辑框中输入 80,000，将最小阈值设定为 80,000。
注意：如果您研究的是较小的细胞（例如血小板或者细菌）或者较大的细胞（例如细胞系），您可能需要分别设置更低或者更高的 FSC-H 阈值。
4. 如果您想要设置第二阈值以过滤更多的数据，做下面操作：
 - 从第二阈值（Secondary Threshold）下拉菜单中选择阈值参数。
 - 在 less than 编辑框中输入数值作为阈值最小值。
5. 做下列操作之一：
 - 选择应用到所有样本（Apply to All Samples）按键，向所有样本应用此设置，包括以前在其他数据孔收集的数据。
 - 选择只应用到此样本（Apply to Only this sample）按键，只向当前样本应用此设置。

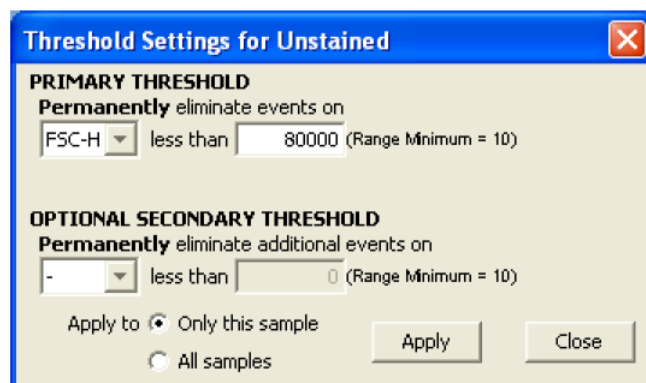


图 3-5 设定阈值对话框

6. 点击应用（Apply）按键应用设定的阈值。
7. 点击关闭（Close）关闭对话框。

3.2.3 运行设置

运行设置指示 BD Accuri C6 何时停止收集数据，您可以单独或者组合设置下列条件为运行停止标准：

- 时间
- 体积
- 数据量（在特定的门中）

如果同时选择多种运行停止标准，当满足第一个运行停止标准时，C6 就会停止运行。

The image shows a 'Run Limits' dialog box with the following controls:

- ☐ Run Unlimited
- ☒ 200000 events
- in Ungated Sample (dropdown menu)
- ☐ 0 Min 0 Sec
- ☐ 0.0 μ L
- Backflush button
- Unclog button

图 3-6 运行设置控制栏

在不设置运行限制条件下，这样收集样本：

1. 使收集面板运行设置（Run Limits）板块的选项都处于未激活状态。
2. 激活无限获取（Run Unlimited）选项。

这样在特定样本量数据被收集后停止运行：

1. 激活 Events 旁边的确认框。
2. 在旁边的文本框中，输入您想要停止运行的样本数据量。
3. 在文本框的下拉菜单中，做下列操作之一：
 - 选择未设门样本（Ungated Sample）。
 - 选择一种设门策略（如果有），当在设门区域内收集的数据量达到设定数值时，停止运行。

这样在获取特定时间后停止运行：

- 激活 **在以下条件获取** 确认框。
- 激活 **分** 和 **秒** 旁边的文本框。
- 在文本框中，输入您想要停止运行的时间。

这样在获取特定体积后停止运行：

- 激活 **在以下条件获取** 确认框。
- 激活 **微升** 旁边的文本框。
- 在文本框中，输入您想要停止运行的体积。

3.2.4 命名样本

您可以随时命名样本，如果您未给样本命名，BD Accuri C6 会按样本孔的位置来为样本命名（例：A01）。

这样命名样本：

在 96 孔板上面的文本框中输入样本名称。



图 3-7 样本命名区

3.2.5 获取样本

1. **温和的重悬样品管中的细胞**，将样品管放在上样针处。
2. 在 BD Accuri C6 Plus 的 **收集** 页面选择一个空的样本孔。
3. 点击运行（RUN）按键开始收集样本。

BD Accuri C6 Plus 开始启动液流，在此期间，BD Accuri C6 Plus 的提示灯会显示黄色，并出现提示信息：准备分析样本（Preparing to analyze sample）。当启动完成，提示灯会变绿，并出现提示信息：C6 Plus 正在收集数据（C6 is collecting data）。当正在收集数据时，当前的数据孔会闪烁蓝色。当达到停止标准时，数据孔停止闪烁，保持蓝色，表明此数据孔已经包含数据。

4. 如果需要，您可以随时通过点击加至（ADD TO）按键，在已经包含数据的数据孔收集更多的数据。

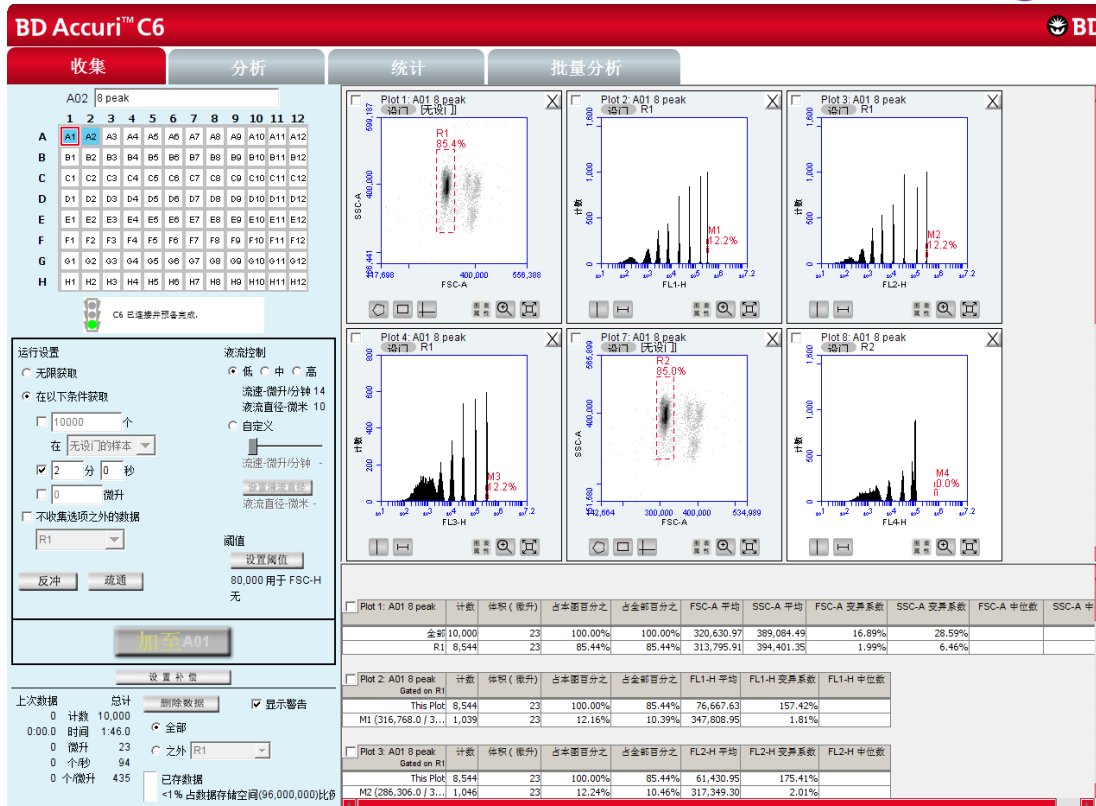


图 3-8 收集数据后的 BD Accuri C6 Plus 软件工作页面

3.2.6 向 BD Accuri C6 Plus 文件添加新样本数据

您可以向已包含样本数据的 BD Accuri C6 Plus 文件添加新的样本数据，也可以向新的数据孔添加新数据。

这样向 BD Accuri C6 Plus 文件添加数据：

温和的重悬新样本后，放置在上样针处。

注意：在收集不同样本时，您不需要做 Backflush 操作。

在 96 孔样本板中选中一个数据孔，如果您选择了一个空的数据孔，那么在收集之前样本时所画的图和门都依然会显示，但并不包含数据，如下图所示。

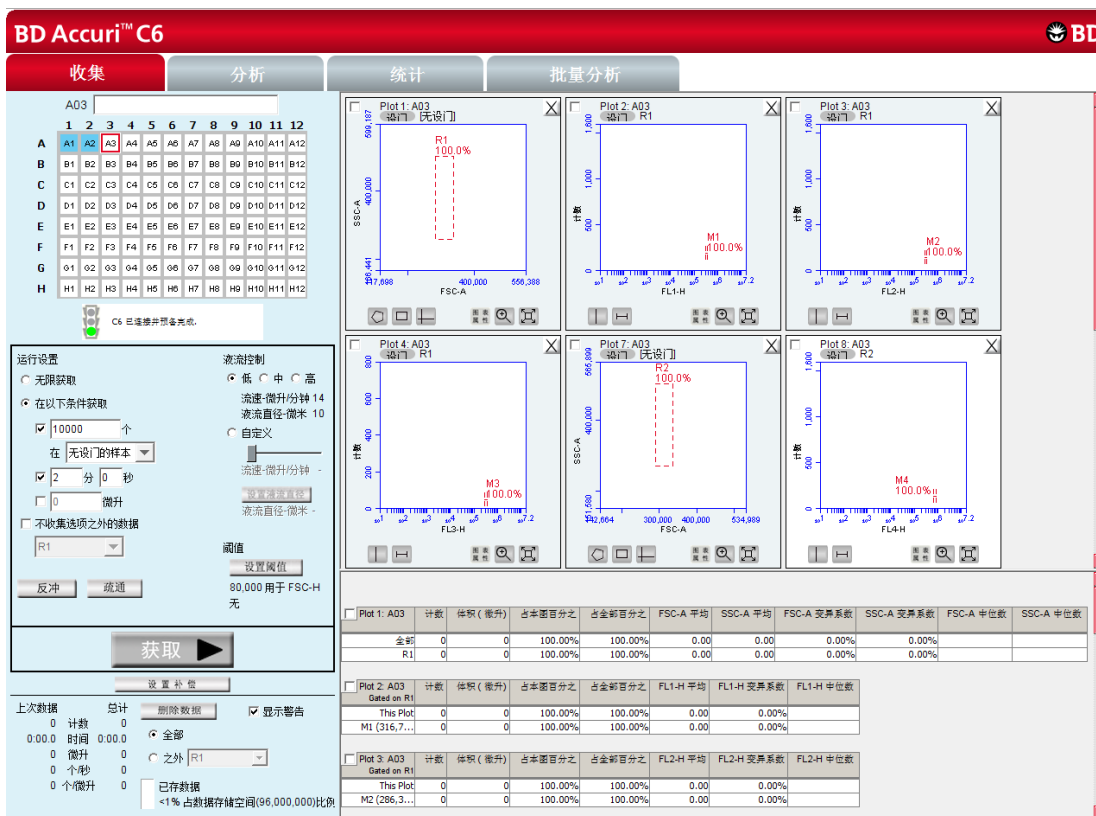


图 3-9 显示空样本孔和空数据图的 BD Accuri C6 Plus 工作平板

点击运行或者添加(RUN or ADD TO)按钮开始收集样本,在收集的过程中,BD Accuri C6 Plus 会实时显示并更新数据,当达到运行限制时,C6 Plus 会自动停止收集。

注意: 如果您点击添加 (ADD TO) 按钮,BD Accuri C6 Plus 会在已存在数据的孔中继续收集数据。

3.2.7 暂停收集数据

在收集数据过程中,您可以随时暂停收集。这样暂停收集:

点击暂停 (PAUSE) 按钮。

这样重新开始收集:

点击添加 (ADD TO) 按钮,BD Accuri C6 会向当前的数据孔继续添加数据。

3.3 终止数据收集

当结束收集样本后，按下列步骤冲洗上样针和液流管线：

1. 在上样针处放置一管 2 ml 过滤去离子水，选择任何空数据孔。
2. 设定运行时间 2 分钟，流速高速。
3. 点击运行按键。
4. 在上样针处放置一管稀释好的 2 ml 去污液（Decontamination Solution）
5. 选择一个空的数据孔。
6. 设置运行时间 2 分钟，流速高速（Fast）。
7. 点击运行按键。
8. 当运行结束后，从上样针处移去去污液管。
9. 在上样针处放置一管 2 ml 过滤去离子水，选择任何空数据孔。
10. 设定运行时间 2 分钟，流速高速。
11. 点击运行按键。
12. 当运行结束，将管子留在上样针处。

3.4 画图表

可以使用三种类型的图表来分析样本数据：直方图，散点图和密度图。

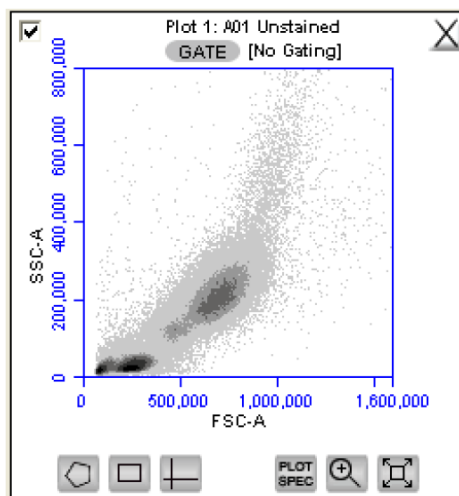










图 3-10 查看图表

每个制图栏包括一系列设门和标记工具，以及一系列查看工具。

- 设门和标记工具：
 - 设门按键 **GATE**：打开设门对话框，对图应用设置的门。

- 多边形门工具 ：用于画不规则形状的门，圈住目标群体。
- 矩形门工具 ：用于画矩形门，圈住目标群体。
- 十字象限工具 ：用于在图中设置象限。
- 竖直 Marker 工具 ：用于将直方图分为左右两个区间。
- 水平 Marker 工具 ：用于在直方图中设置水平区间的门。
- 查看工具：
 - Plot Spec 工具 ：打开设置 Plot Spec 对话框，可以改变 X 轴和 Y 轴的参数，缩放图大小，以及设定对数或者线性显示。
 - 放大工具 ：您可以在图中画矩形区域来放大此区域。
 - 扩展工具 ：扩展回复到放大前的状态。

这样生成新图表：

1. 在一个空的图栏中，点击下列任何一个按键：

- 密度图 
- 散点图 
- 直方图 

BD Accuri C6 默认显示的是横纵坐标分别为 FSC-A 和 SSC-A 的散点图，或者横坐标为 FSC-A 的直方图。

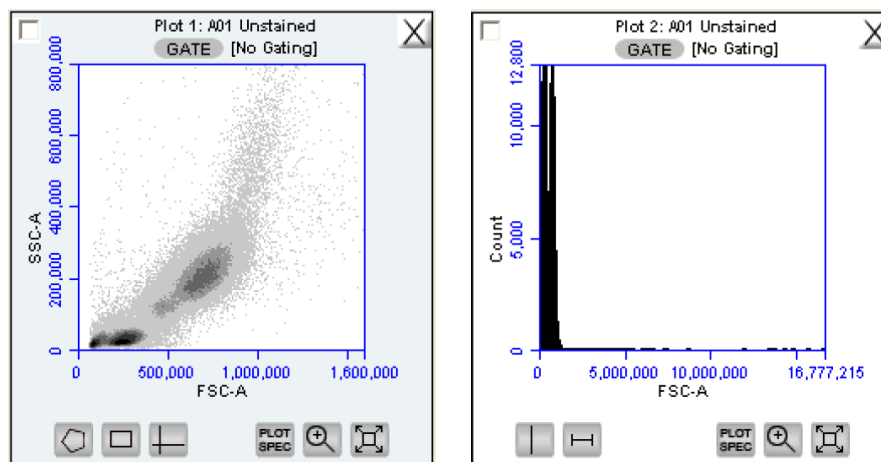


图 3-11 新密度图和直方图

2. 按照需要对图进行设置。

3.5 改变图表属性

利用 Plot Spec 工具可以改变数据在图中显示的方式。您可以改变坐标轴参数，规定坐标轴显示范围，以及对数显示（Log）和线性显示（Linear）方式间进行切换。在 Collect 面板和 Analyze 面板都有 Plot Spec 工具。您可以在收集数据前或者收集数据后随时设置图的规格。这样改变图表属性：

1. 点击 Plot Spec 工具按钮 。

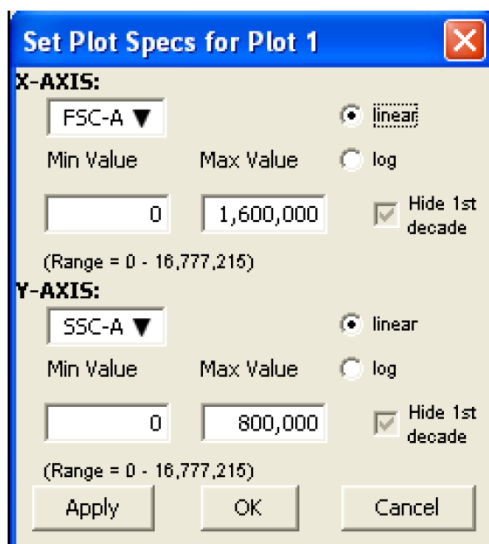


图 3-12 图表属性设置对话框。

2. 在图表属性设置对话框中，对图的每个坐标轴进行下列设置：
 - 在参数下拉菜单中，选择您想要显示的参数。
 - 选择线性（Linear）或者对数（Log）选项，确定数据显示的方式。
 - 输入各通道的最大和最小值，设定通道的显示范围。
 - 激活或者取消隐藏前 10 个数值（Hide 1st Decade）确认按键，指示 BD Accuri C6 是否在图中显示该通道的前 10 个数值。
3. 做下列操作之一：
 - 点击应用（Apply）按键，应用对设置所做的改变，这样操作无需关闭对话框。
 - 点击 OK 按键应用对设置所做的改变，然后关闭对话框。
 - 点击取消（Cancel）按键关闭对话框，不应用对设置所做的改变。

3.6 使用门(Gates)和标记 (Markers)




门 (Gate) 是指图上的特定区域，您可以通过设置门来分析门内的特定数据，BD Accuri C6 软件可以设置下列各种类型的门：

- 多边形门——设置不规则多边形圈住特定细胞群体。
- 矩形门——设置矩形门，圈住特定细胞群体。
- 十字象限门——在图中设置象限。
- 竖直 Marker——将直方图分成左右区间。
- 水平 Marker——在直方图中画出水平 marker。

3.6.1 设置新的门

这样在密度图或散点图中设置新的门：

1. 点击下列设门工具之一：

- 多边形门工具 ：通常应用于不规则形状的目标群体。
- 矩形门工具 ：通常用于矩形目标群体。
- 象限工具 ：通常用于荧光补偿操作。

2. 用鼠标画出一个区域（多边形门会标记为 P1，矩形门会标记为 R1，十字象限门会标记为 Q1）。如果想要画多边形，点击鼠标确定每个顶点，最后双击鼠标完成多边形。

注意：门的名字可以更改，双击门的名字，在编辑框中输入新的名字。

BD Accuri C6 会自动显示所设门内的细胞百分比。

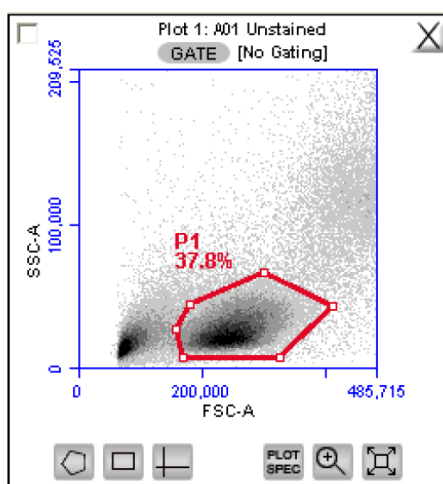


图 3-13 使用多边形门工具

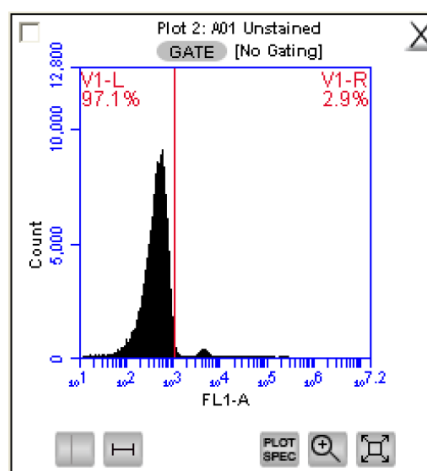



图 3-14 使用竖直 Marker

这样(图 3-13)在直方图中设置竖直 Marker:

1. 点击竖直 Marker 工具 .
2. 沿着 X 轴在您想要设置 Marker 的位置点击光标, BD Accuri C6 会自动显示 Marker 左边 (V1-L) 和右边 (V1-R) 的细胞百分比。

这样(图 3-14)在直方图中设置水平 Marker:

1. 点击水平 Marker 工具 .
2. 沿着您想要设置水平门的区域, 水平点击并拉拽光标。BD Accuri C6 会自动显示所设水平 Marke (标记为 M1) 以内的细胞百分比。

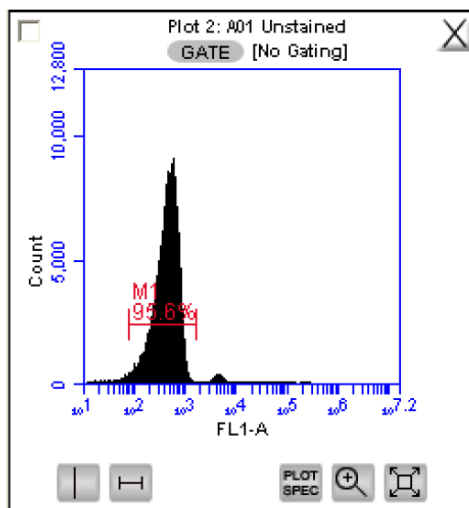


图 3-15 使用水平 Marker

3.6.2 对 Plot 应用所设的门

这样应用所设的门:

1. 点击您想要应用门的图顶部的 GATE 按键。
2. 只有多边形门 (P), 矩形门 (R) 和 Marker 门 (M) 会自动在设门对话框下拉菜单中自动显示, 如果您想要看竖直门或者十字象限门列表, 需要激活门对话框选中对应的确认框。

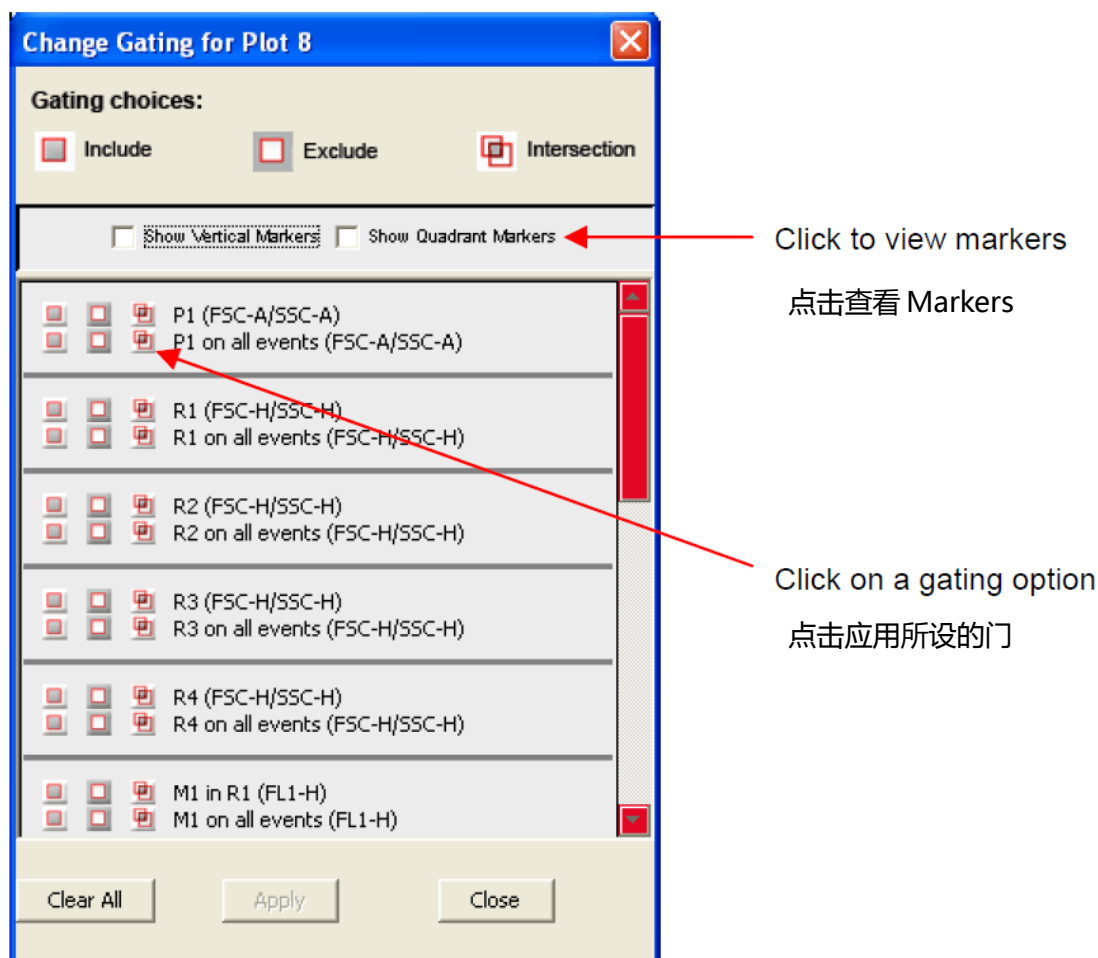


图 3-16 选择门

3. 选择下面一个您想要使用的门的按键。

- 包含按键 ☒ —用来分析此 region 内的数据，您可以点击 include 选项选择一个或者更多的门，以分析这个门或者其他门内的数据。
- 排除按键 ☐ —用来分析此 region 外的数据。
- 交叉按键 ☐ —用来分析两个或者更多 region 交叠区域内的数据。

3. 点击 Apply 按键，BD Accuri C6 会在每张 plot 的 GATE 按键旁显示所应用的门的类型。

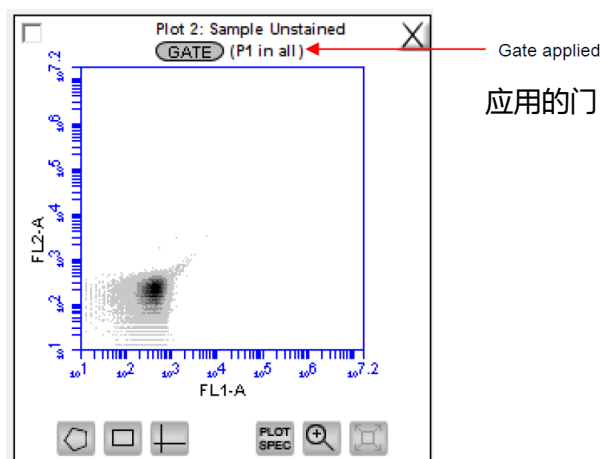


图 3-17 设置包含 P1 门的图

3.6.3 设置并应用嵌套门 (Nested Gates)

您可以设置一系列嵌套门，在嵌套门中每个门都是前一个门的子集，这使您能够微调自己的设门策略，以便更好的查看和分析特定子集中的数据。

这样设置嵌套门：

1. 环绕目的细胞，画一个 region 或者 marker (例如 P1)。

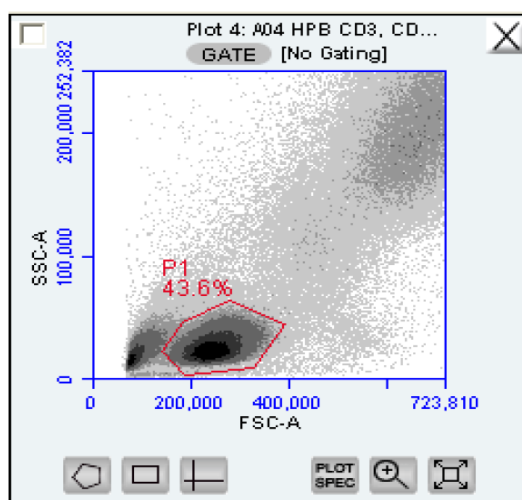


图 3-18 设置嵌套门中的第一个门，在 Plot4 中画。

2. 在新的 plot 中点击 GATE 按键应用所设的 P1 门，这是母门 (Parent Gate)。

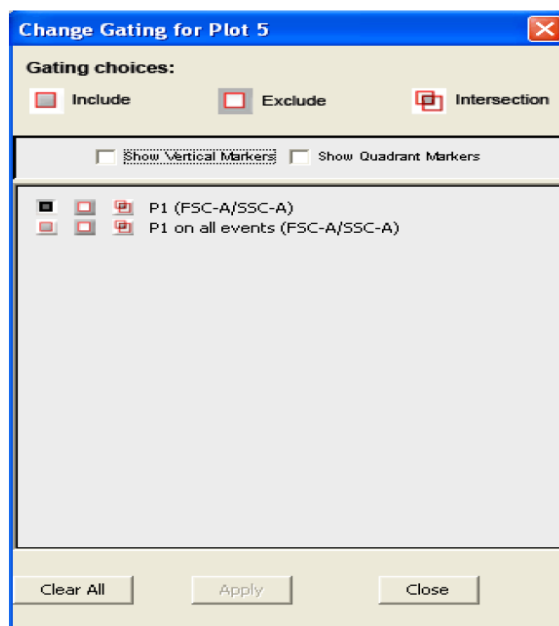


图 3-19 对 Plot5 应用母门

3. 关闭对话框，plot 将只显示母门内的数据。

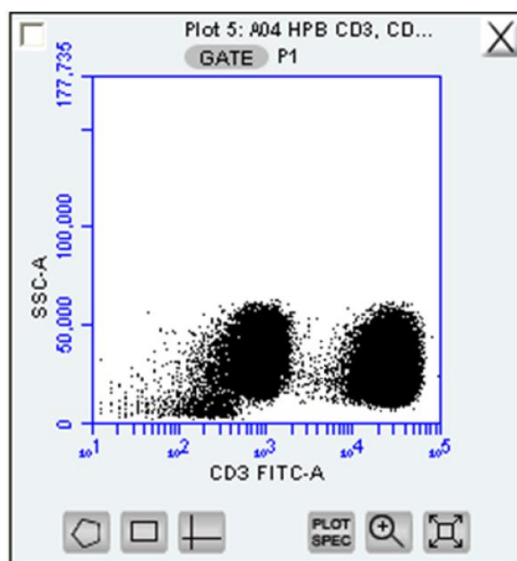


图 3-20 对散点图应用母门

4. 在已 Gate 到 parent gate 的图中（在此例中是 Plot5），环绕图中显示细胞群体子集，画第二个 region 或者 marker（R1）。

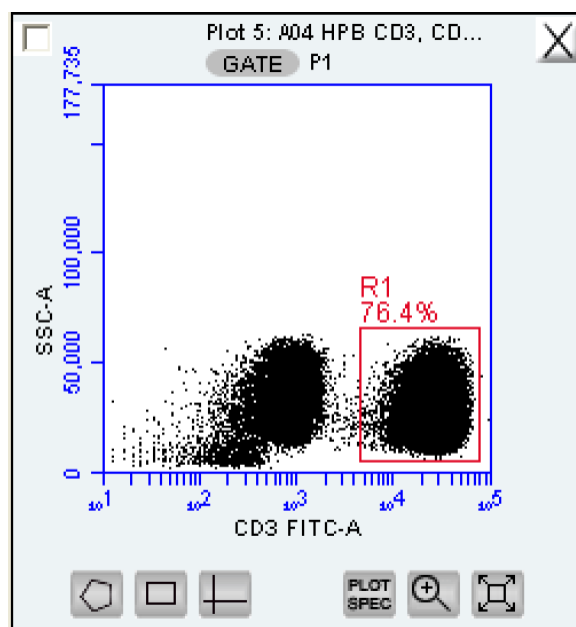


图 3-21 设置嵌套门中的第二个门

5. 打开第三张 plot，点击 GATE 按键。

6. 在改变设门对话框中，选择第二个门“嵌套”在母门（parent gate）中的那个选项（例如 R1 in P1, 如图 3-22 所示）。或者可以选择 on all events 这个选项（例如 R1 on all events），

不嵌套门。

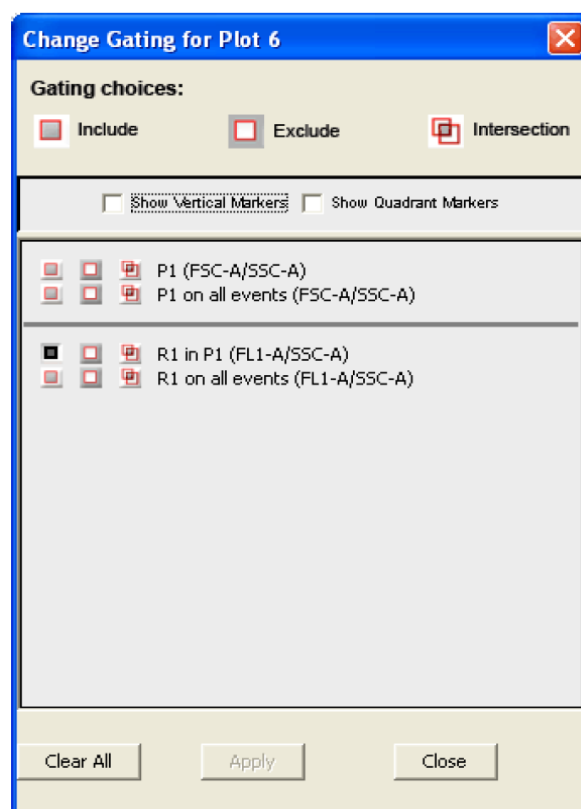


图 3-22 应用子门

7. 应用门，这是子门。

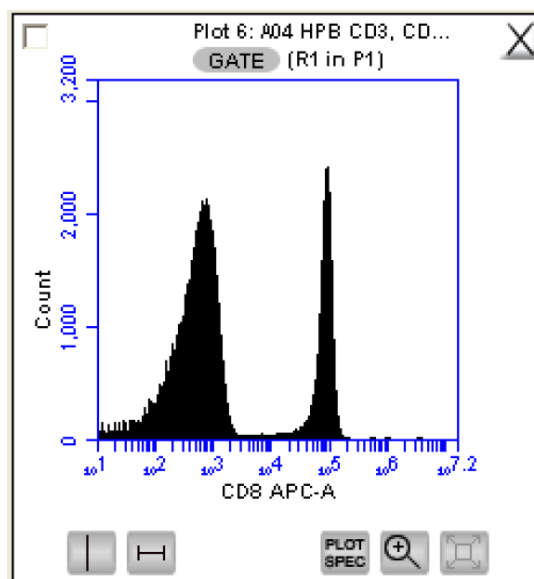


图 3-23 包含所应用嵌套门的第三张 plot (R1 in P1)。

8. 在统计学表格中查看统计数据。

Plot 6: A04 HPB CD3, CD4, CD45, CD8 Gated on (R1 in P1)	Count	Volume (µL)	% of This Plot	% of All	Mean CD8 APC-A	CV CD8 APC-A	Median CD8 APC-A
This Plot	76,415	0.0	100.00%	33.32%	18,572.85	211.93%	526.0

图 3-24 包含嵌套门的 plot 的统计数据。

9. 关闭对话框。

3.7 改变图中显示数据的数目

您可以改变所有样品的所有 plots 中所收集数据显示的数目，以更清楚的查看数据。这个选项使您可以在不删除数据的情况下，移去一部分图中所显示的数据。

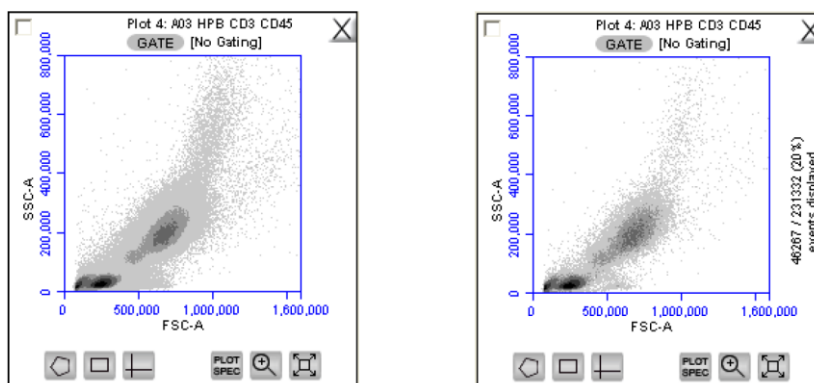


图 3-25 改变显示数据的数目之前和之后。

这样改变 plot 中显示的数据的数目：

1. 选择 Display > Events Display Settings.
2. 在数据显示设定对话框 (Events Display Settings) 做下列操作之一：
 - 要查看所有收集的数据，选择 Show all events 选项。
 - 要查看样本所收集的最初 N 个数据，选择 Display first 选项。
 - 要查看特定百分比的数据，选择 Display 选项，并输入想要显示的百分比（例如，如果选择 20%，那么会显示 1/5 的数据）。

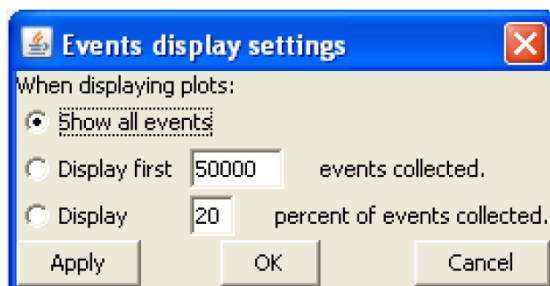


图 3-26 数据显示设定对话框

3. 做下列操作之一：

- 点击 Apply 按键，在不关闭对话框的情况下应用所做的设定。
- 点击 OK 按键应用所做的设定，然后关闭对话框。
- 点击 Cance 按键关闭对话框，不应用设定。

BD Accuri C6 会在 plot 中显示信息：有一些数据没有被显示。

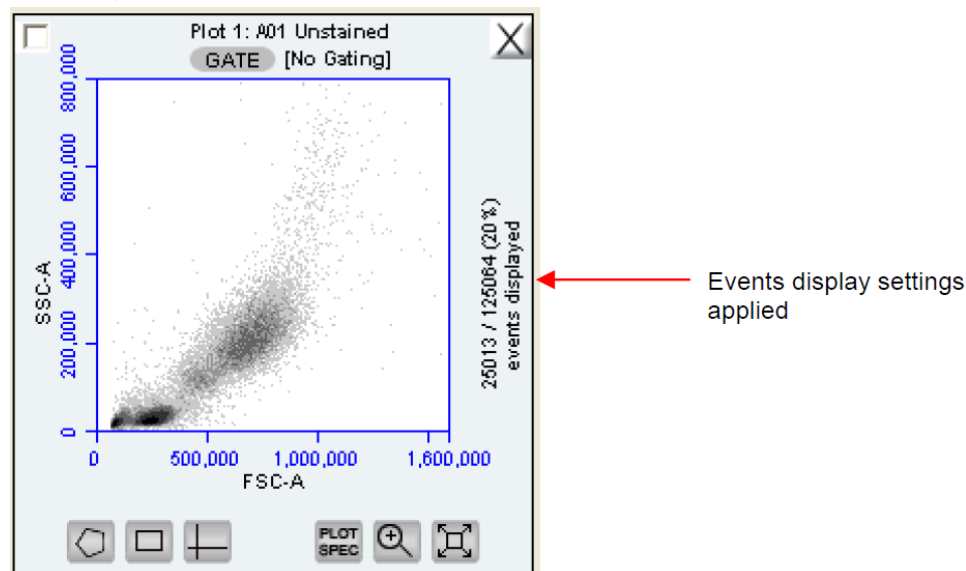


图 3-27 应用了数据显示设定的 plot

3.8 命名 Plot 坐标轴

您可在 Collect 或者 Analyze 面板重命名 plot 坐标轴，来标记对样品所应用的抗体或者荧光素。

1. 点击一个坐标轴的标记，在弹出的菜单中选择 Rename Parameters。

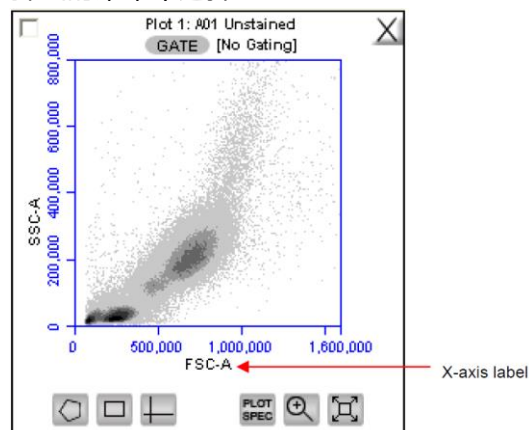


图 3-28 点击坐标轴标记

2. 在重命名参数对话框中，在您想重新命名的参数编辑框输入新的标记。

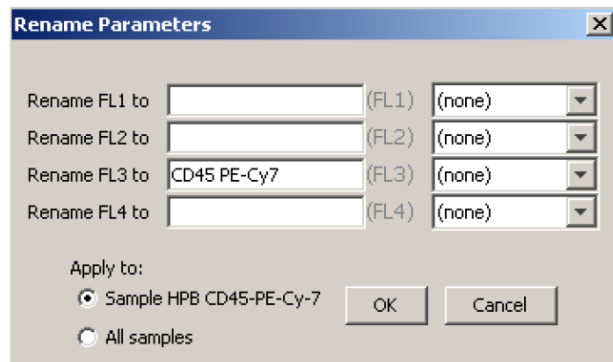


图 3-29 重命名参数对话框

3. 做下列操作之一：

- 选择 Sample XXX 选项（XXX 指当前样本），只将标记应用到当前样本，点击确定。
- 选择 All Samples 选项，将标记应用到所有样本，点击确定。

在另一个样本中命名同样的参数：

1. 在 96 孔样品板中选择另一个样本。
2. 点击 plot 中的坐标轴标记，从弹出的菜单中选择 Rename Parameters 选项。
3. 从与参数关联的下拉菜单中选择参数名称。

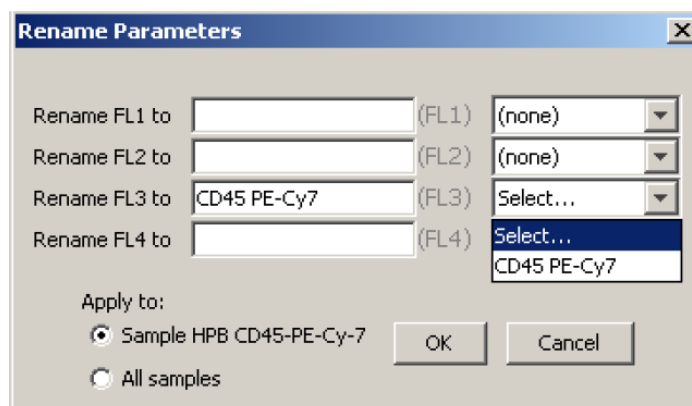


图 3-30 带坐标轴标记下拉菜单的重命名对话框

3.9 对 plot 进行缩放

BD Accuri C6 自动以 $10 - 16.7 \times 10^6$ 对数范围显示最初的任何参数。对大多数分析来说，非常少的事件会落在 0-10 道之间，使用自动缩放功能可以节省时间。然而，当设定 marker (M)，

regions(R),或者 polygons(P)时需要注意,因为此时需要在缩放图上看到 10 以下的数据。推荐不要隐藏最初 10 个道的数据(看 3.5 章节),以防止在设定的门中漏掉数据的可能,特别是在设定荧光补偿时(看 3.12 章节)。

3.9.1 基本缩放

这样对一个群体进行缩放：

1. 点击缩放工具 。
2. 在图中点击并拉拽鼠标，画出一个区域进行放大(图 3-31)。

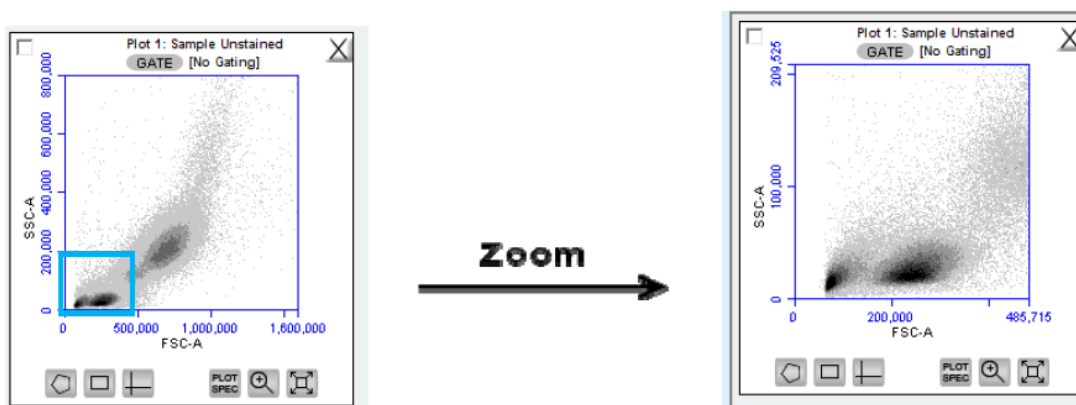


图 3-31. 使用缩放工具前后。

3. 按照需要重复步骤 1-2，进行更精细的缩放。

这样缩小：

1. 点击 Expand 工具 。
2. 按照需要重复步骤 1。

3.9.2 对特定的通道区间进行缩放

有时在一个特定的通道区间内查看 Plot 会很有帮助。

这样看一张 Plot 的特定通道区间：

1. 在您想要进行缩放的 Plot 中，点击 Spec 工具 。

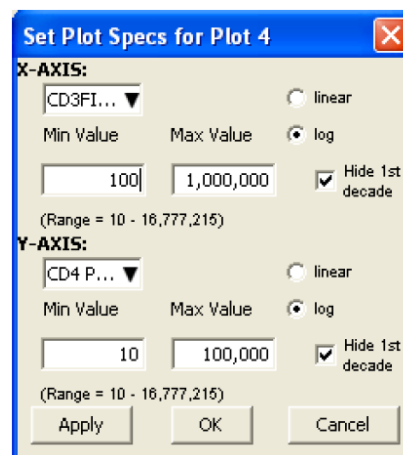


图 3-32. Plot Spec 对话框 为 X 轴和 Y 轴设定最大和最小通道值。

2. 在设定 plot spec 对话框中, 通过在 X-轴输入最小 (Min Value) 和最大值 (Max Value), 确定 X 轴通道区间。
3. 通过在 Y-轴输入最小 (Min Value) 和最大值 (Max Value), 确定 Y 轴通道区间。
4. 点击 Apply 按键应用改动, 点击 OK 按键关闭 Plot Spec 对话框。

3.10 保存 BD Accuri C6 Plus 文件

BD Accuri C6 Plus 文件是包含仪器条件设置、FCS 文件和图形设置的复杂文件 (通常很大)。

BD Accuri C6 Plus 文件包含整个 BD Accuri C6 工作页面, 包括下列元素 :

- 样本数据。
- Plot 图形设置。
- 门。
- 颜色补偿。
- 阈值设定。
- Collect 面板设置。
- 在 Analysis 和 Statistics 面板做的改动。

根据默认设置, BD Accuri C6 Plus 会在每个样品运行完毕后自动保存 BD Accuri C6 Plus 数据。您也可以随时手动保存数据。如果要保存整个 BD Accuri C6 Plus 文件, 就手动保存文件 (看 3.10.2 章)。

当保存了 BD Accuri C6 Plus 文件, BD Accuri C6 Plus 会在 workspace 的左边角落显示文件名称。



图 3-33. 带文件名称的标题栏。

3.10.1 自动保存文件

根据默认设置, 当 C6 达到运行限制或者您点击 Pause 按键时, BD Accuri C6 会随时自动保存收集事件的数据。自动保存不会保存获取条件设定, plots 或者设门策略。

注意: 如果您在运行结束或者暂停运行之后进行改动, BD Accuri C6 不会自动保存文件, 您可

以手动保存这些改动（看 3.10.2 章节）。

这样激活或者取消自动保存：

1. 选择 File>Auto-save Settings.
2. 在自动保存对话框中作下列操作之一：
 - 选择 Auto-save Enabled 按键激活自动保存功能。
 - 选择 Auto-save Disabled 按键取消自动保存功能。

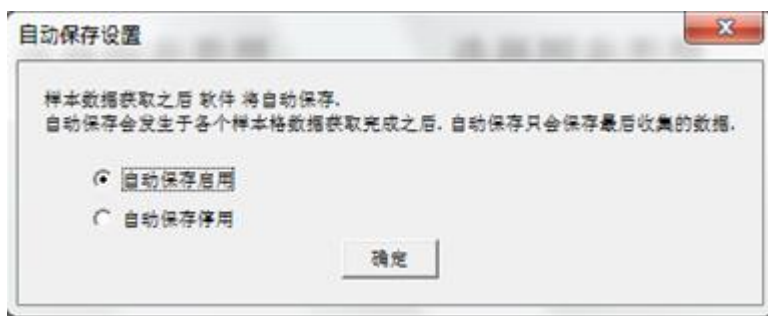


图 3-34. 自动保存设定对话框。

3. 点击 OK 按键接受改动，关闭对话框。
4. 如果被提醒在关闭之前保存 workspace，做以下操作之一：
 - 点击 Yes 按键保存整个 workspace。
 - 点击 No 按键，不保存 workspace 退出对话框。

3.10.2 手动保存文件

您可以随时手动保存 BD Accuri C6 Plus 文件。

这样手动保存 BD Accuri C6 Plus 文件：

1. 选择 File>Save。

这样以新名称保存 BD Accuri C6 文件：

1. 选择 File>Save BD Accuri C6 File As。

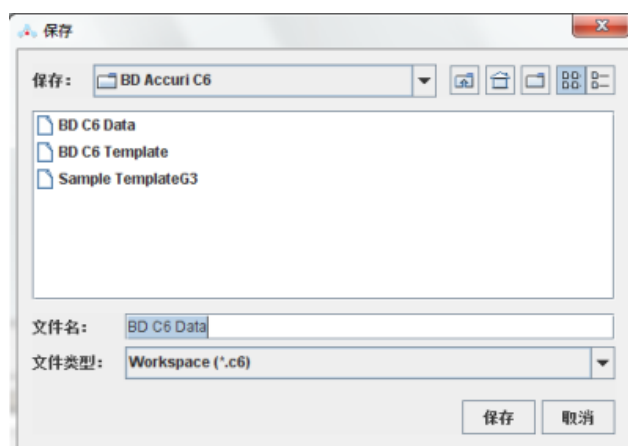


图 3-35 保存 BD Accuri C6 Plus 文件

2. 如果需要，选择保存文件的位置。
3. 在保存对话框，输入文件名称，然后点击 Save 按键，文件会以.c6 为后缀保存。

3.11 创建 BD Accuri C6 模板

BD Accuri C6 模板包含预先定义好的 BD Accuri C6 workspace，以便快速简单的进行设定和分析。所有的 Marker，门，参数名称以及样本名称都会被保存下来。

这样创建模板：

1. 在一个空的 workspace 中，定义 plot，门和获取条件设定，或者使用 current.c6 文件。
2. 选择 File>Save BD Accuri C6 template as。

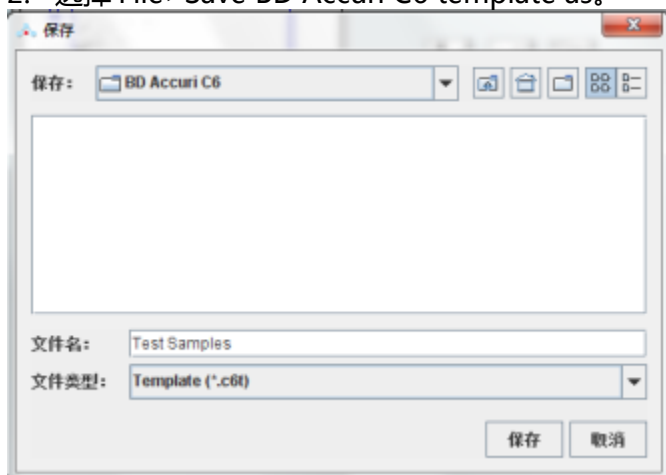


图 3-36. 保存 BD Accuri C6 模板。

3. 如果需要，选择保存文件的位置。
4. 在保存对话框，输入文件名称并点击保存按键，BD Accuri C6 会以.c6t 为后缀保存文件。

注意：获取设置条件基于当前选择样本进行保存。

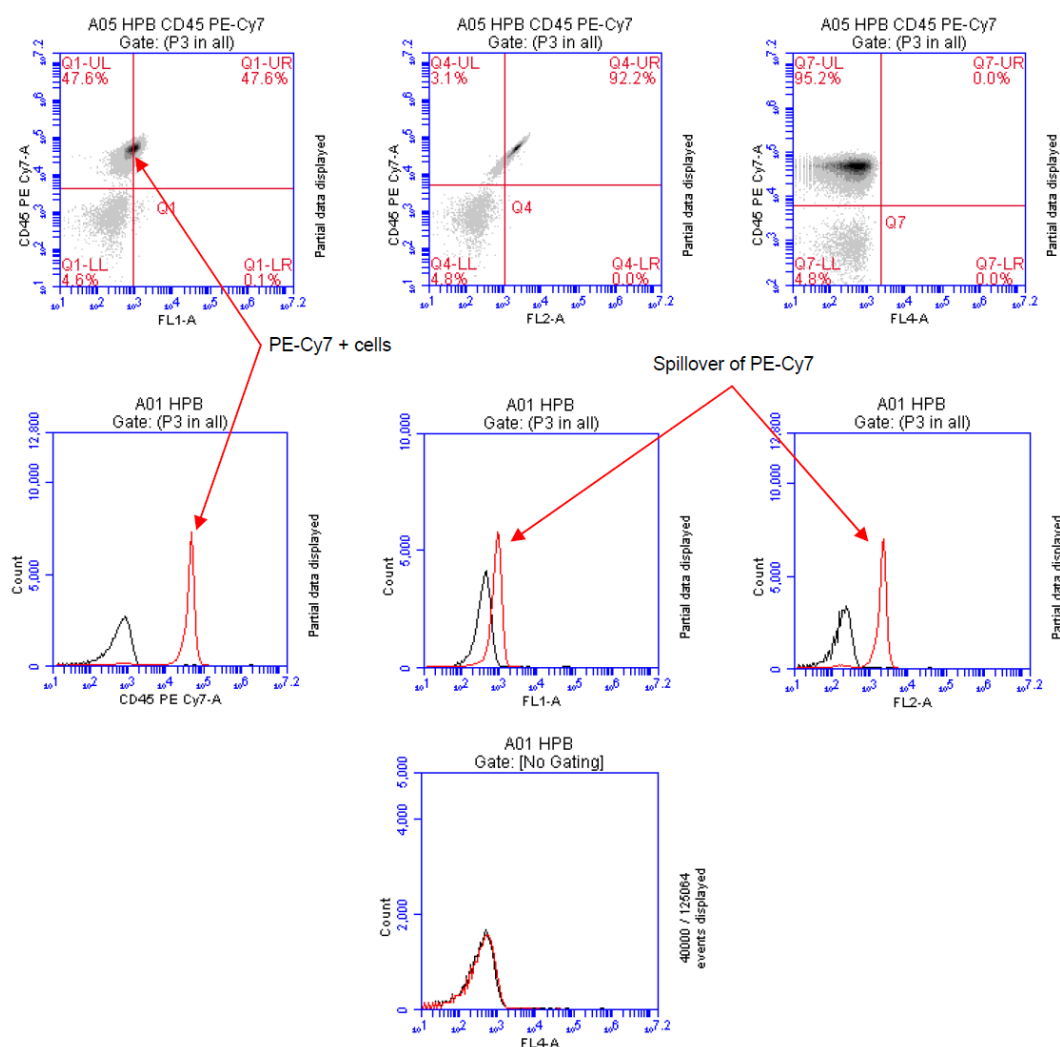
3.12 了解荧光溢出

荧光素通常以广谱波长发射荧光，结果导致发出的荧光信号不仅被流式细胞仪某个预期的主接收器接收，也会被其他接收器接收。这种现象通常就被称为荧光“溢出”，当在分析多色流式数据时，这可能会导致混淆。

3.12.1 识别荧光溢出

每当进行多色实验时，准备一系列只用单种荧光染料进行染色的对照样本，这些单染对照使您能够确定每种荧光素荧光溢出的程度。下面这个图例展示了 PE-Cy7 单染对照收集的数据，大多数来自 PE-Cy7 阳性细胞的荧光信号，如所预期的，会被 FL3 通道 (670LP) 接收器检测到。

然后, 也有 PE-Cy7 荧光信号被 FL1 (530BP) 和 FL2 (585BP) 接收器检测到, 所以从图上来看, 这些检测器似乎也有来自阳性荧光细胞的信号。在 FL4 接收器则没有来自 PE-Cy7 的信号。



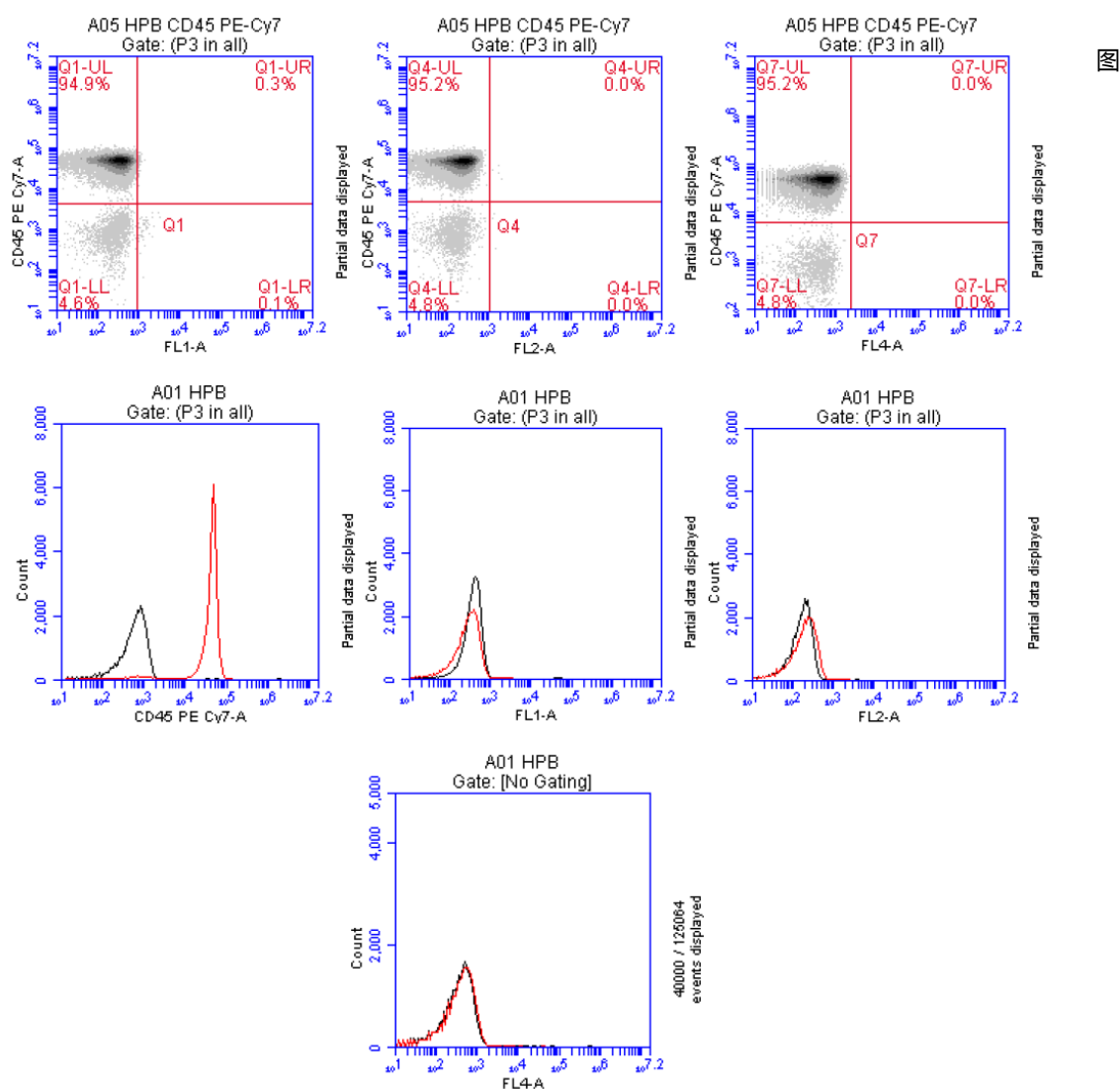
3-37. 在不同 plots 中的荧光溢出。

3.12.2 校正荧光溢出

您可以通过在收集数据时应用数学算法来从 plots 中除去荧光溢出, 这个步骤通常被称为荧光补偿 (或者荧光减除)。因为 C6 收集的数据是数字化的, 您可以在数据收集前、收集中或者收集后应用或者去除荧光补偿。荧光补偿算法会从每个事件减去用户定义的荧光信号百分比, 因此向荧光区间较低的通道重新分配数据, 以去除明显的荧光溢出。当对数据正确的应用荧光补偿时, 每个单染对照样本在其非主要检测器的荧光通道值的中位数, 应该与未染色对照样本一


致。

下列图展示了正确应用荧光补偿之后的数据。



3-38. 校正荧光溢出。

这样校正荧光溢出：

1. 点击十字象限工具，然后点击 Plot。

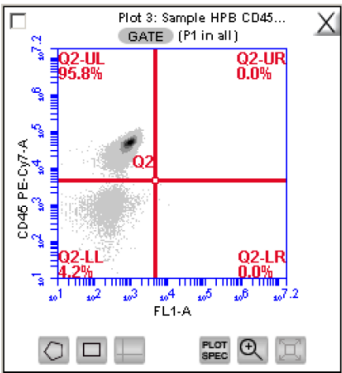


图 3-39. 应用十字象限工具。

2. 调整十字象限 Marker 的位置，使所有阳性群体很好的分布在各个象限内。

BD Accuri C6 在统计表格中显示每个象限内事件的荧光通道值的中值(看下面的展示)。(确认在 显示 下拉菜单中的 显示统计中位数 被选上了)。

<input type="checkbox"/> Plot 3: Sample A2 Gated on (P1 in all)	Count		Median FL1-A	Median CD45 PE-Cy7-A
This Plot	101,660	%	NA	NA
Q1-UL	96,737	%	841.0	45,399.0
Q1-UR	0	%	0.0	0.0
Q1-LL	4,921	%	240.0	771.0
Q1-LR	2	%	10,200.0	1,322.0

图 3-40. 显示中值的统计表格。

3. 比较被影响的通道的中值，如果 UL 或者 LR 象限的中值与阴性群体（LL）的中值不一致，您需要进行荧光补偿。
4. 在 Collect 或者 Analyze 面板中点击 Set Color Compensation 按键打开 Compensation Settings 对话框，对话框包含 4 行 FL 按键，每个荧光通道一行。

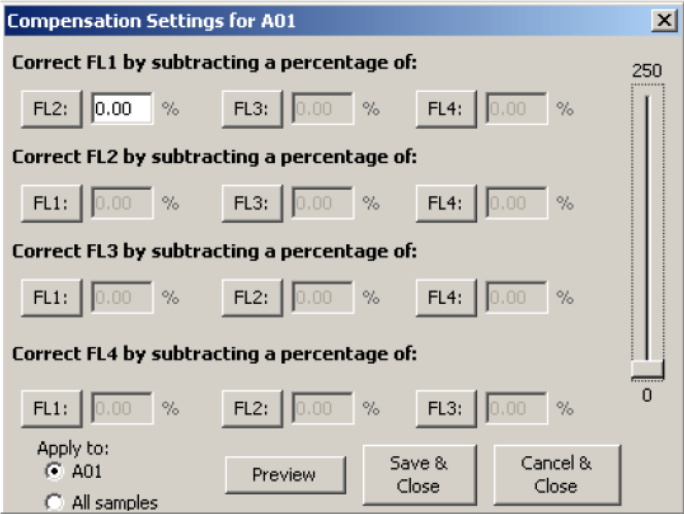


图 3-41. 设定补偿对话框

5. 在需要进行校正的荧光通道行，点击荧光溢出的荧光通道的 FL 按键。
6. 做下列操作之一：
 - 在 FL 按键旁边的文本框中，输入您想要减去的荧光信号的百分比。
 - 使用 Accuri 提供的 C Comp Calculator Excel 表格（在 BD Accuri C6 安装光盘 CD 或 U 盘中）来计算减去的值

Table 3-2. Fluorochrome Spillover per Channel

		Spillover Fluorochrome					
		FITC	PE	PerCP	PerCPCy5.5	PE-Cy7	APC
Channel to Correct	FL1 (530BP)	N/A	3.5	0.00	0.0	1.00	N/A
	FL2 (585 BP)	7.0	N/A	0.00	0.00	3.50	0.0
	FL3 (670 LP)	1.0	14.5	N/A	N/A	N/A	1.2
	FL4 (675 BP)	0.0	0.0	3.00	12.00	0.00	N/A

7. 点击 Preview 按键更新统计表格。
8. 在统计表格中，注意您想要校正的 FL 通道的中值栏（Median）。
9. 重复步骤 5-8，直到 UL 或者 LR 象限的中值与阴性群体（LL）的中值一致（或接近），这个数值被称为补偿值，下图以蓝色高亮显示了中值。

me (μL)	% of This Plot	% of All	Mean FL1-A	Mean CD45 PE-Cy7-A	CV FL1-A	CV CD45 PE-Cy7-A	Median FL1-A	Median CD45 PE-Cy7-A
0.0	100.0%	44.2%	253.9	42,578.8	72.6%	35.8%	NA	NA
0.0	95.2%	42.0%	252.9	44,700.5	70.2%	27.6%	238.0	45,399.0
0.0	0.0%	0.0%	0.0	0.0	0.0%	0.0%	0.0	0.0
0.0	4.8%	2.1%	269.9	887.2	87.6%	71.3%	231.0	771.0
0.0	0.0%	0.0%	7,973.0	1,145.5	27.8%	15.4%	10,187.0	1,322.0

Compare medians

图 3-42. 减除荧光溢出的结果

10. 如果您想对所有样本应用补偿，在补偿设定对话框中选择 Apply to All samples 选项。

11. 点击 Save & Close 按键应用荧光补偿设定。

3.12.3 荧光补偿疑难解答

偶尔的，plot 可能会在象限中显示比 BD Accuri C6 报告小的事件百分率，例如图 3-43 似乎在右下象限中有少于 26.1%的群体，这种情况的发生是由于隐藏了一个包含数据的 decade 区间。在下图中，一部分事件由于过度补偿而被转到了 1 通道，如果最初的 decade 被隐藏的话，这些数据在图上是无法显示的，但是它们也被包含在了统计数据的计算中。

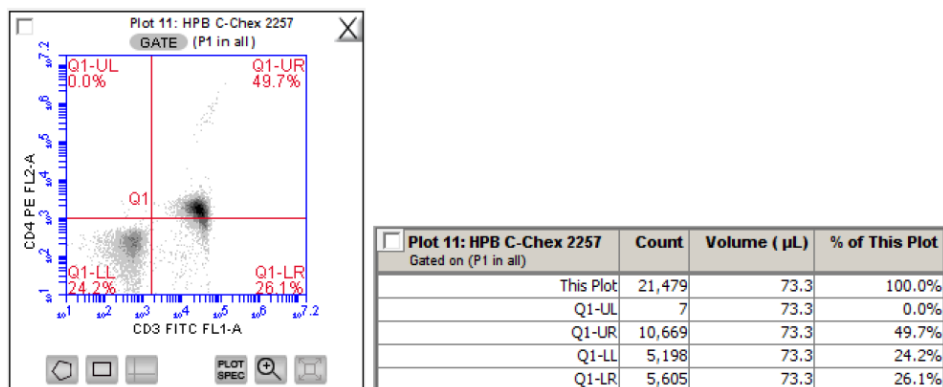



图 3-43. 过度补偿的 plot。

这样校准补偿：

1. 点击 Plot Spec 工具 .
2. 在 Set Plot Specs 对话框中，为 X 轴和 Y 轴取消 Hide 1st decade 确认框。

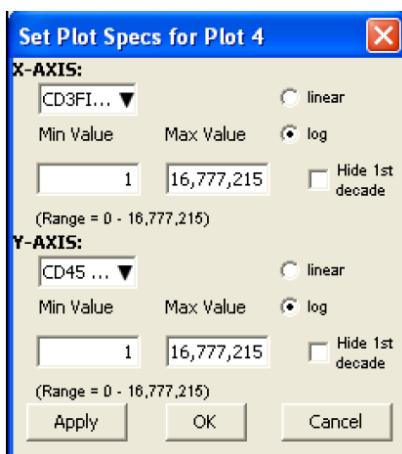
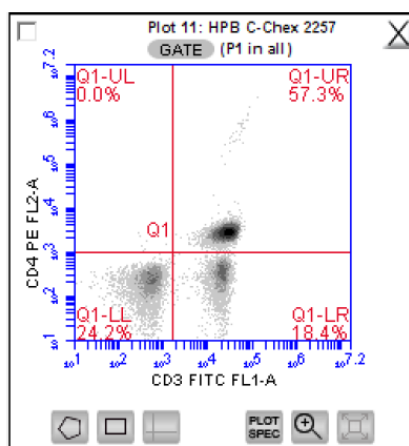


图 3-44. 在 Set Plot Specs 对话框中取消 Hide 1st decade 选项

3. 点击 OK 按键应用设置并关闭对话框。
4. 进行 3.12.2 章节中描述的荧光补偿设置，在 Q1-LR 中显示的事件数目与统计数据一致为 18.4%，如图 3-45 的 plots 以及统计表格所示。



Plot 11: HPB C-Chex 2257	Count	Volume (μL)	% of This Plot
Gated on (P1 in all)			
This Plot	21,479	73.3	100.0%
Q1-UL	8	73.3	0.0%
Q1-UR	12,315	73.3	57.3%
Q1-LL	5,197	73.3	24.2%
Q1-LR	3,959	73.3	18.4%

图 3-45. 在第一个 decade 去隐藏后的正确补偿数值

3.13 改变参数

根据默认设置，BD Accuri C6 显示面积参数（以后缀-A 表示），但是您也可以选择高度（H），宽度（W）或者时间参数。

这样改变参数：

1. 点击 x-或者 y-轴标签，从弹出的菜单中选择您想要选择的参数。

注意：当您点击 Run 按键式，时间参数开始计数，持续计数 19 天（1 秒的 16,000,000 倍），即便您后来又向样本中加数据。即便通过删除数据，您也无法将参数重置为零。

3.14 复制和粘贴 Plots

这样从 收集 或者 分析 页面复制并向 Microsoft Office 应用软件中粘贴图表：

- 点击图表的任意位置并将它拖放到打开的 Microsoft 应用软件中。
- **注意** 无法使用 Ctrl+C 和 Ctrl+V 来从 BD Accuri C6 软件向其他软件中复制粘贴图表。

如果安装了增强分析激活钥匙，在拖放操作中还可以选择下面格式的图表。

这样选择文件格式：

- 选择 文件 > 设置图表拖放模式
- 在对话框中，从下列格式中选择一个：

如果分辨率已经足够，选择.png 格式。拖放图表到 Excel 文件中要选择.png 格式。

如果需要更适合发表或者海报的更高分辨率的图，选择.eps 格式



图 3-46. 设置图表拖放模式对话框

注意：图表拖放模式的选择是 BD Accuri C6 软件特有的，当创建新的 BD Accuri C6 文件时，总会恢复到默认的.png 设置。如果当前的 BD Accuri C6 文件以.eps 模式拖放图表没有保存的话，也会恢复到默认的.png 设置。

点击 **确定** 按钮保存设置，回到 BD Accuri C6 软件工作页面。

3.15 打印数据

您可以在 Collect 或者 Analyze 面板打印选择的 plots 和相关统计数据。

这样打印 plot 数据：

在您想要打印的 plot 的左上角激活确认框。

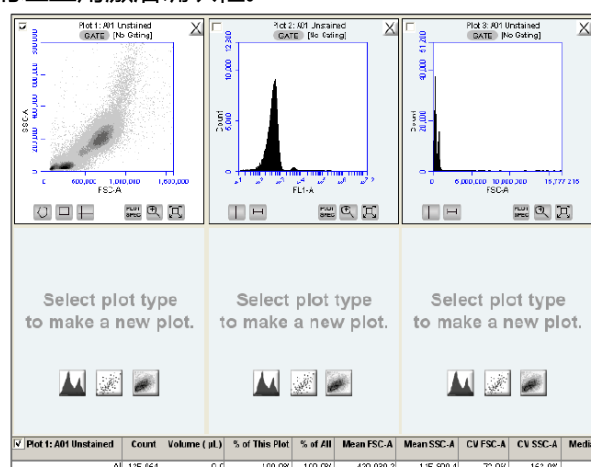


图 3-47. 选择 plots 打印

相关的统计数据会自动被选择打印，如果您不想打印统计数据，可以取消。

- 选择 文件 > 列印选中项目。

注意：直接从 BD Accuri C6 软件打印图表，分辨率会低，即便在设置图表拖放模式对话框中选择了.eps 选项。

3.16 导出或者导入文件

您可以随时从 Collect 或者 Analyze 面板，以 FCS 3.0 格式文件导出各个样本孔的数据。

这样导出数据：

1. 做下列操作之一：

- 选择 File>Export FCS File，以 FCS 3.0 格式导出并保存当前选择的样本孔的数据。
- 选择 File>Export ALL Samples as FCS以 FCS 3.0 格式导出并保存所有样本孔的数据。
- 选择 File>Export ALL Samples to Third Party 以 FCS3.0 格式导出并保存所有样本孔的数据，并且能够被第三方软件分析（如 FlowJo）。
- 选择 File>Export Plot Data as CSV 以.csv 格式保存一个文件。

2. 如果被提示导出，点击 OK 按键。

这样向 BD Accuri C6 导入 FCS 数据文件：

1. 在一个 BD Accuri C6 文件或者模版中，选择一个空的数据孔。
2. 选择 File>Import FCS file。
3. 找到文件的位置。

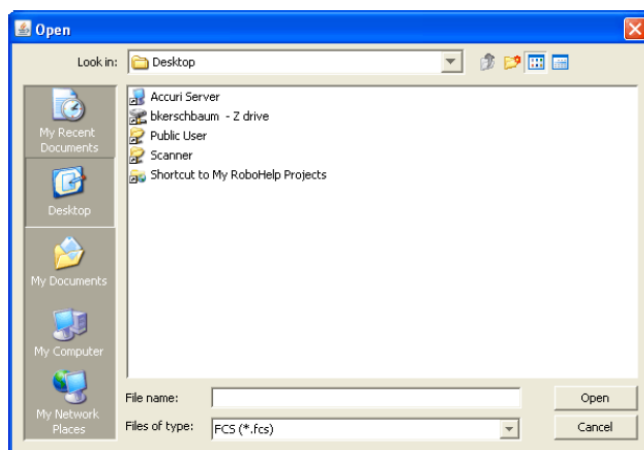


图 3-48. 打开一个 FCS 文件。

4. 选择文件并点击 Open 按键。
5. 按住 Shift 并选中多个 FCS 文件，可以从一个文件夹一次导入一组数据。文件会被导入选择的样本孔，并沿水平方向从左向右依次排列，当前行满了之后继续排列到下一行。

注意：只有 BD Accuri C6 软件生成的 FCS 文件可以被导入到 BD Accuri C6 文件或模板中。

第四章. 分析数据

Analyze 面板使您可以使用相同的 plots 和 gates，同时查看多个样本的数据。

在 Analyze 面板进行以下操作：

- 以任意组合方式查看几个 plots 和样本数据，使分析更容易。
- 比较来自 96 孔板的特定样本。
- 生成新 plots，隐藏或者删除 plots，从 Collect 面板中复制或者重新使用 plots。
- 用同样的 Plots 查看不同的样本数据。
- 生成不同颜色叠加的直方图。
- 打印多个 plots。
- 调整峰的位置。

4.1 查看 Analyze 面板

Analyze 面板分为两个主要版块：

- Setup panel—窗口左边的面板，包含选择样本和 Plots 的控制命令。
- Data Display—窗口右边的更大的区域，以 plots 和统计表格形式显示样本数据。

当您第一次打开 Analyze 面板时，workspace 是空的。要设置 Analyze 面板，您可以从 Collect 面板复制 plots，生成新 plots，以及设定画门策略。

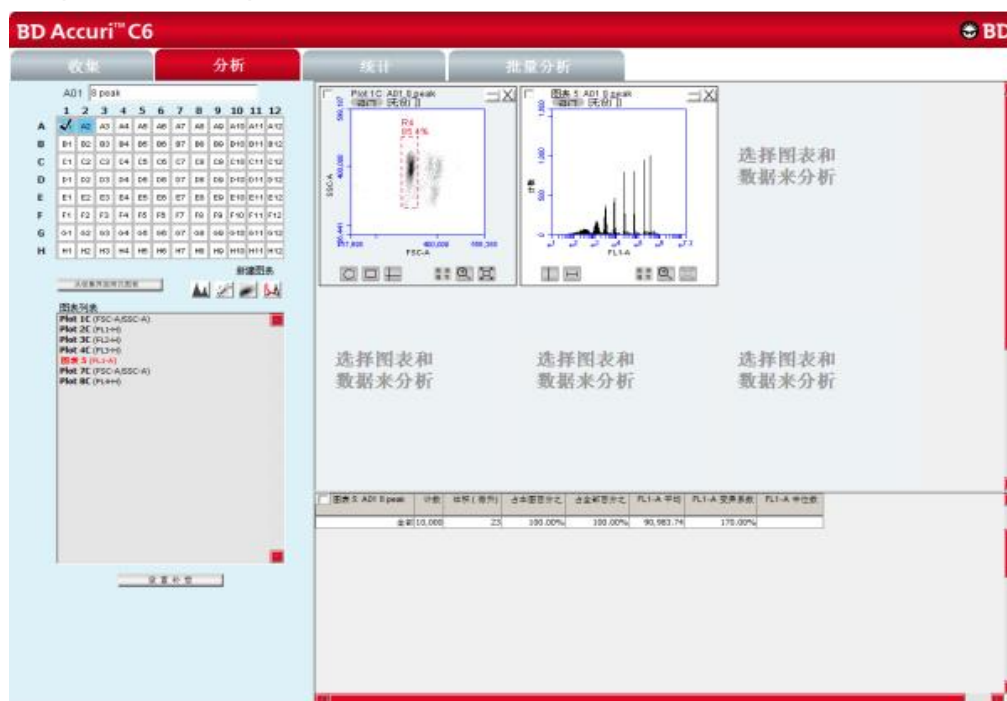


图 4-1. Analyze 工作面板

下面的表格描述了 Analyze 面板的每个控制命令和指示器。

表 4-1 分析面板控制按键

控制按键	功能描述
Sample Naming Field 样品命名区	输入您当前分析样品的名称。
Sample Grid 样品格	<p>为了方便组织实验样品数据,样品格以 96 孔板的矩阵形式显示,每个样品在 96 孔样品格中有自己对应的孔。</p> <p>孔是以颜色区分的:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 白色——不包含数据。 ● 蓝色——包含数据。 ● 红色边框——目前选定以查看数据。

控制按键	功能描述
Copy Plots from Collect 从收集面板复制 Plots	从 Collect 面板复制特定的 plots, 看 4.2.1 细节描述。
Plot Controls Plot 控制命令	一系列控制按键,用于生成新的 Plots 或者叠加直方图,看 4.2.3 的细节描述。 所有在 Analyze 和 Collect 面板生成的 plots,包括叠加图,都可以被直接拖拽到大部分 Microsoft Office 应用程序中。
Plot List Plot 列表	列出从 Analyze 面板可以获取的 plots 表单,可获取的 Plots 包括从 Collect 面板复制的或者在 Analyze 面板生成的 plots。
Set Color Compensation 设定颜色补偿	打开颜色补偿矩阵,校正荧光溢出,看 3.12 章节的细节描述。
Plot Corrals Plot 栏	此区域显示两列 plot 栏,拉上或拉下查看更多 plots,看 4.2.2 章节关于生成 plots 的信息。
Statistics Table 统计表格	Plots 下方的表格显示每张 plot 的统计信息。统计表格可以直接复制粘贴到大多数 Microsoft Office 应用程序中。

4.2 设置 Plots

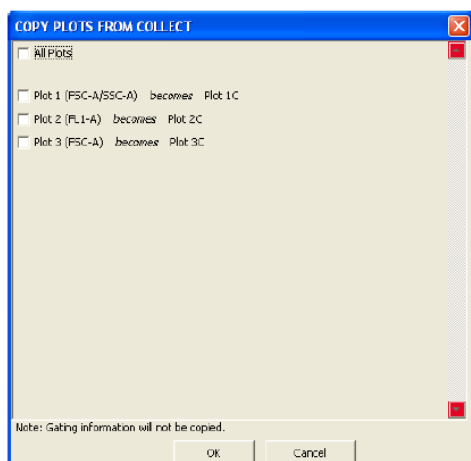
在 Analyze 工作面板,您可以从 Collect 面板复制 plots,或者生成新 plots,从 Collect 面板

复制的 Plots 会被加上 “C” (例如 , Plot 1C)。

4.2.1 从 Collect 面板复制 plots

这样复制 Plots :

1. 在 Collect 面板 , 点击 Copy Plots from Collect 按钮。。
2. 在 Copy Plots from Collect 对话框中 , 做下列操作之一 :
 - 选择您想要复制的 plots 的确认框。
 - 激活 All Plots 确认框 , 从 Collect 面板复制所有的 plots。



4-2. 从 Collect 面板选择要复制的 plots。

3. 点击 OK 按钮关闭对话框 , BD Accuri C6 会向 Analyze 面板的 Plot List 添加选择的 plots (图 4-3)。

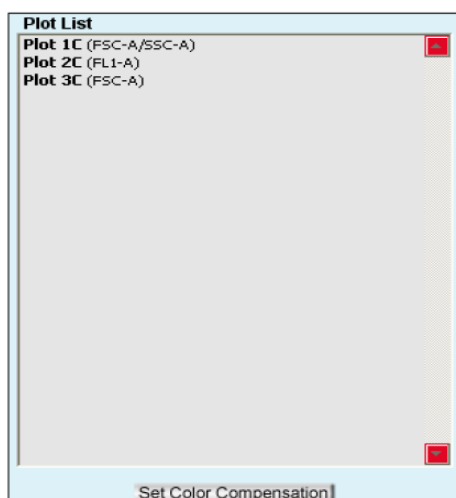






图 4-3. 包含复制的 Plots 的 Plot List。

4.2.2 生成 Plots


这样生成新的 Plots：

1. 点击一个空的 plot 栏。
2. 点击样本格下方的下列按键之一：
 - 直方图 
 - 散点图 
 - 密度图 
 - 叠加直方图  (看 4.2.3 章节的细节描述)
3. 点击您想要查看的包含数据的样本孔。

4.2.3 生成叠加直方图

您可以通过生成叠加直方图，同时比较来自不同样本的多个图的分布情况。

这样生成叠加直方图：

1. 点击一个空的样本栏。
2. 点击叠加直方图工具  工具，打开一个空白的单参数 FSC-A plot (图 4-4)。

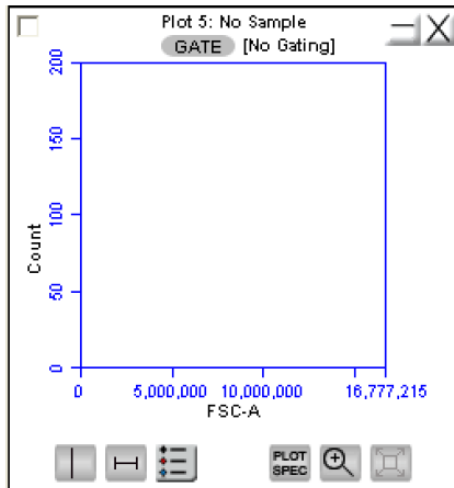


图 4-4. 空白的叠加直方图 plot。

3. 如果需要，点击 X 轴标签 (FSC-A)，从弹出的菜单中选择一个不同的参数。
4. 点击 GATE 按键，正确的应用门 (看 3.6 章节的细节描述)。
5. 从 96 孔样本板中选择想要叠加的数据孔。

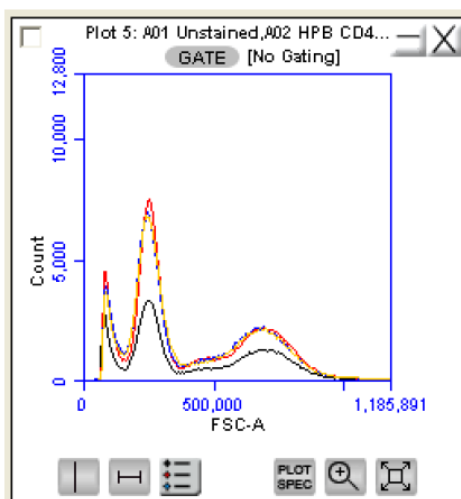



图 4-5. 包含数据的叠加直方图。

6. 点击 Overlay Histogram Legend 工具, 来看叠加直方图的图例说明。

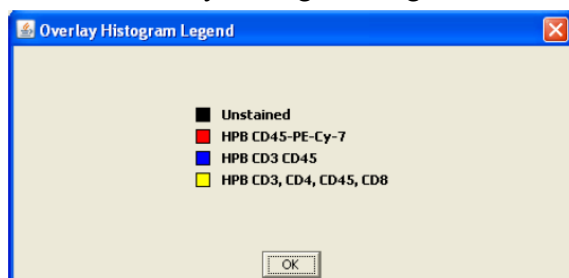


图 4-6. 叠加直方图图例。

这样改变一个或多个叠加直方图的颜色：点击叠加直方图图例中的彩色方框，从挑出的颜色盘中选择需要的颜色。

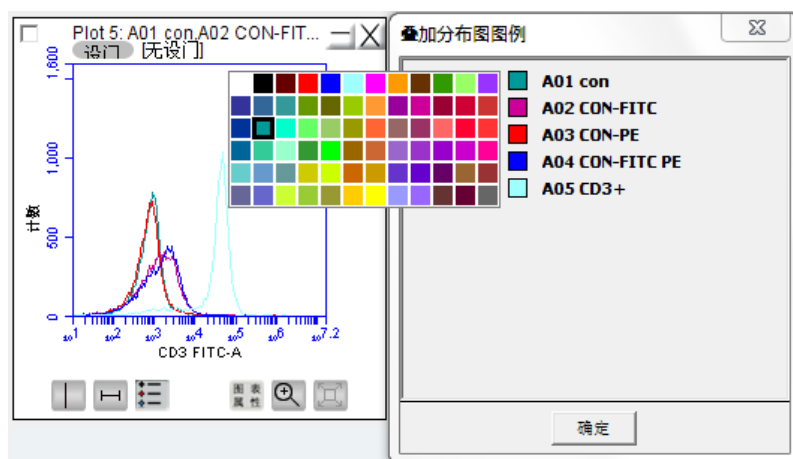


图 4-7. 可以选择颜色的叠加直方图图例。

4.3 查看 Plots

这样在 Plot List 中查看 plot。

1. 在 Analyze 面板中点击一个空的 plot 栏。
2. 点击 Plot List 中的一个 plot (图 4-8) 以打开一张 plot，BD Accuri C6 显示出的 Plot 不包含任何数据。

注意：从 Collect 面板复制过来的任何门都会被重命名(例如：在 Collect 中的 P1 在 Analyze 中是 P2)。您可以在 Analyze 面板调整这些门，而不会改变 Collect 面板中门的位置。

3. 点击您想要查看的样本孔。
4. 如果需要，应用门策略(看 3.6.2 章节的细节描述)。

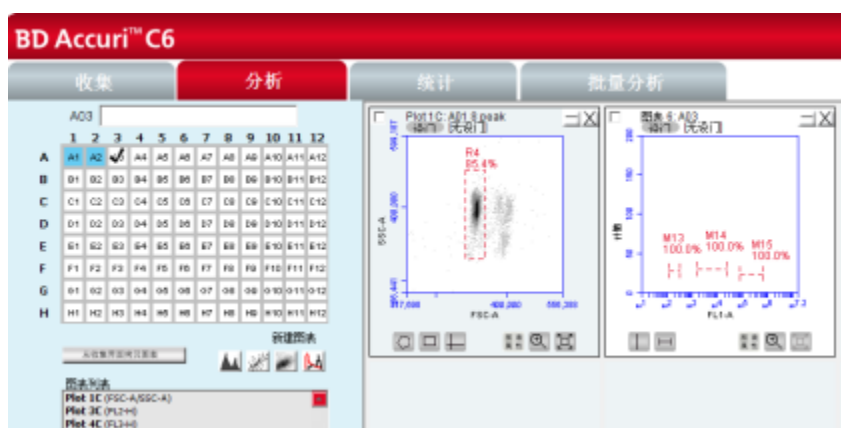


图 4-8 Analyze 面板：应用了门的 Plots。

5. 要查看其他样本的数据，从 Plot List 打开一个或者更多 plots (推荐在另一行 Plot 栏进行这样的操作) 并选择想要在每个 Plot 显示的样本。您在上面所应用的门会自动应用到新一行中对应的 plot 中。
6. 比较样本数据和统计学信息。

第五章. 查看统计数据

Statistics 面板提供了将来自多个样本的数据列在一个专业化表格中进行分析的方式,它使您也可以做下列操作:

- 查看您收集的某些样本或所有样本的统计学信息。
- 显示收集的或者导入的样本数据的统计学信息。
- 列出在 Collect 面板或者 Analyze 面板生成的所有 Plots。
- 显示所有的 plot 名称, 门, 和相关统计学信息。
- 剪切并粘贴数据到电子数据表格。

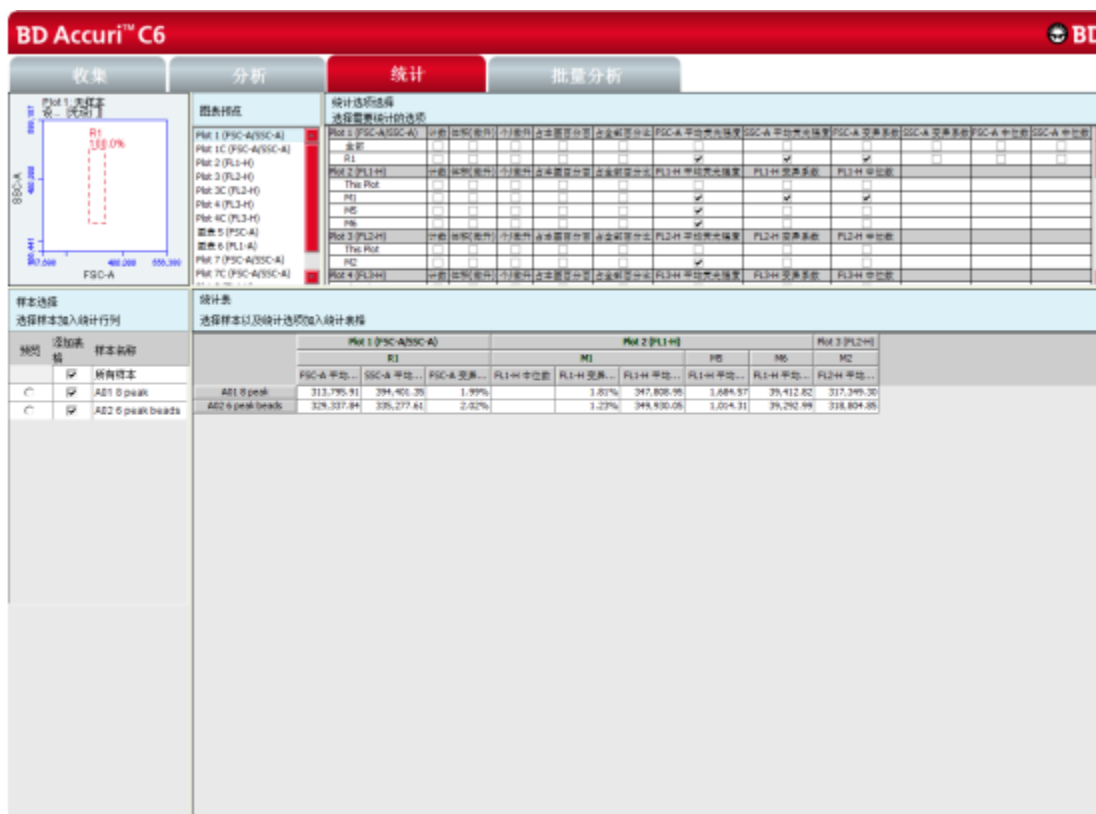


图 5-1. Statistics 工作面板。

5.1 查看 Statistics 面板

下列表格描述了 Statistics 面板的每个控制元件和显示器。

表 5-1 统计面板控制元件

控制按键	功能描述
Plot	预览选择的 plot。看 5.3 章节细节描述。
Display Plot Preview 显示 Plot 预览	列出从 Collect 面板或者 Analyze 面板导入的 plots 列表, 使您能够选择想要预览的 plot
Statistics Column Selector 统计行列	使您能够选择想要在统计表格中查看的每个样本数据, 看 5.2 章的详细描述。
Sample Selector 样本选择	使您能够选择想要在统计表格中查看的样本, 看 5.2 章的详细描述。
Master Statistics Table 定制统计表格	制作显示所选择样本的数据的定制化表格, 看 5.2 章的详细描述。

5.2 生成定制统计表格

定制统计表格使您能够立即看到所选择显示的来自不同样本的数据。

这样生成定制统计表格：

- 在 Statistics Column Selector 中, 激活每张 plot 中您想要查看的数据下方的确认框, BD Accuri C6 自动将这些栏加到您所定制统计表格中。

Display Plot Preview	Statistics Column Selector Add columns to your master statistics table by selecting a cell.																																																					
Plot 1 (FSC-A/SSC-A)	Plot 1 (FSC-A/SSC-A)	Count	Volume (μL)	Events / μL	% of This Plot	% of All	Mean FSC-A	Mean SSC-A	CY FSC-A	CY SSC-A																																												
Plot 2 (FL1-A)	All	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>																																												
Plot 3 (FSC-A)	Plot 2 (FL1-A)	Count	Volume (μL)	Events / μL	% of This Plot	% of All	Mean FL1-A	CY FL1-A																																														
	All	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>																																														
	Plot 3 (FSC-A)	Count	Volume (μL)	Events / μL	% of This Plot	% of All	Mean FSC-A	CY FSC-A																																														
	All	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																														
Master Statistics Table																																																						
Select cells from the Sample Selector and Statistics Column Selector to build your table.																																																						
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="4">Plot 1 (FSC-A/SSC-A)</th><th colspan="4">Plot 2 (FL1-A)</th><th colspan="3">Plot 3 (FSC-A)</th></tr> <tr> <th colspan="4">All</th><th colspan="4">All</th><th colspan="3">All</th></tr> <tr> <th>Count</th><th>Events / μL</th><th>CY FSC-A</th><th>CY SSC-A</th><th>Count</th><th>Events / μL</th><th>CY FL1-A</th><th></th><th>Count</th><th>Events / μL</th><th>Mean FSC-A</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>											Plot 1 (FSC-A/SSC-A)				Plot 2 (FL1-A)				Plot 3 (FSC-A)			All				All				All			Count	Events / μL	CY FSC-A	CY SSC-A	Count	Events / μL	CY FL1-A		Count	Events / μL	Mean FSC-A											
Plot 1 (FSC-A/SSC-A)				Plot 2 (FL1-A)				Plot 3 (FSC-A)																																														
All				All				All																																														
Count	Events / μL	CY FSC-A	CY SSC-A	Count	Events / μL	CY FL1-A		Count	Events / μL	Mean FSC-A																																												

图 5-2. 生成定制统计表格：添加 plots。

Sample Selector	Master Statistics Table Select cells from the Sample Selector and Statistics Column Selector to build your table.									
Preview	Add to Table	Sample Name	Plot 1 (FSC-A/SSC-A)							
		All Samples	All							
	<input checked="" type="checkbox"/>	A01 Unstained	Count	Events / μL	CY FSC-A	CY SSC-A	Count	Events / μL	CY FL1-A	Count
	<input checked="" type="checkbox"/>	A02 HPB CD45-PE-Cy7	230,169	∞	69.9%	163.2%	230,169	∞	237.7%	230,169
	<input checked="" type="checkbox"/>	A03 HPB CD3 CD45	231,332	∞	65.9%	124.2%	231,332	∞	135.2%	231,332
	<input checked="" type="checkbox"/>	A04 HPB CD3 CD45	225,303	∞	71.6%	164.3%	229,303	∞	139.4%	229,303
	<input checked="" type="checkbox"/>	A04 HPB CD3, CD4, ...								413,478.5
	<input checked="" type="checkbox"/>	A04 HPB CD3, CD4, ...								415,636.3

- 在 Sample Selector List 中，激活您想要查看的每个样本的确认框，BD Accuri C6 自动将样本添加到定制的统计表格中，同时显示样本数据。图 5-3 生成定制统计表格：添加样本。

5.3 在 Statistics 面板中预览 plot

这样在 Statistics 面板中预览 plot:

- 在 Display Plot Preview 单中，点击您想要预览的 Plot。

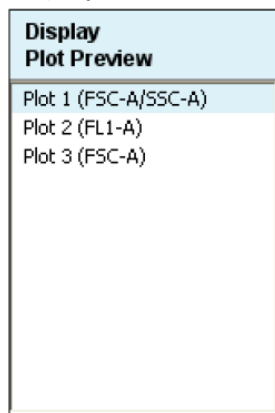


图 5-4. Plot 预览。

- 在 Sample Selector 单中，选择一个样本，BD Accuri C6 会在 Plot 中显示样本的数据。

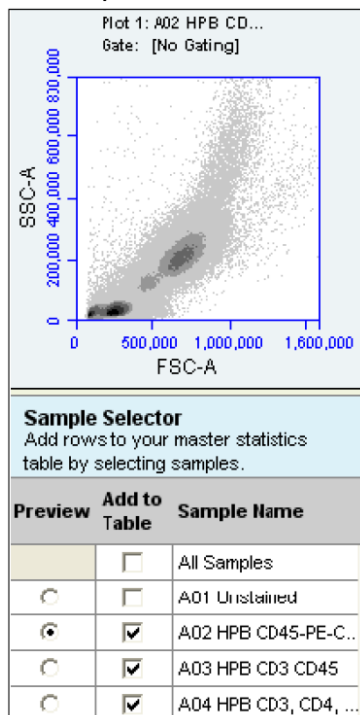


图 5-5 Sample Selector List 和 plot。

Plot 预览只可以查看 ,您可以在 Collect 面板或者 Analyze 面板修改缩放水平和其他 plot 设置条件。

5.4 复制数据到其他应用程序

您可以从定制的统计表格复制粘贴数据到大多数 Microsoft Office 应用软件中。

这样复制数据：

1. 使用鼠标选择您想要复制的区域。选择数据对应的行列标题会同时被自动拷贝。
2. 按下 Ctrl+C 复制数据。
3. 在 Microsoft 软件中，按下 Ctrl+V 粘贴数据。

注意：看附录 A 中关于批量分析的介绍。

第六章. 仪器日常维护

6.1 日常维护事项及频率

维护事项	相关试剂及操作	频 率
Backflush	点击 Backflush	怀疑 SIP 中有阻塞时
SIP Clean	点击 SIP Clean，按提示依次上 Clean 液管、DI water 管	关机前
Clean Fluidics	放置装有 2mL 去离子水的试管在上样处，选择 Instrument>Run Clean Fluidics	在关机过程中自动执行，或有需要时
清洁仪器外部	先用蘸有 BD FACSClean 清洁液的纸巾擦拭，再用蘸有去离子水的纸巾擦拭	在每天结束或需要时候进行清洁操作
清洁流动室	将 500μL Detergent 液放置在在上样处，选择 Instrument>Extend Flow Cell Clean，20 分钟后重启仪器	每周至少 2 次
扩展流动室清洁	将 500μL BD 扩展流动室清洁溶液放置在上样处，选择 Instrument>Extend Flow Cell Clean，2 小时后重启仪器	收到技术支持部的提醒，或者仪器的灵敏度下降时
清洁液流瓶	断开并清空所有瓶子，依次用去离子水、FACSClean 液、去离子水冲洗，然后用对应的液体填充各液流瓶，盖上盖子并连线	每月一次
替换液流瓶过滤器	断开连接线，取下瓶盖，更换过滤器，盖上盖子并连线	每 2 个月一次
替换内嵌鞘液过滤器	在仪器关机时打开仪器盖子，检查管路有无漏液，更换内置过滤器，此过滤器有一个凸出和凹进末端，须确保方向正确	每 2 个月一次
替换蠕动泵管路	在仪器关机时打开仪器盖子，挤压泵限位夹上的握柄标记移除夹子，拉出鲁尔接头，将管路移出蠕动泵机头，拧开接头，更换管路，旋紧接头，插入接头配件，插上 U 型限位夹	每 2 个月一次

6.2 月维护流程

您可以对流动室进行长清洗 (Extended Clean) , 在流动室长清洗循环中, 流动室会通过从上样针处的样品管进行吸取, 而使流动室完全充满清洗液。这一循环会使 C6 在流动室内充满清洗液的情况下自动关机, 这样可以使流动室被清洗液充分浸泡。

月维护操作流程

1. 在上样针处放置一个装有至少 500 μ l 流动室长清洗溶液 (Extended Flow Cell Clean) 的管子。

注意：千万不要没有先在上样针处放置装有至少 500 μ l 长清洗液的管子，就运行流动室长清洗循环。

2. 从菜单选择 Instrument>Extended clean of flow cell。
3. C6 plus 关机后, 让流式细胞仪放置至少 30 分钟 (为了更彻底的清洗, 可放置更长时间)。
4. 重启计算机, C6 Plus 会运行一个长液流启动循环, 并且软件会显示一条信息 :Extra startup time needed due to cleaning or improper shutdown, 这个长液流启动循环会将清洗液从流动室中排出。
5. 当启动完成后, 按平时一样操作仪器即可。

6.3 更换溶液瓶内滤器



每一个鞘液瓶、清洗液瓶以及去污液瓶内都有一个环形滤器, BD Accuri 推荐每两个月更换一次这些滤器。在操作时, 请确认已做好恰当的保护, 比如穿实验服, 佩戴手套以及防护镜等。

这样更换溶液瓶内滤器：

1. 从每个瓶子的顶端断开快速连接管线 (quick connect lines)。
2. 小心的移去每个瓶子的盖子。
3. 从溶液管的末端断开滤器锁扣, 按处理废弃样本一样安全的丢弃旧的滤器。
4. 选择正确的配件进行滤器更换：
 - 鞘液瓶——大的环形滤器
 - 清洗液和去污液瓶——小的环形滤器
6. 装好各溶液瓶, 连上各自的快速连接管线。
7. 在上样针放置一管去离子水, 运行 1 分钟。

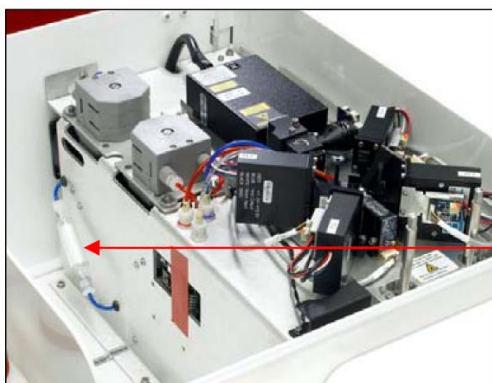
6.4 更换内置鞘液滤器



BD Accuri 推荐每两个月更换一次内置鞘液滤器 (In-line sheath filter)。如果这台 C6 每天都会用几个小时, 那么 BD Accuri 推荐每个月更换一次内置鞘液滤器。在操作时, 请确认已做好恰当的保护, 比如穿实验服, 佩戴手套以及防护镜等。

这样更换内置鞘液滤器:

1. 关闭 C6 流式细胞仪, 并拔下电源插头。
2. 轻轻打开流式细胞仪的盖子。
3. 旋转内置鞘液滤器的金属锁扣, 直至拧开锁扣。
4. 弃去旧的滤器。



In-line sheath filter
内置鞘液滤器

6. 安装新的内置鞘液滤器, 这个滤器的两端是不同的, 以确保安装方向的正确。
7. 重新将滤器的金属锁扣锁好。
8. 轻轻盖上流式细胞仪的盖子。
9. 在上样针处放置一管鞘液。
10. 插上电源插头, 启动流式细胞仪。
11. 排除仪器中的气泡。

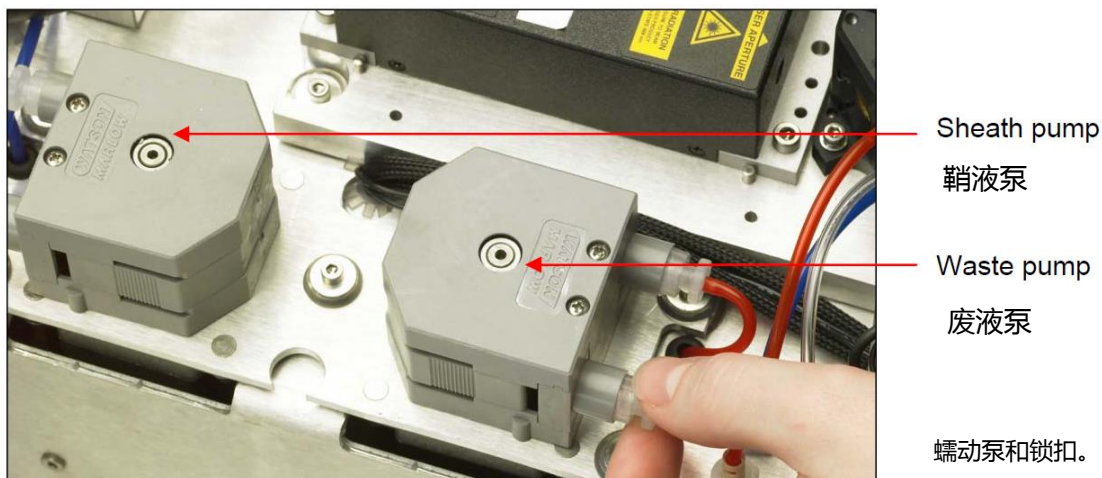
6.5 更换蠕动泵管路



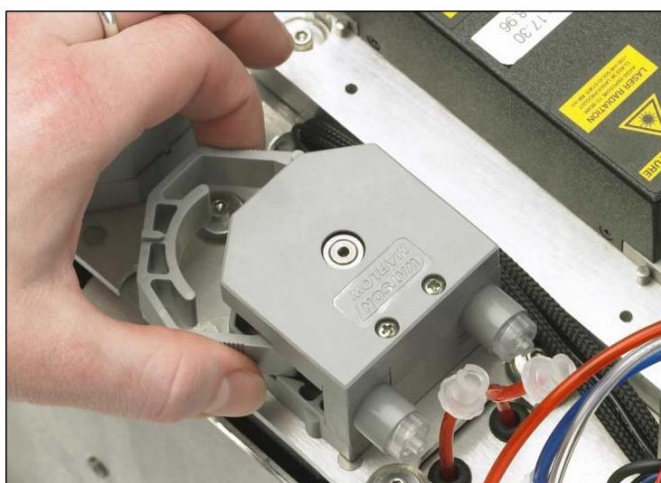
每两个月更换一次蠕动泵管路, BD Accuri 推荐每次同时更换两个管路。管路直接接触生物样本, 因此应该认为是具有生物危险性的, 在操作时请佩戴手套和采取其他必要的防护措施。

这样更换蠕动泵管路：

1. 关闭 C6 流式细胞仪，并拔下电源插头。
2. 轻轻打开流式细胞仪的盖子。
3. 通过旋转，将蠕动泵外侧的液流管路从锁扣上解下，在管路上分别标记 Input 和 Output，保证重新安装时不会弄混。蓝色的管路连接鞘液泵，红色的管路连接废液泵。



4. 用手按压泵芯外侧的夹子，将其取下来。



取下蠕动泵夹子。

5. 将环绕泵芯的锁扣拉下来。



从泵芯拉下锁扣。

6. 取下旧的蠕动泵管路，请按照处理生物样品的标准实验室操作规范丢弃，因为样品会流经这个管路，所以应该认为它是具有生物危险性的。
7. 更换新的蠕动泵管路，将其环绕在泵芯上，并且扣上锁扣。
8. 重新装上泵芯外侧的夹子，将蠕动泵外面的锁扣重新连上。
注意：确认锁扣被连接到正确的管路元件上。
9. 轻轻盖上流式细胞仪的盖子。
10. 在上样针处放置一管鞘液。
11. 插上电源插头，启动流式细胞仪。
12. 排除仪器中的气泡。

6.6 检查液流管线

1. BD Accuri 推荐定期检查流式细胞仪的液流管线，确保没有溶液泄露。
2. 这样检查液流管线：
 - 1) 净化液流（参考 4.3 章）。
 - 2) 关闭流式细胞仪。
 - 3) 打开机器顶盖。
 - 4) 仔细检查每个金属锁扣连接处附近的液体小池，确认是否有溶液泄漏。
 - 5) 仔细检查每个液流系统的金属托盘，观察是否有固体残余物或者褪色情况。
 - 6) 如果发现任何泄露，请立即联系 BD Accuri 的技术支持人员，不要尝试自己修理仪器。



注意：任何从红色或者透明管线中流出的液体都应该认为是具有生物危险性的，请不要尝试在不戴手套和采取其他防护措施的情况下进行接触和清理，如果清洗工具被污染了，请丢弃。

第七章. 常见问题及解答

征状		可能原因		排除问题方向
※ 细胞仪或计算机问题				
C6 和/或计算机无法接通电源	1.0	电源线或者插线没有连好	1.1	连好电源线和各插线
C6 接通电源后, 软件未显示绿灯, 而是显示暗灰色	2.0	USB 数据线没有连接好	2.1	确认已经用 USB 数据线连接好 C6 流式细胞仪和计算机, 计算机可能会用几秒钟时间来识别 C6 流式细胞仪。
	3.0	USB 接口损坏	3.1	将 USB 数据线接到计算机的另一个 USB 接口
	4.0	C6 没有被正确的安装到计算机上	4.1	正确安装 C6 : 双击 My Computer , 从下拉菜单选择 Properties , 点击 Hardware , 点击 Device Manager , 寻找 C6 Cytometer。如果列表中没有 C6 Cytometer , 重装驱动。
	5.0	如果问题发生在最初安装时, 有可能是系统冲突。	5.1	首先确认计算机开机, BD Accuri C6 软件打开, C6 细胞仪开机, 然后再用 USB 数据线重新连接 C6 细胞仪和计算机。
※ 数据显示问题				

收集数据时,看不见信号,或者数据不如预期	6.0	选错设阈值参数信号	6.1	检查设阈值参数(一般荧光分析 FSC ; DNA 分析 FL2-H)。
	7.0	没有摇匀样品, 细胞沉淀。	7.1	摇匀样品。
	8.0	上样管阻塞, 或有气泡, 或光路偏掉。	8.1	放一管清水, 高速运行 5 分钟, 然后重新运行样本。
			8.2	运行 Backflush 或者 Unclog 排除气泡。
			8.3	运行质控小球, 如果小球数据正常, 可能是您样本的问题。如果小球数据不正常, 请执行去污染循环, 然后再次运行小球, 如果数据仍不正常, 请联系 BD 工程师。
当运行样本时, 速度很慢, 但上样针并没有堵	9.0	仪器管路内有细胞残留。	9.1	在上样针处放置一管清洗液 (1x), 运行 5 分钟, 然后上样 ddH ₂ O 运行 1 分钟, 再收集样本。
细胞仪的泵运转正常, 但 BD Accuri C6 无法获取数据	10.0	鞘液桶空或废液桶满, 外部液流管线扭曲, 上样针堵塞, 蠕动泵管路安装不当。	10.1	检查鞘液桶和废液桶液面水平。

			10.2	检查外部液流管线是否扭曲。
			10.3	运行 Backflush 排除气泡。
			10.4	检查蠕动泵管路是否安装正确。
细胞仪的 泵持续运 行	11.0	C6 内置鞘液滤器中有大 气泡, 管路有堵塞, 或蠕 动泵管路需要更换。	11.1	排除 C6 内置鞘液滤器中的大 气泡。
			11.2	运行 Backflush 或者 Unclog 排 除管路中的堵塞。
			11.3	更换蠕动泵管路。
细胞信号 非常高	12.0	流动室中有气泡。	12.1	运行 Backflush 排除气泡。
	13.0	阈值设太低。	13.1	调高阈值。
	14.0	细胞浓度太高。	14.1	稀释样品。理想细胞浓度： $1 \times 10^5 - 1 \times 10^7$ cells/ml
	15.0	样品流速设太高。	15.1	设样品流速成 Medium 或者 Slow
数据的 CV 过高	16.0	流动室中有气泡。	16.1	运行 Backflush 键排除气泡。
	17.0	样品流速太高 (DNA 分 析宜用 Slow)。	17.1	设定上样速度为 Slow 或 Medium。
	18.0	流动室不清洁。	18.1	执行月维护流程
	19.0	不恰当样品制备方法。	19.1	优化样本制备过程

附录 A. 软件增强分析功能

增强分析模块包含多项 BD Accuri C6 软件的高级功能：

- 实时设门
- 图表和区域重命名
- 彩色显示事件
- 向量扩展图形
- 批量分析

注意：增强分析需与 BD Accuri C6 软件 264 版本或更高版本匹配使用。

A.1 创建实时门

实时门，也叫做排除门，是用于排除指定区域以外的事件被显示以及存储为 c6 或 fcs 文件的一部分。任何区域都可以作为一个实时门。如果需要，该选择的区域可以被存储成模板的一部分。

警告：一旦执行实时门策略，就无法重新获取被排除的数据。

这样创建实时门：

- 在 **收集** 面板创建一个区域作为实时门。
- 在 **收集** 面板运行设置中点击 **不收集选项之外的数据** 确认框，并从下拉菜单中选择区域。

图 A-1. 创建 Live Gate

A.2 重命名图表和区域

图表和区域可以被重命名，命名方法相同。



图 A-2. 激活图表重命名

这样重命名图表和区域：

- 双击图表和区域的名称。

- 在文本框区域，输入新的名称。

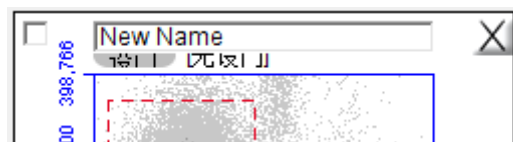


图 A-3. 输入新的图表名称

- 按回车键。

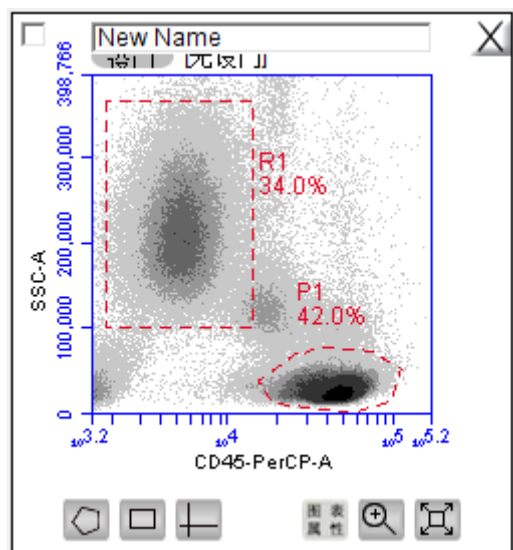


图 A-4. 新的图表名称

A.3 彩色显示区域内事件

一个或更多区域内的所有事件，都可以在其他直方图或者散点图中被指定显示为特定的颜色。在数据获取过程中，事件的彩色显示会保留并自动更新。

注意：密度图无法彩色显示事件。

这样彩色显示事件：

- 在一张直方图、散点图或密度图中创建一个区域。
- 双击区域的名称，点击其中的白色方块来显示色彩调色板，最常用的色彩显示在最上行。

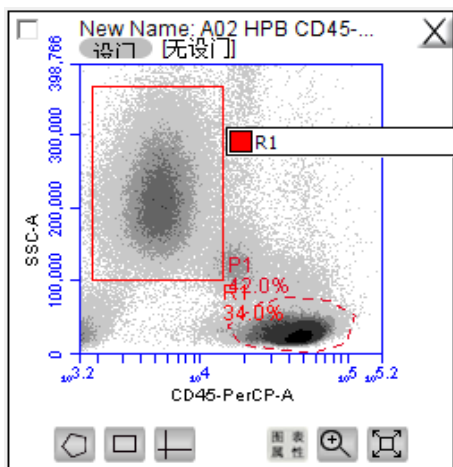


图 A-5. 选择彩色显示的区域

- 选择一种颜色。

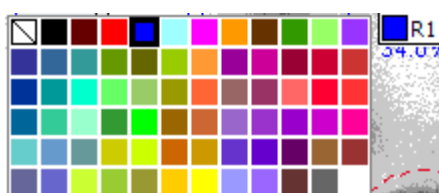


图 A-6. 选择区域的颜色

- 点击区域外面来使颜色改变生效，该区域内的事件在其他的散点图或直方图中会彩色显示，并显示相同的颜色。

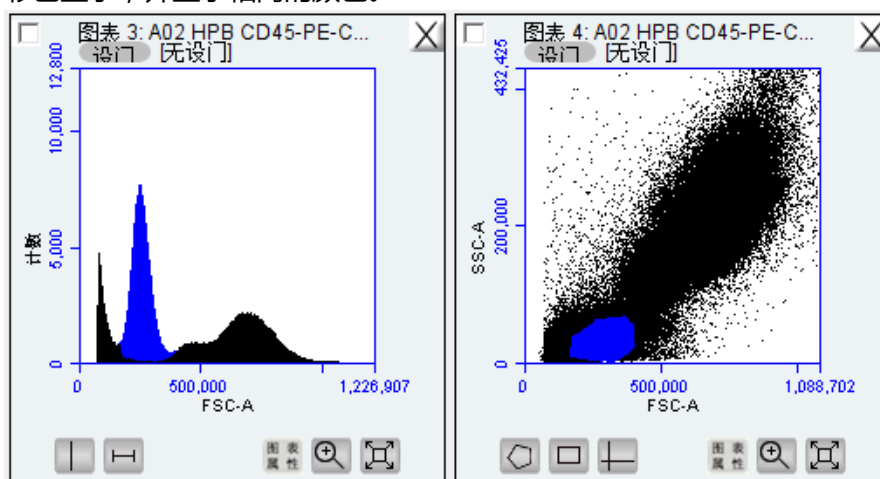


图 A-7. 彩色显示区域内事件

A. 4 创建高质量的图表

高分辨率（出版质量）的图片会以 eps 格式存储，该格式是向量扩展图形。

这样创建高分辨率图表：

- 选择 文件 > 设置图表拖放模式。
- 在对话框中选择.eps 选项。
- 点击 确定 按钮。
- 在 BD Accuri C6 软件工作页面中，点击一张图表，将其拖放至桌面。
- 打开一个图形编辑应用软件（如 Photoshop），确认图片的分辨率设置为 300dpi 或者更高，导入 eps 图片。
- 保存图片。

A. 5 批量分析样本

批量分析 界面可以在同时自动分析多个样本。在获取样本期间所创建的图表类型都会显示在屏幕顶端，单独文件或所有选择文件的统计会被显示。分析后，对于单独样本图表中的区域的移动或调整大小，不会影响其他样本图表。

A. 5.1 查看 **批量分析** 页面

批量分析 界面包含两个主要部分：

- 设置板块—该板块位于窗口的上半部分，含有选择样本和分析图表的控制键。
- 数据显示—该板块位于窗口的下半部分区域，可以在图表和统计表格中显示样本数据。

当首次打开 **批量分析** 页面时，工作页面是空的。为了设置 **批量分析** 页面，可以创建图表，或者从 **收集** 或 **分析** 页面复制图表。

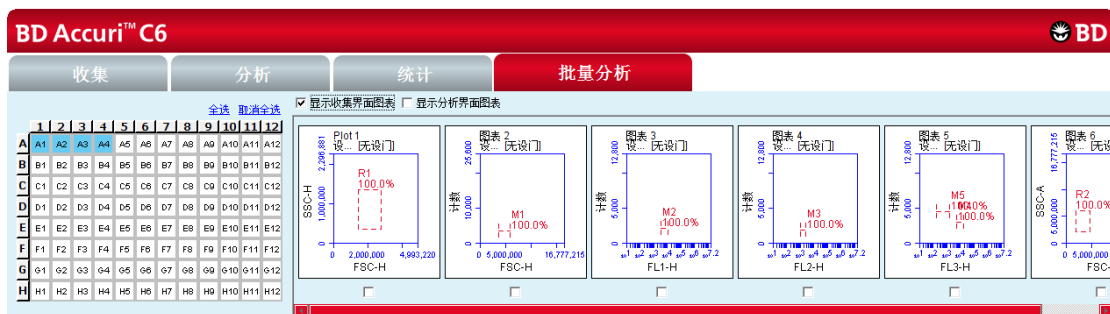


图 A-8. 批量分析工作页面

以下表格描述 *批量分析* 页面的每个控制键和指示：

表 A-9. 批量分析页面控制键

控制键	描述
样本格	96 孔板格式的矩阵布局，用于选取样本进行分析。 样本孔是通过颜色编码的： <ul style="list-style-type: none"> • 白色-----不包含数据。 • 蓝色-----含有数据。 • 黑色确认标记-----当前选择用于批量分析的数据孔。
可用图表	显示包含在批量分析中的图表（无数据）。可用图表包含从收集页面复制的图表或在分析页面创建的图表。详见 A.5.2 章节细节描述。
分析窗格	基于图表，在表格和图表格式的分析数据行被选择用于分析。统计表可以复制到大多数的 Microsoft Office 兼容程序中。

A. 5. 2 运行批量分析

- 获取若干样本。
- 在获取样本后，点击 *批量分析* 页面。
- 在样本格中点击相应的孔，选择样本进行分析。
- 执行下列一项或全部操作：
 - 激活 *显示收集界面图表* 复选框，使 *收集* 页面的所有图表在批量分析中可用。
 - 激活 *显示分析界面图表* 复选框，使 *分析* 页面的所有图表在批量分析中可用。
- 通过激活特定图表下的复选框，来选择批量分析中包含的图表。
- 如果要显示样本相关的统计数据，执行下列操作之一：
 - 激活 *显示所有图表统计* 复选框，在每行中显示统计。
 - 激活各自行中的 *显示统计* 复选框，针对特定样本显示统计。区域可以移动和重新调整大小（见 3.7 章节说明）。

A. 5. 3 导出数据

图表和统计数据可以通过两种方式导出：PowerPoint 文件以及 Excel 电子表格。

这样导出数据：

- 在 *批量分析* 页面的右下角，执行以下其中一项操作：
- 点击 *输出至 PowerPoint* 按键。

- 点击 *输出至 Excel* 按键。

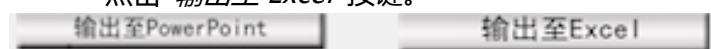


图 A-10. 批量分析页面的导出按键

- 在保存对话框中，确定导出保存的目标文件夹位置，输入文件名，BD Accuri C6 软件将导出文件到此路径下。

附录 B. 高级液流设置

高级用户可以自定义所收集的样本的液流速度和液流直径。

这样自定义液流速度：

- 在 收集 页面的液流控制板块，选择 自定义 按键。

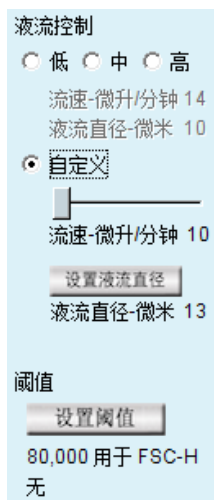


图 B-1. 自定义按键

- 移动自定义滑块调整流速。

这样自定义样本液流直径：

- 在 收集 页面的液流控制板块，点击 设置液流直径 按键。
- 移动自定义滑块调整液流直径大小范围。

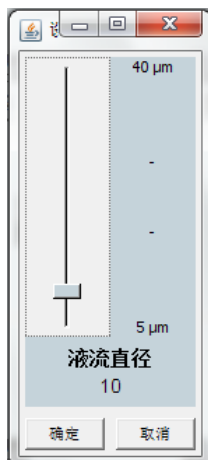


图 B-2. 设置液流直径

注意：液流直径与液流速度并不一定互相对应，BD Accuri C6 软件不允许设置不对应的组合，

使用以下表格来确定允许的液流直径/流速组合。

表 B-1. 液流直径/流速组合

液流直径	最低流速	最高流速
5	10	11
6	10	16
7	10	22
8	10	29
9	10	36
10	10	45
11	10	54
12	10	65
13	10	76
14	12	88
15	14	100
16	15	100
17	17	100
18	19	100
19	22	100
20	24	100
21	26	100
22	29	100
23	32	100
24	35	100
25	38	100
26	41	100
27	44	100
28	47	100
29	50	100
30	54	100
31	58	100
32	61	100
33	65	100
34	69	100
35	74	100
36	78	100
37	82	100
38	87	100
39	91	100
40	96	100

- 点击 **确定** 按键设置液流直径，然后关闭滑块。

附录 C. CSampler 安装及使用指南

在安装 CSampler 之前，先安装 C6 流式细胞仪，并用 6-和 8-peak 小球进行性能校准。

检查 CSampler Accessory Kit 目录，确保所有组件到货齐全。



CSampler Accessory Kit

CSampler Accessory Kit

运货清单

- CSampler
- CSampler 垫子
- 装配螺栓 (3)
- 安装和移除工具
- CSampler 上样针环
- CSampler 软件 CD(未显示)

警告：如果在安装 CSampler 时未关闭 C6 流式细胞仪，可能会导致对 C6 和 CSampler 电子模块的损坏。

1. 关闭 C6 流式细胞仪。
2. 旋开 C6 上样针环，移去样本支架，安上 CSampler 上样针环 (图 1-3)。轻薄的 CSampler 上样针环，可以确保在操作 CSampler 时不会发生碰撞。



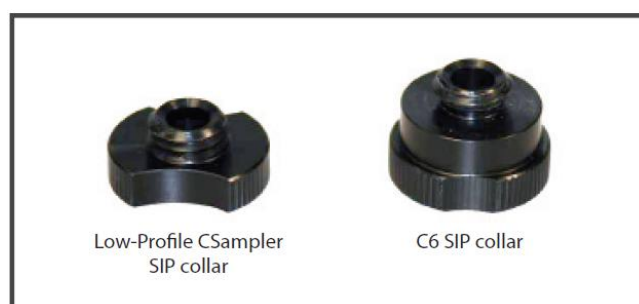
图 1



图 2



图 3



CSampler 安装指南

3. 打开 C6 的盖子，找到用来装配 CSampler 的孔（图 4）。
4. 双手握住 CSampler 组件，小心的将其放在 C6 背面的凹槽中卡好（图 5）。

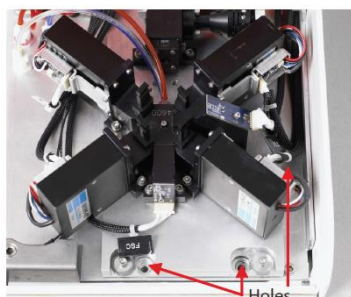


图 4



图 5



图 6

5. 调整 CSampler 组件前端的位置，使上面的孔与 C6 上的螺丝孔对齐。单手握住 CSampler，旋转位于前方右侧的螺栓，将其固定到 C6 上，使用提供的工具拧紧（图 6）。
6. 将另外两个螺栓拧紧（图 7），**注意**不要过紧。



图 7



图 8



图 9

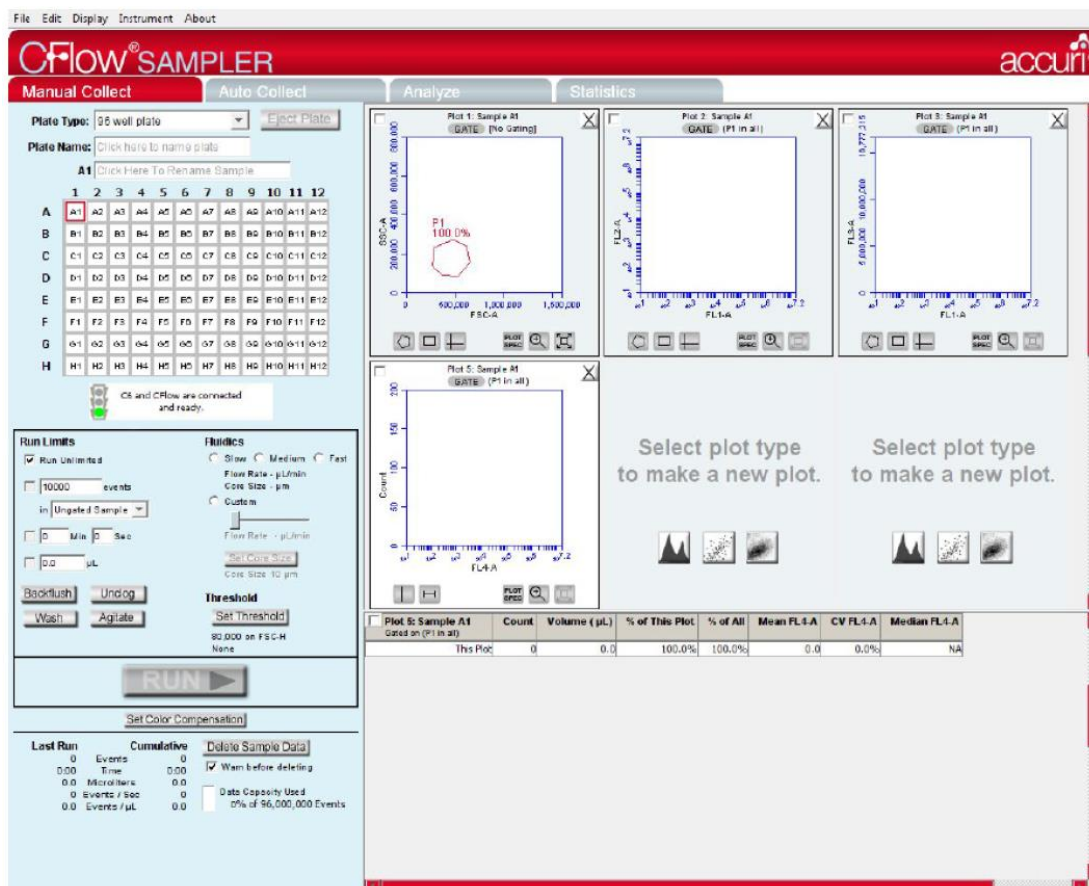


7. 将导线插到 C6 背面的插孔上，打开 C6 电源，CSampler 会自动校正并保持原位（图 8-9）。
8. 将垫子放好（图 10）。**注意**如果没有使垫子和 CSampler 面板保持无障碍移动，会损坏 CSampler。
9. 安装 CSampler 软件。
10. 参考 CSampler 操作指南，用校准小球校正 C6 的运行状态。

快速操作指南: CSampler

使用手动收集面板 (Manual Collect Tab) 进行数据收集

您可以使用 Manual Collect Tab 控制 CSampler 一次收集一孔 (或一管) 的数据。



开始收集数据

1. 确认样品板的类型。
2. 将样品板或管架放在 CSampler 上，然后点击 **Load Plate**。
3. 在板上选择一个样本孔。
4. 设定运行参数：
 - 运行限制
 - 液流 (Fluidics)
 - 阈值 (Threshold)
5. 点击 RUN。CSampler 会移动到选择的样本孔，开始收集数据。

准备好，设定条件，开始！

使用手动收集（Manual Collect）来设门，设定自动收集（Auto Collect）时想要看到的图。使用 Manual Collect 来决定合适的阈值，最佳流速和获取限制条件，进入 Auto Collect 面板。

设定您的收集面板

1. 确认您的样本位置：

- 点击一个样本孔。
- 点击一行或一列的顶端按钮



- 点击 **Select All**

2. 为选定的样本孔设定运行的参数，包括：

- 运行限制
- 洗涤设定
- 液流
- 阈值

3. 点击 **Apply Settings** 按钮

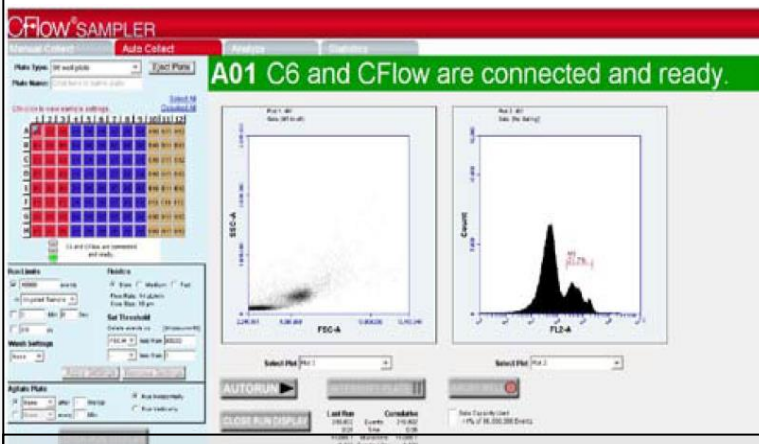
- CFlow Sampler 需要您输入一个文件名，以在收集样本时自动保存。
 - 此时选择的样本颜色一致，表示它们具有相同的运行设定。
4. 重复此步骤，来为其他样本选择不同的运行设定。

其他控制命令

1. Agitate Plate (振荡) : 设定振荡频率，振荡只在孔与孔间发生，不会干扰样本收集。
2. Run Orientation (运行方向) :
 - Run Horizontally: CSampler 从 A1 开始沿水平方向进行样本收集，直到 H12 停止。
 - Run Vertically: CSampler 从 A1 开始沿垂直方向进行样本收集，直到 H12 停止。

使用样本表格

- 数据可以被粘贴到电子表格中，您可以添加样本名，FL 名称和样本注释。这些格可以被复制粘贴到样本统计表格中，您也可以手动进行输入。
- 所有输入表格的数据都会在 CFlow Sampler 文件中保存。



开始自动收集

点击 **Open Run Display** 按钮。

1. **Autorun**: 开始自动收集。
2. **Interrupt Plate**: 在完成当前孔的收集后停止收集，您可以通过点击 **Autorun** 继续开始下一孔样本的收集。
3. **Abort Well**: 立即停止收集，您可以通过点击 **Autorun** 继续开始下一孔样本的收集。
4. **Close Run Display**: 关闭 Run Display 窗口。
5. 一旦点击了 **Auto Run**，您就无法再对运行条件进行改动，只能改变 Plot 显示的方式。

小贴士！

- 颜色补偿是通用设置，阈值和颜色补偿在 **Manual Collect** 和 **Auto Collect** 面板是通用的。
- 在开始自动收集后，可以通过点击 **Interrupt Plate**，**Close Run Display**，然后对样本收集条件进行改动。然后您可以再打开 **Run Display**，继续自动收集样本。
- 在自动收集过程中，一次只能查看一张在 **Manual Collect** 面板所画的 plot。在收集过程中不能对这张 Plot 进行改动，但可以改变在 **Auto Collect** 中想查看的 Plot。
- 您可以随时（除了在收集过程中）将当前样本收集条件以.csv 格式文件导出，在 **File** 菜单中，选择 **Export Sample Settings** 选项进行操作。

附录 D. BD Accuri C6 Plus 培训日程

Day 1

- 9:00-10:00 理论讲解（流式原理+流式应用+仪器介绍）
- 10:00-11:00 开关机流程，仪器日常清洗维护流程介绍，自助更换滤器及管路介绍
- 11:00-11:30 仪器质控
- 11:30-12:30 午餐
- 13:00-15:00 二色实验流程讲解，样本制备，全面介绍BD Accuri C6 Plus软件的使用
- 15:00-17:00 三色/四色实验流程讲解，样本制备及上机练习（学员自己完成，老师辅助，巩固BD Accuri C6 Plus软件的使用），关机流程（学员自己完成）

Day 2

- 9:00-10:00 复习开机流程、质控及多色实验（使用昨天留下来的样本，不再进行样本制备）
- 10:00-12:00 细胞凋亡实验原理、流程及注意事项介绍，样本制备，数据采集分析
- 12:00-13:00 午餐
- 13:00-15:30 细胞周期实验原理、流程及注意事项介绍，质控品&样本制备，数据采集分析
- 15:30-16:30 自由练习，考核
- 16:30-17:30 证书发放，合影