RIC KKU

วิธีการปฏิบัติงานเครื่อง Flow cytometry BECTON DICKINSON
ศูนย์เครื่องมือวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผู้จัดทำ:		
นางสาวอิสยาภรณ์ ประสารกุลนันท์ นักวิชาการวิทยาศาสตร์		นางสาวสาวิณี นาสมภักดิ์ นักวิชาการวิทยาศาสตร์
ผู้ทบทวน:		ผู้อนุมัติ:
นางสาวอิสยาภรณ์ ประสารกุลนันท์ รักษาการผู้จัดการ ศูนย์เครื่องมือวิจัย	ศาสตราจารย์ผิวพรรณ มาลีวงษ์ ผู้ช่วยอธิการฝ่ายวิจัยและบัณฑิตศึกษา	ศาสตราจารย์ มนต์ชัย ดวงจินดา รองอธิการบดีฝ่ายวิจัยและบัณฑิตศึกษา

บันทึกการแก้ไข		
วันที่	**ฉบับแก้ไขครั้งที่**	**รายละเอียดการแก้ไข**
9 กรกฎาคม 2563	00	เริ่มประยุกต์ใช้

1. วัตถุประสงค์ (OBJECTIVE)

1.1 เพื่อเป็นมาตรฐานวิธีปฏิบัติงานในการใช้เครื่อง Flow Cytometry BECTON DICKINSON รุ่น FACSCanto II ให้เป็นไปตามขั้นตอนที่กำหนด

1.2 เพื่อเป็นมาตรฐานวิธีปฏิบัติในการบำรุงรักษา เครื่อง Flow Cytometry BECTON DICKINSON รุ่น FACSCanto II เพื่อให้การตรวจวิเคราะห์มีคุณภาพ และเครื่องมือมีอายุการใช้งานที่ยาวนาน

2. ขอบเขต (SCOPE)

วิธีปฏิบัติงานนี้ใช้สำหรับการให้บริการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow Cytometry BECTON DICKINSON รุ่น FACSCanto II ของศูนย์เครื่องมือวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ครอบคลุมการปฏิบัติงาน โดยเริ่มตั้งแต่ คำจำกัดความ สภาพแวดล้อมของห้องปฏิบัติการ ขั้นตอนการปฏิบัติงาน การตรวจสอบผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง การรายงานผลการวิเคราะห์ และการดูแลรักษาเครื่องมือให้มีสภาพพร้อมใช้งาน

3. เอกสารอ้างอิง (REFERENCE DOCUMENTS)

3.1 เอกสารระเบียบปฏิบัติงานเรื่อง การบำรุงรักษาเชิงป้องกัน และสอบเทียบเครื่องมือวิจัย (QP-RIC-OP-01)

3.2 เอกสารระเบียบปฏิบัติงานเรื่อง การให้บริการเครื่องมือ วิเคราะห์ตัวอย่าง และรายงานผล (QP-RIC-OP-02)

3.3 คู่มือเครื่อง Flow Cytometry BECTON DICKINSON รุ่น FACSCanto II (SD-RIC-OP02-29)

4. คำจำกัดความ (DEFINITIONS)

4.1. ตัวอย่าง หมายถึง อนุภาคที่แขวนลอยในสารลายหรือตัวทำละลาย ในที่นี้หมายถึง เซลล์ เม็ดเลือด ตัวอย่างเลือด เซลล์แบคทีเรีย เป็นต้น

4.2. ผลการวิเคราะห์ หมายถึง ค่าหรือผลลัพธ์ของคุณลักษณะเฉพาะที่ได้จากการตรวจวัด หรือวิเคราะห์ โดยโปรแกรม FACSDiva Software ที่เสร็จสมบูรณ์

5. สภาพแวดล้อมของห้องปฏิบัติการ

ต้องเป็นสภาพห้องที่แห้ง อุณหภูมิ 25 องศา เพื่อถนอมเลเซอร์ที่ใช้งาน มีการบันทึกข้อมูลสภาพแวดล้อมในเอกสาร บันทึกการควบคุมสภาพแวดล้อมประจำห้องปฏิบัติการ (FM-RIC-OP02-01)

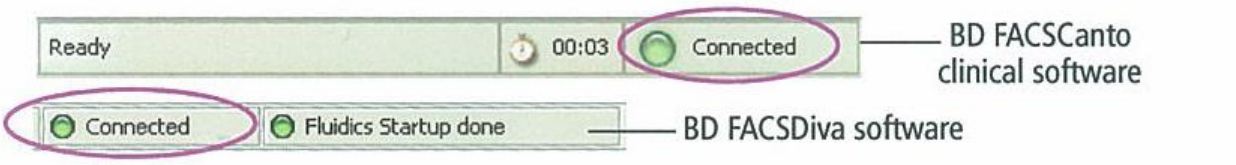
6. ขั้นตอนการปฏิบัติงาน (PROCEDURE)

BD FACSCanto II

เปิดเครื่อง → QC เครื่อง→ปรับตั้งตัวอย่าง →เก็บข้อมูล→วิเคราะห์ข้อมูล→ปิดเครื่อง

การเปิดเครื่อง

1. เปิด Breaker
2. เปิดเครื่องสำรองไฟ
3. เปิด เครื่อง FACSCanto II (Main power)
4. เปิด Computer HP XW4600
5. เปิดหน้าจอ Monitor
6. เข้าโปรแกรม FACSCanto Software หรือ FACDiva Software รอจนกระทั่งเครื่องมีการเชื่อมต่อกับ Computer * หากเครื่องยังไม่มีการเชื่อมต่อกันให้เลือก Cytometer> Connect * เครื่องจะแสดงดังนี้



7. ตรวจเช็คระบบน้ำยาที่ใช้กับเครื่องดังนี้เลือก Cytometer> Status เช็คน้ำยาว่าพร้อมใช้งานหรือไม่จาก Software โดยดูจากระดับที่แสดงในหน้าจอ Computer * ระดับของ Waste ควรจะอยู่ระดับต่ำ ไม่ควรเกิน ¼ ของถัง* ส่วนระดับอื่นๆ ควรจะมีมากกว่า ¾ ของถัง*

8. เอาหลอดตัวอย่างที่อยู่ใน ที่วางตัวอย่างออก (SIT, sample injection tube) หลังจากนั้นเข้าโปรแกรม Fluids start up procedure Choose>Cytometer> Fluidic start up> click start

(* เป็นการล้างเครื่องก่อนการใช้งานและไล่อากาศที่อยู่ในท่อสายยางต่างๆ)

9. ทำการไล่ฟองอากาศใน Flow cell อีกครั้ง โดยเลือก Cytometer> De gas รอจนกระทั่งเครื่องแสดงดังนี้
10. หลังการทำการเปิดเครื่องเสร็จสิ้นก็สามารถทำการวัดตัวอย่างได้

การปิดเครื่อง BD FACSCanto II

1. ใช้หลอดที่มี BD FACSClean solution หรือ 1-2% Hypocholite แล้ว Click >Acquire Data
2. ให้ทำประมาณ 5 นาที หลังจากนั้นให้ Click> Stop Acquiring เอาหลอดออก
3. ทำตามข้อ 1 และ 2 โดยใช้น้ำบริสุทธิ์ (DI water)
4. เข้าขั้นตอนการล้างก่อนการปิดเครื่องโดย เลือก Cytometer> Fluidics Shutdown *ในขั้นตอนนี้จะต้อง เอาหลอดตัวอย่างออกจาก SIT ทุกครั้ง*
5. หลังการทำ Fluidics shutdown เสร็จสิ้นแล้ว
6. ปิดหน้าจอ Monitor
7. ปิด Computer HP XW4600
8. รอประมาณ 5 นาที ปิด เครื่อง FACSCanto II (Main power)
9. ปิดเครื่องสำรองไฟ
10. ปิด Breaker

การกำจัดของเสียและสารอันตราย

Waste หรือของเสีย หรือสารอันตรายจากการวิเคราะห์จากเครื่อง สาร Waste ดังกล่าวที่ผ่านการวิเคราะห์เก็บตัวอย่างจะถูกเก็บลงในถังเก็บ Waste โดยเฉพาะ ทุกครั้งเมื่อถัง Waste เต็ม จะมีสัญญาณเตือน บนหน้า software ของระบบ *ระดับของ Waste ควรจะอยู่ระดับต่ำ ไม่ควรเกิน ¼ ของถัง* ส่วนระดับอื่นๆ ควรจะมีมากกว่า ¾ ของถัง* โดยจะต้องนำทิ้งทันทีลงอ่าง/ซิงค์ ซึ่งจะไปรวมในถังจัดเก็บของเสีย สารอันตรายของคณะเทคนิคแพทย์ จะมีการรวบรวมและกำจัดของเสียปีละ 1-2 ครั้ง จากบริษัทเอกชน ตามรอบการกำจัดของเสียและสารอันตรายจากห้องปฏิบัติการวิจัย

การควบคุมคุณภาพเครื่อง Quality Control for FACSCanto II

1. การควบคุมคุณภาพเครื่องโดยใช้โปรแกรมอัตโนมัติในโปรแกรม FACSDiva software โดยใช้น้ำยา CS&T bead kit
2. สามารถทำได้ 2 แบบดังนี้

2.1 ในกรณีเปิดกล่องใหม่น้ำยาจะต้องทำ Base line performance โดยเตรียมน้ำยา FacsFlow Sheath Fluid ปริมาณ 500 ไมโครลิตร หยด CS&T bead จำนวน 3 หยด

2.1.1 เข้าโปรแกรม FACSDiva Software >Cytometer>CST...

2.1.2 ในเมนู Characterize เลือก Check Baseline

2.1.3 Set up bead ให้เลือก Lot ID: .....เลือกใส่ N. lot.....

2.1.4 กด Run รอจนกระทั่งเครื่องทำการปรับตั้งแบบอัตโนมัติจนเสร็จสิ้น

2.1.5 สั่ง พิมพ์ รายงานผลสำหรับ Baseline performance

2.2 หากเป็น น้ำยาตัวกล่องเดิม ให้ทำเฉพาะ Check performance แบบ Daily ดังนี้

2.2 .1 ใช้หลอดขนาด 12x75 mm เตรียมน้ำยา FacsFlow Sheath Fluid ปริมาณ 350 ไมโครลิตร หยด CS&T bead จำนวน 1 หยด

2.2.1 เข้าโปรแกรม FACSDiva Software >Cytometer>CST...

2.2.2 ในเมนู Characterize เลือก Check Performance

2.2.3 ตรง Set up bead ให้เลือก Lot ID: .....

2.2.4 กด Run รอจนกระทั่งเครื่องทำการปรับตั้งแบบอัตโนมัติจนเสร็จสิ้น

2.2.5 สั่ง พิมพ์ รายงานผลสำหรับ Performance เครื่อง

การปรับตั้งเครื่องสำหรับตัวอย่างการทดลอง

(Optimizing Cytometer Setting: BD FACSDiva Software)

ก่อนการวัดตัวอย่างจะต้องมีการปรับตั้งเครื่องสำหรับแต่ละการทดลองโดยทำการปรับ PMT Voltage, Compensation และ Threshold ของ Fluorochrome นั้นๆ และจะต้องมีการเตรียมตัวอย่างเพื่อการทำ Automatic Compensation ดังนี้

ตัวอย่างกรณีทำ 2 แค่สีเช่น FITC และ PE ให้ทำการย้อมสีสำหรับตัวอย่างเป็นแบบ Single color และ Unstained control คือ หากไม่มีตัวอย่างเลือดให้ใช้ Compensation bead แทนตัวอย่างเลือด

หลอดที่ 1 Unstained sample

หลอดที่ 2 FITC sample

หลอดที่ 3 PE Sample

หลอดที่ 4 Mixed stain sample

หากมีการใช้ Fluorochrome มากกว่าสอง Flurochrome ให้ย้อมตามจำนวนที่ใช้

การเข้า Software เพื่อทำการ Compensation ใน FACSDiva Programe

1. ใน Menu Bar ให้ Choose instrument>Instrument configuration เช่น เลือก 4-2-2 configuration Click set และ Click OK
2. สร้างชุดการทดลองขึ้นมาใหม่ ที่ Brower>new folder> Rename the folder
3. สร้าง Experiment โดยเข้า Experiment>Create Experiment ให้เลือก

2.1 Blank Experiment หรือ

2.2 Blank Experiment with Sample tube

- สำหรับ Experiment ที่สร้างขึ้นมาใหม่ จะมีค่าปรับตั้งที่ทำแล้วของ Instrument setting มี Global worksheet ขึ้นมาด้วย *

4. เลือกเฉพาะ Parameter ที่ต้องการทำในการทดลองนั้น Click inspector window>Parameter tab เลือก FSC, SSC, FITC, PE, และ/หรือ (Per Cy 5.5, APC, PE- Cy 7, PerCP) โดยใช้ ปุ่ม Add หรือ Delete
5. ทำการปรับชดเชยแสงโดยอัตโนมัติ โดยใช้ Software
6. Choose Experiment >Compensation control> Create Compensation Controls > OK *ในขั้นตอนนี้สามารถเพิ่มหรือลดจำนวน Parameter ได้ *
7. โปรแกรมจะสร้างจำนวนหลอดทดลองขึ้นมาใน Compensation Control ดังนี้
   - Unstained control
   - FITC Stained control
   - PE Stained control
8. Click ที่ หลอด Unstained control ให้ปุ่มไฟเป็นสีเขียว(แสดงว่ามีการทำการวัดตัวอย่างนั้นอยู่) หลังจากนั้นให้ Click Acquire ปุ่มไฟจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ให้ปรับThreshold, FSC และ SSC จนกระทั่งเห็นเซลล์ที่ต้องการวัด และเลื่อน Gate region ให้มาครอบคลุมเซลล์ที่เราสนใจ
9. Click ที่ Gate region โดยใช้ Mouse Click ขวา >Apply to all compensation control

10. การปรับตั้ง Fluorescence PMT โดยใช้หลอด Unstained control ปรับค่าของ PMT Voltage ของ FITC และ PE ให้อยู่ใน Negative Quadrant
11. นำหลอดที่ย้อม Mixed sample ปรับตั้งค่าให้ FITC และ PE อยู่ใน Quadrant Scale ของ Positive (Click ที่หลอด FITC Stained control และ หลอด PE Stained control)
12. นำหลอด Unstained control มาใส่ใน SIT อีกครั้ง Click Acquire รอประมาณ 5 วินาที แล้ว Click Record รอจนเครื่องวัดจนครบจำนวน (~5000 events)
13. Unload แล้ว Click next tube
14. นำหลอด FITC Stained control ใส่ทำตามข้อ 12-13
15. นำหลอด PE Stained control ใส่ทำตามข้อ 12-13 ในกรณีที่มี Fluorochorme single stain มากกว่านี้ให้ทำไปจนครบ
16. หลังจากทำครบทุกหลอดสามารถสั่งให้คำนวน Compensation อัตโนมัติ Choose Instrument> Instrument Set up>Calculate Compensation
17. ตั้งชื่อการทดลองที่ต้องการ Save>OK (ให้เลือก Link and Save เพื่อให้ค่า Compensate ที่ทำเสร็จแล้ว Link ไปยัง Sample ของชุดการทดลองที่ต้องการวัด)

การวัดตัวอย่าง Setting Up the Experiment

1. ใน Brower Elements
2. สร้าง Experiment
3. สร้าง Worksheet

หลังจากการทำ Compensation Control แล้วเราสามารถทำต่อได้โดย

18. Click the new Specimen, Add tube ลงในชุด Specimen
19. Click ที่ Specimen เปลี่ยนชื่อตามที่ต้องการ เช่น Test Sample
20. Click (+) ที่ Specimen จะปรากฏจำนวน Tube ที่เราเพิ่มลงไป
21. ให้เปลี่ยนชื่อ Tube ที่เราตามต้องการ เช่น 2 color_001 *ในกรณีที่มี ตัวอย่างเหมือนกันหลายหลอดเราสามารถ Click next tube บน Brower จะแสดงเป็น 2 color_002, 2 color_003 เป็นต้น
22. เลือกขยาย Global worksheet โดยการ Click ที่เครื่องหมาย(+) แก้ไขชื่อตามที่เราต้องการ

(การสลับระหว่าง Global worksheet กับ Normal worksheet ให้ Click Menu bar รูปหน้ากระดาษ Worksheet toolbar)

การใส่รายละเอียดของหลอดตัวอย่างใน Experiment Layout

23. Click Experiment>Experiment Layout
24. ให้ใส่รายละเอียดในแต่ละ Parameter ของแต่ละหลอด เช่น Reagent label ของ FITC, PE ,PerCP Cy5.5
25. ใส่จำนวนที่ต้องการเก็บข้อมูลใน Acquisition และ Keyword

การสร้าง Worksheet ใน Global Worksheet

26. สร้าง Dot plot ระหว่าง FSC กับ SSC และ FITC กับ PE จัดรูปกราฟให้เหมาะสม
27. นำหลอดตัวอย่างใส่ใน SIT นำ Mouse ให้อยู่ในตำแหน่งของหลอดที่ต้องการวัด
28. สั่ง Click Acquire ในเมนู Acquisition Dash board
29. เลือกกลุ่มเซลล์ที่สนใจ โดยสร้าง Gate region ให้ครอบคลุมกลุ่มเซลล์ (P1)
30. เลื่อนหัวลูกศร ไปวางไว้ที่ Dot plot กราฟที่เราจะศึกษา Click ขวาของ Mouse แล้วเลือก Show Population>P1 กราฟจะแสดงเฉพาะกลุ่มเซลล์ที่อยู่ใน P1 region
31. หลังจากได้กลุ่มเซลล์ที่ต้องการรอประมาณ 5 วินาที แล้วสั่ง Record เพื่อเก็บข้อมูลของหลอดตัวอย่างนั้นๆ
32. เมื่อเครื่องได้ทำการเก็บข้อมูลจนครบหลอดตัวอย่างจะกลับมาอยู่ตำแหน่งเดิม นำหลอดตัวอย่างออก นำหลอดอย่างอันใหม่ใส่ใน SIT แล้ว Click> Next Tube >Acquire
33. เมื่อพบเซลล์ที่ต้องการรอประมาณ 5 วินาที > สั่ง Record
34. ทำตามข้อ 32-33 จนกระทั่งครบจำนวนหลอดตัวอย่างที่ต้องการวัด

การวิเคราะห์ข้อมูล (Analysis Data)

1. เปิด Experiment ที่ได้ทำการเก็บข้อมูลไว้แล้ว Brower
2. เปิด Specimen (+) ที่เก็บข้อมูลของหลอดตัวอย่างต่างๆ
3. สร้าง new Global worksheet ใน Global worksheet folder (ในกรณีนี้จะมี 2 Global worksheet
   3.1 Global worksheet อันแรกใช้สำหรับเก็บข้อมูลตัวอย่าง
   3.2 Global worksheet อันที่สองใช้สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลตัวอย่าง
4. เปลี่ยนชื่อ (Rename) Global worksheet ให้เป็น Analysis Data หรืออื่นๆ

5. สร้างกราฟตามจำนวน Fluorochorme ที่ใช้ในหลอดตัวอย่าง (ในกรณีนี้ใช้ FITC กับ PE)

   5.1 FSC-A กับ SSC-A dot plot

   5.2 FITC-A กับ PE-A dot plot

   5.3 FITC และ/หรือ PE Histogram (กราฟ Histogram ขึ้นอยู่กับข้อมูลที่ผู้วิเคราะห์ต้องการจะใช้หรือไม่ใช้ก็ได้

6. เลือกหลอดตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ กด Click (Click pointer at Tube) กราฟข้อมูลจะแสดงขึ้นมาใน Global worksheet 2
7. Clickที่รูป Gate (Polygon gate, Autopolygon gate, Rectangle gate) แล้วเลือกกลุ่มเซลล์ที่ต้องการวิเคราะห์ในกราฟของ FSC กับ SSC (หรือกราฟอื่นๆที่ใช้ในการเลือกกลุ่มเซลล์)โดยครอบให้คลุมพื้นที่เซลล์ที่จะวิเคราะห์ทั้งหมด
8. เลือกให้กราฟที่สองที่ (5.2 FITC-A กับ PE-A) Click ขวาที่ขอบกราฟแล้วให้แสดงเฉพาะ P1
9. หลังจากนั้นให้ ใส่ Quadrant ระหว่างกลุ่มเซลล์ต่างๆ เพื่อแบ่ง Positive cell กับ Negative cell ออกจากกัน
10. สามารถหาค่าทางสถิติ โดย Click ขวาที่ขอบกราฟ >Create Statistic view

    10.1 สามารถแก้ไข การแสดงค่าต่างๆ ได้ใน ผลทางสถิติที่ได้ (Statistic view) โดยการ Click ขวาที่ขอบกราฟ > Edit Statistic view เปลี่ยนแปลงการแสดงค่าต่างๆ ที่ต้องการให้แสดงและไม่ต้องการให้แสดงในหน้านี้ หลังจากเสร็จสิ้น Click>OK

    Header: Choose Experiment Name, Record date, and $OP(Operator)

    Population : Choose # Event, %Parent, and % Total for each population

    Statistic: Deselect all fields

11. เลือกหลอดอื่น ๆ เพื่อทำการวิเคราะห์จนครบจำนวนหลอดตัวอย่าง
12. หากไม่มีการวัดชุดการทดลองอื่นๆ ให้เข้าระบบเพื่อปิดเครื่อง (ทำตามเมนูปิดเครื่อง)