

DNA 分析入門指引

學習本章後應能夠：

- 真實細胞之 DNA 染色技術 (PI 或 7-AAD)。
- 用 CellQuest 從流式細胞儀收取 DNA 樣本。
- 用 ModFit LT 分析 DNA 資料。
- 檢驗實驗報告的可信度。

1. CELLQuest 軟體

1.1 概述

細胞周期分析是細胞生物學、腫瘤學等學科重要的研究及檢測指標，大量的文獻已證實，DNA 細胞周期的分析對反映一個細胞群體的增殖活性具有重要意義，尤其對腫瘤細胞周期的分析，不僅有助於研究藥物的作用機理，指導用藥；還可檢測治療的反應及評價預後。

以 FACS 流式細胞儀進行 DNA 分析，使用者需運用 CELLQuest 軟體進行資料收取，再應用 ModFit LT 軟體來從事 DNA 資料分析。

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。

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。

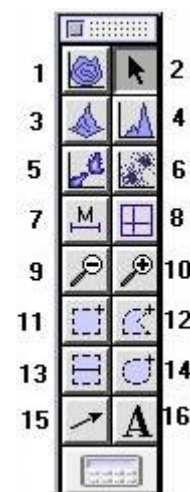
1.1.3 從收取到分析 (Acquisition→Analysis)

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？ 45kb，若 1024 道解析度則文件大小？ 85kb。



1.3.2 CellQuest 實驗文件：

您設置的圖、region、gate、統計(statistics)、markers、文字、? 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、分析和收取到分析。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。



1.4 CellQuest 的儀器控制：

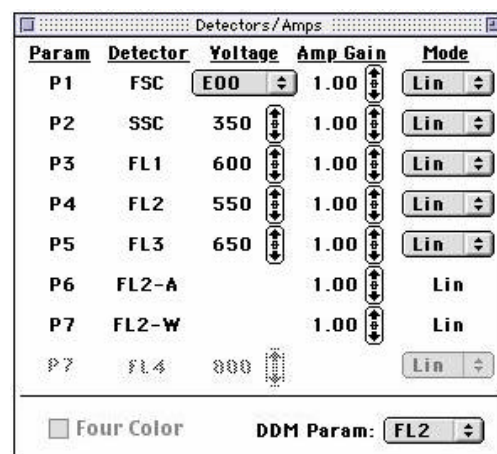
在 CellQuest 軟體中，儀器的控制選單位於 Cytometer 功能表中。用 CellQuest 進行 DNA 分析中，應用陰性對照組進行儀器條件設置。陰性對照可用未加藥物處理組。它將用於調節 FL2-H FSC、SSC 探測器、FL2-H 閾值、FL2-W 放大器、設單一細胞區 region。

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，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 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 $\uparrow\downarrow$ 來選擇或直接拖動滑標上下移動。

放大器 (Amp Gain):

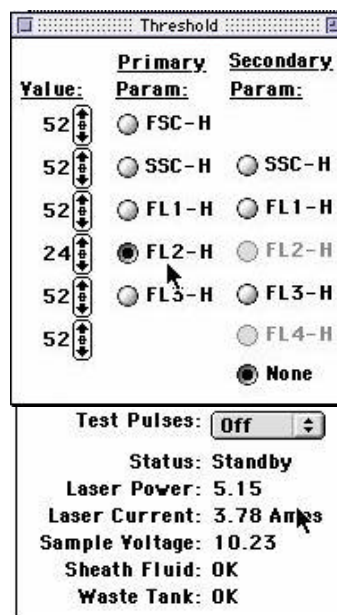
可對信號進行微調。對 FSC、SSC、FL1、FL2、FL3 可設置放大模式和放大增益。DNA 分析一般採用 Lin (線性)放大模式，放大器的增益可在 1 - 9.99 之間調節。可通過點擊↑↓來選擇或直接拖動滑標上下移動。

DDM 功能:

DDM 功能用於同時檢測 DNA 信號脈衝寬度和面積，以區別團塊和形狀異常的核。

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。每次只能有一個設閾參數(FSC、SSC、FL1、FL2、FL3)，在 DNA 分析中常用 FL2-H，閾值可定在 24。可通過點擊↑↓來調整閾值高低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？ 生的信號、或 ALL：所有探測器上？ 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，? 15mW；在 Standby 時，? 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。

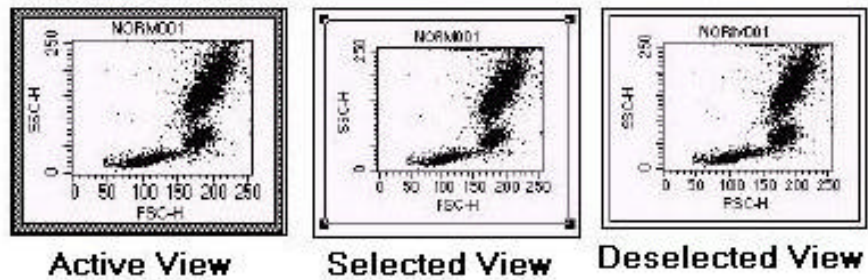
樣本電壓：顯示樣本壓力和鞘液壓力之間的差異。當插上樣本管于上樣區時，樣本壓力和鞘液壓力之間的差異增加，該樣本電壓降低。

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。

2. 調試 FACS Calibur 細胞儀

在此練習中，您將：

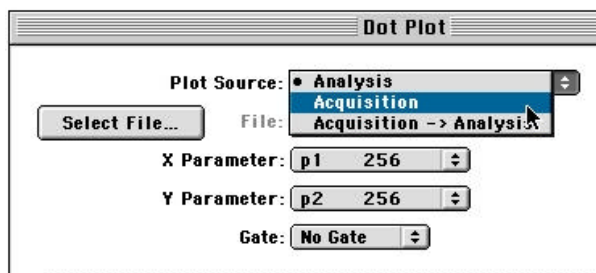
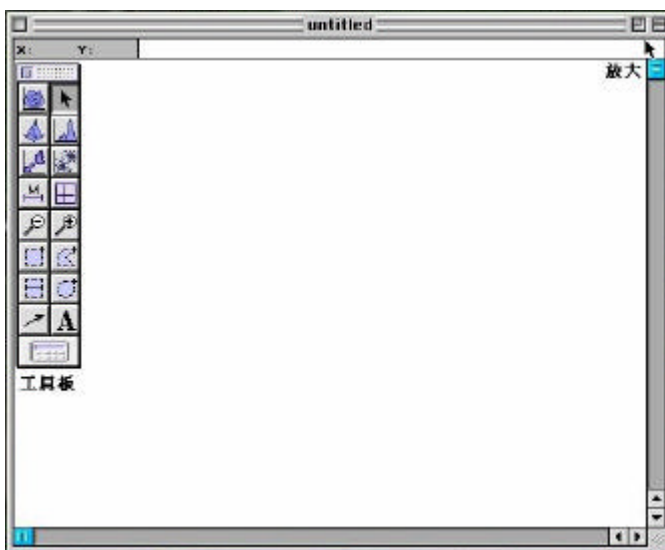
- 建立 CellQuest DNA 實驗文件。
- 調節 FL2-H 探測器和 FL2-H 閾值。
- 調節 FL2-W 放大器
- 畫單一細胞區、設門。
- 調節 FSC、SSC 探測器。

2.1 調試最佳化儀器設置

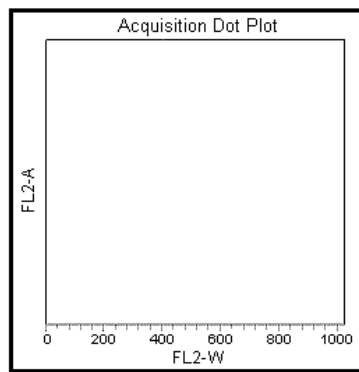
按上述步驟進行最佳化，需準備下列樣本：

- (1) Human PBMC (不加藥物處理)
- (2) Tumor Cell Line。

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 動軟體。
3. 點擊實驗文件的右上角的放大鈕，將實驗文件方框放大。
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。



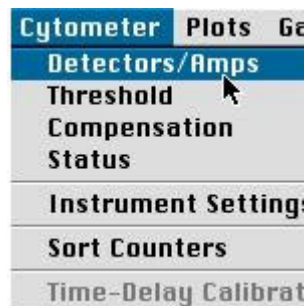
6. 點擊 Plot source (散點圖來源), 從 Analysis 改成 Acquisition (收取)。
7. 選擇 X 參數為 FL2-W 1024、和 Y 軸 FL2-A 1024。
8. 在? 色方框中點擊 Multicolor Gating. (收取樣品時, 門內細胞將出現? 色)。
9. 點擊 OK。出現 FL2-W/FL2-A 散點圖。



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 方框。將其拖至空白區。
12. 從 Cytometer 功能表中選擇 Threshold。出現 Threshold 方框。將其拖至空白區。



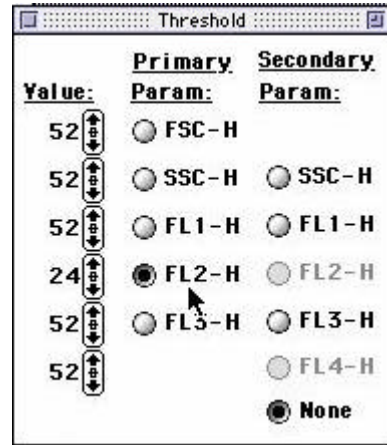
Param	Detector	Voltage	Amp Gain	Mode
P1	FSC	E00	1.00	Lin
P2	SSC	350	1.00	Lin
P3	FL1	600	1.00	Lin
P4	FL2	550	1.00	Lin
P5	FL3	650	1.00	Lin
P6	FL2-A		1.00	Lin
P7	FL2-W		1.00	Lin
P7	FL4	800		Lin

Four Color DDM Param: FL2

2.2 設閾參數與 DDM 參數

進行 DNA 含量分析時，設閾參數與 DDM 參數多為同一參數，如 FL2-H。

1. 在 Threshold 對話方框中，可選擇 FL2-H 參數來設定 Threshold (閾值)。一般進行 DNA 含量分析時，多以 FL2-H 即 DNA 含量為閾值，設定值 24 以去除氣泡與細胞碎片等低階雜訊外，亦可避免收入 DNA 已流失之細胞 (Ghost Cells)。



2. 在 Detectors/Amps 對話方框中，同時請確認 DDM 的

參數項為 FL2-H。並為 FL2-H 參數選擇其適當的倍增模式 (Mode)：Lin。(一般進行 DNA 分析時，FSC, SSC, 與 FL2-H 皆以線性模式 (Lin) 測量)。



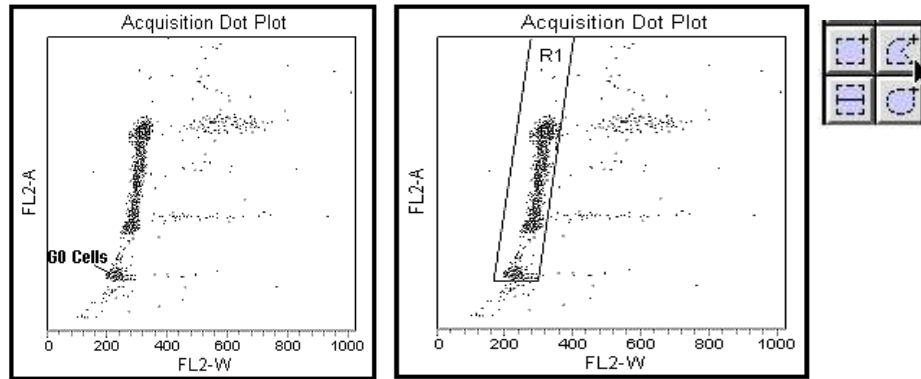
2.3 調節 FL2-H 探測器及 FL2-W 放大器

一般用陰性對照管來調。在 FL2-W/FL2-A 散點圖上，調節 FL2-H 電壓及 FL2-W 放大器增益是？了將單一細胞顯示在圖中。調節 FL2-H 閾值是？了去除碎片和噪音。

1. 用陰性對照組 (未受藥物處理) 樣品上機分析，使儀器處於 LO RUN。
2. 點擊 Acquisition Control 方框中的 Acquire (注意 Setup 前需打叉或打勾，即不儲存資料)。

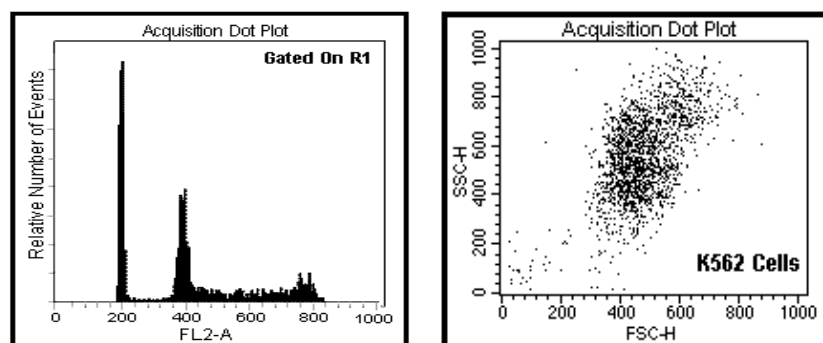


- 調節 FL2-H 電壓(一般在 400 左右), 觀察圖的改變, 注意 FL2-W/FL2-A 點圖上 G0/G1 細胞群著落的位置, 使它們的 FL2-A 訊號著落在道數 200 左右。再調整 FL2-W 放大器增益(Amp Gain 一般在 3.00 左右), 使該群細胞之 FL2-W 訊號也在道數 200 左右。



2.4 設置單一細胞 Region

- 如圖在 FL2-W /FL2-A 點圖上任一空白處輕點一下以選擇該圖, 在工具板中選擇多邊形的 Region, 然後在單一細胞族群周圍繪出區格線, 此為 R1 區域。在 Region 外點擊, 將 R1 拖至空白區。
- 移去陰性對照管, 點擊 Acquisition Control 方框中的 Pause。
- 我們要以 R1 區域來進行圈選, 即選擇性地只顯示著落在 R1 中單一細胞族群的 DNA 直方圖。從工具板中點擊直方圖圖示。
- 在實驗文件的空白區點擊, 然後拖動對角線至所需大小。出現直方圖對話方框。點擊 Plot source (直方圖來源), 選擇 Acquisition (收取)。
- 選擇參數為 FL2-A 1024。將其中 Gate:資料從 No Gate 改成 G1 = R1。
- 點擊 OK。出現 FL2-A 直方圖。



2.5 調節 FSC、SSC 的探測器

盡可能地清楚地顯示 FSC / SSC 的雙參數圖。製備較好的標本中，炎性細胞常可以和腫瘤細胞區分。此外此圖亦可區分開樣品中細胞碎片與聚集細胞，再用設閾值或用圈選方式去除。

1. 選擇散點圖。在實驗文件的空白區點擊，然後拖動對角線至所需大小。
2. 在出現的對話方框內選擇 X 軸：FSC-H 1024，Y 軸：SSC-H 1024。
3. 選擇 No Gate。在? 色方框中點擊 Multicolor Gating。門內細胞將出現? 色。
4. 點擊 OK。出現 FSC/SSC 散點圖。
5. 插上陰性對照管。
6. 點擊 Acquisition Control 方框中的 Restart。
7. 若必要，調節 FSC、SSC 的電壓（在 Detector/Amps 方框中），使這群細胞單獨成群，可與左下角細胞碎片區分開來。
8. 點擊 Acquisition Control 方框中的 Pause。
9. 移去陰性對照管。
10. 關閉 Detector/Amps 和 Threshold 方框。

2.6 DNA 分析典型的儀器設定

	Single Color	Two Color, FITC/ PI
Threshold Value	FL2-H 24	FL3-H 24
FSC PreAmp	E00 (Lin)	E00 (Lin)
SSC Voltage	350 (Lin)	350 (Lin)
FL1 Voltage	-	450 (Log)
FL2 Voltage	400 (Lin)	-
FL3 Voltage	-	350 (Lin)
FL2-A Amp Gain	1.00	-
FL3-A Amp Gain	-	1.00
FL2-W Amp Gain	3.50	-
FL3-W Amp Gain	-	3.00
FL1 – % FL2	0.0%	0.0%
FL2 – % FL1	0.0%	0.0%
FL2 – % FL3	0.0%	0.0%
FL3 – % FL2	0.0%	0.0%

3. 收取細胞 DNA 資料

在此練習中，您將：

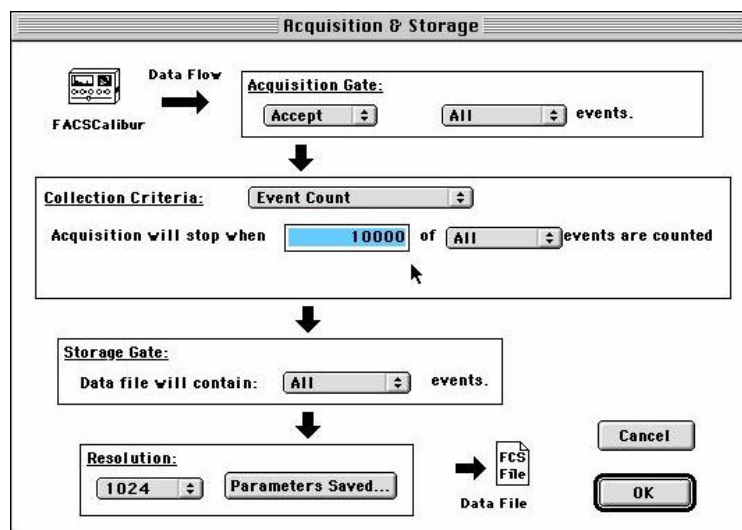
- 設定 Acquisition (收取) 和 Storage (儲存) 的條件。
- 設定文件儲存參數
- 儲存實驗模板文件。
- 儲存儲存、恢復儀器設置
- 收取細胞資料
 - Tumor Cell Line
 - Human PBMC
 - Tumor Cells/ PBMC Mixed Sample



3.1 設置 Acquisition & Storage 方框

在此方框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。

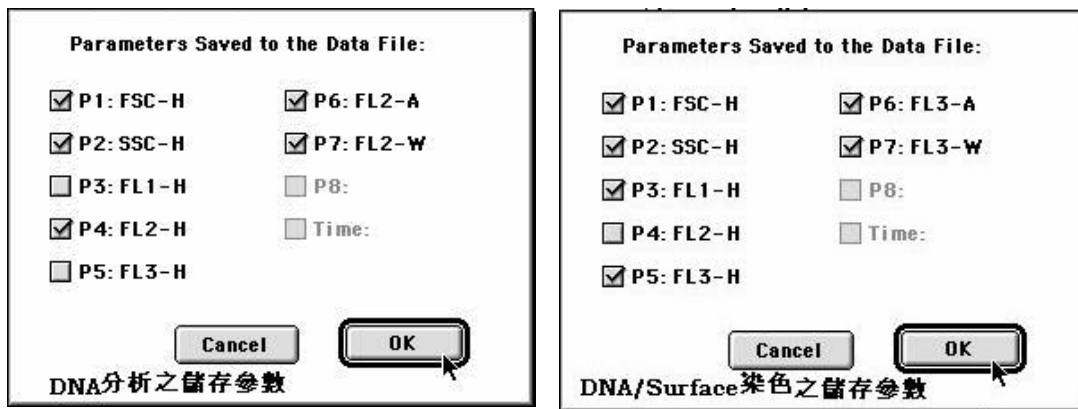
1. 從 Acquire 功能表中選擇 Acquisition & Storage，出現 Acquisition & Storage 方框
2. 在 Acquisition Gate 中選擇預設設置：Accept All。亦即是螢幕上接受所有細胞的資料。
3. 在 Collection Criteria 中選擇定時設置：預設值為 10000 of All，即收取 10000



個細胞，含氣泡與其它細胞雜訊，建議改為 10000 of G1=R1，即收取 10000 個位於 R1 區域中細胞，不計算氣泡與其它細胞雜訊。

4. 在 Storage Gate 中選擇預設設置：預設值為 All，即收取所有細胞。
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。

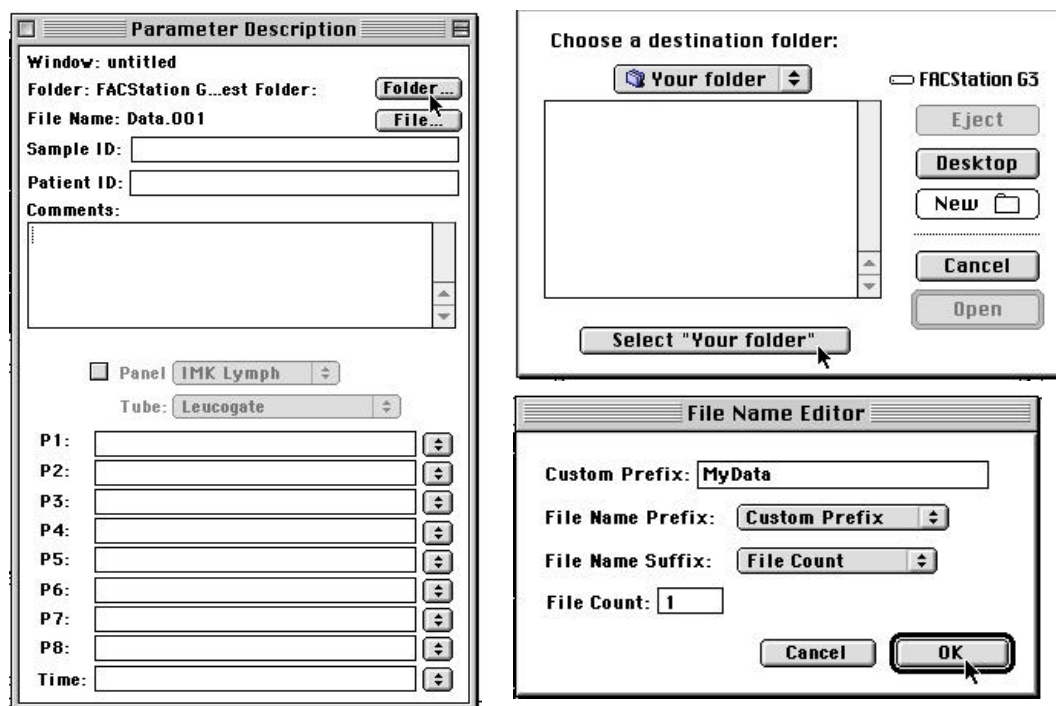
7. 只有被選參數才儲存在 Data file 中。若單色分析，FSC-H、SSC-H、FL2-H、FL2-A、FL2-W 需儲存。



8. 點擊此對話方框的 OK。
9. 點擊 Acquisition & Storage 方框的 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」。點擊此對話方框的 Select「Your Folder」。

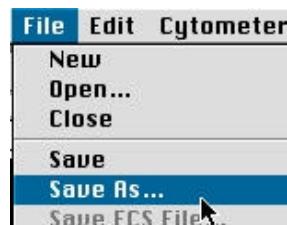


3. 點擊 Parameter Description 對話方框的 File，出現檔案名編輯方框。
4. 在 Custom Prefix 中：輸入檔案名 DnaData。
5. 在 File Name Suffix 中選擇 File Count。
6. 在 File Count 中：確認輸入的？ 1（如此 CellQuest 會依序以 .001, .002 為附加檔名）
7. 點擊此對話方框的 OK。
8. 在 Parameter Description 對話方框中可輸入您想保存的 Patient ID，Sample ID，Comments 等資訊。
9. 選擇或輸入所有參數名
 - 選擇：點擊右側的箭頭，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：/DNA Acquire），點擊 Save。

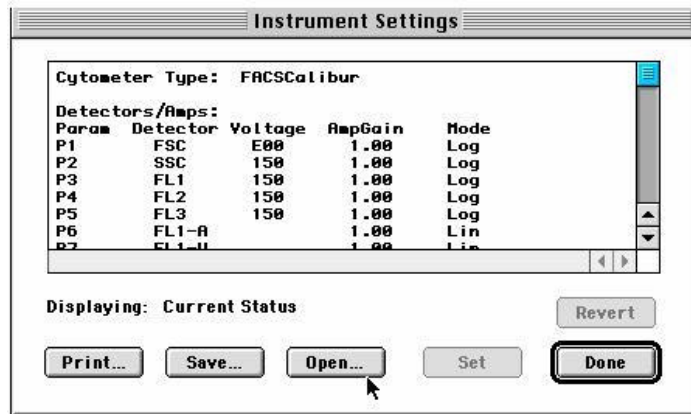


3.4 儲存、恢復儀器設置

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 方框。
2. 點擊 Save，出現文件保存對話方框，選擇文件目錄及檔案名，點擊 Save。
3. 點擊 Print，列印儀器設置條件。
4. 在 Instrument Setting 方框中點擊 Done。



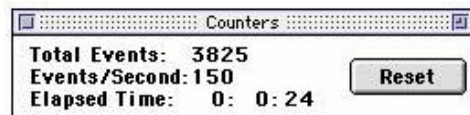
3.4.2 恢復儀器設置

1. 從 Cytometer 功能表中選擇 Instrument Setting。出現 Instrument Setting 方框。
2. 點擊 Open，出現文件打開對話方框，選擇文件目錄及檔案名，點擊 Open。
3. 在 Instrument Setting 方框中點擊 Set，待地球轉完消失後，點擊 Done。

3.5 用預設實驗文件來收取資料

在此將用 DNA Acquire 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. 從蘋果選單中啟動CellQuest。從螢幕上方 File 指令欄中，選取 Open，開啟硬碟中已建立之 **Your Folder : /DNA 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，開啟 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 : /DNA 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 DNA 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，LO 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:DnaData.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。LO RUN，點擊“Acquire”便可啟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 DnaData.001，並會出現“啾”聲，CellQuest 會自動升幕附加檔名成 DnaData.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。

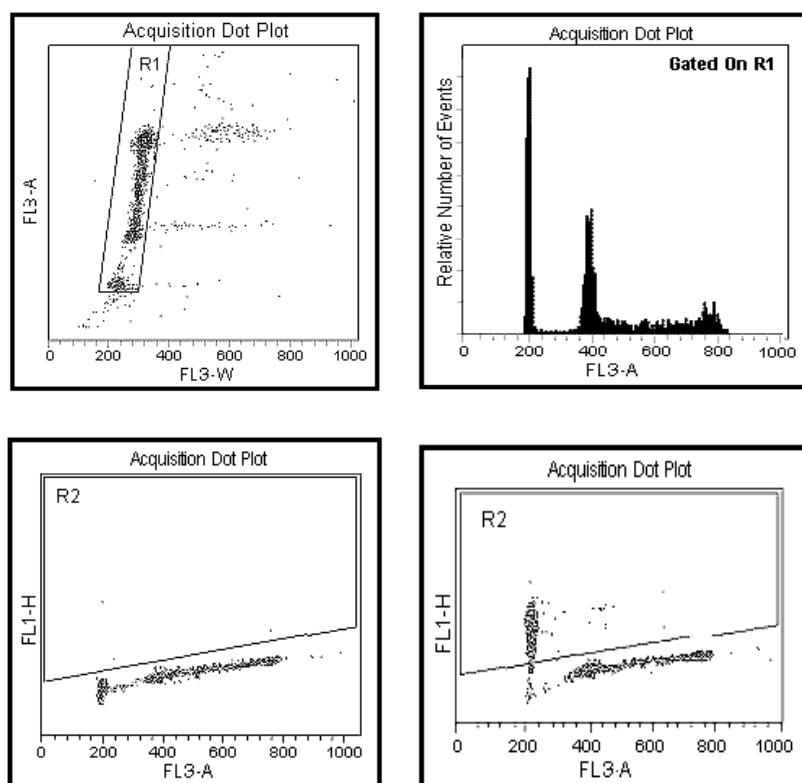


12. 分析完畢後用，用滑鼠從螢幕上方 Acquire 指令欄中，選取 Disconnect to Cytometer 以斷絕電腦與儀器間之連線。之後您可進行關機程序或接著分析已儲存的資料，列印圖表與報告。

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) 以 2 ml 0.5% Triton-X-100 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。
- (4) 同上，改用 2 ml DI water。
- (5) 按 STANDBY，樣品架上留約 1 ml DI water。
- (6) 退出軟體 “File” → “Quit” (永遠選擇 “Don't save”)
- (7) 關電腦 “Special” → “Shutdown”。
- (8) 務必等五分鐘後再關 FACSCalibur 電源，以延長雷射光源壽命。

3.6 雙色螢光 DNA 分析



4. 應用 ModFit LT 軟體分析 DNA 直方圖

4.1 概述

ModFit LT 是由美國 Verity Software House 公司設計，專門用於流式細胞術中進行細胞周期分析的軟體。它通過對 DNA 含量直方圖進行曲線擬合，能快速計算出分析細胞周期各時相細胞的含量、G1/S/G2+M 細胞的百分比，並測量腫瘤細胞的 DNA 指數 (DNA Index)、及析凋亡細胞亞二倍體所占的比例。此外，2.0 版本還增加了“同步化分析”和“增殖分析”的功能，可分別進行同步化細胞和增殖細胞的研究 (Synchronized or Drug-Perturbed Cells)，對於研究凋亡細胞生物學與藥理的同仁，實為一大利器。

本軟體有蘋果電腦與 PC Win98/NT 兩種版本，皆內建有 65 種數學模型，可彈性運用以因應不同的 DNA 直方圖分析。從事直方圖分析時，ModiFit LT 軟體允許使用者應用四種基本方式操作：(1) Automatic Analysis (2) Manual Analysis (3) Synchronization 精靈 (4) Proliferation 精靈。以下之範例練習可讓您熟悉 ModiFit LT 軟體的四種基本分析功能，我們將以四個已儲存之數據檔案來練習 DNA 直方圖之分析。這四個數據檔案之檔名及樣品資料如下：

檔案名	樣品
SampleLM.FCS	

4.2 自動分析

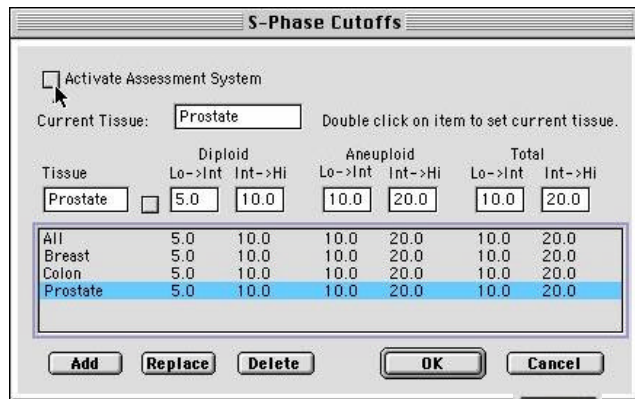
1. 從蘋果功能表下進入 **ModFit LT** 以啟動該軟體，並在隨後出現的對話方框上按 **OK**。

ModFit LT 軟體有一套 S 期評估功能，可以依照您所制定的範圍，評估該樣品中 S Phase 比例是屬於少量、中度或多量的，並在報告中顯示出可信度。軟體若還沒有被實驗室其他人設置過，那？當你進行分析時，將會出現一個關於 S 期評估的詢問方框，提供了 3 個選項：馬上設置 S 期的臨界值；以後再提醒我設置 S 期的臨界值；不需要啟動 S 期評估這項功能。若你需要這項評估，你必須輸入你們實驗室獲得的具有統計意義的各種組織的二倍體或者異倍體的 S 期的臨界值，如沒有，則不必啟動這項功能。



暫時關閉 S-phase 評估功能

2. 從 **Edit menu** 指令板中選擇 **S-Phase Cutoffs**，並將 Activate Assessment System 改成 ，以取消 S Phase 評估功能。軟體中雖有預設值，但各醫院醫檢師必須鍵入自定的範圍才能有真實的評估功能，因此軟體一般會在分析數據時，要求使用者“Entry your own S-Phase cutoff.”。在此練習中，我們先暫時關閉此一功能。



3. 按 **OK** 表示接受此一選項。

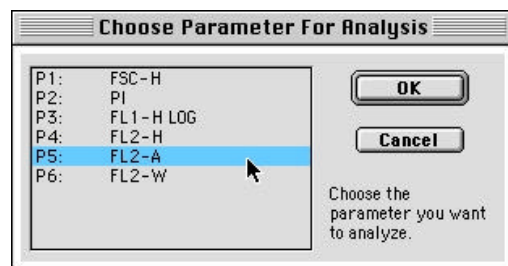
開啟一數據檔案

4. 在工具板中點擊 **File** 鈕以開啟檔案。並在隨後出現的 Open File 對話方框上尋找 **Sample1m.fcs** 數據檔案，路徑為 Mac HD:/BD Application:/ModFit folder，快按兩下以開啟該檔案匣。

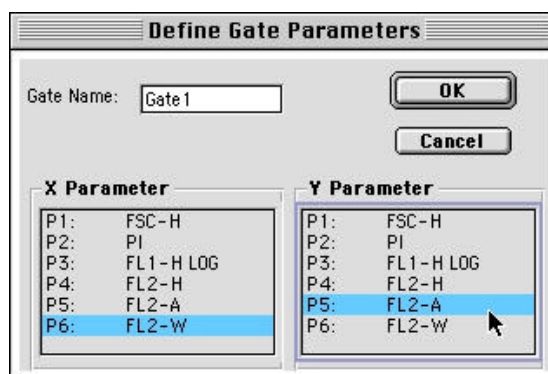
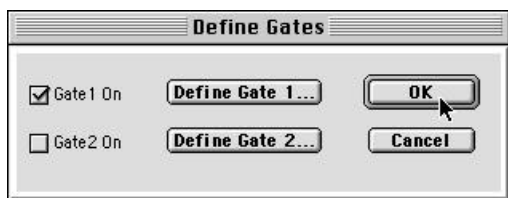


5. 選擇該檔案匣中 **SampleLM.fcs** 數據檔案，並選擇 **Open** 以載入此檔。

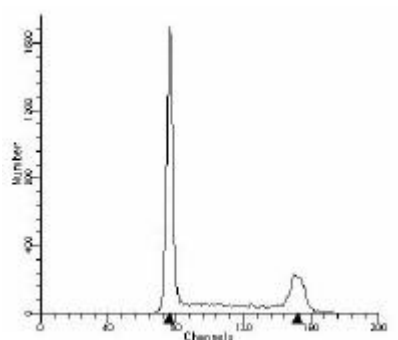
6. 在 **Choose Parameter For Analysis** 對話方框中選擇 **FL2-A** 為 DNA 參數，點擊 **OK**。



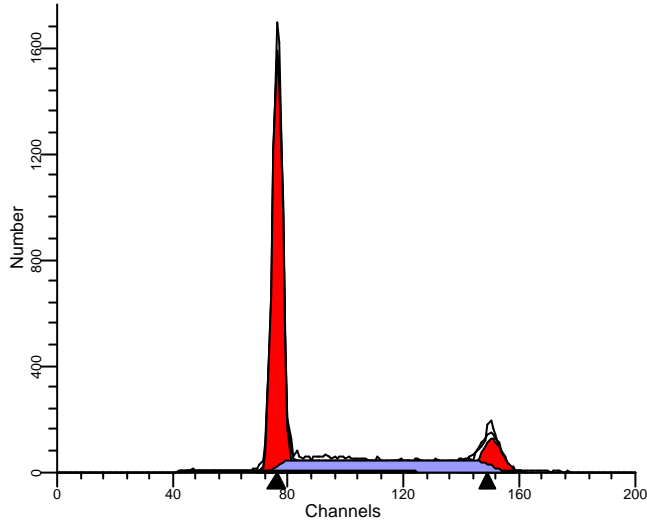
7. 如果想要圈選單一細胞，點擊 **Define Gate 1**。
8. 在隨後出現的 **Define Gate Parameter** 對話方框中選用 **FL2-W** 為 X 參數項，**FL2-A** 為 Y 參數項。點擊 **OK**。



9. 修改多角形區域以包含所有單一細胞（參考下頁之範本）。 點擊 **OK** 表示接受此一區域設定。
10. 再按一次 **OK**。軟體會從指定的磁碟中讀入 SampleLM 的 DNA 數據，我們已準備好了可以進行數據分析。



11. 在工具板中單擊 **Auto** 鍵。此指令要求軟體去執行自動分析功能。它會去掃描 DNA 直方圖，定出尖峰位置，確定倍體，選擇一最適合的數學函數來進行非線性的最小二乘法分析（non-linear least square analysis），最後顯示結果，而所有這些分析過程僅須幾十秒鐘的時間。



Date acquired: 18-Jan-1995
 File: Sample1m.fcs
 Source: sample1m.fcs
 Case: PATIENT ID
 Analysis type: Automatic analysis
 Prep: Fresh/Frozen

DIPLOID: 100.00 %
 Dip G0-G1: 61.14 % at 76.29
 Dip G2-M: 9.49 % at 150.53
 Dip S: 29.36 % G2/G1: 1.97
 Dip %CV: 2.24

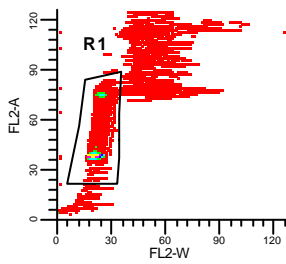
Total S-Phase: 29.36 %

Extra Pop: %
 Debris: 1.18 %
 Aggregates: 0.00 %
 Modeled Events: 11444
 RCS: 1.839

Diploid B.A.D.: 0.58 % no aggs

S-Phase Assessment:

Tissue Type: Breast
 Model type: Diploid
 Diploid S: High
 Calculated p-value: $p < 0.01$
 S-phase Boundaries: 5.1 and 10.0

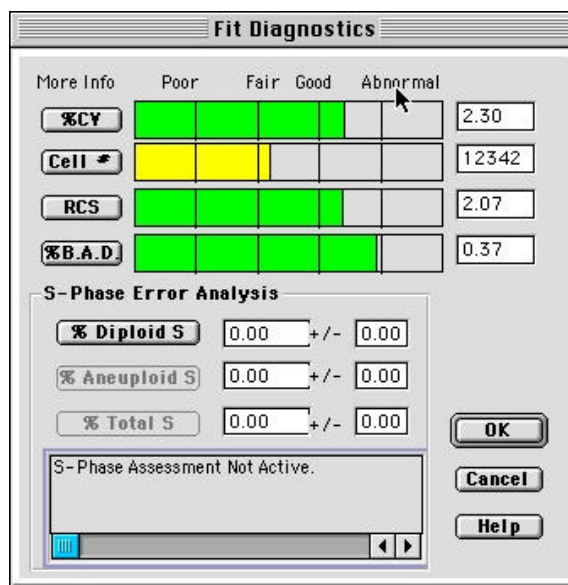


ModFLT1V20(Wk32)

12. 現在我們可以點擊工具板中的 **Diags** 鍵來檢查此一數據的可信度。 **Fit Diagnostic** 方框的上方顯示此一樣品的相關資料，含 %CV, Cell #, RCS, % BAD四項，並以圖表



告訴使用者這些值是 Poor/ Fair/ Good/ 或 Abnormal。 如果想讀這些分析的文字敘述可按 **% CV**, **Cell #**, **RCS**, **% Bad**功能鍵，這些評估的標準是依照 1993 年 DNA Consensus Conference Report 而定，可參考附件中的文獻 (Cytometry 14, P471-500, 1993)，讀完每個文字敘述時，可點擊 **OK**再看另一個文字敘述。



%CV, 指的是 G0/G1 期峰的 CV 值，最好<8%，對於實體組織來說，這個標準比較難達到，但應該盡可能達到，CV 值過大，不僅直接影響到 S 期所占比率的計算，還會給倍體的分析帶來困難，因? 有可能會掩藏了一個不正常的

峰；Cell #, 指的是用於擬合分析的細胞數，不能少於 10000 個；RCS, 是一個統計學上的指標，用來反應你所選擇的這個模式與你的標本的擬合程度，0.9-3.0? 比較好的一個範圍，而 3.0-5.0? 可以接受，小於 0.8 或是大於 5.0, 都被視? 不可接受；%B.A.D, 指的是背景中的碎片和聚集體所占的比率，需小於 20%。軟體選用不同的? 色來代表這些指標的好壞，綠色代表好，黃色代表還可以，紅色代表很差或不正常。

13. 如果您啟動了S期評估這項功能，軟體在Diags中還會進行二倍體，異倍體和總S期的錯誤分析，分別計算它們的標準偏差。一般而言，DNA直方圖的G0/G1峰愈寬，標準差較小，可信度較高，反之，G0/G1峰窄，則變異性高，標準差值變大，實驗數據之可信度變低。

14. 點擊 **OK** 來關閉 **Error Analysis dialog** 對話方框。

15. 點擊 **OK** 來關閉 **Fit Diagnostics dialog** 對話方框。大功告成。

16. 單擊工具板中的 **Report**，設置報告的形式。你可在報告中隨意添加圖形，箭頭，或是各種不同字體，不同? 色，不同大小的文字，? 了節省時間，你還可將設置好的報告以模版的形式保存起來，以後每一次進入ModFIT，就可以先打開報告，在模版的基礎上進行分析了。



17. 如需儲存或列印報告，單擊工具板中的 **Save** 或 **Print**。



4.3 自行設定條件分析

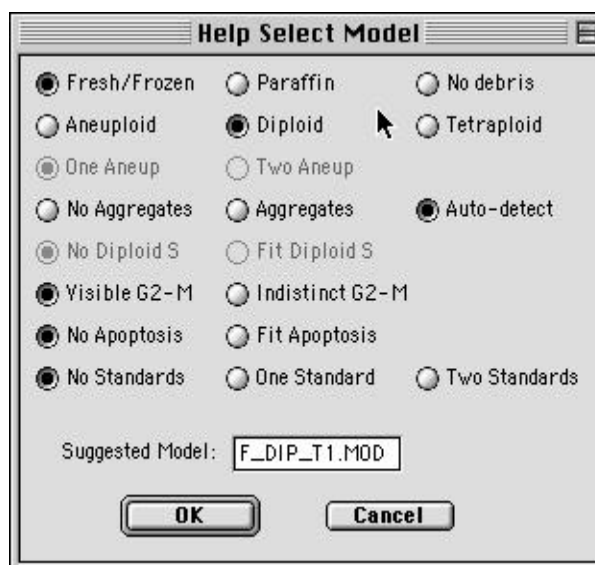
通常比較典型的樣本可使用自動分析；複雜的樣本不適合用自動分析。如果軟體在自動分析過程中無法正確確定峰值的位置或樣本的倍體型，或者您認為軟體自動分析結果不佳，您可以自行設定適合之數學函數模型，以及各細胞時期之範圍，以重行分析。

1. 在工具板中點擊File，選定所要分析的資料檔案，單擊Open。
2. 選擇用於DNA分析的參數：FL2-A。
3. 設門。軟體最多允許同時設兩個門，點擊Gate 1或2前的小方框，然後單擊Define the Gate，選擇合適的X軸和Y軸，將門移動到所要分析的細胞群上，單擊OK。
4. 單擊工具板中的Mod鍵。此時螢幕會出現一 **Help Select Model** 對話方框，在這個對話方框中需要你來描述你所得到的樣本的資訊，比如說，樣本的類型，有無異倍體等。每一個有關的資料都會影響到最終分析模式的選擇。



- > **Fresh/Frozen** 選擇碎片擬合的模式：新鮮/凍存，石蠟切片，沒有碎片（不進行碎片分析）；

- > 選擇倍體：異倍體，二倍體，四倍體；**Diploid**：樣品中只有一群細胞；**Aneuploid**：樣品中除了正常細胞外，含有異倍體腫瘤細胞。圈選此一選項應在One Aneuploid 或 Two Aneuploid 選其一；**Tetraploid**：樣品中除了正常細胞外，還有一群雙套細胞。



- > **No Aggregate/ aggregate** 選擇細胞


聚集體分析模式：用來告知軟體樣品中是否含有細胞團塊，如果您沒有把握，選 Auto-Detect（軟體自行判斷有無需要擬合聚集體）；

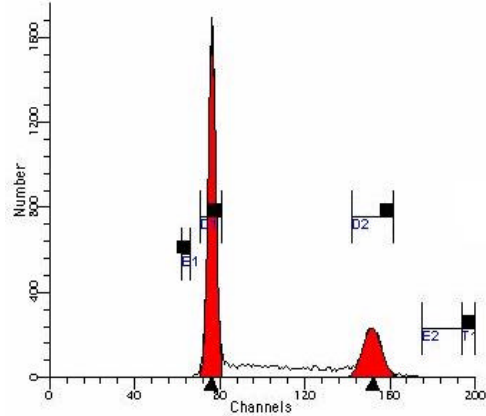
- > **No Diploid S/ Diploid**告知軟體在 Diploid 細胞族群中是否存在有 S Phase 細胞：如異倍體的 G0/G1 期峰與二倍體 G0/G1 期峰明顯分開，我們對每一個細胞周期的 S 期都能夠進行擬合，則選擇 **Fit Diploid S**；如異倍體的 G0/G1 期峰與二倍體 G0/G1 期峰靠得非常近，則選擇 **No Diploid S**；

- > **Visible/ Indistinct G2-M**：選擇能否看得見明顯的 G2/M 期峰（軟體將自動把 G2/M 期峰的位置固定在兩倍於 G0/G1 期峰的位置）；


- > **Fit Apoptosis/ No Apoptosis** 選擇是否擬合凋亡（告知軟體，DNA 直方圖第一個峰是 Apoptosis 造成的 Sub G1 峰）；

- >選擇有無標準參照物：No Standards, One Standard, Two Standards, 告知軟體樣品中，有摻入已知 DNA 含量的標準品，如雞紅血球，其預設位置為 DNA 圖中的首峰。；
- >根據這些資料，軟體選擇分析的模式並將其顯示在對話窗的下部；
- >單擊 OK 確認並關掉對話窗。

3. 按工具列上  的 Range 鈕 此時軟體會嘗試確認每個峰所在的位置，並將 Range 放置於不同的峰上，一般而言，這些定位範圍是不須調整的，如若軟體對於各個峰的確認不太正確，你可依下表移動 Range，將其放在正確的位置：



A1	腫瘤細胞之G0/G1峰；移動A1將其放置在異倍體G0/G1峰的中心位置。
A2	腫瘤細胞之G2/M峰；移動A2將其放置兩倍於異倍體G0/G1峰的道數，即異倍體G2/M期的位置。
D1	正常細胞之G1/G1峰；確認D1是否在二倍體的G0/G1期峰上，這個Range不一定將整個峰都包括在內，只要在峰的中心位置即可。
D2	正常細胞之G2/M峰；移動D2將其放置於二倍體G2/M期峰的中心位置或是兩倍於G0/G1期峰的位置。
E1	將E1放置在碎片峰的起始，應從原點延伸至首峰之根部。
E2	最後，需要將E2放在這個直方圖的最右邊，用來識別碎片的終止位置。
G1	第二群異倍體腫瘤細胞之G0/G1峰或雙套腫瘤細胞之G0/G1峰。
G2	第二群異倍體腫瘤細胞之G2/M峰或雙套腫瘤細胞之G2/M峰。
T1	如果DNA直方圖有T1出現，你可以不去移動它的位置，它只是用來啟動軟體分析聚集體的功能。
Apop	凋亡細胞之Sub-G1峰。

4. 這樣，各個Range都各就各位了，可以開始進行資料分析了。
5. 單擊工具板中的Fit鍵，軟體開始以最小二乘法來擬合曲線 (non-linear least squares fit)，並進行統計。 
6. 分析完畢後，你需要檢查一下分析圖，以確保分析模式很好地擬合你的樣本，如果不是，最好確定你的分析模式選擇是否恰當，以及Range的放置是否正確。
7. 此時可編輯報告形式、儲存、或列印報告。

4.4 Synchronization 同步化精靈

2.0 版本的 ModFIT LT 軟體增加了分析細胞系的同步化程度的功能。

先啟動軟體並暫時關閉 S-phase 評估功能：重複範例練習一之步驟 1-3.

開啟一數據檔案：重複範例練習一之步驟 4-10.

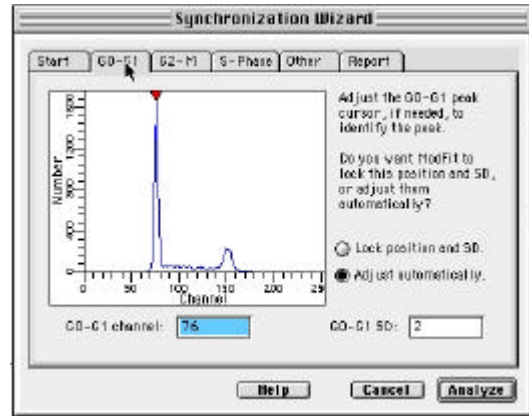
開啟 Synchronization 精靈

8. 打開 Analysis 功能表，點擊 Sync Wizard 鍵，選擇 Create or edit model 這時出現一個對話窗，引導你根據你的樣本的特殊性選擇不同的分析模式。
9. 首先你要選擇的是：重新建立一個同步化分析模式還是修改原有的模式；然後打開所要分析的樣本的原始資料。



分析模型之設定

10. 點擊工具板中的 G0-G1 鍵，確定 G0/G1 期峰的位置，以及標準偏差；軟體還允許你鎖定峰的位置或是在一定範圍內自動調節；
11. 點擊工具板中的 G2M 鍵，確定 G2/M 期峰的位置，或是 G2/G1 的比值；
12. 點擊工具板中的 S-Phase 鍵，選擇用於擬合分析 S 期的圖形的形狀、數目及圖形與圖形之間的時間；預設值為 5 個等聚的梯形函數。
13. 點擊 Other 鍵，選擇是否需要分析碎片和聚集體；
14. 點擊 Report 鍵，選擇報告的內容，例如是否報告所有部分的百分比，是否需要平均值，是否需要 G0G1 峰的 % CV，是否需要關於統計學方面的一些結果等等。
15. 我們現在可以開始進行資料分析了。再同步化精靈方框中點擊 **Analyze** 鍵，精靈便會依您所設置之擬合條件進行資料分析，報告應與前面圖例相類似。



調整分析用模型

如果您覺得分析的結果不完美，可以改變分析用數學模型。假定您希望三個S-Phase函數來定量早、中、晚 S 期細胞比例，並且改用梯型函數，而非長方型函數來分析數據，你可以修改。

20. 點擊精靈工具板上第二鍵，**Synchronization Wizard dialog** 會出現。On the **Start** tab, the Wizard has switched from **Create** to **Edit the current synchronization model** automatically. 可以改變分析用數學模型。



21. 點擊 **S-Phase**
22. 將 **Number of Compartments** 從 **5** 改成 **3**，再點擊 **Analyze** 鍵，軟體會重新分析資料，產生報告（新報告中 S 期細胞只有三組）。

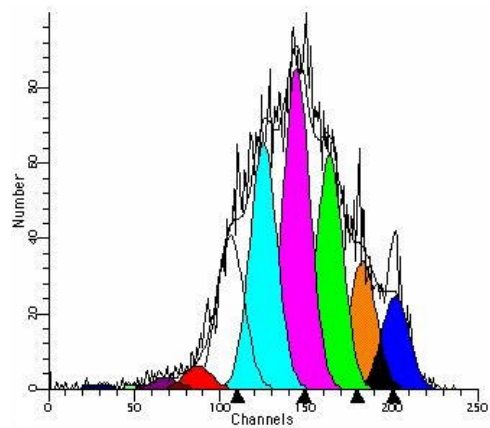
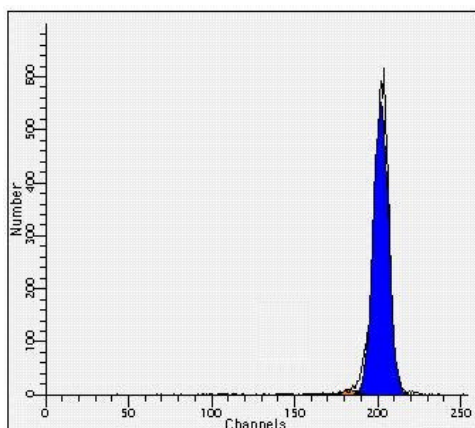
開啟並分析另一組數據

23. 點擊精靈工具板上第一鍵，會出現 **Open** 對話方框。
24. 在硬碟中尋找下一筆資料，點擊 **Open** 以叫出資料檔。資料一被同步化精靈叫出，便會自動進行分析、產生報告。
25. 重複上一步驟直到所有資料都分析完畢。
26. 點擊精靈工具板上第三鍵退出同步化精靈功能，點擊 **Yes** 確認之。

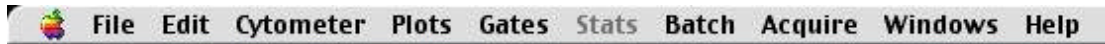
4.5 運用 ModFIT LT 進行細胞增殖分析

ModFIT LT 2.0 可對用跟蹤染料染色的細胞系進行增殖狀況的研究。

1. 進入 ModFIT LT 軟體，點擊工具板中的 **File** 鍵，選擇將要分析的資料檔案；
2. 選擇 **FL2-H** 作 DNA 分析的參量；
3. 打開 **Analysis** 功能表，點擊 **Proliferation Wizard** 鍵，選擇 **Create or edit model**。
4. 這時出現一個對話窗，引導你根據你的樣本的特殊性選擇不同的分析模式。
5. 首先你要選擇的是：重新建立一個同步化分析模式還是修改原有的模式；
6. 點擊工具板中的 **Parent** 鍵，確定代表親代群體的峰的位置；
7. 點擊 **Generations**，選擇所要分析的子代的數目，樣本獲取的細胞數，以及子代和子代之間的時間隔；
8. 點擊 **Other**，選擇是否需要分析背景噪音及不對稱的細胞分裂；
9. 點擊對話窗中的 **Analysis**，軟體自動開始分析，並給出結果。結果中包括親代所占的百分比和平均螢光道數，各個子代所占的百分比和平均螢光道數，增殖指數，非增殖部分的比率，分裂錯誤指數，子代之間的時間隔，背景噪音占的比率，用於分析的細胞數及 RCS 值等等。



5.1 CellQuest 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 ModFit 功能表介紹