

WinMDI 軟體 使用手冊

學習本章後應能夠:

- 用 WinMDI 從流式細胞儀分析 2 色樣本。
- ●應用 Region (區)和 Gate (門)。
- 應用 Marker 產生直方圖統計數據。
- 應用 Quadrant (象限) 產生散點圖統計。
- 將統計結果輸出? Excel 試算表。

1. 概述

雖然大部分 FACScan 用戶喜歡蘋果電腦的優質繪圖,但由於大多數細胞儀為公共儀器,在 儀器使用高峰期,用戶往往沒辦法預約到足夠時間來上機分析樣品,同時分析實驗數據。為了 緩和上述問題,我們建議上機分析樣品時將樣品存放至 IBM-PC 相容之媒體(磁片或 MO 片), 再攜至自己實驗室之個人電腦,用 WinMDI 軟體進行離機分析。

WinMDI 是一在 IBM-PC 視窗環境下運作的共享程式,由本公司兼任技術顧問 Dr. Joseph Trotter 所設計,放在美國聖地牙哥 the Scripps Research Institute 的網站上,供各國流式細胞儀用 戶下載使用。WinMDI 適用於分析由本公司流式細胞儀所產生的數據檔案,新型的蘋果電腦的 數據檔,可直接執行分析,電腦升級前之 HP 系統的數據檔,亦可轉換成 PC 相容格式,在利用 WinMDI 程式進行分析、統計。

WinMDI 程式提供使用者雙色或多色分析功能,除了可以製作一維直方圖、二維點圖、密度圖、等高線圖、及三度空間圖譜外,可作文字處理之中間插圖,亦可將各類圖譜或統計資料輸出至其他相關 PC 程式,如 MS WORD, PowerPoint, Excel, LOTUS 123,適用于論文發表, 及會議報告使用。

程式全名: Windows Multiple Document Interface For Flow Cytometry, Version 2.8

下載網站: <u>http://facs.scripps.edu/software.html</u>

1.1 安裝程序:

FACS101 教育光碟中, WinMDI2.8 次目錄中有一 Setup 應用程式, 點及兩下已進行安裝。

- 1. 在 WinMDI 2.8 Installation 對話方框中點擊 Next。
- 2. 在 Software License Agreement 對話方框中點擊 Yes。
- 3. 在 Information 對話方框中點擊 Next。
- 4. 在 User Information 對話方框中鍵入使用人與使用單位的英文名字,點擊 Next。
- 5. 在 Installation Directory 對話方框中點擊 Next,接受預設之安裝條件。

- 6. 在 Setup Type 對話方框中選擇 Typical 典型安裝。
- 7. 在 Select Program Folder 對話方框中點擊 Next,接受預設之安裝目錄。
- 8. 安裝完成後,螢幕會出現 Setup Complete 對話方框,點擊 Finish 即完成安裝。
- 9. 關閉檔案總管。

2. 範例練習

從事範例練習之前,請將光碟中 WinMDI:/Datafile次目錄整個複製至硬碟中 C:/或 D:/,內 含十二個預存之數據檔 NORM001-012,可供練習。

以下之範例練習可讓您熟悉 WinMDI 程式的基本功能,我們將以十二個預存之數據檔案來 示範一維直方圖及二維點圖之數據分析。這十二個數據檔案都是白血球表面抗原分析之實例, NORM001-4為同一病人血液樣品,NORM005-8,NORM009-12為另一病人血液樣品。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 抗原發橙紅色螢光,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。這四個數據檔案之檔名及樣品資料如下:

數據檔案	FITC 染色	PE 染色		
NORM001	IgG1 Isotype Control	IgG2 Isotype Control		
NORM002	CD3	CD19		
NORM003	CD3	CD4		
NORM004	CD3	CD8		

2.1 WinMDI 的運行

程式安裝完成後,程式集中應有 WinMDI 的 ICONs,可點擊 WinMDI 2.8 來運行 WinMDI。

3

運行程式:開始 程式集 WinMDI WinMDI 2.8



2.2 二維點圖之數據分析

程式以 WinMDI Display 對話方框來開始,我們 先來顯示一個二維散點圖。

在 WinMDI Display 對話方框中選擇 Dotplot,點擊 OK。

Becton Dickinson Immunocytometry System WinMDI28.doc

 WinMDI Version 2.7

 File
 Edit
 Display
 Lools
 Window
 Help

 WinMDI Display
 Select Window
 Style

 Histogram
 Dotplot
 Density Plot

 Contour
 Cancel

 Open Data File

2. 選擇硬碟中次目錄 C:/Datafile 點擊 norm001 檔案, 然後點擊 OK。



2.2.1 繪出一淋巴細胞所著落之區域 (Region)

 從螢幕上方的 Tools 指令欄, 選擇 Regions Tool,四方形區 域選擇 SortRect,點擊
 Creat, (選擇 Ellipse 如需用 圓或橢圓形區域,選擇 Polygon 如需用多角形區域)。



Becton Dickinson Immunocytometry System WinMDI28.doc

4

以滑鼠在淋巴細胞著落處畫一四方形區域,該區域內細胞會以紅色呈現。點擊OK

2.2.2 利用繪出之區域來進行圈選 (Gate)

- 1. 從螢幕上方的 Display 指令欄,選擇 Dotplot,點擊
 norm001,點擊 OK。
- 選擇 FL1-H 256 FL1-H 當 X 參數, FL2-H 256 FL2
 當 Y 參數。 Plot Number of Events 改成 All (6000),
 點選 ☑ Color 2D Region。

Dotplot	- 1920924002 (1,2) 4500	
	R1	
-]	ESCH	255

File:	NORM001		Plot Number of Events	Gate List	2.9 9 32
Pa X: jilih 2	arameters for X 56 FL1-H	and Y	C <u>H</u> alf (3000) C <u>3/4</u> (4500)	Logical Gates Region	Logic
Y: FL2-H 2	56 FL2-H	•	C <u>S</u> et:	R1-1,2 (SortRect)	0ff [] And [*] 0r [+]
Paramete	er Amp	lifier/Scale	Draw Options		Not [-]
Paramete .1-H .2-H	er Amp linear 3 decad 4 decad	lifier/Scale le log le log	Draw Options Kinetics Mode Overlay Kinetics Line Draw Kinetics Only		Not [-]
Paramete .1-H .2-H k	er Amp linear 3 decad 4 decad	lifier/Scale le log le log <u>G</u> ates	Draw Options Kinetics Mode Overlay Kinetics Line Draw Kinetics Only Show XY Labels Color 2D Begings	MultiColor R1 - R3	Not [-]

- 3. 點擊 Gates, 在Gate List 對話方框中點擊 And [*], 點擊 OK 來啟動圈選功能。
- 4. 在 Format Dotplot 對話方框上點擊 OK, 螢幕會出現 Norm001 檔案之 FL1-H/FL2-H 散點圖。如畫面上圖形重疊, 可點擊散點圖上方藍區將疊圖拖放移開。

2.2.3 劃定象限界線,並計算統計

- 1. 從螢幕上方Tools指令欄,選擇 Quadrant Tool,如預設界線可接受,點擊 OK 即可。
- 2. 如需改變象限界線位置,點擊十字中心並拖至定點,然後放手。

Becton Dickinson Immunocytometry System

WinMDI28.doc

3. 在 FL1-H / FL2-H 散點圖之空白處點擊滑鼠左鍵,可見一 pop-up 選項。 選擇 Stats 來 計算統計。 統計資料會依象限別列表。



2.2.4 編輯一列印頁以列印報告 (Print Page)

- 1. 從螢幕上方 File 指令欄,選擇 Format Print Page。螢幕上會出現一空白列印頁,我們要 將兩個散點圖與統計結果剪貼上去,以便列印。
- 點擊 FSC/SSC 散點圖之上方灰區,使灰區變藍色,使此圖成為 active 圖,從螢幕上方 Edit 指令欄,選擇 Copy.
- 在列印頁之空白處點擊使列印頁成為 active 圖,從螢幕上方 Edit 指令欄,選擇 Paste 。
 你應可看到貼圖之縮小版在列印頁上 。

- 點擊 FL1-H / FL2-H 散點圖之上方灰
 區,使此圖成為 active 圖,在此圖之
 空白處點擊左鍵,在 pop-up 選項欄中
 選擇 Copy。
- 在列印頁之空白處點擊使列印頁成為 active 圖,從螢幕上方 Edit 指令欄, 選擇 Paste 。你應可看到貼圖之縮小 版與相關統計資料在列印頁上。



6. 如畫面上圖形重疊,可點擊散點圖將上 方圖拖放至空白處。你已準備好要列印實驗報告。確認列印頁為 active 圖,從螢幕上方 File 指令欄,選擇 [Print Active]。

到此為止,您已經學會如何繪出一細胞群所著落之區域,並利用繪出之區域來進行圈選, 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。

2.2.5 繼續分析其他三個檔案

- 點擊 FSC-H / SSC-H 散點圖之灰區,使此圖成為 active 圖,在此圖之空白處點擊左鍵, 在 pop-up 選項欄中選擇 Next 來讀取 Norm002 之數據。列印頁中之縮小版貼圖亦會同 步改換。
- 2. 點擊 FL1-H/FL2-H 散點圖並依上述步驟,來讀取 Norm002 之數據。
- 3. 從螢幕上方 Tools 指令欄,選擇 Set File Increment。在 File Increment 對話方框上以 數字鍵打入2,點擊 OK。
- 4. 從螢幕上方 Window 指令欄,選擇 Increment All 來讀取 Norm004 之數據,此法會該 改目前所有圖譜內數據。
- 5. 關閉 FL1-H/FL2-H 散點圖,關閉列印頁(點擊圖譜右上角之 🖂)。

2.3 直方圖之數據分析

2.3.1 顯示直方圖

- 1. 從螢幕上方 Display 指令欄,選擇
 Histogram,點擊 Norm001,點擊 OK。
- 在 Select Parameter 對話方框中,選擇 FL2-H 256 FL2-H 為顯示參數。
- 3. 點擊 Gates , 然後點擊 And [*] , 再點擊 OK 來啟動圈選功能。。
- 點擊 **Read** 來顯示直方圖。 將直方 圖拉展開以見全圖。



Histo - NORMOOI
FL2-H 直方图
10°
10°
10°
10°
10°
10°
10°
10°
10°
10°
10°
10°
10°
10°
10°
10°
10°
10°
10°

- 2.3.2 界定螢光強弱分線
- 1. 點擊 FL2-H 直方圖之灰區,使此圖成為 active 圖。
- 2. 從螢幕上 Tools 指令欄,選擇 Marker
 Tool。
- 點擊滑鼠左鍵來定左邊界線,點擊右鍵來 定右邊界線。



- MarkerTool 對話方框中,將 Marker Index 改成 2 來設定第二個 Marker,點擊滑鼠左 鍵定左邊,右鍵定右邊界線,完成後點擊 OK 。
- 5. 點擊 FL2-H 直方圖,使此圖成為 active 圖,然後在圖之空白處點擊滑鼠左鍵,可見一 pop-up 選項。 選擇 Stats 來計算統計。 統計資料會依 marker 別列表。

Becton Dickinson Immunocytometry System

WinMDI28.doc

🥙 Stats - Histo - NORM001 📃 🗖) ×
Append: statfi	le.txt				•	Update	Owner	SaveAs	Print Format	
Multiple Doc	ument	t Inte	erfac	e for l	Flow Cyt	ometry	10 A.C.A.			
WinmDi versi Sun Sen 09 2	on 2 3-24	.8 - 1 .00 21	vinac 101	WS 3.98	5/005 7.	10				-
Gates: R1										
Project: Ex	peri	ment:								
File: IS2092	4002	Samp.	le: 4	81 A						
Date: 24-Sep	-93	Parame	eters	: 1						
Total Events	600	0 Gate	ed Ev	vents 29	908 48	.47%				
System: Log	Para	meter	Mean	ns: Geom	netric					
Param name	М	Low,I	High	Events	%Total	%Gated	GMean	CV	Peak,Value	
FL1-	0	ο,	255	2908	48.47	100.00	3.30	42.75	102,4.21697	
	1	ο,	65	2886	48.10	99.24	3.26	39.49	102,4.21697	
	2	66,	255	22	0.37	0.76	23.37	47.62	4,10.7461	
										-

- 6. 從螢幕上方 File 指令欄,選擇 Preference,並在對話方框中,勾選 ☑ Short Stat Text,然 後點擊 OK 。(File Name: 檔名、Events:細胞數、%Total:百分比、%Gated:百分 比、Markers: Marker 名稱、CV:變異數、Geometric Mean:平均值、Median:中間值)
- 7. 從 Stats-Histo 方框中點擊 Format 來編輯統計資料項目。在 Edit Statistics 對話方框
 上,以點擊方式勾選 ☑ 或 □ 勾消資料項目,點擊 OK。
- 8. 如需輸出統計資料,可在 Stats-Histo 方框中點擊 Save As ,在輸出檔案名稱欄, 鍵入 test.txt,點擊 OK。

🥭 Stats - Histo - NORm002						_ 🗆 ×
Append: statfile.txt	•	Update	Owner	SaveAs	Print	Format

2.3.3 繼續分析其他三個檔案

從螢幕上方 Tools 指令欄,選擇 Set
 File Increment,將升冪數字改成 1,
 點擊 OK。



- 2. 從螢幕上方 Window 指令欄,選擇 **Increment All** 來讀取 Norm002 之數據,此法會該改目前所有圖譜內數據。
- 3. 在 Stats-Histo 對話方框中點擊 來更改輸出檔案名成 test.txt,點擊 Append。來輸出 Norm002 檔案之統計資料。您可在此範例練習後,自行練習以 Microsoft EXCEL 程式開 啟 test.txt。

2.3.4 如何重疊多個直方圖

- 1. 點擊 FL2-H 直方圖之灰區,使此圖成為 active 圖。
- 2. 從螢幕上方 Window 指令欄,選擇 Open File。
- 選擇 Norm001 並選取顯示參數 FL2-H 256 FL2-H , 點擊 Overlay (而非 Read)。此時
 FL2-H 直方圖會出現一黑色曲線。可依需求在 FL2-H 直方圖加畫數條重疊曲線。
- 4. 如需改變重疊曲線之格式、粗細、顏色等,可從螢幕上方的 Display 指令欄,選擇
 Format,依需求在 Format
 Overlay 對話方框中選取欲更改
 參數之曲線,與相關變數。



2.4 離開程式

- 1. 關閉所有視窗 (點擊圖譜右上角之 図)。
- 2. 從螢幕上方 File 指令欄,選擇 Exit, 點擊 Yes.

3.1 File Menu 這些指令可用來開啟、儲存檔案、圈選數據、以及列印。

Open File Next File Prev File Gate File Save As List... Export Data Print Active Print Active Print Screen Format Print Page Record Preferences Exit

3.2 Edit Menu 這些指令可用來編輯統計數據的報告型式,以及選擇圖型檔輸出的型式。

Undo Cut Copy Paste Delete Select All Copy Graphics Format Empty Clipboard View Clipboard

3.3 Display Menu 這些指令可用來開啟四種不同圖譜。

Histogram Dotplot Densityplot Contour Format Retain Markers Screen Stats Edit Stats

3.5 Tools Menu 各種工具指令,可用以界定 Markers, Regions, Quadrants, Logical Gate。

Marker Tool Regions Tool Quadrant Tool Logical Gate Tool Batch File Tool Annotate Parameter Labels Set Standard Logical Gates Sort Windows Set File Increment Set Font Free Memory

3.6 Window Menu 視窗處理指令。

Copy Active Tile Cascade Minimize All Restore All Arrange Icons Close All Increment All Decrement All Fixup Fixup All Refresh Refresh All Set Defaults

3.7 Help Menu 輔助功能內容。

此軟體內附有相當完整的使用說明,請自行參考 HELP MENU 中功能介紹。