

# 人 Th1/Th2 亚群监测试剂盒操作指南（1）

## ——单激光 Calibur 流式细胞仪

### 一. 上机条件设置:

1. 取出3根流式上机试管，分别标记A、B、C。涡旋混匀校准微球（D），A、B、C各管加50 $\mu$ l。
2. 在B管加50 $\mu$ l校准液B（F），C管加50 $\mu$ l校准液A（E）。A、B、C管置室温避光保存30分钟。进入下面的第4步。
3. 加入450 $\mu$ l PBS至A管，加400 $\mu$ lPB到B、C管，每管总共500 $\mu$ l。
4. 打开Calibur的CellQuest软件，下拉Acquire菜单中选择Connect to Cytometer，出现Acquisition Control对话框，选择Set up。下拉cytometer 菜单中打开Detectors/Amps（电压）、Threshold（阈值）、Compensation（补偿）和Status（状态）4个窗口。
5. 在电压窗口中调节SSC 和 FSC电压Mode成LOG。在阈值窗口中点击FSC，调节其域值到650。
6. 上试管A，按流式仪上的LOW，在Acquisition Control对话框点击Aquire。如未见聚集的微球群，则在电压窗口中调节SSC 电压值，使其在现已的基础上再减去100。见图1，移动门 R1圈住微球群。观察图1出现明暗2群微球带。若未观察到，则需要继续移动 R1门。若 R1 门下见杂质多，则在阈值窗口中同时选择FSC和SSC，调高SSC域值至杂质减少。按流式仪上的Median。
7. 见图2，在电压窗口调节 FL3电压值，使 R2门内微球群的在FL3上均值大约等于5000（不要移动R2门）。若需要移动R3圈住FL3上微球。调节FL1电压 使FL1的均值在2—2.5之间。
8. 见图3，调节FL2电压值使FL2均值在2—2.5之间。

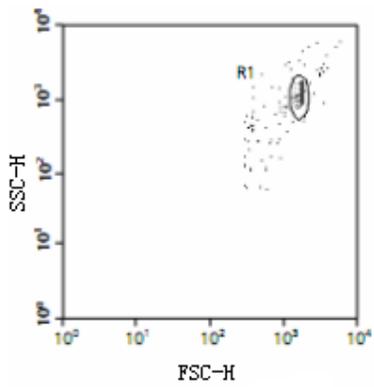


图1

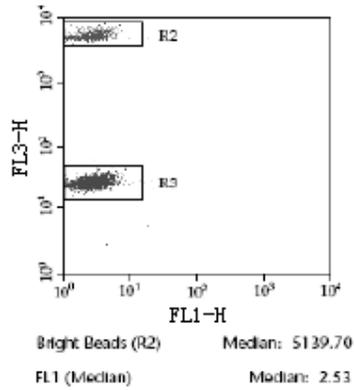


图2

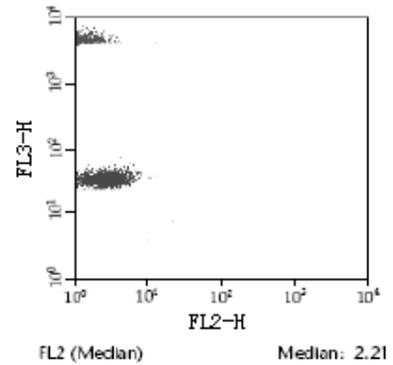


图3

9. 试管B, 确认R1圈住微球群。见图4, 移动 R5 圈住亮微球群 (勿移动 R4), 调节 FL2-%FL1补偿, 使R4和R5在FL2上均值相等。若在R5未见微球群, 则可能是补偿过度, 调小FL2-%FL1值。
10. 上试管C, 确认R1圈住微球群。见图5, 移动R7圈住亮微球落 (勿移动R6), 调节FL1-%RL2补偿, 使R6和R7在FL1上均值相等。
11. 见图, 移动R9圈住亮微球落在里面, 调节FL3- %FL2, 使R8和R9在均值相等。如需要, 调节FL2- %FL3为0.1。
12. 下拉Cytometer菜单, 单击Instrument Setting, 出现Instrument setting对话框, 并以“日期+Th1Th2 Setup”命名保存本试剂的Setup条件。
13. 上试剂说明书的阴性对照管, 确认R1圈住微球群, 确认本次设置成功。

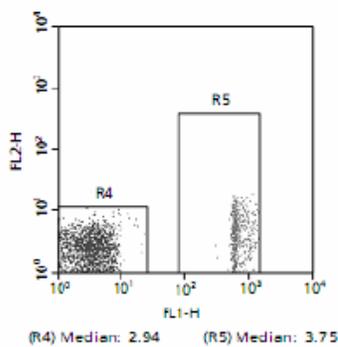


图4

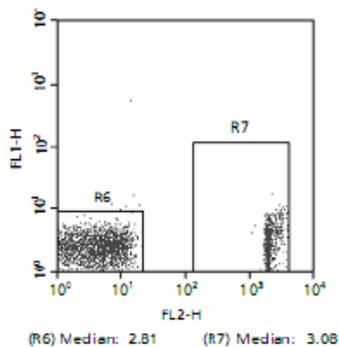


图5

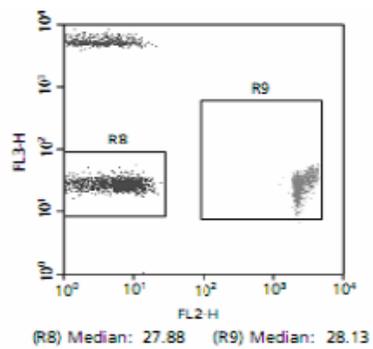


图6

## 二. 样本上机获取

1. 打开建好的模板，下拉cytometer 菜单，单击Instrument Setting，在对话框中单击Open，选择保存过的本试剂保存条件，同时单击 set和 done。
2. 下拉acquire菜单，单击Acquisition &Storage，出现Acquisition &Storage窗口中，将10000改为1800（保证每种微球收集大约300个），All 改成R1。在Storage Gate中选择默认设置：All。 Resolution值调节到1024。单击OK。
3. 下拉Acquire菜单中打开Parameter description窗口，点击Folder，选择流式上机结果保存路径，在此路径下Create一个新文件夹，以“日期+Th1Th2”命名，再Create 2个子文件夹，分别命名为Sample和Standard，选择Standard文件夹，单击OK。单击FILE，出现文件名编辑窗口，在custom prefix中命名文件（文件名前两位必须是字母）。
4. 样本上机之前必须涡旋3—5秒，充分混匀。上阴性对照管，按流式仪上 LOW，在 acquisition control 对话框单击Acauire，观察R1是否圈住微球群，若圈住，按流式仪上MED或HIGH，取消acquisition control对话框中Set up，单击Acquire采集至结束，按照浓度从低到高依次上1：512管至最高 浓度管采集标准品样本。如果样本浓度增高，水平微球微带在FL2上向均值大的方向移动。
5. 依次采集样本数据至结束。