



FlowJo 基本操作手冊

流式細胞儀分析軟體

WINDOWS/MAC 版本使用



目錄

簡介	3
開始啟用 FlowJo 軟體.....	3
下載及安裝軟體.....	3
第一次啟用 FlowJo	4
課程一 FlowJo 操作視窗 (Workspace Window)	5
Workspace Window 組成元件	5
功能列 (TaskBar) 及工作項目欄 (Ribbon)	5
群組分析空間 (Groups pane).....	7
樣本分析空間 (Samples Pane).....	11
螢光補償標誌 (Compensation Matrix Badge).....	11
樣本品質標誌 (Sample Quality Badge).....	12
課程二 作圖視窗和細胞圈選	14
作圖視窗 (Graph Window).....	14
作圖視窗組成元件	15
數值轉換 (Transformation).....	22
圈選階層 (Gating Hierarchy).....	24

調整群組圈選 (group-owned gate)	25
課程三 數據統計 (Statistics)	27
統計欄位 (Statistics Band)	27
新增統計視窗	29
課程四 作圖輸出 (Layout Editor).....	32
作圖編輯視窗組成元件	32
Iteration	38
批次報告 (Batch Report)	39
疊圖 (Overlay)	42
課程五 統計資料輸出 (Table Editor).....	48
統計資料視窗組成元件	48
課程六 儲存 FlowJo 分析檔案.....	52
檔案類型	52
重新載入樣本資料	53
結論	54

簡介

FlowJo 為廣泛應用的離線分析軟體，提供整合型操作平台和完整的分析功能，以 **Workspace** 為主要的操作視窗，讓使用者快速得分析和彙整流式細胞儀收取之實驗數據。

Workspace 包含所有載入的樣本檔案、展示細胞圈選、統計及其他應用分析，也可以進行批次分析、編輯、輸出作圖與統計數值，並依照使用者的需求，製作客製化分析報告。在進行中或是已完成的分析階段，都可以將 **Workspace** 儲存為 **.wsp** 檔案，開啟已儲存檔案即回到前次的工作階段。

本教學手冊示範 **FlowJo** 使用流程，請您隨著我們的教學步驟，一起從匯入原始檔案，並完成統計、分析和結果報告。本次示範檔案為多色實驗，分析 T 細胞在 **Mitogen** 的刺激後，其形態及功能上的變異，詳細資料請參見 www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24464647。

開始啟用 FlowJo 軟體

下載及安裝軟體

FlowJo 軟體必須先安裝後才能進行使用，透過下列連結網址可簡易取得軟體載點：
www.flowjo.com/solutions/flowjo/downloads

操作 **Mac** 及 **PC** 作業系統的使用者，雙點擊連結網址即下載安裝程序，下載完成後開啟程，並依照提示完成安裝。詳細安裝步驟指南連結網址：
http://docs.flowjo.com/d2/installation/installweb_exe

第一次啟用 FlowJo

認證畫面將出現在第一次啟用 FlowJo 時，須同意終端用戶使用許可 (end-user license)。

如已取得 FlowJo 認證，對話框內請選取對應的認證模式 (USB dongle 或是 site liscense 授權序號)。

注意：欲操作教學用示範檔案必先取得認證，FlowJo 官方網站也提供 30 日免費試用認證。

如不選用任何認證，FlowJo 只能載入示範檔案。

1. 30 日免費試用認證：請至 www.flowjo.com/solutions/flowjo/free-trial 取得試用認證權限。

2. 購買 FlowJo 軟體：請洽 office@flowjo.com 取得估價單及購買軟體。

3. 下載教學示範檔案(多色 PBMC)請至下列網址：

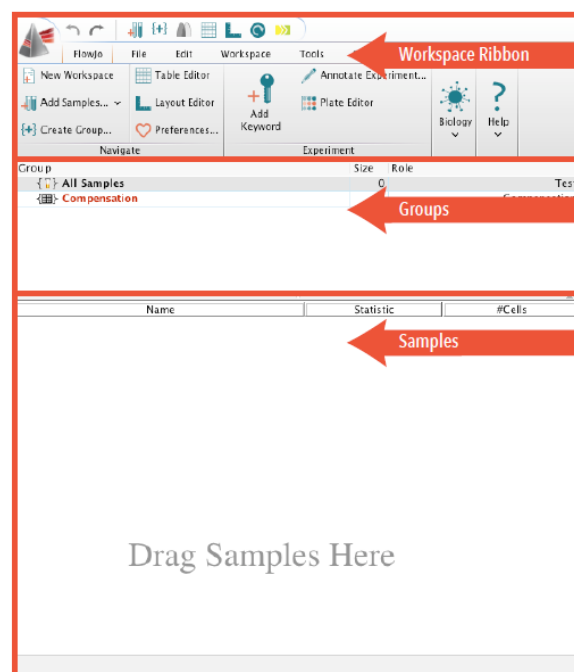
www.flowjo.com/solutions/flowjo/downloads/tutorials

技術支援：FlowJo 功能或使用上問題可電郵技術支援部門 techsupport@flowjo.com

課程一 FlowJo 操作視窗 (Workspace Window)

Workspace Window 組成元件

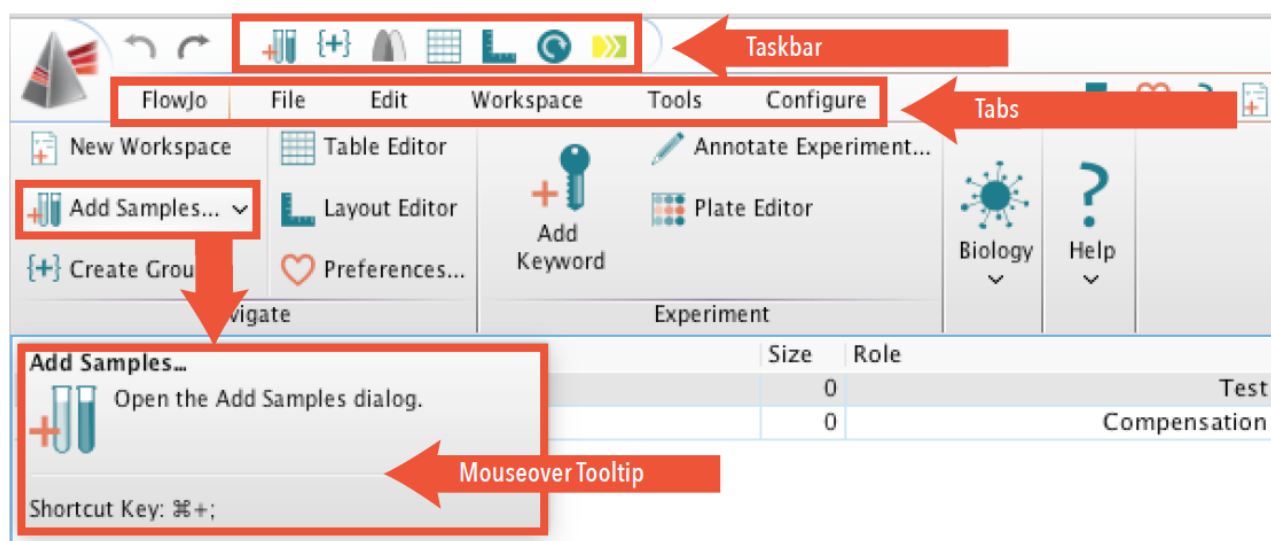
使用 FlowJo 軟體時，主要以 Workspace window 進行資料的整理和分析。Workspace window 分為三個部分，由上自下分別為工作項目窗格 (Ribbon)、群組分析空間 (Groups pane) 和樣本分析空間 (Samples pane)，當視窗內無任何檔案時，顯示為 “Drag Samples Here”。



功能列 (TaskBar) 及工作項目欄 (Ribbon)

Workspace window 最上方又可細分為 Taskbar 和 Ribbon，Taskbar 內有多個快速鍵，最左方為 FlowJo 的金字塔按鍵，往右則為復原及回到下一步，其他快速鍵依序為增加樣本 (Adding Samples)、新增群組 (Creating Groups)、螢光補償 (Compensation)、統計資料輸出 (Table Editor) 和作圖輸出 (Layout Editor)。工作項目欄 (Ribbon) 則位於 Taskbar 下方，包含 FlowJo、File、Edit、Workspace、Tools 及 Configure 等六個工具鍵，每一個工作鍵各有獨立的 Bands。如 FlowJo 工具鍵下有 Navigate、Experiment、Biology 及 Help bands 等項目。

如果將游標移至任意按鍵的上方，提示框將顯示該按鍵之功能，幫助找尋欲使用的功能。



練習活動 新增樣本至 **Workspace**

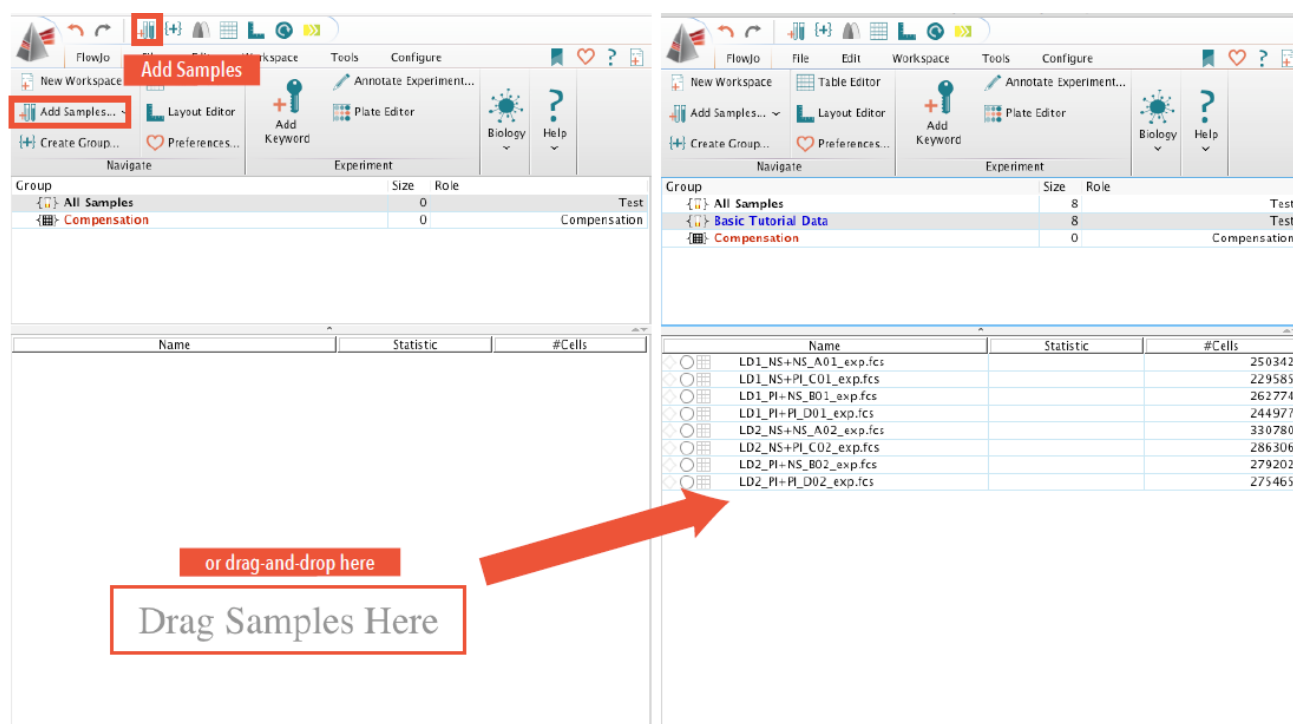
現在開始試試看如何使用 FlowJo 吧！

1. 下載 “Basic Tutorial Data”。
2. 將 Basic Tutorial Data folder 拖曳進樣本分析空間 (Samples pane)，載入的樣本自動匯入群組並命名為 Basic Tutorial Data，同時樣本也會加入 All Samples 群組中，樣本的名稱則顯示於 Sample pane 中的 Name Column。

也可以使用 Add Samples 匯入樣本資料，在 Taskbar 和 Navigate band 都有 Add Samples 工具鍵，操作方法如下：

1. 點選 Add Samples。
2. 選取 Basic Tutorial Data folder。

完成後，樣本自動匯入 Basic Tutorial Data 及 All Samples 群組中，注意只有匯入整個資料夾時，才会有對應資料夾名稱的群組。



群組分析空間 (Groups pane)

Groups pane 位於 Workspace window 中央區，樣本匯入後將自動分為兩組。

All Samples：包含所有載入的樣本。

Compensation group: 樣本名稱含有 “comp” 或是 “unstained” 時，將自動匯入此組別。

依據實驗設計主軸，建議依照下列原則將所有樣本分組：

1. all-stain samples 和 single-stain compensation controls 分開至不同群組。
2. 將樣本依照 file keyword 進行排序 (EX: patient ID、stain reagent panel、stimulation condition、time point 等)。

樣本分組有利於後續分析，例如將某細胞圈選套入特定群組，或對單一群組創建作圖、統計表。

練習活動 新增群組

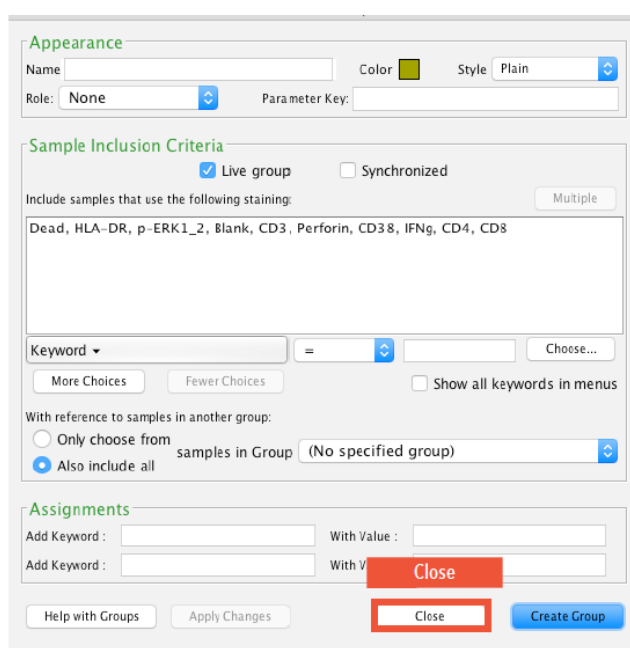
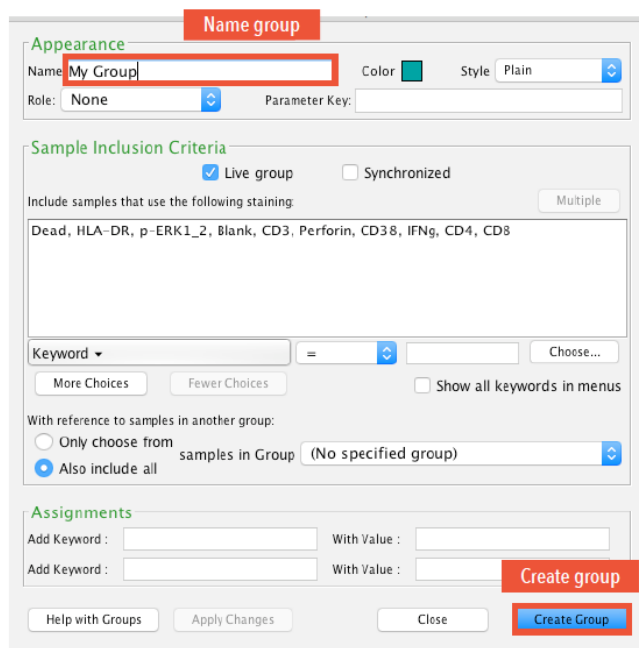
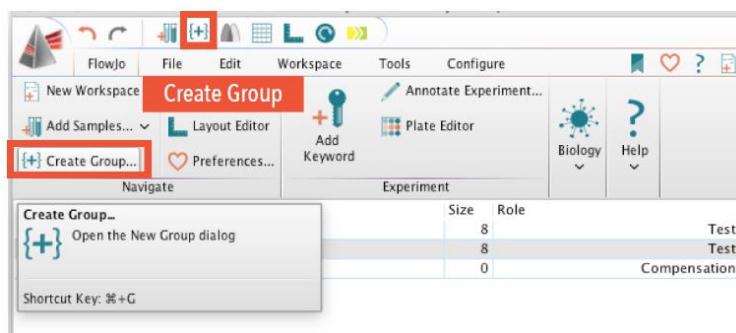
為了幫助大家更了解樣本群組，開始試試看新增群組吧！

1. 在 Taskbar 或 Navigate band 中

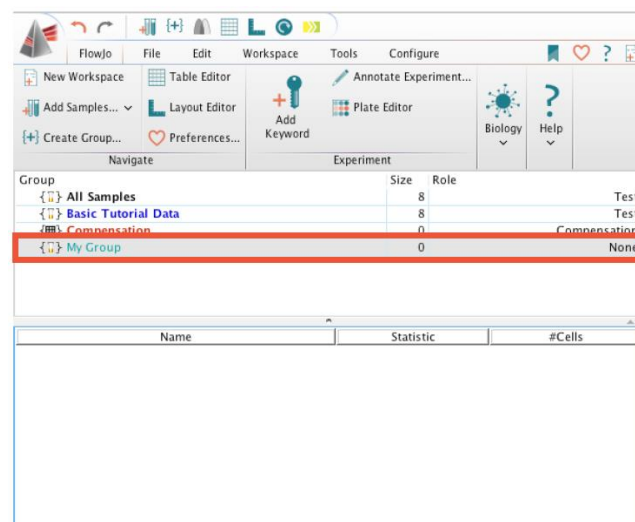
點選 “Greate Group”。

2. 自訂群組名稱 (如：My Group) 並填入 Group window 左上方空格。

3. 點選右下方 “Create Group”，完成新增群組。點選關閉 “Close” 結束視窗。



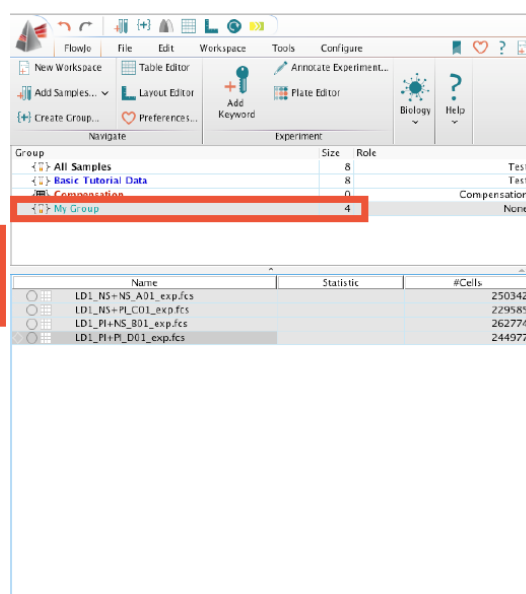
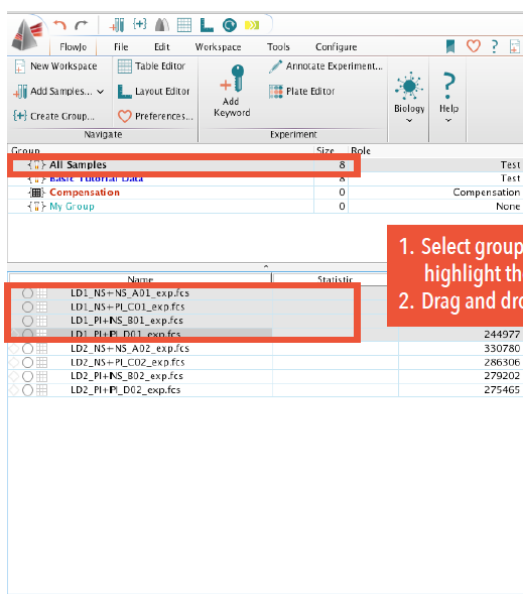
完成以上步驟後，My Group 組別顯示於 Sample pane，目前沒有任何的樣本存在此群組中。



練習活動 樣本匯入至新群組

手動匯入樣本至新群組：

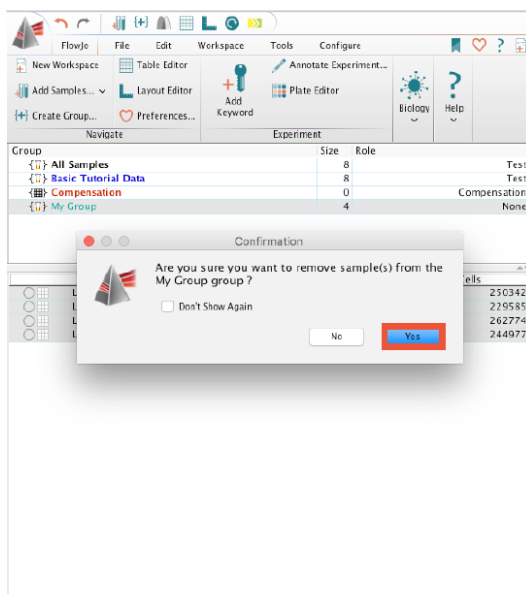
- 點選 “All Samples” 或 “Basic Tutorial Data” 組別，選取前四個樣本（樣本名稱皆含有 LD1）。
- 將選取的樣本直接拖曳到 “My Group”



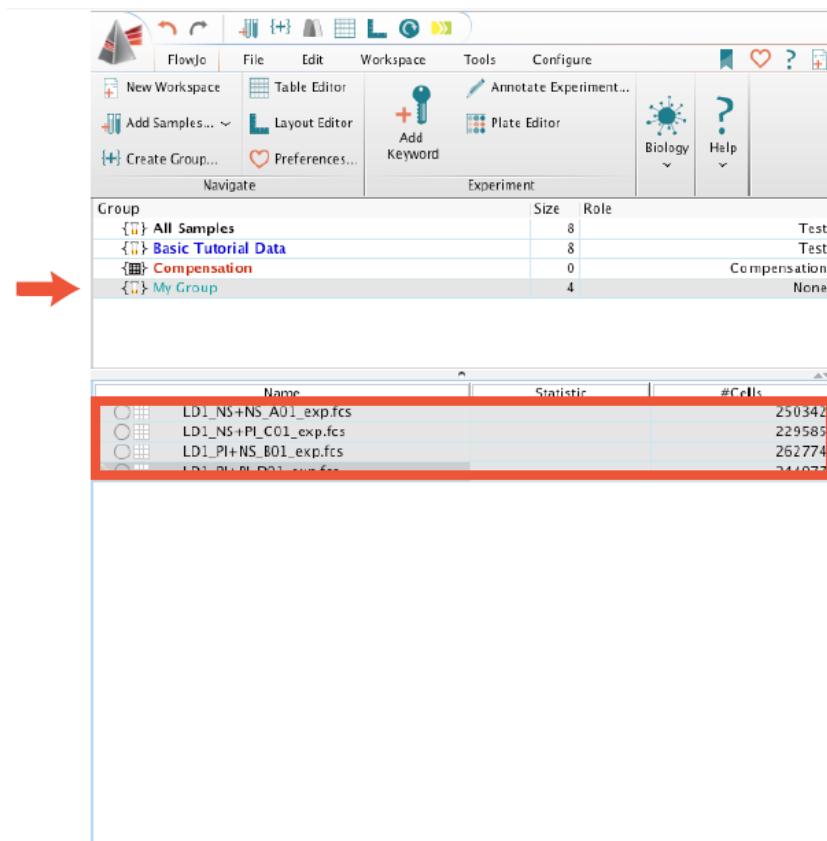
樣本可以同時出現在多個的組別中，將同一個樣本匯入其他群組時，此樣本仍保留於 All Samples 和 Basic Tutorial Data group 中。

欲將樣本移出群組：

- 選擇群組，並點選欲移出的樣本。
- 按 **Delete** 鍵，在出現的對話窗格選擇 “Yes” 後即移除此群組中的樣本，



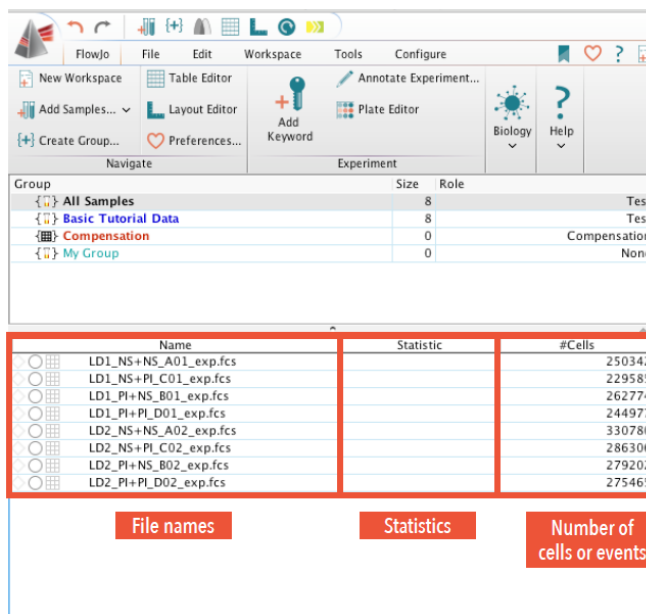
注意！如果將樣本自 All Samples group 中刪除，樣本將於 FlowJo Workspace 中完全移除。誤刪 All Samples Group 中的樣本，可將檔案重新拖曳至 Sample Pane 中載回。



樣本分析空間 (Samples Pane)

Workspace 下半部空間為樣本分析空間 (Samples Pane)·主要功能為顯示群組中樣本的資料。顯示的資訊包含以下資料：

1. 檔案名稱 (File names)－顯示的檔名同匯入之 FSC 檔，等同 \$FIL keyword。
2. 統計資料 (Statistic)
3. 細胞數 (#Cells)－顯示樣本的總細胞數及圈選的細胞數。

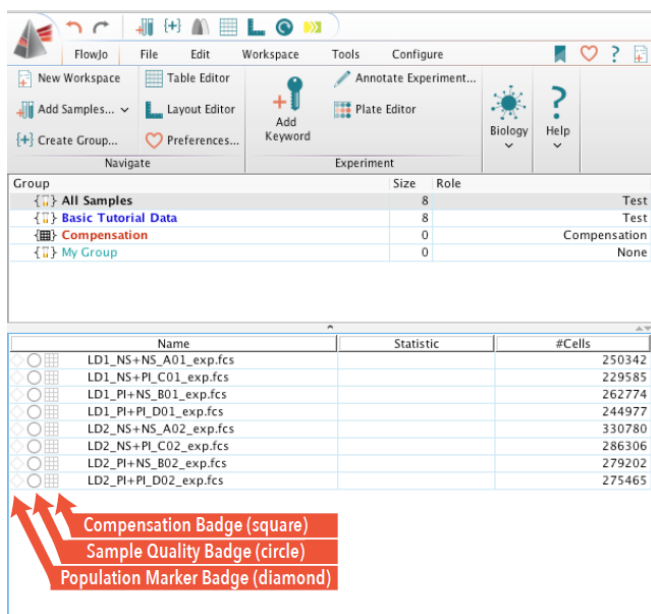


Group	Name	Statistic	#Cells
All Samples			8
Basic Tutorial Data			8
Compensation			0
My Group			0

Name	Statistic	#Cells
LD1_NS+NS_A01_exp.fcs		250342
LD1_NS+PI_C01_exp.fcs		229585
LD1_PI+NS_B01_exp.fcs		262774
LD1_PI+PI_D01_exp.fcs		244977
LD2_NS+NS_A02_exp.fcs		330780
LD2_NS+PI_C02_exp.fcs		286306
LD2_PI+NS_B02_exp.fcs		279202
LD2_PI+PI_D02_exp.fcs		275465

File names Statistics Number of cells or events

樣本按照英文字母順序進行排序，在檔案名稱左方有三個樣本標誌 (Sample Badges)，顯示螢光補償、樣本品質與正顯示的樣本等狀態。



Name	Statistic	#Cells
LD1_NS+NS_A01_exp.fcs		250342
LD1_NS+PI_C01_exp.fcs		229585
LD1_PI+NS_B01_exp.fcs		262774
LD1_PI+PI_D01_exp.fcs		244977
LD2_NS+NS_A02_exp.fcs		330780
LD2_NS+PI_C02_exp.fcs		286306
LD2_PI+NS_B02_exp.fcs		279202
LD2_PI+PI_D02_exp.fcs		275465

Compensation Badge (square)
Sample Quality Badge (circle)
Population Marker Badge (diamond)

螢光補償標誌

(Compensation Matrix Badge)

檔案名稱左方的方形圖示表示該樣本的

螢光補償狀態，有兩種狀態：

1. 空白方格，表示樣本沒有套入任何螢光補償。
2. 網狀方格，表示已套入螢光補償。

左方範例其螢光補償標示為網狀方格，代表樣本已經套入上機時機器收取螢光補償數值。

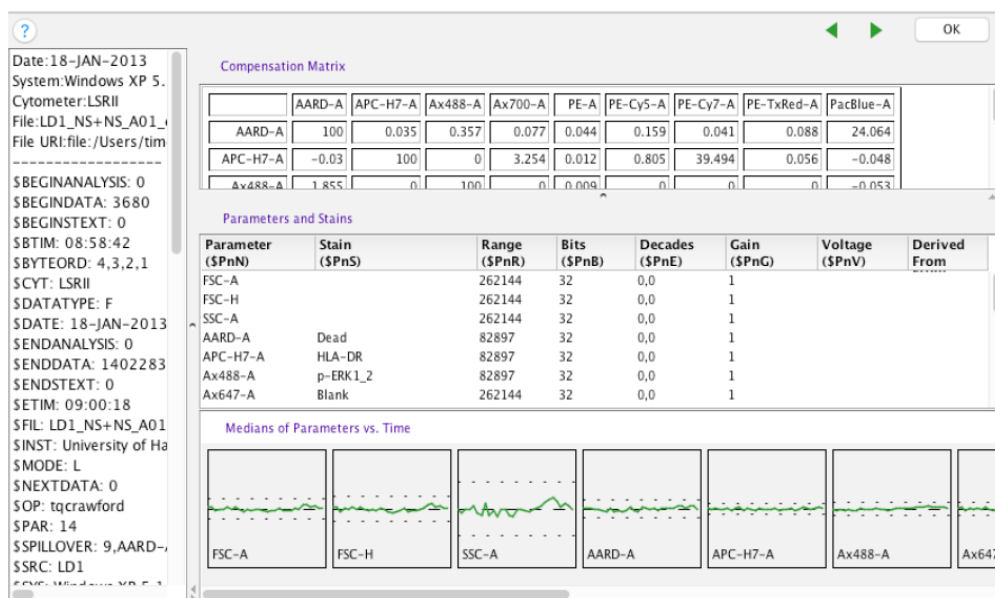
點擊螢光補償標誌可預覽螢光補償矩陣 (Compensation Matrix)，螢光補償的詳細操作及調整請參照進階課程。

樣本品質標誌 (Sample Quality Badge)

螢光補償左方圓形圖示為樣本品質標誌，雙點擊即出現樣本特性視窗 (Properties window)，顯示此樣本所有螢光參數 (Fluorescent Parameters) 在不同時間的讀值、Samples' Keyword Attributes、儀器設定 (Acquisition Cytometer Instrument Settings) 及螢光補償。此標誌的顏色代表上樣時的樣品穩定性，從優良到不良可由藍色→綠→紫→紅代表，如果出現黃色或是橘色則代表在上機時，樣本有團塊或是其他異常的情況發生。

練習活動 檢查樣本品質與特性

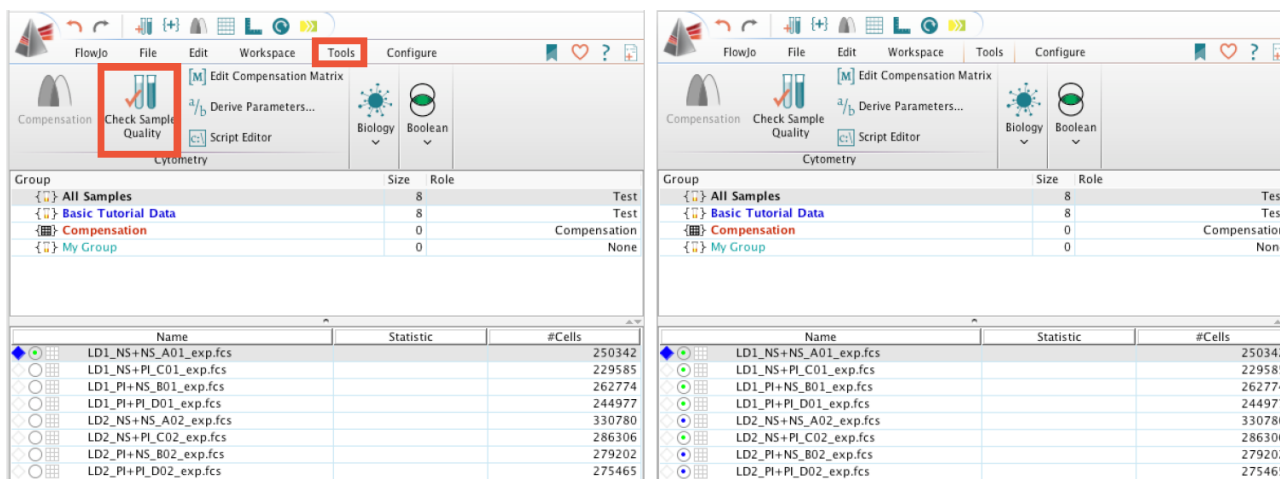
雙點擊圓形樣本品質標誌 (Sample Quality Badge)，顯示樣本特性視窗 (Properties window)，當圓形的標誌內出現藍色或綠色的小圓點，代表上機收取的樣本品質良好，其他顏色則代表品質不穩定。



練習活動 檢查所有樣本的品質

點選 Tools tab 中 Cytometry band，同時檢視所有樣本的品質與上機時的穩定度。

1. 選擇 ribbon 和 Tools tab。
2. 點擊 Check Sample Quality。



樣品讀取標誌 (Population Marker Badge)

最左方的菱形標誌為顯示目前正讀取的樣本，點擊此標誌即出現作圖視窗 (Graph Window)，游標點選在 Graph window 時，呈現藍色實心菱形；只選取樣本，游標非點選在同樣本的 Graph window 時，則呈現藍色框線菱形。

課程二 作圖視窗和細胞圈選

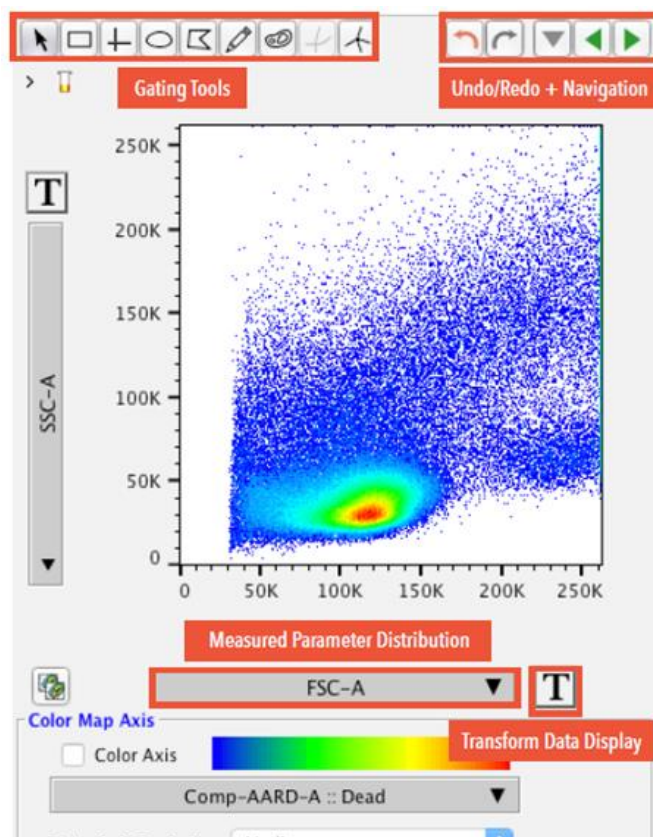
作圖視窗 (Graph Window)

作圖視窗最主要的功能為顯示單一樣品或是某一細胞群的資訊，以二維點狀圖呈現樣品中所有的 **event**，幫助使用者視覺化分辨細胞群態。點狀圖可以顯示單一或雙螢光參數 (Fluorescence Parameter)，螢光參數通常是指流式細胞儀上的 **single channel** 所測定的對應螢光，螢光強度則代表了目標蛋白質在細胞膜上的表現強度或是細胞特性 (包括細胞大小、死活比、DNA 或細胞膜含量、代謝狀況或是訊號傳遞等特徵)。

在作圖視窗內有多種繪圖工具幫助圈選細胞群，圈選出的細胞群為子群 (**child' Population**)，原本未圈選的所有 **events** 則為母群 (**parent events**)。而一連串的圈選過程搭配不同的螢光參數，建立出一套獨有的階梯式 (**hierarchy**) 或樹狀圈選邏輯 (**gating tree**)，讓目標細胞群、表現量和螢光參數分析一目了然。

練習活動 開啟作圖視窗

雙點擊第一個樣本 LD1_ NS_NS 後立刻跳出作圖視窗，第一個點狀圖坐標軸分別為 Forward Scatter (FSC) 和 Side Scatter (SSC)，此時在 Sample Pane 內的 Population Marker Badge 應為藍色實心菱形。在點狀圖內每一個點代表一或多個獨立細胞，圖中的顏色則代表該組螢光參數的細胞數量多寡，紅色代表最高細胞數量（高濃度），藍色則代表最低，中間色為遞減。



作圖視窗組成元件

圈選工具 (Gating tools)：位於視窗左上角。

回到上/下一步 (Undo/Redo) 和瀏覽 (Navigation)：位於視窗右上角。

坐標軸 (Axis Labels)：點擊坐標軸可更換顯示的螢光參數。

數值轉換 (Transformation, T)：坐標軸旁的 T 字按鈕，更改 X 和 Y 軸的數值呈現方式。

其他的作圖顯示及選項則在作圖視窗的下方。

練習活動 繪製橢圓形圈選 (Ellipse Gate)

試試看動手圈選淋巴球細胞吧！示範樣本 LD1_NS_NS 中淋巴球為主要的細胞群，紅、黃和綠色為細胞數量高的位置。

1. 選擇橢圓形工具 (Ellipse tool)
2. 長按滑鼠左鍵拉出欲選取的區域，放開左鍵後完成選取。
3. 命名圈選的細胞群，或是使用建議的名稱 "Lymphocytes"，點擊 **OK**。

細胞群名稱

(Gate label) 和

族群比例出現在

圈選區域的旁邊，

族群比例為子群/

母群的百分比

(% of Child

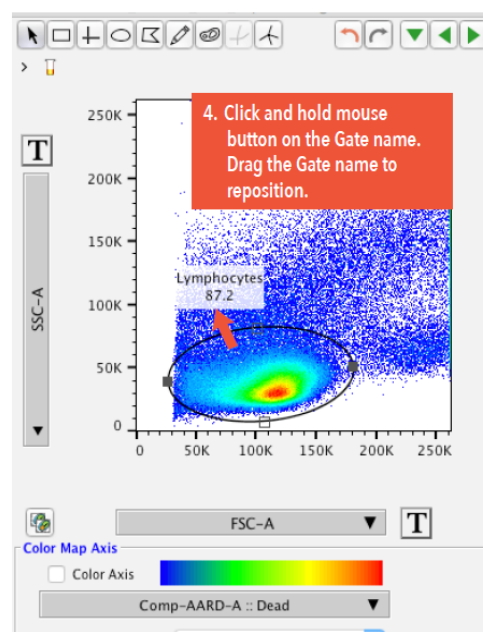
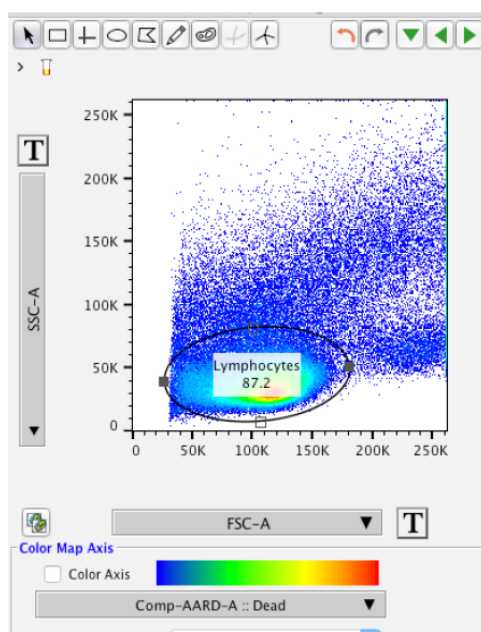
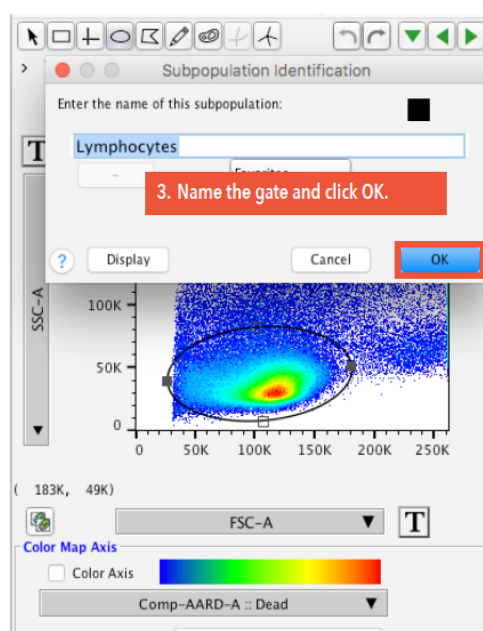
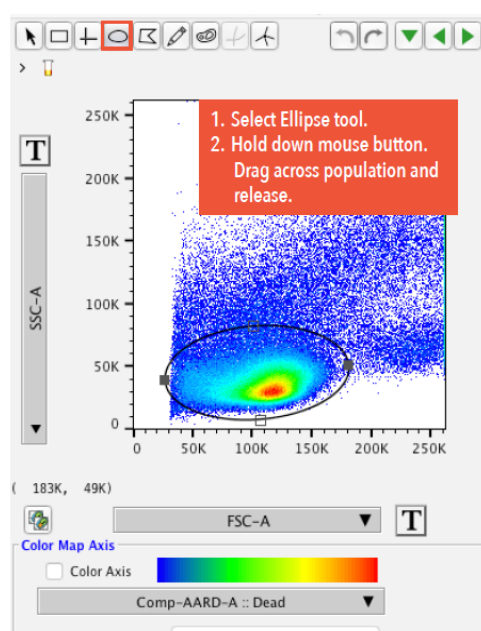
gate/parent

events)。

4. 點選並長按滑鼠

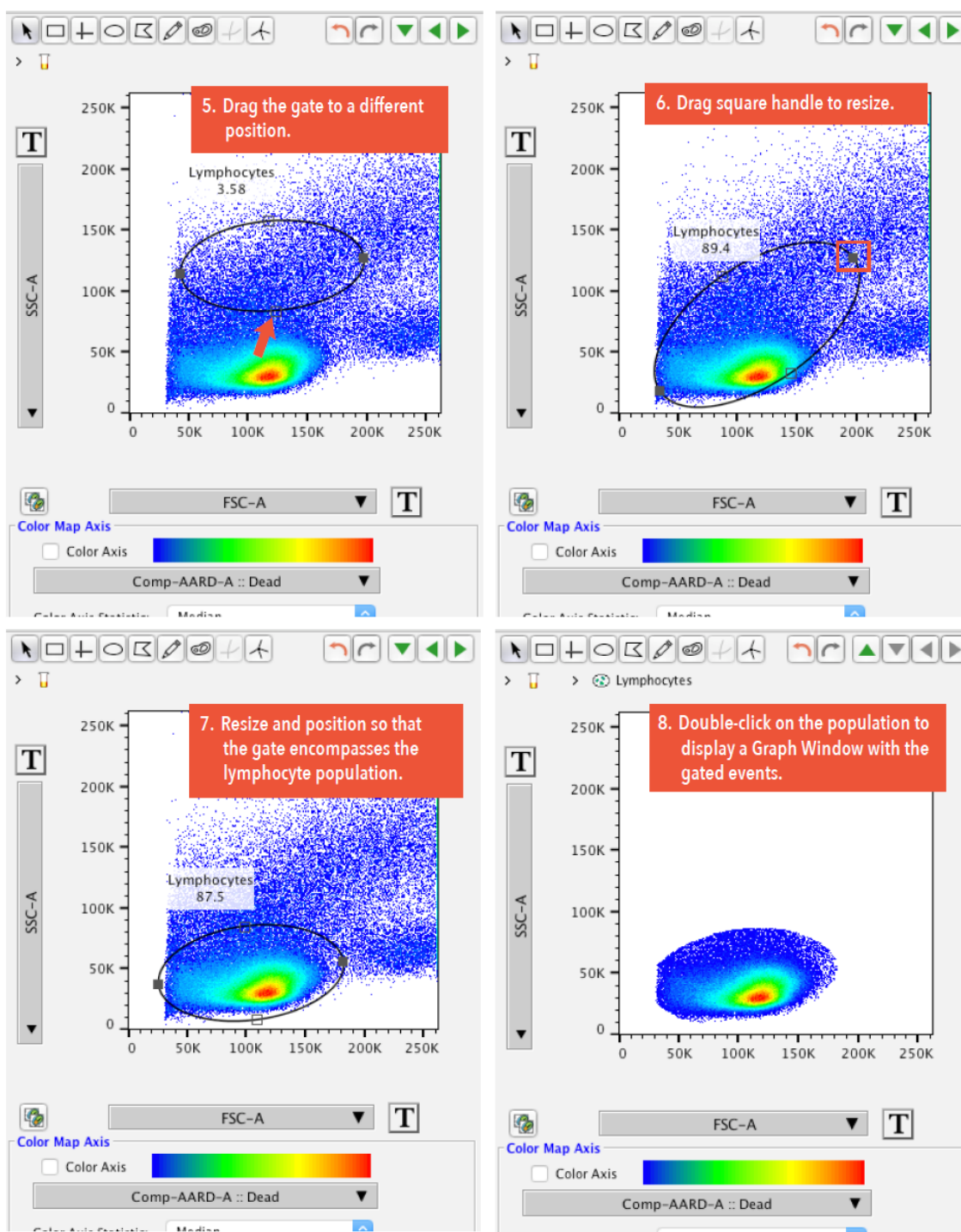
左鍵可移動 Gate

label 位置。



5. 點擊 gate 框線，長按滑鼠左鍵可拖曳 gate 至不同的位置。
6. 點選 gate 框線上的黑色小方塊，長按左鍵可調整 gate 的大小及形狀。
7. 重新調整 gate 大小和圈選方向，框住主要的細胞群。
8. 確定圈選的區域正確後，雙點擊 gate，此時會跳出另一新作圖視窗，此視窗只顯示

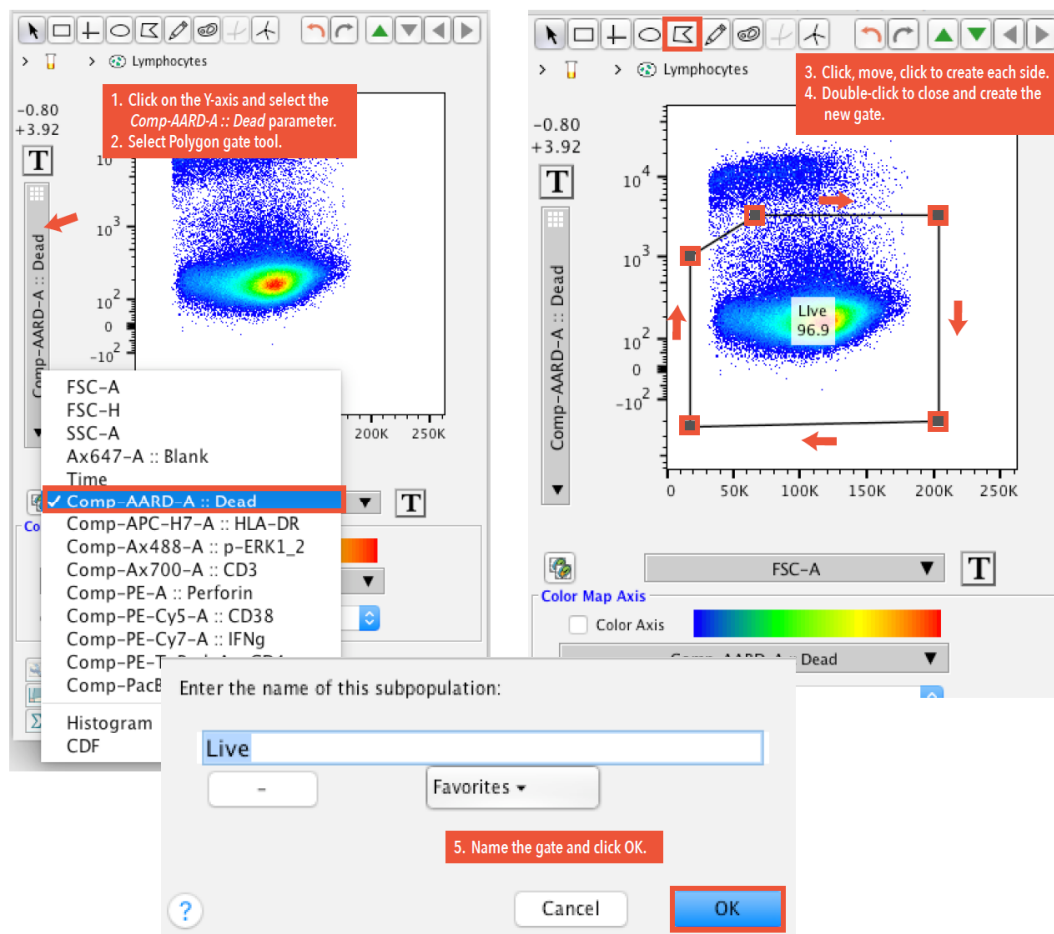
Lymphocyte gate，X 軸及 Y 軸分別為 FSC-A 和 SSC-A parameter。



練習活動 以多邊形 (Polygon gate) 圈選活細胞

Amine reactive dyes (ARD) 為常見的細胞死活染劑，ARD 可穿透死細胞破損的細胞膜，死細胞於上機時 ARD channel 螢光強度增加；而活細胞的細胞膜完整，ARD 無法滲入，ARD channel 訊號低。我們在分析細胞時，主要觀察活細胞的差異，因此圈選 ARD⁻ population 並排除 ARD⁺ population。

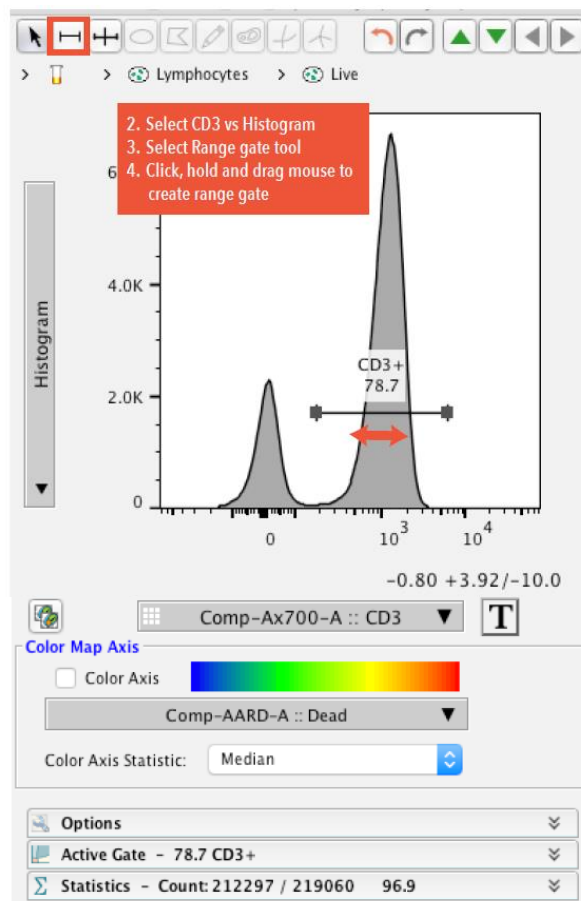
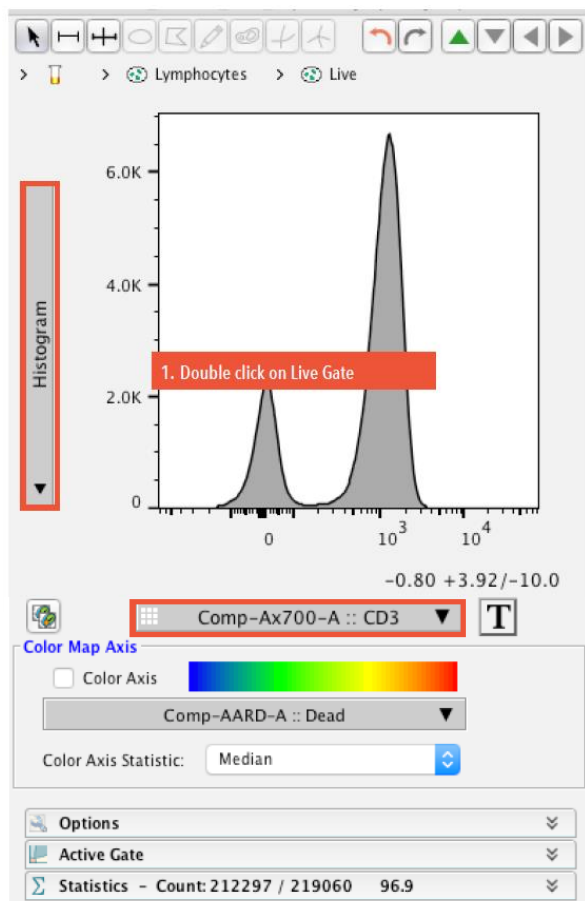
1. 首先，點選 Y 軸，此時出現所有的 Fluorescence parameter，選擇 *Comp-AARD-A :: Dead* parameter，Y 軸更改為 aqua amine reactive dye (AARD) 之螢光強度。
2. 選擇多邊形圈選工具 (Polygon Gate tool)。
3. 沿著細胞群的分布圖形點擊繪圖，而同時按 **Shift** 可調整 gate 角度。
4. 雙擊起始點後結束圈選，將此群細胞命名為 “Live”，點擊 **OK** 後完成。



練習活動 點狀圖轉換為直方圖 (Histogram); 定義 CD3⁺ T cells

1. 雙點擊 “Live” gate 後出現新作圖視窗。
2. 點擊 X 軸下拉式選單，從清單中選擇 “Comp-Ax700-A :: CD3”； 點擊 Y 軸，選擇 “Histogram”。選擇 Histogram 後，左上角的圈選工具即換成區域門 (Range gate) 和雙分門 (Bifurcation gate)。
3. 選擇 “Range Gate” 
4. 細胞在 Histogram 上聚集成兩個波峰，選擇右方 CD3⁺ cells，在波峰的一側點擊後按住鼠左鍵往另一邊移動，放開後完成圈選。
5. 命名為 CD3⁺ 後選擇 。

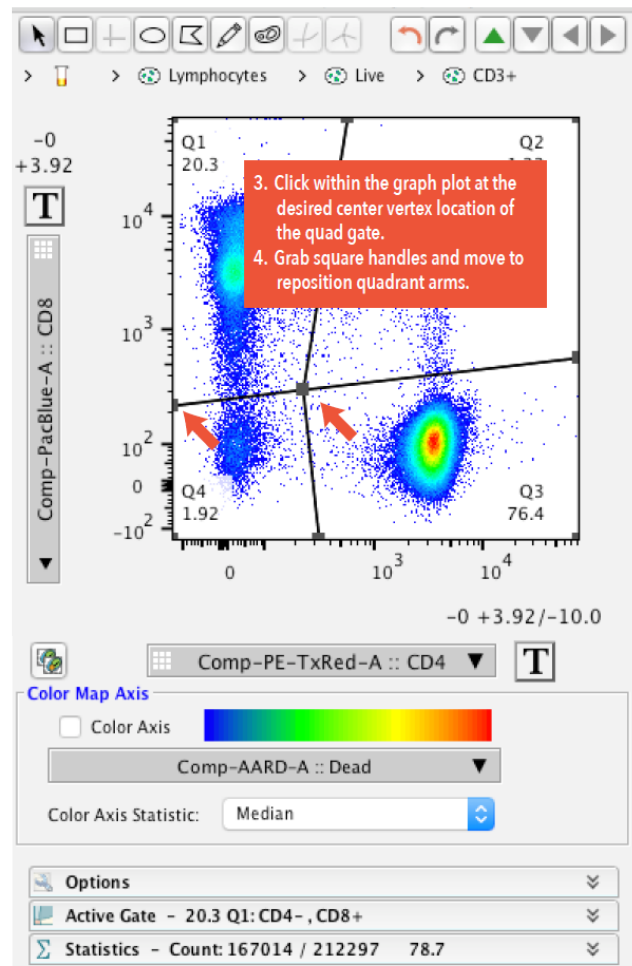
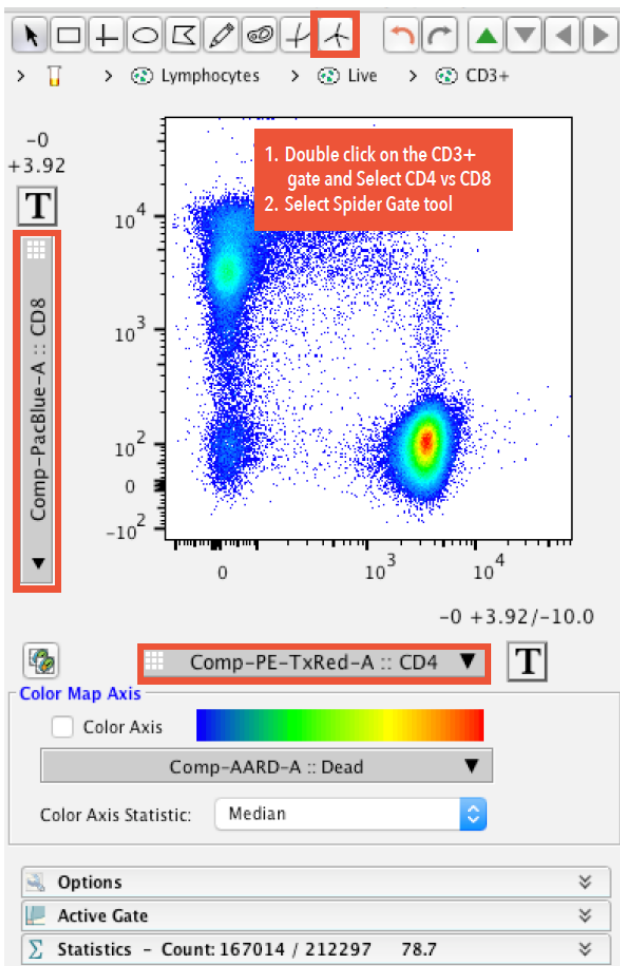
到現在為止，已經成功的圈選出 CD3⁺ cells，是 T cell population 重要的分群指標。



練習活動 繪製四象限分區 (Quadrant Gate)

現在讓我們進一步將 CD3⁺ T 細分為 CD4⁺ T helper 和 CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes。

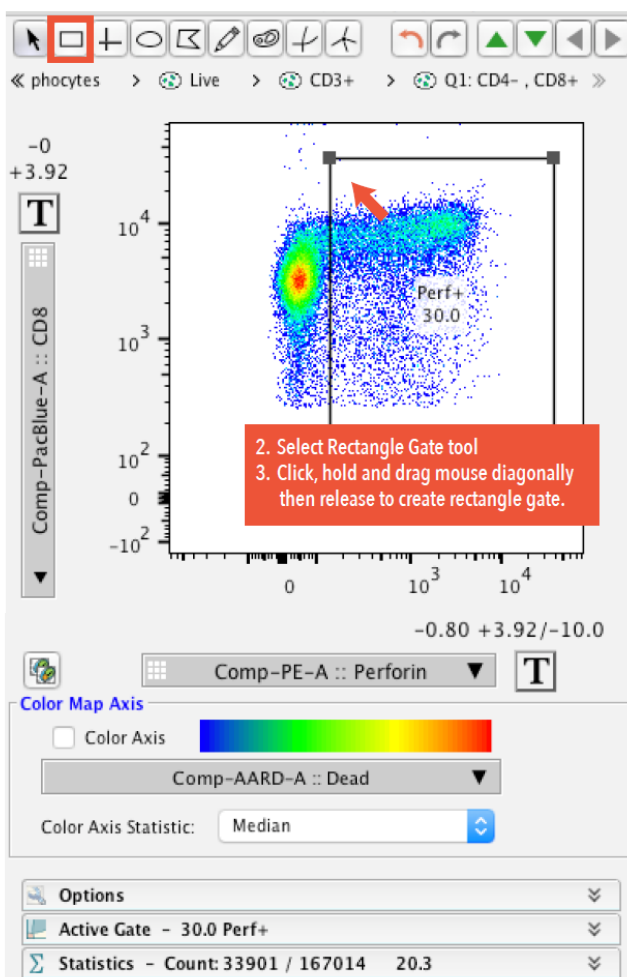
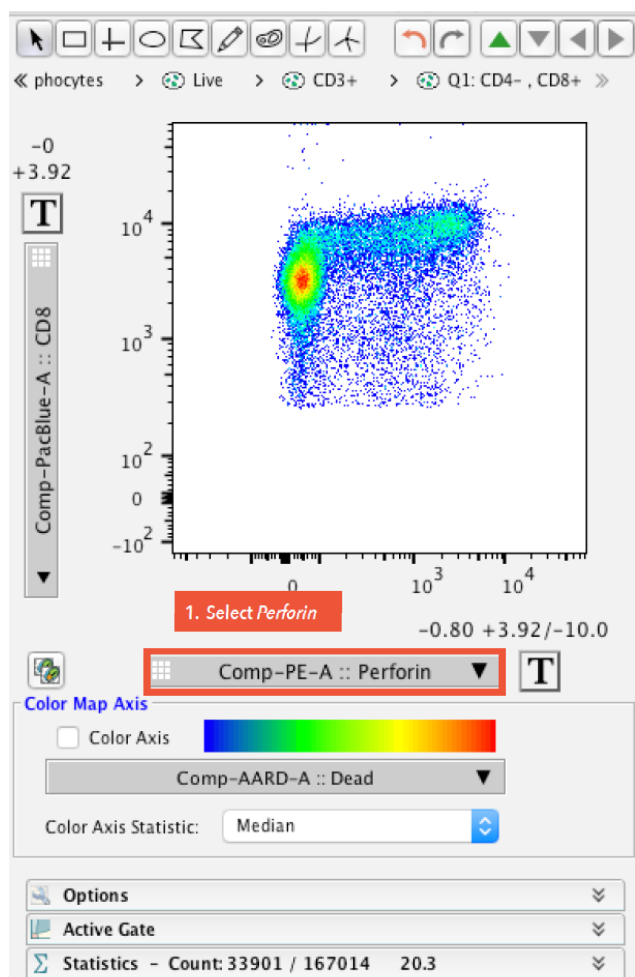
1. 雙點擊 "CD3⁺" gate，跳出只含有 CD3⁺ events 的新作圖視窗。將 X 軸和 Y 軸分別改為 "Comp-PE-TxRed-A :: CD4" 和 "Comp-PacBlue-A :: CD8"。
2. 點選 "Spider Quad Gate" 
3. 選擇細胞分群的中間點，點擊後出現四象限分割畫面。
4. 欲調整分割線條的位置和角度，請點選分割線上的小方塊，拖曳至正確的位置。



練習活動 以長分形圈選 **Perforin⁺ CD8⁺ T Cells**

現在試試看圈選 Perforin⁺ subset !

1. 雙點擊四象限中 Q1: CD4⁻,CD8⁺ population , 將新視窗的 X 軸改為 "Comp-PE :: Perforin" 。
2. 選擇 "Rectangle Gate" 
3. 將游標放置於 Perforin⁺ cells 的左上角，拖曳游標至完整包覆目標細胞群。
4. 命名此細胞群為 Perf⁺ 並完成圈選。



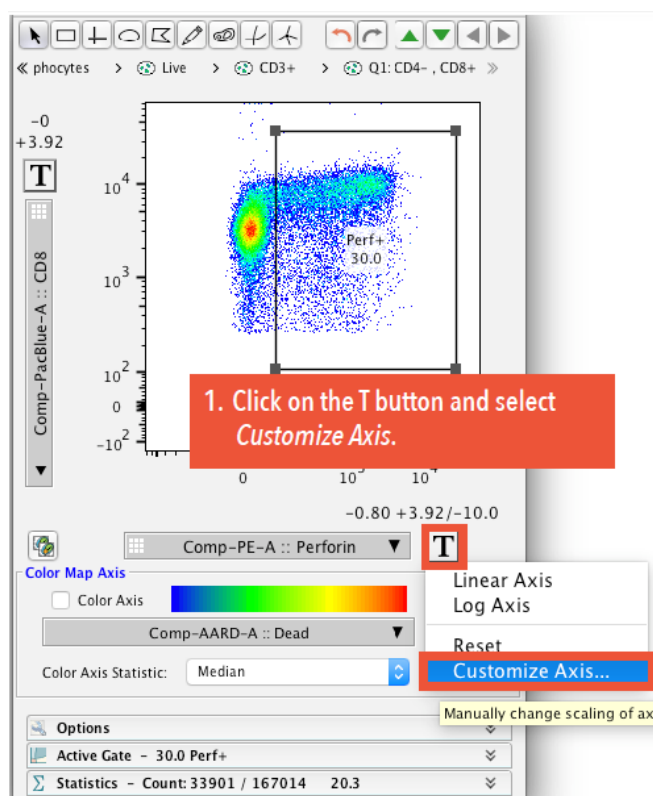
數值轉換 (Transformation)

受限於存的檔案類型或是上機所使用的操作軟體，瀏覽點陣圖或直方圖時，細胞的分佈情形也許不是最理想的狀態，因此，調整 **parameter** 的座標軸刻度可改善細胞分佈的視覺效果，有利於呈現目標細胞群。在 X、Y 軸旁有數值轉換的功能鍵 (Transformation)，使用者可輕易地調整座標軸刻度，其中雙指數 (Biexponential, Biex) 分佈常應用於作圖中，在螢光強度接近於零時呈線性；強度增加時則呈對數分佈。

練習活動 以 T (Transformation) Button 改變作圖呈現效果

1. 點擊 X 軸 Perforin parameter 旁的 “T button” 
2. 在出現的選單中點選 “Customize Axis”，出現的新視窗將 Perforin parameter 裡所有的細胞資料以 histogram 的方式呈現。
3. 注意 Scale 選項將自動設定為 Biex。選擇以 Biex 為刻度時，可以使用以下功能：

- ◆ X 軸右方 “-/+ button” 可調整展示的最大螢光值。
- ◆ Extra Neg Decades slider bar：增加或移除展示的最小螢光值區間。
- ◆ Width Basis slider bar：控制螢光參數接近於零附近區域的刻度壓縮程度。



4. 將 Extra Neg Decades slider bar 向左移動，使所有細胞往左移動，減少左方空白區間。

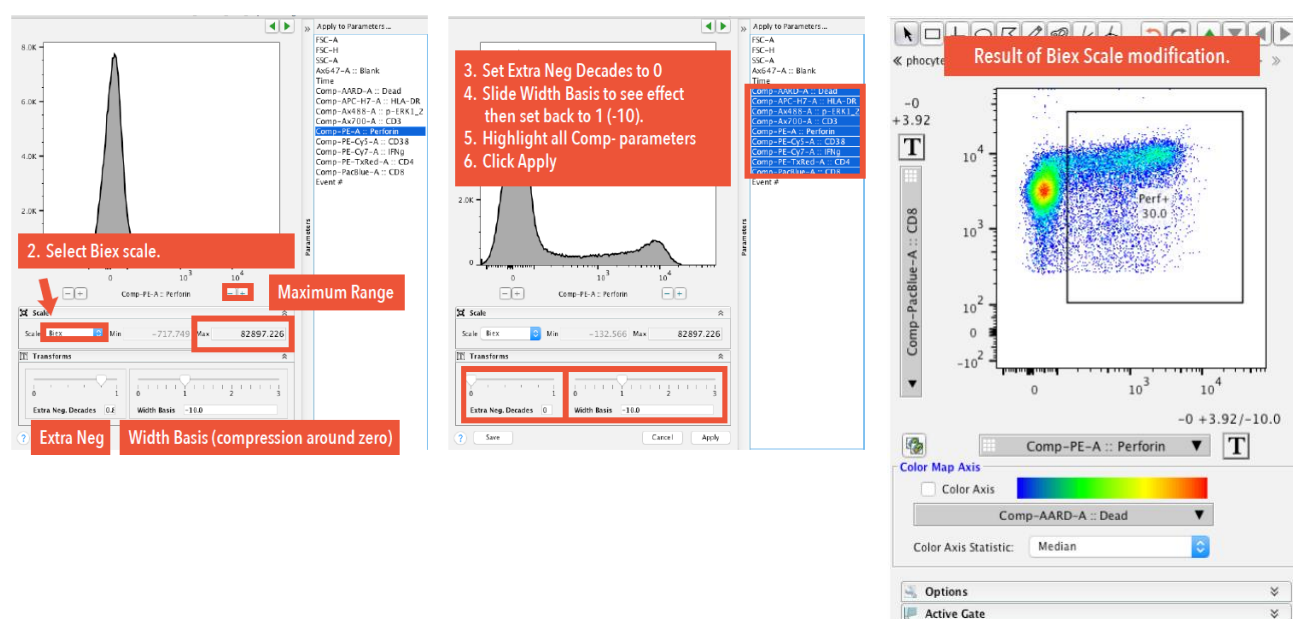
試試看將 Extra Neg Decades 設定為零。

5. 左右滑動 Width Basis slider bar，觀察調整後細胞族群分布的差異，最後將 Width Basis

設定為 1 (-10)。

6. 在視窗的最右側有 Apply to parameters 欄位，將 Comp. parameter 全部選取後點擊

Apply。



所有選取的 comp. parameter 將和上述刻度和區間設定一致，調整的好處是減少低螢光訊號的空白區域 (Extra Neg Decades 從 0.8 降低至 0)，保留最大螢光值和零附近的壓縮區間設定。每一個螢光參數都可以獨立進行調整，調整前後並不影響原始數據，只會改變呈現的效果。

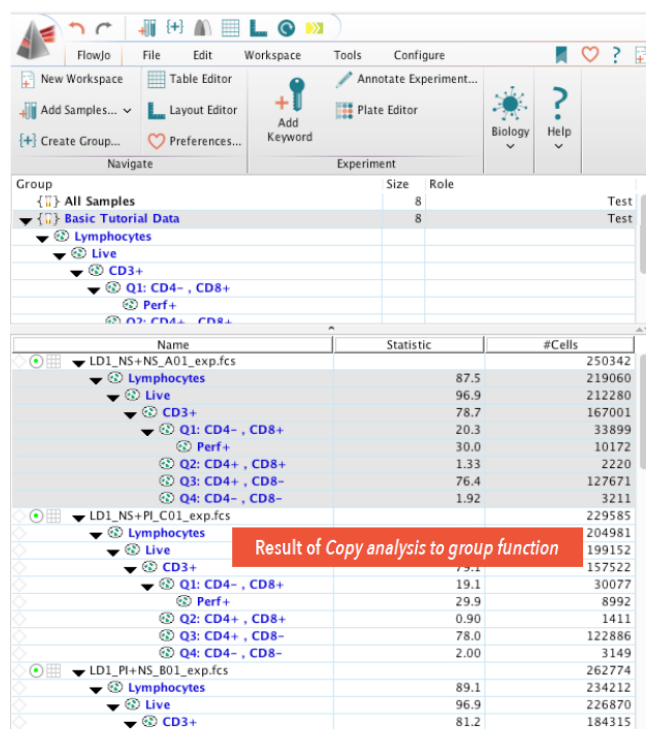
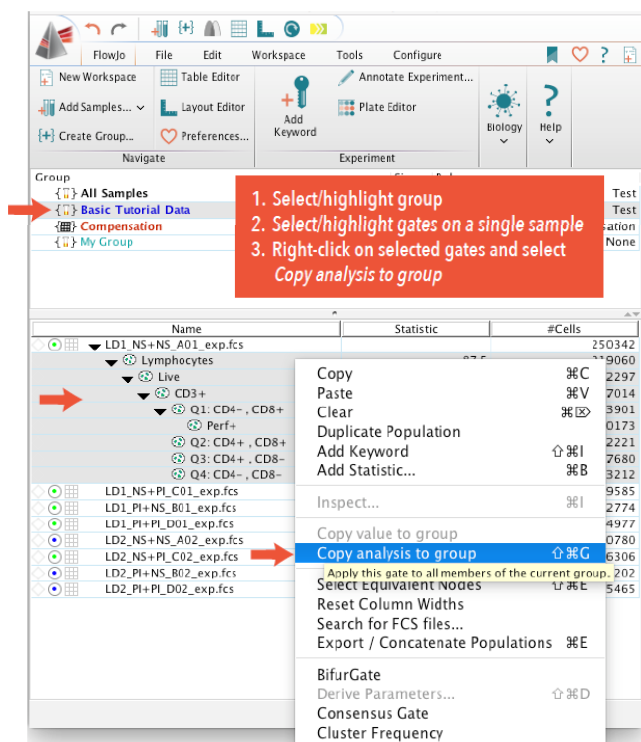
圈選階層 (Gating Hierarchy)

我們已經將樣本按照實驗設計進行圈選，接下來就可將一整組圈選模式套入群組，而這一系列圈選的過程也在 **Workspace** 以階層的方式呈現。

練習活動 圈選階層套入群組

回到 **Workspace window**，圈選時所新增的子群將排列在名稱的下方，試試看將圈選階層套入至整個族群：

1. 點選 “Basic Tutorial Data Group” (應有 8 個樣本)。
2. 將樣本下新增的所有 Gate name 反白。
3. 在反白的區域上按右鍵 (或 **ctrl**+滑鼠左鍵)，選擇 “Copy analysis to group”，圈選階層就會套入至群組中每個樣本，Gate name 字體顏色由黑色變成藍色 (同群組字樣顏色)。



調整群組圈選 (group-owned gate)

當圈選階層套入群組後，仍舊可以針對群組內某個樣本進行調整。

練習活動 調整群組內單一樣本的圈選

1. 雙點擊樣本圈選階層下的 “Q1 CD4- , CD8+ population node”，跳出 Perforin vs CD8 parameters 作圖視窗。
2. 移動 Perf+ gate 位置，此時，Workspce 視窗內顯示的 Perf+ 字體變回黑色，代表這個 gate 和群組中其他樣本不一樣。
3. 欲將調整後的 Perf+ gate 套入群組中所有樣本，可以照著以下方法執行：
 - ◆ 選取目標群組
 - ◆ 選取 Perf+ gate
 - ◆ 按滑鼠右鍵，點選 “Copy analysis to group”
 - ◆ 在跳出的視窗中選擇 “Yes”

調整後的 Perf+ gate 立即套入群組中，字體顏色也會和群組顏色一致。

1. Grab and move gate position

Black gate node color = modified gate not group owned

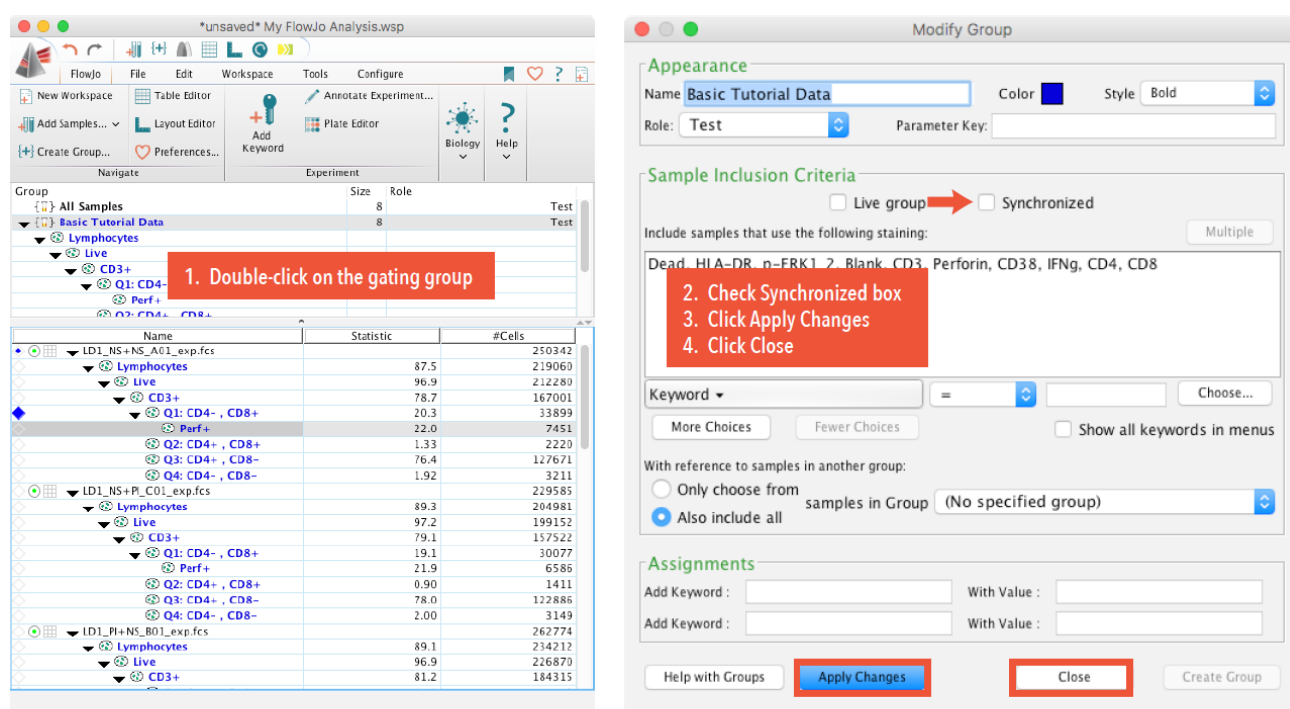
Apply gate change to group

- Highlight the gating group
- Highlight the black gate group
- Right-click and select *Copy analysis to group*

前一個練習活動示範如何調整單一樣本，並將新的圈選設定套入群組中。除此之外，FlowJo 也有另一個功能，可以在調整單一樣本的 gating 時，將調整的結果同步匯入整個群組，不需要再反覆選取圈選階層。以下示範如何進行同步化：

練習活動 同步化修改群組的細胞圈選設定

1. 在群組分析空間 (Groups pane) 中，雙點擊群組名稱 (如：Basic Tutorial Data)，跳出 Modify Group window。
2. 選取 “Synchronized”，並點擊 “Apply Changes”。
3. 任一樣本圈選條件改變，都會自動匯入同群組內所有樣本中。



練習活動 關閉作圖視窗

1. 選取任一個作圖視窗，點擊視窗最上方的關閉按鈕。
2. 快速鍵：**Shift** + **Ctrl** + **W** (Windows) 或 **Shift** + **Command** + **W** (Mac)，關閉所有作圖視窗。

課程三 數據統計 (Statistics)

統計欄位 (Statistics Band)

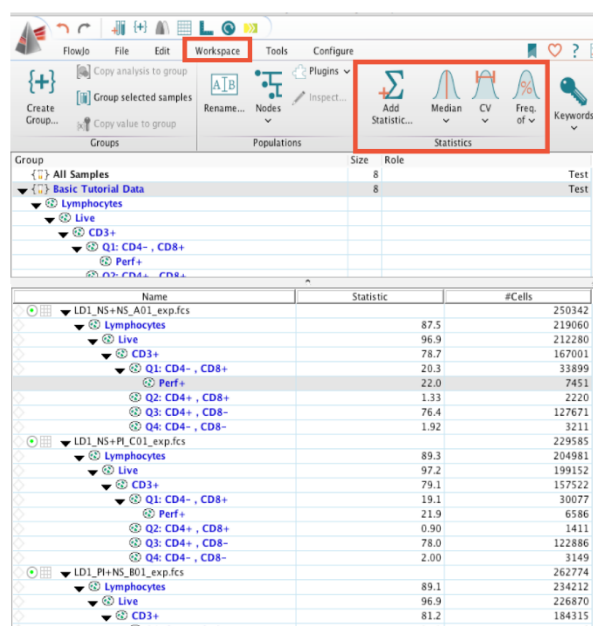
FlowJo 中最基本的統計值為子群佔母群的比例 (Frequency of Parent)，在統計欄位中多種統計數值和功能按鍵，包括：細胞數量 (Event Count)、螢光中位數和平均值 (Median and Geometric Mean Fluorescence Intensity)、變異係數 (Coefficient of Variation) 和目標族群比例 (Frequency of Population) 等統計值。

新增統計資料(Add Statistic)：選取後跳出統計對話框，對話框內可使用所有的統計選項。

中位數 (Median)：點選後在 Workspace 新增目標細胞群的螢光強度中位數。

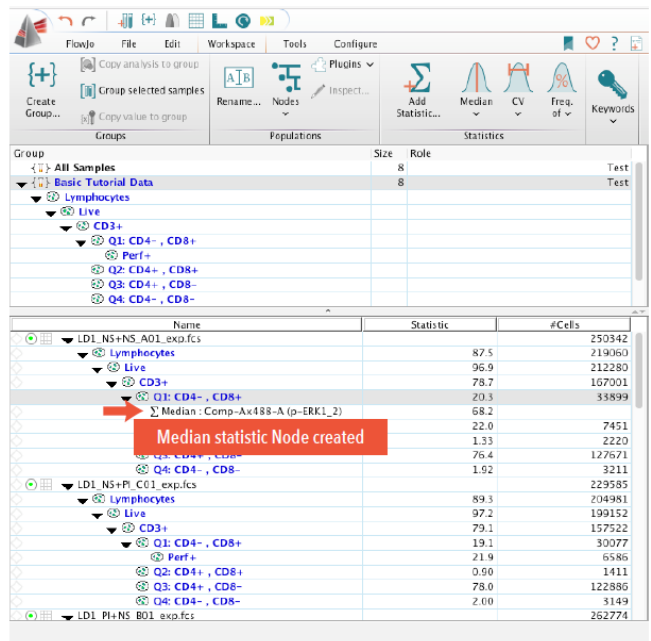
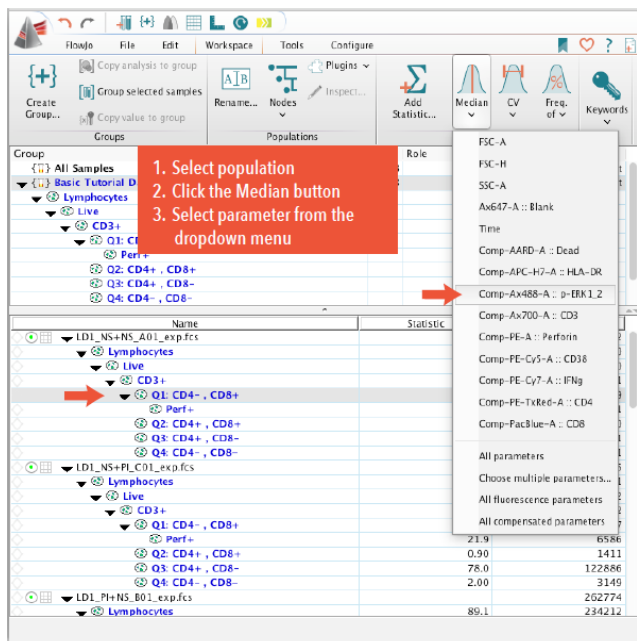
變異係數 (CV)：點選後在 Workspace 新增目標細胞子群螢光參數的 CV 值。

族群比例 (Freq. of)：顯示目標細胞群對上一層細胞群之比例。



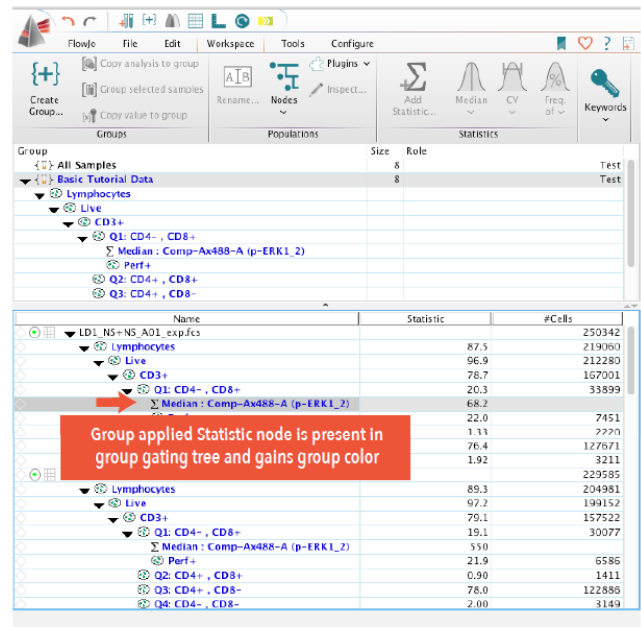
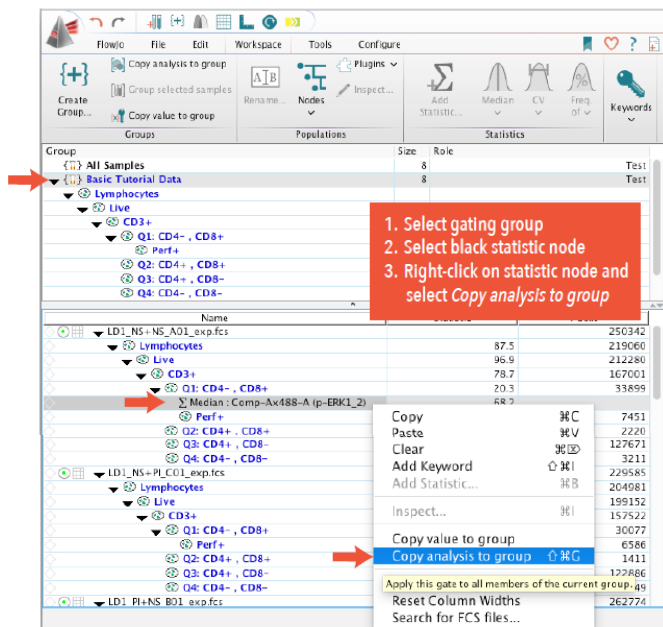
練習活動 新增中位數統計值

1. 選擇 Workspace 中的 "Q1: CD4- , CD8+ population"。
2. 在 Statistics Band 點選 "Median"，跳出下拉式選單。
3. 選擇 "Comp-Ax488-A :: p-ERK1_2" 螢光參數後，中位數出現於 Q1: CD4- , CD8+ population 下方列。



練習活動 中位數套入群組

1. 選擇一個群組，在樣本的下方點選中位數值列。
2. 於數列上按右鍵，點選“Copy Analysis to Group”。



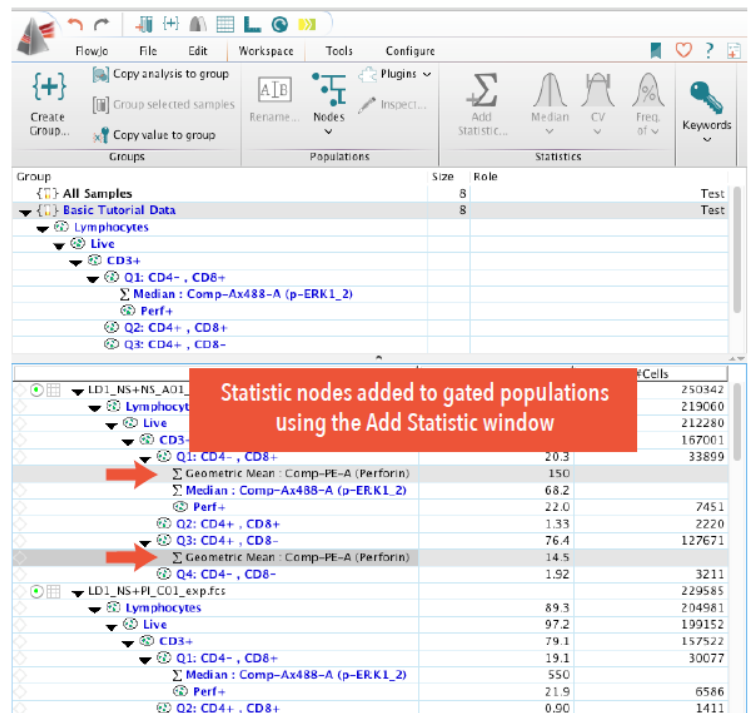
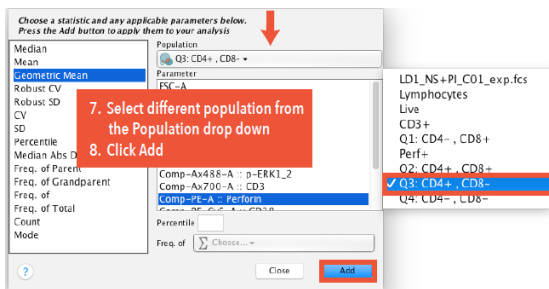
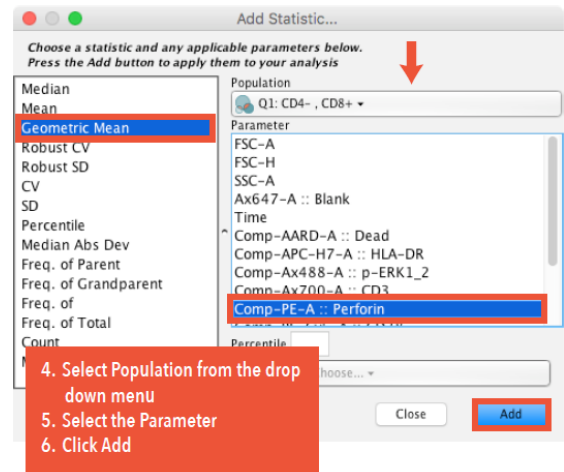
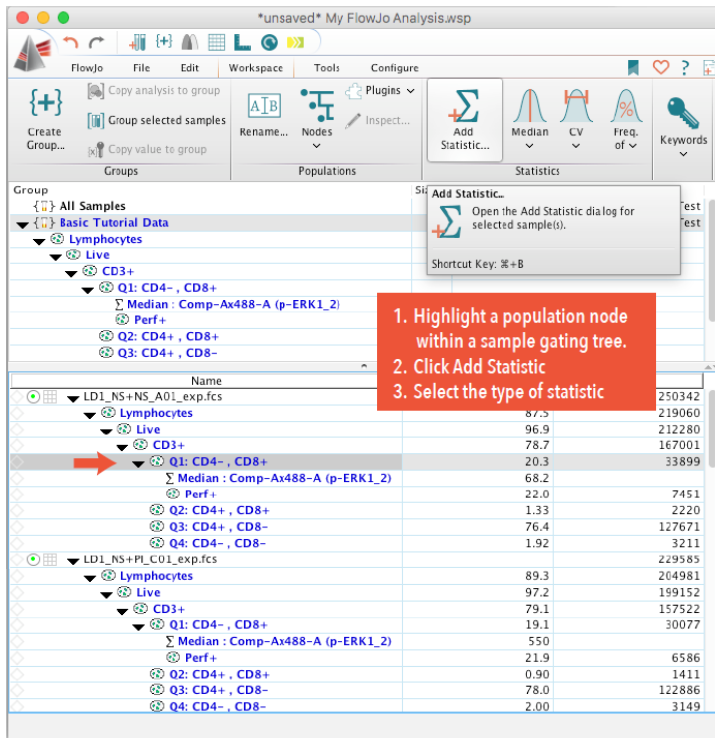
此中位數值列將套入整個群組，數列的字體顏色也會轉為群組的字體顏色。

新增統計視窗

點選 **Statistics Band** 內的 **Add Statistic** 選項時，出現新的統計視窗，在這個視窗內可以任意選擇需要的統計數值及目標族群，也可以快速的匯入至其他族群，並在 **Workspace** 中顯示這些數值。

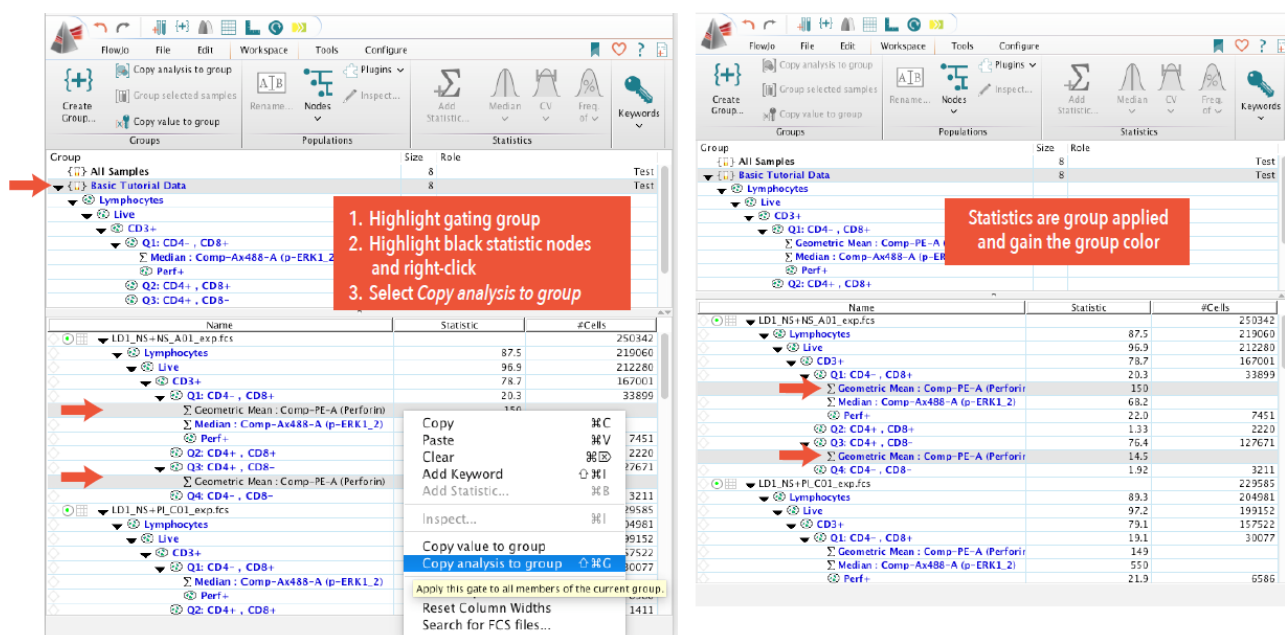
練習活動 新增多個統計值

1. 於階層中點選目標族群，如：Q1 : CD4- , CD8+ gate。
2. 在 **Statistics Band** 中點擊 “Add Statistic”。
3. 選擇欲使用的統計值，如：Geometric Mean。
4. 檢查視窗右方 **Population** 選單是否為欲分析的目標族群。
5. 選擇螢光參數，如：Comp-PE-A :: Perforin。
6. 點擊 “Add”，螢光強度平均值出現於 Q1 : CD4- , CD8+ 下方，而統計視窗還保留在畫面中，可以再繼續增加其他統計值。
7. 試試看在 **Population** 選單選擇另一細胞群，如：Q3: CD4+ , CD8-。
8. 點擊 “Add” 後 **Workspace** 中出現第二個統計值。
9. 關閉視窗。



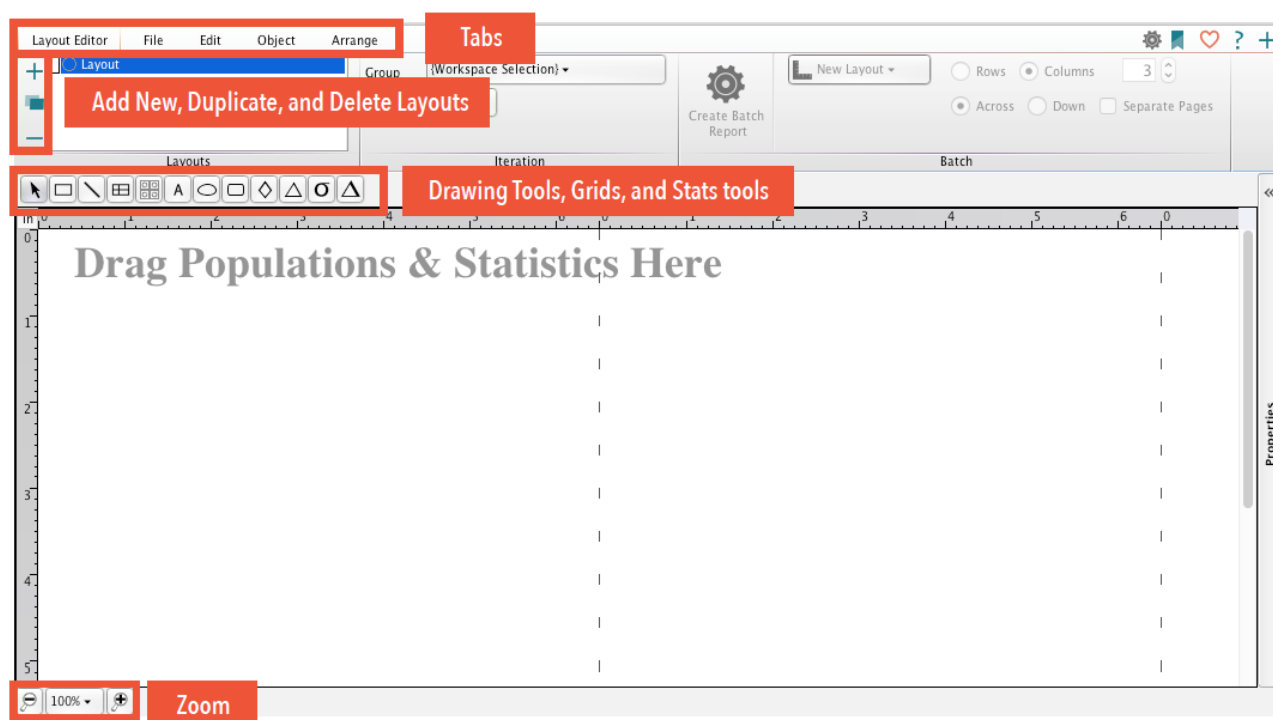
和細胞圈選相同，這些統計值也可以套入整個群組中：

1. 點選欲套入的群組。
2. 再點選已設定好統計數值的樣本。
3. 按右鍵，點擊 “Copy Analysis to Group”。



課程四 作圖輸出 (Layout Editor)

樣本圈選和統計分析皆完成後，接下來我們可以輸出結果取得報告。作圖輸出 (Layout Editor) 為另一獨立的工作臺，在工作臺內有多種工具幫助輸出圖形和統計數據報告，輸出報告形式可為單一圖片或是批次分析結果。



作圖編輯視窗組成元件

工作欄位 (Ribbon)：Layout Editor 的工作欄中有五個工作鍵，執行不同功能。

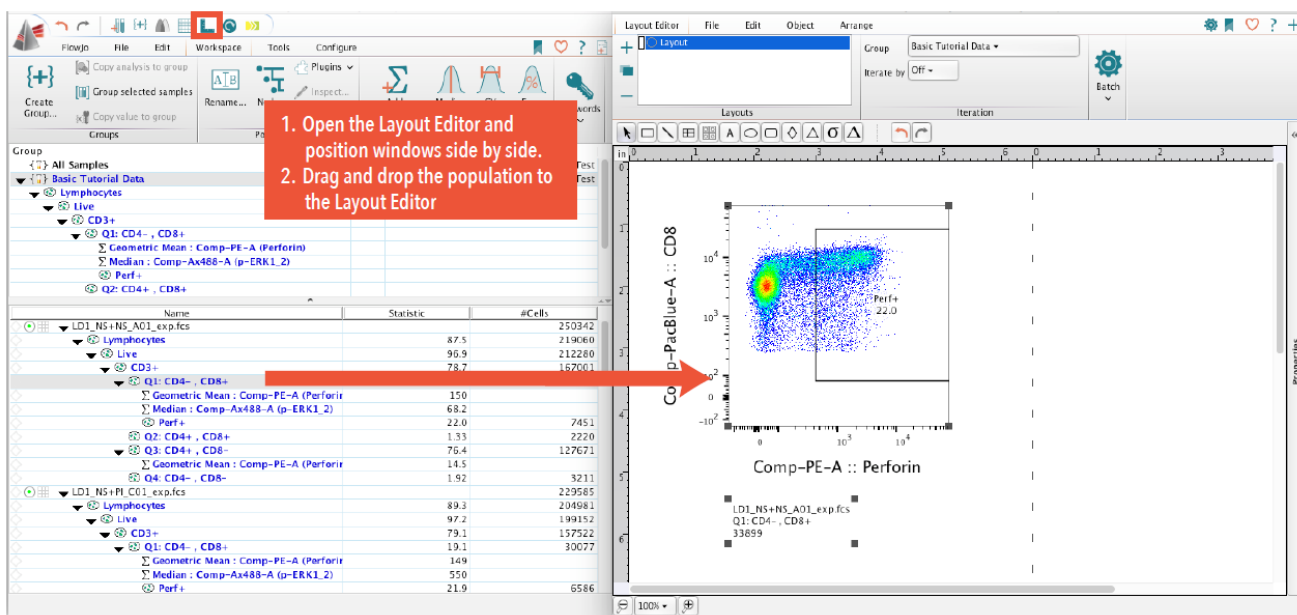
新增、複製及刪除 (Add New, Duplicate, and Delete Layouts)：在 Layout Name 欄位旁，有三個工作鍵分別為新增、複製及刪除，雙點擊 Layout Name 可重新命名此 Layout。

編輯工作 (Drawing Tools, Grids, and Stats tools)

檢視放大 (Zoom)

練習活動 樣本作圖載入 Layout Editor

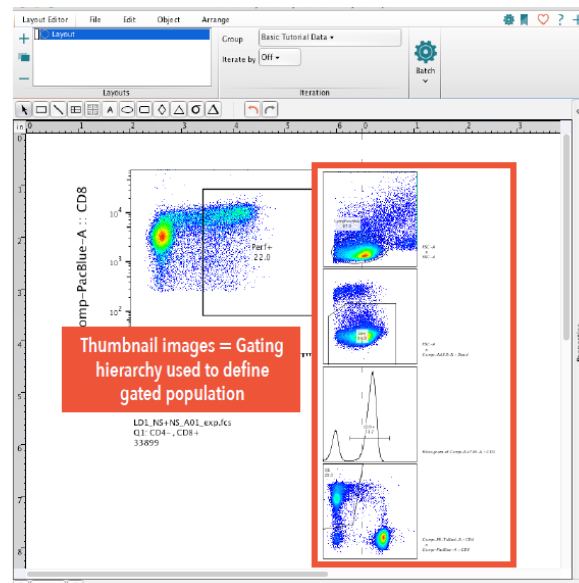
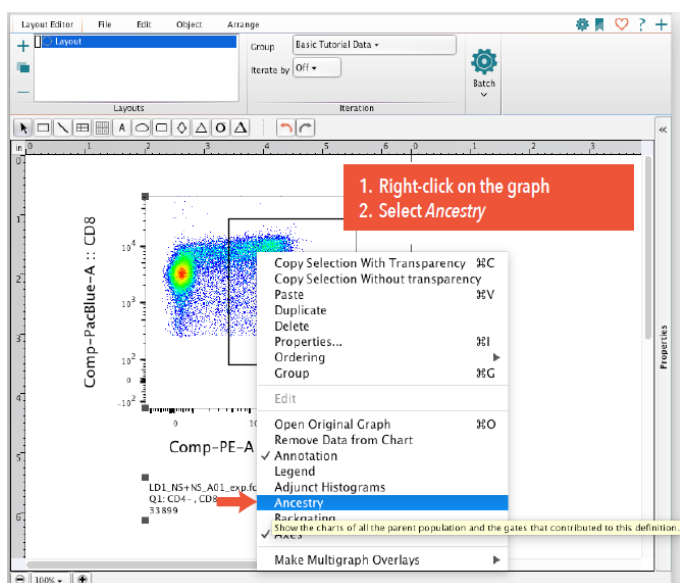
1. 在 Workspace 工具列中，點選  開啟 Layout Editor，將 Workspace 和 Layout Editor 並列在螢幕上，方便操作。
2. 選擇 Workspace 中目標族群，如：Q1: CD4⁻, CD8⁺，點擊後拖曳至 Layout Editor。



在 Layout 中載入作圖後，此圖下方以文字方塊顯示該圖之基本資訊，包括樣本名稱 (Sample Name)、族群名稱 (Gate Name) 和數量 (Event Count) 等。

練習活動 輸出樣本的圈選階層 (Gating Hierarchy Upstream)

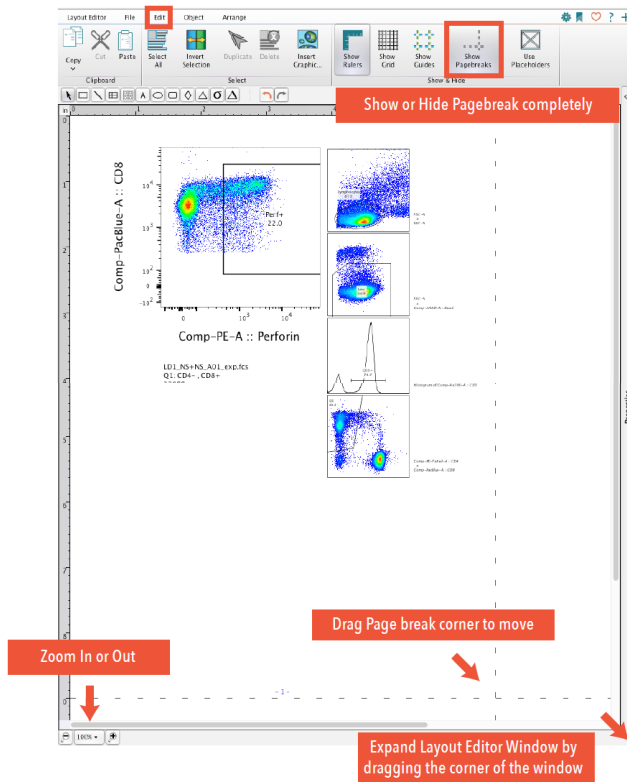
1. 在作圖上按右鍵。
2. 出現下拉式選單，選取 “Ancestry”，展示此 gating population 所有的 parent populations，並以 Gating Hierarchy 縮圖 (thumbnail) 的模式顯示在原作圖的右側。



下列有幾種方式可調整 Layout Editor 視窗或分頁線，方便瀏覽完整的 thumbnail 及其他的

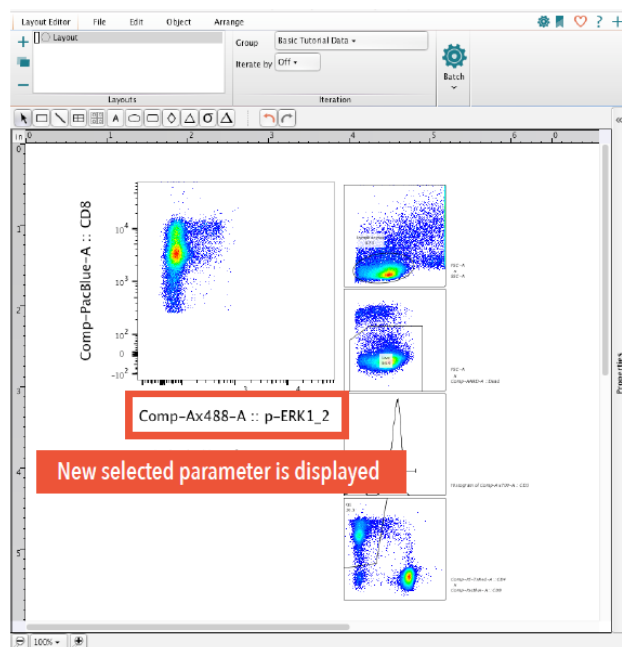
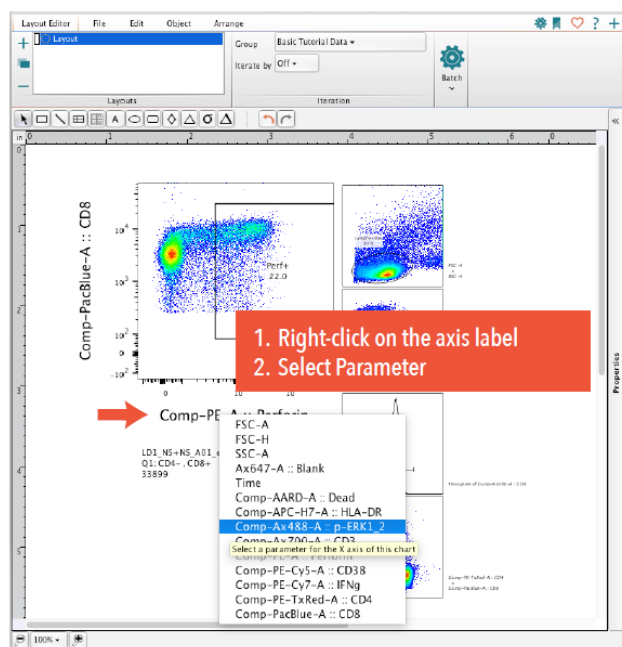
資訊：

- ◆ 視窗左下角 Zoom In 或 out。
- ◆ 拖曳視窗的截角放大或縮小。
- ◆ 點選分頁虛線焦點，拖曳至適合的位置。
- ◆ 點選 “Edit tab”，在右方 Show/Hide 欄位點擊 “Show Pagebreaks” 取消顯示分頁虛線。



練習活動 改變顯示作圖的螢光參數

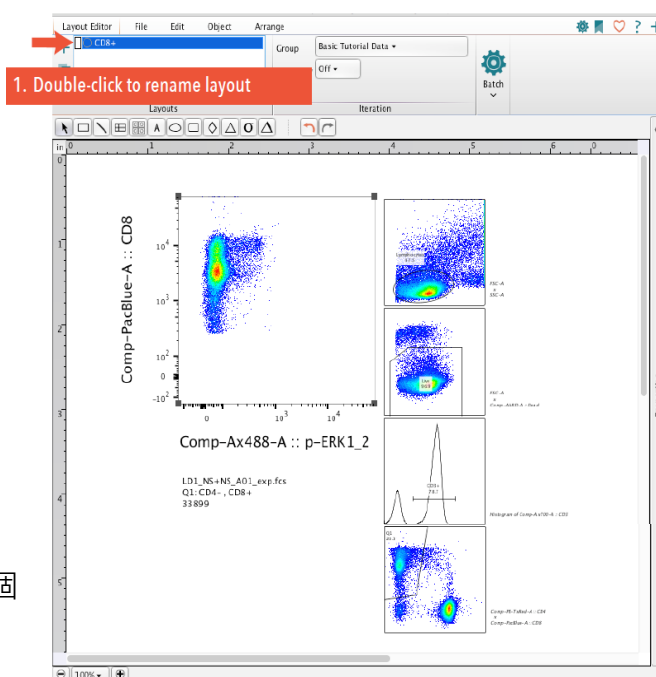
1. 在作圖上選擇任一座標軸，點擊滑鼠右鍵。
2. 跳出下拉式選單，選擇其他螢光參數，直接在 Layout window 更改顯示的參數。



練習活動 重新命名 Layout

1. 雙點擊 Layout Name，輸入更適合描述此 Population 的名稱，幫助你判斷每個樣本的 Phenotype 或是其他特徵上的差異。

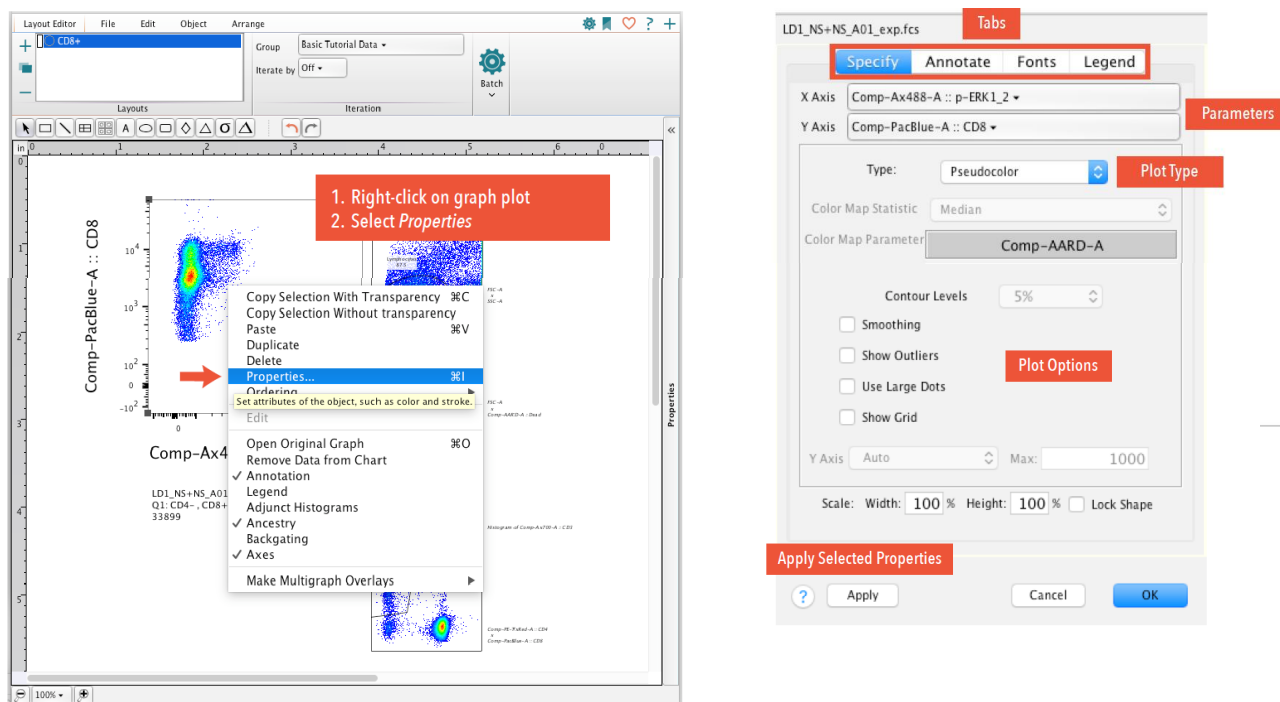
在右方示範圖中，我們將 Single Cell Event、CD3+ (vs SSA)、CD8+ (vs SSA) 定義 CD8+ cytotoxic T cells，因此將這個 Layout 命名為 CD8+。



練習活動 開啟圖形特性 (Graph Definition Property) 視窗

Graph Property 可以調整圖形格式與顯示方式，開啟 Graph Property 方法如下：

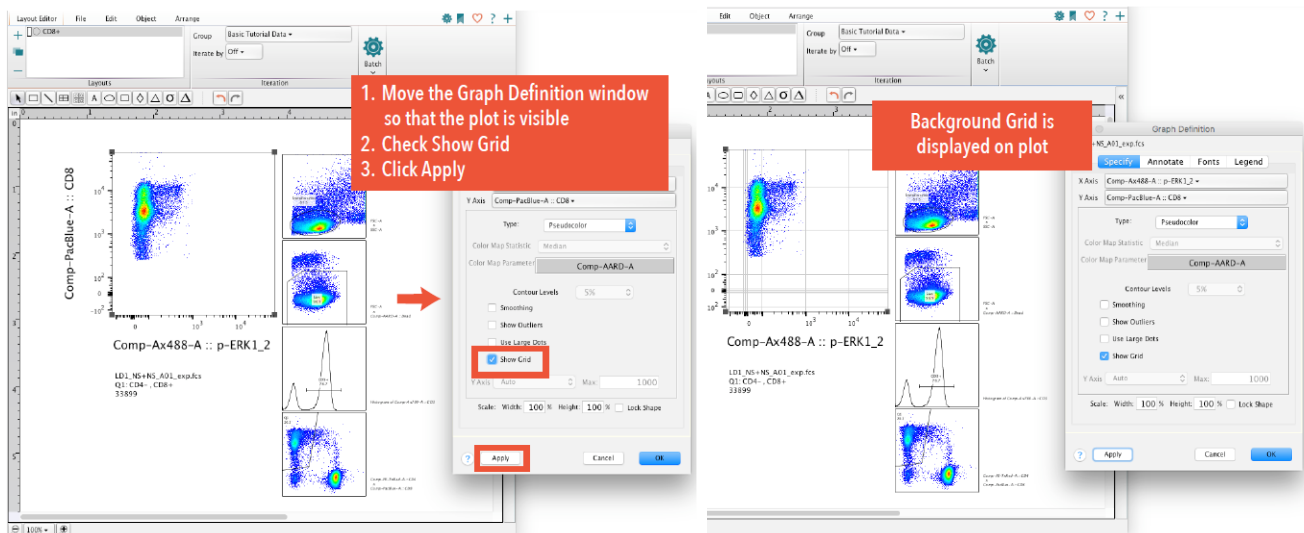
1. 在作圖上點擊滑鼠右鍵，點選“Properties”開啟視窗。



視窗中包含圖形格式和文字選項，上方有四個工具鍵分別為 Specify、Annotate、Fonts 和 Legend，一開始跳出的視窗展示 Specify，在 Specify 下方可改變 Displayed Parameters、Type of Plot 和 Display Options，接下來就試試看改變圖形的格式吧！

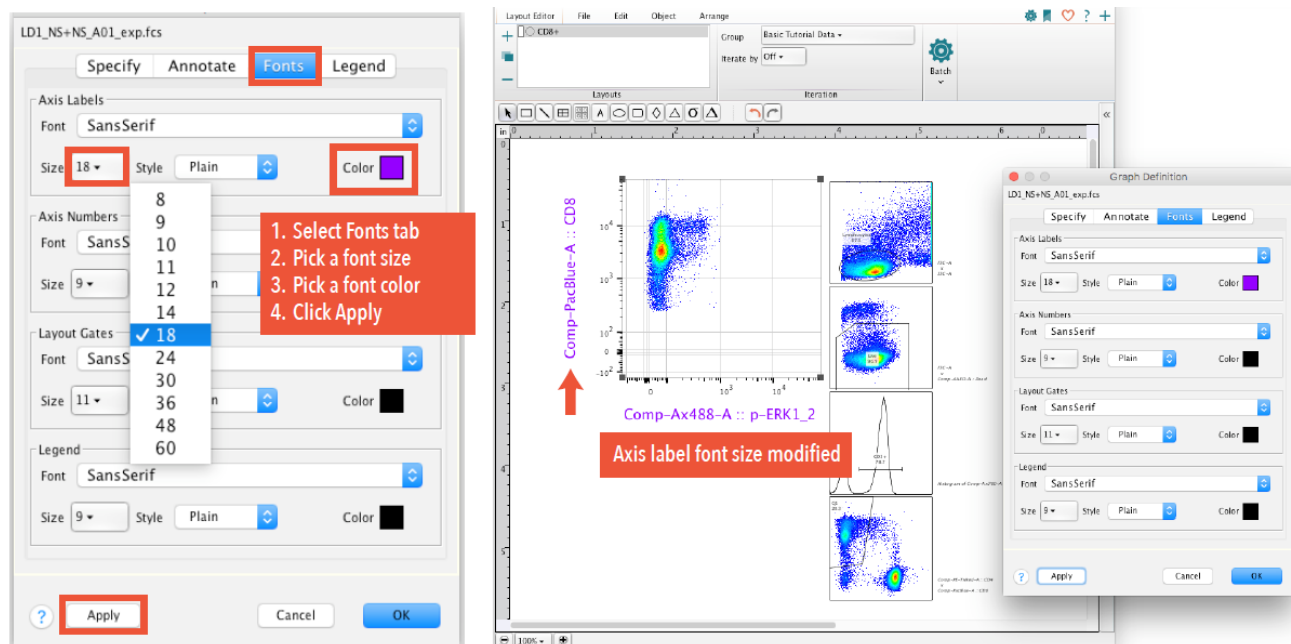
練習活動 顯示圖形背景網格

1. 將 Property window 移至 Layout 的右方。
2. 勾選“Show Grid”。
3. 點擊“Apply”。



練習活動 放大坐標軸字體

1. Property window 中選擇 "Fonts tab"。
2. 在 Axis Labels 區塊點選 "Size"，放大文字 (如：18 pt)。
3. 點擊 "Color Box" 更換字體顏色。
4. 點擊 "Apply"。



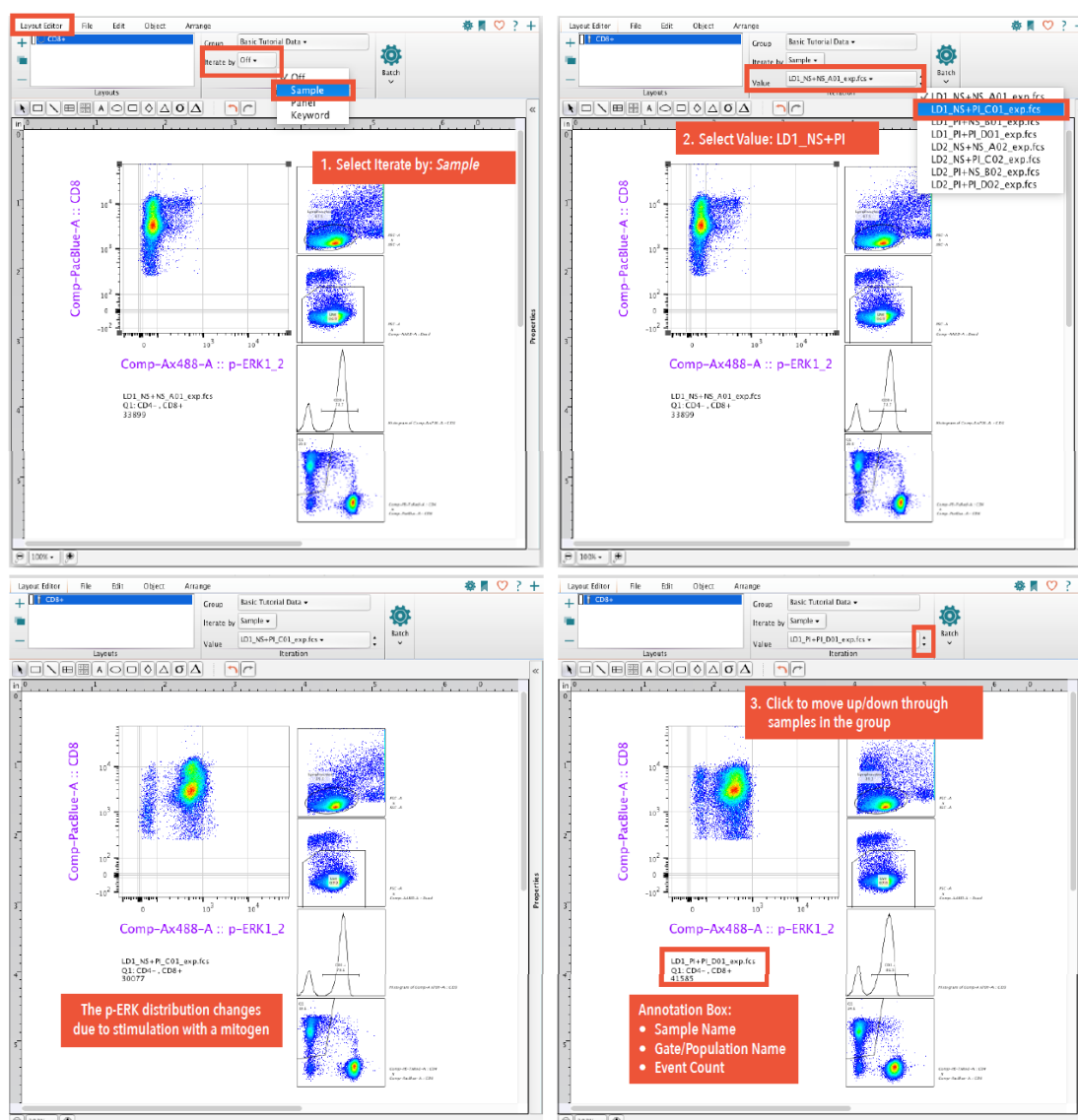
Iteration

Iteration 欄位於 layout 欄的右方，有 Group 和 Iterate by 兩個選項。在 Group 中，選取欲瀏覽或輸出成報告的樣本群組，而 Iterate by menu 則方便使用者切換同群組下不同的樣本，更容易觀察樣本間的差異，以下將示範如何使用 Iteration menu 幫助瀏覽樣本。

練習活動 Iteration

1. 點擊 "Iterate by"，選取 "Sample" 後下方出現 "Value" 選單。
2. 點擊 "Value"，並選擇另一樣本 (如：LD1_NS+PI_C01_exp.fcs)，此時作圖中資料改

顯示 LD1_NS+PI_C01_exp.fcs，點擊 Value 右側的上下箭頭可以瀏覽前後的樣本。

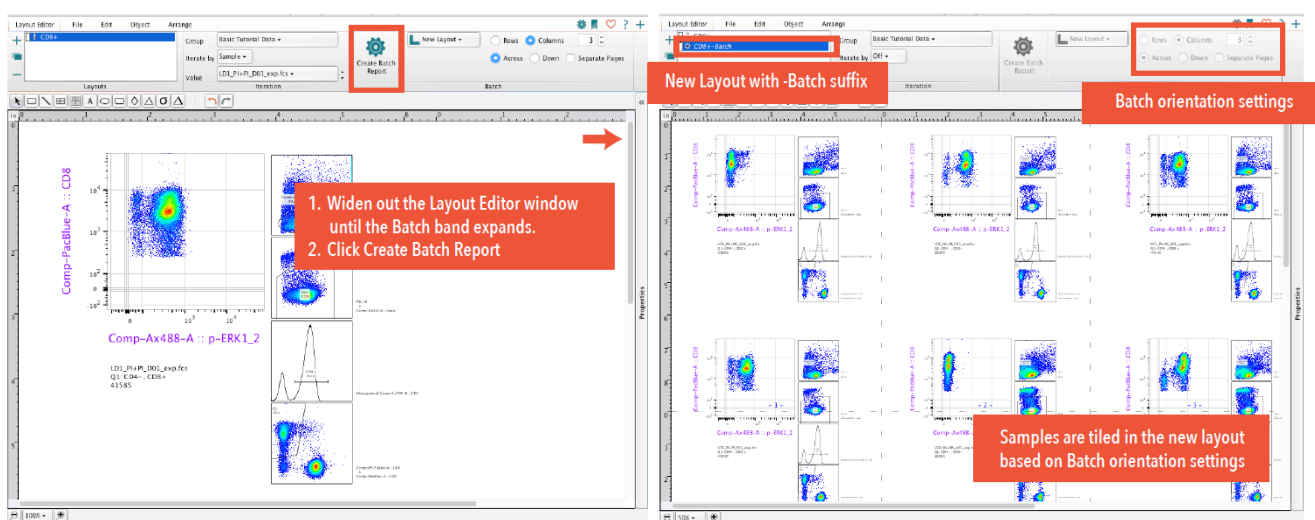


批次報告 (Batch Report)

將作圖與統計圖表於 Layout editor 整理完成後，使用批次輸出得到結果報告。

練習活動 新增批次報告

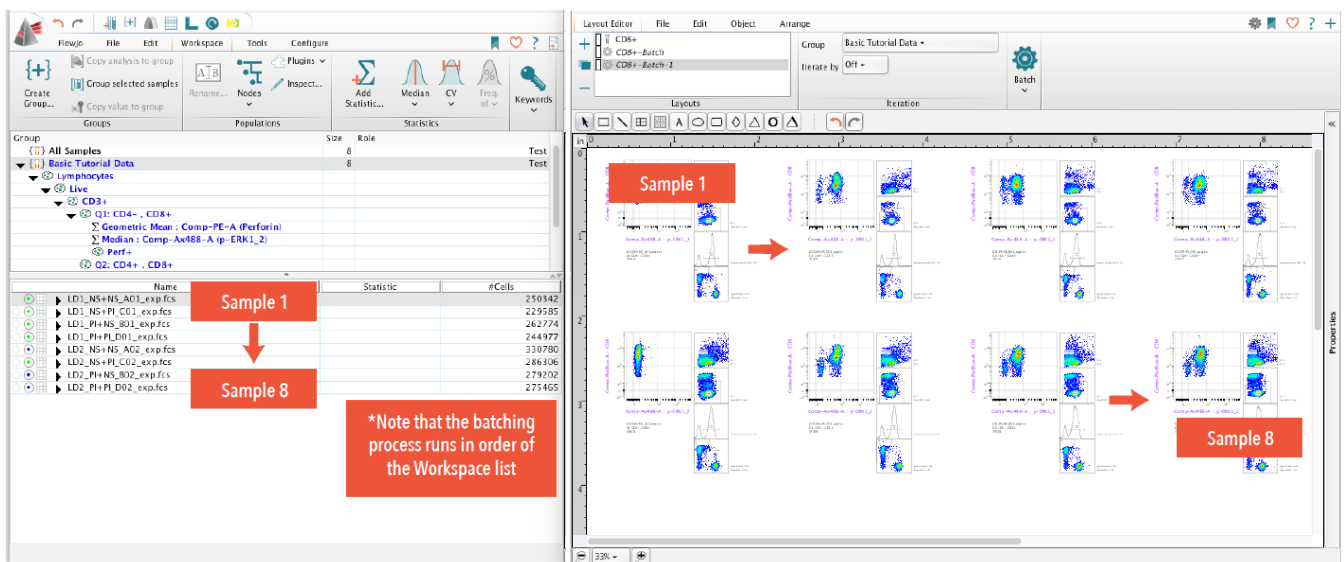
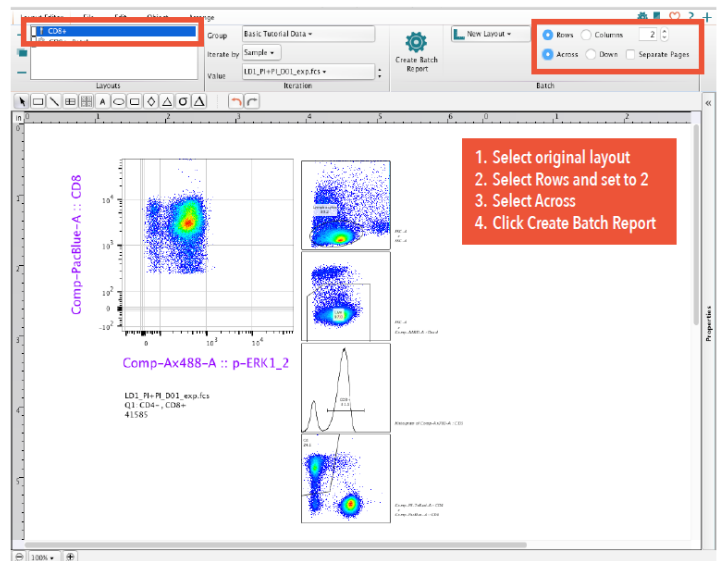
1. 將 Layout Editor 視窗往橫向拉動至顯示 Batch band。
2. 點擊 “Create Batch Report”。



新增 Batch Report 後，在 Layout 欄位出現一個新的 Layout，命名為原本的 Layout Name-Batch (如 Layout Name 為 CD8+，Batch Report Name 將為 CD8+-Batch)。選擇的群組中每個樣本都會按照 Batch Orientation Setting 進行排列，在上方的示範途中，選擇以 3 column 進行 batching，接下來我們可以試試看設定不同的 Batching Orientation。

練習活動 修改 **Batching Orientation**

1. 點選原 Layout “CD8+”。
2. 在 Batch 欄位，點取 “Rows button”，並在數字框內輸入 2。
3. 點取 “Across button”。
4. 點擊 “Create Batch Report”，完成輸出。

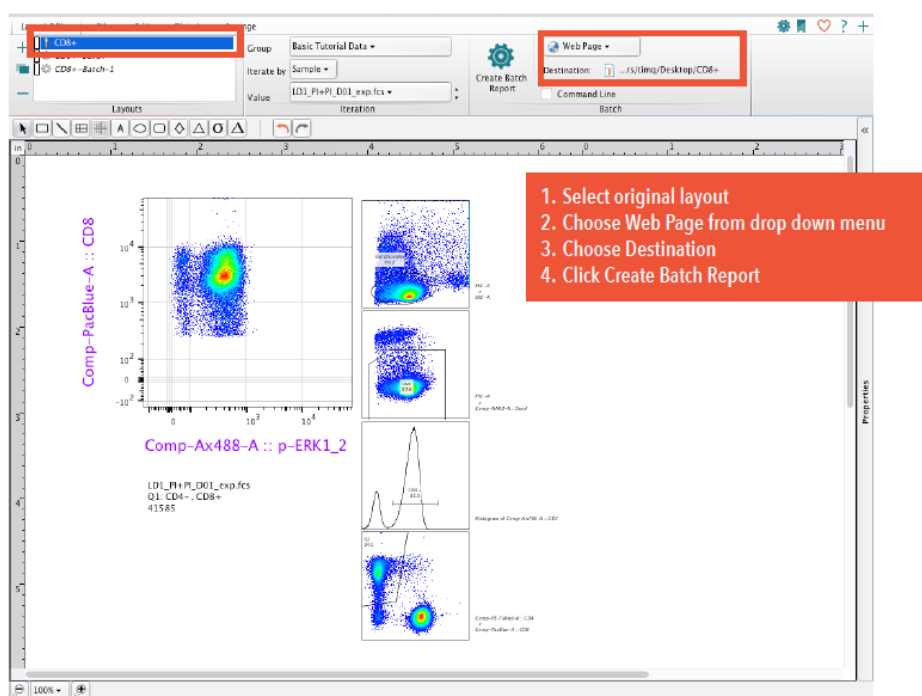


照前述設定 **Batch Report**，所有的樣本將分為兩列排列，而在群組中原有 8 個樣本，所以每列共 4 個樣本，樣本順序則按照群組中的排序由左上到右下排列。

現在我們來試試看將 **Batch Report** 輸出為網頁！

練習活動 批次輸出為網頁

1. 選擇原 Layout “CD8+”。
2. 在 Batch 欄位點選 “Web Page”。
3. 點擊 “Destination”，並選擇存取網頁連結 (.html file) 的目標位址。
4. 點擊 “Create Batch Report”，完成輸出。



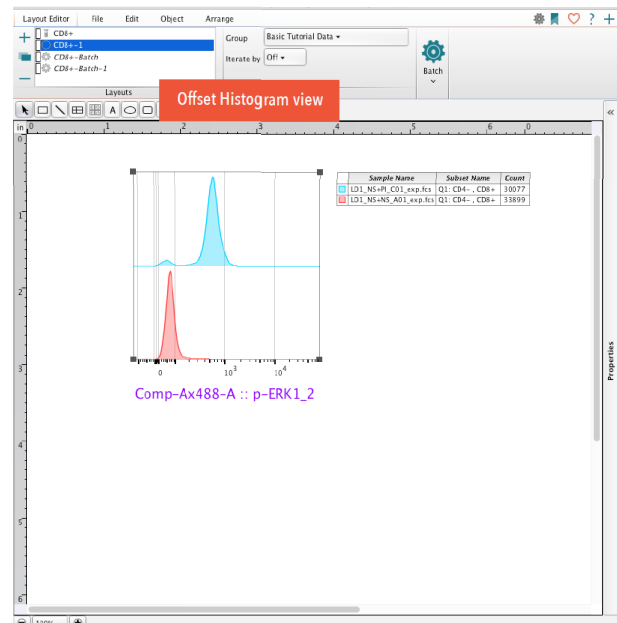
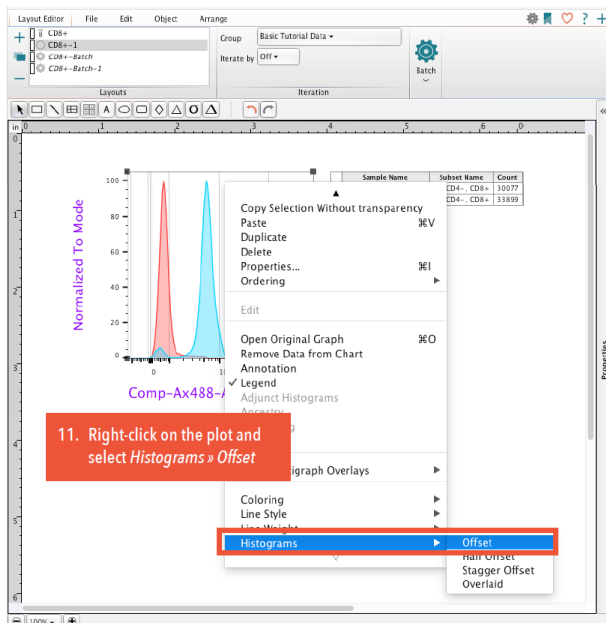
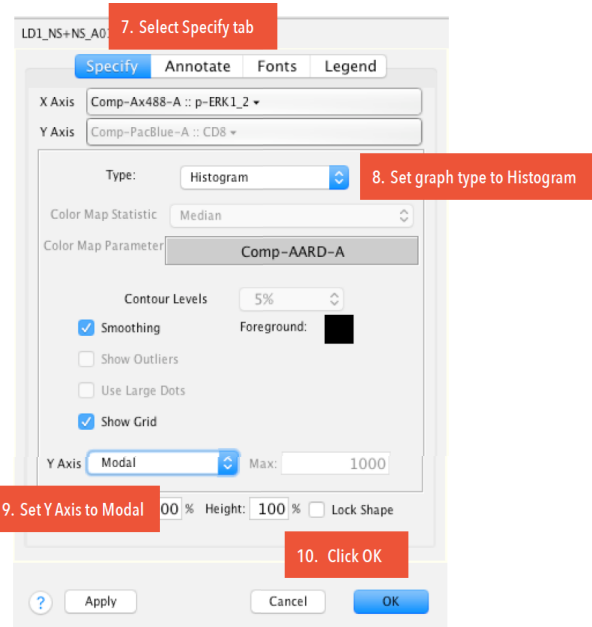
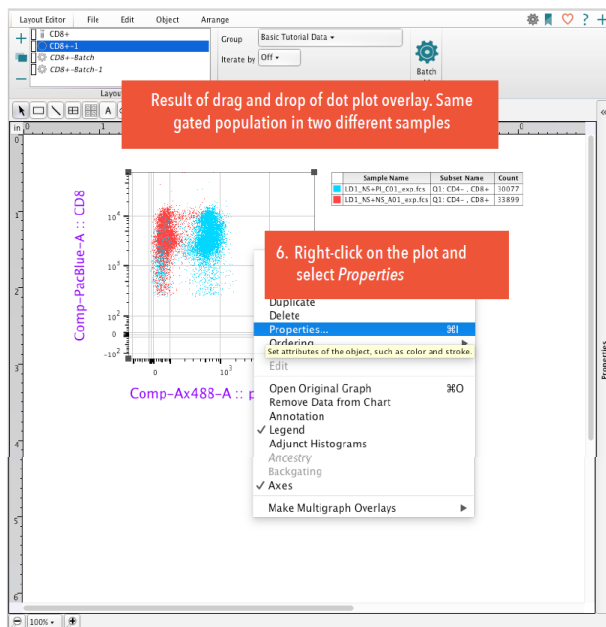
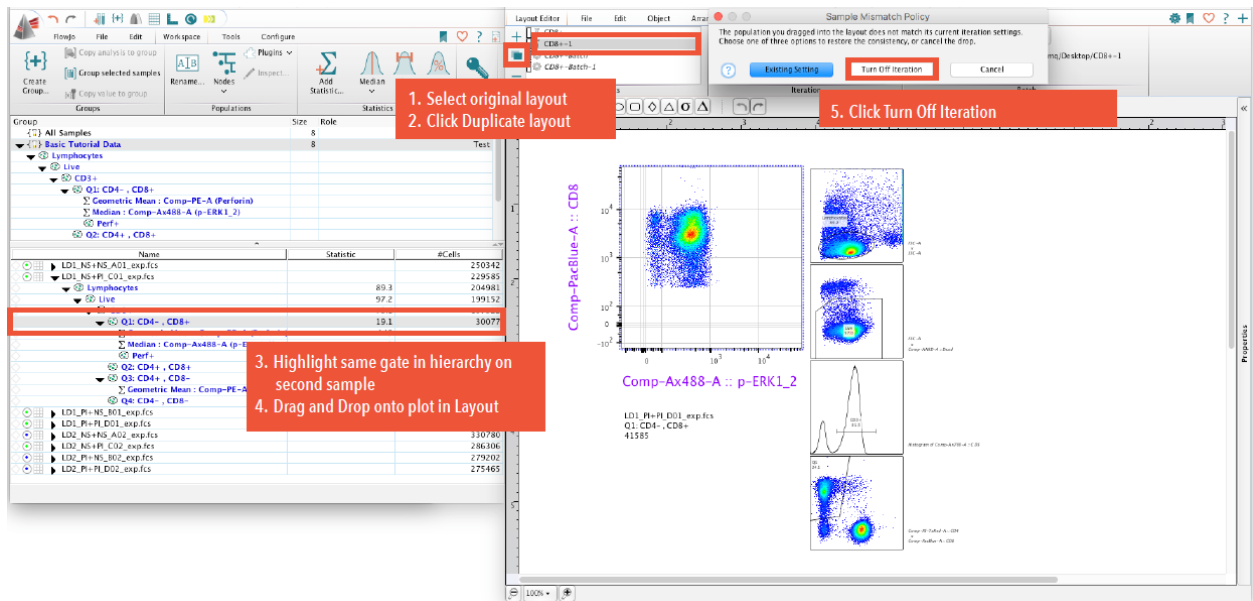
存取完成後，目標位址出現新資料夾（名稱為 FlowJo Web Files），內含 web page .html file 及每一個樣本的 PNG image，Image 也將自動匯入在網頁瀏覽器中。除了存取為網頁，Batch Report 也可以直接列印或是儲存為 PDF、PowerPoint 檔案。

疊圖 (Overlay)

來試試看將多個樣本呈現至同一張作圖吧！

練習活動 新增疊圖

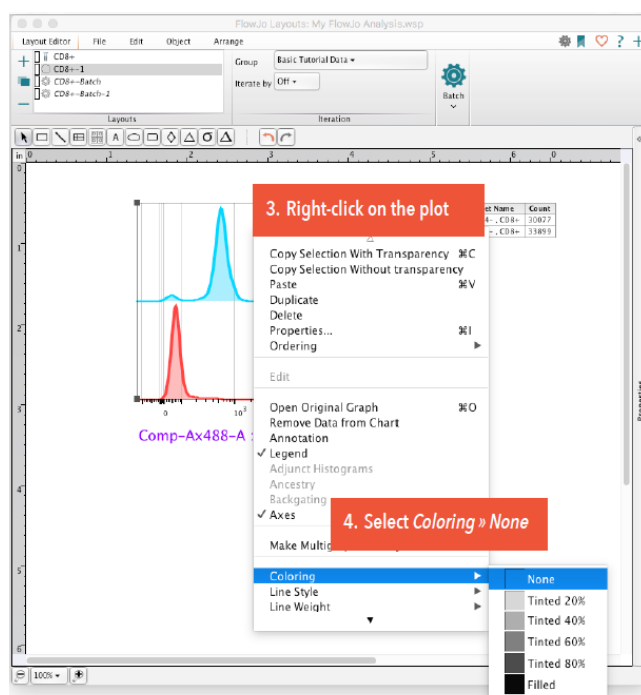
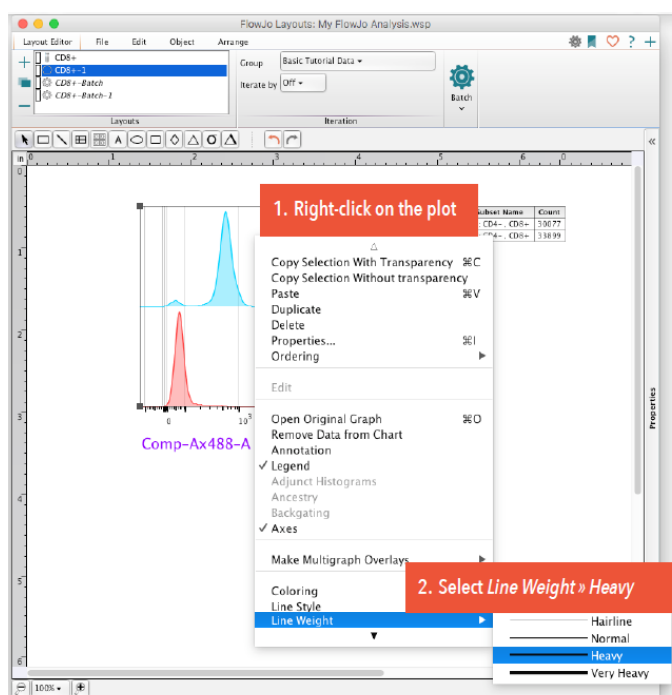
1. 在 Layout 欄位中選擇 “CD8+”。
2. 點擊 Layout 左側的複製鍵 。
3. 回到 Workspace，點選不同樣本 (LD1_NS+PI_ C01) 中同一子群 (Q1: CD4- , CD8+ population)。
4. 將 LD1_NS+PI_C01 子群直接拖曳至 layout editor 視窗內的點狀圖上，此時 LD1_NS+PI_C01 event 匯入至 LD1_NS+NS _A01。
5. 跳出 Iteration Mismatch Warning 視窗，點選 “Turn Off Iteration Option”。完成疊圖後，樣本資料框格將取代原本的 Thumbnail。
6. 在 Dot Plot Overlay 上按滑鼠右鍵，選擇 “Properties”，帶出 Graph Definition window。
7. 點選 “Specify tab”。
8. 選擇 “Type”，在下拉式選單中將 Dot Plot 改為 Histogram。
9. 在視窗的下方，將 Y 軸改選為 “Modal”，並點擊 “OK”。
10. 現在圖形為 Overlaid Histogram，因 Y 軸選擇為 Modal mode，圖上有兩個等高的波峰 (normalized peak)，意旨即使兩個樣本有不同的細胞數仍會 normalize 至相同高度，取得較佳的視覺效果。
11. 最後，在作圖上按滑鼠右鍵，選單最下方處選 “Offset”，兩個樣本將分開排列。



練習活動 修改直方圖樣式

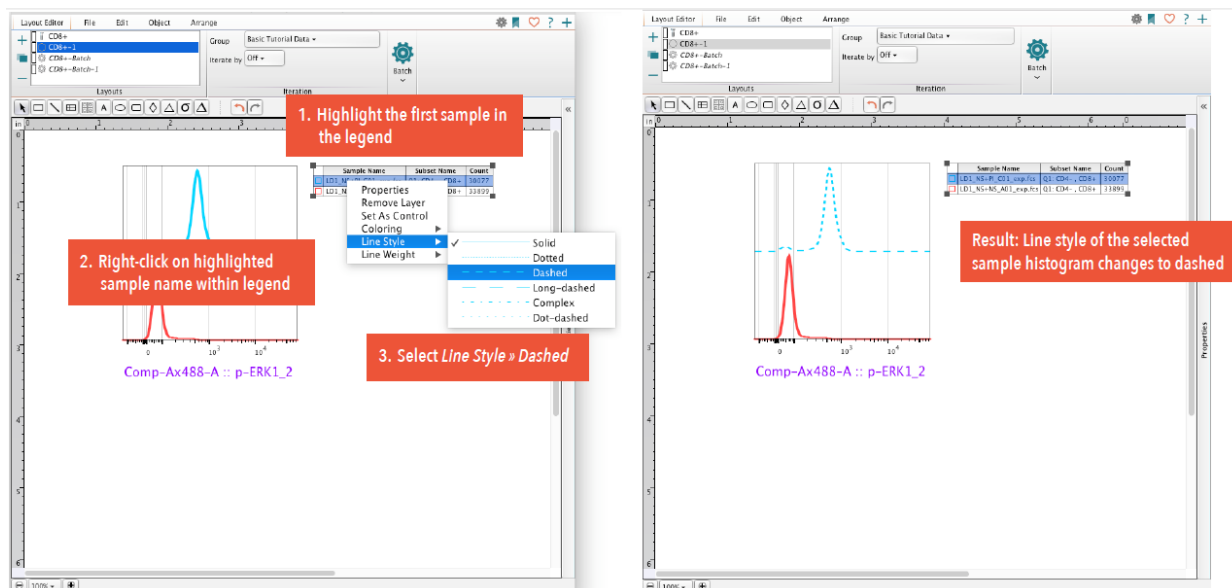
線條寬度、樣式和圖案陰影等細節都可以按照個人喜好調整，調整後的設定可套入群組或是保留在單一樣本內，接下來試試看個人化的設定吧！

1. 在疊加的直方上按滑鼠右鍵，選單下方有 Coloring、Line Style 和 Line Weight 等選項。
2. 點選 “Line Weight” 再選擇 “Heavy”，增加所有 population 作圖上線條厚度，使曲線更明顯並容易閱讀。
3. 再次於直方上按滑鼠右鍵。
4. 點選 “Coloring” 再選擇 “None”，曲線下區域呈透明。



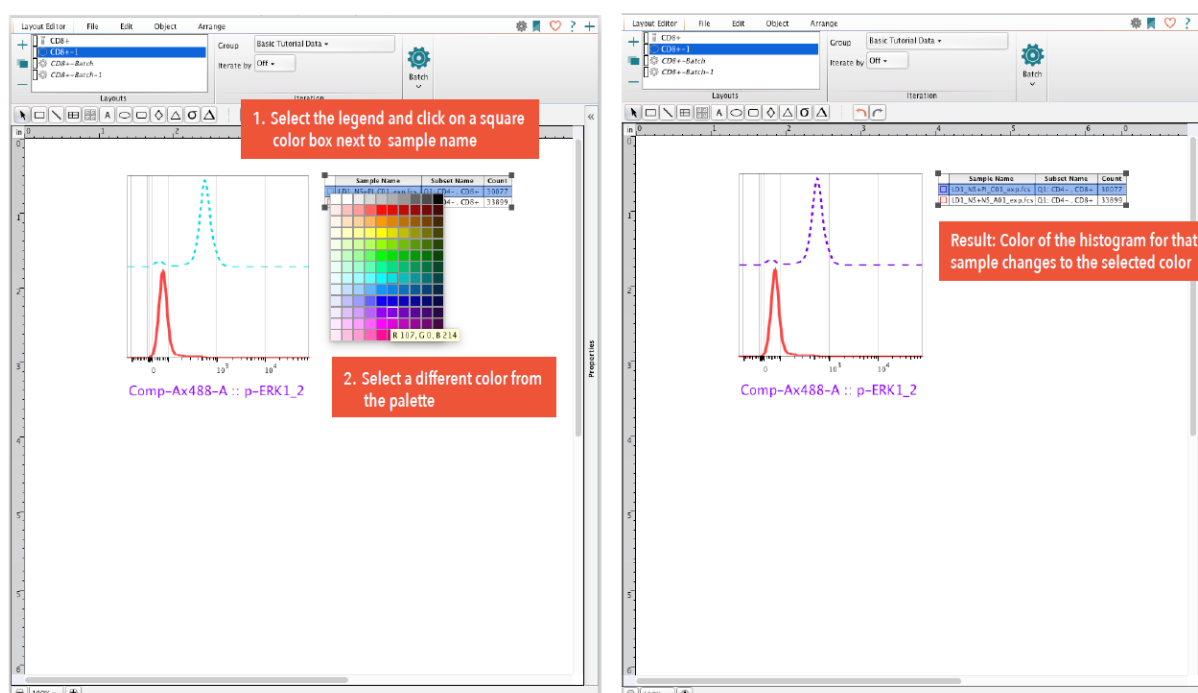
練習活動 修改疊加的直方圖中單一樣本線條樣式

- 點選直方圖右方樣本資料框格中任一樣本，並於樣本名稱上按右鍵。
- 點選“Line Style”再選擇“Dashed Line”，完成後只有被選取的樣本為虛線。



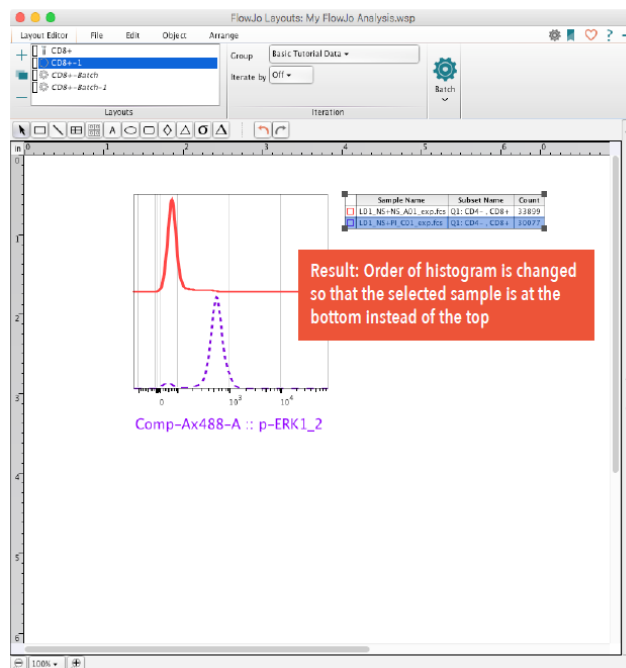
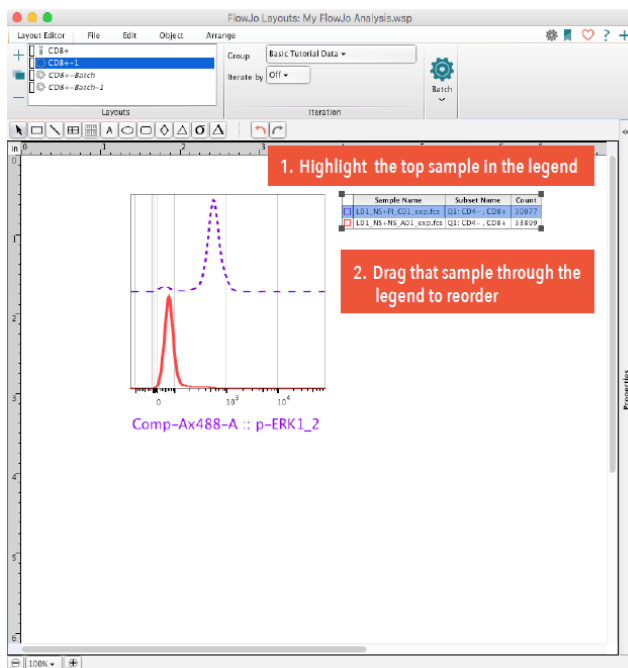
練習活動 變更直方圖顏色

- 點選樣本資料窗格，點擊 sample name 左方欄位的方形圖示。
- 改選樣本顏色。



練習活動 改變樣本在直方圖中疊加的順序

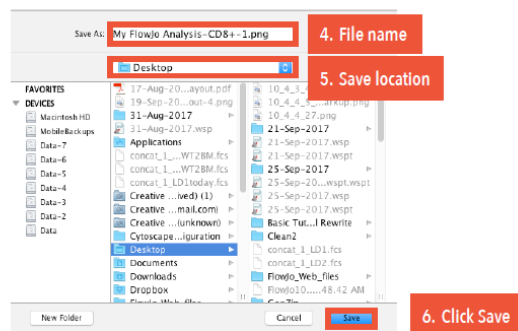
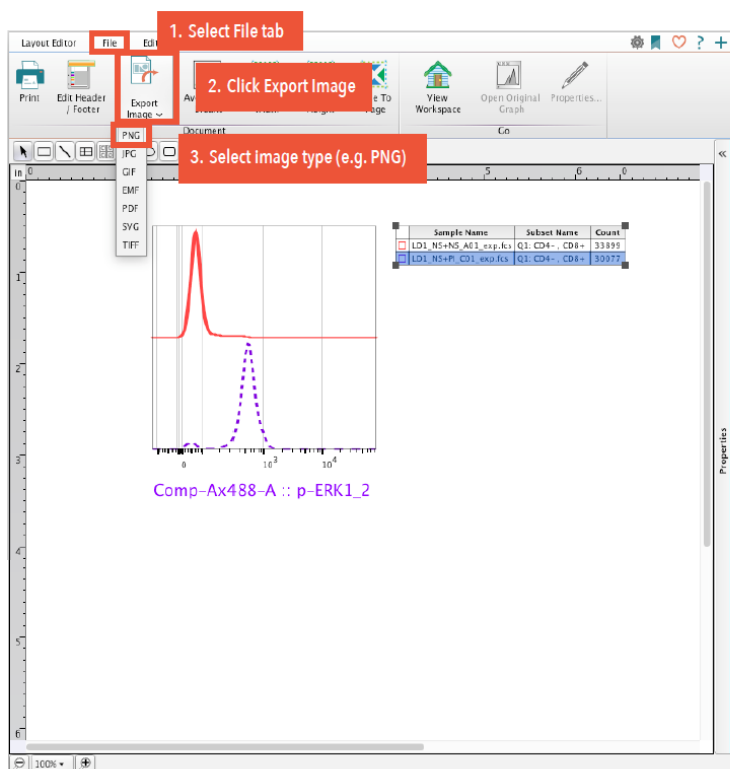
1. 點選樣本資料框格，選擇欲更動之樣本。
2. 長按滑鼠左鍵，拖曳樣本至目標位置後完成。



練習活動 輸出圖像

試試看如何將 Layout 輸出為單一的 PNG 檔案吧！

1. 在 Layout Editor Ribbon 中，點擊第二個圖示 “File”。
2. 點選 “Export Image”。
3. 選擇圖檔型式 (如：PNG)，挑出對話框要求選擇檔案目的地。
4. 在對話框中輸入檔名或是由軟體自動命名，如果是自動命名的檔名包括 Workspace 和 Layout Name (如：Mu FlowJo analysis-CD8+.png)
5. 選擇存取目的地 (如：Desktop)
6. 點擊 “Save”。



課程五 統計資料輸出 (Table Editor)

Table Editor 功能和 Layout Editor 類似，後者以圖形整理和輸出為主，前者則輸出統計值為目的，兩者皆在獨立的工作臺中操作。Table Editor 輸出的結果報告包括：text、CSV、Excel 和 SQL database files，也可以提供批次分析的結果報告。

統計資料視窗組成元件

Ribbon：包括 Table Editor、Edit 和 Visualize。

Table editor：包括新增 (Add)、複製 (Duplicate)、刪除 (Delete Tables)、Iteration 和輸出 (Output) 等功能。

Edit：新增或編輯統計欄位 (Add and Edit Columns)、新增關鍵字 (Add Keywords)。

Visualize：設定 Heatmap 和圖表格式。

練習活動 新增資料至 Table Editor 和輸出表格

試試看將統計資料輸入 Table Editor 吧！

1. Workspace window 工具列中點選 Table Editor 圖示 ，跳出 Table Editor 視窗。
2. 回到 Workspace window，選擇單一樣本下的 Population 和 statistics Node。
3. 將選取的細胞群和統計拖曳至 Table Editor，匯入後每個資料組別都包含指定的統計值。
4. 在 Output band 中點擊 "Create Table"，在 Table Editor 下方跳出新視窗，而新視窗顯示所有樣本資料對應的統計值，並以表格的方式呈現。注意在 Table Editor 裡，不同的

統計資料組排列在不同列 (row) · 在輸出表格中則為欄 (column)。

1. Open the Table Editor and position the windows side by side

2. Highlight gates and statistic nodes

3. Drag and drop to Table Editor

4. Click Create Table

Column	Population	Statistic	Iteration	Output
1	Lymphocytes/Live/CD3+/Q1: CD4+, CD8+	Freq. of Parent		
2	Lymphocytes/Live/CD3+/Q1: CD4+, CD8+	Geometric Mean	Comp-PE-A	
3	Lymphocytes/Live/CD3+/Q1: CD4+, CD8+	Median	Comp-Ax488-A	
4	Lymphocytes/Live/CD3+/Q1: CD4+, CD8+	Freq. of Parent		

Table - Table					
Ancestry Subset Statistic For	Lymphocytes / Live / CD3+ / Q1: CD4+, CD8+ / Freq. of Parent	Lymphocytes / Live / CD3+ / Q1: CD4+, CD8+ / Geometric Mean Perform	Lymphocytes / Live / CD3+ / Q1: CD4+, CD8+ / Median p-ERK1_2	Lymphocytes / Live / CD3+ / Q1: CD4+, CD8+ / Perf+ Freq. of Parent	
LD1_NS+NS_A01_exp.fcs	20.3	150	68.2	22.0	
LD1_NS+PL_C01_exp.fcs	19.1	149	550	21.9	
LD1_PI+NS_B01_exp.fcs	24.2	162	406	23.4	
LD1_PI+PL_D01_exp.fcs	24.1	160	401	22.6	
LD2_NS+NS_A02_exp.fcs	25.5	292	75.2	41.3	
LD2_NS+PL_C02_exp.fcs	24.2	264	587	38.2	
LD2_PI+NS_B02_exp.fcs	25.2	252	469	35.8	
LD2_PI+PL_D02_exp.fcs	24.9	249	451	34.8	
Mean	23.4	210	376	30.0	
SD	2.38	59.8	199	8.28	

練習活動 輸入統計資料名稱

當軟體從 Worksapce 中載入的統計資料，自動命名出的名稱非常複雜，為了方便我們了解資料代表的族群，我們可以在其他欄位輸入簡易的名稱。

1. 在每一列的最右方雙點擊 “Name”。

2. 輸入命名 (如：CD8 %)。

3. 點擊 “Create Table”，新的表格中

即呈現剛剛輸入的命名 CD8 %。

1. Double-click on the name column cell

2. Enter a unique name

3. Click Create Table

Result: Table output column header has a unique name

Table - Table					
Ancestry Subset Statistic For	CD8 %	Lymphocytes / Live / CD3+ / Q1: CD4+, CD8+ / Geometric Mean Perform	Lymphocytes / Live / CD3+ / Q1: CD4+, CD8+ / Median p-ERK1_2	Lymphocytes / Live / CD3+ / Q1: CD4+, CD8+ / Perf+ Freq. of Parent	
LD1_NS+NS_A01_exp.fcs	20.3	150	68.2	22.0	
LD1_NS+PL_C01_exp.fcs	19.1	149	550	21.9	
LD1_PI+NS_B01_exp.fcs	24.2	162	406	23.4	
LD1_PI+PL_D01_exp.fcs	24.1	160	401	22.6	
LD2_NS+NS_A02_exp.fcs	25.5	292	75.2	41.3	
LD2_NS+PL_C02_exp.fcs	24.2	264	587	38.2	
LD2_PI+NS_B02_exp.fcs	25.2	252	469	35.8	
LD2_PI+PL_D02_exp.fcs	24.9	249	451	34.8	
Mean	23.4	210	376	30.0	
SD	2.38	59.8	199	8.28	

練習活動 新增熱圖

為了方便判讀，依照以下步驟將資料轉換為 Heat map：

1. 反白選取 Table Editor

內所有的統計列。

2. 在 Table Editor ribbon

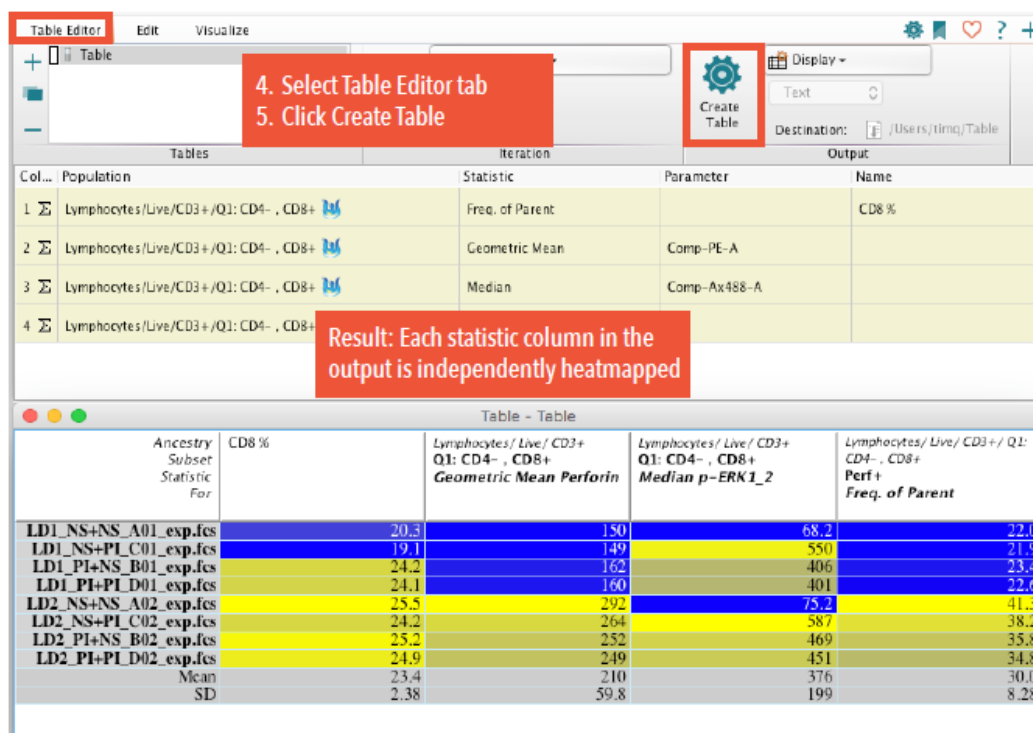
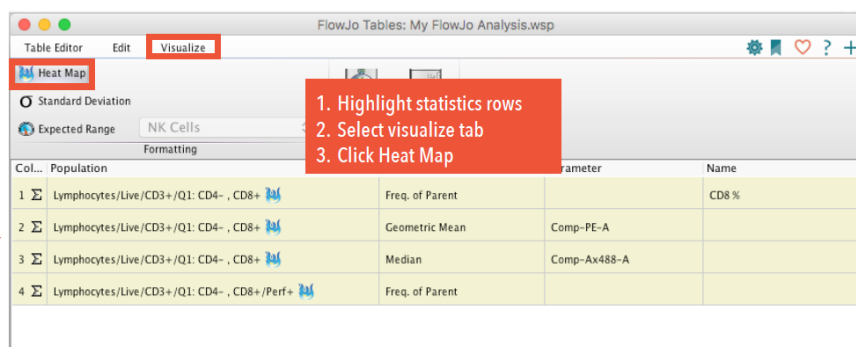
中點選 “Visualize”。

3. 點擊 “Heat Map”，每一個統計列都會出現  圖示。

4. 將 Table Editor Ribbon 點回 “Table Editor”。

5. 點擊 “Create Table”。

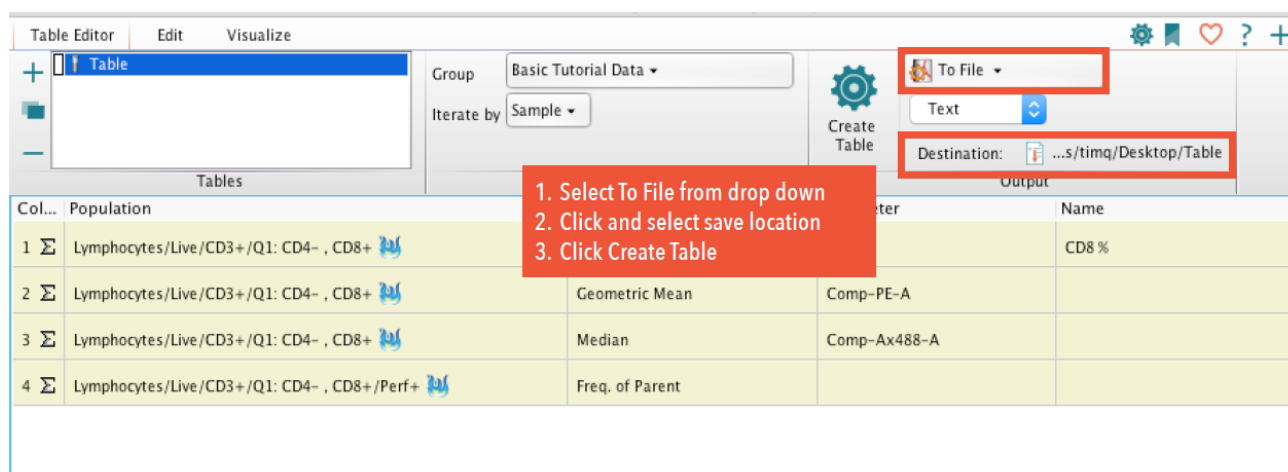
新表格中每組統計數值依照數值高低分別以藍色到黃色表示。



練習活動 儲存統計表格

試試看將表格輸出為其他檔案類型吧！

1. 在 **Output** 欄位的下拉式選單中，點選 “To File”，下方自動顯示輸出檔案類型為 **Text file**，點選右方箭頭可將檔案類型更換為 **CSV**、**Excel**、**HTML** 和 **SQL files**。
2. 選擇輸出的目的地（如：**Desktop**），點選 “Save”。
3. 點擊 “Create Table” 完成存檔。



除了轉存為其他檔案類型，表格內的統計數值也可以直接在 **Table** 內選取後，複製貼上至其他程式（如：**Excel**）。欲輸出 **Heat map**，則須將 **Heat map table** 轉存為 **HTML file**，開啟後可以在網頁瀏覽器讀取 **Heat map**。

課程六 儲存 FlowJo 分析檔案

在 FlowJo workspace 內針對樣本進行分析和整理的過程，以下列檔案類型儲存。

檔案類型

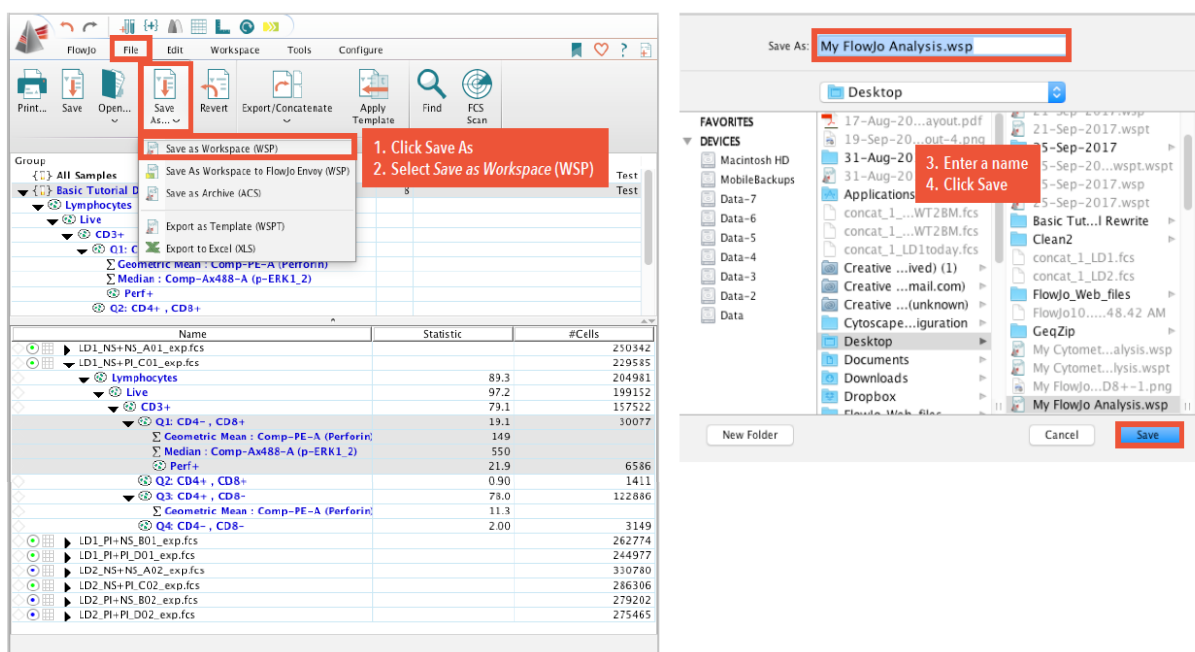
Workspace (WSP)：儲存分析及樣本原始檔案的來源，當開啟以儲存的 WSP 檔案時，先前進行的分析和樣本都會匯入並顯示於 workspace 視窗。但是樣本檔案並沒有被複製，而是自電腦內其他的位址或檔案夾中匯入 workspace。

Archived Cytometry Standard (ACS)：儲存分析和樣本原始檔案於壓縮檔案中。

Workspace Template (WSPT)：只儲存分析，不保留樣本檔案。因此可作為模板套入其他實驗中，確保不同次實驗的分析參數具一致性。

練習活動 儲存 Workspace (.wsp) 檔案

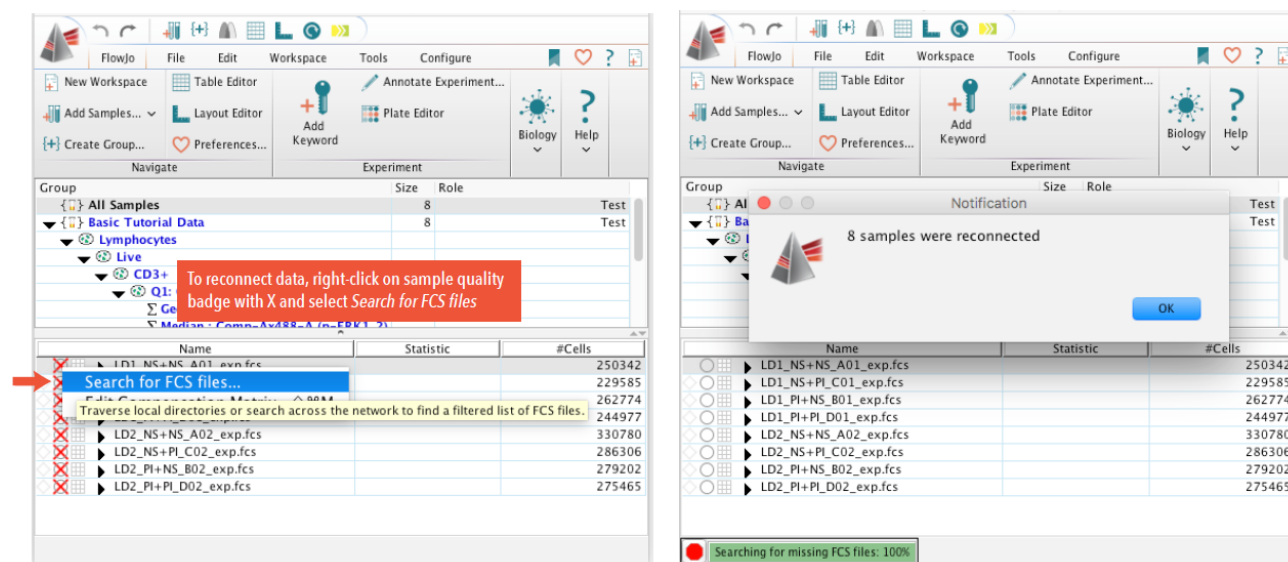
1. 在 workspace ribbon → File tab → Document band 中點擊 “Save As”。
2. 選擇 “Save as Workspace (WSP)”，輸入檔案名稱後點擊 “Save”。



重新載入樣本資料

樣本分析後儲存為 **wsp file** 時，只儲存了分析的模式和資料呈現的模式，樣本的原始檔案將不會被複製，僅存取檔案的來源進行連結和匯入。因此重啟 **wsp file** 時，原始檔案將從其儲存位址載入 **workspace window**。如果在儲存位址中刪除原始檔案，**wsp file** 將失去連結，而在 **workspace** 中樣本名稱前方將出現紅色叉號，代表原始檔案無法讀取/連結。

在紅色叉號上按滑鼠右鍵，選擇 "**Search for FCS files**"，自動搜尋其他夾帶對應原始檔案的資料夾，並重新載入樣本資料。



如果存取檔案為 **archive (ACS)** file 可以避免遺失樣本原始檔案，也就不需要再重新載入樣本資料至 **workspace**。

結論

感謝您使用 FlowJo 分析軟體並學習基礎使用方法，我們的目標為創造一個容易學習、使用便利又具有科學精準度的分析軟體。此教學手冊僅示範 FlowJo 最基本的功能和樣本分析方法，而 FlowJo 仍有許多強大的功能與特色待您探索。以下簡述幾個未出現在本冊中的功能：

螢光補償 (Compensation)

校正 chromophore 激發後螢光發射光譜的重疊，隨著實驗手法的演進，當使用的螢光顏色和複雜性增加，螢光補償的正確性和自動化就越來越重要。

進階螢光參數 (Derived Parameters)

經線性組合後創造一個新的螢光參數，這個新的螢光參數可包含多種功能或方程式的組合，類似於電子表單。Derived Parameters—Supports the creation of new parameters through the algebraic combination of others, including a wide variety of functions and formula structures, analogous to computed columns in a spreadsheet.

動力學分析 (Kinetic Analysis)

分析目標細胞群接受刺激後，在不同的時間點測量染劑訊號、比例、螢光的動態改變等資訊，進行統計和分析。

細胞週期分析 (Cell Cycle Analysis)

使用染劑（如：7AAD、PI、DAPI 等）偵測細胞內 DNA 總量，再經由 FlowJo 自動計算不同細胞週期的細胞群比例。

增殖狀態 (Proliferation Studies)

判斷細胞生長代數，如使用 CFSE 或其他包內染劑等分析細胞群的增殖狀況。

降維 (Dimensionality Reduction)

利用 t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE) 演算法，在二維圖譜中表達多個螢光參數特徵。

其他學習資訊

產品資訊：<https://www.flowjo.com/solutions/flowjo>

完整軟體使用手冊：<http://docs.flowjo.com/d2>

Flow University 線上訓練：<https://www.flowjo.com/learn/flowjo-university>

技術支援：<https://www.flowjo.com/support>