

BD® CBA Analysis Software 簡易マニュアル V1.0.2



© 2021 BD and EyeCue Lab. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

目次

1, BD® CBA Analysis Softwareについて	 P1
2, アプリケーションのダウンロードとインストール	 P1
3, Experimentの作成	 P2
4, ファイルのImport	 P3-P4
5, Templateの作成	 P5-P6
6, Define Population (ビーズ集団の確認)	 P7
7, Gating Your Beads (サイトカイン毎のクラスターゲートの確認)	 P8
8, Standardsカーブの確認・変更	 P9
9, Report (結果)	 P10
10, Append	 P11
11, Reference	 P12



© 2021 BD and EyeCue Lab. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

1, BD® CBA Analysis Softwareについて

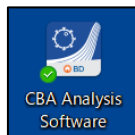
動作環境

- ・ BD® CBA Analysis Softwareは、Windows 7以降、MacOS 10.10（Yosemite）以降での使用に最適化されています。
- ・ すべての主要なLinuxディストリビューションで実行する必要があります。

互換性

- ・ BD® CBA Analysis Softwareは『.fcs』ファイルとのみ互換性があります。
fcs以外のファイルタイプは使用出来ません。
- ・ Zip fileからのFCSファイルの読み込みは出来ません。
- ・ BD® CBA Analysis Softwareは、『.fcs』ファイルのバージョン2.0から3.1を使用する事が出来ます。
- ・ BD® CBA Analysis SoftwareはCBAのデータ以外は解析に用いる事は出来ません。
- ・ 他社フローサイトメーターから出力されたファイルにつきましては、検証されておりません。

2, アプリケーションのダウンロードとインストール



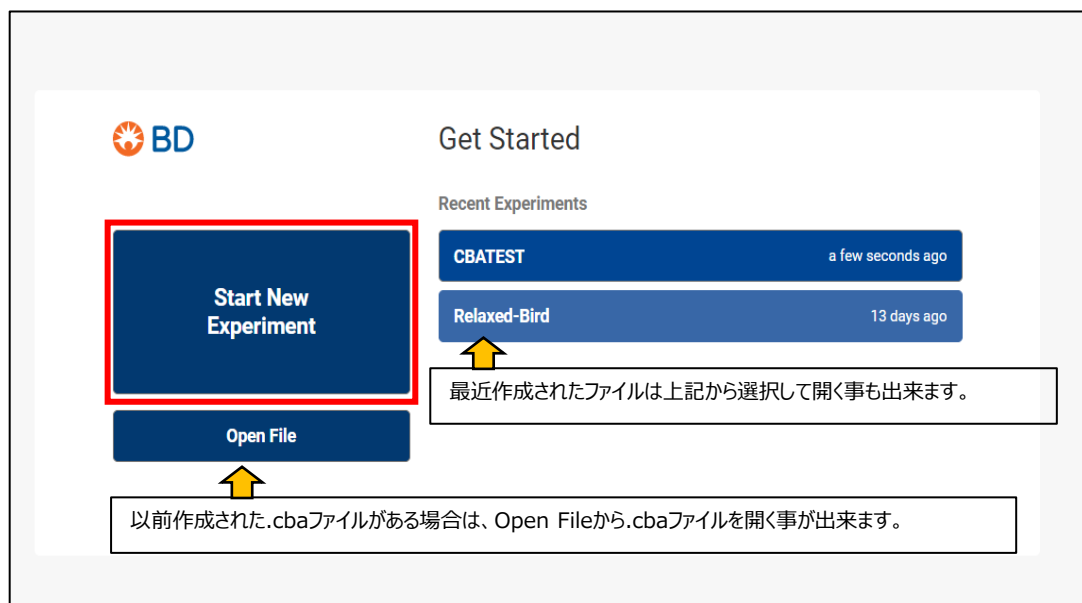
インストール後、CBAASoftwareをクリックしてアプリケーションを起動して下さい。

© 2021 BD and EyeCue Lab. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.



3, Experimentの作成

Start New Experimentを選択してExperimentを作成します。
名前と保存先を設定します（保存後、名前は変更できませんのでご注意ください）。
作成されたファイルには[保存名 + .cba]が付いたファイルになります。



© 2021 BD and EyeCue Lab. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.



4, ファイルのImport(Step1-1)

FCSファイルのSampleデータを下図左に、Standardデータを下図右にドラッグ＆ドロップしてimport, もしくは、下図緑枠部分を選択してファイル場所を指定してimportして下さい。
以降の操作は全てAuto Saveされます。

Step 1. Choose Samples and Standards

You may drag and move files between sections

Home

Next Step

Samples

0 Files, Sorted by Timestamp

Select or Drop
FCS Sample Files Here

Max file size: 100 MB, File type: FCS

Standard

0 Files, Sorted by Timestamp

Select or Drop
FCS Standard Files Here

Max file size: 100 MB, File type: FCS

Concentration

☒	Tube_001	☒	2019/08/15 15:16	FCS ファイル
☒	Tube_002	☒	2019/08/15 15:16	FCS ファイル
☒	Tube_003	☒	2019/08/15 15:16	FCS ファイル
☒	Tube_004	☒	2019/08/15 15:16	FCS ファイル
☒	Tube_005	☒	2019/08/15 15:16	FCS ファイル
☒	Tube_006	☒	2019/08/15 15:16	FCS ファイル
☒	Tube_007	☒	2019/08/15 15:16	FCS ファイル
☒	Tube_008	☒	2019/08/15 15:16	FCS ファイル
☒	Tube_009	☒	2019/08/15 15:16	FCS ファイル
☒	Tube_010	☒	2019/08/15 15:16	FCS ファイル

※ファイルは測定順に並びます。
並び順の変更は出来ません。

※機械側でサンプルに“Sample”、“Smpl”、スタンダードに“Standard”、“Std”、“Ref”と名前を付けていると一括でImportしてもAuto Sortにて自動振り分けをする事が出来ます。

3

© 2021 BD and EyeCue Lab. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

4, ファイルのImport(Step1-2)

Step 1. Choose Samples and Standards

You may drag and move files between sections

Home

Next Step

Samples

5 Files, Sorted by Timestamp

Name	Dilution Factor	
1.fcs	1	...
2.fcs	1	...
3.fcs	1	...
4.fcs	2	...
5.fcs	3	...

Sampleを希釈している場合は、
Dilution Factorの数値を変更して下さい。

Standard

10 Files, Sorted by Timestamp

Concentration

pg/mL

0

20

40

80

156

312.5

625

1250

2500

5000

pg/mL

mg/mL

μg/mL

ng/mL

pg/mL

fg/mL

U/mL

Standardの濃度をそれぞれ入力して下さい。
一括入力などは出来ません。

Concentration

pg/mL

mg/mL

μg/mL

ng/mL

pg/mL

fg/mL

U/mL

必要に応じてプルダウンメニュー
より濃度を選択して下さい。

Add Samples

Remove Sample

Add



5, Templateの作成 (Step2-1)

Step 2. Select Bead Template

Create or choose an experimental template

FilesNext Step

Create New

Search...

Name	Model	Type	Description	Analytes	Detail	Edit	Remove
Human Th1/Th2 Cytokine Kit II	Human	1D	BD® CBA				
Test2	Human	1D					

Create New Template

Select from BD Catalog (optional)...

NameModelTypeDescription

Debris Parameters

XSelectYSelect

Cluster Parameter

XSelect

Reporter Parameter

Select

Analytes2 TotalBead ID

A2A1

Save OnlySave and Select

•Create Newを選択してTemplateを作成して下さい。

※1度templateを作成すると次回以降別のexperimentでもそのtemplateを使用する事が出来ます。



5, Templateの作成 (Step2-2)

Create New Template

①-1 2D: Human Soluble Protein - 54 beads

NameModel①-2 TypeDescription

Human Soluble ProteinHuman2D BD CBA Flex™ Sets

Debris Parameters

②X FSC-AY SSC-A

Cluster Parameters

③X SelectY Select

Reporter Parameter

④ Select

⑤Analytes54 Total Beads

Human IgE

Human MIG

Human IFN-γ

Human IL-13

Human IL-12p70

Human IL-12/IL-23p40

Human MIP-1β

⑥Save OnlySave and Select

Select from BD Catalog (optional)...

Select from BD Catalog (optional)...

1D Kits and Flex Sets

1D: Human Anaphylatoxin Kit - 3 beads

1D: Human Chemokine Kit - 5 beads

1D: Human Th1/Th2 Cytokine Kit - 6 beads

1D: Human Th1/Th2 Cytokine Kit II - 6 beads

1D: Human Inflammatory Cytokine Kit - 6 beads

1D: Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit - 7 beads

1D: Mouse Inflammation Kit - 5 beads

1D: Mouse Inflammation Kit II - 6 beads

1D: Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit - 7 beads

1D: Mouse Immunoglobulin Isotyping Kit - 7 beads

1D: Non-Human Primate Th1/Th2 Cytokine Kit - 6 beads

2D Kits and Flex Sets

2D: Human Immunoglobulin - 6 beads

2D: Human Enhanced Sensitivity (ES) - 11 beads

2D: Human Soluble Protein - 54 beads

2D: Cell Signaling - 23 beads

①Kitを使用している場合は使用Kitを①- 1 のプルダウンメニューから選択して下さい。

※Flexを使用している場合は①-2のTypeを2Dに変更してください。

①-1からFlexを選択しないでください。

②beads集団をゲートする為のパラメーターを選択します。

一般的にはFSCとSSCを使用します。

③クラスター（捕捉ビーズ）をゲートする為のパラメーターを選択します。

Kitの場合はAPC。Flex setの場合はAPCとAPC-Cy7のパラメーターを使用します。

（機器によりパラメーター名が変わりますので適切なパラメーターを選択して下さい）

④検出抗体を選択します。 PEのパラメーターを選択します。

（機器によりパラメーター名が変わりますので適切なパラメーターを選択して下さい）

⑤Flex使用時のみ、『+』マークで使用するサイトカインを追加して、名前とロケーション（Bead ID）をそれぞれ入力して下さい。

⑥Save and selectを選択後、Next Stepを押してStep3に進んでください。



6, Define Population/ビーズ集団の確認(Step3)

Step 3. Define Population
Find your target population

①

Tube_001.fcs
1 of 15 Files

② Apply Gate To All Files

Gate Info

1979 Total Events

FSC-A Min Value: 34090.29

FSC-A Max Value: 41172.836

SSC-A Min Value: 49676.699

SSC-A Max Value: 69102.641

Step 3. Define Population
Find your target population

Ref 625 pg_Samp ctrl_F2_F02_014.fcs
7 of 17 Files: 6 Alerts

Standards

8 Files, Sorted by Timestamp

Ref 20 pg_B1_B01_002.fcs

Ref 40 pg_C1_C01_003.fcs

Ref 60 pg_D1_D01_004.fcs

Ref 156 pg_E1_E01_005.fcs

Ref 5000 pg_B2_B02_010.fcs

Ref 313 pg_Samp ctrl_C2_C02_011.fcs

Ref 625 pg_Samp ctrl_F2_F02_014.fcs

Ref 1250 pg_Samp ctrl_G2_G02_015.fcs

③全て確認、設定が出来たらNext Stepを押して次のステップに進んで下さい。

①の矢印ボタンもしくはファイルを選択して全てのサンプルのBeads集団に適切にゲートがかかっているか確認します。

- ゲートは最初、自動的にかけられます。
- マニュアルで変更したゲートを他のサンプルに適応する場合は、②のApply Gate To All Filesを選択して下さい。

◆beadsが10イベント未満、または母集団イベントの2%未満の場合アラートが表示されます。

※アラートが表示されている場合でも次のStepに進むことは出来ませんが、ゲートとイベント数が適切であることを確認した上で進むことを推奨します。



7, Gating Your Beads/サイトカイン毎のクラスターゲートの確認(Step4)

Step 4. Gating Your Beads
Assign or verify gated beads for each file

①

Tube_001.fcs
1 of 15 Files

②

Apply Gates To All Files

Kitの場合

ID	Name
A1	Human IFN-γ
A2	Human TNF
A3	Human IL-10
A4	Human IL-6
A5	Human IL-4
A6	Human IL-2

Flex setの場合

Step 4. Gating Your Beads
Assign or verify gated beads for each file

Specimen_001_STD_001_006
1 of 22 Files

③

Apply Gates To All Files

ID

Name

C5

Human IgG2

C6

Human IgG1

C7

Human IgG4

C9

Human IgA

・各サイトカイン（クラスター）が適切にゲートされているか確認して下さい。

サンプル毎にゲートが掛かっているかは①の矢印もしくはファイルを選択して確認して下さい。

- ゲートとサイトカインが間違っている場合は、②の緑枠部分をドラッグして移動する事が出来ます。
- マニュアルで変更したゲートを他のサンプルに適応する場合は、③のApply Gate To All Filesを選択して下さい。
- 全てのゲートが確認出来たらNext Stepを選択して次のStepに進んでください。

● Tube_001.fcs
Collision detected between A6 and A5
Collision detected between A5 and A6

※他のゲートと重なってしまった場合はアラートが出ます。適切にゲートがかかっているか確認して下さい。

© 2021 BD and EyeCue Lab. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

8, Standardsカーブの確認(Step5)

Step 5. Standards

Set your regression type for each file

①

Human IFN-γ

1 of 6 Analytes

Standards 10 Files

Tube_001.fcs

0

pg/mL

Tube_002.fcs

20

pg/mL

Tube_003.fcs

40

pg/mL

Tube_004.fcs

80

pg/mL

Tube_005.fcs

156

pg/mL

Tube_006.fcs

312.5

pg/mL

Tube_007.fcs

625

pg/mL

Tube_008.fcs

1250

pg/mL

Tube_009.fcs

2500

pg/mL

Tube_010.fcs

5000

pg/mL

Regression Type

Four Parameter Logistic (Hill)

②

Save Changes

log(y) = d + (a - d) / (1 + (log(x) / c)^b)

Name	Value
r2	0.99969
chi2	0.00082
lmin (a)	1.87509
Hill Slope (b)	2.05776
IC50 (c)	3.21641
lmax (d)	7.25632

- Step4までの設定でstandardの結果が表示されます。
- 各サイトカインごとのstandardを確認する場合は、①の矢印ボタンもしくはファイルを選択して確認して下さい。
- standardファイルのチェックを外すとその値をデータから除く事が出来ます。
- ②のRegression Typeのプルダウンから回帰式を選択する事が出来ます。
- standardのチェックを外したりRegression Typeを変更した場合は、必ずSave Changeを選択して下さい。
- Standardカーブを確認出来たらNext Stepで次のStepに進んで下さい。

9



© 2021 BD and EyeCue Lab. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

9, Report/結果(Step6)

Step 6. Your Report

Review and export your experimental data

Standards

Export Experiment Report

Analyte

② Sample

①

Results Per Analyte

Human IFN-γ

1 of 6 Analytes

③

Regression	Equation	R2	lmin (a)	Hill Slope (b)	IC50 (c)	lmax (d)
Four Parameter Logistic (Hill)	log(y) = d + (a - d) / (1 + (log(x) / c)^b)	0.99969	1.87509	2.05776	3.21641	7.25632

Sample Name	Events	% of Parent	MFI	Nominal CC	Fitted CC	Dilution	Final CC	Unit	Recovery %
Tube_0fcs.01	264	13.34	74.314	0	0.000	1	0.000	pg/mL	100.000
Tube_0fcs.02	199	10.25	423.021	20	21.337	1	21.337	pg/mL	106.685
Tube_0fcs.03	268	14.09	787.714	40	38.791	1	38.791	pg/mL	96.978
Tube_0fcs.04	258	13.60	1637.730	80	75.904	1	75.904	pg/mL	94.880
Tube_0fcs.05	236	12.49	3639.408	156	157.256	1	157.256	pg/mL	100.805
Tube_0fcs.06	228	11.76	7669.617	312.5	317.216	1	317.216	pg/mL	101.509
Tube_0fcs.07	233	12.28	14830.622	625	611.351	1	611.351	pg/mL	97.816

- 解析結果のReportが表示されます。
- ①の矢印ボタンもしくはサイトカインを選択する事でサイトカイン毎のデータを表示することが出来ます。
- ②を選択する事で、Sample毎のデータを表示することが出来ます。

データのExport方法

- ③のPDFを選択するとPDFでデータをExport出来ます。
- ④のExport Experiment Reportを選択するとExcelでExport出来ます。

10



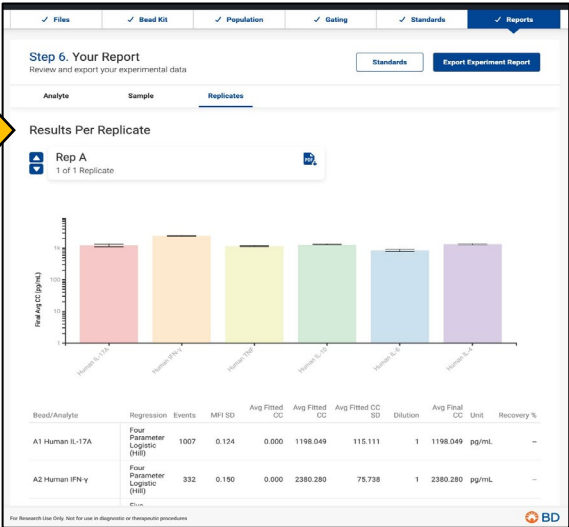
© 2021 BD and EyeCue Lab. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

10, append

Sampleの結果を1つにして再現性を確認する方法

- Step1のSamplesの緑枠部分を選択するとLabelを選択する事が出来ます。
- New Labelを選択するとRapA,RapB・・・と追加する事が出来ます。
- 同じLabelを選択する場合は、緑枠部分を選択した上で、該当Labelを選択して下さい。
- Labelを削除する場合は再度同じLabelを選択する事で削除出来ます。
- Labelを設定したままでStepを進めるとStep6のReportでLabel毎のデータが確認出来ます。

Samples		
9 Files, Sorted by Timestamp		
Name	Dilution Factor	
Test 20 pg_B3_B03_018.fcs	1:	1
Test 40 pg_C3_C03_019.fcs	1:	1
Test 80 pg_D3_D03_020.fcs	1:	
Test 313 pg_F3_F03_022.fcs	1:	
Test 2500 pg_A4_A04_025.fcs	1:	
Test 5000 pg_B4_B04_026.fcs	1:	1
Test 1250 pg_Samp ctrl_E4_E04_029.fcs	1:	1 Rep A
Test 625 pg_F4_F04_023.fcs	1:	1
Test 1250 pg_G4_G04_024.fcs	1:	1 Rep A



11, Reference

Third Party Open Source Software

- <https://cba.eyecue.io/thirdparty-licenses.txt>
- <https://cba.eyecue.io/thirdparty-licenses.pdf>

FlowGrid Clustering Algorithm

For debris gating and bead population clustering:

- Ye, X., Ho, J. Ultrafast clustering of single-cell flow cytometry data using FlowGrid. *BMC SystBiol* 13, 35 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12918-019-0690-2>

Levenberg-Marquardt Curve Fitting Algorithm

For estimating Non-Linear Regressions

- <https://github.com/mljs/levenberg-marquardt> - which is based on:
 - Brown, K.M., Dennis, J.E. Derivative free analogues of the Levenberg-Marquardt and Gauss algorithms for nonlinear least squares approximation. *Numer. Math.* 18, 289–297 (1971). <https://doi.org/10.1007/BF01404679>
 - Gavin, H. (2013). *The Levenberg-Marquardt method for nonlinear least squares curve-fitting problems* c ©. <https://people.duke.edu/~hpgavin/ce281/lm.pdf>

4 / 5 Parameter Hill Regression

For initial parameter estimation methods

- An, Hyowon & Justin, T. & Aubrey, G. & James, S. & Dittmer, Dirk. (2019). dr4pl: A Stable Convergence Algorithm for the 4 Parameter Logistic Model. *The R Journal*. 11. 171. 10.32614/RJ-2019-003. <https://journal.r-project.org/archive/2019/RJ-2019-003/RJ-2019-003.pdf>

FCS 3.1 Specification

- Spidlen, J., Moore, W., Parks, D., Goldberg, M., Bray, C., Bierre, P., Gorombey, P., Hyun, B., Hubbard, M., Lange, S., Lefebvre, R., Leif, R., Novo, D., Ostruszka, L., Treister, A., Wood, J., Murphy, R. F., Roederer, M., Sudar, D., Zigon, R., ... Brinkman, R. R. (2010). Data File Standard for Flow Cytometry, version FCS 3.1. *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 77(1), 97–100. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20825>



お問い合わせ

製品関連・資料請求 カスタマーサービス

電話 : 0120-8555-90

ソフトウェア・機器・試薬の使用方法について

電話 : 0120-4890-77 (平日9:00~17:00)

E-mail: tech.cell@bd.com

機器のメンテナンス・トラブルに関して

電話 : 0120-7099-12 (平日9:00~18:00)

BD バイオサイエンス ウェブサイト

<https://www.bdbiosciences.com/ja-jp/>