Создание протокола для настройки напряжения по прямому и боковому светорассеянию, а также напряжения по каналам флуоресценции.

1. Создайте новый протокол. Для этого необходимо войти в меню "File" (действие 1),

затем "**New**" (действие 2), затем нажмите левой кнопкой мышки **U** на "**New protocol**" (действие 3):

	📣 F1 : Navios - training			
1 7	File Edit View Insert Tools	Plots Analys	is FlowPAGE	Cytometer l
- V	New	۰.	New Protoc	ol Ctri+N
Π	Open Listmode File Save Listmode File As	Ctrl+0	New P <u>a</u> hel New <u>W</u> orkli	3
C	Save Histogram Free As			₩ ₽8 1
	Save All <u>F</u> CS Format Files			
	Open Protocol Save Protocol Save Protocol As Lock Protocol Unlock Protocol	Ctrl+S		0
	Save Listmode Compensation	As		
	View F <u>C</u> S Header Edit FCS Header Attri <u>b</u> utes Import	•		
		Ctrl-P		
	<u>W</u> orkspace Preferences Log Out	Ctrl-W		
	Exit	Alt-F4		

У Вас появится окошко с новым протокол, где будет отображена единственная гистограмма FS против SS.

2. По умолчанию в приборах Navios[™] и Gallios[™] активны все каналы флуоресценции. Так как мы для примера используем комбинацию из четырех флуорохромов (FL1 для детекции флуоресценции FITC, FL2 – для PE, FL3 – для ECD, FL4 – для PC5), то нам необходимо отключить детекторы, которые не используются для проведения анализа (начиная с FL5 и заканчивая FL8).

	1
Cytometer User Wind	ow Help
🐼 Cytometer Controls	1 1
S <u>t</u> atus Page	
Cytometer Log	•
Get Cytosettings rom	Protocol.
Get Cytosettings from	LMD file
▶ <u>S</u> tart	U
■ St <u>o</u> p	F10
II <u>P</u> ause	F11
🗙 <u>A</u> bort	F12
	F9
🗑 Pri <u>m</u> e	
① Cleanse	
Laser Control	

Для этого необходимо зайти во вкладку "Cytometer" (действие 1) и выбрать

нажатием левой кнопки мышки С "Cytometer Controls.." (действие 2)

Blue		Label	Discr.	Volts	Gain
	FS	FS	100	250	1.0
Red 💥 🗕	SS	SS	OFF	250	1.0
	FL1	FL1	OFF	250	1.0
Violet 🔭 🚽	FL2	FL2	OFF	250	1.0
Details	FL3	FL3	OFF	250	1.0
	FL4	FL4	OFF	250	1.0
I Setup Mode	FL5	FL5	OFF	250	1.0
Dots: 1000	FL6	FL6	OFF	250	1.0
QuickCOMP	FL7	FL7	OFF	250	1.0
CuickSET	FL8	FL8	OFF	250	1.0
Baseline Offset	FL9	FL9			
Parameters	F10	FL10			
imits Acquisition Time: Elapsed Time: Set Tim	es	300	Maximum I Live Gate Max Acqui	Events: Ungated	1(s: 2,100,00

После этого у Вас появится окошко "Cytometer Control" вот такого вида:

Чтобы отключить не используемые в рамках данного исследования каналы флуоресценции, Вам необходимо нажатием левой кнопки мыши войти в раздел

галочки напротив

"Parameters" и убрать нажатием левой кнопки мышки неиспользуемых каналов флуоресценции.

Parameter Selection	Parameter Selection
Integral Pesk TOF Angle Angle FS Beile FS FS ND Fåer FS FS FS FS FS ND Fåer FL FL FL FL FL FL FL2 FL2 FS F	Integral Pesk TOF Ando FS Integral Integral Derived Parameter: Integral Integral Integral Integral Integral <t< th=""></t<>
Исходный вид окна " Parameters "	Вид окна "Parameters" после отключения
	латчиков FL 5-FL 8

OK После проведения данной процедуры необходимо нажать клавишу в нижнем левом углу данного окна. Нажатие это клавиши сопровождается появлением окошка:



Вам необходимо сохранить изменения в протоколе, так как Вы внесли изменения в настройки каналов флуоресценции прибора. Если Вы согласны с внесенными изменениями, то следует нажать "Yes", если Вы допустили какие-либо ошибки или по каким-либо причинам не хотите сохранять внесенные изменения, то следует нажать "No". В нашем случае все изменения настроек прибора были проведены правильно,

следовательно, левой кнопкой мыши U нажимаем на клавишу "Yes". После чего появится следующее окошко:

Save in:	Acquisition Protocol		🚽 🗧 🖻	🗗 🎫
Name	Date modified	Туре	Size	
4color	settings.PRO			
4color	FL04.pro			
4color	FL03.pro			
4color	FL02.pro			
4color	FL01.pro			
4color	STAND.pro			
4color	APP.pro			
4 color	setun.PRO			
	PROTOCOL1			<u>S</u> ave
le <u>n</u> ame:				

Вам необходимо ввести название (подсвеченная синим строчка внизу окна – "File name"), под которым Ваш протокол будет сохранен в папке "Acquisition Protocol", например, пусть данный протокол будет называться "4color-setup". Вводим это название в строчку

"File name" и нажимаем \bigcup клавишу "Save".

Save in:	Acquisition Protocol		🚽 🗧 🖻 🖻	* 💷 🕶
Name	Date modified	Туре	Size	
4 color s	ettings.PRO			III
4color_	FL04.pro			
4color_	FL03.pro			
4color_	FL02.pro			
4color_	FL01.pro			
4color_	STAND.pro			
4color_	APP.pro			
4color-	setun.PRO			
	4color-setup PRO		([Save
File <u>n</u> ame:	International and the second s			and the second se

Итак, Вы создали новый протокол под названием "4color-setup", в котором активны только первые четыре датчика для регистрации флуорохромов FITC PE, ECD и PC5.

3. Теперь Вам необходимо нарисовать гистограммы, которые будут отображать выбранные Вами параметры. Для настройки напряжение при помощи изотипических контролей обычно используются однопараметрические гистограммы.

Следующий Ваш шаг – это нарисовать гистограммы распредения флуоресценции по каналам FL1, FL2, FL3 и FL4.

Для этого в верхней части экрана Вам необходимо найти клавишу

Histogram Plot

И

нажать на нее левой клавишей мыши 🖵

Eile	1 : Nav Edit	vios - tr View	aining Insert	Tools	Plats	Analysis	FlowP	AGE	Cyton	neter	User	Windo	w Helr								
		16	X Q	3 6	<u>Ω</u> + 9	2 + 4								8 Ef	Z	0 £		Σ	2	>	П
	1	A			네 다	*망]++[ΞE	E	∢)÷ - 1	1 (1.		K Low		*	² Z ₂ (2)	•	•))			
	🖽	8 C	R 🖸	×	1	e 🖾 🛙		•U	•¥¥ =	7 6	6	ri			10					6-3-	

Нажатие данной клавиши приводит к тому, что у Вас появляется новое окошко с гистограммой (левая часть рисунка) и справа - панель под названием "Histogram Plot Properties".

По умолчанию данная гистограмма будет отображать по оси X прямое светорассеяние. Для того, что изменить данную ось, Вам необходимо войти в графу "**Parameter**", нажав левой кнопкой мыши по указанному на рисунке месту (действие 1), и выбрать из списка каналов FL1 для детекции флуоресценции FITC (действие 2). И нажать клавишу ок (действие 3)



Итак, Вы построили первую гистограммы, где по оси "Х" отображается флуоресценция по каналу FL1, а по оси "Y" откладываются события, обладающие данной флуоресценцией.

Однако, нам необходимо создать аналогичные гистограммы еще и по FL2, FL3 и FL4.





Итак, Вы создали 4 гистограммы, где по оси "Х" отображается флуоресценция по каналу FL1, а по оси "Y" откладываются события, обладающие данной флуоресценцией. Следующим шагом необходимо на второй гистограмме FL1 заменить на FL2, на третей – на FL3, на четвертой – на FL4.



После выбора раздела "Format Plot" у Вас появится окно "Histogram Plot Properties".

В графе "**Parameter**", нажав левой кнопкой мыши С по указанному на рисунке месту (действие 1), и выберите из списка каналов FL2 для детекции флуоресценции PE (действие 2). И нажать клавишу СК (действие 3).



Аналогичную процедуру проделайте для гистограммы 4 и 5, где следует заменить FL1 на FL3 и FL4, соответственно. После проведения этих действий у Вас рабочее пространство будет иметь следующий вид:



Следующее, что Вам необходимо сделать, это расставить гистограммы таким образом, чтобы они не налегали друг на друга. Это можно сделать следующим образом: навести курсор на верхнюю часть гистограммы (синяя область сверху), кликнуть по ней левой

кнопкой мыши **Ш**, затем, удерживая левую кнопку мыши в нажатом положении, переместить гистограмму в удобное для Вас место на экране, после чего отжать левую кнопку мыши.

Однако, если Вы хоти расположить гистограммы в правильном порядке и потерять гораздо меньше времени на эти манипуляции, то следует сделать следующее:



После чего у Вас на экране появится окно "Tile Special"

Tile Special	Некоторые обозначения:
File Gate Parameters Image: File SS INT LIN v. FS INT LIN Image: File Ungated FL1 INT LOG Image: File Ungated FL2 INT LOG Image: File Ungated FL3 INT LOG Image: File Ungated FL4 INT LOG Image: File	 обозначает переход гистограмм на новый ряд, начиная с гистограммы, напротив которые она стоит. Таким образом, прибор предлагает на перейти на новый ряд с гистограммы с FL4, а все остальные гистограммы оставить верхнем ряду. Чтобы выставить все гистограммы в одни ряд – левой кнопкой мыши кликните на , стоящей напротив последней гистограммы с FL4,



Если Вы все сделали правильно, то Ваш экран приобретет следующий вид:



Итак, Вы создали все необходимые гистограммы для настройки прибора для четырехцветного анализа.

Следующим этапом является построение регионов на гистограммах. По правилам все негативные клетки должны располагаться в первой декаде логарифмических шкал интенсивности флюоресценции по всем задействованным каналам. В нашем случае – это каналы FL1, FL2, FL3 и FL4 – гистограммы 2, 3, 4 и 5, соответственно (слева направо на предыдущем рисунке).

Поэтому перед началом настройки прибора по изотипическим контролям необходимо нарисовать соответствующие регионы (от 10⁰ до конца оси) на указанных гистограммах.

Для этого, необходимо сначала активировать интересующую нас гистограммы

(предположим, гистограмму с FL1) нажатием левой кнопки мыши \bigcup по верхней синей части.

	После чего выбрать, также левой кнопки
eter User Window Help	мыши выбрать линейный регион под
▶ II (II) ■ 🗶 Single Linear Region :2 🖉 🕁	hasbannem single Linear Kegion

Далее переведите мышку на активированную гистограммы (в нашем случае - FL1), при

этом при появлении в поле гистограммы курсов приобретает вид , как это показано на рисунке



Далее, примерно выровняйте курсор по 10⁰ на оси FL1, после чего нажмите один раз на левую клавишу мыши **U**. На гистограмме появится следующая картина:



Тем самым, Вы установили начало нового региона на гистограмме. Если Вы подвигаете вправо-влево, то увидите следующее (при движении мыши вправо):



Таким образом, Вы можете регулировать ширину Вашего региона (Следует отметить, что место расположение горизонтальной перекладины по высоте не оказывает влияния на качество анализа, ее расположение должно завсеть от того, на какой высоте Вам в

дальнейшем будем максимально удобно видеть процент чстиц, попадающих в выбранный Вами диапозон!!!)

Как только Вы определились с местом установки верхней границы региона (конец оси

координат), нажмите левую клавишу мыши **Ш**. Регион установлен, и ему автоматически будет присвоено название – в нашем случае **"В**".

Повторите данную процедуру для гистограмм по FL2, FL3 и FL4, нарисуйте на них аналогичные регионы.



В итоге у Вас должна получиться следующая картина (на всех однопараметрических гистограммах находит по одному линейному региону, которые начинаются около 10⁰ и заканчиваются в конце оси "X"):

Теперь вернемся к гистограмме FS против SS.

По умолчанию, на данной гистограмме регион "A" обладает свойства "автогейта". Что это обозначает? Через 10 секунд после начала анализа образца данные регион автоматически перенесется на ближайшую популяцию. В условиях настройки напряжения по прямому и боковому светорассеянию эта опция является излишней, так как постоянное изменение параметров напряжения будет сопровождаться постоянными перестройками данного гейт. Поэтому на стадии настройки рекомендуется эту опцию отключать.

Как это сделать?

Для этого необходимо войти в свойства региона:

Активизируйте гистограмму при помощи нажатия левой кнопкой мыши \square по верхнему синему полю гистограммы. Дале наведите курсор на регион "A", таким образом, что бы

курсор мыши имел вид 🕀, и нажмите левую кнопку мыши 🕻



Как только регион активировался (появились квадраты по углам), не сдвигая мышки из этого положения, нажимайте правую кнопку мыши и, в появившемся окне, выбирайте графу "**Region Properties**" и нажимайте на левую кнопку мышки



В разделе "Autogating" необходимо переставить точку из позиции "Eliptical" в позицию "None" – для этого просто клините левой клавишей мыши на пустом окошке напротив позиции "None", после чего нажмите К.

egion Properties	Region Properties
Region Properties Format	Region Properties Format
Region Name	Region Name A
☐ Prime	Prime
Automatic region name positioning	Automatic region name positioning
Region statistics exported for Quality Control	Region statistics exported for Quality Control
QC Product	QC Product
Autogating	Autogating
C None Sensitivity 0.11 ▼	None Sensitivity 0.11
Bliptical	C Elliptical
C Contour Iravel Jo4	C Contour Travel Jo4
Minimum Count	Minimum Count
Count 0	T Active Count 0
Linked Region	- Linked Region
Linked Region linked to	Linked Region linked to
OK Cancel Help	OK Cancel Help
Становки «по умолчанию» для региона	После провеления описанной выше

В дальнейшем, в указанную область мы поместим популяцию лимфоцитов – целевую популяцию клеток, для анализа уровня экспрессии антигенов которой и происходит настройка прибора. Именно поэтому следующим шагом необходимо сделать так, чтобы на

гистограммах, при помощи которых будет осуществляться оценка уровня экспрессии данных антигенов, отображались только клетки, соответствующие по размеру и структуре лимфоцитам. Данная процедура получила название «гейтирование», то есть введение данных логических ограничений из одной гистограммы в другие. Данная функция позволяет отображать и анализировать события, попадающие исключительно интересующие нас область. Итак, интересующие нас события в дальнейшем будут попадать в область "А". Чтобы только эти события отображались на остальных гистограммах (однопараметрические гистограммы по FL1, FL2, FL3 иFL4) надо сделать следующее.

На интересующей нас гистограмме (для примера – гистограмма FL1), необходимо войти в "Histogram Plot Properties", как это мы делали ранее. Вкратце, нажатием правой кнопки

мыши на гистограмме вызовите диалоговое окно, в котором нажатием левой кнопки мыши выберите раздел "Format Plot".

Labeling Stop and Save Font Data Source Histogram Scaling File F1 Parameter FL1 INT LOG: FL1 INT LOG Gate Ungeded Apply 3 ate A Show % o D E	
File F1 (дейст Parameter FL1 INT LOG: FL1 INT LOG Haxan Gate Ungated Haxan Apply gate B B Apply % of B B Show % of D E	левой кнопкой мышки одимо нажать на раздел ", как это показано на рисунке
Parameter FL1 INT LOG: FL1 INT LOG Gate Ungated Apply gate A Apply % or C Show % o D E	твий 1)
Gate Ungated Apply gate A Apply % or C Show % or D E	И
Apply gate Apply % or C B Apply % or C D C Show % or E C C	чем левой клавиши мыши
Apply % or B perиon Show % or D данно (дейст	ыбрать интересующий Вас
Г Show % од В В В В В В В В В В	н из предложенного списка (в
	м случае – регион "А" вие 2(
OK Cancel Help	

После нажатия клавиши СК операция будет завершена.

C C ibu · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	Для проверки правильности проведения это процедуры Вы можете обратиться к верхней части гистограммы (помечено на рисунке). Название региона, по которому «загейтирована» данная гистограмма, находится в квадратных скобках – в нашем случае это регион " A ".
<u></u>	

Данную последовательность действий необходимо повторить для гистограмм, отображающих флуоресценцию по FL2, FL3 и FL4.

Раз мы остановились на опциях окошка "Histogram Plot Properties", то давайте сразу сделаем еще ряд действий.

1. В созданном протоколе отсутствуют условия для остановки сбора данных, следовательно, прибор будет набирать события до ограничений, установленных «по умолчанию» (для приборов NaviosTM и GalliosTM это 100 000 событий и 300 секунд – это можно посмотреть в окошке "Cytometer Control"), причем сюда входят не только события «интереса», но также и все то, что прибору позволяют анализировать установленные настройки. В случае проведения собственных исследований нас, в первую очередь, интересуют наши определенные клетки – например, лимфоциты периферической крови в приводимом здесь примере. Лимфоциты (после проведения предварительных настроек по параметрам прямого и бокового светорассеяния) будут находиться в регионе "A". Следовательно, необходимо установить ограничение именно по этому типу клеток. Где его устанавливать? На любой гистограмме, где отображаются события, попадающие в регион "A" – в нашем случае это любая из однопараметрических гистограмм по FL1, FL2, FL3 или FL4, в окошке "Histogram Plot Properties" необходимо перейти во вкладку "Stop

and Save" при помощи нажатия левой кнопкой мышки \bigcup (действие 1), после чего необходимо активировать строку "Use Stop Condition" нажатием левой кнопкой мышки

Labeling	Stop and Save	Font)	Data Source	Histogram	Scaling
Data Source	Histogram	Scaling		Stop and Save	Font
ile F1	DG: FL1 INT LOG	·	Acquisition Stop Co	ndition tion	
Apply gate to all plots Apply % on plot to all f	olots	•	☐ Save Histogram	Data in FCS Format	ח

(действие 2).

После чего поставьте курсор мыши на данную строку и, кликнув левой клавишей мыши

	Histogram Plot Prope	erties	X	9
	Data Source	Histogram	Scaling	
	Labeling	Stop and Save	Font	
	Acquisition Stop C	ondition		
	Use Stop Cond	dition		
	Maximum Events	5000		
и нажмите	Save Histogram	n Data in FCS Format	I Help	
B FL1 I D FL1 I D FL1 II D FL1 II D FL1 II D		Для пр процед верхне рисунн которо гистог случае после автома сохран "LMD	ооверки пран дуры Вы мож ей части гист ке). Перед на ому «загейти рамма, в кру с (5000) - поя набора кото атически ост иит получени ".	зильности проведения это жете обратиться к гограммы (помечено на азванием, региона, по прована» данная углых скобках – в нашем явится число событий, рых прибор ановит сбор данных и ный результат в папку

2. Для корректного выставления напряжения по изотипическим контролям необходимо видеть, сколько клеток выходит за пределы первой декады логарифмической шкалы флуоресценции (см. ниже). Следовательно, на гистограммах должно отображаться число событий, попадающих в область "В" на первой гистограмме, а также остальные области на соответствующих гистограммах.

Для этого необходимо снова зайти в "Histogram Plot Properties", вкладка "Data Source" и

при помощи левой клавишей мыши **U** поставить галочки в пустых окошках напротив "Show % on plot" (после этого рядом с названием области появится знак "0,0%") и "Apply % on plot to all plot" (в этом случае значки "0,0%" появятся около названий всех регионов, нарисованных в данном протоколе).

Labelin	ig	Stop and Save	Font	Labeling		Stop and Save	Font
Data S	ource	Histogram	Scaling	Data Sou	urce	Histogram	Scaling
ile	F1		<u></u>	File	F1		
arameter	FL1 INT	LOG: FL1 INT LOG	•	Parameter	FL1 INT LO	DG: FL1 INT LOG	
iate	A		•	Gate	A		
Apply ga	ate to all plot	•		I Apply gate	e to all plots		
Apply ga Apply %	ate to all plet on plot to al	e I plots		Apply gate	e to all plots n plot to all p	olots	
Apply ga Apply % Show %	ate to all plat on plot to al on plot	l plots	U	Apply gate	e to all plots n plot to all p n plot	olots	

Для проверки правильности проведения это процедуры Вы можете обратиться гистограммам – около названия регионов на всех гистограммах появились знаки "**0,0%**" (на рисунке обведено красными кругами)



По завершении всех действий все изменения в проколе необходимо сохранить.

Для этого левой клавишей мыши С следует нажать на клавишу Save Protocol" в левой верхней части экрана.

