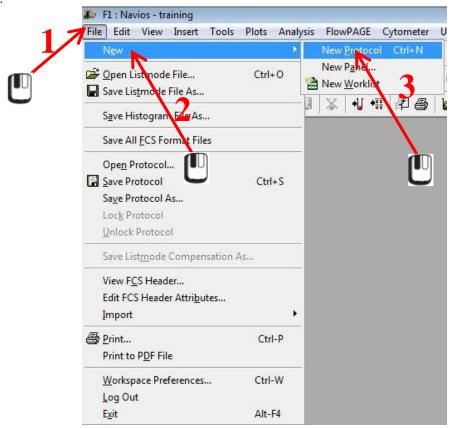
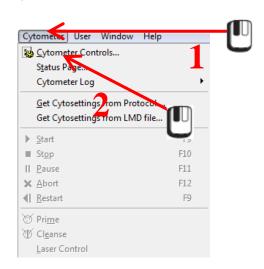
Создание протокола для настройки напряжения по прямому и боковому светорассеянию, а также напряжения по каналам флуоресценции.

1. Создайте новый протокол. Для этого необходимо войти в меню "File" (действие 1), затем "New" (действие 2), затем нажмите левой кнопкой мышки на "New protocol" (действие 3):



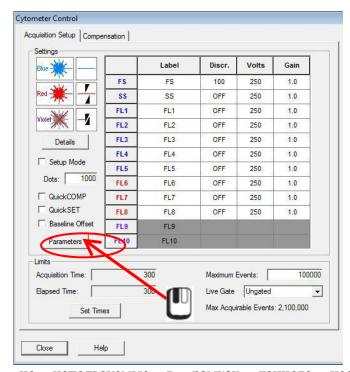
- У Вас появится окошко с новым протокол, где будет отображена единственная гистограмма FS против SS.
- 2. По умолчанию в приборах NaviosTM и GalliosTM активны все каналы флуоресценции. Так как мы для примера используем комбинацию из четырех флуорохромов (FL1 для детекции флуоресценции FITC, FL2 для PE, FL3 для ECD, FL4 для PC5), то нам необходимо отключить детекторы, которые не используются для проведения анализа (начиная с FL5 и заканчивая FL8).



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

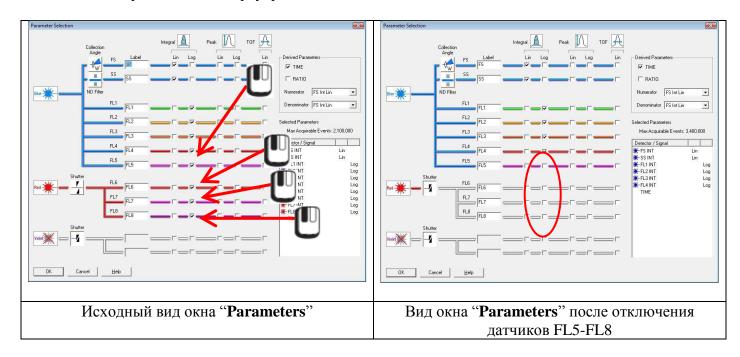
нажатием левой кнопки мышки "Cytometer Controls.." (действие 2)

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

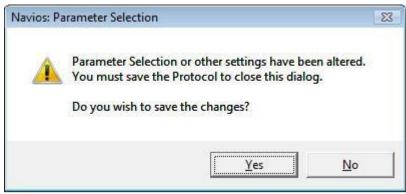


Чтобы отключить не используемые в рамках данного исследования каналы флуоресценции, Вам необходимо нажатием левой кнопки мыши войти в раздел "Parameters" и убрать нажатием певой кнопки мышки галочки напротив

"Parameters" и убрать нажатием левой кнопки мышки \bigcup галочки напротив неиспользуемых каналов флуоресценции.

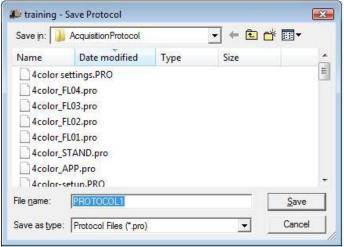


После проведения данной процедуры необходимо нажать клавишу клавишу в нижнем левом углу данного окна. Нажатие это клавиши сопровождается появлением окошка:



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,

появится следующее окошко:



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 клавишу "Save".



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



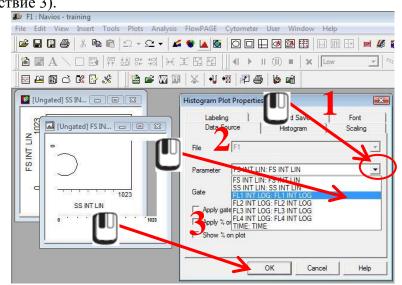
И

нажать на нее левой клавишей мыши



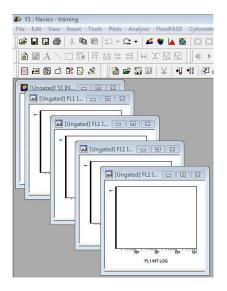
Нажатие данной клавиши приводит к тому, что у Вас появляется новое окошко с гистограммой (левая часть рисунка) и справа - панель под названием "Histogram Plot Properties".

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 "X" 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.

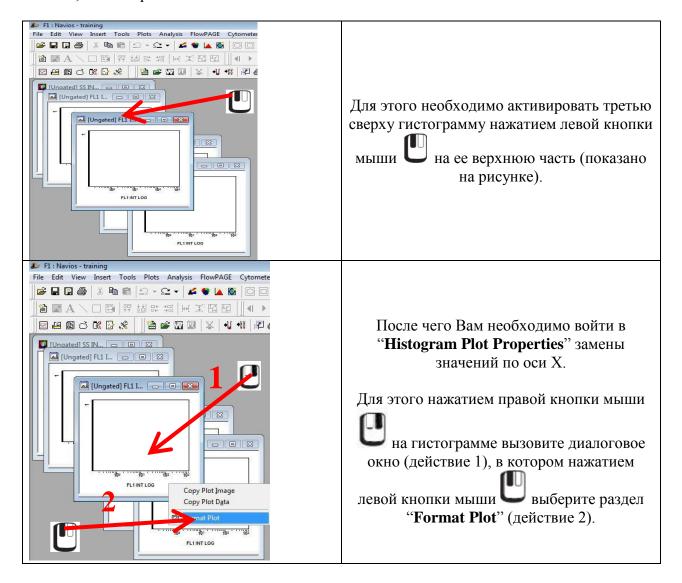


Для этого Вам необходимо активировать только что созданную гистограмму – нажав левой кнопкой мыши на ее верхнюю часть, после чего при помощи

левой кнопкой мыши на ее верхнюю часть, после чего при помощи одновременного нажатия клавиш "Ctrl" и "D" Вы можете создать аналогичную гистограмму. Повтори это действие еще два раза.

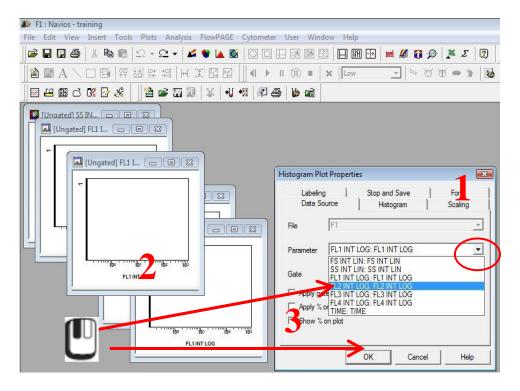
Получится картинка, приведенная справа.

Итак, Вы создали 4 гистограммы, где по оси "X" 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.

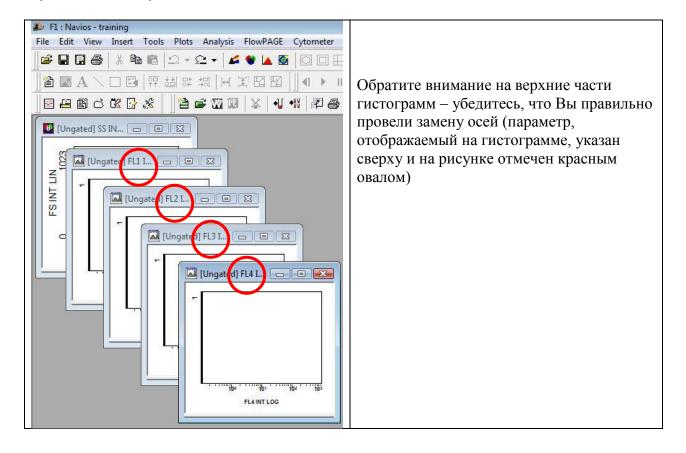


После выбора раздела "Format Plot" у Вас появится окно "Histogram Plot Properties".

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



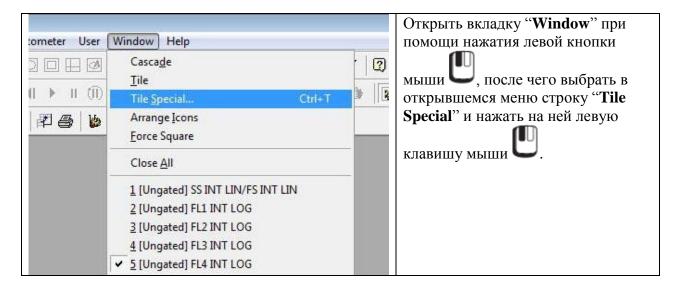
Аналогичную процедуру проделайте для гистограммы 4 и 5, где следует заменить FL1 на FL3 и FL4, соответственно. После проведения этих действий у Вас рабочее пространство будет иметь следующий вид:



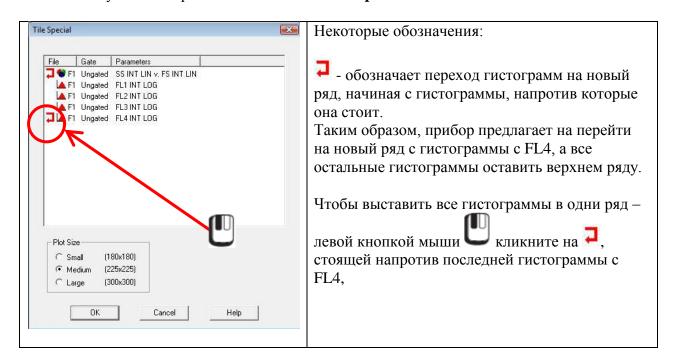
Следующее, что Вам необходимо сделать, это расставить гистограммы таким образом, чтобы они не налегали друг на друга. Это можно сделать следующим образом: навести курсор на верхнюю часть гистограммы (синяя область сверху), кликнуть по ней левой

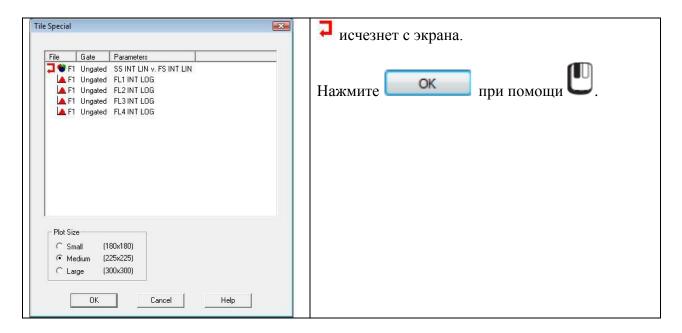
кнопкой мыши , затем, удерживая левую кнопку мыши в нажатом положении, переместить гистограмму в удобное для Вас место на экране, после чего отжать левую кнопку мыши.

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

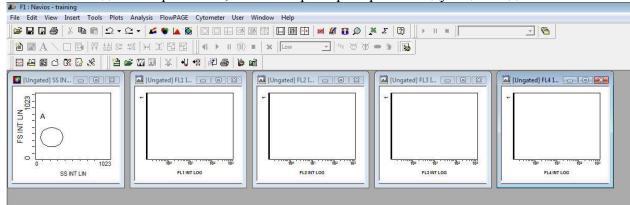


После чего у Вас на экране появится окно "Tile Special"





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



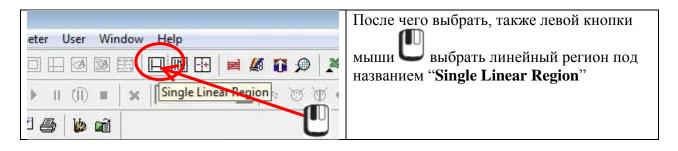
Итак, Вы создали все необходимые гистограммы для настройки прибора для четырехцветного анализа.

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).

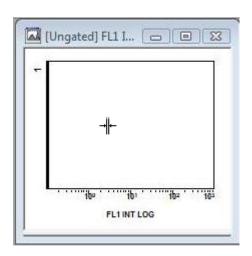
Поэтому перед началом настройки прибора по изотипическим контролям необходимо нарисовать соответствующие регионы (от 10^0 до конца оси) на указанных гистограммах.

Для этого, необходимо сначала активировать интересующую нас гистограммы

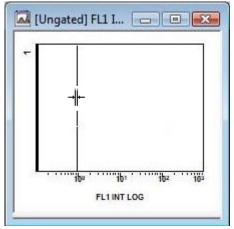
(предположим, гистограмму с FL1) нажатием левой кнопки мыши опо верхней синей части.



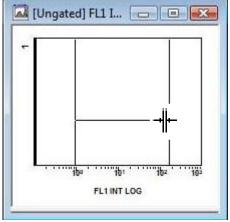
Далее переведите мышку на активированную гистограммы (в нашем случае – FL1), при этом при появлении в поле гистограммы курсов приобретает вид , как это показано на рисунке



Далее, примерно выровняйте курсор по 10^0 на оси FL1, после чего нажмите один раз на левую клавишу мыши . 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):

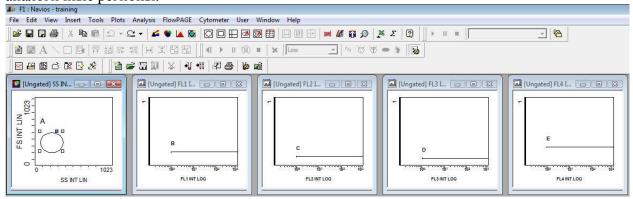


Таким образом, Вы можете регулировать ширину Вашего региона (Следует отметить, что место расположение горизонтальной перекладины по высоте не оказывает влияния на качество анализа, ее расположение должно завсеть от того, на какой высоте Вам в

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 . 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 10^0 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:

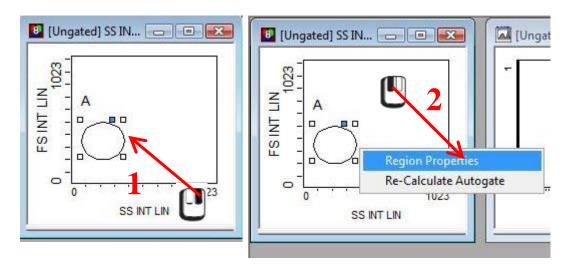
Активизируйте гистограмму при помощи нажатия левой кнопкой мыши по верхнему синему полю гистограммы. Дале наведите курсор на регион "A", таким образом, что бы

курсор мыши имел вид Ф, и нажмите левую кнопку мыши

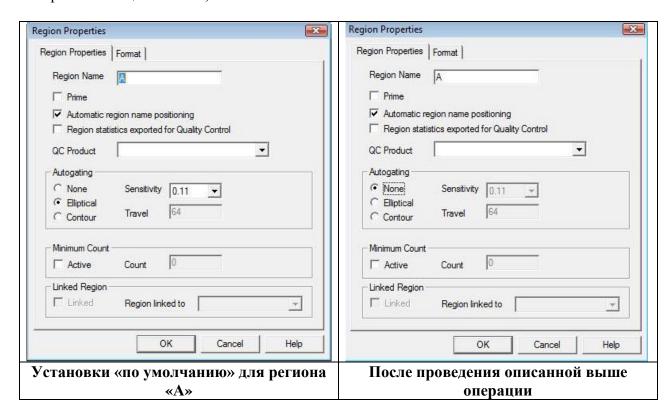
[Ungated] SS IN...

[Ungated] SS

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

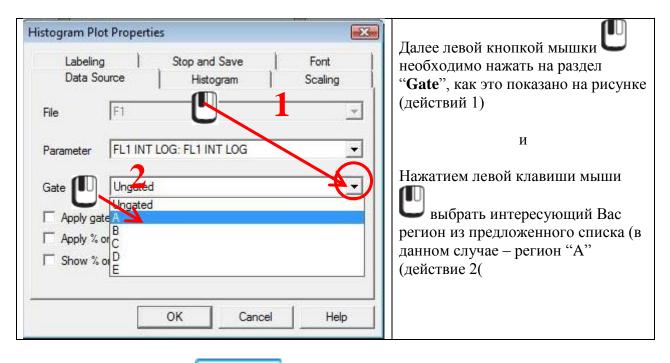


В дальнейшем, в указанную область мы поместим популяцию лимфоцитов — целевую популяцию клеток, для анализа уровня экспрессии антигенов которой и происходит настройка прибора. Именно поэтому следующим шагом необходимо сделать так, чтобы на

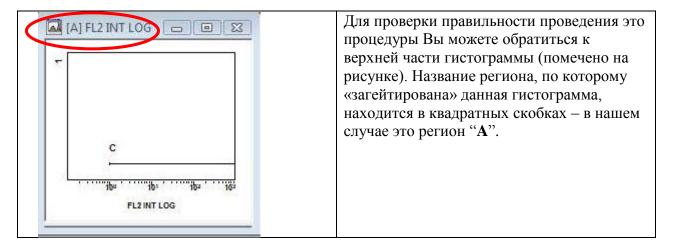
гистограммах, при помощи которых будет осуществляться оценка уровня экспрессии данных антигенов, отображались только клетки, соответствующие по размеру и структуре лимфоцитам. Данная процедура получила название «гейтирование», то есть введение данных логических ограничений из одной гистограммы в другие. 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".



После нажатия клавиши ОК операция будет завершена.

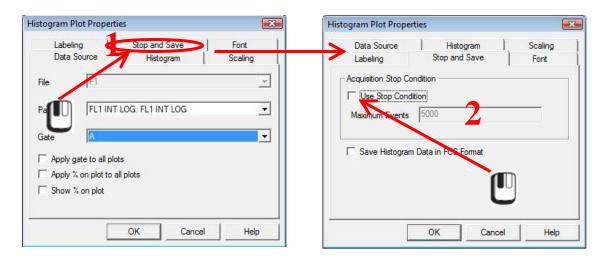


Данную последовательность действий необходимо повторить для гистограмм, отображающих флуоресценцию по FL2, FL3 и FL4.

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

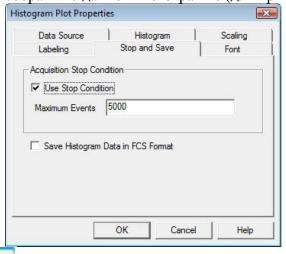
1. В созданном протоколе отсутствуют условия для остановки сбора данных, следовательно, прибор будет набирать события до ограничений, установленных «по умолчанию» (для приборов Navios^{тм} и Gallios^{тм} это 100 000 событий и 300 секунд — это можно посмотреть в окошке "Cytometer Control"), причем сюда 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 "А". Следовательно, необходимо установить ограничение именно по этому типу клеток. Где его устанавливать? На любой гистограмме, где отображаются события, попадающие в регион "А" — 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 (действие 1), после чего необходимо активировать строку "Use Stop Condition" нажатием левой кнопкой мышки (действие 2).

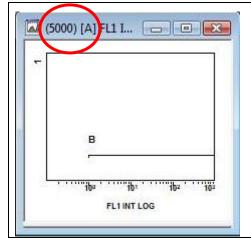


После чего поставьте курсор мыши на данную строку и, кликнув левой клавишей мыши

при помощи клавиатуры введите в строку "**Maximum Events**" необходимое число событий, которое хотите собрать по данной гистограмме (для примера – 5000).



.. и нажмите



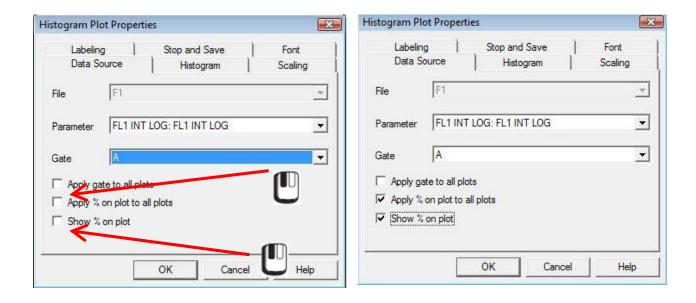
OK

Для проверки правильности проведения это процедуры Вы можете обратиться к верхней части гистограммы (помечено на рисунке). Перед названием, региона, по которому «загейтирована» данная гистограмма, в круглых скобках — в нашем случае (5000) - появится число событий, после набора которых прибор автоматически остановит сбор данных и сохранит полученный результат в папку "LMD".

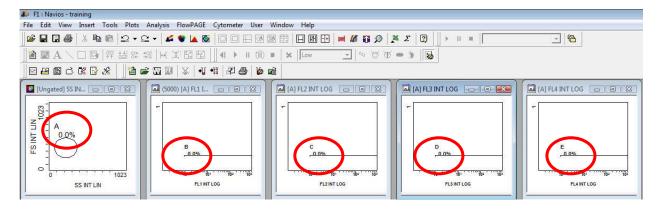
2. Для корректного выставления напряжения по изотипическим контролям необходимо видеть, сколько клеток выходит за пределы первой декады логарифмической шкалы флуоресценции (см. ниже). Следовательно, на гистограммах должно отображаться число событий, попадающих в область "В" на первой гистограмме, а также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

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

при помощи левой клавишей мыши 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).



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.

