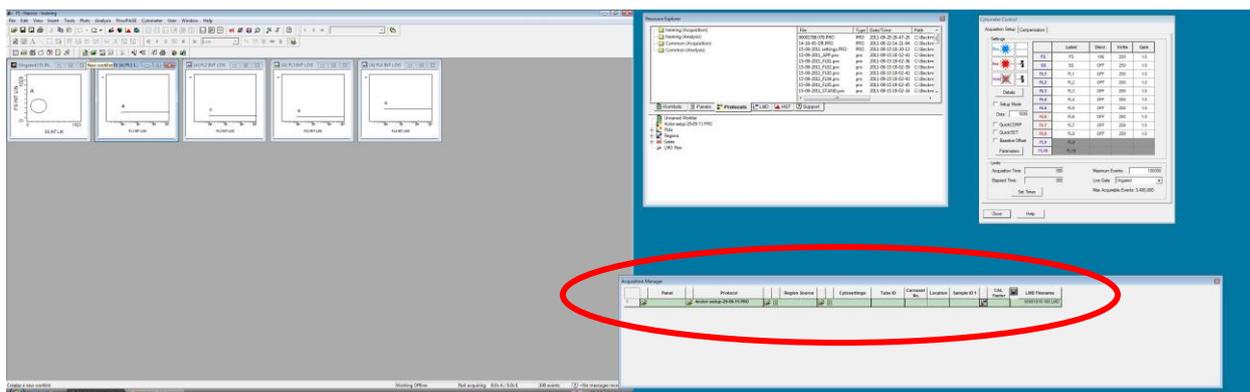
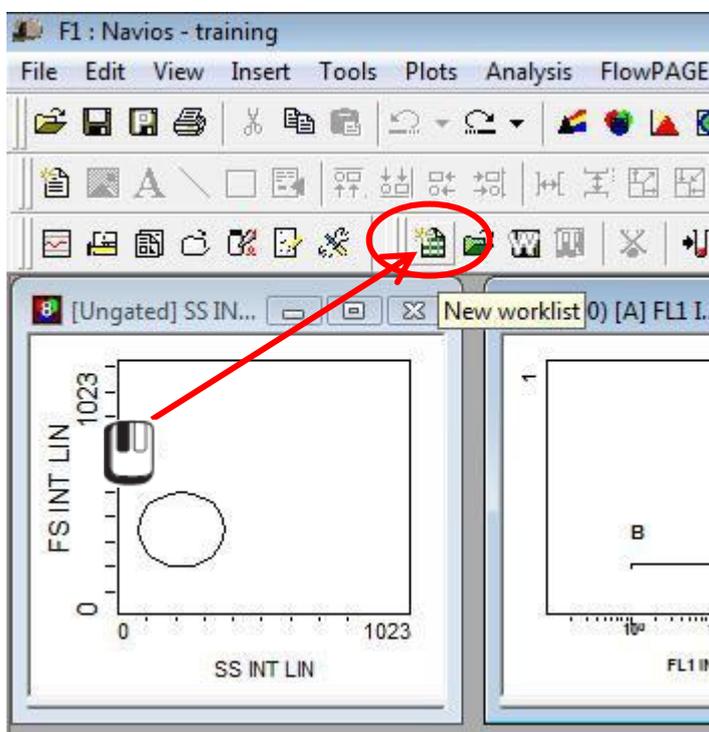


2. Запуск протокола и настройка прямого и бокового светорассеяния, а также напряжения на каналах флуоресценции по изотипическим контролям.

Итак, Вы создали и сохранили протокол для настройки четырехцветного анализа. Следующим шагом является запуск этого протокола для настройки. Для начала необходимо очистить рабочий лист в окне “Acquisition Manager” – данная вкладка всегда активна «по умолчанию» и находится в правой нижней части экрана (см. рисунок).



Для того, чтобы очистить это окно необходимо найти клавишу  - “New worklist” и нажать на нее левой клавишей мыши 



После этого у Вас окно “Acquisition Manager” станет абсолютно чистым.

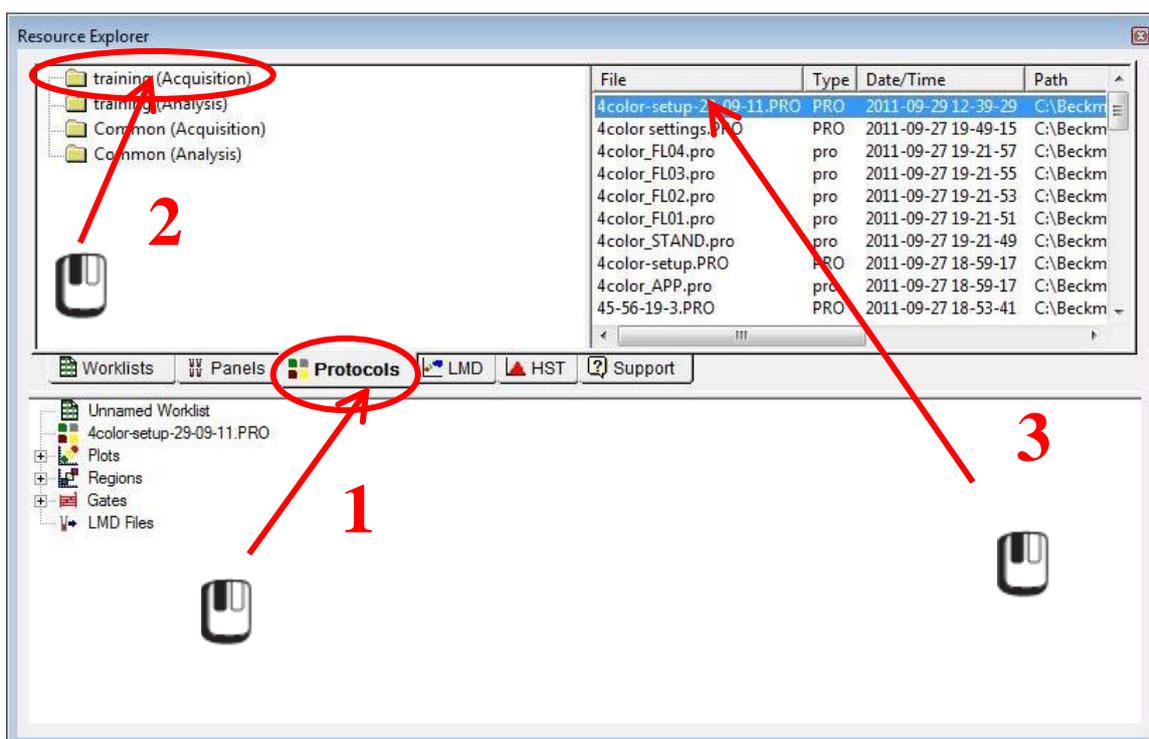
Теперь Вам необходимо подгрузить в “Acquisition Manager” только что созданный протокол. Все Ваши протоколы находятся в окошке “Resource Explorer”, вкладка

“**Protocols**”. Как видно из приведенного ниже рисунка вкладка “**Protocols**” в настоящее время активна, так как она несколько приподнята над остальными вкладками данного окна. В том случае, если это не так, то Вам необходимо нажать на эту вкладку левой

кнопкой мыши  (действие 1). После этого Вы «по умолчанию» оказываетесь в папке с протоколами для сбора данных (“**Acquisition**”), либо Вы можете кликнуть левой кнопкой

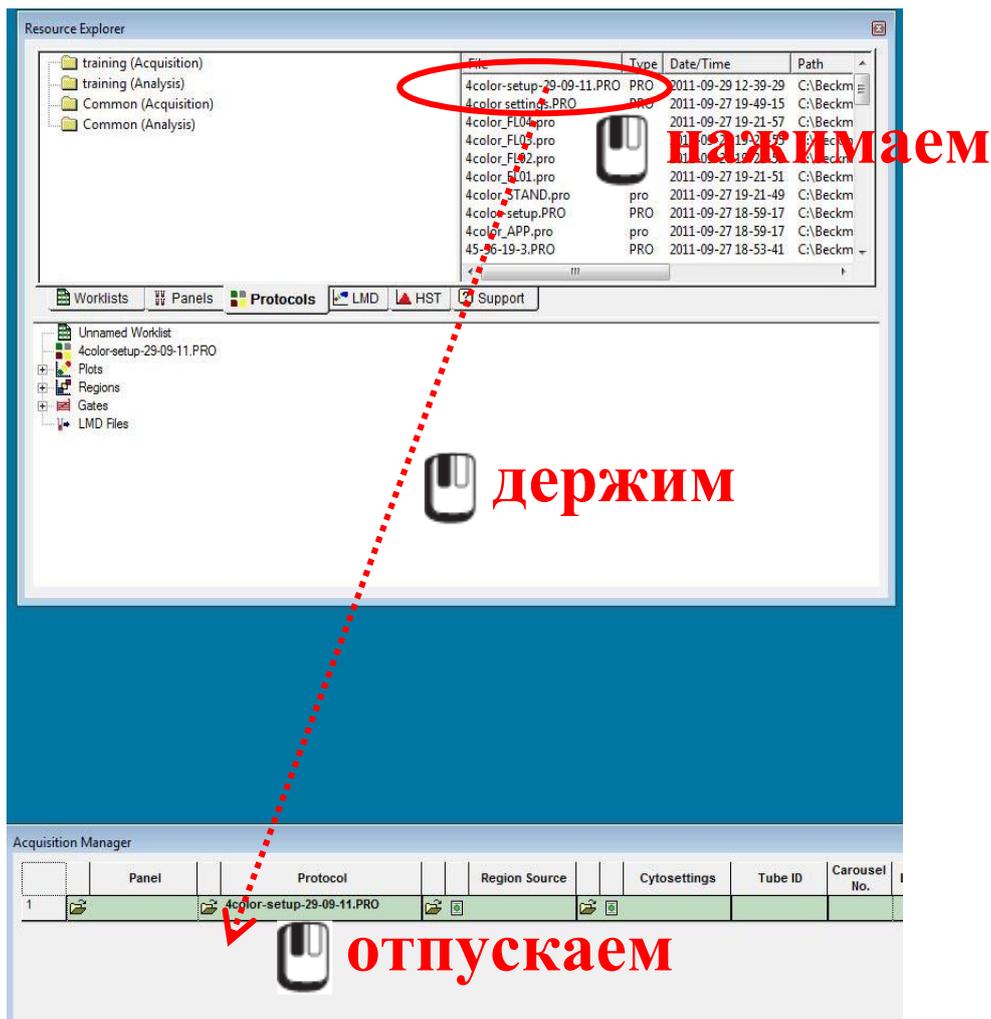
мыши  на этой папке (действие 2). Содержание данной папки отражено в правой верхней части окна “**Resource Explorer**”, после чего Вам необходимо выбрать

интересующий протокол из списка и активировать его нажатием левой кнопки мыши  (действие 3).



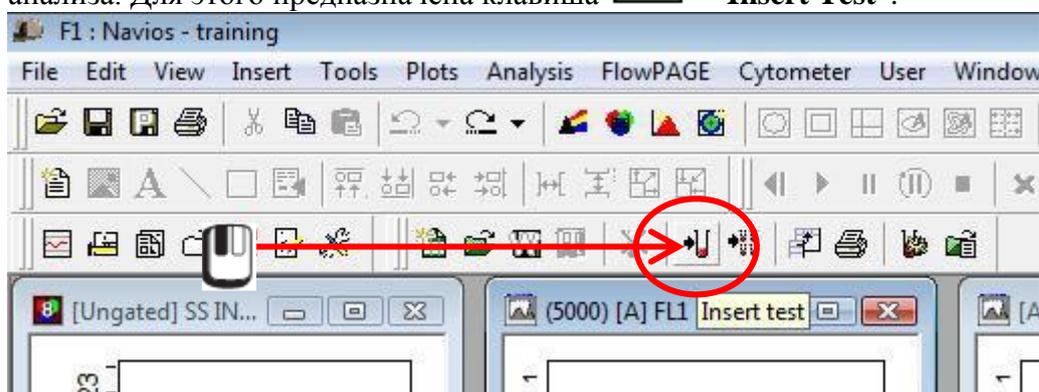
Следующим шагом является загрузка интересующего Вас протокола в окно “**Acquisition Manager**”. Для этого необходимо сделать следующее: не сводя курсор мыши с

выделенного протокола зажмите левую клавишу мыши  и, не отпуская ее, переместите курсор мыши в окно “**Acquisition Manager**” и отпустите левую клавишу мыши. В том случае, если Вы все сделали правильно, то “**Acquisition Manager**” приобретет вид, представленный на картинке. Ваш протокол загружен и готов к работе.



Однако Вам необходимо настроить протокол по 4 каналам флуоресценции, и Ваши изотипические контроли находятся в разных пробирках, а также пробирка с частицами Flow-Set Pro. Следовательно, по данному протоколу Вам необходимо проанализировать 5 отдельных пробирки. Поэтому Вам необходимо добавить еще четыре пробирки в лист

анализа. Для этого предназначена клавиша  - “Insert Test”.



Нажмите на эту клавишу 4 раза, и в окне “Acquisition Manager” у Вас уже будет 5 протокола (см. рисунок):

	Panel	Protocol	Region Source	Cyotosettings	Tube ID	Carousel No.	Location	Sample ID 1	CAL Factor	LMD Filename
1		4color-setup-29-09-11.PRO							<input checked="" type="checkbox"/>	00001819 100.LMD
2		4color-setup-29-09-11.PRO								00001820 101.LMD
3		4color-setup-29-09-11.PRO								00001821 102.LMD
4		4color-setup-29-09-11.PRO								00001822 103.LMD
5		4color-setup-29-09-11.PRO								00001823 104.LMD

Обратите внимание красные и синие стрелки в разделах “**Region Source**” и “**Cyotosettings**”. Данные стрелки свидетельствуют о том, что положения регионов и настройки прибора, соответственно, будут переноситься из вышележащего пробирки в последующую. Это особенно актуально для настроек напряжения, так как каждая пробирка содержит только один изотипический контроль для настройки только одного канала флуоресценции!

Следующим шагом является Вам необходимо указать номер карусели (передняя боковая часть карусели), в которой находятся Ваши образцы. Для этого нажатием левой клавиши



мыши активируйте самую верхнюю ячейку в графе “**Carousel No**” и при помощи клавиатуры введите номер карусели (в данном случае – 1) и нажмите клавишу “**Enter**”. Этот номер автоматически будет применен ко всем пробиркам в данном окне. Также автоматически в графе “**Location**” у Вас появятся порядковые номера пробирок, соответствующие их положениям в карусели (прибор «по умолчанию» начинает отсчет с первой позиции в карусели).

n Source	Cyotosettings	Tube ID	Carousel No.	Location	Sample ID 1	CAL Factor	LMD Filename
			1	1		<input checked="" type="checkbox"/>	00001819 100.LMD
			1	2			00001820 101.LMD
			1	3			00001821 102.LMD
			1	4			00001822 103.LMD
			1	5			00001823 104.LMD

После чего убедитесь в правильности расстановки пробирок в карусели:

- положение 1 – периферическая кровь, окрашенная NEG.CTRL IgG2b(mouse)-FITC CE (6603853)
- положение 2 - периферическая кровь, окрашенная NEG.CTRL IgG1(mouse)-PE CE (A07796)
- положение 3 - периферическая кровь, окрашенная NEG.CTRL IgG1(mouse)-ECD CE (A07797)
- положение 4 - периферическая кровь, окрашенная NEG.CTRL IgG1(mouse)-PC5 CE (A07798)
- положение 5 – флуоросферы Flow-Set Pro

После этого карусель можно загружать в прибор.

Чтобы облегчить дальнейшую процедуру настройки можно заранее поставить нажатием

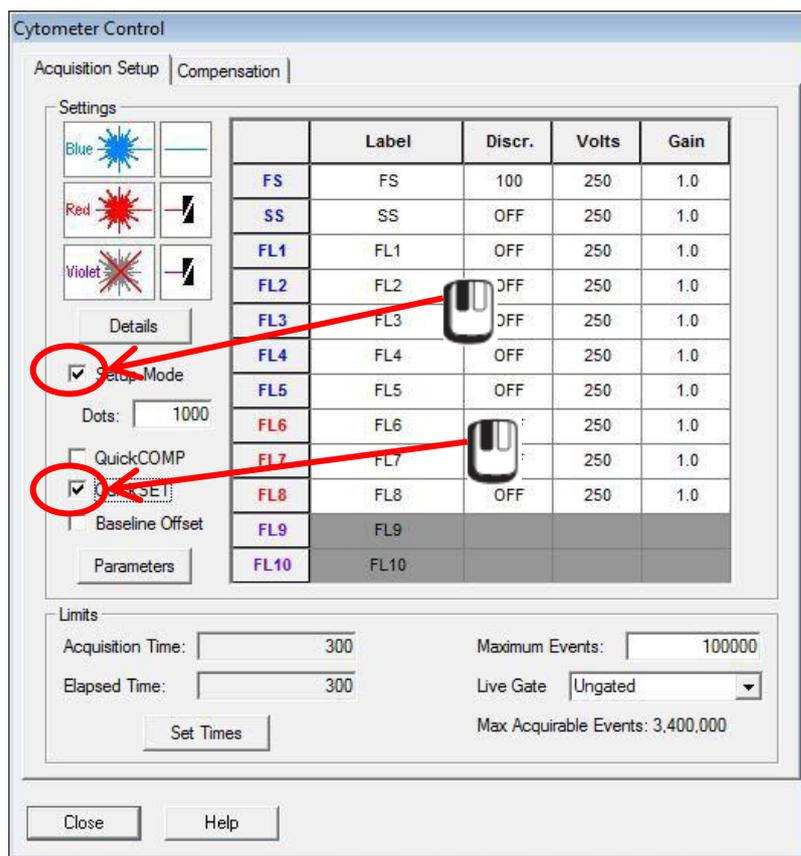


левой клавиши мыши галочки напротив “**Setup Mode**” и “**Quick Set**” в окне “**Cytometer Control**”.

“**Setup Mode**” («режим настройки») – это режим работы прибора, позволяющий в режиме «реального времени» отслеживать малейшие изменения, вносимые при настройке

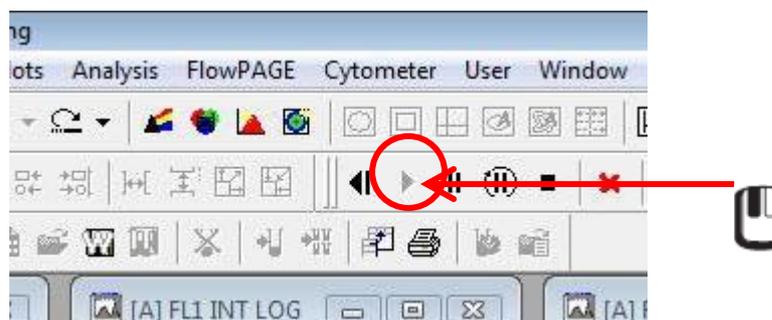
прибора, при этом данные не сохраняются, но события, отображенные на гистограммах постоянно обновляются. Для сохранения данных необходимо убрать данную галочку и, после набора необходимого числа событий (в нашем случае – 5000 событий по гистограмме FL1), прибор автоматически остановится, сохранит результаты анализа в формате LMD и перейдет к анализу следующей пробирки.

“**Quick Set**” («быстрая настройка») – активация этой опции сопровождается появлением бегунков синего цвета на гистограммах. Эти ползунки используются для регулировки напряжения и обновления данных по напряжению в графе “**Volts**” в правой части окна “**Cytometer Control**”. При необходимости можно изменять напряжения напротив каждого из детекторов вручную при помощи мыши или клавиатуры.



После того, как все сделано, можно запускать протокол в работу. Для этого необходимо

нажать клавишу  левой кнопкой мыши .



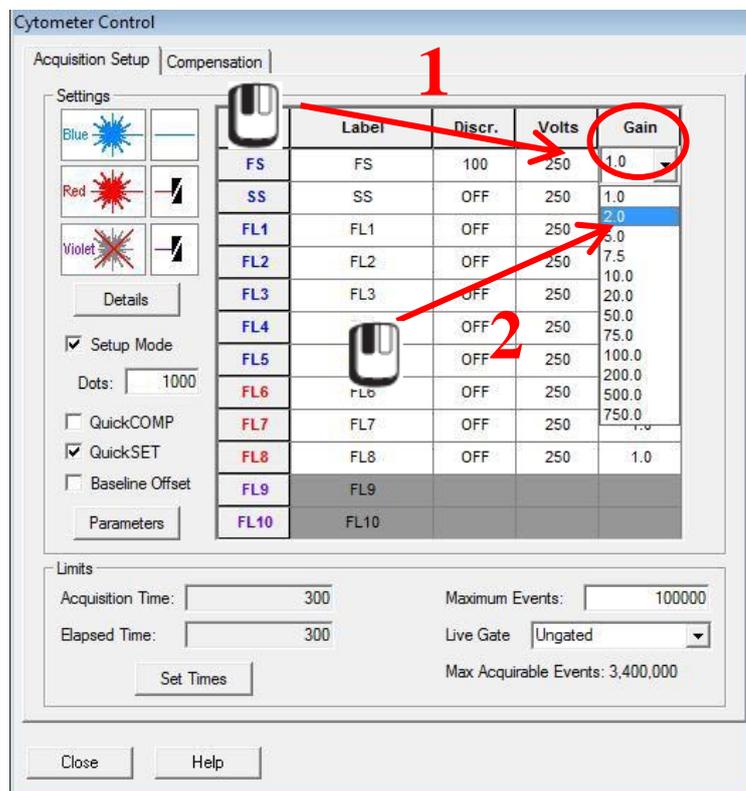
Настройка прямого и бокового светорассеяния, настройка дискриминатора.

Проточные цитометры Navios™ и Gallios™ регистрируют два типа светорассеяния – малоугловое и рассеяния света под углом 90°. Малоугловое светорассеяние (forward scatter, FS) представляет собой рассеяние света от поверхности клеток под малыми углами (1-19°) и пропорционально диаметру исследуемого объекта. В то время как боковое светорассеяния или рассеяния света под углом 90° (side scatter, SS) регистрирует весь свет, рассеянный или отраженный в боковом направлении, как самой клеткой, так и ее структурами (ядром, гранулами), характеризуя сложность организации цитоплазмы. Данные параметры отражают особенности морфологического строения исследуемого объекта. Используя данные характеристики по гистограмме FS против SS можно выделить три основные популяции лейкоцитов периферической крови клинически здорового донора: лимфоциты (высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение, малые размеры и отсутствие сложных образований в цитоплазме), моноциты (более крупные клетки с неспецифическими гранулами – лизосомами – в цитоплазме) и гранулоциты (еще более крупные клетки, имеющие сложное ядро, специфические и неспецифические гранулы в цитоплазме).

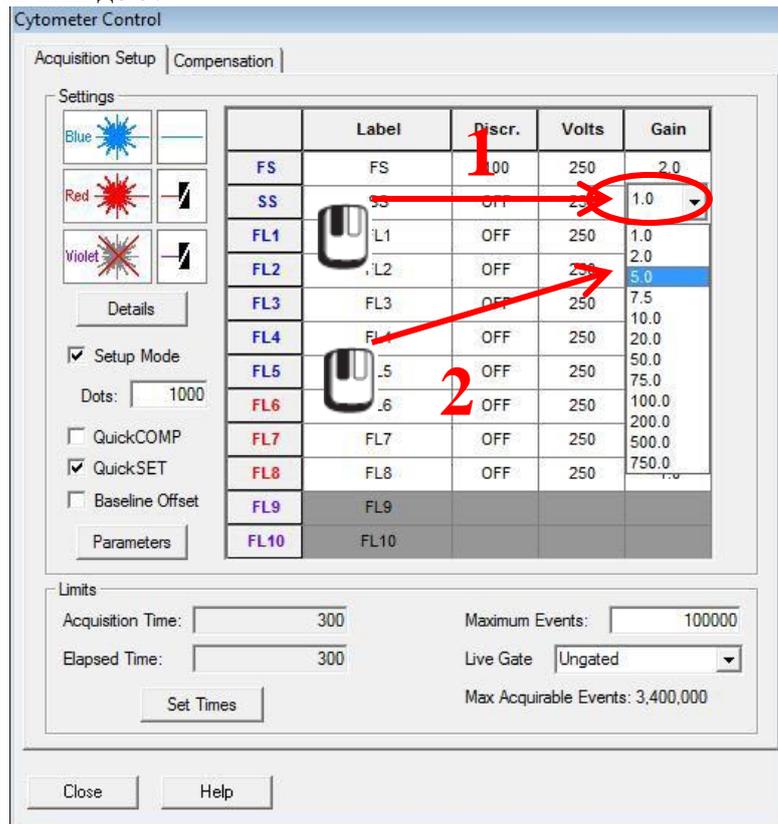
При настройке данных параметров необходимо выставить напряжение на датчиках FS и SS так, чтобы на гистограмме Вы могли одновременно видеть все три основных популяции лейкоцитов и... фрагмент дебриса! Как этого добиться?

Как только Вы запустили работу прибора с первой пробиркой (изотипический контроль по FITC), обратитесь к окошку “Cytometer Control” и увеличьте “Gain” по FS до 2, а по SS – до 5.

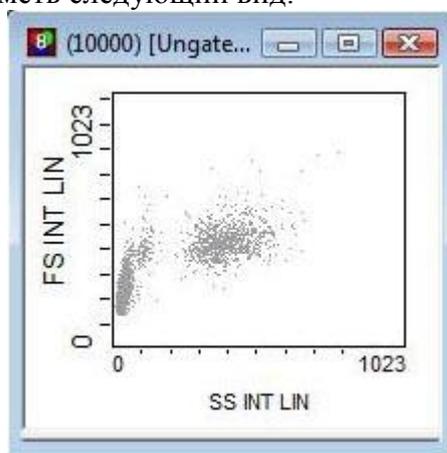
Для этого нажмите левой кнопкой мыши  по графе “Gain” в строке “FS” (действие 1) и в появившемся меню также нажатием левой клавиши мыши  выберите цифру 2 (действие 2).



Аналогично необходимо сделать и с графой “SS”, однако в этом случае “Gain” необходимо увеличить до 5.

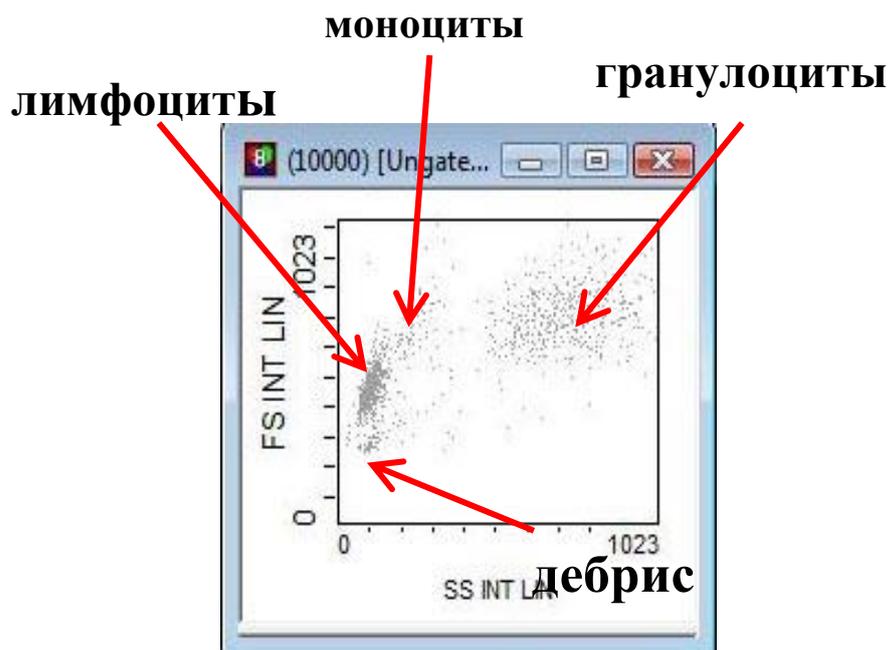


После проведения данных манипуляций на гистограмме FS против SS появятся лейкоциты, которые будут иметь следующий вид:



Имея уже такие настройки, Вы можете увидеть популяции лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов. Однако не можете провести четкое разделение на лимфоциты и дебрис (агрегаты тромбоцитов и «тени» эритроцитов).

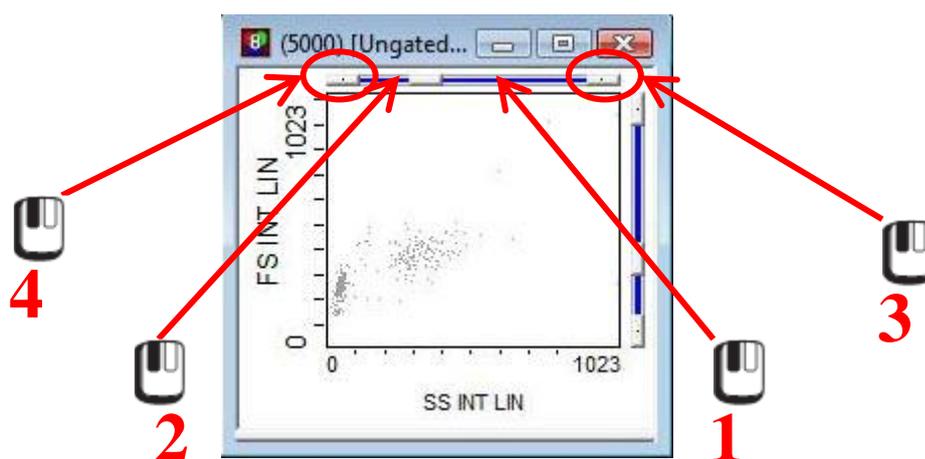
Вам необходимо их привести к вот такому виду:



Как это сделать?

В том случае, если Вы поставили галочку напротив **“Quick Set”** в окне **“Cytometer Control”**, то на Ваши гистограммах напротив названий осей появились синие бегунки, как это показано на рисунке. Например, для корректировки напряжения по **“SS”**. Если Вы

нажимаете левой кнопкой мыши  по синему пространству справа от бегунка, то напряжение увеличивается на 10 вольт (действие 1), слева – уменьшается на 10 вольт (действие 2). Для более точной корректировки напряжения можно нажимать на начала координат, если нажимаете справа – увеличение напряжения на 1 вольт (действие 3), слева – уменьшение на 1 вольт (действие 4).



Используя эти клавиши необходимо оптимизировать настройки по прямому (FS) и боковому (SS) светорассеянию, как это было показано на предыдущем рисунке. Снизу приведены примеры некорректной настройки прямого светорассеяния.

<p>Пример очень низкого напряжения по FS: все популяции лейкоцитов смещены в нижнюю часть гистограммы, напряжение по оси SS – оптимально. Здесь необходимо повысить напряжение по FS</p>	<p>Пример очень высокого напряжения по FS: популяция гранулоцитов видна лишь частично, дебрис занимает до трети поля гистограммы. Здесь необходимо понизить напряжение по FS.</p>

Как только Вы оптимизировали настройки прямого и бокового светорассеяния, четко видите три основных популяции лейкоцитов по размеру и структуре, можно переходить к настройке дискриминатора.

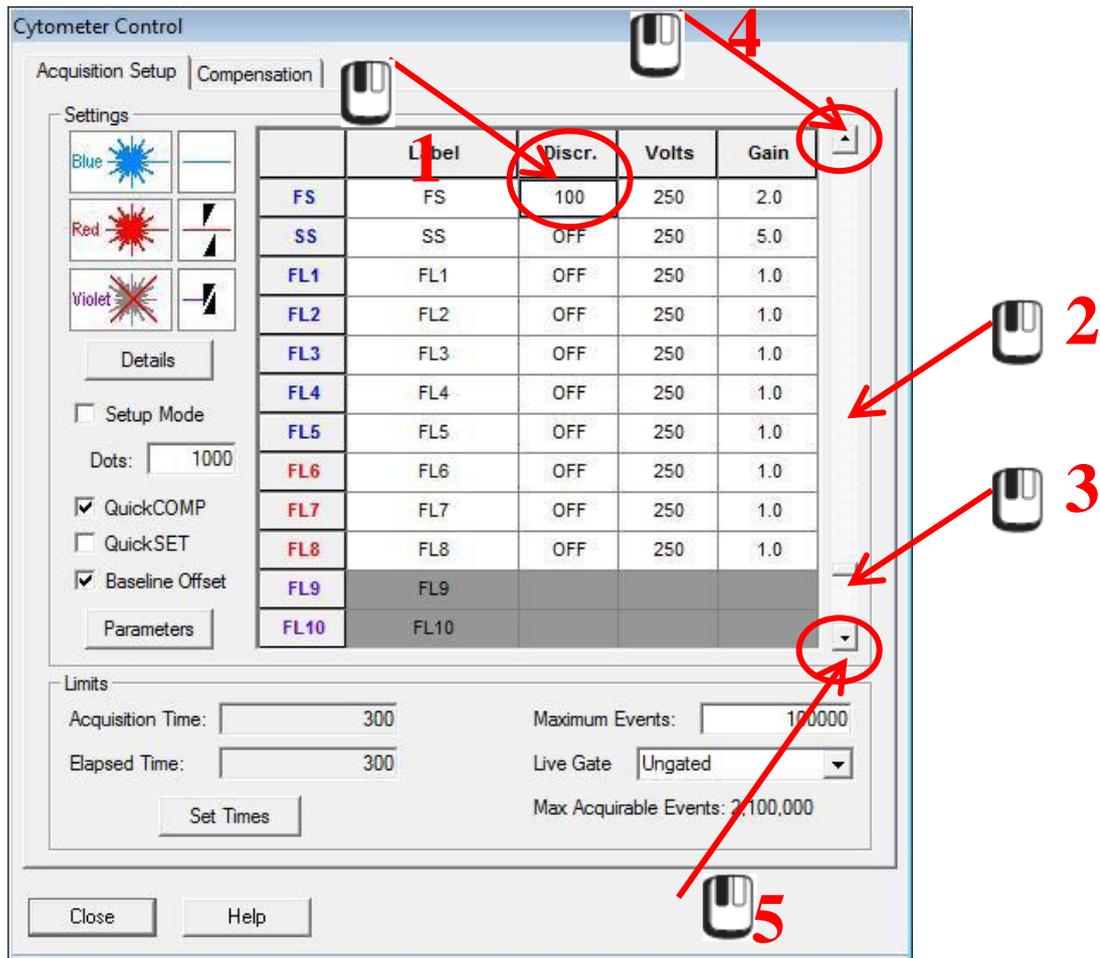
Настройка дискриминатора.

Как было видно из предыдущего рисунка приборы регистрируют, помимо лейкоцитов, множество различных объектов – агрегаты тромбоцитов, остатки лизированных эритроцитов и т.п. Особенно ярко и наглядно это проявляется на образцах, приготовленных по «безотмывочной» технологии (из образцов не удаляются остатки разрушенных эритроцитов). Наличие данных объектов приводит к тому, что прибор очень быстро набирает число событий, установленное для остановки сбора данных «по умолчанию». Следовательно, необходимо избавиться от регистрации лишних событий. Необходимо ввести такие значения дискриминатора, чтобы были видны все основные популяции клеток анализируемого образца, а частицы, которые не являются клетками (дебрис), не попадали в зону анализа. В приборах Navios™ и Gallios™, это ограничение «по умолчанию» ставится на канал малоуглового рассеяния света. Для того, чтобы изменить значения дискриминатора необходимо обратиться к окну “**Cytometer Control**”. В правой части окна напротив каждого из каналов регистрации сигнала есть графа под названием “**Discr.**” Для того, чтобы изменить значение дискриминатора, необходимо

левой кнопкой мыши  (действие 1) нажать на ячейку столбца “**Discr.**” Напротив интересующего Вас канала (в этом случае – FS), после чего справа в окне “**Cytometer**

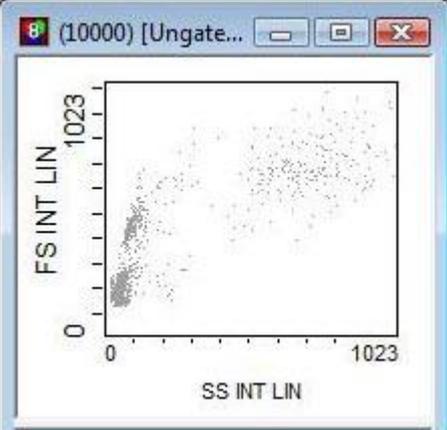
Control” у Вас активизируется серый бегунок. Нажимая левой кнопкой мыши  по пространству над бегунком (действие 2), Вы можете увеличивать значения дискриминатора, тем самым поднимая порог чувствительности прибора на 10 единиц шкалы FS, если нажимаете под бегунком (действие 3) – снижаете значения дискриминатора, тем самым понижая 10 единиц шкалы FS порог чувствительности прибора. Если Вам необходима более точная настройка, то для этого предназначены

боковые кнопки осе, нажатие на эти клавиши левой кнопкой мыши  приводит к увеличению (действие 4) или уменьшению (действие 5) значений дискриминатора на 1.



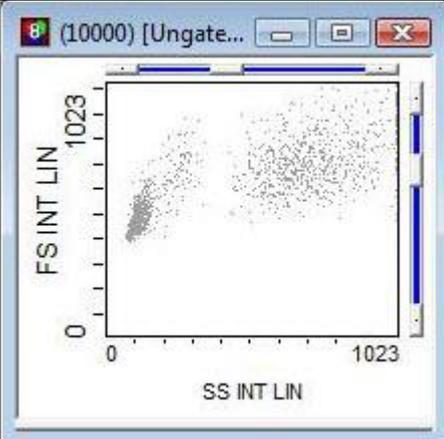
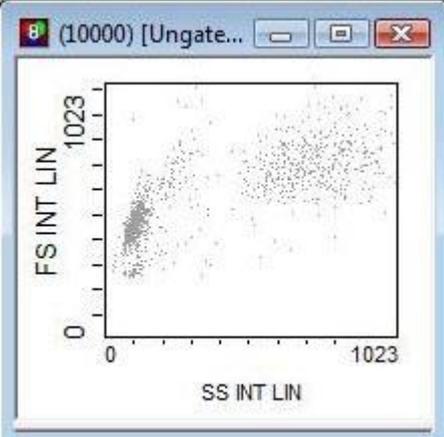
	Label	Discr.	Volts	Gain
FS	FS	100	250	2.0
SS	SS	OFF	250	5.0
FL1	FL1	OFF	250	1.0
FL2	FL2	OFF	250	1.0
FL3	FL3	OFF	250	1.0
FL4	FL4	OFF	250	1.0
FL5	FL5	OFF	250	1.0
FL6	FL6	OFF	250	1.0
FL7	FL7	OFF	250	1.0
FL8	FL8	OFF	250	1.0
FL9	FL9			
FL10	FL10			

Для примера высоких и низких значений дискриминатора было проанализировано по 10000 событий для каждой из гистограмм.



На данном рисунке приведен пример очень низкого значения дискриминатора – в поле анализа попадает очень много посторонних частиц (дебриса). Необходимо повысить значение дискриминатора!!!

Из 10000 событий более половины приходится на дебрис

	<p>На данном рисунке приведен пример очень высокого значения дискриминатора. Обратите внимание, что часть популяции лимфоцитов не попадает в зону анализа! Необходимо понизить значения дискриминатора.</p>
	<p>На данном рисунке приведены оптимальные значения дискриминатора. Видны все основные популяции лейкоцитов, четко отделимые друг от друга, а между лимфоцитами и дебрисом остается свободное пространство. Дебрис ни в коем случае нельзя целиком удалять из зоны анализа, так как эти частицы в данном случае служат отличным ориентиром для того, чтобы знать, не потеряли ли мы лимфоциты при настройке!!!</p>

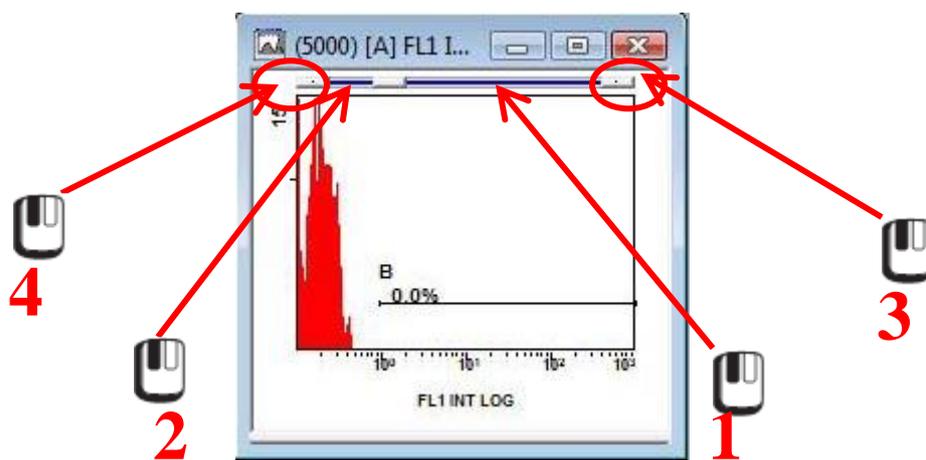
Настройка параметров фотоэлектронных умножителей для флуоресценции.

После настройки каналов светорассеяния и дискриминатора Вам можно перейти к настройке напряжения на каналах флуоресценции. Так как у Вас уже активирован режим “Quick Set” в окне “Cytometer Control”, то на Ваших однопараметрических гистограммах напротив названий осей присутствуют синие бегунки, как это показано на рисунке.

!!! Вы должны корректировать настройки напряжения только на том канале, изотипическими контролями для которого у Вас окрашены клетки в данной пробирке!!!

Ниже приведен пример корректировки напряжения по “FL1” по первой пробирке, где у Вас клетки окрашены изотипическим контролем, конъюгированным с FITC. Если Вы

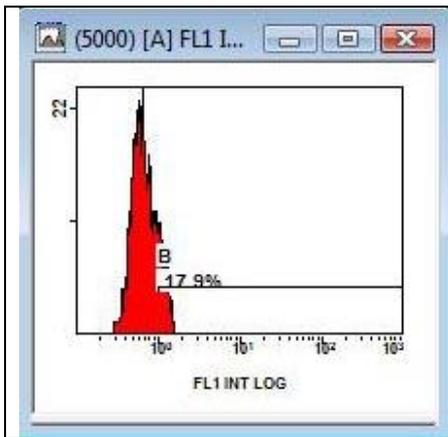
нажимаете левой кнопкой мыши  по синему пространству справа от бегунка, то напряжение увеличивается на 10 вольт (действие 1), слева – уменьшается на 10 вольт (действие 2). Для более точной корректировки напряжения можно нажимать на начала координат, если нажимаете справа – увеличение напряжения на 1 вольт (действие 3), слева – уменьшение на 1 вольт (действие 4).



Как должна выглядеть гистограмма с правильно настроенным напряжением при помощи изотипического контроля?

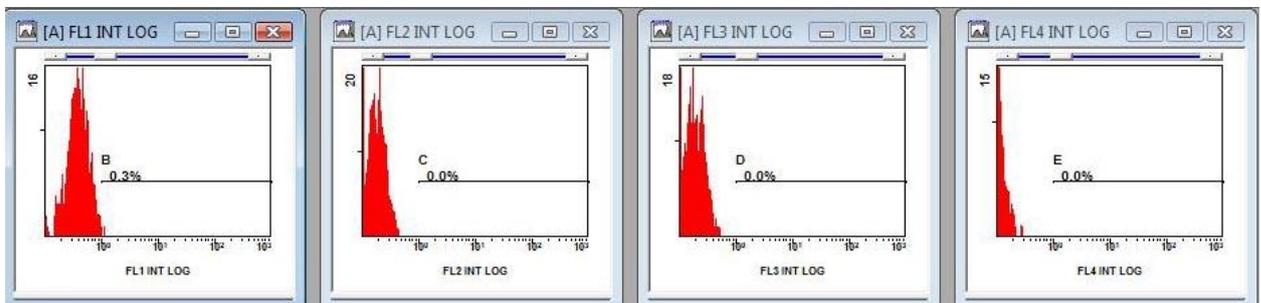
Следует помнить про то, что негативные клетки должны попадать в первую декаду на логарифмической шкале интенсивности флуоресценции по всем задействованным каналам. Необходимо добиться того, чтобы клетки контроля легли, по возможности, в центре первой декады, при этом во вторую декаду должно попадать не более 2% клеток. Рассмотрим примеры корректной и не корректной настройки изотипического контроля по FITC:

	<p>Напряжение очень низкое! Часть пика «прилипает» к началу координат. Необходимо повысить напряжение по FL1. В противном случае при анализе образцов Вы не сможете корректно настроить параметры цветовой компенсации, кроме того, очень велик риск получить некорректный результат при анализе маркеров с низким уровнем экспрессии.</p>
	<p>Напряжение оптимально, Пик виден целиком. В зону позитивных клеток попадает чуть менее 1% клеток.</p>



Напряжение высокое – за пределами первой декады находится более 2% клеток. Необходимо понизить напряжение по FL1. В противном случае при анализе образцов Вы получите ложно позитивные результаты.

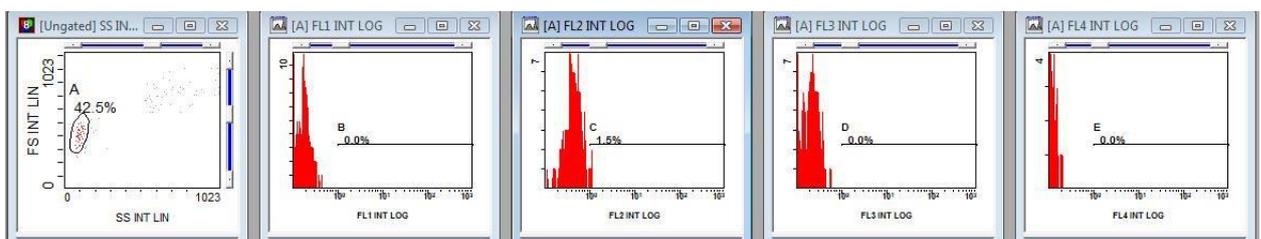
Итак, Вы корректно выставляете напряжение по FL1, при этом на напряжение по остальным каналам флуоресценции Вы не обращаете внимание. У Вас должна получиться подобная картинка:



Как только параметры напряжения по прямому, боковому светорассеянию и по FL1 у Вас оптимизированы, то нажатием левой клавиши мыши  Вам необходимо убрать галочку напротив “**Setup Mode**” в окне “**Cytometer Control**”, Прибор после этого наберет необходимое число событий (5000 по гистограмме FL1), автоматически сохранит результаты анализа и перейдет к пробирке 2, в которой у Вас находится изотипический контроль для настройки второго канала флуоресценции FL2. При этом, как уже отмечалось выше, все сделанные Вами изменения в настройках автоматически перенесутся на данную пробирку.

При анализе второй пробирки оптимизируйте настройки напряжения по FL2 описанным выше способом. Для начала нажатием левой клавиши мыши  верните на место галочку напротив “**Setup Mode**” в окне “**Cytometer Control**”. И продолжите настройку напряжения по каналу FL2. Необходимо помнить, что в пробирке 2 у Вас клетки окрашены антителами, конъюгированными только с PE!

!!! При анализе второй пробирке Вы оптимизируете настройки ТОЛЬКО по каналу FL2. Настройки остальных каналов Вы НЕ ИЗМЕНЯЕТЕ !!!

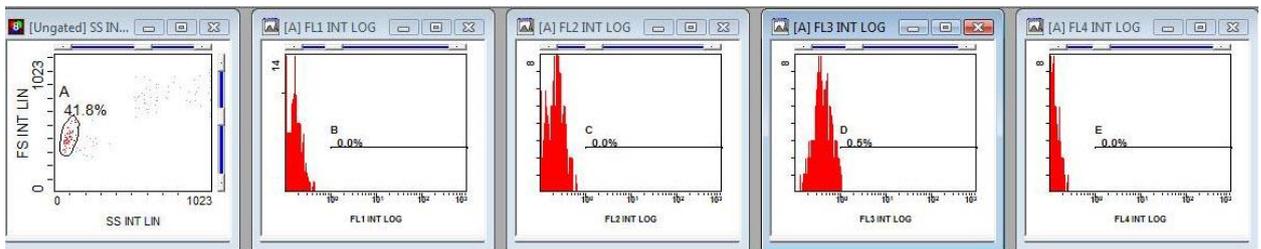




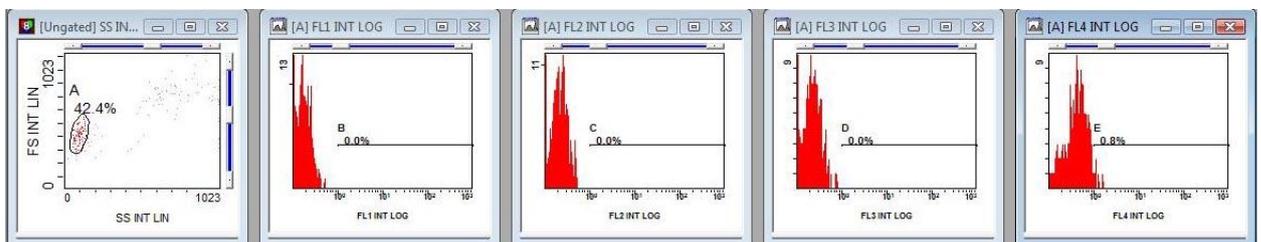
По завершении настройки нажатием левой клавиши мыши Вам необходимо убрать галочку напротив “**Setup Mode**” ” в окне “**Cytometer Control**”, Прибор после этого наберет необходимое число событий (5000 по гистограмме FL1), автоматически сохранит результаты анализа и перейдет к пробирке 3, в которой у Вас находится изотипический контроль для настройки второго канала флуоресценции FL3. При этом, как уже отмечалось выше, все сделанные Вами изменения в настройках автоматически перенесутся на данную пробирку.

Аналогично проделайте для пробирок 3 и 4, где у Вас находятся клетки, окрашенные изотипическими контролями по ECD и PC5.

!!! При анализе третьей пробирке Вы оптимизируете настройки ТОЛЬКО по каналу FL3. Настройки остальных каналов Вы НЕ ИЗМЕНЯЕТЕ !!!

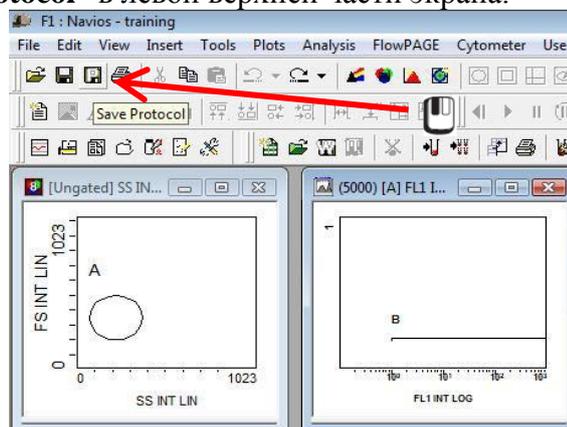


!!! При анализе четвертой пробирке Вы оптимизируете настройки ТОЛЬКО по каналу FL4. Настройки остальных каналов Вы НЕ ИЗМЕНЯЕТЕ !!!



Итак, Вы настроили четыре канала флуоресценции по соответствующим изотипическим контролям. После завершения сбора данных по четвертой пробирке, где у Вас находился изотипический контроля по FL4. По завершении настройки этой пробирки все изменения

в протоколе необходимо сохранить. Для этого левой клавишей мыши  следует нажать на клавишу  “**Save Protocol**” в левой верхней части экрана.



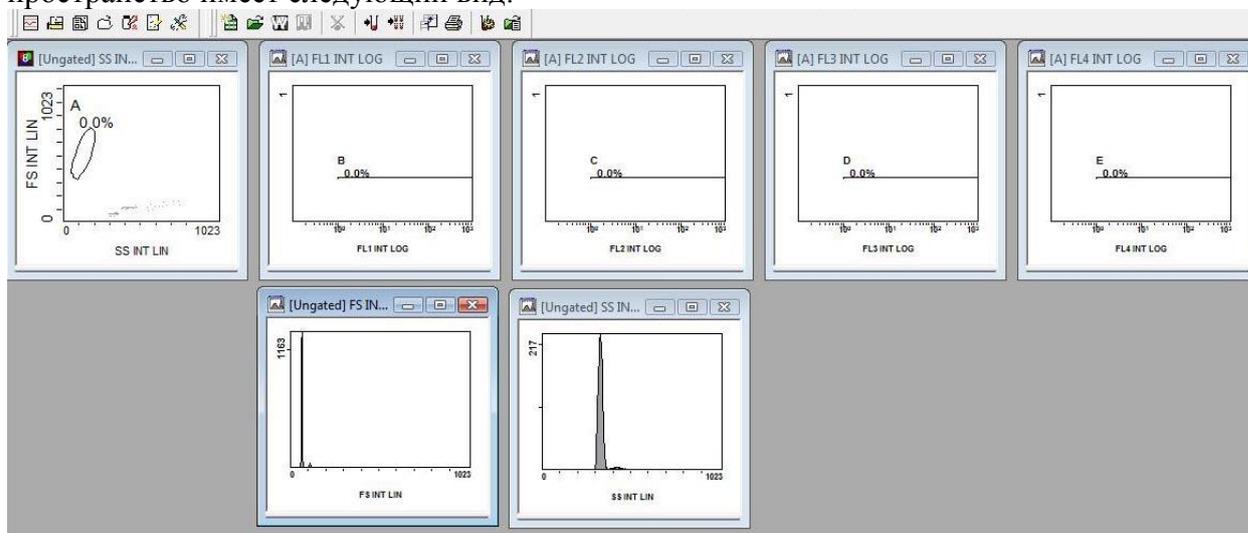
Как только прибор перешел к анализу пятой пробирке, в которой у Вас находятся частицы Flow-Set Pro, то Вам необходимо:

1. создать две однопараметрические гистограммы – по FS и SS, как это Вы делали при создании протокола (гистограммы не стоит гейтировать, сверху в них должно быть написано “Ungated”);

2. понизить дискриминатор (графа “Discr.” напротив “FS” в онке “Cytometer Control”) до 30 единиц по FS (флуоросферы Flow-Set Pro имеют очень небольшой размер);

3. не ставя галочки напротив “Setup Mode” в окне “Cytometer Control” проанализировать 10000 событий и нажать клавишу  “Stop”

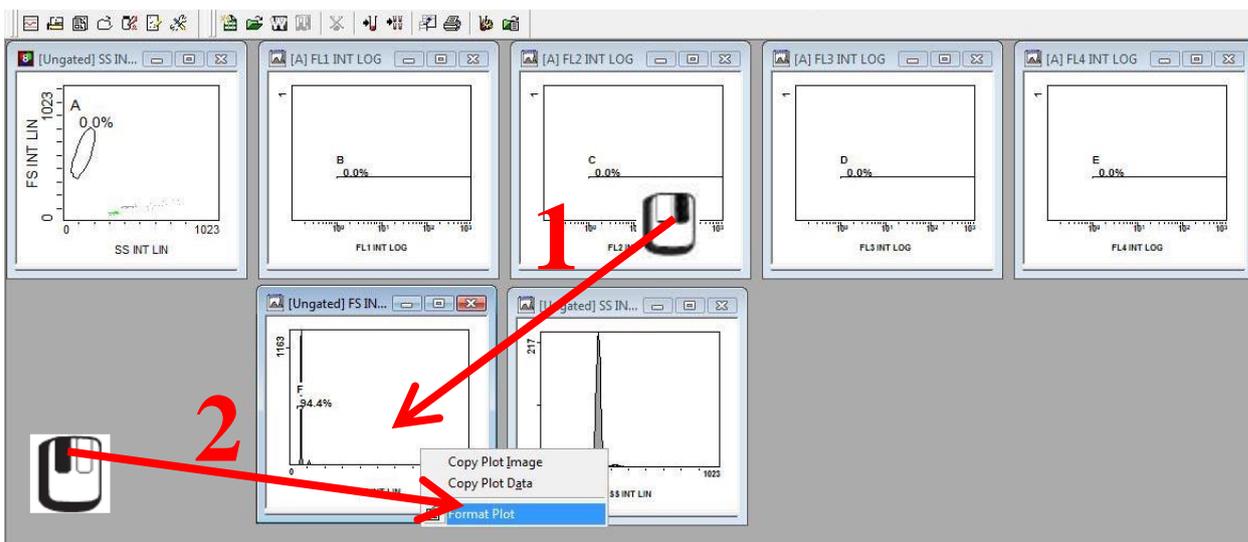
4. Если Вы правильно понизили дискриминатор, то в самом начале координат на однопараметрической гистограмме по FS Вы увидите очень узкий пик частиц почти в самом начале координат (на гистограммах по FL1, FL2, FL3 и FL4 Вы не увидите событий, так как на них отображаются события из области “A”, в которую из-за небольшого размера флуоросферы Flow-Set Pro не попадают!). Ваше рабочее пространство имеет следующий вид:



5. Теперь Вам необходимо создать новый линейный регион (в нашем случае регион “F”) на однопараметрической гистограмме по FS, как это Вы делали при создании регионов для настройки протокола по изотипическим контролям, и зайти в свойства этой гистограммы. При этом пик частиц необходимо охватить очень плотно, чтобы дуплеты (следующий маленький пик) не попадали в данную область. Чтобы уменьшить число дуплетов перед началом работы флакон с флуоросферами Flow-Set Pro необходимо тщательно перемешать!!!

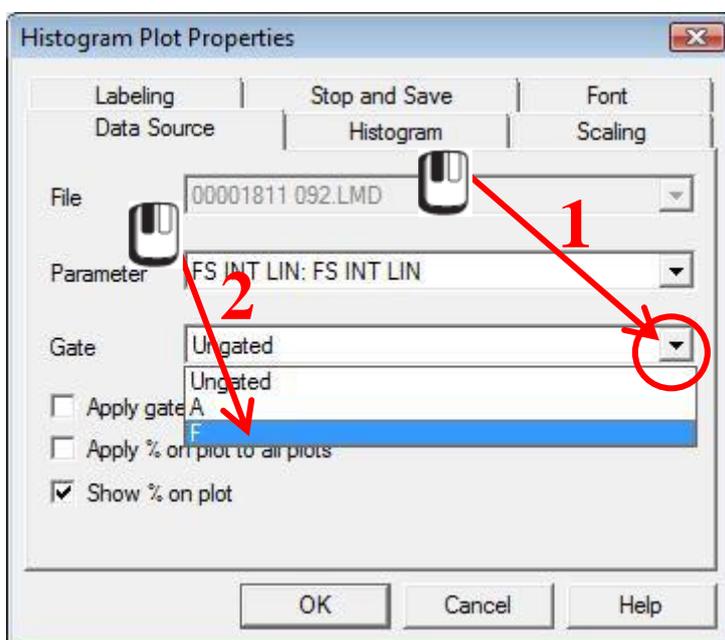
Для этого нажатием правой кнопки мыши  на гистограмме вызовите диалоговое окно

(действие 1), в котором нажатием левой кнопки мыши  выберите раздел “Format Plot” (действие 2).



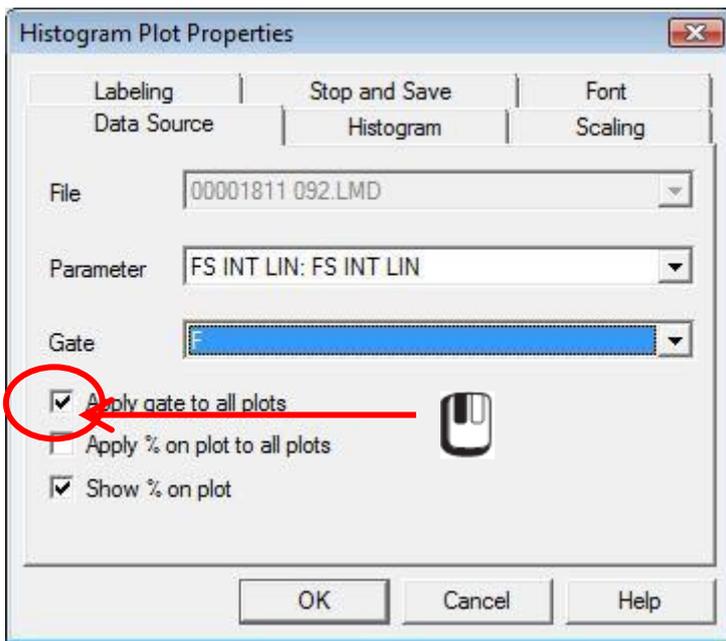
После выбора раздела **“Format Plot”** у Вас появится окно **“Histogram Plot Properties”**.

В графе **“Gate”**, нажав левой кнопкой мыши  по указанному на рисунке месту (действие 1), и выберите из списка доступных регионов регион **“F”** (или тот регион, в который у Вас попадает пик частиц Flow-Set Pro по гистограмме FS) и нажмите на его  названии левой клавишей мыши  (действие 2).



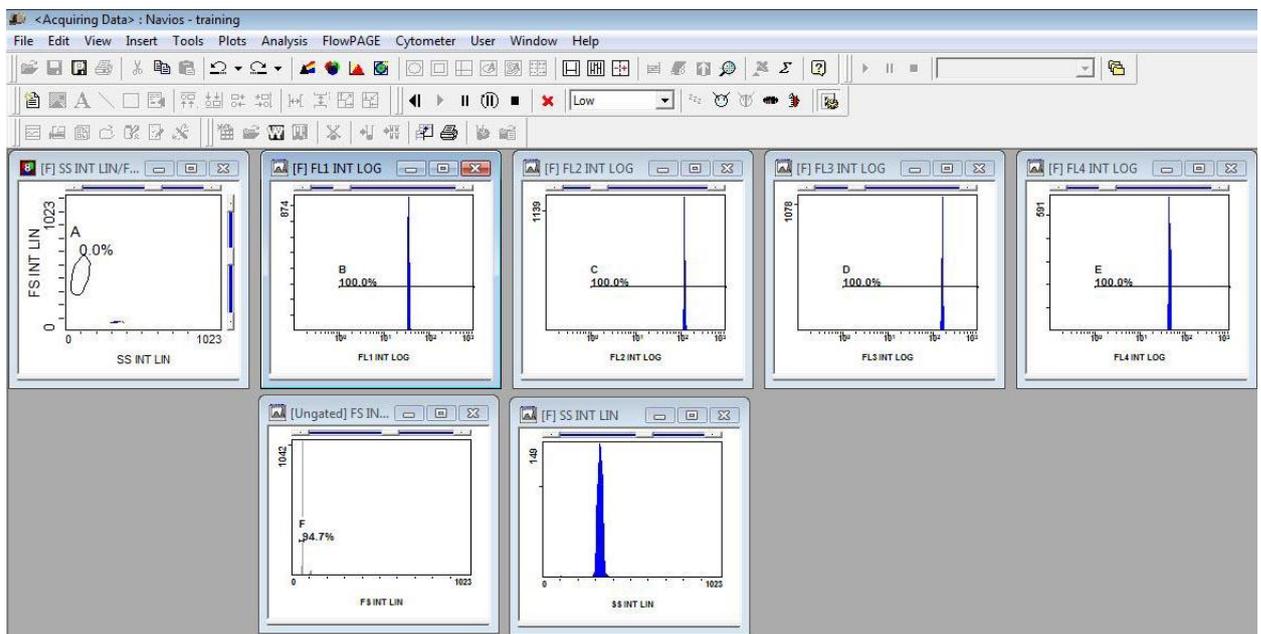
Тем самым, на данной гистограмме у Вас будут отображаться события, попадающие только в регион **“F”**, однако этот регион можно применить и ко всем остальным гистограммам, так как в данном случае Вас интересует только флуоресценция этих частиц и ничего более. Для этого Вам необходимо поставить галочку напротив графы **“Apply**

gate to all plots” нажатием левой клавиши мыши , как это показано на рисунке.



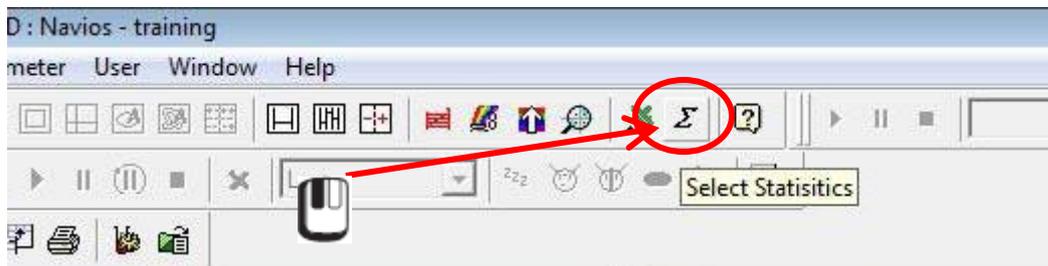
... и нажать клавишу .

После этого на всех гистограммах Вашего протокола будут отображать только значения, полученные для флуоресфер Flow-Set Pro (в данном случае – частицы выделены синим цветом на всех гистограммах).

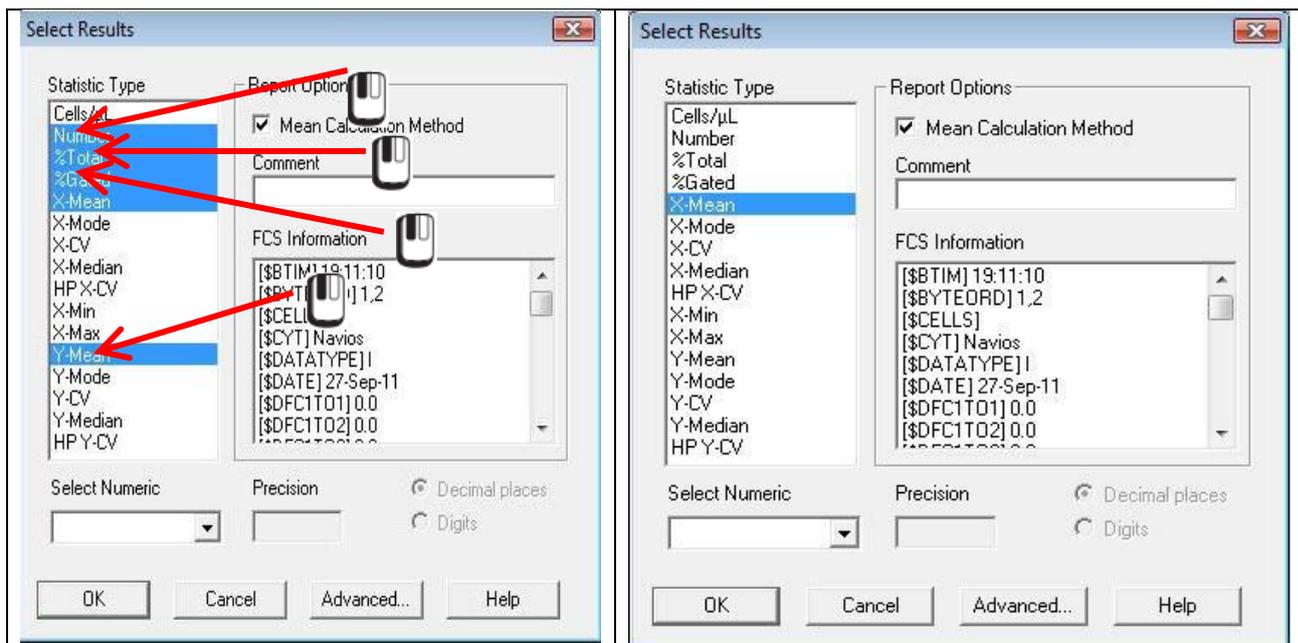


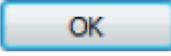
Величина, необходимая Вам для дальнейшей настройки протокола – это “X-mean” или средняя интенсивность флуоресценции. В данном случае Вам необходимо «перевести» язык изотипических контролей (их среднюю флуоресценцию – собственно, то ради чего Вы и настраивали изотипические контроли – чтобы знать фон или флуоресценцию негативных – неокрашенных специфическими антителами – клеток) на язык, понятный прибору, то есть на среднюю флуоресценцию флуоресфер Flow-Set Pro при ВАШИХ НАСТРОЙКАХ НАПРЯЖЕНИЯ!!! Эти величины необходимо записать для всех настроенных Вами каналов, то есть прямого (FS) и бокового (SS) светорассеяния, а также каналов флуоресценции - по FL1, FL2, FL3 и FL4. Как это сделать?

Для начала необходимо войти в окно статистики - кнопка  “**Select Result**” – и нажать на нее левой клавишей мыши .

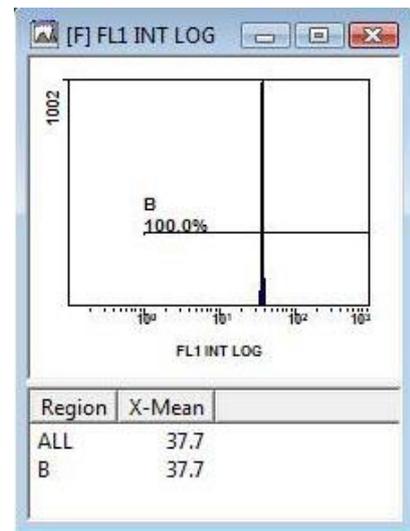
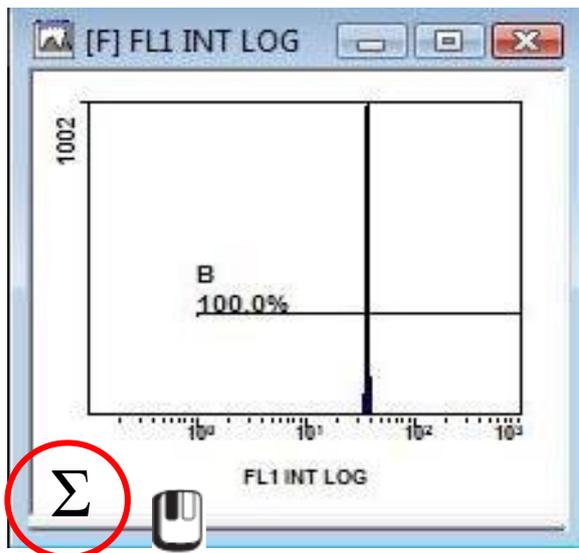


После этого у Вас появится окно, где в разделе “**Statistic Type**” синим отмечены статистические данные, которые прибор выдает «по умолчанию» для проанализированных событий. В данном случае Вас интересует только “**X-Mean**”, а все остальные графы можно инактивировать нажатием левой клавиши мыши , как это показано на рисунке.

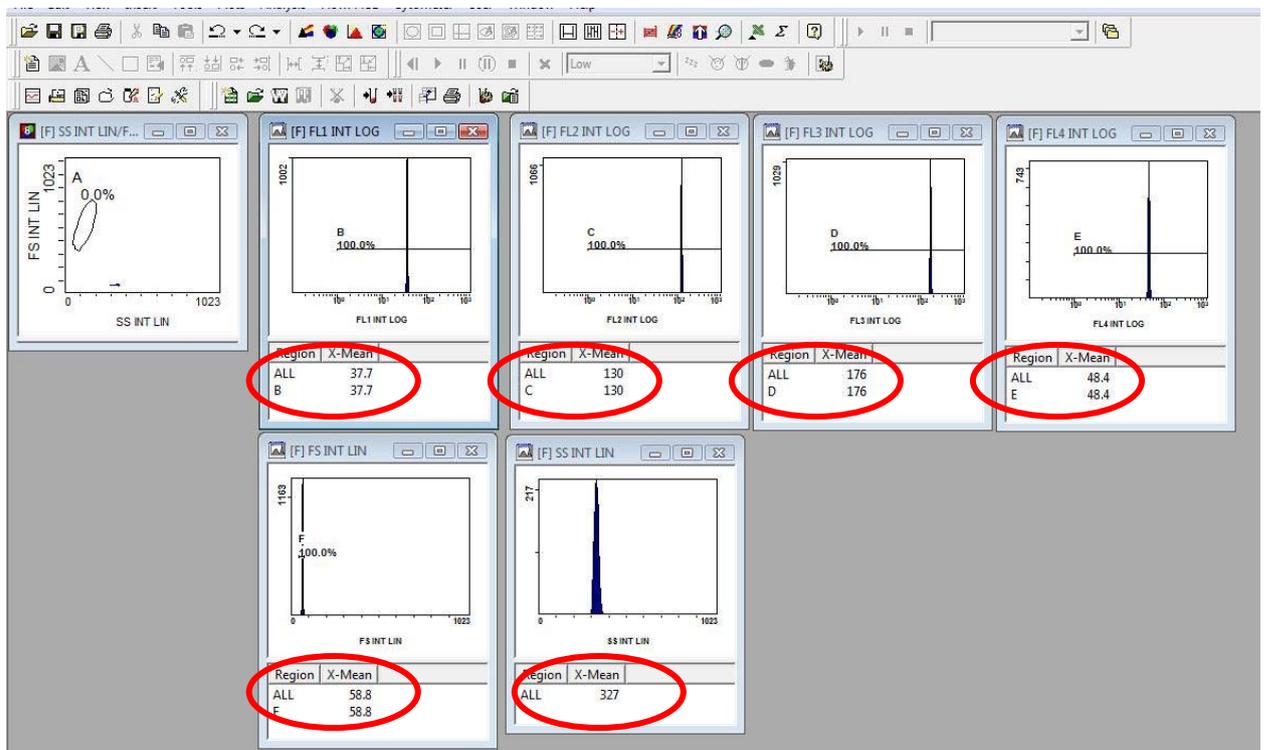


После этих манипуляций подсвеченной синим у Вас должна остаться только строчка “**X-Mean**”. По завершении – нажмите клавишу .

Теперь Вам необходимо записать значения **X-Mean** по FS, SS, FL1, FL2, FL3 и FL4 на листок бумаги. Для этого Вам необходимо открыть раздел статистики на всех однопараметрических гистограммах. Наведите курсор мыши на нижний левый угол для начала гистограммы FL1, курсор мыши приобретет у Вас вид Σ , и нажмите левую клавишу мыши , как это показано на рисунке. И у Вас под гистограммой появится окошко со статистикой.



Проделайте эту манипуляцию со всеми остальными однопараметрическими гистограммами, у Вас окно должно приобрести следующий вид:



Теперь запишите значения X-Mean на листок бумаги. В приведенном случае эти величины составили:

Параметр	Значение X-Mean
FS	58,8
SS	327
FL1	37,7
FL2	130
FL3	176
FL4	48,4

Эти значения Вам понадобятся при создании панели автонастройки компенсации прибора. Теперь можно перейти к созданию панели автонастройки.