


## Reglages et matrice compensation automatique 2 a 10 couleurs

---

*Il faut preparer un tube de cellules non marquees, les x monomarquees que l'on voudra realiser et un melange de monomarques pour verifier les compensations*

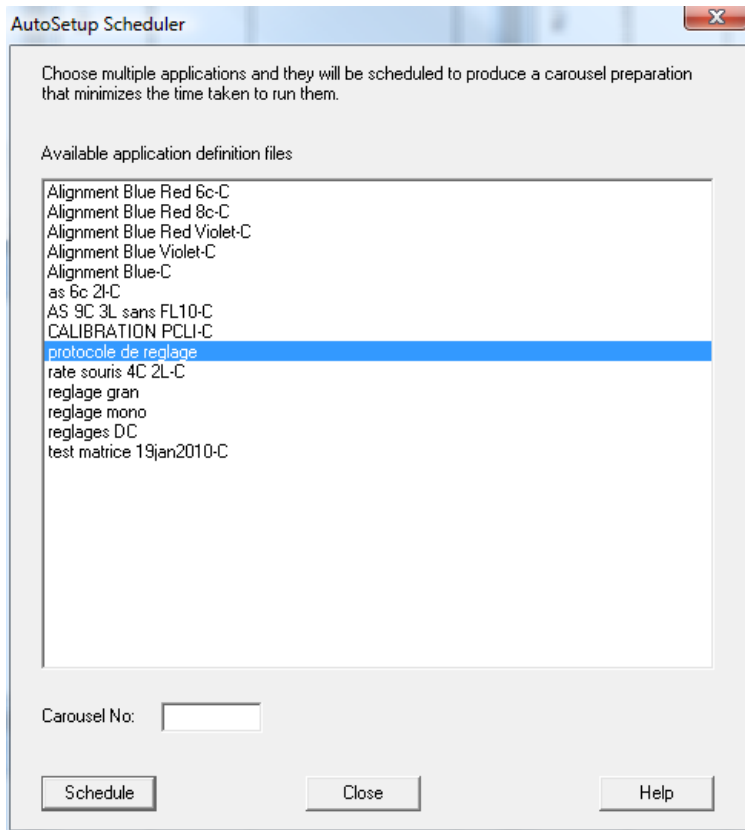
*Les tubes monomarques peuvent etre realises sur des cellules d'interet ou d'autres cellules exprimant les marqueurs d'interet afin de calculer la matrice.*

*Il est possible d'utiliser des billes de capture d'anticorps, si les molecules cibles ne sont pas suffisamment exprimees, ou si la frequence des cellules positives pour ce marqueur est trop faible.*

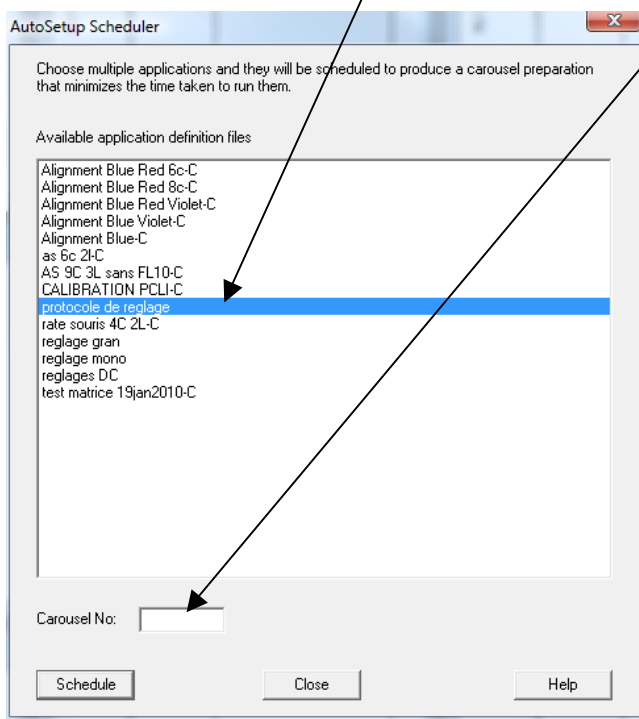
Lancer le process en cliquant sur  dans la barre d'outils de l'acquisition manager :



Une fenetre s'ouvre :

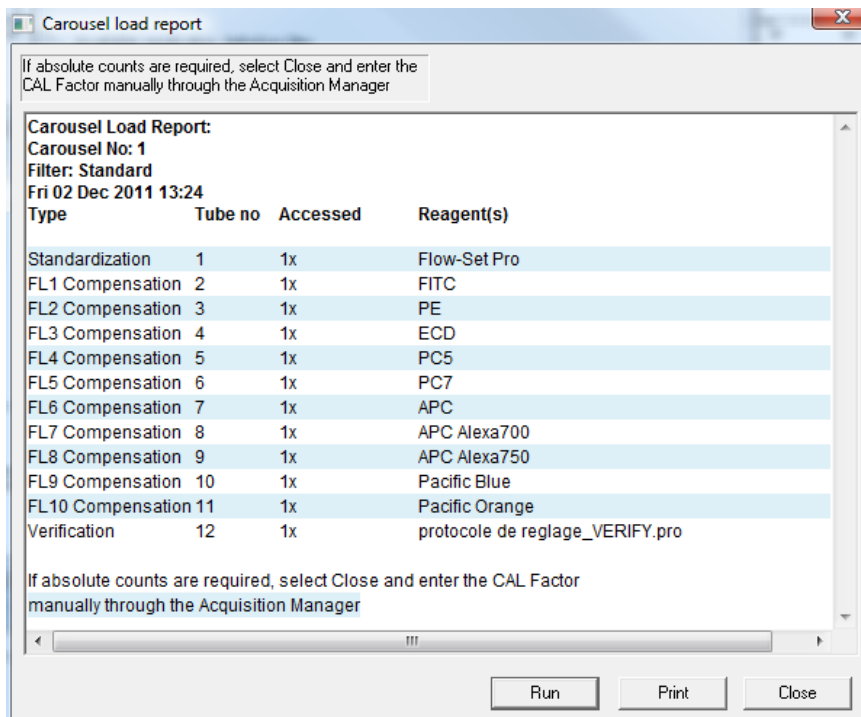


Cliquer sur protocole de réglage, puis inserer le numero de carrousel :



Puis cliquer sur Schedule

Un listing apparait :



Le cytometre vous demande des tubes avec des reactifs qui ne correspondent pas forcément aux vôtres. Ce n'est pas important pour le calcul de la matrice.

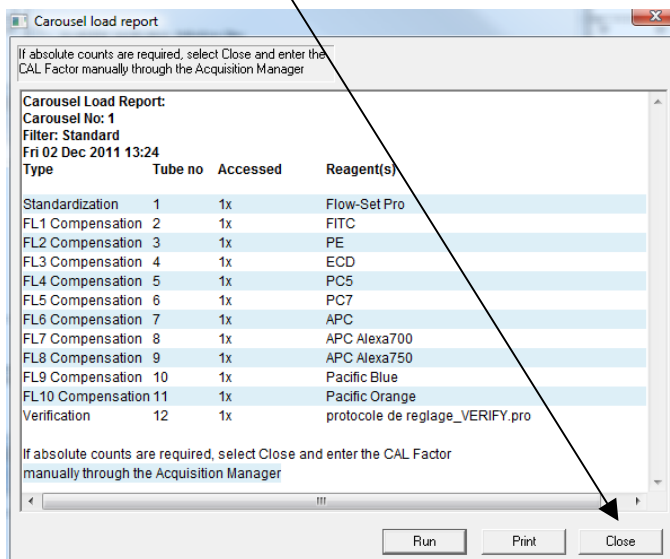
Placer votre tube de cellules non marquées en position 1, puis les monomarques dans l'ordre des FL1 a 10.

Si vous n'avez que 4 fluorescences, par exemple FITC, PC5.5, PC7 et Alexa Fluor 700, il faut les placer en position des FL1, FL4, FL5 et FL7.

Placer des tubes d'eau dans les autres positions pour lesquelles, le cytometre attend des tubes. Comme ça, le cytometre ne calculera pas de matrice pour ces canaux.

Enfin, placer le mélange des monomarques dans la position 12. Attention ne réaliser ce mélange qu'au moment de lancer les réglages.

Ensuite cliquez sur Close :



Puis rentrer les samples ID1 et ID2 dans l'acquisition manager :

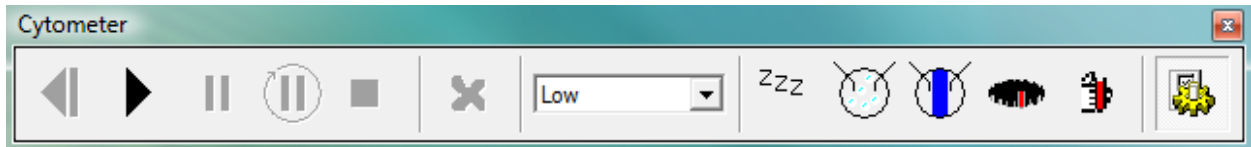
	Panel	Protocol	Region Source	Cytosettings	Tube ID	Carousel No.	Location	Sample ID 1	Sample ID 2
1		protocole de reglage_STAND.pro		protocole de reglage settings PRO		1	reglages 2 12		unlabeled
2		protocole de reglage_FL01.pro		VERIFYING_protocole de reglage		1	reglages 2 12	FITC	
3		protocole de reglage_FL02.pro		VERIFYING_protocole de reglage		1	reglages 2 12	Eau	
4		protocole de reglage_FL03.pro		VERIFYING_protocole de reglage		1	reglages 2 12	Eau	
5		protocole de reglage_FL04.pro		VERIFYING_protocole de reglage		1	reglages 2 12	PC5.5	
6		protocole de reglage_FL05.pro		VERIFYING_protocole de reglage		1	reglages 2 12	PC7	
7		protocole de reglage_FL06.pro		VERIFYING_protocole de reglage		1	reglages 2 12	Eau	
8		protocole de reglage_FL07.pro		VERIFYING_protocole de reglage		1	reglages 2 12	Alexa Fluor 700	
9		protocole de reglage_FL08.pro		VERIFYING_protocole de reglage		1	reglages 2 12	eau	
10		protocole de reglage_FL09.pro		VERIFYING_protocole de reglage		1	reglages 2 12	eau	
11		protocole de reglage_FL10.pro		VERIFYING_protocole de reglage		1	reglages 2 12	eau	
12		protocole de reglage_VERIFY.pro		VERIFYING_protocole de reglage		1	reglages 2 12	mix	

Le sample ID1 est comment a tous les tubes.

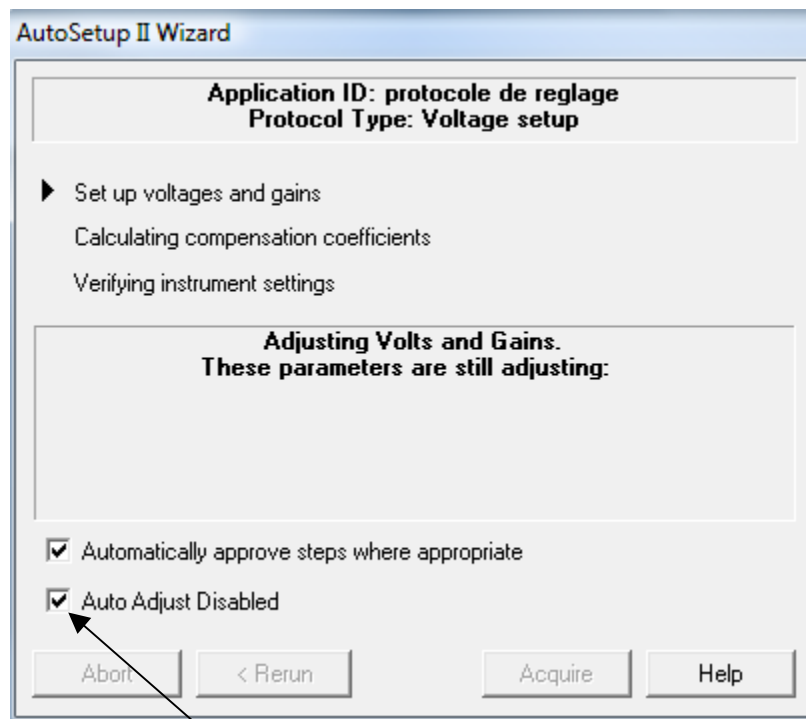
Ensuite lancer l'acquisition en cliquant sur



Dans la barre d'outils du cytomètre :

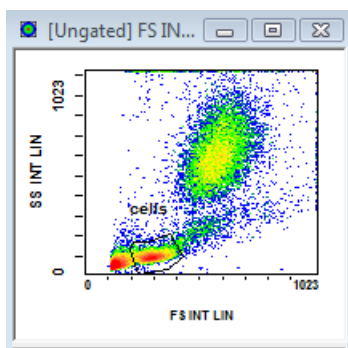


Le premier protocole s'affiche et une boîte s'ouvre :

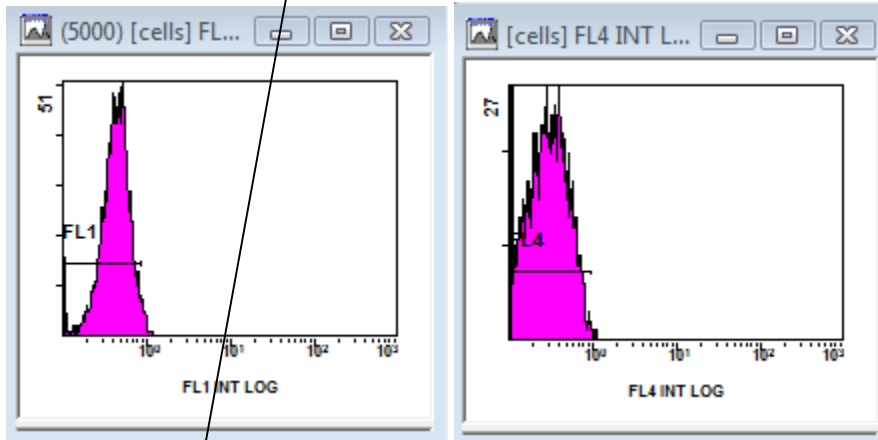


Cocher Auto Adjust Disabled, pour pouvoir régler manuellement les Gains et voltages

Régler les Gains de FS et SS pour voir votre échantillon sur le FS vs SS :



Ensuite a l'aide des Quickset, regler vos voltages pour mettre les negatives dans la premiere decade



Ne regler que les FL qui vous interessent

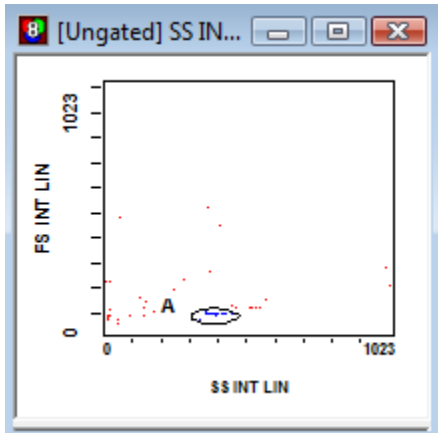
S'il y a trop de debris, remonter le discriminator

	Label	Discr.	Volts	Gain
FS	FS	45	891	2.0
SS	SS	OFF	1000	5.0
FL1	FITC	OFF	481	1.0
FL2	PE	OFF	340	1.0
FL3	ECD	OFF	250	1.0
FL4	PerCPCy5.5	OFF	635	1.0
FL5	PC7	OFF	712	1.0
FL6	APC	OFF	250	1.0
FL7	A700	OFF	628	1.0
FL8	APC-H7	OFF	558	1.0
FL9	PB	OFF	404	1.0
FL10	PO	OFF	378	1.0

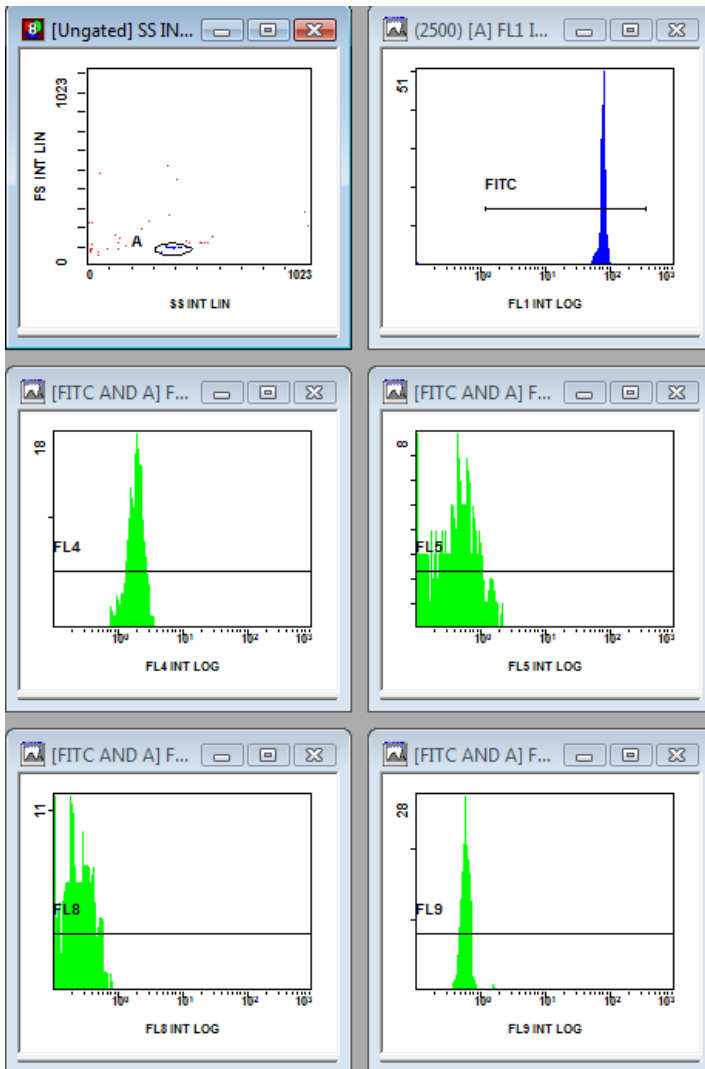
Une fois regle, decocher le setup mode puis faite acquire

Le cytometre acquiert 5000 cellules puis passe au second tube,

Dans le second tube, placer la fenetre A sur les billes de captures ou sur les cellules monomarquees :




et verifier que le monomarque attendu est bien le plus fort dans le bon canal de detection : FITC dans FL1



Et que la region FITC entoure bien le signal,

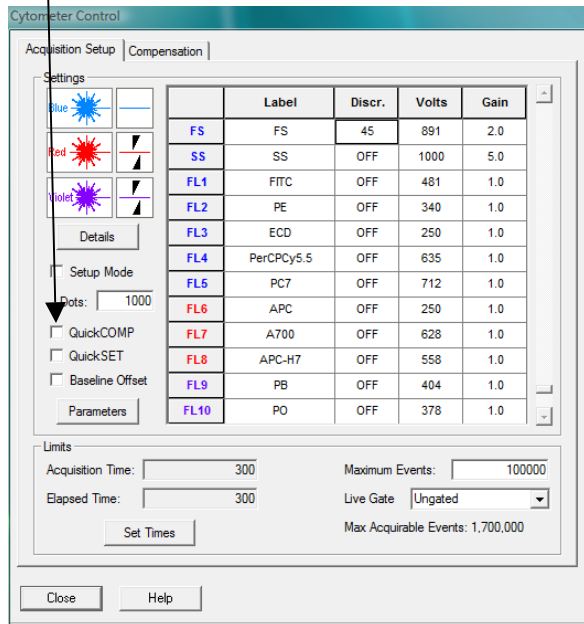
Il acquiert 2500 billes et passe au suivant :



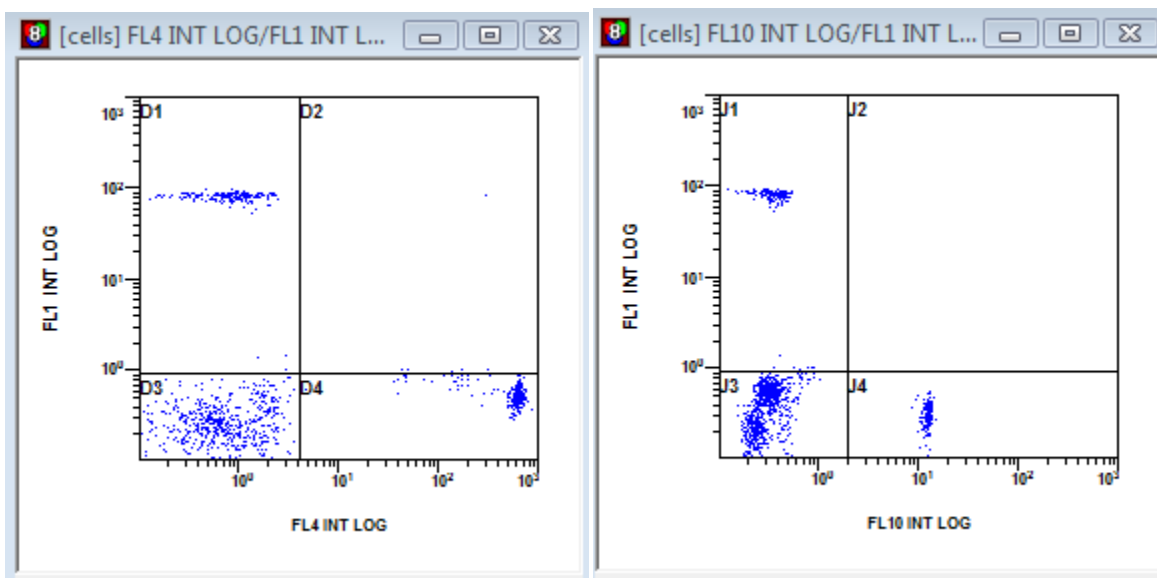
Si le cytomètre arrive sur un tube d'eau, stopper directement l'acquisition en cliquant sur , il passe au suivant

Faites pareil dans les autres tubes monomarkés et dans les tubes d'eau

Au tube final, vous allez pouvoir apprécier son travail, et éventuellement corriger à l'aide des Quickcomp :

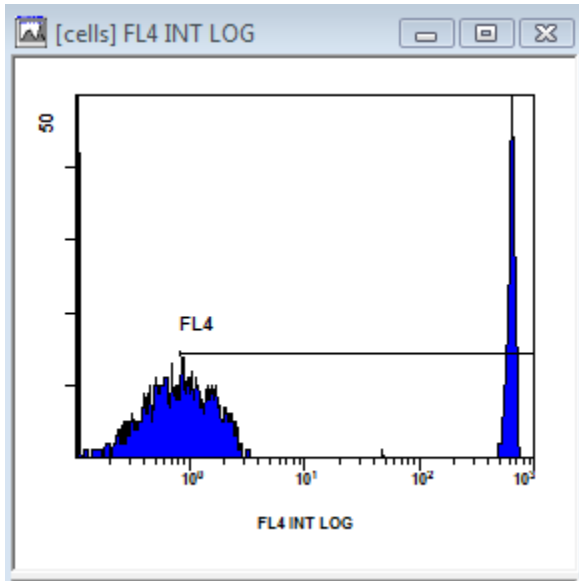


Vérifier que la fenêtre Cells est bien sur les billes ou cellules, puis vérifier l'ajustement des nuages :





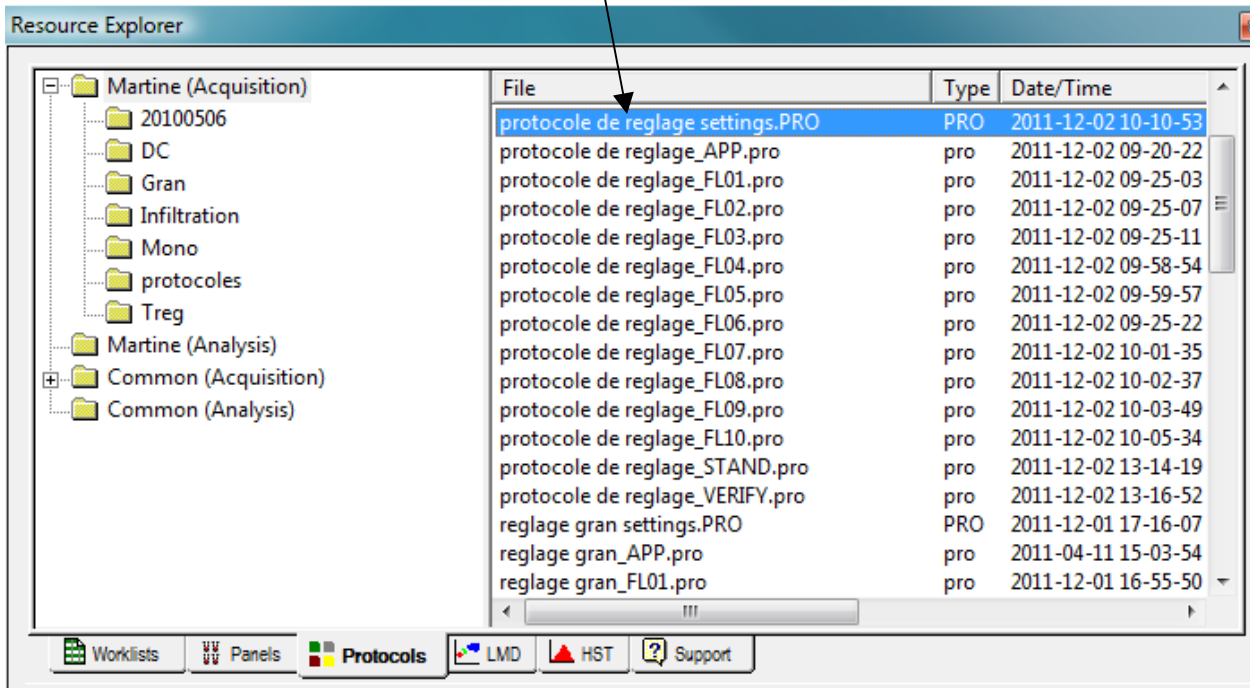
Un coup d'œil rapide sur les monoparametriques vous renseigne rapidement s'il y a des problemes :



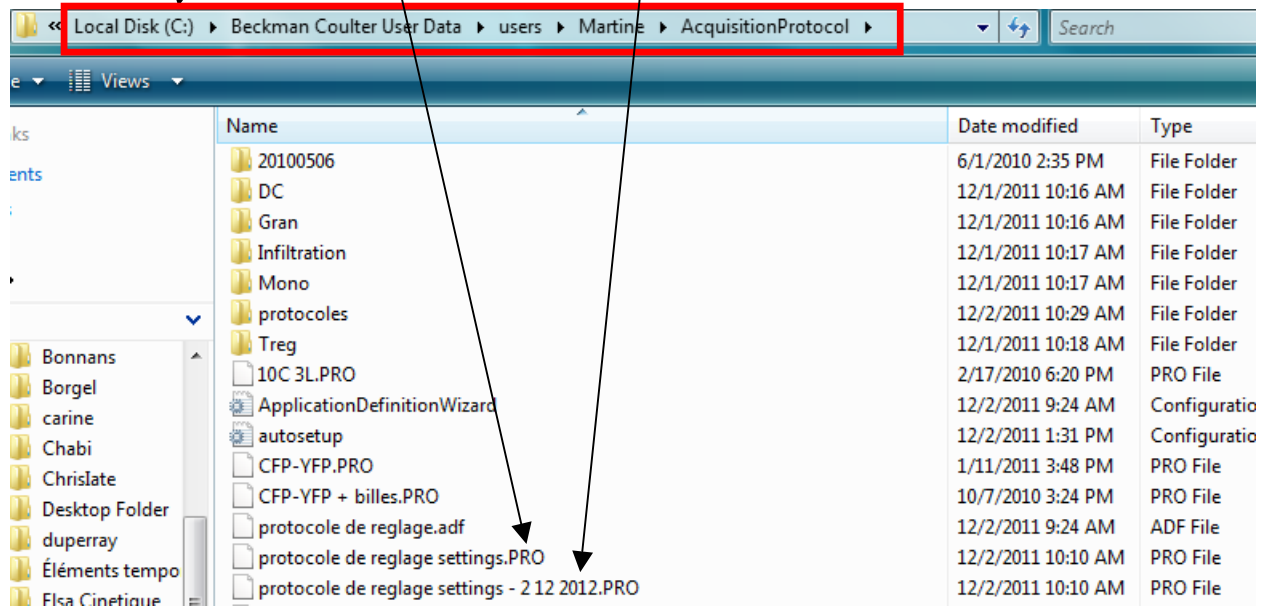
s'il n'y a pas de pics entre les 2 extremes (pic neg et plus), c'est que cela s'est bien deroule

Une fois satisfait, laisser acquerir le tube, puis cliquer sur Finish, et approve

Les settings generes sont enregistres dans le protocole :



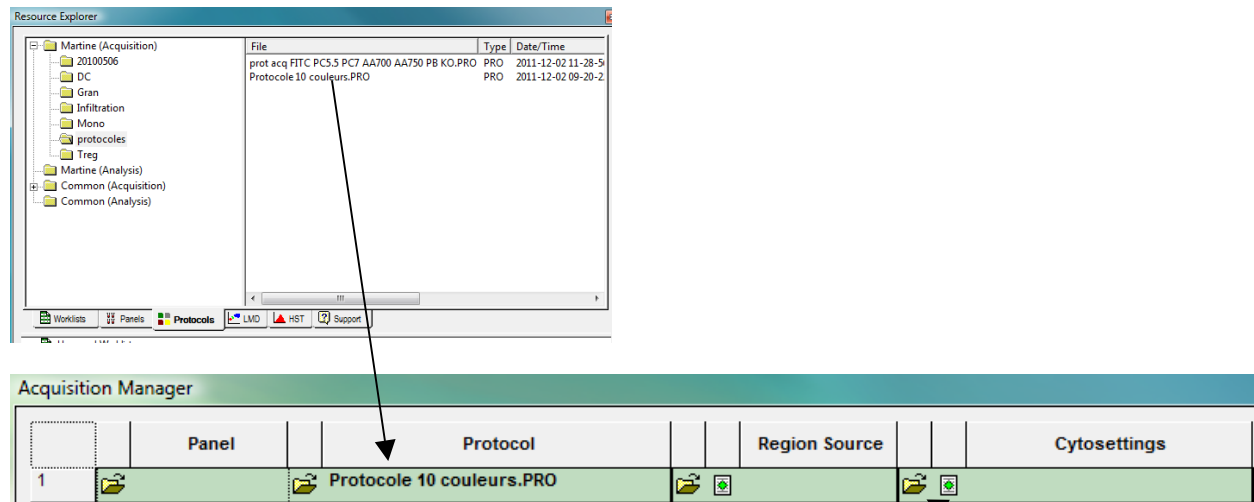
Aller sur le disque dur pour dupliquer et renommer ce protocole, afin de le différencier du protocole par défaut :



Ce protocole pourra être utilisé lors du passage des tubes

Il apportera les settings et la matrice

Pour les utiliser, glisser le protocole d'acquisition dans l'acquisition manager :



Importer les settings dans la colonne cytosettings, en cliquant sur le petit fichier jaune

Chercher dans le disque dur le protocole nouvellement renommé

Acquisition Manager									
		Panel		Protocol		Region Source			Cytosettings
1				Protocole 10 couleurs.PRO					protocole de réglage settings - 2 12 2012.PRO

Le protocole de réglages apparaît dans la colonne cytosettings



Si vous souhaitez ajouter des tubes cliquer sur

Dans la barre d'outils de l'acquisition manager :



Acquisition Manager									
		Panel		Protocol		Region Source			Cytosettings
1				Protocole 10 couleurs.PRO					protocole de réglage settings - 2 12 2012.PRO
2				Protocole 10 couleurs.PRO					
3				Protocole 10 couleurs.PRO					
4				Protocole 10 couleurs.PRO					
5				Protocole 10 couleurs.PRO					

Ils apparaissent, et les réglages seront transférés

Après avoir renseigné les sample ID1 et ID2,

Acquisition Manager													
		Panel		Protocol		Region Source		Cytosettings	Tube ID	Carousel No.	Location	Sample ID 1	Sample ID 2
1				Protocole 10 couleurs.PRO				protocole de réglage settings - 2 12 2012.PRO					
2				Protocole 10 couleurs.PRO									
3				Protocole 10 couleurs.PRO									
4				Protocole 10 couleurs.PRO									
5				Protocole 10 couleurs.PRO									

Lancer l'acquisition de votre ou vos tubes