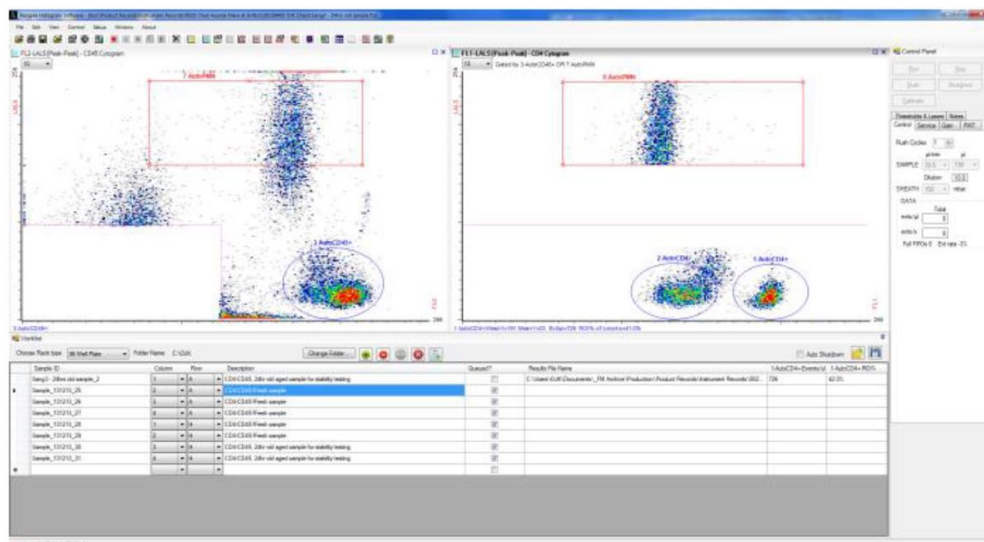


## Apogee protokoll– Vezikulák mérésére (Tünde)



### Ellenőrizzük a folyadékokat:

Az asztal alatt a **waste kanna** üres legyen. Ha nem az, letekerjük a fekete kupakot és kiöntjük a 604-ben. (Ha nem vagyunk biztosak benne, hogy előttünk veszélyes anyaggal dolgoztak-e, akkor vagy megkérjük az előző használót, hogy öntse ki, vagy a veszélyes folyadék gyűjtőbe öntjük.)

A **sheat tank** a két kék doboz a gép tetején, lehet olyat, hogy a bal oldali póttank ki van húzva és csak a jobb oldaliban van folyadék. Ha hosszabb mérésre készülünk, érdemes a két tartályt csatlakoztatni, és több folyadékot tölteni bele.

A **tisztítófolyadék** tank a sheat tank elejében van **Pro cell cleaning fluid (2x, de inkább 3x hígított MQ-val, a dobozon feltüntetett mértékű hígítással).**

**Sheat fluid: 2,5 liter MQ + 100ul ProClin300** ( ezek alul vannak a hűtőben a gyönggyel együtt)

Feltölteni ezt a kettőt a tank tetején levő kör alakú lyukon lehet. A kicsi a cleaning.

Ha azt látjuk, hogy valami baci, gomba nőtt a tankban, kicsatoljuk, elmoszuk mosogatószerrel, MQ-val. Ha a sheat fluidos tartályt detergenssel mossuk, akkor nagyon(!!!) alaposan ki kell öblíteni.

### Indítás:

Gép elején fekete gombbal bekapcsoljuk, várunk 5-10 percet, addig kattog..... majd beírjuk a jelszót:

3 féle felhasználó van: admin (szerelő)

resercher Un1v3R5iTY

student 5eMm31wei5 ----- ez jó, ha van beállított protokoll, mert nem lehet benne véletlenül se törölni dolgokat

a Hisztogramot elindítjuk. Hosszú idő 10 perc akár, mire feláll a rendszer. Vigyázzunk, nehogy 2x nyissuk meg, de azért dupla kattintással indul. Ha véletlen 2x nyitottuk meg vagy kikapcsoltuk, akkor a Feladatkezelő-ben le kell állítani, és csak utána nyitható újra (vagy onnan kell kinyitni).

Ha netet vagy mobilt keres a gép, cancel-lel kinyomjuk.

A monitor jobb oldalán megjelenik egy narancssárga csík, ez zöldre vált, ha kész a gép az inicializálással.

Ha nem akar elindulni, akkor *Load new sheat*. Ha nincs elég folyadék valamelyik tankban, akkor is hibaüzenet, azaz nem vált zöldre a csík, akkor is ezt kell megpróbálni. (Ezt nem mindig engedi a gép, ilyenkor V. Kriszti tud segíteni. Már dolgozunk a szervizzel a probléma megoldásán. Biztos, ami biztos, ne hagyjuk akár a sheat fluid akár a cleaning fluid a bejelölt szint alá csökkenjen.)

Esetleg *Remove air in Syringe*.

*A Flow cell clean az, mikor cleaninggel kimossa az egészet (mint kikapcsoláskor), ezt kell használni, ha jön utánad még valaki,*

*ha nagyon koszos, akkor a soak- ez még áztatja is, ez kb. 15 perc, utána még a flow cell clean **automatikusan elindítja-is kell!***

*Használat után, ha más nem jön, akkor (egy 5-5 perces hypo és MQ minta futtatása után) Clean flow system Shutdown-ban van mosás-lesz.*

Jobboldalon felül sorban van a Run, Flush, Shutdown.

Ez volt a Service tab.

?? Használat: legyen a Setup-ban kipipálva mindenképp az autoshtutdown! Ha nincs, akkor a számítógépet külön ki kell kapcsolni, ami később hibaüzenethez vezethet.

Control tab-on belül a mosás (cycle) 2-n legyen, így kb. 5 perc egy mérés. Alatta 1.50ul/perc mellette 150ul. A 1.5-et ha vizet v. puffert futtatunk, fel lehet nyomni 9-re, de mindig állítsuk vissza a 1.5-re. Ezek a beállítások persze mérésenként változhatnak, de úgy tapasztaltuk, hogy EV mérésnél ezek működnek a legjobban.

Ez a gép nem folyamatosan szívja fel a mintát, 150ul-et szív fel ilyenkor egyszerre és amit nem használ fel, azt kidobja, 130-ból 60-at! 130ul alá ne állítsuk.

Emiatt is kell a mintát higítani 10x és 100x PBS-ben vagy az épp használt pufferben és a leghígabbal kezdeni a mérést. A túl tömény amúgy is adhat fals eredményt, mert az eventeket nem jól számolja! Érdemes hígítási sort készíteni, és a leghígabbal kezdeni. Főleg „ragadós” mintáknál sok mosástól kimélhetjük így meg magunkat.

Alatta (dilution) megadhatom, hogy hányszorosra hígított a minta, visszaszámolja belőle így a hígítatlannak a koncentrációját helyettem.

A 638-as lézer indításkor ki van kapcsolva, ha azt akarom használni, akkor be kell kapcsolnom és ki a végén. Ha már az előre megadott protokollban szerepel ez a lézer, akkor bekapcsolja automatikusan.

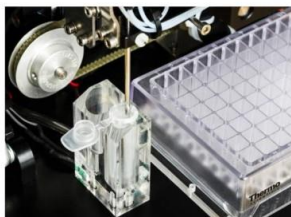
SALS, MALS, LALS short, med, long angle light scatter, mind3-at megnézzük és amelyiken jobban látszik, amit szeretnénk, azt választjuk. A MALS az általánosan használt.

Fent balra tudunk új hisztogrammot létrehozni.

A kék ajtó felfele nyílik.

A bal oldali a mosó, a jobb a mintatartó lyuk:

A mintát – pontosabban először deszt.vizet v. puffert - berakom eppendorf csőben, a kupakja nyitva, felém áll.



File > Load settings > 170-es vagy ha van újabb kalibráció (van), akkor azt hívom be vagy egy korábbi templómat.

### Kalibrálás:

Gyöngyre van kalibrálva: Apogee mix 170mW, ezt legalább 2 havonta ismételni kell.

Minimum 2x-re hígítjuk deszt.vízzel: 500 +500 ul (ez többszöri használatra elég, azért csinálunk ennyit.

Ha a gyöngy kontrollt újra kellett állítgatni, akkor :

Save datafile as és a Protocols-ba mentjük, mint új kalibráció. > ezt fogom köv. alkalommal betölteni, nem a 170-est... [Ha épp nincs protocols mappa, akkor a saját mappánkba.](#)  
Az alap első hisztogram x: MALS, y: 488 green a gyöngyhez. Ezen a gate-eken belül kell látszódnia a populációknak.

Ha elkezdünk mérni (vízzel), akkor alul a név sorában megadhatunk neki protokollt, ha újat csinálunk, akkor itt no protokoll (üres az oszlop lent), fent fájlból mentünk egyet a protokollok közé és utána alul már azt ki tudom választani és alkalmazni.

Balra lent adunk a mintának -nevet. Kipipáljuk a Queue-t mellette ([ezt automatikusan megcsinálja magának a gép.](#)). Automatikusan menti a kísérletet, gyárilag beállítva a főkönyvtárba adott dátummal, nem kell a gépre külön elmenteni, csak a végén egy pendrive-on magamnak, mert ha ezért kell bekapcsolni a gépet, az plussz fél óra.... Kriszti csak innen backup-ol!

(File > Load settings > legutóbbi kontroll mérés

Megnyomjuk a Run-t. Előbb világoskék, majd sötétkék lesz a csík.

Ha tiszta a citométer, akkor 200 alatti event kell legyen/sec 3ul/min-nél.) Ha nem, akkor elvileg addig futtatunk MQ-t v. 0.2um szűrt puffert, míg tiszta nem lesz.

**[Kalibrálásor](#) Víz – gyöngy – víz – minta 150 ul minimum, de inkább 300 ul, ez csak 1-2 havonta kell,**

egyébként víz, puffer, **kontrollok**, minták sorban (kontrollok: 3 hígítás, izotipus, FMO, festett puffer, festetlen minta, lízis...) és [mindezt 3x, mert statisztika...](#))

Ha túl sok az event, akkor tele lesz a puffere(memóriája) és akkor leáll a mérés és eldobja a mintát a waste-be, ezért a hígítás mellett a **threshold-ra is figyeljünk**. Side scatter AND vagy OR Fluoreszc. , utóbbit használjuk általában.

Ha több zajt akarunk kiszűrni, akkor a MALS értékét növelhetjük nagy vezikuláknál. [A memoria puffert tudjuk növelni valameddig. Beállításoknál valahol.](#)

A Gain-t felesleges állítgatni, mert teljes spektrumot mér, utólag is manipulálhatom majd. [Nem ugyanaz, mint a Cytoflexnél!](#)

*Ha plate-et mérek, akkor setup> autocyte és alul is átrakni plate üzemmódba. Ami annyi, elvileg, hogy a minták neve mellett beírom, hogy mondjuk A1, A2,... Ezeket megadhatom egymás alatt mind, kipipálva, autocyte-vel és akkor ha Run-nal elindítom, akkor végigméri az összeset. Itt nem nyomok előtte auto shutdown-t, mert utána még muszáj mosni! [Ha plate mérés közben beteszünk egy eppendorfort, akkor leáll a plate mérés, és az eppendorfort fojja lemérni. Mérés közben a a pléteket ne birizgáljuk, mert az érzékelő le fojja állítani a mérést, attól függetlenül, hogy éppen eppendorfort vagy plate-t mértünk.](#)*

Szóval... kezdjük a MQ-val... a 2. diagram, ami oszlopokat rajzol egymás mellé először magasabb értékeket mutat, aztán beáll egyformákra, ekkor újraindítjuk a mérést a fenti sorban az X-szel, ami a refresh.

Ha megfelel, jobbra fent STOP. Ez után állítjuk be az autocyte-t.

A fenti menüsorból Setup> autocyte ON kipipáljuk, beállítjuk, hogy csak 1 percig menjen. Az elég szokott lenni.

### **Végén tisztítás, közben lehet és KELL menteni a mérést pendrive-ra,**

**5 perc bleach és 5 perc MQ**, működik autocyte-lel is, ha 300 sec-re állítom...

kikapcsolom a 635-ös lézert, [Ez akkor fontos, ha utána még sokáig bekapcsolva marad a gép. Ha protokollt váltunk vagy kikapcsoljuk a gépet, akkor kikapcsol a lézer is.](#)

**[VK1] megjegyzést írt:** Ha van elég hígítás nem kell háromszor lemérni. Az nem segít a statisztikán. Azaz segít, de nem túl szabályos....

szóval: min. 200 ul 10% bleach (? 50ul/min gépkönyv szerint), aztán min. 300 ul deszt. víz (? 5ul/min gépkönyv), de inkább tele eppendorf.

(???? megnézni, hogy az auto shutdown ki van-e pipálva, csak ezután merjünk

**shutdown gomb** (a szoftverben fent jobbra! ), **tilos a gépet magát kinyomni a fekete gombbal!**

ez még min. 5 perc, közben kitöltjük a papírt, aztán kiöntjük a waste-et és kész vagyunk.

(Azért kell menteni, mert csak ezért bekapcsolni és kikapcsolni fél óra, ami nem ugorható!)

**Kompenzálás:** Control > Substraction vagy PMT tab-ban alul: Apply settings on Replay pipa, minden hisztogrammon jobb klikk és subtr. > megnyitja a komp. ablakot, minden negatívnak tartott értéket 1000 alá állítunk.

Vigyázat: ha nyitok új FCS fájlt, onnan veszi majd az új értékeket! Tehát ha azt akarom, hogy a jelenlegi beállításokat lássam egy újonnan megnyitott adatsorban, akkor azokat Load data only-val kell megnyitnom!

Az adatok automatikusan újraíródnak, ha változtatok a subst. értéken. Legyen kipipálva a Gain tab-ban az Apply settings on replay!

## Gépkönyvből kiírva a továbbiak:

Control panel:

ha az öblítés több, mint 4-re van állítva, a Rinse operation is elindul

130ul-ból csak 70-et mér le

Evt rate: -20 és +10% közt jó, az aktuárisevent rate és az első 30 sec eltérése

Full FIFO: hogy ne veszítsünk event-et, állítsunk be threshold-ot!

### Control panel > Service

Amit fentebb leírtam már, mosások, amik akár a hibát is megoldhatják.

### Control panel > PMT

Fényes mintánál 200V elég lehet, gyengénél akár 600V is kell, de ha a noise/zaj felmegy 0.5 fölé, akkor állítsuk lejjebb és inkább a gain-t növeljük a scatternél.

Fluor. mintánál ált. 350-750V kell.

Ha a PMT zaj 1 fölé megy mikor 1 um-es dolgot nézünk gain 1 mellett, akkor Flow cell soak kell, mert koszos a rendszer. Tartsuk a PMT voltage-ot 1 alatt, hogy a PMT noise 1 alatt legyen.

Itt van alul a kompenzáció: Edit substr. v.

### Control panel > Gain

A log skálához a fenti View menüből kell kiválasztani a Log gain opciót, ekkor ha az első 1-2 dekádban nincs mérhető jel, lejjebb lehet vinni a PMT voltage-t. (vagy elrejtjed azt a területet alul a Hide-dal)

Utólag is be lehet állítani, ekkor betöltöd az adatokat, **Apply settings on replay** (alul kipipál), beállítgatjuk és nyomunk egy Replay-t a Toolbar-on v. Control menüben) Ekkor az adatsor nem változik meg. Ennél a nyers adatok vannak elmentve csak. Külön Save-et kell nyomni, ha menteni akarjuk a beállítást.

**Save data with gain and substr.** elvileg már ezzel felülírva menti el a mérést.

Ha nem akarjuk módosítani az értékeket, akkor ne legyen kipipálva az A.s. on replay, viszont legyen az A. s. to stored data!

## Control panel > Thresholds and lasers

Vagy a piros szaggatott vonalat húzom a hisztogrammon vagy beírom az adatokat a négyzetekbe.

Itt tudom bekapcsolni a 635-ös lézert, ha kell és használat-után ki.

AND és OR : egy vagy minden küszöbérték feletti kell legyen a jelem. Ha nem akarom látni a törmeléket a bal alsó sarokban az első 488/MALS-on, akkor AND.

AND-nél a nagy zaj bezavarhat. *Ajánlás: scatter 500 felett, fluo 200 felett!*

Be lehet állítani felső küszöböt is a 65535 helyett. Ez mindig AND.

## File menü

**Load settings:** a gyakran használt templát fájlokat érdemes a **C>Program files>Protocols**-ba menteni, ezek megjelennek a load-nál (az újonnan készített csak restart után). ( vagy sample data egyes gépeknél)

A korábbi fájlt megnyithatjuk **Open datafile**-lal vagy ha nem akarjuk, h véletlenül megváltoztassuk a jelenlegi beállításokat, akkor **Load Data only**-val. Ekkor behozza azokat az adatokat, de a jelenlegi küszöb, erősítés, egyéb paraméterek megtartásával. (új adatokkal felülírhatjuk)

**Apply protocol:** ez a jelenlegi adatokat tartja meg és a beállításokat hívjuk be hozzá egy mentett fájlból. (Módosíthatjuk, ha akarjuk.)

**Saving a data file:** menthetem az adatokat vagy a mentés ikonra kattintok

**Close :** bezár

**Summary info:** adhatok nevet a kísérlethez és leírást vagy ikont is használhatok.

**Page setup:** mit lássunk ha kinyomtatjuk

**current file excel export:** ...

**Batch Excel export:** Add- del kiválasztok több data fájlt, egyből ROI-t, ami az összesre fog vonatkozni, aztán export.

## Edit menü

**Clear datagram:** törli az adatokat az aktív (egy) hisztogramból, replay-el visszaállítható.

**Clear buffer\_t** ne nyomjuk meg, mert nem visszaállítható az adat!

**Refresh szintén mindent töröl az addigi adatokból. ez az X ikon amúgy. A memóriapufferből is. Ezt akkor használhatjuk, ha még a beállításoknál tartunk és az addigi adat nem kell.**

**Az auto refresh-ben be tudjuk állítani, hogy mennyi event-ről vegyen adatot, aztán álljon meg. Ekkor ha megfelel, megtartjuk, ha nem, akkor kitöröljük az addigi mérést és újramérjük.**

**Datagram:** ugyanaz, mintha duplán kattintanék a hisztogramon vagy jobb klikk, edit datagram

Itt tudok beállítani dolgokat a hisztogramon... Histogram setup > **data**, > format> , **skála lin>log** pl.

pl. a ROI-t ,ami a regions of interest, **másnéven Gate**. Meg tudok adni a NOT kipipálásával olyat is, hogy mit NEM szeretnék gate-elni.

**Format :** további megjelenési beállítások: felbontás, x,y tengelyek lin vagy log

**References** : jobb klikk a hisztogramon és mentés, mint reference, betöltöm a 2. adatsort, amit ezzel össze akarok hasonlítani: load data only-val a fájl menüben (az előző cucc látszik a második adataival), ezt is mentem, mint ref.

**Gating**: gating

**Scaling**: a fentebb említett skálázás újra

**ROI** > General, Stats, Ratio (Ez a Gate.) Ezt a hisztogram területére jobb egér gombbal hozhatom elő: új gate

Ez a region of interest, azaz a gate-elt adatok színe, adatai, összehasonlítása

**Copy datagram to clipboard**: itt tudom kimenteni, ha pl. excelbe be akarom vágni

**View menü** mit lássunk...

## **Control menü**

**Replay** : újraindítja a mérést ha pl. változtattunk a gate-en és így csak az új adatok fognak látszódni

**Run**: elvileg nem szükséges, mert ha a sample arm pozícióban van, elindul magától is

**Stop**

**Flush**: öblíti a sample tube-ot, de elvileg ezt se használjuk, mert auto öblít, ha a flush pozícióban áll a tű

**Substraction**: [kompenzálás...](#) a Control tab-on belül a PMT-nél is elérhető. 41.o

**Gain**: lásd fent, Control panel > Gain

## **Setup menü**

**Time per channel**: ? időbeli változás a fluoreszcenciában mérhető vele?

**Autocycle**: ha be akarjuk kapcsolni, kipipáljuk az ON-t, időt vagy eventet is be tudunk neki állítani, ez pl. plate-nél is hasznos, ha automatikusan akarjuk vele mérteni a lyukakat

**Data setup**: meg tudjuk adni a data buffer size-ot, azaz hogy mennyi event után álljon le. [Ha auto refresh be van állítva, akkor törli, amit addig mért, ezt nem használjuk, szerelőnek érdekes.](#) Ha lejár, megtarthatjuk az adatokat v újraindíthatjuk.

**Auto save**: kipipálni érdemes és megadni, hova mentsen. [Mi nem mondunk ilyet neki, nem használjuk ezt a funkciót!](#) Menti az adatot és a beállítást, ha a queue is ki van pipálva, akkor a beírt névvel menti a mintát miután lemérte. 1000 fájl után a legrégebbieket elkezdi felülírni, ezért rendszeresen el kell menteni a méréseket saját tárolóra.

**Set default folder**: megváltoztathatom, hova mentsen

**Apply settings on Replay**: az aktuális méréshez tartozó beállítások megmaradnak, ha Replay-t nyomunk. ? Ha változtatjuk a beállításokat, nem változnak az adatok.

**Apply settings to Data buffer**: az előzőnek aktívnak kell lenni hozzá, nem szokták használni, mert ez hozzárendeli a beállításokat is az adathoz, inkább a nyers adatot szokták tárolni és csak „on replay” hozzáadni a settings and gain-t

Ha apply settings on replay akkor állíthatom utólag a dolgokat, ha a.s. to stored data, akkor nem.

**Window menü**: [értelemszerű...](#)

