

Instruments



AMNIS[®]

量化成像分析流式细胞仪

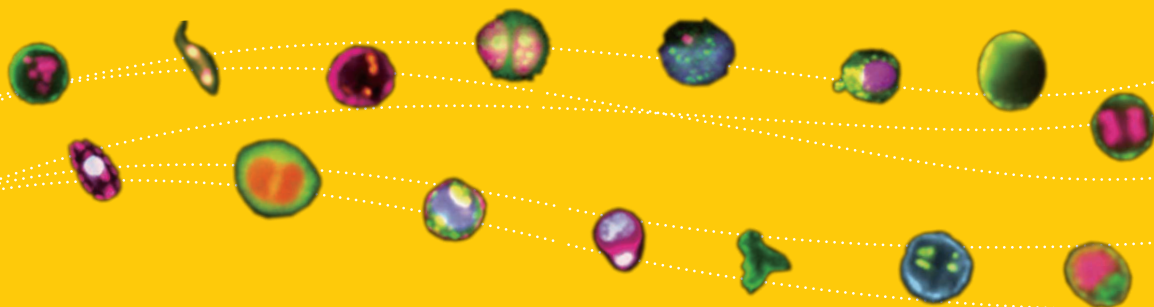
简易操作说明书



contents

目录

 ImageStream ^x Mark II 流式细胞仪操作说明	2
ImageStream ^x Mark II 流式细胞仪维护、运行所需试剂	3
ImageStream ^x Mark II 流式细胞仪荧光素表	3
高通量自动上样器 (Autosampler) 操作步骤	5
EDF (Extended depth of field) 景深模块操作步骤	7
ImageStream ^x Mark II 操作疑难解答	8
 IDEAS [®] 数据分析软件操作说明	15
Wizard 分析模块操作说明	18
细胞凋亡	19
细胞周期和有丝分裂期	19
荧光信号共定位	20
内化	20
蛋白质核转位	21
细胞形变	22
计点	22
手动分析操作说明	23
荧光补偿 (Compensation Matrix) 操作说明	24



ImageStream^x Mark II

流式细胞仪操作说明

步骤

1. 开机:打开 ImageStream^x Mark II 主机和两个电脑的电源,电脑主机默认密码“is100”;双击 ISX 软件图标、启动
2. 检查鞘液、清洗液等是否足够,将废液桶清空
3. 单击软件界面右下方的“Start up”,仪器会自动冲洗管路、将鞘液装载到液流系统中,此过程大概要花费13 min
4. 系统自检:在“ASSIST”界面中点击“Start all calibrations and tests”,仪器自动对系统状态进行检测,此过程大概花费15 min
5. 在“File”中选择“Load default template”或者已有模板
点击“Load”,在1.5 ml或者0.5 ml离心管中加入样品(每种染料都标记)
6. 根据实验要求选择合适的流速和放大倍数
7. 在“Illumination”界面中,打开本次实验要用的所有激光器、选择明场通道所在位置
8. 在“Plot”界面中,生成点图(dot plot)或者直方图(histogram)用于选择数据获取所需的细胞群体(如果是要选定单细胞,使用Area和Aspect Ratio散点图,圈定Aspect Ratio趋近于1、Area中等的密集细胞群)
9. 调整激光机的功率使得荧光值最大,但又不处于过饱和状态(每种染料的Raw Max Pixel的范围为100-4000之间)
10. 在“acquisition parameters”中选择数据保存的文件名称、文件夹、想要获取的细胞群及细胞数(也可以选择保存所有细胞的数据)
11. 在“File”中选择文件的保存格式:.rif (IDEAS), .fcs (FACS software)
12. 点击 获取数据;按照这样设置和方法,依次获取、保存所有样品的数据
13. 荧光补偿:两种方式——在线和离线荧光补偿,所需样本——单阳性

在线荧光补偿

- 1) 点击“creat compensation matrix”
- 2) 点击“Load”,将一个对照单阳性样本放到上样孔中
- 3) 确定系统选择的荧光检测通道是否正确
- 4) 设定要获取的细胞数、文件、文件名,点击“Next”开始获取数据
- 5) 重复2)-5)步获取其他单阳性对照样品数据
- 6) 点击“Exit”,保存荧光补偿文件,其文件类型为“.ctm”
- 7) 使用方法:
 - a) 使用一个标记了所有荧光素的样本调节仪器条件
 - b) 按照在线荧光补偿所述步骤生成荧光补偿文件
 - c) 在获取其他样本数据时可以点击“compensation”中的“Load Matrix”调用荧光补偿文件,此后样本数据皆为荧光补偿后的结果

离线荧光补偿

- 1) **关闭785 nm激光器和Brightfield**
- 2) 点击“Load”,将一个对照单阳性样本放到上样孔中
- 3) 获取细胞范围选择“All”,设定要获取的细胞数(建议为500-1000)、文件、文件名(建议为荧光素名称)
- 4) 点击“Acquire”获取数据,获取数据的文件系统会自动添加“noBF”后缀
- 5) 重复2)-4)步获取其他单阳性对照样品数据
- 6) 使用方法:
 - a) 使用一个标记了所有荧光素的样本调节仪器条件
 - b) 使用该条件获取其他所有样本数据
 - c) 在该条件下,按照离线荧光补偿所述步骤获取单阳性样本数据
 - d) 在使用IDEAS软件分析数据时生成荧光补偿文件
14. 保存实验条件:点击“File”中的“save template”、保存本次实验条件;可以在做类似实验时,点击“File”中的“load template”、调取实验条件
15. 关闭系统:点击“Shutdown”,仪器自动清洗、关闭系统,此过程大概花费45 min

注意事项

1. 保持一定的使用频率,最好保证仪器每周运行;如没有实验,可以正常运行开机(Startup)、关机(Shutdown)一次;
2. 如长期不使用仪器(超过一周),再次使用时,在Startup之后,运行清洗消毒2-3次后再做实验:点击Shutdown,取消“√”;
3. 上样时请注意打开管盖,否则会导致上样器损伤;
4. 不要使用BD或者Beckman等公司的鞘液。

ImageStream[®] Mark II 量化成像分析流式细胞仪 维护、运行所需试剂

试剂名称	成份	Merck-Millipore 货号
Sterilizer	0.4 – 0.7%次氯酸钠	--
Cleanser	Coulter Cleanse Starter Kit	402000
Debubbler	70%异丙醇	--
Sheath	无钙镁的PBS	BSS-1006-B (1X) BSS-2010-B (10X)
Rinse	去离子水	--
SpeedBead Kit for ImageStream [®]	系统自检、对焦	400041

ImageStream[®] Mark II 量化成像分析流式细胞仪荧光素表

单TDI CCD

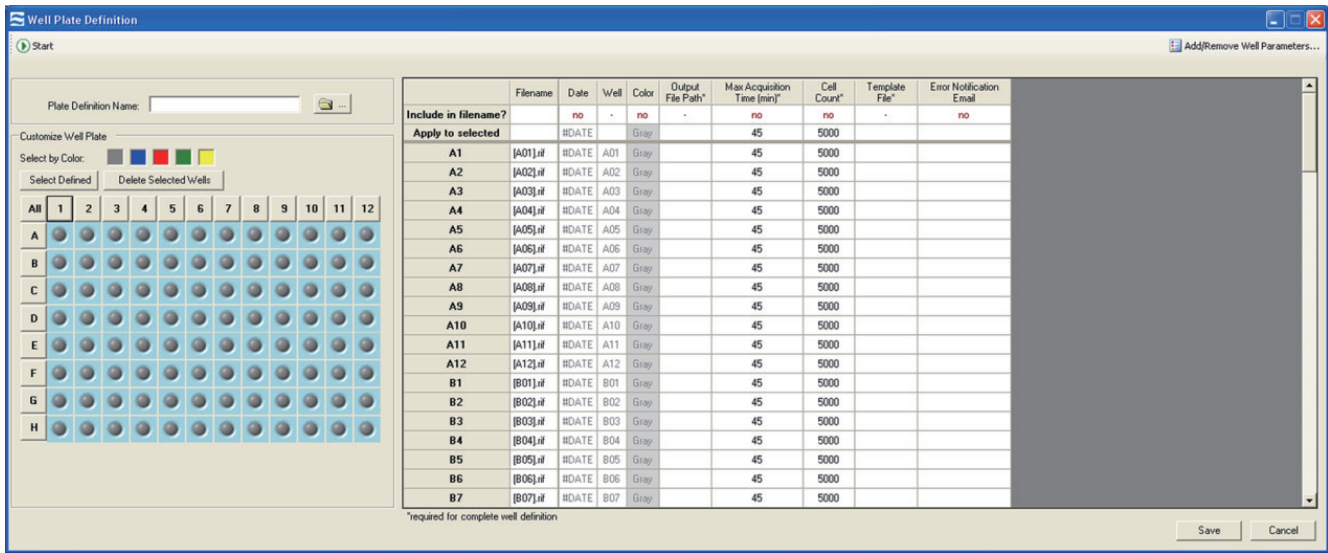
Excitation Laser (nm)

Ch	Band _(nm)	375	405	488	561	592	642	730	785
1	435-505 (457/45)	AF350, DAPI, Hoechst, PacBlue, eFluor490	DAPI,Hoechst, PacBlue, CascadeBlue,AF405, eFLUOR480, DyLight405,CFP, LIVE/DEAD Violet						
2	505-560 (533/55)	PacOranger, CascadeYellow, AF430, QD525, eFluor525	PacOrange, CascadeYellow, AF430, BDHorizonV550, QD525,eFluor525	FITC,AF488,GFP, YFP,DyLight488, PKH67,Syto13, SpectrumGreen, LysoTrackerGreen, MitoTrackerGreen					
3	560-595 (577/35)	QD585, QD585, eFluor585	QD585,QD585	PE,PKH26,DSRed, mOrange, CellMask/CellTracker/ SYTOX Orange,Cy3	PE,AF546, Cy3*, DyLight550, PKH26, DSRed, SpectmOmg, MTOmg				
4	595-642 (610/30)	QD625, eFluor625	QD625,eFluor625	PE-TEXRed,ECD, PE-AF610,7AAD,PI, RFP,QD625, eFluor625	AF568, Cy3*,PE- TexRed, ECD, TexRed,PE- AF610, RFP, mCherry,	TexRed, AF594, DyLight594, mCherry, SpectrumRed, PI,7AAD			
5	642-745 (702/85)	QD705, eFluor6850	QD705,eFluor625	PE-Cy5,PE-AF647, PerCP,PerCP-Cy5.5, DRAQ5,QD705, eFluor650, FuraRedlo	PE-Cy5,PE- AF647, DRAQ5	AF647, AF660, AF680, APC,Cy5, DyLight649, PE-AF647, PE-Cy5, DRAQ5	APC,AF647,AF660, AF680,DRAQ5,Cy5, DyLight849, DyLight880,PE- AF647,PE-Cy5, PerCP,PerCP-Cy5.5		
6	745-780 (762/35)	QD800	QD800	PE-Cy7,PE-AF750 QD800	PE-Cy7,PE- AF750	APC-Cy7, APC-AF750, APC-H7, APC- eFluor750	APC-Cy7,APC- AF750,APC-H7,APC- eFluor750,Cy7, AF750,DyLight750, PE-Cy7,PE-AF750	AF750,Cy7, DyLight750, PE-Cy7,PE- AF750	SSC

Excitation Laser (nm)

Ch	Band(nm)	405	488	561	592	642	785	
1	430-480	BRIGHTFIELD						
2	480-560		FITC, AF488, GFP, YFP, DyLight488, PKH57, Syto13, SpectrumGreen, Ly60TrackerGreen, MitoTrackerGreen, QD525*					
3	560-595		PE, PKH26, Cy3, AF555 DSRed	PE, Cy3, AF546, AF555, DyLight549, DyLight594*, PKH26, DSRed, SpectrumOrange, MitoTrackerOrange				
4	595-640		PE-TexRed*, ECD*, PE-AF610*, 7AAD*, PI*, RFP, QD625*, eFluor625*.	AF568*, AF594*, AF610*, DyLight549*, PE-TexRed*, ECD*, TexRed*, PE-AF610*, RFP*, mCherry*, 7AAD*, PI*				
5	640-745		PE-Cy5*, PE-AF647*, perCP*, PerCP-Cy5.5*, DRAQ5*.QD705*, eFluor550*,	PE-Cy5*, PE-AF647*, DRAQ5*				
6	745-800		PE-Cy7*, pe-af750*, QD800	PE-Cy7*, PE-AF750*			SSC	
7	435-505	DAPI, Hoechst, PacBlue, CascadeBlue, AF405, eFluor405, DyLight405, CFP, LIVE/DEAD Violet						
8	505-560	PacOrange, CascadeYellow, AF430, QD525*,						
9	570-595	BRIGHTFIELD						
10	595-640	QD625*, eFluor625*			TexRed*, AF549*, AF568*, AF610*, DyLight549*, PE-TexRed*, ECD*, PE-AF610*, mCherry*, SpectrumRed, Pr7AAD*			
11	640-745	QD705*, eFluor650*			AF647, AF660, AF680, DRAQ5*, APC, Cy5, DyLight649, DyLight680, PE-AF647*, PE-Cy5*, PerCP*, PerCP-Cy5.5*	APC, AF647, AF660, AF680, Cys, DyLight649, PE-AF647*, PE-Cys*, DRAQ5*		
12	745-800	QD800*			APC-Cy7, APC-AF750, APC-eFluor750	APC-Cy7, APC-AF750, APC-H7, APC-Cy7, Cy7, AF750, DyLight750, PE-Cy7*, PE-AF750*		

高通量自动上样器 (Autosampler) 操作步骤



上样板要求

U形底的96孔板, 上面覆盖pierceable film (推荐品牌: Sigma-Aldrich X-Pierce Film, XP-100, Cat#2722502)

系统自检

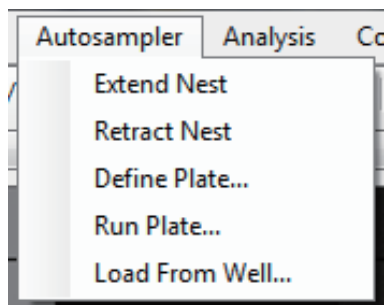
1. 启动仪器, 登录INSPIRE软件
2. 确定各种溶液的量足够
3. 点击Startup, 仪器开始冲洗液流系统并加载鞘液, 大约花费10分钟
4. 在ASSIST界面中, 点击Start All Calibrations and Tests, 大约花费15分钟

建立数据获取模板

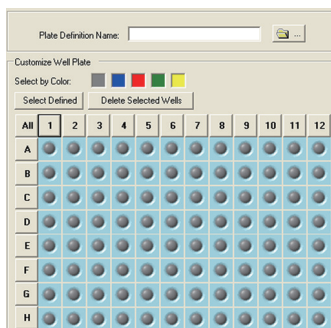
1. 点击Load, 在1.5 ml或者0.5 ml离心管中加入样品 (每种染料都标记)
2. 在“Illumination”界面中, 打开本次实验要用的所有激光器
3. 调整激光机的功率使得荧光值最大, 但又不处于过饱和状态
4. 在“Plot”界面中, 生成点图(dot plot) 或者直方图(histogram) 用于选择数据获取所需的细胞群体
5. 设置各种条件(具体操作, 参见FlowSight多维全景流式细胞仪操作说明)
6. 点击File, 选择Save Template

96孔板定义及数据获取

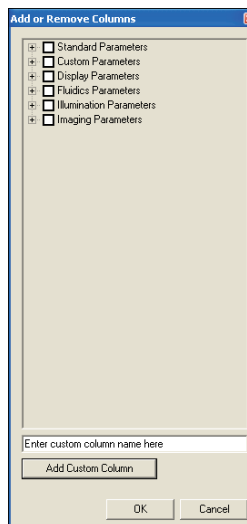
1. 选择Autosampler, 点击Defined Plate



2. 按住ctrl键, 选择需要检测的孔、行或者栏



3. 点击Add/Remove Well Parameter中 选择需要定义的栏



4. 在apply to selected中, 选择: output file path、template或者其他参数

	Filename	Well	Date	Color	Output File Path*	Max Acquisition Time (min)*	Cell Count*	Template File*	Error Notification Email	Stain	Treatment	Comments	Patient#	Dose	Time
Include in filename?		-	yes	no		no	no		no	yes	yes	no	yes	yes	yes
Apply to selected		#DATE		Blue	C:\Documents and Settings\amnia\Desktop\NSK-Data\043010\X101 WB MOND NFr:B TNF	15	5000	043010 WB CD45FITC.ist	@amnis.com	CD45F	TNF				
A1	[A01]#...	A01	#DATE	Blue	C:\Documents and Settings\amnia\Desktop\NSK-Data\043010\X101 WB MOND NFr:B TNF	15	5000	043010 WB CD45FITC.ist	@amnis.com	CD45F	TNF	File ctrl		100pg	60min
A2	[A02]#...	A02	#DATE	Blue	C:\Documents and Settings\amnia\Desktop\NSK-Data\043010\X101 WB MOND NFr:B TNF	15	5000	043010 WB CD45FITC.ist	@amnis.com	CD45F	TNF	PE ctrl		10pg	60min
A3	[A03]#...	A03	#DATE	Blue	C:\Documents and Settings\amnia\Desktop\NSK-Data\043010\X101 WB MOND NFr:B TNF	15	5000	043010 WB CD45FITC.ist	@amnis.com	CD45F	TNF	AFB47 ctrl		1pg	60min
A4	[A04]#...	A04	#DATE	Blue	C:\Documents and Settings\amnia\Desktop\NSK-Data\043010\X101 WB MOND NFr:B TNF	15	5000	043010 WB CD45FITC.ist	@amnis.com	CD45F	TNF			100fg	60min
A5	[A05]#...	A05	#DATE	Blue	C:\Documents and Settings\amnia\Desktop\NSK-Data\043010\X101 WB MOND NFr:B TNF	15	5000	043010 WB CD45FITC.ist	@amnis.com	CD45F	TNF			10fg	60min
A6	[A06]#...	A06	#DATE	Blue	C:\Documents and Settings\amnia\Desktop\NSK-Data\043010\X101 WB MOND NFr:B TNF	15	5000	043010 WB CD45FITC.ist	@amnis.com	CD45F	TNF	DAPI		1fg	60min
A7	[A07]#...	A07	#DATE	Blue	C:\Documents and Settings\amnia\Desktop\NSK-Data\043010\X101 WB MOND NFr:B TNF	15	5000	043010 WB CD45FITC.ist	@amnis.com	CD45F	TNF			100ag	60min
A8	[A08]#...	A08	#DATE	Blue	C:\Documents and Settings\amnia\Desktop\NSK-Data\043010\X101 WB MOND NFr:B TNF	15	5000	043010 WB CD45FITC.ist	@amnis.com	CD45F	TNF			Unrx	60min
B1	[B01]#...	B01	#DATE	Red	C:\Documents and Settings\amnia\Desktop\NSK-Data\043010\X101 WB MOND NFr:B TNF	15	5000	043010 WB CD45FITC.ist	@amnis.com	CD45F	TNF		A	100pg	15min
B2	[B02]#...	B02	#DATE	Red	C:\Documents and Settings\amnia\Desktop\NSK-Data\043010\X101 WB MOND NFr:B TNF	15	5000	043010 WB CD45FITC.ist	@amnis.com	CD45F	TNF		B	10pg	15min
B3	[B03]#...	B03	#DATE	Red	C:\Documents and Settings\amnia\Desktop\NSK-Data\043010\X101 WB MOND NFr:B TNF	15	5000	043010 WB CD45FITC.ist	@amnis.com	CD45F	TNF		C	1pg	15min
B4	[B04]#...	B04	#DATE	Red	C:\Documents and Settings\amnia\Desktop\NSK-Data\043010\X101 WB MOND NFr:B TNF	15	5000	043010 WB CD45FITC.ist	@amnis.com	CD45F	TNF		A	100fg	15min

5. 点击save, 保存96孔板设置

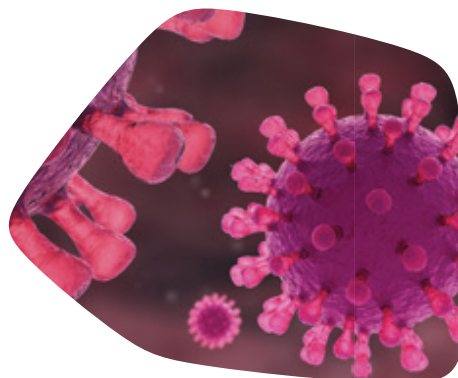
6. 确定各种溶液的量足够, 废液瓶清空

7. 点击start

8. 点击Open Door, 将96孔板放入槽中

9. 点击start

10. 读板结束后会自动生成报告



EDF (Extended depth of field) 景深模块操作步骤

EDF景深模块可以将细胞聚焦厚度扩展到16 μm , 适用于FISH计数等需要整个细胞聚焦清晰的应用, 其中包括利用EDF景深模块获取图片和数据分析前去卷积两步。



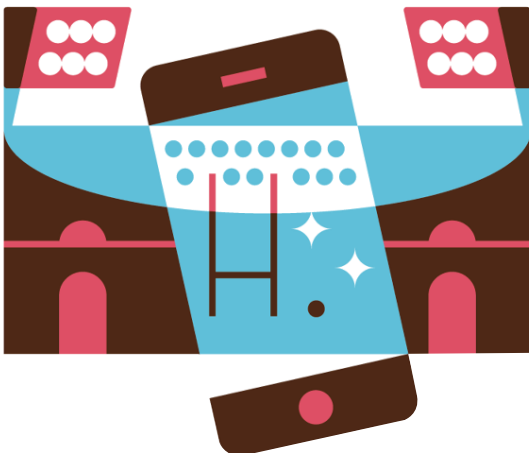
数据获取时的细胞图像:左图 — 使用EDF模块, 右图 — 未使用EDF模块

数据获取

1. 按照正常流程启动仪器和液流
2. 在放大倍数控制区域, 选择EDF
3. 按照正常方式获取、保存数据

说明

1. EDF模式下收集的数据会带有EDF尾缀
2. 荧光补偿数据可以在EDF或者非EDF模式下收集
3. EDF模式下收集的数据去卷积后会光强度会更大一些, 所以raw max pixel可能会超过4096
4. 无需做聚焦分析
5. EDF模块会增加细胞纹理效果
6. 明场效果可能会不如正常模式好



ImageStream^x Mark II 流式细胞仪操作疑难解答

系统

- 🔍 液流不稳定(液流系统中存在气泡或者堵塞)
- 🔍 液流反应迟钝
- 🔍 检测速度过慢
- 🔍 检测速度比预期慢
- 🔍 前一样本的交叉污染
- 🔍 液面传感器报错
- 🔍 无法通过系统自检ASSIST
- 🔍 无法计算出荧光补偿数值并保存文件

强度

- 🔍 荧光图像非常弱
- 🔍 荧光太强, 图像出现对比色或者颜色变浅
- 🔍 一个检测通过荧光饱和, 而其他没有
- 🔍 侧向角散射太弱、太强或者不稳定
- 🔍 明场光强度水平变化大
- 🔍 明场光强度水平设置错误

软件

- 🔍 INSPIRE 无反应
- 🔍 INSPIRE 登录失败
- 🔍 散点图、直方图不刷新或者非常慢
- 🔍 无法收集数据

图像

- 🔍 没有图像
- 🔍 成像和获取速度不稳定或者无反应
- 🔍 检测目标上有条纹
- 🔍 检测目标不在通道的中间
- 🔍 检测目标在核心液流中翻滚
- 🔍 检测目标脱焦
- 🔍 检测目标部分不在图像中
- 🔍 两个明场通道不同步, 显示的不是同一个细胞
- 🔍 图像出现马赛克, 或者比正常情况大
- 🔍 12 个检测通道不能全部显示
- 🔍 图像颜色显示错误

症状	可能的原因	解决方案
系统		
液流不稳定(液流系统中存在气泡或者堵塞)	样本中有气泡	确定样本体积是否足够, 一般为50µl。 液流去泡: 点击instrument, 运行purge bubbles。 去垢剂和气泡剂(比如血清FBS)会导致连续气泡; 如果是这些溶液导致系统中有气泡, 请用无钙镁的PBS 重悬样本。 液流去泡: 点击instrument, 运行purge bubbles。
	液流系统的管路中有气泡	1. 运行消毒程序: 点击shutdown, 将shutdown 前的√去掉 2. 运行startup 3. Load calibration beads 4. 确定系统运行正常
	液流系统管路堵塞	1. 用70µm 细胞筛过滤样本 2. 运行消毒程序: 点击shutdown, 将shutdown 前的√去掉 3. 运行startup 4. Load calibration beads 5. 确定系统运行正常
	样本浓度过高	粘稠的样本会在液流系统管路中形成气穴和气泡。 稀释样本到 1×10^7 cells/ml, 用70µm 细胞筛过滤。 液流去泡: 点击instrument, 运行purge bubbles。
	不恰当的鞘液	确定鞘液是无钙镁的PBS。 鞘液最好抽气、除泡。 不要使用第三方的鞘液, 比如BD 或者Beckman。
	液流系统管路漏液	1. 关闭仪器 2. 查看是否有漏液 3. 如有, 请联系Merck-Millipore 的Amnis 工程师。

症状	可能的原因	解决方案
系统		
液硫反应迟钝	鞘液泵中的气体体积错误	鞘液泵中应该含有2-4 ml 的空气,可以缓冲微型步进电机的移动。如果这截空气太少,可在此执行startup。
	液流系统管路漏液	<ol style="list-style-type: none"> 1. 关闭仪器 2. 查看是否有漏液 3. 如有,请联系Merck-Millipore 的Amnis 工程师。
检测速度过慢	细胞沉淀在管路中	<p>持续运行进样45-60 分钟,会导致检测速度下降。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 停止获取数据并保存 2. 回吐样本 3. 重新浓缩或者稀释样本至30 μl 4. 重新上样、获取数据 5. 使用IDEAS 分析数据时,可以把两次的整合在一起
	液流系统中有气泡或者堵塞	<p>点击instrument,运行purge bubbles。 还可以参考“液流不稳定(液流系统中存在气泡或者堵塞)”。</p>
	样品泵空	重新上样
	鞘液泵空	灌满鞘液,点击instrument,运行prime
检测速度比预期慢	液流系统管路漏液	<ol style="list-style-type: none"> 1. 关闭仪器 2. 查看是否有漏液 3. 如有,请联系Merck-Millipore 的Amnis 工程师。
	样本浓度过低	<p>确定样本浓度在10^7-10^8 cells/ml 之间。 低浓度样本可以检测,但会显著降低检测速度。</p>
	核心液流偏移	<p>在数据获取时,系统会尽量减少裁剪细胞的图片;如果有大量这样的细胞存在,就会显著降低检测速度。 一般来说,这是由于液流系统中有气泡造成的。 点击instrument,运行purge bubbles。 还可以参考“液流不稳定(液流系统中存在气泡或者堵塞)”。</p>
	亮度不足	<ol style="list-style-type: none"> 1. 打开所需激光器 2. 将785nm 激光器功率开到40mW 3. 先将激光器功率开到最高,然后再逐步降低以避免荧光饱和
前一样本的交叉污染	残存的前一样本的DNA 染料将当前样本细胞染色	<p>在运行过含有DNA 染料的样本后,需要充分冲洗样本管路,防止将下一样本中的细胞染色。 两种方法去除仪器中残存的DNA 染料:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 先上样10%的bleach,后上样PBS 2. 运行消毒程序:点击shutdown,将shutdown 前的\checkmark去掉
	细胞的交叉污染	<p>这说明液流系统中存在小的堵塞。 两种解决方法:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 先上样10%的bleach,后上样PBS 2. 运行消毒程序:点击shutdown,将shutdown 前的\checkmark去掉
液面传感器报错	溶液瓶从液面传感器上移开	打开溶液室,让溶液瓶和传感器更近些,直到传感器停止报错。
	传感器损坏	重启仪器,如失败,请联系Merck-Millipore 的Amnis 工程师。

症状	可能的原因	解决方案
系统		
	登录错误的数据库 获取模板	1. 点击file 2. 选择load default template 3. 重新运行ASSIST
	Calibration beads 运行不正常	小球的正常运行速度应大于1000 event/s, 并且没有聚集的现象。 如果小球被稀释或者聚集, 请更换新的试剂; 如果问题仍然存在, 应该是液流系统的问题, 可以参见“检测速度过慢”
	Calibration and Test 失败	如果液流系统正在重新上鞘液, 或者setup 不正常, Test 可能会失败。 重新运行失败的检测项目, 如果连续失败三次, 请联系Merck-Millipore 的Amnis 工程师。
	Focus adjustor calibration 失败	确定明场工作正常。
	Frame Offset calibration 失败	确定明场工作正常。
	Spatial Offset calibration 失败	确定明场工作正常。
	Dark Current Calibration 失败	1. 关闭激光器和明场 2. 重启仪器 3. 再次运行该项检测
无法通过 系统自检 ASSIST	Brightfield XT Talk calibration 失败	确定明场工作正常, “spatial offset”通过。
	Horizontal Laser Calibration 失败	1. 确定激光器打开、可以调到合适的功率 2. 确定“spatial offset”通过 3. 重启仪器 4. 再次运行该检测项目
	Retro Calibration 失败	确定激光器打开、可以调到合适的功率; 确定“spatial offset”和“frame offset”通过
	Side Scatter Calibration 失败	1. 确定785nm 激光器打开、可以调到合适的功率 2. 确定“spatial offset”通过 3. 重启仪器 4. 再次运行该检测项目
	Laser Power test 失败	1. 确定相关激光器打开、可以调到合适的功率 2. 确定“spatial offset”通过 3. 重启仪器 4. 再次运行该检测项目
	Brightfield alignment test 失败	确定明场工作正常。
	Brightfield uniformity test 失败	确定明场工作正常。
	Camera noise test 失败	1. 确定camera 成像正常 2. 重启仪器 3. 再次运行该检测项目

症状	可能的原因	解决方案
系统		
无法通过系统自检 ASSIST	Flow Core Axial Stability test 失败	1.确定各种溶液量足够 2.运行消毒程序:点击shutdown,将shutdown 前的√去掉 3.运行startup 4.再次运行该检测项目 参考“液流不稳定(液流系统中存在气泡或者堵塞)”
	Flow Core Lateral Stability test 失败	参考“Flow Core Axial Stability test 失败”的解决方案
	Flow Core Position test 失败	
	Focus Percentage test 失败	
	Focus Uniformity test 失败	
	Image Quality test 失败	
无法计算出荧光补偿数值并保存文件	获取细胞的范围选择错误	确定在所有“all”细胞的范围内获取1000 events。
	获取细胞数量太多	将获取细胞数设到1000 以内
	细胞没有荧光	确定单阳性对照样本中有大于10%的阳性细胞,而且亮度足够。 如果没有合适的单阳性对照样本,也可以使用IgG 荧光小球或者合适的细胞系
	细胞被不只一种荧光素染色	荧光补偿样本必须是单荧光标记。 每一种荧光素必须分开获取数据。
软件		
INSPIRE 无反应	Camera 不工作	点击run 或者startup
	如果camera 已经在工作了	点击stop,然后点击run 或者startup
	成像暂停	点击resume
	在现有的成像模式之下没有细胞	在细胞显示区域,选择all population
	某个程序正在运行	解决方法:1.等待程序运行完毕 2.如果需要,可以点击abort,停止运行
	INSPIRE 运行冲突	1.按住ctrl+alt+del,打开windows 程序管理器 2.选择“运行” 3.如果FlowSight 的运行状态是“No responding”,选择立刻结束 4.重启INSPIRE 软件 5.确定激光器和明场打开 6.重新建立核心液流 7.如果不能正常使用,再次开打windows 程序管理器,结束INSPIRE程序,重启仪器
	INSPIRE 登录失败	初始屏幕没有反应

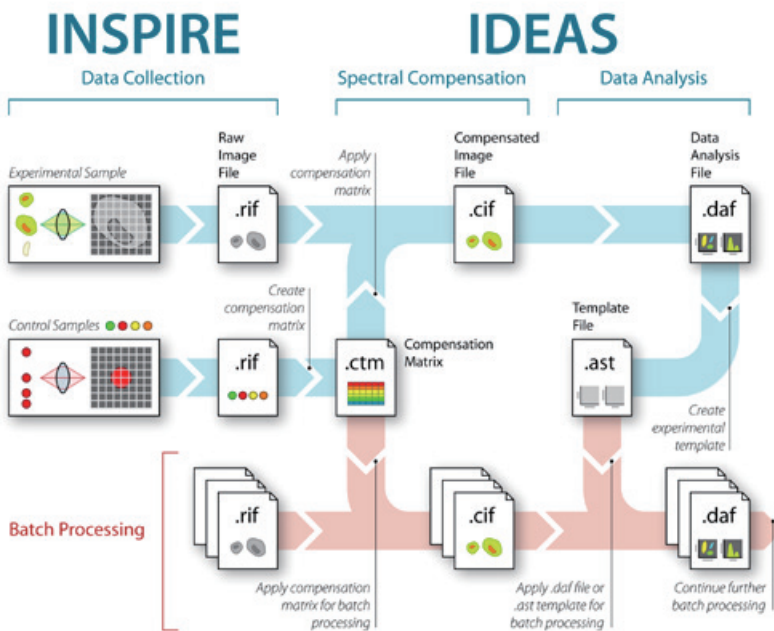
症状	可能的原因	解决方案
	计算机和仪器失去连接	1.关闭电脑和仪器 2.确定所有电脑均关闭 3.重新打开仪器和电脑,等待5 分钟,重新登陆INSPIRE
散点图、直方图不刷新或者非常慢	计算机资源使用过度	关闭所有第三方软件。
	在数据获取模板中使用过多的点图或者直方图	控制图在15 幅以内。
	刷新速度不同	右键点击图,选择graph properties,选择population 为all,或者适宜的细胞群
	图缩放不正常	点击图的工具栏,点击放大镜或者缩小镜改变图的范围
无法收集数据	目的区域中没有细胞	通过细胞图片,确定目标区域中有细胞;选择合适的获取区域。确定细胞浓度是否合适。107 cells/ml 是最合适的。
	计算机硬盘空间已满	确定计算机的硬盘有足够空间可以存储数据。
	数据获取速度过快	有些样本细胞浓度非常高,获取速度比显示的要快。查看文件夹中是否已保存数据。
	文件路径丢失	获取数据时通过或者改变目标文件夹的名字,FlowSight 会丢失数据获取路径。可以点击数据获取设定区域的文件夹查看。
	没有生成rif 或者 fcs 格式的文件	1.点击file 2.在generate rif 或者 fcs 前打√
图像		
没有图像	Camera 没有工作	点击run 或者setup。
	如果camera 已经工作了	点击stop、停止camera 工作,点击run 或者setup。
	成像暂停	点击resume。
	显示区域错误	点击细胞显示区域,选择all population。
	亮度不足	1.打开所需激光器 2.将785nm 激光器功率开到40 mW 3.先将激光器功率开到最高,然后再逐步降低以避免荧光饱和和确定明场打开,点击set intensity。
	核心液流偏离视场	手动找到核心液流:在focus 和centering 区域,点击→←寻找核心液流。
	计算机资源过度使用	关闭所有第三方软件。
	样本浓度过低	确定样本浓度在 10^7 - 10^8 cells/ml 之间。 低浓度样本可以检测,但会显著降低检测速度。
成像和获取速度不稳定或者无反应	图像显示的区域细胞很少或者没有细胞	点击细胞图像显示区域,选择all population; 或者调整所选区域的范围。
	亮度不足	1.打开所需激光器 2.将785nm 激光器功率开到40 mW 3.先将激光器功率开到最高,然后再逐步降低以避免荧光饱和和确定明场打开,点击set intensity。

症状	可能的原因	解决方案
成像和获取速度不稳定或者无反应	样本浓度过高	检测速度最高为4000 events/s。 最大样本浓度为 $4-5 \times 10^8$ cells/ml, 最佳浓度为 $1-10 \times 10^7$ cells/ml。 可以稀释样本来降低速度。
	样本中含有过多的碎片	划取单细胞区域, 减少获取数据中的碎片; 或者重新制备样本。
	计算机资源过度使用	关闭所有第三方软件。
检测目标上有条纹	Camera 没有精确追踪细胞速度	1. 确认明场是否工作正常 2. 运行ASSIST 参考“液流不稳定(液流系统中存在气泡或者堵塞)”。
检测目标不在通道的中间	由于液流系统中有气泡或者堵塞, 造成核心液流偏差	点击instrument, 选择、运行purge bubbles。 参考“液流不稳定(液流系统中存在气泡或者堵塞)”。
	自动对焦和视场校正工作不正常	手动找到核心液流: 在focus 和centering 区域, 点击→←寻找核心液流。
检测目标在核心液流中翻滚	由于液流系统中有气泡或者堵塞, 造成核心液流偏离流动室的中心	短期内核心液流和聚焦的数值不应该差别过大。如果改变明显, 说明检测目标的翻转是由于其与鞘液的接触。 液流系统中有气泡或者堵塞造成该现象。 点击instrument, 选择、运行purge bubbles。 参考“液流不稳定(液流系统中存在气泡或者堵塞)”。
检测目标脱焦	Camera 线速度错误	重新运行ASSIST 中的focus adjuster 和frame offset 检测, 确定其可以通过。
	由于液流系统中有气泡或者堵塞, 造成核心液流偏离	点击instrument, 选择、运行purge bubbles。 参考“液流不稳定(液流系统中存在气泡或者堵塞)”。
	对于camera, 核心液流过快	上样后使系统稳定1 分钟, 等待图像清晰后再获取数据。
	自动对焦工作不正常	在focus 和centering 区域, 点击→←寻找核心液流、使对焦清晰。
检测目标部分不在图像中	由于液流系统中有气泡或者堵塞, 造成核心液流偏离	点击instrument, 选择、运行purge bubbles。 参考“液流不稳定(液流系统中存在气泡或者堵塞)”。
	自动对焦和视场追踪工作不正常	在focus 和centering 区域, 点击→←直到细胞位于中心、对焦清晰。
两个明场通道不同步, 显示的不是同一个细胞	Frame offset 不正常	1. 登录默认模板 2. 上样calibration beads 3. 确定明场在1 和9 号通道, 检测速度为800 events/s 4. 点击instrument, 选择、运行ASSIST 5. 选择性运行frame offset calibration, 确定其通过
	成像同步错误	请联系Merck-Millipore 的Amnis 工程师。
	Cross correlation 错误	1. 登录默认模板 2. 上样calibration beads 3. 确定明场在1 和9 号通道, 检测速度为800 events/s 4. 点击instrument, 选择、运行ASSIST 5. 选择性运行cross correlation utility, 确定其通过
图像出现马赛克, 或者比正常情况大	成像区域放大镜被激活	点击缩小, 调至合适的尺寸。
12 个检测通道不能全部显示	成像区域放大镜被激活	点击缩小, 调至合适的尺寸。
	通道没有被激活	点击通道号, 选择想显示的检测通道。
图像颜色显示错误	成像区域显示错误	点击通道号, 选择伪彩颜色、设定增益。

症状	可能的原因	解决方案
强度	图像显示设置过低	点击通道号, 提高增益; 或者把相应通道改为log 显示。
	样本标记不理想	用荧光显微镜检验样本质量。
	亮度不足	打开合适的激光器, 将激光器功率开到最高, 然后再逐步降低以避免荧光饱和。 由于染色方法造成染色弱, 可以通过将液流速度改为低速来增加仪器的灵敏度。
荧光图像非常弱	由于液流系统中有气泡或者堵塞, 造成核心液流偏离	点击instrument, 选择、运行purge bubbles。 参考“液流不稳定 (液流系统中存在气泡或者堵塞)”。
	激光器位置偏差	1. 登录默认模板 2. 上样calibration beads 3. 确定明场在1 和9 号通道, 检测速度为800 events/s 4. 点击instrument, 选择、运行ASSIST 5. 选择性运行laser alignment calibration, 确定其通过
荧光太强, 图像出现对比色或者颜色变浅	图像显示设置过高	点击通道号, 降低增益; 或者把相应通道改为lin 显示。
	仪器灵敏度过高	降低激光器的功率、防止荧光过饱和。 通过点击set intensity, 设定明场光强度为800。
	鞘液泵空	1. 灌满鞘液 2. 点击instrument, 选择prime
一个检测通过荧光饱和, 而其他没有	液流系统中有气泡或者堵塞	点击instrument, 选择、运行purge bubbles。 参考“液流不稳定 (液流系统中存在气泡或者堵塞)”。
	仪器灵敏度不是最好状态	仪器最好的设定条件, 是将荧光信号在动力学范围内调为最大, 同时避免图像荧光过饱和。 降低激光器功率, 避免荧光饱和。
	染色需要更加平衡	减少荧光饱和探针的使用浓度。
	样本溶液中存在	某些样本需要使用DNA 染料, 但过多的染料会导致核心液流中有荧光。
	过多的荧光染料残留	需要摸索合适的染料浓度, 既保证染色效果, 又不会过多。 可以在“current protocol in cytometry”中找到常规浓度。
侧向角散射太弱、太强或者不稳定	仪器温度变化过大	仪器预热15 分钟。 用风扇直接吹仪器的背面、促进散热; 或者把仪器移到有空调的房间。
	激光器功率设定过高或者过低	增加或者降低785nm 激光器功率。
	液流系统中有气泡或者堵塞	点击instrument, 选择、运行purge bubbles。 参考“液流不稳定 (液流系统中存在气泡或者堵塞)”。
明场光强度水平变化大	液流系统中有气泡引起液流速度变化过大	点击instrument, 选择、运行purge bubbles。 参考“液流不稳定 (液流系统中存在气泡或者堵塞)”。
	光源输出变化过大	重启仪器; 如不能解决, 请联系Merck-Millipore 的Amnis 工程师。
明场光强度水平设置错误	在液流稳定之前, 选择明场的set intensity 光路偏移	上样后, 等待系统稳定后, 再点击set intensity。 重启仪器; 如不能解决, 请联系Merck-Millipore 的Amnis 工程师。

IDEAS[®]

数据分析软件操作说明



数据类型

- rif :INSPIRE 获取的原始数据
- cif :经过荧光补偿后的图片文件
- daf :分析好的数据文件
- ast :分析模板
- ctm:荧光补偿文件

常规数据分析步骤

1. 双击IDEAS® 图标, 登录软件
2. 点击Start Analysis, 进入数据分析向导
3. 选择需要分析的样本数据 (rif 文件)
4. 选择荧光补偿文件 (ctm 文件); 如果没有, 点击New Matrix, 按照引导生成荧光补偿文件
5. 选择数据分析模板 (ast 或者 dat 文件); 如果没有, 可以不选择
6. 软件根据rif 文件名自动生成cif 和daf 文件名; 如果需要, 也可以自行更改
7. 选择数据分析涉及到的检测通道
8. 数据分析:
 - 1) 数据分析向导: 点击select wizard 选择分析向导, 在引导下完成数据分析
 - 2) 手动分析: 点击skip, 手动选择分析所需的直方图

(histogram ) 和散点图 (dot plot )

9. 数据分析结束后, 点击File 中的save, 保存daf 文件或者ast 文件
10. 后续样本数据分析:
 - 1) 少量样本: 重复2-5 步, 选择第一个分析好样本的daf 或者ast 文件为模板
 - 2) 大量样本: Batch 功能
11. 数据导出:
 - 1) 流式结果图的导出: 鼠标右键点击图片, 选择Copy/Save Graph
 - 2) 细胞图片的导出: 点击 , 鼠标双击选择需要导出的细胞, 点击save, 建立细胞图片库; 在population 中找到所需细胞图片库, 鼠标右键点击图片, 选择Copy/Save Gallery, 编辑、导出细胞图片
 - 3) 统计学结果批量导出: 点击Reports, 选择Generate Statistics Report, 选择要导出的样本文件, 点击OK
 - 4) 导出fcs 格式文件: 点击Tools, 选择Export Feature Data; 选择要导出的样本文件、细胞群体 (population)、参数, 点击选择fcs files, 点击OK

批处理功能

1. 点击Tools
2. 选择Batch Data Files
3. 点击Add Batch
4. 选择需要分析的样本数据文件 (rif)、荧光补偿文件、数据分析模板 (daf 或者ast 文件), 点击OK
5. 点击Submit Batch, 软件自动分析生成每个样本的cif 和daf 文件

建立只含某一群体细胞的文件

1. 点击Tools
2. 选择Create Data Files From Populations
3. 选择细胞群, 命名rif 和cif 文件, 点击OK

多样本数据合并

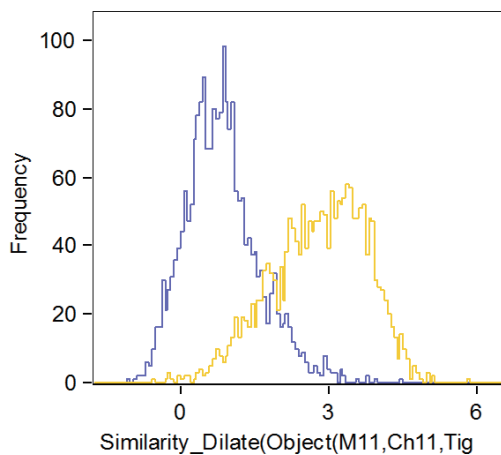
当需要分析大量细胞时,一次获取的细胞数量可能不足,可以分多次获取,通过软件将多个相同样本数据合并成一个文件

1. 点击Tools
2. 选择Merge rif
3. 点击Add Files,选择需要合并的样本数据文件,点击OK

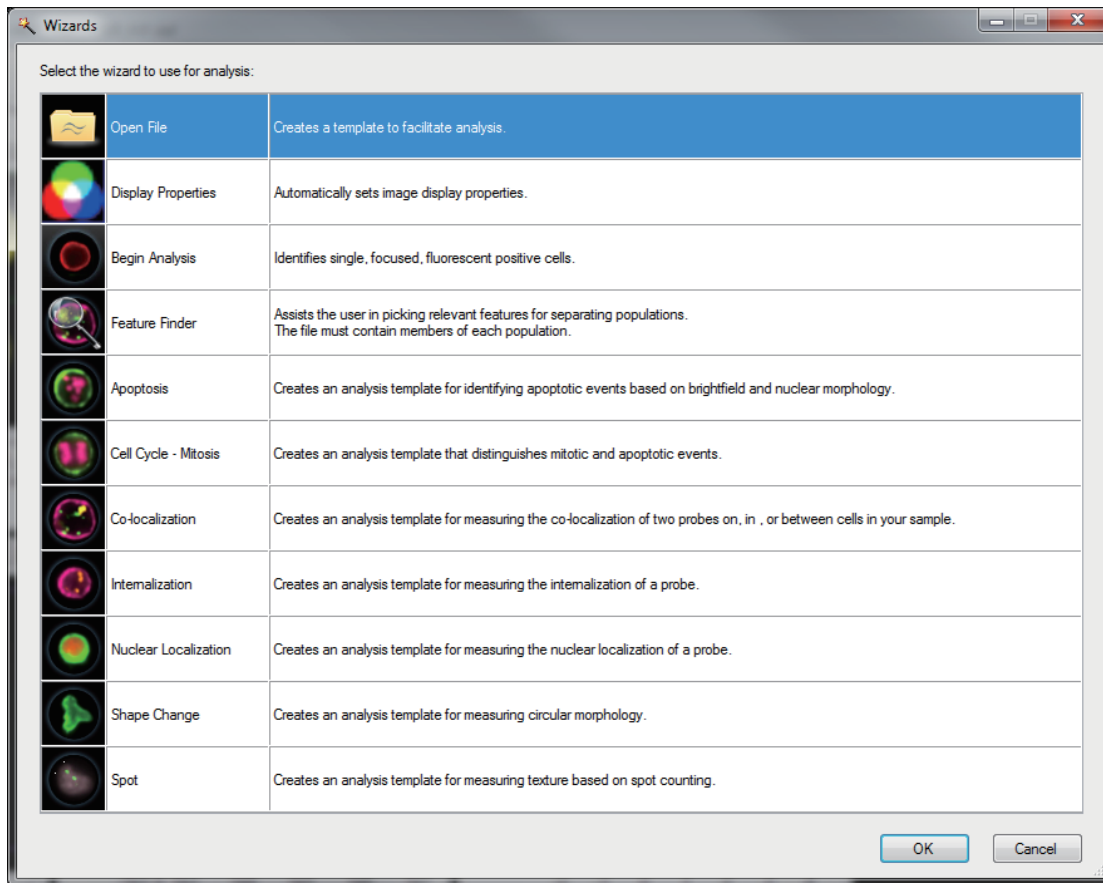
两个直方图叠加

比较对照和不同处理组样本直方图的结果

double positive , double positive



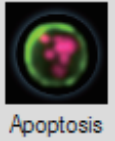
1. 分别分析好需要叠加的样本
2. 点击Tools,选择merge cif 文件,将需要比较样本的cif 文件合并成一个文件
3. 复制第一副图,细胞源头按住ctrl 选择需要比较的文件的所有细胞
4. 复制第二幅图,细胞源头按住ctrl 选择需要比较的文件的第一个门内细胞
5. 以此类推复制完所有的图
6. 鼠标右键点击最后一幅图,选择population,更改细胞源头的颜色
7. 鼠标右键点击最后一幅图,选择region,将Fill 中的√去掉



一般分析原则

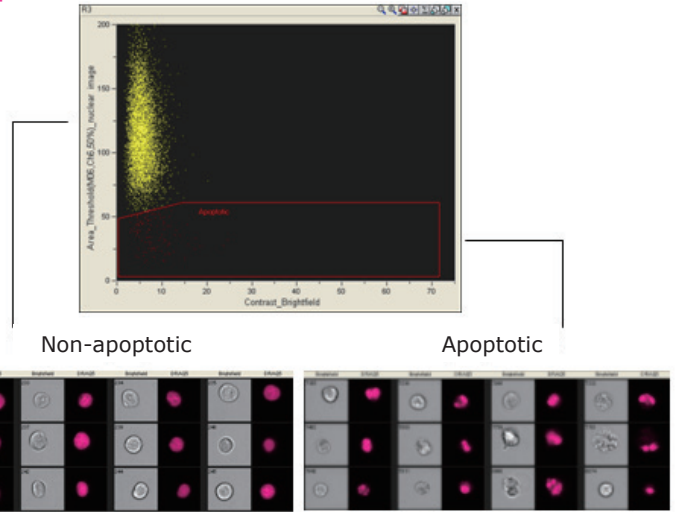
1. 选择分析相关荧光检测通道
2. 圈定对焦好的细胞: Gradient RMS 数值越大, 对焦效果越好
3. 圈定单细胞: Area 和 Aspect Ratio 的散点图中 Area 中等、Aspect Ratio 趋近于1 的细胞群
4. 选择亚细胞群
5. 界定发生某种生理现象的细胞群

细胞凋亡

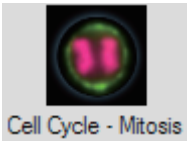


原理： 利用细胞核染色效果和细胞明场图像分析细胞凋亡事件

- 步骤：**
1. 选择细胞核染色通道
 2. 圈定对焦好的细胞: Gradient RMS 数值越大, 对焦效果越好
 3. 圈定单细胞: Area 和 Aspect Ratio 的散点图中 Area 中等、Aspect Ratio 趋近于1 的细胞群
 4. 选择亚细胞群: 如果没有可以跳过
 5. 圈定凋亡细胞: Brightfield Contrast 和 Area of Thresholded nucleus 的散点图中 Brightfield Contrast 数值高、Area of Thresholded nucleus 数值低的细胞群为凋亡细胞

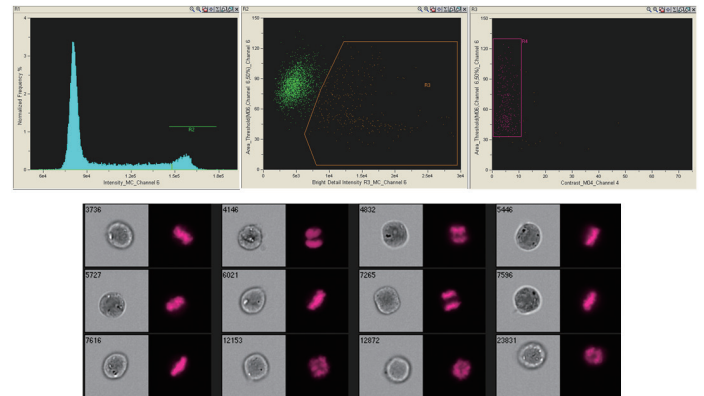


细胞周期和有丝分裂期

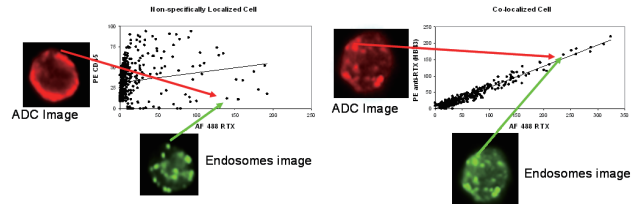


原理： 根据核酸结合量确定细胞周期, 根据细胞核染色形态确定有丝分裂期

- 步骤：**
1. 选择细胞核染色通道
 2. 圈定对焦好的细胞: Gradient RMS 数值越大, 对焦效果越好
 3. 圈定单细胞: Area 和 Aspect Ratio 的散点图中 Area 中等、Aspect Ratio 趋近于1 的细胞群
 4. 选择亚细胞群: 如果没有可以跳过
 5. 根据核酸结合量生成细胞周期直方图, 圈定G2/M
 6. 圈定DNA凝集的细胞: Threshold Area of Nucleus 和 Bright Detail Intensity of Nucleus 的散点图中 Threshold Area of Nucleus 数值较小、Bright Detail Intensity of Nucleus 数值较高的细胞群, 其中包含凋亡细胞, 可在下一步中除去
 7. 圈定有丝分裂期细胞: Brightfield Contrast 和 Area of Thresholded nucleus 的散点图中 Brightfield Contrast 数值低、Area of Thresholded nucleus 数值高的细胞群为有丝分裂期细胞

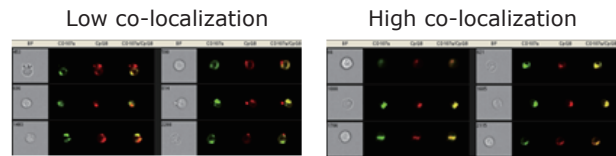
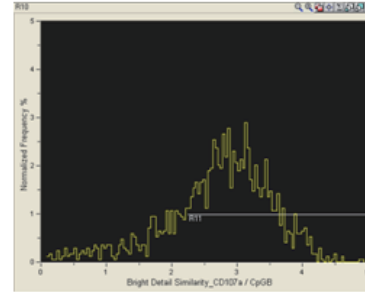


荧光信号共定位

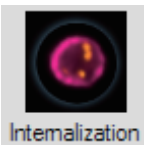


原理: 共定位参数Bright Detail Similarity, 衡量两种荧光信号探针分布位置的相似性

- 步骤:**
1. 选择两个需要比较的荧光探针所在检测通道
 2. 圈定对焦好的细胞: Gradient RMS 数值越大, 对焦效果越好
 3. 圈定单细胞: Area 和 Aspect Ratio 的散点图中 Area 中等、Aspect Ratio 趋近于1的细胞群
 4. 选择亚细胞群: 如果没有可以跳过
 5. 圈定双种荧光探针的阳性细胞群
 6. 界定发生共定位细胞群体: 共定位参数Bright Detail Similarity, 数值越高, 共定位程度越高

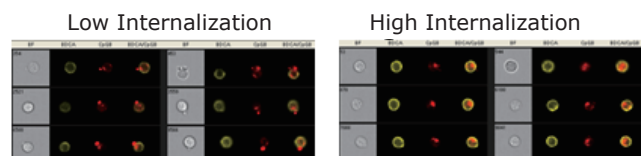
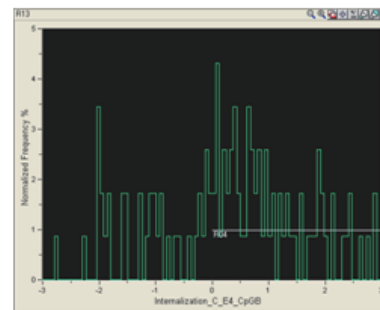


内化



原理: 分析病原体或者纳米颗粒等位于细胞膜内或外; 内化参数 Internalization, 计算细胞膜内荧光素的荧光强度

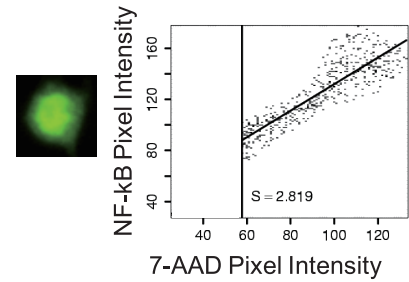
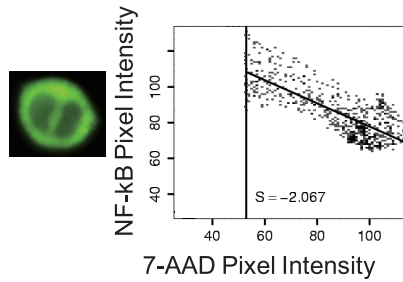
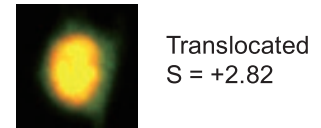
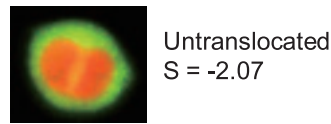
- 步骤:**
1. 选择内化现象相关检测通道: 细胞表面Marker 和内化荧光探针
 2. 圈定对焦好的细胞: Gradient RMS 数值越大, 对焦效果越好
 3. 圈定单细胞: Area 和 Aspect Ratio 的散点图中 Area 中等、Aspect Ratio 趋近于1 的细胞群
 4. 选择亚细胞群: 如果没有可以跳过
 5. 圈定内化荧光探针阳性细胞: Max Pixel of Internalizing probe 和 Intensity of Internalizing probe 散点图中二者参数比较大的细胞群
 6. 界定发生内化的细胞群体: 内化参数 Internalization, 数值越大, 内化程度越高



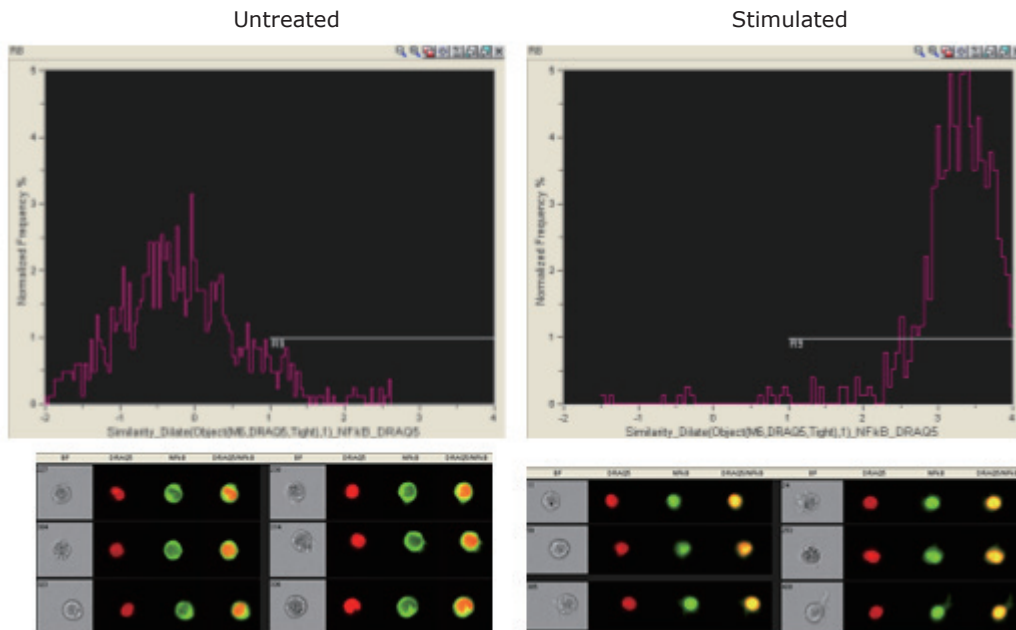
蛋白质核转位



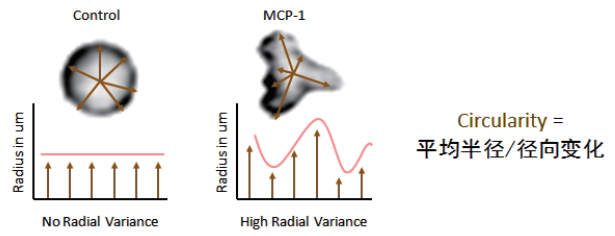
原理: 相似度参数similarity, 衡量蛋白质与细胞核的共定位程度



- 步骤:**
1. 选择转位相关检测通道: 蛋白质和细胞核检测通道
 2. 圈定对焦好的细胞: Gradient RMS 数值越大, 对焦效果越好
 3. 圈定单细胞: Area 和 Aspect Ratio 的散点图中 Area 中等、Aspect Ratio 趋近于1的细胞群
 4. 选择亚细胞群: 如果没有可以跳过
 5. 圈定双种荧光探针的阳性细胞群
 6. 界定发生核转位细胞群体: 相似度Similarity, 数值越高, 核转位程度越高

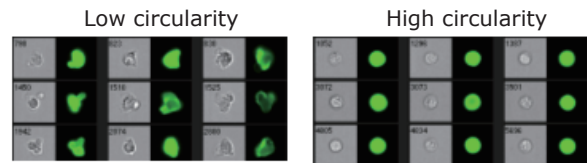
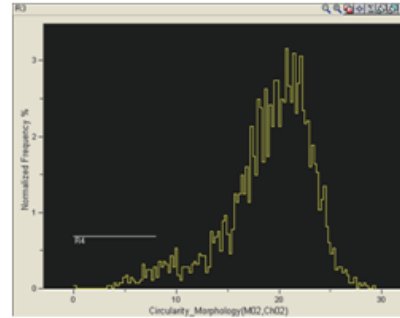


细胞形变

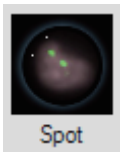


原理: 炎症因子诱导单核细胞形变, 进而发生迁移; 前体细胞向终末细胞分化, 发生形态变化; 利用圆度参数 circularity 衡量细胞的形状是圆形, 还是多边形

- 步骤:**
1. 选择形变检测通道
 2. 圈定对焦好的细胞: Gradient RMS 数值越大, 对焦效果越好
 3. 圈定单细胞: Area 和 Aspect Ratio 的散点图中 Area 中等、Aspect Ratio 趋近于1 的细胞群
 4. 选择亚细胞群: 如果没有可以跳过
 5. 圈定荧光探针的阳性细胞群
 6. 界定发生形变细胞群体: 圆度参数 circularity, 数值越低, 形变程度越高

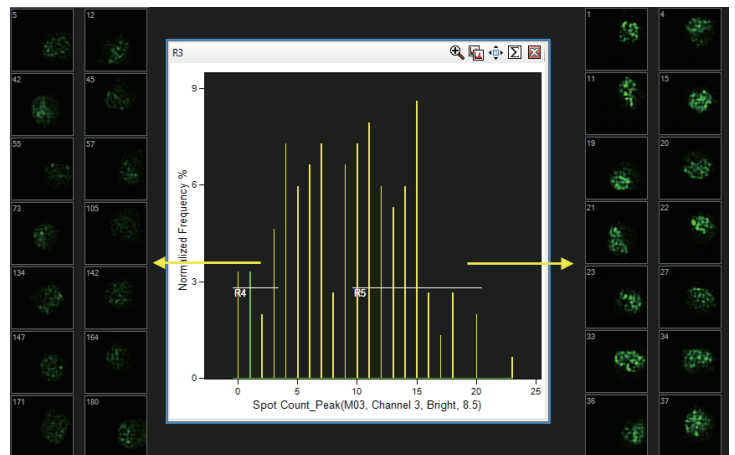


计点



原理: 自噬的程度; 免疫细胞吞噬病原体的个数; 肿瘤细胞吞噬抗癌药物的程度; 射线引起的DNA 损伤; 计点参数 spot count, 计算细胞内荧光素点的个数


- 步骤:**
1. 圈定对焦好的细胞: Gradient RMS 数值越大, 对焦效果越好
 2. 圈定单细胞: Area 和 Aspect Ratio 的散点图中 Area 中等、Aspect Ratio 趋近于1 的细胞群
 3. 选择亚细胞群: 如果没有可以跳过
 4. 选择荧光点所在检测通道
 5. 建立代表细胞库: 分别选择点多细胞和点少细胞的库, 给软件作为分析参考
 6. 界定点多和少的细胞群: 计点参数 spot count, 数值越高, 细胞内点越多

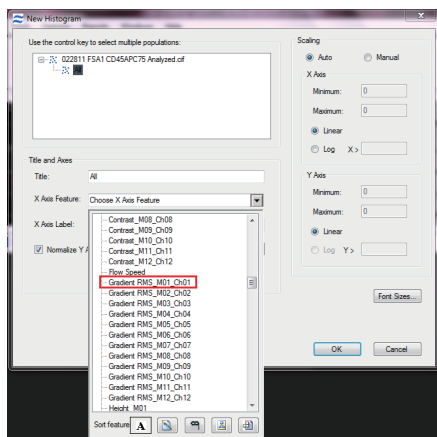


手动分析操作说明

一般分析原则

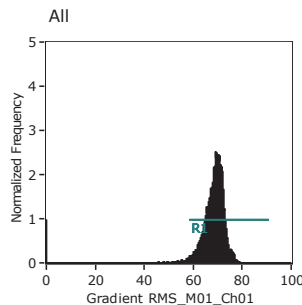
1. 圈定对焦好的细胞:

点击 , 细胞源为所有细胞All, X 轴参数选择 Ch 0 1 (明场) 的 Gradient




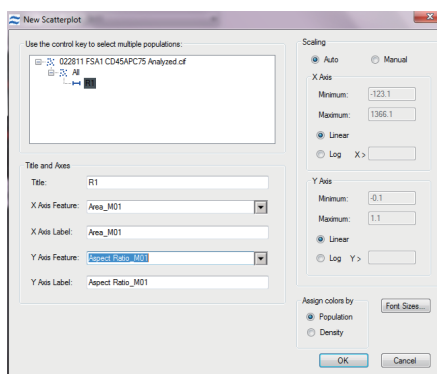
Gradient RMS 数值越大, 对焦效果越好:


点击 , 圈定对焦好的细胞

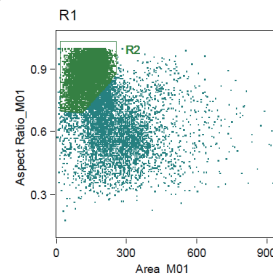


2. 圈定单细胞:

点击 , 细胞源头为聚焦好的细胞R1, X轴参数选择 Ch01 (明场) 的 Area, Y 轴参数选择 Ch01 (明场) 的 Aspect Ratio




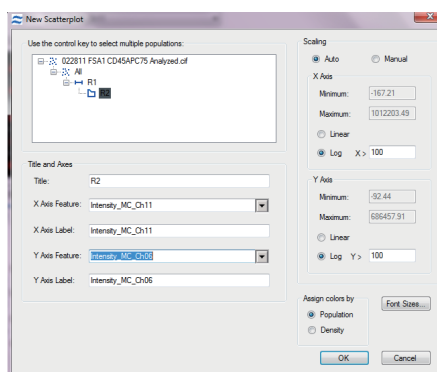
Area 和 Aspect Ratio 的散点图中 Area 中等、Aspect Ratio 趋近于1 的细胞群: 点击 , 圈定单细胞




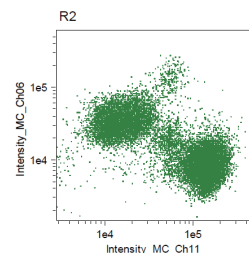
3. 在单细胞的范围内研究抗原表达或者核酸含量等生理现象: 添加直方图或者散点图

举例: 在单细胞的范围内分析外周血细胞CD45 的表达

点击 , 细胞源头为聚焦好的细胞R2, X 轴参数选择 Ch11 (CD45) 的 Intensity, Y 轴参数选择 Ch06 (暗场SSC) 的 Intensity



结果为: 可以按照需要添加多边形或者方形门  圈定细胞

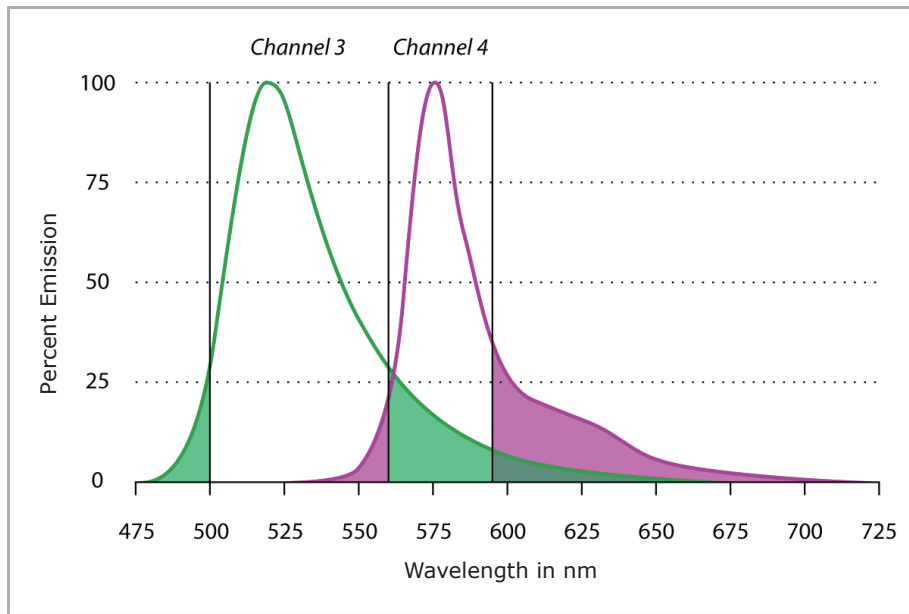


4. 以此类推, 完成所有分析, 点击File, 选择Save 保存daf 文件

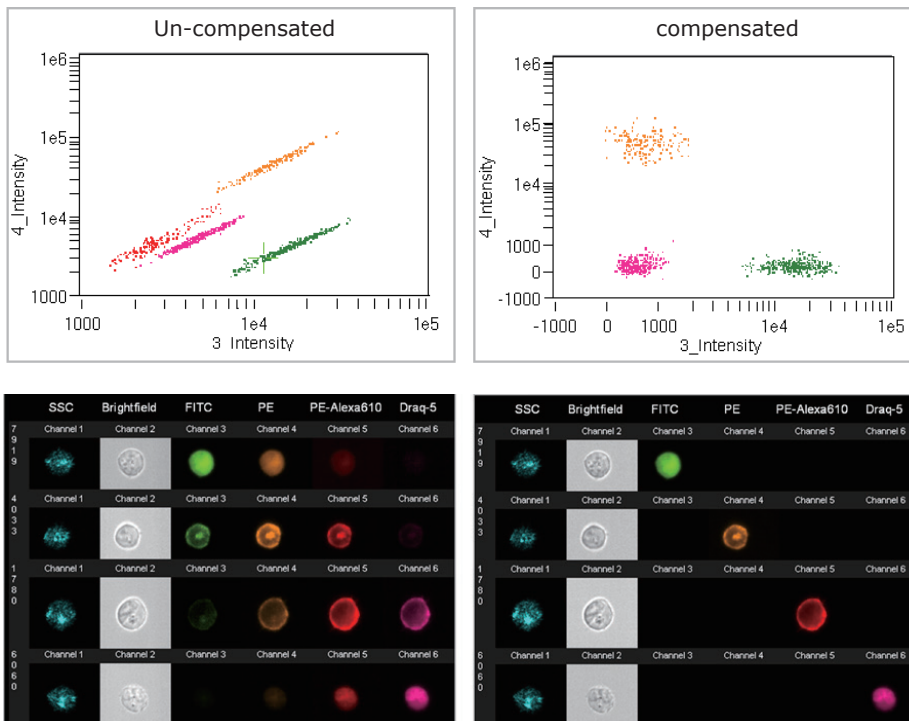
荧光补偿 (Compensation Matrix) 操作说明

荧光补偿

由于荧光素的激发或发射波长是正态或偏态曲线,即有很宽的范围,荧光素之间的光谱往往存在交叉或重叠现象。如图所示发射波长之间就有相互重叠的部分,这样当使用这两种荧光素时,每个荧光素在两个检测通道上都会有信号,为了排除这种影响,需要补偿排除这部分。



反应在实验数据结果上,未补偿和补偿后的结果如下图所示:



在线荧光补偿:

1. 在使用INSPIRE 获取数据时,点击Compensation,选择Create Matrix,即可在引导之下,获取单阳性样本数据、生成荧光补偿文件
2. 后续样本获取时,点击Compensation,选择Load Matrix,此时的成像和流式图为荧光补偿后的效果。

离线荧光补偿:


🔗 单阳性样本数据获取

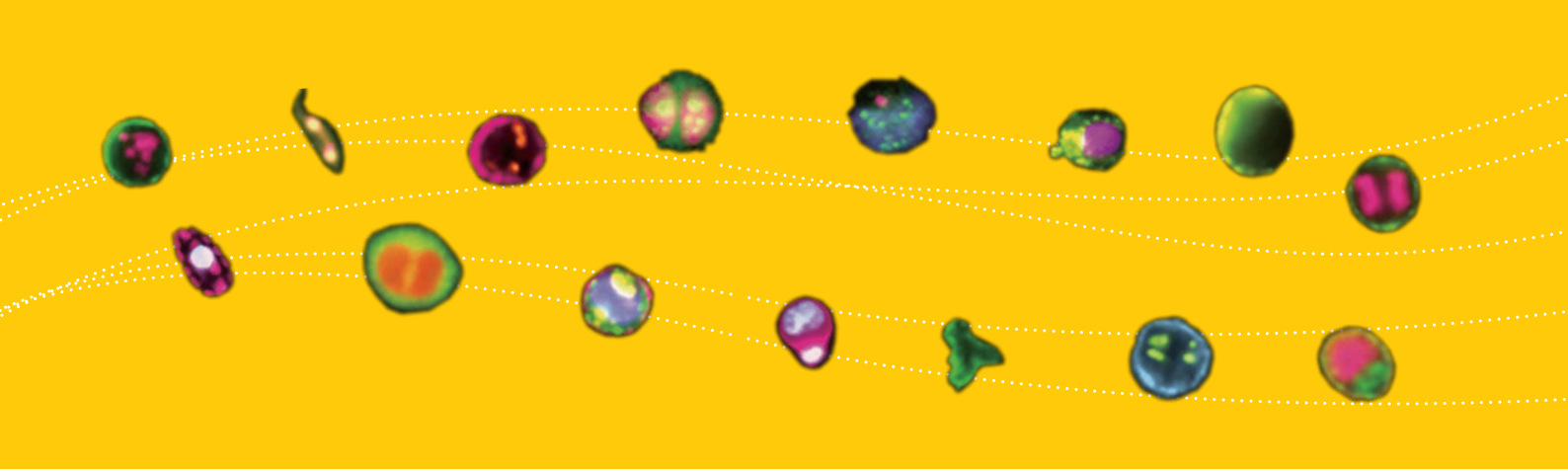
1. 所有激光器和检测通道都要打开,关闭明场和785 nm 激光器
2. 获取单阳性细胞数为500-1000
3. 生成文件会有noBF 的后缀

🔗 荧光补偿文件生成

1. 双击rif文件,点击New Matrix;或者点击IDEAS®,在Compensation 中选择Create New Matrix
2. 点击Add Files,选择带有noBF 后缀的单阳性文件,点击Next
3. 验证荧光补偿涉及到的检测通道,点击Next
4. 软件自动生成Compensation Matrix,如果Matrix 数值的误差大于1即会显示红色
5. 调整被标红色的Matrix 数值:
 - 1) 双击红色的数值,Matrix Coefficient Intensity Plot 出现
 - 2) 如果绿色的线和细胞点分布趋势不一致的话,点击Add Graph to Analysis Area
 - 3) 画门、去除离群的细胞
 - 4) 在Positive Control Populations 中选择重新圈定的细胞群,荧光补偿文件会自动重新计算
6. 图像验证荧光补偿效果
 - 1) 点击Preview Images,选择不同荧光素的代表细胞图片
 - 2) 如果荧光补偿通道的细胞图片出现黑色细胞区域,说明补偿过度,应该减小Matrix数值;如果荧光补偿通道的细胞图片有非常亮的细胞区域,说明补偿不足,应该增加Matrix数值
 - 3) 重复6-2)步,直到荧光补偿通道的细胞图片和背景接近
 - 4) 点击Finish,保存荧光补偿文件

🔗 高级荧光补偿

1. 生成荧光补偿代表细胞库Training Data Set
 - 1) 打开补偿不理想的样本文件
 - 2) 点击,选择具有代表性的细胞,包括没有染上的细胞以及荧光强度图中各种染色强度的细胞
 - 3) 点击Tools,选择Create Data Files From Population,生成代表细胞库
2. 调整条件、生成荧光补偿模板Compensation Template
 - 1) 点击,将每个通道调整到0-100
 - 2) 点击,横纵坐标分别选择相邻通道的Raw Max Pixel
 - 3) 圈出非荧光饱和区域,即Raw Max Pixel 为0-4095
 - 4) 点击,细胞范围为3)圈定的非荧光饱和区域,横纵坐标分别选择相邻通道的Intensity
 - 5) 点击File 中的Save as Template
3. 打开第1 步生成的Training Data Set,以第2 步编辑的Compensation Template 为数据分析模板,使用最初不理想的荧光补偿文件
4. 以点图和细胞图像为参考,验证Matrix 数值是否合理
 - 1) 补偿不足
点图:相邻通道荧光强度呈对角线上行分布
细胞图像:荧光补偿通道有非常清晰的荧光镜像图像
 - 2) 补偿过度
点图:相邻通道荧光强度呈对角线下行分布
细胞图像:真正荧光检测通道中的荧光区域在荧光补偿通道相应区域上为黑色
5. 点击Compensation,选择View Edit Matrix
6. 按照第4 步的标准更改Matrix 数值,点击Save
7. 打开第1 步生成的Training Data Set,以第2 步编辑的Compensation Template 为数据分析模板,使用第6 步新生成的荧光补偿文件
8. 重复第4-7 步,直至补偿到最佳效果,保存最终的荧光补偿文件



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /



Amnis®
量化成像分析流式细胞仪



SMC™ Erenna®
单分子免疫检测平台



Guava® easyCyte系列
微毛细管细胞分析平台



Muse™ 智能触控细胞分析仪



订购及技术支持：

请致电：400 889 1988

或者访问：www.merckmillipore.com/offices

技术服务请访问：www.merckmillipore.com/techservice

上海
上海市浦东新区张江高科
晨晖路88号二号楼2楼
电话：(021)20338288
传真：(021)50803042
邮编：201203

北京
北京市朝阳区曙光西里甲5号
凤凰置地广场A座写字楼18层
电话：(010)59898600
传真：(010)57623560
邮编：100035

广州
广州市黄埔大道西638号
富力科讯大厦803A室
电话：(020) 37883048
传真：(020) 37883072
邮编：510627

成都
成都市锦江区东大街芷泉街
东方广场C座11楼7号
电话：(028)85288550
传真：(028)85288553
邮编：610061

本资料中所有内容（包括但不限于产品图片、公司logo等）为德国默克集团所有，未经允许，任何人或实体不得擅自使用或转载。

更多详情，敬请登陆：www.merckmillipore.com 技术服务电话：400 889 1988 中国技术服务中心：asiatechserv@merckgroup.com

20160727Amnis instruction