



MANUAL DE USO DEL FACSCanto 111 (FACSDiVA 6.1.2)



*Servicio de Citometría de Flujo (S.C.F.)
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa
Universidad Autónoma de Madrid. Cantoblanco.
28049. Madrid. Spain.
Tlf. 34-91 196 4499/4526
E-mail. citometria@cbm.uam.es*

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. GUÍA RÁPIDA de MANEJO del FACSCanto II ADQUISICIÓN DE MUESTRAS (sin HTS) | 4 |
| 1.1. Encender el equipo | 4 |
| 1.2 .Abrir o crear un <i>Experiment</i> | 5 |
| 1.3. Introducir los tubos y adquisición de muestras | 8 |
| 1.3.1 ¿Qué hacer si el citómetro no detecta eventos detecta menos o de forma irregular? | 10 |
| 1.4. Limpieza del citómetro | 11 |
| 1.5. Apagado del citómetro | 11 |
| 2. GUÍA RÁPIDA de MANEJO del FACSCanto II ADQUISICIÓN DE MUESTRAS CON EL CARGADOR DE PLACA (HTS) | 13 |
| 2.1. Encender el equipo | 13 |
| 2.2. Abrir o crear un <i>Experiment</i> | 14 |
| 2.2.1 Ajustar los <i>loading settings</i> | 17 |
| 2.3. Limpieza del citómetro | 19 |
| 2.4. Apagado del citómetro | 19 |
| 3. ANEXOS DE UTILIDAD | |
| 3.1. Instrucciones básicas para crear tu planilla | 21 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2. Importar y exportar archivos ----- | 23 |
| 3.3. Compensación automática----- | 24 |
| 3.4. Abrir archivos 3.0 del Diva con el flowjo ----- | 25 |

1. GUÍA de MANEJO del FACSCanto II ADQUISICIÓN DE MUESTRAS (sin HTS)




1.1. Encender el equipo

- Encender el equipo: **botón verde** en el lateral izquierdo del aparato
- Encender el ordenador de adquisición:

USER: Administrator
PASSWORD: BDIS

- Doble clic en el icono del  software FACSDIVA 6.1.2
- Aparece la ventana **Log In** de control de uso:



- Selecciona tu nombre de usuario (*User Name*) de la lista e introduce tu contraseña (la misma que usas para los caliburs).
- Fijarse en el margen inferior derecho de la pantalla el donde aparece el status bar:
Tarda unos segundos en los que pone “*connecting cytometer*”, una vez conectado aparece  en el status bar.
- Fijarse en los niveles de fluidos, en la parte inferior derecha de la ventana Cytometer . El orden es *Facsflow*, *waste*, solución de lavado 1 y solución de lavado 2 , vaciad o sustituid el fluido correspondiente. La solución de lavado 1 es agua destilada (botellas de 2 litros junto al FACSDIVA) y la solución 2 es Clean.
- Hacer un “**fluidics startup**”: ir en el menú de la barra superior del software a *cytometer* => *fluidics Startup*, sale una ventana en la que te advierte que el acoplador de placa no está conectado le das a aceptar, sale una segunda ventana en la que te indica el tiempo que dura, **7 minutos**: hacer clic en OK y esperar hasta que termine. En el *status bar* aparecerá finalmente

El citómetro está listo para ser utilizado

1. 2. Abrir o crear un *Experiment*

- Selecciona tu carpeta de usuario o crea una si no la tienes:
- Pincha el icono “carpeta” de la barra de herramientas del *browser* antes del experimento. Dentro aparecerán los “experiments de referencia” con los que trabajas más habitualmente.

RECUERDA TENER COPIAS DE SEGURIDAD DE LA INFORMACIÓN DEL BROWSER

RECUERDA QUE NO SE PUEDEN TENER DATOS EN LOS EXPERIMENTOS DEL BROWSER, ESTOS DEBEN SER EXPORTADOS Y ELIMINADOS DEL BROWSER

- Selecciona el EXPERIMENT del *browser* adecuado para las muestras que vas a pasar:
- **ÁBRIR** el “*experiment*” directamente si lo tienes en el *browser* haciendo doble clic, se mostrará el contenido: haz una copia si quieres mantener el original y modifícala o adáptala a las muestras que vas a pasar hoy, crea tubos, modifica las condiciones de adquisición, las planillas...

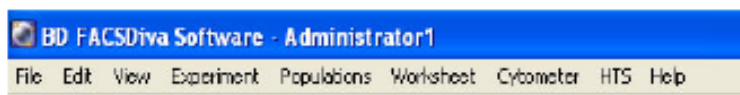
Todo aquello que modifiques de un experimento será automáticamente guardado cuando cierres el software o salgas de tu sesión, SI QUIERES MANTENER EL ORIGINAL HAS DE DUPLICAR EL EXPERIMENTO y CAMBIARLE EL NOMBRE O EXPORTARLO, Y ENTONCES MODIFICAR EL EXPERIMENT.

Los *Experiments* aparecen en el *browser* con el icono de un libro, para abrirlo hacer doble clic y el icono será el de un libro abierto, para cerrarlo volver a hacer doble clic y el icono será el de un libro cerrado. **ÚNICAMENTE SE PUEDE TENER UN EXPERIMENTO ABIERTO A LA VEZ.**

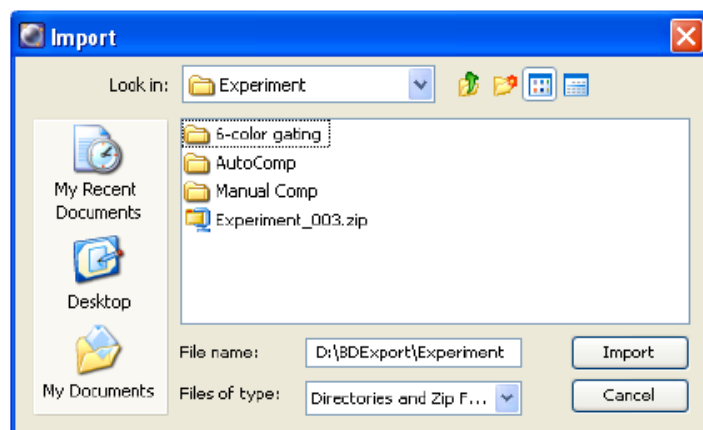


- **IMPORTAR** si no está el experimento de interés en el browser: seleccionar



File >import >experiment



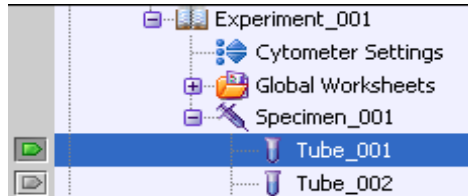
Selecciónalo de la carpeta *Experiments and settings* del escritorio e impórtalo



Añade al experimento el *specimen* (por ejemplo fecha) y las muestras o *tubes* que vas a adquirir ese día(se debe realizar la estructura antes de adquirir datos).

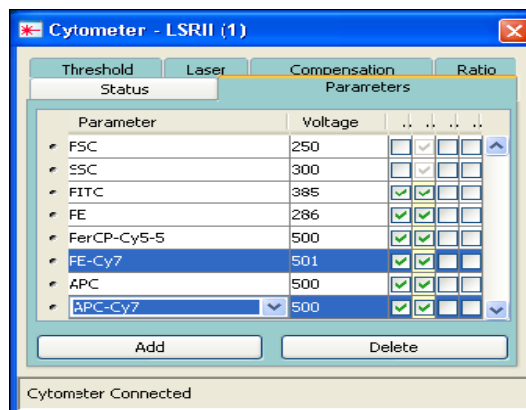
- Clic en el botón *New Specimen*  para añadir un grupo de muestras al experimento. Por defecto, se crea con una muestra.
- Clic en el botón *New Tube*  para añadir muestras, puedes nombrarlas todas antes de la adquisición.

- Clic en el icono del *browser* para seleccionar la muestra que se va a analizar en ese momento, para la que se van a mostrar los datos de adquisición y en la que se van a ajustar los *settings*. El icono se vuelve de color verde y aparecen 5 pestañas verdes en la ventana *Cytometer* (esta ventana sólo está activa y visible si está conectado y encendido el citómetro).

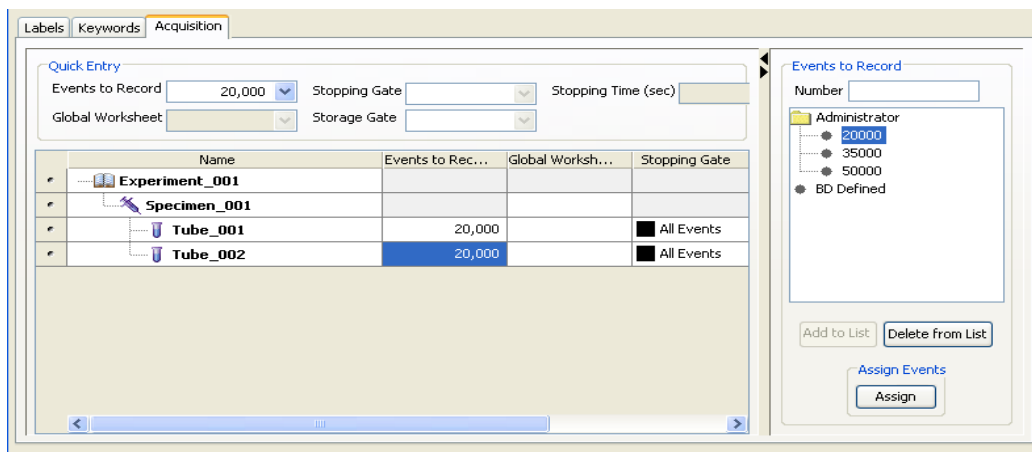
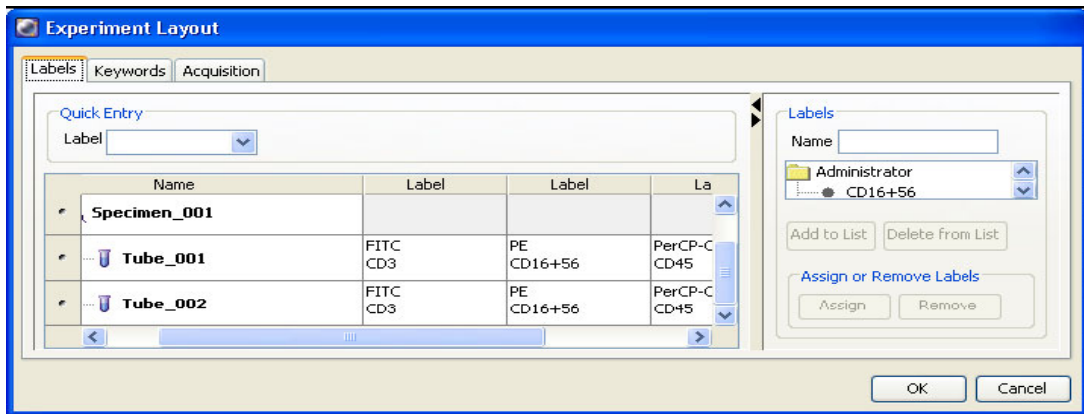


- Clic en la pestaña *Parameters* de la ventana *Cytometer*. Aquí se eliminan los parámetros que no se vayan a utilizar, seleccionando la fila y pulsando el botón *Delete*. Te has de poner sobre un tubo para activar completamente esta ventana.


VERIFICA QUE LOS SETTINGS SON LOS QUE TE INTERESAN EN LA VENTANA DEL CYTOMETER PONIÉNDOTE ENCIMA DE LOS CYTOMETER SETTINGS



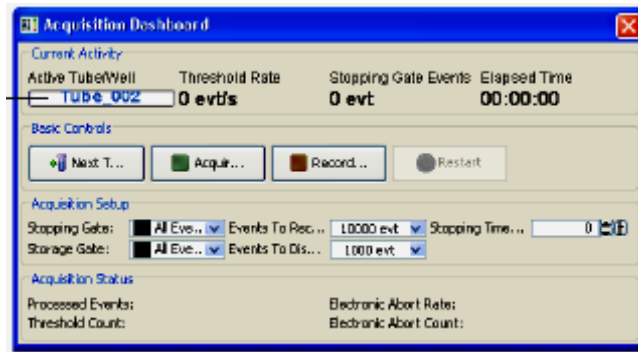
- Al seleccionar la muestra o *Tube*, el inspector nos permite editar diferentes parámetros de ese tubo. Selecciona cada una de las pestañas para ver las distintas opciones de la muestra en curso.
- Selecciona en el menú *Experiment* ⇒ *Experiment Layout* para establecer los nombres o *labels* de cada parámetro y los eventos que se van a grabar de cada tubo en *acquisition* (existe la opción de copiar y pegar).

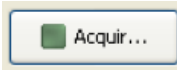


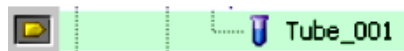
1.3. Introducir los tubos y adquisición de muestras


- Girar el soporte metálico de la parte inferior del SIP (*sample injection port*) **¡¡OJO SOLO GIRA HACIA EL LADO IZQUIERDO!!** Inserta primero un tubo de clean en el SIP encajando la parte superior del tubo al citómetro, el tubo queda suspendido en el aire: ir a la opción Cytometer de la barra de menú, en *Cleaning modes* seleccionar **clean flow cel**.
- Seleccionar el tubo que nos interesa pasar en el *browser* o hacer clic en el botón *next tube*  de la ventana *acquisition dashboard* hasta llegar al tubo deseado (el puntero se pone de color verde).

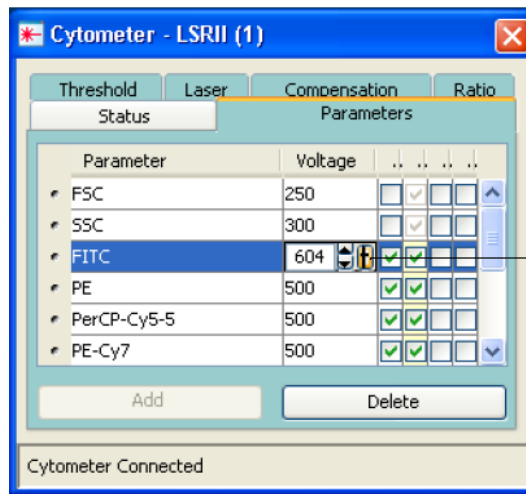







- Hacer clic en *acquire* , equivale al modo *setup* del calibr (el puntero se pone de color amarillo durante la adquisición)




- Ajustar los settings seleccionar la ventana del *cytometer* , seleccionar la pestaña de *parameters* y modificarlos si fuera necesario.



- Para modificar los *settings*, hacer clic encima del voltaje y los puedes modificar de varias maneras :
 - 1.- Tecleando un valor directamente
 - 2.- Haciendo clic en los cursores  que aparecen
 - 3.-Arrastrando el puntero de la barra que aparece a la derecha del número  cuando está seleccionado.
- Para modificar el *threshold* seleccionar la pestaña correspondiente en la ventana *cytometer*. La escala es de 5 décadas logarítmicas reales por lo

- Para modificar las compensaciones seleccionar la pestaña *compensation* de la ventana *cytometer* y se modifica igual que los apartados anteriores
- Una vez verificados y/o ajustados (ver siguiente apartado) los *settings* de la muestra **si haces clic en record**  , **los datos son guardados (el puntero se pone de color naranja durante la grabación)**



- Una vez guardados los datos el puntero se pone verde de nuevo y aparece un diskette negro junto al tubo guardado  .
- Para pasar a la siguiente muestra hacer clic en *next tube* en el *acquisition dashboard* o seleccionar con el ratón la flecha a la izquierda del tubo que se quiere pasar en el browser, si no lo haces te dirá que ese tubo ya existe y que si quieres sobrescribir los datos *overwrite* o bien adjuntarlos al mismo fichero: *append*.
- Una vez adquirido el tubo, el citómetro automáticamente, deja libre el tubo DURANTE UNOS SEGUNDOS para ser retirado, al retirarlo automáticamente suelta una pequeña cantidad de líquido que se absorbe por el brazo metálico del propio citómetro (lavado entre muestra y muestra). Hasta que no acaba este proceso no se puede meter el siguiente tubo.
- Si el tubo no es extraído se abre un mensaje en el software que te pregunta si hay que volver a adquirir o si quieres quitar la muestra: hacer clic donde proceda.

1.3.1 ¿QUÉ HACER SI EL CITÓMETRO NO DETECTA EVENTOS, DETECTA MENOS O DE FORMA IRREGULAR?

- **SE HA ATASCADO:**

PROTOCOLO DE ACTUACIÓN EN CASO DE ATASCO: Si durante la adquisición deja de pasar la muestra o pasa más lentamente detén la adquisición del tubo inmediatamente, quítalo, espera a que el citómetro se limpie,

- seleccionas en la barra del menú del software *cytometer=>cleaning modes=>de-gas flow cell*, posteriormente pasas *clean* un par de minutos y agua otro par.

- Si sigue atascado pones un tubo con clean y te vas a *cytometer*=>*cleaning modes*=>*clean flow cell*
- Si persiste el atasco *cytometer*=>*cleaning modes*=>*Bubble filter purge and degass*
- Al final de la adquisición hacer lavado largo. Si los problemas persisten filtrar las muestras para continuar adquiriéndolas

- **AIRE EN LOS FILTROS DE FLUIDOS:**

EN CASO DE QUE NO PASE MUESTRA, PUEDE SER NECESARIO REALIZAR UN PURGADO DE LOS FILTROS: Con los guantes puestos coger papel absorbente, rodear el filtro a purgar con bastante papel, quitar el tapón dejar salir todo el aire y cuando empiece a salir líquido volver a tapar; el filtro de la izquierda es *sheath* el del medio *clean* (OJO TIENE LEJÍA) y el de la derecha agua.

1. 4. Limpieza del citómetro

- En el browser encontrarás en *shared experiments* un experimento que recibe el nombre de lavado corto y otro que recibe el nombre de lavado largo.
- En cualquier caso primero poner un tubo de clean en el citómetro, ir a la opción *Cytometer* de la barra de menú, en *Cleaning modes* seleccionar ***clean flow cell*** dar a OK, una vez finalizado repetir una vez más.
- Si no eres el último usuario del día y no has pasado muestras problemáticas haz el lavado corto: dos tubos 5 min *clean* y 5 min con agua. **NO DEBEN PASAR MÁS DE 2000 eventos a velocidad máxima (high)** en estas condiciones, si no es así se debe proceder al lavado largo.
- Si eres el último usuario del día o has pasado muestras problemáticas haz el lavado largo: tres tubos 5 min *clean*, 5 min con *rinse* y 5 min de agua. **NO DEBEN PASAR MÁS DE 2000 eventos a velocidad máxima (high)** en estas condiciones, si no es así continuad lavando.

1.5. Apagado del citómetro

- Comprobar en el sistema de reservas si hay un usuario antes de una hora
- **SÍ HAY UN USUARIO** antes de 1 hora, únicamente después de lavar:
 1. Confirma esa reserva.
 2. **EXPORTA TUS DATOS Y/O EXPERIMENTO AL ORDENADOR DE ADQUISICIÓN** (barra del menú *File*=> *export FCS*), y guárdalos en

tu carpeta personal dentro de la carpeta **Data analysis** directamente compartida con ordenador de ANÁLISIS.

3. Sal del DiVa o de tu sesión de DiVa

IMPORTANTE: ES OBLIGATORIO ELIMINAR TUS DATOS DEL BROWSER ANTES DE UNA SEMANA PARA EVITAR PROBLEMAS DE SATURACIÓN Y EXPORTA TODA LA INFORMACIÓN QUE CONSIDERES IMPORTANTE CONSERVAR (experimentos, settings, etc ...)

- **NO HAY UN USUARIO** antes de 1 hora, después de lavar proceder a:
 1. **EXPORTA TUS DATOS*** (File=> export FCS), y guárdalos directamente EN ORDENADOR DE ANÁLISIS seleccionando tu carpeta personal que se encuentra dentro de la carpeta de tu laboratorio que hay en la carpeta *Data analysis* del escritorio. Esta carpeta puede verse desde ambos ordenadores). Comprueba que se han exportado bien cópialos en la carpeta DATOS USUARIOS del ordenador de análisis y/o en la cripta y **ELÍMINALOS DEL BROWSER**. Si el experiment que has modificado te interesa por la planilla o los settings duplica el experimento sin datos en el browser, ponle el nombre correspondiente y expórtala a tu carpeta experiments. Recuerda que este archivo incluye los settings pero también puedes exportarte los settings aparte (ver anexo 2)
 2. Hacer un **fluidics shutdown** en el menú *cytometer* => *fluidics shutdown*. Sale una ventana de aviso, darle a ok y esperar 5 min hasta que finalice el proceso.
 3. Salir del software
 4. Apagar el ordenador
 5. Apagar el citómetro (botón verde lateral izquierdo)

***el Servicio de Citometria no se hace responsable de la pérdida de datos de los usuarios, estos son los responsables de copiar sus archivos en el lugar que corresponde así como de hacer copias de seguridad de sus**

2. GUÍA RÁPIDA de MANEJO del FACSCanto II ADQUISICIÓN DE MUESTRAS CON EL CARGADOR DE PLACA (HTS)

Si es la primera vez que se va a usar el cargador de placa es **OBLIGATORIO** pedir ayuda al personal del Servicio

Se recuerda que **NO TODAS LAS PLACAS** de 96 pocillos son compatibles con el cargador de placas del equipo. El Servicio dispone de las placas compatibles con el equipo que puede suministraros.


2.1. Encender el equipo



- Encender el equipo: **botón verde** en el lateral izquierdo del aparato
- Encender el ordenador de adquisición:

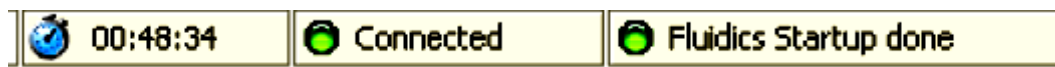
USER: Administrator
PASSWORD: BDIS

- Doble clic en el icono del  software FACSDIVA 6.1.2
- Aparece la ventana **Log In** de control de uso:



- Selecciona tu nombre de usuario (*User Name*) de la lista e introduce tu contraseña (la misma que usas para los caliburs).
- Fijarse en el margen inferior derecho de la pantalla el donde aparece el status bar:
Tarda unos segundos en los que pone "connecting cytometer", una vez conectado aparece  en el status bar.

- Fijarse en los niveles de fluidos, en la parte inferior derecha de la ventana Cytometer . El orden es Facsflow, waste, solución de lavado 1 y solución de lavado 2 , vaciad o sustituid el fluido correspondiente. La solución de lavado 1 es agua destilada (shutdown solution) y la solución 2 es Clean.
- Hacer un “**fluidics startup**”: ir en el menú de la barra superior del software a *cytometer* => *fluidics Startup*, sale una ventana en la que te advierte que el acoplador de placa no está conectado le das a aceptar, sale una segunda ventana en la que te indica el tiempo que dura, **7 minutos**: hacer clic en OK y esperar hasta que termine. En el *status bar* aparecerá finalmente



El citómetro está listo para ser utilizado

En el caso que se quiera utilizar el HTS directamente (los controles para ajustar los settings se pueden pasar en tubo y posteriormente montar el acoplador de placa el SIT). En caso de pasar los controles en placa se puede montar el acoplador de placa antes de empezar el *fluidics start up* **(el cambio de tubo a placa y viceversa será supervisado por el personal del servicio hasta que el usuario se maneje solo)**

2.2. Abrir o crear un Experiment

- Selecciona tu carpeta de usuario o crea una si no la tienes:
- Pincha el icono “carpeta” de la barra de herramientas del browser antes del experimento. Dentro aparecerán los “experiments de referencia” con los que trabajas más habitualmente.

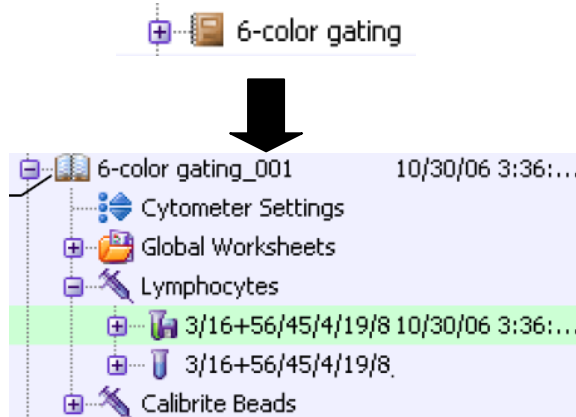
RECUERDA TENER COPIAS DE SEGURIDAD DE LA INFORMACIÓN DEL BROWSER

RECUERDA QUE NO SE PUEDEN TENER DATOS EN LOS EXPERIMENTOS DEL BROWSER, ESTOS DEBEN SER EXPORTADOS Y ELIMINADOS DEL BROWSER

- Selecciona el EXPERIMENT del *browser* adecuado para las muestras que vas a pasar:
- **ABRIR** el “*experiment*” directamente si lo tienes en el *browser* haciendo doble clic, se mostrará el contenido: haz una copia si quieres mantener el original y modifícala o adáptalo a las muestras

Todo aquello que modifiques de un experimento será automáticamente guardado cuando cierres el software o salgas de tu sesión, SI QUIERES MANTENER EL ORIGINAL HAS DE DUPLICAR EL EXPERIMENTO y CAMBIARLE EL NOMBRE O EXPORTARLO, Y ENTONCES MODIFICAR EL EXPERIMENT.

Los *Experiments* aparecen en el *browser* con el icono de un libro, para abrirlo hacer doble clic y el icono será el de un libro abierto, para cerrarlo volver a hacer doble clic y el icono será el de un libro cerrado. **ÚNICAMENTE SE PUEDE TENER UN EXPERIMENTO ABIERTO A LA VEZ.**

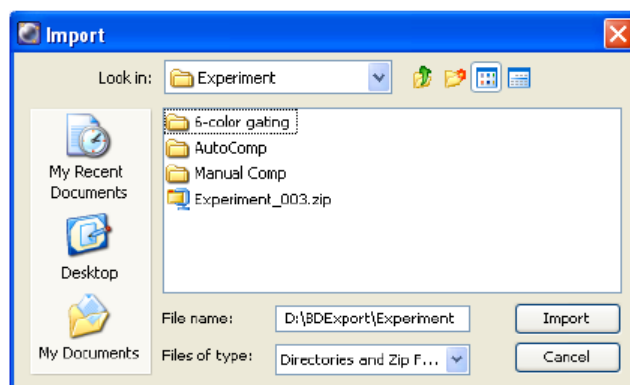


- **IMPORTAR** si no está el experimento de interés en el browser: seleccionar

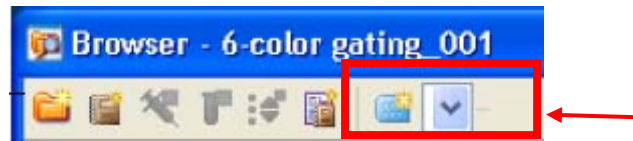
File >import >experiment



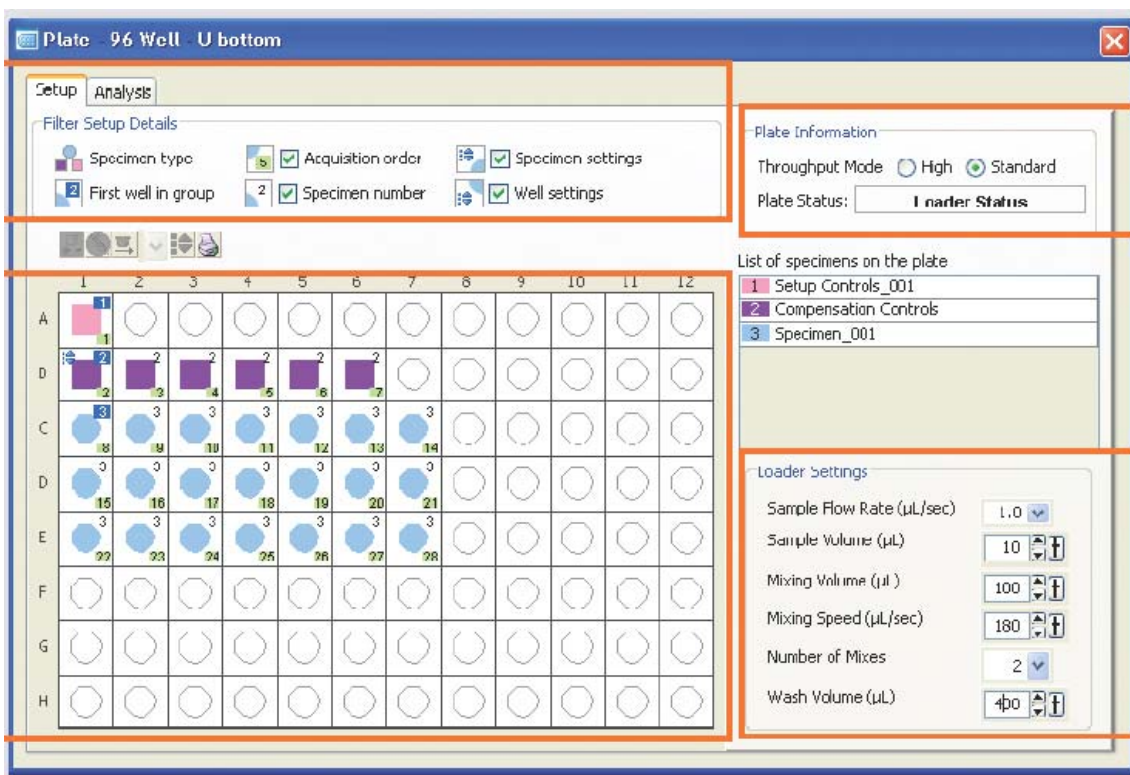
Seleccióvalo de la carpeta *Experiments and settings* del escritorio e impórtalo






Una vez abierto el experimento de interés selecciona en el browser el tipo de placa que vas a utilizar (fondo plano, U ó V)



Se añadirá al experimento el icono de una placa. Hacer doble clic en la placa, se abrirá una ventana como la que se muestra a continuación



- Con el ratón puedes seleccionar los pocillos que quieras y en la parte superior izquierda el tipo de muestra que irá en esos pocillos determinados (setup control : para ajustar voltajes; compensation controls : para hacer la compensación automática en placa y specimen : las muestras propiamente dichas).
- Verificar en *plate information* que el *throughput mode* está en modo standard para poder ajustar los *loading settings*

2.2.1 Ajustar los *loading settings*

- Ajustar los loading settings (ver figura adjunta) en función de las células que quieras analizar, la concentración a la que las tengas y la velocidad a la que las puedas pasar: es **importante minimizar el arrastre* entre muestra y muestra**, verificarlo antes de fijar definitivamente las condiciones. Se ajustan solo los pocillos seleccionados, verifica que son los correctos.
- Para ajustar los settings hay que tener en cuenta que hay un volumen muerto de 20 μL del circuito y el de la placa por lo que el *sample volume* deberá tener esto en cuenta.

Figura LOADING SETTINGS

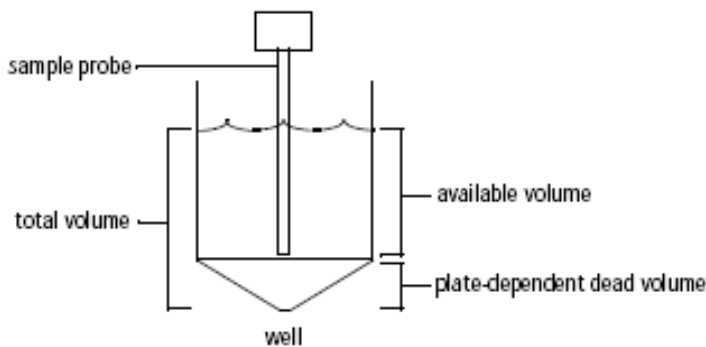


Table 1-3 Volume Type

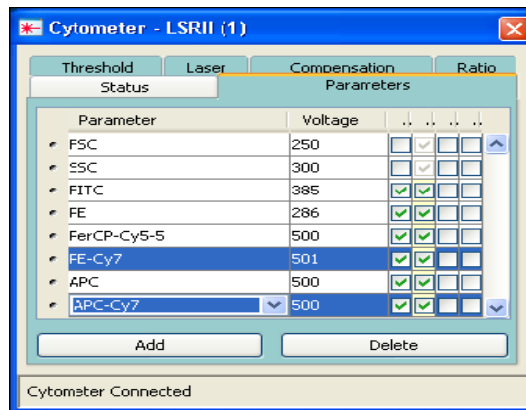
| Volume Type | Definition |
|-------------------------|--|
| Well volume | Volume that well can hold filled to the brim |
| Total volume | Volume pipetted into well minus aspirated excess volume |
| Aspirated excess volume | Standard mode = 20 μL |
| Available volume | Volume pipetted into well minus aspirated excess volume minus dead volume |
| Minimum volume | 50 μL for both standard and high-throughput modes for 96-well plates |
| Mixing volume | Volume one-half the available volume |
| | NOTICE A mixing volume that is larger than the available volume introduces air bubbles into the sample. |

El riesgo de arrastre aumenta:

- **Cuanto mayor es el volumen de muestra.**
- **Cuanto mayor es el volumen de mezcla.**
- **Cuanto mayor es la velocidad de mezcla.**
- **Cuanto menor es el volumen de lavado.**

- Clic en la pestaña *Parameters* de la ventana *Cytometer*. Aquí se eliminan los parámetros que no se vayan a utilizar, seleccionando la fila y pulsando el botón *Delete*. Te has de poner sobre un tubo para activar completamente esta ventana.

VERIFICA QUE LOS SETTINGS SON LOS QUE TE INTERESAN EN LA VENTANA DEL CYTOMETER PONIÉNDOTE ENCIMA DE LOS CYTOMETER SETTINGS



- Al seleccionar la muestra o *well*, el inspector nos permite editar diferentes parámetros de ese tubo. Selecciona cada una de las pestañas para ver las distintas opciones de la muestra en curso.
- Selecciona en el menú *Experiment* ⇒ *Experiment Layout* para establecer los nombres o *labels* de cada parámetro y los eventos que se van a grabar de cada pocillo en *acquisition* (existe la opción de copiar y pegar).
- Una vez verificado que todo está correcto con una placa que contenga solo agua, ponerse encima de un pocillo, verificar que no sale muestra por la junta del acoplador.
- Si todo está OK, poner la placa con las muestras en la orientación correcta y proceder a la adquisición, *Run plate* o *run well*.
- Una vez finalizada la adquisición proceder al lavado de placa tal y como se indica en el siguiente apartado, para exportar los datos y/o el experimento proceder igual que para los tubos.

2.3. Limpieza del citómetro

- En el browser encontrarás en shared experiments un experimento que recibe el nombre de lavado corto y otro que recibe el nombre de lavado largo.
- Selecciona el icono de la placa dentro del experimento lavado largo, haz doble clic, se te abrirá automáticamente una placa con 12 pocillos. Carga la placa de lavado (preguntar Servicio) con 200 ul de clean los 4 primeros, 200 ul de rinse los 4 siguientes y 200 ul de agua los 4 siguientes.
- Selecciona el primer pocillo, y haz clic en la opción run plate del acquisition dashboard.
- Una vez finalizado el lavado de la placa desmonta el cargador de placa (preguntar al Servicio hasta que os manejeis solos) y proceder al lavado corto de tubo lavado corto:
 - primero poner un tubo de clean en el citómetro, ir a la opción *Cytometer* de la barra de menú, en *Cleaning modes* seleccionar **clean flow cell** dar a OK, una vez finalizado repetir una vez más.
 - Después pasar dos tubos el primero 5 min con *clean* y el segundo 5 min con agua. **NO DEBEN PASAR MÁS DE 2000 eventos a velocidad máxima (high)** en estas condiciones, si no es así se debe proceder al lavado largo.

2.4. Apagado del citómetro

- Comprobar en el sistema de reservas si hay un usuario antes de una hora
- **SÍ HAY UN USUARIO** antes de 1 hora, únicamente después de lavar:
 1. Confirma esa reserva.
 2. **EXPORTA TUS DATOS Y/O EXPERIMENTO AL ORDENADOR DE ADQUISICIÓN** (barra del menú File=> export FCS), y guárdalos en tu carpeta personal dentro de la carpeta **Data analysis** directamente compartida con ordenador de ANÁLISIS.
 3. Sal del DiVa o de tu sesión de DiVa

IMPORTANTE: ES OBLIGATORIO ELIMINAR TUS DATOS DEL BROWSER ANTES DE UNA SEMANA PARA EVITAR PROBLEMAS DE SATURACIÓN Y EXPORTA TODA LA INFORMACIÓN QUE CONSIDERES IMPORTANTE CONSERVAR (experimentos, settings, etc




...)

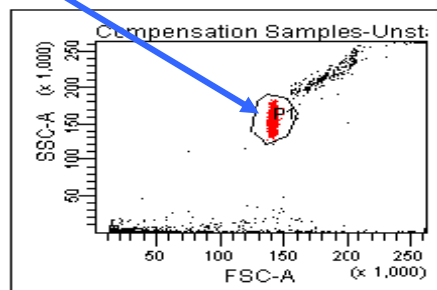
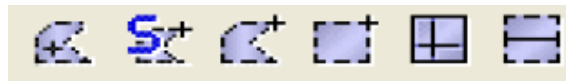
- **NO HAY UN USUARIO** antes de 1 hora, después de lavar proceder a:
 1. **EXPORTA TUS DATOS*** (File=> export FCS), y guárdalos directamente EN ORDENADOR DE ANÁLISIS seleccionando tu carpeta personal que se encuentra dentro de la carpeta de tu laboratorio que hay en la carpeta *Data analysis* del escritorio. Esta carpeta puede verse desde ambos ordenadores). Comprueba que se han exportado bien cópialos en la carpeta DATOS USUARIOS del ordenador de análisis y/o en la cripta y **ELÍMINALOS DEL BROWSER**. Si el experiment que has modificado te interesa por la planilla o los settings duplica el experimento sin datos en el browser, ponle el nombre correspondiente y expórtala a tu carpeta experiments. Recuerda que este archivo incluye los settings pero también puedes exportarte los settings aparte (ver anexo 2)
 2. Hacer un **fluidics shutdown** en el menú *cytometer => fluidics shutdown*. Sale una ventana de aviso, darle a ok y esperar 5 min hasta que finalice el proceso.
 3. Salir del software
 4. Apagar el ordenador
 5. Apagar el citómetro (botón verde lateral izquierdo)

***el Servicio de Citometria no se hace responsable de la pérdida de datos de los usuarios, estos son los responsables de copiar sus archivos en el lugar que corresponde así como de hacer copias de seguridad de sus datos**

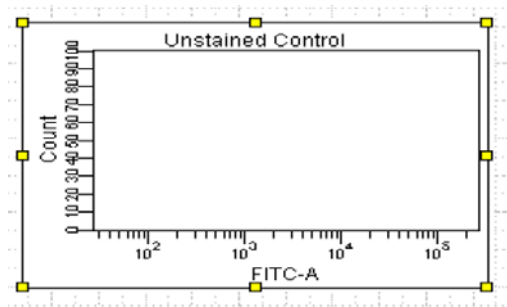
3. ANEXOS DE UTILIDAD

3.1. INSTRUCCIONES BÁSICAS PARA CREAR TU PLANILLA O WORKSHEET

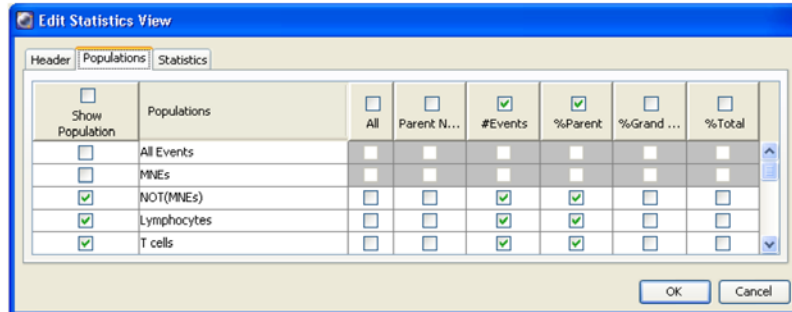
- Clic en el botón *Dot Plot* , *contour plot* , *histogram* ... de la barra de herramientas del *Worksheet* y pincha en la página *Worksheet* para que se dibujen estos gráficos.
- Para cambiar los parámetros de los ejes del gráfico, pincha en los títulos del eje y aparecerá una lista de parámetros (los *labels* creados antes) entre los que puedes seleccionar el parámetro de interés.
- Se aplican estos gráficos a todas las muestras cuando se trabaja en una *Global Worksheet*.
- Crea *gates* a través de los botones de la barra de herramientas del *Worksheet*.



- Se gatea un gráfico respecto de un *gate* P1 haciendo clic con el botón derecho del ratón dentro del gráfico seleccionado (cuadraditos amarillos) a gatear y se selecciona *Show Populations* ⇒ P1... Si sobre este gráfico realizas otro gate este incluye P1 y es un gate subordinado jerárquicamente a P1.



- **ESTADÍSTICA DE LAS POBLACIONES:** Se genera seleccionando un plot, botón derecho show statistics se abrirá una ventana para editarlas donde seleccionas las poblaciones de las que quieres la estadística así como la estadística que te interesa



- Se crea una **JERARQUÍA DE POBLACIONES** a través de los *gates*. Puedes ver esta jerarquía seleccionando cualquier gráfico y pinchando con el botón derecho del ratón y haciendo clic en *Show Population Hierarchy*, desde este panel puedes editar los *gates*, cambiar colores, nombres... directamente en el panel que aparece en el worksheet o en el inspector si la tienes seleccionada en el worksheet .

Tube: 3/16+56/45/4/19/8

| Population | #Events | %Parent | %Total |
|---------------|---------|---------|--------|
| ■ All Events | 10,000 | | 100.0 |
| ■ MNEs | 6,309 | 63.1 | 63.1 |
| ■ NOT(MNEs) | 3,691 | 36.9 | 36.9 |
| ■ Lymphocytes | 3,379 | 91.5 | 33.8 |
| ■ T Cells | 1,836 | 54.3 | 18.4 |
| ■ B Cells | 189 | 5.6 | 1.9 |
| ■ NK Cells | 1,238 | 36.6 | 12.4 |

3.2. IMPORTAR Y EXPORTAR ARCHIVOS

EXPERIMENTS

Importar

File = >import => experiment => browse => seleccionar archivo/s e importar

Lo modificas si fuera necesario para adaptarlo a tus muestras, introduces los tubos que necesites y ya puedes analizar las muestras.

Exportar

Ponerse sobre el experimento (abierto o cerrado) botón derecho **export=> shortcut to shared documents o shortcut to experiment=> experiment=> carpeta laboratorio=> carpeta usuario**

Te exporta una carpeta que tiene el nombre del experimento con un archivo .xlm que es el template: planillas, settings, estructura de tubos... y todos los datos, archivos .fcs sin el nombre, solo con un número correlativo, al importarlos a un experimento si te importa también el nombre.

EN EL ORDENADOR DE ADQUISICIÓN LAS CARPETAS DE EXPERIMENTS NO PUEDEN CONTENER DATOS, ESTOS SE HAN DE EXPORTAR AL ORDENADOR DE ANALISIS (ver siguiente apartado) Y LOS DATOS DE ESTA CARPETA HAN DE SER ELIMINADOS DESDE WINDOWS, O BIEN DUPLICAR SIN DATOS EL EXPERIMENTO EN EL BROWSER (BOTÓN DERECHO) Y EXPORTAR ESTE EXPERIMENTO.

FCS (DATOS)

Importar

File => import => FCS => browse => seleccionar archivo/s e importar

Te importa los datos con la estructura (*specimen*) y nombre del experimento de origen seguido de .001.

Exportar

Seleccionar los datos a exportar:

- A nivel de experimento: te exporta TODOS los datos DEL EXPERIMENTO*
- A nivel de specimen: los datos del specimen seleccionado
- A nivel de tubo: solo esa muestra.

Te lo exporta con la estructura y el nombre que le has dado en del browser a partir del nivel que has exportado.

Se exportan a una carpeta en el escritorio que pone **Data analysis** y que es compartida por el ordenador de análisis. De allí se pueden pasar a través de la cripta a otros ordenadores o guardarlos en el ordenador de análisis para analizarlos.

EN EL ORDENADOR DE ADQUISICIÓN NO PUEDE CONTENER DATOS, ESTOS SE HAN DE EXPORTAR APARTE AL ORDENADOR DE ANÁLISIS Y ALLÍ ANALIZARLOS O ENVIARLOS A LA CRIPTA. LOS DATOS DEL ORDENADOR DE ADQUISICIÓN CON FECHA ANTERIOR A LA SEMANA EN CURSO SON SUSCEPTIBLES DE SER ELIMINADOS.

SETTINGS

Exportar:

Seleccionar los settings de interés, hacer clic con el botón derecho seleccionar el destino (browse=> carpeta de settings en el escritorio) y aceptar

Importar

Para importar *settings* se puede hacer, a nivel de experimento, a nivel de *specimen* o a nivel de tubo haciendo clic en el botón derecho e *import settings* seleccionar la carpeta del escritorio *settings* la de tu laboratorio (formato .csv). **IMPORTANTE:** para importar unos *settings* tienen que tener la misma configuración que el experimento donde los quieres importar. Para cambiar la configuración tienes que ir a *Cytometer=>view configuration=>* seleccionar la configuración de interés, pinchar el botón *set configuration=>OK*

3.3. COMPENSACIÓN AUTOMÁTICA

Para la compensación automática se requiere un tubo con el control negativo (sin teñir/control isotópico) y una muestra marcada con cada uno de los fluorocromos utilizados individualmente que sea positiva para ese marcador.

- Eliminar del *cytometer status* los parámetros que no se vayan a utilizar
- Ir a *experiment=>create compensation controls*: aparece un nuevo specimen con ese nombre en el browser con un tubo llamado unstained y uno para cada color que vayamos a utilizar. Asimismo aparecen una *normal sheet* por cada tubo generado.
- Introducir el tubo *unstained* y ajustar el FSC, SSC para que la población de interés quede centrada en el plot. Seleccionar este gate, hacer clic en el botón derecho y seleccionar *apply to all compensation controls*. Ajustar los voltajes de las diferentes fluorescencias para que queden centradas en la primera región del *grid* (división en 4 partes de los histogramas: esta opción se encuentra en el inspector cuando seleccionas el histograma)
- Guardar (*record*) el tubo una vez ajustado.
- Hacer clic en *next tube*, introducir el primero de los controles de compensación ajustar la región P2 en el pico positivo de tu muestra: grabar el tubo
- Hacer clic en *next tube* y repetir el paso anterior con cada uno de los tubos
- Una vez finalizado el último tubo vuelves a *experiment=>calculate compensation matrix* y en unos segundos aparece una ventana con la fecha del día: la matriz está calculada puedes aplicarla a tu experimento únicamente o salvarla fusionada (link) a ese experimento: a partir de entonces todas las muestras adquiridas en ese experimento aparecerán compensadas.

3.4. ABRIR ARCHIVOS 3.0 (digitales) del DiVA con el FlowJo (versión para Macintosh)

Si hemos salvado en versión 2.0 los datos (fcs) de nuestro experimento se abrirán automáticamente en el FlowJo y se pueden analizar como de costumbre, si están en versión 3.0 proceder como a continuación:

- Abrir el FlowJo del Macintosh
- Seleccionar FlowJo en la barra del menú, se abrirá un submenú seleccionar *preferencias* se abrirá una ventana con varias pestañas en la ventana *workspace* seleccionar abajo a la derecha el botón *define*.
- Seleccionar que parámetros se han de mostrar en escala logarítmica dar a OK
- Cargar los archivos 3.0