

«Проточный цитофлюориметр MACSQuant®»

Инструкция по применению

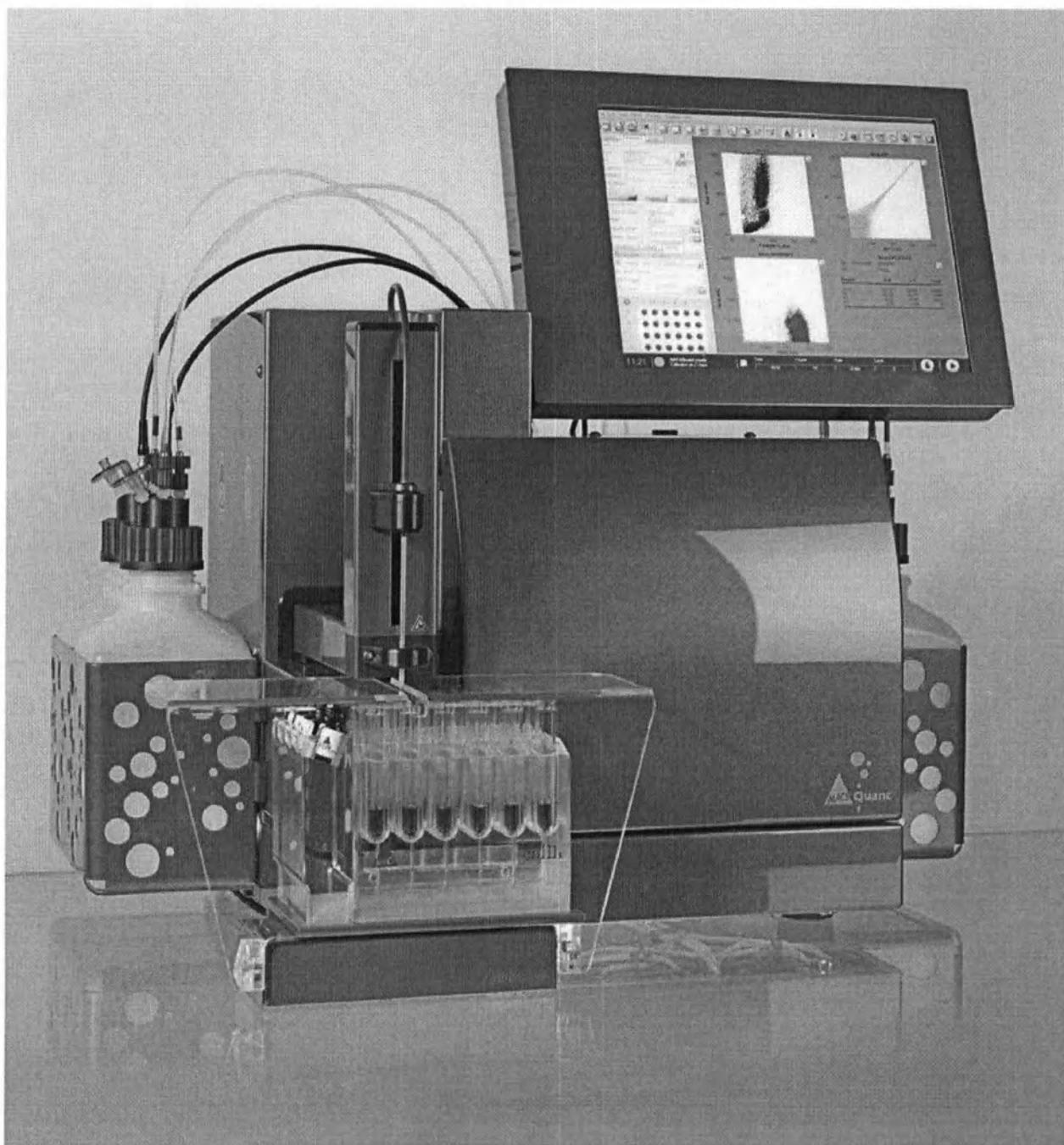
Мильтени Байотек ГмбХ
Фридрих-Эберт Штрассе, 68
51429 Бергиш Гладбах,
Германия

Телефон: +49 2204 8306-0

Факс: +49 2204 85197

Электронная почта: macs@miltenyibiotec.de
www.miltenyibiotec.com

Анализатор MACSQuant® - инновационный инструмент для автоматизированного мультипараметрического клеточного анализа.



1 Важная информация

Пожалуйста, прочитайте перед использованием!

Пожалуйста, внимательно ознакомьтесь с информацией, содержащейся в данной инструкции пользователя. Незнание правил эксплуатации прибора и несоблюдение указаний может привести к ненадлежащему или неправильному использованию прибора, его неправильному обслуживанию или уходу, или причинить вред пользователю, привести к получению непредсказуемых результатов, к повреждению устройства или его преждевременному износу, что сократит срок его эксплуатации или приведет к прекращению гарантийного обслуживания.

Храните данную инструкцию в надежном месте, доступном для каждого, кто эксплуатирует анализатор MACSQuant.

В данной главе описаны инструкции по безопасности и требования к рабочему месту, на котором должен быть установлен анализатор MACSQuant. Следующие предупреждения и предостережения сделаны для того, чтобы помочь Вам избежать травм и не повредить данное устройство при его эксплуатации.

1.1 Символы и уровни угрозы

1.1.1 Описание символов по безопасной эксплуатации

Указания по безопасности предупреждают пользователя о возможных рисках в случае, если пользователь не будет следовать указанным ниже предупреждениям и предостережениям. Пиктограмма слева указывает, какому именно риску подвергается пользователь.

1.1.2 Символы

Таблица – иллюстрированный словарь, отображающий символы, используемые в данной инструкции пользователя и на самом приборе MACSQuant

 CAUTION	Индикатор возможности возникновения опасной ситуации. Если не принять мер к ее предупреждению, возникает риск угрозы здоровью.
 WARNING	Индикатор возможности возникновения опасной ситуации, при которой возможна угроза здоровью.
	Внимание, обратитесь к инструкции пользователя для дальнейших указаний и в дальнейшем действуйте осторожно. Предупреждения включают: риск повреждения оборудования, угроза здоровью.
	Угроза механических повреждений.
	Лазерное излучение
	Магнитное поле Устройство содержит магнит. Магнит может взаимодействовать с электронным оборудованием.
	Риск контаминации в случае использования биологически опасных материалов.

	Угроза здоровью оператора прибора из-за высокого напряжения.
	Защитное заземление. Символ изображен на внутренней поверхности прибора. Обратит внимание сервисному персоналу.
	Включено (питание)
	Выключено (питание)

1.2 Предупреждения и меры предосторожности

Анализатор MACSQuant – новейший в проточной цитометрии, контролируемый компьютером инструмент. Клетки, изолированные при помощи признанной технологии MACS, могут быть последовательно проанализированы при помощи проточного цитометра MACSQuant. Устройство для подачи проб MACS MiniSampler подключается к анализатору MACSQuant и, таким образом, представляет собой часть устройства. Анализатор MACSQuant и устройство подачи проб MACS MiniSampler разработаны таким образом, чтобы обеспечить безопасность работы после инсталляции и использование специально обученным персоналом в соответствии с общими инструкциями по безопасному использованию и в соответствии с указаниями, прописанными в данной инструкции пользователя. Директивы, приведенные в данной главе, объясняют потенциальные угрозы, связанные с эксплуатацией инструмента, и обеспечивают важную информацией для минимизации таких рисков. В точности следуя этим инструкциям, Вы можете защитить себя и оборудование от потенциальных угроз и создать безопасную рабочую обстановку. Если прибор будет использован каким-либо образом, не описанным в спецификации производителя, пользователь может подвергнуть себя риску.

ВАЖНО: Пожалуйста, прочитайте и следуйте рабочим инструкциям, приведенным в настоящем руководстве пользователя и уделите внимание всем предупреждающим знакам, размещенным на инструменте. Сохраните настоящую инструкцию пользователя и любые другие инструкции по безопасности и работе с прибором в месте, легко доступном для всех пользователей прибора.

ВАЖНО: анализатор MACSQuant предназначен только для эксплуатации в помещениях. Не используйте прибор в местах, классифицированных как опасные, таких, как помещения, обогащаемые кислородом.

Свяжитесь с местными властями, обеспечивающими подачу электроэнергии, эксплуатацию зданий, безопасность для дополнительной информации по установке оборудования.

Если у Вас есть серьезные сомнения по поводу безопасности использования инструмента, пожалуйста, свяжитесь с официальным дистрибьютором продукции компании Miltenyi Biotec или позвоните в службу клиентской поддержки компании Miltenyi Biotec.

1.3. Безопасная установка прибора

В этом разделе описаны требования к рабочему месту, которое должно соответствовать определенным условиям безопасного расположения анализатора MACSQuant на рабочем месте. Прочтите указания этого раздела и перед подключением прибора к источнику питания убедитесь, что место, в котором предполагается установить анализатор, должным образом подготовлено.

При планировании расположения места установки и положении оборудования на нем, помните о предостережениях, указанных в данном разделе инструкции. Это поможет избежать неполадок в работе прибора и вероятность отказов, обусловленных несоблюдением требований к рабочему месту.

ВАЖНО: в любом случае, должны соблюдаться: местные инструкции по безопасности, по требованиям к рабочему месту, политика лаборатории, стандарты лаборатории, касающиеся здоровья и безопасности, предупреждения возникновения несчастных случаев.

1.4.1 Установка дополнительного оборудования

Не располагайте прибор на нестабильном столе, подставке, стенде, треноге и т.п. Инструмент может упасть. Это может привести к сильным телесным повреждениям и/или серьезным повреждениям прибора. Используйте только такой стол, подставку, стенд, треногу и т.п., которые могут легко выдержать вес в 50 кг. Не размещайте анализатор MACSQuant внутри встроенной техники или в ограниченном пространстве, таком как полка, если только такая встроенная техника и т.п. не были специально разработаны для расположения такого прибора. Необходимо обеспечение соответствующей вентиляции, а также должны соблюдаться все требования по установке, приведенные далее.

1.4.2 Циркуляция воздуха

Переменная температура воздуха может оказаться не в состоянии обеспечить нормальное охлаждение анализатора MACSQuant до соответствующей рабочей температуры, если не будет обеспечена адекватная циркуляция воздуха. Убедитесь, что рабочее помещение, в котором расположен инструмент, хорошо проветривается. Нельзя размещать прибор рядом с радиаторами отопления, обогревательными приборами, регистраторами тепла, печами либо рядом с иным оборудованием (включая усилители), которое может производить тепло. Обеспечьте возможность достаточной циркуляции воздуха рядом с MACSQuant – по крайней мере, по 15 см с каждой стороны. Это позволит обеспечить нужное охлаждение прибора. Не допускайте попадания на прибор прямых солнечных лучей. Отверстия и открытые части прибора обеспечивают его вентиляцию и предотвращают его перегрев и поэтому они никогда не должны чем-либо перекрываться. Никогда не помещайте инородные предметы внутрь этих отверстий.

1.4.3 Вода, влажность

Не пользуйтесь прибором в сырых и влажных помещениях. Избегайте высокой влажности и образования конденсата, не допускайте попадания на прибор воды.

1.4.4 Заземление

Инструмент оснащен трехжильным кабелем питания с заземлением, третий пин которого предназначен для заземления. Такая вилка питания подходит только к розеткам с заземлением. Это – мера безопасности. Не пытайтесь вставить вилку питания в розетку, не оборудованную заземлением. Если вы не можете вставить вилку в розетку питания, свяжитесь с электриком, обслуживающим ваше помещение, и попросите его заменить розетку.

1.4.5 Источник питания

Инструмент должен подключаться только к такой сети питания, параметры которой указаны на приборе. Если у вас есть вопросы по поводу типа источника питания, который необходимо использовать, свяжитесь с авторизованным представителем компании Miltenyi Biotec либо с организацией, обеспечивающей электропитание в вашем учреждении. Не используйте удлинители. Не перегружайте выход сети питания. Полная нагрузка системы не должна превышать 80% от допустимой нагрузки цепи.

1.4.6 Доступность

Убедитесь, что тумблер включения, а также вилка силового кабеля прибора легко доступны и расположены к оператору прибора настолько близко, насколько это возможно. Если необходимо отключить прибор от сети, вытащите вилку кабеля из розетки сети питания.

1.4.7 Периферийные устройства

К коннекторам с обозначениями "External Can", "CAN1", "CAN2" следует подключать только оригинальное оборудование, предназначенное для использования с анализатором MACSQuant. Уровни напряжения на этих коннекторах не должны превышать опасные уровни напряжения в 30

Vrms (30 среднеквадратических вольт) и 42,4 Vpeak (пиковое напряжение) или 60 Vdc (напряжение постоянного тока). К коннекторам сенсоров бутылей ("Bottle Sensor") следует подключать только кабели сенсоров бутылей (MACSQuant Analyser Bottle Sensor Cable). Только 2D-сканер штрих кодов, рекомендованный компанией Miltenyi Biotec, следует подключать к разъему "RS232/BCR". Внешние лазерные устройства, подключаемые к разъему "RS232/BCR", должны соответствовать стандарту IEC 60825-1. Внешние вычислительные устройства, подключаемые через интерфейс RS232, обозначенный значком "COM1", должны входить в список, соответствующий стандарту UL-60950-1. Разрешено использование кабелей для подключения длиной до 3 м.

1.5 Безопасное использование, техническое обслуживание, транспортировка и утилизация

Прочтите дальнейшие указания по безопасной эксплуатации, техническому обслуживанию, транспортировке и утилизации прибора MACSQuant.

ВАЖНО: в любом случае, должны соблюдаться: местные инструкции по безопасности, по требованиям к рабочему месту, политика лаборатории, стандарты лаборатории, касающиеся здоровья и безопасности, предупреждения возникновения несчастных случаев.

1.5.1 Безопасная эксплуатация

Если прибор не функционирует должным образом, а указания на мониторе прибора содержат требование обратиться в службу технической поддержки, дальнейшая безопасная эксплуатация прибора невозможна. Немедленно выключите анализатор MACSQuant, выключите прибор из розетки сети питания и свяжитесь с авторизованной службой технической поддержки Miltenyi Biotec либо со службой клиентской поддержки компании Miltenyi Biotec.

1.5.5 Транспортировка

Анализатор MACSQuant должен транспортироваться с осторожностью и в упаковке, разработанной компанией Miltenyi Biotec. Возможно возникновение скрытых повреждений в случае, если упаковка с прибором будет подвергнута сильной вибрации или прибор будет уронен. Если необходима отправка прибора к производителю для сервисного обслуживания, проведите деконтаминацию инструмента перед его упаковкой. Если у вас есть вопросы, касающиеся деконтаминации и упаковки инструмента перед его отправкой, пожалуйста, свяжитесь со службой технической поддержки. См. раздел 8.1.9 для дополнительной информации по деконтаминации инструмента.

2 Введение

2.1 Назначение прибора

Анализатор MACSQuant® - это настольный проточный цитофлуориметр, который был специально разработан для быстрого, простого и автоматизированного флуоресцентного анализа суспензий одиночных клеток. Анализатор MACSQuant также оснащен функцией абсолютного подсчета клеточных популяций и может работать на скорости до 10000 событий в секунду. Инструмент был разработан специально для использования с реагентами для клеточного анализа MACS® Cell Analysis и реагентами для сепарации MACS® Separation Reagents в научной области применения. Тем не менее, на приборе можно работать и с использованием общепринятых флуорохромов, конъюгированных с антителами, сторонних производителей.

Относительно небольшая площадь нижней поверхности прибора MACSQuant (60 на 35 на 40 см), по сравнению с другими доступными на рынке проточными цитометрами, делает инструмент идеально подходящим решением для использования в лаборатории. Также прибор имеет несколько особенностей, которые позволяют проводить полностью автоматизированную обработку проб – от окрашивания образца антителами и его перемешивания до отбора образца, его обогащения при помощи магнитной колонки и флуоресцентного анализа.

Анализатор MACSQuant может быть дополнительно оснащен пробоотборником MACS® MiniSampler. Пробоотборник MiniSampler – это моторизованный штатив для пробирок, который может нести штативы для пробирок разного формата, включая 96-луночный микроплащечный штатив. Полностью автоматизированная процедура отбора и анализа группы образцов возможна

благодаря программному обеспечению MACSQuantify™ - таким образом, позволяя разгрузить оператора и повысить производительность труда.

Автоматизированные процедуры обслуживания – также одна из разработок, отличающих анализатор MACSQuant. Они включают в себя различные системные программы отмычки, проводимые перед каждым измерением, автоматический запуск инструмента, а также программы для выключения прибора на ночь или для длительного хранения.

После отбора пробы прибор может анализировать клетки с флуоресцентными метками, используя до девяти оптических параметров – семь каналов флуоресценции и два канала светорассеяния. Программное обеспечение, поставляемое вместе с анализатором MACSQuant®, может представлять полученные данные в стандартных для проточной цитометрии формах, включая гистограммы, точечные диаграммы, диаграммы распределения плотности, логические ограничения, данные статистики. Сбор данных может производиться по времени, по площади, высоте и ширине. Во время сбора данных, файлы данных автоматически сохраняются в папку, определенную пользователем, для последующего анализа. Папки для сохранения данных индивидуальны для каждого пользователя, причем администратор прибора может задать параметры доступа к данным – для частного или публичного доступа.

Анализатор MACSQuant® опционально может проводить предобогащение образца, содержащего магнитно меченые частицы, перед цитофлуориметрическим анализом.

Эта функция прибора основана на знаменитой технологии MACS и особенно полезна в случаях, когда необходимо провести анализ редких клеточных популяций, меченых магнитными частицами MACS MicroBeads.

Управление прибором осуществляется чрезвычайно легко посредством цветного TFT-тачскрина и благодаря интуитивно понятным меню встроенного программного обеспечения MACSQuant. У пользователя есть возможность выбора между простым режимом анализа, «зашитого» в программное обеспечение (режим Express Mode) или режимом с изменяемыми параметрами (режим Custom Mode). Анализ данных с использованием множества средств отображения данных и функций может проводиться на приборе, а программное обеспечение было разработано так, чтобы обеспечить максимально дружелюбный интерфейс и обеспечить высокую гибкость функциональности прибора.

Наконец, стандартные буферы и растворы MACSQuant®, бутылки с которыми непосредственно присоединяются к прибору, стерильны, готовы к использованию и разработаны для оптимальной работы прибора. Прибор также оснащен устройством, предупреждающим пользователя при помощи различных цветов подсветки бутылей с буферами и расходными жидкостями, о том, что нужно заменить ту или иную рабочую жидкость или заменить емкость для отходов на пустую бутылку.

2.2 Приложения

Анализатор MACSQuant® - это больше, чем просто проточный цитометр. Прибор был разработан так, чтобы максимально автоматизировать процесс работы с реагентами MACS® Control – флуоресцентными антителами, конъюгированными с флуорохромами, разработанными в формате, предназначенном для быстрого цитометрического контроля клеточной сепарации, проведенной с помощью технологии MACS. Автоматизированный отбор пробы при помощи роботизированной иглы-пробозаборника позволяет проводить анализ в заранее заданном объеме пробы, что, в свою очередь, позволяет реализовать абсолютный подсчет клеток в образце. Различные клеточные популяции, меченые разными флуоресцентными метками, также могут быть подсчитаны в определенной единице объема. Краткий обзор основных функциональных особенностей анализатора MACSQuant приведен ниже.

2.2.1 Флуоресцентный клеточный анализ

Первый и передовой, анализатор MACSQuant – это проточный цитометр, имеющий девять оптических каналов для регистрации флуоресцентных сигналов и относительного размера и гранулярности частиц. В совокупности с пробоотборником MACS® MiniSampler, автоматизированный анализ группы образцов может быть проведен с легкостью. Программное обеспечение MACSQuantify™ обладает всеми основными функциями для представления данных, статистического анализа. Данные могут быть представлены в виде точечной диаграммы, диаграммы распределения плотности, гистограммы, статистической таблицы.

2.2.2. Приложения MACS® Control

Качество клеточной сепарации, проведенной при помощи технологии MACS, может быть быстро и эффективно оценено при помощи анализатора MACSQuant®. Протоколы процесса измерения и анализа, легко адаптируемые к требованиям пользователя, могут быть созданы для флуоресцентного анализа клеток, для мечения клеток антителами, для измерения, для отбора проб. Все это может быть сделано в автоматическом режиме под контролем программного обеспечения MACSQuantify™.

Специализированные коктейли антител MACS Control доступны для мультипараметрического анализа определенных типов клеток, включая анализ CD14+ - моноцитов и CD19+ - В-клеток.

2.2.3 Детекция редко встречающихся клеток

Включение устройства для предобогащения клеток MACS® Enrichment Unit в состав системы позволяет проводить предобогащение клеточной суспензии *in situ* до флуоресцентного анализа. Устройство для предобогащения клеток MACS® Enrichment Unit и специальная колонка MACSQuant позволяют снизить абсолютное количество анализируемых клеток и получить характеристику представляющих интерес редко встречающихся клеток. Эта функция прибора может быть особенно полезной при анализе клеток с низкой частотой встречаемости, таких как стволовые клетки, субпопуляции дендритных клеток, или субпопуляции NK-клеток.

2.2.4 Абсолютный подсчет клеток

Анализатор MACSQuant® обладает роботизированным манипулятором иглы-пробоотборника для отбора образца клеточной суспензии и последующей его подачи в проточную кювету. Роботизированный манипулятор дает преимущество автоматизации и возможность отбора четко определенного объема пробы. Анализатор MACSQuant®, благодаря этой возможности, может считать абсолютное число клеток на мкл объема пробы (с погрешностью $\pm 5\%$). Это также означает, что несколько клеточных популяций могут быть одновременно подсчитаны в единице объема после флуоресцентного окрашивания и анализа. Например, способность анализатора MACSQuant® подсчитывать абсолютное число клеток в субпопуляции позволяет оптимизировать подсчет специфического типа клеток при помощи подготовленного заранее протокола анализа и специализированного набора антител. Так, используя набор для подсчета CD4+RTE-клеток (CD4+RTE Enumeration Kit, #130-092-055), можно произвести подсчет недавних тимусных иммигрантов (RTE) из образца цельной крови или из выделенных периферических мононуклеарных кровяных клеток. Кроме того, автоматизированная обработка образцов и использование пробоотборника MACS MiniSampler обеспечивает цельную интеграцию анализатора MACSQuant в лабораторию, где необходимы рутинный подсчет абсолютного числа клеток с высокой производительностью. Реагенты для мечения и программная обработка результатов могут быть настроены в соответствии с индивидуальными требованиями исследователя.

2.2.5 Автоматическая окраска клеток флуорохромами и анализ

В анализаторе MACSQuant автоматизация обработки клеточных образцов и анализа данных может быть дополнена автоматической окраской клеток флуорохромами. С опциональным использованием пробоотборника MACS MiniSampler, возможна автоматическая обработка до 96 образцов, что обеспечивает высокую производительность прибора.

2.2.6 Проточная цитофлуориметрия – введение

Любая популяция клеток может быть определена наличием индивидуального набора экспрессируемых антигенов, как поверхностных, так и внутриклеточных. Поэтому, эти антигены могут являться «мишенью» для их обнаружения и для последующего анализа с помощью проточной цитофлуориметрии.

Проточные цитометры регистрируют клетки, используя два основных параметра – светорассеяние и флуоресценцию. Размер клетки и ее гранулярность – это неотъемлемые характеристики клетки, и они различны у различных типов клеток. Эти свойства клетки могут быть измерены при помощи прямого (или малоуглового) светорассеяния (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния, соответственно.

Однако, за исключением временной или постоянной экспрессии флуоресцентных белков, для того, чтобы получить стабильную флуоресценцию, величина сигнала которой будет выше, чем таковая от автофлуоресценции, клетку нужно «покрасить» флуоресцентной меткой. Обычно это делается посредством использования антител к определенной специфичной мишени-белку или иному

биохимическому агенту, экспрессируемому на поверхности или внутри клетки. Эти антитела либо напрямую связаны с флуорохромом, либо, в свою очередь, они могут быть связаны следующим шагом с антителами, конъюгированными с флуорохромом (непрямое окрашивание). Только те клетки, которые несут на себе антиген-мишень, будут нести на себе флуоресцентную метку.

После возбуждения лазером, свет, испускаемый флуоресцентной краской, может быть зарегистрирован в определенном диапазоне длин волн. Это и позволяет отличать один флуорохром от другого. Использование различных светофильтров в проточных цитометрах позволяет одновременно использовать несколько флуоресцентных меток, и, таким образом, позволяет детектировать одновременно несколько клеточных антигенов. Эти фильтры определяют каналы флуоресценции, каждый из которых мониторируется фотоэлектронным умножителем (англ. photomultiplier tube, сокращенно – PMT). Каждый фотоэлектронный умножитель, расположенный после набора светофильтров, будет усиливать сигнал детектируемого света. Поэтому лазерный луч будет возбуждать флуоресцентную метку на клетке, который будет отражаться от клетки и будет регистрироваться под углом 90°. Этот отраженный свет будет проходить через соответствующий светофильтр, а результирующий сигнал будет усилен и обработан программной частью цитометра (например, программой MACSQuantify). Настоятельно рекомендуется прописывать значимые названия для каждого детектора (фотоэлектронного умножителя, PMT) до начала анализа, т.е. номенклатура наименований должна соответствовать флуорохромам, используемым для окрашивания клеток. Например, FITC (флуоресцеин изотиоцианат) имеет максимум эмиссии 521 нм (в водной среде), и, таким образом, детектируется в зеленом флуоресцентном канале (FL2, 525 нм с шириной волны в 50 нм). Другой флуорохром, APC (аллофикоцианин), с максимумом эмиссии 660 нм, регистрируется в красном канале флуоресценции (FL6, 655-730 нм).

Анализатор MACSQuant оснащен тремя лазерами, что позволяет одновременно использовать до 7 каналов флуоресценции (FL1-FL7) и два канала светорассеяния (FSC, SSC). Список наиболее характерных флуорохромов и их соответствующие каналы регистрации смотрите в Таблице 2.1.

Длина волны возбуждения	Название фотоэлектронного умножителя (PMT)	Фильтр
405 nm	FL1 (VioBlue)	450/50
488 nm	FL2 (FITC)	525/50
	FL3 (PE)	585/40
	FL4 (PE-Cy5/PE-Cy5.5)	655-730 (655LP + split 730)
	FL5 (PE-Cy7)	750 (LP)
635 nm	FL6 (APC)	655-730 (655LP + split 730)
	FL7 (APC-Cy7)	750 (LP)
488 nm	FSC/SSC	488/10

Таблица 2.1 Флуорохромы и соответствующие им каналы регистрации

После окрашивания клеток флуоресцентными метками, игла-пробоотборник анализатора MACSQuant отбирает заданный заранее объем образца. Далее клетки либо непосредственно направляются в проточную кювету для последующего анализа, либо могут быть направлены в сепарационную колонку MACSQuant для пред-обогащения клеточной смеси клетками, несущими на себе магнитную метку (см. раздел 6.3.6). Попав в проточную кювету, каждая клетка последовательно проходит через оптический путь лазера, и отражение света от клетки используется для получения информации о физических параметрах клетки, таких как размер и гранулярность. Также луч лазера возбуждает флуорохромы на клетках, несущих флуоресцентные метки; свет, испускаемый каждым возбужденным флуорохромом, регистрируется детекторами флуоресценции после прохождения через соответствующие фильтры (каналы флуоресценции). В конце концов, клетки попадают в емкость для отходов.

2.2.7 Отображение данных в проточной цитометрии

Данные, полученные в результате цитофлуориметрического анализа, могут быть отображены в различных форматах посредством программного обеспечения MACSQuantify: точечная диаграмма, гистограмма, диаграмма распределения по плотности, статистика. Каждому из этих видов представления данных дано краткое описание, однако, стоит отметить, что обычно данные визуализируются при помощи однопараметрической гистограммы и двухпараметрической точечной диаграммы. Для более подробной информации по использованию программного обеспечения MACSQuantify для анализа данных и их отображения см. раздел 6.12.

Точечная диаграмма (dot plot)

Точечная диаграмма (dot plot) также может называться «бивариантный дисплей (bivariant display)», «диаграмма рассеяния (scattergram)» и, в некоторых случаях, «девичным отображением (bitmap)». В этой форме анализа каждое событие (как правило, клетка или иная частица) представлена как единичная точка на двухосевой диаграмме. Расположение точки по отношению к x/y осям зависит от интенсивности измеряемых параметров для того или иного события/клетки. Характеристика клеточной популяции, как правило, получается отображением на точечной диаграмме, где боковое светорассеяние (SSC, ось ординат, Y) строится против прямого светорассеяния (FSC, ось абсцисс, X).

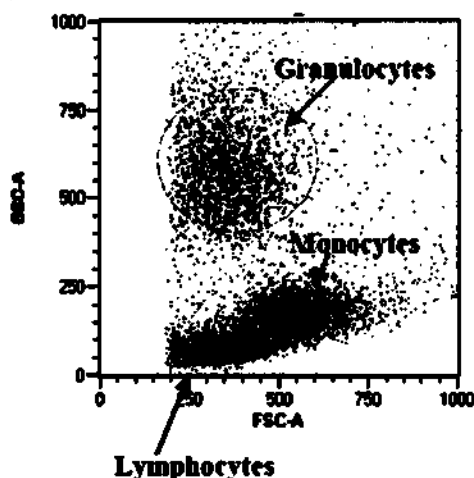


Рис. 2.1 Двухпараметрическая диаграмма, отображающая распределение периферических мононуклеарных клеток крови по двум параметрам - боковому светорассеянию и прямому светорассеянию. Можно различить три четкие субпопуляции в соответствии с их параметрами светорассеяния: гранулоциты, моноциты и лимфоциты.

Шкалы светорассеяния обычно линейные. В двухпараметрических диаграммах, где использованы шкалы интенсивности флуоресценции, поскольку интенсивность флуоресценции может различаться на величины в несколько порядков от клетки к клетке, обычно используется логарифмическая шкала (например, 5-декадная шкала интенсивности флуоресценции; для дополнительной информации по выбору нужного типа шкалы см. раздел «Выбор масштаба отображения данных в проточной цитометрии» далее).

Двухпараметрические диаграммы – идеальны для отображения относительно небольшого количества событий, где клеточные субпопуляции четко различимы (например, см. рис. 2.1). Эти диаграммы также дают некоторое представление относительно плотности распределения клеток/событий. Чем больше событий с похожими параметрами, тем более плотную популяцию они формируют на диаграмме – более плотное и контрастное облако. Однако, для более точного отображения относительной плотности распределения событий/клеток, нужно использовать диаграмму распределения по плотности.

Гистограмма (histogram)

Гистограммы используются для отображения интенсивности одного параметра (ось X) против частоты встречаемости этого параметра (ось Y). Например, ось X отображает светорассеяние или интенсивность по тому или иному каналу флуоресценции, а ось Y отображает количество событий. Поскольку гистограммы дают представление только об одном параметре, их следует использовать для однородных субпопуляций с хорошим разрешением либо для сравнения интенсивности одного и того же параметра у разных образцов (режим графической накладки изображения).

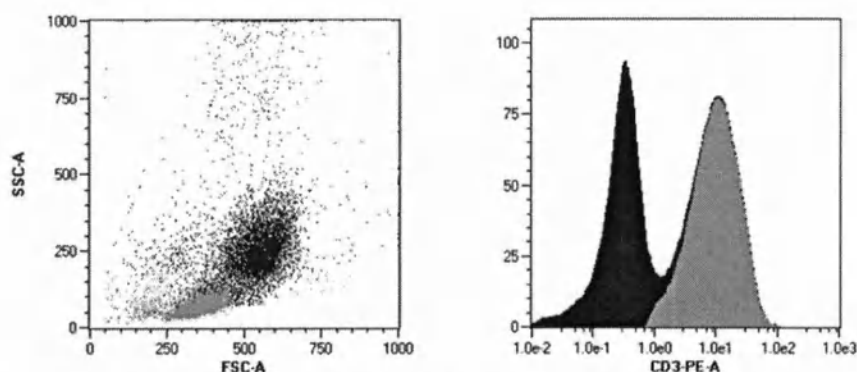


Рис.2.2 Слева: диаграмма FSC/SSC распределения мононуклеаров периферической крови, которые были окрашены анти-CD3 антителами, конъюгированными с PE, CD3+ - клетки отображены зеленым цветом. Справа: соответствующая гистограмма субпопуляции CD3+ - клеток; интенсивность флуоресценции (ось X) против относительного числа клеток (ось Y).

Диаграмма распределения по плотности (density plot)

Диаграммы распределения плотности – полезный инструмент. Используя традиционные точечные диаграммы, бывает трудно сразу определить интенсивность или частоту регистрируемых событий на черно-белом графике. Диаграмма распределения плотности строится в оттенках серого цвета либо в цвете; каждый цвет/оттенок дает информацию об интенсивности получаемых событий. Диаграмма распределения плотности разработана для того, чтобы отображать трехмерный график, где количество клеточных событий отображается как «третье» измерение, либо с помощью оттенков серого, либо разными цветами.

2.3 Технология сепарации клеток MACS® Cell Separation

Технология магнитной сепарации клеток MACS® Cell Separation, т.е. магнитная сепарация определенной клеточной популяции с использованием технологии MACS, является широко известным общепринятым «золотым» стандартом в области сепарации клеток. Технология MACS базируется на использовании магнитных микрошариков MACS MicroBeads, колонок MACS и сепараторов MACS – сильных постоянных магнитов. Технология MACS применяется для таргетированного обогащения суспензии клетками определенного типа или для деплеции того или иного типа клеток или популяций на основании экспрессии клетками поверхностных антигенов. Технология MACS обеспечивает исследователя средством обогащения редкой субпопуляции клеток для последующего цитофлуориметрического анализа.

На первом этапе поверхностные антигены метятся магнитными метками с очень высокой специфичностью – происходит связывание моноклональных антител, связанных с магнитными микрочастицами MACS® MicroBeads. Микрочастицы MACS® MicroBeads – это суперпарамагнитные частицы, диаметр которых составляет около 50 нм, что сравнимо с размерами вирусной частицы. Обнаружено, что частицы MACS® MicroBeads не изменяют параметры светорассеяния клетки при анализе на проточном цитометре и не регистрируются на световом микроскопе. Они формируют стабильную коллоидную суспензию, не выпадают в осадок и не агрегируются в магнитных полях. Частицы MACS® MicroBeads состоят из биodeграбельного матрикса, состоящего из оксида железа и полисахарида; таким образом, нет необходимости удаления магнитных микрочастиц после процесса сепарации, что сохраняет время. Частицы MACS® MicroBeads не изменяют структуру, функции и статус меченой клетки, также они не оказывают влияния на результаты последующих экспериментов. И, наконец, частицы MACS® MicroBeads – это чрезвычайно гибкий инструмент, при помощи которого можно обогащать различные типы смесей клеток, имеющих происхождение от особей разных видов посредством использования различных типов антител. В настоящее время для исследователя доступно несколько сотен реагентов для изоляции клеток человека, мыши, крысы, приматов, а также реагенты для непрямого мечения многих других типов клеток.

После магнитного мечения клетки проходят через сепарационную колонку MACS, помещенную в магнитное поле сепаратора MACS. Клетки без меток проходят через колонку и могут быть собраны в отдельную фракцию; меченые клетки остаются на колонке и могут быть смыты с нее после того, как колонка будет убрана из магнитного поля. Таким образом, как меченые, так и немеченые

клеточные фракции могут быть эффективно изолированы друг от друга при помощи технологии MACS. Вся процедура проста, легко осуществима, проходит в мягких для клеток условиях. В результате исследователь получает обогащенную клеточную фракцию, к анализу которой можно непосредственно приступить.

Анализатор MACSQuant оснащен модулем для обогащения клеток (MACS® Cell Enrichment Unit), что позволяет быстро и легко проанализировать редкую клеточную субпопуляцию при помощи технологии MACS. Установленная в модуль обогащения клеток специально разработанная для анализатора сепарационная колонка MACSQuant™ может изолировать до 5×10^7 клеток, меченых магнитными микрочастицами. После сепарации магнитно меченых клеток, как негативная, так и позитивная фракции могут быть проанализированы в полностью автоматическом режиме. Обогащение суспензии требуемым типом клеток при помощи технологии MACS перед цитофлуориметрическим анализом особенно ценно, когда необходимые исследователю клетки встречаются в очень малом количестве, например, в случае со стволовыми клетками или антиген-специфичными Т-клетками.

2.4 Описание анализатора MACSQuant®

Анализатор MACSQuant – это современный настольный клеточный анализатор, предназначенный для высокочувствительной многоцветной проточной цитофлуориметрии. Три лазера в комбинации с мощным программным приложением MACSQuantify способствуют осуществлению быстрого и простого клеточного анализа. Прибор оснащен двумя каналами светорассеяния (FSC, SSC) и семью каналами флуоресценции. Таким образом, анализатор MACSQuant является идеальным прибором для приложений MACS Control (оптимизированная оценка результатов сепарации, проведенной при помощи технологии MACS), а также для рутинного иммунофлуоресцентного анализа. Система включает в себя модуль для предварительного обогащения клеточной суспензии (MACS Cell Enrichment Unit), что является очень важным подспорьем для надежной детекции и анализа редких клеточных субпопуляций; этот модуль напрямую контролируется программным обеспечением анализатора MACSQuant, что обеспечивает полную автоматизацию процесса обработки проб и анализа клеток. Для расширения возможностей автоматизации (возможность обработки большого количества проб) можно воспользоваться пробоотборником MACS MiniSampler – для удобного проведения измерений без участия человека.



Рис. 2.7. Схематическое изображение анализатора MACSQuant – вид спереди. Передняя крышка прибора изображена прозрачной для наглядности.

Анализатор MACSQuant:

- Компактный, настольный дизайн прибора

- Непосредственный многопараметрический клеточный анализ – от простого подсчета клеток до изоэлектрического цитофлуориметрического анализа
- Абсолютный (волюметрический) подсчет клеток
- Высокочувствительная детекция редко встречающихся клеток
- Полностью автоматизированная процедура мечения и анализа группы образцов

3 Сборка и установка прибора

В данном разделе рассказано о том, как правильно распаковать и установить устройство для первого включения

3.1 Распаковка анализатора MACSQuant®

Внимательно прочитайте инструкции, содержащиеся в данном разделе перед началом установки прибора. Перед открытием упаковки, в которой перевозился прибор, проверьте ее на предмет наличия внешних повреждений. Убедитесь также в том, что индикаторы удара или смещения положения (в случае, если таковые имеются на упаковке) не показывают наличие удара или смещения. Если на коробке присутствуют видимые повреждения и/или сработали индикаторы удара/смещения, свяжитесь со службой технической поддержки (см. раздел 13).

Название, описание	Расположение в коробке
Кабели модуля бутылочных сенсоров	Справа на дне коробки
Силовой кабель	Верхнее отделение
Трубки для жидкостей (6х)	Верхнее отделение
Крышки бутылей с сенсорами	Верхнее отделение
MACS MiniSampler (с крышкой)	Упакован в коробку, которая содержится в верхней части упаковки
Пустые контейнеры для расходных жидкостей с крышками	В держателях для бутылей
Штативы для пробирок	Упакованы в коробку, которая расположена в верхней части упаковки
Анализатор MACSQuant®	В специальном отделении
Руководство пользователя, DVD-диск с программным обеспечением, клавиатура с манипулятором	в специальных отделениях

Таблица 3.1 Описание и расположение частей прибора в контейнере для перевозки

1) Откройте контейнер, предназначенный для авиаперевозок прибора, либо картонную коробку (не показано) и снимите верхний упаковочный слой, убедитесь в наличии прибора и сопутствующей упаковки.

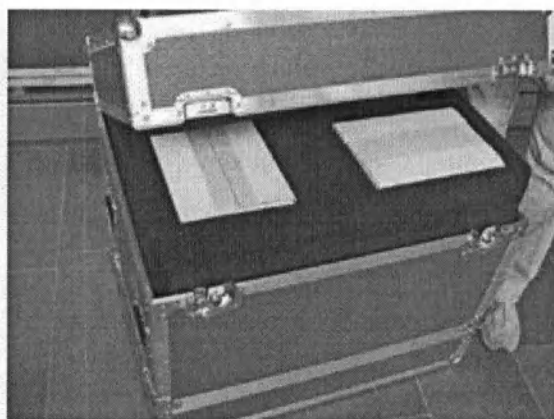
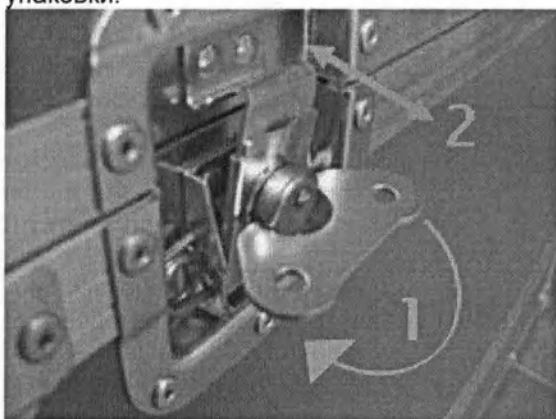


Рис. 3.1. Показано, как правильно открывать контейнер для авиаперевозок. Запирающая ручка должна быть повернута (положение 1) для того, чтобы открыть запирающий зажим (2). Анализатор MACSQuant также может транспортироваться в усиленной картонной коробке.

Примечание: в верхнем упаковочном элементе содержится инструкция пользователя, пробоотборник MACS MiniSampler (в случае, если он включен в комплекте поставки), и различные коробки с аксессуарами. Аккуратно достаньте их.

2) Достаньте коробки, содержащие пробоотборник MACS MiniSampler с крышкой, и аксессуары.



Рис. 3.2 Упаковка анализатора MACSQuant и дополнительного оборудования

3) Уберите панели из твердой упаковочной пены по обеим сторонам от анализатора

Примечание: поднимать анализатор MACSQuant из упаковки необходимо вдвоем. Прибор нужно взять за основание оранжевых держателей для бутылей, расположенных по обе стороны от прибора. Обратите внимание на то, что прибор тяжелее в его фронтальной части. Убедитесь в том, что передняя часть прибора стабилизирована в момент его поднятия.

Поднимайте анализатор MACSQuant с должной осторожностью. Miltenyi Biotec не несет ответственности за возможные повреждения, приобретенные в процессе поднятия/перемещения прибора

4) Поместите прибор на стабильную рабочую поверхность, например, на лабораторный стол. Снимите с прибора пластиковый мешок.

Примечание: примите во внимание, что прибору необходима соответствующая вентиляция для теплообмена и охлаждения. См. раздел 1.4.2 для подробных указаний.

5) Аккуратно извлеките иглу-пробоотборник из углубления в упаковочной твердой пене

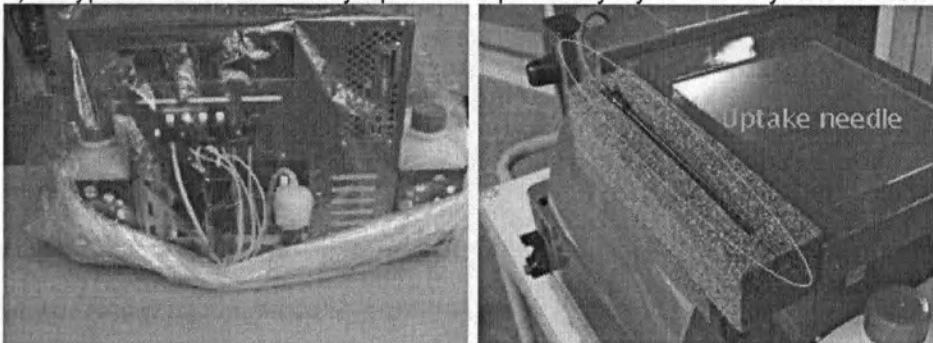


Рис. 3.3 Слева: анализатор MACSQuant надежно установлен на рабочей поверхности. Справа: пластиковый чехол снят с прибора. Обратите внимание, что игла-пробоотборник (uptake needle) лежит в специальном углублении в твердой упаковочной пене

6) Поместите иглу-пробоотборник в направляющий элемент, расположенный на роботизированном манипуляторе. Обратите внимание, что трубка должна свободно двигаться.

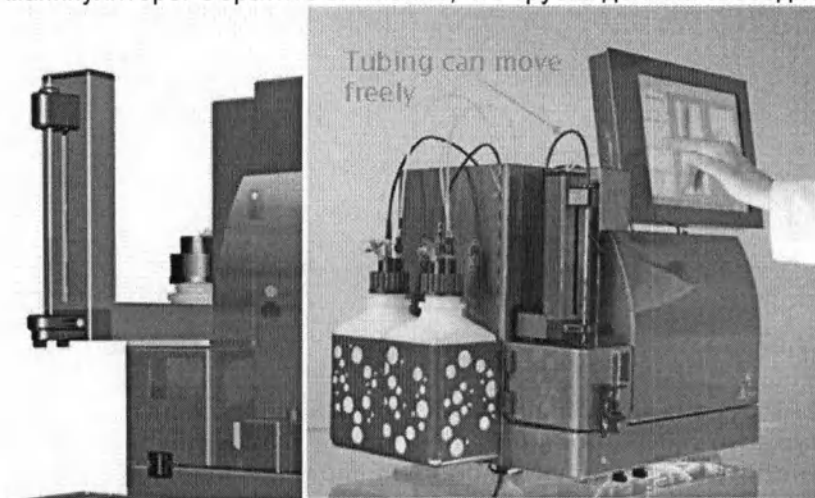


Рис. 3.4 Игла-пробоотборник должен быть расположен так, как показано на рисунке

Примечание: убедитесь в том, что трубка, присоединенная к игле-пробоотборнику, может свободно двигаться в тот момент, когда манипулятор выдвигается из прибора, или когда игла перемещается в положение для забора пробы

7) Настройте угол наклона сенсорного экрана – переместите его в вертикальное положение так, чтобы у Вас был свободный доступ к бутылкам с рабочими жидкостями и к портам для подключения гидрелиний на обратной стороне инструмента.

3.2 Установка анализатора MACSQuant®

Перед инсталляцией прибора внимательно прочтите главу «Важная информация» (раздел 1). Анализатор MACSQuant® - это настольный инструмент, отлично подходящий для установки на лабораторном столе или в стандартном ламинарном шкафу, или ламинарном боксе. Прибор должен быть установлен на стабильной ровной поверхности, не подверженной вибрационным воздействиям. В рабочем помещении не должно быть пыли, оно должно быть с соответствующей вентиляцией, вблизи прибора не должно быть источников электромагнитного излучения. Чтобы обеспечить ровную рабочую поверхность в ламинаре, анализатор MACSQuant® должен быть помещен на специальный поднос, предназначенный для использования в ламинарном шкафу (MACS® Laminar Hood Plate, каталожный номер #130-093-246).

Примечание: перед первым включением анализатора, внимательно прочтите настоящую инструкцию пользователя и свяжитесь с местным представительством компании Miltenyi Biotec для поддержки.

Примечание: поставляемый конечному потребителю анализатор MACSQuant® находится в «сухом» состоянии, т.е. система трубок прибора не заполнена раствором для хранения.

3.2.1 Подключение контейнеров для рабочих жидкостей и кабелей сенсоров наличия жидкостей

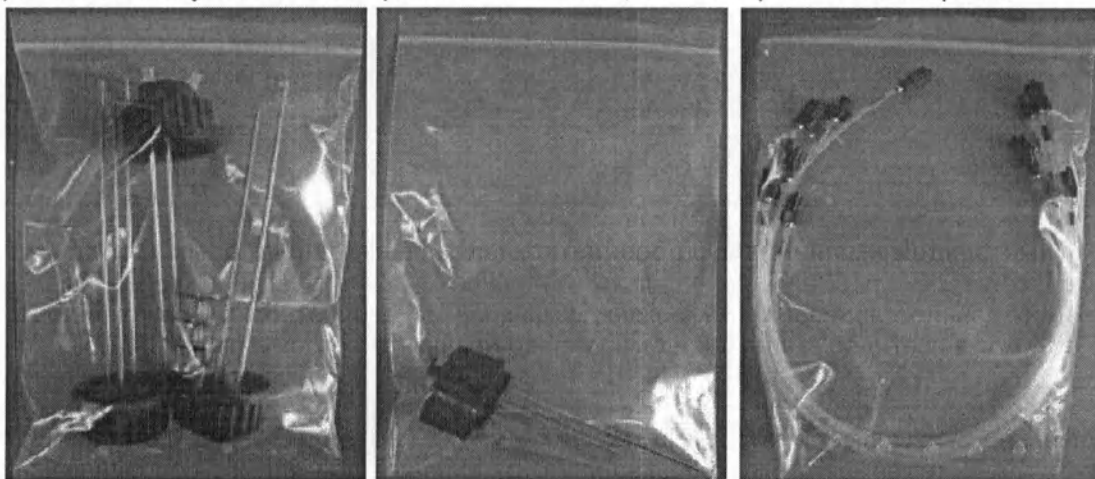
Для работы анализатора MACSQuant® требуется рабочий буферный раствор (Running Buffer), промывочный раствор (Washing Solution) и раствор для хранения (Storage Solution). Всегда работайте только с готовыми к употреблению фирменными растворами MACS. Анализатор MACSQuant поставляется с четырьмя пустыми емкостями (бутылками), которые находятся в оранжевых держателях бутылей, присоединенных к прибору. Крышки бутылей состоят из входных

портов для жидкостей (для растворов: зеленого, голубого и черного цвета), либо из выходного порта (контейнер для сбора отходов), а также из сенсора наличия электролита для измерения уровня жидкости. Контейнеры для жидкости, крышки бутылей, кабели сенсоров наличия жидкости имеют цветовые коды для удобства использования.

Контейнер	Символ	Контейнер	Символ
Рабочий буфер (Running Buffer) голубой цвет		раствор для хранения (Storage Solution) черный цвет	
промывочный раствор (Washing Solution) зеленый цвет		Отходы (Waste) Красный цвет	

Таблица 3.2 Символы и цветные коды контейнеров с различными жидкостями

- 1) Устанавливайте контейнеры с рабочими жидкостями последовательно. Поместите новую бутылку с жидкостью в соответствующий оранжевый держатель. Убедитесь в том, что символичные обозначения совпадают (см. табл. 3.2)
- 2) Открутите крышку бутылки и замените ее на соответствующую специальную крышку, оснащенную портом для подключения трубки и сенсором. Не открывайте крышку бутылки до тех пор, пока она не будет помещена в держатель.
- 3) Извлеките из упаковки сенсорные кабели и специальные крышки с сенсорами.



Крышки с голубым, зеленым и черным портами, а также гидрофобные фильтры, лежат в одной упаковке.

Крышка с красным портом (предназначена для емкости с отходами) упакована отдельно. Все трубки, присоединяемые к бутылкам, упакованы вместе.

Рис. 3.5. Упаковки с трубками, крышками бутылей и гидрофобными фильтрами.

- 4) Открутите заглушки с блока подключения трубок бутылей.

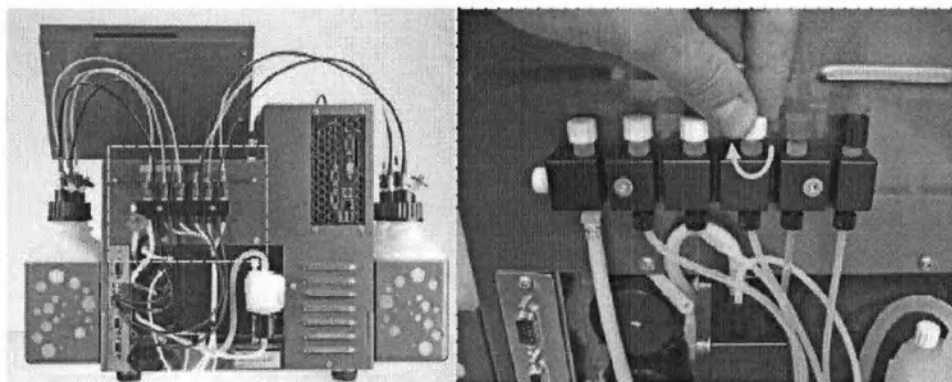


Рис. 3.6 Перед подключением трубок к блоку распределения жидкостей необходимо удалить заглушки.

5) Подключите трубки так, чтобы их цветовые коды соответствовали нанесенным на корпус прибора обозначениям

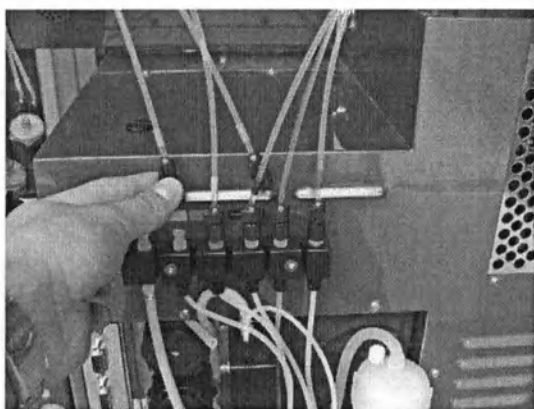


Рис. 3.7 Подключение трубок к блоку распределения жидкостей

6) Подключите разъемы кабелей сенсоров в соответствующие порты на обратной стороне анализатора MACSQuant и надежно их зафиксируйте в пазах, как показано на рисунке

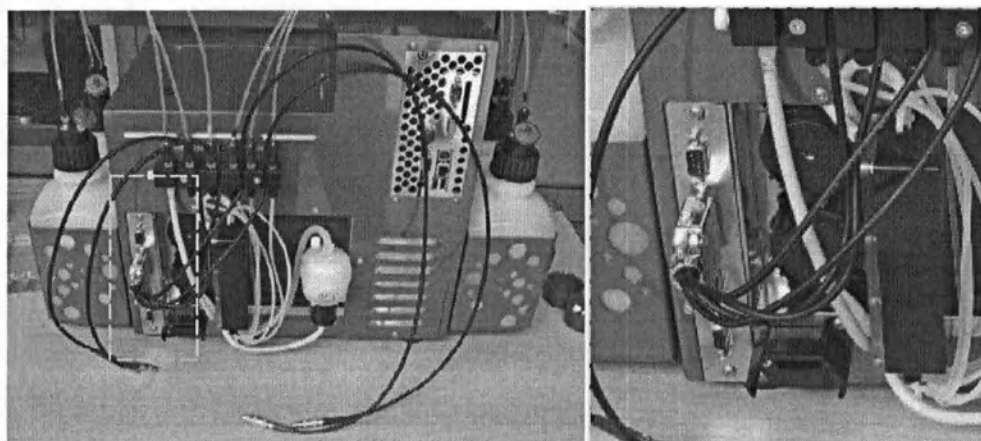
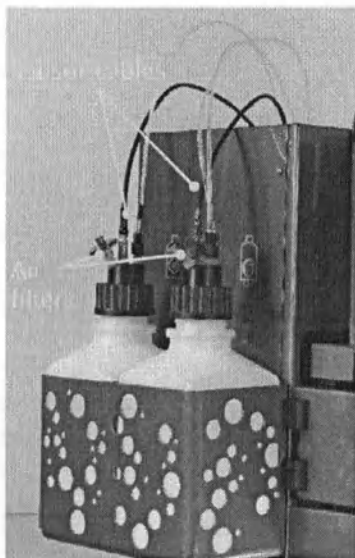


Рис. 3.8 Подключение кабелей сенсоров к порту сенсоров.

7) Обратите внимание, чтобы цветовые коды на кабелях сенсоров соответствовали цветовым кодам разъемов на крышках бутылок.



фильтры

подписи на рисунке: сверху: кабели сенсоров, снизу: воздушные

8) Подключите гидрофобные воздушные фильтры (0,2 мкм) к соответствующим разъемам на крышках бутылей.

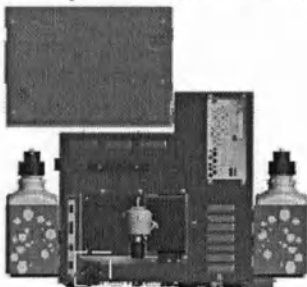
Примечание: Правильное расположение каждого из контейнеров с растворами (легко определяемое при помощи цветового обозначения) жизненно важно для корректной работы прибора MACSQuant®

Для того, чтобы сохранить стерильность буферных растворов, каждая из крышек бутылей должна быть оснащена гидрофобным воздушным фильтром. Избегайте любых контактов фильтров с жидкостями, т.к. это может повлечь за собой закупорку фильтра.

При работе с биологически опасными образцами перед началом работы рекомендуется наливать в контейнер для сбора отходов 100 мл дезинфектанта (например, отбеливающий раствор MACS Bleach Solution, номер для заказа #130-093-663). Для правильной утилизации отходов следуйте нормативам по утилизации таких отходов в соответствии с местным законодательством. Также внимательно ознакомьтесь с главой «Важная информация».

3.2.2 Подключение силового кабеля

1) Обратите внимание на положение силового разъема на задней панели анализатора MACSQuant® (выделено желтым цветом).



Убедитесь, что тумблер включения питания находится в положении «0» перед тем, как присоединить силовой кабель к прибору.

3.2.3 Установка пробоотборника MACS® MiniSampler, штативов для пробирок и штатива для реагентов.

Анализатор MACSQuant® опционально может быть оснащен роботизированным держателем штатива MACS® MiniSampler, тремя различными штативами для пробирок и штативом для реагентов (штатив для реагентов MACS Reagent Rack 4). При подключении к прибору роботизированный штатив (пробоотборник) MACS® MiniSampler автоматически распознается анализатором MACSQuant®. Каждый штатив для пробирок промаркирован штрих-кодом на задней стенке, что обеспечивает его автоматическое распознавание перед началом анализа образцов.

1) Удалите прозрачную защитную пленку с линзы, где расположен сканер штрих-кода штатива. Обратите внимание на расположение направляющей рамки (2) роботизированного штатива MACS MiniSampler и на соответствующий ей слот (1), расположенный на передней панели прибора MACSQuant

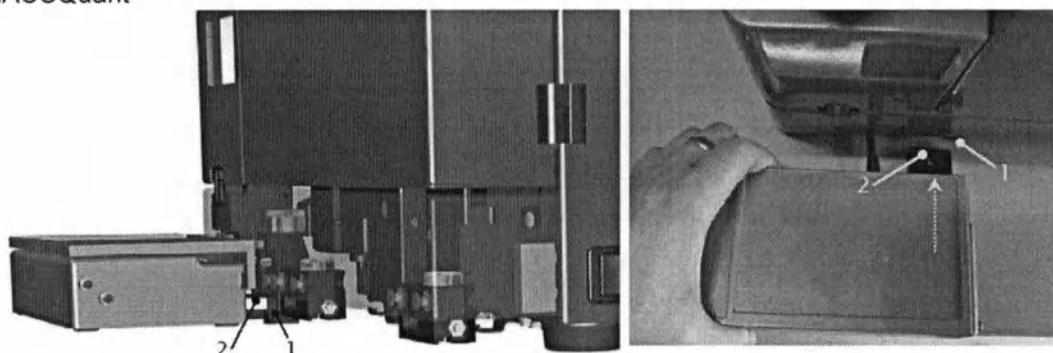


Рис. 3.9 Расположение направляющей рамки (2) и ответного слота (1) роботизированного штатива MACS MiniSampler

2) Вставьте направляющую рамку роботизированного держателя штатива MiniSampler в ответный слот и двигайте вперед до того момента, как будет чувствоваться сопротивление; переведите держатель штатива в горизонтальное положение, т.е. держатель штатива будет зафиксирован в положении, изображенном на рисунке выше.

3) Убедитесь, что MiniSampler полностью вставлен в слот и надежно зафиксирован.

4) Обратите внимание на то, что по обеим сторонам держателя есть направляющие выступы для фиксации крышки держателя штатива. Прикрепите крышку.

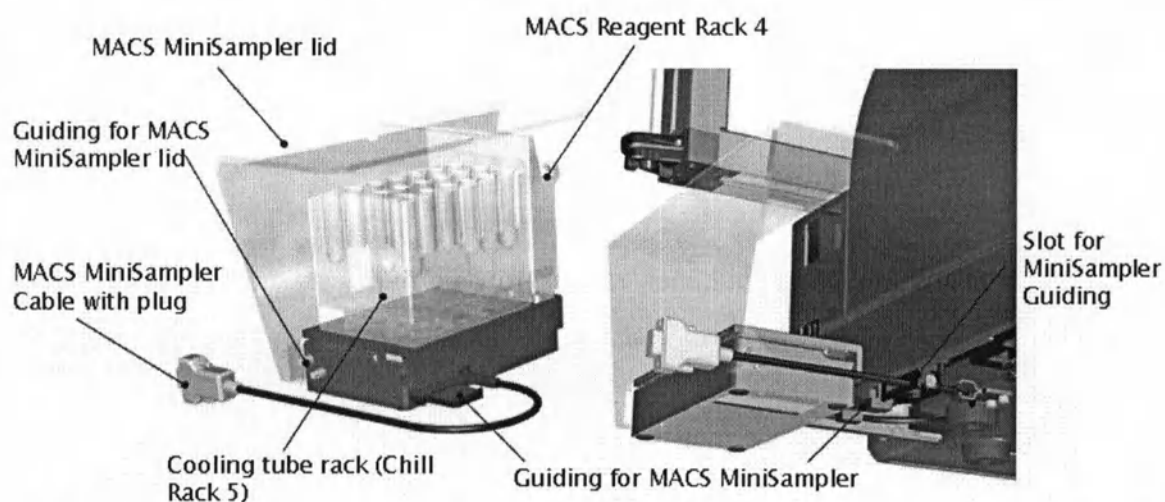


Рис. 3.10 Изображение держателя штатива со штативом для реагентов и со штативом для пробирок Chill Rack 5; вид сзади.

Подписи на рисунке слева направо: крышка держателя штатива, штатив для реагентов, ответный слот для направляющей рамки, направляющая держателя штатива, охлаждаемый штатив для пробирок (Chill Rack 5), разъем роботизированного держателя штатива, выступы для крепления крышки держателя штатива.

5) Разместите кабель держателя штатива под анализатором MACSQuant и подключите его к разъему (4), имеющему обозначение "External CAN" на задней панели

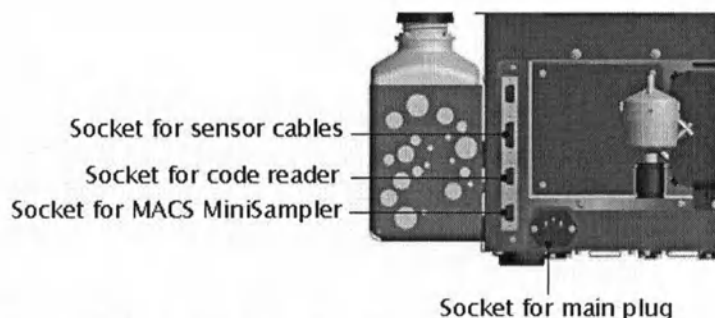


Рис.3.11 Кабель роботизированного держателя штатива MACSMiniSampler присоединен к разъему 4 на обратной стороне прибора.

3.2.4 Расположение охлаждаемого штатива для пробирок и штатива для реагентов (MACS Reagent Rack 4)

- 1) Откройте крышку держателя штатива MACS MiniSampler
- 2) Надежно зафиксируйте штатив для реагентов MACS Reagent Rack 4 на роботизированном держателе штатива в выемке, находящейся слева. Крепежный крюк должен попасть в выемку снизу.



Рис.3.12 Для того, чтобы снять с держателя штатива штатив для реагентов (MACS Reagents Rack), мягко надавите на штатив в направлении, указанном стрелкой 1, а затем поднимите штатив вверх в направлении, указанном стрелкой 2.

- 3) Установите охлажденный штатив для пробирок (например, Chill Rack 5) в держатель штатива MACS MiniSampler в правое отделение; убедитесь, что бар-код штатива располагается напротив ридера анализатора MACSQuant.

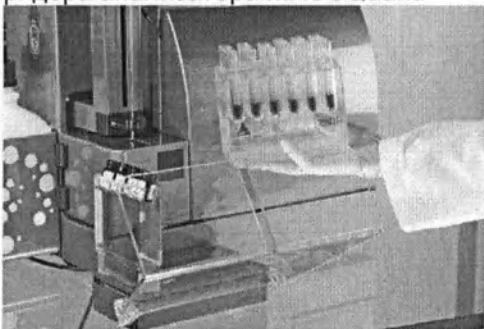


Рис. 3.13 Расположение штатива Chill Rack 5, примыкающего к штативу для реагентов MACS Reagent Rack 4, на держателе штативов MACS MiniSampler

Примечание: штативы для пробирок могут быть предварительно охлаждены в течение 3-4 часов при температуре 2-8°C. Не охлаждайте штативы до температуры ниже нуля, т.к. образцы могут заморзнуть. Если штатив не распознается прибором, то появится меню ручного выбора типа штатива. Перед тем, как подтвердить выбор штатива, убедитесь в том, что штатив правильно размещен на держателе.

3.2.5 Включение/выключение анализатора MACSQuant®

Тумблер включения питания прибора расположен на правой стороне корпуса напротив держателей контейнеров. (I означает «включено», О означает «выключено»). Включите анализатор MACSQuant®.

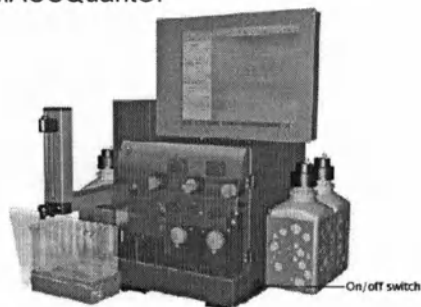


Рис. 3.14. Расположение выключателя прибора

3.2.6. Установка сепарационной колонки MACSQuant® (опционально)

Установите сепарационную колонку MACSQuant вместо пустой пластиковой колонки, расположенной под передней крышкой прибора

3.2.7. Установка веб-камеры

Установите веб-камеру в свободный USB-порт на обратной стороне прибора

3.3. Список контрольных проверок установки прибора

Данный список контрольных проверок может быть использован для проверки правильности установки анализатора MACSQuant®.

- 1) Убедитесь в том, что шнур электропитания прибора надежно присоединен к прибору MACSQuant®, а в розетка подключена к сети питания.
- 2) Убедитесь в том, что все трубки гидрочиний прибора затянуты. Если необходимо, затяните ослабленные соединения трубок с помощью специального ключа.
- 3) Убедитесь в том, что контейнеры для жидкостей наполнены и правильно установлены; в том, что соединительные трубки и сенсоры уровня жидкости подключены к соответствующим контейнерам, и в том, что крышки бутылей плотно затянуты. Убедитесь в том, что бутыль для отходов пуста.

Примечание: При работе с биологически опасными образцами рекомендуется добавлять в контейнер для отходов 100 мл дезинфектанта перед запуском прибора (например, раствора MACSBleach). Для правильной утилизации отходов ознакомьтесь с местными нормами и правилами утилизации таких отходов.

- 4) Опционально: Откройте переднюю крышку прибора и проверьте правильность установки сепарационной колонки. Убедитесь в том, что все трубки надежно затянуты и в том, что ни одна из видимых частей трубок не имеет проколов/повреждений.
- 5) По завершении проверки всех пунктов данного списка контрольных проверок закройте переднюю крышку прибора.
- 6) Включите прибор при помощи тумблера включения питания. Дотроньтесь рукой непосредственно до сенсорного экрана.

3.4 Материалы, требуемые для обслуживания анализатора MACSQuant®

3.4.1 Растворы

Дезинфицирующий раствор
Дистиллированная вода

3.4.2 Расходные материалы

Сепарационные колонки MACSQuant
Холостые колонки
Гидрофобные воздушные фильтры
Пре-фильтры

3.5 Калибровка аппаратной части прибора

Перед первым использованием анализатора MACSQuant необходимо откалибровать аппаратную часть прибора. Это необходимо сделать до калибровки лазеров прибора. В этом разделе описана калибровка аппаратной части прибора.

Примечание: Настоятельно рекомендуется, чтобы калибровка аппаратной части прибора была проведена администратором прибора, прошедшим тренинг в компании Miltenyi Biotec.

Примечание: Для того, чтобы провести калибровку аппаратной части прибора, пользователь должен уметь работать с программой MACSQuantify. Дополнительную информацию см. во вводимом разделе по пользовательскому интерфейсу анализатора MACSQuant.

3.5.1 Калибровка: определение типа штатива

Детекция держателя одной пробирки и кнопки начала сбора данных.

1) Щелкните по закладке **Tools** (инструменты), далее по **Calibrate Rack Detection**

2) Нажмите **Start Calibration**

Диалоговое окно подскажет Вам убрать держатель для одной пробирки (single tube holder) с передней панели прибора

3) Снимите с прибора держатель для одной пробирки, зажимая его двумя пальцами (оранжевая кнопка используется только для начала сбора данных, она – не фиксирующая кнопка, служащая для снятия держателя с прибора). Держатель для одной пробирки может быть легко снят с прибора простым вытягиванием детали из отверстий для крепления.

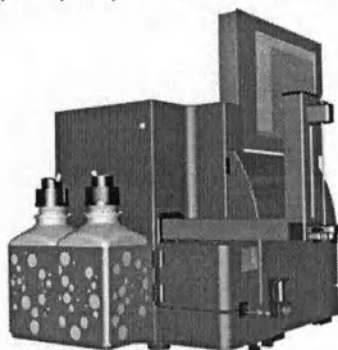


Рис. 3.30 Удаление держателя для одной пробирки. Оранжевая кнопка служит лишь для старта сбора данных.

4) Затем программное обеспечение прибора попросит Вас установить держатель для одной пробирки обратно. Это осуществляется путем совмещения двух штырей на держателе с ответными отверстиями до легкого щелчка.

5) В итоге программное обеспечение попросит Вас нажать и удерживать (press and hold) оранжевую кнопку (старт сбора данных) до тех пор, пока калибровка не будет завершена. Об успешном завершении калибровки свидетельствует зеленый круг напротив соответствующей строки.

Рис. 3.31 Успешное завершение калибровки автоматического определения штатива

Примечание: При калибровке штативов пользователь должен строго следовать указаниям прибора. Это необходимо для корректной калибровки. В противном случае, калибровка не будет завершена.

Автоматическое определение штативов

Этот шаг необходимо выполнить в том случае, если в комплект поставки прибора входит роботизированный держатель штативов MACS MiniSampler. Калибровка осуществляется аналогичным образом. Следуйте указаниям на мониторе.

3.6 Калибровка настроек прибора (instrument settings)

Внимание! Перед началом калибровки прибор необходимо перевести в режим сбора данных (acquisition mode). Для этого необходимо нажать на кнопку  в верхнем правом углу экрана. Программа выдаст диалоговое окно, предлагающее переключиться в режим сбора данных (switch to acquisition mode), либо выключить прибор (instrument off). Необходимо выбрать «switch to acquisition mode». Запустится процесс прайминга прибора (отмывка и заполнение жидкостью гидролиний, резервуара обжимающей жидкости, включение лазеров, переключение прибора в режим сбора данных). Перед началом прайминга (priming) убедитесь в герметичности соединений трубок, в том, что контейнеры с рабочими жидкостями заполнены соответствующими расходными жидкостями, а контейнер для сбора отходов пуст. Обратите внимание на то, что при первом запуске прайминга, по его завершении прибор выдаст системную ошибку. Это связано с тем, что перед транспортировкой прибора все гидролинии, а также резервуар обжимающей жидкости, осушаются, и одного цикла прайминга недостаточно для того, чтобы заполнить резервуар. В этом случае необходимо выключить прибор тумблером питания справа, подождать 5 минут и снова включить прибор, после чего повторить процедуру перевода прибора в режим сбора данных. Снова будет запущен цикл прайминга. После завершения второго цикла прибор будет готов к работе, в строке состояния прибора (внизу экрана) будет гореть зеленый круг с надписью “Calibration required” (требуется калибровка).

В проточной цитометрии интенсивность флуоресценции используется для определения разницы уровня сигнала между «позитивной» и «негативной» популяциями частиц. Воспроизводимость и стабильность сигнала флуоресценции во времени является важнейшим параметром устройства. Для обеспечения стабильности измерений, которые будут независимы от течения времени и от характеристик конкретного прибора, осуществляется его калибровка. Калибровочные кривые флуоресценции рассчитываются при помощи флуоресцентных микрошариков, которые обладают определенным размером и интенсивностью флуоресценции. Выражение линейной регрессии рассчитывается на основе ответов прибора по модальной гистограмме или по гистограмме среднего значения величины сигнала по каналу флуоресценции на основе этих predetermined значений.

3.6.1 Осуществление полностью автоматизированной калибровки

1) Перед началом калибровки убедитесь в том, что держатель для одной пробирки правильно установлен.

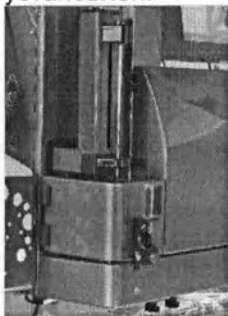


Рис. 3.34 Держатель для одной пробирки и оранжевая кнопка запуска измерения (старт начала сбора данных).

2) Активируйте сканер штрих-кодов посредством нажатия на значок **Barcode**

() и поднесите сосуд с калибровочными частицами MACSQuant™ (MACSQuant™ Calibration Beads) к сканеру штрих-кодов стороной, на которую нанесен штрих-код. Держите емкость с частицами под небольшим наклоном. Калибровочные частицы будут автоматически распознаны прибором, в диалоговом окне отобразится номер партии поставки калибровочных частиц. Для того, чтобы продолжить калибровку, нажмите **Yes** (да).

3) Следуйте дальнейшим указаниям прибора. Т.е. поместите пустую пробирку в держатель (**single tube holder**), добавьте в нее одну каплю калибровочных частиц MACSQuant (предварительно встряхните флакон на вортексе или вручную).

4) Нажмите **ОК** для начала процесса калибровки. Через иглу-пробоотборник в пробирку будет предварительно подан рабочий буфер для того, чтобы довести полный объем в пробирке до 0,5 мл. После этого калибровочные частицы будут перемешаны прибором, а 100 мкл растворенных калибровочных частиц будет введено в порт обжимающей жидкости. Этот объем и будет использован для калибровки. В процессе калибровки будут автоматически настроены параметры усиления и триггеры на соответствующих каналах флуоресценции. Калибровочные частицы MACSQuant – это микросферы двух размеров (неокрашенные частицы размером 2 мкм и окрашенные размером 3 мкм, несущие на себе флуорохромы, флуоресцирующие во всех 7 каналах прибора). 5) Результаты калибровки для каждого канала представлены в виде точечных диаграмм (dot plot), гистограмм и в виде таблицы в двухстраничном (на двух экранах) отчете. Успешная калибровка для каждого из каналов отмечается зеленой отметкой. Для того, чтобы просмотреть все диаграммы, гистограммы и таблицы, воспользуйтесь кнопками **Previous screen** или **Next screen**   (предыдущий и следующий экраны, соответственно).

3.6.2 Калибровка в ручном режиме

Пользователи, работающие в экспертном режиме (**Custom mode**) и администраторы прибора могут осуществлять калибровку в ручном режиме.

Примечание: Калибровочные частицы должны быть предварительно разведены и размешаны. Анализатор MACSQuant может провести разведение и перемешивание калибровочных частиц. Для более подробной информации см. раздел «Настройка параметров разведения и перемешивания калибровочных частиц перед калибровкой».

3.7. Настройка параметров компенсации каналов флуоресценции

Параметры цветовой компенсации, настроенные должным образом – важнейший компонент оптимального сбора и отображения данных в проточной цитометрии. Необходимость настройки параметров компенсации возникает вследствие присущего различным спектрам эмиссии разных флуорохромов общей области перекрытия. Этот флуоресцентный спектральный «перехлест» приводит к детекции одного и того же флуорохрома более чем в одном канале флуоресценции (что ведет к ложно позитивному сигналу). Такое «перекрытие» должно быть выявлено и скорректировано. Это особенно важно при использовании нескольких цветовых маркеров – без правильной настройки параметров компенсации результаты измерения будут неверными.

Например, флуоресценция широко распространенного флуорохрома FITC будет определяться как в канале FL-2, так и в канале FL-3, хотя именно канал FL-2 предназначен для детекции FITC. Поэтому вся флуоресценция от FITC, детектируемая в канале FL-3, считается излишним «переливом» сигнала; эта излишняя величина может быть выражена в процентах, значение которого можно математически «вычесть» (компенсировать) из всей величины начального сигнала. Лучше всего это видно на рис. 3.38, где клетки, меченые CD8-FITC антителами, отображены на двухпараметрической диаграмме (FL-2 против FL-3). Слева показан график с ненастроенными параметрами компенсации, где CD8+ - клетки детектируются как в канале FL-2 (FITC), так и в FL-3(PE), попадая, таким образом, в область двойных позитивных клеток (положительных как по FITC, так и по PE), хотя клетки были мечены только антителами, конъюгированными с FITC. После компенсации (справа) эта процентная величина, эквивалентная перекрывающейся области спектров, была удалена. Данная операция обеспечивает то, что сигнал от FITC (CD8+ - клетки) ограничен осью X (FITC). В данном случае параметры компенсации считаются настроенными правильно, если среднее значение интенсивности флуоресценции (**mean**) по каналу PE в левом нижнем и правом нижнем квадрантах равны. Эти значения можно найти в таблице **Statistics**.

Для настройки параметров компенсации необходимо использовать суспензию клеток, окрашенных только одним флуорохромом (например, только FITC, или только PE), и далее настраивать параметры компенсации для каждого из используемых каналов, где есть перекрывающиеся спектры.

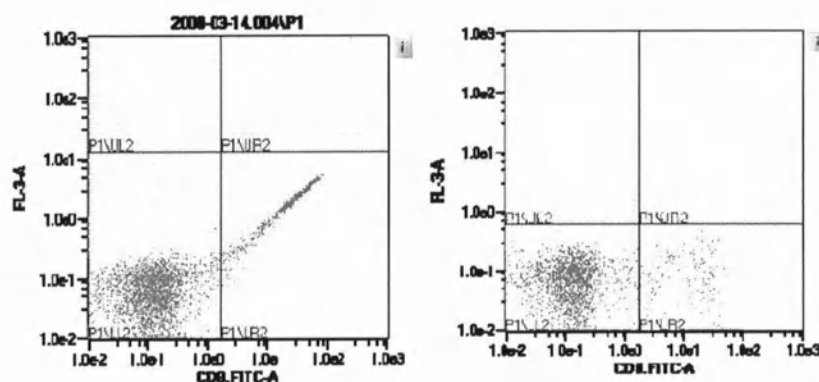


Рис. 3.38 Сигнал от клеток, окрашенных CD8-FITC, правильно скомпенсирован.

Примечание: Невозможно субъективно оценить ту долю сигнала, которую необходимо вычесть; настройки компенсации должны оптимизироваться индивидуально для всех задействованных флуоресцентных каналов, также как и для каждого флуорохрома и комбинации флуорохромов. Оптимальные настройки компенсации особенно важны, когда необходимо отличить слабо меченые клетки (клетки с низкой экспрессией антигена) от негативной популяции.

3.7.1 Осуществление автоматической компенсации

Проводить настройку параметров компенсации следует только после того, как прибор был успешно откалиброван и в строке состояния присутствует надпись «MACSQuant Ready: Calibration OK status». Автоматизированная компенсация прибора основана на матрице размером 7x7. Рекомендуется, чтобы анализатор MACSQuant автоматически рассчитывал подходящие настройки компенсации, используя автоматизированную матрицу компенсации и программу компенсации (метод матрицы). Однако, опытные пользователи могут предпочесть ручную настройку параметров компенсации классическим методом.

Анализатор MACSQuant может точно и надежно провести автоматическую настройку параметров компенсации, основанную на использовании матрицы 7x7 (каждый из каналов компенсируется против остальных 6 каналов), используя либо образцы клеток, окрашенные одним флуорохромом (т.н. single-stained cells), либо специальные калибровочные микросферы. Используемый для этих целей тип клеток и, соответственно, поверхностные маркеры на них должны иметь высокую экспрессию. Например, для того, чтобы компенсировать сигналы флуоресценции в каналах FL2, FL3, FL6, часто используют для контроля аликвоты мононуклеарных клеток периферической крови, меченые CD8-FITC, CD8-PE, CD8-APC – антителами.

Использование суспензии клеток, меченых одним типом антител, конъюгированных с флуорохромом, для настройки компенсации.

1) Отдельно пометьте клетки антителами, конъюгированными с соответствующим флуорохромом, который детектируется в нужном Вам канале флуоресценции. Непосредственно перед началом измерения перенесите равные объемы из всех пробирок, в каждой из которых аликвотирована проба, меченая только одним флуорохромом, включая негативную пробу, в одну пробирку и поместите ее в держатель для одной пробирки (single-tube holder) анализатора MACSQuant. Более подробную информацию, касающуюся реагентов и соответствующих протоколов окрашивания клеток, можно найти в каталоге компании Miltenyi Biotec и/или в технических описаниях соответствующих продуктов на сайте www.miltenyibiotec.com и www.macsquant.com.

3.7.2. 7-цветовая компенсация

В комбинации с функцией группирования возможно осуществление автоматической компенсации с использованием 7 флуоресцентных меток (флуорохромов).

Для того, чтобы провести 7-цветовую компенсацию:

Подготовьте пробирки с образцами клеток, в каждой из которых присутствует только один флуорохром (single-stained cells).

1) Определите количество клеток в образце мононуклеаров периферической крови. Открутите клетки на центрифуге (300g, 7 минут). Аспирируйте супернатант и ресуспендируйте клетки в

буфере, доведя их содержание в пробе до концентрации 1×10^7 клеток в 100 мкл буфера. Аликвотируйте в 9 пробирок.

2) Добавьте соответствующее количество антител, конъюгированных с флуорохромом, в соответствии с рекомендуемым производителем антител титром. Повторите процедуру для других 6 пробирок, используя подходящие конъюгированные с флуорохромом антитела, получив, таким образом, 7 пробирок, каждая из которых будет содержать клетки, окрашенные только одним флуорохромом.

Примечание: Например, для получения клеток, меченых одним флуорохромом, можно использовать следующие флуоресцентные метки: VioBlue, FITC, PE, PE-Cy5, PE-Cy7, APC, APC-Cy7.

3) В одну из пробирок не добавляйте антител. В последнюю пробирку добавьте йодид пропидия (PI) в рекомендуемой производителем концентрации (см. соответствующее техническое описание продукта).

4) Хорошо перемешайте содержимое пробирок и инкубируйте в течение 10 мин. в темноте при 4°C .

5) Промойте клетки – добавьте в каждую из пробирок 1-2 мл буфера и центрифугируйте при 300g в течение 10 минут. Аспирируйте супернатант.

6) Ресуспенсируйте клетки в буфере, доводя их содержание до концентрации 1×10^6 кл./мл.

7) Приступите к проведению автоматической настройки 7-цветовой компенсации на анализаторе MACSQuant.

7-цветовая компенсация на анализаторе MACSQuant

8) Для того, чтобы открыть сохраненные настройки прибора, нажмите на **File**, затем на **Open** и выделите закладку **Instrument settings**. Выберите из списка нужный Вам файл настроек.

9) Выберите штатив для пробирок, например, Chill Rack 5. Штатив должен быть предварительно охлажден до 4°C .

10) Поместите каждую из семи пробирок с образцами, мечеными одной флуоресцентной меткой, в колонны в штативе Chill Rack 5. Порядок размещения пробирок должен быть следующим: VioBlue (A), FITC (B1), PE (C1), PE-Cy5 (D1), PE-Cy7 (A2), APC (B2), APC-Cy7 (C2). Разместите оставшиеся две пробирки - содержащие клетки, окрашенные PI, в положение D2, и пробирку с неокрашенными клетками в положение A3.

11) Сгруппируйте образцы вместе таким образом, чтобы получилась одна группа проб (так, как показано ниже).

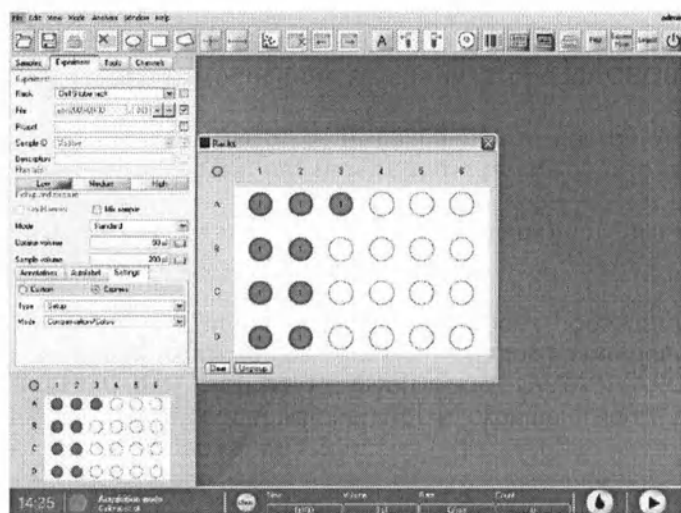


Рис. 3.46 Образцы клеток были сгруппированы вместе

12) Нажмите на кнопку , чтобы начать настройку компенсации.

13) Пользователю будет предложено нарисовать регион (гейт) вокруг интересующей субпопуляции клеток.

14) Анализатор MACSQuant проведет 7-цветовую настройку компенсации в выбранном Вами гейте.

4 Базовые принципы работы с анализатором MACSQuant®

Включите прибор тумблером включения питания. Дотроньтесь до сенсорного экрана. Прибор включится, при этом сначала произойдет инициализация всех систем прибора. Далее Вам будет предложено ввести пароль администратора (создается на более раннем этапе, при первом включении прибора).

По умолчанию прибор находится в режиме **Analysis**. В этом режиме рекомендуется создать шаблон эксперимента (**Analysis Template**). Создайте необходимый Вам шаблон, пользуясь меню **Window -> New analysis window**. При этом кнопка **A** должна быть серого цвета. Вам будет предложено на выбор несколько готовых шаблонов. Выберите наиболее подходящий шаблон, щелкните по нему мышью.

В появившихся диаграммах выберите необходимые Вам параметры (например, SSC и FSC). При помощи кнопок, описанных в таблице 6.1, создайте требуемые регионы, гейты различной формы, квадранты. Задайте выводимые на экран параметры статистики. Сохраните готовый шаблон под требуемым названием при помощи кнопки **Save** (сохранить шаблон можно тогда, когда кнопка **A** оранжевая). Шаблоны сохраняются в папку **Analysis templates**.

Кнопкой **Main instrument control** (кнопка в верхнем правом углу экрана) переключите прибор в **Acquisition Mode**. Подтвердите выбор нажатием кнопки **Yes**. Запустится автоматическая процедура прайминга (подготовка прибора к работе в режиме измерения). Когда процедура прайминга будет завершена, появится зеленый круг в левом углу экрана с надписью рядом **Acquisition Mode. Calibration OK** (в случае, если калибровка не требуется) либо **Calibration recommended**, либо **Calibration required**. В двух последних случаях проведите калибровку прибора, используя калибровочные частицы.

Затем перейдите в меню **Experiment**. Выберите требуемый тип штатива (например, **Single tube rack** – штатив для одной пробирки). В следующей строке (**File**) можно задать имя файла, в который будут сохраняться данные, полученные в результате измерения. Для этого необходимо снять галочку справа и вписать имя файла.

При помощи кнопок **Low, Medium, High** выберите требуемую скорость прохождения образца через проточную кювету (например, **Medium**).

Если требуется перемешать образец до начала измерения, поставьте галочку рядом с надписью **Mix Sample**.

В ниспадающем меню **Mode** выберите необходимый режим проведения измерения, например, **Standard**. В меню **Uptake Volume** задайте тот объем пробы, который будет отобран прибором для последующего измерения (минимальный объем – 25 мкл, максимальный – 450 мкл). В меню **Sample Volume** укажите приблизительный полный объем пробы, находящийся в пробирке (имеет значение для автоматического перемешивания, а также для автоматического разбавления пробы). В закладке **Settings** задайте дополнительные опции измерения – **Express** (доступны режимы **Setup** и **Analysis**) и **Custom** (более детальное задание параметров). В режиме **Custom** выберите необходимые настройки прибора (**Instrument settings**) из ниспадающего списка предварительно сохраненных файлов настройки. В поле **Analysis template** выберите необходимый Вам предварительно созданный шаблон.

Активируйте окно **Instrument Settings**, содержащее закладки **Channel** и **Compensation**.

Поместите пробирку с образцом в держатель пробирки.

Нажмите кнопку **Start** (начало измерения).

Прибор автоматически перемешивает пробу, отберет заданный заранее объем и начнет измерение. Пользуясь настроечными ползунками, регулирующими напряжение на фотоэлектронных умножителях, а также параметром **Trig** (триггер, дискриминатор), добейтесь нужной вам «картинки» на диаграмме. Например, при иммунофенотипировании (определение субпопуляций лейкоцитов человека) настройки параметров FSC и SSC должны быть настроены таким образом, чтобы на диаграмме отображалось минимальное количество дебриса, или клеточных «обломков»

(правильно настроенный триггер по FSC), но в то же время не «отсекались» основные субпопуляции лейкоцитов – лимфоциты, моноциты и гранулоциты. При этом все три указанные субпопуляции должны попадать в видимую область на диаграмме; ни одна из них не должна «уходить» за пределы диаграммы. Также субпопуляции не должны быть сильно «прижаты» к сторонам диаграммы.

Создайте нужный Вам гейт, либо откорректируйте положение уже созданного гейта (возможно только тогда, когда кнопка А серого цвета). Реализуйте нужную Вам стратегию гейтирования. Чтобы на последующей диаграмме/гистограмме отображались лишь события из определенного гейта, в верхней ее части выберите нужный вам гейт из ниспадающего списка (по умолчанию – надпись **live**). Проведите дальнейшую корректировку настроек, если это необходимо (напряжение на фотоэлектронных умножителях различных каналов флуоресценции, значения компенсации и т.п.), а также настройку шаблона. Не забудьте сохранить настройки в файл (настройки прибора сохраняются тогда, когда кнопка А серого цвета), а также сам шаблон (шаблон можно сохранить тогда, когда кнопка А оранжевая). При изменении значений напряжения на ФЭУ или значений дискриминатора, а также при изменении значений компенсации в процессе измерения, не забывайте нажимать кнопку **Clear** (очистить). В противном случае в сохраненном файле будут записаны и данные, полученные до начала внесения изменений, так и после них, что некорректно. Сохраненные в результате измерения файлы отображены в закладке **Samples**.

Пользуясь закладкой File -> Export, Вы можете сохранить полученные данные на внешний носитель информации (например, флеш-накопитель, CD/DVD диск).

5 Выключение анализатора MACSQuant

5.1 Выключение в ручном режиме

1) Нажмите на кнопку  (главная контрольная кнопка). Вам будет предложено два варианта – “data analysis mode” и “instrument off”. Для выключения выберите второй вариант. Автоматически будет запущен протокол отмывки прибора длительностью около 7 минут (включая инкубацию гидролиний с отмывочным буфером, последующей отмывкой и заполнением гидролиний буфером для хранения).

Примечание: прибор может использоваться в режиме “data analysis mode” для анализа данных даже после того, как он был выключен с отмывкой.

5.2. Автоматическое выключение

Прибор может быть выключен автоматически (если данная опция активирована через программу MACSQuantify). Эту опцию можно использовать во избежание холостой работы лазеров (что сокращает время жизни диодных лазеров). Также опция не позволит прибору находиться во включенном состоянии в течение ночи или во время нерабочих дней, если вдруг оператор забыл выключить прибор.