

Plan

1-	CARACTERISTIQUES DE L'APPAREIL ET RESERVATION	2
1.1.	PRÉSENTATION DE LA MACHINE	2
1.2.	CONFIGURATION IMAGE STREAM CYMAGES.....	2
1.3.	LOGICIELS.....	3
1.4.	EDF – EXTENDED DEPTH OF FIELD	3
1.5.	BANC OPTIQUE	4
1.6.	RESERVATION	5
2-	ALLUMAGE.....	6
2.1.	VÉRIFIER LES NIVEAUX DE LIQUIDE	6
2.2.	START-UP	6
2.3.	PERFORMANCE CHECK	7
3-	ACQUISITION DES ECHANTILLONS.....	9
3.1.	INFORMATIONS IMPORTANTES	9

1- CARACTERISTIQUES DE L'APPAREIL ET RESERVATION

1.1. PRESENTATION DE LA MACHINE



1. Double porte
= Accès fluides
2. Insertion Echantillon
3. Serveur
4. PC



- 1- Bouton allumage
- 2- Beads
- 3- Sterilizer = dilution
1/10 de BD FACS clean
- 4- Cleanser
= Coulter clenz
- 5- Debubbler
= 70% Isopropanol
- 6- Rinse = H2O MiliQ
- 7- Sheath = DBBS 1x
- 8- Poubelle

1.2. CONFIGURATION IMAGE STREAM CYMAGES

- 4 Lasers:
 - 405
 - 488
 - 561
 - 642
 - + 785 (= SSC/Darkfield)
- 1 Camera → 6 canaux de détection
 - Brightfield dans n'importe quel canal + 5 canaux
 - SSC uniquement canal 6
- EDF (Extended depth of field) → spot counting

- Multimag : 3 Objectifs (20X, 40X, 60X)

Objective	Field of view	Pixel size	Depth of field
20X	120 μm	1 μm	8 μm
40X	60 μm	0.5 μm	4 μm
60X	40 μm	0.33 μm	2.5 μm

Objective	Speed	Bin	Pixel Resolution	Sensitivity	Core Diameter	Velocity mm/sec	Sample obj/ml	Cells/Sec	Time to 10,000
20x	Low	1x	1 x 1 μm^2	High	10 μm	55	1x10 ^{7th}	200	54 sec
	Med	1x	1 x 1 μm^2	Med	10 μm	110	1x10 ^{7th}	360	28 sec
	High	2x	1 x 2 μm^2	Low	10 μm	220	1x10 ^{7th}	720	14 sec
40x	Low	1x	.5 x .5 μm^2	High	10 μm	55	1x10 ^{7th}	200	50 sec
	Med	2x	.5 x 1 μm^2	Med	10 μm	110	1x10 ^{7th}	360	29 sec
	High	4x	.5 x 2 μm^2	Low	10 μm	220	1x10 ^{7th}	720	14 sec
60x	Low	1x	.3 x .3 μm^2	High	7 μm	40	1x10 ^{7th}	60	160 sec
	Med	2x	.3 x .6 μm^2	Med	7 μm	55	1x10 ^{7th}	75	135 sec
	High	4x	.3x1.2 μm^2	Low	7 μm	110	1x10 ^{7th}	150	68 sec

1.3. LOGICIELS

- INSPIRE (ISX) = ACQUISITION
- IDEAS = ANALYSE

1.4. EDF – EXTENDED DEPTH OF FIELD

Extended depth of field (EDF) is used for experiments where having the entire cell in optimal focus is critical to obtaining accurate results (e.g. FISH spot counting).

General characteristics of using EDF are:

- The EDF element spreads all points of light within a cellular image into consistent L-shaped patterns. When EDF images are opened in IDEAS analysis software, the data is deconvolved to create an image of the entire cell projected simultaneously in focus.
- During acquisition and before deconvolution, images will appear blurred into the L-shaped patterns and raw max pixel values will be lower with EDF than with standard mode collection.
- Compensation controls for EDF data can be collected with or without the EDF element in place.
- When analyzing data in IDEAS, there will be more light per pixel than in non-deconvolved imagery after the deconvolution process. Therefore, raw max pixel values may exceed the recommended value of 4095. As long as the images did not saturate the camera during acquisition, these pixel values are valid.
- Object, Morphology and System Masks will be smaller in EDF mode.
- Focus gating is not required. However if there are blurred events due to streaking, these can be removed from the analysis using a focus gate.
- EDF images exhibit increased texture due to higher resolution.
- Brightfield imagery is not as crisp in EDF mode as in standard mode.

1.5. BANC OPTIQUE

Excitation Laser (nm)											
Ch	Band (nm)	375	405	488	561	592	642	730	785	Used	Ch
1	435-505 (457/45)	*DAPI, BV421, AF350, Hoechst, PacBlue, CascadeBlue, e,	*DAPI, BV421, AF405 , Hoechst, PacBlue, CascadeBlue, , eFluor450, DyLight405, CFP, LIVE/DEAD Violet								1
2	505-560 (533/55)	*BV510, PacOrange, CascadeYellow, AF430, eFluor525, QD525,	*BV510, PacOrange, CascadeYellow, AF430, eFluor525, QD525,	FITC , AF488 , GFP , YFP, DyLight488, PKH67, Syto13, SpectrumGreen, LysoTrackerGreen, MitoTrackerGreen							2
3	560-595 (577/35)	*QD565, QD585, eFluor565	*QD565, QD585, eFluor565	PE , PKH26, DSRRed, mOrange, CellMask/CellTracker/SYTOX Orange, Cy3	PE , AF546 , Cy3*, DyLight550, PKH26, DSRRed, SptmOrng, MTOrg						3
4	595-642 (610/30)	*QD625, eFluor625, BV605	*QD625, eFluor625, BV605	PE-TxRed , ECD , PE-AF610, RFP, QD625, eFluor625	AF568 , Cy3*, PE-TxRed, ECD, TexRed, PE-AF610, RFP, mCherry, PI	TexRed, AF594 , DyLight594, mCherry, SpectrumRed, PI,					4
5	642-745 (702/85)	*QD705, eFluor700, BV711	*QD705, eFluor700, BV711	PE-Cy5 , PE-AF647 , 7AAD, PI*, PerCP, PerCP-Cy5.5, DRAQ5, QD705, eFluor650, FuraRedLo, DRAQ5*, LDS 751	PE-Cy5 , PE-AF647 , DRAQ5* , 7AAD, LDS751	AF647, AF660, AF680, APC, Cy5, DyLight649, PE-AF647, PE-Cy5, DRAQ5*	APC , AF647 , AF660 , AF680 , DRAQ5 , Cy5, DyLight649, PE-AF647, PE-Cy5, PerCP, PerCP-Cy5.5				5
6	745-785 (765/40)	*QD800, BV786	*QD800, BV786	PE-Cy7 , PE-AF750 , QD800	PE-Cy7 , PE-AF750	APC-Cy7 , APC-AF750 , APC-H7 , APC-eFluor750	APC-Cy7 , APC-AF750 , APC-H7 APC-eFluor750, Cy7, AF750, DyLight750, PE-Cy7, PE-AF750	AF750, Cy7, DyLight750, PE-Cy7, PE-AF750	SSC		6

Recommended dyes (based on optimal excitation and detection channels) are in boldface.

*Many dyes will excite by more than one laser, and this can increase cross camera compensation.

**Channel bandpass may change depending on which lasers are on during an experiment. Values listed are assuming 405,488, and 642 laser excitation.

1 laser (488): ideal dyes are BF, AF488, PE, PE-TxRed, PE-Cy5, SSC

2 laser (488,642): ideal dyes are BF, AF488, PE, PE-TxRed, AF647, SSC

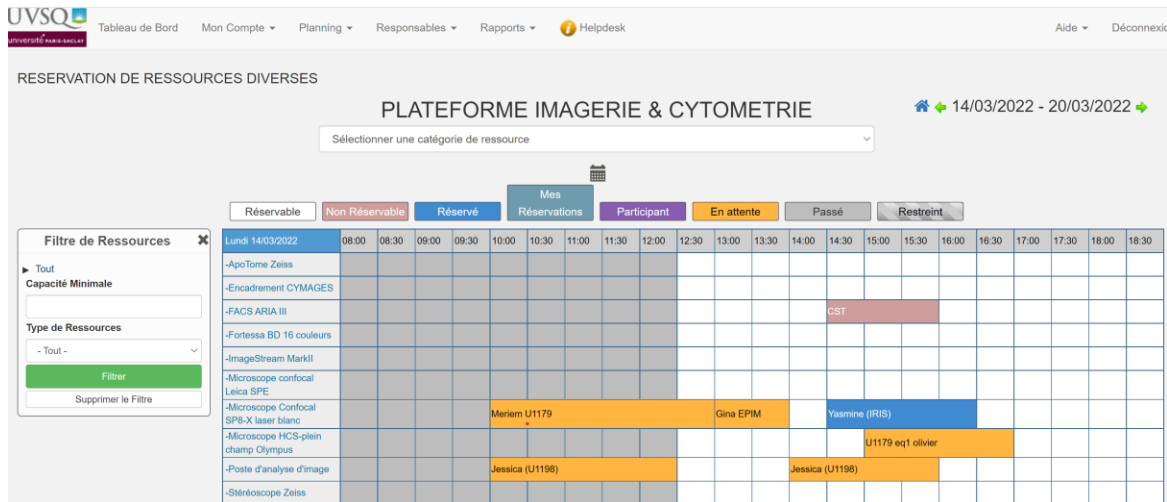
3 laser (405,488,642): ideal dyes are DAPI (or BV421), AF488, PE, PE-TxRed, AF647, SSC/BF

1.6. RESERVATION

1. Rendez-vous sur votre espace personnel de l'UVSQ : <https://www.personnels.uvsq.fr/> avec vos identifiants 4/4 de messagerie
2. Cliquer sur Mes applis / Icone RESA



3. Ou directement : <http://redmine2.dsi.uvsq.fr/resa/Web/schedule.php>
4. Sélectionner « PLATEFORME IMAGERIE ET CYTOMETRIE »



5. Une fois votre formation « utilisateur autonome » effectuée, vous aurez accès à la réservation de l'image stream. Pour créer une réservation, cliquer sur le créneau souhaité. Une nouvelle fenêtre s'affiche :

6. Compléter le **libellé de la réservation** en ajoutant votre **nom et votre équipe**. Préciser la date, le créneau horaire et la ressource (l'appareil choisit).
7. Cliquer sur créer pour valider la réservation
8. Vous pouvez **modifier ou annuler votre réservation** jusqu'à la seconde précédent votre créneau. Pour cela cliquer sur votre créneau, modifier votre créneau selon votre besoin et enregistrer. Pour supprimer votre réservation cliquer sur votre réservation puis sur « Plus » et Effacer.

2- ALLUMAGE

2.1. VERIFIER LES NIVEAUX DE LIQUIDE

1. Ouvrir la double porte de l'Image stream (Voir section 1.1)
2. Vérifier qu'il reste des **Spead Bead** (tube tout à gauche) – au moins 1.5 centimètre de liquide
➔ Attention : **ne pas jeter le tube mais le remplir**. Les nouveaux tubes ne s'adaptent pas sur la bague.
3. Vérifier le niveau des différentes bouteilles de fluide et remplir si besoin
4. Si besoin vider la poubelle dans le bidon placé sous l'image Stream (Déchets CMR – Etiquette verte C4)

2.2. START-UP

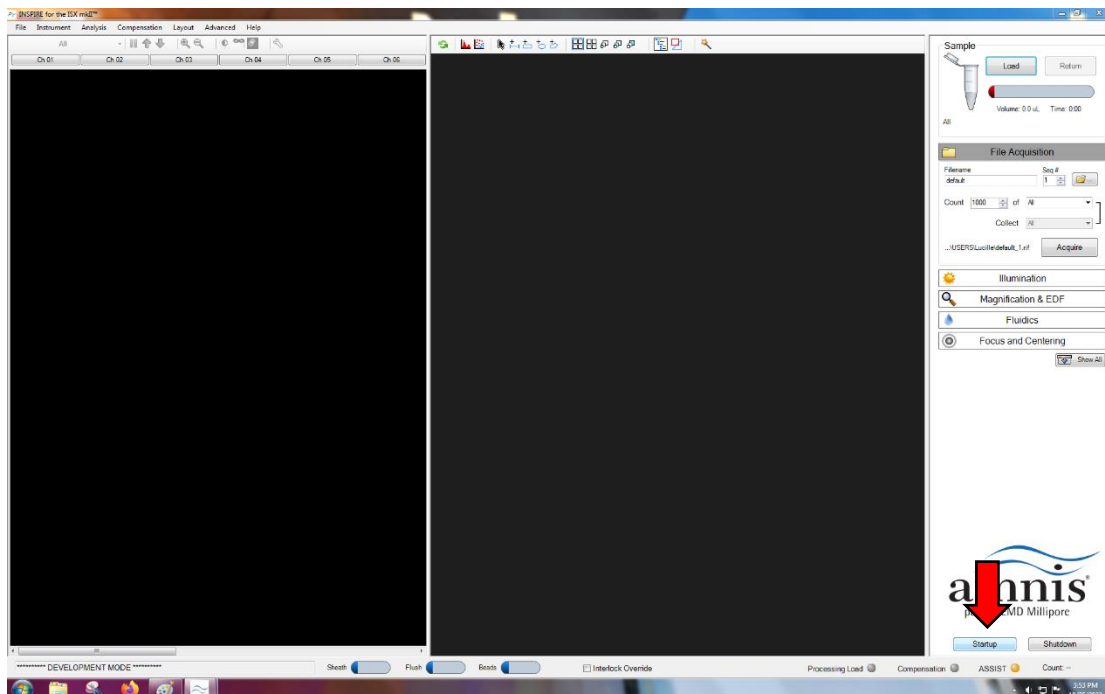
1. Presser le bouton d'allumage (Voir section 1.1)
2. Allumer le serveur (Grosse tour, derrière l'écran)
3. Allumer le PC (petite tour, à droite de l'écran)
4. Allumer l'écran
5. Identifiant : amnis - Mot de passe : CYMAGES
6. Double cliquer sur l'icône « ISX » au centre du bureau (ouvre le logiciel INSPIRE)
➤ **Important : Ne surtout pas fermer la fenêtre LINUX, cela crashera le système !**

```

C:\Program Files (x86)\Amnis Corporation\INSPIRE\INSPIRE\ISX.exe
<<< Creating IFlowSignals interface >>>
ccFlowSignalsIF initialized: registered port = dcs:/cpFlowSignalsProxy
Remote dcs:/cpFlowSignalsProxy port connected
<<< Creating Flow Speed interface >>>
FlowSpeedIF initialized: registered port = dcs:/cpFlowSpeedProxy
Remote FlowSpeed port connected
<<< Creating CoreFlow interface >>>
ccCoreFlowIF initialized: registered port = dcs:/cpCoreFlowProxy
Remote dcs:/cpCoreFlowProxy port connected
<<< Creating Assay interface >>>
ccAssayIF initialized: registered port = dcs:/cpAssayProxy
Remote dcs:/cpAssayProxy port connected
InstrumentIF initialized: registered port = dcs:/cpInstrumentProxy
Remote Instrument port connected
<<< Creating Instrument interface >>>
server name: 192.168.15.100
detected images drive letter: a:\
initialized fs signals update to false
OnHoodInterlockTriggered
Adding all parameter sets to AssayDB.
Set last init time to 07-May-20 11:46:21
Time for Initializing Fluidics... to complete: 813.3031393 seconds
ImagingInterface::Channel 1 enabled = 1
ImagingInterface::Channel 1 enabled = 1

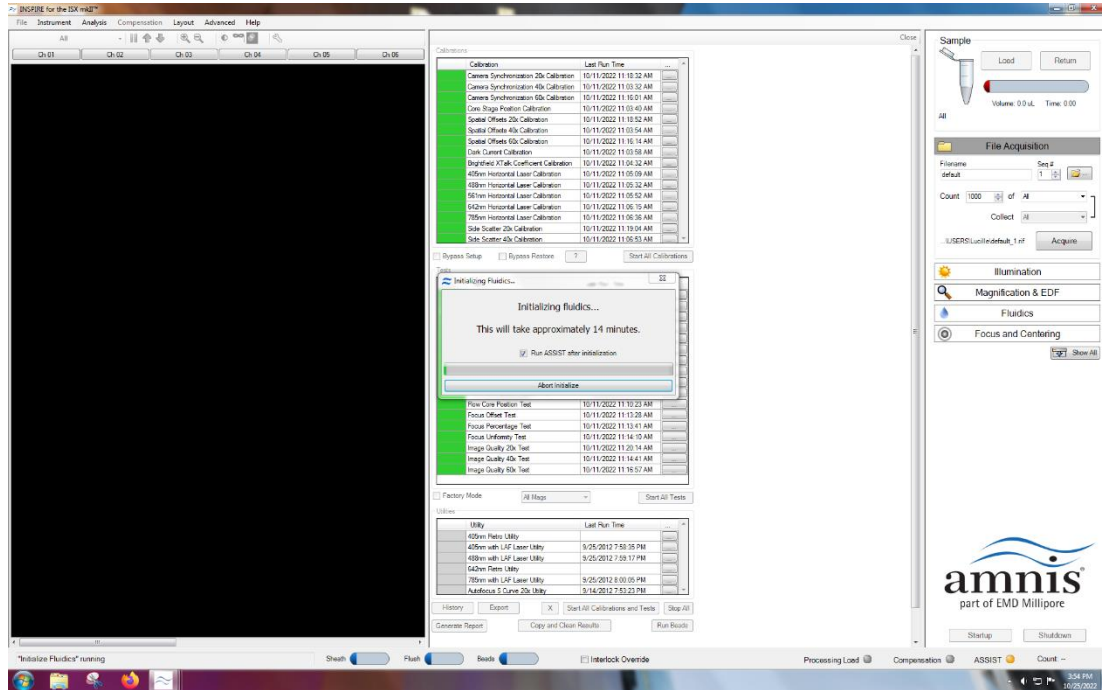
```

7. Une fois le logiciel ouvert, cliquer sur **start-up** (en bas à droite). Le logiciel lance automatiquement la mise en route de l'appareil.

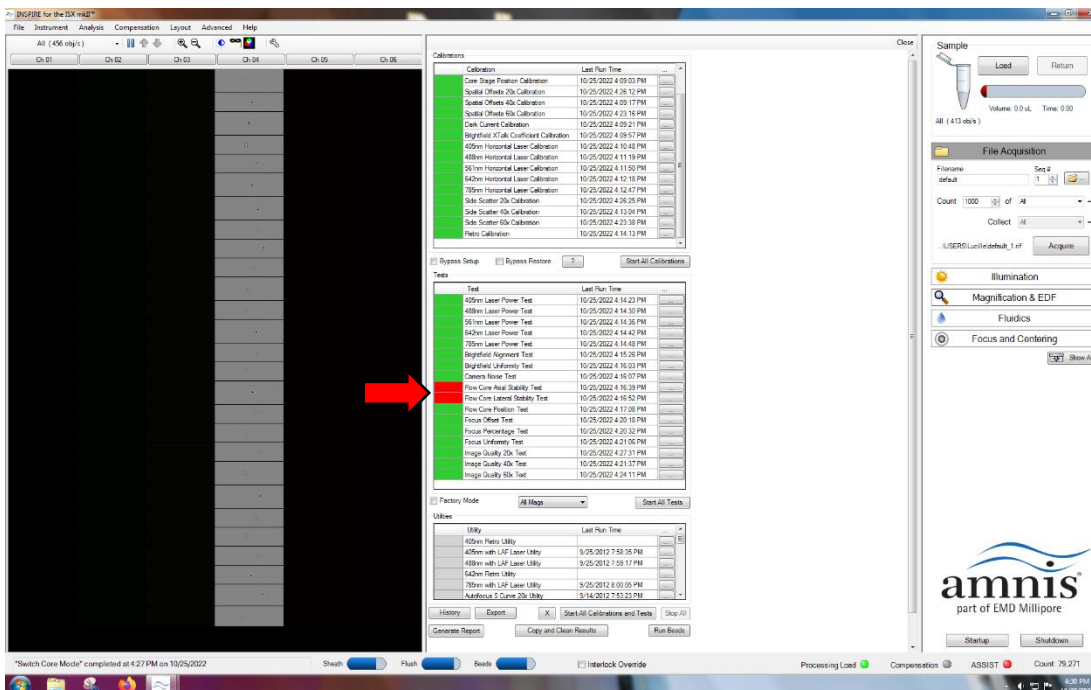


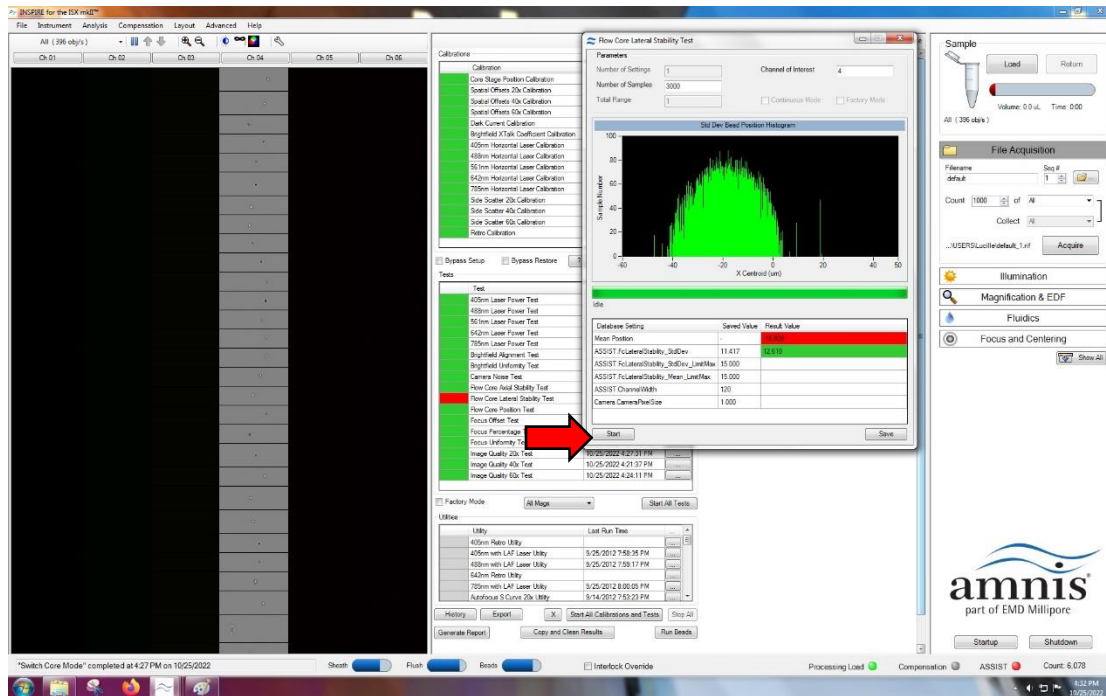
2.3. PERFORMANCE CHECK

- Une fois le start-up lancé, le logiciel vous indique qu'il va ensuite effectuer le « run ASSIST » (case automatiquement cochée). Cela correspond à la calibration et aux vérifications de performances quotidiennes. Le start-up dure 14 minutes, le run ASSIST entre 30 et 45 minutes.

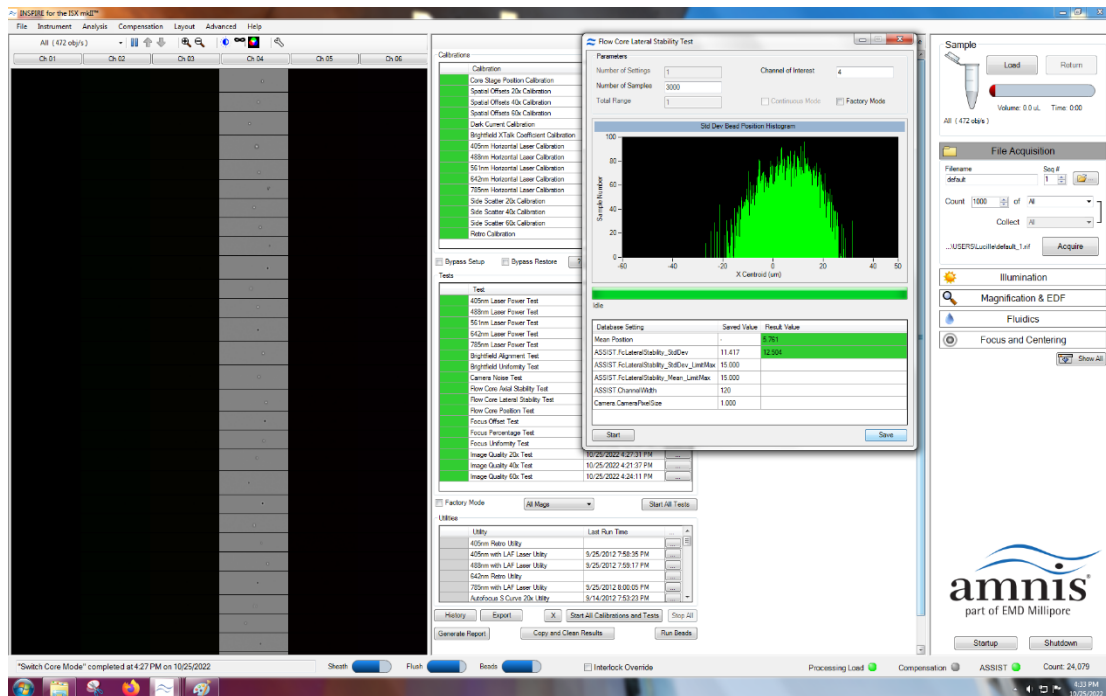


- Une fois les vérifications effectuées, le logiciel affiche pour chaque test une case de couleur :
 - Verte : check point OK
 - Rouge : Check point FAILED
- Vous devez relancer les check-points qui ont échoués en double cliquant sur la case correspondante et sélectionnant START.





Une fois le test validé (vert), cliquer sur SAVE. Le test peut être recommencé plusieurs fois, en cas de test restant invalidé, contacter un personnel de la plateforme.



L'appareil est prêt pour l'acquisition lorsque tous les voyants sont au vert.

3- ACQUISITION DES ECHANTILLONS

3.1. INFORMATIONS IMPORTANTES

- Tubes : **Eppendorf 1.5 ml**
- Volume minimum par échantillon : **50 µL**
- **Protocole de marquage** = Protocole habituel de marquage pour la cytométrie en flux
- **Compensations** : faire des marquages mono-couleurs pour chaque fluorochrome
- **Conditions optimales** : → Run 400 cellules/seconde en low
 - Concentration finale : 1 million de cellules dans 50µL (2×10^7 cells/ml)
 - Diluant : PBS+2% FBS
- Bien penser à **ouvrir les eppendorfs** avant de les placer sur le porte-tube (**capuchon vers soi**)
- Les bulles peuvent entraîner une erreur de chargement de l'échantillon par la machine
- Attention : Pour charger le premier échantillon : cliquer sur LOAD. Une fois l'échantillon chargé (volume restant indiqué dans la fenêtre SAMPLE en haut à droite) pour l'éjecter :
 - **LOAD** = échantillon jeté à la poubelle
 - **RETURN** = échantillon restitué dans le tube Eppendorf