

Luna fl 荧光细胞计数仪操作手册

一、Bright Field Cell Counting

1.1 样品的准备

1.1.1 准备的材料

细胞样品、Luna™ 细胞计数板、Trypan blue 染料、U 盘；

1.1.2 取 10ul 样品和 10ul Trypan blue 染料混匀；

1.2 上样

1.2.1 取 10-12ul 染料和细胞混合的样品，置于计数板的计数腔内，为了计数更准确，上样时计数板和移液器最好以 45-60 度的夹角，保证样品能快速冲入腔内、分布均匀（如图 1）。

1.3 计数

1.3.1 将充有样品的计数板置于计数仪的计数插孔内，装有样品的腔体向内，（如图 2 右侧孔为计数插孔）。

1.3.2 选择“bright field cell counting”选项（如图 3），此时样品的图像即可显示在显示屏上，可通过手指拖动图像查看整个图像的细胞（如图 4）。

1.3.3 调焦（调焦旋钮如图 2 左侧），根据需要进行调焦，活细胞经染色后会呈现中间亮周围暗的图像，死细胞整个为暗色。

注：为达到最佳的调焦效果，可以使用缩放功能，可将图像放大 2 倍和 4 倍后进行调焦。

◇ “stain option” 显示当前的计数模式，可在设置一栏中修改（图 5）；

◇ “color” 可更改当前的背景颜色为彩色；

1.3.4 点击“count”计数，大约 7 秒后，样品的图像、数据、结果（包括总数、死细胞和活细胞浓度、存活率、平均大小以及总数、死细胞和活细胞的实际数量）都会显示在屏幕上（如图 7）。



图 1



图 2

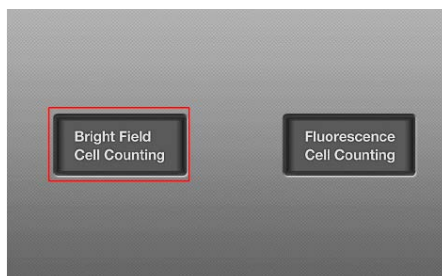


图 3

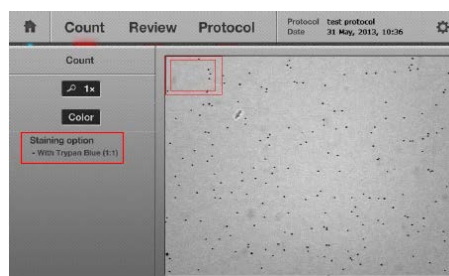


图 4

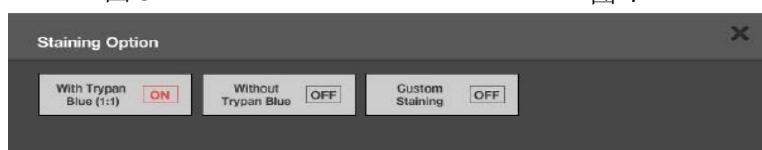


图 5

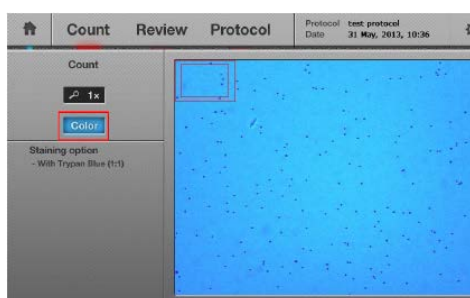


图 6

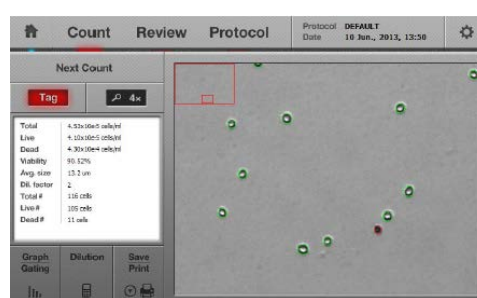


图 7

1.4 “Tag” 功能

1.4.1 点击“Tag”可以验证细胞计数的准确性；

◇ 点击“Tag”之后，样品会做上不同的标记，死细胞标记为红圈，活细胞为绿圈，再次点击“Tag”可以去除标记。

1.5 细胞大小和数量分布

1.5.1 点击屏幕左下角“Graph/gating”，更多样品的参数信息以直方图的形式显示，例如，细胞直径大小、细胞的数量等等（如图9）。

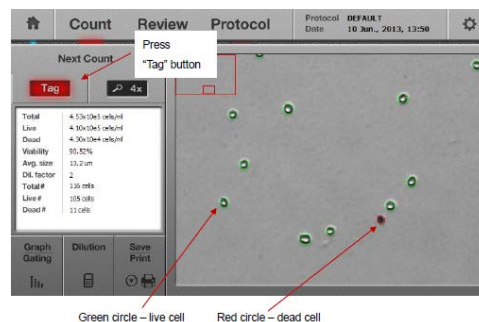
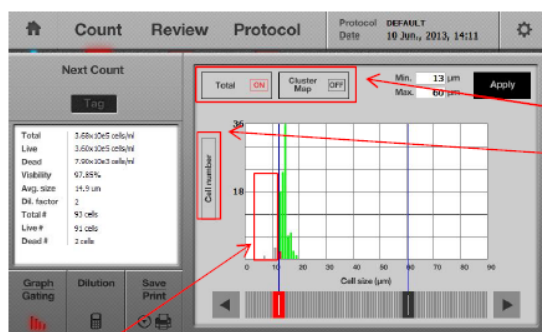


图 8



When the sizes of the cells are out of the range, they are displayed in grey color.

图 9

◇ “total, live or dead” button, 可以显示活细胞、死细胞以及总细胞；

◇ “cluster map” button,显示成团细胞的数量，1-cell 指单个细胞，2-cell 指两个细胞成团；

◇ “cell number or /ml” button,显示细胞的数量或者浓度；

◇ 直方图中绿色代表活细胞，红色代表死细胞，灰色代表未计数的其他杂质；

注，以上按钮可以组合使用，用来查看客户需求的信息。

1.6 稀释计算器

◇ Current concentration 显示目前样品的浓度；点击“total”可以显示“live” / “dead”，在活细胞、死细胞以及细胞总数之间切换；

◇ desired concentration 显示目标浓度，final concentration 显示目标体积，确认这两项后点击 calculate，屏幕下方即可显示具体的稀释方法（图10）。

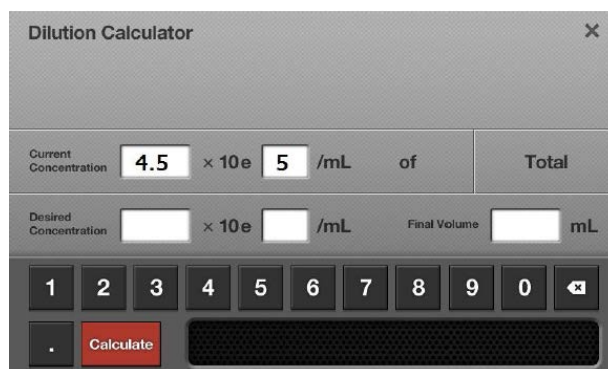


图 10

1.7 结果的保存

点击“save/print”，命名后即可将结果保存（图11）。

◇ 连接 U 盘后可以将结果直接保存在 U 盘中；

◇ 结果包括：TIF 格式的样品原图像，标记过的样品图像，PDF 格式的报告；

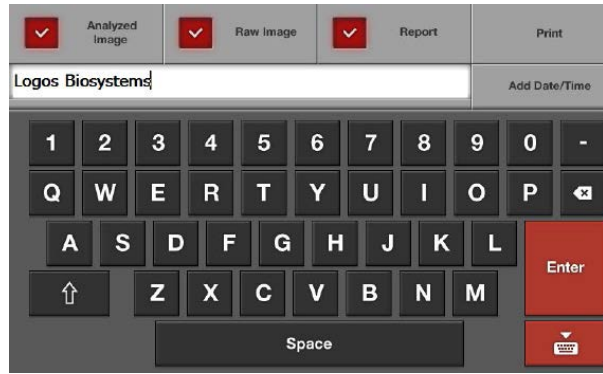


图 11

1.8 结果打印

连接了打印机的 luan-fl 可以将结果直接打印出来；

- ◇ 打印选项位于“save and report”选项中的“print”；
- ◇ 打印的内容包括，总细胞、活细胞、死细胞浓度、存活率、以及 Protocol 设置的参数等（图 12）；
- ◇ 打印内容中的 protocol 参数，如果不需要，可以在设置中将其去除（图 13）。



Luna-fl 打印机

```

Cell Count Report
=====
Instrument: LUNA-FL Automated Cell Counter
File name: Logos Biosystems-
Date: 15 Jun, 2013, 11:40
Cell Counting Mode: Fluorescence

Cell count results
-----
[Total cell]: 3.88x10e5 cells/mL
[Live cell]: 3.88x10e5 cells/mL
[Dead cell]: 0.00x10e0 cells/mL
Viability: 100.0%
AvgSize: 14.1 um
Dil.Factor: 1.11
Total cell: 178 cells
Live cell: 178 cells
Dead cell: 0 cells

Protocol
-----
Protocol name: DEFAULT
Min. cell size: 5 um
Max. cell size: 60 um
Size gating: 5~60 um
Green Threshold: 3
Red Threshold: 3
=====
  
```

图 12

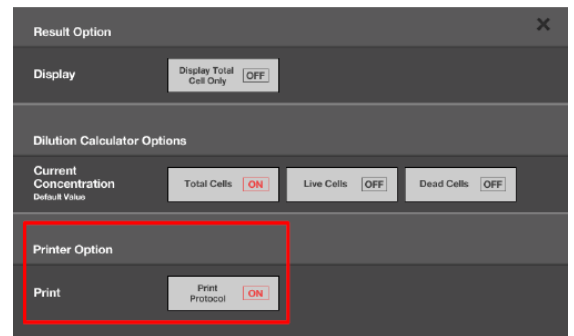


图 13

二、Fluorescence Cell Counting

2.1 样品的准备

2.1.1 准备的材料

细胞样品、Luna™ 细胞计数板、AO/PI cell viability kit、U 盘；

2.1.2 取 AO/PI 染色液 2ul，置于 1.5ml EP 管中；

2.1.3 取细胞样品 18ul 置于 1.5ml EP 管中，和 AO/PI 染色液混匀；

2.2 上样

取 10ul 混合液，加入计数板中，具体如图 14、15；

2.3 计数

2.3.1 静置 1min，待细胞沉淀下来，再进行计数；

◇ 上样板切勿上下反置；

2.3.2 选择“fluorescence cell counting”按钮，进入荧光计数模式（图 16）；

2.3.3 进入荧光计数模式后，屏幕中显示当前样品的图像，通过调焦旋钮可以调节样品的焦距，直到样品清晰为止（图 17）。

2.3.4 点击屏幕左上角的“BF/GF/RF/”

选择按钮,可以浏览样品在明场/绿色激发光/红色激发光下的成像（图 18）；

◇ “explore”选项，可调节视野内样品的光强；

◇ 在荧光模式下，要注意荧光的观察时间和强度，过高的强度和过长的时间都会使样品的荧光效果降低；

2.3.5 点击“count”进行计数；

◇ 计数结果在 30 秒后会出现在显示屏上；

◇ 显示内容包括：总细胞、活细胞、死细胞浓度，存活率、细胞平均直径大小以及实际计算的细胞数量等（图 19）；

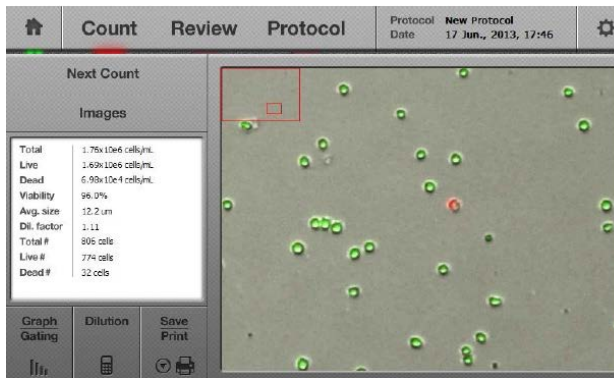


图 19

2.4 标记功能

验证计数的准确性可以使用该功能对样品进行标记；

点击“Tag”按钮，死细胞和活细胞分别以红色和绿色的圈标记；

◇ 再次点击“Tag”可去除对样品的标记；



图 14



图 15

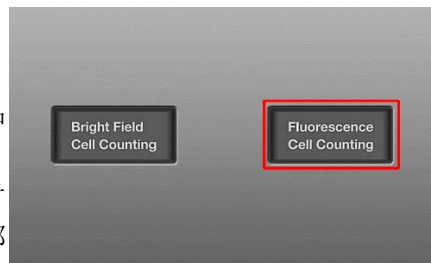


图 16



图 17

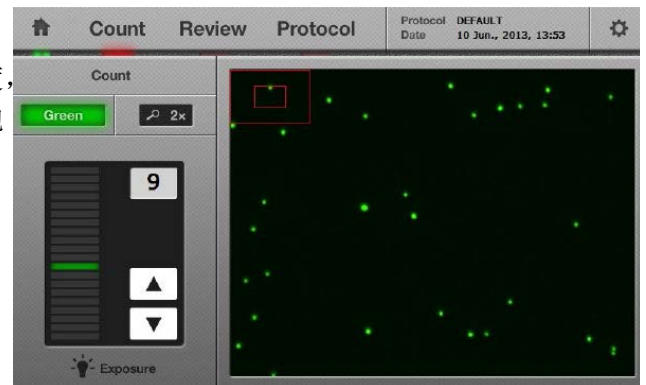


图 18

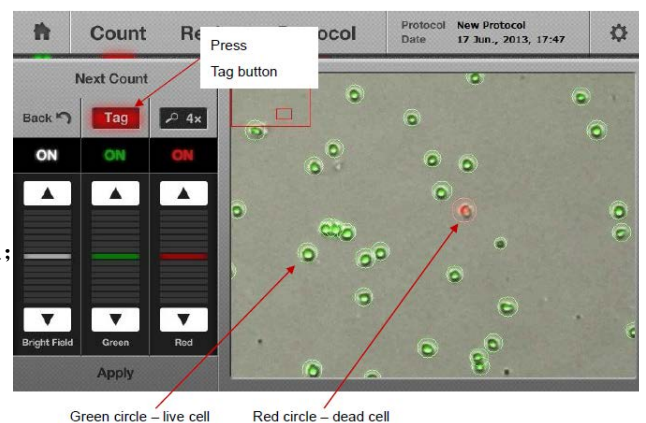


图 20

2.5 细胞大小和数量分布

此功能请参考 1.5 部分;

2.6 稀释计算器 参见 1.6

2.7 结果的保存 参见 1.7

2.8 结果打印 参见 1.8

三、保存结果的回看

Luan-fl 可通过 U 盘直接查看已保存的计数结果。

3.1 连接 U 盘后, 点击“review”, 屏幕左侧即可显示以往的技术结果;

3.2 选择要查看的结果, 点击文件名, 即可在屏幕右侧看到样品的图片, 同时计数的记过也会显示在屏幕左侧;

◇ 可点击缩放按钮, 将图像放大或缩小;

◇ 按“X”可以关闭当前结果, 继续查看其它结果;

◇ 按“count”可对当前结果进行重新计数;

3.3 “previous count”按钮

◇ 点击“previous count”按钮, 可以看到保存在 luna-fl 缓存中的计数结果;

◇ 点击“export to USB”可以将计数的历史结果到处到 U 盘;

◇ “erase all”可以清除缓存中的历史结果;

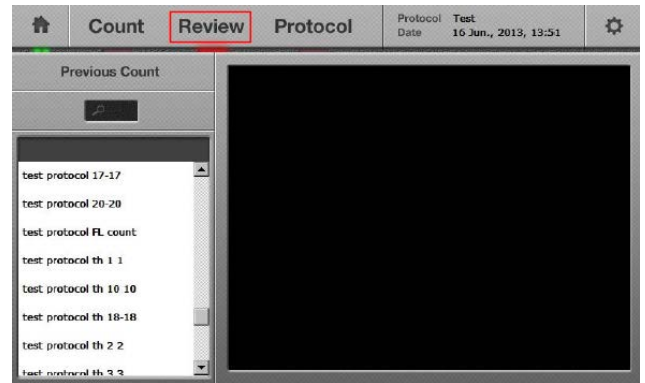


图 21

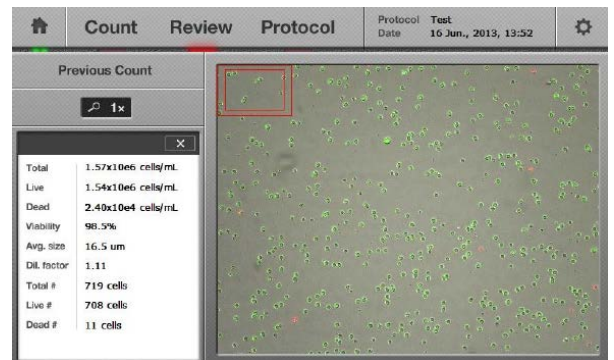


图 22

Mode	Name	Date	Total Cell	Live Cell	Dead Cell	Viability	Avg. Cell Size	Protocol
BF	1545111...	15/06/2013 13:35	6.68E+05	5.35E+05	1.34E+05	80.0%	12.1	Test Protocol
			170	136	34			
FL		15/06/2013 15:30	9.04E+05	9.04E+05	0.00E+00	100.0%	20.9	Test
			95	95	0			
BF		15/06/2013 16:28	2.91E+05	2.16E+05	7.47E+04	74.3%	15.4	Test Protocol
			74	55	19			
FL	9-20	15/06/2013 14:27	8.27E+06	8.27E+06	0.00E+00	100.0%	7.8	Test
			421	421	0			
FL		15/06/2013 14:26	8.27E+06	8.27E+06	0.00E+00	100.0%	7.8	Test
			421	421	0			
FL		15/06/2013 14:25	8.31E+06	8.31E+06	0.00E+00	100.0%	7.8	Test
			423	423	0			
FL	9-19	15/06/2013 14:24	8.31E+06	8.31E+06	0.00E+00	100.0%	7.8	Test

图 23

Protocol	User	Dilution Factor (1-100)	Noise Reduction (1-10)	Live Detection Sensitivity (1-10)	Roundness (50-100%)	Min. Cell Size (1-90um)	Max. Cell Size (1-90um)
DEFAULT	All User						
New Protocol	All User						
Test Protocol	All User	2	5	5	60	5	60

图 24

四、参数的设置

4.1 “bright field counting”参数的设置

4.1.1 在“bright field counting”模式下, 点击“protocol”可以选择、新建或者修改参数;

◇ 新建参数, 点击“new protocol” — “load” — “edit”就可以对参数进行编辑, 编辑后点“save as”就可以将新建的 protocol 进行命名并保存 (图 24);

◇ “dilution factor”默认值为 2, 客户可根据自己样品的稀倍数进行修改;

◇ “noise reduction”背景扣除的值, 一般选择 5, 背景过高时, 可以将该值调高;

◇ “live detection sensitivity”增强仪器对活细胞的检测, 活细胞中心亮点偏小时, 可以调高此值;

◇ “roundness”样品的圆度, 一般放在 60, 细胞不规则是可以调至 50;

◇ “minimum cell size” 和 “maximum cell size” 调节样品大小的分布范围；

4.2 “fluorescence counting” 参数的设置

◇ “dilution factor” 此值设置为 1.11，因为荧光计数时，样品和染色分别取 18ul 和 2ul，进行混合，因此稀释因素为 1.11；

◇ “minimum cell size” 和 “maximum cell size” 调节样品大小的分布范围；

◇ “threshold” 默认值都是 5，荧光强于此值的样品才计为细胞，否则都计为背景，用户可根据样品的背景来调节。

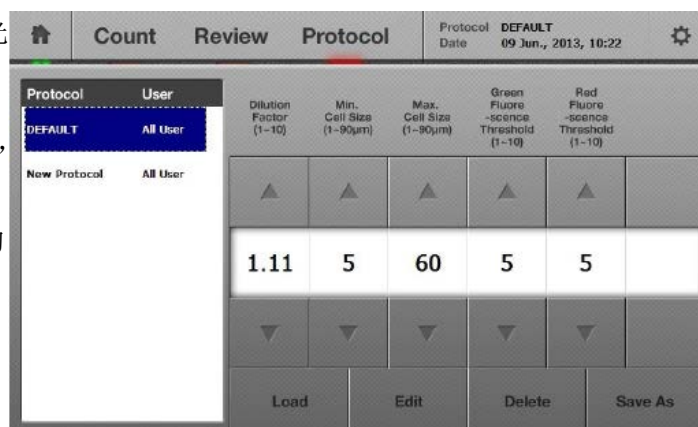


图 25