

PhenoCycler-Fusion 操作手冊

(FFPE sample)

July 2023



博克科技股份有限公司
J&H TECHNOLOGY CO., LTD.

台北市內湖區新湖二路162號4樓之1
www.jnhtech.com.tw service@jnhotech.com.tw
0800-898-178 Tel: 02-87912769

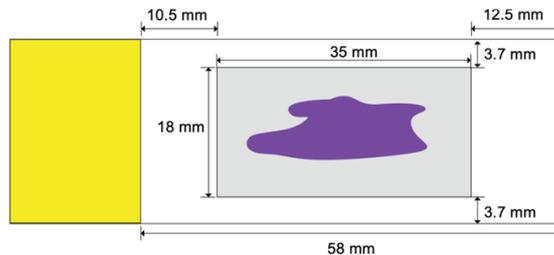
FFPE組織切片製備

設備或材料：

- 組織切片機
- 40°C水浴槽
- FFPE 組織蠟塊
- 玻片 (1" x 3" 正電)
- 高壓噴氣罐 (選擇性使用)
- 玻片儲存盒

1. 將水浴槽放置在切片機附近並設定40 °C。
2. 使用高壓噴氣罐清除玻片上的灰塵。
3. 切組織蠟塊前更換新的刀片。
4. 切組織並確認厚度介於5~10 微米 (μm)。
5. 將切好的組織片放置於水浴槽數秒讓組織切片更平坦。
6. 確認組織切片平坦無交疊即迅速將玻片至於水浴槽內輕輕地朝向組織片，讓組織片貼附上去，並拿出水浴槽。

*** 註記：**務必確保組織切片貼附於玻片中央，並避開flow cell要黏著的區域，如下圖所示。



7. 將玻片置放於乾淨的檯面 (組織面向上) 或置於有斜角的玻片盒 (如下圖所示)，將玻片在室溫下乾燥至隔日。



8. 重複步驟4-7完成每個組織切片。
9. 待組織切片都乾燥後，將組織片收入玻片收納盒。

實驗暫停點：如果儲存得宜，樣本可在4 °C下保存最多6個月。

FFPE組織染色前處理

前置準備-

1. 先將Hydration, Staining以及Storage buffer回溫至室溫。
2. 確認備齊所有材料備齊並把Blockers置於冰桶內。
3. 將ddH₂O注入Slide staining box底層並蓋上蓋子。
4. 將溶劑1x HistoChoice Clearing Agent (或 Xylene) 2個, 100% Ethanol 2個, 90% Ethanol 1個, 70% Ethanol 1個, 50% Ethanol 1個, 30% Ethanol 1個, ddH₂O 2個準備到適當的容器內。

設備或材料：

- 壓力鍋, 抽氣操作台, 烘箱
- Sample kit內容物-Hydration Buffer, Staining Buffer, Blocker (N+J+G+S), Storage Buffer
- Flow Cells
- PhenoCycler 抗體
- Ethanol, 1x HistoChoice Clearing Agent (or Xylene), 10x AR6或10x AR9 Buffer, 1x PBS, Fixative Reagent, 16% paraformaldehyde (PFA), ice-cold Methanol
- Coplin Jars, Slide staining box, solvent-resistant containers with lids, Slide staining rack
- 鋁箔紙, Parafilm (選擇性使用)

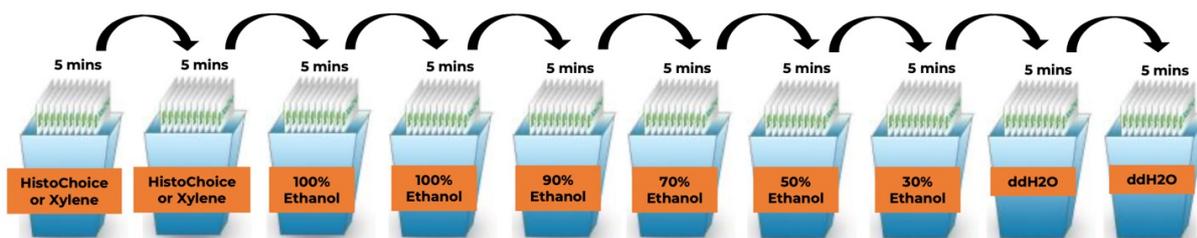
組織前處理-

1. 將組織片放入staining rack裡面。
 2. 將組織片方入烘箱烘烤65 °C 1~3小時 (或前一天60 °C overnight), 進行脫蠟。
- * 註記：根據不同的組織型態及切片方法，組織可能會有某些部位未完全貼附。增加烘烤時間可增強組織對玻片的貼附性。

組織脫蠟及水合-

* 註記：因使用的有機溶劑有毒性及高度揮發性，強烈建議執行此步驟時在抽氣櫃內進行。

1. 將staining rack 依序放入HistoChoice Clearing Agent (or Xylene) 2個, 100% Ethanol 2個, 90% Ethanol 1個, 70% Ethanol 1個, 50% Ethanol 1個, 30% Ethanol 1個, ddH₂O 2個的容器裡各5分鐘，並確保完全浸入，如下圖。



抗原恢復-

1. 以ddH₂O稀釋10x AR9至1x AR9溶液。
2. 如果要染色的切片數小於5片，則將50 ml 的1x AR9溶液倒入Coplin jar；如果要染色的切片數介於5-24片，則將250 ml 的1x AR9溶液倒入EZ Quick slide staining vessel中。
3. 將玻片放入Coplin jar或Quick slide staining vessel中並確認1x AR9溶液涵蓋整個組織片，如下圖所示。



4. 用鋁箔紙包覆容器如下圖所示。

***註記**：此步驟目的為防止壓力鍋內的水氣進入容器。



5. 壓力鍋倒入至多約1公升ddH₂O。

6. 將Coplin jar 放入壓力鍋。

7. 關緊壓力鍋上蓋。

8. 設定High-Pressure模式讓樣本烹煮20分鐘。

9. 結束後先進行洩壓，小心地將Coplin jar移出壓力鍋並於室溫下冷卻至少30分鐘。

***註記**：未在室溫下冷卻至少30分鐘會導致組織掉片。

10. 將組織片從冷卻的AR9溶液中取出來，迅速將組織片浸入裝滿ddH₂O的Coplin jar裡。接著再將組織片浸入第2 罐裝滿ddH₂O的Coplin jar等待2分鐘。

組織清洗-

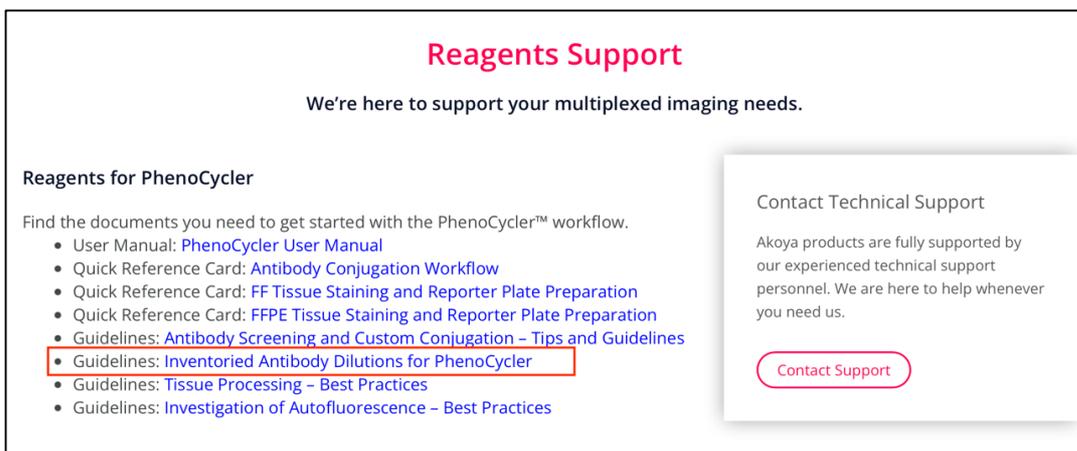
1. 將組織片從ddH₂O中取出，將組織片浸入裝滿Hydration Buffer的Coplin jar裡，上下移動2-3次。

2. 放置2分鐘。
3. 將組織片浸入第二罐裝滿Hydration Buffer的Coplin jar裡。
4. 放置2分鐘。

Staining Buffer放置-

1. 移動組織片到裝滿 Staining Buffer的Coplin jar裡。
2. 放置20-30分鐘。
3. 製備Antibody Cocktail。

***註記**：製備Antibody Cocktail 溶液之前，先確認抗體所需稀釋濃度，最新文件可在官網內點擊 Support => Reagents 接著在Reagents for PhenoCycler底下點擊Guidelines: [Inventoried Antibody Dilutions for PhenoCycler](#) 下載文件。若抗體為自接barcode的話，則需自行測試出最佳稀釋比例。



PHENOCYCLER | Antibody Dilutions

AKOYA BIOSCIENCES
THE SPATIAL BIOLOGY COMPANY

QUICK LINKS
HUMAN FFPE 1
HUMAN FRESH FROZEN 4
MOUSE FRESH FROZEN 5

PhenoCycler Antibody Dilutions

Recommended titrations are based on testing with the control tissue indicated below. Additional titration may be needed for optimized staining of your specific tissue.

| HUMAN FFPE | | Hu FFPE | Hu FF | Mu FF | Recommended titration |
|------------|--|---------------|-------|-------|-----------------------|
| Akoya PN | PhenoCycler™ Antibodies | | | | |
| 4250095 | Anti-Hu ATM(AKYP0122)-BX083—Atto 550 for PhenoCycler | Tonsil | | | 1:200 |
| 4450036 | Anti-Hu b-Catenin1(AKYP0069)-BX020—Atto 550 for PhenoCycler | Breast cancer | | | 1:400 |
| 4250091 | Anti-Hu b-Catenin1(AKYP0068)-BX096—Atto 550 for PhenoCycler | | | | |
| 4550089 | Anti-Hu Bcl-2(AKYP0120)-BX085—Alexa Fluor™ 447 for PhenoCycler™ | Tonsil | | | |
| 4250098 | Anti-Hu Bcl-2(AKYP0120)-BX085—Atto 550 for PhenoCycler | Tonsil | | | 1:200 |
| 4150040 | Anti-Hu Beta-actin(AKYP0072)-BX010—Alexa Fluor™ 488 for PhenoCycler™ | Tonsil | | | |
| 4450040 | Anti-Hu Beta-actin(AKYP0072)-BX010—Alexa Fluor™ 750 for PhenoCycler | Tonsil | | | 1:200 |

組織染色

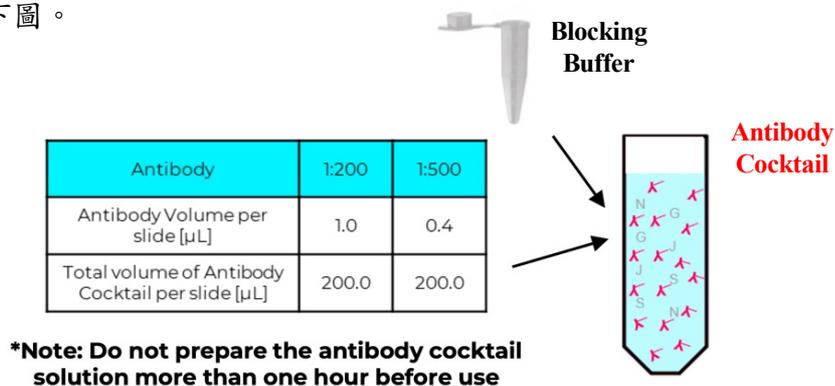
製備Antibody Cocktail 溶液-

1. 將欲使用的抗體從4 °C冰箱拿出，spin down集中任何液體後插入冰上。
2. 配置Blocking Buffer如下。

| PhenoCycler Reagent | 2 Samples | 4 Samples | 6 Samples | 8 Samples | 10 Samples |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| Staining Buffer [μL] | 362 | 724 | 1086 | 1448 | 1810 |
| N Blocker [μL] | 9.5 | 19 | 28.5 | 38 | 47.5 |
| G Blocker [μL] | 9.5 | 19 | 28.5 | 38 | 47.5 |
| J Blocker [μL] | 9.5 | 19 | 28.5 | 38 | 47.5 |
| S Blocker [μL] | 9.5 | 19 | 28.5 | 38 | 47.5 |
| Total [μL] | 400 | 800 | 1200 | 1600 | 2000 |

*** 註記：**如果使用的抗體編碼超過55 (BX055), G Blocker需要使用升級版“G Blocker v2”。製備Blocking Buffer時不要過早準備，提早準備最多不超過1小時為原則。

3. 將配好的Blocking Buffer以適當體積與所需全部抗體混合，最終配置成200 μl Antibody Cocktail 溶液，如下圖。



Ex 1：一片組織染24個抗體，稀釋比例都是1:200 (依照文件建議)，則需加入每個抗體1 μl，共24 μl 的抗體與176 μl 的Blocking Buffer混合。

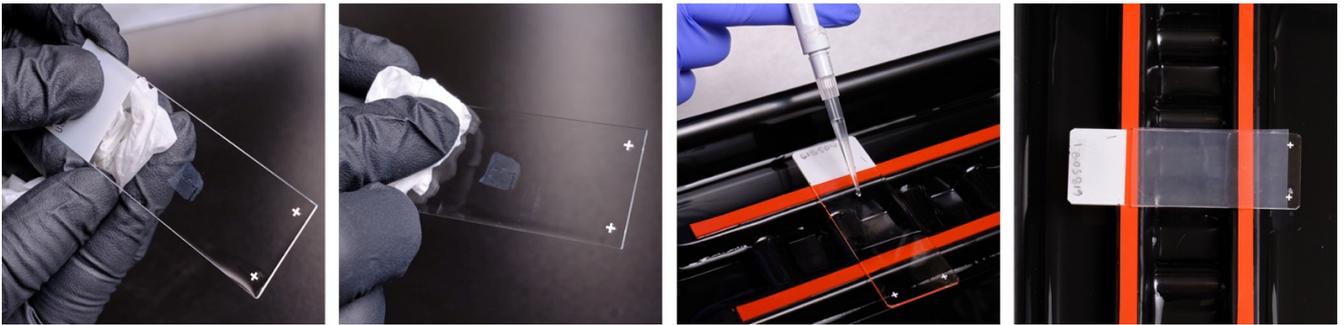
Ex 2：一片組織染8個抗體，其中6個抗體稀釋比例都是1:200，另外2種抗體比例為1:100。則抗體總體積為1x6 μl + 2x2 μl = 10 μl。Block buffer所需體積為200 μl- 10 μl = 190 μl。

*** 註記：**Blocking Buffer的體積需佔Antibody Cocktail總體積超過60%。

如果使用自接的抗體，需進行titration再決定抗體稀釋比例。建議初始稀釋比例為FF-1:250; FFPE-1:50。

4. 將Antibody Cocktail以pipette混合均勻或輕輕地vortex震盪。
5. 先吸取190 μ l的Antibody Cocktail放置在旁邊。
6. 將組織片從Staining Buffer取出，並用Kimwipe小心地吸取多餘的buffer (建議也將組織外圍的區域以方形擦拭)。
7. 將組織片放置在staining box的架上。
8. 迅速地將190 μ l的Antibody Cocktail沿著玻片角落加入，並確認有完全覆蓋整個組織區域，如下左圖。

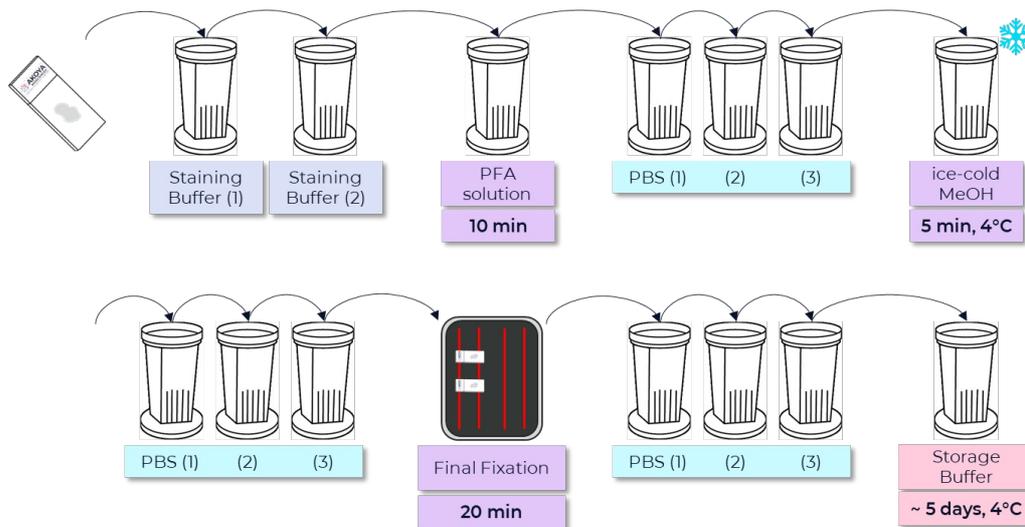
*** 註記**：加入Antibody Cocktail的時候不要直接滴在組織正上方，並應盡量避免產生氣泡。



9. (選擇性步驟)將parafilm (約整個non-label區域的大小)蓋在Antibody Cocktail正上方，如上右圖。
10. 將staining box的蓋子蓋上。
11. 於室溫下置放3小時。

*** 註記**：staining box放置的位子必須是穩固且無震動的地方。放置3小時結束後須立即進行“FFPE組織染色後處理”，並須在結束前先準備所需的buffer。

FFPE組織染色後處理



組織固定前清洗-

1. 將組織片浸入第1個裝滿Staining Buffer的Coplin jar裡，上下清洗2-3遍確保移除抗體溶液。
2. 放置2分鐘。
3. 接著再將組織片浸入第2罐裝滿Staining Buffer的Coplin jar，等待2分鐘。

Post-Staining Fixation 組織固定-

1. 準備Post-Staining Fixing Solution (1.6%PFA)

| Post-Staining Fixing Solution | 1 Coplin jar (1-5 samples) | 2 Coplin jars (6-10 samples) |
|-------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 16% PFA [mL] | 4 | 8 |
| Storage Buffer [mL] | 36 | 72 |
| Total Volume [mL] | 40 | 80 |

2. 將配置好的PFA溶液 (Post-Staining Fixing Solution) 加入Coplin jar。
3. 將組織浸入Post-Staining Fixing Solution，室溫放置10分鐘。

***註記**：在等待的期間先準備好ice-cold Methanol。

組織清洗-

1. 準備3個Coplin jar灌滿1x PBS (1~5個slide)。
2. 將組織片浸入第1罐PBS，上下清洗2-3遍確保移除固定液。
3. 將組織片浸入第2罐PBS，上下清洗2-3遍確保移除固定液。
4. 將組織片浸入第3罐PBS，上下清洗2-3遍確保移除固定液。

Ice-cold Methanol 放置-

1. 將冰箱中的Methanol倒入Coplin jar。
2. 將組織片從PBS移到Ice-cold Methanol，並於4 °C 放置5分鐘。

組織清洗-

1. 迅速將組織片浸入第1 罐PBS，上下清洗 2-3遍確保移除methanol。
2. 將組織片浸入第2 罐PBS，上下清洗 2-3遍確保移除methanol。
3. 將組織片浸入第3 罐PBS，上下清洗 2-3遍確保移除methanol。

Final Fixation 組織固定-

1. Rinse清洗staining box並擦乾。
2. 用剪刀將1管Fixative Reagent Tube 從tube strip剪下(1管可做5片組織)，從-20 °C 冰箱取出。
*註記：千萬不要將整排tube strip解凍！每管只可單次使用，不要回凍。不要提早拿出Fixative Reagent解凍 (體積只有20 µl，解凍速度很快)。
3. 將Fixative Reagent進行spin down收集蓋子上所有液體。
4. 準備1x PBS 與Fixative Reagent配置Final Fixative Solution：

| Final Fixative Solution | 1-5 Samples | 6-10 Samples |
|-------------------------|-------------|--------------|
| 1x PBS | 1000 µL | 2000 µL |
| Fixative Reagent | 20 µL | 40 µL |

5. Vortex混合均勻。
6. (選擇性步驟)剪出一個方形 parafilm (約整個non-label區域的大小)。
7. 先吸取200 µl 的Final Fixative Solution，放置在旁邊。
8. 將組織片從Coplin jar取出，並用Kimwipe小心地吸取多餘的buffer (建議也將組織外圍的區域以方形擦拭)，放置在staining box裡。
9. 迅速地將200 µl的 Final Fixative Solution 沿著玻片角落加入，並確認有完全覆蓋整個組織區。不要直接滴在組織正上方，並應盡量避免產生氣泡。
10. (選擇性步驟)將parafilm 蓋在的 Final Fixative Solution 正上方。
11. 將staining box的蓋子蓋上。
12. 於室溫下置放20分鐘。

組織保存-

1. 將組織片浸入第1 罐PBS，上下清洗 2-3遍。
2. 迅速將組織片浸入第2 罐PBS，上下清洗 2-3遍。
3. 迅速將組織片浸入第3 罐PBS，上下清洗 2-3遍。
4. 準備1個 Coplin jar 倒入Storage Buffer。
5. 將組織片移入裝有Storage Buffer的Coplin jar裡。
6. 組織現在可進行上機掃片或暫時保存。

實驗暫停點：組織放入Storage Buffer 後可在4 °C 暫時保存。建議保存**不超過5**天以維持最好的實驗結果。

Reporter Plate配置以及Protocol設定

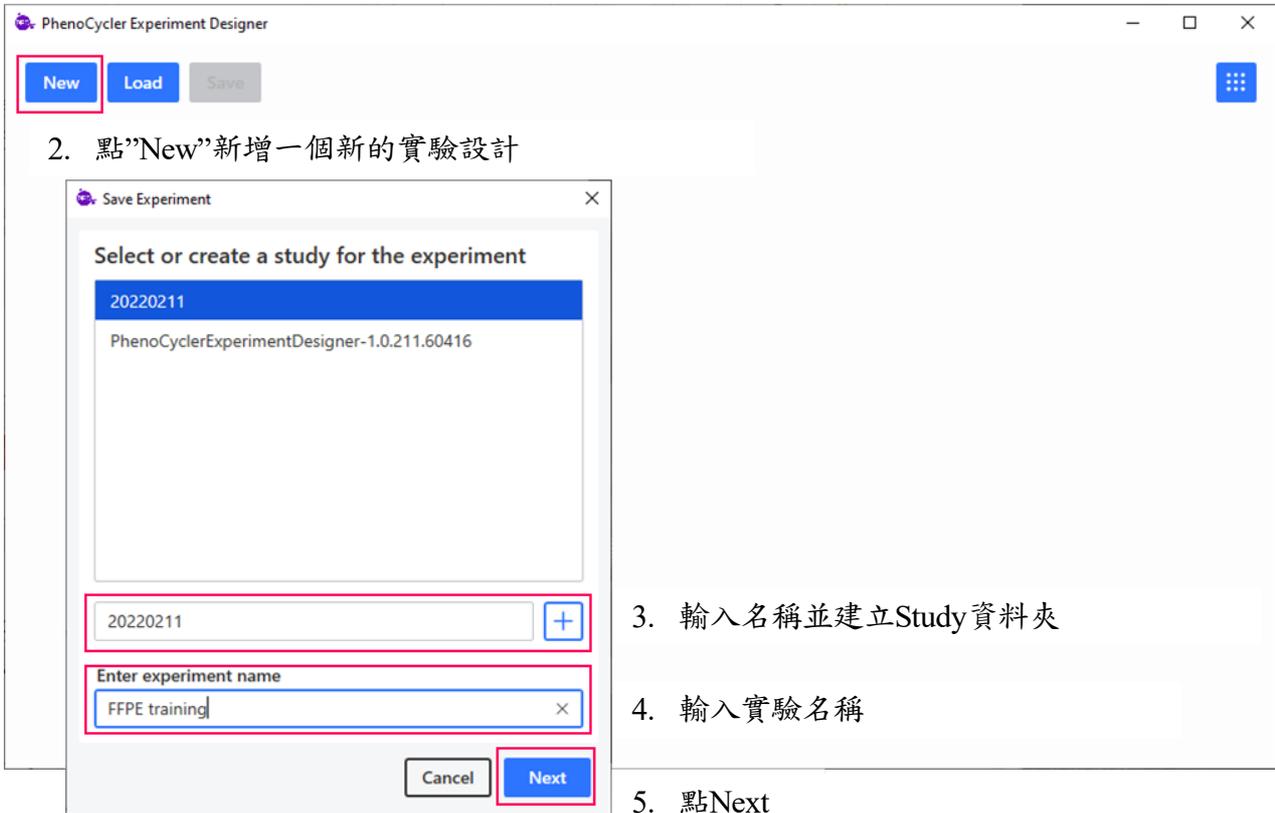
PhenoCycler Experiment Designer (PED)軟體設定-

1. 開啟 PED 軟體。

設備或材料：

- PhenoCycler專用 96-well plate
- PhenoCycler專用 Plate Seals
- 棕色避光管
- 1x PhenoCycler Buffer with Buffer Additive
- Assay Reagent
- Nuclear Stain
- Reporters

2. 點”New”新增一個新的實驗設計



3. 輸入名稱並建立Study資料夾

4. 輸入實驗名稱

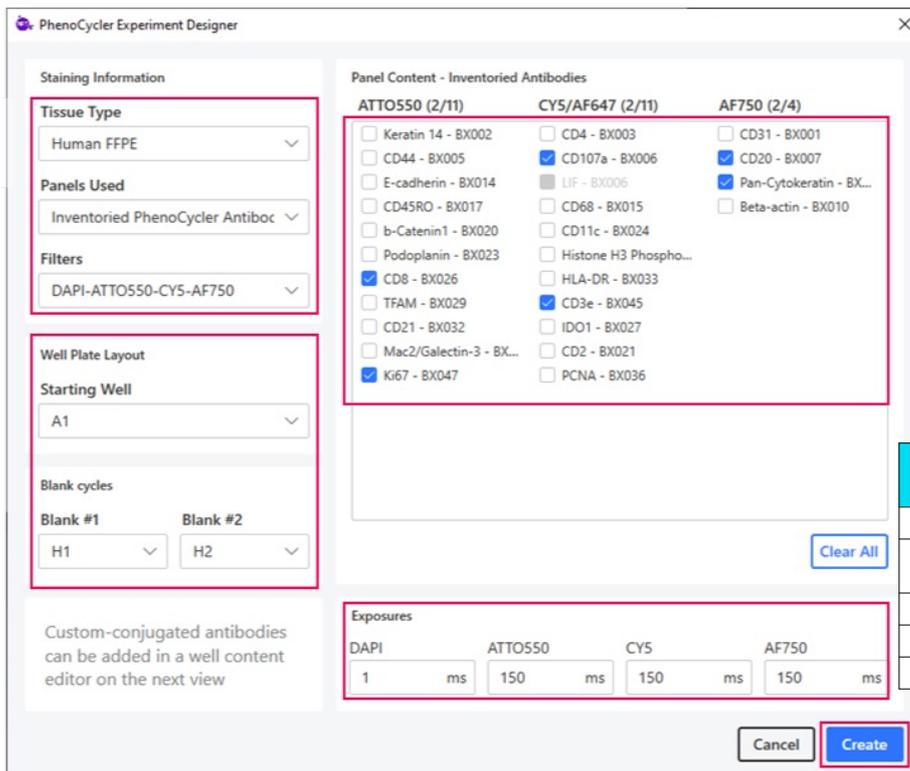
5. 點Next

6. 選擇組織種類、抗體以及濾片

8. 選擇起始well以及2個blank wells

7. 選擇markers

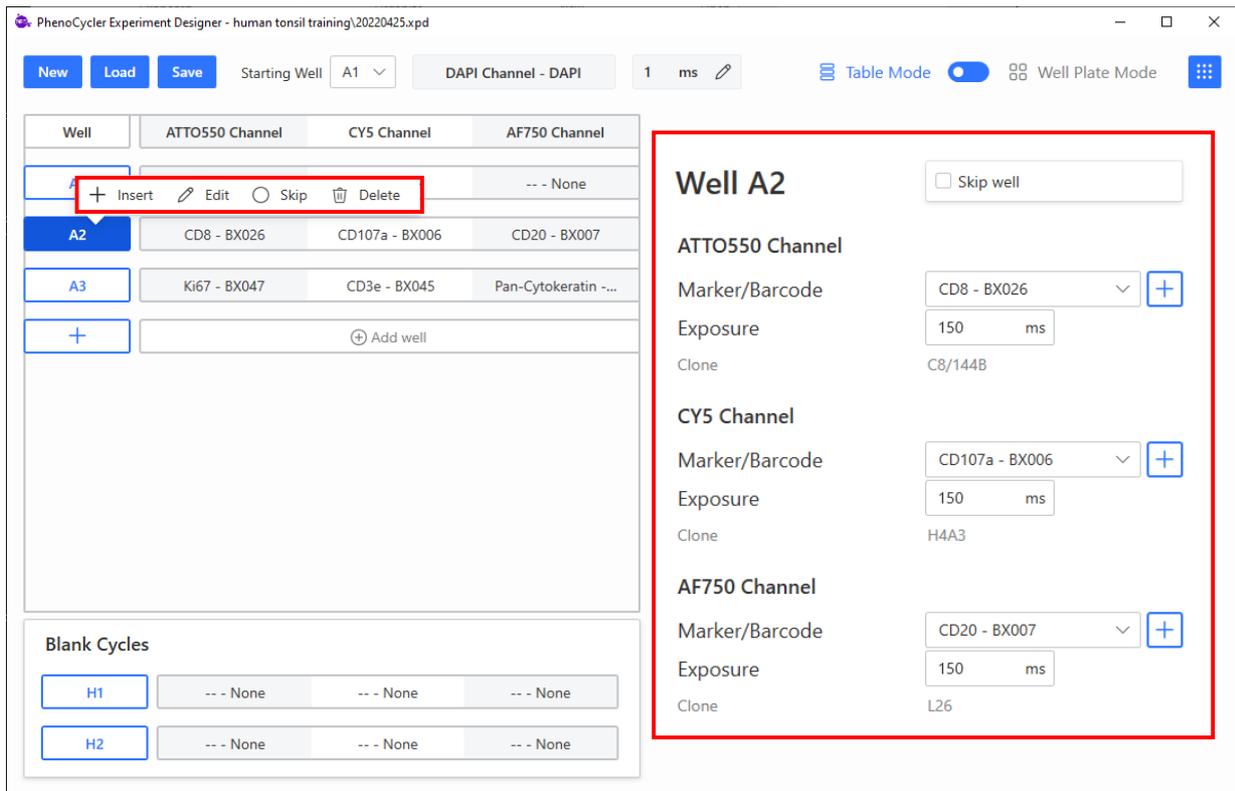
9. 輸入曝光時間
(建議設定如圖)



| Channel | Exposure time | |
|-----------|---------------|-----------------|
| | FF | FFPE |
| DAPI | 2-8 ms | |
| AF488 | 100 ms | Not recommended |
| ATTO550 | 100 ms | 150 ms |
| Cy5/AF647 | 100 ms | 150 ms |
| AF750 | 100 ms | |

10. 點”Create”

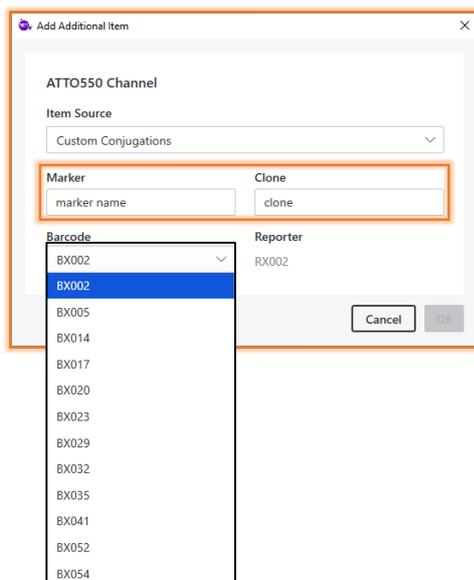
11. 建立之後可以在特定well按下右鍵進行編輯或是刪除等設定。



12. 若選擇編輯，可以在右側更改marker-barcode或更改曝光時間。

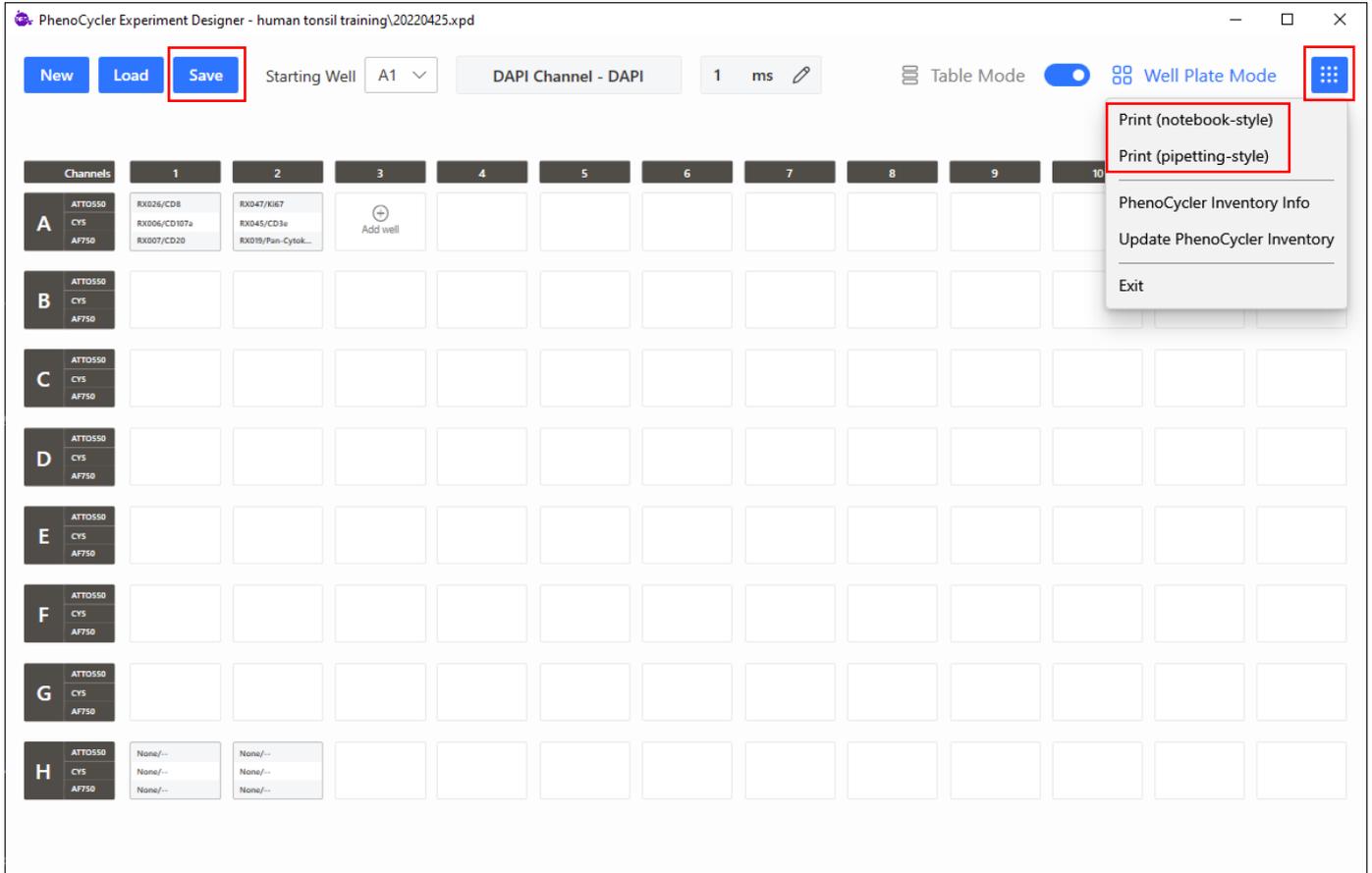
13. 若有empty cycles則將該曝光時間設定為6 ms。

14. 若要設定自接抗體的名稱則在marker右側按下+進行客製化設定。



15. 若要列印或是存出實驗設計圖檔可在最右側點主選單，然後選擇Print。

16. 按下Save存檔 (.xpd)。



notebook-style

pipetting-style

| | |
|---------------|----------------------|
| Study | 20220211 |
| Experiment | FFPE training |
| Starting well | A1 |
| Tissue type | HumanFFPE |
| Report date | 2/11/2022 9:45:14 PM |

| Well | DAPI Channel | ATTO550 Channel | CY5 Channel | AF750 Channel |
|------|--------------|-----------------|----------------|-------------------------|
| A1 | DAPI | CD8 - BX026 | CD107a - BX006 | CD20 - BX007 |
| A2 | DAPI | Ki67 - BX047 | CD3e - BX045 | Pan-Cytokeratin - BX019 |

Blank cycles

| Well | DAPI Channel | ATTO550 Channel | CY5 Channel | AF750 Channel |
|------|--------------|-----------------|-------------|---------------|
| H1 | DAPI | -- None | -- None | -- None |
| H2 | DAPI | -- None | -- None | -- None |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|-----------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| Study | 20220211 | | | | | | | | | | | | | |
| Experiment | FFPE training | | | | | | | | | | | | | |
| Starting well | A1 | | | | | | | | | | | | | |
| Tissue type | HumanFFPE | | | | | | | | | | | | | |
| Report date | 2/11/2022 10:31:26 PM | | | | | | | | | | | | | |

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---------|--------------|--------------------|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| DAPI | None/DAPI | None/DAPI | | | | | | | | | | |
| ATTO550 | RX026/CD8 | RX047/Ki67 | | | | | | | | | | |
| CY5 | RX006/CD107a | RX045/CD3e | | | | | | | | | | |
| AF750 | RX007/CD20 | RX019/Pan-Cytok... | | | | | | | | | | |

Reporter Plate製備-

1. 準備1L 的1x PhenoCycler Buffer with Buffer Additive (配法如下):

在容器加入800 ml ddH₂O 並加入100 ml 10x Buffer for PhenoCycler及100 ml 10x Buffer Additive 並利用pipet aid上下pipetting或利用磁性攪拌棒攪拌。

***註記：**不要將瓶身上下搖晃的方式進行攪拌，以免產生過多泡泡。配置完後不要過濾，未使用的1x buffer 可以在室溫存放2週。

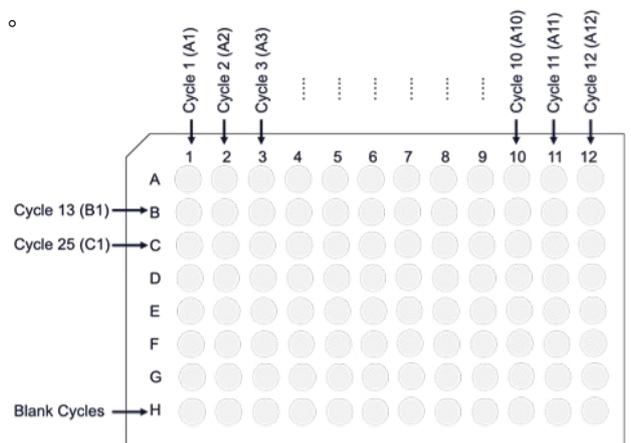
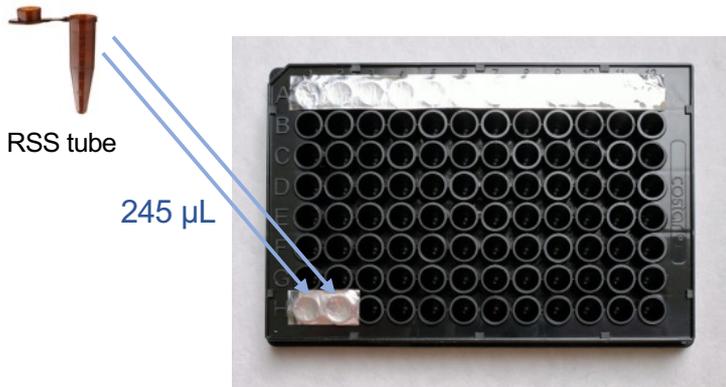
2. 根據實驗cycle數配置Reporter Stock Solution (RSS) 在棕色避光離心管，並pipetting混合均勻，並應避免產生過多氣泡。

| Reporter Stock Solution | Cycles/Wells | | | |
|--|--------------|------|------|------|
| | 5 | 10 | 15 | 20 |
| 1x Buffer for PhenoCycler with Buffer Additive(μL) | 1350 | 2700 | 4050 | 5400 |
| Assay Reagent (μL) | 125 | 250 | 375 | 500 |
| Nuclear Stain (μL) | 25 | 50 | 75 | 100 |
| Total (μL) | 1500 | 3000 | 4500 | 6000 |



3. 從RSS各吸取245 μl至blank wells，例如H1及H2。

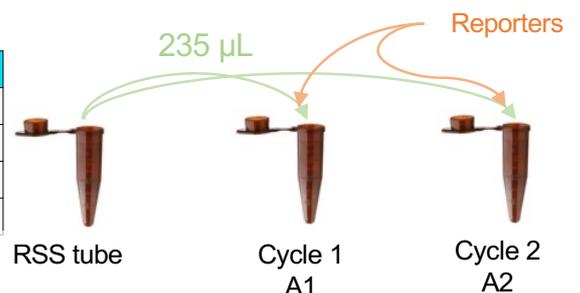
***註記：**盤子的第H排為系統預設給blank專用的wells。



2. 製備其他cycle 的Reporter Master Mix，假設Total cycle 為4，其中2個cycle預計拍攝共6個marker 為例(配法如下)：

- a. 在棕色避光離心管標示cycle數。
- b. 將欲使用的螢光(barcode-Reporter)拿出spin down並插在冰上。
- c. 從RSS吸取235 μl (假設1 cycle欲拍滿3個marker的情況)至新的棕色避光離心管並加入需使用的螢光(每個螢光需5 μl)，溫和地混合均勻。

| | | Cycle 1 (A1) | Cycle 2 (A2) |
|-----------------------------------|---------|--------------|--------------|
| Reporter Stock Solution (μL) | | 235 | 235 |
| Reporters (5 μL each reporter) | Atto550 | RX-026 | RX-047 |
| | Cy5 | RX-006 | RX-045 |
| | AF750 | RX-007 | RX-019 |



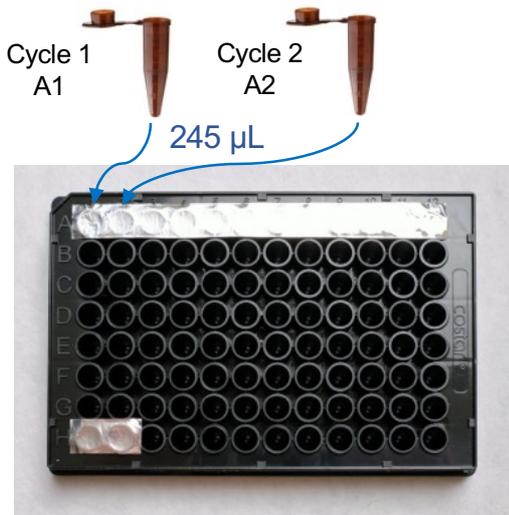
***註記**：因每個cycle不見得會拍滿3個marker，RSS取出的體積視情況調整如下：

| Reporter Stock Solution, Volume [μL] | | | |
|---|-----------------------|-----------------------|-------------|
| 3 Reporters per Cycle | 2 Reporters per Cycle | 1 Reporters per Cycle | Blank Cycle |
| 235 | 240 | 245 | 250 |

Ex1: cycle 1會拍2個marker，故取RSS 240 μL 與2螢光各5 μL 配在新的避光管，最終250 μL 。

Ex2: cycle 2只會拍1個marker，故取RSS 245 μL 與1螢光5 μL 配在新的避光管，最終250 μL 。

5. 從配好的Reporter Master Mix (250 μL)各取245 μL 至Reporter Plate。



6. 取出plate seal並粘貼在欲使用的well上(如上圖)。

7. 提前配置的Reporter Plate 可在4 $^{\circ}\text{C}$ 保存至多2週。

Flow Cell 黏合

設備或材料：

- 1x PhenoCycler Buffer with Buffer Additive
- 1x PBS
- Kimwipes
- Flow cells and Flow cell 組裝裝置
- 高壓噴氣罐（選擇性使用）

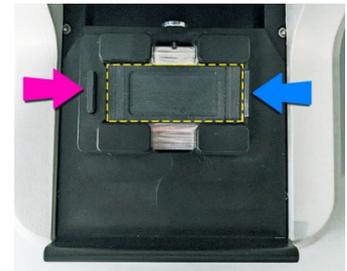
***註記**：確認準備上機前才進行flow cell黏合，不可過早做。黏合之前，務必確認組織slide上面無任何標籤貼紙。



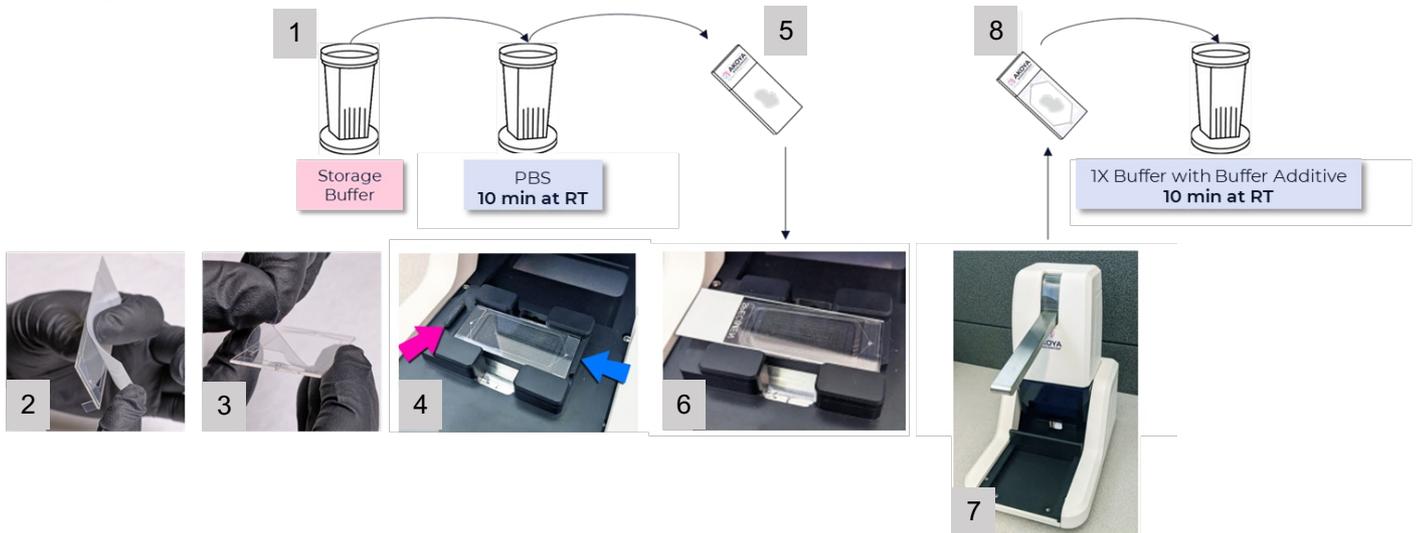
Flow Cell Assembly Device



2 Flow cells



Flow Cell 黏合-



1. 將組織片從Storage Buffer中取出，放入裝有1x PBS 的Coplin jar並等待10分鐘。
2. 取出新的flow cell並撕開表面塑膠片。
3. 握住flow cell的邊緣並撕開透明的膠條，露出黏性區域。
4. 將flow cell黏性區域**朝上靠右側**抵住放置在組裝器上。
5. 將組織片取出，並用kimwipe擦拭slide背面以及組織周圍(尤其是flow cell黏合的區域)。
6. 標籤朝左，組織區域**朝下**將組織片**靠右側**放置在flow cell上方。
7. 將抽屜推進去，握把緩和向下壓，等待至少30秒。
8. 抬起握把並把抽屜拉出。
9. 確認flow cell以及slide有黏好且無破損。
10. 將flow cell 浸入1x PhenoCycler Buffer with Buffer Additive 等至少10分鐘。

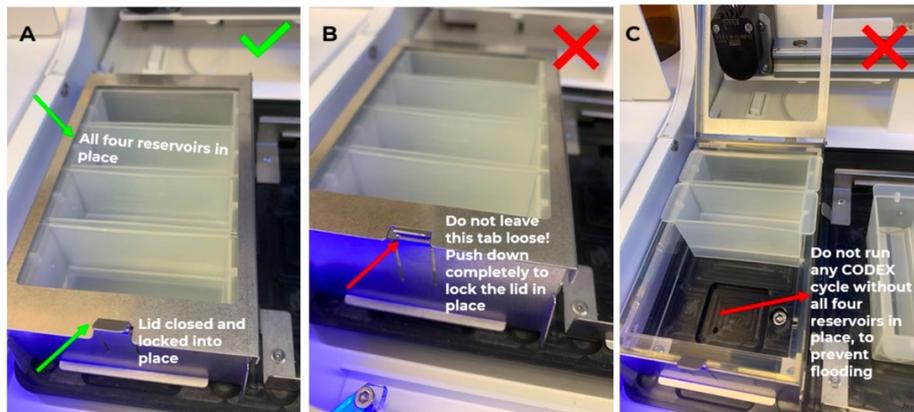
PhenoCycler-Fusion上機

設備或材料：

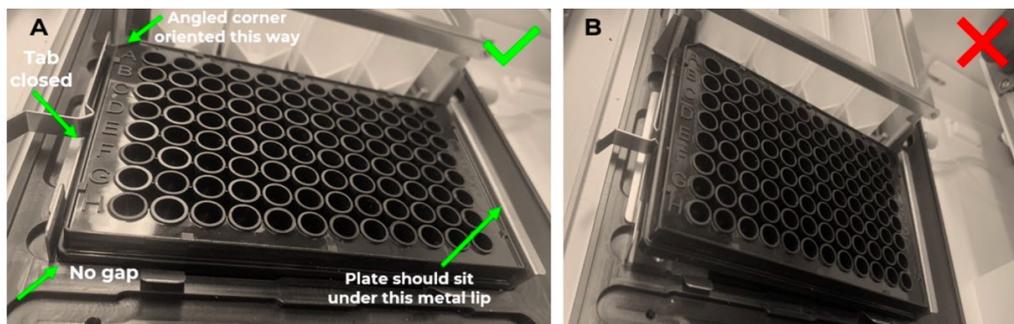
- 1x PhenoCycler Buffer with Buffer Additive
- 1x PBS
- DMSO
- Kimwipes
- Flow cells and Flow cell 組裝裝置
- 高壓噴氣罐（選擇性使用）

上機前準備-

1. 確認組織slide以及配好的reporter plate在室溫下回溫至少15分鐘。
2. 確認上機所需DMSO、ddH₂O以及1x PhenoCycler Buffer with Buffer Additive已經放入瓶子，廢液瓶已清空。
3. 確認4個reservoirs (液體槽)是乾淨狀態且扣好於儀器內，如果之前有上機過則確認已清洗晾乾。盡可能避免任何碎屑殘留在reservoirs，應用晾乾的方式而**不要**用紙張擦乾。

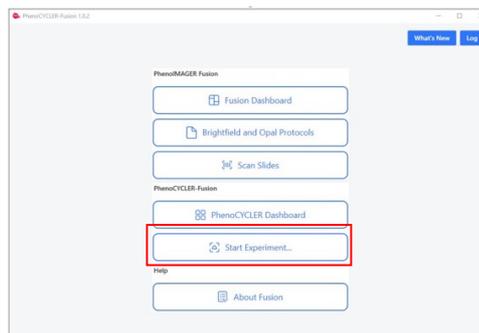


4. 將Reporter plate 放置於機器內的孔盤固定槽 (A1 well在左下角，面向儀器外側)，並確認plate都已往下固定維持平整，避免一高一低。

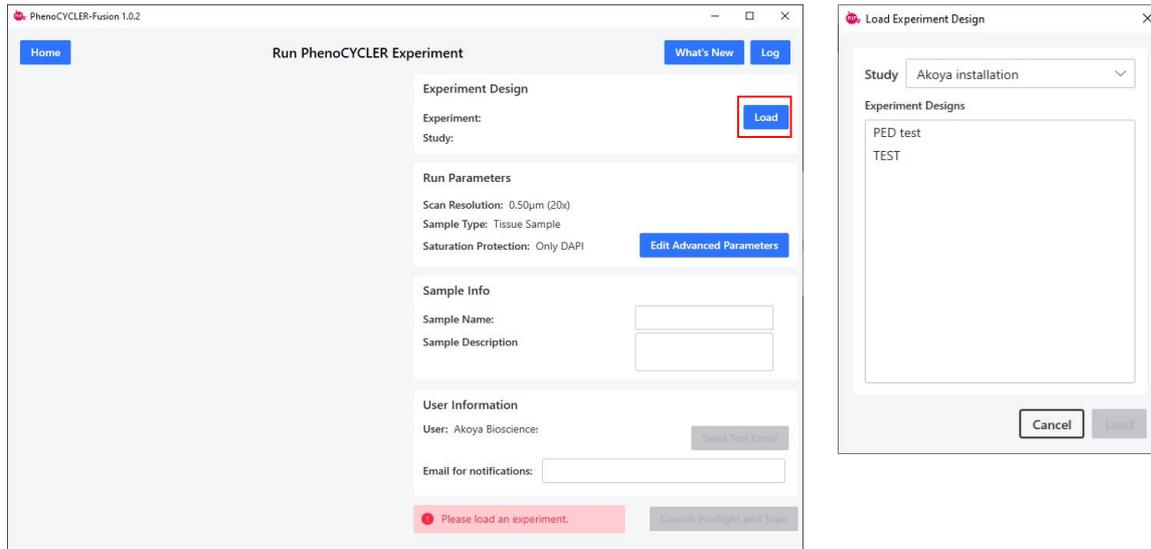


上機拍攝-

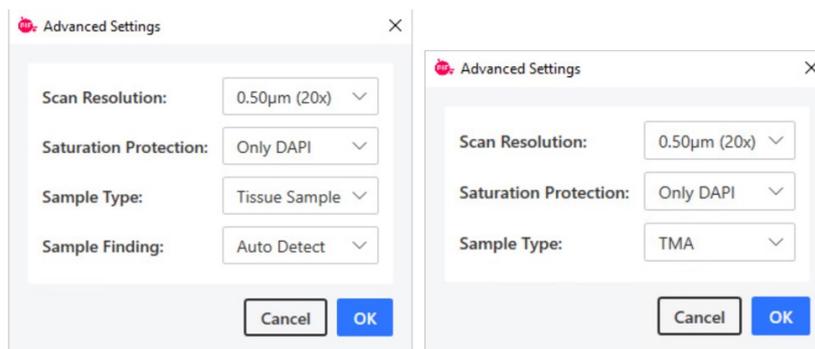
1. 開啟PhenoCycler-Fusion 軟體，在PhenoCYCLER-Fusion欄位下點選”Start Experiment”。



2. 將先前設定好的Protocol (.xpd)檔案載入。



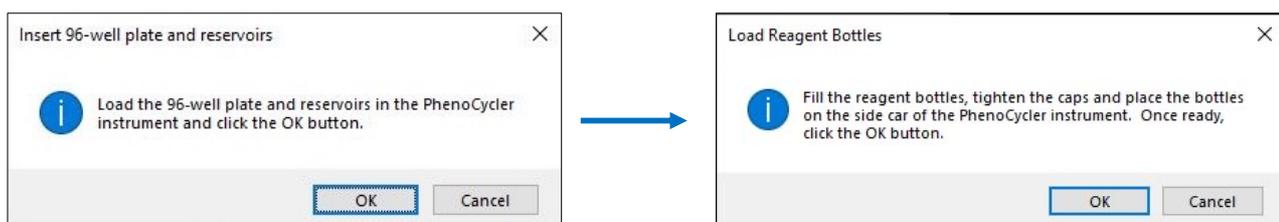
3. 在Advanced Parameters 內確認Saturation Protection選擇” Only DAPI ”; Sample Type下拉式選單選擇樣本型態; Sample Finding 選擇偵測樣本的演算法。

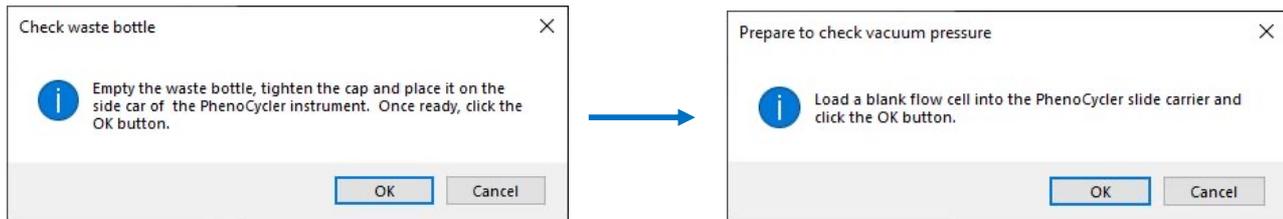


* **註記**：當樣本訊號微弱或是較難偵測的時候，可能會產生不完整的sample masks。此時Sample Finding建議選擇”High Sensitivity”，並使用藍色sharpie筆在flow cell正上方匡選組織區域，避免背景或是其他碎屑被歸入掃描區域。

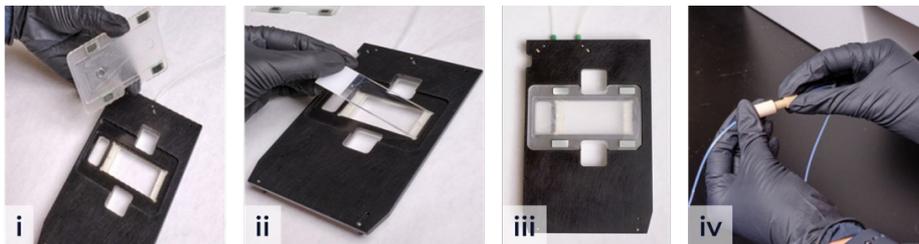
當Sample Type選擇為TMA時， Sample Finding無法自行調整。

4. 點選Launch Preflight and Scan確認每個步驟已完成，點選ok進行下一步：

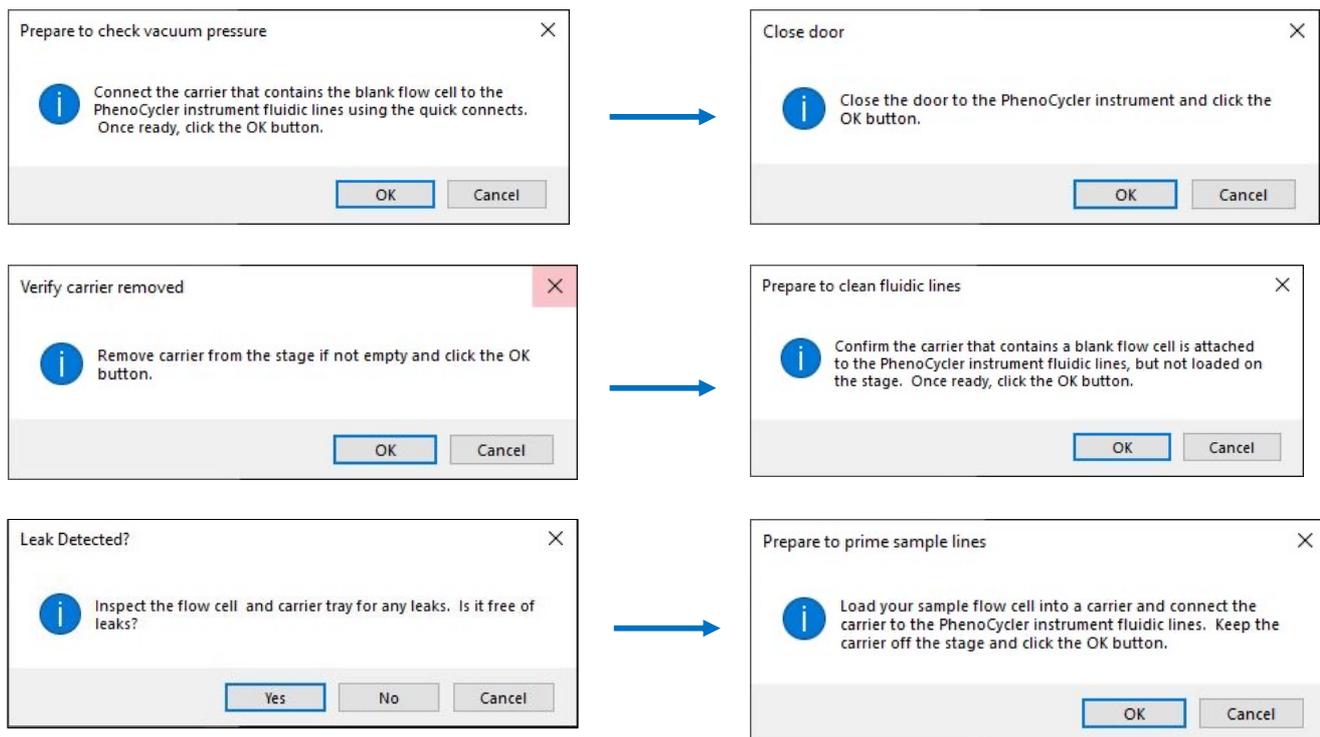




將Blank flow cell載入slide carrier進行測試-



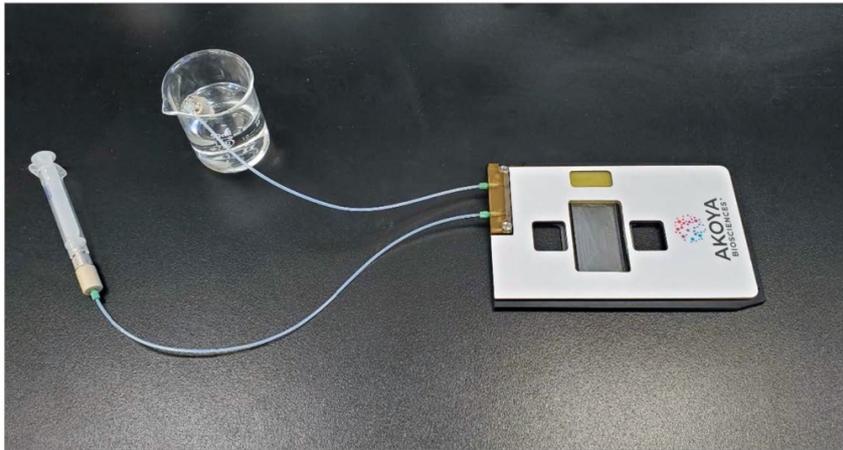
1. 將carrier倒放，並把磁性slide retainer取出。
2. 將blank flow cell裝入 (label端對著window)。
3. 將磁性slide retainer蓋住。
4. Slide carrier的管線與儀器端管線對接。



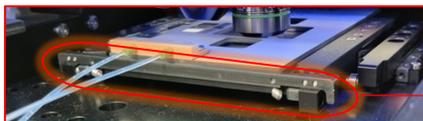
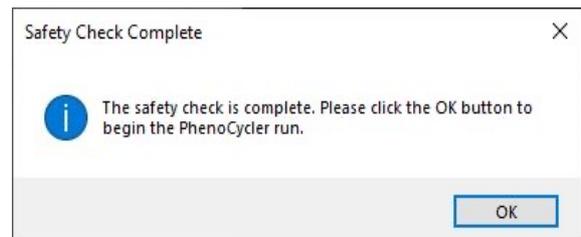
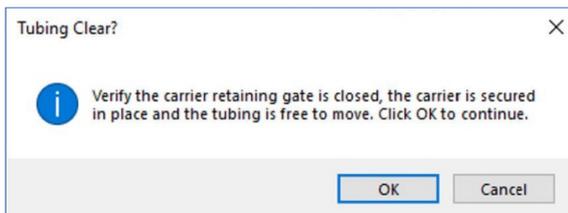
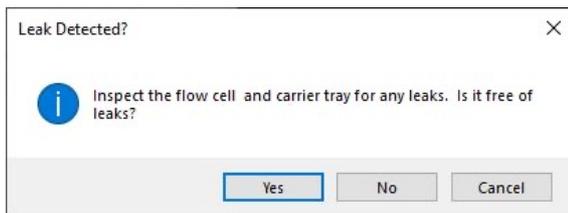
將Sample flow cell載入slide carrier-

1. 取一張kimwipe沾取 DI 水，以單一方向擦拭flow cell正上方 (不要擦到兩端的孔)。
2. 取第二張kimwipe沾取70% 乙醇，以單一方向擦拭flow cell正上方 (不要擦到兩端的孔)。
3. 使用sharpie mark匡出組織區域。
4. 取出blank flow cell，放入sample flow cell。

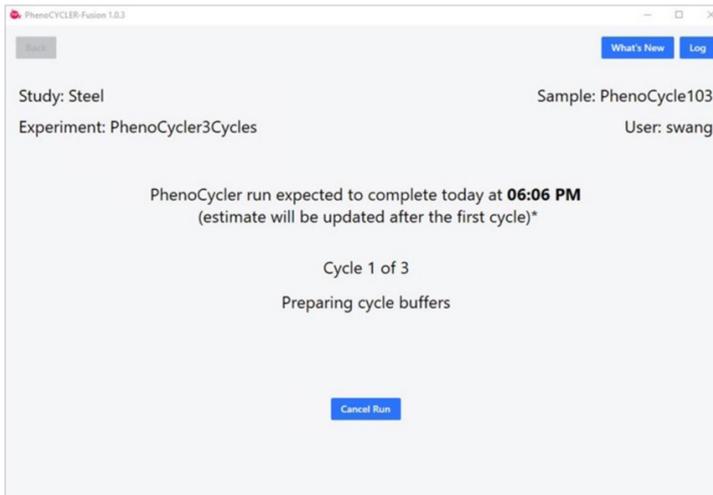
(選擇性步驟) 移除Sample flow cell內的泡泡 (若泡泡的位子接近下端的孔則不需執行此步驟)-



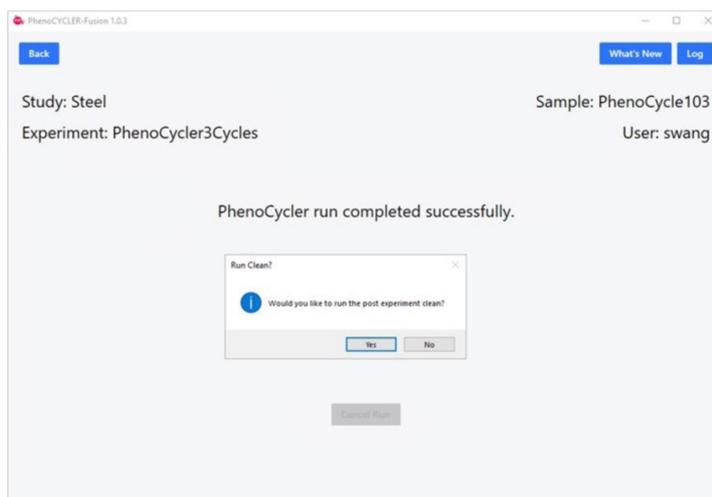
1. 準備一個裝有1x PhenoCycler Buffer with Buffer Additive 的50 ml燒杯。
2. 將inlet (入口管線)浸入燒杯內。
3. 拿出專用syringe與outlet (出口管線)對接。
4. 緩等地用syringe拉取buffer，並觀察flow cell內部的泡泡是否已清除。
5. 將兩端管線接回儀器端。



— carrier retaining gate

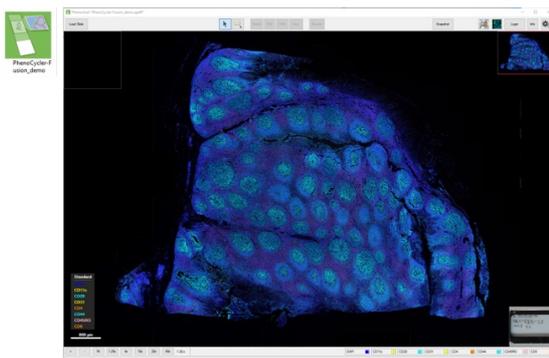


上機所需時間 =
(液流系統(45 min) + 掃描拍攝) x (Cycles數)

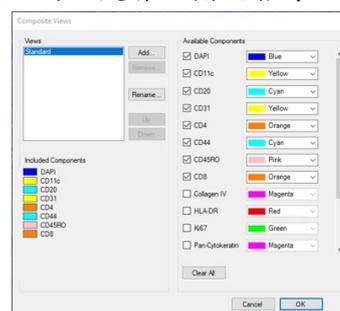


上機完成後會提醒執行Post experiment clean
(詳細清潔保養請見下一頁)

結果觀看-



掃描完成後產出QPTIFF檔案，可在PhenoChart
開啟觀看、輸出影像。



Open-source結果分析-

QuPath以及CytoMAP分析軟體(詳細操作請看Akoya Biosciences提供的分析流程手冊)

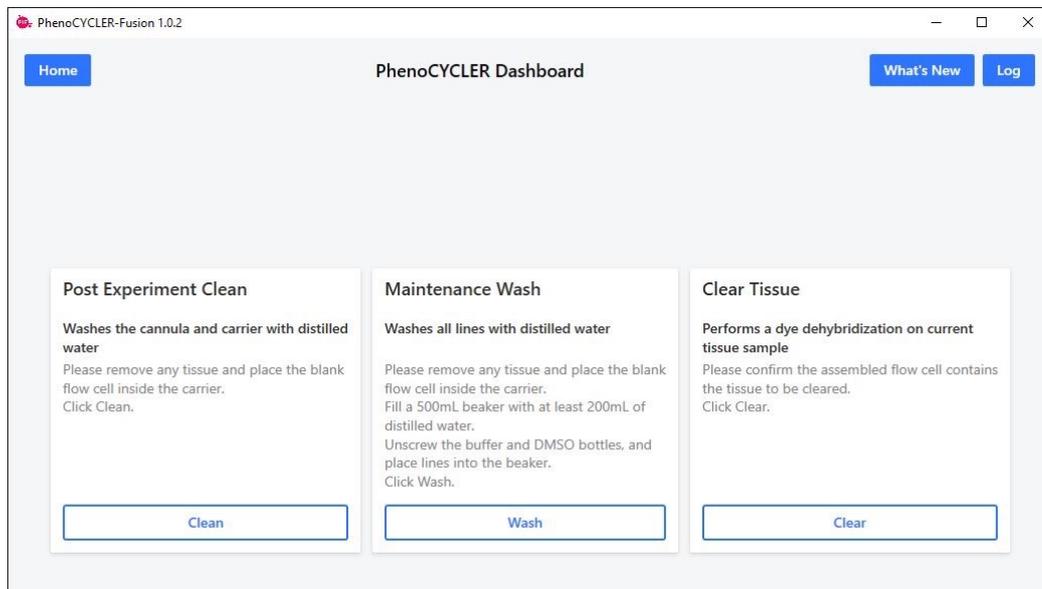


QuPath: Quantitative Pathology & Bioimage Analysis



CytoMAP: Histo-Cytometric Multidimensional Analysis Pipeline

清潔與保養



Post Experiment Clean-

每次上機完成後必須執行的清潔步驟。

*** 註記：**執行前先將sample flow cell取下來，以blank flow cell代替。若sample還在carrier就執行清潔的話，該sample將無法再次上機分析。

Maintenance Wash-

隔週執行一次，清潔管線內殘存的buffer及DMSO等維持儀器效能。

執行前，在carrier內放入blank flow cell並準備燒杯裝至少200 ml DI 水。接著將bottle 1及bottle 2的蓋子取出，將管線浸入燒杯內後即可執行清潔。

Clear Tissue-

去除雜合的螢光(dye de-hybridization)。

若上機途中遭受任何因素干擾而導致拍攝中斷，螢光reporter有可能還留在組織上。為了再次上機必須先去除任何殘留螢光。