

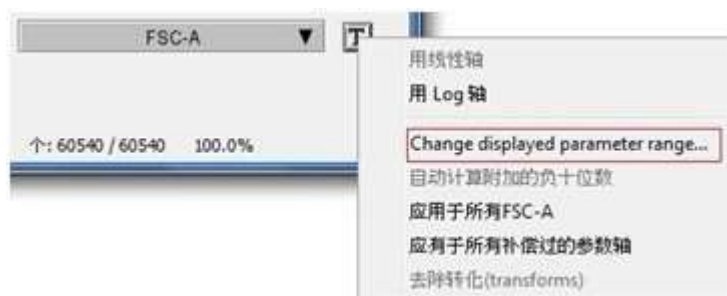
# FlowJo 应用常见问题及其解答

## Basic Analysis

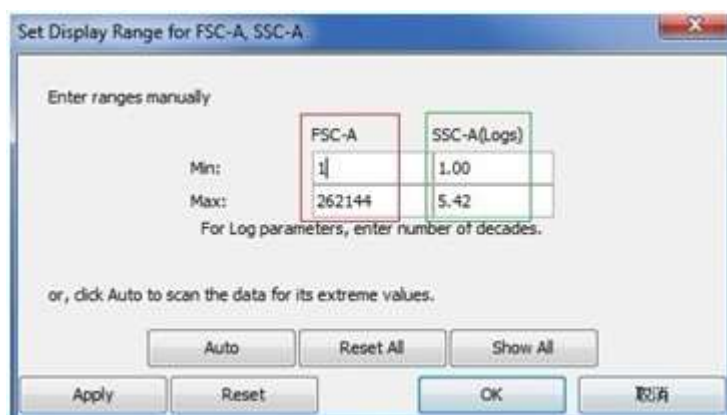
### 1. 散点图中怎样调整坐标轴的范围

(备注: 只有 FCS3.0 格式的数据可以在散点图中调整坐标轴的范围。)

点击坐标轴旁边的“T”按钮, 选择“Change displayed parameter range”,



在弹出的对话框中输入坐标轴范围的最小值和最大值。



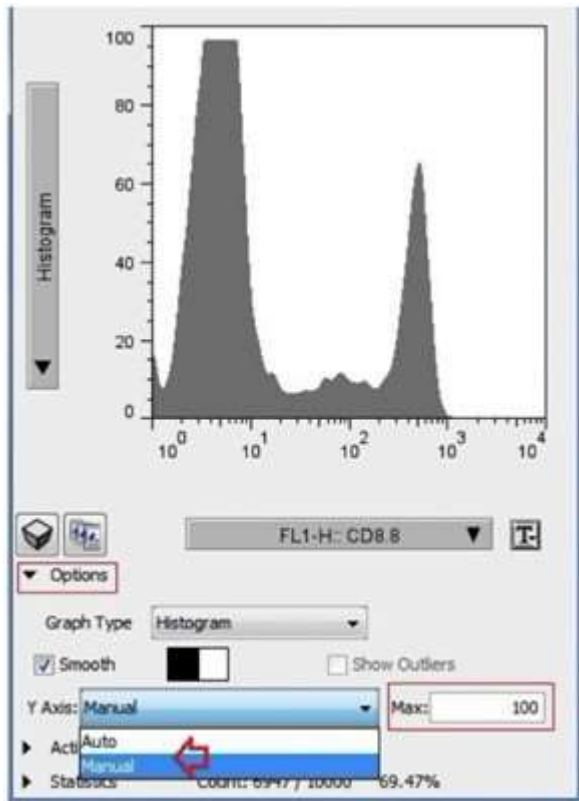
### 2. 直方图中怎样调整 Y 轴的范围

在图形窗口中打开“option”选项, 在“Y Axis”中选择“Auto”或者“Manual”,

Auto: 自动, 软件能自动调整 Y 轴的范围, 将整个直方图显示出来

Manual: 手动, 需要在后面的“Max”选项中手动输入 Y 轴标度的最大值, 然后按“回车键”确认。

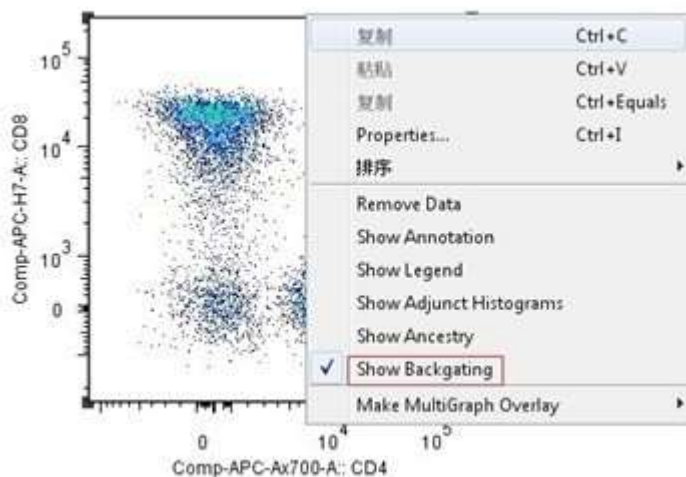
比如, 在此例中需要将“Max”值设为 160。



备注：关于 FlowJo 调整坐标轴的详细内容请参考博文：[FlowJo 如何调整流式数据参数轴](#)

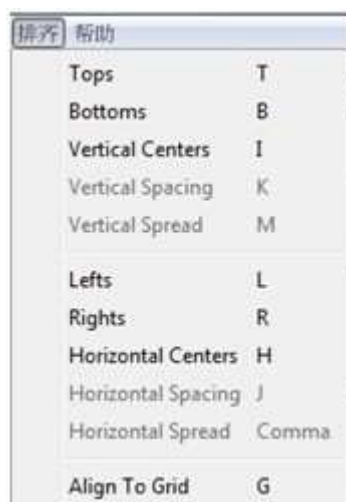
### 3. 反向设门：怎样显示子细胞群在其祖先细胞群中的位置

在布局页中右键单击某个细胞群的图，在弹出的下拉菜单中选择“Show Backgating”



### 4. 输出图形时怎样自动对齐

在布局页中选中需要对齐的多个图形，到布局页的“排齐”菜单中选择对齐的类型，常用的有：顶端对齐(Tops)、底部对齐(Bottoms)、左对齐(Lefts)、右对齐(Rights)



### 5. 输出图片的格式有哪几种，哪种的分辨率最高

可输出的图形格式有 6 种：PNG，JPG，GIF，SVG，EMF，PDF。其中，SVG 为可缩放矢量图形，EMF 格式可以在 microsoftoffice 里面进行编辑。

在做图形输出的时候，如果是用作 PPT 的话，建议在 FlowJo 里面编辑完毕后再直接将完整的 report 输出到 PPT，不建议在 PPT 里面做图形编辑。如果一定要在 PPT 做图形编辑的话，需将图片保存为 EMF 格式，这样可以在 PPT2003 版本里面做 ungroup，进行单个编辑，不过图片插入 PPT 后，转变为 PPT 可识别的图，将会降低分辨率。

如果是用作发表文章的话，建议将图片保存为 PDF 格式，再在专业的图片编辑器如 Photoshop 或者 Illustrator 里面进行编辑，再输出为杂志要求的文件格式，一般为 JPG，现在也有杂志倾向于接收 PDF 图片。

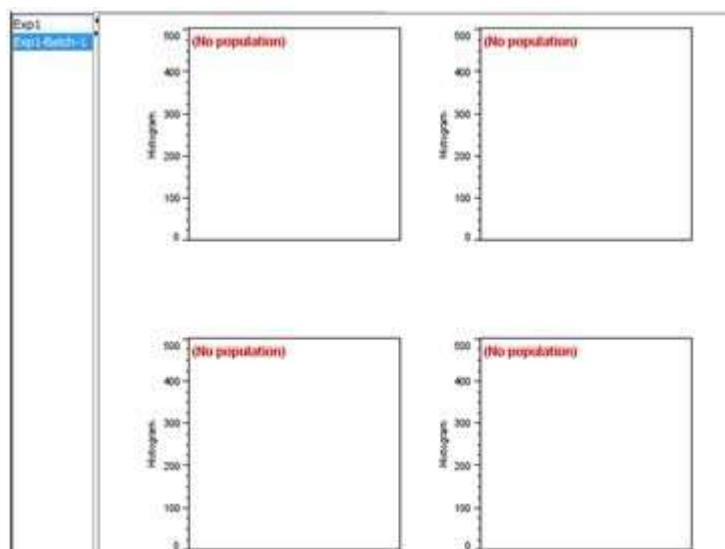
FlowJo 默认的图形输出格式为 PNG 格式，如果需要更改，到“编辑”菜单栏里选择“偏好设置>文件格式”，在“布局编辑器”的输出格式类型中选择：



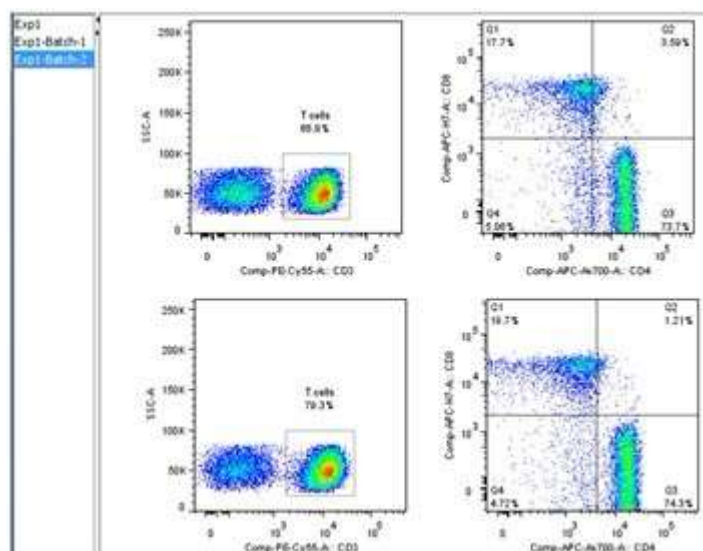
6. 是否可以调整伪色图中每个点所表示的细胞个数，即调整点的数目，使其分辨率更高

不可以调整。但是 Dot Plot 可以调整。（具体内容请参考博文：[如何比较不同细胞数目的流式数据？](#)）

7. 应用模板分析数据时，导入数据之后，布局编辑器里的图形批处理结果显示为 “No Population”



在这个例子中，在布局页中选择 “Exp1”，然后点击 “Batch” 按钮，重新批处理一次，便可得到结果。



8. Mean, Median, Mode, Geom. Mean 的区别

Mean: 平均荧光强度

Median: 荧光强度的中位数

Mode: 众数，是一组数据中出现次数最多的数值

Geometric mean: 几何平均数，是指 n 个观察值连乘积的 n 次方根，计算公式为：

$$X_g = \sqrt[n]{X_1 \times X_2 \times X_3 \times \dots \times X_n}$$

在标准的高斯分布情况下，Median=mean=mode. 通常在流式中因为总会有异常值（超高或者超低值）的存在，不是完美的高斯分布，建议使用 Median，降低异常值对数据的影响。

### 9. 对于不同样本，目标细胞群所设的门的范围及位置不相同，是否影响可比性

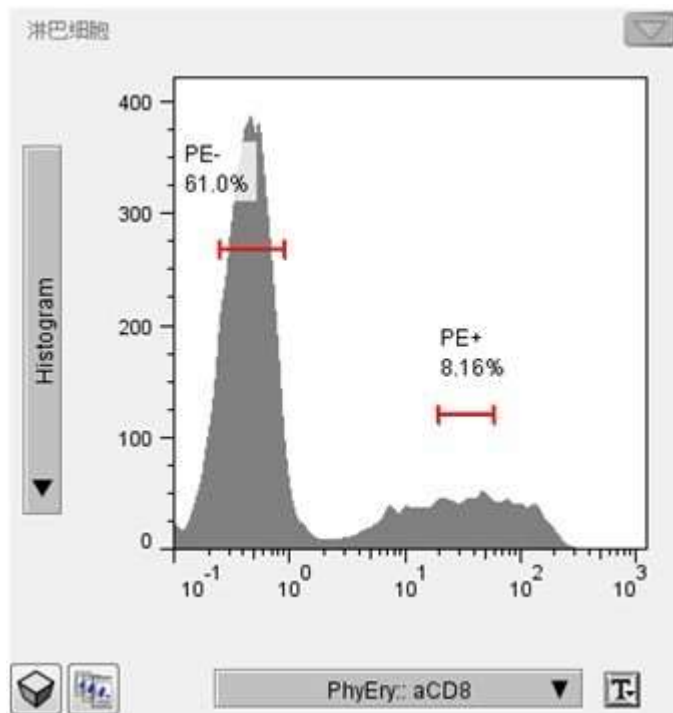
不影响。同一组实验中的不同样本，目标细胞群的位置和分布范围可能会有变化，在设门的时候，需要将目标细胞群都划在门内；而在分析数据的时候，是以统计学方法分析整个细胞群的分布情况，得到百分比以及平均荧光强度等数据。因此不会影响可比性。

## Compensation

1. 没有补偿对照单染管（单染样本或者单染 Beads）是否可以用 FlowJo 调补偿不可以。不论是在仪器上调补偿，还是在软件比如 FlowJo 上调补偿，都必需在单染对照的基础上进行。

### 2. 实际实验的时候，单染管没有明显的双峰分布，应该怎么调补偿

如果没有明显的双峰分布，在设门界定阴性群和阳性群的时候：应使用区域门进行设门，阴性群和阳性群之间的距离要尽量远一些，阴性群不要包含极低值区域，阳性群不要包含极高值区域。如下图所示：



关于用 FlowJo 做软件补偿请参考博文：[FlowJo 软件荧光补偿](#)

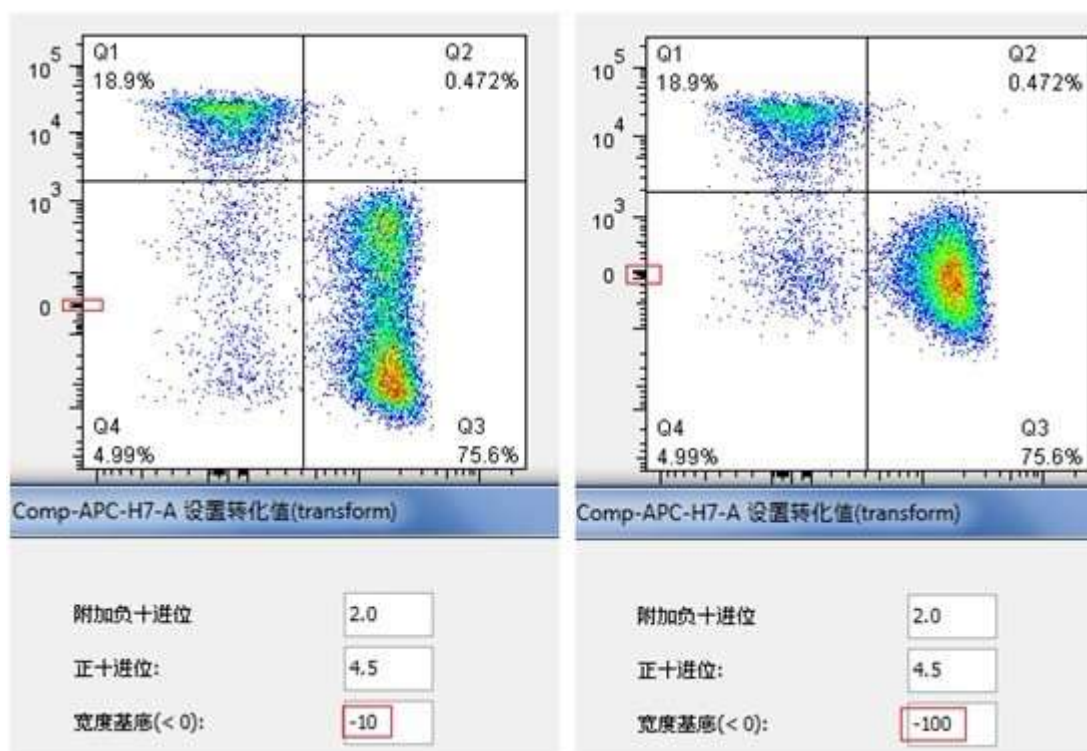
### 3. 怎样才能确定 FlowJo 的补偿矩阵的准确度？依据单染对照的散点图还是实验样本的？

依据单染对照进行判定。以一个两色实验为例（FL1::CD3-FITC 和 FL2::CD4-PE），在补偿之后，如果单染对照（比如 FITC 单染）中 FITC 阳性群和 FITC 阴性群的中位数（Median of FL2::CD4-PE）一致，说明补偿准确。

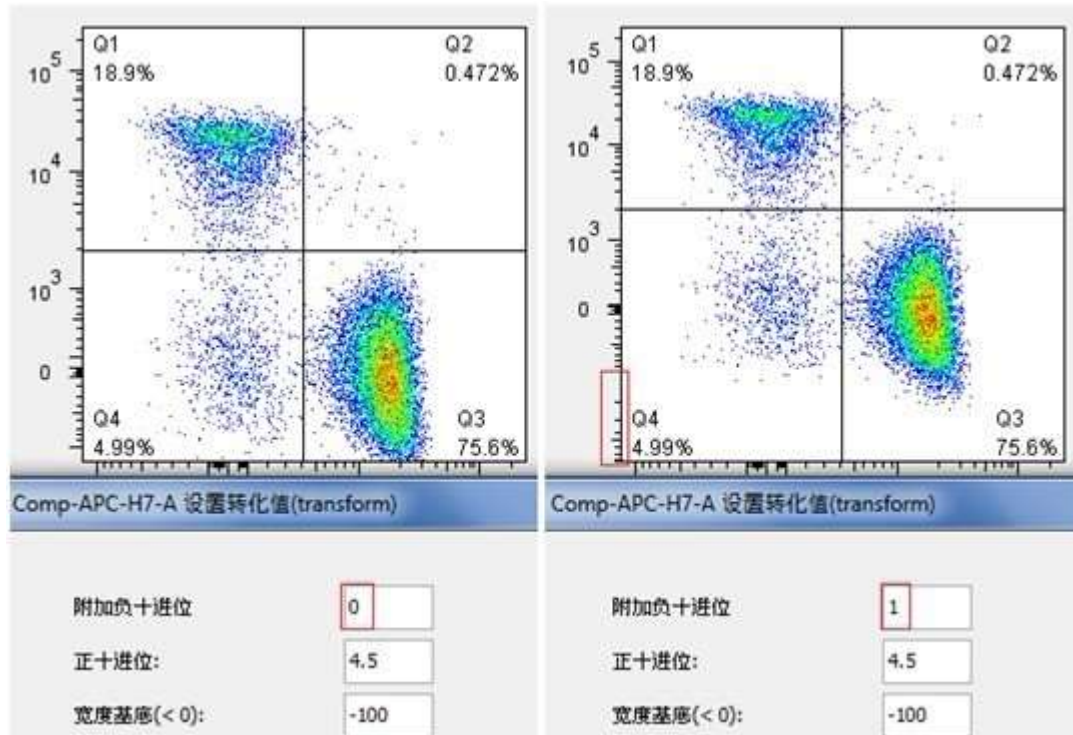
详细内容请参考博文：[如何确定流式分析中荧光补偿是正确的呢？](#)

### 4. 双指数转换中的 3 个参数分别表示什么

**Width Basis: 宽度基底**，为负值。在图形显示效果上反映了压缩的程度。在 Logicle 轴中，-10 表示“-10<sup>1</sup>~0 段”以及“0~10<sup>1</sup> 段”以线性形式显示，-100 表示“-10<sup>2</sup>~0 段”以及“0~10<sup>2</sup> 段”以线性形式显示，如下图：左图中 Width Basis 为-10，右图中为-100



**Extra negative decades: 附加负十进位**，即在坐标轴中增加的负数段的数目。“1”表示增加 1 个负十进位段，如下图：红色方框中的部分为在坐标轴上增加 1 个负十进位段

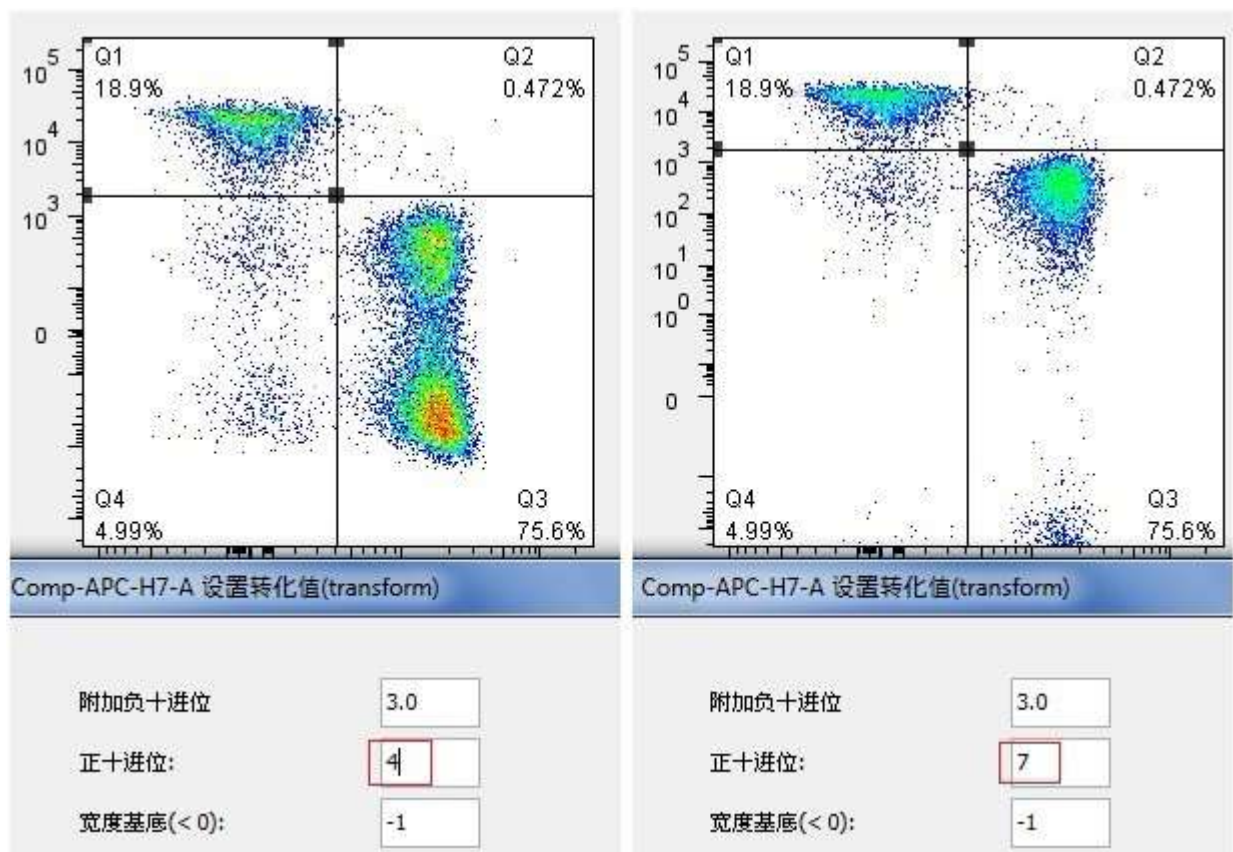


**Positive decades: 正十进位**, 表示正十进位的数目。如下图所示:

左图中 Positive decades 为 4, 表示有 4 个正十进位段:  $10^1 \sim 10^2$ 、 $10^2 \sim 10^3$ 、 $10^3 \sim 10^4$ 、 $10^4 \sim 10^5$ 。

右图中 Positive decades 为 7, 表示有 7 个正十进位段:  $10^{-2} \sim 10^{-1}$ 、 $10^{-1} \sim 10^0$ 、 $10^0 \sim 10^1$ 、 $10^1 \sim 10^2$ 、 $10^2 \sim 10^3$ 、 $10^3 \sim 10^4$ 、 $10^4 \sim 10^5$ 。

增大 Positive Decades, 能在二维图中以更大的空间显示低位段 ( $0 \sim 10^1$ ) 的数据



## Cell Cycle

### 1. RMS 值位于哪个范围之内，周期分析结果可用

FlowJo 没有给出一个确定的 RMS 值范围来判断周期分析结果是否可用。RMS 反映的是 FlowJo 拟合结果和实际数据的吻合程度，吻合得越好，RMS 值越小。在进行周期分析的时候，如果数据比较好，FlowJo 能自动拟合得到一个很好的周期拟合结果，RMS 值很小。如果数据不是很理想，需要不断更改限制条件，使 RMS 值更小，模型拟合得更好。RMS 是对同一个数据的不同拟合情况进行比较的，数值越小则拟合越好，不能用来比较不同数据间拟合的好坏。

### 2. CV 值位于哪个范围之内，周期分析结果可用

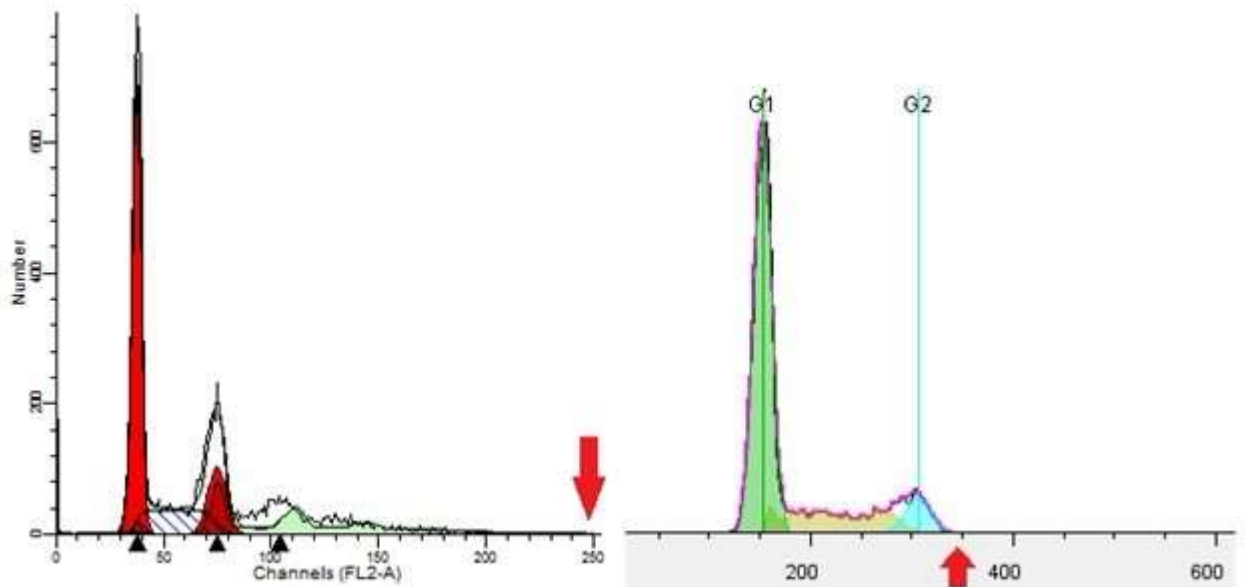
FlowJo 没有给出一个确定的 CV 值范围来判断周期分析结果是否可用。周期实验中 CV 值的大小主要是由流式仪的灵敏度及 DNA 染色剂的特异性决定的。

### 3. FlowJo 拟合得到的 CV 值明显高于 ModFit

CV 为变异系数，反映的是峰的宽度。ModFit 在呈现数据的时候，是将荧光强度的范围归并为 256 个 Channel，因此在分析任何数据的时候，其坐标轴的范围均为 256。FlowJo 则是呈现实际的荧光强度，坐标轴的范围依据具体数据的荧光强度来确定，大于 256。因此 FlowJo 得到的 CV 值高于 ModFit。

下图中为同一个数据分别用 ModFit 和 FlowJo 进行分析得到的结果，左边为 ModFit，右边为 FlowJo。





#### 4. FlowJo 的周期模块中怎么分析凋亡

FlowJo 的周期模块是专门用来分析细胞周期的，得到细胞周期各个时期的比例。分析细胞凋亡一般需要采用特定的方法，比如 Annexin V-FITC/PI 双标记法，用四分门设门方法来界定出凋亡细胞。

具体内容请参考博文：[FlowJo 分析凋亡数据](#)

#### 5. FlowJo 的周期模块中怎么分析异倍体

FlowJo 在分析细胞周期的时候，能够得到某一个细胞周期各个时期的比例。如果样本中包含有多个不同的倍体（比如同时含有二倍体以及异倍体），该样本中含有多个细胞周期，则需要借助其他的分析工具来分析。

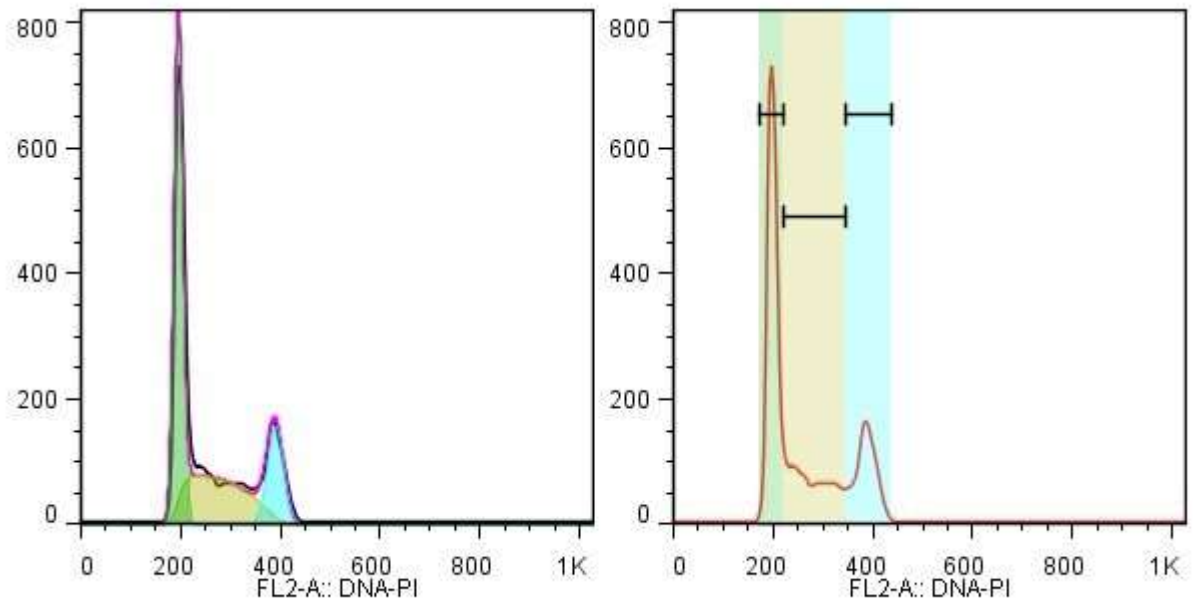
#### 6. “创建门”之后，各个时期的比例发生变化

创建门之前，计算细胞周期各个时期的比例是根据拟合方程计算出来的。左图创建门之前的周期图，其中 G1 期与 S 期有相交部分，对于相交的部分，是根据方程计算出其属于 G1 期的可能性有多少，属于 S 期的可能性有多少，然后再计算出 G1 期细胞所占的总的比例。

创建门之后，如右图，G1 期、S 期、G2 期之间没有相交的部分，而是硬性地设了一个门，明确规定出 G1 期、S 期和 G2 期的范围。因此，创建门之后，细胞周期各个时期的百分比会发生变化。

如果周期分析的的目的只是为了计算出细胞周期各个时期的比例，则不需要“创建门”。

如果周期分析之后，需要界定出 G1 期、S 期、G2 期的细胞，并对某个时期比如 G1 期的细胞做进一步分析，则需要“创建门”界定出各个时期的细胞。



更多关于周期分析的内容，请参考博文：[FlowJo 软件分析细胞周期样品](#)

## Porliferation

### 1 增殖分析发文章时采用哪个参数

一般采用增殖指数 (Proliferation Index) 和分裂指数 (Division Index)

### 2 增殖指数和分裂指数的定义及其区别和关系

增殖指数 (Proliferation Index)：分裂次数的总和除以发生过增殖的亲代细胞数目

分裂指数 (Division Index)：分裂次数的总和除以增殖发生前的细胞总数

### 3 为什么默认的增殖峰的最大值为 8

根据以往的研究结果，在 CFSE 法分析细胞增殖的实验中，可分辨出的最多的增殖峰的数目为 8 个