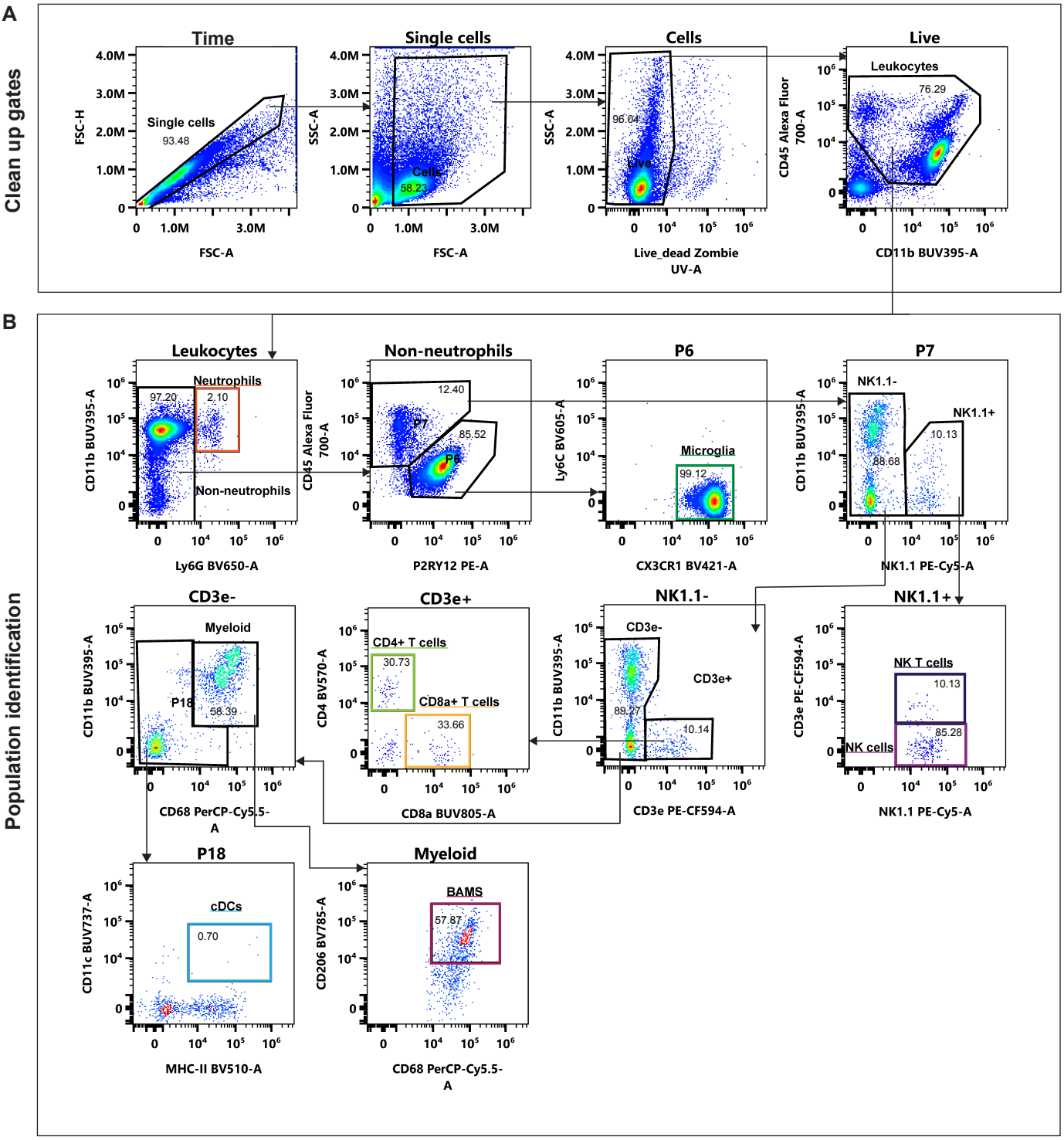
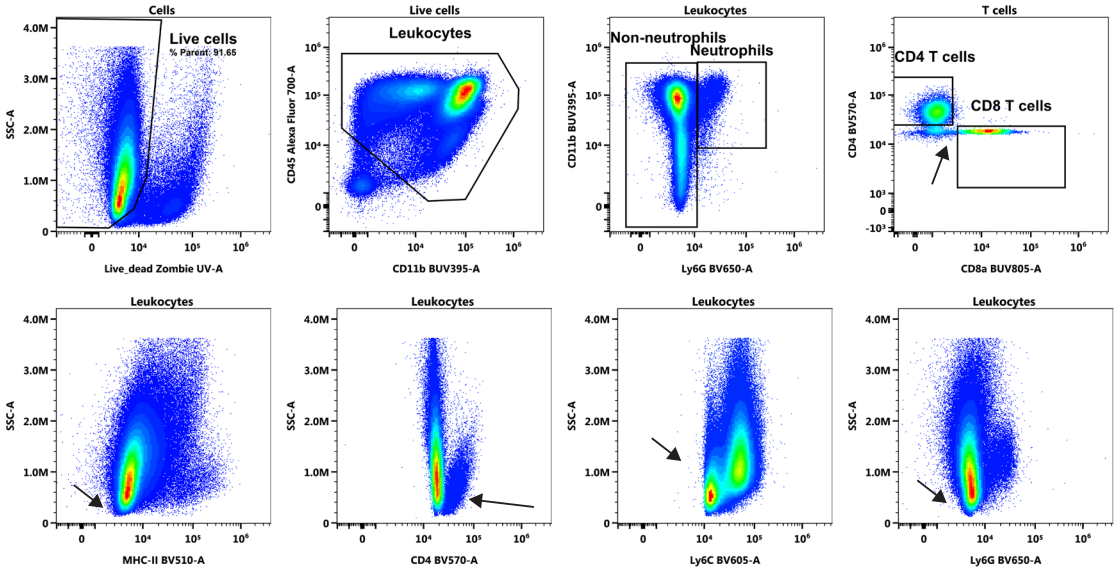
Step	*Parameter
1	temp ON
2	loop 6x
3	ramp -750 rpm, 3 seconds
4	spin -800 rpm, 2 seconds
5	ramp 750 rpm, 3 seconds
6	spin 800 rpm, 2 seconds
7	end loop
8	loop 9x
9	spin -30 rpm, 30 seconds
10	spin 0 rpm, 15 seconds
11	spin 30 rpm, 15 seconds
12	end loop
13	loop 4x
14	spin -800 rpm, 3 seconds
15	spin 800 rpm, 2 seconds
16	end loop
17	loop 9x
18	spin -30 rpm, 30 seconds
19	spin 0 rpm, 15 seconds
20	spin 30 rpm, 15 seconds
21	end loop
22	loop 4x
23	spin -800 rpm, 3 seconds
24	spin 800 rpm, 2 seconds
25	end loop
26	loop 10x
27	spin -30 rpm, 30 seconds
28	spin 0 rpm, 15 seconds
29	spin 30 rpm, 15 seconds
30	end loop
31	end

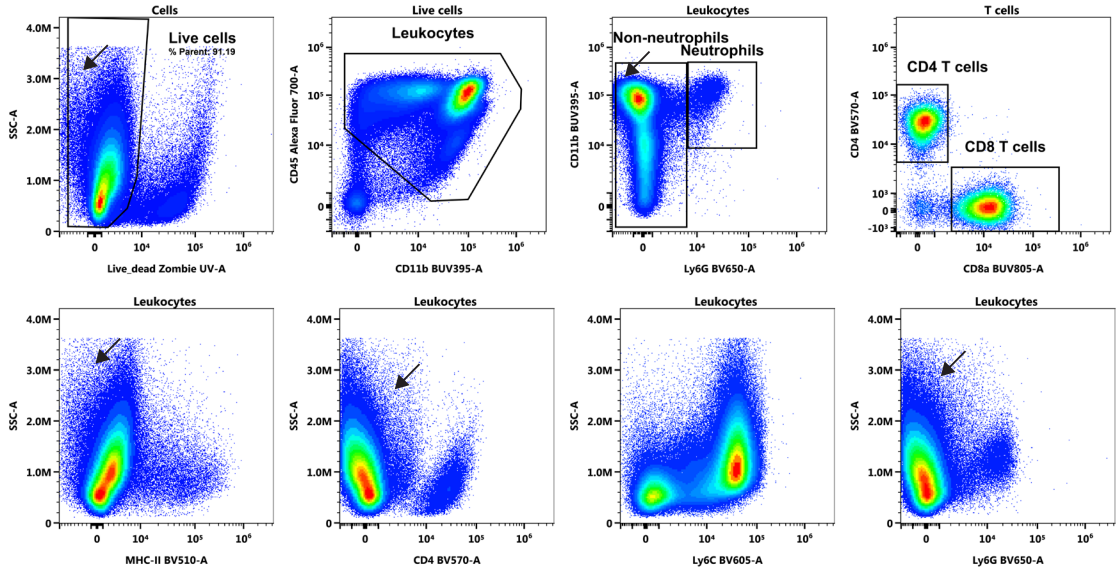
*This program was developed by Dr Thomas Ashhurst


A
Clean up gates
Time
Single cells
93.48
FSC-H
FSC-A
Single cells
Cells
58.23
SSC-A
FSC-A
Cells
96.04
Live
SSC-A
Live_dead Zombie UV-A
Live
Leukocytes
76.29
CD45 Alexa Fluor 700-A
CD11b BUV395-A
B
Population identification
Leukocytes
Neutrophils
97.20
2.10
Non-neutrophils
CD11b BUV395-A
Ly6G BV650-A
Non-neutrophils
12.40
P7
85.52
P6
CD45 Alexa Fluor 700-A
P2RY12 PE-A
P6
Microglia
99.12
Ly6C BV605-A
CX3CR1 BV421-A
P7
NK1.1-
NK1.1+
10.13
88.68
CD11b BUV395-A
NK1.1 PE-Cy5-A
CD3e-
Myeloid
P18
58.39
CD11b BUV395-A
CD68 PerCP-Cy5.5-A
CD3e+
CD4+ T cells
30.73
CD8a+ T cells
33.66
CD4 BV570-A
CD8a BUV805-A
NK1.1-
CD3e-
CD3e+
89.27
10.14
CD11b BUV395-A
CD3e PE-CF594-A
NK1.1+
NK T cells
10.13
85.28
NK cells
CD3e PE-CF594-A
NK1.1 PE-Cy5-A
P18
cDCs
0.70
CD11c BUV737-A
MHC-II BV510-A
Myeloid
BAMS
57.87
CD206 BV785-A
CD68 PerCP-Cy5.5-A

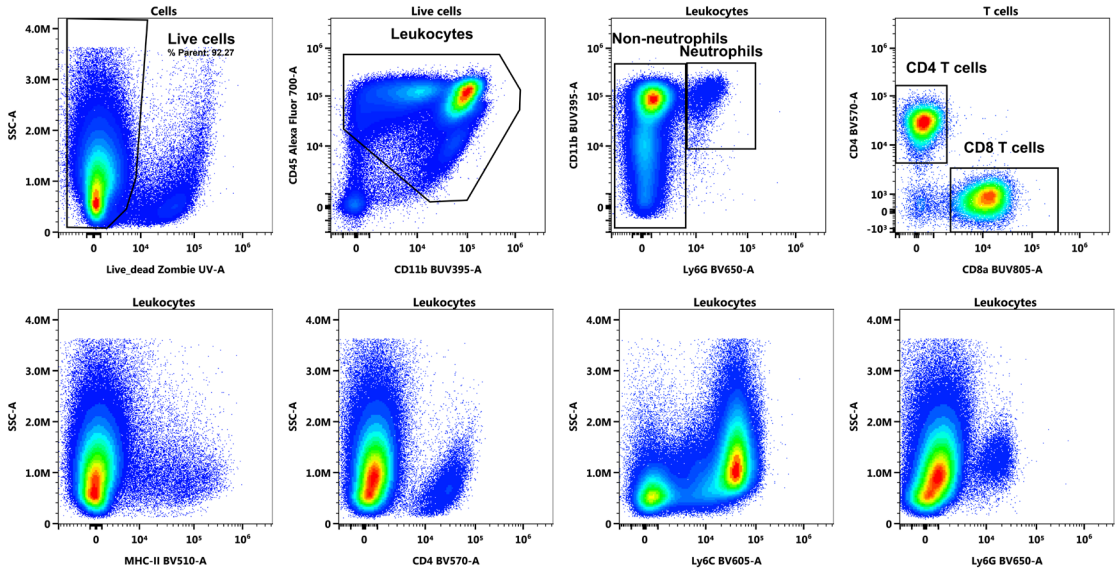
A No AF extraction



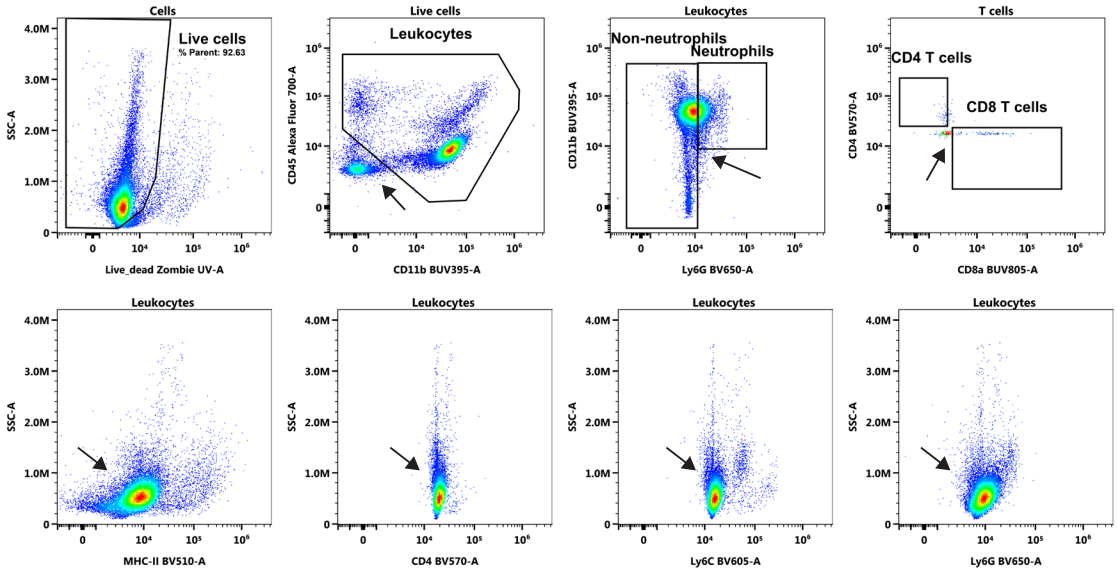
B AF extraction



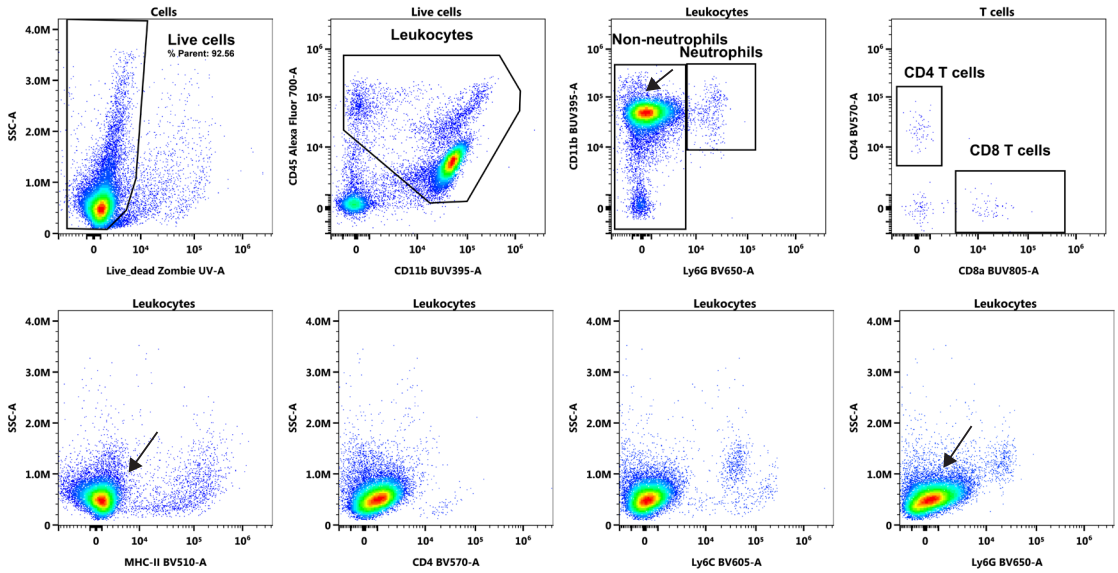
C Multiple AF extraction



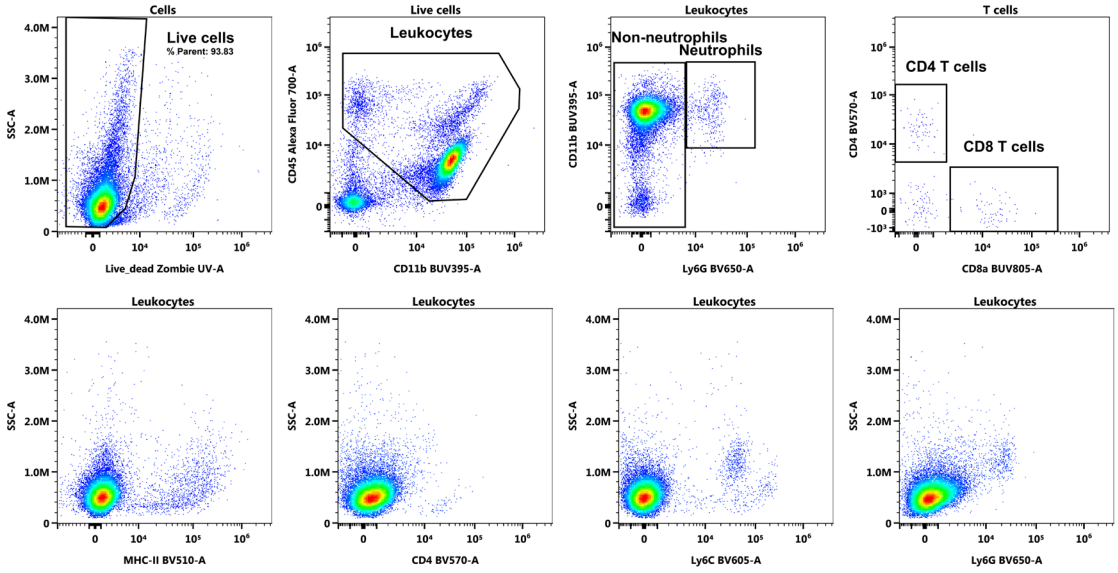
A No AF extraction



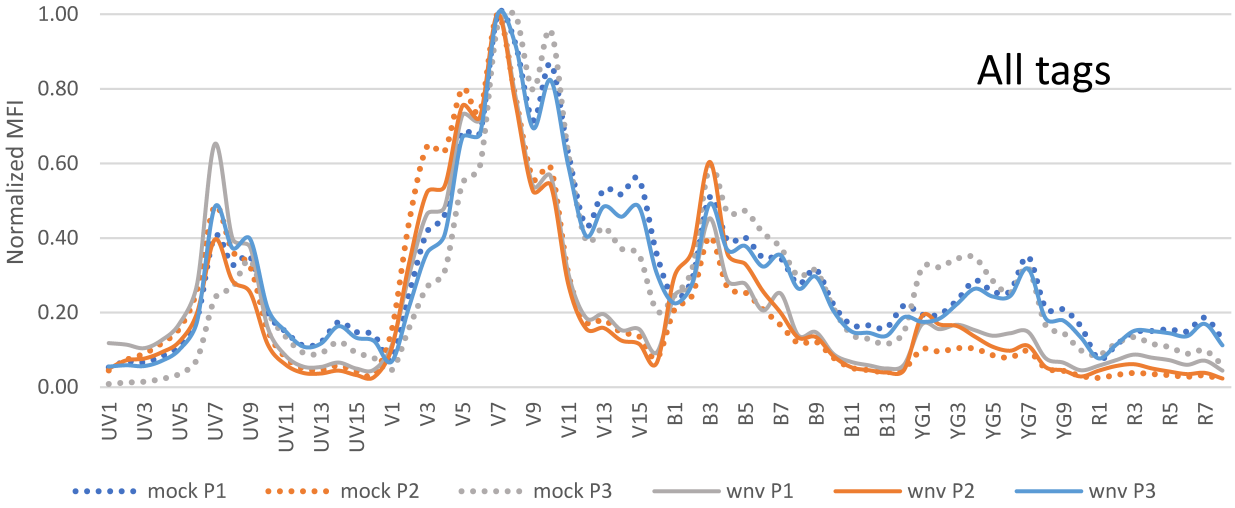
B AF extraction



C Multiple AF extraction



A Normalised median fluorescence intensity of mock and WNV AF tags



B No AF extraction without BrdU

	BUV395	Zombie UV	BUV737	BUV805	BV421	BV510	BV570	BV605	BV650	BV711	BV785	PerCP-Cy5.5	PE	PE-CF594	PE-Cy5	PE-Cy7	Alexa Fluor 700	APC-Cy7	DAF-FM
BUV395	1																		
Zombie UV	0.59	1																	
BUV737	0.04	0.04	1																
BUV805	0.15	0.13	0.41	1															
BV421	0.1	0.55	0.01	0.03	1														
BV510	0.09	0.4	0.03	0.04	0.19	1													
BV570	0.02	0.15	0.02	0.02	0.18	0.51	1												
BV605	0.02	0.08	0.06	0.03	0.08	0.36	0.67	1											
BV650	0.01	0.07	0.14	0.04	0.11	0.16	0.25	0.56	1										
BV711	0.01	0.06	0.39	0.12	0.1	0.07	0.08	0.19	0.46	1									
BV785	0.01	0.05	0.21	0.24	0.08	0.04	0.04	0.08	0.16	0.49	1								
PerCP-Cy5.5	0.01	0.04	0.27	0.07	0.02	0.1	0.13	0.25	0.43	0.53	0.21	1							
PE	0.01	0.02	0	0.01	0.01	0.09	0.55	0.26	0.05	0.01	0	0.09	1						
PE-CF594	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.05	0.31	0.47	0.2	0.05	0.01	0.36	0.43	1					
PE-Cy5	0.01	0.01	0.09	0.02	0	0.01	0.09	0.23	0.34	0.16	0.03	0.73	0.11	0.5	1				
PE-Cy7	0	0.01	0.12	0.08	0	0.01	0.03	0.04	0.05	0.11	0.18	0.26	0.04	0.08	0.14	1			
Alexa Fluor 700	0.01	0.01	0.4	0.08	0.01	0.02	0.02	0.06	0.21	0.49	0.12	0.38	0.01	0.06	0.22	0.1	1		
APC-Cy7	0	0.01	0.26	0.21	0	0.01	0.01	0.03	0.09	0.23	0.25	0.18	0.01	0.03	0.09	0.29	0.42	1	
DAF-FM	0.02	0.08	0.01	0.01	0.04	0.15	0.1	0.07	0.04	0.02	0.01	0.06	0.1	0.06	0.03	0.01	0.02	0.01	1

Complexity Index: 6.25

C No AF extraction with BrdU

	BUV395	Zombie UV	BUV737	BUV805	BV421	BV510	BV570	BV605	BV650	BV711	BV785	PerCP-Cy5.5	PE	PE-CF594	PE-Cy5	PE-Cy7	APC	Alexa Fluor 700	APC-Cy7	DAF-FM
BUV395	1																			
Zombie UV	0.59	1																		
BUV737	0.04	0.04	1																	
BUV805	0.15	0.13	0.41	1																
BV421	0.1	0.55	0.01	0.03	1															
BV510	0.09	0.4	0.03	0.04	0.19	1														
BV570	0.02	0.15	0.02	0.02	0.18	0.51	1													
BV605	0.02	0.08	0.06	0.03	0.08	0.36	0.67	1												
BV650	0.01	0.07	0.14	0.04	0.11	0.16	0.25	0.56	1											
BV711	0.01	0.06	0.39	0.12	0.1	0.07	0.08	0.19	0.46	1										
BV785	0.01	0.05	0.21	0.24	0.08	0.04	0.04	0.08	0.16	0.49	1									
PerCP-Cy5.5	0.01	0.04	0.27	0.07	0.02	0.1	0.13	0.25	0.43	0.53	0.21	1								
PE	0.01	0.02	0	0.01	0.01	0.09	0.55	0.26	0.05	0.01	0	0.09	1							
PE-CF594	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.05	0.31	0.47	0.2	0.05	0.01	0.36	0.43	1						
PE-Cy5	0.01	0.01	0.09	0.02	0	0.01	0.09	0.23	0.34	0.16	0.03	0.73	0.11	0.5	1					
PE-Cy7	0	0.01	0.12	0.08	0	0.01	0.03	0.04	0.05	0.11	0.18	0.26	0.04	0.08	0.14	1				
APC	0.01	0.04	0.23	0.06	0.02	0.06	0.08	0.17	0.46	0.33	0.09	0.41	0.05	0.19	0.5	0.08	1			
Alexa Fluor 700	0.01	0.01	0.4	0.08	0.01	0.02	0.02	0.06	0.21	0.49	0.12	0.38	0.01	0.06	0.22	0.1	0.59	1		
APC-Cy7	0	0.01	0.26	0.21	0	0.01	0.01	0.03	0.09	0.23	0.25	0.18	0.01	0.03	0.09	0.29	0.3	0.42	1	
DAF-FM	0.02	0.08	0.01	0.01	0.04	0.15	0.1	0.07	0.04	0.02	0.01	0.06	0.1	0.06	0.03	0.01	0.04	0.02	0.01	1

Complexity Index: 6.72

D Multiple AF extraction on mock brain without BrdU

	BUV395	Zombie UV	BUV737	BUV805	BV421	BV510	P1	P2	BV570	BV605	BV650	BV711	P3	BV785	DAF-FM	PerCP-Cy5.5	PE	PE-CF594	PE-Cy5	PE-Cy7	Alexa Fluor 700	APC-Cy7
BUV395	1																					
Zombie UV	0.58	1																				
BUV737	0.04	0.04	1																			
BUV805	0.15	0.13	0.41	1																		
BV421	0.1	0.56	0.03	0.04	1																	
BV510	0.09	0.4	0.03	0.04	0.23	1																
P1	0.11	0.36	0.21	0.13	0.32	0.75	1															
P2	0.16	0.54	0.08	0.08	0.49	0.88	0.91	1														
BV570	0.02	0.15	0.02	0.02	0.22	0.51	0.61	0.57	1													
BV605	0.02	0.08	0.06	0.03	0.13	0.37	0.61	0.47	0.67	1												
BV650	0.01	0.07	0.14	0.04	0.15	0.16	0.49	0.29	0.25	0.56	1											
BV711	0.01	0.06	0.39	0.12	0.14	0.07	0.42	0.19	0.08	0.19	0.46	1										
P3	0.06	0.26	0.15	0.08	0.25	0.73	0.98	0.88	0.69	0.67	0.48	0.33	1									
BV785	0.01	0.05	0.21	0.24	0.11	0.04	0.3	0.12	0.04	0.08	0.16	0.49	0.2	1								
DAF-FM	0.02	0.06	0.01	0.01	0.04	0.13	0.34	0.35	0.08	0.05	0.02	0.01	0.38	0.01	1							
PerCP-Cy5.5	0.01	0.03	0.27	0.07	0.06	0.08	0.49	0.23	0.12	0.24	0.42	0.52	0.46	0.21	0.04	1						
PE	0.01	0.02	0.01	0.01	0.03	0.09	0.29	0.22	0.55	0.26	0.05	0.01	0.38	0	0.1	0.08	1					
PE-CF594	0.01	0.02	0.03	0.01	0.03	0.05	0.36	0.21	0.31	0.47	0.2	0.05	0.44	0.01	0.06	0.35	0.43	1				
PE-Cy5	0.01	0.01	0.09	0.02	0.03	0.01	0.34	0.15	0.09	0.23	0.34	0.15	0.35	0.03	0.02	0.73	0.11	0.5	1			
PE-Cy7	0	0.01	0.12	0.08	0.02	0.01	0.19	0.06	0.02	0.04	0.05	0.11	0.14	0.18	0.01	0.26	0.03	0.07	0.13	1		
Alexa Fluor 700	0.01	0.01	0.41	0.07	0.02	0.01	0.21	0.07	0.02	0.05	0.21	0.49	0.17	0.12	0.01	0.38	0.01	0.05	0.22	0.1	1	
APC-Cy7	0	0.01	0.26	0.21	0.02	0.01	0.16	0.04	0.01	0.03	0.09	0.23	0.1	0.25	0	0.18	0.01	0.03	0.09	0.29	0.42	1

Complexity Index: 57.25

E Multiple AF extraction on WNV brain without BrdU

	BUV395	Zombie UV	BUV737	BUV805	BV421	BV510	P1	P2	BV570	BV605	BV650	BV711	P3	BV785	DAF-FM	PerCP-Cy5.5	PE	PE-CF594	PE-Cy5	PE-Cy7	Alexa Fluor 700	APC-Cy7
BUV395	1																					
Zombie UV	0.58	1																				
BUV737	0.04	0.04	1																			
BUV805	0.15	0.13	0.41	1																		
BV421	0.1	0.56	0.03	0.04	1																	
BV510	0.09	0.4	0.03	0.04	0.23	1																
P1	0.2	0.53	0.11	0.09	0.41	0.88	1															
P2	0.14	0.47	0.08	0.07	0.42	0.84	0.98	1														
BV570	0.02	0.15	0.02	0.02	0.22	0.51	0.58	0.58	1													
BV605	0.02	0.08	0.06	0.03	0.13	0.37	0.48	0.46	0.67	1												
BV650	0.01	0.07	0.14	0.04	0.15	0.16	0.31	0.28	0.25	0.56	1											
BV711	0.01	0.06	0.39	0.12	0.14	0.07	0.21	0.17	0.08	0.19	0.46	1										
P3	0.12	0.37	0.2	0.12	0.31	0.78	0.94	0.92	0.62	0.6	0.48	0.4	1									
BV785	0.01	0.05	0.21	0.24	0.11	0.04	0.13	0.1	0.04	0.08	0.16	0.49	0.27	1								
DAF-FM	0.02	0.06	0.01	0.01	0.04	0.13	0.38	0.46	0.08	0.05	0.02	0.01	0.35	0.01	1							
PerCP-Cy5.5	0.01	0.03	0.27	0.07	0.06	0.08	0.28	0.24	0.12	0.24	0.42	0.52	0.48	0.21	0.04	1						
PE	0.01	0.02	0.01	0.01	0.03	0.09	0.27	0.29	0.55	0.26	0.05	0.01	0.29	0	0.1	0.08	1					
PE-CF594	0.01	0.02	0.03	0.01	0.03	0.05	0.27	0.27	0.31	0.47	0.2	0.05	0.35	0.01	0.06	0.35	0.43	1				
PE-Cy5	0.01	0.01	0.09	0.02	0.03	0.01	0.21	0.17	0.09	0.23	0.34	0.15	0.33	0.03	0.02	0.73	0.11	0.5	1			
PE-Cy7	0	0.01	0.12	0.08	0.02	0.01	0.08	0.06	0.02	0.04	0.05	0.11	0.17	0.18	0.01	0.26	0.03	0.07	0.13	1		
Alexa Fluor 700	0.01	0.01	0.41	0.07	0.02	0.01	0.12	0.08	0.02	0.05	0.21	0.49	0.21	0.12	0.01	0.38	0.01	0.05	0.22	0.1	1	
APC-Cy7	0	0.01	0.26	0.21	0.02	0.01	0.07	0.05	0.01	0.03	0.09	0.23	0.15	0.25	0	0.18	0.01	0.03	0.09	0.29	0.42	1

Complexity Index: 42.65