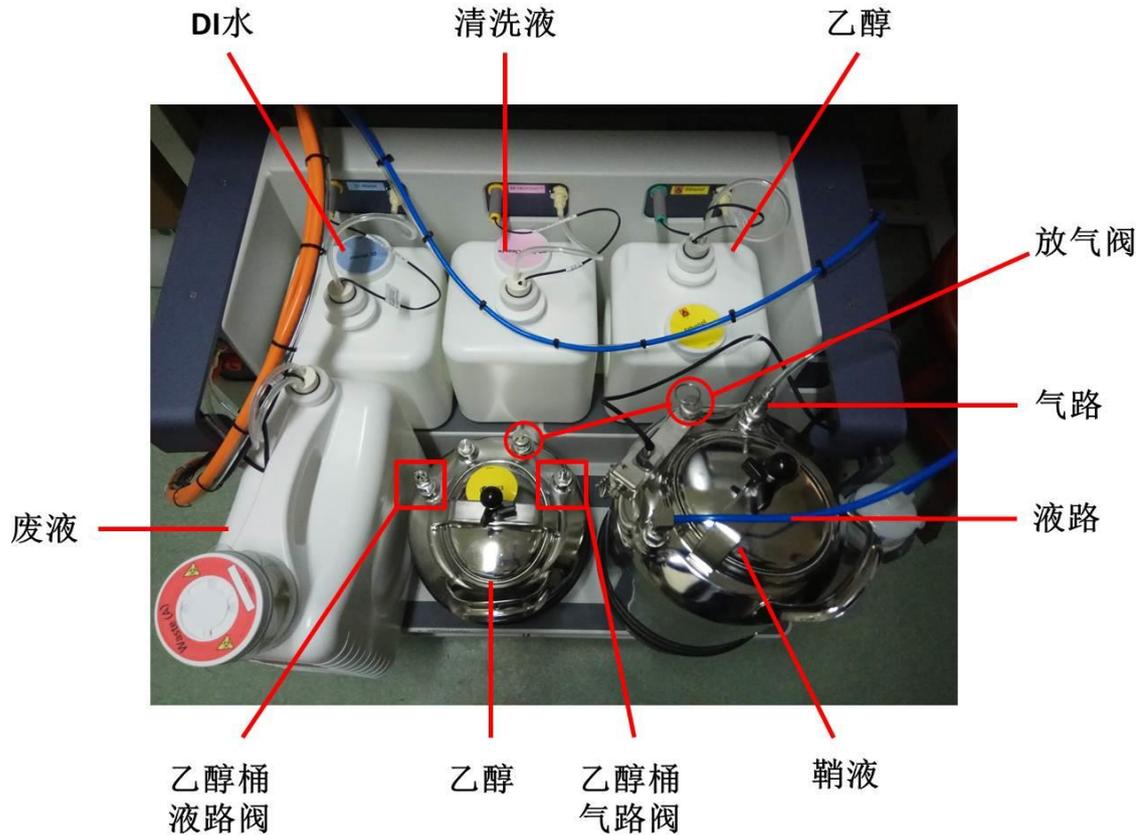


BD FACSAriaIII 基础操作流程

1. 开机

1.1 检查液流车各桶内液体情况：如图所示，下图中上方三个白色桶分别为去离子水（DI）、清洗液和 75%乙醇，容积为 5L，进行无菌分选前液路清洗时使用；下方白色的长方形桶为废液桶（10L），右边的金属桶为鞘液桶（10L），中间的金屬桶为 75%乙醇桶（5L），金属乙醇桶为液流关闭时使用。



1.2 打开稳压器，打开电脑，输入密码“BDIS#1”；

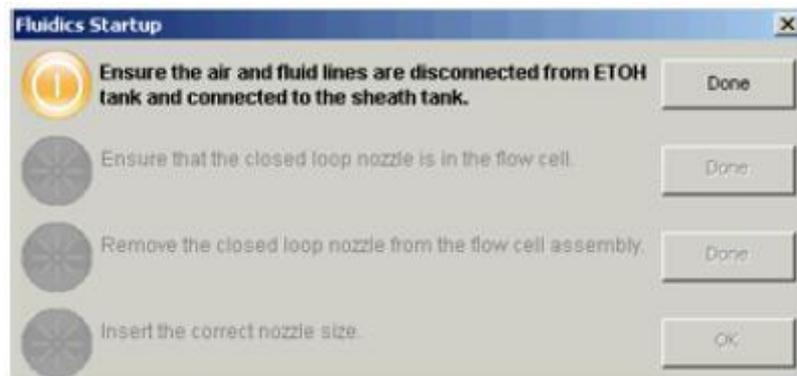
1.3 打开仪器主电源，打开所需的激光器开关；



- 1.4 双击电脑上 BD FACSDiva Software，无需输入密码，直接点击 OK 登录软件，此时软件自动连接仪器，Cytometer 窗口下显示 Cytometer Connected 表示软件和仪器已连接好，旁边 5 个绿色方框显示液流车各桶内液体的剩余情况：



- 1.5 液流启动：在 Cytometer 菜单下选择 Fluidics Startup，按提示进行，完成一步，点击 Done 进行下一步：



- 1) 确认液路管和气路管没有连接在乙醇金属桶上，而是连接在鞘液桶上；
 - 2) 确认闭合喷嘴连接在流动室上，点击 Done 后一起开始用鞘液充盈管路（替换之前的液流关闭时的乙醇）；
 - 3) 液流启动结束后，将闭合喷嘴取下；
 - 4) 换上合适的喷嘴，点击 OK。
- 1.6 液流启动在液流关闭后开机，或者液路中有气泡，或者一个星期使用一次，平时在仪器显示 Cytometer Connected 以及换好合适的喷嘴后，即可开启 stream；
- 1.7 喷嘴形状如下图所示，有红色 O 圈的一面朝上，喷嘴有 70 μ m、85 μ m、100 μ m、130 μ m 等几个规格：

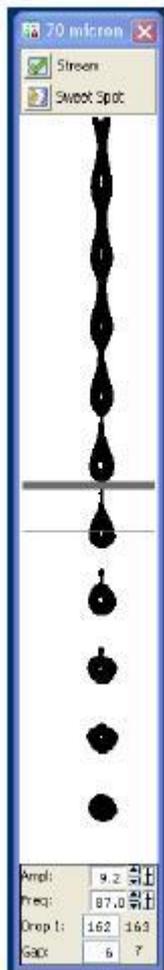


- 1.8 在 Sort 菜单中选择 Sort Setup，选择安装的喷嘴孔径；或者在 Cytometer 中选择 View configurations 菜单下，在 configurations 界面中选择喷嘴的孔径，并设好对应的鞘液压力：



Sort Setup Name	Nozzle (microns)	Default Pressure (PSI)
70 micron	70	70
85 micron	85	45
100 micron	100	20
130 micron	130	10

1.9 在 Breakoff 窗口，点击  开启 stream，开启后会显示 ，调节振幅 Ampl，使断点位置处于第二滴，Gap 值在下表中的范围内，等待液流稳定后点击 Sweet Spot 锁定：



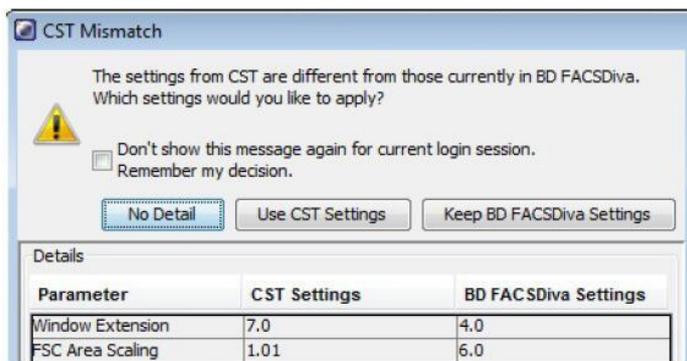
Setting	70 micron	85 micron	100 micron	130 micron
Sheath Pressure	70	45	20	10
Amplitude	60	32	12	24
Frequency	87	47	30	12
Drop 1	150	150	150	150
Gap (upper limit)	6 (14)	7 (17)	10 (21)	12 (21)

2. CST 校准

- 2.1 新装机或者更换了新的喷嘴，需要使用 CST 质控微球进行基线（baseline）校准，评估仪器的线性、探测器效率、光学背景、CV、电子噪音等参数，并自动校准激光延迟和面积因子等；
- 2.2 在 0.5ml ddH₂O 中加入三滴 CS&T 荧光微球，记下小球的批号；
- 2.3 Cytometer 菜单下选择 CST，Characterize 中选择 Define Baseline，Setup Beads 中的 Lot ID 中选择 CST 小球的批号（如没有，可在 Tool 中导入），再点击 RUN 即可；中途需要点击两次 continue；

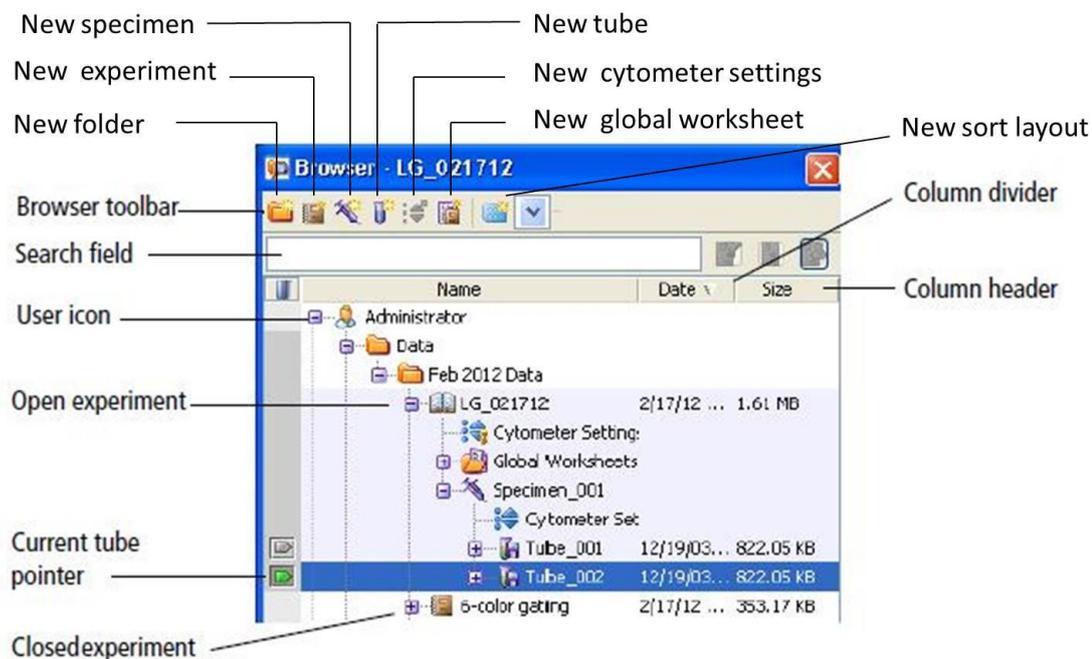


- 2.4 点击 View Report，查看检测报告，没有红字即可通过；
- 2.5 通过基线检测后，以后每次开机，需进行仪器状态自动校准（Check Performance）；
- 2.6 在 0.35ml ddH₂O 中加入 1 滴 CS&T 荧光微球，记下小球的批号；
- 2.7 Cytometer 菜单下选择 CST，Characterize 中选择 Check Performance，Setup Beads 中的 Lot ID 中选择 CST 小球的批号（如没有，可在 Tool 中导入），再点击 RUN 即可；
- 2.8 点击 View Report，查看检测报告，没有红字即可通过；
- 2.9 通过后关闭 CST 窗口回到 BD FACSDiva 窗口，仪器重新与软件连接，选择 Use CST Settings 可按照校准后参数进行后续实验；

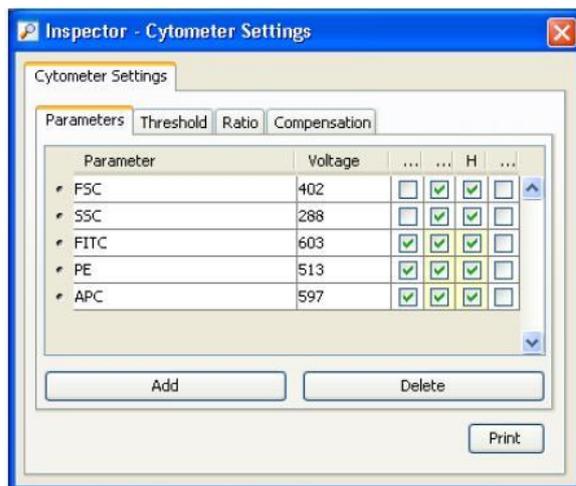


3. 流式分析

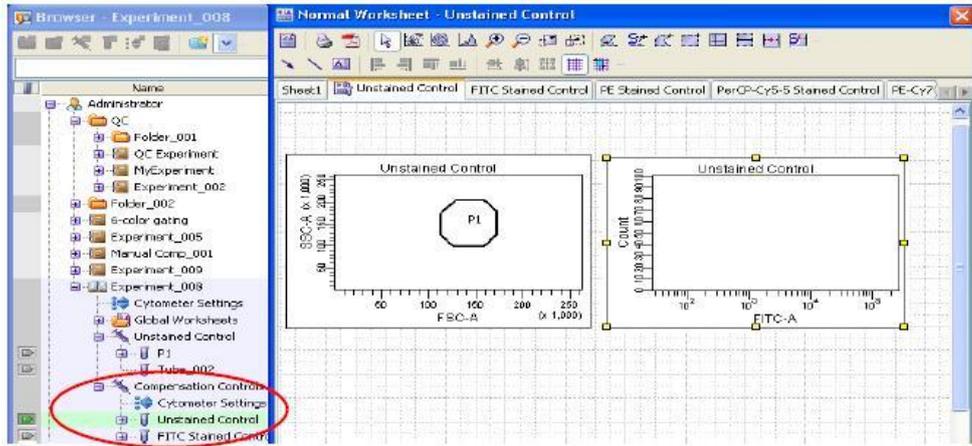
3.1 新建一个New folder，在new folder下新建new experiment；



3.2 在Inspector, parameters中把不需要的接收通道去掉，



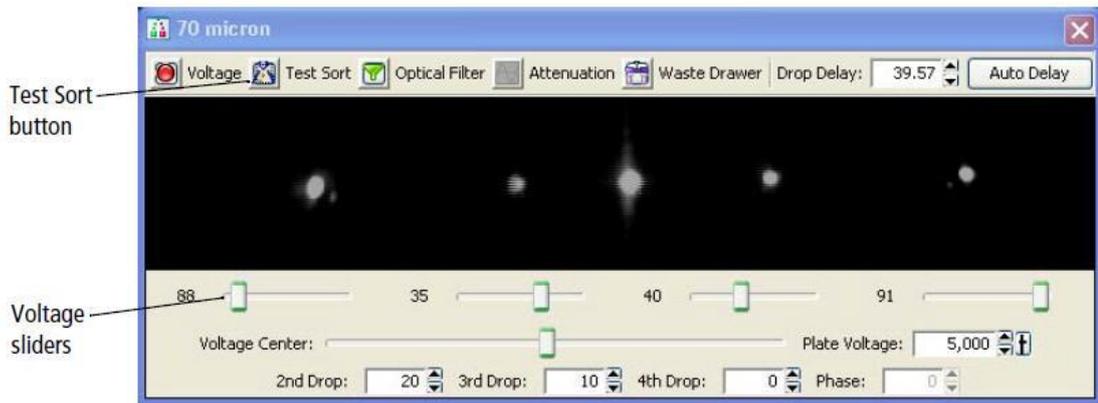
3.3 设置自动补偿: Experiment 菜单下Compensation Setup, 会根据之前选择的通道自动生产Compensation Controls和图, 按照Compensation Controls的顺序, 上阴性样本和单阳管, 上阴性对照时调节好电压和P1门的位置, 在P1门上右键点击Apply to All Compensation Controls, 使P1门应用到当前experiment下所有的Compensation Controls中;



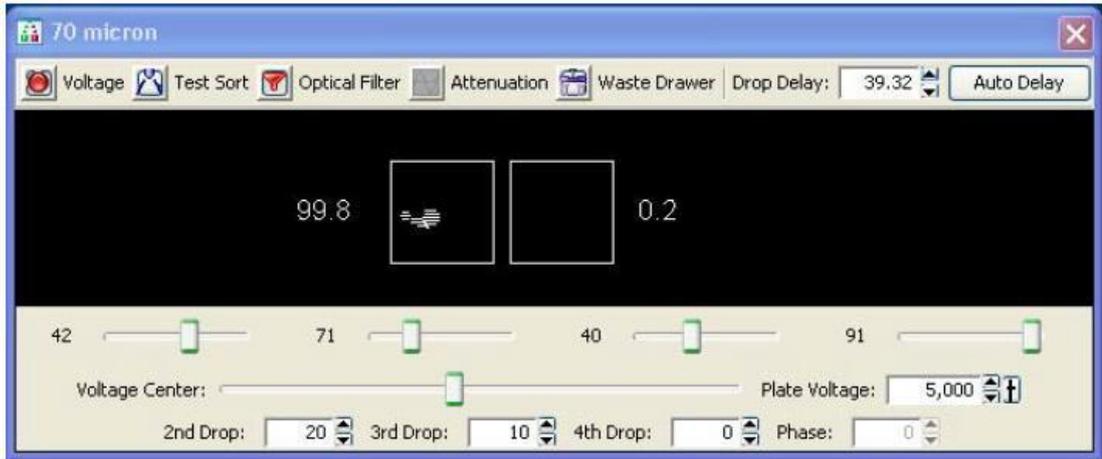
- 3.4 上完所有单阳管后，点击Experiment > Compensation Setup > Calculate Compensation，自动成补偿；
- 3.5 补偿生成后，弹出一个窗口，出现三个选项：Link & Save、Apply Only、Cancel，选择Link & Save把当前补偿数据应用到当前experiment的所有数据中并生成一个文件，后期可以直接调出该文件应用其中的补偿数据，Apply Only只应用不保存当前补偿文件，cancel取消，选择Link & Save或Apply Only使补偿生效；
- 3.6 在当前experiment下新建一个specimen，开始上样，上阴性管调电压，点击next tube直接上后续样本；
- 3.7 画门分析。

4. 流式分选

- 4.1 液流stream稳定后，点击Voltage打开偏转板的电压（之前用去离子水冲洗干净并完全擦干），点击Test Sort，将左边第二根液流的voltage打开，其它可以关闭，通过调节2nd Drop、3rd Drop和4th Drop，将中间液流和侧液流调至最集中，没有分叉，再点击Optical filter，会出现两个白色框，调节侧液流电压使侧液流的在左边的框范围内；



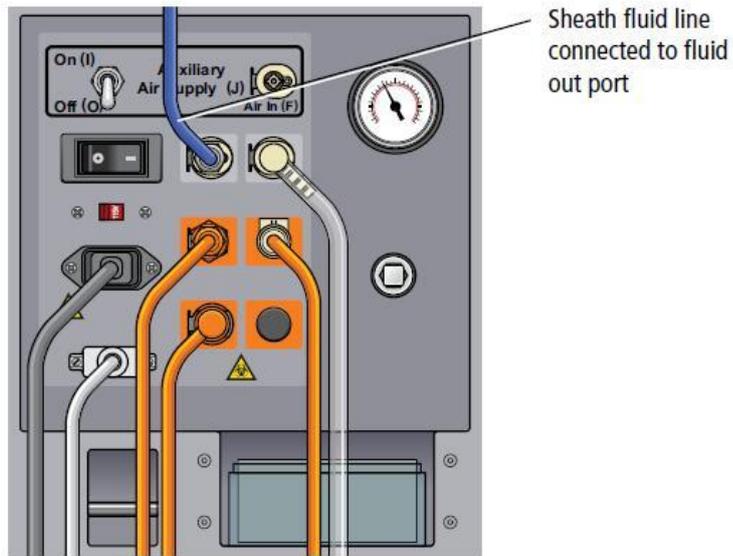
- 4.2 设置Accudrop: Experiment > New Experiment下选择Accudrop Drop Delay，在Cytometer窗口的Lab中，把window extension设为0；
- 4.3 准备Accudrop微球样品，500ulddH₂O中加1-2滴微球，混匀上样；
- 4.4 点击Sort Layout中Sort开始分选，点击cancel不需收集微球；
- 4.5 设Device 中选择2 Tube，Precision 为Initial，Target events 为Continuous ；
- 4.6 打开Voltage和Optical Filter，关闭Test Sort，调节Drop Delay使中间的亮点基本全部移至左边



- 4.7 在Sort Layout中点击Fine Tune，再次微调Drop Delay，使左边微球的百分比最高；
- 4.8 关闭Voltage和Optical Filter，把Cytometer窗口Lab中的window extension设为2；
- 4.9 Drop Delay设置完毕，新建experiment，进行分选实验。

5. 关机及维护

- 5.1 日常关机：上Clean Buffer（稀释5-10倍）或者 Rinse Buffer（不稀释），最高速上样10分钟，再换去离子水最高速上样15分钟，关闭stream，在Cytometer中点击Standby，仪器放气，取下喷嘴（超声清洗），拉起鞘液桶排气阀放掉气压，关闭仪器电源，关闭软件，清空废液桶。
- 5.2 液流关闭：每周做一次或者长期不用了最后用液流关闭。
 - 1) 清洗上样管路后关闭stream；
 - 2) 将鞘液桶的液路（从液路滤器以下）和气路连接到乙醇金属桶的对应阀门，清空废液桶；
 - 3) Cytometer中点击Fluidics shutdown，取下上样喷嘴（超声清洗），装上闭合喷嘴；
 - 4) 在上样台上放置2ml去离子水，按页面提示完成液流关闭；
 - 5) 完成后关闭仪器电源，关闭软件，清空废液桶。
- 5.3 分选无菌清洗：分选前，要进行无菌清洗管路。
 - 1) 确认液流车前方3个小白桶内液体充足，鞘液桶用75%乙醇润洗过后盖上盖子过夜让乙醇挥发，再用灭菌的去离子水洗净乙醇，再装满用0.22um滤器过滤后的鞘液，去离子水桶和液面感应器同样处理消毒并装满去离子水；
 - 2) Cytometer > Cleaning Modes > Prepare for Aseptic Sort，按提示完成每步点击Done进行下一步；
 - 3) 确认闭合喷嘴在流动室上；
 - 4) 将蒸馏水桶和清洗液桶的液路从液流车上的快速接口上断开，将清洗液桶的液路连接到蒸馏水桶的快速接口上；
 - 5) 将清洗液桶的液路从蒸馏水桶的快速接口上断开，将蒸馏水桶和清洗液桶的液路连回各自的快速接口上；
 - 6) 将鞘液的液路从鞘液过滤器远离鞘液桶的一端断开，将其连接到液流车侧面面板的



“Fluid” 接口上

- 7) 将鞘液的液路从液流车侧面面板上取下，连接回鞘液桶的过滤器上；
- 8) 关机

5.4 其他保养程序：

- 1) **Sample Line Backflush:** 用鞘液再清洗样本管路，每次将样本从进样仓放下时，仪器会自动backflush清洗进样管，点击Sample Line Backflush可再次进行清洗
- 2) **Clean Flow Cell:** 用Clean Buffer清洗流动室，可在必要时进行，关闭液流后，在上样台放置3ml Clean Buffer，然后选择Clean Flow Cell，按提示进行即可；
- 3) **Prime after Tank Refill:** 5L小白桶与液流车脱离后需要进行，排除管路中的气泡。