

BD FACSVerser 流式细胞仪样品测试操作流程

1. 开机前或关机后检查鞘液桶中是否需要添加鞘液；清空废液桶中的废液后，添加 500ml NaClO 溶液（NaClO 原液稀释 20 倍使用）清洗废液桶，并用纯净水清洗干净（**注意：仪器运行时最好不要进行此项操作**）；鞘液成分：一定浓度的 NaN₃（叠氮化钠）或使用标准较高的纯净水；
2. 开电脑（仪器开机密码：BDIS#1），电脑主机显示屏右下角网络连接图标显示为×号；
3. 按下仪器 Power 键，启动仪器（正常启动，电源键为绿色），20 分钟后激光器预热完成；
4. 待×号变为! 时，即可运行 FACSuit 软件（软件密码：bdadministrator）；连接成功，则工作界面左下角状态符号显示为 Connected；液流系统就绪，则工作界面左下角状态符号显示为 Fluidics；
5. 仪器开机或运行时出现故障，根据提示信息操作后仍然无法修正，根据以下途径获得故障发生时产生的报告：a)在 FACSuite 软件中的 Cytometer > Maintenance > Generate System Health Report, 根据日期、时间将生成的两个文件拷贝出来：system health report connected_月日年 txt.和 zip 文件。b) 关闭 FACSuite 软件，在电脑桌面上找到 ServiceClient 文件夹，打开，找到 ServiceClient.exe 文件，双击打开，选择 Cytometer > Connect > Get Log File, 根据提示将其存在自定义的位置，将以上文件发送给您所在区域的工程师或技术支持，或拨打 400-819-9900 以获得准确、有效的支持；
6. 正式测定样品前，自下而上执行以下 4 步操作：Cytometer → Fluidics →
（1）SIT Flush 反冲，执行此步操作前取下样品管（自动结束）；（2）Purge Sheath Filter 排气泡、清洗；（3）Drain and Fill Flow Cell 流动室排空气，上样针处添加一管干净的蒸馏水，点击确定；（4）Clean Curvette 清洗流动室，此步所需水量稍多，管中水量不能太少（2~3ml）；
7. 上述 4 步完成之后，先做一个水样，测试仪器状态，Flow rate 调制 High，水样较为干净时，Threshold Rate 值较小，一般在 50events/s 以下；
8. 水样完成之后，取下样品管，进样针上的指示灯为黄色，指示灯变为绿色时，即可套上测试样品；
9. 第一个测试样品为阴性对照样品（细胞未用任何荧光染料进行染色），Flow rate 调制 Low，主要用于调试电压，电压调试好之后，细胞位于 FSC-A×SSC-A 图像角落；阴性对照样品需要的量较多，应加大备用量；样品测试时，先点击 Preview（采样，但不收集数据），

然后调试电压，点击 Restart，重复 3 次左右即可将电压调适好；电压调试好之后，点击 Acquire，开始采样同时收集数据；

10. 测试完成之后，操作软件中点击 next tube 添加新的样品管（该管属性带有上一样品管属性），并选中；取下样品管，仪器自动反冲（灯光为黄色），灯光变为绿色即可上下一个样品；下一个测试样品为单个荧光染料进行染色的样品，主要用于调整荧光补偿值；调整好之后，荧光染色细胞重心高度与阴性对照细胞一致，其它荧光强度数值为 0；
11. 样品用 n 种染料进行荧光标记，则需要进行 n 次调整荧光补偿值；单个染料进行荧光标记，则不需要调整荧光补偿值；
12. 测试完成之后，操作软件中点击 next tube 添加新的样品管（该管属性带有上述所有样品管属性），并选中；取下样品管，仪器自动反冲（灯光为黄色），灯光变为绿色即可上正式样品管（多重荧光染料同时标记不同类群的细胞）；
13. 正式样品测试完成，即可进行数据分析，包括门的设置（分析某一类群细胞）、添加十字象限、细胞成分分析；
14. 样品测试全部完成，执行 daily clean，将 3ml 稀释 20 倍 NaClO（国产原液）溶液上样，高速运行 10 分钟，清洗管路；
15. NaClO 溶液清洗完成，用标准较高的纯水 3ml 走样 2 次，每次 15 分钟，清洗管路中残存的 NaClO；
16. 清洗完成，点击 Cytometer 菜单中的 shut down，仪器状态灯由绿色变为黄色，即可关闭电源，随后关闭电脑和显示器；
17. 进样针处保留 1 管较为干净的除离子水（任何时候进样针处样品管不能为空，仪器未使用时需添加适量的除离子水）。

BD FACSVerse 流式细胞仪维护及注意事项

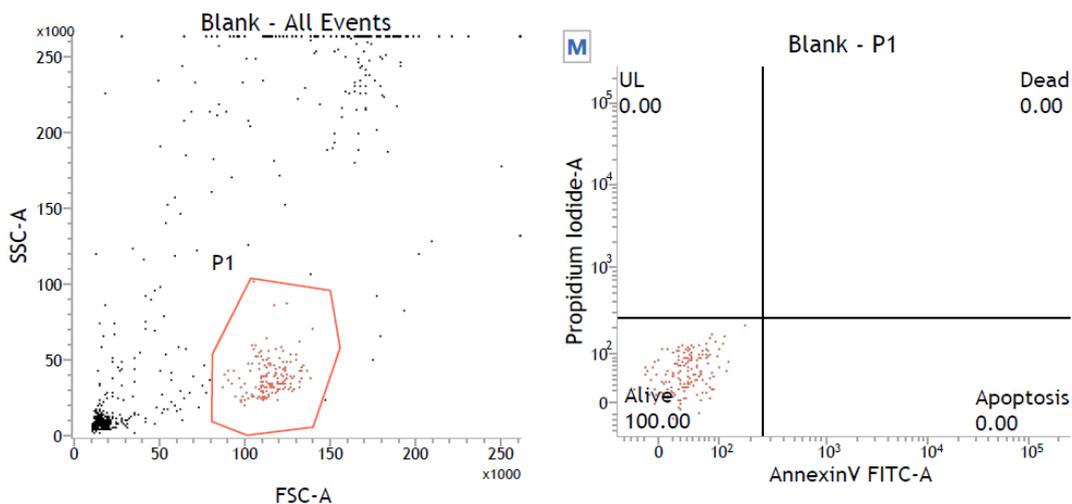
1. 仪器所处环境温度保持 22℃左右，湿度控制在 60%以下；
2. 关机后进样针处保留 1 管较为干净的除离子水；
3. 过滤器发黑、杂质较多则需要更换，一般情况下过滤器每 6 个月更换一次；
4. 鞘液使用叠氮化钠（仪器生产厂家销售），或使用标准较高的纯净水替代；国产 NaClO 原液需要用纯净水稀释 20 倍后方可用于仪器管路的清洗。
5. 每 6 个月做一次 CQC（仪器质控），每 1 个月做一次 PQC（仪器质控），检测仪器状态是否正常（500ul 纯净水+2 滴质控小球，质控小球商品化销售）；管路较脏，cv 值偏大，清洗仪器即可；若质控不通过，唯一能做的就是清洗管路或重新配置小球，或询问技术工程师解决方法；
6. 仪器使用频率较低，降低激光器使用寿命；长时间无样品测定时，每周开机 1 次，测定 1 个水样，操作步骤如下：开仪器主机—预热—开电脑及显示器—执行正式测样前 4 步操作—测 1 个水样 30 分钟—使用稀释 20 倍 NaClO 溶液清洗管路—纯水 2 次清洗管路中残存的 NaClO—关机、电脑及显示器（具体操作步骤见 **BD FACSVerse 流式细胞仪样品测试操作流程**部分）；
7. 仪器月清洗每 3 个月执行一次，进行月清洗之前，鞘液桶中的鞘液换成稀释 20 倍的 NaClO 溶液（约需要 2 升），取下仪器过滤器，并用短接管短接（防止 NaClO 腐蚀过滤器），上样针处放上 3ml 稀释 20 倍的 NaClO 溶液或 3ml 纯水，按照软件提示信息进行操作；月清洗完成之后，取下短接管，重新将过滤器接上，剩余 NaClO 溶液倒掉，重新换上鞘液，同时清空废液桶中的废液；
8. 样品测试全部完成，执行 daily clean，将 3ml 稀释 20 倍 NaClO（国产原液）溶液上样，高速运行 10 分钟，清洗管路；NaClO 溶液清洗完成，用标准较高的纯水 3ml 走样 2 次，每次 15 分钟，清洗管路中残存的 NaClO；清洗完成，点击 Cytometer 菜单中的 shut down，仪器状态灯由绿色变为黄色，即可关闭电源，随后关闭电脑和显示器。

Perform Setup & QC 仪器质控

1. 质控小球制备：500ul 纯净水+2 滴质控小球（1 滴 20 μ l），振荡充分混匀；若不立即检测，则避光保存（2~8 $^{\circ}$ C 保存，可用于 24h 内检测；15~25 $^{\circ}$ C 保存，可用于 8h 内检测）；
2. 质控小球批号导入方法：从 BD 公司网站（www.bdbioscience.com）下载与购买质控小球批号一致的文件（CS Beads Lots），解压到电脑文件夹中；点击 library——Beads and Reagents——FC Beads/CS & T Beads（选中）——File——import——点击选中解压文件——确定；
3. 打开 BD FACSuite 软件，点击 Setup & QC 图标，在 Task 图标下选中 Perform QC，CS & T Beads Lot ID 选中小球批号；
4. 配置好的质控小球放置在进样针处，点击 Start 图标，采集数据，仪器质控开始（质控功能：检测激光器调准；测量 %rCV、线性度、分辨率及激光功能；与 Characterization QC 测得的 %rCV、线性度、灵敏度进行比较；确定 PMT 电压值，更新荧光补偿矩阵值，作为默认条件）；管路较脏，导致质控 cv 值偏大，需要清洗仪器管路；
5. 提示检测完成后，可立即点击 yes 查看 PQC 结果报告，多次进行 PQC 质控，可追踪仪器性能条件的变化（折线图）；报告若出现警告、错误信息，参看 BD FACSVerser System Users Guide 进行处理；
6. 仪器质控（PQC）一般 1 个月做一次，CQC 每 6 个月做一次；商业销售的质控小球 1 瓶 3000 元左右，可做 50 次仪器质控；

双色实验案例（PI 和 FITC 染色）-参考 1

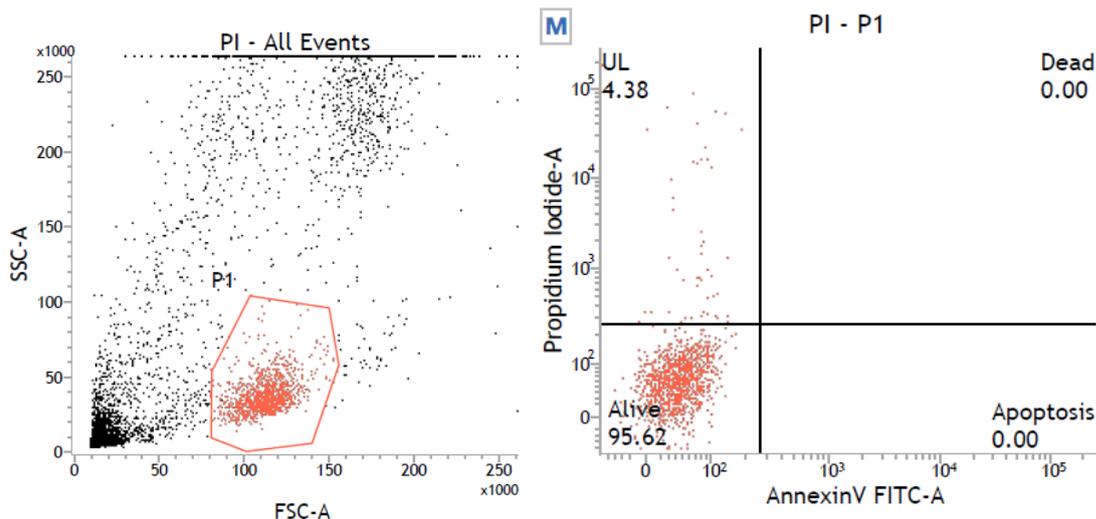
- (1) 开仪器、显示器、电脑、实验操作前的准备工作见“流式细胞仪样品测试操作流程”部分
- (2) 开仪器软件，点击“Experiment”图标，新建实验。在 worksheet 里面画两张标准模式图。（a）全向角和侧向角散点图，X 轴 Label 为 FSC-A，Y 轴 Label 为 SSC-A，X 和 Y 轴 Scale 均为 Linear。（b）另一张同样也是散点图，X 轴 Label 为 FITC-A（FITC 染正在凋亡的细胞），Scale 为 BiExponential；Y 轴 Label 为 PI-A（PI 染死细胞），Scale 为 BiExponential。设置方法：鼠标选中图像，右击鼠标，下拉菜单选择“Properties”，出现 Plot Editor 对话框，选择“Parameters”，对图像 X 和 Y 轴的 Label 和 Scale 进行设置
- (3) 阴性对照样品命名为 Blank，将样品上样。首先需调节电压，使全向角和侧向角散点图上的细胞不压轴、不偏向 X 或 Y 轴、多数细胞处于图像左下角
- (4) 收集细胞数量的设置：鼠标选中“Blank”样品管，右击鼠标，在下拉菜单中选择“Properties”，出现“Tube Properties-Blank”对话框，选择“Acquisition”，在 Stopping Rules/Create Gate Criteria/Events 中选择细胞数量，点击“Add Criteria”，在 Combine Gate Criteria and Apply Rule 下面框中出现 All Events+选择的细胞数量，点击“Apply Rule”，关闭窗口，完成设置。点击 Acquire，仪器开始细胞至设定值时自动停止



- (5) 在全向角和侧向角散点图中画门 P1，圈出需要分析的细胞群体。越靠近角落的细胞群体多为黏连或碎片细胞，因此需要选择具有活力的目标细胞群。在 FITC-A~PI-A 图像中，设置仅显示 P1 门中的细胞群体。方法：鼠标选中图像，右击鼠标，选中“Properties”，

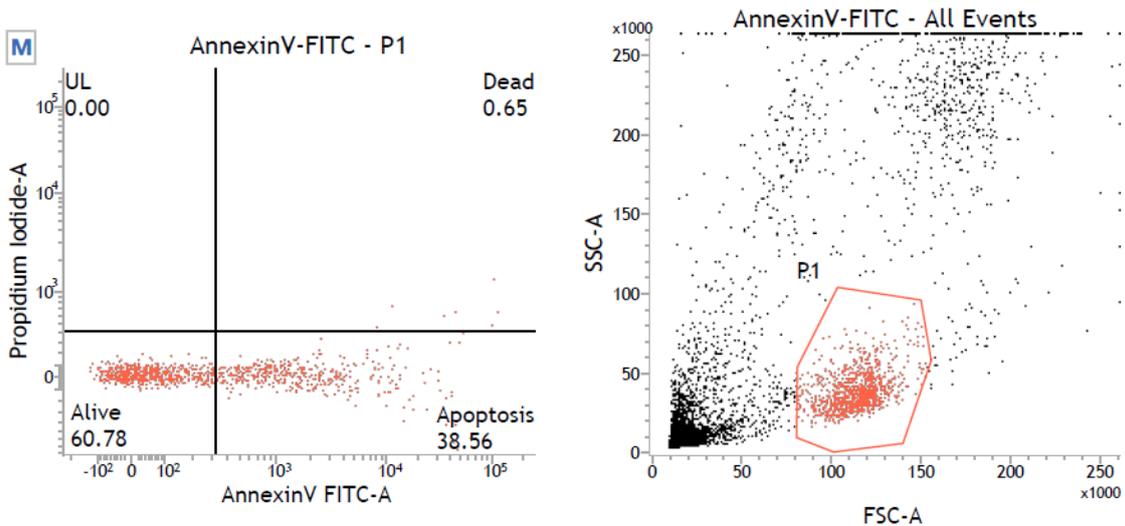
出现“Plot Editor”对话框，在 General/Primary Data Source/Parent Population 中，将 P1 勾选上，关闭窗口，FITC-A~PI-A 图像中仅显示 P1 门中的细胞

- (6) 在 FITC-A~PI-A 图像中画十字象限，使 P1 门中的细胞全部分布在一个象限内（处于图像左下角的象限内）。处于不同象限的细胞具有不同的活力状态：一般左上和右上象限细胞为死细胞，左下象限为活细胞，右下象限细胞为即将凋亡细胞。点击“Create rich text”图标，在图像上添加文字说明
- (7) 点击“Next”，添加新的样品管，将 PI 单染的样品上样，并将 PI 染色的样品管名称更改为 PI。可设置 P1 门中收集细胞的数量。方法：选中 PI 管右击鼠标，选择“Properties”，出现“Tube Properties-PI”对话框，在 Acquisition/Stopping Rules/Create Gate Criteria 里面设置，将 Gate 设置为 P1，Events 里面填写需要收集的细胞数量，点击“Add Criteria”，在 Combine Gate Criteria and Apply Rule 下面框中出现 P1+选择的细胞数量，鼠标选中 P1+数量，点击“Apply Rule”，关闭窗口。将 PI 样品管放置在进样针处，直接点击“Acquire”，P1 门中收集细胞到设定数值时，实验自动停止
- (8) 荧光补偿调节。调节后的效果是：活细胞在左下象限，死细胞在左上象限。但实际情况：有一些被 PI 染色的细胞会分布在右上象限，需要调节荧光补偿。调节方法：鼠标选中 PI 管，右击鼠标，选中“Properties”，出现“Tube Properties-PI”对话框，选“Compensation”，调节 X 为 FITC、Y 为 PI 框中的数值，增大或减小框中的数值，边调节数值，边查看 FITC-A~PI-A 图像，使右上象限中的细胞全部转移到左上象限。



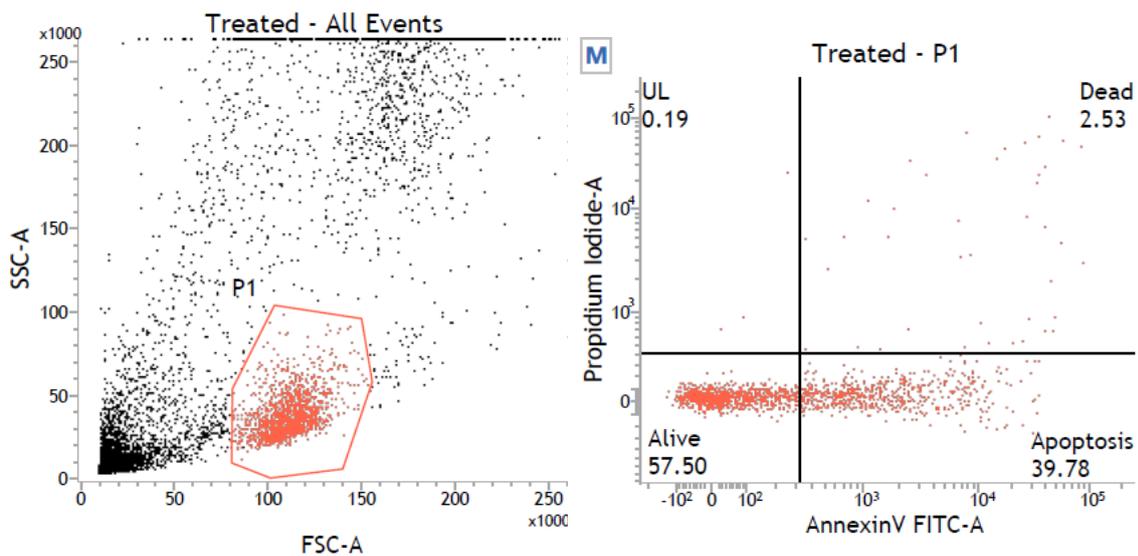
- (9) 点击“Next”，添加新的样品管，将 FITC 单染的样品上样，并将 FITC 染色的样品管名称更改为 FITC。FITC 管带有所有上述样品管的属性，直接点击“Acquire”，P1 门中收集细胞到设定数值时，实验自动停止

(10) 荧光补偿调节。调节后的效果是：活细胞在左下象限，凋亡细胞在右下象限。但实际情况：有一些被 FITC 染色的细胞会分布在右上象限，需要调节荧光补偿。调节方法：鼠标选中 FITC 管，右击鼠标，选中“Properties”，出现“Tube Properties-FITC”对话框，选“Compensation”，调节 X 为 PI、Y 为 FITC 框中的数值，增大或减小框中的数值，边调节数值，边查看 FITC-A~PI-A 图像，使右上象限中的细胞全部转移到右下象限



(11) 点击“Next”，添加新的样品管，将处理样品上样（FITC 和 PI 双染色实验），并将该样品管名称更改为 Treated。Treated 管带有所有上述样品管的属性，直接点击“Acquire”，P1 门中收集细胞到设定数值时，实验自动停止

(12) 在画有十字象限的 FITC-A~PI-A 图像中，死亡细胞和即将凋亡细胞占总细胞数量的比例，可直接从图中读出



- (13) 点击“Statistics”，在 worksheet 空白处点击鼠标，即出现统计数据表格。选中统计表格，右击鼠标选中“Edit population”，对统计的细胞群体进行定义，将 Blank、PI、FITC 和 Treated 需要显示的群体勾选上，例如勾选上 All events 或 P1。选中“Edit Statistics”，将需要显示的参数勾选上（有 Mean、Geo Mean、SD、CV、RSD、RCV、Median、Min、Max、Mode 等十种）

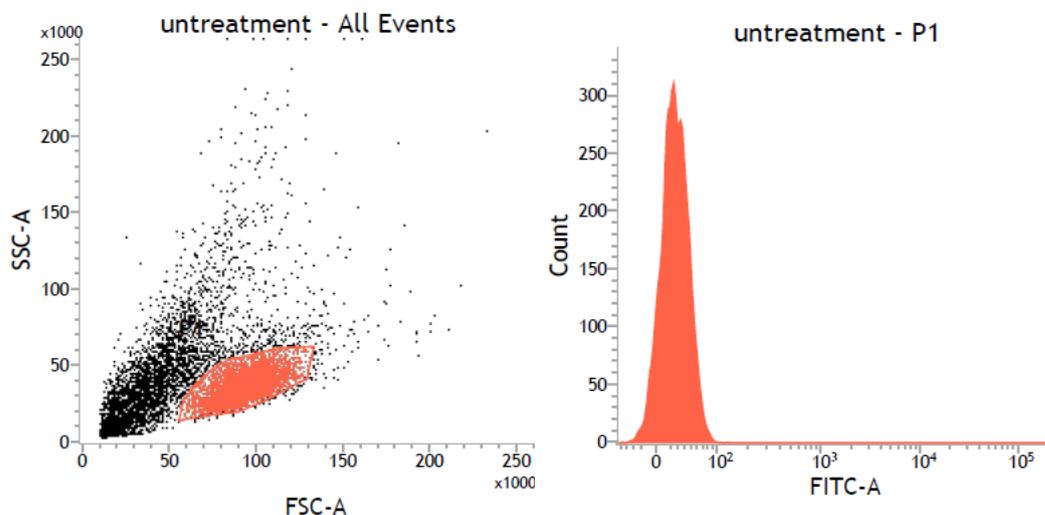
Name	Events	% Parent	% Grandparent	% Total	FSC-A Mean	SSC-A Mean	AnnexinV FITC-A Mean	Propidium Iodide-A Mean
Blank:All Events	763	***	***	100.00	73,327	72,478	51	82
Blank:P1	160	20.97	***	20.97	115,890	37,474	45	56
PI:All Events	7,149	***	***	100.00	62,360	62,403	156	4,914
PI:P1	1,096	15.33	***	15.33	113,816	36,644	49	638
AnnexinV-FITC:All Events	7,463	***	***	100.00	60,126	55,241	7,269	412
AnnexinV-FITC:P1	1,071	14.35	***	14.35	114,540	37,151	2,164	0
Treated:P1	1,581	15.81	***	15.81	112,196	36,431	1,939	433
Treated:All Events	10,000	***	***	100.00	60,019	53,712	8,039	4,762

- (14) 选中需要保存图像的管号（例如 Blank、PI、FITC、Treated），点击 File/Export To PDF，给文件命名，选中保存路径，点击 Save 保存（保存格式为 PDF）
- (15) 需要保存整个实验的图像和数据，点击 File/Export/FCS files，选择保存路径，点击“OK”即可
- (16) 仪器清洗及关机步骤见“流式细胞仪样品测试操作流程”部分

单色实验案例（FITC 染色）-参考 2

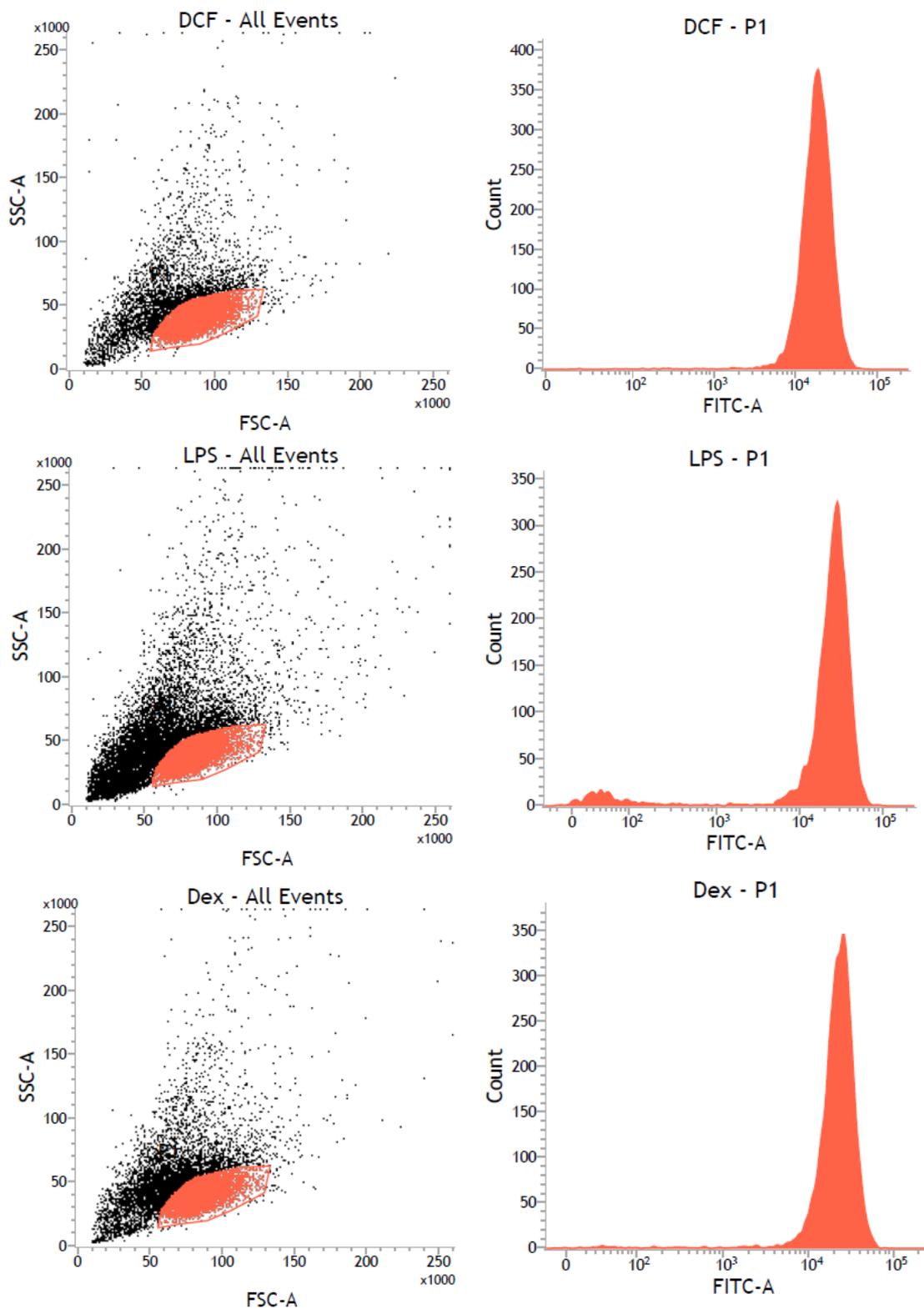
检测 3 种处理（DCF、LPS、DEX）对细胞凋亡的影响

- （1）标准模式图。图 1：全向角和侧向角散点图 FSC-A（X 轴）~SSC-A（Y 轴），X 轴和 Y 轴均设置为 Linear（Create dot plot）；图 2：Create Histogram，X 轴为 FITC-A，Y 轴为 Count，X 轴和 Y 轴均设置为 Linear
- （2）阴性对照(untreated)样品上样,收集细胞数量参照双色实验步骤(4)。先点击“Preview”，调节电压，方法参照“流式细胞仪样品测试操作流程”步骤（9）。点击“Acquire”，阴性对照管开始收集数据
- （3）图 1 中画门 P1，圈住待分析的细胞群体。选中图 1，右击鼠标，选中“Properties”，在 General/Primary Data Source/Parent Population 界面，勾选 All Events，让图 1 显示所有细胞;勾选 P1，让图 1 仅显示 P1 门中的细胞。选中图 2，右击鼠标，选中“Properties”，在 General/Primary Data Source/Parent Population 界面，勾选上 P1，让图 2 仅显示 P1 门中的细胞。在 Histogram/Histogram Visualization 中勾选上 Fill Histogram 和 Draw Curve，对图形进行可视化设置



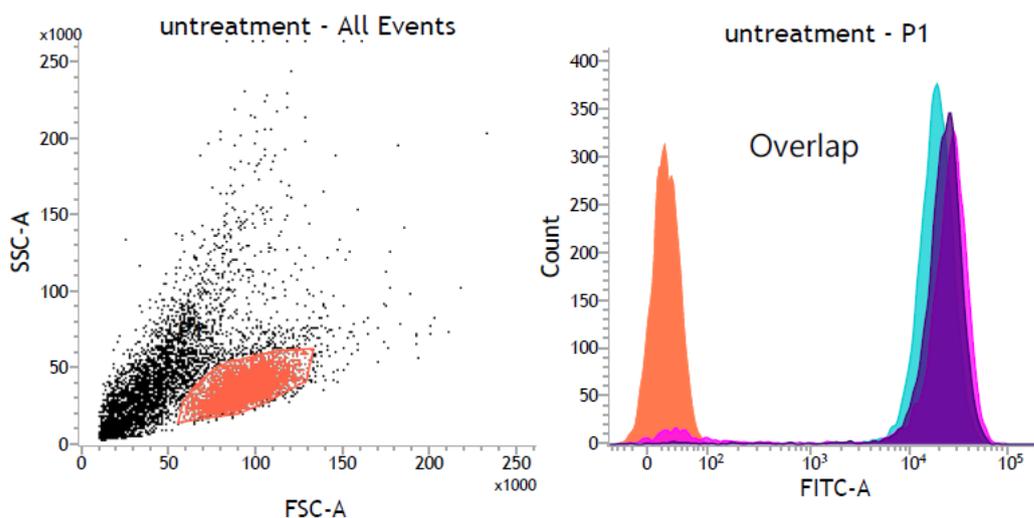
- （4）点击“Next”，添加上样管，名称更改为 DCF（处理名称），可对 P1 门中收集细胞数量进行设置，方法参照双色实验步骤（4）。将 DCF 处理管放置在进样针处，直接点击“Acquire”，收集细胞至设定值停止
- （5）点击“Next”，添加上样管，名称更改为 LPS（处理名称），可对 P1 门中收集细胞数量进行设置，方法参照双色实验步骤（4）。将 LPS 处理管放置在进样针处，直接点击“Acquire”，收集细胞至设定值停止

(6) 点击“Next”，添加上样管，名称更改为 Dex（处理名称），可对 P1 门中收集细胞数量进行设置，方法参照双色实验步骤（4）。将 Dex 处理管放置在进样针处，直接点击“Acquire”，收集细胞至设定值停止



(7) 为更形象化比较不同处理对细胞凋亡的影响程度，将对照及 3 种处理的 FITC-A~Count

图进行叠加。方法：选中“untreated”管，鼠标选中“FITC-A~Count”图，右击鼠标，选中“Properties”，出现 Plot Editor 对话框，选中“Overlay”，在“Source”里面选择 untreated 后，点击“Add”按钮；在“Source”里面选择 DCF 后，点击“Add”按钮；在“Source”里面选择 LPS 后，点击“Add”按钮；在“Source”里面选择 Dex 后，点击“Add”按钮。将对照及 3 种处理共 4 张 FITC-A~Count 图叠加在一起。在该界面下可对图的 Population/Color/Line Style 进行修改。Population 一般设置为 P1



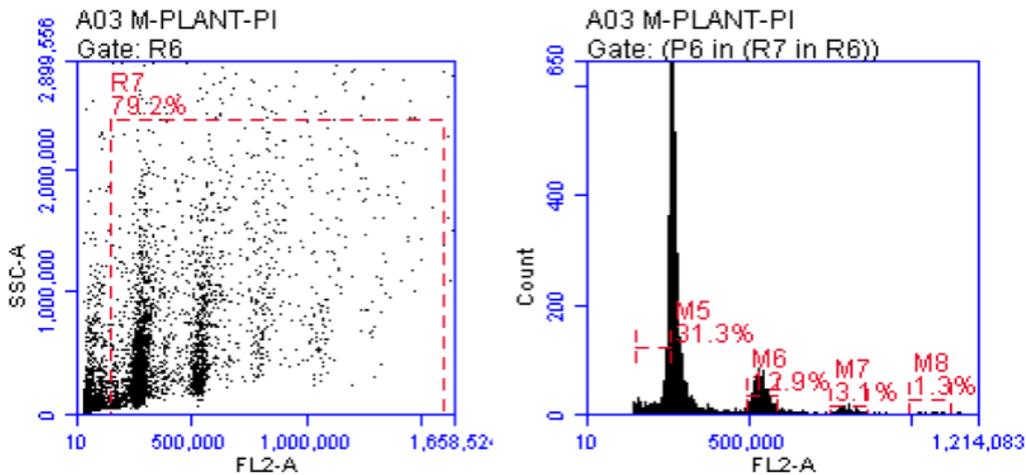
(8) 数据统计分析见双色实验步骤 (13)

Statistics							
Name	Events	% Parent	% Grandparent	% Total	FSC-A Mean	SSC-A Mean	FITC-A Mean
DCF:P1	8,770	72.28	***	72.28	88,974	37,339	20,552
LPS:P1	7,763	44.02	***	44.02	84,828	37,025	26,660
Dex:P1	7,968	59.65	***	59.65	85,344	37,506	24,813
untreatment:P1	6,086	60.86	***	60.86	93,641	33,229	29

(9) 仪器清洗及关机步骤见“流式细胞仪样品测试操作流程”部分

植物倍性实验 (PI 染色) -参考 3

植物样本用流式检测往往碎片很多，所以我们一般用 SSC 配合 PI 的图来圈住目的细胞群体，排除碎片，如下左图，门里是 PI 染上色的 DNA，左侧压在坐标轴上的是碎片。植物样本无需去除粘连体，直接画直方图看 DNA 倍性关系即可，如下图：



上述是用流式细胞仪 Accuri C6 检测植物倍性所得的图像。PI 检测通道为 FL2-A，因此 X 轴的 Label 为 FL2-A。X 轴和 Y 轴的 Scale 均为 Linear。左图上靠近 Y 轴的为细胞碎片，分析时画门将其排除，例如图中画门 R7，排除碎片，圈住待分析的细胞群体。右图细胞荧光峰值图，X 轴表示荧光值的大小，Y 轴为数量。荧光值越大，表示细胞 DNA 含量越高，代表职务倍性越高。右图靠近 Y 轴的第一个峰数量较多，真实反映细胞倍性，其它峰表示细胞处于细胞周期的不同阶段。植物倍性计算方法：参考植物的倍性 × (待测物种荧光值/参考物种荧光值)。