

流式细胞仪 Accuri C6

一、启动 Accuri C6 仪器

- ① 依次开仪器电源、电脑显示器及主机电源
- ② 5~10 分钟后，双击电脑桌面“CFlow Plus”图标，进入仪器控制软件界面。软件界面信号灯指示为黄色，显示仪器与电脑没有连接好；软件界面信号灯指示为绿色，显示仪器与电脑已连接好
- ③ 检查仪器旁边四个液体容器，清空“Waste”桶中的废液，检查“**Sheath**”、“**Cleanning fluid**”、“**Decontamination**”三个桶中液体量是否满足实验要求，若存放时间超过 1 个月，则需要更换。其中“**Sheath**”为超纯去离子水，“**Cleanning fluid**”有效氯离子为 1% 的次氯酸钠，“**Decontamination**”为细菌消毒液，1295 μ l 杀菌液原液用超纯水定容 250ml
- ④ 载物台上放置空管，点击软件界面 **Instrument/Run backflush cycle**，可以看见少许液体从进样针中流出来，作用为反冲，清除进样针中的残留物
- ⑤ 在软件 96 孔板界面中任选 1 孔，载物台上放置 1 管去离子水，
- ⑥ 选择运行速度为“**High**”，运行时间设置为 10 分钟，点击“**Run**”按钮运行 10 分钟自动停止。该步骤的作用是：激光器预热，清晰管路
- ⑦ 该孔收集数据后变为蓝色，鼠标选中该孔，点击“**Delete Sample Data**”，删除孔内数据，启动步骤完成，即可开始检测样品

二、Accuri C6 样品检测

- ① 将样品放置在载物台上，在软件 96 孔界面选择样品的位置，并命名
- ② 设置检测停止条件。(1) 无限制检测 **Run unlimited**，手动点击停止；(2) 收集多少个细胞后停止，在 **events** 框中填写；(3) 收集多长时间停止，在 **min** 和 **sec** 框中填写；(4) 收集多少体积停止，在 **ml** 框中填写
- ③ 在 **Fluidics** 框设定进样速度，可选择慢速、中速和快速，或者在 **Custom** 框中手动设置进样速度
- ④ “**Set Threshold**”设定阈值，需要根据实验设定合适的阈值，阈值设置太低，背景荧光对目标细胞的荧光信号产生较大的干扰，阈值设置太高，

无法有效检测目标细胞

- ⑤ “Set Color Compensation” 设定颜色补偿，一般在数据处理分析过程中进行
- ⑥ 点击 “Run” 按钮，开始样品检测

三、样品检测过程中注意事项：

- ① 样品之间无需去离子水冲洗，当完成所有样品检测时，必须运行 Instrument/Cleaning fluid cycle 清晰程序。检测结束后，在载物台上放置 1ml 有效氯离子为 1% 的次氯酸钠，点击清晰程序开始清晰
- ② 样品检测过程中发现每秒细胞数量减少，表明管路发生堵塞，需要运行 Backflush，再用去离子水清洗 2 分钟
- ③ 每个样品测定完，需及时保存测定数据

四、关闭 Accuri C6

- (1) 在任意 1 个打开的文件下，在 96 孔界面中任选 1 空白孔，载物台上放置 0.1% 次氯酸钠溶液，高速运行 2 分钟
- (2) 在 96 孔界面中任选 1 空白孔，载物台换上去离子水，高速运行 2 分钟，多余的去离子水一直留在载物台上
- (3) 按一下仪器前方电源按钮关闭仪器，信号灯由绿色变为黄色，显示仪器正在关闭，关闭过程中大约需要 10 分钟
- (4) 关闭软件，不用保存清洗步骤所产生的数据，关闭电脑及显示器。注意：C6 和电脑控制软件相对独立，关闭 C6 和退出控制软件不讲究先后顺序

五、Accuri C6 的日常维护（管路清洗）

- (1) 开仪器、电脑显示器、主机及软件，仪器稳定后，清洗上样针：在上样针下面放一张吸水纸或者空管子，用来接滴下的水滴，运行 Instrument/Run Black flush cycle，清除上样针里面的残留物
- (2) 运行去碎片化循环 (Unclog)：在上样针下面放一张吸水纸或者空管子，

用来接滴下的水滴，运行 Instrument/Run unclog cycle，清除流动室中的碎片

(3) 清除液流管线：上样针处放置 1 管清洗液（Decontamination concentrate solution），运行 Instrument/Run cleaning fluid cycle

(4) 排除仪器管路气泡：上样针位置放置 1 管清水，运行 Instrument/Run cleaning fluid cycle。在 CFlow 控制面板 Run limits 设定运行时间为 5 分钟，点击“Run”键，让仪器运行至自动结束。运行时间设置为 30 秒，点击“Run”键，让仪器运行至自动结束，重复该步骤 4~5 次，充分排除系统中的气泡

(5) 净化液流：上样针位置放置 1 管纯净水，运行 Instrument/Run decontamination fluid cycle（大约运行 13 分钟），用于清除液流系统中生物毒性物质

(6) 运行流动室延长清洗循环：上样针处放置 1 管超纯水（至少 500 μ l），运行“Instrument/Extended clean of flow cell”，运行完成后仪器自动关机

(7) 仪器关机后，上样针处放置 1 管超纯水，使流动室被液体充分浸泡

六、Accuri C6 硬件及外接设备维护

(1) 清空废液桶：清空废液桶并用 0.5% 的 NaClO 溶液消毒杀菌，然后再用超纯水清洗

(2) 填充溶液：在开机运行之前，填充鞘液桶和清洗液桶中的液体，使其液体量满足实验要求

(3) 检查液流管线：确保液流管线不向外泄漏溶液

(4) 更换内置鞘液滤器（样品量较大时，每两个月更换一次内置鞘液滤器）

(5) 更换蠕动泵管路（样品量较大时，每两个月更换一次内置鞘液滤器）

七、Accuri C6 仪器专业术语

(1) FSC 前向角散射，代表细胞的体积，值越大表示细胞越大；SSC 侧向角散射，代表细胞的颗粒度，值越大代表细胞的颗粒度越大，颗粒度表示细

胞的皱褶度

- (2) 激光管和荧光通道-488nm 蓝色激光: FL1 530±15nm (FITC、GFP);
FL2 585±20nm (PE、PI); FL3 >670nm (PE-CY5、PE-CY7)。640nm
红色激光: FL4 675±12.5nm (APC)
- (3) FL2-A 中的“A”代表荧光的峰面积, FL2-W 中的“W”代表荧光的峰
宽度, FL2-H 中的“H”代表荧光的峰高度(脉冲高度)
- (4) Accuri C6 仪器不需要进行 PMT 电压调节, 不回丢失任何有用的细胞
信息
- (5) 数据分析软件可以脱机使用, 没有加密, 安装即可使用

八、Accuri C6 数据处理分析

- (1) 系统默认的 FSC/SSC 散点图: 利用软件画门工具圈出需要分析的细胞
群体(画门-region 门选定的区域); 利用放大工具, 在图中画矩形工具来
放大此区域; 点击扩展工具将图像恢复到放大前状态; 点击 Plot Spec, 设
置 X-AXIS 和 Y-AXIS 参数(包括 Min Value/Max Value, Linear/Log), 通
过数量化的方式更精确的显示目标区域
- (2) 新建荧光信号图: 单色实验-新建直方图, 双色实验-新建散点图。图
形放大及显示区域参照步骤(1)。更改横坐标名称: 鼠标放置在横坐标名
称处, 右击鼠标出现下拉菜单, 选择自己标记的分子名称。设定显示细胞
群: 点击图形上方的 GATE, 出现 Change Gating for Plot X 对话框, 选中
包含按键(Include), 用来分析此 region 内的数据; 选中排除按键(Exclude),
用来分析此 region 外的数据; 选中交叠按键(Exclude), 用来分析两个或
更多 region 交叠区域内的数据。点击“Apply”键, 会在图 Plot X 的 GATE
按键旁边显示所应用门的类型
- (3) 可在新建荧光信号图上画竖门和横门, 在下一个图像中对 GATE 进行
设置, 仅显示上述竖门或横门中的图像。图形放大及显示区域参照步骤(1)
和(2)
- (4) 调节荧光补偿: 一般选择散点图调节荧光补偿。选中需要调节的 Plot
图, 点击十字象限工具, 然后点击 Plot, 调整十字象限 Marker 位置, 使

所有阳性群体很好的分布在各象限内。如果 UL 或者 LR 两个象限群体的中值与阴性群体 (LL) 的中值不一致时, 则需要进行荧光补偿。在 Collect 或者 Analyze 面板中点击 Set Color Compensation 按钮打开 Compensation Settings 对话框, 对话框包含 4 行 FL 按钮, 每个荧光通道 1 行。在需要进行校正的荧光通道行, 点击荧光溢出的荧光通道的 FL 键。例如某种荧光染料检测通道为 FL2, 如果在 FL3 检测通道中也能检测出荧光信号, 则需要将 FL3 通道的荧光信号进行剔除, 在散点图中表现为 UL 或者 LR 两个象限群体的中值与阴性群体 (LL) 的中值不一致。校正方法: 点击 Set Color Compensation / 出现对话框 Compensation Settings for Plot XX / Correct FL2 by subtraction a percentage of / 点击 FL3, 在 FL3 旁边的框中填写数字, 并实时查看 UL 或者 LR 两个象限群体的中值与阴性群体(LL) 的中值, 调节至二者的中值接近或相等

- (5) 图形叠加: 点击 “Analyze” 选项卡, ①先选中需要叠加的数据孔, ②再点击 “Copy Plots from Collect”, 重复①②步骤, 可将图形叠加, 最多可叠加 6 幅图
- (6) 数据结果的统计学分析: 分物种统计学分析方法, 包括图形预览、图形列表、图形参数列表、样品列表及用户自定义统计表格
- (7) 数据及图形的输出。图形: 可以通过拖拽的方式直接以图形文件的格式输出到 word、excel、powerpoint, 也可以输出到图片处理软件 (例如: 画图板)。数据: 可以通过复制粘贴 (Ctrl+C/ Ctrl +V) 方式以表格的形式输出到 word、excel、powerpoint 中