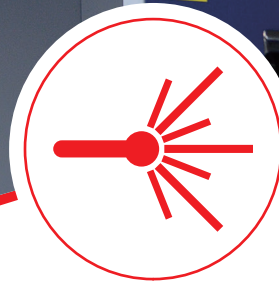


CytoFLEX SRT

流式细胞分选仪——简易操作指南



目录

CONTENTS

分选实验准备	1
开机流程	2
仪器质控质量控制	6
关机流程	8
清洁流程	16
单细胞分选	24
多色方案调节	27

一、分选实验准备

1. 仪器开机维护准备

- 1.1 鞘液：推荐商品化的缓冲液，如CytoFLEX IsoFlow 鞘液（货号：8546859）；ISOTON II 稀释剂（货号：8546719）；生理盐水；PBS
- 1.2 清洗液：CLENZ Cleaning Agent（货号：8546929）；84消毒液；Contrad 70（货号：81911）、去离子水以及70%乙醇
- 1.3 质控微球：CytoFLEX Daily QC Fluorescence（货号：B53230）
- 1.4 关机液：CytoFLEX SRT Shutdown fluid（货号：C52574）

2. 分选实验准备

- 2.1 细胞过滤（300目尼龙网或40um细胞筛网）
- 2.2 上样管：5 mL (12 x 75 mm)流式管
- 2.3 收集容器：5 mL (12 x 75 mm)流式管；15ml标准离心管；6孔，24孔，48孔，96孔和384孔板，96孔深孔板，载玻片

3. 分选环境控制准备

- 3.1 （非生物安全柜下）环境温度控制在15-27°C，且 每小时温度波动小于2°C
- 3.2 紫外消毒30min以上
- 3.3 环境相对湿度：20% RH-80% RH (non-condensing)
- 3.4 准备酒精喷壶用于上样区域及收集区域消毒
- 3.5 准备无纺布，无纺布棉签用于喷嘴，液流探头等位置擦拭清洗

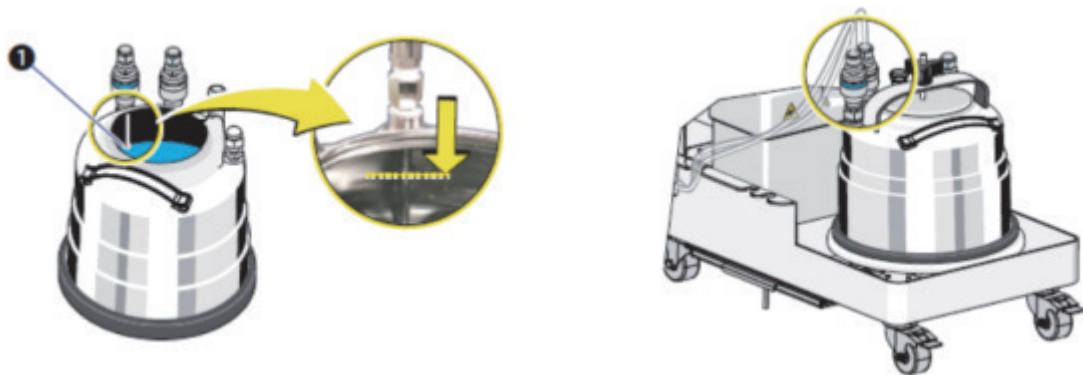
二、开机流程

a、每日开机工作流程



1. 开机前检查

- 1.1 系统连接线检查：确保仪器各连接线及接口连接无误。
- 1.2 检查鞘液桶，废液桶，关机液桶
 - 确保鞘液桶内有足够鞘液，添加液体不超过桶内测指示环
 - 盖紧盖子，旋紧放气口，扣紧鞘液出口接头和进气接头



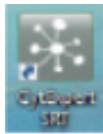
(注意：液体溅出可能会损坏仪器电路系统，添加鞘液时，把鞘液桶拿出液流车，避免损坏仪器电路)

- 清空废液桶，如果有生物危害性样本，可在废液桶内添加400ml 5-6% 次氯酸钠
- 确保关机液足够，添加液体不超过脖颈底部

2. 打开仪器电源

- 2.1 打开生物安全柜（如果有）。
- 2.2 打开仪器左侧后方按钮。
(注意：如果仪器经常使用，每日可通过软件控制关机，第二天直接通过软件开机即可。)
- 2.3 等待仪器通电，之后启动工作站。

3. 打开电脑及软件



3.1 打开电脑，双击桌面上的CyExpert SRT软件。

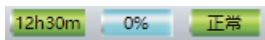
3.2 确保软件和仪器已经正确连接，如下图。



(注意：如果出现红色指示灯，代表连接不成功，此时确保仪器电源正确打开及各连接接口连接正确，重启仪器和 workstation。)



3.3 确保鞘液，废液，关机液指示正常。如果为黄色或红色，提示我们需要添加液体或清空废液。



4. 系统启动流程

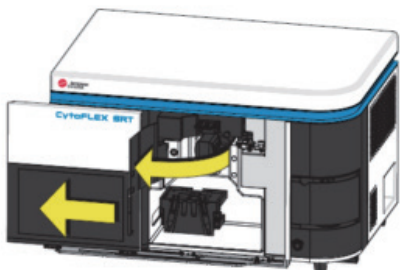
每次开机都需要做系统启动流程，此过程包括鞘液桶建压，液路自检,排气泡，稳定压力，清洗进样针，时长为10min。

每日关机后重新启动（仪器管路内为关机液）。

4.1 选择细胞仪下的“系统启动流程”，系统启动界面出现。



4.2 打开分选舱门及分选保护门。

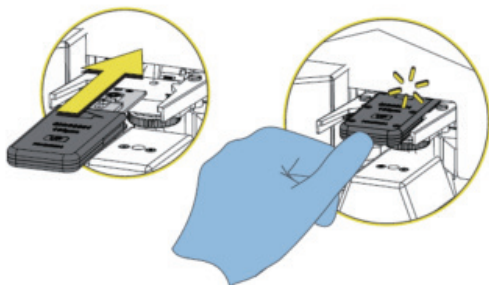


4.3 清洁流动室底部，喷嘴插入滑轨，V型板表面。

(注意：一个湿的堵塞的喷嘴可能导致液流偏离中心甚至没有液流)

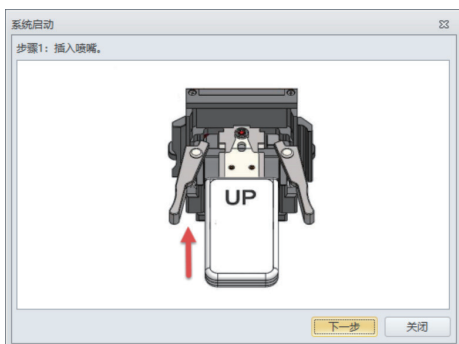
4.4 确保喷嘴是洁净干燥的。如果需要，清洁喷嘴。

4.5 将喷嘴小心插入仪器，注意标注“UP”的一面朝上，当听到“咔哒”一声时，喷嘴就会锁定在它的位置上。

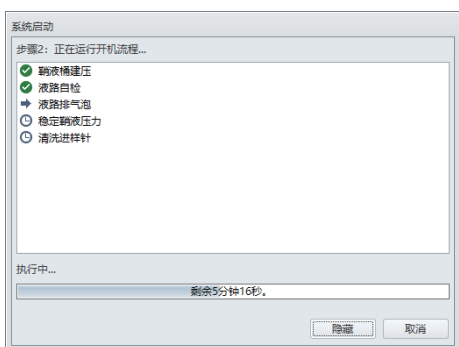


4.6 关闭分选保护门及分选舱门，以及上样舱门。

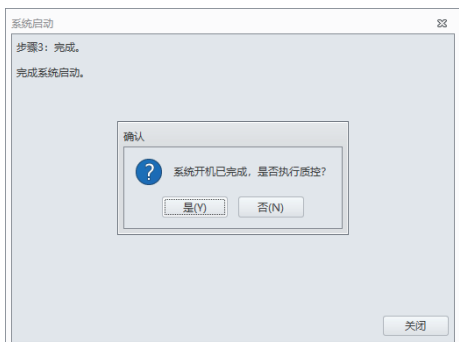
4.7 点击“下一步”。



系统开始执行启动流程，此过程大约10分钟。



确认窗口将在启动流程结束后出现，选择“是”开始QC。



4.8 点击“关闭”来退出系统启动流程。这个系统现在已经可以使用。

b、长期关机后重新启动(仪器中为70%乙醇)

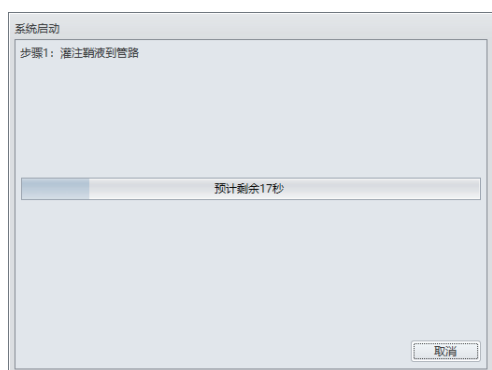
1. 选择细胞仪下的“系统启动流程”。



2. 按提示，清空鞘液桶并重新装至少1.5L鞘液。

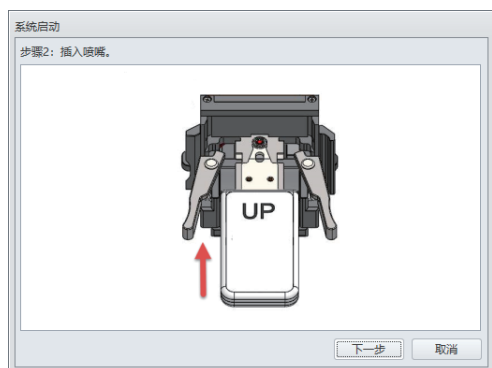
3. 清空废液桶。

4. 点击下一步。系统开始用鞘液填充管路。



5. 当系统完成灌注后按提示，更换无菌干净的鞘液过滤器。

6. 点击下一步。



7. 打开分选舱门及分选保护门，插入喷嘴。。。 (之后同每日开机工作流程开机)

三、仪器质控质量控制

1. 日常质控 / 标准化

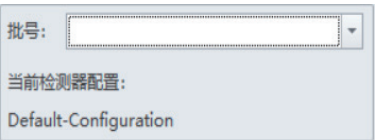
1.1 **质控微球准备**：5ml流式管加入1ml超纯水，滴入混匀后CytoFlex Daily QC Fluorospheres3滴，涡旋混匀。

1.2 **选择“质控/标准化” → “启动质控/标准化”**

- 进入质控/标准化界面，根据需要选择质控或者标准化



- 确保“批号”下拉菜单



可选择质控微球的靶值。

(注意：如果批号不可选，请按照下载靶值文件部分的步骤从贝克曼网站下载特定批次的靶值文件)

1.3 **质控运行**：如果系统进入待机模式，点击初始化对系统进行初始化，将准备好的质控微球样本管插入管架。在“批号”下拉菜单中选择正确的批号，点击“开始”运行质控程序。



注意：QC可能需要几分钟时间。在质控过程中，软件自动查找质控微球并计算结果。一旦完成，结果将自动显示并保存。

- Result部分中的绿色图标表示通过。
- Result部分中的红色图标表示失败。

注意：QC微球的最小采样流速为80事件/秒。如果采样率过低，向样管中加入一滴每日QC微球（或摇匀），并重复QC。

注意：如果QC失败，从细胞仪菜单中选择每日清洁和排气泡，根据提示重复QC。如果QC在同一天连续两次失败，请联系你的Beckman Coulter工程师

1.4 **退出标准化程序**：在文件-质控/标准化菜单下选择“关闭QC/标准化”。

1.5 质控微球靶值的下载以及导入

- 下载质控微球靶值文件：登录www.Beckman.com主页，导航到Shop and Products >Reagents>Flow Cytometry Reagents>Fluorospheres and Quality Control，选择CytoFlex Daily QC Fluorospheres产品并点击Download target files

Software Download

* Indicates required fields

Search By Product

Market Segment*

Product Line*

Product Series

Product

Software Name

Research & Discovery

Flow Cytometry

Instruments

CytoFLEX

Cytoflex QC Fluorospheres

Language

English

Search

Search By Software Name

Search By Item/REF Number

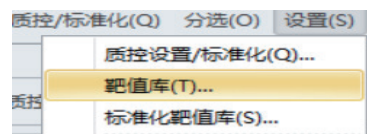
Software Download Search Results

First Prev 1 2 Next Last

View 25 per page

Software Name	Product	Lot No.	Version	Item/REF NO.	Release Date	Language
CytoFLEX QC Fluorospheres Target Values	CytoFLEX	A555F		B53230		English

- 导入目标文件：在质控/标准化模式下，选择设置菜单下的“靶值库”



，进入后选择导入，导航到目标靶值文件，选择打开，然后

选择关闭。

靶值库

批号

失效日期

批号:

失效日期:

阈值

通道

模式

值

信号

激光

滤光片

增益

中值

中值容差(%)

rCV(%)

下载靶值文件

导入(I)...

删除(D)

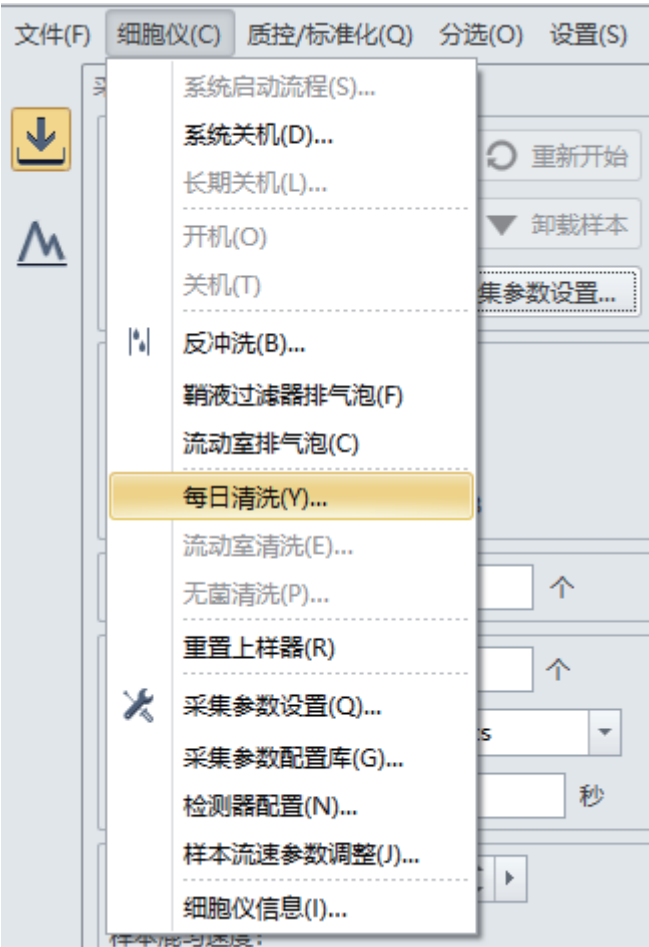
关闭(C)

四、关机流程

a、短时间关机流程（7日内会使用）



- 1. 准备好清洗液和去离子水
- 2. 在细胞仪选项中启动每日清洗（已初始化才可以点击）。



3. 设置清洗液清洗5分钟，去离子水清洗5分钟，根据提示分别在上样管架中放入3mL清洗液或3mL去离子水。



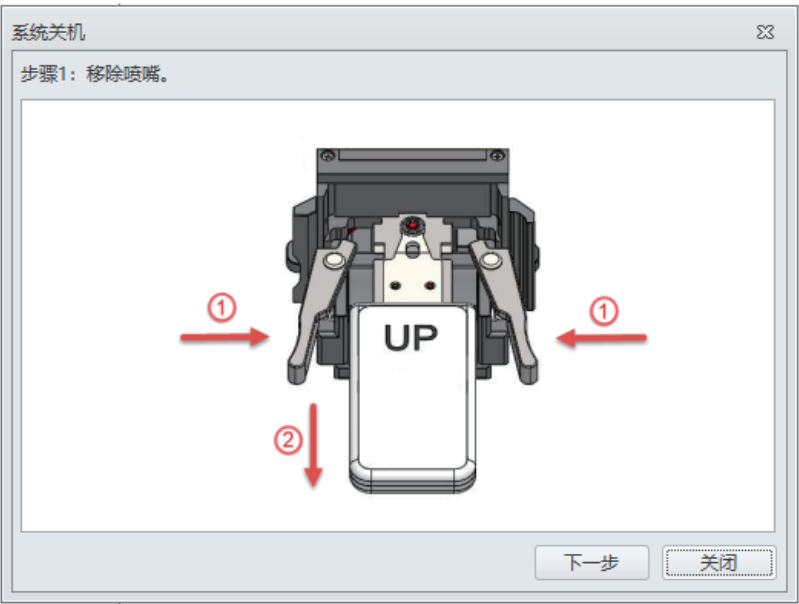
4. 点击待机以关闭液流



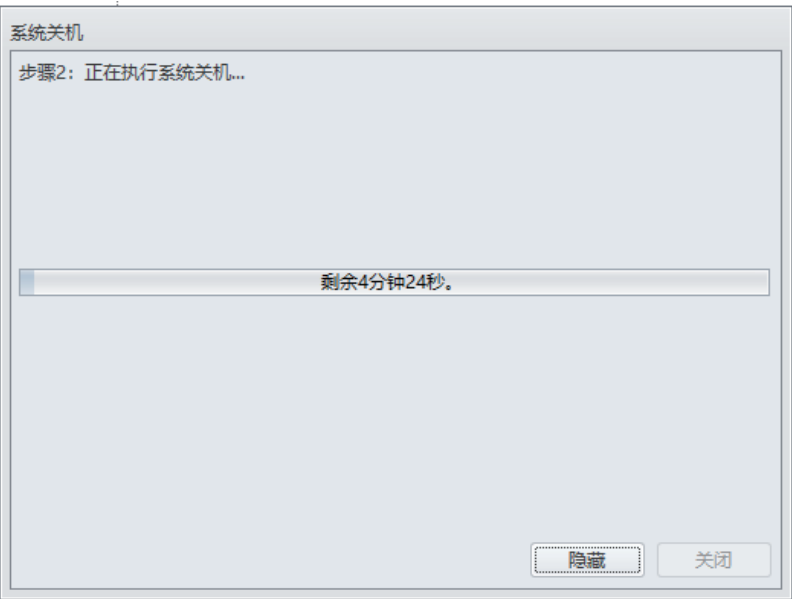
5. 在细胞仪选项中选择系统关机



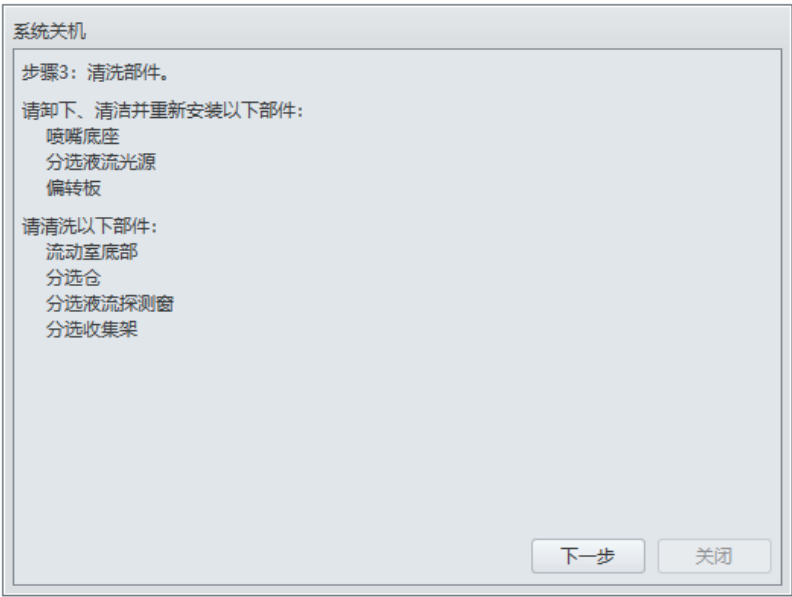
5.1 根据提示移出喷嘴



5.2 移出喷嘴后点击下一步，确认进行系统关机，系统关机需时5分钟。

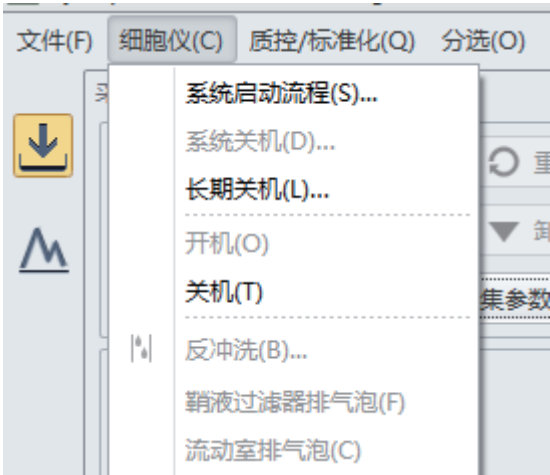


5.3 按照提示进行清洁



6. 按规范清洁以下部件（参考每日清洗）：偏转板，喷嘴，喷嘴底座，废液槽底部，分选液流光源，液流检测窗口，分选收集架，分选仓的所有表面，辅助门，样品架。

7. 在细胞仪选项中选择关机。



8. 关闭软件，电脑。

9. 倒空并清洗干净废液桶，加入无菌鞘液到鞘液桶。

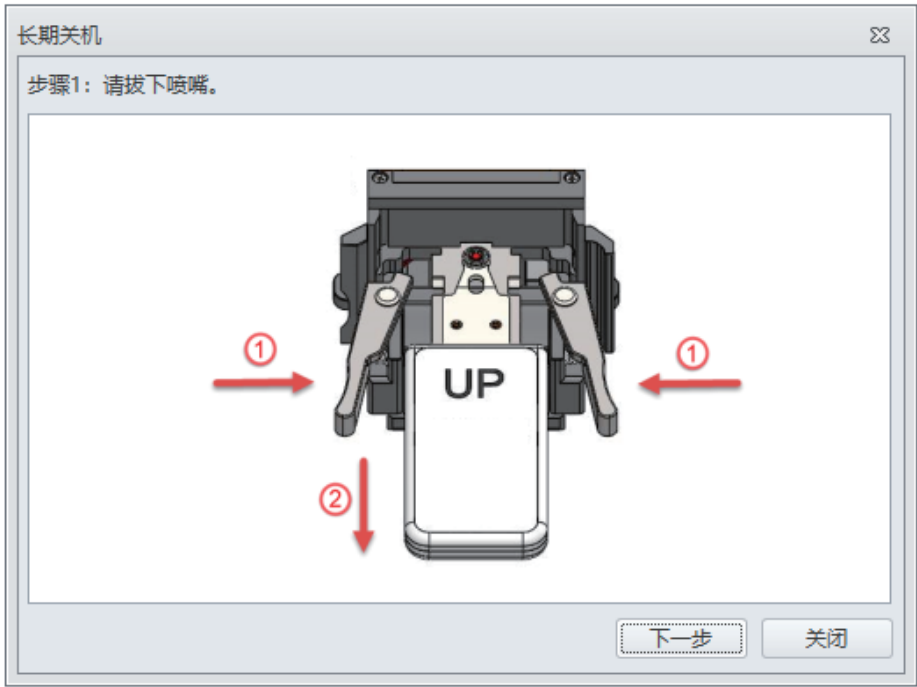
b、长时间关机流程（7日内不使用）



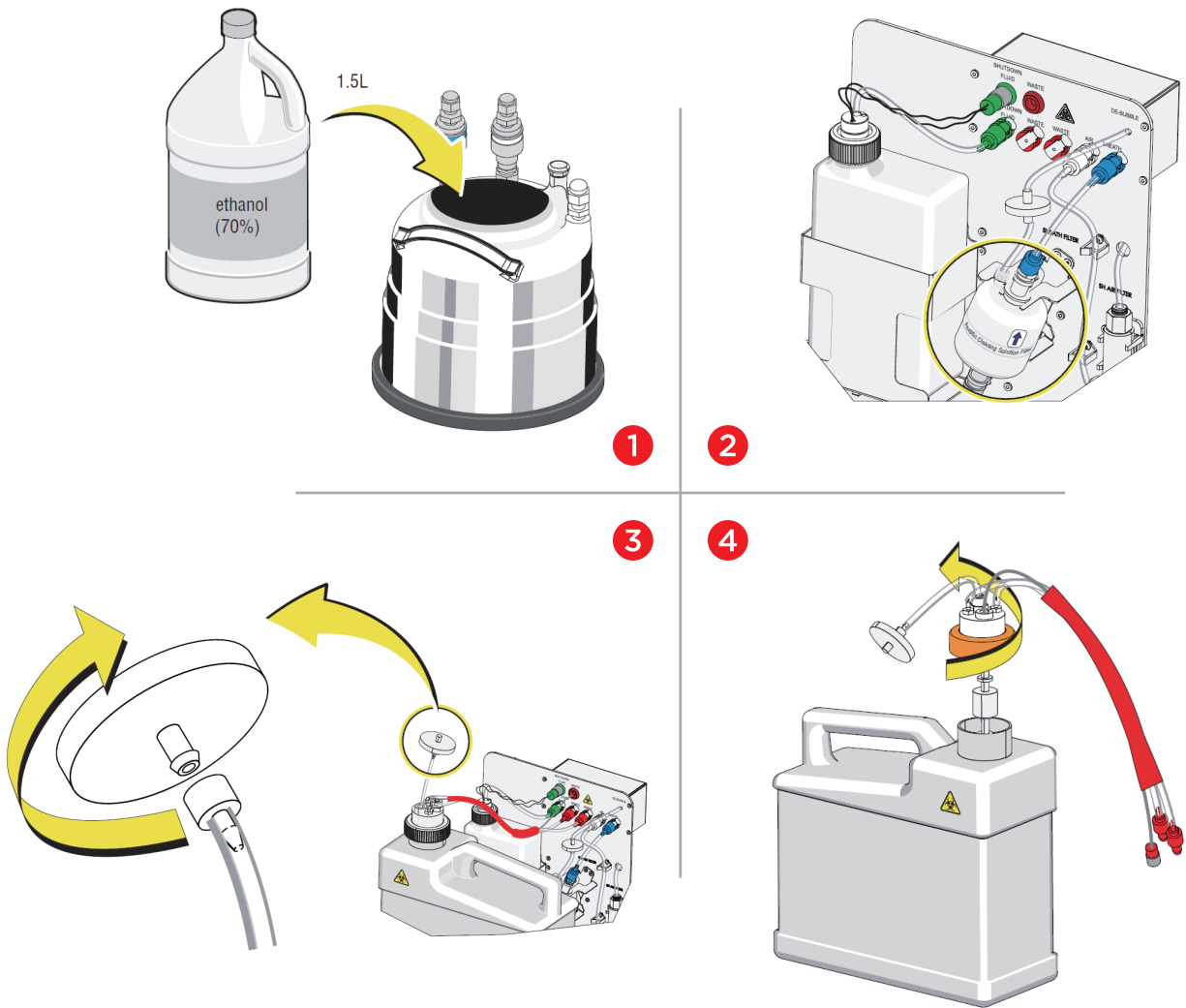
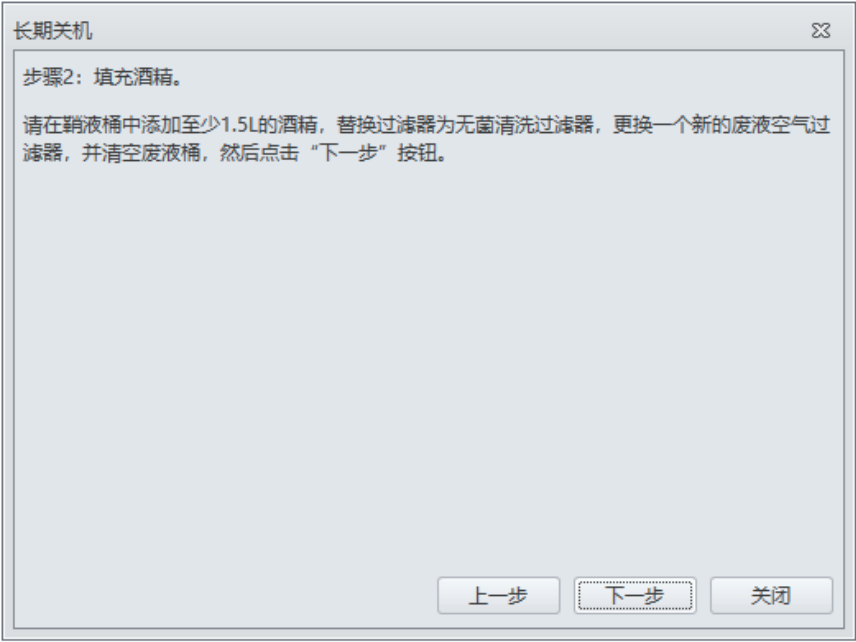
- 1. 准备好1.5L 70%乙醇，新的无菌清洗过滤器，新的废液空气过滤器，清洗液和去离子水
- 2. 在细胞仪选项中启动每日清洗（参考短时间关机流程图片）。
- 3. 设置清洗液清洗5分钟，去离子水清洗5分钟（参考短时间关机流程图片）。
- 4. 点击待机（参考短时间关机流程图片）。
- 5. 在细胞仪选项中选择系统关机使仪器处于闲置状态
- 6. 在细胞仪选项中选择长期关机（需要大概30分钟）。



6.1 移出喷嘴



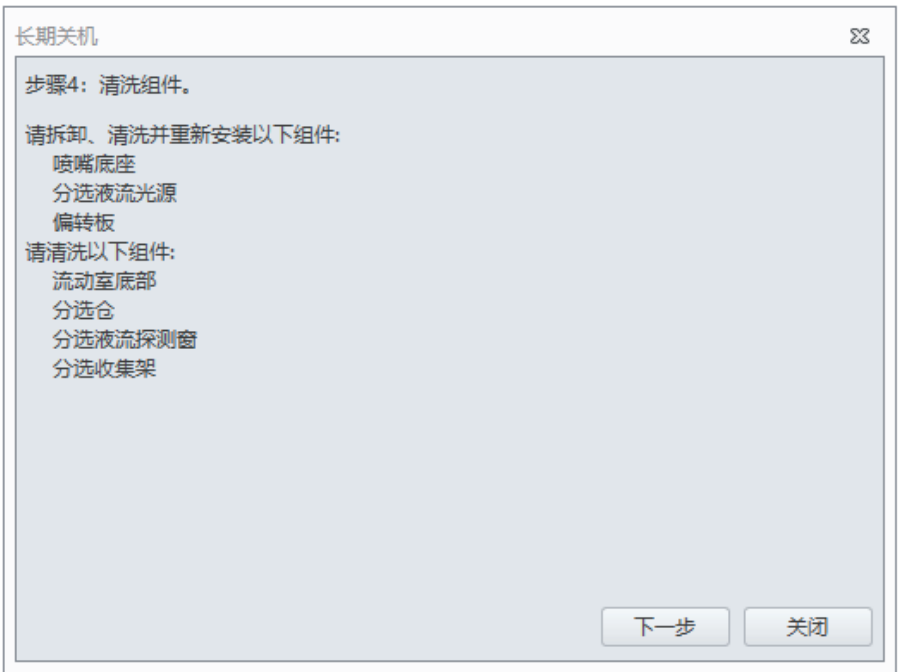
6.2 填充70%乙醇到鞘液桶，倒空清洗干净废液桶



6.3 70%乙醇清洗系统，约15分钟

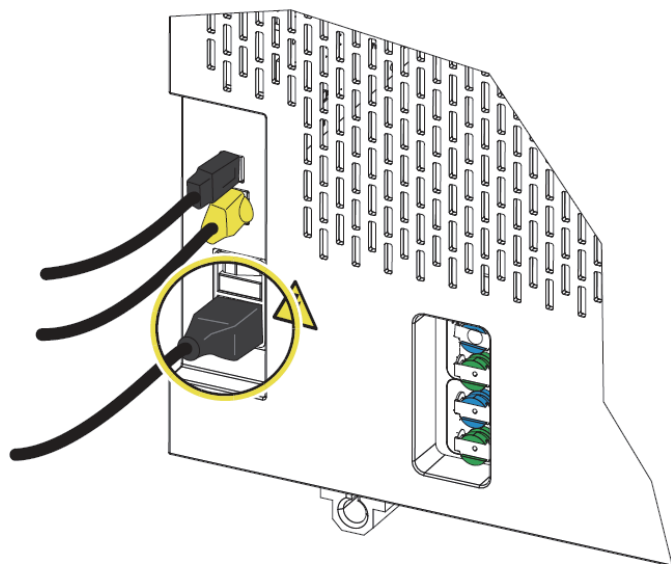


6.4 按照提示进行清洁



7. 按规范清洁以下部件： 偏转板，喷嘴，喷嘴底座，废液槽底部，分选液流光源，液流检测窗口，分选收集架，分选仓的所有表面，辅助门，样品架。

8. 关闭仪器电源开关



9. 关闭软件，电脑

10.倒空并清洗干净废液桶和鞘液桶

五、清洁流程

1. 每日清洗流程（在关闭仪器前执行每日清洗。也可通过每日清洗去除来自之前样本的残留）

- 1.1 点击“初始化”启动仪器，如果仪器已经处于“运行”状态则跳过该步
- 1.2 选择菜单栏“细胞仪”中的“每日清洗”选项，弹出下面对话框



- 1.3 放入装有2mL蓝色清洗液（货号8546929）的流式管，设定好运行时间（1-20分钟），点击“运行”，同时准备另外一管装有3mL ddH2O的流式管
- 1.4 运行结束后自动跳入第二步，更换好装有ddH2O的流式管，设定好运行时间（1-20分钟，默认5分钟），点击“运行”，运行结束后点击“关闭”则完成每日清洗流程



2. 流动室清洗流程：（每月执行一次流动室清洗。如果不使用仪器超过5天，建议在关闭或重新启动仪器之前执行流动室清洗。整个过程大概需要35min）

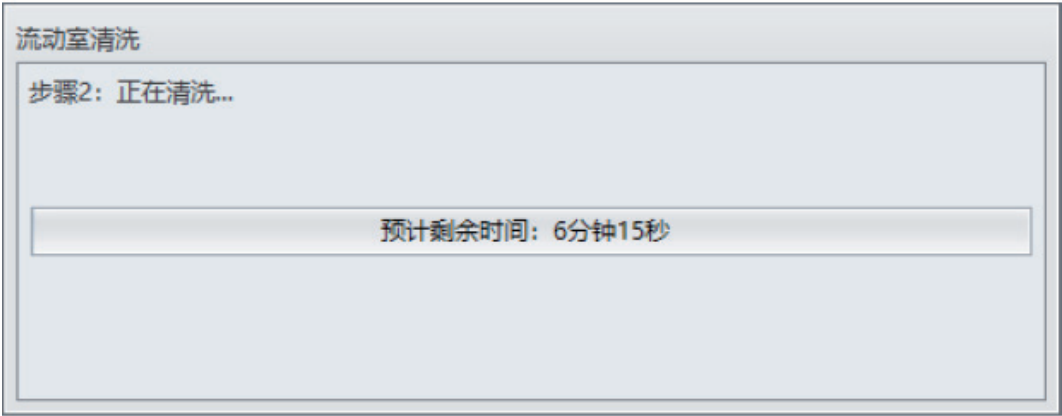
2.1 点击“待机”使仪器处于待机状态

2.2 选择菜单栏“细胞仪”中“流动室清洗”选项，弹出以下对话框

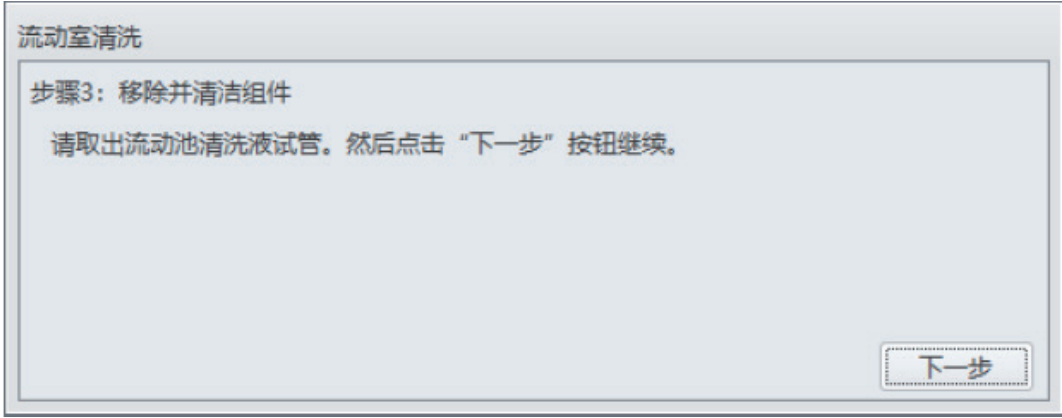


（注释：勾选清洗后关机则在流动室清洗程序完成后自动运行系统关闭程序。

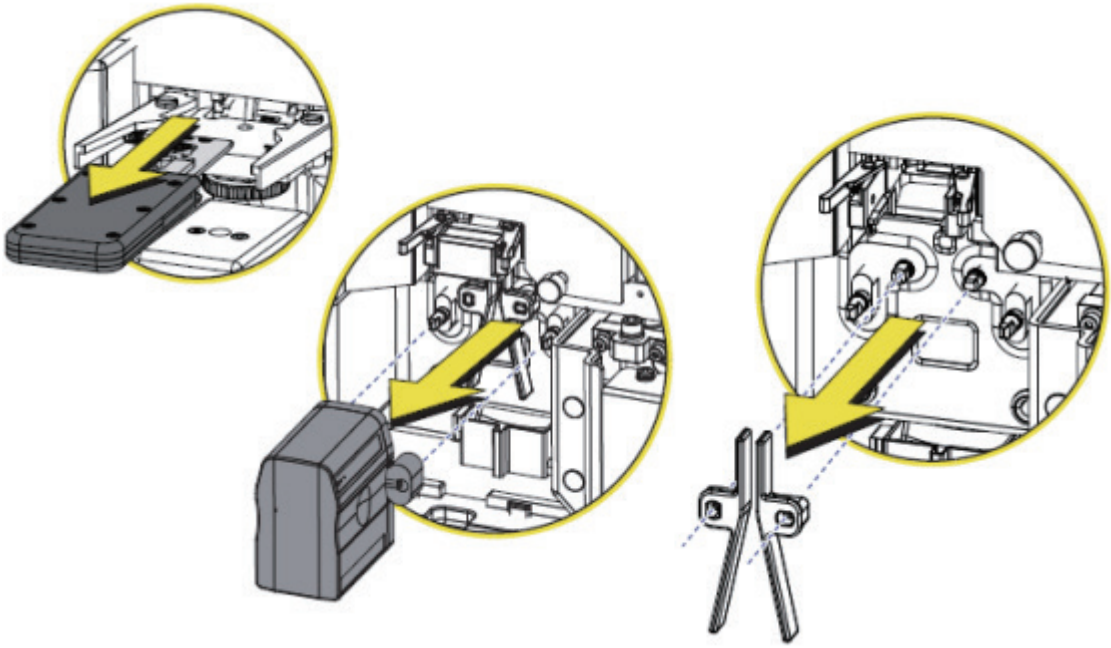
2.3 准备装有3mL 1:1 稀释好的Contrad 70清洗液（货号81911）的流式管，放入载样台并且点击“下一步”启动流动室清洗流程如下图，大概耗时6分钟左右



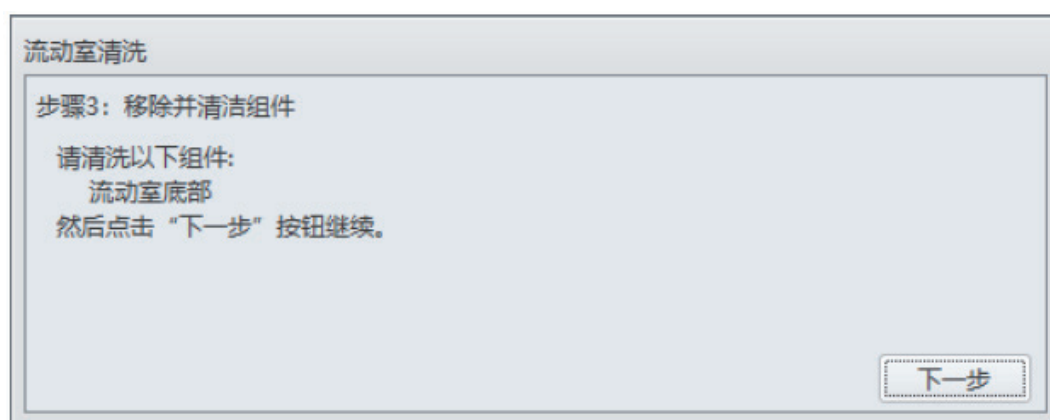
2.4 清洗流程完成后弹出以下对话框，取出装有Contrad 70清洗液的流式管，点击“下一步”；出现以下对话框



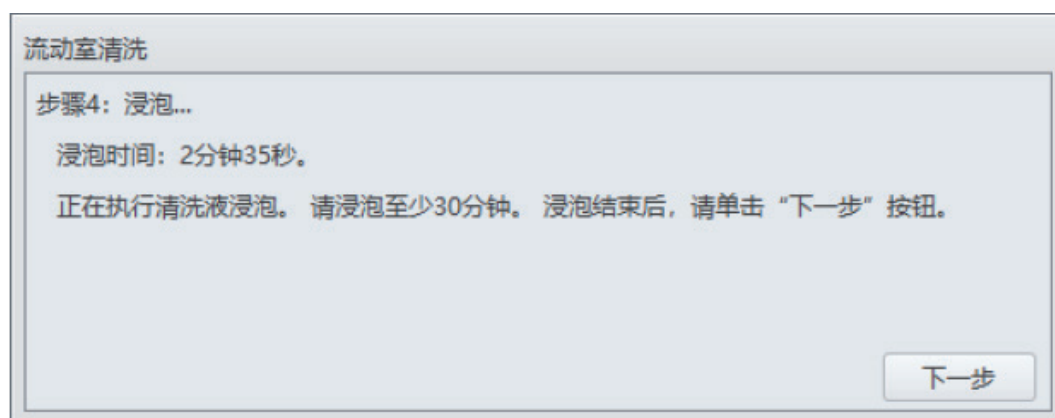
2.5 取出并清洁喷嘴、喷嘴托座、侧流照明光源和偏转板，点击“下一步”



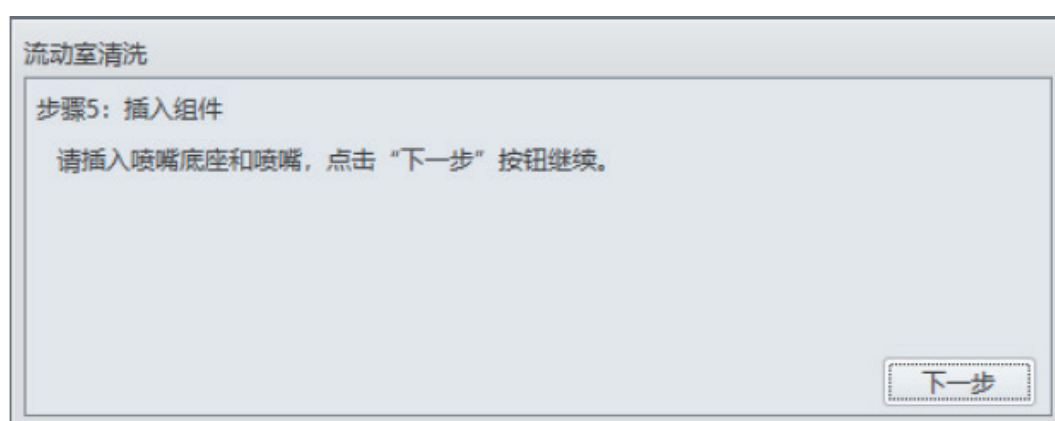
2.6 用沾有无水酒精的棉签清洁流动室底部，点击“下一步”

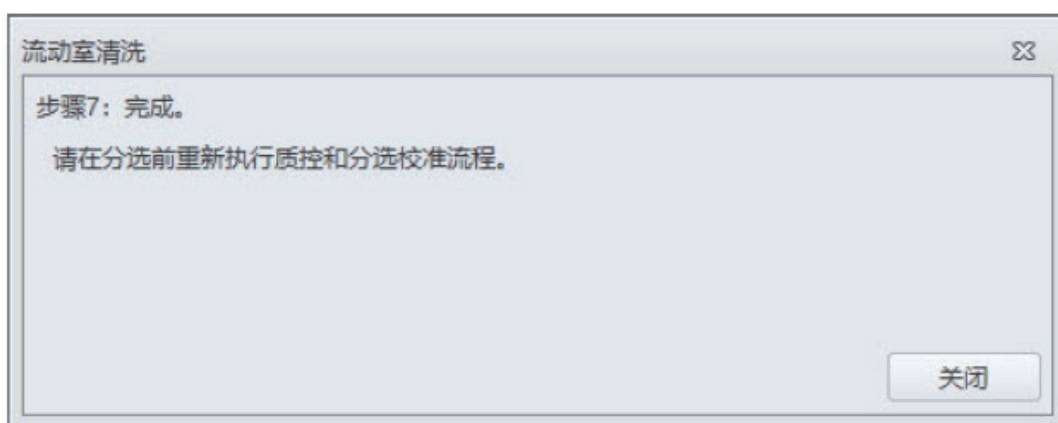


2.7 让清洗液浸泡流动室30分钟左右，然后点击“下一步”



2.8 重新装回喷嘴、喷嘴托座、侧流照明光源和偏转板，点击“下一步”，完成流动室清洗程序后，选择“关闭”



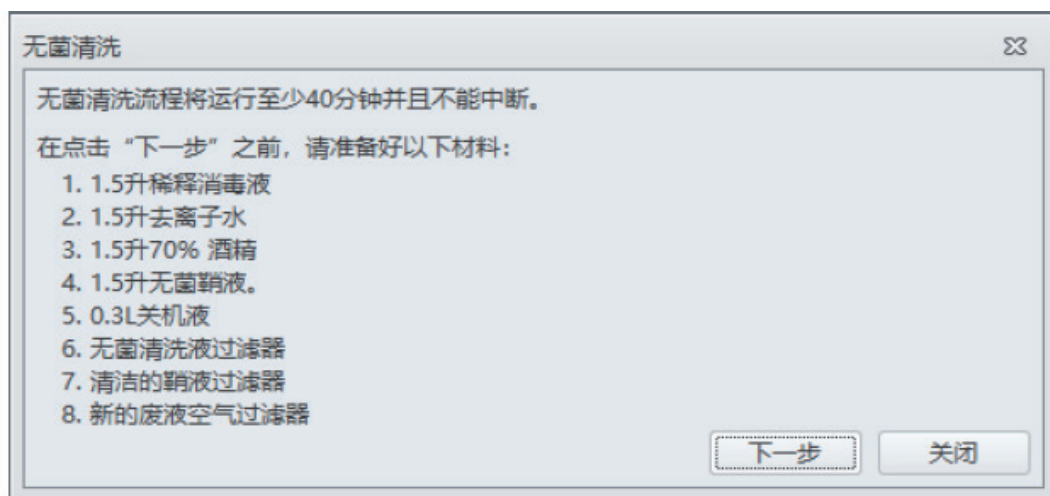


3. Aseptic Cleaning Process: (Perform when the instrument has not been used for more than 30 days or before aseptic sorting, before or after system startup/shutdown. The process takes about 1 hour.)

3.1 Ensure the instrument is in a standby state. Otherwise, perform the system shutdown process first.

3.2 Select the "Aseptic Cleaning" option in the "Cell Sorter" menu, which will pop up the following dialog box.





3.3 确保关机液充足，点击“下一步”，弹出下图对话框，仪器进入无菌清洗状态



3.4 卸掉喷嘴、关闭进样仓门、清空鞘液桶并重新加入至少1.5L 10%消毒液、更换鞘液过滤器、更换废液过滤器、清空废液桶、设置好浸泡时间（默认设置为10分钟），点击“开始”，仪器开始无菌清洁流程

3.5 当浸泡时间结束，出现以下信息，清空鞘液桶并加入至少1.5L无菌水，清空废液桶，点击“开始”



3.6 无菌水清洗管路结束后出现下面信息，然后清空鞘液桶并加入至少1.5L酒精，清空废液桶，点击“开始”进行酒精清洗管路



3.7 酒精清洗管路完成后，重新在鞘液桶中加入无菌鞘液，清空废液桶，然后点击“开始”使管路重新注入鞘液



3.8 重新更换回过滤器，点击“开始”



3.9 结束后仪器自动排气泡并进入自动关机程序，点击“下一步”，然后点击“关闭”完成整个无菌清洗流程，仪器进入闲置状态



3.10 可选：如果要继续进行无菌分选，则执行系统开机程序；如果要离开仪器，则关闭仪器。

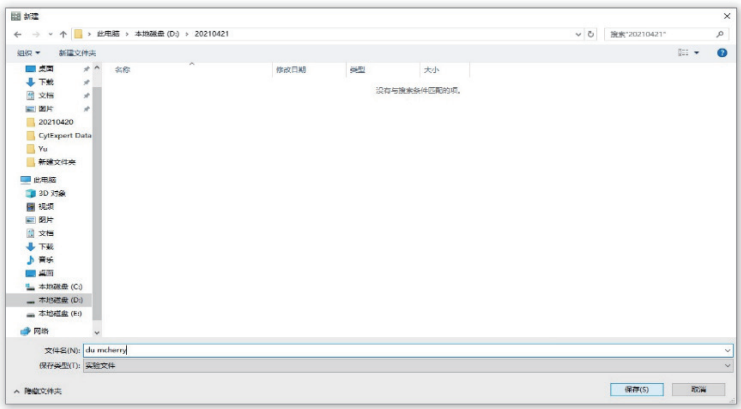
六、单细胞分选

- 1. 实验目的及原理：对表达了mcherry的细胞进行单细胞分选，而后进一步培养、扩增成蛋白水平表达均一的单克隆细胞群体
- 2. 实验步骤

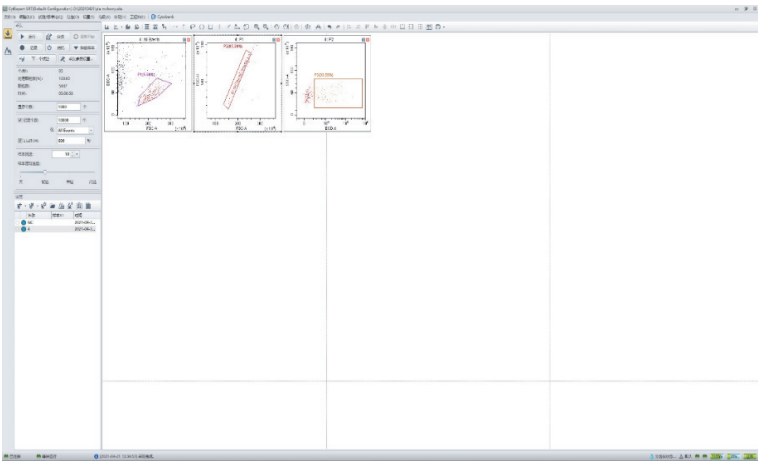
2.1 新建实验：点击图中“新建实验”选项



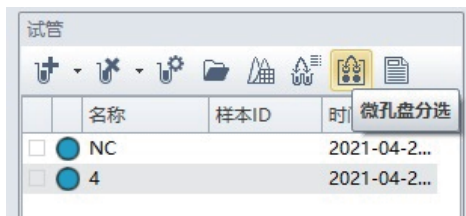
2.2 设置实验名称、存储路径



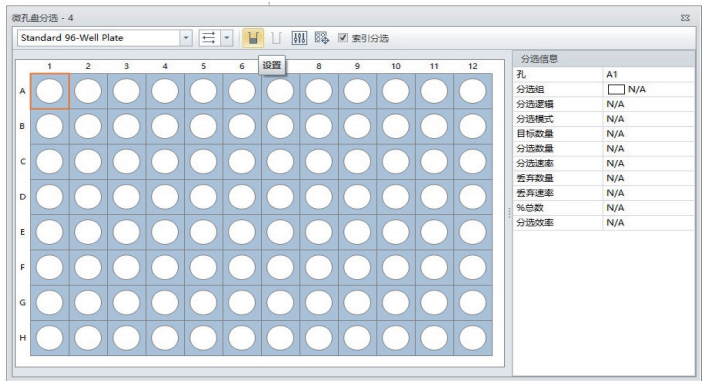
2.3 画图、设门，找到目的群体，图中找的目的群体是P3



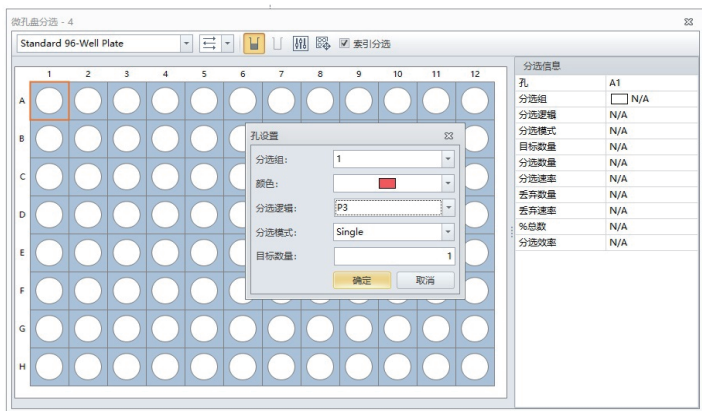
2.4 找到目的群体后点击 “微孔盘分选”



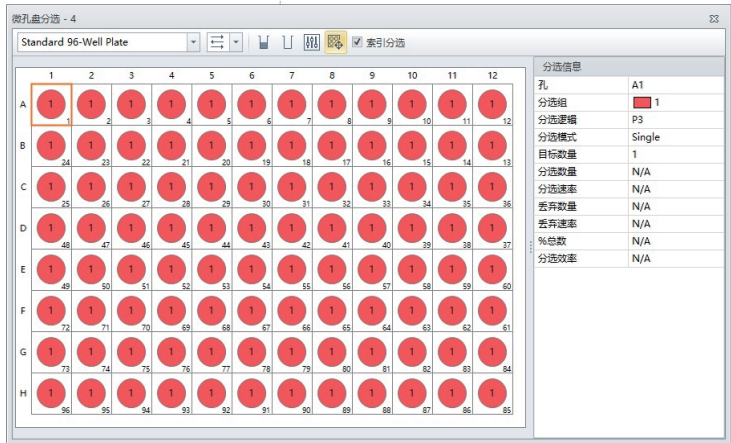
2.5 在弹出的窗口中点击 “设置” 按钮



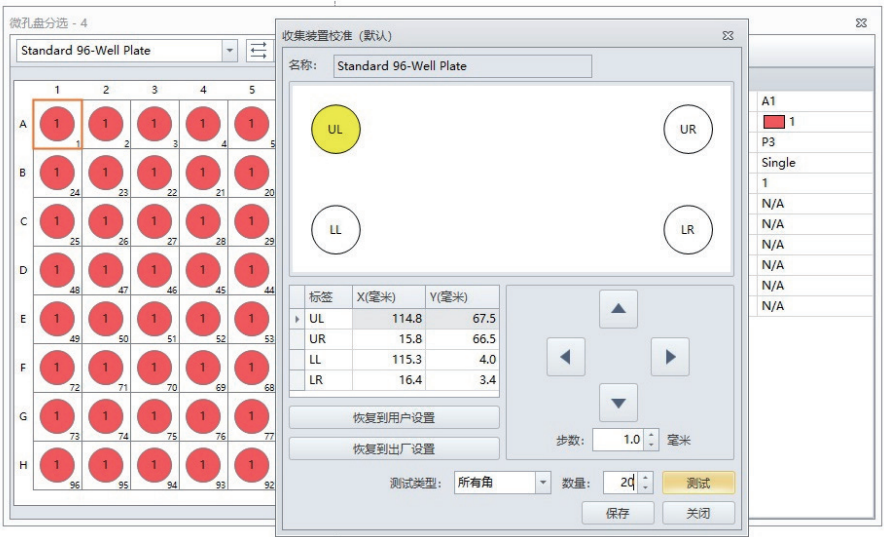
2.6 进行分选设置：分选组、颜色自行设置；分选逻辑选对应目标群体P3；单细胞分选时，分选模式选single；目标数量设为1



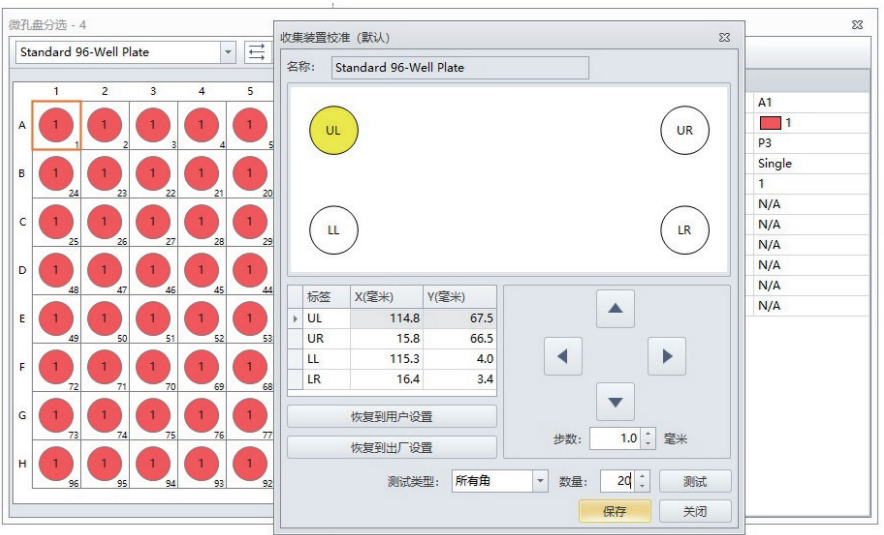
2.7 点击下图按钮进行孔板位置校准



2.8 进行孔板位置校准：选择孔板，在分选仓内放好96孔板后，点击“测试”按钮就行测试，根据测试结果点击上图“箭头”调节孔板位置，直至所有测试液滴都打在孔板中心



2.9 校准完成后点击“保存”



2.10 先点击“运行”按钮，待液流稳定后，点击“分选”按钮，开始分选

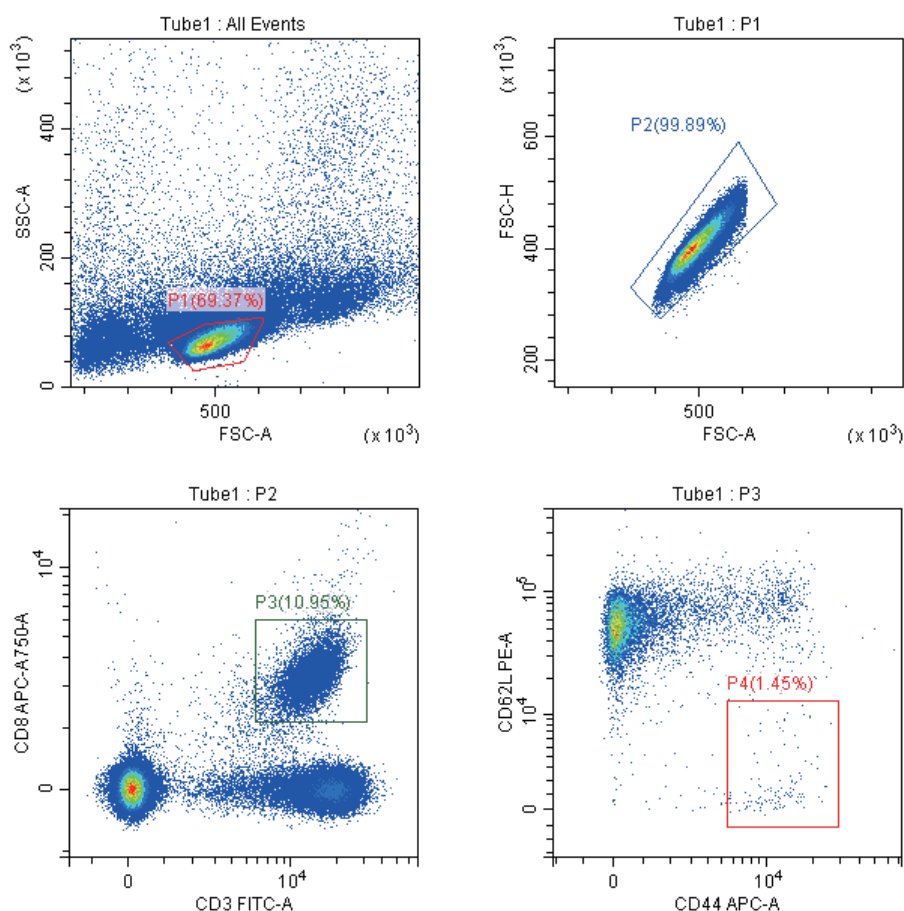


七、多色方案调节

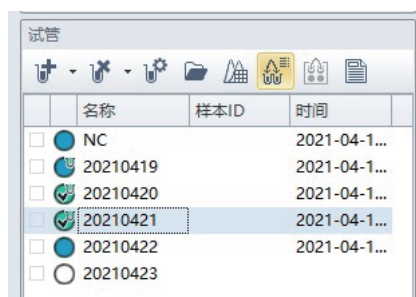
1. **实验目的及原理：**用CD3、CD8、CD44、CD62L对细胞进行染色，而后对分化了的CD8 T进行分选（effector memory：CD44+ CD62L-）

2. 实验步骤

2.1 **画图、设门：**找到目的群体，图中找的目的群体是P4（新建实验部分略，可参考单细胞分选部分）



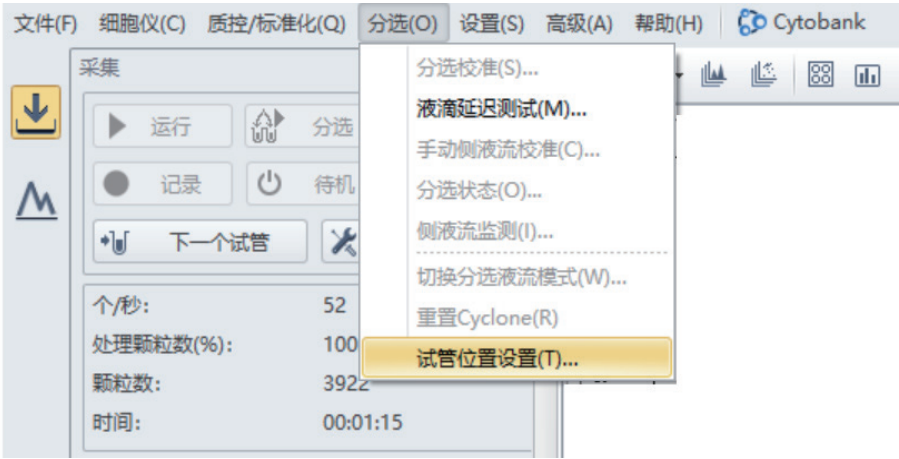
2.2 找到目的群体后点击“试管分选”



2.3 设置分选条件



2.4 选择“试管位置设置”



2.5 在弹出的窗口调节试管位置



2.6 调整好试管位置后即可开始分选：先点击“运行”按钮，待液流稳定后，点击“分选”按钮，开始分选



* 以上产品仅用于工业及科研，不用于临床诊断，禁忌内容或注意事项详见说明书。
* 未经授权，不得对原有的文字图片等内容进行变动、重新编排或者增加新的内容，贝克曼库尔特保留在不告知前提下随时更新版本的权利。
* 商标中Life Sciences为整体商标的一部分，意为“生命科学”。

RA-221-flow-br-ruo



贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司

贝克曼库尔特生命科学中国区热线:400 821 8935

联系邮箱:apls@beckman.com

官网:mybeckman.cn