

BD 生命科学 上海 COE 培训中心

2015

BD FACSAria™培训手册



lingwu zeng

地址：上海市徐汇区建国西路 445 号
3 楼（中科院上海生科院院内）

电话：400-819-9900

邮箱：COE_BDB_China@bd.com

网址：www.bdbiosciences.com/cn

4/8/2015



目录

BD FACSAria 系列流式细胞仪工作所需辅助设备	2
BD FACSAria 日常操作流程	4
BD FACSAria 开机程序	5
BD FACSAria 的分选	7
BD FACSAria 微孔板分选	15
BD FACSAria 关机程序	18
每周五的关机流程	19
BD FACSAria 保养和维护	21
BD FACSAria 不定期维护流程	30
BD FACSAria 常见问题答疑	31
关于液流的问题	31
关于液流断点问题	33
关于分选常见问题	34
关于采样常见问题	37
关于液流系统常见问题	41
关于电子系统常见问题	42
BD FACSAria 使用 FACSDiva 软件质控	43
设置仪器的 Configuration	43
准备质控微球	43
调节合适的激光延迟和面积因子	44
设置质控实验	44
调节蓝激光对应的面积因子	44
调节红激光、紫激光的激光延迟和面积因子	47
记录质控数据	48
BD FACSAria 培训日程安排	51

注：本操作手册适用于 BD FACSAriaII/III/SORP 型号

BD FACSAria 系列流式细胞仪工作所需辅助设备

日常工作所需要的设备设施

1. ddH₂O
2. 低速水平离心机
3. 多种规格移液器及枪头（如可取量程 20ul，50ul，100ul，1ml 等）
4. 次氯酸钠溶液（使用液有效氯浓度~0.5%）
5. 75%酒精、喷壶
6. PBS 溶液
7. 高压灭菌装置
8. 300-400 目左右或根据细胞大小选择合适孔径滤网过滤细胞用
9. 棉签、吸水纸
10. 仪器质控微球：
11. Diva6 CST Beads：641319 1bottle 50test、642412 3bottles 150test
12. Diva7 CST Beads：655050 1bottle 50test、655051 3bottles 150test
13. 分选校准微球：AccuDrop Beads 货号:345249
14. 仪器放置于单独的房间，房间需要装配紫外灯
15. 高压灭菌桶（10L）
16. 流式专用 5ml 样本管或 15ml 样本管（也可以用实验室常规的离心管）
17. 超声清洗设备（喷嘴堵时，清洗用）
18. 抽湿机，24hr 常开

液流车

1. 10 升金属鞘液桶：FACSFlow 鞘液（货号 342003）或自行配置过滤灭菌的 0.01M 的 PBS 溶液
2. 10 升 Waste 桶：根据需要预装入高浓度的消毒液
3. 5 升金属 Ethanol 桶：过滤过的 75%酒精
4. 5 升 Bleach 桶：FACSClean solution 清洗液（货号 340345）
5. 5 升 DI Water 桶：过滤灭菌的 ddH₂O 溶液
6. 5 升 Ethanol 桶：过滤过的 75%酒精

无菌清洗流程需要事先备好

1. 高压灭菌 DDH₂O 10L(过滤、高压灭菌、冷却后用)

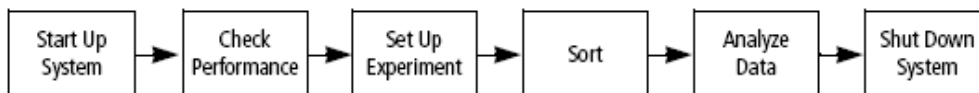
2. 高压灭菌 PBS 10L(过滤、高压灭菌、冷却后用)
3. 70%酒精 5L

常用的流式专用管：

1. 5ml 非无菌、无盖 1000 支/箱 PS 货号:352008 可用于日常检测
2. 5ml 无菌、有盖独立包装 500/箱 PS 货号:352003 可用于无菌分选的样本管或接收管
3. 5ml 无菌、有盖，25 根/包，500/箱 PP 货号:352003 可用于无菌分选的样本管或接收管
4. 15ml 样本管可用实验室常规 15ml 离心管

Corning 的联系方式： 021-22152888；4000-770-082；CLStechserv@Corning.com

BD FACS Aria 日常操作流程



- a. 打开电脑和主机.
- b. 准备好液体.
- c. 优化断点.

一 , Start Up System

目的：做好上样准备。

- 1 开启仪器和电脑
- 2 开启液流
- 3 调整断点位置

二 , Check Performance

目的：确认仪器状态的稳定性

- 1 准备好光路系统
- 2 进入CS&T界面，做好相关设置
- 3 准备CS&T微球
- 4 运行日常质控过程
- 5 检查结果

三 , Set up Experiment

目的：为要分选的样本做好实验设置和门的设置

- 1 启用 Sweet Spot
- 2 准备好工作面板
- 3 确保合适的仪器条件设置
- 4 记录分选前数据

5 创建和调整门的设置

四 , Sort

目的：设置和执行分选

- 1 调整侧液流
- 2 设置液滴延迟
- 3 设置和分选窗口
- 4 开始并监控分选执行

五 , Analyze Data

目的：确认分选出纯度

- 1 记录分选后数据
- 2 分析结果
- 3 打印或导出结果

六 , Shut Down System

目的：用DI水或酒精润洗管路，清洁流动室

- 1 执行液流关闭或者清洁流动室的过程
- 2 做好外部清洁工作
- 3 关闭仪器和电脑

BD FACSAria 开机程序

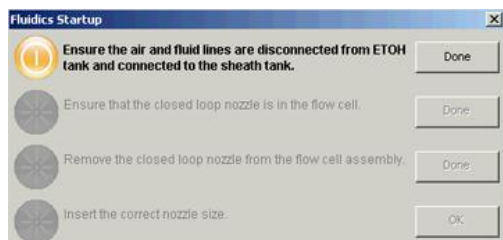
1. 开启稳压电源，启动计算机，在出现的登陆对话框中，输入用户名和密码，点击“OK”。
默认密码为：“BDIS”或“BDIS#1”。



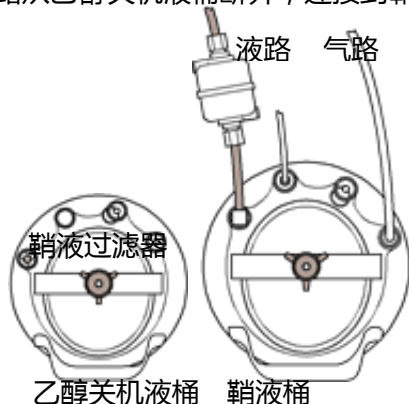
2. 开启仪器主电源，打开所需激光电源。
若仪器刚关闭，需等到系统压力完全消除（滋滋声停止）后，再开启主电源。
3. 运行 BD FACSDiva Software 软件，双击桌面上的快捷方式。在出现的登陆对话框中，无需输入用户名和密码，直接点击“OK”。
4. 仪器自动联机，在“Cytometer 仪器框”中确认软件已经和仪器相连接即“Cytometer Connected”；检查此窗口底部的液流系统水平，如果需要，则充满液体或倾空废液。单击工具栏中的“Cytometer(仪器)”按钮，可以显示该窗口。



5. 在 FACSDiva 软件的“Cytometer (仪器)”菜单中，选择“Fluidics Startup(启动液流系统)”选项。按窗口提示步骤进行操作。

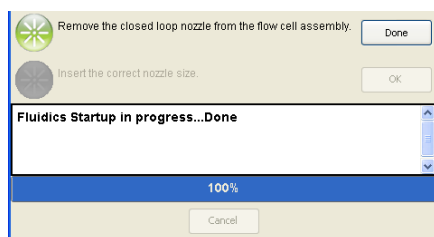


6. 将气路和液路从乙醇关机液桶断开，连接到鞘液桶对应接口上，如图所示，点击 done。



7. 确认装有 O 圈的闭合喷嘴在流动检测池上，点击 done。

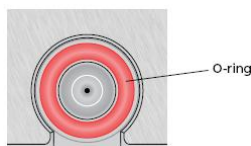
液流启动过程开始，进程提示显示在对话框底部。



8. 取下闭合喷嘴，点击 done。

9. 安装合适口径的喷嘴，保证 O 圈正确装入喷嘴。

可在显微镜下观察喷嘴，确保喷嘴未阻塞。



10. 单击 OK 完成此过程。

11. 液流启动完成后，在“Sort (分选)”菜单中选择“Sort Setup (分选设置)”选项，确认设置模式与喷嘴的口径相匹配。

12. 在 Cytometer-View Configuration-点击需要的 Configuration-Set Configuration-OK，关掉 Configuration 窗口。

13. 开启液流。

a. 单击工具栏中的“Sorting (分选)”按钮，可显示断点液流窗口(Break off)和侧液流窗口(Side Stream)。

b. 单击位于断点液流窗口中“Stream (液流)”按钮，则可以开启液流。



14. 打开流动检测池上盖，打开分选区门，检查位于废液吸引器中的液流的位置，并检查断点液流窗口中的液流情况。液流应顺利由喷嘴流入废液吸引器的中央。调节断点液流窗口下面的 Ampl 的数值 (10-70 范围内)，液滴应表现为大小均匀，且以一定的距离相隔排列，卫星液滴的数目小于等于 6 个。如果发现有液滴滴洒、不稳定或任何液流异常现象，关闭液流 (单击位于断点液流窗口中“Stream (液流)”按钮，重新检查鞘液过滤器里是否有气泡或重新超声清洗喷嘴后，再开启液流。

15. 关闭分选区门和流动检测池上盖。

BD FACS Aria 的分选

1. 选择合适尺寸的喷嘴

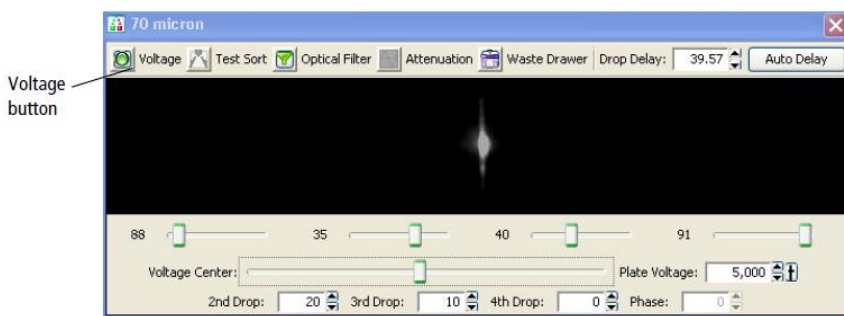
将仪器进行正常开机后，制备需要分选的本，选定分选所需要的喷嘴 Sort-Sort setup (70um, 85 um, 100 um 或 130um)，选择对应的 Configuration 完成仪器必需的质控操作。

2. 分选前数据的记录

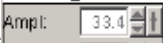
根据实验需要建立相应的 Folder/Experiment/Specimen/Tube，并且在通用工作页面 (Global sheet) 上建立获取模板，画出实验需要的图形 (散点图或直方图)，圈定需要分析和分选的细胞群 (P1, P2...)。然后上样本，调试各参数的电压、补偿后获取数据。以上详细操作参见样本获取的操作说明。

3. 液流监视

- ①. 首先打开液流断点 break off 窗口的主液流 Stream，保证液束较细，没有分支。如果液束有分支，将喷嘴取下，重新安装；或将喷嘴超声清洗后再安装。(超声清洗时间一般 1 - 2 分钟左右)。然后点击侧液流 Side stream 窗口的电压按钮 ，使之变为 ，打开偏转板电压。此时再观察液流：
 - 液流应该比较稳定。如果加压后，液流左右移动幅度大，关掉电压，将电极板、分选仓的所有表面用蒸馏水擦洗干净，再用干纸巾擦干，重新加电，确保液流稳定。**切记：先关电压再操作，保证安全！**
 - 调节分选仓的角度，使得废液落入废液吸引槽的中心

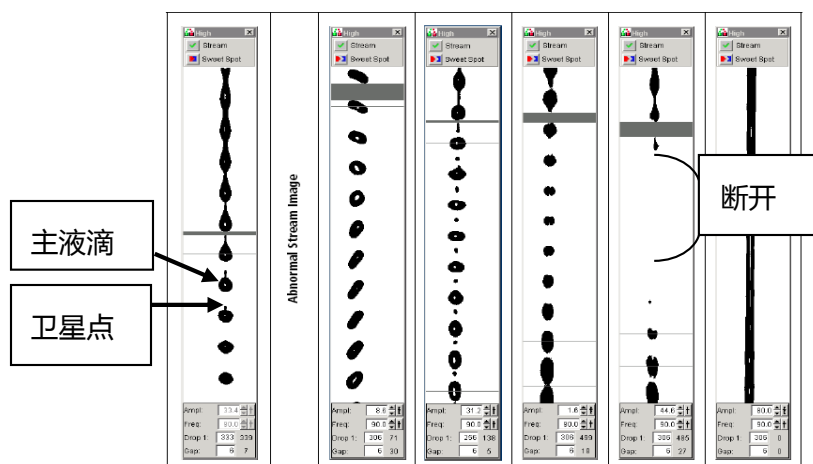


②. 液流断点位置的监视

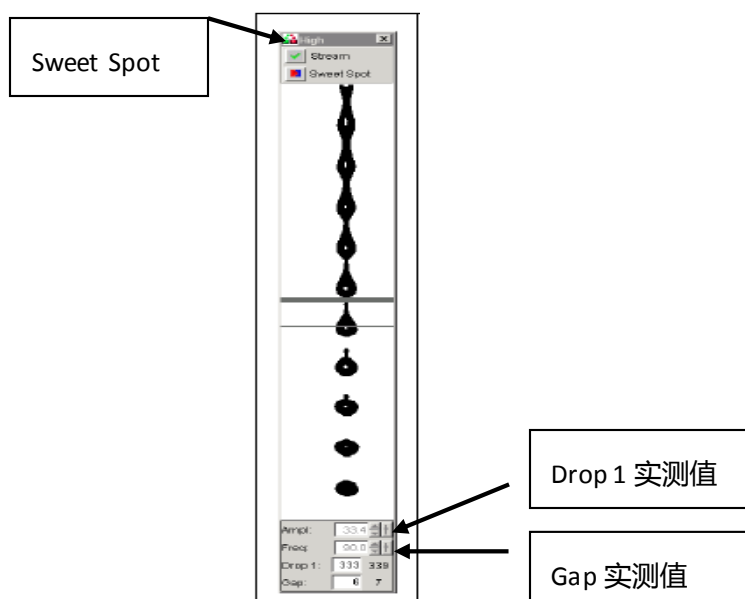
调节主液流 Stream 窗口下端 Ampl 右侧滚动条的上下箭头 ，使液流断点位置位于窗口中上部。Ampl 的调整不应超过 70；确保护星点 Satellite drop 融入主液滴的位置合适，卫星点 Satellite drop 少于 5 个。如果不合适：

- 1) 可能流动室有气泡：将液流关闭，然后再打开。
- 2) 将喷嘴卸下，超声清洗后再装上；或更换喷嘴。

如下图中所示：最左侧的主液流正常，右侧五种主液流是不正常的。



- ③. Breakoff window 下方 Drop1 右侧的实测值输入到框里，激活此窗口上方的 Sweet Spot 的功能。



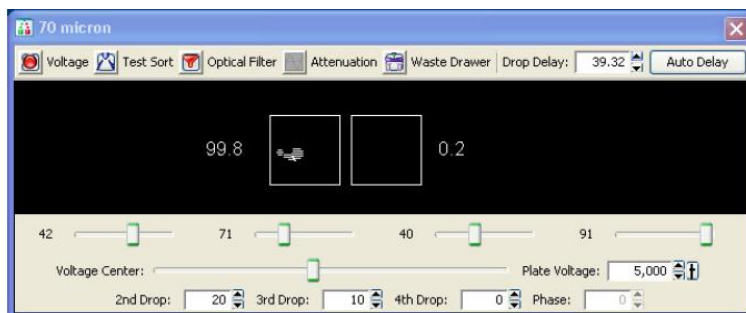
- ④. 待液流比较稳定，即断点位置恒定；以及最下方 Gap 右侧实测值和框里的靶值比较接近时继续下一步。

4. 确定液滴延迟 (Drop delay)

自动液滴延迟：

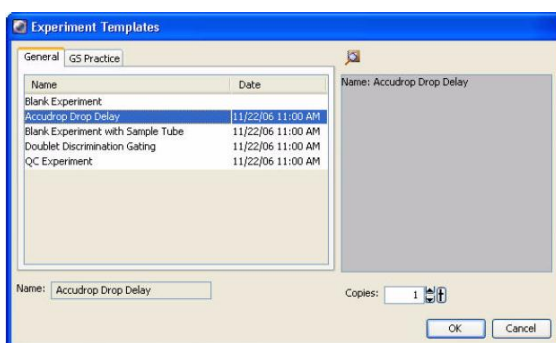
- ①. 电极板加电
- ②. 点开 Test Sort
- ③. 调整 Left 侧液流的角度
- ④. 点开 Optical Filter，再关闭，关闭瞬间观察中间和 Left 侧液流是否位于两个框的中心位置

- ⑤. 如果不在，重复③-④步，直至在框的中心位置



- ⑥. 调整分选仓左侧小红激光调节旋钮，使得 Left 和中心液流的亮度达到最亮

- ⑦. 选择 Experiment--New Experiment.弹出对话框中,选择 Accudrop Drop Delay, 然后单击 OK。



- ⑧. 实验下面自动生成相应的 Specimen。

- ⑨. 将 Speciman 前的 “+” 点开，看到 Tube，将 Tube 前 “+” 点开，将下方的 sort layout 双击打开。



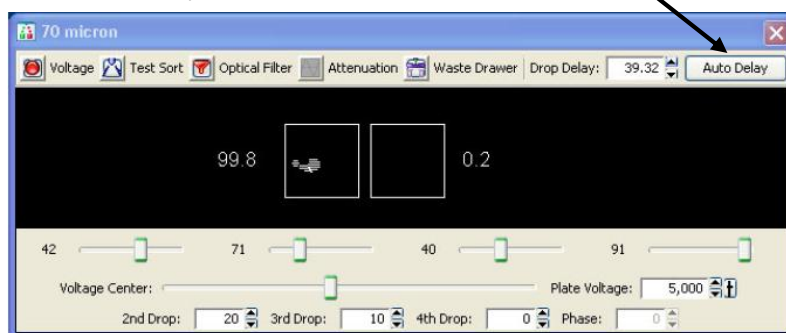
- ⑩. 滴 1 滴 Accudrop beads 到 1mL 的 PBS 中，上样。调整流速到到以下相应喷嘴的要求。

70 micron = 1,000 to 3,000
85 micron = 800 to 2,000
100 micron = 600 to 1,500
130 micron = 400 to 1,200

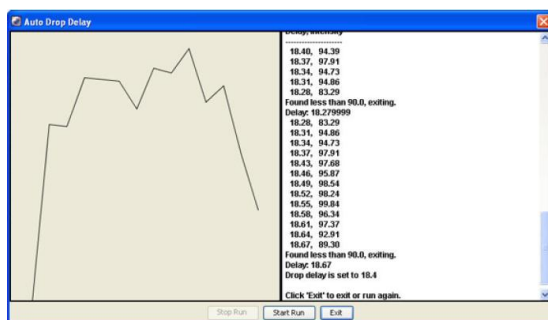
- ⑪. 点击 Sort layout 窗口中的“Sort (分选)”键 。此时弹出一个对话框，在对话框提示菜单中选择 Cancel，不推开废液吸引槽。不用收集微球，这些 Accudrop 微球将被抽入废液桶中。



⑫. 点击 Auto Delay 键



⑬. 出现 Auto Drop Delay 对话框，点击 Start Run 键。



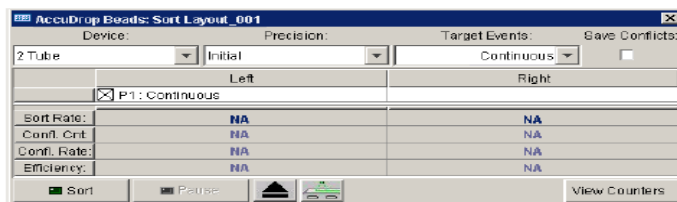
⑭. 直至其完成后在下面窗口的左侧绘出曲线，完成最佳的 Drop Delay 数值的确定。

手动液滴延迟:

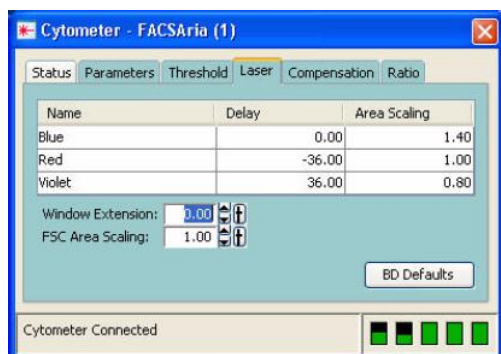
- ①. 建立一个新的 Experiment，并命名为 Accudrop，并建立相应的 Specimen 和 Tube。
- ②. 将 Tube 命名为 Accudrop beads。
- ③. 在右侧电脑的“通用工作页面（Global sheet）”上建立获取模板，画一个散点图，横轴 FSC-A，纵轴 SSC-A，设单个微球的矩形门（rectangle gate）P1。P1 要设到最大。
- ④. 也同样从菜单上的 Sort 中选 New sort layout ，在此 Experiment 下创建 Sort layout，双击将其打开。

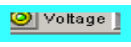


- ⑤. 设 Device 中选择 2 Tube，Precision 为 Initial，Target events 为 Continuous。将 Left 下的分选群加为 P1。（见下图）

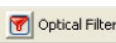


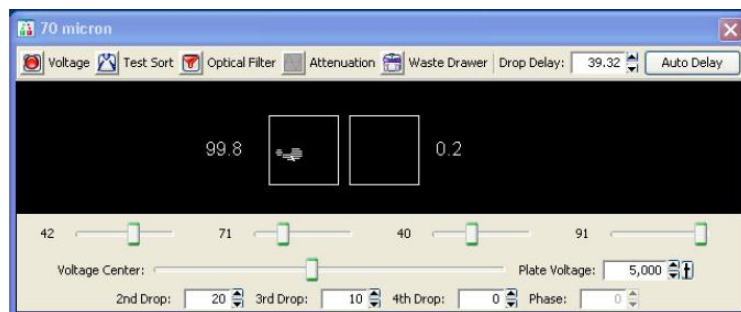
- ⑥. 滴 1 滴 Accudrop beads 到 0.5mL 的 PBS 中，上样。在 Instrument 菜单中选择 Laser 页面，将 Windowextension 设为零。调整流速到 1000-3000 events/秒。



- ⑦. 在侧液流窗口中启动电压 ，使之变为 。
- ⑧. 点击打开 Sort layout 窗口，并点击“Sort (分选)”键 。此时弹出一个对话框，在对话框提示菜单中选择 Cancel，不打开分选门（不开启抽吸装置）。不用收集微球，这些分选微球将进入废液槽中。

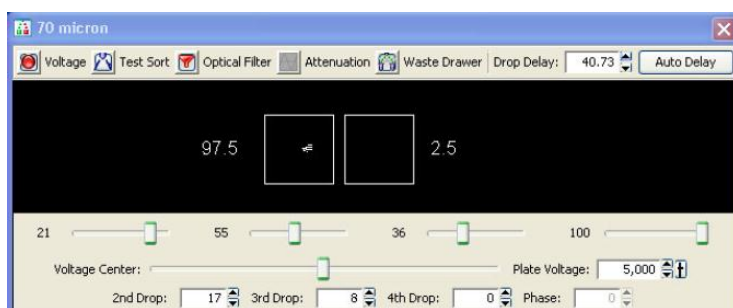


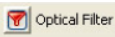
- ⑨. 在侧液流 Side stream 窗口中，单击滤光片图标 。此时，Side stream 窗口出现两个框。调整 Drop delay（ctrl+箭头），使左框中亮度接近 100%。每次单击后都请稍等一会儿，待系统对液滴延迟时间更改后进行反应。



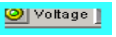
- ⑩. 然后在 Sort layout 窗口将 Precision 改为 Fine tune，同样点击 Drop delay 的箭头调整，

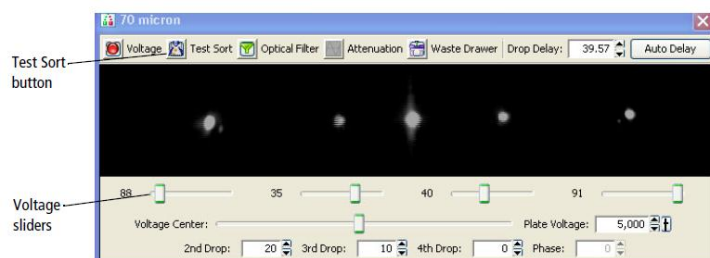
使左框数值最大 ($\geq 90\%$)。



- ⑪. 点击 Optical filter ，将其关闭。重新将 Window extension 恢复为初始值 2。关掉偏转板电压。

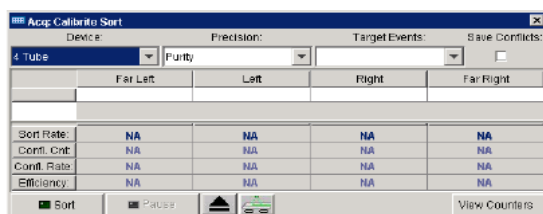
1. 分选液路的调整

- ① 打开侧液流 Side stream 窗口的偏转板电压 ，使之变为 ，再打开分选测试 ，此时应看到四束偏转液流。通过调整 Voltage sliders 分别调整四路偏转的角度大小。如果中间光斑比较分散，通过调整窗口下方的 2nd Drop 和 3rd Drop 对应数值，使得其最



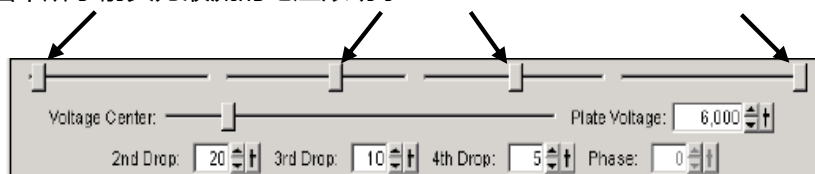
集中。

- ② 安装分选装置：根据分选需要，将收集管放入四路或两路的分选装置中，然后将该装置滑入分选槽中。
- ③ 在前面记录数据的 Experiment 下建立 Sort layout ，并双击打开 Sort layout。点击 Sort layout 窗口的抽屉 （见下图箭头），此时弹出一个对话框，在对话框的提示菜单中选择 OK，打开分选门（开启抽吸装置）。



- ④ 观察分选液流是否落入相应分选收集管中，如果没有，轻拉动液流的电压滚动条，使分选液流落入收集管中，最好使液流落到液面上而非收集管壁上。

⑤ 图中所示箭头为液流的电压滚动条

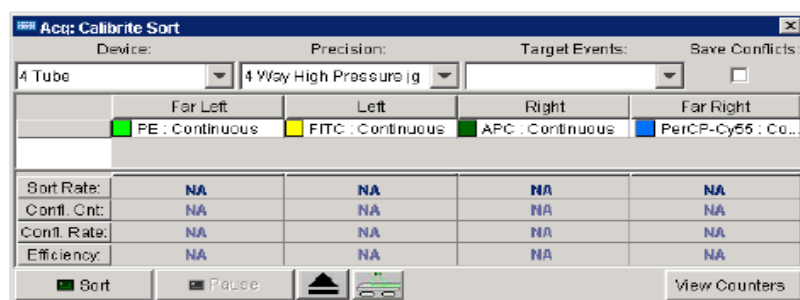


调试完毕后关闭分选门  (Sort block door), 关闭分选电压 .

2. 分选

上述工作准备完毕后, 即可安排分选。

- ① 打开刚才记录实验数据的 Experiment。
- ② 在打开的 Experiment 中, 打开 Sort layout, 在 Sort layout 窗口输入合适的选项



- 从 Device 选项中选择合适的收集装置 (4 Tube/2 Tube)。
- 从 Precision 选项中选择 Purity。
- 在 Target events (分选细胞数) 下选择数目、输入数字或选 Continuous。
- 在相应分选区域 (Far Left/Left/Right/Far Right), 加入要分选的细胞群。

① 开始分选

- A. 打开分选收集装置前的门, 放入新的收集管。
- B. 在上样架上放上要分选的样品管。上样 (load)。
- C. 设定合适的收集速率。速率低时分选效果比较好。一般 <4.0 。

② 打开偏转板电压  , 打开分选抽屉  , 在弹出的对话框提示菜单中选择 OK , 打开分选门。

③ 确认绿色的采集箭头指向 Browser 中合适的上样管。

④ 点击 Sort layout 上的“Sort”。

⑤ 如果此时出现一个对话框, 点击 “OK”。

分选过程一直持续，直至您将所有需要的细胞群体分选完毕。如果 Target events 选择了“Continuous”，仪器将持续分选，直至点击“Sort”或“Acquire”手动停止分选。分选结束后，获取停止，废液抽吸装置也关闭。从 Sort layout 窗口可监测分选的进度，分选的细胞数显示在相应的区域。在相关的计数区显示分选速率。



【注】：在分选时可以将 Sweet Spot (甜美液滴) 启动，当 Sweet Spot (甜美液滴) 功能启动时，如果“Drop 1”和“Gap”的设置超过了正常范围，分选过程会自动暂停。并会自动条件相关设置“Drop 1”和“Gap”回归设定范围之内再继续分选，使用此功能保证分选过程只在合适的断点状态下进行。如果系统发现了严重问题，如检测到堵塞，那么液流会停止，分选过程会结束；电偏转板会停止，吸引装置会关闭，样品管会卸下。已经收好的样本会自动保护起来。

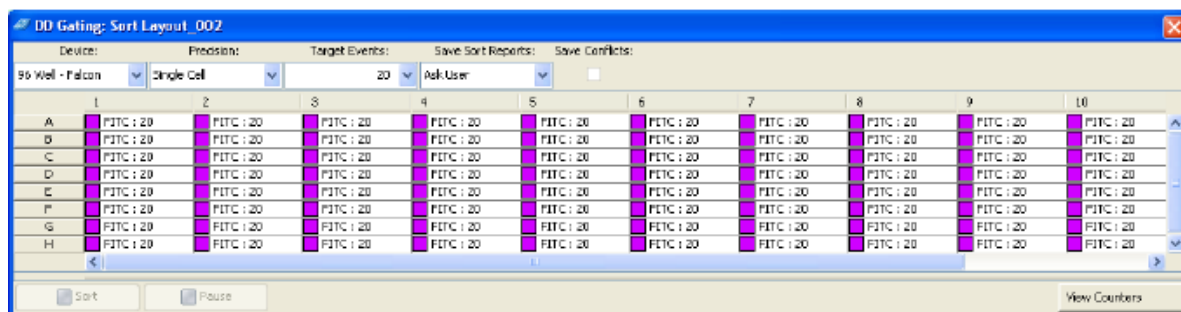
3. 分选完毕后的检测

- ① 从载样端口上取下样品管。
- ② 从分选收集室中取下分选的收集装置。
 - 打开分选收集室门。
 - 将收集装置朝外滑动，将其从分选抽吸装置下方的固定凹槽中取下。
 - 关闭分选收集室门。
- ③ 检查每一个分选收集管的分选纯度。
 - 打开已获取样本的 Experiment，在 Specimen 目录下加上几个新的 Tube (几路分选加几个 Tube)。
 - 将 Tube 的名字改为 Post sort Far Left，Post sort Left，Post sort Far Right，Post sort Right。
 - 依次记录样本。在记录样本之前使用上样针反冲功能清洗干净上样针，以避免交叉污染。
- ④ 最后在统计结果中记录下每种细胞的分选纯度。

BD FACSAria 微孔板分选

【新建浏览器文件】

- 1、在浏览器中选择您的文件夹，然后新建一个” Experiment（实验）” 文件夹。
- 2、根据需要命名 “Experiment（实验）”。
- 3、根据需要命名 “Specimen（标本）”。
- 4、根据需要命名第一个 “Tube（采集管）”。
- 5、新建一个 FSC/SSC 图形，和 FITC/PE 等荧光组合图形。
- 6、在散点图上，沿单个细胞设门。
- 7、右键单击 FITC/PE 图形，选择 “Show Population P1” 命令。
- 10、沿 FITC 阳性的细胞群体设门。
- 11、（备选）在细胞群体级别图中重命名细胞群体，如 FITC 阳性群体命名为 FITC。
- 12、在浏览器中选择新建一个 “Sort Layout”。
- a) 将设备改成 “96well - Falcon”。
- b) 将分选精度模式改成单细胞模式。
- c) 将目标细胞改成 “20”。
- d) 在所有的微孔中加入 FITC 细胞群体。
- e) 单击” View Counters（显示计数器）”；分选设置中所有计数器都不选择。



【安装分选硬件】



警告

任何于生物标本接触的仪器表面都有可能传播致死性疾病。在处理分选硬件时必须使用常规的防护措施。必须穿戴合适的防护衣和手套。

- 1、在抽吸装置下方安装防溅防护。
 - a) 如果需要，关闭分选仓门。
 - b) 如果需要，打开分选收集室门。
 - c) 分选仓门必须始终关闭，才能打开收集室门。
 - d) 安装完毕，取下样品管支架。

- e) 微微倾斜防溅防护装置，使之能够插入废液抽吸装置下方的固定凹槽中。将防溅防护架以一个方向插入。



安装防溅防护装置

- 单击“Access Stage (载物台进入状态)”按钮，将 ACDU 载物台移至前方。
在分选设置中，单击“Access Stage (载物台进入状态)”按钮 ，将载物台移至分选收集室前方。
- 安装 96 孔微孔板及其盖子。



微孔板的 A1 孔置于左外侧

装备有微孔板(左)和滑动卡条(右)的 ACDU 载物台

分选由载物台的前方左侧角开始 (A1 部位)，以从前向后，从左至右的曲折路线进行分选。一个微孔板的分选过程是：A1 - A12，B12 - B1，C1-C12，依此类推。

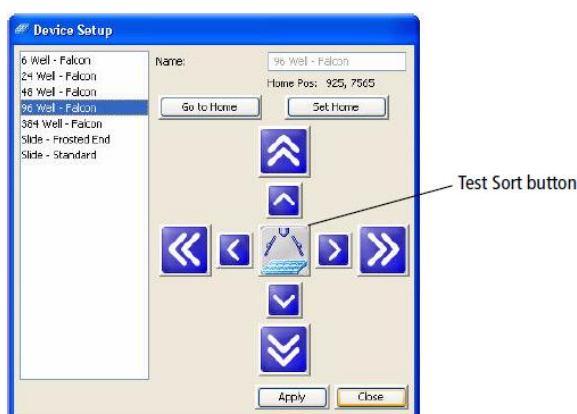
【调整液流】

- 在本节中，您将学习如何最优化偏转的侧液流，以及如何调节初始位置。
- 在分选至微孔板或载玻片时，预先对微孔板上的微孔或载玻片上的斑迹间隔进行了设置。以初始位置为起始点：Far Left 液流应到达左上角的微孔中心，或者是载玻片左上角的起始位置。
- 默认的起始位置的设置，适用于标准分选收集装置：Falcon 多孔微孔板有 6，24，48 和 384 孔，并有标准或边缘粗糙的载玻片。对于其它载物类型，需要设置其起始位置。
- 如果需要，可以通过以下步骤来确认起始位置并进行调节。

- 优化液滴延迟时间。
- 打开分选仓门。
- 在分选设置中单击废液抽吸装置按钮 .
- 打开电偏转板。

在侧液流窗口中单击电压按钮 。此时电压警示灯亮起，提示电偏转板加电。

- 5、通过单击侧液流窗口上的测试分选按钮  来启动液滴偏转。
- 6、调节 Far Left 的滑动条，直至 Far Left 液流能够通过防溅防护装置上的小孔并从孔中心角度落下。（孔板和玻片分选都只使用 Far Left 一路偏转）
液流偏转应刚好穿过防溅防护装置上的小孔。
- 7、再次单击侧液流窗口上的测试分选按钮  结束液滴偏转角度的调节。
- 8、选择“Sort>Home Device”命令。
- 9、在设备设置对话框中，选择您在使用的收集装置。
- 10、在设备设置对话框中，单击“Go to Home（返回初始位置）”命令。



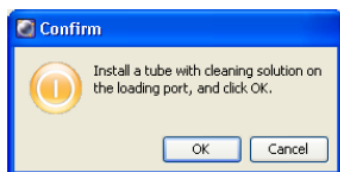
载物台移至预先设置好的起始位置。

- 11、双击分选检测按钮，使得液滴落在起始位置（单击打开，再单击关闭）。
- 12、检查收集装置，观察液滴落下的位置。
若想将载物台移至前方，请关闭设备设置窗口，在分选设置中单击载物台进入控制选项。
- 13、将收集装置擦拭干净，将它放回载物台上。
如果需要，请单击“Access Stage（载物台进入状态）”，载物台回到原处，然后选择“Sort>Home Device”重新进入设备安装对话框。
- 14、如果需要，调节起始位置。如果需要，单击箭头来移动载物台。大箭头以五步的单位移动；小箭头以一步的单位移动。
- 15、重复第 11 至 14 步，直到所有的液滴都适当地进入 A1 孔中心位置为止。
- 16、单击“Set Home（设定初始位置）”键，然后关闭窗口。
- 17、在 FITC 分选采集管的分选设置界面上，单击分选按钮。

BD FACSAria 关机程序

每日关机

1. 用 2mL FACS Clean 清洗液的流式管上样 5 分钟，注意高速运行：Flow rate 调到 6。
2. 同样，用 2mL DI Water 的流式管高速上样 10 分钟，注意高速运行：Flow rate 调到 6。
3. 关闭液流（单击位于断点液流窗口中“Stream（液流）”按钮）。
注意：确保在您关闭液流前，先将当前的标本卸下。
4. 将分选仓里的废液吸引槽的左、中、右各加入 10ml ddH₂O。
5. 将普通喷嘴更换为闭合喷嘴，确认 0 圈在喷嘴上。
6. 在“Cytometer”菜单下选择“Cleaning Modes（清洗模式）”选项。点击“Clean Flow Cell（清洗流动室）”选项。出现提示框后，在进样管中装约 2ml 去离子水然后点击 OK。



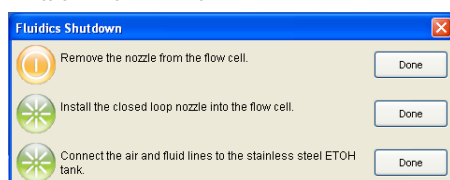
7. 关闭激光器电源，关闭仪器主电源。
8. 退出 BD FACSDiva 软件，并关闭计算机和稳压电源。
9. 拉开鞘液桶压力阀，完全释放压力。
10. 用棉签或纸蘸 ddH₂O 擦净分选仓、电极板、收集仓、上样仓等所有可能溅有 PBS 的表面
11. 再用干棉签和纸擦干所有湿的表面，同时防止棉絮、纸屑等掉入仪器内部如废液吸引槽里。

每周五的关机流程

1. 用 2mL FACS Clean 清洗液的流式管上样 5 分钟，注意高速运行：Flow rate 调到 6。
2. 同样，用 2mL DI Water 的流式管高速上样 10 分钟，注意高速运行：Flow rate 调到 6。
3. 关闭液流（单击位于断点液流窗口中“Stream（液流）”按钮）。

注意：确保在您关闭液流前，先将当前的标本卸下。

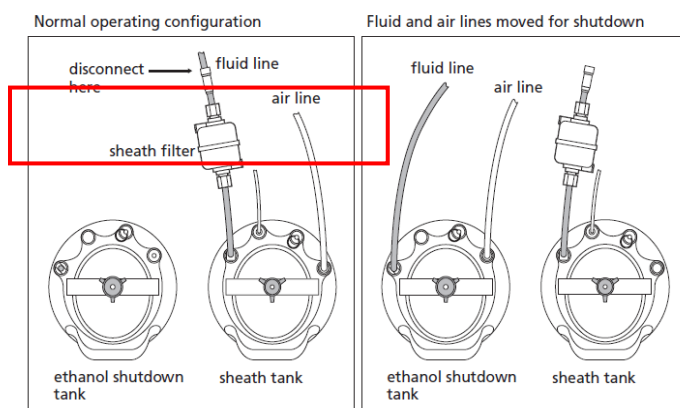
4. 检查废液桶是否已满、乙醇关机桶是否需要补液。
5. 在“Cytometer”菜单下选择“Fluidics Shutdown（关闭液流系统）”选项。下列提示信息即出现，



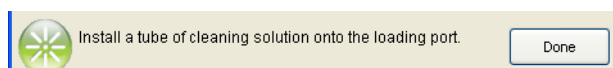
6. 从流动检测池取下喷嘴（已完成），点击 done。
7. 安装好闭合喷嘴，确认 0 圈在喷嘴上（已完成），点击 done。



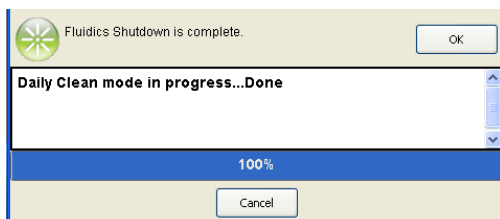
8. 将液路和气路连接到乙醇关机液桶上，如图所示，点击 done。



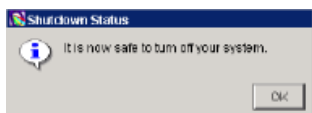
9. 出现以下提示信息时，在进样管中装入约 2ml 去离子水，放于载物台上，然后点击 done。



10. 出现以下信息时，清洗过程完成。



11. 当您看到“系统可安全关闭”的信息时，点击 OK。



12. 关闭激光器电源，关闭仪器主电源。
13. 退出 BD FACSDiva 软件，并关闭计算机和稳压电源。
14. 拉开鞘液桶压力阀，完全释放压力。
15. 用棉签或纸蘸 ddH₂O 擦净分选仓、电极板、收集仓、上样仓等所有可能溅有 PBS 的表面。
16. 再用干棉签和纸擦干所有湿的表面，同时防止棉絮、纸屑等掉入仪器内部如废液吸引槽里。

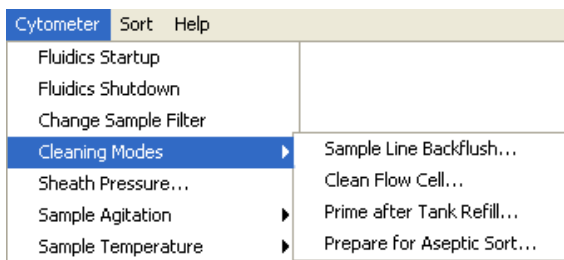
BD FACSAria 保养和维护

日常维护

维护内容	要求频率
内部清洗流程，请见下表	
液流车上的滤器排气	每周
鞘液桶上的滤器排气	每周
更换废液桶盖子	每月
流动室清洗 (with 0.5%-1%有效氯的Clean)	每月
更换液流车上的滤器	每6个月
更换鞘液桶上的滤器	每3个月
更换进样管道	每4 - 6 个月或需要更换时
更换空气过滤网	每6 - 12 个月，跟环境空气质量有关
更换鞘液桶上气路管道上的滤器	每6个月
检查液流车上的接水槽	每周

内部清洗流程

BD FACSDiva 软件包含四种预置的清洗模式，可以每个单独使用或组合使用来进行必要的仪器维护。后面会分别介绍其过程。以下为各清洗模式的总览。



内部清洗模式

清洁模式	概要	频率
1. 进样管路反冲 (Sample Line Backflush)	用鞘液冲洗进样管路	运行完有黏附细胞或黏附染料的样本后，或为了降低管间交叉污染时
2. 清洗流动室 (Clean Flow Cell)	用清洗溶液或 ddH ₂ O 浸泡流动室	碎片、杂质多或CV高时进行，或作为日常关闭操作
3. 小液体桶重新灌液后排气	排除3个5L容器液路插拔时	5L 容器与液流车断离后需要进行

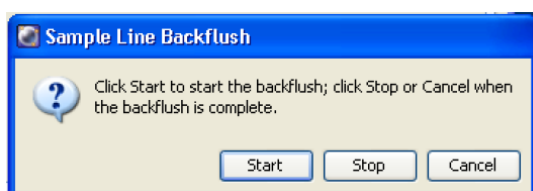
(Prime after Tank Refill)	产生的气泡	
4. 无菌清洗 (Prepare for Aseptic Sort)	用Cleaning , DI水和75%乙醇清洁鞘液路径和样本路径	在无菌分选之前进行, 或发现管道污染后

一 . 进样管路反冲 (Sample Line Backflush)

当样本管卸载后, 进样管道将由鞘液冲洗内外壁以减少可能的样本残留。

注意在进行进样管路反冲时, 液流是开启的。

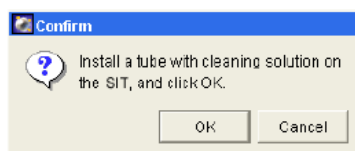
- 1 选择 Cytometer > Cleaning Modes > Sample Line Backflush。
- 2 点击 Start 开始返流操作。



- 3 点击 Stop 停止返流操作, 或者点击 Cancel 停止返流并关闭对话框。此冲洗流程不会自动停止。

二 . 清洗流动室 (Clean Flow Cell)

1. 关闭 Stream。
2. 将普通喷嘴更换成闭合喷嘴。
3. 选择 Cytometer > Cleaning Modes > Clean Flow Cell。
4. 根据提示, 手动在上样架上放一支装约3ml洗液 (FACSClean/ddH2O) 的试管, 然后点击 "OK" 。



5. 仪器将利用清洗液对进样管和流动室进行清洗。当清洗完毕信息出现后, 点击 "OK" 。清洗完成后, 清洗液留在进样管和流动室内, 如使用 FACSClean 溶液请等待约 5 分钟后,

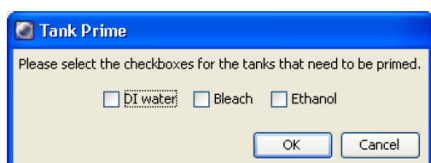
再用 ddH₂O 执行三次 Clean Flow Cell。（每日关机使用 ddH₂O 在流动室里浸泡过夜，第二天再正常开机）。

6. 打开液流，等待 10 分钟后进行后面的操作或执行关机程序。

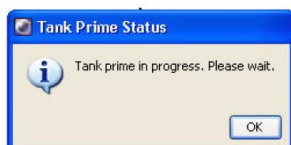
三．小液体桶重新灌液后排气 (Prime after Tank Refill)

5L 的塑料液体容器断开与液流车的连接以便充满时，使用溶液箱充满后准备的指令来准备液路。

- 1 关闭 Stream。
- 2 选择 Cytometer > Cleaning Modes > Prime After Tank Refill。
- 3 选择对应插拔过的容器，然后点击 OK。



流式细胞仪将对特定管路排气。在液体箱准备过程中将出现以下进程信息。



- 4 当排气完毕后点击 OK。



四．无菌清洗 (Prepare for Aseptic Sort)

如果要对完整的鞘液路径进行消毒，使用无菌分选的准备指令。该操作用漂白剂，DI 水和乙醇清洗系统。

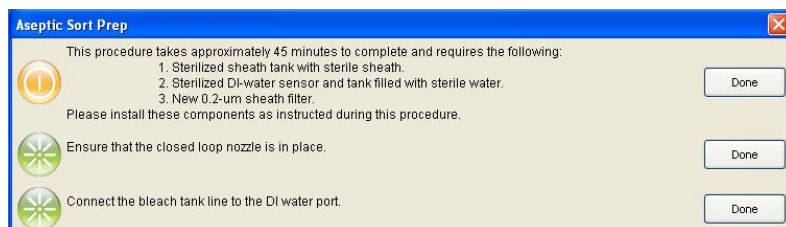
为了获得完全消毒，在无菌清洗之前，灭菌鞘液桶和 DIWater 桶：

1. 清空鞘液桶和 DIWater 桶
2. 用 2L, 1L 75%酒精分别浸润鞘液桶和 DIWater 桶内表面后浸泡过夜
3. 第二天，分选仪器房间紫外灯照射灭菌
4. 清空鞘液桶和 DIWater 桶里的酒精

5. 用过滤灭菌后的 ddH₂O 分别涮洗三遍
6. 用过滤灭菌后的 PBS 涮洗一遍鞘液桶
7. 将鞘液桶和 DI Water 桶里分别装入 8L PBS 和 3L 的 ddH₂O
8. 将液流车上对应的小桶里加入对应的溶液
9. 注, 鞘液高压灭菌条件: 125°C, 15 psig, 30 minutes

无菌清洗管路

- 1、准备好无菌鞘液桶、过滤灭菌鞘液
- 2、准备好无菌DI Water桶、过滤灭菌水
- 3、准备好一个新的鞘液过滤器。
- 4、在 “Cytometer” 菜单下选择 “Cleaning Modes (清洗模式) > Prepare for Aseptic Sort (无菌分选制备)” 选项。下列提示信息即出现, 按屏幕上的提示信息一步步操作,



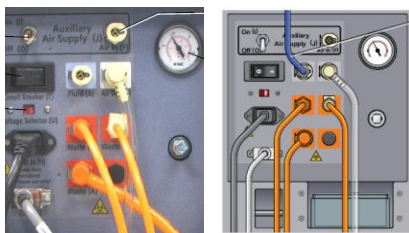
- 5、1-3步已完成, 直接点击done。
- 6、确认装有O圈的闭合喷嘴在流动检测池上, 点击done。
- 7、将DI Water桶和BD FACSClean桶的液路从液流车上的快速接口上断开, 将BD FACSClean桶的液路连接到DI Water桶的快速接口上, 如下图所示, 点击done。

无需变动两个桶的液面感应器。

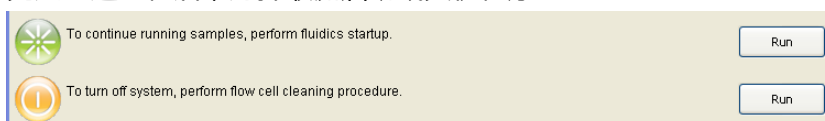


- 8、将BD FACSClean桶的液路从DI Water桶的快速接口上断开, 将DI Water桶和BD FACSClean桶的液路连回各自的快速接口上, 点击done。
- 9、将鞘液的液路从鞘液过滤器远离鞘液桶的一端断开, 将其连接到液流车侧面面板的 “Fluid (液流)” 接口上, 如下图所示, 点击done。

此清洗过程耗时大约20分钟。



- 10、将鞘液的液路从液流车侧面面板上取下，连接到一个新的鞘液过滤器上。
- 11、取下旧的鞘液过滤器，将连有新鞘液过滤器的鞘液液路连回鞘液桶。
- 12、完成上述过程后，选择液流启动或关机程序。



非仪器内部的定期维护流程流程

一，鞘液桶上的滤器排气

每周一次，鞘液滤器上侧方都有一个螺旋冒，旋松可以进水将气体排掉。

- 1 将滤器竖直放正。
- 2 在滤器下方放一容器或吸水纸以便接收溢出的液体。
- 3 轻拍滤器使其中的气体走至螺旋冒出口处，再稍扭松螺旋冒，让液体将气体挤出。
- 4 关紧螺旋冒。
- 5 搽干净所有溢出来的液体。

二，流动室预防性清洗

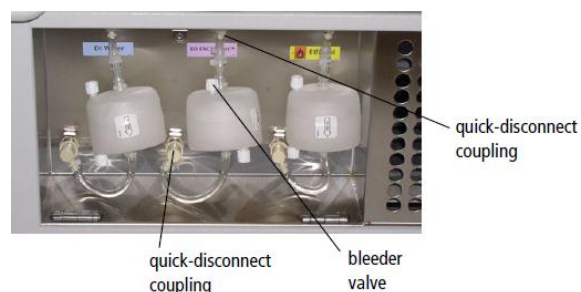
每月执行一次，或根据样本和使用情况更高频率执行，执行此预防性流动室清洗流程，以保持流动室的洁净。在当日仪器使用完毕关机前执行。

- 1 关闭液流。
- 2 将普通喷嘴更换为闭合喷嘴，并确定闭合喷嘴上的 0-ring 是正常放置的。
- 3 选择 Cytometer > Cleaning Modes > Clean Flow Cell.
- 4 放置一管 3 mL 0.5-1%有效氯的 Clean，点击 OK. 管子上去，洗液充满流动室。
- 5 点 OK.
- 6 浸泡5min后用ddWater执行3次此流程。
 - a 关闭仪器电源。
 - b 退出 BD FACSDiva 软件，关闭电脑。
 - c 让ddH2O留在流动室里浸泡过夜。

三，液流车上的滤器更换

每6个月需要更换这些滤器。

图 6-7 液流过滤器



- 1 断开滤器的上下快速接头，取下滤器，见图6-7.
- 2 同样通过快速接头连接上新的滤器。标上更换日期.
- 3 旋松滤器侧上方的螺旋冒，让液体进入滤器.
- 4 关紧螺旋冒.
- 5 擦干所有溢出来的液体

四，更换鞘液滤器

每3个月需要更换一次鞘液过滤器，或观察到FSC vs SSC 散点图上的杂质信号明显增多时也提示需要更换.

- 1 关掉液流.
- 2 通过断开两头的快速接头取下滤器，见图 6-8.

图 6-8 鞘液滤器

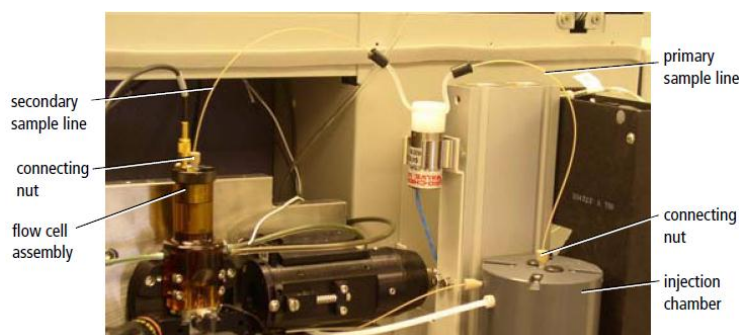


- 3 使用扳手将蓝管末端和滤器相接处断开.
- 4 将新滤器末端螺旋纹处缠上生料带(Teflon tape).
- 5 将取下来的蓝管扭紧到新的滤器上.
- 6 注意新接上的滤器的液流流向和原来的相同。标上更换日期.
- 7 扭松螺旋冒, 让液体充满滤器.
- 8 关紧螺旋冒.

五，更换进样管路

离样本管近的那段进样管(Primary sample line)每 4 - 6 个月换一次，或样本流速明显下降时（通过冲洗方式无法改善）提示也需要更换。从软管阀到流动室这段样本管(secondary sample line)在折到或发现堵时才需要更换。

图 6-9 Primary and secondary sample lines



为了耐受 BD FACSAria II 的高压系统，样本管道使用了两件式压力适配件，有锥形的螺冒和套圈，用于固定。第一段进样管有 12 英寸左右长，第二段 7 英寸左右长。备件箱会备有一些，锥形的螺冒和套圈可以继续使用。

注：所有生物样本和材料接触的地方都有潜在的致病危害，进行必要的如防护服、手套之类的防护。

A，更换第一段进样管路

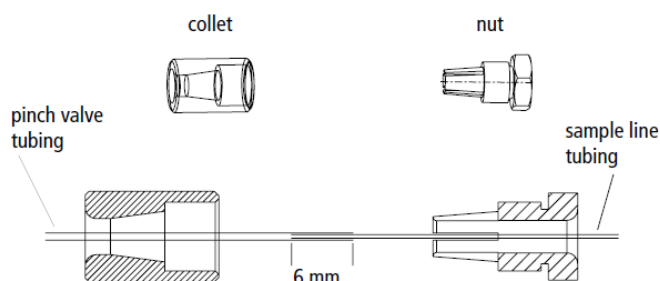
从备件箱中取出12英寸的长的进样管，进样管在仪器上的两端连接方式有所不同，所以更换过程会有所不同：

夹管阀这头的组装

第一段进样管，有个夹头将进样管和夹管阀处的软管相连，执行如下操作更换第一段进样管。

- 1 Unload样本管，关掉液流。
- 2 扭松和软管连接的黑色夹头上的螺冒(下图中的collet)，分开黑色夹头的两部分 (collet 和nut)。
- 3 将软管从nut上拉下，再将软管和进样管拉开，见图 6-10。
- 4 换上12英寸的新的进样管。
- a 将nut这个组件套到新的进样管上。

图 6-10 Collet nut 组装到夹管阀处的软管上



- b 将软管套到进样管上，套进长度在 6mm 左右。
- c 将黑色固定的组件中的螺钉nut 的卡扣部分套在软管上，直到再无法进一步套进过多为止。
- d 将黑色固定组件中的collet拧到nut上，拧紧。

第一段进样管在进样仓这端的更换

在进样仓这端的进样管，也是有个固定的组件帮助将进样管固定于进样仓顶上。

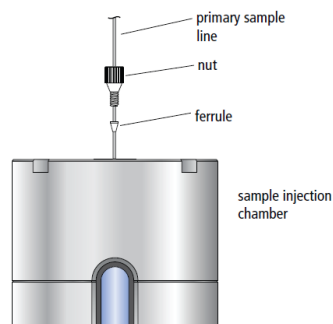


图 6-11 第一段进样管接入进样仓

- 1 Unload样本管，关掉液流。
- 2 如果进样管末端连有样本过滤器，请先取下（按照Cytometer > Installing or Removing a Sample Line Filter 的流程执行）。
- 3 拧松螺钉（nut）进样管路拉出进样仓。
- 4 确认白色锥形的套圈（ferrule）连在进样管上，见图 6-11 所示。此套圈也有可能会留在进样仓顶上的凹槽内，可以使用下图工具（置于备件箱内）将其取出。如果套圈（ferrule）有损坏，需要更换新的（备件箱里有）。



图 6-12 套圈取出工具

钉 nut 取下。

- 6 将螺钉 nut 和套圈ferrule套进样管上，留下大致12.7 cm 长样管在进样仓外，可以根据样本型和厚度进行调整，可以以这个为基准。

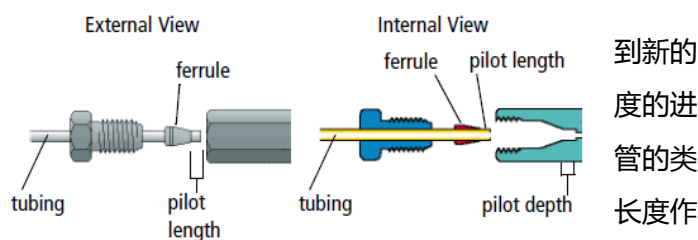


图 6-13 连接固定部分的组成

- 7 将进样管插入进样仓顶部对应的孔，并不断往下送，小心不要把进样管弄折了。送到合适位置后，拧紧螺钉nut。无需使用工具去拧，拧的过紧可能会损坏进样管。
- 8 检查进样管两个末端的连接情况，不会有液体溢出。根据需要Unload样本管，关闭液流，重新固定。如果固定紧以后仍然溢出液体，则需要更换新的套圈（ferrule）。确保所有连接处都是连紧的，否则在高压工作下，可能会有生物样本喷出。
- 9 Verify the length of the sample line. 确认进样管进入进样仓里的长度是合适的，样本管load上去之后，进样管插到样本管底部同时不能有弯曲。根据需要再拧松进样仓顶部的螺钉（nut）调整进样管的高度）。

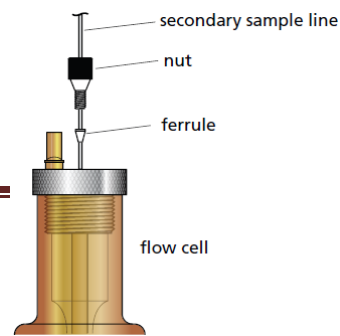
B，更换第二段进样管

同样由于两末端的连接方式不同，分两部分介绍：

夹管阀端

此末端的更换方式同第一段进样管。

流动室端



- 1 断掉液流.
- 2 拧松流动室顶部的螺钉 (nut) , 拉出进样管. (见右图.)

- 3 确认锥形的套圈 (ferrule) 在进样管上.

如果套圈留在了凹槽里请用工具取出. 发现损坏需要及时更换.

- 5 将螺钉nut和套圈ferrule取出套到新的进样管上, 末端穿出套圈ferrule约0.25cm. (见图6-13).

- 6 将进样管从流动室顶部的凹槽内插入, 往下送到合适位置.

- 7 拧紧螺钉nut. 无需使用工具, 拧的过紧, 可能会损坏进样管.

- 8 检查确认连接紧密, 没有液体溢出.

打开液流, Load 一管 DI water, 确认没有水溢出. 根据需要放下样本管, 关掉液流, 重新拧紧各固定处. 拧紧后仍然有液体溢出, 则需要更换套圈ferrule.

确保所有连接处都是连紧的, 否则在高压工作下, 可能会有生物样本喷出.

六, 更换空气过滤网

BD FACSAria II 仪器上有两个空气过滤网: 一个在分选收集仓, 一个在右侧门上.

- 更换分选收集仓处的, 直接拉出旧的, 插入新的即可.
- 更换右侧门上的 (图 6-15), 拧松滤网上面角落处的螺丝, 将旧的滤网取下. 装上一个新的滤网, 拧紧螺丝固定. 一年需要更换一到两次, 根据环境空气的洁净度来决定.

图 6-15 更换空气过滤网



七, 更换鞘液桶上气路的空气过滤器

周期性检查鞘液桶上气路连着的空气过滤器, 是否有滤膜碎掉或变色的情形. 建议每6个月更换一次, 或根据需要更好频率更换.

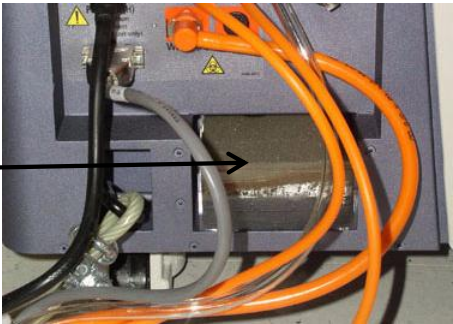
图 6-16 鞘液桶上的气路过滤器



- 1 关掉仪器.
- 2 拉掉空气滤器两端的连接.
- 3 按照正确的方向连接上新的空气过滤器.

八，检查液流车上的水盘

每周检查清空液流车侧面的水盘.



BD FACS Aria 不定期维护流程

有许多仪器部件需要不定期维护、检查和更换。请见下表：

Table 6-3 不定期维护内容

维护内容	要求频率
更换喷嘴	根据样本类型改变的需要
清洗喷嘴	液流出现异常时常提示喷嘴有堵
闭合喷嘴的维护	根据需要
安装或移除样本过滤器	样本过滤器需要安装或更换时
夹管阀软管更换	根据需要
摄像头镜头清洁	在两个摄像头的窗口里看到异常成像时
取下偏转电极板	根据清洁电极板的需要
润滑样本管底座上的O-Ring	当O-ring 干掉影响上样密封性时
清洁光学滤片	在更换滤片时根据需要

BD FACSria 常见问题答疑

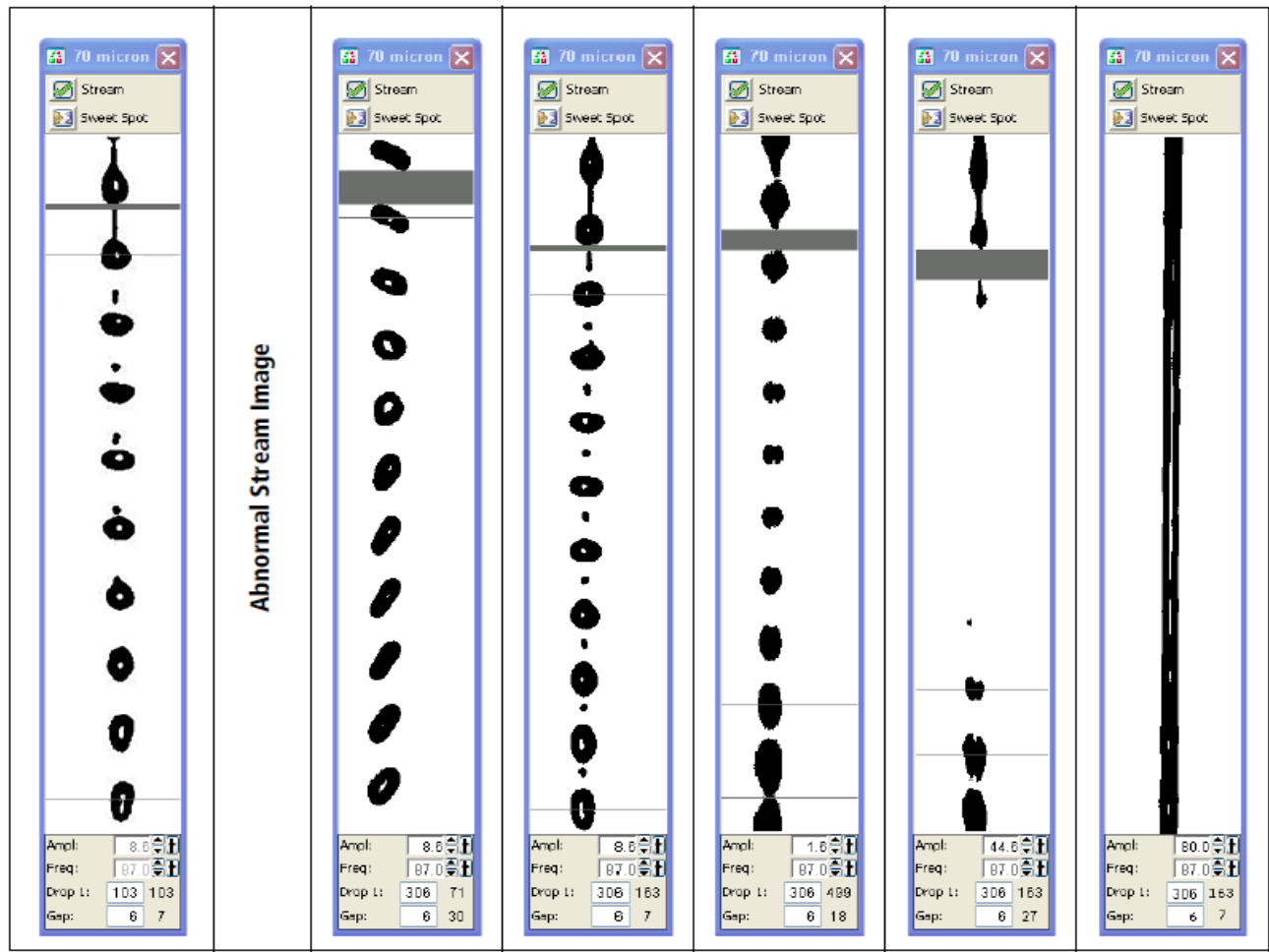
关于液流的问题

现象	可能的原因	解决方案
液流不流入废液槽中心	不同喷嘴孔的位置差异	如果由于新换一个喷嘴造成的，使用螺丝起拧松分选仓两侧的螺丝，调整整个分选仓的角度，使得液流落入废液槽的中心位置，拧紧螺丝
	喷嘴安装合适	关闭液流，取出喷嘴，确保 O-ring 仍在，重新径直平滑插入喷嘴，旋转固定扭至 12 点位置
	喷嘴堵塞或损坏	关闭液流，取出喷嘴，显微镜下观察 • 如果有污物，超声清洗喷嘴 • 如喷嘴损坏，需要更换
液流无法开启或液流成滴状滴下	喷嘴安装不合适	关闭液流，重新安装喷嘴
	喷嘴堵塞或损坏	关闭液流，取出喷嘴，显微镜下观察 • 如果有污物，超声清洗喷嘴 • 如喷嘴损坏，需要更换
小桶液流控制失灵或点后无作用	小桶液体过滤器有气栓	执行 Prime 流程排气； 如不管用，取下过滤器安装 bypass 直管，重新执行 Prime 流程，直至液流正常进入管道； 之后取下直管换上滤器再执行一次 Prime 流程
	工作站和主机之间通讯异常	退出软件重进
开启液流，不起作用	鞘液里液体过少，或空了	填充鞘液； 鞘液少时会有警示出现，如警示不被消除，15min 后液流会自动断掉
	鞘液管路里有气泡	执行 Prime 流程排气
	鞘液过滤器里	排过滤器里的气泡

	有气泡	
	过滤器干掉	缓慢打开过滤器一侧的排气按钮，直至滤器充满液体
中心液流周围有散在液流	喷嘴安装不合适	重新安装喷嘴，径直平滑插入，不要左右摇晃挪动
液流不稳	流动室或喷嘴上有污物	取下喷嘴打开液流冲 10s； 超声清洗喷嘴重新安装
	液流管道接在关机酒精桶上	将液路和气路从酒精桶移到鞘液桶重新执行液流启动流程
喷嘴周围有液体溢出	O-ring 损坏	更换新的 O-ring
	喷嘴安装不当	关闭液流，取下喷嘴，重新安装
	以前有 O-ring 遗留在插孔里	取下喷嘴，用棉签清洁插孔
液流在过低位置断开	流动室里有气泡	打开流动室仓门，观察流动室是否有气泡，如气泡可见，关闭液流等几秒，再次打开液流
	震荡振幅加强开关打开	关闭加强开关
	震荡振幅调的过低	调高振幅，直至断点到达合适位置。如果振幅调到 70 以上才能达到合适位置，提示流动室里可能有气泡
	喷嘴安装不当	关闭液流，取出喷嘴，确认 O-ring 在且位置合适，重新安装固定
自动液滴延迟调教问题	液流不稳	在做液滴延迟调教前要确保液流是稳定的
	小红激光和液流正交不好	调节红激光使其和液流正交，尤其是保证中心和左路液流光斑最亮
	每秒事件数过低或过高	调节流速使每秒事件数合适

关于液流断点问题

使用下图帮助分析。



正常液流状态

异常液流状态	可能原因	喷嘴安装不当	喷嘴安装不当或孔不在中央	堵塞	摄像头镜片湿了或脏了	震荡加强开关 压力和喷嘴尺寸不吻合
	解决办法	重装喷嘴	重装喷嘴	喷嘴超声清洗，重装	擦干净	关掉震荡加强开关 调整鞘液压力设定

关于分选常见问题

现象	可能原因	解决办法
Sweet Spot 功能 点开后，断点跳 上跳下	内部管道酒精残留	液流打开多流一段时间，等待液流稳定
	Drop 1 靶值和实测值距离 太远	把 Drop 1 的实测值作为靶值输入； 当靶值有变化时建议液滴延迟要重新设定
	喷嘴堵塞或安装不当	超声清洁后重新安装
	摄像头镜面有水或污物	清洁干净
	鞘液滤器有气泡	排滤器气泡
	流动室和喷嘴有污物	取下喷嘴后打开液流 10s，超声清洗喷嘴，重 新装上
侧液流观察窗口 里中心光斑模糊	摄像头镜面脏	清洁干净
	液流和小红激光非正交	调节红激光旋钮至光斑最亮
电击板加电时， 中心液流偏出废 液槽中心	电击板电压调节滑条过高或 过低	调节滑条位置使中心液流归位
	电极板或分选仓表面有盐液 或结晶	清洁干净
电极板之间有电 弧产生	盐桥效应	清洁干净电极板、及其后面周边区域
微孔板分选失败	侧液流偏转不够	调高远左路的偏转电压
	防溅板未安装	安装防溅板
侧液流完全反向 变化，即滑条调	滑条调得过近或过远	调滑条到合适位置正确控制偏转角度

大偏转变小		
分选设定窗口里的分选细胞数不更新	查看的是其他样本管对应的分选设置窗口	打开或创建当前管对应的分选设定窗口
不偏转或偏转不够	电压不够	侧液流滑条调到更大 增大电极板电压
不偏转或偏转不够 中心液流或侧液流周围有杂散液流	液流加电电线松动或脱落	插紧流动室右侧的该电线
	盐桥效应	关闭液流，清洁分选仓和电极板
	Drop 1 实测值超出范围，分选暂停	等待 Sweet Spot 自动调节振幅数值，使 Drop 1 实测值回归范围； 分选中如此现象发生频繁，提示流动室、喷嘴上有污物，需清洁
	喷嘴安装不当	关掉液流，取出喷嘴，检查 O-ring，平滑径直插入喷嘴
中心液流或侧液流周围有杂散液流 分选按钮不起作用	Sweet Spot 关闭	Sweet Spot 开启
	分选模式不合适	分选模式根据实验情况重选或重设
	2nd, 3rd, 或 4 th 液滴校正值不合适	调整 2nd, 3rd, 和 4th 液滴校正值的设置，使中心液滴更集中
	对该喷嘴而言，细胞过大	更换更大尺寸的喷嘴
	没有激活对应的样本管	激活当前管
在分选设置窗口里添加分选门的列表里没有需要	使用 snap-to gate 的方式设定的门	用其他设门方式重画门

的门		
在分选设置窗口里添加分选门的列表里没有需要的门	查看的是其他样本管对应的分选设置窗口	打开或创建当前管对应的分选设定窗口
分选窗口显示冲突量过高	每秒事件数太高	降低流速或稀释样本
分选窗口显示冲突量过高	门的设置有冲突	查看确认门的逻辑关系
分选速度变化很大	分选模式里 Purity mask 设定过高	降低 purity mask 的设定值
	流速设定过高	降低流速
分选结果异常	液滴延迟不合适	重新执行延迟设定过程
分选结果异常	分选模式选择不合适	确认合适的分选模式
	Sweet Spot 关闭	分选过程中保持 Sweet Spot 打开
	液滴延迟设定好后，Drop 1 实测值又有较大变化	每次重新设定 Drop 1 值时，建议重新进行液滴延迟设定
	液滴延迟设定好后，激光延迟又有新的变化	每次改变激光延迟时，建议重新进行液滴延迟设定
	门的逻辑关系不对	检查确认门的逻辑关系
	目门和子门内细胞分别分到不同管	如果目门和子门内细胞分别分到不同管，Diva 软件会将子门内细胞丢弃，不做分选； 应该在目门下设定另一个子门，可以定义为该

		子门取非即 NOT (child)，这样就会子门里的细胞分到一侧，子门以外的木门内细胞分到另一侧
--	--	--

关于采样常见问题

现象	可能原因	解决办法
点击 Load 或 Acquire 后，图上没有颗粒出现	激活的不是当前样本管	激活当前样本管
	激光挡条未打开	确保流动室仓门在采样时是关闭的
	激光关闭	打开激光电源
	激光延迟设定不合适	重新质控设定激光延迟
	观察的是另一个样本管对应的图形	在 Browser 窗口里双击当前样本管，显示该管的信息
	图上关联的门不合适	右击改图，在 show population 中确定勾选显示合适门内细胞
	门内细胞颜色设定不合适	- 右击改图，使其显示 All events - 给该图上显示的门设定合适颜色 - 确定门设定的先后顺序
	当前的 Configuration 和仪器上光学实物不匹配	使两者一致
	样本管里没有细胞	更换新的样本管或往该样本管里加入待测细胞
	样本未预混匀	升高样本混匀强度
	进样针堵塞	上样针反冲，或根据需要更换
	样本过滤器堵塞	更换样本过滤器

	阈值参数设置不合适	阈值设定在合适的参数上
	多个阈值，设置不合适	检查多个阈值时，不同参数间 And/Or 的逻辑关系是否设置合适
	阈值过高或过低	调节阈值大小
	光学滤片未装紧	装紧滤片
	FSC area scaling 不合适	确认 FSC-H 和 FSC-A 的关系
没有荧光信号	仪器的 configuration 和光学物件不符	更换滤片或创建新的 configuration
	安装了错误的滤片或滤片未安紧	确认滤片和染料的匹配情况；滤片安紧了
	激光延迟设定不对	重新质控，调整激光延迟
A 信号过低	Area scaling 太小	用样本调节每根激光合适的 area scaling 值
图上出现异常群体	门的逻辑关系不对	检查确认门的逻辑关系
	门关联不对	右击图，在 show population 中确定勾选显示合适的门内细胞
	门画的顺序不对	确认该门内细胞未被其他门隐藏，右击该图 选择 Order Populations by Count
进样速度不停在变	样本聚集	过滤样本
	进样底座 O-ring 破损	更换
	样本污染	重染样本，并确保样本管是干净的
	鞘液过少	填充鞘液

每秒事件数异常之高	阈值设定过低	调高阈值
	样本太浓	稀释样本
	流速过高	降低流速
	流动室有气泡	断掉液流，等几秒，再打开
每秒事件数过低	样本混匀不充分	升高样本混匀设定强度
	阈值过高	调低阈值
	样本过稀	浓缩样本
	样本针堵塞或折损	上样针反冲，或根据需要更换上样针
		观察上样针是否有折损，有就更换
	上样针安装不当	重新安装
	样本聚集	过滤样本
群体形态异常或高 CVs	电脑内存满	比较 Diva 软件里显示的处理颗粒数和阈值以上颗粒数，如果过低，需要退出软件重启
	仪器设置有问题	优化参数设置
	流速过高	降低流速
	Window extension 过低	升高 Window Extension
	流动室有气泡	断掉液流，等待几秒，再开启液流
	喷嘴堵或脏	超声清洗喷嘴

	流动室脏	安装闭合喷嘴，用去污剂如 100% Contrad 70 执行 Clean flow cell 流程，浸泡流动室 5min，之后用 ddH2O 执行 Clean flow cell 3 次后，再更换喷嘴打开液流
	样本制备不好	重新制备样本
	Area scaling 太低	用样本调节合适的 Area scaling 各值
图上显示出过多碎片	阈值过低	升高阈值
	样本里死细胞或碎片过多	显微镜下镜检样本
	样本被污染	重新制备样本，确认样本管干净
电子丢失率过高 (如>10%)	Window extension 设定过高	降低 window extension 值
	阈值过低	升高阈值
	每秒事件数过高	降低流速
	样本聚集	过滤样本
	样本过浓	稀释样本
门内细胞少于预测	Window extension 设定不合适	调节 window extension
	激光延迟不对	重新质控调校激光延迟
	图局部放大了	图形复原，或调整门的大小
	门外也有符合条件的细胞	画门时要确保压在坐标轴上的细胞也被圈入
升高阈值，A 的信	Window extension 值	轻微升高 window extension 使 A 信号达到最大

号减弱	过低	注： window extension 过高，电子丢失率会升高，CV 值会变大
A 信号超出线性范围，H 信号在线性范围	Area scaling 太高	降低 area scaling 使 A 信号回归线性范围，一般会将 A 调成和 H 相等
不能删除参数、阈值、补偿值或比值设定	未选中预删除行	选中预删除相
	数据已记录	创建新样本管后删除

关于液流系统常见问题

现象	可能原因	解决办法
系统预冲时没有液体进入液流管路	鞘液或液流车上的过滤器有气栓	移除对应通路上的滤器，安装旁路直管，反复执行 Prime After Tank Refill 流程，直至观察到液体进入液路。之后将旁路直管换回滤器后再执行一次 Prime After Tank Refill 流程
无菌清洗流程失败	滤器有气栓	排气
	液流管路脱落	确保液流管路连接通畅
液流车压力表读数 <80 psi	漏气	呼叫 BD 工程师
液流车压力表读数 >100 psi	Regulator 设置不当	呼叫 BD 工程师
液流车下面或侧门处有液体渗出	从泄压阀处浓缩产生	这是个正常现象，由环境中空气压缩产生，环境湿度大时，压缩水产生更多，建议每日擦拭清洁
	滤器的排气阀未关紧	关紧所有液体和鞘液过滤器上的排气阀

	液流管路断裂	呼叫 BD 工程师
进样仓无法正常上样闭合，提示 BISH 或 BISO 出错信息	样本架底座上的 O-ring 太干	O-ring 和样本管底座底部涂抹润滑剂

关于电子系统常见问题

现象	可能原因	解决办法
联机不成功	流式主机关闭	打开主机
	主机和工作站之间通讯问题	- 退出软件重新进入 - 如果重新进入未解决，主机全被关掉 10s 后再重新打开主机 - 主机和工作站全部重起
	主机和工作站之间的通讯线链接松动	拔下重新插紧
	IP 地址变动	输入正确的 IP 地址。呼叫 BD 工程师
状态栏报错“Master DAQ Overflow”	每秒事件数过高	降低流速或升高阈值
	流动室脏	清洗流动室
状态栏报错“Cytometer not responding”	原因不明	参考上面通讯错误解决办法

BD FACSAria 使用 FACSDiva 软件质控

利用 FACSDiva 软件质控，调节激光延迟、面积因子的调节，记录数据长期追踪仪器在信号强度、CV 值等方面性能的变化。

设置仪器的 Configuration

仪器的 configuration 包括:

- 染料
 - 滤光片
 - 鞘液压力(一定要和 sort setup 里匹配)
 - 喷嘴尺寸
 - Window extension
1. 选择 Cytometer > View Configurations
 2. 选择合适当天实验的 Configuration
 3. 点 Set Configuration , 点 OK
 4. File > Exit 退出 CS&T 界面，重新回到 Diva 界面

如果 Configuration 鞘液压力设置和 Diva 软件里的不同，会出现如下警示

Figure E-1 退出 CS&T 时可能会出现的警示窗

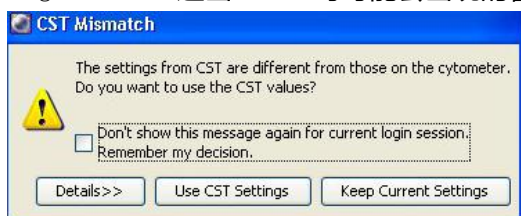
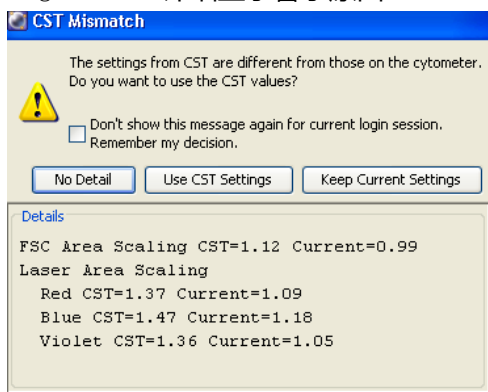


Figure E-2 详细显示警示原因



准备质控微球

Table E-1 质控微球信息

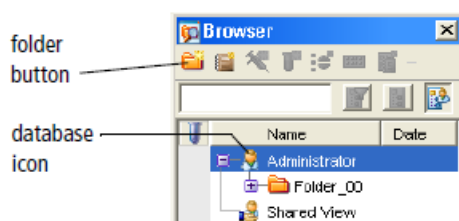
稀释液 BDFACSFlo TM	品名：SPHERO Rainbow Particles (3.0-3.4 microns)	货号
1 mL	2 to 3 drops	556291

调节合适的激光延迟和面积因子

面积因子和鞘液压力、细胞大小有关，不同类型的样本会有所不同。

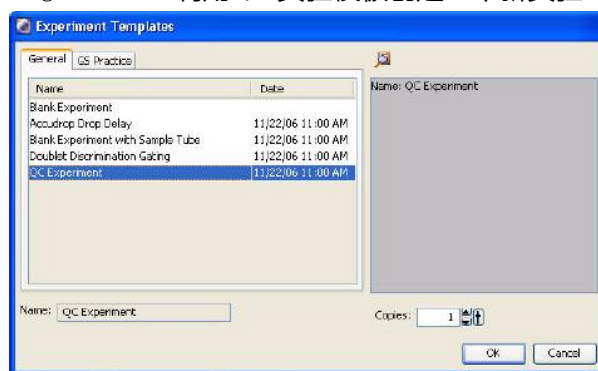
设置质控实验

1. 在工作区工具条上双击对应图标，展示所有需要的窗口 Browser (), Cytometer (), Inspector (), Worksheet (), 和 Acquisition Dashboard ()。
2. 在 Browser 窗口下创建一个文件夹命名 *Cytometer QC*



3. 利用 QC 模板创建一个新实验

Figure E-3 利用 QC 实验模板创建一个新实验



4. 实验命名上加入年月，样本名输入质控微球名称（如 Rainbow beads），样本管以当日日期命名

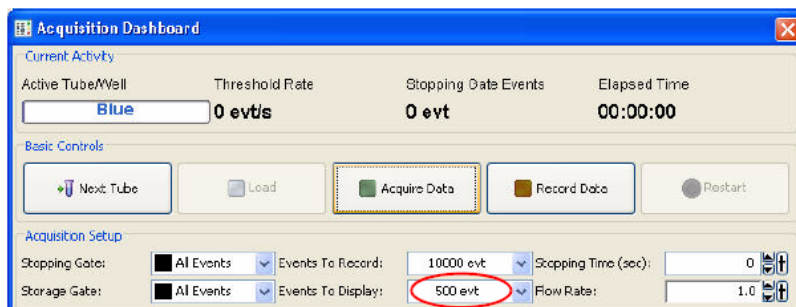
调节蓝激光对应的面积因子

1. 双击打开质控实验，确认面积调节因子需要的图形展示在 worksheet 里

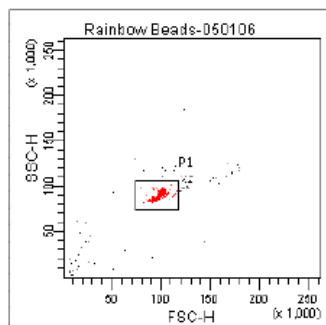
2. 激活对应日期命名的样本管



3. 加载对应的质控微球管
4. 点采样控制面板 (Acquisition Dashboard) 上的 Load 样本管升入进样仓, 密闭, 并自动进样
5. 设定图上显示颗粒数为 500 evt



6. 调节 FSC/SSC 电压使质控微球落入 P1 门内, 在 FSC-H vs SSC-H 图上大致 100 x 103 位置



7. 调节 FSC 面积因子直到 FSC-A 和 FSC-H 信号强度相当, A<H 调大面积因子, 反之调小

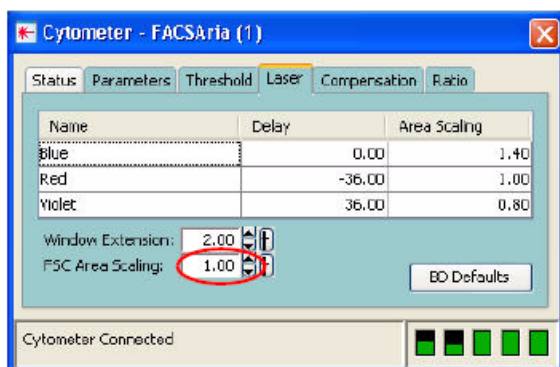
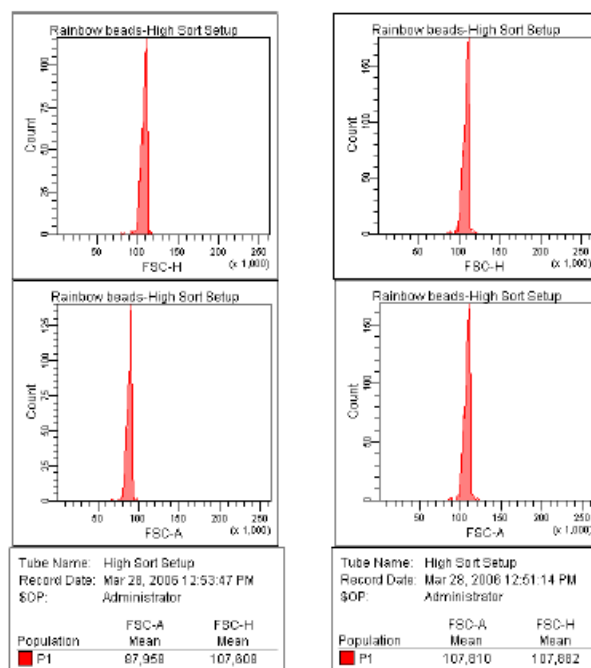
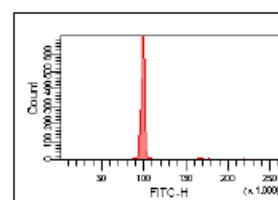


Figure E-4 FSC 面积因子不合适(左) 和合适的 (右)



8. 调节 FITC 电压，将 FITC-H 信号调至 100×10^3 位置



9. 调节蓝激光对应的面积因子，直至 FITC-A 和 FITC-H 信号强度相当，A<H 调大面积因子，反之调小

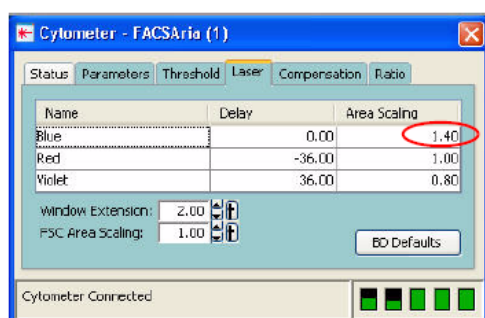
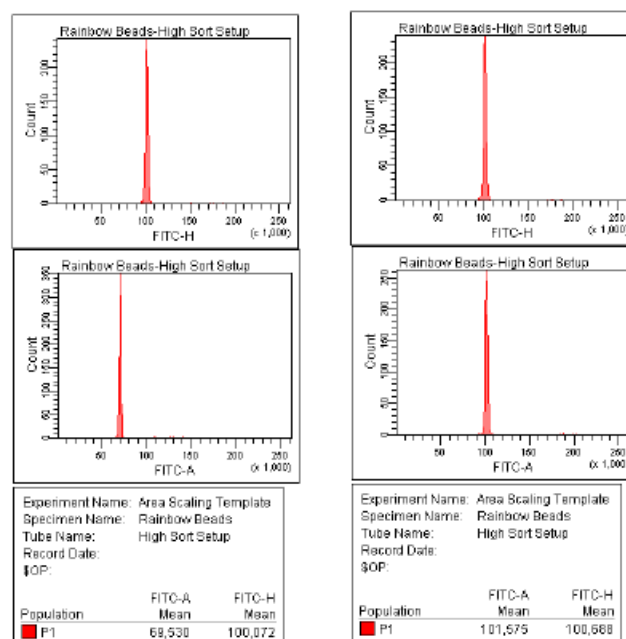


Figure E-5 蓝激光面积因子调之前 (左) 和调之后(右)



调节红激光、紫激光的激光延迟和面积因子

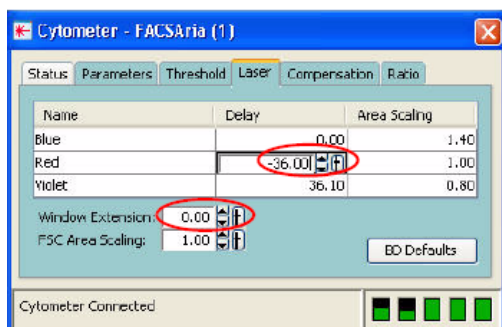
所有激光的时间延迟都是以蓝激光为基准的，所以蓝激光的延迟默认为 0。其他激光的延迟可能为正可能为负值。

1. 调节 APC 电压使 APC-H 信号强度在 100×10^3

2. 调节红激光延迟

激光延迟和面积因子会保留前一次的设置，原则上不会变化太大。正确的激光延迟对应的信号强度是最亮的。

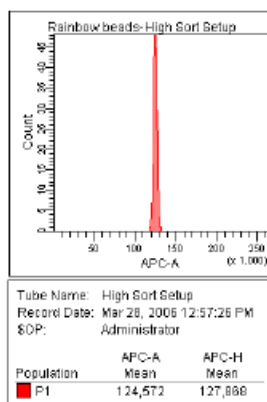
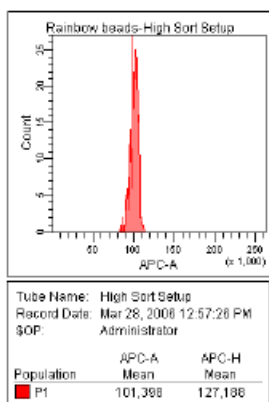
- a. 点击进入 Cytometer 窗口下的 Laser 界面
- b. 将 window extension 调到 0
 - 如果 APC-A 信号没变，直接进入步骤 e
 - 如果 APC-A 信号降低，进入步骤 c
- c. 点击红激光对应的延迟数



d. 调节此数值使 APC-A 信号达到最强

调之前

调之后



e. 把 window extension 设回 2

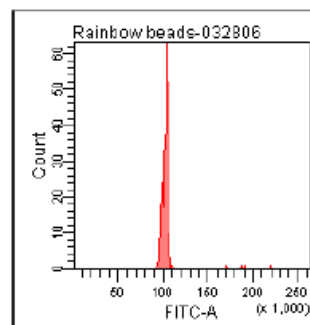
3. 调节红激光的面积因子直至 APC-A 和 APC-H 信号强度相当

4. 重复步骤 1-3，调节紫激光或其他激光的延迟和面积因子

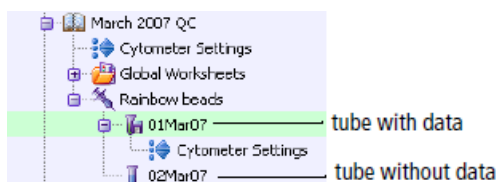
记录质控数据

第一次使用 QC 实验模板时，将每个通道的信号都调至 100,000 位置，所有相关设置都可持续用于以后的质控过程。

1. 显示 QC worksheet
2. 调节 PMT 电压使信号强度都位于 100×10^3
3. 设定 Flow Rate 为 1.0
4. 激活第一管，点击 Record



收集好数据的管子图标有变，也包含了当时的采样条件。



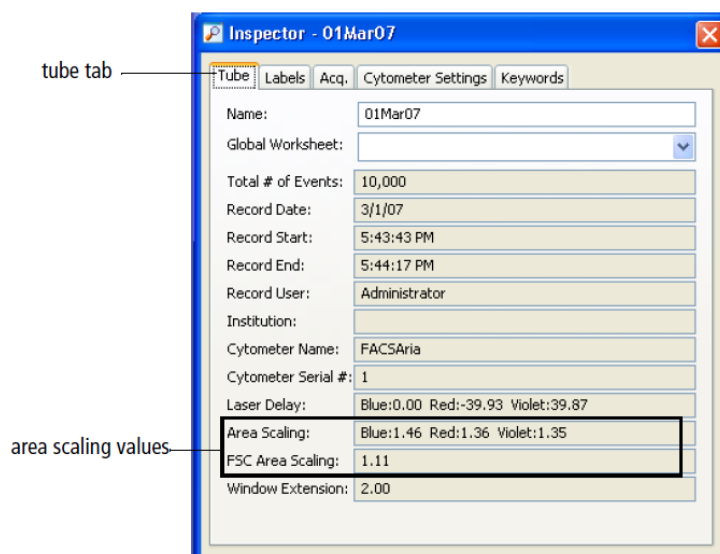
5. 数据记录完成，点击 Unload，取下样本管。
6. 保存质控结果。格式参考图 E-6。包括各通道 mean 值和 cv 值。

QC实验反复用

之前设置的 QC 实验可供日后反复使用，将每次质控数据都收集在同一个实验下，很容易导出多次的质控结果到 Excel 表格，长期监控。

- 1 确认选择对应的 configuration.
- 2 打开 QC 实验.
- 3 右键点击最近一次的 tube，选择 Duplicate without Data.
- 4 样本用当日日期命名.
- 5 检查和调节 area scaling 和 laser delay.
 - a 打开显示 Area Scaling 调节用的 worksheet.
 - b 准备并 Load 质控微球.
 - c 检查和调节 FSC 和蓝激光的 Area Scaling.

Tip 激活上次收集的质控数据管，在Inspector窗口里点开Tube tab，可以看到当时的 area scaling值，输入Cytometer窗口的Laser tab里继续使用。



d window extension 设 0，调节红激光、紫激光或近紫外激光延迟。

e window extension 设 回2。

f 检查和调节红激光、紫激光的Area Scaling值。

6 Flow Rate 调成 1.0。

7 记录 10,000颗粒数。

不要调节任何通道的放大电压，FSC-A vs SSC-A 图上门的位置可能需要调整。

Figure E-6 Recorded QC data

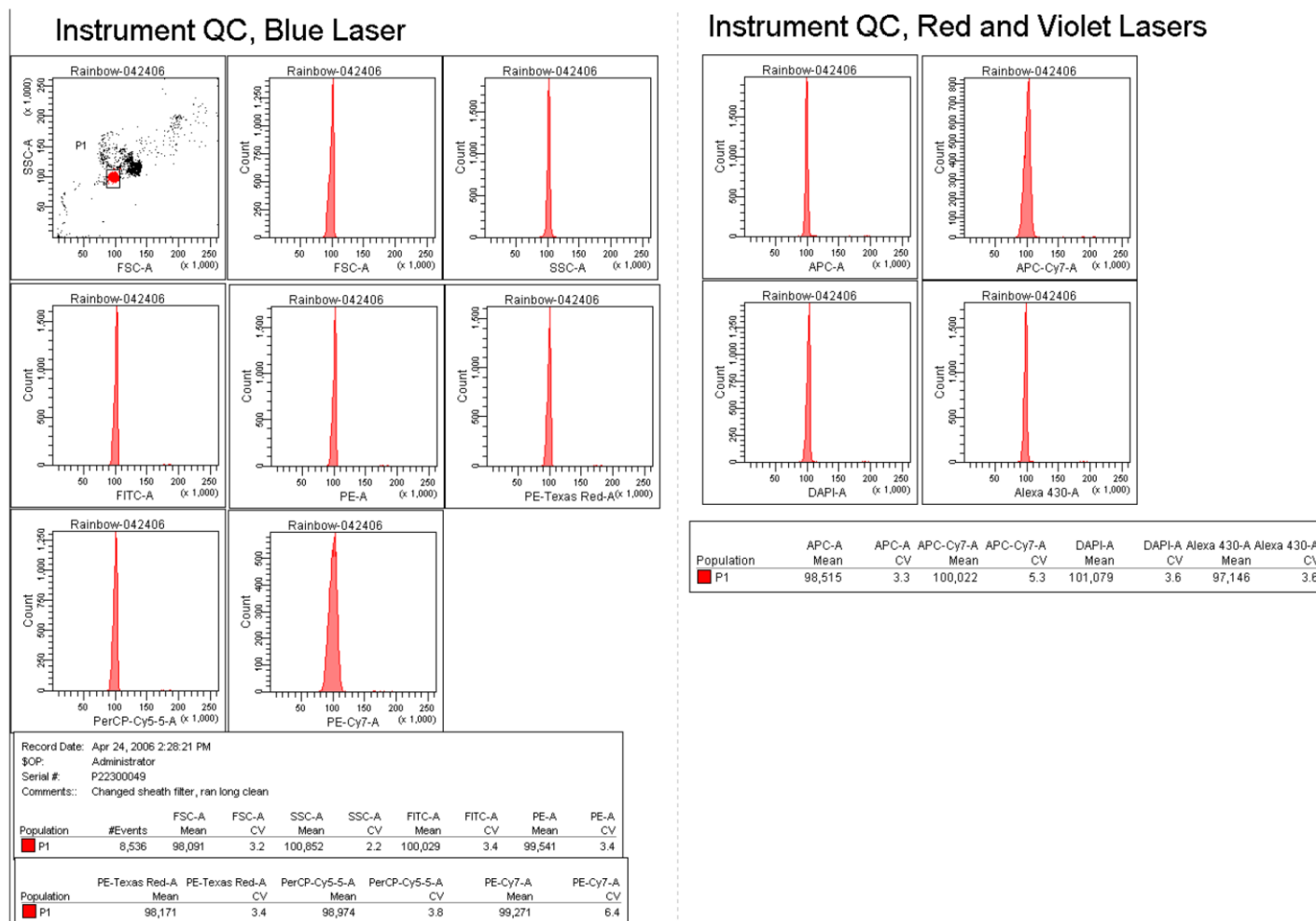


Figure E-6 质控结果记录

BD FACSAria 培训日程安排

第一天

- 1, 工作原理介绍
- 2, 仪器质控介绍
- 3, 仪器硬件各部分介绍
- 4, 开机流程
- 5, 软件界面介绍
- 6, 日常维护
- 7, 备件箱认识
- 8, Configuration 的创建
- 9, 执行仪器质控过程
- 10, 质控结果解读
- 11, 关机流程

第二天

- 1, 开机
- 2, 仪器质控
- 3, 多色样本制备
- 4, Application setting 建立
- 5, 多色实验过程
- 6, 数据分析和结果导出
- 7, 关机

第三天

- 1, 分选原理和影响因素

- 2, 开机
- 3, 质控
- 4, 分析设置过程
- 5, 分选样本
- 6, 分选后鉴定
- 7, 关机

第四天

- 1, 开机
- 2, 更换不同尺寸喷嘴
- 3, Configuration 建立
- 4, 质控过程
- 5, 分析实验过程
- 6, 分选实验过程
- 7, 关机

第五天

- 1, 日常维护
- 2, 无菌清洗流程
- 3, 96 孔板分选 (选)
- 4, 理论考核
- 5, 实践考核
- 6, 培训证书颁发