



MoFlo XDP

中文应用培训手册

V 1.1

Genomics
Proteomics
Cell Analysis
Particle Characterization
Centrifugation
Lab Automation
Bioseparation
Lab Tools



美国贝克曼库尔特有限公司

目 录

培训所需设备及试剂	2
每日开机程序	3
每日关机程序	4
日常保养与维护	5
MoFlo XDP 光路校准程序	7
双色淋巴细胞亚群检测	10
单色&多色样本检测	19
四色荧光自动补偿	20
DNA 测定	25
MoFlo XDP 分选	29
CyCLONE 的使用	36

相关文件：

1. 《MoFlo XDP Instructions for Use》；
2. 《Coulter DNA Prep Reagents Kit Instructions For Use》；

本手册自2011年6月1日起执行

培训所需设备及试剂

1. 普通光学显微镜;
2. 普通超声清洗机;
3. 棉签、吸水纸若干;
4. 普通低速离心机 (实验要求为 300g, 相当于 1000~1500rpm, 可调转速调时间);
5. 固定或可调节的加样器及相应加样头若干: 20ul, 50ul, 100ul, 200ul, 250ul, 450ul, 1ml;
6. 旋涡混匀器;
7. 烧杯, 量筒或移液管, 三个清洁的玻璃或塑料带盖试剂瓶 (50-100ml), 一个棕色瓶 (约 500ml), 漏斗, 滤纸;
8. 300 目过滤尼龙网;
9. PBS 溶液和蒸馏水: 0.22 μ m 滤膜过滤;
10. NaClO: 分析纯, 有效氯浓度 10%;
11. 每天需要一管 2ml 抗凝的人血样本 (最好是 EDTA-K₃ 抗凝);
12. 多聚甲醛。

附 1:

PBS 配制方法: 800ml 蒸馏水中溶解 NaCl 8.0g; KCl 0.2g; Na₂HPO₄ 1.44g; KH₂PO₄ 0.24g; 调节 pH 到 7.2~7.4 (用 HCl 或 NaOH 调节, 各地蒸馏水的酸碱度不同), 加蒸馏水定容至 1L, 0.22 μ m 滤膜过滤后, 室温保存。

附 2:

多聚甲醛配制方法: 贮存液用 PBS 配制 4%多聚甲醛溶液, 待完全溶解后 (溶解时需要不断搅拌, 加热的温度小于 50 $^{\circ}$ C), 调整 PH 值在 7.2~7.4, 并用 0.22 μ m 的滤膜过滤后置于 2-8 $^{\circ}$ C 保存。使用时, 用 PBS 稀释为 2%浓度的应用液。应用液 2-8 $^{\circ}$ C 存放, 可使用一周。

MoFlo™ XDP

每日开机程序

1. 打开稳压电源，打开气压泵电源；
2. 打开“ aXcess Control Panel”。

注意：电源开关位于显示器右下角，通常每日使用仪器可使系统保持“开启”

状态，如未打开系统，按下电源键执行开机程序。

3. 打开需要使用的激光器电源。
4. 如需要，通过“ Laser Control Panel” 设定合适的激光电压。
5. 激光器预热 30 分钟，等待过程中可继续执行步骤 6。
6. 启动液路：
 - (1) . 确认鞘液桶充满鞘液；
 - (2) . 倾空废液桶废液；
 - (3) . 打开压力控制台左边的蓝色空气压力开关和红色的废液桶真空开关；
 - (4) . 待压力和真空稳定后，排除鞘液过滤器中的气泡；
7. 如无“ Smart Sampler”，执行步骤 8-10；如有“ Smart Sampler” 执行步骤 11-12；
8. 将两个鞘液阀门置于“ Sheath”，打开阀门，返冲进样管路 10-15 秒；
9. 排除喷嘴处气泡：关闭样本阀，将顶端鞘液阀置于鞘液位置，而另一个鞘液阀置于真空位置，运行 10-15 秒；交换两个鞘液阀位置，运行 15 秒；将两个鞘液阀重新置于“鞘液”位置；
10. 检查液流，如有必要，重复 7-9 步骤排除气泡；
11. 如有“ Smart Sampler”，按下 aXcess Control Panel 控制面板上的“ StartFluidics”，启动液路按钮，仪器将自动执行启动鞘液、返冲和排除气

泡过程；

注意 Smart Sampler 电源键应长期保持开启状态,以保证其与 MoFlo XDP

电路连通;

13. 检查液路中是否有气泡,如有必要,重复排除气泡步骤;
14. 启动计算机;
15. 双击桌面上的“Summit Software”软件图标,运行软件,执行光路校准后即可开始实验。



MoFlo™ XDP 每日关机程序

1. 在 aXcess Control Panel 中关闭激光器；
2. 在 Stream Configuration Screen 关闭 Drop Drive、Deflection Plates 和 Stream Illumination；
3. 在 Course Alignment Screen 关闭 Pinhole Illumination；
4. 如仪器为手动进样系统,执行以下步骤 5-11,如有 Smart Sampler,执行步骤 12,关闭液流系统；
5. 将两个鞘液阀置于 Sheath 鞘液位置,打开 Pinch 阀门返冲进样管 10-15 秒；
6. 将一个盛有消毒液的样本管上样,并将鞘液阀置于真空位置,另一个置于鞘液位置,按下压力控制台的 Boost 按钮;当管中消毒液消耗一半时,将两个阀门位置转换到相应另一位置；
7. 取下消毒液管,换上蒸馏水；
8. 将两个鞘液阀均置于“关闭”位置,按下 Boost 按钮,当蒸馏水剩余 10%时,关闭样本压力阀和样本阀；

9. 关闭压力控制器上的红色真空阀和蓝色压力阀，释放压力和真空；

注意：请不要将该阀门松开超过 1 圈，否则会使压缩的弹簧和球形轴承弹出；

10. 将鞘液和清洗液桶的减压阀转 1 周释放压力；
11. 断开鞘液桶和废液桶的快速接头，打开废液桶盖，清空刻液并清洗或消毒废液桶（注：如用漂白剂，请不要让液体在废液桶内过夜）；打开鞘液桶盖，加鞘液至液面达到上部焊接线，盖好盖子，关闭减压阀（可重新连接管路继续工作）；
12. 按下 Stop Fluidics（停止液流）按钮，然后执行步骤 9-11；
13. 无需关闭 aXcess Control Panel 和 Summit 软件；
14. 如长期不开机，关闭 aXcess Control Panel 和 Sumit 软件，关闭电脑。

MoFlo™ XDP

日常保养与维护

为了保证 MoFlo™ XDP 流式细胞仪的正常运转和测定结果的可靠，仪器的日常保养与维护必不可少。为保证液流稳定，建议每周至少开机 2 次，每次至少冲水 1 小时以上。

保养内容	推荐频率
1、添加鞘液、清洗液	每天开机前检查液面水平，如需要及时添加
2、清空废液桶	每天开机前检查废液的液面水平，如需要倒空废液桶
3、排除液路系统气泡	无论何时，更换容器时或做其他保养时，要执行该程序
4、常规清洗进样管路	每日或有需要时
5、鞘液桶	每月
6、清洗液桶	每 60 天

清洗液的选择

- **Cleanse 液**：流式细胞仪的常规清洗用液，直接使用，可有效去除仪器管路内的样本、染料等造成的污染。
- **漂白剂——NaClO 溶液**：流式细胞仪的常规清洗用液。目前市场上的漂白剂有效氯浓度多为 5-10%。漂白剂须经 0.45 μ m 滤膜或滤纸过滤后，稀释至有效氯浓度 0.5-1%，现用现配。
- **表面活性剂——Triton 等**：使用浓度约为 1%，0.45 μ m 滤膜过滤后备用。使用表面活性剂时，注意上样管中不要加满，也不要反冲，防止操作不当造成液体进入气路，或进入压力控制器。
- **蒸馏水**：为了防止管路内残留有清洗液，形成结晶或造成管路接口的腐蚀，在使用清洗液清洗完毕后，一定要用蒸馏水，再次冲洗管路。蒸馏水必须以 0.22 μ m 滤膜过滤后备用。

仪器日常维护


在下述情况下应进行仪器日常维护以清洁进样管路：

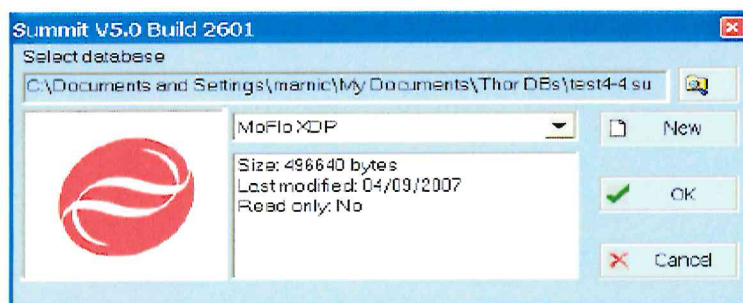
- ❖ 每日实验结束后，请于关机前清洁进样管路，防止进样管路堵塞或有染料残留；
- ❖ 在使用了一些荧光染（如 PI、EB、AO、TO 等）后，也需要立即进行进样管路的清洁；
- ❖ 当观察到细胞碎片明显增加或背景噪音明显增加时，说明进样管路中有大量碎片或蛋白残留，应及时进行清洗。

步骤:

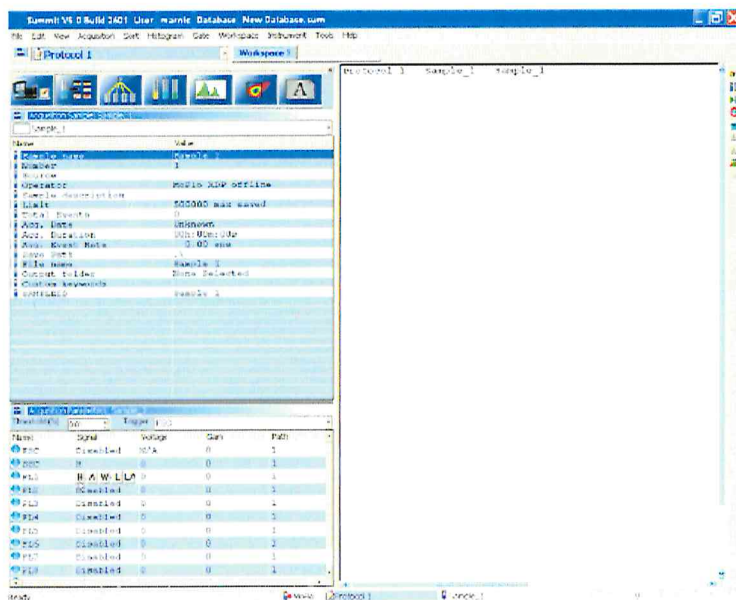
1. 准备一支上样管，加入 2ml 漂白剂；另一只上样管，加入 3ml 蒸馏水。
2. 将上述两管当做样本分别上样。
3. 先运行漂白剂 5-10 分钟，然后再运行蒸馏水至少 15 分钟，以充分去除管路中的漂白剂。

MoFlo XDP 光路校准程序

1. 桌面上的 Summit Software 软件图标 ，运行软件；
2. 在弹出的对话框中建立新的数据库或选择合适的数据库；



3. 在软件的“Acquisition”获取界面，选择实验所需参数，并加载光路校准 Protocol 或建立新的直方图；



4. 粗调：

(1). 打开所需激光电源，如 488nm 激光器，按  键打开 shutter；


- (2). 在 aXcess ControlPanel 界面, 单击 , 进入粗调屏幕; 单



打开激发舱光源, 如有必要, 可以拖动滑杆调节激光功率;

- (3). 调节液流垂直: 在液流可见前提下, 降低喷嘴, 使其末端在相机查看窗顶端, 调节 X、Y 千分尺, 使液流处于小孔中心位置, 聚焦良好; 提高喷嘴到最顶端, 观察全过程液流是否还处于小孔中心位置, 聚焦良好, 如不好, 则调节喷嘴前端两个平衡旋钮, 纠正液流位置, 再将喷嘴降到最低, 调节 X、Y 千分尺, 使液流处于小孔中心位置, 聚焦良好; 如此反复, 直到喷嘴上下移动时全过程均可达到液流处于小孔中心位置, 聚焦良好状态, 且液流可以直接落入废液收集器内, 即为液流垂直;
- (4). 将喷嘴旋至恰好在相机查看窗顶端; 插上 Illuminator Chamber 的 interlock, 打开 Illuminator 舱门, 观察激光是否恰好打在喷嘴的末端;
- (5). 检查激光束的 360 度散射, 并恰好完全围绕于液流激发点, 此称为衍射环, 调整千分尺, 直至衍射环最亮; 关闭激发舱门, 取下 Interlock;
- (6). 取一管黄绿色荧光水, 置于进样器上, 上样, 如有必要, 按下压力控制器上的 Boost 按钮, 看荧光水的亮点是否在其对应的小孔中, 且聚焦良好, 位置居中; (488nm 为上数第一个孔, 405nm 或 355nm 为上数第二个孔, 633nm 为上数第三个孔)

5. 精确校准:

- (1). 按  键进入精确校准屏幕, 将一管含有 10^6 的 SpectraAlign 微球上样;
- (2). 按下压力控制器上的 Boost 按钮, 当屏幕上能够看到微球闪烁时, 调节千分尺及 POD 滤光片角度, 使各检测通道收集的信号最强且 CV 最小;
- (3). 调节 PMT 电压, 使所有参数位于 128 ± 5 ;

6. 在 Droplet 屏幕中, 调节振幅电压 (Amplitude Voltage), 并不断切换 Drop Drive 按钮的 ON/OFF, 确认在 Drop Drive on 的下无信号噪音;



7. 如需校准其它激光器光路，不要移动任何激光器的千分尺，直接打开需要校准的激光器 Shutter，按照上述步骤 4 的 (5)、(6) 和步骤 5 执行校准即可。
8. 当同时使用两个以上激光器时，需进行 Laser Delay 的校准：
 - (1)、将一管含有 10^6 的 SpectraAlign 微球上样；
 - (2)、按 Ctrl、Alt 和 F1 键，将弹出 Laser Delay 调节对话框；
 - (3)、在 FSC/SSC 双参数点图中设门，圈中微球；
 - (4)、在 Summit 软件中设定循环显示模式 (Cycle Count 为 100events)，并且将流速设定为 100EPS；
 - (5)、以 FSC 为阈值，增加阈值，直到第一个小孔中的信号消失 (即 FL1、FL2、……)，降低阈值，使各通道峰重现，随着阈值的增加，脉冲宽度逐渐变小，Median 值也同时下降，如有必要，可在该峰处设定 Marker 门；
 - (6)、对第二个小孔和第三个小孔重复步骤 5；
 - (7)、将阈值设定为第 2 个激光的参数，调节 Laser Delay 值，使其达到最强的 Median 值和最好的 CV；
 - (8)、通常第三个激光的 Laser Delay 值应为第二个激光 Delay 值的 2 倍；
 - (9)、记录 Laser Delay 的值，此应为更换喷嘴及鞘液压力时的起始调节值；
 - (10)、关闭 Laser Delay 调节窗口；

双色淋巴细胞亚群检测

【实验目的和原理】

利用荧光技术在不同的抗体上标记荧光素，该荧光抗体即通过抗原-抗体反应与细胞表面的抗原分子特异性结合，然后用流式细胞仪检测，分析细胞表面相应蛋白的表达情况，计算百分比。本实验以人双色淋巴细胞亚群为例，介绍流式细胞术双色样本检测流程。

【实验试剂】

- 1、 荧光单克隆抗体：
 - ① Isotype control (IgG1-FITC/IgG1-PE) , PN:A07794;
 - ② CD3-FITC/CD19-PE, PN:A07736; ③ CD3-FITC/CD4-PE, PN:A07733;
 - ④CD3-FITC/CD8-PE, PN:A07734; ⑤ CD3-FITC/CD16+56-PE, PN:A07735;
- 2、 红细胞裂解液: OptiLyse C (A11895): 即用型, 室温保存 (18-25℃)
- 3、 0.01M PBS
- 4、 Immunotrol (PN.6607077) 质控血或者EDTA抗凝血

【实验步骤】

- 1、取5支流式试管, 编号为1、2、3、4、5, 分别将100 μ l抗凝全血或Immunotrol质控血加入1-5号试管中, 小心不要将血挂在试管内壁上;
- 2、在各管中依次加入20 μ l的IgG1-FITC/IgG1-PE、CD3-FITC/CD19-PE、CD3-FITC/CD4-PE、CD3-FITC/CD8-PE、CD3-FITC/CD16+56-PE, 涡旋混匀后, 室温避光孵育15分钟;
- 3、取出试管, 每管加入500 μ l 红细胞裂解液OptiLyse C, 涡旋混匀, 室温避光10分钟; 300g (约1200rpm) 室温离心5min, 弃去上清液;
- 4、每管加入2ml的PBS, 涡旋混匀, 300g室温离心5min, 弃去上清液;
- 5、每管加入0.5ml PBS混匀, 4℃避光1h内上机检测; 若不能及时上机, 加入0.5ml 含1-2%多聚甲醛的PBS溶液, 置于4℃冰箱保存, 24h内上机检测。

【注意事项】

- ① 弃掉试管中上清液时, 一定保证一次性垂直倒掉, 不能反复倾倒, 防止细胞丢失。
- ② 2~8℃保存, 抗体试剂在保质期内稳定, 不能冻存。抗体保存期间或与细

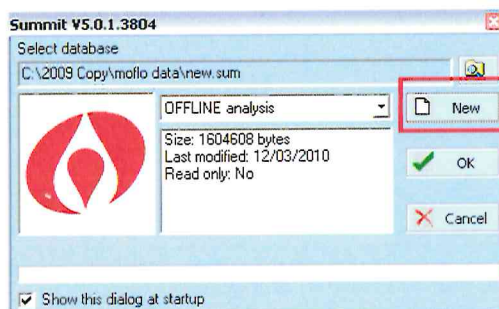
胞孵育时注意避光。试剂瓶应保持干燥。

- ③ 任何试剂的外观改变，如沉淀、变色，都表明试剂已不稳定，这时试剂不能使用。
- ④ 为得到理想结果，血样应在静脉穿刺后6h内染色。
- ⑤ 操作时如未按指定的孵育时间、离心次数或温度进行，容易发生错误。
- ⑥ 抗体试剂虽含有叠氮钠保护剂，仍需注意微生物污染，以免导致错误结果。

【流式细胞仪检测】

一、双色方案建立

- 1、 打开Summit软件，在弹出对话框选择“New”，新建一个Database，为其命名“*Lym cell.sum*”，指定保存路径，点击“Save”；



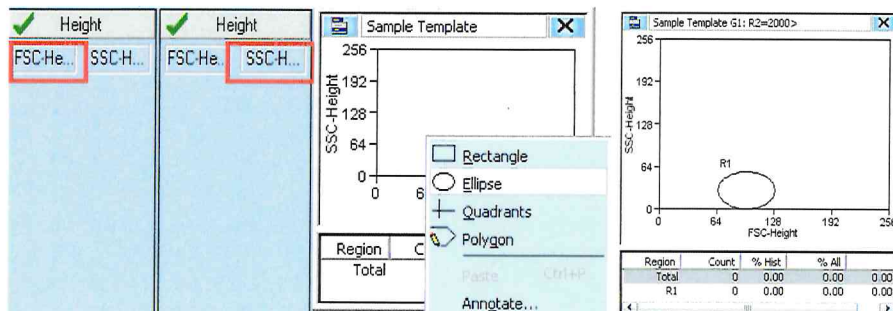
- 2、 选择“*File > Protocol > New*”，方案自动按Protocol 1, Protocol 2顺序命名。单击选中新建的方案，点击“*File > Protocol > Rename*”，在原方案名称处输入“2C Lym”，回车确定；
- 3、 选择参数：选择“*Acquisition Tab*”，在“*Acquisition Parameters*”面板处，分别双击FS/SS/FL1/FL2的“*Disabled*”激活参数，单击参数的字母缩写，选择参数类型。本实验选择 FS-H/SS-H/FL1-L/FL2-L；

- H = linear height
- L = log height
- A = linear area
- LA = log area
- W = pulse width

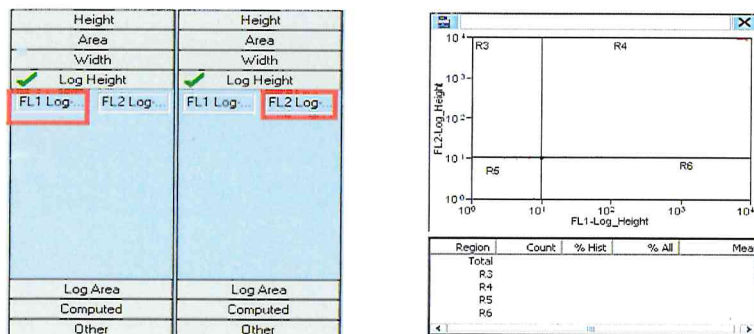
- 4、 建立实验方案所需图形：本实验需要画两个图，如下：

- 1) FSC/SSC双参散点图：选择“*Histograms Tab*”，在“*Create Histograms/Plots*”面板处，先单击左侧的“*Height*”选择“*FSC-Hight*”

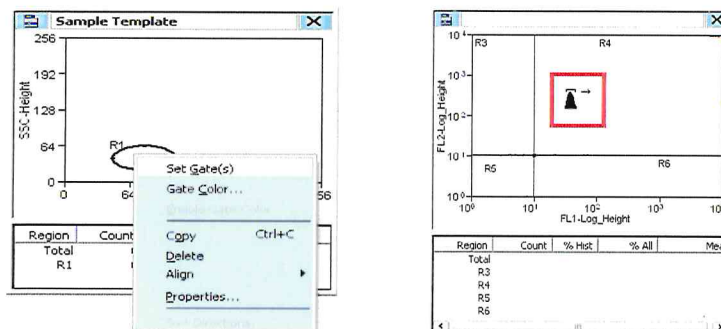
做为X轴参数，再双击右侧“Height”中“SSC-Height”做为Y轴参数，软件自动在右侧的“Workspace 1”工作页面处弹出FSC/SSC双参数散点图（如下图）。右键单击散点图，选择“Ellipse”，在FSC/SSC散点图上画椭圆型门R1，用来圈定淋巴细胞；




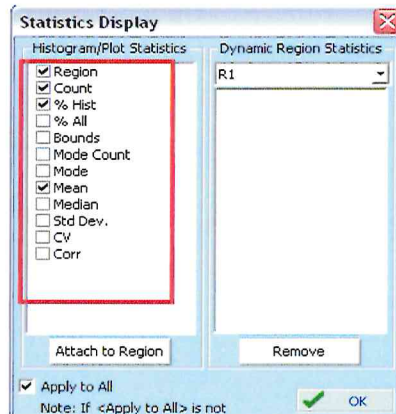
- 2) FL1/FL2双参数散点图：在“Create Histograms/Plots”面板处，单击左侧“Log Height”中的“FL1-Log_Height”（X轴），双击右侧“Log Height”中的“FL2-Log_Height”（Y轴），软件自动在右侧的“Workspace 1”工作页面处弹出FL1/FL2双参数散点图（如下图）。右键单击该散点图，选择“Quadrants”，在FL1/FL2散点图上 $10^1/10^1$ 处做十字象限；



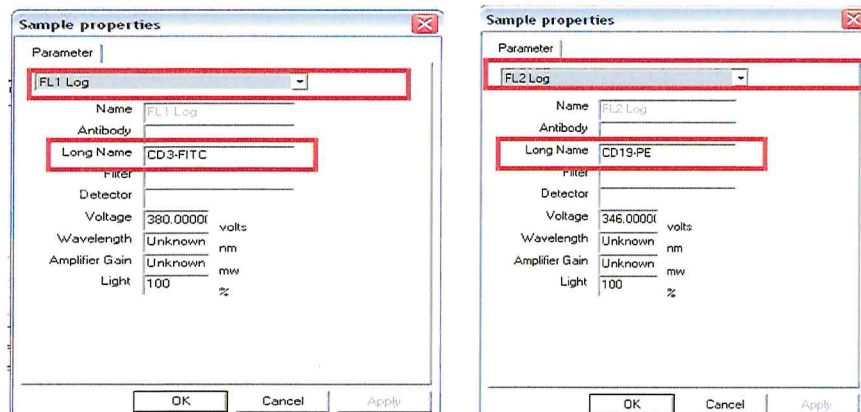
- 3) 设门 (Gating): 右键单击FSC/SSC点图中的R1门，弹出的菜单中，选择“Set Gate(s)”，出现黑色三角图像后，将鼠标移到FL1/FL2点图上，双击此图，即完成Gating到R1，如下图：




- 4) 左键点击任意点图左上角的“*Additional menu*”, 选择“*Statistics* > *Edit display*”编辑数据统计项。在弹出对话框中, 依该实验需要选择Region、Count、%Hst、Mean; 勾选“*Apply to All*”点击“*OK*”;



- 5、设定坐标轴名称: 右键点击FL1/FL2 点图的坐标轴处, 选择“*Parameter Properties*”。选择“*FL1-Log*”在“*Long Name*”处输入“*IgG1-FITC*”; 选择“*FL2-Log*”在“*Long Name*”处输入“*IgG1-PE*”, 点击“*OK*”, 设定完成(如下图);

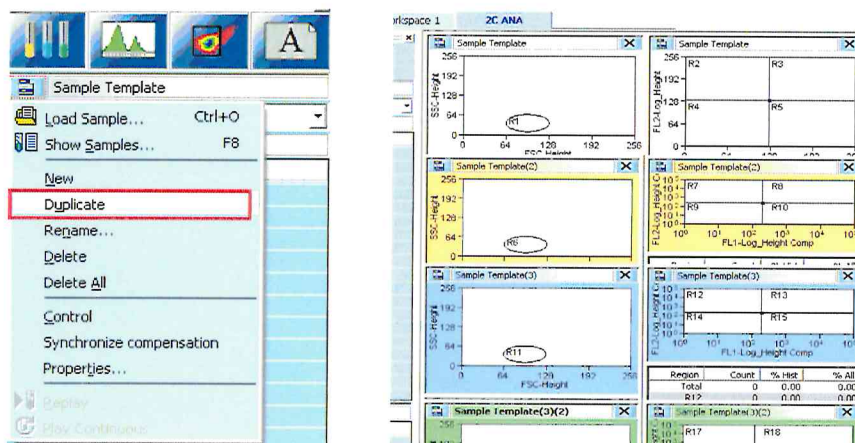


- 6、设定检测停止条件: 选择“*Acquisition Tab*”界面, 双击“*Limit*”的右侧, 弹出的对话框中, 分别可以从时间“*Time Limit*”, 细胞总数“*Event Limit*”, 门内细胞总数“*Gate Limit*”来设置检测停止条件。如本实验, 设定G1门内记录2000个细胞后停止;

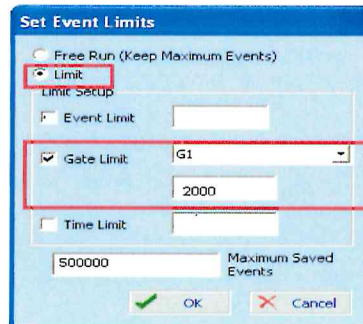
- 10、点下拉键头，选择2C Lym CD3-56+16，进入方案，上机检测第5管，保存数据；

三、数据分析

- 1、点击菜单栏 **“Workspace > New”** 创建新工作面板，右键点击新建 Workspace 选择 **“Rename”**，重命名为 **“2C ANA”**；
- 2、页面上点击鼠标右键，选择 **“New Plot”** 自动弹出FSC/SSC散点图；再次用鼠标右键建立第二张散点图，分别右键点击参数坐标轴，设置X/Y轴分别为FL1-Log/FL2-Log。
- 3、选择 **“Sample information”** ，在 **“sample template”** 处选择 **“Duplicate”** 如下图左，复制一组点图模板；如此重复，共复制5组不同颜色点图模板，如下图右，可以分别代入5个独立数据。




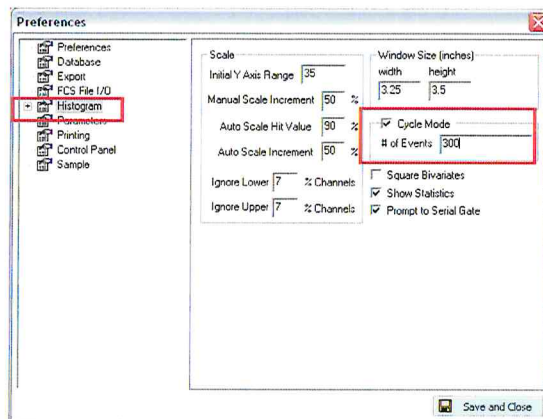
- 4、点击菜单栏 **“File > Load sample”** 用 **“Ctrl”** 键打开以上检测的5个数据。点击右侧工具栏的  或者 **“F8”**，显示打开的数据列表。列表中，选中数据 **“2C Isotype Control”**，左键点按住该数据直接拉在第一个模板上，即显示Isotype Control的数据结果。如此方法，依次分别把数据 CD3-CD19、CD3-CD4、CD3-CD8、CD3-CD56+16，带入其它四个不同的模板，分别显示数据的结果，如下图。点击 **“Workspace>Print”** 选择打印机




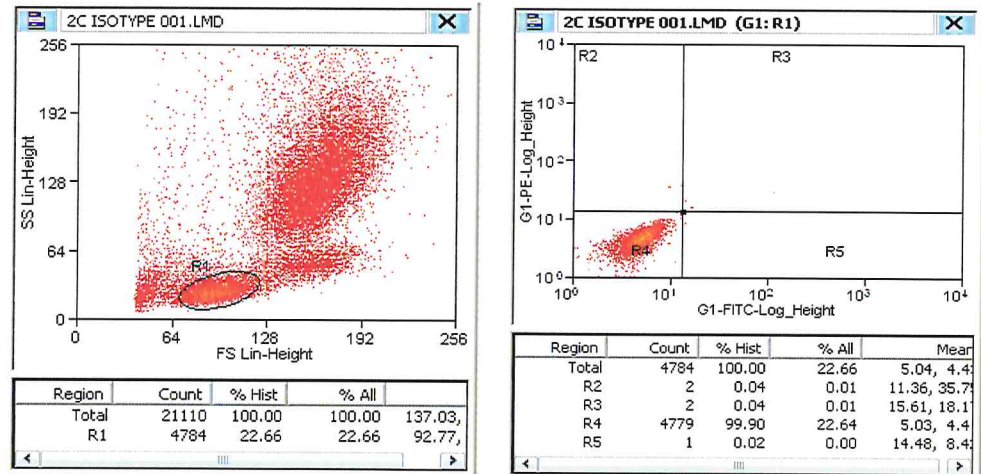
二、数据获取条件设置


1、电压调节：

- 1) 选择“*Edit > Preferences...*”，选择“*Histogram*”，勾选“*Cycle Mode*”，在Events中输入300，点击“*Save and Close*”。左键点击右侧工具栏中的，启动cycle循环模式，细胞每记录300个后自动刷新。






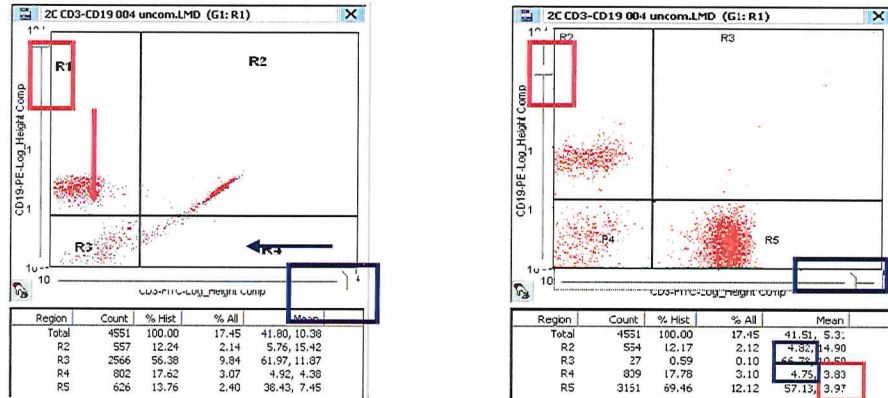
- 2) 电压和阈值的设定：将1号试管放在进样台，点击axcese control panel 的后，点击键盘的“*F2*”开始检测样本；
 - a) 在“*Acquisition Tab*”界面中“*Voltage*”栏，双击相应的检测参数的电压值，移动滚动条改变FSC的Gain和SSC的电压，使FSC/SSC点图中细胞分群良好，调整R1门位置，圈中淋巴细胞；
 - b) 在“*Acquisition Tab*”界面中“*Threshold*”处设定阈值，扣除碎片。通常以FSC为阈值，调节扣除百分比，该参数可根据点图中碎片的多少进行相应调整，在保证目的细胞群完整的前提下，尽量扣除（如图左）；
 - c) 调节FL1和FL2的电压使细胞群位于X轴和Y轴的第一个对数标记 10^4 内，调整十字象限位置，使细胞群位于左下象限（如图右）。



- 3) 条件调节合适, 左键点击 , 取消自动刷新模式, 当R1门内记录到2000个细胞时自动停止。点击“F3”弹出对话框, 指定数据保存路径和名称 (2C Lym Isotype Control.plo), 条件自动保存;

2、补偿调节:

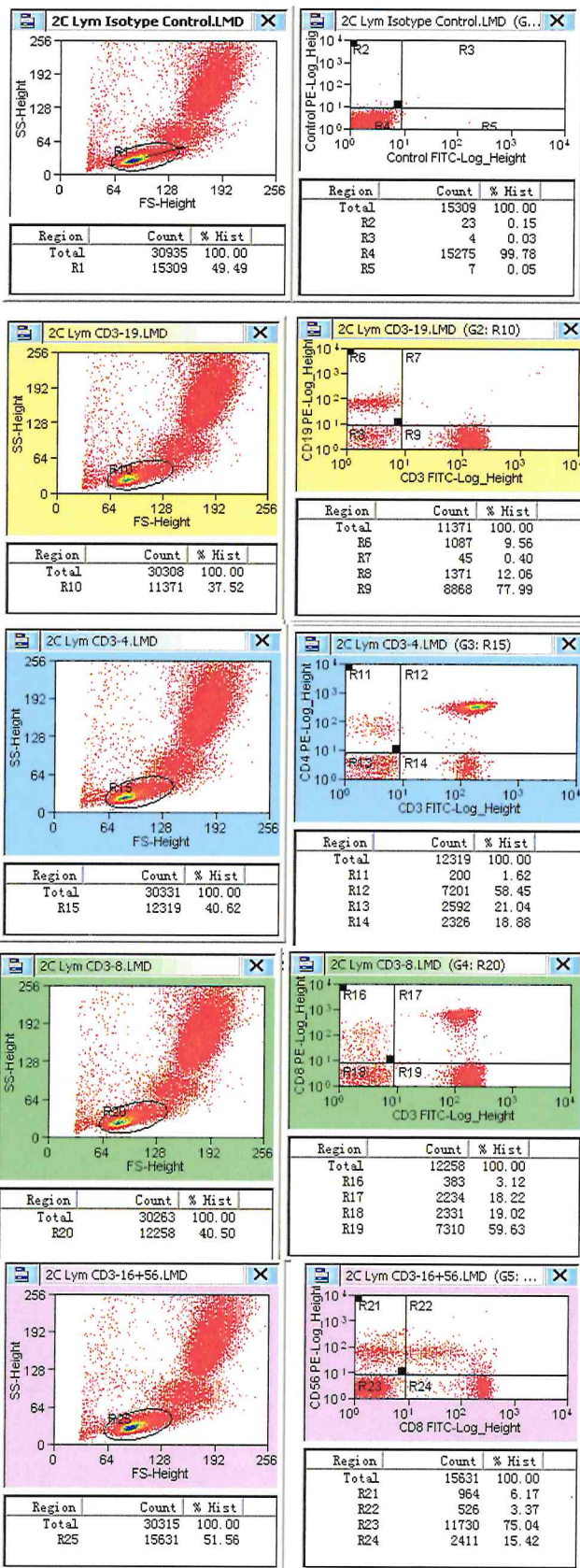
- 1) 将FL1、FL2坐标改为“CD3-FITC”、“CD19-PE”, 换上2号管, 点击aXcese control panel的  后, 点击键盘的“F2”开始检测样本;
- 2) 点击  进入自动刷新模式, 点CD3/CD19图左上角的“Additional menu” , 选择下拉菜单的“compensate”, 在图形上出现快速调节滚动条, 直接拉动垂直滚动条, 调节FL2-FL1%, 直到FITC单阳性细胞落在图中右下象限, 使R4和R5区内细胞的Y轴平均荧光强度 (右侧Mean值-红色区) 一致 (相差<0.1), 如下图左; 拉动水平滚动条, 调节FL1-FL2%, 直到PE单阳性细胞落在图中左上象限, 使R2和R4区内细胞的X轴平均荧光强度 (左侧Mean值-蓝色区) 一致 (相差<0.1)。条件调节合适, 取消自动刷新模式, 收集数据结束后, 点击F3为保存数据命名 (2C Lym CD3-19.plo) 和指定路径, 补偿条件自动保存在方案中。



- 3、点击菜单栏“*File > Protocol > Save as*”，指定保存路径，命名为“2C Lym CD3-4.plo”，点击“*Save*”保存；
- 4、点击菜单栏“*File > Protocol > Load*”，将“2C Lym CD3-4.plo”方案带入当前的Database。右键点击FL1/FL2 点图的坐标轴处，选择“*Parameter Properties*”。选择“*FL1-Log*”在“*Long Name*”处输入“CD3-FITC”；选择“*FL2-Log*”在“*Long Name*”处输入“CD4-PE”，点击“*OK*”，设定完成；
- 5、点击菜单栏“*File > Protocol > Save as*”，指定保存路径，命名为“2C Lym CD3-8.plo”，点击“*Save*”保存；
- 6、点击菜单栏“*File > Protocol > Load*”，将“2C Lym CD3-8.plo”方案带入当前的Database。右键点击FL1/FL2 点图的坐标轴处，选择“*Parameter Properties*”。选择“*FL1-Log*”在“*Long Name*”处输入“CD3-FITC”；选择“*FL2-Log*”在“*Long Name*”处输入“CD8-PE”，点击“*OK*”，设定完成；
- 7、点击菜单栏“*File > Protocol > Save as*”，指定保存路径，命名为“2C Lym CD3-56+16.plo”，点击“*Save*”保存；
- 8、在*Protocol*工具栏位置，点击下拉键头，选择 2C Lym CD3-4，进入方案，上机检测第3管，保存数据；



- 9、点下拉键头，选择2C Lym CD3-8，进入方案，上机检测第4管，保存数据；



单色 & 多色样本检测

单色样本

- 1、按实验需要制备样本，同型对照管和实验管。
- 2、建立单色方案：选择 “*File > Protocol > New*”。
- 3、按实验要求绘制FSC/SSC和相应检测荧光参数的直方图；在FSC/SSC上设门R1，圈目的细胞；将R1门Gating到直方图上，使其只显示R1门内细胞。
- 4、上机检测阴性管：
 - 1) 调节FSC和SSC的增益、电压和阈值，使检测细胞群位于FSC/SSC的图形中央。
 - 2) 观察荧光参数直方图，调节相应荧光参数的电压，使所有的阴性细胞位于X轴阴性区内，即第一个对数标记 10^1 附近，由阴性区向右设阳性门R2，使阳性门内细胞比例小于2%。
- 5、上机检测实验管，收集保存数据。

三色样本

- 1、按实验需要制备样本，包括同型对照管、单阳标记补偿管和实验管。如选择CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PC5 (FL1/FL2/FL4) 三色荧光标记，需分别单独标记FITC、PE、PC5荧光用于补偿调节。
- 2、建立实验Protocol：一张FSC/SSC散点图，其他点图按荧光参数两两组合作图，分别为FL1/FL2、FL1/FL4、FL2/FL4。更多色实验依次类推。在FSC/SSC上设门R1，圈目的细胞；将R1 Gating在荧光参数散点图上，使其显示R1门内细胞；每张荧光参数散点图上做十字象限。
- 3、上机检测同型对照管：
 - 1) 调节FSC和SSC的增益、电压和阈值，使检测细胞群位于FSC/SSC的图形中央。
 - 2) 观察荧光参数散点图，调节相应荧光参数的电压，使所有的阴性细胞位于左下象限阴性范围内，根据阴性细胞边界调整十字象限位置。
- 4、分别上机检测单色标记补偿管，调节荧光补偿，使只有单一荧光标记的细胞群落在相应的单阴、单阳区，补偿条件自动保存在方案。
- 5、检测三色标记的实验管，记录并保存数据。

不一定在 10^1 附近，依据阴性峰定义。
若阳性峰在最低电压400附近有噪音，可通过调节gain(增益)来消除。

四色荧光自动补偿

【实验试剂】


- 1、 四色淋巴细胞亚群试剂：
CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 (PN. 6607013) 和
CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 (PN. 6607073)；
- 2、 溶血素 (OptiLyse C , PN. A11895) :即用型，室温保存；
- 3、 QuickComp 4 Kit (PN. 177017): 包括CD45-FITC、CD45-PE、CD45-ECD、
CD45-PC5单色试剂
- 4、 0.01M PBS溶液
- 5、 Immunotrol质控血 (PN. 6607077) 或者EDTA抗凝血；

【实验步骤】

- 1、 标记Immunotrol质控血 (PN. 6607077) 或者EDTA抗凝血：包括同型对照
(IgG1-FITC/IgG1-PE/IgG1-ECD/IgG1-PC5)、用于补偿调节的单阳标记
(FITC、PE、ECD、PC5)和实验管 (CD45-FITC/CD4-PE/CD8-ECD/CD3-PC5
； CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5)，室温避光孵育15分钟。
- 2、 每管加入500 μ l 红细胞裂解液OptiLyse C，涡旋混匀，室温避光10分钟
； 300g (约1200rpm) 离心5min，弃去上清液；
- 3、 每管加入2ml的PBS，涡旋混匀，300g离心5min，弃去上清液；
- 4、 每管加入0.5ml PBS混匀，4 $^{\circ}$ C避光1h内上机检测；若不能及时上机，加
入0.5ml 含1-2%多聚甲醛的PBS溶液，置于4 $^{\circ}$ C冰箱保存，24h内上机检测
。

【流式细胞仪检测】

一、实验方案建立

- 1、 在当前的Database中，选择 “*File > Protocol > New*”，方案自动按
Protocol 1, Protocol 2顺序命名。选择该方案，点击 “*File > Protocol
>Rename*”，在原方案名称处，输入新命名“CD45-CD4-CD8-CD3”，回车确
定。
- 2、 选择参数：选择 “*Acquisition Tab*” ，在 “*Acquisition Parameters*”
面板处，双击FS/SS/FL1/F12/FL3/FL4的 “*Disabled*” 激活参数，之后，
单击参数的缩写字母，选择参数类型。本实验选择

FS-H/SS-H/FL1-L/FL2-L/FL3-L/FL4-L。



- 3、建立实验方案所需图形：一张FSC/SSC散点图，其他点图按荧光参数两两组合作图，分别为FL1/FL2、FL1\FL3、FL1/FL4、FL2\FL3、FL2/FL4、FL3\FL4；更多色实验依次类推；在FSC/SSC上设门R1 (G1=R1)，圈目的细胞；将R1 Gating在荧光参数散点图上，使其显示R1门内细胞，其他荧光参数散点图上做十字门。

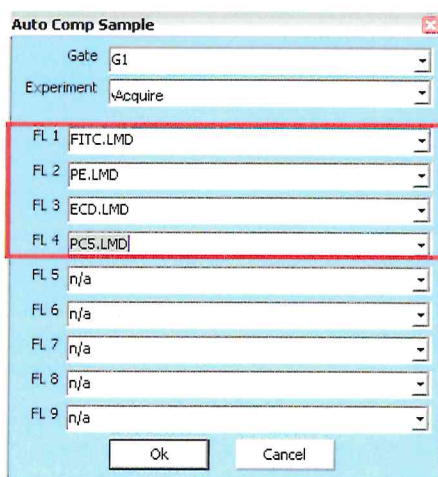
二、实验条件建立

1、同型对照管检测-确定合适的电压

- 1) 调节FSC和SSC的增益、电压和阈值，使检测细胞群位于FSC/SSC的图形中央。
- 2) 观察荧光参数散点图，调节相应荧光参数的电压，使每张荧光参数点图的阴性细胞位于左下侧阴性区内，根据阴性区边界调整十字门位置。

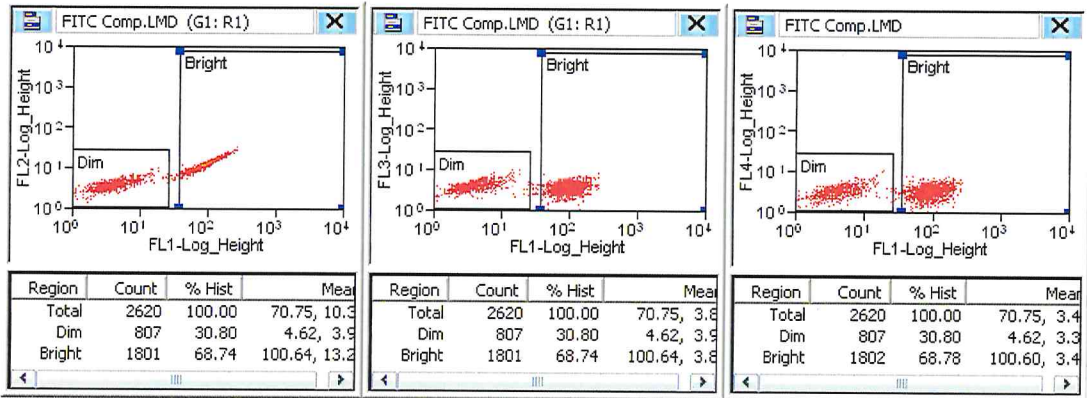
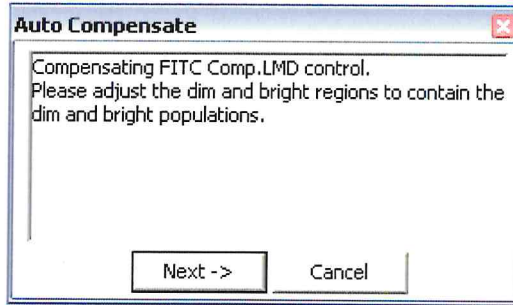
- 2、分别上机检测单色标记管 (FITC、PE、ECD、PC5)，点击“F3”保存每管检测数据，分别命名为“FITC Comp. LMD”、“PE Comp. LMD”、“ECD Comp. LMD”、“PC5 Comp. LMD”。

- 3、在Summit软件中，选择“*Sample information*”界面。于“*Compensation*”面板处，左键点击，在下拉列表中选择“*Auto Compensate*”，弹出自动补偿设置对话框，完成如下设置。在Gate处指定目的细胞(G1)；Experiment：选择“Acquire”（刚刚纪录的数据）；为每个荧光通路，通过下拉箭头指定相应单色荧光检测数据。

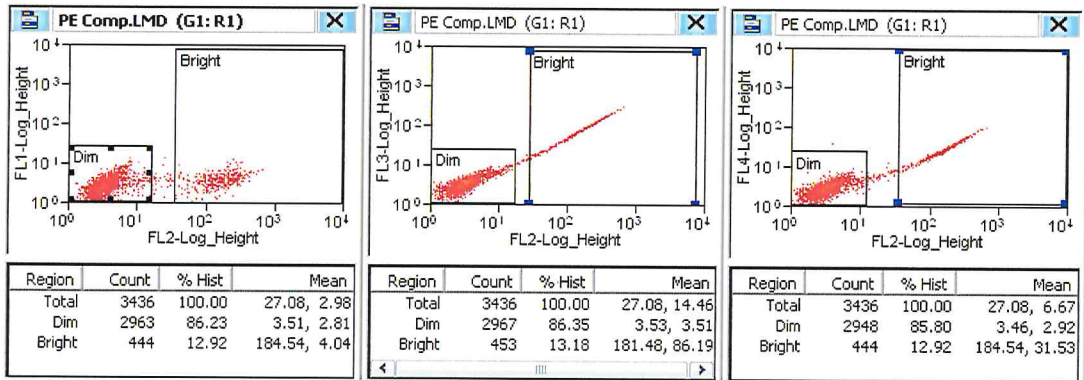


- 4、点击“OK”，自动创建“*AutoComp*”工作页面和第一组用于FL1 (FITC) 补

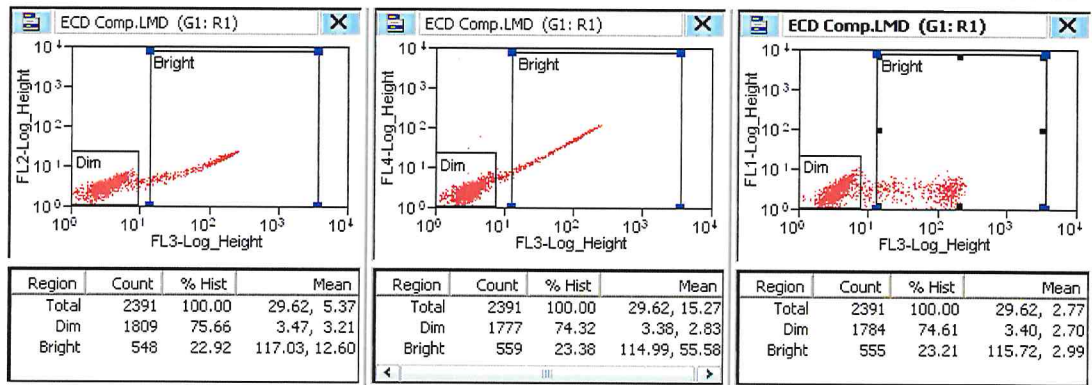
偿调节的散点图，同时弹出“自动补偿向导”对话框（下图上）。在每张散点图上，移动“Bright”和“Dim”门位置，分别圈住FLTC荧光阳性细胞群和阴性细胞群（下图下）。



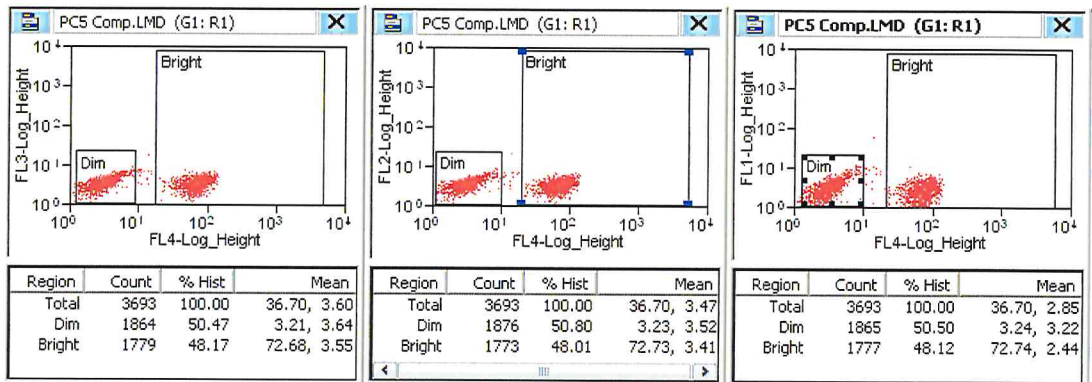
5、点击“Next”，自动进入FL2（PE）荧光补偿界面，移动“Bright”和“Dim”门位置，分别圈住PE荧光阳性细胞群和阴性细胞群；



6、点击“Next”，自动进入FL3（ECD）荧光补偿界面，移动“Bright”和“Dim”门位置，分别圈住ECD荧光阳性细胞群和阴性细胞群；



- 7、点击“*Next*”，自动进入FL4 (PC5) 荧光补偿界面，移动“*Bright*”和“*Dim*”门位置，分别圈住PC5荧光阳性细胞群和阴性细胞群；



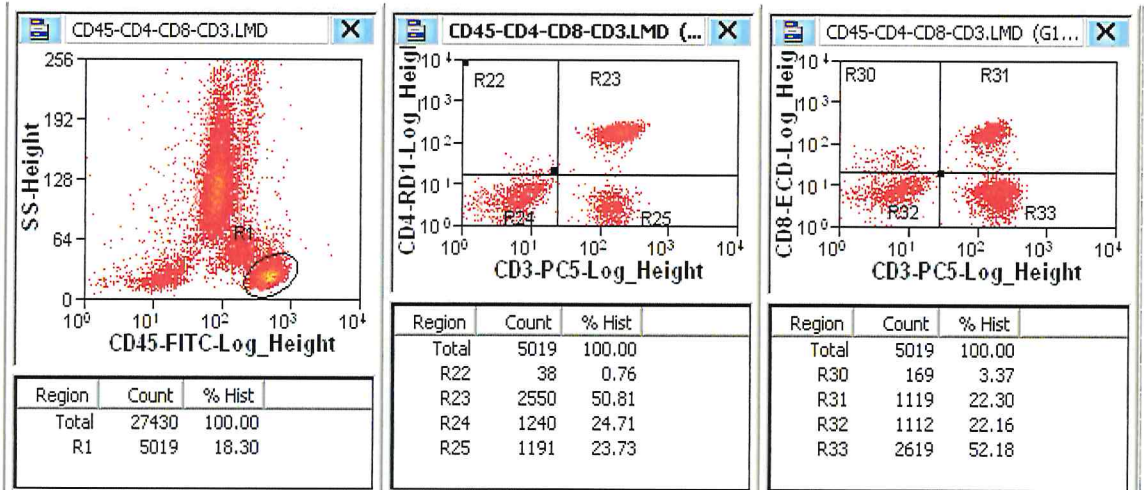
- 8、点击“*Finish*”，自动计算荧光补偿，并返回到方案“CD45-CD4-CD8-CD3”工作页面，同时将荧光补偿值代入此方案；
- 9、检测实验管6 (CD45-FITC/CD4-PE/CD8-ECD/CD3-PC5)，并记录数据。
- 10、将此方案另存为CD45-CD56-CD19-CD3：点击菜单栏“*File > Protocol > Save as*”，指定保存路径，命名为“CD45-CD56-CD19-CD3.plo”，点击“*Save*”保存；
- 11、点击菜单栏“*File > Protocol > Load*”，将“CD45-CD56-CD19-CD3.plo”方案带入当前的Database。更改相应X轴和Y轴的参数名称。
- 12、检测实验管7 (CD45-FITC/CD56-PE/CD19-ECD/CD3-PC5)，并记录数据。


三、数据分析

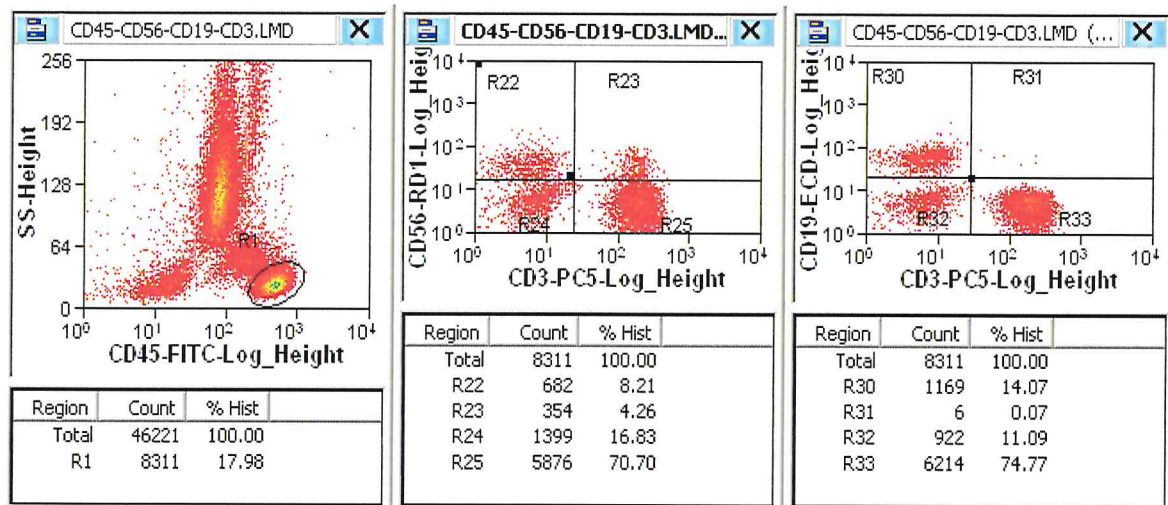
- 1、在当前的Database中，选择“*File > Protocol > New*”，方案自动按Protocol 1, Protocol 2顺序命名。选择该方案，点击“*File > Protocol > Rename*”，在原方案名称处，输入新命名“CD45-CD4-CD8-CD3 ANA”，回车确定。

2、 建立实验方案所需图形（如下图）：

- (1)、 第一张图：CD45/SSC散点图，圈R1门，确定淋巴细胞；
- (2)、 第二张图：CD3/CD4双参数点图，在 $10^1/10^1$ 处做十字象限；
- (3)、 第三张图：CD3/CD8双参数点图，在 $10^1/10^1$ 处做十字象限；
- (4)、 点击菜单栏“*File > Load sample*”，选择45-4-8-3数据，并调整R1门和十字象限位置；



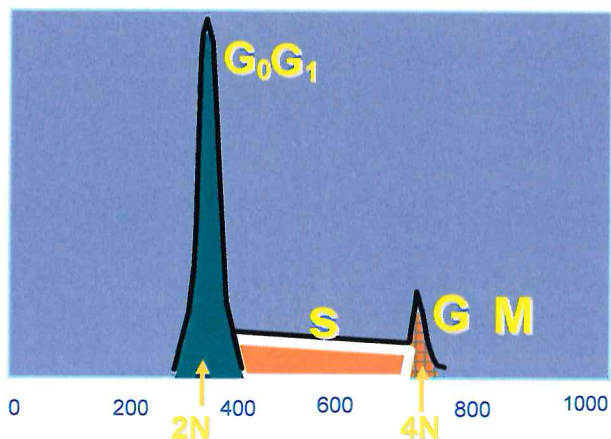
- (5)、 选择“*Sample information*” ，在“*sample template*”处选择“*Duplicate*”如下图左，复制一组点图模板；
- (6)、 点击菜单栏“*File > Load sample*”，选择45-56-19-3数据，并调整R1门和十字象限位置。



DNA测定

【实验目的和原理】

利用特殊核酸荧光染料（PI、EB、DAPI等）标记DNA，通过流式细胞仪检测荧光染料的激发荧光。荧光强度与DNA的含量成正比关系，即DNA含量多少与PI结合量成正比。因此，FCM分析细胞周期时，将DNA含量直方图分为三部分，即G₀/G₁、S、G₂/M期。



【实验试剂】


- 1、 培养的细胞或者外周血单个核细胞（PBMC）
- 2、 DNA Prep Reagents Kit (Beckman Coulter, 6607055, 100test)
 - ① DNA PREP LPR: 非离子去垢剂和氰化钾，用于细胞破膜打孔
 - ② DNA PREP Stain: 含有PI染料浓度50 $\mu\text{g/mL}$ 和RNase

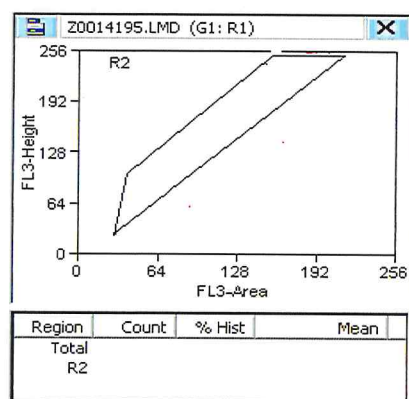
【实验步骤】


- 1、 制备检测样本单细胞悬液，稀释浓度到 $1.0 \times 10^6/\text{ml}$ ，将100 μl 细胞悬液加入流式试管中；
- 2、 加入100 μl DNA PREP LPR，轻轻混匀，室温避光反应10秒钟；
- 3、 加入1ml DNA PREP Stain，轻轻混匀，室温避光反应20-30分钟；
- 4、 用300目过滤尼龙网过滤细胞，上机检测。

【流式细胞仪检测】

一、实验方案建立

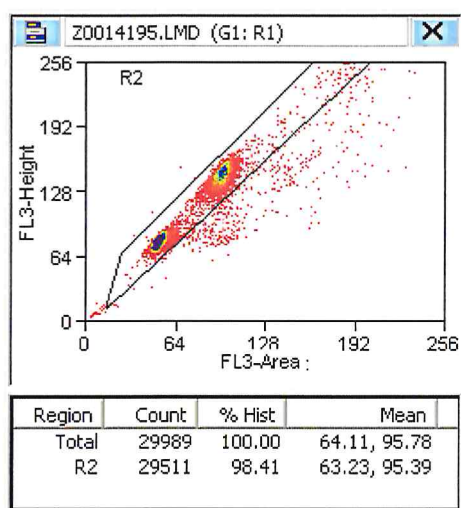
- 1、在当前的Database中，选择 “*File > Protocol > New*”，建立新方案。
选择刚所建的方案，点击 “*File > Protocol > Rename*”，在原方案名称处，输入新命名 “*Cell cycle*” 之后回车确定。
- 2、选择参数：选择 “*Acquisition Tab*” ，在 “*Acquisition Parameters*” 面板处，选择 FS-H/SS-H/FL3-H/FL3-A 。
- 3、建立实验方案所需图形：一张FSC/SSC散点图，一张FL3-A/FL3-L点图和一张FL3-A直方图。在FSC/SSC上设门R1 (G1=R1)，圈目的细胞；将R1 Gating到FL3-A/FL3-L散点图上，使其显示R1门内细胞。
- 4、在FL3-A/FL3-L散点图上，由左下到右上的对角线上，向左上绘制多边形门R2，对角线以下分布的为粘连细胞。



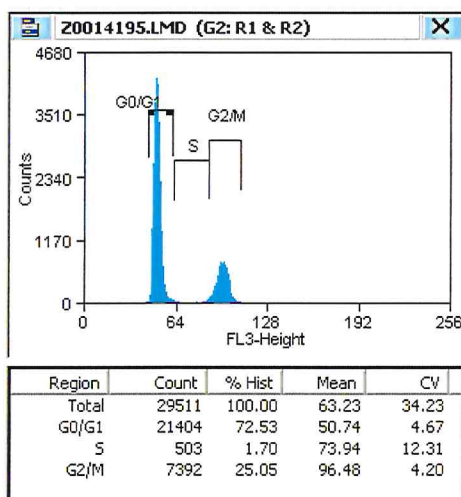
- 5、将R2 Gating到FL3-A直方图上。
- 6、选择 “*Acquisition Tab*” 界面 ，双击 “*Limit*” 的右侧，弹出的对话框中，用 “*Gate Limit*” 来设置检测停止条件。设定G1门内记录10000个细胞后自动停止。

二、获取条件设定

- 1、上机检测样本，调节FSC和SSC的增益、电压，使检测细胞群位于FSC/SSC的图形中央，调节R1门位置，使其圈中目的细胞。
- 2、在FL3-H/FL3-A图上调节FL3电压，尽量使细胞群主体在左下到右上的对角线附件分布，调节R2门位置，只圈定对角线附近集中分布单个细胞。



3、当R2门内获取10000个细胞时自动停止，即可得到细胞周期直方图。



4、选择 “*Edit > Preferences*”，在 “*Sample*” 选项中，将 “*FCS save max parameter bits*” 由 “*32*” 改为 “*16*”；点击 *F3*，保存数据并命名 cell cycle。

三、Multicycle 软件分析 DNA 周期

- 1、在主菜单或桌面上打开 Multicycle 软件。
- 2、在 “File” 下打开待分析的 HST 数据，点击 “Open”，自动弹出周期图形。
- 3、周期图形分析
 - 1) 自动分析：点击 “Auto fit” 自动对图形进行 G0/G1、S、G2/M 期分析拟合。
 - 2) 手动分析：根据图形可以选择几个 cycle。如 1 个 cycle，点击 “1cycle fit”，分别点击对话框中的 “G1 mean” 和 “G2 mean” 按钮，用鼠标左键

确认G0/G1和G2/M期峰值的位置。点击OK软件进行曲线拟合。

- 3) 点击分析和计算区按钮，对分析结果进行评估，6个分析模式中如果两个以上模式报告结果是“poor”，则这次实验失败。



MoFlo XDP 分选

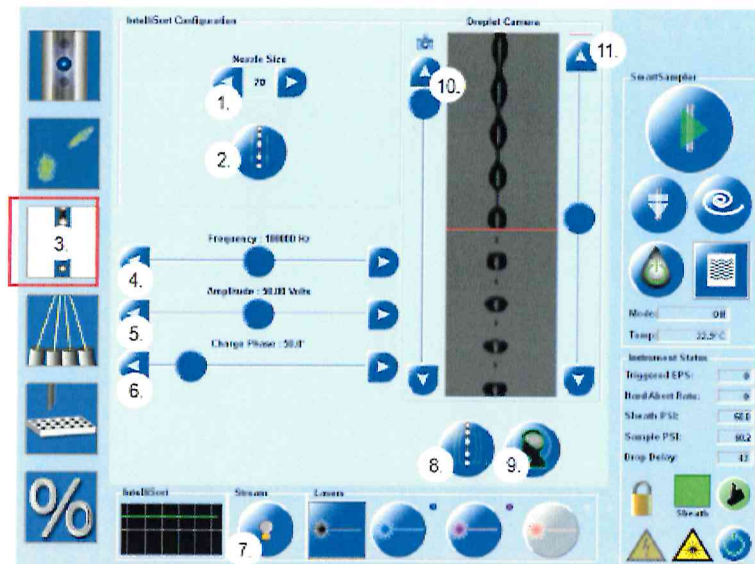
将仪器进行正常开机后，制备需要分选的样本，并且完成仪器必需的质控操作，根据细胞大小选定分选所需要的喷嘴（通常喷嘴直径为细胞直径的3倍左右为佳）。

一、分选前数据的记录：

根据实验需要建立相应的 Protocol，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。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。

二、优化液滴形成

首先按  打开液滴控制屏（Droplet Control Screen），如下图。按图中顺序进行液滴优化。





- | | |
|---------------------------|-------------------------------|
| 1. Enter Nozzle Size | 7. Sort Chamber Illumination |
| 2. IntelliSort Initialize | 8. Drop Drive |
| 3. Droplet Control screen | 9. Enable IntelliSort |
| 4. Frequency | 10. Move Droplet Camera |
| 5. Amplitude | 11. Last Attached Drop Marker |
| 6. Charge Phase | |

(1)、按实验要求在  中选择输入喷嘴规格（如：70，100，……）；

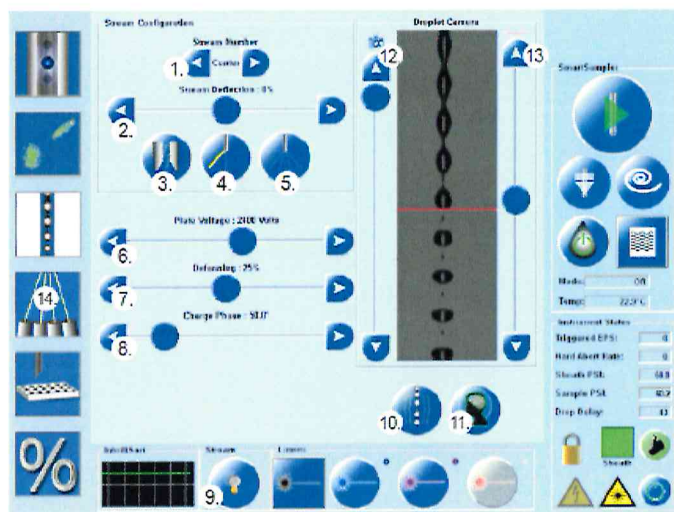
(2)、按下  形成液滴 (Droplet);

(3)、通过调节频率 (Frequency) 和振幅 (Amplitude), 使得液流断点窗口 (Droplet Camera) 的主液流如上图中所示状态; 通过调节 Charge Phase, 保证液束较细, 没有分支。

(4)、通过调节 , 可移动相机, 找到断点位置, 通过调节  可以将红线固定在某一位置, 观察液流是否稳定。

三、优化偏转液流及启动 IntelliSort

将两个电压偏转板插入相应槽内, 按下 , 进入优化偏转液流及启动 IntelliSort 窗口, 如下图。按图中顺序进行优化。



- | | |
|---------------------------------|---------------------------------|
| 1. Select Stream | 8. Charge Phase |
| 2. Stream Deflection Percentage | 9. Sort Chamber Illumination |
| 3. Power Charge Plates | 10. Drop Drive |
| 4. Enable Stream | 11. Enable IntelliSort |
| 5. Test Pattern | 12. Move Droplet Camera |
| 6. Plate Voltage | 13. Last Attached Drop Marker |
| 7. Defanning | 14. Stream Configuration screen |

(1)、打开分选舱照明灯 (图中 9, Sort Chamber Light), 以便于观察液流偏转;

(2)、打开偏转板电压 (图中 3, Power Charge Plates);

(3)、根据需要选择需要打开的液流, 如图中 1, 可选择左 2, 左 1, 中

心，右 1，右 2，可以根据需要全部打开或仅打开所需液流；

(4)、调节偏转板电压 (Plate Voltage)，如需进行四路分选，将电压调至 4000V；

(5)、按下分选测试键 (图中 5, Test Pattern)，检查四路分岔；通过调节液流偏转百分数 (图中 2, Stream Deflection Percentage) 确定分选液流的位置，使其能够落入相应接收容器内；通过调节 Defanning 可调节废液流较细，没有分支；通过调节 Charge Phase 可调节四路分选液流较细没有分支；

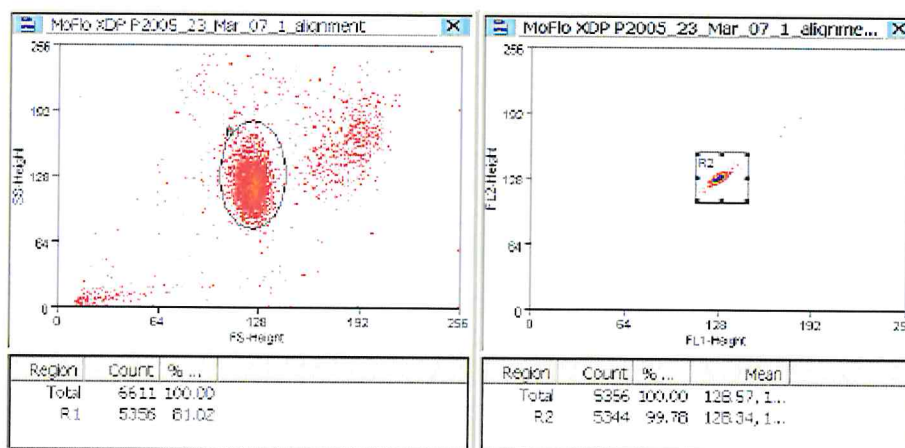
注意：液束应该没有分支。如果加压后，液束有分支或有液滴溅出，关掉电压，用棉签蘸蒸馏水清洗偏转板及周围可能有盐溶液溅到的地方。待干了以后，重新打开电压，观察液束情况。切记：先关电压再操作，保证安全！

如经过上述调节后可以保证分选液流稳定，可关掉测试。如需使用 IntelliSort 功能，按下 IntelliSort 键 (图中 11, Enable IntelliSort)；

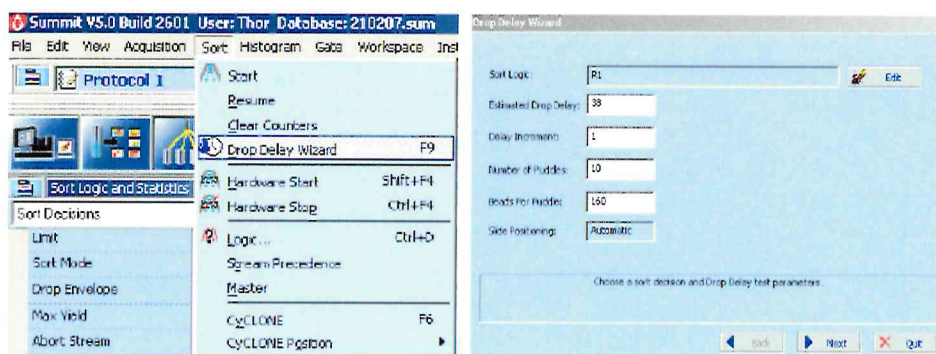
当启动 IntelliSort 时，频率、振幅及 Charge Phase 均变为灰色，不可再调节；IntelliSort 启动后，当环境温度变化在 $\pm 3^{\circ}\text{C}$ ，鞘液压力变化在 $\pm 1\text{psi}$ 条件下，可自动调节液滴延迟 (Drop Delay) 变化范围为 10%。


四、确定液滴延迟 (Drop Delay)

- 1、将 Flowcheck 微球做为样本，上样，调节进样速度为 100EPS；
- 2、建立一个新的 Protocol，命名为 Drop Delay，包含两个双参数点图，一个 FSC/SSC，一个为 FL1/FL2，在点图中设门圈中单个微球，如下图：

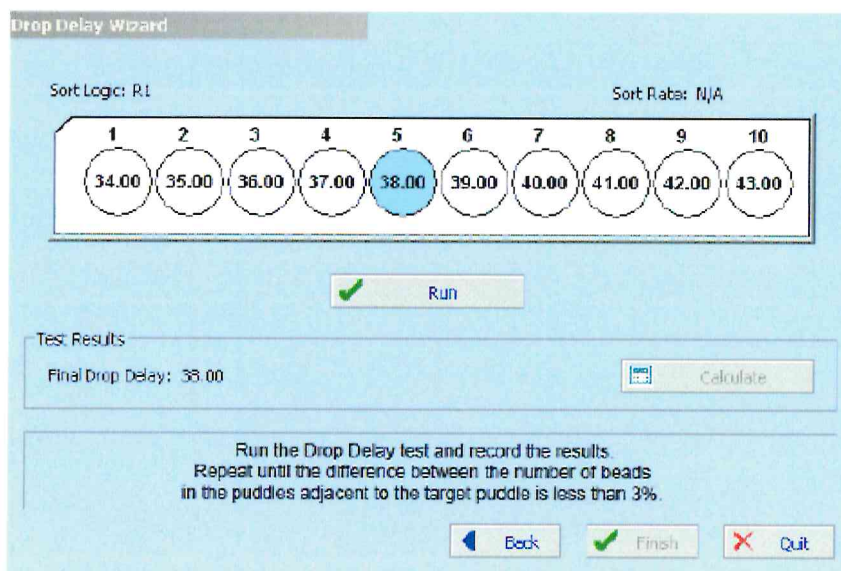


3、将分选收集器移开，在分选菜单中选择液滴延迟向导（Drop Delay Wizard）如下图左；液滴延迟向导（Drop Delay Wizard）窗口弹出，如下图右；

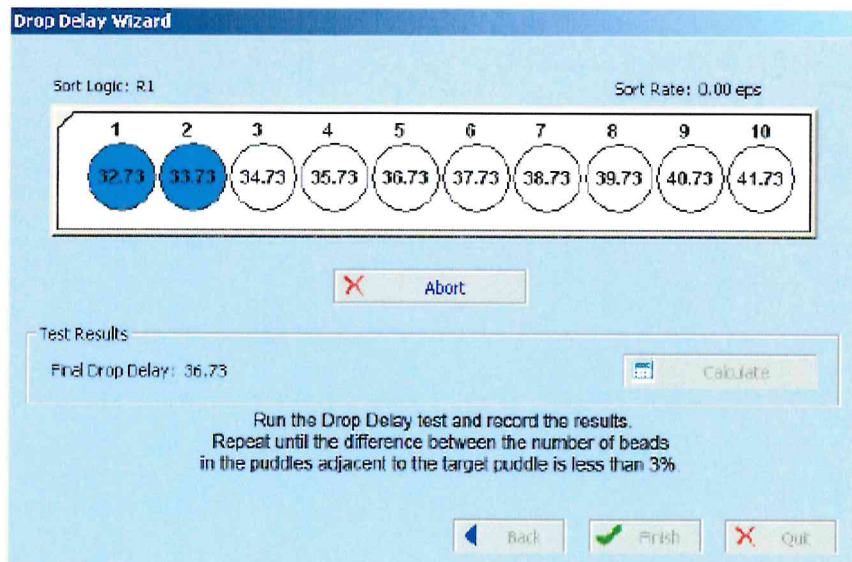


4、CyCLONE 将移至分选舱门前，在其上放置一张干净的载玻片，点击  Edit，在弹出的 Right 2 Stream Sort Logic 对话框中选择 R1，点击 OK；

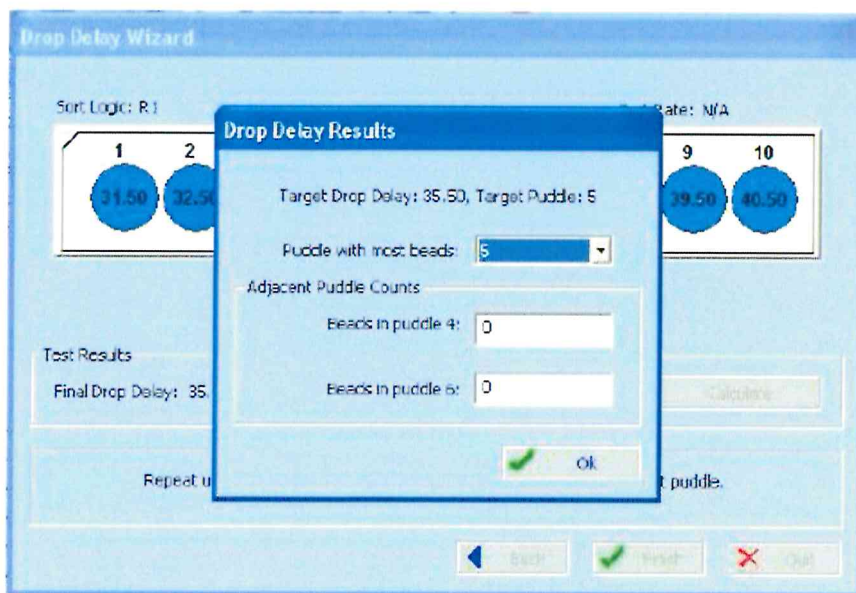
5、点击  Next，弹出如下窗口；



6、点击  Run，开始分选，如下图；



7、分选完毕，取下玻片，于显微镜下观察各液滴中的荧光微球数量，确认微球数量最多的液滴，及其相邻两个液滴中的微球数量，并将其输入弹出的对话框中，如下图；




8、重复上述步骤 6、7，直至数量最多的微球位置为第 5 滴，第 4 和 6 滴中的微球数量总和 <3 ，此时的分选纯度可达 97%；

9、点击“Finish”，结束。

五、分选

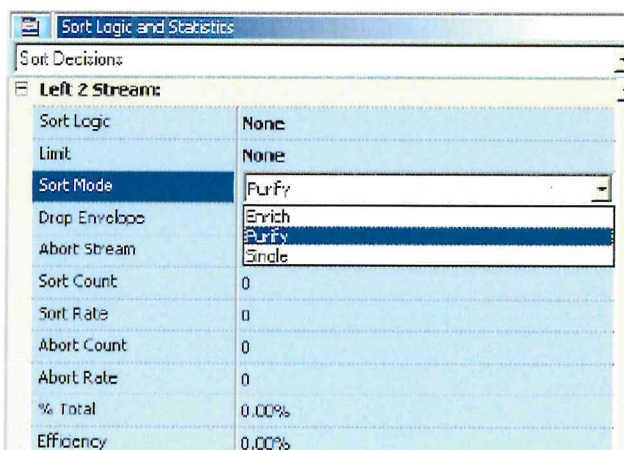
上述工作准备完毕后，即可安排分选。

1、打开刚才记录实验数据的 Protocol。在 Summit 软件中打开 Sort 分选标签

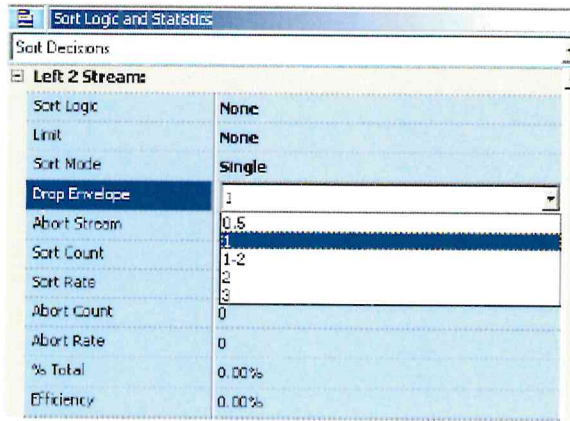
，在 Sort Logic and Statistics 窗口的下拉菜单中选择“New Decisions”，如下图左；弹出 Sort Logic and Statistics 编辑窗口，如下图右；



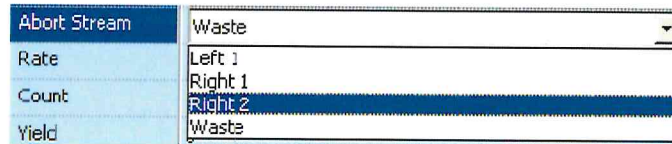
2、在 Sort Mode 右侧的窗口双击鼠标，即可显示下拉菜单，可从选项中选择合适的收集模式（Purity 纯度，Enrich 富集，Single 单细胞）；



3、从 Drop Envelope 中选择 Drop Envelope 值；



4、从 Abort Stream 中选择回收的细胞收集容器；



5、开始分选

- ①打开分选收集装置前的门，放入新的收集管；
- ②在上样架上放上要分选的样品管，上样；
- ③在 Sort 下拉菜单中选择 Start；
- ④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。

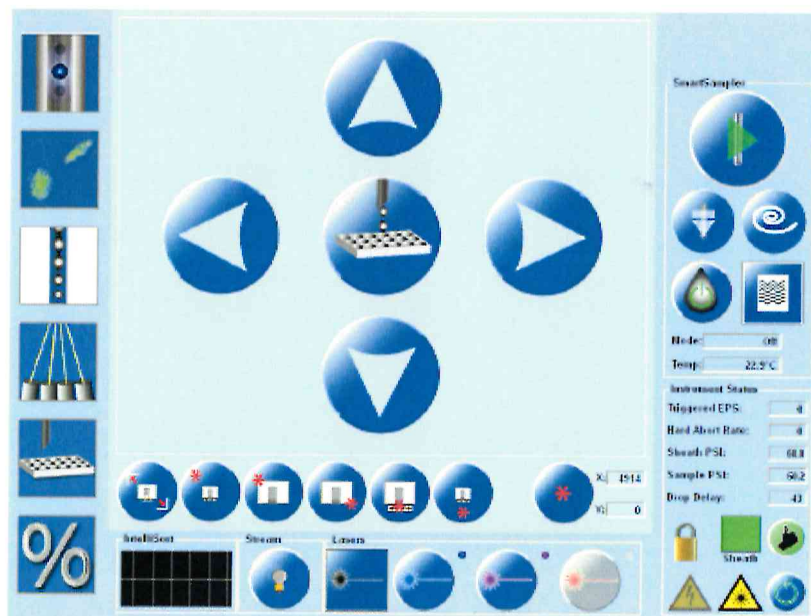
六、分选完毕后的检测

- 1、从载样端口上取下样品管，冲洗进样管。
- 2、从分选收集室中取下分选的收集装置。
- 3、检查每一个分选收集管的分选纯度。

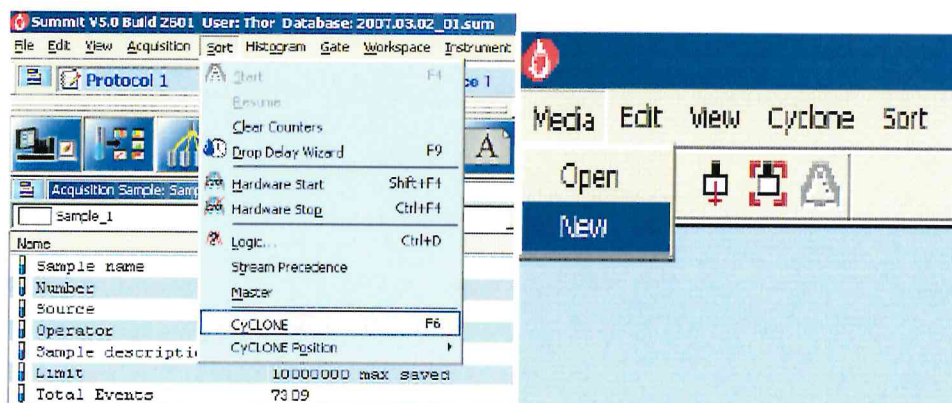
CyCLONE 的使用

如需使用 CyCLONE 分选装置进行克隆分选，需首先进行 CyCLONE 的定位。点

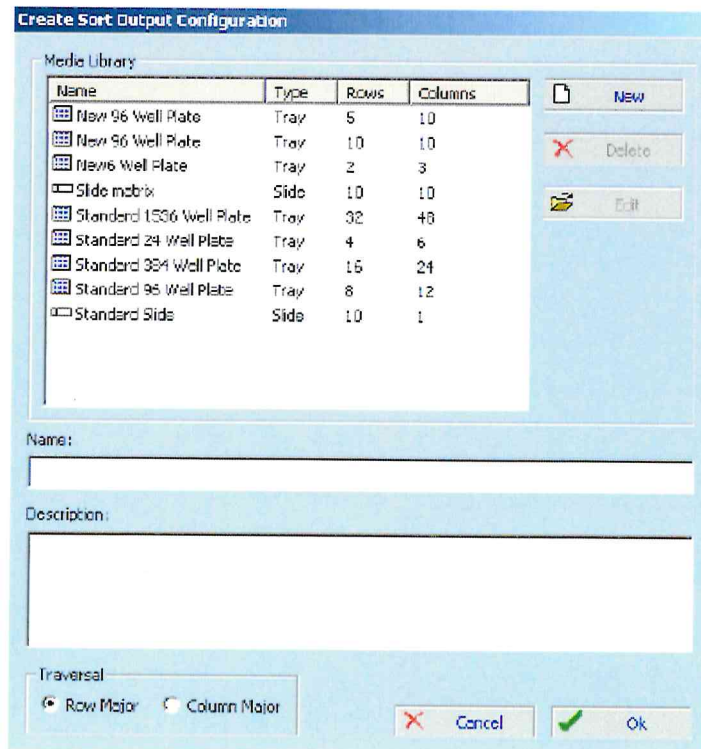
击 ，进入 CyCLONE 配置屏，如下图：



- 1、在 Sort 下拉菜单中选择“CyCLONE”，如下图左；在弹出的窗口中选择“Media” → “New”，如下图右；



- 2、在弹出的对话框中选择合适的接收装置，并在 Name 栏中为该装置命名，点击 OK；



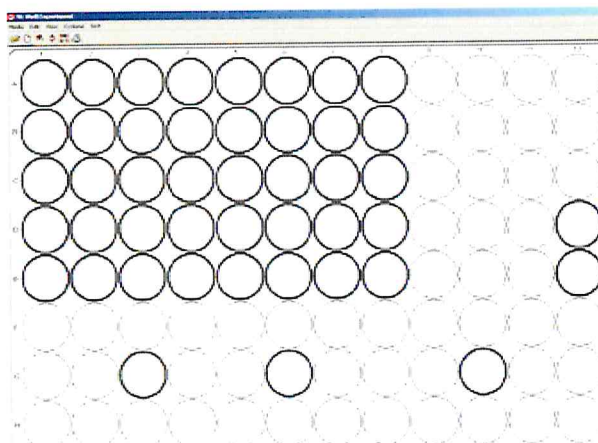
3、将所用装置置于 CyCLONE 上，如 96 孔板；点击 Home  键，定位起始收

集点，点击  测试液滴是否可以正好打在目标位置上，如有必要，可按 、、、 键调整位置，调整后，按  键确定位置；

4、点击 End  键，定位最后一个收集点，如位置不合适，按上面步骤进

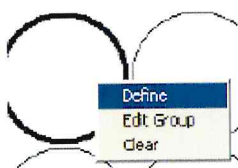
行调整，最后按  键确定位置；

5、当选择了一种接收装置后，即出现了对应的 Layout 窗口，选择需要接收的位置，如下图；如需选择多个孔，可以按住 Ctrl 键，再点击欲接收的孔；如需选择连续的孔，可点击第一个孔，再按住 Shift 键点击最后一个孔；如需删除某一孔，只需在该孔中再点一次即可；

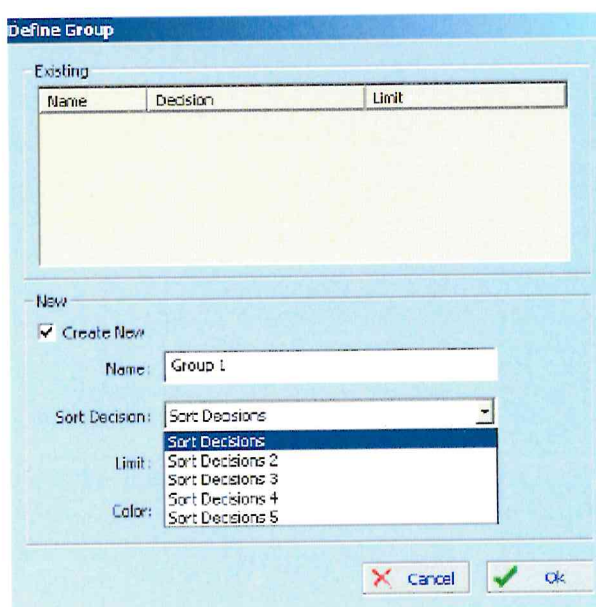


6、右键单击某一选中的孔，并选择 Define，如下图；

Figure 7.28 CyCLONE Define Layout

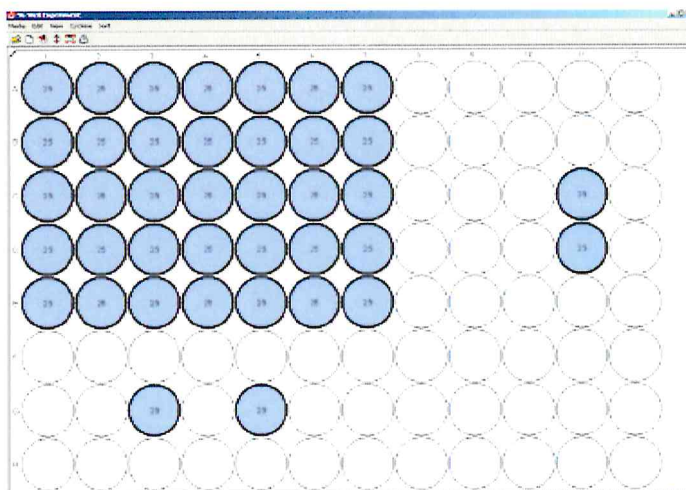


7、如尚未定义 Sort Decision，需将其设置为 R2；

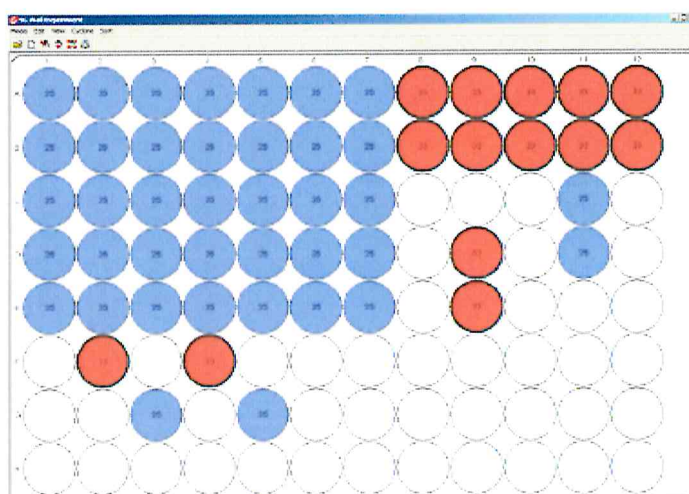


8、在 Limit 中设定所需收集细胞数量；

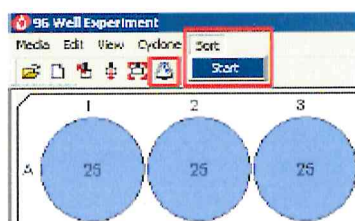
9、设置分选收集孔颜色，点击 OK；



10、 如需进行不同的收集选择，可重复上述步骤，进行多重选择，如下图；



11、 选择 Start，开始分选；



12、 分选完成后，自动停止。