

Beckman 流式细胞仪操作流程 ——杨真整理

1, 准备过滤且高压灭菌的 1XPBS, 清空废液桶。管道连接颜色一一对应就可以。

2, 选定喷嘴: 超声清洗喷嘴或者用注射器反复冲打喷嘴。


鞘液桶的压力要和喷嘴推荐的压力匹配

Nozzle Size (μm)	Recommended Pressure (psi)	Approximate Frequency (Hz)	Approximate DD Amplitude (Volts)	Approximate Drop Delay
50	80-100	120000	25	25
70	60	100000	15	40
80	60	80000	30	45
90	40	60000	40	40
100	25	40000	30-50	40
120	20	30000	50	35
150	15	20000	50	30
200	5	7000	50	15

3, 依次打开空压机, UPS, 电脑, 最后打开仪器主机 (顺序不可乱)。打开仪器软件 Summit 软件。

4, 打开需要用的激光 (光强不用调节), 355 激光需要预热三十分钟, 其他激光无需预热。



5, 打开 , 看鞘液桶与废液桶表上的压力是否正常。旋转主机上的旋钮调节鞘液以及样品压力 (样品压力比鞘液压力略大就可以了, 如果做细胞测试, 压力差最好保持在 0.8 以内, 可以适当提高细胞浓度)。若鞘液桶压力上不来, 查看鞘液桶是否关紧, 密封橡胶圈是否擦干。

6, 查看激光照射液流的小仓室以及侧边的镜子是否干净, 必要时擦洗镜子。在触屏上选定今天要用的喷嘴尺寸

7, 装上喷嘴, 倒置流动室打开液流排出流动室的气泡。(鉴于气泡的巨大影响, 喷嘴的黑色套头要拧紧, 一段时间, 可以给密封圈上油) 打开液流, 确定液流通过

小孔，流到废液槽。**粗调喷嘴垂直，在大致的频率以及振幅下加电，观察液滴的形态是否圆润正常。**如果液滴异常，重新清洗喷嘴。

8，打开仪器左右的液流抽屉，打开鞘液过滤器排气阀 3sec 再关上，如此往复 10 次排除鞘液过滤器气泡。

(Note: 接下来是调机器步骤，可以排气泡十分钟，然后上 84 稀释液上水跑跑冲洗管道，顺便稳定液流)

9，液流调节：

1)，打开触屏中的第一项粗调屏幕，打开照明灯，使得 pinhole 上能看到液流（太暗可能是喷嘴太低了，或者聚焦调过头了）。

2)，液流垂直调节： 可以先用眼睛观察，粗调喷嘴的垂直，让液流进入废液槽的正中间。

location 1， 流动室工作位置（喷嘴可见），

location 2， 流动室在最高的位置

在 Location 1 调架子（左右与聚焦千分尺），在 location 2 调喷嘴（前后与左右旋钮）。如此反复。使得在 location1 跟 location 2, 镜头中的液流没有明显变化 (Note:调节过程中，location 2 的调节幅度通常要大一些，约为人眼所观察到的拍偏差的三倍以上。上下千分尺，顺时针调高，逆时针降低)；

10，激光光斑调节：

如果一开始没有找到激光光斑，需要调节架子的**聚焦千分尺**。当绿色的线出现时，调节上下千分尺是的喷嘴达到绿色的线（note：根据屏幕中的文字提示操作即可）；

11, 扣背景: 每次做实验, 都可以抠一下背景, 后面出错的机会会少很多。

12, 计算 laser delay (标准微球): 每次换一次喷嘴, 或者喷嘴没换, 但是鞘液桶的压力变化了, 都要重新算一次 laser delay。首先扣背景, 然后上标准微球, 先找到微球群, 然后开始跑 laser delay 计算程序 (开始上样速度可以设置低速, 让 eps 小于 100。机器会逐渐加大上样速度, 在达到 100eps 的时候, 开始做 laser delay。)

Laser delay 校准之后, 会有结果显示:



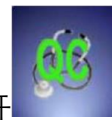
13, 光路调节 (标准微球): 喷嘴支架细调—>确保激光与液流正交, CV 值达到理想状态, 确保在分析与分选中, 细胞群体可以很好地分开

1), 在 summit 软件里选择 File > Protocol > Load Protocol to open the Alignment Protocol (This example protocol can be found in "C:\ProgramData\BeckmanCoulter\Summit\6.xx\Protocols\BCI_Alignment.pl o". 也可以保存我们自己的 protocol);

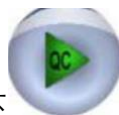
2), 设置好触发信号 (FSC 或者 SSC), 设置好阈值 (不高于 5%), 显示数选 100, 打开所用的激光的 shutter, 调节前侧向电压, 找到小球群, 有必要可以 boost 样品, 微球聚焦旋钮, 帮助寻找小球群。

3), 找到目标信号群后, 换用荧光信号, 调节相应 PMT 电压, 尽量让信号群在散点图的中间区域。微调架子的左右 (动得不大)、前后 (即聚焦, 主要调节) 的千分尺使得每个通道的信号都达到最强最聚集。(note: 选择荧光坐标, 可以

根据具体实验需求。除了 355 激光之外，其他激光都是集成的，通常往红外方向的通道越难调。调节 355 激光的时候，其中一个坐标为 355 即可，然后调节 355 激光的前后与左右，如有必要，再动上下)。



14, 做质控 (标准微球): 在上一步调好光路后, 就可以打开



屏幕。按下, 仪器将执行自动 QC (用于确定之前的调整的液流以及光路是否是理想的。CV 值尽量要小于 3, 越小越好。其中红光及红外的 CV 值可能不容易得到理想值)。

15, 分选调节



1), 优化液流: 仪器自动优化液流, 确定频率与振幅 (70um 喷嘴, 对应 15V 电压; 100um 喷嘴, 对应 50V 电压);



2), 手动调节, 当仪器不稳定的时候, 优化频率可能需要手动确定, 上下调节频率, 观察断点位置, 找到断点处液流变化最小的位置, debubble, 看看断点的位置是否改变, 用以判断液流是否稳定。



3) 分液调节: 打开电压, 看看中心液流是否稳定, 如果产生偏差, 有可能



是电极板没有擦干净。打开多管分选按钮, 然后调节 **charge phase**, 找到图片清晰区间, 选取中间值。(清晰的区域大, 说明液流越稳定)。**defanning** 用于调节中间液流的集中程度, 往往只有一个值比较合适。



4), 自动计算 drop delay, 按下 Maintain button



, 使得 Dropdelay 得到监控和维持。可以给断点窗口拍个照, 分选时时不时观察液滴

断点。当液滴的断点改变超过 0.5 滴时，dropdelay 就不再准确，仪器将自动停止分选。机器自动寻找的 dropdelay 不一定准确，需要上标准微球打点，显微镜观察确定。打开 Tube 四路分选，放上玻璃片打点确定分选优化结果。如果液滴不清晰有拉丝情况，则不适合分选，需要重新进行分选调节。

5), 分选设置： 在分选栏主页面，选择分选类型，调节侧液流的偏转角度(孔板



分选，默认用左一路)，按 保存位置。

16, 关机：在关机前，可以高速跑一管清洗液 (BD 的 bleach) 以及 DI water, 清洗进样管路。然后点击屏幕上的关闭按钮，关闭仪器。继续放一管 DI water 放在样品腔里；按照提示操作。然后依次关闭电脑，UPS，空压机。

F2, 获取开始与结束

F3, 保存。保存窗口会自动跳出来

F4, sort 开始与结束 control+Z, 刷新