

# FACS

## Contents

- 1 每人必读 (by zl)>>
- 2 提高效率的几点注意 (by zs, liang)>>
- 3 BD Jazz how-to (by zs,wj,oyhc,zl)>>
  - 3.1 做之前的准备工作>>
  - 3.2 开机>>
  - 3.3 液路调节>>
  - 3.4 调节分选液流偏转>>
  - 3.5 光路调节>>
  - 3.6 荧光信号补偿>>
  - 3.7 调节 Drop Delay>>
- 4 Others>>

## 每人必读 (by zl)

- 准备分选后所需的细胞培养液，需含有抗性；实验室现有的培养液配制中一般的都含有1xPS，如果没有请补。
- 将准备分选尚贴壁的细胞用PBS洗一遍，消化充分，中和，离心，重悬于0.5~1毫升体积的PBS溶液，不是PBS+EDTA，如果信号强或者系统灵敏足够，含抗性的细胞培养液也可。
- 细胞过滤：将打开制备管无菌包装袋，开盖，40 $\mu$ m过滤器像帽子一样扣在管口，细胞液吹匀，吸取，枪头稍用力按压在过滤网上，缓慢打出液体，打入到需要使用BD专用的6-ml圆底试管，盖盖盖子；冰上放置【冰很脏，注意无菌操作】，等待上样。吸取1-ml的细胞培养液于第二支BD管中，供收集分选出的细胞。
- 流式分选所得活细胞，直接种到合适的环境，静置贴壁后再更换培养基；离心的方法不可能收集到几万个细胞。分选后处理：
  - 培养基需要有1x PS，也可以是2x甚至3x的双抗；
  - 细胞数目少于1000个，直接放到96孔板，每孔最多可以有250 $\mu$ l培养基（请阅读 96-well cell cloning>> 要点）；建议在95个孔分单细胞的同时，第96个孔收集1000个细胞，从而较早知道该批细胞的情况如何；
  - 细胞数目在 $10^4$ ，铺到24孔板内的一孔，待细胞贴壁后更换培养液；
  - 细胞数目在 $10^5$ ，铺到12孔板内的一孔，待细胞贴壁后更换培养液；
  - 需要**注意**的是：如果最终分选得到了3毫升液体，是有2毫升鞘液混进了培养基，这对细胞生长是不利的；务必在细胞贴壁后马上更换培养基 / 为避免忘记，可将需要更换的培养基取在一个试管中，放置在生物安全柜内试管架上。
- 分选后，细胞应在培养箱至少2天不动；假设皆为污染状态，适当分区以防污染其他细胞。

## 提高效率的几点注意 (by zs, liang)

按如下实践，应该可以在开机一小时后开始正式分选样品。

- 使用后马上补满鞘液PBS、清空废液；确保分选当天有2/3体积以上的鞘液PBS。
- 排气泡的关键是桌角的蓝色滤器，先保证滤器没有气泡后，再把之后的连接管道检查一遍。
- 超过3天没使用机器，PURGR操作时直接上75%酒精；若连续多天使用，关机前用ddH<sub>2</sub>O封住喷嘴，再关掉液流。
- 排气泡后，直接调取已有WORKSPACE（桌面/CL LAB/LC），开荧光上RAINBOW珠子看一下FSC/SSC是否最佳，FITC/mCherry是否聚集在右上角。荧光调节旋钮处已经加了挡板保护，仅仅在荧光信号不对了才需要调节。
- 通过TEXT确定好振幅后，借助屏幕上的贴纸确定液路是否稳定；计时10分钟，这个时间可以继续处理待分选的细胞，临分选前再调DROP DELAY。
- 荧光无法在细胞房内显微镜上看到的，才需要设阴性细胞的GATE。
- 可以小体积胰酶（先加入后吸走大部分）消化，然后1:1培养基中中和，吹打均匀后不更换到PBS就用于分选（需置于冰上，减慢细胞粘连的形成）。MDCK/MCF10a因为细胞极易容易粘连，建议制备后马上分选。对于培养的细胞株，40微米的过滤器可以不用；从组织或三维培养物中分选细胞时，必须用。
- 确保足够的细胞密度，参考的分选体积：满的10cm<sup>3</sup>皿，1毫升；满的6cm<sup>3</sup>皿，0.5毫升；满的35mm<sup>3</sup>皿，0.3毫升。
- 制备CRISPR敲除的细胞，可以在分选96孔时，最后的3孔，每孔收1000个细胞用于快速确定此次切割的效率。

## BD Jazz how-to (by zs,wj,oyhc,zl)

### 做之前的准备工作

1. 准备好用具：ddH<sub>2</sub>O洗瓶；试管架；无尘纸；记号笔
2. 装有喷嘴的小管放在专用超声仪中超声10 min（超声前加水，超声后倒水 / 死水易长菌；超声前把盖子拧紧）。
3. 检查鞘液桶和废液桶的液量是否合适，检查后注意密闭金属盖，尤其是废液桶盖。如果需要添加鞘液，一定先要清空废液桶。最好是实验前一天检查并补充鞘液，避免液体倾倒中产生的气泡影响液流的稳定。
4. 取下电极板，无尘纸沾水擦净，擦干，再装入。
5. 注意：实际操作中有任何不清楚的地方，可以参考机器旁的操作手册，否则咨询ZS, WJ, OYHC。

## 开机

Jazz共有6个开关，开启顺序为（可参考操作手册步骤）：稳压器 → 地上大机箱 → 机箱右侧大泵（顺时针拧） → 机箱左侧小泵 → 电脑，等半分钟 → 分选仪。

1. 观察废液桶压力表读数应该在5~10之间（否则调节负压泵左侧旋钮），鞘液压力表读数应该在30左右；若有问题则检查金属盖以及减压阀是否拧紧。
2. 赶气泡（此步骤最重要）：将接废液的Flush Bucket放在喷嘴下方，点击软件操控板上的Rinse，反复多开关几次，同时不断拍打过滤器，尽可能赶走肉眼可见的气泡（尤其是重新加过鞘液，一定要仔细排汽泡）。
3. 安装喷嘴
  1. 将超声后的喷嘴小心的用镊子夹出（注意任何时候都不要碰到喷嘴的鼻尖），放在吸水纸上吸干水。用注射器吸取3毫升高无水乙醇或ddH<sub>2</sub>O，冲洗喷嘴几次，正反向都要冲洗。
  2. 取出保存在15毫升离心管中的金属套，用镊子夹住喷嘴小心放在金属套中间，用帽子上带的软管调正，用两只手的手指把带着喷嘴的金属套拧在机器上。拧紧前，放置Flush Bucket在喷嘴下方，然后拧紧。
4. 用吸水纸小心吸干喷嘴头周围的液滴。

## 液路调节

1. 赶走鞘液管末端（喷嘴处）的气泡
  1. 点击Purge，这时喷嘴和连接的鞘液管中的液体会排空。
  2. 把Flush Bucket放在喷嘴下方，装满水（一定要没过喷嘴尖），点Purge：这时水会缓慢的吸入喷嘴和鞘液管，仔细观察鞘液管有无气泡。如果有气泡的话，拿掉Flush Bucket再Purge，重复刚才的过程，直到气泡消失。如果不行，重复，75%乙醇、水、空气。
  3. 待液面露出三通管时，点Stream，擦干喷嘴周围的液滴。
2. 保证电极板处于打开状态。在样品架下方垫一块吸水纸。点ILLUM按钮，会有红色激光出现，拿掉Flush Bucket的同时在屏幕上的第三个摄像窗口看是否有亮点，如果没有则需要立即调节喷嘴上方的X、Y方向黑色旋钮，前后左右移动，使亮点出现并且最亮。如果有液体溅出，及时擦干。
3. 再调液流，看最上面的摄像窗口，调节银色金属旋钮：X方向是左右，Y是聚焦，Z是喷嘴高度（一般不要动）。先调节Y轴使液流最清晰，再调节X使液流处在正中间；看第三个窗口中的亮点是否变化，通过Y/X的调节保证液流是最亮、最清晰的。
4. 打开File ~ Restore ~ workspace，打开QC，在Sort setting中设置振幅 Pizeo Amplitude 为3~6之间，下面的频率 Prop Frequency 为39.2（一般无需改动）。关上电极板。
5. 调节单独的Z轴旋钮，在第二个视窗中能看到第一滴刚出视野的状态。稳定15min后再进行微调。分选过程中如果有变化，立即停止分选，待重新液路稳定、调整液滴后再开始。分选中出问题的原因多是由于气泡尚未排干净。

## 调节分选液流偏转

此步骤在上样品前要经常重复。

1. 点亮Plate（此时会在电极板上加电），然后点Test Stream，会看到第三个窗口有三个亮点。如果不是三个亮点，调节振幅 Pizeo Amplitude，使亮点间隔最大。
2. 点Flash change，看亮点是否还在，间距是否最大；否则再调节振幅。
3. 点Short Flash，同上检查；都正常则液路及偏转都调节完成。

上述步骤，类似粗调、细调和微调。

## 光路调节

光路调节时，可关闭电极板/Plate。

1. 打开两个激光；如果看不到，用手指点击小室门右上的 reset director（找不到的可参考操作手册44）。需要观察喷嘴室侧壁是否有线性激光，不然微调荧光旋钮使其呈线性。同时，摄像窗口的液流中需要两条较亮且清晰的光线。
2. 上Rainbow样品（在BD管中，1毫升ddH<sub>2</sub>O加2滴彩色珠子，避光四度保存直至用完）
  1. File ~ Restore ~ QC模板；或者在Worksheet中新建两个散点图，第一个图的横轴是FSC而纵轴SSC，第二个图的横坐标为DSPs-\*530/40[488]FITC而纵坐标为DSPs-585/29[561]PE/dsRed（看荧光数据，需要勾选Cytometer Setting中对应通道的log）。
3. 在Recording Settings 窗口中设置本次分选存储文件的路径，文件名和收集信号数量，Default Display Count设为200。
4. 点Sample, Acquire, Boost（瞬时加压）几下，上样速度100个左右/s（1.5psi左右）。
5. 先调节前/侧向角（参照操作手册51），使黑点不要太靠近边线（mean值在2000左右为宜）。
6. 此时可在第一摄像窗口看到亮点。微调荧光按钮，使黑点聚集在图的最右上角。
7. 激光调节，先蓝色激光，再调黄绿激光。调节荧光时，主要使用荧光相关的旋钮；而后是调FSC。
8. 加电，确保液流及偏转是正常的。

## 荧光信号补偿

并非每次都要做此步骤，除非发现分选后纯度不高，且回测时有问题，则再看是否需要进行荧光补偿的调节。每次更换样品前，按一下Back flush，反冲，把上样针内样品冲回原试管。

1. 配制阴性管 / 无荧光细胞、PE / 红色荧光细胞、FITC / 绿色荧光细胞、PE+FITC / 红绿色细胞。
2. 先上阴性管，按Sample上样，点击Acquire进行预览，看Worksheet中散射点，调节FSC和SSC电压，使样品在散点图上分群明显（从左到右：碎片、单细胞、团块 / 多细胞聚集）。如果有必要，在Cytometer Setting中调节Trigger Level的阈值（默认3000左右）以减少碎片又保证目的细胞群的完整。

3. 在第一个图中圈定目的信号门P1，单击选定第二个图，在Gate Hierarchy中选中P1且只显示P1，即仅显示目的细胞门P1内的颗粒。在图中画一个十字象限，右键图形，选择Statistics View，即出现统计结果。要注意All Events / P1 / P2 / ...的先后上下关系，否则可以在Gate Hierarchy中通过拖放改变。
4. 在荧光点图中，调节FITC/PE电压，尽量使阴性细胞位于左下角的格内。记录数据（Record）。打开Compensation窗口，点击Manage Parameters，选择相应的通道30/40[488]FITC和85/29[561]PE/dsRed，点OK。此时，Compensation窗口会变化。
5. 更换FITC样品，Sample, Acquire，看荧光信号在图上的位置。在Compensation窗口中，调节530/40[488]下的585/29[561]的数值，使荧光信号与阴性管中心点的连线与X轴平行。Record。
6. 上PE样品，调节585/29[561]下530/40[488]的数值后Record。
7. 上样品管，Sample, Acquire，看FITC和PE所处象限位置是否正确且聚集。

## 调节 Drop Delay

延迟是指液滴形成后多久加电实现细胞的偏转，对活细胞分选很重要。

1. 反冲上样针，用水润洗，Boost几下，增加上样速度至4.0；稍等，待之前样品流干净。
2. 上AccuDrop样品（在BD管中，1毫升ddH<sub>2</sub>O加1滴珠子，四度保存直至用完），Boost几下；当有信号出现时，降低上样速度至1.2左右。在FSC和SSC图中，框起所有散点；在Sort layout中选择AccuDrop模式，选择P1，检查Test stream。
3. 点AccuDrop滤镜。可以看到细小的亮点处于液流中间，Sort Layout的AccuDrop setup点start；如果亮点没有向左偏转，则调节Drop Delay的数值（约在36~39之间），使亮点偏移到左侧（左侧为最亮，中间最弱）。需注意，Drop1不变则Drop Delay不会变。
4. 调节液流角度。在样品架放置含有少量水的BD管，玻片覆盖在小管子上。在sort layout使用2-tube模式。按sort ready，再是test stream。需要在玻片上合适位置有液滴，即液滴打进了收集管；而后应该看到管中液面有漩涡，即证明分选出的样品直射到管底而不是打在管子边缘（通过调节左右电极板的电压或者样品台的位置来实现）。
5. 调好用乙醇洗涤上样针5min，无菌PBS再洗涤5min，就可以上样进行正式分选了。注意：每次更换样品前，按一下Back flush，反冲，把上样针内样品冲回原试管。

## Others

- 流式划门选颜色时千万不能选黑色，BD软件直接死掉
- 国重的MoFlo流式细胞分选仪在网上预约系统中没有录入；故要做分选，请提前电话或者见面联系沈素芹老师【手机：139-1720-6242】。预约的前一天，跟负责老师再次确认实验时间、样品数目及要求；同时提醒鞘液。
- 国重的MoFlo分选系统需要调试约1~2小时，提前准备好培养液、消化好的待分选细胞、灭菌枪头，40μm孔径过滤网，到国重平台等候；房间温度较低，注意保暖。
- Rainbow 货号URFP-30-2 spherotech.com (lot AG03)
- Accudrop BD货号345249
- **BD FACS ARIA2**>> 操作
- 重装win7的x64后的操作：使用电脑的驱动包补齐驱动，安装sorter 1.2，产生x86下面两个目录BD和BD Biosciences（抱错一个快捷键设不了没有问题，手动添加software pressureapp sortview）；遇到cytometer Error连不上的问题，手动设置电脑网卡IP为192.168.111.2（主机111.1 液流111.3）

Categories>>: [Lab>>](#) | [Library>>](#)