

目录

Contents

BD LSRFortessa 流式细胞仪工作所需辅助设备.....	2
LSRFortessa 每日开机程序.....	4
LSRFortessa 每日关机程序.....	5
LSRFortessa 每月维护程序.....	6
LSRFortessa 仪器性能状态自动监控.....	7
LSRFortessaDivar 软件创建应用设定	13
LSRFortessaDiva 软件三色样本检测	18
LSRFortessaDiva 软件 DNA 测定.....	29
LSRFortessaDiva 软件 FITC AnnexinV-PI 凋亡检测	32
LSRFortessa 不定期维护.....	33
LSRFortessa 常见问题解答.....	35
附录 1：清洗液的选择.....	38
附录 2 LSR Fortessa 常用试剂耗材	39

BD LSRFortessa 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. 鞘液：FACSFlow 鞘液（货号 342003）或自行配制过滤灭菌的 0.01M 的 PBS 溶液
2. 清洗液：FACSClean solution（货号 340345）或自行配制次氯酸钠溶液（使用液有效氯浓度~0.5%，原液用滤纸过滤保存于棕色瓶，用时以过滤过的蒸馏水 10 倍稀释，注意现用现配。）
3. 双蒸水或去离子水：0.22 μ m 滤膜过滤
4. 75%酒精、喷壶
5. 0.22 μ m 的过滤装置
6. 低速水平离心机（实验要求为 300g,相当于 1200-1500rpm, 可调转速及时间，可离心 12x75mm 的 5ml 试管）
7. 多种规格移液器及枪头（如可取量程 5ul, 20ul, 50ul, 100ul, 1ml 等）
8. 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）
9. 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
10. 可放置 12x75mm 的 5ml 试管的试管架
11. 旋涡混匀器
12. 棉签、吸水纸
13. 仪器质控微球（四种选一种）：
 - a. BD™ Cytometer Setup & Tracking Beads Kit (use with BD FACSDiva™ software v 6.x) 1bottle 50test Cat NO. 641319
 - b. BD™ Cytometer Setup & Tracking Beads Kit (use with BD FACSDiva™ software v 6.x) 3bottles 150test Cat NO. 642412
 - c. BD FACSDiva™ CS&T Research Beads (use with BD FACSDiva™ software v7 or later) 1bottle 50test Cat NO.655050
 - d. BD FACSDiva™ CS&T Research Beads (use with BD FACSDiva™ software v7 or later) 3bottles 150test Cat NO.655051
14. 补偿调节微球（多色实验需要）：
 - a. BD™ CompBead Anti-Mouse Ig, κ /Negative Control Compensation Particles Set Cat NO.552843 6ml
 - b. BD™ CompBead Anti-Rat Ig, κ /Negative Control Compensation Particles Set Cat NO.552844 6ml
 - c. BD™ CompBead Anti-Rat and Anti-Hamster Ig κ /Negative Control Compensation Particles Set Cat NO.552845 6ml
 - d. BD™ CompBead Plus Anti-Mouse Ig, κ /Negative Control (BSA) Compensation Plus (7.5 μ m) Particles Set Cat NO.560497 6ml
 - e. BD™ CompBead Plus Anti-Rat Ig, κ /Negative Control (BSA) Compensation Plus (7.5 μ m) Particles Set Cat NO.560499 6ml
15. 抽湿机，24hr 常开

16. 具体实验需要的流式抗体和其他试剂

常用的流式专用管：

1. 5ml 非无菌无盖 1000 支/箱 PS Cat No:352008 可用于日常检测
2. 5ml 无菌有盖、独立包装 500/箱 PS Cat No:352003
3. 5ml 非无菌、带过 35um 滤网 25/包，500/箱 PS Cat No:352235 主要用于过滤样本中的细胞团块，免得堵塞仪器管道，如有其他过滤细胞用器材可以不配这个
4. 15ml 样本管可用实验室常规 15ml 离心管

流式管需要找 Corning 购买，Corning 的联系方式： 021-22152888；4000-770-082；

CLStechserv@Corning.com

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，0.22μm 滤膜过滤后，室温保存。

LSRFortessa 每日开机程序

1. 打开稳压器电源，启动计算机，在出现的登陆对话框中，输入用户名和密码 BDIS#1，点击“OK”。



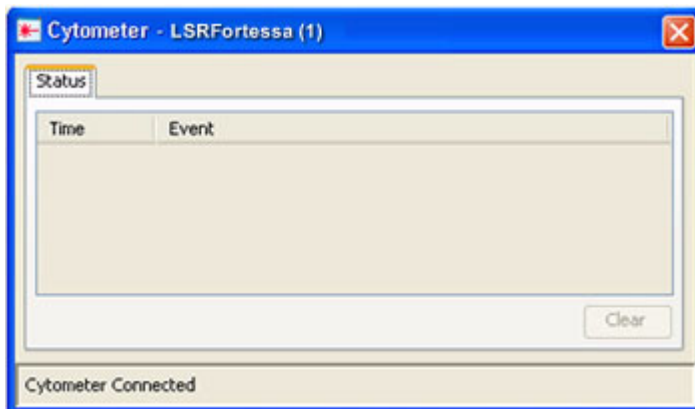
2. 打开位于仪器右侧的总电源;



3. 运行软件，双击桌面上的快捷方式。

4. 在 BD FACSDiva 软件出现的登陆对话框中，无需输入用户名和密码，直接点击“OK”

5. 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”；



单击工具栏中的“Cytometer(仪器)”按钮，可以显示该窗口。

如果有必要，选择 Cytometer>Connect；

6. 检查鞘液桶，如需要加满鞘液；检查废液桶，如需要，倒空废液，并在废液桶中加入 500ml 次氯酸钠原液（终浓度约 10%）
7. 排除管路和鞘液过滤器中气泡。
8. 样品支撑架上放蒸馏水管，做 2 次 Prime。
9. 将 1ML 蒸馏水管放至进样针处，支撑臂置于正位. 仪器选择 STNDBY 待机模式
10. 预热 10min 后待用。

LSRFortessa 每日关机程序

1. 用 3ml FACSClean 洗液作为样品，将样品支撑架置于中位，以 HI RUN 运行 5 分钟;
2. 将样品换成去离子水 ddH₂O，将样品支撑架置于旁位，用外管吸 ddH₂O，2ml;
3. 将样品支撑架置于中位，以 HI RUN 运行 10 分钟;
4. 放置盛有 1ml 蒸馏水的试管于样品支撑架上;
5. 关闭仪器;
6. 退出软件，关闭计算机;
7. 关闭仪器总电源；
8. 关闭稳压电源。

LSRFortessa 每月维护程序

1. 取下鞘液过滤器，使用去离子水清洗鞘液桶，将 FACSClean 洗液 2L 装入鞘液桶，倒空废液桶，样品支撑架上放蒸馏水管，做两遍 PRIME。
2. 将盛有 FACSClean 洗液 3ml 的试管置于样品支撑架上，以 HI RUN 运行 30 分钟，仪器置于 STNDBY 待机状态，卸掉鞘液桶压力。
3. 将鞘液桶换成 FACSRinse 洗液，重复步骤 2。
4. 将鞘液桶换成蒸馏水，重复步骤 2，运行时间 30 分钟。
5. 将鞘液桶装满鞘液，恢复鞘液过滤器，样品支撑架上放蒸馏水管，做 2 次 Prime。
6. 放置盛有 1ml 蒸馏水的试管于样品支撑架上，以 HI RUN 运行 5 分钟。

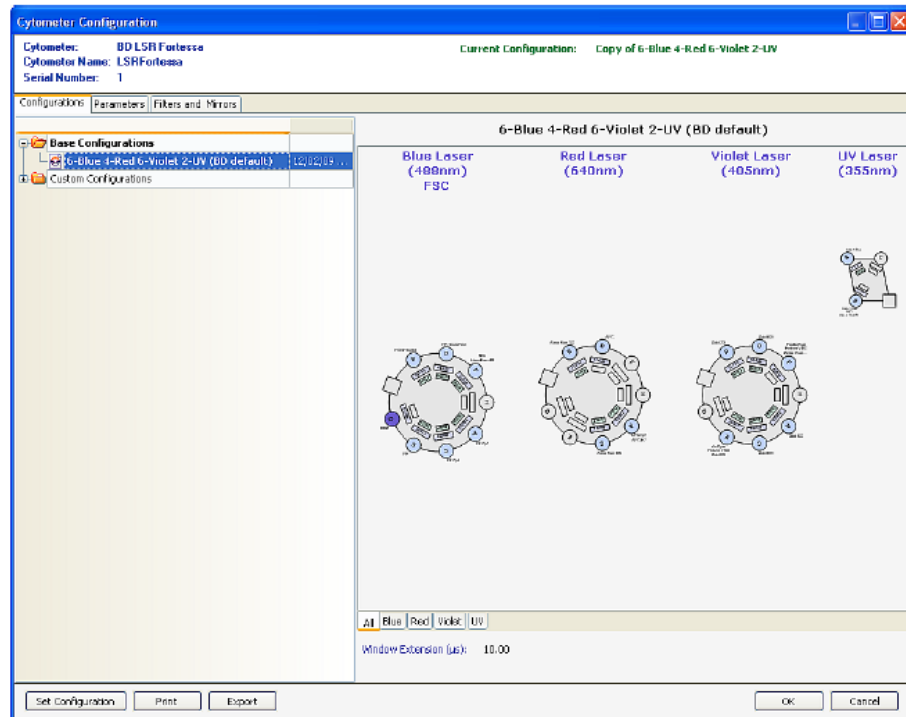
LSRFortessa 仪器性能状态自动监控

CS&T 仪器性能状态自动监控可根据每日仪器状态自动调整实验的电压设置，PMT 灵敏度及仪器在工作中可能产生其它的一些变化，提高仪器设置的精确性，降低不一致设置造成的检测误差，保证不同时间实验数据的一致性。同时可以追踪仪器性能，帮助用户了解仪器性能，以及在使用过程中的仪器变化。

【创建新的 configuration】

实验建立前，确认机器 configuration 符合你的实验

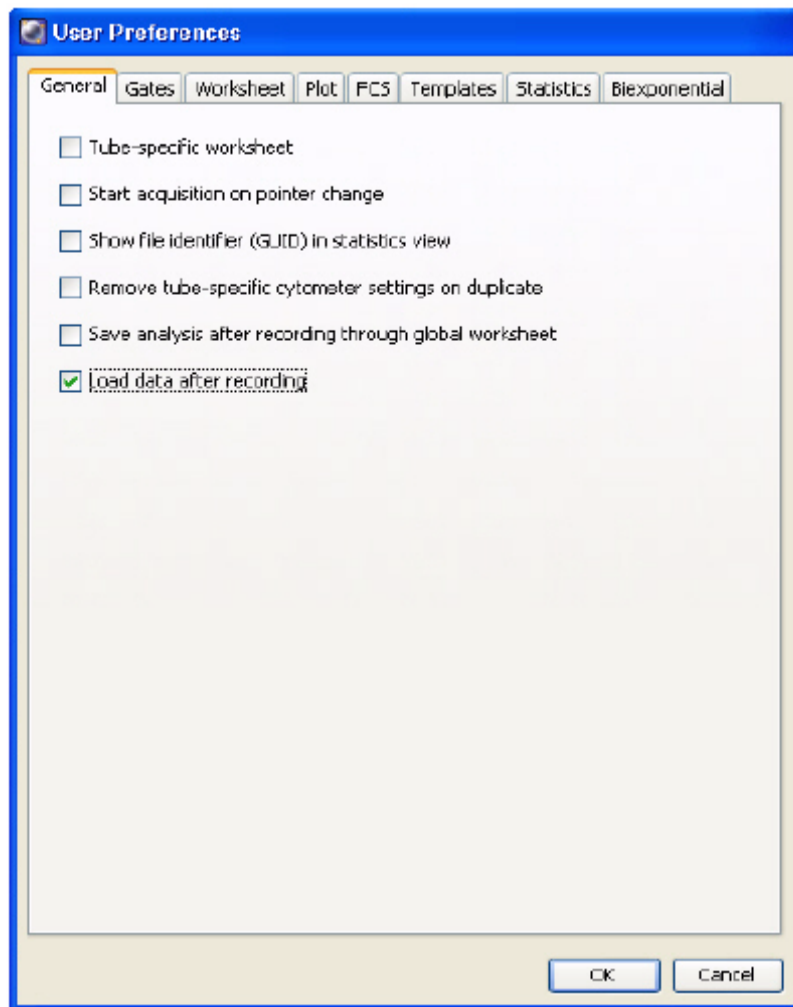
1. 选择 cytometer>view configuration,进入 cytometer configuration



注意当 CS&T 模块运行时，BD FACSDiva 处于挂起模式，不接受使用者的操作。当 CS&T 关闭时，BD FACSDiva 再次激活。

2. 右键 copy 复制 basic configuration。
3. 在客户文件夹下右键，paste 创建新的 configuration，直接键入新的名字或右键重命名。
4. 新创建的 configuration，右键 Edit 编辑，通过拖拉的方式添加所用荧光染料，创建符合实验的 configuration。
5. 要应用某个 configuration 设置，选中并按 set configuration。点 ok 即设置完成。

6. File>Exit 关闭 CS&T 窗口。
7. 选择 Edit>user preference 在 general 下选择 Load data after recording。



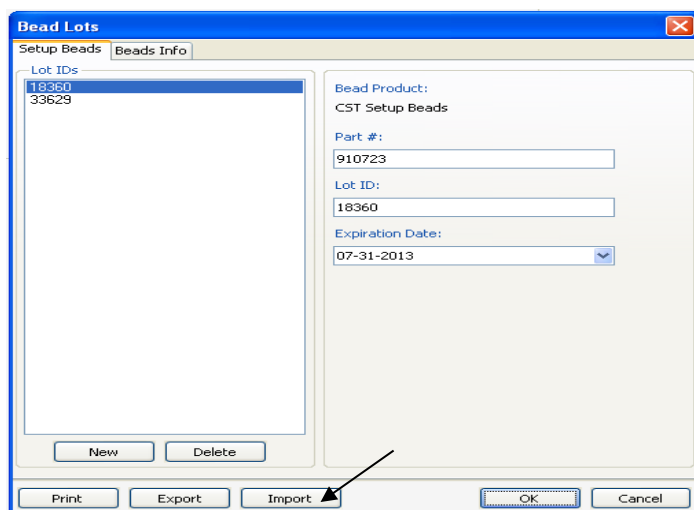
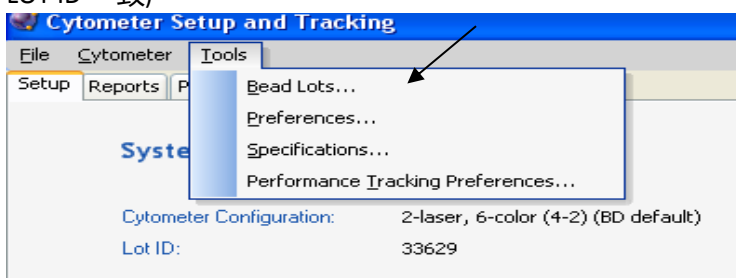
为了保证检查结果的精确性，流式细胞仪的光学设置必须同流式细胞仪的设置匹配。

【Define Baseline 基线设置】

新装机或者仪器配置发生改变的用户，通过运行 CS&T 质量控制微球，可以报告仪器性能基线。它为我们提供了仪器线性、探测器效率、光学背景、CV、电子噪音等性能参数的评估，自动调整激光延迟和面积因子，有助于我们了解机器性能。新建 configuration 或是在更换 CS&T 小球批号时需更新 Define Baseline，否则此操作定期 6 个月更新一次即可。

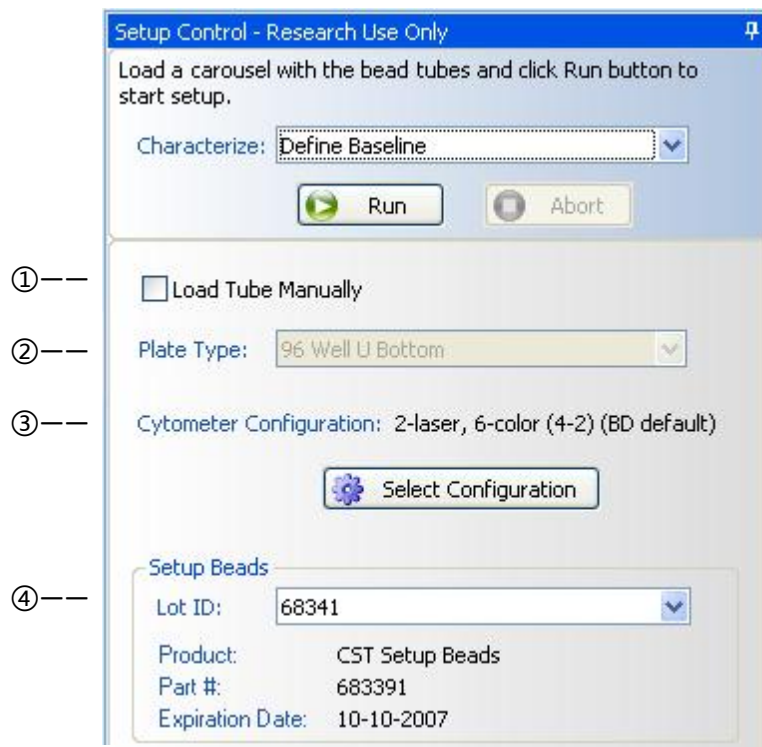
1. 样本制备：向 0.5ml 鞘液中加入 3 滴混合均匀的 CS&T 荧光微球（Cat. No.641319）
2. 打开 FACSDiva 软件--选择 Cytometer>CST
3. 导入 CS&T 质量控制微球批号

选择 Tools—Beads Lot—Import—选择从 BD 网站上下载的解压缩后的文件(文件名与微球 LOT ID 一致)



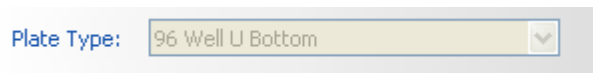
CS&T 文件下载网站：<http://www.bdbiosciences.com/cn/resources/software/index.jsp>

在右边 Setup Control 窗口下做以下设置。(如没有安装 Loader，跳过①、②选项，直接进入③、④)



①勾选此项 ☐ Load Tube Manually

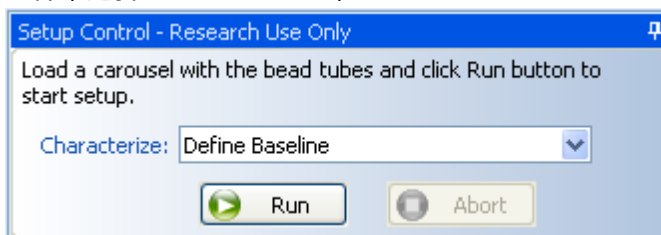
②如果不使用手动上样，可在 plate Type 中选择使用 Loader 或者 HTS



③点击 Configuration，打开仪器配置窗口。

④确定 Setup Beads 的 ID 号

1. 选择与本仪器相同的 configuration，点击 Set Configuration——OK.
2. 上样，选择 Define Baseline，Run



随后出现 Running Cytometer Baseline window 窗口及 PMTVs (PMT voltages)窗口

3. 在出现相应数据结果后点击窗口右下角的 Continue Setup，出现靶值结果图

Target Values Results						
Laser	Detector	PMTV	New Target Value	Old Target Value	Use Old Target Value	
Blue	FSC	539	150000	N/A	<input type="checkbox"/>	
Blue	F(SSC)	566	150000	N/A	<input type="checkbox"/>	
Blue	E	435	20759	N/A	<input type="checkbox"/>	
Blue	D	426	11700	N/A	<input type="checkbox"/>	
Blue	B	565	18239	N/A	<input type="checkbox"/>	
Blue	A	729	37575	N/A	<input type="checkbox"/>	
Red	C	539	21563	N/A	<input type="checkbox"/>	
Red	A	598	28539	N/A	<input type="checkbox"/>	

点击右下角 Continue Setup，完成基线设置

☒ **Tip** 如果需要查看基线报告，点击 View Report

完成基线设置点击 Finish

数据记录完成后，取下 CS&T 管，样品支撑架上放置 1ml 蒸馏水管。

【Check Performance 仪器性能状态自动监控】

每日运行 Performance Tracking 可自动调整实验的电压设置，PMT 灵敏度及仪器在工作中可能产生其它的一些变化，提高仪器设置的精确性，降低不一致设置造成的检测误差，保证不同时间实验数据的一致性。

1. 样本制备：向 1/3 ml 鞘液中加入 1 滴混合均匀的 CS&T 荧光微球（Cat. No.641319）
2. 打开 FACSDiva 软件。选择 Cytometer>CST
3. 在右侧的窗口中核对 Setup Beads 中 CS&T 荧光微球 ID 是否与设置基线时使用微球的 ID 号相匹配。

Setup Beads

Lot ID: 68341

Product: CST Setup Beads

Part #: 683391

Expiration Date: 10-10-2007

4. 检查流式细胞仪的配置是否与实验需要的参数相匹配。

System Summary: OK

Cytometer Configuration: Custom 6-Blue 4-Red 6-Violet 2-UV

Lot ID: 54102

确定当前的参数设置是否有可用的基线。

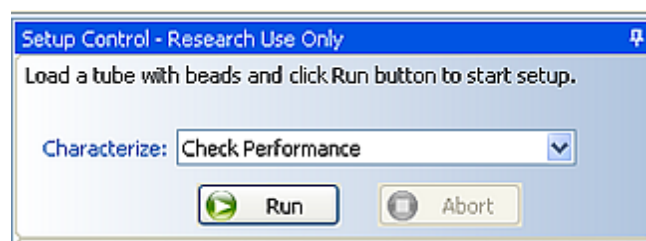


☒ **Tip** 如果仪器基线已经设定，继续第 7 步。

如果仪器基线未设定，则需要先设置仪器基线。

5. 上样

6. Setup Control 窗口中，在 Characterize 选择 Check Performance，点击 Run

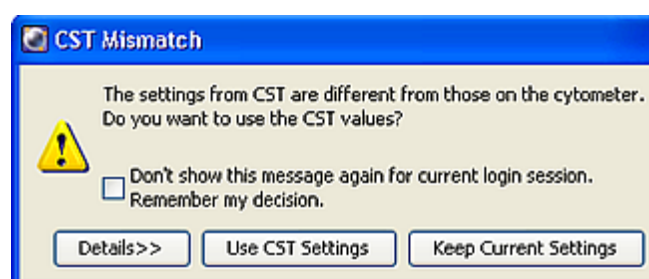


7. 确定样本支撑架在中位，并以低速运行


8. 当 performance check 运行完成后，点击 View Report，确定 cytometer performance result 为 pass 状态。



9. 选择 File > Exit，退出 CS&T 窗口，回到 BD FACSDiva，出现窗口，点击 Use CST Settings



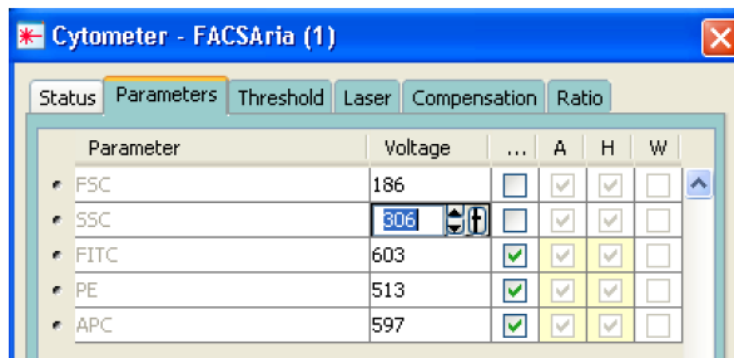
LSRFortessaDivar 软件创建应用设定

- 1、打开 FACSDiva 软件。
- 2、在“浏览框”建文件夹和 experiment，以及 specimen 样本，展开样本管 tube。
- 3、将“Browser 浏览框”选中采集管 （箭头变成绿色），点击“Cytometer”的参数 parameter 页面，所有参数选择高度 H，面积 A 信号参数。

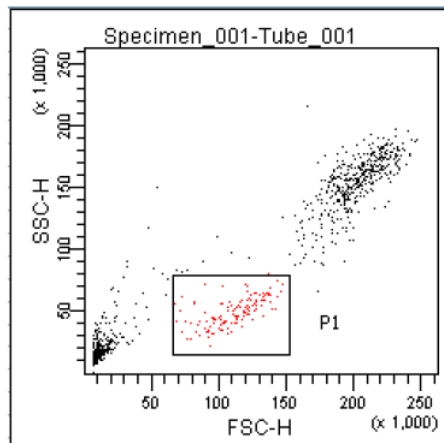


所需要的面积因子是根据鞘液压力和颗粒的大小而改变的。必须对每个在流式细胞仪上运行的实验进行面积因子的确定。

- 4、在通用工作模板，画直方图，选择要应用的激光的一个代表检测通道，分别设置 A 和 H 信号。
- 5、上样调整：
 - ① 确认“Browser 浏览框”的采集箭头选中采集管（箭头变成绿色），将阴性对照管放在流式细胞仪上，然后点击获取命令栏中的 Acquire。
调节 FSC 和 SSC 电压，使样本在 FSC/SSC 上分群明显，目标细胞群清晰可见。



调节 FSC/SSC 图中的 P1 门使其环绕在目标细胞群周围。

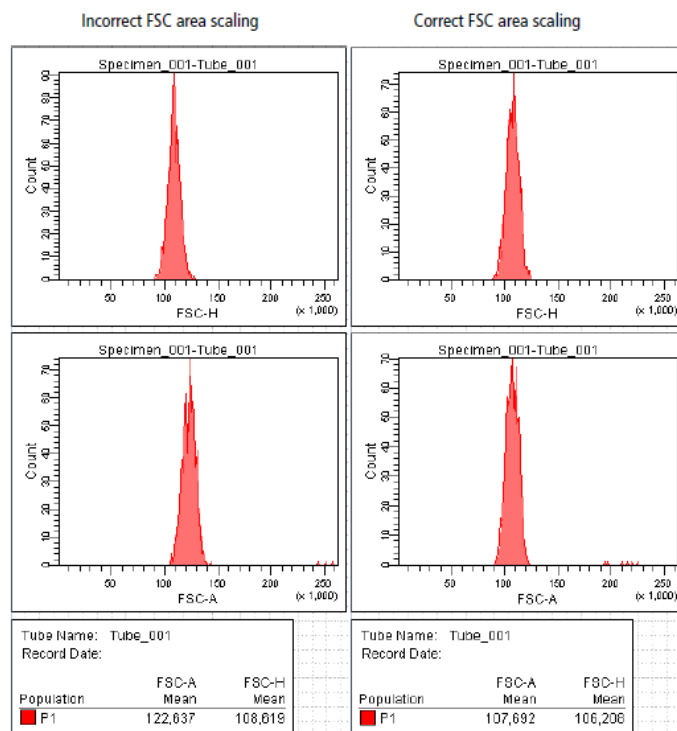
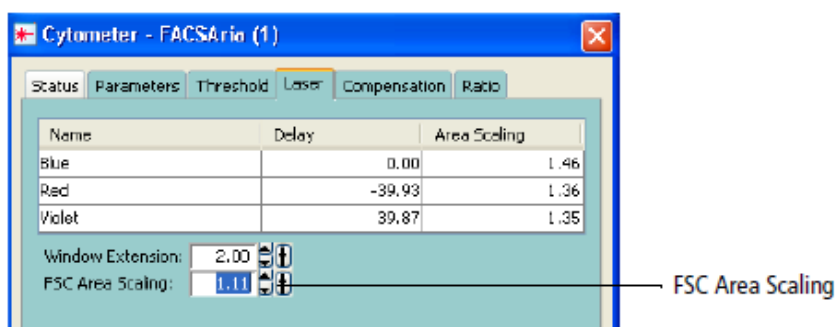


若有必要，点击仪器框的阈值（threshold）菜单调整 FSC 阈值。

② 检查 FSC 的面积因子。

在统计图中检查 FSC-A 和 FSC-H 的平均荧光强度（mean）。如果这两种信号强度是相等的，那么就没有必要调节面积因子。如果二者不相等，按照下列步骤进行调节：

- 单击窗口中的“Laser (激光)”页面。
- 改变“FSC Area Scaling（面积因子）”的数值，观察直方图上 FSC-A 和 FSC-H 的 Means 值变化。
- 继续调节 FSC 面积因子，直到 FSC-A 和 FSC-H 的信号强度相等。

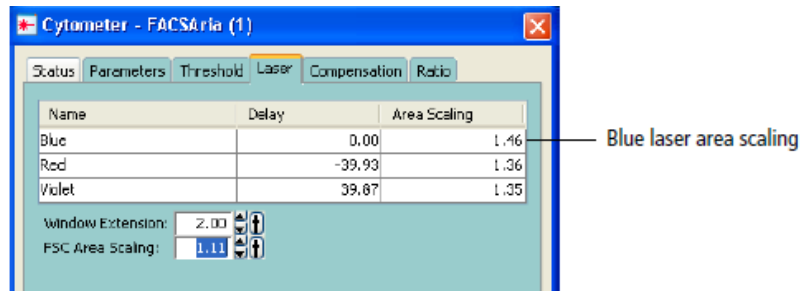


③ 检查 488nm 的面积因子。

将 FITC-单阳对照管放在流式细胞仪上，点击 acquire。

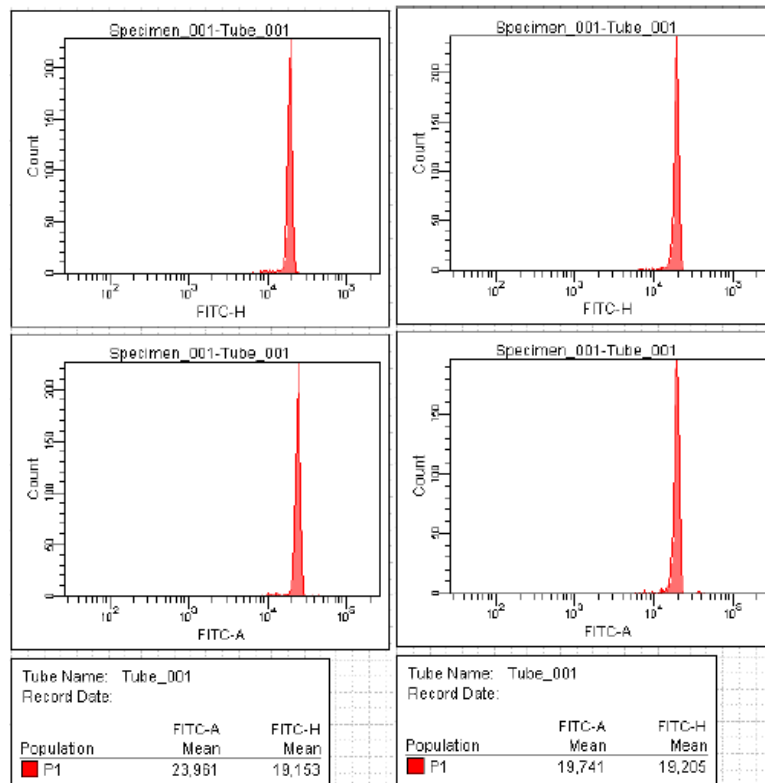
在统计图中检查 FITC-A 和 FITC-H 的平均荧光强度（mean）。如果这两种信号强度是相等的，那么就没有必要调节面积因子。如果二者不相等，按照下列步骤进行调节：

- 单击在窗口中的“Laser (激光)”页面。
- 改变蓝色激光（Blue Laser）的“Area Scaling（面积因子）”的数值，观察直方图上 FITC-A 和 FITC-H 的 Means 值变化。
- 继续调节蓝色激光的面积因子，直到 FITC-A 和 FITC-H 的信号强度相等。



Incorrect blue laser area scaling

Correct blue laser area scaling

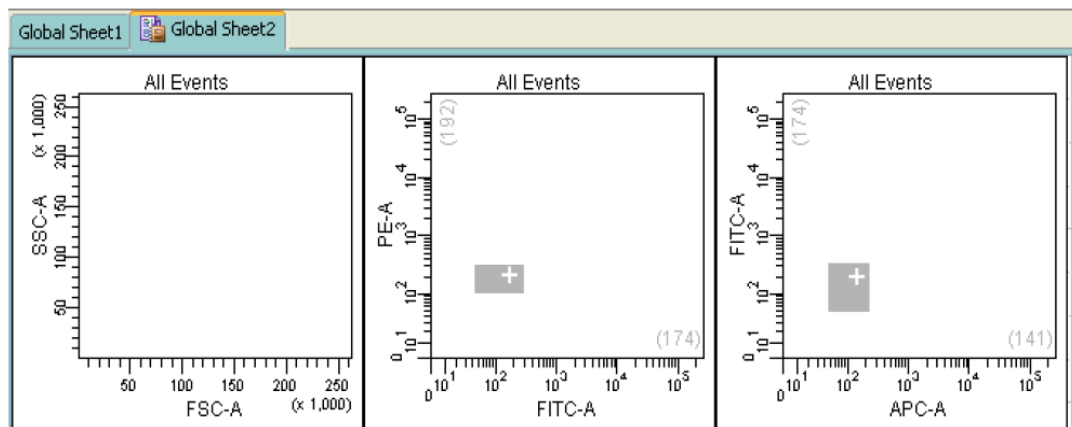


④ 检查红色激光的面积因子。

将 APC-单阳对照管放在流式细胞仪上，点击 acquire。

在统计图中检查 APC-A 和 APC-H 的平均荧光强度。如果这两种信号强度是相等的，那么就没有必要调节面积因子。如果二者不相等，按照下列步骤进行调节：

- A. 单击在窗口中的“Laser (激光)”页面。
 - B. 改变红色激光 (Red Laser) 的“Area Scaling (面积因子)”的数值，观察直方图上 APC-A 和 APC-H 的 Means 值变化。
 - C. 继续调节红色激光的面积因子，直到 APC-A 和 APC-H 的信号强度相等。
- ⑤ 检查紫色激光的面积因子 (options，如果用到紫激光的实验)。
- 将 Violet1-单阳对照管放在流式细胞仪上，点击 acquire。
- 在统计图中检查 Violet1-A 和 Violet1-H 的平均荧光强度。如果这两种信号强度是相等的，那么就没有必要调节面积因子。如果二者不相等，按照下列步骤进行调节：
- A. 单击在窗口中的“Laser (激光)”页面。
 - B. 改变紫色激光 (Violet Laser) 的“Area Scaling (面积因子)”的数值，观察直方图上 Violet1-A 和 Violet1-H 的 Means 值变化。
 - C. 继续调节紫色激光的面积因子，直到 Violet1-A 和 Violet1-H 的信号强度相等。
1. 点击“Cytometer”的参数 parameter 页面，清除所有参数的高度选定，将不会用到的荧光参数删掉，只留需要用的。
 2. 优化 PMT 电压
- ① 右击浏览器中的流式细胞仪设定图标，选择 Application Settings > Create Worksheet。产生第二个通用工作表如下，



- ② 将未染色的对照试管加载到流式细胞仪上，按采样 acquire。
- ③ 在流式细胞仪窗口中，优化应用的设定。
 - a 优化 FSC 和 SSC 电压，将目标细胞亚群放置在合适的位置。
 - b 优化 FSC 阈值以减少细胞碎片，而不对目标细胞亚群产生影响。
 - c 调节每个荧光通道 PMT 电压，使阴性细胞群放置在 “+” 图标的左下角。
- ① 将未染色对照试管从流式细胞仪中卸载。
- ② 将多色样本加载到流式细胞仪中。

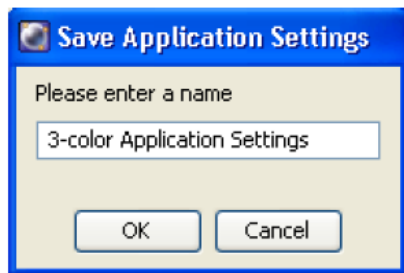
③ 确定阳性细胞亚群在刻度内。

如果阳性细胞亚群不在刻度上，降低该参数的 PMT 电压直到阳性细胞亚群可以在刻度上完整看到。

④ 从流式细胞仪上卸载多色样本。

1. 保存应用设定

- a. 右击浏览器中的流式细胞仪设定图标，然后选择 Application Settings > Save，来保存需要再使用的数据。



1. 在应用设定对话框中，用描述性名称对应用设定重新命名。

2. 点击 OK。

此时应用设定将被保存到目录中。

此时应用设定将被保存到目录中，供以后使用。上述 application settings 的设置过程，其中优化了：

1. **FSC** 和荧光通道 Area scaling 设置
2. **FSC/SSC** 放大电压的设置
3. FSC 阈值设置
4. 荧光通道 PMT 放大电压设置



LSRFortessaDiva 软件三色样本检测


【样本制备】：

详情请参看样本制备手册

试管编号	加入荧光抗体		
1 isotype	IgG1-FITC	IgG1-PE	IgG1-PerCP-Cy5.5
2 compensation-FITC	CD4-FITC	IgG1-PE	IgG1-PerCP-Cy5.5
3 compensation-PE	IgG1-FITC	CD8-PE	IgG1-PerCP-Cy5.5
4 compensation-PerCP-Cy5.5	IgG1-FITC	IgG1-PE	CD3-PerCP-Cy5.5
5 sample	CD4-FITC	CD8-PE	CD3-PerCP-Cy5.5

【流式上机检测】：

1. 在“浏览框”建文件夹（3C）和 experiment 实验组（T-Lym），specimen 样本（日期），5 个 tube 采集管（isotype，compensation-FITC，compensation-PE，compensation-PerCP-Cy5.5，sample），并重命名。
2. 将“Browser 浏览框”的采集箭头选中采集管（箭头变成绿色），点击“Cytometer”的参数 parameter 页面，删除不必要的荧光参数，仅保留 FITC、PE 和 PerCP-Cy5.5，散射光参数选择线性，荧光参数选择对数，参数均选择 A 面积信号。
3. 在“Global Sheet 通用工作页面”上建获取模板：一共画 3 个图。
 - ① 第一个图，横轴 FSC-A，纵轴 SSC-A，
选中工作页面工具栏中的绘图工具散点图 ，在空白页面上单击，即出现相应图形，再调整大小。
设圈定淋巴细胞的不规则门  P1；

② 第二个图，横轴 PE-A，纵轴 FITC-A，设定合适的象限门，选中该图后：

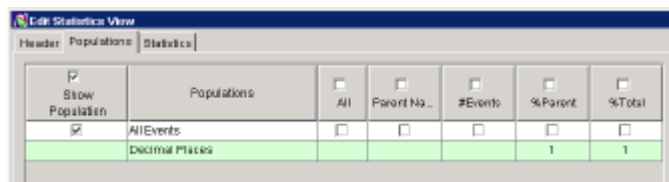
- 单击右键，在“Show Population”下选中 P1，即仅显示 P1 淋巴细胞门内的颗粒。
- 单击右键，选择“Show Population Hierarchy”。
- 单击右键，选择“Creat Statistics View”，右键单击统计图，如要编辑统计结果，选择“Edit Statistics View”。

③ 第三个图，横轴 PerCP-Cy5.5-A，纵轴 PE-A，设定合适的象限门，选中该图后：

- 单击右键，在“Show Population”下选中 P1，即仅显示 P1 淋巴细胞门内的颗粒。
- 单击统计图右键，选择“Edit Statistics View”，增加统计选项。
- 单击“Edit Statistics View”窗口：

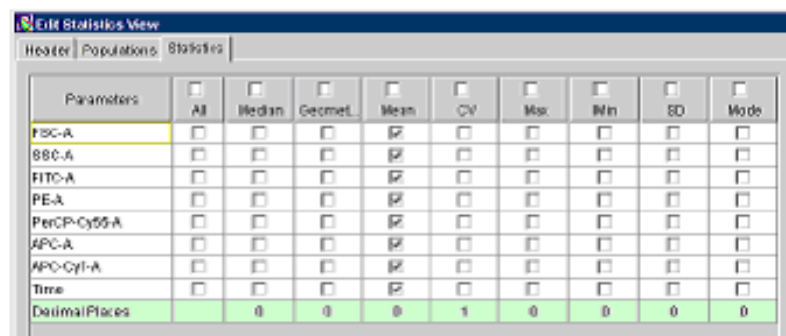
(1)“Header (表头)”页面，选择需要项目。

(2)“Population (细胞群体)”页面，选择 P1，“# Events (细胞数)”和“%Parent (%母细胞群体，即门内细胞群体)”为选项。



Header	Populations	All	Parent No.	#Events	%Parent	%Total
<input checked="" type="checkbox"/> Show Population						
<input checked="" type="checkbox"/> AllEvents						
Decimal Places					1	1

(3)“Statistics (统计)” 页面，仅选择所有实验涉及到的参数的“Mean (平均值)”选项。



Parameters	All	Median	GeometL	Mean	CV	Max	Min	SD	Mode
ISC-A	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
SSC-A	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
FITC-A	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PE-A	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PerCP-Cy55-A	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
APC-A	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
APC-Cy7-A	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Time	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Decimal Places		0	0	0	1	0	0	0	0



Tip

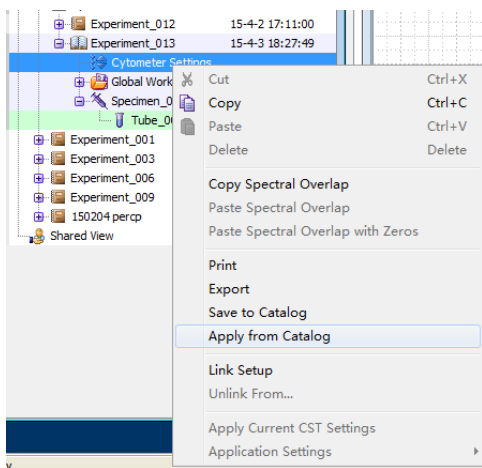
右键单击任何一张图，选择“Show Population Hierarchy（显示细胞群体级别）”，出现该图，以明确层层包含的细胞归属级别。

当一个“门”设置完毕之后，可以手动改变其内细胞群体的颜色。双击“细胞群体级别图”上的颜色盒，从菜单中选择新颜色。也可改变门内细胞群的名字，双击“细胞群体级别图”上的门的名字，使其处于活动状态。

- ④ 选中这三个图，单击“Inspector 检查框”的“Title”页面，选中“Tube”和“Population”复选框。
- ⑤ 定义每个样本管的参数标志，参数标志将显示在数据图的坐标轴上和统计表中。
 - 选择页面最上面一排中的 Experiment>Experiment Layout 路径，在出现的对话框中的“Label”一栏中，输入每管正确的荧光标志。
 - 在“Acquisition”一栏中，按住 ctrl，选择或输入每管要获取的微粒总数 10000 个。

4. 上机检测：

- ① 调用目录中合适的应用设置，选中 experiment 下的 cytometer setting，右键，从下拉菜单中选择” apply from Catalog”，如下，

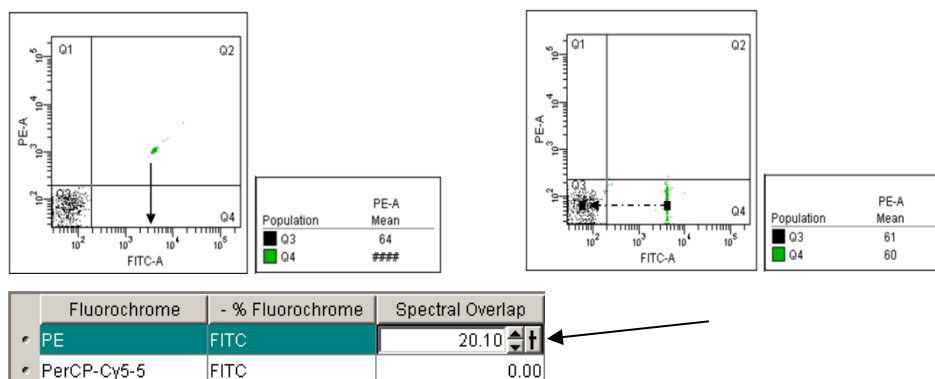


从出现的 cytometer setting 对话框中选择适用的应用设置，然后点击 apply 应用，即可

- ② 依次记录包括补偿管和样本管在内的所有数据。

① 脱机手动补偿：

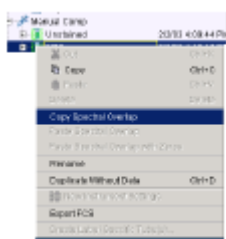
A. 将绿色的数据采集箭头指向第二管补偿管，在通用工作页面上显示其数据，调节补偿，使荧光点图单阳区域内的细胞位于合适位置（Mean 值相等）。



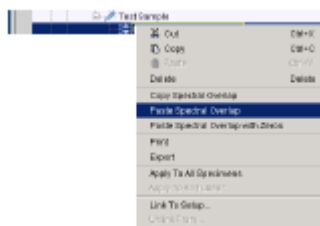
Tip


补偿过量可以从阳性细胞十分贴近坐标轴这一现象观察出来。而补偿不足可以从单阳性细胞落入双阳性检测区域这一现象观察出来。一个恰当的补偿应该是 Q1-PE 单阳性细胞荧光强度与落在 Q3 中的阴性细胞的 X 轴（即 FITC）荧光强度一致，而 Q4-FITC 单阳性细胞荧光强度与落在 Q3 中的阴性细胞的 Y 轴（即 PE）荧光强度一致（看统计图中显示）。

B. 将补偿应用到检测样品上：选中第二管补偿管，单击右键选择“Copy Spectral Overlap（复制光谱重叠）”命令；



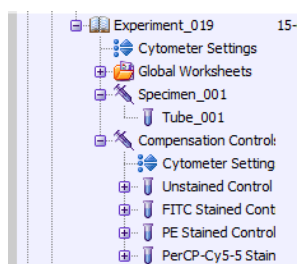
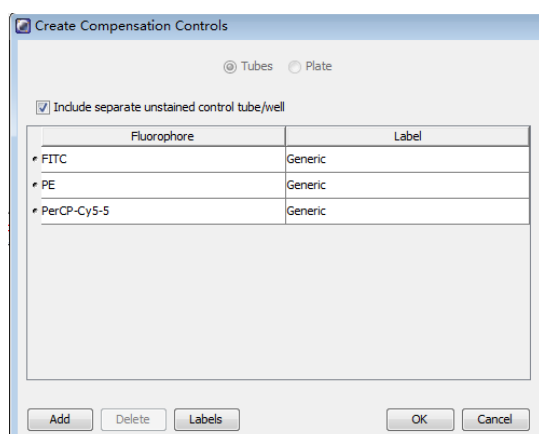
C. 按住 ctrl，选中其余样本管，单击右键选择“Paste Spectral Overlap（粘贴光谱重叠）”命令。




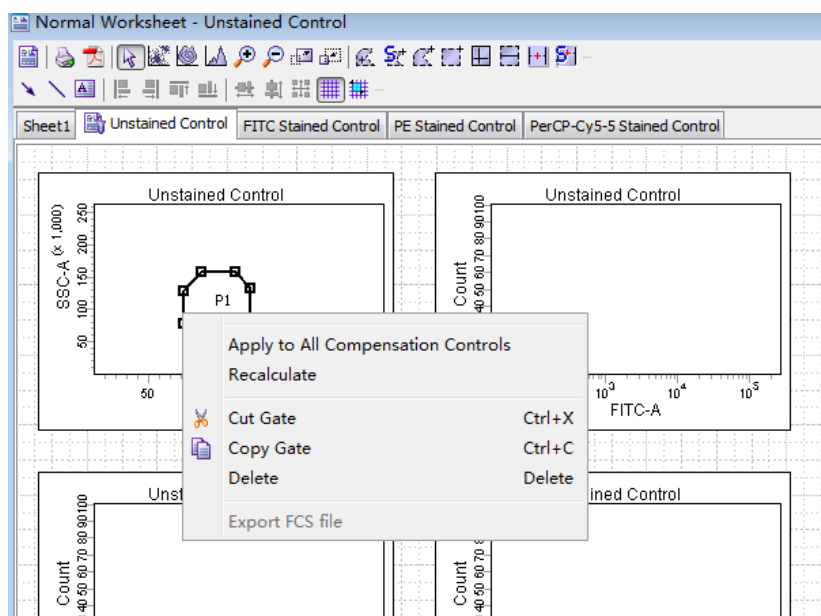
D. 在工作页面的工具栏中，点击 () 按钮从通用工作页面转换至下一个补偿管，同样原理调整电压，依次将补偿的光谱重叠参数粘贴至样本管后，可查看各管的统计结果。

5. (options) 自动补偿设置

① 点击工具栏中 experiment>compensation setting>create compensation control，建立一个新的 specimen，其下包括与 parameter 中保留的荧光参数同样数量的单染对照管以及 unstaining control。




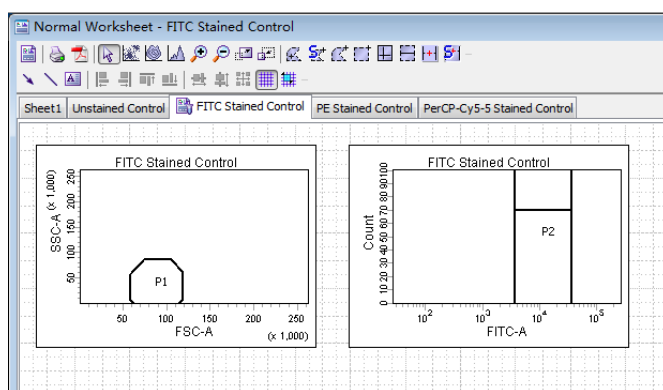
② 点击 () 按钮选中 unstaining control，global worksheets 变为 normal worksheets，并且包含固定模板。




将同型对照管放到流式细胞仪上，按 acquire，调节合适的上样速度，改变 FSC、SSC 电压，将目标细胞放在 FSC/SSC 合适的位置。将 P1 们圈到目标细胞群。并选中 P1 门，右键选择 apply to all control，将 p1 们定位。在调节各荧光通道电压，将各直方图的细胞信号，调解在坐标最左侧，并完整显示。


record 记录同型对照管数据。数据收集完毕取下同型对照管。

- ③ 按 acquire setting 面板上 next tube 按钮， 跳到下一管单荧光对照管，将相应的单染管放到流式细胞仪上，按 acquire，并按 record 记录数据。



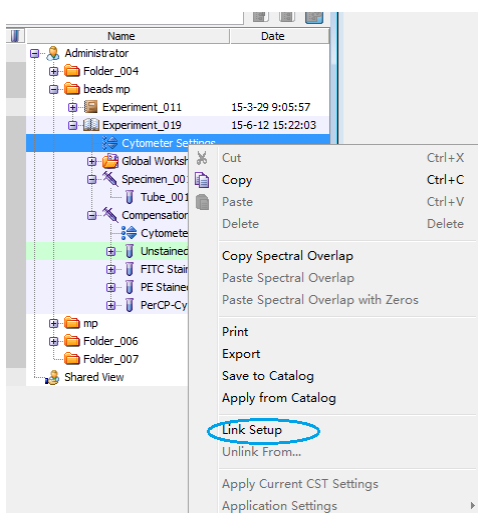
- ④ 按照自动补偿产生的单染管，顺序上样收集数据，同③，直到所有单染管都有数据。
- ⑤ 点击各单染管，确认其相应直方图上，P2 门跨于该荧光阳性群体上。
- ⑥ 点击工具栏中 experiment>compensation setting>calculate compensation

软件自动计算补偿值，并跳出窗口，命名，并选择

- Save and link，软件将补偿条件存于数据库中，以备日后调用。
 - Apply only，补偿条件只用于本 experiment。
 - Cancel，取消。
- ⑦ 点击 worksheets 工具栏第一个图标，转换为 global worksheets。
- ⑧ 点击实验用 specimen 下任一 tube ，收集样本。
- ⑨ 收集完一管后，按 next tube 生成新的 tube。直到生成满足本次实验所需数量。

☒ **Tip** 新建实验再次调用补偿条件，experiment 下 cytometer setting 右击，下拉

菜单里选择 link setup



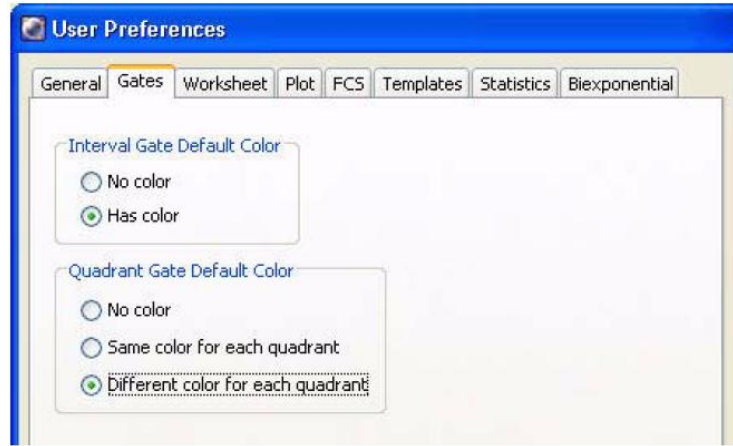
在 compensation setup，对话框中选择合适设置，选择 link 即可。

☒ **Tip** 如果先把本次试验的电压，补偿，阈值条件，以及分析模板，应用于下一个实验，你可以选中本次试验 experiment，右键选择 duplicate without data，就会形成一个新的实验，包括本次实验的所有条件和模板，但是不含有本次实验的数据。

【分析数据】

该部分描述了如何设定图，门以及统计学预览来分析所记录的数据。在该部分的结尾，你的分析结果应该和图 4-26 显示的类似。

- 1 选择 Edit > User Preferences。
- 2 在门栏中，按照下列步骤设定优先选项：



- 3 创建下列门：

FITC vs PE 图中的象限门。

APCvsPerCP-Cy5.5 图中的区间门，以捕获 APC 微球。

APCvsPerCP-Cy5.5 图中的矩形门，以捕获 PerCP-Cy5.5 微球。

- 4 在细胞群层次中对每个细胞群重新命名。

提示：按下 Enter 按钮两次以进入下一个细胞群，而无需用鼠标。

- 5 右击任何一个荧光图，然后选择 Create Statistics View (创建统计学预览) 。
- 此时统计学预览将被加入工作表中。

- 6 右击统计学预览然后选择 Edit Statistics View (编辑统计学预览) 。

- 7 按照下列步骤编辑统计学：

在标题栏中，选择 Use 2 columns for display (使用 2 队列显示) 检查框。

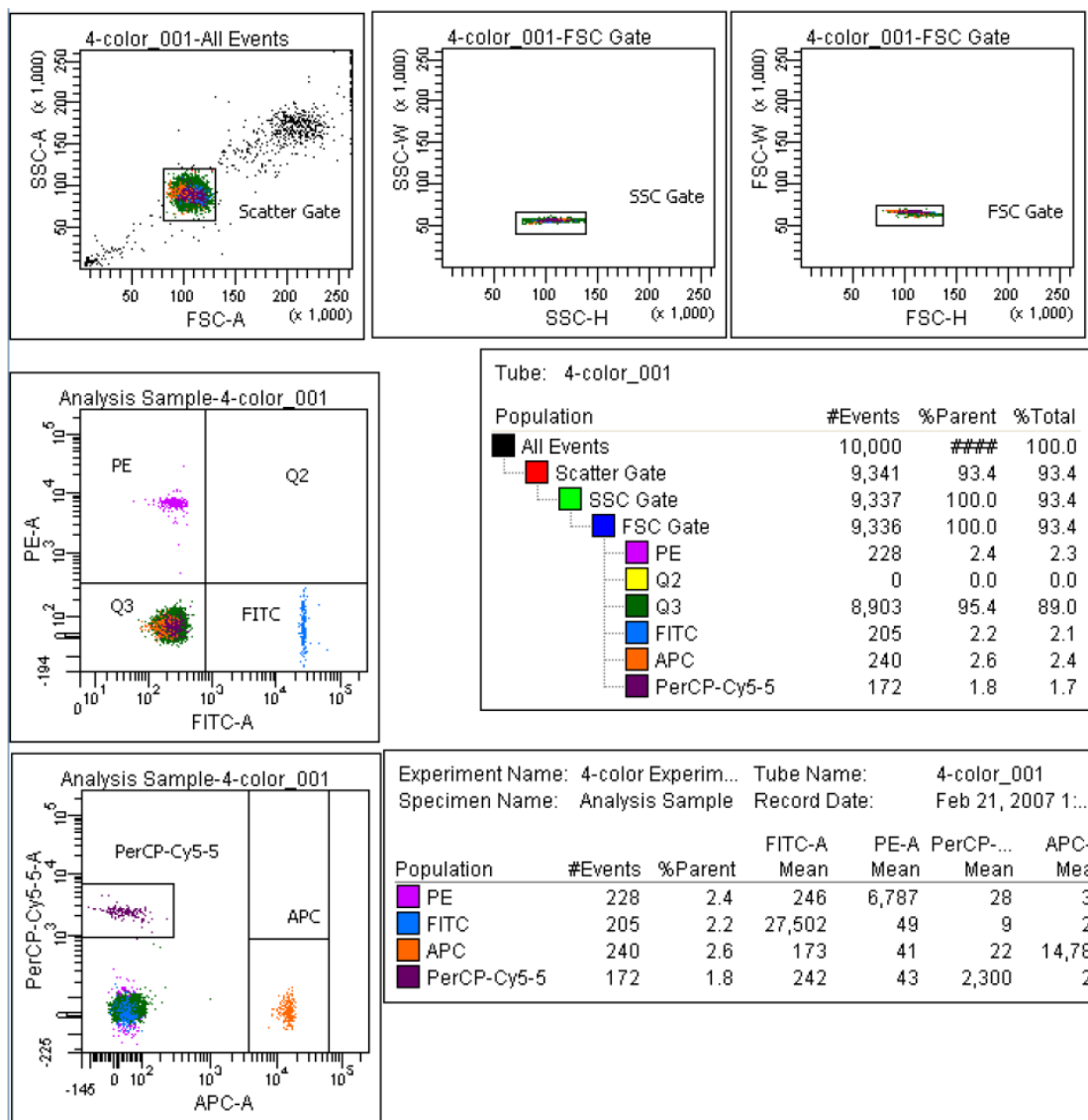
在细胞群栏中，清除 FITC，PE，PerCP-Cy5.5 和 APC 以外的所有群的检查框。

在统计学栏中，对荧光-A 参数选择平均检查框。

- 8 调整统计学预览使其和页面相符。

- 9 (可选择) 打印分析。

图 4-26 混合微球试管的分析示例



【进行批量分析】

批量分析可以允许操作者在使用通过工作表时，自动进行选定试管数据的分析。

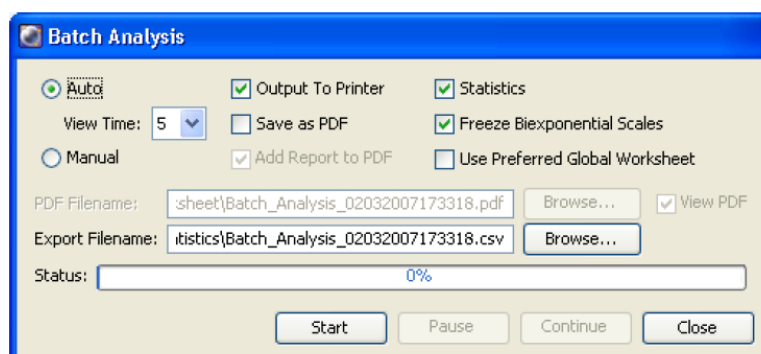
如果要进行批量分析：

- 1 确定将要使用的通用工作表显示在工作表窗口中。
- 2 在浏览器中右击待分析的样本然后选择 Batch Analysis（批量分析）。

此时批量分析对话框出现。

只有在选定样本下的试管才进入程序。不带有数据的试管将在批量分析过程中被跳过。

3 在批量分析对话框中进行下列操作：



选择 Auto，自动分析所有文件而无需操作者参与。

在预览时间菜单中选择 5，这样可以在每个试管加载后中断 5 秒钟。

选择 Output to Printer 框，打印数据分析结果拷贝。

选择 Statistics 检查框将统计学数据输入到单独的文件，然后为统计学文件输入名称。默认情况下，该文件保存在 D:\BD Export\Statistics。

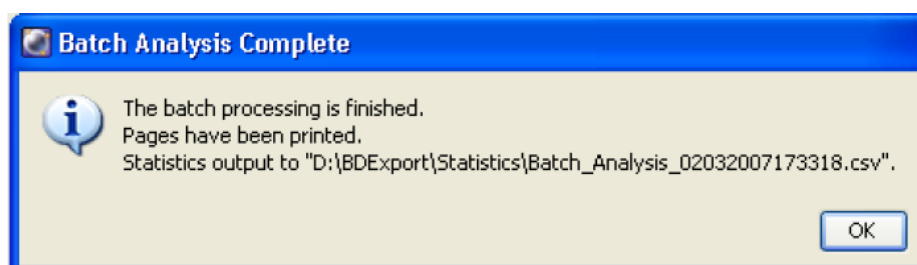
选择 Freeze Biexponential Scales 检查框，用相同的双指数刻度处理所有文件。

清除 Use Preferred Global Worksheet 检查框，在相同的通用工作表中显示试管分析结果。该选择在分析每个试管需要单独通用工作表的面板时非常有用。

点击 Start 开始分析。


分析完成后，将出现和图 4-27 相似的完成信息提示。

图 4-27 批量分析完成



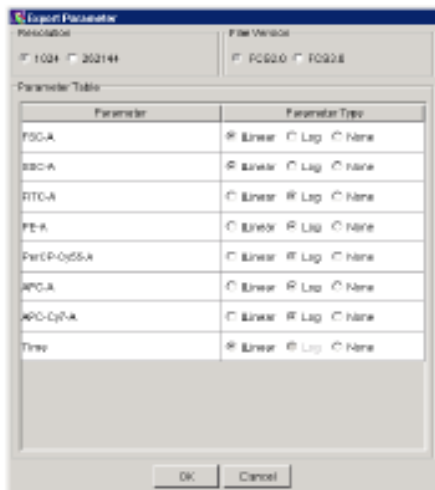
【数据的导出】

1. 图片数据导出

- ① Pdf 图片导出，点击 worksheet 页面顶部工具栏中 pdf 图标，即将整张 worksheet 以图片格式保存，自己选择保存路径。或直接点击工具栏中，打印按钮，可将本页打印。
- ② 选中某一张图片，散点图或直方图，右键选择 copy，则可将本图片任意黏贴于 Word 或 PPT 中。
- ③ 选中任一统计表格，右键选择 export statistics，选择存储路径，即可将本统计表以 excel 格式保存。

2. 文件数据导出

- ① 在浏览栏中，选中文件夹，点击 file>export, 选择 fcs files，选择存储路径，将所采集数据导出到移动存储盘上。






- FCS2.0 导出的数据图形包括补偿效果，但补偿的数值不能保存，即补偿值都显示为 0。可以在识别 FCS2.0 的软件，如 Cell quest 软件中打开。如原始图中包含负轴显示，一旦保存为 FCS2.0 后，负轴以下数据不能显示。
 - FCS3.0 及以上导出的数据保留其补偿效果，以及原补偿值。可以在识别 FCS3.0 的软件中打开。
- ② 选中 worksheet 中所有图或 Hiarchy gate，点击 file>export, 选择 worksheet element，选择存储路径，每张图或 Hiarchy gate 将被导出成 JPEG 格式文件
 - ③ 选中相应的 experiment，右击 export 选项，
 - a. Export experiment：将本次试验导出，包括试验的模板，图形，门的形状以及实验条件。
 - b. Export fcs files：本次收集样本的原始数据。可被其他流式数据分析软件识别。
 - c. Experiment Template：输出本次试验的模板，包括图形，门的形状，以及实验条件，但没有本次试验的数据。

LSRFortessaDiva 软件 DNA 测定

【材料和试剂】：

1. 抗凝外周血；
2. DNA QC Particle , DNA 测定质量控制试剂盒 (BD 公司 , 349523 , 25tests)
3. CycleTEST PLUS DNA Reagent Kit , DNA 测定样本制备试剂盒 (BD 公司 , 340242 , 40tests)

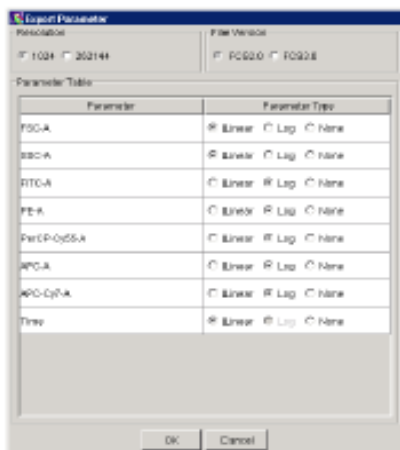
【流式上机检测】-- (以 CTN 为例) ：

1. 在浏览框里建文件夹 (DNA) 和实验组 (PI) , 样本 (日期) , 1 个采集管 (CTN) , 并重命名。
2. 选择 Cytometer>View Configuration , 确保当前的仪器设置包含了合适的参数 , 本实验需要添加一个 parameter , 即 PI , 蓝光激发 , 用 B 接收器接收。
3. 将“浏览框”的采集箭头选中采集管 , 点击“仪器框”的参数 parameter 页面 , 删除不必要的荧光参数 , 仅保留 PI (仪器设置列表中 B 探测器下有多个参数 , 默认显示 PerCP-Cy5.5 , 在该参数的下拉菜单中选择 PI) 。所有参数均设为线性 , 选择 A 面积信号 , PI 还需选择 W 宽度信号。阈值设为 PI , 取值 200-5000 (收集包括从二倍体 G1 峰道数值 1/10 处以上所有的信号) 。
4. 在“通用工作页面”上建获取模板：一共画三个图：
 - ① 第一个点图，散点图，横轴 FSC-A，纵轴 SSC-A；
 - a. 设圈定主要细胞群的不规则门  P1；
 - b. 单击右键，选择“Show Population Hierarchy”
 - ② 第二个点图，散点图，横轴 PI-W，纵轴 PI-A，（DDM 模式，区别粘连细胞）；
 - a. 单击右键，在“Show Population”下选中 P1，即仅显示 P1 门内的颗粒。
 - b. 设圈定单个细胞的不规则门  P2，去除粘连细胞
 - ③ 第三个直方图，直方图，横轴 PI-A；
 - a. 单击右键，在“Show Population”下选中 P2，即仅显示 P2 门内非粘连细胞
 - b. 在 50 和 100 道数位置设两个间隔门 P3、P4。
 - c. 单击右键，选择“Create Statistics View” ,
 - d. 右键单击统计表，选择“Edit Statistics View” , 在“Edit Statistics View”窗口的“Statistics”页面选择 PI 的“Mean , CV”选项。
5. 上机检测：放 CTN 在流式细胞仪上。
 - ①  确认调节机器、获取样本均为**低速**。

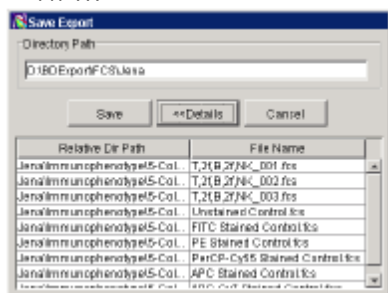
- ② 确认数据采集箭头指向该管；点击“Acquire”按钮。
- ③ 看通用工作页面中的散射光点图，调整 FSC 和 SSC 电压，使图中细胞群显示在合适位置。
- ④ 看 PI 直方图，调节 PI 电压，使得 CTN 单个细胞核的 DNA G0/G1 峰位于 50 道数上。
- ⑤ 看 PI 散点图（横轴 PI-W，纵轴 PI-A），观察单个细胞群的位置。
- ⑥ 调试结束后，在“采集控制框”里选择获取全部 20000 个微粒停止，记录数据“Record”。

【数据导出】：

1. Diva 软件的数据是以“FCS 3.0”版本格式输出。而 ModFIT 软件可分析的流式数据为“FCS 2.0”和/或“FCS 3.0”版本格式，因此需将数据导出，转变版本格式。
2. 在“D:\BD Export\FCS”目录下，选择“File>New Folder”命令，新建一个文件夹。双击打开要导出的实验组，选择“File>Export>Export FCS”命令。
3. 在“Export Parameter（输出参数）”窗口中选择“FCS 2.0”或“FCS 3.0”版本，所有实验涉及的参数均设为线性关系，并把不用的参数选为 none，单击“OK”。



4. 文件输出的默认路径为 D:\BDExport\FCS，您也可以用对话框上的“Browser”更改存储路径。



5. 单击“Save (保存)”。

【Analysis 数据分析】--（用 ModFIT 软件）

1. 在桌面上双击 ModFIT 图标，打开软件，OK-OK-进入软件主屏；
2. 在 File 下打开数据保存文件夹，文件类型设为 ALL File，选出待分析的文件；
3. 选择参数 Choose parameter of analysis，选 PI-A，双击；
4. 在设门中选择 Defile gate（根据需要，选择是否设门，设几个门）
 - Gate 1：X 轴选 FSC-A，Y 轴选 SSC-A，OK，然后在图中圈出你所要分析的细胞；
 - Gate 2：X 轴选 PI-W，Y 轴选 PI-A，OK，然后在图中圈出你所要分析的单个细胞；
5. OK 后出现一个 DNA 直方图。
6. 对这个图进行分析
 - 自动分析（点击工具栏中的 Auto 键）。
 - 手动分析
- ① 单击工具栏中的 Mod 键：选择分析所要的参数（是否有凋亡 Apoptosis，是否有标准参照 Standard，是否有聚集体），选择有几个 Cycle（二倍体、四倍体、异倍体），并对每一个循环是否有 S 期和 G2/M 期进行定义。选择完毕，点击 OK；
- ② 确认每个峰的位置，并将 Range 放置于不同的峰上；
- ③ 单击工具栏中的 Fit 键，软件开始以最小二乘法拟合曲线，并进行统计；
7. 此外，还可以点击工具栏中的 Diags 键来得到关于分析结果的一系列评估指标。
8. Save As 保存分析结果，Print 打印分析结果。
9. 报告中至少应包含以下信息：
 - ① DNA 倍体，包括所有群体的 DI；
 - ② S 期比例；
 - ③ G0/G1 峰的 CV；
 - ④ 必要的简单评价：如细胞数的不足、碎片较多、CV 太高等。

LSRFortessaDiva 软件 FITC AnnexinV-PI 凋亡检测

[材料和试剂]

- 1、抗凝外周血
- 2、FITC AnnexinV-PI 凋亡检测试剂盒（BD 公司，556570，100test）

[样本制备]

详情请见样本制备手册。

【流式上机检测】

- 1、在 global worksheet 界面建立获取模板：一共画二个图：均为散点图。
第一个点图，横轴 FSC-A，纵轴 SSC-A，用 P1 门圈住目的细胞；
第二个点图，横轴 FITC AnnexinV，纵轴 PI，Show Population P1，在坐标轴 101 处画十字象限门。
1. 在 global worksheet 界面作两个图：
 - a) 第一个图是 FSC-SSC 散点图；
 - b) 第二个图是相应荧光参数的散点图；
2. 上阴性样本管：

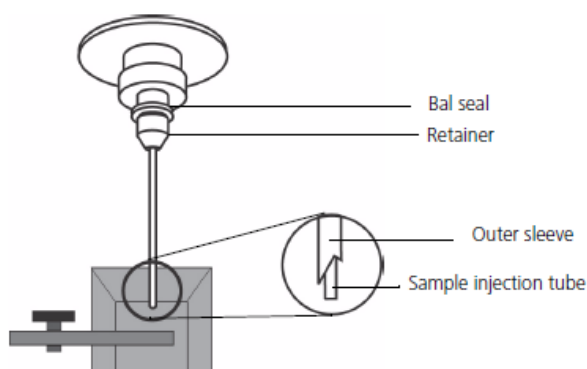
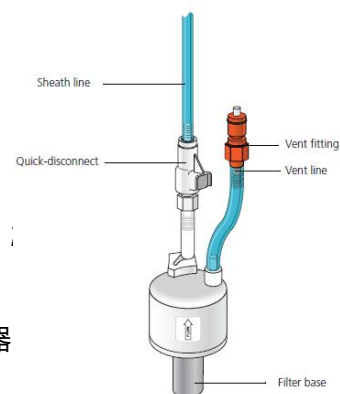
管号	名称	荧光标记 AnnexinV	核酸染料
1	阴性对照	-	-
2	单阳1	AV-FITC	-
3	单阳2	-	PI
4	样本	AV-FITC	PI

- a) 先看第一张图，调整 FSC、SSC 电压和 FSC 阈值，使细胞群位于图中合适位置，作门 P1，圈住目的细胞群；
 - b) 先看第二张图，让第二张图显示 P1 门内的细胞群 show population-P1，调整相应荧光通道电压，使得阴性细胞峰位于左下角荧光表达阴性区域内，沿阴性细胞群设十字象限门。
 - c) 记录阴性样本管数据。
3. 所有条件保持不变，依次记录包括两个单阳补偿管在内的所有实验组样本管数据。
 4. 选中两个补偿管，脱机调节补偿，并将补偿应用到各个采集管，分析统计结果。

LSRFortessa 不定期维护

1. **鞘液滤器的更换**：需要定期更换鞘液过滤器，以保证能有效过滤鞘液，液路正常稳定。一般 6 个月更换一次鞘液过滤器。

- 1) 流式细胞仪处于 standby 状态；
- 2) 按压两侧弹簧扣取下旧滤器；
- 3) 取下通气小管（vent line）和滤器基座（filter base）
- 4) 至于一侧；
- 5) 将通气小管连于新滤器上；用防水胶布 Wrap Teflon® tape（生料带）缠绕滤器颈部并与滤器基座连接；
- 6) 将新的滤器通过弹簧扣与鞘液管、液路管连接。
- 7) 将通气小管引到烧瓶处，按压顶端的按钮使鞘液快速充满滤器
- 8) 拍打滤器以排除气泡。



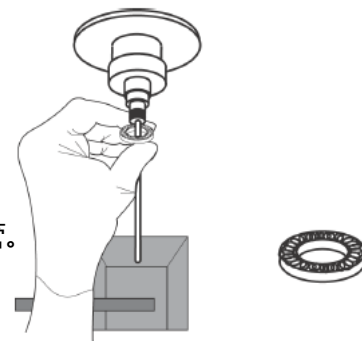
- 9) 重复 6 直到液体充满整个滤器。

2. **更换 Bal seal**：是上样管的密封圈，其老化直接导致上样管无法正常加压，而不能正常上样，所以在以下情况：

- a. 上样管无样本支撑臂情况下，无法固定于采样针处；
- b. 上样管在上样针处，“run”键，灯呈橙色。

请更换 Bal seal。

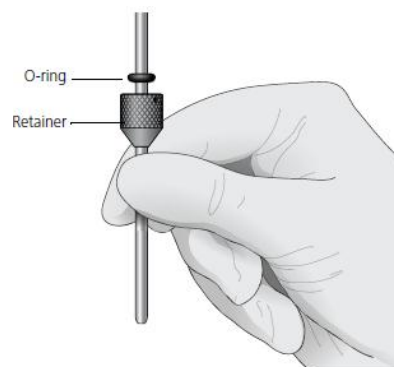
- 1) 旋松采样针上部固定旋钮（retainer），取下采样针外管。
- 2) 拇指与食指挤压，慢慢取下 Bal seal。
- 3) 换上新的 bal seal，弹簧圈朝上
- 4) 将采样针外管套上，旋紧固定旋钮（确保旋钮内 o 圈还在），恢复原位。



- 5) 换好后将一流式管套在上样针处，采样管不触及管底为准，否则，旋松固定旋钮，尽量使套管向上插入，重新旋紧固定旋钮。

3. 置换 O 圈：O 圈是在上样针的外管处形成密闭，以保证残液处理系统正常工作，所以当上样管取下，残液处理系统开启，而上样针处仍有残液时，请更换 O 圈。

- 1) 取下采样针外管。
- 2) 退下外管固定旋钮，露出 O 圈，并取下。
- 3) 从顶部套上新的 O 圈。
- 4) 将外管恢复原位，旋紧外管固定旋钮。
- 5) 换好后将一流式管套在上样针处，采样管
- 6) 不触及管底为准，否则，旋松固定旋钮，尽量
- 7) 使套管向上插入，重新旋紧固定旋钮。



LSRFortessa 常见问题解答

1. 加样针有鞘液反流

检查以下情况：

- 1) 检查上样针外管是否安好，可以将外管拧下，向上推动，重新拧紧。
- 2) 确认废液筒是否满溢，清空废液筒。
- 3) 检查废液管路是否蜷折，确认废液管路通畅。
- 4) 更换上样针上部的O 圈。
- 5) 检查液流保存系统DCS 的真空泵是否工作。如果样本管支撑架位于旁位时，听不到真空泵的工作声音，可能是真空泵停了。关闭LSR Fortessa，再打开，如果马达仍然不动，请致电BDIS客户服务部门的工程师寻求帮助。

2. 计算机屏幕上见不到细胞显示

检查以下情况：

- 1) 如果仪器一直处于STANDBY 状态，则检查System Status。需待机器预热30分钟后，再检查。
- 2) 如果STATUS 窗口显示READY，则检查样本管中细胞浓度是否够，上样前是否混匀了。
- 3) 检查实验的Instrument Settings 是否正确。
- 4) 检查阈值，是否设在正确的参数上，是否设置过高，导致无法检测目标细胞群。
- 5) 检查设阈值的参数的电压是否过低。
- 6) 检查上样针是否堵塞，正常上样ddH₂O一段时间后，观察液面是否有下降，如果液面不下降，重复几次PRIME，以反冲排堵。
- 7) 检查流式细胞仪与电脑是否联机成功。电脑是否正常工作，否则需重启电脑。
- 8) PRIME 仪器液流，去除流动池中可能存在的气泡。若流动池中存在气泡，可能使样本流的位置偏离激光束，导致无细胞信号。
- 9) 检查鞘液滤器是否有气泡，排除管路及滤器中的气泡。
- 10) 检查RUN灯，如果是橙色，
 - a. 检查鞘液筒是否盖紧，是否正确加压，是否鞘液已空；
 - b. 废液筒是否正确连接，或满溢；
 - c. 样本管是否有裂隙；
 - d. 更换Bal seal。

3. 上样速率过高 (events/second)

- 1) 检查鞘液滤器是否有气泡；
- 2) 阈值是否太低或阈值设定的通道电压太高；

- 3) 样本浓度太高；
- 4) 上样速度太高，放在了HI。

4. 样本快速吸干

- 1) 支撑臂在侧位
- 2) 残滴处理系统出错，参看**加样针有鞘液反流**

5. 上样速率不稳

- 1) 检查样本管是否破裂；
- 2) 流动室是否有气泡或是碎片；
- 3) Bal seal 是否老化需要更换；上样针是否堵塞；
- 4) 样本是否有细菌污染；
- 5) 鞘液过滤器是否有杂质需要更换。

6. 异样的散射光信号

- 1) 检查散射光参数设定是否正确；
- 2) 鞘液过滤器或流动室是否有气泡，排除气泡；
- 3) 流动室是否有杂质；
- 4) 鞘液筒是否漏气；
- 5) 缓冲液是否等渗。

7. 过多的细胞碎片信号

- 1) 检查阈值是否太低；
- 2) 鞘液过滤器是否有杂质；
- 3) 流动室是否有杂质，清洗细胞仪管路；
- 4) 样本中是否死细胞或碎片多；
- 5) 样本是否有细菌污染；
- 6) 鞘液是否存储时间太久而被细菌污染。

8. CV值大或者QC结果差

- 1) 检查鞘液过滤器或流动室是否有气泡；
- 2) 上样流速设置太高；
- 3) 鞘液筒漏气，确认各个接口正确连接；
- 4) 双向滤光片装反了；
- 5) 废液筒加压，小心去除压力，更换鞘液筒通气管的过滤器；
- 6) 质控样本制备有误，质控样本是否用鞘液稀释；
- 7) 滤光片设置是否有误；

- 8) QC质控品过保质期或被污染；
- 9) 机器预热不完全。

9. 流式细胞仪联机不成功

- 1) 检查流式细胞仪电源是否正确连接并开启；
- 2) 流式细胞仪与处理器是否连接，请选择Cytometer > Connect，如果机器还未联机，关掉细胞仪电源，1分钟后重启细胞仪电源。

10. 带有 FFSS 液流系统的机器，液流系统不停的往小鞘液桶里泵液，即使满溢也不停止。

请确保您使用的鞘液是 FACSFlow or PBS，而不是水。

附录 1：清洗液的选择

1. FACS Clean Fluid：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。
2. 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%。滤纸过滤后备用。
3. FACS Rinse Fluid：流式细胞仪的清洗液，直接使用，可有效去除仪器管路内积聚的蛋白成分。
4. 表面活性剂——Triton、Tween20、NP40 等：使用浓度约为 0.5%，0.45 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。
5. 蛋白酶液：测定血样以后，可以使用蛋白酶液清洗上样管，有效去除加样针、流动池中附着的蛋白成分。0.45 m 滤膜过滤后备用。
6. 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。0.22 m 滤膜过滤后备用。

附录 2 LSR Fortessa 常用试剂耗材

LSR Fortessa 常用试剂耗材			
品名	包装	货号	
BD™ Cytometer Setup & Tracking Beads Kit	150 Tests	642412	for Diva 6
BD™ Cytometer Setup & Tracking Beads Kit	50 Tests	641319	for Diva 6
BD FACSDiva CS&T Research Beads	50 Tests	655050	for Diva 7 及以上
BD FACSDiva CS&T Research Beads	150 Tests	655051	for Diva 7 及以上
BD FACSFlow sheath fluid	20L	342003	
BD FACS sheath solution with surfactant	20L	336524	
BD FACS Rinse Solution	5L	340346	
BD FACS Clean Solution	5L	340345	
Falcon Tubes	1000/箱	康宁公司	
Falcon Tubes	125/包,1000/箱	康宁公司	
PI/RNase Staining Buffer	100ml	550825	
Lysing Buffer (10X concentrate)	100ml	555899	
Sheath filter	个	343542	
Bal seal for SIP	个	343509	
Sheath Tube Filter for FFSS (LSRFortessa only)	个	65033007	
Annexin V : FITC Apoptosis Detection Kit I	100Test	556547	
Annexin V : PE Apoptosis Detection Kit I	100Test	559763	