

BD Fortessa 流式细胞仪使用指南

培训&资质

1.1. 培训

1.2. 培训流程

1.2.1. 仪器预约网站 (<https://book.ibmc.ac.cn/>) 报名参加平台组织的培训

1.2.2. 培训前需学习本使用指南及相关仪器使用材料

1.2.3. 培训：①递交导师签字的安全责任书（非电子签）②管理员培训③个人练习

1.2.4. 培训后有3次免费辅助机会，其中第一次为强制性的

1.3. 本仪器采用层次培训

1.3.1. 基础培训：

原理、预约规则、上样、protocol建立、非补偿实验、清洗规则、数据保存

1.3.2. 资深培训：

开关机、常见简单非硬件问题判断与处理等（详见附件）

1.3.3. 特殊培训：

多色补偿、周期、调亡等特殊使用

1.4. 资质

1.4.1. 未授权

1.4.1.1. 未参加培训的用户

1.4.1.2. 不可以操作仪器，可以委托管理员进行实验

1.4.2. 普通资质

1.4.2.1. 参加基础培训或者特殊培训的用户

1.4.2.2. 第一次预约前需联系管理员（邓杰或谢番）

1.4.2.3. 可以在工作时间预约并使用仪器

1.4.3. 资深资质

1.4.3.1. 普通用户独立使用机时>15h，参加资深培训，使用仪器>3次后申请考核，考核通过后获得资深资质

1.4.3.2. 可以在工作时间和非工作时间预约并使用仪器

预约

1.1. 预约

1.1.1. 系统最少提前预约时间：

①普通用户：4h；②资深用户：0.5h；③委托&辅助测试：24h（联系管理员）

1.2. 试剂耗材

1.2.1. 用户自备：300目滤膜、流式管（货号352052）

1.2.2. 平台统一提供鞘液

注意事项

1.1. 上机操作前

1.1.1. 样品一定要经300目的滤膜过滤，并且正式上样前需要再次轻弹混匀并观察有无

絮状物或其他异物。

1.2. 上机过程中

- 1.2.1. 上机开始水洗检测，如需prime，则那管水必须扔掉，更换新的水进行上样针清洗
- 1.2.2. 只能用指定货号的流式管上样，上样安装好流式管后，流式管托盘需要快速从旁位拨到正位，否则样品会快速丢失。
- 1.2.3. 实验中不得随意离开，若需要短暂离开仪器必须处于LOW-STANDBY状态。
- 1.2.4. 不要随意触碰或者 click 称的去零等按键，灌鞘液时勿将鞘液撒入称的电源线插口处。
- 1.2.5. 使用过程中遇到异常，及时联系管理员。

1.3 上机结束后

- 1.3.1. 非工作时间预约仪器，如果实验被取消，切记不要忘记自己已经预约，需要检查仪器关机情况。
- 1.3.2. 使用登记：包含通道数、样品数、实验类型（项目委托/辅助测试/自主上机/培训送样等）、清洗开始时间及清洗步骤。（注意：多色实验委托测试样品数包含所有上机测试样品，例如空白和对照）。培训后3次以内的辅助或委托，使用耗材、使用过程中遇到异常情况。
- 1.3.3. 废液桶倒完废液提前加好84消毒液，盖子不要紧盖，放上面即可。
- 1.3.4. 数据安全性：平台概不负责用户的数据安全性，大家数据导出时按照下方步骤操作，自己保留好所有数据。管理员会定期清理数据，不再通知和等待用户前来进行数据的保留。

操作流程及视频

1.1. 视频链接

<https://b23.tv/v1Lu1fC>

1.2. 操作流程

- 1.2.1. 开机：普通权限可以找谢番老师开机，资深权限自己开机。
- 1.2.2. 新建实验：新建一个课题组文件夹-新建experiment-新建specimen-打开specimen-选中tube-进行cytometer setting，设定实验所需的参数。将实验中不需要的通道选中并点击右下方Delete删除，add 需要的通道。
- 1.2.3. 上样操作
 - 1.2.3.1. 单色上样
 - (1) 先在worksheet 中画好想要分析的流式图
 - (2) 先上空白管，圈出主群，调节FSC/SSC 电压和荧光通道的阴性电压，将阴性群体的位置调到10的2次方左右。
 - (3) 再上阳性对照和阳性最强的样品，单峰图中通过调节电压将荧光通道的阳性群体调到合适的位置，不超过10的5次方。
 - (4) 从空白管开始跑样记录数据。
 - 1.2.3.2. 双色上样及手动补偿
 - (1) 先在worksheet 中画好想要分析的流式图
 - (2) 上空白管，圈出主群，调节FSC/SSC 电压和荧光通道的阴性电压，将阴性群体的位置调到10的2次方左右
 - (3) 再上阳性对照，单染管和阳性最强的样品，单峰图中通过调节电压将荧光通道的阳性群体调到合适的位置，不超过10的5次方

(4) 从空白管开始跑样，再跑单染管，记录数据后，手动调节此通道的补偿。并右键copy 补偿值粘贴到下一个单染管。再copy 第二个单染管的补偿值粘贴到本实验

(5) 点击nest sample，即为已经调好补偿的结果

1.2.3.3. 多色上样及自动补偿

(1) 点击工具栏中experiment>compensation setting>create compensation control

(2) 上空白管，调节FSC、SSC 电压，将目标细胞放在FSC/SSC 合适的位置。将各通道的阴性电压调节到10 的2次方左右，再上阳性对照和样品管，调节各荧光通道电压，保证阳性信号不超过10的5次方。为最大程度的去降低补偿，在调节电压时，需要对各荧光通道的电压之间进行相互制衡。

(3) 电压调节好后，按照自动补偿产生的单染管的顺序上样收集数据。

(4) 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。

(5) 点击工具栏中experiment>compensation setting>calculate compensation

(6) 点击worksheets 工具栏第一个图标，转换为global worksheets。

(7) 点击实验用specimen 下任一tube，收集样本。

1.2.3.4. 数据的导出：

(1) Export experiment: 将本次试验导出，包括试验的模板、图形、圈门及实验条件。

(2) 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。

(3) 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。

(4) 单个样品生成PDF: 点击PDF 图标，以及批量生成PDF: 点击实验，右键batch analysis。

(5) 数据的上传: 网盘上传。

1.2.4. 清洗关机

1.2.4.1. 普通实验清洗程序（单色或者两色，如果单色或者两色中有粘性染料，如 PI也按照步骤（二）进行清洗）

(1) 用 3ml 1*Clean 洗液作为样品，将样品支撑架置于一侧，清洗外管 30 s；之后将样品支撑架置于中位，以 HI-RUN 4 min，以清洗液名称命名，记录数据。

(2) 用 1 管新的 3ml ddH₂O 作为样品，将样品支撑架置于一侧，清洗外管 30 s；之后将样品支撑架置于中位，以 HI-RUN 6 min，以清洗液名称命名，记录数据。若6min仍然没有洗干净，需要继续清洗，直至1min内上样速度保持个位数。

(3) 清洗完成后，将 ddH₂O 留置于样品支撑架上。登记清洗步骤，关键的清洗步骤拍1-2张照片到群里即可。

(4) 检查后面预约情况，如 2 小时内没有人使用，关闭软件，关闭计算机，关闭仪器，刷卡下机，收拾干净实验台面。

1.2.4.2. 糖珠、细菌、真菌及多色实验清洗程序（≥三色时）

(1) 用 3ml 1*Clean 洗液作为样品，将样品支撑架置于一侧，清洗外管 30 s；之后将样品支撑架置于中位，以 HI-RUN 4 min。以清洗液名称命名，记录数据。

(2) 用 3ml 1*Rinse 洗液作为样品，将样品支撑架置于一侧，清洗外管 30 s

；之后将样品支撑架置于中位，以 HI-RUN 4 min。以清洗液名称命名，记录数据。

- (3) 用 1 管新的 3ml ddH₂O 作为样品，将样品支撑架置于一侧，清洗外管 30 s；之后将样品支撑架置于中位，以 HI-RUN 6 min。以清洗液名称命名，记录数据。
- (4) 清洗完成后，将 ddH₂O 留置于样品支撑架上。登记清洗步骤，关键的清洗步骤拍1-2张照片到群里即可。
- (5) 检查后面预约情况，如 2 小时内没有人使用，关闭仪器，退出软件，关闭计算机，刷卡下机，收拾干净实验台面。

1.2.4.3. HTS 清洗过程

- (1) 单色或者两色：5孔 250 微升的 1*clean 液，10孔 250 微升的水进行不混匀高速清洗。
- (2) 多色（≥三色时）：5孔 250微升的1*clean 液， 5孔 250微升的1*Rinse 洗液，10孔 250 微升的水进行不混匀高速清洗。
- (3) 备注：清洗时，可尝试将停止条件的时间设置为 10S，可以大大缩短清洗时间。清洗完后将硬件切换为 tube 模式。检查预约情况，如 2 小时内没有人使用，关闭仪器，退出软件，关闭计算机，刷卡下机，收拾干净实验台面。

常见问题及解决方案

见附件常见简单非硬件问题判断与处理（资深培训内容）

考核

资质获得：未授权用户培训并练习，第一次预约联系管理员辅助，方可获得普通资质；普通用户独立使用机时>15h后方可参加资深培训，考核后方可获得资深资质。

门禁

门禁联动政策：预约前后30分钟可以开3-301的门。且可同时开3-311含纯水仪和水池（倒废液）的门。

收费规则

参见生物成像平台仪器服务收费标准。

违规及处罚

1. 没有过滤或者已经过滤，但过滤时间很久，上样前也没有仔细观察有无团块或者异物造成堵的情况。扣信用分3分。
2. 没有及时倒废液并且被提醒后不能及时处理的，扣信用分3分。
3. 清洗时间不够，取消当前资格，降级。
4. 按照使用登记要求，不登记者第一次1分、第二次2分……第10次降级
5. 发现代约、代刷的行为，实验者和预约者均降级。
6. 取消预约：若还未开机可无代价取消，若已开机则按1小时机时收取费用；失约等原因导致仪器长时间未关，视情况严重程度：降级；停用一至两个月。
7. 遇到问题主动请求和咨询帮助，态度恶劣者，停用一至两个月。
8. 及时擦净仪器附近白色晶体，忘记收拾桌面，扣信用分3分。
9. 其它违规行为，按科学实验中心制度、生物成像平台制度及各仪器相关制度及通知处理

附件 常见简单非硬件问题

1. 软件无法连接成功:

关机后重新按照规定的顺序开机，仪器一键开机后需要等待 5min 以上，再开软件。

2. 上样时无细胞出现?

首先打开废液桶盖，检查是否流畅，液滴是否连续滴下？废液的流量应该为 90mL/5min；检查鞘液剩余量；第二，检查流式管是否有破损，没有破损，测样本流速应为60uL/min，检查液面下降情况；第三，若液面无下降，清洗、排气泡：排过滤器气泡；clean 液高速上样 3 分钟，prime 3 次，水上样冲洗后上实验样品检查有无恢复正常。第四，再检查密封圈是否有磨损，是否有变形，位置有无明显变化。

3. 文件管理器文件异常丢失

把鼠标放在文件夹搜索处搜索点一下后，再重新展开文件管理器试试。如果不行，或者不是人为删除导致的话，那又是跟之前相同的现象，重启开机后可能会恢复。此处强调平台一概不负责数据得安全性，用户及时导出数据和模板。

4. HTS 最开始上样时为什么会堵?

链接成功后，在正式上样前Prime 至少三次。

5. 刷卡上机后，电脑屏幕不亮

主屏幕不亮：检查电脑电源线，是否接触不良，重新紧固连接线插口；副屏幕不亮：检查电脑后面的大仪系统的信号灯是否为绿色（正常），若为红色（不正常），在右侧抽屉找到圆形信号贴，将信号贴对准信号感应处，直到为绿灯，副屏幕便正常通电。