

BD Melody 分选型流式细胞仪使用指南

资质&培训&预约

1. 参加平台组织的培训后，可申请普通权限，用于机时预约，本仪器暂时都已委托测试完成服务测试。
2. 先了解激光器和通道信息（三激光：488/561/637；8 通道），了解系统补偿已经做了的补偿单染管。
3. 至少提前 2 个工作日预约。
4. 自带 300 目滤膜、无菌独立包装流式管、1 瓶 84 消毒液、1 包医用棉签。

简易操作指南

一、开机步骤：

检查鞘液，废液，刷卡上机，按照 1 气泵，2 分选机，3 电脑主机的顺序缓慢逐步开启，电脑打开后，登录主界面（开机用户名：BDAdmin，开机密码：BDIS#2\$\$），打开 T-term，等待运行结束后，再打开软件，登录软件（软件用户名：admin，软件密码：FACSMelody#1）

二、质控和分选操作

A. 质控

CST 微球：500ul 鞘液+3 滴，稀释后有效期：4 度 24 小时。

Accudrop 微球：1ml 鞘液+ 1 滴。稀释后有效期：4 度一个月。

注意：※用鞘液稀释微球，不要用水稀释珠子。充分混匀。

B. 分选实验流程

a) 新建实验-通道设置-电压及绘图-确定分选细胞群体-可记录数据-设置 Tube 分选条件-放置收集装置-确定收集方式及原始收集液体-开始分选-DATA 界面的分选数据可截图保存-reports 可另外导出。

b) 多色分选步骤

先用空白和单染调节电压-update compensation -按照顺序去 run 并圈出阴性门和阳性门，阳性们尽量少圈，减少补偿调节不足的机会。建议大家第一次实验自己做单染管。补偿完成后，可跑一管单染管验证补偿的调节情况。补偿没有问题后可直接分选。

C. 清洗进样针

- a) 在实验结束时以及下一个用户之前执行此操作。
- b) 将装有 3mL 10%漂白溶液的试管装入样品装载口
- c) ※8min 后点击 Unload Sample。
- d) 将装有 3mL DI water 的试管装入样品装载口，点击 load Sample。※8min 后点击 Unload Sample。
- e) 多色实验，一定要再次重复 steps c 和 d
- f) 将清洗的时间界面拍照发到群里。（清洗液和水清洗的都要发）

D. 执行 Daily Shut down（当天最后一个用完的用户在清洗完执行）

- a) 点击软件左栏 Cytometer -点击 Daily Shutdown。
- b) 按照步骤执行每一步的操作。

三、关机

1. 执行 Daily Shut down 后，分选喷嘴超声后用吸水纸轻轻吸净表面的液体，置于喷嘴盒内，小心保存好。将闭合喷嘴用无水乙醇擦净表面的结晶后，插入流动池比色杯底部，红色 O 形环和“TOP”面朝上将喷嘴锁定杆顺时针转动到 12:00 位置。
2. 按照 321 的顺序关软件，关电脑，倒废液，刷卡下机，登记使用记录。

注意事项

1. 用户进入分选实验室必须穿实验服、鞋套（或换鞋）。
2. 为保证无菌分选，为大家备好桌面式超净工作台，用户应尽可能保证无菌操作。
3. 有无菌分选要求的用户提前跟管理员沟通。若因未按照本使用指南的要求准备收集液等条件导致的细胞污染，或者细胞活性问题，平台不承担相应责任。
4. 上样前一定要经 300 目的滤膜过滤。
5. 喷嘴一定要拿好，不要掉在地上或者仪器里面的某个角落，造成 O 形环的磨损。
6. 分选过程中不要点其它的界面，比如 cytometer，否则会提示重新做质控。

违规处理办法

1. 已经过滤，但过滤时间已经很久，上样前也没有仔细观察有无团块造成堵的情况，用户承担相应责任。
2. 仪器已经开机，临时失约，按照1小时机时处理。
3. 其它违约行为，按平台制度处罚。

样本制备和收集液准备

1、样本准备

各种对照的准备：尽量温和的制备单细胞悬液。

2、单细胞悬液：

建议 10^6 至 10^7 cells/mL，上样前300目过滤；推荐重悬液：DPBS/HBSS+HEPES（10-25mM）+2%BSA/FBS，重悬液中可适当添加EDTA（1-5mM）和/或DNAase（20-200ug/mL）已防止聚集成团。

建议分选速度控制：建议高细胞浓度、低上样速度；

建议使用死活染料在分选过程中去除死细胞：建议使用核酸染料，可以实时动态监测死细胞的比例；

建议大量细胞分选时，可制备一批，分选一批，及时处理分选后细胞。接收到的细胞应尽快培养、处理。

3、接收管准备

接收液：DPBS/HBSS+HEPES（10-25mM）+高浓度血清+双抗（细菌和真菌）；高浓度血清有利于保持细胞活性，但可能会改变细胞形态，并产生许多非细胞颗粒；

建议接收管提前包被：含有BSA 或者FBS 的buffer 4度过夜。

4、细胞分选后若需直接裂解，为保护实验室环境的生物安全，用户需带回样品在自己实验室通风厨内进行，避免刺激性气味的气体污染实验室环境。