BD 生物科学北京卓越中心 COE, BDBiosciences, Beijing, China

# BD FACSMelody 培训手册



# 目 录

FACSMelody 系列培训所需设备/试剂1
FACSMelody 日常开机程序2
FACSMelody 仪器自动校准流程5
荧光补偿计算8
双色淋巴细胞亚群检测11
分选设置18
FACSMelody 日常关机程序 20
FACSMelody 系列日常保养和维护22
FACSMelody 系列仪器使用的微球和试剂25
Troubleshooting

### FACSMelody 系列培训所需设备/试剂

- 1. 普通低速离心机(实验要求: 300g(1000~1500rpm), 能离心 12X75mm 的 5ml 试管);
- 2. 加样器及相应加样头若干: 20ul, 50ul, 100ul, 200ul, 250ul, 450ul, 1ml;
- 3. 涡旋混匀器;
- 烧杯,量筒或移液管,三个清洁的玻璃或带盖塑料试剂瓶(50-100ml),一个棕色瓶(约 500ml),漏斗,滤纸;
- 5. 300 目过滤尼龙网;
- 6. 可放置 12X75mm 的 5ml 试管的试管架 3 个;
- 7. 超声波清洗机;
- 8. 无棉棉签;
- 9. 擦镜纸;
- 10. PBS 溶液和蒸馏水(实验要求: 0.22 m 滤膜过滤,高压灭菌(无菌分选));
- 11. FACSClean 洗液;
- 12. 2ml 抗凝的人血样本/实验 (最好是 EDTA-K3 抗凝);
- 13. 多聚甲醛。

## FACSMelody 日常开机程序

- 1、确保房间温度控制在 22°C+/-1.5°
- 2、开机前开启压力泵,检查压力表的读数是否大于 100Psi。

A, 检查鞘液桶是否满,千万不要用摇晃鞘液桶来判断鞘液的多少,打开鞘液桶的盖子检 查鞘液的量;

- B, 或通过软件检查剩余时间。
- 3、添加鞘液时千万不要超过鞘液桶的提示线,同时要离提示线至少 0.5 厘米((建议使用 BD 公司的 FACSFlow,否则会导致 CS&T 失败)。
- 4、检查废液是否满,至少留 2/3 的余量。
- 5、打开压力泵开关,按下仪器前的红色电源开关;





- 6、开启电脑,输入密码"BDIS#1",启动 BD FACSChorus 软件<sup>FACSChorus</sup>,输入用户名(Admin) 及密码(FACSMelody#1)登陆;
- 7、仪器自动进行系统启动,显示"connected",表明联机成功;
- 8、双击 TTerm,按下仪器开关,观察 TTerm内是否有显示,如果 2 分钟以上没有显示内容, 关掉机器,等 1 分钟后重新开机。
- 9、打开 Chorus 软件,打开左边菜单下方的"Stream",观察图像上是否有漏水现象,如果漏水用干棉签将水吸干,千万不要上下左右用力,特别注意不要擦洗右边的小窗,用棉签蘸水轻微擦洗喷嘴下方,最后用干棉签将水吸干。见下图



10、 启动液流,在软件打开的界面上,选择"Run Daily Fluidics Startup",按照屏幕上显示的提示操作,绿色的对勾表明成功完成了各项任务,否则会出现相应的错误信息;

	tion Sheath Tank	vvaste tank	
📀 Connected	🥑 17 hr 57 min remaining	📀 ок	
Last Shutdown: 03/	/01/2017 4:13 PM Type: Daily		
Last Fluidics Startu	p: 03/01/2017 4:51 PM Type: Daily		
	Run Daily Fluidics Startup Run Extended	Fluidics Startup	Skip
	Run Daily Fluidics Startup Run Extended	Fluidics Startup	Skip
y Fluidics Startup	Run Daily Fluidics Startup Run Extended	Fluidics Startup	Skip
y Fluidics Startup	Run Daily Fluidics Startup Run Extended	Fluidics Startup	Skip
<b>y Fluidics Startup</b> his procedure takes about 1 inute to complete.	Run Daily Fluidics Startup       Run Extended         Daily Fluidics Startup       Image: Closed-Loop Nozzle Insert the closed-loop nozzle.	Fluidics Startup	Skip
<b>y Fluidics Startup</b> his procedure takes about 1 inute to complete.	Run Daily Fluidics Startup       Run Extended         Image: Startup       Image: Startup         Image: Startup	Fluidics Startup	Skip

11、 当各项任务完成后,点击"Close" "Continue"进入下一界面,选择"Flow Cell Clean", 按照提示操作,清洗流动室;

-			
Prepare for Aseptic	: Sort	Flow Cell Clean	
DI water, and ethanol.	imple paths with bleach,	with DI water. Run this procedure when poor optical performance indicates that additional cleaning is needed.	
Last Run: 10/15/2016 10	):37 PM	Last Run: 02/28/2017 9:20 AM	Skip
Cell Clean	1 Flow Cell Clean		
v Cell Clean his procedure takes about 30 cconds to complete.	Flow Cell Clean		
v Cell Clean	Flow Cell Clean     Closed-Loop Nozzle     Insert the closed-loop n	nozzle.	
v Cell Clean	Flow Cell Clean     Closed-Loop Nozzle     Insert the closed-loop n     Sheath and Waste Tank     Sheath and Waste Tank	nozzle. Ks	
v Cell Clean	Flow Cell Clean     Flow Cell Clean     Closed-Loop Nozzle     Insert the closed-loop n     Seath and Waste Tank     Verify that the fluid lew     (Refer to the status indi	nozzle. <b>ks</b> els in the sheath and waste tanks are acceptable. icators on the side navigation bar.)	

- 12、 完成后点击"Close" "Continue",按照提示移除闭合喷嘴,拔出 closed Nozzle,用清 水清洗一下,擦干插入储存处。
- 13、 将喷嘴超声 20 秒,取出用纸吸干喷嘴周围的水。喷嘴插入时不要太用力,以免损伤 喷嘴上的 0 圈。插入超声清洗后的喷嘴,点击"Continue";

Insert the sort nozzle. A Remove the closed-loop nozzle	and insert the sort	t nozzle.	
			6.4

- 14, 检查液流车上的鞘液过滤器是否有气泡,如果有将气泡排掉。
- 15, 执行开液流指令,调整废液槽位置,使液流流入收集槽的中间(见下图。)



## FACSMelody 仪器自动校准流程

- 1, 运行 CST 检查仪器性能;
  - 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;
  - 核对使用的微球的 Lot ID 号是否与 Lot Number 一致,如果不一致点击"Change",选择下载的批次文件(.bls),更改 Lot Number 号;

- → · ↑ 🔛 → This PC → Desktop →	653828_6284594			~ Ū	Search 653	828_6284594		
Organize 🔻 New folder						== •		
Configuration ^ Name	^	Date modified	Туре	Size				
<ul> <li>picture 2017033(</li> <li>653828_6284;</li> <li>Sample</li> <li>xuying1121</li> <li>OneDrive</li> </ul>	594.bls	11/15/2016 4:37 PM	BLS File		6 KB			
Deskton								
Documents								
🕹 Downloads								
J Music								
E Pictures								
Videos								
🏪 Local Disk (C:)								
🥩 Network 🗸 🗸								
File name:					×.bls			
					Open		Cancel	
Change								

3) 运行 CST, 点击"Run Cytometer Setup";



4) 上样品管,点击"Continue",仪器会自动进行检测;

	Continue	þ
Running Cytometer Setup Step 1 of 5: Initializing Cytometer		

	Cytometer Setup completed successfully.
	Continue
上"4	Accudrop"测定 drop delay
1)	样本制备:向 1ml 鞘液中加入 1 滴混合均匀的 Accudrop 荧光微球;
2)	点击"Run Drop Delay";
	Run <u>Drop Delay</u> daily before you perform any experiments.
	Drop Delay Last Run: 03/01/2017 5:46 PM Status: Passed
	上"⁄ 1) 2)

3) 上样品管,点击"Continue";

Run Drop Delay

Skip

	Continue	Skip
Punning Drop Delay		
Step 1 of 5: Initializing Cytometer		

4) 等待完成后,显示"Drop Delay completed successfully",点击"Continue"进入主界面。

		_

### 荧光补偿计算

BD FACSChorus 软件使用已储存的与特定染料光谱匹配的标准化 FC beads 来计算补偿, 这是默认补偿值, 推荐每 60 天用 FC beads 更新一下补偿。

自定义补偿:

任何实验默认的 FC beads 的补偿值都可以用自己的单阳补偿对照来自定义更新补偿。系统会根据新的值自动计算补偿。

自定义的补偿可以仅更新个别荧光素,而不用更新整套。系统会根据已更新的和没有更新 的值放在一起计算补偿,并进行更新。

#### 【FC beads 批号文件更新】

在碧迪生物科学的官网(http://www.bdbiosciences.com)选择"仪器与软件";找到 Melody, 点击"Resources";点击"bead lots files";点击"BD FACSChorus FC Bead Lot Updater",网页 会提示下载一个小程序,下载后,双击打开,即可自动更新最新 FC beads 批号文件。

#### 【系统补偿更新】

1. 在主页面中选择"CYTOMETER" —> "Update Compensation Standards"更新补偿值;

,	CYTOMETER				
NTS	STARTUP / SHUTDOWN				
TER	System Startup Prepare: the cytometer for sorting by performing fluidics startup, cytometer stup (CSST), and setting the drop delay. CSST Liast Run: 03/01/2012/6:41 PM Drop Delay Last Run: 03/01/2017/6:44 PM	Daily Shutdown Geans the sample path and fills the flow cell with DI water in preparation for shutdown. Last Rur: 03/01/2017 8:03 PM	Long-Term Shutdown Removes sheath fluid from the lines, fills the lines with 70% ethanol, and drains the flow cell. Run thig procedure when the cyclometer will not be used for more than two days. Last Run: 12/29/2016 3:41 PM		
s	Flow Cell Clean Cleans the sample path and fills the flow cell with DI water. Run this procedure when poor optical performance indicates that additional cleaning is needed. Last Run: 03/01/2017 6:16 PM	Sample Line Backflush Flushes the sample line with sheath fluid for 30 seconds. Run this procedure when you observe sample carryover, or after you run adherent cells or dye,			
	OTHER				
ted	Update Compensation Standards Updates the standard flunchrone upstral references for compensations. This is needed for calculating softwarts applications values in experiments. But this procedure with Plunerscence Control (FC) basis very 60 days to ensure accurace.	Cytometer Setup Reports View and export cytometer setup (CS&T) reports.	Sheath Filter Purge Purges air from the sheath tank to provent. Isobher from rotering the flow call. Run this procedure if you observe problems with the stream.	Replace Sample Line Replace the sample line every 4-6 months, or when decreased event rates indicate that the sample line might be clogged.	Replace Sample Line Filter Replace the sample line filter when decreased event rates indicate that the sample fine might be clogged.
min	Last Run: 03/02/2017 5:54 PM				
>					
n >					

 准备好 FC beads; (FC beads 配制方法;将需要配制的 FCbeads 的密封袋平衡至室温, 分别从中取出一支,室温避光放置,同时将密封袋冷藏保存;在各管中分别滴入 10 滴或 0.5ml BD FC Beads Dilution Buffer,涡旋 5 秒混匀,冷藏避光待用)
 选择需要更新的荧光素,点击"Run"; 4. 上相应的单阳管,系统自动进行补偿的计算及更新,更新后的补偿管后会出现绿色的 对勾;

Load tube wit	th FITC FC beads.			
			Continue	Cancel
FITC FC	beads			
	Step 1 of 4: Initializing	cytometer		

5. 结束后,点击"Finished",系统自动保存计算的补偿值。

😡 BD FACSChorus

😳 BD	CYTOMETER > UPDATE COMPENSA	ATION STANDARDS	
A experiments	Running Cytometer Setup (CS&T) before you update the compensation standards will	Spectrally-Matched Controls for Compe	nsation
CYTOMETER	ensure accurate compensation. To run Cytometer Setup, select System Startup on the Cytometer	PE-Cy7 FC beads Last Run: 10/14/2016 11:02 PM	Run
<b>O</b> USERS	page. Prepare the Fluorescence Control (FC) beads according to the product insert.	PerCP FC beads Last Run: 11/30/2016 05:13 PM	Run
Image: Provide state     HELP	Run each fluorochrome that you want to update.	PerCP-Cy5.5 FC beads Last Run: 11/30/2016 05:13 PM	Run
<b>≗</b> BD		PE FC beads Last Run: 11/30/2016 05:13 PM	Run
Log Out		FITC FC beads Last Run: 11/30/2016 05:13 PM 🔮	Run
		BB515 FC beads Last Run: 11/30/2016 05:13 PM	Run
		Finished	Cancel
	System compensation wa	as successfully calculated and saved. Close	

### 【个人实验的补偿更新】

 选择"Experiment" > "View Data" > "Data Soures" > "Update Compensation",打开更新补 偿的对话框;

BD FACSChorus	EXPERIMENTS > 2COLOR	<ul> <li>g Design Experiment</li> <li>Set Up Sort</li> <li>Sort</li> <li>View Reports</li> </ul>
	COLORD C	Total Events: 0     Propulation: All Events •     Statt     Description: Diagnostic •     Description
CYTOMETER	Event Rate: 0	Elapsed Time: 00:00:00 0 10:000
O USERS	DATA SOURCES Live Data Oevents	Displar Chude         Displar Events         2,000              •             enerwholas            THRESHOLD AND SCATTER SETUP.
<b>€</b> HELP	Update Compensation Export FCS Files	Alf-cents         Alf-cents         Scatar         SC Singlets           301         301         301         301         301
a BD Log Out	Satter	an 200 200 2 (00) 2 (0) 2 (00
		0         0
Connected		STATISTICS Population Events © Ni Parent © Ni Total © FSCA Median © FSCA NuCV © SSCA Median © SSCA NuCV © Millowits Control
@ Waste		Soc Singles +
System >		·

2. 选择想要更新的荧光素,只有选定的荧光素才会在 Design Experiment (13 页中的图例) 中显示;

Any fluorochrome that you do not update will use the existing spectral references (Compensation Standards).	Select the fluorochromes that you want to up	pdate for this experiment.
	Unstained Control	
	PE	Includes Negative Population
	FITC	Includes Negative Population
		Continue

- 3. 选择需要更新的管子,点击"Continue",会出现一个新的对话框;
- 4. 选定对话框中的管子,正确上样,点击"Run",将门调整到合适的位置;



- 5. 对剩下的管子,重复步骤4;
- 6. 按照屏幕上的提示,直到所有的管完成。

### 双色淋巴细胞亚群检测

#### 【试验准备】:

- 实验目的和原理:利用荧光技术在不同的鼠抗人抗体上标记荧光素,该荧光抗体与人外周 血中淋巴细胞表面的 CD 分子特异性结合,然后用流式细胞仪检测,计算各淋巴细胞亚群 的百分比,了解人的免疫状态,从而指导临床诊断和治疗。
- 血样采集:用 EDTA 真空采血管采集静脉血 2ml,反复颠倒 8-10 次,充分混匀;血样采 集后 6 小时内处理、检测。
- 3. 主要试剂: (Cat No: 340182)
  - a: Simultest IMK Lymphocytes Kit 检测试剂盒:

(1)Isotype Control (MouseIgG1/IgG2a)

2CD3-FITC /CD19-PE

3CD3-FITC /CD4-PE

(4)CD3 FITC /CD8-PE

(5)CD3-FITC /CD16+CD56-PE

- b: FACS Lysing Solution 溶血素 (10X, 使用前用蒸馏水稀释成 1X);
- c: PBS 溶液。

#### 【样本制备】:

- 取 5 支流式上样管,编号为 1、2、3、4、5,分别取 100µl 充分混匀的抗凝全血加入每 支管管底,注意不要碰到管壁。
- 依次加入 20µl Isotype Control (MouseIgG1/IgG2a)、CD3/CD19、CD3/CD4、CD3/CD8、 CD3/CD16+CD56 双标荧光抗体,涡旋混匀。室温避光孵育 15-30 分钟。
- 取出试管,每管加入 10 倍稀释的 1X FACS Lysing Solution 2ml,涡旋混匀,室温避光 10 2 分钟。
- 4. 300g, 离心 5min。
- 5. 弃去上清液,每管加入 2ml 的 PBS,涡旋混匀。
- 6. 300g 离心 5min。
- 弃去上清液,每管加入 0.5ml PBS 混匀,4℃避光,1h 内上机检测;若不能及时上机,加入 0.5ml 1-2%的多聚甲醛,放 4℃冰箱保存,48h 内上机检测。

#### 【注意事项】:

- 1. 弃掉试管中上清液时,一定保证一次性垂直倒掉,不能反复倾倒,防止细胞丢失。
- 2~8℃保存,抗体试剂在保质期内稳定,不能冻存。抗体保存期间以及细胞孵育时应注意 避光。试剂瓶应保持干燥。
- 3. 任何试剂的外观改变,如沉淀、变色,都表明试剂不稳定,这时试剂不能使用。
- 4. 为得到理想结果,血样应在静脉穿刺后 6h 内染色。
- 5. 操作时如未按指定的孵育时间、离心次数或温度进行,容易发生错误。
- 6. 抗体试剂虽含有叠氮钠保护剂,仍需注意微生物污染,以免导致错误结果。
- 7. 中国人群淋巴细胞亚群正常参考值(采用此 Kit 检测, 各实验室最好建立自己的参考值)

CD3(总T淋巴细胞)	50-84%
CD3+CD4+(Th 细胞)	27-51%
CD3+CD8+(Tc/Ts 细胞)	15-44%
CD3-CD16+CD56+(NK 细胞)	7-40%
CD3-CD19+(B细胞)	5-18%
CD4/CD8 (Th/Ts)	0.71-2.78

### 【创建实验】:

- 1. 在左侧的"navigation"栏中,选择"Experiment";
  - BD FACSChorus

😳 BD	EXPERIMENTS
لم experiments	+ New Experiment Delete
¢ CYTOMETER	Name
¢ USERS	
Image: Control	
<b>≜</b> BD	
Log Out	

- 2. 点击"+New Experiment"创建新的实验,选择"Blank Experiment",创建新的实验;
- 3. (可选项)也可以从已存模板中开始新的实验;

#### EXPERIMENTS

+ New Exp	eriment	Delete	
		Name	Fluorochromes & Labels
□ ☆	わ	Experiment 4-3-2	PE-Cy7, PE
□ ☆	ත	KLM	cd4 PE-Cy7,cd8 PE,c45 FITC
	ආ	Experiment 3	PE-Cy7
	ආ	Experiment 1	PE-Cy7, FITC, BV 421, APC-Cy7
$\bigcirc$	2		

① 实验模板选项

使用之前创建的实验模板,实验模板中包含初始实验中的各个参数,但不含任何数据 和分选报告文件。在使用实验模板创建新的实验时,电压会根据最后一次的 CS&T 的 设置更新;

- ② 复制不含数据的实验 根据已保存的实验来创建新的实验,所有设置都一致,仅不含数据文件。文件只可以 复制一次,当复制多次实验时,请使用"实验模板选项"。新创建的实验中电压会根据 最后一次的 CS&T 的设置更新;
- 4. 在"Experiment Name"区输入实验名称(比如 2Color);
- 5. (可选项)如果希望多次使用该实验,可建立实验模板,选择"Use as an experiment template";
- 6. (可选项)选择"Sample Temperature",让实验在指定的样品温度下开始实验,该选项只能控制上样仓的温度,不控制分选仓的温度;

EXPERIMENT INFO	ORMATION	5	
Experiment Name:	2Color	Use as Experiment Template	
Description:	6		
Sample Temperature:	4°C •		

 在荧光素列表中选择一个或多个荧光素,点击任意一个荧光素旁边的"+",在该列添加新 的荧光素(用户自定义的荧光素会有\*标志);在"Labels"中可添加荧光素标记的抗体名称; 每一列中只能选择一种荧光素;

#### FACSMelody 系列培训手册

BD FACSChorus	EXPERIMENTS > EXPER	IMENT 1		
	EXPERIMENT INFO	RMATION		
•	Experiment Name:	2C		Use as Experiment Template
CYTOMETER	Description:			
USERS	Sample Temperature:	Off	•	
<b>Ø</b> HELP		& LABELS		
<b>A</b>	Fluorochromes		Labels	
Log Out	+ PerCP	PerCP-Cy5.5		
	+ PE		CD19	
	+ нтс	BB515	СДЗ	

8. (可选项)将鼠标悬浮在任一荧光素上,可以查看各激光和滤光片信息;

### 【定义视图界面】:

BD FACSChorus	EXPERIMENTS > 2COLOR 2	Design Experiment     View Data     Set Up Sort
	ACQUISITION DASHBOARD     Load     Load     Sample     Pause     Flow Rate: 1     Lovert Rate: 0	Total Events: 0     Prostation: All Events: v     Prostation: All Events v
¢ USERS	DATA SOURCES	O Linde         Display Events         2.000         ■ Refreeb.Data           Image: Strain S
<b>⊘</b> HELP	POPULATION HIERARCHY     All Events	107 107 107 200 200 200 200 200 200 200
BD Log Out	Scatter SCC Singlets FSC Singlets FSC Singlets	
		PSCH         x10*            PSCH         x10*            PSCH         x10*              PLOTS         +         <
Connected Sheath 12 hr 51 min		Statistics  Population  Fixeds  Streets  Streets  Streets  Fixeds  Fixeds Fixeds  Fixeds  Fixeds  Fix
System >		FAC Singlets

- 1. 点击"View Data";
- "Acquisition Dashboard"用于 load 或 unload 样品,可选择调整:上样速度(flow rate), 震荡频率(agitate samples),反冲上样针(backfulush),样品室的灯光和数据记录选项;
- 3. "Data Sources"界面用于选择想要查看的文件,导出数据文件,更新补偿;

- 4. "population hierarchy"用于查看各门的逻辑关系;
- 5. "plots"用于设置阈值,改变电压,和画门:

有 4 个默认的散点图,分别为 All Events, Scatter, SSC singlets 和 FSC singlets。如果将 Doublet Discrimination 前的对勾勾掉,则只会存在 2 个默认图。根据实验需要设置。



- ① 改变图的类型,删除图,选择 population filter 或 plot option (锯齿形按钮);
- ② 设置阈值:将鼠标悬浮在在默认散点图上的阈值标记显示,沿着坐标轴移动阈值标记 来调整阈值,点击阈值散点图的x轴,可以选择想要设置的参数;
- ③ 改变电压:将鼠标悬浮在散点图上的电压滑动显示,沿着坐标轴移动滑条来调整电压, 或者使用 x-, y-轴的上下、左右箭头调整电压;
- ④ 添加散点图,直方图,等高线图或密度图,点击"+"按钮,选择图的类型,改变图形 大小可以将鼠标悬浮在图上点击 zoom 按钮;



- 6. 创建、移动、改变、删除门:
  - 创建新的门,单击带有虚线的正方形图标,从列表中选择一个形状,然后在绘图上绘制门;
  - ② 移动门,选择门,将其拖动到新的位置;

- ③ 修改门,选择门的顶点并拖动到别的位置;
- ④ 删除门,在 population hierarchy 中选择想要删除的门,选择 X 进行删除;
- 7. 在屏幕底部 STATISTICS 中查看数据统计结果,点击"+"添加或编辑数据;

						View	Hoight	1/5	our Midth	
Parameter	Mean	Median	Geo. Mean	SD	%CV	rSD	%rCV	Min	Max	Mod
FSC-A										
SC-A										
CD19-A			1							
CD3-A										
Time										
Time										

- 8. 上机检测:
  - 1) 在 PLOTS 下画一张 FITC 和 PE 的双参数散点图;
  - 2) 放同型对照管在上样仓上,点击"Load Sample"上样;
  - 3) 调节 FSC 和 SSC 的电压, 使得样品在图上分群明显, 不压线, 不超过检测范围;
  - 4) 如果有必要,调整 FSC 阈值,减少碎片,同时保证淋巴细胞的完整性;
  - 5) 调整门的位置,使其只圈中淋巴细胞;
  - 6) 在荧光图中,选择仅显示选定细胞群,调整 FITC 和 PE 电压,尽量使阴性细胞位于 图的坐下角位置,即认为是荧光表达的阴性区域;
  - 7) 沿着阴性细胞群的上沿和右沿, 画十字象限门点;



8) 击"Start Recording"记录第一管数据,命名;

	Provide a name for your recording. Your recording will be available to you in the Data	a Sources panel.
1	ISO	
		ОК

- 9) 依次上样,记录数据;
- 9. 数据导出:在"Data sources"中点击"Export All FCS files"。

### 分选设置

#### 【流程】:

- 1. 在分选仓内安装合适的分选装置;
- 2. 点击"Set Up Sort"选项;
- 3. 选择分选细节,比如:
  - ① Format, 定义收集装置(Tube/Plate/Slide);
  - ② Volume, 定义收集的液体体积(1.5 ml/2.0 ml/5.0 ml);
  - ③ Sort Mode,选择不同的分选模式 Yield/ Purity/ Single cell;
- 4. 在下方的面板中, 定义分选的细胞群:

使用流式管分选的话,首先选定流式管,然后在 population hierarchy 中选择想要分选的 细胞群,选定后流式管的颜色与选定的细胞群颜色一致;

C BD	EXPERIMENTS > 2C	OLOR			O Design Experiment	2 View Data	3 Set Up Sort
		ETUP					
	Format:	Tube	•				
٠	2 Volume:	5.0 mL	•				
CYTOMETER	3 Sort Mode:	Purity	•				
٠							
USERS	Tube	1	2				
0 HELP	Initial Buffer Volume:	0.50 mL	0.50 mL				
۵	Number of Events:	10000	10000 🗘				
BD		Max: 1,152,000 events	Max: 1,152,000 events				
	Assign a sort population	n by clicking a tube and selecting	the population that you want.	Population Hierarchy			
				All Events			
				SSC Singlets			
				FSC Singlets			
				B Coll			
				P1-2			
				T Cell			
Connected							
Sheath 11 hr 55 min			4				
Waste		B Cell	T Cell				

使用平板分选的话,首先选定板上的不同孔,然后在 population hierarchy 中选择想要分 选的细胞群;



- 5. 在分选前,选择收集装置中加入的起始液体体积;
- 6. 选择分选到各个装置中的 event 数;
- 7. 点击"Load Sample"进行上样;
- 8. 点击"Start Sort"开始分选;

Stop Sort	Pause Sort		Retract
Sort Mode: Purity Remaining Time: 1 min			
Population:	B Cell	T Cell	
Target Count:	10000	10000	
Sort Count:	790	0	
Sort Rate:	112	0	
Efficiency:	99.37	0.00	

9. 点击"View Reports"查看分选报告,报告可以导出或打印。

EXPERIMENTS > 2COLOR			1 Design Experiment	2 View Data	3 Set Up Sort	Sort	5 View Reports	
Select Sort Report:	Sort Report 3/1/2017 7:54 PM	٠	Export Report					

## FACSMelody 日常关机程序

- 1. 用 3mL FACS Clean 清洗液的流式管上样 5 分钟,注意: Flow Rate 设置为 100。
- 2. 同样,用 3mL DI Water 的流式管, Flow Rate 设置为 100 上样 5 分钟。
- 3. 在 Stream 窗口中关闭液流,用温度在 60°左右的水,倒入分选仓两边的废液槽内, 冲洗暂留的 PBS,防止废液槽堵塞。
- 4. 在 Cytometer 页面,选择"Long-Trem Shutdown"程序;



5. 按照向导完成步骤。

Daily Shutdown		
This procedure takes about 30 seconds to complete.	1 Daily Shutdown	*
	Closed-Loop Nozzle Insert the closed-loop nozzle.	*
	3 Sheath and Waste Tanks Verify that the fluid levels in the sheath and waste tanks are acceptable. (Refer to the status indicators on the side navigation bar.)	*
	DI Water Load a clean tube with 3 mL of sterile deionized water.	*
	The procedure completed successfully. You can now turn off the cytometer.	Close

- 6. 如果看到有漏水现象,用干棉签将水吸干,千万不要上下左右用力,特别 注意不要擦洗右边的小窗,然后棉签蘸水轻微擦洗喷嘴下方,最后用干棉 签将水吸干(如果多次出现漏水现象,该喷嘴已经损坏,需要更换)。
- 拿配制好的 Detergent Solution Concentrate (P/N660585)清洗液,运行 clean flowcell。

- 8. 将喷嘴超声 30 秒,吸干水后放置到带盖子的样本管保存。
- 9. 用纱布蘸水清洁分选仓,高压电极板,清洁 AccuDrop 收集镜片和 AccuDrop 激光射出处镜片。
- 10. 清洁流动室周围的盐结晶
- 11. 退出软件,关闭仪器和电脑,将鞘液桶的压力释放(向上拉鞘液桶的勾环直至压力显示为0),关闭压力泵

## FACSMelody 系列日常保养和维护

很多维护程序需要在液流关闭时进行,需要先手动关闭液流。

#### 【液流关闭】:

1. 在导航栏中点击"Stream";



2. 在 Stream 窗口,点击"Stop Stream"。

#### 【清洁表面】:

- 1. 关闭液流;
- 检查并清理以下部件表面:偏转板,上样仓,收集装置,分选仓内部,闭合喷嘴,插 入喷嘴的基座,内部模块。

#### 【清洗喷嘴】:

- 1. 将喷嘴从流式细胞仪上取出;
- 将喷嘴置于含有 DI 水的流式管中超声 1 分钟,可以重复此步骤直至喷嘴干净; 注意:不可以使用漂白剂或是别的强性清洁剂清洗喷嘴。
- 3. 将喷嘴放在空气中干燥几分钟,或用擦镜纸擦干;
- 4. 将喷嘴重新插入流式细胞仪。

#### 【偏转板清洁】:

- 1. 确保液流关闭;
- 2. 打开流式室门和分选仓门;
- 3. 确保分选仓旁边的红色警示灯是灭的,表明偏转板没有加电;
- 4. 通过旋转分选仓门前的螺丝打开分选仓;
- 5. 用蘸水的无棉棉签清洁偏转板;

6. 加电之前确保偏转板已经干燥。

#### 【清空废液桶】:

每次开机装鞘液时都需要清空废液桶,在软件提示废液桶快满时也需要对废液桶进行清空。

- 1. 关闭液流;
- 断开感应器、液流管跟废液桶的连接;
   注意:当流式细胞仪运行时,废液桶会被加压。在开桶前等待1分钟解压。
- 3. 打开废液桶盖,根据实验室生物安全标准流程清空废液;
- 4. 在废液桶中加入约 1L 的消毒液,或者加入总体积 10%的消毒液;
- 5. 盖上废液桶盖子,重新连上感应器与液流管;
- 6. 建议一个月更换一次废液桶的滤盖。

#### 【无菌管理的制备】:

无菌管路制备可以对整个系统任何潜在污染进行清洁,在分选前,您都需要运行该程序。 确保每种液流对应一个液流过滤器,不可以交叉使用。如果整个流程中使用的是同一个液流桶, 在换成另一种不同溶液时,需要对桶用 DI 水进行彻底的清洗。

需要准备的试剂:

至少 2.5L 10%的 Clean 清洗液;

至少 2.5L DI 水;

至少 2.5L 70%的酒精;

至少 2.5L 鞘液。

1. 移去鞘液感应器;

- 2. 对鞘液桶进行高压或者 70%的酒精过夜熏蒸;
- 3. 在软件 Cytometer 界面,选择 System Startup;
- 4. 选择完成一个液流启动的选项,或者点击"Skip";
- 5. 选择"Prepare for Aseptic Sort", 点击"Start";
- 6. 按照指示完成步骤。

Prepare for Aseptic Sort	
Refer to the user's guide for complete instructions on preparing for aseptic sort.	Prepare for Aseptic Sort     Start
If you use the same sheath tank for the entire procedure, make	Closed-Loop Nozzle     Insert the closed-loop nozzle.
sure you rinse it thoroughly with DI water before you refill it with a different cleaning solution.	Bleach Decontamination Install a sheath tank containing at least 2.5 L of 10% bleach solution. Install the bleach filter on the sheath tank. Empty the waste tank.
This procedure takes about 30 minutes to complete. Ensure that your computer will not enter sleep mode during this procedure.	DI Water Flush Install a sheath tank containing at least 2.5 L of sterile deionized water. Install the deionized water filter.
	5 Ethanol Decontamination Install a sheath tank containing at least 2.5 L of 70% ethanol solution. Install the ethanol filter on the sheath tank. Empty the waste tank.
	6 Sheath and Waste Tanks Install the autoclaved sheath tank with at least 2.5 L of sterile, 1X PBS. Install the sheath filter. Empty the waste tank.
	Start Sheath Filter Purge and Prime the Stream
	Court

# FACSMelody 系列仪器使用的微球和试剂

货号	英文品名	备注		
653828	BD CS&T RUO Beads (50 tests)	仪器状态检查&跟踪		
661612	BD Accudrop Beads	细胞分选调节		
661614	BD FC Beads Dilution Buffer	补偿的调节		
661615	BD FC Beads FITC	补偿的调节		
661616	BD FC Beads PE	补偿的调节		
661619	BD FC Beads PerCP-Cy™5.5	补偿的调节		
661618	BD FC Beads PerCP	补偿的调节		
661617	BD FC Beads PE-Cy™ 7	补偿的调节		
661620	BD FC Beads APC	补偿的调节		
661622	BD FC Beads APC-Cy7	补偿的调节		
661621	BD FC Beads APC-H7	补偿的调节		
661625	BD FC Beads APC-R700	补偿的调节		
661623	BD FC Beads V450	补偿的调节		
661624	BD FC Beads V500-C	补偿的调节		
661627	BD FC Beads BV421	补偿的调节		
661628	BD FC Beads BV510	补偿的调节		
661630	BD FC Beads BV786	补偿的调节		
661631	BD FC Beads BV515	补偿的调节		

容器	适用液体	容积
鞘液桶	FACSFlow 鞘液(货号 342003)	10L 不锈钢桶
	FACSClean solution 清洗液 ( 货号	
	340345)	
	75%乙醇	
	0.22um 滤过的去离子水(无菌)	
	有效氯浓度 10%、无需过滤的次氯酸钠原液	
	1升(废液消毒)	
废液桶		10L 塑料桶

## **Troubleshooting**

- 1、当出现无法开启液流或 AccuDrop 失败时,退出软件,进入工程师 Service 界面,用户名: service,密码:工程师 GID+6 位数字,双击左边菜单上的 Service,在工程师的指导下进 行选 sort version 进行操作。
- 2、如果出现 CS&T 失败,将喷嘴超声清洗一下(1 分钟),如果还是失败,请用手动方式建立 每个通道的直方图,上样运行 CST beads 并将观察到的情况跟工程师联系。
- 3、当出现软件无法与仪器联机的问题时,可尝试关闭所有电源,重新依次开启电脑,和 Melody 的电源。
- 4、当联机问题通过重启电脑和流式无法解决,请进行如下操作,打开计算机,



1) 在如图所示位置输入 "Service", 然后双击打开 Service 应用。

2) 在打开的窗口中找到 "BD FACSChorus Instrument Service.exe" 右击,选择 "Properties" 点击打开

Services (Local)	Services (Local)						553
	BD FACSChorus Inst	rument Service Name ActiveX Installer (AdnstSV) Adobe Acrobat Update Serv Alloyn Router Service App Readiness Application Host Helper Ser Application Identity Application Identity Application Information Application Layer Gateway Application Management AppX Deployment Service ( ASP.NET State Service Auto Time Zone Updater Background Intelligent Tran Background Intelligent Tran	Description Status Provides Us Adobe Acro Running Routes AllJo Gets apps re Provides ad Running Determines Facilitates t Running Provides su Processes in Provides su Automatica Transfers fil Running Windows in Running		Startup Type Manual Automatic Manual (Trig Manual Automatic Start Stop Pause Resume Restart All Tasks Refresh	Log On As Local Syst Local Syst Local Serv Local Syst Local Syst Local Syst v t t t t t t t t t t t t t t	
		BD FACSChorus Instrument	The base riter	Running	Properties		IVR.
		BD FACSChorus Instrument BitLocker Drive Encryption Block Level Backup Engine	BDESVC hos The WBENG	furn Der	Properties Help		

3) 在打开的对话框中找"Start Type",选择 Manual,点击 Apply

General	Log On	Recovery	Depen	dencies	
Service	name:	InstSrv			
Display name:		BD FACSO	horus In	strument Service	
Descript	tion:				
Path to executable "C:\Program Files"		e: \BD\FACSC	horus\Si	ervice\BD.Simple	adty.instrumentServ
		Automatic Automatic	(Delayed	l Start)	
Service	status:	Disabled			
9	art	Stop		Pause	Resume
You can from here	specify th	e start paran	neters th	at apply when yo	u start the service
Start par	ameters:		1		

4) 在如图中位置点击"Stop the service"

Gervices File Action View	Help				
Services (Local)	Services (Local) BD FACSChorus Instrument Service Stop the service Restart the service	Name ActiveX Installer (AxInstSV) Adobe Acrobat Update Serv AllJoyn Router Service App Readiness	Description Provides Us Adobe Acro Routes AlVo Gets apps re	Status Running	Sta Ma Au Ma Ma

- 5) 打开仪器的 AC 电源,(电子系统部分后面)和 DC 电源(分选部分前面红色按钮)
- 6) 打开电脑桌面上的 Tera Term 软件
- 7) 手动开启仪器服务的步骤:
  - I. 找到以下路径

C:\Program Files\BD\FACSChorus\Service and locate BD.Simplexity.InstrumentService.exe

Sen ♥ Sen	/ice				
File Home	Share	View			
← ~ ↑ 📒	> This	s PC > Local Disk (C:) > Program Files	> BD > I	ACSChorus > Sen	vice
# Quick access		Name	L	ate modified	Type
Desktop	*	BD.Simplexity.Analysis.dll	7	715/2016 11:47 AM	Application action
🐥 Downloads	*	BD.Simplexity.Analysis.pdb	7	/15/2016 11:47 AM	PDR File
Documents	A	BD.Simplexity.Api.dll	7	/15/2016 11:57 AM	Application extens.
Fictures	#	BD.Simplexity.Api.pdb	7	/15/2016 11:57 AM	PDB File
Config		BD.Simplexity.Core.dll	Z	/15/2016 11:57 AM	Application extens.
Configuration		BD.Simplexity.Core.pdb	7,	/15/2016 11:57 AM	PDB File
Ennad		BD.Simplexity.InstrumentService.Api.	dli 7)	15/2016 11:57 AM	Application extens
скроп		BD.Simplexity.InstrumentService.Api.	pdb 7/	15/2016 11:57 AM	PDB File
Melody pics		BD.Simplexity.InstrumentService.exe	7)	15/2016 11:57 AM	Application
a OneDrive		BD.Simplexity.InstrumentService.exe	File descrip	tion: BD FACSChor	is Instrument Service
This PC		BD.Simplexity.Interfaces.dll	File version	: 1.0.0.0	
Desktop		BD.Simplexity.Interfaces.pdb	Date create Size: 46.5 K	ed: 7/15/2016 11:57 ø B	MM
		Change to at it in		17 1584 F 18 FT 281	

- II. 右击 BD.Simplexity.InstrumentService.exe 文件,右击选择 Run as Administrator.
- III. 打开 BD FACSMelody 的软件,登陆后检查仪器是否正常和软件连接。
- 8) 回到 3) 步,将 Manual 改回 Automatic,点击 ok,关闭 Tera Term 窗口。