**CytoFLEX流式细胞仪操作流程**

**一、开机校正流程**

**1 开机前检查**

* 1.  **检查鞘液桶，确认：**
* 鞘液桶内装有足量鞘液，同时不超过指示上限。如使用灭菌纯水为鞘液时，需加入适当量**抑菌防腐剂**在鞘液桶内【建议使用原装鞘液】，防止鞘液桶及仪器流路管路长菌。
* 防腐剂配方：Proclin 3000 0.05% w/v;2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮 0.05%；2-苯氧乙醇 0.2-0.5% w/v;氟化钠 0.3 g/L。
	1. **检查废液桶，确认：**
* 清空废液桶
* 如果需要检测有生物危害性的样本，废液桶内加入 400ml 次氯酸钠原液。
1. **打开电源**

打开位于仪器后面的电源开关，仪器通电。电源指示灯亮。可以听到“滴”一声轻响，工作站电源打开，等待工作站启动、系统启动完毕。

**3打开软件**

**3.1** 打开电脑，双击桌面CytExpert图标打开仪器，CytExpert软件界面出现。

**3.2**确保软件界面左下角连接指示灯应为绿色，左侧显示“已连接”，表示连接正常；左侧为连接状态，中间为仪器状态，右侧为状态信息。

***注意：***连接指示灯为红色表示联机工作不正常。确认仪器电源已正常打开，连线正确，保证仪器USB牢固连接到计算机，并重新启动计算机。

**4初始化仪器**

**4.1** 在**“细胞仪”**菜单中选择**“开机流程”**程序。

**4.2** 出现开机流程程序窗口，选择初始化。

**4.3** 等待系统初始化。按照屏幕上的软件提示，然后选择启动，并按照软件指示完成仪器初始化。

**4.4** 在初始化结束后，选择关闭以退出启动程序。现在系统被初始化。

 4.4.1 现场配置有效氯浓度的1%~2%的次氯酸钠溶液1~2ml，并将其过滤备用【建议购买的花王白色衣服专用漂白剂（以下简称花王漂白剂），可直接取原液过滤备用】；

 4.4.2 新建实验方案，将上样速度调整为高速；

 4.4.3 将配置好的次氯酸钠溶液置于样本架，并点击运行5min【可根据实际情况延长/减少时间】后停止上样；

 4.4.4 取2~3ml灭菌纯水置于样本架，并点击运行5~10min【可根据实际情况延长/减少时间】后停止上样；

**4.5** 排除流动室气泡

**4.5.1**确认仪器处于待机状态。如果为非待机状态，可以选择**“细胞仪”**菜单下的**“待机”**，或是直接点击数据获取控制界面上的**“待机”**键设置。

**4.5.2**选择**“细胞仪”**菜单下的**“排气泡”**，运行气泡排除程序，等到“滴”声，并指示窗口消失，或是看到状态指示栏提示结束。

**注意：在检测过程中遇到信号不佳，怀疑可能有气泡的时候，也可以运行排除气泡程序；如怀疑管路可能有样品残留时，可采取1%~2%的次氯酸钠溶液和去离子水冲洗管路，参考4.4步骤。**

**二、仪器QC及验证操作**

**1 准备质控样本**

* 1. **需要的材料**
* 12x75mm 上样管
* Cyto-CalTM+ Violet Alignment & Set-up Beads 荧光微球
* 0.2μm 过滤去离子水

**1.2** 取0.5mL去离子水加入12×75mm的试管，再加入充分混匀的荧光微球1-2滴，混匀。

**2 进入QC实验界面**

**2.1** 打开 CytExpert 软件，确认已经联机，并且已初始化仪器。

**2.2** 选择**“质控”**菜单下的**“启动质控”**，运行QC程序。

**3 QC设置**

**3.1** 在 QC 设置界面上在批号下拉菜单中选择正确的质控品批号。



***注意：***不同批号对应有不同的靶值信息，选择错误的批号会导致错误的QC结果。

**4 获取数据**

**4.1** 点击**“初始化”**。

**4.2** 将准备好的质控样本管放入样本管支架。

**4.3** 点击**“开始”**上样，并进入QC实验界面。

**4.4** 软件左侧会显示运行过程，右侧会出现图形。质控实验将依次进行检测配置、激光功率、延迟、信号强度、信号变异系数、本底背景信号。

**4.5** 运行过程中，软件将自动寻找质控微球全体，并获取计算数据结果。等待QC实验过程结束，并回到QC设置界面。

***注意：***如果上样速度过低，软件在运行过程中可能会自动停止进样并落下样本管，出现提示信息。如果出现此情况，请提高样本浓度再进行实验。

**5 确认结果**

 回到QC设置界面，任何时候均可回顾完成的检测结果

**5.1** 点击左侧QC结果列表，右侧即出现检测报告。结果栏显示为 的表示通过，显示为的表示失败。

**5.2** 右侧的报告区域会显示具体的测试结果，分别显示激光的功率、延迟、检测条件和信号结果。同样会以和标明各项结果。对于没有通过的项目，超出范围的值将以红色字体标明。在comment 区，会对未通过项目进行说明。

***注意：***如果质控未通过，请按以下流程检查

 1. 使用的微球是否在效期内，并按照说明书要求保存

 2. 配置的样本管是否按要求正确处理并放置

 3. 完成一次排气泡流程并再次检测

 4. 完成一次清洗流程并再次检测

 5. 若经以上处理后，质控仍然未通过，请咨询维修工程师

**三、关机流程**

**1 准备清洗液**

* 1. **需要的材料**
* 12x75mm 上样管
* 有效率浓度为1%~2%的次氯酸钠溶液【需过滤】
* 清洗液
* 0.2μm 过滤去离子水

**1.2** 分别取1%~2%的次氯酸钠溶液、清洗液、去离子水备用。

**2 清洗仪器**

**2.1** 打开 CytExpert 软件，确认已经联机，并且已初始化仪器。

2.2 新建实验方案，将上样速度调整为高速；

2.3 将配置好的次氯酸钠溶液置于样本架，并点击运行5min【可根据实际情况延长/减少时间】后停止上样；

2.4 取2~3ml灭菌纯水置于样本架，并点击运行5~10min【可根据实际情况延长/减少时间】后停止上样

**2.5** 选择**“细胞仪”**菜单下的**“每日清洗”**，运行清洗程序。

**2.6** 将 2mL 清洗液放置在上样座，选择运行，默认清洗时间为3分钟。

**2.7** 等待结束后，将3mL去离子水管放置在上样位置，点击运行，进行第二步清洗。默认清洗时间5分钟。

**2.8** 等待结束后，取下样本管。关闭每日清洗窗口。

**3 关机**

**3.1** 退出软件，仪器会自动处于待机状态。

**3.2** 关闭计算机。

**3.3** 关闭仪器主电源开关。

**四、日 常 保 养 与 维 护**

为了保证CytoFLEX 流式细胞仪的正常运转和测定结果的可靠，仪器的日常保养与维护必不可少。

|  |  |
| --- | --- |
| **保 养 内 容** | **推 荐 频 率** |
| 1、添加鞘液、清洗液 | 每天开机前检查液面水平，如需要及时添加 |
| 2、清空废液桶 | 每天开机前检查废液的液面水平，如需要倒空废液桶 |
| 3、排气泡 | 无论何时，更换溶液时或做其他保养时，要执行该程序 |
| 4、鞘液桶 | 每月 |
| 5、清洗液瓶 | 每月 |
| 6、深度清洗 | 每周 |

**清洗液的选择**

* 漂白剂——NaClO溶液：流式细胞仪的常规清洗用液。漂白剂须经0.22μm滤膜或滤纸过滤后，稀释至有效氯浓度1%-2%，现用现配。
* Contrad 70 洗液：深度清洗专用洗液。每次以Contrad 70 洗液:蒸馏水=1:1的比例配置30ml左右工作液,一般1个月更换一次(如果使用频率高,更换工作液频率可提高)
* 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。蒸馏水必须以0.22μm滤膜过滤后备用。

**仪器日常维护**

* 每日实验结束后，请于关机前执行每日清洗程序,清洁样本针及进样管路，防止样本针及进样管路堵塞或有染料残留；同时用75%的酒精擦拭样品台表面以及半自动上样器底座
* 在使用了一些荧光染（如PI、EB、AO、TO等）后，需要立即使用Beckman Coulter 的Cleanz液跑5min,然后换成蒸馏水跑5min;
* 当观察到细胞碎片明显增加或背景噪音明显增加时，说明样本针及进样管路中有大量碎片或蛋白残留，应及时进行清洗程序。

清洗过程如下：

1. 现场配置有效氯浓度的1%~2%的次氯酸钠溶液1~2ml，并将其过滤备用【建议购买的花王漂白剂，可直接取原液过滤备用】；
2. 新建实验方案，将上样速度调整为高速；
3. 将配置好的次氯酸钠溶液置于样本架，并点击运行至少5min后停止上样；
4. 取2~3ml灭菌纯水置于样本架，并点击运行5~10min【可根据实际情况延长/减少时间】后停止上样；

**定期维护**

需要定期进行仪器检查和清洁，

* 鞘液滤器的更换：定期更换鞘液过滤器，以保证能有效过滤鞘液内的杂质，保障液路正常稳定。厂家建议更换鞘液过滤器的周期为6个月【可根据实际情况进行更换】。
* 蠕动泵管的更换: 厂家建议的更换周期为6个月【可根据实际情况进行更换，如果使用频率非常高，可以提前自备蠕动泵管】。

**样本的处理**

样本上样前,必须经过过滤去除聚集物,防止样本上样针的堵塞,可采用300目的细胞筛过滤细胞样本.

**上样针的维护**

由于1.5ml的EP管材质不均一,所以上样前先将EP管盖子剪掉,然后将EP管放在上样底座正中央,不可歪斜放置EP管,以免造成上样针的损伤.