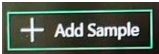


光谱型流式分选仪 Thermo Bigfoot 操作手册

一、分选准备

1. 新建实验：点击  New sort 按钮>>在 Name 界面填写实验名称>>选择补偿或光谱解析模式>>在 Fluorophores 界面选择荧光素将其添加到实验中>>选择是否有阴性对照和单染管>>进入到实验工作界面。
2. 设置逻辑圈门：Primary Group>>自动生成图 P1（FSC-A/SSC-A）>>选择圈门形状（矩形、多边形、圆形、线段）在图中设门>>双击圈门进入下一层，根据实验需要多次设门。
3. 清洗进样管路：在右侧工作栏中点击  新建样本管，将含双抗的 PBS 缓冲液管放在上样位置 1 号（默认），设置上样速度 Flow rate 100，点击  开始上样冲洗 3~5 分钟，确保分选前进样管路无菌以避免样本污染。
4. 调节电压：新建样本管，将样品管放在上样位置 1 号，设置上样速度 Flow rate 30，点击  开始上样，拖动对应坐标轴的光标/输入具体数值改变电压，使细胞群在合适的可检测范围，点击“Stop”停止上样。
5. 补偿调节（若不需要此步骤可跳过）：根据实验需要，设置记录事件数目限制 Event Limit，点击  依次记录阴性对照和各个单染管样本。记录结束后点击“Auto Comp”计算补偿，记录全染样本数据后补偿自动应用，检查补偿是否适配样本，如需调整点击“Comp”调出补偿矩阵进行修改。
6. 分选设置：右键点击要分选的目的细胞群，打开 Sort 属性  使该细胞群可以被分选。Flex Controls>>Sort>>选择收集装置类型（Tube、Plate、Advanced）>>选择 Tube 类型（1.5mL、5mL、15mL）或选择 Plate 类型（96-well、384-well 等），分配分选位置、模式和记录事件数目限制。
>>若收集装置为 Tube，需详细设置选择待分选目的细胞群的分选位置>>点击  图标，进入 Sort Pre-Check 界面>>“Check Streams Deflection”和“Check Reverse Streams Deflection”确认下方相机图像中的测液流偏移情况。
>>若收集装置为 Plate，则需设置选择待分选目的细胞群及每孔分选细胞个数>>点击  图标，进入 Sort Pre-Check 界面>>点击“Check Streams Deflection”确认下方相机图像中的测液流偏移情况>>在分选舱中放入孔板收集架以及校准板，Test sort 检查液滴落点是否合适。

7. 孔板校准：Flex Controls>>Maintenance>>Media Calibration Wizard>>Setup Media Calibration，选择孔板类型及分选模式，在分选舱中放入孔板收集架以及校准板>>3-Point Calibration，先通过分选舱摄像头调节孔板位置水平，再通过校准板的“Start”“Medium”“End”三点进行精细校准，校准完成后点击“Calibration”保存校准位置>>Adjust Streams，调节侧液流>>Validation，Test sort 整板>>校准完成。

二、上样分选

新建样本管，放置样品管在上样位置 1 号>>打开分选舱门，在分选设置好的对应位置放入收集管/孔板>>设置上样速度 Flow rate 30，开始上样，确认样本各细胞群位置正确>>点击  图标，进入 Sort Pre-Check 界面，显示 Sort Ready，点击“Sort Start”即开始分选；点击“Stop”即停止分选，打开分选舱门取出收集管/孔板。如有多个样本需要分选，重复上述步骤。

三、进样管路清洗

在分选实验结束后，清洗进样管路：将清洗液管放在上样位置“1”，上样速度 Flow rate 调至 150，Clean、Rinse、H₂O 各冲洗 10 分钟。

四、数据导出

1. FCS 格式原始数据导出：点击软件左侧工具栏  图标>>选择要导出的数据>>选择存储位置>>开始导出。
2. 分选 Plots 和 Sort report 导出：点击软件上方工具栏  图标>>选择要导出的 Plots 和 Sort report>>点击“Print”>>选择选择存储位置>>PDF 文件命名>>开始导出。

五、Troubleshooting

1. 分选后收集细胞活性较差。对于较为脆弱的样本，将上样速度 Flow rate 适当降低、搅拌速度由“Med”调至“Low”，并同步开启上样舱与分选舱 4℃ 温控，可显著提升分选后细胞活性。
2. 100μm 喷嘴分选效率偏低。当目的细胞比例较低导致分选效率偏低（如每秒事件数约 2000、效率仅 40%）时，可通过多倍稀释样本并适当提高进样流速（如至 100）将分选效率提升至 75%左右，且分选后细胞活性良好。
3. 收集管液面升高但离心后细胞回收率低。该问题多因仅以 PBS 缓冲液作为收集液、缺乏 BSA 或血清所致，可通过在 PBS 中添加适量 BSA 或血清加以改善；具体收集液体系应视细胞类型而定。