

Sony MA900 开关机操作流程

开机

1. 检查鞘液/纯水和废液体积，补充鞘液桶/纯水桶、清空废液桶（**鞘液建议提前一天加入桶内**），擦拭电极板。
2. 打开总电源，先开空气压缩机（等待约 15s 让压力稳定），再开启仪器面板 Power/Standby 开关，开启电脑并打开 MA900 软件，以默认用户名 user1 登录，密码为 password1。
3. 取新 Chip 根据软件指示用电脑摄像头扫描 chip 包装上的二维码。
4. 点击“next”，取出旧 chip 插入新 chip（注意 chip 方向不要插反），chip 插入至一半时会被自动吸入并完成液路与 chip 管路的自动密封；点击“next”。
5. 默认 laser setting 设置即可（即只勾选 488），点击“next”。
6. 默认滤光片配置即可，点击“next”。
7. 液流启动检查(Fluidics check)，约需 5 min。

此时需检查两处细节：1)上样针针尖处是否有液滴滴下，若无液滴滴下请点击 sample line cleaning 冲洗上样针；2)液流监控窗口中液滴是否稳定，若不稳定请点击 sheath filter debubble 排气泡（默认执行）。

注意：每次开机前若补充了鞘液或者纯水，均需要进行排气泡步骤。

8. 进入 Auto Calibration 程序，根据软件指示取 Auto Setup beads 上下颠倒 5 次混匀，滴 15 滴（无需稀释）至 5 mL 流式管（或 15 ml 离心管），放入上样仓，确认分选仓内未放置收集装置后，点击“OK”。
9. 仪器自动依次完成光路校准(Chip Alignment)/激光延迟校准(Laser delay)、液滴断点计算(Droplet Calibration)、侧液流偏转(Side Stream Calibration)和液滴延迟计算(Sort Delay Calibration)共 4 个步骤，约需 20-30 min。
10. 待自动校准完毕，点击“OK”进入操作软件界面，根据实验需求，新建实验或调用原来实验模板。

SONY

关机：

1. 点击软件菜单“Cytometer”下的“Hardware and Software Shutdown”。
2. 准备好 10 mL 次氯酸钠溶液和 12 mL 无菌纯水各一管（均以 15 mL 离心管盛放），按照弹出窗口的提示进行操作，依次用次氯酸钠溶液和无菌纯水上样冲洗管路（均选用 normal cleaning）。
3. 完成冲洗后点击“OK”仪器和软件均自动关闭。
4. 关闭电脑和空气压缩机。

Sony MA900 上样分选操作流程

基本实验设置:

1. 点击 **blank template** 创建新的模板，输入实验名称，选择检测通道和激光器（**不论任何实验，488 激光器必选**），点击 “**Create Experiment**” 按钮创建实验。
2. 若是单色实验，可自动进入上样操作界面；若是多色实验，软件会有对话框提示：1）直接收取上样；2）开启自动补偿向导，按向导提示依次进行 **blank** 管和单染管数据收集，最后计算补偿矩阵即可。
3. 自动进入上样窗口 **acquisition window**，点击 **Tube One**，选择停止条件，设置停止分选或记录事件的数目，选择散点图显示数量帮助稀有事件分析。

样品分选基本操作:

1. 将样品放入上样舱，点击  开始上样。
2. 约 30s 后开始出现 **events** 信号，调整上样压力 “**Sample Pressure**”，达到理想的上样速度。
3. 点击 “**Detector & Threshold**” 按钮，调节 **FSC/BSC** 电压，使主细胞群呈现在前侧向散点图中左下角。点击 “**Restart**” 确认调节后的电压是否合适。
4. 调整 **gate A** 形状/位置以匹配细胞群，随后双击 **gate A** 创建新的散点图，调整 **X/Y** 坐标轴参数改为 **FCS-A/FSC-W**，画门圈取单细胞群 **gate B** 去除黏粘细胞。再次双击 **gate B** 创建新散点图，调整 **X/Y** 坐标轴参数改为目标荧光通道，调节相应通道电压值，使阴阳细胞群体呈现在图中合适位置（如已进行了自动补偿，此处不需要调整荧光通道电压）。
5. 点击 **Pause** 暂停上样，设置分选模式：“**5ml tube**” 流式管分选，“**15ml tube**” 离心管分选或者 “**96 well plate**” 孔板分选，选择合适的 **purity/yield/single cell** 模式。
6. 将添加有合适培养基或 **PBS** 的收集管放入收集舱门中，软件中点击 “**Load collection**”。
10. 在 **Left** 和 **Right** 的下拉菜单中选择对应的门，以及相应的分选事件数（**stop value** 默认为 0，表示当前样本分完为止）。在 **stop condition** 菜单中选择 **record** 数值。当数据记录值达到设定值，停止记录不影响分选的进行，分选同时也不影响记录的数据。

SONY

11. 检查液流监控窗口中液流指示灯  是长亮绿色即可进行分选，如果绿灯闪烁表明系统液滴不稳定，可以执行 chip debubble & sheath filter debubble/vent air 排除气泡，等待 1 分钟让指示灯长亮；若指示灯为灰色 ，表明软件无法恢复液流条件，需要重做 sort calibration。。
12. 点击 **Resume** 恢复上样，勾选 auto record，点击 sort & record 分选开始的同时开始记录数据。
13. 分选结束后点击 stop 按钮停止上样，点击“next tube”按钮创建新的分选 tube，开始下一管样本分选。
14. 分选实验结束后，依次点击 cytometer 菜单下“Bleach clean”和“DI Rinse”按钮进行次氯酸钠清洗和纯水清洗。
15. 选中实验文件，右键点击“Export to FCS file”按钮导出 FCS 文件。
16. 点击“File – Database - Export”按钮，选中目标实验文件移动到待导出列表，选定导出路径后点击 export 按钮导出“.expdat”原始实验文件，进行数据备份。

孔板分选基本操作：

1. 点击“Next tube”新建上样 tube，选择 sort method 为“96 well”孔板分选。
2. 打开分选仓门，安装孔板适配器支架和防飞溅片 (splash guard)，取出一块孔板，带盖置于适配器中，随后放于支架上（注意 A1 孔位于左下角），关闭仓门。
3. 打开“sort setting”，点击“Plate adjustment”标签，选择“Four corners and center well”选项，点击“start”开始液滴打点。
4. 打点完成后取出孔板，确认板盖上液滴是否位于孔的正中间，若液滴位置不佳，鼠标选中相应的孔，按方位箭头调整液滴至理想的落点位置。调整完成后点击“save custom position”，放回孔板重新打点确认液滴位置。
5. 将样品放入上样舱，点击  开始上样。
6. 待 events 出现后调节相应的前侧向电压和荧光通道电压，随后点击 Pause 暂停上样，进行圈门分析。
7. 打开“sort setting”，在“sample info”标签中设置孔板分选信息，如分选孔位置，分选细胞亚群，分选模式，分选数量，点击“add”添加分选程序（如需索引分选，勾选“index sort”）。

SONY

8. 取待分选的孔板，添加分选收集液后放于分选仓中，取出板盖，关闭分选仓门。
9. 点击“load collection”加载孔板，点击 Resume 恢复上样，待上样 eps 稳定后点击“Index sorting” 开始分选。