



BD FACSAria 流式分选仪无菌制备流程的优化

杨欢^{1,2}, 郭英华^{1,2}, 张雪芳^{1,2}, 罗佳^{1,2}, 杜立颖^{1,2}, 吕红霞^{1,2*}

(1. 北京大学生命科学学院, 北京 100871; 2. 国家蛋白质研究中心(北京)北京大学分中心, 北京 100871)

摘要: 为优化 BD FACSAria 流式分选仪无菌制备和无菌维护的流程, 以保持设备长期稳定的无菌分选状态, 从无菌制备的成本、操作流程和系统稳定性等方面进行优化, 探索了 LB 培养基监测管路无菌状态的方法, 并对 HCT116 细胞无菌分选状态及长期培养情况进行观察。优化后的无菌制备方法简化了操作流程、节约了成本, 能够长期保持仪器液管的无菌状态; HCT116 结直肠癌细胞分选后在无双抗培养基中长期培养状态良好且未出现污染的情况。优化的 BD FACSAria 分选仪无菌制备方法及管理流程为仪器的运行和管理提供了简单可行的方案, 为科研工作提供更加优质稳定的无菌分选技术服务。

关键词: 流式分选仪; 无菌制备优化; 无菌维护; 无菌分选

中图分类号: TH74

文献标志码: A

DOI: 10.12179/1672-4550.20230169

Optimization of the Aseptic Preparation Process for BD FACSAria Flow Sorter

YANG Huan^{1,2}, GUO Yinghua^{1,2}, ZHANG Xuefang^{1,2}, LUO Jia^{1,2}, DU Liying^{1,2}, LYU Hongxia^{1,2*}

(1. School of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China;

2. National Center for Protein Sciences (Beijing) at Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: To optimize the process of aseptic preparation and maintenance for BD FACSAria cell sorter to maintain long-term stable sterile sorting state, the cost of aseptic preparation, operation process and system stability are optimized. The method of monitoring the aseptic status of the fluidics system with LB medium is explored, and the aseptic sorting status and long-term culture of HCT116 cells are observed. The optimized aseptic preparation methods simplify the operation process, save the cost, and can keep the aseptic state of the instrument liquid flow pipeline for a long time. HCT116 colorectal cancer cells are sorted and cultured in antibiotic-free medium for a long time without contamination. The optimized aseptic preparation methods and maintenance procedure of BD FACSAria sorter provide a simple and feasible scheme for the operation and management of the instrument, and provide high-quality and stable aseptic sorting services for scientific research.

Key words: flow cytometry sorter; optimization of aseptic preparation; aseptic maintenance; aseptic sorting

流式细胞分选是在流式分析技术的基础上, 使用静电分选技术将目的群体进行分离与纯化的技术^[1-3]。由于其快速、准确、通量高等特点, 已被广泛应用于免疫、肿瘤、微生物检测、疾病监测等科研及医学领域^[4-7]。无菌分选则可以进一步保障目的细胞得以长时间培养, 以便后续实验的

顺利开展。要维持分选仪长久稳定的无菌条件, 无菌制备及后期的无菌维护是关键^[8-9]。虽然 BD FACSAria 流式分选仪内置了无菌管路制备的流程, 但前期的准备及后期的维护工作依然耗费精力。该研究以 BD FACSAria III 分选仪为例, 从成本支出、时间、系统稳定性等方面优化了无菌制

收稿日期: 2023-03-28

作者简介: 杨欢, 硕士, 工程师, 主要从事流式细胞分析分选技术服务工作。E-mail: hhyang2@163.com

* 通信作者: 吕红霞, 博士, 高级工程师, 主要从事流式分析分选技术的进展及应用研究。E-mail: hongxia.lu@pku.edu.cn

备的流程,探索了检测管路清洁度的简便方法;针对分选过程中的污染源,详述了无菌维护的流程。该研究建立的简化版的流式无菌分选的制备和维护方案为相关技术及管理人员提供参考借鉴。

1 无菌管路制备的优化

无菌管路的制备,不仅需要对接管路进行无菌化处理,还需制备无菌容器、无菌鞘液等。本研究优化了无菌鞘液的制备过程,建立了简明的无菌管路制备流程并探索了检测管路清洁度的方法。

1.1 无菌鞘液及鞘液桶制备的优化

鞘液的无菌是维持整个无菌管路制备的关键,优化前无菌鞘液(桶)的制备过程参考已有报道^[9-10],所需的耗材及器材如图1所示,从左至右分别为:2.5 L 75%乙醇溶液、10 L 超纯水、10 L 鞘液、鞘液桶(空)。具体制备过程为:

- 1) 10 L 无菌水及 10 L 鞘液高温高压灭菌, 120 °C, 30 min;
- 2) 乙醇溶液充分浸润鞘液桶内壁及鞘液传感器,浸泡至少 1 h 或过夜熏蒸;
- 3) 无菌水少量多次反复冲洗鞘液桶内壁,以去除残留的乙醇;
- 4) 无菌环境中将鞘液灌装于鞘液桶;
- 5) 安装鞘液过滤器并排除气泡。

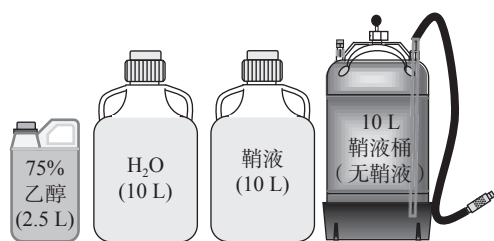


图1 优化前制备无菌鞘液(桶)所需的试剂及器材

本研究对无菌鞘液及鞘液桶的制备进行了优化,使流程更为简化。所需的耗材及器材如图2所示,从左至右分别为:鞘液桶(含10 L 鞘液),500 mL 超纯水,500 mL 75%乙醇溶液。具体制备过程为:

- 1) 将鞘液传感器旋出,浸泡于75%乙醇溶液中,锡箔纸密封鞘液传感器插口、鞘液管及气路管插口;
- 2) 鞘液桶中配制鞘液,高温高压鞘液及纯水,121 °C,45 min;
- 3) 待鞘液温度降至室温,传感器在无菌纯水

中清洗后插入鞘液桶;

- 4) 安装鞘液过滤器并排除气泡。

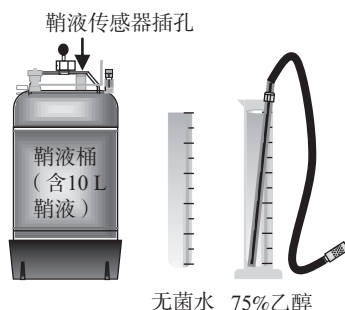


图2 优化后制备无菌鞘液(桶)所需的试剂及器材

优化方案除流程更简便外,成本也降低了,系统则更加稳定。

1) 节约成本:试剂需求量大大减少,具体用量如表1所示;鞘液桶与鞘液可直接灭菌,无需分别处理,节约时间成本。

2) 系统稳定:无需灌装,减少鞘液与空气的接触,进而减少污染的可能性;同时避免罐装过程引入大量气泡,液流系统更加稳定。

表1 无菌鞘液及鞘液桶制备优化前后器材及试剂用量

器材及试剂名称	优化前需求量	优化后需求量
10 L 原装鞘液钢桶 (可高温高压)	1个	1~2个
10 L 塑料桶 (可高温高压)	1~2个	0个
无菌水	10 L	0.5 L
鞘液	10 L	10 L
75% 乙醇溶液	2.5 L	0.5 L

1.2 无菌管路制备流程

BD FACSAria 分选仪内置了无菌管路制备程序(prepare for aseptic sort),制备过程需提前准备5 L 无菌水,5 L BD FACSClean 溶液,5 L 75%乙醇溶液,10 L 无菌鞘液(桶)(制备过程见1.1节)。

无菌管路制备流程:

- 1) 用75%乙醇溶液对蒸馏水桶和传感器进行无菌处理;
- 2) 按照 Prepare for Aseptic Sort 程序逐条进行操作,运行过程中 BD FACSClean 溶液、无菌水、乙醇溶液先后浸泡管路;
- 3) 运行 Startup 开机流程,即可将管路中的乙醇溶液冲洗干净并充满无菌鞘液。

1.3 管路清洁度的检测——LB 检测法

管路污染可能会导致分选的细胞污染,鞘液(或管路)的细菌污染大多数情况下非肉眼可见,

所以找到一种快速而简便的方法测定鞘液(或管路)的清洁度,对于了解仪器的状态十分重要。

使用 LB 培养基可以检测鞘液(或管路)的清洁度,具体操作方法如下。

1) 配置 2×LB 培养基,高温高压灭菌,4 ℃ 保存。

2) 在接收装置中放置一个 5 mL 流式管,加电、点击“Waste Drawer”、调节相应试管的偏转电压,点击“Test Sort”,接收大约 1 mL 鞘液。

3) 在管中补充 1 mL 2×LB 培养基,轻轻混匀,拧松管盖,放入 37 ℃ 培养箱中。一般约 12~16 h 后,即可看到检测结果。如需缩短检测时间,可采取以下措施:接收 50 mL 鞘液,10000 r/min 离心 10 min,留 1 mL 鞘液重悬,加

入 1 mL 2×LB 培养基,摇床 200 r/min,37 ℃ 恒温培养 8~10 h。

结果如图 3 所示,管 1 鞘液来源于无菌制备后的 FACS Aria 分选仪,管 2 鞘液来源于未做无菌制备的 FACS Aria 分选仪。图 3(a)为接种鞘液后 0 h, LB 清澈且透明;图 3(b)是接种后培养 16 h 的状态,管 1 透亮清澈,管 2 呈明显浑浊样,说明管 1 所接种的鞘液清洁无菌,管 2 接种的鞘液已明显污染,并且 LB 具有良好的指示作用;图 3(c)是接种后培养 7 天的图片,管 2 液体更加浑浊,管 1 仍保持无菌状态,表明管路污染与否在短时间内已经可以检测,随着时间的延长,污染管由于细菌繁殖变得更加浑浊,而未污染管则始终保持无菌状态。

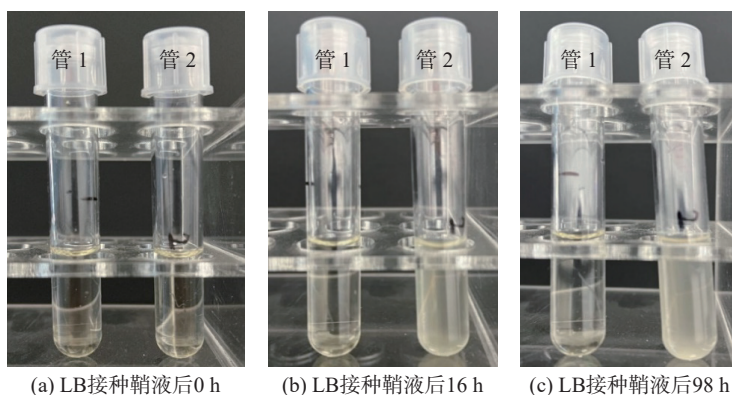


图 3 LB 检测不同分选仪液路清洁度的结果比较

2 无菌制备的维护

流式分选仪在前期无菌制备后,后期的无菌维护工作也很重要^[7,9]。根据仪器的构造明确分选过程中的污染源,可以有针对性地进行维护。如图 4 所示,仪器的维护主要从以下几个方面进行:进样管路、鞘液管路、分选仓、上样仓、收集仓、分选环境及分选耗材等的无菌维护。

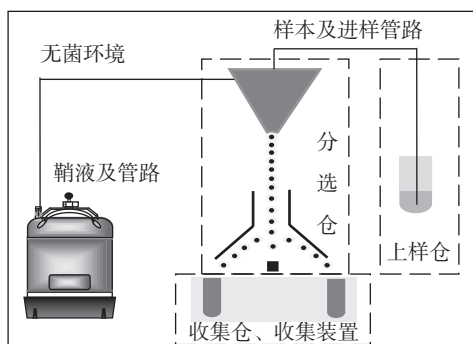


图 4 流式分选仪结构简图

2.1 进样管及鞘液管路的日常维护

每日实验结束,需清洁进样管路并运行 Fluidics Shutdown 程序,具体流程如下。

1) 清洗进样管路:每天实验结束后,先后用 BD FACSClean 溶液及无菌水高速清洗管路 10 min。

2) 清洗流动室(无需每日运行,可根据使用情况调整清洗周期,一般 1 次/周):关闭液流,更换闭合喷嘴,运行 Clean Flow Cell 程序,先用 BD FACSClean 溶液冲洗 1 遍,停留 5~10 min,再用无菌水冲洗 3 遍。

3) 运行 Fluidics Shutdown 程序:按提示逐条操作,使乙醇溶液充满管路,结束后关机即可。

2.2 分选仓、上样仓及收集仓等的无菌维护

每日首次启动液流前,先后用无菌水、75% 乙醇溶液擦拭分选仓的内壁、电极板、喷嘴锁扣、喷嘴室。上样仓、收集仓、收集装置用 75%

乙醇擦拭干净。

喷嘴用无菌水超声(若喷嘴堵塞严重,可用NaClO溶液超声,再用无菌水超声清洗干净),倾倒干净后用75%乙醇溶液浸润,甩干后插入喷嘴室。

2.3 其他日常无菌操作

除上述的无菌维护外,提供独立、洁净、温湿度恒定、可紫外消毒的细胞间也是很有必要的(每日首次实验前及当日实验结束后均需紫外照射30 min)。另外实验过程中使用的耗材如枪头、试管、滤网等都要求无菌,最后建议用户在分选接收液中适量添加抗生素(一般添加生产商建议用量的青链霉素即可)。

2.4 建立反馈机制

对于管路的无菌维护,除仪器管理员要做好相关维护工作,也要做好反馈机制,及时对用户进行回访,了解分选后细胞的活率、纯度、细胞是否污染等情况,以便快速了解仪器的清洁度及用户的分选情况。

3 样本分选及观察

无菌制备后的BD FACSAria分选仪分别分选1个和 4×10^4 个HCT116细胞,并在无双抗培养基中长期无菌培养,显微镜连续观察细胞的生长情况。结果如图5所示,分选不同起始数量的细胞,在无双抗培养基中培养7天均生长良好,未污染。

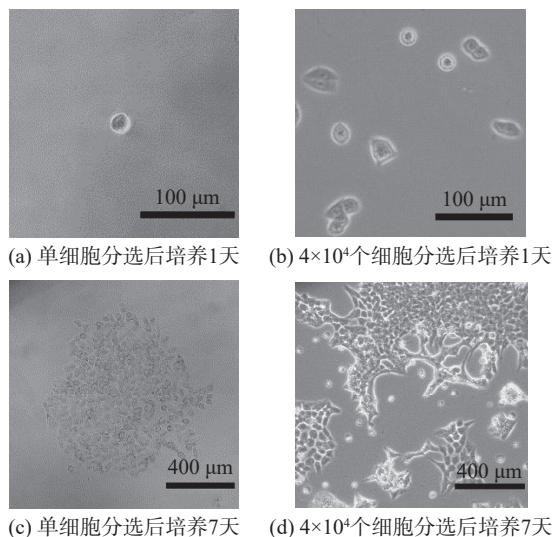


图5 不同起始数量的HCT116细胞分选后培养1天、7天的生长情况

4 讨论

流式细胞分选是可以快速、准确地将目的细胞筛选出来的高通量技术,BD FACSAria流式分选仪作为流式领域的主流机型之一,被广泛应用于科学研究中^[11-13]。作为使用率较高的仪器,简化的无菌制备流程及规范的维护流程不仅可以减轻管理者的工作负担、延长仪器的使用寿命,还能提供高质量而稳定的科研服务^[13-15]。

对于需要长期培养的细胞,无菌分选则是后续实验得以顺利进行的必要条件之一^[8-9]。要保证无菌分选的长期维持,首先要清楚污染的来源,进而有针对性地对其进行预防性维护或清除。流式分选引起污染的原因,一般为样本处理过程中引起的污染、上样仓及样本管路的污染、鞘液及鞘液管路的污染、收集器材及收集仓室的污染及环境污染等,其中鞘液及鞘液管路更是关键^[8]。与文献^[9-10]相比,该研究优化了无菌管路的制备流程,帮助科研工作者节约开支及时间成本,同时液路系统及无菌维持也相对稳定,还探究了用LB检测液路清洁度的方法,让不易观察到的污染变得可测可见,帮助仪器管理者及时掌握液路的清洁度。为了给相关技术和管理人员提供完整的仪器无菌维护流程,本文还概述了分选仪液路、进样管路、分选仓、收集仓、环境、实验器材等的无菌维护流程。

5 结束语

BD FACSAria流式分选仪的无菌制备优化和无菌维护流程为广大科研人员提供了更简化、更节约、更稳定的方案,同时提供了监测管路清洁度的方法,以便管理人员及时了解仪器的无菌情况,有助于进一步提供高质量的分选服务。

参考文献

- [1] 杜立颖,冯仁青.流式细胞术[M].北京:北京大学出版社,2008.
- [2] 陈朱波,曹雪涛.流式细胞术:原理操作及应用[M].北京:北京科学出版社,2010.
- [3] 杭海英,刘春春,任丹丹.流式细胞术的发展、应用及前景[J].中国生物工程杂志,2019,39(9):68-83.
- [4] 米蕊芳,潘春晓,张俊文,等.荧光探针及流式分选法追踪胰腺癌细胞增殖的研究[J].医学研究杂志,2016,

- 45(6): 29-32.
- [5] 户乃丽, 徐晓雪, 邹林樾, 等. FACS Aria 流式细胞仪分选小鼠肺脏自然杀伤细胞方法的建立与评价[J]. 医学信息, 2021, 34(15): 115-118.
- [6] 阮楚晋, 郑小伟, 王丽, 等. 基于流式细胞仪高通量分选的深海微生物单细胞培养[J]. 微生物学报, 2021, 61(4): 816-827.
- [7] 丁凤玲, 上官爱哨, 周扬, 等. 荷斯坦公牛 X 和 Y 精子核形态差异及其影响因素分析[J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(3): 766-777.
- [8] 刘洋, 王丽婷, 刘芳, 等. 流式细胞分选优化经验浅谈[J]. 科学咨询(科技·管理), 2018(1): 55-56.
- [9] 刘锡娟, 丁慧荣, 田志华, 等. FACS Aria 流式细胞仪无菌操作分选高纯度细胞亚群[J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(12): 1811-1814.
- [10] 周密, 张全胜, 包明柱. 流式细胞仪细胞分选参数调校方法的研究[J]. 医疗装备, 2016, 29(7): 58-61.
- [11] HAWLEY T S, HAWLEY R G. Flow cytometry protocols[M]. 3rd Edition. Totowa: Humana Press, 2011.
- [12] COSSARIZZA A, CHANG H D, RADBRUCH A, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies[J]. Eur J Immunol, 2017, 47(10): 1584-1797.
- [13] 任晓越, 李敬贤, 熊纓. BD FACS Aria 流式细胞分选仪的常见故障分析[J]. 中国医疗设备, 2021, 36(8): 177-180.
- [14] 付伟超, 安崇佑, 任彦松, 等. 仪器维护与技术培训一体化在流式细胞仪管理中的应用[J]. 医疗卫生装备, 2021, 42(2): 66-72.
- [15] 李艳伟, 王佳佳, 黄莹莹, 等. 不同激发方式的流式细胞分选仪一体化管理模式研究[J]. 中国医学装备, 2022, 19(4): 179-183.

编辑 钟晓

(上接第 113 页)

参考文献

- [1] 杨晓, 廉静静, 任鸿翔, 等. 船舶导航设备虚拟仿真实验教学平台设计与开发[J]. 实验室研究与探索, 2021, 40(12): 191-194.
- [2] 朱志辉, 刘丽丽, 徐磊, 等. 钢弹簧浮置板减振轨道虚拟仿真实验开发与实践[J]. 实验技术与管理, 2021, 38(12): 112-116.
- [3] 王庆凤, 李传南. 基于 MATLAB 物理模型的自动控制原理综合性实验的虚拟仿真[J]. 中国现代教育装备, 2017(17): 34-36.
- [4] 张萌娇, 李晖, 刘婷. 过程控制系统虚拟仿真实验教学平台建设[J]. 中国现代教育装备, 2022(17): 28-30.
- [5] 邓晓刚, 杨明辉. 面向现代控制理论实验教学的倒立摆虚拟仿真系统[J]. 实验室研究与探索, 2017, 36(5): 79-83.
- [6] 杨未柱, 何新党, 李磊, 等. 基于虚拟仿真实验的实验力学混合式一流课程建设[J]. 实验科学与技术, 2024, 22(2): 64-68.
- [7] 尉小荣, 徐建, 李洋洋. 高校国家级示范性虚拟仿真实验教学课程建设与应用现状分析[J]. 实验科学与技术, 2022, 20(3): 26-30.
- [8] 常广晖, 张亚超, 苏攀. 一阶直线倒立摆控制器 MBD 设计方法研究[J]. 计算机仿真, 2022, 39(6): 293-297.
- [9] 常广晖, 陈诚, 吴越, 等. 一种支持 Cortex-M3 的 Simulink 自定义目标系统设计[J]. 计算机测量与控制, 2021, 29(8): 190-195.
- [10] 常广晖, 刘金林, 郭朝有. 基于数字孪生的调距桨虚拟样机设计及应用研究[J]. 实验室科学, 2020, 23(6): 23-26.
- [11] 卓莉, 万里. 基于 Unity3D 的液塑限含水率虚拟实验设计与实现[J]. 实验科学与技术, 2022, 20(5): 29-34.
- [12] 梁广昱, 庞新宇, 李硕杰, 等. 数字孪生在控制课程虚拟仿真实验教学中的应用[J]. 实验技术与管理, 2024, 41(3): 175-180.
- [13] 常广晖, 苏攀, 张亚超, 等. 四旋翼虚拟仿真实验平台开发与实践[J]. 实验技术与管理, 2023, 40(8): 106-113.

编辑 钟晓