

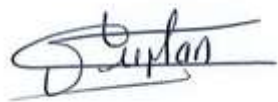
	Mode Opératoire	Indice : 05
	Vérification et Maintenance Cytométrie	

OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Ce document décrit les modes opératoires pour vérifier et entretenir les équipements de cytométrie et de trieur cellulaire de la PF d'imagerie TRI.

SUIVI DES MODIFICATIONS

Date	Indice	Nature modification
15.02.09	01	Création
21.07.10	02	Lien vers tableau de fréquence de maintenance
21.11.12	03	Modification nettoyage suite acquisition nouveaux équipements
06.01.14	04	Modification maintenance suite nouvel équipement (Macsqant)
17.06.16	05	Modification 'Vérifications' suite nouvel équipement (ImagestreamX)

Rédigé par : V.Duplan 	Validé par: C.Pouzet 
--	---

	Mode Opératoire	Indice : 05
	Vérification et Maintenance Cytométrie	

Sommaire

Maintenances	3
Net-01 : nettoyage complet FACSCalibur/FACSCAN.....	3
Net-02 : nettoyage complet BD LSRII Fortessa.....	3
Net-03 : nettoyage complet BD FACSVerse.....	3
Net-04 : nettoyage complet BD Influx.....	3
Vérifications.....	4
Cal : passage du kit calibrite III.....	4
APC : passage du kit calibrite III + APC.....	4
DNA : passage du kit DNA QC.....	4
Passage de CS&T	5
Alignement & QC BD Influx.....	6
Macquant calibration billes	6
Calibration ImagestreamX : Tests 'Assist'.....	7

	Mode Opératoire	Indice : 05
	Vérification et Maintenance Cytométrie	

Cf **tableau fréquence maintenance cytométrie** pour la liste des vérifications et entretien à effectuer en fonction des équipements.

Maintenances

Net-01 : nettoyage complet FACSCalibur/FACSCAN

Cf document fournisseur "Procédures FACSCalibur / Procédure hebdomadaire de maintenance"

Pensez à éteindre la pompe de facs flow pour ne pas avoir de rejets de facs flow.

Net-02 : nettoyage complet BD LSRII Fortessa

Cf document fournisseur « Procédure de maintenance BDB FR Rev 02/10 Fortessa-Diva » (Classeur Fortessa Tutoriel), en remplaçant en alternance la solution de Javel (BD FACSClean) par la solution détergent (BD FACSRinse).

Net-03 : nettoyage complet BD FACSVerse

Cf document fournisseur « BD FACS VERSE System User's guide 23-11463-00 REV .016/2011 New Document, p 172 à 178 » (Classeur Facs Verse Tutoriel)

Net-04 : nettoyage complet BD Influx

Cf document fournisseur, BD Influx Operator Course, chapitre 8, en remplaçant en alternance la solution de Javel (BD FACSClean) par la solution détergent (BD FACSRinse).

Le nettoyage complet du FC500 'ancien net 03' ainsi que les nettoyages complets des FacsARIA 'ancien net 04' ne sont plus réalisés. Ces nettoyages ne sont plus recommandés par les fournisseurs.

	Mode Opérateur	Indice : 05
	Vérification et Maintenance Cytométrie	

Vérifications

Cal : passage du kit calibrite III

- Prendre les billes calibrite III et les billes APC au réfrigérateur et les vortexer.
- Préparer :
 - tube A avec 1 mL de facs flow ou PBS+ 1 goutte de billes unlabelled (tube blanc)
 - tube B avec 3 mL de facs flow ou PBS + 1 goutte de chaque tube : 1 unlabelled (tube blanc) + 1 FITC (tube vert) + 1 PE (tube rouge) + 1 PerCP (tube rose).
- Lancer le soft FACS Comp
- Renseigner les références des billes
- Choisir les tests lyse/ wash et lyse/no wash
- Suivre la procédure à l'écran ; les résultats sont enregistrés automatiquement
- Vérifier que :
 - la colonne resultat indique *Pass* pour tous les types de billes.
 - Blue laser current : au environ de 7.5 A.
 - Blue laser power : au environ de 15mW.
 - Compensation : comparer avec les derniers résultats, la différence doit être inférieure à 10%.
 - Comment: time delay calibration **passed**.

NB : En cas de message d'erreur indiquant « failed » au niveau d'un des types de billes, remettre un goutte de ces billes dans le tube après les avoir bien vortexer et relancer l'acquisition.

APC : passage du kit calibrite III + APC

Idem que protocole **Cal** sauf qu'on ajoute des billes APC à la préparation de la façon suivante:

- tube A avec 1 mL de facs flow ou PBS+ 1 goutte de billes unlabelled (tube blanc) + 1 goutte de billes APC (tube turquoise)
- tube B avec 3 mL de facs flow ou PBS + 1 goutte de chaque tube : 1 unlabelled (tube blanc) + 1 FITC (tube vert) + 1 PE (tube rouge) + 1 PerCP (tube rose) + 1 APC (tube turquoise)

DNA : passage du kit DNA QC

- Préparer 3 tubes :
 - A : 40µL du tube A (CEN) + 1 mL du tube D (iodure propidium).
 - B : 40µL du tube B (CTN) + 1 mL du tube D (iodure propidium).
 - Billes : 1 goutte du tube C (bille de 2µm) dans 1 mL de facs flow ou PBS 1X.
- Mettre dans la glace pendant 10 minutes

	Mode Opératoire	Indice : 05
	Vérification et Maintenance Cytométrie	

- Ouvrir Cells Quest Pro et les fenêtres
 - Acquire/connect to cytometer
 - Cytometer/detector-amps
 - Acquire/ counter
- Ouvrir le document d'analyse (file/open/desktop/lbcmcp/test cycle/CEN ou CTN)

Tube A (CEN)

- Définir le nom du document (« CEN ») et son emplacement (*desktop/LBME, IBCG, CBD/CBD/maintenance*) dans un dossier à la date du jour.
- Mettre le tube A, RUN et LOW
- Régler le FL2 puis FL-2A et FL-2W pour que les 1° pics des histogrammes FL-2A et FL-2W soit sur 200.
- Lancer l'acquisition

Tube B

- Définir le nom du document (« CTN ») et son emplacement (*desktop/LBME, IBCG, CBD/CBD/maintenance*) dans un dossier à la date du jour.
- Régler le FL2 puis FL-2A et FL-2W pour que les 1° pics des histogrammes FL-2A et FL-2W soit sur 200.
- Lancer l'acquisition
- Vérifier que sur le dot plot FL2-A/FL2-W on sépare bien les populations G0/G1 et G2/M

Billes

- Définir le nom du document (« CTN ») et son emplacement (*desktop/LBME, IBCG, CBD/CBD/maintenance*) dans un dossier à la date du jour.
- Passer les billes, centrer le pic sur 200 aussi en réglant les PMT FL2 et FL2-A.
- Lancer l'acquisition

NB : à savoir de le Cv est considéré comme bon jusqu'à une valeur de 3,5.

Faire un bilan des résultats d'après la feuille de résultats compte rendu, vérifier que les valeurs soient inférieurs au seuil définis par le test, nommer et enregistrer la feuille de résultats sous le nom bilan_AAAA-MM-JJ dans un dossier à la date du jour.

Passage de CS&T

Cf notice "CS&T" bead pour la préparation des bille de calibration

Cf notice "CS&T application guide" page 91 pour la mise en oeuvre de la calibration

CS&T pour FacsVerse : Performance QC avec billes BD FACSuite CS&T Research Beads cf document 23-11463-00 Rev. 01 6/2011 New Document p71 à 73 (classeur Verse Tutoriel).

	Mode Opérateur	Indice : 05
	Vérification et Maintenance Cytométrie	

CS&T pour Fortessa avec BD Cytometer Setup Tracking Beads document BDB FR
Rev 11/09 - Diva 6 CS&T. (classeur Fortessa Tutoriel).

Alignement & QC BD Influx

A&QC journalier pour BD Influx Cf document fournisseur, BD Influx Operator Course, chapitre 18.

Macsquant calibration billes

- 1- Allumer le MACSQuant en touchant l'écran tactile (allume l'informatique mais pas les lasers)
- 2- Ouvrir la session "Calibrations"
Le cytomètre s'initialise, ne pas toucher les parties mobiles de l'appareil
- 3- Pastille orange= le cytomètre est en "Data analysis mode"
- 4- Allumer les lasers en cliquant sur le bouton  en haut à droite → une fenêtre s'ouvre : cliquer sur "Acquisition mode"
Pastille jaune="Priming" puis pastille verte="OK", affiche depuis quand les calibrations n'ont pas été faites
- 5- Laisser chauffer le laser jusqu'à 40°C (laser bleu sur Q10, jaune sur VYB), contrôle de la température dans l'onglet "View", "Hardware", "Lasers and detectors"

Calibrations

Dans l'onglet "Experiment", choisir le projet "mois" (cocher la ligne et choisir "mois" dans la liste déroulante)

➤ Avec le code barre (dilution automatique) :

- 1- Vortexer le flacon de bille et mettre une goutte dans un tube 5ml
- 2- Poser le tube dans le single tube rack
- 3- Scanner le flacon de billes devant le lecteur de code barre (à côté du single tube rack) en cliquant sur le bouton 
2 fenêtres successives s'ouvrent : cliquer sur "Yes"

➤ Sans le code barre (billes déjà diluées) :

- 1- Placer le tube de billes dans le single tube rack
- 2- Dans l'onglet "Experiment", sous onglet "Settings" cocher le mode "Express", choisir "Type"="Setup" et "mode"="Calibrations"



3- Lancer l'acquisition en cliquant sur  (en bas à droite)

A la fin vérifier que tous les PMTs aient été cochés en vert "✓"

Sortir de la session "Calibrations" en cliquant sur le bouton  en haut à droite

Calibration ImagestreamX : Tests 'Assist'

1- Allumage du système

➤ Avant d'allumer l'ISX : Ouvrir les portes avant de l'ISX, bien vérifier le niveau des billes 'Spreads beads' (tubes 15ml) et de chaque bidon



- Sterilizer : Clean dilué au 1/2
- Cleanser : Rinse
- Debubbler : Isopropanol 70%
- Rinse : H2O mQ
- Sheath : PBS 1X sans Mg++ et Ca++

	Mode Opérateur	Indice : 05
	Vérification et Maintenance Cytométrie	

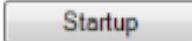
La poubelle doit être vidée dans les cartons de 20L 'FacsFlow' réservés à l'évacuation des déchets

Pour allumer l'ISX : Bouton situé à gauche de la partie fluïdique

puis allumer les 2 ordinateurs : 'Amnis' mot de passe **is100**

Cliquez sur le raccourci **INSPIRE** software. Attendre l'ouverture du logiciel (ceci prend quelques secondes)

2- Calibration et tests

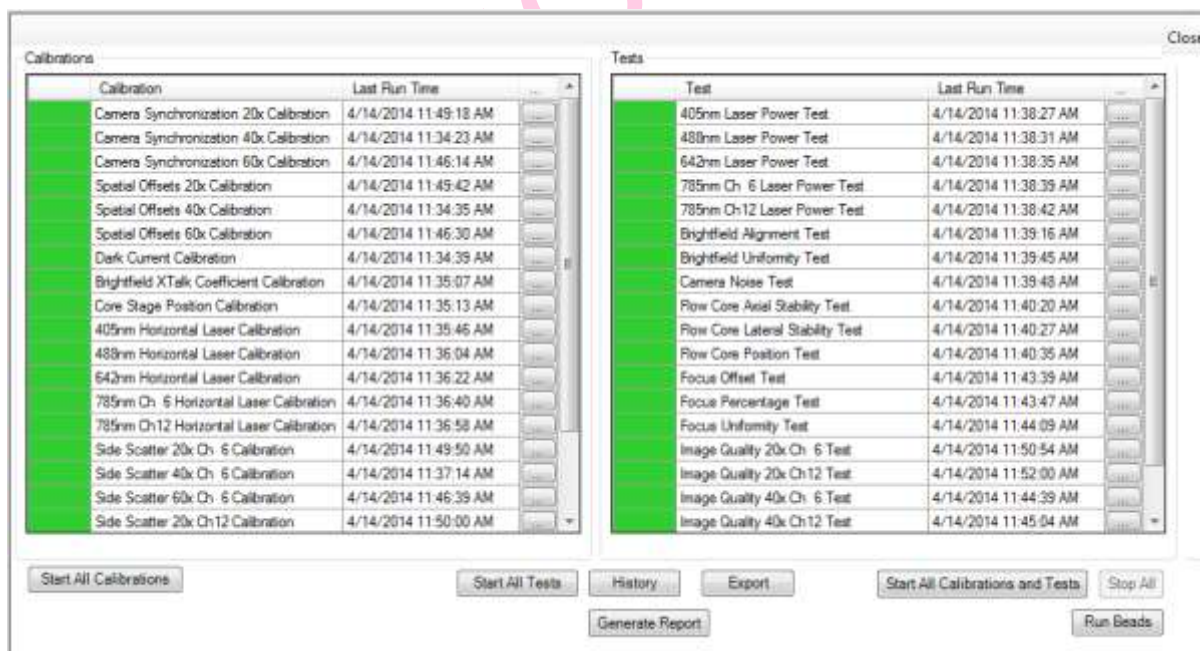
Une fois le logiciel INSPIRE ouvert, cliquer sur  (en bas à droite du logiciel)

L'ensemble des tests se lance, **comptez 1h.** (tests aux 20x, 40x et 60x)

L'appareil est fonctionnel lorsque le bouton ASSIST est vert



Tous les tests sont précédés d'un encadré 'vert'



The screenshot shows the INSPIRE software interface with two main windows: 'Calibrations' and 'Tests'. Both windows have a 'Close' button in the top right corner.

Calibrations Window:

Calibration	Last Run Time
Camera Synchronization 20x Calibration	4/14/2014 11:49:18 AM
Camera Synchronization 40x Calibration	4/14/2014 11:34:23 AM
Camera Synchronization 60x Calibration	4/14/2014 11:46:14 AM
Spatial Offsets 20x Calibration	4/14/2014 11:49:42 AM
Spatial Offsets 40x Calibration	4/14/2014 11:34:35 AM
Spatial Offsets 60x Calibration	4/14/2014 11:46:30 AM
Dark Current Calibration	4/14/2014 11:34:39 AM
Brightfield XTalk Coefficient Calibration	4/14/2014 11:35:07 AM
Core Stage Position Calibration	4/14/2014 11:35:13 AM
405nm Horizontal Laser Calibration	4/14/2014 11:35:45 AM
488nm Horizontal Laser Calibration	4/14/2014 11:36:04 AM
642nm Horizontal Laser Calibration	4/14/2014 11:36:22 AM
785nm Ch. 6 Horizontal Laser Calibration	4/14/2014 11:36:40 AM
785nm Ch12 Horizontal Laser Calibration	4/14/2014 11:36:58 AM
Side Scatter 20x Ch. 6 Calibration	4/14/2014 11:49:50 AM
Side Scatter 40x Ch. 6 Calibration	4/14/2014 11:37:14 AM
Side Scatter 60x Ch. 6 Calibration	4/14/2014 11:46:39 AM
Side Scatter 20x Ch12 Calibration	4/14/2014 11:50:00 AM

Tests Window:

Test	Last Run Time
405nm Laser Power Test	4/14/2014 11:38:27 AM
488nm Laser Power Test	4/14/2014 11:38:31 AM
642nm Laser Power Test	4/14/2014 11:38:35 AM
785nm Ch. 6 Laser Power Test	4/14/2014 11:38:39 AM
785nm Ch12 Laser Power Test	4/14/2014 11:38:42 AM
Brightfield Alignment Test	4/14/2014 11:39:16 AM
Brightfield Uniformity Test	4/14/2014 11:39:45 AM
Camera Noise Test	4/14/2014 11:39:48 AM
Flow Core Axial Stability Test	4/14/2014 11:40:20 AM
Flow Core Lateral Stability Test	4/14/2014 11:40:27 AM
Flow Core Position Test	4/14/2014 11:40:35 AM
Focus Offset Test	4/14/2014 11:43:39 AM
Focus Percentage Test	4/14/2014 11:43:47 AM
Focus Uniformity Test	4/14/2014 11:44:09 AM
Image Quality 20x Ch. 6 Test	4/14/2014 11:50:54 AM
Image Quality 20x Ch12 Test	4/14/2014 11:52:00 AM
Image Quality 40x Ch. 6 Test	4/14/2014 11:44:39 AM
Image Quality 40x Ch12 Test	4/14/2014 11:45:04 AM

At the bottom of the interface, there are several buttons: 'Start All Calibrations', 'Start All Tests', 'History', 'Export', 'Start All Calibrations and Tests', 'Stop All', 'Generate Report', and 'Run Beads'.

Vous pouvez alors fermer la fenêtre des calibrations : '**Close**'.

	Mode Opérateur	Indice : 05
	Vérification et Maintenance Cytométrie	

Si un ou plusieurs tests ne sont pas passés, le bouton assist est jaune. Le test qui n'est pas passé est précédé d'un encadré 'rouge'. Vous pouvez alors cliquer sur ce test pour le relancer. Si au 2^{ème} essai le test est toujours 'rouge', en informer le personnel du plateau.

Une fois le bouton 'Assist' en vert vous pouvez travailler. Toutes les calibrations et tests sont valides.

COPIE NON GEREE