

|                                                                                   |                                                   |             |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------|
|  | Mode Opératoire                                   | Indice : 04 |
|                                                                                   | <b>Vérification et Maintenance<br/>Cytométrie</b> |             |

## 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 (Macsqquant) |

|                                                                                                              |                                                                                                               |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Rédigé par : V.Duplan<br> | Validé par: C.Pouzet<br> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                                                                                   |                                           |             |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------|
|  | Mode Opératoire                           | Indice : 04 |
|                                                                                   | Vérification et Maintenance<br>Cytométrie |             |

## Sommaire

|                                                  |                                    |
|--------------------------------------------------|------------------------------------|
| <b>Maintenances .....</b>                        | <b>3</b>                           |
| Net-01 : nettoyage complet FACS Calibur .....    | 3                                  |
| Net-02 : nettoyage complet BD LSR Fortessa ..... | 3                                  |
| Net-03 : nettoyage complet BD FACSVerser .....   | <b>Erreur ! Signet non défini.</b> |
| Net-04 : nettoyage complet BD Influx .....       | <b>Erreur ! Signet non défini.</b> |
| <br><b>Vérifications .....</b>                   | <br><b>4</b>                       |
| 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 BDInflux.....                    | 6                                  |
| <b>Macsquant calibration billes.....</b>         | <b>6</b>                           |

|                                                                                   |                                                   |             |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------|
|  | Mode Opérateur                                    | Indice : 04 |
|                                                                                   | <b>Vérification et Maintenance<br/>Cytométrie</b> |             |

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 « Procedure 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 : 04 |
|                                                                                   | Vérification et Maintenance<br>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 1mL de facs flow ou PBS+ 1goutte de billes unlabelled (tube blanc)
  - tube B avec 3 mL de facs flow ou PBS + 1goutte 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 1mL de facs flow ou PBS+ 1goutte de billes unlabelled (tube blanc) + 1 goutte de billes APC (tube turquoise)
- tube B avec 3 mL de facs flow ou PBS + 1goutte 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) + 1mL du tube D (iodure propidium).
  - B : 40µL du tube B (CTN) + 1mL 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 Opérateur                            | Indice : 04 |
|                                                                                   | Vérification et Maintenance<br>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 : 04 |
|                                                                                   | Vérification et Maintenance<br>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**

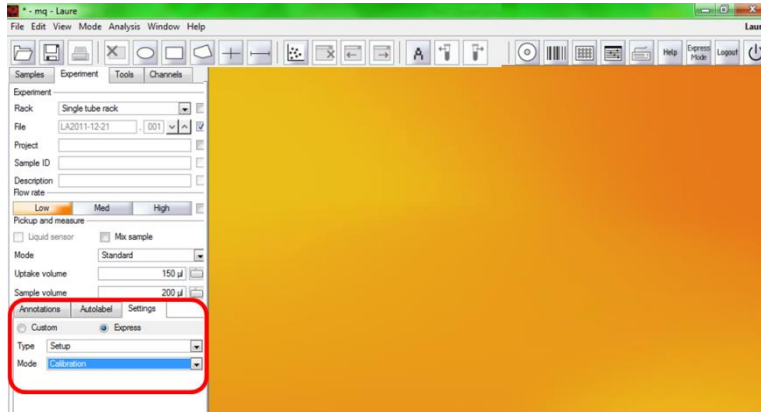
Dans l'onglet "Experiment", choisir le projet "mois" (cocher la ligne et choisir "mois" dans la liste déroulante)

#### ➤ 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

