

Attune NxT 操作指南

开机:

1. 打开仪器右后方主机电源（若前一天没关则关掉，1 min后再开），指示灯变为蓝色常亮，随后打开计算机电源。
2. 检查左侧液流系统液位状态，**蓝灯闪烁**表示对应液体需要处理。

【建议】实验开始前补满鞘液并清空废液，避免实验中途操作液流系统引入气泡

从左至右依次为废液桶—鞘液桶（超纯水）—Wash Solution（商品化）—Shutdown Solution（商品化）需要对对应桶进行操作，请遵循以下顺序

- a) 拆拔顺序：先拔下sensor（**黑色线**），然后按住金属卡片取下透明管道
 - b) 安装顺序：先按住金属卡片连接管路，再将sensor插上
3. 启动Attune NxT 软件，登录

【提示】新用户请参加培训后用户名及密码请联系管理员获取，原则上一组一个账户，请不要与人共享账号密码。

4. 将进样器降下，取下放置在上方的流式管
5. 启动仪器：Instrument—Startup【约4min，结束后左下角状态栏显示绿色对勾 

且仪器呼吸灯变为绿色长亮】

数据采集:

1. 新建实验：New experiment，编辑实验名称，设置Group 和 Sample 数量
2. **※取3 mL 10% 84溶液（当天现配，过膜）上样，清洗进样针：Instrument—SIP**
【注意】上样前请务必确认仪器状态及管路清洁，一旦开始实验，默认用户认为仪器正常，随后发生的任何人为故障由该使用者负责。
3. **设置通道：**软件右下角Instrument Settings—parameters，选择所需通道，Target可编辑 Marker名称
4. **画图圈门：**上方工具栏选择Workspace，根据图标选择对应的图和门的类型进行操作
软件右下角customize可修改现有图和门的类型、编辑门的名称、修改门颜色等



5. 工具栏Workspace点击Statistics显示统计学参数，可根据实验选择需要的参数



6. 上样：**确保每一个样品上样前5min内样品刚过300 目筛网（拍照发至群里）**

将样品放置在进样器上，升起进样器，Flow Option栏：设置预抽体积及样本流速，随后点击Run开始上样

- 【注意】1. 注射器上样有50 μ L死体积，样本体积必须大于预抽体积+死体积，避免吸入气泡
- 2. 进样器为手动进样，Raise tube时请务必小心，注意进样针的位置，避免进样针损坏

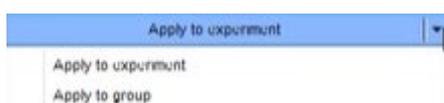
7. 采集参数调节：Instrument Settings——Voltage，调整对应通道的电压
Instrument Settings——Threshold，设置阈值

【建议】FSC细胞样品一般电压在30-120V左右，可先调到80找到群体后再调整

荧光通道阴性群强度在 10^2 - 10^3 之间

8. 记录数据：Stop Options 设置停止条件，分别可记录个数及记录门、记录时间、记录体积，可根据需要选择，若全选则先到先停。点击 Record，等待 Collection panel 圆圈进度条都变成蓝圈，显示100%即采集完成。

调整好上样条件后，在Run Protocol 栏可选择整个实验或组的上样条件保持一致



9. 若需要回收样本，点击 Recover——next 可收集到原样品管

【注意】实验过程中，如果 events/s 一直为 0 或出现明显的降低（如 200 变成 20），仪器可能发生堵塞，请立刻停止上样，多次执行反冲：进样器放一管空管，Instrument—Unclog，并电话联系管理员。

10. ※上样结束后清洗

- 1) 跑完非粘性细胞，如 B 细胞和非激活 T 细胞后：取 3 mL 10% 84 溶液（当天现配、过膜）上样，Instrument——Sanitize SIP，做两次（共 4 min 左右）
- 2) 跑完黏性细胞（DC、血红细胞、激活的 T 细胞、肿瘤细胞、细菌和酵母等）：若时间充足，取 4 mL 10% 84 溶液（当天现配、过膜）上样，Instrument—Deep Clean（quick）（约 20 min）；若剩余时间少于 15 min：取 3 mL 10% 84 溶液（当天现配、过膜）高速上样（流速 500 μ L/min，体积 3000 μ L），再取 3 mL 10% 84 溶液（当天现配、过膜）上样，Instrument——Sanitize SIP（共 10 min 左右）

11. 数据导出：选择实验—右键—Export—FCS Files—路径保存在 D 盘课题组文件夹（全拼）

【注意】文件格式请选择 FCS 3.0

12. 数据拷贝：使用内网云盘，禁止使用 USB，请及时传输数据，平台将定期清理

关机：每天最后一位预约使用者必须执行

1. 准备1管3 mL 10% 84溶液（当天现配，过膜）
2. Instrument—Shutdown（约50 min），根据提示将上述10% 84溶液上样
3. 软件页面右下角出现Shutdown进度条后即可关闭软件，再关闭电脑（仪器电源不用关）、刷卡下机、按实登记

注意事项：

1. 关于3-301和过渡房Thermo流式的预约联动

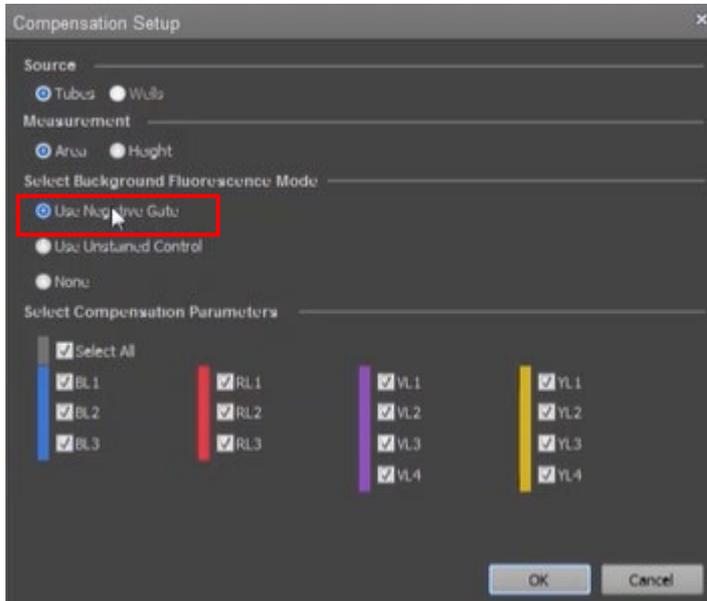
- 1) 在3-301培训，且3次辅助上机后方可授权普通用户，也可预约过渡房的1、2号机，
注意：
 - ① 第一次预约过渡房1、2号Thermo需联系邓老师（15221337058）。
 - ② 3-301清洗要求与过渡房有差异，所以在3-301培训的用户若预约使用过渡房1、2号Thermo，需遵守过渡房的清洗要求。
 - ③ 若用户在使用过渡房Thermo因违规被罚，3-301将同步资格处罚。
- 2) 在过渡房培训的用户也可预约3-301的Thermo
 - ① 第一次预约使用请联系杨老师（18888921321）、谢老师（18290561250）。
 - ② 若违规被罚，也将同步到过渡房。
2. 上样前请务必确认仪器状态及管路清洁，一旦开始实验默认用户认为仪器正常，随后发生的任何人为故障由该使用者负责。
3. 请各位务必按规使用，违规行为将根据《科学实验中心管理制度》进行处罚
 - 1) 禁止未经培训私自上机，违者禁用；
 - 2) 禁止私自代刷、代约、一个预约多人使用。每个人都必须按实登记，否则对代刷者及使用者都将进行处罚；
 - 3) 未按实登记及未将过筛图片发至群内一经发现将扣除信用分，分值按违规次数累加；
 - 4) 因个人操作导致设备故障将通报导师、并需提交导师签字版检讨、取消相应使用资格，维修费用由该课题组承担。
4. 以下试剂耗材请自备
 - 1) 当天配置10% 84溶液（需过0.22 μm耐酸碱滤膜），一次实验备20 mL左右
 - 2) 300目筛网

补偿调节：

1、新建实验后，双击Compensation

2、当确定单染管有阳性和阴性峰或用beads调补偿时：

1) 选择Negative Gate模式，选择需要的通道，然后依次上单染管，调整阴性和阳性峰的门位置



2) 补偿结果将自动计算和应用到实验，点击工具栏Compensation，View Matrix可查看结果

3、当单染管没有明显的阴性和阳性分群：

选择Unstained Control模式，选择需要的通道，然后依次上UC和单染管，根据UC管来确定阴性画门位置