**Thermo Attune NxT流式细胞仪使用指南**

**资质&培训**

1.1.培训

1.2.培训流程

1.2.1.仪器预约网站（https://book.ibmc.ac.cn/）报名参加平台组织的培训

1.2.2.培训前需学习本使用指南及相关仪器使用材料

1.2.3.培训：①递交导师签字的安全责任书（非电子签）②管理员培训③个人练习

1.2.4.培训后有3次免费辅助机会，其中第一次为强制性的

1.3.资质

1.3.1.未授权

1.4.1.1.未参加培训的用户

1.4.1.2.不可以操作仪器，可以委托管理员进行实验

1.3.2.普通资质

1.4.2.1.参加上机操作培训

1.4.2.2.第一次预约前需联系管理员

1.4.2.3.可以在工作时间预约并使用仪器

1.4.3.资深资质

1.4.3.1.普通用户独立使用机时>15h，参加资深培训，使用仪器>3次后申请考核，考核通过后获得资深资质

1.4.3.2.可以在工作时间和非工作时间预约并使用仪器

**预约**

1.1.预约

1.1.1.系统最少提前预约时间：

①普通用户：4h；②资深用户：0.5h；③委托&辅助测试：24h（联系管理员）

1.2.试剂耗材

1.2.1.用户自备：300目滤膜、清洗用流式管或5mL EP管、上样用流式管或1.5mL EP管

1.2.2.平台统一提供鞘液

**操作流程及视频**

1.1 操作视频见1号机桌面，可与管理员联系相关事宜

1.2.上机操作步骤

1.2.1开机

1.2.1.1 当天第一次实验前，仪器若是开机状态，需要关机重启： 刷卡上机-关闭软件-关闭电源 - 等待 30 秒后，打开仪器电源-打开软件并登录；用户名 admin和密码password；检查液路系统的液面情况。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。

1.2.1.2 液路插拔操作

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

1.2.1.3 执行 Startup ！！！（当天第一个用户需要做）

1. 将进样器降下，取下放置在上面的流式管
2. 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】

1.2.1.4 质控 （管理员执行，用户可跳过此步骤）

确认微球批次号-剧烈摇晃或涡旋微球1 分钟 -2 ml鞘液中加入3滴质控微球 ，混匀，上样

1.2.2 创建实验

【注意】上样前请务必确认仪器状态及管路清洁，（不如实转述情况的降级：比如已经上样致堵，却说是前一个人致堵）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。非工作时间资深用户在实验过程中致堵的，需要另加X倍辅助测试费，以及其他可能的仪器损耗费。

1.2.2.1 清洗上样针

取1 mL 水高速上样清洗上样针。

1.2.2.2 主页面下，点击New Experiment -编辑实验名称，设置 Sample 数量。

1.2.2.3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；

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

1.2.2.4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

1.2.2.5 上样：确保每一个样品上样前5min内样品刚过300 目筛网，上样前，轻弹混匀，观察有无团块、絮状物、异物等。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。

1. 注射器上样有50μL 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

1.2.2.6 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 细胞样品一般电压为30-120V，可先调到80找到群体后再调整

荧光通道阴性群强度在102-103之间。

1.2.2.7 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。

【建议】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



1.2.2.8 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。

1.2.2.9 清洗关机

见仪器旁张贴的清洗程序。

1.2.2.10 数据处理：

图形个性化设置Customize Plots ：切换图片类型、选择分辨率、选择样品显示量-选择图片的名称及X、Y轴的名称-X、Y轴坐标轴设置线性、对数、超对数。

1.2.2.11 样品区域和门的设置Regions and Gates

1. 门的个性化设置 Gate Editing：在个性化设置Customize下可以对单个门进行设置 -选中希望设置的门-可以改变门的种类、名称、颜色等 -把show name勾掉后，门的名称即不在图上显示 -也可在Workspace选项卡下使用Edit Gates下对所有门进行设置 -门的颜色 -母群门的选择 -反圈门 -门的名称 -删除门
2. 反圈门Back Gate

在Edit Gates下，Back Gate All Plots选项下，将希望使用反圈门的gate勾选上，其他的门不选，将图片切换成散点图，即可在散点图上看到选定门的颜色。

1.2.2.12 数据导出：

1. 导出.FCS 文件：鼠标右键分别单击Experiment、Group 或Sample文件，选择export-选择导出FCS File、experiment、template 文件 -选择希望保存的文件夹 -格式下拉选项下可选3.0/3,1
2. 导出PDF文件：鼠标右键分别单击Experiment、Group或Sample文件，选择Print-选择Printer as PDFCreator

【注意】平台一概不负责数据安全性（包括实验管理器和本地的数据文件），用户做完实验，及时导出FCS File、experiment、template 文件等数据，自行保存。

**注意事项**

1. 液路系统亮灯提示后，要先拔senser，再拔液路。安装时，先插好液路，再插好senser。错误操作造成仪器损坏的，承担相应的经济赔偿。
2. 上样时注意保护上样针，不要为了吸到底部的液体，将流式管和EP管向上硬顶上样针。
3. 项目委托和辅助测试预约时，需要告知管理员样品大致情况，比如几种细胞，样品分几组等等，方便提前平衡电压和分组
4. 上样前没有观察有无团块，没有过滤导致堵塞，细胞不易太浓，上样速度控制在2000events/s(试运行)，严重者可降级使用权限。
5. 分别将含有清洗液和水清洗的界面以及清洗完成后执行shutdown过程登记在使用登记本。
6. 使用登记：项目委托必须注明项目委托、通道数、样品数等信息；忘记登记使用记录，扣5分。
7. 非工作时间资深用户使用过程中遇到非硬件问题
8. 使用过程中遇到异常，及时联系管理员。