ThermoFisher
SCIENTIFIC

Attune NxT操作及日常维护

开机

1. 检查Attune® NxT声波聚焦流式细胞仪溶液桶的状态。

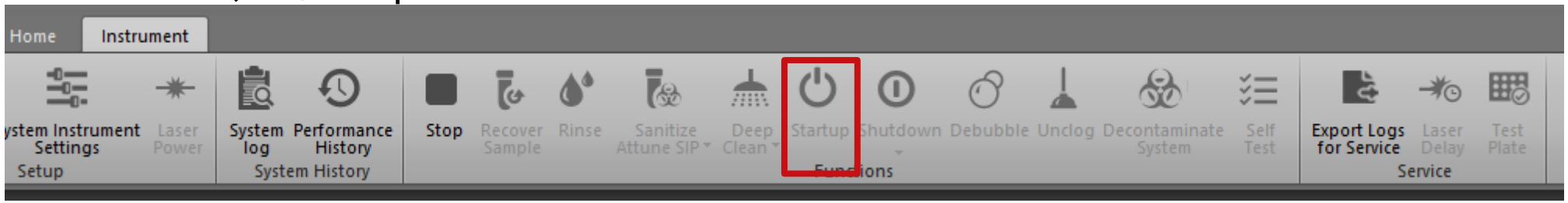
2. 打开Attune® NxT声波聚焦流式细胞仪的主机和计算机的电源，无先后顺序。

3. 登录Windows® 并启动Attune® NxT软件。

Windows用户名：INSTR-ADMIN；密码：INSTR-ADMIN。

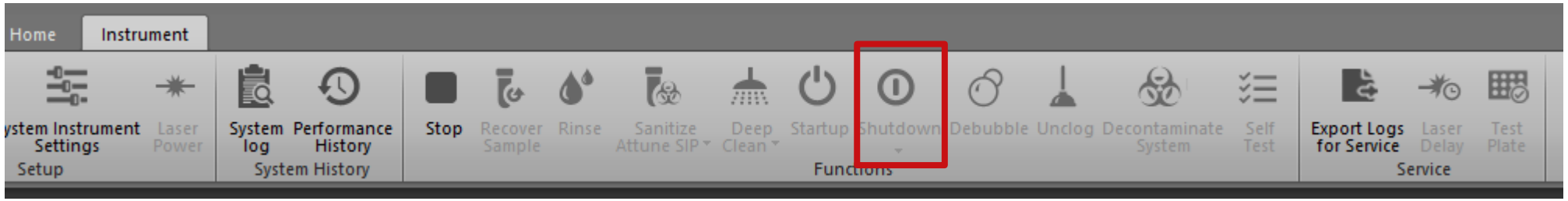
4. 在Instrument里选择Startup，启动仪器。（启动仪器前需将自动进样器中的板子取出，将进样针上的管子取下）

软件用户名：admin；密码：password



ThermoFisher SCIENTIFIC

关机



1. 准备3 ml 10%的Bleach（或者是3 ml有效氯终浓度为0.525%的次氯酸钠）。

2. 在Instrument里选择Shutdown。直接点击shutdown默认标准。也可以从下拉菜单里选择快速 (Quick)、标准 (Standard) 或完全 (thorough)。打开关机对话框，逐步操作。

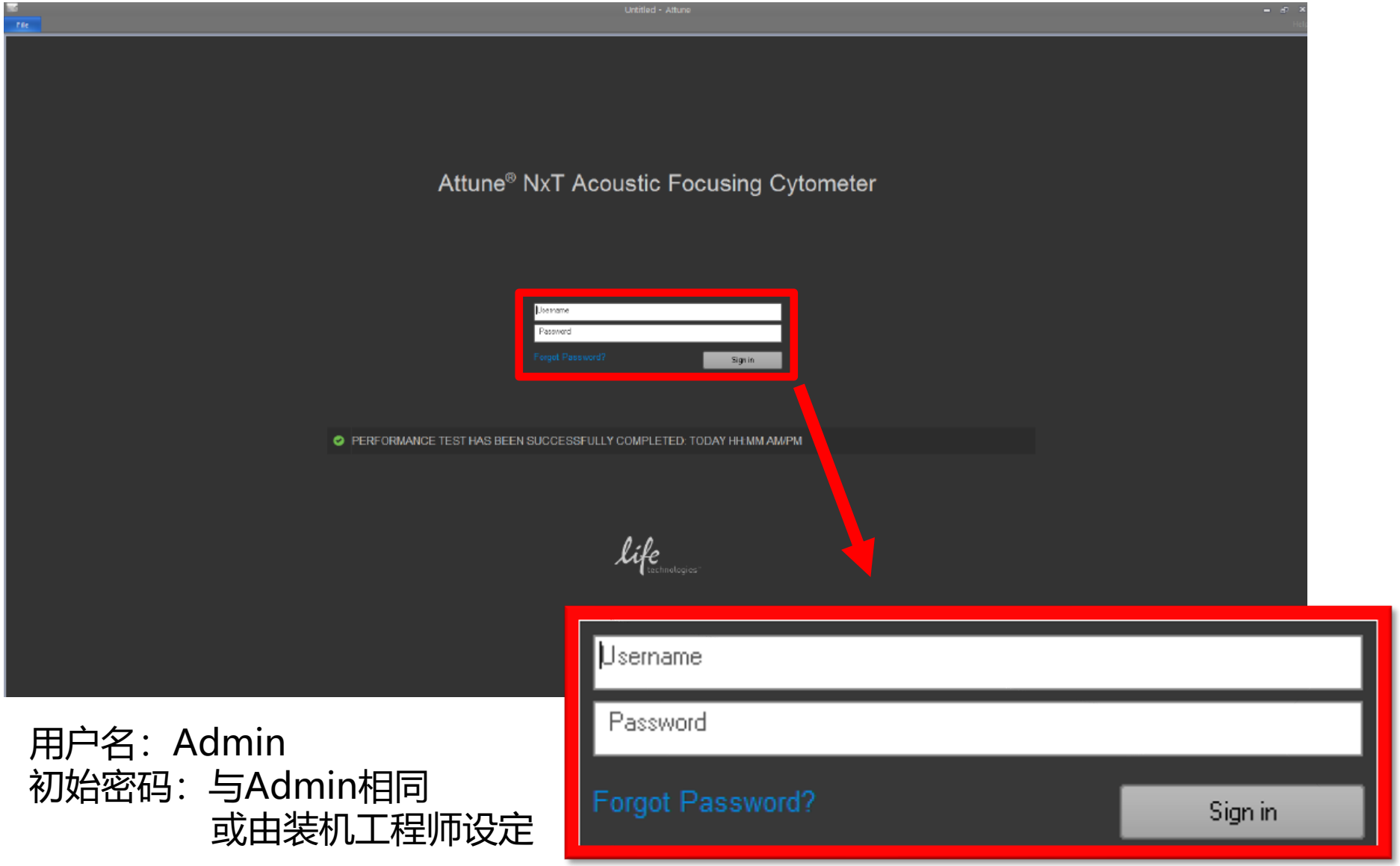
3. 按照提示，将Bleach置于进样口 (SIP)，上样。如果自动进样器已连接至主机，则放入一块干净的96孔板（前三个孔是干净的即可）。

4. 开始关机操作后，即可关闭软件及电脑。关机操作结束后关闭系统电源（可以第二天操作）。

Note：每天必须至少执行一次关机操作。

ThermoFisher SCIENTIFIC

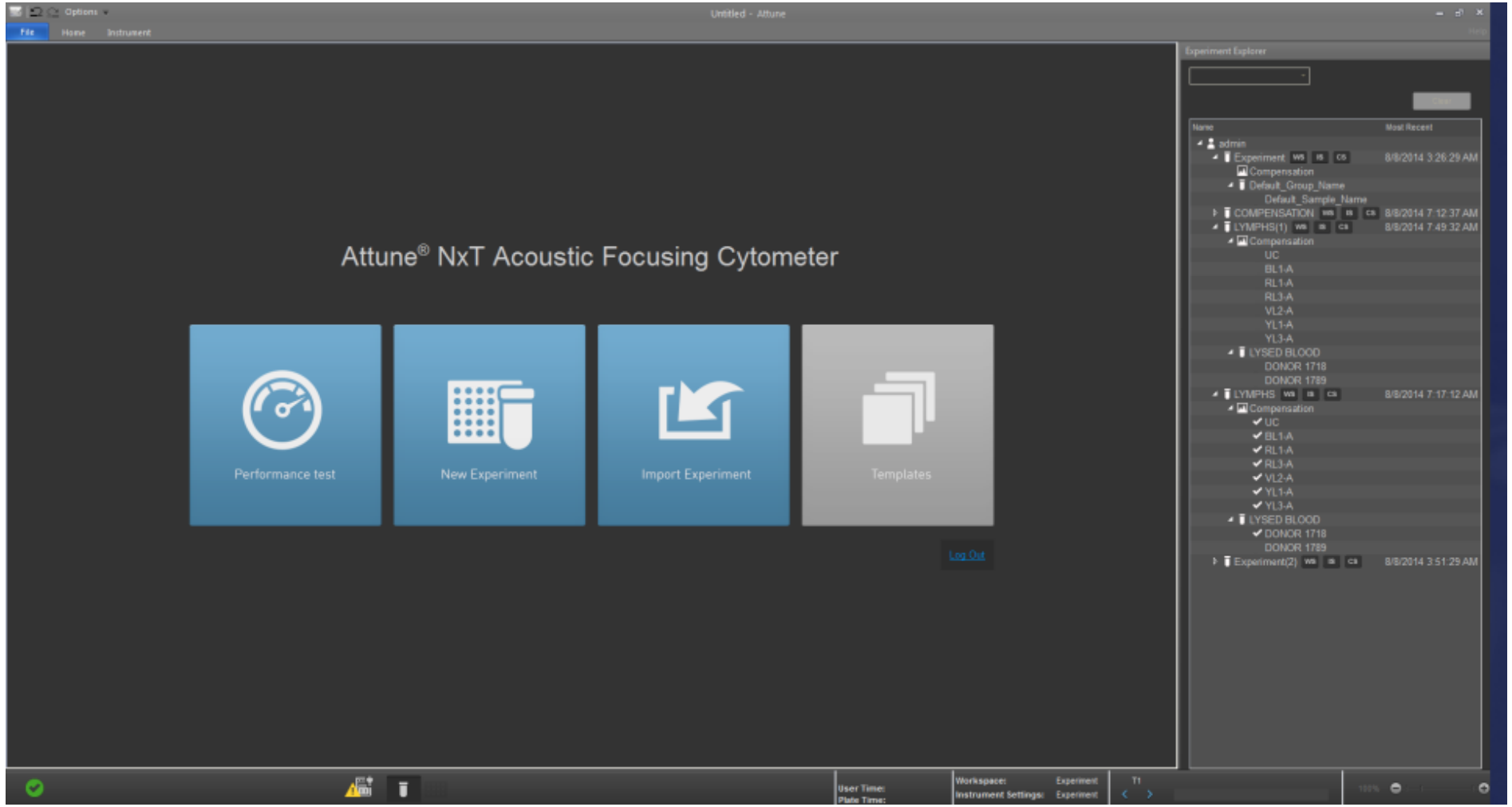
登录软件



用户名：Admin
初始密码：与Admin相同
或由装机工程师设定

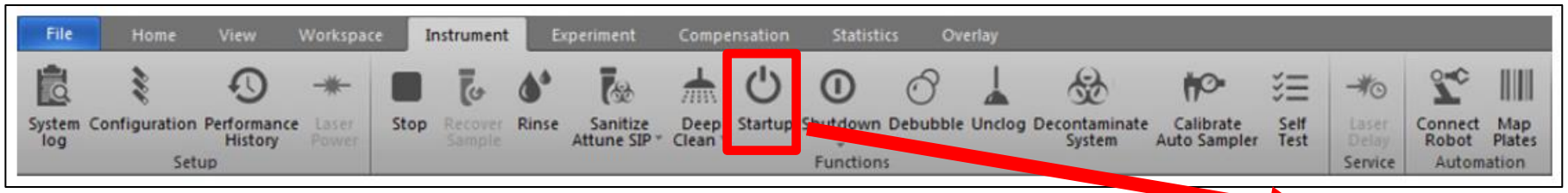
ThermoFisher SCIENTIFIC

主页面



ThermoFisher SCIENTIFIC

仪器启动 —— Instrument Startup



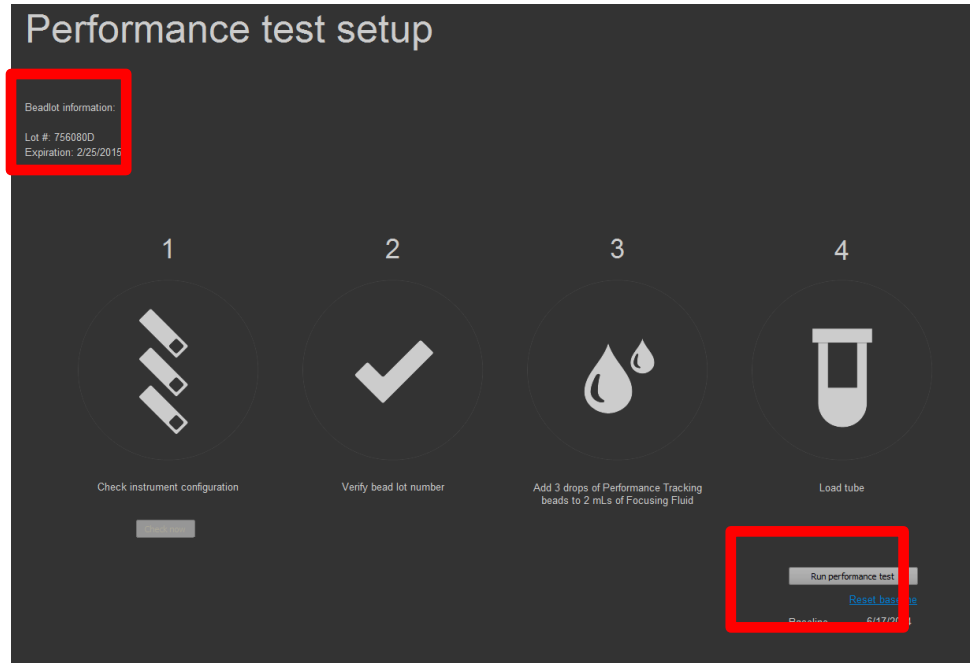
- 在运行“Startup”之前，仪器状态指示灯呈现蓝色
- 单击“Instrument”选项卡中的“Startup”
- 在“Startup”程序执行期间，仪器将完成如下操作：
  - 自动打开仪器系统
  - 激光器预热
  - 进样泵初始化
  - 液路液体更换
- “Startup”完成后，仪器状态指示灯呈现绿色，可进入后续操作。

ThermoFisher SCIENTIFIC

Attune® Performance Tracking Beads

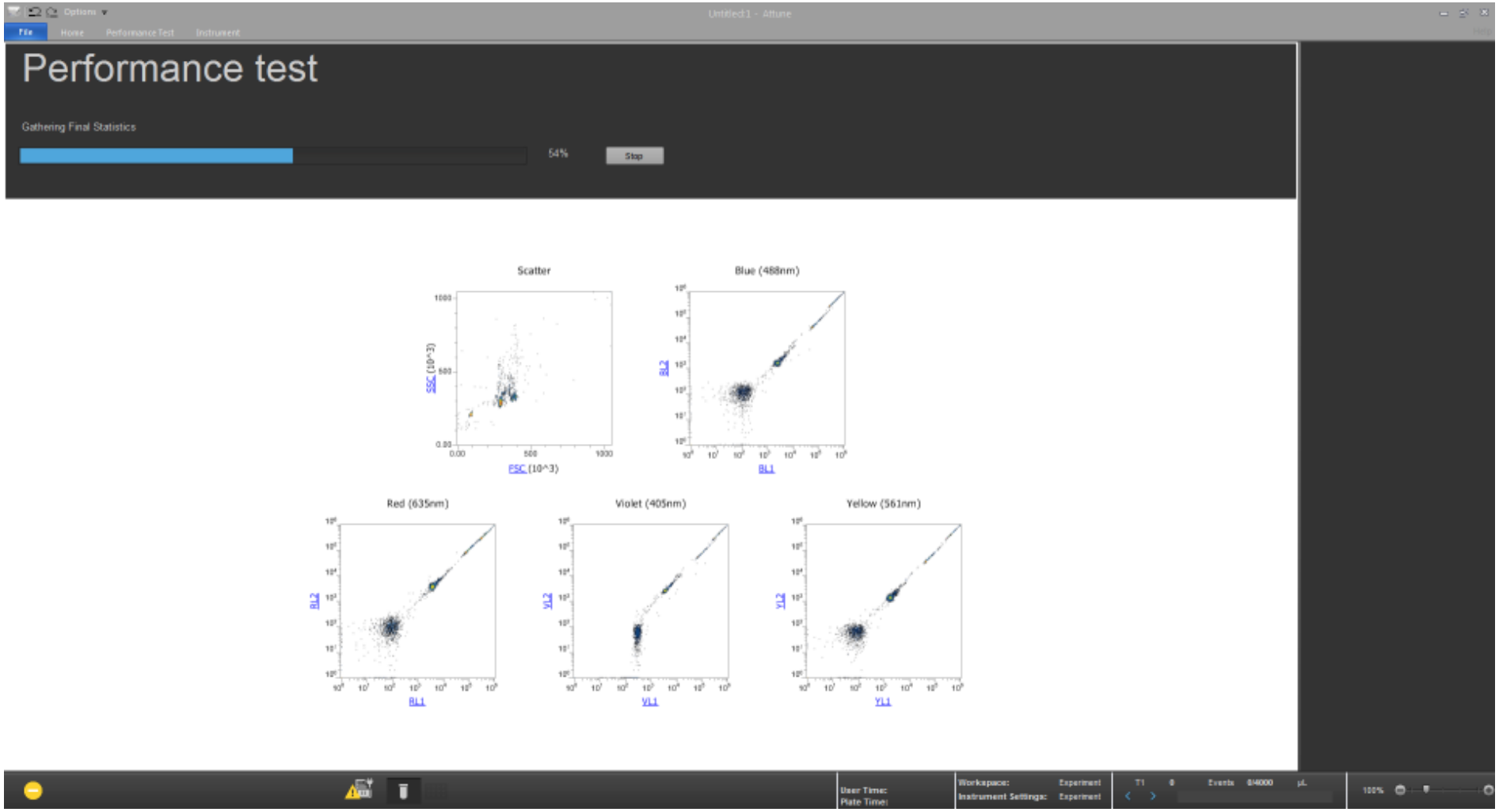
- **质控微球货号**：4449754（3 ml）

- **质控步骤**：
  - 1. 主页面点击Performance Test进入质控页面（见右图）
  - 2. 检查光学配件
  - 3. 确认微球批次号（见下图左上角红框。最后一位如若是字母，则忽略）
  - 4. 剧烈摇晃或涡旋微球1 分钟
  - 5. 2 ml鞘液中加入3滴质控微球
  - 6. 混匀，上样
  - 7. 点击Run Performance Test
    （见右图右下角红框）



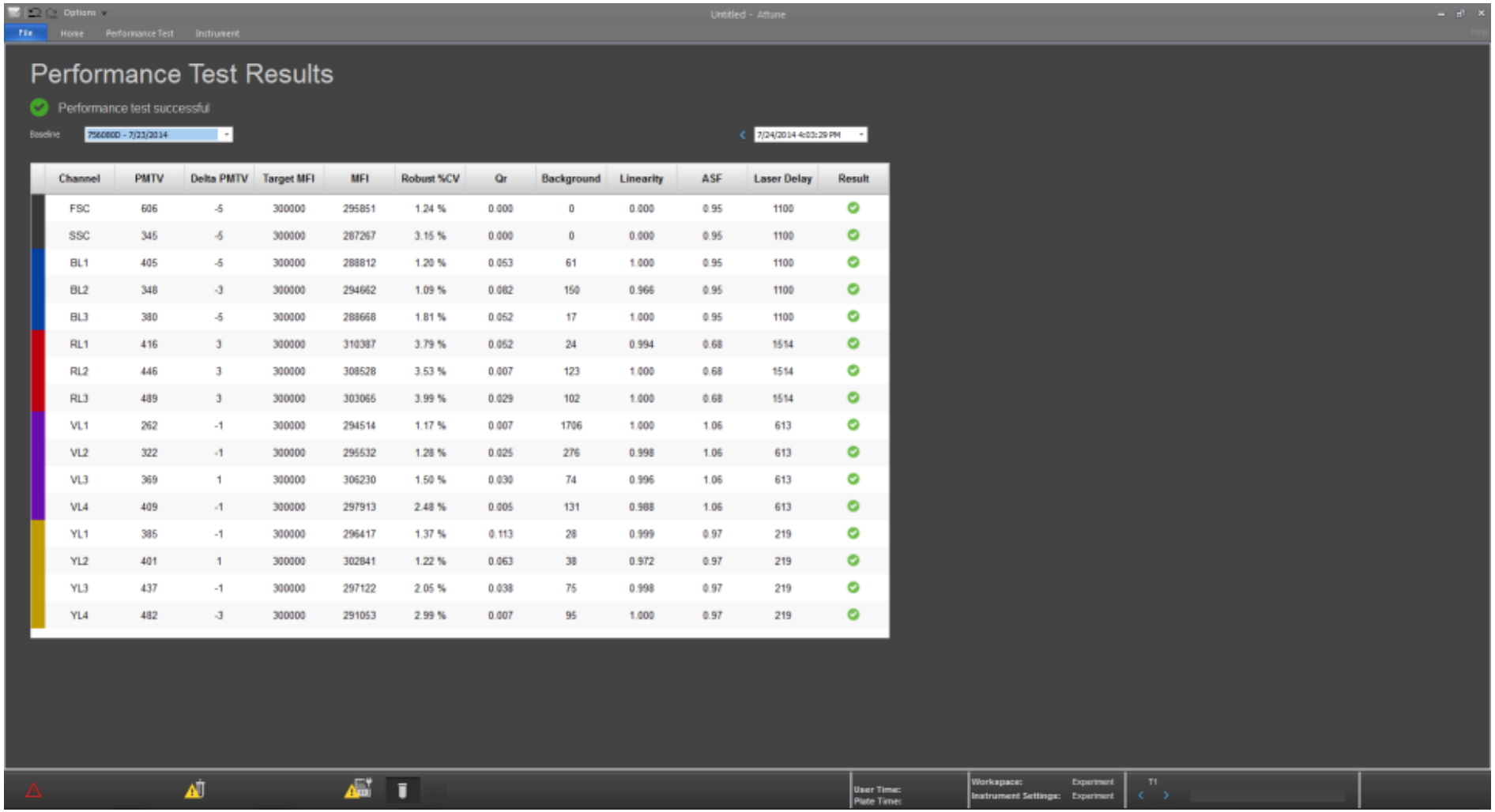
ThermoFisher SCIENTIFIC

Performance Test



ThermoFisher SCIENTIFIC

Performance Test Results



Channel	PMTV	Delta PMTV	Target MFI	MFI	Robust %CV	Qr	Background	Linearity	ASF	Laser Delay	Result
FSC	606	-5	300000	295851	1.24 %	0.000	0	0.000	0.95	1100	✓
SSC	345	-5	300000	287267	3.15 %	0.000	0	0.000	0.95	1100	✓
BL1	405	-5	300000	288812	1.20 %	0.053	61	1.000	0.95	1100	✓
BL2	348	-3	300000	294662	1.09 %	0.082	150	0.966	0.95	1100	✓
BL3	380	-5	300000	288668	1.81 %	0.052	17	1.000	0.95	1100	✓
RL1	416	3	300000	310387	3.79 %	0.052	24	0.994	0.68	1514	✓
RL2	446	3	300000	308528	3.53 %	0.007	123	1.000	0.68	1514	✓
RL3	489	3	300000	303065	3.99 %	0.029	102	1.000	0.68	1514	✓
VL1	262	-1	300000	294514	1.17 %	0.007	1706	1.000	1.06	613	✓
VL2	322	-1	300000	295532	1.28 %	0.025	276	0.998	1.06	613	✓
VL3	369	1	300000	306230	1.50 %	0.030	74	0.996	1.06	613	✓
VL4	409	-1	300000	297913	2.48 %	0.005	131	0.988	1.06	613	✓
YL1	385	-1	300000	296417	1.37 %	0.113	28	0.999	0.97	219	✓
YL2	401	1	300000	302841	1.22 %	0.063	38	0.972	0.97	219	✓
YL3	437	-1	300000	297122	2.05 %	0.038	75	0.998	0.97	219	✓
YL4	482	-3	300000	291053	2.99 %	0.007	95	1.000	0.97	219	✓

ThermoFisher SCIENTIFIC

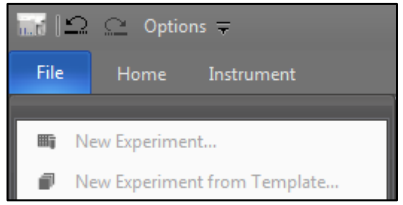
创建新的实验 —— New Experiment

创建新的实验有4种方法：

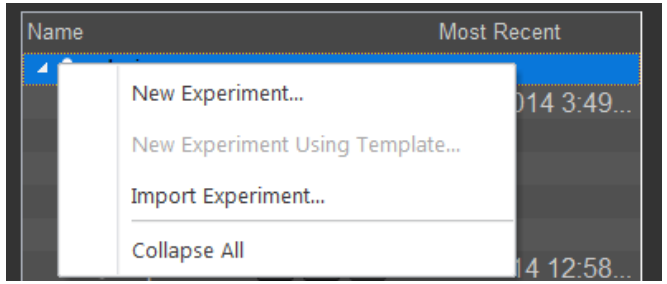
- 1. 主页面下，点击New Experiment

- 2. 在Home选项卡下，点击New Experiment

- 3. 在File选项卡下，点击New Experiment

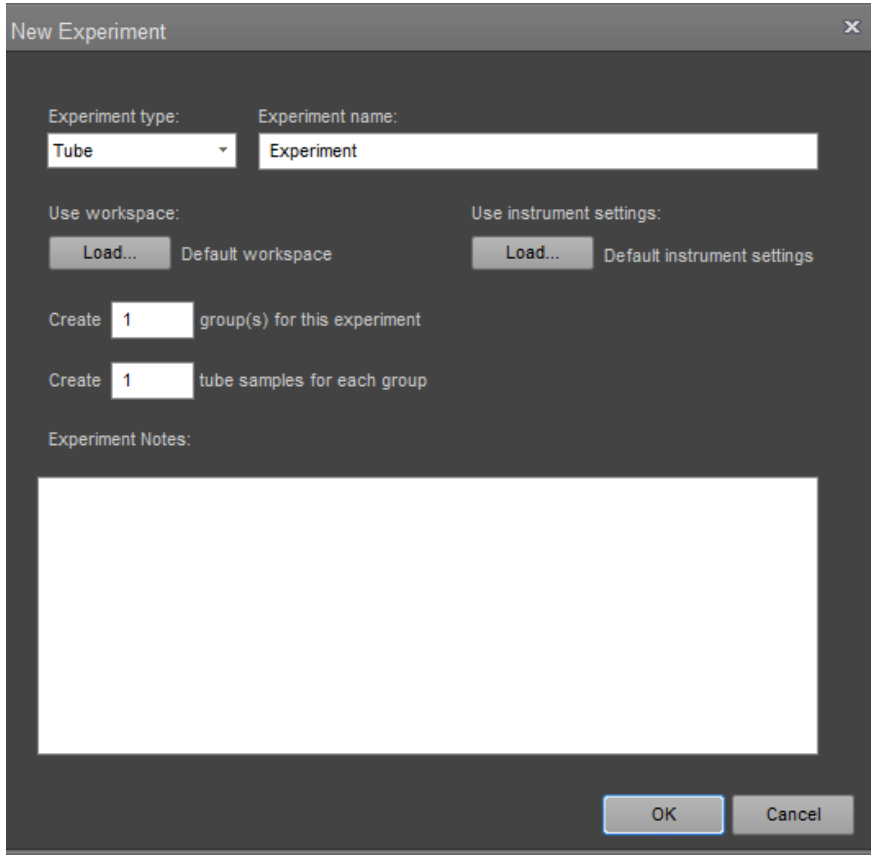


- 4. 在Experiment Explorer下，右击User Name，点击New Experiment。



ThermoFisher SCIENTIFIC

New Experiment 对话框 —— Tube Experiment



- 1. 选择实验类型：Tube
- 2. 命名实验
- 3. 加载Workspace（.aws文件）或使用默认设置（可选）
- 4. 加载仪器设置（.ais文件）或使用默认设置（可选）
- **5. 设置样本组数**
- **6. 设置每组样本数**
- 7. 附加说明（可选）
- 8. 单击OK

ThermoFisher SCIENTIFIC

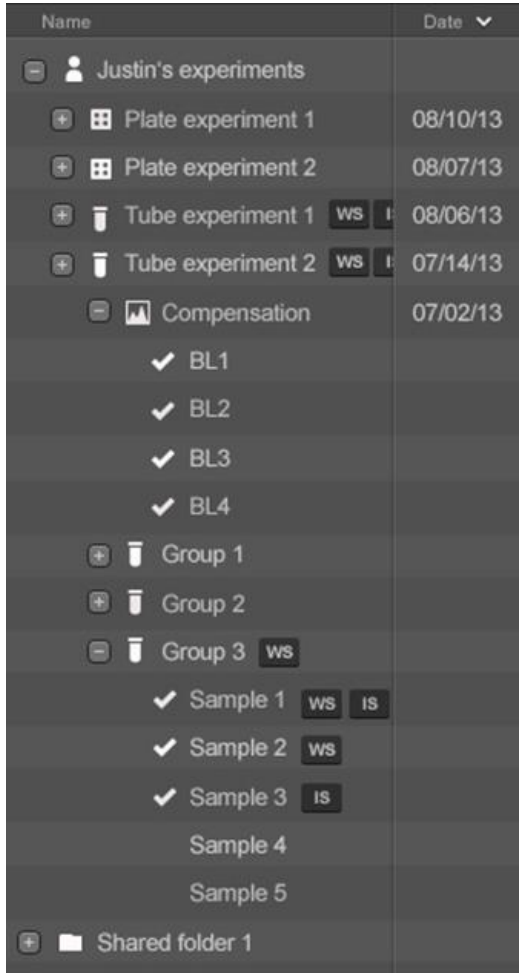
添加新的Group及Tube Sample

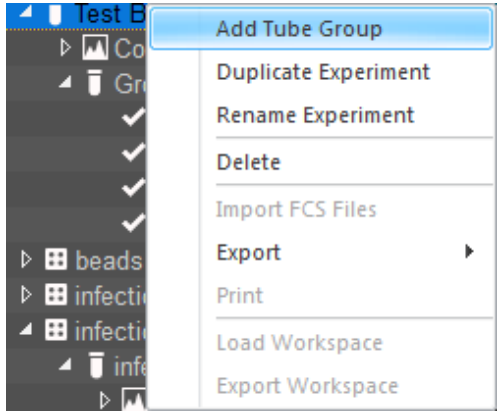
添加新的Group

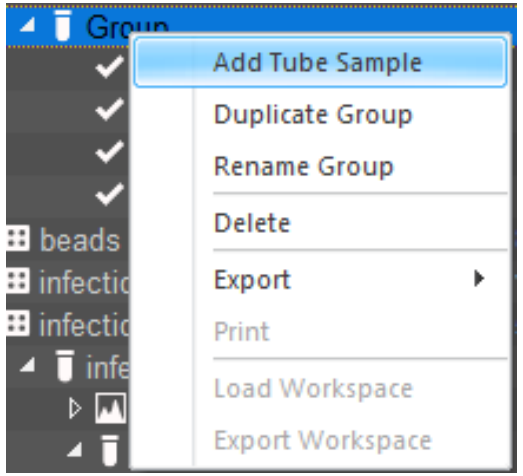
- 1. 右击相应的实验名称
- 2. 点击Add Tube Group
- 3. 右击Group Name，选择Rename重命名，或者选中Group Name点击F2进行重命名

添加新的Sample

- 1. 右击相应的Group名称
- 2. 点击Add Tube Sample
- 3. 右击Sample Name，选择Rename重命名，或者选中Sample Name点击F2进行重命名







ThermoFisher SCIENTIFIC

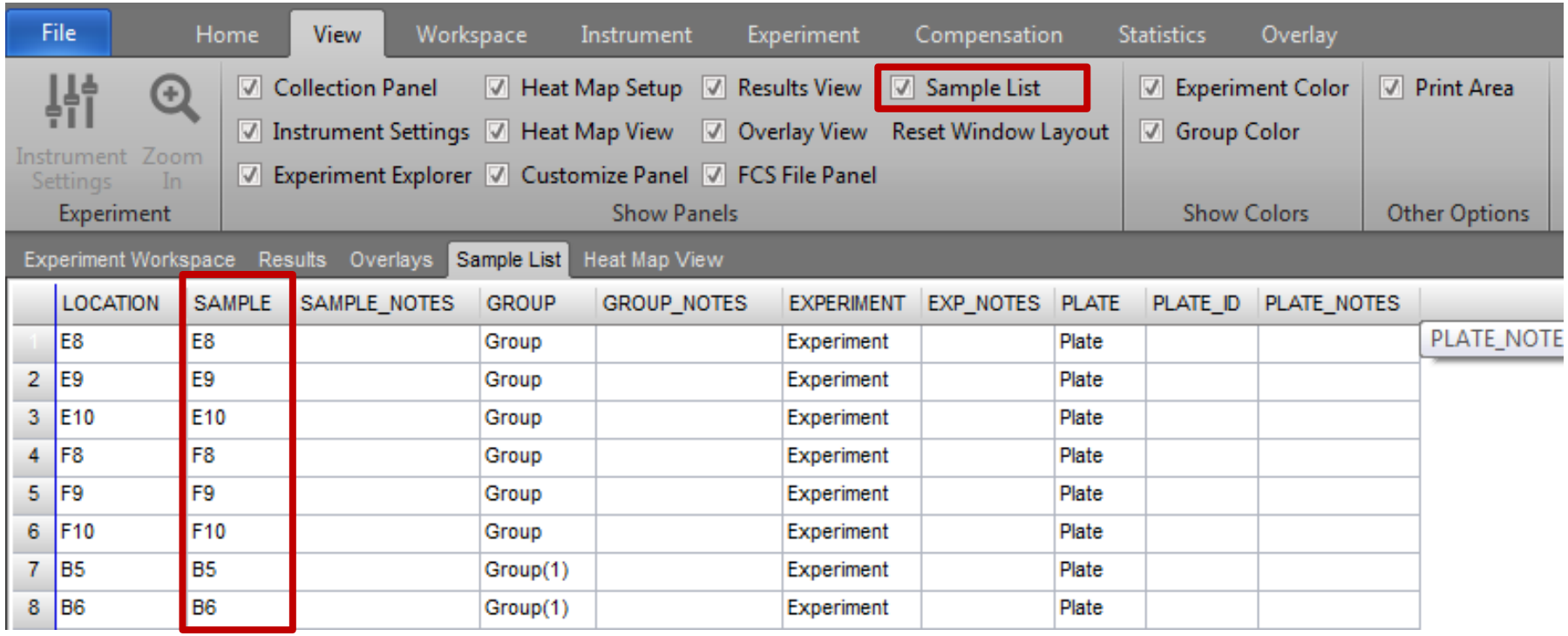
修改Sample名称

添加Sample List操作框

- 1. 点击View
- 2. 将Sample List勾选上，在中间操作框中选定Sample List

修改Sample名称

- 1. 可以在Excel表中直接将Sample名称改好，复制到Sample栏中
- 2. 也可直接在Sample栏中修改名称



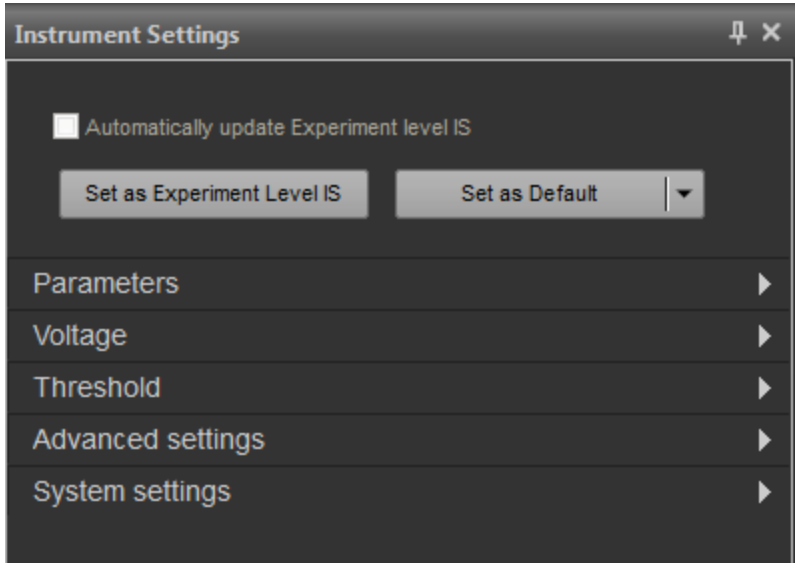
	LOCATION	SAMPLE	SAMPLE_NOTES	GROUP	GROUP_NOTES	EXPERIMENT	EXP_NOTES	PLATE	PLATE_ID	PLATE_NOTES
1	E8	E8		Group		Experiment		Plate		
2	E9	E9		Group		Experiment		Plate		
3	E10	E10		Group		Experiment		Plate		
4	F8	F8		Group		Experiment		Plate		
5	F9	F9		Group		Experiment		Plate		
6	F10	F10		Group		Experiment		Plate		
7	B5	B5		Group(1)		Experiment		Plate		
8	B6	B6		Group(1)		Experiment		Plate		

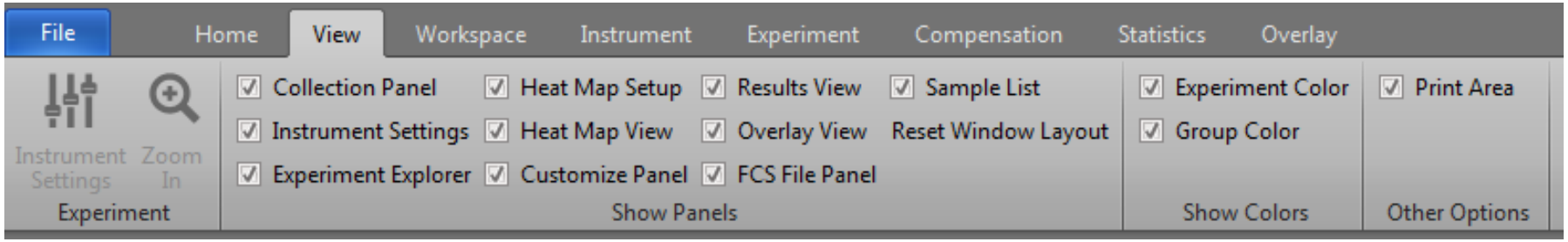
ThermoFisher SCIENTIFIC

仪器设置 —— Instrument Settings

添加Instrument Settings操作框

- 1. 点击View
- 2. 将Instrument Settings勾选上
- 3. 在左边或者右边的操作框中找到Instrument Settings
- 4. 点开之后共有5个操作栏，常用的有3个
  - Parameters —— 通道选择
  - Voltage —— 电压调节
  - Threshold —— 阈值调节





ThermoFisher SCIENTIFIC

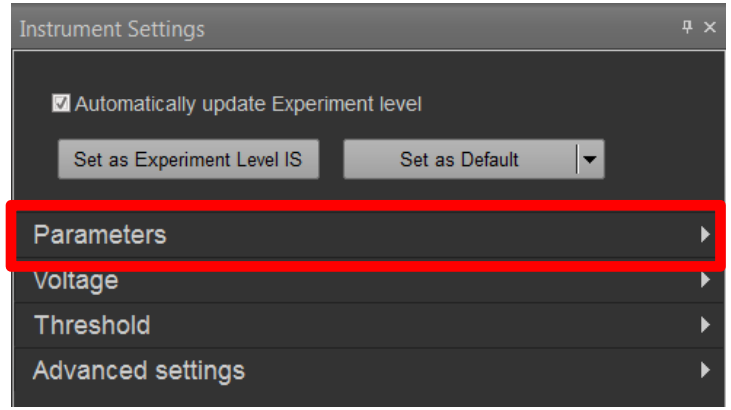
仪器设置 —— 参数设置 （Parameters）

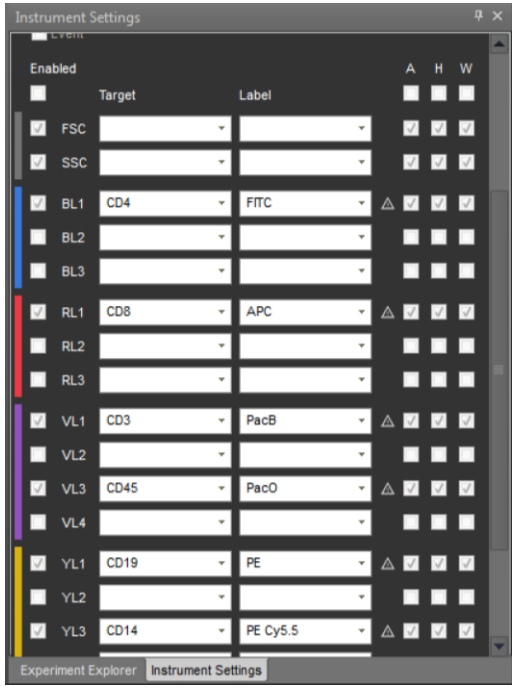
展开参数部分

- 默认设置包括所有通道和所有参数(A-H-W)
- 取消选择实验中不需要的荧光通道，以减小文件大小，
- 取消选择不需要的参数(A-H-W)
- 为每个所需通道添加marker名称和染料名称（例如：CD4-FITC）
- 选择/取消事件计数和/或时间

备注：
没有选定的通道和参数的数据将不被记录。

超大文件：在以30-35K/秒的检测速率记录20x106样品数时，参数选择限制为34个参数。检测速率较慢时，可以全部使用。



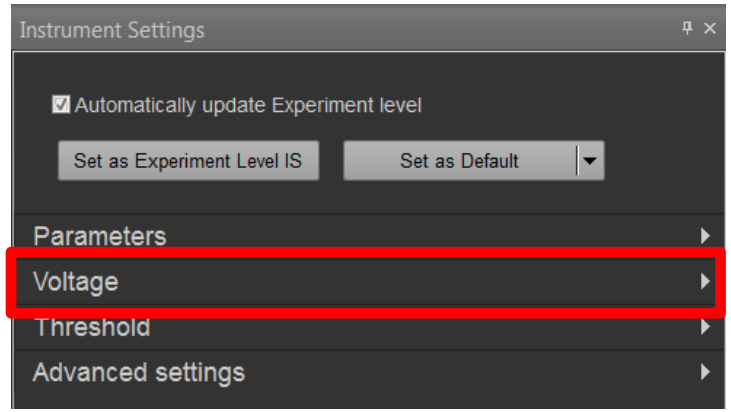


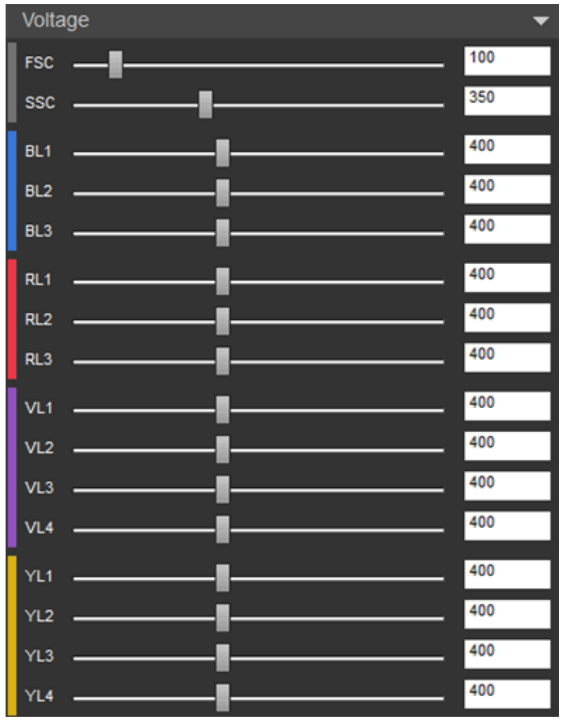
ThermoFisher SCIENTIFIC

仪器设置 —— 电压设置 （Voltage）

展开电压部分

- 未选中的通道，电压为不可调状态
- 可以使用鼠标直接拖拽来进行电压的调节
- 可以使用鼠标滚轮来调节电压
- 可以直接输入期望的电压值





备注：

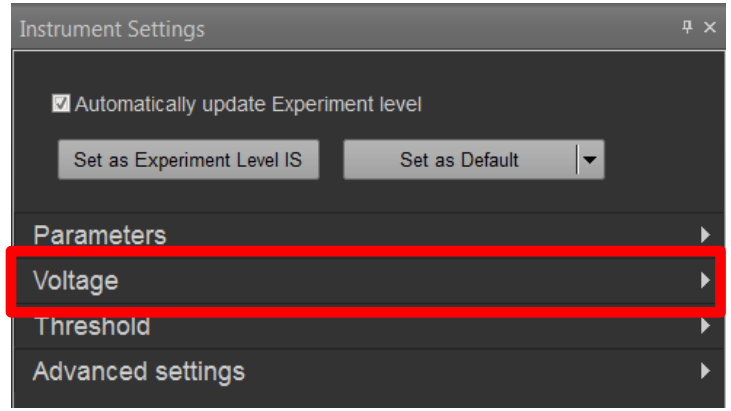
为了方便实验，可以将质控得到的电压值设置成默认值

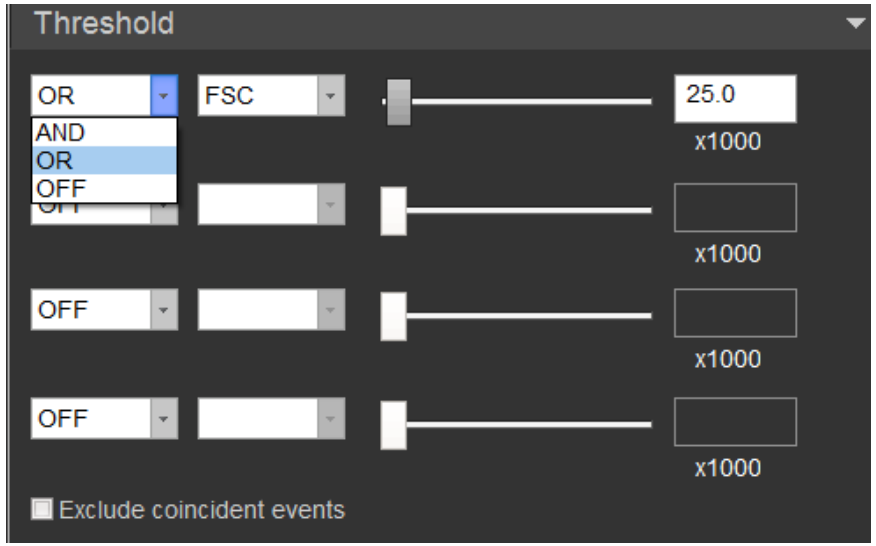
ThermoFisher SCIENTIFIC

仪器设置 —— 阈值设定 （Threshold）

展开阈值部分

- 在记录样本之前，使用阈值消除不想要的事件(即噪声)。
- 可设置1-4通道(散射和/或荧光)。
- **不符合阈值标准的数据将永久丢失**



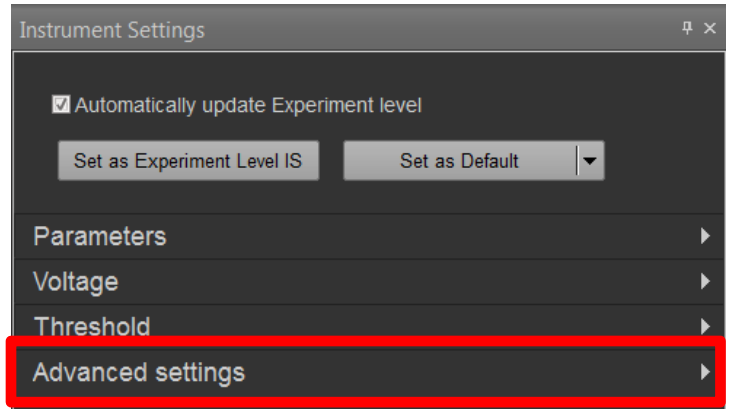


ThermoFisher SCIENTIFIC

仪器设置 —— 阈值设定 （Threshold）

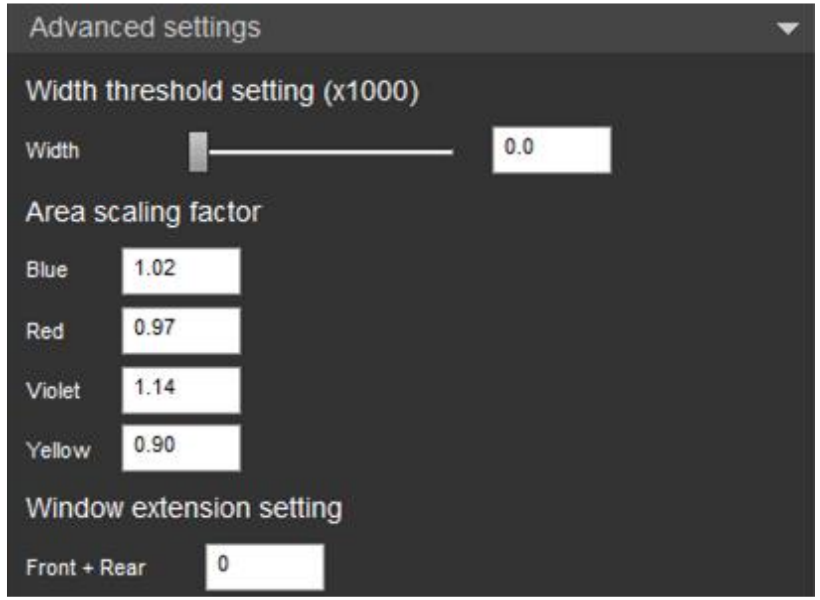
备注：

请不要随意改变这里面的设置！！！



展开高级设置部分

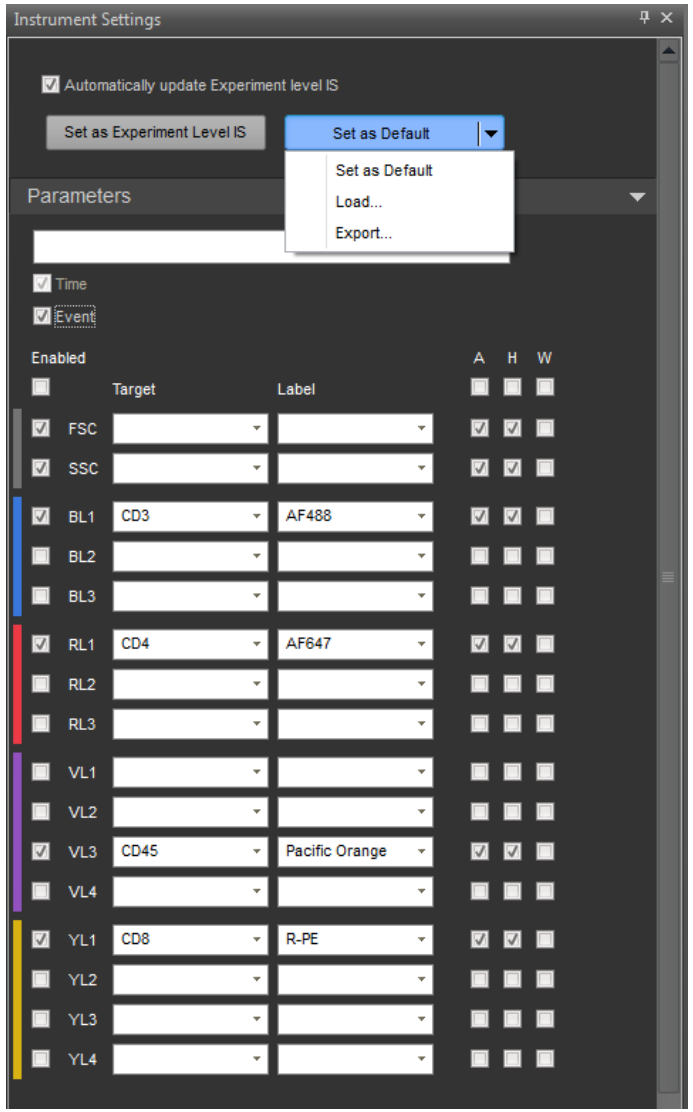
- 在记录样本之前，使用阈值消除不想要的事件(即噪声)。
- 可设置1-4通道(散射和/或荧光)。
- **不符合阈值标准的数据将永久丢失**



ThermoFisher SCIENTIFIC

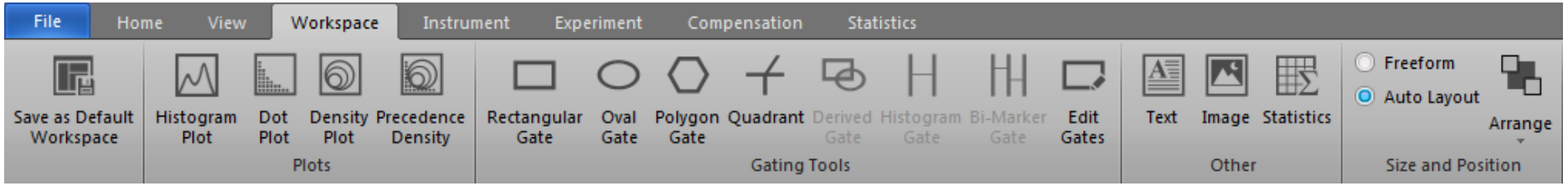
仪器设置 —— 默认设置、导入及导出

- 仪器设置可以导出、导入或设置为适用于未来所有实验的默认设置。
- 一旦设置成默认设置，随后新建的实验，包括选定的参数、marker名称、染料名称都会被设置为默认值。
- 如果需要，可以进一步修改所有的参数。



ThermoFisher SCIENTIFIC

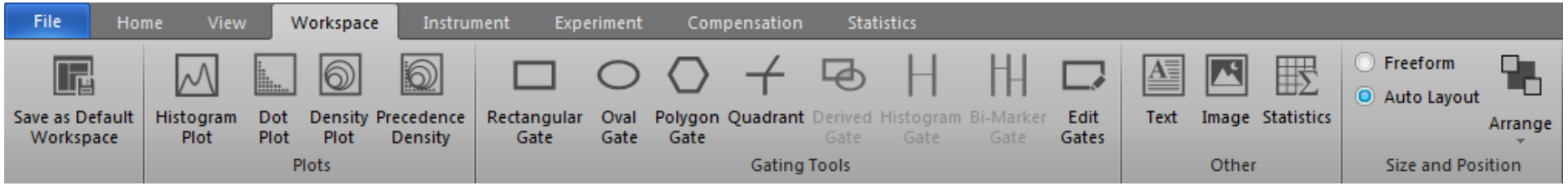
工作区 —— Workspace



- Save as Default Workspace —— 设置默认工作区
- Plot —— 画图
- Gate —— 画门
- Other —— 其他
- Size and Position —— 页面设置

ThermoFisher SCIENTIFIC

工作区 —— Workspace



- **Histogram Plot 直方图** —— 仅显示events数量和分布的单参数图
- **Dot Plot 散点图** —— 双参数图，X/Y轴分别显示一个参数的信号强度
- **Density Plots 密度图** —— 双参数图，根据颜色深浅表示不同密度的样品
- **Precedence 优先密度图** —— 双参数图，点和密度显示的组合。颜色用于显示当前颗粒的母门颜色，颜色深浅用于指示每个门内的样品数。

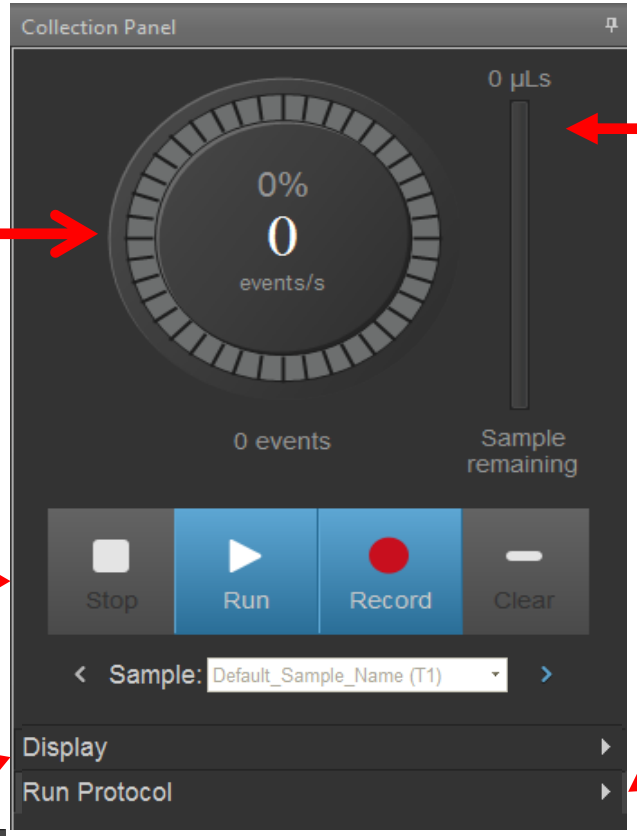
ThermoFisher SCIENTIFIC

数据采集（样品管模式） —— Collection Panel

样品获取状态

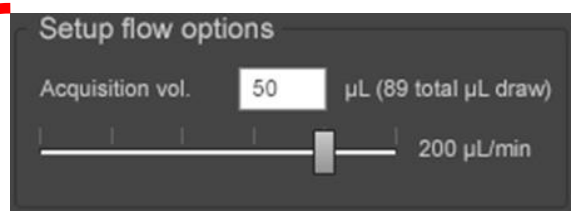
- 进样转盘
- 样品实时检测数
- 记录总样品数

收集指令栏

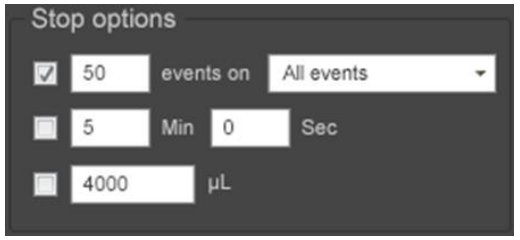


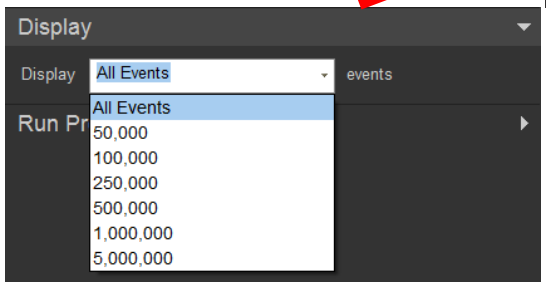
剩余样品量

进样量及流速选择



记录停止选择





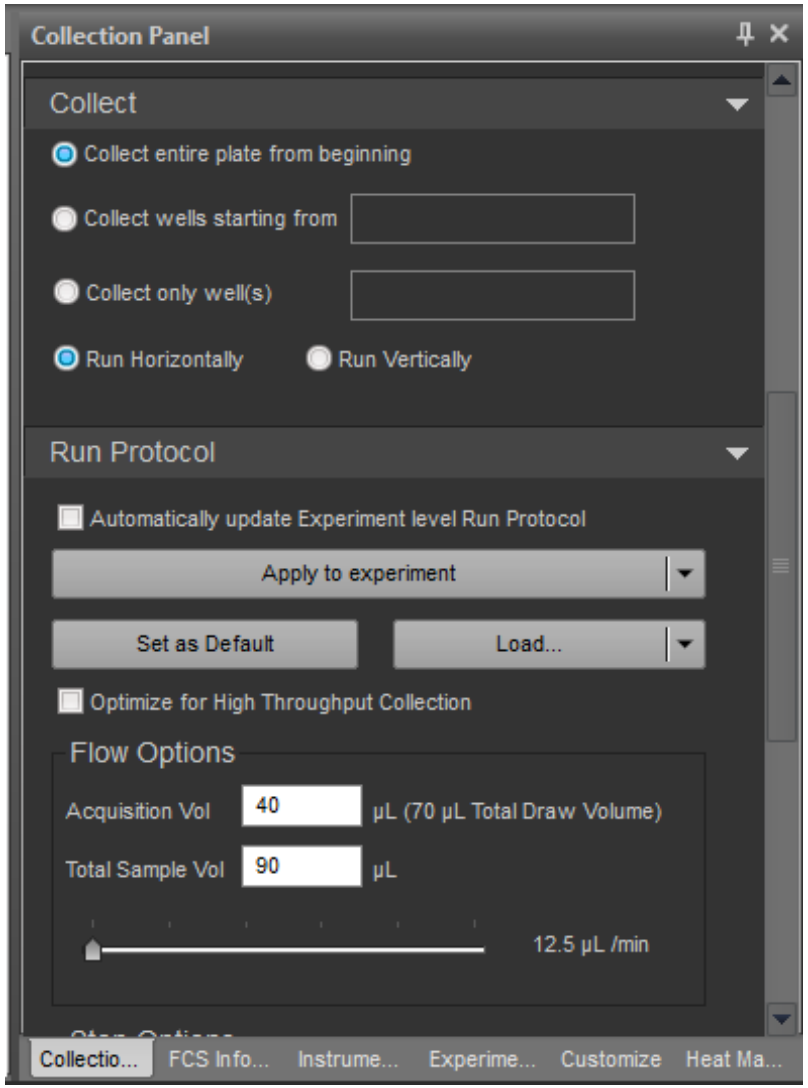
获取数据的过程中
实时显示的样品数

ThermoFisher SCIENTIFIC

数据采集（孔板） —— Collection Panel

- 选择从第一个样品开始
- 选择从特定一个样品开始
- 自定义上样

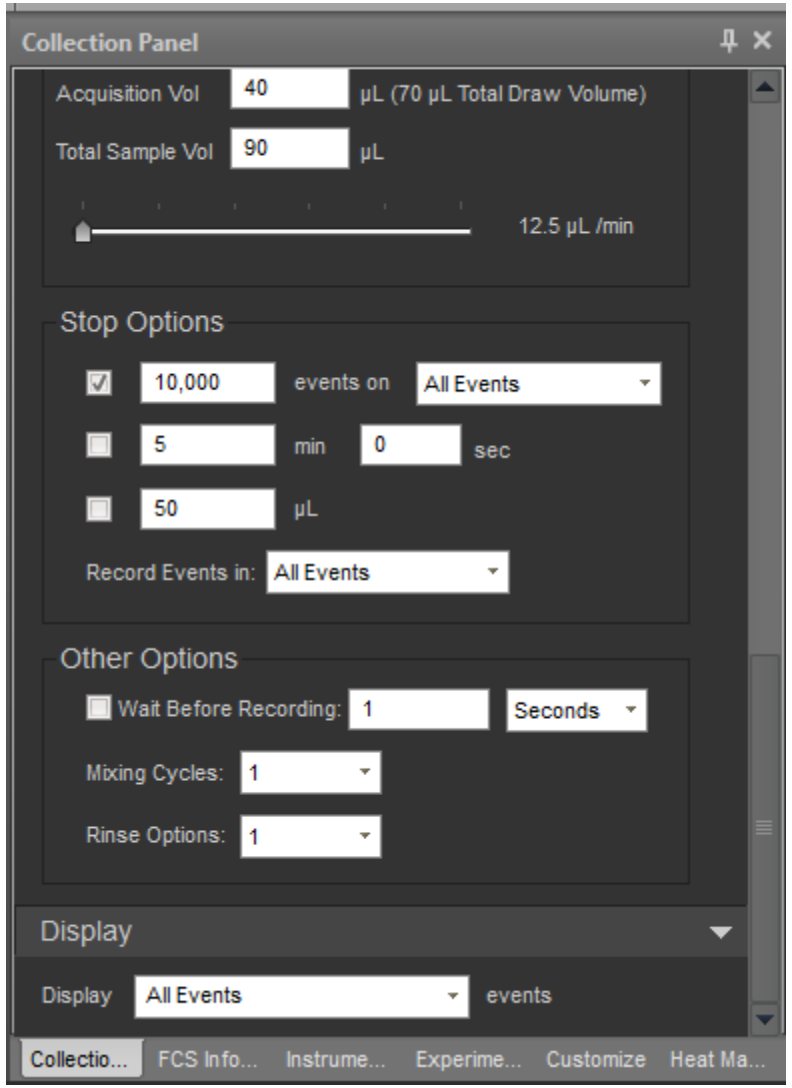
选择进样体积
及样品总体积



ThermoFisher SCIENTIFIC

数据采集（孔板） —— Collection Panel

- 选择停留多久后开始记录
  - 选择混匀次数
  - 选择清洗次数



ThermoFisher SCIENTIFIC

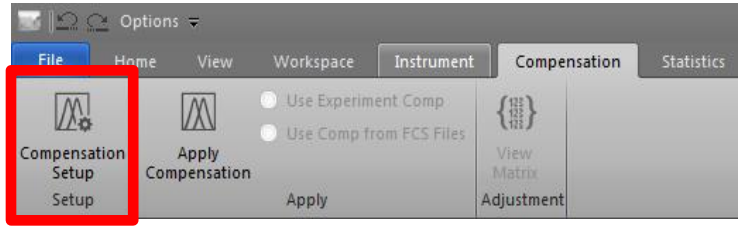
仪器自动计算补偿 —— Automatic Compensation

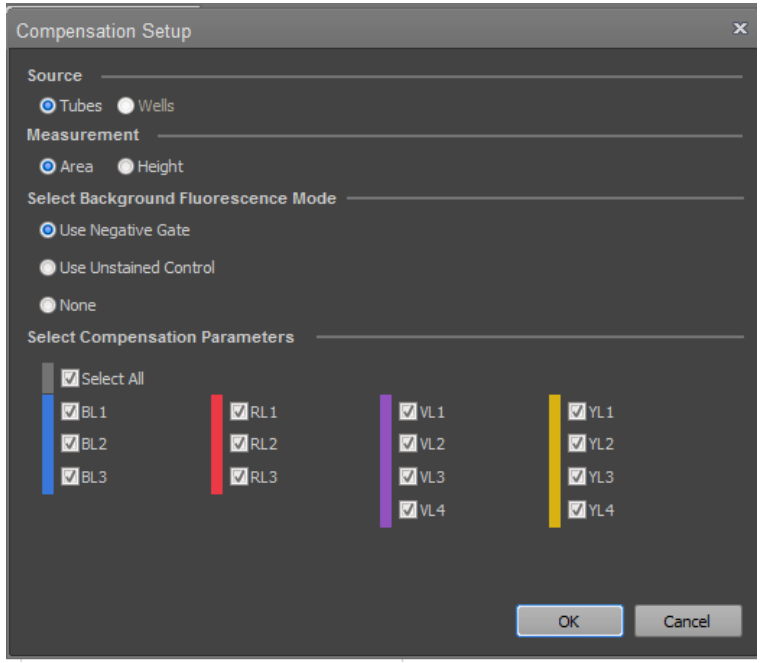
- 使用细胞或补偿微球进行补偿设置。

- 在补偿选项卡***Compensation***下，点击“补偿设置”Compensation Setup
- 或者在Experiment Explorer下双击Compensation，进入补偿选项。

- 补偿设置选项Compensation Setup：
  - 进样方式Source：选择样品管Tube或者孔板Well
  - 参数Parameter：Area或Height
  - 自动补偿模块Autofluorescence：阴性门模式Negative gate，未染色对照模式Unstained control，或者其他none
  - 荧光通道选择Fluorescent channels

- 运行所有的补偿管并调整相应的门的位置.

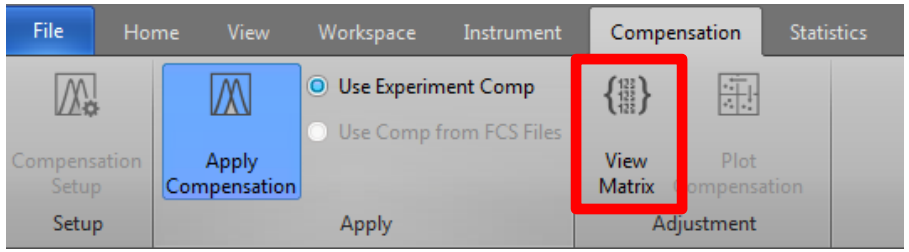




ThermoFisher SCIENTIFIC

补偿矩阵 —— Spillover Matrix

- 自动补偿完成后At the end of Auto-compensation:
  - 补偿矩阵会自动计算并自动应用到所有样品（Apply Compensation）。
  - 可以点击View Matrix来看已计算好的补偿矩阵。



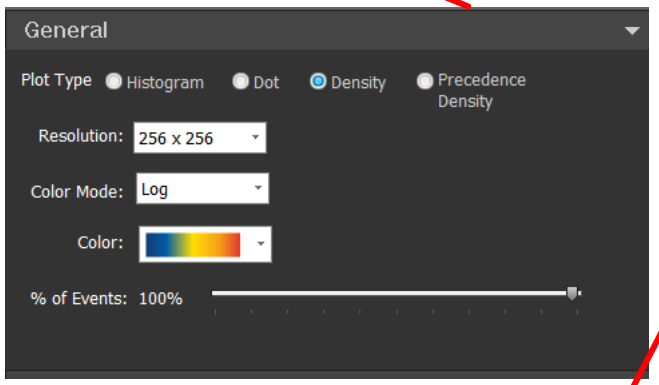
Spillover

	BL1-H	BL3-H	RL1-H	RL3-H	YL1-H	YL4-H
BL1-H	100.00	0.31	0.12	0.14	0.04	0.04
BL3-H	1.76	100.00	1.65	0.67	81.71	14.70
RL1-H	0.10	0.29	100.00	22.10	0.00	1.08
RL3-H	0.17	0.00	0.39	100.00	0.01	3.64
YL1-H	1.29	3.68	0.09	0.02	100.00	0.50
YL4-H	3.24	0.22	0.11	34.20	2.44	100.00

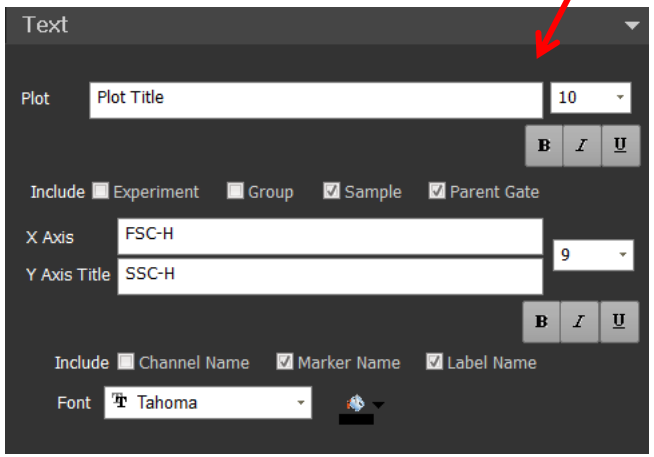
ThermoFisher SCIENTIFIC

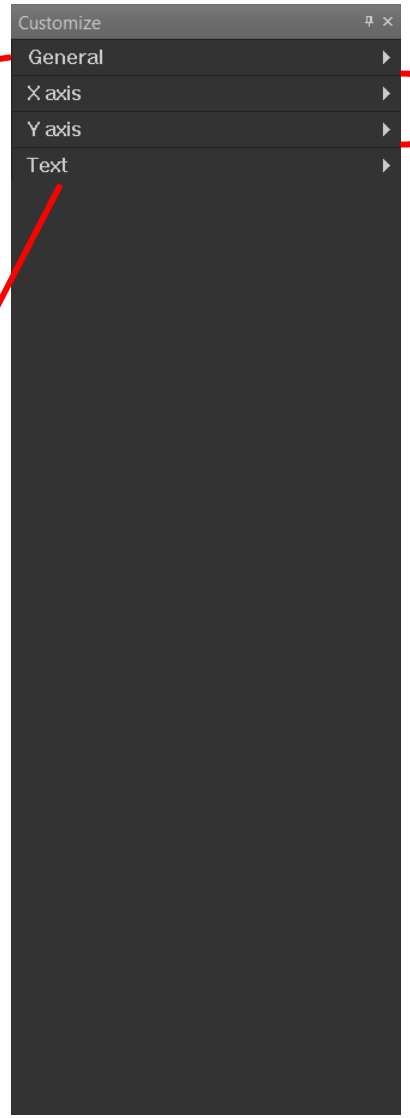
图的个性化设置 —— Customize Plots

切换图片类型、选择分辨率
选择样品显示量

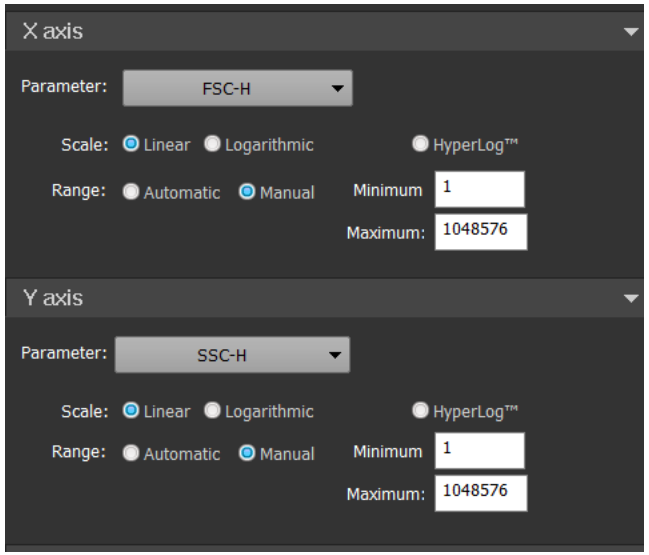


选择图片的名称及
X、Y轴的名称





X、Y轴坐标轴设置
线性、对数、双指数



ThermoFisher SCIENTIFIC

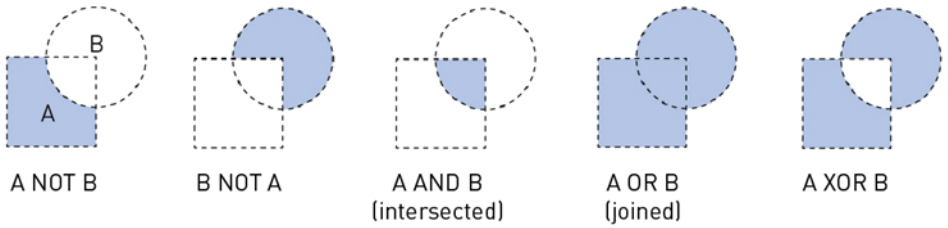
样品区域和门的设置 —— Regions and Gates

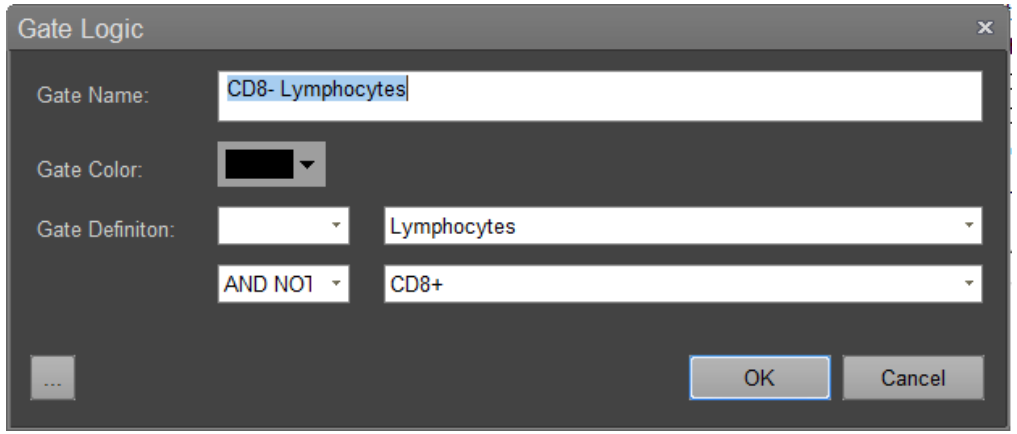
- **门的种类**
  - 双参数门：矩形门（Rectangular Gate）、椭圆门（Oval Gate）、多边门（Polygon Gate）、十字象限门（Quadrant）
  - 单参数门：直方图门（Histogram Gate）
  - 特殊门：逻辑门（Derived Gate）

ThermoFisher SCIENTIFIC

逻辑门 —— Derived Gates

- 以不同逻辑关系进行组合的门





AND gates = All events that are shared.

OR gates = All events found within 2 or more individual gates.

NOT gates = All events found outside the gate.

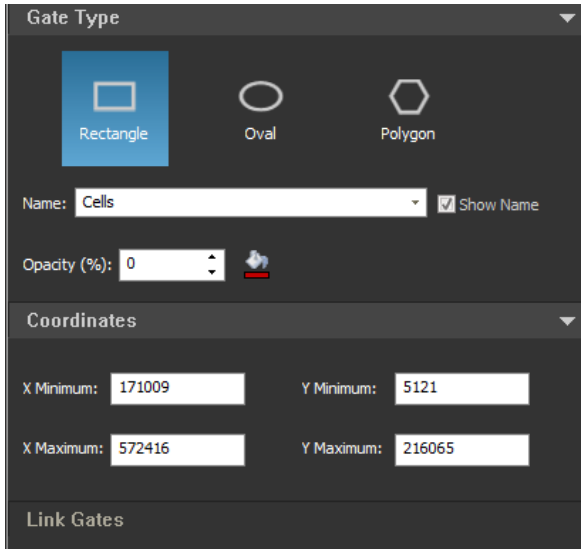
XOR gates = Unique events found within an individual gate.

ThermoFisher SCIENTIFIC

门的个性化设置 —— Gate Editing

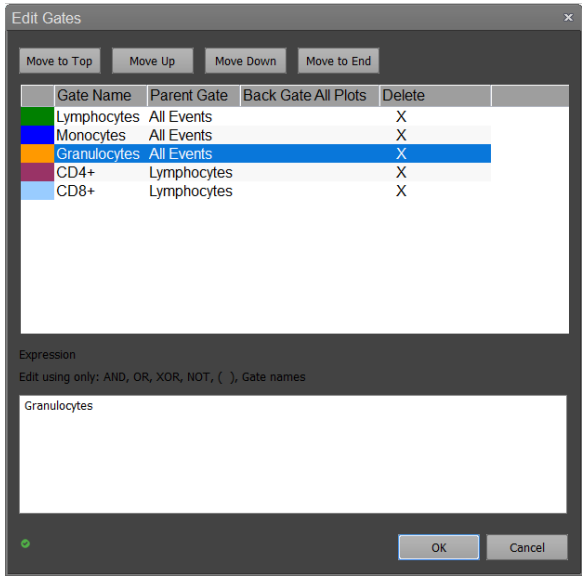
在个性化设置***Customize***下可以对单个门进行设置

- 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



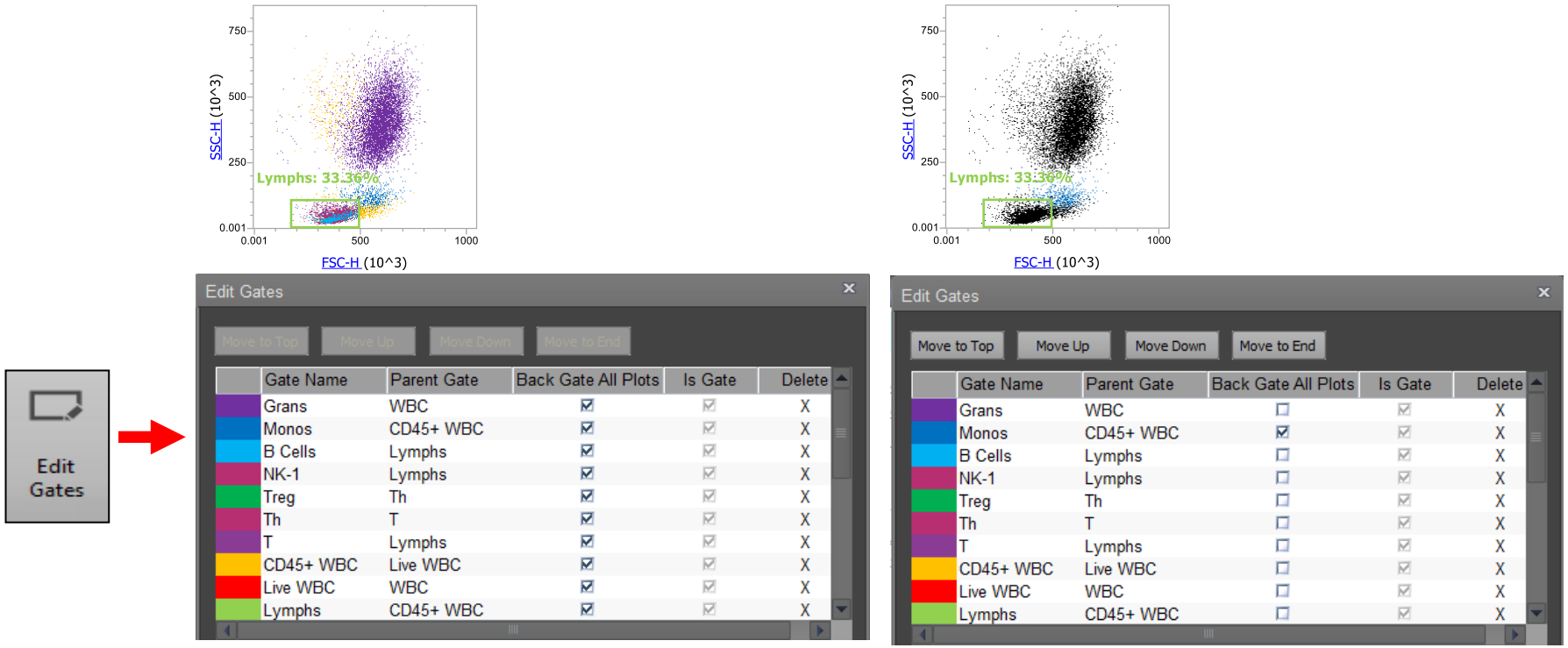
也可在***Workspace***选项卡下使用**Edit Gates**下对所有门进行设置

- 门的颜色
- 母群门的选择
- 反圈门
- 门的名称
- 删除门
- 等



ThermoFisher SCIENTIFIC

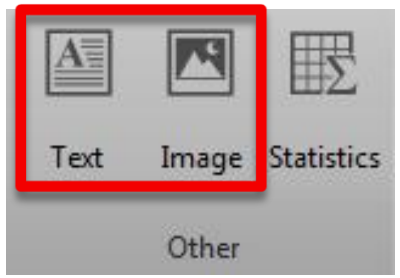
反圈门 —— Back Gate



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。

ThermoFisher SCIENTIFIC

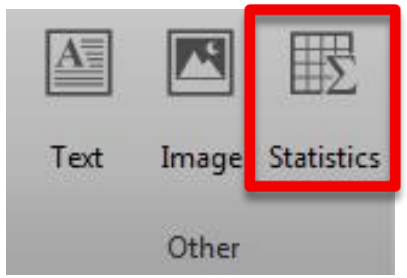
文本框及图片的插入 —— Text & Image



- 在***Workspace*** 选项卡下，点击Text添加文本框，点击Image添加图片。
- 文本框字体的调整及修改在个性化设置***Customize*** 工具栏里。

ThermoFisher SCIENTIFIC

统计学参数 —— Statistics Table



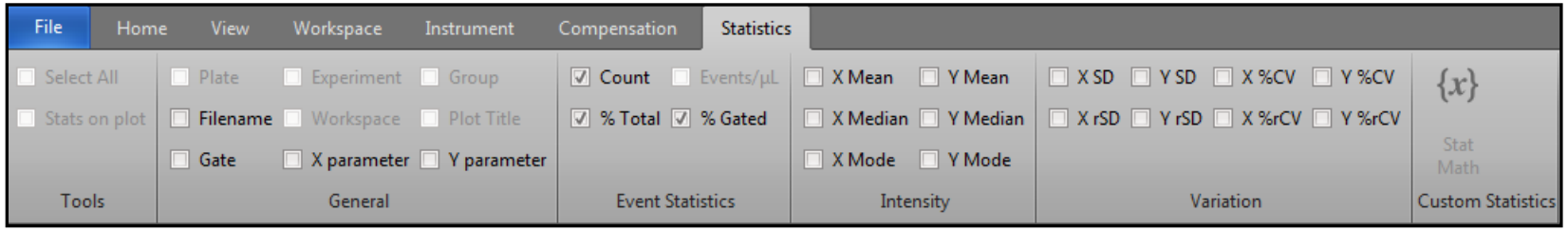
Experiment: **6 color immuno**
Group: **Default_Group_Name**
Sample: **NOT-IN_STATS**

Name	Count	%Gated	%Total
All Events	30000	100.00	100.00
Lymphocytes	6728	22.43	22.43
CD4+	2893	43.00	9.64
CD8+	1358	20.18	4.53
Monocytes	2080	6.93	6.93
Granulocytes	14933	49.78	49.78

- 显示整个工作区的统计学参数**Workspace Statistics Table**：选中工作区的空白位置，点击Statistics。
- 显示单个图的统计学参数**Plot Statistics Table**：选中对应的图，点击Statistics。

ThermoFisher SCIENTIFIC

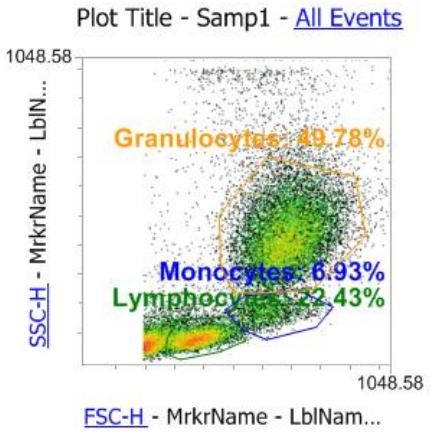
统计学参数的个性化设置 —— Customize Statistics



Experiment: **6 color immuno**
Group: **Default_Group_Name**
Sample: **NOT-IN_STATS**

Name	Count	%Gated	%Total
All Events	30000	100.00	100.00
Lymphocytes	6728	22.43	22.43
CD4+	2893	43.00	9.64
CD8+	1358	20.18	4.53
Monocytes	2080	6.93	6.93
Granulocytes	14933	49.78	49.78

- 设置统计学参数表格：点击统计学参数表格，在统计学参数***Statistics*** 选项卡下，选择需要显示的统计学参数。



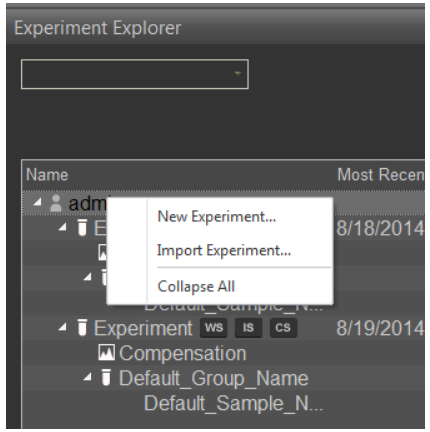
- 设置图片中的统计学参数：点击图片，在统计学参数***Statistics*** 选项卡下，选择需要显示的统计学参数。

ThermoFisher SCIENTIFIC

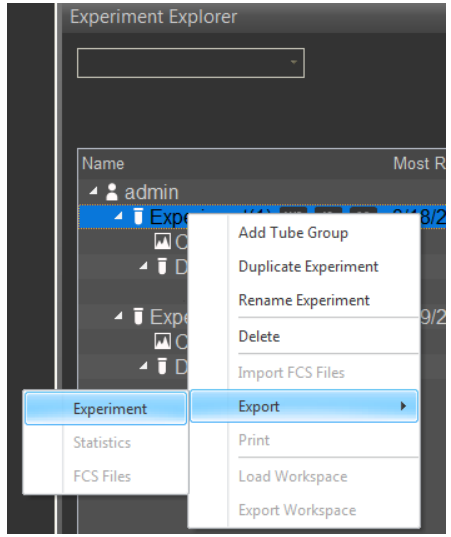
实验资源管理器 —— Experiment Explorer

- **上下文菜单 —— Context Menus**
- 鼠标右键单击将显示与资源管理器层次结构不同级别相关的菜单

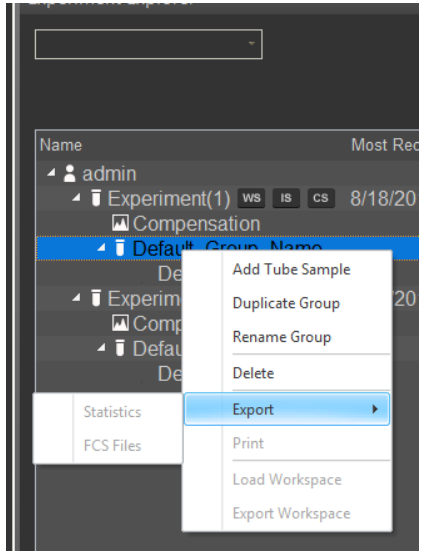
User



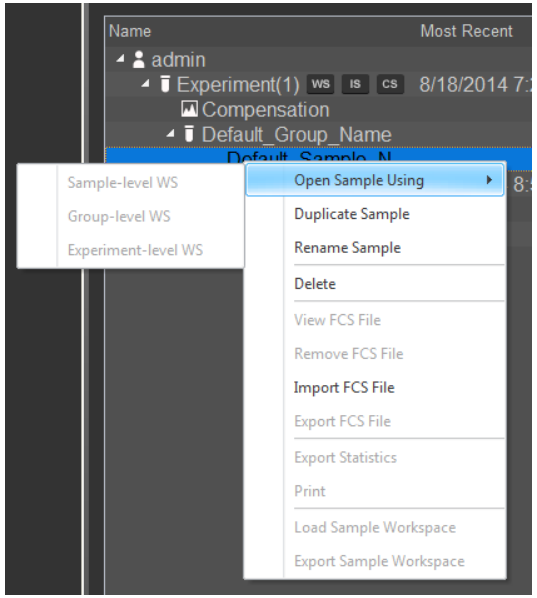
Experiment



Group



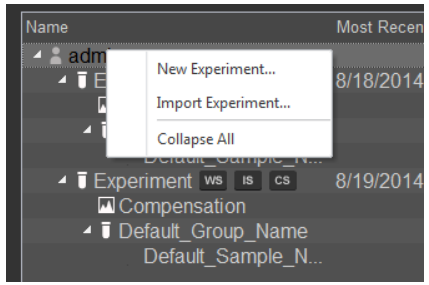
Sample



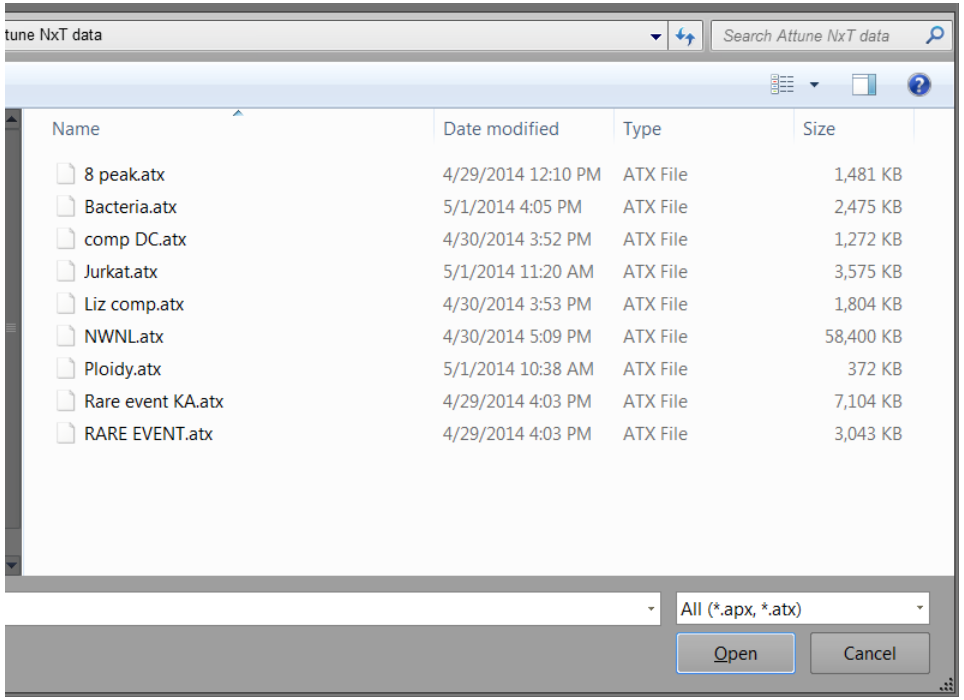
ThermoFisher SCIENTIFIC

实验的导入 —— Experiment Import

- 鼠标右键单击用户名，如admin，打开菜单栏。
- 选择***Import Experiment***。



- 在windows里选择相关路径。



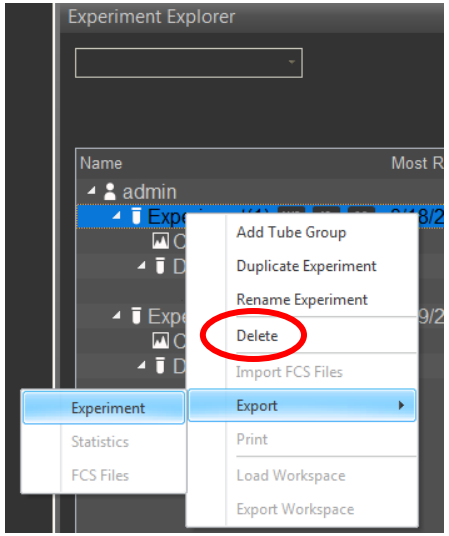
- 选择相对应的实验文件
  - .atx
    进样管Tube experiment
  - .apx
    进样板Plate experiment

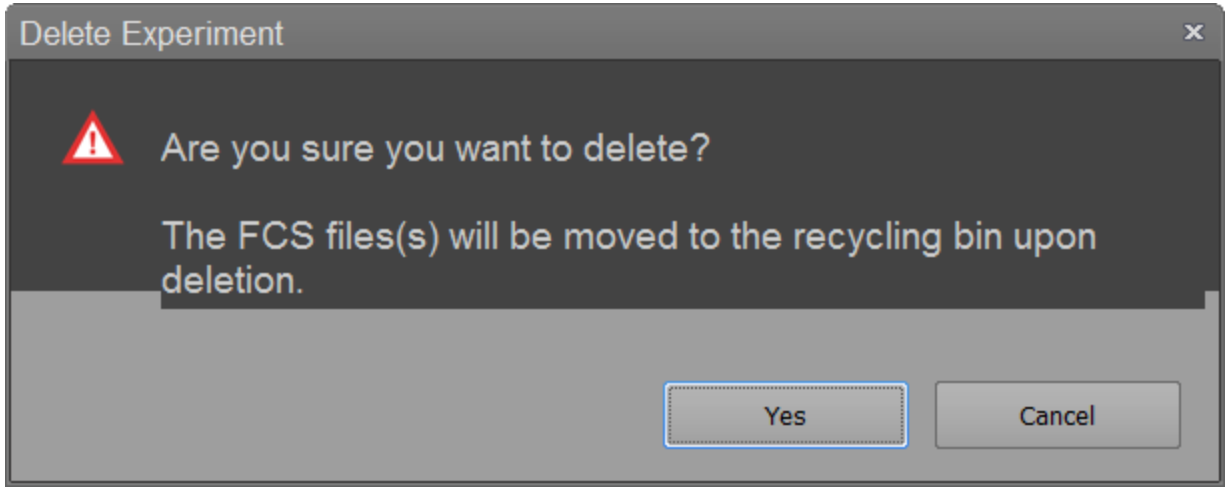
ThermoFisher SCIENTIFIC

文件管理 —— Delete

- 鼠标右键单击Experiment, Group 或者 Sample
- 选择 *Delete*
- 按提示操作删除所选文件

- 点击Ctrl键可以多选



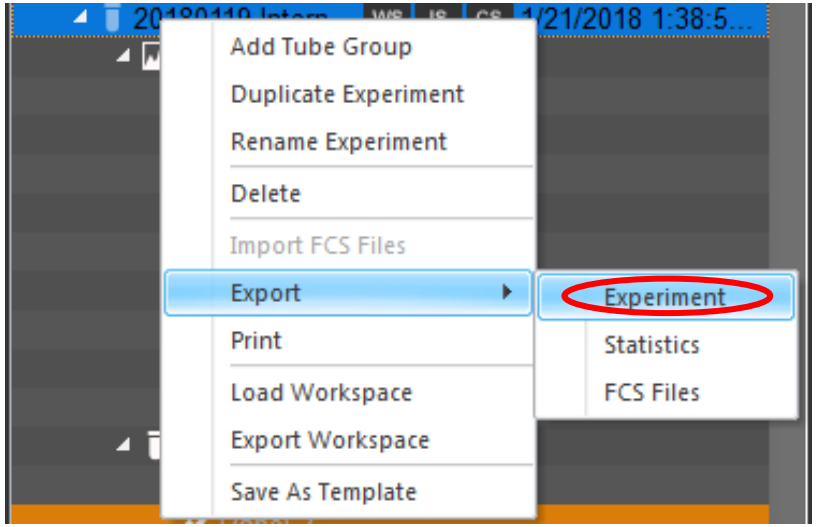


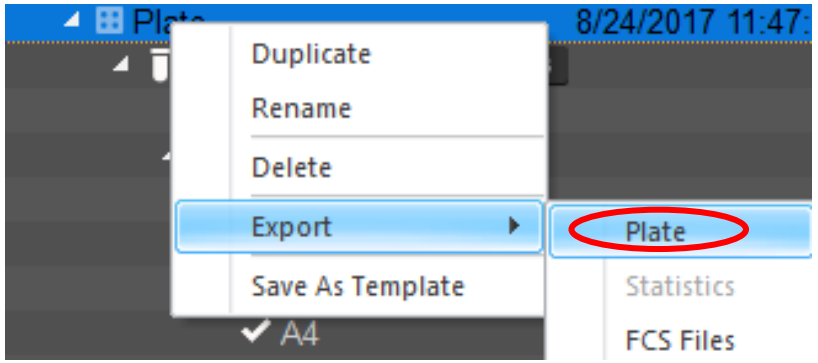
ThermoFisher SCIENTIFIC

数据管理 —— 导出 Experiment 或者 Plate

选择需要导出的Experiment或者Plate：

- 鼠标右键单击*Export*，选择*Experiment*或者*Plate*
- 导出的文件格式如下： .atx 样品管实验
  .apx 样品板实验



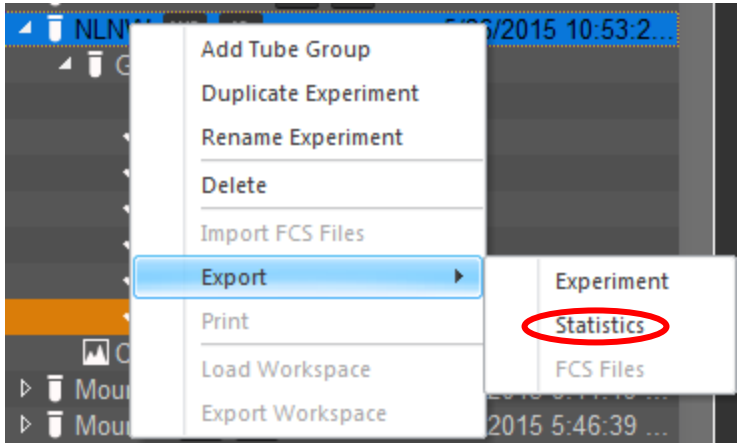


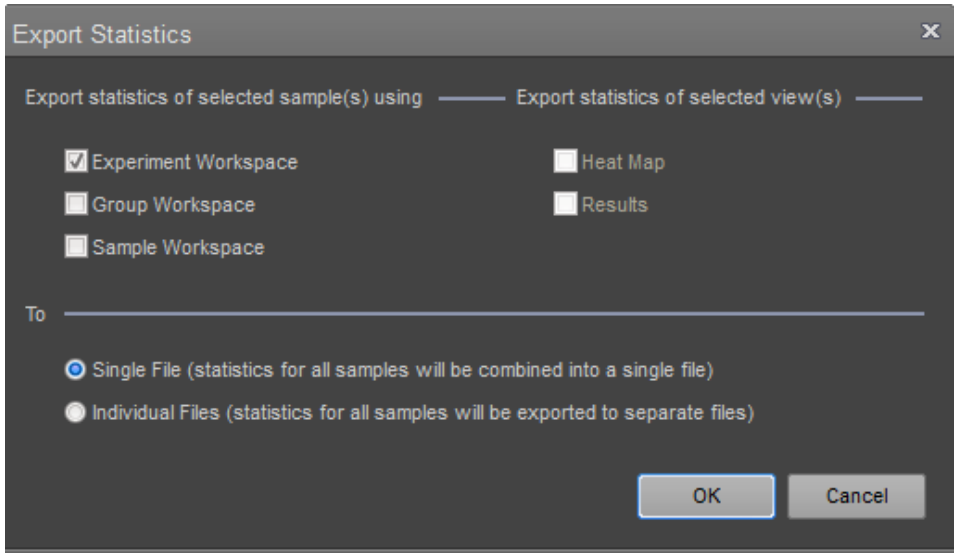
ThermoFisher SCIENTIFIC

数据管理 —— 导出统计学参数 Statistics

鼠标右键分别单击Experiment、Group或Sample文件，选择export：

- 选择导出*Statistics*
- 选择statistics的层级
- 选择生成单一文件*Single File* 或多个文件*Individual Files*
- 生成 .csv 文件



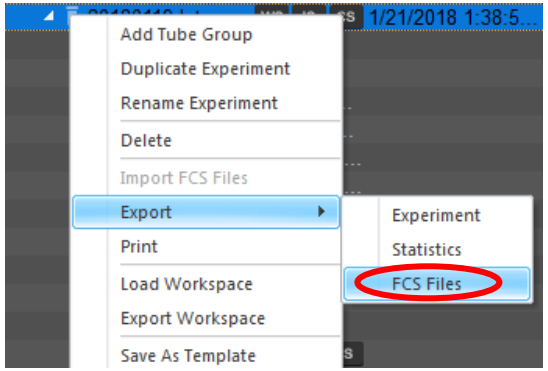


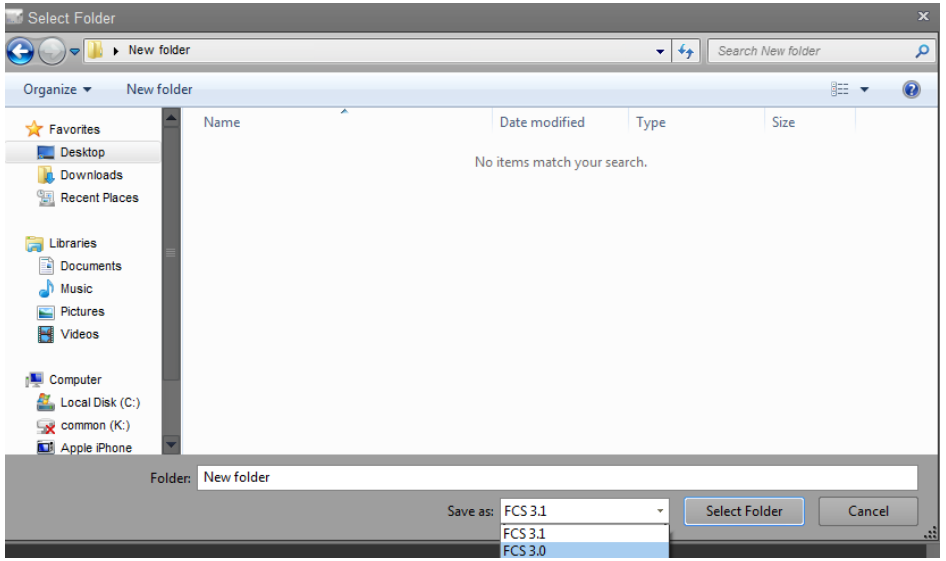
ThermoFisher SCIENTIFIC

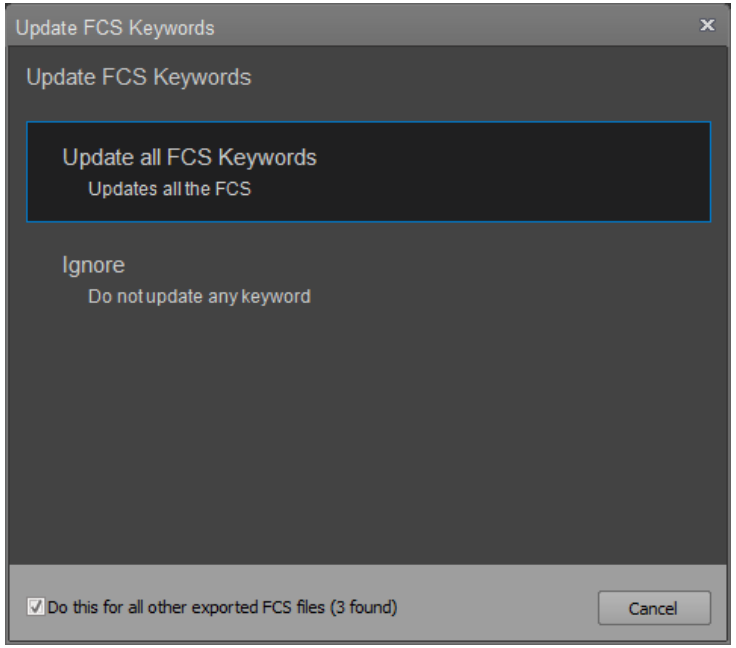
数据管理 —— 导出 .FCS 文件

鼠标右键分别单击Experiment、Group或Sample文件，选择export：

- 选择导出*FCS File*
- 选择希望保存的文件夹
- 选择*Do this for all other exported FCS files and Update all FCS Keywords*
- 导出.FCS文件





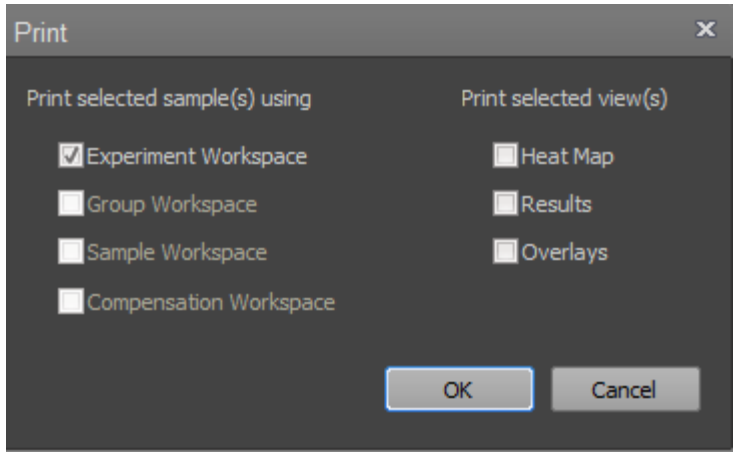


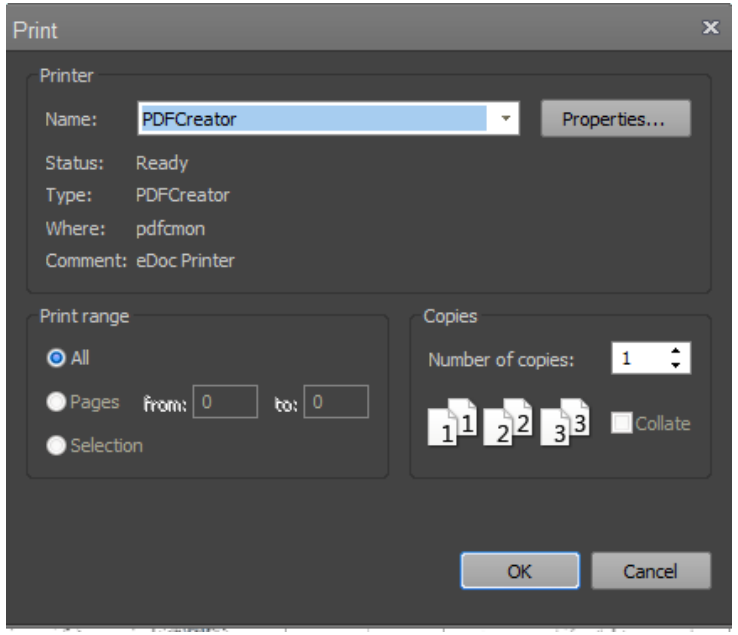
ThermoFisher SCIENTIFIC

数据管理 —— 导出 PDF 格式文件

鼠标右键分别单击Experiment、Group或Sample文件，选择Print:

- 选择需要生成PDF的种类，点击OK
- *选择Printer as PDFCreator*
- 虚拟打印PDF格式文件



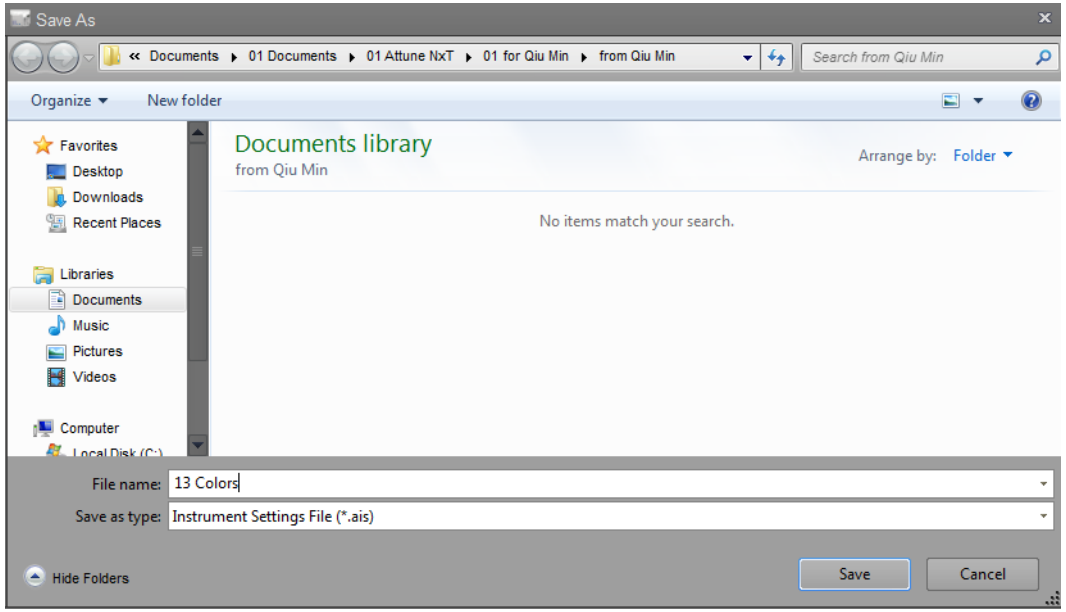


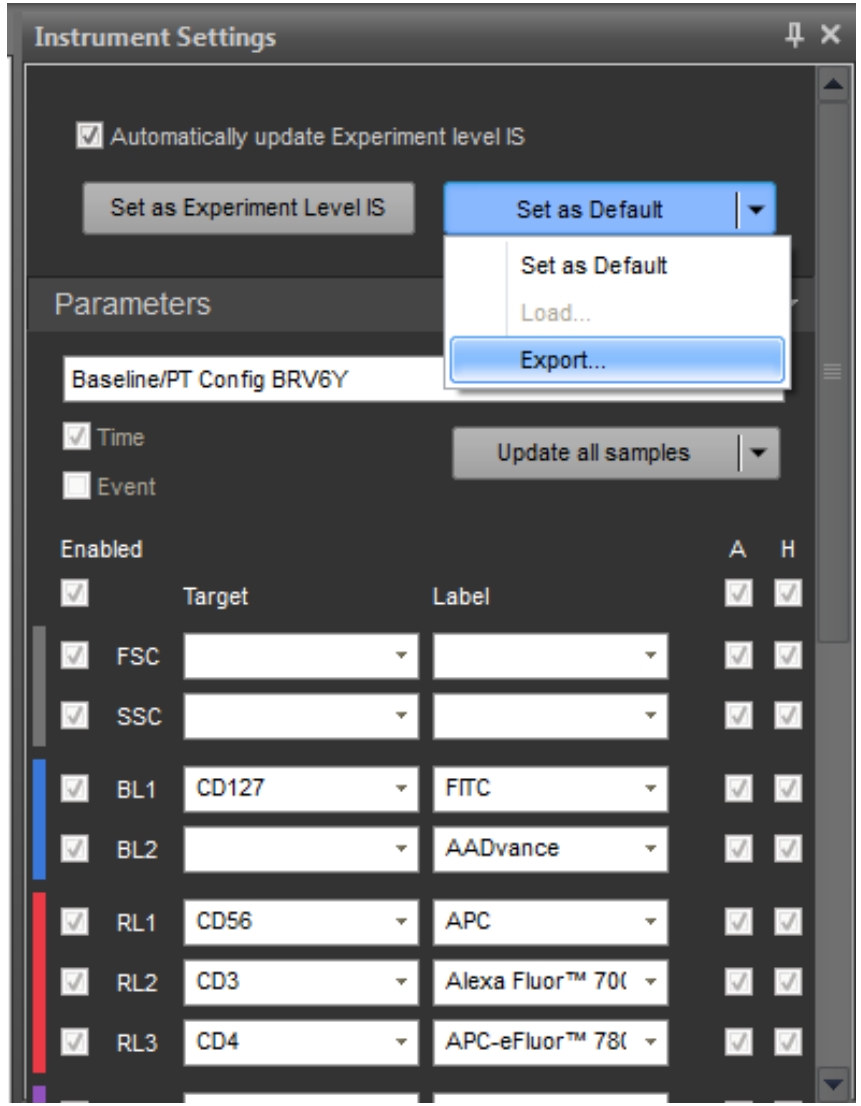
ThermoFisher SCIENTIFIC

数据管理 —— 导出工作区Instrument IS模块

选中Instrument Setting，左键点击Set as Default右边的下拉键，选择Export。

- 生成后缀名是.ais（attune instrument setting）的instrument setting模板文件





ThermoFisher SCIENTIFIC

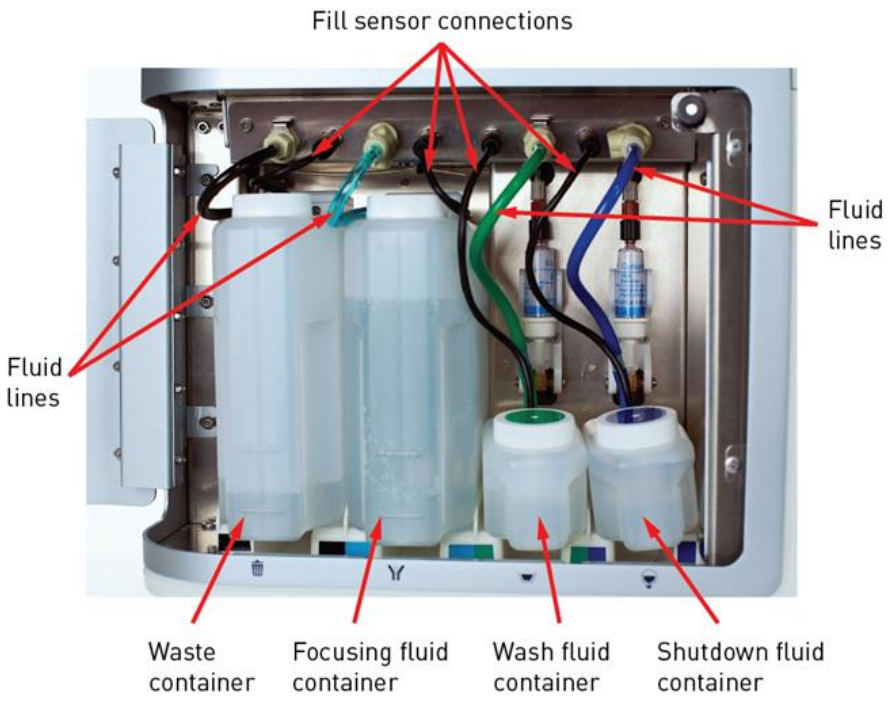
日常维护 —— Daily Maintenance

- 常规检查 —— Visual inspection
- 开机/关机 —— Startup/Shutdown
- 质控 —— Performance Test
- 实验间清洗 —— Clean between Experiments

ThermoFisher SCIENTIFIC

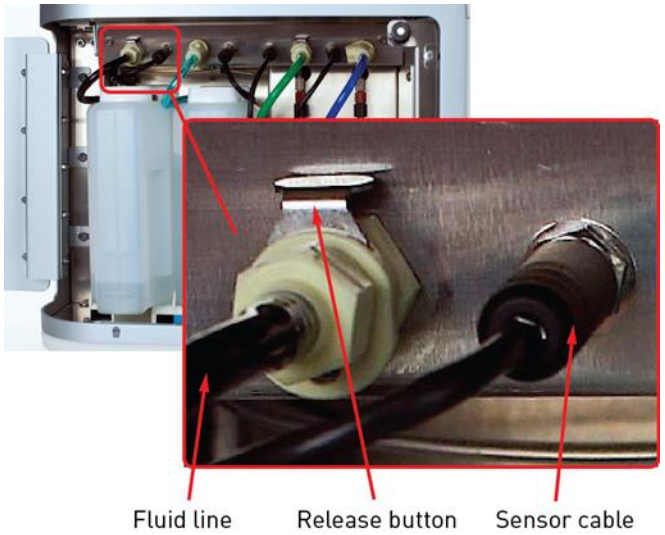
常规检查

- 液流系统外部检查：确保液流仓的底部、液流管路连接器周围没有液体或盐残留物。
- 检查各种液体的容量。根据需要填充或清空
  - 废液桶
  - 鞘液桶
  - 清洗液桶
  - 关机液桶
- 检查进样针及注射器状态



ThermoFisher SCIENTIFIC

检查各种液体的容量



1. 从仪器上拆下传感器电缆。
2. 按下金属释放按钮，取下液流管路。
3. 补充各种试剂
4. 将液流桶放回液流仓，接上液流管路，再接传感器电缆。

重点注意！

1) 当液流管路断开时，连接传感器电缆可能会增加背压，并将空气引入系统。
2) Attune NxT声学聚焦细胞计在重新填充流体容器之前必须处于空闲状态。

ThermoFisher SCIENTIFIC

Startup / Shutdown

开机 —— Startup

- 打开激光器
- 初始化泵
- 初始化液流系统
- 清空shutdown solution
- 确保仪器状态。

开机完成后可确认

- 所有液流管路和注射器泵充满新鲜的鞘液。
- 激光器处于待机工作状态。

关机 —— Shutdown

- 消毒仪器
- 清洗和冲洗液体管路
- 用关闭溶液灌装液体管道
- 需要10%的新配制的Bleach。

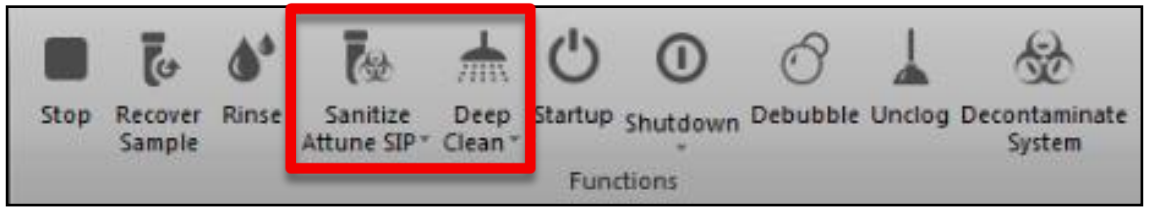
Shutdown option	Nb of Cycles Duration	When?
Quick	5cycles/25min	Few samples
Standard	15cycles/55min	Standard Applications
Thorough	25cycles/75min	Sticky samples or dyes, NLNW…

关机完成后可确认

- 用防止晶体形成和气泡的溶液填充液流管路。

ThermoFisher SCIENTIFIC

实验间清洗

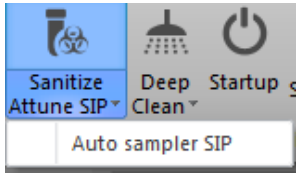


清洗进样针 —— Sanitize SIP

进样针及进样管路的快速清洗/消毒

持续时间：1 min

需要3 mL的10%Bleach

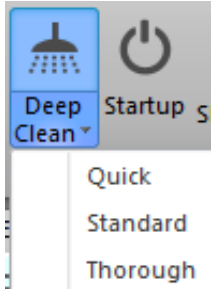


深度清洗（可选）—— Deep Clean

使用漂白剂和清洗液的消毒系统，可选择一段时间。

三个层次：

Quick	5 cycles/10 min
Standard	15 cycles/40 min
Thorough	25 cycles/60 min



如果对仪器清洁度要求很高，清洗进样针不能够满足，可以进行深度清洗

ThermoFisher SCIENTIFIC