

ATTUNE NXT 基礎培訓

上機應用 2：儀器設置

在本單元中，您將在 Attune NxT 流式細胞儀上，以多種流速收集性能追蹤微球樣本。您將瞭解如何設置試管實驗，並手動調整收集和儀器設置。

學習目標：

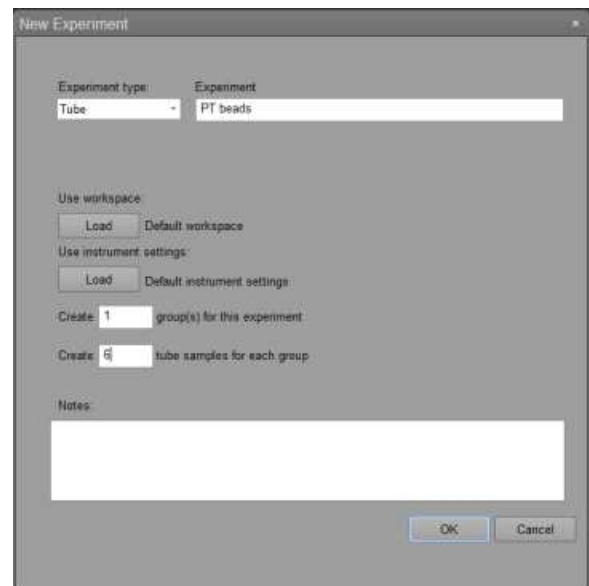
1. 瞭解如何創建新的試管實驗
2. 瞭解如何設置工作區，進行樣本收集和分析
3. 瞭解如何使用收集面板運行樣本
4. 瞭解如何調整儀器設置，包括 PMT 電壓和閾值

本實驗室需要：

- Attune® 性能追蹤微球
- 1x 調焦液或 1x PBS
- 流式管 (12x75mm 試管)

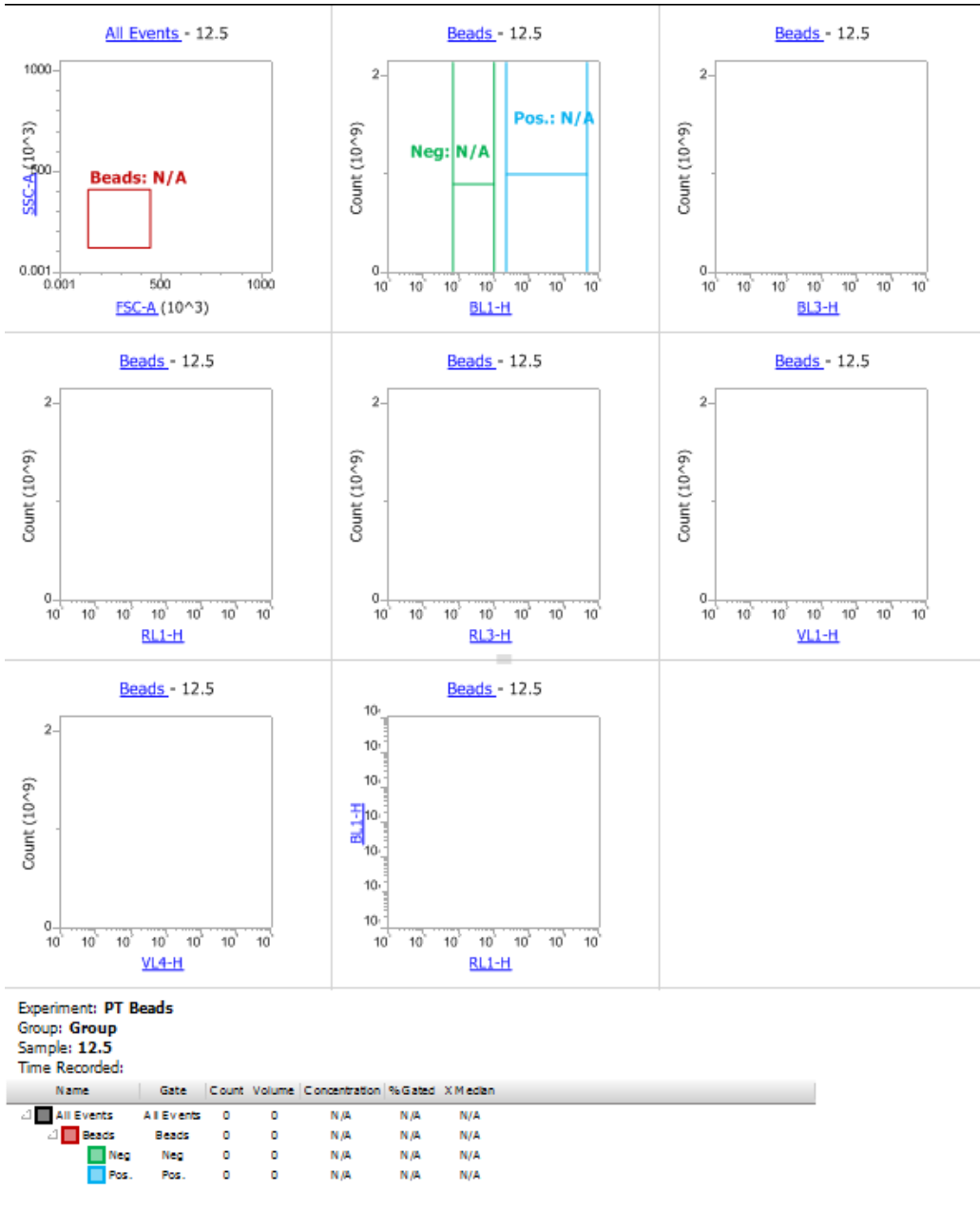
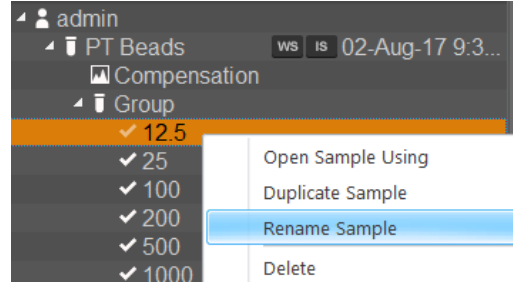
實驗室活動

1. 在主選單中選擇新實驗 (New Experiment)，或右擊實驗瀏覽器中的用戶名，從下拉選單中選擇“新實驗”(New experiment)。
2. 選擇實驗類型 (試管)，將實驗命名為“PT微球”(PT beads)。選擇1個群組和6個樣本 (每種流速1個)。
3. 滑鼠右鍵點擊實驗瀏覽器中的群組名稱和樣本名稱，以重新命名。將群組標記



為“PT微球”(PT beads)，按照流速標記樣本

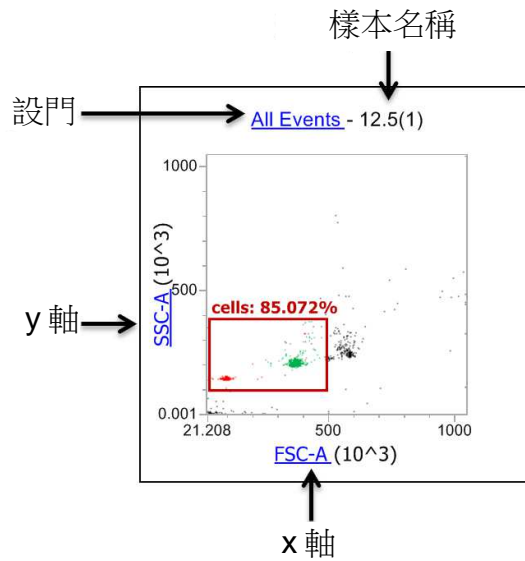
4. 在“儀器設置”(Instrument Settings) 標籤頁下，打開“參數”(parameters)，確認所有通道已打開。
5. 在中間的工作區中，使用“工作區”(Workspace) 中的工具，生成如下的工作區。



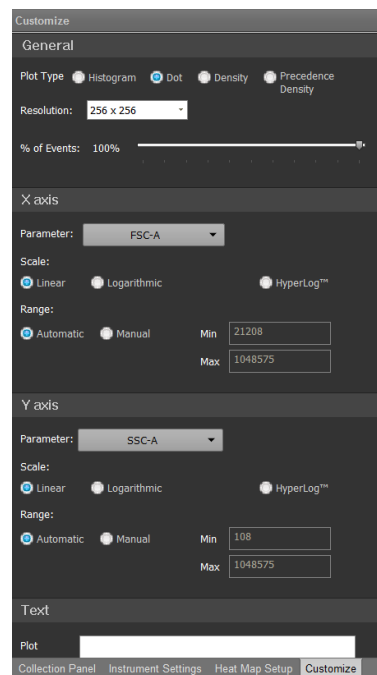
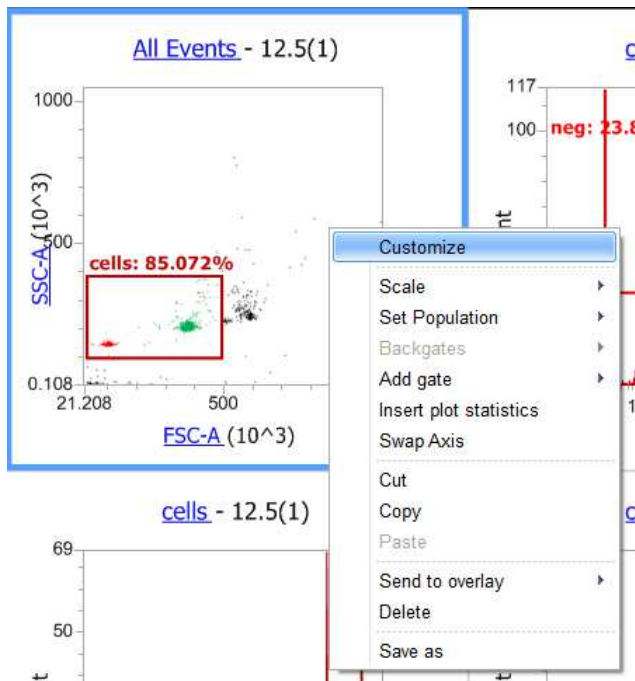
小技巧：您可以使用密度圖，利用熱圖顏色反映事件密度，或使用散點圖反映圈門 (gate)。前導密度圖顯示密度及反向圈選。使用密度圖顯示FSC/SSC

小技巧：點擊數軸名稱 (如FSC-A) 以更改參數。

點擊圈門(gate)名稱 (如“所有事件”(All Events)) 以更改圈門(gate)

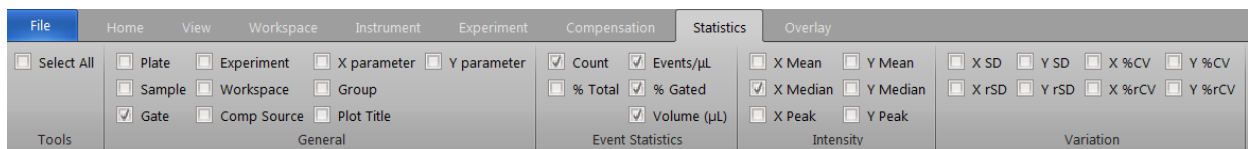


小技巧：選擇圖表(plot)或圈門(gate)，在自定義標籤頁中定義數軸、名稱或顏色。

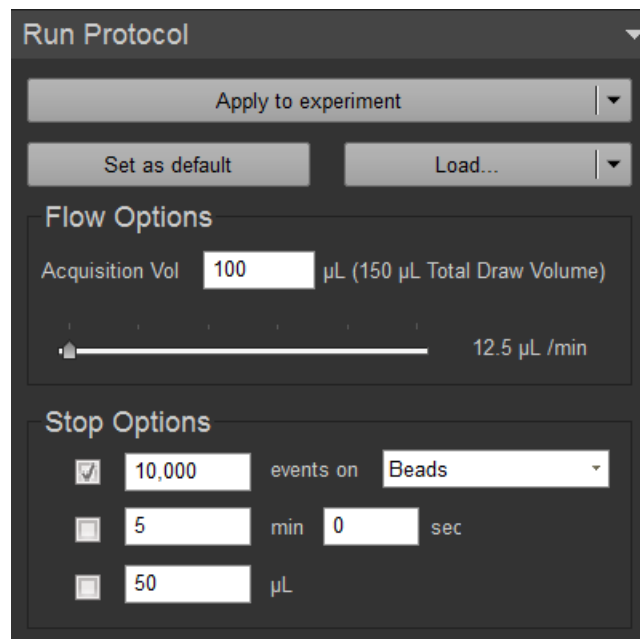


小技巧：複製並貼上，以重製圖譜

小技巧：在工作區功能區中選擇“統計指標”(Statistics)，以創建統計指標。通過先點擊統計指標，在“統計指標”(Statistics) 功能區中選擇統計指標類別，選擇您需要的統計指標。



6. 選擇“收集面板”(Collection Panel) 標籤頁，以更改收集設置。按如下所示更改。全部設置好後，切記選擇“應用於實驗”(Apply to experiment)。



您現在將設置FSC和SSC以及各通道的電壓。

7. 將試管置於試管升降器上。沖洗試管升降器。按下運行 (Run)。
8. 打開儀器設置標籤頁。打開電壓 (Voltage) 下拉選單。

9. 調整FSC和SSC電壓，使微球群體符合比例。一般而言：升高電壓將使群體或尖峰向數軸右側 (或上方) 移動。

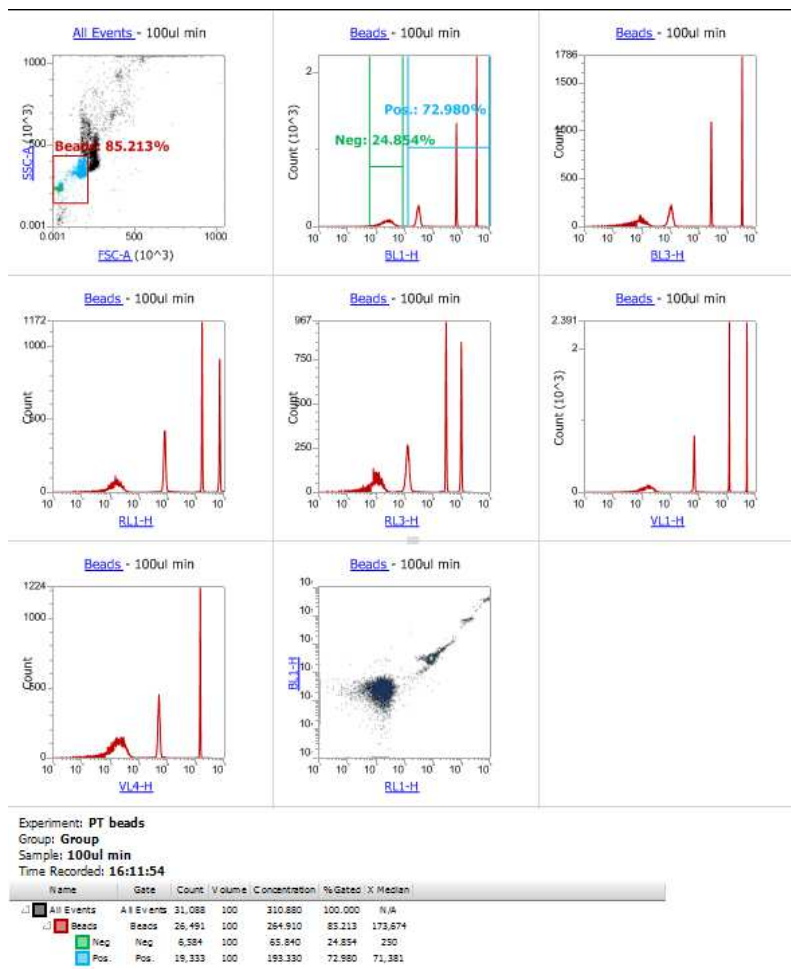


10. 移動圈門(gate)，以覆蓋較小和較大的微球群體。您還可以查看雙聚體及其他多聚體等多種群體。

11. 對於各螢光直方圖，提高或降低各通道的電壓，使**亮度最低的尖峰保持在 10^2 - 10^3 區域**。這稱為“電壓行走”(Voltage Walking)。總共應有4個尖峰。

12. 將最低的尖峰, 圈(gate)為“陰性”(Neg) 群體，其他3個尖峰為“陽性”(Pos) 群體。

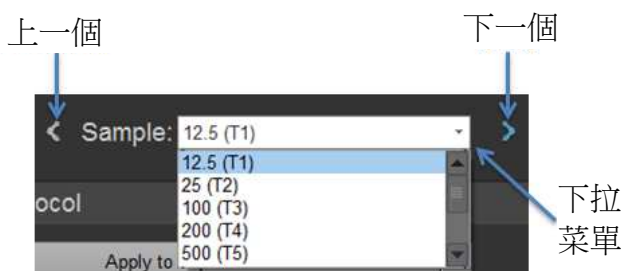
數據示例



13. 調整好所有電壓後，按下停止 (STOP)，降下試管升降器進行沖洗。



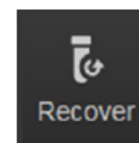
14. 調整運行實驗方案中的速度，開始收集各樣本。文件成功記錄後，其名稱左邊將出現勾號。通過雙擊名稱或在收集面板中使用下列選項，滾動至下一個樣本。



注：確保試管升降器已降低，啓動沖洗循環。沖洗循環可以降低殘餘污染，並將提升結果的品質。可以在不降低試管升降器的情況下多次運行樣本，但一直如此會導致數據品質較差。

15. 利用下列方法模擬重新記錄樣本：右擊樣本名稱，選擇刪除fcs文件，重複樣本收集

16. 點擊出現在停止 (STOP) 按鈕位置的**回收樣本 (Recover Sample)** 按鈕，進行樣本回收。遵循屏幕上的指示操作。



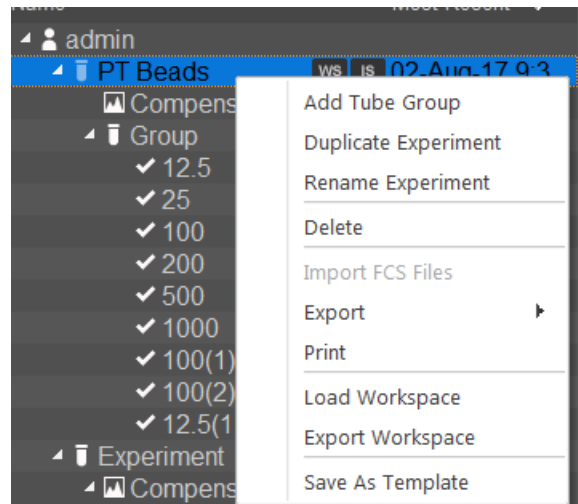
回收樣本：您可以回收未使用的樣本。當儀器狀態為空閒 (即未主動收集) 且樣本回路中有足夠的樣本或足夠的預先加載的樣本可供回收時，可以啓用該按鈕。按下按鈕，剩餘的樣本將返回到試管 (從樣本回路) 或樣本孔 (反應板中預先加載的樣本) 中。

17. 收集完所有樣本後，執行關機-快速方案

額外活動：使用 **FSC/SSC** 曲綫中的反向圈選，瞭解陰性微球是屬於較小還是較大的微球群體。

數據處理方案

18. 通過右擊實驗名稱並選擇輸出“實驗”(Experiment)，輸出實驗 (.atx文件)。保存至桌面。



19. 通過右擊實驗名稱並選擇輸出“FCS文件”(FCS files)，輸出FCS文件。保存至適當的文件夾。
20. 通過右擊實驗名稱並選擇刪除，刪除實驗。
21. 通過右擊用戶名並選擇輸入實驗，輸入實驗。
22. 可選：將該實驗保存為模板
23. 複製整個實驗，將每個設定複製至新實驗。
24. 創建新實驗，通過拖放WS徽章，複製“PT微球”(PT beads) 實驗的工作區。通過拖放IS徽章，複製儀器設置。
25. 可選：保存儀器設置、工作區和運行實驗方案