

文件编号:

版本号:

受控状态:

分发号:

# 物质科学公共实验平台

## 质量管理文件

### 单颗粒纳米生物检测仪（纳米流式检测仪） （NanoFCM U30） 标准操作规程

2023 年 02 月 09 日发布

年 月 日实施

物质科学公共实验平台 发布

物质科学公共实验平台



物质科学公共实验平台

## 目录

1. 目的	1
2. 范围	1
3. 职责	1
4. 综合物性分析实验室安全管理规范	1
5. 综合物性分析实验室仪器设备管理规范	1
5.1. 预约制度	2
5.2. 培训考核制度	3
6. 实验内容	3
6.1. 系统组成	3
6.2. 样品的准备	4
6.3. 单颗粒纳米生物检测仪（纳米流式检测仪）系统启动	4
6.4. 单颗粒纳米生物检测仪（纳米流式检测仪）日常质控	6
6.5. 单颗粒纳米生物检测仪（纳米流式检测仪）样品测试流程	10
6.5.1 浓度标准品（QC beads 250 nm SiNPs）检测	11
6.5.2 粒径标准品（QC beads 250 nm SiNPs）检测	12
6.5.3 空白对照检测	13
6.5.4 样品检测	13
6.6 数据分析	14
6.6.1 样品粒径数据分析	14
6.6.2 样品浓度分析	16
6.6.3 荧光数据分析	18
6.7 仪器关机	20
6.8 注意事项	21
7. 相关/支撑性文件	23
8. 记录	23

物质科学公共实验平台

## 1. 目的

建立单颗粒纳米生物检测仪（纳米流式检测仪）标准操作规程，使其被正确、规范地使用。

## 2. 范围

本规程适用于所有使用单颗粒纳米生物检测仪（纳米流式检测仪）(NanoFCM U30)的用户。

## 3. 职责

3.1. 用户：严格按本规程操作，发现异常情况及时汇报设备管理员。

3.2. 设备管理员：确保操作人员经过相关培训，并按本规程进行操作。

## 4. 综合物性分析实验室安全管理规范

4.1. 严格遵守综合物性分析实验室的各项安全注意警示标识。

4.2. 实验室通道及消防紧急通道必须保持畅通，所有实验人员应了解消防器具与紧急逃生通道位置。

4.3. 严禁戴手套接触门把手。禁止随意丢弃实验废弃物。禁止将锐器、玻璃等丢弃在常规垃圾箱中。

4.4. 实验室应保持整洁，禁止携带食物饮品等与实验不相关物品进入实验室。严禁在实验室进食与抽烟。严禁动物进入实验室。

4.5. 实验室内存放的药品、试剂、废液应标签、标识完整清晰。

4.6. 实验室内均为大型科研设备，有专人负责管理，未经培训人员，不得擅自上机使用；经过培训的用户，需使用预约系统，使用本人的账号进行登录使用。

4.7. 非常规实验测试须经设备管理员同意并指导方可进行。个人 U 盘、移动硬盘等易带入病毒的存储设备不得与仪器电脑连接。

4.8. 实验过程中如发现仪器设备及基础设施发生异常状况，需及时向该仪器负责人或实验室负责人反馈。严禁擅自处理、调整仪器主要部件，凡自行拆卸者一经发现将给予严重处罚。

4.9. 为保持实验室内环境温度及湿度，保持实验室门窗关闭。实验结束后，实验人员必须进行清场。最后离开实验室人员需检查水、电、门窗等。

## 5. 综合物性分析实验室仪器设备管理规范

该仪器遵从学校“实验室与科研设施部”对大型仪器设备实行的管理办法和“集中投入、统一管理、开放公用、资源共享”的建设原则，面向校内所有教学、科研单位开放使用；根据使用情况适当收取费用；并在保障校内使用的同时，面向社会开放。

单颗粒纳米生物检测仪（纳米流式检测仪）样品测试方案分为四类：

- (1) 培训测试：用户提出培训申请，技术员安排培训。培训内容包括：单颗粒纳米生物检测仪（纳米流式检测仪）各部分功能介绍；样品要求、仪器的标准操作流程、数据处理及测试注意事项等；
- (2) 自主测试：用户在培训考核合格后在预约时间段内，独立完成样品的制备、测试、数据分析及数据上传等；校内用户以自主上机为主；
- (3) 送样测试：用户提供样品准确信息及测试要求；技术员负责制样、装样、操作仪器进行测试并做基本数据处理；
- (4) 维护/开发测试：技术员定期维护仪器及其配套附属设备，检测仪器性能；基于用户的特殊测试需求，开发新方法/技术；

该仪器的使用实行预约制度，请使用者根据样品的测试要求在学校“大型仪器共享管理系统”（以下简称大仪共享）进行预约，并按照要求登记预约信息。

使用物质科学公共实验平台的仪器设备、或得到平台技术人员的支持协助，获得相应成果，应在发表的文章中对平台予以致谢，建议致谢方式参见 <https://iscps.westlake.edu.cn/info/1129/1462.htm>。

### 5.1. 预约制度

为充分利用仪器效能、服务全校科研工作，根据测试内容与时间的不同，综合物性分析实验室制定了单颗粒纳米生物检测仪（纳米流式检测仪）7\*24 小时预约制度。

- (1) 校内使用者须经过技术员的实验操作培训，考核合格后方可上机使用；
- (2) 实验开始时务必在实验记录本上登记，结束时如实记录仪器状态；
- (3) 严禁随意移动仪器。严禁擅自处理、拆卸、调整仪器主要部件。使用期间如仪器出现故障，使用者须及时通知技术员，以便尽快维修或报修；隐瞒不报者将被追究责任，加重处理；
- (4) 因人为原因造成仪器故障的（如硬件损坏），其导师课题组须承担维修费用；
- (5) 使用者应保持实验区域的卫生清洁，测试完毕请及时带走样品，技术员不负责保管。使用者若违犯以上条例，将酌情给予警告、通报批评、罚款及取消使用资格等惩罚措施。



## 5.2. 培训考核制度

校内教师、学生均可提出培训申请，培训内容包括仪器使用规章制度、基本硬件知识、标准操作规程和注意事项等。

仪器管理员认为培训者达到相应级别的独立操作水平后，给予培训者授权在相应级别所允许的可操作实验范围内独立使用仪器。如果在各级别因为人为操作错误导致仪器故障者，除按要求承担维修费用之外，给予降级重考惩罚、培训费翻倍。

## 6. 实验内容

### 6.1. 系统组成

单颗粒纳米生物检测仪（纳米流式检测仪）（Flow NanoAnalyzer）可实现亚细胞结构、细菌、病毒、外泌体等天然生物纳米颗粒以及功能化纳米颗粒的表征，为流式分析技术打开了通往纳米世界的窗口。通过对单个纳米颗粒（7-1000nm）的粒径及其分布、颗粒浓度、以及生物化学性状的高分辨、高选择性、高通量检测，纳米流式检测仪为生命科学和生物医学研究以及纳米科技的发展提供了一个强有力的表征手段。仪器基本参数为：

- （1）激光器：488nm 和 638nm 全固态激光器；
- （2）检测器：单光子检测模块；
- （3）检测通道：SSC, FITC, PE, PC5；
- （4）粒径范围：7 - 1000 nm (>200nm 粒径测试结果准确性差)；
- （5）荧光灵敏度：FITC < 10 MESF, PE < 1 MESF；
- （6）样品流速：2 - 60 nL/min；
- （7）样品量：10 - 100  $\mu$  L；
- （8）获取速率：10,000 events/min；
- （9）可插拔式滤光片，支持通道配置更改；



图 6-1

## 6.2. 样品的准备

合适浓度的样品分散在溶剂（一般为水）中，样品量 10 - 100  $\mu$  L。

所有样品均置于 0.6ml 离心管中。

重要：样品体积不得超过 100  $\mu$  L，洗液和超纯水的体积为 150  $\mu$  L。

## 6.3. 单颗粒纳米生物检测仪（纳米流式检测仪）系统启动

- (1) 按预约时间登录基理系统。
- (2) **开机前检查（十分重要）**：检查洗液液面高度（>10 mL）以及鞘液与废液的液面高度差（20-30 cm）。

洗液瓶在仪器右侧门内；洗液浓度为 1X，需要过 0.2 $\mu$ m 滤膜后方可使用；

为保证鞘液洁净和新鲜，每次测试前使用新的瓶装水；架子高度可通过螺钮调节；观察废液瓶中废液量，如较多；倒掉部分废液，瓶底保留约 0.5cm 高度废液并确保废液瓶内吸管头在液面以下；

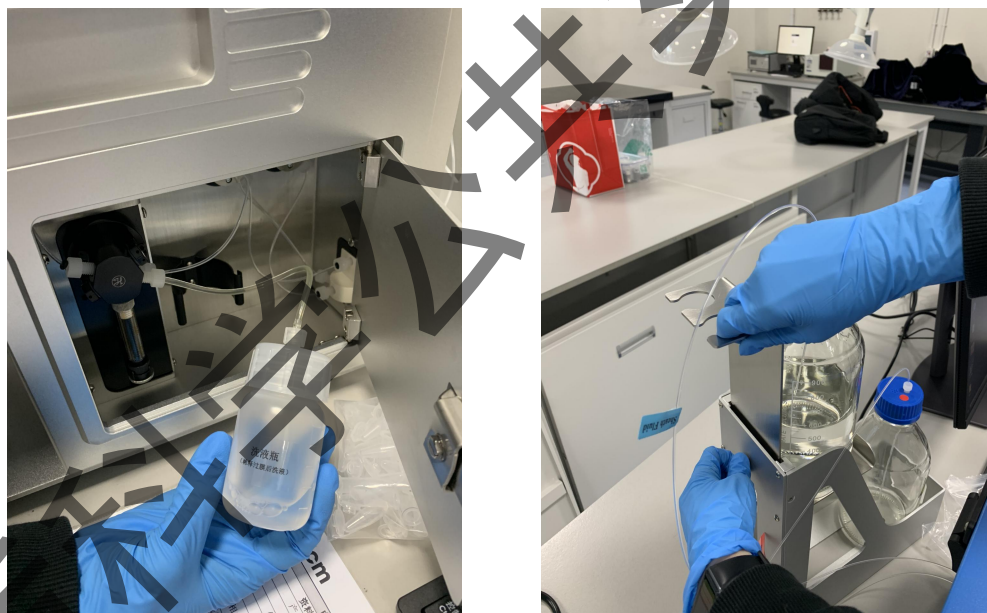



图 6-2

- (3) 检查滤光片，默认 488/10、525/40 和 670/30，根据需要可将 670/30 滤光片换为 580/40 滤光片（注意确认滤光片与软件设置相同）。

- (4) 开启仪器的主电源（仪器背面），等待 20 s。

- (5) 运行 NF Profession 2.0 软件 ，当听到两声“滴——滴——”的声音表示仪器连接成功。

- (6) 系统初始化：点击 Start Up，此时相机、激光和空气泵已开启。

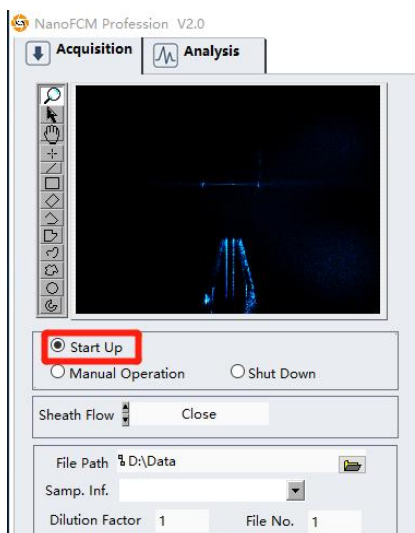


图 6-3

(7) 液流初始化：上样台放置超纯水（150 μL），点击Sample Flow——Boosting；同时启动液流系统，点击Sheath Flow——Start Up，液流初始化5 min，完成后会自动变为Sheath Flow——Normal。

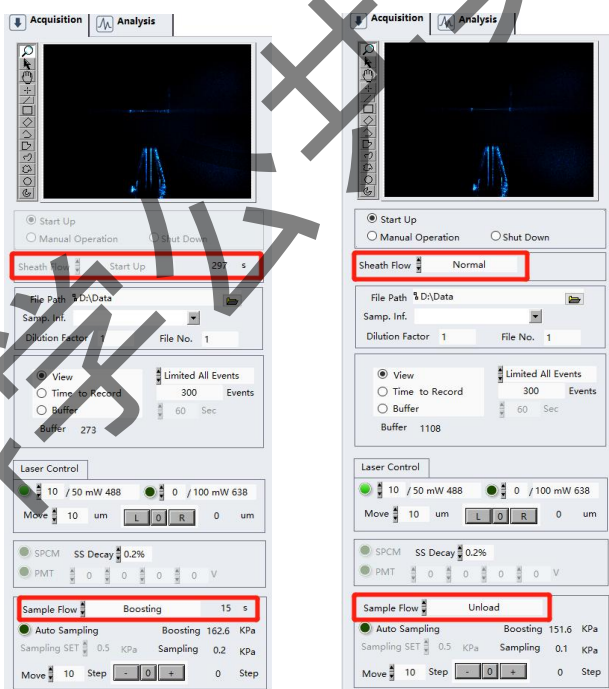


图 6-4

(8) 排除气泡：点击Sheath Flow——Empty Sheath，完成后点击Sheath Flow——Purge。完成后，Sheath Flow 的状态会自动切换到Normal。观察仪器右侧门内的管路是否残留气泡，如有，重复此操作直至管路内无残留气泡。

完成后，点击Sample Flow——Unload。

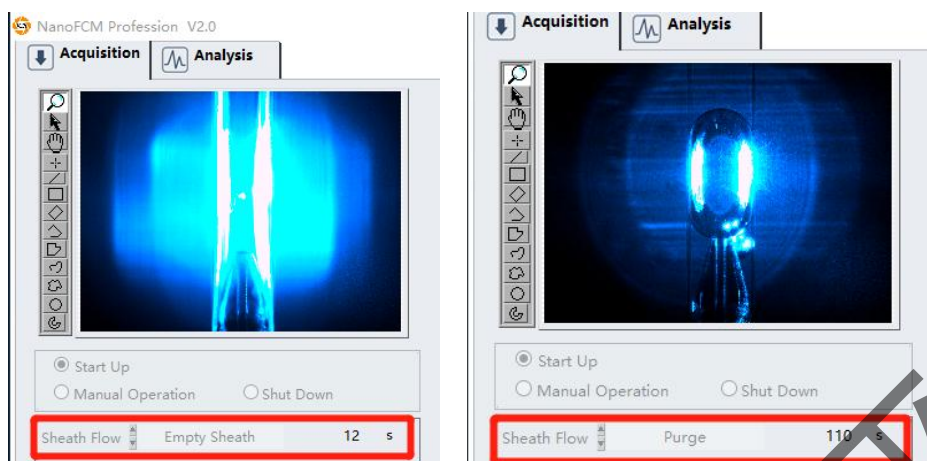


图 6-5

#### 6.4. 单颗粒纳米生物检测仪（纳米流式检测仪）日常质控

仪器每次开机均需要检查光路状态，必要时进行调节。

(1) 点击 Manual Operation 切换到数据采集模式，SPCM检测器自动开启。Auto Sampling 开启，并且下方 Sampling SET 为 1.0 kPa。

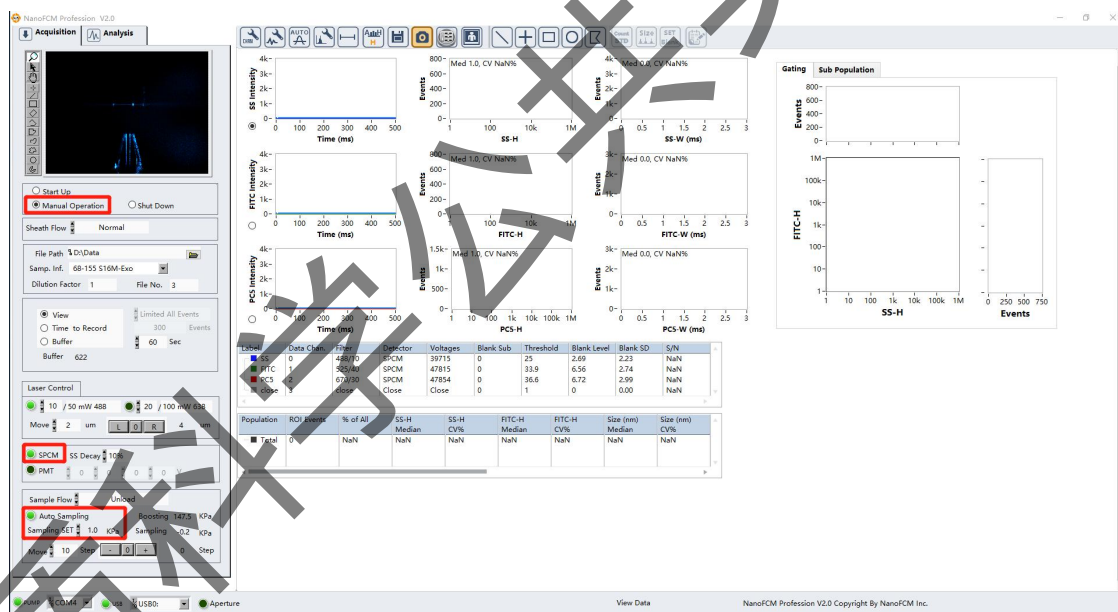


图 6-6

(2) 准备一管稀释后的质控球标样（QC beads 250 nm SiNPs）。原浓度标样放在4°C冰箱内，使用完后务必及时放回4°C冰箱内。将原浓度标样稀释100倍（即1μL标样稀释于99μL水中）后获得的100 μL样品待用。稀释前后样品均需要涡旋振荡5s以上后再使用和测试，注意样品溶液底部不可有气泡。

**注意：**质控球标样（QC beads 250 nm SiNPs）同时也是浓度标样，为获得更准确的浓度数据，应采用更大的样品量稀释100倍，即5μL标样稀释于495μL水中后，取100 μL稀释

后样品待用；或者梯度稀释，即取1 $\mu$ L原浓度标样先稀释10倍后再稀释10倍。

(3) 稀释后的质控球标样（100 $\mu$ L）放置在上样台，点击Sample Flow——Boosting，时间60 s。同时打开638nm激光器，手动输入功率设为20(mW)，即双激光光路校准。

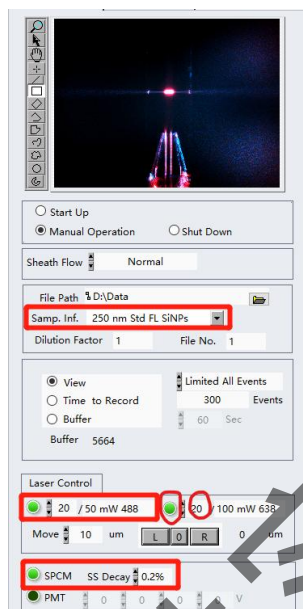


图 6-7

(4) 在Samp.Inf 中选择对应的质控球标样名称（250-nm Std FL SiNPs），仪器默认参数为Laser Control: 20 / 50 mW 488, SS Decay: 0.2%，一般不要手动更改激光和检测器参数。

(5) 可选步骤：Boosting质控球时能在相机窗口中看到明亮的光斑则跳过此步；如果光斑很弱或无光斑，则需调节激光聚焦水平位置（Move值为10 $\mu$ m）使光斑最亮，点击L或R。

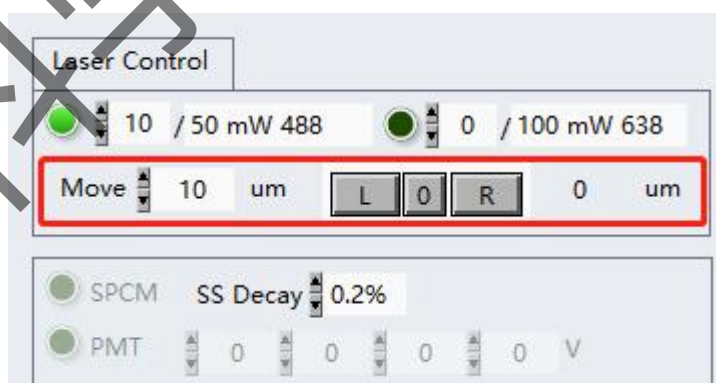



图 6-8

(6) 点击Sample Flow——Sampling，此时图形区可见实时信号波形图，点击工具栏 并选择Large signal（自动设置阈值）。

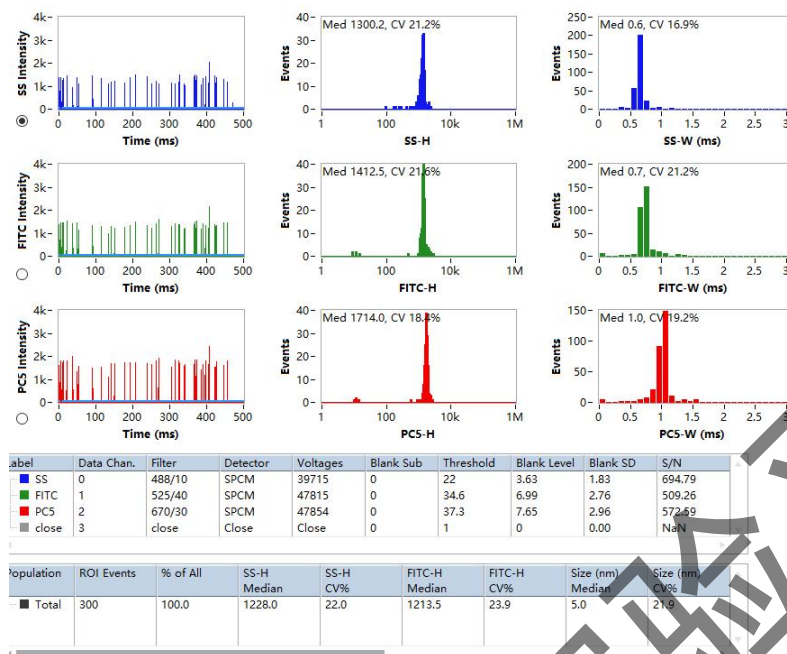


图 6-9

(7) 调节激光的水平位置，设置激光步长（Move）为2 μm，点击L或R使信号最强且均一。

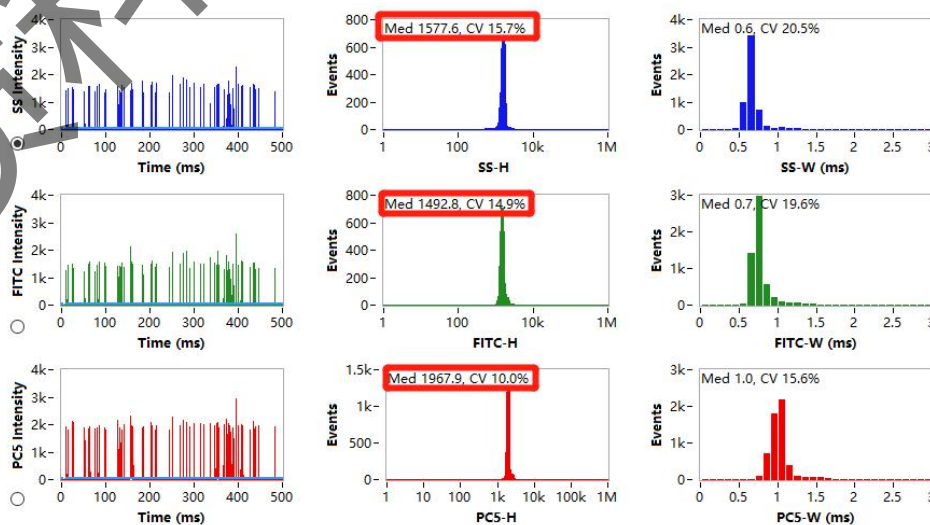


图 6-10

(8) 调节第一个荧光通道FITC检测器前的XY平移调整架，先X轴后Y轴，使信号最强且均一。



图 6-11

(9) 调节第二个荧光通道PC5检测器前的XY平移调整架，先X轴后Y轴，使信号最强且均一。

(10) 调节散射光通道SS检测器前的XY平移调整架，先X轴后Y轴，使信号最强且均一。

(11) 重复(7)~(10)，直至所有通道的信号最强且均一。仪器在正常情况下，一般无需过大的调节。

(12) 点击Time to Record 采集数据，数据采集完成后，跳转至Buffer 状态，同时软件跳出弹框，点击save按钮保存数据为Nfa File；点击Sample Flow——Unload。

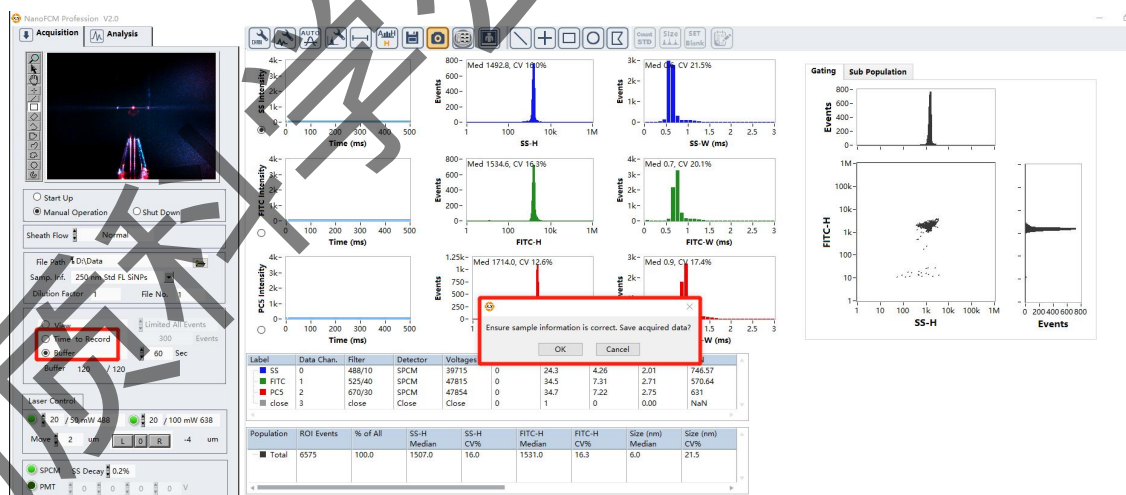


图 6-12

(13) 放置一管洗液（150 μL），点击Sample Flow——Boosting，清洗管路至少60 s，样品浓度过高时，延长清洗时间。点击Sample Flow——Unload完成清洗，取出洗液。手动放入一管超纯水用于润洗管路外壁，防止交叉污染。

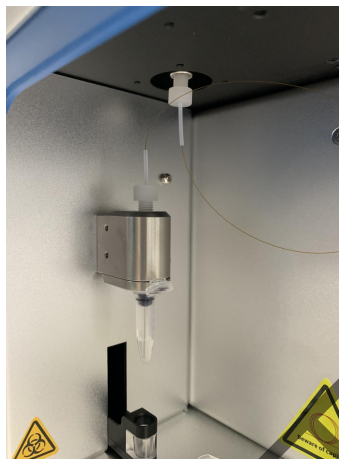
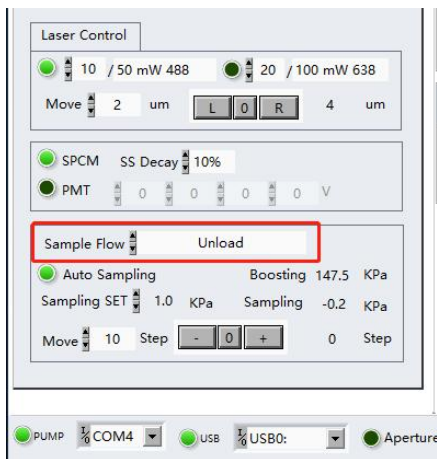


图 6-13

**注意事项：**建议一管洗液最多清洗5次。上样浓度较高时，洗液需及时更换。  
 放置或拿取样品管时，不允许对毛细管造成外力作用。  
 样品如果会和洗液发生反应，则不使用洗液进行清洗。

### 6.5. 单颗粒纳米生物检测仪（纳米流式检测仪）样品测试流程

基于不同的检测目的，需要进行不同标样测试，如下表：

	粒径检测	浓度检测	生化标记
<b>S16M-Exo</b> (5~10 mW, 10%, 1.0 kPa)	✓		
<b>Sample</b> (5~10 mW, 10%, 1.0 kPa)	✓	✓	✓
<b>Blank Control</b> (5~10 mW, 10%, 1.0 kPa)	✓	✓	✓
<b>Counting Standard</b> (20 mW, 0.2%, 1.0 kPa)		✓	

- **粒径标样：**S16M-Exo ( Silica Nanospheres Cocktail 68-155 nm, 100 times dilution) 用于EVs 检测，如外泌体及其他折射率相近的纳米粒子。
- **浓度标样：**Counting standard beads ( QC beads 250 nm SiNPs, 即前述质控球, 100 times dilution ) 作为浓度标准品用于浓度定量。

说明：

#### 一、浓度检测

浓度检测的原理是外标法，用已知浓度的标准品来标定样品的浓度，前提条件是标准品和样品检测时体积流量一致。

以外泌体浓度检测为例：



- 250 nm SiNPs 浓度标准品检测条件：20 mW (laser power) 0.2% (SS Decay)。
- 外泌体和空白对照检测条件：5~10 mW (laser power) 10% (SS Decay)。
- 浓度标准品和样品在相同Sampling压力下进行检测（如：1.0 kPa）。
- 稀释浓度标准品和样品检测粒子数在**4000-8000 particles/min**（最佳范围），**最高颗粒数不要超过12000 particles/min**。
- 250 nm SiNPs 浓度标准品建议稀释100倍。

## 二、粒径检测

粒径标准品、空白对照和待测样品均需要在相同检测条件（激光功率和散射通道衰减系数等）下采样。

以外泌体常规检测为例：

- 68-155 nm 粒径标准品常规检测条件选择仪器默认条件，同时待测样品和空白对照也在此条件下检测。
- 若待测样品粒径偏小，需要提高激光功率，则68-155 nm 粒径标准品和空白对照也在修改后的条件下进行检测。

## 三、荧光样品检测（去除游离的染料分子\*）

- 确认选用的荧光染料的激发光谱和发射光谱与仪器相匹配。
- 根据“检测条件设置”设定初始检测条件，再根据各个通道的信号强度调整激光检测参数使荧光通道的信号能与背景良好区分，且散射通道的信号不饱和（<3600），即提高激光功率，增大散射通道信号衰减倍数。
- 去除游离的染料（会影响被标记的荧光颗粒检测）或优化抗体标记量  
免疫荧光染色时，请确认游离的抗体已被除去（过多会使得基线偏高）或者优化抗体标记量使荧光背景水平降低到合适的水平；  
做磷脂染色时，要注意磷脂分子自身团聚的问题；  
一般核酸染料本身不发荧光，无需处理。

## 四、测试中如不需要使用638nm激光器，请及时关闭，延长激光器寿命。

### 6.5.1 浓度标准品（QC beads 250 nm SiNPs）检测

多数情况下在光路调节中已完成此项检测，如已完成，可跳过此节。

(1) 上样：Load 浓度标准品（250 nm SiNPs，稀释100倍，100 $\mu$ L），Sample Flow——Boosting，时间60s。

(2) 参数设置：在Samp.Inf 中选择“250 nm Std FL SiNPs”，默认参数为Laser power: 20 mW, SS Decay: 0.2%。同时，输入稀释倍数100。

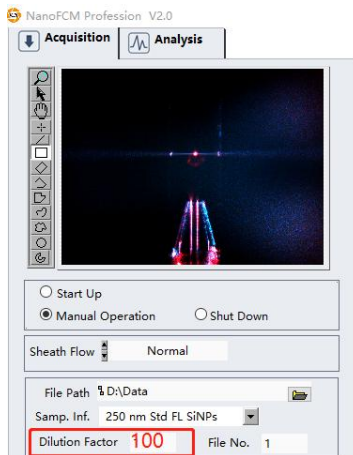



图 6-14

(3) 采样：Sample Flow——Sampling，点击工具栏  并选择Large signal，自动设置阈值；点击Auto Sampling并确认Sampling SET右侧框中为1.0，即固定Sampling压力为1.0kPa；等待Sampling压力稳定在1.0 kPa后，点击Time to Record采集数据；数据采集完成后采集模式自动跳到Buffer，点击弹框中的Save按钮，保存数据为Nfa File；点击Sample Flow——Unload。


(4) 毛细管清洗：放置洗液（150  $\mu$ L），Sample Flow——Boosting时间60s后，Sample Flow——Unload。取出洗液管，手动用超纯水（150  $\mu$ L）清除毛细管头残留的洗液。

### 6.5.2 粒径标准品（QC beads 250 nm SiNPs）检测

样品的粒径检测是通过与标准品（68~155 nm）比对得到，SiO<sub>2</sub>球更接近生物样品折射率。

(1) 上样：Load 粒径标准品（Silica Nanospheres 68~155 nm，稀释100倍，100 $\mu$ L），Sample Flow——Boosting，时间60s。

(2) 参数设置：在Samp.Inf 中选择“68-155 S16M-Exo”。

(3) 采样：Sample Flow——Sampling，点击工具栏  并选择Small signal，自动设置阈值；确定Sampling压力为1.0 kPa并稳定；点击Time to Record 采集数据；点击弹框中的Save按钮，保存数据为Nfa File；点击Sample Flow——Unload将样品Unload。

(4) 毛细管清洗：放置洗液（150 $\mu$ L），Sample Flow——Boosting时间60s后，Sample

Flow——Unload。取出洗液管，手动用超纯水（150 $\mu$ L）清除毛细管头残留的洗液。

### 6.5.3 空白对照检测

(1) 上样：Load空白对照样品溶剂（100  $\mu$  L），Sample Flow——Boosting，时间60s。

(2) 参数设置：在Samp.Inf 中选择与粒径标准品同样参数的方法（一般为“68-155 S16M-Exo”实验参数），注意修改样品名称。

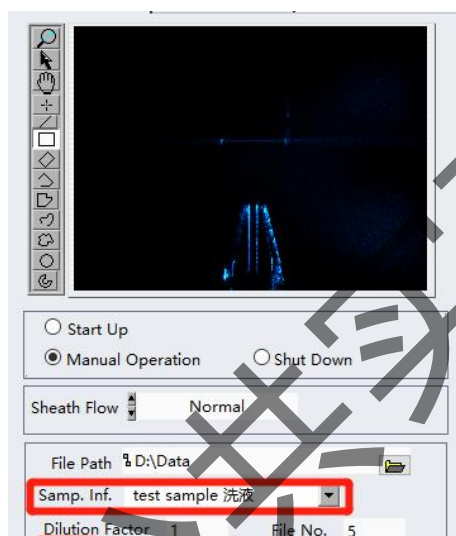



图 6-15

(3) 采样：Sample Flow——Sampling，点击工具栏  并选择Small signal，自动设置阈值；确定Sampling压力为1.0 kPa并稳定；点击Time to Record 采集数据；数据采集完毕后点击save按钮保存数据为Nfa File；点击Sample Flow——Unload将样品Unload。

### 6.5.4 样品检测

(1) 上样：Load合适浓度样品（100 $\mu$ L），Sample Flow——Boosting，时间60s。

(2) 参数设置：在Samp.Inf 中选择与粒径标准品同样参数的方法（一般为“68-155 S16M-Exo”实验参数），注意修改样品名称并输入稀释倍数（粒径标准品、空白对照溶剂、样品的检测条件要保持一致）。

**注意：**因不同样品存在差异，可以先测试样品，优化确认合适参数后，再采用相同参数测试粒径标准品和空白溶剂。

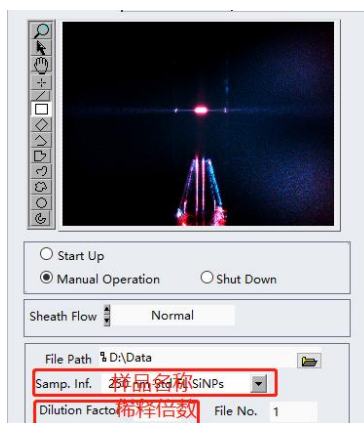



图 6-16

(3) 采样：Sample Flow——Sampling，点击工具栏  并选择 Small signal/Large signal，自动设置阈值；确定 Sampling 压力为 1.0 kPa 并稳定；点击 Time to Record 采集数据；数据采集完毕后点击 save 按钮保存数据为 Nfa File；点击 Sample Flow——Unload 将样品 Unload。

(4) 毛细管清洗：放置洗液（150 $\mu$ L），Sample Flow——Boosting 时间 60s 后，Sample Flow——Unload。取出洗液管，手动用超纯水（150 $\mu$ L）清除毛细管头残留的洗液。


## 6.6 数据分析

### 6.6.1 样品粒径数据分析

原理：当待测样品的折射率与二氧化硅颗粒的折射率相同或相近时适用。利用二氧化硅标准球建立散射光强度与颗粒粒径的标准工作曲线，即可将相同条件下待测样品的散射强度转化为粒径参数，获得待测样品的粒径分布。



图 6-17

- 样品阈值设置：选择样品数据，先点击自动设阈值（工具栏  ——Small Signal）。
- 粒径标准曲线拟合



切换到相同检测条件下测试的粒径标准品数据，点击工具栏 。单击Standard 选择“S16M-Exo”，函数关系默认为“Power”。



图 6-18

点击“Find peak”软件自动显示出四个峰的Median值和Events值并生成拟合曲线。

点击“Close”关闭小窗口，粒径标准品的图标显示黄色 。

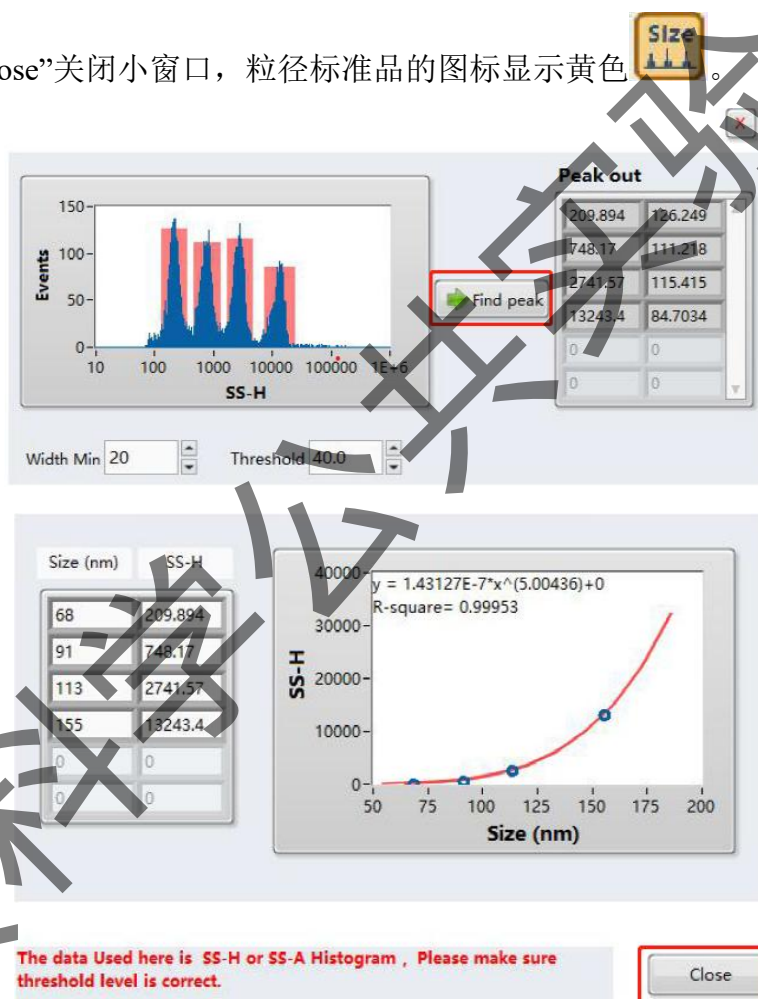





图 6-19

- 空白对照设置：选择空白对照数据（纯溶剂），单击工具栏按钮 ，将其设置为空白对照，设置完成后，该图标显示黄色 。

- 报告生成：选择待测样品，鼠标单击工具栏按钮 ，选择需要导出的报告类型。粒径报告导出报告包含总颗粒数、中位值、平均值以及标准差。

右击设置range选项，使用红色竖线门，在Gating Range输入粒径范围，圈定目标粒径分布范围，软件会自动生成圈门内颗粒数等相关信息。点击界面下方Save按钮，粒径报告存储为PDF格式；

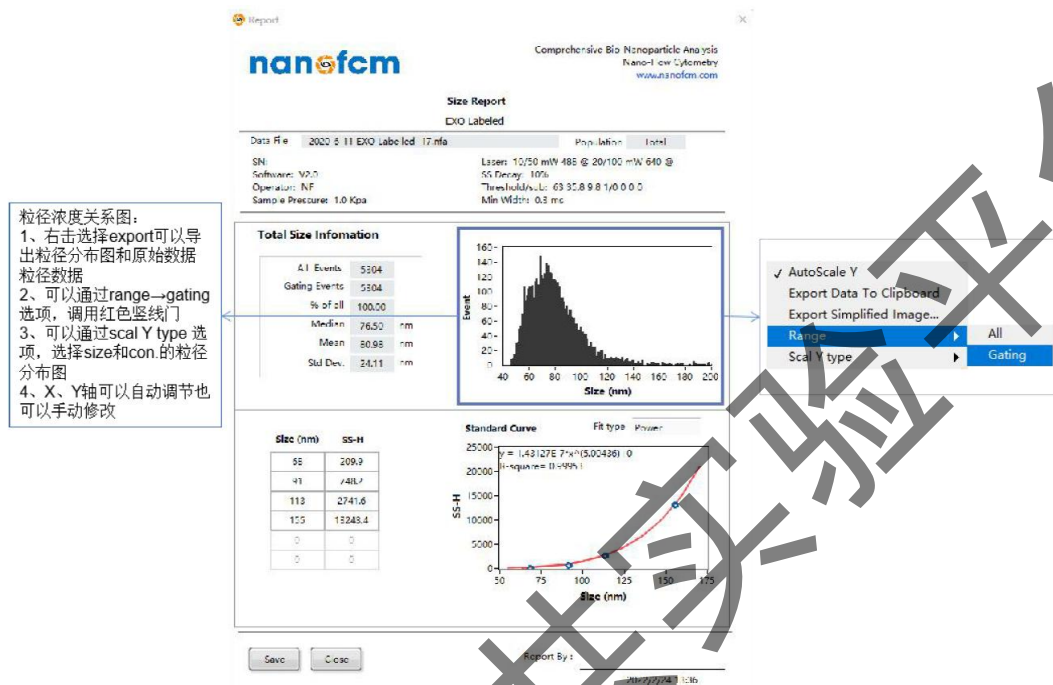


图 6-20

同时，在粒径分布直方图上点击鼠标右键-Export，可以导出粒径分布的统计结果。

### 6.6.2 样品浓度分析

原理：通过检测特定时间内浓度已知的荧光微球的个数，计算样品流速，结合相同进样压力条件下样品的颗粒数，即可快速获得待测样品的颗粒浓度。

(1) 浓度标准品设置：选择浓度标准品（250 nm SiNPs）数据，点击自动设阈值（工

具栏 Large Signal），使用圈门工具 圈出目标颗粒。

鼠标单击软件工具按钮 ，确认浓度标准品浓度（固定值）及稀释倍数，点击 Close关闭对话框；重新点击圈门按钮去掉圈门工具。完成后，浓度标准品设置的

图标显示黄色 。

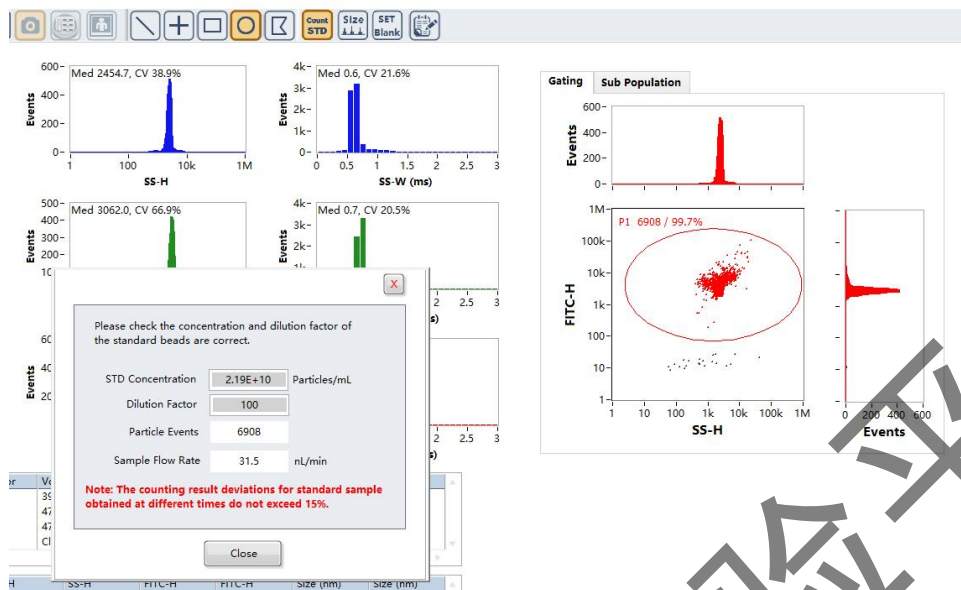




图 6-21

(2) 样品阈值设置：选择样品数据，先点击自动设阈值（工具栏  —— Small Signal）。

(3) 空白对照设置：选择空白对照数据（纯溶剂），单击工具栏按钮  ，将其设置为空白对照，设置完成后，该图标显示黄色  。

(4) 报告生成：选择待测样品，鼠标单击工具栏按钮  ，选择需要导出的报告类型。导出浓度报告时软件自动计算出待测样品的浓度。点击界面下方Save按钮，浓度报告存储为PDF格式。

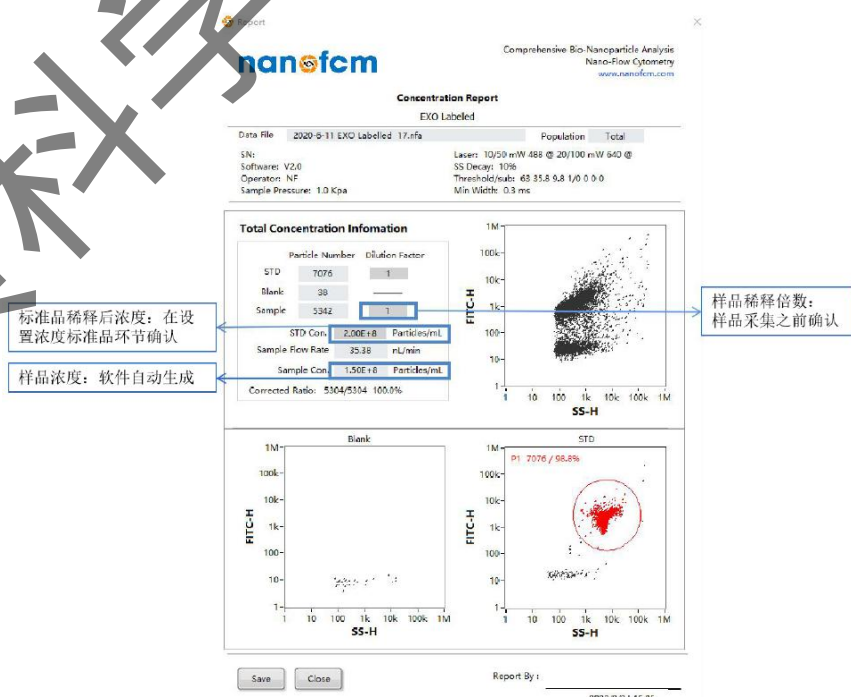


图 6-22

粒径和浓度报告：导出报告包含总颗粒数、中位值、平均值以及标准差。右击设置 range 选项，使用红色竖线门，在 Gating Range 输入粒径范围，圈定目标粒径分布范围，软件会自动生成圈门内颗粒数等相关信息；软件自动计算出待测样品的浓度；

在进行粒径和浓度分析后，报告会直接给出该样本 size 及 con. 的分布直方图，也可以右击选择 size 与 events 的分布直方图；在直方图右键-Export，可以导出粒径分布直方图；点击界面下方 Save 按钮，粒径和浓度报告存储为 PDF 格式。

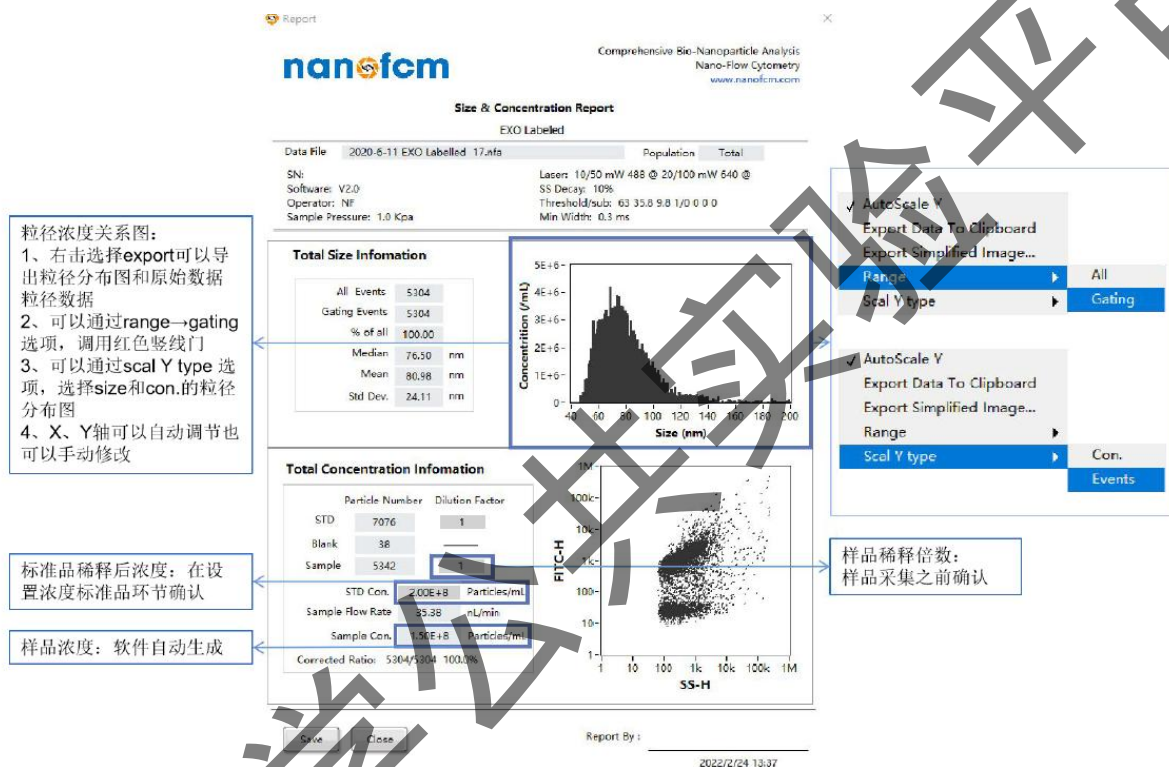



图 6-23

### 6.6.3 荧光数据分析

(1) 浓度标准品设置：选择浓度标准品（250 nm SiNPs）数据，点击自动设阈值（工具栏 Large Signal），使用圈门工具 圈出目标颗粒。鼠标单击软件工具按钮 ，确认浓度标准品浓度（固定值）及稀释倍数，点击Close关闭对话框；重新点击圈门按钮去掉圈门工具。完成后，浓度标准品设置的图标显示黄色 。无需浓度分析，该步骤省略。

(2) 样品阈值设置：选择荧光样品数据，点击自动设阈值（工具栏 Small Signal）。





(3) 粒径标准曲线拟合：参照前文粒径标准曲线拟合进行操作。拟合完成后，粒径标准品的图标显示黄色 。无需粒径分析，该步骤省略。

(4) 圈门：选择荧光样品数据，选择合适的X轴和Y轴，例如SS-A和FITC-A（单荧光标记），FITC-A和PC5-A（双荧光标记）；利用工具栏中的圈门工具



，可在二维散点图上（纵横坐标可选）进行数据分析，以染色比例为例，具体分析过程如下：

- 点击工具栏中的圈门工具，圈出目的群，如下图使用十字圈门  或矩形门 ，其中1为子群名称，2为门内颗粒数，3为门内亚群的比例（此时未扣除对照buffer中颗粒）。

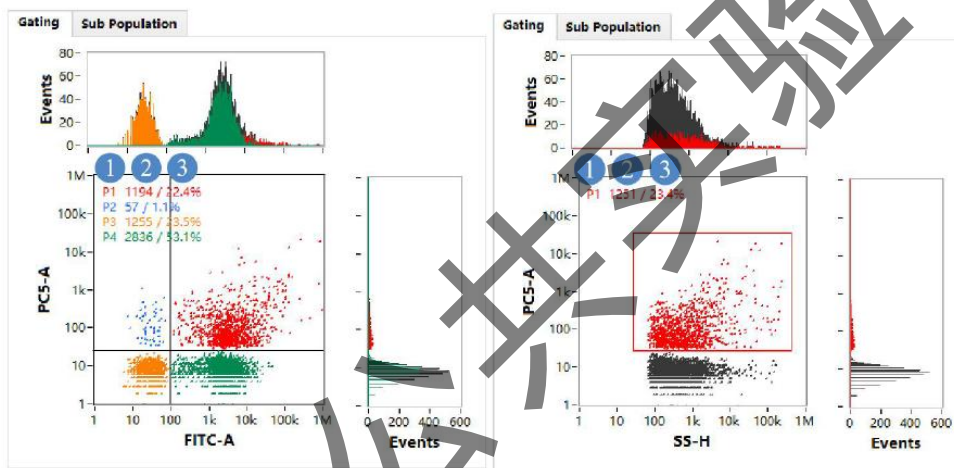


图 6-24

- 进行粒径分析后，圈门后将同步获得总颗粒及各分群的分布情况（未扣除对照）。如下图，进行粒径及浓度分析后，使用十字圈门：

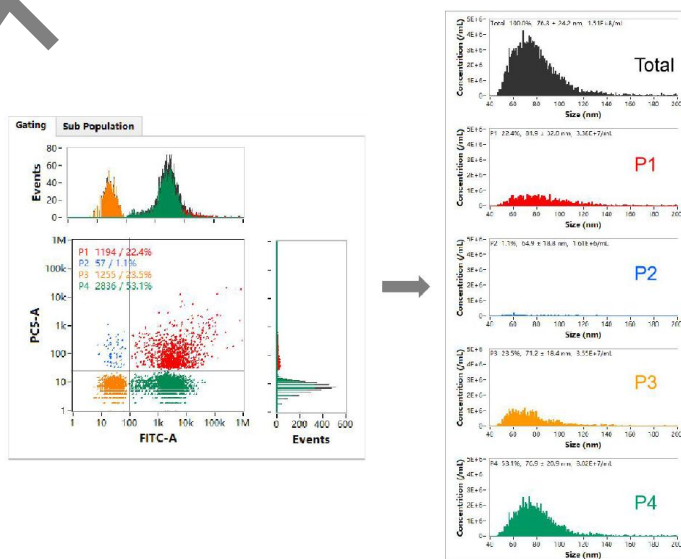





图 6-25

(5) 空白对照设置：选择空白对照数据（纯溶剂），单击工具栏按钮 ，将其设置为空白对照，设置完成后，该图标显示黄色 。

(6) 报告生成：选择待测样品，鼠标单击工具栏按钮 ，选择需要导出的报告类型，以size & concentration 报告为例：

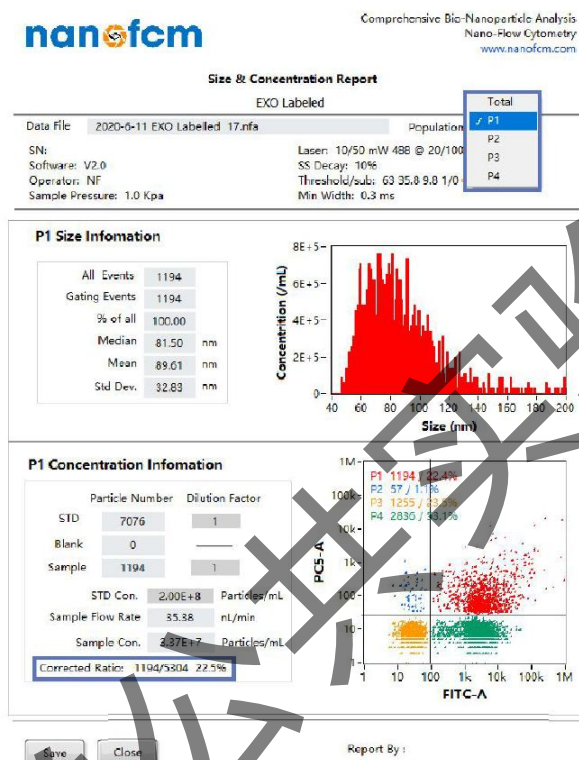


图 6-26

- 报告右上角population选项，可以选择感兴趣的分群。选择分群之后，软件自动给出该分群的粒径信息及浓度信息。
- 报告中“Corrected Ratio”是指校正后荧光比例，即样品扣除空白对照中杂质颗粒后的比例。
- 二维散点图可以在软件分析界面右击export，导出后的图片默认保存在该分析数据所在的文件夹中。

## 6.7 仪器关机

- (1) 关闭488nm激光器。
- (2) 清洗毛细管：放置一管新鲜洗液（150  $\mu$ L），点击Sample Flow——Boosting冲洗约5 min后点击Sample Flow——Unload。
- (3) 液流系统清洗：放置一管超纯水（150  $\mu$ L），点击Sample Flow——Boosting，同时

点击Sheath Flow——Shut Down，整个过程约7 min。清洗结束后，Sheath Flow会自动切换到Sheath Close。点击Sample Flow——Unload。

(4) 关闭系统：点击Shut Down，关闭系统，此时激光、检测器和空气泵已关闭。

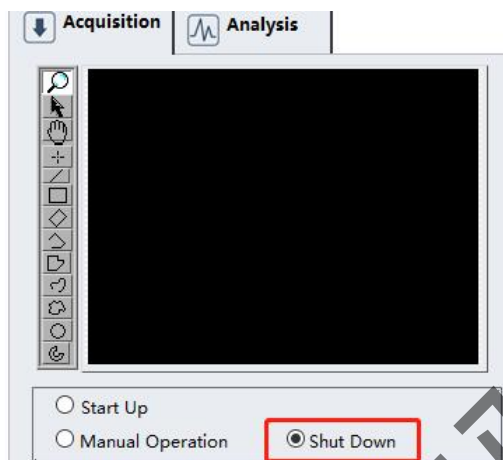


图 6-27

(5) 关闭软件和仪器：退出NF Profession 2.0 软件，关闭仪器，退出基理系统登录。

## 6.8 注意事项

### (1) 空白对照的重要性

- 空白对照为样品的缓冲液，用于判断背景基线，辅助设置阈值，同时可用于扣除杂质颗粒。在样品纯度较高且上样浓度合适情况下，样品阈值和空白对照阈值基本一致。若样品阈值高于空白对照，建议优化样品纯化方法。
- 对于任何实验，样品和空白对照均需在相同检测条件（激光功率和散射通道衰减系数一致）采集数据，并用相同阈值进行数据处理。

### (2) 检测浓度的确定

- Boosting时相机图像光斑合适（需要结合实际样品判断，光斑亮度与颗粒大小、浓度相关，颗粒越大、浓度越高，则光斑越亮）。
- 采样过程，点击自动设置阈值，若10 s后采样总颗粒数超过2000个则应当适当稀释样品。
- 样品的背景基线与空白对照相比没有显著提高，若提高明显，则需要进行稀释。
- 将散射通道纵坐标轴数值调小，根据信号峰的疏密程度判断样品浓度，如下图所示。

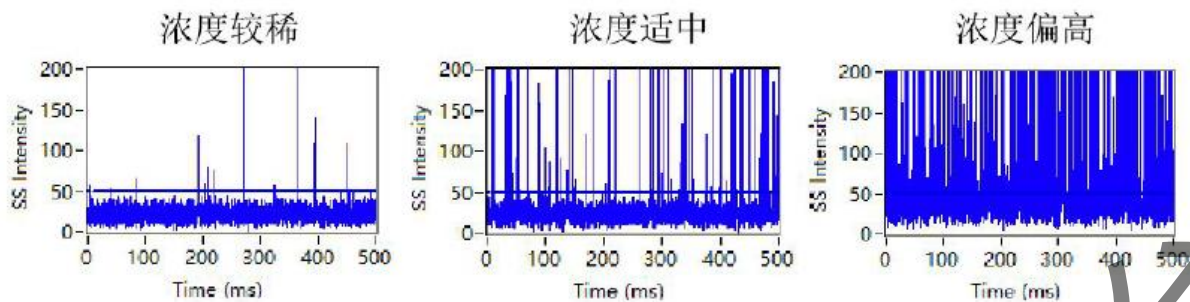


图 6-28

- 未知浓度的样品稀释：根据预估的颗粒浓度进行10倍梯度稀释，由低到高检测。
- 浓度稍微偏高样品稀释：3~5 倍梯度稀释（可参考初次采集的总颗粒数）。

(3) 检测条件设置

根据样品大致粒径设定初始的检测条件（切换到Analysis界面可获取历史检测参数，打开特定日期的文件夹—选择Nfa文件导入数据—选中目标数据—参考其激光功率和衰减系数）：

样品类别	大致粒径 (nm)	参考检测条件* (激光功率, 衰减系数)	
		Blue Laser (488 nm)	20 mW, 0.2%
质控球 (250 nm 二氧化硅球)	250	Green Laser (528 nm)	20 mW, 0.2%
		Red Laser (638 nm)	20 mW, 0.2%
粒径标准品 (混合硅球)	68-155 (S16M-Exo)	5~10 mW, 10%	
	155-850 (S17M-MV)	10 mW, 0.2%	
病毒	T2	100	4 mW, 100%
	T7	60	10 mW, 100%
	M13	41	15 mW, 100%
外泌体	30-150	5~10 mW, 10%	
微囊泡等亚微米级颗粒	100-1000	10 mW, 0.2%	
线粒体、细菌等微米级颗粒	直径 500-1000 长度 1500-3000	6 mW, 0.2%	
聚苯乙烯微球 (PS)	200-350	10 mW, 0.2%	
	100	10 mW, 10%	
二氧化硅球	≤150	10 mW, 10%	
	150-450	20 mW, 0.2%	
	> 450	10 mW, 0.2%	

粒径检测时，待测样品的检测条件与粒径标准球一致

备注：根据实际信号进行调整，以信号与背景完全分开且不饱和为准，饱和值 3.6 k。

## 7. 相关/支撑性文件

7.1. Q/WU FLHR001 文件编写规范

## 8. 记录

FLHS028 单颗粒纳米生物检测仪（纳米流式检测仪）使用记录表 V1.0

物质科学公共实验平台

### 仪器设备使用记录

日期 年/月/日	使用人	课题组 导师	样品名称 或代号	检测方式(√)		实验内容/溶剂类型	实验起止时间	样品数	文件名 导师名首字母-使用人名 首字母-日期-样品编号	仪器状态		备注
				送样	自主					正常	报错及问 题描述	
2022.5.6	张三	王五	聚苯胺	√		粒径、粒径分布、浓度等/水	9:00-9:30	3	WW-ZS-20200506-001	√		

\*\*请注意：使用前先检查仪器状况，一切正常方可操作；一旦开始实验，默认为使用前仪器状况良好；使用过程中出现故障须立即联系技术员；测试后请及时取回样品。

内部文件，请勿随意转发、打印、复印