

数据分析

浓度计数原理

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。

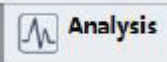

粒径检测原理




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。

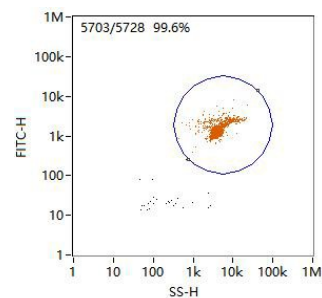
样品粒径及浓度分析



具体数据分析过程如下，浓度分析请选择1、2、4步，粒径分析请选择以下2、3、4步。

点击导航栏  图标进入数据分析界面，点击原始数据列表栏右侧文件夹图标  选择需要导入的数据（仅支持 Nfa 格式）

- 1. 浓度标准品设置：**选择浓度标准品数据，点击工具栏  ——Large Signal 自动设阈值，使用圈门工具圈出目标颗粒，如右图；鼠标单击软件右上方工具按钮 ，确认浓度标准品浓度及稀释倍数，重新点击圈门按钮去掉圈门工具，浓度标准品设置的图标显示黄色 ，浓度标准品设置完成。





Please check the concentration and dilution factor of the standard beads are correct.

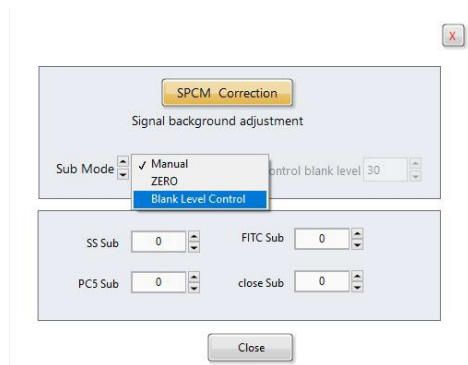
STD Concentration	<input type="text" value="2.19E+10"/>	Particles/mL
Dilution Factor	<input type="text" value="100"/>	
Particle Events	<input type="text" value="4553"/>	
Sample Flow Rate	<input type="text" value="20.8"/>	nL/min



Note: The counting result deviations for standard sample obtained at different times do not exceed 15%.

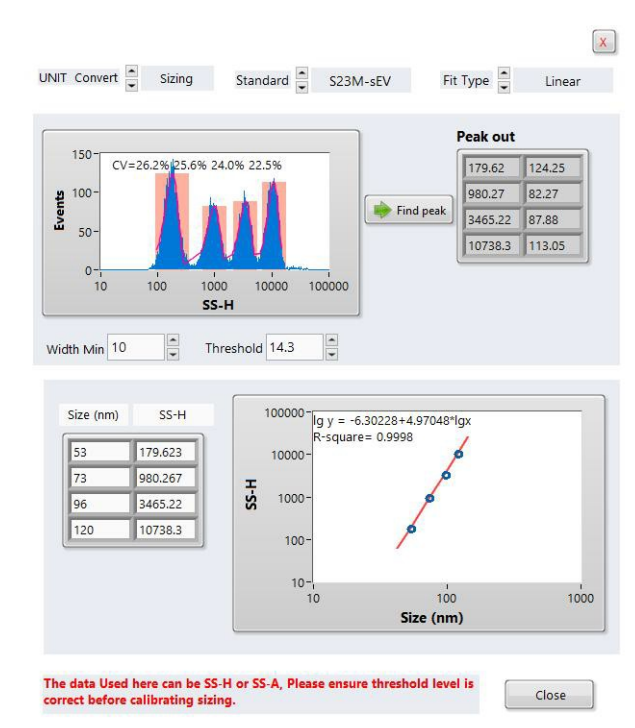
Close

2. 粒径标准曲线拟合

- 切换到粒径标准品数据，点击工具栏  --Ultra Small 自动设阈值，然后点击工具栏  单击Sub Mode，选择“Blank Level Control”，软件将自动扣除背景，点击“Close”关闭该窗口。

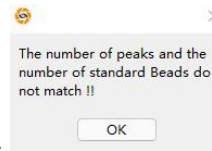


- 点击工具栏 ，弹出对话框。
- 单击 Standard 选择“S23M-sEV”，Fit Type 选择为“Linear”。
- 点击“Find peak”软件自动显示出四个峰的Median 值和Events 值并生成拟合曲线。
- 点击“Close”关闭小窗口，粒径分布直方图显示在界面右下方，粒径标准品的图标显示黄色 。

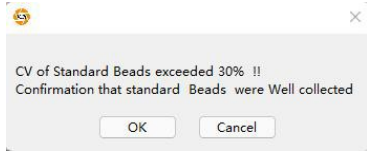


- 粒径标准品分布由4个背景分离的峰组成，当峰数目异常或其中某一个峰的

CV 值大于30 %时，软件会提示峰数目不匹配




或CV 值不满足要求



。如果出现上述提示，请调节拟合窗口“**Threshold**”数值或通过质控球检查仪器是否处于最佳状态。

- 3. 空白对照设置：**选择空白对照数据（如 PBS），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：**切换回样品数据，鼠标单击工具栏按钮 ，选择需要导出的报告类型，具体展示如下：

- **浓度报告**: 设置浓度标准品、空白对照后, 点击待测样品导出浓度报告, 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。

Report

nanofcm Comprehensive Bio-Nanoparticle Analysis Nano-Flow Cytometry www.nanofcm.com

Concentration Report

Sample

Data File: 20230606 20221101 24.nfa Population Total

SN: DEMO15 Laser: 30/50 mW 488
 Software: V2.0 SS Decay: 10%
 Group/Operator: Examination/ yanchunhong Threshold/sub: 72.1 29.1 7.9 1/100 0 0 0
 Min Width: 0.2 ms

Total Concentration Information

Particle Number	Dilution Factor
STD 4761	100
Blank 205	
Sample 4738	50000

STD Con. 2.17E+10 Particles/mL
 Sample Flow Rate 21.94 nL/min
 Sample Con. 1.03E+13 Particles/mL
 Corrected Ratio: 4533/4533 100.0%

Blank

STD

P1 4761 / 99.6%

Save Close

Report By: 2023/7/17 10:21

标准品稀释后浓度: 在设置浓度标准品环节确认

样品浓度: 软件自动生成

样品稀释倍数: 样品采集之前确认

- **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 Size & Con.图设置Range 选项，可使用红色竖线门，圈定目标粒径分布范围，或在Gating Range 输入粒径范围，软件会自动生成圈门内颗粒数等相关信息。在 Size & Con.图上点击鼠标右键-Export，可以导出粒径分布的统计结果（如图 A、B）。点击界面下方Save 按钮，粒径报告存储为PDF 格式。

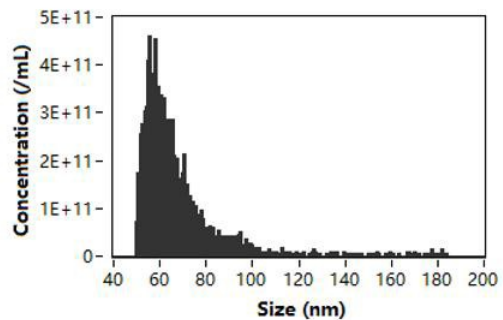
粒径浓度关系图，

- 1、右击选择export可以导出粒径分布图和原始数据粒径数据
- 2、可以通过range→gating选项，调用红色竖线门选项，调用红色竖线门
- 3、X、Y轴可以自动调节也可以手动修改

A

Size (nm) - events	Event - events
46.5	8
47.5	9
48.5	14
49.5	12
50.5	30
51.5	31
52.5	49
53.5	53
54.5	69
55.5	53
56.5	106
57.5	88
58.5	94
59.5	104
60.5	107
61.5	102
62.5	108
63.5	92
64.5	114
65.5	118
66.5	101
67.5	110

B



- **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 Size & Con.图设置 Range 选项, 可使用红色竖线门, 圈定目标粒径分布范围, 或在 Gating Range 输入粒径范围, 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, 也可以右键点击纵坐标改成 events; 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。

nanofcm Comprehensive Bio-Nanoparticle Analysis Nano-Flow Cytometry www.nanofcm.com

Size & Concentration Report

Sample

Data File: 20230606 20221101 24.nfa Population Total

SN: DEMO15 Laser: 30/50 mW 488
 Software: V2.0 SS Decay: 10%
 Group/Operator: Examination/ yanchunhong Threshold/sub: 72.1 29.1 7.9 1/100 0 0 0
 Min Width: 0.2 ms

Total Size Information

All Events	4533
Gating Events	4533
% of all	100.00
Median	62.8 nm
Mean	66.8 nm
Std Dev.	14.6 nm

Total Concentration Information

Particle Number	Dilution Factor
STD 4761	100
Blank 205	
Sample 4738	50000

STD Con. 2.17E+10 Particles/mL
 Sample Flow Rate 21.94 nL/min
 Sample Con. 1.03E+13 Particles/mL
 Corrected Ratio: 4533/4533 100.0%


Annotations:



- 粒径浓度关系图:
 - 1、右击选择export可以导出粒径分布图和原始数据粒径数据
 - 2、可以通过range→gating选项, 调用红色竖线门
 - 3、可以通过scal Y type 选项, 选择size和con.的粒径分布图
 - 4、X、Y轴可以自动调节也可以手动修改
- 标准品稀释后浓度: 在设置浓度标准品环节确认
- 样品浓度: 软件自动生成
- 样品稀释倍数: 样品采集之前确认

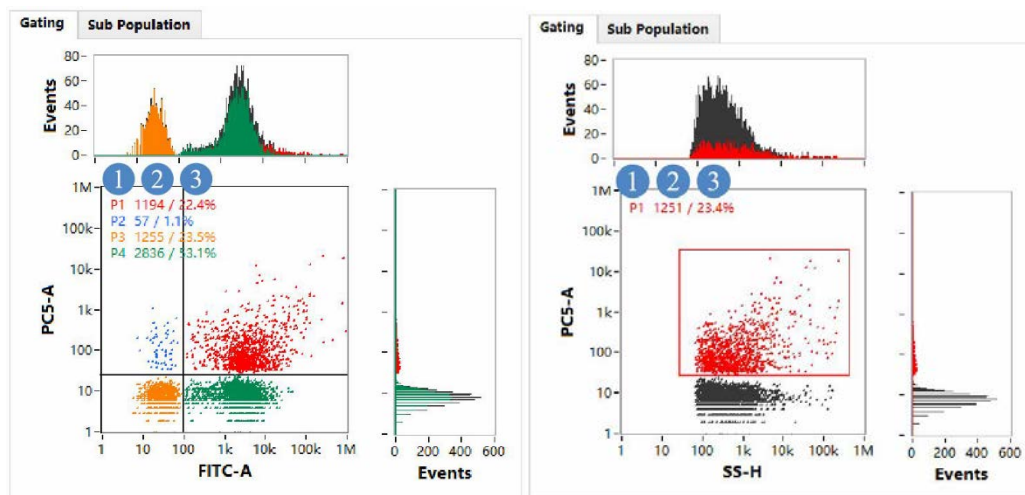
荧光数据分析



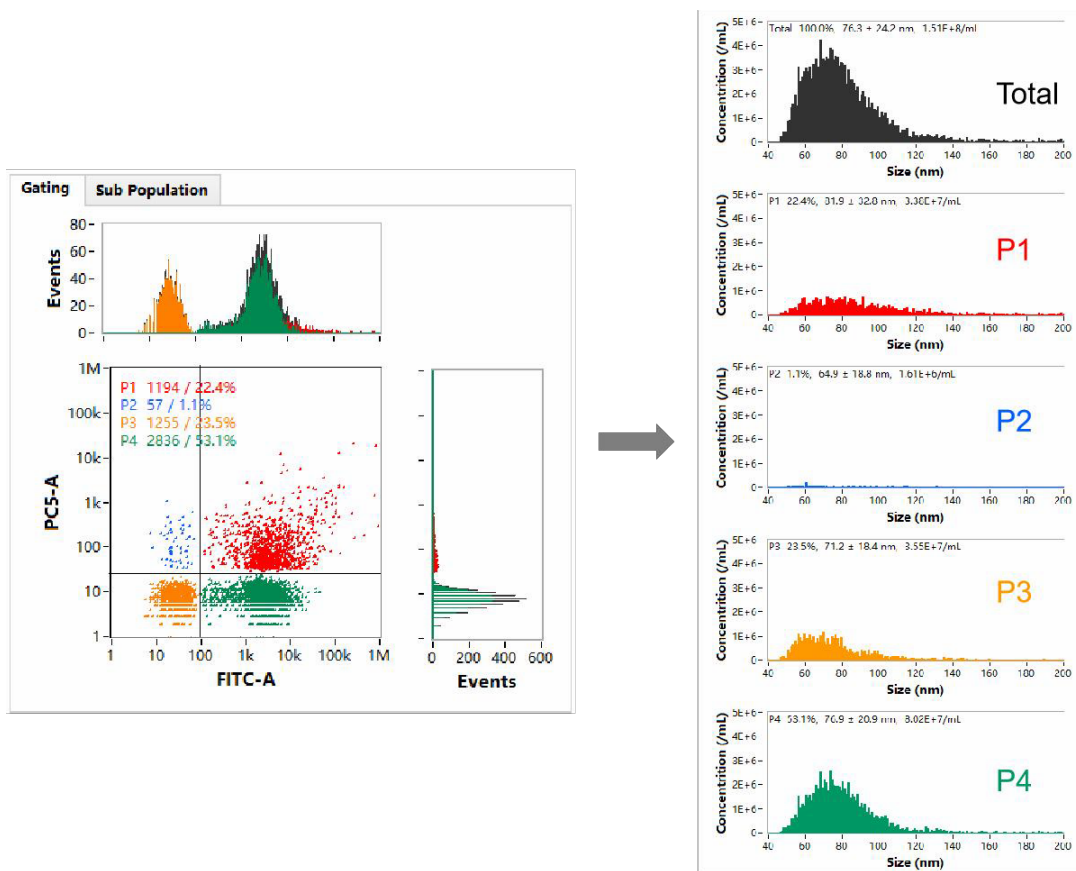
荧光样本的粒径及浓度分析步骤与前述步骤一致，当分析荧光标记比例或亚群信息时，需要用到工具栏中的圈门工具，具体内容介绍如下：



1、圈门：选择荧光样品数据并设置阈值，右击坐标轴选择合适的 X 轴和 Y 轴名称，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）。

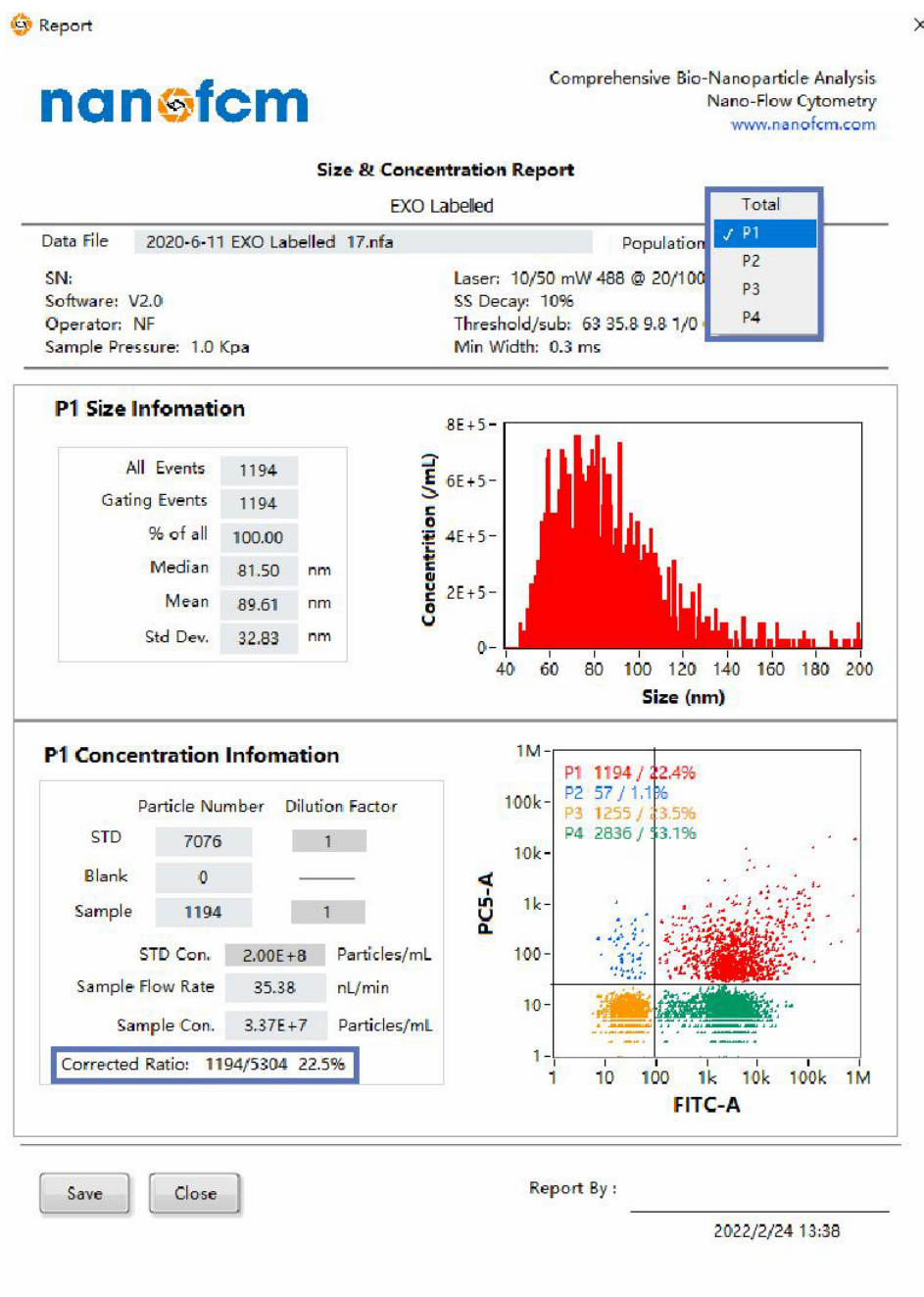


- 进行粒径分析后，圈门后将同步获得总颗粒及各亚群的分布情况（未扣除对照）。
如下图所示：



2、空白对照设置：选择空白对照数据（如 PBS），单击工具栏按钮 ，将其设为空白对照 。

3、报告生成：切换回样品数据，单击工具栏按钮 ，选择需要导出的报告类型，荧光信息报告展示如下：



- 报告右上角population选项，可以选择感兴趣的亚群。选择亚群之后，软件自动给出该亚群的粒径信息及浓度信息。
- “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。

