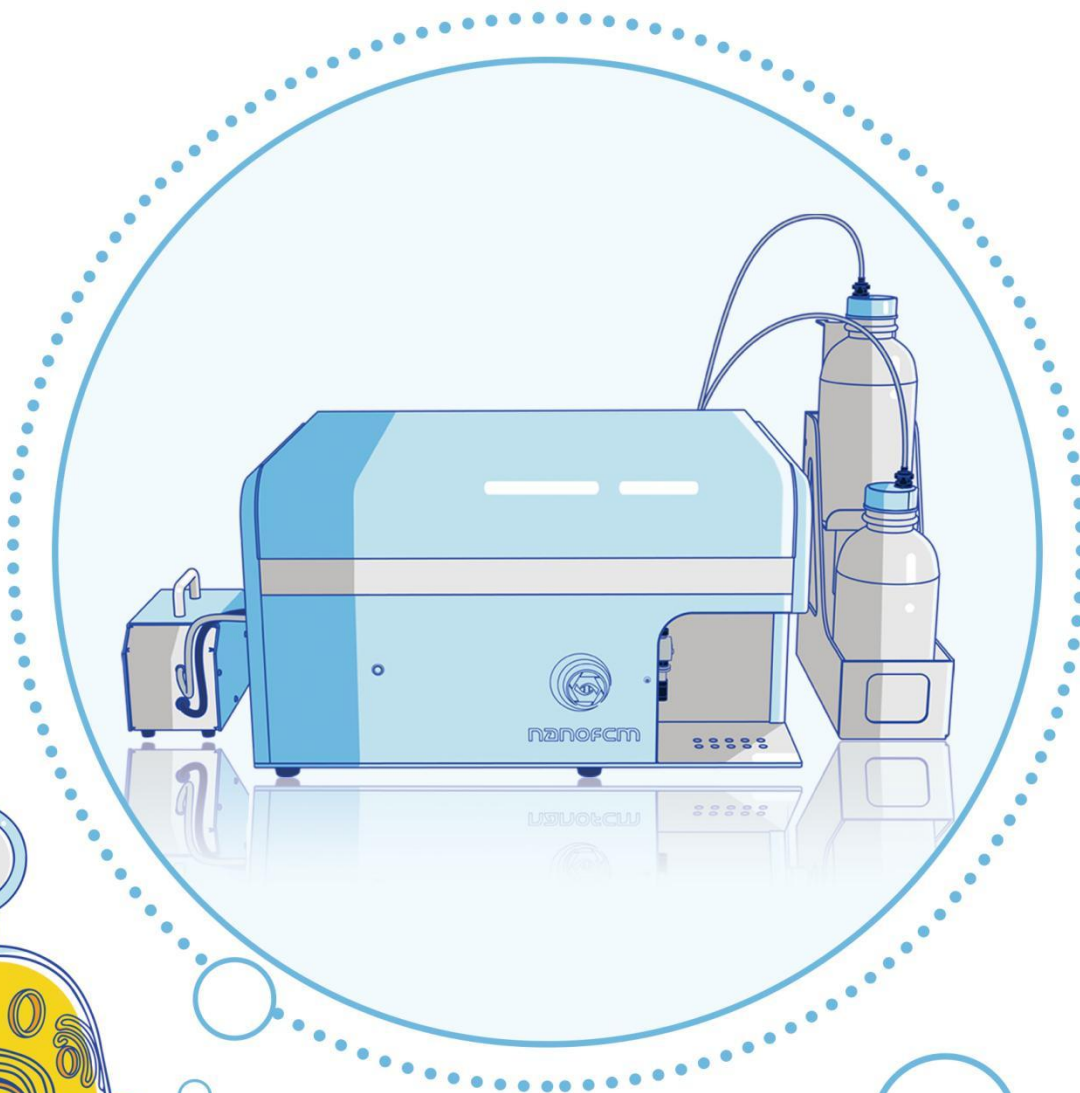


nanofcm

- Unmatched Performance
- Superior Sensitivity
- Innovation for NanoWorld



| 用户使用手册

# 纳米流式检测仪

NanoFCM Flow NanoAnalyzer



## 版权声明

© 2021 版权所有 侵权必究 厦门福流生物科技有限公司

NanoFCM 及其注册商标为厦门福流生物科技有限公司所有。

NanoFCM 注册商标和厦门福流生物科技有限公司在中华人民共和国工商管理局登记注册。

*其他产品、服务商标为各自供应商或服务商所有。*

## 法律条例

纳米流式检测仪仅用于科研用途，不得用于临床诊断。该设备的任何临床用途均需获得相关部门的批准，如 CFDA 或 FDA。用户在科研用途以外使用造成的后果由研究发起者承担，厦门福流生物科技有限公司（NanoFCM Inc.）不承担任何责任。

本文档适用于最新版的 NF Profession 1.0 软件，当后续软件版本影响到本文档信息时，请访问 [www.nanofcm.com](http://www.nanofcm.com) 获取。

## FCC 认证

**警告：** 未经授权单位许可不得擅自拆装、修改仪器。

**注意：** 该设备已经过测试，符合 B 类数字设备要求及符合 FCC 第 15 章规则。该规则旨在为住宅安装提供合理的保护，防止有害干扰。如果安装不当或未按照说明书使用，本设备可能会产生辐射射频能量，引起无线电通讯干扰。不能保证在特定的安装中不会发生干扰。如果此设备确实对收音机或电视无线信号造成有害干扰（可通过开关仪器进行验证），用户可通过以下方法进行改善：

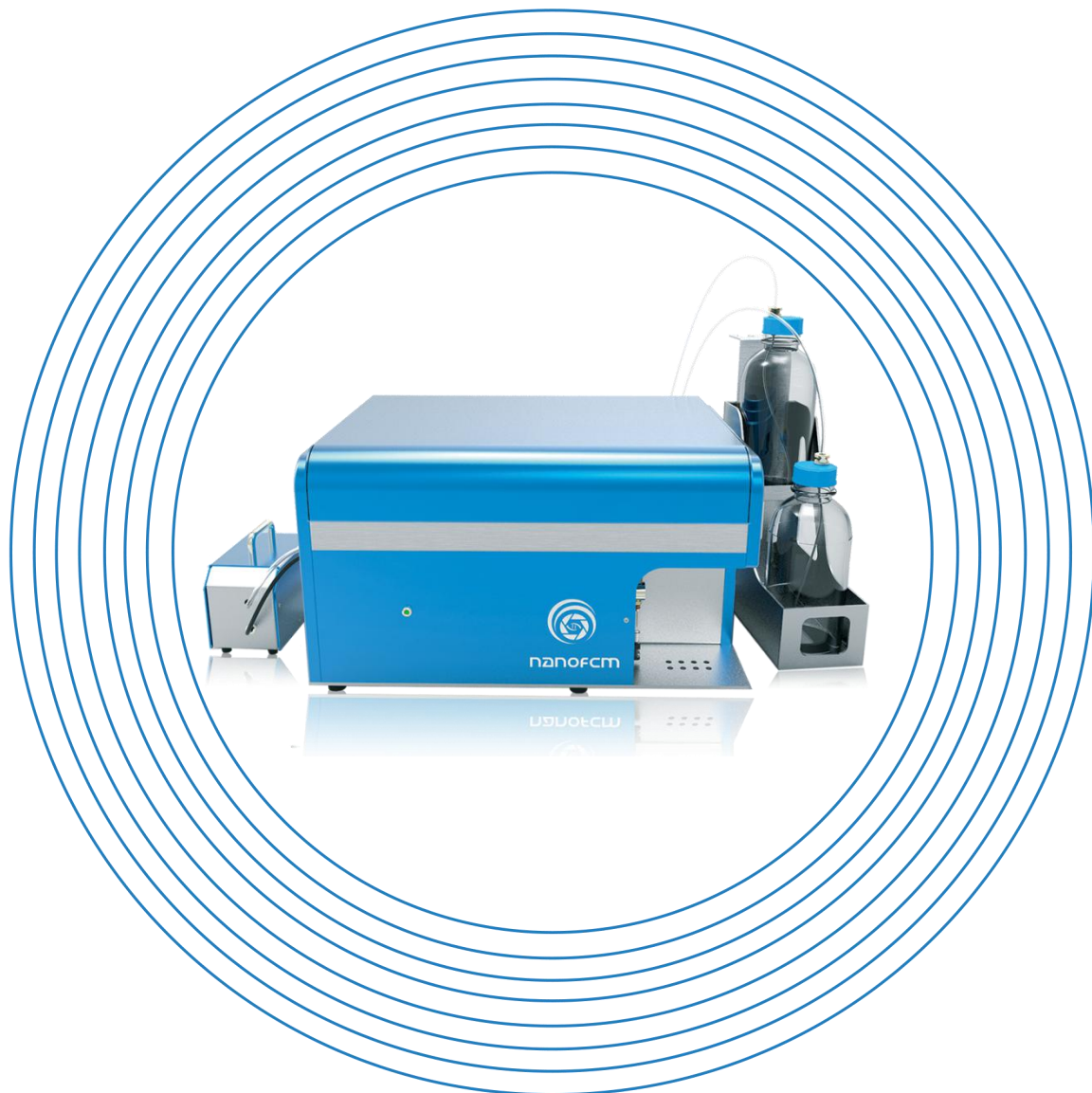
- 重新定位接收天线
- 增加接收器和仪器间的距离
- 将本设备和受干扰设备连接到不同的电源插座上
- 向经销商或有经验的广播/电视技术人员寻求帮助

## CE&RoHS 认证

通过欧盟市场安全合格标志 CE 和 RoHS 认证

联系我们，欢迎访问：

[www.nanofcm.com](http://www.nanofcm.com)



## 关于手册

本手册为纳米流式检测仪日常操作和维护提供使用说明，用户可以参照详细步骤进行每日开机、质控、数据采集和日常关机。该说明书同样包括技术规格、安全信息和故障排除及仪器软件设置内容。

用户应具备流式细胞术基本概念和 Windows 操作系统的经验。对于不熟悉 Windows 操作系统的用户，请阅读电脑配置的说明书。

# 《使用手册》

## 信息按如下章节设置

### 第一章 系统概述

提供有关纳米流式检测仪系统硬件、单个组件以及这些组件相应功能的信息。

### 第二章 NF Profession 1.0 软件

介绍 NF Profession 1.0 软件的功能及其特点。

### 第三章 日常开机

介绍纳米流式检测仪启动和切换至样品检测状态的方法。

### 第四章 仪器校准和数据采集

提供仪器日常质控和数据采集的具体方法。纳米流式检测仪日常质控对于确认仪器状态和实验数据的准确性非常必要。

### 第五章 日常关机和维护

介绍如何通过日常清洗来关闭系统并保持系统处于最佳状态。

### 第六章 数据分析

介绍如何使用 NF Profession 1.0 软件进行数据分析。

### 第七章 故障排除

以案例方式介绍如何解决常见的仪器故障。

### 第八章 内部清洗程序

介绍不同清洗程序的特点及使用方法。

### 附录 A 仪器安装

提供纳米流式检测仪安装流程。

### 附录 B 有害物质表

提供有害物质的名称和含量的信息。

### 缩略词

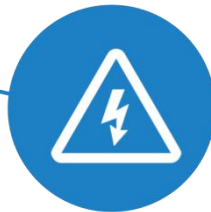
SAFERY INSTRUCTIONS  
**安全须知**  
SAFERY FIRST

在仔细阅读所有产品手册之前，请勿尝试执行任何操作。

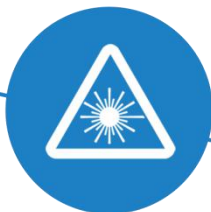
在任何情况下对于任何操作如有疑问，请及时与我们联系。



小心/警告：  
危险或不安全操作可能导致物资损失、数据丢失、轻微或严重损伤



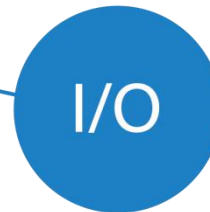
电击危险  
小心操作



相关区域内存在潜在的激光辐射



生物危害



开/关

# CATALOGUE

# 01

## 目录

<b>第一章 系统概述</b> .....	1
1.1 产品描述.....	1
1.2 主要组件.....	1
1.3 纳米流式检测仪主机介绍.....	2
1.3.1 光学系统.....	2
1.3.2 液流系统.....	5
1.3.3 进样系统.....	6
1.3.4 系统连接.....	8
1.3.5 检测仪后面板.....	9
1.3.6 检测仪前面板.....	10
1.4 物品和耗材.....	10
1.5 技术参数.....	11
<b>第二章 NF Profession 1.0 软件</b> .....	12
2.1 软件概述.....	12
2.1.1 软件启动.....	12
2.1.2 软件界面.....	12
2.1.3 导航栏.....	13
2.1.4 数据采集界面.....	13
2.1.5 数据分析界面.....	13
2.1.6 相机窗口.....	14
2.1.7 仪器控制面板.....	16
2.1.8 工具栏.....	25
2.1.9 图表区.....	35
2.1.10 状态栏.....	36
<b>第三章 日常开机</b> .....	37
3.1 开机前准备.....	37
3.2 开机流程.....	37
3.2.1 打开检测仪主机和电脑工作站.....	37
3.2.2 启动软件.....	37
3.2.3 仪器初始化.....	38
3.2.4 液流初始化.....	38
<b>第四章 仪器校准和数据采集</b> .....	39
4.1 引言.....	39
4.1.1 质控微球.....	39
4.1.2 检测样品参数推荐.....	39
4.2 仪器校准.....	40
4.3 数据采集.....	41

# CATALOGUE

# 目录

# 02

4.3 样品检测须知	42
4.4 样品浓度检测须知	43
4.5 样品粒径检测须知	43
4.6 荧光样品检测须知	44
4.7 样品检测步骤	44
4.7.1 外泌体样品检测步骤	44
4.7.2 其他样品检测步骤	46
4.8 参考检测条件	47
<b>第五章 关机和维护</b>	<b>48</b>
5.1 关机流程	48
5.1.1 关闭液流系统	48
5.1.2 关闭仪器	48
5.2 日常维护和保养	48
5.2.1 日常维护	48
5.2.2 定期维护	49
5.2.3 清空程序	49
<b>第六章 数据分析</b>	<b>51</b>
6.1 导入数据	51
6.2 数据分析	51
6.2.1 浓度分析	51
6.2.2 粒径分析	53
6.2.3 粒径和浓度分析	56
6.2.4 荧光数据分析	59
6.3 注意事项	63
6.3.1 空白对照的重要性	63
6.3.2 数据分析	63
<b>第七章 故障排除</b>	<b>64</b>
7.1 概述	64
7.2 案例分析（供参考）	67
<b>第八章 内部清洗程序</b>	<b>71</b>
<b>附录 A 仪器安装</b>	<b>72</b>
仪器运输及存储	72
安装环境要求	72
<b>附录 B 有害物质表</b>	<b>73</b>
<b>缩略词</b>	<b>75</b>

# CHAPTER 01

## 系统概述





# 第一章 系统概述

## 1.1 产品描述

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（7-1000 nm）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以及纳米科技的发展提供了一个强有力的表征手段。

仅用于科研用途，不用于临床诊断。

## 1.2 主要组件

如图 1-1 所示，本仪器主要包含以下四部分：空气泵，纳米流式检测仪主机，液流容器和电脑工作站。

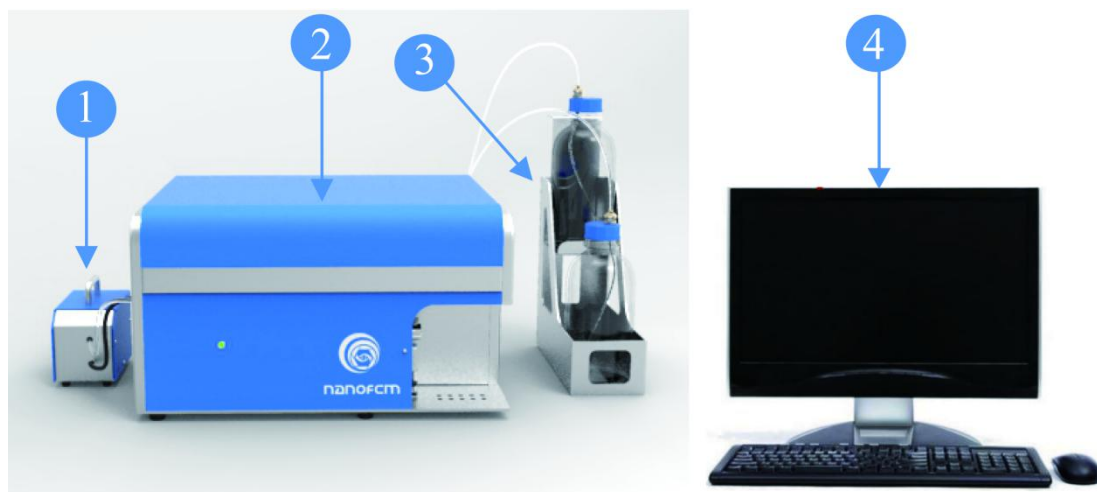


图 1-1 仪器外观示意图

- 1) 空气泵：提供进样压力，将样品导入检测仪。
- 2) 纳米流式检测仪主机：生成和采集信号。



- 3) 液流容器：提供仪器运行时所需要的鞘液和废液存储装置
- 4) 电脑工作站：数据采集、数据分析以及由 NF Profession 1.0 软件控制的检测仪的功能均在工作站上完成。工作站包括一台显示器和和一台台式计算机。计算机配备 Windows 操作系统、NF Profession 1.0 软件和其他支持性文件

### 1.3 纳米流式检测仪主机介绍

如图 1-2 所示，纳米流式检测仪主要包含光学系统、液流系统、电子系统和进样系统四部分。

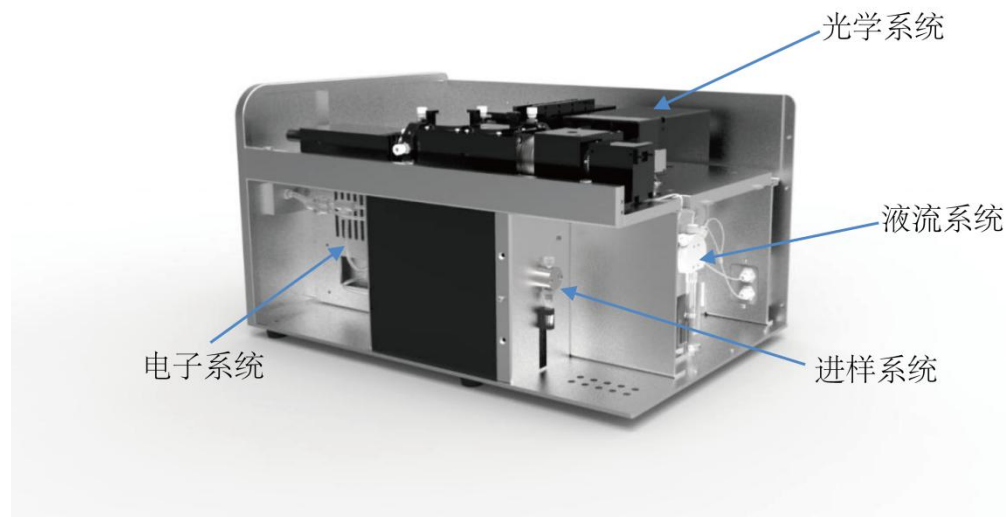


图 1-2 纳米流式检测仪主机的结构示意图

#### 1.3.1 光学系统

光学组件位于检测仪上部，打开上盖和光学暗盒后可对光学系统进行查看，如图 1-3 所示。光学系统包含激光器、透镜、滤光片和检测器等主要部件，用于光信号的产生、传输和收集。

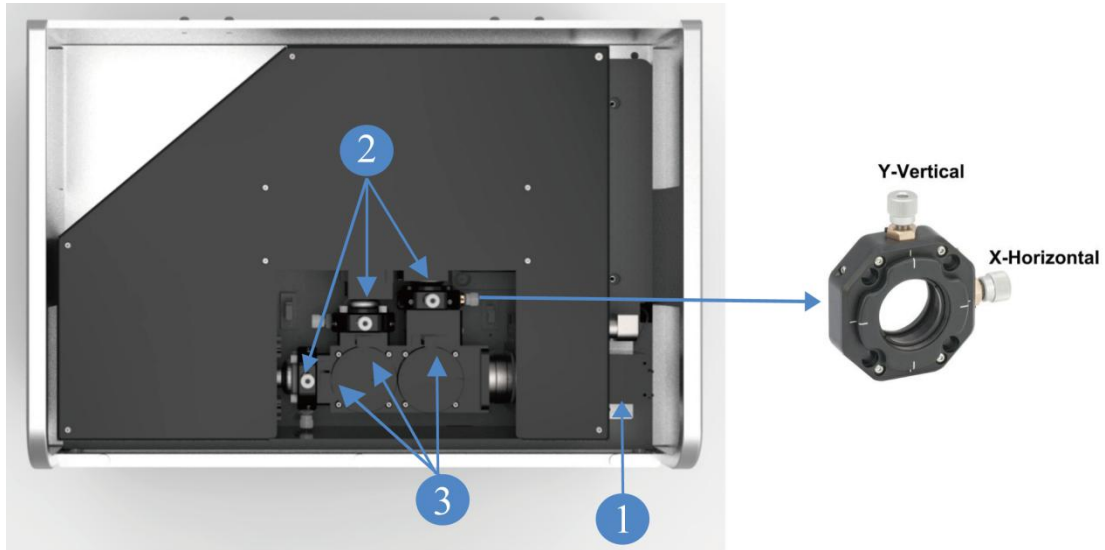


图 1-3 光学系统组成示意图（左）和 XY 轴调节架（右）

- 1) 相机
- 2) XY 轴调节架





XY 轴调节架位于检测器的前方，如图 1-3 左图所示。XY 轴调节架分为 X 轴和 Y 轴，如图 1-3 右图所示，主要用于调节光的位置。XY 轴的初始位置为 2 条白线重合的位置。

- 3) 光学部件

纳米流式检测仪的光学配置情况如下表：



表 1-1 纳米流式检测仪配置表

型号	激光	检测器	二向色滤光片	带通滤光片	检测通道名称
N30E	 488 nm	SPCM-1		488/10	SSC
		SPCM-2	DicF495	525/40	FITC/GFP/AF488
		SPCM-3	DicF555	670/30	PE-Cy5/PerCp/PE-AF647
		SPCM-3	可选配	580/40	PE/AF555/SYTO82
		SPCM-3	可选配	710/40	PerCP-Cy5.5/PE-AF680
	 528 nm	SPCM-1		528/14	SSC
		SPCM-2	DicF555	580/40	PE/AF555/SYTO82
		SPCM-3	可选配	670/30	PE-Cy5/PerCp/PE-AF647
		SPCM-3	DicF650	710/40	PerCP-Cy5.5/PE-AF680
	U30E	 488 nm & 638 nm	SPCM-1		488/10
SPCM-2			DicF495	525/40	FITC/GFP/AF488
SPCM-3			DicF555	670/30	PE-Cy5/PerCp/PE-AF647
SPCM-3			可选配	580/40	PE/AF555/SYTO82
SPCM-3			可选配	710/40	PerCP-Cy5.5/PE-AF680
 528 nm & 638 nm		SPCM-1		528/14	SSC
		SPCM-2	DicF555	580/40	PE/AF555/SYTO82
		SPCM-3	DicF650	710/40	PerCP-Cy5.5/PE-AF680
		SPCM-3	可选配	670/30	PE-Cy5/PerCp/PE-AF647



## 1.3.2 液流系统

液流系统包含两部分：液流容器和液流模块。液流模块位于检测仪主机的右侧，打开右侧门可进行操作或维护。在液流系统中，鞘液以稳定的流速包裹样品流通过流通池，从而保证被测颗粒依次通过检测区。

### 1.3.2.1 液流容器

液流容器包括鞘液瓶和废液瓶，分别置于液流架上，如图 1-4 所示：位于液流架上方的为鞘液瓶，下方的是废液瓶。液流容器内不需要施加额外的压力。对液流容器进行操作时，请做好全面的生物预防措施和个人保护措施。

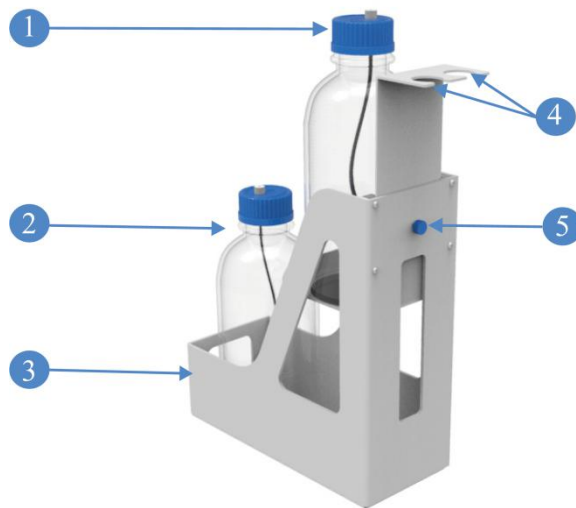


图 1-4 液流容器的外形示意图

- 1) 鞘液瓶：1 L 容量，用于存储鞘液。为保证液流系统的洁净度和稳定性，推荐使用  $0.22\ \mu\text{m}$  滤膜过滤的超纯水作为鞘液。
- 2) 废液瓶：1 L 容量，用于存储废液。使用时请注意生物安全和废弃物标志，并根据实际检测样品做好生物防护和生物处理。
- 3) 液流架：用于放置鞘液瓶和废液瓶。
- 4) 液流容器瓶盖托架：当需要添加鞘液或倾倒废液时，托架用于放置鞘液瓶和废液瓶瓶盖，防止管路损坏或污染。
- 5) 调节旋钮：调节鞘液瓶的高度从而调节鞘流速度。



### 1.3.2.2 液流模块

液流模块位于检测仪主机的右侧，通过打开右侧门可观察液流模块的组成部分，如图 1-5 所示。除液流管路外，右侧门内放置洗液瓶。在仪器日常开机前需检查洗液的体积，并根据实际需要进行添加。

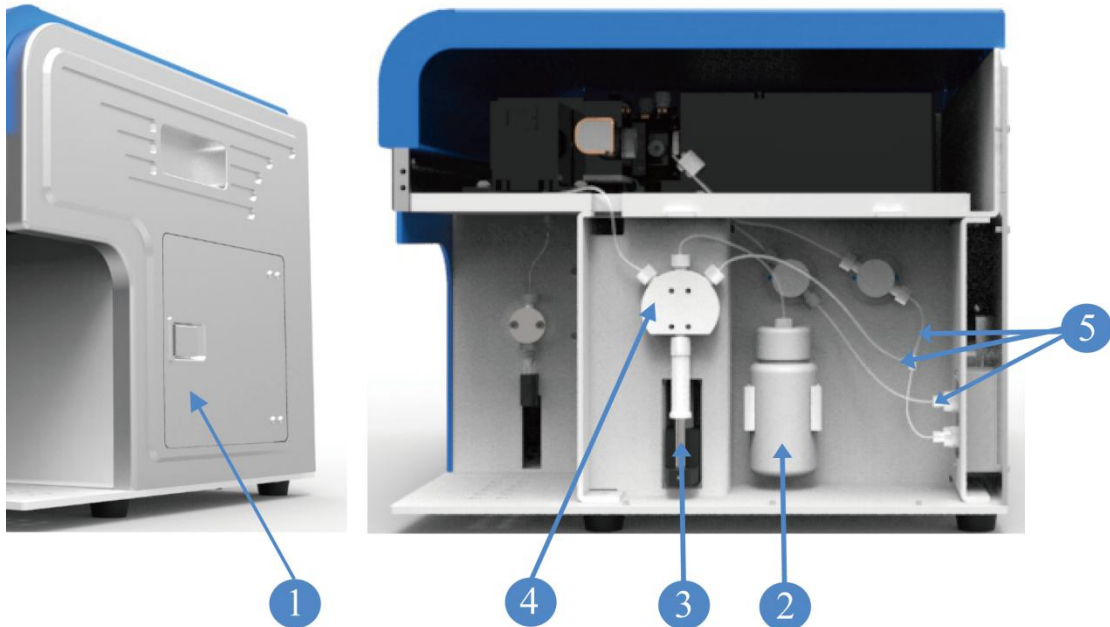


图 1-5 液流模块的外部（左）和内部（右）示意图

- 1) 右侧门
- 2) 洗液瓶：50 mL 容量，用于存储洗液。
- 3) 注射器：用于抽打鞘液和废液，执行 Start up、Purge 和 Shut down 等程序时工作。
- 4) 三通阀：分别连接流动室，洗液瓶，废液管等管路。
- 5) 液流管：连接至废液容器或鞘液容器；将仪器中的废液输送至废液容器或鞘液输送至仪器。

### 1.3.3 进样系统

进样系统主要包含两部分：空气泵和上样装置。

#### 1.3.3.1 空气泵

仪器配置一台空气泵，通过仪器左侧的连接端口与主机相连，如图 1-6 所示。空气泵的主要用途是将样品导入检测区。

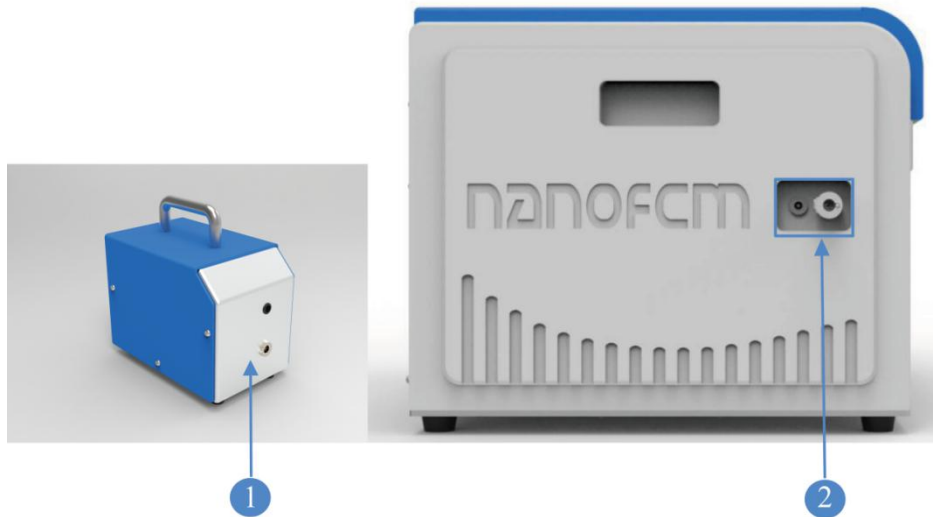


图 1-6 空气泵的外形（左）和连接端口（右）示意图

### 1.3.3.2 上样装置

上样装置的外观和组成部分如图 1-7 所示。



存在有害生物污染和/或仪器损坏的风险

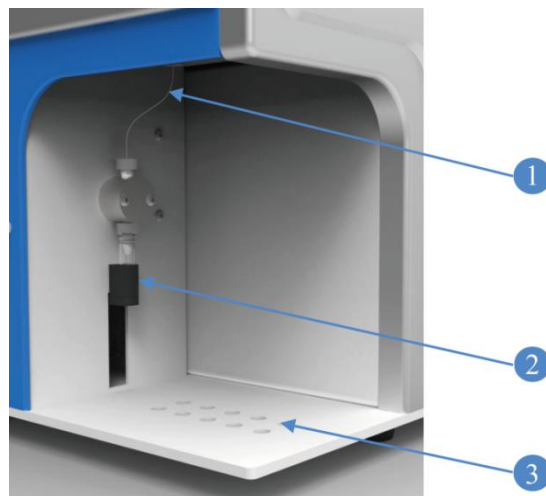


图 1-7 上样装置的外形示意图

- 1) 毛细管：空气泵提供压力将样品压入毛细管内，并传送至流通池。
- 2) 样品管托架：样品检测时用于放置样品管，仅适用于 0.6 mL 离心管。
- 3) 样品管架：用于临时放置待测样品。



### 1.3.4 系统连接

仪器各部位的连接方式，如图 1-8 所示。

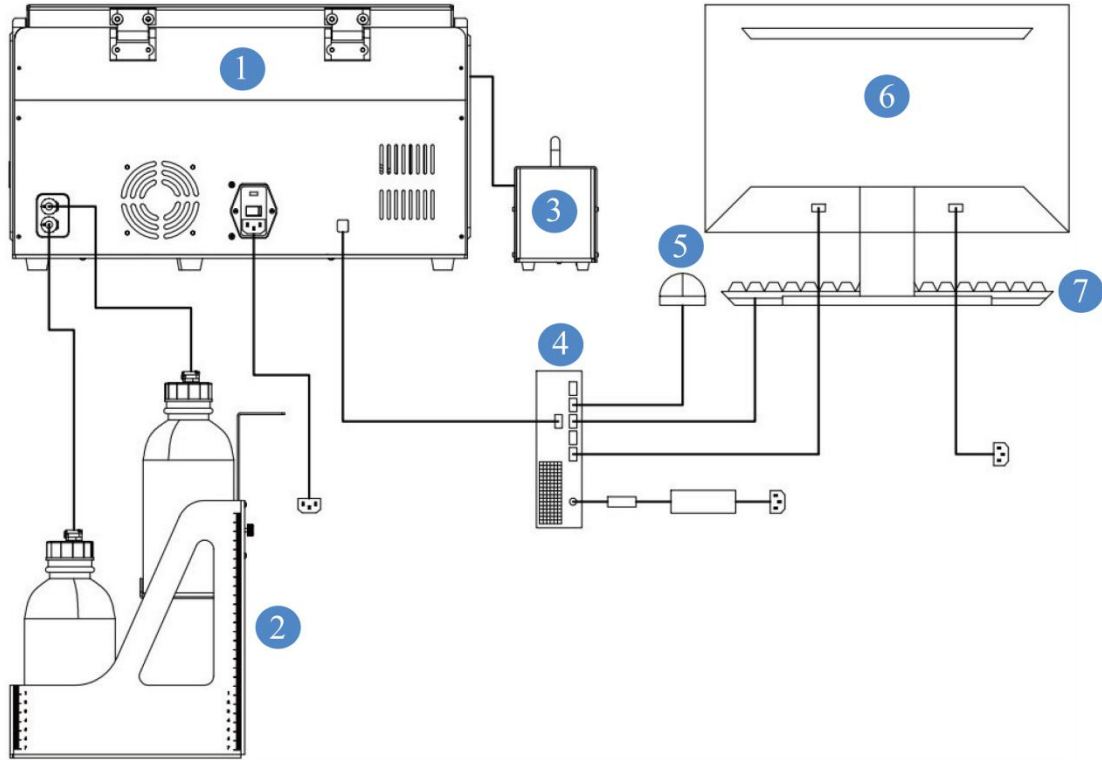


图 1-8 仪器连接示意图

- 1) 纳米流式检测仪
- 2) 液流装置
- 3) 空气泵
- 4) 计算机主机
- 5) 鼠标
- 6) 显示器
- 7) 键盘



### 1.3.5 检测仪后面板

纳米流式检测仪的背面结构，如图 1-9 所示。

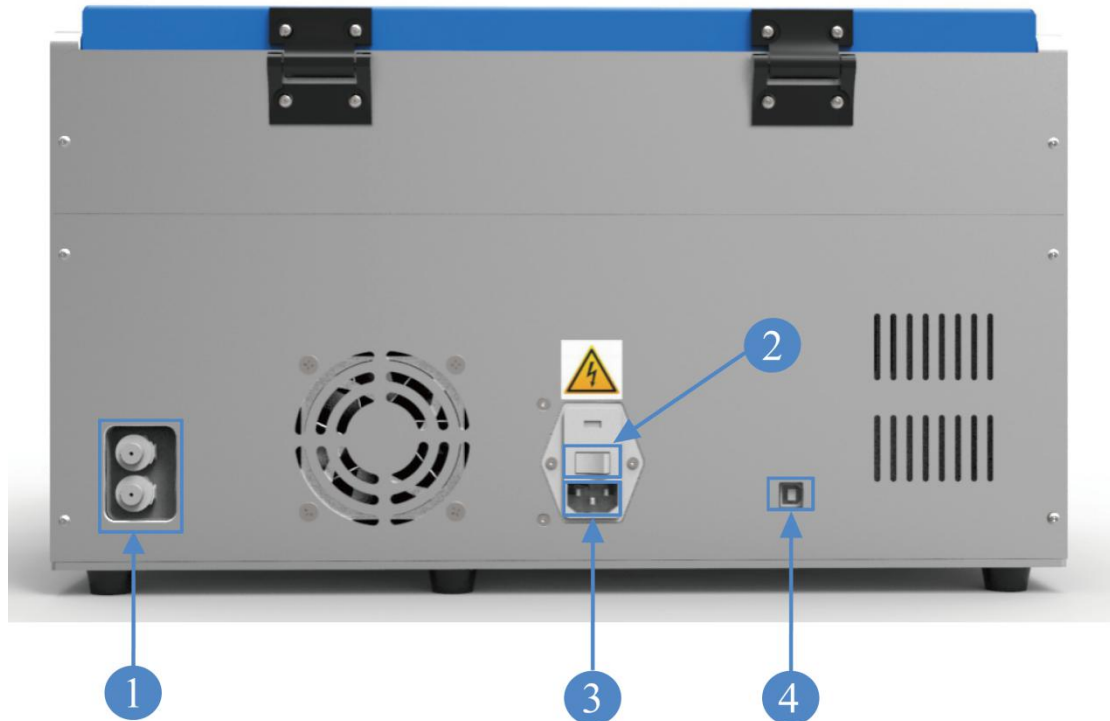


图 1-9 检测仪的背面板

- 1) 液流连接端口：上方是鞘液管连接口，下方是废液管链接口。
- 2) 电源开关：启动和关闭仪器。启动仪器时，前面板电源指示灯亮起。
- 3) 电源端口：为仪器提供电源。
- 4) USB 端口：连接仪器主机与工作站。

 存在数据丢失或仪器损坏的风险。

进行数据采集时请勿关闭电源或断开数据连接线，可能会引起数据丢失或者仪器损坏。



### 1.3.6 检测仪前面板

纳米流式检测仪的前面结构，如图 1-10 所示。



图 1-10 检测仪的前面板

电源指示灯：启动仪器后，电源指示灯亮起。

### 1.4 物品和耗材

纳米流式检测仪日常质控微球是一种荧光微球悬液，用于检测仪的日常校准。

表 1-2 纳米流式检测仪的质控微球

货号	质控微球	缩写
S08210	200 纳米聚苯乙烯荧光微球	200 nm PS
QS2502	250 纳米二氧化硅荧光微球	250 nm SiNPs
QS2503	250 纳米二氧化硅荧光微球（双激光）	Dual laser 250 nm SiNPs



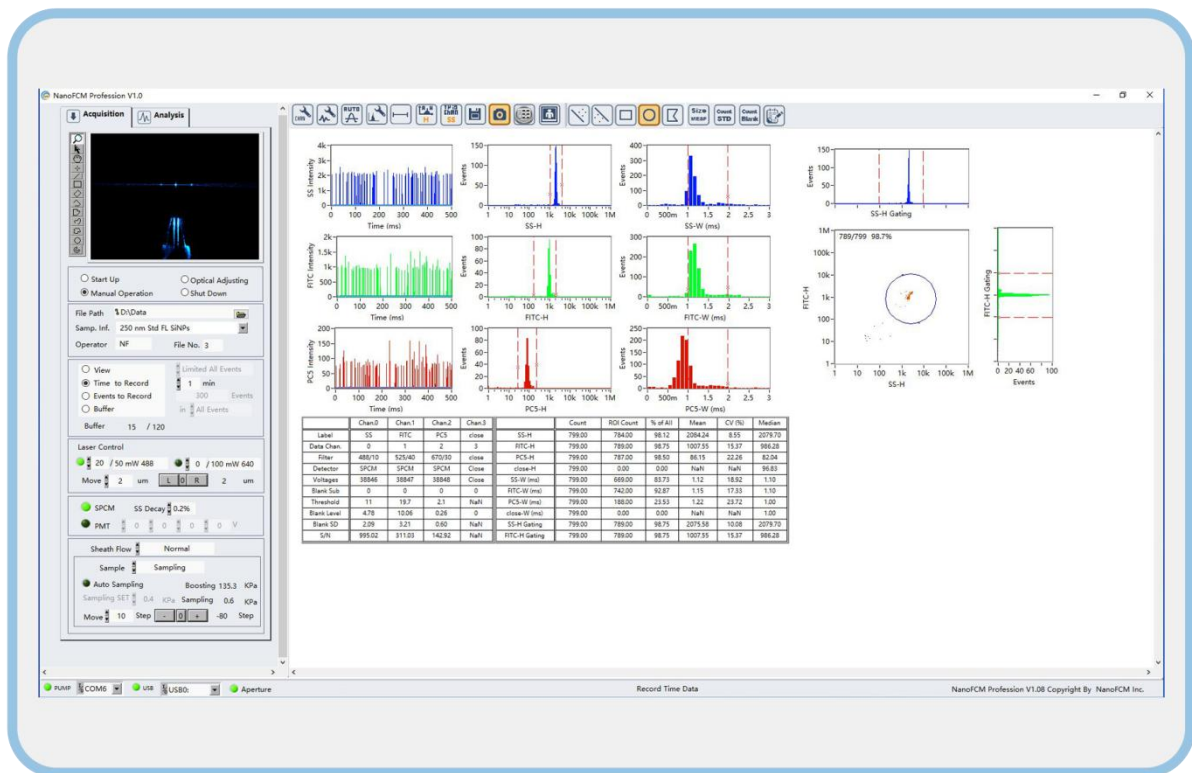
## 1.5 技术参数

表 1-3 纳米流式检测仪的技术参数

NanoAnalyzer	型号	N30E		U30E	
检测器	激光	488 nm	528 nm	488 & 638 nm	528 & 638 nm
	侧向散射 (SSC)	SPCM	SPCM	SPCM	SPCM
	荧光通道 (525/40 nm)	SPCM	—	SPCM	—
	荧光通道 (580/40 nm)	—	SPCM	—	SPCM
	荧光通道 (>650 nm)	SPCM	SPCM	SPCM	SPCM
*SPCM:单光子计数模块;					
光学	激光光斑	6 μm × 24 μm椭圆光斑			
	流通池	250 × 250 μm方形石英池			
	侧向散射灵敏度	< 30 nm			
	侧向散射分辨率	40/50 nm			
	粒径范围	7-1000 nm			
	荧光灵敏度	FITC <10 MESF, PE < 1 MESF			
	荧光分辨率	42/133 MESF			
滤光片	可插拔				
液流	样品通量	10,000 events/min			
	样品流速	2-60 nL/min			
	鞘液流速	10-40 μL/min			
	样品量	10 - 100 μL			
	流体容器容量	1 L 鞘液瓶, 1 L 废液瓶, 100 mL 洗液瓶			
	液流维护	自动初始化、清洗和关机			
数据处理	参数	峰高、峰面积			
	输出格式	NFA 1.0; FCS 3.0;			
	软件	NF Professional 1.0			
采样	手动进样	0.6 mL EP管			
运行条件	设备尺寸 (W × D × H)	50.6 cm × 34.6 cm × 29.0 cm 19.9 in × 13.6 in × 11.4 in			
	设备重量	51.6 lb (23.4 kg)			
	电源	100-240 VAC, 50-60 Hz			
	外界环境	温度: 15-35°C; 相对湿度: 80% maximum			

更多详情请访问网站 [www.nanofcm.com](http://www.nanofcm.com) 或邮件咨询 [info@nanofcm.com](mailto:info@nanofcm.com)

# CHAPTER 02 | NF Profession 1.0 软件





## 第二章

# NF Profession 1.0 软件

### 2.1 软件概述

NF Profession 1.0 是一个综合性软件，控制仪器运行，并提供数据采集和数据分析功能。本章介绍 NF Profession 1.0 软件的特性及功能。

#### 2.1.1 软件启动

双击 NF Profession 1.0 快捷方式 ，软件启动后进入主屏幕界面。在进行后续操作前，确保位于状态栏的空气泵（PUMP）和连接线（USB）的绿色指示灯亮起 。

#### 2.1.2 软件界面

软件的主界面，如图 2-1 所示，主要由 7 个部分组成。



图 2-1 软件主界面



- 1) 导航栏：提供访问数据采集界面/数据分析界面的选项。
- 2) 相机窗口：可实时显示探测区的情况。样品流与激光束正交的区域即为探测区。
- 3) 仪器控制面板：提供模式选择、样品数据存储、样品数据采集、激光器和检测器参数设置等。
- 4) 工具栏：提供数据采集或数据分析的条件设置。
- 5) 图形区：包括实时信号图波形图、统计直方图和二维散点图。
- 6) 参数和统计数据表：提供各个检测通道的参数和统计数据。
- 7) 状态栏：显示仪器连接和狭缝（Aperture）开关状态。

### 2.1.3 导航栏

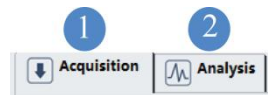


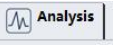
图 2-2 导航栏

- 1) 数据采集界面图标：进入数据采集界面
- 2) 数据分析界面图标：进入数据分析界面

### 2.1.4 数据采集界面

软件打开后默认进入数据采集界面，如图 2-2 所示。可通过鼠标左键单击进行界面切换。在数据采集时不能进行界面切换，否则会造成数据丢失。

### 2.1.5 数据分析界面

点击左上方  图标进入数据分析界面，如图 2-3 所示。除左侧仪器控制面板更改为原始数据列表外，数据分析界面与数据采集界面相似。

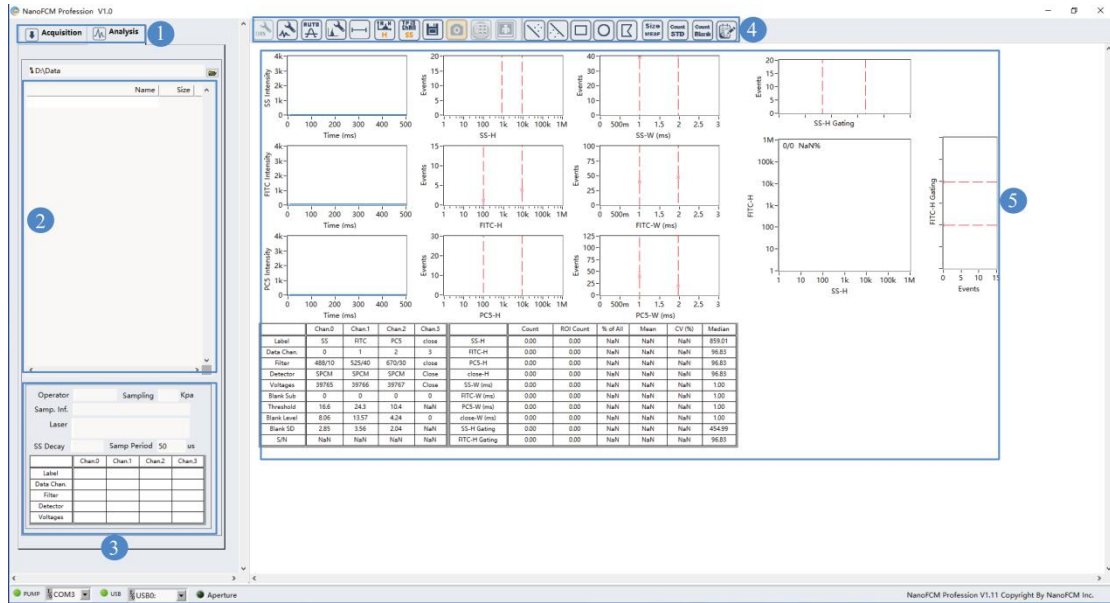


图 2-3 数据分析界面

- 1) 导航栏
- 2) 原始数据列表
- 3) 样品信息与检测参数
- 4) 工具栏：切换到分析界面，检测通道参数设置、相机控制、相机参数设置和图像储存功能关闭。
- 5) 图表区

## 2.1.6 相机窗口

相机窗口位于软件界面左上方，如图 2-4 所示。相机窗口主要拍摄的位置是探测区。通过相机窗口可以实时观察样品流和激光正交区域的变化，样品流与激光正交会产生光斑，光斑直径的大小有助于粗略判断样品的浓度。

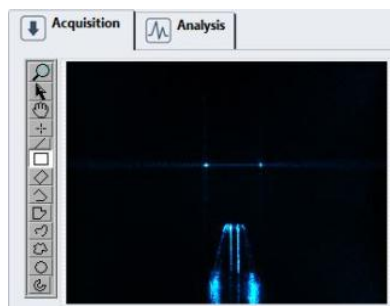


图 2-4 相机窗口界面

激光光斑的相关参数：

Boosting 时激光光斑直径：大于  $40\ \mu\text{m}$ ，如图 2-5 所示。

Sampling 时激光光斑直径：小于  $10\ \mu\text{m}$ ，如图 2-6 所示。

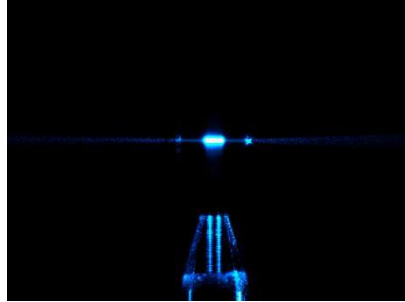


图 2-5 Boosting 时激光光斑（250 nm SiNPs，激光功率：20 mW）

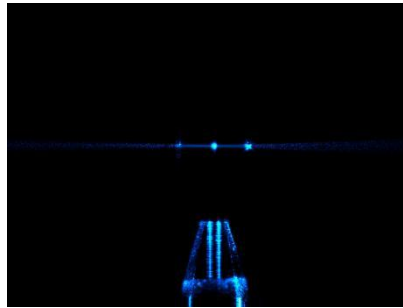


图 2-6 Sampling 时激光光斑（250 nm SiNPs，激光功率：20 mW）

## 2.1.7 仪器控制面板

仪器的控制面板，如图 2-7 所示，主要包括六个部分，具体如下：



图 2-7 仪器控制面板（左边是单激光，右边是双激光）

- 1) 模式选择
- 2) 样品数据存储
- 3) 样品数据采集
- 4) 激光器参数设置（单激光与双激光）
- 5) 检测器参数设置
- 6) 液流和样品流控制



### 2.1.7.1 模式选择

1) 硬件启动模式 (Start Up), 如图 2-8 所示。

点击 Start Up, 仪器将执行以下功能:

- ✓ 开启相机 (相机窗口内可观察到毛细管尖端和激光束)
- ✓ 开启激光器 (激光器控制按钮绿灯亮起)
- ✓ 开启空气泵

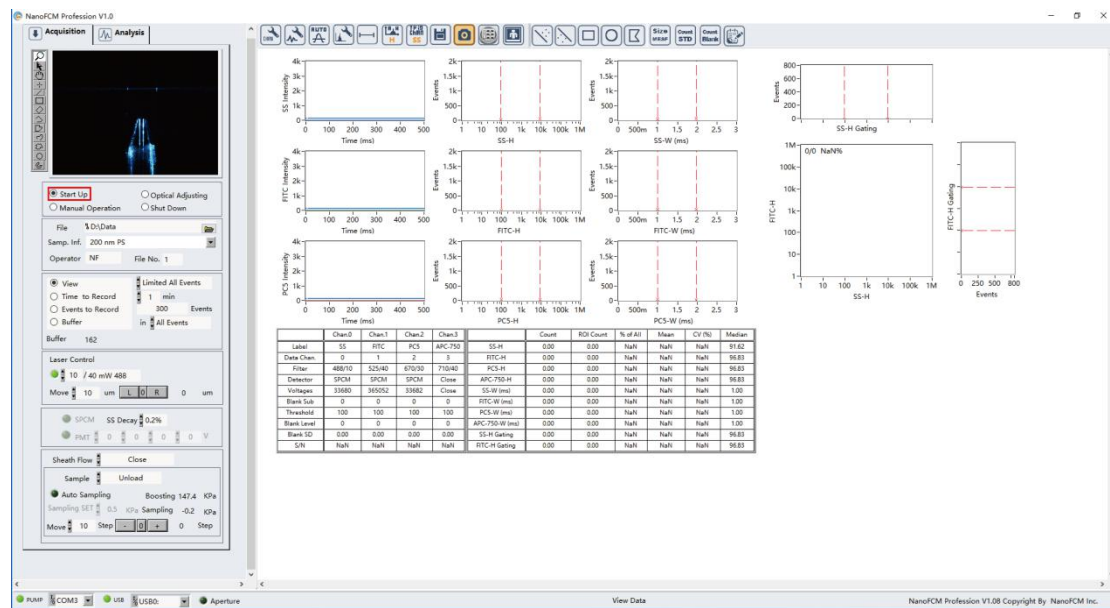


图 2-8 Start Up



2) 光路调节模式 (Optical Adjusting), 如图 2-9 所示。

在光路调节模式下, 所有检测器关闭且不能开启 (检测器参数设置面板内所有指示灯变为灰色), 狭缝 (Aperture) 自动开启 (状态栏狭缝指示灯亮起), 允许光信号通过狭缝进入检测器。

**注意: 未经工程师允许请勿自行运行该模式。**

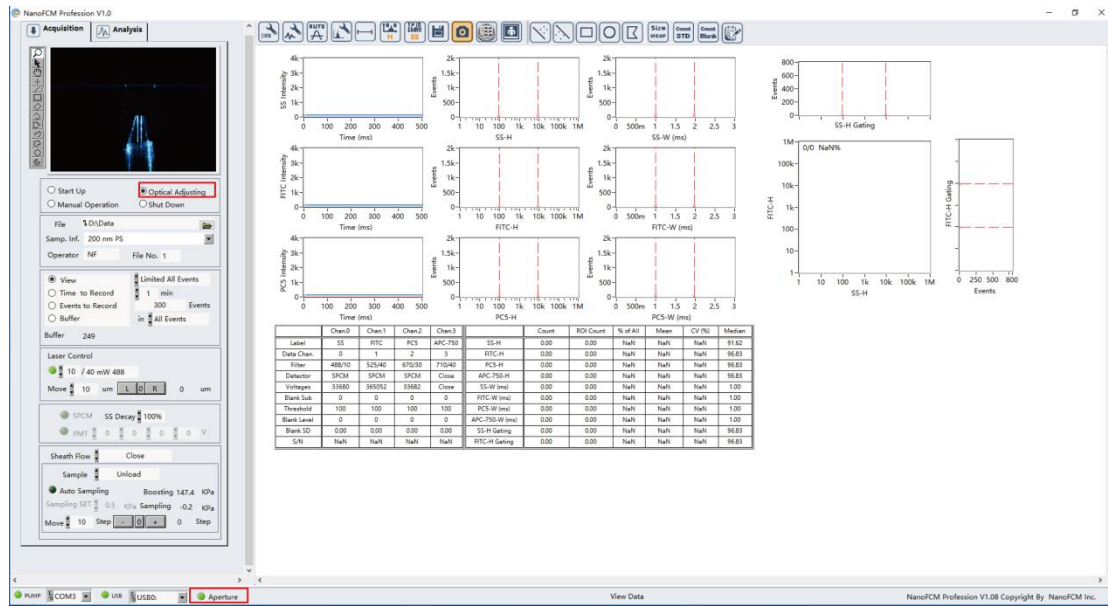


图 2-9 Optical Adjusting



### 3) 样品检测模式 (Manual Operation)，如图 2-10 所示。

样品检测模式用于采集样品数据。在此模式下，检测器可以手动开启与关闭，且狭缝可由软件自动调节。狭缝是保护检测器的装置，开启条件取决于上样压力和各个检测通道的实时脉冲信号强度。Sampling 状态下狭缝开启，Boosting 状态下狭缝为关闭状态，当任一检测通道的平均信号强度达到检测器饱和值时，狭缝自动关闭以保护检测器。

**注意：当 Boosting 样品时请勿手动开启狭缝 (Aperture)，高强度信号可能造成检测器损坏。**

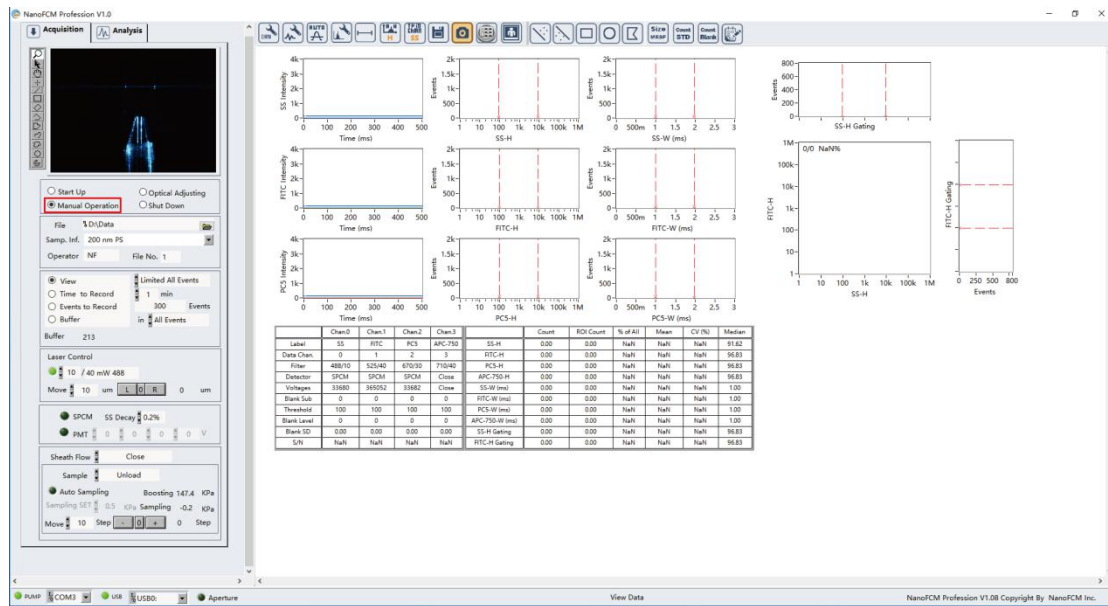


图 2-10 Manual Operation



#### 4) 关机模式 (Shut Down)，如图 2-11 所示。

在关机模式下，激光器和检测器全部关闭。一般在液流深度清洗并关闭后运行该模式。

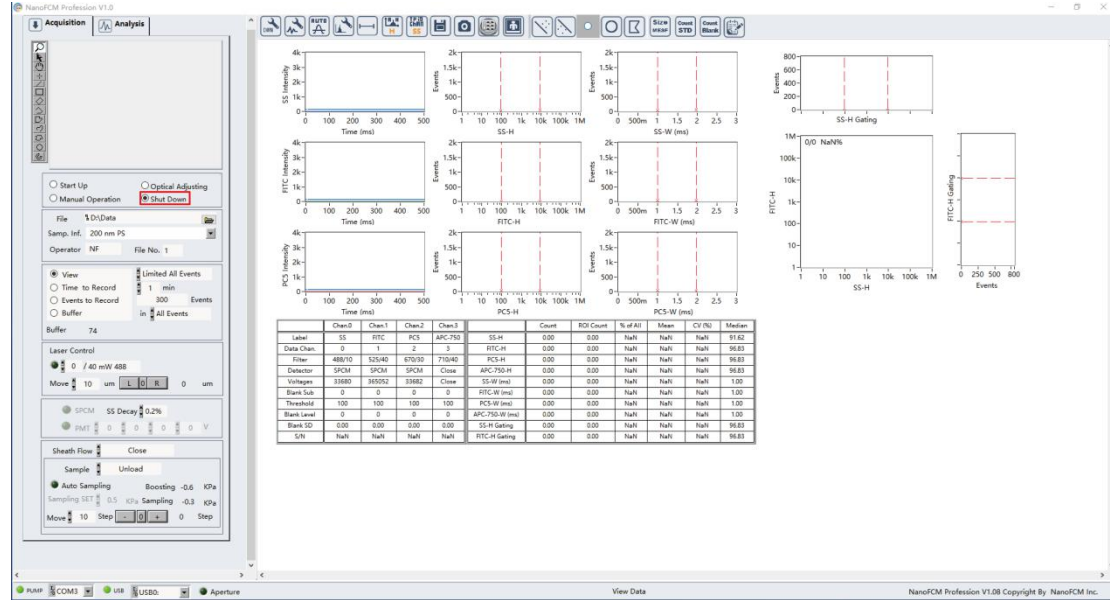


图 2-11 Shut Down

### 2.1.7.2 样品数据存储

如图 2-12 所示，样品数据存储模块主要包括储存路径、样品名称、操作者和文件编号，具体内容如下：

图 2-12 样品信息和数据储存路径

- 1) 存储路径：样品数据存储前，软件自动在 D:\Data 文件夹内生成一个以当天日期命名的文件夹，当天采集的所有样品数据和图像全部存储在此文件夹内。
- 2) 样品信息：单击下拉菜单，根据需要选择样品名称或手动输入样品名称。默认的名称和检测参数如表 2-1 所示。

表 2-1 软件默认设置的样品名称和检测参数

Sample Inf.	Parameters*	
	Laser Power	Attenuation Factor
250nm Std FL SiNPs	20	0.20%
200nm Std FL PS	10	0.20%
68-155 S16M-Exo	5~10	10%
Labelled Exo	5~10	10%
155-850 S17M-MV	10	0.20%
Labelled MV	10	0.20%

- 3) 操作者：默认 NF，可手动更改。
- 4) 文件编号：软件运行后默认编号为“1”，采集数据并存储后，文件编号依次递增。同一天内重启软件后需要手动更改文件编号防止前一次采集的同名数据被覆盖。

### 2.1.7.3 样品数据采集

- 1) 实时观察模式 (View)：在该模式下可以实时观察数据的变化，但是不保存任何数据。该模式仅用于实时观察信号的状态。
- 2) 本机提供两种数据采集模式（时间采集模式和颗粒数采集模式）。

a. 时间采集模式：在固定时间内采集样品信息，默认采集时间为 1 min，

也可根据需要设置合适的采集时间，如图 2-13 左图。

b. **颗粒数采集模式**：采集固定颗粒数的样品信息，可根据需要设置合适的颗粒数量（设置合适阈值后可以选择所有颗粒或门内的亚群颗粒进行计数，然后开始采集数据），如图 2-13 中图。

3) 数据采集结束后软件自动跳转到 **Buffer** 选项，如图 2-13 右图。



图 2-13 样品数据采集

（时间采集模式（左）、颗粒数采集模式（中）和 Buffer（右））

### 2.1.7.4 激光器参数设置

激光器的参数设置主要包括激光开启、激光功率和激光水平位置。目前仪器的型号主要分为单激光和双激光，如图 2-14 所示。



图 2-14 激光器参数设置（单激光（左）和双激光（右））

- 1) 激光器开启后初始默认功率为 10 mW，激光功率可以根据需要更改；需要使用双激光时，点击图 2-14 右图中红色圆圈内按钮，开启红色激光器，可以根据需要进行激光器的开启与关闭。
- 2) 激光束的水平位置可以进行调节（左移或右移）。步长默认值为 10  $\mu\text{m}$ ，Sampling 微调时可改为 2  $\mu\text{m}$ 。点击中间的按钮“0”可将当前的水平位移数值设置为 0（仅将数值标记为 0，不作位置上的归零）。

### 2.1.7.5 检测器参数设置

检测器的参数设置主要包括检测器的开启和衰减系数设置，如图 2-15 所示。

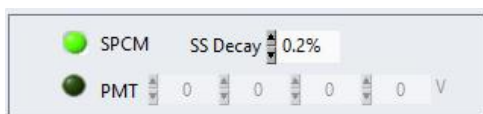


图 2-15 检测器的参数设置

- 1) 单击 SPCM 左侧的绿色按钮开启 SPCM，此时绿灯亮起。
- 2) 散射通道设有衰减片组件，衰减系数分为不衰减(100%)、10 倍衰减(10%)、50 倍衰减(2%)和 500 倍衰减(0.2%)四档。在数据采集时，衰减系数可根据需要进行切换，以免检测器信号饱和。
- 3) 检测器信号饱和值为 3.6 k counts/bin 左右（SPCM 校正前），因此，当检测器信号大于 3.6 k counts/bin 时需要提高衰减系数（散射通道）或降低激光功率。

### 2.1.7.6 液流和样品流控制

液流系统的控制主要包括鞘液流设置、样品流设置、固定进样压力以及进样压力调节等，如图 2-16 所示。

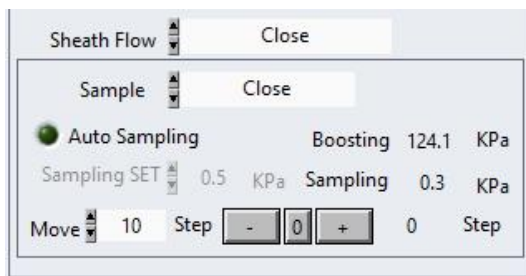


图 2-16 液流系统的设置

- 1) 鞘液流的下拉框包括六个选项，如图 2-17 所示：

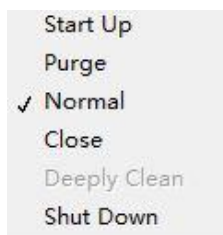


图 2-17 鞘液流的设置

**Start Up:** 初始化液流系统，用于日常开机程序。

**Purge:** 抽取干净的鞘液冲洗整个液流系统，可用于排除液流管中的气泡。

**Normal:** 表示液流系统开启/处于待机状态，可进行样品检测。

**Close:** 表示液流系统关闭。

**Shut Down:** 深度清洗并关闭液流系统，用于日常关机程序。

当 **Start Up** 和 **Purge** 程序运行结束时，鞘液流自动跳转到 **Normal** 模式。

当 **Shut Down** 程序运行结束时，鞘液流自动关闭，显示为 **Close**。

- 2) 样品流的下拉框包括四种模式，如图 2-18 所示：

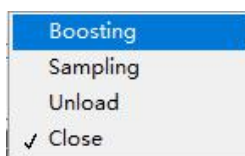


图 2-18 样品流的设置

**Boosting:** 高压进样，将样品快速引入检测区。

**Sampling:** 低压进样，用于数据采集。

**Unload:** 卸载样品管。

**Close:** 关闭空气泵。

- 3) 进样压力的设置：单击“+”提高 **Sampling** 压力，单击“-”降低 **Sampling** 压力。当位移超出-500~1500 的范围时需要点击中间的“0”进行归零，归零前需要将上样管 **Unload** 下来；在进行样品浓度检测时，如果需要固定进样压力，可以点击 **Auto Sampling** 左侧的绿色按钮开启固定进样压力，同时在 **Sampling SET** 右侧框内输入需要固定的压力值（如 1.0 kPa），如图 2-19 所示；**Boosting** 压力为固定值，不可调节。

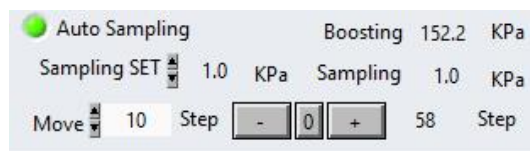


图 2-19 固定进样压力

## 2.1.8 工具栏



工具栏各项功能如下：



### 检测通道参数设置

检测通道的参数主要包括通道名称、检测器类型、滤光片和通道颜色，如图 2-20 所示。当更换滤光片需要进行参数修改时进行以下操作：

在标签栏中选择需要的检测通道名称或滤光片参数，其他参数会自动修改；

检测通道参数修改是一次性的，当软件关闭后又会恢复到出厂设置；如需保存，请点击 Save Con File 保存修改后的参数，后续可直接点击 Read Con File 进行调用；

检测通道参数修改仅在采集界面可以修改，进入分析界面时，无法修改该通道的参数。

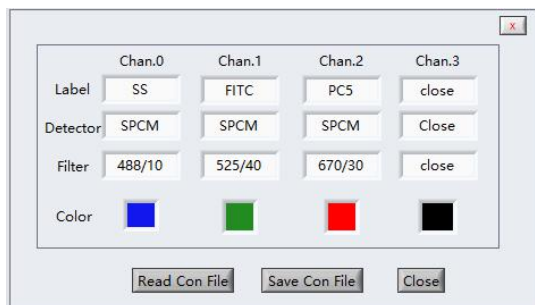


图 2-20 检测通道参数设置



### 信号处理

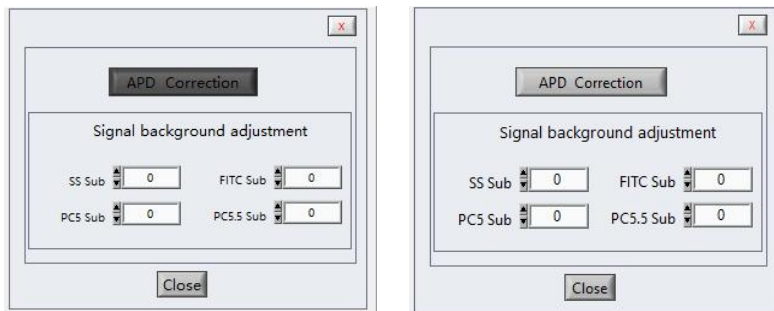


图 2-21 数据校正（左）和数据非校正（右）

- 1) **APD 校正**: 当每个光子被检测时从检测器上输出一个 TTL 脉冲, 检测器在输出一个电脉冲之后的死时间内不能对新的入射光子做出响应, 要得到实际的脉冲计数必须对计数器检测道的脉冲数进行校正。当软件切换到数据分析界面时, APD 校正自动应用于保存的数据。关闭数据校正可点击 APD Correction, 此时图标颜色变浅, 如图 2-21 所示。
- 2) **背景基线调整** (可选, 仅在背景值较高时使用), 在对应检测通道的背景基线扣除方框内输入数值即可, 例如 SS Sub 2000, 背景基线的变化, 如图 2-22 所示。

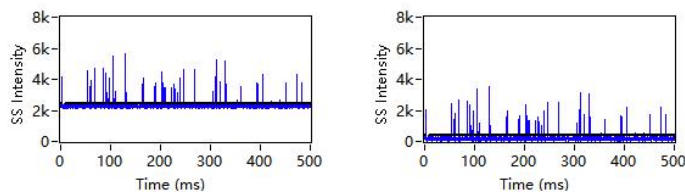


图 2-22 散射脉冲信号图 (未扣背景 (左) 和扣背景 (右))



### 阈值设置

设置阈值的目的是将信号和背景区分开。阈值的设置可以通过自动或手动方式, 阈值的模式主要包括三种: 小信号模式、大信号模式和自定义模式, 如图 2-23 左图所示。三种模式的适用范围如下:

- 1) **小信号模式**: 适用于大多数天然或人工合成的纳米颗粒 (粒径小于 200 nm), 如外泌体、病毒、纳米药物等。
- 2) **大信号模式**: 适用于粒径大于 200 nm 的颗粒。
- 3) **用户自定义**: 包括两种方式, 一种是根据阈值等于背景加上 N 倍标准方差, 手动输入 N 的数值, 如图 2-23 中图所示; 另一种是直接手动输入阈值, 如图 2-23 右图所示。

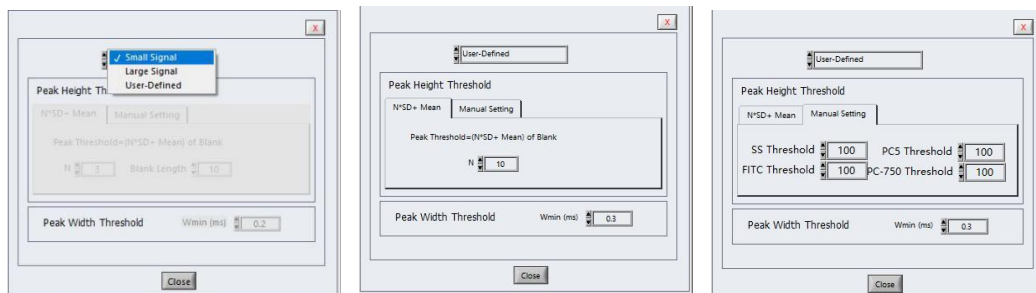


图 2-23 阈值设置

## 数据显示设置

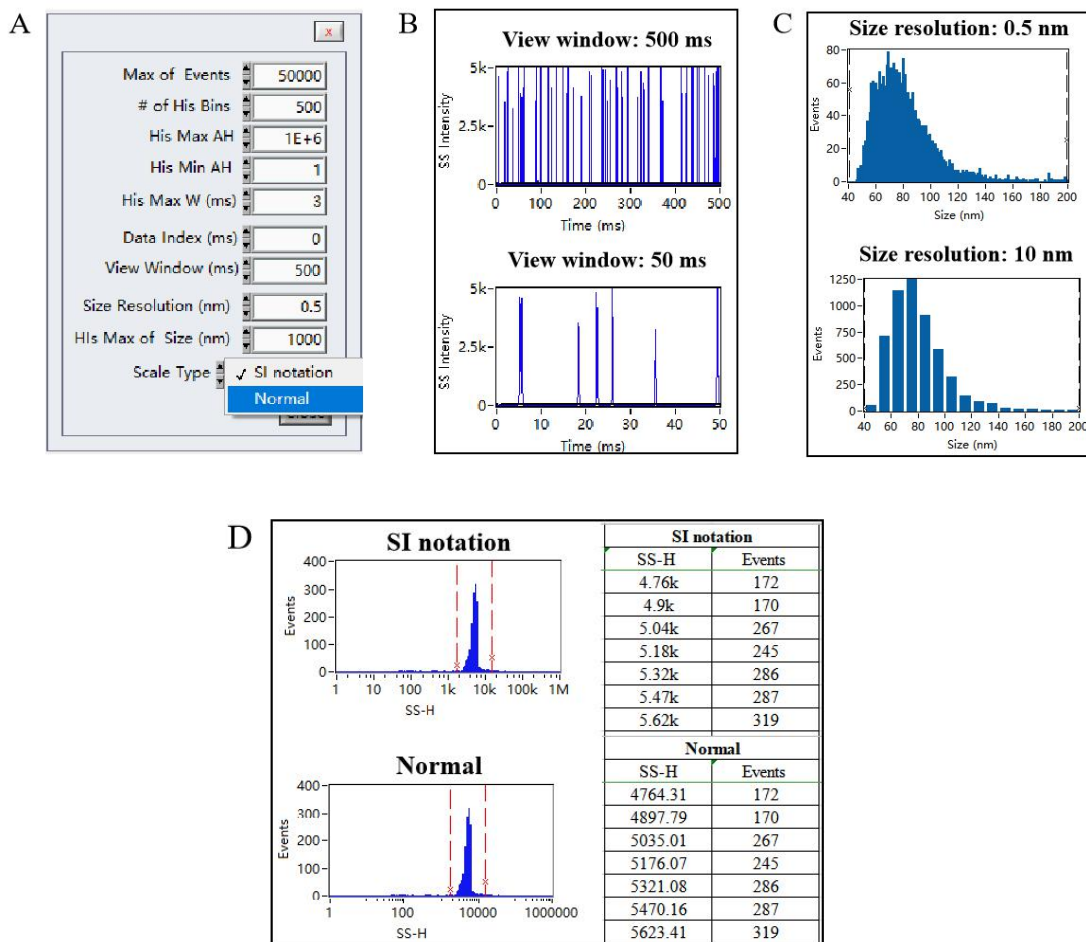


图 2-24 数据显示设置

该图标可以对图表区的显示参数进行设置，如图 2-24-A 所示。

- 1) **View Window:** 可以更改实时脉冲信号图显示的时间长度，例如调小时间长度可以观察颗粒是单个通过的，如图 2-24-B 所示。
- 2) **粒径分辨率 (Size Resolution):** 通过调节粒径分辨率，可以导出不同粒径分辨率的结果报告，默认的分率为 0.5 nm，如图 2-24-C 所示。
- 3) **刻度类型 (Scale Type)** 分为符号模式和数字模式，相应的峰高直方图横坐标刻度显示和导出的峰高原始数据形式如图 2-24-D 所示。



### 重置红色竖线门

用于将红色竖线门恢复到初始位置，如图 2-25 所示。鼠标左键单击即可，也可根据需要手动拖拽更改圈门位置。

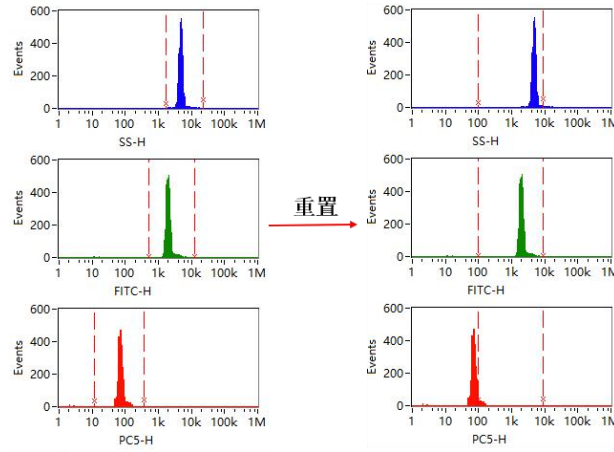



图 2-25 重置红色竖线门



### 统计直方图数据类型

用于设置统计直方图显示的数据类型，根据需要选择峰高或峰面积模式。单击  进行设置，如图 2-26 所示。“A”表示峰面积，“H”表示峰高，各个检测通道的数据类型显示在检测通道名称后。

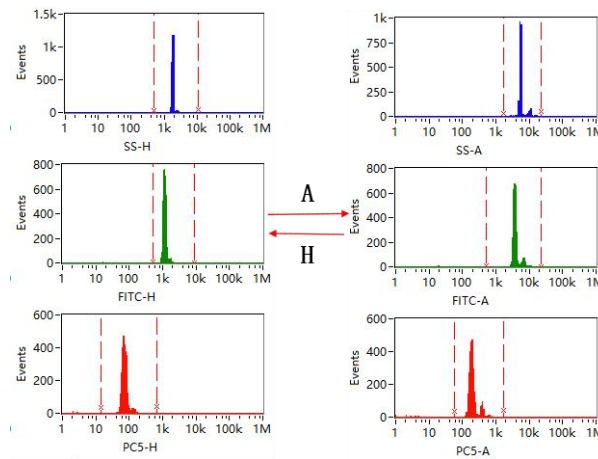


图 2-26 统计直方图（峰高（左）和峰面积（右））


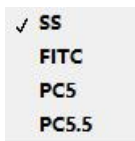
 触发通道

图 2-27 触发通道

触发通道是指数据分析时以该通道采集的颗粒为基准进行分析。例如，SS 为触发通道，表示具有散射信号的颗粒才会被分析，如果颗粒只具有荧光信号而不具有散射信号则不计入分析。数据处理时可根据需要进行选择，默认触发通道为侧向散射通道，如图 2-27 所示。

注：不管触发通道的选择如何，数据采集时，每一个通道的信息都会被采集。


 数据存储

图 2-28 数据类型

数据储存类型主要包括 4 种，如图 2-28 所示，具体每种类型的用途如下所示：

- 1) **Nfa 文件**：由厦门福流开发和定义的软件格式，包含所有的原始数据信息。该类型文件仅能通过 NF Profession 1.0 软件进行查看和分析。
- 2) **FCS 3.0**：由国际流式细胞术促进会定义的流式细胞术标准文件格式，可通过 FlowJo，或 FCS Express 等软件进一步分析。该文件格式需在设定阈值后方可导出。
- 3) **Data view**：仅保存实时脉冲信号图的数据（默认时间 500 ms）。
- 4) **Size or MESF**：保存纳米颗粒粒径或荧光当量信息，必须在粒径标准品或荧光当量标准品拟合标准曲线之后方可导出。数据的排列方式是按时间顺序。

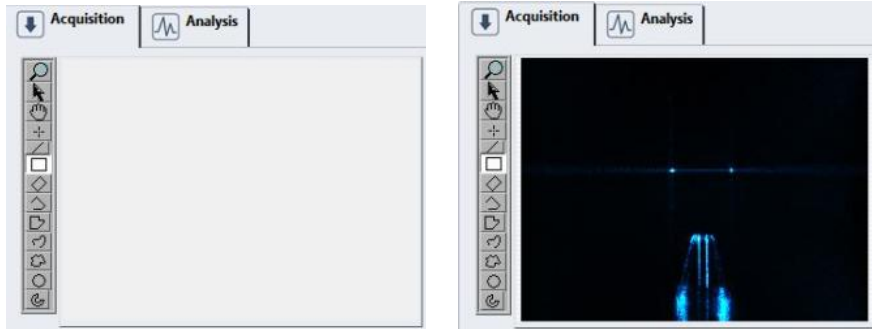
**相机控制**


图 2-29 相机的关闭（左）和开启（右）

图标显示为橙黄色表示相机已打开，可对检测区进行实时观察。相机开启和关闭的状态，如图 2-29 所示。右图显示激光束和流动室的情况。

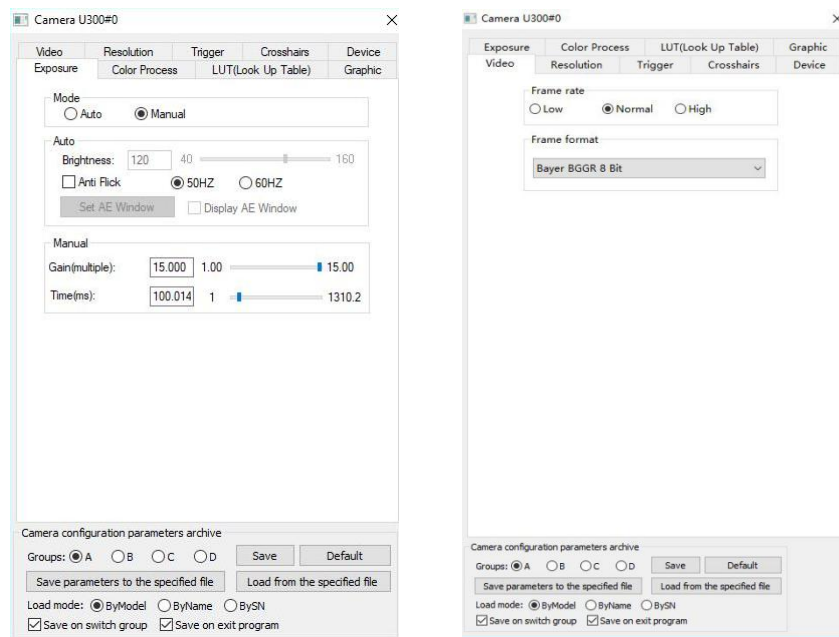

**相机参数设置**


图 2-30 相机曝光时间（左）和帧速率（右）设置

- 1) 确保曝光时间（Time）设置合理（短于 150 ms），曝光时间过长可能引起响应延迟，如图 2-30 左图所示。
- 2) 确认 Video 窗口的帧速率（Frame rate）为常规（Normal）选项，如图 2-30 右图所示。

 图像存储

单击该图标保存当前相机窗口的图像，该图像可提供一些仪器状态的信息。

 圈门方式

软件内提供多种圈门方式：

- 1) 对于一维图（统计直方图）：竖线门
- 2) 对于二维散点图：直线门、矩形门、椭圆形门、多边形门。散点图上方和右侧的统计直方图分别显示门内的颗粒在各个检测通道的统计分布情况。


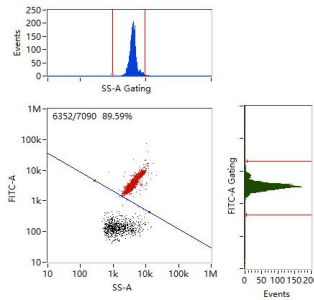
 直线门-上方

图 2-31 直线门上方示意图


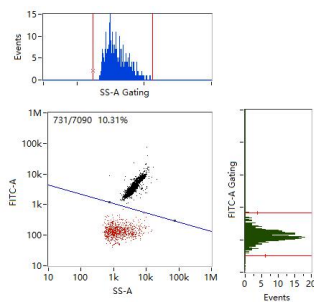
 直线门-下方

图 2-32 直线门下方示意图

矩形门

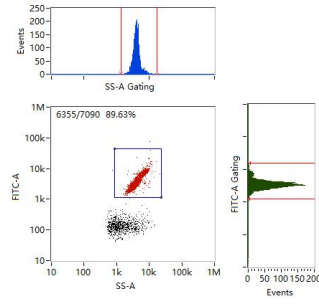


图 2-33 矩形门示意图

椭圆形门

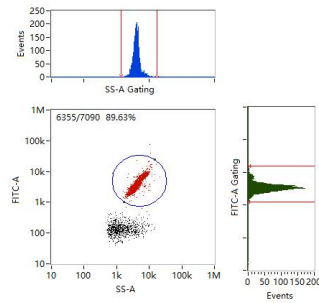


图 2-34 椭圆形门示意图

多边形门

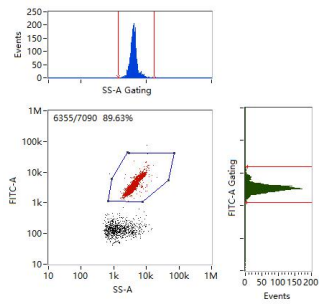


图 2-35 多边形门示意图



## 粒径和 MESF 分析

以粒径分析为例，粒径标准品参数设置如图 2-36 所示：

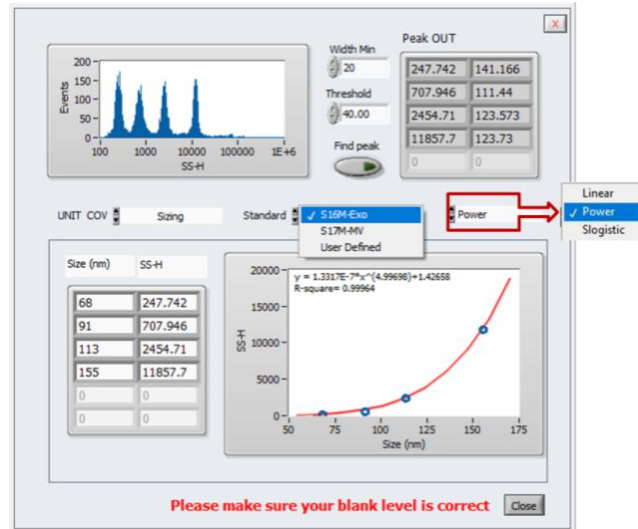


图 2-36 粒径和 MESF 参数设置

设置合适的峰宽 (Width) 和阈值 (Threshold)，在 Standard 中选择 S16M-Exo (S16M-Exo 为二氧化硅粒径标准品，用来进行外泌体粒径分析)，函数关系选择 Power，然后点击 Find peak，软件自动进行标准曲线拟合。



## 浓度标准品

对浓度标准品进行阈值设置和圈门后单击此图标，完成浓度标准品设置。

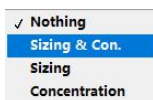


## 浓度空白对照

选择空白对照样品，设置阈值后单击此图标，完成浓度空白对照设置。



## 数据报告



下拉框包括粒径报告、浓度报告、粒径浓度综合报告，可以根据需要导出粒径报告、浓度报告或粒径浓度综合报告。例如：外泌体粒径浓度综合报告，如图 2-37 所示。

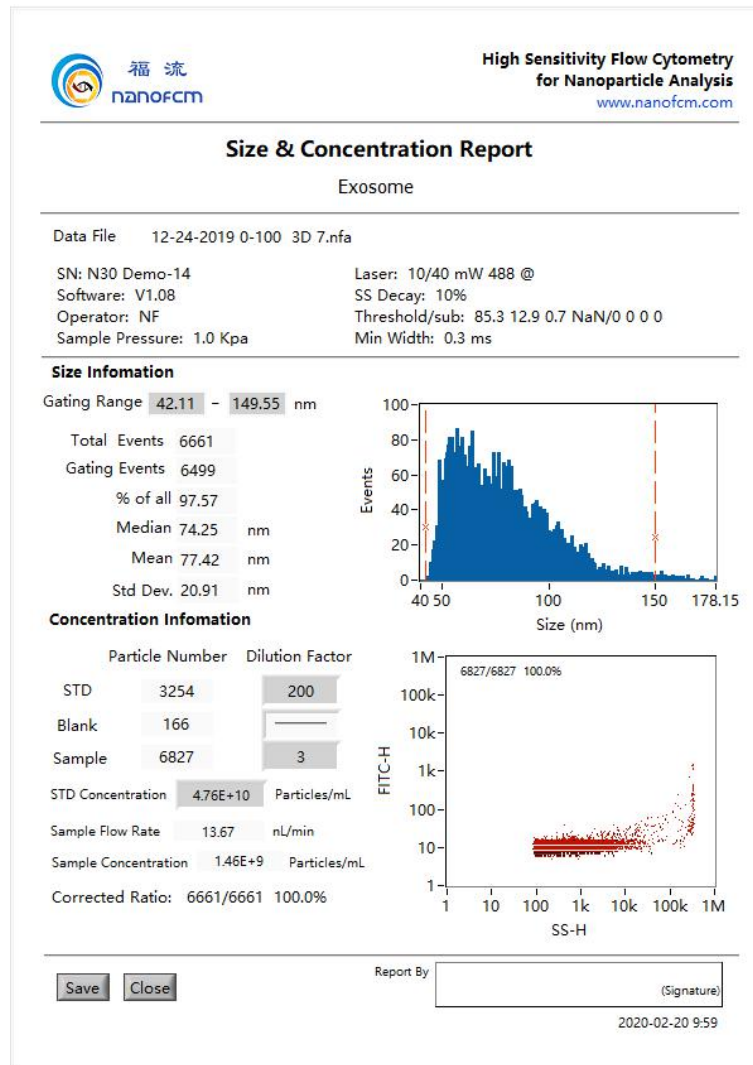


图 2-37 粒径和浓度综合报告

粒径信息：左侧是粒径的相关参数，可以通过手动圈门或者在 **Gating Range** 输入粒径范围，得到感兴趣的粒径范围；右侧是粒径分布图，右击分布图可以导出粒径分布图以及原始粒径数值。

浓度信息：手动输入浓度标准品稀释倍数、浓度标准品浓度、样品稀释倍数，软件自动进行样品浓度计算；如果样品有荧光，则可以得到荧光比例信息。

点击左下方 **Save** 可保存为 PDF 文件。

## 2.1.9 图表区

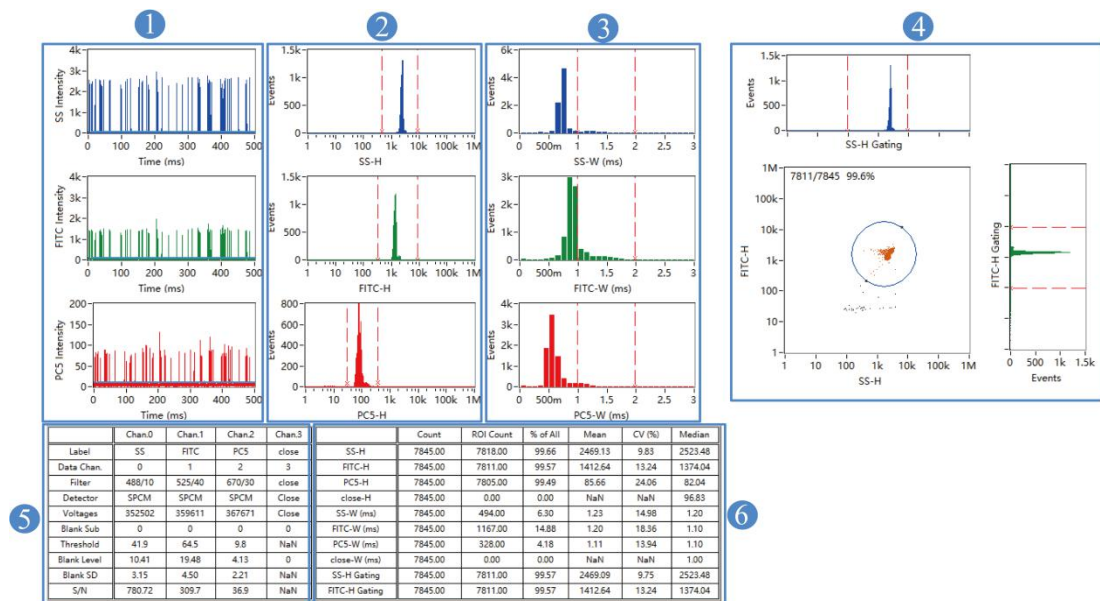


图 2-38 图表区

图表区主要包括 6 个部分，如图 2-38 所示，具体名称和功能如下：

- 1) 实时信号波形图：显示各个检测通道的实时波形信号。
- 2) 统计直方图-峰高/峰面积：显示各个检测通道峰高/峰面积的统计直方图。
- 3) 统计直方图-峰宽：显示各个检测通道峰宽的统计直方图。
- 4) 二维散点图与圈门：显示二维散点图（可根据需要选择不同检测通道）和圈内颗粒在各自检测通道的统计直方图。
- 5) 参数表：显示仪器各项参数，包括检测通道名信息、带通滤光片信息、检测器参数，阈值、背景值、信噪比等。
- 6) 统计数据表：包括各个检测通道竖线门内颗粒总数、比例统计、平均值、中位数值、变异系数（Coefficient of Variation, CV）、标准差等。CV 为标准差与平均值的比值，对于同一个信号强度均值，CV 值越小，信号越均一。



### 2.1.10 状态栏



图 2-39 状态栏

状态栏主要显示三种连接状态，包括空气泵（PUMP）、软件与仪器的连接（USB）以及狭缝（Aperture），如图 2-39 所示。启动 NF Profession 1.0，与仪器主机连接成功后，空气泵和 USB 端口的绿色指示灯自动开启，上样前请确认两个指示灯均正常亮起。狭缝用于控制进入检测器的光强度，由软件自动控制，请勿自行操作。

**注意：当 Boosting 样品时请勿手动开启狭缝，高强度信号可能缩短检测器使用寿命。**

# CHAPTER 03 | 日常开机





## 第三章

# 日常开机

### 3.1 开机前准备

**耗材:** 0.6 mL 标准样品管（普通，NanoFCM-SLT-N）；0.6 mL 标准样品管（低吸附，NanoFCM-SLT-L）

**溶剂:** 所有的溶剂和缓冲液均需过膜后使用（0.22 μm 滤膜），包括鞘液和洗液。

**液流容器:** 检查液流架液面高度差（鞘液液面和废液液面的高度差），推荐废液液面在 100 mL 左右（请勿清空废液瓶，需保证废液管头插入液面以下），调节鞘液液面高度使液面高度差在 20-30 cm。打开右侧门，确保洗液瓶内存储足量洗液（大于 10 mL，每隔一周更换一次新鲜洗液）。

**注意:** 如果长期没有使用仪器（如两周左右），请更换新鞘液（润洗鞘液瓶 3 次），盖紧瓶盖，保证所有管路连接正常。



### 3.2 开机流程

#### 3.2.1 打开检测仪主机和电脑工作站

**检测仪主机:** 确认仪器后面板端口连接正常后，打开后面板电源开关，此时前面板指示灯亮起（仪器运行时绿灯长亮）。

**电脑工作站:** 打开电脑开关。

#### 3.2.2 启动软件

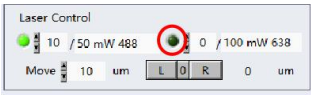
双击桌面 NF Profession 1.0 快捷方式 ，当听到两声“嘀——嘀——”的声音表示仪器连接成功。在进行后续操作前，检查确认状态栏 PUMP 和 USB 指示灯正常开启 




### 3.2.3 仪器初始化

- 1) 点击模式选择面板的开机模式  进行系统初始化，此时包括相机、激光器和空气泵等硬件将自动开启。

- 2) 手动设置激光功率 ，默认值为 10 mW，样品采集时可

- 手动更改； 双激光仪器需手动点击开启 638 nm 激光器。

- 3) 点击  图标可进行相机图像拍照并存储。建议日常开机 Boosting 洗液时采集相机图像记录液流状态。

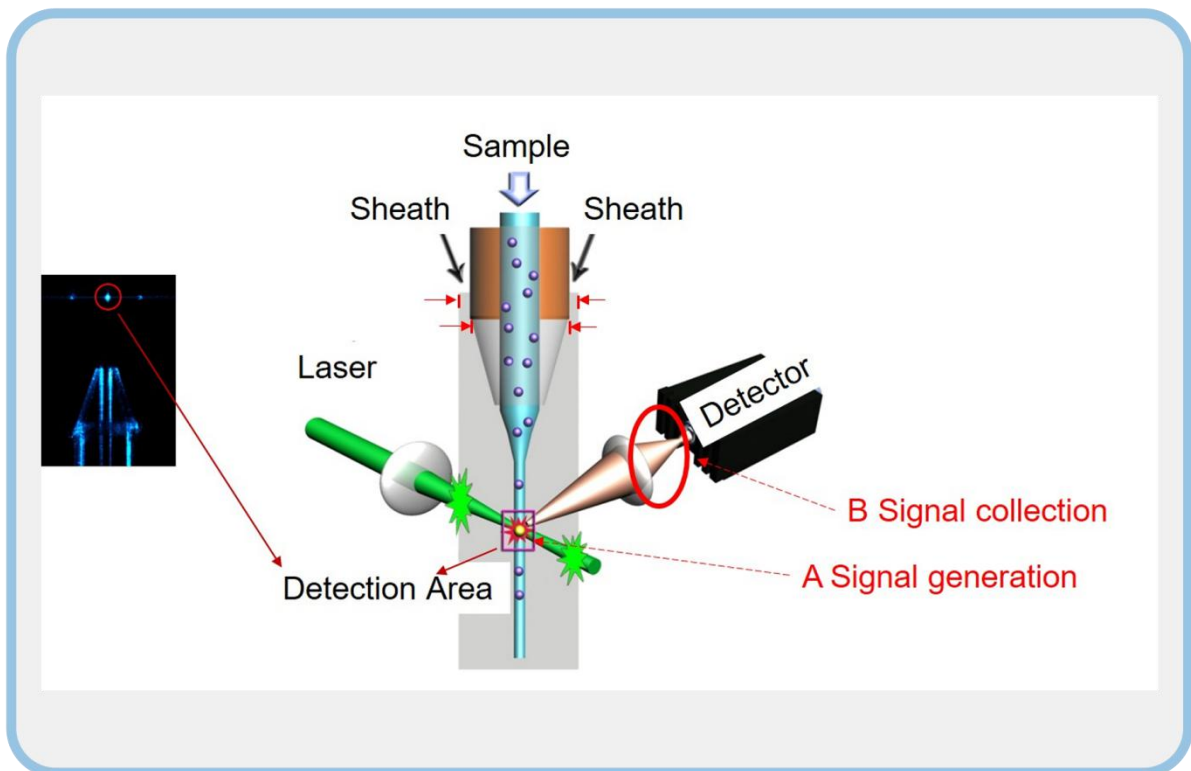
### 3.2.4 液流初始化

- 1) 点击液流控制面板 Sheath Flow 下拉菜单,选择 Start Up 进行液流初始化(大约 4 min)，同时将一管超纯水 (150  $\mu$ L) 放置在样品管托架上，点击 Sample 下拉菜单，选择 Boosting，排除毛细管内气泡。Start Up 结束后点击 Unload 卸载样品管。

**注意：**液流初始化程序 Start Up 运行时，液流控制面板的图标自动变为灰色，同时图标右侧出现倒计时。在该程序运行过程中请勿进行其他液流系统的操作。

- 2) 液流系统内的气泡可能导致液流不稳定，在 Start Up 结束后需进行排气泡操作，先 Load 空管，Sample--Boosting，30 s 后 Unload，再 Load 超纯水，Sample--Boosting，同时 Sheath Flow--Purge。

# CHAPTER 04 | 仪器校准和 数据采集





## 第四章

# 仪器校准和数据采集

### 4.1 引言

每日样品测试前需要对系统进行校准和质控。通过追踪对比校准结果可以确保实验结果的稳定性和可靠性。

#### 4.1.1 质控微球

表 4-1 质控球类型

质控微球	缩写
200 纳米聚苯乙烯荧光微球	200 nm PS
250 纳米二氧化硅荧光微球	250 nm SiNPs
250 纳米二氧化硅荧光微球（双激光）	Dual laser 250 nm SiNPs

#### 4.1.2 检测样品参数推荐

粒径大小：< 1000 nm

浓度： $1 \times 10^8$ - $1 \times 10^9$  particles/ mL

上样体积：10-100  $\mu$ L

采样压力：0.5-1.5 kPa, 不超过 2.0 kPa

## 4.2 仪器校准

- 1) 点击控制面板 Manual Operation 按钮切换至样品检测模式。
- 2) 将一管 250 nm SiNPs (100  $\mu$ L) 放置在样品管托架上, 然后点击 Sample--Boosting, 持续 Boosting 60 s 将样品导入检测区。
- 3) 光路粗调 (可选)

Boosting 时在相机窗口应能看到样品流与激光束正交产生的激光光斑, 如无光斑或光斑很弱, 则需要调节激光的水平位置。激光光斑的大小, 如图 4-1 所示。

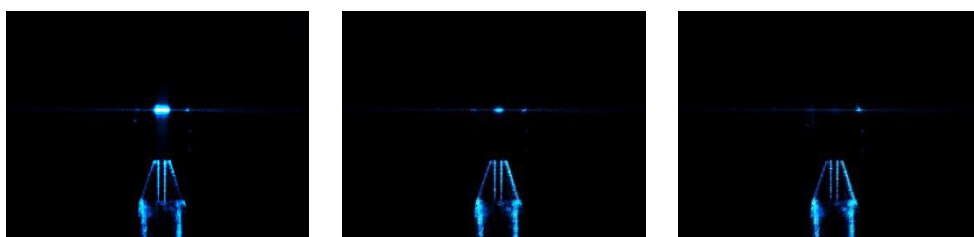


图 4-1 Boosting 时激光光斑 (250 nm SiNPs, 20 mW)

(正常光斑大小 (左)、光斑很弱 (中) 和无光斑 (右))

调节激光水平的方法: 点击激光器参数设置面板 “R” 或 “L” 直到相机窗口激光光斑最大最亮 (使用激光器参数设置面板默认步长 10  $\mu$ m)。

- 4) 光路精细校准

✓ 激光水平位置的校准

### 单激光校准

① 打开 488 nm 或 528 nm 激光器, 确认 Boosting 时间超过 60 s 且相机窗口的激光光斑正常; 设置合适的检测条件和样品名称 (例如 250 nm SiNPs, 可直接在 Samp. Inf. 下拉菜单中选择 250 nm Std FL SiNPs, 检测条件自动设置为 20 mW 0.2%); 单击 Sample--Sampling。

② 单击检测器参数设置面板上的 SPCM 指示灯打开检测器。将激光束水平移动的步长调节至 2  $\mu$ m, 点击 “R” 或 “L” 调节激光束水平位置使样品实时脉冲信号强度最强且均一。

**注意:** 当实时脉冲信号强度大于或等于 3.6 k counts/bin 时 (数据采集界面), 检测器饱和, 需要提高衰减系数或降低激光功率。

### 双激光校准

① 将两个激光都打开，638 nm 激光器需要手动打开并设置激光功率。设置检测条件（在 Samp. Inf. 下拉菜单中选择 250 nm Std FL SiNPs，检测条件为 20 mW（488 nm 或 528 nm）、20 mW（638 nm）和 0.2%），按照单激光调节方法进行调节。

- ✓ 光收集位置的校准

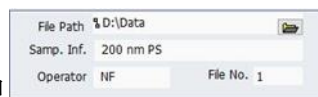


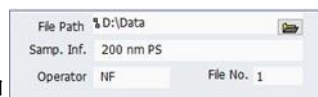

图 4-2 XY 轴调节架示意图

光收集位置的校准方法：先调节 XY 轴调节架的水平位置（X 轴）旋钮使实时信号波形强度最强且信号均一，然后用相同的方法调节竖直方向（Y 轴）旋钮；先调节第一荧光通道，然后调节第二荧光通道，最后调节散射光通道。

重复以上光路精细校准的步骤直至实时信号波形强度最强且信号均一。

## 4.3 数据采集



- 1) 在样品数据存储面板内填写样品信息 。数据和相机图像均存储在 D:\Data 中以当天日期命名的文件夹内。
- 2) 点击样品数据采集面板的时间采集模式（默认时间为 1 min）开始采集数据。
- 3) 数据采集结束后自动跳转到 Buffer 状态。点击工具栏  按钮选择 Nfa File，将文件存储为 Nfa 格式。该格式包含样品的所有信息，如需其他格式的文件，请分析数据后再另行保存。



- 4) 点击样品流控制面板 Sample--Unload 卸载样品管。
- 5) 将一管洗液（150  $\mu\text{L}$ ）放置在样品管托架上，点击 Sample--Boosting，60 s 后卸载洗液。
- 6) 取一管干净的超纯水（150  $\mu\text{L}$ ）润洗毛细管头，然后进行下一管样品采集，防止样品间污染

**注意：**即使非常微量的高浓度样品也会污染洗液，为确保洗液和用于润洗的超纯水干净，建议每 10 个样品更换新的洗液和超纯水。

### 4.3 样品检测须知

- 1) 样品检测前需要持续 Boosting 60 s 使样品到达检测区。
- 2) 根据样品信息选择合适的激光功率和散射通道的衰减系数，然后输入样品名称。
- 3) Boosting 60 s 后将进样方式改为 Sampling，设置合适的检测压力（0.1-1.5 kPa），采集数据。如果在低压力范围内（0.1-1.0 kPa）颗粒信号密度过高，则需稀释样品至合适浓度后重新上样检测。
- 4) 样品信息采集完毕后需及时保存数据，点击 Sample--Unload 卸载样品管。
- 5) 进行下一个样品检测前需 Boosting 洗液 60 s，并用超纯水润洗毛细管管头，防止样品间交叉污染。
- 6) 样品浓度粗略判断：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）。
- 7) 上样浓度过高判断：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。
- 8) 上样浓度过高判断：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。
- 9) 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，如图 4-3 所示。

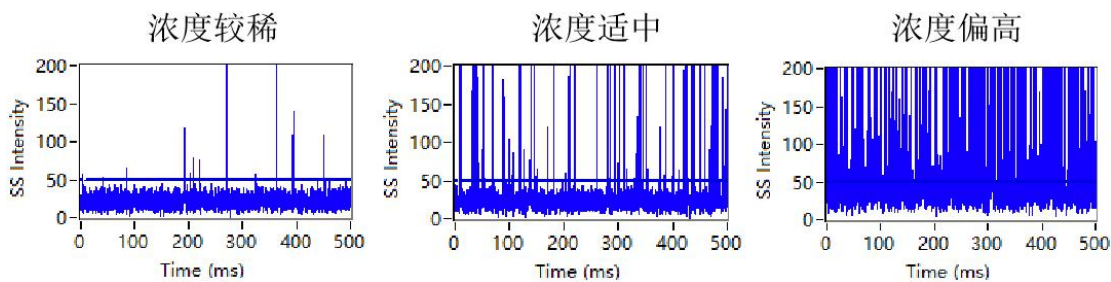


图 4-3 不同上样浓度的散射脉冲信号图

10) 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。

11) 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）。

## 4.4 样品浓度检测须知

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（488 nm 激光器）：

- 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、样品和空白对照在相同 Sampling 压力下进行检测（如：1.0 kPa）。
- 稀释浓度标准品和样品使检测颗粒数在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。

## 4.5 样品粒径检测须知

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）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。

## 4.6 荧光样品检测须知

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，即提高激光功率，增大散射通道信号衰减倍数。上样前建议去除游离的染料样品：

- 免疫荧光染色时，请确认游离的抗体已被除去；
- 做磷脂染色时，要注意磷脂分子自身团聚的问题；
- 一般低浓度的核酸染料本身不发荧光，无需处理。

## 4.7 样品检测步骤

### 4.7.1 外泌体样品检测步骤


该样品检测步骤适用于检测与二氧化硅折射率相近且粒径小于 155 nm 的颗粒的粒径和浓度，比如二氧化硅球、外泌体、脂质纳米颗粒和病毒等。

#### 4.7.1.1 浓度标准品检测

- 1) **上样**：Load 浓度标准品（250 nm SiNPs, 100  $\mu$ L），**Sample--Boosting**，时间 1 min。
- 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%。样品名称可手动修改。
- 3) **采样**：**Sample--Sampling**，点击 **Auto Sampling** 并在 **Sampling SET** 右侧框中输入 1.0，固定 **Sampling** 压力为 1.0 kPa。等待 **Sampling** 压力稳定在 1.0 kPa 后，点击 **Time to Record** 采集数据，完成后仪器自动跳到 **Buffer**，点击工具栏 ，保存数据为 **Nfa File**，将标准品 **Unload**。
- 4) **毛细管清洗**：Load 洗液（150  $\mu$ L），**Sample--Boosting** 时间 1 min，**Unload**。用超纯水（150  $\mu$ L）清除毛细管头残留的洗液。



#### 4.7.1.2 粒径标准品检测

- 1) 上样: Load 粒径标准品 (Silica Nanospheres 68~155 nm, 100  $\mu\text{L}$ ), **Sample--Boosting**, 时间 1 min。
- 2) 参数设置: 在 Samp.Inf 中选择“68-155 S16M-Exo”。样品名称可手动修改。
- 3) 采样: **Sample--Sampling**, 固定 **Sampling** 压力为 1.0 kPa。等待 **Sampling** 压力稳定在 1.0 kPa 后, 点击 **Time to Record** 采集数据, 完成后仪器自动跳到 **Buffer**, 点击工具栏 , 保存数据为 **Nfa File**, 将标准品 **Unload**。
- 4) 毛细管清洗: Load 洗液 (150  $\mu\text{L}$ ), **Sample--Boosting** 时间 1 min, **Unload**。用超纯水 (150  $\mu\text{L}$ ) 清除毛细管头残留的洗液。

#### 4.7.1.3 空白对照检测

- 1) 上样: Load 空白对照 (样品的稀释液, 例如 PBS), **Sample--Boosting**, 时间 1 min。
- 2) 参数设置: 在 Samp.Inf 中选择“68-155 S16M-Exo”, 修改样品名称 (空白对照的检测条件要与样品保持一致)。
- 3) 采样: **Sample--Sampling**, 固定 **Sampling** 压力为 1.0 kPa。等待 **Sampling** 压力稳定在 1.0 kPa 后, 点击 **Time to Record** 采集数据, 完成后仪器自动跳到 **Buffer**, 保存数据为 **Nfa File**, 将空白对照 **Unload**。

#### 4.7.1.4 样品检测

- 1) 上样: Load 样品 (100  $\mu\text{L}$ ), **Sample--Boosting**, 时间 1 min。
- 2) 参数设置: 在 Samp.Inf 中选择“68-155 S16M-Exo”, 修改样品名称。
- 3) 采样: **Sample--Sampling**, 固定 **Sampling** 压力为 1.0 kPa。等待 **Sampling** 压力稳定在 1.0 kPa 后, 点击 **Time to Record** 采集数据, 完成后仪器自动跳到 **Buffer**, 保存数据为 **Nfa File**, 将样品 **Unload**。
- 4) 毛细管清洗: Load 洗液 (150  $\mu\text{L}$ ), **Sample--Boosting** 时间 1 min, **Unload**。用超纯水 (150  $\mu\text{L}$ ) 清除毛细管头残留的洗液。



## 4.7.2 其他样品检测步骤

### 4.7.2.1 浓度标准品检测

浓度标准品检测步骤和方法可参考 4.7.1.1。

### 4.7.2.2 样品检测

- 1) **上样**: Load 样品 (100  $\mu\text{L}$ )，**Sample--Boosting**，时间 1 min。
- 2) **初始检测参数设置**: 根据样品粒径大小并结合表 4-2，设置初始检测参数 (或直接选择默认参数)。
- 3) **检测参数调整**: **Sample--Sampling**，设置 **Sampling** 压力不大于 1.0 kPa (检测浓度时建议固定压力为 1.0 kPa)；先调节衰减倍数，后调节激光功率，使散射脉冲信号与背景完全分开且不超过 3.6k。
- 4) **采样**: 请参考 4.7.1 中的采样步骤。

### 4.7.2.2 空白对照检测

- 1) **上样**: Load 空白对照，**Sample--Boosting**，时间 1 min。
- 2) **参数设置**: 检测参数与样品检测参数一致。
- 3) **采样**: 请参考 4.7.1 中的采样步骤。



## 4.8 参考检测条件

根据样品大致粒径设定初始的检测条件，可参考表 4-2。

表 4-2 不同样品类型的参考检测参数

样品类别		大致粒径 (nm)	参考检测条件*	
			(激光功率, 衰减系数)	
质控球 (250 nm 二氧化硅球)		250	Blue Laser (488 nm)	20 mW, 0.2%
			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	10mW, 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	5~10 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。

# CHAPTER 05 | 关机和维护





# 第五章

## 关机和维护

### 5.1 关机流程

#### 5.1.1 关闭液流系统

- 1) 在关机前需要对液流系统进行深度清洗。首先在样品管托架上放置一管新鲜洗液，点击 Sample--Boosting，清洗 5 min 后卸载洗液管。
- 2) 点击 Sheath Flow--Shut Down，此步骤耗时大约 4 min。同时在样品管托架上放置一管新鲜的超纯水，在液流执行 Shut Down 过程中 Boosting 超纯水。
- 3) Shut Down 结束后液流自动关闭，Unload 超纯水。

**注意：**保持毛细管头在超纯水里，无需卸下超纯水。

#### 5.1.2 关闭仪器

- 1) 点击模式选择面板的 Shut Down 关闭仪器。此时激光器、检测器和气泵全部关闭。
- 2) 关闭 NF Profession 1.0 软件，关闭电脑。
- 3) 关闭检测仪主机后面板的电源按钮，确认前面板电源指示灯熄灭。

### 5.2 日常维护和保养

#### 5.2.1 日常维护

- 关于仪器的日常使用中的注意事项，请参考“纳米流式检测仪操作规程”中的注意事项。



- 如果当日测试样品数量较多（针对样品类型为细胞外囊泡），实验结束后可执行如下操作，以保证管路的洁净。
  - 1) 放置一管 150  $\mu\text{L}$  的洗液，Sample--Boosting 1 min 后 Unload;
  - 2) 换一管 150  $\mu\text{L}$  的超纯水，Sample--Boosting 1 min 后 Unload;
  - 3) 换一管 150  $\mu\text{L}$  的 NaOH(1 M, 经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤), Sample--Boosting 5 min 后 Unload;
  - 4) 换一管 150  $\mu\text{L}$  的超纯水，Sample--Boosting 2 min 后 Unload;
  - 5) 每日实验结束后，请于关机前按照“纳米流式检测仪操作规程”执行“系统关闭”操作，进行管路的彻底清洗。

### 5.2.2 定期维护

- 定期进行鞘液的更换，推荐频率为每两周更换一次。
- 定期进行鞘液瓶的清洗，推荐频率为春夏季每两周清洗一次，秋冬季为每个月清洗一次。可用试管刷蘸取少量洗洁精清洁鞘液瓶内的污渍，清洁后务必将鞘液瓶内残留的清洁剂冲洗干净，然后用超水润洗鞘液瓶三次，再装鞘液。**注意不要沾湿瓶盖上的空气滤膜，以免发生堵塞，空气滤膜如右图所示。**鞘液瓶洁净的标准：瓶壁上出现均匀水膜，器壁上的水不聚成水滴且不成股流下。



- 每周至少开机一次，无需测样时依据“纳米流式检测仪操作规程”依次执行系统启动、运行超纯水和系统关闭操作即可，以保持液流系统的洁净。

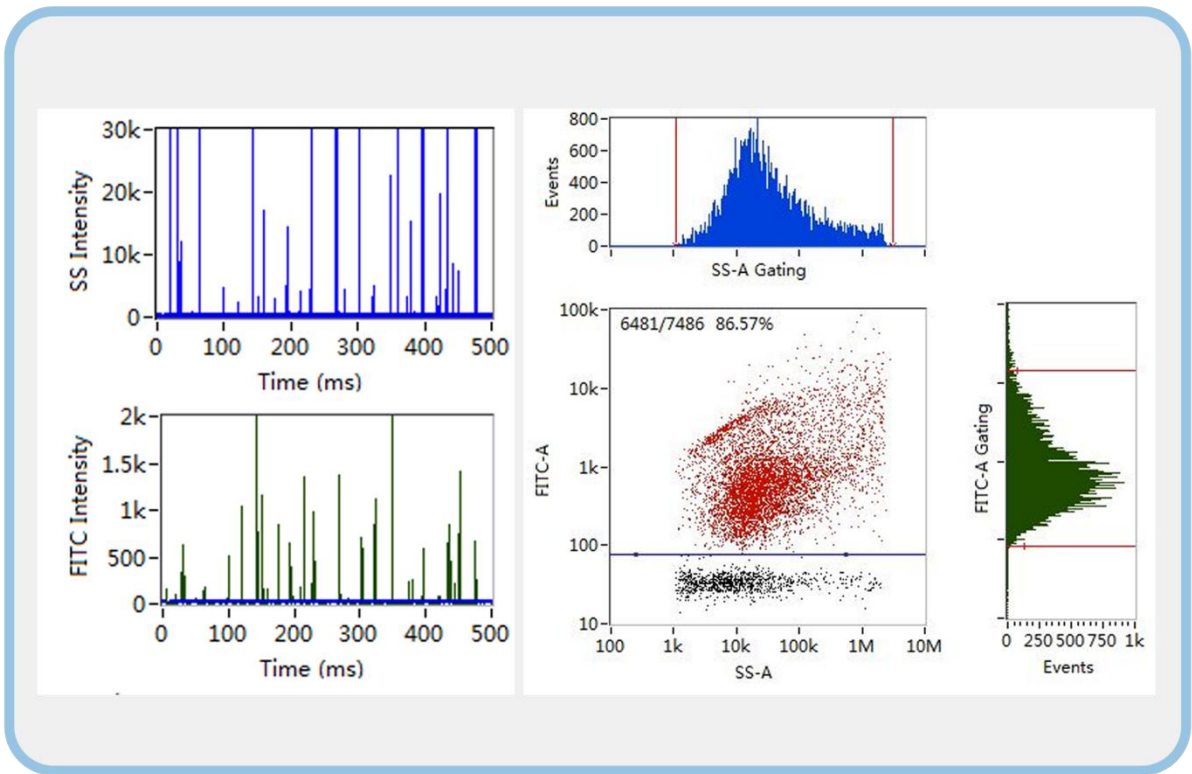
### 5.2.3 清空程序

如果仪器需要运输或者需要关机一个月及以上时，请完成清空程序，以减少生物污染的可能性。



- 1) 毛细管清洗：参见“5.2.1 日常维护”操作中的第 1) 2) 3) 步骤；
- 2) 液流系统深度清洗：放置一管 150  $\mu$ L 超纯水，Sample--Boosting，同时点击 Sheath Flow--Shut Down，运行结束后 Unload 超纯水；
- 3) 液流系统清空：
  - ① 清空鞘液瓶；
  - ② 放置空管，Sample--Boosting，同时执行两次 Sheath Flow--Purge；
  - ③ 运行结束后 Unload 空管，并将毛细管头保存在空管内；
  - ④ 清空废液瓶。
- 4) 点击 Shut Down，退出软件，关闭电脑和仪器电源。

# CHAPTER 06 | 数据分析






# 第六章

## 数据分析

### 6.1 导入数据

双击 NF Profession 1.0 快捷方式启动软件。点击导航栏  图标进入数据分析界面。点击右侧文件夹图标  选择需要导入的数据（仅支持 Nfa 格式）。



### 6.2 数据分析

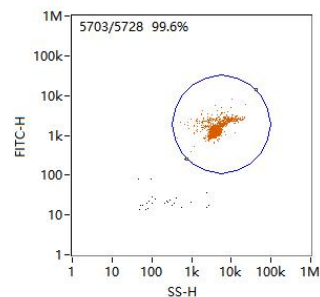
#### 6.2.1 浓度分析


##### 6.2.1.1 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。


##### 6.2.1.2 数据分析

1) **浓度标准品设置**: 选择浓度标准品，点击自动设阈值（工具栏  --Large Signal），使用圈门工具圈出圈出目标颗粒，如右图；鼠标单击软件右上方工具按钮 ，将其设置为浓度标准品；重新点击圈门按钮去掉圈门工具。



2) **阈值设置**: 选择样品数据，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（如 PBS），单击工具栏按钮 ，将其设置为空白对照。

4) 待测样品浓度报告生成：选择待测样品，鼠标单击工具栏按钮，选择 Concentration，软件弹出浓度报告页，如图 6-1 所示。

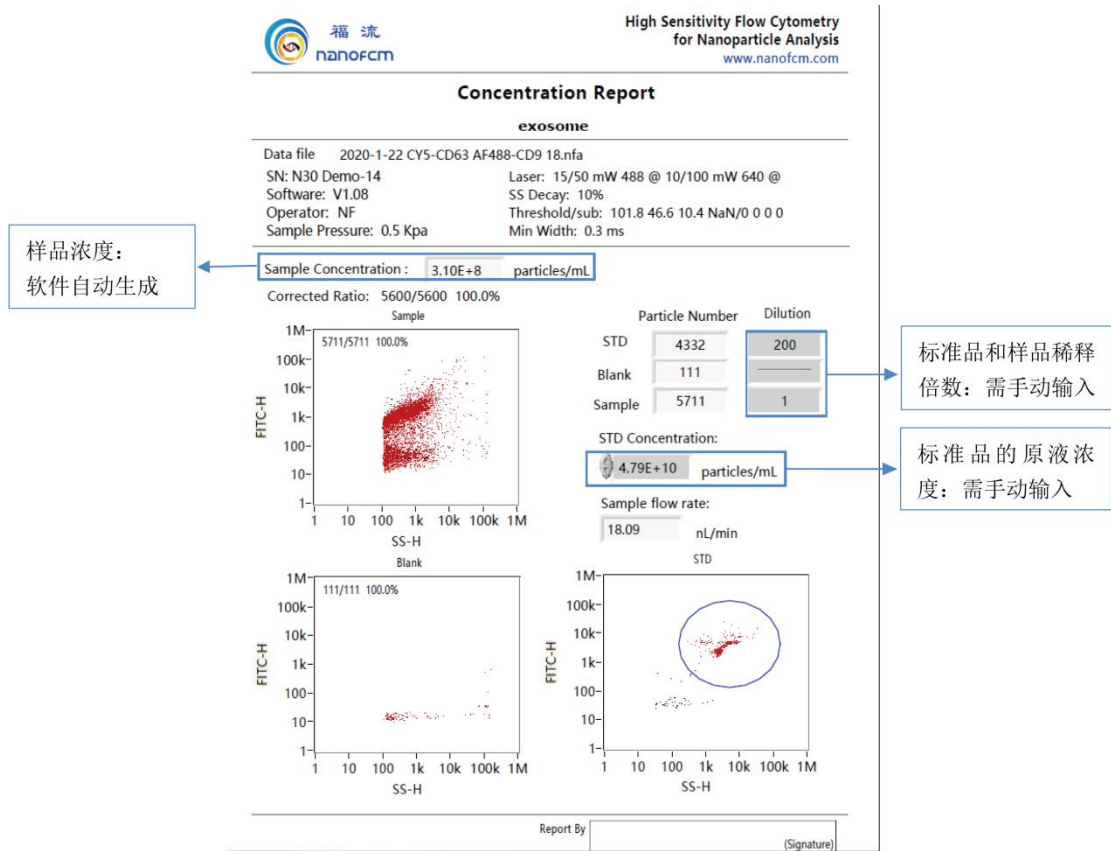


图 6-1 浓度报告

**浓度报告：**确认浓度标准品、空白对照和待测样品统计颗粒数正确后，手动输入浓度标准品和待测样品的稀释倍数及浓度标准品颗粒浓度（例如：4.76E+10 particles/mL，每一批次的浓度标准品浓度都有所差异，请以浓度标准品说明书为主），则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。




## 6.2.2 粒径分析

### 6.2.2.1 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信息，获得待测样品的粒径分布。

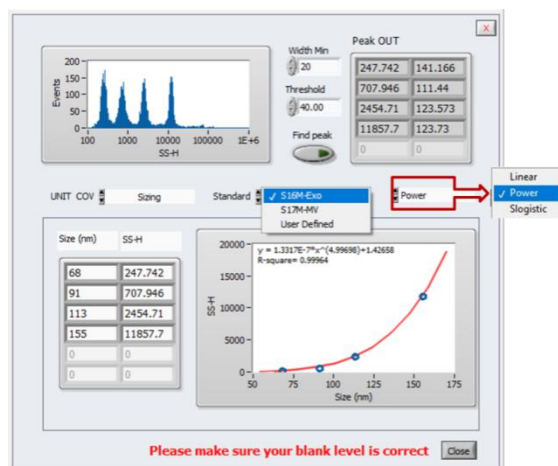
### 6.2.2.2 数据分析

#### 1) 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）

#### 2) 粒径标准曲线拟合

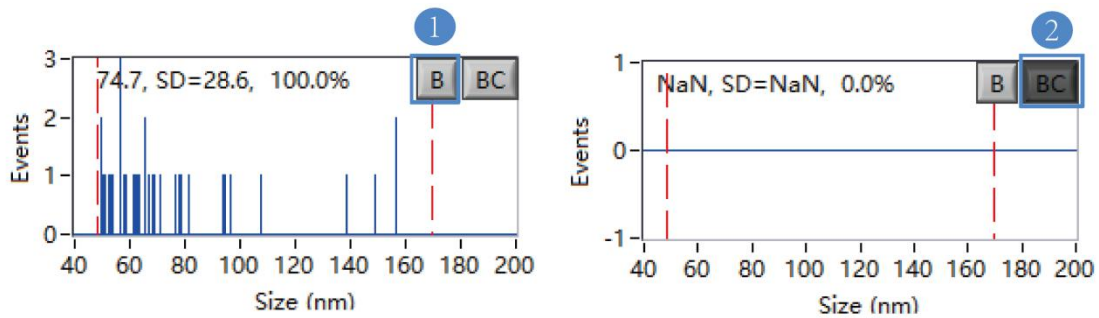
- 切换到**相同检测条件下**测试的粒径标准品数据，点击工具栏 ，根据粒径标准品图形分布设置合适的阈值或选择默认（设置合适的阈值保证每一个峰形可以良好区分，以便软件识别读取主峰的中位数值）。
- 单击 **Standard** 选择“S16M-Exo”，函数关系默认为“Power”。
- 点击“Find peak”软件自动显示出四个峰的 Median 值和 Events 值并生成拟合曲线。
- 点击“Close”关闭小窗口，粒径分布直方图显示在界面右下方。



#### 3) 扣除空白背景


切换到空白对照数据，在粒径分布直方图中的右上角点击“B”（下图

步骤 1)，将其设置为背景，点击“BC”（下图步骤 2），空白对照的粒径分布直方图被扣除。



#### 4) 结果导出

切换至样品数据，根据下列几种方式保存不同数据类型：

- 粒径报告：单击  选择 **Sizing** 生成粒径检测报告，可存为 PDF 文档或直接打印，如图 6-2 所示；
- 粒径分布图：在粒径分布直方图上点击鼠标右键并选择“**Export-Export Simplified Image**”，可导出粒径分布图，如图 6-3C 所示
- 粒径原始数据：在粒径分布直方图上点击鼠标右键并选择“**Export-Export Data to Clipboard**”，建立一个 TXT 文本并将剪切板数据粘贴如图 6-3B 所示；
- 点击工具栏选择“**Size or MESF**”，得到按时间顺序排列的颗粒粒径大小，如图 6-3A 所示。

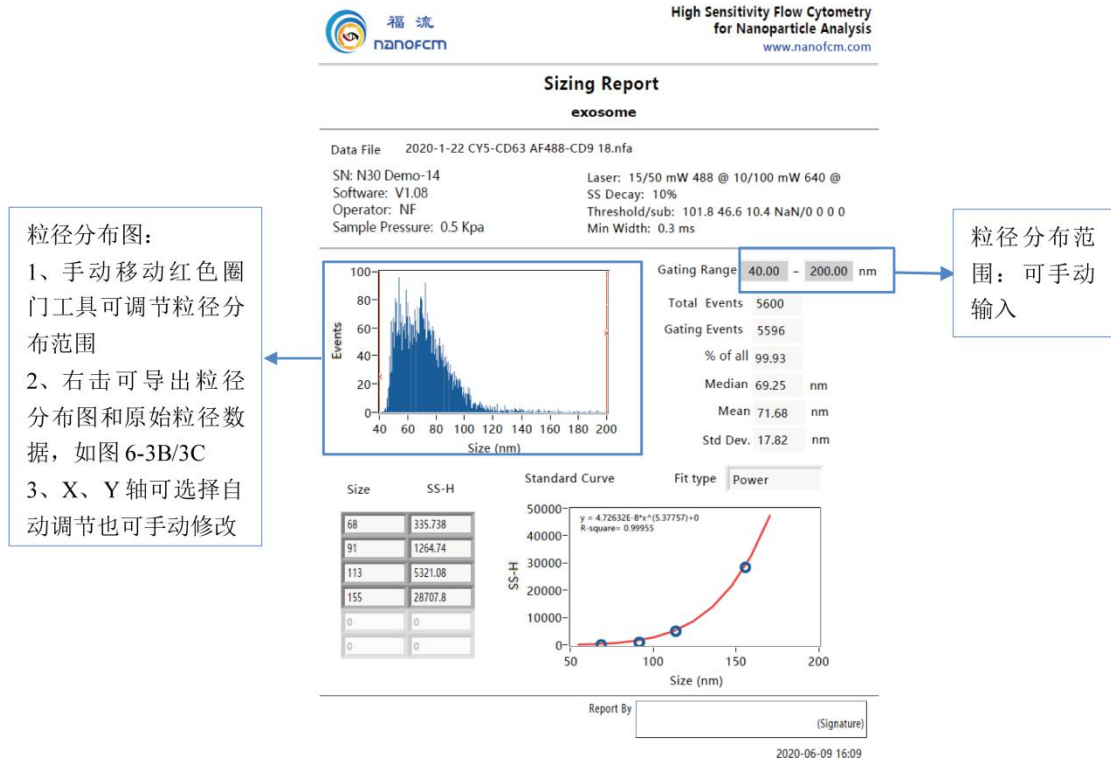


图 6-2 粒径报告

**粒径报告：**手动移动红色圈门工具或在 Gaing 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、圈门内颗粒数的百分比和圈门内颗粒的粒径中位值、平均值和以及标准差；点击界面下方 Save 按钮，粒径报告存储为 PDF 格式；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（默认的 bin 宽度为 0.5 nm）。

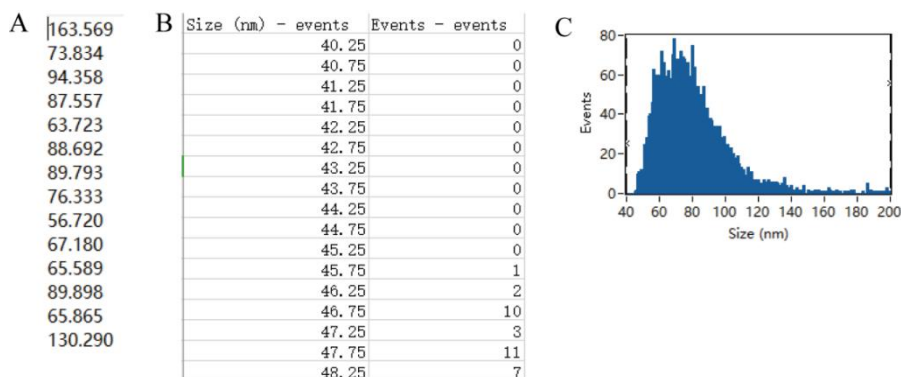
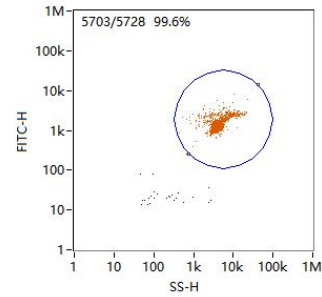


图 6-3 粒径原始数据和粒径分布图

### 6.2.3 粒径和浓度分析

1) **浓度标准品设置**: 选择浓度标准品, 点击自动设阈值 (工具栏 --Large Signal), 使用圈门工具圈出圈出目标颗粒, 如右图; 单击工具栏按钮 , 将其设置为浓度标准品。重新点击圈门按钮去掉圈门工具。



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

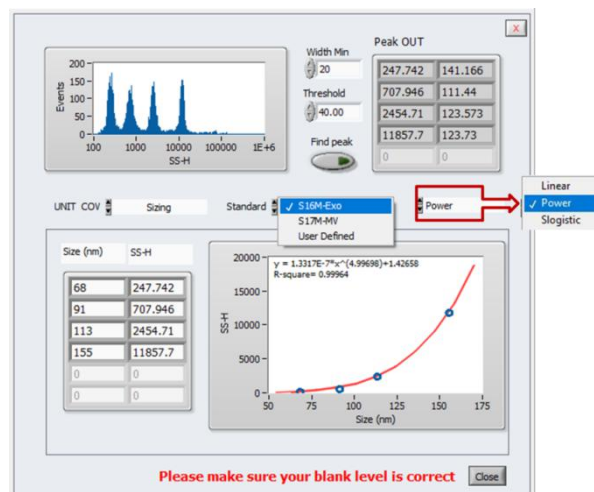
3) **粒径标准曲线拟合**

- 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 , 根据粒径标准品图形分布设置合适阈值或选择默认 (设置合适的阈值保证每一个峰形可以良好区分, 以便软件识别读取主峰的中位数值)。


- 单击 **Standard** 选择 “S16M-Exo”, 函数关系默认为 “Power”。

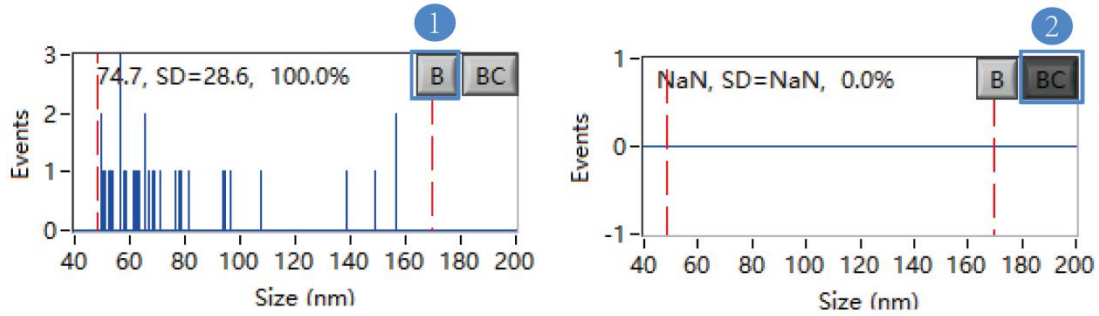
- 点击 “**Find peak**” 软件自动显示出四个峰的 Median 值和 Events 值并生成拟合曲线。

- 点击 “**Close**” 关闭小窗口, 粒径分布直方图显示在界面右下方。





#### 4) 扣除空白背景

切换到空白对照数据，单击软件右上方工具按钮 ，将其设置为浓度空白对照；同时，在粒径分布直方图中的右上角点击“B”（下图步骤1），将其设置为背景，点击“BC”（下图步骤2），空白对照的粒径分布直方图被扣除。



#### 5) 结果保存

切换至样品数据，根据下列几种方式保存不同数据类型：

- 浓度和粒径报告：单击  选择 **Size & Concentration**，生成粒径浓度检测报告，可存为 PDF 文档，如图 6-4 所示。
- 粒径分布图：在粒径分布直方图上点击鼠标右键并选择 **“Export-Export Simplified Image”**，可导出粒径分布图。
- 粒径原始数据：在粒径分布直方图上点击鼠标右键并选择 **“Export-Export Data to Clipboard”**，建立一个 TXT 文本并将剪切板数据粘贴。
- 离散的粒径信息：点击工具栏  选择 **“Size or MESF”**。

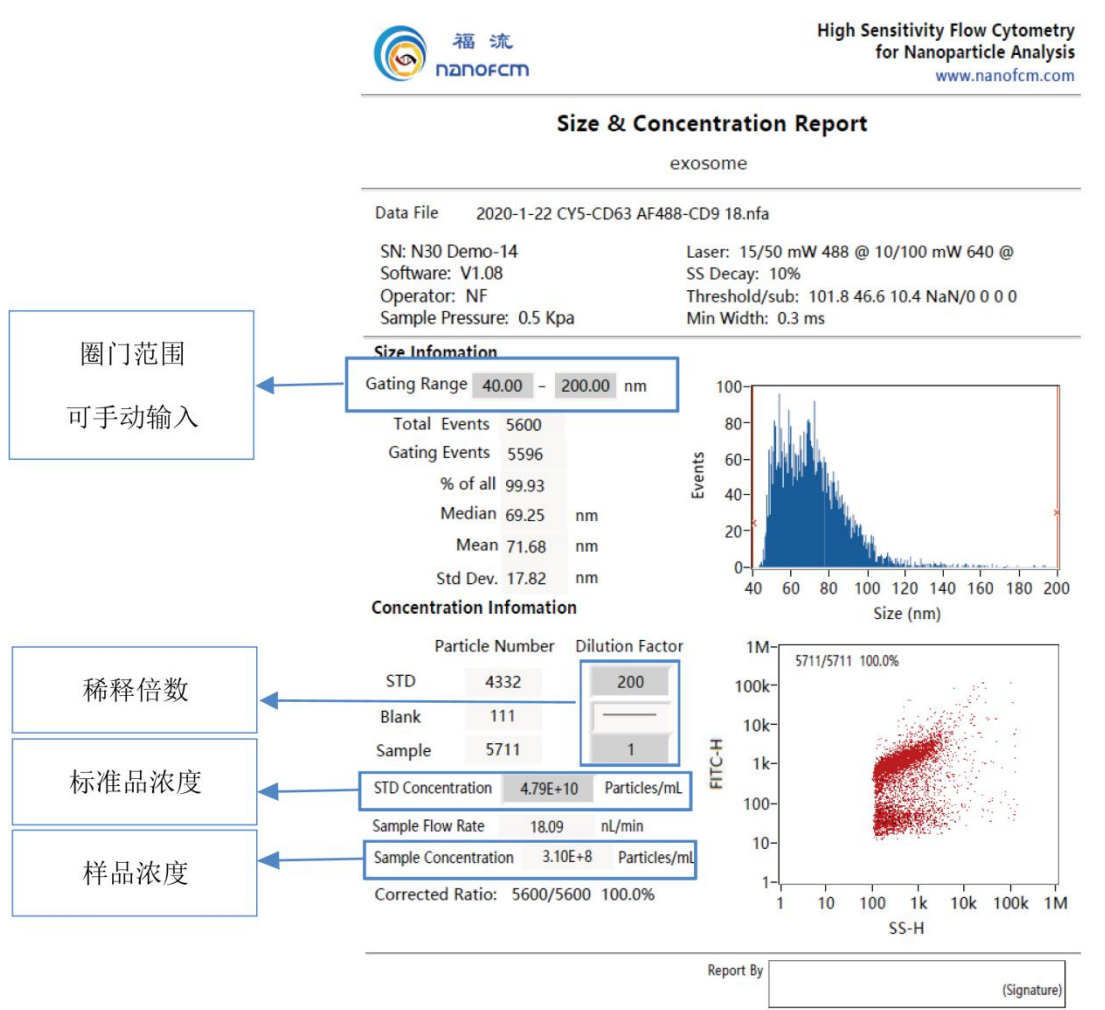


图 6-4 粒径和浓度报告

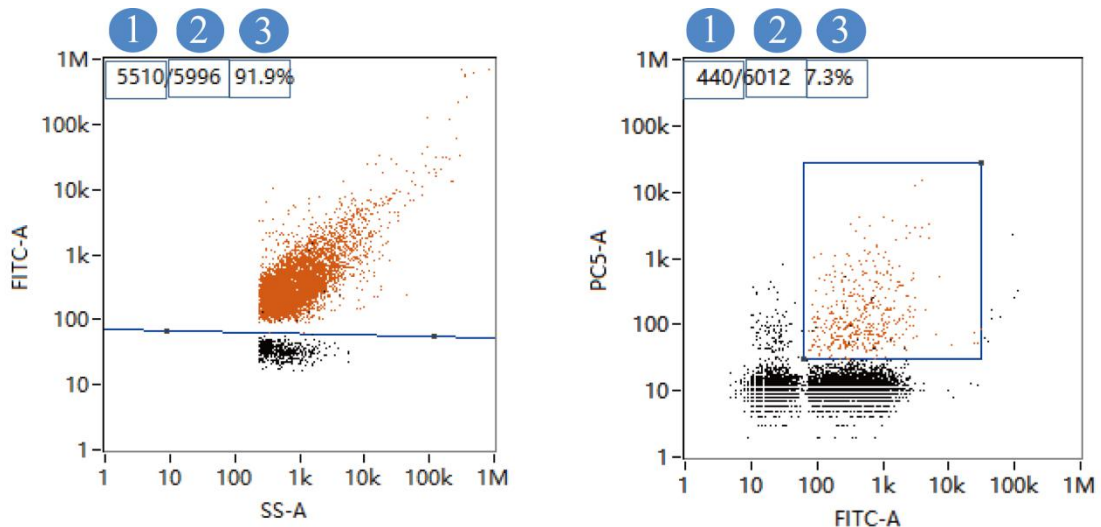
**粒径和浓度报告：**手动移动红色圈门工具或在 Gaing Range 输入粒径范围，圈定目标粒径分布范围，软件会自动生成圈门内颗粒数、圈门内颗粒数的百分比和圈门内颗粒的粒径中位值、平均值和以及标准差；手动输入浓度标准品和待测样品的稀释倍数及浓度标准品颗粒浓度（例如： $4.76E+10$  particles/mL，每一批次的浓度标准品浓度都有所差异，请以浓度标准品说明书为主），则软件自动计算出待测样品的浓度；在粒径分布直方图上点击鼠标右键-Export，可以导出粒径分布直方图；点击界面下方 Save 按钮，粒径和浓度报告存储为 PDF 格式。

## 6.2.4 荧光数据分析

### 6.2.4.1 荧光比例和浓度分析

- 1) **浓度标准品设置**：选择浓度标准品，点击自动设阈值（工具栏--Large Signal）；使用圈门工具圈出圈出目标颗粒；鼠标单击软件右上方工具按钮，将其设置为浓度标准品；重新点击圈门按钮去除圈门工具。
- 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) **圈门**：选择荧光样品数据，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（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：

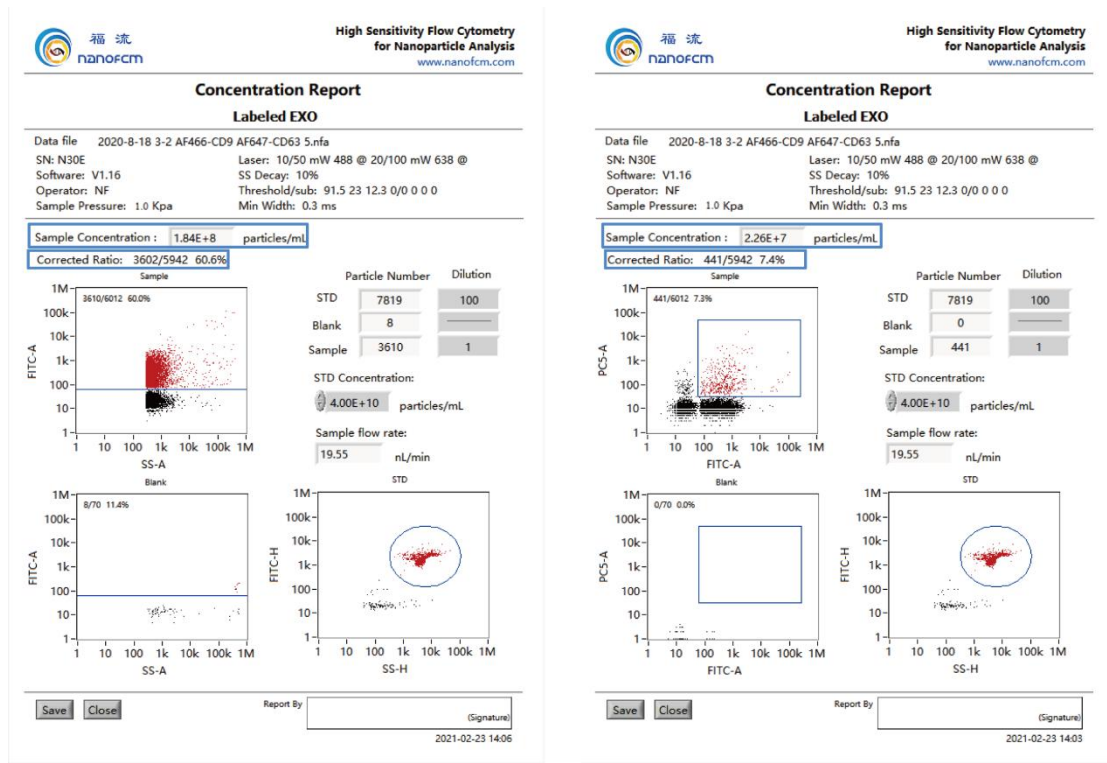
- 点击工具栏中的圈门工具，圈出目的群，如下左图所示，使用 选中直线以上的部分，其中 1 为圈门内的颗粒数，2 为总颗粒数，3 为门内亚群的比例（此时未扣除对照 buffer 中颗粒）。



- 4) **空白扣除**：保留圈门，切换回空白对照数据，选中工具栏按钮 ，将其设为空白对照。



5) 结果导出: 选择样品, 单击选择 Concentration, 软件弹出浓度报告页, 如下图。



### 荧光浓度和比例报告:

- 左图为单荧光标记的浓度和荧光比例报告, 右图为双荧光标记的浓度和荧光比例报告。
- 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。
- 该报告中“Sample Concentration”是指门内颗粒的颗粒浓度。

### 6.2.4.2 荧光颗粒的粒径和浓度分析

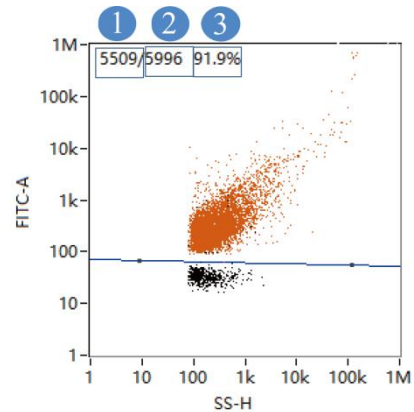
1) **浓度标准品设置**: 选择浓度标准品, 点击自动设阈值 (工具栏 --Large Signal); 使用圈门工具圈出圈出目标颗粒; 鼠标单击软件右上方工具按钮 , 将其设置为浓度标准品; 重新点击圈门按钮去除圈门工具。

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

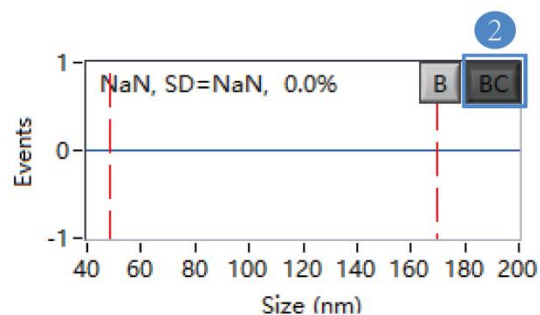
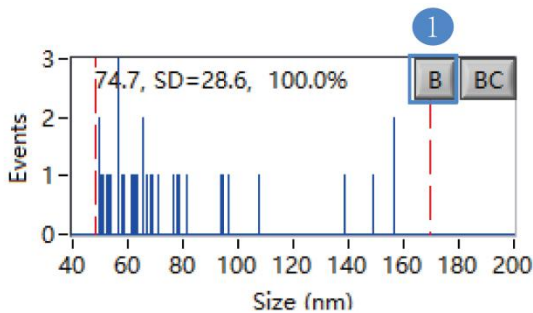
3) **粒径标准曲线拟合**: 参照前文粒径标准曲线拟合进行操作 (注意将二维散点图的横坐标修改为 SS-H 后再拟合标准曲线。拟合粒径时, SS 一定要选择峰高, 即 SS-H)。

4) **圈门**: 选择样品数据, 选择合适的 X 轴和 Y 轴名称, 例如 SS-H 和 FITC-A; 利用工具栏中的圈门工具, 将阳性和阴性区分开来, 具体分析过程如下:


- 点击工具栏中的圈门工具, 圈出目的群, 如右图所示, 使用 选中直线以上的部分, 其中 1 为圈门内的颗粒数, 2 为总颗粒数, 3 为门内颗粒占总颗粒数的比例 (此时未扣除对照 buffer 中的颗粒)。

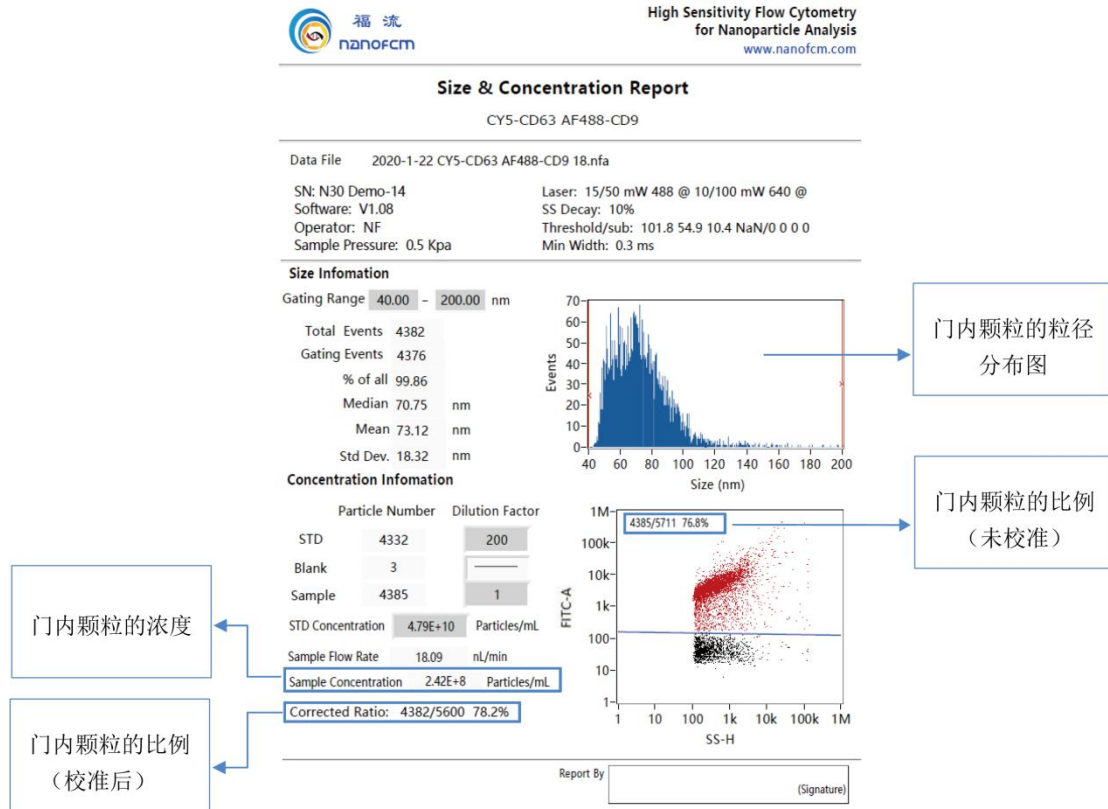


5) **空白扣除**: 保留圈门, 切换回空白对照数据, 选中工具栏按钮 , 将其设为浓度空白对照; 在粒径分布直方图中的右上角点击“B” (下图步骤 1), 将其设置为背景, 点击“BC” (下图步骤 2), 空白对照的粒径分布直方图被扣除。





- 6) 结果导出: 选择样品数据, 保留圈门。单击  并选择“Size & Concentration”, 导出 PDF 报告。





## 6.3 注意事项

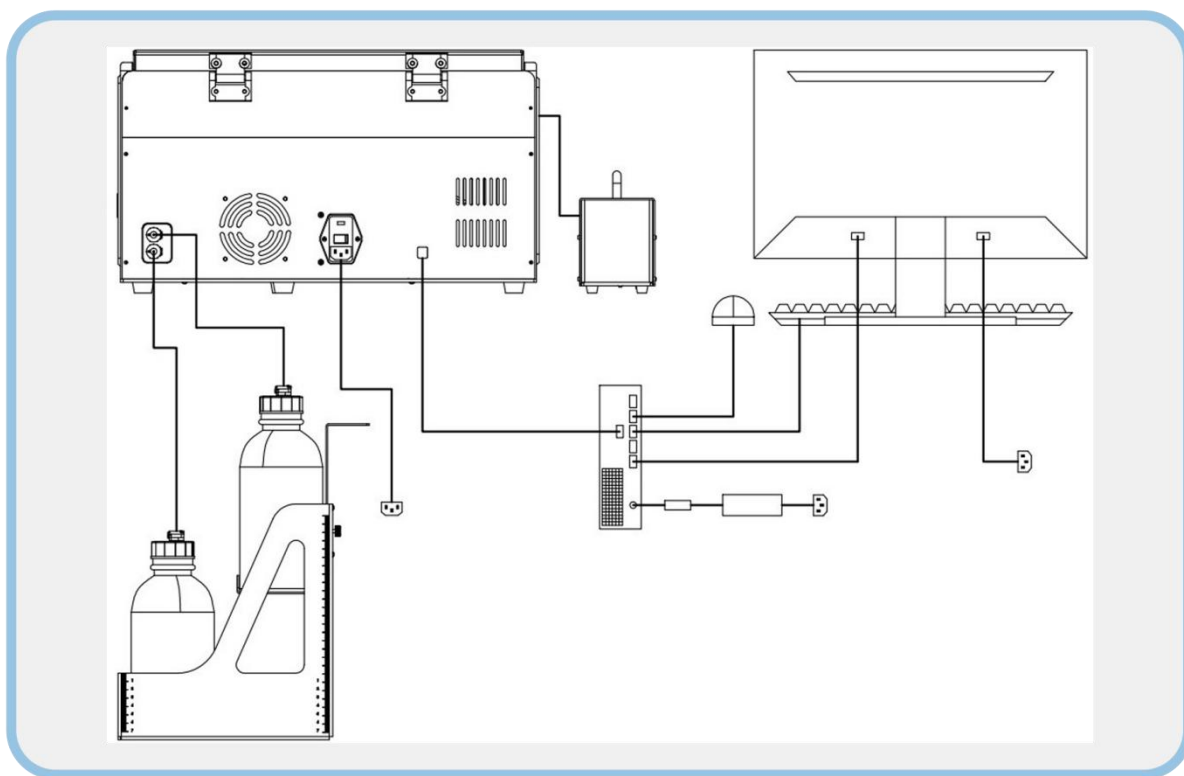
### 6.3.1 空白对照的重要性

- 空白对照为样品重悬时用的缓冲液，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。
- 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。

### 6.3.2 数据分析

- 粒径标准品拟合标准曲线以及样品拟合粒径时，二维散点图的横坐标建议用SS-H。
- 多个样品进行粒径分析时，在阈值基本一致的情况下，在分析完第一个样品后，剩下的样品可直接导出报告，不需要重复整个分析过程。

# CHAPTER 07 | 故障排除





# 第七章

## 故障排除

### 7.1 概述

本章提供常见问题的解决方案，在仪器使用过程中如果遇到问题，请根据本章的信息进行自检。如果问题仍然存在，请联系我们。

#### 重要信息

除规定信息外，请勿拆卸仪器或经未授权的人员修理仪器。NanoFCM 对未经授权维修仪器导致的任何问题概不负责。



未经授权请勿重调整个光学系统。

当仪器出现异常信号时请先全面排查液流系统的状态。

表 7.1 故障排除表

故障	可能的原因	处理措施
检测仪主机无法启动	电源开关处于关闭位置； 电源线未牢固连接； 保险丝熔断。	确保检测仪后面板的电源开关处于打开位置； 确保电源线牢固地连接至检测仪； 更换保险丝； 如果问题仍然存在，请联系我们。
电脑工作站无法启动	电源线未牢固连接。	确保电源线牢固地连接至电脑工作站； 如果问题仍然存在，请联系我们。
检测仪主机和电脑工	USB 连接线未正确连接；	确保 USB 连接线牢固地连接检测仪主机和



<p>作站连接异常</p>	<p>检测仪主机电源未开启； 检测仪主机电源线未连接。</p>	<p>电脑工作站。 确保检测仪主机电源线正常连接并开启。 如果问题仍然存在，请联系我们。</p>
<p>样品管难以上样至顶部</p>	<p>样品管与上样台的橡胶圈之间的摩擦力过大。</p>	<p>确认所用样品管为 0.6 mL 微量离心管 (NanoFCM-SLT-N)； 将少量凡士林涂在一支空的上样管的管口边缘，然后将上样管手动推至顶部并轻轻旋转，使凡士林均匀涂抹在橡胶圈的边缘。 如果问题仍然存在，请联系我们。</p>
<p>空气泵工作声音偏大</p>	<p>空气泵底部的螺丝松动； 空气泵下方平面有扰动。</p>	<p>用随机附带的内六角工具将空气泵底部的螺丝固定缩紧； 确保空气泵放置在平整无震动的桌面上，下部没有电线等干扰。 如果问题仍然存在，请联系我们。</p>
<p>注射器无响应</p>	<p>仪器长时间待机后通讯中断。</p>	<p>正常关闭软件和硬件后，重新启动并连接。 如果问题仍然存在，请联系我们。</p>
<p>样品实时脉冲信号强度减弱，CV 值增大</p>	<p>液流系统中存在气泡</p>	<p>Purge 两次或引入一段空气柱后 Purge 两次，重新用质控微球校准仪器。 如果问题仍然存在，请联系我们</p>
<p>相机窗口的鞘液流中存在大量颗粒亮点</p>	<p>鞘液流不干净</p>	<p>Purge 两次，重新用质控微球校准仪器。 如果问题仍然存在，请联系我们。</p>
<p>相机窗口无实时图像</p>	<p>工具栏相机图标关闭，呈白色 ；</p>	<p>鼠标单击重新打开相机图标，打开后为橙色 ；</p>



	<p>曝光时间过长引起响应延迟或无响应。</p>	<p>点击相机参数设置按钮  重新调整曝光时间（不超过 150 ms）。</p> <p>如果问题仍然存在，请联系我们。</p>
<p>Sampling 后，各个检测通道均无实时脉冲信号(Boosting 样品时间超过 60 秒)</p>	<p>检测器未打开；</p> <p>任意检测通道信号饱和，狭缝保护性关闭；</p> <p>无样品颗粒或样品浓度过低；</p> <p>数据采集模式“view”关闭；</p>	<p>打开检测器；</p> <p>提高衰减系数（散射通道）或降低激光功率。</p> <p>上样管确认无误，提高进样 Sampling 压力或增加样品浓度；</p> <p>打开数据采集“view”模式；</p> <p>如果问题仍然存在，请联系我们。</p>
<p>Sampling 压力不可调节</p>	<p>Sampling 压力超出可调节范围。</p>	<p>Unload 样品，进行进样泵归零操作。</p> <p>如果问题仍然存在，请联系我们。</p>

**注意：**液流控制面板内的操作（如 Purge）可能对样品流位置或状态产生轻微影响（微米级的移动可能影响探测区的位置），因此需要用质控微球确认仪器状态，如有变动需要重新进行校准操作。



## 7.2 案例分析（供参考）

**案例 1:** 用质控微球进行仪器校准时散射通道 CV 值偏大（如，出现前拖峰）。

解决方案：

- 1) 重新配制质控微球；
- 2) Purge 两次；
- 3) Boosting 新的质控微球 60 s 后切换为 Sampling，根据实时脉冲信号强度调节激光束的水平位置（步长设置为 2  $\mu\text{m}$ ）使荧光通道 CV 值最小；
- 4) 轻微调节 XY 轴调节架（先水平调节后竖直调节）使所有检测通道的实时脉冲信号最强，CV 值最小；
- 5) 轻微调节激光束水平位置（步长设置：先 2  $\mu\text{m}$  后 1  $\mu\text{m}$ ）使所有检测通道的实时脉冲信号最强，CV 值最小。

注意：

- ✓ 如果 Purge 后质控微球信号的 CV 值一直偏大，需要考虑以下两点：
  - 1) 质控微球可能被洗液污染，需要重新配制；
  - 2) Boosting 时间太短（推荐 Boosting 时间不少于 60 s）。
- ✓ Start Up 结束后引入空气柱，然后 Load 超纯水 Purge 一次增加液流稳定性。
- ✓ 避免样品污染的措施：
  - 1) 质控微球需要每天新鲜配置；
  - 2) 每检测 10 个样品需要更换新的洗液；
  - 3) 进行下一管样品检测前用超纯水去除毛细管头残留的洗液。

**案例 2:** 实际样品检测时信号出现异常，例如，检测通道的 CV 值突然增大或者实时脉冲信号强度明显降低。

解决方案：

重新上质控微球，如果质控微球信号异常，Purge 两次后用质控微球校准仪器。



**案例 3:** 鞘液液面和废液液面的液面高度差小于 20 cm。

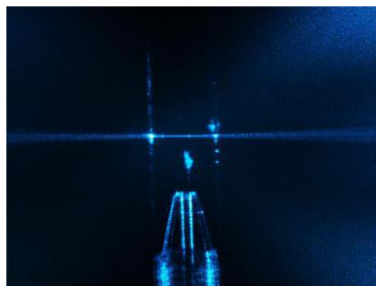
解决方案:

如果废液体积大于 400 mL，或者鞘液体积小于 100 mL，按以下步骤操作:

- 1) 卸载样品;
- 2) 点击 Sheath flow -Close 关闭液流;
- 3) 清空鞘液瓶内液体，用超纯水（0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤）清洗鞘液瓶三次，重新加入 600 mL 超纯水;
- 4) 减少废液体积至 100 mL 左右，保证废液管管头位于废液液面以下;
- 5) 重新调节鞘液和废液液面高度差至 20-30 cm;
- 6) Purge 两次
- 7) 上质控微球重新校准仪器。

注意: 建议每日开机前检查鞘液瓶和废液瓶内液体的体积及液面高度差，避免测试过程中添、减液体，影响样品检测。

**案例 4:** 相机窗口鞘液流异常（例如下图案例：毛细管头悬挂异物）。



解决方案:

- 1) 卸载样品，快速点击 Sheath Flow-Close 再切换为 Normal，重复 2-3 次;
- 2) 如果问题仍然存在，Boosting 洗液同时点击 Sheath Flow-Shut Down，完成后点击 Sheath Flow-Normal 开启液流。
- 3) 如果问题仍然存在，Boosting 蒸馏水 1 min 后 Boosting 1.0 M NaOH 同时进行 Shut Down 操作。完成后点击 Sheath Flow-Normal 开启液流，再用



蒸馏水 Boosting 1 min。

4) 按照常规操作进行排除气泡和校准操作。

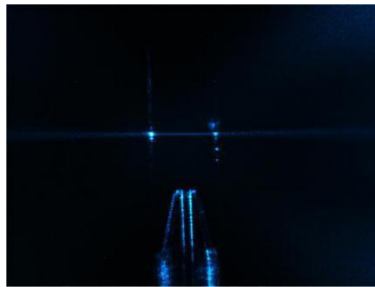
**注意：**

如果毛细管头悬挂异物一直存在，需确认待测样品的性质（是否容易导致毛细管管头悬挂异物），并选择合适的缓冲溶液和样品浓度进行检测。

用 NaOH 进行清洗前后必须用超纯水冲洗管路，防止 NaOH 和其他溶液发生反应，破坏管路状态。

如果挂物情况经常出现，可尝试彻底清洁鞘液瓶。用试管刷蘸取少量洗洁精清洁鞘液瓶内的污渍，清洁后务必将鞘液瓶内残留的清洁剂冲洗干净，然后用超纯水润洗鞘液瓶三次，再装鞘液。注意不要沾湿瓶盖上的空气滤膜，以免发生堵塞。鞘液瓶洁净的标准：瓶壁上出现均匀水膜，器壁上的水不聚成水滴且不成股流下。

**案例 5：Boosting 质控微球时，液流中心无可见的激光光斑（如下图）。**



**解决方案：**

- 1) 卸载样品管， Boosting 空管引入空气柱。
- 2) 如果 60 s 后相机窗口仍然没有出现气泡，请联系我们。
- 3) 如果相机窗口出现大量气泡，卸载空管， Boosting 一管超纯水同时 Purge 两次。
- 4) 将一管新鲜的洗液放置在样品管托架上， Boosting 60 s，然后调节激光束水平移动的步长（先设置为 50  $\mu\text{m}$  向右移动一次，然后设置为 100  $\mu\text{m}$  向左移动一次）。如果看到激光光斑出现，在此范围内细调直到光斑最大最亮。如果仍然找不到光斑，请联系我们。

**注意：** 案例 5 发生的可能原因包括：



1) 待测样品粒径偏大或样品发生团聚,导致毛细管堵塞(推荐小于 1000 nm 样品)。

2) 关闭检测仪主机后,毛细管头没有始终保持在超纯水中。

**案例 6:** Sampling 质控微球时,相机窗口的液流中心没有光斑(见案例 5 图),图形区仅出现少量实时脉冲信号。

解决方案:

1) 提高 Sampling 压力;

2) 如果样品压力超过 1.5 kPa 仍然只有少量实时脉冲信号,需要提高上样浓度重新检测。

**案例 7:** 样品 1 分钟内采集颗粒数超过 12000 个。

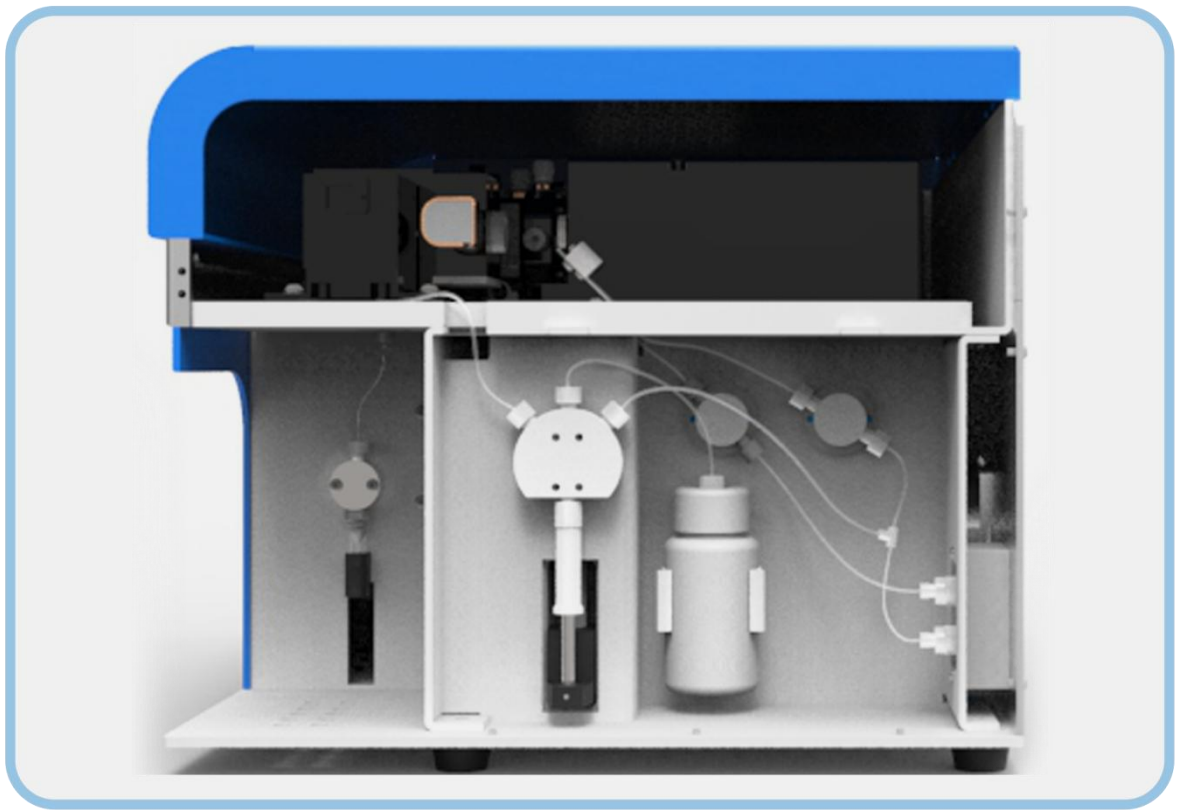
解决方案: 降低 Sampling 压力或稀释样品后重新上样。

**案例 8:** 液流开启 (Sheath-Normal) 状态下,样品流没有被鞘液流聚焦(如下图)。



解决方案: 将样品 Unload 后执行 Purge 1-2 次。

# CHAPTER 08 | 内部清洗程序





# 第八章

## 内部清洗程序

### 概述

NF Profession 1.0 软件包含三个预设的清洗模式，这三种模式可以单独运行或联合使用以达到预期的清洗目标。下表详细介绍三种清洗模式的特点及应用范围。

表 8.1 纳米流式检测仪清洗模式

清洗模式	功能介绍	使用频率
Start Up 启动	充分清洗整个液流系统使其充满新鲜的鞘液，准备进行样品检测。	日常开机启动程序
Purge 清洗	抽取鞘液全面清洗液流系统	当液流不稳定（如液流系统出现气泡、质控微球 CV 值偏大）、鞘液变脏（如相机窗口液流出现大量亮点、毛细管头悬挂异物）或其他影响液流的原因。
Shut Down 关机	结合洗液和鞘液全面清洗整个液流系统，使其充满新鲜的超纯水过夜。该程序执行完毕后鞘液流自动关闭。	日常关机程序，也可用于深度清洗液流系统。

参考本章进行仪器安装。

## 仪器运输及存储

在运输打包或存储前，全面清洗液流系统后清空所有容器内的液体，并遵循以下步骤：

保护仪器免受雨水或阳光的照射。

始终将仪器放置在平坦、稳定的平面上，正面朝上。

存放温度：15-35 °C。

湿度要求：不超过 80%。

纳米流式检测系统运输包装尺寸：（宽×深×高=80×58×39 cm，重量=52 kg）。

## 安装环境要求

工作台必须平滑稳固，用于放置仪器主机、气泵和工作站等。

台面尺寸：1.5 m（宽度）×0.8 m（深度），机身周边留有 0.5 m 的空间，方便日后维护。

电源规格：110 V-240 V，50/60 Hz，3 接头电源线。该系统需要一个接地良好的电源插座来提供必要的电源。

# B

## 附录

### 有害物质表

表 9-1 有害物质表

电子信息产品号码 EIP Part Number:	产品名称 Product Name: NanoFCM 产品型号 Product Model Number: N30E/U30					
部件名称 Component Name	有毒有害物质或元素 Hazardous Substances Name					
	铅 (Pb)	汞 (Hg)	镉 (Cd)	六价铬 (Cr(VI))	多溴 联苯 (PBB)	多溴二 苯醚 (PBDE)
电源组件 Power Supplies	○	○	○	○	○	○
计算机 Computer	○	○	○	○	○	○
滤波器 Filter	○	○	○	○	○	○
光量传感器 Optical Sensors	○	○	○	○	○	○

激光 Laser	O	O	O	O	O	O
电机/泵/阀门 Motors/Pumps/Valves	O	O	O	O	O	O
电线 Cables	O	O	O	O	O	O
管路及橡胶 Tubing & Rubber	O	O	O	O	O	O
液流瓶 Fluid Containers	O	O	O	O	O	O
印刷电路板组件 Circuit Boards*	X	O	O	O	O	O
结构件 Hardware	X	O	O	X	O	O
包装材料 Packing Materials	O	O	O	O	O	O

\*: 电路板组件包括印刷电路板及其构成的零部件，如电阻、电容、集成电路、连接器等

O: 表示该有毒有害物质在该部件所有均质材料中的含量均在 GB/T 26572 规定的限量要求以下

X: 表示该有毒有害物质至少在该部件的某一均质材料中的含量超出 GB/T 26572 规定的限量要求

\*: The circuit boards include printed circuit boards and their components, such as resistances, capacitors, integrated circuits, connectors, etc.

O: Indicates that the toxic or hazardous substances contained in all of the homogenous materials for this part is below the limit requirements in GB/T 26572.

X: Indicates that this toxic or hazardous substance contained in at least one of the homogenous materials used for this part in above the limit requirement in GB/T 26572.

## 缩略词

下方列表列出在本手册中使用或与本手册信息相关的符号、缩写词、首字母缩写和参考标志。

% — 百分比 percent

°C — 摄氏度 degrees Celsius

± — 正负号 plus or minus

A — 面积 Area

AC — 交流电 alternating current

AF488 — Alexa Fluor™ 488

APC — 别藻蓝蛋白 Allophycocyanin

APC-Cy7 — 别藻蓝蛋白-花青素 7 Allophycocyanin-Cyanin 7

SPCM — 雪崩光电二极管 avalanche photodiode

BP — 带通滤光片 bandpass filter

CFSE — carboxyfluorescein succinimidyl ester

Chan. — 通道 channel

cm — 厘米 centimeter

CV — 变异系数 coefficient of variation

Cy — 花青素 cyanine

D — 深度 depth

DicF — 二向色滤光片 dichroic filter

DNA — 脱氧核糖核酸 deoxyribonucleic acid

EP — 艾本德 eppendorf

FCC — 联邦通信委员会 Federal Communications Commission

FCS — 流式细胞术标准 flow cytometry standard

FITC — 异硫氰酸荧光素 fluorescein isothiocyanate

- FL — 荧光 fluorescent
- GFP — 绿色荧光蛋白 green fluorescent protein
- H — 高 height
- Hz — 赫兹 hertz
- In — 英寸 inch
- kg — 千克 kilogram
- kPa — 千帕 kilopascal
- L — 升 liter
- Lb — 英镑 pound
- m — 米 meter
- MESF — 可溶性荧光素当量分子 molecules of equivalent soluble fluorochrome
- min — 分钟 minute
- mL — 毫升 milliliter
- mm — 毫米 millimeter
- ms — 毫秒 millisecond
- mW — 毫瓦 milliwatt
- nm — 纳米 nanometer
- PC5 — 藻红蛋白-cy TM5 串联染料 Phycoerythrin-CyTM5 tandem dye
- PC5.5 — 多甲藻素叶绿素- CyTM 5.5Peridinin Chlorophyl-CyTM 5.5 串联染料 tandem dye
- PE — 藻红蛋白 Phycoerythrin
- PerCP — 多甲藻素叶绿素 Peridinin-Chlorophyll
- PI — 碘化丙啶 Propidium Iodine
- PMT — 光电倍增管 photomultiplier tube
- PS — 聚苯乙烯 polystyrene
- SiNPs — 二氧化硅 Sillica nanospheres
- QC — 质控 Quality control
- ROI — 目标区 regions of interest

s — 秒 second

SAIC — 中华人民共和国国家工商行政管理局 The State Administration for Industry & Commerce of the People's Republic of China

SD — 标准差 Standard deviation

7-AAD — 放线菌素 D 7-aminoactinomycin D

S/N — 信噪比 signal to noise ratio

SSC — 侧向散射 side scatter

Sub. — 扣除

$\mu\text{L}$  — 微升 microliter

$\mu\text{m}$  — 微米 micrometer

$\mu\text{s}$  — 微秒 microsecond

USB — 通用串行总线 universal serial bus

V — 伏特 volts

W — 瓦特 watts

Learn more about us, visit [www.nanofcm.com](http://www.nanofcm.com)  
or email [info@nanofcm.com](mailto:info@nanofcm.com)



NanoFCM Inc., Floor 5 Angye Bldg,  
Xiamen Pioneering Park,  
Xiamen, CHINA

+86 592 209 1013



NanoFCM Co., Ltd, MediCity, D6  
Thane Road, Nottingham, NG90  
6BH, UK

+44 115 784 0128

