

Qsep100 核酸蛋白分析系统检测 Total RNA 的标准操作流程

适用样本：R1 卡夹检测 Total RNA 样本，上机检测浓度范围 5-100ng/μL，建议上机浓度 10-20ng/μL (Qubit 定量)；NR1 (高敏 RNA 卡夹) 上机检测浓度范围 0.5-10ng/μL，建议上机浓度 1-5ng/μL (Qubit 定量)。

衡量总 RNA 完整性的指标：根据 RQN (RNA Quality Number) 值 1-10 分来衡量 Total RNA 完整性，越接近 10 的 Total RNA 完整性越好，越接近 1 的 Total RNA 完整性越差。

注意：以下实验用品所用到的耗材都必须是无 RNA 酶，所有步骤中使用到的水都是 DEPC 水或无 RNA 酶水。

1. 准备缓冲液

1.1 分离缓冲液 (SEPARATION BUFFER) (1×)：用 DEPC 水将 10×的分离缓冲液原液 (Cat.No104409-10X) 稀释成 1×使用。

1.2 稀释缓冲液 (DILUTION BUFFER) (1×)：用 DEPC 水将 10×的稀释缓冲液原液 (Cat.No104408-10X) 稀释成 1×稀释缓冲液。

1.2 稀释缓冲液 (DILUTION BUFFER) (0.1×)：用 DEPC 水将 1×的稀释缓冲液原液稀释成 0.1×稀释缓冲液。

2. 准备 Marker

2.1 加 20μL 1×稀释缓冲液到 200μL 的 PCR 管。

2.2 加 5μL 5× RNA Lower Marker 到以上 PCR 管并混合均匀，即稀释 LM 到 1×。

2.3 加入 10-15 μL 矿物油油封。

Lower Marker 使用的注意事项：

1) 使用量：每次吸样会消耗 0.1μL 的 Lower Marker，每个样本会消耗 0.1μL 的

Lower Marker, 校准不消耗卡夹次数。

- 2) 更换频率: 使用频率高建议 50 个样本更换, 频率低建议 2 周更换。油封后放 4°C。若 Marker 体积 $\leq 15 \mu\text{L}$ 不建议往里添加, 请直接换新。
- 3) 收到 RNA 卡夹及试剂后的保存: 5 \times RNA Lower Marker ≤ 3 个月可 4°C 保存, 长期保存放-20°C, 化冻放后 4°C。

注意: RNA 卡夹放室温, 置于黑色避光袋中并放入卡夹盒子中避光保存, 务必保持直立状态, 不要平躺。 (如下图)



2.4 Size Marker C109600(可选, 需要计算片段准确大小配置)

2.5 加 14 μL 1 \times 稀释缓冲液到 200 μL 的 PCR 管。

2.6 加 1 μL 的 RNA Size Marker 到以上 PCR 管并混合均匀

Size Marker 使用注意事项:

- 1) 使用前需要进行热变性, 70°C 2min 立刻冰浴 5 min。
- 2) 建议 Size Marker 购买后分管冷冻保存。

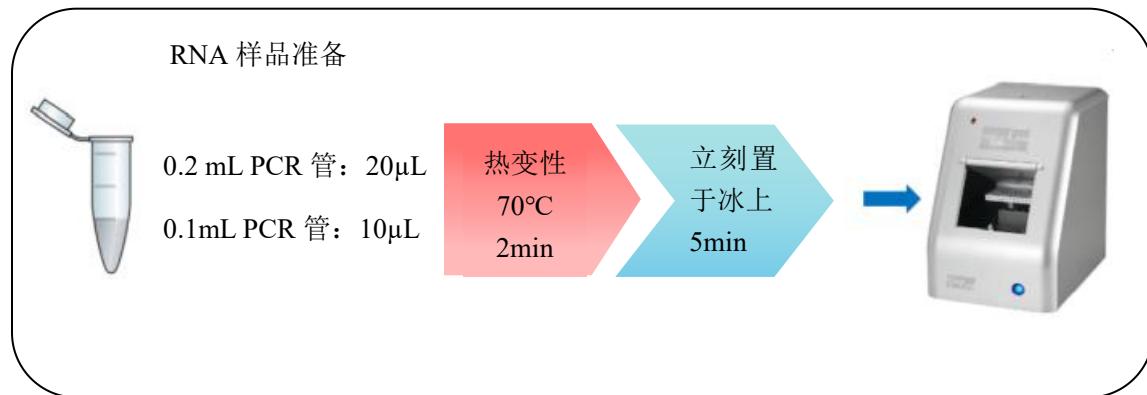
***建议使用试剂盒配套的八连管用作 marker 管。**

3. 准备 Total RNA 样本

3.1 样本稀释: 用 1 \times 稀释缓冲液调整 RNA 样本最佳浓度范围为 10-20ng/ μL , 体积 $\geq 15 \mu\text{L}$, 放 0.2mL PCR 管、八连管或者 PCR 板上, 如样本浓度过低, 可使用

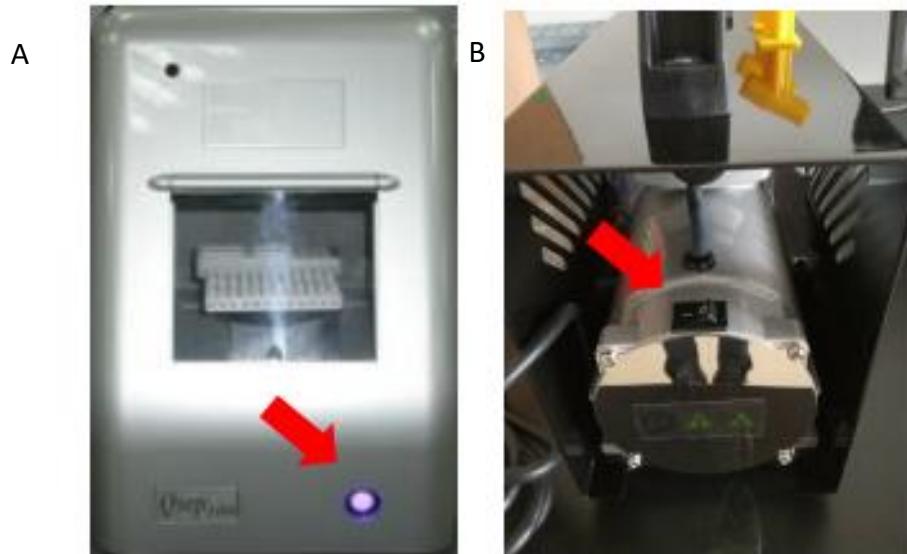
0.1× dilution buffer 稀释样本，提高样本检测灵敏度（浓度过低可增加进样时间）。

一般建议，样本浓度 $\geq 200\text{ng}/\mu\text{L}$ ，用 1 × RNA Dilution Buffer 稀释样本到 10-20ng/ μL ；样本浓度 $< 200\text{ng}/\mu\text{L}$ ，用 0.1 × RNA Dilution Buffer 稀释样本到 10-20ng/ μL 。



3.2 样本变性处理：70°C变性 2min，立即放冰上 5min，再上机检测。

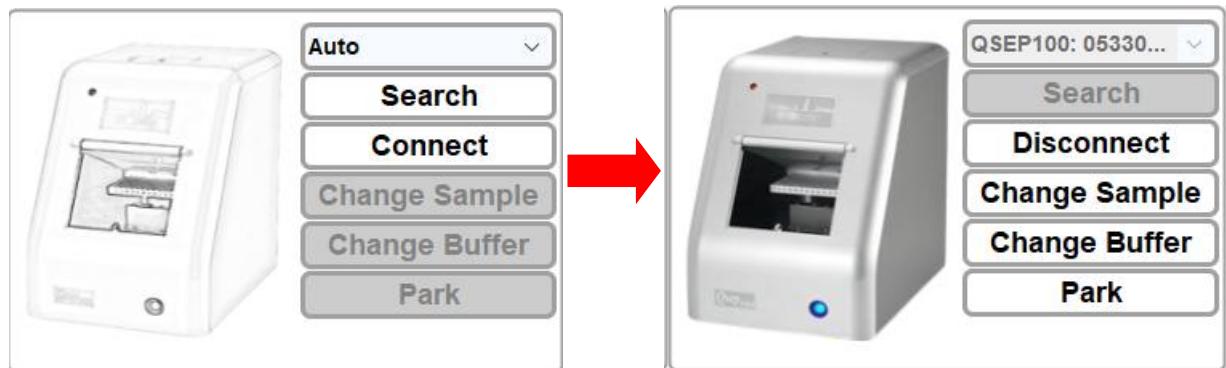
4. 打开 Qsep100 仪器电源和空气压缩机开关



Qsep100 仪器开关（A）和空气压缩机开关（B）实物图

5. 双击软件“Qsep 100”图标，打开软件。

6. 点选“Connect”建立系统联机



7. 放置缓冲液与 Marker

点选“Change Buffer”，放入 Marker 和缓冲液。



7.1 缓冲液

标记“S”的凹槽加入 1×Separation Buffer（原液稀释 10 倍液），标记“C、W、P”的三个凹槽中加入 DEPC 水，液面高度以缓冲液槽的刻度线 2/3 以上处为宜。将缓冲液槽妥善放置于接盘处，确保缓冲液槽放置方向正确。更换频率遵循两个前提，有异物要更换，体积小于 1/2 要更换。缓冲液凹槽中液体体积不够时禁止添加，需清洗后换新。



7.2 Marker

在 MC1 处放置 1× RNA Lower Marker。C109600 Size Marker (1 μ L 原液 +14 μ L 1×dilutuion buffer, 混匀, 70°C 变性 2 分钟, 而后立即冰浴 5 分钟) 放置于 MC2。用手托着样品盘然后用大拇指将 Marker 管向下紧压, 保证管子按到底。



8. 放置样品

点选 Change Sample, 打开透明样品门并放入样本 (样本体积 $\geq 15\mu$ L) , 请确保样本溶液中没有气泡, 样本管没有盖子。



9. 点选“Park”复位

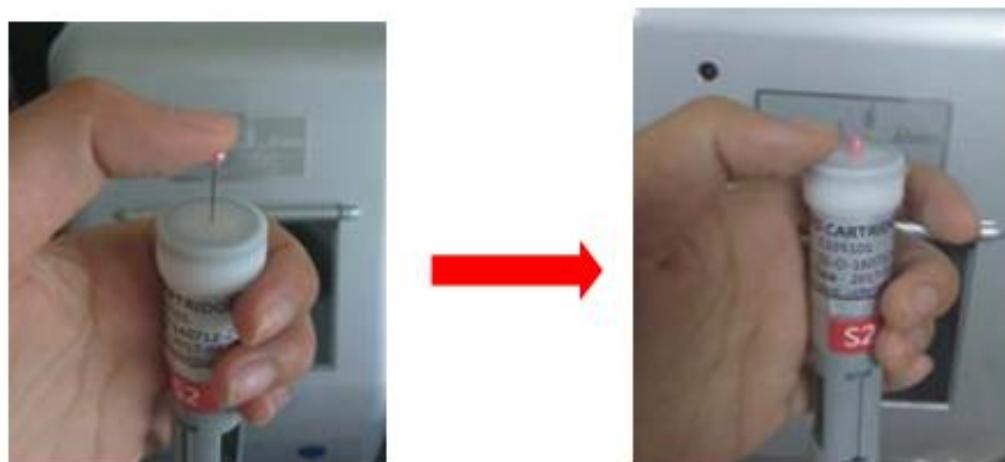
10. 装入卡夹

10.1 新卡夹需要先进行扎孔操作，若为新卡夹，请按照 10.2-10.4 步骤继续实验。若为使用过的卡夹，则无需重复扎孔，从 10.5 步骤继续实验。

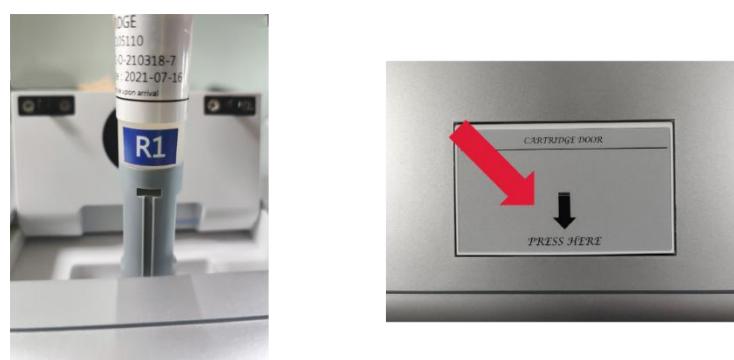
10.2 打开卡夹外壳包装，请取出卡夹时一直保持直立状态，NR1 卡夹先去掉避光的锡箔纸。在卡夹完成一轮实验后，如果需要取出 NR1 卡夹，用锡箔纸重新覆盖卡夹上部区域，保存时务必保持卡夹总是处于直立状态。

10.3 将随包装盒附带的大头针完全插入卡夹上盖中心的孔中，并且重复该动作 2-3 次，以保证大头针完全插入孔内。

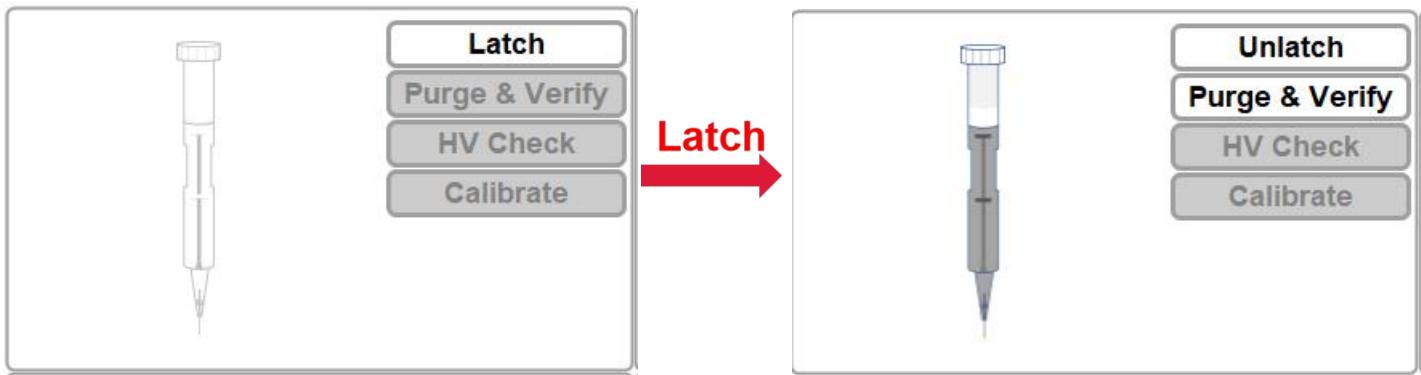
10.4 取出大头针，用无尘纸擦拭卡夹上盖区域，务必保持卡夹直立状态。



10.5 以按压的方式开启卡夹门，放入卡夹时将有标签的一面朝向自己，再关紧卡夹门（注：卡夹门的开关皆以按压方式操作）。



10.6 点选“Latch”锁定卡夹，下方信息方块会显示适配卡夹相关信息。

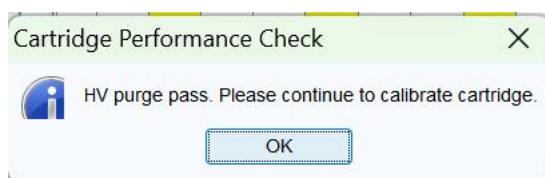


11. 卡夹校正

11.1 新卡夹使用说明:

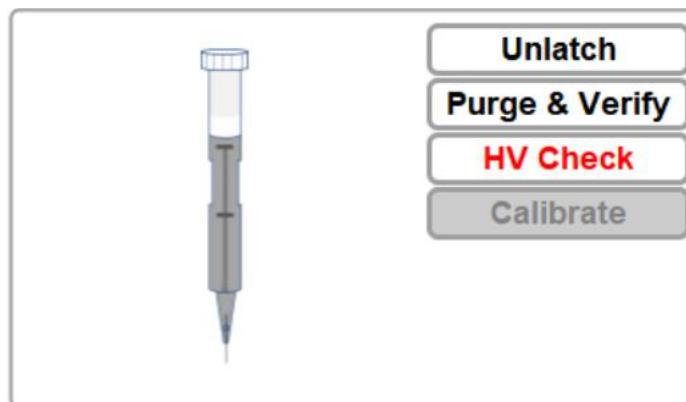
卡夹使用前皆需经过校正以确保数据正确, 请依照以下步骤进行卡夹校正

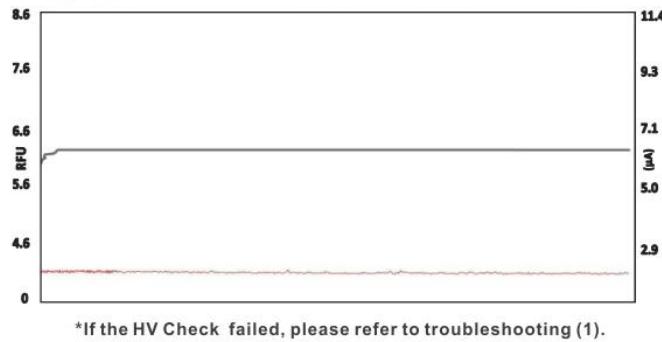
1) 点选“OK”



2) 点选“HV check”

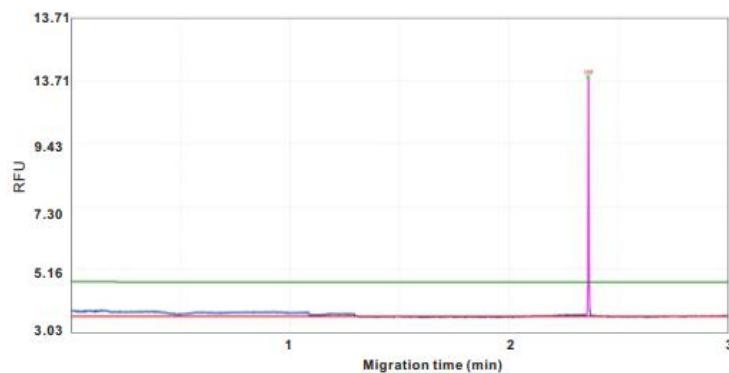
存储与运输环境皆会影响卡夹中的凝胶状态, 请在进行 HV check 操作时, 确定胶体电流值处于稳定状态 (注: 处于稳定状态的电流值时灰色电流线应该基本呈水平直线状态, 并且数值 $>2\mu\text{A}$)。





3) 点选“Calibration”

请先确保 1×RNA Lower Marker 放置在 MC1 位置，没有气泡，体积 $\geq 20\mu\text{L}$ 。



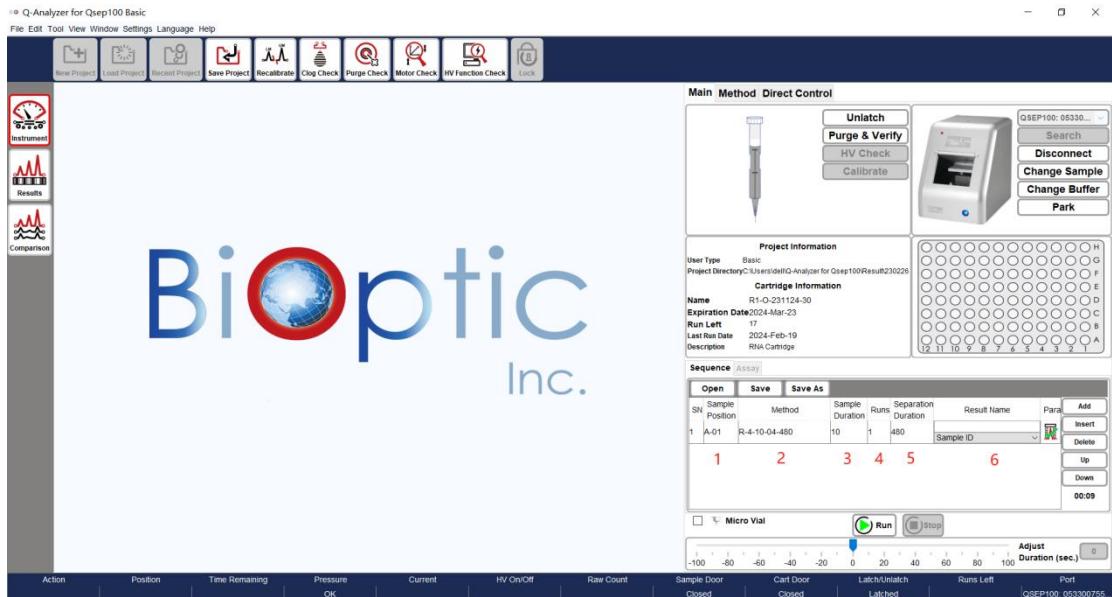
(注：卡夹校正成功的输出结果)

11.2 使用过的卡夹，直接点击“Recalibrate”进行校正，校正成功会自动提示“Recalibrate Succeed”，点击“确定”即可。

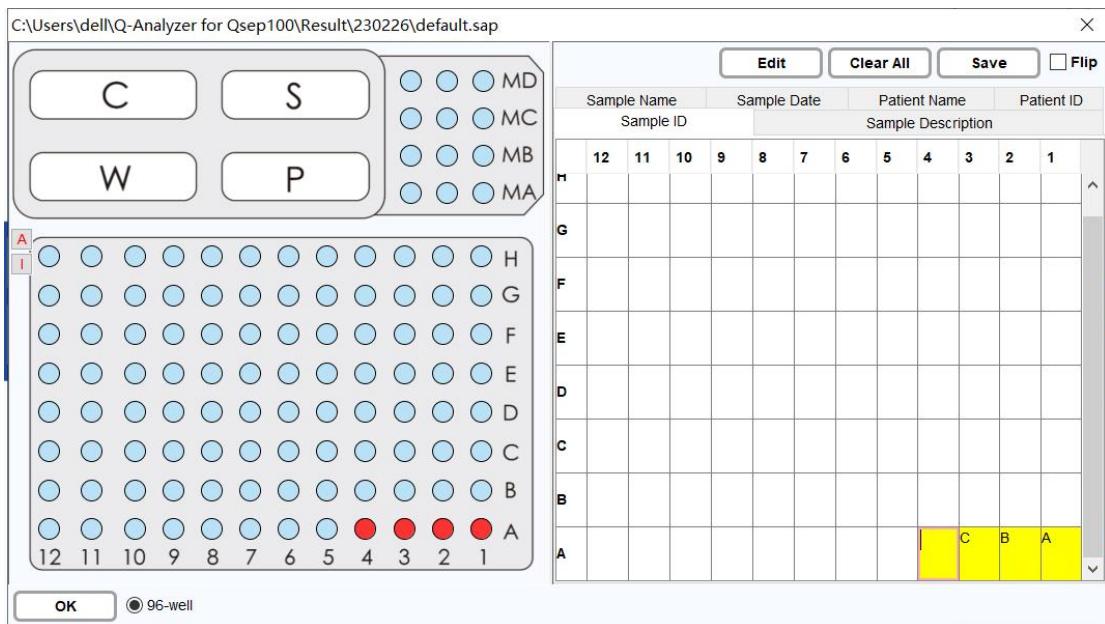
* 新卡夹校正 3 次不通过需联系技术支持处理。

12. 运行程序（若直接调用快速程序，步骤 12 可忽略，直接进行 13）

点选空白处依次选择：（1）样本位置；（2）测试方案；（3）进样时间；
 （4）测验次数；（5）分离时间；（6）结果文档命名；（7）参数设置



12.1 点选样本位置“Sample Position”，选取样本位置并编辑样本信息（Sample ID 等），完成后点击“OK”键。



12.2 点选测试方案“Method” 并选择电泳方法 R-4-10-04-480，可根据样本上机浓度范围调整进样电压（Sample Concentration 选项）。

Method Selector

Application	<input type="radio"/> DNA	<input checked="" type="radio"/> RNA	<input type="radio"/> Glycan	<input type="radio"/> Protein
Analysis Type	<input checked="" type="radio"/> Qualitative <input type="radio"/> Quantitative Sample Volume (x): <input type="text"/> μ l			
Alignment Marker	<input checked="" type="checkbox"/>	RNA-LM(MC-1)	20	N/A
Cartridge Type	<input type="radio"/> R1	RNA Cartridge(Shelf Life: 4 Months)		
Sample Concentration	<input type="radio"/> High (>50 ng/ μ l)	<input checked="" type="radio"/> Regular (5-50 ng/ μ l)	<input type="radio"/> Low (<5 ng/ μ l)	

Method	Description	Range	Remark
R-4-10-04-480	Sample Injection 4kv 10s Separation 4kv 480s		Total RNA QC
R-4-10-06-300	Sample Injection 4kv 10s Separation 6kv 300s	20nt~1000nt	ssRNA & dsRNA Fragment Analysis
T-HVPurge-04-120	HV Purge for 120s		
T-Purge-120	Purge for 120s		

High Voltage Purge Purge Purge Modification

12.3 (可选) 点选进样时间 “Sample Duration” , 改变数字大小来调整进样时间, 注意进样时间不要超过 20s。一般为 10s。

12.4 (可选) 点选测验次数 “Runs” 。一般选 1 次。如果选 2, 代表同一样本重复检测 2 次。

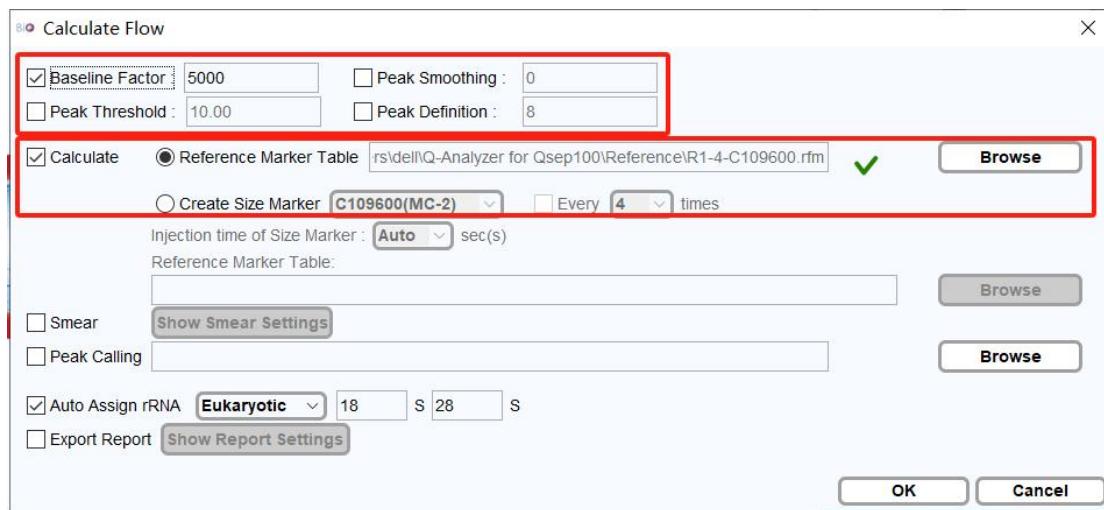
12.5 (可选) 点选分离时间 “Separation Duration” , 单位为秒, 改变数字大小来调整样本分离时间。**电泳分离时间可以在跑之前的程序根据样本情况进行修改设置; 也可在跑胶过程中通过拖动 “Modify Action Duration” 时间轴实时调整分离时间。**

12.6 (可选) 点选结果档命名 “Result Name” , 输入结果文件名统一前缀。

Sequence Assay

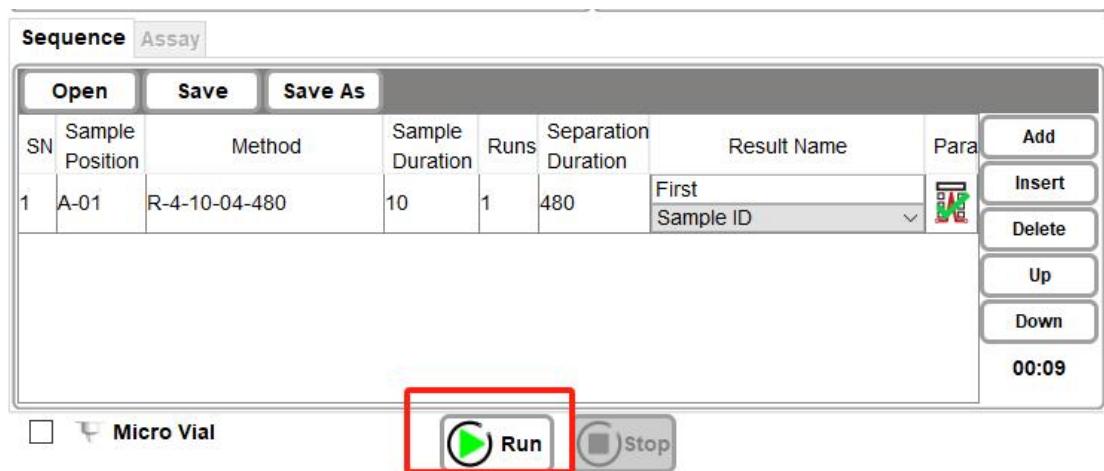
Open	Save	Save As					
SN	Sample Position	Method	Sample Duration	Runs	Separation Duration	Result Name	Para
1	A-01	R-4-10-04-480	10	1	480	First	Add
<input type="button" value="Insert"/> <input type="button" value="Delete"/> <input type="button" value="Up"/> <input type="button" value="Down"/>							00:09
<input type="text" value="Sample ID"/>							

12.7 点选 Para, 更改计算参数, Baseline Factor 改为 5000。

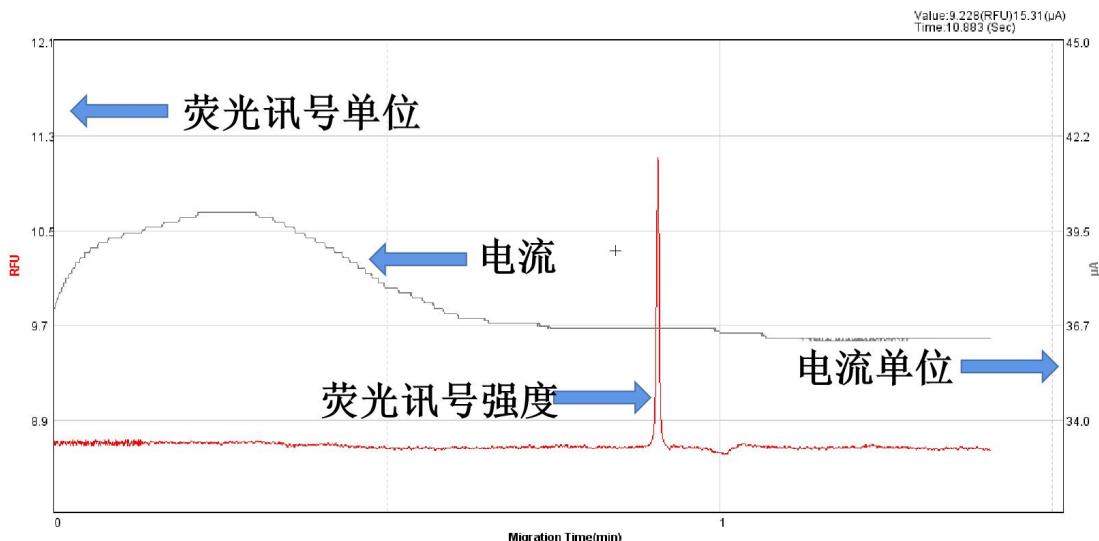


片段计算处可选择电子 Reference Marker 进行计算, 如需片段准确大小, 可选择 Create Size Marker。

12.8 点选“Run”启动实验。



12.9 信号图谱及注意事项。

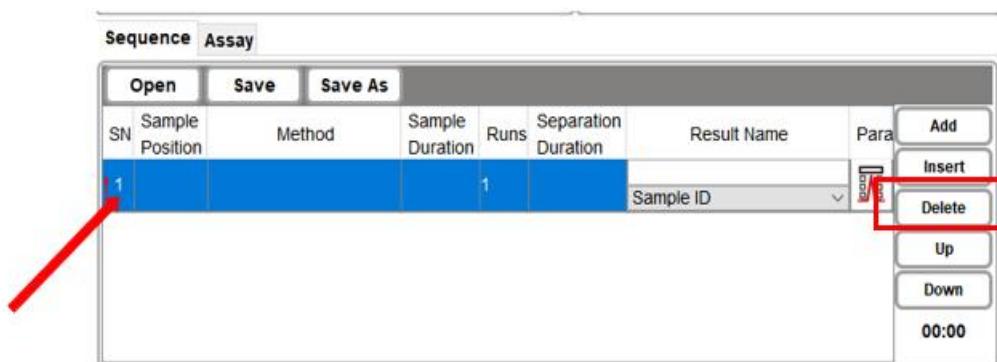


注意事项：

- (1) 确定Marker所放位置正确并且足量；
- (2) 确认缓冲液槽内液面高于最低限制；
- (3) 确认新卡夹已扎孔；
- (4) 检测样本前需要进行卡夹校正—Calibrate。

13.程序运行（直接调用快速程序）

(1) 调用快速程序：鼠标点击程序中 SN 下方的程序编号（图箭头所指），选中程序后点击 Delete 删除程序框内的程序，再点击 Open 选中对应位置的快速程序点击“打开”。





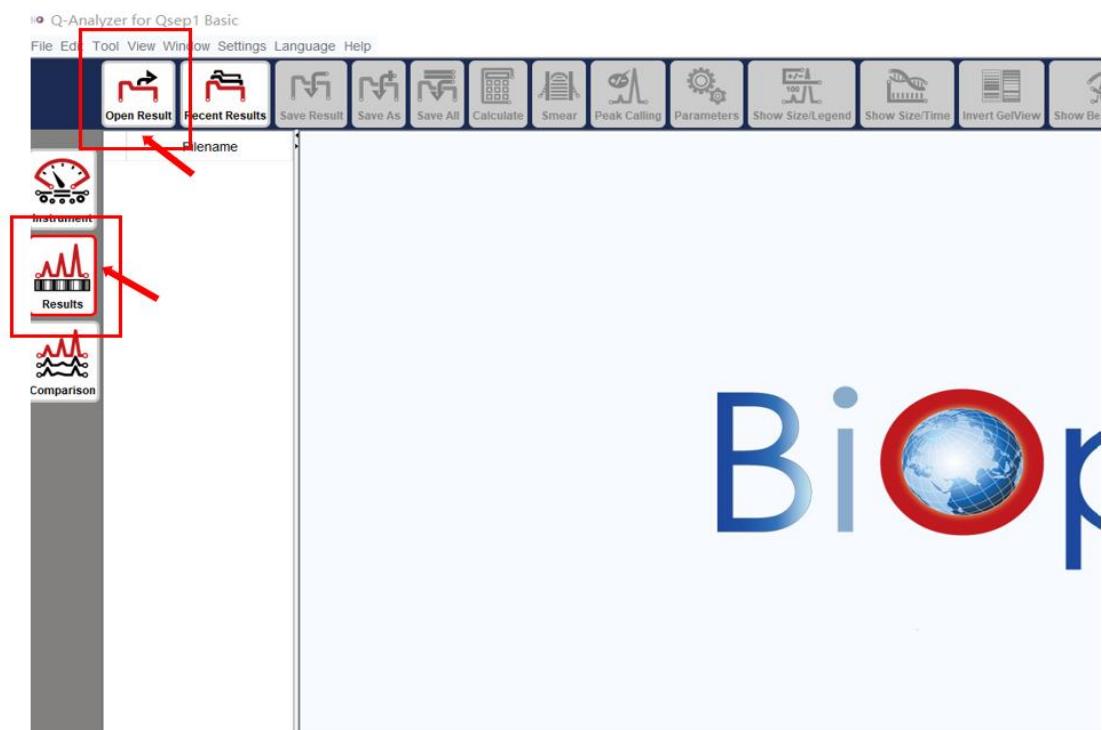
(2) 选择样本孔位置以及编辑样本名称：单击 Sample Position 下方的空白格，弹出 96 孔盘模拟图，于左侧选择所放样品位置，双击右侧相应位置处输入样品信息 (Sample ID)，设置完成后点击 OK (样本量多时，可以选择使用 Excel 模板进行一次性导入)。

(3) 设置完成后，点击 RUN，开始运行。Instrument 界面的左侧是 Real Time 的图像，可以进行实时监测电泳过程。

14. 数据分析：

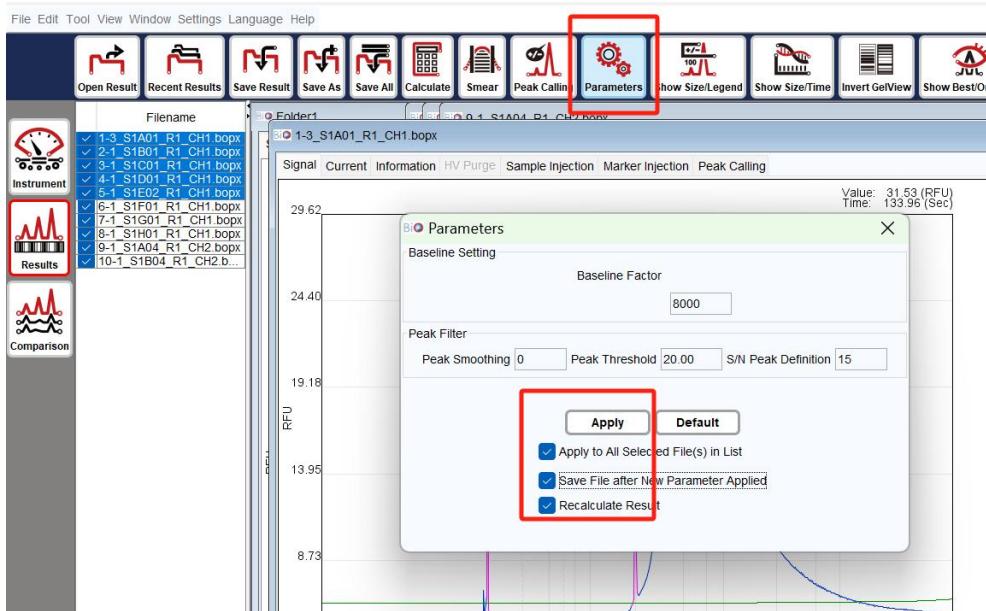
14.1 打开检测结果

样本检测完成后，点击 Results ---Open File，选择目标结果文件，打开。



14.2 参数调整

选中需要进行参数修改的样本，点击 Parameters，在弹出的对话框中对 Baseline factor（基线因子）、Peak threshold（阈值线高度）和 S/N Peak definition（峰值疏密度）进行修改，勾选上 Apply to all selected files in list、Save file after new parameter applied 和 Recalculate result，点击 Apply。



现对各参数进行解释，可根据需求调整峰图的美观性：

- Baseline factor** 会改变基底值（Baseline）的判断，Baseline factor 设定越大，基底值越平滑，较小则基底值容易受到讯号的影响而起伏，可调整为 2000 甚至更高后重新计算结果。
- Peak Smoothing** 会改变原始数据的显示，显示的峰值个数会变少，使其变得更为平滑；Peak Smoothing 指定的值越大，数据便会越平滑同时降低讯号强度，从而可以减少因为杂峰而产生的错误讯号。
- Peak threshold** 可以改变判断为 Peak 所需的讯号强度，当 Peak threshold 指定的值越高，要被判断为 Peak 所需的讯号强度也越强，若指定的值越低，则所需的讯号强度越低，较容易能得到一些较低浓度碱基对的 Peak，但同时也较容易受杂峰影响。
- Peak definition** 改变峰值显示的疏密度，设置的值越低，显示峰值的间隔越小，一般 PCR 产物设置偏低，文库等弥散样本数值设置相对高。

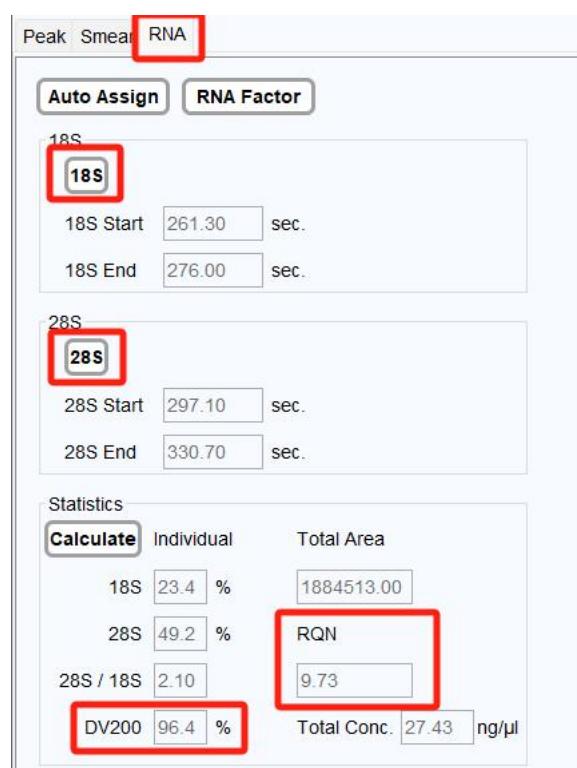
14.3 RNA 质量评分：RNA Quality Number (RQN)

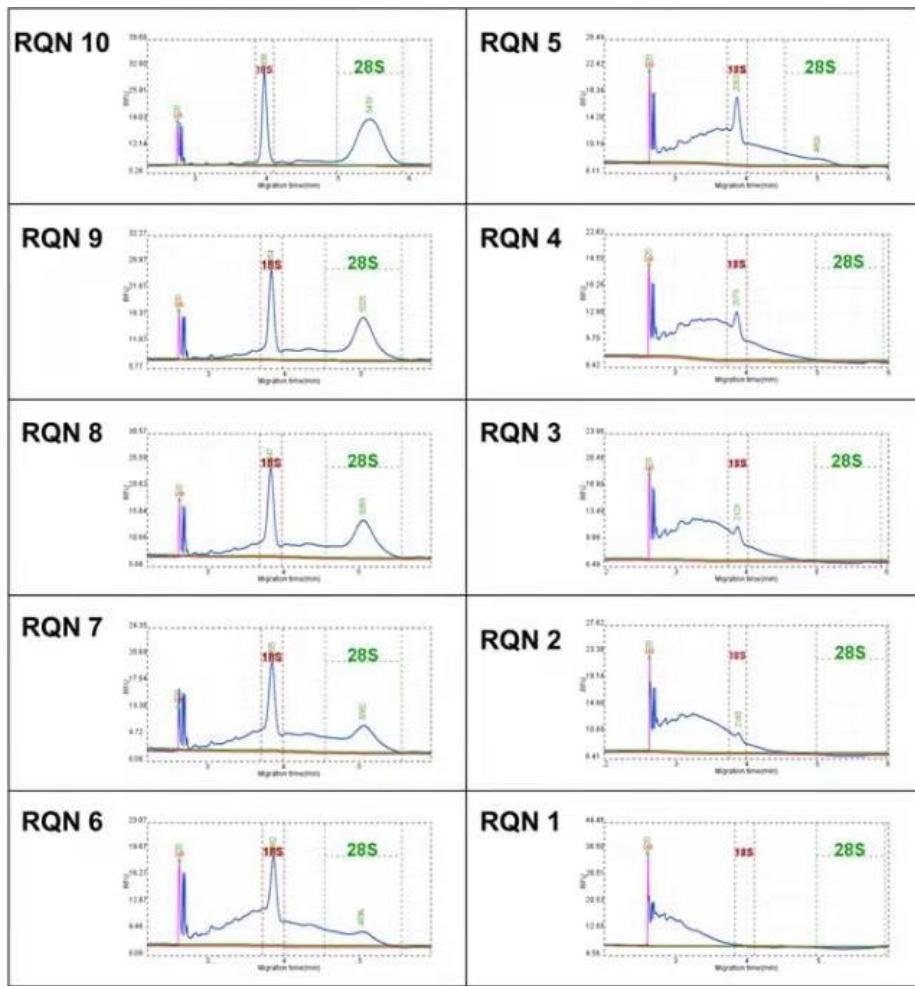
(1) 软件可以自动识别 Lower marker, 18S 和 28S。如果样本降解严重, 浓度过低, 软件没有识别 18S 和 28S, 可以点击“Auto assign”按钮。根据 28S/18S 值, RQN 值就会计算并显示出来。

(2) 18S 和 28S 区域的调整: 可以通过拉动红色和绿色的虚线大小来调整 18S 和 28S 区域的面积大小。

(3) 不同大小的 RQN 的峰图如下图所示, 可根据峰图对比

DV200: 大于 200nt 的片段占比, 针对 FFPE 等降解严重的样本, 没有明显的 18S, 28S 峰形, 根据 DV200 来评判 RNA 质量。





15 导出报告

15.1 点击 Comparison --- New Folder, 用鼠标将计划处理的结果拖到 Folder 框内, 勾选 Signal Alignment (信号对齐), 点击 Apply All; 勾选 Time Alignment (时间对齐), 点击 Apply All; Signal Offset 打勾 (打勾是正向拉开间距, 不打勾是反向拉开间距), 后面输入数值, 点击 Apply All (可点击多次), 可调整结果间距, 点击 Reset All 可取消间距。



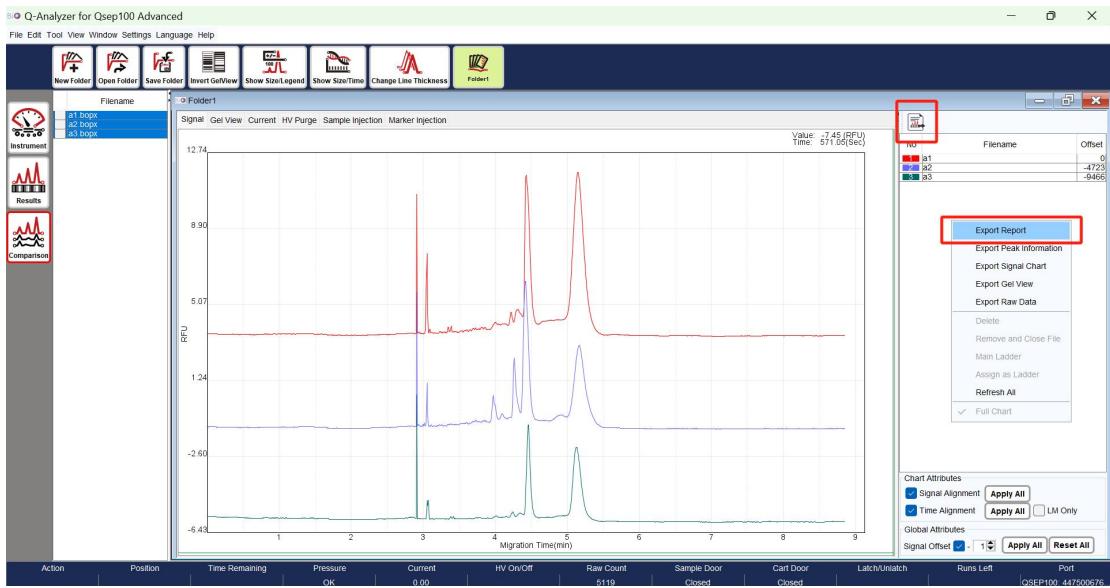
15.2 导出结果

(1) 导出峰图, 胶图, 表格信息, 点图信息

于 Folder 空白处右击, 选择 Export Peak Information , 导出表格信息; 选择 Export Signal Chart, 导出峰图; 选择 Export Gel View, 导出胶图, 选择 Export Raw Data , 导出点图信息。

(2) 多个结果导出报告

点击右上角小图标, 在 Report Format 弹窗上按照下图设置后, 点击 OK 可导出 Pdf 格式报告, 也可根据需要在 File Format 处选择 Word 或者 Excel 格式。



Report Format

Export Type :
 Individual Folder

Application Type :
 Standard(DNA) Smear RNA Peak Calling

Signal View :
 Window Best Fit(LM-UM) Best Fit(LM-End) Original

X Axis :
 Time Size

Gel View :
 Best Fit(LM-UM) Best Fit(LM-End) Original

Result List :
 Result Name Sample Description

Smear Zone :
 Only Zone1 Both Zone

Small Chart Description :
 Sample Position Sample ID

File Format :
 Preview PDF WORD EXCEL

OK

- Report Type: Individual (每个结果单独输出文档), Folder (所有结果输出一个文档);
- Application Type: 若检测的是 PCR 产物, 则选择 Standard (DNA), 输出 peak 信息; 若检测的是弥散样本并做过 Smear 分析, 则可选择 Smear, 输出片段平均大小以及片段占比信息; 若检测的样品为 RNA, 则选择 RNA; 若有建立 Peak

calling table 信息，则选择 Peak calling;

- c. Signal View 和 Gel View: Window (按照原始文件显示框展示的结果输出，若有对原始结果进行拖拉放大调整，着重某部分显示可以选择此功能)；Best fit (LM-UM) (最佳视区，输出 low 和 up marker 包围的区间)；Best fit (LM-End) (输出 low 开始直到电泳结束阶段的区间)；Original (从头到尾全部区间)；默认选择 Best fit (LM-UM)，若是 gDNA 样本则选 Best fit (LM-End)；
- d. X axis : 设置 X 轴显示 Time 还是 bp 大小；
- e. Result list: 保持默认即可
- f. Smear zone: 选择导出 Z1 区 smear 信息导出还是 Z1 和 Z2 两个区间信息均导出，取决于之前对样本的结果处理。
- g. Small chart description: report 结果里的小图名字是按照 Sample Position 还是 Sample ID 来命名；
- h. File Format: 导出文件的格式，用户可根据自身需求选择；
- i. 点击 OK 后选择保存路径。

(3) 单个结果导出报告

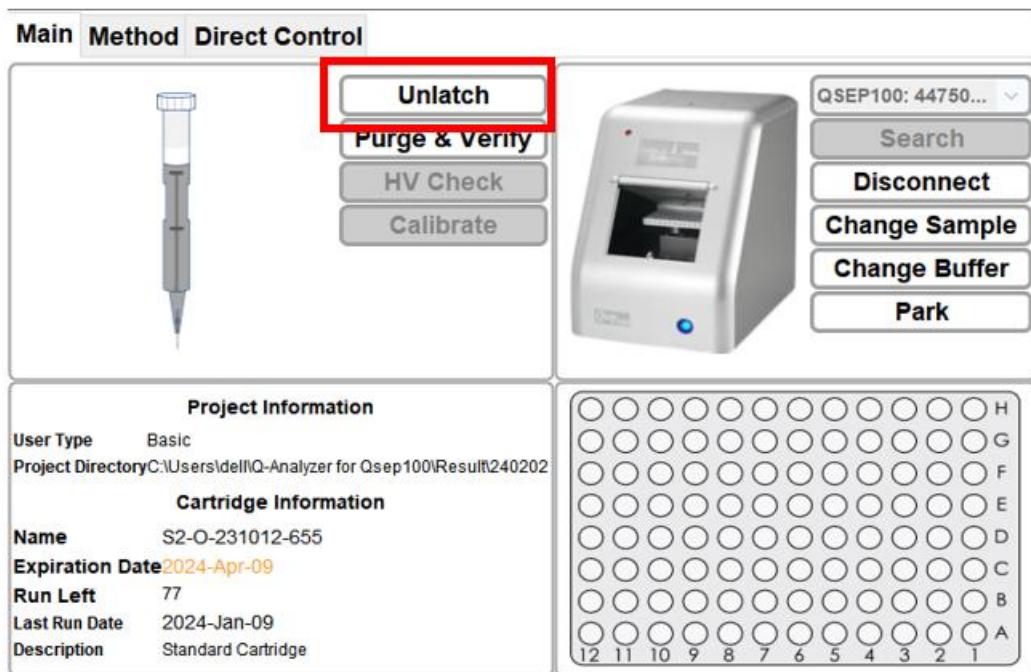
将需要导出的数据在 Results 中打开后，选中（数据前打勾）后，右键选择所需格式（选择 Export Report 或直接点击右下角 Export Report 图标，可导出报告；选择 Export Raw Data，可导出点图信息；选择 Export Smear Information，可导出片段分布分析结果，以表格形式呈现；选择 Export Chart，可导出信号图）。

16、仪器关机

16.1 取出卡夹

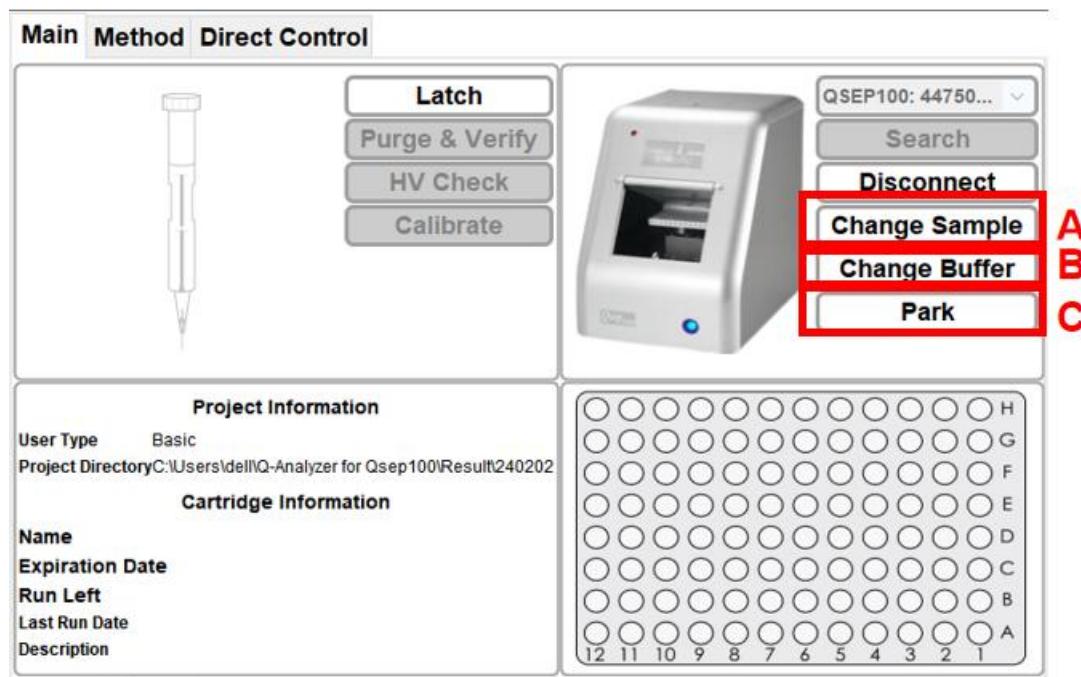
测完样品后，点击“Unlatch”断开卡夹连接，完全断开卡夹连接后再打开卡夹门取出卡夹，卡夹取出后插入卡夹盒子中。

注意：①卡夹使用完及时从仪器中取出，请勿长时间放置在仪器中；
②卡夹插入盒子中需确保尖端插在保湿凝胶中，注意卡夹尖端不要暴露空气中；
③扎孔后的卡夹用完后需要竖直放置，请勿倒置或躺平放置；



16.2 取出样品和试剂

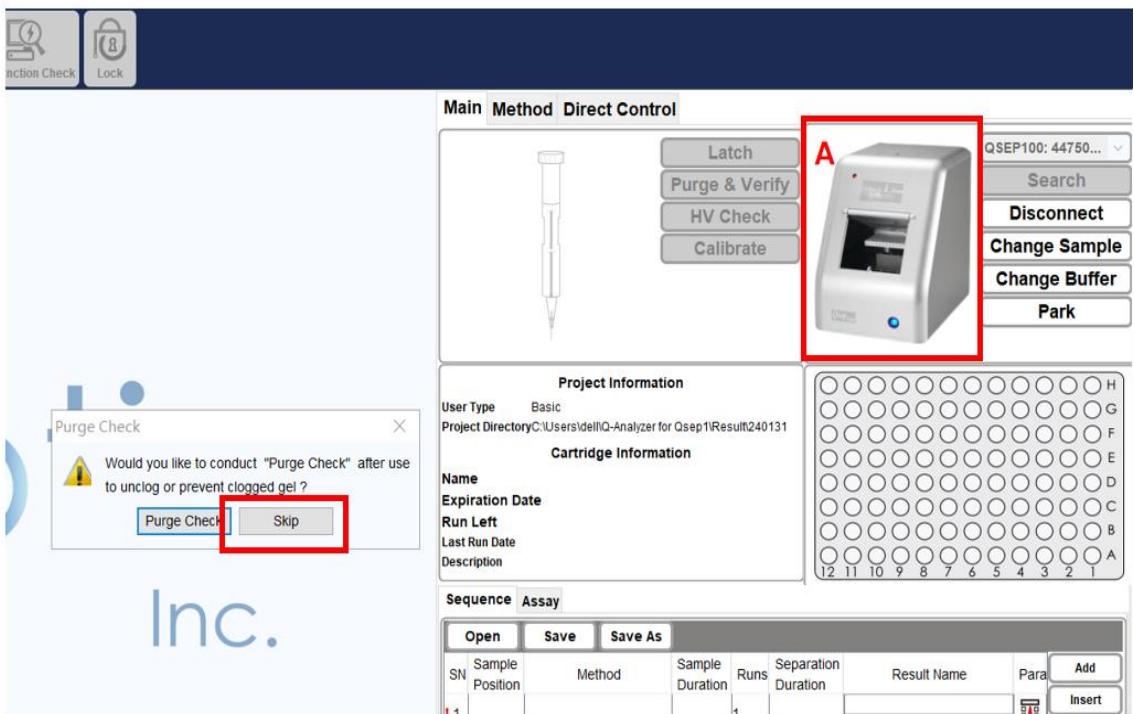
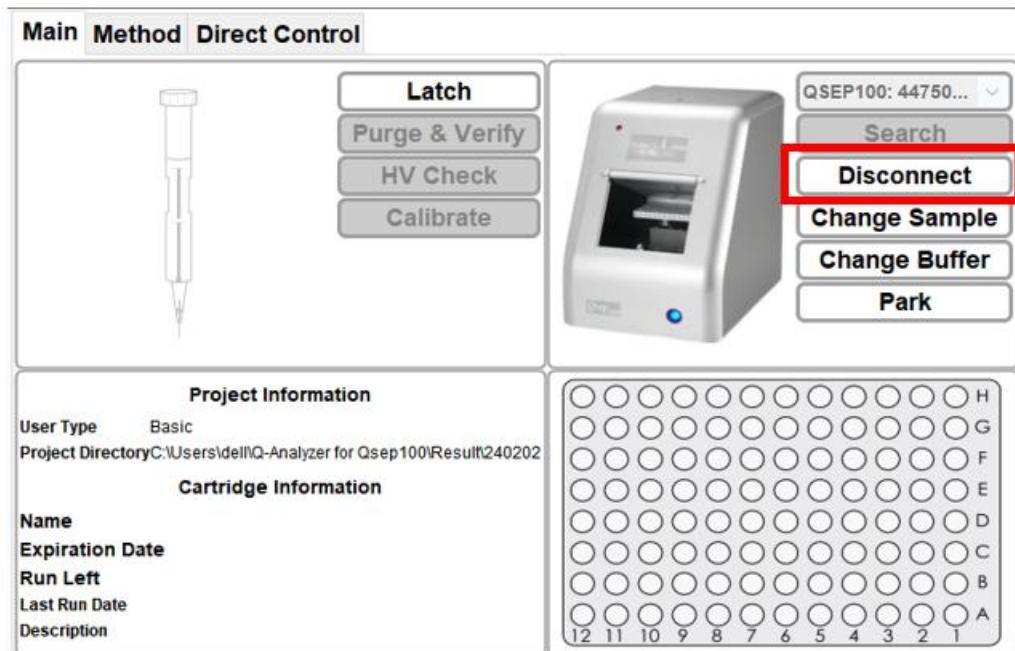
点击 Change Sample (图 A) , 取出样品, 点击 Change Buffer (图 B) 取出 buffer 和 marker, 而后点击 Park (图 C) , 样品盘复位。



16.3 仪器断开连接

点击 Disconnect, 断开仪器连接, 弹出 Purge Check 的弹窗, 点击 Skip 跳过,

等待仪器图标变黑白色后可关闭软件。



16.4 关闭仪器主机的电源开关

16.5 关闭空气压缩机电源开关

“0”是关，“1”是开。

