

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×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×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。

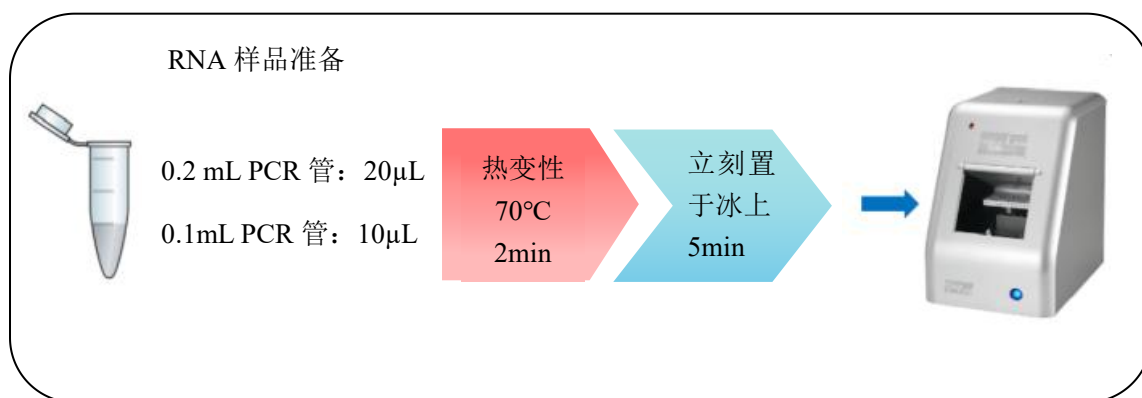
***建议使用试剂盒配套的八连管用作 marker 管。**

3. 准备 Total RNA 样本

3.1 样本稀释：用 1×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

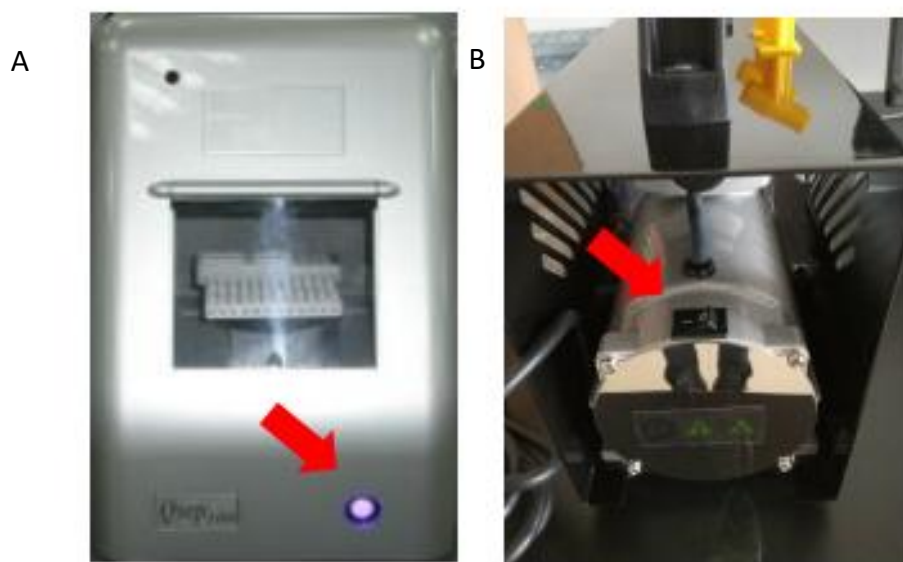
0.1× dilution buffer 稀释样本，提高样本检测灵敏度（浓度过低可增加进样时间）。

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



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

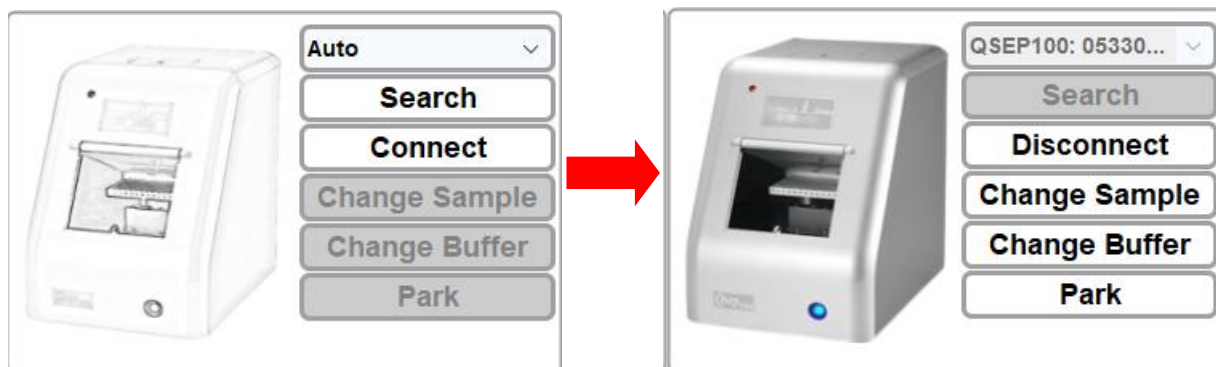
4. 打开 Qsep100 仪器电源和空气压缩机开关



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（1μL 原液 +14μL1×dilution buffer，混匀，70℃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≥15μL），**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

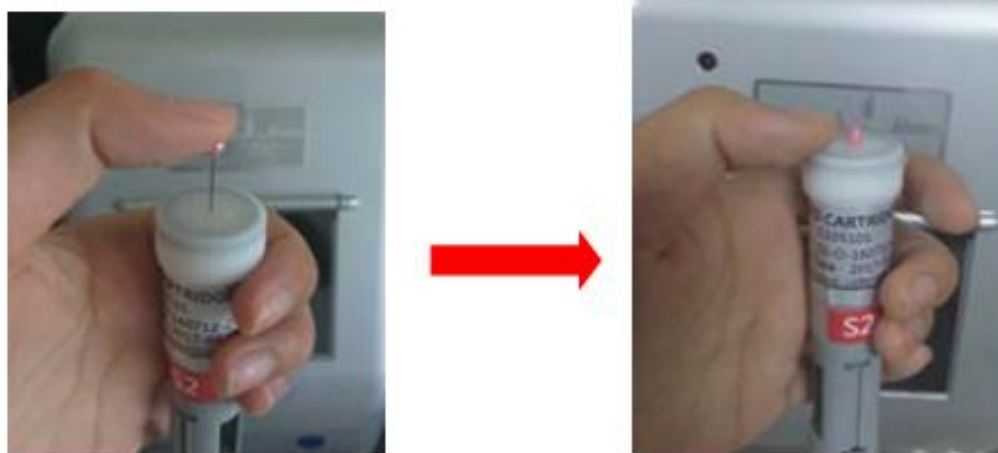
10. 装入卡夹

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。

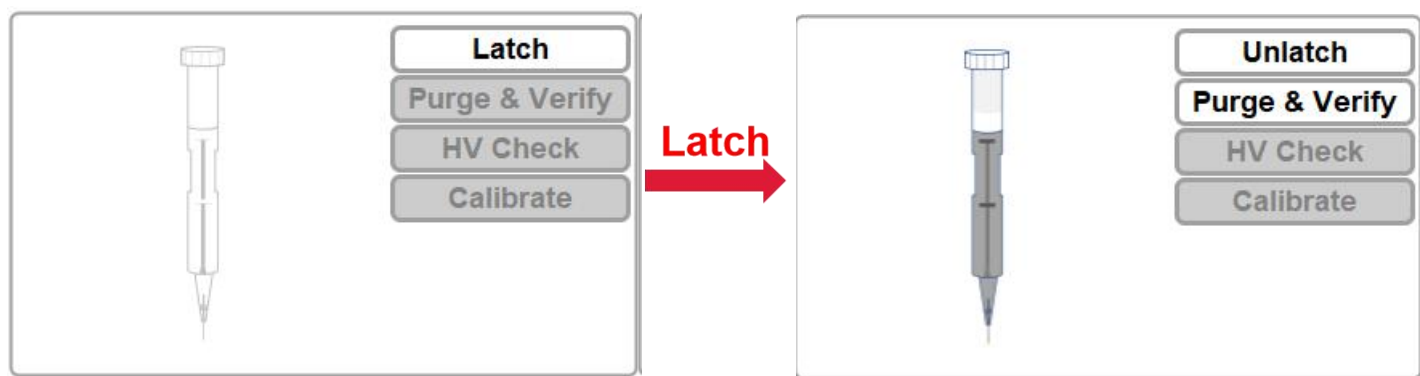
10.4 取出大头针，用无尘纸擦拭卡夹上盖区域，务必保持卡夹直立状态。



10.5 以按压的方式开启卡夹门，放入卡夹时将带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。

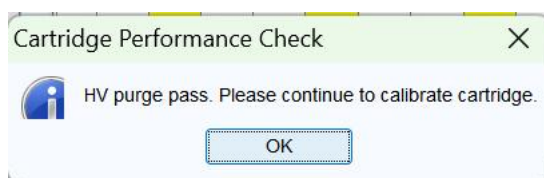


11. 卡夹校正

11.1 新卡夹使用说明：

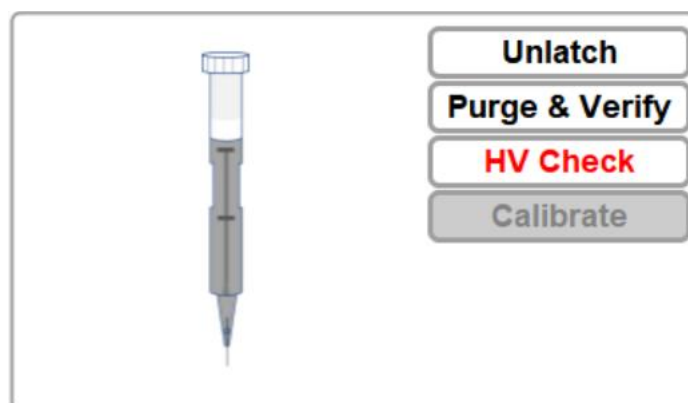
卡夹使用前皆需经过校正以确保数据正确，请依照以下步骤进行卡夹校正

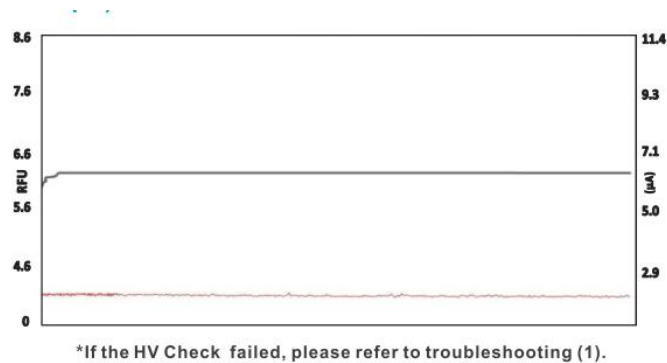
1) 点选“OK”



2) 点选“HV check”

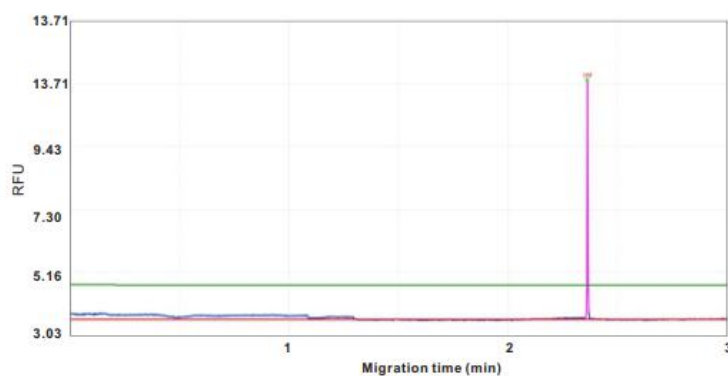
存储与运输环境皆会影响卡夹中的凝胶状态，请在进行 HV check 操作时，确定胶体电流值处于稳定状态（注：处于稳定状态的电流值时灰色电流线应该基本呈水平直线状态，并且数值 $>2\mu\text{A}$ ）。





3) 点选 “Calibration”

请先确保 1×RNA Lower Marker 放置在 MC1 位置，没有气泡，体积≥20μL。



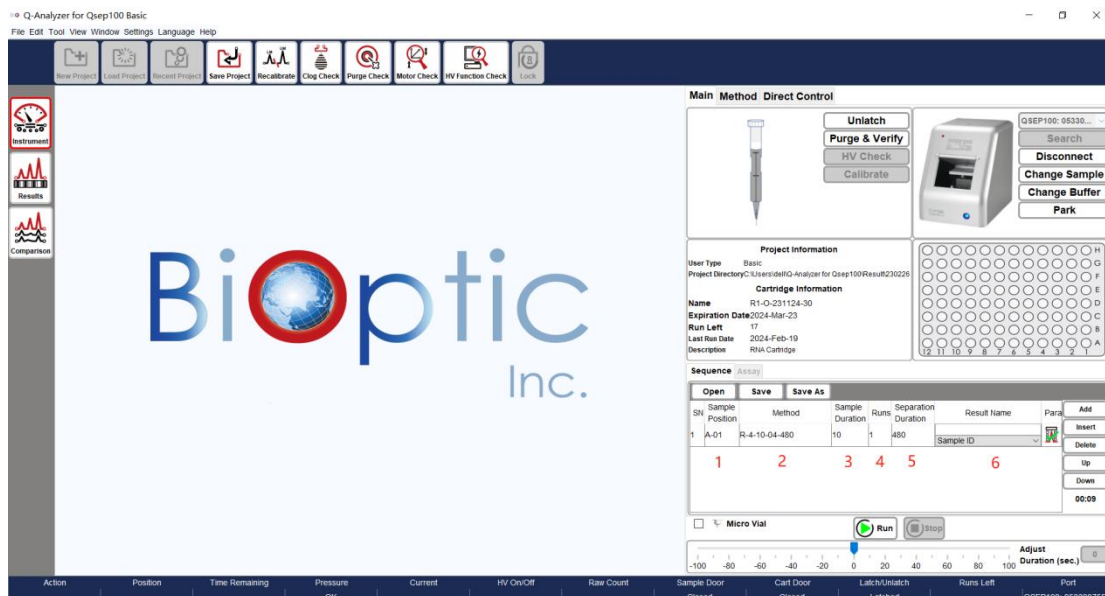
(注：卡夹校正成功的输出结果)

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。

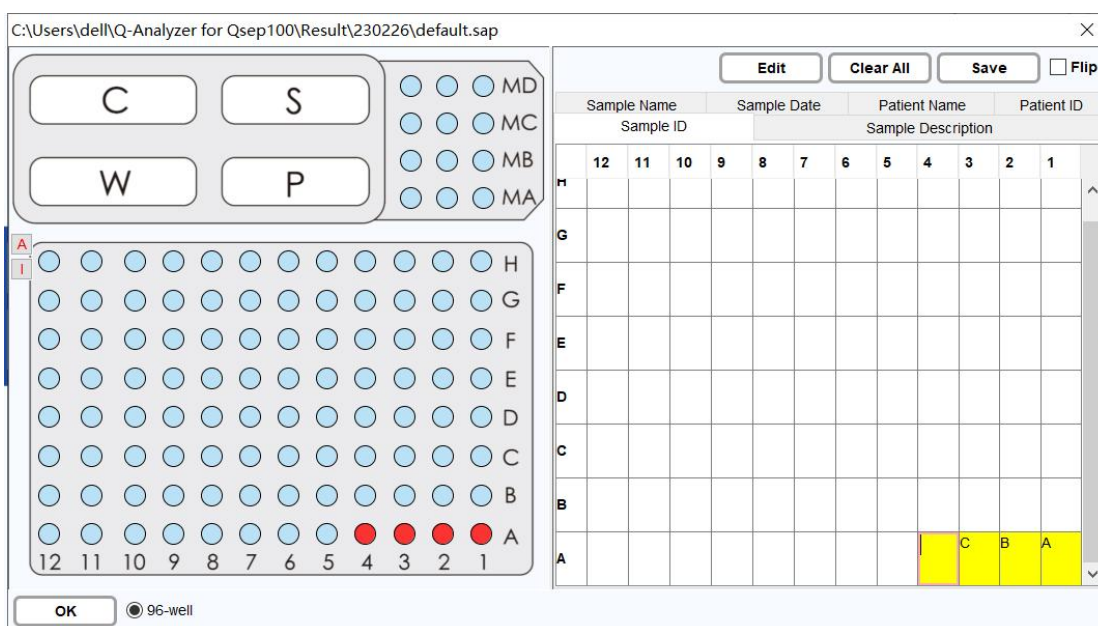
*** 新卡夹校正 3 次不通过需联系技术支持处理。**

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 [X]

Application ☐ DNA ☒ RNA ☐ Glycan ☐ Protein

Analysis Type ☒ Qualitative ☐ Quantitative Sample Volume (x) : µl

Alignment Marker ☒ RNA-LM(MC-1) 20 N/A ☐ Reduce ☒ Normal ☐ Enhance

Cartridge Type R1 RNA Cartridge(Shelf Life: 4 Months)

Sample Concentration ☐ High (>50 ng/µl) ☒ Regular (5-50 ng/µl) ☐ Low (<5 ng/µl)

| 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

Customized Method [OK]

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 | Sample ID |

Add
Insert
Delete
Up
Down
00:09

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

Calculate Flow

☒ Baseline Factor: 5000 ☐ Peak Smoothing: 0

☐ Peak Threshold: 10.00 ☐ Peak Definition: 8

☒ Calculate ☒ Reference Marker Table: rs\deli\Q-Analyzer for Qsep100\Reference\IR1-4-C109600.rfm

☐ Create Size Marker: C109600(MC-2) ☐ Every 4 times

Injection time of Size Marker: Auto sec(s)

Reference Marker Table:

☐ Smear

☐ Peak Calling

☒ Auto Assign rRNA: Eukaryotic 18 S 28 S

☐ Export Report

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。

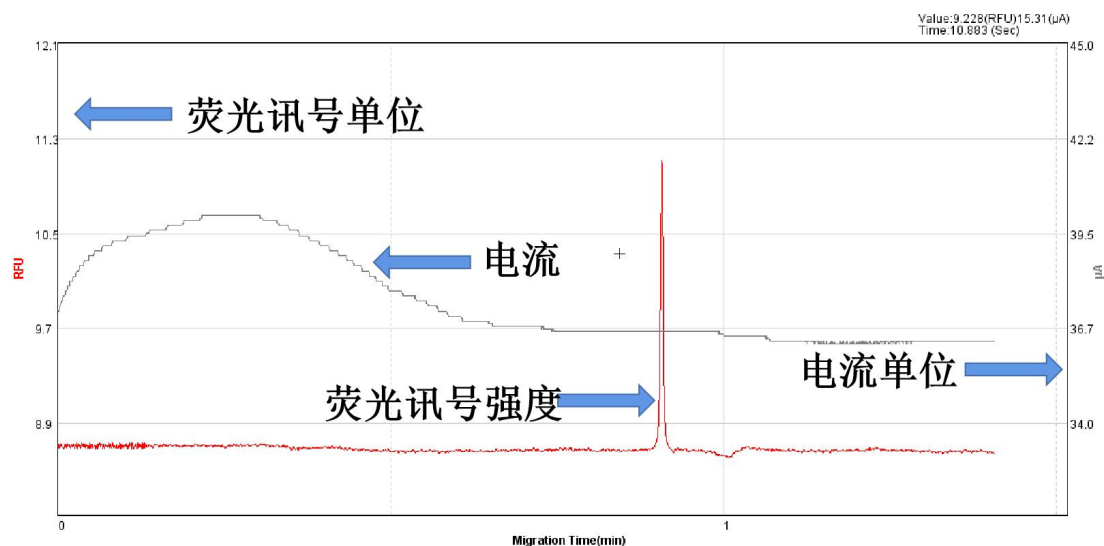
12.8 点选 “Run” 启动实验。

Sequence Assay

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

☐ Micro Vial

12.9 信号图谱及注意事项。

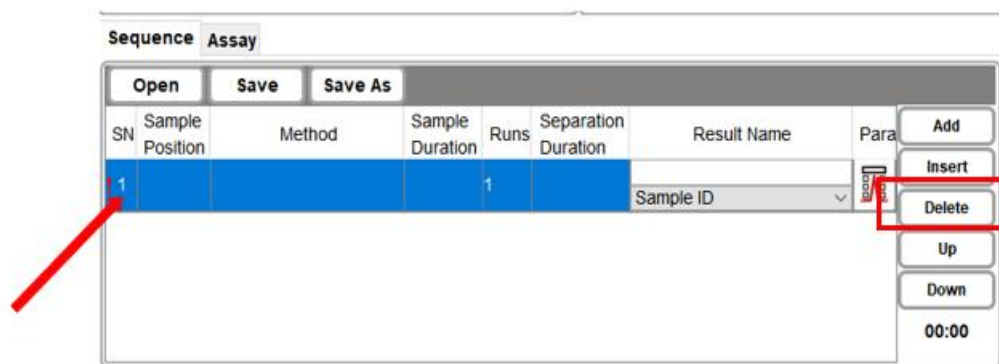


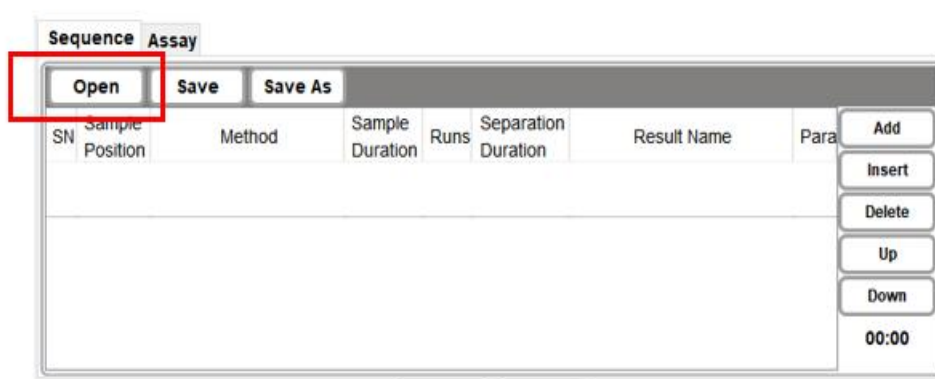
注意事项：

- (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），选蓝程序后点击 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”。





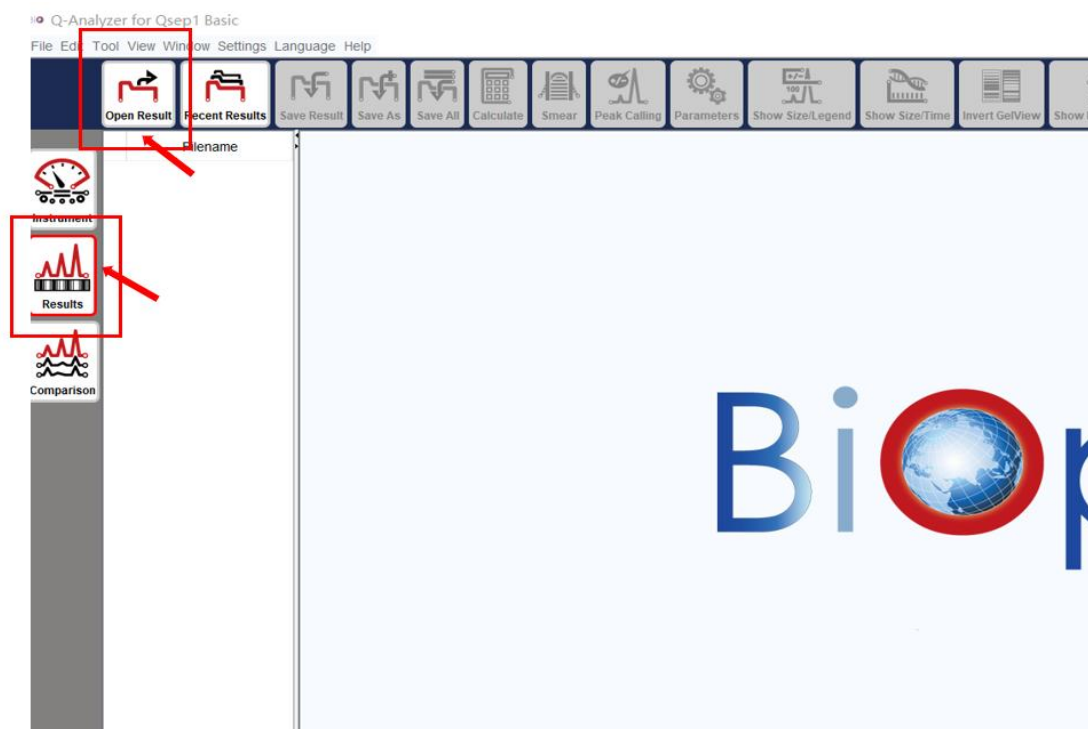
(2) **选择样本孔位置以及编辑样本名称：**单击 Sample Position 下方的空白格，弹出 96 孔盘模拟图，于左侧选择所放样品位置，双击右侧相应位置处输入样品信息（Sample ID），设置完成后点击 OK（样本量多时，可以选择使用 Excel 模板进行一次性导入）。

(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：

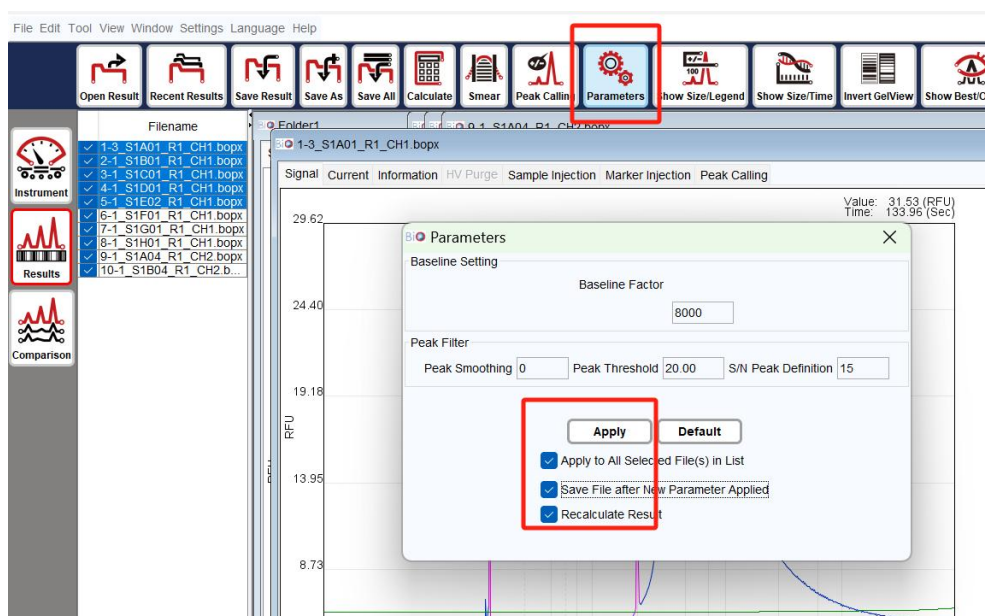
14.1 打开检测结果

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

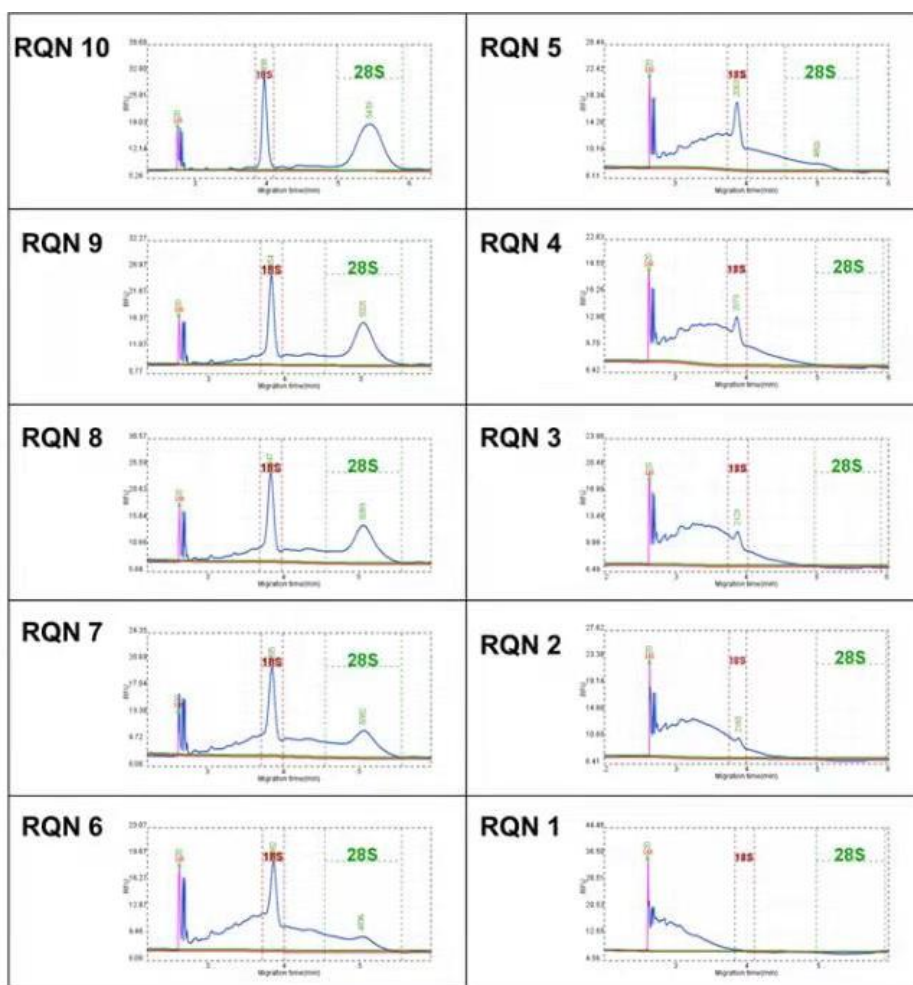
DV200: 大于 200nt 的片段占比, 针对 FFPE 等降解严重的样本, 没有明显的 18S, 28S 峰形, 根据 DV200 来评判 RNA 质量。

The screenshot displays the 'RNA' tab in a software interface. It features two main sections: '18S' and '28S', each with a peak selection button, start/end time inputs, and a 'Calculate' button. Below these is a 'Statistics' section with a table of results. Red boxes highlight the '18S' and '28S' buttons, the 'RQN' value, and the 'DV200' value.

| Peak | Start (sec.) | End (sec.) |
|------|--------------|------------|
| 18S | 261.30 | 276.00 |
| 28S | 297.10 | 330.70 |

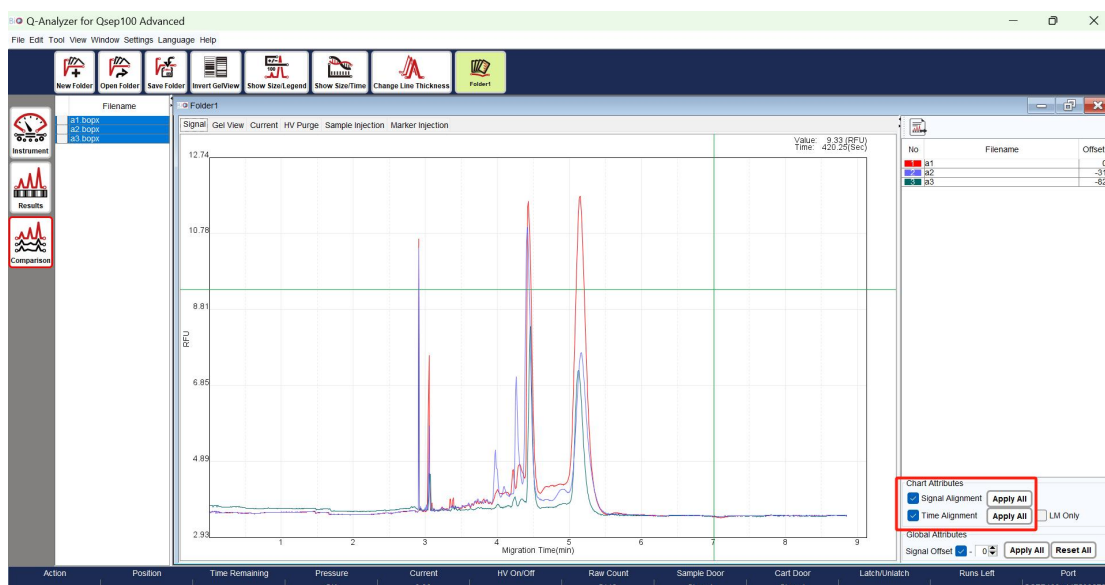
| Statistics | Individual | Total Area |
|------------|------------|------------|
| 18S | 23.4 % | 1884513.00 |
| 28S | 49.2 % | |
| 28S / 18S | 2.10 | |
| DV200 | 96.4 % | |

RQN: 9.73
Total Conc.: 27.43 ng/ul



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

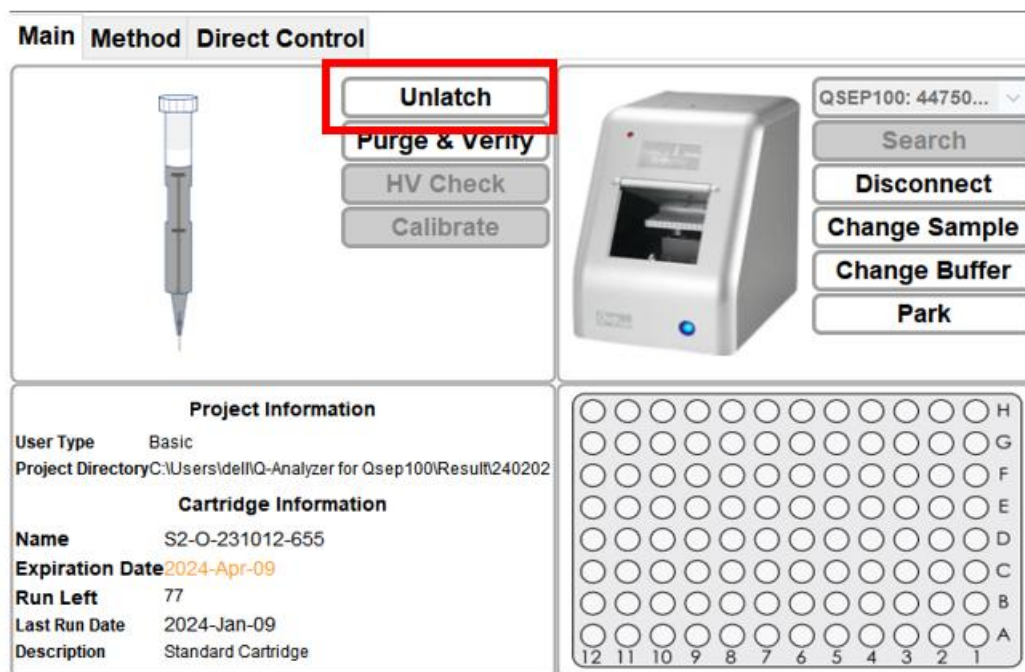
16.1 取出卡夹

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;

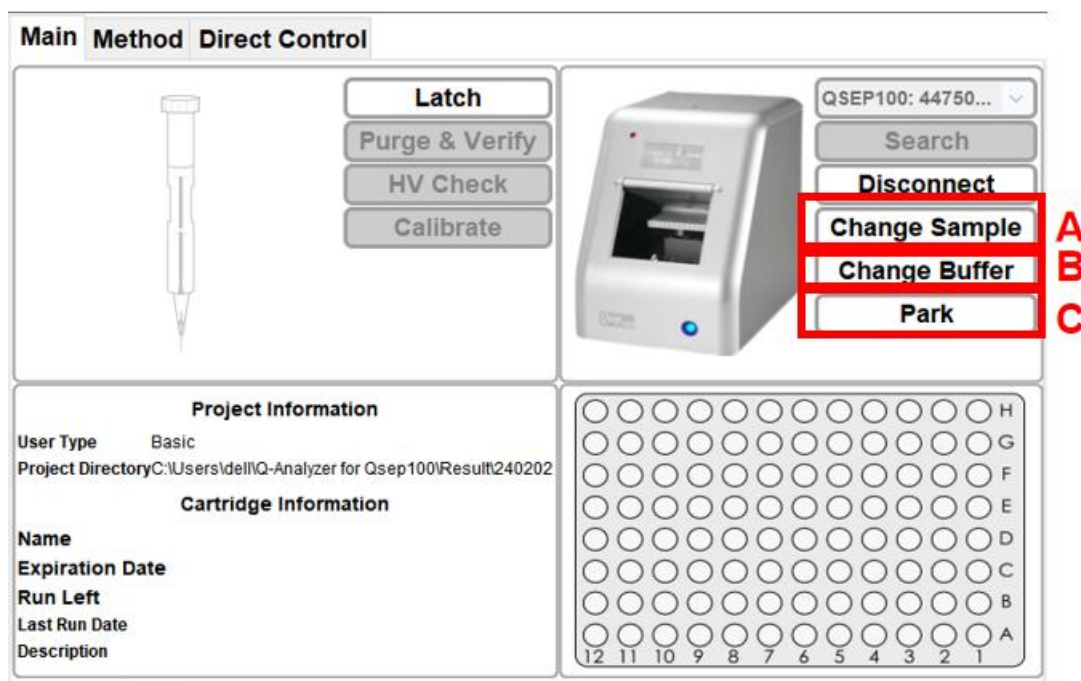
②卡夹插入盒子中需确保尖端插在保湿凝胶中, 注意卡夹尖端不要暴露空气中;

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

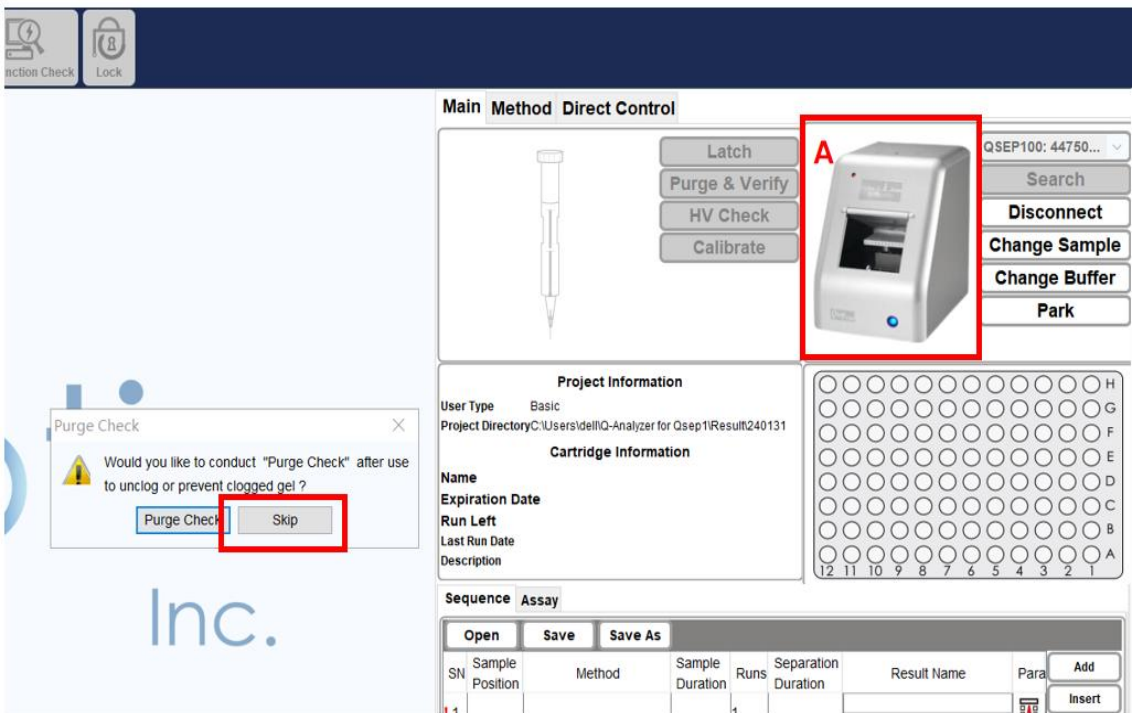
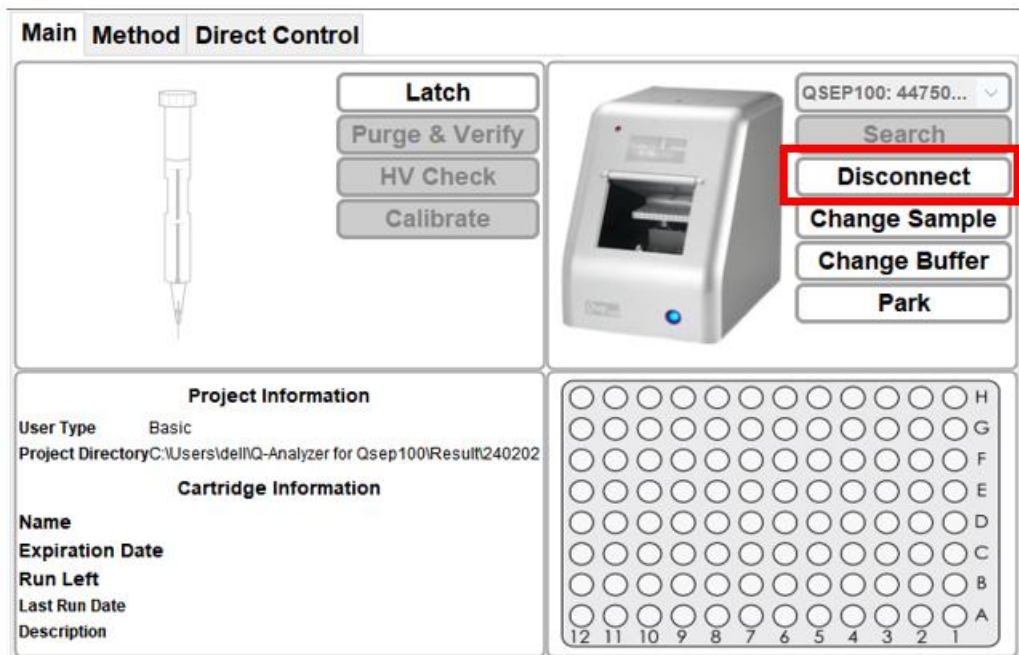
点击 Change Sample（图 A），取出样品，点击 Change Buffer（图 B）取出 buffer 和 marker，而后点击 Park（图 C），样品盘复位。



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。

