

Qsep100 核酸蛋白分析系统检测 cDNA 的标准操作流程

4.0 版本

适用样本：S1 卡夹检测 cDNA 样本上机浓度范围 0.2-10ng/ μ L (Qubit 定量) 建议上机浓度 1-5ng/ μ L。若样本浓度比较低可选择 N1 高敏卡夹。

衡量 cDNA 质量的指标：(1) 降解是否严重；(2) 平均大小是否符合预期；(3) 片段占比分布是否符合预期

1. 准备缓冲液

1.1 分离缓冲液 (SEPARATION BUFFER)。

1.2 稀释缓冲液 (DILUTION BUFFER)，用纯水稀释 10 倍后使用。

2. 准备 Marker

2.1 Alignment Marker 体积 30 μ L，加入 10-15 μ L 矿物油油封

2.2 Size Marker 体积30ul，加入 10-15 μ L 矿物油（不跑Size Marker 时直接调用原来保存的 Marker）(N1 卡夹需使用 Dilution Buffer 原液将 Size Marker 稀释 10 倍)

Alignment Marker 使用的注意事项：

- 1) 使用量：每次吸样会消耗 0.1 μ L 的 Alignment Marker，每个样本会消耗 0.1 μ L 的体积，校准不消耗卡夹次数。
- 2) 更换频率：使用频率高建议 100 个样本更换，频率低建议 2 周更换。油封后放 4°C 保存，不建议添加，需直接换新。
- 3) 收到卡夹及试剂后的保存。

Marker≤3 个月可 4°C 保存，长期保存放-20°C，化冻放后 4°C。

卡夹放 4°C 避光保存，务必保持直立状态，防止胶流出。

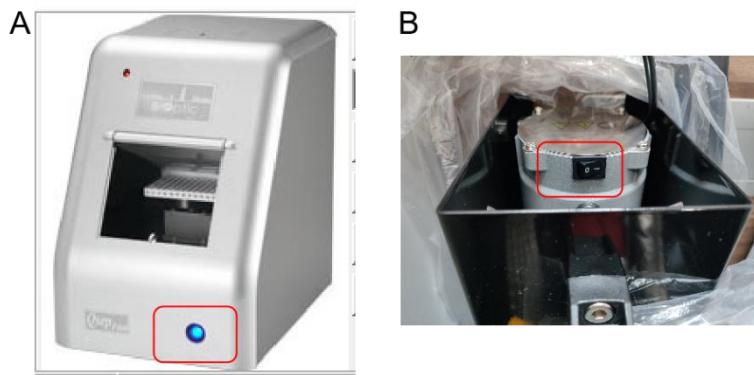
***建议使用试剂盒配套的八连管用作 marker 管。**

3. 准备 cDNA 样本

样本稀释：用稀释 10 倍后的 Dilution Buffer 调整 cDNA 样本最佳浓度范围为

1-5ng/ μ L，体积 \geq 15 μ L，加入200 μ L PCR管中。浓度过低可更换N1高敏卡夹或增大样品进样电压和进样时间。

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. 连接“Qsep 100”与放置试剂和样品

(1) 联机与通气检查

点击 Connect (联机) (图1)，仪器图片会从灰色变为彩色，表示联机成功。
随之会弹出 Purge Check 提示窗口 (图2)，点击 Purge Check 进行通气检查，
根据提示操作，结束后点击 Finish。

注意：Purge Check不是每天开机关机都必须做，可以半个月或者一个月做一次，用于检查仪器气密性。

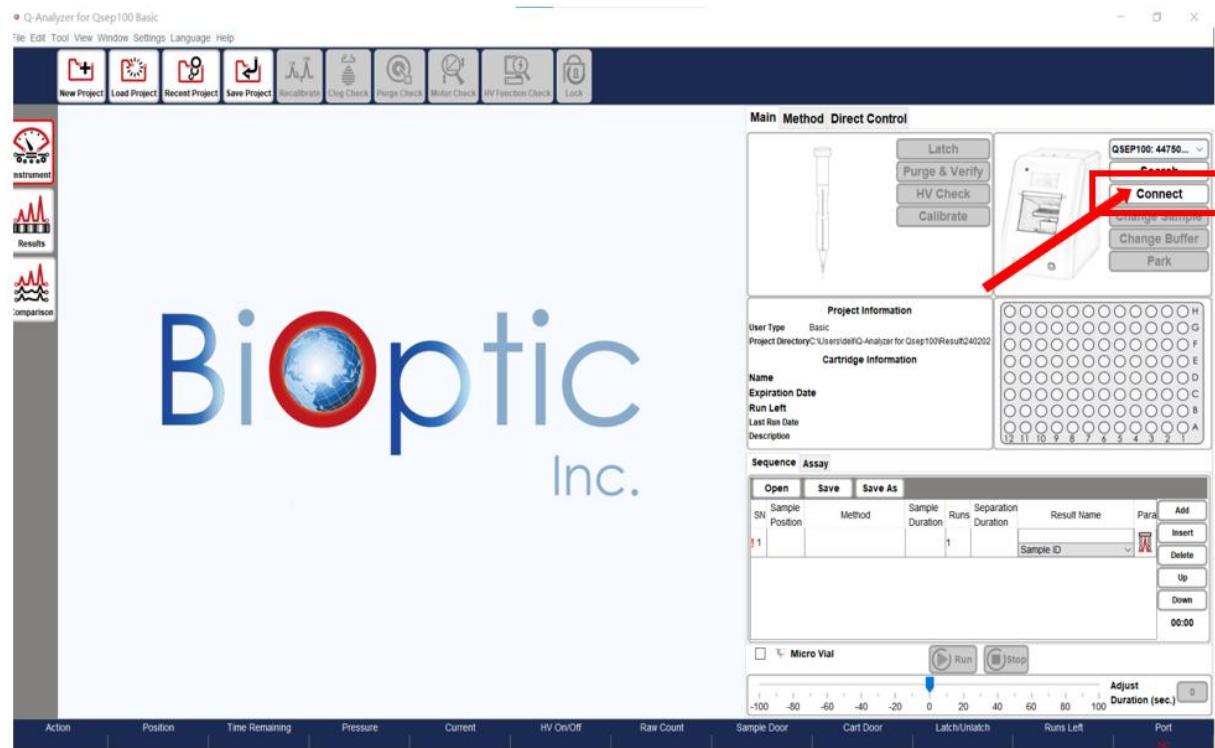


图 1 联机

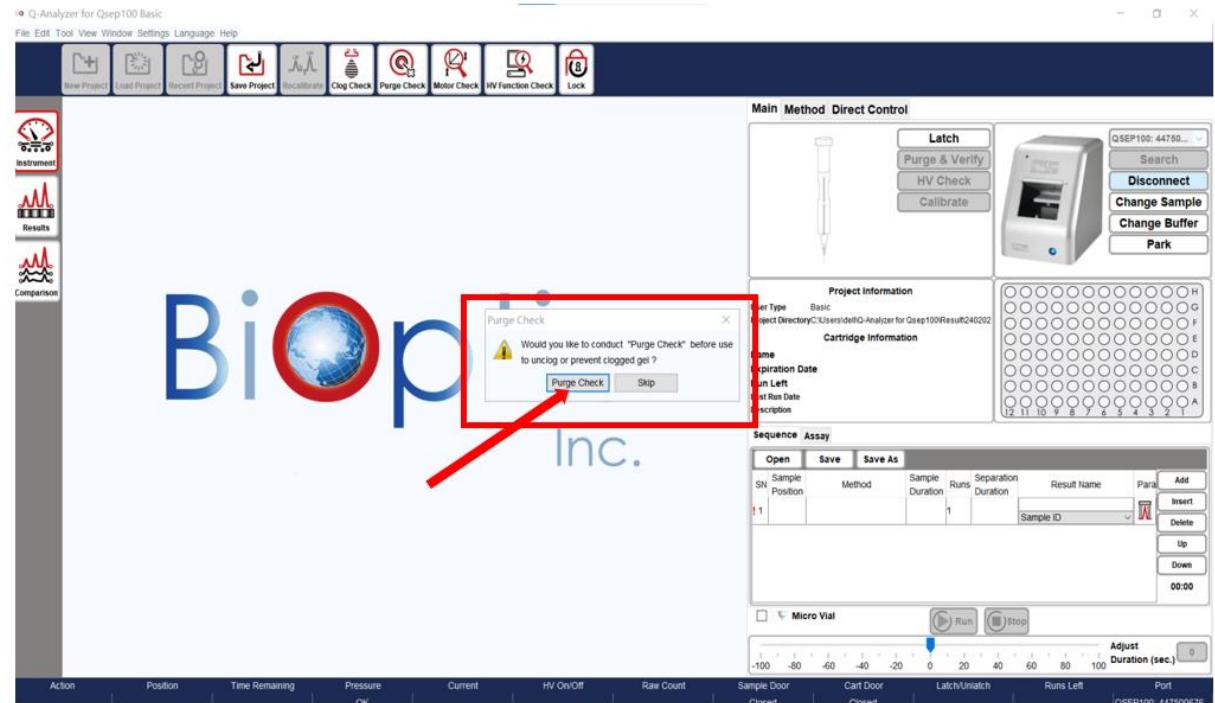


图 2 通气检查

(2) 放入缓冲液和 Marker

点击 Change Buffer (图 3, B), 放置 buffer 槽和对应位置的 marker:

a、P (Park) 为打胶槽, W (Wash)、C (Clean) 位置为清洗槽, 三个孔均加纯水, S 槽加 Separation Buffer。液面高度以缓冲液槽的刻度线 (2/3 处) 处为宜, 放置方向为左窄右宽 (图 4)。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。需倒掉清洗换新, 禁止添加。

b、在左侧的 MB1 孔中放置 20bp-5000bp 的 Alignment Marker (C109102), MB2 孔中放置对应的 Size Marker (C109301-100)。(建议 cDNA 样本选择 5k Marker 搭配使用)。(图 4)。

注: MB1 和 MB2 孔位 marker 均取 20-30 μ L, 再覆盖 10-15 μ L 矿物油 (Mineral Oil) 防止挥发, 应避免气泡产生, 若有气泡, 请离心。

注意: ①样品和 marker 管不能有气泡, 且确保体积 $\geq 15 \mu$ L, 建议使用试剂盒配套的八连管用作 marker 管;

②marker 管中的矿物油是覆盖在上层, 若沉底请离心, 盖油时注意枪头不要伸到 marker 液面以下;

③放置 marker 管的时候用食指和中指托住底部, 用拇指将管子按压到底, 以免打弯卡夹。

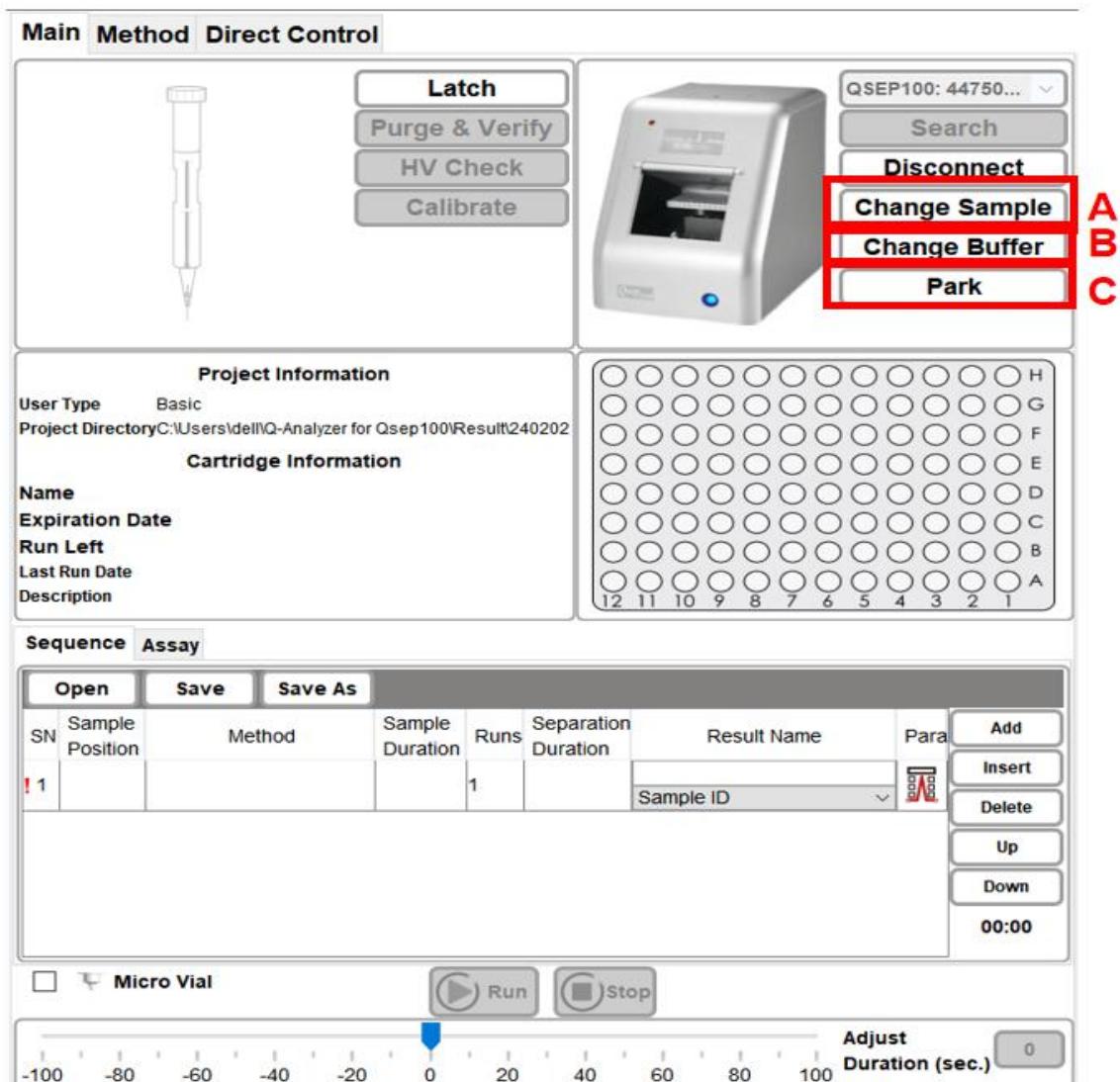


图 3 软件主界面



图 4 缓冲液和 Marker 位置

(3) 放入样品并复位

点击 Change Sample (图 3, A) 转出样品盘，打开透明样品门并放入样本 (样本体积 $\geq 15\mu\text{L}$)，关上样品门；点击 Park 复位 (图 3, C)，使样品盘复位。请确保样本溶液中没有气泡，样本管没有盖子。

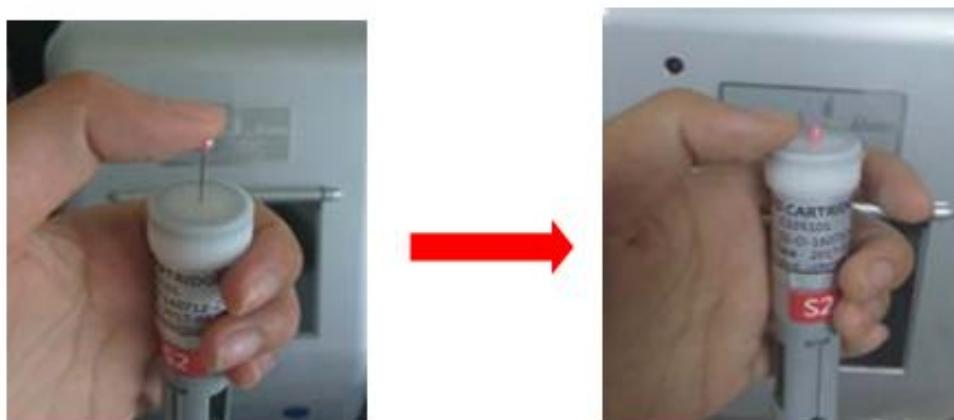
7. 卡夹置入与校正

注意：1、新卡夹需要先进行扎孔操作，若为新卡夹，请按照 2-4 步骤进行扎孔。若为使用过的卡夹，则无需重复扎孔，按照后续步骤继续实验。

2、 打开卡夹外壳包装，请取出卡夹时一直保持直立状态，N1 卡夹先去掉避光的锡箔纸。在完成一轮实验后，如果需要取出 N1 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。

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。

4、 取出大头针，用无尘纸擦拭卡夹上盖区域，务必保持卡夹的直立状态。



(1) 置入卡夹

打开仪器上方的卡夹门，放入卡夹（标签、凹槽向前），关闭卡夹门（图 5）。

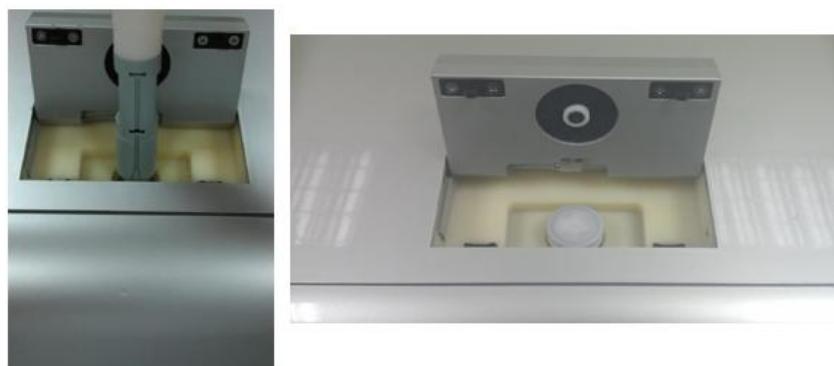
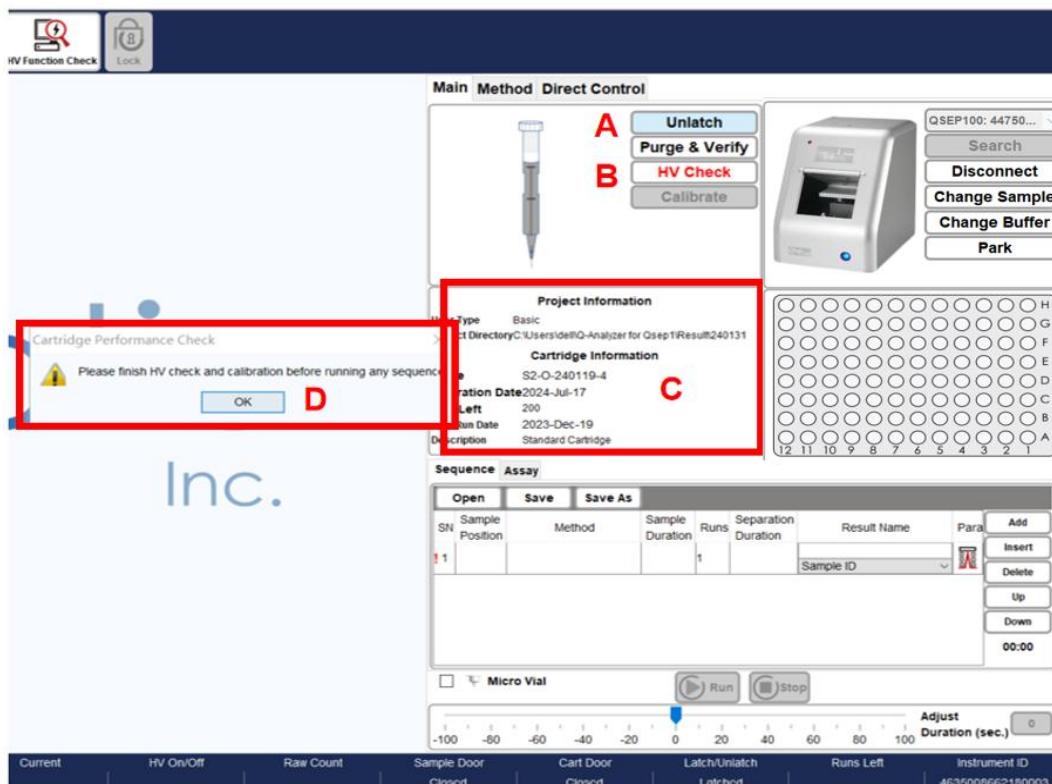


图 5 置入卡夹

(2) 卡夹锁定和校准

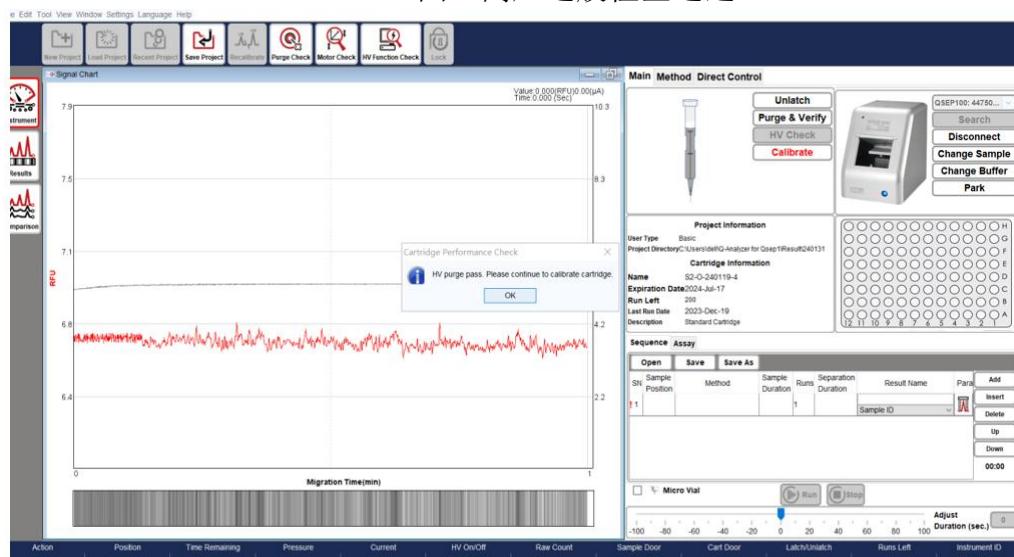
点击 Latch (图 6, A), 卡夹图片颜色变成彩色, 下方显示卡夹信息 (Cartridge Information), 包括卡夹序号 (Cartridge Number)、过期日期 (Expiration Date) 和剩余可用次数(Runs Left) (图 6, C)。

图 6 卡夹锁定与校准



a、若放入的是新卡夹 (放入前一定要用大头针扎孔, 要按到底)。软件会在 Latch后弹出卡夹检查的窗口 (图6, D) 点击 “OK”, 然后点击红色的HV check (图6, B), 进行高压通胶检查 (HV Check), 成功后提示如图7。

图7 高压通胶检查通过



高压通胶检查 (HV check) 通过后，系统提示要进行卡夹校准，点击确定，然后点击红色的 **Calibrate**，会弹出 Start Calibrate 对话框，点击“是 (Y)”，选择 20-1K (图 8)，弹出 Cartridge Performance Check 是否确定 Alignment Marker 在 MA-1 孔，点击“Yes” (图 9)，在 8KV 电泳电压下进行新卡夹校准。卡夹校准成功后点击“OK” (图 10)。

*注意 新卡夹校正 3 次不通过需联系技术支持处理。

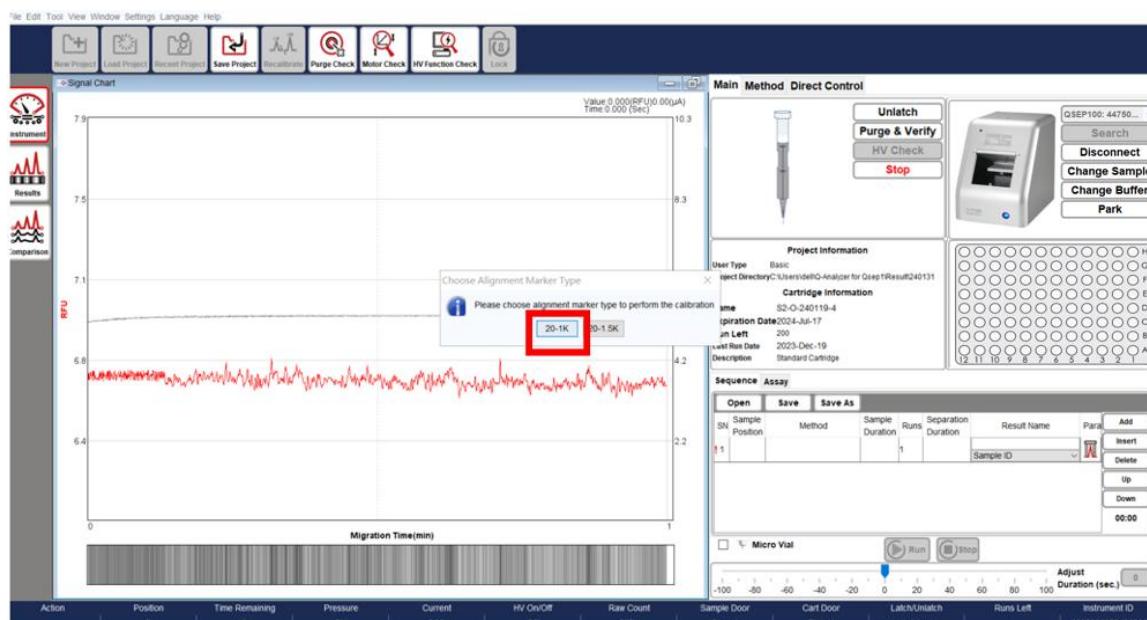


图 8 卡夹校准

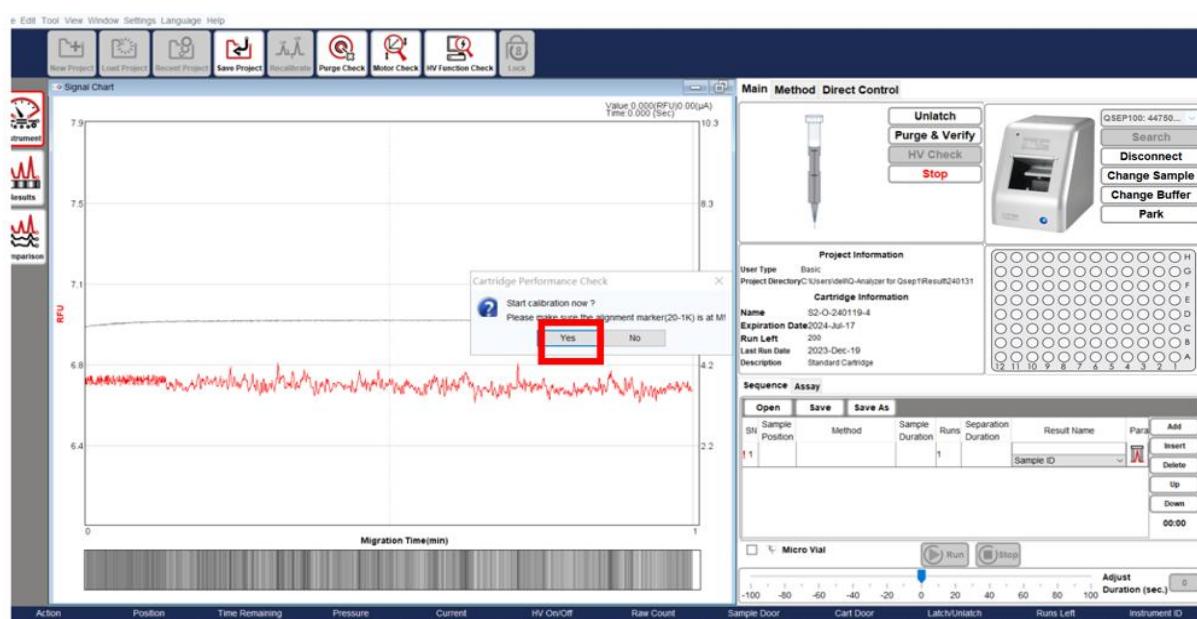


图 9 是否确认 Alignment Marker 在 M1 位置

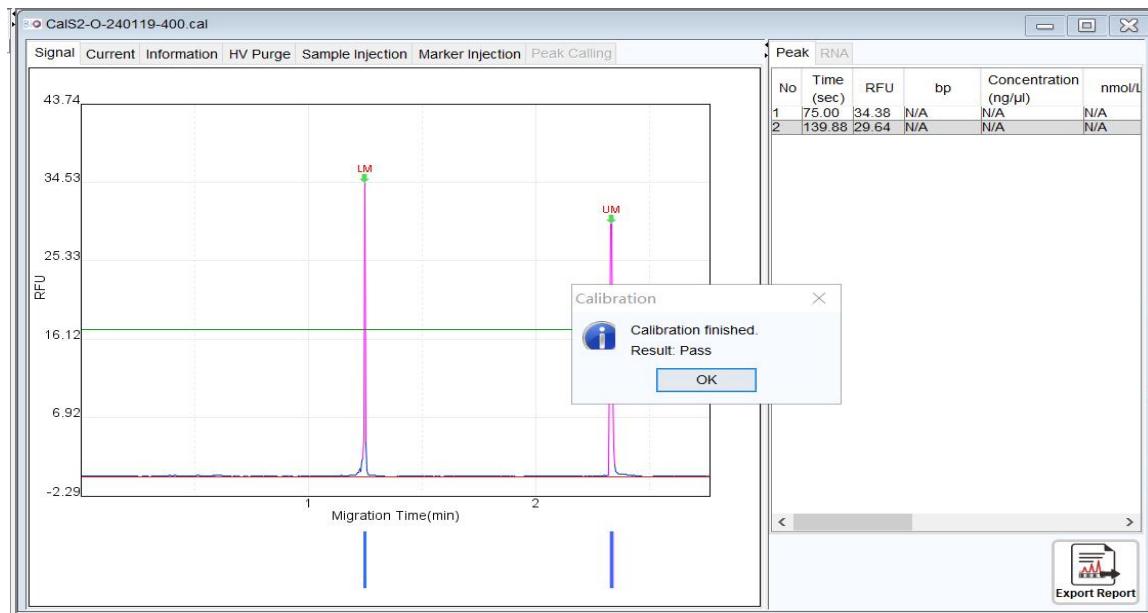


图 10 卡夹校准成功

b、若放入的是已用过的旧卡夹，则点击 Latch 后，点击 Recalibrate（图 11,A）进行重新校准，在弹出的选项框中选择合适的 Voltage（电压，一般为默认推荐电压）(图 11,B) 和 Alignment Marker 类型(图 11,C)，点击 Start Calibration (图 11,D)，校准完成时会弹出 Calibration 通过的窗口(图 10)，点击 OK。

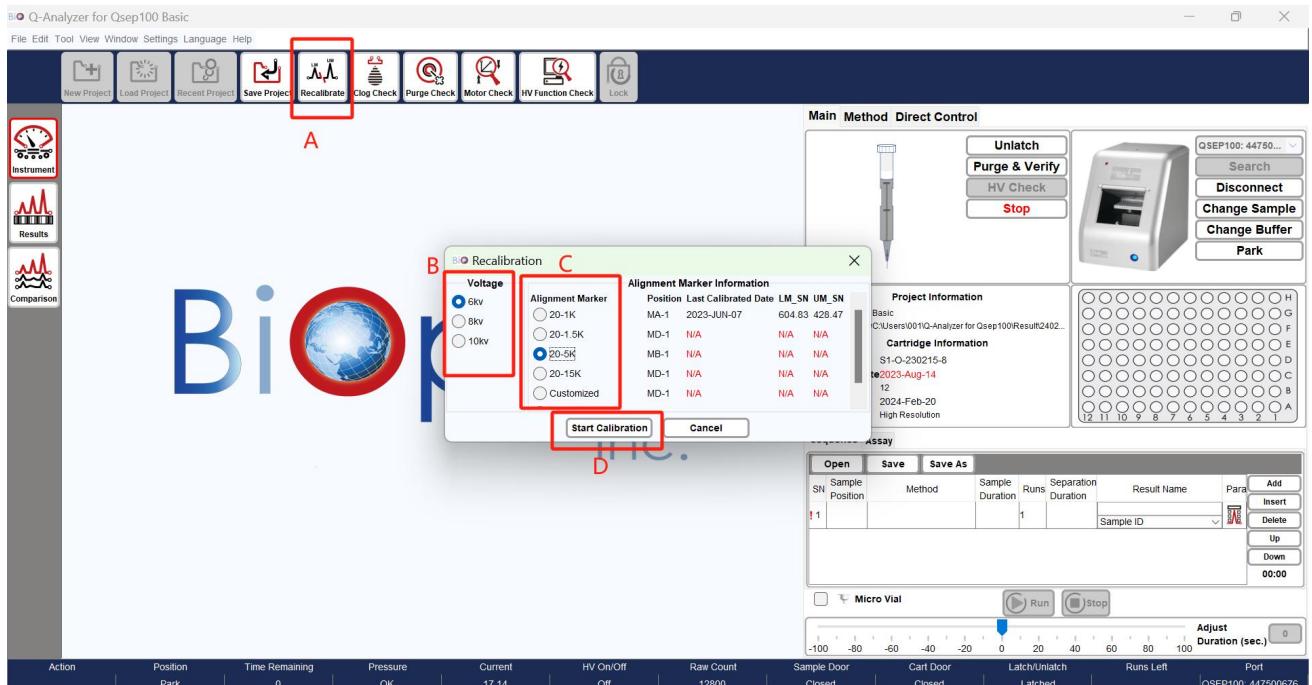


图 11 旧卡夹校准

8. 程序设定

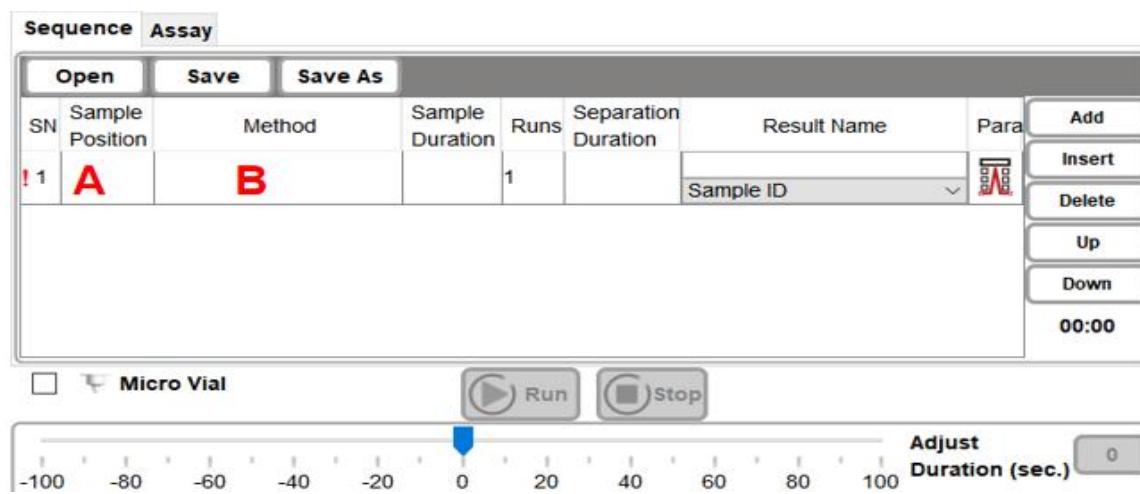


图 12 程序设定界面

(1) 单击 Sample Position 下方的空白格 (图 12, A), 弹出 96 孔盘模拟图 (图 13), 于左侧选择所放样品位置, 可单选, 也可点击右侧 A-H 或下方 01-12 坐标以直接选取一行或一列, 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;

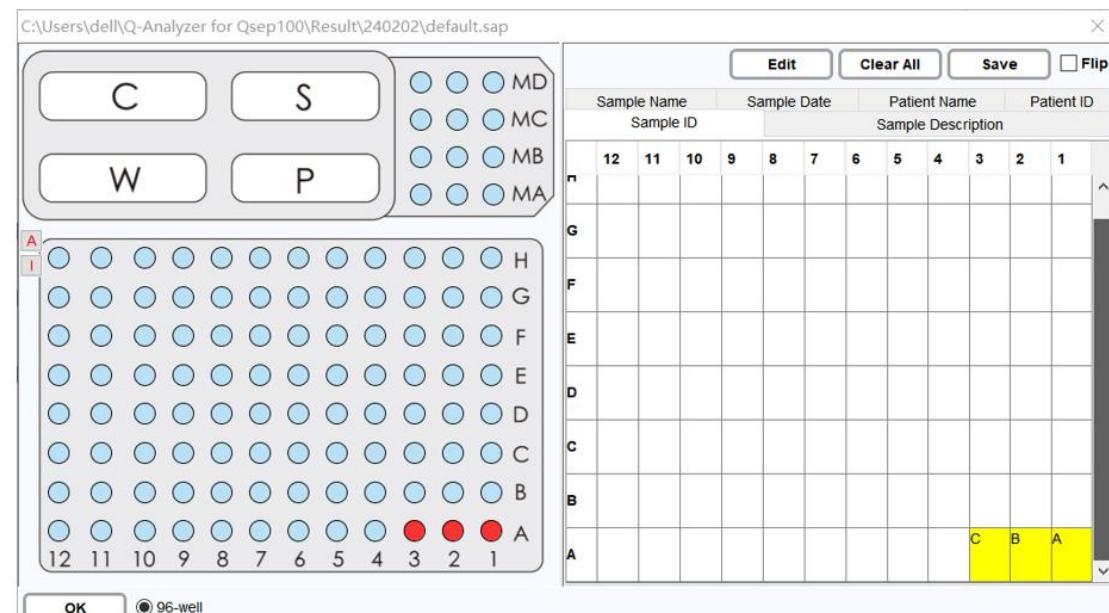


图 13 样品位置选择

(2) 单击 Method 下方的空白格(图 12, B), 弹出测试方法选择框 (图 14), 选择适合的 Alignment Marker 和 Method (注意: 所选方法的电泳电压要与卡夹校正时的电压一致, 一般为第一个程序), 选好后点击 OK; Sample Duration (吸样时间)、Runs (检测重复次数) 和 Separation Duration (分离时间) 可以根据样本情况灵活设定 (双击输入);

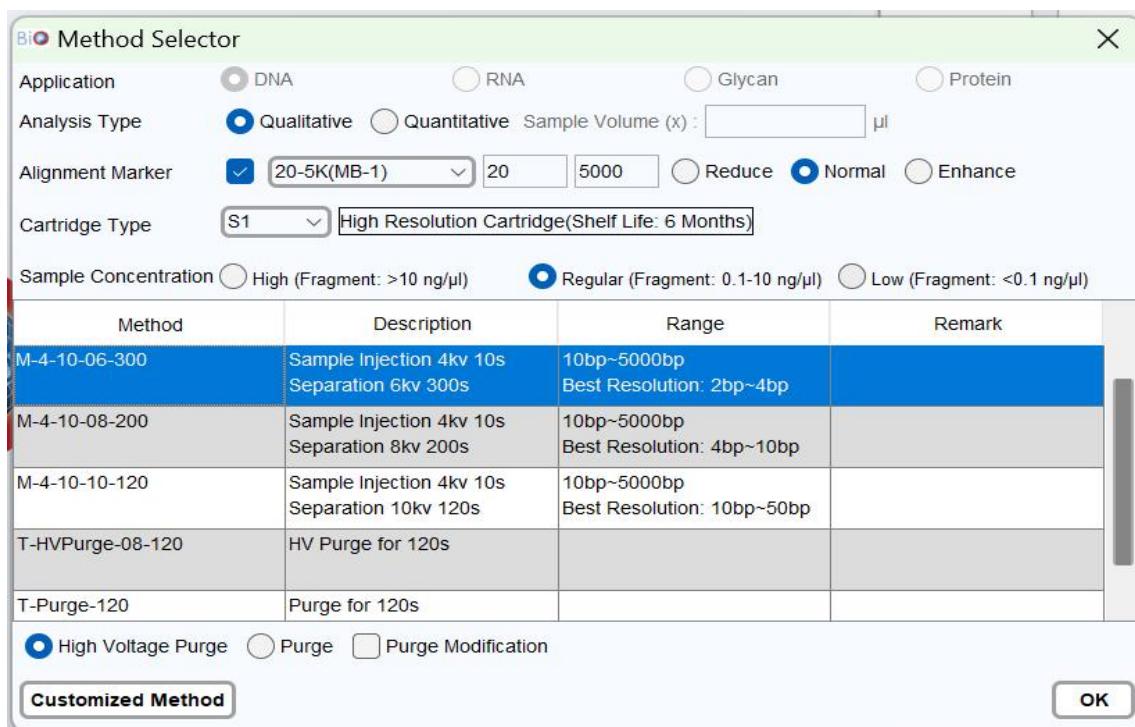


图 14 电泳方法选择

(3) 在 Result Name 下面空框中可输入这一批样本的总名称（前缀，也可以空着）(图 15);

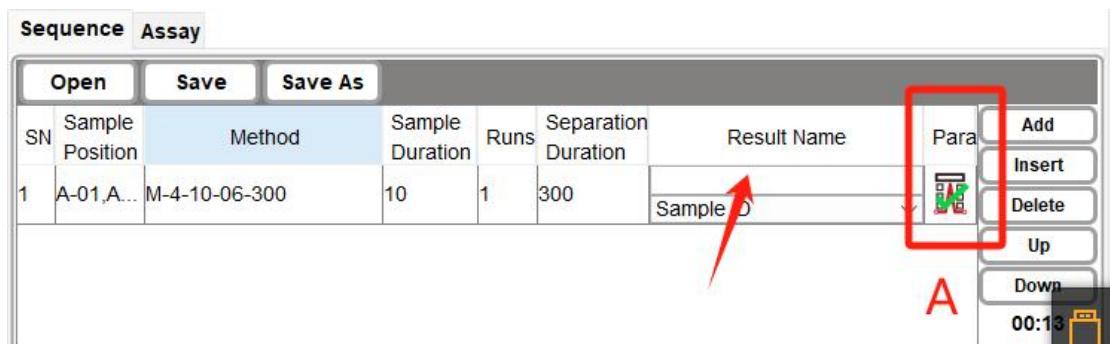


图 15 Result Name 选填

- (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。
- (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。
- (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。在跑胶过程中可以调整，比如在 280s 发现没有跑完，可以直接在原有跑胶时间上增加 50s 分离时间。

(4) 点击 Para (参数) (图 15, A), 弹出 Calculate Flow 框, 一般建议参数如图 16A 所示。勾选 Calculate, 可根据计算准确度需要选择调用 Reference Marker 或者 Create Size Marker (图 16-B 为新建 size marker。为保证实验结果的准确性, 建议每天先新建一次 Size Marker 之后调用当天的 Reference), 之后点击 OK, 完成程序设置。

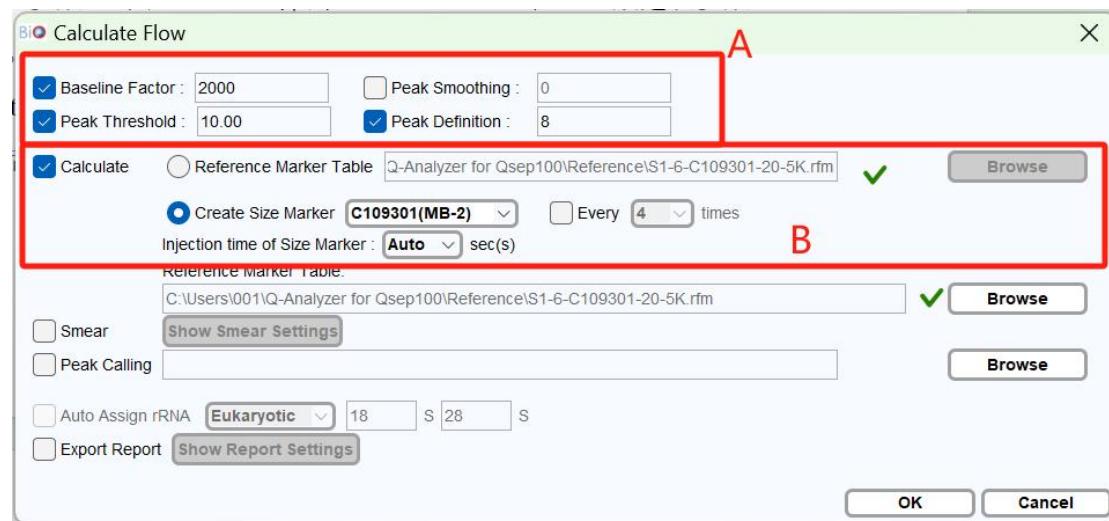


图 16 参数调整

(5) 程序设置完成后, 点击 RUN, 开始运行 (图 17)。Instrument 界面的左侧是 Real Time 的图像, 可实时监测电泳过程。**注意: 点击 Run 后不能打开样品门, 否则运行自动停止!**

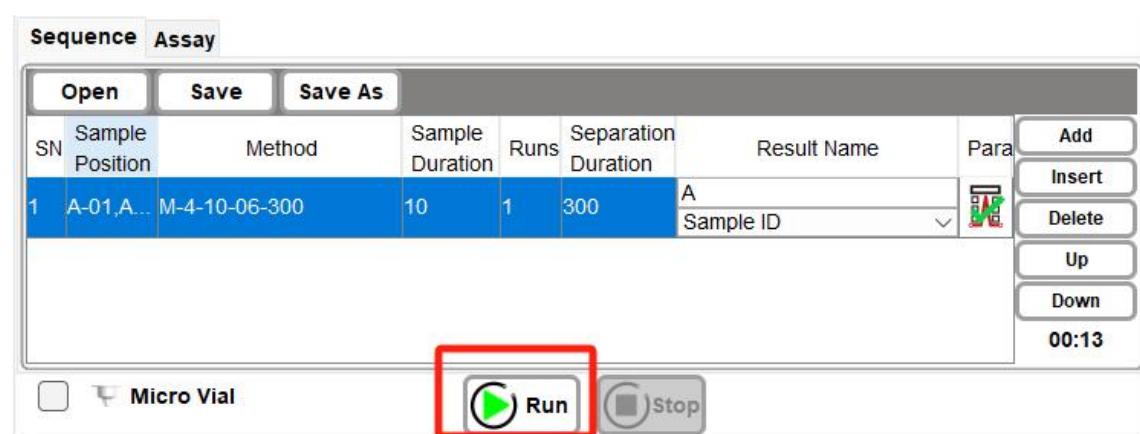
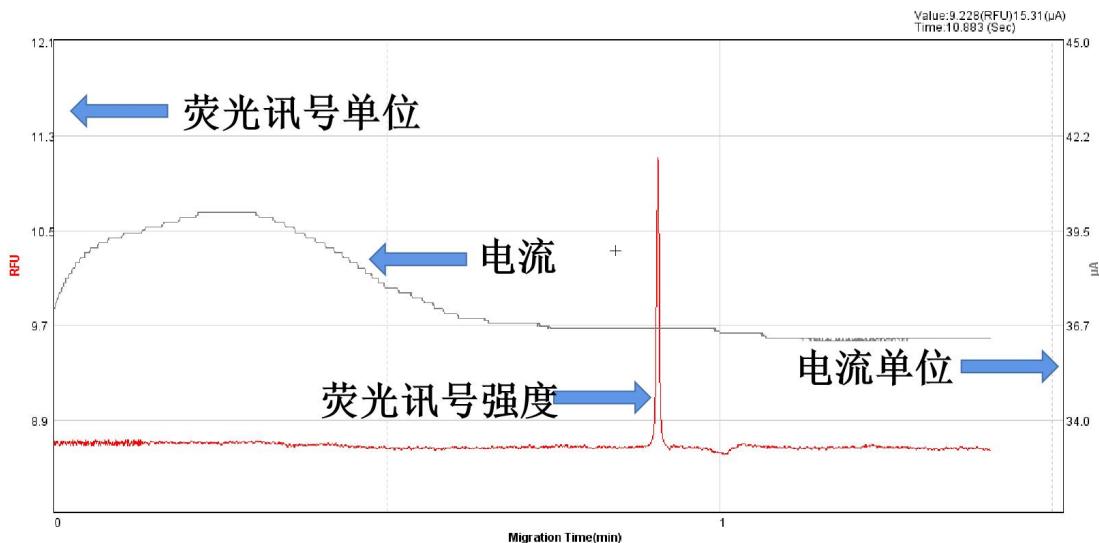


图 17 点击 RUN 开始运行

*注：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。

9. 数据结果分析

9.1 打开检测结果

样本检测完成后，点击 Results -- Open Results，选择目标结果文件，打开（图 18-19）。

图 18 打开结果文件



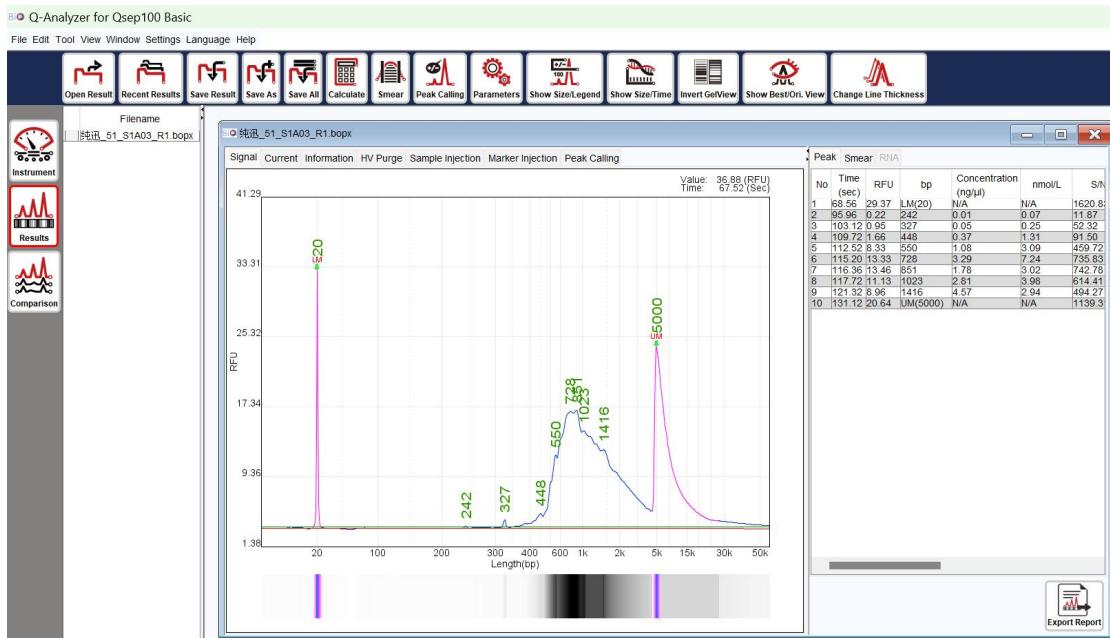


图 19 结果展示

9.2 参数调整

选中需要进行参数修改的样本（左侧 Filename 结果名前 ，或选中后右键 check）（图 20），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，修改后勾选上 Apply to all selected files in list、Save file after new parameter applied 和 Recalculate result，点击 Apply（图 21）。

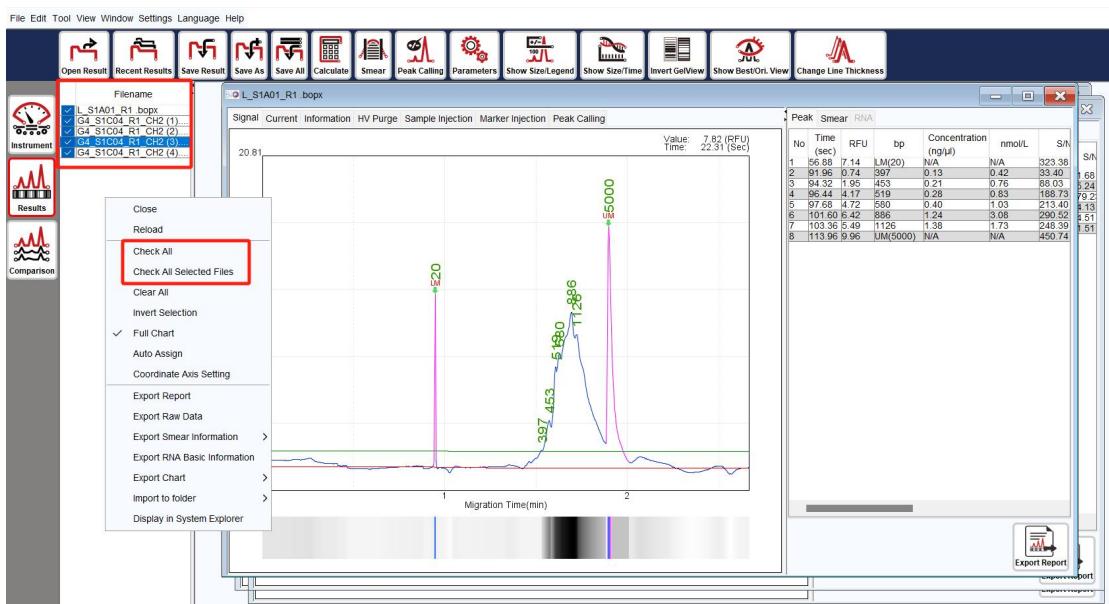


图 20 选择需处理样本

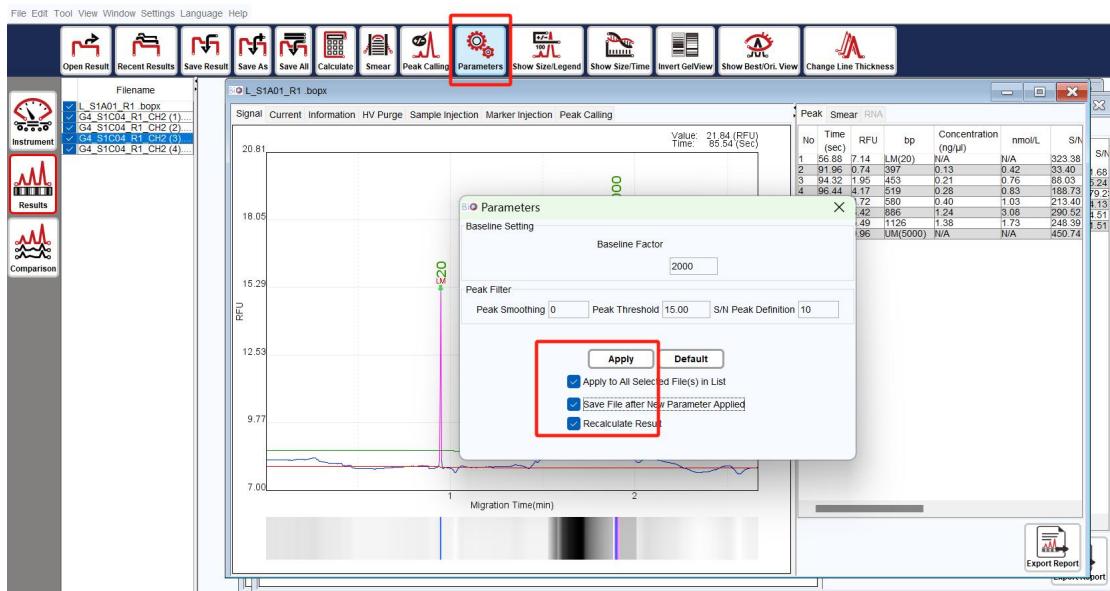


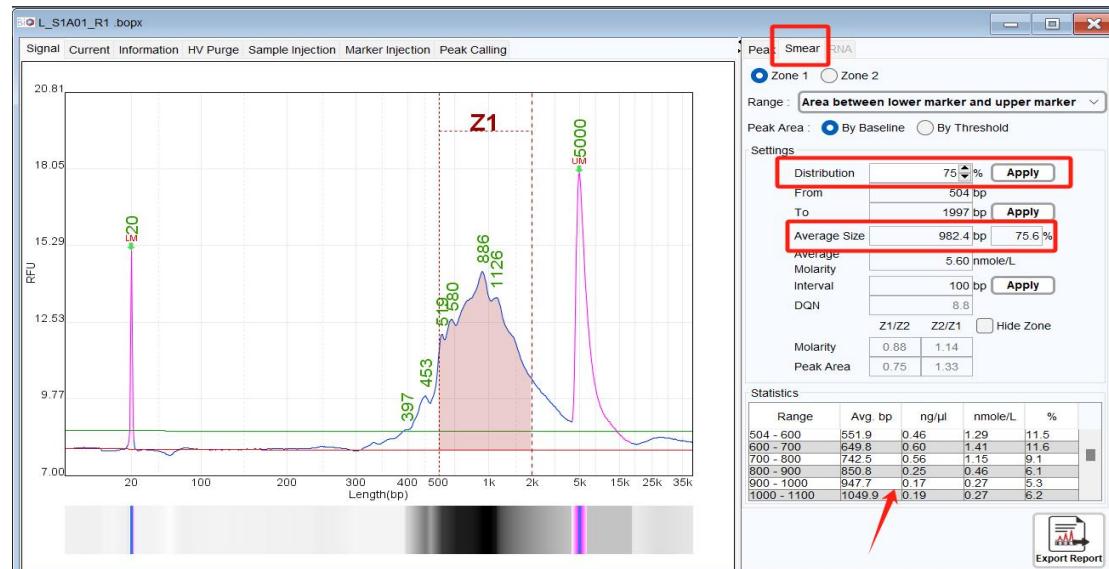
图 21 参数修改

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 越大，基底值越平滑，较小则基底值容易受到讯号影响而起伏，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。

9.3 数据分析

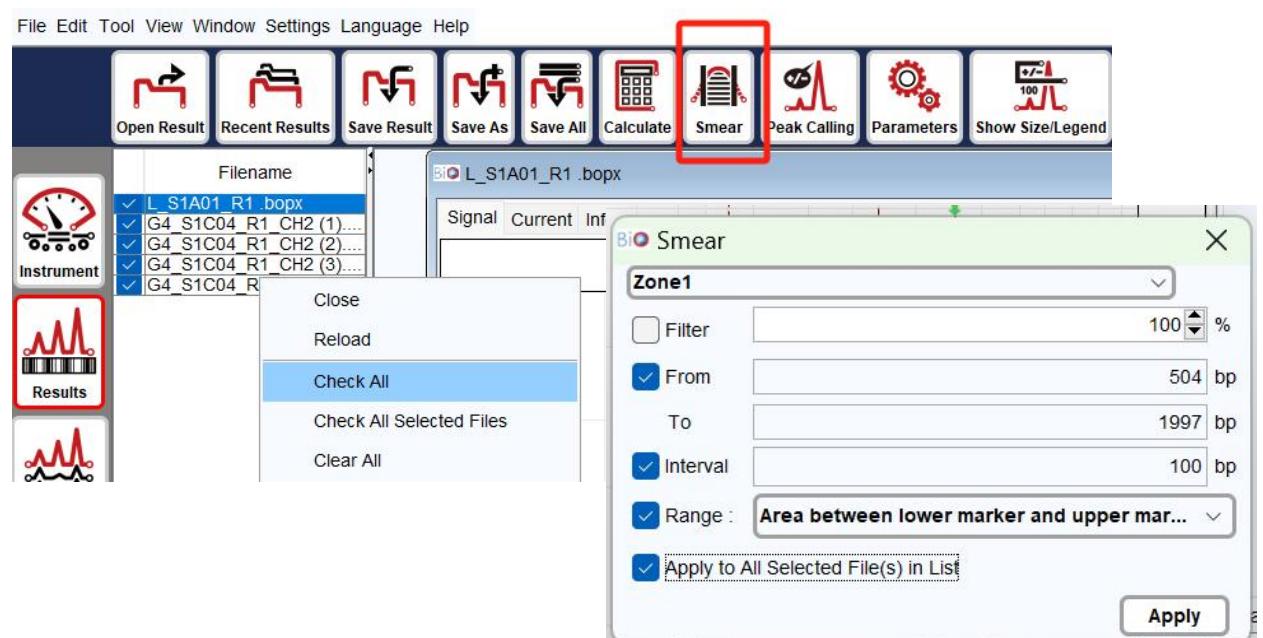
样本检测完成后，点击 Results ---Open File，选择目标结果文件，打开。在 Smear（片段分布分析）状态下，查看片段平均大小以及片段分布占比。



Smear 功能介绍：

在 Smear 状态下，可以查看片段平均大小，分布占比以及主峰占比。可以手动拖动虚线，选定自己想要的区域，也可输入固定的 bp 大小区间 (From.....To.....)，点击 Apply；即可显示该样本该区间的百分比占比及平均等信息。Interval 的值是 100 或者其他任意数字，代表的就是虚线区间内，软件会自动以 100bp 为区间分段，计算每 100bp 内的相对浓度和平均大小。处理多个结果时，可全部勾选批量处理。

批量处理方法：



9.4 新建比对文档（以 sizemarker 为例）

将所有需要比对的数据在 Results 中打开后，点击 Comparison --- New Folder，将计划处理的结果拖到 Folder 框内（图 22），勾选 Signal Alignment（信号对齐），点击 Apply All（图 22）；勾选 Time Alignment（时间对齐），点击 Apply All（图 22）；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（图 23），点击 Reset All 可取消间距。

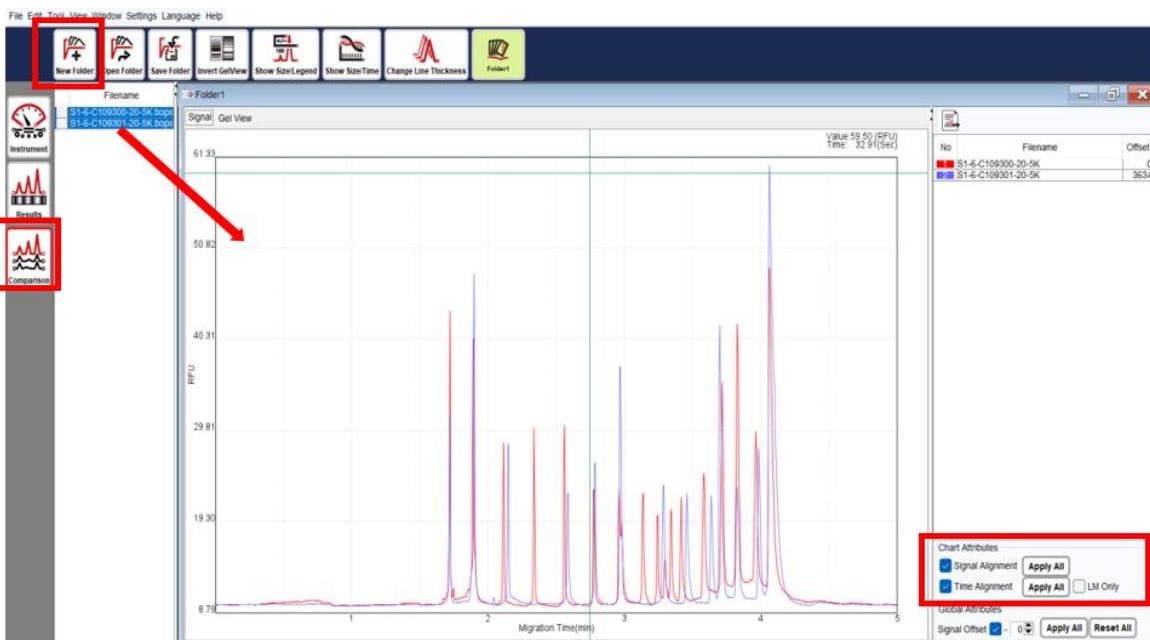


图 22 选择对比文档

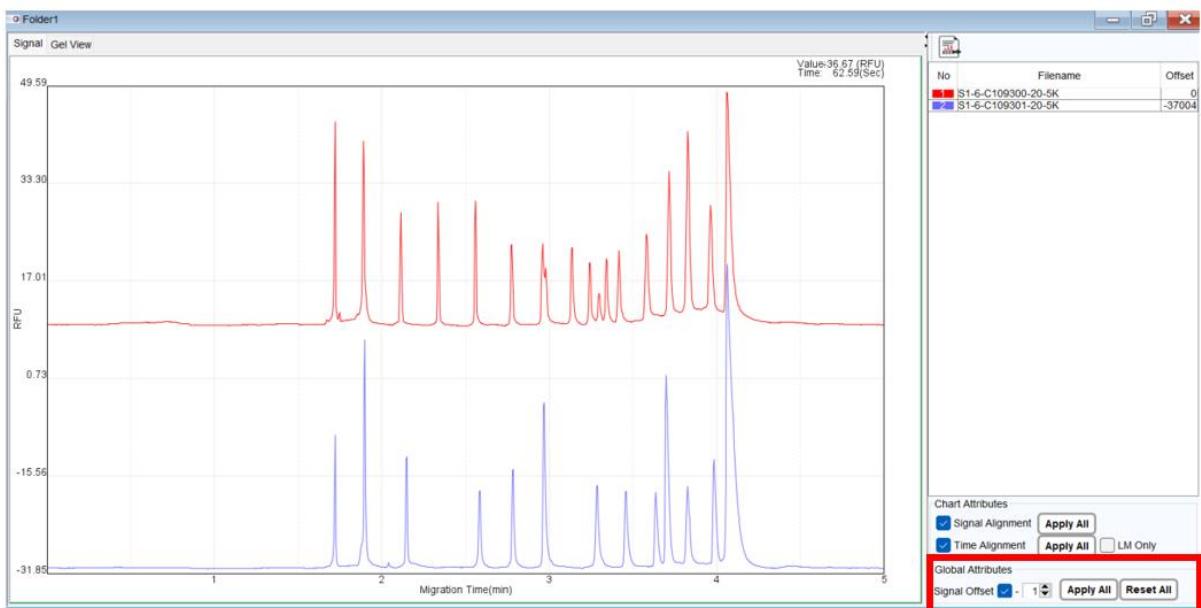


图 23 对比峰图数据

若想让胶图里 Ladder 条带大小标注在每组泳道旁边，则点击峰图右侧列表里的 ladder 文件右击，选择 Main Ladder；或拖入数据时首先将 ladder(sizemarker) 拖入即可（图 24）。

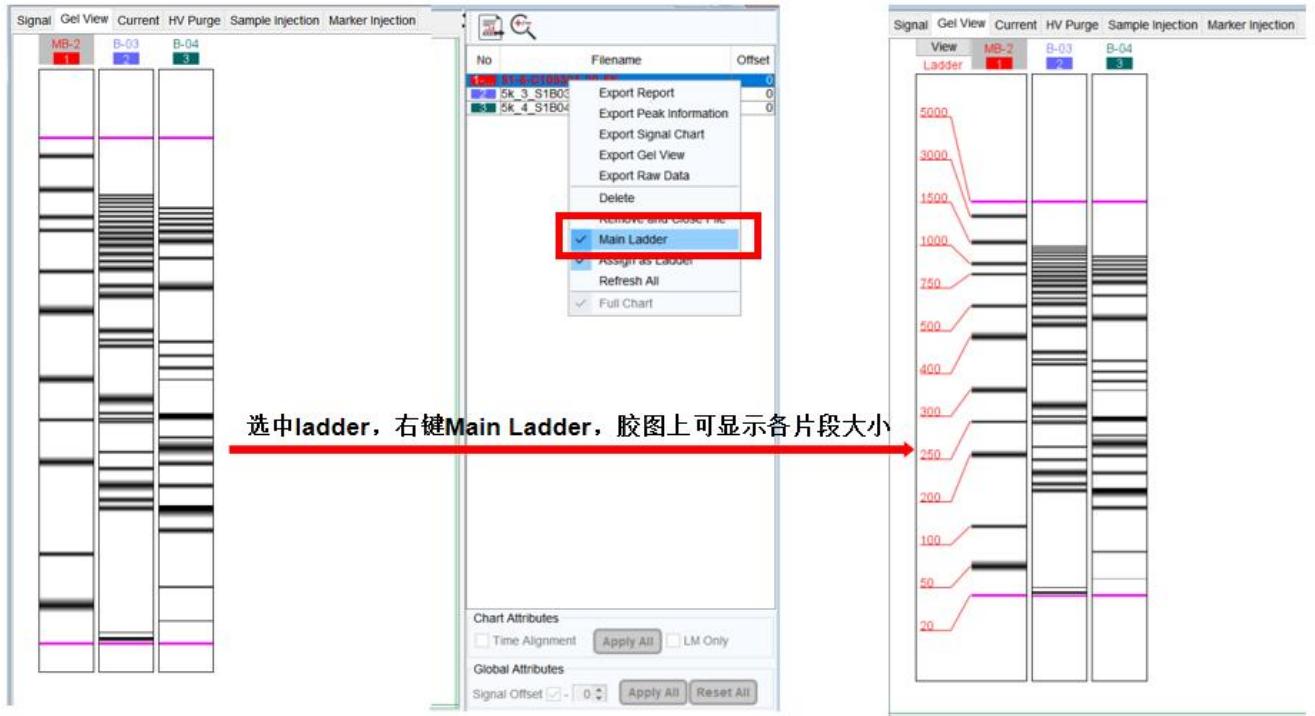


图 24 显示胶图里 Ladder 各片段大小

9.5 导出数据

一、批量数据导出报告

将所有需要导出的数据在 Results 中打开后，点击 Comparison --- New Folder，将计划处理的结果拖到 Folder 框内（图 22），

（1）导出峰图，胶图，表格信息，点图信息

于 Folder 文件右侧 Filename 空白处右击，选择 Export Peak Information，导出表格信息（图 25，A）；选择 Export Signal Chart，导出峰图（图 25，B）；选择 Export Gel View，导出胶图（图 25，C），选择 Export Raw Data，导出点图信息（图 25，D）。

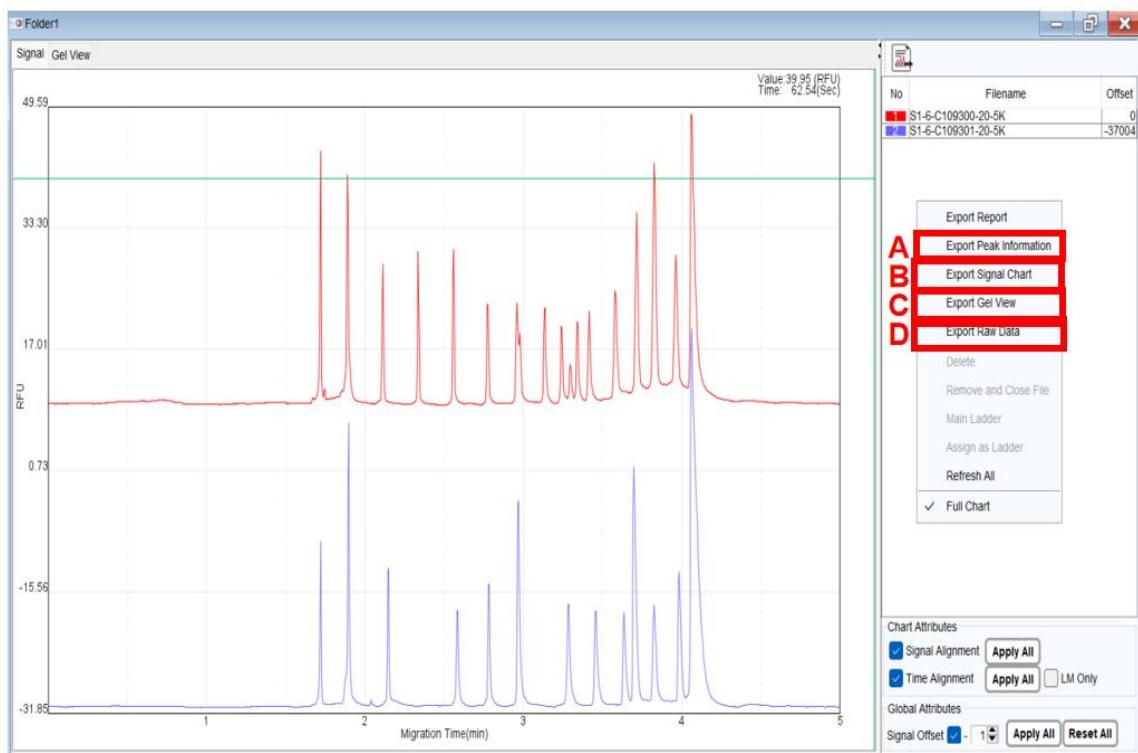


图 25 导出结果选择

(2) 导出报告

点击 Filename 右上角小图标或于 Folder 文件右侧 Filename 空白处右击，选择 Export Report，选择导出报告的格式（图 26）：

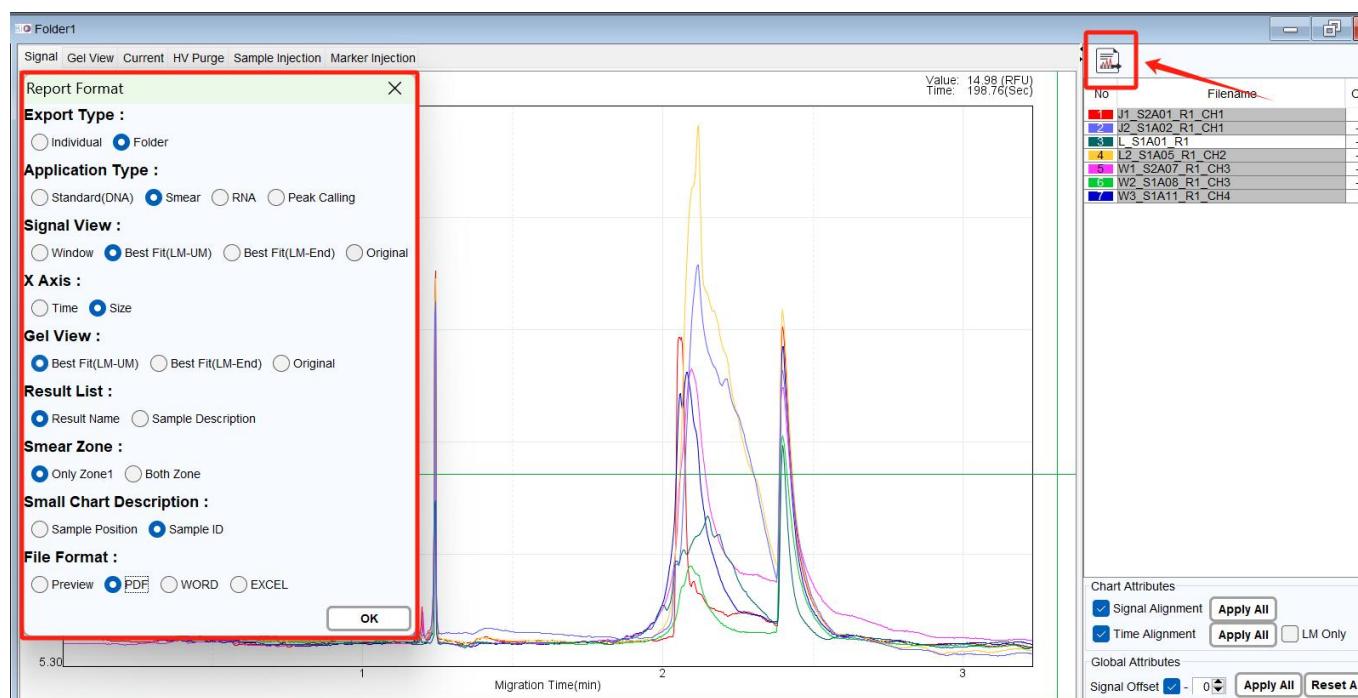
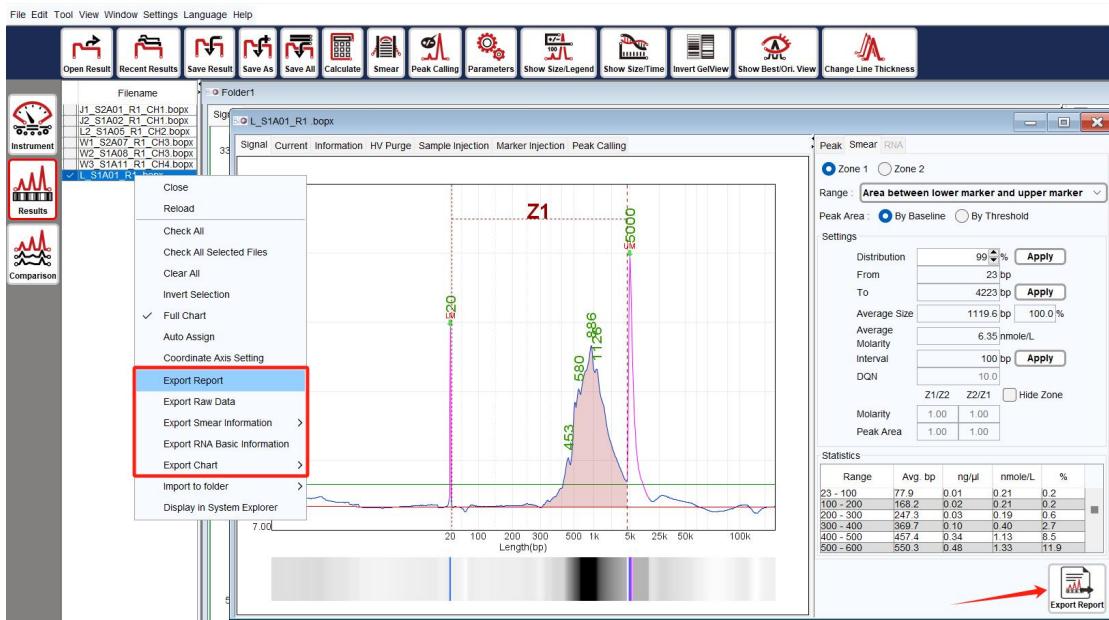


图 26 导出报告

- a. **Report Type:** Individual (每个结果单独输出文档), Folder (所有结果输出一个文档);
- b. **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

二、单个结果导出

将需要导出的数据在 Results 中打开后, 选中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, 导出报告; 选择 Export Raw Data , 导出点图信息; 选择 Export Smear Information, 导出片段分布分析结果, 以表格形式呈现; 选择 Export Chart, 导出信号图)



Export Smear Information 结果（选中多个结果可批量导出）：

A	B	C	D	E	F	G	H	
1	Result Name	Sample ID	Zone	Range	Avg. bp	ng/uL	nmole/L	%
2	W2_S1A08_FW2		1	24 - 200	122.1	0.07	0.92	1.9
3	W2_S1A08_FW2		1	200 - 400	330.4	0.16	0.73	4.4
4	W2_S1A08_FW2		1	400 - 600	526.7	0.94	2.74	27.5
5	W2_S1A08_FW2		1	600 - 800	679.6	1.21	2.74	31.7
6	W2_S1A08_FW2		1	800 - 1000	890.6	0.28	0.49	8.5
7	W2_S1A08_FW2		1	1000 - 1200	1090.3	0.2	0.28	6.5
8	W2_S1A08_FW2		1	1200 - 1400	1294	0.13	0.15	3.9
9	W2_S1A08_FW2		1	1400 - 1600	1489.9	0.09	0.09	2.6
10	W2_S1A08_FW2		1	1600 - 1800	1695.9	0.06	0.06	1.8
11	W2_S1A08_FW2		1	1800 - 2000	1895.7	0.06	0.04	1.6
12	W2_S1A08_FW2		1	2000 - 2200	2100	0.05	0.04	1.5
13	W2_S1A08_FW2		1	2200 - 2400	2299.3	0.04	0.03	1.2
14	W2_S1A08_FW2		1	2400 - 2600	2499.2	0.04	0.02	1.2
15	W2_S1A08_FW2		1	2600 - 2800	2698.8	0.03	0.02	1
16	W2_S1A08_FW2		1	2800 - 3000	2893.6	0.03	0.02	1
17	W2_S1A08_FW2		1	3000 - 3200	3093.3	0.02	0.01	0.7

10、仪器关机

10.1 取出卡夹

测完样品后，点击“Unlatch”断开卡夹连接（图 27），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。

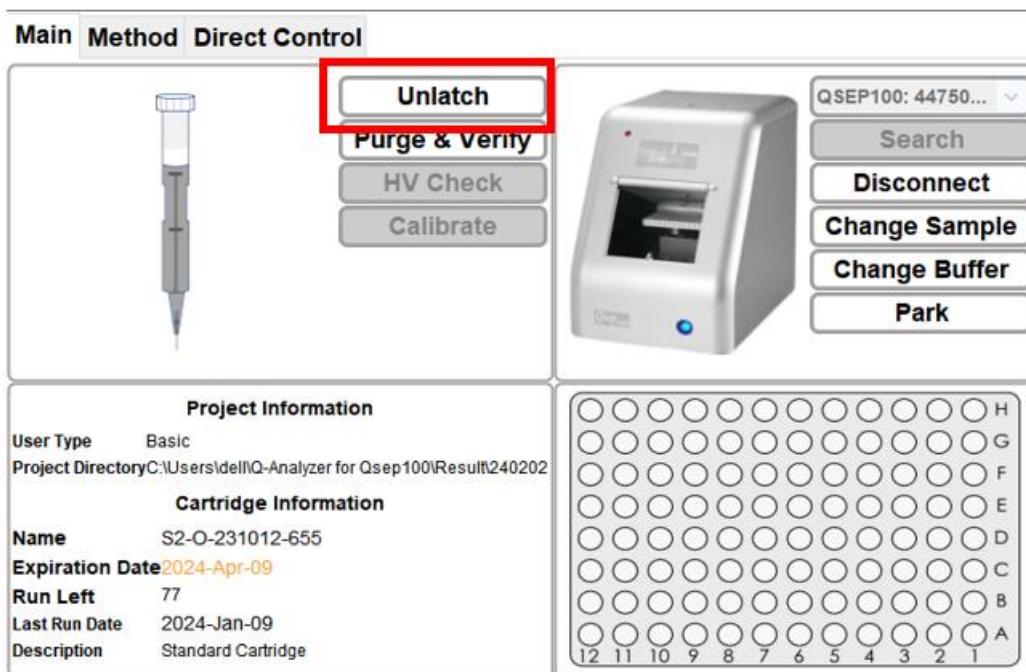


图 27 断开卡夹连接

10.2 取出样品和试剂

点击 Change Sample (图 28, A), 取出样品, 点击 Change Buffer (图 28, B) 取出 buffer 和 marker, 而后点击 Park (图 28, C), 样品盘复位。

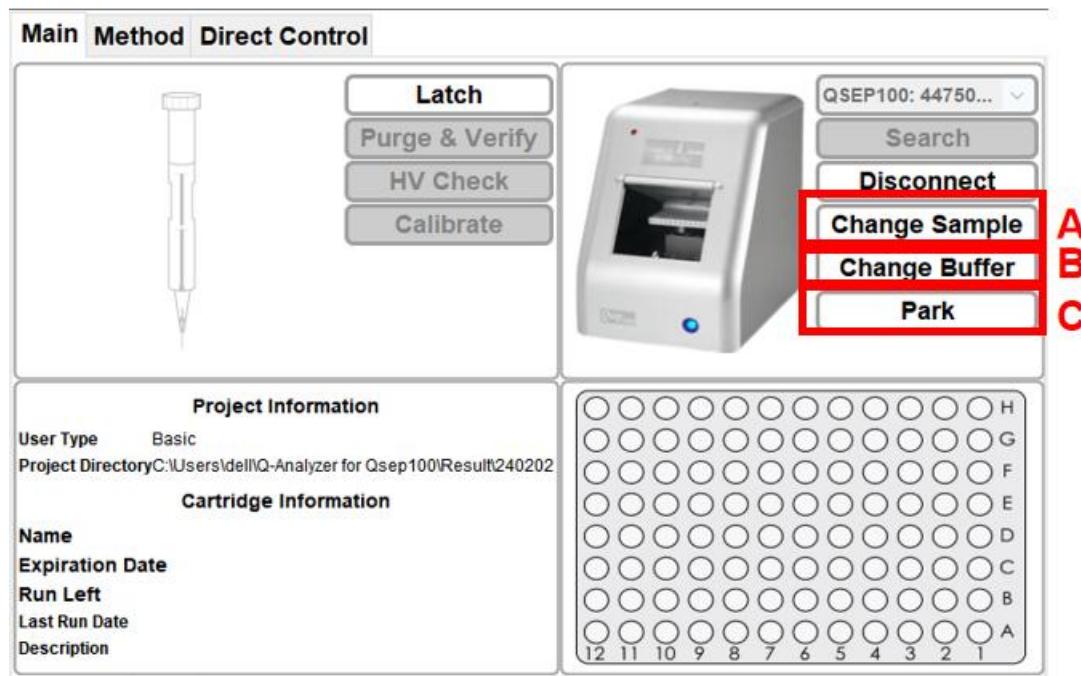


图 28 取出样品和试剂

10.3 仪器断开连接

点击 Disconnect，断开仪器连接（图 29），弹出 Purge Check 的弹窗，点击 Skip 跳过（图 30），等待仪器图标变黑白色后可关闭软件（图 30，A）。

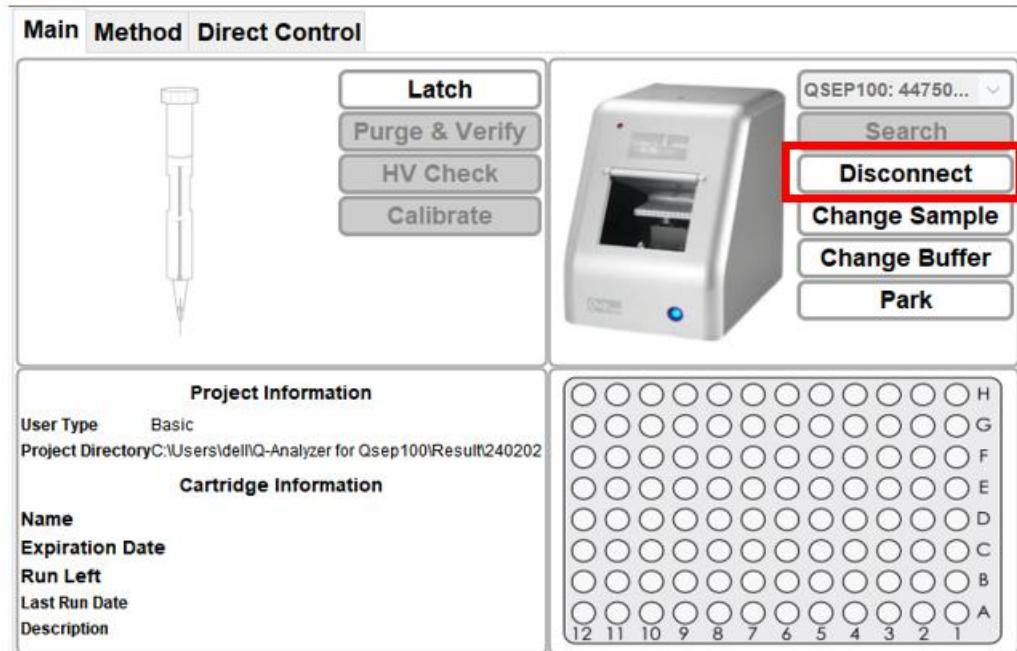


图 29 断开仪器连接

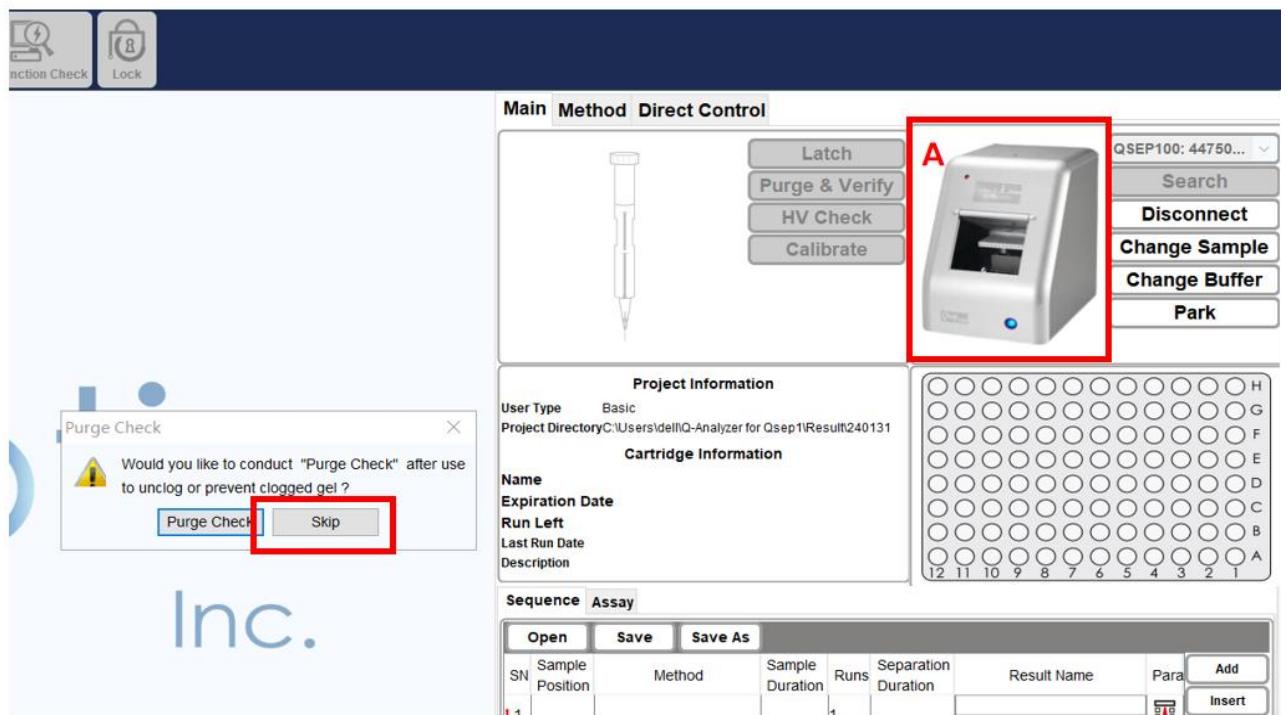


图 30 断开连接时 Purge Check 可跳过

10.4 关闭仪器主机的电源开关

10.5 关闭空气压缩机电源开关

“0”是关，“1”是开（图31）。

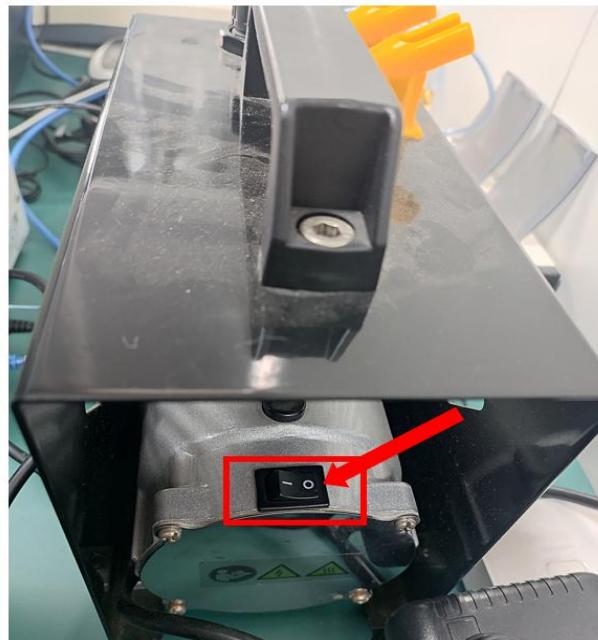


图 31 空气压缩机开关