

# 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/μL（Qubit 定量）建议上机浓度 1-5ng/μL。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 30μL，加入 10-15μL 矿物油油封

2.2 Size Marker 体积30ul，加入 10-15μL 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 0.1μL 的 Alignment Marker，每个样本会消耗 0.1μL 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℃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℃保存，长期保存放-20℃，化冻放后 4℃。

卡夹放 4℃避光保存，务必保持直立状态，防止胶流出。

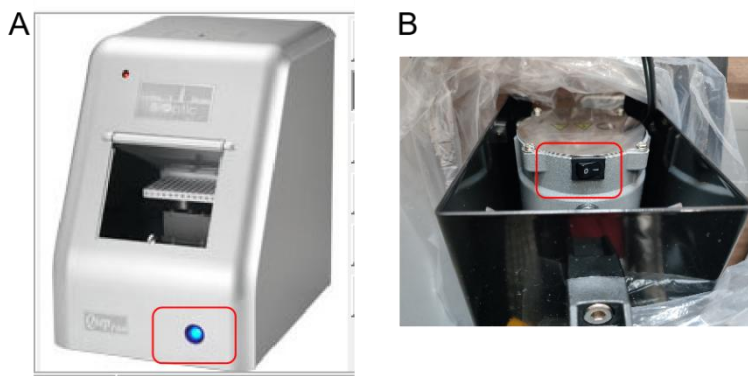
**\*建议使用试剂盒配套的八连管用作 marker 管。**

### 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/ $\mu$ L，体积 $\geq 15\mu$ L，加入 200 $\mu$ 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。**

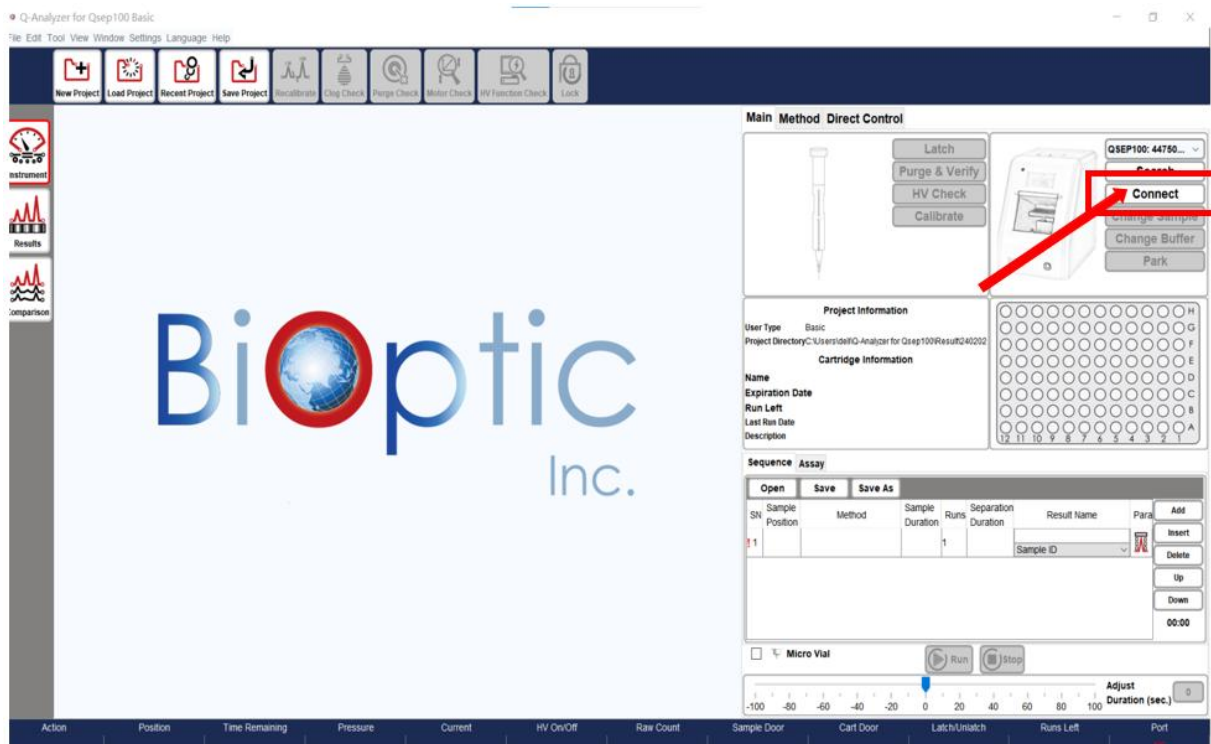


图 1 联机

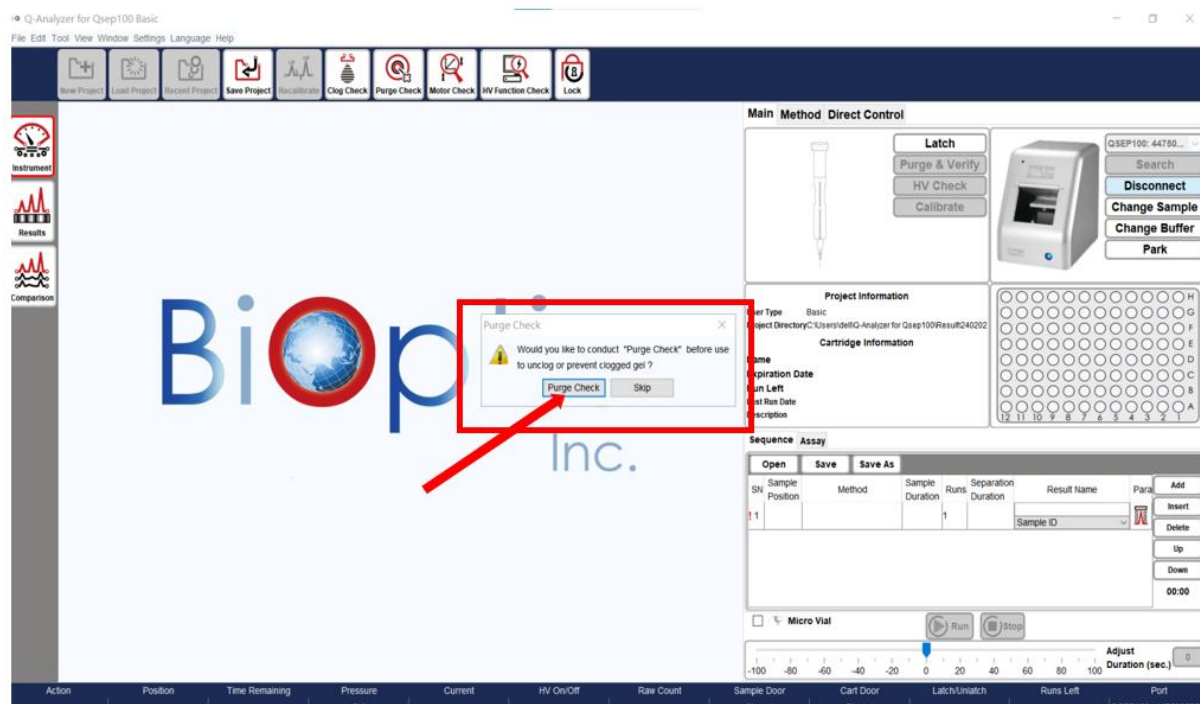


图 2 通气检查

## (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 $\mu$ L, 再覆盖 10-15 $\mu$ 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。**

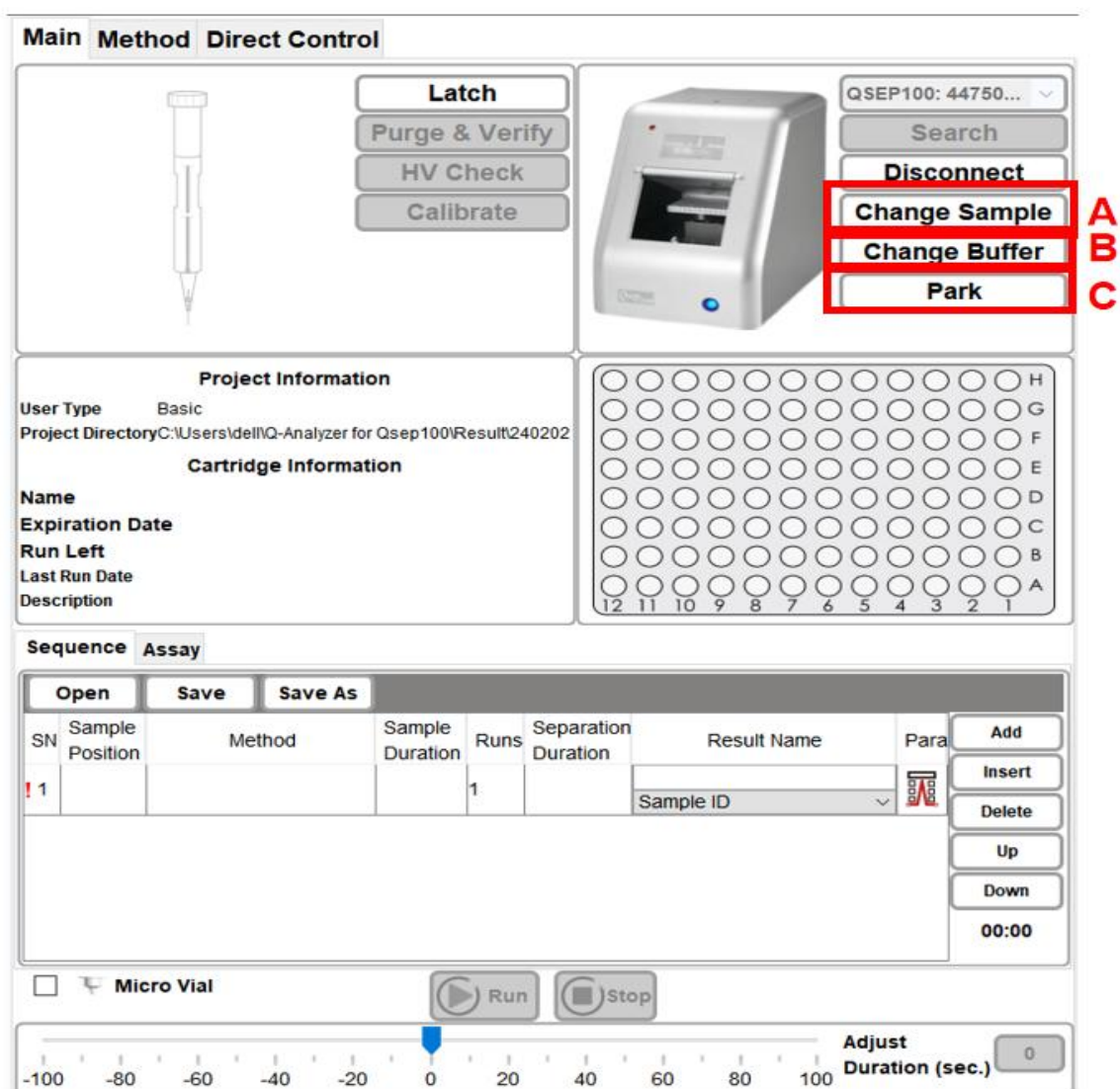


图 3 软件主界面



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。

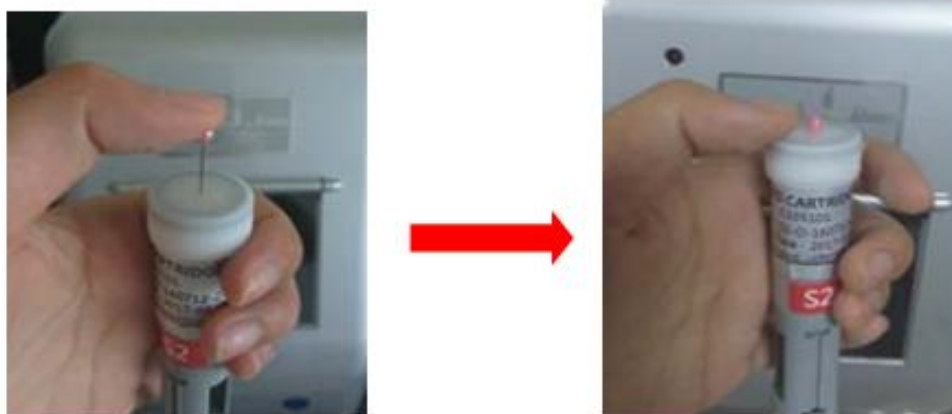
## 7. 卡夹置入与校正

**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)。

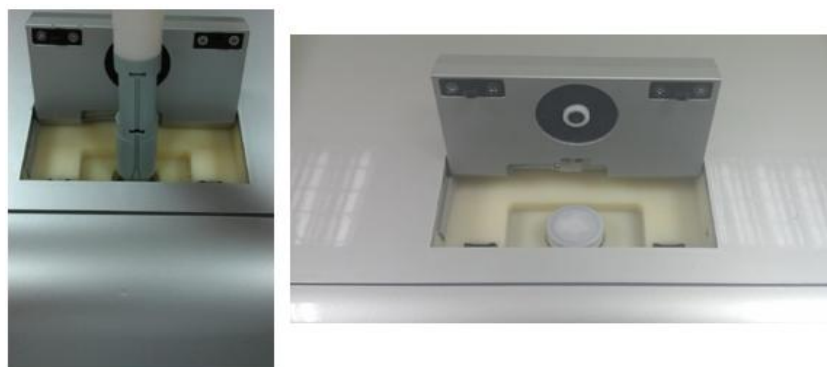


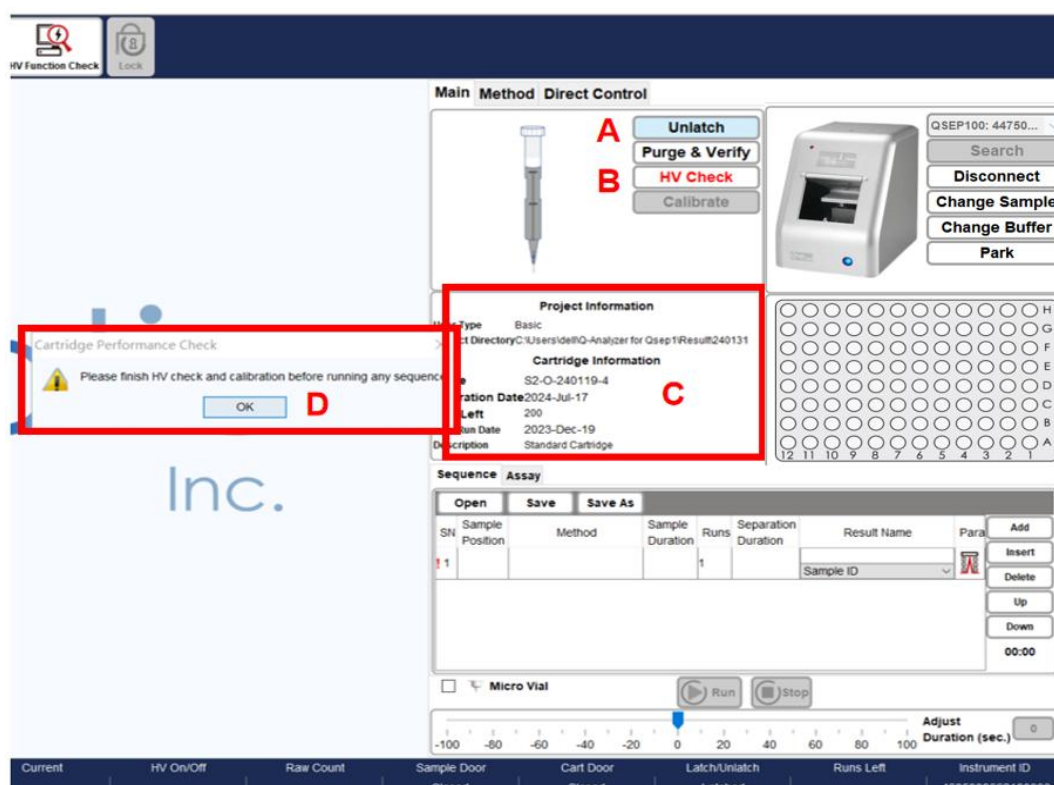
图 5 置入卡夹



## (2) 卡夹锁定和校准

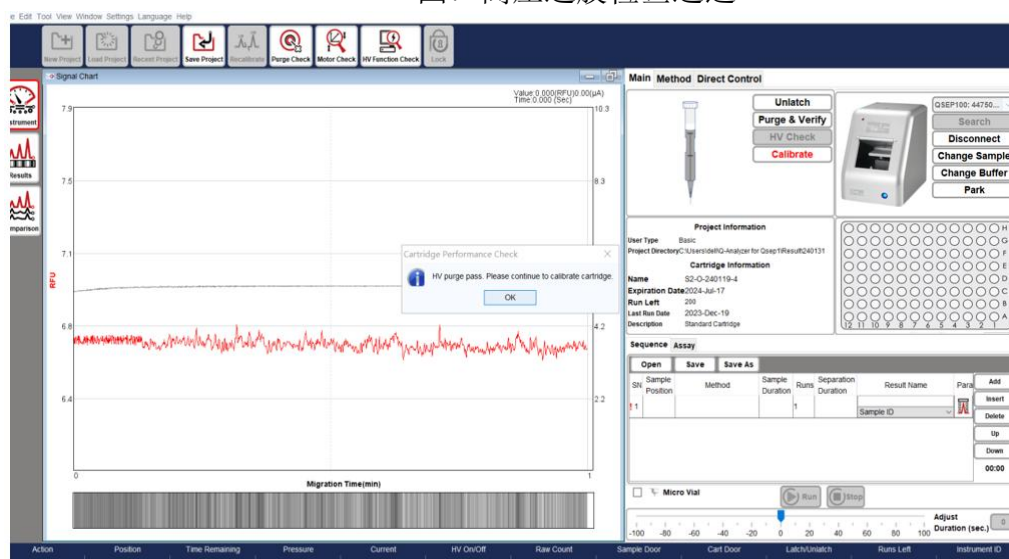
点击 Latch (图 6, A), 卡夹图片颜色变成彩色, 下方显示卡夹信息 (Cartridge Information), 包括卡夹序号 (Cartridge Number)、过期日期 (Expiration Date) 和剩余可用次数(Runs Left) (图 6, C)。

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。**

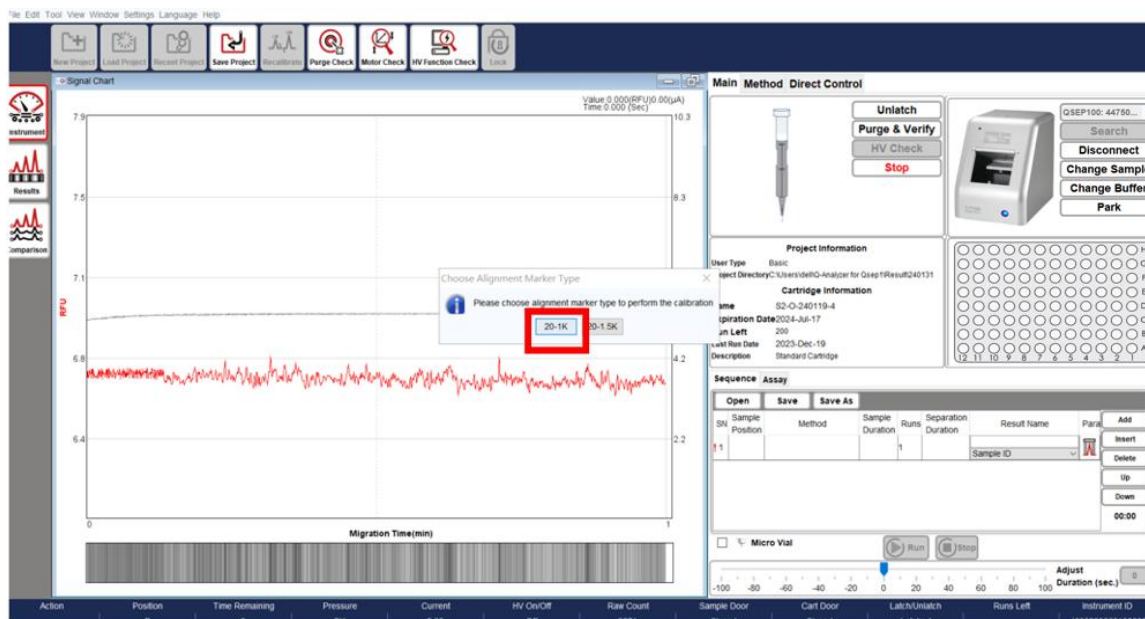


图 8 卡夹校准

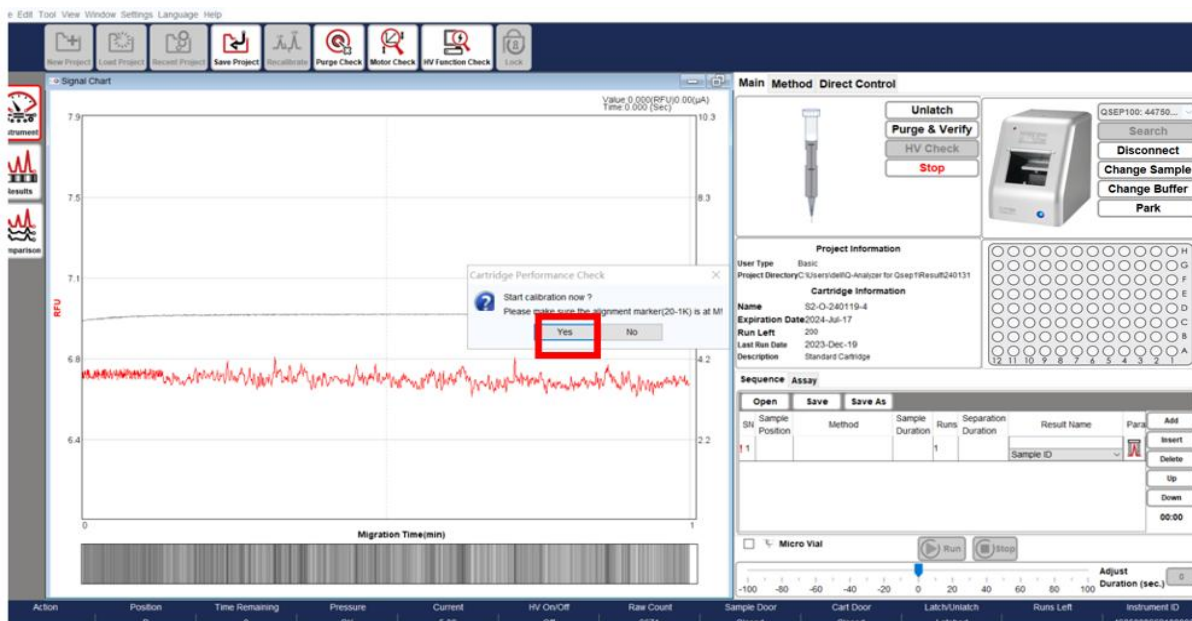


图 9 是否确认Alignment Marker在MA1位置



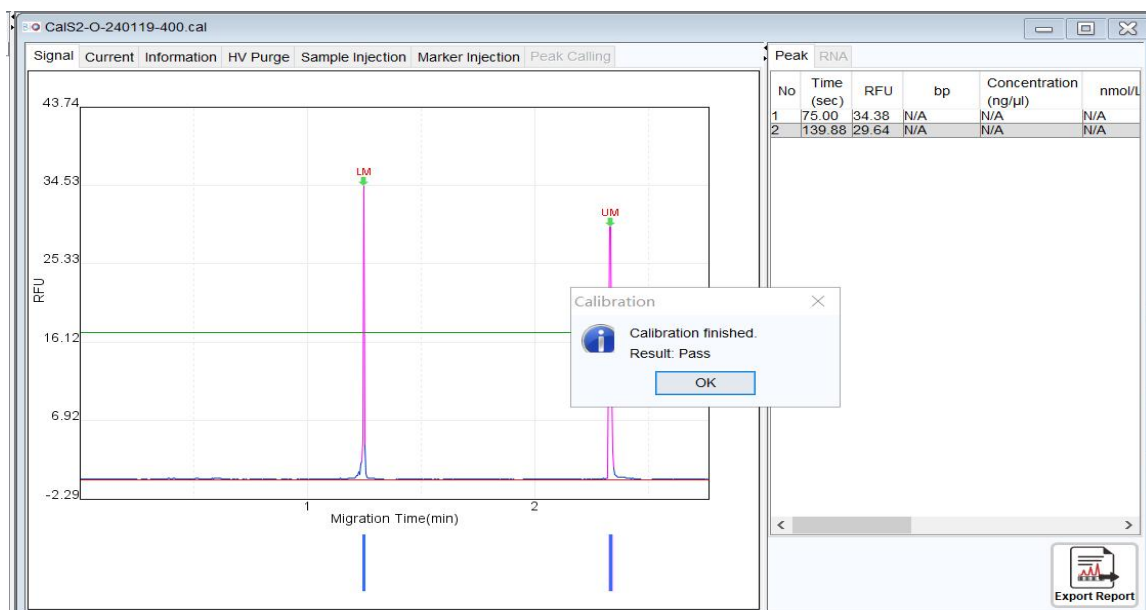


图 10 卡夹校准成功

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。

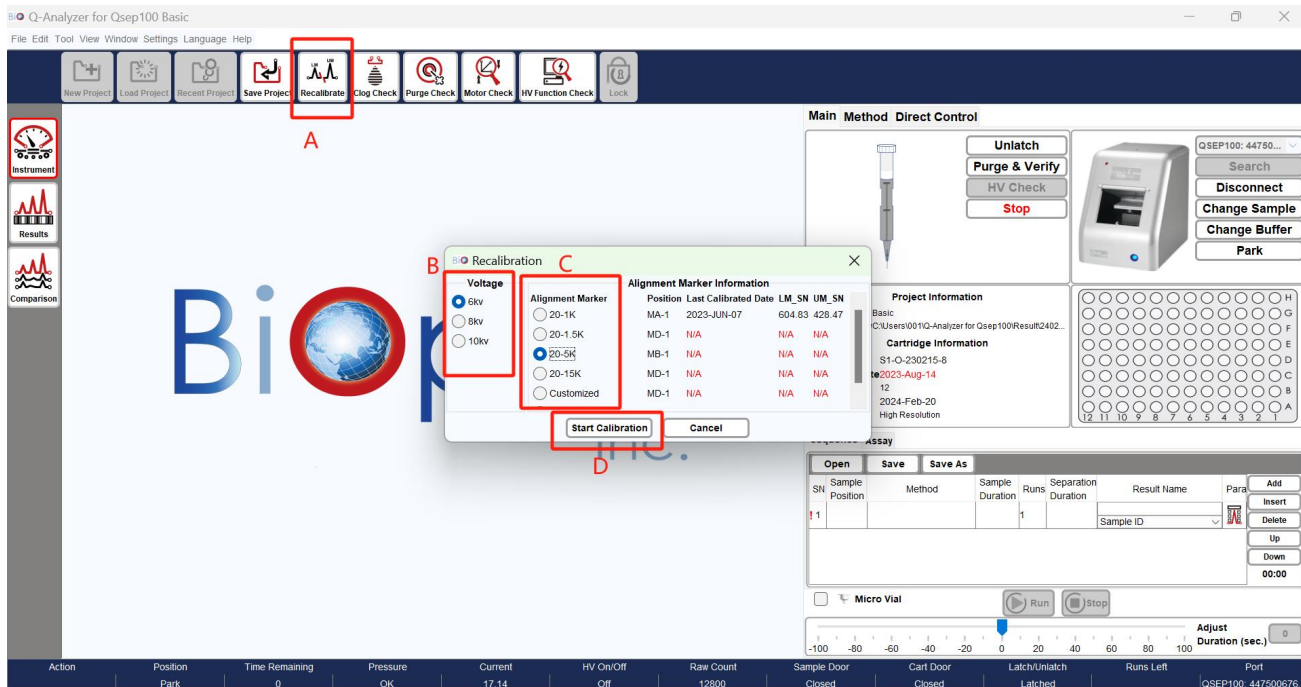


图 11 旧卡夹校准

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；

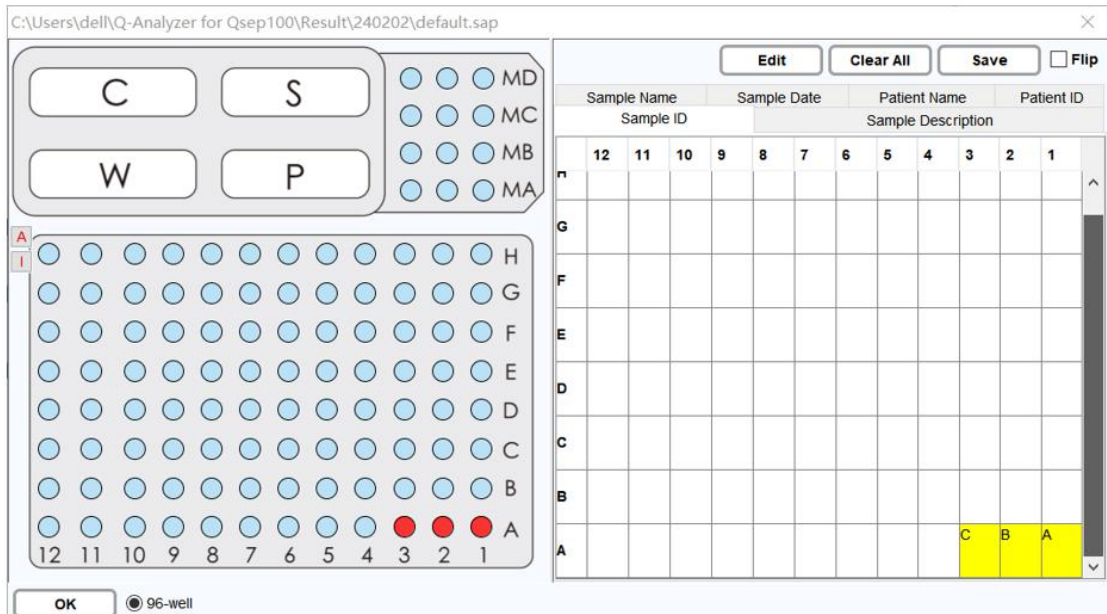


图 13 样品位置选择

(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）；

**Method Selector**

Application: ☒ DNA ☐ RNA ☐ Glycan ☐ Protein

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

Alignment Marker: ☒ 20-5K(MB-1) ☐ 20 ☐ 5000 ☐ Reduce ☒ Normal ☐ Enhance

Cartridge Type:  High Resolution Cartridge(Shelf Life: 6 Months)

Sample Concentration: ☐ High (Fragment: >10 ng/µl) ☒ Regular (Fragment: 0.1-10 ng/µl) ☐ Low (Fragment: <0.1 ng/µl)

Method	Description	Range	Remark
M-4-10-06-300	Sample Injection 4kv 10s Separation 6kv 300s	10bp~5000bp Best Resolution: 2bp~4bp	
M-4-10-08-200	Sample Injection 4kv 10s Separation 8kv 200s	10bp~5000bp Best Resolution: 4bp~10bp	
M-4-10-10-120	Sample Injection 4kv 10s Separation 10kv 120s	10bp~5000bp Best Resolution: 10bp~50bp	
T-HVPurge-08-120	HV Purge for 120s		
T-Purge-120	Purge for 120s		

☒ High Voltage Purge ☐ Purge ☐ Purge Modification


**Customized Method** OK

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）；

**Sequence Assay**

Open Save Save As

SN	Sample Position	Method	Sample Duration	Runs	Separation Duration	Result Name	Para	Add	Insert	Delete	Up	Down
1	A-01,A...	M-4-10-06-300	10	1	300	Sample 0						

00:13

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。

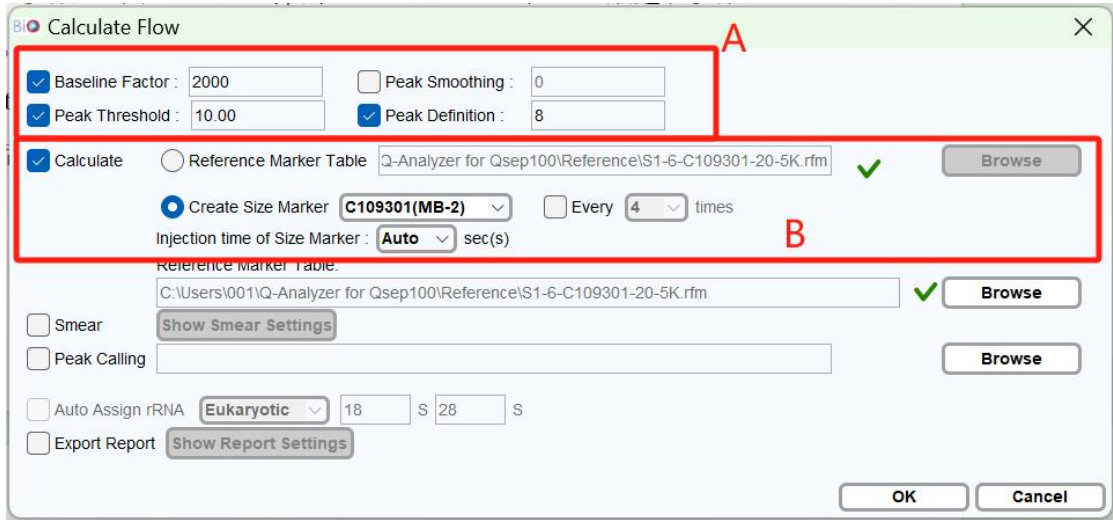


图 16 参数调整

(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!**

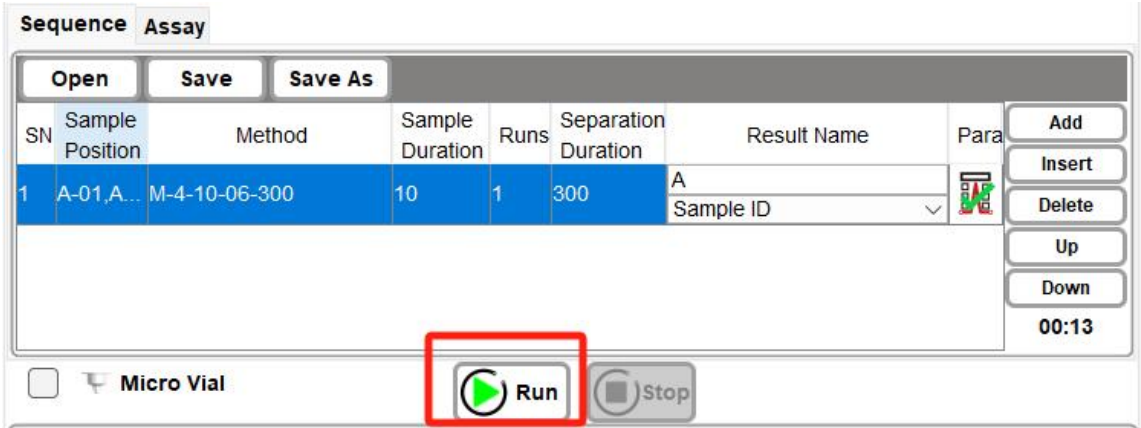
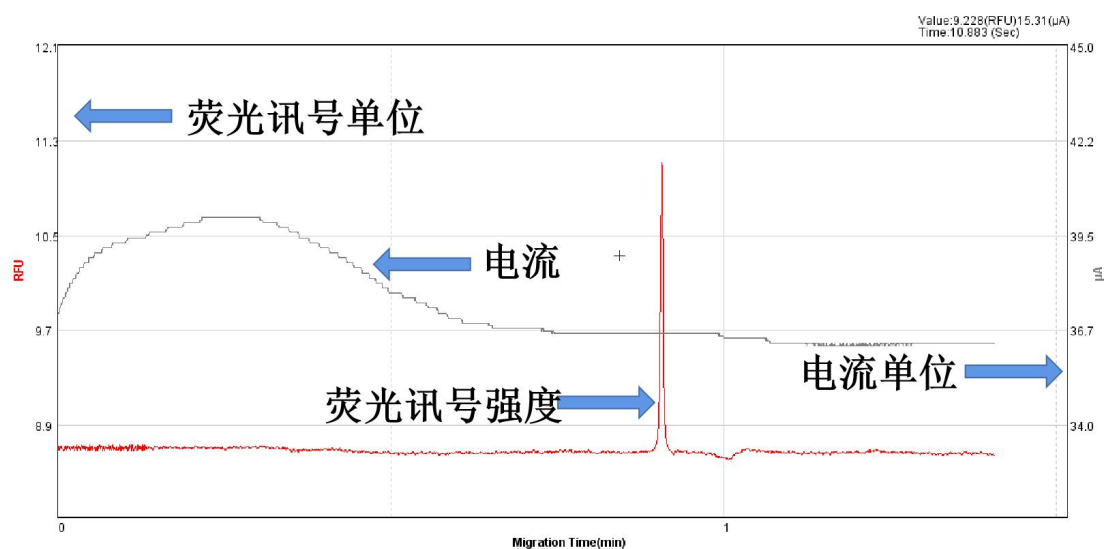


图 17 点击 RUN 开始运行

\*注：信号图谱及注意事项



### 注意事项：

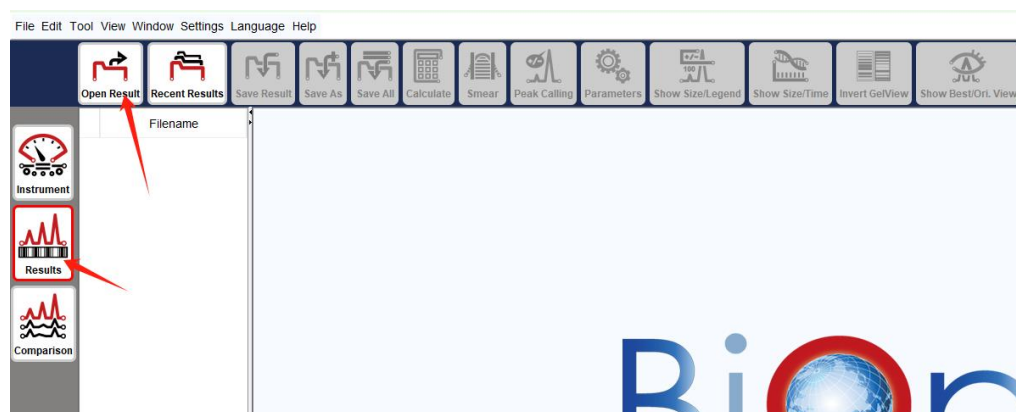
- (1) 确定Marker所放位置正确并且足量；
- (2) 确认缓冲液槽内液面高于最低限制；
- (3) 确认新卡夹已扎孔；
- (4) 检测样本前需要进行卡夹校正—Calibrate。

## 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





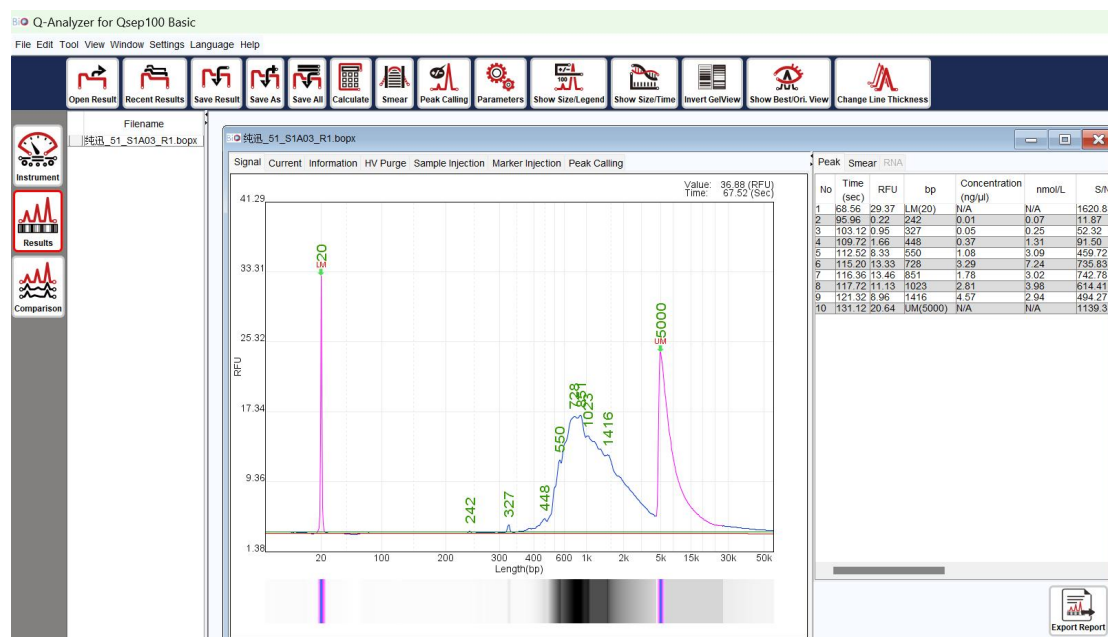


图 19 结果展示

## 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）。

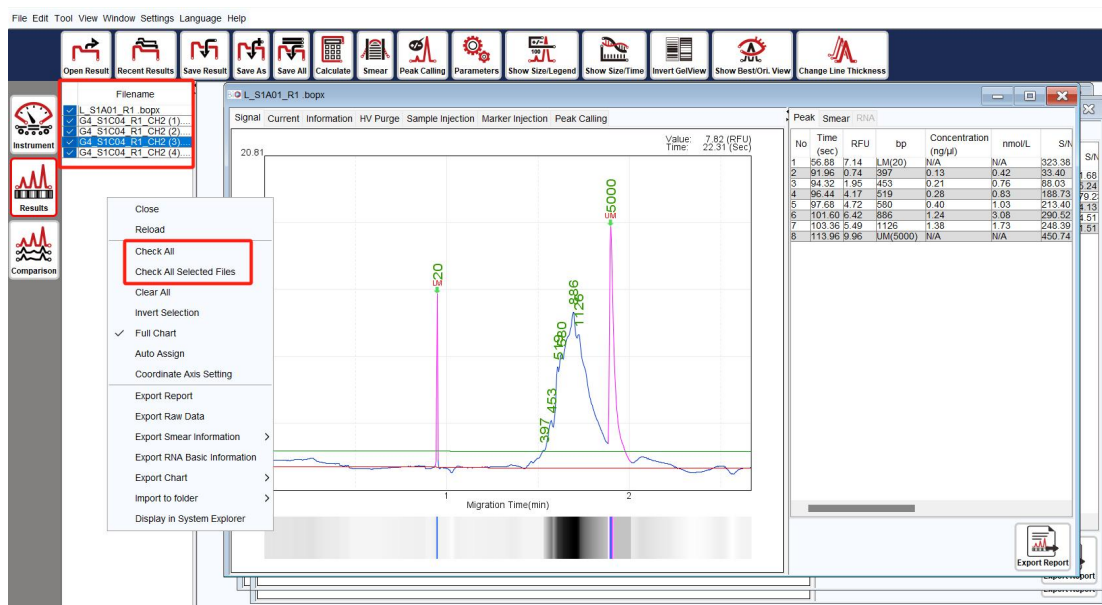


图 20 选择需处理样本

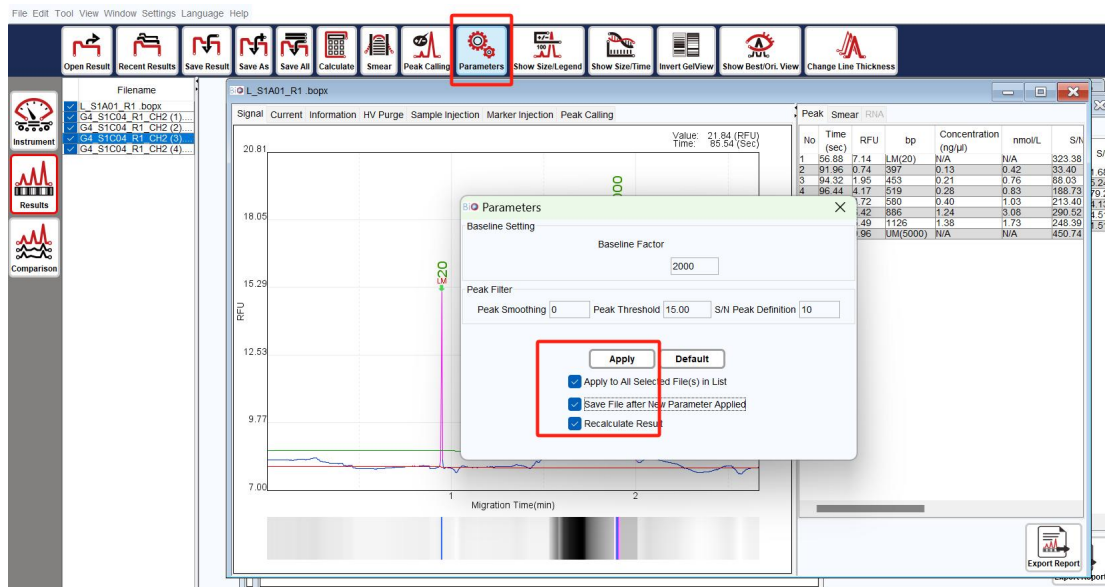


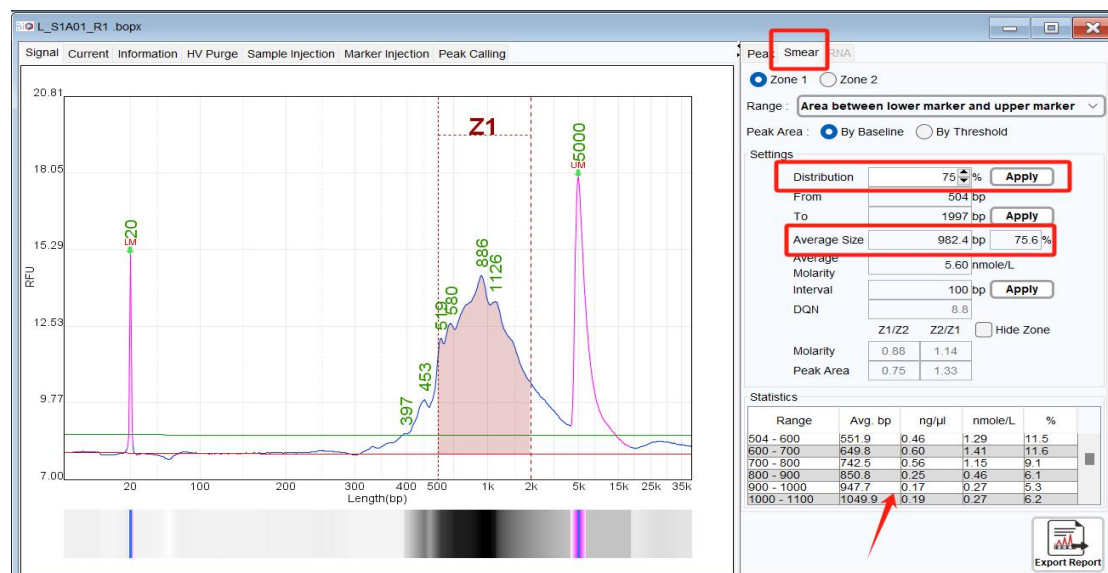
图 21 参数修改

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

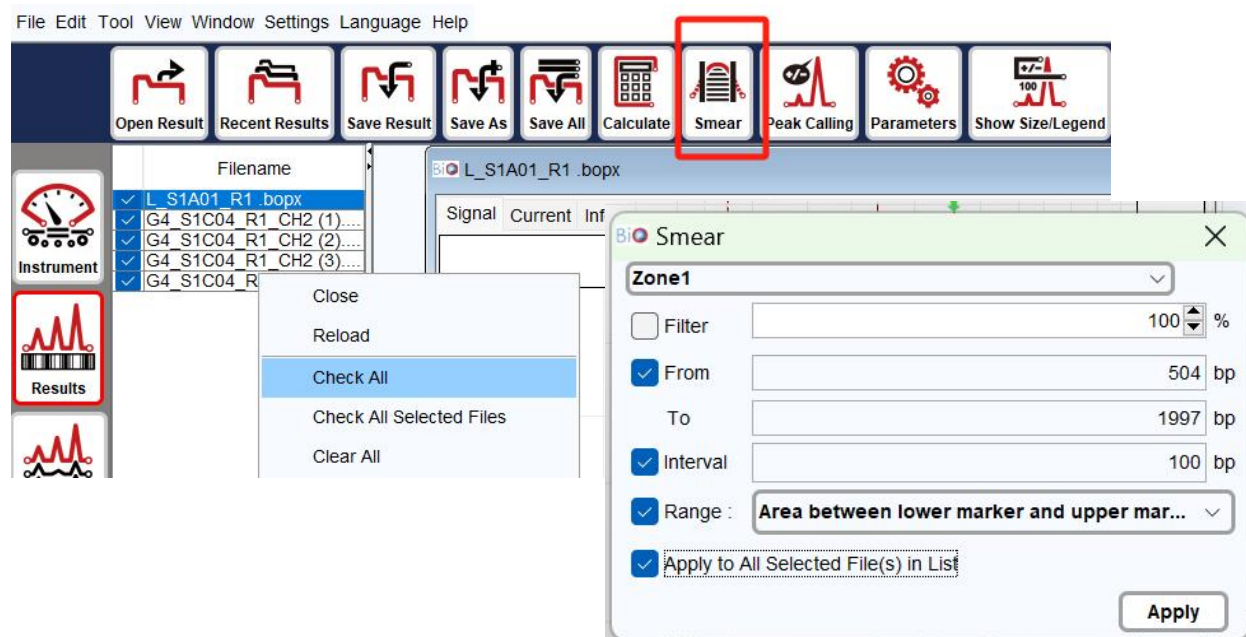
样本检测完成后, 点击 Results ---Open File, 选择目标结果文件, 打开。在 Smear (片段分布分析) 状态下, 查看片段平均大小以及片段分布占比。



### 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。

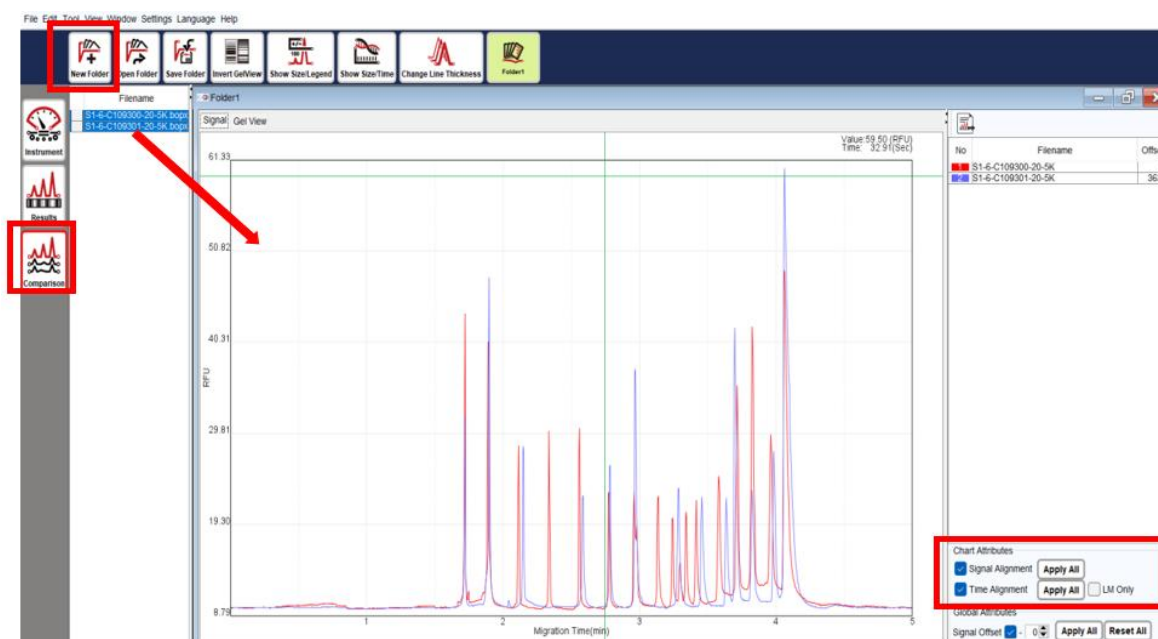


图 22 选择对比文档

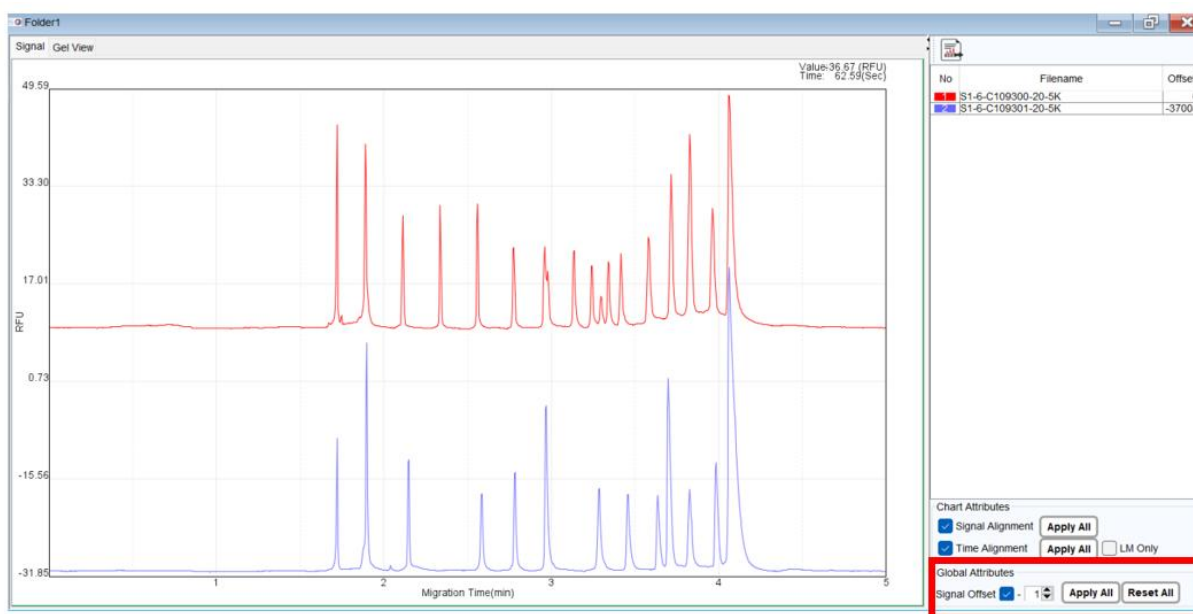


图 23 对比峰图数据

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）。

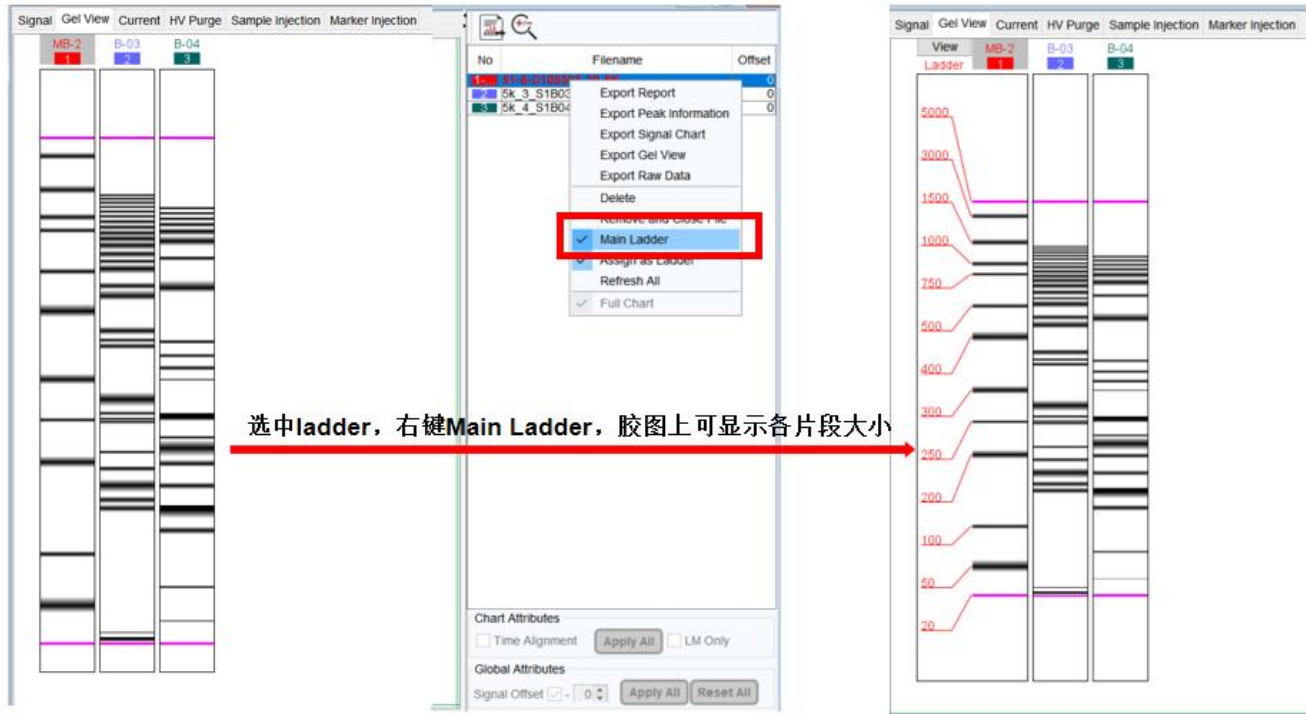


图 24 显示胶图里 Ladder 各片段大小

## 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）。



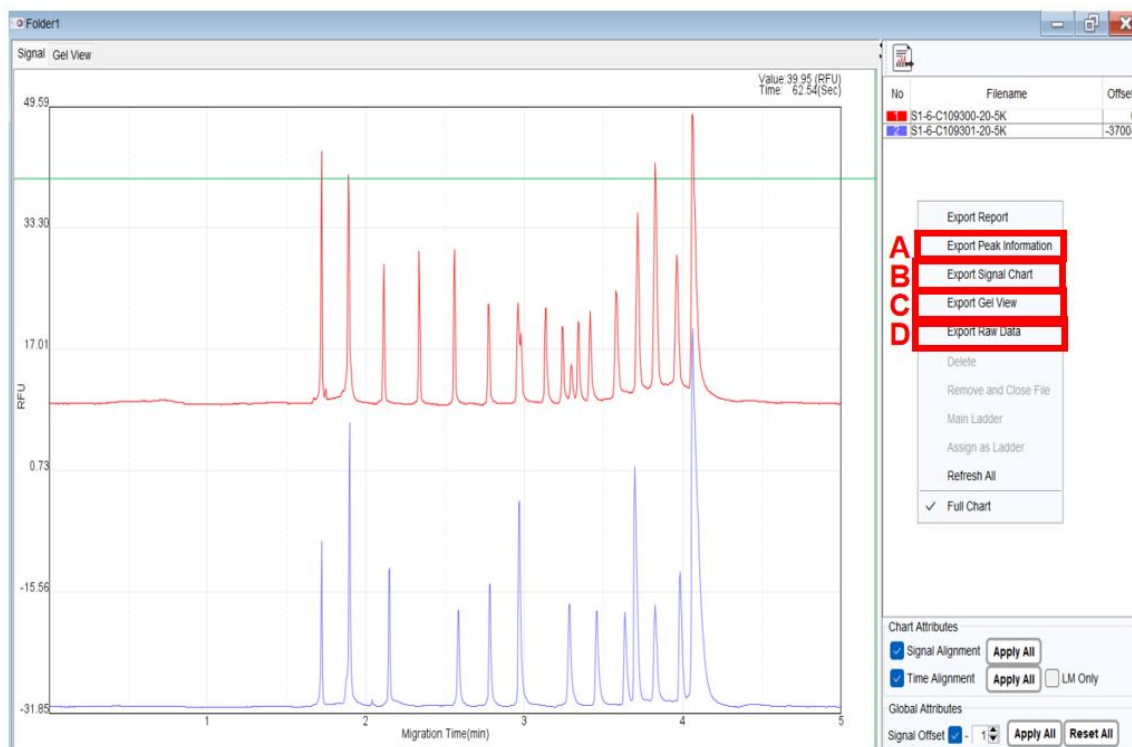


图 25 导出结果选择

## (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）：

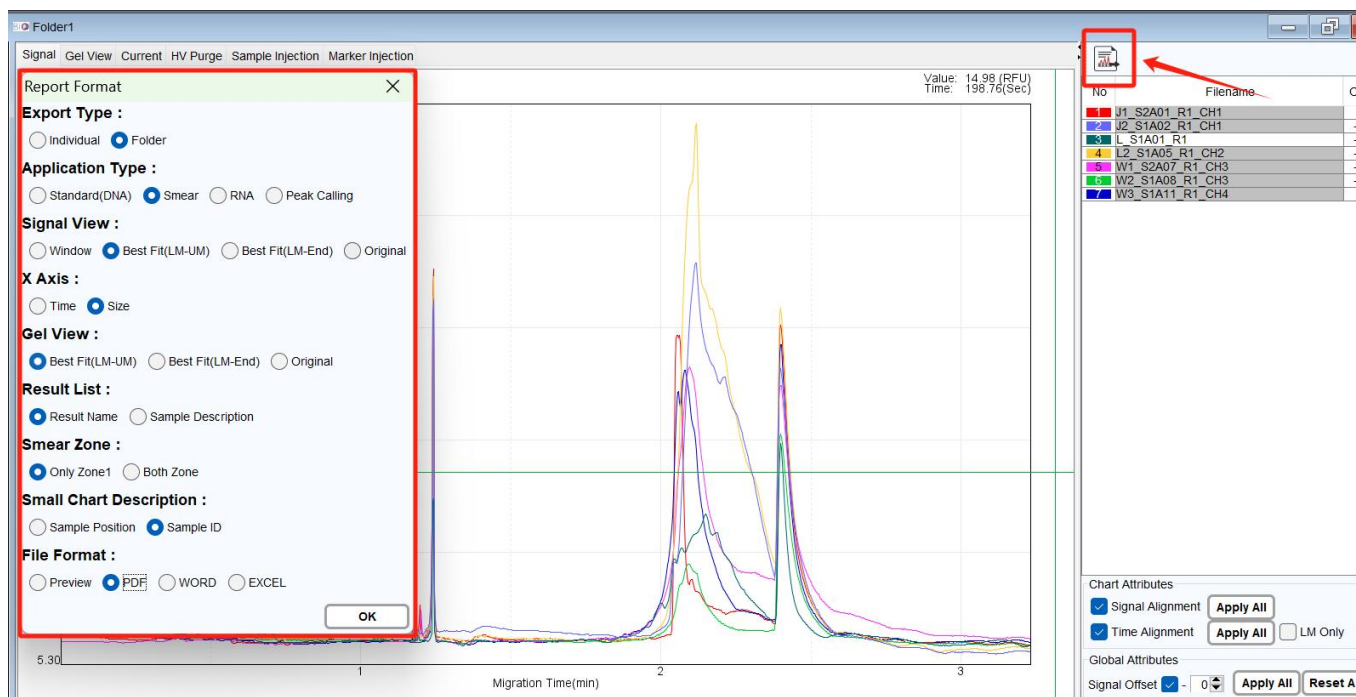
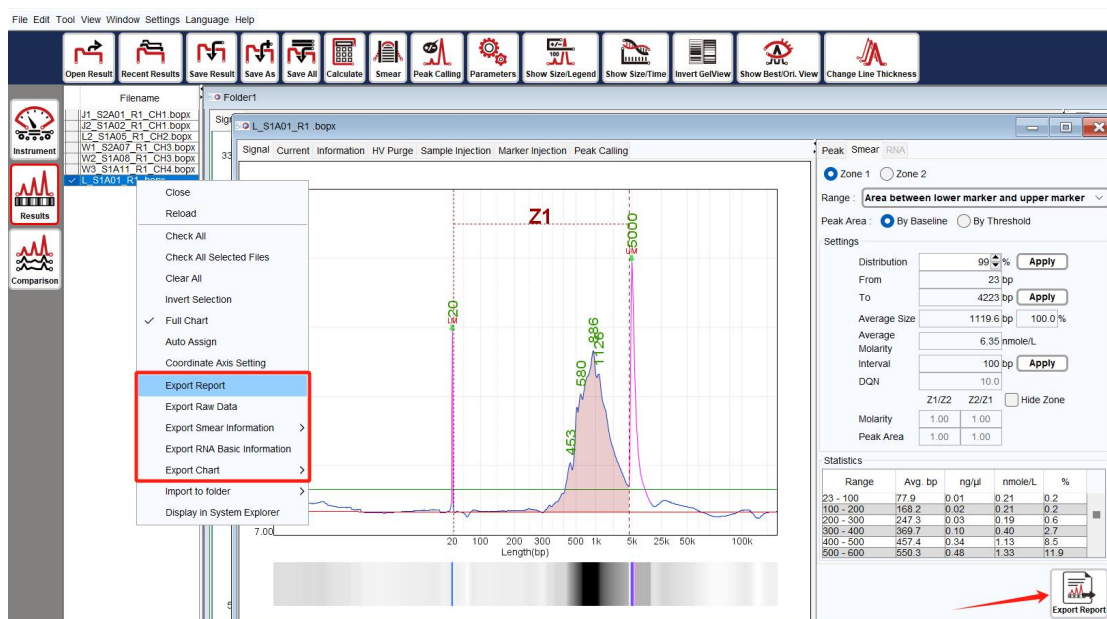


图 26 导出报告

- 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_IW2			1 24 - 200	122.1	0.07	0.92	1.9
3	W2_S1A08_IW2			1 200 - 400	330.4	0.16	0.73	4.4
4	W2_S1A08_IW2			1 400 - 600	526.7	0.94	2.74	27.5
5	W2_S1A08_IW2			1 600 - 800	679.6	1.21	2.74	31.7
6	W2_S1A08_IW2			1 800 - 1000	890.6	0.28	0.49	8.5
7	W2_S1A08_IW2			1 1000 - 1200	1090.3	0.2	0.28	6.5
8	W2_S1A08_IW2			1 1200 - 1400	1294	0.13	0.15	3.9
9	W2_S1A08_IW2			1 1400 - 1600	1489.9	0.09	0.09	2.6
10	W2_S1A08_IW2			1 1600 - 1800	1695.9	0.06	0.06	1.8
11	W2_S1A08_IW2			1 1800 - 2000	1895.7	0.06	0.04	1.6
12	W2_S1A08_IW2			1 2000 - 2200	2100	0.05	0.04	1.5
13	W2_S1A08_IW2			1 2200 - 2400	2299.3	0.04	0.03	1.2
14	W2_S1A08_IW2			1 2400 - 2600	2499.2	0.04	0.02	1.2
15	W2_S1A08_IW2			1 2600 - 2800	2698.8	0.03	0.02	1
16	W2_S1A08_IW2			1 2800 - 3000	2893.6	0.03	0.02	1
17	W2_S1A08_IW2			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。

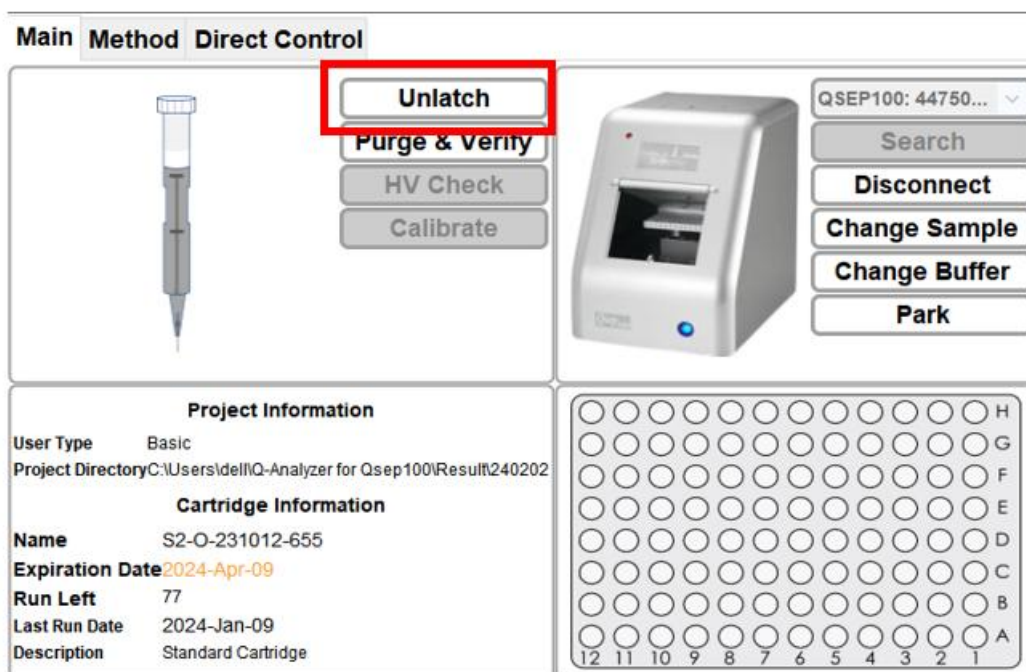


图 27 断开卡夹连接

## 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。

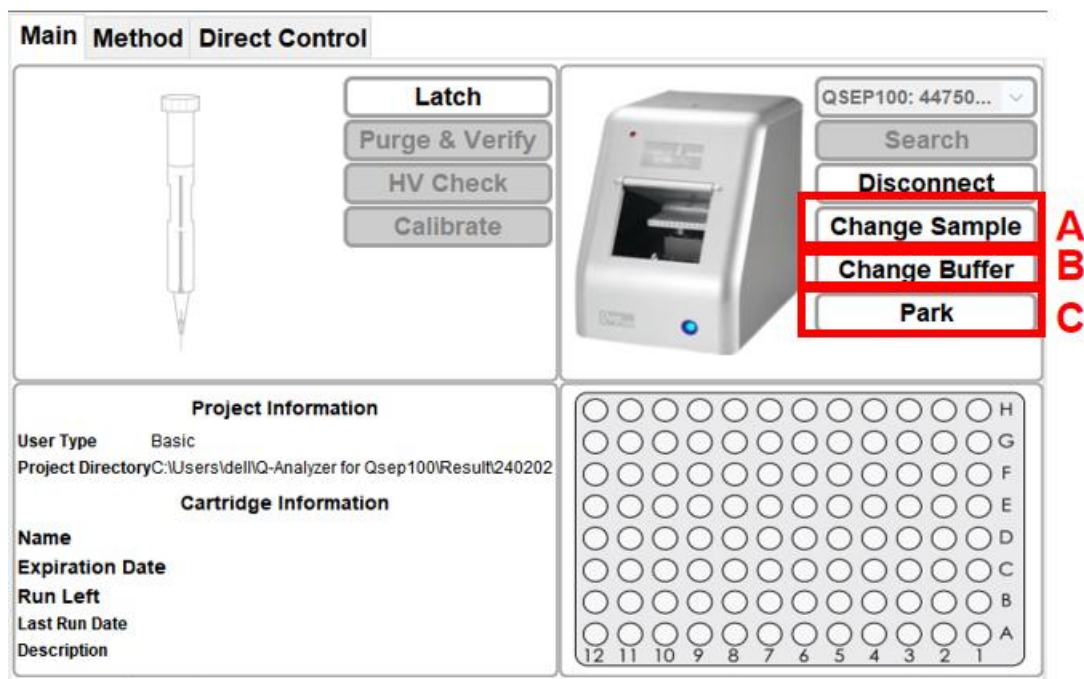


图 28 取出样品和试剂



### 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）。

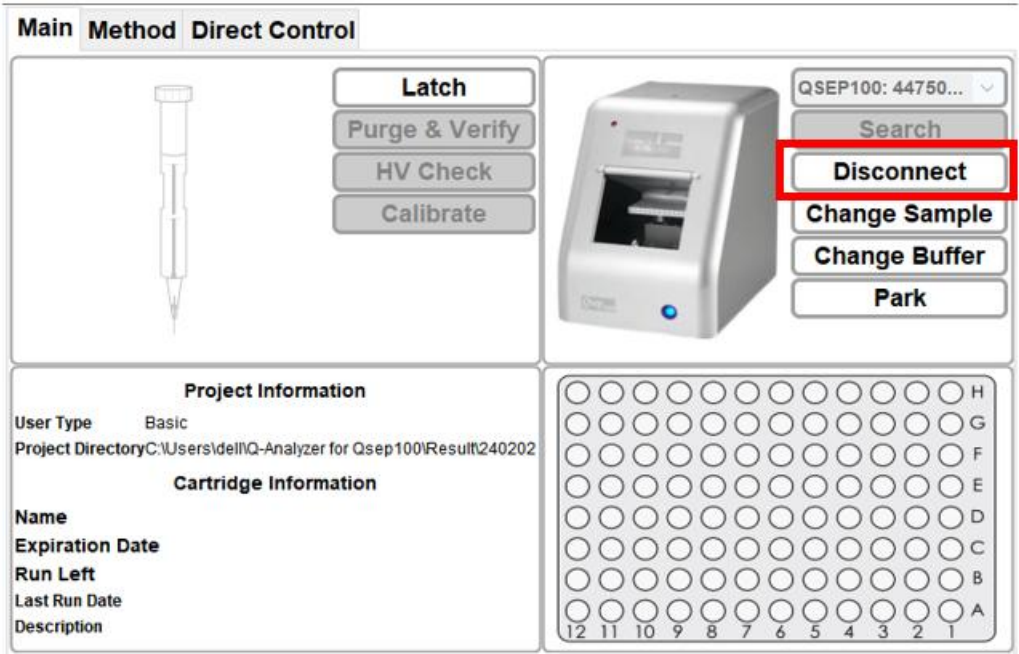


图 29 断开仪器连接

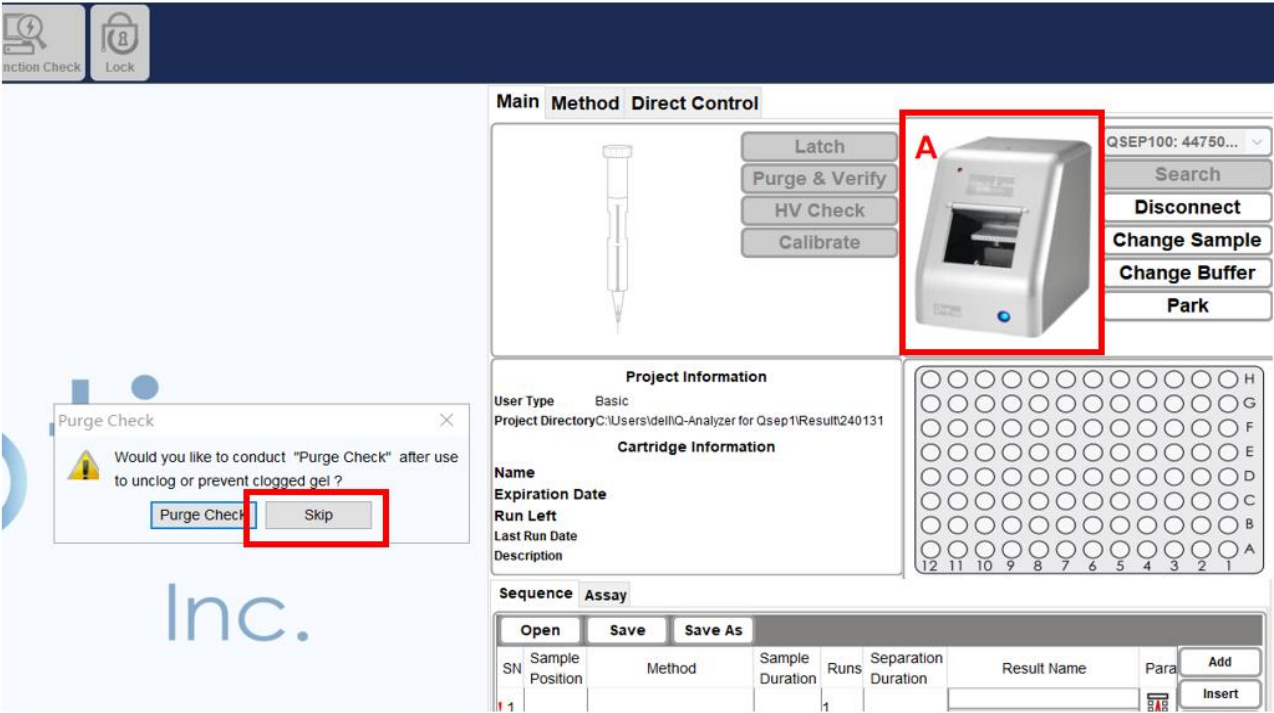


图 30 断开连接时 Purge Check 可跳过



#### 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）。

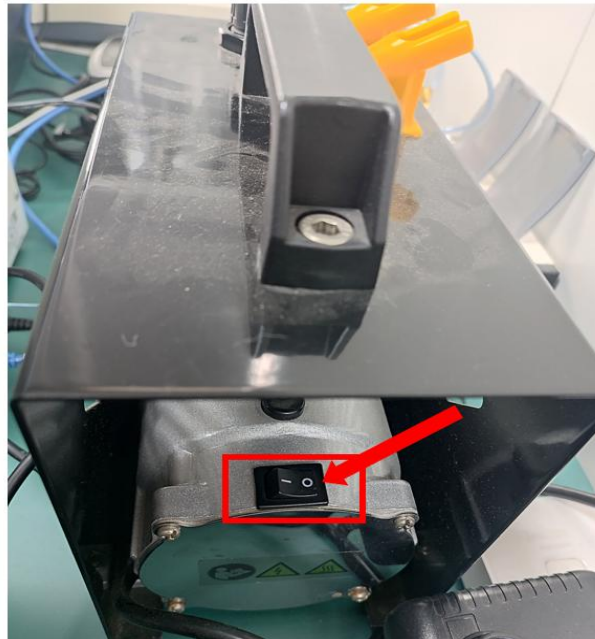


图 31 空气压缩机开关