

Qsep100 核酸蛋白分析仪系统检测文库样本的标准操作流程

适用样本：S2 卡夹检测文库样本建议上机浓度 1-2ng/μL (Qubit 定量)。N1 检测文库下限可到 0.1 ng/μL。

衡量文库质量的指标：(1) 引物接头是否去除；(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。

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）

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 50 个样本更换，频率低建议 2 周更换。油封后放 4℃ 保存。
- 3) 收到卡夹及试剂后的保存。

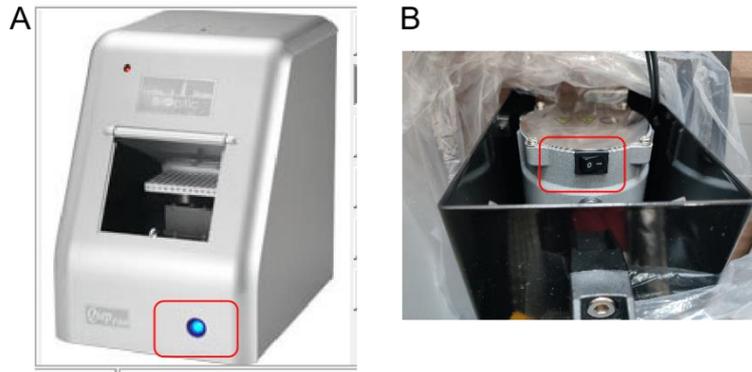
Marker≤3 个月可 4℃ 保存，长期保存放-20℃，化冻放后 4℃。

卡夹放 4℃ 避光保存，扎孔前可水平放置，扎孔后务必保持直立状态，防止胶流出。

3. 准备文库样本

样本稀释：用稀释缓冲液调整文库样本最佳浓度范围为 1-2ng/μL，体积为 15-20μL，加入 200μL PCR 管中。浓度过低可更换 N1 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. 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。



置换缓冲液和 Marker

7.1 缓冲液

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。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。

7.2 Marker

在左侧的 MA1 孔中放置 20bp-1000bp 的 Alignment Marker，MA2 孔中放置对应的 Size Marker (C109200-100)，在 MB1 孔中放置 20bp-5000bp 的 Alignment Marker，MB2 孔中放置对应的 Size Marker (C109301-100)，根据建库的平均片段大小选择 marker。用食指和中指托住底部，用拇指将管子**按压到底**。



缓冲液和 Marker 位置

8. 放置样本

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

9. 点选“Park”复位

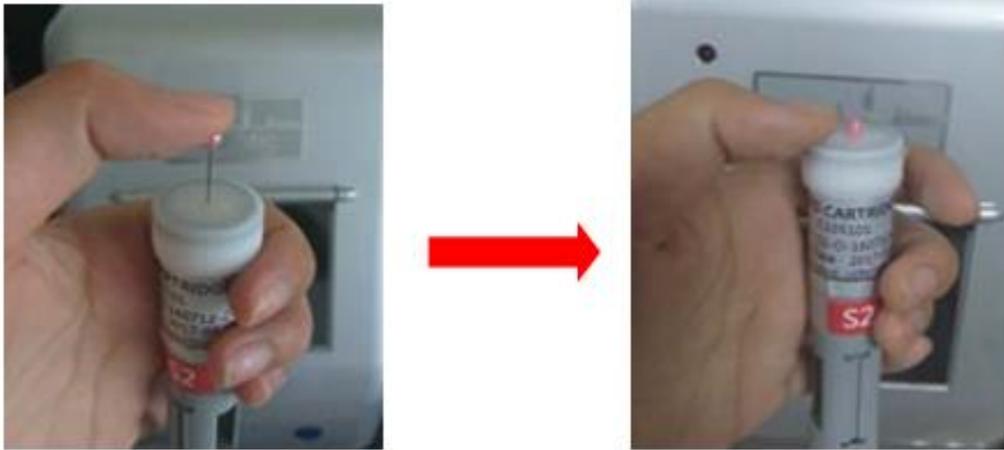
10. 装入卡夹

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，N1 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 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。

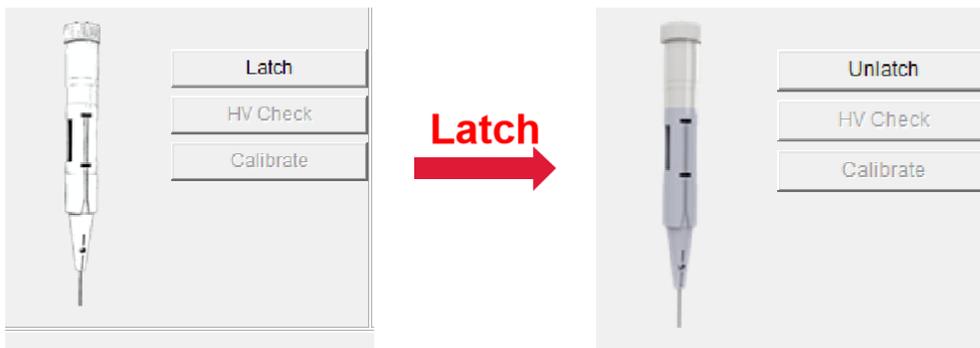
10.3 将随包装盒附带的大头针完全插入卡夹上面帽子的孔中，并且重复该动作 2-3 次，以保证大头针完全插入孔内。

10.4 取出大头针，用无尘纸擦拭卡夹帽子区域，务必保持卡夹的直立状态。



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自己的方向，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，接着可以看到左上角信息方块会显示适配卡夹相关信息。

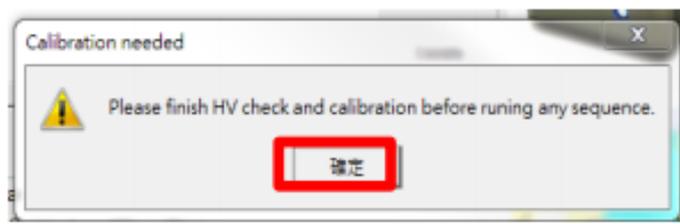


11. 卡夹校正

11.1 新卡夹使用说明：

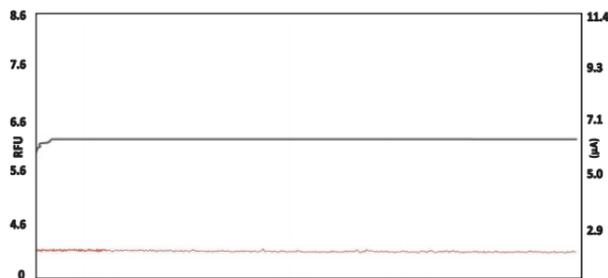
卡夹使用前皆需经过校正以确保数据正确，请依照以下步骤进行卡夹校正

1) 点选“确定”



2) 点选“HV check”

存储与运输皆会影响卡夹中凝胶的状态，请在进行 HV check 操作时，确定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 $> 2\mu\text{A}$ ）。



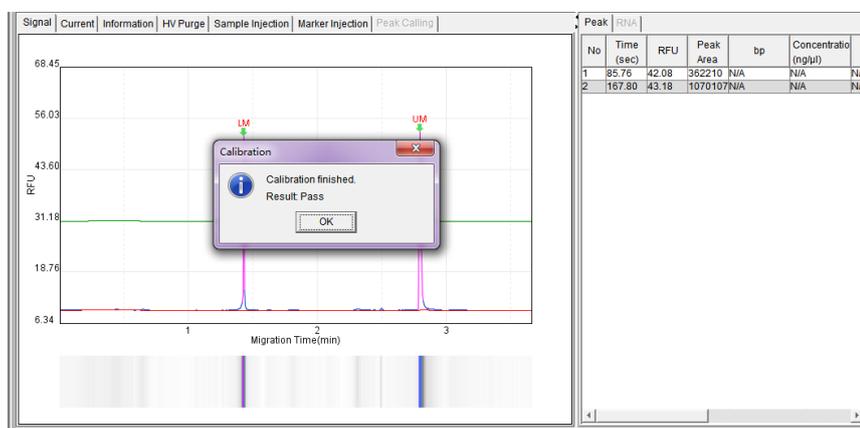
*If the HV Check failed, please refer to troubleshooting (1).

3) 点选“Calibration”

选择相应的 marker 和电压，确保 Marker 放置在正确位置，体积 $\geq 15\mu\text{L}$ ，并且没有气泡。

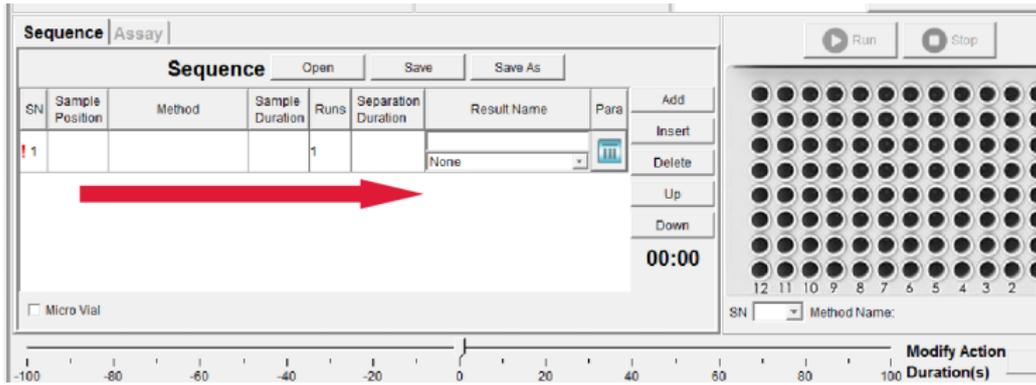
11.2 使用过的卡夹，直接点击“Recalibrate”进行校正。

校正成功会自动提示“Recalibrate Succeed”，点击“确定”即可。

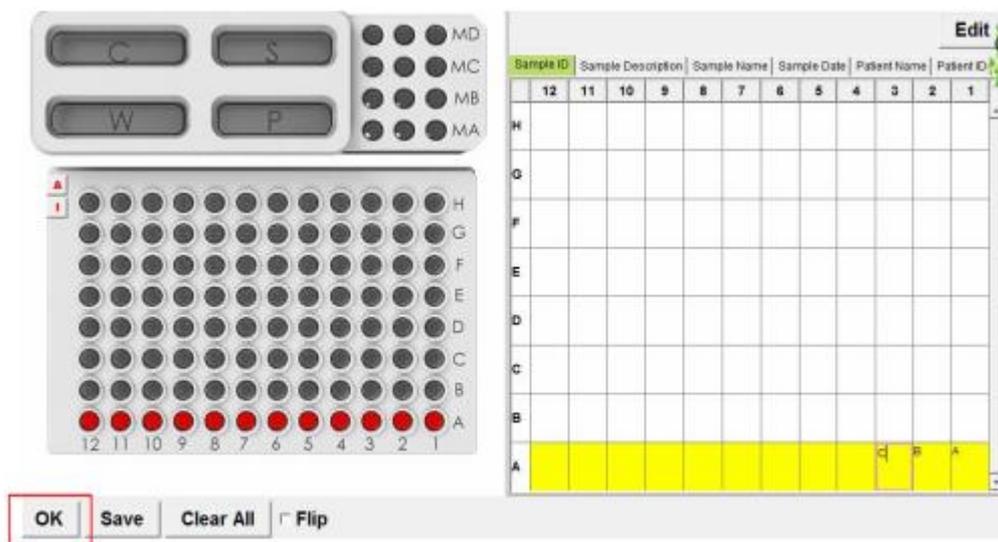


12. 运行程序

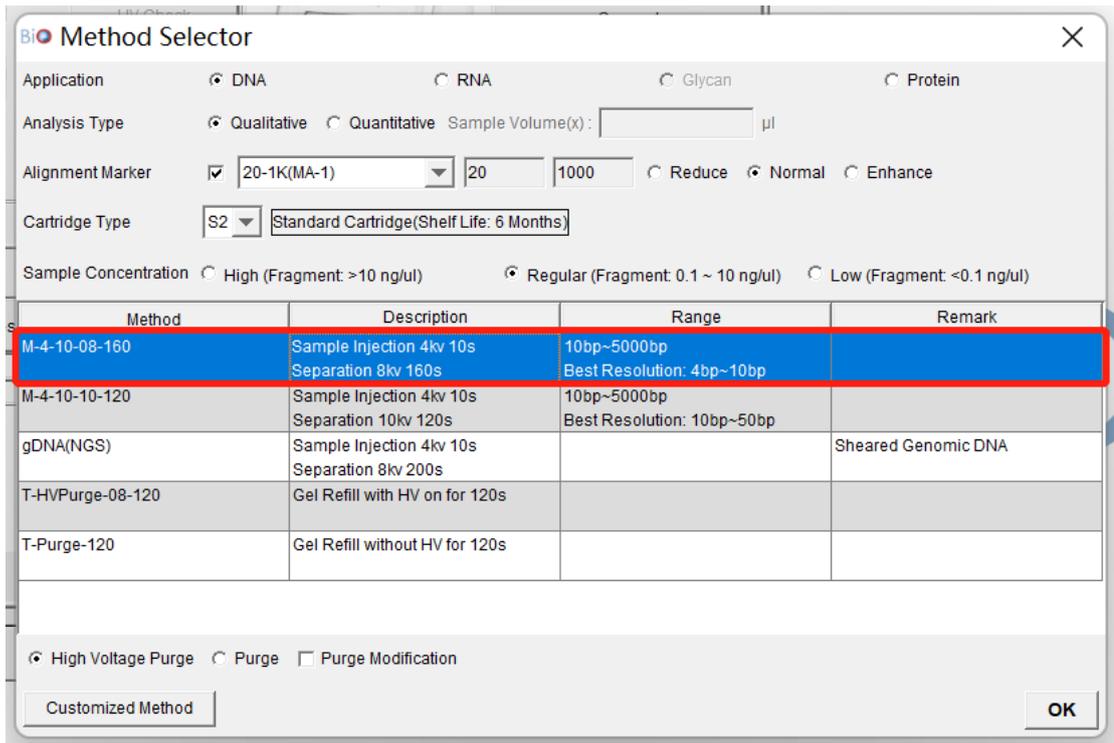
点选空白处依次选择：(1) 样本位置；(2) 测试方案；(3) 进样时间；(4) 测验次数；(5) 分离时间；(6) 结果文档命名



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。文库样本一般选择第一个方法 M-4-10-08-160，根据样本终浓度范围调整进样电压。

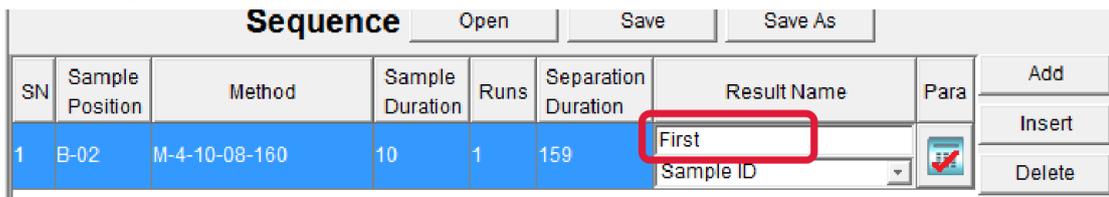


12.3 (可选) 点选进样时间“Sample Duration”，改变数字大小来调整进样时间，注意进样时间不要超过 20s。一般为 10s。

12.4 (可选) 点选测验次数“Runs”。一般选 1 次。如果选 2，代表跑 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。在跑胶过程中可以调整，比如在 250s 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。

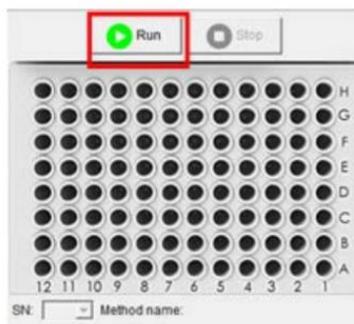
12.6 点选结果档命名“Result Name”并输入结果文件名。



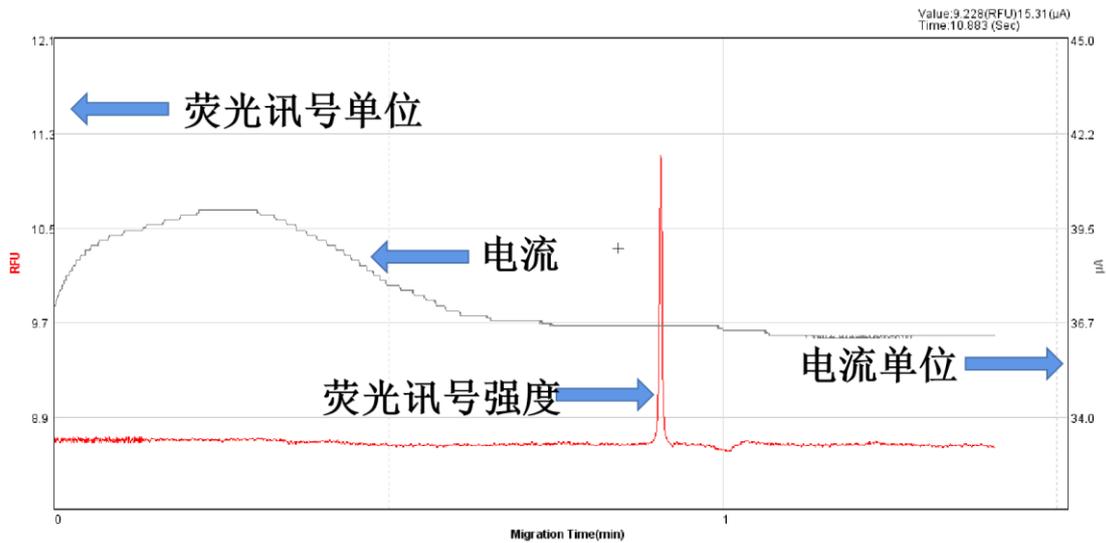
12.7 点选“Sample ID”，则最后结果以 Sample ID 为样本名称显示。

12.8 点选 parameter, 更改计算参数。如 Baseline Factor, Peak Threshold 等。

12.9 点选“Run” 启动实验。



12.10 讯号图谱及注意事项，详细说明请参阅试用手册

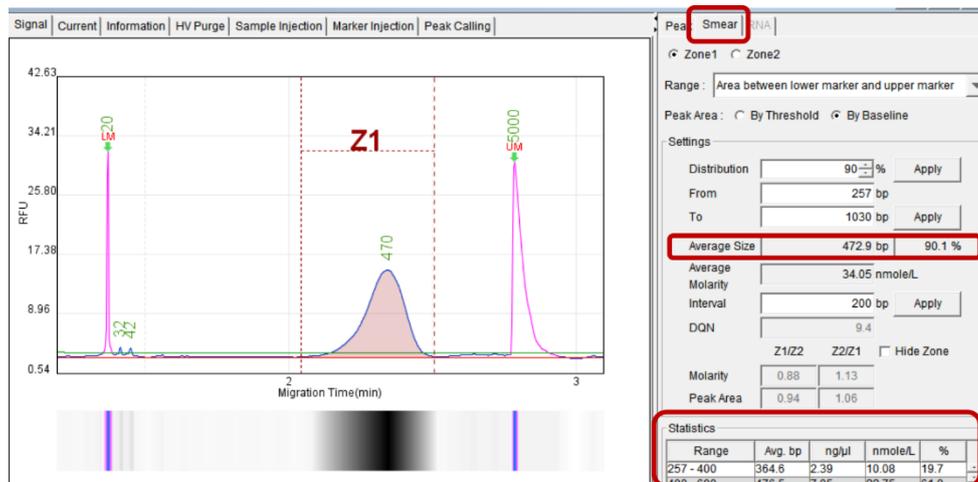


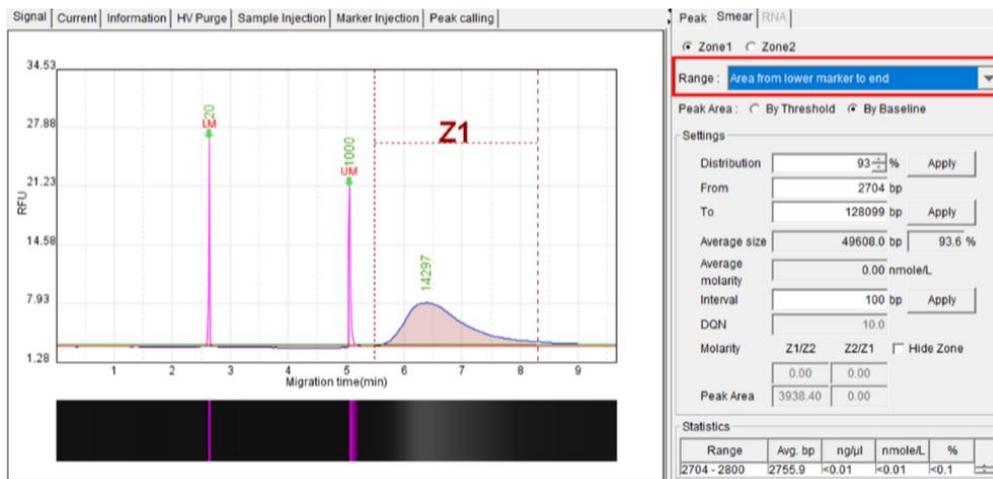
注意事项：

- (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. 数据分析

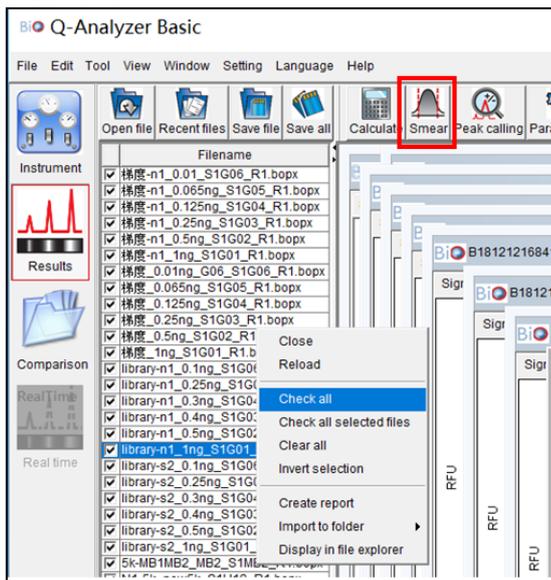
样本检测完成后，点击 results --- open file，选择目标结果文件，打开。在 smear（片段分布分析）状态下，查看片段平均大小以及片段分布占比。





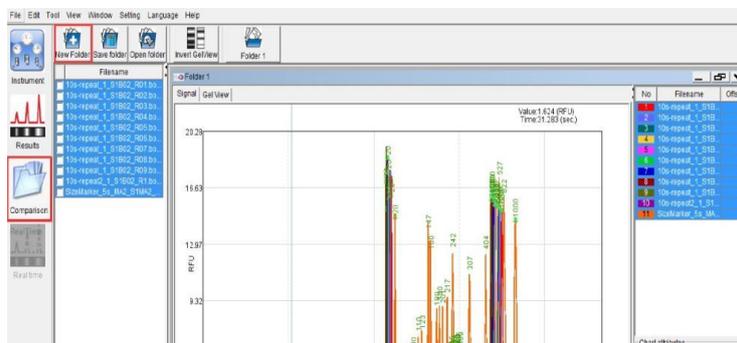
Smear 功能介绍:

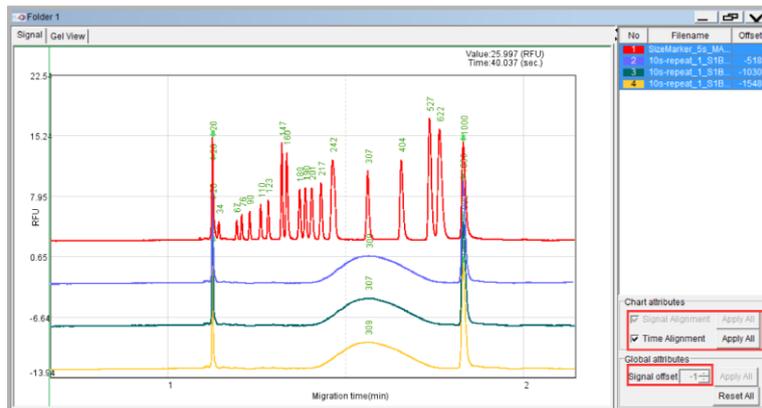
在 Smear 状态下, 可以查看片段平均大小, 分布占比以及主峰占比。可以手动拖动虚线, 选定自己想要的区域, 也可输入固定的 bp 大小区间 (From.....to.....), 点击 Apply; 即可显示该样本该区间的百分比占比及平均等信息。Interval 的值是 100 或者其他任意数字, 代表的就是虚线区间内, 软件会自动以 100bp 为区间分段, 计算每 100bp 内的相对浓度和平均大小。处理多个文库结果时, 可全部勾选批量处理。



14. 导出报告

14.1 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 调整为“-1”, 点击 apply all (可点击多次), 调整结果间距。





14.2 于右侧空白处右击，选择 Export report，根据下图选择导出报告

The 'Report Format' dialog box contains the following options:

- 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

An 'OK' button is located at the bottom right of the dialog box.