Qsep100 ^{TM} 全自动核酸蛋白分析系统操作步骤

1. Qsep100^{TM} 使用步骤

1.1 软件界面

打开 Qsep100^{TM} 全自动核酸蛋白分析系统主机和空气压缩机的开关，双击软件图标，点击 New project，设定 Project 名称与存储路径（Browse）（图 1）。

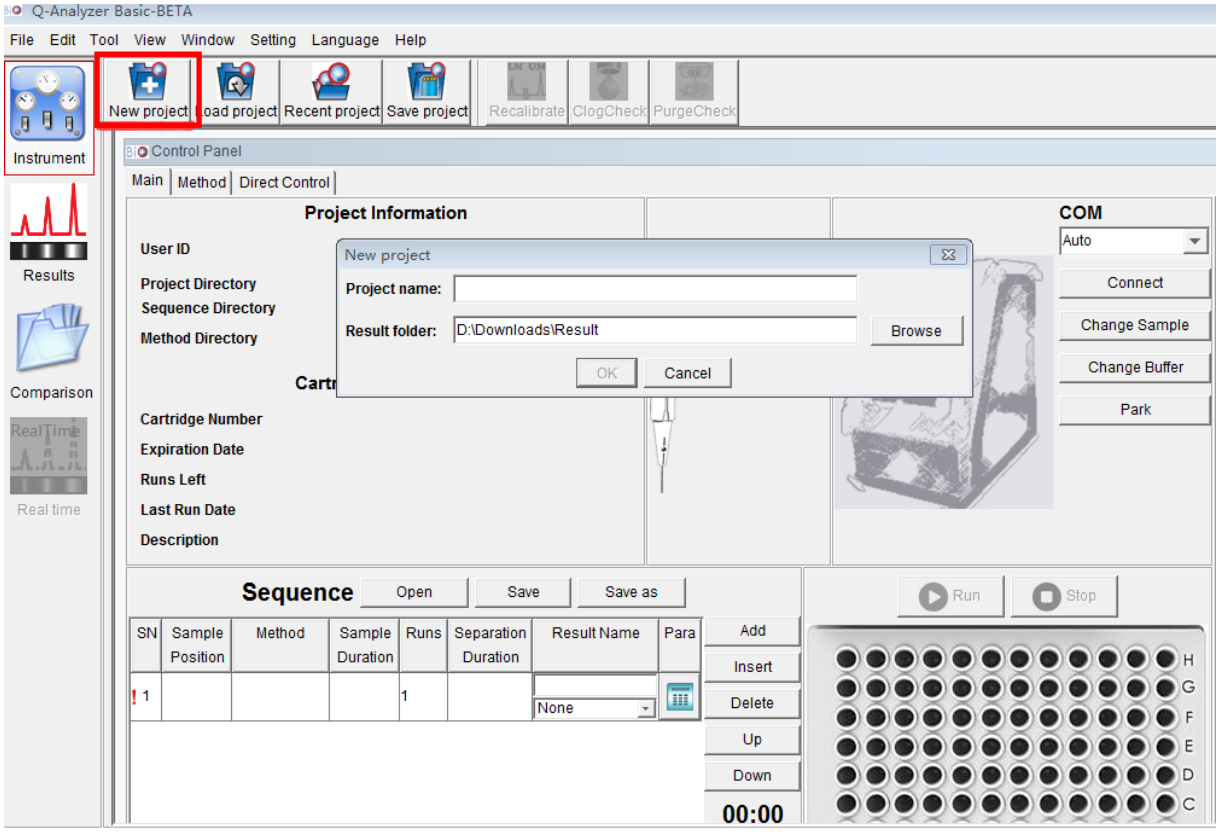


图 1 新建专案（New project）

1.2 连接 Qsep100^{TM} 与初始化设定

（1）联机与通气检查

点击 Connect（图 2，A）（仪器图片会从灰色变为彩色，表明联机成功）；随之会弹出 Purge Check 提示窗（图 3-1），点击 Purge check 进行通气检查，根据提示操作：点击 Next（图 3-2）→打开卡夹门→点击 Next（图 3-3）→点击 Purge（30s 后自动停止）（图 3-4）→点击 Finish（图 3-5）。

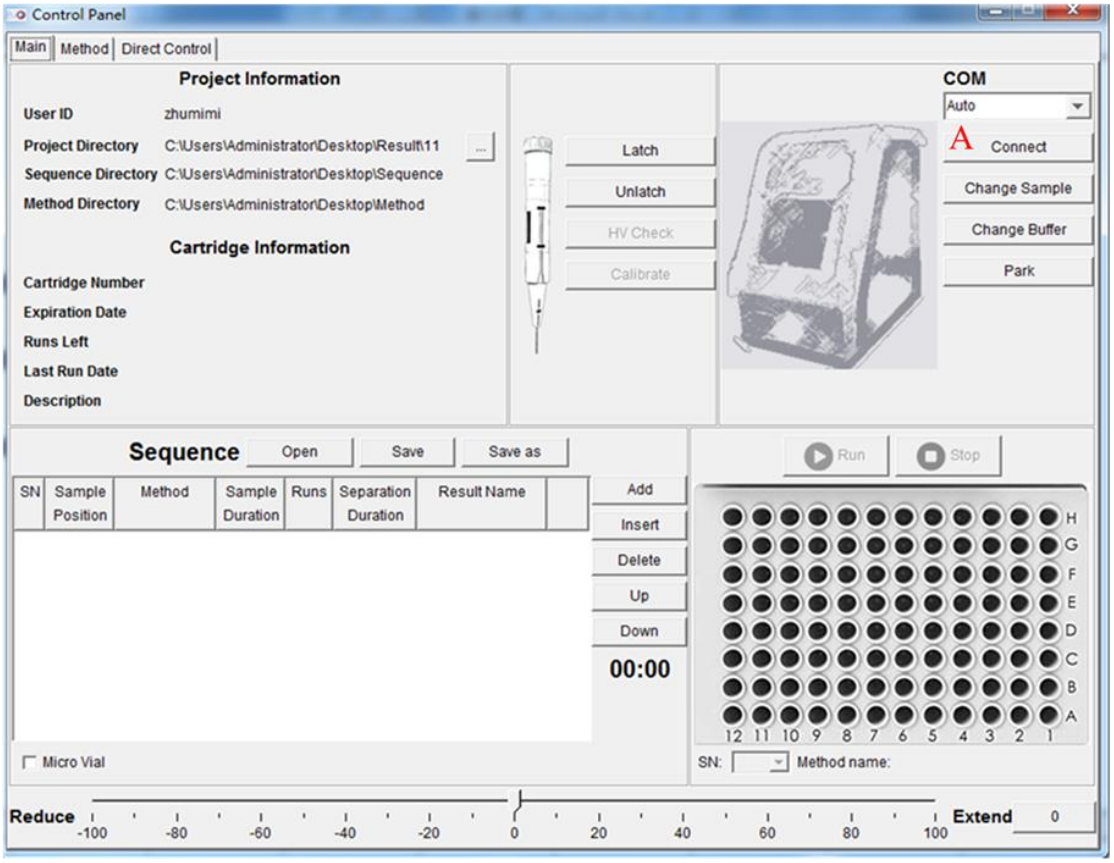


图 2 主控页面

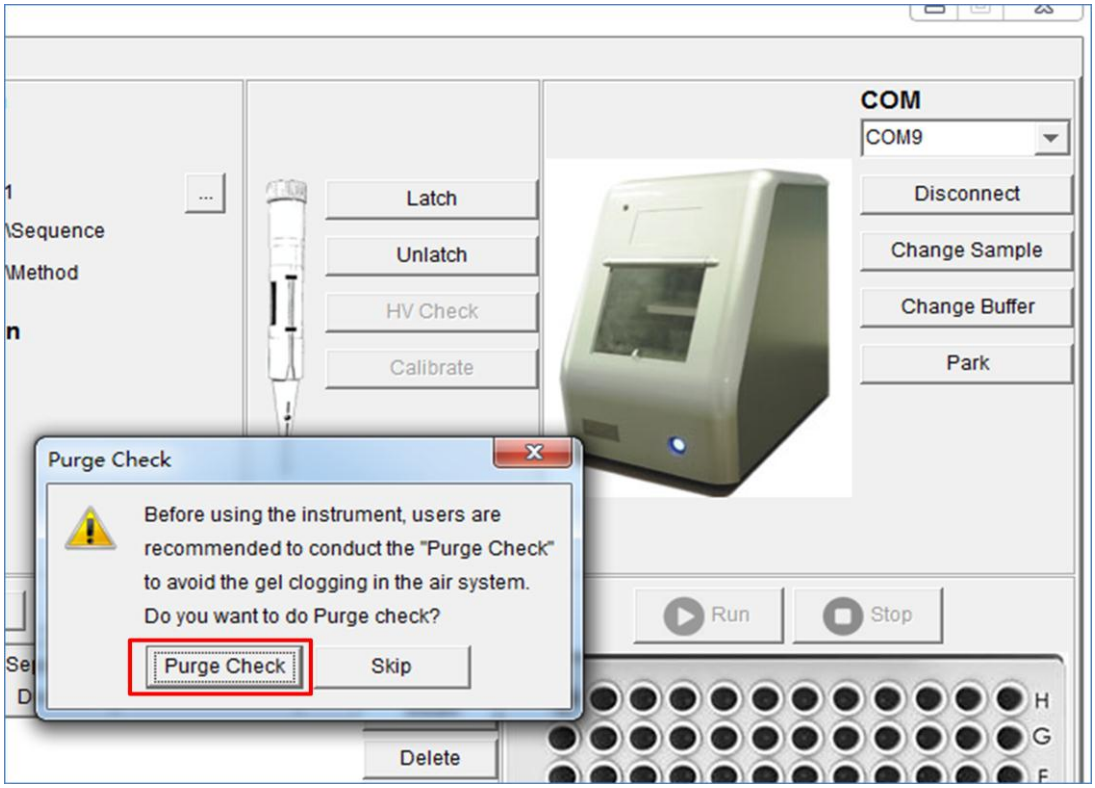


图 3-1 联机通气检查

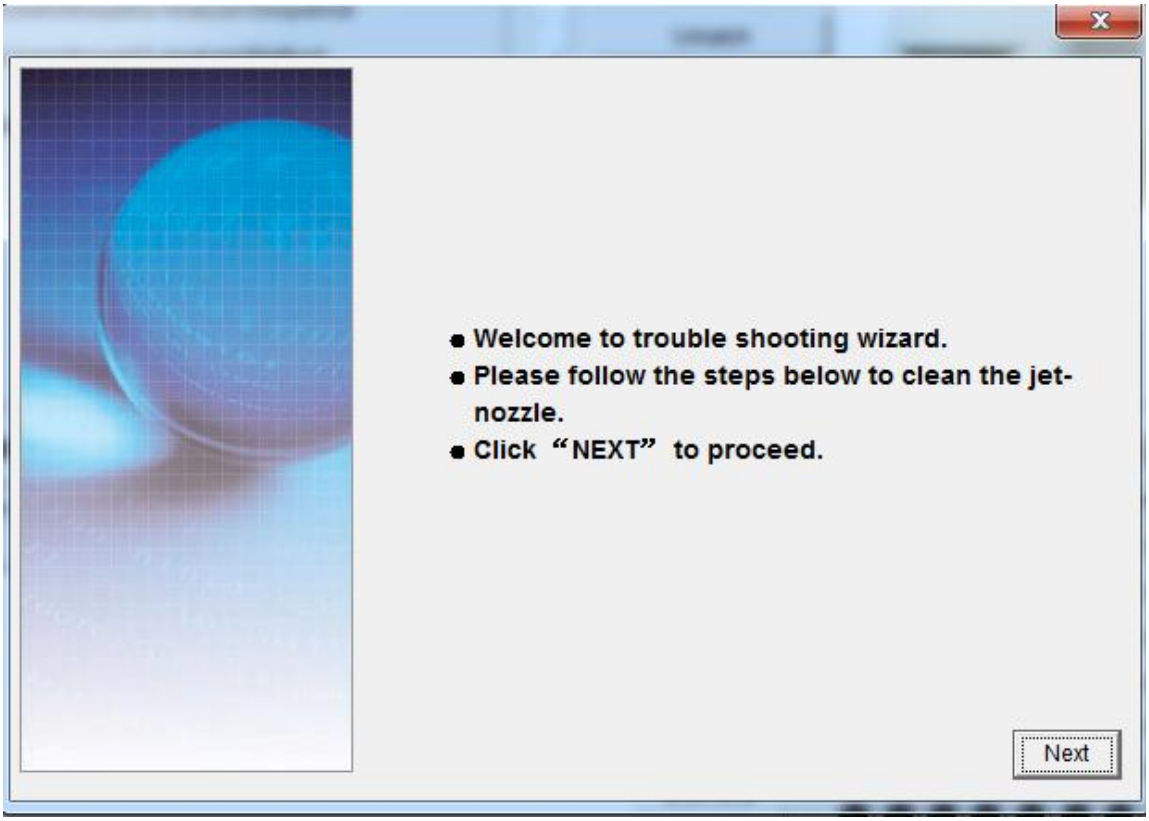

● Welcome to trouble shooting wizard.
● Please follow the steps below to clean the jet-nozzle.
● Click “NEXT” to proceed.
Next

图 3-2


1. Open the cartridge door.
2. Click “NEXT”.
Previous
Next

图 3-3

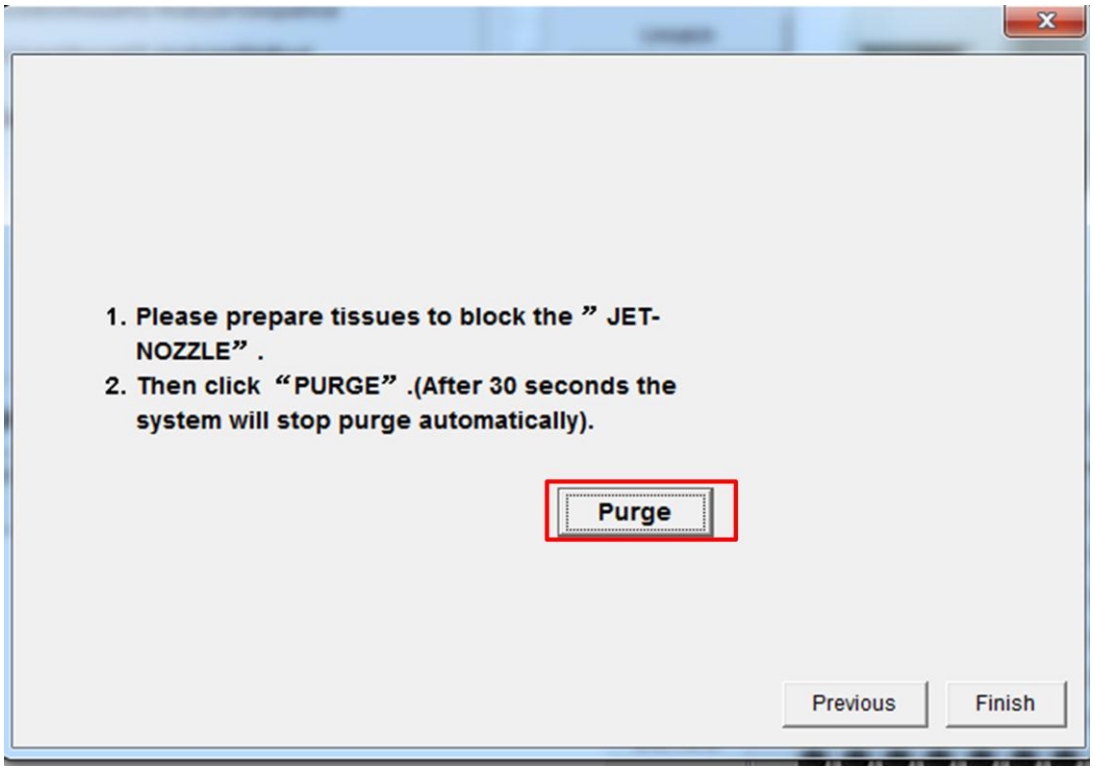


图 3-4

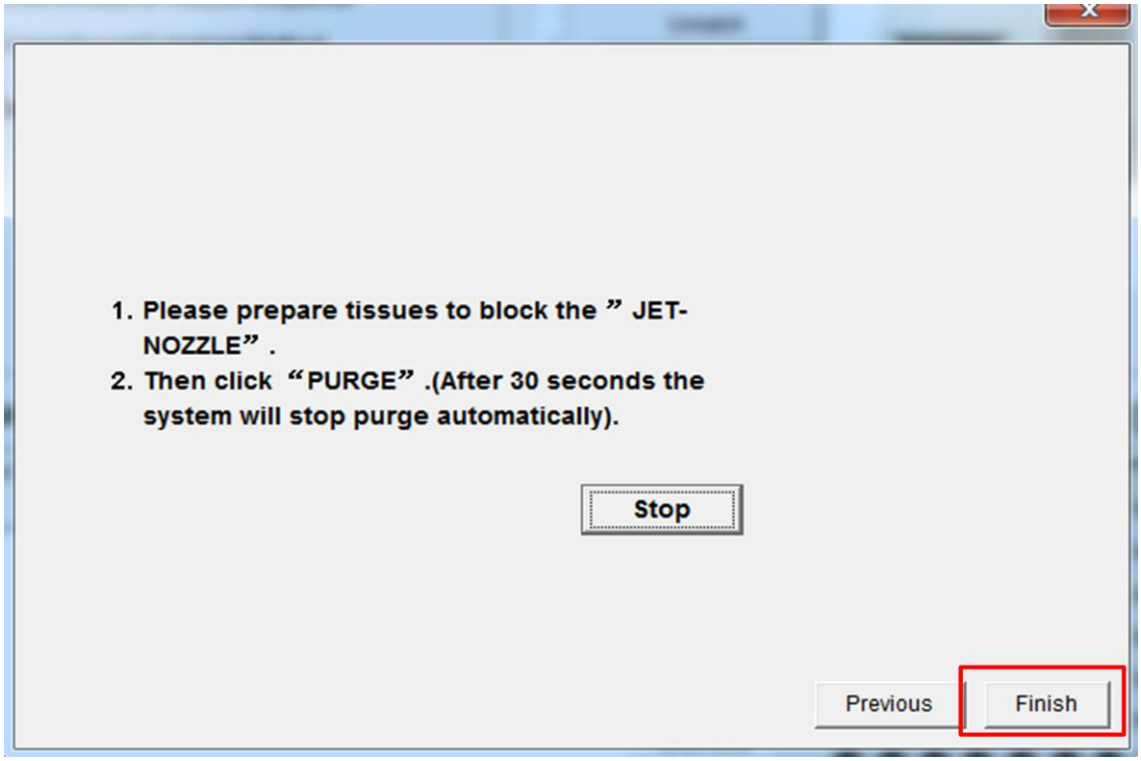


图 3-5

（2）放入缓冲液和 Marker

a、点击 Change Buffer（B），P（Park）、W （Wash）、C（Clean）位置为清洗槽，放蒸馏水，S 位置放 Separation Buffer（图 4）。

b、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（C109300-100）（图 5）。用食指和中指托住底部，用拇指将管子按压到底。

注：P、W、C 和 S 槽中的液面高度以缓冲液槽的刻度线处为宜，不能低于槽体积的 2/3；MA1、MA2、MB1 和 MB2 均取 20-30 μl，再覆盖 20-30 μl 矿物油（Mineral Oil）防止挥发，应避免气泡产生，若有气泡，请离心。

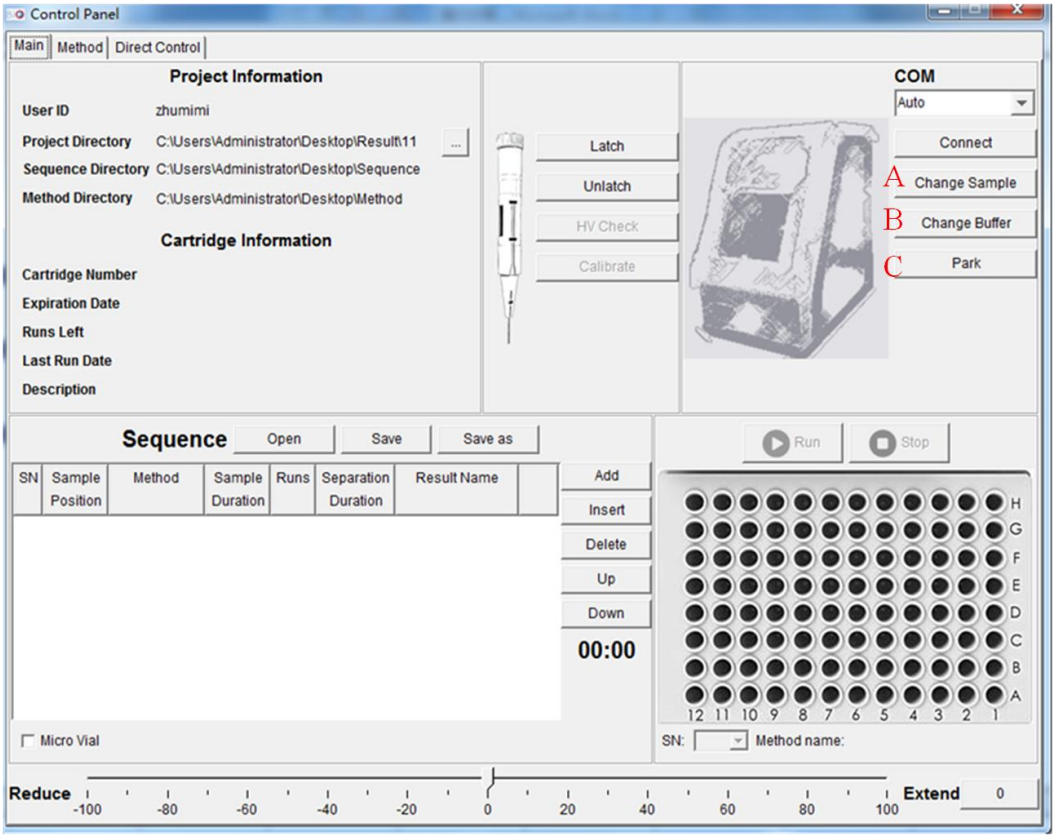


图 4 置换缓冲液和 Marker

图 5 缓冲液和 Marker 位置

（3）放入样品并复位

点击 Change Sample（A），放入样品，关上样品门；点击 Park（C），使样品盘复位

1.3 卡夹置入与校正（以 S2 卡夹为例）

（1）置入卡夹

打开仪器上方的卡夹门，放入卡夹（凹槽向前），关闭卡夹门（图 6）。

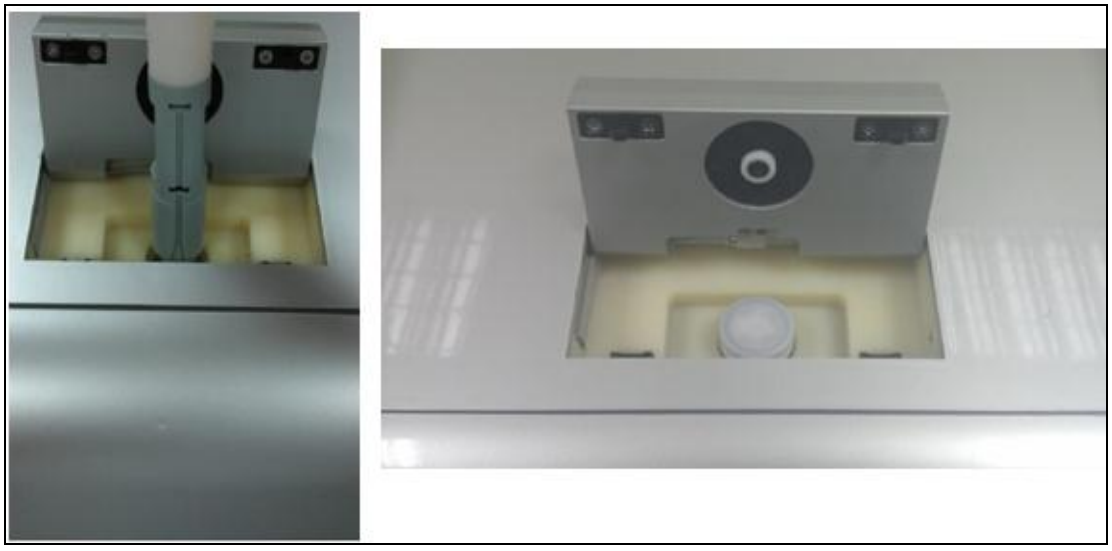


图 6 置入卡夹

（2）卡夹锁定和校准

点击 Latch，卡夹图片颜色变成彩色，左侧跳出卡夹信息（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 7）。

a、若置入的是新卡夹，则软件会在 Latch 后弹出 Calibration needed 窗口，点击‘确定’进行高压通胶检查（HV check）（图 8-9）。**注意：新卡夹需用大头针扎孔后再使用。**

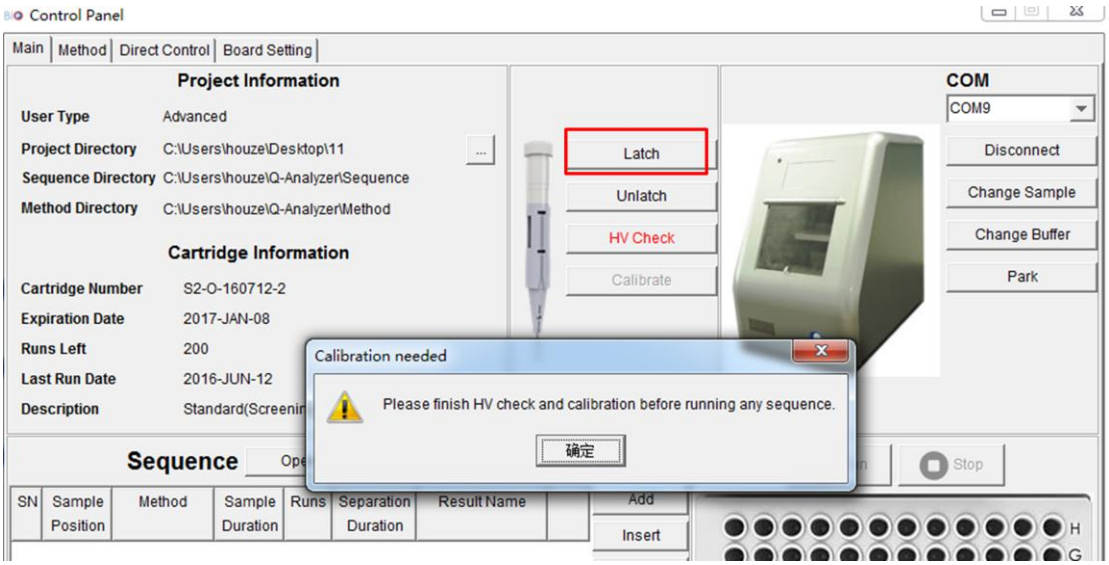


图 7 卡夹锁定

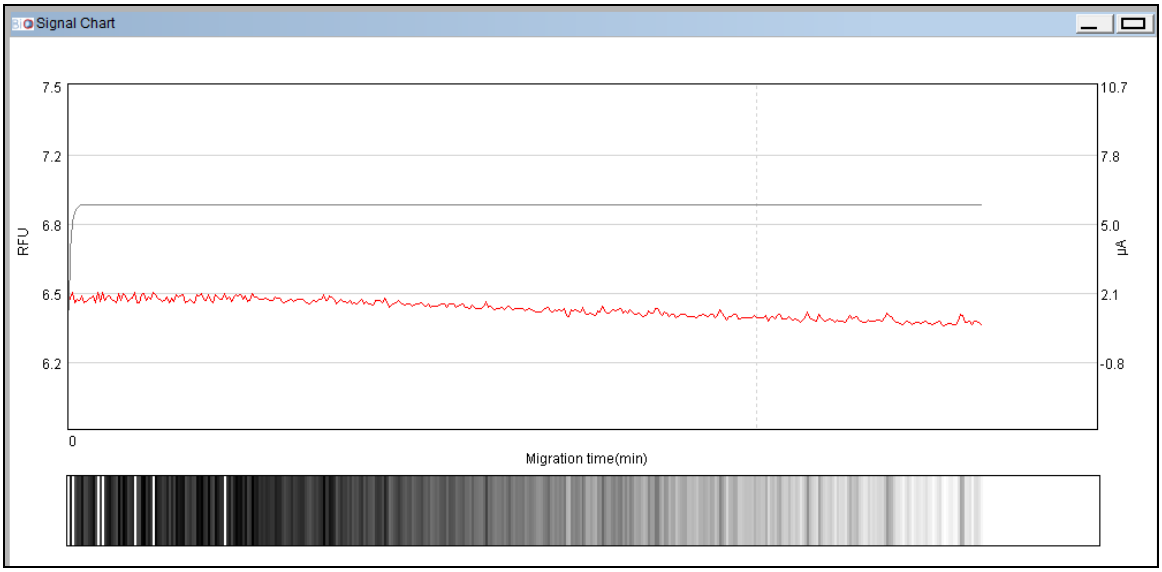


图 8 高压通胶检查信号图

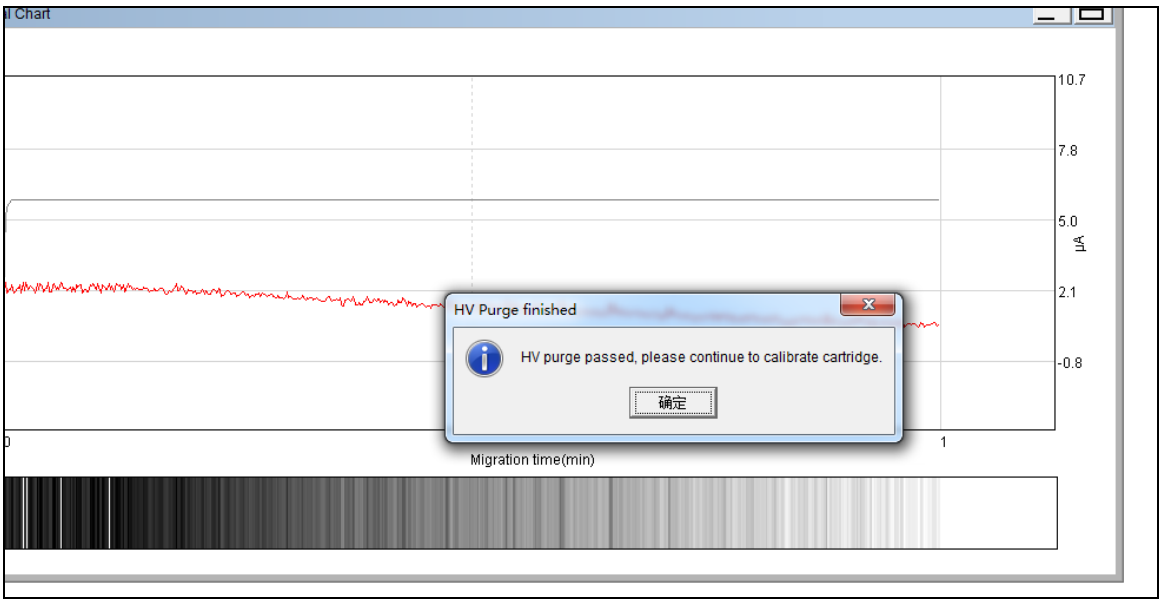


图 9 高压通胶检查通过

高压通胶检查（HV Check）通过后，点击 Calibrate，系统提示是否要进行卡夹校正（图 10），点击‘是’，系统默认卡夹初次校正的电压为 8KV。卡夹校正成功后点击‘确定’（图 11）。

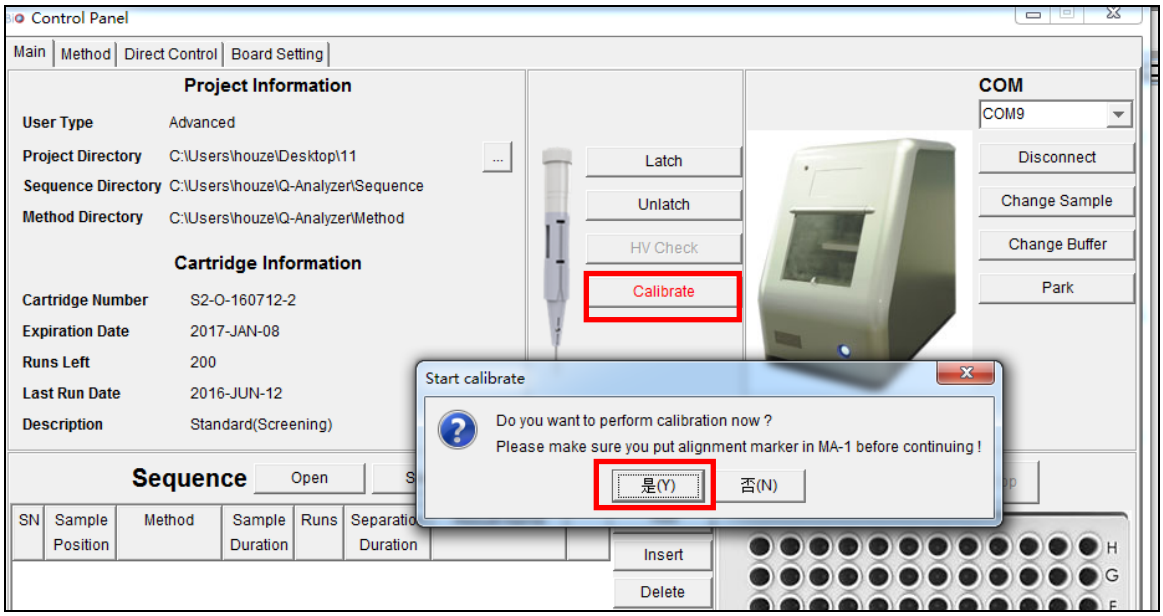


图 10 卡夹校正

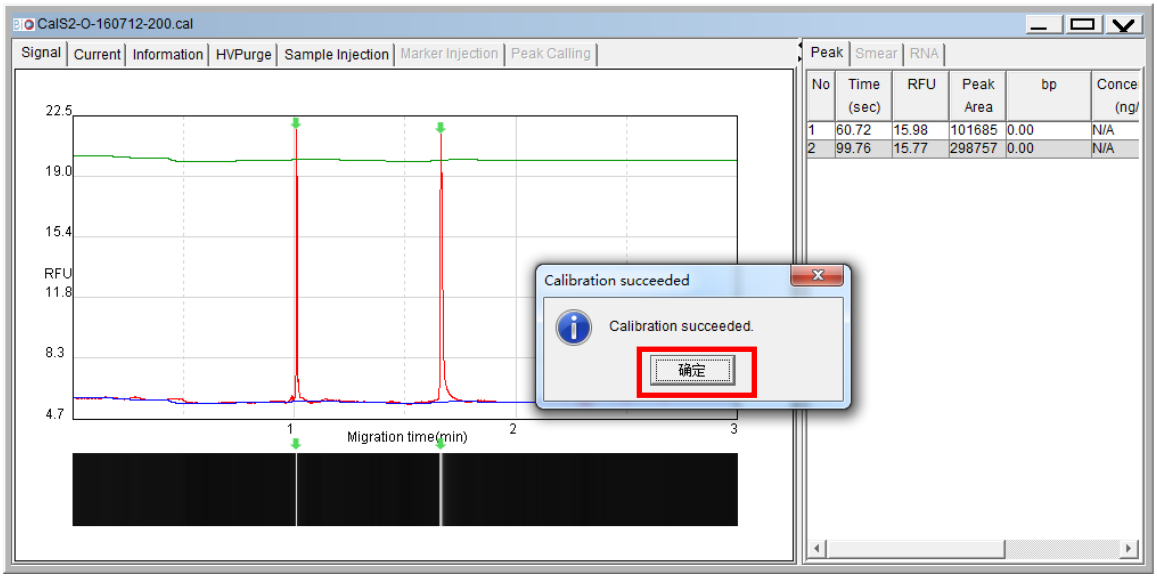


图 11 卡夹校正成功

b、若置入的是已用过的卡夹，则在点击 Latch 后，点击 Tool→Recalibrate 进行卡夹重新校正，在弹出的选项框中选择合适的 Voltage（电压）和 Alignment Marker（内参）类型，点击 Start Calibration（图 12），校正完成时会弹出 Calibration succeed 窗口，点击确定（图 13）。

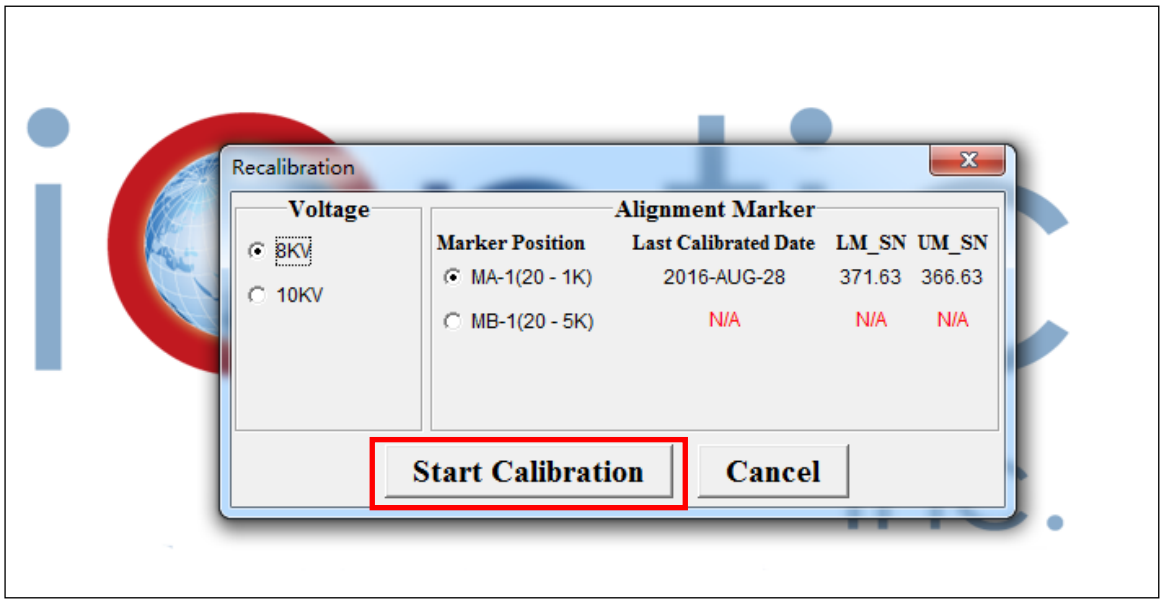


图 12 卡夹重校正（Recalibration）

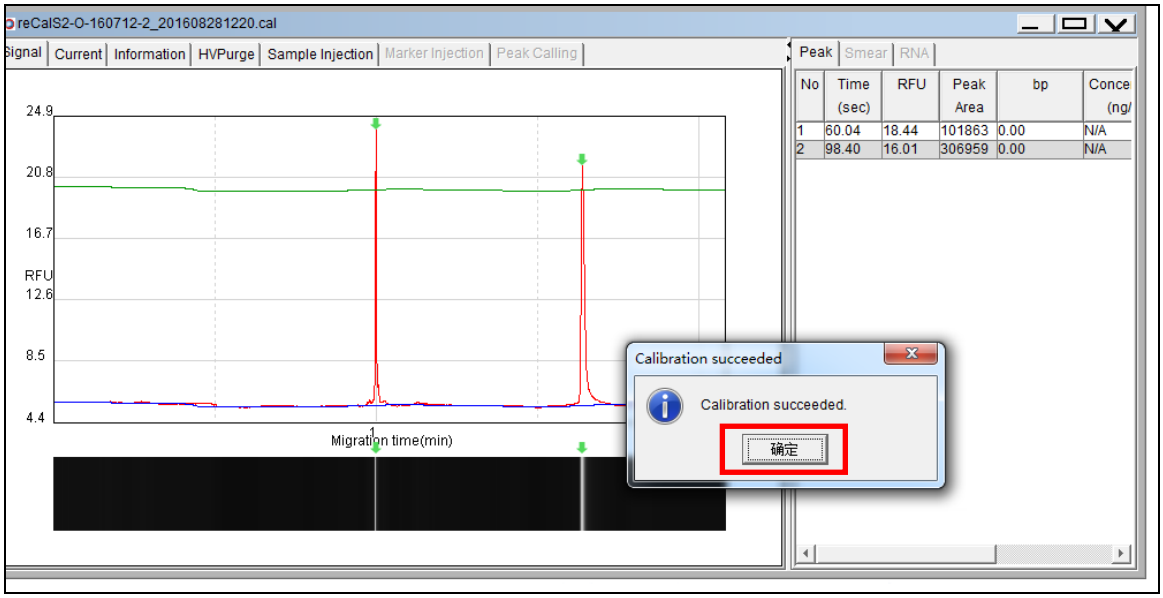


图 13 卡夹重校正成功

1.4 程序设定（图 14）（以 S2 卡夹为例）

（1）单击 Sample Position 下方的空白格（A），弹出 96 孔盘模拟图（图 15），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；

（3）单击 Method 下方的空白格 (B)，弹出测试方法选择框（图 16），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），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）；

（4）在 Result Name 里输入一批样品的名字，在下面选项框中选择 Sample ID；

（5）点击小计算器图标（C），弹出 Calculate Flow 框，文库样本的建议参数如图 17 所示。勾选 Calculate，点中 Create size marker，下面的 Size marker injection time 选择 5s，点击 OK（为保证实验结果的准确性，建议每天或每批样本新建一个 Size Marker）；

（6）程序设好后，点击 Run，开始电泳分离（图 18）。使用者可点击 Real time 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！**

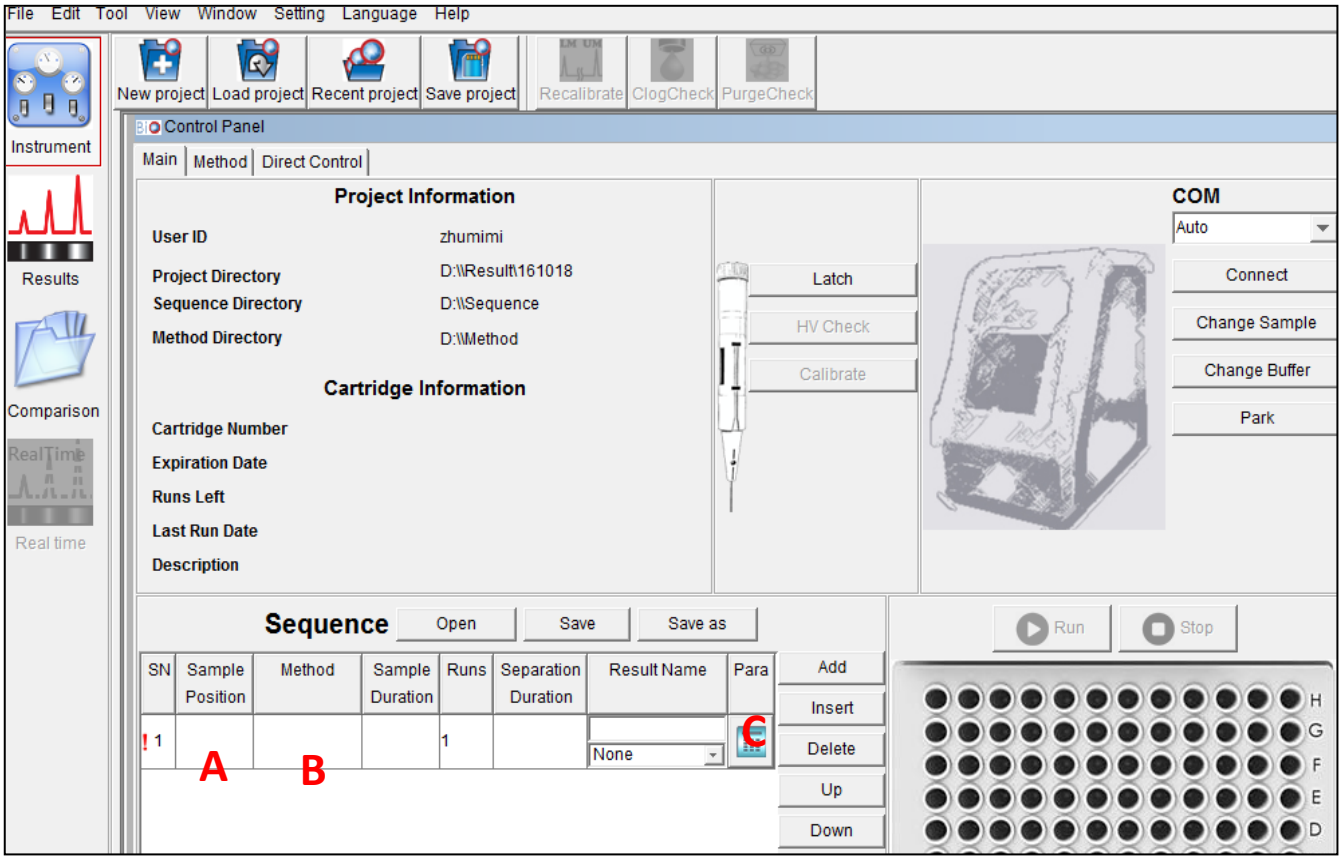


图 14 程序设定

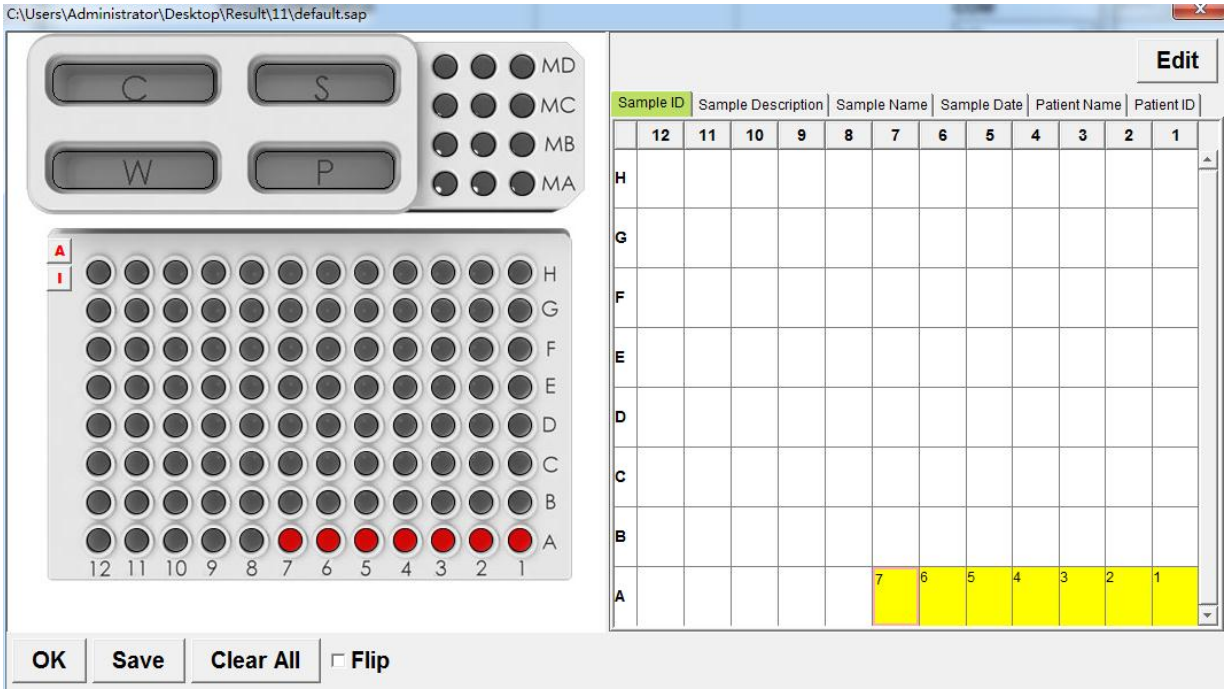


图 15 样品位置选择

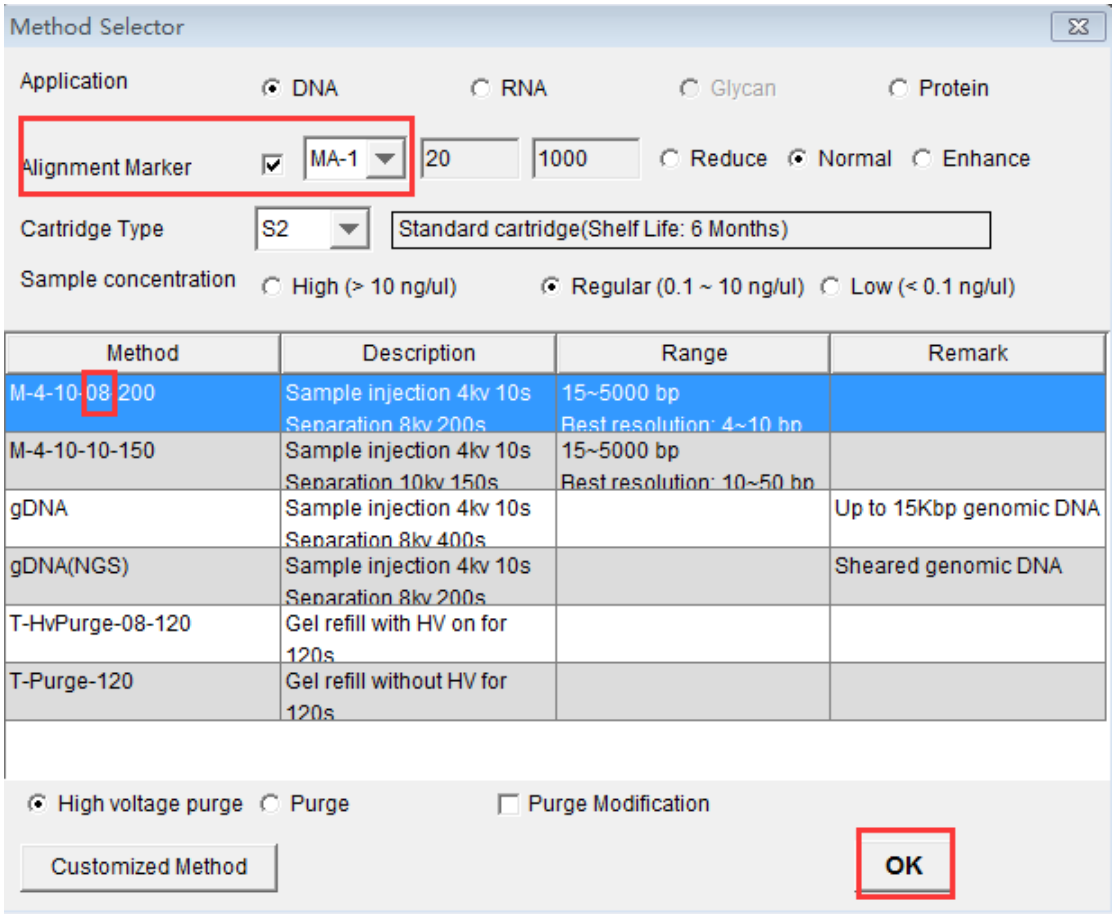


图 16 电泳方法选择

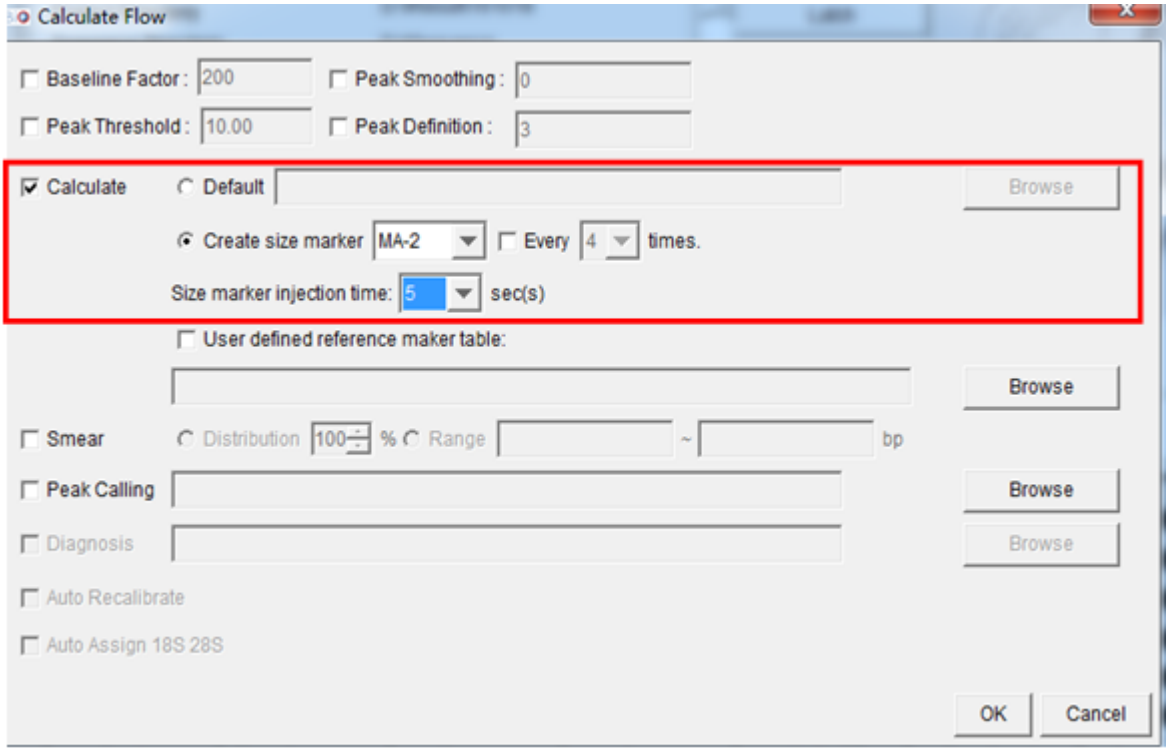


图 17 Size marker 的选择

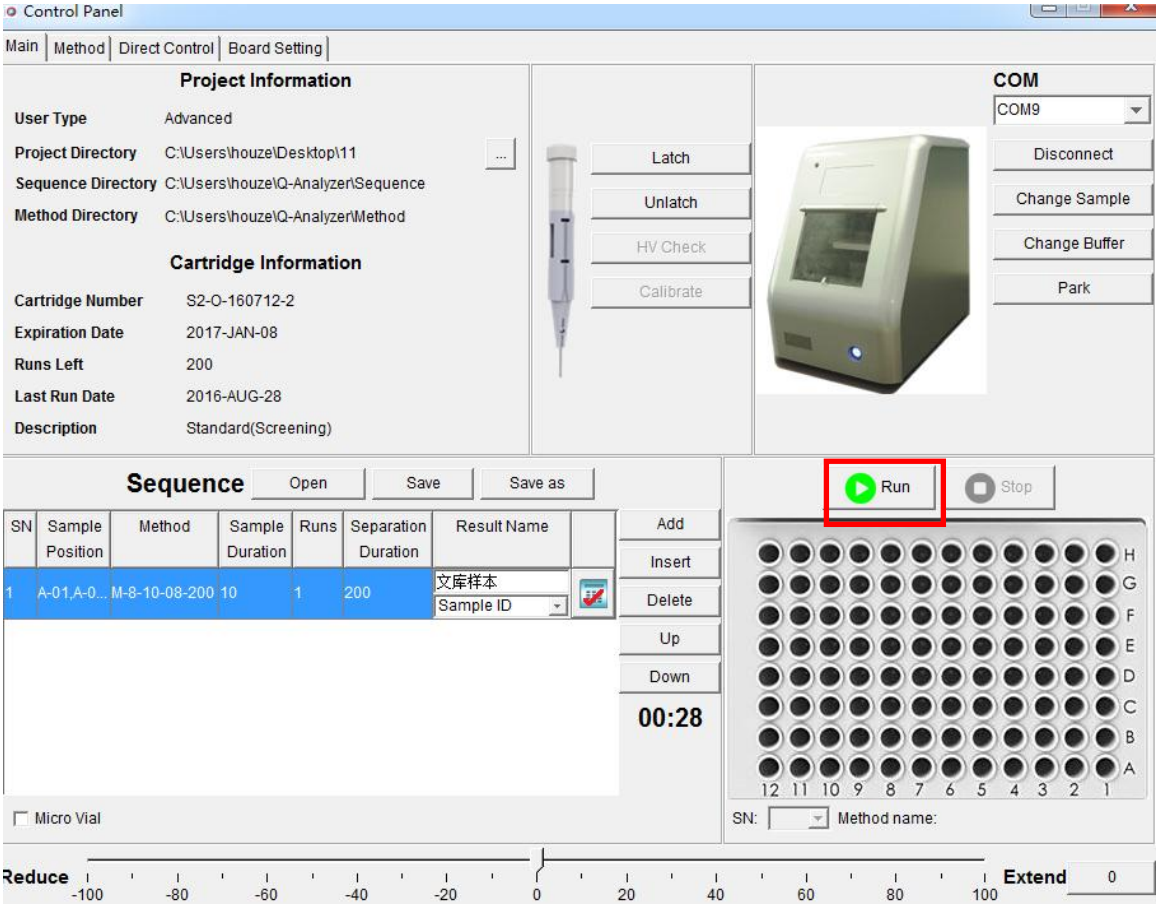


图 18 启动程序

2 数据结果分析

2.1 打开检测结果

样品检测完成后，点击 Open file，选中目标结果文件，打开（图 19-20）。

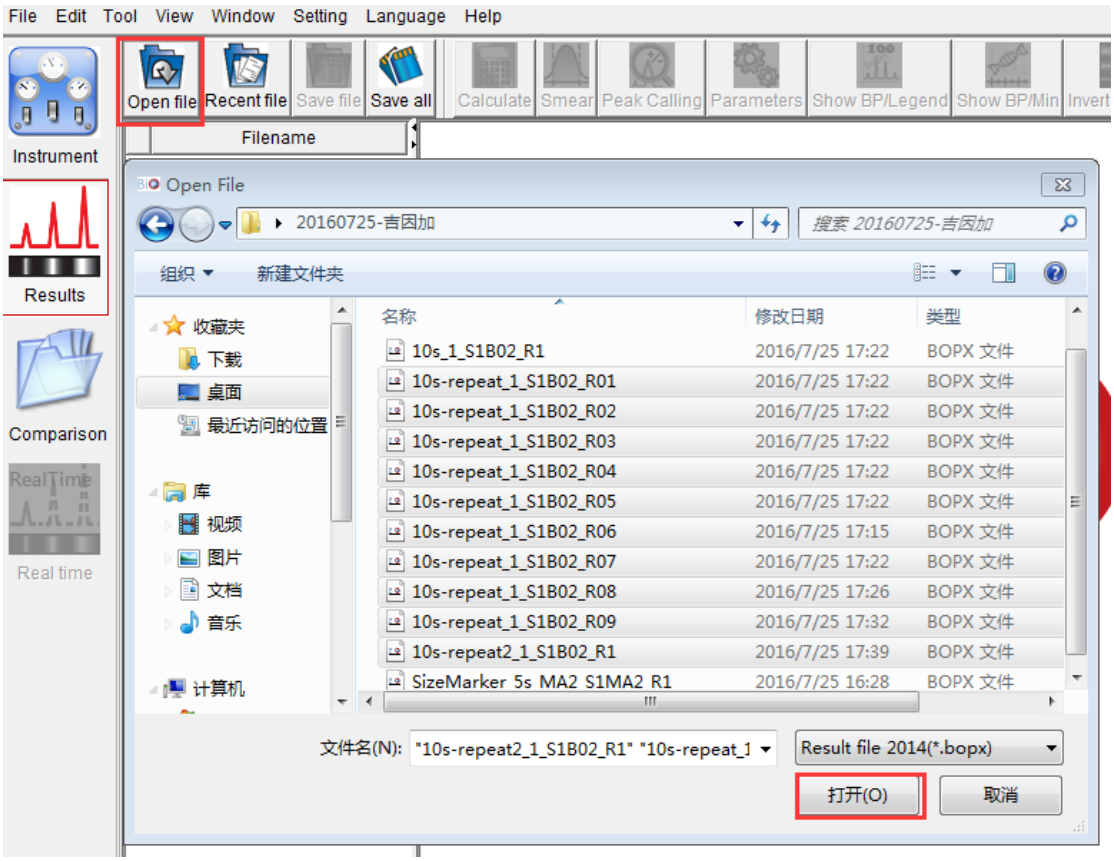


图 19 打开结果文件

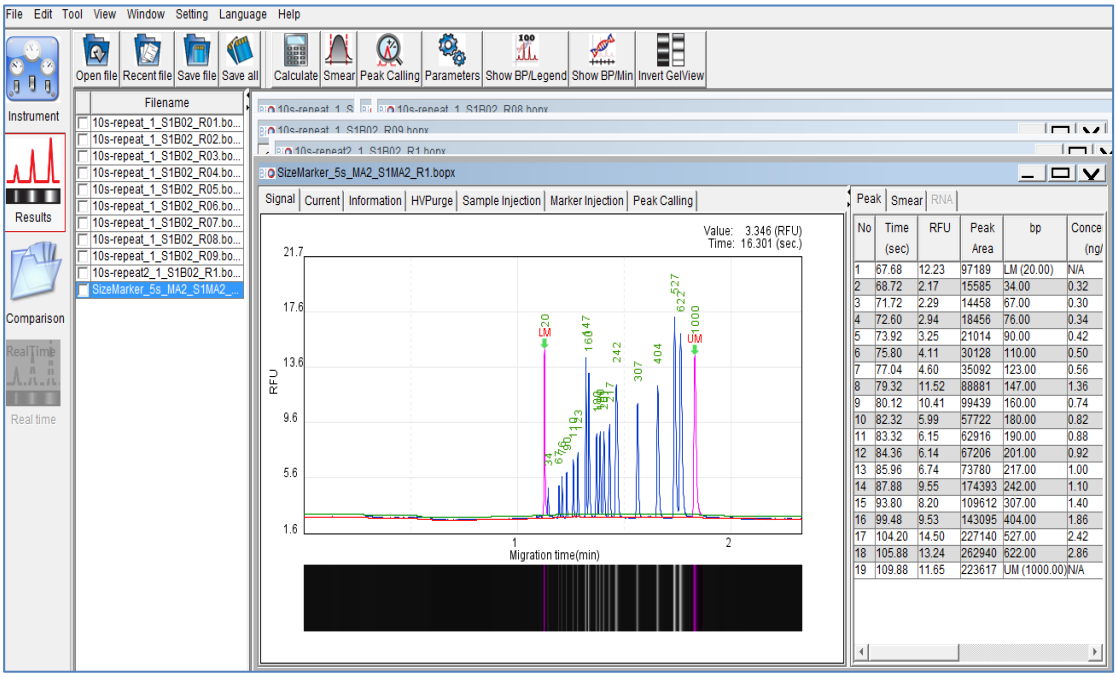


图 20 结果文件显示框

2.2 新建比对档

点击 Comparison→New Folder，用鼠标将计划处理的结果拖进 New folder 框内（图 21）。勾选 Time Alignment（时间对齐），点击 Apply all；勾选 Signal Alignment（信号基底值对齐），点击 Apply all；Signal offset 调为‘-1’，点击 Apply all（可点击多次），调整结果间距（图 22）。

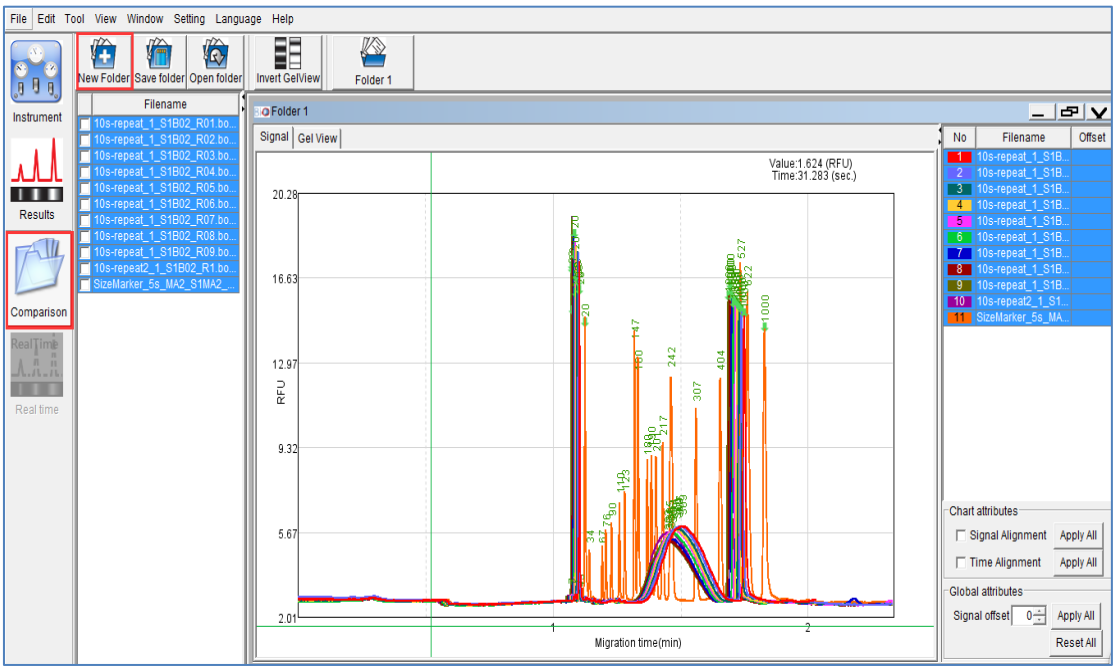
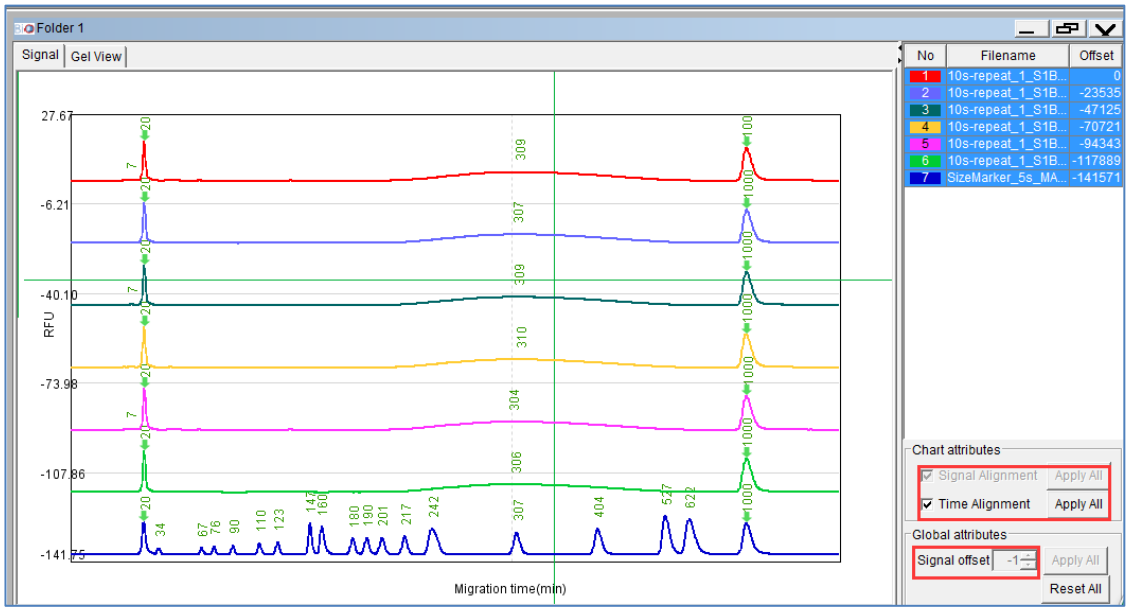


图 21 新建比对档（New Folder）



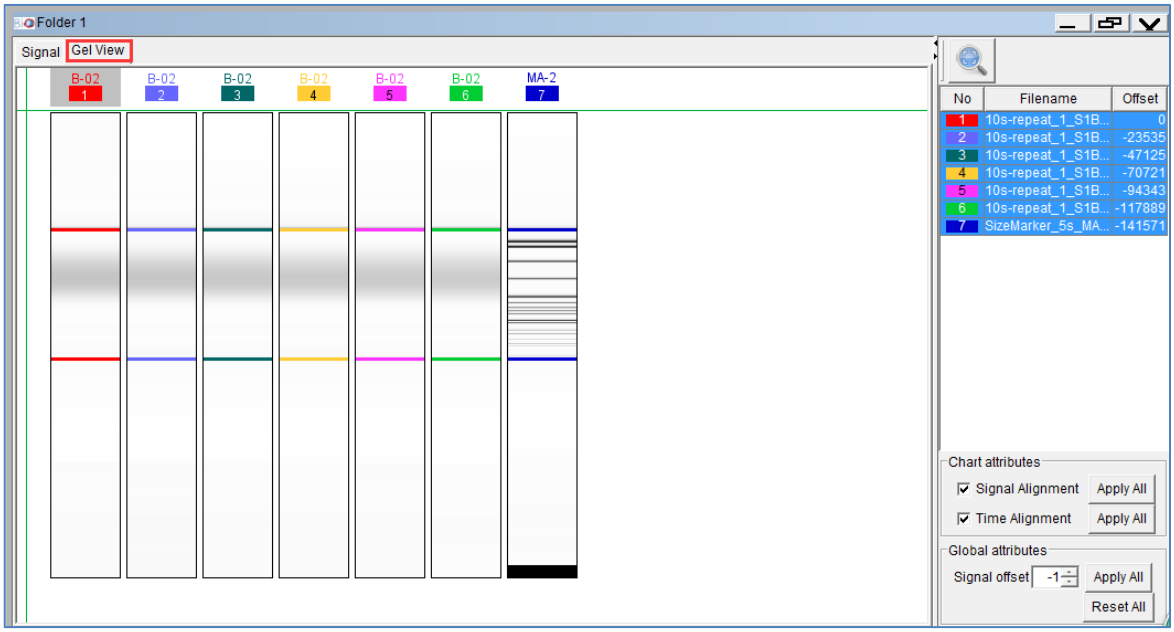


图 22 结果比对（峰图&胶图）

2.3 导出数据

（1）导出峰图和胶图

于空白处右击，选择 Export signal chart，导出峰图。点击左上角的 Gel View，可展示模拟胶图，于空白处右击，选择 Export gel view，导出胶图（图 23）。

（2）导出报告

于空白处右击，选择 Export report，选择导出报告的格式（Report Type）；若检测的是 PCR 产物，则选择 Standard(DNA)，若检测的是文库样本，需要 Smear 信息，则选择 Smear，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。再保存即可（图 24）。

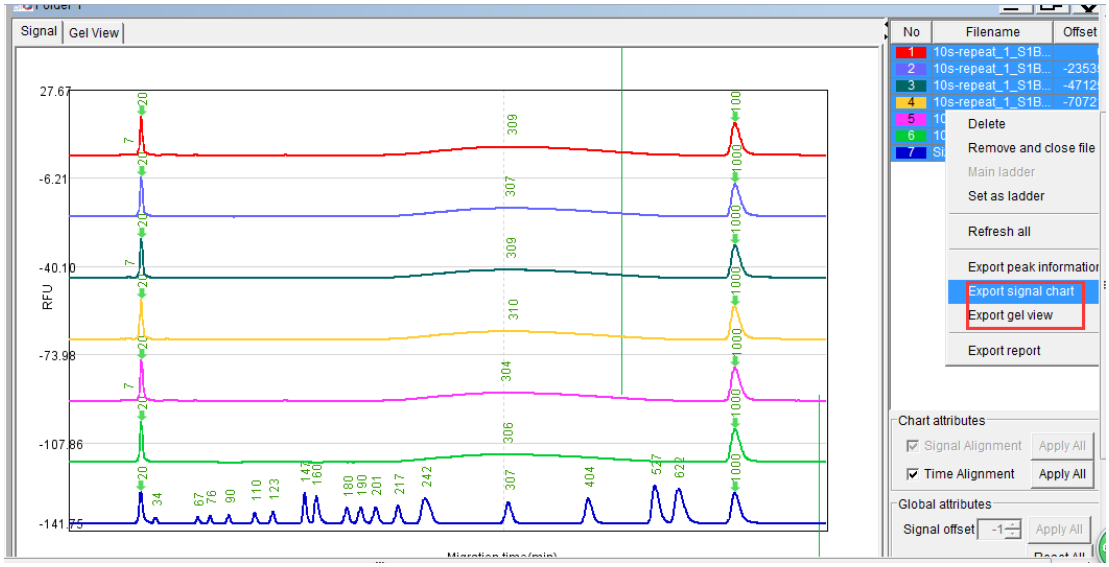


图 23 导出结果图片

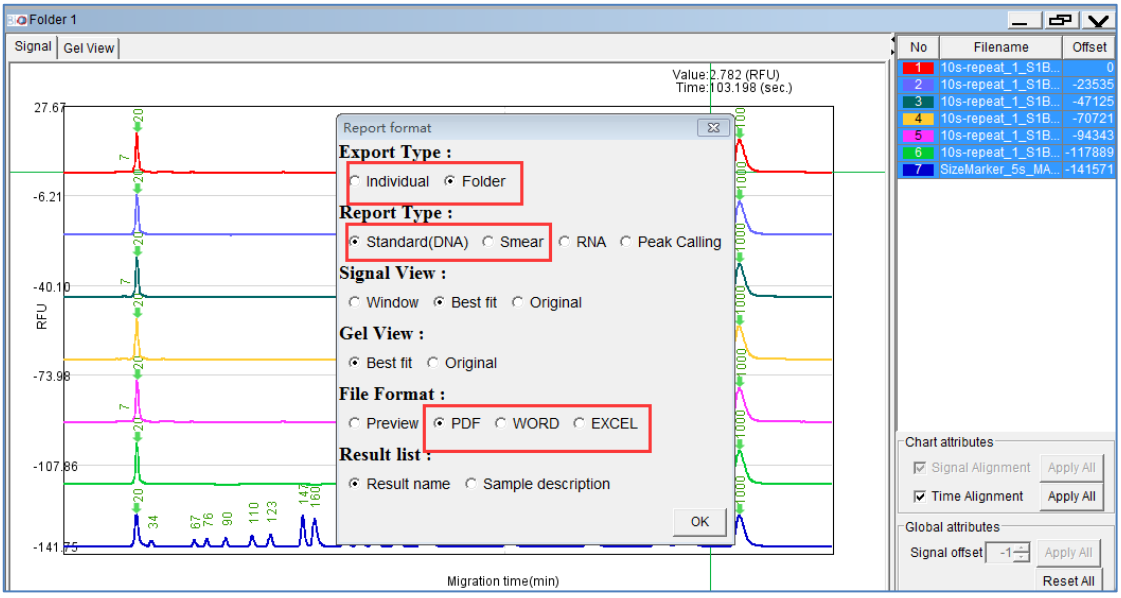


图 24 导出报告

附： 5K Size marker 的构建（以 S1 卡夹为例）

（1）在 Latch 卡夹后，进行卡夹校准时，Alignment marker 需选择 MB-1（如下图 1）。

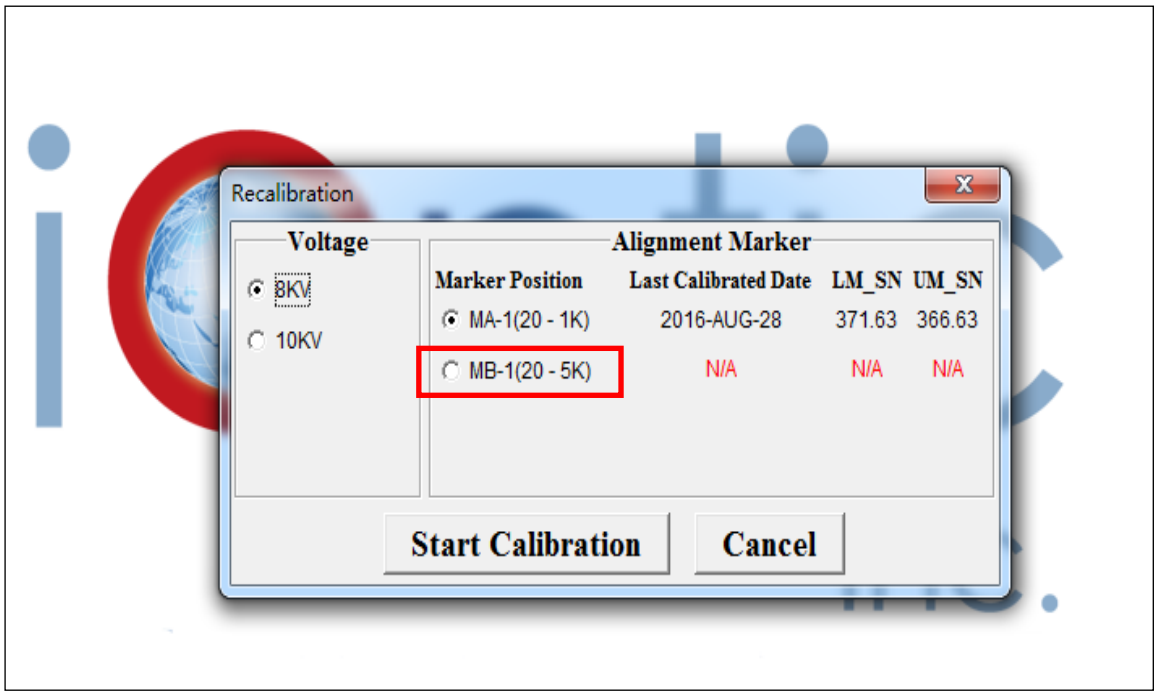


图 1　5K marker 建立时的卡夹校准

（2）校准完成后，Add 一个新程序（图 2），点击 Sample Position 下方空白格子（B 处），在弹出的窗口中选中 MB2 孔（图 3），点击 OK。

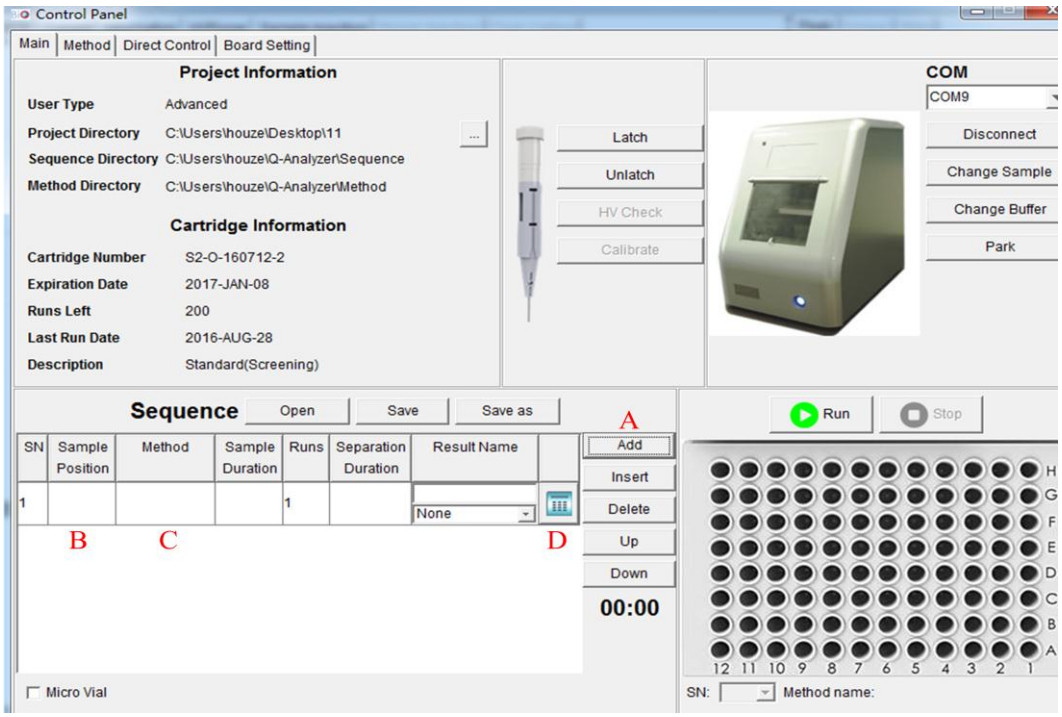


图 2　添加新程序

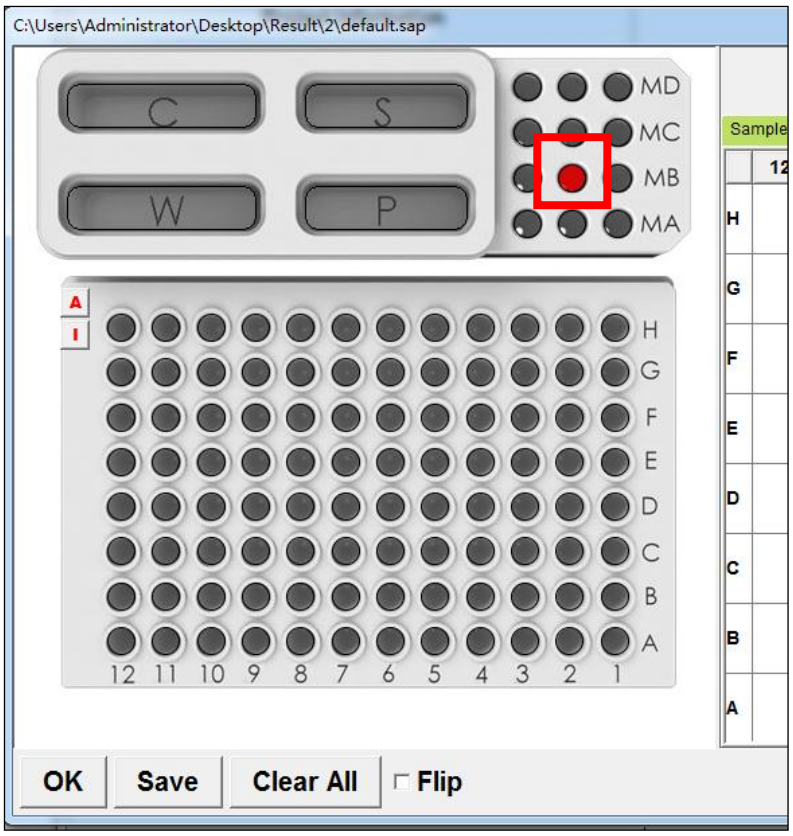


图 3　MB2 孔的选择

（3）点击 Method 下方空白格子（C 处），弹出检测方法选择框（图 4），Alignment Marker 选择 MB1，选择 Method 时也同样注意电压要与卡夹校准时的电压一致，选好后点击 OK；Sample Duration（吸样时间）设置为 5s、其他默认；就可以点击 Run。

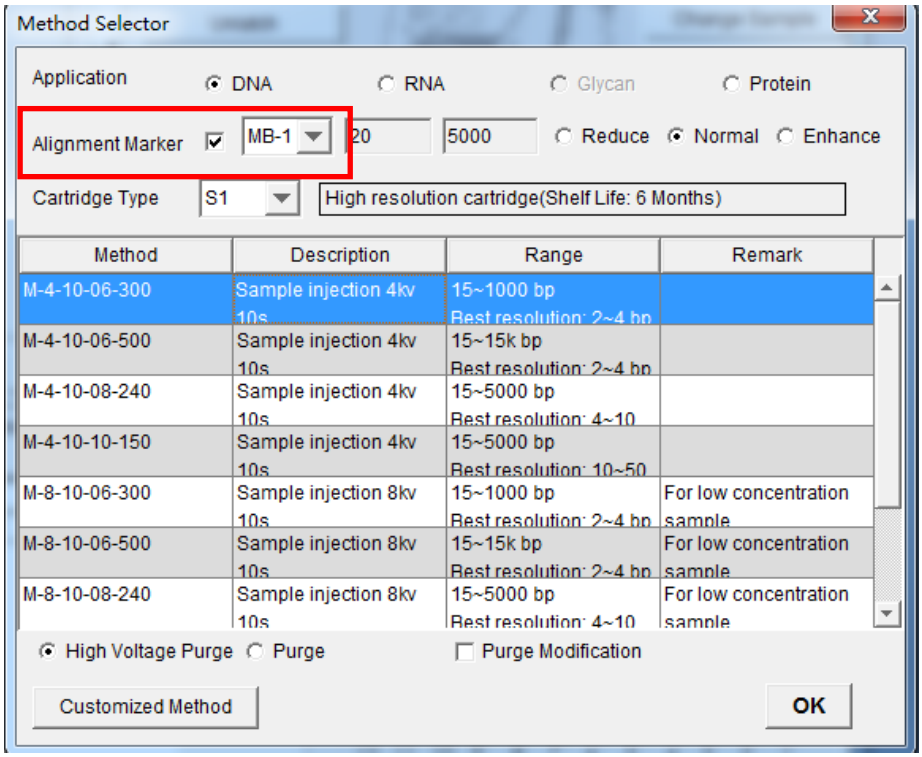


图 4 检测方法选择

（3）结果处理

以上程序完成后得到的结果图（图 5），只有峰型，没有片段 bp 大小，需手动赋值。

a、先删除 A 区数据栏里的杂峰（RFU 值小于 4 的均是杂峰），也可通过挨个点击，看箭头所指来确定是否为杂峰。

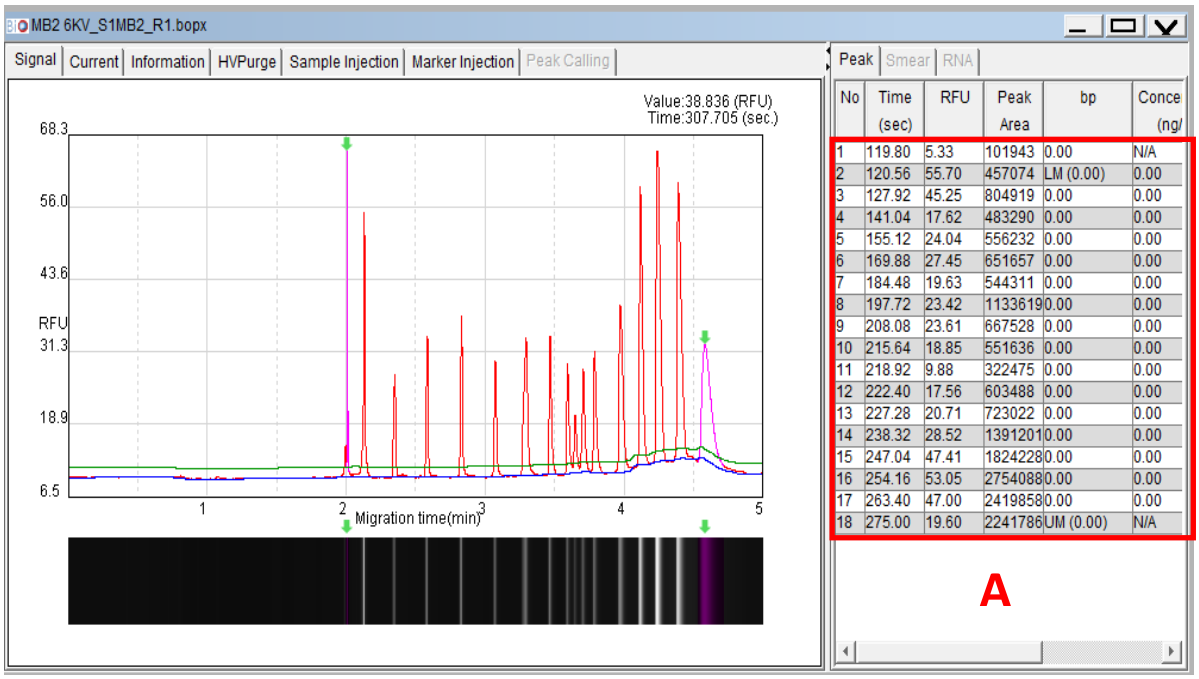
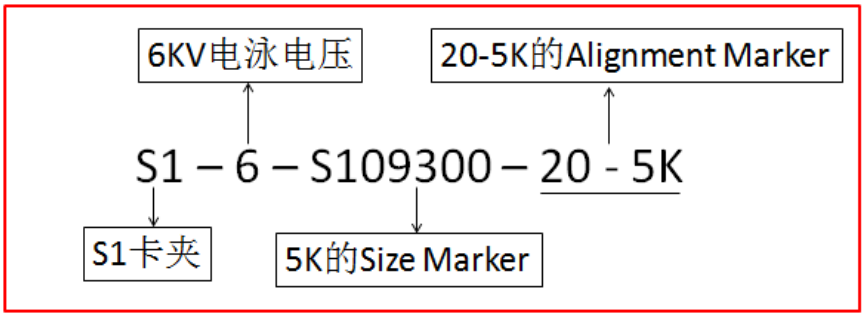


图 5 MB2 初始结果

b、点击 Edit→Ref Marker（图 6），弹出图 7，点击左上角 Load，弹出软件自带的所有 Marker 组合，根据所用的卡夹类型，所用电压和选用的 Marker 选择对应的 Ref Marker（图 8），此处以 S1-6-S109300-20-5K.ref 为例：

（表示 S1 卡夹，6KV 电压下 5K 的 Size Marker 和 5K 的 Alignment Marker 组合下跑出的结果）；



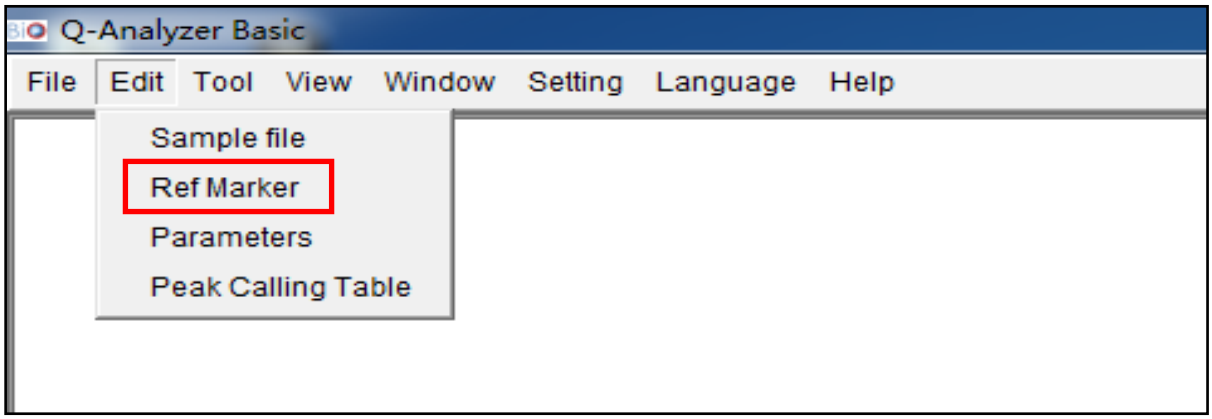


图 6 点击 Ref Marker

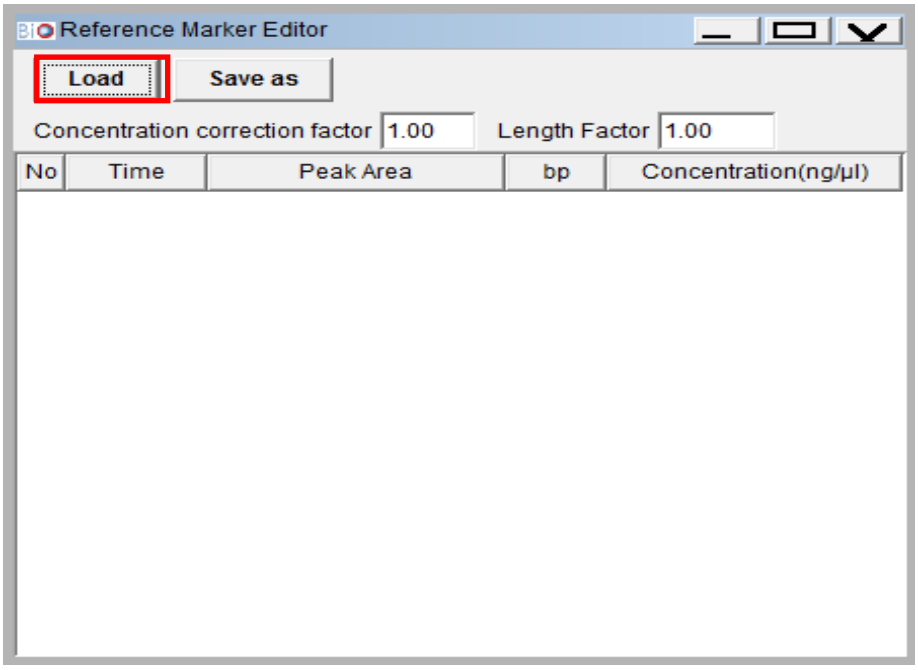


图 7 Reference marker editor

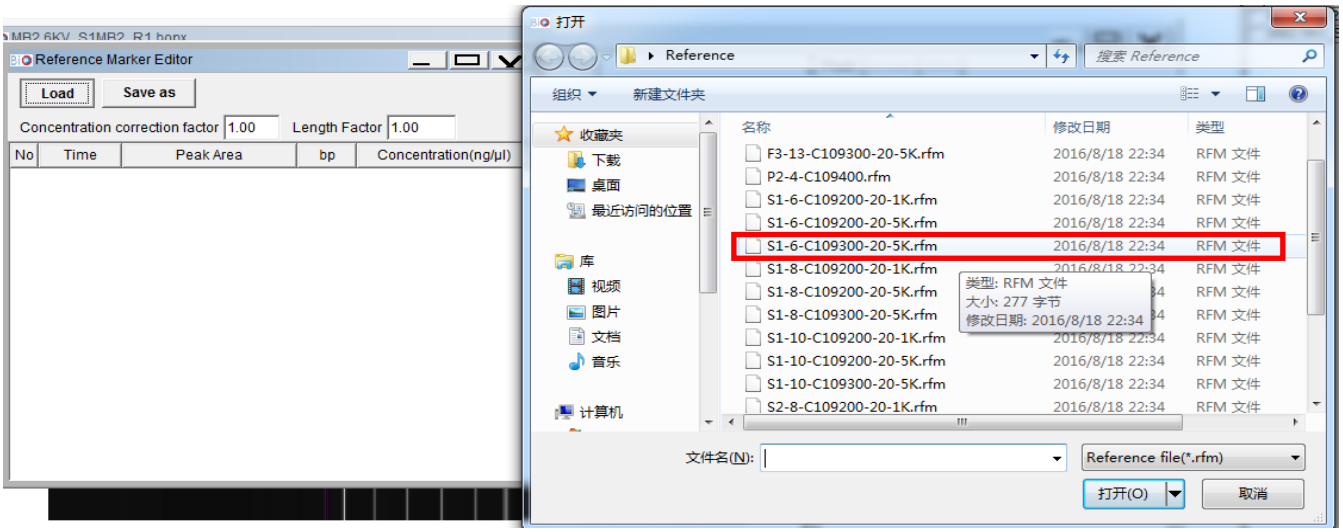
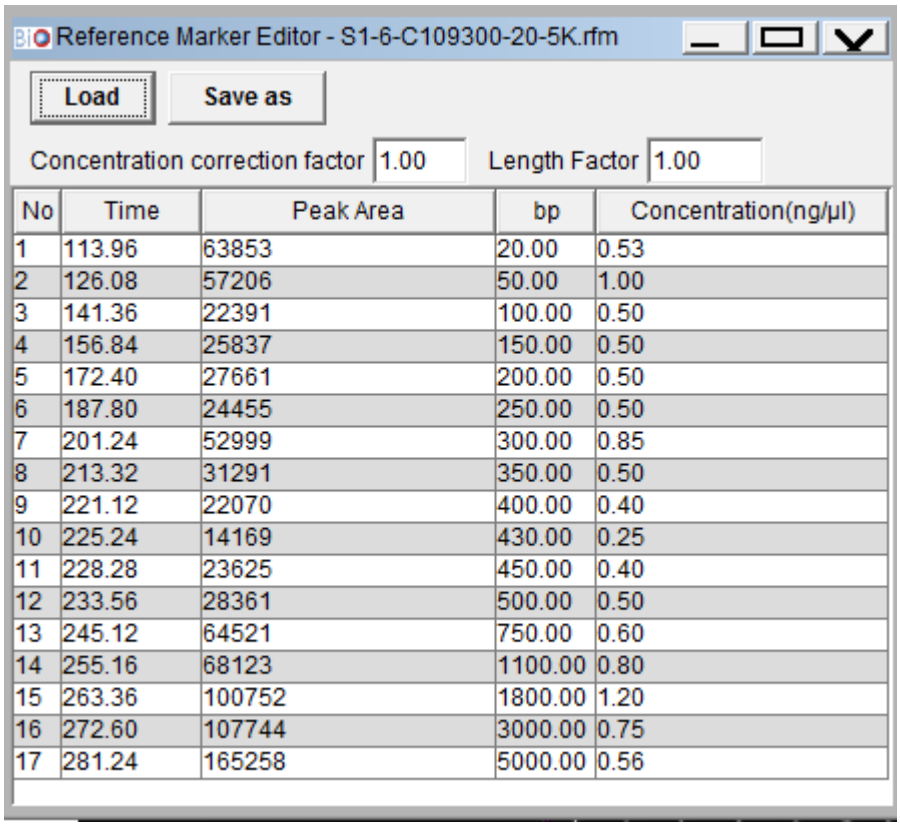


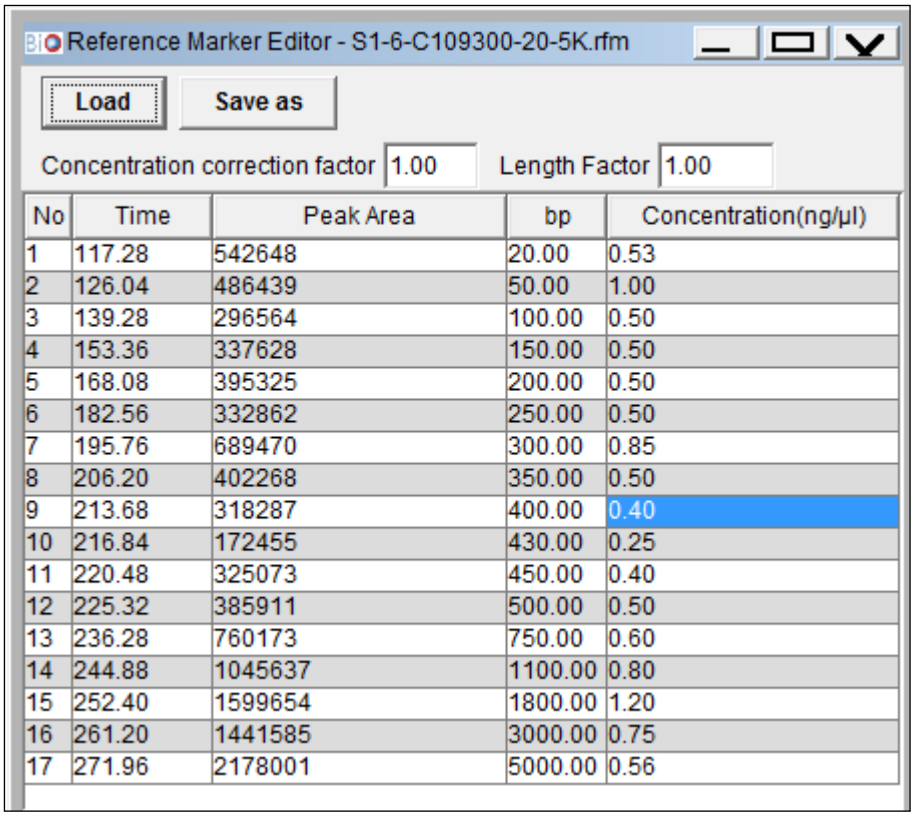
图 8 选择合适的 Reference Marker 文件打开

c、选中对应的 Ref Marker 打开后得图 9，Ref Marker 为 17 条带，需与图 5（A 区）的条带数一致，于图 5（A 区）任意处右击，选择 Copy reference marker data，到图 9 数据栏任意处右击，选择 Paste reference marker data，即可将新跑的 MB2 的出峰时间和信号值粘贴到具有片段大小的 Ref Marker 里，构建出当下实验可用的 MB2（图 10），再右击图 10 左上方的 Save as，将建好的 MB2 数据另存为新的 5k 的 Size Marker，用于后面样品产物大小的计算。



No	Time	Peak Area	bp	Concentration(ng/μl)
1	113.96	63853	20.00	0.53
2	126.08	57206	50.00	1.00
3	141.36	22391	100.00	0.50
4	156.84	25837	150.00	0.50
5	172.40	27661	200.00	0.50
6	187.80	24455	250.00	0.50
7	201.24	52999	300.00	0.85
8	213.32	31291	350.00	0.50
9	221.12	22070	400.00	0.40
10	225.24	14169	430.00	0.25
11	228.28	23625	450.00	0.40
12	233.56	28361	500.00	0.50
13	245.12	64521	750.00	0.60
14	255.16	68123	1100.00	0.80
15	263.36	100752	1800.00	1.20
16	272.60	107744	3000.00	0.75
17	281.24	165258	5000.00	0.56

图 9 选中的 Reference Marker 文件的具体信息



No	Time	Peak Area	bp	Concentration(ng/μl)
1	117.28	542648	20.00	0.53
2	126.04	486439	50.00	1.00
3	139.28	296564	100.00	0.50
4	153.36	337628	150.00	0.50
5	168.08	395325	200.00	0.50
6	182.56	332862	250.00	0.50
7	195.76	689470	300.00	0.85
8	206.20	402268	350.00	0.50
9	213.68	318287	400.00	0.40
10	216.84	172455	430.00	0.25
11	220.48	325073	450.00	0.40
12	225.32	385911	500.00	0.50
13	236.28	760173	750.00	0.60
14	244.88	1045637	1100.00	0.80
15	252.40	1599654	1800.00	1.20
16	261.20	1441585	3000.00	0.75
17	271.96	2178001	5000.00	0.56

图 10 新构建的 MB2 的结果