

2017 年 9 月

# QIAasymphony<sup>®</sup> RGQ 應用表

*artus*<sup>®</sup> EBV QS-RGQ 試劑組 (檢體類型：血漿)

IVD



REF

4501363ZH-TW *artus* EBV QS-RGQ 試劑組，第 1 版。



執行檢測前，請在 [www.qiagen.com/products/artusebvpcrkitce.aspx](http://www.qiagen.com/products/artusebvpcrkitce.aspx) 查閱是否有可用的新電子標示修訂版。

## 一般資訊

試劑組	artus EBV QS-RGQ 試劑組，第 1 版 (目錄編號 4501363)
已驗證檢體材料	人類 EDTA 血漿
前端純化	QIAasymphony DSP 病毒/病原體 Midi 試劑組 (目錄編號 937055)
檢體容量 (包含超額容量)	1200 µl
分析參數集	artus_EBV_plasma1000_V5 MA_artus_EBV_plasma1000_V5*
預設分析對照集	Cellfree1000_V7_DSP_artus_EBV
析出液容量	60 µl
所需軟體版本	版本 4.0 或更高
主要混合物容量	30 µl
模板容量	20 µl
反應次數	6-24
在 AS 模組上的執行時間	6 次反應：約 9 分鐘 72 次反應：約 35 分鐘

\* 以 artus CMV QS-RGQ 試劑組載入 CMV RG IC 用於純化過程和分析設定之多重分析執行操作程序。

## 需要但並未提供的材料

### 純化試劑組

- QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (QIAasymphony DSP 病毒/病原體 Midi 試劑組)  
(目錄編號 937055)

### 適用於 QIAasymphony SP 的轉接器

- Elution Microtube Rack QS (析出液微量離心管架 QS) (冷卻轉接器，EMT，v2，Qsym，目錄編號 9020730)

- 轉移框架
- Tube Insert 3B (試管襯墊 3B) (襯墊, 2.0ml v2, 檢體放置架(24), Qsym, 目錄編號 9242083)

#### 適用於 QIASymphony SP 的耗材

- Sample Prep Cartridges, 8-well (檢體製備匣, 8 孔) (目錄編號 997002)
- 8-Rod Covers (8 柱蓋) (目錄編號 997004)
- Filter-Tips (過濾管尖), 1500 µl (目錄編號 997024)
- Filter-Tips (過濾管尖), 200 µl (目錄編號 990332)
- Elution Microtubes CL (析出液微量離心管 CL) (目錄編號 19588)
- Tip disposal bags (管尖棄置袋) (目錄編號 9013395)
- Micro tubes 2.0 ml Type H or Micro tubes 2.0 ml Type I (H 型微量離心管 2.0 ml 或 I 型微量離心管 2.0 ml) (Sarstedt®, 目錄編號 72.693 及 72.694, [www.sarstedt.com](http://www.sarstedt.com)) 用於檢體及內部對照

#### 適用於 QIASymphony AS 的轉接器和試劑固定器

- Reagent holder 1 QS (試劑固定器 1 QS) (冷卻轉接器, 試劑固定器 1, Qsym, 目錄編號 9018090)
- RG Strip Tubes 72 QS (RG 連排試管 72 QS) (冷卻轉接器, RG 連排試管 72, Qsym, 目錄編號 9018092)

#### 適用於 QIASymphony AS 的耗材

- Strip Tubes and Caps (連排試管及蓋), 0.1 ml (目錄編號 981103)
- Tubes, conical, 2 ml, Qsym AS (試管, 圓錐形, 2 ml, Qsym AS) (目錄編號 997102) 或 I 型微量離心管 2.0 ml (Sarstedt, 目錄編號 72.694.005)
- 可能採用: Tubes, conical, 5 ml, Qsym AS (試管, 圓錐型, 5 ml, Qsym AS) (目錄編號 997104) Tubes with flat base from PP (或 PP 平底試管) (Sarstedt, 目錄編號 60.558.001)
- Filter-Tips (過濾管尖), 1500 µl (目錄編號 997024)
- Filter-Tips (過濾管尖), 200 µl (目錄編號 990332)
- Filter-Tips (過濾管尖), 50 µl (目錄編號 997120)
- Tip disposal bags (管尖棄置袋) (目錄編號 9013395)

## 檢體處理與儲存

檢體收集	血液檢體 5–10 ml EDTA 血液 8x 垂直旋轉混合 — 不得激盪！ 不得使用肝素化人類檢體。
檢體儲存	分離：收集後 24 小時內以 800–1600 x g 離心 20 分鐘 轉移分離的血漿到無菌聚丙烯試管 如果檢體例行冷凍或長時間儲存，分析靈敏度會降低。
檢體運送	防破碎運送 在 24 小時內運送 依據當地病原體材料運送指示郵寄運送* 血液檢體應低溫 (2 至 8°C) 運送
干擾物質	肝素 ( $\geq 10$ IU/ml) 會影響 PCR。不得使用以含肝素做為抗凝劑的試管收集之檢體，或來自肝素化患者的檢體。
檢體製備	防止檢體內或上方形成泡沫 開始執行之前，應讓檢體與室溫 (15–25°C) 平衡。

\* 國際航空運輸協會 (IATA)。危險貨品規範。

## 程序

### 製備載體 RNA 並添加內部對照到檢體內

併用 QIASymphony DSP 病毒/病原體 Midi 試劑組和 *artus* EBV QS-RGQ 試劑組，需要引入內部對照 (EBV RG IC) 到純化程序中，以監測檢體製備和下游分析的效率。

對於將在相同 PCR 中分析 EBV 和 CMV 的多重分析執行，確認純化過程中使用來自 *artus* CMV QS-RGQ 試劑組的 CMV RG IC。兩份檢體製備和 PCR 對照的分析設定，請使用來自相同批次的 CMV RG IC。請勿使用具有不同批號的 CMV RG IC。

內部對照必須添加載體 RNA (CARRIER)-AVE 緩衝液 (AVE) 混合物，且內部對照-載體 RNA (CARRIER)-AVE 緩衝液 (AVE) 混合物的總容量維持 120  $\mu$ l。

下表呈現以每 1  $\mu$ l 析出液容量 0.1  $\mu$ l 的比例，添加內部對照到分離物。我們建議每次執行時，在使用前立即製備新鮮混合物。也可使用 QIASymphony Management Console 中的「IC Calculator」(IC 計算器) 工具。

組分	容量 ( $\mu$ l) (Sarstedt 試管)*	容量 ( $\mu$ l) (Corning 試管)†
庫存載體 RNA (CARRIER)	5	5
內部對照‡	9	9
AVE 緩衝液	106	106
每份檢體最終容量 (不含無用容量)	120	120
n 份檢體的總容量	$(n \times 120) + 360^{\S}$	$(n \times 120) + 600^{\P}$

\* H 型微量離心管 2.0 ml 和 I 型微量離心管 2.0 ml，Sarstedt 目錄編號 72.693 及 72.694。

† 試管 14 ml，17 x 100 mm 聚苯乙烯圓底 (Corning® Inc.，目錄編號 352051；Becton Dickinson 為此試管之前的供應商，而 Corning Inc. 現在為新的供應商)。

‡ 內部對照數量依據初始析出液容量 (90  $\mu$ l) 計算。額外無效容量依據使用的檢體試管類型而定。

§ 需要對應至 3 份額外檢體 (亦即，360  $\mu$ l) 的內部對照混合物。請勿裝填超過 1.92 ml 總容量 (對應至最多 13 份檢體。這些容量專門用於 H 型微量離心管 2.0 ml 和 I 型微量離心管 2.0 ml，Sarstedt 目錄編號 72.693 及 72.694)。

¶ 需要對應至 5 份額外檢體 (亦即，600  $\mu$ l) 的內部對照混合物。請勿裝填超過 13.92 ml 總容量 (對應至最多 111 份檢體。這些容量專門用於試管 14 ml，17 x 100 mm 聚苯乙烯圓底，Corning Inc.，目錄編號 352051；Becton Dickinson 為此試管之前的供應商，而 Corning Inc. 現在為新的供應商)。

## QIAasymphony SP 設定

### 「廢棄物」抽屜

單位盒固定器 1-4	空的單位盒
廢棄物袋固定器	廢棄物袋
廢液瓶固定器	倒空並安裝廢液瓶

### 「析出液」抽屜

析出液架	析出液微量離心管 CL 置於析出液微量離心管架 QS 及轉移框架上 使用空槽 1，冷卻位置
析出液容量*	預選的析出液容量：60 µl 初始析出液容量：90 µl

\* 已針對操作程序預選析出液容量。這是最終析出液試管中，析出液的最低可用容量。需要析出溶液的初始容量，以確保析出液的實際容量和預選容量相同。

### 「試劑和耗材」抽屜

RC 位置 1 和 2	載入適用於最多 48 份檢體的 1 個試劑藥匣 (RC)，或適用於最多 96 份檢體的 2 個新試劑藥匣 (RC)
管尖架固定器位置 1-18	載入足量數量的 200 µl 及 1500 µl 拋棄式過濾管尖架 (參閱「第 7 頁的「1-4 檢體批次所需的塑膠器材」)
單位盒固定器位置 1-4	載入含檢體製備匣和 8 柱蓋的單位盒 (參閱第 7 頁的「1-4 檢體批次所需的塑膠器材」)

「檢體」抽屜

檢體類型	人類 EDTA 血漿
檢體容量 (包含超額容量)	1200 µl
檢體試管	H 型微量離心管 2.0 ml 或 I 型微量離心管 2.0 ml (Sarstedt, 目錄編號 72.693 及 72.694)
襯墊	試管襯墊 3B (目錄編號 9242083)

1-4 檢體批次所需的塑膠器材

組分	一批次， 24 份檢體*	兩批次， 48 份檢體*	三批次， 72 份檢體*	四批次， 96 份檢體*
拋棄式過濾管尖， 200 µl†‡	28	52	76	100
拋棄式過濾管尖， 1500 µl†‡	113	206	309	402
檢體製備匣§	21	42	54	72
8 柱蓋¶	3	6	9	12

\* 每批次使用超過一根內部對照試管，和執行超過一次存量掃描，需要額外拋棄式過濾管尖。

† 每個管尖架有 32 個過濾管尖。

‡ 所需過濾管尖數量包括用於每個試劑藥匣 1 次存量掃描的過濾管尖。

§ 每個單位盒有 28 個檢體製備匣。

¶ 每個單位盒有 12 個 8 柱蓋。

## QIASymphony AS 設定

### 耗材

設定期間，會在儀器的觸控螢幕上，指出每種耗材在 QIASymphony AS 模組上的適當位置。

耗材	觸控螢幕上的名稱	搭配轉接器/ 試劑固定器使用
連排試管及蓋， 0.1 ml (250)	QIA#981103 *StripTubes 0.1	RG 連排試管 72 QS
試管，圓錐型，2 ml， Qsym AS (500) <sup>†‡</sup>	QIA#997102 *T2.0 ScrewSkirt <sup>§</sup>	試劑固定器 1 QS
試管，圓錐型，5 ml， Qsym AS (500) <sup>†‡</sup>	QIA#997104 *T5.0 ScrewSkirt <sup>§</sup>	試劑固定器 1 QS

\* 指示可使用附條碼冷卻轉接器冷卻的實驗器材。

<sup>†</sup> 適用於主要混合物組分、系統製備主要混合物、分析標準，以及分析對照。

<sup>‡</sup> 也可使用第 2 頁的「需要但並未提供的材料」中所述的 Sarstedt 試管。

<sup>§</sup> 觸控螢幕中的後綴「(m)」表示個別試管的液位計算，已針對形成凹陷彎月面的試劑最佳化。

### 轉接器和試劑固定器

架/試劑固定器	名稱	所需數量 <sup>¶</sup>
試劑固定器	試劑固定器 1 QS	1
檢體架	RG 連排試管 72 QS	1

<sup>¶</sup> 針對執行 72 次反應的分析計算。



## 過濾管尖

從「析出液與試劑」抽屜中的管尖空槽 1、2 和 3 開始載入管尖架，然後將管尖架載入「分析」抽屜中的管尖空槽 7、8 和 9。

耗材	觸控螢幕上的名稱	24 次反應的最少數量	72 次反應的最少數量
過濾管尖，1500 µl (1024)	1500 µl	4	5
過濾管尖，200 µl (1024)	200 µl	9	8
過濾管尖，50 µl (1024)	50 µl	25	73
管尖棄置袋	–	1	1

## 在 Rotor-Gene Q\* 上進行 PCR

操作程序詳情，請參閱位於 [www.qiagen.com/products/artusebvpcrkitce.aspx](http://www.qiagen.com/products/artusebvpcrkitce.aspx) 的軟體專屬操作程序表《執行 artus QS-RGQ 試劑組之設定》(Settings to run artus QS-RGQ Kits)。

### artus EBV QS-RGQ 試劑組之專屬設定

使用 Rotor-Gene® 軟體 2.1 或更高版本時，專屬設定如下所示。

反應容量 (µl)	50
維持 (hold)	維持溫度：95 度 維持時間：10 分鐘
循環	45 次 95 度持續 15 秒 65 度持續 30 秒 (對綠色、黃色擷取，並啟動遞減功能持續 10 個循環) 72 度持續 20 秒
自動增益最佳化設定	65 度 (檢體：綠色；IC：黃色)

### 多重分析執行

螢光頻道的偵測範圍，必須依據 PCR 試管中的螢光強度決定。按一下 **New Run Wizard** (新執行精靈) 對話方塊中的 **Gain Optimisation** (增益最佳化) 以開啟 **Auto-Gain Optimisation Setup** (自動增益最佳化設定) 對話方塊 (請參閱操作程序表《執行 artus QS-RGQ 試劑組之設定》中的步驟 6 和圖 7)。

對於單一分析執行，將校正溫度設為 **65**，與擴增計畫中的退火溫度相符。對於將在相同 PCR 中分析 EBV 和 CMV 的多重分析執行，手動調整螢光頻道強度。

\* 如果適用，使用生產日期為 2010 年 1 月或以後的 Rotor-Gene Q 5plex HRM 儀器。生產日期可以從儀器背面的序號中獲知。序號的格式為「mmyyynn」，其中「mm」表示生產月份的數字，「yy」表示生產年份的最後兩位數字，「nnn」表示唯一的儀器識別碼。

1. 按一下 **Edit** (編輯) (圖 1) 以編輯螢光頻道。

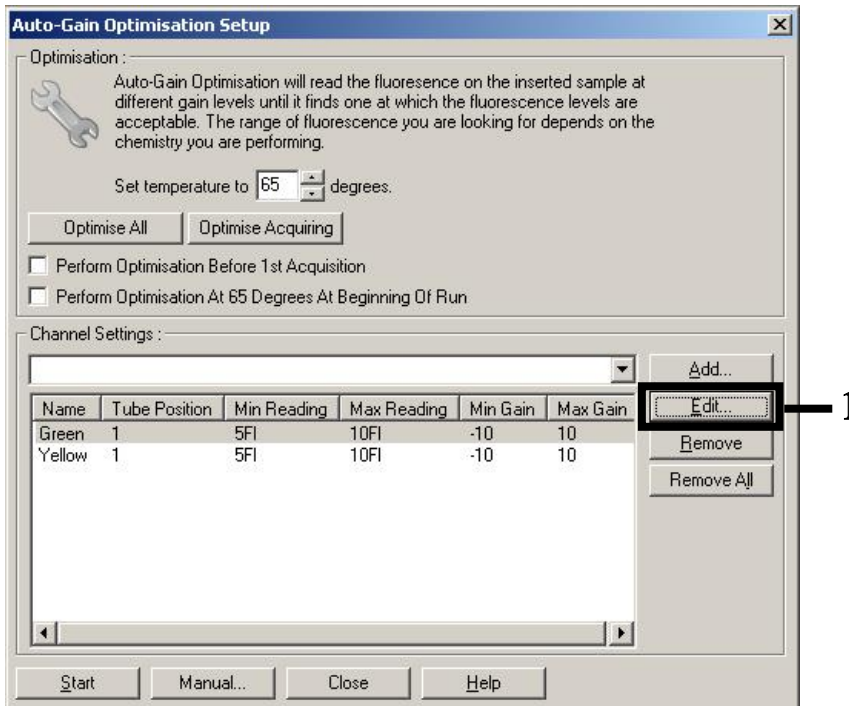


圖 1：手動調整螢光頻道強度。針對不同分析 (CMV 和 EBV)，調整不同試管位置的每個螢光頻道強度。

2. 為第一項 *artus* 分析 (例如，EBV) 的試管設定試管位置。為所有螢光頻道設定試管位置，然後按一下 **OK** (確定) (圖 2)。

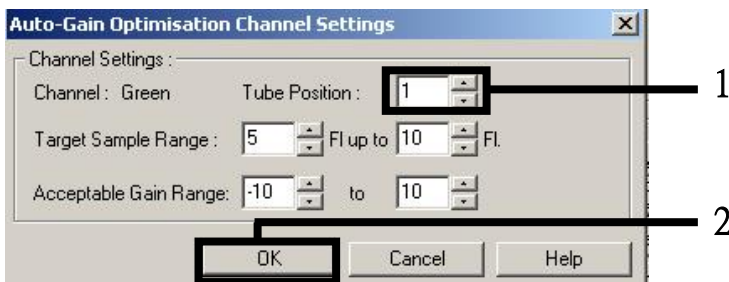


圖 2：設定試管位置。

- 按一下 **Start** (開始) 以開始第一項 *artus* 分析的增益最佳化 (圖 3)。

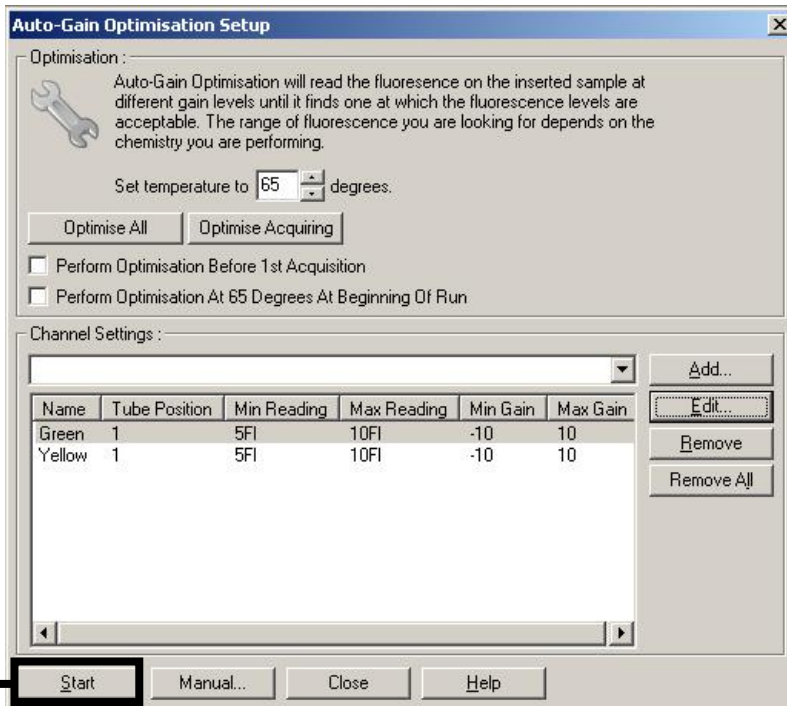


圖 3：開始增益最佳化。

- 將開啟一個新的 **Running Auto-Gain Optimisation** (執行自動增益最佳化) 視窗。等候直到此視窗中出現 **Completed** (已完成) (圖 4)。寫下兩個頻道的選取增益值，然後按一下 **Close** (關閉) (圖 4)。

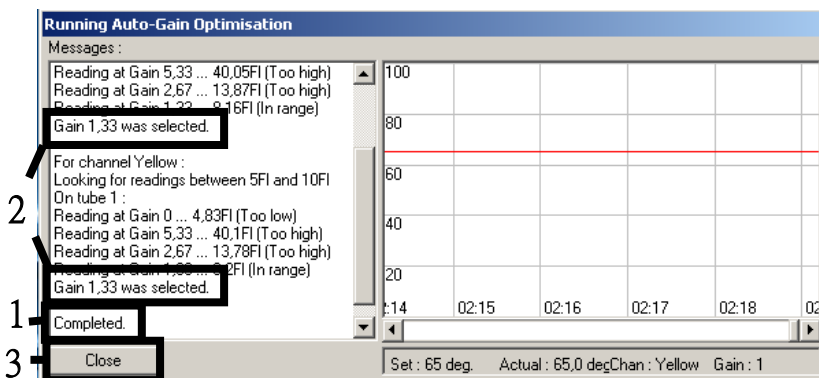


圖 4：增益最佳化已完成。記下增益值 (這個案例中，兩個螢光頻道都是 1.33)。

- 為第二項 *artus* 分析 (例如，CMV) 的試管位置重複步驟 1–4。

6. 按一下 **Edit Gain** (編輯增益) 手動編輯增益值 (圖 5)。

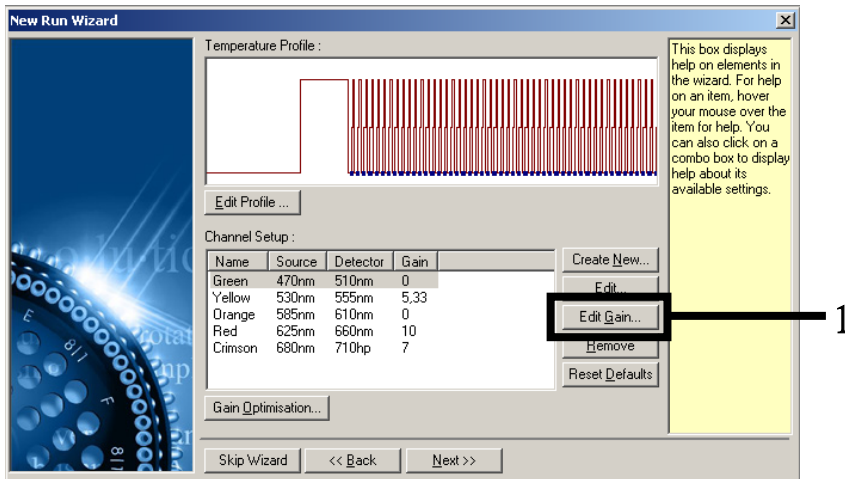


圖 5：手動編輯增益值。

7. 選取步驟 4 記下的循環綠色最低增益值，並將此值手動輸入 **Gain for Green** (綠色增益) 視窗 (圖 6)。選取步驟 4 記下的循環黃色最低增益值，並將此值手動輸入 **Gain for Yellow** (黃色增益) 視窗 (圖 6)。

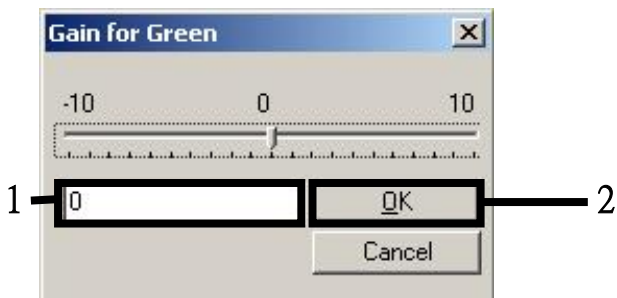


圖 6：手動輸入最低增益值。

8. 由頻道校正決定 (或手動指派) 的增益值會自動儲存，並列在設定程序的最後一個選單視窗內 (圖 7)。按一下 **Start Run** (開始執行)。

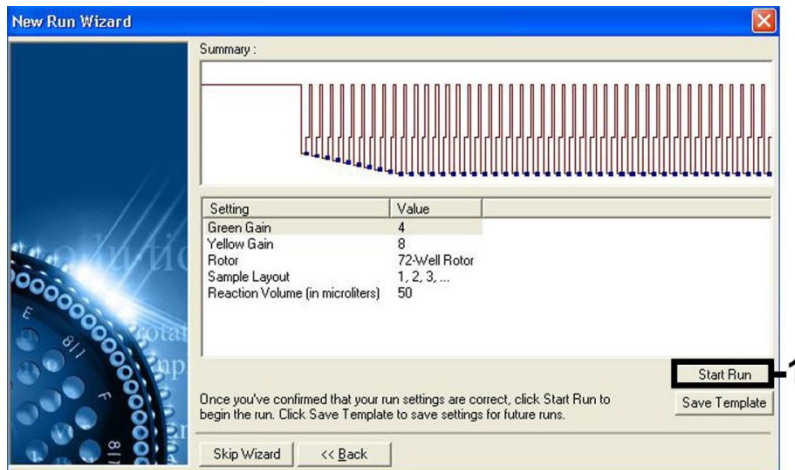


圖 7：開始執行。

## 結果判讀

本節描述 Rotor-Gene Q 的結果判讀。請同時檢閱來自 QIAasymphony SP/AS 結果檔案的檢體狀態資訊，以分析完整的檢體至結果工作流程。僅應使用具有效狀態的檢體。

artus EBV QS-RGQ 試劑組可在安裝 Rotor-Gene Q 軟體版本 2.1 或更高版本的 Rotor-Gene Q 上，使用手動分析執行。下列各節描述使用 Rotor-Gene Q 軟體版本 2.1 或更高版本的結果判讀。

## 訊號偵測與結論 — 血漿

循環綠色 頻道中有訊號	循環黃色 頻道中有訊號	量化結果 (copies/ml)	判讀
是	是	<157	有效結果：偵測到 EBV DNA， <157 copies/ml。 由於量化結果低於偵測限值而無法量 化。無法確保陽性結果的重現性。
是	是	≥157 和 <631	有效結果：偵測到 EBV DNA， <631 copies/ml。 由於量化結果低於分析的線性範圍而無 法量化。
是	是/否**	≥631 和 ≤1 x 10 <sup>7</sup>	有效結果：在計算濃度下偵測到 EBV DNA。 量化結果在分析的線性範圍內。
是	是/否**	>1 x 10 <sup>7</sup>	有效結果：偵測到 EBV DNA， >1 x 10 <sup>7</sup> copies/ml。 由於量化結果高於分析的線性範圍而無 法量化。*
否	是	–	有效結果：偵測不到 EBV DNA。†
否	否	–	無效結果：無法得出確切結果。‡

\* 如果要量化，以不含 EBV 血漿稀釋檢體並重新處理。將重新處理檢體得出的量化結果乘上稀釋係數。

† 如果執行中，陰性檢體的內部對照之 C<sub>T</sub> 值，比無模板對照的內部對照之 C<sub>T</sub> 值多超出 3 個循環 (C<sub>T</sub> IC<sub>Sample</sub> – C<sub>T</sub> IC<sub>NTC</sub> >3)，則檢體應視為無效。無法得出確切結果。

‡ 誤差來源以及其解決方案的相關資訊，可參閱《artus EBV QS-RGQ 試劑組手冊》(artus EBV QS-RGQ Kit Handbook) 的「疑難排解指南」(Troubleshooting Guide)。

\*\* 在這個情況下，循環黃色頻道中的訊號偵測非必要，因為 EBV DNA 的初始高濃度 (循環綠色頻道中的陽性訊號) 會導致循環黃色頻道中的內部對照螢光訊號降低或消失 (競爭)。

## PCR 分析的閾值設定

Rotor-Gene Q 儀器和 artus QS-RGQ 試劑組的特定組合之最佳閾值設定，應透過測試每種個別組合，依據經驗設定，因為這是依據整體診斷工作流程而定的相對值。第一次 PCR 執行的分析閾值可設為 0.04 的初步數值，但此數值應在工作流程後續執行之比較分析中微調。閾值應手動設定至略高於陰性對照和陰性檢體的背景訊號。從這些實驗計算得出的平均閾值，極可能適用於未來絕大多數執行，但使用者仍應定期檢閱產生的閾值。閾值通常在 0.03–0.05 的範圍內，且應四捨五入到不超過小數點後三位數。

## 量化

*artus* EBV QS-RGQ 試劑組中的量化標準 (EBV QS 1–4) 會視為先前純化的檢體並使用相同容量 (20 µl)。要產生 Rotor-Gene Q 儀器的標準曲線，應使用全部 4 個量化標準，並在 Rotor-Gene Q 儀器的 **Edit Samples** (編輯檢體) 對話方塊中定義為指定濃度的標準 (參閱儀器使用者手冊)。

**注意：**量化標準定義為析出液中的 **copies/µl**。必須套用下列方程式將使用標準曲線決定的數值，轉換為檢體材料的 **copies/ml**。

$$\text{檢體材料中的結果 (copies/ml)} = \frac{\text{析出液中的結果 (copies/}\mu\text{l)} \times \text{初始析出液容量 (90 }\mu\text{l)}^*}{\text{檢體容量 (ml)}}$$

原則上應在上述方程式中輸入初始檢體容量。檢體容量已在核酸萃取之前改變時，必須考量這一點 (例如，透過離心減少容量，或加入分離所需容量以增加容量)。

對於將在相同 PCR 中分析 CMV 和 EBV 的多重分析執行，確認以對應的量化標準分別分析 CMV 和 EBV 的檢體。

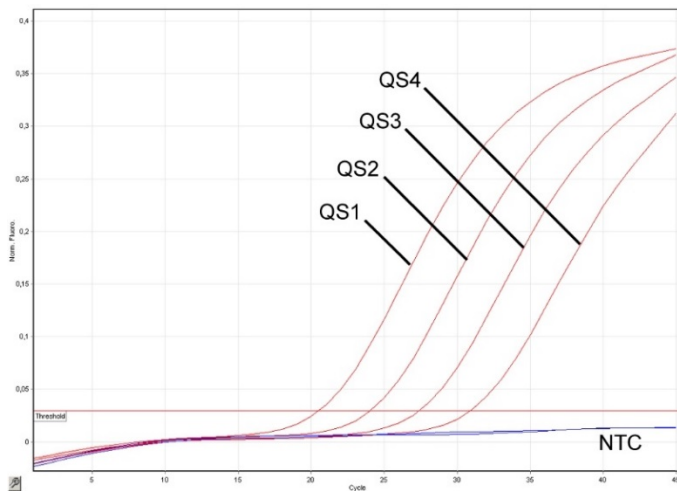
\* 計算依據為初始析出液容量 (90 µl)。



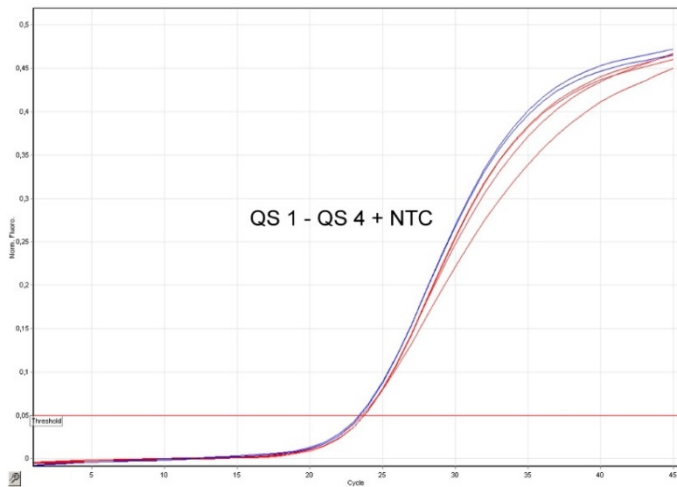
## 轉換係數

在 Rotor-Gene Q 上，1 copy/ml 對應至 0.142 IU/ml 以偵測來自人類 EDTA 血漿的 EBV DNA。遵循本應用表中所述的已驗證工作流程時，適用這個轉換係數。這個轉換係數為依據分析動態範圍內平均係數的近似值。

## 陽性和陰性 PCR 反應的範例



在螢光頻道循環綠色中偵測量化標準 (EBV QS 1-4)。NTC：無模板對照 (陰性對照)。



在螢光頻道循環黃色中偵測內部對照 (IC)，並同時擴增量化標準 (EBV QS 1-4)。NTC：無模板對照 (陰性對照)。

## 文件修訂歷程紀錄

2017 年 9 月

新增轉換係數資訊 (copies 至 IU/ml)。移除可在一次 AS 執行中設定最多 216 項分析的註解。改變所需材料，僅包含在 QS-SP/AS 上整合執行設定最多 72 次反應所需的材料。新增關於使用 EBV (使用 CMV IC) 多重分析執行之材料的更詳細資訊。在「程序」一節中，新增將 QIASymphony Management Console 軟體用於載體 RNA 及 IC 製備。將來自 BD 的實驗室器材製造商，改為 Corning 實驗室器材。釐清 RGQ 執行設定 (使用遞減功能，擷取)。新增關於結果判讀資訊，納入「病原體陽性和 IC 陰性」案例。移除關於使用 Rotor-Gene AssayManager 的說明。改變量化結果限制，以符合更新的線性範圍數值。釐清量化計算中，析出液和檢體濃度之間的差異。引用前端純化列表。更新 QIASymphony 操作程序版本：將「分析參數集」(Assay Parameter Set) 的版本號碼從 V4 增加到 V5，而「預設分析對照集」(Default Assay Control Set) 從 V6 增加到 V7。

欲瞭解最新的許可資訊和產品特定的免責聲明，請參閱各 QIAGEN 試劑組手冊或使用者手冊。QIAGEN 試劑組手冊和使用者手冊可從 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) 上下載，或者從 QIAGEN 公司技術服務或您當地經銷商處取得。

商標：QIAGEN®、Sample to Insight®、QIASymphony®、artus®、Rotor-Gene® (QIAGEN 集團)；BD™ (Becton, Dickinson and Company)；Corning® (Corning Inc.)；Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.)。即使沒有特別標明，本文中使用的註冊名稱、商標等也不應被視為不受法律保護。09/2017 HB-0357-S02-002  
© 2012 - 2017 QIAGEN，保留所有權利

---

訂購：[www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | 技術支援：[support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | 網站：[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)