

食品微生物之檢驗方法－沙波病毒之檢驗
Methods of Test for Food Microorganisms-Test of Sapovirus

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於生鮮貝類及飲用水中沙波病毒之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經 RNA 萃取後，以反轉錄聚合酶鏈反應(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)之方法。

2.1. 工作環境：工作平台須寬敞、潔淨、光線良好，操作平台光度約為 100 呎燭光。檢體前處理、RT-PCR 試劑配製及相關實驗操作皆需有區隔空間，避免交叉汙染。

2.2. 裝置

- 2.2.1. 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。
 - 2.2.2. 高壓滅菌釜。
 - 2.2.3. 冰箱：能維持 $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 。
 - 2.2.4. 均質機(Homogenizer)。
 - 2.2.5. 天平：可稱量到 2000 g 者，靈敏度為 0.1 g；可稱量到 120 g 者，靈敏度為 1 mg。
 - 2.2.6. 振盪器。
 - 2.2.7. pH 測定儀。
 - 2.2.8. 電泳膠體影像系統或紫外燈箱：具波長 312 nm、365 nm 紫外燈。
 - 2.2.9. 微波爐或加熱板(Hot plate)。
 - 2.2.10. 聚合酶鏈反應器^(註 1)：ABI PRISM 9700 Sequence Detector，或同級品。
 - 2.2.11. 電泳槽：供 DNA 電泳用。
 - 2.2.12. 加熱振盪器：能維持內部溫度溫差 0.5°C 以內者。
 - 2.2.13. 微量冷凍離心機(Micro refrigerated centrifuge)：可供各式離心管離心使用，可達 15000 rpm 以上，並具 4°C 溫控功能。
 - 2.2.14. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2.15. 抽氣幫浦。
 - 2.2.16. 玻璃過濾器組：直徑為 47mm 且可滅菌者。
- 註 1：本方法所使用或提及之產品品牌不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或未提及之產品品牌亦不代表為同類產品中較差者。

2.3. 試藥

- 2.3.1. 病毒萃取用：氯化鈉、無水磷酸氫二鈉、磷酸二氫鉀、消泡劑 B

$\text{Na}_2\text{-EDTA}$)、丁醇、三氯甲烷、氫氧化鈉、硫酸及氯化鎂($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)等均採用試藥特級。

- 2.3.2. 病毒 RNA 抽取用：適用於病毒 RNA 抽取之市售套組。
- 2.3.3. 病毒 RNA 處理用：去氧核糖核酸水解酶 I (DNase I) 5 U/ μL 。
- 2.3.4. RT-PCR：酵素(內含反轉錄酶 (reverse transcriptase)及DNA聚合酶)、5 倍緩衝溶液、10 mM去氧核糖核苷三磷酸(dNTP)溶液：含去氧腺苷三磷酸(deoxyadenosine triphosphate, dATP)、去氧胞苷三磷酸(deoxycytidine triphosphate, dCTP)、去氧鳥糞嘌呤核苷三磷酸(deoxyguanosine triphosphate, dGTP)、去氧胸苷三磷酸(deoxythymidine triphosphate, dTTP)及專一性引子。
- 2.3.5. 二次 PCR：DNA 聚合酶(*Taq* DNA 聚合酶 5 U/ μL ，內附 10 倍緩衝溶液，或同級品)、去氧核糖核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)各 2.5 mM 之溶液及專一性引子。
- 2.3.6. 檢測用之引子及探針^(註 2)
- 2.3.6.1. 沙波病毒引子: 10 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$ 。
標的基因: ORF1
SLV5317 (F) 5'-CTCGCCACCTACRAWGCBTGGTT-3'
SLV5749 (R) 5'-CGGRCYTCAA AVSTACCBCCCCA-3'
PCR 增幅產物大小 434 bp
- 2.3.6.2. 小兒麻痺病毒引子: 10 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$ 。
標的基因: 聚合蛋白質基因(polyprotein gene)
SB2-F1 (F) 5'-GTTTCATGTCTGCTCCGTCTG-3'
SB2-R1 (R) 5'-AGCAAGCACCGTATTGAGCC-3'
PCR 增幅產物大小 220 bp
- 註 2：合成之引子拆封後，以無菌水稀釋成適當濃度，分裝後置於 -20°C 貯存備用。引子序列中，R 為混合鹼基代碼(A/G)，表示同時含 A 及 G；W 為混合鹼基代碼(A/T)，表示同時含 A 及 T；B 為混合鹼基代碼(C/G/T)，表示同時含 C、G 及 T；Y 為混合鹼基代碼(C/T)，表示同時含 C 及 T；V 為混合鹼基代碼(A/C/G)，表示同時含 A、C 及 G。
- 2.3.7. 電泳用試藥：乙二胺四乙酸二鈉(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, $\text{Na}_2\text{-EDTA}$)、溴酚藍(bromophenol blue)、二甲苯藍(xylene cyanol FF)、溴化乙錠(ethidium bromide)、三羥甲基胺基甲烷(tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris-base)、甘油、硼酸及瓊膠(agarose)均採用分子生物分析級試藥；DNA 分子量標記

- 2.3.8. 對照用物質：含第 2 型不活化小兒麻痺病毒之疫苗，或使用行政院衛生署食品藥物管理局提供編號 pIDV31 之參考質體作為對照用物質。

2.4. 器具及材料^(註 3)

- 2.4.1. 可調式微量分注器：10 μ L、20 μ L、200 μ L 及 1000 μ L。
- 2.4.2. 吸管尖頭(Pipette tips)：10 μ L、20 μ L、200 μ L 及 1000 μ L。
- 2.4.3. 微量離心管：100 μ L、200 μ L 及 1.5 或 2.0 mL。
- 2.4.4. 藥勺、剪刀、小刀及鑷子：可滅菌者。
- 2.4.5. 塑膠離心管：50 mL。
- 2.4.6. 酒精燈、濾紙及褐色試藥瓶。
- 2.4.7. 電泳膠片製作盤：含製膠用尺梳。
- 2.4.8. 玻棒。
- 2.4.9. 無菌濾膜：孔徑 0.45 μ m，直徑 47 mm 之親水性醋酸纖維膜。
- 2.4.10. 濃縮離心管：50K NMWL (nominal molecular weight limit)且為無菌處理者。
- 2.4.11. 三角錐瓶：可滅菌者。
- 2.4.12. 過濾吸引瓶：可滅菌者。

註 3：使用之塑膠或玻璃器皿均為無 DNase 及 RNase 污染。

2.5. 試劑之配製

- 2.5.1. 磷酸鹽緩衝溶液(Phosphate buffered saline, PBS)：
稱取氯化鈉 76.5 g、無水磷酸氫二鈉 7.2 g 及磷酸二氫鉀 2.1 g，以水溶解使成 1000 mL，即為 10 倍 PBS 溶液。取 10 倍 PBS 溶液 100 mL 加水使成 1000 mL，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4。
- 2.5.2. 聚乙二醇 6000-氯化鈉(PEG 6000-NaCl)溶液：
稱取氯化鈉 26.4 g，以水溶解使成 380 mL，再加入 PEG 6000 120 g 混勻，以 121°C 滅菌 15 分鐘。
- 2.5.3. 2.5 M 氯化鎂溶液：
稱取氯化鎂 254.1 g，以水溶解使成 500 mL，以 121°C 滅菌 15 分鐘。
- 2.5.4. 50 mM 硫酸溶液：
量取硫酸 2.8 mL，徐徐加入無菌水 1 L 中。
- 2.5.5. 0.5 mM 硫酸溶液：
量取 50 mM 硫酸溶液以無菌水稀釋 100 倍，最終 pH 值為 3.0。
- 2.5.6. 1 mM 氫氧化鈉溶液：稱取氫氧化鈉 0.4 g，加入無菌水 100 mL

- 2.5.7. 0.5 M 乙二胺四乙酸二鈉溶液：
稱取乙二胺四乙酸二鈉 186.1 g，加水溶解使成 1 L，最終 pH 值為 8.0。
- 2.5.8. 100 倍 Tris-EDTA 緩衝溶液：
稱取 10 M 三羥甲基氨基甲烷 12.1 g 及 0.5 M 乙二胺四乙酸二鈉溶液 20 mL，加水成 100 mL，最終 pH 值為 8.0。
- 2.5.9. 5 倍 TBE (Tris-borate-EDTA)緩衝溶液：
稱取三羥甲基氨基甲烷 54 g 及硼酸 27.5 g，加 0.5 M 乙二胺四乙酸二鈉溶液 20 mL，再加水溶解使成 1000 mL。臨用前以水稀釋為 0.5 倍。
- 2.5.10. 6 倍載入膠片緩衝溶液(6 × gel loading buffer)：
稱取溴酚藍 25 g 及二甲苯藍 0.25 g，加甘油 30 mL，再加水使成 100 mL，置於冰箱貯存備用。
- 2.5.11. 2%膠片：
稱取瓊膠 2 g，加入 0.5 倍 TBE 緩衝溶液 100 mL，加熱攪拌至瓊膠完全溶解，冷卻至約 50°C 時，倒入電泳膠片製作盤，並置入適當之尺梳，待膠片凝固後，即可使用。
- 2.5.12. 膠片染液：
稱取溴化乙錠 0.1 g，加水 10 mL 溶解，供作原液(含溴化乙錠 10 mg/mL)，使用前以水稀釋成含溴化乙錠 1 µg/mL。溴化乙錠為致癌物質，配製時應注意安全。
- 2.5.13. 鑑別試驗試劑

2.5.13.1. 病毒 RNA 溶液之 DNase I 處理

病毒 RNA 溶液	24 µL
10 倍緩衝溶液	3.0 µL
無菌去離子水	1.0 µL
DNase I (5 U/µL)	2.0 µL
總體積	30 µL

2.5.13.2. RT-PCR 試劑配製

經 DNase I 處理之 RNA 溶液	5.0 µL
5 倍緩衝溶液	5.0 µL
10 mM dNTP	1.0 µL
引子-正股	2.0 µL
引子-對股	2.0 µL
酵素 ^(註 4)	1.0 µL
無菌去離子水	9.0 µL

總體積	25 μ L
-----	------------

註 4： 含反轉錄酶及 DNA 聚合酶。

2.5.13.3. 二次 PCR

第一次 PCR 產物	2.0 μ L
10 倍緩衝溶液	5.0 μ L
dNTP	4.0 μ L
引子 ^(註 5) -正股	1.0 μ L
引子 ^(註 5) -對股	1.0 μ L
DNA 聚合酶	0.25 μ L
無菌去離子水	36.75 μ L
總體積	50 μ L

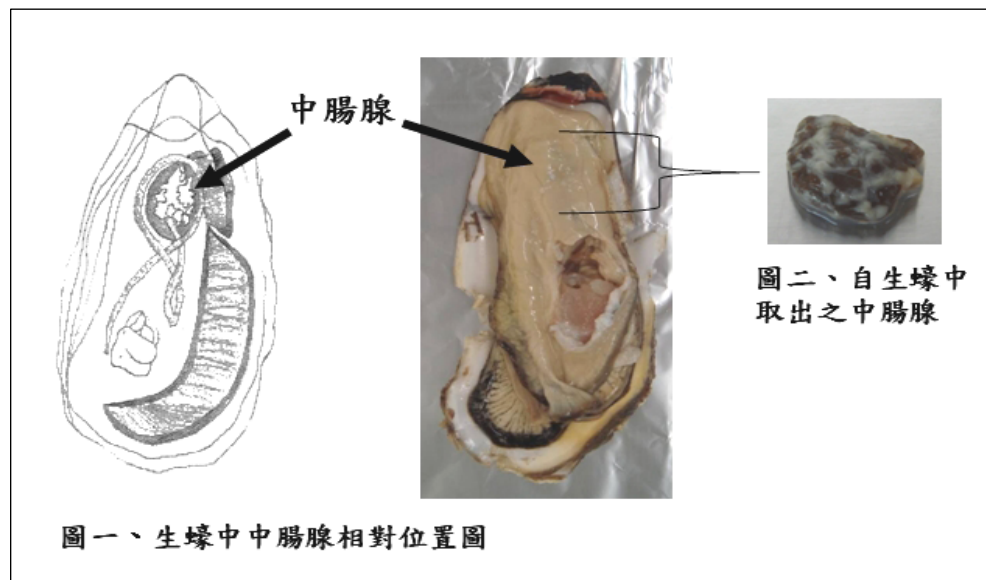
註 5： 檢測沙波病毒與第一次之引子組相同。

2.6. 病毒之濃縮

2.6.1. 貝類檢體

2.6.1.1. 檢體前處理

貝類外殼用已滅菌小刀或鑷子打開，取出肉質部分並將外套膜及白色組織去除，白色組織儘可能剔除乾淨，留下中腸腺部分，如圖一、二，供作檢體。



2.6.1.2. 中腸腺處理

稱取中腸腺1.5 g加入磷酸鹽緩衝溶液10 mL及消泡劑B 0.2 mL，以均質機18000 rpm均質30秒，停頓30秒，再以18000 rpm均質30秒。於4℃以5000~12000 rpm (約2400~13000 × g)離心20分鐘，取上層液。

2.6.1.3. PEG 6000濃縮病毒

2.6.1.3.1. 加入聚乙二醇6000-氯化鈉溶液6.5 mL至2.6.1.2.節上層液中，充份攪拌，於4°C放置過夜，再於室溫以120 rpm振盪2小時。

2.6.1.3.2. 於4°C以5000~12000 rpm (約2400~13000 × g)離心20分鐘，吸除上層液，以無菌去離子水200 μL溶解沉澱物後即為檢液。當檢液中雜質太多時，將檢液於4°C以10000 rpm (約9200 × g)離心20分鐘，取上層液供作檢液。

2.6.2. 飲用水檢體

2.6.2.1. 大量檢體之病毒濃縮

取檢體 100~1000 mL，加入氯化鎂(最終濃度 25 mM)，設置一水樣過濾裝置(如圖三)，將檢體加入過濾漏斗中，經由真空抽氣機的抽氣作用，將檢體通過濾膜，以 0.5 mM 硫酸溶液 200 mL 沖洗濾膜，棄沖洗液，置換過濾吸引瓶成檢液收集裝置(如圖四)，再以 1 mM 氫氧化鈉溶液 10 mL 洗滌濾膜，收集洗滌液至檢液收集裝置內之無菌離心管中(離心管中預先加入 50 mM 硫酸溶液 0.1 mL 及 100 倍 Tris-EDTA 緩衝溶液 0.1 mL)，取出離心管，將洗滌液倒入濃縮離心管過濾槽中，於 4°C 以 3000 rpm 離心 20~30 分鐘，濃縮至約 0.5 mL 以下，將濃縮液吸取至 1.5 mL 微量離心管中，供作檢液。



2.6.2.2. 小量檢體之病毒濃縮

檢體體積小於 100 mL 時，將檢體分次倒入濃縮離心管過濾槽，於 4°C 以 3000 rpm 離心 20~30 分鐘，濃縮至約 0.5 mL 以下，吸取濃縮液至 1.5 mL 微量離心管中，供作檢液。

2.7. 病毒 RNA 之抽取

取 2.6.1.3.2.、2.6.2.1.或 2.6.2.2.節檢液，依市售套組操作說明步驟抽取病毒 RNA。抽取之病毒 RNA 收集至已滅菌之 1.5 mL 離心管，供作病毒 RNA 溶液。

2.8. 正對照組病毒添加

於空白組中加入含小兒麻痺病毒之疫苗，依 2.6.及 2.7.節步驟同樣操作，抽取病毒 RNA 以供作正對照組。

2.9. 鑑別試驗

2.9.1. 病毒 RNA 溶液之 DNase I 處理

取微量離心管，依照 2.5.13.1.節配製混合液，於 37°C 反應 30 分鐘，續於 75°C 反應 5 分鐘後，立即移置冰浴中，即為經 DNase I 處理之 RNA 溶液，供 RT-PCR 應用。

2.9.2. RT-PCR^(註 6)

取微量離心管，依照 2.5.13.2.節配製 RT-PCR 混合液，反應條件如下：

步驟	溫度(°C)	時間(min)
1.反轉錄	50	45
2.反轉錄酵素失活	95	15
3.變性	94	0.5
4.黏接	50	0.5
5.延展	72	1
步驟 2 至步驟 4，共進行 40 個循環反應		
6.最終延展	72	15

註 6： RT-PCR 反應條件係採 ABI PRISM 9700 設定之，當使用其他機型時，應自行探討反應條件。

2.9.3. 膠片電泳分析^(註 7)

2.9.3.1. 取適量之 6 倍載入膠片緩衝溶液，分別與 DNA 分子量標記物質、無菌去離子水(空白組)及 PCR 增幅產物混合均勻，注入 2%膠片孔中，以 50 或 100 伏特電壓進行電泳。電泳後之膠片置入膠片染液中染色約 10 分鐘後，續置入水中漂洗及褪染，再以紫外光照射觀察是否有明顯之 DNA 螢光帶(band)，並判讀結果。

2.9.3.2. 當檢體中含有沙波病毒目標產物之 DNA 螢光帶為 434 bp 位

2.9.3.3. 當第一次聚合酶鏈反應結果無明顯 DNA 螢光帶時，應續進行二次 PCR (2 nd PCR)。

註 7： 電泳分析結果需確認時，以核酸定序進行之。

2.9.4. 二次 PCR

2.9.4.1. 取微量離心管，依照 2.5.13.3.節配製二次 PCR 混合液，反應條件如下：

步驟	溫度(°C)	時間(min)
1.最初變性	94	5
2.變性	94	0.5
3.黏接	50	0.5
4.延展	72	1
步驟 2 至步驟 4，共進行 35 個循環反應		
5.最終延展	72	15

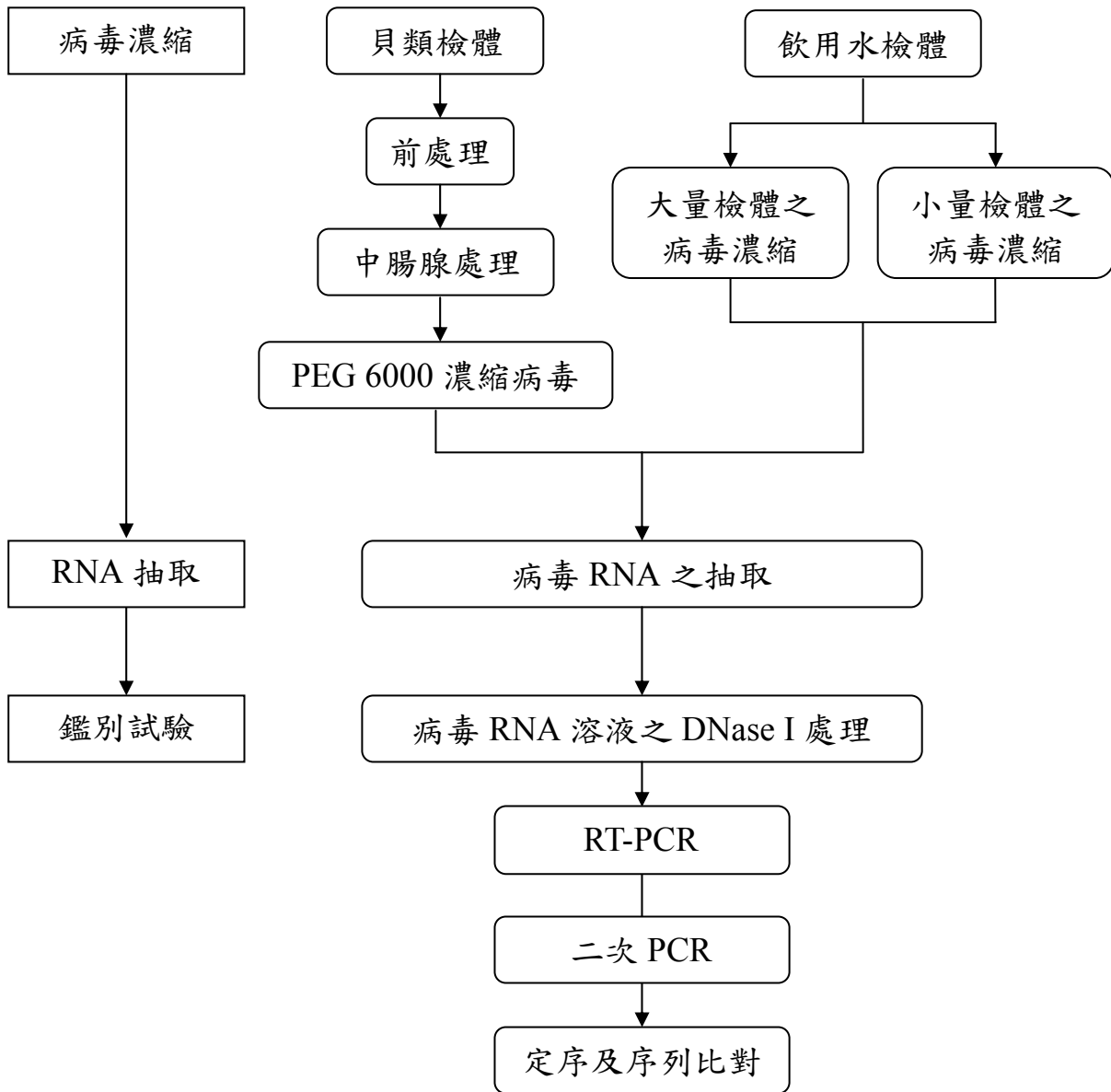
2.9.4.2. 膠片電泳分析及結果判讀

依 2.9.3.節步驟進行膠片電泳分析及結果判讀。

2.9.5. 定序及序列比對

依 2.9.3.節，於膠片電泳確認 PCR 產物後定序，每一 PCR 產物至少做正向(forward)與反向(reverse)定序。俟取得定序結果，將序列上載至美國國家衛生院 NCBI Blast 網頁，與 GenBank 資料庫做序列比對，比對序列相同度達 95%以上，且為序列相同度最高者，作為比對結果，以確認病毒。

2.10.檢驗流程圖



附註：食品中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

1. Nishida, T., Kimura, H., Saitoh, M., Shinohara, M., Kato, M., Fukuda, S., Munemura, T., Mikami, T., Kawamoto, A., Akiyama, M., Kato, Y., Nishi, K., Kozawa, K., and Nishio, O. 2003. Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(10):5782-5786.
2. 日本厚生省。2003。ノロウイルスの検出法（諾羅病毒檢驗方法）。日本厚生省公告（食安監発第 1105001 号）。
3. Katayama, H., Shimasaki, A. and Ohgaki, S. 2002. Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(3): 1033-1039.