

食品中微生物之檢驗方法—諾羅病毒之檢驗
Methods of Test for Food Microorganisms- Test of Norovirus

1. 適用範圍：本方法適用於貝類及飲用水中諾羅病毒之檢驗。
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。檢體前處理、RT-PCR 試劑配製及 PCR 等檢驗過程皆需有區隔空間，避免交叉汙染。
 - 2.2. 裝置^(註 1)
 - 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：最大稱重量為 2000 g 者，靈敏度為 0.1 g；最大稱重量為 120 g 者，靈敏度為 1 mg。
 - 2.2.6. 振盪器。
 - 2.2.7. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
 - 2.2.8. 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：GeneAmp[®] PCR System 9700，或同級品。
 - 2.2.11. 電泳槽：供 DNA 電泳用。
 - 2.2.12. 加熱振盪器：具 55°C 溫控及振盪功能，且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(Microrefrigerated centrifuge)：可供各式離心管離心使用，可達 $20000 \times g$ 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 47 mm 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、氫氧化鈉、硼酸、無水磷酸氫二鈉

(Na_2HPO_4)、磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)、聚乙二醇 6000 (polyethylene glycol 6000, PEG 6000)、氯仿、丁醇、硫酸、鹽酸、氯化鎂($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、乙二胺四乙酸二鈉(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, $\text{Na}_2\text{-EDTA}$) 及 三 羥 甲 基 胺 基 甲 烷 (tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris-base)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. 反轉錄反應用：適用於病毒 RNA 抽取之市售套組，內含反轉錄酶(reverse transcriptase)、5 倍 TBE 緩衝溶液、10 mM 去氧核糖核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)、隨機引子(random primer)、0.1 M 二硫蘇糖醇(dithiothreitol, DTT)及核糖核酸水解酶抑制劑(RNase inhibitor)。

2.3.5. 聚合酶鏈反應用：

2.3.5.1. DNA 聚合酶：*Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μL)，內附 10 倍 PCR 緩衝溶液(含 20 mM 氯化鎂)，或同級品。

2.3.5.2. 去氧核糖核苷三磷酸(Deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)溶液：含去氧腺苷三磷酸(deoxyadenosine triphosphate, dATP)，去氧胞苷三磷酸(deoxycytidine triphosphate, dCTP)，去氧鳥糞嘌呤三磷酸(deoxyguanosine triphosphate, dGTP)及去氧胸苷三磷酸(deoxythymidine triphosphate, dTTP)各 2.5 mM 之溶液。

2.3.5.3. 引子^(註2)：

2.3.5.3.1. 第一群(Group I, GI)諾羅病毒(標的區域：ORF2)

引子 F1：COG1F 5'-CGYTGGATGCGNTTYCATGA-3'

引子 F2：G1-SKF 5'-CTGCCCCGAATTYGTAATGA-3'

引子 R：G1-SKR 5'-CCAACCCARCCATTRTACA-3'

引子 COG1F/G1-SKR 之 PCR 增幅產物大小 377 bp

引子 G1-SKF/G1-SKR 之 PCR 增幅產物大小 330 bp

2.3.5.3.2. 第二群(Group II, GII)諾羅病毒(標的區域：ORF2)

引子 F1：COG2F 5'-CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGA
G-3'

引子 F2：G2-SKF 5'-CNTGGGAGGGCGATCGCAA-3'

引子 R：G2-SKR 5'-CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT-

3'

引子 COG2F/G2-SKR 之 PCR 增幅產物大小 386 bp

引子 G2-SKF/G2-SKR 之 PCR 增幅產物大小 344 bp

2.3.5.3.3. 小兒麻痺病毒

(標的基因：聚合蛋白質基因(polyprotein gene))

引子 F：SB2-F1 5'-GTTTCATGTCTGCTCCGTCTG-3'

引子 R：SB2-R1 5'-AGCAAGCACCGTATTGAGCC-3'

PCR 增幅產物大小 220 bp

註 2：合成之引子拆封後，以無菌去離子水稀釋成適當濃度，分裝後置於-20℃貯存備用。引子序列中，B 為混合鹼基代碼(C/G/T)，表示同時含 C、G 及 T；H 為混合鹼基代碼(A/C/T)，表示同時含 A、C 及 T；N 為混合鹼基代碼(A/C/G/T)，表示同時含 A、C、G 及 T；R 為混合鹼基代碼(A/G)，表示同時含 A 及 G；Y 為混合鹼基代碼(C/T)，表示同時含 C 及 T。

2.3.6. 電泳用試藥：乙二胺四乙酸二鈉(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, Na₂-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 分子量標記物質(DNA molecular weight marker): 100 bp DNA ladder marker。

2.3.7. 對照用物質：含第 2 型不活化小兒麻痺病毒之疫苗。

2.4. 器具及材料^(註 3)

2.4.1. 可調式微量分注器：10 µL、20 µL、200 µL 及 1000 µL。

2.4.2. 吸管尖頭(Pipette tips)：10 µL、20 µL、200 µL 及 1000 µL。

2.4.3. 微量離心管：200 µL、1.5 mL、2 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 0.22 µm 之親水性醋酸纖維膜。

2.4.10. PCR 反應管：200 µL 及 500 µL。

2.4.11. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000 mL。

2.4.12. 濃縮離心管：15 mL，100 K，針對分子量大於 10^5 道爾頓(dalton)之物質進行濃縮。

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，溶於去離子水 1000 mL，即為 10 倍 PBS 緩衝溶液。取 10 倍 PBS 緩衝溶液 100 mL，加去離子水使成 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-氯化鈉)溶液：

稱取氯化鈉 26.4 g，以去離子水溶解使成 380 mL，再加入聚乙二醇 6000 120 g，混勻，以 121°C 滅菌 15 分鐘。

2.5.3. 氯仿-丁醇溶液：分別取等體積的氯仿與丁醇，置於褐色瓶，混合均勻。

2.5.4. 50 mM 硫酸溶液：

量取硫酸 1.39 mL，緩緩加入無菌去離子水 200 mL 中，再加無菌去離子水使成 500 mL。

2.5.5. 0.5 mM 硫酸溶液：

量取 50 mM 硫酸溶液以去離子水稀釋 100 倍。

2.5.6. 1 mM 氫氧化鈉溶液：

稱取氫氧化鈉 4 g，加無菌去離子水 80 mL 溶解使成 100 mL，再以無菌去離子水稀釋 1000 倍。

2.5.7. 6 N 鹽酸溶液：

量取鹽酸 50 mL，緩緩加入無菌去離子水使成 100 mL。

2.5.8. 100 倍三羥甲基胺基甲烷-乙二胺四乙酸溶液：

稱取三羥甲基胺基甲烷 12.1 g 及乙二胺四乙酸 2.9 g，以去離子水 80 mL 溶解，再以 6 N 鹽酸溶液調整 pH 值至 8.0，並加去離子水使成 100 mL，以 121°C 滅菌 15 分鐘。或使用市售 100 倍無菌三羥甲基胺基甲烷-乙二胺四乙酸溶液。

2.5.9. 0.5M 乙二胺四乙酸(EDTA)溶液：

稱取乙二胺四乙酸二鈉 186.1 g，加去離子水 800 mL 溶解，再加入氫氧化鈉 20 g，調整 pH 值至 8.0，並加去離子水使成 1000 mL。

2.5.10. 0.5 倍 TBE (Tris-borate-EDTA)緩衝溶液：

稱取三羥甲基胺基甲烷 54 g 及硼酸 27.5 g，加入 0.5M EDTA 溶液 20 mL，再加去離子水溶解使成 1000 mL，供作 5 倍 TBE 緩衝

溶液，或使用市售 5 倍 TBE 緩衝溶液。臨用前以去離子水將 5 倍 TBE 緩衝溶液稀釋為 0.5 倍，作為 0.5 倍 TBE 緩衝溶液。

2.5.11. 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，加入甘油 30 mL，再加入無菌去離子水使成 100 mL，置於 4℃ 冰箱貯存備用。

2.5.12. 2.5% 膠片：

稱取瓊膠 2.5 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℃ 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。

2.5.13. 膠片染液：

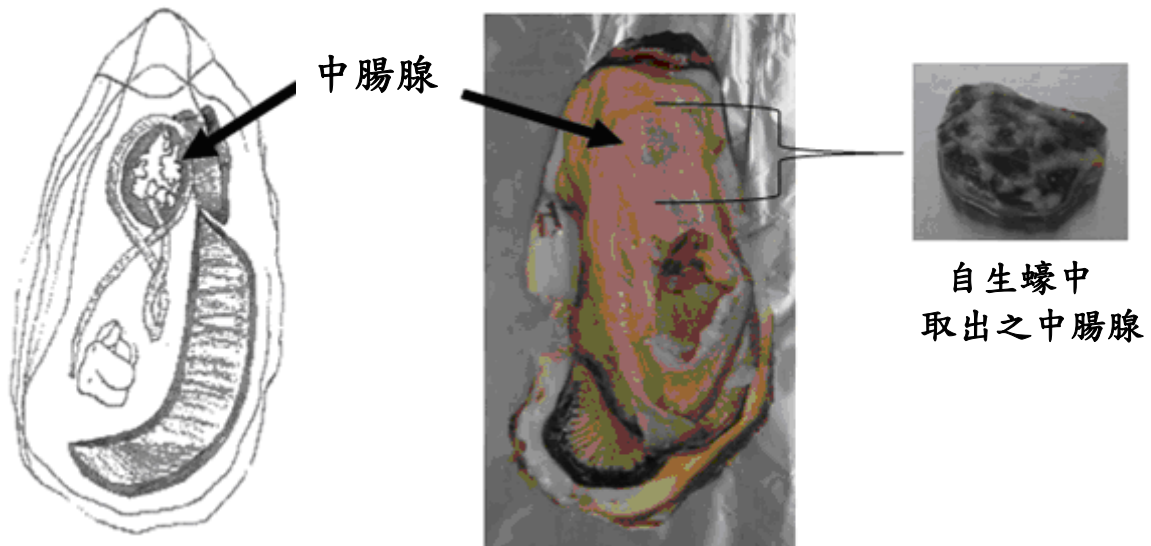
稱取溴化乙錠 0.1 g，加去離子水 10 mL 溶解，供作原液(10 mg/mL)，使用前以去離子水稀釋成 1 μg/mL。溴化乙錠為致癌物質，配製時應注意安全。

2.6. 病毒之濃縮

2.6.1. 貝類檢體

2.6.1.1. 貝類檢體處理：

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，供作檢體，如圖一。



圖一、生蠔中中腸腺相對位置圖

2.6.1.2. 中腸腺前處理：

取中腸腺 1.5 g，置於 50 mL 離心管，加入磷酸鹽緩衝溶液 10 mL，置於冰上，以均質棒進行 2 段式研磨，每段各 30 秒；續加入氯仿-丁醇溶液 6 mL，持續均質 30 秒，再以磷酸鹽緩衝溶液 3 mL 沖洗殘留於均質棒上之檢體。將研磨後之檢體於 4°C 旋轉混合均勻 1 小時，以轉速 12000×g 離心 20 分鐘，取上層液。

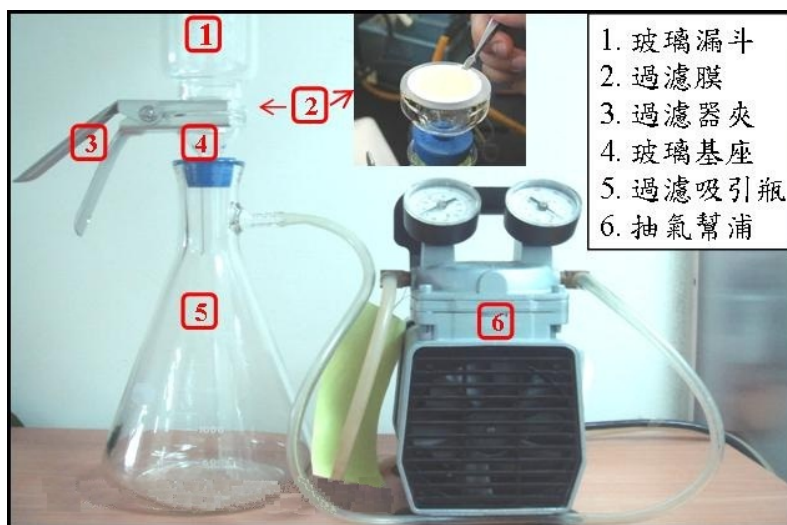
2.6.1.3. PEG 6000 濃縮處理：

加 PEG6000-氯化鈉溶液 10.5 mL 至 2.6.1.2.節上層液中，充份混勻，混合液於 4°C 持續旋轉混合均勻過夜。混合液於 4°C 以 12000×g 以上之轉速進行離心 20 分鐘，去除上清液，續以市售套組操作抽取病毒 RNA。

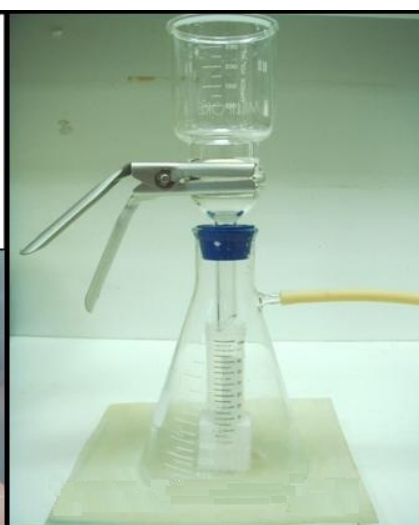
2.6.2. 飲用水檢體

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)，設置一水檢體過濾裝置(如圖二)，將檢體加入過濾漏斗中，經由真空抽氣，將檢體通過無菌濾膜，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(如圖三)，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，該離心管預先加入 50 mM 硫酸溶液 0.1 mL 及 100 倍三羥甲基胺基甲烷-乙二胺四乙酸溶液 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×g 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。



圖二、水檢體過濾裝置



圖三、檢液收集裝置

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×g 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：

針對貝類檢體，取 2.6.1.3. 節檢液沉澱物，針對飲用水檢體，則取 2.6.2.1. 及 2.6.2.2. 之病毒濃縮液，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：

貝類檢體取中腸腺 1.5 g 添加約 10^4 個小兒麻痺病毒疫苗之病毒粒子，飲用水檢體則每 mL 水檢體添加 100 顆病毒粒子，依 2.6. 及 2.7. 節，抽取病毒 RNA，供作正對照組。

2.9. 以 DNase I 處理病毒 RNA 溶液：

2.9.1. 取微量離心管，依下表配製混合液：

病毒 RNA 溶液	24.0 μ L
10 倍緩衝溶液	3.0 μ L
無菌去離子水	1.0 μ L
DNase I (5 U/ μ L)	2.0 μ L
總體積	30.0 μ L

2.9.2. 混合液於 37°C 反應 30 分鐘，續以 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，供反轉錄反應用。

2.10. 反轉錄反應：

2.10.1. 取微量離心管，依下表配製混合液：

病毒 RNA 溶液	5.0 μ L
5 倍 TBE 緩衝溶液	5.0 μ L
10 mM dNTP	4.0 μ L
25 mM 氯化鎂溶液	5.0 μ L
隨機引子 (3 μ g/ μ L)	1.3 μ L
0.1 M DTT	2.5 μ L

核糖核酸水解酶抑制劑 (40U/μL)	1.4 μL
反轉錄酶 (200U/μL)	0.8 μL
總體積.....	25.0 μL

2.10.2. 混合液配製完成後，依下表條件進行反轉錄反應^{註 4}：

步驟	溫度(°C)	時間(min)
反轉錄	25	10
	50	50
	85	15

反應完畢立即移置冰浴中，此為 cDNA 產物，供聚合酶鏈反應用。

註 4：對於同一管 RNA，應至少進行二重複反轉錄反應。

2.11. 第一次聚合酶鏈反應(PCR)：

2.11.1. 取微量離心管，依下表配製第一次 PCR 混合液：

cDNA 產物	5.0 μL
10 倍 PCR 緩衝溶液(含 20 mM 氯化鎂).....	5.0 μL
2.5 mM dNTP	4.0 μL
10 μM 引子 F ^(註 5)	1.0 μL
10 μM 引子 R ^(註 5)	1.0 μL
DNA 聚合酶 (5 U/μL).....	0.5 μL
無菌去離子水.....	33.5 μL
總體積.....	50.0 μL

註 5： 檢測第一群諾羅病毒，採引子對 COG1F/G1-SKR 及 G1-SKF/G1-SKR；檢測第二群諾羅病毒，採引子對 COG2F/G2-SKR 及 G2-SKF/G2-SKR；檢測正對照組（小兒麻痺病毒疫苗），採引子對 SB2-F1/ SB2-R1。

2.11.2. 混合液配製後，依下表條件進行 PCR：

步驟	溫度	時間
1.最初變性	95℃	4 min
2.變性	95℃	30 sec
3.黏接	50℃	30 sec
4.延展	72℃	1 min
步驟 2 至步驟 4，共進行 40 個循環反應。		
5.最終延展	72℃	7 min

2.11.3. 膠片電泳分析：

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 2.5%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，並判讀結果。正對照組在 220 bp 位置上應有一明顯 DNA 螢光帶。當檢體中含有第一群諾羅病毒時，引子 COG1FG/SKR 在 377 bp 位置、引子 G1-SKF/G1-SKR 在 330 bp 位置上應各有一明顯 DNA 螢光帶；含第二群諾羅病毒時，引子 COG2F/G2-SKR 在 386 bp 位置、引子 G2-SKF/G2-SKR 在 344 bp 位置上應有一明顯 DNA 螢光帶。當第一次聚合酶鏈反應結果無明顯 DNA 螢光帶時，應續進行第二次 PCR。每次反應皆應有正對照組及空白組，空白組為無菌去離子水，添加小兒麻痺病毒疫苗之病毒粒子為正對照組。

2.12. 第二次 PCR：

2.12.1. 取微量離心管，依下表配製第二次 PCR 混合液：

第一次 PCR 產物之稀釋溶液 ^(註 6)	5.0 µL
10 倍 PCR 緩衝溶液（含 20 mM 氯化鎂）	5.0 µL
2.5 mM dNTP	4.0 µL
10 µM 引子 F ^(註 7)	1.0 µL
10 µM 引子 R ^(註 7)	1.0 µL
DNA 聚合酶 (5 U/µL)	0.5 µL
無菌去離子水	33.5 µL
總體積	50.0 µL

註 6：第一次 PCR 產物建議以 10-20 倍無菌去離子水進行稀釋，供作第二次 PCR 反應 DNA 模板。

註 7：檢測第一群諾羅病毒時，採引子對 G1-SKF/G1-SKR；檢測第二群諾羅病毒時，採引子對 G2-SKF/G2-SKR 及引子對；檢測正對照組（小兒麻痺病毒疫苗），採引子對 SB2-F1/ SB2-R1。

2.12.2. 混合液配製後依下表條件進行 PCR：

步驟	溫度	時間
1. 最初變性	95°C	4 min
2. 變性	95°C	30 sec
3. 黏接	60°C ^{註 8}	30 sec
4. 延展	72°C	1 min
步驟 2 至步驟 4，共進行 40 個循環反應。		
5. 最終延展	72°C	7 min

2.12.3. 膠片電泳分析及結果判讀：

依 2.11.3. 節步驟進行膠片電泳分析及結果判讀。當檢體中含有第一群諾羅病毒時，使用引子對 G1-SKF/G1-SKR，則在 330 bp 位置上應有一明顯 DNA 螢光帶。含第二群諾羅病毒時，引子對 G2-SKF/G2-SKR 在 344 bp 位置上應有一明顯 DNA 螢光帶。每次反應皆應有正對照組及空白組，空白組為無菌去離子水，添加小兒麻痺病毒疫苗之病毒粒子為正對照組。

2.12.4. 定序及序列比對：

依 2.12.3. 節，於膠片電泳確認 PCR 產物後定序。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，以確認諾羅病毒。同一管 RNA 之二重複檢驗，若任一次之結果為陽性時，視為檢驗結果陽性；二重複之結果皆為陰性時，視為檢驗結果陰性。

附註：本方法反應條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之反應條件。

檢驗流程圖

