

# 食品中微生物之檢驗方法—諾羅病毒之檢驗修正 總說明

為加強食品微生物之管理，並依據食品衛生管理法第二十五條規定：「食品衛生檢驗之方法，由中央主管機關公告指定之。」爰修正「食品中微生物之檢驗方法—諾羅病毒之檢驗」，其修正要點如下：

- 一、「適用範圍」新增「飲用水」一項。
- 二、「裝置」修正「聚合酶鏈反應器」及新增水檢體之病毒濃縮使用裝置。
- 三、「試藥」新增「氯仿、丁醇」及「水檢體之病毒濃縮」所需試藥及修正部分引子。
- 四、「器具及材料」新增「PCR 反應管、玻璃或塑膠瓶及濃縮離心管」。
- 五、「試劑之配製」新增「氯仿-丁醇」等溶液之配製及修正部分試劑之配製。
- 六、新增「病毒之濃縮」，分為「貝類檢體」及「飲用水檢體」兩大類。
- 七、「病毒 RNA 之抽取」及「正對照組病毒添加」皆增加「飲用水檢體」之處理流程。
- 八、修正反轉錄反應及 PCR 反應之條件。
- 九、新增檢驗流程圖。
- 十、增修訂部分文字。

# 食品中微生物之檢驗方法—諾羅病毒之檢驗修正 對照表

| 修正規定                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 現行規定                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 說明                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>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。</p> <p>2. 檢驗方法：<u>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。</u></p> <p>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。</p> <p>2.2_ 裝置<sup>(註1)</sup></p> <p>2.2.1_ 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。</p> <p>2.2.2_ 高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.3_ 冰箱：能維持 <math>5\pm3^{\circ}\text{C}</math>。</p> <p>2.2.4_ 均質機(Homogenizer)。</p> <p>2.2.5_ 天平：<u>最大稱重量為 2000 g</u>者，靈敏度為 0.1 g；<u>最大稱重量為 120 g</u>者，靈敏度為 1 mg。</p> <p>2.2.6_ 振盪器。</p> <p>2.2.7_ <u>酸鹼度測定儀(pH meter)</u>。</p> <p>2.2.8_ 紫外燈箱：具波長 312 nm、365 nm 紫外燈。</p> <p>2.2.9_ 微波爐或加熱板(Hot plate)。</p> <p>2.2.10_ 聚合酶鏈反應器：</p> | <p>1.適用範圍：本方法適用於貝類中諾羅病毒之檢驗。</p> <p>2.檢驗方法：反轉錄聚合酶鏈反應(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)方法。</p> <p>2.1 工作環境：工作平台須寬敞、潔淨、光線良好，<u>操作平台光度約為 100 呎燭光</u>。檢體前處理、RT-PCR 試劑配製及<u>相關實驗操作</u>皆需有區隔空間，避免交叉汙染。</p> <p>2.2 裝置：</p> <p>2.2.1 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。</p> <p>2.2.2 高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.3 冰箱：能維持 <math>5\pm3^{\circ}\text{C}</math>。</p> <p>2.2.4 均質機(Homogenizer)。</p> <p>2.2.5 天平：<u>可稱量到 2000 g</u>者，靈敏度為 0.1 g；<u>可稱量到 120 g</u>者，靈敏度為 1 mg。</p> <p>2.2.6 振盪器。</p> <p>2.2.7 pH測定儀。</p> <p>2.2.8 <u>電泳膠體影像系統或</u>紫外燈箱：具波長 312 nm、365 nm 紫外燈。</p> <p>2.2.9 微波爐或加熱板(Hot plate)。</p> <p>2.2.10 聚合酶鏈反應器<sup>(註)</sup></p> | <p>一、「適用範圍」新增「飲用水」一項。</p> <p>二、「裝置」修正「聚合酶鏈反應器」及新增水檢體之病毒濃縮使用裝置。</p> <p>三、「試藥」新增「氯仿、丁醇」及「水檢體之病毒濃縮」所需試藥及修正部分引子。</p> <p>四、「器具及材料」新增「PCR 反應管、玻璃或塑膠瓶及濃縮離心管」。</p> <p>五、「試劑之配製」新增「氯仿-丁醇」等溶液之配製及修正部分試劑之配製。</p> <p>六、新增「病毒之濃縮」，分為「貝類檢體」及「飲用水檢體」兩大類。</p> <p>七、「病毒 RNA 之抽取」及「正對照組病毒添加」皆增加「飲用水檢體」之處理流程。</p> <p>八、修正反轉錄反應及 PCR 反應之條件。</p> <p>九、新增檢驗流程圖。</p> <p>十、增修訂部分文字。</p> |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <p><u>GeneAmp® PCR System 9700</u>，或同級品。</p> <p>2.2.11. 電泳槽：供 DNA 電泳用。</p> <p>2.2.12. 加熱振盪器：<u>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。</u></p> <p>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 20000 × g 以上，並具 4°C 溫控功能。</p> <p>2.2.14. 旋渦混合器 (Vortex mixer)。</p> <p>2.2.15. 抽氣幫浦。</p> <p>2.2.16. 玻璃過濾器組：<u>直徑為 47 mm 且可滅菌者。</u></p> <p>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。</p> <p>2.3. 試藥</p> <p>2.3.1. 病毒萃取用：<u>氯化鈉、氫氧化鈉、硼酸、無水磷酸氫二鈉(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)、磷酸二氫鉀(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)、聚乙二醇 6000 (polyethylene glycol 6000, PEG 6000)、氯仿、丁醇、硫酸、鹽酸、氯化鎂 (MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O)、乙二胺四乙酸二鈉 (ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, Na<sub>2</sub>-EDTA)及三羥甲基胺</u></p> | <p><u>1)</u>：<u>ABI PRISM 9700 Sequence Detector</u>，或同級品。</p> <p>2.2.11 電泳槽：供DNA電泳用。</p> <p>2.2.12 加熱振盪器：能維持內部溫度溫差0.5°C以內者。</p> <p>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<u>15000 rpm (20000 × g)</u>以上，並具4°C溫控功能。</p> <p>2.2.14 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>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。</p> <p>2.3 試藥：</p> <p>2.3.1 病毒萃取用：氯化鈉、無水磷酸氫二鈉、磷酸二氫鉀、<u>消泡劑 B (antifoam B) 及 聚 乙 二 醇 6000 (polyethylene glycol 6000, PEG 6000)</u>等均採用試藥特級。</p> |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <p><u>基甲烷</u><br/>(<u>tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris-base</u>)均採用試藥特級。</p> <p>2.3.2_ 病毒 RNA 抽取用：適用於病毒 RNA 抽取之市售套組。</p> <p>2.3.3_ 病毒 RNA 處理用：去氧核糖核酸水解酶 I (DNase I) 5 U/μL。</p> <p>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 <u>TBE</u> 緩衝溶液、10 mM 去氧核糖核苷三磷酸 (deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)、隨機引子(random-primer)、<u>0.1 M</u> 二硫蘇糖醇(dithiothreitol, DTT)及核糖核酸水解酶抑制劑(RNase inhibitor)。</p> <p>2.3.5_ 聚合酶鏈反應用：</p> <p>2.3.5.1_ DNA 聚合酶：<i>Taq</i> DNA 聚合酶(5 U/μL)，內附 10 倍 <u>PCR</u> 緩衝溶液(含 <u>20 mM</u> 氯化鎂)，或同級品。</p> <p>2.3.5.2_ 去氧核糖核苷三磷酸(<u>Deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP</u>)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)及去氧</p> | <p>2.3.2 病毒RNA抽取用：適用於病毒RNA抽取之市售套組。</p> <p>2.3.3 病毒RNA處理用：去氧核糖核酸水解酶I (DNase I) 5 U/μL。</p> <p>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 倍緩衝溶液、10 mM去氧核糖核苷三磷酸 (deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)、隨機<u>六聚體</u>引子 (random <u>hexamer</u> primer)、<u>100 mM</u>二硫蘇糖醇 (dithiothreitol, DTT) 及核糖核酸水解酶抑制劑 (RNase inhibitor)。</p> <p>2.3.5 聚合酶鏈反應用：</p> <p>2.3.5.1 DNA聚合酶：<i>Taq</i> DNA聚合酶(5 U/μL)，內附 10X緩衝溶液，或同級品。</p> <p>2.3.5.2 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) 及去氧胸苷三磷酸(deoxythymidine triphosphate, dTTP) 各 2.5</p> |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <p>胸苷三磷酸(deoxythymidine triphosphate, dTTP)各 2.5 mM 之溶液。</p> <p>2.3.5.3_ 引子<sup>(註2)</sup>：</p> <p>2.3.5.3.1_ 第一群(Group I, GI)諾羅病毒(標的區域：ORF2)</p> <p><u>引子 F1：COG1F</u><br/>5'-CGYTGGATGCGNTTYCATGA-3'</p> <p><u>引子 F2：G1-SKF</u><br/>5'-CTGCCCCGAATTYGTAATGA-3'</p> <p><u>引子 R：G1-SKR</u><br/>5'-CCAACCCARCCATTTRTACA-3'</p> <p><u>引子 COG1F/G1-SKR 之 PCR 增幅產物大小 381 bp</u></p> <p><u>引子 G1-SKF/G1-SKR 之 PCR 增幅產物大小 330 bp</u></p><br><p>2.3.5.3.2_ 第二群(Group II, GII)諾羅病毒(標的區域：ORF2)</p> <p><u>引子 F1：COG2F</u><br/>5'-CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG-3'</p> <p><u>引子 F2：G2-SKF</u><br/>5'-CNTGGGAGGGCGATCGCAA-3'</p> <p><u>引子 R：G2-SKR</u><br/>5'-CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT-3'</p> <p><u>引子 COG2F/G2-SKR 之 PCR 增幅產物大小 387 bp</u></p> <p><u>引子 G2-SKF/G2-SKR 之 PCR 增幅產物大小 344 bp</u></p> | <p>mM之溶液。</p><br><p>2.3.5.3 引子<sup>(註2)</sup>：</p> <p>2.3.5.3.1 <u>檢測第一群(Group I, GI) 諾羅病毒引子：10 μM/μL。</u></p> <p>標的區域：ORF2</p> <p><u>COG1F(forward)</u><br/>5'-CGYTGGATGCGNTTYCATGA-3'</p> <p><u>COG1R(reverse)</u><br/>5'-CTTAGACGCCATCATCATTYAC-3'</p> <p><u>G1-SKR (reverse)</u><br/>5'-CCAACCCARCCATTTRTACA-3'</p> <p><u>G1-SKF(forward)</u><br/>5'-CTGCCCCGAATTYGTAATGA-3'</p> <p><u>PCR 增幅產物大小</u><br/>COG1F/G1-SKR : 381 bp ;<br/>G1-SKR/G1-SKF : 330 bp ;<br/><u>COG1R/COG1F : 85 bp</u></p> <p>2.3.5.3.2 <u>檢測第二群(Group II, GII) 諾羅病毒引子：10 μM/μL。</u></p> <p>標的區域：ORF2</p> <p><u>COG2F(forward)</u><br/>5'-CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG-3'</p> <p><u>COG2R(reverse)</u><br/>5'-TCGACGCCATCTTCATTCACA-3'</p> <p><u>G2-SKR (reverse)</u><br/>5'-CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT-3'</p> <p><u>G2-SKF(forward)</u><br/>5'-CNTGGGAGGGCGATCGCAA-3'</p> <p><u>ALPF(forward)</u><br/>5'-TTTGAGTCCATGTACAAGTGGATGCG-3'</p> <p><u>G2AL-SKR(reverse)</u><br/>5'-CCACCAGCATATGAATTGTACA</p> |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <p>2.3.5.3.3_ 小兒麻痺病毒<br/>(標的基因:聚合蛋白質基因<br/>(polyprotein gene))<br/>引子 F : SB2-F1<br/>5'-GTTTCATGICTGCTCCGTCTG-3'<br/>引子 R : SB2-R1<br/>5'-AGCAAGCACCGTATTGAGCC-3'<br/>PCR 增幅產物大小 220 bp</p> <p>註 2: 合成之引子拆封後,<br/>以無菌<u>去離子水</u>稀釋成適<br/>當濃度, 分裝後置於-20℃<br/>貯存備用。引子序列中, B<br/>為混合鹼基代碼(C/G/T), 表<br/>示同時含 C、G 及 T; H 為<br/>混合鹼基代碼(A/C/T), 表示<br/>同時含 A、C 及 T; N 為混<br/>合鹼基代碼(A/C/G/T), 表示<br/>同時含 A、C、G 及 T; R<br/>為混合鹼基代碼(A/G), 表<br/>示同時含 A 及 G; Y 為混合<br/>鹼基代碼(C/T), 表示同時含<br/>C 及 T。</p> <p>2.3.6_ 電泳用試藥: 乙二胺<br/>四乙酸二鈉<br/>(ethylenediaminetetraacetic<br/>acid disodium salt,<br/>Na<sub>2</sub>-EDTA)、溴酚藍<br/>(bromophenol blue)、二甲苯</p> | <p>T-3'<br/>PCR 增幅產物大小<br/>COG2F/G2-SKR : 387 bp ;<br/>ALPF/G2AL-SKR : 387 bp ;<br/>G2-SKF/G2-SKR : 344 bp ;<br/>G2-SKF/ G2AL-SKR : 344<br/>bp ; COG2F/COG2R : 98<br/>bp ; ALPF/COG2R : 98 bp<br/>2.3.5.3.3 小兒麻痺病毒引<br/>子: 10 μM/μL。<br/>標的基因: 聚合蛋白質基因<br/>(polyprotein gene)<br/>SB2-F1(forward)<br/>5'-GTTTCATGICTGCTCCGTCTG-3'<br/>SB2-R1 (reverse)<br/>5'-AGCAAGCACCGTATTGAGCC-3'<br/>PCR 增幅產物大小<br/>SB2-R1/SB2-F1 : 220 bp</p> <p>註2: 合成之引子拆封後, 以<br/>無菌<u>純水</u>稀釋成適當濃度,<br/>分裝後置於-20℃貯存備<br/>用。引子序列中, B 為混合<br/>鹼基代碼(C/G/T), 表示同時<br/>含 C、G 及 T; H 為混合鹼基<br/>代碼(A/C/T), 表示同時含<br/>A、C 及 T; N 為混合鹼基代<br/>碼(A/C/G/T), 表示同時含<br/>A、C、G 及 T; R 為混合鹼基<br/>代碼(A/G), 表示同時含 A 及<br/>G; Y 為混合鹼基代碼<br/>(C/T), 表示同時含 C 及 T。</p> <p>2.3.6 電泳用試藥: 乙二胺四<br/>乙酸二鈉<br/>(ethylenediaminetetraacetic<br/>acid disodium salt,<br/>Na<sub>2</sub>-EDTA)、溴酚藍<br/>(bromophenol blue)、二甲苯</p> |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <p>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(<u>DNA molecular weight marker</u>): 100 bp DNA ladder marker。</p> <p>2.3.7. 對照用物質：含第2型不活化小兒麻痺病毒之疫苗。</p> <p>2.4. 器具及材料<sup>(註3)</sup></p> <p>2.4.1. 可調式微量分注器：10 µL、20 µL、200 µL 及 1000 µL。</p> <p>2.4.2. 吸管尖頭(Pipette tips)：10 µL、20 µL、200 µL 及 1000 µL。</p> <p>2.4.3. 微量離心管：200 µL、1.5 mL、2 mL。</p> <p>2.4.4. 藥勺、剪刀、小刀及鑷子：可滅菌者。</p> <p>2.4.5. 塑膠離心管：50 mL。</p> <p>2.4.6. 酒精燈、濾紙及褐色試藥瓶。</p> <p>2.4.7. 電泳膠片製作盤：含製膠用尺梳。</p> <p>2.4.8. 玻棒。</p> <p>2.4.9. 無菌濾膜：孔徑 0.22 µm 之親水性醋酸纖維膜。</p> <p>2.4.10. <u>PCR 反應管：200 µL 及 500 µL。</u></p> <p>2.4.11. <u>玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000 mL。</u></p> <p>2.4.12. <u>濃縮離心管：15 mL，</u></p> | <p>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)等均採用分子生物分析級試藥。DNA 分子量標記物質：100 bp DNA ladder marker。</p> <p>2.3.7 對照用<u>參考</u>物質：含第2型不活化小兒麻痺病毒之疫苗。</p> <p>2.4 器具及材料<sup>(註3)</sup>：</p> <p>2.4.1 可調式微量分注器：10 µL、20 µL、200 µL及1000 µL。</p> <p>2.4.2 吸管尖頭(Pipette tips)：10 µL、20 µL、200 µL 及1000 µL。</p> <p>2.4.3 微量離心管：200 µL及1.5或2.0 mL。</p> <p>2.4.4 藥勺、剪刀、小刀及鑷子：可滅菌者。</p> <p>2.4.5 塑膠離心管：50 mL。</p> <p>2.4.6 酒精燈、濾紙及褐色試藥瓶。</p> <p>2.4.7 電泳膠片製作盤：含製膠用尺梳。</p> <p>2.4.8 玻棒。</p> <p>2.4.9 無菌濾膜：孔徑0.22 µm之親水性醋酸纖維膜。</p> <p>註 3：使用之塑膠或玻璃器皿均為無DNase及RNase污染。</p> |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <p><u>100 K，針對分子量大於 10<sup>5</sup> 道爾頓(dalton)之物質進行濃縮。</u></p> <p>註 3：使用之塑膠或玻璃器皿均為無 DNase 及 RNase 污染。</p> <p>2.5. 試劑之配製</p> <p>2.5.1. 磷酸鹽緩衝溶液 (Phosphate buffered saline, PBS )：</p> <p>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℃滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4。</p> <p>2.5.2. 聚乙二醇 6000-氯化鈉(PEG 6000-氯化鈉)溶液：</p> <p>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℃滅菌 15 分鐘。</p> <p>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。</p> <p>2.5.4. 50 mM 硫酸溶液：</p> <p>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。</p> <p>2.5.5. 0.5 mM 硫酸溶液：</p> <p>量取 50 mM 硫酸溶液以去離子水稀釋 100 倍。</p> <p>2.5.6. 1 mM 氫氧化鈉溶液：</p> <p>稱取氫氧化鈉 4 g，加無菌</p> | <p>2.5 試劑之配製：</p> <p>2.5.1 磷酸鹽緩衝溶液 (Phosphate buffered saline, PBS )：</p> <p>稱取氯化鈉76.5 g，無水磷酸氫二鈉7.2 g，磷酸二氫鉀2.1 g，溶於水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℃滅菌15分鐘，最終 pH值為7.4。</p> <p>2.5.2 聚乙二醇6000-氯化鈉 (PEG 6000-NaCl)溶液：</p> <p>稱取氯化鈉26.4 g，以水溶解使成380 mL，續加入PEG 6000 120 g混勻，以121℃滅菌15分鐘。</p> |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                            |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <p><u>去離子水 80 mL 溶解使成 100 mL，再以無菌去離子水稀釋 1000 倍。</u></p> <p><u>2.5.7. 6 N 鹽酸溶液：</u><br/><u>量取鹽酸 50 mL，緩緩加入無菌去離子水使成 100 mL。</u></p> <p><u>2.5.8. 100 倍三羥甲基胺基甲烷-乙二胺四乙酸溶液：</u><br/><u>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。</u></p> <p><u>2.5.9. 0.5M 乙二胺四乙酸 (EDTA) 溶液：</u><br/><u>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。</u></p> <p><u>2.5.10. 0.5 倍 TBE (Tris-borate-EDTA) 緩衝溶液：</u><br/><u>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。</u></p> <p><u>2.5.11. 6 倍載入膠片緩衝溶</u></p> | <p><u>2.5.3 5 倍 TBE (Tris-borate-EDTA) 緩衝溶液：</u><br/><u>稱取三羥甲基胺基甲烷 54 g，硼酸 27.5 g 及 0.5M pH 8.0 乙二胺四乙酸二鈉 (EDTA) 溶液 20 mL，加水溶解後使成 1000 mL，供作 5 倍 TBE 緩衝溶液。臨用前以水稀釋為 0.5 倍。</u></p> <p><u>2.5.4 6 倍載入膠片緩衝溶液 (6 × gel loading buffer)：</u></p> |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

液( $6 \times$  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  $4^{\circ}\text{C}$  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  $50^{\circ}\text{C}$  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。

#### 2.5.13. 膠片染液：

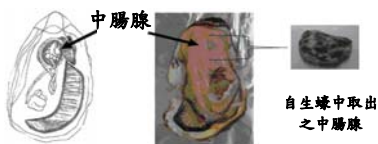
稱取溴化乙錠 0.1 g，加去離子水 10 mL 溶解，供作原液 (10 mg/mL)，使用前以去離子水稀釋成  $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。溴化乙錠為致癌物質，配製時應注意安全。

### 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：

稱取溴酚藍 25 g、二甲苯藍 0.25 g 及量取甘油 30 mL，加入水使成 100 mL，置於冰箱貯存備用。

#### 2.5.5 2%膠片：

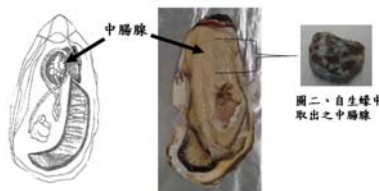
稱取瓊膠 2 g，加入 0.5 倍 TBE 緩衝溶液 100 mL，加熱攪拌至瓊膠完全溶解，冷卻至約  $50^{\circ}\text{C}$  時，倒入電泳膠片製作盤，並置入適當之尺梳，待膠片凝固後，即可使用。

#### 2.5.6 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)，使用前需以水稀釋成含溴化乙錠  $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。溴化乙錠為致癌物質，配製時應注意安全。

#### 2.6 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，如下圖，供作檢體。



圖一、生蠔中中腸腺相對位置圖

#### 2.7 病毒之抽取：

##### 2.7.1 中腸腺前處理：

稱取中腸腺 1.5 g 加入磷酸鹽

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <p>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。</p> <p>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。</p> <p>2.6.2. 飲用水檢體</p> <p>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</p> | <p>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°C 以 5000~12000 rpm(約 2400~13000 × g)離心 20 分鐘，取上層液。</p> <p>2.7.2 PEG 6000 濃縮處理：</p> <p>2.7.2.1 加入 PEG 6000-NaCl 6.5 mL 至 2.7.1 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。</p> <p>2.7.2.2 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。</p> |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

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℃ 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℃ 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

#### 2.8 病毒RNA之抽取：

取2.7.2.2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。

#### 2.9 正對照組病毒添加：

另取中腸腺1.5 g加入含小兒麻痺病毒(約含10,000個病毒粒子)之疫苗，依2.7及2.8節步驟同樣操作，抽取病毒RNA以供作正對照組。

#### 2.10 以DNase I處理病毒RNA溶液：

##### 2.10.1 取微量離心管，依下

|                                                                                    |                                                                                    |                      |                                                                          |
|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| RNA 溶液：                                                                            | 表配製混合液：                                                                            |                      |                                                                          |
| 2.9.1. 取微量離心管，依下表配製混合液：                                                            |                                                                                    |                      |                                                                          |
| 病毒 RNA 溶液                                                                          | 24 μL                                                                              | 病毒 RNA 溶液            | 24 μL                                                                    |
| 10 倍緩衝溶液                                                                           | 3.0 μL                                                                             | 10 倍緩衝溶液             | 3.0 μL                                                                   |
| 無菌去離子水                                                                             | 1.0 μL                                                                             | 無菌去離子水               | 1.0 μL                                                                   |
| DNase I (5 U/μL)                                                                   | 2.0 μL                                                                             | DNase I (5 U/μL)     | 2.0 μL                                                                   |
| 總體積                                                                                | 30 μL                                                                              | 總體積                  | 30 μL                                                                    |
| 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。 | 2.10.2 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，供反轉錄反應用。 |                      |                                                                          |
| 2.10. 反轉錄反應：                                                                       | 2.11 反轉錄反應：                                                                        |                      |                                                                          |
| 2.10.1. 取微量離心管，依下表配製混合液：                                                           | 2.11.1 取微量離心管，依下表配製混合液：                                                            |                      |                                                                          |
| 病毒 RNA 溶液                                                                          | 5.0 μL                                                                             | 經 DNase I 處理之 RNA 溶液 | 25 μL                                                                    |
| 5 倍 TBE 緩衝溶液                                                                       | 5.0 μL                                                                             | 5 倍緩衝溶液              | 10 μL                                                                    |
| 10mM dNTP                                                                          | 4.0 μL                                                                             | 10mM dNTP            | 2.5 μL                                                                   |
| 25mM 氯化鎂溶液                                                                         | 5.0 μL                                                                             | 隨機六聚體引子 (註 4)        | 1.25 μL                                                                  |
| 隨機引子 (3 μg/μL)                                                                     | 1.3 μL                                                                             | 核糖核酸水解酶抑制劑           | 1.67 μL                                                                  |
| 0.1 M DTT                                                                          | 2.5 μL                                                                             | 100 mM DTT           | 2.5 μL                                                                   |
| 核糖核酸水解酶抑制劑 (40 U/μL)                                                               | 1.4 μL                                                                             | 反轉錄酶                 | 2.5 μL                                                                   |
| 反轉錄酶 (200 U/μL)                                                                    | 0.8 μL                                                                             | 無菌去離子水               | 4.58 μL                                                                  |
| 總體積                                                                                | 25.0 μL                                                                            | 總體積                  | 50 μL                                                                    |
| 2.10.2. 混合液配製完成後，依下表條件進行反轉錄反應 <sup>註 4</sup> ：                                     | 註 4：可以諾羅病毒引子組及小兒麻痺病毒引子組，取代隨機六聚體引子。                                                 |                      |                                                                          |
| 步驟                                                                                 | 溫度 (°C)                                                                            | 時間 (min)             | 2.11.2 混合液於 42°C 反應 1 小時，續於 99°C 反應 5 分鐘後，立即移置於冰浴中，此為 cDNA 產物，供聚合酶鏈反應應用。 |
| 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。                                                                                                                                 |              |          |                                                                                      |               |          |
| <u>註 4：對於同一管 RNA，應至少進行二重複反轉錄反應。</u>                                                                                                     |              |          |                                                                                      |               |          |
| 2.11. 第一次聚合酶鏈反應 (PCR)：                                                                                                                  |              |          | 2.12 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：                                                                                                        |              |          | 2.12.1 取微量離心管，依下表配製第一次 PCR 混合液：                                                      |               |          |
| cDNA 產物                                                                                                                                 | 5.0 $\mu$ L  |          | cDNA 產物                                                                              | 5.0 $\mu$ L   |          |
| 10 倍 PCR 緩衝溶液 (含 20 mM 氯化鎂)                                                                                                             | 5.0 $\mu$ L  |          | 10 倍緩衝溶液                                                                             | 5.0 $\mu$ L   |          |
| 2.5mM dNTP                                                                                                                              | 4.0 $\mu$ L  |          | dNTP                                                                                 | 4.0 $\mu$ L   |          |
| 10 $\mu$ M 引子 F <sup>(註5)</sup>                                                                                                         | 1.0 $\mu$ L  |          | 引子 <sup>(註5)</sup> -正股                                                               | 1.0 $\mu$ L   |          |
| 10 $\mu$ M 引子 R <sup>(註5)</sup>                                                                                                         | 1.0 $\mu$ L  |          | 引子 <sup>(註5)</sup> -對股                                                               | 1.0 $\mu$ L   |          |
| DNA 聚合酶(5U/ $\mu$ L)                                                                                                                    | 0.5 $\mu$ L  |          | DNA 聚合酶                                                                              | 0.25 $\mu$ L  |          |
| 無菌去離子水                                                                                                                                  | 33.5 $\mu$ L |          | 無菌去離子水                                                                               | 33.75 $\mu$ L |          |
| 總體積                                                                                                                                     | 50.0 $\mu$ L |          | 總體積                                                                                  | 50 $\mu$ L    |          |
| <u>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。</u> |              |          | <u>註 5：檢測第一群諾羅病毒時，採引子對 COG1F/G1-SKR；檢測第二群諾羅病毒時，採引子對 COG2F/G2-SKR 及 ALPF/G2ALSKR。</u> |               |          |
|                                                                                                                                         |              |          | 2.12.2 取微量離心管，依下表配製正對照組 PCR 混合液：                                                     |               |          |
|                                                                                                                                         |              |          | 正對照組 cDNA                                                                            | 5.0 $\mu$ L   |          |
|                                                                                                                                         |              |          | 10 倍緩衝溶液                                                                             | 5.0 $\mu$ L   |          |
|                                                                                                                                         |              |          | dNTP                                                                                 | 4.0 $\mu$ L   |          |
|                                                                                                                                         |              |          | 引子 SB2-R1                                                                            | 1.0 $\mu$ L   |          |
|                                                                                                                                         |              |          | 引子 SB2-F1                                                                            | 1.0 $\mu$ L   |          |
|                                                                                                                                         |              |          | DNA 聚合酶                                                                              | 0.25 $\mu$ L  |          |
|                                                                                                                                         |              |          | 無菌去離子水                                                                               | 33.75 $\mu$ L |          |
|                                                                                                                                         |              |          | 產物總體積                                                                                | 50 $\mu$ L    |          |
| 2.11.2. 混合液配製後，依下表條件進行 PCR：                                                                                                             |              |          | 2.12.3 混合液配好後，依下表條件進行 PCR：                                                           |               |          |
| 步驟                                                                                                                                      | 溫度           | 時間 (min) | 步驟                                                                                   | 溫度 (°C)       | 時間 (min) |
|                                                                                                                                         |              |          | 1.最初變性                                                                               | 94            | 3        |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| 1.最初變性 95°C 4                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 2.變性 94 1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |  |
| 2.變性 95°C 0.5                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 3.黏接 50 1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |  |
| 3.黏接 50°C 0.5                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 4.延展 72 2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |  |
| 4.延展 72°C 1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 步驟 2 至步驟 4，共進行 40 個循環反應                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |  |
| 步驟 2 至步驟 4，共進行 40 個循環反應                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 5.最終延展 72 15                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |  |
| 5.最終延展 72°C 7                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |  |
| 2.11.3. 膠片電泳分析：                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 2.12.4 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 <u>COG1F/G1-SKR</u> 在 381 bp 位置、引子 <u>G1-SKF/G1-SKR</u> 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 <u>COG2F/G2-SKR</u> 在 387 bp 位置、引子 <u>G2-SKF/G2-SKR</u> 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。 | 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。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(引子 <u>COG1F/G1-SKR</u> )時，在 381 bp 位置上應有一明顯 DNA 螢光帶，含第二群諾羅病毒引子( <u>COG2F/G2-SKR</u> 或 <u>ALPF/G2AL-SKR</u> )時，在 387 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，應續進行巢式 PCR (nested PCR)。每次反應皆應有正對照組及空白組，空白組為無添加對照用參考物質 cDNA 之反應，而正對照組係指有添加對照用參考物質 cDNA 之反應。 |  |
| 2.12. 第二次 PCR：                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 2.13 巢式 PCR：                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |  |
| 2.12.1. 取微量離心管，依下表配製第二次 PCR 混合液：                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 2.13.1 取微量離心管，依下表配製巢式 PCR 混合液：                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |  |
| 第一次 PCR 產物之 5.0 μL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 第一次 PCR 產物 2.0μL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 10倍緩衝溶液 5.0μL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | dNTP 4.0μL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 引子 <sup>(註6)</sup> -正股 1.0μL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |  |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                    |          |                                                                                                                                                                                        |         |          |        |    |   |      |    |     |      |                    |     |      |    |   |                         |  |  |        |    |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |  |    |         |          |        |    |   |      |    |   |      |    |   |      |    |   |                         |  |  |        |    |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|----------|--------|----|---|------|----|-----|------|--------------------|-----|------|----|---|-------------------------|--|--|--------|----|---|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|----|---------|----------|--------|----|---|------|----|---|------|----|---|------|----|---|-------------------------|--|--|--------|----|----|
| <u>稀釋溶液<sup>(註6)</sup></u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                    |          | <u>引子<sup>(註6)</sup>-對股</u> 1.0μL                                                                                                                                                      |         |          |        |    |   |      |    |     |      |                    |     |      |    |   |                         |  |  |        |    |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |  |    |         |          |        |    |   |      |    |   |      |    |   |      |    |   |                         |  |  |        |    |    |
| 10倍PCR緩衝溶液<br>(含20 mM氯化鎂) 5.0 μL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                    |          | DNA聚合酶 0.25μL                                                                                                                                                                          |         |          |        |    |   |      |    |     |      |                    |     |      |    |   |                         |  |  |        |    |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |  |    |         |          |        |    |   |      |    |   |      |    |   |      |    |   |                         |  |  |        |    |    |
| 2.5mM dNTP 4.0 μL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                    |          | 無菌去離子水 36.75μL                                                                                                                                                                         |         |          |        |    |   |      |    |     |      |                    |     |      |    |   |                         |  |  |        |    |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |  |    |         |          |        |    |   |      |    |   |      |    |   |      |    |   |                         |  |  |        |    |    |
| <u>10μM 引子 F<sup>(註7)</sup></u> 1.0 μL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                    |          | <u>總體積</u> 50μL                                                                                                                                                                        |         |          |        |    |   |      |    |     |      |                    |     |      |    |   |                         |  |  |        |    |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |  |    |         |          |        |    |   |      |    |   |      |    |   |      |    |   |                         |  |  |        |    |    |
| <u>10μM 引子 R<sup>(註7)</sup></u> 1.0 μL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                    |          | 註 6：檢測第一群諾羅病毒時，引子對 G1-SKF/G1-SKR 及 COG1F/COG1R；檢測第二群諾羅病毒時，第一次PCR以 COG2F/G2-SKR 為引子對者，則採引子對 G2-SKF/G2-SKR 及 COG2F/COG2R。當第一次PCR以 ALPF/G2AL-SKR 引子對者，則採引子對 G2-SKF/G2AL-SKR 及 ALPF/COG2R。 |         |          |        |    |   |      |    |     |      |                    |     |      |    |   |                         |  |  |        |    |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |  |    |         |          |        |    |   |      |    |   |      |    |   |      |    |   |                         |  |  |        |    |    |
| DNA 聚合酶(5U/μL) 0.5 μL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                    |          |                                                                                                                                                                                        |         |          |        |    |   |      |    |     |      |                    |     |      |    |   |                         |  |  |        |    |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |  |    |         |          |        |    |   |      |    |   |      |    |   |      |    |   |                         |  |  |        |    |    |
| 無菌去離子水 33.5 μL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                    |          |                                                                                                                                                                                        |         |          |        |    |   |      |    |     |      |                    |     |      |    |   |                         |  |  |        |    |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |  |    |         |          |        |    |   |      |    |   |      |    |   |      |    |   |                         |  |  |        |    |    |
| <u>總體積</u> 50 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；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：                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                    |          |                                                                                                                                                                                        |         |          |        |    |   |      |    |     |      |                    |     |      |    |   |                         |  |  |        |    |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |  |    |         |          |        |    |   |      |    |   |      |    |   |      |    |   |                         |  |  |        |    |    |
| <table><tr><td>步驟</td><td>溫度 (°C)</td><td>時間 (min)</td></tr><tr><td>1.最初變性</td><td>95</td><td>4</td></tr><tr><td>2.變性</td><td>95</td><td>0.5</td></tr><tr><td>3.黏接</td><td>60<sup>(註8)</sup></td><td>0.5</td></tr><tr><td>4.延展</td><td>72</td><td>1</td></tr><tr><td colspan="3">步驟 2 至步驟 4，共進行 40 個循環反應</td></tr><tr><td>5.最終延展</td><td>72</td><td>7</td></tr></table> |                    |          | 步驟                                                                                                                                                                                     | 溫度 (°C) | 時間 (min) | 1.最初變性 | 95 | 4 | 2.變性 | 95 | 0.5 | 3.黏接 | 60 <sup>(註8)</sup> | 0.5 | 4.延展 | 72 | 1 | 步驟 2 至步驟 4，共進行 40 個循環反應 |  |  | 5.最終延展 | 72 | 7 | <table><tr><td>步驟</td><td>溫度 (°C)</td><td>時間 (min)</td></tr><tr><td>1.最初變性</td><td>94</td><td>3</td></tr><tr><td>2.變性</td><td>94</td><td>1</td></tr><tr><td>3.黏接</td><td>45</td><td>1</td></tr><tr><td>4.延展</td><td>72</td><td>2</td></tr><tr><td colspan="3">步驟 2 至步驟 4，共進行 35 個循環反應</td></tr><tr><td>5.最終延展</td><td>72</td><td>15</td></tr></table> |  |  | 步驟 | 溫度 (°C) | 時間 (min) | 1.最初變性 | 94 | 3 | 2.變性 | 94 | 1 | 3.黏接 | 45 | 1 | 4.延展 | 72 | 2 | 步驟 2 至步驟 4，共進行 35 個循環反應 |  |  | 5.最終延展 | 72 | 15 |
| 步驟                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 溫度 (°C)            | 時間 (min) |                                                                                                                                                                                        |         |          |        |    |   |      |    |     |      |                    |     |      |    |   |                         |  |  |        |    |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |  |    |         |          |        |    |   |      |    |   |      |    |   |      |    |   |                         |  |  |        |    |    |
| 1.最初變性                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 95                 | 4        |                                                                                                                                                                                        |         |          |        |    |   |      |    |     |      |                    |     |      |    |   |                         |  |  |        |    |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |  |    |         |          |        |    |   |      |    |   |      |    |   |      |    |   |                         |  |  |        |    |    |
| 2.變性                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 95                 | 0.5      |                                                                                                                                                                                        |         |          |        |    |   |      |    |     |      |                    |     |      |    |   |                         |  |  |        |    |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |  |    |         |          |        |    |   |      |    |   |      |    |   |      |    |   |                         |  |  |        |    |    |
| 3.黏接                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 60 <sup>(註8)</sup> | 0.5      |                                                                                                                                                                                        |         |          |        |    |   |      |    |     |      |                    |     |      |    |   |                         |  |  |        |    |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |  |    |         |          |        |    |   |      |    |   |      |    |   |      |    |   |                         |  |  |        |    |    |
| 4.延展                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 72                 | 1        |                                                                                                                                                                                        |         |          |        |    |   |      |    |     |      |                    |     |      |    |   |                         |  |  |        |    |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |  |    |         |          |        |    |   |      |    |   |      |    |   |      |    |   |                         |  |  |        |    |    |
| 步驟 2 至步驟 4，共進行 40 個循環反應                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                    |          |                                                                                                                                                                                        |         |          |        |    |   |      |    |     |      |                    |     |      |    |   |                         |  |  |        |    |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |  |    |         |          |        |    |   |      |    |   |      |    |   |      |    |   |                         |  |  |        |    |    |
| 5.最終延展                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 72                 | 7        |                                                                                                                                                                                        |         |          |        |    |   |      |    |     |      |                    |     |      |    |   |                         |  |  |        |    |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |  |    |         |          |        |    |   |      |    |   |      |    |   |      |    |   |                         |  |  |        |    |    |
| 步驟                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 溫度 (°C)            | 時間 (min) |                                                                                                                                                                                        |         |          |        |    |   |      |    |     |      |                    |     |      |    |   |                         |  |  |        |    |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |  |    |         |          |        |    |   |      |    |   |      |    |   |      |    |   |                         |  |  |        |    |    |
| 1.最初變性                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 94                 | 3        |                                                                                                                                                                                        |         |          |        |    |   |      |    |     |      |                    |     |      |    |   |                         |  |  |        |    |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |  |    |         |          |        |    |   |      |    |   |      |    |   |      |    |   |                         |  |  |        |    |    |
| 2.變性                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 94                 | 1        |                                                                                                                                                                                        |         |          |        |    |   |      |    |     |      |                    |     |      |    |   |                         |  |  |        |    |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |  |    |         |          |        |    |   |      |    |   |      |    |   |      |    |   |                         |  |  |        |    |    |
| 3.黏接                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 45                 | 1        |                                                                                                                                                                                        |         |          |        |    |   |      |    |     |      |                    |     |      |    |   |                         |  |  |        |    |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |  |    |         |          |        |    |   |      |    |   |      |    |   |      |    |   |                         |  |  |        |    |    |
| 4.延展                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 72                 | 2        |                                                                                                                                                                                        |         |          |        |    |   |      |    |     |      |                    |     |      |    |   |                         |  |  |        |    |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |  |    |         |          |        |    |   |      |    |   |      |    |   |      |    |   |                         |  |  |        |    |    |
| 步驟 2 至步驟 4，共進行 35 個循環反應                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                    |          |                                                                                                                                                                                        |         |          |        |    |   |      |    |     |      |                    |     |      |    |   |                         |  |  |        |    |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |  |    |         |          |        |    |   |      |    |   |      |    |   |      |    |   |                         |  |  |        |    |    |
| 5.最終延展                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 72                 | 15       |                                                                                                                                                                                        |         |          |        |    |   |      |    |     |      |                    |     |      |    |   |                         |  |  |        |    |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |  |    |         |          |        |    |   |      |    |   |      |    |   |      |    |   |                         |  |  |        |    |    |
| 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，使用引子對                                                                                                                                                                                                                                                                               |                    |          |                                                                                                                                                                                        |         |          |        |    |   |      |    |     |      |                    |     |      |    |   |                         |  |  |        |    |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |  |    |         |          |        |    |   |      |    |   |      |    |   |      |    |   |                         |  |  |        |    |    |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <p>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<u>無菌去離子水</u>，添加<u>小兒麻痺病毒疫苗之病毒粒子</u>為正對照組。</p> <p>2.12.4. 定序及序列比對：<br/>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。<u>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。</u><br/><u>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。</u></p> | <p>COG1F/COG1R，則在85 bp位置上應有一明顯DNA螢光帶。含第二群諾羅病毒時，<u>使用引子對G2-SKF/G2-SKR及G2-SKF/G2AL-SKR</u>，則在344 bp位置上應有一明顯DNA螢光帶。<u>使用引子對COG2F/COG2R及ALPF/COG2R</u>，則在98 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<u>無添加對照用參考物質cDNA之反應</u>，而正對照組係指有<u>添加對照用參考物質cDNA之反應</u>。</p> <p><u>註7：電泳分析結果疑似為諾羅病毒時，以核酸定序確認之。</u></p> <p>2.13.4 定序及序列比對：<br/>依2.13.3節，於膠片電泳確認PCR產物後定序，<u>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，以確認諾羅病毒。</u></p> |  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

檢驗流程圖

