食品中微生物之檢驗方法—諾羅病毒之檢驗修正草案總說明

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草案對照表

修正規定	現行規定	說明
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。	1.適用範圍：本方法適用於貝類中諾羅病毒之檢驗。	一、「適用範圍」新增「飲用水」一項。
2. 檢驗方法：檢體經 RNA 萃取後，以反轉錄聚合酶鏈反應(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)之方法。	2.檢驗方法：反轉錄聚合酶鏈反應(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)方法。	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。
2.1. 工作環境：工作平台須寬敞、潔淨、光線良好。檢體前處理、RT-PCR 試劑配製及 PCR 等檢驗過程皆需有區隔空間，避免交叉汙染。	2.1 工作環境：工作平台須寬敞、潔淨、光線良好，操作平台光度約為 100 呎燭光。檢體前處理、RT-PCR 試劑配製及相關實驗操作皆需有區隔空間，避免交叉汙染。	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。
2.2. 裝置(註 1)	2.2 裝置：	四、「器具及材料」新增「PCR 反應管、玻璃或塑膠瓶及濃縮離心管」。
2.2.1. 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。	2.2.1 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。	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。
2.2.2. 高壓滅菌釜。	2.2.2 高壓滅菌釜。	六、新增「病毒之濃縮」，分為「貝類檢體」及「飲用水檢體」兩大類。
2.2.3. 冰箱：能維持 5±3℃。	2.2.3 冰箱：能維持 5±3℃。	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。
2.2.4. 均質機(Homogenizer)。	2.2.4 均質機(Homogenizer)。	八、修正反轉錄反應及 PCR 反應之條件。
2.2.5. 天平：最大稱重量為 2000 g者，靈敏度為0.1 g；最大稱重量為120 g者，靈敏度為1 mg。	2.2.5 天平：可稱量到2000 g者，靈敏度為0.1 g；可稱量到120 g者， 靈敏度為1 mg。	九、新增檢驗流程圖。
2.2.6. 振盪器。	2.2.6 振盪器。	十、增修訂部分文字。
2.2.7. 酸鹼度測定儀(pH meter)。	2.2.7 pH測定儀。	
2.2.8. 紫外燈箱：具波長 312 nm、365 nm 紫外燈。	2.2.8 電泳膠體影像系統或紫外燈箱：具波長312 nm、365 nm紫外燈。	
2.2.9. 微波爐或加熱板(Hot plate)。	2.2.9 微波爐或加熱板(Hot plate)。	
2.2.10. 聚合酶鏈反應器：	2.2.10 聚合酶鏈反應器(註	

GeneAmp® PCR System 9700，或同級品。	[1]：ABI PRISM 9700 Sequence Detector，或同級品。	
2.2.11. 電泳槽：供 DNA 電泳用。	2.2.11 電泳槽：供DNA電泳用。	
2.2.12. 加熱振盪器：具55℃溫控及振盪功能，且能維持內部溫度溫差 0.5℃以內者。	2.2.12 加熱振盪器：能維持內部溫度溫差0.5℃以內者。	
2.2.13. 微量冷凍離心機(Micro refrigerated centrifuge)：可供各式離心管離心使用，可達 20000 × g 以上，並具 4℃溫控功能。	2.2.13 微量冷凍離心機(Micro refrigerated centrifuge)：可供各式離心管離心使用，可達15000 rpm (20000 × g)以上，並具4℃溫控功能。	
2.2.14. 旋渦混合器(Vortex mixer)。	2.2.14 旋渦混合器(Vortex mixer)。	
2.2.15. 抽氣幫浦。		
2.2.16. 玻璃過濾器組：直徑為 47 mm 且可滅菌者。		
註 1：本方法所使用或提及之產品品牌不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或未提及之產品品牌亦不代表為同類產品中較差者。	註 1: 本方法所使用或提及之產品品牌不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或未提及之產品品牌亦不代表為同類產品中較差者。	
2.3. 試藥	2.3 試藥：	
2.3.1. 病毒萃取用：氯化鈉、氫氧化鈉、硼酸、無水磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)、磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)、聚乙二醇 6000 (polyethylene glycol 6000, PEG 6000)、氯仿、丁醇、硫酸、鹽酸、氯化鎂($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)、乙二胺四乙酸二鈉(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, Na2-EDTA)及三羥甲基胺	2.3.1 病毒萃取用：氯化鈉、無水磷酸氫二鈉、磷酸二氫鉀、消泡劑 B (antifoam B)及聚乙二醇 6000 (polyethylene glycol 6000, PEG 6000)等均採用試藥特級。	

基甲烷(tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris-base)均採用試藥特級。		
2.3.2. 病毒 RNA 抽取用：適用於病毒 RNA 抽取之市售套組。	2.3.2 病毒RNA抽取用：適用於病毒RNA抽取之市售套組。	
2.3.3. 病毒 RNA 處理用：去氧核糖核酸水解酶 I (DNase I)5 U/μL。	2.3.3 病毒RNA處理用：去氧核糖核酸水解酶I (DNase I) 5 U/μL。	
2.3.4. 反轉錄反應用：適用於病毒 RNA 抽取之市售套組，內含反轉錄酶(reverse transcriptase)、5 倍 TBE 緩衝溶液、10 mM 去氧核糖核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)、隨機引子(random-primer)、0.1 M 二硫蘇糖醇(dithiothreitol, DTT)及核糖核酸水解酶抑制劑(RNase inhibitor)。	2.3.4 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)、隨機六聚體引子 (random hexamer primer)、100 mM二硫蘇糖醇 (dithiothreitol, DTT) 及核糖核酸水解酶抑制劑 (RNase inhibitor)。	
2.3.5. 聚合酶鏈反應用： 2.3.5.1. DNA 聚合酶：*Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL)，內附 10 倍 PCR 緩衝溶液(含 20 mM 氯化鎂)，或同級品。	2.3.5 聚合酶鏈反應用： 2.3.5.1 DNA聚合酶：*Taq* DNA聚合酶(5 U/μL)，內附 10X緩衝溶液，或同級品。	
2.3.5.2. 去氧核糖核苷三磷酸(Deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)溶液：含去氧腺苷三磷酸(deoxyadenosine triphosphate, dATP)，去氧胞苷三磷酸(deoxycytidine triphosphate, dCTP)，去氧鳥糞嘌呤苷三磷酸(deoxyguanosine triphosphate, dGTP)及去氧	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)，去氧鳥糞嘌呤苷三磷酸 (deoxyguanosine triphosphate, dGTP) 及去氧胸苷三磷酸(deoxythymidine triphosphate, dTTP) 各 2.5	

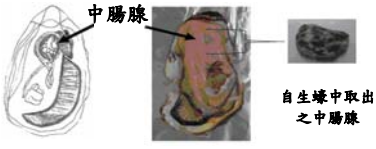
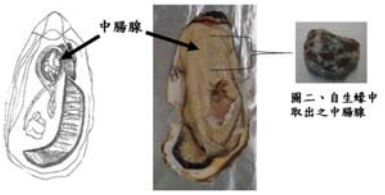
胸苷三磷酸(deoxythymidine triphosphate, dTTP)各 2.5 mM 之溶液。 2.3.5.3. 引子(註 2)： 2.3.5.3.1. 第一群(Group I, GI)諾羅病毒(標的區域：ORF2) 引子 F1：COG1F 5'-CGYTGGATGCGNTTYCATGA-3' 引子 F2：G1-SKF 5'-CTGCCCGAATTYGTAAATGA-3' 引子 R：G1-SKR 5'-CCAACCCARCCATTRTACA-3' 引子 COG1F/G1-SKR 之 PCR 增幅產物大小 381 bp 引子 G1-SKF/G1-SKR 之 PCR 增幅產物大小 330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

	T-3’ PCR 增幅產物大小 COG2F/G2-SKR : 387 bp； ALPF/G2AL-SKR : 387 bp； G2-SKF/G2-SKR : 344 bp； G2-SKF/ G2AL-SKR : 344 bp； COG2F/COG2R : 98 bp；ALPF/COG2R : 98 bp	
2.3.5.3.3. 小兒麻痺病毒(標的基因：聚合蛋白質基因(polyprotein gene)) 引子 F：SB2-F1 5’-GTTTCATGTCTGCTCCGTCTG-3’ 引子 R：SB2-R1 5’-AGCAAGCACCGTATTGAGCC-3’ PCR 增幅產物大小 220 bp	2.3.5.3.3 小兒麻痺病毒引子: 10 μM/μL。 標的基因: 聚合蛋白質基因(polyprotein gene) SB2-F1(forward) 5’-GTTTCATGTCTGCTCCGTCTG-3’ SB2-R1 (reverse) 5’-AGCAAGCACCGTATTGAGCC-3’ PCR 增幅產物大小 SB2-R1/SB2-F1：220 bp	
註 2：合成之引子拆封後，以無菌去離子水稀釋成適當濃度，分裝後置於–20℃貯存備用。引子序列中，B 為混合鹼基代碼(C/G/T)，表示同時含 C、G 及 T；H 為混合鹼基代碼(A/C/T)，表示同時含 A、C 及 T；N 為混合鹼基代碼(A/C/G/T)，表示同時含 A、C、G 及 T；R 為混合鹼基代碼(A/G)，表示同時含 A 及 G；Y 為混合鹼基代碼(C/T)，表示同時含 C 及 T。	註2：合成之引子拆封後，以無菌純水稀釋成適當濃度，分裝後置於–20℃貯存備用。引子序列中，B為混合鹼基代碼(C/G/T)，表示同時含C、G及T；H為混合鹼基代碼(A/C/T)，表示同時含A、C及 T；N為混合鹼基代碼(A/C/G/T)，表示同時含A、C、G及T；R為混合鹼基代碼(A/G)，表示同時含A及G；Y為混合鹼基代碼(C/T)，表示同時含C及T。	
2.3.6. 電泳用試藥：乙二胺四乙酸二鈉(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, Na2-EDTA)、溴酚藍(bromophenol blue)、二甲苯	2.3.6 電泳用試藥：乙二胺四乙酸二鈉(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, Na2-EDTA)、溴酚藍(bromophenol blue)、二甲苯	

藍(xylene cyanol FF)、溴化乙錠(ethidium bromide)、三羥甲基胺基甲烷(tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris-base)、甘油、硼酸及瓊膠(agarose)均採用分子生物分析級試藥。DNA分子量標記物質(DNA molecular weight marker): 100 bp DNA ladder marker。 2.3.7. 對照用物質：含第2型不活化小兒麻痺病毒之疫苗。 2.4. 器具及材料(註3) 2.4.1. 可調式微量分注器：10 μL、20 μL、200 μL及1000 μL。 2.4.2. 吸管尖頭(Pipette tips)：10 μL、20 μL、200 μL及1000 μL。 2.4.3. 微量離心管：200 μL、1.5 mL、2 mL。 2.4.4. 藥勺、剪刀、小刀及鑷子：可滅菌者。 2.4.5. 塑膠離心管：50 mL。 2.4.6. 酒精燈、濾紙及褐色試藥瓶。 2.4.7. 電泳膠片製作盤：含製膠用尺梳。 2.4.8. 玻棒。 2.4.9. 無菌濾膜：孔徑0.22 μm之親水性醋酸纖維膜。 2.4.10. PCR反應管：200 μL及500 μL。 2.4.11. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL及2000 mL。 2.4.12.濃縮離心管：15 mL，	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。 2.3.7 對照用參考物質：含第2型不活化小兒麻痺病毒之疫苗。 2.4 器具及材料(註3)： 2.4.1 可調式微量分注器：10 μL、20 μL、200 μL及1000 μL。 2.4.2 吸管尖頭(Pipette tips)：10 μL、20 μL、200 μL及1000 μL。 2.4.3 微量離心管：200 μL及1.5或2.0 mL。 2.4.4 藥勺、剪刀、小刀及鑷子：可滅菌者。 2.4.5 塑膠離心管：50 mL。 2.4.6 酒精燈、濾紙及褐色試藥瓶。 2.4.7 電泳膠片製作盤：含製膠用尺梳。 2.4.8 玻棒。 2.4.9 無菌濾膜：孔徑0.22 μm之親水性醋酸纖維膜。 註 3：使用之塑膠或玻璃器皿均為無DNase及RNase污染。	

100 K，針對分子量大於 10^5 道爾頓(dolton)之物質進行濃縮。 註 3：使用之塑膠或玻璃器皿均為無 DNase 及 RNase 污染。		
2.5. 試劑之配製 2.5.1. 磷酸鹽緩衝溶液 (Phosphate buffered saline, PBS)： 稱取氯化鈉 76.5 g、無水磷酸氫二鈉 7.2 g 及磷酸二氫鉀 2.1 g，溶於水 1000 mL，即為 10 倍 PBS 緩衝溶液。取 10 倍 PBS 緩衝溶液 100 mL，加水使成 1000 mL，以 121℃滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4。 2.5.2. 聚乙二醇 6000-氯化鈉(PEG 6000-氯化鈉)溶液：稱取氯化鈉 26.4 g，以水溶解使成 380 mL，再加入聚乙二醇 6000 120 g，混勻，以 121℃滅菌 15 分鐘。 2.5.3. 氯仿-丁醇溶液：分別取等體積的氯仿與丁醇，置於褐色瓶，混合均勻。 2.5.4. 50 mM 硫酸溶液：量取硫酸 1.39 mL，緩緩加入無菌去離子水 200 mL 中，再加無菌去離子水使成 500 mL。 2.5.5. 0.5 mM 硫酸溶液：量取 50 mM 硫酸溶液以去離子水稀釋 100 倍。 2.5.6. 1 mM 氫氧化鈉溶液：稱取氫氧化鈉 4 g，加無菌去離子水 80 mL 溶解使成	2.5 試劑之配製： 2.5.1 磷酸鹽緩衝溶液 (Phosphate buffered saline, PBS)： 稱取氯化鈉76.5 g，無水磷酸氫二鈉7.2 g，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。 2.5.2 聚乙二醇6000-氯化鈉 (PEG 6000-NaCl)溶液： 稱取氯化鈉26.4 g，以水溶解使成380 mL，續加入PEG 6000 120 g混勻，以121℃滅菌15分鐘。	

100 mL，再以無菌去離子水稀釋 1000 倍。 2.5.7. 6 N 鹽酸溶液： 量取鹽酸 50 mL，緩緩加入無菌去離子水使成 100 mL。 2.5.8. 100 倍三羥甲基胺基甲烷-乙二胺四乙酸溶液： 稱取三羥甲基胺基甲烷 12.1 g 及乙二胺四乙酸 2.9 g，以去離子水 80 mL 溶解，再以 6 N 鹽酸溶液調整 pH 值至 8.0，並加去離子水使成 100 mL，以 121℃滅菌 15 分鐘。或使用市售 100 倍無菌三羥甲基胺基甲烷-乙二胺四乙酸溶液。 2.5.9. 0.5M 乙二胺四乙酸(EDTA)溶液： 稱取乙二胺四乙酸二鈉 186.1 g，加去離子水 800 mL 溶解，再加入氫氧化鈉 20 g，調整 pH 值至 8.0，並加去離子水使成 1000 mL。		
2.5.10. 0.5 倍 TBE (Tris-borate-EDTA)緩衝溶液： 稱取三羥甲基胺基甲烷 54 g 及硼酸 27.5 g，加入 0.5M EDTA 溶液 20 mL，再加水溶解使成 1000 mL，供作 5 倍 TBE 緩衝溶液，或使用市售 5 倍 TBE 緩衝溶液。臨用前以去離子水將 5 倍 TBE 緩衝溶液稀釋為 0.5 倍，作為 0.5 倍 TBE 緩衝溶液。	2.5.3 5倍TBE(Tris-borate-EDTA)緩衝溶液： 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。	
2.5.11. 6 倍載入膠片緩衝溶液(6 × gel loading buffer)：	2.5.4 6倍載入膠片緩衝溶液(6 × gel loading buffer)：	

稱取溴酚藍 25 g 及二甲苯藍 0.25 g，加入甘油 30 mL，再加入無菌去離子水使成 100 mL，置於 4℃冰箱貯存備用。 2.5.12. 2.5%膠片： 稱取瓊膠 2.5 g，加入 0.5 倍 TBE 緩衝溶液 100 mL，加熱攪拌至瓊膠完全溶解，冷卻至約 50℃時，倒入電泳膠片製作盤，並置入適當之尺梳，待膠片凝固後，即可使用。 2.5.13. 膠片染液： 稱取溴化乙錠 0.1 g，加水 10 mL 溶解，供作原液(10 mg/mL)，使用前以水稀釋成 1 μg/mL。溴化乙錠為致癌物質，配製時應注意安全。 2.6. 病毒之濃縮 2.6.1. 貝類檢體 2.6.1.1. 貝類檢體處理： 貝類外殼用已滅菌小刀或鑷子打開，取出肉質部分並將外套膜及白色組織去除，白色組織儘可能剔除乾淨，留下中腸腺部分，供作檢體，如圖一。  圖一、生蠔中中腸線相對位置圖 2.6.1.2. 中腸腺前處理： 取中腸腺 1.5 g，置於 50 mL 離心管，加入磷酸鹽緩衝溶	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℃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 μg/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、生蠔中中腸線相對位置圖 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	

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℃旋轉混合均勻 1 小時，以轉速 12000×g 離心 20 分鐘，取上層液。 2.6.1.3. PEG 6000 濃縮處理：加 PEG6000-氯化鈉溶液 10.5 mL 至 2.6.1.2.節上層液中，充份混勻，混合液於 4℃持續旋轉混合均勻過夜。混合液於 4℃以 12000×g 以上之轉速進行離心 20 分鐘，去除上清液，續以市售套組操作抽取病毒 RNA。 2.6.2. 飲用水檢體 2.6.2.1.大量檢體之病毒濃縮：取檢體 100～1000 mL，加入氯化鎂(最終濃度 25 mM)，設置一水檢體過濾裝置(如圖二)，將檢體加入過濾漏斗中，經由真空抽氣，將檢體通過無菌濾膜，以 0.5 mM 硫酸溶液 200 mL 沖洗濾膜，棄沖洗液，置換過濾吸引瓶成檢液收集裝置(如圖三)，再以 1 mM 氫氧化鈉溶液 10 mL 洗滌濾膜，收集洗滌液至檢液收集裝置內之無菌離心管中，該離心管預先加入 50 mM 硫酸溶液 0.1 mL 及 100 倍三羥甲基胺基甲烷-乙二胺四乙酸溶液 0.1 mL，取出離心管，將洗滌液倒入濃縮離心	緩衝溶液10 mL及消泡劑B 0.2 mL，以均質機18000 rpm均質30秒，停頓30秒，再以18000 rpm均質30秒。於4℃以5000～12000 rpm(約2400～13000 × g)離心20分鐘，取上層液。 2.7.2 PEG 6000濃縮處理： 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℃放置過夜，再於室溫以120 rpm振盪2小時。 2.7.2.2 於 4℃ 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℃以10000 rpm(約9200 × g)離心20分鐘，取上層液供作檢液。	

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 RNA 溶液： 2.9.1. 取微量離心管，依下	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	

表配製混合液：

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

2.9.2. 混合液於 37℃反應 30 分鐘，續以 75℃反應 5 分鐘後，立即移置冰浴中，即為經 DNase I 處理之 RNA 溶液，供反轉錄反應用。

2.10. 反轉錄反應：

2.10.1. 取微量離心管，依下表配製混合液：

病毒 RNA 溶液	5.0 μL
5 倍 TBE 緩衝溶液	5.0 μL
10mM dNTP	4.0 μL
25mM 氯化鎂溶液	5.0 μL
隨機引子(3μg/μL)	1.3 μL
0.1 M DTT	2.5 μL
核糖核酸水解酶抑制劑(40U/μL)	1.4 μL
反轉錄酶(200U/μL)	0.8 μL
總體積	25.0 μL

2.10.2. 混合液配製完成後，依下表條件進行反轉錄反應[註4]：

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

反應完畢立即移置冰浴中，此為 cDNA 產物，供聚合酶鏈反應用。

註 4：對於同一管 RNA，應

表配製混合液：

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

2.10.2 混合液於37℃反應30分鐘，續於75℃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。

2.11 反轉錄反應：

2.11.1 取微量離心管，依下表配製混合液：

經 DNase I 處理之 RNA 溶液	25μL
5 倍緩衝溶液	10μL
10mM dNTP	2.5μL
隨機六聚體引子[註4]	1.25μL
核糖核酸水解酶抑制劑	1.67μL
100 mM DTT	2.5μL
反轉錄酶	2.5μL
無菌去離子水	4.58μL
總體積	50μL

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。

2.11.2 混合液於42℃反應1小時，續於99℃反應5分鐘後，立即移置於冰浴中，此為cDNA產物，供聚合酶鏈反應用。

至少進行二重複反轉錄反應。 2.11. 第一次聚合酶鏈反應(PCR)： 2.11.1. 取微量離心管，依下表配製第一次 PCR 混合液： cDNA 產物 5.0 μL 10 倍 PCR 緩衝溶液(含 20 mM 氯化鎂) 5.0 μL 2.5mM dNTP 4.0 μL 10μM 引子 F(註5) 1.0 μL 10μM 引子 R(註5) 1.0 μL DNA 聚合酶(5U/μL) 0.5 μL 無菌去離子水 33.5 μL 總體積 50.0 μL 註 5：檢測第一群諾羅病毒，採引子對 COG1F/G1-SKR 及 G1-SKF/G1-SKR；檢測第二群諾羅病毒，採引子對 COG2F/G2-SKR 及 G2-SKF/G2-SKR；檢測正對照組（小兒麻痺病毒疫苗），採引子對 SB2-F1/ SB2-R1。 2.11.2. 混合液配製後，依下表條件進行 PCR： 步驟 溫度 時間(min) 1.最初變性 95℃ 4 2.變性 95℃ 0.5 3.黏接 50℃ 0.5	2.12 第一次聚合酶鏈反應(PCR)： 2.12.1 取微量離心管，依下表配製第一次 PCR 混合液： cDNA 產物 5.0μL 10 倍緩衝溶液 5.0μL dNTP 4.0μL 引子(註5)-正股 1.0μL 引子(註5)-對股 1.0μL DNA 聚合酶 0.25μL 無菌去離子水 33.75μL 總體積 50μL 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。 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 5.0μL 10倍緩衝溶液 5.0μL dNTP 4.0μL 引子SB2-R1 1.0μL 引子SB2-F1 1.0μL DNA聚合酶 0.25μL 無菌去離子水 33.75μL 產物總體積 50μL 2.12.3 混合液配好後，依下表條件進行PCR： 步驟 溫度(℃) 時間(min) 1.最初變性 94 3	

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 2.11.3. 膠片電泳分析： 取適量之 6 倍載入膠片緩衝溶液，分別與 DNA 分子量標記物質、無菌去離子水(空白組)及 PCR 增幅產物混合均勻，注入 2.5%膠片孔中，以 50 或 100 伏特電壓進行電泳。電泳後之膠片置入膠片染液中染色約 10 分鐘後，續置入水中漂洗及褪染，再以紫外光照射觀察是否有明顯之 DNA 螢光帶，並判讀結果。正對照組在 220 bp 位置上應有一明顯 DNA 螢光帶。當檢體中含有第一群諾羅病毒時，引子 COG1F/G1-SKR 在 381 bp 位置、引子 G1-SKF/G1-SKR 在 330 bp 位置上應各有一明顯 DNA 螢光帶；含第二群諾羅病毒時，引子 COG2F/G2-SKR 在 387 bp 位置、引子 G2-SKF/G2-SKR 在 344 bp 位置上應有一明顯 DNA 螢光帶。當第一次聚合酶鏈反應結果無明顯 DNA 螢光帶時，應續進行第二次 PCR。每次反應皆應有正對照組及空白組，空白組為無菌去離子水，添加小兒麻痺病毒疫苗之病毒粒子為正對照組。 2.12. 第二次 PCR： 2.12.1. 取微量離心管，依下表配製第二次 PCR 混合液：	2.變性 94 1 3.黏接 50 1 4.延展 72 2 步驟 2 至步驟 4，共進行 40 個循環反應 5.最終延展 72 15 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%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COG1F/G1-SKR)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(COG2F/G2-SKR或 ALPF/G2AL-SKR)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。 2.13 巢式PCR： 2.13.1 取微量離心管，依下表配製巢式PCR混合液：	

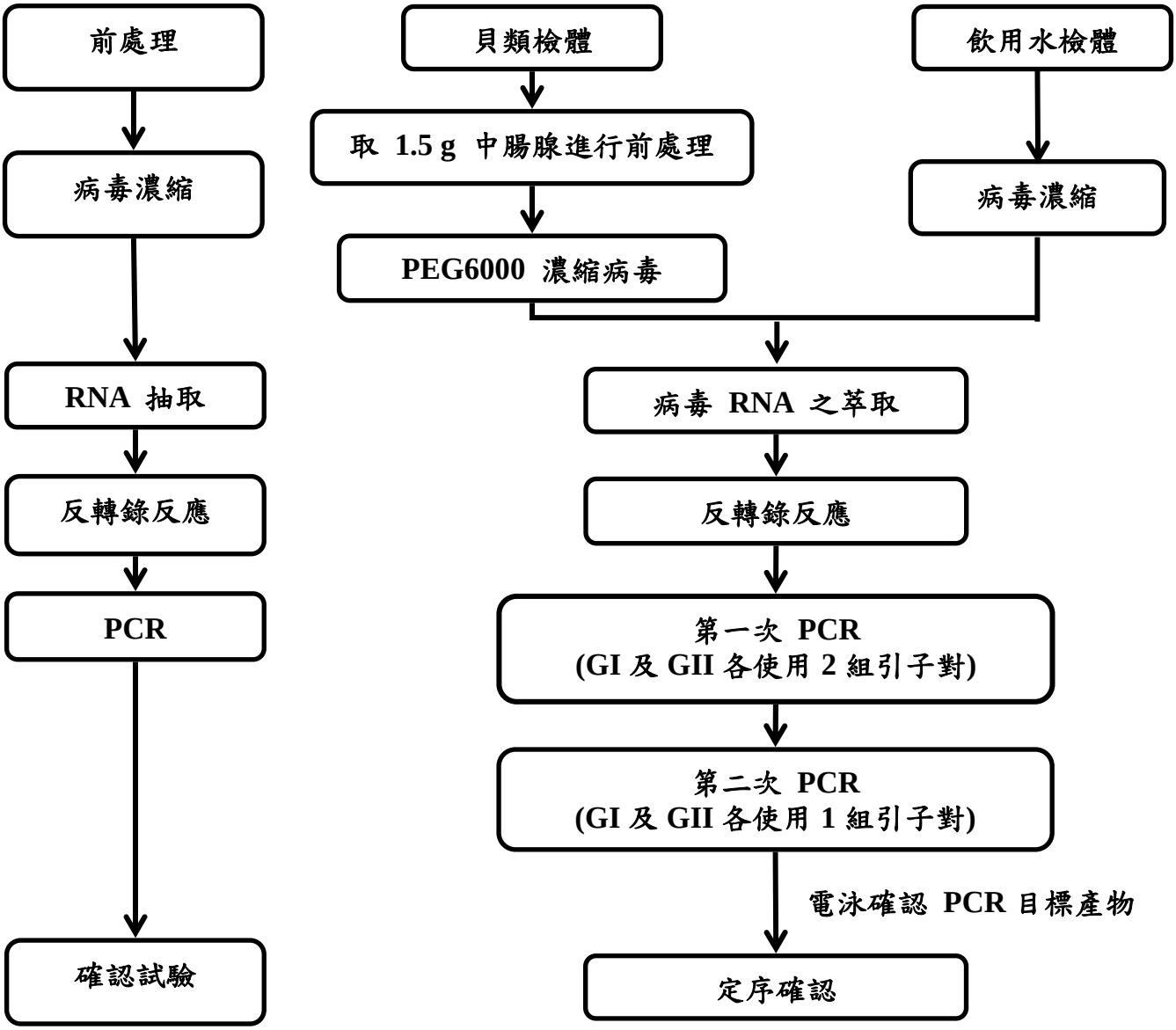
第一次PCR產物之稀釋溶液(註6)	5.0 μL
10倍PCR緩衝溶液(含20 mM氯化鎂)	5.0 μL

第一次 PCR產物	2.0μL
10倍緩衝溶液	5.0μL
dNTP	4.0μL
引子(註6)-正股	1.0μL

2.5mM dNTP 4.0 μL 10μM 引子 F(註7) 1.0 μL 10μM 引子 R(註7) 1.0 μL DNA 聚合酶(5U/μL) 0.5 μL 無菌去離子水 33.5 μL 總體積 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： 步驟 溫度(℃) 時間(min) 1.最初變性 95 4 2.變性 95 0.5 3.黏接 60(註8) 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 2.12.3. 膠片電泳分析及結果判讀： 依2.11.3.節步驟進行膠片電泳分析及結果判讀。當檢體中含有第一群諾羅病毒時，使用引子對 G1-SKF/G1-SKR，則在330 bp位置上應有一明顯DNA螢光帶。含第二群諾羅病毒	引子(註6)-對股 1.0μL DNA聚合酶 0.25μL 無菌去離子水 36.75μL 總體積 50μL 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。 2.13.2 混合液配好後依下表條件進行PCR： 步驟 溫度(℃) 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 2.13.3 膠片電泳分析及結果判讀(註7)： 依2.12.4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	

時，引子對G2-SKF/G2-SKR在344 bp位置上應有一明顯DNA螢光帶。每次反應皆應有正對照組及空白組，空白組為無菌去離子水，添加小兒麻痺病毒疫苗之病毒粒子為正對照組。	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，使用引子對G2-SKF/G2-SKR及G2-SKF/G2AL-SKR，則在344 bp位置上應有一明顯DNA螢光帶。使用引子對COG2F/COG2R及ALPF/COG2R，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。 註7：電泳分析結果疑似為諾羅病毒時，以核酸定序確認之。	
2.12.4. 定序及序列比對： 依2.12.3.節，於膠片電泳確認PCR產物後定序。取得定序結果，將序列上載至美國國家衛生院NCBI Blast網頁，與GenBank資料庫做序列比對，以確認諾羅病毒。同一管RNA之二重複檢驗，若任一次之結果為陽性時，視為檢驗結果陽性；二重複之結果皆為陰性時，視為檢驗結果陰性。 附註：本方法反應條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之反應條件。	2.13.4 定序及序列比對： 依2.13.3節，於膠片電泳確認PCR產物後定序，每一PCR產物至少做正向(forward)與反向(reverse)定序。俟取得定序結果，將序列上載至美國國家衛生院NCBI Blast網頁，與GenBank資料庫做序列比對，比對序列相同度達95%以上，且為序列相同度最高者，作為比對結果，以確認諾羅病毒。	

檢驗流程圖


前處理
病毒濃縮
RNA 抽取
反轉錄反應
PCR
確認試驗
貝類檢體
取 1.5 g 中腸腺進行前處理
PEG6000 濃縮病毒
飲用水檢體
病毒濃縮
病毒 RNA 之萃取
反轉錄反應
第一次 PCR
(GI 及 GII 各使用 2 組引子對)
第二次 PCR
(GI 及 GII 各使用 1 組引子對)
電泳確認 PCR 目標產物
定序確認