

食品微生物之檢驗方法－輪狀病毒A型之檢驗

Methods of Test for Food Microorganisms - Test of Rotavirus A

1. 適用範圍：本方法適用於貝類、飲用水及蔬果中輪狀病毒A型之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經RNA萃取後，以反轉錄聚合酶鏈反應(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)分析之方法。
 - 2.1. 工作環境：工作平台須寬敞、潔淨、光線良好。檢體前處理、RT-PCR試劑配製及PCR等檢驗過程皆需有區隔空間，避免交叉汙染。
 - 2.2. 裝置^(註1)
 - 2.2.1. 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。
 - 2.2.2. 高壓滅菌釜：可達121°C以上者。
 - 2.2.3. 冰箱：能維持 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 。
 - 2.2.4. 冷凍櫃：能維持 $-30 \pm 3^\circ\text{C}$ 。
 - 2.2.5. 超低溫冷凍櫃：能維持 $-70 \pm 5^\circ\text{C}$ 。
 - 2.2.6. 均質機。
 - 2.2.7. 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。
 - 2.2.8. 振盪器。
 - 2.2.9. 酸鹼度測定儀。
 - 2.2.10. 紫外燈箱：具波長312 nm、365 nm紫外燈。
 - 2.2.11. 微波爐或加熱板。
 - 2.2.12. 聚合酶鏈反應器：GeneAmp® PCR System 9700，或同級品。
 - 2.2.13. 電泳槽：供DNA電泳用。
 - 2.2.14. 微量冷凍離心機：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。
 - 2.2.15. 旋渦混合器。
- 註1：本方法所使用或提及之產品品牌不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或未提及之產品品牌亦不代表為同類產品中較差者。
- 2.3. 試藥
 - 2.3.1. 病毒萃取用：氯化鈉、甘胺酸(glycine)、氫氧化鈉、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)、聚乙二醇8000 (polyethyleneglycol 8000, PEG 8000)、氯仿、丁醇、鹽酸、硼酸、氯化鎂($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)、乙二胺四乙酸二鈉(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, Na_2 -EDTA)及三羥甲基胺基甲烷(tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris-base)均採試藥特級；牛肉萃取物(beef extract powder)及蛋白腺(peptone)均採微生物級；果膠酶(pectinase from *Aspergillus niger* or *Aspergillus aculeatus*)採分子生物級。

2.3.2. 病毒RNA抽取用：適用於病毒RNA抽取之市售套組。

2.3.3. 病毒RNA處理用：去氧核糖核酸水解酶I (DNase I) 5 U/ μ L。

2.3.4. 反轉錄反應用：反轉錄酶(reverse transcriptase)、5倍TBE緩衝溶液、10 mM去氧核糖核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)、隨機引子(random-primer)、0.1 M二硫蘇糖醇(dithiothreitol, DTT)及核糖核酸水解酶抑制劑(RNase inhibitor)。

2.3.5. 聚合酶鏈反應用：

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

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

2.3.5.3. 引子^(註2)：輪狀病毒A型

(標的基因：outer capsid protein VP7 gene)

引子F：Beg9

5'-GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG-3'

引子R：Vp7-1

5'-ACTGATCCTGTTGGCCATCCTTT-3'

PCR增幅產物大小 395 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°C貯存備用。

2.3.6. 電泳用試藥：乙二胺四乙酸二鈉(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, Na_2 -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：輪狀病毒A型。

2.4. 器具及材料^(註3)

2.4.1. 可調式微量分注器：2 μ L、10 μ L、20 μ L、200 μ L及1000 μ L。

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

2.4.3. 吸管或自動吸管/吸管尖：已滅菌。1mL吸管應有0.01 mL之刻度、5 mL及10 mL吸管應有0.1 mL刻度，塑膠和玻璃材質。

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

2.4.5. 微量離心管：1.5 mL及2 mL。

2.4.6. 離心管：50 mL，PP材質。

2.4.7. 分子篩濃縮離心管：15 mL及50 mL，可收集分子量大於50 kDa之物質。

2.4.8. 無菌袋、附濾網無菌袋。

2.4.9. 藥勺、剪刀、小刀及鑷子：可滅菌者。

2.4.10. PCR反應管：200 μ L及500 μ L及96孔反應盤。

2.4.11. 電泳膠片製作盤：含製膠用尺梳。

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、磷酸氫二鈉7.2 g及磷酸二氫鉀2.1 g，溶於去離子水1000 mL，即為10倍PBS緩衝溶液。取10倍PBS緩衝溶液100 mL，加去離子水使成1000 mL，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.4。

2.5.2. 聚乙二醇6000-氯化鈉(PEG 6000-氯化鈉)溶液：

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

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

2.5.4. 1 mM氫氧化鈉溶液：

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

2.5.5. 6 N鹽酸溶液：

量取12 N鹽酸50 mL，緩緩加入去離子水使成100 mL。

2.5.6. 0.5 M 乙二胺四乙酸(EDTA)溶液：

稱取乙二胺四乙酸二鈉186.1 g，加入去離子水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

2.5.7. 蛋白胍緩衝溶液(Buffer peptone water, BPW)：

稱取蛋白胍10 g、氯化鈉5 g、磷酸氫二鈉3.5 g及磷酸二氫鉀1.5 g，溶於去離子水使成1000 mL，分裝於稀釋用容器中，經121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.2 ± 0.2。

2.5.8. 三羥甲基氨基甲烷-甘胺酸-牛肉萃取物緩衝溶液(Tris-glycine-beef extract buffer, TGBE)：

稱取三羥甲基氨基甲烷12.1 g、甘胺酸3.8 g及牛肉萃取物10 g，溶於去離子水使成1000 mL，經121°C滅菌15分鐘，最終pH值為9.5 ± 0.2。

2.5.9. 含果膠酶之TGBE緩衝溶液：

取TGBE緩衝溶液100 mL，加入果膠酶*Aspergillus niger* 75 unit或*Aspergillus aculeatus* 2850 unit，臨用時配製。

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

稱取三羥甲基氨基甲烷54 g及硼酸27.5 g，加入0.5M EDTA溶液20 mL，再加去離子水溶解定量成1000 mL，供作5倍TBE緩衝溶液，或使用市售5倍TBE緩衝溶液。臨用前以去離子水將5倍TBE緩衝溶液稀釋為0.5倍，作為0.5倍TBE緩衝溶液。

2.5.11. 6倍載入膠片緩衝溶液(6 × gel loading buffer)：

稱取溴酚藍25 g及二甲苯藍0.25 g，加入甘油30 mL，再加入無菌去離子水使成100 mL，置於4°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°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：

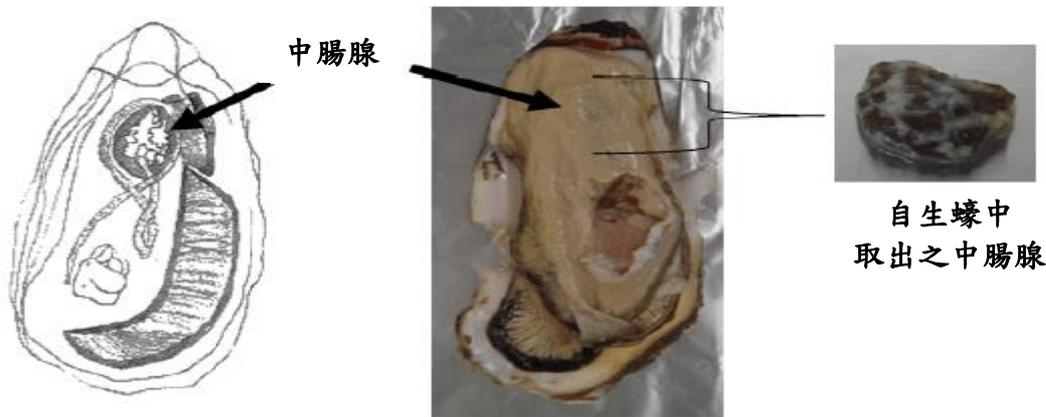
稱取溴化乙錠0.1 g，加去離子水10 mL溶解，供作原液(10 mg/mL)，使用前以去離子水稀釋成1 µg/mL。溴化乙錠為致癌物質，配製時應注意安全。

2.6. 病毒之濃縮

2.6.1. 貝類檢體

2.6.1.1. 貝類檢體處理：

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



圖一、生蠔中中腸腺相對位置圖

2.6.1.2. 中腸腺前處理：

取中腸腺1.5 g，置於50 mL離心管，加入磷酸鹽緩衝溶液10 mL，倒入均質杯並置於冰上，裝上均質刀並安裝至均質機，以10000 rpm轉速進行3段式均質，每段各10秒，間隔10秒；續加入氯仿-丁醇溶液6 mL，以10000 rpm轉速進行均質，每段各10秒，間隔10秒，直至檢體完全均質完成，再以磷酸鹽緩衝溶液3 mL沖洗殘留於均質刀上之檢體。將均質後之檢體於4°C溫和翻轉混和均勻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，充分混勻，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，並以無菌水0.5 mL沖提打散沉澱物以取得病毒濃縮液，續以市售套組操作抽取病毒RNA。

2.6.2. 飲用水檢體：

取檢體50~1000 mL，分次加入50 kDa分子篩濃縮離心管過濾槽，於4°C以4000~5000 ×g離心，收取分子量大於50 kDa之物質，濃縮至約0.5 mL以下作為病毒濃縮液，並吸取至1.5 mL微量離心管中，續以市售套組操作抽取病毒RNA。

2.6.3. 蔬果類檢體：

2.6.3.1. 非軟果類檢體之處理：

小葉菜類、包葉菜類及乾豆苗類檢體，取約10 g，剪碎為約2.5公分大小；根菜類、果菜類檢體，取約25 g，保持完整性，將檢體分裝至2管50 mL離心管，加入BPW緩衝溶液至50 mL刻度；體積較大之檢體則置入無菌袋中，加入BPW緩衝溶液100 mL，於室溫以80 rpm均勻振盪30分鐘，經附濾網無菌袋濾去殘渣，吸取沖提液至50 mL離心管，於4°C以10000 ×g離心30分鐘，取上清液至另一50 mL離心管，加BPW緩衝溶液至45 mL刻度，再加入PEG 8000 5 g及氯化鈉0.176 g，充分混勻，混合液於4°C持續旋轉均勻過夜。

2.6.3.2. 軟果類檢體之處理：

取軟果類(如草莓、藍莓、葡萄)檢體約25 g，保持完整性，小顆軟果分裝至2管50 mL離心管，分別加入含果膠酶之TGBE緩衝溶液至50 mL刻度；大顆軟果則置入無菌袋中，加入含果膠酶之TGBE緩衝溶液100 mL，於室溫以80 rpm均勻振盪30分鐘，經附濾網無菌袋濾去殘渣，吸取沖提液至50 mL離心管，於4°C以10000 ×g離心30分鐘，取上清液至另一50 mL離心管，加TGBE緩衝溶液至45 mL刻度，調整pH值至7.0，再加入PEG 8000 5 g及氯化鈉0.176 g，充分混勻，混合液於4°C持續旋轉均勻過夜。

2.6.3.3. 檢液之調製：

取2.6.3.1.或2.6.3.2.節之混合液，每一檢體各2管，於4°C以轉速10000 ×g離心30分鐘，緩慢倒除上清液，檢體第1管加入PBS 3 mL反覆沖洗離心管內側及沉澱物，並以旋渦混合器混合20秒，於4°C以轉速10000 ×g離心1分鐘，將沖洗液吸至檢體第2管，重複第1管之步驟，得每一檢體PBS沖洗液約5~6 mL，加入等體積之氯仿-丁醇溶液，以旋渦混合器混合20秒，室溫靜置5分鐘，於4°C以轉速10000 ×g離心15分鐘取上清液供作檢液。

2.7. 病毒RNA之抽取：

針對2.6.1.3.節取得之貝類病毒濃縮液，或2.6.2.節取得之水體病毒濃縮液，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。針對蔬果類檢體，取2.6.3.3.節之檢液依大體積檢液(1 mL)病毒RNA抽取之市售套組操作說明步驟抽取病毒RNA，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，添加正對照病毒株約 10^4 PCR Unit；飲用水檢體則每 mL水檢體添加 10^2 PCR Unit；蔬果檢體，另取同類檢體作為添加對照組，檢體同時與待測檢體進行裁切與裝袋(管)步驟，在BPW或含果膠酶之TGBE緩衝溶液震盪洗滌步驟前，先添加正對照病毒株 10^3 PCR Unit，依2.6.及2.7.節，抽取病毒RNA，供作正對照組。

2.9. 以DNase I處理病毒RNA溶液：

2.9.1. 取微量離心管，依下表配製混合液：

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

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

2.10. 反轉錄反應：

2.10.1. 取微量離心管，依下表配製混合液：

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

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)(註5)}

步驟	溫度($^\circ\text{C}$)	時間(min)
	25	10
反轉錄	50	50
	80	15

反應完畢立即移置冰浴中，此為互補DNA (complementary DNA, cDNA)產物，供聚合酶鏈反應用。

註4：對於同一管RNA，應至少進行二重複反轉錄反應。

註5：反轉錄反應條件可視不同反轉錄酶性質進行調整。

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

2.11.2. 混合液配製後，依下表條件進行PCR：

步驟	溫度(°C)	時間(min)
1. 最初變性	94°C	3 min
2. 變性	94°C	30 sec
3. 黏接	55°C	30 sec
4. 延展	72°C	1 min
步驟2至步驟4，共進行40個循環反應。		
5. 最終延展	72°C	7 min

2.11.3. 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100或135伏特電壓進行電泳約25~35分鐘。電泳後之膠片置入膠片染液中染色約10分鐘後，續置水中漂洗及褪染，再以紫外光照射觀察是否有明顯之DNA螢光帶，並判讀結果。當檢體中含有輪狀病毒A型時，對應引子Beg9/Vp7-1在395 bp位置應有一明顯DNA螢光帶。每次反應皆應有正對照組及空白組，正對照組使用2.8.節之對照用物質，空白組為無菌去離子水。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。

2.12. 第二次PCR：

2.12.1. 取微量離心管，依下表配製第二次PCR混合液：

第一次 PCR 產物之稀釋溶液 ^(註6)	5.0 μ L
10 倍 PCR 緩衝溶液(含 20 mM 氯化鎂).....	5.0 μ L
2.5 mM dNTP.....	4.0 μ L

10 μM 引子 F ^(註8)	1.0 μL
10 μM 引子 R ^(註8)	1.0 μL
DNA 聚合酶 (5 U/μL).....	0.5 μL
無菌去離子水.....	33.5 μL
總體積.....	50.0 μL

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

2.12.2. 混合液配製後依下表條件進行PCR：

步驟	溫度(°C)	時間(min)
1. 最初變性	94°C	3 min
2. 變性	94°C	30 sec
3. 黏接	55°C	30 sec
4. 延展	72°C	1 min
步驟2至步驟4，共進行40個循環反應。		
5. 最終延展	72°C	7 min

2.12.3. 膠片電泳分析及結果判讀：

依2.11.3.節步驟進行膠片電泳分析及結果判讀。當檢體中含有輪狀病毒A型，對應引子Beg9/Vp7-1在395 bp位置應有一明顯DNA螢光帶。每次反應皆應有正對照組及空白組，正對照組使用2.8.節之對照用物質，空白組為無菌去離子水。

2.12.4. 定序及序列比對：

依2.11.3.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，以確認輪狀病毒A型。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。

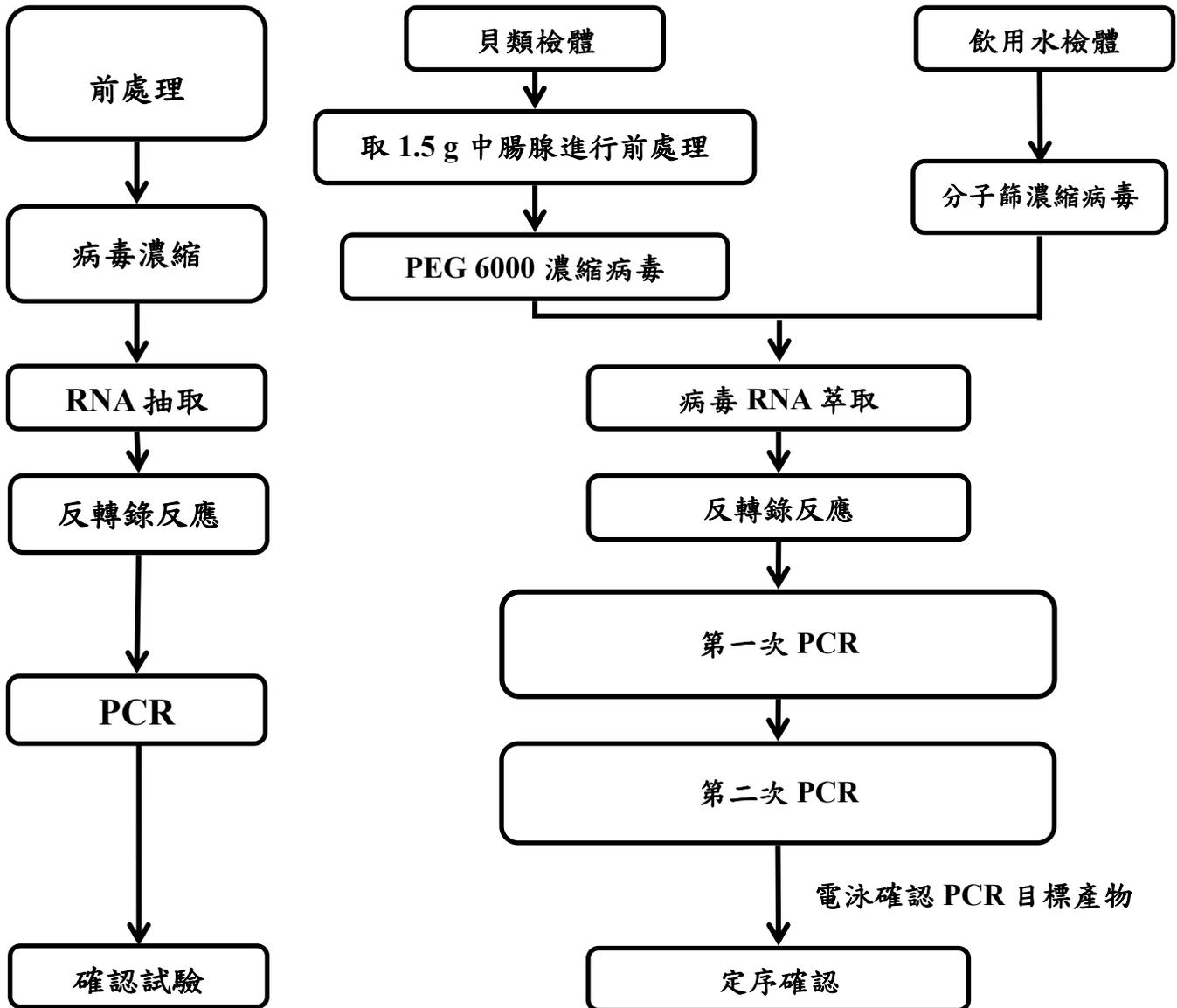
附註：本方法反應條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之反應條件。

參考文獻：

1. Ushijima, H., Morikawa, S., Mukoyama, A. and Nishio, O. 1995. Characterization of VP4 and VP7 of a murine rotavirus (YR-1) isolated in Japan. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 48: 237-247.
2. Nguyen, T. A., Khamrin, P., Takanashi, S., Le Hoang, P., Pham, L. D., Hoang, K. T., Satou, K., Masuoka, Y., Okitsu, S. and Ushijima, H. 2007. Evaluation of immunochromatography tests for detection of rotavirus and

norovirus among Vietnamese children with acute gastroenteritis and the emergence of a novel norovirus GII.4 variant. *J. Trop. Pediatr.* 53: 264-269.

檢驗流程圖(貝類及水)



檢驗流程圖(蔬果)

