

# 食品中微生物之檢驗方法－A型肝炎病毒之檢驗 修正草案總說明

「食品中微生物之檢驗方法－A型肝炎病毒之檢驗」自一百零三年六月十六日公告訂定。為加強食品微生物之管理，並依據食品安全衛生管理法第三十八條規定：「各級主管機關執行食品、食品添加物、食品器具、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，經食品檢驗方法諮議會諮議，由中央主管機關定之」，爰擬具「食品中微生物之檢驗方法－A型肝炎病毒之檢驗」修正草案，名稱並修正為「食品微生物之檢驗方法－A型肝炎病毒之檢驗」，其修正要點如下：

一、修正中英文名稱。

二、「檢驗方法」修正為「real-time RT-PCR 分析之方法」，一併修正「工作環境」、「裝置」、「試藥」、「器具及材料」、「試劑之配製」、「病毒之濃縮」、「病毒 RNA 之抽取」、「正對照組之製備」及「反轉錄反應」，增列「試藥之『即時聚合酶鏈反應用』」、「即時聚合酶鏈反應」及「偽陽性排除試驗」，並刪除「試藥之『聚合酶鏈反應用』」、「第一次聚合酶鏈反應(PCR)」、「第 2 次 PCR」及「定序及序列比對」。

三、「工作環境」、「裝置」、「試藥」、「器具及材料」、「試劑之配製」、「病毒之濃縮」、「病毒 RNA 之抽取」、「正對照組之製備」及「反轉錄反應」，依現有檢驗方法格式修正。

四、增列「參考文獻」及修正「檢驗流程圖」。

五、修正部分文字。

# 食品中微生物之檢驗方法－A型肝炎病毒之檢驗 修正草案對照表

| 修正名稱                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 現行名稱                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 說明                                                                                                                                                                               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 食品微生物之檢驗方法－A型肝炎病毒之檢驗<br>Methods of Test for Food Microorganisms- Test of Hepatitis A Virus                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 食品中微生物之檢驗方法－A型肝炎病毒之檢驗<br>Methods of Test for Food Microorganisms- Test of Hepatitis A virus                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 修正中英文名稱。                                                                                                                                                                         |
| 修正規定                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 現行規定                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 說明                                                                                                                                                                               |
| <p>1. 適用範圍：本方法適用於貝類、飲用水及蔬果中A型肝炎病毒之檢驗。</p> <p>2. 檢驗方法：檢體經RNA萃取後，以<u>即時反轉錄聚合酶鏈反應(real-time reverse transcription polymerase chain reaction, real-time RT-PCR)</u>分析之方法。</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、<u>檢體RNA抽取</u>、<u>real-time RT-PCR</u>試劑配製及檢驗過程皆需有區隔空間，避免交叉污染。</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：<u>可達121°C以上者</u>。</p> <p>2.2.3. 冷藏冷凍設備：具冷藏及凍結(-20°C及-70°C)功能。</p> <p>2.2.4. 均質機：<u>SMT pH91，或同級品</u>。</p> <p>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<u>100 g</u>者，靈敏度為1 mg。</p> <p>2.2.6. 振盪器。</p> <p>2.2.7. 酸鹼度測定儀。</p> <p>2.2.8. 微波爐或加熱板(Hot plate)。</p> <p>2.2.9. 聚合酶鏈反應器：GeneAmp® PCR System 9700，或同級品。</p> <p>2.2.10. 即時聚合酶鏈反應器：<u>Applied Biosystems QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System，或同級品</u>。</p> <p>2.2.11. <u>DNA電泳槽</u>。</p> <p>2.2.12. <u>電泳膠片照相裝置</u>。</p> <p>2.2.13. 加熱振盪器：具55°C以上溫</p> | <p>1. 適用範圍：本方法適用於貝類、飲用水及蔬果中A型肝炎病毒之檢驗。</p> <p>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。</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<u>PCR</u>等檢驗過程皆需有區隔空間，避免交叉污染。</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. <u>冰箱：能維持5±3°C。</u></p> <p>2.2.4. <u>冷凍櫃：能維持-30±3°C。</u></p> <p>2.2.5. <u>超低溫冷凍櫃：能維持-70±5°C。</u></p> <p>2.2.6. <u>均質機(Homogenizer)。</u></p> <p>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<u>120 g</u>者，靈敏度為1 mg。</p> <p>2.2.8. 振盪器。</p> <p>2.2.9. <u>酸鹼度測定儀(pH meter)。</u></p> <p>2.2.10. <u>紫外燈箱：具波長312 nm、365 nm紫外燈。</u></p> <p>2.2.11. <u>微波爐或加熱板(Hot plate)。</u></p> <p>2.2.12. 聚合酶鏈反應器：GeneAmp® PCR System 9700，或同級品。</p> <p>2.2.13. <u>電泳槽：供DNA電泳用。</u></p> <p>2.2.14. 加熱振盪器：具55°C溫控及振盪功能，<u>且能維持內部溫度溫差0.5°C以內者。</u></p> <p>2.2.15. <u>微量冷凍離心機</u></p> | <p>一、「檢驗方法」修正為「real-time RT-PCR分析之方法」，一併修正「工作環境」、「裝置」、「試藥」、「器具及材料」、「試劑之配製」、「病毒之濃縮」、「病毒RNA之抽取」、「正對照組之製備」及「反轉錄反應」，增列「試藥之『即時聚合酶鏈反應』」、「即時聚合酶鏈反應」及「偽陽性排除試驗」，並刪除「試藥之『聚合酶鏈反應』」、「第一次</p> |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>控及振盪功能者。</p> <p>2.2.14. 冷凍離心機：可達20000×g以上，<u>且具4°C以下溫控功能者</u>。</p> <p>2.2.15. 旋渦混合器。</p> <p>2.2.16. 抽氣幫浦。</p> <p>2.2.17. 玻璃過濾器組：直徑為47 mm且可滅菌者。</p> <p>2.2.18. 旋轉混合器：<u>HulaMixer™ Sample Mixer</u>，或同級品。</p> <p>2.3. 試藥</p> <p>2.3.1. <u>前處理及病毒濃縮用</u>：氯化鈉、氯化鉀、甘胺酸(glycine)、氫氧化鈉、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)、聚乙二醇8000 (polyethylene glycol 8000, PEG 8000)、<u>無菌去離子水</u>、氯仿、丁醇、硫酸、鹽酸、硼酸、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)及三羥甲基胺基甲烷(tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris-base)均採用試藥特級，牛肉萃取物(beef extract powder)及蛋白胨(peptone)均採用微生物級，果膠酶(pectinase from <i>Aspergillus brasiliensis</i> or <i>Aspergillus aculeatus</i>)採用<u>分子生物分析級</u>。</p> <p>2.3.2. 病毒RNA抽取用：<u>針對貝類及飲用水檢體</u>，採用小體積檢液(如140 µL)病毒RNA抽取之市售套組；針對蔬果檢體，採用大體積檢液(如1 mL)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反轉錄之市售套組，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)。</p> <p>2.3.5. <u>即時聚合酶鏈反應用</u>：</p> <p>2.3.5.1. <u>A型肝炎病毒</u><br/>(標的區域：5'端非轉譯區)</p> | <p>(Microrefrigerated centrifuge)：可供各式離心管離心使用，可達20000×g以上，<u>並具4°C溫控功能</u>。</p> <p>2.2.16. 旋渦混合器(<u>Vortex mixer</u>)。</p> <p>2.2.17. 抽氣幫浦。</p> <p>2.2.18. 玻璃過濾器組：直徑為47 mm且可滅菌者。</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；<u>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</u>。</p> <p>2.3. 試藥</p> <p>2.3.1. 病毒萃取用：氯化鈉、氯化鉀、甘胺酸(glycine)、氫氧化鈉、<u>無水磷酸氫二鈉(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)</u>、磷酸二氫鉀(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)、聚乙二醇6000 (polyethylene glycol 6000, PEG 6000)、聚乙二醇8000 (polyethylene glycol 8000, PEG 8000)、氯仿、丁醇、硫酸、鹽酸、硼酸、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)及蛋白胨(peptone)均採微生物級，果膠酶(pectinase from <i>Aspergillus niger</i> or <i>Aspergillus aculeatus</i>)採分子生物級。</p> <p>2.3.2. 病毒RNA抽取用：<u>適用於病毒RNA抽取之市售套組</u>，針對蔬果檢體，採用大體積檢液(1 mL)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反轉錄之市售套組，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)。</p> <p>2.3.5. <u>聚合酶鏈反應用</u>：</p> <p>2.3.5.1. <u>DNA聚合酶：Taq DNA聚合</u></p> | <p>聚合酶鏈反應(PCR)」、「第2次PCR」及「定序及序列比對」</p> <p>二、「工作環境」、「裝置」、「試藥」、「器具及材料」、「試劑之配製」、「病毒之濃縮」、「病毒RNA之抽取」、「正對照組之製備」及「反轉錄反應」，依現有檢驗方法格式修正。</p> <p>三、增列「參考文獻」及修正「檢驗流程圖」。</p> <p>四、修正部分文字。</p> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <p>引子F：GAR2F<br/>5'-ATAGGGTAACAGCGGCGGATAT-3'</p> <p>引子R：GAR1R<br/>5'-CTCAATGCATCCACTGGATGAG-3'</p> <p>探針P：GARP<br/>5'-(FAM)-AGACAAAAACCATTC AACGCCGAGG-(BHQ)-3'</p> <p>PCR增幅產物大小90 bp</p> <p>2.3.5.2. A型肝炎病毒(偽陽性排除試驗)<br/>(標的區域：5'端非轉譯區)</p> <p>引子F：HAVCROF<br/>5'-CCGTTTGCCTAGGCTATAGGCT-3'</p> <p>引子R：JWCORR<br/>5'-GGAGAGCCCTGGAAGAAAG AAGA-3'</p> <p>探針P：JWCROP<br/>5'-(FAM)-TGATTTGTAAATATTG ATTCTGCAG-(BHQ)-3'</p> <p>PCR增幅產物大小169 bp (陽性反應組)或180 bp (正對照組)<sup>(註1)</sup></p> <p>註1：正對照組為實驗室培養株(laboratory strain-HM175/18f)，其與野生株(wild-type strain-HM175)經序列比對，野生株基因序列在探針位置有部分鹼基之缺失，故PCR增幅產物大小不一樣，且野生株無法被探針所偵測。</p> <p>2.3.5.3. Real-time PCR Master Mix (適用於 Applied Biosystems QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System-fast mode)<br/>本試劑內含real-time PCR所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，使用時添加引子、探針及待測檢體DNA。</p> <p>2.3.6. 電泳用試藥：Na<sub>2</sub>-EDTA、Tris-base、硼酸、6倍電泳指示劑(EZ-Vision® DNA dye as loading buffer，或同級品)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)。</p> <p>2.3.7. 對照用物質：A型肝炎病毒株 (如 ATCC VR-1402 strain: HM175/18f)。</p> | <p>酶(5 U/μL)，內附10倍PCR緩衝溶液(含20 mM氯化鎂)，或同級品。</p> <p>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)，去氧鳥糞嘌呤核苷三磷酸(deoxyguanosine triphosphate, dGTP)及去氧胸苷三磷酸(deoxythymidine triphosphate, dTTP)各2.5 mM之溶液。</p> <p>2.3.5.3. A型肝炎病毒<br/>(標的區域：5端非轉譯區)</p> <p>引子F：HAV68<br/>5'-TCACCGCCGTTTGCCTAG-3'</p> <p>引子R：HAV240<br/>5'-GGAGAGCCCTGGAAGAAAG-3'</p> <p>PCR增幅產物大小173 bp<br/>(標的區域：蛋白質外殼結構基因VP1/P2A)</p> <p>引子F：VP1-4<br/>5'-CGTTGCTTCCCATGTCAGAG-3'</p> <p>引子R：VP1-5<br/>5'-GACCTTCCCATAAACTTGTAAG-3'</p> <p>PCR增幅產物大小369 bp</p> <p>2.3.6. 電泳用試藥：乙二胺四乙酸二鈉(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, Na<sub>2</sub>-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。</p> <p>2.3.7. 對照用物質：A型肝炎病毒。</p> <p>2.4. 器具及材料<sup>(註2)</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. 吸管或自動吸管/吸管尖：已</p> |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>2.4. 器具及材料<sup>(註2)</sup></p> <p>2.4.1. <u>吸管輔助器或微量吸管。</u></p> <p>2.4.2. <u>吸管：已滅菌，1 mL吸管應有0.01 mL之刻度；5 mL及10 mL吸管應有0.1 mL之刻度。</u></p> <p>2.4.3. <u>吸管尖：已滅菌，10 µL、20 µL、200 µL及1000 µL。</u></p> <p>2.4.4. <u>玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL及2000 mL。</u></p> <p>2.4.5. <u>微量離心管：200 µL、1.5 mL及2 mL。</u></p> <p>2.4.6. <u>離心管：50 mL，PP材質。</u></p> <p>2.4.7. <u>離心過濾管(分子篩)：15 mL，可篩選分子量大於10<sup>5</sup> Da之物質。</u></p> <p>2.4.8. <u>無菌袋：400 mL，附濾網。</u></p> <p>2.4.9. <u>藥勺、剪刀、小刀及鑷子：可滅菌者。</u></p> <p>2.4.10. <u>無菌濾膜：孔徑0.22 µm，親水性醋酸纖維膜材質。</u></p> <p>2.4.11. <u>PCR反應管：200 µL及500 µL。</u></p> <p>2.4.12. <u>電泳膠片製作盤：含製膠用尺梳。</u></p> <p>註2：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. <u>磷酸鹽緩衝溶液(Phosphate buffered saline, PBS)</u><br/> 稱取氯化鈉<u>7.7 g</u>、磷酸氫二鈉<u>0.7 g</u>及磷酸二氫鉀<u>0.2 g</u>，溶於去離子水1000 mL，以1 N氫氧化鈉溶液調整pH值至<u>7.4</u>，以121°C滅菌15分鐘。</p> <p>2.5.2. <u>聚乙二醇6000-氯化鈉(PEG 6000-氯化鈉)溶液</u><br/> 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。</p> <p>2.5.3. <u>氯仿-丁醇溶液</u><br/> 分別取等體積之氯仿與丁醇，置於褐色瓶中，混合均勻。</p> <p>2.5.4. <u>50 mM硫酸溶液</u><br/> 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. <u>0.5 mM硫酸溶液</u></p> | <p>滅菌。<u>1mL吸管應有0.01 mL之刻度、5及10 mL吸管應有0.1 mL刻度。</u></p> <p>2.4.4. <u>玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL及2000 mL。</u></p> <p>2.4.5. <u>微量離心管：200 µL、1.5 mL、2 mL。</u></p> <p>2.4.6. <u>離心管：50 mL，PP材質。</u></p> <p>2.4.7. <u>離心過濾管：15 mL，篩選分子量大於10<sup>5</sup> 道爾頓(dalton)之物質。</u></p> <p>2.4.8. <u>無菌袋、附濾網之無菌袋(400 mL)。</u></p> <p>2.4.9. <u>藥勺、剪刀、小刀及鑷子：可滅菌者。</u></p> <p>2.4.10. <u>無菌濾膜：孔徑0.22 µm之親水性醋酸纖維膜。</u></p> <p>2.4.11. <u>PCR反應管：200 µL及500 µL及96孔反應盤。</u></p> <p>2.4.12. <u>電泳膠片製作盤：含製膠用尺梳。</u></p> <p>註2：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. <u>磷酸鹽緩衝溶液(Phosphate buffered saline, PBS)：</u><br/> 稱取氯化鈉<u>76.5 g</u>、<u>無水磷酸氫二鈉7.2 g</u>及<u>磷酸二氫鉀2.1 g</u>，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。</p> <p>2.5.2. <u>聚乙二醇6000-氯化鈉(PEG 6000-氯化鈉)溶液：</u><br/> 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。</p> <p>2.5.3. <u>氯仿-丁醇溶液：</u><br/> 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. <u>50 mM硫酸溶液：</u><br/> 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. <u>0.5 mM硫酸溶液：</u></p> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>取<u>適量</u>50 mM硫酸溶液，以<u>無菌</u>去離子水稀釋100倍。</p> <p>2.5.6. 1 mM氫氧化鈉溶液<br/>稱取氫氧化鈉4 g，以無菌去離子水溶解使成100 mL，再以無菌去離子水稀釋1000倍。</p> <p>2.5.7. 6 N鹽酸溶液<br/>取鹽酸50 mL，緩緩加入無菌去離子水80 mL中，再加無菌去離子水使成100 mL。</p> <p>2.5.8. 100倍三羥甲基胺基甲烷-乙二胺四乙酸溶液<br/>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。亦可使用市售100倍無菌三羥甲基胺基甲烷-乙二胺四乙酸溶液。</p> <p>2.5.9. 0.5 M乙二胺四乙酸(EDTA)溶液<br/>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。</p> <p>2.5.10. 蛋白胨緩衝溶液(Buffer peptone water, BPW)<br/>稱取蛋白胨10 g、氯化鈉5 g、磷酸氫二鈉3.5 g及磷酸二氫鉀1.5 g，以去離子水溶解使成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。</p> <p>2.5.11. <u>TGBE 緩衝溶液 (Tris-glycine-beef extract buffer)</u><br/>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，以去離子水溶解使成1000 mL，經121°C滅菌15分鐘，最終pH值為9.5 ± 0.2。</p> <p>2.5.12. 含果膠酶之TGBE緩衝溶液<br/>取TGBE緩衝溶液100 mL，加入果膠酶<i>Aspergillus brasiliensis</i> 75 units或<i>Aspergillus aculeatus</i> 2850 units，臨用時配製。</p> <p>2.5.13. 0.5 倍 TBE 緩衝溶液(Tris-borate-EDTA buffer)<br/>稱取三羥甲基胺基甲烷54 g及硼酸27.5 g，加入0.5 M EDTA溶液20</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：<br/>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。</p> <p>2.5.7. 6 N 鹽酸溶液：<br/>量取鹽酸50 mL，緩緩加入無菌去離子水使成100 mL。</p> <p>2.5.8. 100倍三羥甲基胺基甲烷-乙二胺四乙酸溶液：<br/>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。</p> <p>2.5.9. 0.5 M乙二胺四乙酸(EDTA)溶液：<br/>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。</p> <p>2.5.10. 蛋白胨緩衝溶液(Buffer peptone water, BPW)：<br/>稱取蛋白胨10 g、氯化鈉5 g、無水磷酸氫二鈉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。</p> <p>2.5.11. <u>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)</u>：<br/>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。</p> <p>2.5.12. 含果膠酶之TGBE緩衝溶液：<br/>取TGBE緩衝溶液100 mL，加入果膠酶 <i>Aspergillus niger</i> 75 unit 或 <i>Aspergillus aculeatus</i> 2850 nit，臨用時配製。</p> <p>2.5.13. 0.5 倍 TBE (Tris-borate-EDTA)緩衝溶液：<br/>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</p> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

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。臨用時以去離子水將5倍TBE緩衝溶液稀釋10倍，作為0.5倍TBE緩衝溶液。

#### 2.5.14. 3%膠片

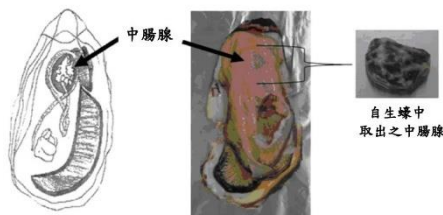
稱取瓊膠3 g，加入0.5倍TBE緩衝溶液100 mL，加熱攪拌至瓊膠完全溶解，冷卻至約50°C時，倒入電泳膠片製作盤，並置入適當之尺梳，待膠片凝固後，即可使用。

### 2.6. 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，將離心管置於冰上，以均質棒進行2段式均質，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。將均質後之檢體於4°C旋轉混勻1小時，以12000 ×g離心20分鐘，取上層液。

##### 2.6.1.3. PEG 6000濃縮處理

取PEG6000-氯化鈉溶液10.5 mL，加至2.6.1.2節上層液中，充分混勻，混合液於4°C持續旋轉混勻過夜。混合液於4°C以12000 ×g離心20分鐘，去除上清液，沉澱物加入無菌去離子水約0.5 mL，混合均勻，供作檢液。

#### 2.6.2. 飲用水檢體

##### 2.6.2.1. 大量檢體之病毒濃縮

取檢體100~1000 mL，加入氯化鎂(最終濃度25 mM)，設置一水檢體

mL，再加去離子水溶解使成1000 mL，供作5倍TBE緩衝溶液，或使用市售5倍TBE緩衝溶液。臨用前以去離子水將5倍TBE緩衝溶液稀釋為0.5倍，作為0.5倍TBE緩衝溶液。

#### 2.5.14. 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。

#### 2.5.15. 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。

#### 2.5.16. 膠片染液：

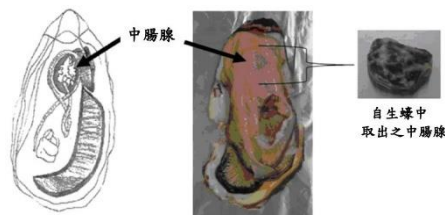
稱取溴化乙錠0.1 g，加去離子水10 mL溶解，供作原液(10 mg/mL)，使用前以去離子水稀釋成1 μg/mL。溴化乙錠為致癌物質，配製時應注意安全。

### 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，將離心管置於冰上，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

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，將洗滌液倒入過濾離心管中，於4°C以3000×g離心20~30分鐘，濃縮至約0.5 mL以下，將濃縮液吸取至1.5 mL微量離心管中，供作檢液。



圖二、水檢體過濾裝置

圖三、檢液收集裝置

#### 2.6.2.2. 小量檢體之病毒濃縮

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

#### 2.6.3. 蔬果類檢體

##### 2.6.3.1. 非軟果類檢體之處理

取小葉菜類、包葉菜類或乾豆苗類檢體約10 g，將其剪碎至約2.5公分大小；取根菜類或果菜類檢體約25 g，保持其完整性，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，將2管混合液於4°C持續旋轉混勻過夜。

##### 2.6.3.2. 軟果類檢體之處理

取軟果類(如草莓、藍莓或葡萄等)

速12000×g離心20分鐘，取上層液。

##### 2.6.1.3. PEG 6000濃縮處理：

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

#### 2.6.2. 飲用水檢體

##### 2.6.2.1. 大量檢體之病毒濃縮：

取檢體100~1000 mL，加入氯化鎂(最終濃度25 mM)，設置一水檢體過濾裝置(如圖二)，將檢體加入過濾漏斗中，經由真空抽氣，將檢體通過無菌濾膜，以0.5 mM硫酸溶液200 mL沖洗濾膜，棄沖洗液，置換過濾吸引瓶成檢液收集裝置(如圖三)，再以1 mM氫氧化鈉溶液10 mL洗滌濾膜，收集洗滌液至檢液收集裝置內之無菌離心管中，該離心管預先加入50 mM硫酸溶液0.1 mL及100倍三羥甲基胺基甲烷-乙二胺四乙酸溶液0.1 mL，取出離心管，將洗滌液倒入濃縮離心管過濾槽中，於4°C以3000×g離心20~30分鐘，濃縮至約0.5 mL以下，將濃縮液吸取至1.5 mL微量離心管中，供作檢液。



圖二、水檢體過濾裝置

圖三、檢液收集裝置

##### 2.6.2.2. 小量檢體之病毒濃縮：

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

#### 2.6.3. 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

檢體約25 g，保持其完整性，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，以6 N鹽酸溶液調整pH值至7.0，再加入PEG 8000 5 g及氯化鈉0.176 g，充分混勻，將2管混合液於4°C持續旋轉均勻過夜。

#### 2.6.3.3. 檢液之調製

將2.6.3.1或2.6.3.2節之2管混合液於4°C以10000×g離心30分鐘，緩慢去除上清液，於第1管加入PBS 3 mL，反覆沖洗離心管內側及沉澱物，並旋渦混合20秒，於4°C以10000×g離心1分鐘，將沖洗液吸至第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，旋渦混勻後，於室溫靜置5分鐘，於4°C以10000×g離心15分鐘，取上清液，供作檢液。

#### 2.7. 病毒RNA之抽取

針對貝類檢體，取2.6.1.3節之檢液，針對飲用水檢體，則取2.6.2.1及2.6.2.2節之檢液，依小體積檢液(如140 µL)病毒RNA抽取之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離心管中，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(如1 mL)病毒RNA抽取之市售套組操作說明步驟抽取病毒RNA，將抽取之病毒RNA收集至已滅菌之1.5 mL離心管中，供作病毒RNA溶液。

#### 2.8. 正對照組之製備

貝類檢體取中腸腺1.5 g，添加對照用物質(A型肝炎病毒株)約500 PFU以上；飲用水檢體則每mL水檢體添加對照用物質約5 PFU以上；蔬果檢體先進行裁切與裝袋(管)步

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，並以旋渦混合器震盪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，以旋渦混合器混合均勻後，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節之病毒濃縮液，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

驟，加入BPW緩衝溶液或含果膠酶之TGBE緩衝溶液，再添加對照用物質約50 PFU以上；將上述檢體分別依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 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              | 30.0 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. 反轉錄反應<sup>(註3)</sup>

2.10.1. 取PCR反應管，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  |
| 10 mM dNTP          | 4.0 µL  |
| 25 mM氯化鎂溶液          | 5.0 µL  |
| 隨機引子(3 µg/µL)       | 1.3 µL  |
| 0.1 M DTT           | 2.5 µL  |
| 核糖核酸水解酶抑制劑(40 U/µL) | 1.4 µL  |
| 反轉錄酶(200 U/µL)      | 0.8 µL  |
| 總體積                 | 25.0 µL |

註3：本方法所提之酵素或套組可參考使用市售套組，並依其產品說明執行。

2.10.2. 混合液配製完成後，移入PCR反應器，依下表條件進行反轉錄反應<sup>(註4)</sup>，同時另執行正反應對照組(添加對照用物質)及負反應對照組(無菌去離子水)。反應完畢立即移置冰浴中，此為cDNA產物，供即時聚合酶鏈反應用。

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

註4：對於同一管RNA，應至少進行二重複反轉錄反應。

2.11. 即時聚合酶鏈反應(real-time PCR)

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，並以同一核酸親和性管柱反覆過濾濃縮濾液中之病毒RNA，再以無菌去離子水100~200 µL回溶病毒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，先添加之正對照病毒株 $10^3$  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 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              | 30.0 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. 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  |
| 10 mM dNTP          | 4.0 µL  |
| 25 mM氯化鎂溶液          | 5.0 µL  |
| 隨機引子(3 µg/µL)       | 1.3 µL  |
| 0.1 M DTT           | 2.5 µL  |
| 核糖核酸水解酶抑制劑(40 U/µL) | 1.4 µL  |
| 反轉錄酶(200 U/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<sup>(註3)</sup>：

| 步驟  | 溫度(°C) | 時間(min) |
|-----|--------|---------|
| 反轉錄 | 25     | 10      |

|                                                                                                                                                                                                                                                      |         |       |                                                                                                                                                                                                                                                                                          |         |        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|--------|
| 2.11.1. 取PCR反應管，依下表於冰浴中配製real-time PCR溶液。                                                                                                                                                                                                            |         |       |                                                                                                                                                                                                                                                                                          |         |        |
| 5 μM引子F <sup>(註5)</sup>                                                                                                                                                                                                                              | 1.0 μL  |       |                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 50      | 50     |
| 5 μM引子R <sup>(註5)</sup>                                                                                                                                                                                                                              | 1.0 μL  |       |                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 85      | 15     |
| 5 μM探針P <sup>(註5)</sup>                                                                                                                                                                                                                              | 1.0 μL  |       | 反應完畢立即移置冰浴中，此為cDNA產物，供聚合酶鏈反應用。                                                                                                                                                                                                                                                           |         |        |
| 2倍real-time PCR Mastr Mix                                                                                                                                                                                                                            | 10.0 μL |       | 註3：對於同一管RNA，應至少進行二重複反轉錄反應。                                                                                                                                                                                                                                                               |         |        |
| cDNA產物 <sup>(註6)</sup>                                                                                                                                                                                                                               | 2.0 μL  |       | 2.11. 第一次聚合酶鏈反應(PCR)：                                                                                                                                                                                                                                                                    |         |        |
| 無菌去離子水                                                                                                                                                                                                                                               | 5.0 μL  |       | 2.11.1. 取微量離心管，依下表配製第一次PCR混合液：                                                                                                                                                                                                                                                           |         |        |
| 總體積                                                                                                                                                                                                                                                  | 20.0 μL |       | cDNA產物                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 5.0 μL  |        |
| 註5：A型肝炎病毒之檢驗，採用引子對及探針為GAR2F/GAR1R/GARP。                                                                                                                                                                                                              |         |       | 10倍PCR緩衝溶液(含20 mM氯化鎂)                                                                                                                                                                                                                                                                    | 5.0 μL  |        |
| 註6：對於同一管cDNA，應至少進行二重複real-time PCR。                                                                                                                                                                                                                  |         |       | 2.5 mM dNTP                                                                                                                                                                                                                                                                              | 4.0 μL  |        |
| 2.11.2. Real-time PCR溶液配製完成後，移入real-time PCR反應器，依下表條件進行反應。同時另執行正反應對照組(添加對照用物質)及負反應對照組(無菌去離子水)。                                                                                                                                                       |         |       | 10 μM 引子F <sup>(註4)</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                | 1.0 μL  |        |
| 步驟                                                                                                                                                                                                                                                   | 溫度      | 時間    | 10 μM 引子R <sup>(註4)</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                | 1.0 μL  |        |
|                                                                                                                                                                                                                                                      | (°C)    | (sec) | DNA聚合酶(5 U/μL)                                                                                                                                                                                                                                                                           | 0.5 μL  |        |
| 1. 熱活化                                                                                                                                                                                                                                               | 95      | 20    | 無菌去離子水                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 33.5 μL |        |
| 2. 最初變性                                                                                                                                                                                                                                              | 95      | 3     | 總體積                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 50.0 μL |        |
| 3. 黏接、延展                                                                                                                                                                                                                                             | 60      | 30    | 註4：檢測A型肝炎病毒，採引子對HAV68/HAV240及VP1-4/VP1-5。                                                                                                                                                                                                                                                |         |        |
| 步驟2至步驟3，共進行50個循環反應                                                                                                                                                                                                                                   |         |       | 2.11.2. 混合液配製後，依下表條件進行PCR：                                                                                                                                                                                                                                                               |         |        |
| 2.11.3. Real-time PCR螢光分析                                                                                                                                                                                                                            |         |       | 步驟                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 溫度      | 時間     |
| 檢體cDNA經real-time PCR反應後，直接從real-time PCR反應器上之螢幕觀察探針所產生之螢光增幅曲線，即可判讀反應結果。                                                                                                                                                                              |         |       | 1.最初變性                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 95°C    | 4 min  |
| 2.11.4. 結果判讀                                                                                                                                                                                                                                         |         |       | 2.變性                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 95°C    | 30 sec |
| 檢體cDNA之real-time PCR螢光增幅曲線圖與正反應對照組螢光增幅曲線圖進行相互比對，當正反應對照組有螢光增幅曲線且負反應對照組無螢光增幅曲線，即為有效試驗。當檢體之real-time PCR反應及正反應對照組real-time PCR反應同時有螢光增幅曲線，即確認該檢體含有A型肝炎病毒之核酸。同一管cDNA之二重複檢驗，二重複結果皆為陰性時，檢驗結果為陰性；若任一次結果為陽性，視為檢驗結果陽性。若檢驗結果為陽性，為排除此陽性結果有正對照組病毒污染之疑慮，應進行偽陽性排除試 |         |       | 3.黏接                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 50°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。當檢體中含有A型肝炎病毒時，引子HAV68/HAV240在173 bp位置、引子VP1-4/VP1-5在369 bp位置上應各有一明顯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，正對照組添加A型肝炎病毒，空白 |         |        |

驗。

## 2.12. 偽陽性排除試驗 (HAV Control Exclusion Assay)

2.12.1. 取PCR反應管，依下表於冰浴中配製real-time PCR溶液。

|                              |              |
|------------------------------|--------------|
| 5 $\mu$ M引子F <sup>(註7)</sup> | 1.0 $\mu$ L  |
| 5 $\mu$ M引子R <sup>(註7)</sup> | 1.0 $\mu$ L  |
| 5 $\mu$ M探針P <sup>(註7)</sup> | 1.0 $\mu$ L  |
| 2倍real-time PCR Mastr Mix    | 10.0 $\mu$ L |
| cDNA產物 <sup>(註8)</sup>       | 2.0 $\mu$ L  |
| 無菌去離子水                       | 5.0 $\mu$ L  |
| 總體積                          | 20.0 $\mu$ L |

註7：採用引子對及探針為HAVCROF/JWCROR/JWCROP。

註8：取real-time PCR陽性反應之檢體cDNA。對於同一管cDNA，應至少進行二重複real-time PCR。

2.12.2. Real-time PCR溶液配製完成後，移入real-time PCR反應器，依下表條件進行反應。同時另執行正反應對照組(添加對照用物質)及負反應對照組(無菌去離子水)。

| 步驟                 | 溫度<br>(°C) | 時間<br>(sec) |
|--------------------|------------|-------------|
| 1. 熱活化             | 95         | 20          |
| 2. 最初變性            | 95         | 3           |
| 3. 黏接、延展           | 60         | 30          |
| 步驟2至步驟3，共進行50個循環反應 |            |             |

## 2.12.3. Real-PCR螢光分析

檢體cDNA經real-time PCR反應後，直接從real-time PCR反應器上之螢幕觀察探針所產生之螢光增幅曲線，即可判讀反應結果。

## 2.12.4. 結果判讀

檢體cDNA之real-time PCR螢光增幅曲線圖與正反應對照組螢光增幅曲線圖進行相互比對，當正反應對照組有螢光增幅曲線且負反應對照組無螢光增幅曲線，即為有效試驗。當檢體之real-time PCR反應沒有螢光增幅曲線，而正反應對照組real-time PCR反應有螢光增幅曲線，即表示該檢體所含A型肝炎病毒之核酸無法被此組探針所偵測，即非實驗室培養株，可排除有正對照組病毒污染之疑慮。當檢體之

組為無菌去離子水。

## 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 <sup>(註5)</sup>  | 5.0 $\mu$ L  |
| 10倍PCR緩衝溶液(含20 mM氯化鎂)          | 5.0 $\mu$ L  |
| 2.5 mM dNTP                    | 4.0 $\mu$ L  |
| 10 $\mu$ M 引子F <sup>(註6)</sup> | 1.0 $\mu$ L  |
| 10 $\mu$ M 引子R <sup>(註6)</sup> | 1.0 $\mu$ L  |
| DNA聚合酶(5 U/ $\mu$ L)           | 0.5 $\mu$ L  |
| 無菌去離子水                         | 33.5 $\mu$ L |
| 總體積                            | 50.0 $\mu$ L |

註5：第一次PCR產物建議以10至20倍無菌去離子水進行稀釋，供作第二次PCR反應DNA模板。

註6：檢測A型肝炎病毒，採引子對HAV68 / HAV240及VP1-4 / VP1-5。

2.12.2. 混合液配製後依下表條件進行PCR：

| 步驟                  | 溫度   | 時間     |
|---------------------|------|--------|
| 1.最初變性              | 95°C | 4 min  |
| 2.變性                | 95°C | 30 sec |
| 3.黏接                | 60°C | 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A型肝炎病毒時，引子HAV68/HAV240在173 bp位置、引子VP1-4/VP1-5在369 bp位置上應各有一明顯DNA螢光帶。每次反應皆應有正對照組及空白組，正對照組添加A型肝炎病毒，空白組為無菌去離子水。

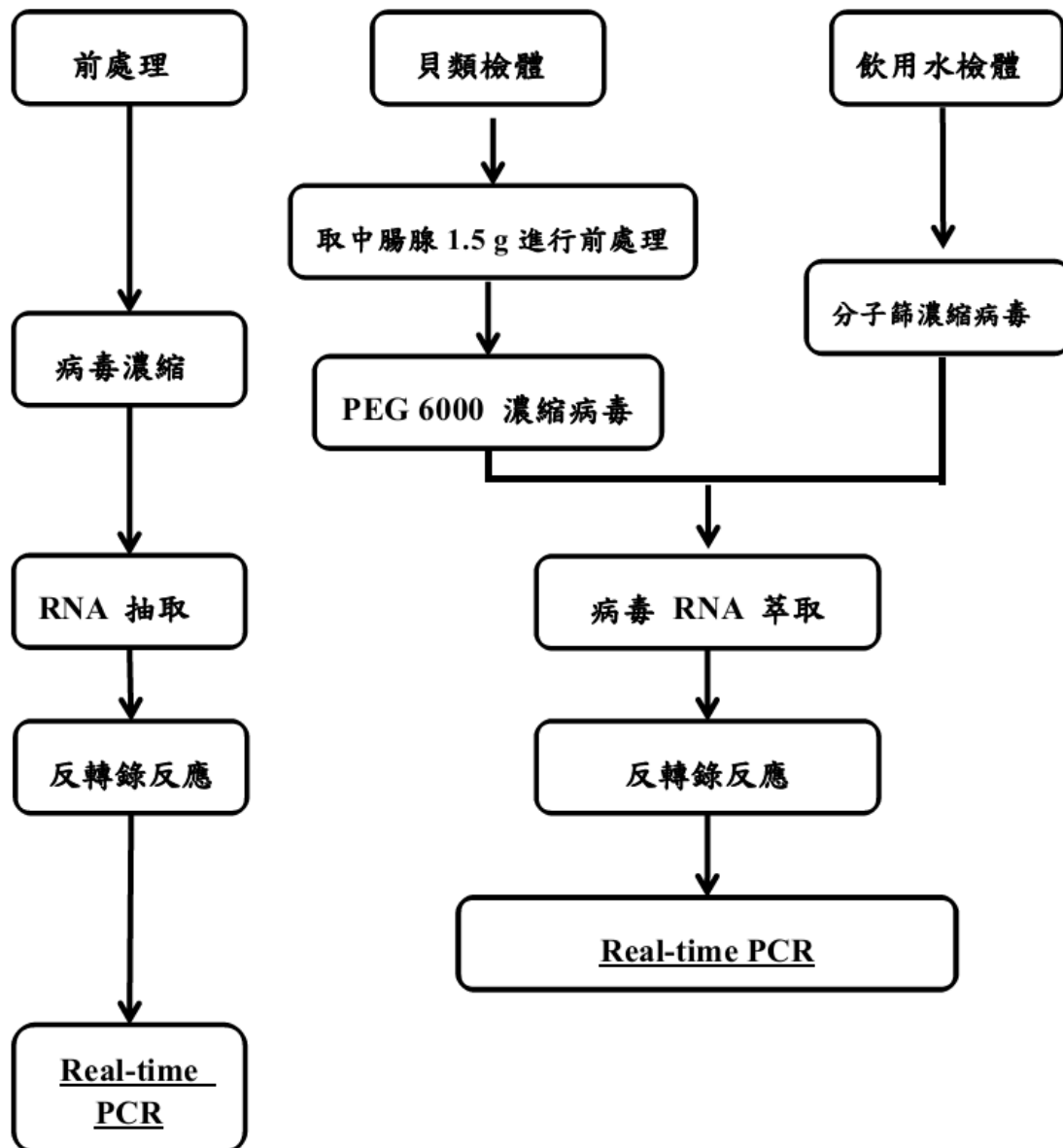
## 2.12.4. 定序及序列比對：

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A型肝炎病毒。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，檢驗結果為陰性。

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| <p><u>real-time PCR反應及正反應對照組</u></p> <p><u>同時有螢光增幅曲線，即表示該檢體所含A型肝炎病毒無法排除有正對照組病毒污染之疑慮。</u></p> <p><u>2.12.5. 偽陽性排除試驗之膠片電泳分析<sup>(註9)</sup></u></p> <p><u>2.12.5.1. 取適量之6倍電泳指示劑，分別與無菌去離子水(空白組)及PCR增幅產物混合均勻，注入3%膠片孔，以100伏特電壓進行電泳。同時另取DNA分子量標記物質進行電泳，作為PCR增幅產物大小之判別與計算依據。取出電泳後之膠體，置於照相裝置，以紫外光照射觀察是否有明顯之DNA螢光帶，照相並判讀結果。同時另測試正反應及負反應對照組。</u></p> <p><u>註9：此步驟可視需要執行，以確認PCR增幅產物之大小。</u></p> <p><u>2.12.5.2. 結果判讀</u></p> <p><u>檢體cDNA溶液之PCR增幅產物電泳結果，須與正反應對照組及DNA分子量標記物質之電泳結果進行相互比對，當負反應對照組無PCR增幅產物，且經由DNA分子量標記物質估算正反應對照組有預期增幅產物(180 bp)，即為有效試驗。當檢體未出現PCR增幅產物，則視為陰性，若出現PCR增幅產物為169 bp，即判定該檢體含有A型肝炎病毒(野生株)且可排除正對照組病毒(實驗培養株)汙染之疑慮。同一管cDNA之二重複檢驗，二重複結果皆為陰性時，檢驗結果為陰性；若任一次結果為陽性，視為檢驗結果陽性。</u></p> <p><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><u>參考文獻</u></p> <p><u>Williams-Woods, J., Rodriguez, R., Marchant, J., Swinford, A. and Burkhardt III, W. 2022. Chapter 26: Concentration, extraction and detection of enteric viruses from food. Bacteriological Analytical Manual.</u></p> <p><u>[<a href="https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-26-">https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-26-</a></u></p> | <p><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> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|

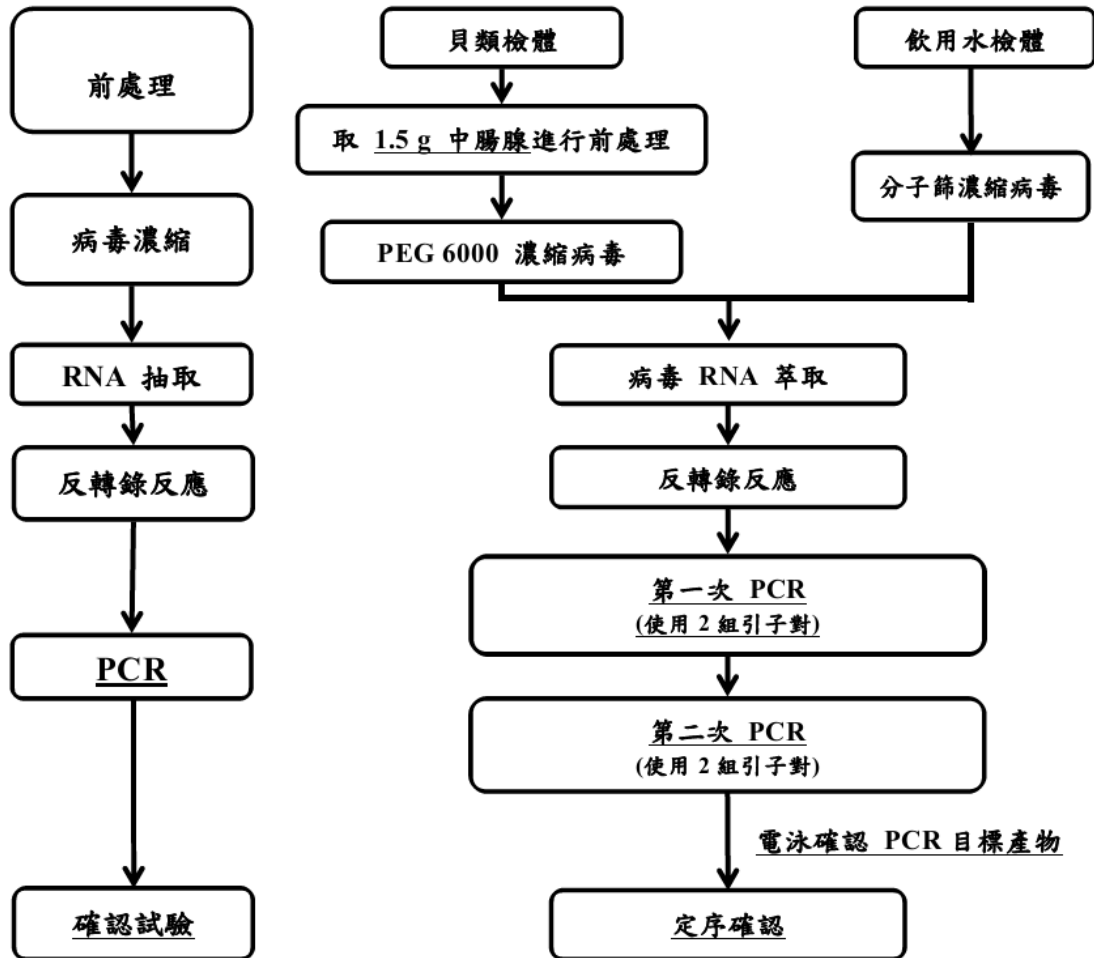
|                                                                                               |  |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|
| <u>and-appendices-concentration-<br/>extraction-and-detection-enteric-<br/>viruses-food].</u> |  |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|

檢驗流程圖(貝類及飲用水)(修正後)

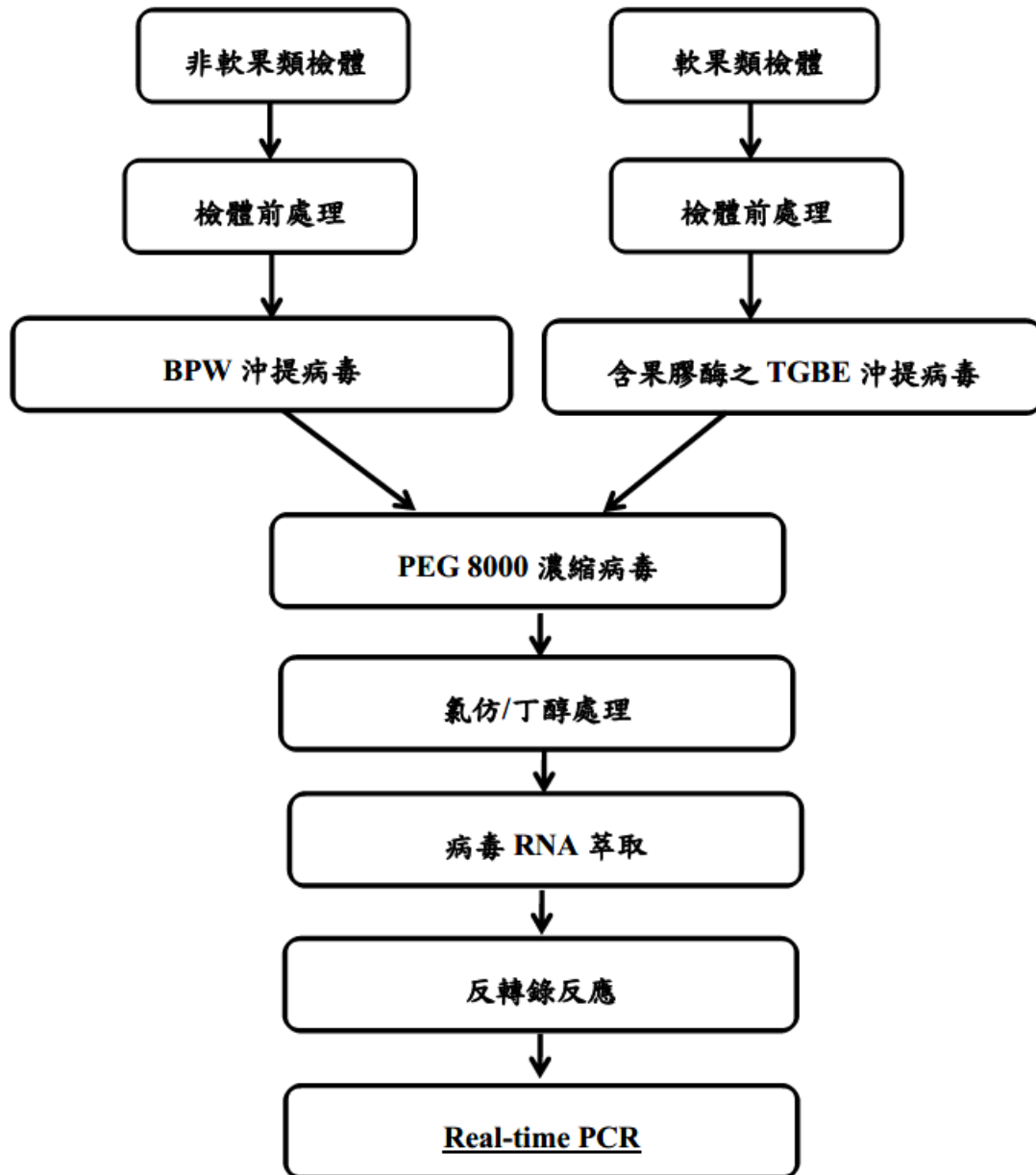


修正說明：檢驗方法由 RT-PCR 修正為 real-time RT-PCR。

現行檢驗流程圖(貝類及水)(修正前)



檢驗流程圖（蔬果類）（修正後）



修正說明：檢驗方法由 RT-PCR 修正為 real-time RT-PCR。

現行檢驗流程圖（蔬果）（修正前）

