

食品微生物之檢驗方法－A型肝炎病毒之檢驗

Methods of Test for Food Microorganisms- Test of Hepatitis A Virus

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。
2. 檢驗方法：檢體經RNA萃取後，以即時反轉錄聚合酶鏈反應(real-time reverse transcription polymerase chain reaction, real-time 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、檢體RNA抽取、real-time RT-PCR試劑配製及檢驗過程皆需有區隔空間，避免交叉污染。
 - 2.2. 裝置
 - 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. 冷藏冷凍設備：具冷藏及凍結(-20°C及-70°C)功能。
 - 2.2.4. 均質機：SMT pH91，或同級品。
 - 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100 g者，靈敏度為1 mg。
 - 2.2.6. 振盪器。
 - 2.2.7. 酸鹼度測定儀。
 - 2.2.8. 微波爐或加熱板(Hot plate)。
 - 2.2.9. 聚合酶鏈反應器：GeneAmp® PCR System 9700，或同級品。
 - 2.2.10. 即時聚合酶鏈反應器：Applied Biosystems QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System，或同級品。
 - 2.2.11. DNA電泳槽。
 - 2.2.12. 電泳膠片照相裝置。
 - 2.2.13. 加熱振盪器：具55°C以上溫控及振盪功能者。
 - 2.2.14. 冷凍離心機：可達20000×g以上，且具4°C以下溫控功能者。
 - 2.2.15. 旋渦混合器。
 - 2.2.16. 抽氣幫浦。
 - 2.2.17. 玻璃過濾器組：直徑為47 mm且可滅菌者。
 - 2.2.18. 旋轉混合器：HulaMixer™ Sample Mixer，或同級品。

2.3. 試藥

2.3.1. 前處理及病毒濃縮用：氯化鈉、氯化鉀、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 (polyethylene glycol 8000, PEG 8000)、無菌去離子水、氯仿、丁醇、硫酸、鹽酸、硼酸、氯化鎂($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、乙二胺四乙酸二鈉(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, $\text{Na}_2\text{-EDTA}$) 及 三 羥 甲 基 胺 基 甲 烷 (tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris-base)均採用試藥特級，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 *Aspergillus brasiliensis* or *Aspergillus aculeatus*)採用分子生物分析級。

2.3.2. 病毒RNA抽取用：針對貝類及飲用水檢體，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。

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)。

2.3.5. 即時聚合酶鏈反應用：

2.3.5.1. A型肝炎病毒

(標的區域：5'端非轉譯區)

引子F：GAR2F

5'-ATAGGGTAACAGCGGCGGATAT-3'

引子R：GAR1R

5'-CTCAATGCATCCACTGGATGAG-3'

探針P：GARP

5'-(FAM)-

AGACAAAACCATTC AACGCCGGAGG-(BHQ)-3'

PCR增幅產物大小90 bp

2.3.5.2. A型肝炎病毒(偽陽性排除試驗)

(標的區域：5'端非轉譯區)

引子F：HAVCROF

5'-CCGTTTGCCTAGGCTATAGGCT-3'

引子R：JWCROR

5'-GGAGAGCCCTGGAAGAAAGAAGA-3'

探針P：JWCROP

5'-(FAM)-

TGATTTGTAAATATTGATTCCTGCAG-(BHQ)-3'

PCR增幅產物大小169 bp (陽性反應組)或180 bp (正對照組)^(註1)

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。

2.3.5.3. Real-time PCR Master Mix (適用於Applied Biosystems QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System-fast mode)

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。

2.3.6. 電泳用試藥：Na₂-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)。

2.3.7. 對照用物質：A型肝炎病毒株(如 ATCC VR-1402 strain: HM175/18f)。

2.4. 器具及材料^(註2)

2.4.1. 吸管輔助器或微量吸管。

2.4.2. 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。

2.4.3. 吸管尖：已滅菌，10 µL、20 µL、200 µL及1000 µL。

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：200 µL、1.5 mL及2 mL。

2.4.6. 離心管：50 mL，PP材質。

2.4.7. 離心過濾管(分子篩)：15 mL，可篩選分子量大於10⁵ Da之物

質。

2.4.8. 無菌袋：400 mL，附濾網。

2.4.9. 藥勺、剪刀、小刀及鑷子：可滅菌者。

2.4.10. 無菌濾膜：孔徑0.22 μm ，親水性醋酸纖維膜材質。

2.4.11. PCR反應管：200 μL 及500 μL 。

2.4.12. 電泳膠片製作盤：含製膠用尺梳。

註2：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7.7 g、磷酸氫二鈉0.7 g及磷酸二氫鉀0.2 g，溶於去離子水1000 mL，以1 N氫氧化鈉溶液調整pH值至7.4，以121°C滅菌15分鐘。

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

分別取等體積之氯仿與丁醇，置於褐色瓶中，混合均勻。

2.5.4. 50 mM硫酸溶液

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

取適量50 mM硫酸溶液，以無菌去離子水稀釋100倍。

2.5.6. 1 mM氫氧化鈉溶液

稱取氫氧化鈉4 g，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。

2.5.7. 6 N鹽酸溶液

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。

2.5.8. 100倍三羥甲基胺基甲烷-乙二胺四乙酸溶液

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

2.5.9. 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. 蛋白胰緩衝溶液(Buffer peptone water, BPW)

稱取蛋白胰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 。

2.5.11. TGBE緩衝溶液(Tris-glycine-beef extract buffer)

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 。

2.5.12. 含果膠酶之TGBE緩衝溶液

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

2.5.13. 0.5倍TBE緩衝溶液(Tris-borate-EDTA buffer)

稱取三羥甲基氨基甲烷54 g及硼酸27.5 g，加入0.5 M EDTA溶液20 mL，再加去離子水溶解使成1000 mL，供作5倍TBE緩衝溶液，或使用市售5倍TBE緩衝溶液。臨用時以去離子水將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

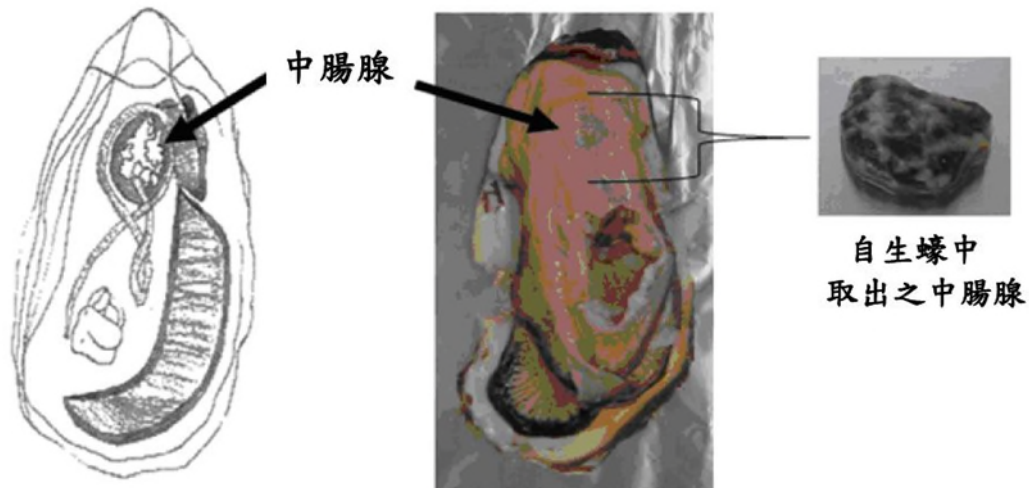
稱取瓊膠3 g，加入0.5倍TBE緩衝溶液100 mL，加熱攪拌至瓊膠完全溶解，冷卻至約50°C時，倒入電泳膠片製作盤，並置入適當之尺梳，待膠片凝固後，即可使用。

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

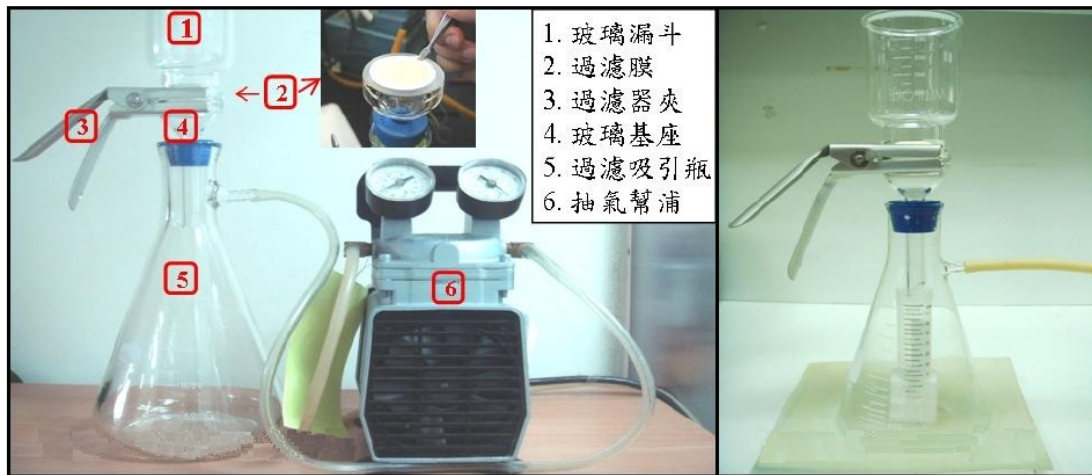
取PEG6000-氯化鈉溶液10.5 mL，加至2.6.1.2節上層液中，充分混勻，混合液於4°C持續旋轉混勻過夜。混合液於4°C以12000 ×g離心20分鐘，去除上清液，沉澱物加入無菌去離子水約0.5 mL，混合均勻，供作檢液。

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倍三羥甲基氨基甲烷-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、飲用水檢體過濾裝置

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)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持續旋轉混勻過夜。

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^(註3)

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^(註4)，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)
	25	10
反轉錄	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)

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 ^(註5)	1.0 μL
5 μM引子R ^(註5)	1.0 μL
5 μM探針P ^(註5)	1.0 μL

2倍real-time PCR Master Mix.....	10.0 μL
cDNA產物 ^(註6)	2.0 μL
無菌去離子水.....	5.0 μL
總體積.....	20.0 μL

註5：A型肝炎病毒之檢驗，採用引子對及探針為GAR2F/GAR1R/GARP。

註6：對於同一管cDNA，應至少進行二重複real-time PCR。

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)。

步驟	溫度(°C)	時間(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

2.11.3. Real-time 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。

2.11.4. 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 μM引子F ^(註7)	1.0 μL
5 μM引子R ^(註7)	1.0 μL
5 μM探針P ^(註7)	1.0 μL

2倍real-time PCR Master Mix.....	10.0 μL
cDNA產物 ^(註8)	2.0 μL
無菌去離子水.....	5.0 μL
總體積.....	20.0 μL

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(°C)	時間(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real-time PCR反應及正反應對照組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。

2.12.5. 偽陽性排除試驗之膠片電泳分析^(註9)

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。

註9：此步驟可視需要執行，以確認PCR增幅產物之大小。

2.12.5.2. 結果判讀

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。

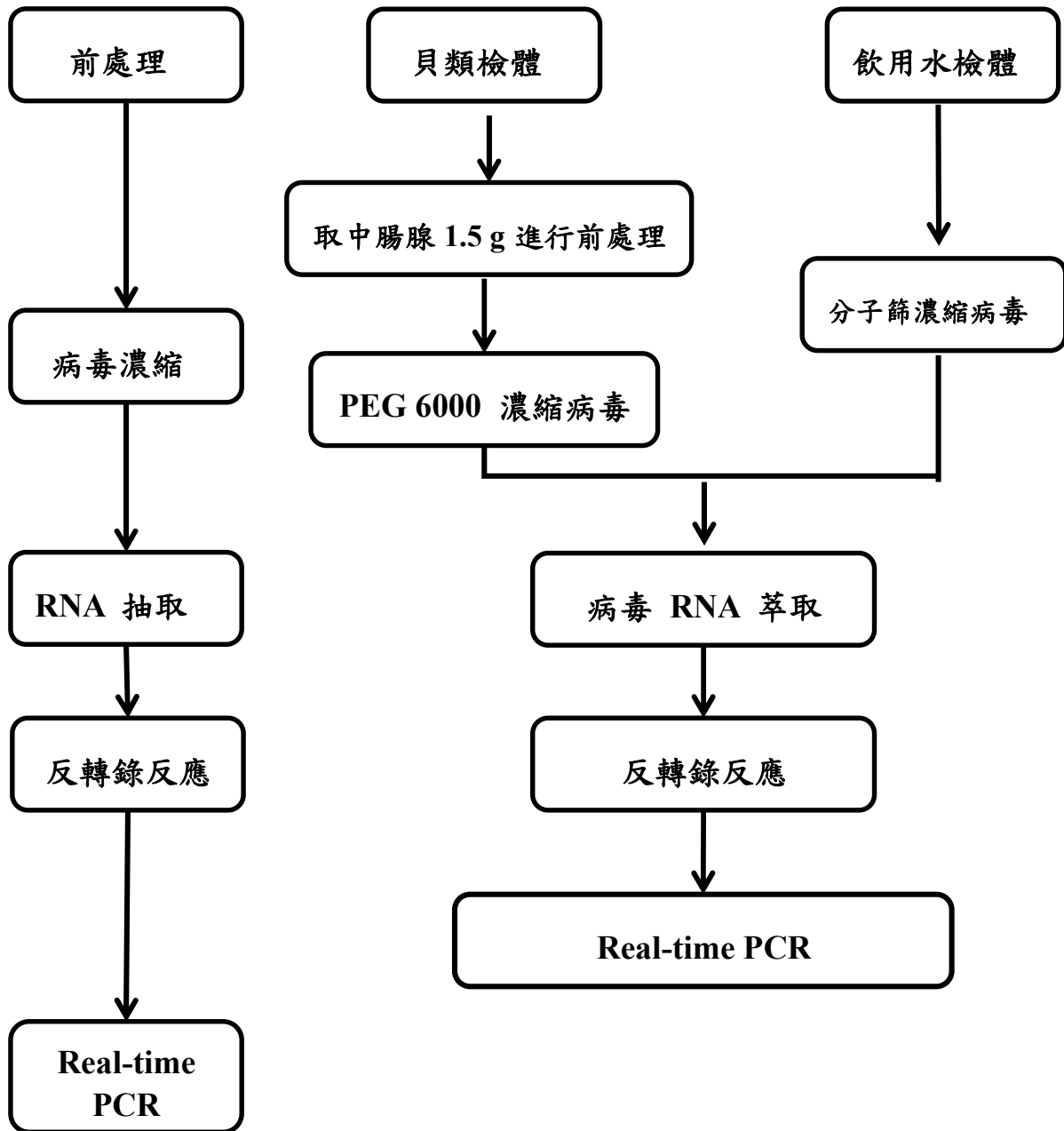
附註：本方法反應條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之反應條件。

參考文獻

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.

[<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-26-and-appendices-concentration-extraction-and-detection-enteric-viruses-food>].

檢驗流程圖(貝類及飲用水)



檢驗流程圖（蔬果類）

