



衛生福利部疾病管制署  
檢驗及疫苗研製中心

**SARS-CoV-2 病毒核酸檢測**

# 衛生福利部疾病管制署檢驗及疫苗研製中心

2020/04/10

1. 目的：

以分子生物學的技术利用即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應(real-time RT-PCR)來檢測檢體中是否有 SRAS-CoV-2 病毒。
2. 檢體種類與採檢容器：
  - 2.1. 檢體種類:適用之檢體種類包括痰 (sputum)、糞便 (stool)、咽喉拭子 (throat swab)、血清 (serum)、血漿 (plasma) 等。
  - 2.2. 採檢容器:請參照本署最新版傳染病檢體採檢手冊。
3. 原理概述：
  - 3.1. 此系統的定量原理是利用一標記兩種螢光的 DNA 探針來偵測聚合酶鏈反應的產物。此 DNA 探針的 5' 端標記一報告染劑 (reporter dye), 3' 端則標記一遮蔽染劑 (quencher dye), 完整的 DNA 探針其報告染劑所散發出的螢光會被遮蔽染劑所掩蓋。當聚合酶進行延伸反應 (extension phase) 時, 具有從 5' 端 DNA 切割活性的 DNA 聚合酶將探針切割, 使得 5' 端報告染劑與 3' 端遮蔽染劑分開, 遮蔽效應被破壞, 此時即可偵測到螢光反應。
4. 試劑耗材：
  - 4.1. 試劑:核酸萃取試劑(QIAmp viral RNA kit 及 Taiwan Advanced Nanotech system 等)、Real-time RT-PCR reagent(NeuMoDx Molecular Systems, ABI system, Bio-rad system, Roche system、Qiagen system 等)。
  - 4.2. 耗材:無菌 PCR 反應管、無菌 2  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1,000  $\mu$ L Tips、無菌 1.5 mL 微量離心管、Optical 96 well reaction plate 等。
  - 4.3. 個人防護耗材:拋棄式手套、實驗衣、外科口罩、護目鏡或面盾。
5. 儀器設備：
  - 5.1. 即時螢光定量偵測儀 (如 ABI system, Bio-rad system, Roche system 等) 或全自動即時螢光定量偵測儀 (如 NeuMoDx Molecular Systems, Qiagen system, Roche system, Abbott system 等)。
  - 5.2. 其他:2  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1,000  $\mu$ L Pipetman、第二級生物安全櫃、離心機。
6. 品質管制：

每次實驗均需帶入陽性對照及陰性對照組。陽性對照組(含有病原體基因物質)需有陽性螢光訊號產生。陰性對照組(二次水)需無任何螢光訊號產生。若檢驗結果不符合上述任一品質管制要點, 該結果不可作為檢驗結果判讀依據, 檢體需重新檢驗。
7. 檢驗步驟：
  - 7.1. 檢體前處理(於 BSL-2 實驗室內生物安全操作櫃進行)
    - 7.1.1. 咽喉拭子檢體:加入 1ml DMEM 培養液, 與棉棒充分攪拌後, 於塑膠管壁旋轉擠乾取出, 收集上清液分裝於 Cryotube。
    - 7.1.2. 痰檢體:取 PBS 緩衝液與痰檢體約 1:1 的比例混合。攪拌使其均質化, 收集上清液。
  - 7.2. 萃取病毒 RNA :請依各試劑原廠說明。

## 衛生福利部疾病管制署檢驗及疫苗研製中心

- 7.3. 即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應 (real-time RT-PCR) (以使用 Roch LightCycler 480 I & II 機型，試劑為 LightCycler® Multiplex RNA Virus Master Kit 為例)  
試劑添加量如下：(For WHO-E、WHO-N、US CDC-N1、US CDC-N2、US CDC-N3)

RT Enzyme Solution	0.1 µl
RT-qPCR Reaction Mix	4 µl
Water, PCR Grade	8.4 µl
Forward Primer (10 µM)	1 µl
Reverse Primer (10 µM)	1 µl
Probe (5 µM)	0.5 µl
Template RNA	5 µl
<hr/>	
Total Volume	20 ul

試劑添加量如下：(For WHO-RdRp)

RT Enzyme Solution	0.1 µl
RT-qPCR Reaction Mix	4 µl
Water, PCR Grade	7.3 µl
Forward Primer (10 µM)	1.2 µl
Reverse Primer (10 µM)	1.6 µl
Probe (5 µM)	0.8 µl
Template RNA	5 µl
<hr/>	
Total Volume	20 ul

使用 PCR thermal cycler：R.T.作用，50 °C 10 min。  
Taq 活化作用，95 °C 30 sec。  
Denaturation，95 °C 5 sec。  
Annealing，53 °C 15 sec。  
Extension，60 °C 15 sec。  
重複 11.3.3.3 至 11.3.3.5 步驟 45 cycle。

8. 結果判定：

檢體產生有陽性螢光訊號為陽性、不具明顯訊號為陰性。

9. 參考文件：

WHO. Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR.

[https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf?sfvrsn=a9ef618c\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf?sfvrsn=a9ef618c_2)

US CDC. 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes

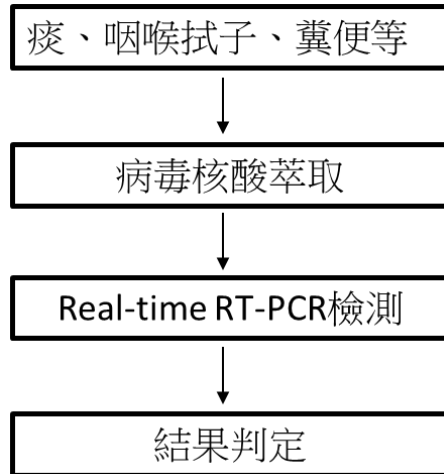
<https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/uscdcr-rt-pcr-panel-primer-probes.pdf>

# 衛生福利部疾病管制署檢驗及疫苗研製中心

[f?sfvrsn=fa29cb4b\\_2](#)

10. 附錄：

## SARS-CoV-2 病毒鑑定流程圖



## SARS-CoV-2 病毒診斷用引子組序列表

### 1. WHO methods

RdRP\_SARSR-F2-GTGARATGGTCATGTGTGGCGG

RdRP\_SARSR-R1-CARATGTTAAASACACTATTAGCATA

**RdRP\_SARSR-R2-CAAATGTTAAAAACACTATTAGCATA**

RdRP\_SARSR-P2-FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ

RdRP\_SARSR-P1-FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC-BBQ

E\_Sarbeco\_F1-ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT

E\_Sarbeco\_R2-ATATTGCAGCAGTACGCACACA

E\_Sarbeco\_P1-FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ

N\_Sarbeco\_F1-CACATTGGCACCCGCAATC

N\_Sarbeco\_R1-GAGGAACGAGAAGAGGCTTG

N\_Sarbeco\_P1-FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BBQ

### 2. US CDC methods

2019-nCoV\_N1-F-GACCCCAAATCAGCGAAAT

2019-nCoV\_N1-R-TCTGGTACTGCCAGTTGAATCTG

2019-nCoV\_N1-P-FAM-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC-BBQ

2019-nCoV\_N2-F-TTACAAACATTGGCCGCAA

2019-nCoV\_N2-R-GCGCGACATTCCGAAGAA

2019-nCoV\_N2-P-FAM-ACAATTTGCCCCAGCGCTTCAG-BBQ

## 衛生福利部疾病管制署檢驗及疫苗研製中心

2019-nCoV\_N3-F-GGGAGCCTTGAATACACCAAAA

2019-nCoV\_N3-R-TGTAGCACGATTGCAGCATTG

2019-nCoV\_N3-P-FAM-AYCACATTGGCACCCGCAATCCTG-BBQ