衛生福利部疾病管制署
檢驗及疫苗研製中心

2019-nCoV 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

2020/02/18

1. 目的：

以分子生物學的技術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 2019-nCoV 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(ABI system, Bio-rad system, LightCycler 480 system 等)。

4.2. 耗材：無菌 PCR 反應管、無菌 2 μL , 20 μL, 100 μL, 200 μL, 1,000 μL 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. PCR thermal cycler、即時定量偵測儀(如 ABI system, Bio-rad system, LightCycler 480 system 等)、2 μL, 20 μL, 100 μL, 200 μL, 1,000 μL 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。

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

©版權所有 抄襲必究

三階文件

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
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
Total Volume	20 ul

使用 PCR thermal cycler：R.T.作用，50 ºC 10 min。
Taq 活化作用，95 ºC 30 sec。
Denaturation，95 ºC 5 sec。
Annealing，53 ºC 15 sec。
Extension，60 ºC 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：

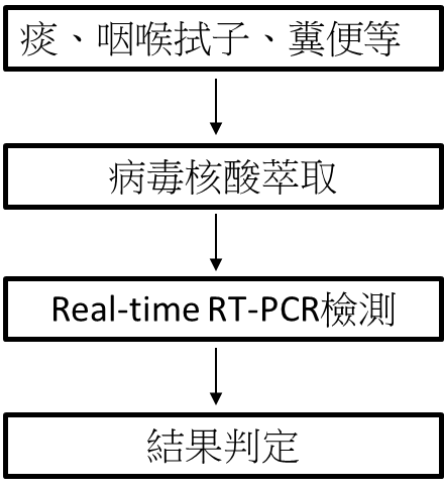
WHO. Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR.
https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf?sfvrsn=a9ef618c_2

US CDC. 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes
https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html

©版權所有 抄襲必究

10. 附錄：

2019-nCoV 病毒鑑定流程圖



2019-nCoV 病毒診斷用引子組序列表

1. WHO methods

RdRP_SARSr-F2-GTGARATGGTCATGTGTGGCGG

RdRP_SARSr-R1-CARATGTTAAASACACTATTAGCATA

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-GACCCCAAAATCAGCGAAAT

2019-nCoV_N1-R-TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG

2019-nCoV_N1-P-FAM-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC-BBQ

2019-nCoV_N2-F-TTACAAACATTGGCCGCAAA

2019-nCoV_N2-R-GCGCGACATTCCGAAGAA

2019-nCoV_N2-P-FAM-ACAATTTGCCCCCAGCGCTTCAG-BBQ

2019-nCoV_N3-F-GGGAGCCTTGAATACACCAAAA

2019-nCoV_N3-R-TGTAGCACGATTGCAGCATTG

2019-nCoV_N3-P-FAM-AYCACATTGGCACCCGCAATCCTG-BBQ

©版權所有 抄襲必究