



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I885227 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：110143526

(22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 11 月 23 日

(51)Int. Cl. : C12Q1/6851 (2018.01)

C12Q1/6876 (2018.01)

C12Q1/70 (2006.01)

C12N15/11 (2006.01)

C12R1/93 (2006.01)

(30)優先權：2021/02/23 美國

63/152,492

(71)申請人：財團法人工業技術研究院 (中華民國) INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE (TW)

新竹縣竹東鎮中興路 4 段 195 號

(72)發明人：周民元 CHOU, MIN-YUAN (TW)；鄭光琪 CHENG, KUANG-CHI (TW)；楊明華 YANG, MING-HUA (TW)；郭俊麟 GUO, JIUN-LIN (TW)

(74)代理人：洪澄文

(56)參考文獻：

CN 107287320A

期刊 Ding et. al., "Sequence-specific and multiplex detection of COVID-19 virus (SARS-CoV-2) using proofreading enzyme-mediated probe cleavage coupled with isothermal amplification" Biosensors and Bioelectronics, Volume 178, Elsevier, Published online 2021 Jan 28, 113041

審查人員：余家嫻

申請專利範圍項數：52 項 圖式數：13 共 148 頁

(54)名稱

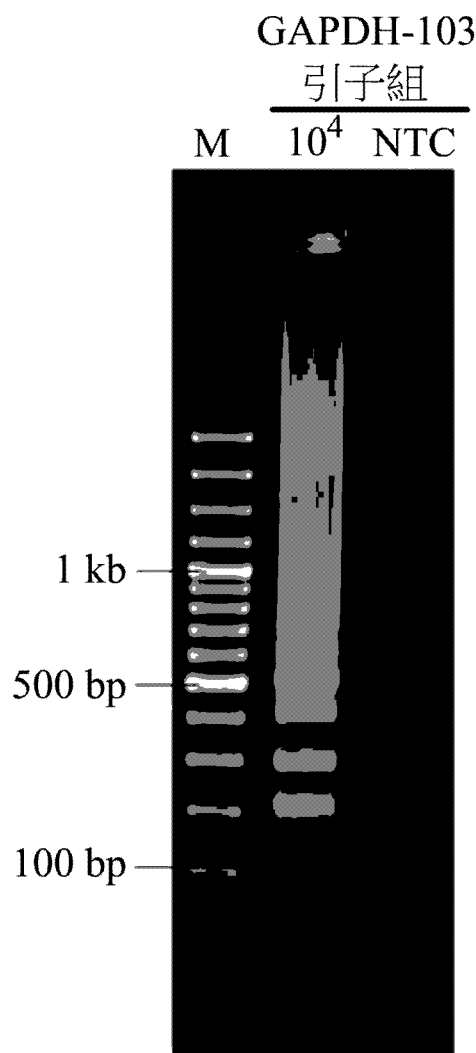
核酸偵測套組及核酸偵測方法

(57)摘要

一種 GAPDH 核酸偵測套組，包括一偵測 GAPDH 核酸之引子組。該偵測 GAPDH 核酸之引子組包括：一針對 GAPDH 核酸之順向內引子；一針對 GAPDH 核酸之順向外引子；一針對 GAPDH 核酸之逆向內引子；以及一針對 GAPDH 核酸之逆向外引子。而該偵測 GAPDH 核酸之引子組係用於一恆溫環型核酸擴增法(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)。

A GAPDH nucleic acid detection kit includes a primer set for detecting GAPDH nucleic acid. The primer set for detecting GAPDH nucleic acid includes a forward internal primer for GAPDH nucleic acids, a forward outer primer for GAPDH nucleic acids, a backward internal primer for GAPDH nucleic acids and a backward outer primer for GAPDH nucleic acids. The primer set for detecting GAPDH nucleic acid is used in a loop-mediated isothermal amplification (LAMP).

指定代表圖：



第 3B 圖



I885227

【發明摘要】

【中文發明名稱】 核酸偵測套組及核酸偵測方法

【英文發明名稱】 Nucleic acid detection kit and nucleic acid detection method

【中文】

一種GAPDH核酸偵測套組，包括一偵測GAPDH核酸之引子組。該偵測GAPDH核酸之引子組包括：一針對GAPDH核酸之順向內引子；一針對GAPDH核酸之順向外引子；一針對GAPDH核酸之逆向內引子；以及一針對GAPDH核酸之逆向外引子。而該偵測GAPDH核酸之引子組係用於一恆溫環型核酸擴增法(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)。

【英文】

A GAPDH nucleic acid detection kit includes a primer set for detecting GAPDH nucleic acid. The primer set for detecting GAPDH nucleic acid includes a forward internal primer for GAPDH nucleic acids, a forward outer primer for GAPDH nucleic acids, a backward internal primer for GAPDH nucleic acids and a backward outer primer for GAPDH nucleic acids. The primer set for detecting GAPDH nucleic acid is used in a loop-mediated isothermal amplification

(LAMP).

【指定代表圖】 第3B圖

【代表圖之符號簡單說明】 無。

【特徵化學式】 無。

【發明說明書】

【中文發明名稱】 核酸偵測套組及核酸偵測方法

【英文發明名稱】 Nucleic acid detection kit and nucleic acid detection method

【技術領域】

【0001】 本揭露是關於核酸偵測套組與核酸偵測方法，且特別是關於GAPDH核酸偵測套組、標的核酸偵測套組或新型冠狀病毒之核酸偵測套組與偵測方法。

【先前技術】

【0002】 新冠肺炎由新型冠狀病毒(SARS-CoV-2)感染所引起。截至2021年2月20日為止，全球已有1.1億人受到感染，超過246萬人死亡。新冠肺炎臨床症狀多變，從嚴重肺炎、呼吸窘迫、味覺喪失，到無症狀感染皆有。

【0003】 目前新型冠狀病毒的檢測方法之步驟主要包括，採集上呼吸道檢體（鼻咽或咽喉擦拭液）或下呼吸道檢體（痰液、氣管內抽取液或支氣管肺泡沖洗液），將檢體經過核酸萃取，且之後以定量反轉錄聚合酶反應（RT-qPCR, Quantitative reverse transcription PCR）檢測，而篩檢時間約為4小時。採檢者須穿戴手套、隔離衣與護目鏡等防護措施，而此過程需要大量人力及備品的支援。又，上呼吸道檢體（鼻咽或咽喉擦拭液）或下呼吸道檢體

的採集屬於侵入性採集，易造成受檢者的不適，而引起打噴嚏或咳嗽等飛沫產生，進而產生病毒散播的潛在危機。

【0004】 因此，目前亟需一種新穎之核酸檢測套組與方法，其不僅具備相當不錯的偵測靈敏度，且可採用非侵入式採集之檢體來進行檢驗。

【發明內容】

【0005】 本揭露提供一種GAPDH核酸偵測套組，包括一偵測GAPDH核酸之引子組。該偵測GAPDH核酸之引子組包括：一針對GAPDH核酸之順向內引子；一針對GAPDH核酸之順向外引子；一針對GAPDH核酸之逆向內引子；以及一針對GAPDH核酸之逆向外引子。該針對GAPDH核酸之順向內引子係由一第一片段與一第二片段所組成，而該第一片段之3'端連接該第二片段之5'端，或該針對GAPDH核酸之順向內引子係由一第一片段、一第一連接子與一第二片段所組成，而該第一片段之3'端連接該第一連接子之5'端，且該第一連接子之3'端連接該第二片段之5'端。該第一片段具有約10-30個核苷酸，且係由一第一序列區段之互補股所組成，而該第一序列區段位於序列識別號：1之核苷酸序列的第134個位點至第175個位點之間，又該第二片段具有10-30個核苷酸，且係由一第二序列區段所組成，而該第二序列區段係位於序列識別號：1之核苷酸序列的第77個位點至第115個位點之間，且該第一連接子係由1-6個胸腺嘧啶(thymine, T)或肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)

所組成。該針對GAPDH核酸之順向外引子具有約10-30個核苷酸，且係由一第三序列區段所組成，而該第三序列區段係位於序列識別號：1之核苷酸序列的第42個位點至第79個位點之間。該針對GAPDH核酸之逆向內引子係由一第三片段與一第四片段所組成，而該第三片段之3'端連接該第四片段之5'端，或該針對GAPDH核酸之逆向內引子係由一第三片段、一第二連接子與一第四片段所組成，而該第三片段之3'端連接該第二連接子之5'端，且該第二連接子之3'端連接該第四片段之5'端。該第三片段具有約10-30個核苷酸，且係由一第四序列區段所組成，而該第四序列區段係位於序列識別號：1之核苷酸序列的第156個位點至第207個位點之間，又該第四片段具有約10-30個核苷酸，且係由一第五序列區段之互補股所組成，而該第五序列區段係位於序列識別號：1之核苷酸序列的第211個位點至第250個位點之間，且該第二連接子係由1-6個胸腺嘧啶或肽核酸所組成。該針對GAPDH核酸之逆向外引子具有約10-30個核苷酸，且係由一第六序列區段之互補股所組成，而該第六序列區段係位於序列識別號：1之核苷酸序列的第238個位點至第275個位點之間。又，該偵測GAPDH核酸之引子組係用於一恆溫環型核酸擴增法(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)，而該恆溫環型核酸擴增法包括標準恆溫環型核酸擴增法或反轉錄恆溫環型核酸擴增法(reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT LAMP)。

【0006】 本揭露也提供一種標的核酸偵測套組，包括一偵測

GAPDH核酸之引子組以及一偵測標的核酸之引子組。該偵測

GAPDH核酸之引子組包括：一針對GAPDH核酸之順向內引子；一針對GAPDH核酸之順向外引子；一針對GAPDH核酸之逆向內引子；以及一針對GAPDH核酸之逆向外引子。該針對GAPDH核酸之順向內引子係由一第一片段與一第二片段所組成，而該第一片段之3'端連接該第二片段之5'端，或該針對GAPDH核酸之順向內引子係由一第一片段、一第一連接子與一第二片段所組成，而該第一片段之3'端連接該第一連接子之5'端，且該第一連接子之3'端連接該第二片段之5'端，其中該第一片段具有約10-30個核苷酸，且係由一第一序列區段之互補股所組成，而該第一序列區段係位於序列識別號：1之核苷酸序列的第134個位點至第175個位點之間，又該第二片段具有約10-30個核苷酸，且係由一第二序列區段所組成，而該第二序列區段係位於序列識別號：1之核苷酸序列的第77個位點至第115個位點之間，且該第一連接子係由1-6個胸腺嘧啶或肽核酸所組成。該針對GAPDH核酸之順向外引子具有約10-30個核苷酸，且係由為一第三序列區段所組成，而該第三序列區段位於序列識別號：1之核苷酸序列的第42個位點至第79個位點之間。該針對GAPDH核酸之逆向內引子係由一第三片段與一第四片段所組成，而該第三片段之3'端連接該第四片段的5'端，或該針對GAPDH核酸之逆向內引子係由一第三片段、一第二連接子與一第四片段所組成，而該第三片段之3'端連接該第二連接子之5'端，且該第二連接子之3'端連接該第四片段之5'端，其中該第三片段具有約10-30個

核苷酸，且係由一第四序列區段所組成，而該第四序列區段位於序列識別號：1之核苷酸序列的第156個位點至第207個位點之間，又該第四片段具有約10-30個核苷酸，且係由一第五序列區段之互補股所組成，而該第五序列區段係位於序列識別號：1之核苷酸序列的第211個位點至第250個位點之間，且該第二連接子係由1-6個胸腺嘧啶或肽核酸所組成。該針對GAPDH核酸之逆向外引子具有約10-30個核苷酸，且係由一第六序列區段之互補股所組成，而該第六序列區段位於序列識別號：1之核苷酸序列的第238個位點至第275個位點之間。又，偵測標的核酸之引子組，包括：一針對標的核酸之順向內引子；一針對標的核酸之順向外引子；一針對標的核酸之逆向內引子；以及一針對標的核酸之逆向外引子。該偵測標的核酸之引子組的偵測標的不同於該偵測GAPDH核酸之引子組的偵測標的。該偵測GAPDH核酸之引子組與該偵測標的核酸之引子組分別用於一第一恆溫環型核酸擴增法與一第二恆溫環型核酸擴增法，而該第一恆溫環型核酸擴增法與該第二恆溫環型核酸擴增法獨立地包括，標準恆溫環型核酸擴增法或反轉錄恆溫環型核酸擴增法。此外，該第一恆溫環型核酸擴增法的結果，可作為一內部控制組。

【0007】 本揭露還提供一種新型冠狀病毒偵測套組，包括：一偵測新型冠狀病毒之核酸的引子組。該偵測新型冠狀病毒之核酸的引子組包括：一針對新型冠狀病毒之核酸之順向內引子；一針對新型冠狀病毒之核酸之順向外引子；一針對新型冠狀病毒之核酸之

逆向內引子；以及一針對新型冠狀病毒之核酸之逆向外引子。該針對新型冠狀病毒之核酸之順向內引子係由一第五片段與一第六片段所組成，而該第五片段之3'端連接該第六片段之5'端，或該針對標的核酸之順向內引子係由一第五片段、一第三連接子與一第六片段所組成，而該第五片段之3'端連接該第三連接子之5'端，且該第三連接子之3'端連接該第六片段之5'端。該第五片段具有約10-30個核苷酸，且係由一第七序列區段之互補股所組成，而該第七序列區段係位於序列識別號：11之核苷酸序列的第90個位點至第134個位點之間，又該第六片段具有約10-30個核苷酸，且係由一第八序列區段所組成，而該第八序列區段係位於序列識別號：11之核苷酸序列的第45個位點至第82個位點之間，且該第三連接子係由1-6個胸腺嘧啶或肽核酸所組成。該針對新型冠狀病毒之核酸之順向外引子具有約10-30個核苷酸，且係由為一第九序列區段所組成，而該第九序列區段係位於序列識別號：11之核苷酸序列的第27個位點至第64個位點之間。該針對新型冠狀病毒之核酸之逆向內引子係由一第七片段與一第八片段所組成，而該第七片段之3'端連接該第八片段之5'端，或該針對標的核酸之逆向內引子係由一第七片段、一第四連接子與一第八片段所組成，而該第七片段之3'端連接該第四連接子之5'端，且該第四連接子之3'端連接該第八片段之5'端。該第七片段具有約10-30個核苷酸，且係由一第十序列區段所組成，而該第十序列區段係位於序列識別號：11之核苷酸序列的第123個位點至第165個位點之間，又該第八片段具有約10-30個核苷酸，且

係由一第十一序列區段之互補股所組成，而該第十一序列區段係位於序列識別號：11之核苷酸序列的第170個位點至第208個位點之間，且該第四連接子係由1-6個胸腺嘧啶或肽核酸所組成。該針對新型冠狀病毒之核酸之逆向外引子具有約10-30個核苷酸，且係由為一第十二序列區段之互補股所組成，而該第十二序列區段係位於序列識別號：11之核苷酸序列的第226個位點至第263個位點之間。又，該偵測新型冠狀病毒之核酸的引子組用於一恆溫環型核酸擴增法，而該恆溫環型核酸擴增法包括標準恆溫環型核酸擴增法或反轉錄恆溫環型核酸擴增法。

【0008】 又，本揭露提供一種偵測GAPDH核酸之方法，包括：(a) 提供一待測樣本；以及(b) 將該待測樣本以上述之GAPDH核酸偵測套組中的該偵測GAPDH核酸之引子組進行該恆溫環型核酸擴增法。若該待測樣本含有GAPDH核酸，則自該恆溫環型核酸擴增法獲得一GAPDH的核酸擴增產物。該恆溫環型核酸擴增法包括，標準恆溫環型核酸擴增法或反轉錄恆溫環型核酸擴增法。

【0009】 本揭露也提供一種偵測新型冠狀病毒的方法，包括：(a) 提供一待測樣本；以及(b) 將該待測樣本以上述之新型冠狀病毒偵測套組中的該偵測新型冠狀病毒之核酸的引子組進行一恆溫環型核酸擴增法。若該待測樣本含有新型冠狀病毒，自該恆溫環型核酸擴增法獲得一新型冠狀病毒的核酸擴增產物。又，該恆溫環型核酸擴增法包括，標準恆溫環型核酸擴增法或反轉錄恆溫環型核酸擴增法。

【0010】 為了讓本發明之上述和其他目的、特徵、和優點能更明顯易懂，下文特舉較佳實施例，並配合所附圖示，作詳細說明如下：

【圖式簡單說明】

【0011】

第1A圖、第1B圖與第1C圖顯示，於本揭露之GAPDH核酸偵測套組中，偵測GAPDH核酸之引子組的設計及其操作原理，以及，於標的核酸偵測套組中，偵測GAPDH核酸之引子組及偵測標的核酸之引子組的設計及其操作原理。

第2A圖顯示，於本揭露之一實施例中，側流免疫分析試片之作用機制的示意圖。

第2B圖顯示，於本揭露之另一實施例中，側流免疫分析試片之作用機制的示意圖。

第2C圖顯示，於本揭露之又一實施例中，側流免疫分析試片之作用機制的示意圖。

第3A圖顯示，含合成之SARS-CoV-2 RNA控制組之唾液檢體的總RNA利用RdRp引子組（順向內引子之5'端標示有FAM，逆向內引子之5'端標示有生物素）經由反轉錄恆溫環型核酸擴增法（一步驟反應）所產生之產物的電泳分析結果。正控制組(positive control, PC)：將合成之SARS-CoV-2 RNA控制組直接與RdRp引子組及RT/*Bst* mix混合並進行一反轉錄恆溫環型核酸擴增法所

產生之產物。無模板控制組(no template control, NTC)：將1倍RNAsecure™ RNase Inactivation Reagent (用於取代總RNA模板) 與RdRp引子組及RT/Bst mix混合以進行一反轉錄恆溫環型核酸擴增法所產生的產物。M：DNA分子量標準品；PC：正控制組；NTC：無模板控制組； 10^4 ：含 10^4 拷貝/毫升之合成SARS-CoV-2 RNA控制組之唾液檢體的總RNA利用RdRp引子組經由反轉錄恆溫環型核酸擴增法所產生之產物。

第3B圖顯示，含合成之SARS-CoV-2 RNA控制組之唾液檢體的總RNA利用GAPDH-103引子組（順向內引子之5'端標示有DIG，逆向內引子之5'端標示有生物素）經由反轉錄恆溫環型核酸擴增法（一步驟反應）所產生之產物的電泳分析結果。無模板控制組(no template control, NTC)：將1倍RNAsecure™ RNase Inactivation Reagent (用於取代總RNA模板) 與GAPDH-103及RT/Bst mix混合以進行一反轉錄恆溫環型核酸擴增法所產生的產物。M：DNA分子量標準品；NTC：無模板控制組； 10^4 ：含 10^4 拷貝/毫升之合成SARS-CoV-2 RNA控制組之唾液檢體的總RNA利用組GAPDH-103引子組經由反轉錄恆溫環型核酸擴增法所產生之產物。

第3C圖顯示，將含合成之SARS-CoV-2 RNA控制組之唾液檢體分別以RdRp引子組與GAPDH-103引子組進行反轉錄恆溫環型核酸擴增法（一步驟反應）所獲得之兩個產物取等量混合所獲得的混合物的側流免疫分析結果。正控制組：將合成之SARS-CoV-2

RNA控制組直接與RdRp引子組及RT/*Bst* mix混合並進行一反轉錄恆溫環型核酸擴增法所產生之產物。無模板控制組(no template control, NTC)：將第3A圖之無模板控制組與第3B圖之無模板控制組取等量混合所獲得之混合物。 10^4 拷貝/毫升：含 10^4 拷貝/毫升之合成SARS-CoV-2 RNA控制組之唾液檢體分別以RdRp引子組與GAPDH-103引子組進行反轉錄恆溫環型核酸擴增法所獲得之兩個產物等量混合所獲得的混合物；NTC：無模板控制組；C：控制線；T1：第一測試線；T2：第二測試線。

第4圖顯示，合成之SARS-CoV-2 RNA控制組藉由RdRp引子組進行反轉錄恆溫環型核酸擴增法（兩步驟反應）所產生之產物的電泳分析結果。M：DNA分子量標準品；N：無模板控制組。

第5A圖顯示，SARS-CoV-2病毒RNA藉由利用RdRp引子組並以重組之*Bst* DNA聚合酶大片段作為聚合酶的反轉錄恆溫環型核酸擴增法所產生之產物的電泳分析結果。M：DNA分子量標準品；BEI：去活化的SARS-CoV-2病毒液；NTC：無模板控制組。

第5B圖顯示，SARS-CoV-2病毒RNA藉由利用RdRp引子組並以重組之*Bst* DNA聚合酶大片段作為聚合酶的反轉錄恆溫環型核酸擴增法所產生之產物的側流免疫分析結果。BEI病毒：去活化的SARS-CoV-2病毒液；NTC：無模板控制組；C：控制線；T2：第二測試線。

第6圖顯示，將添加有去活化SARS-CoV-2病毒液之新型冠狀病毒陰性唾液檢體經熱處理後，分別以RdRp引子組與

GAPDH-103 引子組對前述樣本直接進行反轉錄恆溫環型核酸擴增，並將分別獲得之產物進行電泳分析所獲得的結果。M：DNA 分子量標準品；PC：正控制組；NTC-RdRp：RdRp 引子組之無模板控制組；NTC-GAPDH：GAPDH-103 引子組之無模板控制組。

第 7 圖顯示，將添加有去活化 SARS-CoV-2 病毒液之新型冠狀病毒陰性唾液檢體經熱處理後，分別以 RdRp 引子組與 GAPDH-103 引子組對前述樣本直接進行反轉錄恆溫環型核酸擴增，並以分別獲得之產物混合後所獲得的混合物進行側流免疫分析的結果。NTC：無模板控制組；C：控制線；T1：第一測試線；T2：第二測試線。

第 8A 圖顯示，不同之 GAPDH 引子組於反應溫度 65℃之反轉錄恆溫環型核酸擴增法所產生之產物的電泳分析結果。M：DNA 分子量標準品；D：Expi293 細胞基因體 DNA；R：Expi293 細胞總 RNA；N：無模板控制組。

第 8B 圖顯示，不同之 GAPDH 引子組於反應溫度 68℃之反轉錄恆溫環型核酸擴增法所產生之產物的電泳分析結果。M：DNA 分子量標準品；D：Expi293 細胞基因體 DNA；R：Expi293 細胞總 RNA；N：無模板控制組。

第 8C 圖顯示，不同之 GAPDH 引子組於反應溫度 70℃之反轉錄恆溫環型核酸擴增法所產生之產物的電泳分析結果。M：DNA 分子量標準品；D：Expi293 細胞基因體 DNA；R：Expi293 細胞總 RNA；N：無模板控制組。

第 9 圖顯示，不同之經修飾之 GAPDH 引子組於反應溫度 65°C 之反轉錄恆溫環型核酸擴增法所產生之產物的電泳分析結果。M：DNA 分子量標準品；D：Expi293 細胞基因體 DNA；R：Expi293 細胞總 RNA；N：無模板控制組。

第 10A 圖顯示，將添加有去活化之 SARS-CoV-2 病毒液之新型冠狀病毒陰性唾液檢體經熱處理後，以 RdRp 引子組對前述樣本進行反轉錄恆溫環型核酸擴增，並將所產生之產物進行電泳分析的結果。M：DNA 分子量標準品；NTC：無模板控制組。

第 10B 圖顯示，將添加有去活化 SARS-CoV-2 病毒液之新型冠狀病毒陰性唾液檢體經熱處理後，以 GAPDH-103-B3-I 引子組對前述樣本進行反轉錄恆溫環型核酸擴增，並將所產生之產物進行電泳分析的結果。M：DNA 分子量標準品；NTC：無模板控制組。

第 10C 圖顯示，將添加有去活化 SARS-CoV-2 病毒液之新型冠狀病毒陰性唾液檢體經熱處理後，分別以 RdRp 引子組與 GAPDH-103-B3-I 引子組對前述樣本進行反轉錄恆溫環型核酸擴增，並將分別獲得之產物混合後所獲得的混合物進行側流免疫分析的結果。NTC：無模板控制組；C：控制線；T1：第一測試線；T2：第二測試線。

第 11A 圖顯示，體外轉錄之 RdRp RNA 以帶有 RNase H 活性之反轉錄酵素於不同溫度下進行反轉錄反應，隨後再以重組 *Bst* DNA 聚合酶進行恆溫環型核酸擴增法（兩步驟反應）所產生之產物的電泳分析結果。M：DNA 分子量標準品；NTC：無模板控制組。

第 11B 圖顯示，體外轉錄之 RdRp RNA 以帶有 RNase H 活性之反轉錄酵素於不同溫度下進行反轉錄反應，隨後再以重組 *Bst* DNA 聚合酶進行恆溫環型核酸擴增法（兩步驟反應）所產生之產物的側流免疫分析結果。NTC：無模板控制組；C：控制線；T2：第二測試線。

第 12A 圖顯示，體外轉錄之 RdRp RNA 以帶有 RNase H 活性之反轉錄酵素與重組 *Bst* DNA 聚合酶於 65°C 進行反轉錄恆溫環型核酸擴增法（一步驟反應）所產生之產物的電泳分析結果。M：DNA 分子量標準品；NTC：無模板控制組。

第 12B 圖顯示，體外轉錄之 RdRp RNA 以帶有 RNase H 活性之反轉錄酵素與重組 *Bst* DNA 聚合酶於 65°C 進行反轉錄恆溫環型核酸擴增法（一步驟反應）所產生之產物的側流免疫分析結果。NTC：無模板控制組；C：控制線；T2：第二測試線。

第 13 圖顯示，將本揭露之引子組 GAPDH-103 與並非於本揭露之設計區段所設計之引子組 GAPDH-5 以及引子組 GAPDH-90 分別進行反轉錄恆溫環型核酸擴增法的電泳分析結果。M：DNA 分子量標準品；293：Expi293 細胞之總 RNA；Sal：新型冠狀病毒陰性唾液之總 RNA；NTC：無模板控制組。

【實施方式】

【0012】 本揭露可提供一種 GAPDH 核酸偵測套組，其可包括一偵測 GAPDH 核酸之引子組，但不限於此。

【0013】 上述本揭露之GAPDH核酸偵測套組中的偵測GAPDH核酸之引子組，可用於一恆溫環型核酸擴增法(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)，以確認一待測樣本中是否存在GAPDH核酸。

【0014】 上述恆溫環型核酸擴增法，可包括，標準恆溫環型核酸擴增法或反轉錄恆溫環型核酸擴增法(reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT LAMP)，但不限於此。

【0015】 而上述待測樣本，可為一未經任何純化處理，例如未經核酸純化處理之樣本。亦即，藉由上述本揭露之GAPDH核酸偵測套組中的偵測GAPDH核酸之引子組，可對一未經任何純化處理之生物樣本，進行核酸擴增反應，而獲得準確之GAPDH核酸偵測結果，而可達成減少或免除處理待測樣本的效果。

【0016】 上述待測樣本之來源可包括，但不限於，唾液檢體、痰液檢體、鼻腔拭子(nose swab)檢體、咽喉拭子(throat swab)檢體、鼻咽(nasopharyngeal)檢體、尿液檢體、糞便檢體、直腸拭子(rectal swab)檢體、腦脊髓液(cerebrospinal fluid, CSF)檢體、體液(body fluid)檢體等。

【0017】 在一實施例中，上述待測樣本之來源可為一非侵入式採樣所獲得之檢體，如唾液檢體、痰液檢體、尿液檢體、糞便檢體等，但不限於此。於此實施例中，本揭露之GAPDH核酸偵測套組可搭配一恆溫反應機器與一簡易分析試片，如側流免疫分析試片

(lateral flow immunoassay test strip)，而達成居家檢驗。

【0018】 又，上述本揭露之GAPDH核酸偵測套組中的偵測GAPDH核酸之引子組，可以單股RNA或第一股cDNA(first strand cDNA)為起始模板，進行上述恆溫環型核酸擴增法，但不限於此。

【0019】 本揭露之GAPDH核酸偵測套組中的偵測GAPDH核酸之引子組的設計係根據一恆溫環型擴增法，但所設計出之引子組，並非僅適用於恆溫環型擴增法。上述本揭露之GAPDH核酸偵測套組中的偵測GAPDH核酸之引子組的設計與其操作原理，如第1A圖、第1B圖與第1C圖所示。

【0020】 參見第1A圖、第1B圖與第1C圖。由第1A圖可知，在一標的核酸（如RNA序列）100中選出了六個區域，分別為F1區域、F2區域、F3區域、B1c區域、B2c區域與B3c區域（其互補股分別為F1c區域、F2c區域、F3c區域、B1區域、B2區域與B3區域）。於此方法中，採用四條引子，分別為經特殊設計之順向內引子(forward internal primer, FIP) 101、順向外引子(forward outer primer) 103、逆向內引子(backward internal primer, BIP) 105與逆向外引子(backward outer primer) 107，其中順向內引子101之序列為由一第一片段（F1區域之序列的互補股，即F1c區域的序列）與一第二片段（F2區域之序列）所組成，順向外引子103之序列為F3區域之序列，而逆向內引子105之序列為由一第三片段（B1c區域之序列，即B1區域之序列的互補股）與一第四片段（B2c區域

之序列的互補股，即B2區域之序列）所組成，逆向外引子107之序列為B3c區域之序列的互補股（即B3區域之序列）。

【0021】 在恆溫環型擴增法進行中，順向內引子101之第二片段（F2區域之序列）會黏附於上述標的核酸100之互補股（例如cDNA）的F2c區域而進行互補股合成反應，而合成出具有第一片段（F1區域之序列的互補股，即F1c區域的序列）、第二片段（F2區域之序列）、F1區域、B1c區域、B2c區域與B3c區域之序列的一第一股，又順向外引子103會將此股移開，另合成出具有F3區域、F2區域、F1區域、B1c區域、B2c區域與B3c區域之序列的一第二股。接著，逆向內引子105之第四片段（B2區域之序列）黏附於上述第一股之B2c區域，並以此第一股為模板而合成出具有B1c區域、B2區域、B1區域、F1c區域、F2c區域與F1區域之序列的一第三股。之後，逆向外引子107會將此第三股移開，另合成出具有B3區域、B2區域、B1區域、F1c區域、F2c區域與F1區域之序列的一第四股。而上述第三股之B1c區域與B1區域之間會產生自身黏附，且同樣地，F1區域與F1c區域之間也會產生自身黏附，因此使第三股成為兩端皆形成有莖環(loop)的一股。然後順向內引子與逆向內引子依序依照此股及/或其互補股合成產物為模板持續進行互補股合成反應，而形成一具有複數個莖環之雙股產物（再次參見第1A圖與第1B圖）。

【0022】 此外，也可進一步於F1區域與F2區域之間設計順向環引子(forward loop primer, FLP)109，在B1c區域與B2c區域

之間設計逆向環引子(backward loop primer, BLP)111，以提升恆溫環型核酸擴增法的效率（參見第1C圖）。

【0023】 因此，上述本揭露之GAPDH核酸偵測套組中的偵測GAPDH核酸之引子組至少可包括，一針對GAPDH核酸之順向內引子、一針對GAPDH核酸之順向外引子、一針對GAPDH核酸之逆向內引子與一針對GAPDH核酸之逆向外引子，但不限於此。

【0024】 用於設計上述引子組之GAPDH核酸的序列可為序列識別號：1之核苷酸序列，其為一GAPDH之mRNA序列（NCBI獲取編號NM_001256799）的一部分，但不限於此。

【0025】 上述針對GAPDH核酸之順向內引子可由一第一片段與一第二片段所組成，而上述第一片段之3'端連接上述第二片段的5'端，或上述針對GAPDH核酸之順向內引子可由一第一片段、一第一連接子與一第二片段所組成，而上述第一片段之3'端連接上述第一連接子之5'端，且上述第一連接子之3'端連接上述第二片段之5'端。上述第一片段可具有約10-30個核苷酸，且可由一第一序列區段之互補股所組成，又上述第一序列區段可位於序列識別號：1之核苷酸序列的第134個位點至第175個位點之間，但不限於此。上述第二片段可具有約10-30個核苷酸，且可由一第二序列區段所組成，又上述第二序列區段可位於序列識別號：1之核苷酸序列的第77個位點至第115個位點之間，但也不限於此。而上述第一連接子可包括約1-6個胸腺嘧啶(thymine, T)或肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)，但不限於此。

【0026】 上述針對GAPDH核酸之順向外引子可具有約10-30個核苷酸，且可由為一第三序列區段所組成，而上述第三序列區段可位於序列識別號：1之核苷酸序列的第42個位點至第79個位點之間，但不限於此。

【0027】 上述針對GAPDH核酸之逆向內引子可由一第三片段與一第四片段所組成，而上述第三片段之3'端連接上述第四片段的5'端，或上述針對GAPDH核酸之逆向內引子可由一第三片段、一第二連接子與一第四片段所組成，而上述第三片段之3'端連接上述第二連接子之5'端，且上述第二連接子之3'端連接上述第四片段之5'端。上述第三片段可具有約10-30個核苷酸，且可由一第四序列區段所組成，而上述第四序列區段可位於序列識別號：1之核苷酸序列的第156個位點至第207個位點之間，但不限於此。上述第四片段可具有約10-30個核苷酸，且可由一第五序列區段之互補股所組成，而上述第五序列區段可位於序列識別號：1之核苷酸序列的第211個位點至第250個位點之間，但也不限於此。而上述第二連接子可包括約1-6個胸腺嘧啶或肽核酸，但不限於此。

【0028】 上述針對GAPDH核酸之逆向外引子可具有約10-30個核苷酸，且可由為一第六序列區段之互補股所組成，而上述第六序列區段可位於序列識別號：1之核苷酸序列的第238個位點至第275個位點之間，但不限於此。

【0029】 在一實施例中，於上述本揭露之GAPDH核酸偵測套組中的偵測GAPDH核酸之引子組中，上述第一序列區段可位於序

列識別號：1之核苷酸序列的第139個位點至第170個位點之間，上述第二序列區段可位於序列識別號：1之核苷酸序列的第82個位點至第110個位點之間，上述第三序列區段可位於序列識別號：1之核苷酸序列的第47個位點至第74個位點之間，上述第四序列區段可位於序列識別號：1之核苷酸序列的第161個位點至第202個位點之間，上述第五序列區段可位於序列識別號：1之核苷酸序列的第216個位點至第245個位點之間，且上述第六序列區段可位於序列識別號：1之核苷酸序列的第243個位點至第270個位點之間。

【0030】 又，在一特定實施例中，於上述本揭露之GAPDH核酸偵測套組中的偵測GAPDH核酸之引子組中，上述針對GAPDH核酸之順向內引子之序列可包括序列識別號：2之核苷酸序列，上述針對GAPDH核酸之順向外引子之序列可包括序列識別號：3之核苷酸序列，上述針對GAPDH核酸之逆向內引子之序列可包括序列識別號：4之核苷酸序列，序列識別號：6之核苷酸序列或序列識別號：7之核苷酸序列，且上述針對GAPDH核酸之逆向外引子之序列可包括序列識別號：5之核苷酸序列。

【0031】 在另一實施例中，於上述本揭露之GAPDH核酸偵測套組中的偵測GAPDH核酸之引子組中，上述針對GAPDH核酸之順向內引子、上述針對GAPDH核酸之順向外引子、上述針對GAPDH核酸之逆向內引子與上述針對GAPDH核酸之逆向外引子的至少一者，以自其3'端起之第4個位點至第14個位點的任一個位點為起點之1至10個核苷酸可獨立地被肌苷(I)、鳥嘌呤(G)、尿嘧啶(U)等所

取代，但不限於此。舉例來說，在一實施例中，於上述本揭露之 GAPDH 核酸偵測套組中的偵測 GAPDH 核酸之引子組中，上述針對 GAPDH 核酸之順向內引子、上述針對 GAPDH 核酸之順向外引子、上述針對 GAPDH 核酸之逆向內引子與上述針對 GAPDH 核酸之逆向向外引子的至少一者，可包括，但不限於以下幾種取代情況：以自其 3' 端起之第 5 個位點至第 9 個位點的任一個位點為起點之 2 至 7 個核苷酸可獨立地被肌苷、鳥嘌呤、尿嘧啶等所取代、以自其 3' 端起之第 7 個位點為起點之 3 至 5 個核苷酸可獨立地被肌苷所取代、或以自其 3' 端起之第 9 個位點為起點之 3 至 5 個核苷酸可獨立地被肌苷所取代。例如，於上述本揭露之 GAPDH 核酸偵測套組中的偵測 GAPDH 核酸之引子組中，上述針對 GAPDH 核酸之逆向內引子之序列可包括序列識別號：8 之核苷酸序列，或，例如，於上述本揭露之 GAPDH 核酸偵測套組中的偵測 GAPDH 核酸之引子組中，上述針對 GAPDH 核酸之逆向外引子之序列可包括序列識別號：9 之核苷酸序列。此外，於一特定實施例中，於上述本揭露之 GAPDH 核酸偵測套組中的偵測 GAPDH 核酸之引子組中，上述針對 GAPDH 核酸之順向內引子之序列可包括序列識別號：2 之核苷酸序列；上述針對 GAPDH 核酸之順向外引子之序列可包括序列識別號：3 之核苷酸序列；上述針對 GAPDH 核酸之逆向內引子之序列可包括序列識別號：4 之核苷酸序列，且上述針對 GAPDH 核酸之逆向外引子之序列可包括序列識別號：9 之核苷酸序列。而於另一特定實施例中，於上述本揭露之 GAPDH 核酸偵測套組中的偵測 GAPDH 核酸之引子

組中，上述針對GAPDH核酸之順向內引子之序列可包括序列識別號：2之核苷酸序列，上述針對GAPDH核酸之順向外引子之序列可包括序列識別號：3之核苷酸序列，上述針對GAPDH核酸之逆向內引子之序列可包括序列識別號：8之核苷酸序列，且上述針對GAPDH核酸之逆向外引子之序列可包括序列識別號：9之核苷酸序列。

【0032】請參見第2A圖，其為本揭露之一實施例中之側流免疫分析試片之作用機制的示意圖。於第2A圖中，所示各元件的大小、數量、形狀及/或結構等皆僅用於示意與方便說明，並不用以代表各元件之實際大小、數量、形狀及/或結構等。在一實施例中，於上述本揭露之GAPDH核酸偵測套組中的偵測GAPDH核酸之引子組中，上述針對GAPDH核酸之逆向內引子BIP-G的5'端可標示有一第一標誌M1，而上述針對GAPDH核酸之順向內引子FIP-G的5'端可標示有一第二標誌M2，且其中上述第一標誌M1與上述第二標誌M2不同。上述第一標誌M1可包括生物素(biotin)、卵白素(avidin)、鏈親和素(streptavidin, SA)、長葉毛地黃配質(digoxigenin, DIG)、螢光素(fluorescein, FAM)等，但不限於此。上述第二標誌M2也可包括，但不限於，生物素、卵白素、鏈親和素、長葉毛地黃配質、螢光素等。又，於此實施例中，本揭露之GAPDH核酸偵測套組，除了上述偵測GAPDH核酸之引子組，還可更包括一側流免疫分析試片(lateral flow immunoassay test strip)200，但不限於此。上述側流免疫分析試片200之材質可包

括，但不限於，硝化纖維(nitrocellulose)膜、尼龍(nylon)膜、聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜、聚醚砜(polyethersulfone, PES)膜等。

【0033】 再次參見第2A圖。上述側流免疫分析試片200依據分析物流動方向，依序可包括：一分析物添加區201、一結合區203、一GAPDH偵測區205與一試片控制區207。上述結合區203具有一第一結合顆粒203BP，其具有一第一結合分子203B與連接上述第一結合分子203B之一顆粒203P，其中上述第一結合分子203B具有結合上述第一標誌M1之能力。上述顆粒203P之材質可包括，但不限於，金、碳、乳膠、磁性物質等。或者，上述結合區203除了上述第一結合顆粒203BP，還可更包括塗覆有一特定物質的一控制顆粒CP（未顯示），控制顆粒CP之材質的例子可參考上方所述顆粒203P之材質，但於側流免疫分析試片200上，控制顆粒CP與顆粒203P兩者之材質可為相同或不同。又，上述特定物質並無特殊限制，只有一分子可與其結合即可，而上述特定物質的例子，可包括，但不限於，血清（如小鼠血清，但不限於此）。上述GAPDH偵測區205固定有一第二結合分子205B，其具有結合上述第二標誌M2之能力。又，上述試片控制區207固定有一第三結合分子207B，其具有結合上述第一結合顆粒203BP之上述第一結合分子203B的能力，其中上述第三結合分子207B與上述第一標誌M1可為相同或不同。或者，在上述結合區203除了第一結合顆粒203BP，還可更包括一控制顆粒CP（未顯示）的情況下，上述試片控制區207所固定

之第三結合分子207B，其可為具有結合上述控制顆粒CP之上述特定物質的能力。例如塗覆控制顆粒之特定物質為小鼠血清時，第三結合分子207B可為抗小鼠血清抗體。

【0034】 以下說明第2A圖之示意圖所示之側流免疫分析試片200於操作時於各區發生的反應。參見第2A圖。當一待測樣本中含有GAPDH核酸時，將待測樣本以上述本揭露之GAPDH核酸偵測套組中的偵測GAPDH核酸之引子組經由恆溫環型核酸擴增法可獲得含GAPDH核酸擴增產物的一反應溶液，而GAPDH核酸擴增產物則具有第一標誌M1與第二標誌M2。將上述反應溶液添加於上述側流免疫分析試片200之分析物添加區201後，上述反應溶液會移動至上述結合區203，因此GAPDH核酸擴增產物之第一標誌M1會與上述結合區203中部分的第一結合顆粒203BP之第一結合分子203B結合，並與未與任何擴增產物結合之剩餘的第一結合顆粒203BP一併移動至上述GAPDH偵測區205。於上述GAPDH偵測區205，已與第一結合顆粒203BP之第一結合分子203B結合的GAPDH核酸擴增產物之第二標誌M2，會與固定於上述GAPDH偵測區205之第二結合分子205B結合，而使GAPDH核酸擴增產物停留於上述GAPDH偵測區205，並呈現第一結合顆粒203BP的顏色，而未與任何擴增產物結合之剩餘的第一結合顆粒203BP則繼續移動至上述試片控制區207。於上述試片控制區207中，未與任何擴增產物結合之剩餘的第一結合顆粒203BP之第一結合分子203B則會與固定於上述試片控制區207之第三結合分子207B結合，而使未與任何擴增

產物結合之剩餘的第一結合顆粒203BP停留於試片控制區207，並呈現第一結合顆粒203BP的顏色。相對於此，當一待測樣本中並未含有GAPDH核酸時，將待測樣本以上述本揭露之GAPDH核酸偵測套組中的偵測GAPDH核酸之引子組經由恆溫環型核酸擴增法則會獲得不含GAPDH核酸擴增產物的一反應溶液。將上述反應溶液添加於上述側流免疫分析試片200之分析物添加區201後，上述反應溶液會移動至上述結合區203，但由於反應溶液中並不存在任何擴增產物，因此於上述結合區203之第一結合顆粒203BP並不會與任何擴增產物（如同時帶有第一標誌M1與第二標誌M2的擴增產物）結合，而是移動至上述GAPDH偵測區205。相似地，由於第一結合顆粒203BP並不會與任何擴增產物（如同時帶有第一標誌M1與第二標誌M2的擴增產物）結合，因此其並不會與固定於上述GAPDH偵測區205之第二結合分子205B結合而停留於上述GAPDH偵測區205並呈現其顏色。之後，第一結合顆粒203BP繼續移動至上述試片控制區207。於上述試片控制區207中，第一結合顆粒203BP之第一結合分子203B則會與固定於上述試片控制區207之第三結合分子207B結合，而使第一結合顆粒203BP停留於試片控制區207，並呈現第一結合顆粒203BP的顏色。

【0035】 在一特定實施例中，於上述本揭露之GAPDH核酸偵測套組中的偵測GAPDH核酸之引子組中，上述針對GAPDH核酸之逆向內引子BIP-G的5'端標示有生物素，而上述針對GAPDH核酸之順向內引子FIP-G的5'端標示有長葉毛地黃配質。又，於此特定

實施例中，本揭露之GAPDH核酸偵測套組，除了上述偵測GAPDH核酸之引子組，還更包括上述側流免疫分析試片200，且於上述側流免疫分析試片200中，上述結合區203具有第一結合顆粒203BP，而第一結合顆粒之第一結合分子203B為卵白素，上述GAPDH偵測區205之第二結合分子205B為可辨識長葉毛地黃配質之抗體，而上述試片控制區207中之第三結合分子207B為生物素或可辨識卵白素之抗體。

【0036】 又，於一實施例中，本揭露之GAPDH核酸偵測套組，除了上述偵測GAPDH核酸之引子組，還可更包括一聚合酶及/或核苷酸基質，但不限於此。上述聚合酶可具有反轉錄酶之功能，但也不限於此。在一特定實施例中，上述聚合酶為一*Bst* DNA聚合酶，例如，其序列包括序列識別號：10之胺基酸序列之一*Bst* DNA聚合酶，但不限於此。

【0037】 又，於一實施例中，本揭露之GAPDH核酸偵測套組，除了上述偵測GAPDH核酸之引子組，也可更包括一反轉錄酶及/或核苷酸基質，但不限於此。上述反轉錄酶可具有一核糖核酸酶(RNase)之功能，但也不限於此。在一特定實施例中，上述反轉錄酶為可具有核糖核酸酶H(RNase H)之功能。

【0038】 本揭露還可提供一種標的核酸偵測套組，其可包括，但不限於，一偵測GAPDH核酸之引子組與一偵測標的核酸之引子組，其中上述偵測標的核酸之引子組的偵測標的不同於上述偵測GAPDH核酸之引子組的偵測標的。

【0039】 上述本揭露之標的核酸偵測套組中的偵測GAPDH核酸之引子組與偵測標的核酸之引子組，可分別用於一第一恆溫環型核酸擴增法與一第二恆溫環型核酸擴增法，以確認一待測樣本中是否存在標的核酸。

【0040】 上述第一恆溫環型核酸擴增法與第二恆溫環型核酸擴增法，可包括，標準恆溫環型核酸擴增法或反轉錄恆溫環型核酸擴增法等，但不限於此。

【0041】 而上述待測樣本，可為一未經任何純化處理，例如未經核酸純化處理之樣本。亦即，藉由上述本揭露之標的核酸偵測套組中的偵測GAPDH核酸之引子組與偵測標的核酸之引子組，可對一未經任何純化處理之生物樣本，進行恆溫環型核酸擴增法，而獲得準確之標的核酸偵測結果，而可達成減少或免除處理待測樣本的效果。

【0042】 上述待測樣本之來源可包括，但不限於，唾液檢體、痰液檢體、鼻腔拭子檢體、咽喉拭子檢體、鼻咽檢體、尿液檢體、糞便檢體、直腸拭子檢體、腦脊髓液檢體、體液檢體等。

【0043】 在一實施例中，上述待測樣本之來源可為一非侵入式採樣所獲得之檢體，如唾液檢體、痰液檢體、尿液檢體、糞便檢體等，但不限於此。於此實施例中，本揭露之標的核酸偵測套組可搭配一恆溫反應機器、一恆溫加熱機器或一簡易分析試片，如側流免疫分析試片，而達成居家檢驗之目的。

【0044】 又，上述本揭露之標的核酸偵測套組中的偵測

GAPDH核酸之引子組與偵測標的核酸之引子組，皆可以單股RNA或第一股cDNA為起始模板，分別進行上述第一恆溫環型核酸擴增法與第二恆溫環型核酸擴增法，但不限於此。

【0045】 本揭露之標的核酸偵測套組中的偵測GAPDH核酸之引子組與偵測標的核酸之引子組的設計，係同樣根據一恆溫環型擴增法，但所設計出之引子組，並非僅適用於恆溫環型擴增法。本揭露之標的核酸偵測套組中的偵測GAPDH核酸之引子組與偵測標的核酸之引子組的設計與其操作原理，也如第1A圖、第1B圖與第1C圖所示。詳細之本揭露之標的核酸偵測套組中的偵測GAPDH核酸之引子組與偵測標的核酸之引子組的設計與其操作原理的說明，可參見前方段落中關於本揭露之GAPDH核酸偵測套組中的偵測GAPDH核酸之引子組之設計與操作原理的說明，因此不於此贅述。

【0046】 因此，上述本揭露之標的核酸偵測套組中的偵測GAPDH核酸之引子組，可為任何上述之本揭露之GAPDH核酸偵測套組中的偵測GAPDH核酸之引子組，而上述本揭露之標的核酸偵測套組中的偵測標的核酸之引子組，則可包括一針對標的核酸之順向內引子、一針對標的核酸之順向外引子、一針對標的核酸之逆向內引子與一針對標的核酸之逆向外引子，但不限於此。

【0047】 本揭露之標的核酸偵測套組中之偵測標的核酸之引子組的偵測標的，並無特別限制，只要其與本揭露之標的核酸偵測套組中的偵測GAPDH核酸之引子組不同即可。

【0048】 在一實施例中，本揭露之標的核酸偵測套組中的偵

測標的核酸之引子組的偵測標的可為一RNA病毒之核酸。上述RNA病毒的例子，可包括冠狀病毒(coronavirus)、流行感冒病毒(influenza virus)、人類免疫缺乏病毒(human immunodeficiency virus, HIV)、伊波拉病毒(Ebola virus)、C型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)，但不限於此。

【0049】而上述冠狀病毒可包括，但不限於，嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)、嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒2型(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)(新型冠狀病毒)、中東呼吸症候群冠狀病毒(middle east respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)等。

【0050】此外，上述嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒2型(新型冠狀病毒)之核酸可包括，但不限於，ORF1ab範圍內之核酸(如，RdRp基因之核酸，但不限於此)、棘蛋白(spike protein, S)基因之核酸、套膜(envelope, E)基因之核酸、膜蛋白(membrane protein, M)基因之核酸、核蛋白(nucleoprotein, N)基因之核酸等。

【0051】在一實施例中，本揭露之標的核酸偵測套組中的偵測標的核酸之引子組的偵測標的可為嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒2型(新型冠狀病毒)之RdRp基因的核酸。

【0052】於本揭露之標的核酸偵測套組中的偵測標的核酸之引子組的偵測標的可為嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒2型(新型

冠狀病毒)之RdRp基因的核酸的實施例中，用於設計上述引子組之RdRp基因之核酸的序列可為序列識別號：11之序列，其為嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒2型之ORF1ab之核酸序列(NCBI獲取編號MN908947)的一部分，但不限於此。

【0053】 於本揭露之標的核酸偵測套組中的偵測標的核酸之引子組的偵測標的可為嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒2型(新型冠狀病毒)之RdRp基因之核酸的實施例中，上述針對標的核酸之順向內引子可由一第五片段與一第六片段所組成，而上述第五片段之3'端連接上述第六片段的5'端，或上述針對標的核酸之順向內引子係由一第五片段、一第三連接子與一第六片段所組成，而上述第五片段之3'端連接上述第三連接子之5'端，且上述第三連接子之3'端連接上述第六片段之5'端。上述第五片段可具有約10-30個核苷酸，且可由一第七序列區段之互補股所組成，又上述第七序列區段可位於序列識別號：11之核苷酸序列的第90個位點至第134個位點之間，但不限於此。上述第六片段可具有約10-30個核苷酸，且可由一第八序列區段所組成，又上述第八序列區段可位於序列識別號：11之核苷酸序列的第45個位點至第82個位點之間，但也不限於此。而上述第三連接子可包括約1-6個胸腺嘧啶或肽核酸，但不限於此。

【0054】 又，上述針對標的核酸之順向外引子可具有約10-30個核苷酸，且可由為一第九序列區段所組成，而上述第九序列區段可位於序列識別號：11之核苷酸序列的第27個位點至第64個位點之

間，但不限於此。

【0055】 上述針對標的核酸之逆向內引子可由一第七片段與一第八片段所組成，而上述第七片段之3'端連接上述第八片段的5'端，或上述針對標的核酸之逆向內引子係由一第七片段、一第四連接子與一第八片段所組成，而上述第七片段之3'端連接上述第四連接子之5'端，且上述第四連接子之3'端連接上述第八片段之5'端。上述第七片段可具有約10-30個核苷酸，且可由一第十序列區段所組成，而上述第十序列區段可位於序列識別號：11之核苷酸序列的第123個位點至第165個位點之間，但不限於此。上述第八片段可具有約10-30個核苷酸，且可由一第十一序列區段之互補股所組成，而上述第十一序列區段可位於序列識別號：11之核苷酸序列的第170個位點至第208個位點之間，但也不限於此。而上述第四連接子可包括約1-6個胸腺嘧啶或肽核酸，但不限於此。

【0056】 上述針對標的核酸之逆向外引子可具有約10-30個核苷酸，且可由為一第十二序列區段之互補股所組成，而上述第十二序列區段可位於序列識別號：11之核苷酸序列的第226個位點至第263個位點之間，但不限於此。

【0057】 於本揭露之標的核酸偵測套組中的偵測標的核酸之引子組的偵測標的可為嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒2型（新型冠狀病毒）之RdRp基因之核酸的實施例中，於一特定實施例中，於上述本揭露之偵測標的核酸之套組中的偵測標的核酸之引子組中，上述第七序列區段可位於序列識別號：11之核苷酸序列的第95

個位點至第129個位點之間，上述第八序列區段可位於序列識別號：11之核苷酸序列的第50個位點至第77個位點之間，上述第九序列區段可位於序列識別號：11之核苷酸序列的第32個位點至第59個位點之間，上述第十序列區段可位於序列識別號：11之核苷酸序列的第128個位點至第150個位點之間，上述第十一序列區段可位於序列識別號：11之核苷酸序列的第175個位點至第203個位點之間，且上述第十二序列區段可位於序列識別號：11之核苷酸序列的第231個位點至第258個位點之間。

【0058】 或者，於本揭露之標的核酸偵測套組中的偵測標的核酸之引子組的偵測標的可為嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒2型（新型冠狀病毒）之RdRp基因之核酸的實施例中，對於一特定實施例而言，於上述本揭露之偵測標的核酸之套組中的偵測標的核酸之引子組中，上述針對標的核酸之順向內引子之序列可包括序列識別號：12之核苷酸序列，上述針對標的核酸之順向外引子之序列可包括序列識別號：13之核苷酸序列，上述針對標的核酸之逆向內引子之序列可包括序列識別號：14之核苷酸序列，且上述針對標的核酸之逆向外引子之序列可包括序列識別號：15之核苷酸序列。

【0059】 於本揭露之標的核酸偵測套組中的偵測標的核酸之引子組的偵測標的可為嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒2型（新型冠狀病毒）之RdRp基因之核酸的實施例中，對於一特定實施例而言，上述偵測標的核酸之引子組可更包括一針對標的核酸之順向環引子與一針對標的核酸之逆向環引子，但不限於此。

【0060】 上述針對標的核酸之順向環引子可具有約10-30個核苷酸，且可由為一第十三序列區段所組成，而上述第十三序列區段可位於序列識別號：11之核苷酸序列的第63個位點至第104個位點之間。上述針對標的核酸之逆向環引子可具有約10-30個核苷酸，且可由為一第十四序列區段所組成，而上述第十四序列區段可位於序列識別號：11之核苷酸序列的第146個位點至第187個位點之間。或者，上述第十三序列區段可位於序列識別號：11之核苷酸序列的第68個位點至第99個位點之間，而上述第十四序列區段可位於序列識別號：11之核苷酸序列的第151個位點至第182個位點之間。

【0061】 或者，於上述特定實施例中，本揭露之標的核酸偵測套組中的偵測標的核酸之引子組中之上述針對標的核酸之順向內引子之序列可包括序列識別號：12之核苷酸序列，上述針對標的核酸之順向外引子之序列可包括序列識別號：13之核苷酸序列，上述針對標的核酸之順向環引子之序列可包括序列識別號：16之核苷酸序列，上述針對標的核酸之逆向內引子之序列可包括序列識別號：14之核苷酸序列，上述針對標的核酸之逆向外引子之序列可包括序列識別號：15之核苷酸序列，且上述針對標的核酸之逆向環引子之序列可包括序列識別號：17之核苷酸序列。

【0062】 在另一實施例中，於上述本揭露之偵測標的核酸之套組中的偵測標的核酸之引子組中，上述針對標的核酸之順向內引子、上述針對標的核酸之順向外引子、上述針對標的核酸之逆向內

引子與上述針對標的核酸之逆向外引子的至少一者，以自其3'端起之第4個位點至第14個位點的任一個位點為起點之1至10個核苷酸可獨立地被肌苷(I)、鳥嘌呤(G)、尿嘧啶(U)等所取代，但不限於此。舉例來說，在一實施例中，於上述本揭露之偵測標的核酸之套組中的偵測標的核酸之引子組中，上述針對標的核酸之順向內引子、上述針對標的核酸之順向外引子、上述針對標的核酸之逆向外引子與上述針對標的核酸之逆向外引子的至少一者，可包括，但不限於以下幾種取代情況：以自其3'端起之第5個位點至第9個位點的任一個位點為起點之2至7個核苷酸可獨立地被肌苷、鳥嘌呤、尿嘧啶等所取代、以自其3'端起之第7個位點為起點之3至5個核苷酸可獨立地被肌苷所取代、或以自其3'端起之第9個位點為起點之3至5個核苷酸可獨立地被肌苷所取代。

【0063】 第2B圖與第2C圖為於不同實施例中之側流免疫分析試片之作用機制的示意圖。於第2B圖與第2C圖中，所示各元件的大小、數量、形狀及/或結構等皆僅用於示意與方便說明，並不用以代表各元件之實際大小、數量、形狀及/或結構等。

【0064】 在一實施例中，於上述本揭露之偵測標的核酸之套組中，上述針對GAPDH核酸之逆向外引子BIP-G的5'端與上述針對標的核酸之逆向外引子BIP-T的5'端標示有一第一標誌M1，上述針對GAPDH核酸之順向外引子FIP-G的5'端標示有一第二標誌M2，上述針對標的核酸之順向外引子FIP-T的5'端標示有一第三標誌M3，其中上述第一標誌M1、上述第二標誌M2與上述第三標誌

M3皆不同。上述第一標誌M1可包括生物素、卵白素、鏈親和素、長葉毛地黃配質、螢光素等，但不限於此。上述第二標誌M2也可包括，但不限於，生物素、卵白素、鏈親和素、長葉毛地黃配質、螢光素等。相似地，上述第三標誌M3也可包括，但不限於，生物素、卵白素、鏈親和素、長葉毛地黃配質、螢光素等。又，於此實施例中，本揭露之偵測標的核酸之套組，除了上述偵測GAPDH核酸之引子組與上述偵測標的核酸之引子組，還可更包括一側流免疫分析試片200'或200''，但不限於此。上述側流免疫分析試片200'或200''之材質可包括，但不限於，硝化纖維膜、尼龍膜、聚偏二氟乙烯膜、聚醚砜膜等。

【0065】 請再次參見第2B圖與第2C圖。上述側流免疫分析試片200'或200''根據分析物流動方向，依序可包括：一分析物添加區201、一結合區203、一GAPDH偵測區205、一標的核酸偵測區206與一試片控制區207（側流免疫分析試片200'），或依序可包括一分析物添加區201、一結合區203、一標的核酸偵測區206、一GAPDH偵測區205與一試片控制區207（側流免疫分析試片200''）。上述結合區具有一第一結合顆粒，其中上述第一結合顆粒203BP具有一第一結合分子203B與連接上述第一結合分子203B之一顆粒203P，而上述第一結合分子203B具有結合上述第一標誌M1之能力。上述顆粒203P之材質可包括，但不限於，金、碳、乳膠、磁性物質等。或者，上述結合區203除了上述第一結合顆粒203BP，還可更包括塗覆有一特定物質的一控制顆粒CP（未顯示）

控制顆粒CP之材質的例子可參考上方所述顆粒203P之材質，但於側流免疫分析試片200'或200''上，控制顆粒CP與顆粒203P兩者之材質可為相同或不同。又，上述特定物質並無特殊限制，只有一分子可與其結合即可，而上述特定物質的例子，可包括，但不限於，血清（如小鼠血清，但不限於此）。上述GAPDH偵測區205固定有一第二結合分子205B，其具有結合上述第二標誌M2之能力。而上述試片控制區207固定有一第三結合分子207B，其具有結合上述第一結合顆粒203BP之上述第一結合分子203B的能力，其中上述第三結合分子207B與上述第一標誌M1可為相同或不同。或者，在上述結合區203除了第一結合顆粒203BP，還可更包括一控制顆粒CP（未顯示）的情況下，上述試片控制區207所固定之第三結合分子207B，其可為具有結合上述控制顆粒CP之上述特定物質的能力。例如塗覆控制顆粒之特定物質為小鼠血清時，第三結合分子207B可為抗小鼠血清抗體。又，上述標的核酸偵測區206固定有一第四結合分子206B，其具有結合上述第三標誌M3之能力。

【0066】 以下說明第2B圖之示意圖所示之側流免疫分析試片200'於操作時於各區發生的反應。參見第2B圖。當一待測樣本中含有GAPDH核酸與標的核酸時，將待測樣本以上述本揭露之標的核酸偵測套組中的偵測GAPDH核酸之引子組與偵測標的核酸之引子組分別經由第一恆溫環型核酸擴增法與第二恆溫環型核酸擴增法可獲得含GAPDH核酸擴增產物的一第一反應溶液與含標的核酸擴增產物的一第二反應溶液，而GAPDH核酸擴增產物具有第一標誌M1

與第二標誌M2，標的核酸擴增產物具有第一標誌M1與第三標誌M3。將上述第一反應溶液與第二反應溶液混合，獲得一混合反應溶液。將上述混合反應溶液添加於上述側流免疫分析試片200'之分析物添加區201後，上述反應溶液會移動至上述結合區203，因此GAPDH核酸擴增產物之第一標誌M1與標的核酸擴增產物之第一標誌M1分別皆會與上述結合區203中部分的第一結合顆粒203BP之第一結合分子203B結合，並與未與任何擴增產物結合之剩餘的第一結合顆粒203BP一併移動至上述GAPDH偵測區205。於上述GAPDH偵測區205，已與第一結合顆粒203BP之第一結合分子203B結合的GAPDH核酸擴增產物之第二標誌M2，會與固定於上述GAPDH偵測區205之第二結合分子205B結合，而使GAPDH擴增產物停留於上述GAPDH偵測區205，並呈現第一結合顆粒203BP的顏色，而已與第一結合顆粒203BP之第一結合分子203B結合的標的核酸擴增產物及未與任何擴增產物結合之剩餘的第一結合顆粒203BP則繼續移動至上述一標的核酸偵測區206。於上述標的核酸偵測區206，已與第一結合顆粒203BP之第一結合分子203B結合的標的核酸擴增產物之第三標誌M3，會與固定於上述標的核酸偵測區206之第四結合分子206B結合，而使標的核酸擴增產物停留於標的核酸偵測區206，並呈現第一結合顆粒203BP的顏色，而未與任何擴增產物結合之剩餘的第一結合顆粒203BP則繼續移動至上述試片控制區207。於上述試片控制區207中，未與任何擴增產物結合之剩餘的第一結合顆粒203BP之第一結合分子203B則會與固定於上

述試片控制區207之第三結合分子207B結合，而使未與任何擴增產物結合之剩餘第一結合顆粒203BP停留於試片控制區207，並呈現並呈現第一結合顆粒203BP的顏色。相對地，當一待測樣本中含有GAPDH核酸但不含標的核酸時，將待測樣本以上述本揭露之標的核酸偵測套組中的偵測GAPDH核酸之引子組與偵測標的核酸之引子組分別經由第一恆溫環型核酸擴增法與第二恆溫環型核酸擴增法可獲得含GAPDH核酸擴增產物的一第一反應溶液與不含標的核酸擴增產物的一第二反應溶液，而GAPDH核酸擴增產物具有第一標誌M1與第二標誌M2。將上述第一反應溶液與第二反應溶液混合，獲得一混合反應溶液。將上述混合反應溶液添加於上述側流免疫分析試片200'之分析物添加區201後，上述反應溶液會移動至上述結合區203，因此GAPDH核酸擴增產物之第一標誌M1會與上述結合區203中部分的第一結合顆粒203BP之第一結合分子203B結合，並與未與任何擴增產物結合之剩餘的第一結合顆粒203BP一併移動至上述GAPDH偵測區205。於上述GAPDH偵測區205，已與第一結合顆粒203BP之第一結合分子203B結合的GAPDH核酸擴增產物之第二標誌M2，會與固定於上述GAPDH偵測區205之第二結合分子205B結合，而使GAPDH擴增產物停留於上述GAPDH偵測區205，並呈現第一結合顆粒203BP的顏色，而未與任何擴增產物結合之剩餘的第一結合顆粒203BP則繼續移動至上述一標的核酸偵測區206。由於上述混合反應溶液中並不存在標的核酸擴增產物（同時帶有第一標誌M1與第三標誌M3之擴增產物），因此未與任何擴

增產物結合之剩餘的第一結合顆粒**203BP**並不會與標的核酸擴增產物（同時帶有第一標誌**M1**與第三標誌**M3**之擴增產物）結合，且不會與固定於上述標的核酸偵測區**206**之第四結合分子**206B**結合而停留於上述標的核酸偵測區**206**並呈現其顏色。之後，剩餘之第一結合顆粒**203BP**繼續移動至上述試片控制區**207**。於上述試片控制區**207**中，剩餘之第一結合顆粒**203BP**之第一結合分子**203B**則會與固定於上述試片控制區**207**之第三結合分子**207B**結合，而使剩餘之第一結合顆粒**203BP**停留於試片控制區**207**，並呈現並呈現第一結合顆粒**203BP**的顏色。

【0067】 第**2C**圖之示意圖所示之側流免疫分析試片**200''**的各區反應原理與第**2B**圖之示意圖所示之側流免疫分析試片**200'**相似，因此不於此贅述。

【0068】 在一特定實施例中，於上述本揭露之偵測標的核酸之套組中的偵測**GAPDH**核酸之引子組與偵測標的核酸之引子組中，上述針對**GAPDH**核酸之逆向內引子**BIP-G**的5'端與上述針對標的核酸之逆向內引子**BIP-T**的5'端標示有生物素，而上述針對**GAPDH**核酸之順向內引子**FIP-G**的5'端標示有長葉毛地黃配質，且上述針對標的核酸之順向內引子**FIP-T**的5'端標示有螢光素。又，於此特定實施例中，本揭露之偵測標的核酸之套組，除了上述偵測**GAPDH**核酸之引子組與上述偵測標的核酸之引子組，還可更包括上述側流免疫分析試片**200'**或**200''**，且於上述側流免疫分析試片中，上述結合區**203**具有第一結合顆粒**203BP**，而第一結合顆

粒之第一結合分子203B為卵白素，上述GAPDH偵測區205之第二結合分子205B為可辨識長葉毛地黃配質之抗體，上述標的核酸偵測區206之第四結合分子206B為可辨識螢光素之抗體，而上述試片控制區207中之第三結合分子207B為生物素或可辨識卵白素之抗體。

【0069】 又，於一實施例中，本揭露之偵測標的核酸之套組，除了上述偵測GAPDH核酸之引子組與上述偵測標的核酸之引子組，還可更包括一聚合酶及/或核苷酸基質，但不限於此。上述聚合酶可具有反轉錄酶之功能，但也不限於此。在一特定實施例中，上述聚合酶為一*Bst* DNA聚合酶，例如，其序列包括序列識別號：10之胺基酸序列之一*Bst* DNA聚合酶，但不限於此。

【0070】 又，於一實施例中，本揭露之偵測標的核酸之套組，除了上述偵測GAPDH核酸之引子組與上述偵測標的核酸之引子組，也可更包括一反轉錄酶及/或核苷酸基質，但不限於此。上述反轉錄酶可具有一核糖核酸酶(RNase)之功能，但也不限於此。在一特定實施例中，上述反轉錄酶為可具有核糖核酸酶H (RNase H)之功能。

【0071】 依據上述內容，本揭露還可提供一種新型冠狀病毒偵測套組，其可包括一偵測新型冠狀病毒之核酸的引子組，但不限於此。

【0072】 而上述本揭露之新型冠狀病毒偵測套組中之偵測新型冠狀病毒之核酸的引子組，可為在上方關於本揭露之標的核酸偵測套組中的偵測標的核酸之引子組的偵測標的可為嚴重急性呼吸道

症候群冠狀病毒2型（新型冠狀病毒）之RdRp基因之核酸的實施例的所有段落中所述之任何偵測標的核酸之引子組，但不限於此。

【0073】 上述本揭露之新型冠狀病毒偵測套組中之偵測新型冠狀病毒之核酸的引子組可用於一恆溫環型核酸擴增法，以確認一待測樣本中是否存在新型冠狀病毒。

【0074】 上述恆溫環型核酸擴增法，可包括，標準恆溫環型核酸擴增法或反轉錄恆溫環型核酸擴增法等，但不限於此。

【0075】 而上述待測樣本，可為一未經任何純化處理，例如核酸純化處理之樣本。亦即，藉由上述本揭露之新型冠狀病毒偵測套組中之偵測新型冠狀病毒之核酸的引子組，可對一未經任何純化處理之生物樣本，進行恆溫環型核酸擴增法，而獲得準確之新型冠狀病毒偵測結果，而可達成減少或免除處理待測樣本的效果。

【0076】 上述待測樣本之來源可包括，但不限於，唾液檢體、痰液檢體、鼻腔拭子檢體、咽喉拭子檢體、鼻咽檢體、尿液檢體、糞便檢體、直腸拭子檢體、腦脊髓液檢體、體液檢體等。

【0077】 在一實施例中，上述待測樣本之來源可為一非侵入式採樣所獲得之檢體，如唾液檢體、痰液檢體、尿液檢體、糞便檢體等，但不限於此。於此實施例中，本揭露之新型冠狀病毒偵測套組可搭配一恆溫反應機器、一恆溫加熱機器或一簡易分析試片，如側流免疫分析試片，而達成居家檢驗之目的。

【0078】 又，上述本揭露之新型冠狀病毒偵測套組中之偵測新型冠狀病毒之核酸的引子組，可以單股RNA或第一股cDNA為起

始模板，進行上述恆溫環型核酸擴增法，但不限於此。

【0079】 此外，在一實施例中，於上述本揭露之新型冠狀病毒偵測套組中之偵測新型冠狀病毒之核酸的引子組中，上述針對新型冠狀病毒之核酸之逆向內引子的5'端可標示有一第一標誌，而上述針對新型冠狀病毒之核酸之順向內引子的5'端可標示有一第二標誌，且其中上述第一標誌與上述第二標誌不同。上述第一標誌可包括生物素、卵白素、鏈親和素、長葉毛地黃配質、螢光素等，但不限於此。上述第二標誌也可包括，但不限於，生物素、卵白素、鏈親和素、長葉毛地黃配質、螢光素等。

【0080】 又，於此實施例中，本揭露之新型冠狀病毒偵測套組，除了上述偵測新型冠狀病毒之核酸的引子組，還可更包括一側流免疫分析試片，但不限於此。上述側流免疫分析試片之材質可包括，但不限於，硝化纖維膜、尼龍膜、聚偏二氟乙烯膜、聚醚砜膜等。

【0081】 上述側流免疫分析試片依據分析物流動方向依序可包括一分析物添加區、一結合區、一新型冠狀病毒偵測區與一試片控制區。上述結合區具有一第一結合顆粒，其具有一第一結合分子與連接上述第一結合分子的一顆粒，其中上述第一結合分子具有結合上述第一標誌之能力。上述顆粒之材質可包括，但不限於，金、碳、乳膠、磁性材料等。或者，上述結合區除了上述第一結合顆粒，還可更包括塗覆有一特定物質的一控制顆粒，而控制顆粒之材質的例子可參考上方所述顆粒之材質，但於側流免疫分析試片上，控制

顆粒與顆粒兩者之材質可為相同或不同。又，上述特定物質並無特殊限制，只要有一分子可與其結合即可，而上述特定物質的例子，可包括，但不限於，血清（如小鼠血清，但不限於此）。上述新型冠狀病毒偵測區固定有一第二結合分子，其具有結合上述第二標誌之能力。又，上述試片控制區固定有一第三結合分子，其具有結合上述第一結合顆粒中之上述第一結合分子的能力，其中上述第三結合分子與上述第一標誌可為相同或不同。或者，在上述結合區除了第一結合顆粒，還可更包括一控制顆粒的情況下，上述試片控制區所固定之第三結合分子，其可為具有結合上述控制顆粒之上述特定物質的能力。例如塗覆控制顆粒之特定物質為小鼠血清時，第三結合分子可為抗小鼠血清抗體。在一特定實施例中，於上述本揭露之新型冠狀病毒偵測套組中之偵測新型冠狀病毒之核酸的引子組中，上述針對新型冠狀病毒之核酸之逆向內引子的5'端標示有生物素，而上述針對新型冠狀病毒之核酸之順向內引子的5'端標示有螢光素。又，於此特定實施例中，本揭露之新型冠狀病毒偵測套組，除了上述偵測新型冠狀病毒之核酸的引子組，還更包括上述側流免疫分析試片，且於上述側流免疫分析試片中，上述結合區中之第一結合分子為卵白素，上述新型冠狀病毒偵測區之第二結合分子為可辨識螢光素之抗體，而上述試片控制區中之第三結合分子為生物素或可辨識卵白素之抗體。

【0082】 又，於一實施例中，本揭露之新型冠狀病毒偵測套組，除了上述偵測新型冠狀病毒之核酸的引子組，還可更包括一聚

合酶及/或核苷酸基質，但不限於此。上述聚合酶可具有反轉錄酶之功能，但也不限於此。在一特定實施例中，上述聚合酶為一*Bst* DNA聚合酶，例如，其序列包括序列識別號：10之胺基酸序列之一*Bst* DNA聚合酶，但不限於此。

【0083】此外，於一實施例中，本揭露之新型冠狀病毒偵測套組，除了上述偵測新型冠狀病毒之核酸的引子組，也可更包括一反轉錄酶及/或核苷酸基質，但不限於此。上述反轉錄酶可具有一核糖核酸酶(RNase)之功能，但也不限於此。在一特定實施例中，上述反轉錄酶為可具有核糖核酸酶H(RNase H)之功能。

【0084】此外，根據上述，本揭露也可提供一種偵測GAPDH核酸之方法。本揭露之偵測GAPDH核酸之方法，可包括，但不限於以下步驟。

【0085】首先，提供一待測樣本。於此所述之待測樣本的來源的相關說明，可與上方關於本揭露之GAPDH核酸偵測套組之段落中所述之待測樣本的來源的相關說明相同，且因此不於此贅述。在一實施例中，上述待測樣本的來源可為一唾液檢體。

【0086】接著，將上述待測樣本以上方所述任何之本揭露之GAPDH核酸偵測套組中的偵測GAPDH核酸之引子組進行一恆溫環型核酸擴增法。若上述待測樣本含有GAPDH核酸，則自上述反應中獲得一GAPDH的核酸擴增產物。

【0087】又，在一實施例中，於上述本揭露之偵測GAPDH核酸之方法中，上述GAPDH核酸的擴增產物之存在的確認方式，並

無特別限制，只要可確認上述GAPDH核酸的擴增產物是否存在即可。例如，上述GAPDH核酸的擴增產物之存在的確認方式，可包括，一膠體電泳分析、一側流免疫分析等，但不限於此。

【0088】 於上述本揭露之偵測GAPDH核酸之方法中，上述恆溫環型核酸擴增法係可以上述待測樣本中之單股RNA或第一股cDNA為起始模板，但不限於此。

【0089】 在一實施例中，於上述本揭露之偵測GAPDH核酸之方法中，上述待測樣本，可為一未經任何純化處理，例如核酸純化處理之樣本。亦即，上述本揭露之偵測GAPDH核酸之方法，可直接對一未經任何純化處理的生物樣本進行上述恆溫環型核酸擴增法，而獲得準確之GAPDH核酸偵測結果，而可達成減少或免除處理待測樣本的效果。在一特定實施例中，上述待測樣本可為一原始唾液檢體。

【0090】 在一實施例中，上述本揭露之偵測GAPDH核酸之方法，可更包括於提供待測樣本之前，將一生物樣本進行一前處理以獲得上述待測樣本。上述前處理可包括，但不限於以下步驟之一：

- (i) 將該生物樣本進行一熱處理步驟；
- (ii) 將上述生物樣本進行一核酸純化步驟；
- (iii) 將上述生物樣本進行一反轉錄步驟；
- (iv) 將上述生物樣本進行一核酸純化步驟之後，進行一反轉錄步驟；
- (v) 將上述生物樣本進行一反轉錄步驟之後，進行一RNA去除

步驟；與

(vi) 將上述生物樣本進行一核酸純化步驟之後，進行一反轉錄步驟，且之後進行一RNA去除步驟。

【0091】 上述熱處理步驟之溫度可為約45-100℃，例如約50-95℃、約55-90℃、約60℃、約70℃、約80℃、約90℃、約95℃等，但不限於此。

【0092】 而上述生物樣本可包括，唾液檢體、痰液檢體、鼻腔拭子檢體、咽喉拭子檢體、鼻咽檢體、尿液檢體、糞便檢體、直腸拭子檢體、腦脊髓液檢體、體液檢體等，但不限於此。在一實施例中，上述生物樣本可為一唾液檢體。

【0093】 此外，於上述本揭露之偵測GAPDH核酸之方法中，上述恆溫環型核酸擴增法可包括，標準恆溫環型核酸擴增法、反轉錄恆溫環型核酸擴增法等，但不限於此。

【0094】 在一實施例中，於上述本揭露之偵測GAPDH核酸之方法中的恆溫環型核酸擴增法，可為反轉錄恆溫環型核酸擴增法。於一特定實施例中，於上述反轉錄恆溫環型擴增法中，反轉錄程序與恆溫環型擴增程序係以一個步驟來進行，又於上述反轉錄恆溫環型擴增法中，可使用一具有反轉錄酶之功能的聚合酶，例如，一*Bst* DNA聚合酶，但不限於此。上述*Bst* DNA聚合酶的例子，可包括，但不限於，其序列可包括序列識別號：10之胺基酸序列的*Bst* DNA聚合酶。在另一特定實施例中，於上述反轉錄恆溫環型擴增法中，一恆溫環型擴增程序係於一反轉錄程序後進行，又於此特定實施例

中，反轉錄程序可藉由一具有一核糖核酸酶(RNase)之功能的反轉錄酶來進行，但不限於此，而上述核糖核酸酶(RNase)可包括，但不限於糖核酸酶H(RNase H)等。

【0095】 又，根據上述，本揭露也可提供一種偵測標的核酸之方法。

【0096】 本揭露之偵測標的核酸之方法，可包括，但不限於以下步驟。

【0097】 首先，提供一待測樣本。於此所述之待測樣本的來源的相關說明，可與上方關於本揭露之偵測標的之套組之段落中所述之待測樣本的來源的相關說明，且因此不於此贅述。在一實施例中，上述待測樣本的來源可為一唾液檢體。

【0098】 接著，將上述待測樣本分別以上方所述任何之本揭露之GAPDH核酸偵測套組中的偵測GAPDH核酸之引子組與偵測標的核酸之引子組進行上述第一恆溫環型核酸擴增法與上述第二恆溫環型核酸擴增法。若上述待測樣本含有上述標的核酸，則自上述第一恆溫環型核酸擴增法獲得為一內部控制組之一GAPDH核酸的擴增產物，且自上述第二恆溫環型核酸擴增法獲得一標的核酸的擴增產物。

【0099】 又，在一實施例中，於上述本揭露之偵測標的核酸之方法中，上述GAPDH核酸的擴增產物或上述標的核酸的擴增產物之存在的確認方式，並無特別限制，只要可確認上述GAPDH核酸的擴增產物或上述標的核酸的擴增產物是否存在即可。上述

GAPDH核酸的擴增產物或上述標的核酸的擴增產物之存在的確認方式，可包括，一膠體電泳分析、一側流免疫分析等，但不限於此。

【0100】 於上述本揭露之偵測標的核酸之方法中，上述第一恆溫環型核酸擴增法與第二恆溫環型核酸擴增法係可以上述待測樣本中之單股RNA或第一股cDNA為起始模板，但不限於此。

【0101】 在一實施例中，於上述本揭露之偵測標的核酸之方法中，上述待測樣本，可為一未經任何純化處理，例如核酸純化處理之樣本。亦即，上述本揭露之偵測標的核酸之方法，可直接對一未經任何純化處理的生物樣本進行上述第一恆溫環型核酸擴增法與第二恆溫環型核酸擴增法，而獲得準確之標的核酸偵測結果，而可達成減少或免除處理待測樣本的效果。在一特定實施例中，上述待測樣本可為一原始唾液檢體。

【0102】 在一實施例中，上述本揭露之偵測標的核酸之方法，可更包括於提供上述待測樣本之前，將一生物樣本進行一前處理以獲得上述待測樣本。上述前處理可包括，但不限於以下步驟之一：

(i) 將該生物樣本進行一熱處理步驟；

(ii) 將上述生物樣本進行一核酸純化步驟；

(iii) 將上述生物樣本進行一反轉錄步驟；

(iv) 將上述生物樣本進行一核酸純化步驟之後，進行一反轉錄步驟；

(v) 將上述生物樣本進行一反轉錄步驟之後，進行一RNA去除

步驟；與

(vi) 將上述生物樣本進行一核酸純化步驟之後，進行一反轉錄步驟，且之後進行一RNA去除步驟。

【0103】 上述熱處理步驟之溫度可為約45-100℃，例如約50-95℃、約55-90℃、約60℃、約70℃、約80℃、約90℃、約95℃等，但不限於此。

【0104】 而上述生物樣本可包括，唾液檢體、痰液檢體、鼻腔拭子檢體、咽喉拭子檢體、鼻咽檢體、尿液檢體、糞便檢體、直腸拭子檢體、腦脊髓液檢體、體液檢體等，但不限於此。在一實施例中，上述生物樣本可為一唾液檢體。

【0105】 此外，於上述本揭露之偵測標的核酸之方法中，上述第一恆溫環型核酸擴增法或上述第二恆溫環型核酸擴增法可包括，標準恆溫環型核酸擴增法、反轉錄恆溫環型核酸擴增法等，但不限於此。

【0106】 在一實施例中，於上述本揭露之偵測標的核酸之方法之第一恆溫環型核酸擴增法或上述第二恆溫環型核酸擴增法可為反轉錄恆溫環型擴增法。於一特定實施例中，於上述反轉錄恆溫環型擴增法中，反轉錄程序與恆溫環型擴增程序係以一個步驟來進行，又於上述反轉錄恆溫環型擴增法中，可使用一具有反轉錄酶之功能的聚合酶，例如，一*Bst* DNA聚合酶，但不限於此。上述*Bst* DNA聚合酶的例子，可包括，但不限於，其序列可包括序列識別號：10之胺基酸序列的*Bst* DNA聚合酶。在另一特定實施例中，於上述

反轉錄恆溫環型擴增法中，一恆溫環型擴增程序係於一反轉錄程序後進行，又於此特定實施例中，反轉錄程序可藉由一具有一核糖核酸酶(RNase)之功能的反轉錄酶來進行，但不限於此，而上述核糖核酸酶(RNase)可包括，但不限於糖核酸酶(RNase) H等。

【0107】 在一實施例中，本揭露之偵測標的核酸之方法的偵測標的可為一RNA病毒之核酸。上述RNA病毒的例子，可包括冠狀病毒、流行感冒病毒、人類免疫缺乏病毒、伊波拉病毒、C型肝炎病毒，但不限於此。

【0108】 而上述冠狀病毒可包括，但不限於，嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒、嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒2型（新型冠狀病毒）、中東呼吸症候群冠狀病毒等。

【0109】 此外，上述嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒2型（新型冠狀病毒）之核酸可包括，但不限於，ORF1ab範圍內之核酸（如，RdRp基因之核酸，但不限於此）、棘蛋白(spike protein, S)基因之核酸、套膜(envelope, E)基因之核酸、膜蛋白(membrane protein, M)基因之核酸、核蛋白(nucleoprotein, N)基因之核酸等。

【0110】 在一實施例中，本揭露之偵測標的核酸之方法的偵測標的可為，嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒2型（新型冠狀病毒）之RdRp基因的核酸。

【0111】 於本揭露之偵測標的核酸之方法的偵測標的可為嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒2型（新型冠狀病毒）之RdRp基因的

核酸的實施例中，所採用之本揭露之標的核酸偵測套組中之偵測標的核酸之引子組，可為前方本揭露之標的核酸偵測套組中，偵測標的核酸之引子組的偵測標的為嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒2型（新型冠狀病毒）之RdRp基因之核酸時，相關實施例之段落中所提及之任何偵測標的核酸的引子組，但不限於此。

【0112】 另外，根據上述，本揭露也可提供一種偵測新型冠狀病毒的方法。

【0113】 本揭露之偵測新型冠狀病毒的方法，可包括，但不限於以下步驟。

【0114】 首先，提供一待測樣本。於此所述之待測樣本的來源的相關說明，可與上方關於本揭露之偵測標的之套組之段落中所述之待測樣本的來源的相關說明，且因此不於此贅述。在一實施例中，上述待測樣本的來源可為一唾液檢體。

【0115】 接著，將上述待測樣本以上方所述任何之本揭露之新型冠狀病毒偵測套組中的偵測新型冠狀病毒之核酸的引子組進行一恆溫環型核酸擴增法。若上述待測樣本含有新型冠狀病毒，自上述恆溫環型核酸擴增法獲得一新型冠狀病毒核酸的擴增產物。

【0116】 又，在一實施例中，於上述本揭露之偵測新型冠狀病毒的方法中，上述新型冠狀病毒核酸的擴增產物的確認方式，並無特別限制，只要可確認上述新型冠狀病毒核酸的擴增產物是否存在即可。上述新型冠狀病毒核酸的擴增產物之存在的確認方式，可包括，一膠體電泳分析、一側流免疫分析等，但不限於此。

【0117】 於上述本揭露之偵測新型冠狀病毒的方法中，恆溫環型核酸擴增法係可以上述待測樣本中之單股RNA或第一股cDNA為起始模板，但不限於此。

【0118】 在一實施例中，於上述本揭露之偵測新型冠狀病毒的方法中，上述待測樣本，可為一未經任何純化處理，例如未經核酸純化處理之樣本。亦即，上述本揭露之偵測新型冠狀病毒的方法中，可直接對一未經任何純化處理的生物樣本進行上述恆溫環型核酸擴增法，而獲得準確之新型冠狀病毒偵測結果，而可達成減少或免除處理待測樣本的效果。在一特定實施例中，上述待測樣本可為一原始唾液檢體。

【0119】 在一實施例中，上述本揭露之偵測新型冠狀病毒的方法中，可更包括於提供上述待測樣本之前，將一生物樣本進行一前處理以獲得上述待測樣本。上述前處理可包括，但不限於以下步驟之一：

(i) 將該生物樣本進行一熱處理步驟；

(ii) 將上述生物樣本進行一核酸純化步驟；

(iii) 將上述生物樣本進行一反轉錄步驟；

(iv) 將上述生物樣本進行一核酸純化步驟之後，進行一反轉錄步驟；

(v) 將上述生物樣本進行一反轉錄步驟之後，進行一RNA去除步驟；與

(vi) 將上述生物樣本進行一核酸純化步驟之後，進行一反轉錄

步驟，且之後進行一RNA去除步驟。

【0120】 上述熱處理步驟之溫度可為約45-100℃，例如約50-95℃、約55-90℃、約60℃、約70℃、約80℃、約90℃、約95℃等，但不限於此。

【0121】 而上述生物樣本可包括，唾液檢體、痰液檢體、鼻腔拭子檢體、咽喉拭子檢體、鼻咽檢體、尿液檢體、糞便檢體、直腸拭子檢體、腦脊髓液檢體、體液檢體等，但不限於此。在一實施例中，上述生物樣本可為一唾液檢體。

【0122】 此外，於上述本揭露之偵測新型冠狀病毒的方法中，上述恆溫環型核酸擴增法可包括，標準恆溫環型核酸擴增法、反轉錄恆溫環型核酸擴增法等，但不限於此。

【0123】 在一實施例中，於上述本揭露之偵測標的核酸之方法之第一恆溫環型核酸擴增法或上述第二恆溫環型核酸擴增法可為反轉錄恆溫環型核酸擴增法。於一特定實施例中，於上述反轉錄恆溫環型核酸擴增法中，反轉錄程序與恆溫環型核酸擴增程序係以一個步驟來進行，又於上述反轉錄恆溫環型核酸擴增法中，可使用一具有反轉錄酶之功能的聚合酶，例如，一*Bst* DNA聚合酶，但不限於此。上述*Bst* DNA聚合酶的例子，可包括，但不限於，其序列可包括序列識別號：10之胺基酸序列的*Bst* DNA聚合酶。在另一特定實施例中，於上述反轉錄恆溫環型核酸擴增法中，一恆溫環型核酸擴增程序係於一反轉錄程序後進行，又於此特定實施例中，反轉錄程序可藉由一具有一核糖核酸酶(RNase)之功能的反轉錄酶來進

行，但不限於此，而上述核糖核酸酶(RNase)可包括，但不限於糖核酸酶(RNase) H等。

【0124】 此外，上述新型冠狀病毒之核酸可包括，但不限於，ORF1ab範圍內之核酸（如，RdRp基因之核酸，但不限於此）、棘蛋白(spike protein, S)基因之核酸、套膜(envelope, E)基因之核酸、膜蛋白(membrane protein, M)基因之核酸、核蛋白(nucleoprotein, N)基因之核酸等。

【0125】 在一實施例中，本揭露之偵測新型冠狀病毒的方法的偵測標的可為新型冠狀病毒之RdRp基因的核酸。

【0126】 實施例

【0127】 A. 材料與方法

【0128】 A-1. 去活化的嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒2型(SARS-CoV-2)（新型冠狀病毒）

【0129】 去活化的SARS-CoV-2病毒購自BEI Resources (Catalog No. NR-52286; Lot: 70034991)。

【0130】 A-2. 合成之SARS-CoV-2 RNA控制組的製備

【0131】 合成之SARS-CoV-2 RNA(GenBank ID: MT007544.1; 型號: 102019)購自Twist Bioscience。

【0132】 將上述合成之SARS-CoV-2 RNA以無菌之1倍RNAsecure™ RNase Inactivation Reagent（廠牌：Thermo Fisher Scientific Inc.; 型號：AM7006），稀釋至最終濃度 2.5×10^4 個拷貝/毫升(copies/mL)，以作為每一次反轉錄恆溫環型擴增法

(RT-LAMP)的正控制組。

【0133】 A-3. 反轉錄恆溫環型核酸擴增法所使用之引子：

【0134】 1. 針對GAPDH的引子組

【0135】 以GAPDH之mRNA序列（NCBI獲取編號NM_001256799）的一部分（序列識別號：1）來設計針對GAPDH的引子組。

【0136】 所設計出之用於反轉錄恆溫環型核酸擴增法的5個引子組如以下表1所示。

【0137】 表1、對於序列識別號：1之核苷酸序列所選取之六個區域與所設計之引子組

依據序列識別號：1之核苷酸序列之引子組設計				
引子組GAPDH-103				
所選取區域與所設計之引子	5' 端位點	3' 端位點	長度	序列
F3區域 (順向外引子)	52	69	18	GATGCTGGCGCT GAGTAC (序列識別號：3)
F2區域	87	105	19	CGTCTTCACCACC ATGGAG (序列識別號：19)
F1c區域	144	165	22	AGCAGAGGGGGC AGAGATGATG (序列識別號：18)

B1c 區域	176	197	22	TGTTTCGTCATGGG TGTGAACCA (序列識別號：20)
B2 區域	221	240	20	GGAGGCATTGCT GATGATCT (序列識別號：21)
B3 區域 (逆向外引子)	248	265	18	GGGGTGCTAAGC AGTTGG (序列識別號：5)
FIP (順向內引子)			47	AGCAGAGGGGGC AGAGATGATGTT TTTTCGTCTTCAC CACCATGGAG (序列識別號：2)
BIP (逆向內引子)			48	TGTTTCGTCATGGG TGTGAACCATTTT TTGGAGGCATTG CTGATGATCT (序列識別號：4)
引子組 GAPDH-103-B3-I				
所選取區域與所設計之引子	5' 端位點	3' 端位點	長度	序列
F3 區域	52	69	18	GATGCTGGCGCT

(順向外引子)				GAGTAC (序列識別號：3)
F2區域	87	105	19	CGTCTTCACCACC ATGGAG (序列識別號：19)
F1c區域	144	165	22	AGCAGAGGGGGC AGAGATGATG (序列識別號：18)
B1c區域	176	197	22	TGTTCGTCATGGG TGTGAACCA (序列識別號：20)
B2區域	221	240	20	GGAGGCATTGCT GATGATCT (序列識別號：21)
B3區域 (逆向外引子)	248	265	18	GGGGTGCHIIIAG TTGG (序列識別號：9)
FIP (順向內引子)			47	AGCAGAGGGGGC AGAGATGATGTT TTTTCGTCTTCAC CACCATGGAG (序列識別號：2)
BIP			48	TGTTCGTCATGGG

(逆向內引子)				TGTGAACCATTTT TTGGAGGCATTG CTGATGATCT (序列識別號：4)
引子組GAPDH-103-BIP-3				
所選取區域與所設計之引子	5' 端位點	3' 端位點	長度	序列
F3 區域 (順向外引子)	52	69	18	GATGCTGGCGCT GAGTAC (序列識別號：3)
F2 區域	87	105	19	CGTCTTCACCACC ATGGAG (序列識別號：19)
F1c 區域	144	165	22	AGCAGAGGGGGC AGAGATGATG (序列識別號：18)
B1c 區域	176	197	22	TGTTCGTCATGGG TGTGAACCA (序列識別號：20)
B2 區域	229	246	18	GGTGCAGGAGGC ATTGCT (序列識別號：22)
B3 區域	248	265	18	GGGGTGCTAAGC

(逆向外引子)				AGTTGG (序列識別號：5)
FIP (順向內引子)			47	AGCAGAGGGGGGC AGAGATGATGTT TTTTCGTCTTCAC CACCATGGAG (序列識別號：2)
BIP (逆向內引子)			46	TGTTCGTCATGGG TGTGAACCATTTT TTGGTGCAGGAG GCATTGCT (序列識別號：6)
引子組GAPDH-103-B3/BIP-3-I				
所選取區域與所設計之引子	5' 端位點	3' 端位點	長度	序列
F3 區域 (順向外引子)	52	69	18	GATGCTGGCGCT GAGTAC (序列識別號：3)
F2 區域	87	105	19	CGTCTTCACCACC ATGGAG (序列識別號：19)
F1c 區域	144	165	22	AGCAGAGGGGGGC AGAGATGATG

				(序列識別號：18)
B1c 區域	176	197	22	TGTTTCGTCATGGG TGTGAACCA (序列識別號：20)
B2 區域	229	246	18	GGTGCAGGAGGC ATTGCT (序列識別號：22)
B3 區域 (逆向外引子)	248	265	18	GGGGTGCIIIIAG TTGG (序列識別號：9)
FIP (順向內引子)			47	AGCAGAGGGGGC AGAGATGATGTT TTTTCGTCTTCAC CACCATGGAG (序列識別號：2)
BIP (逆向內引子)			46	TGTTTCGTCATGGG TGTGAACCATTTT TTGGTGCIIIIIGC ATTGCT (序列識別號：8)
引子組 GAPDH-103-BIP-4				
所選取區域與所設計之引子	5' 端位點	3' 端位點	長度	序列

F3 區域 (順向外引子)	52	69	18	GATGCTGGCGCT GAGTAC (序列識別號：3)
F2 區域	87	105	19	CGTCTTCACCACC ATGGAG (序列識別號：19)
F1c 區域	144	165	22	AGCAGAGGGGGC AGAGATGATG (序列識別號：18)
B1c 區域	176	197	22	TGTTCGTCATGGG TGTGAACCA (序列識別號：20)
B2 區域	228	245	18	GTGCAGGAGGCA TTGCTG (序列識別號：23)
B3 區域 (逆向外引子)	248	265	18	GGGGTGCTAAGC AGTTGG (序列識別號：5)
FIP (順向內引子)			47	AGCAGAGGGGGC AGAGATGATGTT TTTTCGTCTTCAC CACCATGGAG (序列識別號：2)

BIP (逆向內引子)			46	TGTTTCGTCATGGG TGTGAACCATTTT TTGTGCAGGAGG CATTGCTG (序列識別號：7)
------------------	--	--	----	--

註：

I代表肌苷(inosine)

【0138】 2. 針對嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒2型的引子組RdRp基因之核酸的引子組

【0139】 以嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒2型之ORF1ab核酸（NCBI獲取編號MN908947）的一部分（序列識別號：11來設計針對RdRp基因之核酸的引子組。

【0140】 所設計出之用於反轉錄恆溫環型核酸擴增法的1個引子組如以下表2所示。

【0141】 表2、對於序列識別號：11之核苷酸序列所選取之六個區域與所設計之引子組

依據序列識別號：11核苷酸序列之引子組設計				
引子組RdRp				
所選取區域與所設計之引子	5' 端位點	3' 端位點	長度	序列
F3 區域	37	54	18	ATGGCCTCACTTG

(順向外引子)				TTCTT (序列識別號：13)
F2區域	55	72	18	GCTCGCAAACAT ACAACG (序列識別號：25)
F1c區域	100	124	25	CTTGAGCACACT CATTAGCTAATCT (序列識別號：24)
B1c區域	133	155	23	GAAATGGTCATG TGTGGCGGTTC (序列識別號：26)
B2區域	180	198	19	TGTGGCATCTCCT GATGAG (序列識別號：27)
B3區域(逆向外引子)	236	253	18	TAACATTGGCCG TGACAG (序列識別號：15)
FIP (順向內引子)			49	CTTGAGCACACT CATTAGCTAATCT TTTTTTGCTCGCA AACATACAACG (序列識別號：12)
BIP			48	GAAATGGTCATG

(逆向內引子)				TGTGGCGGTTCTT TTTTTGTGGCATC TCCTGATGAG (序列識別號：14)
FLP (順向環引子)	73	94	22	AACGGTGTGACA AGCTACAACA (序列識別號：16)
BLP (逆向環引子)	156	177	22	ACTATATGTTAA ACCAGGTGGA (序列識別號：17)

【0142】 A-5. 反轉錄恆溫環型核酸擴增法

【0143】 1.引子使用濃度：

【0144】 反轉錄恆溫環型核酸擴增法中，所使用之各引子的濃度如下所述。

【0145】 用來擴增人類GAPDH基因之各引子的最終濃度：
FIP/BIP為0.8 μM；F3/B3為0.1 μM。

【0146】 用來擴增SARS-CoV-2 RdRp核酸序列之各引子的最終濃度：FIP/BIP為0.8 μM；F3/B3為0.1 μM；FLP/BLP為0.2 μM。

【0147】 2. 反應試劑與條件

【0148】 (1) 以市售RT/*Bst* mix試劑為聚合酶

【0149】 以市售RT/*Bst* mix試劑（WarmStart® LAMP kit

(Cat No. E1700L)；廠牌New England Biolabs) 進行反轉錄恆溫環型核酸擴增法。

【0150】 反應溫度為65℃，反應時間為60分鐘。反應所需各項成分與其體積如表3所示：

【0151】 表3

成分	實驗組	陽性品管組	陰性品管組
RT/ <i>Bst</i> mix	10 μL	10 μL	10 μL
引子組	1 μL	1 μL	1 μL
待測樣本*	9 μL	0 μL	0 μL
合成之SARS-CoV-2 RNA控制組	0 μL	9 μL	0 μL
1倍RNAsecure™ RNase Inactivation Reagent	0 μL	0 μL	9 μL
總體積	20 μL	20 μL	20 μL

*待測樣品可為含有SARS-CoV-2病毒或SARS-CoV-2 RNA控制組的唾液，或是Expi293細胞之基因體DNA (genomic DNA)或總RNA(total RNA)。

【0152】 (2) 以重組之*Bst* DNA聚合酶大片段(recombinant *Bst* DNA polymerase large fragment)為聚合酶

【0153】 以重組之*Bst* DNA聚合酶大片段為聚合酶，其胺基酸序列（序列識別號：10）如下所示：

MGSSHHHHHSGGPEQKLISEEDLPGGSWSHPQFEK
SGLVPRGSGRAVQTDEGEKPLAGMDFAIADSVTDEMLAD
KAALVVEVVGDNYHHAPIVGIALANERGRFFLRPETALAD
PKFLAWLGDETKKKTMFDSKRAAVALKWKGIELRGVVFD
LLLAAYLLDPAQAAGDVAAVAKMHQYEAVRSDEAVYGKG
AKRTVPDEPTLAEHLVRKAAAIWALEEPLMDELRRNEQDR
LLTELEQPLAGILANMEFTGVKVDTKRLEQMGAELTEQLQ
AVERRIYELAGQEFNINSPKQLGTVLFDKLQLPVLKKTKTG
YSTSADVLEKLAPHHEIVEHILHYRQLGKLQSTYIEGLLKV
VHPVTGKVHTMFNQALTQTGRLSSVEPNLQNIPIRLEEGRK
IRQAFVPSEPDWLIFAADYSQIELRVLAHIAEDDNLIEAFRR
GLDIHTKTAMDIFHVSEEDVTANMRRQAKAVNFGIVYGIS
DYGLAQNLNITRKEAAEFIERYFASFPGVKQYMDNIVQEA
KQKGYVTLLHRRRYLPDITSRNFNVRSAERTAMNTPIQG
SAADIKKAMIDLSVRLREERLQARLLLQVHDELILEAPKE
EIERLCRLVPEVMEQAVALRVPLKVDYHYGPTWYDAK

N-端序列所包含之組胺酸-標誌(HHHHHH) (序列識別號：28)、c-myc-標誌(EQKLISEEDL) (序列識別號：29)、Strep-標誌II(WSHPQFEK) (序列識別號：30) 與凝血酶(thrombin)切位(cleavage site)(LVPRGS) (序列識別號：31) 被以粗體顯示且畫底線。

【0154】 反應溫度為65℃，反應時間為60分鐘。反應所需各項成分與其體積如表4所示：

【0155】 表4

成分	BEI	無模板控制組 (no template control, NTC)
10x 恆溫擴增緩衝溶液 (pH 8.8)	2 μL	2 μL
100 mM MgSO ₄	1.2 μL	1.2 μL
RdRp 引子組	1 μL	1 μL
10 mM dNTP	2.8 μL	2.8 μL
<i>Bst</i> DNA聚合酶大片段	1 μL	1 μL
RNA 模板	9 μL	0 μL
H ₂ O	3 μL	12 μL
總體積	20 μL	20 μL

10x 恆溫擴增緩衝溶液(pH 8.8)之成分如下：

200 mM Tris-HCl

100 mM (NH₄)₂SO₄

500 mM KCl

20 mM MgSO₄

1% Tween-20

【0156】 A-6. 側流免疫分析(lateral flow immunoassay)

【0157】 以市售核酸側流免疫分析(Nucleic Acid Lateral Flow Immunoassay, NALFIA)試片PCRD FLEX Dipstick (型號FG-FD51676, 廠牌Abingdon Health) 進行側流免疫分析。

【0158】 PCRD FLEX Dipstick根據分析物流動方向依序具有一分析物添加區、一結合區、一第一測試線(T1)、一第二測試線(T2)與一控制線(C)。當將試片之分析物添加區插入含有反轉錄恆溫環型核酸擴增法之產物的反應樣本中時，於試片之結合區上之表面塗覆有中性卵白素(NeutrAvidin)的碳粒子會與反應樣本中標誌有長葉毛地黃配質(DIG)/生物素之DNA擴增產物的生物素與標誌有螢光素(FAM)/生物素之DNA擴增產物結合，並利用毛細現象沿著硝化纖維膜移動。

【0159】 若反應樣本中標誌有DIG/生物素之DNA擴增產物，則標誌有DIG/生物素之DNA擴增產物的DIG可與T1測試線中的抗DIG抗體結合，形成暗灰色的複合物，並可藉由肉眼辨識；若反應樣本中標誌有FAM/生物素之DNA擴增產物，則標誌有FAM/生物素之DNA擴增產物的FAM可與T2測試線中的抗FAM抗體結合，產生肉眼可見的暗灰色線條。

【0160】 最後，塗附有小鼠血清之碳粒子會於控制線被抓取而產生肉眼可見的暗灰色線條，作為核酸側流免疫分析試片的品管線。

【0161】 B. 結果

【0162】 實施例1

【0163】 經由反轉錄恆溫環型核酸擴增法（一步驟反應）之唾液中的SARS-CoV-2 RdRp與人類GAPDH的偵測

【0164】 將合成之SARS-CoV-2 RNA控制組(Twist Bioscience)以最終濃度為 1×10^4 個拷貝/毫升加入新型冠狀病毒陰性唾液檢體中。

【0165】 之後，將上述含合成之SARS-CoV-2 RNA控制組之唾液檢體以QIAamp Viral RNA Mini Kit (廠牌: Qiagen，型號: 52906)萃取，以獲得總RNA。

【0166】 將9 μ L總RNA作為核酸模板與RdRp引子組（順向內引子之5'端標示有FAM，逆向內引子之5'端標示有生物素）及RT/*Bst* mix混合並進行一反轉錄恆溫環型核酸擴增法。又，將9 μ L總RNA作為核酸模板與GAPDH引子組（順向內引子之5'端標示有DIG，逆向內引子之5'端標示有生物素）及RT/*Bst* mix混合並進行另一反轉錄恆溫環型核酸擴增法。另一方面，以9 μ L之1倍RNAsecure™ RNase Inactivation Reagent取代總RNA模板，將RdRp引子組與GAPDH引子組分別加入其中，並與RT/*Bst* mix混合後進行反轉錄恆溫環型核酸擴增法，以作為無模板控制組 (no template control, NTC)。此外，將合成之SARS-CoV-2 RNA控制組直接與RdRp引子組（順向內引子之5'端標示有FAM，逆向內引子之5'端標示有生物素）及RT/*Bst* mix混合並進行一反轉錄恆溫環型核酸擴增法，以作為正控制組(positive control)。

【0167】 將上述含合成之SARS-CoV-2 RNA控制組之唾液檢體分別以RdRp引子組與GAPDH引子組進行反轉錄恆溫環型核酸擴增法所獲得之兩個產物分別以2%洋菜膠進行電泳分析，結果分別如第3A圖與第3B圖所示。

【0168】 將上述含合成之SARS-CoV-2 RNA控制組之唾液檢體分別以RdRp引子組與GAPDH引子組進行反轉錄恆溫環型核酸擴增法所獲得之產物混合所獲得之混合物進行側流免疫分析，結果如第3C圖所示。

【0169】 第3A圖顯示，將上述含合成之SARS-CoV-2 RNA控制組之唾液檢體所萃取出之總RNA以RdRp引子組進行反轉錄恆溫環型核酸擴增法，可獲得梯狀擴增產物。而正控制組也可獲得梯狀擴增產物。

【0170】 第3B圖也顯示，將上述含合成之SARS-CoV-2 RNA控制組之唾液檢體所萃取出之總RNA以GAPDH引子組進行反轉錄恆溫環型核酸擴增法，可獲得梯狀擴增產物。

【0171】 第3C圖顯示，上述含合成之SARS-CoV-2 RNA控制組之唾液檢體分別以GAPDH引子組與RdRp引子組進行反轉錄恆溫環型核酸擴增法所獲得之產物，可分別於一側流免疫層試片之T1測試線與T2測試線產生暗灰色線條。正控制組的產物只會在T2測試線產生暗灰色線條，而無模板控制組的產物在T1測試線與T2測試線皆無顯現暗灰色線條。

【0172】 由上述結果可知，本揭露之RdRp引子組確實可以偵

測唾液檢體中之SARS-CoV-2，而GAPDH引子組在唾液檢體之總RNA的反轉錄恆溫環型核酸擴增法中確實可獲得產物，並可以此產物作為一內部控制組。

【0173】 實施例2

【0174】 經由反轉錄恆溫環型核酸擴增法（兩步驟反應）之SARS-CoV-2 RdRp的偵測

【0175】 將合成之SARS-CoV-2 RNA控制組(Twist Bioscience)（最終濃度為 1×10^4 個拷貝/毫升）（單股RNA）作為模板與SuperScript IV反轉錄酶(Invitrogen)混合以進行反轉錄（50°C反應15分鐘），以形成RNA-cDNA雜合體(hybrid)。

【0176】 接著，將反轉錄產物以95°C加熱3分鐘以使RNA降解而獲得單股cDNA。之後，將cDNA分別進行5倍與10倍稀釋。

【0177】 將2 μ L cDNA（未經稀釋、5倍稀釋或10倍稀釋）進行恆溫環型核酸擴增法。並將恆溫環型核酸擴增法產物以2%洋菜膠進行電泳分析，結果分別如第4圖所示。

【0178】 第4圖顯示，本揭露之RdRp引子組可以單股cDNA作為模板進行恆溫環型核酸擴增法並獲得產物。

【0179】 實施例3

【0180】 經由以重組之 *Bst* DNA 聚合酶大片段作為聚合酶之反轉錄恆溫環型核酸擴增法之 SARS-CoV-2 病毒 RNA 的偵測

【0181】 於新型冠狀病毒陰性唾液檢體加入15,000個拷貝/毫升之去活化的SARS-CoV-2病毒液(BEI Resources, Catalog

No. NR-52286; Lot: 70034991)。

【0182】 將上述含去活化的SARS-CoV-2病毒液之唾液檢體進行核酸純化，以獲得總RNA。

【0183】 將9 μ L總RNA作為模板與RdRp引子組及重組之*Bst* DNA聚合酶大片段於65°C下進行恆溫環型核酸擴增法1小時。將所獲得之產物分別以2%洋菜膠進行電泳分析以及進行側流免疫分析。結果分別如第5A圖與第5B圖所示。

【0184】 第5A圖與第5B圖皆顯示，上述恆溫環型核酸擴增法確實可獲得擴增產物。由此實驗結果可得知，重組之*Bst* DNA聚合酶大片段具有內源性(endogenous)反轉錄酶活性，且本揭露之RdRp引子組能以單股RNA作為模板藉由此重組之*Bst* DNA聚合酶大片段，於65°C下進行反轉錄恆溫環型核酸擴增法。

【0185】 實施例4

【0186】 經熱處理之唾液直接經由反轉錄恆溫環型核酸擴增法偵測其中SARS-CoV-2病毒

【0187】 去活性的SARS-CoV-2病毒以最終濃度10,000個拷貝/毫升或100,000個拷貝/毫升加入50 μ L新型冠狀病毒陰性唾液檢體。將上述樣本與未添加病毒之陰性唾液檢體以以下兩種方式進行處理：

(1) 將50 μ L DPBS與2×RNAsecure加入上述樣本，並於95°C中加熱30分鐘；

(2) 將蛋白酶(proteinase) K與2x RNAsecure加入上述樣

本，並於95°C中加熱5分鐘。

【0188】 於上述兩種處理方式後，將9 μ L加熱後的上清液作為核酸模板與RdRp引子組或GAPDH-103引子組混合以進行反轉錄恆溫環型核酸擴增法，並將所獲得之產物以2%洋菜膠進行電泳分析。結果如第6圖所示。

【0189】 將相同病毒濃度的RdRp與GAPDH所放大出來的產物混合，並進行側流免疫分析。結果如第7圖所示。

【0190】 依據實驗結果可知，藉由本揭露之RdRp引子組或GAPDH引子組，一唾液檢體無需經過核酸純化步驟即可直接進行以RT/*Bst* mix為聚合酶的反轉錄恆溫環型核酸擴增法而獲得SARS-CoV-2病毒之RdRp RNA與人類GAPDH基因的擴增產物。

【0191】 實施例5

【0192】 GAPDH引子組之RT-LAMP反應溫度測試

【0193】 收取Expi293細胞。一部分細胞以QIAamp genomic DNA kits (Qiagen)萃取基因體DNA，隨後以RNase A/T1 (Thermo Scientific)處理。另一部分之細胞則以Direct-zol RNA Miniprep (Zymo Research) 萃取總RNA，並進行於管柱上以DNase I 進行消化。

【0194】 將經純化之基因體DNA與總RNA作為測試GAPDH引子組的核酸模板。將反轉錄恆溫環型核酸擴增法之反應溫度分別設定為65°C、68°C與70°C以進行測試。當反應溫度定為65°C時，GAPDH-103引子組可同時擴增基因體DNA與總RNA中的

GAPDH基因，而GAPDH-103-BIP-3引子組與GAPDH-103-BIP-4引子組則只能擴增總RNA中的GAPDH基因（第8A圖）。

【0195】 當反應溫度提高到68℃，GAPDH-103-BIP-3引子組與GAPDH-103-BIP-4引子組仍然保有只擴增總RNA中GAPDH基因的特性。對GAPDH-103引子組而言，提高溫度可增加此組引子對基因體DNA與總RNA間的鑑別性（第8B圖）。

【0196】 當反應溫度上升到70℃時，GAPDH-103引子組僅少許擴增總RNA中的GAPDH基因，而GAPDH-103-BIP-3引子組與GAPDH-103-BIP-4引子組依然具有只擴增總RNA中之GAPDH基因的特性（第8C圖）。

【0197】 上述實驗結果顯示，相較於GAPDH-103引子組，GAPDH-103-BIP-3引子組與GAPDH-103-BIP-4引子組具有較廣的溫度容許範圍 (temperature tolerance)。

【0198】 實施例6

【0199】 經取代之GAPDH引子組擴增法測試：

【0200】 收取Expi293細胞。一部分細胞以QIAamp genomic DNA kits (Qiagen)萃取基因體DNA，隨後以RNase A/T1 (Thermo Scientific) 處理。另一部分之細胞則以Direct-zol RNA Miniprep (Zymo Research) 萃取總RNA，並進行於管柱上以DNase I 進行消化。

【0201】 將經純化之基因體DNA與總RNA作為測試GAPDH

引子組的核酸模板。將RT-LAMP反應溫度設定為65℃。

【0202】 以肌苷取代GAPDH-103引子組中B3上的五個核酸（標示為GAPDH-103-B3-I），則可使引子組僅以總RNA為模板，對GAPDH基因進行擴增（第9圖）。此結果顯示，人類GAPDH基因的引子組經過肌苷修飾後，可以不受基因體DNA序列的干擾，只針對mRNA進行反轉錄恆溫環型核酸擴增法。

【0203】 另外將GAPDH-103引子組中BIP部分序列進行挪移，形成GAPDH-103-BIP-3與GAPDH-103-BIP-4兩引子組。實驗結果顯示，兩引子組只以總RNA為模板，專一性地擴增GAPDH基因。

【0204】 實施例7

【0205】 熱處理樣本中偵測RdRp與GAPDH RNA：

【0206】 去活性的SARS-CoV-2病毒以最終濃度10,000個拷貝/毫升或100,000個拷貝/毫升加入50 μL新型冠狀病毒陰性唾液檢體。將上述樣本與未添加病毒之陰性唾液檢體以95℃加熱5分鐘以獲得一經熱處理之樣本。

【0207】 將9 μL之經熱處理樣本作為模板分別與RdRp引子組與帶有肌苷取代的GAPDH引子組(GAPDH-103-B3-I)混合並於65℃下進行反轉錄恆溫環型核酸擴增法。將所獲得之產物分別以2%洋菜膠進行電泳分析。結果分別如第10A圖與第10B圖所示。

【0208】 將上述經熱處理樣本分別以RdRp引子組與GAPDH引子組進行反轉錄恆溫環型核酸擴增法所獲得之產物混合所獲得之

混合物進行側流免疫分析，結果如第10C圖所示。

【0209】 實驗結果顯示，藉由本揭露之RdRp引子組或GAPDH引子組，一唾液檢體無需經過核酸純化步驟即可直接進行以RT/*Bst* mix為聚合酶的反轉錄恆溫環型核酸擴增法而獲得SARS-CoV-2病毒之RdRp RNA與人類GAPDH RNA的擴增產物，並以電泳分析與側流免疫分析確認擴增產物。RdRp引子組與肌苷取代之GAPDH引子組皆能應用於經熱處理之樣本中，且透過GAPDH擴增產物可確認樣本RNA在熱處理過程中有被釋放出來。

【0210】 實施例8

【0211】 以帶有RNase H活性之反轉錄酵素進行反轉錄恆溫環型核酸擴增法：

【0212】 將體外轉錄之RdRp RNA作為模板與帶有RNase H活性之RocketScript反轉錄酶 (Bioneer)混合，以將RNA反轉錄成cDNA，隨後再進行恆溫環型核酸擴增法。

【0213】 在兩步驟的反轉錄恆溫環型核酸擴增法中，體外轉錄之 RdRp RNA 以最終濃度為 6×10^6 個拷貝/毫升添加，分別於 50°C 與 65°C 下反應 15 分鐘，隨後再以 95°C 加熱 5 分鐘。將 2 μ L 之反轉錄產物與重組 *Bst* DNA 聚合酶大片段及 RdRp 引子組混合，並於 65°C 下進行恆溫環型核酸擴增法 1 小時。將所獲得之產物分別以 2% 洋菜膠進行電泳分析以及進行側流免疫分析。結果分別如第 11A 圖與第 11B 圖所示。

【0214】 在一步驟反轉錄恆溫環型核酸擴增法中，體外轉錄

之RdRp RNA (1×10^4 個拷貝)與RdRp引子組、RocketScript Reverse Transcriptase及重組*Bst* DNA聚合酶大片段混合，於65°C中反應1小時。將所獲得之產物分別以2%洋菜膠進行電泳分析以及進行側流免疫分析。結果分別如第12A圖與第12B圖所示。

【0215】 由實驗結果可知，本揭露之RdRp引子組能以單股RNA作為模板藉由帶有RNase H活性之反轉錄酵素進行反轉錄。

【0216】 實施例9

【0217】 引子組之比較

【0218】 將本揭露之引子組，GAPDH-103引子組，與並非於本揭露之設計區段所設計之引子組，例如GAPDH-5引子組以及GAPDH-90引子組，分別進行反轉錄恆溫環型核酸擴增法。引子組GAPDH-5以及引子組GAPDH-90之設計區段與其序列如表5所示。

【0219】 收取Expi293細胞，並以Direct-zol RNA Miniprep (Zymo Research)萃取Expi293細胞總RNA。之後將所萃取之總RNA於管柱上以DNase I進行消化。新型冠狀病毒陰性唾液樣品以QIAamp Viral RNA Mini Kit進行萃取，以獲得新型冠狀病毒陰性唾液的總RNA。

【0220】 從Expi293之總RNA中分取9 μ L作為核酸模板，分別加入裝有GAPDH-5引子組、GAPDH-90引子組及GAPDH-103引子組的管子中，與RT/*Bst* mix混合後置於65°C進行反轉錄恆溫環型核酸擴增法1小時。從上述新型冠狀病毒陰性唾液萃取的總

RNA分取9 μL作為核酸模板，分別加入裝有GAPDH-5引子組、GAPDH-90引子組及GAPDH-103引子組的管子中，與RT/*Bst* mix混合後於65°C中反應1小時。將所獲得之產物以2%洋菜膠進行電泳分析，結果分別如第13圖所示。

【0221】 表5

依據序列識別號：11核苷酸序列之引子組設計				
引子組GAPDH-5				
所選取區域與所設計之引子	5' 端位點	3' 端位點	長度	序列
F3區域（順向外引子）	268	287	20	GCCAAGGTCATC CATGACAA （序列識別號：33）
F2區域	291	310	20	TGGTATCGTGGA AGGACTCA （序列識別號：37）
F1c區域	333	353	21	TCCACAGTCTTCT GGGTGGCA （序列識別號：36）
B1c區域	387	408	22	CGGGGCTCTCCA GAACATCATC （序列識別號：38）
B2區域	433	450	18	GATGACCTTGCC CACAGC

				(序列識別號：39)
B3 區域 (逆向外引子)	452	469	18	GCTTCCCGTTCAG CTCAG (序列識別號：35)
FIP (順向內引子)			47	TCCACAGTCTTCT GGGTGGCATT TTGGTATCGTGG AAGGACTCA (序列識別號：32)
BIP (逆向內引子)			46	CGGGGCTCTCCA GAACATCATCTTT TTGATGACCTTG CCCACAGC (序列識別號：34)
引子組 GAPDH-90				
所選取區域與所設計之引子	5' 端位點	3' 端位點	長度	序列
F3 區域 (順向外引子)	291	310	20	TGGTATCGTGGA AGGACTCA (序列識別號：37)
F2 區域	315	333	19	CACAGTCCATGC CATCACT (序列識別號：43)

F1c 區域	362	381	20	ATCACGCCACAG TTTCCCGG (序列識別號：42)
B1c 區域	387	408	22	CGGGGCTCTCCA GAACATCATC (序列識別號：38)
B2 區域	433	450	18	GATGACCTTGCC CACAGC (序列識別號：39)
B3 區域 (逆向外引子)	456	473	18	GTGAGCTTCCCGT TCAGC (序列識別號：41)
FIP (順向內引子)			45	ATCACGCCACAG TTTCCCGGTTTT TCACAGTCCATG CCATCACT (序列識別號：40)
BIP (逆向內引子)			46	CGGGGCTCTCCA GAACATCATCTTT TTTGATGACCTTG CCCACAGC (序列識別號：34)

【0222】 結果如第13圖所示。
第 79 頁，共 81 頁(發明說明書)

【0223】 實驗結果顯示，相較於GAPDH-103引子組，GAPDH-5引子組以及GAPDH-90引子組在無模板控制組也出現擴增產物，因此並無法作為偵測GAPDH的引子組。

【0224】 雖然本發明已以較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作些許之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

【符號說明】

【0225】

100～目標基因；

101～順向內引子(forward inner primer, FIP)；

103～順向外引子(forward outer primer)；

105～逆向內引子(backward inner primer, BIP)；

107～逆向外引子(backward outer primer)；

109～順向環引子(forward loop primer, FLP)；

111～逆向環引子(backward loop primer, BLP)；

BIP-G～針對GAPDH核酸之逆向內引子；

FIP-G～針對GAPDH核酸之順向內引子；

BIP-T～針對標的核酸之逆向內引子；

FIP-T～針對標的核酸之順向內引子；

M1～第一標誌；

M2～第二標誌；

M3～第三標誌；

200、200'或200''～側流免疫分析試片；

201～分析物添加區；

203～結合區；

203BP～第一結合顆粒；

203B～第一結合分子；

203P～連接第一結合分子203B之顆粒；

205～GAPDH偵測區；

205B～第二結合分子；

206～標的核酸偵測區；

206B～第四結合分子；

207～試片控制區；

207B～第三結合分子。

序列表

<110> 財團法人工業技術研究院

<120> 核酸偵測套組及核酸偵測方法

<130> 9044B-A28212TW

<150> US 63/152,492

<151> 2021-02-23

<160> 43

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 600

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1	
aatcccatca ccattctcca ggagcgagat cctccaaaa tcaagtgggg cgatgctggc	60
gctgagtacg tcgtggagtc cactggcgtc ttcaccacca tggagaaggc tggggctcat	120
ttgcaggggg gagccaaaag ggtcatcatc tctgccccct ctgctgatgc ccccatgttc	180
gtcatgggtg tgaaccatga gaagtatgac aacagcctca agatcatcag caatgcctcc	240
tgcaccacca actgcttagc acccctggcc aaggatcatc atgacaactt tggatatctg	300
gaaggactca tgaccacagt ccatgccatc actgccaccc agaagactgt ggatggcccc	360
tccgggaaac tgtggcgtag tggccgcggg gctctccaga acatcatecc tgcctctact	420
ggcgctgcc aaggctgtgg caaggtcatc cctgagctga acgggaagct cactggcatg	480
gccttcctgt tccccactgc caacgtgtca gtggtggacc tgacctgccg tctagaaaaa	540

cctgccaaat atgatgacat caagaagggtg gtgaagcagg cgtcggaggg cccctcaag 600

- <210> 2
- <211> 47
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 順向內引子

<400> 2
agcagagggg gcagagatga tgttttttcg tcttcaccac catggag 47

- <210> 3
- <211> 18
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 順向外引子

<400> 3
gatgctggcg ctgagtac 18

- <210> 4
- <211> 48
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 逆向內引子

<400> 4
tgttcgtcat ggggtgtgaac catttttttg aggcattgct gatgatct 48

<210>	5	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	逆向外引子	
<400>	5	
ggggtgctaa gcagttgg		18
<210>	6	
<211>	46	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	逆向內引子	
<400>	6	
tgttcgtcac ggggtgaac catTTTTTgg tgcaggaggc attgct		46
<210>	7	
<211>	46	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	逆向內引子	
<400>	7	
tgttcgtcac ggggtgaac catTTTTTgt gcaggaggca ttgctg		46

<210> 8
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 逆向內引子

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(38)
<223> n 為肌苷(inosine)

<400> 8
tgttcgtcat ggggtgtgaac catttttttg tgcnnnnngc attgct 46

<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 逆向外引子

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(12)
<223> n 為肌苷

<400> 9
gggggtgcnnn nnagttgg 18

<210> 10
<211> 637

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Bst DNA 聚合酶大片段

<400> 10

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Gly Gly Pro Glu Gln
1 5 10 15

Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Pro Gly Gly Ser Trp Ser His Pro
20 25 30

Gln Phe Glu Lys Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly Arg Ala Val
35 40 45

Gln Thr Asp Glu Gly Glu Lys Pro Leu Ala Gly Met Asp Phe Ala Ile
50 55 60

Ala Asp Ser Val Thr Asp Glu Met Leu Ala Asp Lys Ala Ala Leu Val
65 70 75 80

Val Glu Val Val Gly Asp Asn Tyr His His Ala Pro Ile Val Gly Ile
85 90 95

Ala Leu Ala Asn Glu Arg Gly Arg Phe Phe Leu Arg Pro Glu Thr Ala
100 105 110

Leu Ala Asp Pro Lys Phe Leu Ala Trp Leu Gly Asp Glu Thr Lys Lys
115 120 125

Lys Thr Met Phe Asp Ser Lys Arg Ala Ala Val Ala Leu Lys Trp Lys
130 135 140

Gly Ile Glu Leu Arg Gly Val Val Phe Asp Leu Leu Leu Ala Ala Tyr
145 150 155 160

Leu Leu Asp Pro Ala Gln Ala Ala Gly Asp Val Ala Ala Val Ala Lys
165 170 175

Met His Gln Tyr Glu Ala Val Arg Ser Asp Glu Ala Val Tyr Gly Lys
180 185 190

Gly Ala Lys Arg Thr Val Pro Asp Glu Pro Thr Leu Ala Glu His Leu
195 200 205

Val Arg Lys Ala Ala Ala Ile Trp Ala Leu Glu Glu Pro Leu Met Asp
210 215 220

Glu Leu Arg Arg Asn Glu Gln Asp Arg Leu Leu Thr Glu Leu Glu Gln
225 230 235 240

Pro Leu Ala Gly Ile Leu Ala Asn Met Glu Phe Thr Gly Val Lys Val
245 250 255

Asp Thr Lys Arg Leu Glu Gln Met Gly Ala Glu Leu Thr Glu Gln Leu
260 265 270

Gln Ala Val Glu Arg Arg Ile Tyr Glu Leu Ala Gly Gln Glu Phe Asn
275 280 285

Ile Asn Ser Pro Lys Gln Leu Gly Thr Val Leu Phe Asp Lys Leu Gln
290 295 300

Leu Pro Val Leu Lys Lys Thr Lys Thr Gly Tyr Ser Thr Ser Ala Asp
305 310 315 320

Val Leu Glu Lys Leu Ala Pro His His Glu Ile Val Glu His Ile Leu
325 330 335

His Tyr Arg Gln Leu Gly Lys Leu Gln Ser Thr Tyr Ile Glu Gly Leu
340 345 350

Leu Lys Val Val His Pro Val Thr Gly Lys Val His Thr Met Phe Asn
355 360 365

Gln Ala Leu Thr Gln Thr Gly Arg Leu Ser Ser Val Glu Pro Asn Leu
370 375 380

Gln Asn Ile Pro Ile Arg Leu Glu Glu Gly Arg Lys Ile Arg Gln Ala
385 390 395 400

Phe Val Pro Ser Glu Pro Asp Trp Leu Ile Phe Ala Ala Asp Tyr Ser
405 410 415

Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Ile Ala Glu Asp Asp Asn Leu
420 425 430

Ile	Glu	Ala	Phe	Arg	Arg	Gly	Leu	Asp	Ile	His	Thr	Lys	Thr	Ala	Met
435				440				445							
Asp	Ile	Phe	His	Val	Ser	Glu	Glu	Asp	Val	Thr	Ala	Asn	Met	Arg	Arg
450				455				460							
Gln	Ala	Lys	Ala	Val	Asn	Phe	Gly	Ile	Val	Tyr	Gly	Ile	Ser	Asp	Tyr
465				470				475				480			
Gly	Leu	Ala	Gln	Asn	Leu	Asn	Ile	Thr	Arg	Lys	Glu	Ala	Ala	Glu	Phe
				485				490				495			
Ile	Glu	Arg	Tyr	Phe	Ala	Ser	Phe	Pro	Gly	Val	Lys	Gln	Tyr	Met	Asp
				500				505				510			
Asn	Ile	Val	Gln	Glu	Ala	Lys	Gln	Lys	Gly	Tyr	Val	Thr	Thr	Leu	Leu
515				520				525							
His	Arg	Arg	Arg	Tyr	Leu	Pro	Asp	Ile	Thr	Ser	Arg	Asn	Phe	Asn	Val
530				535				540							
Arg	Ser	Phe	Ala	Glu	Arg	Thr	Ala	Met	Asn	Thr	Pro	Ile	Gln	Gly	Ser
545				550				555				560			
Ala	Ala	Asp	Ile	Ile	Lys	Lys	Ala	Met	Ile	Asp	Leu	Ser	Val	Arg	Leu
				565				570				575			

Arg Glu Glu Arg Leu Gln Ala Arg Leu Leu Leu Gln Val His Asp Glu
580 585 590

Leu Ile Leu Glu Ala Pro Lys Glu Glu Ile Glu Arg Leu Cys Arg Leu
595 600 605

Val Pro Glu Val Met Glu Gln Ala Val Ala Leu Arg Val Pro Leu Lys
610 615 620

Val Asp Tyr His Tyr Gly Pro Thr Trp Tyr Asp Ala Lys
625 630 635

<210> 11
<211> 300
<212> DNA
<213> 嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒 2 型

<400> 11
aaatgtgata gagccatgcc taacatgctt agaattatgg cctcacttgt tcttgctcgc 60

aaacatacaa cgtgtttag ctgtgcacac cgtttctata gattagctaa tgagtgtgct 120

caagtattga gtgaaatggt catgtgtggc ggttcactat atgttaaacc aggtggaacc 180

tcatcaggag atgccacaac tgcttatgct aatagtgttt ttaacatttg tcaagctgtc 240

acggccaatg ttaatgcact tttatctact gatggttaaca aaattgccga taagtatgtc 300

<210> 12
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>		
<223>	順向內引子	
<400>	12	
cttgagcaca ctcattagct aatctttttt tgctcgcaaa catacaacg		49
<210>	13	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	順向外引子	
<400>	13	
atggcctcac ttgttctt		18
<210>	14	
<211>	48	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	逆向內引子	
<400>	14	
gaaatggtca tgtgtggcgg ttcttttttt gtggcatctc ctgatgag		48
<210>	15	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	逆向外引子	

<400> 15
taacattggc cgtgacag 18

<210> 16
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 順向環引子

<400> 16
aacggtgtga caagctacaa ca 22

<210> 17
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 逆向環引子

<400> 17
actatatgtt aaaccaggtg ga 22

<210> 18
<211> 22
<212> DNA
<213> 智人

<400> 18
agcagagggg gcagagatga tg 22

<210> 19
<211> 19
<212> DNA
<213> 智人

<400> 19
cgtcttcacc accatggag 19

<210> 20
<211> 22
<212> DNA
<213> 智人

<400> 20
tgttcgcatc ggggtgaac ca 22

<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人

<400> 21
ggaggcattg ctgatgatct 20

<210> 22
<211> 18
<212> DNA
<213> 智人

<400> 22
ggtgcaggag gcattgct 18

<210> 23
<211> 18

<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	23	
	gtgcaggagg cattgctg	18
<210>	24	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒 2 型	
<400>	24	
	cttgagcaca ctcattagct aatct	25
<210>	25	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒 2 型	
<400>	25	
	gctcgcaaac atacaacg	18
<210>	26	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒 2 型	
<400>	26	
	gaaatggtca tgtgtggcgg ttc	23
<210>	27	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒 2 型	

<400> 27

tgtggcatct cctgatgag

19

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 組胺酸-標誌

<400> 28

His His His His His His

1 5

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> c-myc-標誌

<400> 29

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Strep-標誌 II

<400> 30

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
1 5

<210> 31

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 凝血酶切位

<400> 31

Leu Val Pro Arg Gly Ser
1 5

<210> 32

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 順向內引子

<400> 32

tccacagtct tctgggtggc atttttttgg tatcgtggaa ggactca 47

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	順向外引子	
<400>	33	
	gcccaaggtca tccatgacaa	20
<210>	34	
<211>	46	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	逆向內引子	
<400>	34	
	cggggctctc cagaacatca tcttttttga tgaccttgcc cacagc	46
<210>	35	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	逆向外引子	
<400>	35	
	gcttcccggtt cagctcag	18
<210>	36	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	智人	

<400> 36
tccacagtct tctgggtggc a 21

<210> 37
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人

<400> 37
tggtatcgtg gaaggactca 20

<210> 38
<211> 22
<212> DNA
<213> 智人

<400> 38
cggggctctc cagaacatca tc 22

<210> 39
<211> 18
<212> DNA
<213> 智人

<400> 39
gatgaccttg cccacagc 18

<210> 40
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 順向內引子

<400> 40

atcacgccac agtttcccg ttttttcaca gtccatgcca tcact 45

<210> 41

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 逆向外引子

<400> 41

gtgagcttcc cgttcagc 18

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> 智人

<400> 42

atcacgccac agtttcccg 20

<210> 43

<211> 19

<212> DNA

<213> 智人

<400> 43

cacagtccat gccatcact 19

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種GAPDH核酸偵測套組，包括：

一偵測GAPDH核酸之引子組，包括：

一針對GAPDH核酸之順向內引子；

一針對GAPDH核酸之順向外引子；

一針對GAPDH核酸之逆向內引子；以及

一針對GAPDH核酸之逆向外引子，

其中，

該針對GAPDH核酸之順向內引子係由一第一片段與一第二片段所組成，而該第一片段之3'端連接該第二片段之5'端，或該針對GAPDH核酸之順向內引子係由一第一片段、一第一連接子與一第二片段所組成，而該第一片段之3'端連接該第一連接子之5'端，且該第一連接子之3'端連接該第二片段之5'端，

其中，

該第一片段具有10-30個核苷酸，且係由一第一序列區段之互補股所組成，而該第一序列區段係位於序列識別號：1之核苷酸序列的第134個位點至第175個位點之間，

又該第二片段具有10-30個核苷酸，且係由一第二序列區段所組成，而該第二序列區段係位於序列識別號：1之核苷酸序列的第77個位點至第115個位點之

間，

且該第一連接子係由1-6個胸腺嘧啶或肽核酸
(peptide nucleic acid, PNA)所組成，

該針對GAPDH核酸之順向外引子具有10-30個核苷酸，且係由一第三序列區段所組成，而該第三序列區段係位於序列識別號：1之核苷酸序列的第42個位點至第79個位點之間，

該針對GAPDH核酸之逆向內引子係由一第三片段與一第四片段所組成，而該第三片段之3'端連接該第四片段之5'端，或該針對GAPDH核酸之逆向內引子係由一第三片段、一第二連接子與一第四片段所組成，而該第三片段之3'端連接該第二連接子之5'端，且該第二連接子之3'端連接該第四片段之5'端，

其中，

該第三片段具有10-30個核苷酸，且係由一第四序列區段所組成，而該第四序列區段係位於序列識別號：1之核苷酸序列的第156個位點至第207個位點之間，

又該第四片段具有10-30個核苷酸，且係由一第五序列區段之互補股所組成，而該第五序列區段係位於序列識別號：1之核苷酸序列的第211個位點至第250個位點之間，

且該第二連接子係由1-6個胸腺嘧啶或肽核酸所組成，

該針對GAPDH核酸之逆向外引子具有10-30個核苷酸，且係由一第六序列區段之互補股所組成，而該第六序列區段係位於序列識別號：1之核苷酸序列的第238個位點至第275個位點之間，

其中該偵測GAPDH核酸之引子組係用於一恆溫環型核酸擴增法(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)，而該恆溫環型核酸擴增法包括標準恆溫環型核酸擴增法或反轉錄恆溫環型核酸擴增法(reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP)。

【請求項2】 如請求項1所述之GAPDH核酸偵測套組，其中，該針對GAPDH核酸之順向內引子之序列包括序列識別號：2之核苷酸序列；

該針對GAPDH核酸之順向外引子之序列包括序列識別號：3之核苷酸序列；

該針對GAPDH核酸之逆向內引子之序列包括序列識別號：4之核苷酸序列、序列識別號：6之核苷酸序列或序列識別號：7之核苷酸序列，且

該針對GAPDH核酸之逆向外引子之序列包括序列識別號：5之核苷酸序列。

【請求項3】 如請求項1所述之GAPDH核酸偵測套組，其中該針對GAPDH核酸之順向內引子、該針對GAPDH核酸之順向外引子、該針對GAPDH核酸之逆向內引子與該針對GAPDH核酸之逆向外引子的至少一者，以自其3'端起之第4個位點至第14個位點的任一個位點為起點之1至10個核苷酸獨立地被以下核苷酸之一所取代：

肌苷(I)

鳥嘌呤(G)；以及

尿嘧啶(U)。

【請求項4】 如請求項3所述之GAPDH核酸偵測套組，其中該針對GAPDH核酸之逆向內引子之序列包括序列識別號：8之核苷酸序列及/或該針對GAPDH核酸之逆向外引子之序列包括序列識別號：9之核苷酸序列。

【請求項5】 如請求項3所述之GAPDH核酸偵測套組，其中，該針對GAPDH核酸之順向內引子之序列包括序列識別號：2之核苷酸序列；

該針對GAPDH核酸之順向外引子之序列包括序列識別號：3之核苷酸序列；

該針對GAPDH核酸之逆向內引子之序列包括序列識別號：4之核苷酸序列或序列識別號：8之核苷酸序列，且

該針對GAPDH核酸之逆向外引子之序列包括序列識別號：9之核苷酸序列。

【請求項6】 如請求項1所述之GAPDH核酸偵測套組，其中，該針對GAPDH核酸之逆向內引子的5'端標示有一第一標誌，而該針對GAPDH核酸之順向內引子的5'端標示有一第二標誌，且該第一標誌與該第二標誌不同，又其中該第一標誌之種類包括生物素(biotin)、卵白素(avidin)、鏈親和素(streptavidin, SA)、長葉毛地黃配質(digoxigenin, DIG) 或螢光素(fluorescein, FAM)，且該第二標誌之種類包括生物素、卵白素、鏈親和素、長葉毛地黃配質或螢光素。

【請求項7】 如請求項6所述之GAPDH核酸偵測套組，更包括一側流免疫分析試片(lateral flow immunoassay test strip)，其依據分析物流動方向依序包括一分析物添加區、一結合區、一GAPDH偵測區與一試片控制區，

其中，

該結合區具有一第一結合顆粒，其具有一第一結合分子與連接該第一結合分子的一顆粒，其中該第一結合分子具有結合該第一標誌之能力，

該GAPDH偵測區固定有一第二結合分子，其具有結合該第二標誌之能力，

而該試片控制區固定有一第三結合分子，其具有結合該第一結合顆粒中之該第一結合分子的能力，其中該第三結合分子與該第一標誌相同或不同。

【請求項8】 如請求項1所述之GAPDH核酸偵測套組，更包括

一聚合酶及/或核苷酸基質，其中該聚合酶具有反轉錄酶之功能，而該聚合酶為一*Bst* DNA聚合酶，且其序列包括序列識別號：10之胺基酸序列。

【請求項9】 一種標的核酸偵測套組，包括：

一偵測GAPDH核酸之引子組，包括：

一針對GAPDH核酸之順向內引子；

一針對GAPDH核酸之順向外引子；

一針對GAPDH核酸之逆向內引子；以及

一針對GAPDH核酸之逆向外引子，

其中，

該針對GAPDH核酸之順向內引子係由一第一片段與一第二片段所組成，而該第一片段之3'端連接該第二片段之5'端，或該針對GAPDH核酸之順向內引子係由一第一片段、一第一連接子與一第二片段所組成，而該第一片段之3'端連接該第一連接子之5'端，且該第一連接子之3'端連接該第二片段之5'端，

其中，

該第一片段具有10-30個核苷酸，且係由一第一序列區段之互補股所組成，而該第一序列區段係位於序列識別號：1之核苷酸序列的第134個位點至第175個位點之間，

又該第二片段具有10-30個核苷酸，且係由一第

二序列區段所組成，而該第二序列區段係位於序列識別號：1之核苷酸序列的第77個位點至第115個位點之間，

且該第一連接子係由1-6個胸腺嘧啶或肽核酸所組成，

該針對GAPDH核酸之順向外引子具有10-30個核苷酸，且係由一第三序列區段所組成，而該第三序列區段係位於序列識別號：1之核苷酸序列的第42個位點至第79個位點之間，

該針對GAPDH核酸之逆向內引子係由一第三片段與一第四片段所組成，而該第三片段之3'端連接該第四片段之5'端，或該針對GAPDH核酸之逆向內引子係由一第三片段、一第二連接子與一第四片段所組成，而該第三片段之3'端連接該第二連接子之5'端，且該第二連接子之3'端連接該第四片段之5'端，

其中，

該第三片段具有10-30個核苷酸，且係由一第四序列區段所組成，而該第四序列區段係位於序列識別號：1之核苷酸序列的第156個位點至第207個位點之間，

又該第四片段具有10-30個核苷酸，且係由一第五序列區段之互補股所組成，而該第五序列區段係位

於序列識別號：1 之核苷酸序列的第 211 個位點至第 250 個位點之間，

且該第二連接子係由 1-6 個胸腺嘧啶或肽核酸所組成，

該針對 GAPDH 核酸之逆向外引子具有 10-30 個核苷酸，且係由一第六序列區段之互補股所組成，而該第六序列區段位於序列識別號：1 之核苷酸序列的第 238 個位點至第 275 個位點之間；以及

一偵測標的核酸之引子組，包括：

- 一針對標的核酸之順向內引子；
- 一針對標的核酸之順向外引子；
- 一針對標的核酸之逆向內引子；以及
- 一針對標的核酸之逆向外引子，

其中，該偵測標的核酸之引子組的偵測標的不同於該偵測 GAPDH 核酸之引子組的偵測標的，

且其中該偵測 GAPDH 核酸之引子組與該偵測標的核酸之引子組分別用於一第一恆溫環型核酸擴增法與一第二恆溫環型核酸擴增法，而該第一恆溫環型核酸擴增法與該第二恆溫環型核酸擴增法獨立地包括，標準恆溫環型核酸擴增法或反轉錄恆溫環型核酸擴增法，

又，其中該第一恆溫環型核酸擴增法的結果，係作為一內部控制組。

【請求項10】 如請求項9所述之標的核酸偵測套組，其中，
該針對GAPDH核酸之順向內引子之序列包括序列識別號：2之
核苷酸序列；

該針對GAPDH核酸之順向外引子之序列包括序列識別號：3之
核苷酸序列；

該針對GAPDH核酸之逆向內引子之序列包括序列識別號：4之
核苷酸序列、序列識別號：6之核苷酸序列或序列識別號：7之
核苷酸序列，且

該針對GAPDH核酸之逆向外引子之序列包括序列識別號：5之
核苷酸序列。

【請求項11】 如請求項9所述之標的核酸偵測套組，其中該針
對GAPDH核酸之順向內引子、該針對GAPDH核酸之順向外引
子、該針對GAPDH核酸之逆向內引子與該針對GAPDH核酸之逆
向外引子的至少一者，以自其3'端起之第4個位點至第14個位點的
任一個位點為起點之1至10個核苷酸獨立地被以下核苷酸之一所取
代：

肌苷(I)

鳥嘌呤(G)；以及

尿嘧啶(U)。

【請求項12】 如請求項11所述之標的核酸偵測套組，其中該針
對GAPDH核酸之逆向內引子之序列包括序列識別號：8之核苷酸
序列及/或該針對GAPDH核酸之逆向外引子之序列包括序列識別

號：9之核苷酸序列。

【請求項13】 如請求項11所述之標的核酸偵測套組，其中，該針對GAPDH核酸之順向內引子之序列包括序列識別號：2之核苷酸序列；

該針對GAPDH核酸之順向外引子之序列包括序列識別號：3之核苷酸序列；

該針對GAPDH核酸之逆向內引子之序列包括序列識別號：4之核苷酸序列或序列識別號：8之核苷酸序列，且

該針對GAPDH核酸之逆向外引子之序列包括序列識別號：9之核苷酸序列。

【請求項14】 如請求項9所述之標的核酸偵測套組，其中該偵測標的核酸之引子組的偵測標的為一RNA病毒之核酸，而該RNA病毒包括冠狀病毒(Coronavirus)、流行感冒病毒(Influenza virus)、人類免疫缺乏病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)、伊波拉病毒(Ebolavirus)或C型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)。

【請求項15】 如請求項14所述之標的核酸偵測套組，其中該冠狀病毒包括嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)、嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒2型 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) (新型冠狀病毒) 或中東呼吸症候群冠狀病毒(middle east respiratory syndrome

coronavirus, MERS-CoV)。

【請求項16】 如請求項9所述之標的核酸偵測套組，其中該偵測標的核酸之引子組之偵測標的為嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒2型（新型冠狀病毒）之核酸，且其中

該針對標的核酸之順向內引子係由一第五片段與一第六片段所組成，而該第五片段之3'端連接該第六片段之5'端，或該針對標的核酸之順向內引子係由一第五片段、一第三連接子與一第六片段所組成，而該第五片段之3'端連接該第三連接子之5'端，且該第三連接子之3'端連接該第六片段之5'端，

其中，

該第五片段具有10-30個核苷酸，且係由一第七序列區段之互補股所組成，而該第七序列區段係位於序列識別號：11之核苷酸序列的第90個位點至第134個位點之間，

又該第六片段具有10-30個核苷酸，且係由一第八序列區段所組成，而該第八序列區段係位於序列識別號：11之核苷酸序列的第45個位點至第82個位點之間，

且該第三連接子係由1-6個胸腺嘧啶或肽核酸所組成，

該針對標的核酸之順向外引子具有10-30個核苷酸，且係由一第九序列區段所組成，而該第九序列區段係位於序列識別號：11之核苷酸序列的第27個位點至第64個位點之間，

該針對標的核酸之逆向內引子係由一第七片段與一第八片

段所組成，而該第七片段之3'端連接該第八片段的5'端，或該針對標的核酸之逆向內引子係由一第七片段、一第四連接子與一第八片段所組成，而該第七片段之3'端連接該第四連接子之5'端，且該第四連接子之3'端連接該第八片段之5'端，

其中，

該第七片段具有10-30個核苷酸，且係由一第十序列區段所組成，而該第十序列區段係位於序列識別號：11之核苷酸序列的第123個位點至第165個位點之間，

又該第八片段具有10-30個核苷酸，且係由一第十一序列區段之互補股所組成，而該第十一序列區段係位於序列識別號：11之核苷酸序列的第170個位點至第208個位點之間，

且該第四連接子係由1-6個胸腺嘧啶或肽核酸所組成，

該針對標的核酸之逆向外引子具有10-30個核苷酸，且係由一第十二序列區段之互補股所組成，而該第十二序列區段係位於序列識別號：11之核苷酸序列的第226個位點至第263個位點之間。

【請求項17】 如請求項16所述之標的核酸偵測套組，其中該偵測標的核酸之引子組更包括：

一針對標的核酸之順向環引子；以及

一針對標的核酸之逆向環引子，

其中，

該針對標的核酸之順向環引子具有10-30個核苷酸，且係由一第十三序列區段所組成，而該第十三序列區段係位於序列識別號：11之核苷酸序列的第63個位點至第104個位點之間，

該針對標的核酸之逆向環引子具有10-30個核苷酸，且係由一第十四序列區段所組成，而該第十四序列區段係位於序列識別號：11之核苷酸序列的第146個位點至第187個位點之間。

【請求項18】 如請求項17所述之標的核酸偵測套組，其中，該針對標的核酸之順向內引子之序列包括序列識別號：12之核苷酸序列；

該針對標的核酸之順向外引子之序列包括序列識別號：13之核苷酸序列；

該針對標的核酸之順向環引子之序列包括序列識別號：16之核苷酸序列；

該針對標的核酸之逆向內引子之序列包括序列識別號：14之核苷酸序列，

該針對標的核酸之逆向外引子之序列包括序列識別號：15之核苷酸序列，且

該針對標的核酸之逆向環引子之序列包括序列識別號：17之核苷酸序列。

【請求項19】 如請求項9所述之標的核酸偵測套組，其中該針對GAPDH核酸之逆向內引子的5'端與該針對標的核酸之逆向內引

子的5'端標示有一第一標誌，該針對GAPDH核酸之順向內引子的5'端標示有一第二標誌，該針對標的核酸之順向內引子的5'端標示有一第三標誌，且該第一標誌、該第二標誌與該第三標誌皆不同，又其中該第一標誌之種類包括生物素、卵白素、鏈親和素、長葉毛地黃配質或螢光素、該第二標誌之種類包括生物素、卵白素、鏈親和素、長葉毛地黃配質或螢光素，且該第三標誌之種類包括生物素、卵白素、鏈親和素、長葉毛地黃配質或螢光素。

【請求項20】 如請求項19所述之標的核酸偵測套組，更包括一側流免疫分析試片，其根據分析物流動方向依序包括一分析物添加區、一結合區、一GAPDH偵測區、一標的核酸偵測區與一試片控制區，或依序包括一分析物添加區、一結合區、一標的核酸偵測區、一GAPDH偵測區與一試片控制區，

其中，

該結合區具有一第一結合顆粒，其中該第一結合顆粒具有一第一結合分子與連接該第一結合分子的一顆粒，而該第一結合分子具有結合該第一標誌之能力，

該GAPDH偵測區固定有一第二結合分子，其具有結合該第二標誌之能力，

該試片控制區固定有一第三結合分子，其具有結合該第一結合顆粒中之該第一結合分子的能力，其中該第三結合分子與該第一標誌相同或不同，

而該標的核酸偵測區固定有一第四結合分子，其具有結合該第

三標誌之能力。

【請求項21】 如請求項9所述之標的核酸偵測套組，更包括一聚合酶及/或核苷酸基質，其中該聚合酶具有反轉錄酶之功能，而該聚合酶為*Bst* DNA聚合酶，且其序列包括序列識別號：10之胺基酸序列。

【請求項22】 一種新型冠狀病毒偵測套組，包括：
一偵測GAPDH核酸之引子組，包括：

- 一針對GAPDH核酸之順向內引子；
 - 一針對GAPDH核酸之順向外引子；
 - 一針對GAPDH核酸之逆向內引子；以及
 - 一針對GAPDH核酸之逆向外引子，
- 其中，

該針對GAPDH核酸之順向內引子係由一第一片段與一第二段所組成，而該第一片段之3'端連接該第二段之5'端，或該針對GAPDH核酸之順向內引子係由一第一片段、一第一連接子與一第二段所組成，而該第一片段之3'端連接該第一連接子之5'端，且該第一連接子之3'端連接該第二段之5'端，

其中，

該第一片段具有10-30個核苷酸，且係由一第一序列區段之互補股所組成，而該第一序列區段係位於序列識別號：1之核苷酸序列的第134個位點至第175

個位點之間，

又該第二片段具有10-30個核苷酸，且係由一第二序列區段所組成，而該第二序列區段係位於序列識別號：1之核苷酸序列的第77個位點至第115個位點之間，

且該第一連接子係由1-6個胸腺嘧啶或肽核酸所組成，

該針對GAPDH核酸之順向外引子具有10-30個核苷酸，且係由一第三序列區段所組成，而該第三序列區段係位於序列識別號：1之核苷酸序列的第42個位點至第79個位點之間，

該針對GAPDH核酸之逆向內引子係由一第三片段與一第四片段所組成，而該第三片段之3'端連接該第四片段之5'端，或該針對GAPDH核酸之逆向內引子係由一第三片段、一第二連接子與一第四片段所組成，而該第三片段之3'端連接該第二連接子之5'端，且該第二連接子之3'端連接該第四片段之5'端，

其中，

該第三片段具有10-30個核苷酸，且係由一第四序列區段所組成，而該第四序列區段係位於序列識別號：1之核苷酸序列的第156個位點至第207個位點之間，

又該第四片段具有10-30個核苷酸，且係由一第五序列區段之互補股所組成，而該第五序列區段係位於序列識別號：1之核苷酸序列的第211個位點至第250個位點之間，

且該第二連接子係由1-6個胸腺嘧啶或肽核酸所組成，

該針對GAPDH核酸之逆向外引子具有10-30個核苷酸，且係由一第六序列區段之互補股所組成，而該第六序列區段係位於序列識別號：1之核苷酸序列的第238個位點至第275個位點之間；以及

一偵測新型冠狀病毒之核酸的引子組，包括：

- 一針對新型冠狀病毒之核酸之順向內引子；
 - 一針對新型冠狀病毒之核酸之順向外引子；
 - 一針對新型冠狀病毒之核酸之逆向內引子；以及
 - 一針對新型冠狀病毒之核酸之逆向外引子，
- 其中，

該針對新型冠狀病毒之核酸之順向內引子係由一第五片段與一第六片段所組成，而該第五片段之3'端連接該第六片段之5'端，或該針對標的核酸之順向內引子係由一第五片段、一第三連接子與一第六片段所組成，而該第五片段之3'端連接該第三連接子之5'端，且該第三連接子之3'端連接該第六片段之5'端，

其中，

該第五片段具有10-30個核苷酸，且係由一第七序列區段之互補股所組成，而該第七序列區段係位於序列識別號：11之核苷酸序列的第90個位點至第134個位點之間，

又該第六片段具有10-30個核苷酸，且係由一第八序列區段所組成，而該第八序列區段係位於序列識別號：11之核苷酸序列的第45個位點至第82個位點之間，

且該第三連接子係由1-6個胸腺嘧啶或肽核酸所組成，

該針對新型冠狀病毒之核酸之順向外引子具有10-30個核苷酸，且係由為一第九序列區段所組成，而該第九序列區段係位於序列識別號：11之核苷酸序列的第27個位點至第64個位點之間，

該針對新型冠狀病毒之核酸之逆向內引子係由一第七片段與一第八片段所組成，而該第七片段之3'端連接該第八片段之5'端，或該針對標的核酸之逆向內引子係由一第七片段、一第四連接子與一第八片段所組成，而該第七片段之3'端連接該第四連接子之5'端，且該第四連接子之3'端連接該第八片段之5'端，

其中，

該第七片段具有10-30個核苷酸，且係由一第十序列區段所組成，而該第十序列區段係位於序列識別號：11之

核苷酸序列的第123個位點至第165個位點之間，

又該第八片段具有10-30個核苷酸，且係由一第十一序列區段之互補股所組成，而該第十一序列區段係位於序列識別號：11之核苷酸序列的第170個位點至第208個位點之間，

且該第四連接子係由1-6個胸腺嘧啶或肽核酸所組成，

該針對新型冠狀病毒之核酸之逆向外引子具有10-30個核苷酸，且係由為一第十二序列區段之互補股所組成，而該第十二序列區段係位於序列識別號：11之核苷酸序列的第226個位點至第263個位點之間，

又，其中該偵測GAPDH核酸之引子組與該偵測新型冠狀病毒之核酸的引子組分別用於一恆溫環型核酸擴增法，而該恆溫環型核酸擴增法包括標準恆溫環型核酸擴增法或反轉錄恆溫環型核酸擴增法。

【請求項23】 如請求項22之新型冠狀病毒偵測套組，其中該偵測新型冠狀病毒之標的核酸的之引子組更包括：

一針對新型冠狀病毒之核酸之順向環引子；以及

一針對新型冠狀病毒之核酸之逆向環引子，

其中，

該針對新型冠狀病毒之核酸之順向環引子具有10-30個核苷酸，且係由為一第十三序列區段所組成，而該第十三序列區段係位於序列識別號：11之核苷酸序列的第63個位點至第104

個位點之間，

該針對新型冠狀病毒之核酸之逆向環引子具有10-30個核苷酸，且係由為一第十四序列區段所組成，而該第十四序列區段係位於序列識別號：11之核苷酸序列的第146個位點至第187個位點之間。

【請求項24】 如請求項23之新型冠狀病毒偵測套組，其中，該針對新型冠狀病毒之核酸之順向內引子之序列包括序列識別號：12之核苷酸序列；

該針對新型冠狀病毒之核酸之順向外引子之序列包括序列識別號：13之核苷酸序列；

該針對新型冠狀病毒之核酸之順向環引子之序列包括序列識別號：16之核苷酸序列；

該針對新型冠狀病毒之核酸之逆向內引子之序列包括序列識別號：14之核苷酸序列，

該針對新型冠狀病毒之核酸之逆向外引子之序列包括序列識別號：15之核苷酸序列，且

該針對新型冠狀病毒之核酸之逆向環引子之序列包括序列識別號：17之核苷酸序列。

【請求項25】 如請求項22之新型冠狀病毒偵測套組，其中，該針對新型冠狀病毒之核酸之逆向內引子的5'端標誌示有一第一標誌，而該針對新型冠狀病毒之核酸之順向內引子的5'端標誌示有一第二標誌，且其中該第一標誌與該第二標誌不同，又其中該第一標

誌之種類包括生物素、卵白素、鏈親和素、長葉毛地黃配質或螢光素，且該第二標誌之種類包括生物素、卵白素、鏈親和素、長葉毛地黃配質或螢光素。

【請求項26】 如請求項25之新型冠狀病毒偵測套組，更包括一側流免疫分析試片，其依據分析物流動方向依序包括一分析物添加區、一結合區、一新型冠狀病毒偵測區與一試片控制區，

其中，

該結合區具有一第一結合顆粒，其具有一第一結合分子與連接該第一結合分子的一顆粒，其中該第一結合分子具有結合該第一標誌之能力，

該新型冠狀病毒偵測區固定有一第二結合分子，其具有結合該第二標誌之能力，

而該試片控制區固定有一第三結合分子，其具有結合該第一結合顆粒中之該第一結合分子的能力，其中該第三結合分子與該第一標誌相同或不同。

【請求項27】 如請求項22之新型冠狀病毒偵測套組，更包括一聚合酶及/或核苷酸基質，其中該聚合酶具有反轉錄酶之功能，而該聚合酶為一*Bst* DNA聚合酶，且其序列包括序列識別號：10之胺基酸序列。

【請求項28】 一種偵測GAPDH核酸之方法，包括：

(a) 提供一待測樣本；以及

(b) 將該待測樣本以請求項1之GAPDH核酸偵測套組中的該偵

測GAPDH核酸之引子組進行該恆溫環型核酸擴增法，

其中若該待測樣本含有GAPDH核酸，自該恆溫環型核酸擴增法獲得一GAPDH的核酸擴增產物，

其中該恆溫環型核酸擴增法包括，標準恆溫環型核酸擴增法或反轉錄恆溫環型核酸擴增法。

【請求項29】 如請求項28所述之偵測GAPDH核酸之方法，其中該恆溫環型核酸擴增法係以該待測樣本中之單股RNA或第一股cDNA(first strand cDNA)為起始模板。

【請求項30】 如請求項28所述之偵測GAPDH核酸之方法，其中該待測樣本之來源包括唾液檢體、痰液檢體、鼻腔拭子(nose swab)檢體、咽喉拭子(throat swab)檢體、鼻咽(nasopharyngeal)檢體、尿液檢體、糞便檢體、直腸拭子(rectal swab)檢體、腦脊髓液(cerebrospinal fluid, CSF)檢體或體液(body fluid)檢體。

【請求項31】 如請求項28所述之偵測GAPDH核酸之方法，更包括於步驟(a)之前，將一生物樣本進行一前處理以獲得該待測樣本，其中該前處理包括擇自由下列步驟所組成之群組的一步驟：

- (i) 將該生物樣本進行一熱處理步驟；
- (ii) 將該生物樣本進行一核酸純化步驟；
- (iii) 將該生物樣本進行一反轉錄步驟；
- (iv) 將該生物樣本進行一核酸純化步驟之後，進行一反轉錄步驟；

(v) 將該生物樣本進行一反轉錄步驟之後，進行一RNA去除步驟；與

(vi) 將該生物樣本進行一核酸純化步驟之後，進行一反轉錄步驟，且之後進行一RNA去除步驟。

【請求項32】 如請求項31所述之偵測GAPDH核酸之方法，其中該生物樣本為一唾液檢體。

【請求項33】 如請求項28所述之偵測GAPDH核酸之方法，其中該待測樣本為一原始唾液檢體。

【請求項34】 如請求項28所述之偵測GAPDH核酸之方法，其中該恆溫環型核酸擴增法為反轉錄恆溫環型核酸擴增法。

【請求項35】 如請求項34所述之偵測GAPDH核酸之方法，其中於該反轉錄恆溫環型核酸擴增法中，反轉錄程序與恆溫環型擴增程序係以一個步驟來進行，且於該反轉錄恆溫環型核酸擴增法中，係使用一具有反轉錄酶之功能的聚合酶，又其中該聚合酶為一*Bst* DNA聚合酶，且該*Bst* DNA聚合酶之序列包括序列識別號：10之胺基酸序列。

【請求項36】 如請求項34所述之偵測GAPDH核酸之方法，其中於該反轉錄恆溫環型核酸擴增法中，一恆溫環型擴增程序係於一反轉錄程序後進行。

【請求項37】 如請求項28所述之偵測GAPDH核酸之方法，其中，

該針對GAPDH核酸之順向內引子之序列包括序列識別號：2之

核苷酸序列；

該針對GAPDH核酸之順向外引子之序列包括序列識別號：3之核苷酸序列；

該針對GAPDH核酸之逆向內引子之序列包括序列識別號：4之核苷酸序列、序列識別號：6之核苷酸序列或序列識別號：7之核苷酸序列，且

該針對GAPDH核酸之逆向外引子之序列包括序列識別號：5之核苷酸序列。

【請求項38】 如請求項28所述之偵測GAPDH核酸之方法，其中該針對GAPDH核酸之順向內引子、該針對GAPDH核酸之順向外引子、該針對GAPDH核酸之逆向內引子與該針對GAPDH核酸之逆向外引子的至少一者，以自其3'端起之第4個位點至第14個位點的任一個位點為起點之1至10個核苷酸獨立地被以下核苷酸之一所取代：

肌苷(I)

鳥嘌呤(G)；以及

尿嘧啶(U)。

【請求項39】 如請求項38所述之偵測GAPDH核酸之方法，其中，

該針對GAPDH核酸之順向內引子之序列包括序列識別號：2之核苷酸序列；

該針對GAPDH核酸之順向外引子之序列包括序列識別號：3之

核苷酸序列；

該針對GAPDH核酸之逆向內引子之序列包括序列識別號：4之核苷酸序列或序列識別號：8之核苷酸序列，且

該針對GAPDH核酸之逆向外引子之序列包括序列識別號：9之核苷酸序列。

【請求項40】 如請求項28所述之偵測GAPDH核酸之方法，其中該GAPDH核酸的擴增產物之存在係藉由一膠體電泳分析或一側流免疫分析來確認。

【請求項41】 一種偵測新型冠狀病毒的方法，包括：

(a) 提供一待測樣本；以及

(b) 將該待測樣本以請求項22所述之新型冠狀病毒偵測套組中的該偵測GAPDH核酸之引子組與該偵測新型冠狀病毒之核酸的引子組分別進行一恆溫環型核酸擴增法，

其中以該偵測GAPDH核酸之引子組所進行之恆溫環型核酸擴增法的結果，作為一內部控制組，而若該待測樣本含有新型冠狀病毒，則自以該偵測新型冠狀病毒之核酸的引子組所進行之恆溫環型核酸擴增法獲得一新型冠狀病毒的核酸擴增產物，

其中該恆溫環型核酸擴增法包括，標準恆溫環型核酸擴增法或反轉錄恆溫環型核酸擴增法。

【請求項42】 如請求項41所述之偵測新型冠狀病毒的方法，其中該恆溫環型核酸擴增法係以該待測樣本中之單股RNA或第一股cDNA為起始模板。

【請求項43】 如請求項41所述之偵測新型冠狀病毒的方法，其中該待測樣本之來源包括唾液檢體、痰液檢體、鼻腔拭子檢體、咽喉拭子檢體、鼻咽檢體、尿液檢體、糞便檢體、直腸拭子檢體、腦脊髓液檢體或體液檢體。

【請求項44】 如請求項41所述之偵測新型冠狀病毒的方法，更包括於步驟(a)之前，將一生物樣本進行一前處理以獲得該待測樣本，其中該前處理包括擇自由下列步驟所組成之群組的一步驟：

- (i) 將該生物樣本進行一熱處理步驟；
- (ii) 將該生物樣本進行一核酸純化步驟；
- (iii) 將該生物樣本進行一反轉錄步驟；
- (iv) 將該生物樣本進行一核酸純化步驟之後，進行一反轉錄步驟；
- (v) 將該生物樣本進行一反轉錄步驟之後，進行一RNA去除步驟；與
- (vi) 將該生物樣本進行一核酸純化步驟之後，進行一反轉錄步驟，且之後進行一RNA去除步驟。

【請求項45】 如請求項44所述之偵測新型冠狀病毒的方法，其中該生物樣本為一唾液檢體。

【請求項46】 如請求項41所述之偵測新型冠狀病毒的方法，其中該待測樣本為一原始唾液檢體。

【請求項47】 如請求項41所述之偵測新型冠狀病毒的方法，其中該恆溫環型核酸擴增法為反轉錄恆溫環型核酸擴增法。

【請求項48】 如請求項47所述之偵測新型冠狀病毒的方法，其中於該反轉錄恆溫環型核酸擴增法中，反轉錄程序與恆溫環型核酸擴增程序係以一個步驟來進行，且於該反轉錄恆溫環型核酸擴增法中，係使用一具有反轉錄酶之功能的聚合酶，又其中該聚合酶為一 *Bst* DNA聚合酶，且該 *Bst* DNA聚合酶之序列包括序列識別號：10之胺基酸序列。

【請求項49】 如請求項47所述之偵測新型冠狀病毒的方法，其中於該反轉錄恆溫環型核酸擴增法中，一恆溫環型核酸擴增程序係於一反轉錄程序後進行。

【請求項50】 請求項41所述之偵測新型冠狀病毒的方法，其中該偵測新型冠狀病毒之標的核酸的之引子組更包括：

- 一針對新型冠狀病毒之核酸之順向環引子；以及
- 一針對新型冠狀病毒之核酸之逆向環引子，

其中，

該針對新型冠狀病毒之核酸之順向環引子具有約10-30個核苷酸，且係由為一第十三序列區段所組成，而該第十三序列區段係位於序列識別號：11之核苷酸序列的第63個位點至第104個位點之間，

該針對新型冠狀病毒之核酸之逆向環引子具有約10-30個核苷酸，且係由為一第十四序列區段所組成，而該第十四序列區段係位於序列識別號：11之核苷酸序列的第146個位點至第187個位點之間。

【請求項51】 如請求項50所述之偵測新型冠狀病毒的方法，其中，

該針對新型冠狀病毒之核酸之順向內引子之序列包括序列識別號：12之核苷酸序列；

該針對新型冠狀病毒之核酸之順向外引子之序列包括序列識別號：13之核苷酸序列；

該針對新型冠狀病毒之核酸之順向環引子之序列包括序列識別號：16之核苷酸序列；

該針對新型冠狀病毒之核酸之逆向內引子之序列包括序列識別號：14之核苷酸序列，

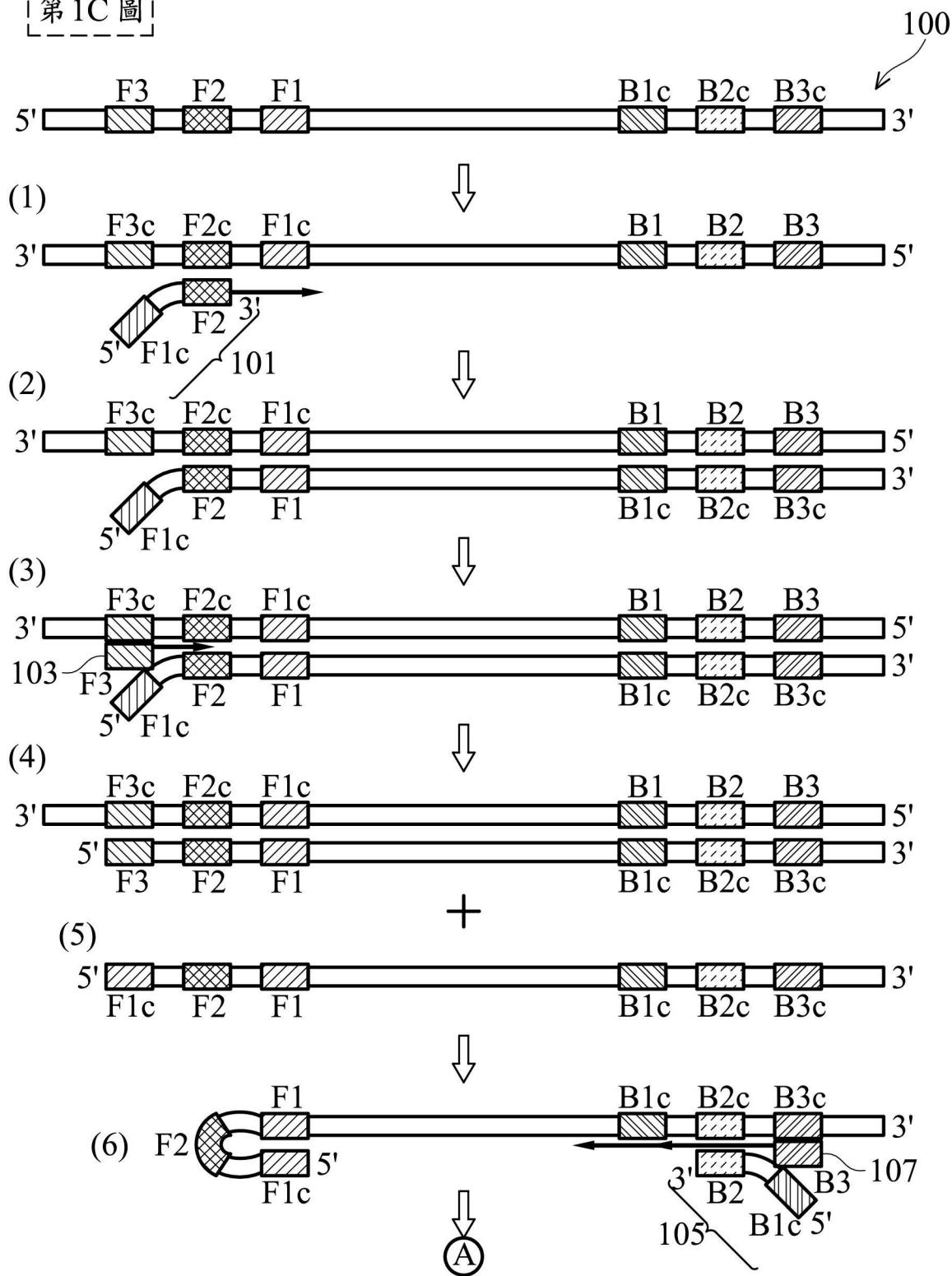
該針對新型冠狀病毒之核酸之逆向外引子之序列包括序列識別號：15之核苷酸序列，且

該針對新型冠狀病毒之核酸之逆向環引子之序列包括序列識別號：17之核苷酸序列。

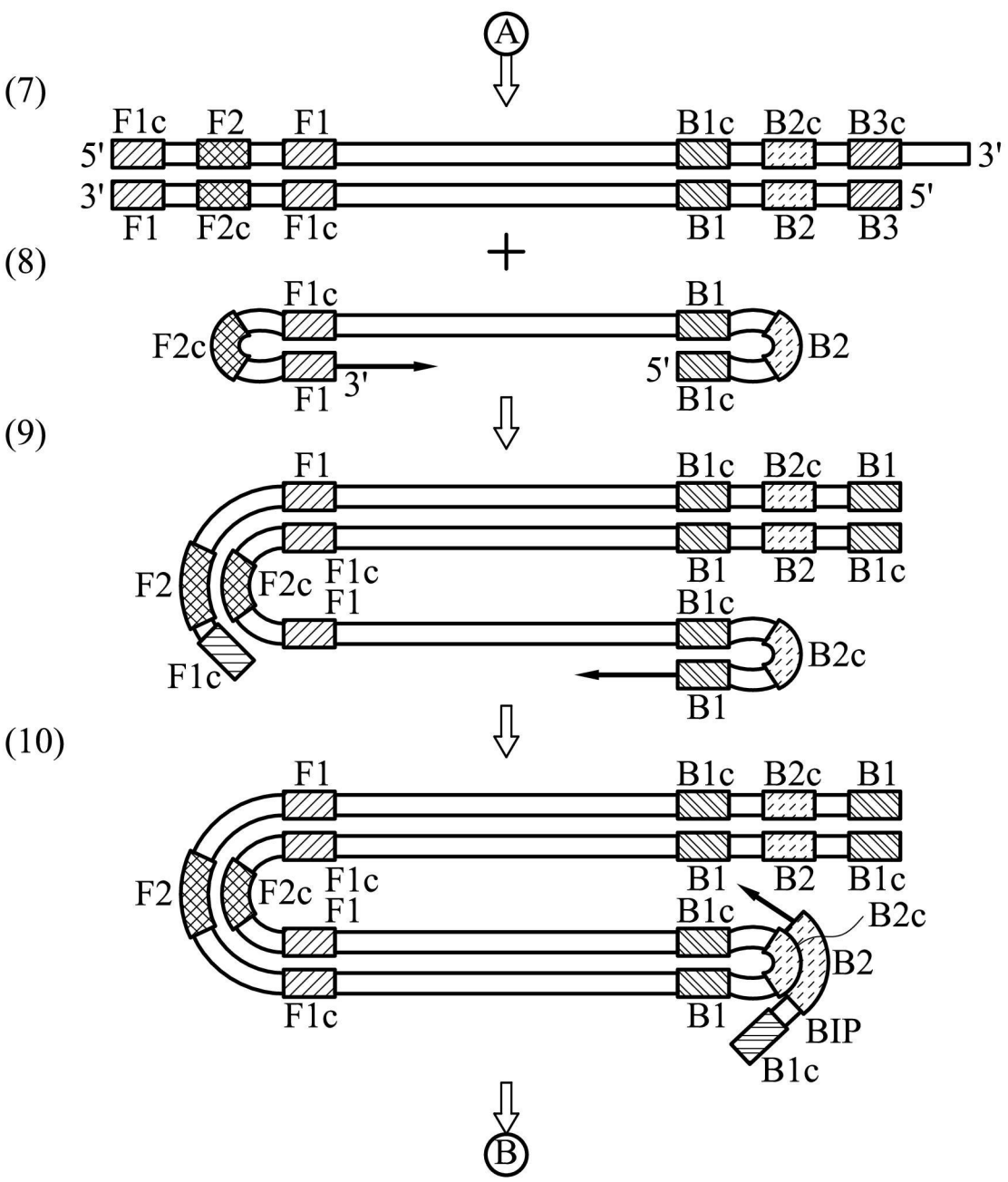
【請求項52】 如請求項41所述之偵測新型冠狀病毒的方法，其中該新型冠狀病毒的核酸擴增產物之存在係藉由一膠體電泳分析或一側流免疫分析來確認。

【發明圖式】

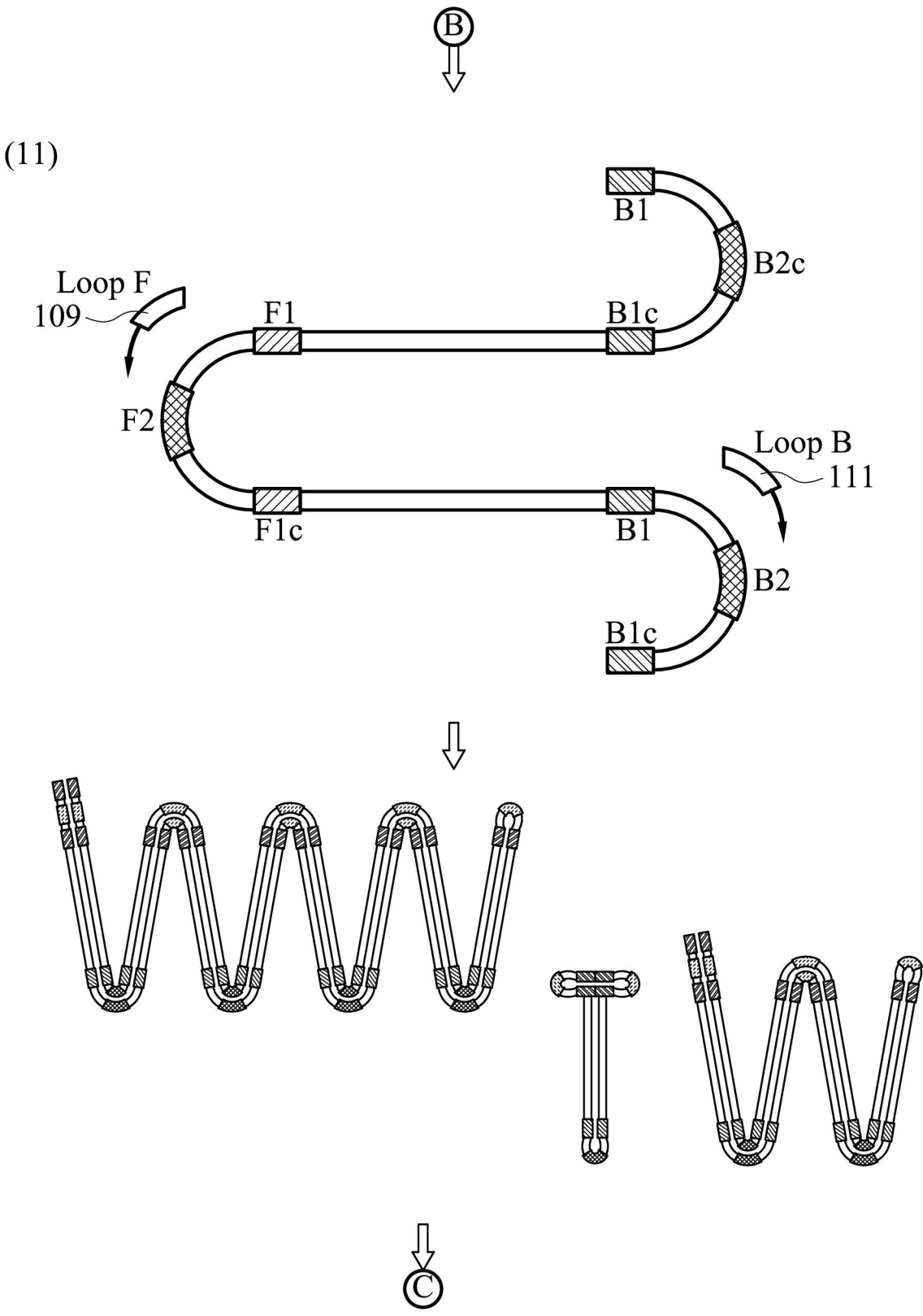
- 第 1A 圖
- 第 1B 圖
- 第 1C 圖



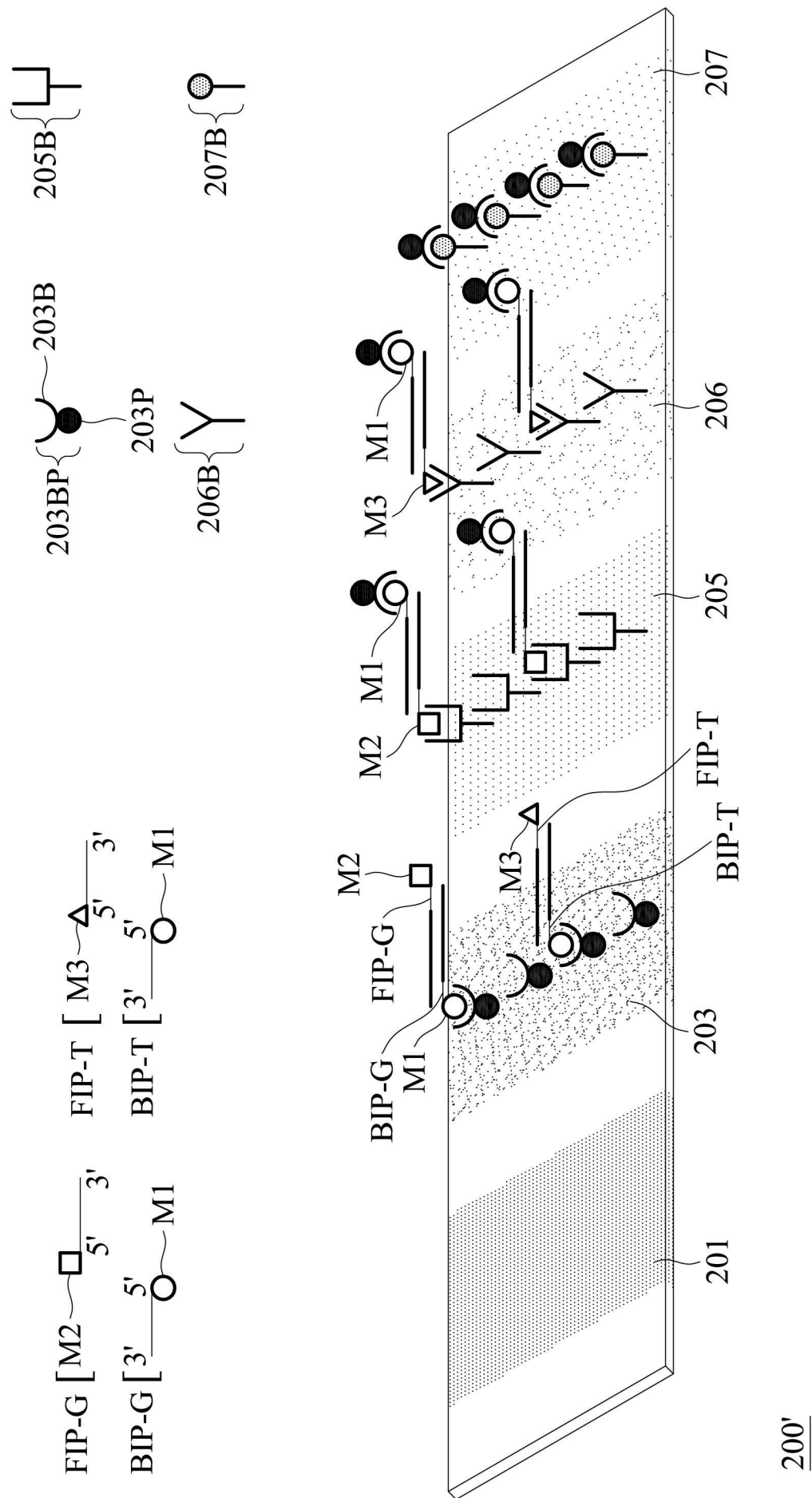
第 1A 圖



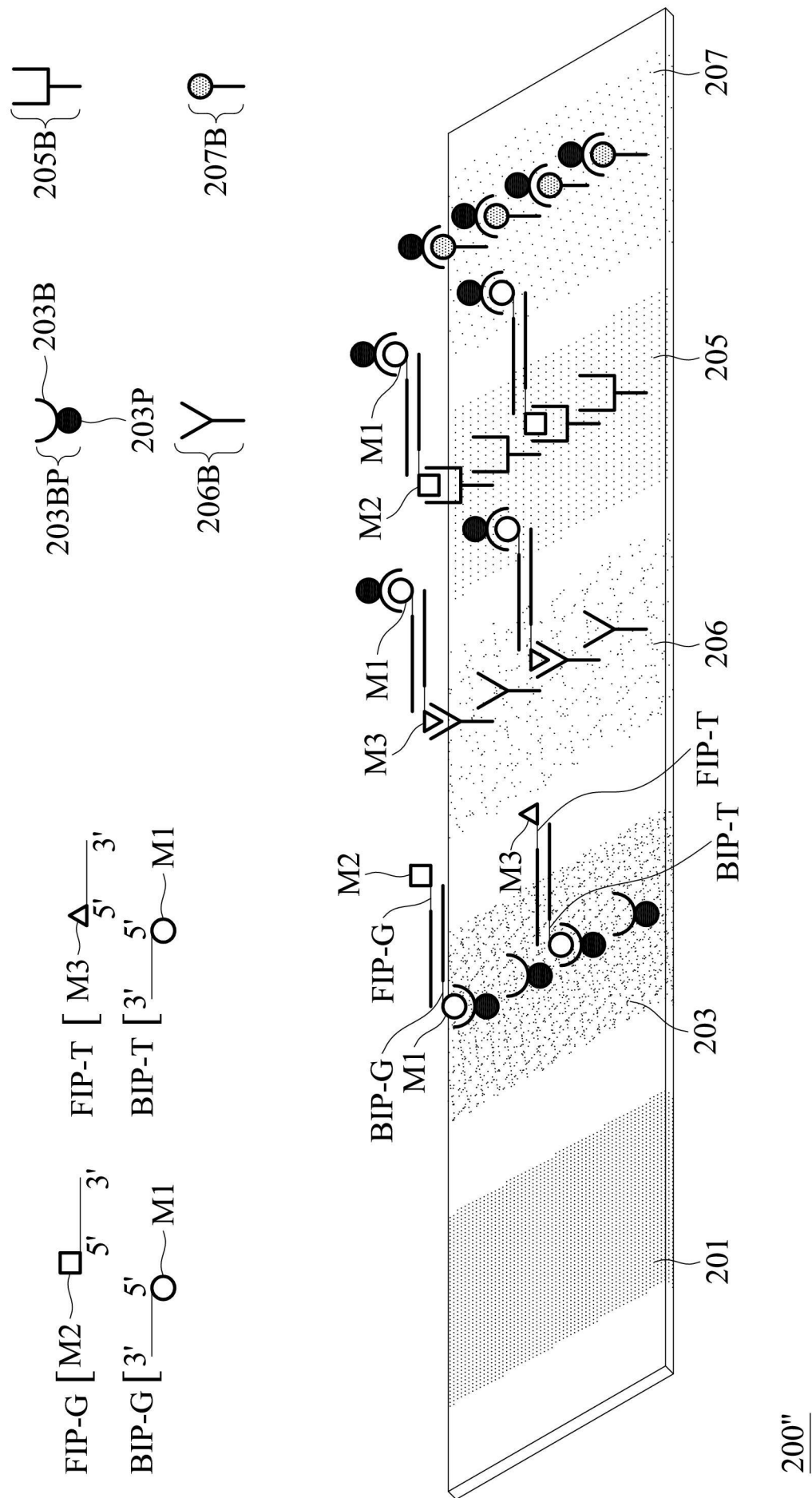
第 1B 圖



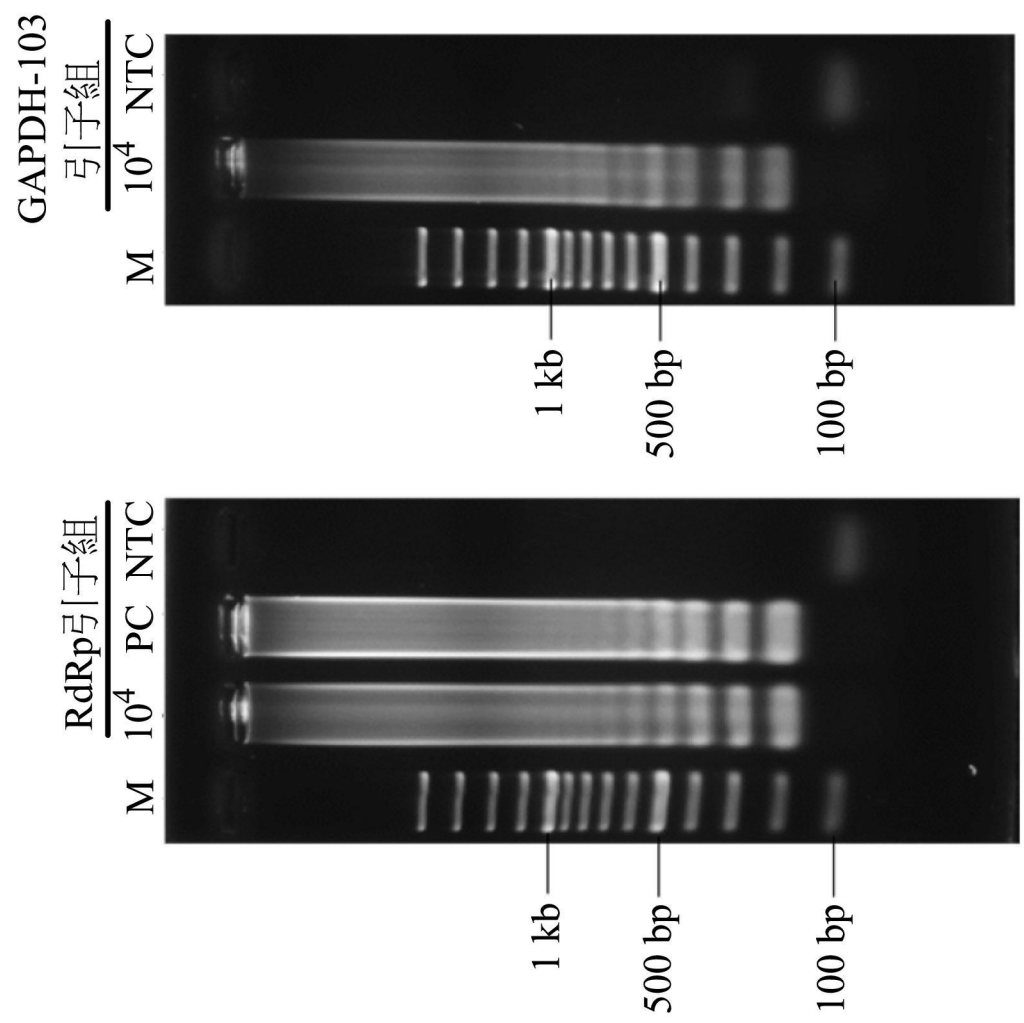
第 1C 圖



第 2B 圖

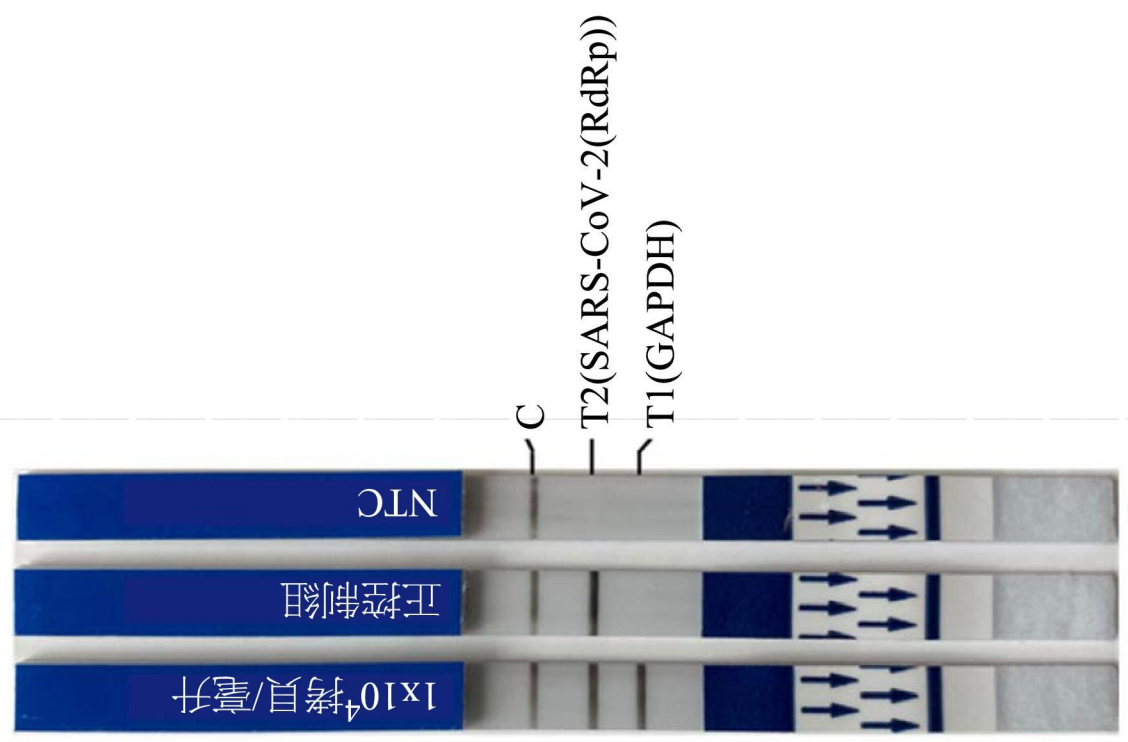


第 2C 圖

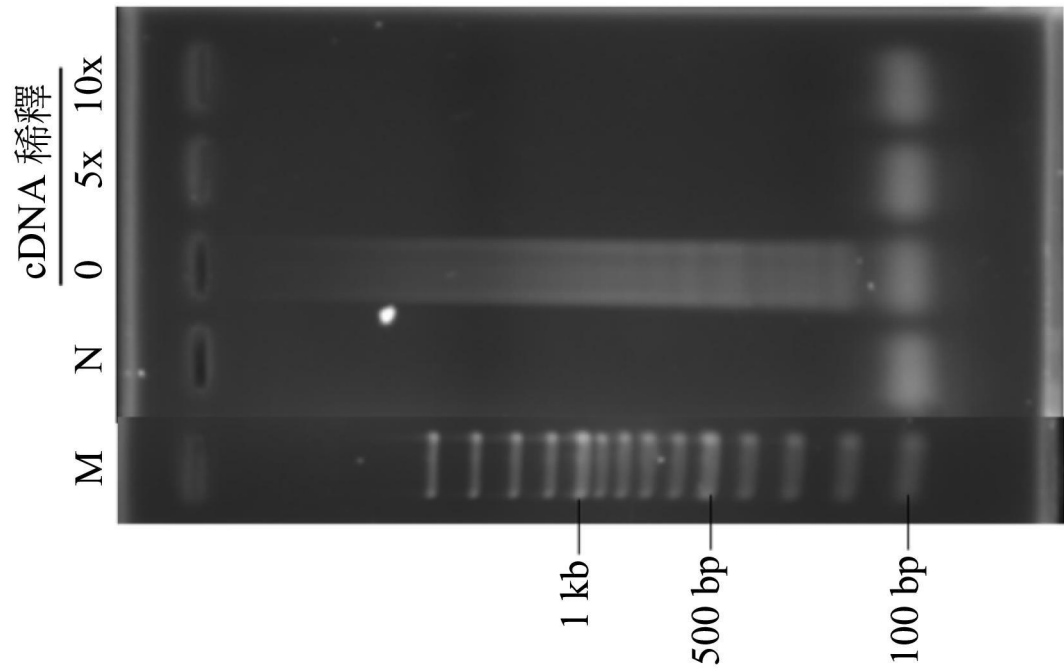


第3A圖

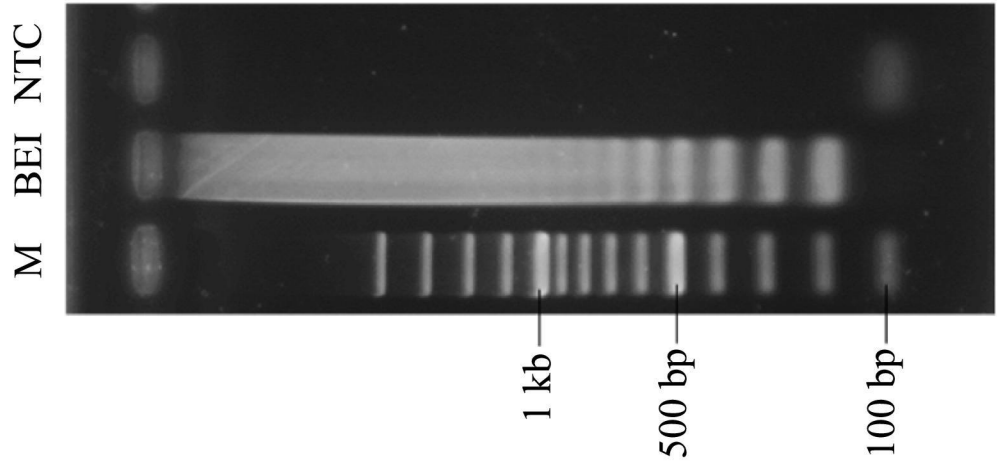
第3B圖



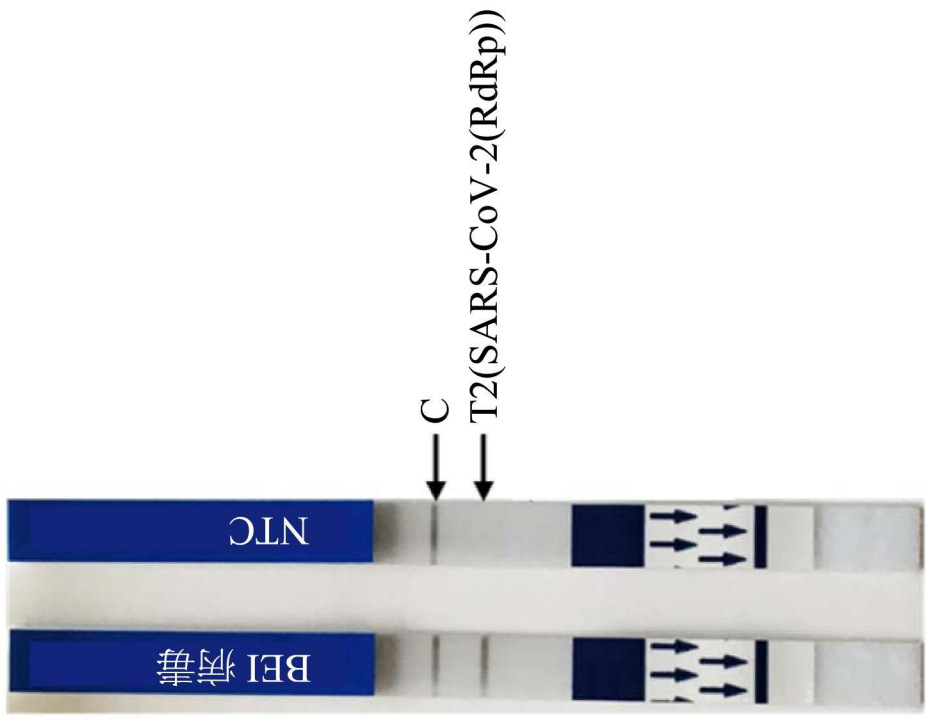
第3C圖



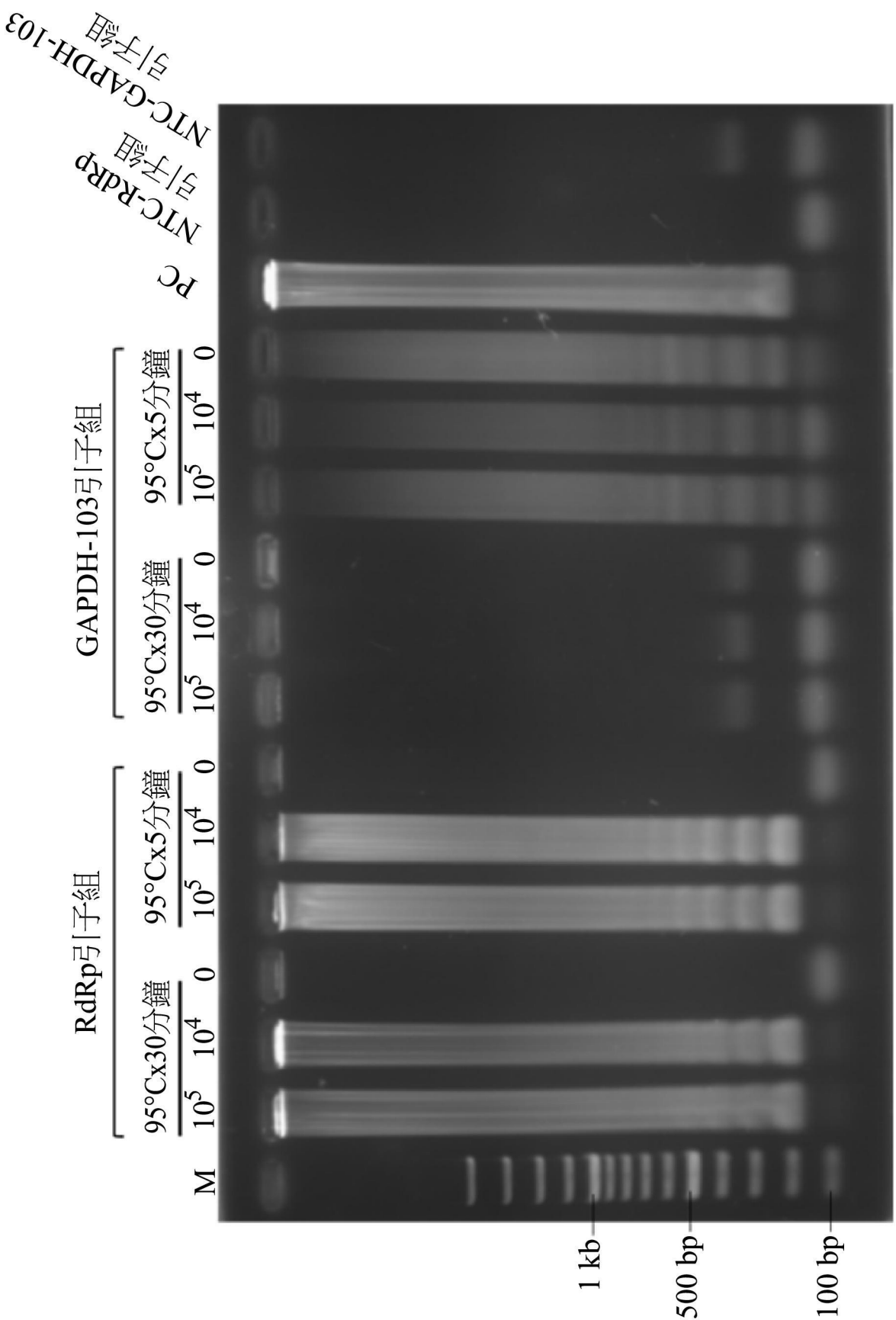
第4圖



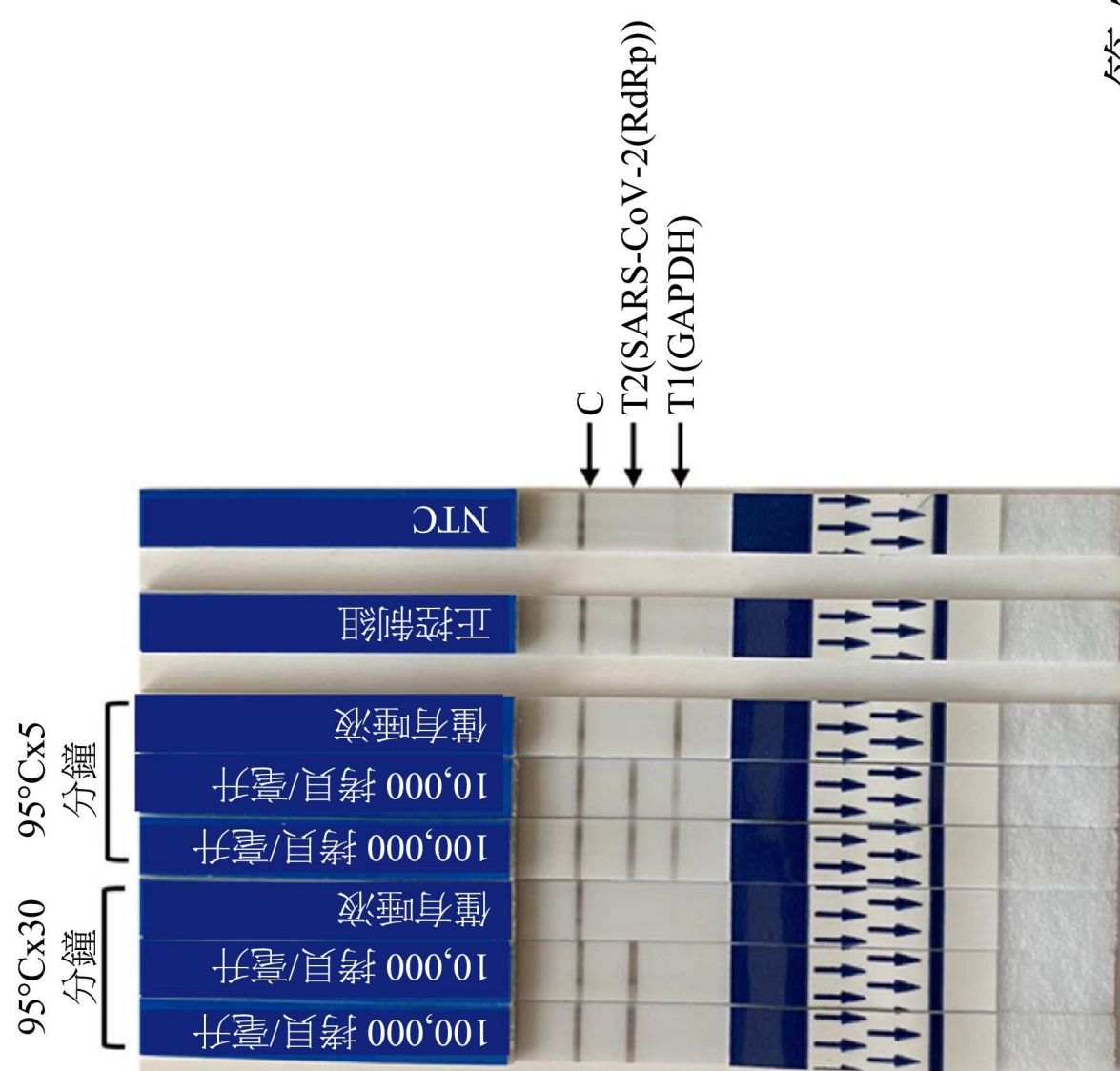
第5A圖



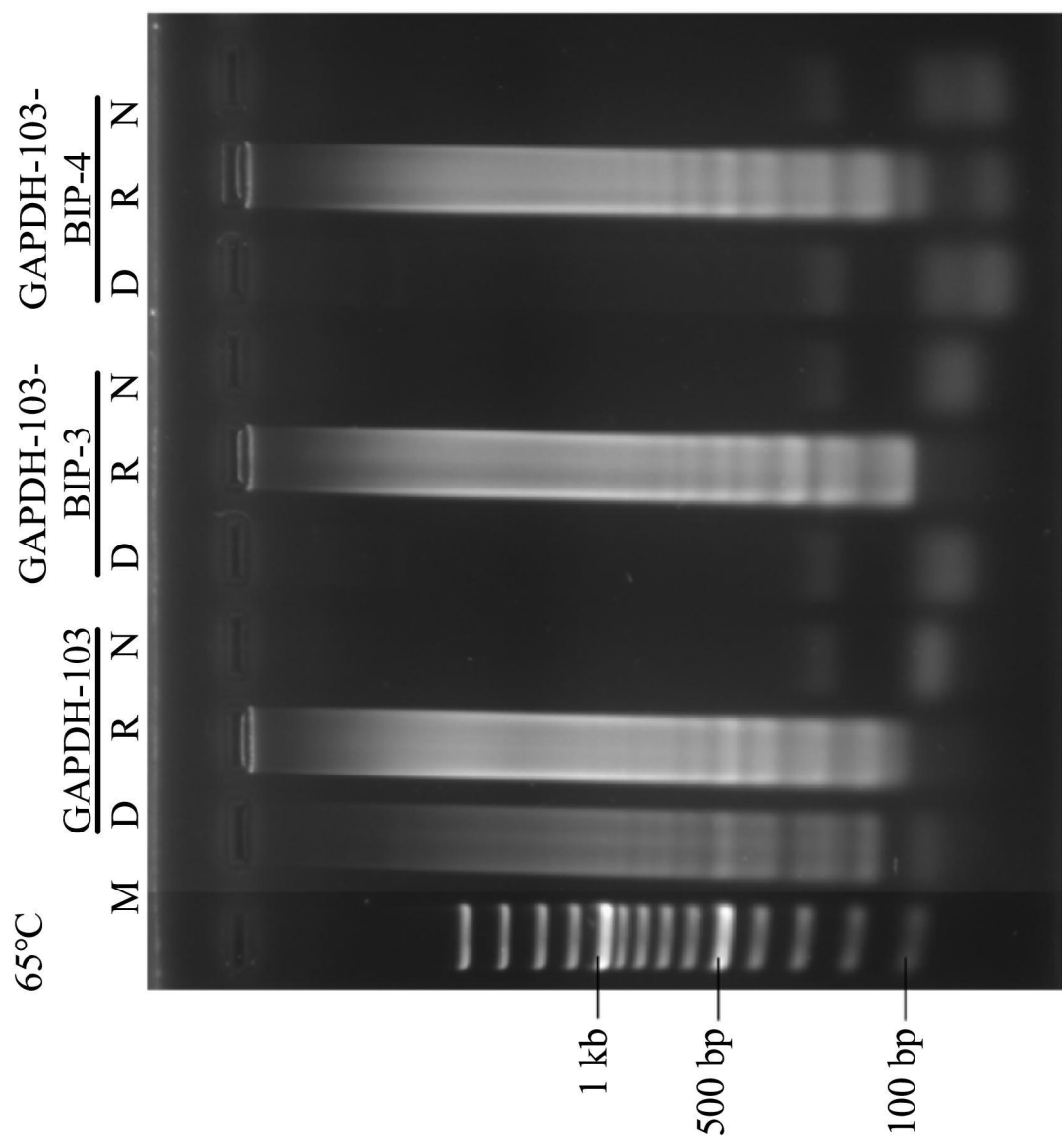
第5B圖



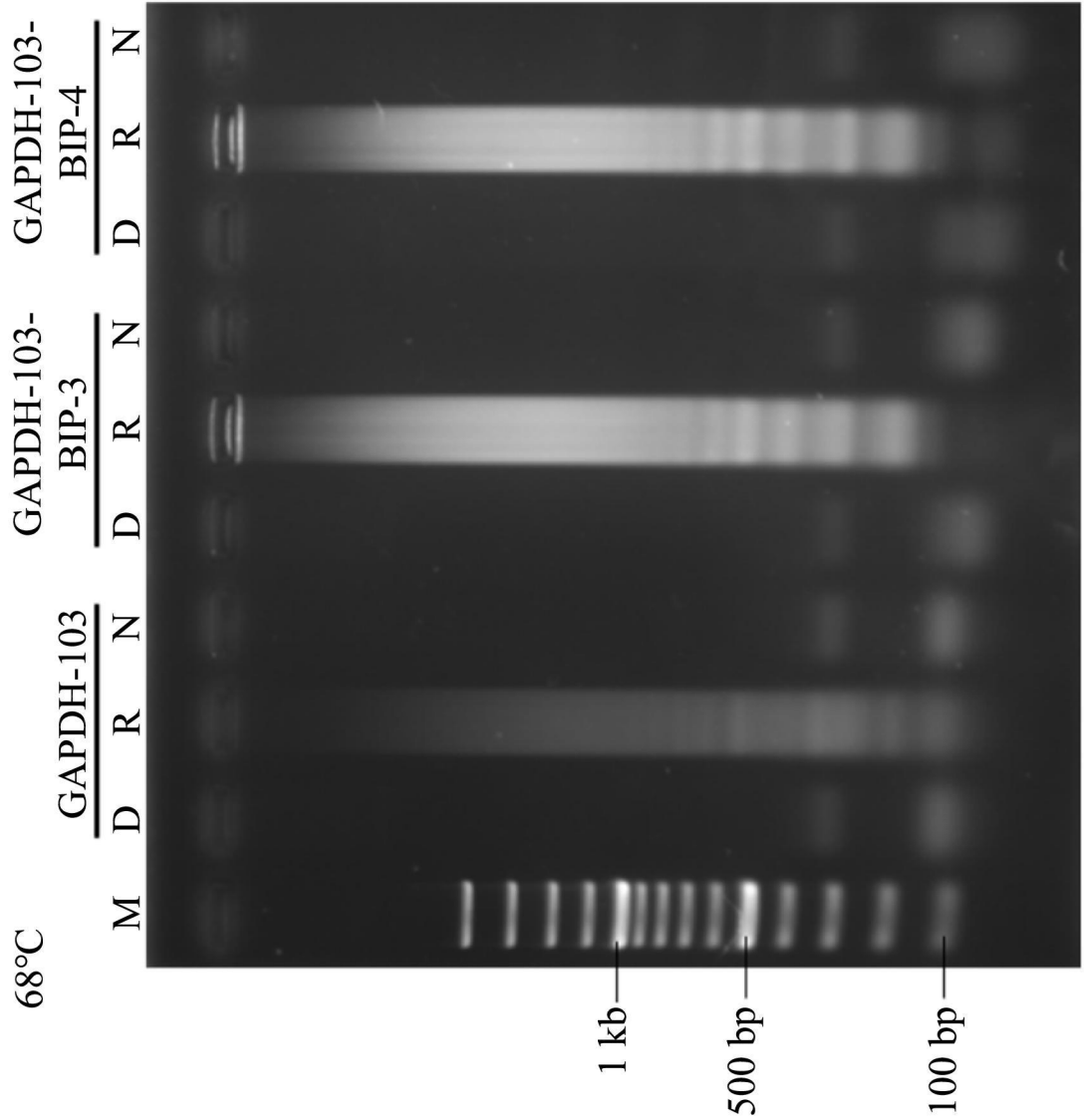
第6圖



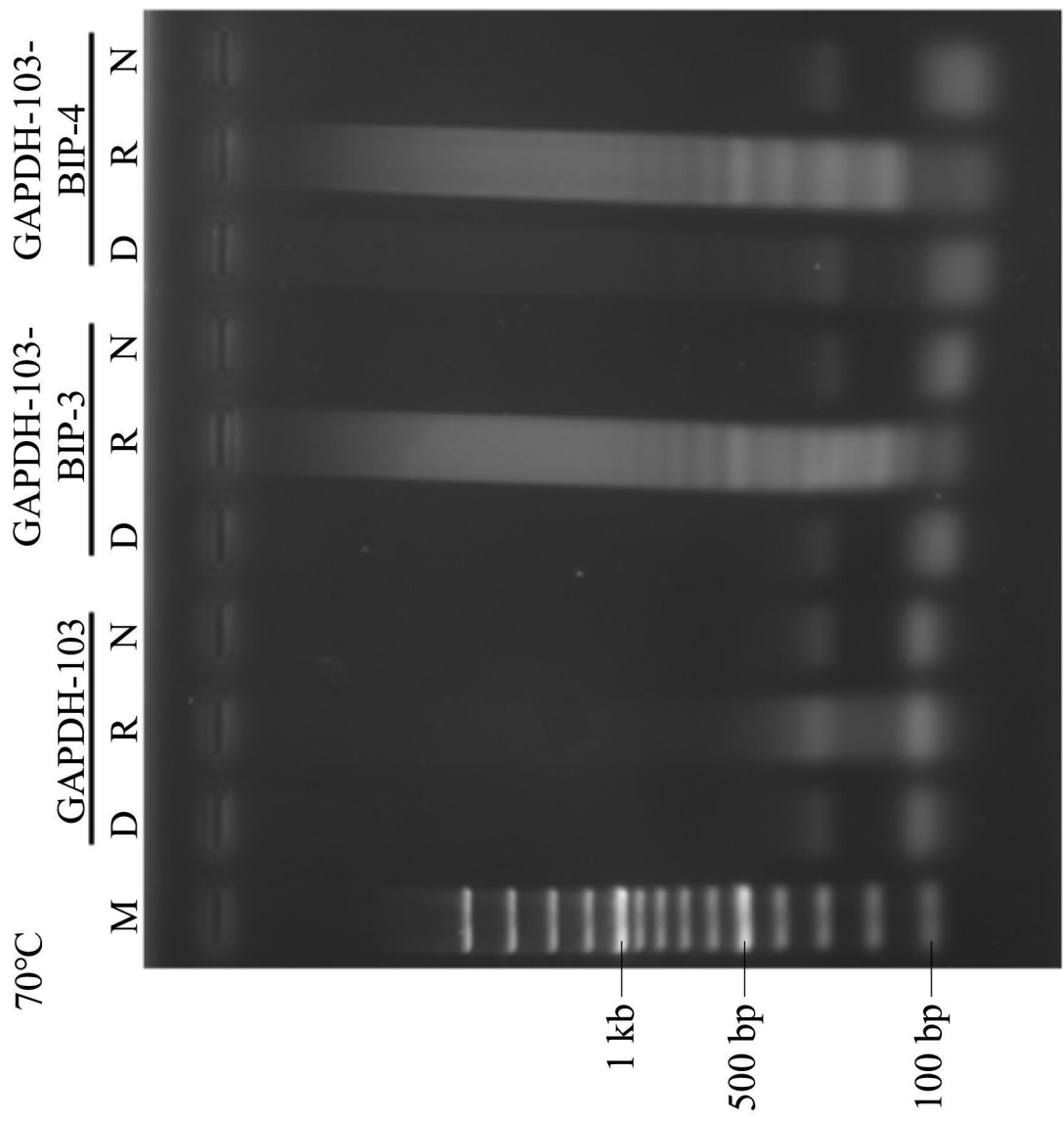
第7圖



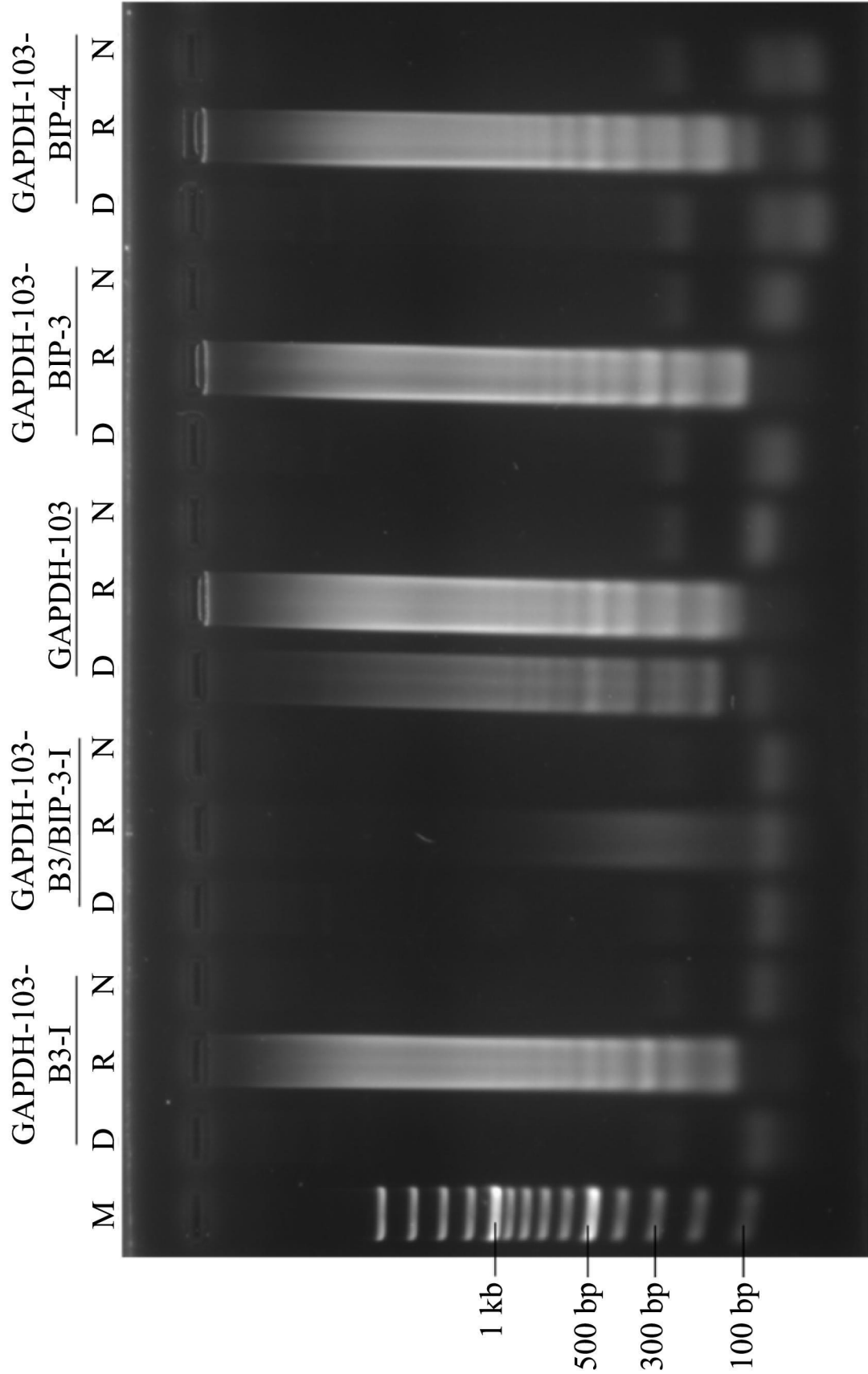
第 8A 圖



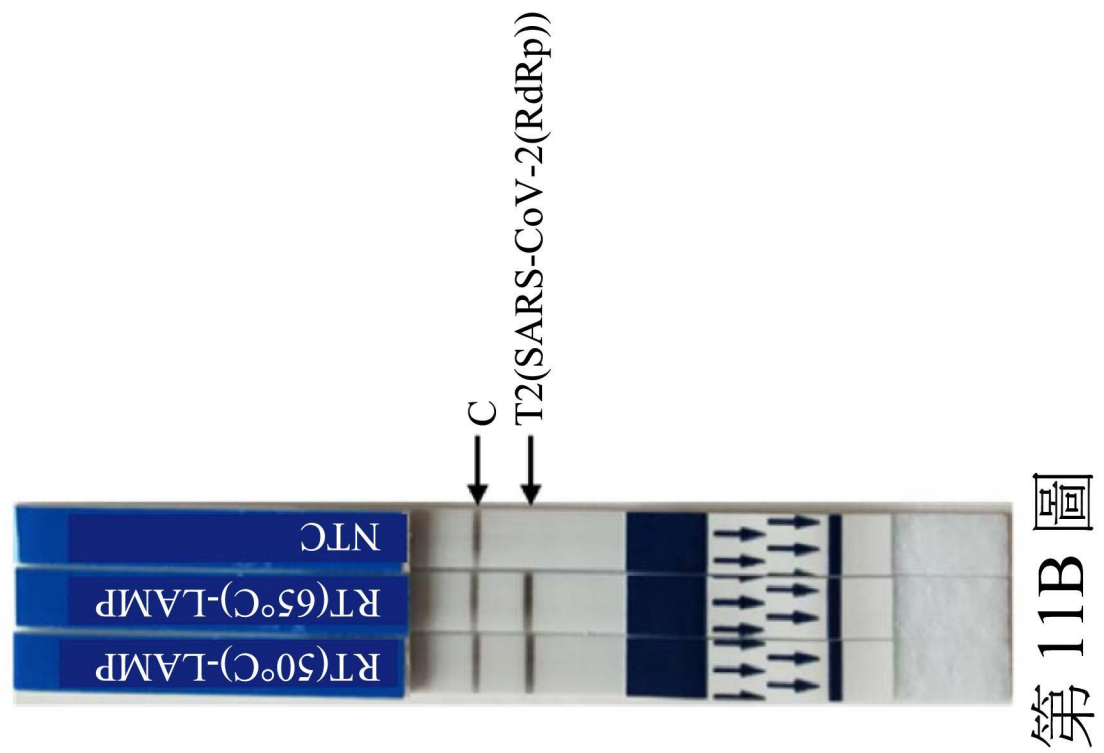
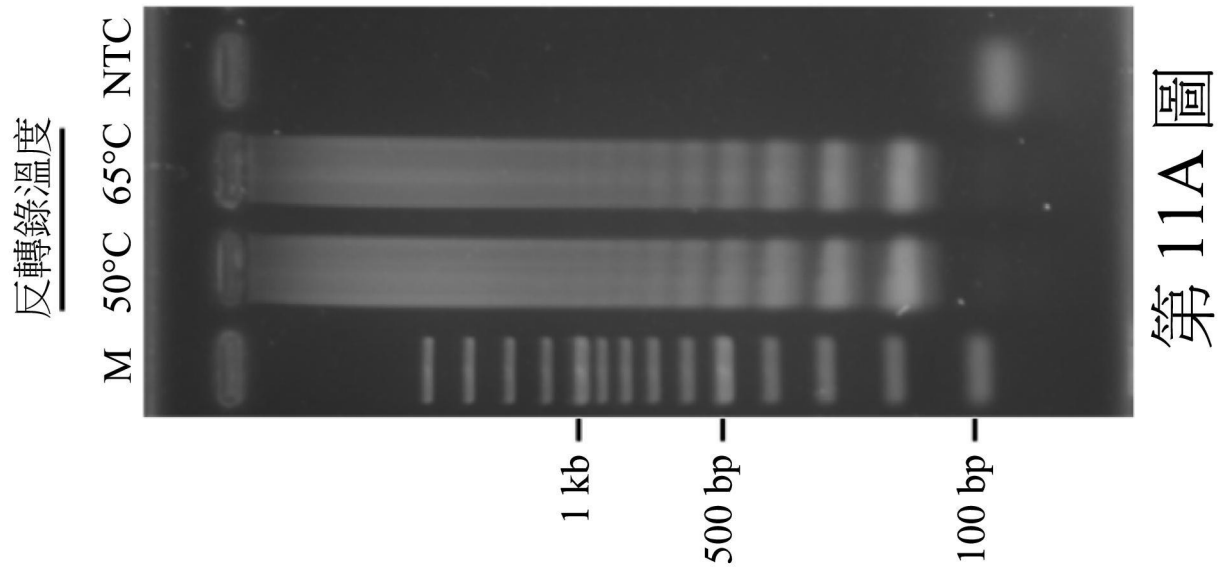
第 8B 圖

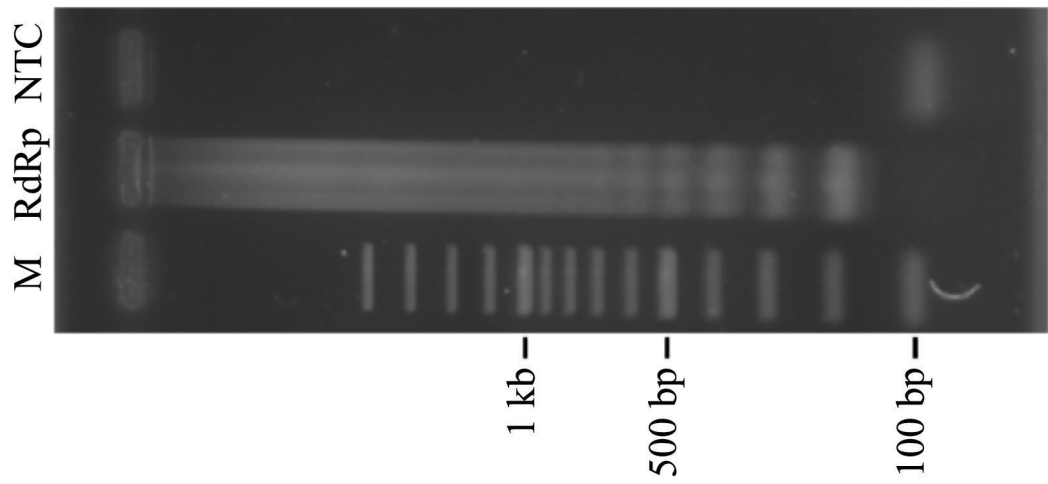


第8C圖

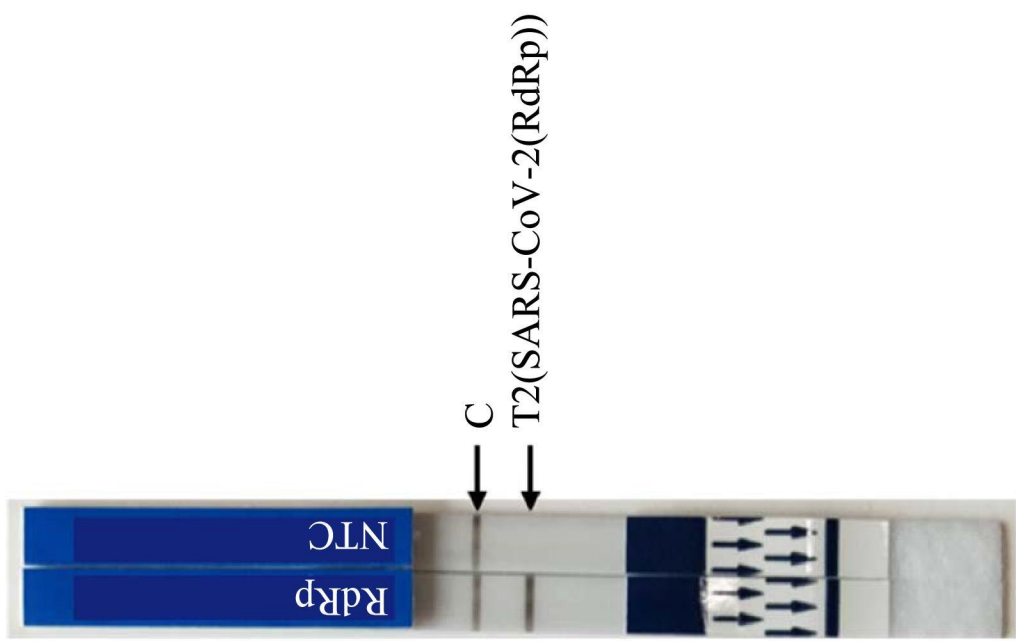


第9圖

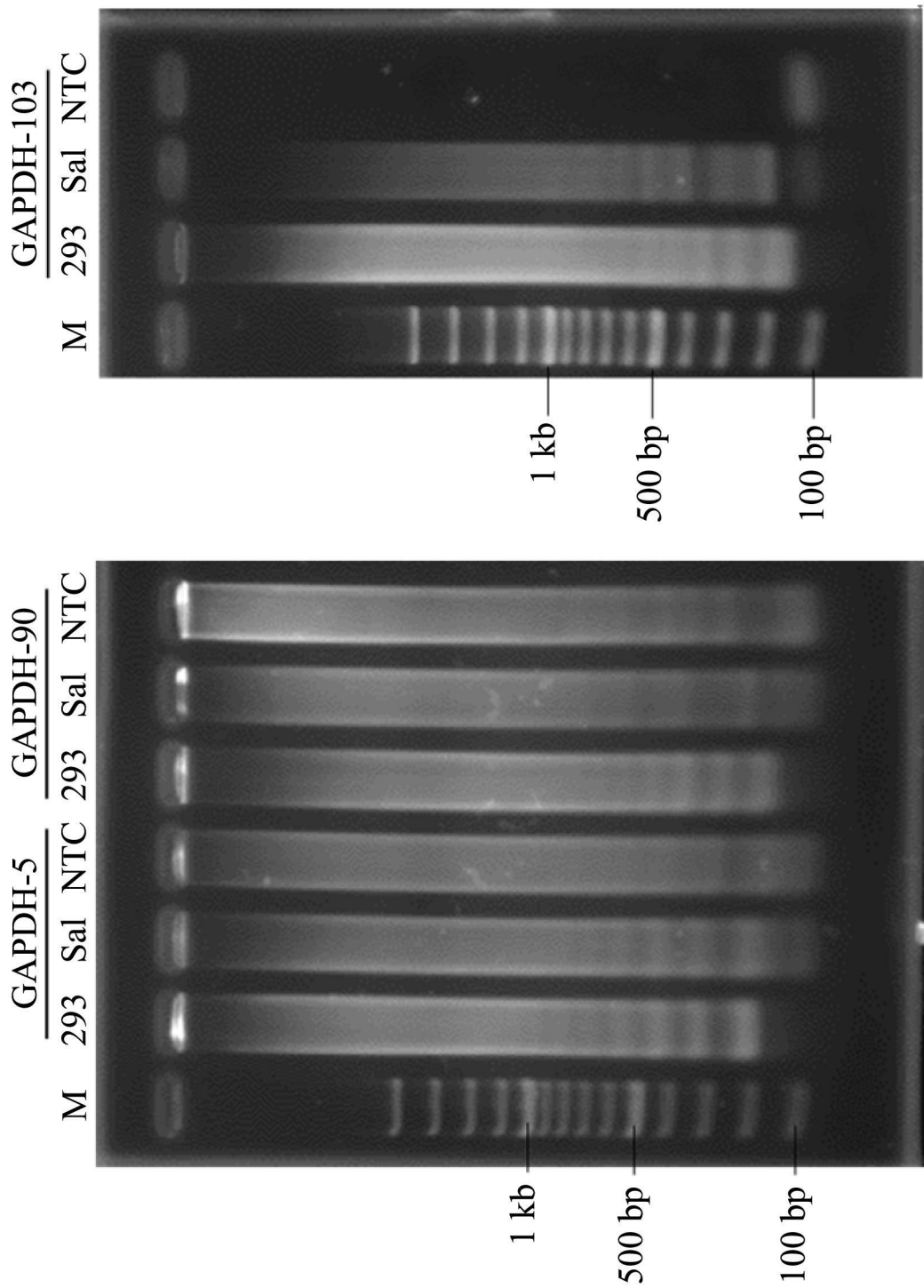




第 12A 圖



第 12B 圖



第 13 圖