



(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 I874625 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 03 月 01 日

---

(21)申請案號：110110913 (22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 03 月 25 日  
(51)Int. Cl. : C12Q1/686 (2018.01) C12N15/11 (2006.01)  
(30)優先權：2020/03/27 世界智慧財產權組織 PCT/JP2020/014415  
2020/10/02 世界智慧財產權組織 PCT/JP2020/037492  
(71)申請人：日商島津製作所股份有限公司 (日本) SHIMADZU CORPORATION (JP)  
日本  
(72)發明人：小林慎一郎 KOBAYASHI, SHINICHIRO (JP)；四方正光 SHIKATA, MASAMITSU  
(JP)；二宮健二 NINOMIYA, KENJI (JP)；高岡直子 TAKAOKA, NAOKO (JP)；  
丸瀨英明 MARUSE, HIDEAKI (JP)  
(74)代理人：卓俊傑  
(56)參考文獻：  
CN 108546736A  
審查人員：吳祖漢  
申請專利範圍項數：8 項 圖式數：5 共 40 頁

---

## (54)名稱

新型冠狀病毒的檢測方法和檢測試劑

## (57)摘要

本發明提供一種於防止假陰性的同時迅速且廉價地檢測有無感染 SARS-CoV-2 的方法和可簡便地實施該方法的套組。一種新型冠狀病毒的檢測方法，具有：將自受驗者採集的檢體樣本或所述檢體樣本與培養基的混合液、以及以氫氧化鈉為主成分的檢體處理液混合，獲得混合液的步驟；將所述混合液進行培育的步驟；向所述培育後的混合液中添加包含反應液、內部標準物質、引物、探針、反轉錄酶和 PCR 酶的主混合物，獲得最終混合液的步驟；對所述最終混合液進行反轉錄反應處理的步驟；和利用所述探針偵測將藉由所述反轉錄反應處理生成的 DNA 作為模板並藉由 PCR 擴增後的 DNA 的步驟。



## 公告本

I874625

## 【發明摘要】

【中文發明名稱】 新型冠狀病毒的檢測方法和檢測試劑

【中文】

本發明提供一種於防止假陰性的同時迅速且廉價地檢測有無感染 SARS-CoV-2 的方法和可簡便地實施該方法的套組。一種新型冠狀病毒的檢測方法，具有：將自受驗者採集的檢體樣本或所述檢體樣本與培養基的混合液、以及以氫氧化鈉為主成分的檢體處理液混合，獲得混合液的步驟；將所述混合液進行培育的步驟；向所述培育後的混合液中添加包含反應液、內部標準物質、引物、探針、反轉錄酶和 PCR 酶的主混合物，獲得最終混合液的步驟；對所述最終混合液進行反轉錄反應處理的步驟；和利用所述探針偵測將藉由所述反轉錄反應處理生成的 DNA 作為模板並藉由 PCR 擴增後的 DNA 的步驟。

【指定代表圖】 無。

【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】 新型冠狀病毒的檢測方法和檢測試劑

【技術領域】

【0001】 本發明是有關於一種新型冠狀病毒的檢測方法和用以執行該方法的套組。

【先前技術】

【0002】 已知冠狀病毒感染家畜、實驗動物、寵物、野生動物等所有動物，引起各種疾病。其中，關於感染人類的冠狀病毒，迄今為止已知有四種感冒綜合症以及兩種由動物感染的重症肺炎病毒。

據說引起感冒的冠狀病毒佔感冒原因的 10%~15%，於流行期佔感冒原因的 35%。關於該些冠狀病毒，於 20 世紀 60 年代發現了 HCoV-229E 和 HCoV-OC43，進入 2000 年代後發現了 HCoV-NL63 和 HCoV-HKU1 此兩種。

【0003】 另一方面，2002 年所發現的嚴重急性呼吸道症候群（severe acute respiratory syndrome，SARS）冠狀病毒（以下有時稱為 SARS-CoV）被認為大蹄鼻蝠是天然宿主。已知 SARS-CoV 會引起嚴重急性呼吸系統綜合症，給人體帶來嚴重的症狀。另外，2012 年所發現的中東呼吸綜合症（middle east respiratory syndrome，MERS）冠狀病毒（以下有時稱為 MERS-CoV）以單峰駱駝為感染源，已知若感染人類則會引起重症肺炎。任一冠狀病

毒均會引起全球性流行，從而出現很多感染者。

【0004】 進而，2019 年末判明了新的新型冠狀病毒（以下有時稱為 SARS-CoV-2）會引起急性呼吸道疾病。最初的流行地被認為是中國湖北省武漢市，但其後成為全球性流行，以東亞為中心，感染持續擴散至東南亞、中東、歐洲、美國等。2020 年初於巴西出現感染者，因此感染擴散至除南極大陸以外的所有五個大洲。

【0005】 新型冠狀病毒尚未確立其有效的預防方法和治療方法，另外，因人而異，有時會引起嚴重的肺炎症狀，最嚴重時會導致死亡，但其症狀並不特殊。例如，自無症狀時到重症肺炎、死亡，表現出廣泛的症狀。作為典型症狀，一般認為有發燒、乾咳、疲勞、咳痰、氣喘、咽喉痛、頭痛、肌肉痛或關節痛等。

由於初期症狀與感冒極像，於發病早期的階段難以區分，自感染經過潛伏期後，低燒發熱和感冒症狀有時會持續約一週，但患者的最初的症狀並不僅限於肺炎特有的發熱和咳嗽，亦存在出現腹瀉、噁心、頭痛和全身無力等消化系統和神經系統的症狀的情況，早期診斷變得困難。

【0006】 因此，要求確立一種用以判定是否感染了 SARS-CoV-2 的迅速的檢測方法。其中，利用聚合酶連鎖反應（以下有時稱為 PCR（polymerase chain reaction））的 PCR 法能夠擴增極微量的核酸，進行高靈敏度的偵測，因此是適合於病毒之類的微生物的偵測的方法。

【0007】 作為 SARS-CoV-2 的偵測方法，由國立傳染病研究所發

表了利用聚合酶鏈反應（polymerase chain reaction，PCR）法進行偵測的方法（非專利文獻 1）。該方法是如下方法：自包含作為核糖核酸（ribonucleic acid，RNA）病毒的 SARS-CoV-2 的檢體純化源自病毒的 RNA，藉由反轉錄-聚合酶鏈反應（以下有時稱為 RT-PCR 法）將經純化的 RNA 擴增為 cDNA，從而偵測 SARS-CoV-2。

[現有技術文獻]

[專利文獻]

**【0008】** [非專利文獻 1]國立傳染病研究所 病原體偵測手冊  
2019-nCoV

**【發明內容】**

**【0009】** [發明所欲解決之課題]

但是，所述 SARS-CoV-2 的偵測方法為了 RNA 的採集和純化而需要兩小時以上的時間，因此純化需要時間和工夫，成為進行多個檢體處理的課題。另外，對於用於偵測 SARS-CoV-2 的檢測而言需要某種程度的熟練度，因此認為擴大檢測機構需要時間。

**【0010】** 於 SARS-CoV-2 的情況下，報告了發病前的潛伏期長達一週以上，並且於所述潛伏期中亦會引起二次感染，因此期望一種迅速、且高精度的檢測方法。另外，鑒於 SARS-CoV-2 的全球性流行，亦期望一種能夠簡便地進行高精度的 SARS-CoV-2 的檢測的檢測套組。

**【0011】** 進而，為了防止感染擴散，於檢測中，重要的是避免儘

管檢體中實際包含 SARS-CoV-2，但判定為未檢測出該病毒的假陰性。然而，於構成檢體的病毒的保存液及/或輸送液中，例如若混入有阻礙反轉錄酶及/或去氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid，DNA）聚合酶的酶活性的物質，則反轉錄-聚合酶鏈反應（reverse transcription-polymerase chain reaction，RT-PCR）的反應不會進行，有即使檢體中包含 SARS-CoV-2，亦會導致假陰性的判定的可能性。因此，期望一種可防止假陰性的檢測套組。此處所說的陰性是指基於 PCR 法的偵測界限以下。

**【0012】** 本發明的目的在於提供一種於防止假陰性的同時迅速且廉價地檢測有無感染 SARS-CoV-2 的方法和可簡便地實施該方法的套組。

**【0013】** 於 SARS-CoV-2 的檢測中，通常向自檢體中提取源自病毒的 RNA 而得的檢體處理液中添加 PCR 主混合物，進行 RT-PCR。所述 PCR 主混合物包含：反轉錄酶、DNA 聚合酶、PCR 引物、用以偵測去氧核苷三磷酸（dNTPs）和 PCR 擴增產物的探針，其中所述去氧核苷三磷酸（dNTPs）為使所述 PCR 引物延伸的 DNA 聚合酶的基質。於 PCR 主混合物中，於製備 PCR 主混合物後，於將自檢體中提取的 RNA 添加至 PCR 主混合物之前，有時會發生所述引物彼此所引起的非特異性擴增反應，於所述情況下，認為會對病毒的檢測精度產生影響。特別是於 SARS-CoV-2 偵測步驟中，有時亦會根據偵測作業的情況，將 PCR 主混合物於其製備後放置數小時，於所述期間需要抑制意想不到的所述非特異性擴增反

應，維持檢測精度。

【0014】 本發明的目的在於提供一種藉由抑制所述非特異性擴增反應，迅速、廉價、且高精度地檢測有無感染 SARS-CoV-2 的方法及和可簡便地實施該方法的套組。

[解決課題之手段]

【0015】 即，本發明是有關於一種新型冠狀病毒的檢測方法，具有：

將自受驗者採集的檢體樣本或所述檢體樣本與病毒保存液等的混合液、以及以氫氧化鈉為主成分的檢體處理液混合，獲得混合液的步驟；

將所述混合液進行培育的步驟；

向所述培育後的混合液中添加包含反應液、內部標準物質、引物、探針、反轉錄酶和 PCR 酶的主混合物，獲得最終混合液的步驟；

對所述最終混合液進行反轉錄反應處理的步驟；和

利用所述探針偵測將藉由所述反轉錄反應處理生成的 DNA 作為模板並藉由 PCR 擴增後的 DNA 的步驟。

【0016】 進而，本發明是有關於一種新型冠狀病毒的檢測方法，其中

於所述新型冠狀病毒的檢測方法中，所述檢體處理液或所述反應液包含去氧腺苷三磷酸（deoxyadenosine triphosphate，dATP）、去氧鳥苷三磷酸（deoxyguanosine triphosphate，dGTP）、

去氧胞苷三磷酸（deoxycytidine triphosphate，dCTP）和去氧胸苷三磷酸（deoxythymidine triphosphate，dTTP）。

【0017】 進而，本發明是有關於一種新型冠狀病毒的檢測用套組，

具有以氫氧化鈉為主成分的檢體處理液、反應液、內部標準物質、引物、探針、反轉錄酶和 PCR 酶。

【0018】 進而，本發明是有關於一種新型冠狀病毒的檢測用套組，其中

於所述新型冠狀病毒的檢測用套組中，所述檢體處理液或所述反應液包含 dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP。

[發明的效果]

【0019】 根據本發明，可提供一種不將檢體中所含的病毒 RNA 純化，而於防止假陰性的發生的同時迅速且廉價地檢測有無感染 SARS-CoV-2 的方法和可簡便地實施該方法的套組。

【0020】 通常，作為 DNA 聚合酶的基質的 dNTPs 添加至用以製備 PCR 主混合物的反應液中。然而，根據本發明，藉由代替所述反應液而於檢體處理液中添加 dNTPs，即使於製備 PCR 主混合物後亦不會發生 PCR 引物彼此所引起的非特異性擴增反應，藉由將檢體樣本與檢體處理液的混合液添加至 PCR 主混合物中來開始所有擴增反應。因此，本發明能夠高精度地檢測檢體樣本中有無存在新型冠狀病毒。

【圖式簡單說明】

**【0021】**

圖 1 是表示用以藉由一步 RT-PCR 的測定的混合液（10  $\mu\text{L}$ ）中的、包含合成 SARS-CoV-2 RNA 的一部分的人工合成 RNA、咽拭子和 UTM 培養基的樣本液的含量變化為 1  $\mu\text{L}$ 、3  $\mu\text{L}$ 、5  $\mu\text{L}$  和 7  $\mu\text{L}$  時的實時 RT-PCR 的擴增曲線的圖。

圖 2A 是表示與不伴隨樣本液中的 PCR 反應阻礙物質所致的 PCR 反應阻礙的樣本液相關的實時 RT-PCR 的擴增曲線的圖。

圖 2B 是表示與伴隨樣本液中的 PCR 反應阻礙物質所致的 PCR 反應阻礙的樣本液相關的實時 RT-PCR 的擴增曲線的圖。

圖 3A 是表示與被判定為陽性的樣本液相關的實時 RT-PCR 反應的擴增曲線的圖。

圖 3B 是表示與被判定為陰性（偵測界限以下）的樣本液相關的實時 RT-PCR 反應的擴增曲線的圖。

圖 4 是表示利用病原體偵測手冊 2019-nCoV（非專利文獻 1）中記載的方法和本發明的方法檢測作為檢體的鼻拭子和咳痰（25 例）而得的結果的圖。

圖 5 是表示利用病原體偵測手冊 2019-nCoV（非專利文獻 1）中記載的方法和本發明的方法檢測作為檢體的唾液（22 例）而得的結果的圖。

**【實施方式】**

**【0022】** 冠狀病毒的特徵之一是其基因組並非 DNA 而為 RNA。因此，於應用 PCR 法時，RT-PCR 法亦是有效的。RT-PCR 法中有

一步 RT-PCR 法和兩步 RT-PCR 法。一步 RT-PCR 法由於於同一容器內連續進行反轉錄反應以及 PCR，因此就操作簡便，抑制樣品間污染的觀點而言較佳。

【0023】 本發明的新型冠狀病毒的檢測方法包括將用以判定有無感染的自受驗者採集的檢體樣本、或所述檢體樣本與培養基的混合液與以氫氧化鈉為主成分的檢體處理液混合的步驟。作為自受驗者採集的檢體樣本，包括咽拭子、鼻拭子、咳痰、支氣管洗淨液、唾液等。所述培養基包括病毒保存液等。

【0024】 所使用的培養基於微生物和生物組織的培養中，對培養對象提供生長環境，可適宜地使用市售的 UTM 培養基（日本貝克頓-迪金森（Nippon Becton Dickinson）股份有限公司製造）和 VTM（杉山根（SUGIYAMA-GEN）股份有限公司製造）等的病毒輸送/保存培養基。所述檢體樣本除了與培養基混合以外，亦可與磷酸緩衝食鹽水（以下有時稱為 PBS）等混合。另外，自受驗者採集的所述檢體樣本有時亦無需與培養基混合。

【0025】 所述檢體處理液是以氫氧化鈉為主成分的水溶液，以自冠狀病毒粒子中提取 RNA 為目的而添加。就有效率地進行後述的 RT-PCR 處理、提高檢測精度的觀點而言，檢體處理液除了包含氫氧化鈉以外，亦可包含二醇醚二胺四乙酸（以下有時稱為 EGTA）等金屬螯合劑及/或二硫蘇糖醇（以下有時稱為 DTT）等還原劑。

【0026】 檢體樣本、或所述檢體樣本與培養基的混合液（以下有時將兩者合稱為樣本液）與檢體處理液是將樣本液的體積設為

1.0，以體積比計檢體處理液成為 0.4 倍～2.3 倍的比例混合，獲得混合液。可認為藉由獲得以所述體積比混合的所述混合液，冠狀病毒的基因組 RNA 被適當提取，反轉錄反應和 PCR 適當地進行。關於樣本液與檢體處理液的混合比例，將樣本液的體積設為 1.0，檢體處理液以體積比計較佳為 0.5 倍以上，更佳為 0.8 倍～1.3 倍，進而佳為 0.9 倍～1.1 倍。

【0027】 樣本液和檢體處理液較佳為以所述混合比混合，但就可利用少量的檢體樣本簡便地應對、和抑制高價的酶類的使用量來降低檢測成本的觀點而言，後述的最終混合液的體積較佳為大致 25  $\mu\text{L}$  以下。於使最終混合液體積為 25  $\mu\text{L}$  以下的情況下，較佳為將樣本液的 3  $\mu\text{L}$ ～5  $\mu\text{L}$  和檢體處理液的 3  $\mu\text{L}$ ～5  $\mu\text{L}$  混合而獲得混合液。樣本液和檢體處理液均更佳為 5  $\mu\text{L}$ 。

【0028】 所獲得的所述混合液進行培育。培育溫度可適當設定。就檢測的迅速性和所獲得的結果的精度的觀點而言，培育溫度為常溫～95 $^{\circ}\text{C}$ ，較佳為 80 $^{\circ}\text{C}$ ～95 $^{\circ}\text{C}$ ，另外培育時間較佳為 3 分鐘～5 分鐘。再者，常溫通常是 25 $^{\circ}\text{C}$  左右。

【0029】 於經過所述培養步驟的混合液中，添加包含反應液、PCR 引物對、探針、反轉錄酶和 PCR 酶的主混合物，獲得最終混合液。反應液含有包含界面活性劑的 PCR 緩衝液。界面活性劑可選自陰離子界面活性劑、陽離子界面活性劑、兩性界面活性劑和非離子界面活性劑。

【0030】 作為陰離子界面活性劑，可列舉烷基硫酸鹽、烷基醚硫

酸鹽、多庫酯 ( docusate )、磺酸鹽含氟界面活性劑、烷基苯磺酸鹽、烷基芳基醚磷酸鹽、烷基醚磷酸鹽、烷基羧酸鹽、月桂醯基肌胺酸鈉、羧酸鹽含氟界面活性劑、膽酸鈉和去氧膽酸鈉等，但並不限定於該些。作為烷基硫酸鹽，較佳為十二烷基硫酸鈉 ( Sodium Dodecyl Sulfate , SDS ) 和十二烷基硫酸銨，更佳為十二烷基硫酸鈉。十二烷基硫酸鈉亦稱為月桂基硫酸鈉 ( Sodium Lauryl Sulfate , SLS )。作為陽離子界面活性劑，可列舉乙基三甲基溴化銨、十六烷基三甲基溴化銨和十四烷基三甲基溴化銨等，但並不限定於該些。作為兩性界面活性劑，例如可列舉甜菜鹼和烷基胺基脂肪酸鹽，但並不限定於該些。作為非離子界面活性劑，可列舉壬基苯氧基聚乙氧基乙醇 ( NP-40 )、聚氧乙烯脫水山梨糖醇單油酸酯 ( Tween ( 註冊商標 ) 80 )、聚氧乙烯 p-t-辛基苯酚 ( Triton X-100 ( 註冊商標 ) ) 等，但並不限定於該些。作為反應液中所含的界面活性劑，較佳為非離子界面活性劑，為了效率良好地提取病毒 RNA，濃度較佳為 0.05% ( w/v ) ~ 5% ( w/v )。

【0031】 就進行有效率的 RT-PCR 的觀點而言，所述 PCR 緩衝液較佳為包含 KCl、MgCl<sub>2</sub> 和去氧核糖核苷酸 5'-三磷酸 ( deoxyribonucleotide 5'-triphosphate ) ( 以下有時簡稱為 dNTP ) 混合物。再者，所謂 dNTP 混合物為以規定濃度預先混合去氧腺苷三磷酸 ( deoxyadenosine triphosphate ) ( 以下有時簡稱為 dATP )、去氧鳥苷三磷酸 ( deoxyguanosine triphosphate ) ( 以下有時簡稱為 dGTP )、去氧胞苷三磷酸 ( deoxycytidine triphosphate ) ( 以下有時

簡稱為 dCTP) 和去氧胸苷三磷酸 (deoxythymidine triphosphate) (以下有時簡稱為 dTTP) 而成的水溶液。另外，作為所述 PCR 緩衝液，並無特別限定，可列舉磷酸緩衝液、三羥甲基胺基甲烷 (tris) 緩衝液、硼酸緩衝液、HEPES 等良好 (Good) 緩衝液，就進行有效率的 RT-PCR 的觀點而言，較佳為三鹽酸緩衝液。關於 dNTP、MgCl<sub>2</sub>、KCl 和緩衝液的濃度，可根據後述的 RT-PCR 處理進行適當設定。例如，可例示 MgCl<sub>2</sub> 為 1.5 mM、KCl 為 35 mM、dNTP 分別為 200 μM 和 tris 為 10 mM 的濃度。

**【0032】** dNTP 混合物亦可包含於以氫氧化鈉為主成分的所述檢體處理液中，來代替包含於構成所述反應液的所述 PCR 緩衝液中。於所述情況下，所述主混合物不包含 dNTPs (dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP)，因此可抑制製備主混合物後可能發生的、引物彼此所引起的非特異性擴增反應。

**【0033】** 亦可於將選自 dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP 中的任意一種～三種 dNTP 加入所述 PCR 緩衝液中的基礎上，使剩餘的 dNTP 包含於所述檢體處理液中。較佳為於將選自 dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP 中的任意兩種 dNTP 加入所述 PCR 緩衝液中的基礎上，將剩餘的兩種 dNTP 添加至所述檢體處理液中。如此，即使於所述主混合物包含選自 dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP 中的任意一種～三種 dNTP 的情況下，亦可抑制製備主混合物後可能發生的、引物彼此所引起的非特異性擴增反應。

**【0034】** 為了防止來自先前的 PCR 的 PCR 產物的攜帶，亦可於

所述檢體處理液中包含將 dTTP 替代為去氧尿苷三磷酸 (deoxyuridine triphosphate, dUTP) 的 dNTP 混合物。由於摻入了去氧尿苷 (deoxyuridine, dU) 的擴增產物可藉由尿嘧啶-N-糖基化酶 (uracil-N-glycosylase, UNG) 處理進行分解，因此可於 PCR 之前藉由 UNG 將混入 PCR 反應液中的包含 dU 的擴增產物進行分解，防止因先前的 PCR 的擴增產物的影響所致的假陰性。

【0035】自受驗者採集的檢體樣本中，有時會混入吸附於 DNA 聚合酶上的源自生物體的負電荷物質（例如某種糖和色素等）和吸附於 DNA 上的源自生物體的正電荷物質（例如某種蛋白質等）。該些負電荷物質和正電荷物質會阻礙 PCR，因此難以進行準確的測定。為了應對所述 PCR 阻礙的問題，於所述 PCR 緩衝液中加入藉由與該些負電荷物質和正電荷物質結合來中和該些電荷物質所致的 PCR 阻礙作用的物質。作為所述 PCR 緩衝液，可使用基因擴增用試劑 Ampdirect（註冊商標，島津製作所）或 Ampdirect Plus（註冊商標，島津製作所）。就無需固相提取和液液提取等對核酸進行純化的處理，且亦無需廢棄液體，因此可利用更少量的樣本進行 PCR 等的觀點而言，較佳為使用所述基因擴增用試劑。

【0036】於本發明中，內部標準物質包括以下的（1）以及（2）中的至少任一種。（1）內部標準核酸和（2）內部標準核酸的藉由 PCR 的擴增所需的引物對和探針的組合。本發明中，內部標準核酸是於 PCR 中與用於檢測 SARS-CoV-2 的引物和探針不發生交叉反應的序列。所述內部標準核酸是具有與源自 SARS-CoV-2 RNA

的核酸不同的序列、且獨立於所述源自病毒的核酸而擴增的核酸，可為 DNA 和 RNA 中的任一者。所述內部標準核酸可添加至執行 RT-PCR 的主混合物中，亦可為源自檢體的核酸。另外，為了提高擴增效率，所述內部標準核酸的鏈長較佳為 300 bp 以下，更佳為 100 bp 以下。例如，於所述內部標準核酸為 DNA 的情況下，內部標準 DNA 為具有與於 PCR 中由 SARS-CoV-2 RNA 藉由反轉錄反應生成的 cDNA 不同的序列、且獨立於所述源自病毒的 cDNA 而擴增的 DNA。即，內部標準核酸可作為用以判斷 PCR 是否適當進行的指標來使用。於 PCR 中，內部標準核酸擴增的情況下，表示 PCR 適當進行，於未擴增的情況下，表示 PCR 本身並未進行。因此，可避免儘管檢體樣本中包含 SARS-CoV-2，但未偵測出 SARS-CoV-2 基因的錯誤判定（假陰性）。作為內部標準核酸的例子，只要不影響 SARS-CoV-2 基因的擴增即可，可為具有人工設計的序列的核酸，亦可為源自其他生物的序列，另外亦可為源自檢體的核酸。於向主混合物中添加所述內部標準核酸的情況下，用於利用 PCR 對不影響 SARS-CoV-2 基因的擴增的核酸進行擴增的正向引物和反向引物以及用於偵測該引物對所致的擴增產物的探針包含於本發明的套組中。作為所述內部標準核酸，於利用源自檢體的核酸的情況下，用於對不影響 SARS-CoV-2 基因的擴增的源自檢體的核酸進行擴增的正向引物和反向引物以及用於偵測該引物對所致的擴增產物的探針包含於本發明的套組中。

【0037】 於本發明中，擴增目標基因的 PCR 引物對(正向和反向)

可使用對源自 SARS-CoV-2 的 RNA 的核酸的序列特異性的引物，例如可使用對由 SARS-CoV-2 RNA 藉由反轉錄反應生成的 cDNA 的序列特異性的引物。作為引物，可例示表 1 中記載的引物對和表 2 中記載的引物對。所例示的 PCR 引物對的偵測對象是核蛋白衣 (Nucleocapsid, N) 基因的兩個區域。於國立傳染病研究所的方法中，例示了 N 組的 N\_Sarbeco\_F1 (正向、序列號 1) 和 N\_Sarbeco\_R1 (反向、序列號 2) 以及 N 組 No.2 的 NIID\_2019-nCOV\_N\_F2 (正向、序列號 3) 和 NIID\_2019-nCOV\_N\_R2 (反向、序列號 4)，另外，於美國疾病控制與預防中心的方法中，例示了 N1 正向引物 (Forward Primer) (序列號 5) 和 N1 反向引物 (Reverse Primer) (序列號 6)、以及 N2 正向引物 (Forward Primer) (序列號 7) 和 N2 反向引物 (Reverse Primer) (序列號 8)。擴增內部標準核酸的 PCR 引物對較佳為於嚴格的條件下與內部標準核酸雜交、且不與所述源自 SARS-CoV-2 的核酸雜交的 PCR 引物對。所述嚴格的條件是指於作為引物與模板核酸結合的步驟的 PCR 的退火中，模板核酸與引物的結合是特異性的條件。

【0038】 [表 1]

名稱	序列 (5'至 3')	Seq.ID No.
N 組		
(1) N_Sarbeco_F1	CACATTGGCACCCGCAATC	1
(2) N_Sarbeco_R1	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	2
(3) N_Sarbeco_P1	FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BHQ1	9

N 組 No.2		
( 4 ) NIID_2019-nCOV_N_F2	AAATTTTGGGGACCAGGAAC	3
( 5 ) NIID_2019-nCOV_N_R2	TGGCAGCTGTGTAGGTCAAC	4
( 6 ) NIID_2019-nCOV_N_P2	ROX-ATGTCGCGCATTGGCATGGA-BHQ2	10

## 【0039】 [表 2]

表 2		
名稱	序列 ( 5'至 3' )	Seq.ID No.
2019-nCOV_N1 ( N1 組 )		
N1 正向引物	GAC CCC AAA ATC AGC GAA AT	5
N1 反向引物	TCT GGT TAC TGC CAG TTG AAT CTG	6
N1 探針	ROX-ACC CCG CAT TAC GTT TGG TGG ACC-BHQ2	11
2019-nCOV_N2 ( N2 組 )		
N2 正向引物	TTA CAA ACA TTG GCC GCA AA	7
N2 反向引物	GCG CGA CAT TCC GAA GAA	8
N2 探針	FAM-ACA ATT TGC CCC CAG CGC TTC AG-BHQ1	12

【0040】 就檢測的迅速性的觀點而言，於後述的 RT-PCR 中，PCR 產物藉由實時測定而被監視。於進行該實時測定時，RT-PCR 和偵測該 RT-PCR 產物的步驟於同一容器內進行。PCR 產物的實時測定亦被稱為實時 PCR。實時 PCR 中，通常藉由螢光偵測 PCR 擴增產物。螢光偵測方法有使用嵌入性螢光色素的方法和使用螢光標記探針的方法。作為嵌入性螢光色素，例如可使用 SYBR (註冊商標) Green I。嵌入性螢光色素與藉由 PCR 合成的雙鏈 DNA 結合，藉由激發光的照射發出螢光。藉由測定所述螢光強度，可測定 PCR 擴增產物的生成量。

【0041】 為了對 PCR 擴增產物進行螢光偵測，本發明的新型冠狀

病毒的檢測方法中，添加一種或兩種以上的螢光色素所標記的探針。作為探針的例子，可列舉水解探針、分子信標（**Molecular Beacon**）等。水解探針是 5'末端被螢光色素修飾、且 3'末端被猝滅劑物質修飾的寡聚核苷酸。水解探針於 PCR 的退火步驟中與模板 DNA 特異性雜交，但由於探針上存在猝滅劑，因此即使照射激發光亦可抑制螢光的產生。於之後的延伸反應步驟中，例如當藉由 Taq DNA 聚合酶所具有的 5'→3'核酸外切酶活性，與模板 DNA 雜交的水解探針被分解時，螢光色素自探針游離，由猝滅劑所引起的螢光產生的抑制被解除。藉由測定所述螢光強度，可測定擴增產物的生成量。

【0042】 作為所述螢光色素的例子，作為探針上標記的螢光，可使用 FAM（6-羧基熒光素（6-carboxyfluorescein））、ROX（6-羧基-X-玫瑰紅（6-carboxy-X-rhodamine））、Cy3 和 Cy5（花青（Cyanine）系色素）、以及 HEX（4,7,2',4',5',7'-六氯-6-羧基熒光素（4,7,2',4',5',7'-hexachloro-6-carboxyfluorescein））等。作為所述猝滅劑的例子，可列舉 TAMRA（註冊商標）、黑洞猝滅劑（**Black Hole Quencher**）（BHQ，註冊商標）1、BHQ2、MGB-Eclipse（註冊商標）和 DABCYL 等。

【0043】 於本發明中，作為可用於偵測源自 SARS-CoV-2 RNA 的 cDNA 的 PCR 擴增產物的寡聚核苷酸螢光標記探針，可例示表 1 或表 2 中記載的探針。作為於嚴格的條件下與藉由表 1 中記載的 N 組和 N 組 No.2 的 PCR 引物對擴增的基因雜交的探針，分別示出

N\_Sarbeco\_P1 和 NIID\_2019-nCOV\_N\_P2。N\_Sarbeco\_P1 結合作為 5'末端的螢光色素的 FAM 和作為 3'末端的猝滅劑物質的 BHQ1。NIID\_2019-nCOV\_N\_P2 結合作為 5'末端的螢光色素的 ROX 和作為 3'末端的猝滅劑物質的 BHQ2。作為於嚴格的條件下與藉由表 2 中記載的 N1 組和 N2 組的 PCR 引物對擴增的基因雜交的探針，分別示出 N1 Probe 和 N2 Probe。N1 Probe 結合作為 5'末端的螢光色素的 ROX 和作為 3'末端的猝滅劑物質的 BHQ2。N2 Probe 結合作為 5'末端的螢光色素 FAM 和作為 3'末端的猝滅劑物質的 BHQ1。再者，關於所述探針的 5'末端的螢光色素，可將 FAM 置換為 ROX，另外亦可將 ROX 置換為 FAM。進而亦可使用其他螢光色素，但相對於 SARS-CoV-2 的擴增後的 N 基因的 2 個區域雜交的探針會結合相互不同的螢光色素。

**【0044】** 為了偵測內部標準核酸的 PCR 擴增產物，較佳為於嚴格的條件下與內部標準核酸雜交的寡聚核苷酸螢光標記探針，且為與和 SARS-CoV-2 偵測用螢光探針結合的螢光色素不同的螢光色素結合的探針。於使用表 1 中記載的兩種 SARS-CoV-2 偵測用螢光探針時，作為內部標準核酸偵測用螢光探針的螢光色素，可例示 Cy5，但並不限定於此。如上所述，於本發明中，用於偵測 PCR 擴增產物的寡聚核苷酸螢光標記探針藉由與各個探針結合的螢光色素相互不同，可分別偵測藉由多個引物對所產生的 PCR 擴增產物。

**【0045】** 所述反轉錄酶是以冠狀病毒的 RNA 為模板來生成單鏈

的互補 DNA (cDNA) 的酶。例如可使用源自禽成髓細胞增多症病毒 (Avian Myeloblastosis Virus, AMV)、莫羅尼小鼠白血病毒 (Moloney Murine Leukemia Virus, M-MLV) 和人類免疫缺陷病毒 (Human Immunodeficiency Virus, HIV) 等 RNA 病毒的 RNA 依賴性 DNA 聚合酶以及該些的突變體。反轉錄酶較佳為具有 200 U 以上的活性的酶。

**【0046】** 作為 PCR 酶的 DNA 聚合酶較佳為源自嗜熱性細菌的耐熱性 DNA 聚合酶，例如可列舉 Taq、Tth、KOD、Pfu 和該些的突變體。就避免 DNA 聚合酶所引起的非特異性擴增的觀點而言，亦可使用熱啟動 DNA 聚合酶。作為熱啟動 DNA 聚合酶，可列舉結合有抗 DNA 聚合酶抗體的 DNA 聚合酶或對酶活性部位進行了熱敏感性化學修飾而得的 DNA 聚合酶，較佳為結合有抗 DNA 聚合酶抗體的 DNA 聚合酶。PCR 酶較佳為具有 3 U 以上的活性的酶。

**【0047】** 將包含反應液、內部標準物質、PCR 引物對、探針、反轉錄酶和 PCR 酶的主混合物添加至培育後的所述混合液中，獲得最終混合液。於將最終混合液的體積設為大致 25  $\mu\text{L}$  以下時，主混合物較佳為於 14  $\mu\text{L}$  ~ 16  $\mu\text{L}$  的範圍內添加。

**【0048】** 所獲得的最終混合液進行 RT-PCR 處理。RT-PCR 中的反轉錄反應的反應溫度條件和 PCR 條件 (溫度、時間和循環數) 可適當設定。另外，RT-PCR 利用市售的 RT-PCR 用反應管實施。

**【0049】** 藉由使用經標記的所述螢光標記探針偵測藉由所述 RT-PCR 處理擴增後的 RNA，可藉由實時測定實時地判定有無

SARS-CoV-2，進行新型冠狀病毒的迅速檢測。

**【0050】** PCR 產物的實時測定可藉由使用與所使用的螢光色素對應的螢光濾光片來監測 PCR 產物的擴增曲線，實時地確認 PCR 的進展狀況。於與 PCR 循環數相應地螢光強度增加時，判定為檢體樣本中的 SARS-CoV-2 的存在為陽性，另一方面，於 PCR 中螢光強度並未增加時判定為陰性。此時，當將內部標準物質添加至所述主混合物時，若與 PCR 循環數相應地所述內部標準核酸所對應的螢光強度增加，則容易排除假陰性的可能性。作為所述內部標準核酸的例子，只要不影響 SARS-CoV-2 的擴增即可，可具有源自其他生物的序列、或者人工設計的序列，亦可為源自檢體的序列。

**【0051】** 為了有效率地進行所述方法，本發明進而提供一種具有包含氫氧化鈉的檢體處理液、反應液、內部標準物質、PCR 引物對、探針、反轉錄酶和 PCR 酶的新型冠狀病毒的檢測用套組。所述檢測用套組於採集極少量的檢體，並按照以上所述的各步驟進行新型冠狀病毒的檢測時，能夠有效率地進行檢測。檢體處理液、反應液、內部標準物質、PCR 引物對、探針、反轉錄酶和 PCR 酶如上所述。

**【0052】** 所述 PCR 引物對較佳為包含對源自 SARS-CoV-2 RNA 的核酸進行擴增的一個以上的 PCR 引物對和對內部標準核酸進行擴增的 PCR 引物對。當包含兩個以上的用於擴增 SARS-CoV-2 基因的 PCR 引物對時，為了提高病毒偵測精度，較佳為選擇與各不

同的 DNA 序列雜交的引物對。

【0053】 提供一種套組，其中所述寡聚核苷酸螢光標記探針藉由與各個探針結合的螢光色素相互不同，可個別地測定 PCR 擴增產物。

【0054】 所述檢測用套組可將檢體處理液、反應液、內部標準物質、PCR 引物對、探針、反轉錄酶和 PCR 酶收納於分別不同的容器中，但按照本發明的新型冠狀病毒的檢測方法的程序，將各個以適當、規定的量預先混合的方法可避免檢測時混合的複雜性，故較佳。

【0055】 例如，亦可將檢體處理液收納於一個容器中，將反應液、內部標準物質、PCR 引物對、探針、反轉錄酶和 PCR 酶分別以規定量混合並收納於一個容器中。另外，亦可將反應液、內部標準物質、PCR 引物對和探針分別以規定量混合於一個容器中，將反轉錄酶和 PCR 酶分別以規定量混合於另一容器中。

【0056】 就檢測時混合的複雜性和保存穩定性的觀點而言，較佳為將該些分配至兩個～四個容器中，例如可將檢體處理液、反應液和內部標準物質、以規定量混合的 PCR 引物對和探針、以及以規定量混合的反轉錄酶和 PCR 酶分別獨立地收納於單獨的容器中。

【0057】 藉由使用本發明的新型冠狀病毒的檢測方法和檢測用套組，可於防止假陰性的發生的同時，迅速且簡便地檢測有無感染 SARS-CoV-2。RT-PCR 檢測與免疫層析相比偵測靈敏度高，因

此於在高熱和咳嗽等方面無症狀但為 SARS-CoV-2 感染者的情況下，亦可提供一種可短時間內精度良好地判定的冠狀病毒的檢測。

[實施例]

【0058】 接下來列舉實施例來對本發明進行詳細說明，但本發明的範圍並不受該些限定。

【0059】 [實施例 1]

[混合液的調整]

使用合成新型冠狀病毒的基因組 RNA 的一部分的人工合成 RNA (10,000 拷貝) 進行以下的 RT-PCR。於 PCR 管中，向包含 UTM 培養基 (日本貝克頓-迪金森 (Nippon Becton Dickinson) 股份有限公司製造) 以及所述人工合成 RNA 和咽拭子的樣本液的 1  $\mu\text{L}$ 、3  $\mu\text{L}$ 、5  $\mu\text{L}$  或 7  $\mu\text{L}$  中分別添加包含氫氧化鈉的檢體處理液 9  $\mu\text{L}$ 、7  $\mu\text{L}$ 、5  $\mu\text{L}$  或 3  $\mu\text{L}$ ，將合計量設為 10  $\mu\text{L}$ 。

【0060】 將上述所獲得的混合液利用旋渦混合器進行混合，利用恆溫裝置於 90°C 下培育 5 分鐘後，進行冰浴冷卻。

【0061】 將試劑 A 的 6.5  $\mu\text{L}$ 、試劑 B 的 6.5  $\mu\text{L}$  和試劑 C 的 2  $\mu\text{L}$  利用旋渦混合器進行混合，製成主混合物。試劑 A、試劑 B 和試劑 C 的組成如下所述。

試劑 A：含有界面活性劑和 PCR 緩衝液的反應液

試劑 B：PCR 引物對和探針

試劑 C：250 U 的反轉錄酶和 3.125 U 的 PCR 酶

【0062】 向裝有所述培育後的混合液 10  $\mu\text{L}$  的 PCR 管中添加所述

主混合物 15  $\mu\text{L}$ 。其後，利用旋渦混合器進行混合，將 PCR 管設置於實時 PCR 裝置，立即開始 PCR。

【0063】 實時 RT-PCR 的設定條件如下所述。

#### RT-PCR 設定條件

於 50°C 下保持 10 分鐘後，於 95°C 下保持 1 分鐘。其後，將於 95°C 下保持 5 秒後降溫至 60°C 並保持 30 秒的循環實施 45 個循環。

【0064】 相對於循環數繪製實時 RT-PCR 的擴增曲線而得的結果為圖 1。培養基的量為 3  $\mu\text{L}$  和 5  $\mu\text{L}$  時，與不添加培養基的情況相比，擴增曲線的上升幾乎看不到差別。

【0065】 根據所述結果，於 SARS-CoV-2 的檢測中，有時會處理包含培養基的樣本，但認為於將包含培養基的樣本直接添加至反應液中時，會對 PCR 產生影響。本發明的新型冠狀病毒的檢測方法排除所述影響，可迅速地獲得有無新型冠狀病毒的結果。

【0066】 [實施例 2]

〔病毒基因偵測中的假陰性的確認〕

自多個受驗者取得咽拭子作為檢體樣本，針對各檢體樣本，混合 UTM 培養基來製備多個樣本液。對於各樣本液 5  $\mu\text{L}$ ，添加包含氫氧化鈉的檢體處理液 5  $\mu\text{L}$ ，利用旋渦混合器進行混合。將所獲得的混合液利用恆溫裝置於 90°C 下培育 5 分鐘後，進行冰浴冷卻。

【0067】 將試劑 A 的 6.5  $\mu\text{L}$ 、試劑 B 的 6.5  $\mu\text{L}$  和試劑 C 的 2  $\mu\text{L}$

利用旋渦混合器進行混合，製成主混合物。試劑 A、試劑 B 以及試劑 C 的組成如下所述。

試劑 A：含有內部標準 DNA（76 bp）、界面活性劑和 PCR 緩衝液的反應液

試劑 B：PCR 引物對和探針

試劑 C：250 U 的反轉錄酶和 3.125 U 的 PCR 酶

**【0068】** 向裝有所述培育後的混合液 10  $\mu$ L 的 PCR 管中添加作為 15  $\mu$ L 所述主混合物的包含基因擴增區域不同的兩種 PCR 引物對和探針（表 2 中記載的 N1 組和 N2 組）以及內部標準 DNA 偵測用的 PCR 引物對和 Cy5 標記探針的主混合物。其後，利用旋渦混合器進行混合，將 PCR 管設置於實時 PCR 裝置後立即開始 PCR。RT-PCR 於與實施例 1 相同的條件下進行。

**【0069】** 於圖 2A 中示出如上所述準備的多種樣本液中，與不伴隨樣本液中的 PCR 反應阻礙物質所致的 PCR 反應阻礙的樣本液相關的實時 RT-PCR 的擴增曲線。未發現 SARS-CoV-2 基因的 N1 區域和 N2 區域的擴增，但觀察到內部標準 DNA（IC）的擴增曲線的上升，因此表示 PCR 適當地進行。其結果判定為樣本液中不含病毒基因的真陰性。於圖 2B 中示出所述多種樣本液中，與伴隨樣本液中的 PCR 阻礙物質所致的 PCR 反應阻礙的樣本液相關的實時 RT-PCR 的擴增曲線。由於未發現內部標準 DNA（IC）的擴增曲線的上升，因此無法識別是陰性（偵測界限以下）還是假陰性。於所述情況下，藉由進行再分析，可防止假陰性的發生。

**【0070】 [實施例 3]**

[ 判定為 SARS-CoV-2 陽性或陰性的 PCR 擴增曲線 ]

使用添加或未添加 SARS-CoV-2 基因的樣本液，研究實時 RT-PCR 中判定為病毒陽性或陰性時的擴增曲線。向包含合成 SARS-CoV-2 基因的基因組 RNA 的一部分的人工合成 RNA( 10,000 份 ) 的樣本液 5  $\mu$ L，添加包含氫氧化鈉的檢體處理液 5  $\mu$ L，利用旋渦混合器進行混合。將所獲得的混合液利用恆溫裝置於 90°C 下培育 5 分鐘後，進行冰浴冷卻。

**【0071】** 將試劑 A 的 6.5  $\mu$ L、試劑 B 的 6.5  $\mu$ L 和試劑 C 的 2  $\mu$ L 利用旋渦混合器進行混合，製成主混合物。試劑 A、試劑 B 和試劑 C 的組成如下所述。

試劑 A：含有內部標準 DNA ( 76 bp )、界面活性劑和 PCR 緩衝液的反應液

試劑 B：PCR 引物對和探針

試劑 C：250 U 的反轉錄酶和 3.125 U 的 PCR 酶

**【0072】** 於裝有所述培養後的混合液 10  $\mu$ L 的 PCR 管中，添加作為 15  $\mu$ L 所述主混合物的包含基因擴增區域不同的兩種 PCR 引物對和探針 ( 表 1 中記載的 N1 組和 N2 組 ) 以及內部標準 DNA 偵測用的 PCR 引物對和 Cy5 標記探針的主混合物。其後，利用旋渦混合器進行混合，將 PCR 管設置於實時 PCR 裝置後立即開始 PCR。RT-PCR 於與實施例 1 相同的條件下進行。測定中使用 CFX96 Touch Deep Well 實時 PCR 解析系統 ( 伯樂 ( Bio-Rad ) 公司 )，Cq

值（擴增曲線與臨界值線（Threshold Line）交叉的循環數）解析設定如下所述。

Cq 確定模式（Cq Determination Mode）：單臨界值（Single Threshold）

基線設置（Baseline Setting）：基線消除曲線擬合（Baseline Subtracted Curve Fit）

此處，將 Cq 值  $\leq 40$  判定為陽性。

【0073】 於圖 3A 中示出針對包含 SARS-CoV-2 基因的樣本液進行 RT-PCR 時的擴增曲線。於所述情況下，觀察到 SARS-CoV-2 基因的 N1 區域和 N2 區域以及內部標準 DNA (IC) 的擴增曲線的上升，因此表示 PCR 適當地進行。其結果，判定為樣本液中含有病毒基因的陽性。

【0074】 於圖 3B 中示出針對不含 SARS-CoV-2 基因的試料液進行 RT-PCR 時的擴增曲線。於所述情況下，未發現 SARS-CoV-2 基因的 N1 區域和 N2 區域的擴增，但觀察到內部標準 DNA (IC) 的擴增曲線的上升，因此表示 PCR 適當地進行。其結果，判定為樣本液中不含病毒基因的陰性（檢出界限以下）。

【0075】 [實施例 4]

[ SARS-CoV-2 感染的判定中的本發明的方法與非專利文獻「病原體偵測手冊 2019-nCoV」中記載的方法的比較 (1) ]

對與 UTM 培養基混合的鼻拭子和未與培養基混合的咳痰的臨床檢體 25 例，利用本發明的方法和非專利文獻「病原體偵測手

冊 2019-nCoV」中記載的方法進行測定，將判定結果加以比較。基於本發明的方法的測定於與實施例 3 相同的條件下進行。再者，dNTP 混合物預先添加至包含氫氧化鈉的檢體處理液中。

【0076】 於本發明的方法中，判定  $C_q$  值  $\leq 40$  為陽性，對病毒基因的 N1 區域及/或 N2 區域進行偵測。其結果，本發明的方法中，陽性為 10 例並且陰性為 15 例，所有例子與《病原體檢測手冊 2019-nCoV》中記載的方法一致（圖 4）。如此，表示本發明的方法可提供可靠性高的檢測結果。

【0077】 [實施例 5]

[ SARS-CoV-2 感染的判定中的本發明的方法與非專利文獻「病原體偵測手冊 2019-nCoV」中記載的方法的比較（2）]

對未與培養基混合的臨床檢體（唾液）22 例，利用本發明的方法和非專利文獻「病原體偵測手冊 2019-nCoV」中記載的方法進行測定，將檢測結果加以比較。基於本發明的方法的測定於與實施例 3 相同的條件下進行。再者，dNTP 混合物預先添加至包含氫氧化鈉的檢體處理液中。

【0078】 於本發明的方法中，判定  $C_q$  值  $\leq 40$  為陽性，對病毒基因的 N1 區域及/或 N2 區域進行偵測。其結果，於兩種方法中，陽性一致率為 93%（13/14）和陰性一致率為 100%（8/8），總體一致率為 95%（21/22）（圖 5）。如此，表示本發明的方法即使於將未與培養基混合的唾液作為檢體樣本的情況下亦可提供可靠性高的檢測結果。

【0079】 實施例 2 和實施例 3 中示出了向主混合物中添加內部標準 DNA 作為內部標準核酸的例子，但可代替該內部標準 DNA，而使用源自檢體樣本且不影響 SARS-CoV-2 基因的擴增的核酸序列。即，於實施例 2 和實施例 3 中，不向試劑 A 中添加內部標準 DNA，而於試劑 B 中添加用於不影響 SARS-CoV-2 基因擴增的源自檢體樣本的核酸序列的擴增的引物對和探針，藉此使用源自檢體樣本的核酸序列作為內部標準，可獲得與實施例 2 和實施例 3 相同的效果。

【0080】 dNTPs 可藉由添加至包含 PCR 緩衝液的反應液(所述試劑 A)中而包含於所述主混合物中，但於實施例 4 和實施例 5 中，於向檢體樣本添加的所述檢體處理液中添加 dNTP。藉由配置所述 dNTP，可抑制於製備主混合物後，將所述主混合物添加至包含檢體樣本的所述檢體處理液中，開始 SARS-CoV-2 基因的擴增之前的期間內可能發生的、引物彼此所引起的非特異性擴增反應。dNTPs 於藉由將檢體樣本和檢體處理液的混合物於 90°C 下加熱處理 5 分鐘而進行的病毒 RNA 提取操作中幾乎不分解。

【0081】 [實施方式]

本領域技術人員理解到以上所述例示的實施方式為以下實施方式的具體例。

【0082】 [1]一種新型冠狀病毒的檢測方法，具有：

將自受驗者採集的檢體樣本或所述檢體樣本與培養基的混合液、以及以氫氧化鈉為主成分的檢體處理液混合，獲得混合液的

步驟；

將所述混合液進行培育的步驟；

向所述培育後的混合液中添加包含反應液、內部標準物質、引物、探針、反轉錄酶和 PCR 酶的主混合物，獲得最終混合液的步驟；

對所述最終混合液進行反轉錄反應處理的步驟；和

利用所述探針偵測將藉由所述反轉錄反應處理生成的 DNA 作為模板並藉由 PCR 擴增後的 DNA 的步驟。

**【0083】** 根據所述[1]的發明，可提供一種迅速且廉價地檢測有無感染 SARS-CoV-2 的方法。另外，RT-PCR 檢測與免疫層析相比偵測靈敏度高，因此於已感染但未出現高熱和咳嗽等症狀的情況下亦可提供一種時間短且靈敏度高的冠狀病毒的檢測。

**【0084】** [2]如所述[1]所述的新型冠狀病毒的檢測方法，其中，所述主混合物的量為 14  $\mu$ L 至 16  $\mu$ L。

**【0085】** [3]如所述[1]或[2]所述的新型冠狀病毒的檢測方法，其中，所述最終混合液為 24  $\mu$ L 至 26  $\mu$ L。

**【0086】** [4]如所述[1]至[3]中任一項所述的新型冠狀病毒的檢測方法，其中，於常溫至 95°C 下進行 3 分鐘至 5 分鐘的所述培育。

**【0087】** [5]如所述[1]至[4]中任一項所述的新型冠狀病毒的檢測方法，其中，所述檢體處理液更包含二醇醚二胺四乙酸以及二硫蘇糖醇中的至少任一者。

**【0088】** [6]如所述[1]至[5]中任一項所述的新型冠狀病毒的檢測

方法，其中，所述檢體處理液或所述反應液包含 dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP。

【0089】 [7]如所述[1]至[5]中任一項所述的新型冠狀病毒的檢測方法，其中，所述檢體處理液包含 dATP、dGTP、dCTP 和 dUTP。

【0090】 [8]一種新型冠狀病毒的檢測用套組，具有以氫氧化鈉為主成分的檢體處理液、反應液、內部標準物質、引物、探針、反轉錄酶和 PCR 酶。

【0091】 [9]如所述[8]所述的新型冠狀病毒的檢測用套組，包含 2 個～四個容器。

【0092】 [10]如所述[9]所述的新型冠狀病毒的檢測用套組，其中，將所述檢體處理液、所述反應液和所述內部標準物質、所述引物和所述探針、以及所述反轉錄酶和所述 PCR 酶分別獨立地收納於四個容器中。

【0093】 [11]如[8]至[10]中任一項所述的新型冠狀病毒的檢測用套組，其中，所述檢體處理液或所述反應液包含 dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP。

【0094】 [12]如[8]至[10]中任一項所述的新型冠狀病毒的檢測用套組，其中，所述檢體處理液包含 dATP、dGTP、dCTP 和 dUTP。

【0095】 根據所述[8]至[12]的發明，可迅速地進行檢測有無感染 SARS-CoV-2 的方法。另外，RT-PCR 檢測與免疫層析相比偵測靈敏度高，因此於已感染但未出現高熱和咳嗽等症狀的情況下亦可進行時間短且高靈敏度的冠狀病毒的檢測。

【符號說明】

【0096】

無

## 【序列表】

<110> 島津製作所股份有限公司(SHIMADZU CORPORATION)

<120> 新型冠狀病毒的檢測方法和檢測試劑

<150> PCT/JP2020/014415

<151> 2020-03-27

<150> PCT/JP2020/037492

<151> 2020-10-02

<160> 12

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> Primer

<223> Synthetic oligonucleotide to act as a PCR forward primer to amplify N1 region fragment.

<400> 1

cacattggca cccgcaatc

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> Primer

<223> Synthetic oligonucleotide to act as a PCR reverse primer to amplify N1 region fragment.

<400> 2

gaggaacgag aagaggcttg

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> Primer

<223> Synthetic oligonucleotide to act as a PCR forward primer to amplify N2 region fragment.

<400> 3

aaatTTTggg gaccaggaac

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> Primer

<223> Synthetic oligonucleotide to act as a PCR reverse primer to amplify N2 region fragment.

<400> 4

tggcagctgt gtaggtcaac

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> Primer

<223> Synthetic oligonucleotide to act as a PCR forward primer to amplify N1 region fragment.

<400> 5

gaccccaaaa tcagcgaat

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> Primer

<223> Synthetic oligonucleotide to act as a PCR reverse primer to amplify N1 region fragment.

<400> 6

tctggttact gccagttgaa tctg

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> Primer

<223> Synthetic oligonucleotide to act as a PCR forward primer to amplify N2 region fragment.

<400> 7

ttacaaacat tggccgcaaa

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> Primer

<223> Synthetic oligonucleotide to act as a PCR reverse primer to amplify N2 region fragment.

# I874625

<400> 8

gcgcgacatt ccgaagaa

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> Probe

<223> Synthetic oligonucleotide to act as a probe to detect amplified N1 region fragment.

<400> 9

acttctctcaa ggaacaacat tgcca

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> Probe

<223> Synthetic oligonucleotide to act as a probe to detect amplified N2 region fragment.

<400> 10

atgtcgcgca ttggcatgga

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> Probe

<223> Synthetic oligonucleotide to act as a probe to detect amplified N1 region fragment.

<400> 11

accccgatt acgtttggtg gacc

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> Probe

<223> Synthetic oligonucleotide to act as a probe to detect amplified N1 region fragment.

<400> 12

acaatttgcc cccagcgctt cag

## 【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種新型冠狀病毒的檢測方法，具有：

將自受驗者採集的檢體樣本及/或所述檢體樣本與培養基的混合液、以及以氫氧化鈉為主成分的檢體處理液混合，獲得混合液的步驟；

將所述混合液進行培育的步驟；

向所述培育後的混合液中添加包含反應液、內部標準物質、引物、探針、反轉錄酶和聚合酶鏈反應酶的主混合物，獲得最終混合液的步驟；

對所述最終混合液進行反轉錄反應處理的步驟；和

利用所述探針偵測將藉由所述反轉錄反應處理生成的 DNA 作為模板並藉由聚合酶鏈反應擴增後的 DNA 的步驟，

其中所述檢體處理液包含去氧腺苷三磷酸、去氧鳥苷三磷酸、去氧胞苷三磷酸和去氧尿苷三磷酸，代替所述反應液而於所述檢體處理液中添加 dNTPs。

【請求項2】 如請求項 1 所述的新型冠狀病毒的檢測方法，其中，所述主混合物的量為 14  $\mu\text{L}$  至 16  $\mu\text{L}$ 。

【請求項3】 如請求項 1 或請求項 2 所述的新型冠狀病毒的檢測方法，其中，所述最終混合液為 24  $\mu\text{L}$  至 26  $\mu\text{L}$ 。

【請求項4】 如請求項 1 至請求項 3 中任一項所述的新型冠狀病毒的檢測方法，其中，於常溫至 95°C 下進行 3 分鐘至 5 分鐘的所述培育。

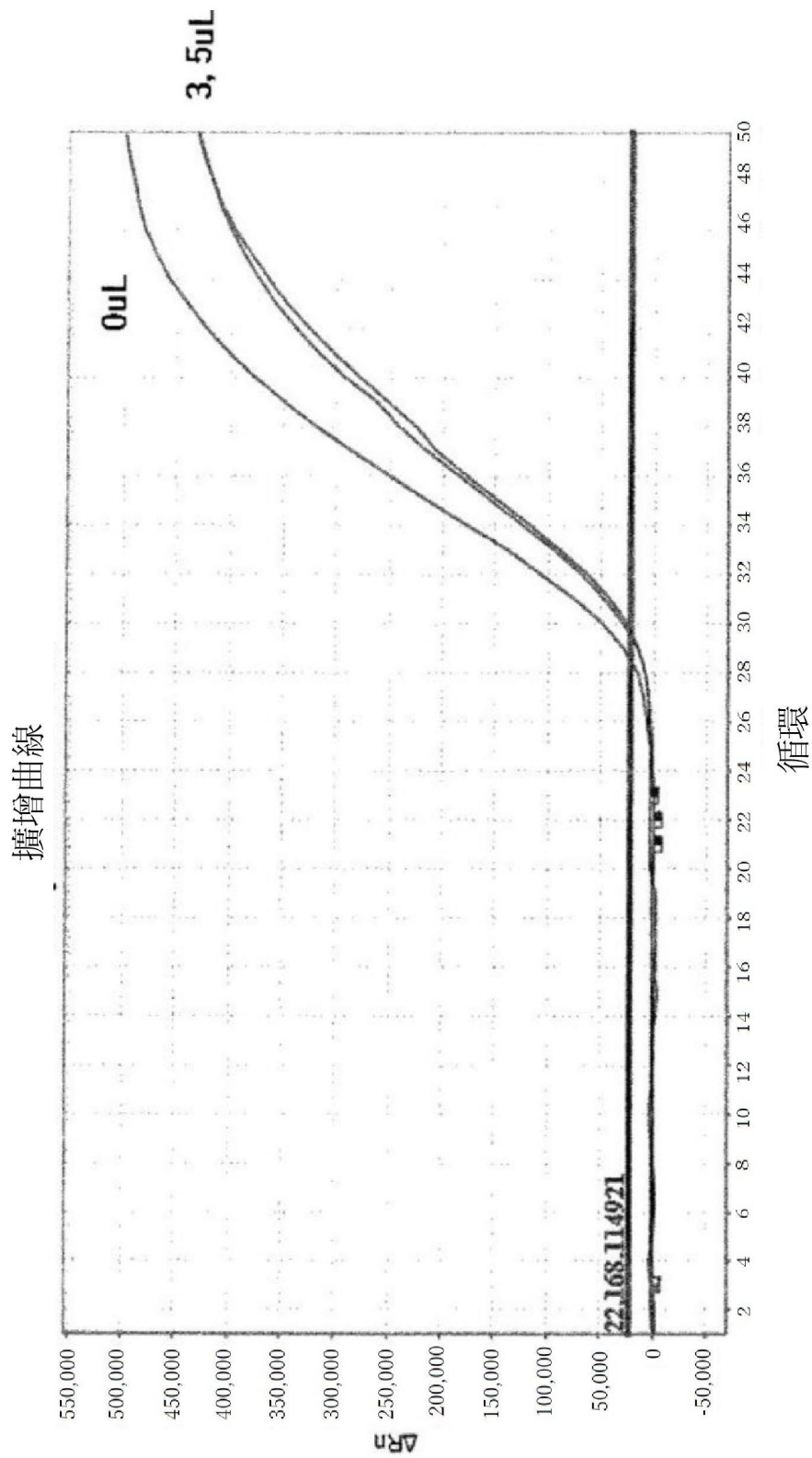
【請求項5】 如請求項 1 至請求項 4 中任一項所述的新型冠狀病毒的檢測方法，其中，所述檢體處理液更包含二醇醚二胺四乙酸以及二硫蘇糖醇中的至少任一者。

【請求項6】 一種新型冠狀病毒的檢測用套組，具有以氫氧化鈉為主成分的檢體處理液、反應液、內部標準物質、引物、探針、反轉錄酶和聚合酶鏈反應酶，其中所述檢體處理液包含去氧腺苷三磷酸、去氧鳥苷三磷酸、去氧胞苷三磷酸和去氧尿苷三磷酸，代替所述反應液而於所述檢體處理液中添加 dNTPs。

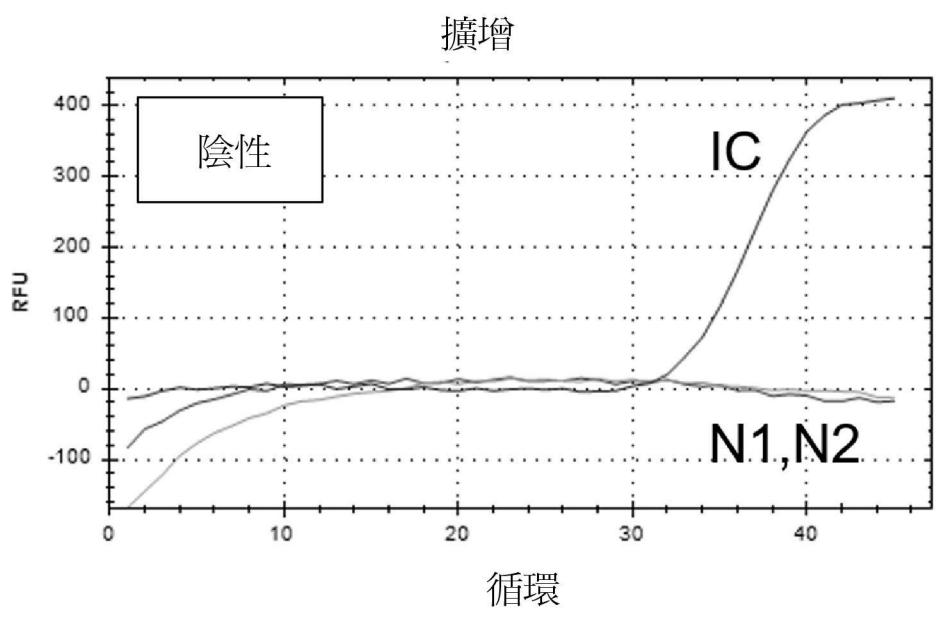
【請求項7】 如請求項 6 所述的新型冠狀病毒的檢測用套組，包含 2 個～4 個容器。

【請求項8】 如請求項 7 所述的新型冠狀病毒的檢測用套組，其中，將所述檢體處理液、所述反應液和所述內部標準物質、所述引物和所述探針、以及所述反轉錄酶和所述聚合酶鏈反應酶分別獨立地收納於 4 個容器中。

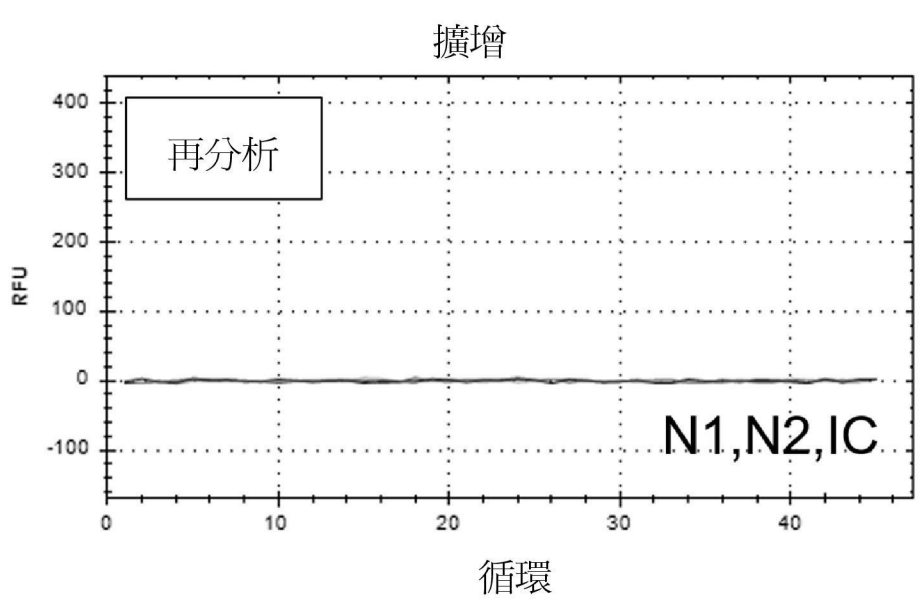
【發明圖式】



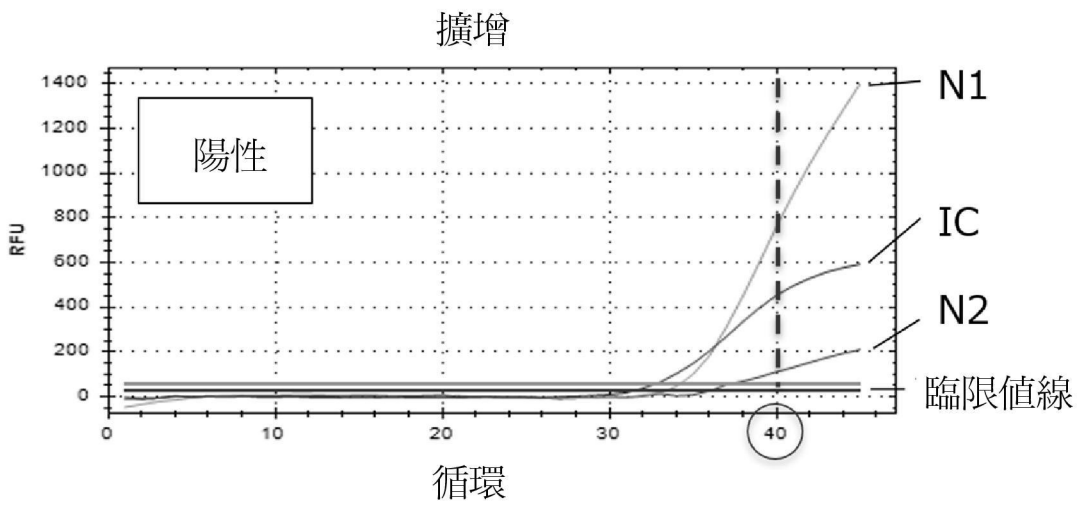
【圖1】



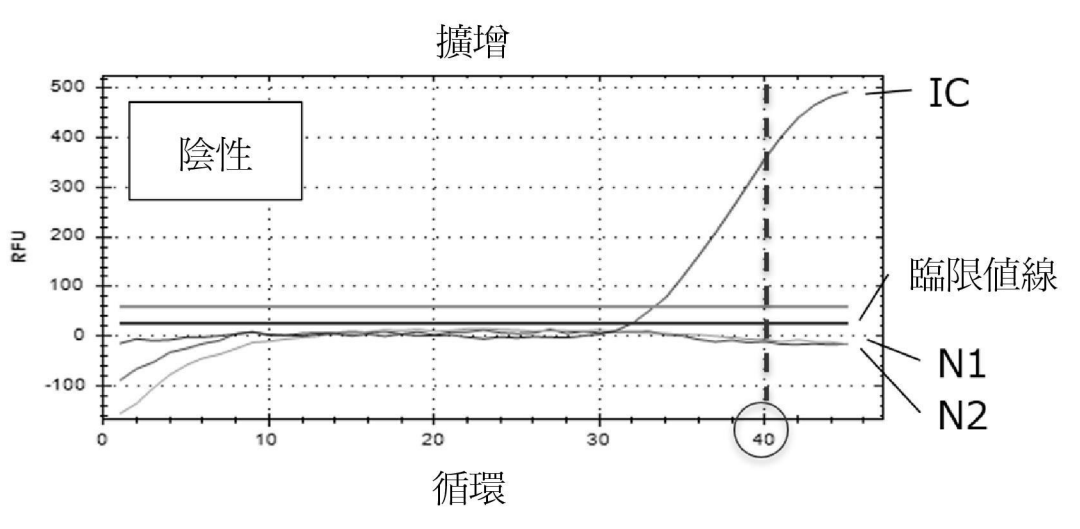
【圖2A】



【圖2B】



【圖3A】



【圖3B】

		「病原體偵測手冊2019-nCoV」記載法		合計
		陽性	陰性	
本品	陽性	10	0	10
	陰性	0	15	15
合計		10	15	25

【圖4】

		國立傳染病研究所的檢測法		合計
		陽性	陰性	
本品	陽性	13	0	13
	陰性	1	8	9
合計		14	8	22

【圖5】