

東海大學環境科學與工程研究所

碩士論文

The seal of Donghai University is a circular emblem with a scalloped outer edge. It features the university's name in Chinese characters '東海大學' at the top and 'DONGHAI UNIVERSITY' in English around the bottom. The year '1955' is inscribed at the very bottom. In the center, there are three interlocking rings and a cross symbol.

校園廢水及回收水中病毒族群及大小分析
Surveillance of viruses diversity and abundance
in MBR-treated reclaimed water

研究生：林至榮 Chih-Rong, Lin 撰

指導教授：郭獻文 Hsion- Wen, Kuo 博士

中華民國一零五年

東海大學碩士班研究生
論文指導教授推薦書

環境科學與工程學系林至榮君所提之論文

題目：校園廢水及回收水中病毒族群及大小分析

Surveillance of viruses diversity and abundance in
MBR-treated reclaimed water

係由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授： 鄧獻文 (簽章)

105年2月15日

東海大學環境科學系碩士班

論文口試委員審定書

環境科學與工程學系碩士班林至榮君所提之論文

題目：校園廢水及回收水中病毒族群及大小分析

Surveillance of viruses diversity and abundance in MBR-treated reclaimed water

經本委員會審議，認為符合碩士資格標準。

論文口試委員召集人 林至榮 (簽章)

委員 吳哲宏

鄧獻文

中華民國 105 年 1 月 12 日

致謝

當我在寫致謝的時候，也就是我將要完成碩士生涯的最後階段了，此刻我才感受這些訓練以及付出都是值得的，這場漫長的學習歷程終於有結束的一天。回顧三年之間所花費的青春光陰使我心中的感慨良多，在求知及求學的歷練中很快的消逝我過去稚氣及衝動，才發現在寫這篇論文的一年當中身心也經歷了一場巨大的考驗，為了文章結構吃盡了苦頭，對問題提出合理的參考性觀點時也遇到思路的瓶頸，同時在這個過程了發現了自己知識的不足，欠缺對理論及文字的駕馭力不足。不過對最終論文還是成型，深感欣慰，這其中真正投入了自己的心血和付出。只是自己所擁有的知識素養只能支撐自己寫出這種水平和高度，希望在今後的再繼續努力，期望未來能有更大的提升及更深的見解來使自己的觀點得以完善。

感謝指導教授郭獻文博士不厭其煩的教導，已完全信任的態度讓我們追尋想要的研究結果，不濟一切的想要突破實驗的困境，建立安全的實驗設備讓所有的使用者得到防護，而在統整資料與寫作的的能力上指點出正確的觀念，且好還要更好，將來肯定受用無窮。這項研究歷程能夠持續進行的動力來至於身邊的所有人，感謝黃啟裕老師提供閱讀、學習及實驗的空間，感謝在佳崑及良誌學長的帶領之下進入分生的領域，了解實驗室的運作及管理的重要性，教導有關生物方面的技術與資訊，感謝一起在研究室中度過這些日子的每一個人阿祥、宥鈞、皓瑋、昆瀚、浩銘、文翰、德偉家齊、，，能看到充滿學習熱情的新進成員。

中文摘要

民生廢水中含有已感染者所釋放的致病病毒，雖然透過汙染控制技術可以大幅降低汙染物濃度，但是回收水依然可以發現致病病毒的存在，而目前台灣的回收水供應於景觀澆灌使用，因目前的汙染控制技術還未能掌握水中致病病毒的動態，使得回收水的使用範圍還屬於非飲用的階段而未能突破，然而使用回收水是現代補足缺水景況的一大趨勢，能夠指出廢水及回收水中的衛生問題有助於提升使用者的安全。有鑑於水質的細菌指標不足以代表實際微生物汙染物的族群，而根據文獻報告指出腸道病毒(例如人類腺病毒, HAdV)更適合代表微生物汙染的指標，使得本研究想探究腸道病毒在回收水中族群的大小。本研究目的是利用宏基因定序及即時定量 PCR 調查校園廢水(CWW)及其經薄膜生物反應器(MBR)處理的回收水(RCW)中之病毒族群組成及大小，結果顯示宏基因定序產生的資料量為 1.87×10^9 - 3.19×10^9 raw reads，接著透過 *de novo* assembly 組裝成 contigs 後比對 NCBI GenBank 物種基因庫，可以比對到之 Hits 有 10.8-12.7% contigs(可以比對到已知的物種 Hits)以及未知的 contigs 序列(No hits)約 90%，CWW 和 RCW 中病毒族群共有 199 species 病毒家族，其中噬菌體(Phage)是最主要的群體為 75.48-79.71%，包括 Myoviridae、Siphoviridae、Podoviridae、Inoviridae、unclassified phage 等病毒科；總病毒族群的人類病毒(human virus)為 2.4-3.2%，包括反轉錄病毒(RtV)、諾羅病毒(NoV)及 C 型肝炎病毒(HCV)會造成人類的皮膚、呼吸系統及腸胃炎等疾病。在病毒族群定量方面，以即時定量 PCR 偵測四個月份的腸道病毒的濃度，發現 HAdV、HEV 及 NoV-gii 均在 CWW 和 RCW 樣品中測定中分別出現濃度 6.80×10^3 - 9.75×10^6 、 8.49×10^4 - 6.51×10^6 及 1.84×10^4 - 1.37×10^7 virus particles/L，一般而言傳染病有季節性的特徵例如腸道病毒在夏季為流行感染的季節，而在本研究結果中並未發現腸道病毒有季節性的特徵，而本研究結果證實 CWW 及 RCW 中病毒的族群及大小之複雜且不具週期性，而為了水質的衛生安全需要監測多種的腸道病毒的項目，制定多種腸道病毒共通的分析方法會使水中致病病毒的管理更佳安全。

關鍵字：宏基因定序、回收水、校園廢水、腸道病毒、水中病毒濃度、高通量定序、即時定量聚合酶鏈鎖反應。



Abstract

Pathogenic viruses are a group of microbial contaminants frequently occur in municipal wastewaters or even in reclaimed waters. Although practice of pollution control techniques could reduce the concentration of these microbial pollutants, hygiene and safety problems about discharge or reuse treated wastewater are still being questioned. Reclaimed water is most commonly used for nonpotable (not for drinking) purposes, such as agriculture, landscape, public parks, and golf course irrigation. Given that bacterial indicators are insufficient to represent actual microbial contamination conditions, some human enteric viruses (e.g., human adenovirus, HAdV) have been considered as more suitable pathogenic indicators. The objectives of this study were to investigate viral diversity based on metagenomic sequencing and to assess viral concentration using quantitative real-time PCR assays for a campus wastewater (CWW) and its MBR-treated reclaimed water (RCW) samples. Results showed that more than 1.87×10^9 - 3.19×10^9 raw reads were obtained for each sample library which were used for further contig assembly by using the CLC Genomics Workbench. Majority (96.4%) of the assembled contigs had a size larger than 300 nt. About 10.76-12.65% of the assembled contigs were hit with sequences within NCBI GenBank and more than 90% of hit contigs were identical with some viral genomic sequences for both CWW and RCW samples. Among the identified viral community, bacterial phages were the most dominant group (76.51% and 77.60% for CWW and RCW samples, respectively) including phages of the Myoviridae, Podoviridae, and Siphoviridae families for both CWW and RCW samples. Besides, 2.44 - 3.23% of revealed viruses were related to human infections for CWW and RCW samples, accordingly; including Retrovirus, Norovirus, and Hepatitis C viruses responsible for skin diseases, respiratory diseases, and gastroenteritis. Additionally, human adenovirus (HAdV), human enterovirus (HEV), and norovirus group Gii (NoV-Gii) were detected in all CWW and RCW samples by real-time PCR assays with concentrations ranged from 6.80×10^3 to 9.75×10^6 viral particles/L, from 8.49×10^4 and 6.51×10^6 viral particles/L, and from 1.84×10^4 and 1.37×10^7 viral particles/L, respectively; while norovirus group Gi (NoV-Gi) were not

detected in all samples. Overall results demonstrated diverse viral communities were occurred in both campus wastewater and its MRR-treated reclaimed water providing further viral pollution information of municipal wastewater for public health awareness.

Key word : metagenomic, high throughput screening, enterovirus, norovirus, hepatitis A virus, Adenovirus, Real-time PCR.



章節目錄

第一章 前言	1
1.1 水資源與民生用水	1
1.2 水體之生物性汙染問題	1
1.3 常見的人類腸道病毒及相關疾病	2
1.4 研究動機	3
第二章 回顧	4
2.1 暴發感染的病毒	4
2.2 環境中病毒的調查報告	5
2.3 利用分子生物技術檢測環境病毒	5
2.4 病毒基本資訊	7
2.4.1 病毒的分類	7
2.5 人類腸道病毒	14
2.5.1 腸病毒	14
2.5.2 肝炎病毒 A 型	14
2.5.3 諾羅病毒	15
2.5.4 噬菌體	15
2.6 分子生物檢測技術	16
2.6.1 取得基因	16
2.6.2 傳統定序法	17
2.6.3 次世代定序法	17
2.6.4 宏基因定序法原理	18
2.6.5 聚合酶鏈鎖反應	19
2.6.6 即時聚合酶鏈鎖反應	21
第三章 材料與方法	22
3.1 樣品採集	23
3.1.1 DNA 及 RNA 病毒核酸萃取	24
3.1.2 反轉錄	25
3.4 宏基因定序分析	25
3.4.1 宏基因宏基因定序法之前處理	25
3.4.2 定序結果分析與序列比對分類	27
3.4.3 帶有生物訊息的基因序列	27
3.2 利用 PCR 預測	28
3.2.3 洋菜膠體電泳	28
3.3 腸道病毒 Real-time PCR 量化分析	29

3.3.1 腸道病毒標準品製備	29
3.3.2 腸道病毒量化分析	33
第四章 結果與討論	35
4.1 校園民生廢水與回收水之病毒組成分析	35
4.1.1 宏基因定序之序列組裝(asmbling)結果	35
4.1.2 分析不同組裝方法的差異	38
4.1.3 萃取的病毒核酸濃度與病毒族群的關係	40
4.2 宏基因定序組利用 MEGAN 分析	41
4.2.1 比對 NCBI 的物種資料庫的結果	41
4.2.2 校園廢水及回收水中的病毒族群	44
4.2.3 大量的噬菌體	47
4.2.4 影響人類用水安全的病毒	47
4.3 調查水中腸道病毒濃度	50
4.3.1 測試引子及探針	50
4.3.2 腸道病毒通用引子歸納	51
4.3.3 腸道病毒在校園廢水及回收水中的濃度	54
第五章 結論與建議	56
參考文獻	57
附錄	68





第一章 前言

- 1.1 水資源與民生用水
- 1.2 水體之生物性汙染問題
- 1.3 常見的人類腸道病毒及相關疾病
- 1.4 研究動機

第一章 前言

1.1 水資源與民生用水

現代的人類社會為了提高日常生活品質，必須利用水作為飲用、洗滌、生產、灌溉及遊憩等用途，要維持這樣的生活水準必須不斷的供應大量且乾淨的水源來滿足人類的需求。根據國際水協會(International Water Association, IWA)於 2014 年統計指出，世界各地區每人每日平均用水量從 49 到 526 公升不等，顯示出貧富之間用水的需求量，而相較於 2012 年世界各地區的平均用水量(45-464 公升)都有上升的趨勢，這也表示用水需求以及生活水平逐漸提升，而臺灣地區每人每日用水量約為 300 公升左右亦屬於用水量偏高的地區，而要持續維護、管理並開發可利用之水資源來確保台灣民眾穩定的用水需求已經是重要的議題。

根據臺灣水利署的調查顯示，臺灣每年總降雨量約 905 億噸，而民生用水量是 29.1 億噸，只有總降雨量的 3.22%，理應沒有水資源匱乏的問題，然而，民生用水有 71.20% 必須仰賴水庫供應，其餘則以未受污染的地下水(12.76%)及河川水(17.04%)作為水源；此外不易取得合適地點建造新水庫，蓄水容積卻因淤沙使容量逐漸下降中，而臺灣雨季集中，雨季所帶來的水庫儲水量往常無法維持到次年雨季來臨，因此經常造成冬季非降雨季節的缺水狀況。更突顯臺灣的水資源規劃管理有其必要性，而水回收再利用不但可以減少污染物排放至自然水體，亦可減少對目前水資源的依賴，是水資源規劃的重要一環。

1.2 水體之生物性汙染問題

一般而言水體污染物的分類包括微生物、消毒劑、消毒附產物、無機化合物、有機化合物及放射線等六大類，而日常生活使用過的廢污水可能含有大量碳水化合物、氮、磷和硫等營養元素的無機物和有機化合物以及複雜的微生物和病原體所組成，雖然利用污水處理系統可以大幅降低污染物濃度，但水中還存在具有活性的微生物還是具有繁衍的能力，最後再使用消毒劑降低微生物的活性，要將生

活污水回收再使用會有一定的風險(Steyer *et al.*, 2015; Prevost *et al.*, 2015)，因為微生物對環境的適應力強也具有快速繁殖的能力，所以如在未防範的情況之下碰觸到這樣的水體，很容易受到廢水或是回收水中殘留的微生物影響，又使傳染病再一次回到人類的活動範圍(Wigginton *et al.*, 2012)。

污水的生物性污染需要更嚴苛的污染控制技術來管制及監測，而目前水處理系統對微生物污染物的去除效果並不非常清楚(Miura *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2015)。水質分析中典型的指標微生物僅能辨別到部分易培養的細菌，而忽略生長條件較為嚴苛或是複雜的微生物，此微生物指標作為評估水體的衛生與安全指標不足以代表生物性污染程度。而且微生物污染物當中，病毒的危害具有較高的風險，一個完整的病毒顆粒就具有感染力，當傳輸到人體就能迅速的繁殖並造成健康影響。在過去的調查研究中都證實環境水體中含有高濃度的微生物污染物(如致病病毒)，且表示這些微生物污染物來源絕大部分屬於污水處理系統的排放廢水(Bradbury *et al.*, 2013; Wong *et al.*, 2012; Okoh *et al.*, 2010; Kuo *et al.*, 2009)，這使得人類的生活環境暴露在病原體之中，而我們仍然沒有對病原體的含量規範。

1.3 常見的人類腸道病毒及相關疾病

腸道病毒已是台灣地區流行疾病之一，主要是經由糞-口傳染到未受感染的個體，適合在溼熱的環境下傳播且具有高傳染性，且台灣全年都有感染的個案發生，在全球各地區也會不定期的傳出腸道病毒的流行感染。在環境水體的研究發表中也常被檢測出腸道病毒的存在，而在台灣地區對環境水體中的病毒調查研究明顯不足。

病原體的傳播方式是經過各種途徑傳染給另一個人，而環境中的病原體須經由相對複雜的傳遞路徑才會到人體當中。人類腸道病毒主要是藉由直接接觸已被感染之感染者的體液或排泄物，或是間接接觸到感染者所污染到的食物、空氣、飲用水或其他載體，再散布到其他人體之中，近年來較常流行的致病源如流感病毒、腸病毒、諾羅病毒、沙波病毒、輪狀病毒和 A 型肝炎病毒，在各地區的城鎮

中不定期的爆發感染事件而影響人類健康。根據文獻指出在環境水體(如地下水、湖水、河川)、食品(如鮮蚶)、娛樂用水(如游泳池、溫泉)都存在病原體，暴露在這樣的環境之下，雖然人類自身的免疫系統可以抵抗病原體，但是感染風險的依然存在，人類是腸病毒唯一的傳染來源，主要經由腸胃道(糞-口、水或食物污染)或呼吸道(飛沫、咳嗽或打噴嚏)傳染，亦可經由接觸已感染者皮膚的水泡體液而受到感染。在發病前數天，喉嚨部位或糞便可發現病毒，此時即有傳染力，通常以發病後1週內傳染力最強；而患者可持續經由腸道釋出病毒，時間長達8到12週之久。常見的腸道病毒可以引發多種疾病，其中很多是沒有症狀的感染，或是出現類似一般感冒的輕微症狀，常引起之症狀為手足口病、皰疹性咽峽炎，有些時候則會引起一些較特殊的臨床表現，包括無菌性腦膜炎、病毒性腦炎、心肌炎、肢體麻痺症候群、急性出血性結膜炎等。

1.4 研究動機

回收水已被證實含有致病病毒的存在，而本校的校舍用水系統有使用回收水作為宿舍沖洗馬桶之用，當前的水質指標未能清楚的說明回收水的衛生安全風險，對於未知情的使用者可能受感染的風險較高，然而，回收水中致病的病毒族群的組成和數量還未能夠明瞭，需要透過準確度的技術來分析水中的病毒族群，而反覆的透過宏基因定序以及 Real-time PCR 等技術來證實病毒族群的多樣性及豐富度，有助於水質衛生安全的管理。

研究目的分別如下：

1. 以宏基因宏基因定序法(high through-put metagenomics sequencing)分析民生廢水及回收水樣品之病毒族群。
2. 以即時聚合酶鏈鎖反應(real-time PCR)定量樣品中 HAdV、HEV、NoV-gi,gii、HAV 四個月份中的濃度。



第二章 回顧

- 2.1 暴發感染的病毒
- 2.2 環境中病毒的調查報告
- 2.3 利用分子生物技術檢測環境病毒
- 2.4 病毒基本資訊
 - 2.4.1 病毒的分類
- 2.5 人類腸道病毒
 - 2.5.1 腸病毒
 - 2.5.2 肝炎病毒 A 型
 - 2.5.3 諾羅病毒
 - 2.5.4 噬菌體
- 2.6 分子生物檢測技術
 - 2.6.1 取得基因
 - 2.6.2 傳統定序法
 - 2.6.3 次世代定序法
 - 2.6.4 宏基因定序法原理
 - 2.6.5 聚合酶鏈鎖反應
 - 2.6.6 即時聚合酶鏈鎖反應

第二章 回顧

2.1 暴發感染的病毒

從世界各國的疾病管制中心通報中，各地頻頻傳出不同傳染病所引起的區域性疫情(Mathers *et al.*, 2004)，近期之疫情在日本、英國、澳門及新加坡都暴發腸道病毒(腸病毒、諾羅病毒及沙波病毒)的感染，規模不等已有數百到數千的確診病例(NIID, Japan；PHE, England；MOH, Singapore；WPRO, Macao)。臺灣也不定期的傳出傳染病爆發，如引起感冒症狀及腸道腹瀉的諾羅病毒、引起的手口足病或是其他特殊的併發重症的腸病毒。而現代國際之間及區域性的交流日漸頻繁，使得傳染病在這些活動之下更容易擴散，根據美國疾病控制與預防中心(CDC, USA)評估，從 1997 至 2000 年之間的 232 次，疫情事件中，經由食物傳播 57%、人傳人為 16%，全世界每年更有約 2300 萬人次因感染諾羅病毒而造成腸胃炎，其中有 50%是經由食物傳播，每年數百萬人口因為感染腸胃炎而死亡，其中五分之一是五歲以下兒童(WHO)，所以藉由預防及檢疫工作來避免傳染病的散布就更需要被關注。

而在臺灣衛生福利部疾病管制署的病歷調查顯示不定期出現疫情爆發(Centers for Disease Control, R.O.C, Taiwan)，疾管局的統計資料顯示從 2005-2014 年在臺灣 A 型肝炎病毒所造成的肝臟細胞發炎導致肝細胞損傷的案例平均每年一百七十人；腸病毒導致兒童和成人急性腹瀉和嘔吐症狀，於 2000-2001 年爆發大型感染有六百八十一人病患確診，2008 年腸病毒感染併發重症病例有三百七十三人確診，並發症包括腦炎、無菌性腦膜炎、肺水腫(肺出血)、急性肢體麻痺症候群和心肌炎(Green *et al.*, 1997)，除了腸病毒之外，還有多種不同病毒也會導致的腸胃炎，如諾羅病毒及腺病毒最常見，病毒引起的腸胃炎主要症狀是水瀉和嘔吐，而台灣主要流行的季節為 11 月到 3 月間，仍然持續在爆發感染影響人民(Richards *et al.*, 2004)。目前控制感染暴發的方法大多使用疫苗接種來達到個人及群體免疫力提升或是隔離以感染的病患使疾病不再散播。

2.2 環境中病毒的調查報告

在天然水體、市政用水、娛樂用水、廢水、回收水當中都有學者證實病毒的物種豐富度及數量)，而這些環境水體中的病毒主要來源，我們認為是來自己感染者體內所釋放之增殖病毒，經由中央汙水處理系統排放的病毒濃度最高，易感染者(Susceptible individual)接觸這些水體時有較高的感染風險(Xagamoto *et al.*, 2004; Hsu *et al.*, 2008; Djikeng *et al.* 2009; Bibby *et al.*, 2011; Bradbury *et al.*, 2013)。因此調查及監控的工作是使人類生活環境的衛生安全提升的最佳方法。大多的水源(地下水、水庫水)已受到汙染卻還做為生活用水即休閒娛樂用水(Chen *et al.*, 2008)，俄羅斯南部達吉斯坦(Dagestan)地區於 2015 年爆發 A 型肝炎的疫情，當地的 69 名病例中 84% 為兒童，經實驗室檢驗指出疫情歸咎於當地的供水系統使疫情擴散開來，所以制訂有效的監控是可以預防疫情暴發的可能。台灣目前在部分水域也作過病毒豐富度的調查，曾經在 7 座水庫中檢測到腸道病毒(EV-A2, 6, 71)(Hsu *et al.*, 2009)，在台灣環境中影響微生物群落變化的環境因素很多，當中降雨是影響水庫為生物變化最顯著的因素；夏季的病毒社區經常表現出相對較高的豐度和多樣性，大多為典型的噬菌體（即長尾噬菌體科，肌尾噬菌體科和短尾噬菌體科）(Tseng *et al.* 2013)。人類病毒最好的活性溫度約為攝氏 38 度，而在溫泉水域裡成為人類腸道病毒附著下一位宿主最好的環境，在沒有良好消毒作業的情況之下公共池水是很容易殘留人類腸道病毒，檢測結果顯示台灣不同地區的溫泉池中 38.2% 陽性反應，含有腸病毒(EV-A2, 71、EV-B11、EV-G9)(Hus *et al.*, 2008)。

2.3 利用分子生物技術檢測環境病毒

環境病毒的檢測受到很多技術的限制，早期收集病毒的技術回收率大約 40-68% 甚至更低，而環境中的病毒濃度偏低，需要利用活體動物或是組織器官(動物之大腦、血液、肌肉、皮膚)培養病毒，觀察動物或組織的變化判別病毒的種類，過程相當耗時且無法顯現病毒多樣性(Williams *et al.*, 1962; Payment *et al.*, 1988; Stetler *et al.*, 1992)，早年環境病毒檢測的目標病原體如腺病毒及輪狀病毒族群，現在培

養及濃縮病毒的技術已經突破很多限制，如成功的培養細胞讓病毒繁殖而不再需要活體動物來養殖，或是利用聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)對目標基因進行大量複製的得以證明含有相同基因的生物存在，已被廣泛的應用在檢測環境病毒。從 1993 年聚合酶連鎖反應的技術有突破性進展，使 PCR 技術能夠普及便開始出現大量的文獻記載不同水域中的病毒研究，但是調查環境病毒的起因，往往是在暴發大規模的疾病感染之後，所以，人們對生活周遭衛生安全的防範措施相對偏低，在未預警的情況使用已汙染的水源就會容易受到病原體的影響，慢慢開始對不同水體進行檢測。直到 PCR 衍伸出 Real-time PCR 之後，其偵測範圍廣、靈敏度高、準確的測量數量、專一及快速，已慢慢成為環境檢測的主流，如湖泊、地表水、河川、地下水、海水、溫泉水、飲用水、廢水以及回收水都是使用 Real-time PCR 檢驗病毒濃度(Bradbury et al., 2013; Jothikumar et al., 2006; McQuaig et al., 2009; Lee et al., 2002; Kuo et al., 2010; Agidi et al., 2013; Xagorarakis et al., 2014)。從 1993 年以來已越來越多不同種的病原體受到關注，而針對特定血清型準確的偵測，如腺病毒、腸病毒、諾羅病毒、流感病毒、禽流感…等。

然而 PCR 應用的結果還未能完全的表示目標基因的意義，因為 PCR 的反應條件雖然複雜，但仍然有研究指出 PCR 反應容許引子匹配錯誤，所以在面對環境中龐大複雜的物種，所以 PCR 產物需要再進行一次核酸定序才更能保證結果的正確性(Stadhouders et al., 2010)，兩者並用時就會是一個強而有力的證明。現代的定序技術已經非常純熟，利用 ddNTP 標記不同的螢光分子在雷射的作用下發出螢光，再用光譜儀偵測訊號來判讀基因序列 A、T、G、C 的排列，準確度可達到 99.99%，目前已經有全自動化的設備普遍被使用，品質穩定且準確，但是定序長度以 1,000 bps 為限制，且核酸樣品的相似性要足夠，否則難以判讀螢光訊號，而新一代的宏基因定序法可以跨越這項限制，而使得環境病毒的檢測有所突破，能夠低成本且快速的檢測複雜核酸所組成的樣品，從 2000 年開始有較多利用宏基因定序法檢測水中病毒族群的研究，能夠隨機的定序檢測的樣品可以全面的探討水中生物族群的組成(Djikeng et al., 2009; Breitbart et al., 2002; Cantalupo et al., 2011;

Bibby & Peccia, 2013)。

台灣以及全世界的研究相比之下，台灣仍然還有許多水域的病原體屬於未知(Table 2-1)，而根據研究調查污水處理系統中都維持 $10-10^3$ copies/L 的腸道病毒濃度；自來水中不定期出現檢出病毒結果，這些研究結果顯示了爆發感染事件中的水資源系統受到環境的污染所致(Haramoto et al., 2004; Butot 2007; Kuo et al., 2010; Bradbury et al., 2013; Hellm et al., 2014)，如管線老舊使得外在環境中高濃度的病原體能夠進到生活用水，所以需要更良好的水質安全監控及管理；污水處理系統需要足夠消除病原體的能力，配合高敏感度的監測方法(Table 2-2,3,4,5)。

2.4 病毒基本資訊

2.4.1 病毒的分類

病毒體(virion)的基本構造由具有保護功能的蛋白質外殼(capsids)包裹著 DNA 或 RNA 核酸(nucleic acids)所組合，外殼和核酸合稱為核衣殼(nucleocapsid)，外觀可以透過電子顯微鏡觀察外殼由稱為衣殼粒(capsomer)的蛋白質構成，呈現明顯的幾何排序(Figure 2-1)，型態分成四種型態螺旋型(helical)、正二十面體型(icosahedral)、包膜型(envelope)、複雜型(complex)，病毒的尺寸大約在 20-300nm 之間，隨著種類而有所分別且大小維持一定。以非細胞形態的存活，靠著寄生在其他生命體內繁衍後代，而在非生命的環境之下不表現生命跡象，它既不是生物亦是非生物。藉由特殊的蛋白質外殼入侵寄主的細胞體內，通過受體介導的胞吞、膜融合、基因注入等方式入侵宿主細胞，而動物病毒大多以胞吞、膜融合進入細胞內的，有些病毒外殼之外有一層套膜，其外套膜是在經過寄主的細胞膜時，攜帶一部分寄主細胞膜，加上一些病毒的蛋白質所構成的。故外套膜的構造類似細胞膜，脂雙層構造來自寄主細胞膜。(來自宿主非病毒自身構造)，而只有核衣殼的病毒稱為裸病毒(naked viruses)。病毒分類的依據外部構造形狀和大小(統稱形態)初步分類，再以基因序列做分類。本研究的病毒分類依據國際病毒分類委員

會(International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)公認的病毒分類標準，分類層級從目(-virales)、科(-viridae)、亞科(-virinae)、屬(-virus)、種(-virus)。病毒的變異速率高以至於種類繁多，即便同種病毒的血清型(serotype)，致病的能力有很大的差異，每年 ICTV 更新病毒分類的資料，於 2014 年新版本的分類結果，分類出七個目(order)二十六個科(family)以及未分類的病毒七十八個科(Andrew *et al.*, 2011; Adams *et al.*, 2015)。

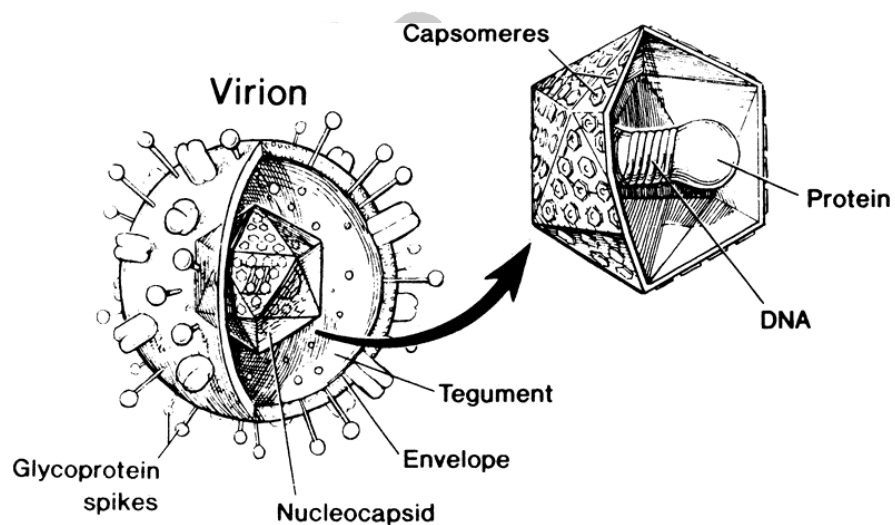


Figure 2-1 圖解病毒結構

Table 2-1 臺灣及其他國家之調查環境病毒的文獻比較

Samples	TAIWAN						Worldwide						
	High throughput			Quantification			High throughput			Quantification			
	Infancy	Universal	Metagenomic	Infancy	Universal	Metagenomic	Infancy	Universal	Metagenomic	Infancy	Universal	Metagenomic	
GROUNDWATER	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Bradbury 2013
SURFACE WATER													Jothikumar 2006
Lake water	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Haramoto 2004
River water	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Xagorarakaki 2007
Sea water	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Bradbury 2013
MUNICIPALE													Haramoto 2004
Tap water	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	McQuaig 2009
Waste water	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Calgua 2013
Reclaimed water	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Katayama 2002
OTHERS													Winter 2014
Hot spring	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Lee 2002
													Haramoto 2004
													Butot 2007
													McQuaig 2009
													Kuo 2010
													Bradbury 2013
													Xagorarakaki 2014
													Purnell 2015
													Agidi 2013
													Breitbart 2004

Table 2-2 環境檢測所使用的腸病毒之引子

	Primer	Sequence	Length(nucleotides)	Sequence region	GC content	Melting Temperature (TM) °C	Serotype	References
Enterovirus	Forward	CCTCCGGCCCCTGAATG	17	5'UTR	71%	59.8	-	<i>Samuel and Sunny, 2005</i>
	Reverse	ACCGGATGGCCAATCCAA	18		56%	56.3		
	Probe	CGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGT	26		58%	71.1		
	Primer	CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG	21	-	57%	63.2	enteroviru 60 of 66	<i>Zoll et al., 1992</i>
	Primer	TCCTCCGGCCCCTGAATGCG	21	-	70%	66.6		
	Primer	ATTGTCACCATAAGCAGCCA	20	-	45%	56.4		
	Probe	AAACACGGACACCCAAAGTA	20	-	45%	56.7		
	Forward	ACATGGTGTGAAGAGTCTATTGAGCT	26	-	42%	64.6	EV-A), E30 E7 (EV-B), CAV21 (EV-C), EV70 (EV-D)	<i>Kelvin et al., 2010</i>
	Reverse	CCAAAGTAGTCGGTTCGCG	19	-	42%	64.6		
	Probe	TCCGGCCCCTGAATGCGGCTAAT	23	-	61%	68.3		
	Forward	CTCCGGCCCCTGAATGCG	18	449-466	72%	62.9	EV, PV, CV	<i>Petitjean et al., 2006</i>
	Forward	CCCTGAATGCGGCTAATCC	19	456-474	58%	59.5		
	Reverse	CACTCGGATGGCC	13	633-644	69%	44		
	Reverse	ATTGTCACCATAAGCAGCCA	20	582-601	45%	56.4		
	Probe	AAACACGGACACCCAAAGTA	20	546-565	45%	56.4		
	Probe	AACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTCTA	30	539-566	47%	70.8		
	up-1	GTAGATCAGGTCGATGAGTC	20	5 UTR	50%	58.4	HEV	<i>Fong et al., 2005</i>
	down-1	ACYGRTGGCCAATC	15		43% to 67%	46 to 51.7		
	up-2	CCTCCGGCCCCTGAATG	17	5 UTR	71%	59.8		
	down-2	ATTGTCACCATAAGCAGCC	19		47%	55		
	Probe	TACTTTGGGTGTCCGTGTTTC	21		48%	59.5		
Forward	CCTCCGGCCCCTGAATG	17	-	71%	59.8	-	<i>Haramoto et al. 2005</i>	
Reverse	ACCGGATGGCCAATCCAA	18	-	56%	56.3			
Probe	TGGGAGGGCGATCGCAATCT	20	-	60%	62.5			
Forward	CCTCCGGCCCCTGAATG	17	444-450	71%	59.8	-	<i>Katayama et al., 2002</i>	
Reverse	ACCGGATGGCCAATCCAA	18	621-638	56%	56.3			
Probe	CCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTC	26	-	54%	69.5			
Forward	CCTCCGGCCCCTGAATG	17	-	71%	59.8	-	<i>Abbaszadegan et al., 1993</i>	
Reverse	ACCGGATGGCCAATCCAA	18	-	58%	56.3			
Probe	CCCAAAGTAGTCGGTTCGCG	20	-	60%	62.5			

Table 2-3 環境檢測所使用的 A 型肝炎病毒之引子

Primer	Sequence	Length(nucleotide s)	Sequence region	GC content	Melting Temperature (TM) °C	Seroty p	References
HAVp1	CTCCAGAATCATCTCC	16		50%	48.2	HAV	<i>Atmar et al. 1995</i>
downstream(HAVp2)	GGAAATGTCTCAGGTACTTCTTTG	25		40%	62.5		
upstream(HAVp4)	GTTTTGCTCCTCTTTATCATGCTATG	26		38%	62.9		
HAVp5	ATGTTTTGCTCCTCTTTATCATGCTAT GTCTGGTGGTTTTTCAACAAC	48		38%	77.4		
Forward	GGT AGG CTA CGG GTG AAA C	19		58%	59.5	HAV	<i>Daniel Pang University of Alberta</i>
Reverse	AAC AAC TCA CCA ATA TCC GC	20		45%	56.4		
Probe	FAM-CTT AGG CTA ATA CTT CTA TGA AGA GAT GC-TAMRA	29		38%	66.2		
Forward	GGG TGA AAC CTC TTA GGC TAA TAC	29		38%	66.2	HAV	<i>Kodani et al.2014</i>
Reverse	TCC TCC GGC GTT GAA TG	17		59%	54.9		
Probe	CAC CAA TAT CCG CCG CTG TTA CCC TAT CCA	30		53%	73.3		
Forward	AAAGTGGAGTTTASTCAGTGTAAGTGGGAATTYACTCAGTGTAAGTGGGAATTTACTCAA TGT	63		35%	80.2	HAV	<i>Hellmér et al. 2014</i>
Reverse	ACWGCAGGAAAATTAATCATG	21		33%	53.4		
Probe	TGAATGTGGTCTCCAAAACGCTGAATGTAGTCTCCAAAACGC	42		45%	77.8		
fierst Forward	AAYGTTGCTTCYCATGTYAGRGT	23		52%	64.6	HAV	<i>Tallo et al., 2003</i>
fierst Reverse	ACCADGCCATDCCATCHACATC	22		59%	65.8		
Forward	TGCAGGT TCAGGGTTCTTAAATCTGTTTCTC	31		42%	69.7	HAV	<i>TELLIER et al. 1996</i>
Reverse	CAAATCATGAAAGGTCACAAATGAAACACTGG	32		38%	68.9		
Reverse	TATTTACTGATAAAAAGAAATAAAC	24		17%	51.7		
NCR Forward	TCACCGCCGTTTGCCTAG	18	68-85	61%	58.4	HAV	<i>Sanchez et al. 2002</i>
NCR Reverse	GGAGAGCCCTGGAAGAAAGA	20	241-222	55%	60.5		
NH2-VP3 Forward	GGGACAGGAACTTCAGCTTATAC	23	1380-1402	48%	62.9		
NH2-VP3 Reverse	TCTACCTGAATGATATTTGG	20	1859-1840	35%	52.3		
Inner VP3 Forward	GTTATTCCAGTGGACCCATATT	22	1701-1722	41%	58.4		
Inner VP3 Reverse	TCGTGTACCTATTCACCTATA	22	2031-2010	36%	56.4		
COOH-VP3-F	TGTGCAGTGATGGATATTACAG	22	1938-1959	41%	58.4		
COOH-VP3-R	GTTGTTATGCCAACTTGGGGA	21	2287-2267	48%	59.5		
NH2-VP1 Forward	AATGTTTATCTTTCAGCAAT	20	2136-2155	25%	48.2		
NH2-VP1 Reverse	ACAGCTCCAAGAGCAGTTTT	20	2751-2770	45%	56.4		
COOH-VP1-F	ATGGCCTGGTTTACTCCAG	19	2673-2691	53%	57.5		
COOH-VP1-R	CCCTTCATTTTCCTAGG	17	3229-3213	47%	49.9		

Table 2-4 環境檢測所使用的諾羅病毒 GI 之引子

Primer	Sequence	Length(nucleotides)	Sequence region	GC content	Melting Temperature (TM) °C	Serotyp	References
NVKS1-Forward	ACAGCATGGGACTCAACACA	20		50%	58.4	GI	Liu et al., 2013
NVKS2-Reverse	GGGAAGTACATGGGAATCCA	20		50%	58.4		
NVKS3 probe	TCACCAGAATTGGCCGAGGTTGT	23		52%	64.6		
IAC probe	ATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCC	29		55%	73.2		
Forward	CACCACCATAAACAGGCTG	19		53%	57.5	GI	Richards et al., 2004
Reverse	AGCCTGATAGAGCATTCTTT	20		40%	54.3		
JJV1Forward	GCCATGTTCCGITGGATG	18	5282-5299	56 to 61%	56.3 to 58.4	GI	Jothikumar et al., 2005
JJV1Reverse	TCCTTAGACGCCATCATCAT	20	5377-5358	45%	56.4		
JJV1Porbe	TGTGGACAGGAGATCGCAATCTC	23	5319-5341	52%	64.6		
MON 432 Forward	TGG ACI CGY GGI CCY AAY CA (RNA sence)	30		52 to 57%	61.2 to 63.2	GI	Anderson et al., 2003
MON 434 Forward	GAA SCG CAT CCA RCG GAA CAT (cDNA sence)	21					
MON 431 Reverse	TGG ACI AGR GGI CCY AAY CA (RNA sence)	29					
MON 433 Reverse	GGA YCT CAT CCA YCT GAA CAT (cDNA sence)	31					
COG1F	CGY TGG ATG CGN TTY CAT GA	20	ORF2	45 to 60%	56.4 to 62.5	GI	Tian et al., 2008
G1SKR	CCA ACC CAR CCA TTR TAC A	19	ORF2	42 to 53%	53.5 to 7.5		
NV192 (s)	GCYATGTTCCGCTGGATGC	19	5282-5300	58 to 63	59.5 to 61.6	GI	Hoehne and Schreier, 2006
NV193 (as)	CGTCCTTAGACGCCATCATCA	21	5379-5359	52%	61.2		
TM9-MGB probe	VIC-TGGACAGGAGATCGC-MGB-NFQ	15	5345-5359	60%	48.8		
COG1F (+) b	CGYTGGATGCGNTTYCATGA	20	5291-5310	49.7 to 55.9	56.4 to 62.5	GI	Loisy et al., 2005
COG1R (-) b	CTTAGACGCATCATCATTYAC	21	5351-5375	38 to 43%	55.4 to 57.5		
RING1 (-) b	FAM-AGATYGCGATCYCCTGTCCA-TAMRA	20	5321-5340	50 to 60	58.4 to 62.5		
NoVGIF	GCYATGTTCCGYTGGATGC	19		53 to 63%	57.5 to 61.6	GI	Wolf et al., 2010
NoVGIR	GTCCTTAGACGCCATCATCATT	22		45%	60.1		
NoVGIprobe	TCGGGCAGGAGATYGCGRTCYC	22		59 to 73%	65.8 to 71.6		
Forward	CGYTGGATGCGNTTYCATGA	20		45 to 60%	56.4 to 62.5	GI	Haramoto et al. 2004
Reverse	CTTAGACGCCATCATCATTYAC	22		41 to 45%	58.4 to 60.1		
probe	AGATYGCGATCYCCTGTCCA-TAMRA	20		50 to 60%	58.4 to 62.5		

Table 2-5 環境檢測所使用的諾羅病毒 GII 之引子

Primer	Sequence	Length(nucleotides)	Sequence region	GC content	Melting Temperature (TM) °C	Serotyp	References
CB1	GGC CCC ATC ATC TTC GAG AG	20	ORF1	60	62.5	GII	White et al., 2002
CB2	GTT TYA RCC CGT ATT CCT TG	20	ORF1	40 to 50 %	54.3 to 58.4		
CB3	AGC AGC CCT AGA AAT CAT GG	20	ORF1	50%	58.4		
CB4	CAG AGA GTG AGG AGC CAG TG	20	ORF1	60%	62.5		
NV107a (s)	AGCCAATGTTTCAGATGGATG	20	5007-5026	45%	56.4	GII	Hoehne and Schreier, 2006
NV107c (s)	AICCIATGTTYAGITGGATG	21	5007-5026				
NV119 (as)	TCGACGCCATCTTCATTAC	20	5100-5081	50%	58.4		
TM3A probe	FAM-TGGGAGGGCGATCGCAATCTGGC-NFQ	23	5048-5070	65%	69.9		
JJV2F _b	CAA GAG TCA ATG TTT AGG TGG ATG AG	26	4997-5022	42%	64.6	GII	Gregory et al., 2011
COG2R _c	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	21	5074-5094	48%	59.5		
RING2-TP _c	TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT	20	5042-5061	60%	62.5		
CIPC-Probed _d	TGT GCT GCA AGG CGA TTA AGT TGG GT	26		50%	67.9		
NoV IC Mut Rev	ACC CAA CTT AAT CGC CTT GCA GCA CAG TAC GTG CTC AAG TCA GAA	45	5026-5042	49%	80.8		
NoV IC Mut For	TGT GCT GCA AGG CGA TTA AGT TGG GTA GCT CTG GCT CCC AGT TTT G	46	5059-5075	52%	82.4		
JJV2F T7 Comp	CAC GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGGCAA GAG TCA ATG TTT AGG TGG ATG AG	50	4997-5022	44.00%	80.5		
QNIF2d (+)	ATGTTTCAGRTGGATGAGRITTCWGA	26	5012-5037	38 to 46%	62.9 to 66.2	GII	Loisy et al., 2005
COG2R (-) _b	TCGACGCCATCTTCATTACACA	21	5080-5100	48	59.5		
QNIFS (+)	AGCACGTGGGAGGGCGATCG	20	5042-5061	70%	66.6		
NoVGIIIF	ATGTTYAGRTGGATGAGRITTYTC	23		30 to 48%	55.5 to 62.9	GII	Wolf et al., 2010
NoVGIIR	TMGAYGCCATCWTTCATTAC	20		40 to 50%	54.3 to 58.4		
NoVGIIprobe	CACRTGGGAGGGCGATCGCAATC	23		61 to 65%	68.3 to 69.9		
COG2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	26		35 to 58%	61.7 to 71.1	GII	Kageyama et al., 2003
COG2R	TCGACGCCATCTTCATTACACA	21		48%	59.5		
RING2-TPprobe	TGGGAGGGCGATCGCAATCT	20		60%	62.5		
JV12Y	ATACCACTATGATGCAGAYTA	21		33 to 38%	53.4 to 55.4	GII	Vennema et al., 2002
JV13Y	TCATCATCACCATAGAAIGAG	21	RdRp				
Ni-R	AGCCAGTGGGCGATGGAATTC	21		57%	63.2		
Forward	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	26		35 to 58%	61.7 to 71.1	GII	Haramoto et al. 2004
Reverse	TCGACGCCATCTTCATTACACA	21		48%	59.5		
probe	TGGGAGGGCGATCGCAATCT	20		60%	62.5		

2.5 人類腸道病毒

2.5.1 腸病毒

腸病毒(Enterovirus, EV)，在分類學上為病毒之第四類正股單鏈 RNA 病毒，外殼由六十個原具體(Protomer)組合成 T=pseudo 3 的二十面體之球型，每個原聚體是由四個多肽黏合，VP1、VP2、VP3、VP4，而 VP4 為於原聚體內部，直徑大小約 30 奈米，基因長度 7.2-8.5 kb，全基因序列分成四大部分 5 端非編碼區(5'NCR)、結構(P1)、非結構(P2、P3)、3 端非編碼區(3'NCR)，5 端非編碼區主要在轉譯二級結構時轉譯調控的功能，具有高 GC 含量，則 P1 區編碼為多肽的結構基因，在 P2 和 P3 區編碼與複製有關的非結構蛋白基因。主要經由兩種途徑傳染人類，經由被汙染的食物、水、玩具、口水(Fecal-oral)或呼吸道(Respiratory)(飛沫、咳嗽等)傳染。會引起人類皰疹性咽峽炎、結膜炎、輕度皮疹、輕度呼吸道疾病、發燒等手口足疾病，嚴重時併發重症如中樞神經系統疾病、弛緩性麻痺及肌肉損傷或神經組織變性。五歲以下兒童被腸病毒感染較可能併發重症，曾經爆發感染為腸病毒 71 型最多見。

2.5.2 肝炎病毒 A 型

肝炎病毒 A 型(hepatitis A virus, HAV)，在分類學上為病毒之第四類正股單鏈 RNA 病毒，外殼由六十個原具體(Protomer)組合成 T=pseudo 3 的二十面體之球型，每個原聚體是由三個多肽黏合，VP1、VP2、VP3，VP4 未證實與原聚體組合，直徑大小約 30 奈米，基因長度 7.478 kb，全基因序列分成四大部分 5 端非編碼區(5'NCR)、結構(P1)、非結構(P2、P3)、3 端非編碼區(3'NCR)，5 端非編碼區主要在轉譯二級結構時轉譯調控的功能，則 P1 區編碼為多肽的結構基因，在 P2 和 P3 區編碼與複製有關的非結構蛋白基因。為糞口途徑的傳染。因此，當沒有抵抗力的人吃到或喝到被 A 型肝炎病毒污染的水或食物時，就會感染到 A 型肝炎。發

病情況通常為突然發燒，全身倦怠不適，食慾不振，嘔吐及腹部不舒服，數天之後發生黃疸，通常臨床症狀的嚴重度會隨年齡增加而增加。在發病前 1-2 週，可於感染者糞便中檢出大量病毒，並在肝功能指數上升或臨床症狀出現後，迅速減少。極少數病患可能出現急性肝功能衰竭，這在老年患者中比較常見。

2.5.3 諾羅病毒

諾羅病毒(Norovirus, NV)，在分類學上為病毒之第四類正股單鏈 RNA 病毒，外殼由一百八十個 VP1 多肽組合成 T=3 的二十面體之球型，直徑大小約 38-40 奈米，基因長度 7.3-8.3 kb，諾羅病毒的 RNA 可以做為宿主疾病毒之間的 mRNA，且具有傳染性。傳染途徑有人傳人或間接通過污染的水和食物。它們非常具有強的傳染性，並少於 20 病毒顆粒可引起感染，一般症狀主要有腹痛、腹瀉、嘔吐、低燒、全身肌肉酸痛等。症狀一般維持 12 至 60 小時自行消退，但病毒的排泄會延續 2 星期左右。如腹瀉厲害，容易發生脫水、休克等症狀(Patel *et al.*, 2009; Robilotti *et al.*, 2015)。

2.5.4 噬菌體

噬菌體 (bacteriophages 或 phages) 以寄生細菌為主的病毒，典型的外型結構由蛋白質組成，形狀為二十面體的外殼，包裹著遺傳物質(頭部)，核酸的形式有環狀或線狀的單股 DNA 或雙股，也有 RNA 的類型，核酸長度由 5k-5000k bps 不等。底下連接中空的針狀結構及外鞘組成的(尾部)，具有注射遺傳物質的功能，亦感染宿主的功能結構。噬菌體寄宿的方式有兩大類：裂解性 (lytic) 噬菌體和溶原性 (lysogenic) 噬菌體。裂解性噬菌體感染細菌後，被感染的細胞就變成製造噬菌體的蛋白質和核酸的工廠，當噬菌體複製完成，細菌就被溶解 (lysis) 而破裂死亡。另一種溶原性噬菌體是比較溫和性的 (temperate) 噬菌體，它可以進

行裂解性或溶原性的生活史，繁多的噬菌體生活於生物圈中，以不同的形態(外型、基因組、寄宿方式)存在。由國際病毒分類委員會(ICTV)依據型態和核酸序列分類，目前公認十九個家族(families)都是感染細菌(bacteria)及古菌(archaea)，其中兩族屬於 RNA 病毒；五族有外膜(envelope)結構。

2.6 分子生物檢測技術

2.6.1 取得基因

去氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 是一種可以組成遺傳指令的分子，去氧核糖核酸的鹼基，分別是有四種：腺嘌呤(Adenine, A)、胞嘧啶(Cytosine, C)、鳥嘌呤(Guanine, G)與胸腺嘧啶(Thymine, T)，組成單位稱為核苷酸，透過氫鍵的鍵結構成帶有編碼的長鏈聚合物片段稱為基因(DNA)。這些鹼基沿著 DNA 長鏈所排列而成的序列，可組成遺傳密碼，是蛋白質胺基酸序列合成的依據；以及引導生物發育與生命機能運作，其中包含的指令是建構細胞內的化合物、以本身構造發揮作用、參與調控遺傳訊息的表現，基因代表著生命的基本構造和性能，儲存著種族的生命。

利用物理與化學原理從細胞中分離質體 DNA，初步需細胞破碎技術，分成機械法與非機械法，機械法運用高壓、震盪、研磨及超聲波等物理性原理；非機械法利用滲透壓、冷凍、酵素及介面活性劑等物化原理。DNA 的分離技術日漸精良，與各項分離技術結合出更有效率的分離高純度的 DNA，現代取得核苷酸技術非常純熟，從細胞萃取 DNA 的方法，目前最常見管柱萃取純化法(Column Purification)與有機試劑萃取純化法原理主要是先以清潔劑 SDS (Sodium dodecyl sulfate)或 SLS (Sodium lauryl sulfate)使磷脂質(細胞膜及各種胞器的膜)變性，以抑制 DNase 的活性，隨後加入蛋白酶讓 DNA 上的蛋白質解離。接著將此含有 DNA 的混合物滴入純化管柱中，DNA 會與純化管柱中的矽膜(Silica membrane)過濾結合，其它物質不會與過濾膜結合而流出，最後再利用緩衝液分離附著在矽膜上的 DNA 洗

提使其流出，接著將 DNA 進行基因的定序工程(Chang *et al.*,2009)。

2.6.2 傳統定序法

定序的價值遠遠超出 DNA 序列的分析，經常用來分析生物的組成，如 RNA、蛋白質以及基因表現的複雜關係(Soon *et al.*, 2013)，也可應用在生物個體的身分或親源鑑定以及醫療診斷(Lee and Chuang, 2010)。現代取得核苷酸技術非常純熟，快速的效率及純度高，人工定序進步到現在的螢光標記，全自動儀器定序分析(Chang *et al.*,2009)定序技術在 1980 年代發展成功，定序技術已從早年的 Maxam-Gilbert 定序法，這種方法可以在 DNA 低濃度情況下得到基因定序，因使用具有放射性的磷酸基螢光標記，被 Sanger 定序法取代。現代主流的 Sanger 定序法結合酵素，利用雙脫氧核甘酸(ddNTP)來終止聚合酶合成作用。將 DNA 樣品被分成四個單獨的測序反應，每個反應包含四個標準的脫氧核苷酸(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)和 DNA 聚合酶，再加入缺少羥基的四種鹼基之一的雙脫氧核苷酸(ddATP、ddGTP、ddCTP、ddTTP)，進行 PCR 反應時會產生不同長度的 DNA，並通過凝膠電泳尺寸分離，依照顯影的排序即可讀取 DNA 序列，目前的運用讀取長度可達 1000 個鹼基，準確度 99.999%，成本為 0.5 美金，Sanger 定序法即為新一代定序法之基礎進展(Shendure and Ji, 2008)。

2.6.3 次世代定序法

基因的定序技術在二十一世紀已有所革新，目前稱此技術為次世代定序法(Next-Generation Sequencing, NGS)；宏基因定序法(Metagenomics Sequencing)，透過自動化工程技術的突破；光學偵測的更新及資訊科技進行片段接合，能反覆的偵測及試劑置換，能快速且同時讀取龐大數量的 DNA 序列，分析出完整的核酸序列(Lee and Chuang, 2010)，一次宏基因定序的輸出量是傳統定序法的百萬倍，

也大幅降低周轉的時間(Soon *et al.*, 2013)，於 2005 年 Roche 公司首開商業的宏基因 Roche/454 定序儀，至今已為普遍的技術，各開發團隊在定序儀的偵測尺度上精進，如奈米孔洞的感測晶片、精準的螢光標記的定位。各有特色，目前 Helicos 公司讀取序列資料量最多為 21,000-35,000 Mb/run，454FLX 公司每單位序列長度最長 800 個鹼基，各公司讀取錯誤率都在 1-0.0001% 以下(Barzon *et al.*, 2011)。近年來研究報告中，基因定序技術亦被廣泛應用在單一物種基因序列的研究，以及細菌與真菌等微生物之鑑定，抗生素之藥物開發，提供解析環境中未能培養的細菌基因組編碼的開拓工具，對複雜樣品時，顯現出物種多樣性以及各物種在整個組成的比例(Djikeng *et al.* 2009; Rosario *et al.* 2009; Tseng *et al.* 2013; Charlop-Powers *et al.*, 2014)。

2.6.4 宏基因定序法原理

本實驗方法選用 Illumina 定序儀，原理為：依照定序儀的機制不同，每單位的定序長度都到限制，此法須將待測樣品在定序前會先進行超音波震盪的方是將基因體打斷成小片段，以膠體電泳法取得適當的 DNA 長度片段，選擇萃取長度集中在 300-500 bps 以 Klenow fragment 將 3'端接上胸腺嘧啶(Thymine, T)，再以腺嘌呤(Adenine, A)與 T 鍵結的方式接上轉接序列並再一次利用膠體電泳切膠純化。接著利用會與轉接序列黏合的 primer 以 PCR 進行放大，此時 DNA 的片段兩端皆具有與定序儀中 flow cell 上 oligomer 雜交的能力。具有與 oligomer 雜交能力的片段黏著於 flow cell 上後進行橋式 PCR，橋式 PCR 以 flow cell 上的 oligomer 為引子，denaturation 階段雙股分開，3'端黏於 flow cell 上 5'端則懸浮於反應槽中，priming 階段 5'懸浮端會彎曲與 flow cell 上的引子做引子黏附，並於 extension 階段完成延展，反覆擴增成為 cluster(因百萬條序列黏於 flow cell，似序列叢束)。擴增完成後先與其中一股 5'懸浮端上轉接序列互補之 primer 為引子進行合成定序法。合成定序法所使用 dNTP 經過修飾，使五碳糖 3'端為 OCN3 基，而含氮鹼基

上帶有螢光分子，3'端的 OCN3 基不被 DNA polymerase 所辨識，即終止反應，而螢光分子會產生螢光訊號，因 cluster 中來源為同一 DNA，經橋式 PCR 所放大的每一條序列皆只接上一個 dNTP 便終止並一起發出相同的螢光訊號，而定序儀即偵測此螢光訊號並記錄後。記錄完後以酵素反應試劑切除螢光分子和 3'端上 OCN3 基並修飾成 DNA polymerase 可辨識的 OH 基，便再加入修飾過的 dNTP：如此反覆加入 dNTP、讀訊、移除並修飾等循環直至定序結束。此為單一 DNA 生成 cluster 並定序之原理，而 flow cell 上有以百萬計的 cluster 同時進行偵測 (圖 2.4)，而當定序完一股(R1)時，還可依另一股的轉接序列做完引子開始進行互補序列定序(R2)，並可依 R2 與 R1 上的重疊區域組裝。

2.6.5 聚合酶鏈鎖反應

另外聚合酶鏈鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)已經成為分子生物檢測技術中的基礎實驗方法，託 Mullis 所創於 1983 年開創的 PCR 分子生物檢測技術，在 1993 年榮獲諾貝爾化學獎，快速擴增短鏈 DNA 的技術，在微量的檢體中能成功反應，使得檢測微生物突破轉殖的限制，如病人檢體 (Maluquer de Motes *et al.*, 2004)、地表水(Chapron *et al.*, 2000)、游泳池水(Papapetropoulou and Vantarakis, 1998)、飲用水(Heerden *et al.*, 2005)中檢測病毒。透過具有高靈敏度及特異性的引子(Primer)及耐高溫的聚合酶(Polymerase)相應引子的基因片段，即可在幾小時內大量的複製；成功的 PCR 反應表示該基因片段存在於樣品(Josephson *et al.*, 1993)。PCR 須設計一對互補目標基因序列的核苷酸序列引子(Primer)，作為聚合酶作用的起點而延伸複製；當溫度在 95°C 時雙股 DNA 的鏈結會斷裂分離，接著溫度降至 55°C 使得引子能夠進行基因配對(anneal)，之後再提升至耐高溫的聚合酶的反應溫度 72°C，使 dNTP 透過聚合酶排列到互補的基因完成一次一倍的複製；反覆這樣的溫度變化 25-40 次得以對目標基因複製出 2^n 倍的數量(Figure 2-2)。

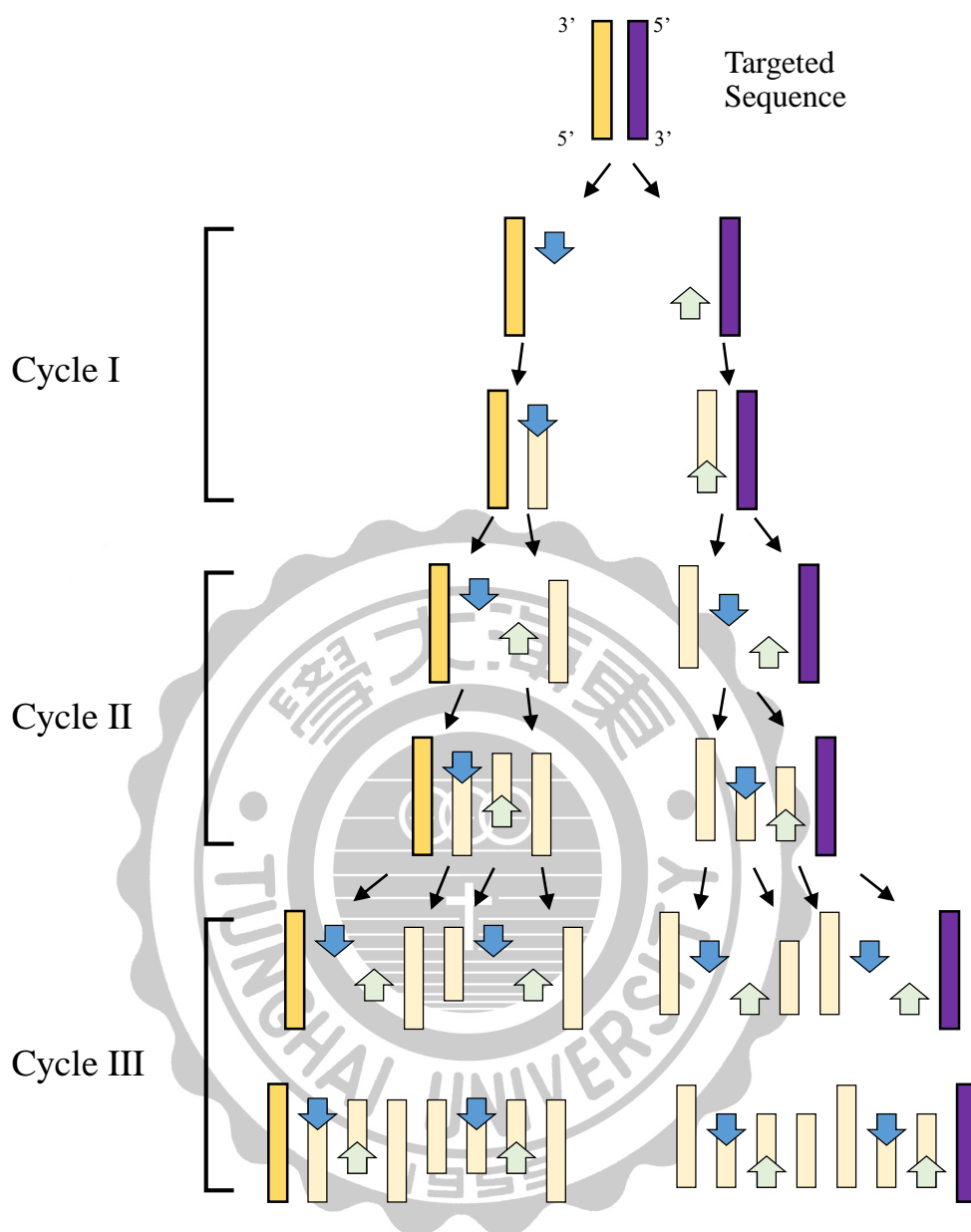


Figure 2-2 聚合酶連鎖反應的過程

2.6.6 即時聚合酶鏈鎖反應

即時聚合酶鏈鎖反應(Real-time quantification PCR)是 PCR 原理衍生的應用。在 PCR 反應中添加結合螢光訊號第三引子探針(Probe)，此探針 5'端及 3'端分別結合 Reporter 和 Quencher 兩種螢光物質，當探針為游離狀態時，兩螢光物質之間有遮蔽作用不發光，需透過激發光源給予能量之後發螢光，探針將會黏著再上下引子(Forward/Reverse)之間的基因，PCR 擴增的同時，探針被聚合酶水解，Reporter 與 Quencher 就會脫離並釋放螢光訊號(Kubista *et al.*, 2006)(Figure 2-3)，再利用光學偵測儀偵測，每次 PCR 反應的訊號次數代表定量的結果，再換算成分子顆粒濃度。Real-time PCR 需同時滿足 PCR 反應以及 Probe 的條件，故具有偵測範圍廣、靈敏度高、準確、專一及快速等優點(Kitajima *et al.*, 2010)，已有研究報告探測在環境腸道病毒濃度的檢測(Hewitt *et al.*, 2013; wong *et al.*, 2012; Loisy *et al.*, 2005)。

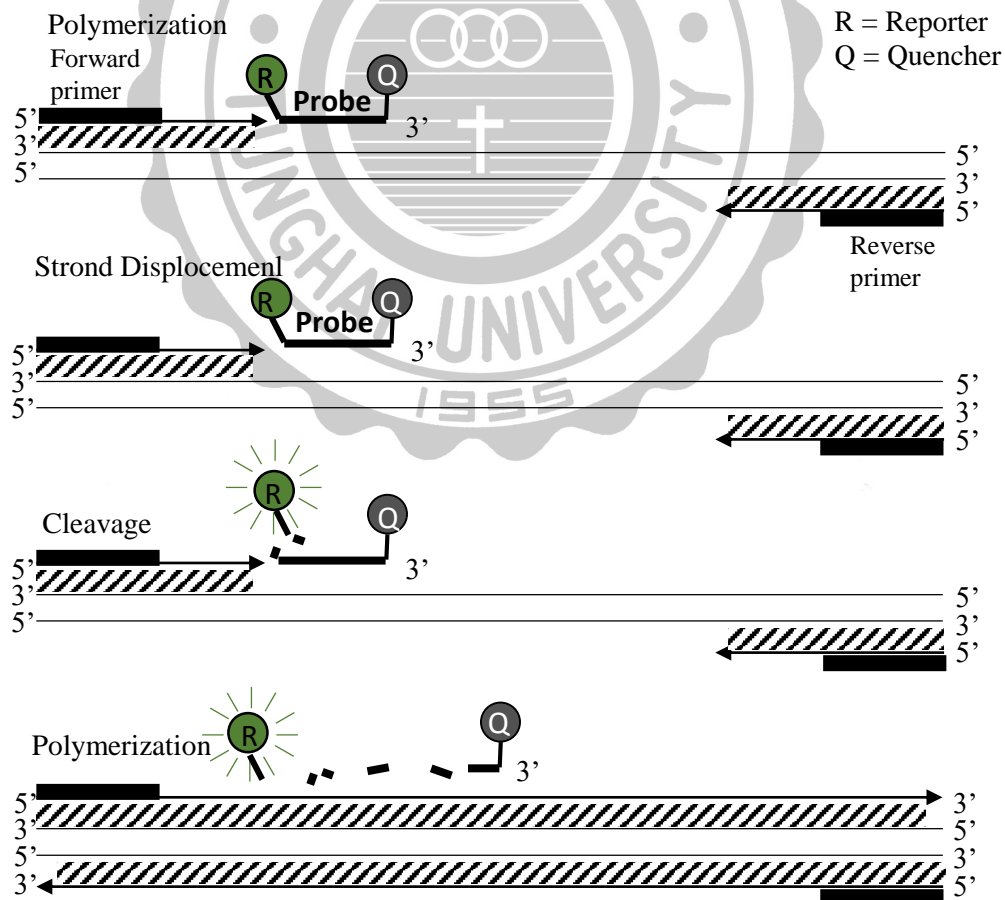


Figure 2-3 Real-time PCR 反應示意圖



第三章 材料與方法

3.1 樣品採集

3.1.1 DNA 及 RNA 病毒核酸萃取

3.1.2 反轉錄

3.4 宏基因定序分析

3.4.1 宏基因宏基因定序法之前處理

3.4.2 定序結果分析與序列比對分類

3.4.3 帶有生物訊息的基因序列

3.2 利用 PCR 預測

3.2.3 洋菜膠體電泳

3.3 腸道病毒 Real-time PCR 量化分析

3.3.1 腸道病毒標準品製備

3.3.2 腸道病毒量化分析

第三章 材料與方法

本研究目的為調查水中的病毒多樣性及人類腸道病毒的豐度，採集台中東海大學薄膜生物處理場之校園宿舍民生廢水(CWW)及薄膜生物處理之回收水(RCW)之病毒濃縮樣品，以宏基因定序法分析的病源體組成，以及美國環保署公布的污染物候選名單中，微生物污染物如腸病毒、諾羅病毒及 A 型肝炎病毒，使用即時聚合酶鏈鎖反應得知水中實際的病毒濃度；本實驗流程如 Figure 3-1, 2。

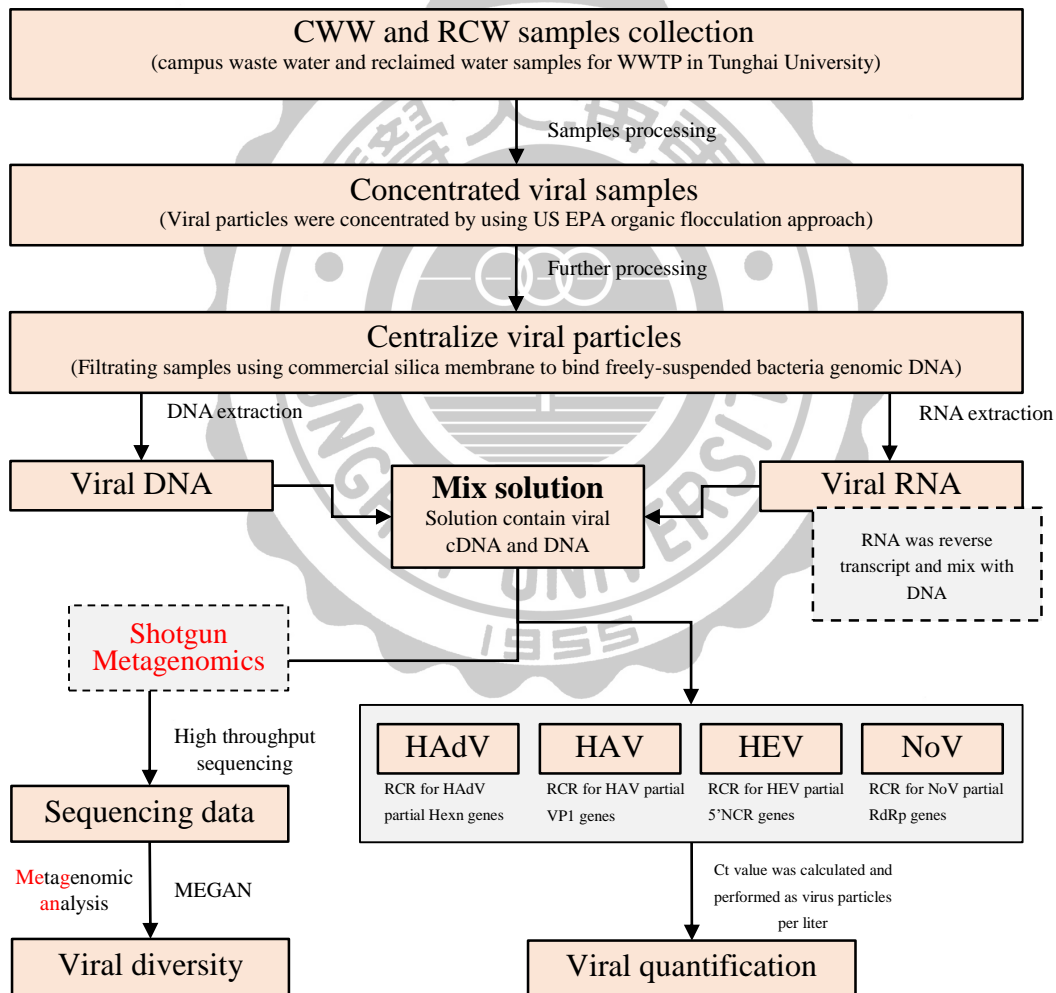


Figure 3-1 本研究針對病毒物種豐富度及濃度所設計之實驗流程。

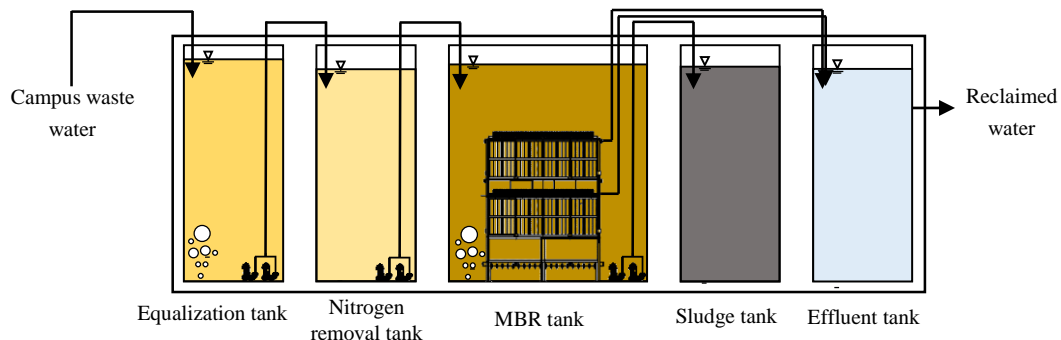


Figure 3-2 本研究所研究的汙水處理廠結構圖。

3.1 樣品採集

使用美國環保署公布濃縮病毒方法，以 1MDS 濾膜吸附病毒洗脫 (Viradel) 方法採集水中人體腸道病毒 (Fout et al., 1996)。該方法採用了具有帶正電特性的筒式過濾器，從水中濃縮病毒。將水樣通過 1MDS 濾膜 (Lenntech, Delft, Netherlands) 的採樣方式，以壓力幫浦抽取水樣 (流速 3 加侖/分鐘) 並通過濾心，使病毒及懸浮顆粒滯留於濾心外膜，直到水壓達到 30 psi 時停止抽取水樣，並記錄採樣體積，採集過樣品之濾心保存於 4°C 並在 72 小時內洗脫。採集的樣本為台中東海大學薄膜生物處理場於學期中四個月份 (4, 6, 9, 11 月) 所採集樣品混合後之校園宿舍民生廢水 (CWW) 及薄膜生物處理之回收水 (RCW) 為樣品。

滯留於 1MDS 濾芯的病毒顆粒洗脫使用 1L 牛肉萃取液 (1.5% of beef extract powder, 0.05M glycine, pH9.0-9.5) 洗脫 1MDS 濾心，利用壓力泵以氮氣加壓促使牛肉萃取液由濾芯內而外流出濾心外膜，當牛肉萃取液充滿 1MDS 裝置皿時停止加壓 2 分鐘後，再將 1L 牛肉萃取液全部通過濾心並收集沖提液。將 CWW 及 RCW 沖提液以 1M HCl 調整 pH 至 3.5 並持續慢混 30 min 後，以 4°C 下 5,000xg 離心 15 min 並保留沉澱物，以約 30ml 的 0.15M Na₂HPO₄ · 7H₂O 沖提沉澱物並調整 pH 至 9.5，此沖提液再於 4°C 以 7500xg 離心 10 min，調整 pH 至 7.5 並通過

0.22 μ m 濾紙去除非病毒顆粒，記錄最後體積再儲放於-70 $^{\circ}$ C。

接著利用 Silicon filter 帶正電的特性吸附樣品中的游離 DNA，將欲萃取的樣品每 1,000 μ L 通過 Zymo-SpinTM IC column，並利用 13,100 \times g 離心 2 分鐘，此步驟需做兩次，最後空管離心一次以確保濾膜上無殘留的液體。接著利用 PCR 針對細菌常見的 16s rRNA gene 進行擴增，該引子為 27f 及 1492r，每次 PCR 反應包含 12.5 μ L 的 Master mix (EmeraldAmp[®] MAX HS PCR Master Mix)，10 mM 的 Forward 與引子 1 μ L (最終反應濃度為 400 nM) 與等體積混合三種 10mM 的 Reverse 引子 1 μ L，最後加入不含 RNA 降解酶之純淨水使總反應體積為 25 μ L。16s rRNA gene 基因擴增使用梯度溫度 PCR 反應器(Mycycler Thermal cycle PCR, Bio-rad, USA)調控溫度梯度以 94 $^{\circ}$ C 持續 5 分鐘，接著 94 $^{\circ}$ C 使雙股 DNA 分離 30 秒、55 $^{\circ}$ C 使引子黏合 DNA 30 秒、72 $^{\circ}$ C 讓聚合酶接合引子延伸 30 秒皆循環 45 次，最後保持 5 分鐘於 72 $^{\circ}$ C 確保 PCR 反應完成擴增。確認沒有 16s rRNA gene 之後，過濾後的流出液為不含有游離 DNA 的樣品。

3.1.1 DNA 及 RNA 病毒核酸萃取

本研究以 ZR Viral DNA KitTM (ZYMO Reserch,Irvine, USA)直接萃取病毒 DNA，實驗前先將 ZR Viral DNA Buffer 加入具有破壞雙硫鍵功用之 β -mercaptoethanol 使最終濃度為 0.5% (v/v)，另外在 DNA Wash Buffer 加入乙醇 (ethanol) 使 DNA 便於沉澱。本流程離心一律使用 13,100 \times g 離心；首先將 200 μ L 之病毒濃縮液與 800 μ L ZR Viral DNA Buffer 在 1.5mL 離心管混合並簡要震盪以利破碎病毒蛋白質外殼，並在室溫下靜置 5 分鐘後將混合液移入 Zymo-SpinTM IC column，並組合至 Collection Tubes 離心後棄流出液；之後加入 300 μ L 之 DNA wash buffer 至 Spin column 並離心棄流出液，此步驟需做兩次。最後空管離心一次讓多餘的 DNA wash buffer 流出後加入適當體積 6~10 μ L 的 DNA elution Buffer(宏基因定序則為 20 μ L，PCR 檢測 30 μ L)至 Spin column 並靜置 1 分鐘，套

入新的離心管上離心提取 DNA，將 DNA 流出液保存於-20°C。

RNA 萃取方面以 ZR Viral RNA Kit™ (ZYMO RESEARCH, Irvine, USA) 提取 RNA，同樣地先加入 β -mercaptoethanol 和 Ethanol 於 RNA Bugger 和 wash buffer 中。本流程離心一律使用 13,100×g 離心 1.5 min，並確保在無 RNA 降解酶環境下操作。將 200 μ L 之病毒濃縮液與 600 μ L ZR Viral RNA Buffer 在 1.5mL 離心管混合並以指尖輕彈使混和後靜置 2 min，將混合液移入 Zymo-Spin™ IC column 並組合 Collection Tubes 上，離心棄流出液；之後加入 300 μ L 之 RNA wash buffer 至 Spin column 並離心棄流出液，此步驟需做兩次。最後空管離心一次以讓多餘的 RNA wash buffer 流出後加入 10 μ L DNase/RNase Free Water 至 Spin column 並靜置 1 分鐘，套入新的離心管上離心取得 RNA 流出液並即時進行反轉錄 PCR。

3.1.2 反轉錄

RNA 通常以單股的形式存在，且容易被核糖核酸酶(RNase)分解故轉其穩定型態的互補 DNA(cDNA)，反轉錄步驟以 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, California, USA) 來執行轉錄，將 2 μ L 10X RT Buffer、0.8 μ L 25X dNTP Mix (100nm)、2 μ L 10X RT Randon Primers、1 μ L MultiScribe Reverse Transcriptase、1 μ L RNase Inhibitor、3.2 μ L DNase/RNase Free Water，混合成體積 10 μ L 反轉錄工作液後，加入上述萃取之 10 μ L RNA 流出液使總體積為 20 μ L，並在下列溫度梯度下執行反轉錄：25°C 持續 10 min，升溫至 37°C 下 120 min 執行反轉錄，並在 85°C 下 5 min 將 cDNA 與模板熱解後，存放於-20°C 備用。

3.4 宏基因定序分析

3.4.1 宏基因宏基因定序法之前處理

為檢測校園宿舍民生廢水(CWW)及薄膜生物處理之回收水(RCW)中病毒多樣性，將CWW及RCW於步驟3.2處理之濃縮液各取1mL做為樣品代表，在分別萃

取DNA與萃取RNA並反轉錄成cDNA，再將DNA與cDNA混合，以NanoDrop (Green BioResearch, Rahway, USA)測定DNA品質與濃度滿足定序所要求的品質以冷凍包裹運送至定序公司。基因組DNA是通過超聲波處理分段，篩選出適合的尺寸，該片段的DNA末端利用聚合酶修飾並接上klenow片段A-tailed，接著進行10~18個循環的PCR反應，以豐富修飾過的DNA片段。利用qPCR驗證樣品的質量，該樣品就能利用Illumina miseq被定序(Figure 3-3)，本實驗宏基因定序委託YourGene BioScience操作，定序儀為Illumina Genome Analyzer V2.5，本次定序設定如下：序列Library 種類為 Whole genome library，產生資料量為2 GB，定序方式為paired-end，定序長度R1為300bp，R2為300bp。

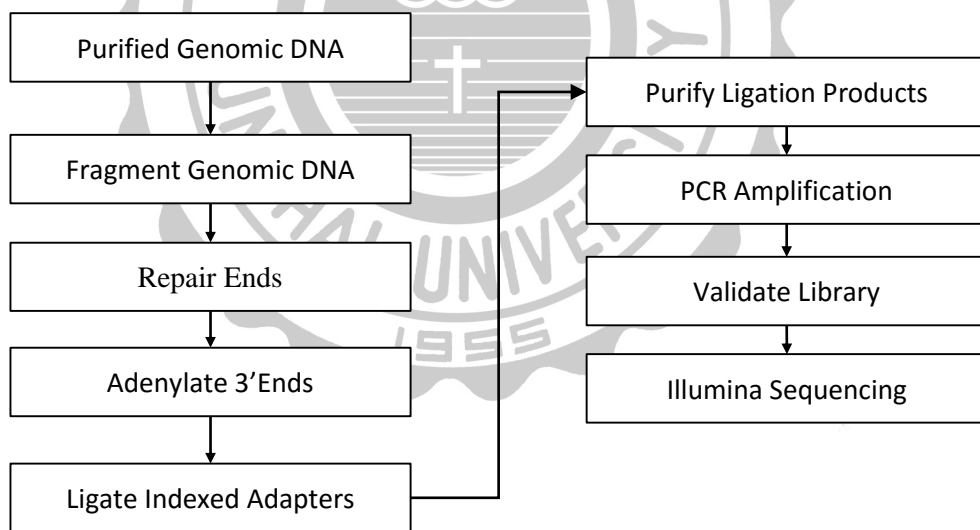


Figure 3-3 宏基因定序實驗流程圖。

3.4.2 定序結果分析與序列比對分類

定序結果首先將所有R2序列依重疊區域反向互補接上R1，再將序列來源可能為同一物種之序列組裝，組裝條件為100bp中少於10個mismatch即可被組裝。這些經組裝的序列以National Center for Biotechnology Information (NCBI)的Basic Local Alignment Search Tool 之 BLASTn方式比對核酸資料庫(即：核酸序列比對核酸序列)，使用Metagenome analysis (MEGAN)軟體讀取BLASTn輸出的xml檔，MEGAN軟體會依照BLAST的結果生物分類法(Biological classification)之分類階級(taxonomic ranks)製作樹狀圖，並在節點大小表示數量。

3.4.3 帶有生物訊息的基因序列

DNA 序列上可以轉譯成蛋白質的部分稱為 Open Reading Frame (ORF)，而通常會在起始密碼子(initiation codon)ATG 開始到終止密碼子(termination codon) TAA、TAG 或 TGA 之前結束，而宏基因定序可能有讀取錯誤使基因序列備位移，所以利用 MetaGeneMark 軟體工具來檢定定序結果的合理性，目標就在起始密碼子與終止碼之間的範圍，計算轉譯過後符合生物性質的一種排列組合作為修正結果，但是若此框架片段的密碼子小於 50 個，通常會被認為是無效的框架，無法轉譯成蛋白質。

3.2 利用 PCR 預測

利用 PCR 可以初步判定樣品中是否存在目標基因，以避免在 Real-time PCR 實驗時產生誤判，測試的結果也代表著核酸萃取以及反轉錄成功與否，而本研究參考檢測環境病毒之文獻所使用的引子，利用 Aligment 軟體檢查病毒全基因型的基因與引子是否有不滿足 PCR 條件的情形並進行微調，制定出屬於檢測環境腸道病毒全基因型的偵測引子，而本研究目標的腸道病毒-HAdV, HEV, NoV-gi, NoV-gii, HAV。

目標基因為 HAdV-Hexon, HEV-5'NCR, NoV-gi-RdRp, NoV-gii-RdRp, HAV-VP1 基因，PCR 反應所使用的材料相同，多組引子的 HEV、NoV 需要等體積愈混合在使用，每次 PCR 反應包含 12.5 μ L 的 Master mix (EmeraldAmp® MAX HS PCR Master Mix)，10mM 的 Forward 與 Reverse 引子各 1 μ L (最終反應濃度為 400nM)及 2.5 μ L 萃取之病毒 DNA，最後加入不含 RNA 降解酶之純淨水使總反應體積為 25 μ L。配置好藥劑的樣品接著使用梯度溫度 PCR 反應器(Mycycler Thermal cycle PCR, Bio-rad, USA)調控溫度梯度以 94 $^{\circ}$ C 持續 5 分鐘，接著 94 $^{\circ}$ C 使雙股 DNA 分離 30 秒、引子黏合 DNA 30 秒(HAdV : 60.2 $^{\circ}$ C, HEV : 59.8 $^{\circ}$ C, NoV-gi : 57.3 $^{\circ}$ C, NoV-gii : 59.5 $^{\circ}$ C, HAV : 60.1 $^{\circ}$ C)、72 $^{\circ}$ C 讓聚合酶接合引子延伸 30 秒皆循環 45-50 次，最後保持 5 分鐘於 72 $^{\circ}$ C 確保 PCR 反應完成擴增，接著將 PCR 產物置入洋菜膠體電泳分離 DNA 來判讀 PCR 反應的成果(Table 3-1)。

3.2.3 洋菜膠體電泳

DNA 分子可藉由 DNA 骨架-長鏈磷酸根-糖所帶負電的特性、提供電場使 DNA 在膠體中往正極移動，在具有孔隙特性的洋菜膠體中移動，而 DNA 片段長度不同在孔隙移動時因為短片段易通過孔隙，產生速率的差異，藉此分離不同長短的 DNA 片段，並依 PCR 擴增片段長度配置適當濃度的洋菜膠體。配置 1.5% 的洋菜膠體，取 0.3g 的 Agarose (AMRESCO) 粉末於 TAE Buffer (Tris-base 40 mM, NaOAc 20

mM, EDTA 1 mM, pH 8.3, BioTechnology) 中，反覆微波加熱使 Agaroses 粉末溶解直至 TAE Buffer 呈現透明後待溫度稍下降但凝固前加入 EtB⁺Out⁺Nucleic Acid Staining Solution，使最終濃度: $5 \times 10^{-3} \%$ (Yeastern Biotech, Taipei, Taiwan)，搖均倒入製膠台中。待凝固後將膠體浸泡於含 TAE Buffer 電泳槽中，將 5-10 μL 之 PCR 產物注入膠體孔洞中，另為評估 PCR 產物的片段大小，另將 100-3000 bps ladder (Fermentas, altham, USA) 注入另一孔 24 洞中。樣品和 ladder 皆注入後，以 50 V 進行水平式電泳約 40-50 min。最後以電泳影像照膠系統 (Major Science, Saratoga, USA) 檢驗是否具有可視化的亮帶來評估 PCR 結果。

3.3 腸道病毒 Real-time PCR 量化分析

環境中的物種歧異度高，使具高專一性的檢測技術受到限制，透過病毒之血清型基因的整合，設定出可囊括相同病毒種類之引子時，同時對同種病毒做通盤的檢測，避免少數族群未測得的損失。本實驗室並針對人類腸道病毒整合出通用引子，腺病毒 (Human Adenovirus) 延續使用本研究團隊先前分析台灣地區腺病毒的引子及探針，腸病毒 (Human enterovirus)、諾羅病毒 (Norovirus)、A 型肝炎病毒 (hepatitis A virus) 本研究參考文獻報告中所使用過的引子及探針進行全血清型的基因比對，再經過微調及篩選得到可以讓腸道病毒之血清型通用的引子及探針 (Table 3-1,2,3,4)。

3.3.1 腸道病毒標準品製備

本研究根據檢測環境病毒的文獻資料中的引子及探針，微調文獻中的引子及探針序列，找出可以符合腺病毒、腸病毒、諾羅病毒及 A 型肝炎病毒之全基因型序列片段作為檢測的目標基因，而製作標準品所需的基因片段，本研究使用自訂的引子測試環境樣品進行 PCR 擴增目標基因，以及從臨床檢體中所分離出來的已知病毒取得目標基因，或是利用人工合成目標基因片段，取得所需要的標的基

因(target gene)之 DNA 片段接合載體(pBlueScript II KS+)並植入勝任細胞(DH5 α)，培養次代進行基因選殖，接著雙向序列定序確保合成之基因正確，即為本研究之定量標準品，而本研究最終取得目標基因的結果，腺病毒為環境中塞選出來的 HAdV-F41 型、腸病毒為病人檢體中分離出來的 HEV-B12 型，而諾羅病毒 GI,GI 以及 A 型肝炎病毒未能在環境中擴增出目標基因，所以利用人工合成的方式取代，而合成之病毒基因序列為 NoV-GI: U04469、NoV-GII: X86557、HAV: AB623053 目標基因片段。

利用 PCR 反應擴增 HAdV、HEV、NoV-gi,gii、HAV 標基因片段，將 PCR 產物以 yT&A Cloning kit (Yeastern Biotech, Taipei, Taiwan) 進行連接，於 0.1 mL PCR 反應管中依序加入各 1 μ L ligation buffer A 和 ligation buffer B，2 μ L T&A TM cloning vector(Figure 3-4)，5 μ L PCR 產物及 1 μ L yT4 DNA ligase，並在 4 $^{\circ}$ C 隔夜。

將上述 yT&A 載體連接與 PCR 反應管中混合液將加入 Escherichia coli DH5 α competent cell，先以室溫水將 1.5 mL 離心管內勝任細胞解凍約 1/2 體積後立刻置於碎冰上，將 PCR 反應管內所有混合液全部加入離心管內並簡要震盪 1 秒，於 42 $^{\circ}$ C 水浴 45 秒，加入 200 μ L 的 SOC 培養基(2% (W/V) Tryptone，0.5% (W/V) yeast extract，0.05% (W/V) NaCl，2.5 mM KCl 10 mM MgCl₂，20 mM glucose)並在 37 $^{\circ}$ C 下震盪 2 小時，接著各抽取 10、50、200 μ L 培養液滴於含有加入 Ampicillin(100mg/ml)、IPTG(24mg/ml)、X-Gal(20mg/ml)的 LB 培養盤(1% peptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 100 μ g/mL of ampicillin)上並均勻塗抹後，在 37 $^{\circ}$ C 隔夜培養。將盤養盤上有長出初代菌株後使用無菌的接種環挑起單一純菌，劃盤於另一 LB 培養盤上，再一次以 37 $^{\circ}$ C 培養。

對次世代單一菌株進行 Colony PCR 確認 PCR 擴增片段是否嵌入載體。於 PCR 反應管中加入 12.5 μ L Master mix，再加入 yT&A Cloning kit 所附贈 M13 Forward/M13 Reverse 各 1 μ L(Figure 3-5)，接著加入 10.5 μ L H₂O 使總體積為 25 μ L，再以滅菌牙籤挑起次世代菌株並沾於 PCR 反應管後進行 PCR 反應，PCR 反應溫度如下：94 $^{\circ}$ C 持續 5 分鐘、及 25 個循環 (94 $^{\circ}$ C, 30 sec、55 $^{\circ}$ C, 30 sec、72 $^{\circ}$ C, 50 sec) 最

後保持7 min 於72°C。經膠體電泳圖判斷PCR擴增片段是否有成功嵌入質體。

經Colony PCR 確認質體含有擴增片段後，以5mL液態LB培養基培養16-18hr，以 Gene-Spin™ Miniprep Plasmid Purification Kit (Protech Technology, Taipei, Taiwan)抽取質體。本流程一律以13,100×g離心；首先將5mL菌液於離心管離心1.5 min，並去除上清液體，於剩下的沉澱物加入200μL solution I (50 mM glucose, 25mM Tris-HCL, 10 mM EDTA)並震盪混合後，接著加入200μL solution II (0.2M NaOH, 1% SDS) 並翻轉離心管五次使溶液混合，再加入200μL solution III (3M sodiumacetate)後再翻轉離心管五次並離心5min。組合Spin column和Collection tube，將離心上清液移至Spin column離心並棄濾液，加入700μL Wash Solution 並離心，再加入一次Wash Solution離心後棄流出液。接著在空離心5 min 去除殘留液，將Spin column移入新的離心管，加入50~100μL的Elution Solution靜置2 min 後離心，保留DNA 流出液並存放於-20°C。

以Nanodrop分光光度儀測量上步驟所抽取之質體在260nm波長下吸光度，換算成質體濃度(ng/μL)，再轉換成每單位體積的copies 數，如下述：

$$\frac{c \left(\frac{ng}{\mu l} \right) \times 6.022 \times 10^{23} \left(\frac{copies}{mole} \right)}{2950(bps) \times 10^9 \left(\frac{1}{n} \right) \times 660 \left(\frac{g}{mole \times bps} \right)}$$

- C 為分光光度計在波長260nm所測得質體濃度。
- 6.022×10^{23} 為1M濃度下的理想病毒copies數。
- 2950 bp為3.5.1步驟所使用載體長度2728bps加上所連接上的PCR產物bps 共2950 bps。
- 10^9 為因次換算，而 $660(g/mole \times bps)$ 為DNA 每一個核苷酸的平均分子量。

將所製備質體濃度約有 10^9 (copies/μL)，將此濃度稀釋成 5×10^8 (copies/μL)，並採取連續十倍稀釋得 5×10^n ，n=2-8 之梯度濃度標準液，存於-20°C。

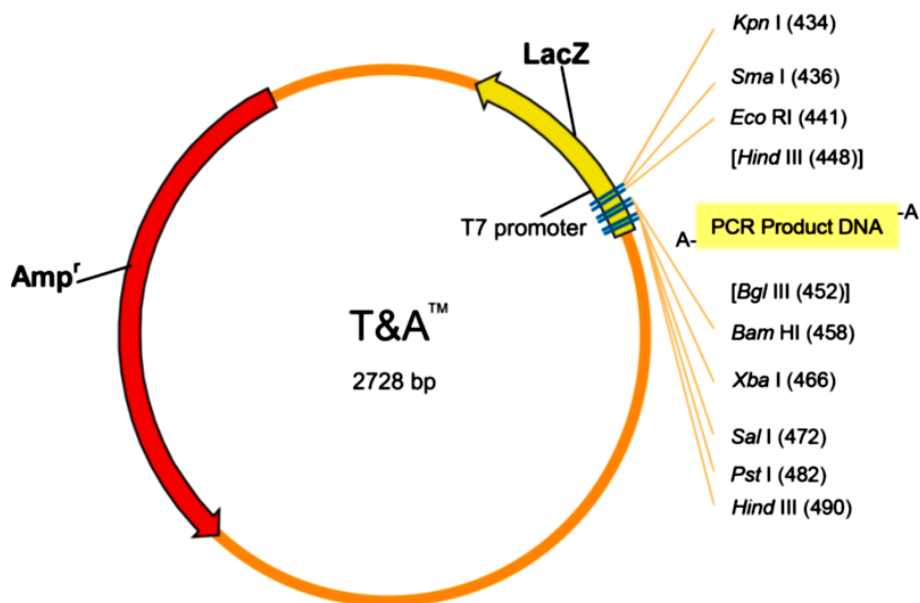


Figure 3-4 yT&A克隆載體及擴增片段所連接位置。

301	TACGCCAGCT	GGCGAAAGGG	GGATGTGCTG	CAAGGCGATT	AAGTTGGGTA	
	ATGCGGTCGA	CCGCTTTCCC	CCTACACGAC	GTTCGGCTAA	TTCAACCCAT	
	M13 Forward Primer					
351	ACGCCAGGGT	TTTCCCAGTC	ACGACGTTGT	AAAACGACGG	CCAGTGAATT	
	TGCGGTCCCA	AAAGGGTCAG	TGCTGCAACA	TTTTGCTGCC	GGTCACTTAA	
	T7 Promoter					
401	GTAATACGAC	TCACATATAGG	GCGAGCTCGG	TACCGGGCG	AATFCCAAGC	
	CATTATGCTG	AGTGATATCC	CGCTCGAGCC	ATGGGCCCGC	TTAAGGTTCCG	
		<i>Bgl</i> II	<i>Bam</i> HI	<i>Xba</i> I	<i>Sal</i> I	<i>Pst</i> I
451	TT	AGATCTGGAT	CCCCTCTAGA	GTCGACCTGC	AGGCATGCAA	
	AA	TCTAGACCTA	GGGGAGATCT	CAGCTGGACG	TCCGTACGTT	
	<i>Hind</i> III					
493	CGTTGGCGTA	ATCATGGTCA	TAGCTGTTTC	CTGTGTGAAA	TTGTTATCCG	
	GCAACCGCAT	TAGTACCAGT	ATCGACAAAG	GACACACTTT	AACAATAGGC	
		M13 Reverse Primer				

Figure 3-5 擴增片段於載體上所連接位置及Colony PCR 所用引子區域片段。

3.3.2 腸道病毒量化分析

Probe 探針黏合的位子介於 Forward 和 Reverse 引子之間，而帶有螢光訊號的探針會在 PCR 擴增的同時被釋放出來，屆時使用螢光偵測儀累計訊號的數量，本研究量化分析使用 StepOne™ Real-Time PCR 系統(Applied Biosystems, California, USA)，每次定量反應管中含有 5 μ L TaqMan® Universal Master Mix II, with UNG (Applied Biosystems, California, USA)、10mM 的 Forward 與 Reverse 引子各 0.5 μ L (最終反應濃度為 200nM)、Probe 探針 0.3 μ L (最終反應濃度為 330nM)及 DNA 萃取樣品 2.5 μ L，針對腺病毒、腸病毒、諾羅病毒及 A 型肝炎病毒進行 CWW 及 RCW 樣品定量，所用引子與探針如 Table 3-1，最後加入無核酸水使總反應體積為 10 μ L。配置好藥劑的樣品接著置入 Real-time PCR 反應器 StepOne (Applied Biosystems, California, USA)調控溫度梯度以 50 $^{\circ}$ C 持續 2 分鐘，接著 95 $^{\circ}$ C 使雙股 DNA 分離 15 秒、引子黏合 DNA 30 秒(HAdV : 60.2 $^{\circ}$ C, HEV : 59.8 $^{\circ}$ C, NoV-gi : 57.3 $^{\circ}$ C, NoV-gii : 59.5 $^{\circ}$ C, HAV : 60.1 $^{\circ}$ C)、72 $^{\circ}$ C 讓聚合酶接合引子延伸 15 秒皆循環 45-50 次並同時偵測螢光訊號，最後保持 30 秒於 72 $^{\circ}$ C 確保反應完成。檢量線也利用相同的藥品配置方法。

Table 3-1 本研究對腸道病毒所使用的引子。

Virus	Primers	Sequence	Expected size(bps)	Target region	Annealing temperature(°C)	Reference
HAdV	JTVX-F	GGACGCCTCGGAGTACCTGAG				
	JTVX-R	ACIGTGGGGTTTCTGAACTTGTT	222	Hexon	60.2	Jothikumar <i>et al.</i> , 2005
	JTVX-P	FAM-CGACKGGCAGCAAKCGCAGCGT-BHQ				
HEV	EV-F	CCTCCGGCCCCTGAATG				
	EV-r1	RATTGTCACCATAAGCAGCCA				
	EV-r2	TRTCAGTCAATGTCACCAT	154	5'NCR	59.8	Nijhuis <i>et al.</i> , 2002; Verstrepen <i>et al.</i> , 2001
	EV-r3	TCTCAACAATTGTCACCATAAAR				
	EV-p1	FAM-ACACGGWCACCCAAAGTAGTCGGTTCC-BHQ				
	EV-p23	FAM-CGGRGTACCGAAAGTAGTCTGTCCG-BHQ				
NoV-gi	NoV-gi-f	CATgTTCCgYTggATgCg				
	NoV-gi-r1	gCACCCTgTgCCATC				
	NoV-gi-r2	CgCCgCTTgCgCCATC	129	RdRp	57.3	
	NoV-gi-r3	CgCCACTggCgCCATC				
	NoV-gi-p	FAM-CgTCCTTAgACgCCATCATCATTTAC-BHQ				Kageyama <i>et al.</i> , 2003; Loisy <i>et al.</i> , 2005; Hoehne <i>et al.</i> , 2006
NoV-gii	NoV-gii-f1	gCCAATgTTCAGATggATgAg				
	NoV-gii-f2	CCAATgTTCAGgTggATgAg				
	NoV-gii-f3	CCATgTTCAGgTggATgAg	96	RdRp	59.5	
	NoV-gii-r	TTCgACgCCATCTTCATTCACA				
	NoV-gii-p	VIC-TTgCgATCgCCCTCCACgTgCT-BHQ				
HAV	HAV-f	GGGTGAAACCTCTTAGGCTAAT				
	HAV-r	CGGCGTTGAATGGTTTTTGTC	104	VP1	60.1	Hanai <i>et al.</i> , 2014; Hewitt <i>et al.</i> , 2013
	HAV-p	FAM-CAATATCCGCCGCTGTACCCTATCCAA-BHQ				



第四章 結果與討論

- 4.1 校園民生廢水與回收水之病毒組成分析
 - 4.1.1 宏基因定序之序列組裝(asmbling)結果
 - 4.1.2 分析不同組裝方法的差異
 - 4.1.3 萃取的病毒核酸濃度與病毒族群的關係
- 4.2 宏基因定序組利用 MEGAN 分析
 - 4.2.1 比對 NCBI 的物種資料庫的結果
 - 4.2.2 校園廢水及回收水中的病毒族群
 - 4.2.3 大量的噬菌體
 - 4.2.4 影響人類用水安全的病毒
- 4.3 調查水中腸道病毒濃度
 - 4.3.1 腸道病毒通用引子歸納
 - 4.3.2 腸道病毒在校園廢水及回收水中的濃度

第四章 結果與討論

4.1 校園民生廢水與回收水之病毒組成分析

4.1.1 宏基因定序之序列組裝(assembly)結果

宏基因定序產生出龐大的原始序列(Raw reads)需要經過修剪(quality trimming, QT)，讓定序過程中產生錯誤機率高的 bps 修剪掉(Q 值為 0.05)，QT 處理過後的 raw reads 保留約 92.1-99.9%，且經過修正的每條 raw read 長度大約減少 19.67-31.73%，而宏基因定序 raw reads QT 處理的資料量分別為 CWW-ut： 2.24×10^9 bps 和 RCW-ut： 2.19×10^9 bps；CWW-twsf： 1.87×10^9 bps 及 RCW-twsf： 3.19×10^9 bps，raw reads 長度為原先的短 31.73%(CWW-ut)和 30.02%(RCW-ut)平均序列長度為 146.5 bps；19.67%(CWW-twsf)及 22.39%(RCW-twsf)平均序列長度為 237.7 bps (Table 4-1)，顯示有去除游離 DNA 的樣品所產生出來的宏基因定序資料品質較好。

而處理過後的 Raw read 接著組裝成 contigs，組裝的條件需要滿足每 100 bps 含 90%相同，利用基因組學工作平台(CLC Genomics Workbench® CLC bio)來組裝 QT 過後的序列，運算的原理是使用 *De novo* assembled 的序列重組方法，將所有子序列中互相重疊及比對，相疊之外的部分使序列延伸，基礎長度逐漸加長，組裝的結果顯示約 50.1-62.23%的 contigs 無法接在一起，只有少部分的 contigs 可以黏接長度大於 100kb 以上，最長 Hits 的 contigs 不超過 20Kb，且長度介於 10K-20Kb 的 contigs 約 90%皆屬於 phage，而絕大部分的 contigs 長度集中在 10k bps 以下，然而長度越長的序列未能比對出相對應結果，如長達 100kb 之 contigs 與基因庫已知物種的相似度最高為 1%(Figure 4-1)。最後產生最終的 contig 之數量分別為 CWW-ut 的 261,123 條和 RCW-ut 的 239,960 條 contigs，平均 contigs 序列長度分別為 642.39 及 618.37 bps；CWW-twsf 的 180,679 條和 RCW-twsf 的 332,152 條 contigs，平均 contigs 序列長度分別為 793.58 及 743.35 bps。接著利用 N50(contig 依長度排名從低到高的中位數長度)指出 contigs 的質量中心位子，從最長的 contig

開始排序下來，當累加到總長度的 50% 時所加上的 contig 長度代表 N50，也代表有一半的 contig 長度大於 N50 (Table 4-1,2)。

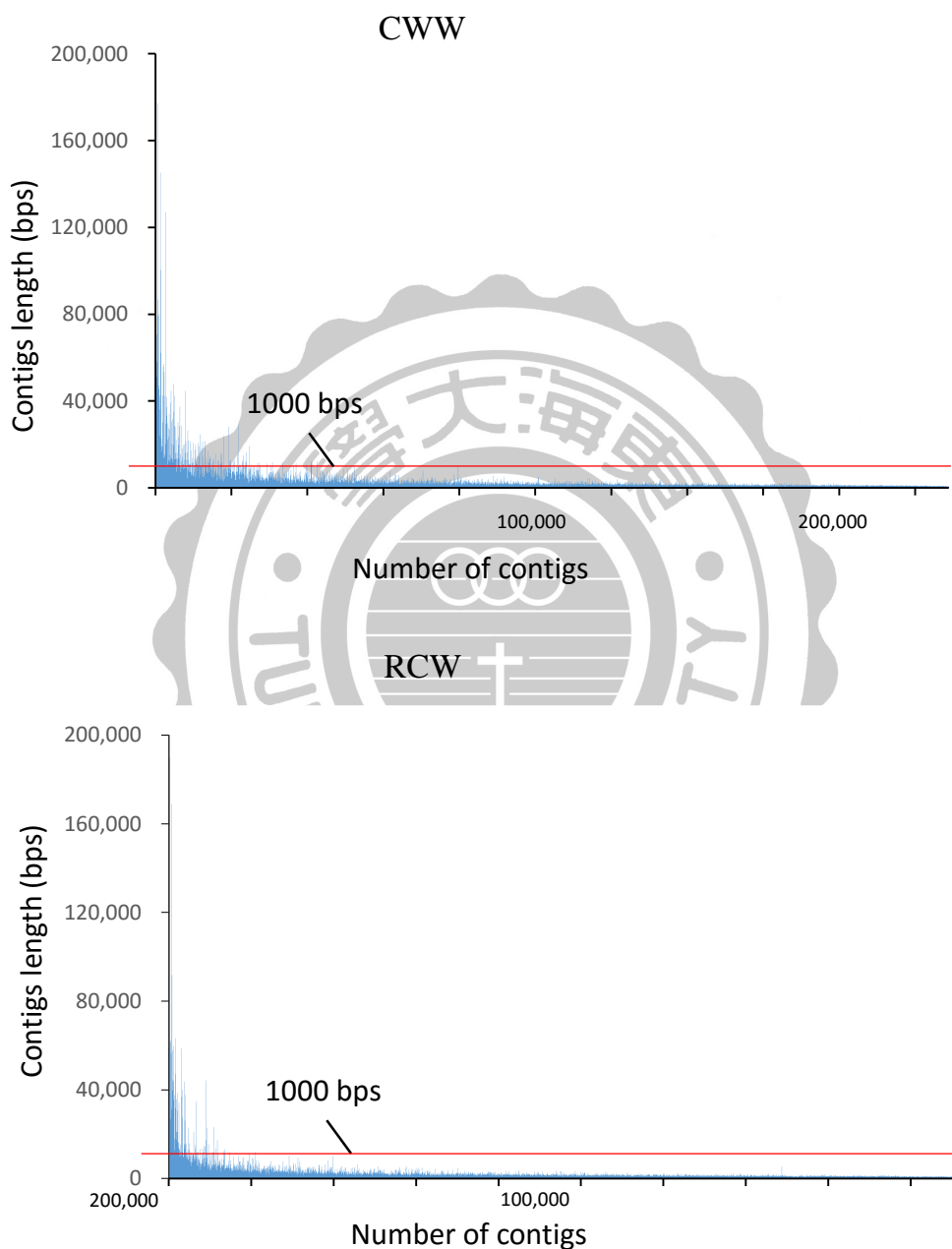


Figure 4-1 將 Assembled 之 contigs 排列出來，顯示出宏基因定序的長度分布

Table 4-1 宏基因定序的序列結果顯示。

Sample	Untreated		Treated with silicon filter	
	CWW	RCW	CWW	RCW
Total reads	18,379,302	15,677,084	7,723,116	13,667,858
Read length	193.5	211.2	301	301
Total reads after adapter trimming	18,377,956	15,675,324	7,723,116	13,667,451
Average read length after adapter trimming	185.5	191.0	253.2	243.8
Total reads after QT	16,936,991	14,788,561	7,716,000	13,649,188
Average length after QT	132.1	147.8	241.8	233.6
Total base after QT	2,237,299,407	2,186,178,334	1,865,728,800	3,188,450,316
Average insert size (bp)	313	308	204	175

Table 4-2 *de novo* assembled 所組裝序列的統計結果。

Sample	Untreated		Treated with silicon filter	
	CWW	RCW	CWW	RCW
GC content	47 %	49.6 %	53.9%	50.5%
Max contig length	177,204	939,725	181,760	740,782
Min contig length	200	200	200	200
Avg contig length	642.39	618.37	793.58	743.35
Total contig length	167,743,106	148,382,876	143,382,768	246,905,734
N50	679	631	904	815
Number of contig	261,123	239,960	180,679	332,152
# contig >= 300b	220,137	206,192	160,704	300,524
% of contig >= 300b	93.7 %	94.1 %	96.4%	96.7%
# contig >= 1kb	26,641	20,581	28,190	47,853
% of contig >= 1kb	36.1 %	31.8 %	46.3%	40.9%
# contig >= 10kb	497	289	576	627
% of contig >= 10kb	6.3 %	6.2 %	8%	6.5%
# contig >= 100kb	6	9	6	12
% of contig >= 100kb	0.5 %	2.2 %	8%	1.4%
Number of N	197,754	38,312	4,825	5,245
N-percentage	0.12 %	0.03 %	0.003%	0.002%

* Data required: 0.2G (each sample)

* QT = quality trim (criteria: min length = 35bp, error probability < 0.05)

4.1.2 分析不同組裝方法的差異

目前已經有多種運算技術來分析宏基因定序的數據，在本研究結果中發現不同的運算方法會有的差異，結果顯現出透過 ORF prediction 的宏基因定序的資料 (contigs) 能 Hits 到基因庫的比例增加，ORF prediction 軟體工具調整 *de novo* assembly 組裝的位置 (Meyer et al., 2007)，透過 ORF prediction 運算之後的 contigs 比對 NCBI 基因庫的結果，Assigned 的比例高出 10 倍，從約 10^3 提高到 10^4 contigs (Table 4-3)。從 *De novo* assembly 運算的結果顯示出細菌的基因數量高出病毒基因許多，ORF prediction 的結果使病毒的比例大幅增加，且細菌的 contigs 數量有漸少。

理想情況 Assembly 可以組裝成源物種的全基因，同源的基因序列會接在同一條 contigs 上，而序列相似度滿足組裝的條件時便會架接在一起，且核酸樣品處理的太小 (200 bps) 增加了組裝的難度，Assembly 的結果就有多種組裝的可能，我們利用 MetaGeneMark 軟體工具排除 contigs 組裝的錯誤回到正確的位置或是將 contigs 分開來，所以 contigs 的數量會有所增加，將 contigs 經過 ORF prediction 過後的核酸片段為 CWW-ut:372,470 contigs、RCW-ut:320,635 contigs、CWW-twsf:285,161 contigs 及 RCW-twsf:368126 contigs (Table 4-4)，將此修正結果比對 NCBI 的核酸資料庫 (BLAST-nt)，並匯出一個含有每條 contig 的分類報告 (檔案為 XML 格式)，將檔案匯入 MEGAN 分析軟體，此軟體將依照分類報告編排顯示數量 (Edwards and Rohwer, 2005)。

而本研究會有兩種不同的樣品處理方式是因為 *de novo* assembly 的 contigs 比對基因庫之後的 Assigned 佔 Total contigs 的比例小於 1%，這樣的結果不如本研究的預期，而根據其他水中病毒組成的文獻報告指出，樣品處理的方法與本研究有所不同，使用 CsCl Gradient Centrifugation method 來純化病毒樣品，利用病毒密度的特性與其他非病毒的雜質分離 (如細菌、游離 DNA)，由這樣的實驗方法產生的病毒基因約佔 20-60% 之間，顯示本研究樣品處理的方法需要改進，所以在實驗設備有限的情形之下，本研究利用帶有電性的 silicon filter 吸附游離 DNA；

孔徑 0.2 μm 的薄膜過濾水樣排除細菌存在的可能，使最終的水樣只有病毒顆粒，為了確保處理過後的樣品中未含有細菌及游離 DNA，所以將處理過的 CWW 及 RCW 樣品利用 PCR 擴增 16s rRNA gene 來檢測細菌以及游離 DNA 是否完全去除，根據電泳的顯影可以得知，樣品中是否含有細菌以及游離 DNA(Figure 4-2)，這使得本研究宏基因定序的樣品有兩種樣品處理方式。

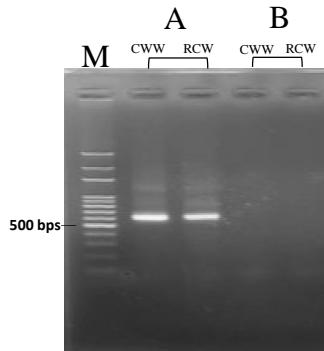


Figure.4-2 此圖為 16s rRNA 存在樣品中的 PCR 測試，分別三組(A)原濃縮樣品 (B)將濃縮樣品經過 silicon filter 去除游離 DNA 的樣品。

Table 4-3 兩種不同的資料的運算結果顯示出 contigs 數量及比對 NCBI 結果的差異

algorithms	samples	Total Contigs				First-matched			
		No hits	Hits	No assigned	Assigned	Bateria	Archaea	Eukaryote	Viruses
<i>De novo</i> Assembly	CWW-ut	<u>304,743</u>	<u>2,317</u>	<u>74</u>	<u>2,243</u>	<u>1,809</u>	<u>6</u>	<u>24</u>	<u>389</u>
	RCW-ut	<u>493,364</u>	<u>1,813</u>	<u>57</u>	<u>1,756</u>	<u>1,393</u>	<u>3</u>	<u>11</u>	<u>333</u>
ORF prediction	CWW-ut	<u>321,768</u>	<u>42,952</u>	<u>3,332</u>	<u>39,620</u>	<u>787</u>	:	:	<u>38,833</u>
	RCW-ut	<u>286,172</u>	<u>34,463</u>	<u>2,568</u>	<u>31,895</u>	<u>756</u>	:	:	<u>32,947</u>

Table 4-4 ORF 預測的結果

Samples	Untreated		Treated with silicon filter	
	CWW	RCW	CWW	RCW
# genes (ORF prediction)	372,470	320,635	285,161	368,126
# genes with hits in NCBI <i>nr</i> database	42,952	34,463	36,065	42,066
# genes without hits in NCBI <i>nr</i> database	329,518	286,172	241,776	326,060

4.1.3 萃取的病毒核酸濃度與病毒族群的關係

定序之前的處理作業，必須將混合的樣品萃取出DNA病毒的核酸與RNA病毒的核酸(RNA要反轉錄成cDNA)，根據病毒在廢水中的研究調查未顯示出季節影響病毒的濃度，所以將四個月份的樣品混合後檢測病毒族群，而本研究的樣品來自東海大學的廢水處理系統之一月、四月、六月、十一月的病毒濃縮樣品等體積混合，而CWW萃取出核酸質量與RCW相差約2-4倍，CWW及RCW之未處理(Untreated, UT)與矽膜處理(Treated with silicon filter, Twsf)的四種混合樣品的核酸總質量CWW與RCW分別為UT的963及219.6ng、Twsf的768及336ng (Table 4-5)。這可能表示CWW的病毒數量與RCW之間的差距，使得萃取病毒核酸的結果產生差異，但是本研究結果表明CWW及RCW的病毒族群相像，且RCW的病毒濃度有時會高於CWW的樣品濃度，這顯示了結果與核酸質量的相關性不高。

Table 4-5 CWW 與 RCW 核酸混合液所測得濃度、體積、核酸質量與 260/280 吸光值比值，及定序時核酸樣品須符合的核酸質量與吸光度範圍。

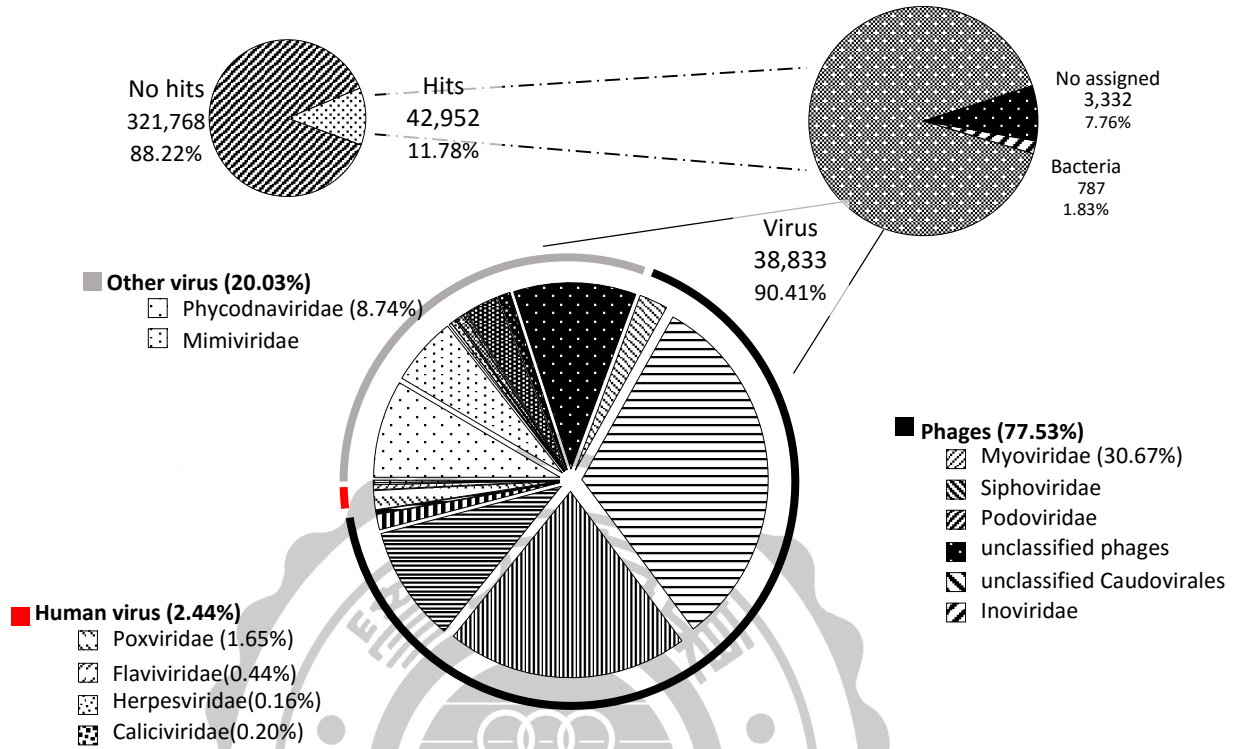
Sample name	CWW		RCW	
	UT	twsf	UT	twsf
Concentration (ng/ μ L)	1063	1553	837.2	1150
Volume (μ L)	30	9	30	9
Total amount (ng)(>200ng)	768	963	336	219.6
260/280 ratio (1.8-2.0)	1.46	1.88	1.49	1.87

4.2 宏基因定序組利用 MEGAN 分析

4.2.1 比對 NCBI 的物種資料庫的結果

比對結果將分出已知(Hits)及未知(No hits)的兩個部分，Hits 與 No hits 的比值 1：8，No hits 是基因庫完全未知的或是非生物基因的序列，成功組裝的 hits 的部分即為物種資料庫已知或是新生命體的基因，CWW 及 RCW 的樣品 Hits 的比例相像，表示這兩個樣品的處理方法的一致性，而比對到基因庫的結果(Assigned)絕大部分皆為病毒族群約占 90%，少部分為細菌及未知的物種(Figure 4-3,4)。本實驗使用專為病毒濃縮之採樣及萃取程序；環境病毒樣品濃縮處理程序中以 0.22 μ m 濾紙過濾細菌，因此大量的 bacteria 的基因將會減少很多，因此在宏基因定序結果中出現的細菌結果，可能來自於未被 Silicon filter 吸附的部份游離之細菌 DNA(可能來自死亡瓦解之 bacteria)以及病毒從宿主中繁殖時包裹的細菌 DNA(因此再萃取環境病毒的核酸時，一起被純化到病毒核酸萃取液中)，而在進行宏基因定序時，這些細菌 DNA 也參與定序反應，便占據一些對病毒定序的效果。另外噬菌體可能會感染水樣中的多種微生物，使微生物死亡而破裂，導致核酸物質游離出而讓水樣中含游離細菌基因序列。從 hits 的結果顯示細菌與病毒的比例是經過 silicon filter 處理不能完全去除游離 DNA 沒有明顯的效果。而在各國的文獻當中，本研究的 Hits 的比例相較於其他文獻的結果略低約在 40-60%，而本研究 Hits 的比例約為 10.75-12.65%，有些文獻則未表示 Hits 與 No hits 的比例；本研究 Contigs 的數量與其他研究團隊做比較是高出許多(平均 59,926 contigs)，而其他文獻的結果皆低於本研究之下(Table 4-6)，因此我們認為是新一代-宏基因定序儀的穩定性有所突破，所以在數量及組裝的品質有所提升；而這些文獻所使用的病毒採樣方法皆為超高速梯度分離法來純化病毒，而本研究是經過繁複的病毒濃縮的程序，使用 1MDS 濾膜來蒐集病毒顆粒，再用高壓鍋爐將濾膜上的病毒顆粒反沖洗出來而得到的病毒樣品，因此在實驗方法上造成定序結果，因此屬於病毒族群的 contigs 數量遠大於其他文獻。

Campus Waste Water- Untreated



Reclaimed water-Untreated

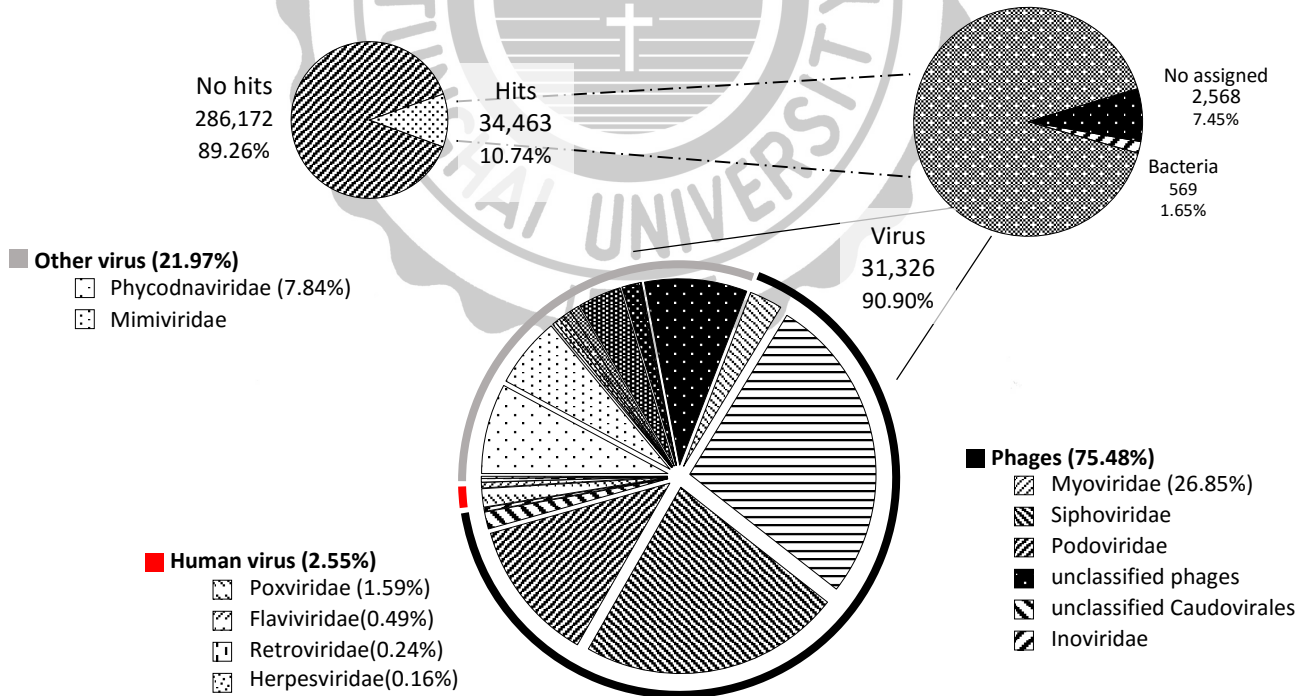
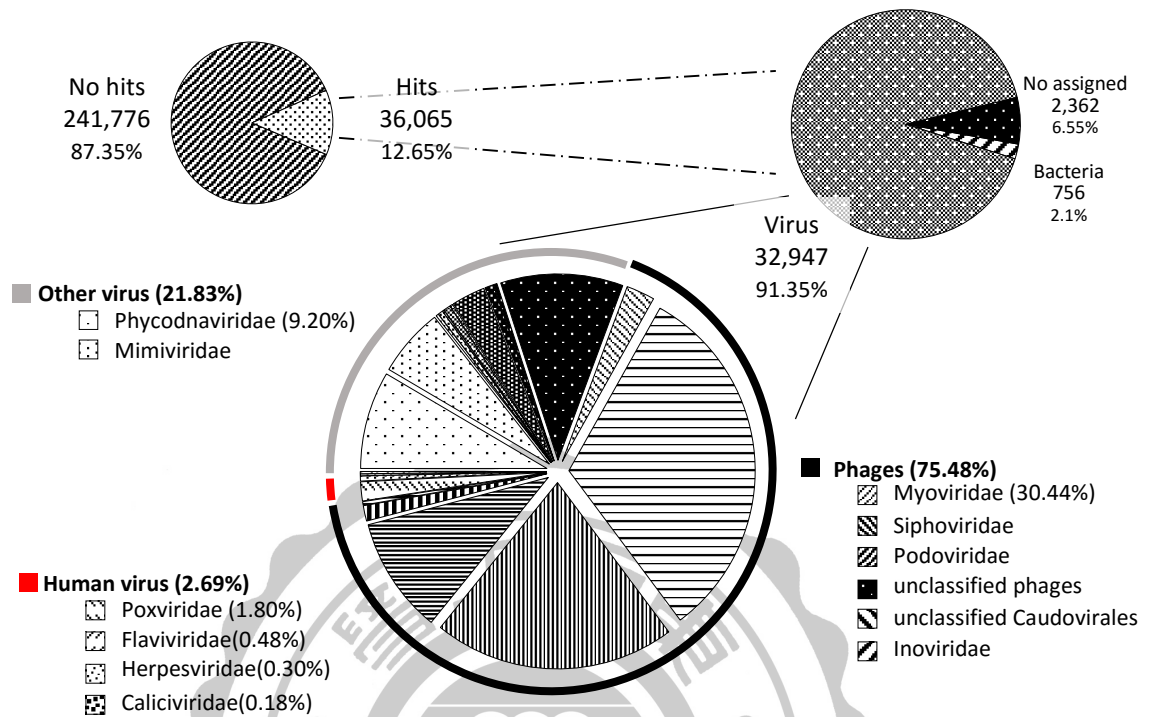


Figure 4-3 CWW 及 RCW 的病原體組成，以及宏基因定序的結果，與 NCBI 的物種資料庫做比對所鑑定成功的比例。

Campus Waste Water -Treated with Silicon filter



Reclaimed water - Treated with Silicon filter

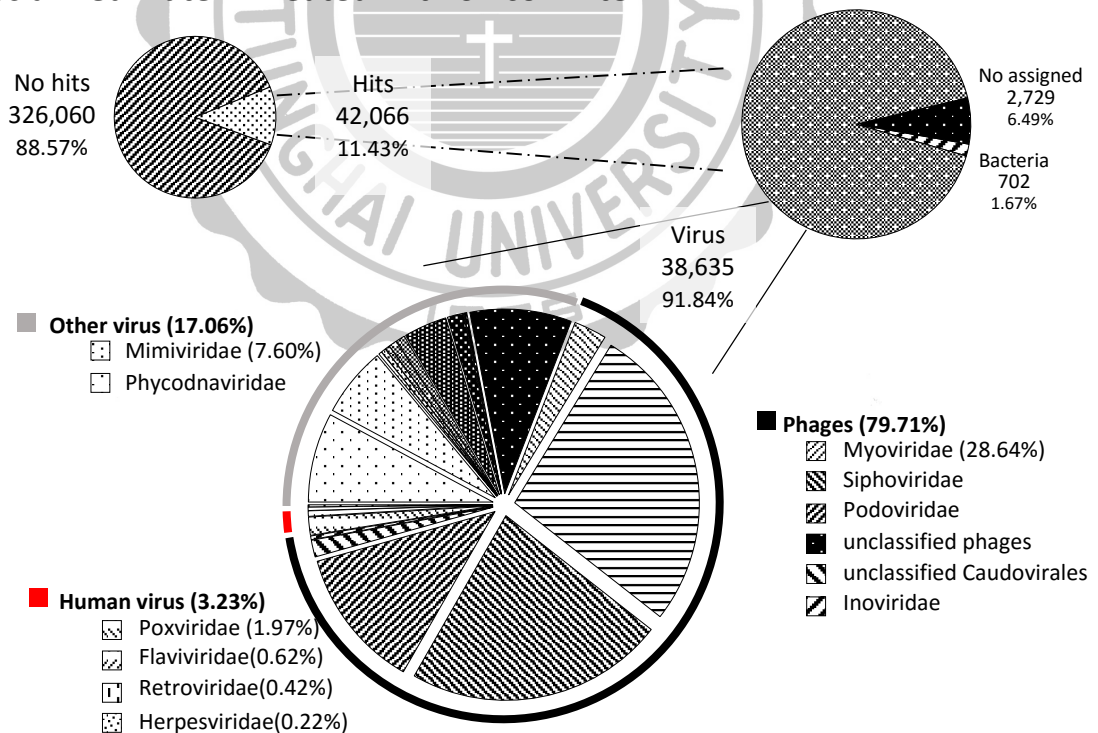


Figure 4-4 CWW 及 RCW 的病原體組成，以及宏基因定序的結果，與 NCBI 的物種資料庫做比對所鑑定成功的比例。

Table 4-6 利用宏基因定序研究水體中生物族群的文獻比較表。

samples	Total Contigs				Community				References
	No hits	Hits	No assigned	Assigned	Bateria	Archaea	Eukaryote	Viruses	
Waste water	<u>321768</u>	<u>42952</u>	<u>3332</u>	<u>39620</u>	<u>1.99%</u>	---	---	<u>98.01%</u>	CWW-ut
	<u>241776</u>	<u>36065</u>	<u>2362</u>	<u>33703</u>	<u>2.14%</u>	---	---	<u>97.86%</u>	CWW-twsf
	---	---	---	<u>51925</u>	<u>64.27%</u>	---	<u>33.80%</u>	<u>0.10%</u>	Bibby et al., 2011
Reclaimed water	<u>286172</u>	<u>34463</u>	<u>2568</u>	<u>31895</u>	<u>1.78%</u>	-	-	<u>98.22%</u>	RCW-ut
	<u>326060</u>	<u>42066</u>	<u>2729</u>	<u>39337</u>	<u>1.78%</u>	---	---	<u>98.22%</u>	RCW-twsf
	<u>13912</u>	---	---	<u>5962</u>	<u>36.28%</u>	<u>0.35%</u>	<u>1.69%</u>	<u>61.67%</u>	Rosario et al., 2009
Lake	<u>5484</u>	---	-	<u>4145</u>	<u>72.91%</u>	<u>0.22%</u>	<u>1.86%</u>	<u>24.99%</u>	
	---	---	---	<u>15376</u>	<u>17.30%</u>	<u>0.30%</u>	<u>15.70%</u>	<u>66.70%</u>	Dijkeng et al., 2009
poTable water	---	---	---	<u>10133</u>	<u>23.80%</u>	<u>0.06%</u>	<u>6.10%</u>	<u>66.90%</u>	
	<u>3664</u>	---	---	<u>4663</u>	<u>70.92%</u>	<u>0.21%</u>	<u>1.87%</u>	<u>25.01%</u>	Rosario 2009

4.2.2 校園廢水及回收水中的病毒族群

在 CWW 及 RCW 的樣品當中病毒族群十分相似，統計結果共有 69 屬(genus) 病毒家族，其中 46 屬皆屬於噬菌體的病毒家族；5 屬會感染人類的病毒族群，此外數量最多為細菌界(Bacteria)的病毒族群占 64.59%、植物界(Plantae)的病毒占 6.67%、原核生物(Protozoa)病毒占 6.62%、動物界(Animalia)的病毒占 4.53% 以及未分類的病毒及未分類的噬菌體占 17.60% (Figure 4-5)，從各病毒的結構資訊發現短邊小於 200 nm 的病毒族群 contigs 數量約有 61-81%，其餘的病毒族群為何能在 RCW 中出現，可能是因為較大型的病毒外殼還包覆著宿主的細胞膜，而此

類的病毒族群經過薄膜時脫去外膜而保留了完整的病毒顆粒，或是部分的薄膜已經受損，使大於薄膜孔徑的病毒顆粒可以穿過，CWW 及 RCW 檢測結果中沒有 MBR 過篩的效果(MBR filter 孔徑 200 nm)，在 RCW 當中還是可以發現體型大於 200 nm 的病毒家族存在於水體當中，而與人類疾病相關的病毒大小為 27-260 nm 之間，通過濾膜的可能性較高，此外噬菌體則是在 50-110 nm，其餘的病毒族群則是 12-400 nm 及長型的病毒結構有 900-2000 nm(Figure 4-6)多是相同的，其中，與腸胃道疾病相關的杯狀病毒科(Caliciviridae)家族以及植物界病毒馬鈴薯 Y 病毒科(Potyviridae)病毒族群只在 CWW 中出現；不導致人類疾病的 Retroviridae 病毒家族在 RCW 中出現。

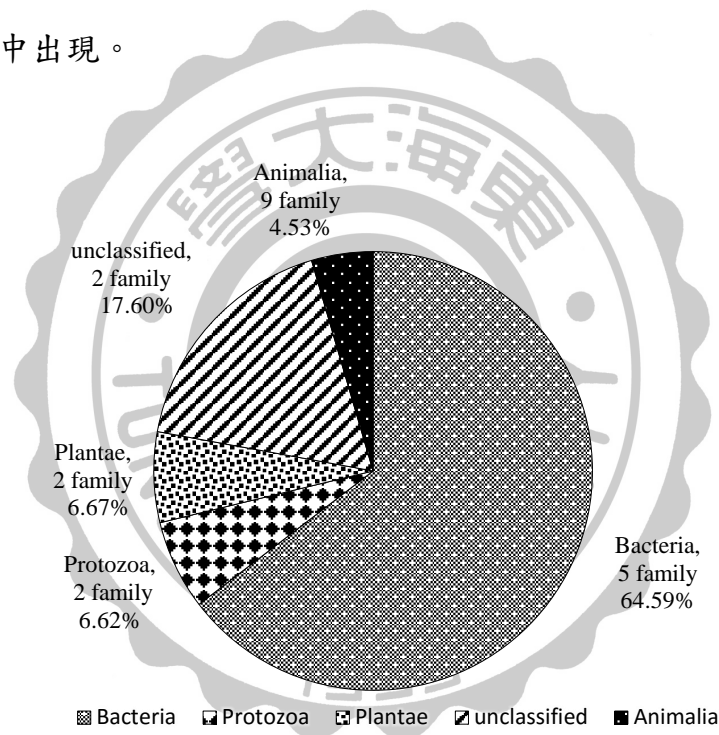
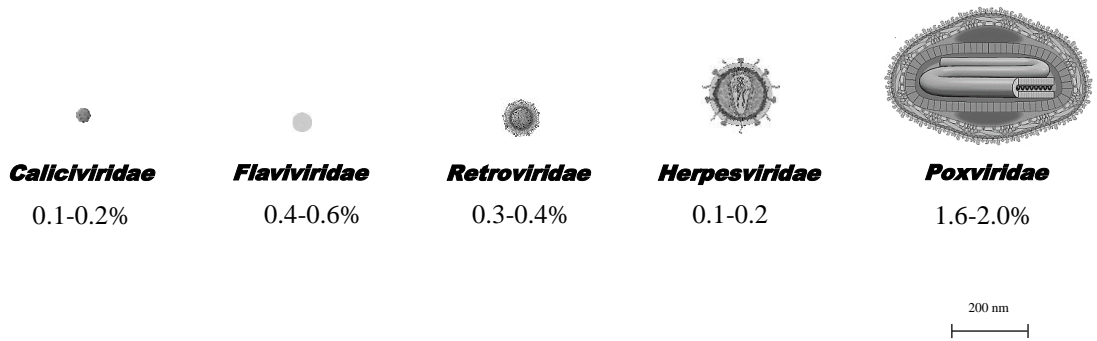
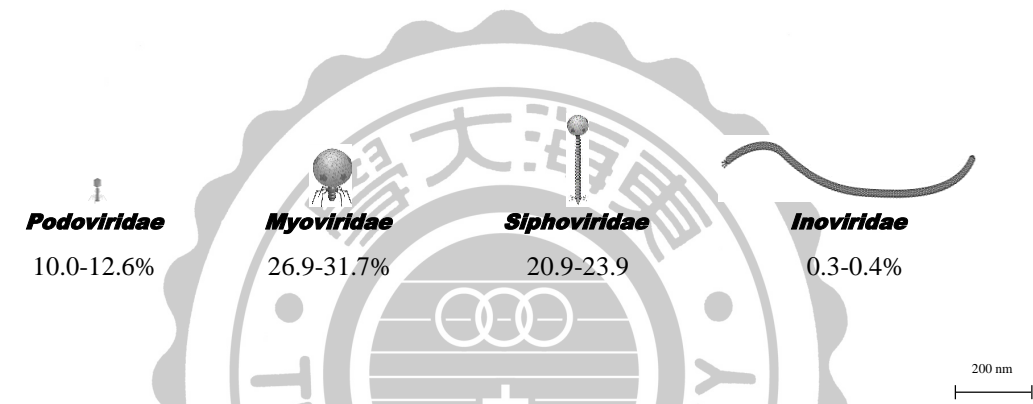


Figure 4-5 細菌界(Bacteria)的病毒占 64.59%、植物界(Plantae)的病毒占 6.67%、原核生物(Protozoa)病毒占 6.62%、動物界(Animalia)的病毒占 4.53%以及未分類的病毒及未分類的噬菌體占 17.60%。

HUMAN VIRUS



BACTERIOPHAGE



OTHER VIRUS

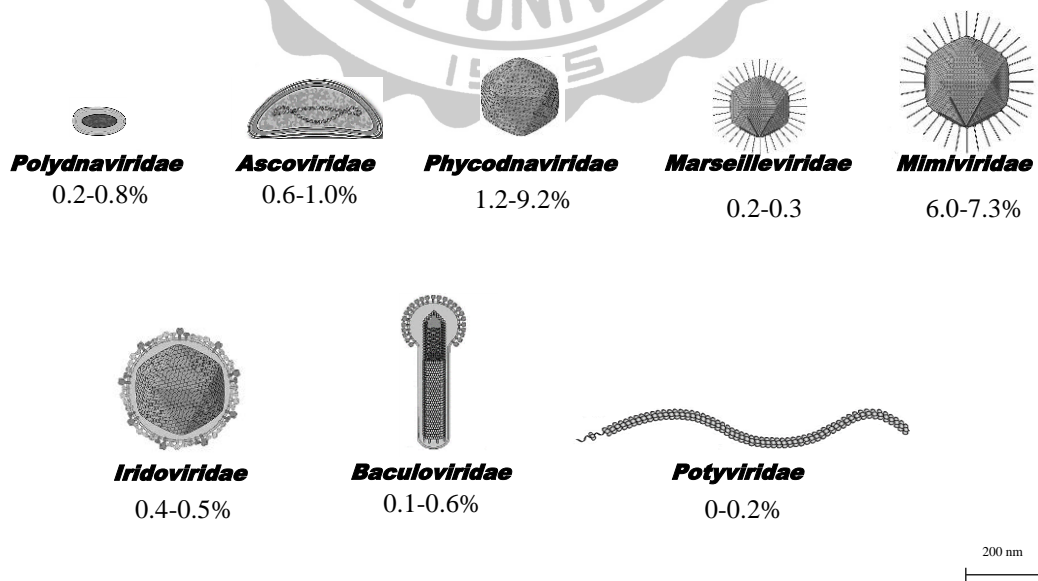


Figure 4-6 WW 及 RCW 樣品中所出現的病毒尺寸及外型結構

4.2.3 大量的噬菌體

根據研究指出市政廢水處理廠(municipal treatment plant)中主要的細菌族群為 *Escherichia* (76%) 屬於噬菌體的寄主之一，這可能就是噬菌體在廢水中為主要族群的要素(Ferreira da Silva et al., 2007; Rakuba et al., 2010)，噬菌體是隨處可見的生物體，而本研究宏基因定序的結果當中，CWW 及 RCW 中都含有大量噬菌體的基因存在約各占 75.48-79.71%，而 Myoviridae 及 Siphoviridae 為 CWW 及 RCW 中病毒的優勢種，Podoviridae、Inoviridae 及未分類的病毒族群也出現在結果當中等病毒家族也出現在本研究結果當中，這些病毒都是屬於環境常見並以細菌為寄主的噬菌體家族，

4.2.4 影響人類用水安全的病毒

目前在 CWW 及 RCW 中已知有 38 species 會造成人類疾病，其中之一為人類皰疹病毒，接觸到已感染者的皮膚便有感染的機會，會引起水痘和帶狀皰疹(Chisholm and Lopez, 2011)；諾羅病毒造成哺乳動物及人類腸胃道疾病如腸胃炎、嘔吐及腹瀉等疾病(Lambden and Clarke, 1995)，顯示 CWW 及 RCW 可能造成人類皰疹及腸胃道疾病的機會。

在定序結果中本校 CWW 及 RCW 出現這五種與哺乳類動物(包括人類)相關的病毒家族平均共占 Hits 2.7%，CWW 及 RCW 病毒族群的組成未顯示出名顯得差異，定序結果的序列數量相當，而這些病毒家族如杯狀病毒(Caliciviridae)、黃病毒科(Flaviviridae)、皰疹病毒(Herpesviridae)、痘病毒科(Poxviridae)、逆轉錄病毒(Retroviridae) (Table 4-7)。

痘病毒科(Poxviridae)有外膜包覆，為哺乳動物病原體當中最大且結構複雜的病毒，同屬的痘病毒之間常有血清型交互反應，形成複雜的蛋白複合體使，使得抗體感不上痘病毒抗原的變化，因此特性部分痘病毒屬的病毒影響全人類，目前已被撲滅(Lefkowitz et al., 2005)；黃病毒科(Flaviviridae)是以人類及哺乳動物作為

宿主的病毒族群，他們也可以透過節肢動物作為傳播的媒介，黃病毒屬代表的物種有登革熱病毒(Dengue virus)、西尼羅河病毒(West Nile virus)、瘟疫病毒屬的代表牛科病毒性腹瀉病毒(Bovine viral diarrhea virus)、肝炎病毒屬的代表 C 型肝炎病毒(Hepatitis C virus)(Leysen et al., 2000)；反轉錄病毒科(Retroviridae)引起的各種疾病如癌症、愛滋病、免疫系統及中樞神經系統、骨骼及關節疾病；皰疹病毒科(Herpesviridae)這類病毒被統稱為人類皰疹病毒，接觸到已感染者的皮膚便有感染的機會，會引起水痘和帶狀皰疹、伯奇氏淋巴瘤和鼻咽癌、嬰兒玫瑰疹，這類病毒會模仿人類白細胞介素 10 (human interleukin 10, hIL-10) 來躲避免疫系統的防禦，所以不會完全的從人體中清除，當免疫系統減弱就有再發病的機會，受感染者是需要定期觀察或治療(Chisholm and Lopez, 2011)；杯狀病毒科(Caliciviridae)這類病毒可造成海洋和陸地的哺乳動物及人類腸胃道疾病如腸胃炎、嘔吐及腹瀉，全球各地區的自然環境及污水處理場都曾經被檢驗出來，主要是藉由糞-口傳染或是飛沫傳染，常見的如諾羅病毒(Norovirus)、札幌病毒(Sapovirus)(Lambden and Clark, 1995)會對人體的腸胃道、肝臟、皮膚組織或呼吸道系統產生相關的疾病，症狀包括咳嗽、打噴嚏、鼻涕、流鼻水、鼻塞、咽喉痛或有痰、頭痛以及疲倦等，產生腸胃方面的症狀，諸如腹脹、腹痛、腹瀉；皮膚組織在身體任何部位都有感染的可能，特別是在嘴、臀、生殖器、指間，發疹前會有局部瘙癢、刺痛或灼熱感出現，甚至還有嚴重的腦膜炎、淋巴瘤、出血性綜合症、肝炎。

Table 4-7 可能感染人類的病毒族群

Human virus homologue	Taxonomic classification	CWW		RCW		Transmission
		ut	twsf	ut	twsf	
Poxviridae						
Molluscum contagiosum virus	Molluscipoxvirus	⊙	⊙	⊙	⊙	Contact, Sexual contact
Callithrix jacchus orthopoxvirus	Orthopoxvirus		⊙	⊙	⊙	Respiratory, contact, Zoonosis
Cowpox virus		⊙	⊙	⊙	⊙	
Ectromelia virus		⊙	⊙	⊙	⊙	
Monkeypox virus		⊙	⊙	⊙		
Taterapox virus		⊙	⊙		⊙	
Vaccinia virus		⊙	⊙	⊙	⊙	
Volepox virus			⊙	⊙	⊙	
Yoka poxvirus		⊙	⊙		⊙	
Rabbitpox virus					⊙	
Pseudocowpox virus	Parapoxvirus		⊙	⊙		Zoonosis, contact
Diachasmimorpha longicaudata entomopoxvirus	Poxvirida	⊙	⊙	⊙	⊙	unknow
Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus		⊙	⊙	⊙	⊙	
Cotia virus		⊙	⊙	⊙	⊙	
Flaviviridae						
Bovine viral diarrhea virus	Pestivirus	⊙	⊙	⊙	⊙	Parenteral, Sexual contact, blood.
Hepatitis C virus	Hepacivirus	⊙	⊙	⊙	⊙	
Retroviridae						
Simian immunodeficiency virus	Lentivirus			⊙	⊙	Sexual contact, blood, breast feeding
Feline immunodeficiency virus				⊙	⊙	
Human immunodeficiency virus				⊙	⊙	
Common marmoset foamy virus	Spumavirus			⊙	⊙	Contact, saliva
Feline foamy virus				⊙	⊙	
Mandrillus sphinx foamy virus				⊙	⊙	
Simian foamy virus				⊙	⊙	
Herpesviridae						
Bandicota indica cytomegalovirus	Cytomegalovirus			⊙		Contact, urine, saliva
Tupaiaid herpesvirus		⊙		⊙	⊙	
Gorilla gorilla lymphocryptovirus	Lymphocryptovirus			⊙		Contact, saliva, Zoonosis, animal bite
Ateline herpesvirus	Rhadinovirus	⊙	⊙	⊙	⊙	Sexual contact, saliva
Herpesvirus saimiri		⊙	⊙	⊙	⊙	
Leporid herpesvirus			⊙	⊙	⊙	
Murid herpesvirus					⊙	
Pan troglodytes rhadinovirus				⊙		
Retroperitoneal fibromatosis-associated herpesvirus		⊙	⊙		⊙	
Cercopithecine herpesvirus	Simplexvirus	⊙	⊙	⊙	⊙	contact, saliva, sexual contact, maternal-neonatal
Herpes simplex virus			⊙	⊙	⊙	
Macropodid herpesvirus				⊙	⊙	
Papiine herpesvirus			⊙	⊙		
Saimiriine herpesvirus		⊙	⊙	⊙	⊙	
Caliciviridae						
Norwalk virus	Norovirus	⊙	⊙			Fecal-oral route from contaminated water and food.

4.3 調查水中腸道病毒濃度

4.3.1 測試引子及探針

目前已有很多學者設計出多組腸道病毒的引子及探針用於檢測環境病毒，然而這些引子及探針都具有高度的專一性，對於非目標的病毒血清型有較高的 Mismatch，有鑑於水體環境中腸道病毒多樣性，所以本研究透過文獻中使用過的引子及探針進行微調及修改，制定出通用型的引子避免獨特的血清型沒有被檢驗出來，利用一株從檢體中分離出來的腸病毒(EV-B12)全基因樣品與腺病毒、腸病毒、諾羅病毒、A 型肝炎病毒的引子及探針進行 Real-time PCR 檢測，檢測結果顯示非腸病毒的引子及探針屬於陰性反應(Figure 4-7)，然而，因本實驗室缺乏多元的病毒基因體，所以本研究所以使用的引子及探針的專一性，目前只針對腸病毒的基因體進行鑑別。

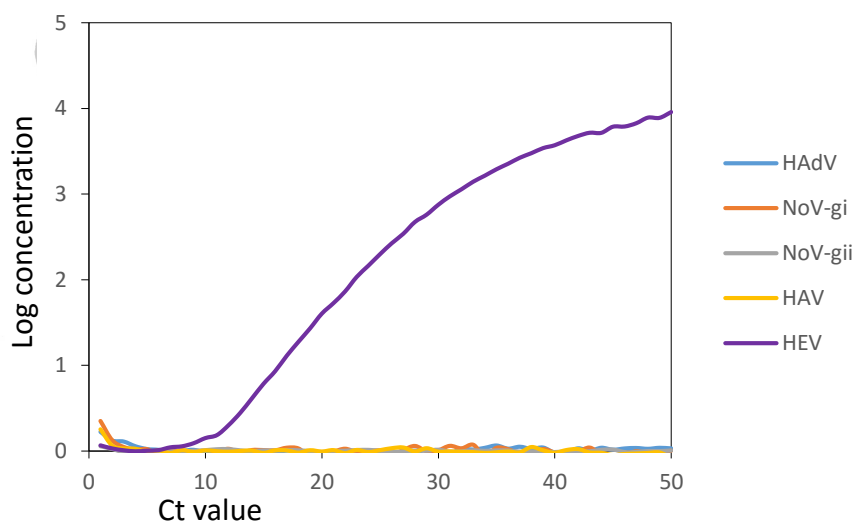


Figure 4-7 使用 HAdV、HEV、NoV-gi,gii、HAV 的引子及探針來偵測 EV-B12 的全基因，結果顯示本研究所使用的引子及探針在不同病毒族群之間的專一性。

4.3.2 腸道病毒通用引子歸納

本研究從 NCBI 的基因庫找出腺病毒、腸病毒、諾羅病毒及 A 型肝炎病毒血清型 (serotypes) 的目標基因片段，經過 ClustalX 工具軟體 Alignment 病毒基因，多重排序後找出相似的基因片段作為 PCR 實驗中的一對短的正向引子 (Forward primer) 及反向引子 (Reverse primer)，以及在正反引子之間 Probe 探針的序列做為 real-time PCR 的實驗所用，而 primer 與目標基因黏合 (Annealing)、裂解 (Melting) 及延伸 (Extension) 的溫度必須滿足諸多條件例如引子長度一般在 15~30 bp、GC 含量在 40~60%、避免引子互黏的現象等等，而這兩條引子會在 PCR 反應中夾出目標基因片段，代表腸道病毒的存在，Probe 探針著是在定量實驗時可以準確測出目標基因片段的數量。如 Figure 4-8,9,10 所示為針對這些腸道病毒的基因做交互比對的結果。

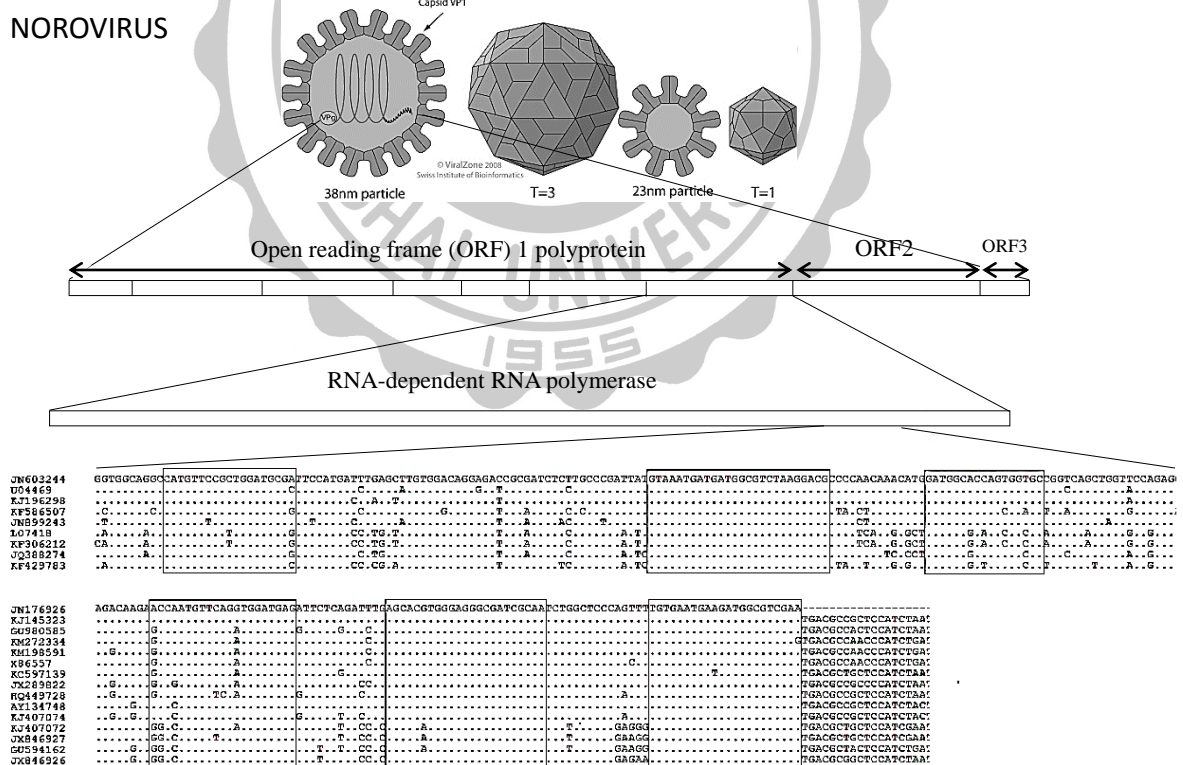


Figure 4-8 諾羅病毒血清種的基因序列做比對，而分別在不同功能基因片段上有高相似度的基因，以此做為 Real-time PCR 的引子。

HEPATITIS A VIRUS

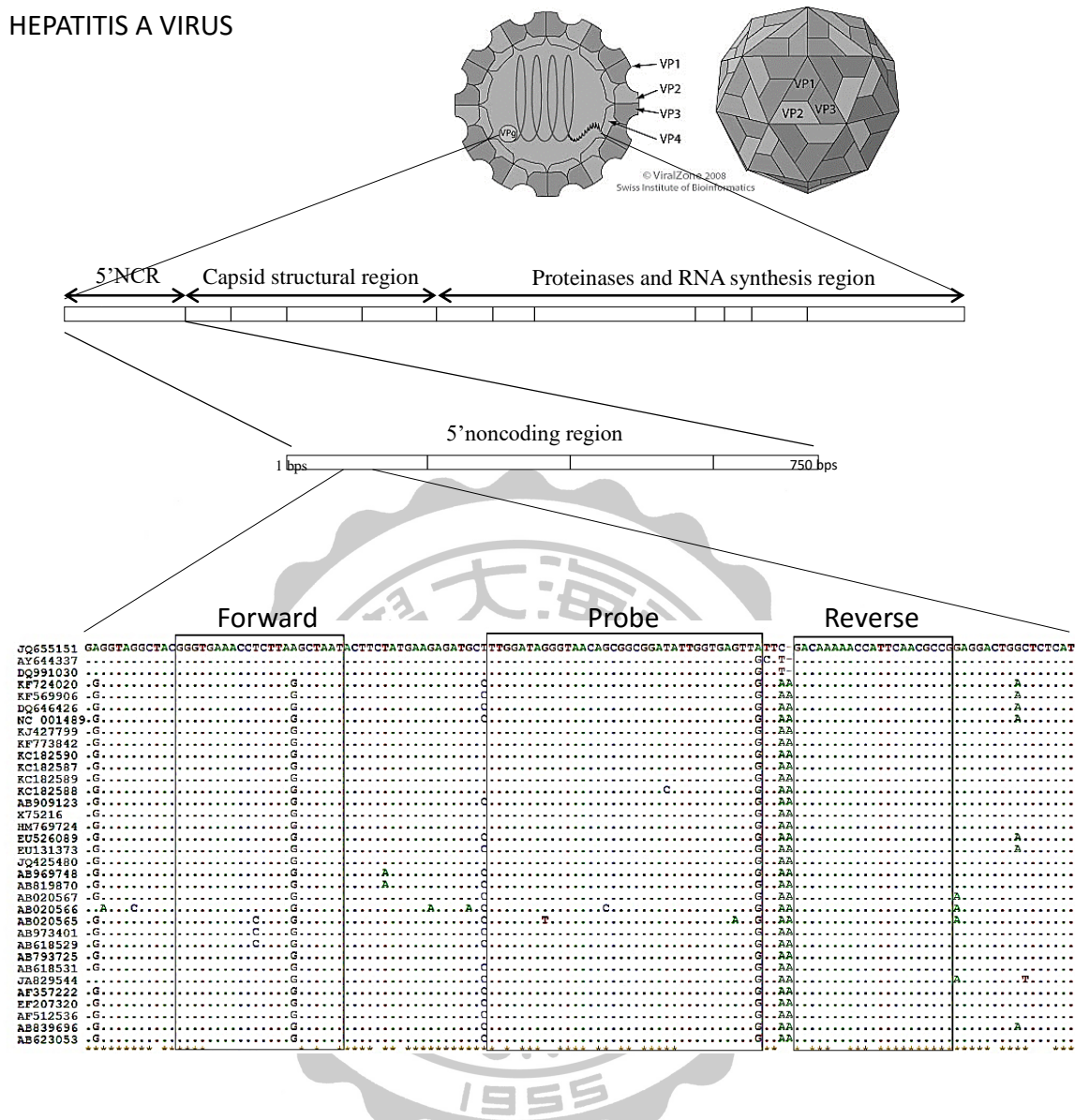


Figure 4-9 A 型肝炎病毒血清種的基因序列做比對，而分別在不同功能基因片段上有高相似度的基因，以此做為 Real-time PCR 的引子。

4.3.3 腸道病毒在校園廢水及回收水中的濃度

以古至今的污水處理技術依然正在研發及改進，雖然現在的水污染控制技術可以大幅降低污染濃度，但是許多微量的污染物質還是具有很強的危害性質。Real-time PCR 檢測方法具代表性及可快速完成且具有高靈敏度的技術，多數的研究結果都顯示排放水中還有生物性的污染物，而在自然水體中所檢測到的病毒的濃度大約是 10^2 - 10^4 viruses particles/L，廢水則是 10^6 - 10^9 viruses particles/L，本研究檢測 CWW 及 RCW 水樣中腸道病毒的濃度(HAdV、HEV、NoV-gi、NoV-gii、HAV)，相較於其他研究結果，東海大學污水廠的濃度較不穩定，回收水的病毒濃度出現高於 CWW 的狀態，推測是此污水處理廠的懸浮固體物濃度變化較大，以至於病毒顆粒與污泥之間牽引的作用力降低，而釋放出的病毒顆粒使濃度呈現不規則的濃度變化，有時還有 RCW 病毒濃度大於 CWW 的結果。

Real-time PCR 結果顯示四個月份的 CWW 及 RCW 樣品沒有檢測出 NoV-gi 及 HAV 的結果，HAdV、HEV 及 NoV-gii 在 CWW 及 RCW 的濃度大約相差 1-7 倍，且這些腸道病毒並未顯示出季節性及水處理的效果，兩水體皆在不同季節中出現高峰期，含有 6.80×10^3 - 1.37×10^7 (copies/rxn)，HAdV 的結果顯示春季到秋季之間顯著的上升趨勢，在秋季為高峰期，而 HEV 及 NoV-gii 的結果中未顯現出季節性。針對全部 species HAdV 的引子所測出 CWW 濃度範圍為 6.80×10^3 至 4.99×10^6 、平均為 1.27×10^6 (copies/rxn)，RCW 濃度範圍為 1.53×10^4 至 9.75×10^6 、平均為 2.46×10^6 (copies/rxn)；全部 species HEV 測出 CWW 濃度範圍為 8.49×10^4 至 6.51×10^6 、平均為 1.69×10^6 (copies/rxn)，RCW 濃度範圍為 8.36×10^4 至 5.46×10^6 、平均為 1.63×10^6 (copies/rxn)(Figure 4-9, 10, 11)。藉由質體 DNA 連續稀釋（即： 10^2 - 10^8 copies/rxn），而引子及探針對目標基因的質體進行 PCR 擴增得到各濃度的 Ct 值並繪製檢量線（附件 2），每個梯度濃度都是三重複所得測值，相關係數皆小於 5%且線性回歸的 R-square 值在 0.999 以上，顯示兩條檢量線具有可信度。

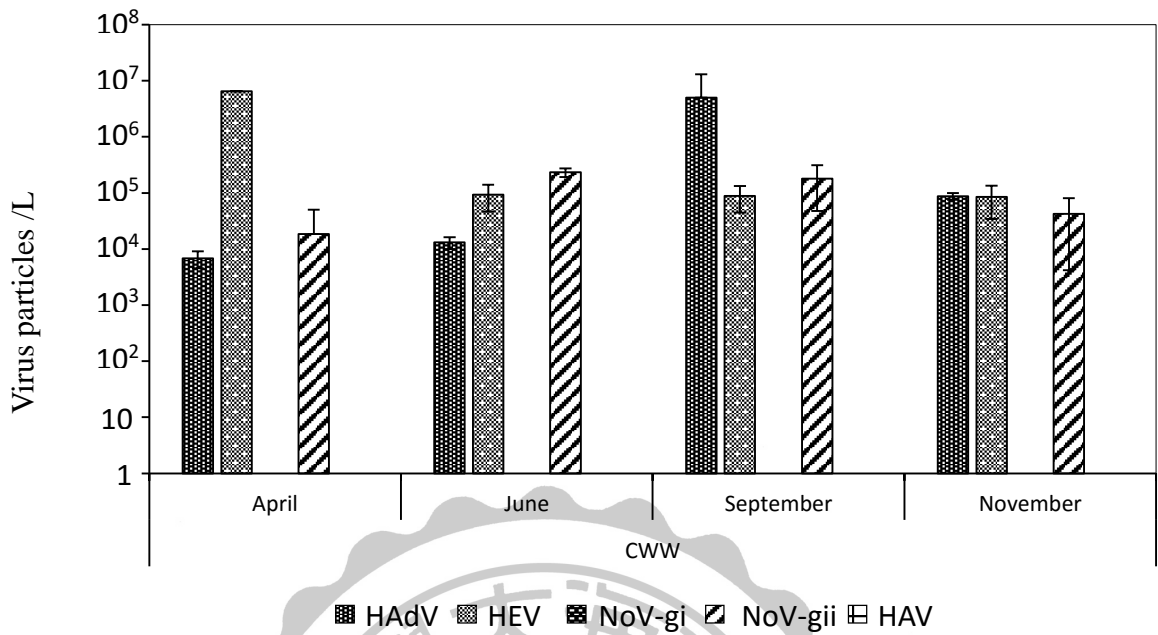


Figure 4-9 腸道病毒在 CWW 中不同月份的濃度

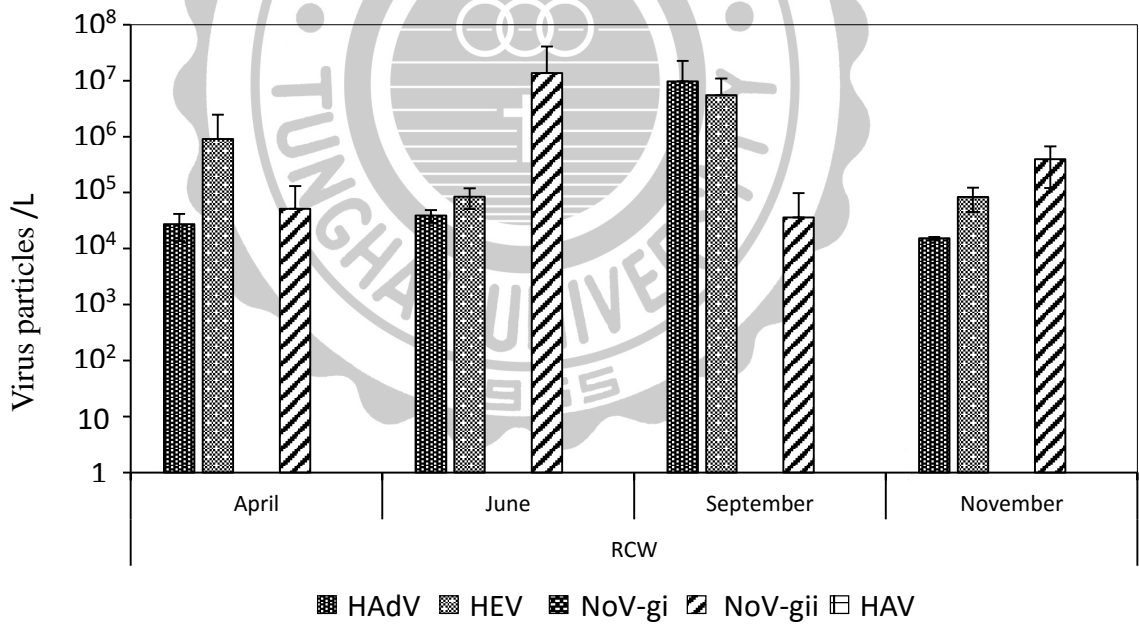


Figure 4-10 腸道病毒在 RCW 中不同月份的濃度



第五章 結論與建議

參考文獻

附錄

第五章 結論與建議

宏基因定序結果約有 10.75-12.65% 能成功 Hits 到基因庫的資料，且 CWW 及 RCW 樣品病毒族群大致相似，宏基因定序之序列與基因庫比對結果屬於病毒約占 90.41-91.84%，在樣品中共發現 199 種不同病毒族群，病毒族群的組成與其他回收水的文獻結果之病毒多樣性及 contigs 數量較高，而病毒族群的種類相當複雜，依照病毒的宿主種類可以分成細菌病毒(64.59%)、植物病毒(6.67%)、原生動物病毒(6.62%)、動物病毒(4.43%)及未分類病毒(17.60%)，其中噬菌體為優勢族群佔據大多數的 contigs 75.48-79.71% 包括 Myoviridae、Siphoviridae、Podoviridae、Inoviridae、unclassified phage，會感染人類的病毒約為 2.6-3.23% 包括 Poxviridae、Flaviviridae、Retroviridae、Herpesviridae、Caliciviridae，其他種類的病毒約為 17.06-21.97% 包括 Phycodnaviridae、Mimiviridae... 等，在宏基因定序的結果中諾羅病毒、C 型肝炎病毒、痘病毒及皰疹病毒族群存在 CWW 及 RCW 水中，顯示回收水含有不同種類的病毒據有影響人類健康及衛生安全。

透過即時定量 PCR 偵測四個月份的腸道病毒的濃度，發現 HAdV、HEV 及 NoV-gii 均在 CWW 和 RCW 樣品中測定中分別出現 6.80×10^3 - 9.75×10^6 、 8.49×10^4 - 6.51×10^6 及 1.84×10^4 - 1.37×10^7 virus particles/L 不等的濃度，且腸道病毒族群的大小在每個季節中不定期出現高峯值，且出現三種腸道病毒的族群及不具週期性的濃度值，而為了水質的衛生安全需要監測更多的腸道病毒族群，且可以簡易的檢測單一族群的分析方法是有助於提升水中致病病毒的管理辦法。

在宏基因定序的資料中未能發現腸病毒及腺病毒的基因序列，而在即時定量 PCR 中卻含有高濃度的病毒顆粒數，顯示出宏基因定序法之隨機定序的性質，需要反覆的檢測及鑑定才能顯示回收水中病毒族群所涵蓋的範圍，而因受到經費及時間的限制使得本研究無法解釋兩種檢測方法之結果不相符的現象，而增加使用宏基因定序的次數是有助於偵查病毒族群的族成。

参考文献

Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AM, Bamford DH, Breitbart M, Davison AJ, Ghabrial SA, Gorbalenya AE, Knowles NJ, Krell P, Lavigne R, Prangishvili D, Sanfaçon H, Siddell SG, Simmonds P, Carstens EB., 2015. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2015). *Archives of Virology* 160, 1837-1850.

Agidi S, Vedachalam S, Mancl K, Lee J., 2013. Effectiveness of onsite wastewater reuse system in reducing bacterial contaminants measured with human-specific IMS/ATP and qPCR. *Journal of Environmental Management* 115, 167-174.

Aherfi S, La Scola B, Pagnier I, Raoult D, Colson P., 2014. The expanding family *Marseilleviridae*. *Virology* 466-467, 27-37.

Angly FE, Felts B, Breitbart M, Salamon P, Edwards RA, Carlson C, Chan AM, Haynes M, Kelley S, Liu H, Mahaffy JM, Mueller JE, Nulton J, Olson R, Parsons R, Rayhawk S, Suttle CA, Rohwer F., 2006. The Marine Viromes of Four Oceanic Regions. *Plos Biology* 4, 2121-2131.

Barzon L, Lavezzo E, Militello V, Toppo S, Palù G., 2011. Applications of Next-Generation Sequencing Technologies to Diagnostic Virology. *Molecular Sciences* 12, 7861-7884.

Bibby K, Peccia J., 2013. Identification of Viral Pathogen Diversity in Sewage Sludge by Metagenome Analysis. *Environmental Science and Technology* 47, 1945-1951.

Bibby K, Viau E, Peccia J., 2011. Viral metagenome analysis to guide human pathogen monitoring in environmental samples. *Applied Microbiology* 52,386-392.

Bibby K., 2013. Metagenomic identification of viral pathogens. *Trends in Biotechnology* 31, 275-279.

Bigot Y, Rabouille A, Sizaret PY, Hamelin MH, Periquet G., 1997. Particle and genomic characteristics of a new member of the Ascoviridae: *Diadromus pulchellus* ascovirus. *The Journal of general virology* 78 1139-1147.

Bradbury KR, Borchardt MA, Gotkowitz M, Spencer SK, Zhu J, Hunt RJ., 2013. Source and Transport of Human Enteric Viruses in Deep Municipal Water Supply Wells. *Environmental Science & Technology*. 47, 4096-4103.

Breitbart M, Salamon P, Andresen B, Mahaffy JM, Segall AM, Mead D, Azam F, Rohwer F., 2002002E Genomic analysis of uncultured marine viral communities. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 14250-14255

Cantalupo PG, Calgua B, Zhao G, Hundesa A, Wier AD, Katz JP, Grabe M, Hendrix RW, Girones R, Wang D, Pipas JM., 2011. Raw Sewage Harbors Diverse Viral Populations. *mBio* 2 , 180-11.

Carter MJ, 2005. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and Charlop-Powers Z, Milshteyn A, Brady SF., 2014. Metagenomic small molecule discovery methods. *Current Opinion in Microbiology* 19, 70-75.

Carter MJ., 2005. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and Significance for food and waterborne infection. *Journal of Applied Microbiology* 98, 1354–1380.

Charlop-Powers Z, Milshteyn A, Brady SF., 2014. Metagenomic small molecule discovery methods. *Current Opinion in Microbiology* 19,70-75.

Chen C.H, Hsu B.M, Wan M.T., 2008. Molecular detection and prevalence of enterovirus within environmental water in Taiwan. *Journal of Applied Microbiology* 104, 817-823.

Chen W, Lu S, Pan N, Wang Y, Wu L., 2015. Impact of reclaimed water irrigation on soil health in urban green areas. *Chemosphere* 119, 654–661

Cheng HW, Lucy FE, Broaders MA, Mastitsky SE, Chen CH, Murray A., 2012. Municipal wastewater treatment plants as pathogen removal systems and as a contamination source of noroviruses and *Enterococcus faecalis*. *Journal of Water and Health* 10, 380-389.

Chibani-Chennoufi S, Bruttin A, Dillmann ML, Brüßow H., 2004. Phage-host interaction: an ecological perspective. *Journal of Bacteriology*. 186, 3677-3686

Chisholm C, Lopez L., 2011. Cutaneous Infections Caused by Herpesviridae. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 135, 1357-1362.

Choi S, Jiang SC., 2005. Real-Time PCR Quantification of Human Adenoviruses in Urban Rivers Indicates Genome Prevalence but Low Infectivity. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 7426-7433.

Djikeng A, Kuzmickas R, Anderson NG, Spiro DJ., 2009. Metagenomic analysis of RNA viruses in a fresh water lake. 29, 7264.

Eaton HE, Metcalf J, Penny E, Tcherepanov V, Upton C, Brunetti CR., 2007. Comparative genomic analysis of the family Iridoviridae: re-annotating and defining the core set of iridovirus genes. *Virology Journal* 4, 1743-422X-4-11

Edwards RA, Rohwer F., 2005. Viral metagenomics. *Nature Reviews Microbiology* 3, 504-510.

Fong TT, Griffin DW, Lipp EK., 2005 Molecular Assays for Targeting Human and Bovine Enteric Viruses in Coastal Waters and Their Application for Library-Independent Source Tracking. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2070-2078.

Fong TT, Phanikumar MS, Xagorarakis I, Rose JB., 2010. Quantitative Detection of Human Adenoviruses in Wastewater and Combined Sewer Overflows Influencing a Michigan River. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 715-723.

Goodrich DW, Guesberg PH., 1990. Retroviral recombination during reverse transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 87, 2052-2056.

Green SM, Lambden PR, Caul EO, Clarke IN., 1997. Capsid Sequence Diversity in Small Round Structured Viruses From Recent UK Outbreaks of Gastroenteritis. *Journal of Medical Virology* 52, 14-19.

Häfliger D, Hübner P, Lüthy J., 2000. Outbreak of viral gastroenteritis due to sewage-contaminated drinking water. *International Journal of Food Microbiology* 54, 123-126.

Hamblin S, Tanaka MM., 2013. Behavioural manipulation of insect hosts by Baculoviridae as a process of niche construction. *BMC Evolutionary Biology* 170, 1-10

Handelsman J, 2004. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *American Society for Microbiology* 68, 669-685.

Haramoto E, Katayama H, Oguma K, Ohgaki S., 2005. Application of Cation-Coated Filter Method to Detection of Noroviruses, Enteroviruses, Adenoviruses, and Torque

Teno Viruses in the Tamagawa River in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2403-2411.

Haramoto E, Katayama H, Ohgaki S., 2004. Detection of Noroviruses in Tap Water in Japan by Means of a New Method for Concentrating Enteric Viruses in Large Volumes of Freshwater. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 2154-2160.

Hill WF Jr, Jakubowski W, Akin EW, Clarke NA., 1976. Detection of Virus in Water: Sensitivity of the Tentative Standard Method for Drinking Water. *American Society for Microbiology*. 31, 254-261.

Huson DH, Auch AF, Qi J, Schuster SC., 2007. MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Research* 17, 377-386.

Jiang SC, Chu W., 2003. PCR detection of pathogenic viruses in southern California

Jjemba PK, Johnson W, Bukhari Z, LeChevallier MW., 2015. Occurrence and Control of Legionella in Recycled Water Systems. *Pathogens* 4, 470-502.

Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR., 2006. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus . *Journal of Virological Methods*. 131, 65-71.

Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR., 2006. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *Journal of Virological Methods* 131, 65-71.

Katayama H, Shimasaki A, Ohgaki S., 2002. Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Seawater. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1033-1039.

Kitajima M, Oka T, Takagi H, Tohya Y, Katayama H, Takeda N, Katayama K., 2010. Development and application of a broadly reactive real-time reverse transcription-PCR assay for detection of murine noroviruses. *Journal of Virological Methods* 169, 269-273.

Koopmans M, Duizer E., 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology* 90, 23– 41.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27, 95–125.

Kukkula M, Maunula L, Silvennoinen E, von Bonsdorff CH., 1999. Outbreak of Viral Gastroenteritis Due to Drinking Water Contaminated by Norwalk-like Viruses. *The Journal of Infectious Diseases* 180, 1771-1776.

Kuo DH, Simmons FJ, Blair S, Hart E, Rose JB, Xagorarakis I., 2010. Assessment of human adenovirus removal in a full-scale membrane bioreactor treating municipal wastewater. *Water Research*. 44, 1520-1530.

Lees D, 2000. Viruses and bivalve shellfish. *International Journal of Food Microbiology* 59, 81-116.

Lefkowitz EJ, Upton C, Changayil SS, Buck C, Traktman P, Buller RM., 2005. Poxvirus Bioinformatics Resource Center: a comprehensive Poxviridae informational and analytical resource. *Nucleic Acids Research* 33, 311-316.

Leyssen P, De Clercq E, Neyts J., 2000. Perspectives for the treatment of infections with Flaviviridae. *Clinical Microbiology Reviews* 2000, 67–82.

Meyer QC, Burton SG, Cowan DA., 2007. Subtractive hybridization magnetic bead capture: A new technique for the recovery of full-length ORFs from the metagenome. *Biotechnology Journal* 2, 36-40.

Ferreira da Silva M, Vaz-Moreira I, Gonzalez-Pajuelo M, Nunes OC, Manaia CM., 2007. Antimicrobial resistance patterns in *Enterobacteriaceae* isolated from an urban wastewater treatment plant. *Federation of European Microbiological Societies* 60, 166-176.

Morillo SG, Timenetsky Mdo C., 2011. Norovirus: an overview. *Revista da Associação Médica Brasileira* 57, 453-458.

Morillo SG, Timenetsky Mdo C., 2011. Norovirus: an overview. *Revista Da Associacao Medica Brasileira* 57, 462-467.

Ouchi A, Nerome K, Kanegae Y, Ishida M, Nerome R, Hayashi K, Hashimoto T, Kaji M, Kaji Y, Inaba Y., 1996. Large outbreak of swine influenza in southern Japan caused by reassortant (H1N2) influenza viruses: its epizootic background and characterization of the causative viruses. *Journal of General Virology* 77, 1751-1759.

Patel MM, Hall AJ, Vinjé J, Parashar UD., 2009. Parashar Noroviruses: A comprehensive review. *Journal of Clinical Virology* 44, 1-8.

Payment P, Affoyon F, Trudel M., 1988. Detection of animal and human enteric viruses in water from the Assumption River and its tributaries. *Canadian Journal of Microbiology*. 34, 967-973.

Petitjean J, Vabret A, Dina J, Gouarin S, Freymuth F., 2006. Development and evaluation of a real-time RT-PCR assay on the LightCycler for the rapid detection of enterovirus in cerebrospinal fluid specimens. *Journal of Clinical Virology* 35, 278-284.

Posada D, Crandall KA., 2001. Simple (Wrong) Models for Complex Trees: A Case from Retroviridae. *Molecular Biology and Evolution* 18, 271-275.

Purnell S, Ebdon J, Buck A, Tupper M, Taylor H., 2015. Bacteriophage removal in a full-scale membrane bioreactor (MBR) - Implications for wastewater reuse. *Water Research*. 73, 109-117.

Rajtar B, Majek M, Polański Ł, Polz-Dacewicz M., 2008. Enteroviruses in Water Environment– A Potential Threat to Public Health. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 15, 199-203.

Rajtar B, Majek M, Polański Ł, Polz-Dacewicz M., 2008. Enteroviruses In Water Environment–A Potential Threat To Public Health. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 15, 199-203.

Rakuba DV, Kolomiets EI, Szwajcer Dey E, Novik GI., 2010. Bacteriophage, Mechanisms of Phage Adsorption and Penetration into Host Cell. *Polish Journal of Microbiology*. 59, 145-155.

Rohwer F, Edwards R., 2002. The Phage Proteomic Tree: a Genome-Based Taxonomy for Phage. *American Society for Microbiology* 184, 4529-4535.

Rosario K, Breitbart M., 2011. Exploring the viral world through metagenomics. *Current Opinion in Virology* 1, 289-297.

Rosario K, Nilsson C, Lim YW, Ruan Y, Breitbart M., 2009. Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water. *Environmental Microbiology* 11, 2806-2820.

Rusiñol M, Fernandez-Cassi X, Timoneda N, Carratalà A, Abril JF, Silvera C, Figueras MJ, Gelati E, Rodó X, Kay D, Wyn-Jones P, Bofill-Mas S, Girones R., 2015. Evidence

of viral dissemination and seasonality in a Mediterranean river catchment: Implications for water pollution management. *Journal of Environmental Management* 159, 58-67.

Rzezutka A, Cook N., 2004. Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiology* 28, 441–453.

Salgot M , Priestley GK and Folch M., 2012. Golf Course Irrigation with Reclaimed Water in the Mediterranean: A Risk Management Matter. *Water* 4, 389-429.

Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW., 2000. Quantitative Reverse Transcription±Polymerase Chain Reaction to Study mRNA Decay: Comparison of Endpoint and Real-Time Methods. *Analytical Biochemistry* 285,194-204.

Shelby KS, Cui L, Webb BA., 1998. Polydnavirus-mediated inhibition of lysozyme gene expression and the antibacterial response. *Insect Molecular Biology* 7, 265-272.

Shendure J & Ji H, 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*. 26, 1135-1145.

Soon WW, Hariharan M, Snyder MP., 2013. High-throughput sequencing for biology and medicine. *Molecular Systems Biology* 9, 640.

Stadhouders R, Pas SD, Anber J, Voermans J, Mes TH, Schutten M., 2010. The Effect of Primer-Template Mismatches on the Detection and Quantification of Nucleic Acids Using the 5´ Nuclease Assay. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 12, 109-117.

Stetler RE, Morris ME, Safferman RS., 1992. Processing procedures for recovering enteric viruses from wastewater sludges. *Journal of Virological Methods*. 40, 67-75.

Stetler RE, Waltrip SC, Hurst CJ., 1992. Virus removal and recovery in the drinking water treatment train. *Water Research*. 26, 727-731

Thorne LG, Goodfellow IG, 2004. Norovirus gene expression and replication. *Journal of General Virology* 95, 278–291.

Toze S, 1999. PCR and The Detection Of Microbial Pathogens In Water And Wastewater. *Water Research* 33, 3545-3556.

urban rivers. *Journal of Applied Microbiology* 97, 17–28.

Valli A, López-Moya JJ, García JA., 2007. Recombination and gene duplication in the evolutionary diversification of P1 proteins in the family Potyviridae. *Journal of General Virology* 88, 1016-1028.

van Heerden J, Ehlers MM, Heim A, Grabow WO., 2005. Prevalence, quantification and typing of adenoviruses detected in river and treated drinking water in South Africa. *Journal of Applied Microbiology* 2005, 99, 234–242.

van Heerden J, Ehlers MM, van Zyl WB, Grabow WO., 2004. Prevalence of human adenoviruses in raw and treated water. *Water Science and Technology* 50, 39-43.

Wilson WH, Van Etten JL, Allen MJ., 2009. The Phycodnaviridae: The Story of How Tiny Giants Rule the World. *Curr Top Microbiol Immunol* 328, 1-42

Woeste S, Demchick P, 1991. New Version of the Negative Stain. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1858-1859.

Wong K, Fong TT, Bibby K, Molina M., 2012. Application of enteric viruses for fecal pollution source tracking in environmental waters. *Environment International* 45, 151-164.

Wong K, Onan BM, Xagorarakis I., 2010. Quantification of Enteric Viruses, Pathogen Indicators, and Salmonella Bacteria in Class B Anaerobically Digested Biosolids by Culture and Molecular Methods. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 6441-6448.

Wyn-Jones AP, Pallin R, Sellwood J, Touganidou D., 1995. Use of the polymerase chain reaction for the detection of enteroviruses in river and marine recreational waters. *Water Science and Technology* 31, 337-344.

Wynjones AP, Pallin R, Sellwood J, Touganidou D., 1995. Use Of The Polymerase Chain-Reaction For The Detection Of Enteroviruses In River And Marine Recreational Waters. *Water Science and Technology*. 31, 337-344.

Xagorarakis I, Kuo HW, Wong K, Wong M, Rose JB., 2007. Occurrence of Human Adenoviruses at Two Recreational Beaches of the Great Lakes. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 7874-7881.

Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Sasaki N, Gotanda Y, Okamoto H., 2003. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *Journal of General Virology* 84, 2351-2357.

Zoll GJ, Melchers WJ, Kopecka H, Jambroes G, van der Poel HJ, Galama JM., 1992. General Primer-Mediated Polymerase Chain Reaction for Detection of Enteroviruses: Application for Diagnostic Routine and Persistent Infections. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 160-165.

附錄

附件一

Enterovirus A : JX867330、AY421761、AY421762、HQ728261、AB779614、GU942823、AY421766、HQ728262、AY421768、AY421769、AF177911、AF119795、AY697458、AY697459、AY697460、AY697461、EF667344、AF326754、AF326761、EF667343、AF326750

Enterovirus B : M16560、AF081485、M88483、JX276378、X05690、AF105342、D00627、AF029859、AY302545、AY302553、AY302557、AY302558、AY302559、X92886、AY167104、X77708、AY302539、AY302541、AY302542、AY302543、AF317694、AY302544、AY302546、AY302547、AY302548、AY302549、AY302550、AY302551、AY302552、AF311938、AY302554、AY302556、AY302560、AY556057、JQ397329、AY556070、AJ493062、AY208120、AY843297、JX644073、AY843299、AY843300、AY843301、DQ902712、JX898909、AY843304、KC292019、AY843306、KF385943、AB426611、AB426608、DQ902713、AY843308、KF990476、AB426609、KF312882、AF326751、

Enterovirus C : KC785529、AF499636、DQ995639、KC785532、EF015014、EF015031、AF499643、D90457、JX417823、KF495604、EF015886、KF129411、EF555645、KC785524、JX393302、GQ865517、KC344834、JX514942、JX262382、JX393301、

Enterovirus D : EF107098、DQ201177、DQ916376

Enterovirus E : D00214、AF123432、KF748290

Enterovirus F : KC748420、HQ917061、DQ092794

Enterovirus G : Y14459、AF363455、HQ702854、JN807387、JQ277724、JQ818253、KJ156400、KJ156402、KJ156410、KJ156415

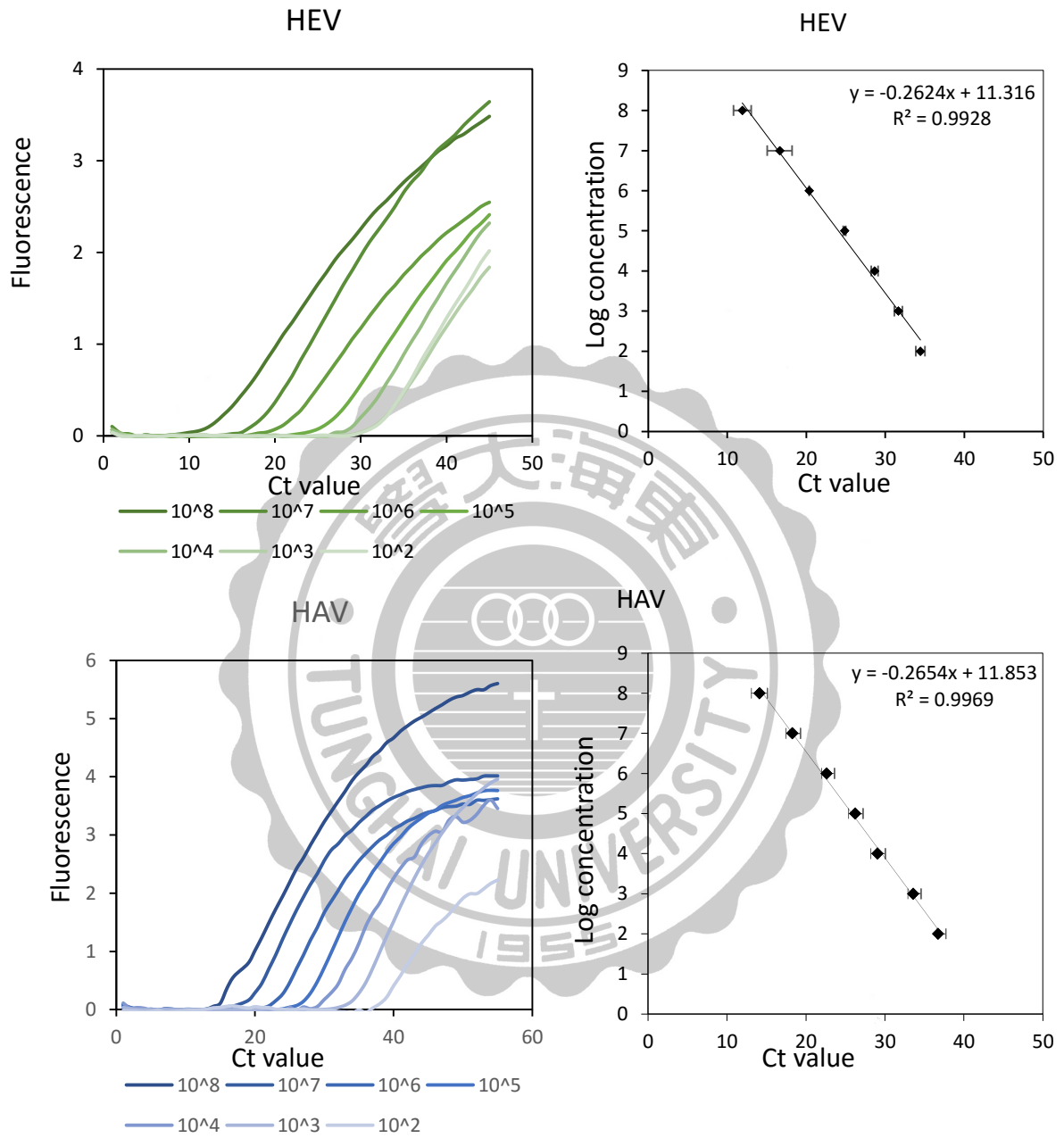
Enterovirus H : AF326757、AF326759、EF364420、EF364415、AF201894

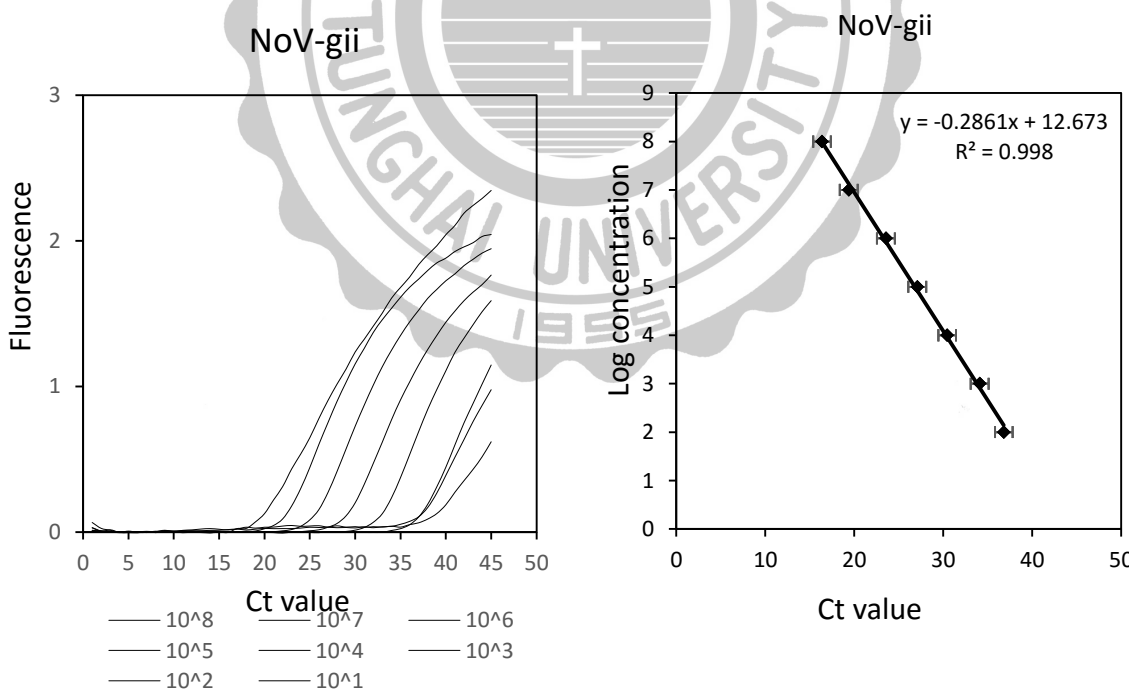
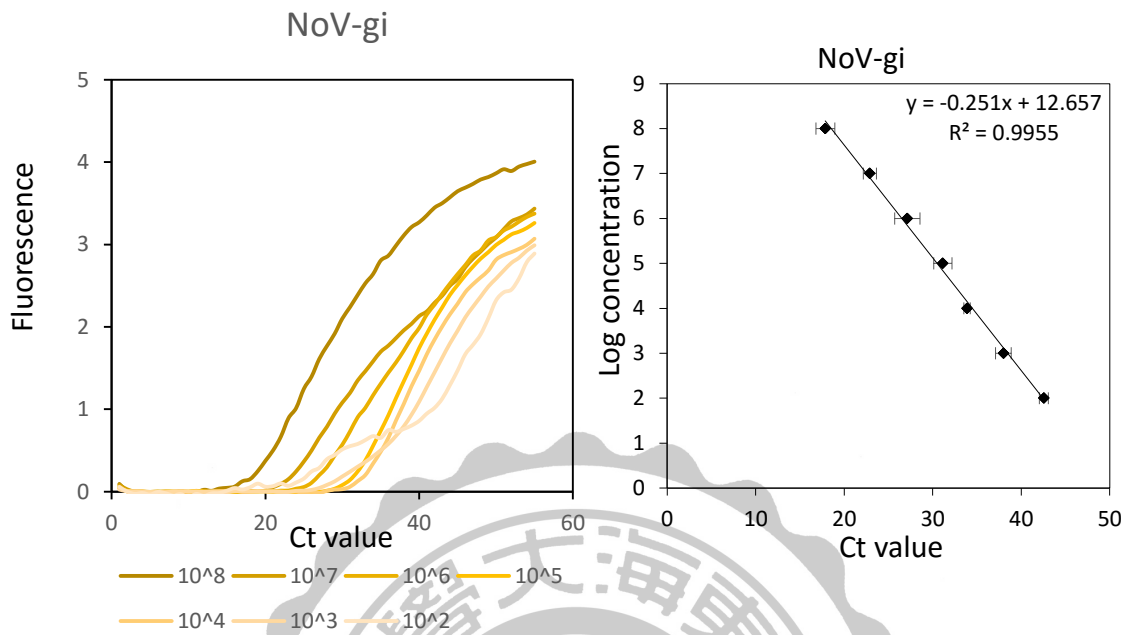
Norovirus Gii : JF300313、JN176926、X86557、KJ407072、KM272334、GU134965、JX289822、JX416402、EU448331、HQ449728、JN899242、JX846926、KM198591、GU594162、KJ179756、JX846927、KJ145841、KC597139、EU448333、GQ149616、KJ407074、JN899245、GU980585、JN699044、KF289337、KJ145323、GQ849127、JQ934820、KJ143754、KJ956722、AY134748、

Norovirus Gi : KJ196298、U04469、KF429765、KM246911、HM055939、KM246906、KM246914、KM017951、AB919128、KF306212、KF569794、JN603244、AM712390、GQ413970、FM212903、JQ388274、JN899243、L07418、JQ692891、KF586507、GU299761

Hepatitis A virus : X75216、AB020566、AB020567、AB020565、DQ646426、EF207320、AF357222、AF512536、EU131373、DQ991030、AY644337、HM769724、HV192266、AB618531、AB618529、AB623053、JQ425480、NC001489、JA829544、JQ655151、KF569906、AB819870、KC182587、KC182589、KC182588、KC182590、KF773842、KF724020、KJ427799、AB839696、AB793725、AB969748、AB973401、AB909123

附件二





Family	Capsid Size (nm)	Host	CWW		RCW	
			ut Contigs (%)	twsf Contigs (%)	ut Contigs (%)	twsf Contigs (%)
Phycodnaviridae	100-220	alga	3112 (8.47%)	2945 (9.20%)	2378 (7.84%)	400 (1.17%)
Mimiviridae	400	Amoeba	2190	1915	1863	2487
Marseilleviridae	250		84 (6.19%)	80 (6.23%)	86 (6.42%)	109 (7.60%)
Iridoviridae	120-350	Invertebrates	153 (0.42%)	124 (0.39%)	121 (0.40%)	171 (0.50%)
Baculoviridae	21-260	Crustacean	52 (0.14%)	54 (0.17%)	118 (0.39%)	205 (0.60%)
Ascoviridae	200-400	Insects	216	236	209	335
Polydnaviridae	30-150		90	77	241	-
Potyviridae*	12-900	Plants	--	50 (0.16%)	--	--
unclassified phages			3904	3189	2696	3291
unclassified dsDNA viruses			1070	1147	1146	1549
unclassified dsDNA phages	Unknow	unknow	910 (17.08%)	778 (17.10%)	872 (17.20%)	1068 (18.97%)
environmental samples <viruses>			275	235	426	474
unclassified viruses			112	125	78	97
Myoviridae	50-110	Bacteria	11631	9745	8145	9782
Siphoviridae	60		7716	6680	6885	8158
Podoviridae	60		3708 (64.42%)	3199 (63.09%)	3759 (63.72%)	4299 (66.95%)
unclassified Caudovirales	-		492	452	447	527
Inoviridae	7-2000		111	122	97	100
Poxviridae	140-260	Human, mammals, vertebrates	605	576	481	674
Flaviviridae*	50		160	156	145	211
Retroviridae*	80-100		- (2.44%)	- (2.69%)	92 (2.55%)	144 (3.23%)
Herpesviridae	150-200		60	77	55	74
Caliciviridae*	27-40		72	51	-	-
Total reads			36,723	32,013	30,340	34,155