

台灣地區嚴重急性呼吸道症候群病毒之分子生物學分析

前 言

非典型肺炎（SARS的前稱）疫情的爆發，最早出現在西元 2003 年二月廿六日一位美國商人在越南河內因發病就醫，之後送至香港治療後死亡，接著陸續在香港、越南出現非典型肺炎合併有呼吸道衰竭案例。同年二月下旬在中國大陸廣東地區發生非典型肺炎之疫情共有 305 件個案，其中有 5 例死亡。很不幸的是台灣也在 3 月中旬傳出類似個案，該名台商曾到大陸廣東地區出差旅行回台後出現發燒、呼吸急促、肺炎等症狀住進臺大醫院，其它國家包括加拿大、新加坡、美國等地也傳出疫情，也有醫護人員在照顧這些病患時遭受到波及。最初，科學家推測其病原體可能為 *Chlamydia pneumoniae*，其特點為發生瀰漫性肺炎及呼吸衰竭，但較過去所知病毒、細菌引起的非典型肺炎更為嚴重。然而，造成全球震撼的非典型肺炎疫情，經過世界各國科學家傾全力投入研究後，世界衛生組織（WHO）為有效區隔與界定該疫情的特徵，於三月十五日公布新名稱，正式將此疾病正名為「嚴重急性呼吸道症候群」（Severe Acute Respiratory Syndrome, 簡稱為SARS）[1]。

處理

SARS 疫情在三月份爆發期間，所有會引發非典型肺炎症狀的細菌及病毒等病原體，都曾經是懷疑的目標。當疑似 SARS 感染的檢體送至本研究檢驗組，本組病毒實驗室針對可能造成呼吸窘迫的所有病原體，如肺結核菌、披衣菌、流行性感冒病毒、禽流感病毒（H5,H7,H9）、副流行性感冒病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、腺病毒、呼吸道融合病毒、Nipah 病毒、Hendra 病毒、漢它病毒等進行檢驗分析，但所有的結果均呈陰性。

美國疾病管制局駐泰國的主任與流病專家率其組員來台協助並進行調查。由於台灣每年往返大陸經商、旅遊、探親者眾，所以衛生署急欲釐清感染原以便進一步的防治，避免疫情之擴散，遂決定派本組楊志元研究員將台灣疑似 SARS 病患檢體送往位於美國亞特蘭大的 CDC 進行檢測。當時香港中文大學宣稱已經找到並培養出 SARS 病原體，應該是副黏液病毒科（paramyxoviridae）家族成員的 human metapneumovirus（hMPV）。由於 SARS 病患的肺部組織呈現有細胞核融合現象及病理變化均顯示較有可能是由病毒所造成的感染，但是美國 CDC 從世界各地有傳出疫情之國家所收到疑似 SARS 的檢體都檢測不出 hMPV 之存在。

之後，根據美國疾病管制局所給予的 SARS 相關資料訊息，本組病毒實驗室也利用傳統與分生的方法朝向可能造成 SARS 的元兇-冠狀病毒（Coronavirus）進行分析。

檢體採檢與實驗室檢驗

生物安全性（Biosafety）

由於 SARS 病毒目前已經被衛生署列為第四類法定傳染病，根據病原體級數的分類基準第四級（BL4）之定義為-對個體及社區成員均具高度危險性，對人類或動物可造成嚴重疾病，而且可經罹患者傳播給他人者均屬之。因此處理 SARS 檢體根據生物安全實驗室隔離設施之規定須於第二級

(P2) 以上實驗室；若需分離培養 SARS 病毒則需第三級 (P3) 以上之實驗室。操作人員需經過事前教育與訓練且具備實驗器具滅菌及廢棄物處理等有關生物安全的基本知識，操作時需穿戴隔離裝備以確保自身之安全，處理後之生物廢棄物需以化學或物理方法進行消毒、滅菌。

檢體來源

全國醫學中心與教學醫院門診病患與住院病人，以及全國各醫師診所若病患之症狀符合我國“疑似病例”及“通報病例”之定義者皆可採檢。疑似病例患者高燒超過攝氏三十八度以上有上呼吸道之病徵如咳嗽、呼吸急促或呼吸困難或 x 光檢查有瀰漫性肺炎等[2]其患者不見得要有旅行史或接觸史皆可通報，而合乎疑似病例定義且經胸部 X 光攝影證實為肺炎者或有呼吸窘迫症候群現象者，在發病期間採取上呼吸道檢體如咽喉拭子 (throat swab) 以及唾液、痰、血液、糞便、尿液 等檢體並以低溫運送至疾病管制局研究檢驗組病毒實驗室，進行病毒鑑定。

檢體前處理：

(1) 血液檢體：血清或添加抗凝劑如 sodium citrate 或 EDTA 的血漿皆可使用，檢體以 4°C 的運送。採集後之檢體，以 2,000 rpm 離心 10 分鐘，以分離出的血清備用。並將檢體分裝依其姓名作檢體編號，並將血清分成兩管：一管放置 4°C 供應 RT-PCR 檢驗用；另一管放置 -20°C 儲存。

(2) 咽喉拭子檢體：咽喉拭子棉棒充分攪拌後於塑膠管壁旋轉擠乾取出。將擠出之液體於 4°C，2100 ×g 離心 15 分鐘。收集上清液裝於管子標示號碼及日期保存於 -70°C。

(3) 糞便檢體：取糞便 1 g，放入 15 ml 離心管中，加入玻璃圓球及 10 ml PBS 調成 10% 懸浮液。於 4°C，2100 ×g 離心 15 分鐘，上清液移至耐氯仿的離心管，視上清液之總體積量依比率加入 1/10 量氯仿，振盪混合 15 分鐘。於 4°C，2100 ×g 離心 15 分鐘收集上清液分裝於 2~3 支 Cryotube，標示號碼及日期保存於 -70°C。

(4) 痰檢體：取痰檢體與 0.9%NaCl(內含 1% N-Acetylcysteine)體積 1: 2 攪拌靜置 30 分鐘後於 4°C，2100 ×g 離心 15 分鐘，收集上清液。

注意事項：一般，痰檢體之收集最易弄錯；不是收集量過少，就是檢體中只含有口腔、鼻腔或咽喉之分泌物，根本沒有痰的存在。檢體收集前須用牙膏刷淨牙齒，然後從呼吸道咳出痰。所採取的痰檢體，必須真正能代表肺部之分泌者。通常清晨痰量最多。痰以深咳排出後，應裝於有密封瓶蓋之無菌塑膠容器內以免感染自己或他人。

SARS病毒鑑定

RNA 的萃取：

使用 QIAGEN 公司的 QIAmp Viral RNA kit 進行 RNA 的純化。取患者唾液、咽喉拭子、血液等檢體 140 ul 加入 560 ul Buffer AVL 室溫作用 10 分鐘，再加入 560 ul 絕對酒精 vortexing，上述混合液再通過 QIAmp spin column，column 以 Buffer AW 洗兩次以後，用 80°C 純水將 RNA 溶出。製備的病毒 RNA 可用於反轉錄及聚合酶鏈鎖反應 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)。

反轉錄及聚合酶鏈鎖反應 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction ; RT-PCR)

(1) Reverse Transcription 反應

取病毒RNA 10ul 加入 75mM KCl、50 mM Tris-HCl、3 mM MgCl₂、10 mM DTT、ATCG dNTP mixture 0.5 mM、RNasin 38U/ul 及反股引子 (antisense primer) : IN4 或IN7 (表一) [4] 50 pmole的混合物中，70°C 10 分鐘，再加入 100 units Superscript II -reverse transcriptase，於 37°C 作用 90 分鐘。

(2) 聚合酶鏈反應 PCR

a 第一次 PCR (first round PCR)

以Reverse Transcription反應中所得cDNA進行PCR，cDNA加入 50

mM KCl、10 mM Tris-HCl、1.5 mM MgCl₂、0.1% Triton-X 100、ATCG dNTP mixture 1 mM及primer:In2/In4 or In6/In7 各 50 pmole的混合物中,加入 5 units Taq polymerase(Invitrogen),於 94°C 變性(denature) 3 分鐘後,以 94°C 30 秒、50°C 45 秒、72°C 1 分鐘,進行 35 次反應,最後在 72°C作用 10 分鐘

b 第二次 PCR (nest-PCR)

將第一次PCR產物取 5ul加入 50 mM KCl、10 mM Tris-HCl、1.5 mM MgCl₂、0.1% Triton-X 100、ATCG dNTP mixture 1 mM及F2/R1 or F3/R1 各 50 pmole的混合物中,加入 5 units Taq polymerase (Promega),於 94°C 變性(denature) 3 分鐘後,以 94°C 30 秒、55°C 45 秒、72°C 1 分鐘,進行 35 次反應,最後在 72°C作用 15 分鐘。

(3) 定序分析 (Sequencing)

使用商用螢光核酸定序試劑組 ABI PRISM^(TM) BigDye^(TM) Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) 來標記欲分析之核酸產物。由於核酸的純度會影響定序反應之好壞,取用高純度 (OD_{260/280} >1.8) 之核酸產物來做為定序之模板。所需之核酸量於雙股DNA (例如:質體)使用 200~500 ng、單股DNA 50~100 ng, PCR反應產物 30~90 ng即可。將適量核酸模板、3μl premix (包括 Tris-HCl buffer, pH 9.0, MgCl₂, dNTP mix, labeled A-dye terminator, C-dye terminator, G-dye terminator, T-dye terminator, AmpliTag DNA polymerase FS with thermally stable pyrophosphatase)、3.2~5.0 pmole 的核酸引子(本實驗使用的引子為:2-Rabies-F/2-Rabies-R),與適量的水混合均勻,使反應總體積為 10μl。然後再覆上一層礦物油(mineral oil),並將裝有反應物之微量離心管移置預熱在 94°C 之聚合酶連鎖反應器中,以 94°C 30 秒、55°C 15 秒、60°C 4 分鐘之條件,進行

25 次之循環反應，最後將反應停止在 4°C。

反應產物之純化—酒精沉澱法

爲了減少未反應之游離的標記螢光之 dye terminator 對訊號判讀所造成之干擾，須先將定序反應產物進一步純化方可進行核酸序列分析。純化定序反應產物的方法有很多種，本實驗採用酒精沉澱的方法以去除之。首先以尖頭吸管將已標記好之反應產物吸出，以石臘紙除去多餘的石臘油。再將去油後之產物置於乾淨之微量離心管中，加入 2 μ l 3 M sodium acetate (NaOAc, pH 4.6) 及 50 μ l 95% ethanol，均勻混合。將混合物於室溫下靜置 15 分鐘後，以 15000 g 離心 30 分鐘。以尖頭吸管小心吸除含游離螢光物的上清液，再加入 250 μ l 70% ethanol 清洗沉澱物。經短暫震盪混合後，以 15000g 離心 10 分鐘。最後再以真空乾燥機將反應產物乾燥，保存於 -20°C。上機前，再溶於 3 μ l 之 loading buffer (deionized formamide : 25 mM EDTA, pH 8.0 = 5 : 1) 中。

將經過 RT-PCR 反應所增幅的 DNA 片段，以酒精沉澱法純化後利用 ABI 377 自動化核酸螢光定序儀 (DNA Autosequencer) 作定序分析。

演化樹 (Phylogenetic tree) 之分析：

將目前已知的冠狀病毒序列 Human coronavirus (229E)、Bovine coronavirus (BcoV)、Canine coronavirus (CCoV)、Feline infectious peritonitis virus (FIPV)、Human coronavirus (HCoV)、Avian infectious bronchitis virus (IBV-A)、Mouse hepatitis virus (MHV)、Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus (PHEV)、Rat sialodacryoadenitis virus (RAT-SDAV)、Turkey coronavirus (TcoV)、Porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV)、Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)、CH-TW。(Gene Bank 的序號爲 AF124992, Z34093, AF124987, AF124986, NC002645, NC001451, AF124991, M55148, NC001846, AF124990, AF124989, AF124988, AF124985, NC003045, AY268049) 與從病患檢體中所得到的病毒序列作演

化樹之分析。演化樹是以電腦軟體 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 2.1 操作。本分析一律採用“Neighbor-joining”方法，並重複計算 (Bootstrap) 1,000 次。

結 果

將疑似 SARS 感染檢體經核酸萃取後以引子對作 RT-PCR 與 nest-PCR 分析後，結果發現在經過第一次 RT-PCR 增幅後，多數的檢體經電泳分析後並看不到 405bps 的片段，要將檢體經過 nest-PCR 再增幅放大後經電泳分析才可見到約 368bps 的基因片段如圖一，將 nest-PCR 的產物經過純化後以 ABI377 作序列分析，並將得到的序列上 NCBI 網站作比對，結果發現僅 58 個核苷酸與 Human coronavirus 相同，其餘的基因序列均不相同。

將不同種類的檢體作 RT-PCR 與 nest-PCR 增幅並以洋菜膠電泳分析，結果發現咽喉拭子與痰是最容易偵測出冠狀病毒序列的檢體，發病早期的血清也是可以偵測出冠狀病毒的序列，少數的糞便檢體有偵測到冠狀病毒，其餘的檢體都沒有偵測分析到冠狀病毒(data not shown)。

將從檢體中經 RT-PCR 與 nest-PCR 增幅放大 SARS 病毒 pol 基因區域所得到的病毒序列 CH-TW (此個案為台灣首例疑似感染 SARS 勤姓台商之咽喉拭子檢體以 RT-PCR 增幅出序列其 Accession Number : AY268049) 與目前已知的冠狀病毒(種類見材料方法)作核苷酸與胺基酸的相似度(similarity)的比較，結果發現核苷酸相似度 CH-TW 與其它已知冠狀病毒相似度只有 54%~62%，其中與 CH-TW 相似度較高的有 MHV-NC-001846，相似度為 62.9%；MHV-M55148,相似度為 62.4%；RAT-SDAV-AF124990，相似度為 62.1%。其中相似度最低者為 CCoV-AF124986, 相似度為 55%。以此段 pol 基因序列相似度較高的前三者其病毒分離來自於老鼠，相似度最低者其病毒分離來自於狗。(見表二)

從胺基酸序列相似度比較來分析，結果發現 CH-TW 與其它已知冠狀

病毒胺基酸相似度介於 55%~73%，其中病毒分離來自於豬的冠狀病毒 PHEV-AF1249880 胺基酸相似度較高有 73.1%，與病毒分離來自於人的 HcoV-OC43-AF124989、病毒分離來自於牛的 BCoV-AF124985 與 BCoV-NC-003045 胺基酸相似度有 72.3%，而胺基酸相似度最低者為病毒分離來自於豬的 TGEVP-AF124992、TGEV-Z34093 相似度只有 55.4%。(見表三)

將 CH-TW 基因序列與其它已知的冠狀病毒作基因演化樹的分析，將序列擷取相同的長度 390bp 並以電腦軟體 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 2.1 操作，採用“Neighbor-joining”方法，並重複計算 (Bootstrap) 1,000 次。結果發現演化樹呈現三個聚集(見圖二)，分別為 group I、group II、group III，而 CH-TW 則因差異甚大獨自呈現出一個分支[3]。從演化樹的結果來分析可以看出此 CH-TW 株應該是變種的冠狀病毒，和先前從人、豬、牛、狗等動物身上分離出的冠狀病毒差異很大！

結論與討論

此新型冠狀病毒 (novel coronavirus) 其序列和以往所發現的冠狀病毒序列差異很大，一開始由於香港大學從患者的檢體中以電子顯微鏡觀察到副黏液病毒，因此使許多實驗室朝此方向進行分析檢驗，本組病毒實驗室也嘗試用各種方法與技術希望從台灣疑似感染病患檢體檢測分離出病毒，但始終毫無結果。直到美國疾病管制局在接種過病患檢體的部分細胞培養 (Vero-E6) 有了意外的發現，他們從 Vero-E6 的細胞培養觀察到細胞病變 (CPE) 的現象[4]，透過電子顯微鏡觀察看到有類似冠狀的病毒顆粒 (如圖三)；然而冠狀病毒只是一般感冒常見的病原體之一，因此從檢體中培養出冠狀病毒並不是很特殊，另外直接以電子顯微鏡觀察 BAL (Bronchoalveolar lavage) 時，也找到類似培養液中所觀察到之冠狀病毒顆粒。因此根據這些結果推測冠狀病毒是造成此波疫情的原兇。之後，全

球許多實驗室都從疑似感染的患者檢體中發現此新型冠狀病毒[5]。四月十六日世界衛生組織（WHO）正式宣布冠狀病毒為 SARS 的致病原，其病毒為變種冠狀病毒屬於冠狀病毒科(coronaviridae)。

在這一波 SARS 的疫情中，傳統的病毒學偵測方法發揮到最大的功效，從美國 CDC 發現此病毒外觀跟冠狀病毒相似，因此便朝此方向進行研究，加上分子生物技術的進步與全球科學家數日不眠不休的努力，終於定序出 SARS 病毒的基因序列，其基因全長介於 29000 到 31000 個核苷酸 [6]。加拿大與美國 CDC 兩個研究中心公佈的基因序列分別是 29736 與 29727 個核苷酸，香港大學與香港中文大學公佈的病毒序列分別是 29742 與 29702 個核苷酸，與美、加結果相近，而台大醫學院的研究團隊也已定序出台灣本土 SARS，目前疾病管制局病毒實驗室也積極從 SARS 死亡個案檢體中分離到的病毒做基因全長定序[7, 8]。

演化樹（Phylogenetic tree）分析方面，雖然無法將 SARS 病毒歸入目前已知的三個冠狀病毒群組中，但比對核苷酸顯示第二群組中鼠類肝炎病毒(murine hepatitis virus) 中間序列、第三群組禽類感染性支氣管炎病毒 (avian infectious bronchitis virus) 與中後端序列等冠狀病毒有較大的相似度[4]。本局病毒實驗室將從這些已經發現的基因序列中瞭解病毒的突變率，試圖儘速發展針對 SARS 的診斷工具，目前已經成功發展出即時定量 RT-PCR 螢光偵測系統，憑藉其快速、高敏感度、高專一性的特性，並同時可以篩檢大量的檢體，而免疫螢光染色 (IFA)、酵素免疫偵測法(EIA)目前都在積極研發測試中。實驗室的診斷則為防疫的第一道防線，儘快在第一時間內作出最新疫情報告和預測，時刻監測疫情的動態變化，並可及早遏止疫情持續的擴大，進而有效防治 SARS 的流行，因此快速且準確的檢驗方法的研發就顯得格外重要。

衛生署已於三月二十七日晚間宣佈將嚴重急性呼吸道症候群（SARS）列為第四類法定傳染病，世界衛生組織更將台灣列為病例集中區[9]。疾病

管制局全力投入於防治防疫與檢驗診斷的工作，時時刻刻監測疫情的動態變化了解全面態勢，在第一時間內採取防疫措施控制病毒的擴散，期望將 SARS 對民眾健康的影響減到最低。截至目前，醫界對 SARS 還沒有找到有效的控制，唯有自身提高警覺，避免前往感染區旅遊，減少公共場所的進出，並提升自我保護的能力，是目前對 SARS 的預防之道。

撰稿者：王聖帆、楊志元、李祥吉、陳豪勇

行政院衛生署疾病管制局檢驗研究組病毒實驗室

參考文獻

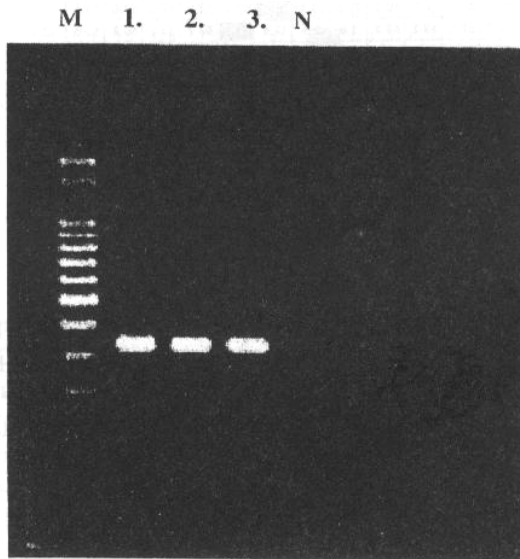
1. Update: outbreak of severe acute respiratory syndrome--worldwide, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2003,52:269-272.
2. Severe acute respiratory syndrome (SARS). *Wkly Epidemiol Rec* 2003,78:81-83.
3. Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, *et al.* Characterization of a Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. *Science* 2003.
4. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, *et al.* A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. *N Engl J Med* 2003.
5. Drosten C, Gunther S, Preiser W, *et al.* Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *N Engl J Med* 2003.
6. Marra MA, Jones SJ, Astell CR, *et al.* The Genome Sequence of the SARS-Associated Coronavirus. *Science* 2003.
7. Lee N, Hui D, Wu A, *et al.* A Major Outbreak of Severe Acute Respiratory Syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med* 2003.
8. Tsang KW, Ho PL, Ooi GC, *et al.* A Cluster of Cases of Severe Acute Respiratory Syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med* 2003.
9. Global surveillance for severe acute respiratory syndrome (SARS). *Wkly Epidemiol Rec* 2003,78:100-119.

表一

Primers	Sequence
IN2-S	5'-GGGTTGGGACTATCCTAAGTGTGA-3'
IN4-AS	5'-TAACACACAAACACCCATCATCA-3'
IN6-S	5'-GGTTGGGACTATCCTAAGTGTGA-3'
IN7-AS	5'-CCATCATCAGATAGAATCATCATA-3'
F2-S	5'-CTAACATGCTTAGGATAATGG-3'
F3-S	5'-GCCTCTCTTGTTCTTGCTCGC-3'
R1-AS	5'-CAGGTAAGCGTAAACTCATC-3'

RT-PCR 與 nest-PCR 所需的引子對 S(sense) 為正股，AS(Anti-sense) 為反股。

圖一



以 F2/R1 為引子利用 nest-PCR 方法增幅出約 368bp 的片段，其中 M 為 100 bp ladder marker，1~3 為一 SARS 患者痰與兩次採檢咽喉拭子檢體萃取液。Lane 1 為痰檢體，Lane 2、3 為第一次與第二次採檢咽喉拭子檢體，N 為 Negative Control。

表二

		Percent Similarity																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
Percent Divergence	1	█	57.5	61.1	61.0	55.0	55.8	60.9	58.7	62.4	62.9	61.4	62.1	58.2	55.8	55.8	60.1	1	CH-TW SEQ
	2	62.9	█	58.0	58.0	67.8	69.1	56.1	55.0	58.6	58.0	58.0	58.3	50.4	68.5	68.5	68.3	2	D-229E-NC_002646-390bp_SEQ
	3	55.0	60.3	█	99.5	58.3	58.1	98.2	58.7	62.9	62.0	98.2	83.0	58.7	57.5	57.5	53.2	3	D-BCoV-NC_003046-390bp_SEQ
	4	53.9	60.3	0.5	█	59.8	59.3	95.9	59.0	62.0	62.4	98.0	83.4	59.0	57.8	57.8	52.7	4	D-BCoV-NC_003046-390bp_SEQ
	5	69.4	42.4	60.9	60.4	█	95.7	57.5	55.0	59.0	59.0	58.3	59.8	54.0	65.7	65.7	65.0	5	D-CCoV-AF124086-390bp_SEQ
	6	67.3	40.1	61.5	60.9	4.5	█	56.8	56.4	59.8	59.8	59.1	60.1	55.4	66.7	66.7	65.7	6	D-FIPV-AF124087-390bp_SEQ
	7	55.5	59.2	3.9	4.2	62.8	64.8	█	59.7	62.0	62.0	96.4	93.1	60.3	58.8	58.8	51.9	7	D-HCoV-OC43-AF124089-390bp_SEQ
	8	61.5	67.6	60.3	59.7	67.1	65.7	59.0	█	58.5	59.0	58.7	59.2	93.6	56.7	56.7	57.9	8	D-IBV-Avian-NC_001451-390bp_SEQ
	9	52.2	60.4	10.5	10.9	58.1	57.8	10.5	60.7	█	98.0	82.4	97.2	58.2	50.6	50.6	53.5	9	D-MHVM55148-390bp_SEQ
	10	61.2	60.4	19.8	20.2	58.2	57.7	19.8	50.5	2.1	█	82.1	98.0	58.5	59.8	59.8	52.9	10	D-MHVM-NC_001840-390bp_SEQ
	11	54.4	60.3	1.9	2.1	61.0	61.6	3.7	60.3	20.2	20.5	█	82.9	50.2	57.5	57.5	53.2	11	D-PHEV-AF124088-390bp_SEQ
	12	52.7	61.0	18.5	18.8	57.7	57.1	10.2	58.9	2.9	2.1	19.5	█	50.2	50.8	50.8	53.5	12	D-RAT-SDAV-AF124090-390bp_SEQ
	13	62.8	65.7	60.3	50.7	70.4	68.2	56.8	6.7	61.3	60.7	59.1	59.0	█	55.6	55.6	59.0	13	D-TCoV-AF124091-390bp_SEQ
	14	67.3	41.0	62.7	62.1	4.5	3.4	84.8	85.0	58.2	58.2	62.8	57.7	67.5	█	100.0	66.5	14	D-TGEV(F)-AF124092-390bp_SEQ
	15	67.3	41.0	62.7	62.1	4.5	3.4	84.8	85.0	58.2	58.2	62.8	57.7	67.5	0.0	█	66.5	15	D-TGEV-Z34093-390bp_SEQ
	16	57.4	59.8	73.8	75.3	47.8	46.3	77.1	63.0	73.2	74.9	73.8	73.3	60.1	44.8	44.8	█	16	D-PEDV_SEQ
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16			

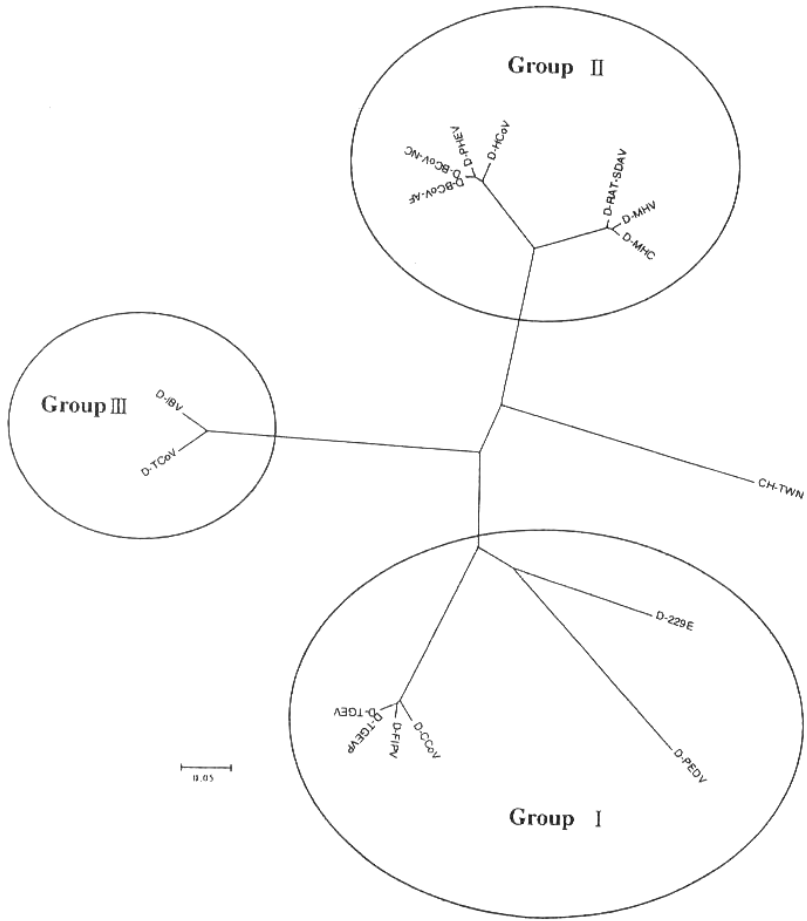
此表為 Human coronavirus (229E)、Bovine coronavirus(BcoV)、Canine coronavirus (CCoV)、Feline infectious peritonitis virus (FIPV)、Human coronavirus (HCoV)、Avian infectious bronchitis virus (IBV-A)、Mouse hepatitis virus (MHV)、Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus (PHEV)、Rat sialodacryoadenitis virus (RAT-SDAV)、Turkey coronavirus (TcoV)、Porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV)、Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)其間的核苷酸相似性(右上半部)與相異性(左下半部)。

表三

		Percent Similarity																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
Percent Divergence	1	█	98.9	72.3	72.3	58.2	58.2	72.3	63.1	88.5	89.2	73.1	89.2	83.1	55.4	55.4	60.8	1	CH-TW.PRO
	2	83.1	█	52.3	52.3	73.1	73.1	51.5	53.8	51.5	51.5	53.1	51.5	53.8	72.3	72.3	73.8	2	229E-NC002645.PRO
	3	34.8	73.9	█	100.0	53.1	53.1	96.2	82.3	88.5	89.2	99.2	99.2	81.5	52.3	52.3	57.7	3	BCoV-AF124985.PRO
	4	34.8	73.9	0.0	█	53.1	53.1	96.2	82.3	88.5	89.2	99.2	99.2	89.2	81.5	52.3	52.3	4	BCoV-NC_003045.PRO
	5	64.8	33.4	72.0	72.0	█	100.0	51.5	53.1	52.3	52.3	52.3	52.3	53.1	99.2	99.2	76.2	5	CCoV-AF124986.PRO
	6	64.8	33.4	72.0	72.0	0.0	█	51.5	53.1	52.3	52.3	52.3	52.3	53.1	99.2	99.2	76.2	6	FIPV-AF124987.PRO
	7	34.8	75.8	4.0	4.0	75.8	75.8	█	82.3	89.9	87.7	95.4	87.7	81.5	51.5	51.5	57.7	7	HCoV-OC43-AF124989.PRO
	8	50.5	70.1	52.0	52.0	72.0	72.0	52.0	█	81.5	82.3	82.3	82.3	97.7	52.3	52.3	54.8	8	IBV-avian-NC_001451.PRO
	9	40.8	75.8	12.8	12.8	73.9	73.9	14.4	53.5	█	99.2	89.5	99.2	90.8	52.3	52.3	58.2	9	MHV-M55148.PRO
	10	39.5	75.8	11.7	11.7	73.9	73.9	13.5	52.0	0.8	█	89.2	100.0	81.5	52.3	52.3	58.2	10	MHV-NC_001848.PRO
	11	33.4	72.0	0.8	0.8	73.9	73.9	4.8	52.0	12.6	11.7	█	89.2	81.5	51.5	51.5	56.9	11	PHEV-AF124988.PRO
	12	39.5	75.8	11.7	11.7	73.9	73.9	13.5	52.0	0.8	0.0	11.7	█	81.5	52.3	52.3	58.2	12	RAT-SDAV-AF124990.PRO
	13	50.5	70.1	53.5	53.5	72.0	72.0	53.5	2.3	55.0	53.5	53.5	53.5	█	52.3	52.3	53.8	13	TCoV-AF124991.PRO
	14	68.5	34.8	73.9	73.9	0.8	0.8	75.8	73.9	73.9	73.9	75.8	73.9	73.9	█	100.0	76.2	14	TGEV(P)-AF124992.PRO
	15	68.5	34.8	73.9	73.9	0.8	0.8	75.8	73.9	73.9	73.9	75.8	73.9	73.9	0.0	█	76.2	15	TGEV-A234993.PRO
	16	55.0	32.2	81.4	81.4	28.7	28.7	61.4	68.3	64.8	64.8	63.1	64.8	70.1	28.7	28.7	█	16	D-PEDV.PRO
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		

此表為 Human coronavirus (229E)、Bovine coronavirus(BCoV)、Canine coronavirus (CCoV)、Feline infectious peritonitis virus (FIPV)、Human coronavirus (HCoV)、Avian infectious bronchitis virus (IBV-A)、Mouse hepatitis virus (MHV)、Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus (PHEV)、Rat sialodacryoadenitis virus (RAT-SDAV)、Turkey coronavirus (TcoV)、Porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV)、Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)其間的胺基酸酸相似性(右上半部)與相異性(左下半部)。

圖二、以 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 2.1 作演化樹分析。本分析一率採用“Neighbor-joining”方法，並重複計算 (Bootstrap) 1,000 次。



圖三、以電子顯微鏡觀察到 SARS 病患檢體中的類似冠狀病毒顆粒(圖來源於美國 CDC)

