

## 電子顯微鏡下的 SARS 病毒

### 前 言

今年 3 月冠狀病毒 (Coronaviruses) 被世界衛生組織 (WHO) 確認為「嚴重急性呼吸道症候群」(SARS) 或俗稱的「非典型肺炎」(Atypical Pneumonia) 的致病原, 其特點為發生瀰漫性間質肺炎及呼吸衰竭進而導致死亡。它們會令人體免疫系統產生過敏反應, 連人體健康的肺細胞也攻擊吞噬, 令肺部潰瘍發炎, 甚至導致患者死亡。它們亦損害骨髓、脾臟、肌肉, 免疫系統, 嚴重者的血液中也充滿大量病毒。一般而言冠狀病毒科除了會感染人類外, 還會感染某些鼠類、豬、貓、犬、雞、牛等動物, 但動物間不會互相傳染<sup>(1,2)</sup>。人類冠狀病毒主要侵襲呼吸系統中的支氣管、鼻腔以及肺泡的纖毛細胞, 還有肝炎, 有一至二成的人類急性上呼吸道感染的病原是屬於冠狀病毒 (常引起普通感冒或傷風), 而這次的 SARS 病毒序列與雞、牛的冠狀病毒接近, 可能為新的變種病毒<sup>(3,4,5)</sup>。

冠狀病毒是一具封套之病毒, 其基因體為單股正向的 RNA, 5' 端有 cap, 3' 端有 poly (A)n 尾, 具有感染性。此次造成人類大流行之 SARS-CoV 基因組約有 30,000 個核苷酸、11 個開放閱讀框 (Opening Reading Frames) 組成。它的基因組結構和其他的冠狀病毒非常相似。本身呈多切面型狀, 有一個脂肪外套, 此脂肪外套向細胞表面突出, 使得病毒本身看起來類似冠狀, 而稱之為「冠狀病毒」, 其直徑在 100 nm 左右。冠狀病毒表面有幾種糖蛋白, 主要是 S、M、H 和 HE 蛋白。而冠狀病毒核心部分則是 RNA 基因序列碼和一種鹼性磷酸蛋白 (C)<sup>(6)</sup>。冠狀病毒侵入人體後, 在細胞質內生存繁殖。冠狀病毒表面糖蛋白中, 分子量最大的蛋白為 S 蛋白約 150-180 kda, 可區分成兩個次單元 (S1 及 S2), 主要與宿主細胞接受體的結合及誘發免疫有關; 穿膜 M 蛋白為病毒顆粒含量最多的蛋白質, 與

S 共同形成病毒的封套膜<sup>(7、8、9)</sup>；HE (hemagglutinin-esterase) 醣蛋白具有血球凝集及切除receptor之acetyl group功能，與病毒感染進入細胞及釋出有關，但非病毒複製之絕對必需；最小的封套蛋白為E由 76 個氨基酸組成，於murine coronavirus之細胞培養為細胞凋亡的誘發物可誘發細胞產生凋亡(10、11、12、13)。

當 2002 年 9 月大陸發生疫情時，疾病管制局即關切此疫情的發展，到 2003 年 3 月 14 日首例境外移入疑似病例，使台灣成為疫區。疾病管制局為台灣最高防疫單位，責無旁貸須快速偵測病原體，找出感染源，阻斷傳染途徑，以控制疫情。而在檢驗疑似病毒感染的病原體時，最直接的方法就是電子顯微鏡檢測，而以負染色法(negative stain)為最常使用的方法，負染色實際上不是染色，而是用高密度染液將病毒包圍起來，並沉積在病毒凹陷處或穿透病毒顆粒的內部空隙，由於負染液密度較大，能較強地散射電子射線，結果在病毒顆粒周圍形成黑色背景，而由反射作用，使病毒顆粒的外形、殼膜結構清晰可見，在負染色中可見到“黑色背景、白色病毒顆粒”的呈現。

## 檢驗方法

因 SARS 病毒已被衛生署列為第一類法定傳染病，所以所有檢體的處理須特別注意其生物安全性，故本實驗檢體前處理的過程均在第三級(P3)實驗室操作，檢體係採自醫院通報疑似案例患者咽喉拭子，進行細胞培養(Vero-E6)觀察其有發生細胞病變現象(CPE)，收集細胞培養上清液進行固定滅菌作用後，才能視為一般檢體製作電子顯微鏡標本。

本實驗以負染色法(negative stain)進行電子顯微鏡直接檢測 SARS 病毒，負染色法操作步驟如下：

- 1.Add 4% GA into the sample to fixed and kill the pathogens.
- 2.Centrifuge the sample by 3000 rpm for 30 min.

3. Collect the supernatant, then re-centrifuge in super-speed centrifuge (100,000 rpm).
4. Add 2 % PTA into the virus pellet (precipitant) and mix them as suspension.
5. Place one drop on the Formvar film-covered grid.
6. Observe in electronic microscopy.

## 結 果

冠狀病毒因其病毒體外圍有脂肪外套，此脂肪外套向細胞表面突出，使得病毒本身看起來類似冠狀，而稱之為「冠狀病毒」，其直徑在 100 nm 左右。SARS 病毒的電子顯微鏡觀察如圖一、二所示，其日冠狀 (solar-corona) 形狀清晰可見，病毒體直徑在核心 (Core) 部分為 74 至 85 nm，包含外套膜 (Envelope) 時約 100 至 106 nm。

## 結論與討論

病毒是最小的生物形態 (18-350nm)，唯靠電子顯微鏡才能直接觀察到，在早期病毒學的檢查研究中是非常重要的工具之一，近代因分子生物科技的發展，傳統的基礎實驗方法被忽視，如動物實驗、細胞培養……等，而此次 SARS 病毒的被發現並確定方向，係由美國疾病管制局將患者檢體接種在 Vero-E6 細胞株中培養，觀察到細胞病變，再用電子顯微鏡觀察到有類似冠狀的病毒顆粒而確定。此次 SARS 疫情，疾病管制局研究檢驗組全力投入 SARS 檢驗工作，由動物接種實驗、細胞培養、電子顯微鏡檢查，至 RT-PCR、nest-PCR、Real Time RT-PCR、Sequencing 等；檢體檢驗速度由開始 7 天縮短到 3 天，再努力由 36 小時至 24 小時內發報告，一天的檢體量在高峯期時曾多達 400-500 支；檢驗的項目涵蓋病毒、細菌、黴菌等。疾病管制局研究檢驗組為全國最高防疫檢驗單位，在檢驗能力方面，除在分子生物科技的提昇外，亦會加強基礎實驗方法，當下一波疫情再次來臨

時，會再次為全國民眾的防疫健康做好準備。

## 誌 謝

感謝中興大學陳三多教授和家畜衛生試驗所郭舒亭小姐給予協助。

**撰稿者：**蘇勳璧、邱詩惠、林美嫻、王明琴、周振英

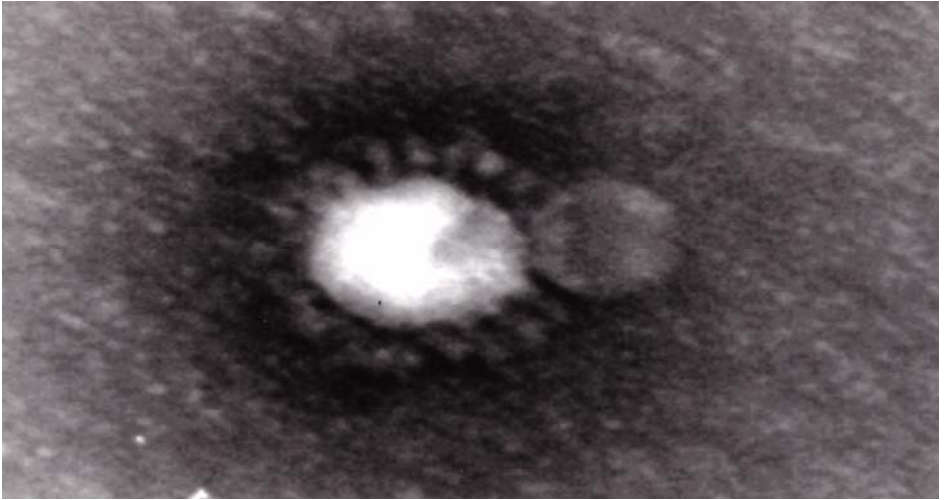
衛生署疾病管制局研究檢驗組

## 參考文獻

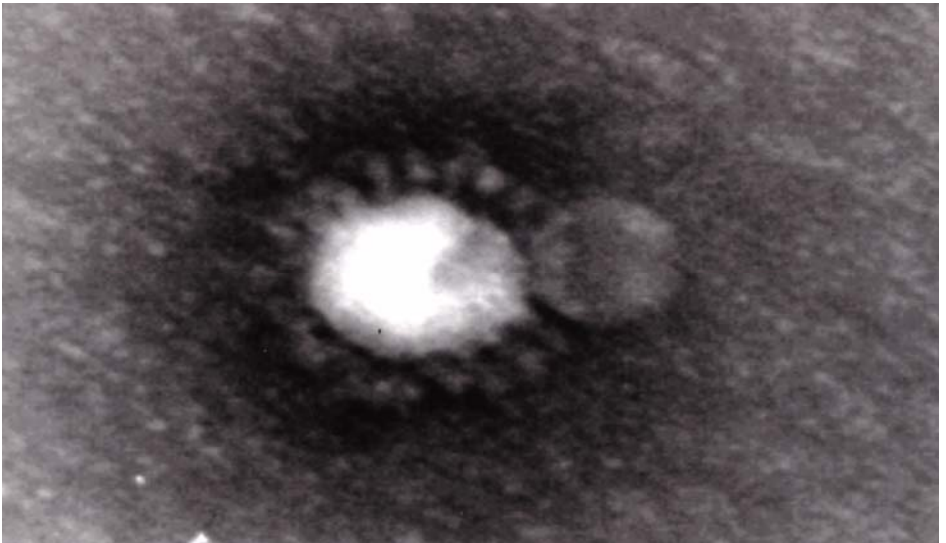
1. Wege, H., S. Siddell, and V. ter Meulan. 1982. The biology and pathogenesis of coronaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 99:165–200.
2. Compton, S. R., S. W. Barthold, and A. L. Smith. 1993. The cellular and molecular pathogenesis of coronaviruses. *Lab. Anim. Sci.* 43:15–28.
3. Drosten C, Gunther S and Preiser W, et al. 2003. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* ( published online April 10, 10.1056/NEJMoa030781 ).
4. Ksiazek T.G., D. Erdman., C.S. Goldsmith. 2003. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* ( published online April 10, DOI: 10.1056/NEJMoa030747 ).
5. Peiris, J.S.M., S.T. Lai., L.L.M. Poon., et al. 2003. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 361: 1319–25.
6. Marra M.A., S.J.M. Jones., C.R. 2003. Astell. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. Published online May 1, 2003:

<http://www.sciencemag.org/cgi/rapidpdf/1085953v1.pdf> (accessed May 7, 2003)

7. Jackwood, M.W. and D.A. Hilt. 1995. Production and immunogenicity of multiple antigenic peptide (MAP) constructs derived from the S1 glycoprotein of infectious bronchitis virus (IBV). *Adv Exp Med Biol* 308:213–19.
8. Callenbaut. P., Enjuanes, L. and Pensaert, M. 1998. An adenovirus recombinant expression the spike glycoprotein of porcine respiratory coronavirus is immunogenic in swine. *J. Gen. Virol.*; 77: 309–13.
9. Gomez. N., C. Carrillo., J. Salinas., F. Parra., M. V. Borca., J.M. Escribano. 1998. Expression of immunogenic glycoprotein S polypeptides from transmissible gastroenteritis coronavirus in transgenic plants. *Virology* 249: 352–58.
10. Yu, X., W. Bi, S. R. Weiss, and J. L. Leibowitz. 1994. Mouse hepatitis virus gene 5b protein is a new virion envelope protein. *Virology* 202:1018–1023.
11. Yokomori, K., M. Asanaka, S. A. Stohlman, S. Makino, R. A. Shubin, W. Gilmore, L. P. Weiner, F.-I. Wang, and M. M. C. Lai. 1995. Neuropathogenicity of mouse hepatitis virus JHM isolates differing in hemagglutinin-esterase protein expression. *J. Neurovirol.* 1:330–339.
12. Sungwhan, A. N., C.J. Chen., X. Yu., J. L. Leibowitz. And S. Makino. 1999. Induction of apoptosis in murine coronavirus-infected cultured cells and demonstration of E protein as an apoptosis inducer. *J Virol* 73: 7853-7859.
13. Junko, M., J. F. Repass., A. Maeda. and S. Makino. 2001. Membrane Topology of coronavirus E protein. *Virology* 281, 163-169.



圖一、電子顯微鏡下的SARS病毒之一



圖二、電子顯微鏡下的SARS病毒之二