

計畫編號：DOH93-DC-2028

行政院衛生署疾病管制局九十三年度科技研究發展計畫

人類感染症的病原微生物電子顯微鏡觀察
研究及系統建立

研 究 報 告

執行機構：衛生署疾病管制局

計畫主持人：周振英

共同及協同主持人：蘇勳璧、馮天霖

研究人員：邱詩惠、朱美蓮

執行期間：93年1月1日至93年12月31日

* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見 *

目錄

目錄	頁次
中文摘要	2
英文摘要	4
前言	6
材料與方法	8
結果與討論	15
結論與建議	17
參考文獻	19
圖表	20

摘要

關鍵詞：穿透式電子顯微鏡；掃描式電子顯微鏡；病原體檢出。

感染症最基本也是最重要的診斷方法就是看到病原體，在感染症中最重要的病原體包括細菌、真菌、病毒，都是極微小的構造體，不管是經由培養或直接的檢體均需利用各種染色法或物理性的光源調整後，經由顯微鏡的擴大才能獲得觀察。

在科學領域中，精密的儀器設備與熟稔的實驗技術是擴大新知識的不二法門，電顯可說是融合二者的典型例子。本局已擁有透過型電子顯微鏡及掃描型電子顯微鏡的兩大設備，若加上熟練的操作人員當必能對感染症中，病原體的檢出及確認而獲得屹立不動的證據。

本計劃首先將現有的電子顯微鏡重新整備及調整，預定在一年內將最基本的感染病原體的各種檢出操作技術完成，並建立各種病原體的標準圖像資料，以便將來能利

用電子顯微鏡進一步地功能來作形態學以外的各種研究。

今年度的研究計畫，我們拍攝完成了五種重要的病毒及十四種常見的病原性細菌的電子顯微鏡圖像，可以提供今後本局在宣傳政策或發佈新聞時有屬於自己的資料。

Abstract

Keywords: Transmission electron microscope; Scanning electron microscope; pathogen

As we are dealing with infectious diseases, the most essential and fundamental diagnostic method is nothing but directly eye witnessing the pathogen. However, pathogens of most important infectious diseases are microorganisms including bacteria, viruses, and fungi and they are all microscopic in size, which means they are too small to be seen by eye without the help of a microscope. Besides, various staining techniques and physical light source adjustments are often necessary in order to observe certain specific pathogens in specimens with or without prior cultivation process.

Nowadays, new breakthroughs in science are hard to come by without the assistance of intricate precision instruments and mature, skillful technical know-how. Electro microscope (EM) is a typical example of this concept. We at CDC-Taiwan are very fortunate to have a scanning EM and a transmission EM. With experienced operators and well thought out plans, we should be able to develop solid ways to detect and confirm the presence of certain pathogens in infection cases.

In this project, we have firstly spent sometime to

restore and readjust the two existing EM to their most optimum working conditions. Our immediate plan after that is, within one year or so, to have some of the most basic EM detection techniques for various pathogens established, and also start a database for standard EM graphs of them. Future studies will include other EM-related functions beside morphology.

During the past year, we completed the EM photography of 5 important viruses and 14 general bacteria. The stock files will be part of CDC-Taiwan's own resource and can be used in its future documents such as news releases and policy announcements.

前言

電子顯微鏡技術的進步,特別是其周邊應用技術的凍結法,畫像解析法等開發,不但微生物的微細構造可以從各種角度來觀察,從生化學及遺傳學的手法對構造解析及構造與機能的關係亦可透過所見獲得理解。

首先利用超薄切片法及負染色法對包括病毒在內的微生物作外觀上的觀察,並同時應用在病原體的檢出,這是感染症確立診斷最重要的根據。爾後對各種形態變化來求證各種病理的或生理的變化以及對各種關聯因子的影響所造成的形態變化亦可得到證明,此即所謂動態電子顯微鏡的應用。

疾病管制局自 1999 年成立後,電子顯微鏡是承繼預防醫學研究所時代之機器,但因為人員移動關係,數年來並無專人管理並不曾使用,惟成立這幾年間經歷許多重大案件,如 2001 年的漢他病毒肺症事件,2002 年輸入狂犬病事件及 2003 年 SARS 肺炎重大事件,對於病源的確認是電子顯微鏡發揮最大潛力的地方,除了這次 SARS 事件屬

於國際問題,首先由美國從電顯確定 SARS 冠狀病毒外,本局也利用負染色法證明了台灣病人檢體的冠狀病毒,因此重新對電顯的功能受到重視。本局擁有透過式及掃描式兩具電顯,在性能上雖有增強附屬設備必要外,尚可充分利用,惟人員之儲備及專職人員之設置及建立國家級檢驗機構成立實有必要。並且依所調查結果,國內之電顯除淡水的家畜衛生研究所作動物感染症檢查研究外,其餘大部分大學之電顯室皆屬於研究動植物解剖學的形態研究。本局為國家的疾病管制機構,對一般國民所發生的傳染性疾病及新型病原體的檢出實有責無旁貸之職責,故希望利用此次 SARS 事件所得到的經驗及重新認識疾病的觀念,儘速在平時對各種傳染病原的實體以電子顯微鏡來確認,並進而研究其病因學的動態變化及病原體的型態變化等,來擔當病原體檢出重要一端。

材料與方法

掃描式電子顯微鏡標本製作法

(1) 液體培養基發育之細菌體標本製作法

1. 用液體培養基培養細菌，以圓底離心管離心，速度為 3000 rpm。
2. 細菌沉澱於管底之後呈現塊狀之原狀加以固定，使用的固定液為 2.5% glutaraldehyde in 0.05M PBS，將離心後的上清液去除，加入固定液之後靜置兩個小時。
3. 固定完成後抽去固定液，以 0.05M PBS 加入離心管清洗三次，之後加入丙酮或酒精進行脫水，逐漸升高濃度，從 50%，70%，80%，90%，95%，以及三次 100%，每個濃度進行脫水 15 分鐘。
4. 脫水完成後以 Tert-Butyl Alcohol 置換酒精，將酒精抽離加入 Tert-Butyl Alcohol 靜置 15 分鐘，此步驟實行兩次，避免酒精殘留在細菌細胞。
5. 將處理完成的細菌塊放入臨界點乾燥的不鏽鋼網內，在內側鋪上濾紙以防止細菌標本從網孔間掉出，

將不鏽鋼網放入臨界點乾燥機器中，進行二氧化碳臨界點乾燥(Critical point drying)。

6. 取出已經乾燥完成的細菌標本，將乾燥之塊狀物放上掃描式電顯用之金屬標本台，用鑷子尖端將標本塊敲碎，將雙面膠帶貼上標本台傾斜放置，黏住敲碎的細菌標本，丟棄較大的碎塊。
7. 放入黃金覆膜儀器(Ion Sputter)進行蒸鍍，黃金離子蒸鍍六分鐘後取出標本台，則掃描式電子顯微鏡標本製作完成。

(II) 固體培養基發育之細菌體標本製作法

1. 配製固體培養基，溶解後將培養基放置於 50℃ 水浴槽保溫。
2. 事先準備已經滅菌的濾紙，最好是玻璃纖維製品，將濾紙裁剪成邊長 7 mm 正方形。
3. 用滴管吸取溶解的培養基，滴 1~2 滴在濾紙上，培養基被濾紙吸乾而凝固，在濾紙上形成薄層固體培養

基。

4. 將濾紙片放置於新的固體培養基上。
5. 把培養在液體培養基的菌液取一滴在濾紙的薄膜培養基上，菌液被吸乾後，菌體就留在濾紙上發育。
6. 培養一至數天後可見到細菌增長到一定程度，即可進行標本處理程序。
7. 固定與脫水的步驟與前頁(1)所述相同，是以整張濾紙連同發育在上方之菌體一起處理。
8. 注意在處理過程中不可將濾紙的上下兩面混淆，因菌體是生長在濾紙上方，若操作過程中不小心倒置將會使標本受到污染，而臨界點乾燥完成後必須以雙面膠布將濾紙黏貼在標本台上，有菌體的那一面朝上進行黃金覆膜蒸鍍，鍍金結束後就完成掃描式電子顯微鏡標本製作過程。
9. 這種方法的優點是可以直接觀察到正在培養基上發育的細菌，缺點則是無法應用在一些不容易黏上培養基的細菌。

穿透式電子顯微鏡標本製作法

(1) 細菌之負染色法

1. 收集固體培養基上方之細菌，以蒸餾水調成適當濃度之菌液。
2. 取 500 μl 菌液於離心管，離心五分鐘，轉速為 5000 rpm，使細菌沉澱集中於離心管底部。
3. 抽去上清液，加入 30 μl 的蒸餾水，將沉澱物打散，使細菌均勻分散於此濃縮的菌液中。
4. TEM 標本的乘載物為銅網 (cooper grid)，負染色法所使用的銅網必須事先處理，以增加銅網與細菌體本身的親合力 (affinity)，取 30 μl 之 1% BSA 溶液，靜置 3 分鐘，以濾紙吸去多餘液體，之後等待自然風乾至半乾的程度。
5. 取 30 μl 已經離心濃縮的菌液滴在銅網 (cooper grid) 上，等待 3 分鐘使細菌黏附在銅網上，以濾紙吸去多餘液體，等待自然風乾至半乾的程度。
6. 取 20 μl 之 2% PTA 溶液滴於銅網上，染色 5 秒鐘後以濾紙吸乾多餘液體，之後在空氣中自然乾燥

30~60 分鐘，乾燥過程必須避免灰塵污染，完成後即可在穿透式電子顯微鏡觀察。

(II) 病毒之負染色法

1. 取出 700 μ l 病毒培養液，置於 2 mL 微量螺旋蓋試管。
2. 病毒液與 700 μ l 4 % glutaraldehyde 等體積混合，最終濃度為 2 %，室溫反應 1.5 小時，反應液移置 4 $^{\circ}$ C，反應 1.5 小時使病毒去活化，並且達成蛋白質固定的目的。
3. 純化與濃縮病毒病毒顆粒，取出 200 μ l 樣品以 90000 rpm 離心 10 分鐘，除去上清液。加入 200 μ l ddw，以 90000 rpm 離心 10 分鐘，除去上清液。加入 30 μ l ddw 蓋過沉澱物，靜置 2 分鐘。輕彈離心管後，以 pipetman 充分混合。
4. 將 parafilm 剪裁成適當大小，滴上 40 μ l ddw, grid 正面朝下蓋在水珠上靜置 5 分鐘，濾紙除去水分。將 grid 過 1% BSA，吸去過多的液體，靜置乾燥備用。

5. 取出 10 μ l 病毒濃縮液，加入 10 μ l 2% PTA 染色液，充分混合，靜置 2 分鐘。
6. 取 5 μ l 混合液，滴在 BSA 處理過的 grid，靜置 5 至 10 分鐘，使病毒顆粒黏附在 grid 上。
7. 濾紙吸去多餘水分，乾燥後放置於保存盒，未來即可在穿透式電子顯微鏡觀察。

(III) Shadowing 法 (投影法)

1. 把液體培養基的菌體經離心沉澱後，抽去上清液，加入 2% ammonium acetate，使細菌均勻旋浮在溶液中。
2. 滴一滴菌液在 grid 上，再用濾紙吸乾，而後再一次加上一滴 ammonium acetate，之後用濾紙吸乾，這是要盡量除去細菌以外的培養基，使背景更為清楚，在前一步驟中用 ammonium acetate 溶液離心 2~3 次洗淨也可以有同樣的效果，但是會離心過程的機械破壞力會使鞭毛脫落，因此並不適當。
3. 等待 grid 上的菌液乾燥後，將試料面向上貼在

slide-glass 上，此時也可使用雙面膠帶，放入機器中進行蒸鍍。

4. 在真空度 10^{-6} torr 時通電，蒸鍍過程中必須要從一定的角度進行，大部分是用 10-45 度進行，角度越小會使陰影部分加大，以目測法觀察厚度，一般只要稍有薄膜程度即可。
5. 蒸鍍完成之後即可在穿透式電子顯微鏡觀察，投影法的優點是影像比負染色法有立體感。

結果與討論

此次的研究計劃，最初的三個月間幾乎耗費在檢體的製作方法的建立及電子顯微鏡本身的維修，深感機器的正常運作及人員的技術熟練度在精密的科學領域裡是缺一不可的。

本年度的目標在於對本局所管制的法定傳染病病原體的病毒及細菌的外型構造影像之製備，也就是電子顯微鏡最基礎及最重要的必要功能，因此在細菌方面大部分採用掃描式電子顯微鏡來製作，而病毒則必須利用透過型電子顯微鏡的技術來取得，同時細菌方面也以透過型電顯的負染色法及投影法冀求獲得更精密的構造，但目前尚未達到預期的效果。

此次攝影共得到十四種主要病原細菌圖像，包括不動桿菌(圖一)，類鼻疽菌(圖二)，彎曲桿菌(圖三)，退伍軍人病菌(圖四)，流行性腦脊髓膜炎菌(圖五)，肺炎鏈球菌(圖六)，霍亂弧菌(圖七)，腸炎弧菌(圖八)，鼠疫桿菌(圖九)，百日咳菌(圖十)，A型鏈球菌(猩紅熱，圖十一)，鉤端螺旋體(圖十二)，痢疾桿菌(圖十三)，及葡萄球菌(圖十四)。

在病毒方面的攝影取得 B 型肝炎病毒(圖十五), 輪狀病毒(圖十六), 痘瘡病毒(圖十七), 腸病毒(圖十八), 以及 SARS 病毒(圖十九)。其中 B 型肝炎病毒是直接由病人的血液檢體濃縮取得, 因此病毒數量少, 但還是可以觀察到 B 型肝炎病毒的三個主要型態。最後的 SARS 病毒是本實驗室在去年的 SARS 狂暴中, 從台灣的第一個病人的喉頭洗液的培養細胞中取得的病毒影像。

結論與建議

這次的研究計劃我們建立了最根本也是最重要的檢體操作步驟，並完成了最基本的病毒及細菌外部構造影像圖譜，但離更高的完成度尚有一段距離，今後仍須繼續製作及觀察，以獲得更精密的完美圖像，同時更追求以更高的技術及更高的電顯倍數來觀察病毒及細菌的內部構造，不只是能增加對病原體的認識，而且更能獲得其致病原因的所在，這才是電子顯微鏡研究的最終目標。

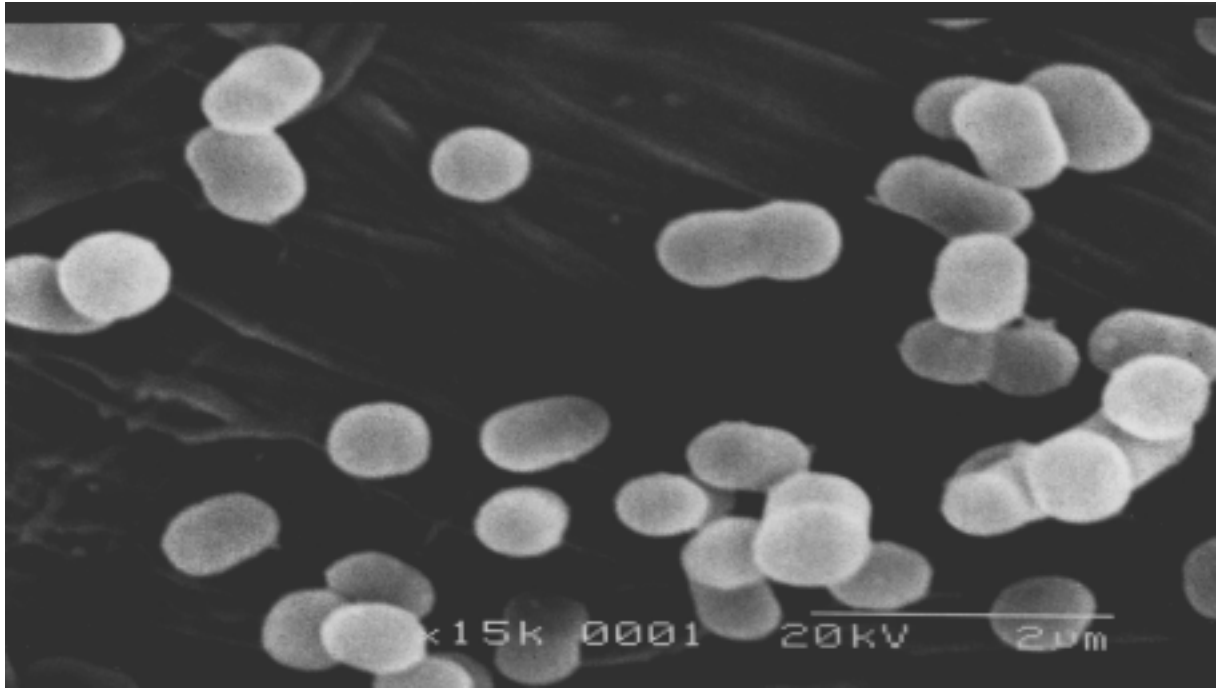
電子顯微鏡的複雜構造及操作技術等因素，已經成為一門學問，操作人員的知識與熟練度，當然會被要求，本局電子顯微鏡室在目前並未配置專職人員，因此單以研究計劃來維持，這種不安定的狀況，絕對無法養成專家，目前疾病管制局已成為全國傳染病的檢驗及技術開發的研究中心，實有負責全國國民健康，尤其是公共衛生方面的重責大任，以目前的情況是無法受到肯定的，縱然電子顯微鏡並非有經常直接檢驗重要病原體及發現病原的日常工作，但是誠如養兵千日用於一時的道理，經常的技術維持，也就是技術革新的重要步驟，所謂精益求精，在日夜

的操作下，熟練的技術就能夠迅速而正確地找到病原體，是無庸置疑的事，因此電子顯微鏡的系統管理，是本局今後重要的工作之一。

參考文獻

1. 陳家全等:生物電子顯微鏡學 行政院國家科學委員會
精密儀器發展中心編印 1991
2. 天兒和暢:細菌的電子顯微鏡圖譜 南山堂 日本東京
1983
3. 周振英:硬組織形成細胞的基質形成能的電子顯微鏡研
究 岐阜大學醫學部記要 p92-110, 1982

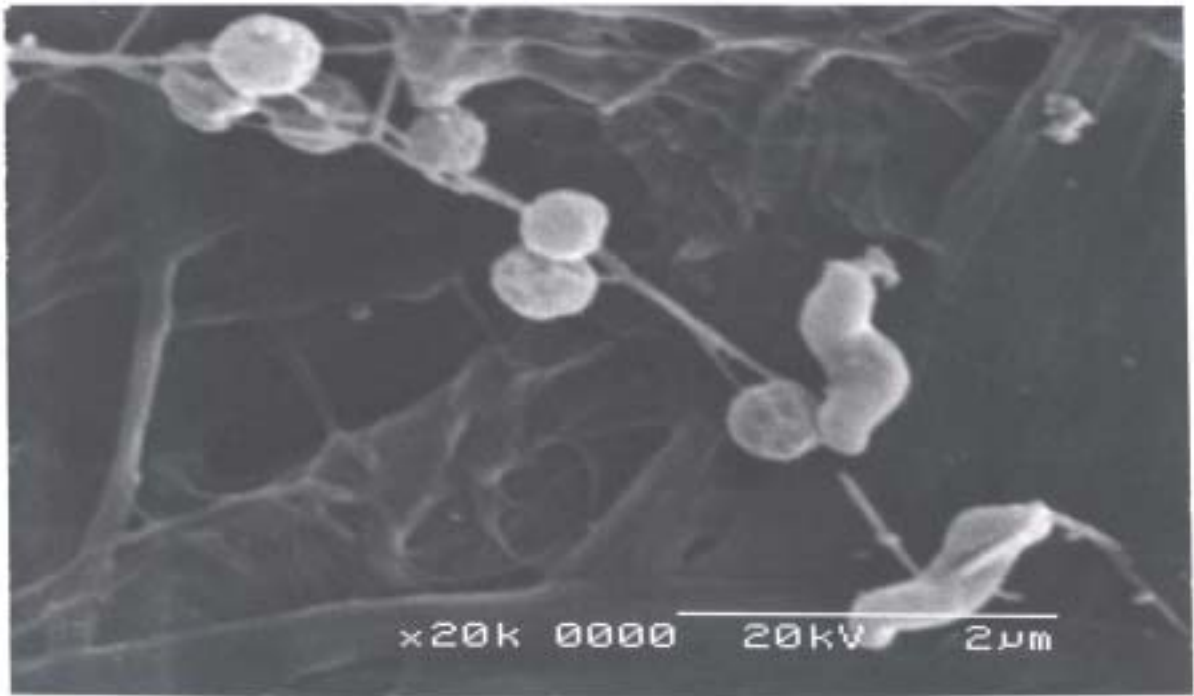
圖表



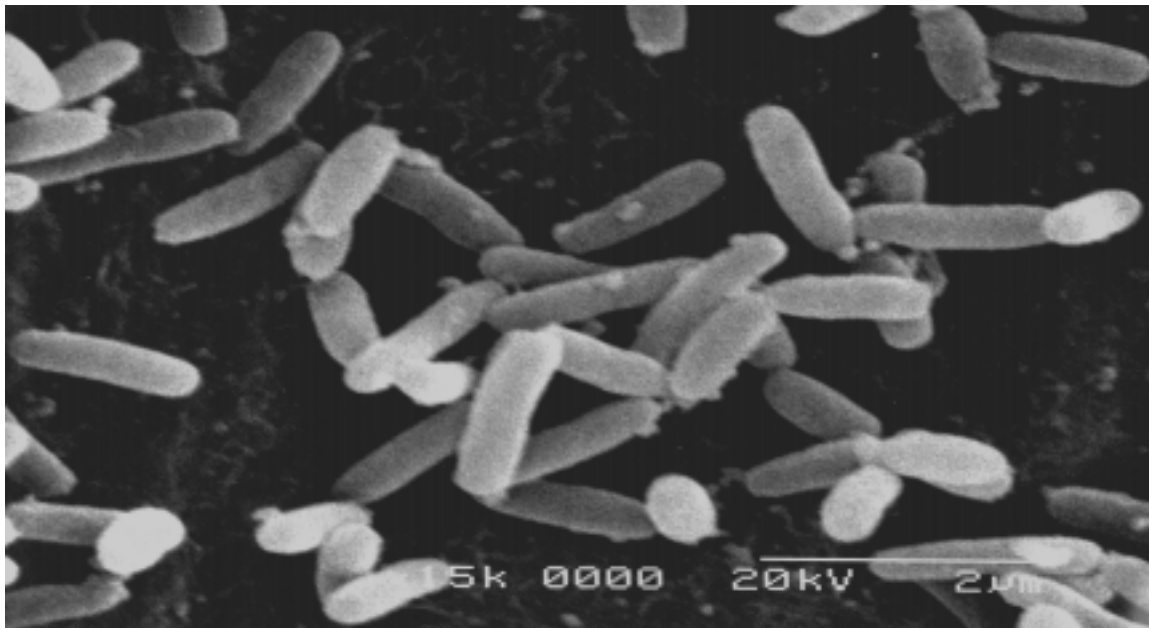
圖一 *Acinetobacter* spp. (15,000 倍)



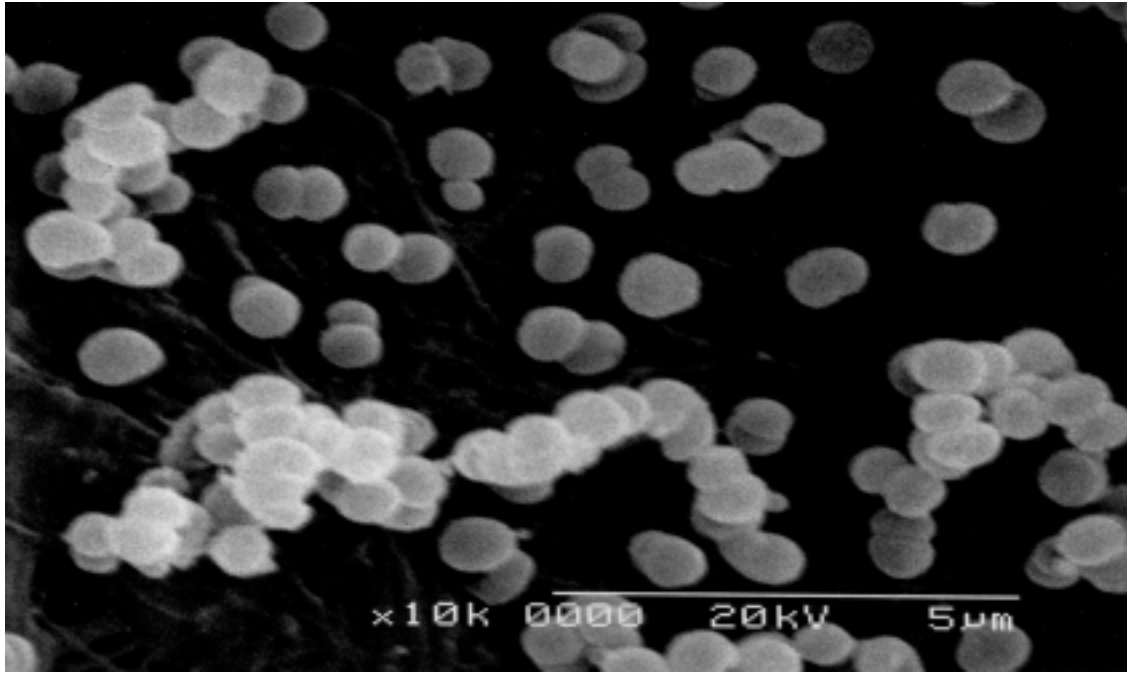
圖二 *Burkholderia pseudomallei* (6,000 倍)



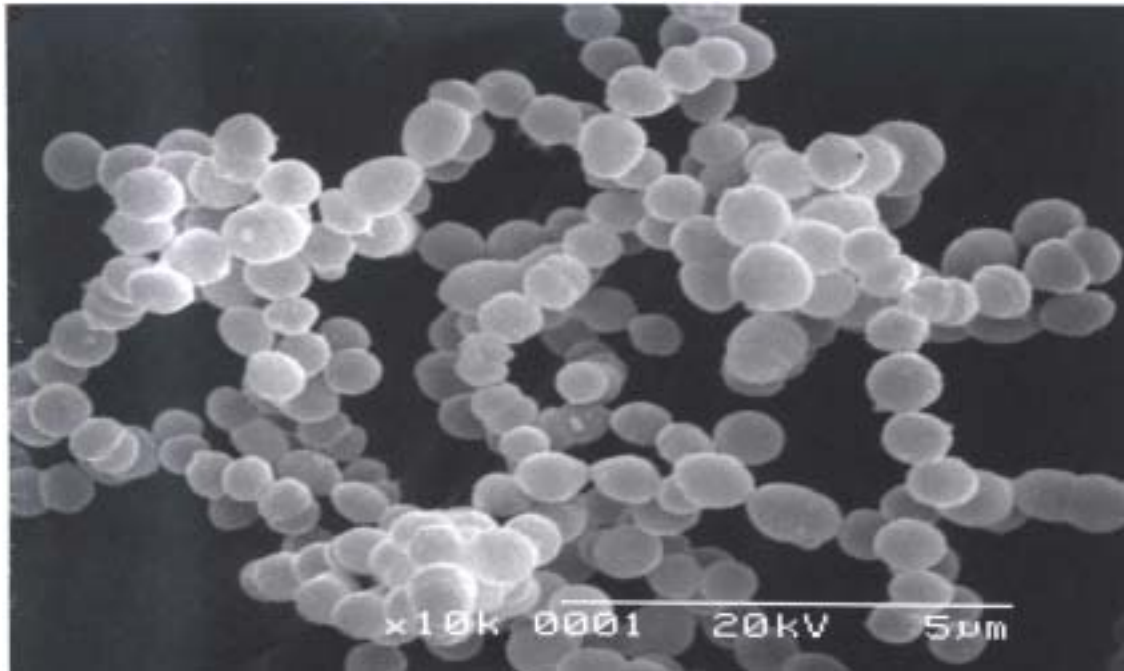
圖三 .*Campylobacter jejuni* (20,000 倍)



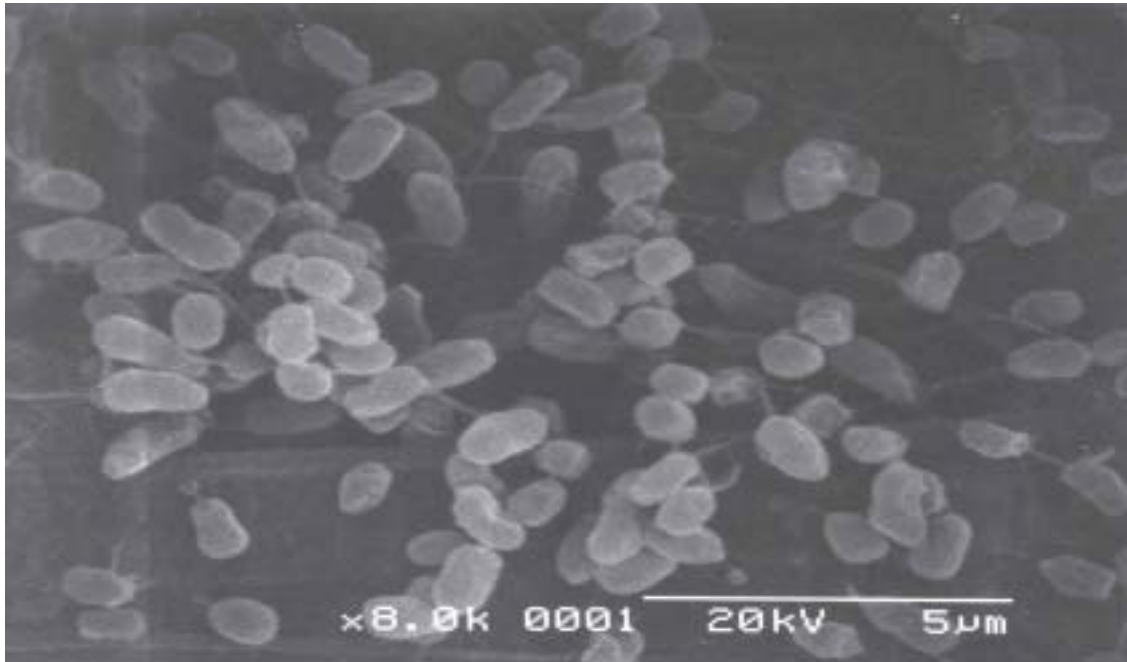
圖四 .*Legionella pneumophilla* (15,000 倍)



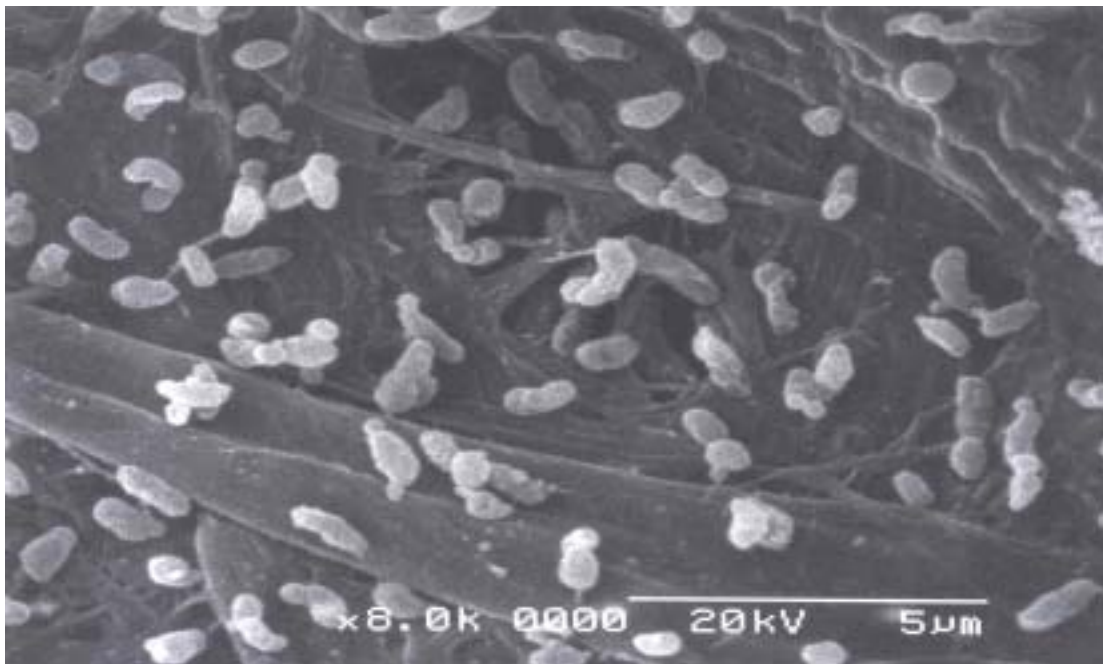
圖五.*Neisseria meningitidis* (10,000 倍)



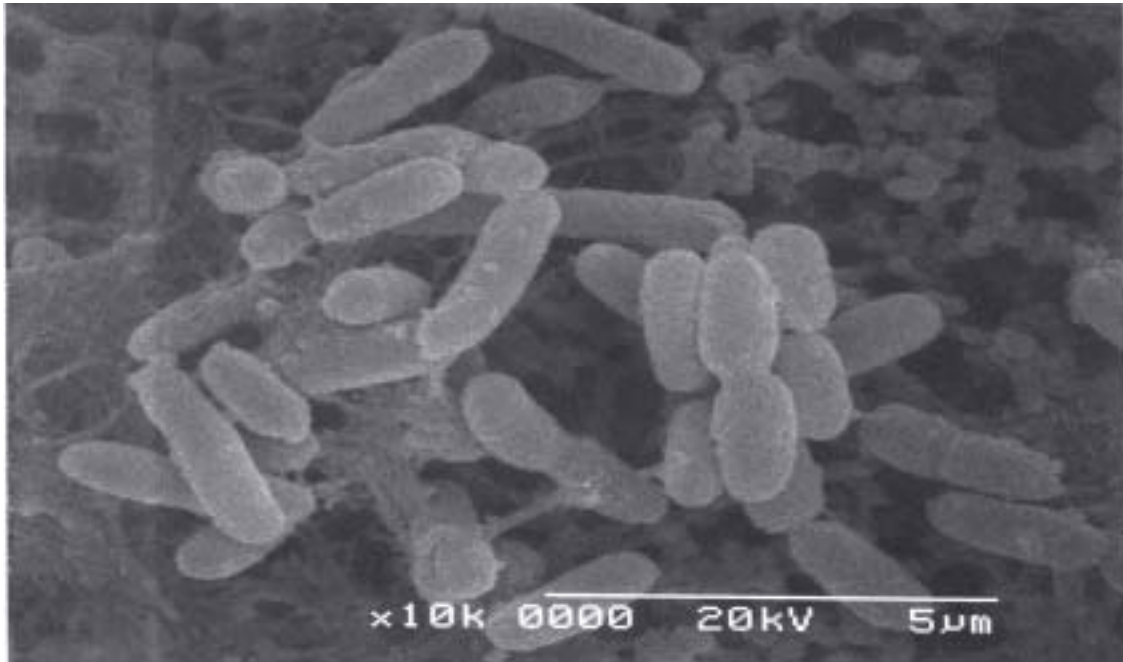
圖六.*Streptococcus pneumoniae* (10,000 倍)



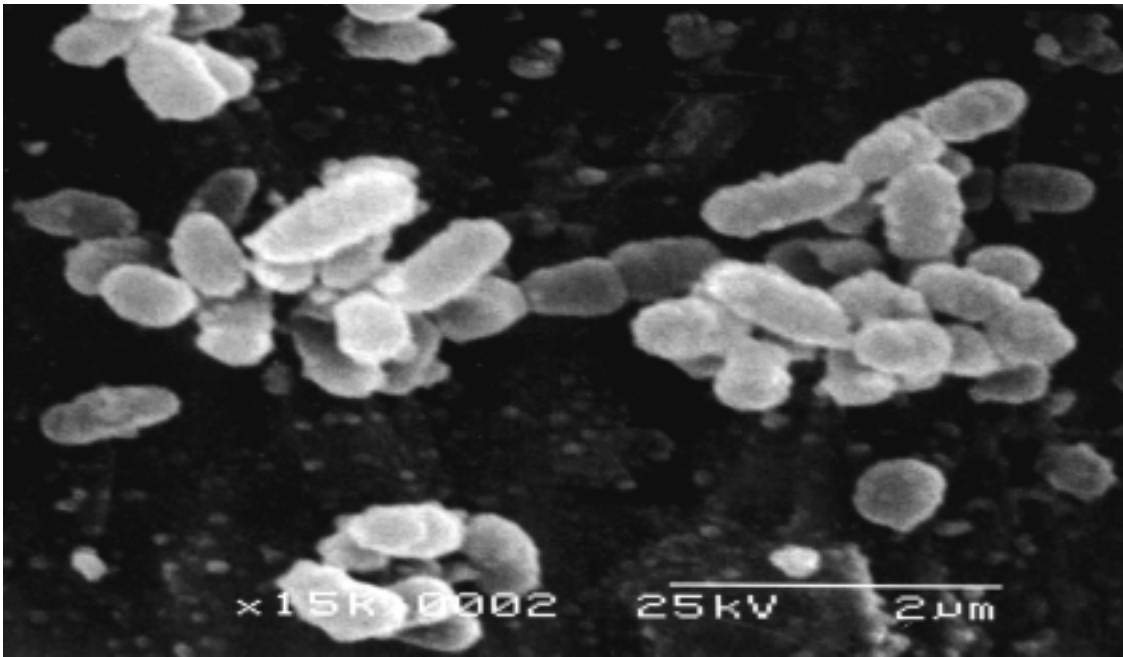
圖七. *Vibrio cholerae* (8,000 倍)



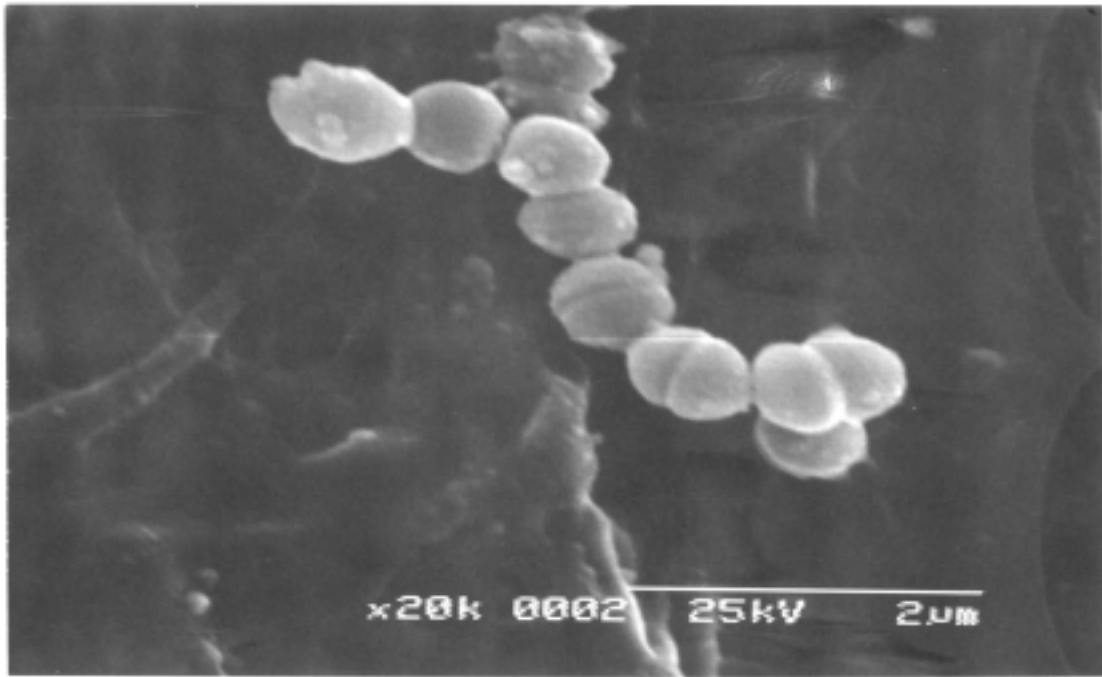
圖八. *Vibrio parahaemolyticus* (8,000 倍)



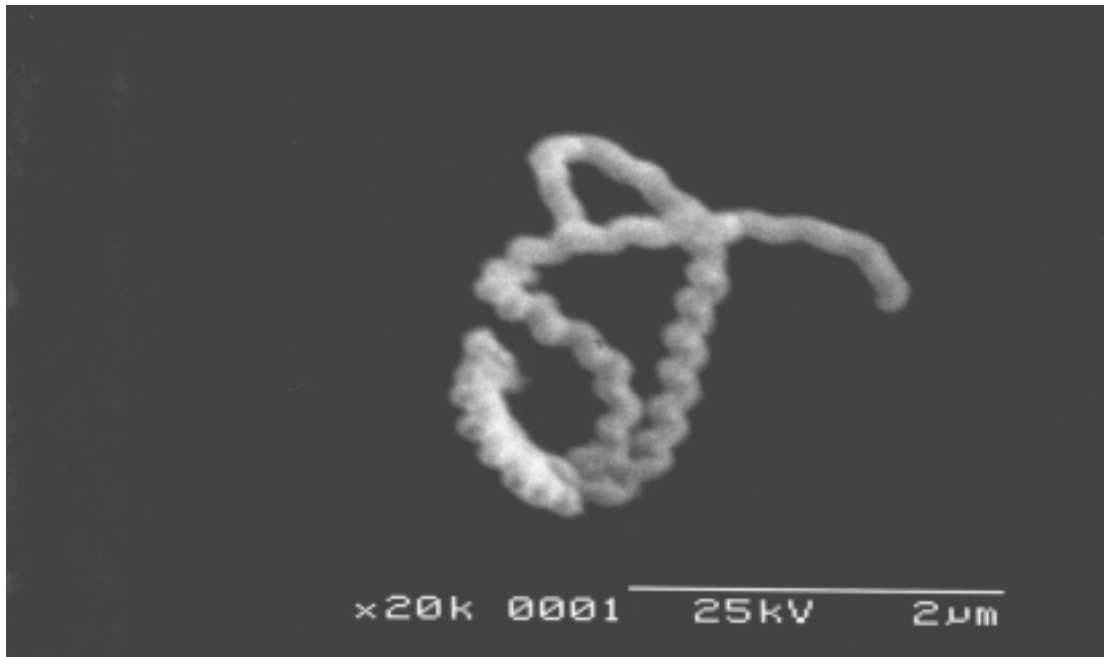
圖九 .*Yersinia pestis* (10,000 倍)



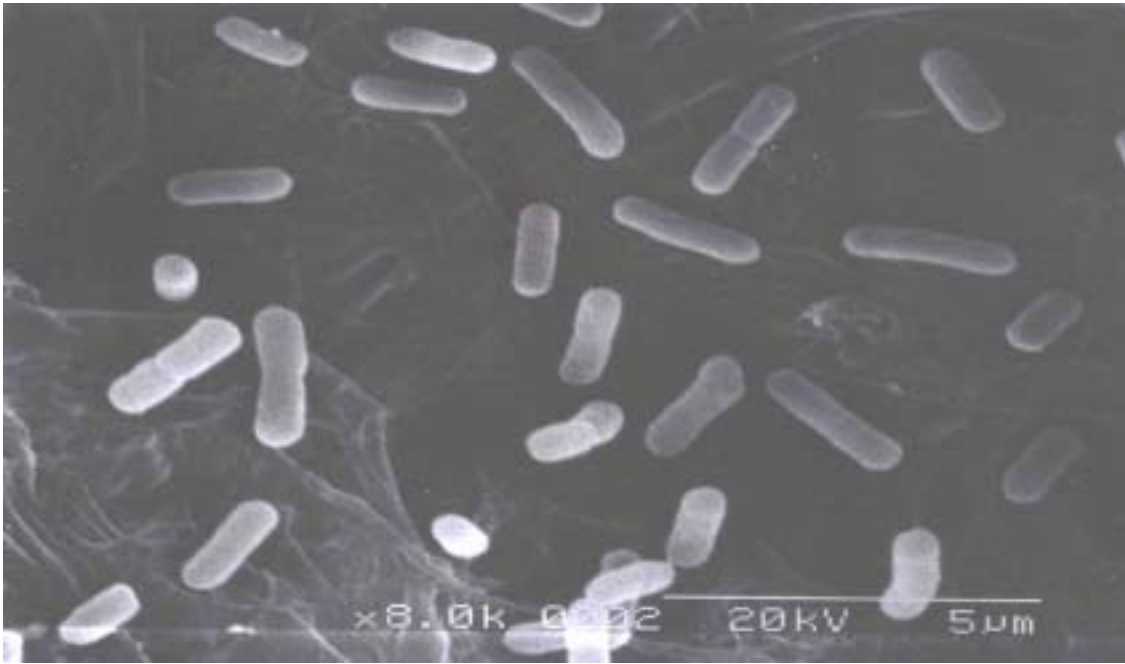
圖十 .*Bordetella pertussis* (15,000 倍)



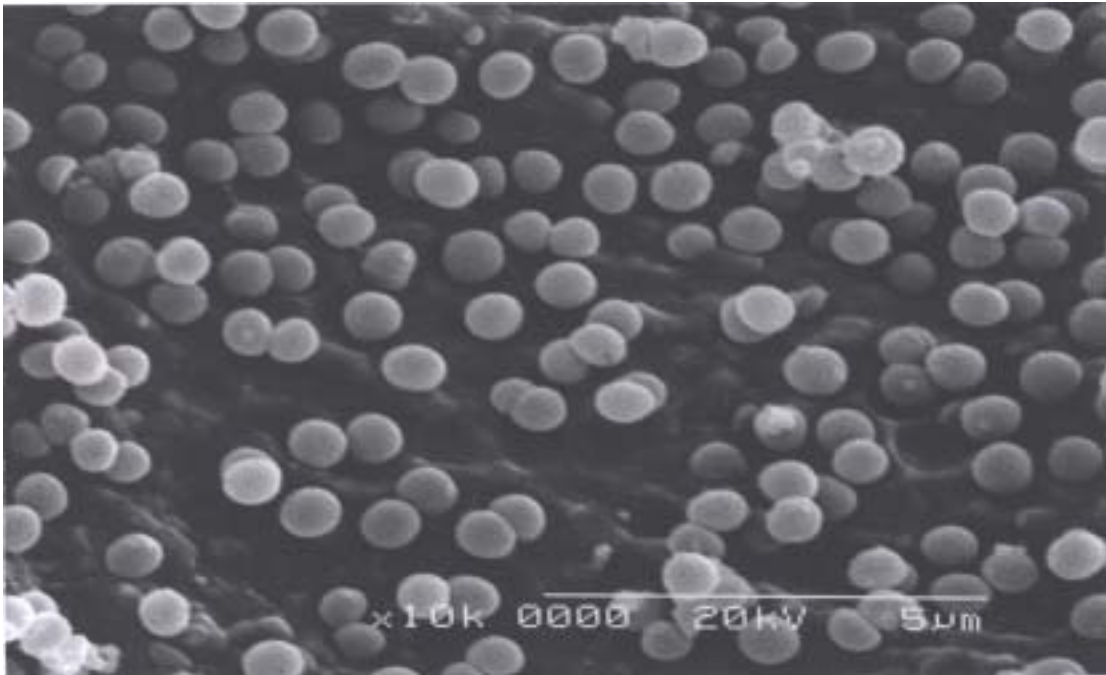
圖十一 *Streptococcus pyogenes* (20,000 倍)



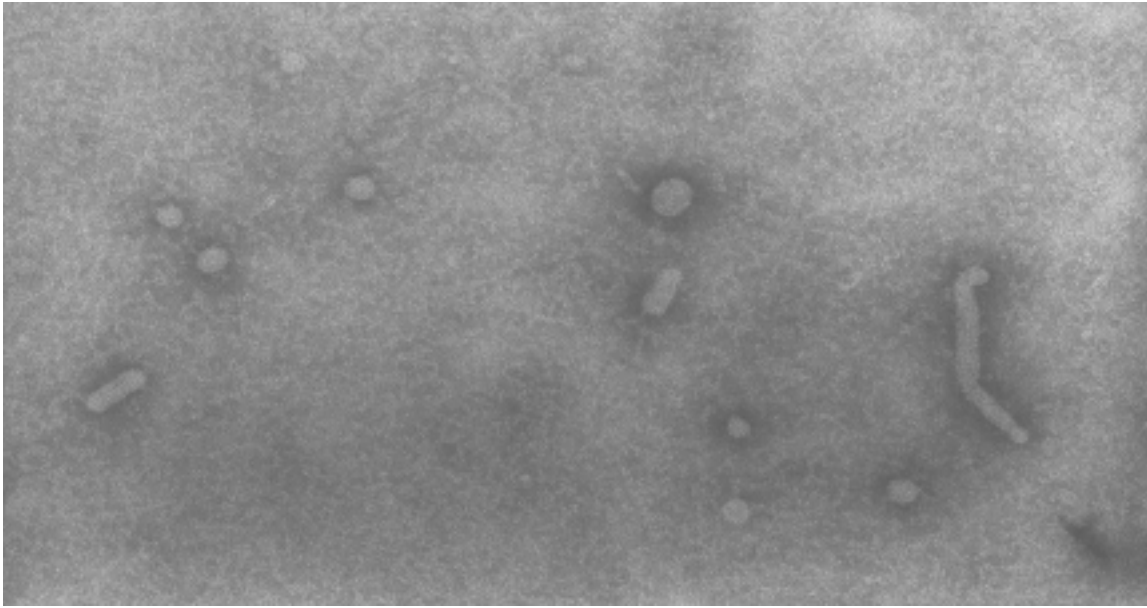
圖十二 *Leptospira interrogans* (20,000 倍)



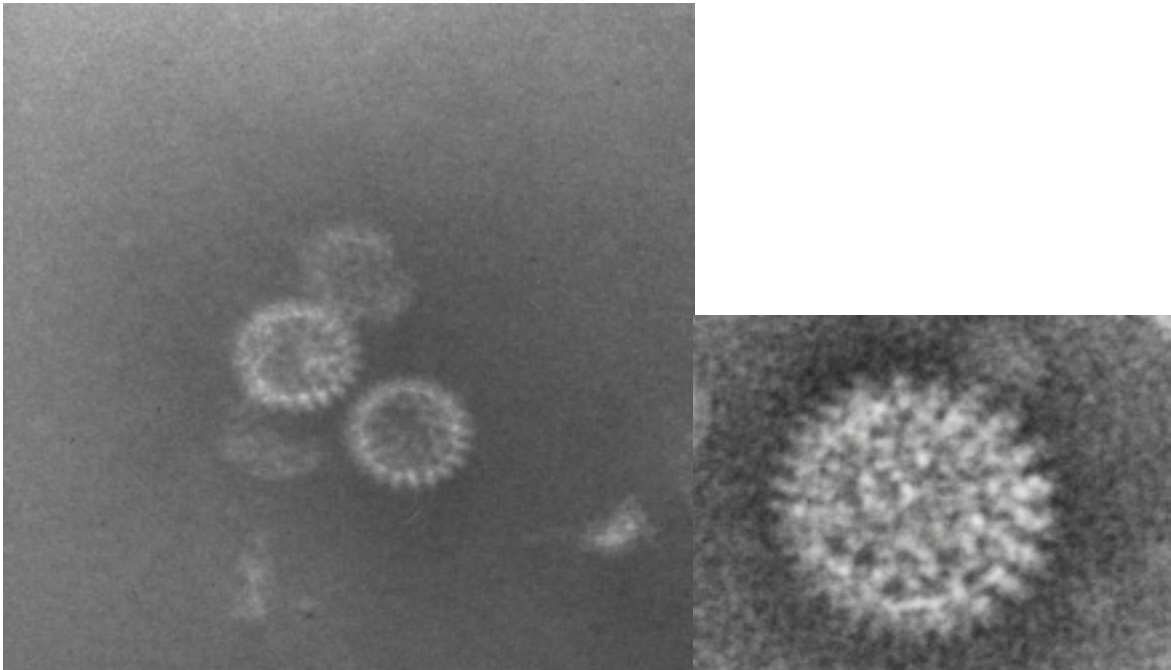
圖十三 *.Shigella spp.* (8,000 倍)



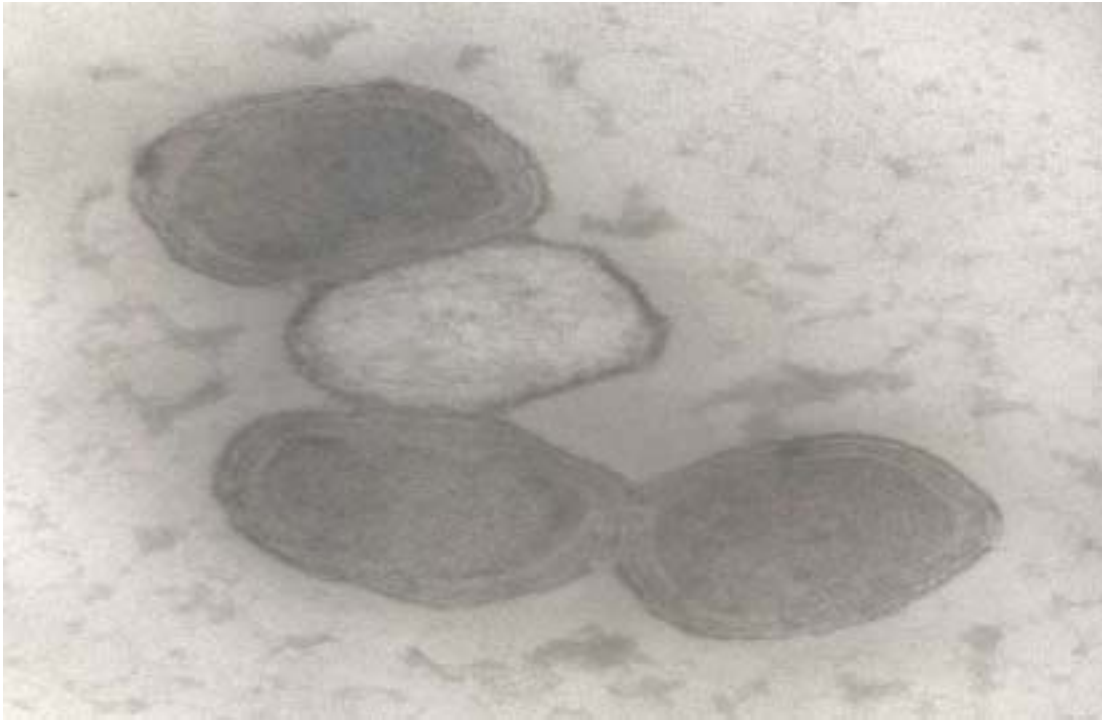
圖十四 *.Staphylococcus aureus* (10,000 倍)



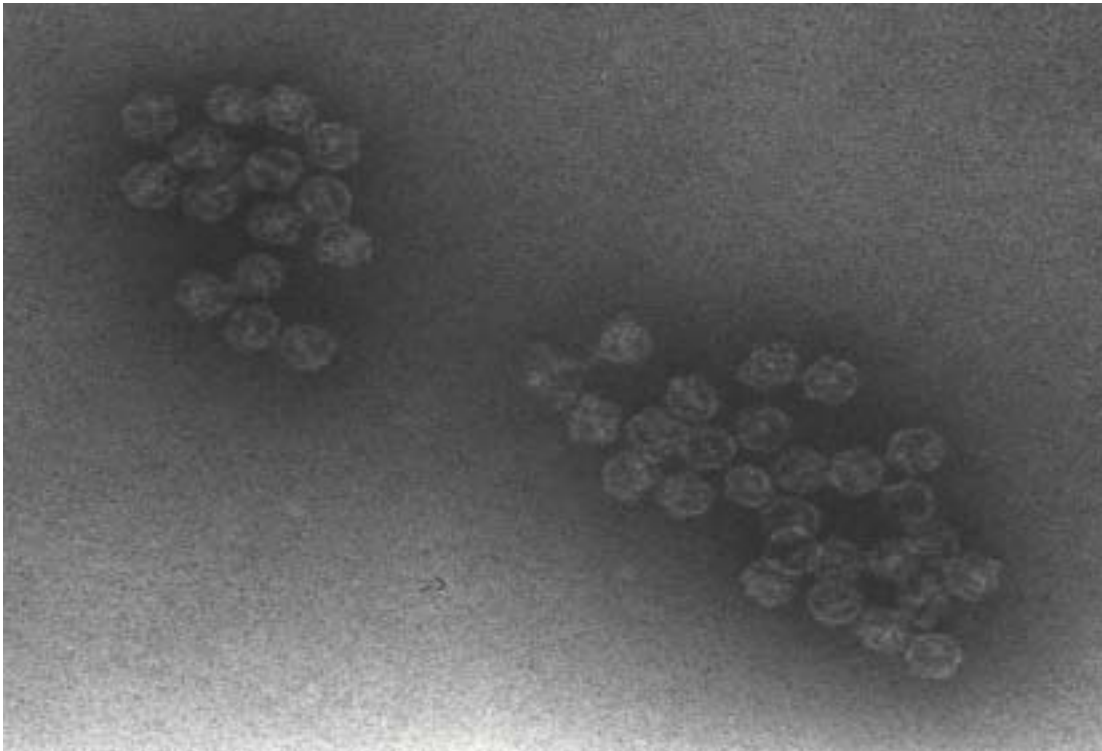
圖十五 .hepatitis B virus



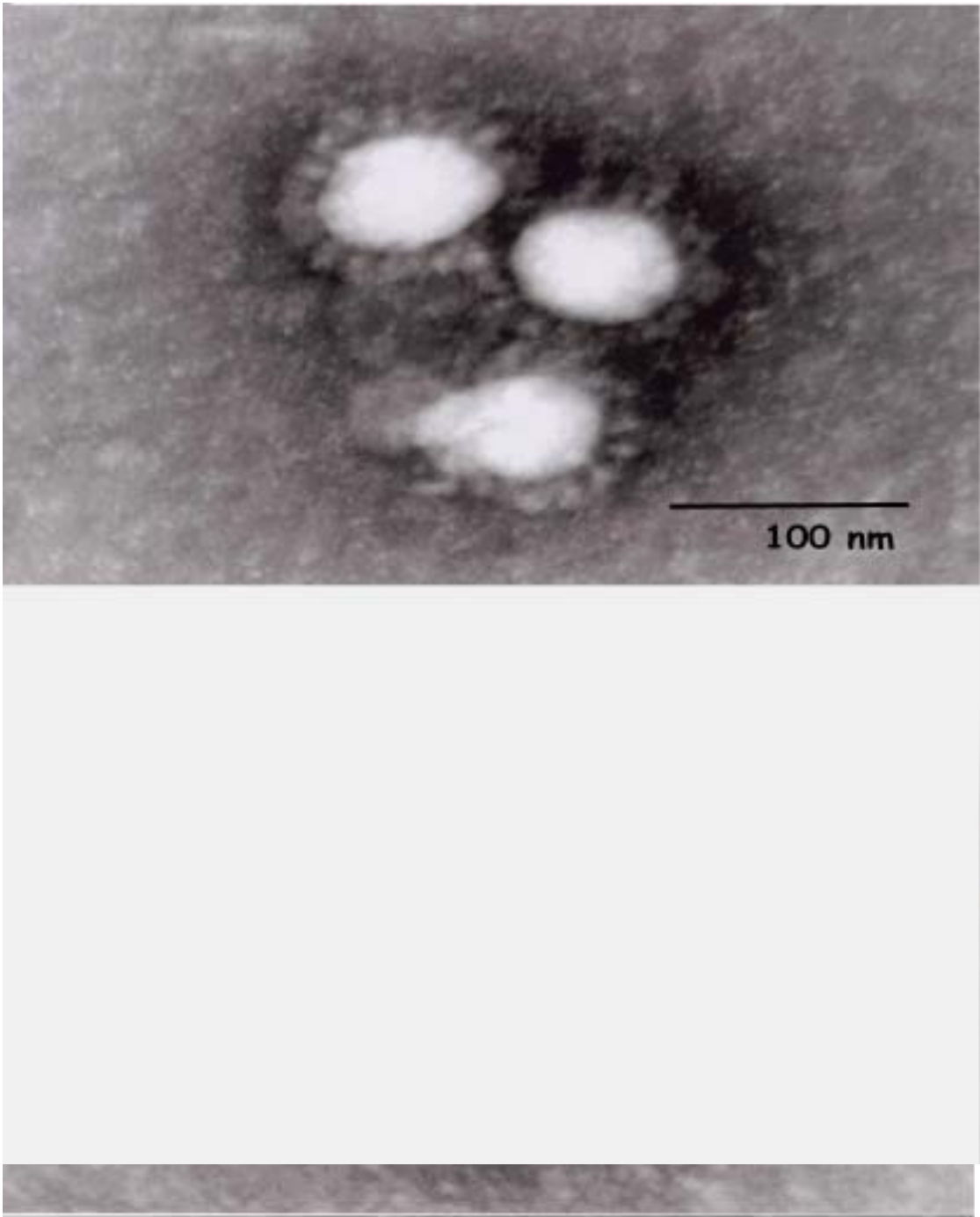
圖十六 .rota virus



圖十七 .variola virus (vaccine)



圖十八 .enterovirus



圖十九 .SARS virus