

衛生署疾病管制局 委託研究計劃報告

中文計畫名稱：多重抗體腸病毒快速檢測感測器之開發
研究

英文計畫名稱： Development of a multi-channel biosensor for
immediate detection of Enterovirus

申請計畫機構與單位：台灣大學生化科技學系

壹、摘要：

貳、計畫摘要：請摘述本計畫之目的與實施方法及關鍵詞

關鍵詞：腸病毒 71 型、壓電石英晶體、單株抗體、免疫感測器、臨場即時快速檢測

腸病毒 (*Enterovirus*) 屬於小 RNA 病毒科 (*Picornaviridae*)，包括小兒麻痺病毒、克沙奇病毒、伊科病毒、及腸病毒等，其中腸病毒 71 型是目前已知的腸病毒當中，致病力特別高的一種，尤其容易引發有關於神經系統方面的併發症。腸病毒的型別繁多，廣泛分佈於世界各地，而且一直持續性的感染並存在人體中，人類是已知的唯一宿主及感染源。

本計畫之第一年度擬開發多重抗體腸病毒快速檢測生物感測器，擬配合抗腸病毒 71 型之分型單株抗體的外購與自製系統、實驗室既有之病毒檢測系統、多通道量測系統之開發等，希望開發建構一種可以自由攜帶行動、供應臨場使用、具備即時量測特性的免疫型壓電石英晶體快速檢測生物感測器，用以對不同腸病毒分型進行快速檢測及鑑別。依此原理構成之多重抗體腸病毒快速檢測感測器，將可迅速提供檢驗數據，作為防疫處理或儘早進行治療之參考，亦可應用類似模式構築其他適合供應防疫或臨床檢驗之生物感測器。依本年度計畫之執行成果，預期下一年度將可以進一步進行同步 pan-EV 與 EV-71/EV70 之即時檢測。

本研究室持續進行生物感測技術相關研究，已累積二十餘年經驗，對於以抗原抗體免疫反應為基礎之量測技術稍有寸進，尤其最近自行發明研製之微量樣品自動吸取裝置，不但使微天平電極上之免疫反應可在液態環境中進行、可即時檢測免疫反應、更可將原本至少需時數十分鐘之免疫反應檢測縮短到三至五分鐘內完成，使得原來必須在實驗室內才能進行之免疫分析，變成可以在臨場進行即時檢測之方便快捷檢測系統。由於上述發明具備新穎性、進步性、以及產業上利用之可行性，已準備提出專利申請。上述系統應用在以病毒與細菌表面抗原為樣品之檢測實驗中，結果顯示抗原濃度在 $0.1 \sim 20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 具有良好線性關係， R^2 分別為 0.9944 與 0.9889。系統檢測極限可達 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 或更低。將樣品以等體積混合人體血清 HAS 後進行檢測，結果顯示於 $0.1 \sim 20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 具有良好線性關係，陽性反應強度為干擾值五倍以上，証實檢測結果具專一性。另外模擬樣品於人體血清中進行檢測，檢測極限亦可達 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

本計劃將應用上述免疫反應之快速檢測系統技術開發建構腸病毒快速檢測生物感測器，預期經過詳細檢討各項影響因子並改進電極反應特性後，應可製成預備實用價值之優異感測器。

為因應外購抗體單價高昂與專一性不佳困擾，本年度新增兩工作項目：一為自製 Pan EV/71 單株抗體，二為加入偵測抗體產生之實驗以推測病程。

貳、計劃說明

計畫內容

一、研究主旨：

本計劃分兩年度進行，擬開發多重抗體腸病毒快速檢測感測器，第一年度預計使用壓電晶體作為檢測系統與抗EV-71型病毒表面抗原之單株抗體作為模型。未來進一步配合各型腸病毒之單株抗體作為生物識別功能性材料，共同構築多重抗體腸病毒快速檢測感測器。壓電晶體檢測系統因具有高靈敏度、測試時間短、成本低、測試步驟簡易等優點，目前已在免疫化學分析方面廣受注目。利用本實驗室所開發之壓電晶體感測系統，於晶片電極表面固定上抗體（腸病毒71型之抗體）來辨識抗原（腸病毒71型抗原）。預期應用固定有腸病毒71型的單株抗體的石英晶片，可提供腸病毒71型快速（本系統需時五分鐘，可提供現場即時檢測）、準確之診斷。

此外計畫新增兩工作項目：其一、固定二級抗體偵測抗腸病毒之一次抗體用以偵測病程供醫檢單位了解病程。二、為提高精度與降低檢測成本開始於實驗室自行生產70/71型單株抗體。

第二年度將利用pan-EV單株抗體進行對EV-71與EV-70之快速檢測工作進一步擴大系統檢測之工作項目。

本計劃今年度預定執行工作內容如下：

壓電石英晶體電極之取得與修飾以及腸病毒 71 型單株抗體之固定化條件檢討，並利用人造樣本進行系統檢量線之建立：

1. 10MHz 壓電石英晶體之取得與特性確認並進一步改進自動吸取裝置之特性。
2. 取得並評估國內外產製之商業化腸病毒單株抗體與其抗原樣品。
3. 進行石英壓電晶體之電極表面腸病毒 71 型單株抗體固定。實際於實驗室系統架構下偵測病毒表面抗原蛋白標準樣品。
4. EV71 腸病毒快速檢測感測器於實驗室偵測抗原（死病毒檢體）

第二年度計劃預定執行工作內容如下：

壓電石英晶體電極之取得與修飾以及腸病毒 pan-EV 單株抗體之固定化條件檢討，並利用人造樣本進行系統檢量線之建立：

1. 取得國內外產製之商業化腸病毒 pan-EV 單株抗體與其 EV-70/EV-71 型抗原樣品。
2. 進行石英壓電晶體之電極表面腸病毒 pan-EV 單株抗體固定。實際於實驗室系統架構下偵測病毒表面抗原蛋白標準樣品。
3. 實際取得其他實驗單位所採取之經處理之死病毒檢體並與其他檢驗系統進行比對校正。
4. 進行多種單株抗體同時於單片晶片或多片晶片表面固定，實際測試人造血清樣本了解其專一性與靈敏度等參數。分析此種多重抗體偵測系統之量測特性供後續系統改進所需。

新增：EV71/Pan EV 自行製備單株抗體。請惠予經費協助。謝謝。

二、 背景分析：

腸病毒的背景

腸病毒的傳染性極強，主要經由腸胃道（糞-口、水、食物）及呼吸道（飛沫、嗽、打噴嚏）傳染，亦可經由接觸及分泌物而受到感染。以民國八十七年國內腸病毒 71 型(EV-71)流行事件為例，病毒在呼吸道中的濃度極高（自咽喉分離出病毒者，大約佔 89.2%、彰基佔 55.3%），而依疾病管制局近兩年統計的合約實驗室結果亦顯示，經咽喉分離出腸病毒的平均陽性率達 38%，且採檢 9 天內陽性率平均達三成以。由此可見，呼吸道傳染極可能是相當重要的一個蔓延途徑，且患者可長時間釋出病毒。

腸病毒感染的潛伏期大約 2~10 天，傳染力始於發病前數天，在喉嚨及糞便都病毒存在，而腸道排出病毒的時間可持續達數週之久，通常以發病後一週內傳力最強。

腸病毒可以引發多種疾病，其中很多是沒有症狀的感染或只出現類似一般流感的輕微症狀。有些時候則會引起一些較特殊的臨床表現，包括：手足口病 (hand-foot-mouth disease)、疱疹性咽峽炎 (herpangina)、無菌性腦膜炎、病毒性腦炎、心肌炎、肢體痺症候群、急性出血性結膜炎 (acute hemorrhagic conjunctivitis) 等。手足口病患者會在手腳與臀部周圍出現稍微隆起的紅疹，疹子的頂端大多有小水泡，口腔也會有潰瘍。疱疹性咽峽炎則多數會發高燒，特點是在口腔後部出現水泡，然後很快地破裂變成潰瘍。

腸病毒之實驗室檢測方法：依衛生署疾病管制局開發之檢驗方法

臨床上通常使用兩種方式來作鑑定診斷：一種是採用**細胞培養感染** (cell culture infectivity) (1)，傳統的方法是將檢體處理後，接種到適合的細胞上，經過一段時間培養後觀察有無細胞病變 (CPE) 的現象，有 CPE 者再以免疫螢光法、中和反應或分子生物學技術來鑑定其感染源種類；另一種則採用**分子生物診斷方式**，例如：RT-PCR(2)。

目前疾管局實驗室發展出利用即時 PCR (real-time PCR) 的方法來直接偵測檢體中腸病毒，此方法為結合 *Taq-Man* 的技術與 *ABI Prism™ 7900* 即時序列偵測系統，特性為高敏感度、高專一性且節省人力與時間，其方法是根據腸病毒 5' 端 non-coding region (此區為腸病毒高保守

(high-conserved) 區域) 設計引子以單一步驟 (one-step) 的 RT-PCR(3) 增幅出約 145bps 片段，同時以雙螢光標記的 DNA 探針 (probe) 與 *AmpliTaq* DNA 聚合酶 5' - 3' nucleolytic activity 的特性，偵測具有特異性之 PCR 產物並可與已知量的標準線性比較而間接偵測出病毒量，為了要更準確的定出檢體中的病毒數量，本實驗使用 Mahoney type 1 poliovirus RNA 作為 standard 並採用分子選殖 (molecular cloning) 的方法將此片段黏接到 pGEM-T Easy Vector 上。此方法的線性範圍約 7-log dynamic range

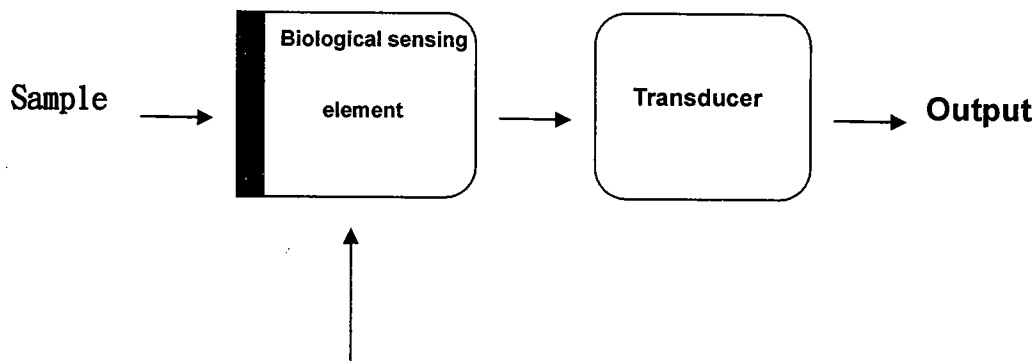
(101~107)，並且適合用於篩檢大量的檢體，並且由於PCR 反應後即可得知檢體中是否有特異性之產物，故可省略傳統方法在PCR 反應後，還須進行PCR 產物的分析，所以能更快速得知結果。

病毒細胞培養及定量

將已定病毒量或尚未定量的檢體，以RD 細胞培養於96 孔盤，培養液為DMEM 加上10%的胎牛血清，每孔加入50 μ l 細胞生長培養基（細胞對照孔除外）及100 μ l 細胞懸浮液（ 5×10^4 細胞），置36 $^{\circ}$ C，CO₂ 培養箱培養，於第4-5及7天觀察細胞病變CPE（cytopathic effect），並計算其TCID₅₀ 與病毒量。

多通道壓電石英晶體免疫感測器

生物感測器是近幾十年內發展起來的一種新的感測器應用。生物感測器係應用生物分子之專一性辨識特性配合電子元件所構成之分析系統。主要由生物辨識材料與各種訊號轉換器(transducer)組合而成(圖一)，是一門整合了生物分子、電子與材料科學之整合技術⁽¹¹⁾。



圖一、Biological sensing coating

本計劃將利用實驗室發展之石英壓電感器測量換能器表面之質量變化作為腸病毒之生物感測器。一般的壓電晶體系統是於石英晶體經切割研磨後於各切向上建構不同種類之電極構型以利用各種不同之表面聲波特性和偵測表面質量變化情形。

壓電晶體微量天平(Quartz crystal microbalance, QCM)

1880 年 Curies 發現若對某些晶體如石英(quartz)、電石(tourmaline)、Rochelle salt 等施以機械應力，則在晶體兩側產生電位差，其大小與應力成正比，此現象稱為壓電效應(Piezoelectric effect)。1920 年 Cady 發現在晶體切面兩側表面施以電壓時，晶體會產生剪力變形，此壓電效應可用來建構非常穩定之振盪迴路。晶體天然之振盪頻率稱為基本振頻或諧振頻率，主要由其化學特性、大小、形狀、以及質量等因子決定。當晶體具有壓電性，會使振盪迴路產生振盪電場，且晶體之振頻與電場相同。

壓電石英晶體通常以兩片金屬電極如三明治般將石英晶體夾在中間。其中金屬電極一般材料為金、銀、鋁或鎳，因金最為安定，所以用途最廣。所用的壓電晶體大多為 AT-cut 之石英晶體，電極之作用為沿晶體垂直方向導入一振盪電場，此電場迫使晶體內部結晶格子產生類似立波(standing wave)之機械振盪行為。假使石英片之厚度一定，此機械性振盪會以一定頻率表現，而此諧振頻率很容易藉著導入一適當振盪路線而量測。此種由機械與電子兩種振盪所產生之諧振頻率決定於溫度、密度、剪力係數等多項因素。某些因素在正常情況下均為固定值，包括：石英晶體之厚度、密度及剪力係數等，且在某些情況下，氣體或液體接觸時晶體表面之密度、黏度及橫跨晶片兩面間之壓力差與溫度亦保持固定值等。因此改變晶體頻率最大因素為電極之質量與附加在電極上之質量變化，此即為壓電石英晶體微量天平的主要原理。

1959 年 Sauerbrey 導出在石英晶體金屬表面之質量與頻率變化之關係式，用來描述氣相狀態下壓電晶體之質量變化與頻率應答關係^(9,10)：

$$\Delta F = -2.3 \times 10^6 F^2 \Delta M / A$$

ΔF (Hz)：表示因質量負載所導致之頻率變化。

F：為石英晶體之諧振頻率。

M：為電極上所覆加之質量(g)。

A：表示金屬電極之面積。

隨著質量負載(ΔM)增加，頻率衰減值(ΔF)越大。若將抗體固定在金電極表面，再使固定化抗體與樣品接觸，則樣品中存在之抗原將與固定在金電極表面之抗體結合，造成質量負載增加，導致石英晶體之諧振頻率降低，而震頻降低之程度將與樣品中之抗原濃度成比例。

本年度將提出一種建構快速偵測、即時之壓電石英免疫感測器。利用本實驗室現在所使用之系統。

振盪電路：目前供本計劃使用之振盪線路如圖二所示。該振盪電路係本研究室參酌商業資料構築完成後，再經由中央研究院原分所汪治平教授修改而成者。

本實驗所使用的石英壓電晶體 (QCM)：

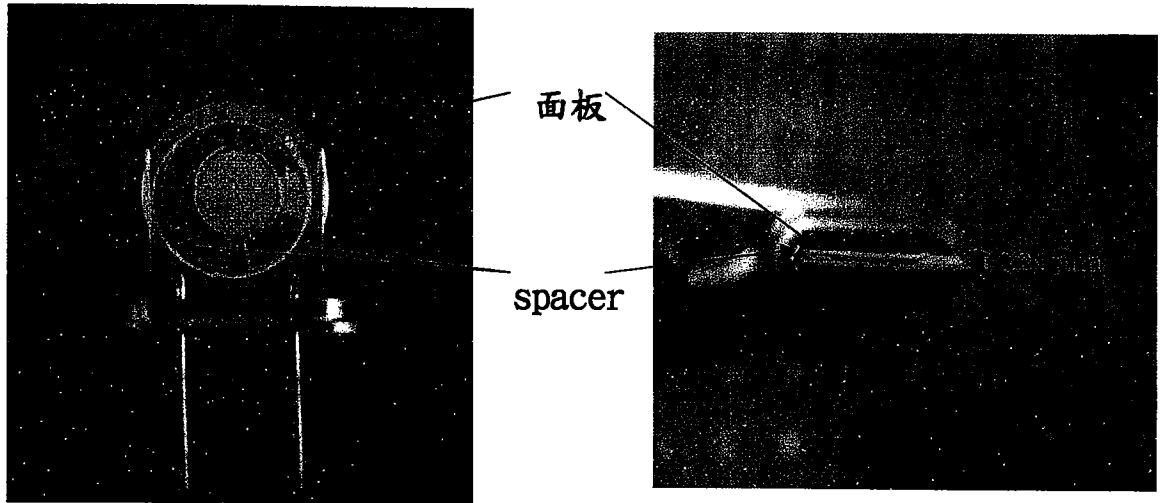
晶片直徑：8 mm

厚度：0.16 mm

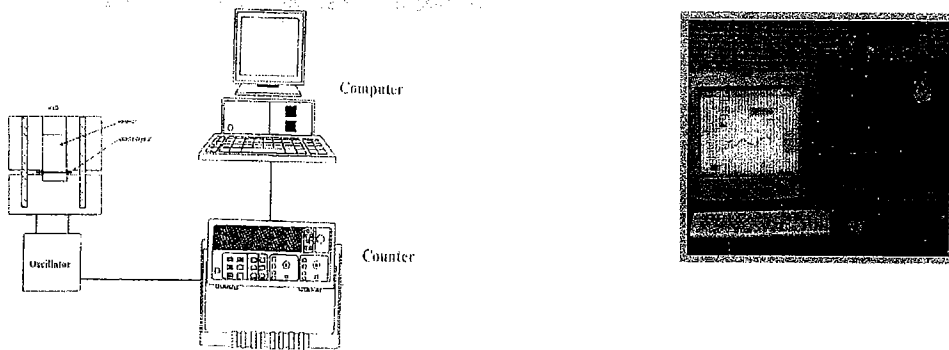
電極材質：金

圓形電極直徑：3.6 mm

振頻：10 MHz



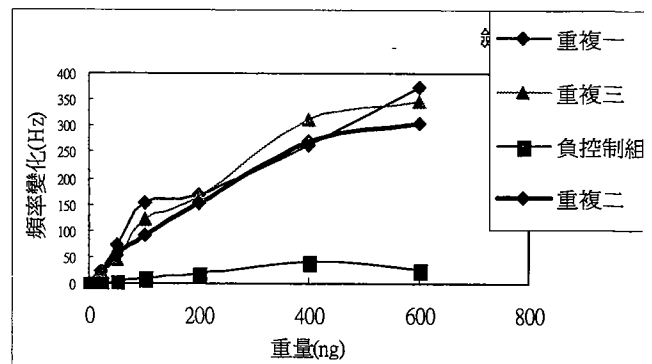
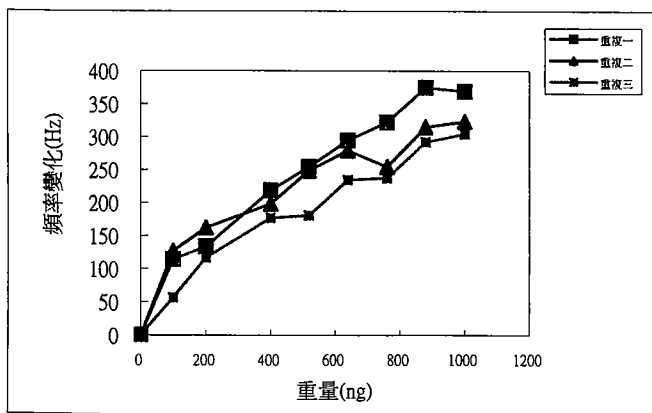
自動吸取裝置



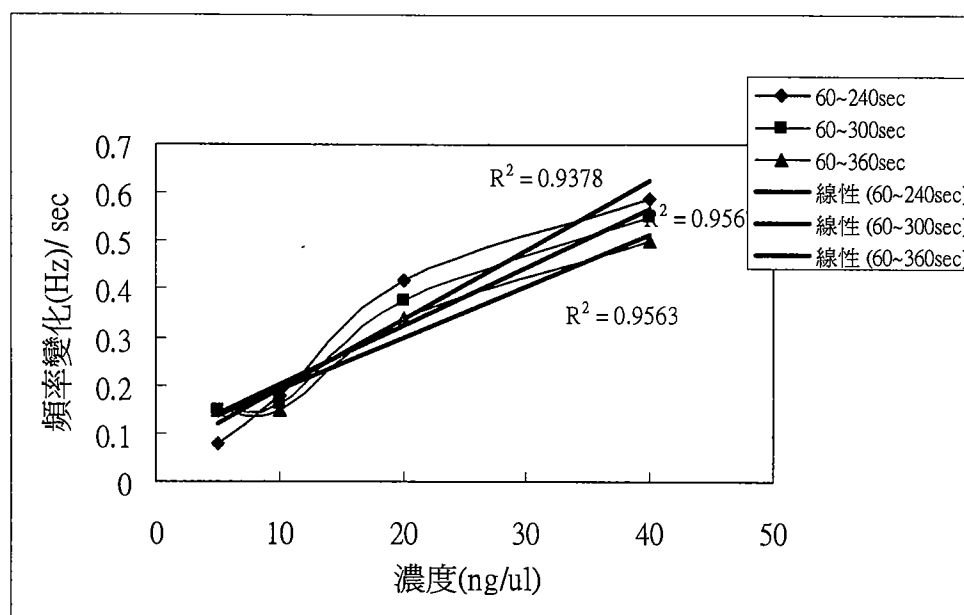
圖二、本計劃目前使用之振盪系統與石英晶片

電腦控制儀器與資料擷取分析：

採用 LabVIEW(Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench)之圖形化程式語言，是目前已被廣泛應用做為資料擷取分析的一套軟體。使用該軟體進行振頻量測時電腦螢幕顯示狀況如圖三所示。



圖三、LabVIEW 軟體進行振頻量測，由結果可知檢測範圍在 500ng 後抗體抗原反應即達飽和。在 500ng 檢測範圍內其頻率的反應有很好的線性關係，其 R^2 可達 0.9。從重複一到重複三的試驗可看出檢測的結果具有良好的再線性。而從負控制組（加 BSA 取代抗原）和檢測結果的比較可知本系統的檢測具有很好的專一性。



圖四、取不同濃度抗原在反應時間 60~240、60~300、60~360 秒內的斜率值做比較，發現它們彼此都有很高的線性度和相關性。這代表本系統可以在五分鐘內做快速的檢測。

抗體之分離純化：

由於腸病毒表面抗原之單株抗體為不同 subtype 之 IgG，本實驗室已購入並建立 HiTrap™ Protein G HP column (Amersham Biosciences Co.) 準備進行抗體 IgG 之純化。購得抗體之純度若能直接使用，則不須再經分離純化處理。若純度不佳或需構入細胞株自行生產抗體時，即可進行抗體之純化處理。抗體純化之相關技術在本實驗室已建立完整並累積多年經驗，前此用於純化本實驗室所製備之單株抗體亦均有滿意之純化結果，應可充分配合本計劃之需求。

抗體專一性測試：

已建立 ELISA 標準操作程序，可隨時檢測抗體與抗原間之專一性。另可

能向台大醫學院借用 BIAcore 等大型免疫反應監控系統，用以建立抗原與抗體間之親和常數 (Affinity Constant)。

抗體之固定化：

試行採用之固定化方法包括 cystamine-glutaraldehyde 法、以及 3-Glycidxypropyl- trimethoxysilane ，11-MUA 法等⁽¹¹⁾。

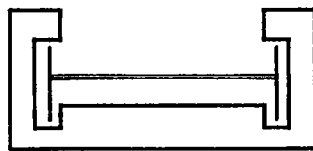
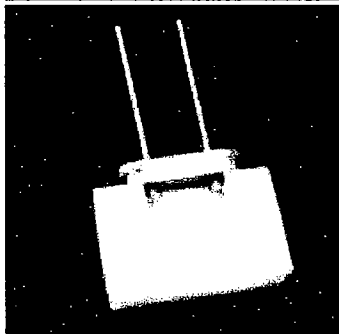
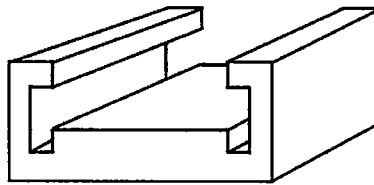
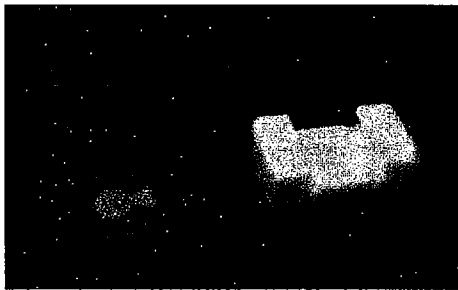
參、結果與討論

1. 10MHz 壓電石英晶體之取得與特性確認並進一步改進自動吸取裝置之特性

已進行石英壓電晶體免疫感測器系統特性之測量工作，偵測靈敏度、溫度係數、系統頻率之時間漂移值(drift)、晶片的半衰期等特性。本系統採用之自動吸取裝置為非流動之液相環境設計與以往之氣相或是流動性之液相系統頗有不同。目前本實驗室之設計可以縮短檢測時間至五分鐘以內。在氣相系統中，反應基質承載於晶片電極上後，需經過乾燥，才再加入下一個基質做反應。

- 由於基質乾燥後會改變其反應活性，故需要使基質保存於液態環境中。
- 設計一『卡夾』以維持基質在液態環境中作反應。

卡夾構造



使用流程：

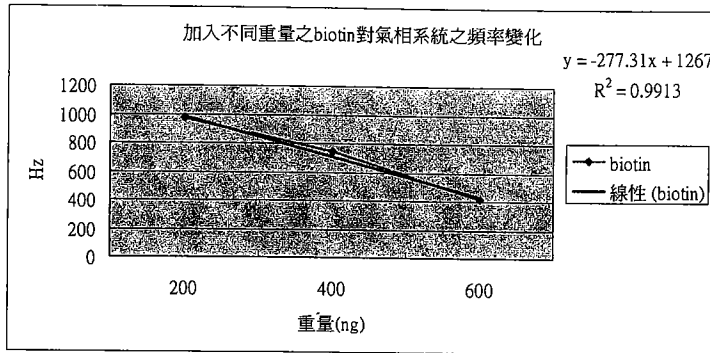
- (1) 晶片插入卡夾加上反應溶液
- (2) 晶片吸入溶液的面朝下
- (3) 晶片於偵測器上偵測頻率

反應環境：

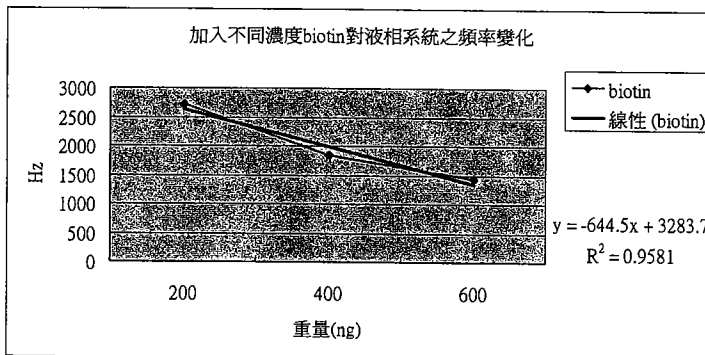
反應溶液在晶片與卡夾中，溶液與晶片接觸，進行化學反應。



比較使用卡夾與氣相方式測量對於測量頻率的穩定度：



在氣相系統中以不同質量的 biotin 對振頻的移差之關係。圖上由左至右三點分別代表加入 200ng、400ng、600ng 之 biotin，平均代表為三重複之振頻移差值取平均，線性代表為趨勢線。已逐步加覆不同濃度的 biotin 於 QCM 晶片上之金電極，偵測振頻變化與質量變化之相對關係。由 200 ng ~ 600 ng 範圍內之 biotin 之質量聚集與振頻移差之線性相關係數為 0.9913。



在液相系統中以不同質量的 biotin 對振頻的移差之關係。圖上由左至右三點分別代表加入 200ng、400ng、600ng 之 biotin，平均代表為三重複之振頻移差值取平均，線性代表為趨勢線。已逐步加覆不同濃度的 biotin 於 QCM 晶片上之金電極，偵測振頻變化與質量變化之相對關係。由 200 ng ~ 600 ng 範圍內之 biotin 之質量聚集與振頻移差之線性相關係數為 0.9581。

2. 取得國內外產製之商業化腸病毒單株抗體與其抗原樣品

由國內外生技公司購買腸病毒之 EV70 腸病毒之偵測單株抗體(IgG)。分析抗體專一性、親合力、與偵測靈敏度、費用等產品特性。抗體之測試方法藉由本實驗室目前自行生產抗體時所使用之酵素鏈結免疫測試法以測試其效價與專一性並配合本系統行測試。

甲、特異性：。

乙、適用樣品濃度範圍： ELISA測試titer為 10^3 -- 10^5

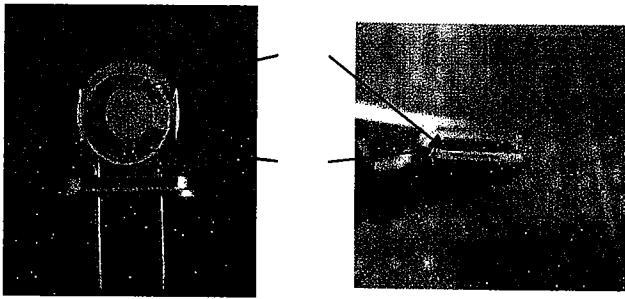
丙、應答時間：10分鐘內可以達到穩定反應曲線。

保存安定性：固定化之晶片經保存測試後一個月內訊號仍有 60% ，10 天內則有 83% 。

本實驗室(許, 2004) 也曾經嘗試以 3 碳鏈長之 3-mercaptopropionic acid (3-MPA) 配合 EDC 和 NHS 做為建構自組裝單層之材料，但是由抗體固定情形和檢測結果來看不甚理想，所以參酌文獻的研究，以市面上商品化之十一碳鏈長烷基硫醇化物 11-MUA 做為自組裝單層膜之材料。而 Cystamine-glutaraldehyde 法是參酌本實驗室歷年來研究結果(所歸納出之抗體最佳固定方法，所以本研究以此兩種方法在石英晶體電極表面建構自組裝單層膜。從兩種固定法之結構圖來看可知，因為 Cystamine 和 glutaraldehyde 的反應是藉由胺基和醛基之縮合反應，在單層膜中間疏水性區域上含有-NH- 基團；推測此基團會破壞單層膜的規則排列和形成之穩定度，加上部分 glutaraldehyde 兩端的醛基 (-CHO) 也會和金電極上經 Cystamine 修飾後所裸露的胺基(-NH₂) 彼此相互反應，這樣便會降低抗體固定於電極表面的機會；相較 Cys 和 GA 法，11-MUA 藉由 EDC 與 NHS 活化一端之羧酸基團使之與抗體反應。11-MUA 中間為長碳鏈疏水性結構，比起前述方法更能形成穩定規則的單層膜，抗體固定效率相對來說比較好。此結果對應台大化工系研究烷基硫醇自組裝單分子層於金電極上之電化學特性，研究結果指出十二碳鏈長之烷基硫醇自組裝單分子層有最緊密和規則的排列。然而抗體固定量高並不代表反應活性就會比較好，因為這還牽涉到抗體固定在晶片表面的位向，是否有立體障礙的產生，抗體活性是否受到表面修飾的影響等等，所以必須再觀察兩種固定法在樣品檢測上的反應再做比較。

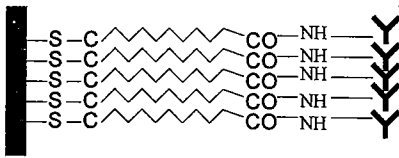
本系統之頻率響應範圍

	Sucrose (Hz/ng)	NaCl (Hz/ng)	BSA (Hz/ng)
0~100 ng	7.08	6.94	7.04
0~1000ng	2.39	2.29	1.40
0~8000ng	1.10	1.18	0.65
R ² (100~1000 ng)	0.9715	0.9435	0.9488



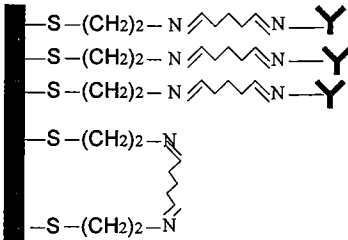
利用自動吸取裝置將樣品吸至晶片電極表面

(A) 11-MUA method



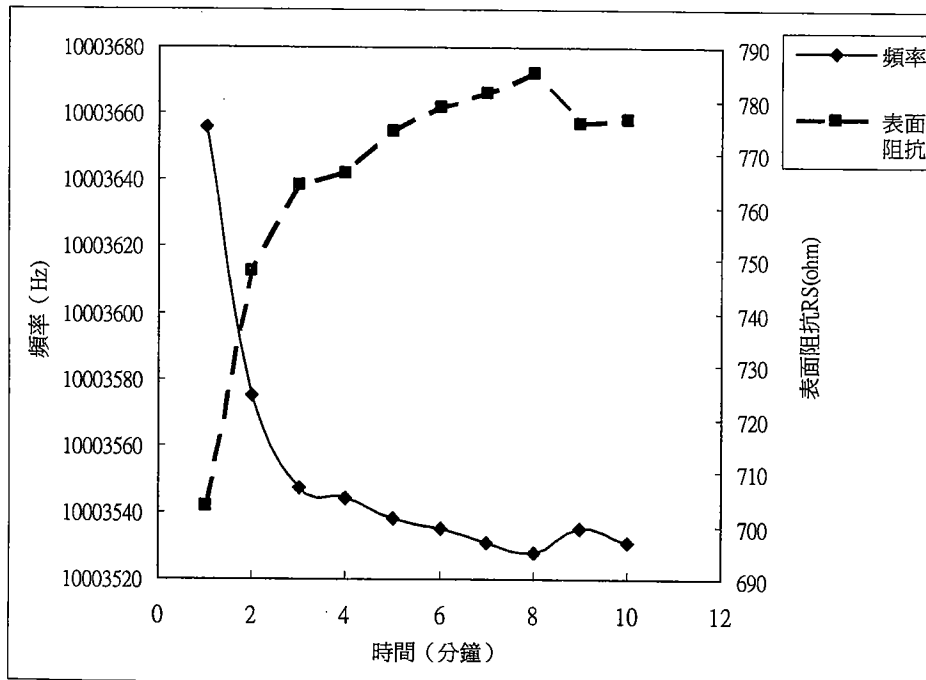
金電極

(B) Cys + GA method

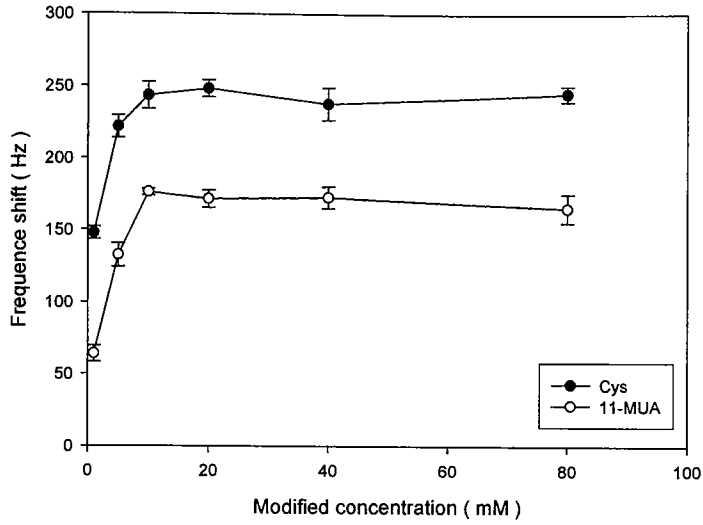


金電極

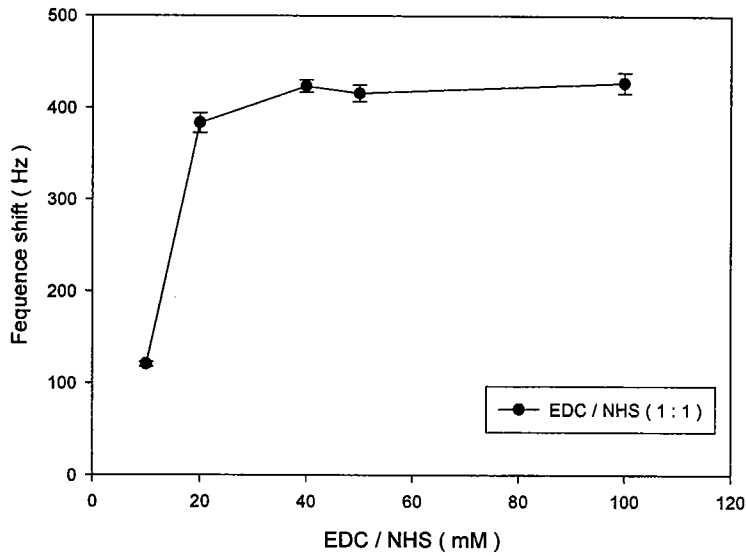
本系統中兩種不同固定法與抗體連結之結構示意圖



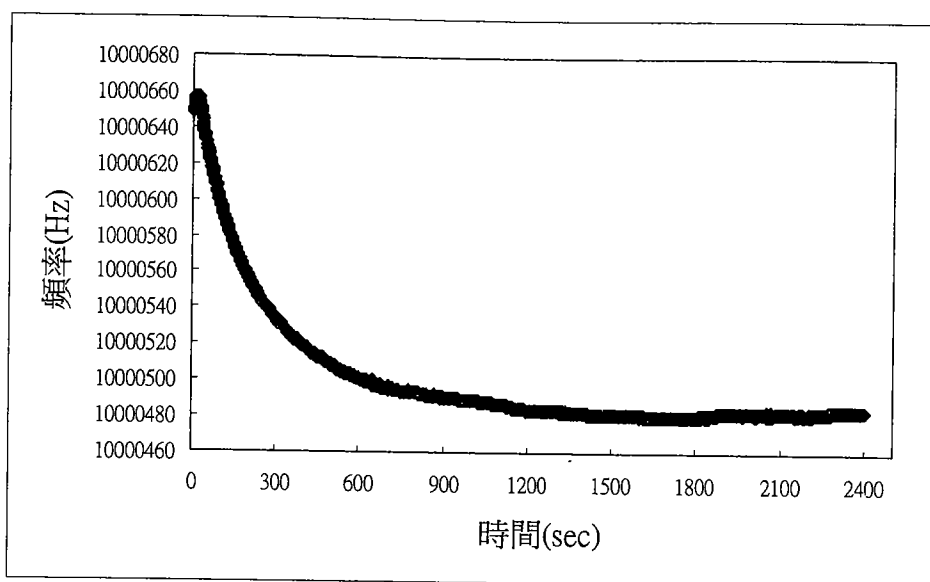
本系統之樣品檢測過程中石英晶體表面阻抗對振頻之關係圖



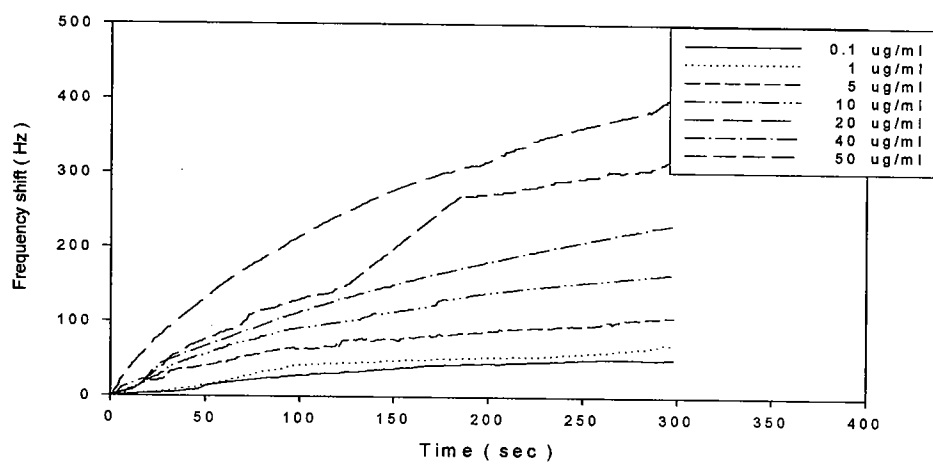
不同濃度 Cys 和 11-MUA 對振頻移差之關係



不同濃度之 EDC/NHS (1:1) 對振頻移差之關係

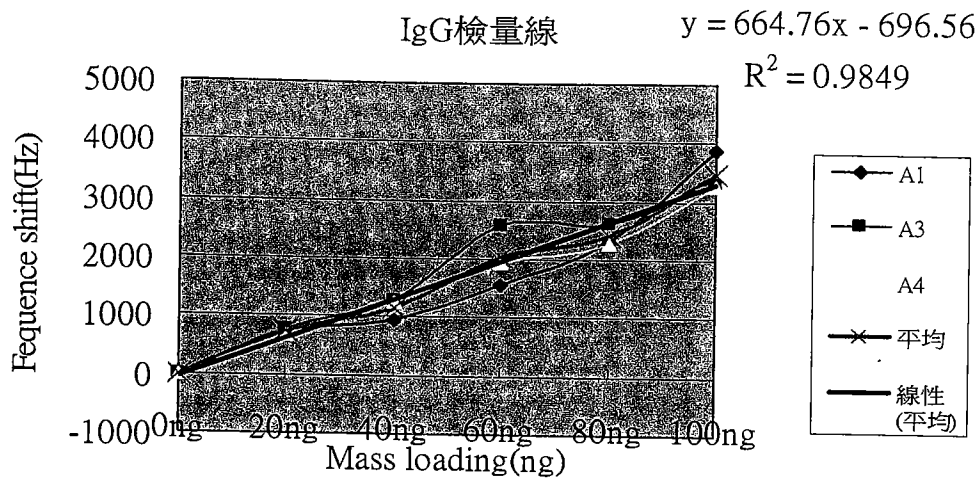


利用免疫感測器即時量測目標蛋白之振頻對時間關係圖

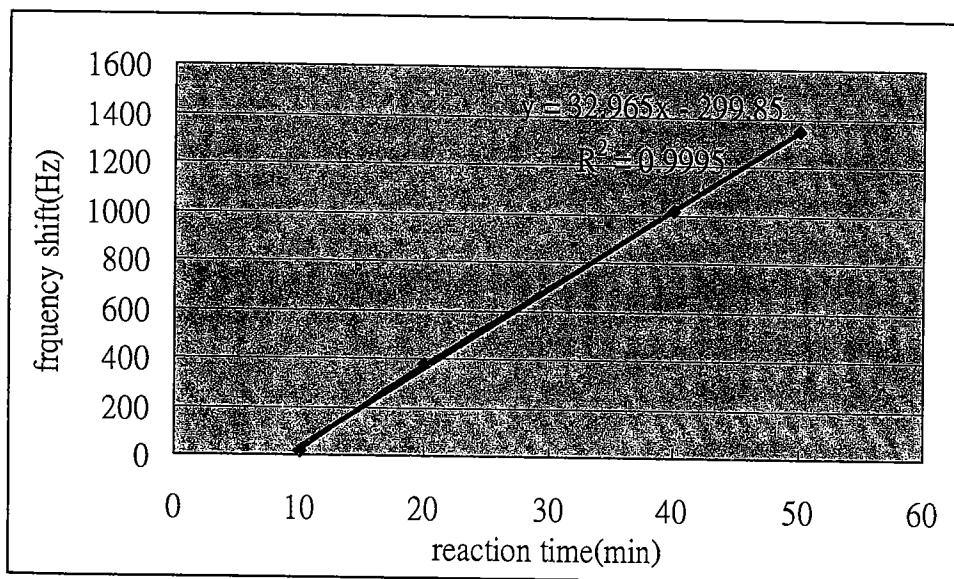


目標蛋白即時量測之振頻移差對時間關係圖

3. 進行石英壓電晶體之電極表面 71 型腸病毒單株抗體固定，實際於實驗室偵測 71 型腸病毒標準樣品

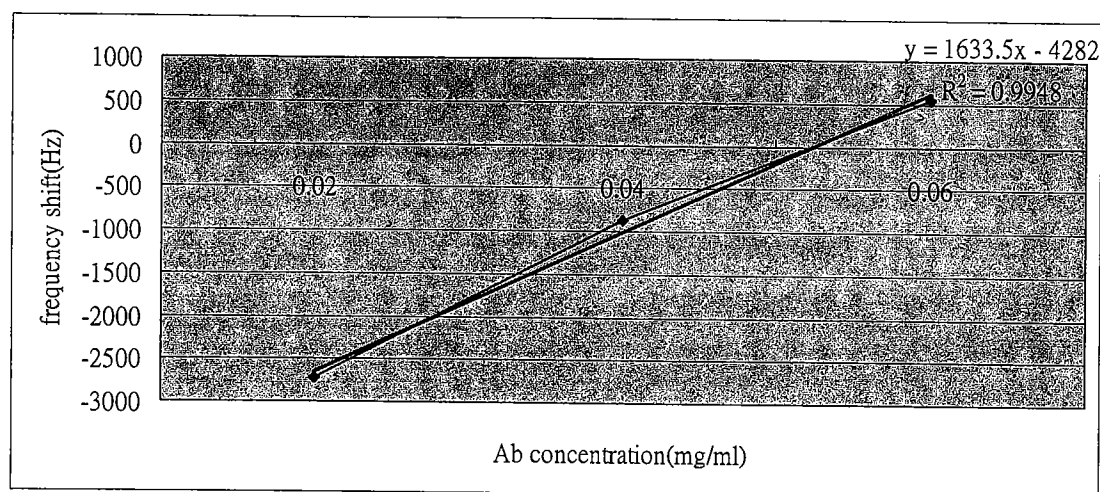


不同質量的 IgG 抗體對振頻的移差之關係。A1 代表為重覆一，A3 代表為重覆二，A4 代表重覆三，平均代表為三重覆之振頻移差值取平均，線性代表為趨勢線。已逐步加覆不同濃度的 IgG 抗體於 QCM 晶片上之金電極，偵測振頻變化與質量變化之相對關係。由 20 ng ~ 100 ng 範圍內之 IgG 抗體之質量聚集與振頻移差之線性相關係數為 0.984。



以 11-MUA 之自組裝單層薄膜法以不同反應時間固定腸病毒 71 抗體，對腸病毒 71 型抗原之檢測結果。取偵測 60 秒~120 秒內的頻率變化平均值作圖。先以 11-MUA 之自組裝單層薄膜法，固定濃度為 0.05 mg/ml 之腸病毒 71 型抗體，以相間格 10 分鐘的反應時間，共檢測 10 分鐘到 60 分鐘。而觀察抗體固定時間與

頻率變化關係。由於振頻移差於反應時間 30 分鐘時，可能由於人為操作誤差極大數值忽略不計，然而從其他結果可看到在 10~50 分鐘內固定量與振頻差之關係呈線性變化，其質量聚集與振頻移差之線性相關係數高達 0.9995，利用原子力顯微鏡來試證晶片上之固定情況，來確定是否推結果是正確的。



以 11-MUA 之自組裝單層薄膜法固定不同濃度之腸病毒 71 抗體，對腸病毒 71 抗原之檢測結果。取偵測 60 秒~120 秒內的頻率變化平均值作圖。從國內進階生技公司購買 Mouse anti-enterovirus 71 monoclonal antibody (MAB979, CHEMICON)，其原始濃度為 5 mg/ml。我們將此抗體稀釋成濃度範圍在 0.02 ~ 0.06 mg/ml。先以 11-MUA 之自組裝單層薄膜法，固定不同濃度之腸病毒 71 型抗體，而從其振頻移差與濃度關係觀察到，然而從其他結果可看到在 0.02~0.06 mg/ml 內固定量與振頻差之關係呈線性變化，其質量聚集與振頻移差之線性相關係數高達 0.9948。與上述的反應時間對振頻移差顯示結果皆呈上升的線性關係。

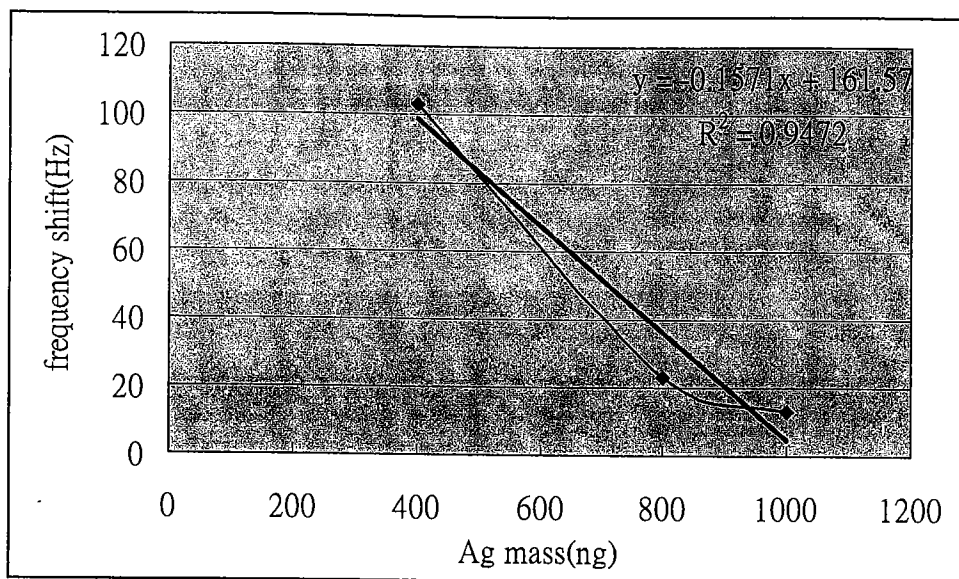
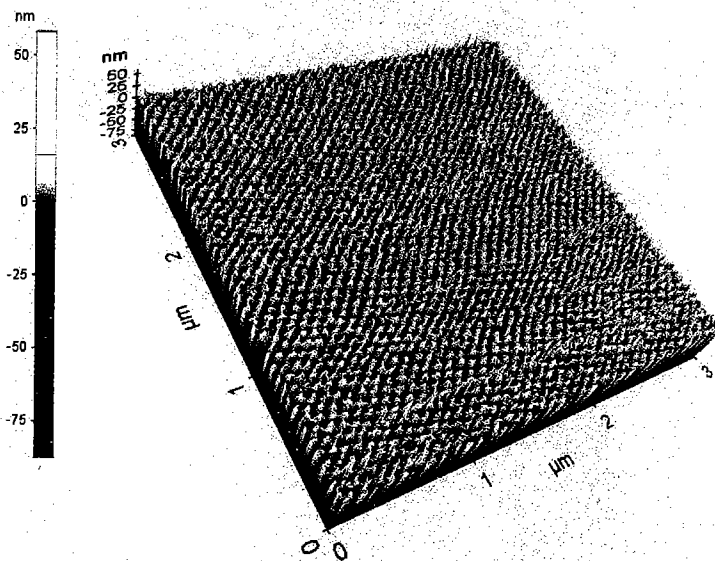
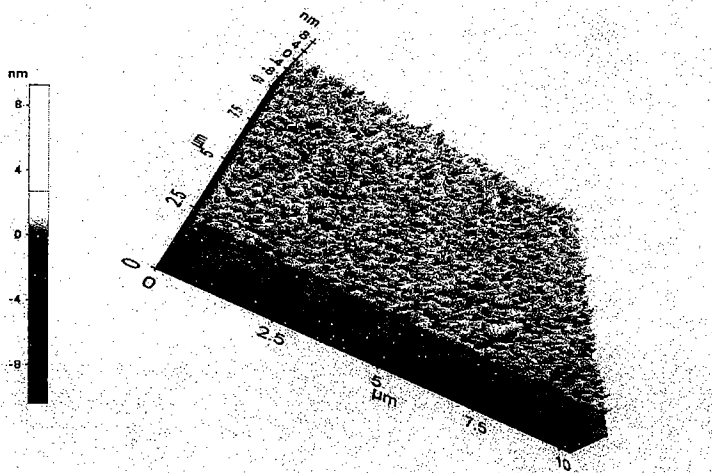


Fig 6.將利用 UV 處理的腸病毒 71 型病毒株，以 11MUA 之自組裝單層膜固定方法，固定腸病毒 71 型單株抗體，來檢測不同濃度之抗原。將抗原起始濃度 5 mg/ml 稀釋成 0.04, 0.08, 0.1 mg/ml。



未經任何處理之晶片表面原子立顯微鏡圖 (TOPOGRAPH IMAGE /PSIA-XE1 本實驗室)



經抗體固定化後與抗原反應之晶片表面原子立顯微鏡圖 (TOPOGRAPH IMAGE /PSIA-XE1 本實驗室)

4. EV71 腸病毒快速檢測感測器於實驗室偵測抗原(死病毒檢體)
已委託疾管局提供失活病毒樣本進行中

詳細數據將於下一年度之連續計畫報告中提供。

結論與建議

本實驗室執行計畫過程中，新加入兩項工作：一為加入偵測抗腸病毒之抗體偵測，二為將自行生產 EV71/Pan EV 單株抗體。經費上極為不足請貴單位評量是否能追認增加經費以使實驗能順利進行。