

計畫編號：MOHW106-CDC-C-315-000106

衛生福利部疾病管制署 106 年署內科技研究計畫

計畫名稱：精進腺病毒之電子顯微鏡檢測技術

年度/全程研究報告

執行機構：疾病管制署檢驗中心

計畫主持人：吳秀玲

研究人員：許珍禎

執行期間：106 年 1 月 1 日至 106 年 12 月 31 日

研究經費：新臺幣 52 萬元整

## 目 錄

計畫中文摘要.....	1
計畫英文摘要.....	2
前言.....	3
材料與方法.....	6
結果.....	11
討論.....	14
結論與建議.....	15
參考文獻.....	17
圖表.....	20

## 中文摘要

關鍵詞：電子顯微鏡技術、過濾、腺病毒

應用電子顯微鏡技術，有助於診斷及研究已知及未知病毒的顯微結構。人類腺病毒引起的感染症狀種類很多包括結膜炎、呼吸道症狀及腸胃道症狀等，嚴重會造成死亡。本研究計畫以腺病毒為研究對象，以透過在活化原有設備及更新試片製備方法以達到簡化檢驗程序及有效縮短檢驗時間，精進電子顯微鏡技術，以迅速且精確剖析微生物病原體結構。目前本中心的掃描式電子顯微鏡可觀察校正試片至500奈米以下，穿透式顯微鏡可觀察校正試片到100奈米以下。去活化腺病毒則是以戊二醛固定腺病毒，濃度2%，作用1小時。使用不同孔徑的膜過濾器以濃縮檢體中的腺病毒，膜過濾器事先以金屬覆膜增加導電度，鍍不同厚度的金，不影響膜過濾器過濾能力。應用特製過濾器技術，有效濃縮病原體，並簡化傳統電顯試片製備技術，縮短製備程序及時間、明顯提升製備病毒試片的生物安全。

## 英文摘要

keywords : Electron microscope 、 Filtration 、 Adenovirus

Electron microscopy is an excellent tool for investigating the ultrastructure of microbes such as virus or bacteria. Adenoviruses are implicated in a wide range of human diseases, including respiratory diseases, conjunctivitis, cystitis and gastroenteritis. Our project is adenovirus as the research object, through the activation of the original equipment, update specimen preparation methods and enhanced electronic microscope technology platform, providing sample detection prevention to diagnosis nanoscale. At present, Our center of the scanning electron microscope can observe the calibration specimen to 500 nm or less. Transmission electron microscope can be observed to calibration specimen to 100 nm below. For inactivation of adenovirus is to use 2% glutaraldehyde incubation for one hour. The use of membrane filters of different pore size to concentrate the adenovirus in the sample, the membrane filter to increase the electrical conductivity of the metal coating in advance, plated with different thickness of gold, does not affect the membrane filter ability to filter. Application of special filter technology, the effective concentration of pathogens, and simplify the preparation of traditional process, shorten the preparation process and time, significantly improve the biological safety of preparation of the virus specimen.

## 前言

穿透式電顯(transmission electron microscope; TEM)對病毒及細菌的了解有很深的幫助，尤其是病毒，具傳染性的病毒，唯藉由電顯才能肉眼看到，而且病毒的分類主要也是依據電圖圖譜分類的。電顯在臨床微生物的應用主要是於 1960 年代為了快速診斷天花病毒，並依形態學於鑑別出痘病毒(poxvirus)、B 型肝炎病毒及微小病毒 B19(parvovirus B19)等其他病毒。而近期的多是用於鑑別腸胃炎有關的病毒，甚至於今日分子生物學的蓬勃發展下，電顯的診斷仍然是很重要，不論是在單一病原體或是多重病原體，在診斷的時間及效能上還是有其優勢[1-3]。

傳統上利用負染法製備病原體試片於穿透式電顯觀察微生物樣品特別是病毒為標準方法[4]，負染法需要的病毒量以痘病毒約每毫升至少需含  $10^5$  至  $10^6$  個病毒才可於穿透式電顯觀察到病毒[5]。但目前透過濾的技術用掃描式電顯(scanning electron microscope; SEM)及 TEM 的檢測每個樣品內含 5000 個病毒即可。而且電顯技術能有效彌補下列狀況，(1)當使用分子生物學檢測需要有對感染微生物潛在的知識，才能選用正確方法檢定時，(2)病原體並沒有適合的試劑檢測，特別是在病原體生長差或是不容易在體外系統培養以獲得足夠的

材料以製作商用試劑套組時，及(3)雙重感染患者只使用分子或以抗原為基礎的檢測時，有可能錯過第 2 個致病原時。所以電顯技術仍是非常重要的。

腺病毒在 60 多年前首次自人類的腺體分離出來，而後陸續也自不同的動物及人類分離到腺病毒。依據血清學及基因序列人類腺病毒 (human Adenovirus; HAdVs) 有 53 種血清型，A 至 G 7 個次族群 (subgroup)[6]。HAdVs 的形態為無套膜，直徑 70-100nm，二十面體，線狀雙股的 DNA 病毒。HAdVs 引起的感染症狀種類很多包括結膜炎、呼吸道症狀及腸胃道症狀等，嚴重會造成死亡[7, 8]。腺病毒佔上呼吸道感染約 5-15% 與下呼吸道感染 5%-10%[9]。腺病毒第 4、7、14 型與呼吸道感染的大流行有關，其中又以第 14 型會引起免疫功能不全的病人嚴重的呼吸道疾病與肺炎[10, 11]。在台灣全年都可自上呼吸道感染的孩童分離出腺病毒[12]，而且是孩童因呼吸道感染住院第 2 名的致病原[13]。

目前電顯室的穿透式電顯及掃瞄式電顯(包含臨界點乾燥機及黃金覆膜機)主體設備購於 1992 年，其他相關儀器也陸續購置，影像系統於 2005 年更新完成，以數位影像處理取代傳統的人工沖洗照片的方式。人員的配置原有專門技術 1 人負責，後因為人員升職、調職、離職及退伍，加上政府預算減少，剩餘 1 人兼職管理維護。1992 年

自今電顯室有數項重要事蹟包括於 2003 年協助 SARS 冠狀病毒的確認及 2009 年出版臨床微生物電顯圖譜一書[14]等。

本計畫的目標有 2 點，首先是活化電顯室，目前主體設備因最基本的維護保養，所以可正常使用，但無熟練的技術人員，活化重點在檢體前處理及操作程序的再確認。選擇腺病毒為研究對象，原因是病毒培養容易，主持人之前的工作經驗及目前的工作環境[15, 16]。第 2 個目標是依據 2016 年 Golding 氏等人發表的研究報告方法[[3]，配合現有的電顯設備，精進防疫檢體的試片製備方式，提供精確的臨床微生物診斷工具，幫助防疫工作。

## 材料與方法

### 腺病毒培養

腺病毒接種於 HEp-2c 細胞，生長培養基為 DMEM 加入 10% FBS 與 1% antibiotic antimycotic 抗生素，維持培養基為 DMEM 2% FBS 與 1% antibiotic antimycotic 抗生素，細胞繼代 75 cm<sup>2</sup> 的培養瓶，37 °C 先回溫 0.25% trypsin- EDTA。HEp-2c 細胞株在顯微鏡下先觀察確認細胞形態正常，且沒有污染。移除生長培養基，加入 5 mL 的 PBS 清洗殘餘之生長培養基後，吸除 PBS。加入 2 mL 的 0.25% trypsin-EDTA 作用 1 分鐘。以 10 mL 生長培養基由下往上將細胞沖下。計算細胞數。稀釋細胞至適當濃度作接種與繼代。放入 37°C、5% CO<sub>2</sub> 保溫箱中培養。接種病毒，發育完成之 HEp-2c 細胞將生長培養基丟棄，加入等量之維持培養基。於第 II 級生物安全櫃中將每一檢體分別接種至 2 支 HEp-2c 培養細胞中，每支接種 0.2 ml。另取 2 支培養細胞各接種 Hank's 液 0.2 ml 做為對照。置於 36°C，5% CO<sub>2</sub> 培養箱繼續培養。觀察，由翌日起每天以倒立顯微鏡觀察細胞形態是否改變。待檢體接種細胞呈顯著病變時，收集細胞及培養液。4°C，2100×g 離心 10 分鐘。上清液移至冷凍小管。若接種細胞觀察至第 7 天仍無病變，則於 - 80 °C 及 37 °C 冷凍、溶解二次，收集細胞及培



養液於 4 °C 以 2,100 ×g 離心 10 分鐘。取上清液再接再種一次，若觀察至第 7 天仍無細胞病變，則以間接免疫螢光法鑑定。

#### 間接免疫螢光法鑑定腺病毒

先以 2,100 ×g 離心 10 分鐘，收集上清液放入冷凍小管中，保存於 -80°C。在已移除上清液的細胞培養管中，加入少許 PBS，用 dropper 將壁上的細胞沖下，再加 PBS 至 5 ml，並將 cell 沖散。取兩片 21 well 的載玻片，用鉛筆分別標上日期及片數。每個待檢查之接種腺病毒之細胞管或細胞培養瓶，須點 6~9 個 well，另於玻片的最後一排，要以正常細胞為陰性對照。風乾後，放入 4°C 的丙酮液中固定 15 分鐘。取出風乾，加入腺病毒螢光抗體第一劑，將玻片置入潮濕盒內 37°C，作用 30 分鐘。取出用 PBS 浸洗 3 至 5 分鐘再風乾。加入螢光抗體第二劑 (FITC)，再置入潮濕盒中 37°C，作用 30 分鐘。再取出用 PBS 浸洗 3 至 5 分鐘再風乾。封片。以螢光顯微鏡觀察，並記錄結果。

#### 腺病毒去活化

不同濃度的戊二醛(glutaraldehyde)與相同力價的腺病毒，於室溫下，不同的時間作用( 10 分鐘、30 分鐘、1 小時及 2 小時)，以 3000×g 離心 15 分鐘，取上清液，再以 15000×g 離心 1 小時，沉澱物再去進行

培養確認是否會產生細胞病變。

### 聚碳酸酯軌道蝕刻膜過濾器(SPI-pore polycarbonate track etch filters)

#### 鍍金製備

聚碳酸酯軌道蝕刻膜過濾器放置於 6cm Hitachi S-2400 載台，放入黃金覆膜濺鍍機(Hitachi E101 Ion Sputter)進行黃金濺鍍。首先將 MAIN VALVE 打開在 OPEN 的位置，破真空後即可打開真空室的蓋子。將載台放在樣品台上，並蓋上蓋子，注意在蓋的時候要輕輕往上提，不然轉軸的部分會卡住。打開電源(POWER 在 ON 的位置)，用手指輕壓蓋子周圍使其密合，開始抽真空。確定 COATING / CLEANING 的選擇開關在 COATING 的位置。將計時器(Timer)時間依需求設定在不同時間點。當 VACUUM 綠燈亮起，並且觀察真空度指針達到氣壓 0.05 torr 時，按下 START 鈕開始通電，則 HV 指示燈會亮。開始放電後觀察電流表指針，輕輕轉動 VACUUM CONTROL 來控制電流，使之固定在 15 mA 左右，由於電流的改變非常敏感，因此每輕轉一些刻度要等指針穩定，再繼續轉動來調整。當計時器時間到，HV 指示燈會熄滅而且電流會降為 0，此時將 POWER 撥到 OFF，等數秒鐘後真空室內部壓力已經與外界達到平衡，即可打開蓋子取出樣品。

### 黃金覆膜機處理的過濾器做為 SEM 試片製備使用

SPI pore polycarbonate track etch 過濾器有不同孔徑，0.8 $\mu\text{m}$  (用於預試驗)，0.05 $\mu\text{m}$  (用於細菌)，0.01 $\mu\text{m}$  (用於腺病毒)，含病原體液體經過過濾器，留在膜的表面，可用掃描式電顯觀察。過濾器經過黃金覆膜濺鍍處理，放置於 13mm Swinnex<sup>R</sup> 過濾單元(filter unit)內，詳如圖六。

過濾器首先用裝有 2ml PBS 之 3ml Luer-Lok<sup>TM</sup>針筒過濾達濕潤效果，100 $\mu\text{l}$  腺病毒液加在 5ml PBS 中，將針筒接上過濾單元，腺病毒液經過 Legato 200 注射筒幫浦以 1000 $\mu\text{l}/\text{ml}$  濾過。若是病毒液濃度太高則須稀釋。而後用 5ml 蒸餾水過濾，完成後取出吸附腺病毒的過濾器放置於空氣中乾燥 30 分鐘，將過濾器以碳膠帶固定於 SEM 的載台，放入掃描式電顯 Hitachi S-2400 進行觀察。試片製備皆可在生物安全櫃內執行。

### TEM 試片的製備-負染法

將 parafilm 剪裁成適當大小，滴上 40 $\mu\text{l}$  蒸餾水，銅網(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。取出 10 $\mu\text{l}$  病毒液，加入 10 $\mu\text{l}$  2 % PTA

染色液，充分混合，靜置 2 分鐘。取 5 $\mu$ 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。濾紙吸去多餘水分，染色完之後吸去多餘的水分，靜置 30min，讓 grid 完全乾燥後，才可放入 TEM 作觀察。

### SEM 影像

SEM 試片應用掃描式電顯 Hitachi S-2400 進行觀察，並用 KanImager2.0 版的軟體進行影像截取及分析。

### TEM 影像

TEM 試片應用穿透式電顯 Hitachi S-2400 進行觀察，並用 AmtV542 的軟體進行影像截取及分析。

## 結果

### 電顯設備的活化及效能

SEM 及其相關試片製備的黃金覆膜機及臨界點乾燥器皆購置於民國 81 年 6 月，圖一 A 為本中心 SEM，放大倍率為 20 倍至 30 萬倍，以奈米金顆粒(大小為 3-50nm)校正試片，可觀察至 10 萬倍(500nm 以下)以上，詳見圖一的(B)及(D)，(C)是 0.8 $\mu$ m 聚碳酸酯軌道蝕刻膜過濾器鍍金後，於 SEM 觀察到 2 萬倍的影像

圖二(A)為為本中心，放大倍率為 50 倍至 60 萬倍。圖二(B)應用光柵陰影鑄造碳複製品(Cross grating replica)的校正銅網，置 TEM 觀察，圖二(B)為校正銅網 10 萬倍影像，圖二(C)是校正銅網 30 萬倍(100nm)影像，圖二為腺病毒過濾濃縮過程中，取出的沉澱物經負染法染色後，於 TEM 放大 15 萬倍觀察到的影像，圖中不是腺病毒，而是雜質的影像。

本中心的 SEM 及 TEM 仍可使用，SEM 可觀察校正試片至少到 10 萬倍(500 奈米以下)，TEM 可觀察校正試片至少到 30 萬倍(100 奈米以下)。實際觀察其他試片的放大效果如 0.8 $\mu$ m 聚碳酸酯軌道蝕刻膜過濾器，與樣品本身、試片的材質、製備的方法及操作人員的經驗有密切關係。

### 腺病毒培養及鑑別

腺病毒以 HEp-2c 細胞進行培養，圖三(A)是正常的 HEp-2c 細胞在顯微鏡下觀察到的影像，圖三(B)是 HEp-2c 細胞受到腺病毒感染產生細胞病變的影像。應用間接免疫螢光染色法，鑑別腺病毒，圖三(C)為正常細胞，(D)為受腺病毒感染的細胞蘋果綠螢光。

### 腺病毒去活化

不同濃度的戊二醛(glutaraldehyde；GA)與相同力價( $10^{-2.5}$ CCID<sub>50</sub>/50 $\mu$ l)的腺病毒，於室溫下，不同的時間作用 10 分鐘、30 分鐘、1 小時及 2 小時，使用戊二醛固定腺病毒，GA 濃度在 5% 以下，作用 10 分鐘以上，可達到腺病毒去活化的作用。表一呈現腺病毒去活化條件結果，定量腺病毒力價，不同濃度 GA 作用不同時間後，再進行細胞培養，以確定腺病毒的活性，此初步實驗及參考文獻 [17]，我們去活化的條件為 2%GA，作用 1 小時。

### 製備鍍金聚碳酸酯軌道蝕刻膜過濾器

聚碳酸酯軌道蝕刻膜過濾器置於 SEM 觀察，需鍍金屬導電膜，此過程並不會影響膜過濾器過濾液態樣品的能力。圖五(A)為單一金屬鍍膜的過濾器製備過程，膜過濾器需放一個墊片，這樣才能固定在黃金鍍膜機內進行濺鍍。膜過濾器濺鍍完成後膜過濾器大部分覆蓋金。圖五(B)鍍不同厚度的金，推估值為 5nm、10nm、20nm、30nm 及 40nm，

鍍金膜後用碳膠帶黏置於 SEM 載台，放入 SEM 觀察。圖五(C)及(D)是孔徑 0.8 $\mu$ m 聚碳酸酯軌道蝕刻膜過濾器鍍 5nm 金及 30nm 金，測量孔徑，兩者無明顯差距。

#### 生物樣品製備用於 SEM 觀察

本過濾單元是依據參考 2016 年 Golding 氏等人發表的研究報告方法[3]。圖六(A)為過濾單元在過濾步驟前，需組合的各個組件。(B)是過濾單元組合好，接上針筒，而後放置於注射針筒幫浦，整個過濾的過程是在生物安全櫃內進行(C)(D)。過濾器的孔徑，病毒液濃度及過濾的速度都可選擇及設定。

## 討論

目前電顯室的穿透式電顯及掃瞄式電顯(包含臨界點乾燥機及黃金覆膜機)主體設備已經使用 26 年，影像系統於 2005 年更新完成，藉由計畫，已知設備還可以使用，但是 SEM 及黃金覆膜機停產，SEM 的效能降低，開啟程序也因機器老化，而必須更改程序。目前較適合觀察細菌及蟲媒，病毒顆粒基本上小於 100nm，較不易清楚觀察到。

TEM 與 SEM 的觀察微小病原體的原理不同，TEM 是藉由穿透電子束打至試片，再經放大成像，因此，TEM 試片其所要觀察的區域薄度，必需達到電子束能穿透的等級；穿透試片的薄度，必須在  $2\text{\AA}$  以下。SEM 利用電磁透鏡聚焦高能的電子束而在試片掃描樣品依其所激發出的二次電子與背向散射電子的接收對試片表面進行分析。目前本中心 TEM 是與 SEM 一起購置，仍可使用，相同高倍率使用時，人員需要較有經驗及試片的品質要求要比較高。基本上本中心的掃描式電子顯微鏡目前維持觀察校正試片可至 500 奈米，穿透式顯微鏡可觀察校正試片可 100 奈米。

病毒的去活化條件，文獻上詳細的記載比較少，我們應用不同濃度的戊二醛固定腺病毒以達去活化的效果，適用的條件是 2%GA，作用 1 小時。戊二醛主要的作用機制是與蛋白質的胺基酸產生



methylenic bridges，戊二醛是屬於 crosslinker fixtives，這類的化合物還有甲醛(formaldehyde)及聚甲醛(paraformaldehyde)。應用其他病毒則最好預先測試條件。

科技的發達，市售有不同奈米孔徑聚碳酸酯軌道蝕刻膜過濾器，有助於過濾濃縮病毒，我們目前應用三不同孔徑的聚碳酸酯軌道蝕刻膜過濾器，0.8 $\mu\text{m}$  (用於預試驗)，0.05 $\mu\text{m}$  (用於細菌)，0.01 $\mu\text{m}$  (用於腺病毒)，利用黃金鍍膜機濺鍍金至膜過濾器並不影響過濾效果，圖五得到證實，與 Beniac 氏及 Golding 氏的研究報告結論是一致[3, 18]。除了鍍金，我們還嘗試鍍鋁，發現我們的濺鍍機只能鍍金及金鉑，無法鍍鋁。

圖六的過濾裝置可放置於生物安全櫃操作提升操作傳染性病原體體的安全性，降低實驗室操作人員的風險。有研究報告已將此過濾裝置結合高級 SEM 設備，應用於生恐的即時檢測[19]。

## 結論與建議

應用特製過濾器技術，有效濃縮病原體，並簡化傳統電顯試片製備技術，縮短製備程序及時間、明顯提升製備病毒試片的生物安全。但由於時間不足，還有許多實驗要在重複及更深入的研究，由於計畫告一段落，希望未來能每年有固定的維護合約，繼續維持儀器的運行，發揮功能。

## 參考文獻

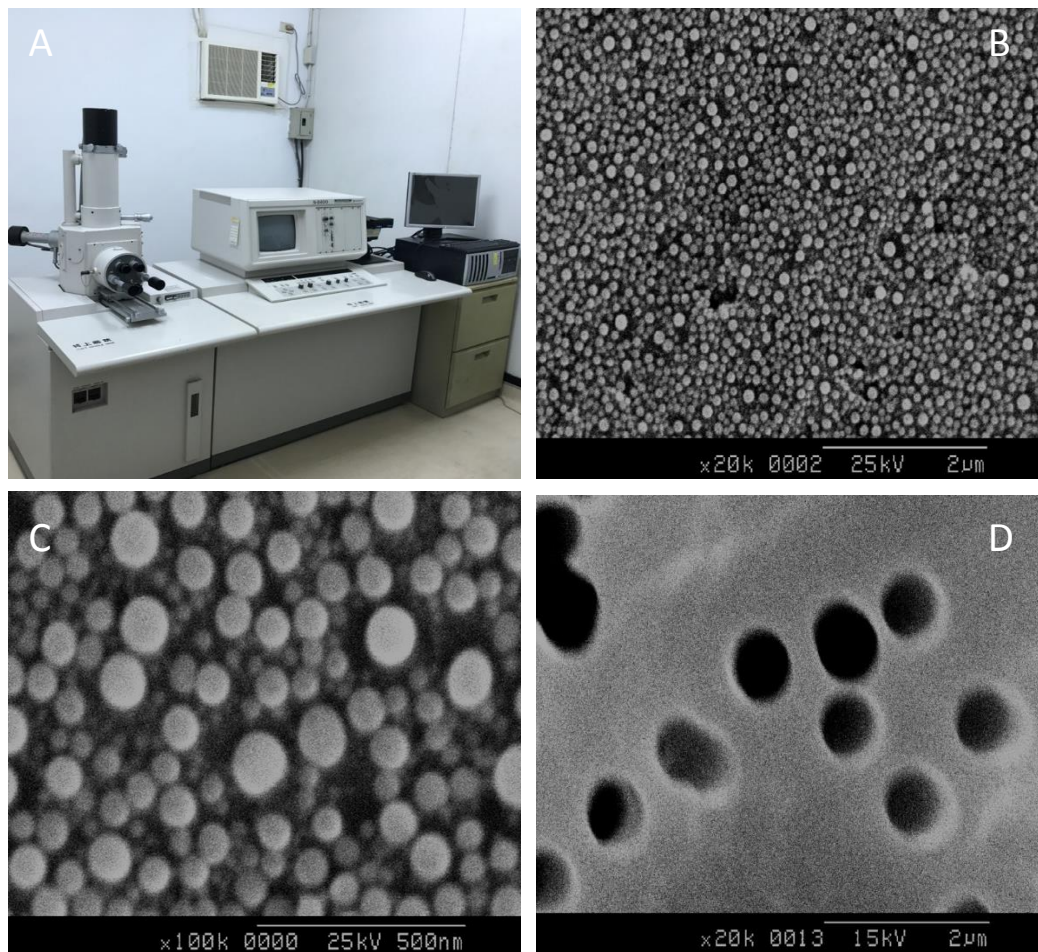
1. Curry, A., H. Appleton, and B. Dowsett, *Application of transmission electron microscopy to the clinical study of viral and bacterial infections: present and future*. *Micron*, 2006. **37**(2): p. 91-106.
2. Zhang, Y., et al., *Electron microscopy: essentials for viral structure, morphogenesis and rapid diagnosis*. *Sci China Life Sci*, 2013. **56**(5): p. 421-30.
3. Golding, C.G., et al., *The scanning electron microscope in microbiology and diagnosis of infectious disease*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 26516.
4. Hazelton, P.R. and H.R. Gelderblom, *Electron microscopy for rapid diagnosis of infectious agents in emergent situations*. *Emerg Infect Dis*, 2003. **9**(3): p. 294-303.
5. Nitsche, A., et al., *Pitfalls in diagnosing human poxvirus infections*. *J Clin Virol*, 2007. **38**(2): p. 165-8.
6. 楊淑理, et al., *以免疫層析法快速偵測多種血清型腺病毒*. *Journal of Biomedical & Laboratory Sciences*, 2015. **27**(4): p. 146-152.
7. Robinson, C.M., et al., *Computational analysis and identification of an emergent human adenovirus pathogen implicated in a respiratory fatality*. *Virology*, 2011. **409**(2): p. 141-147.
8. Lin, Y.C., et al., *Molecular Epidemiology and Phylogenetic*

- Analysis of Human Adenovirus Caused an Outbreak in Taiwan during 2011*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0127377.
9. Hong, J.Y., et al., *Lower respiratory tract infections due to adenovirus in hospitalized Korean children: epidemiology, clinical features, and prognosis*. Clin Infect Dis, 2001. **32**(10): p. 1423-9.
  10. 吳仁光, *Viral Pneumonia in Adults*. 內科學誌, 2013. **24**(4): p. 317-327.
  11. Louie, J.K., et al., *Severe pneumonia due to adenovirus serotype 14: a new respiratory threat?* Clin Infect Dis, 2008. **46**(3): p. 421-5.
  12. Kidd, A.H., et al., *Rapid subgenus identification of human adenovirus isolates by a general PCR*. J Clin Microbiol, 1996. **34**(3): p. 622-7.
  13. Kim, Y.J., et al., *Genome type analysis of adenovirus types 3 and 7 isolated during successive outbreaks of lower respiratory tract infections in children*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(10): p. 4594-9.
  14. 行政院衛生署疾病管制局, *臨床微生物電顯圖譜*. 防疫學苑系列 015, ed. 張瑞炘, et al. 2009: 行政院衛生署疾病管制局.
  15. 吳秀玲, et al., *1997 年至 1999 年臺灣地區孩童上呼吸道感染單純疱疹病毒分析*. 台灣公共衛生雜誌, 2002. **21**(5): p. 380-386.
  16. 吳秀玲, et al., *臺灣孩童上呼吸道腸病毒感染之實驗室監視系統*. 台灣醫學, 2004. **8**(3): p. 293-300.
  17. Hsiung, G.D.G.D., C.K.Y. Fong, and M.L. Landry, *Hsiung's diagnostic virology : as illustrated by light and electron*

*microscopy / G.D. Hsiung, Caroline K.Y. Fong, and Marie L. Landry. . 1994.*

18. Beniac, D.R., et al., *A filtration based technique for simultaneous SEM and TEM sample preparation for the rapid detection of pathogens.* Viruses, 2014. **6**(9): p. 3458-71.
19. Beniac, D.R., et al., *A mobile biosafety microanalysis system for infectious agents.* Sci Rep, 2015. **5**: p. 9505.

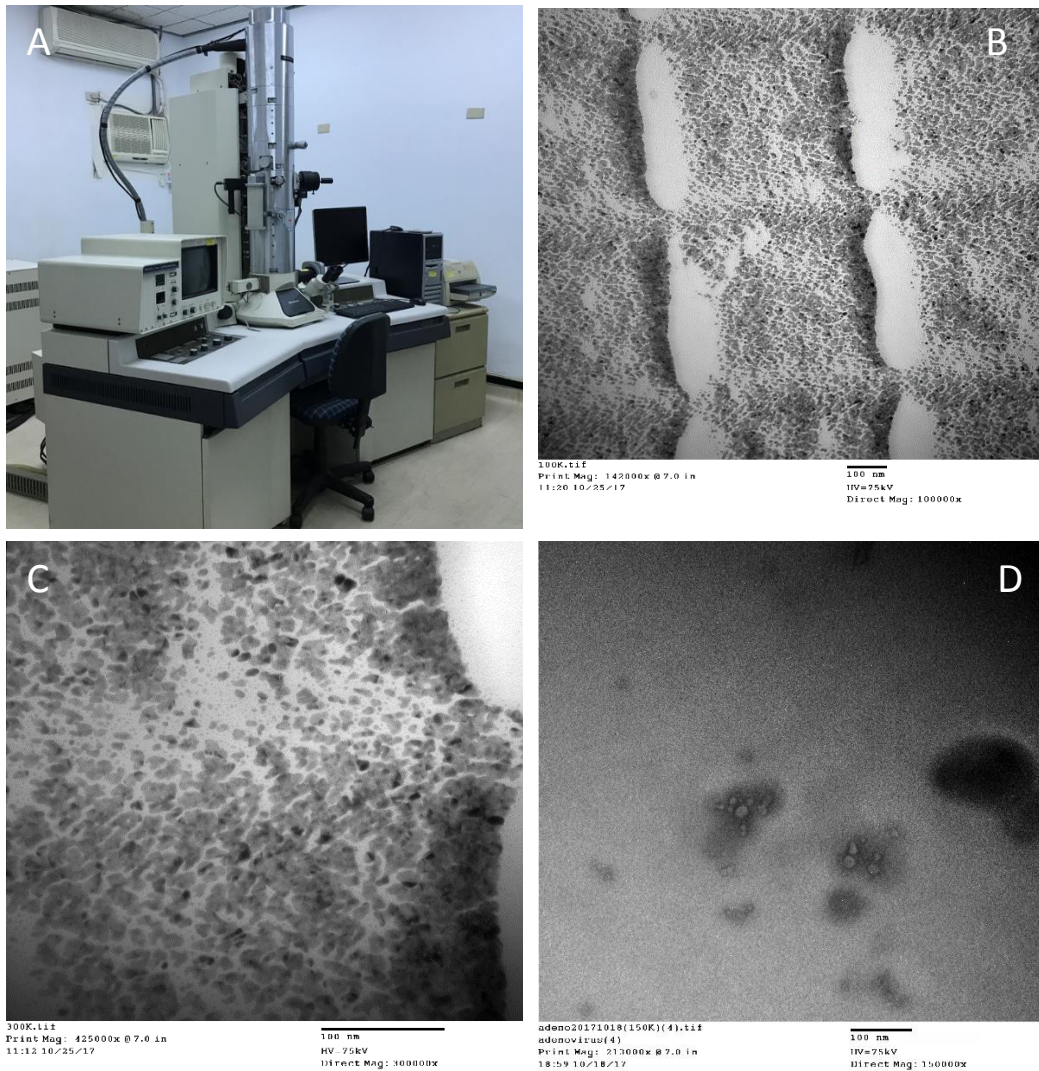
## 圖表



### 圖一、SEM 效能

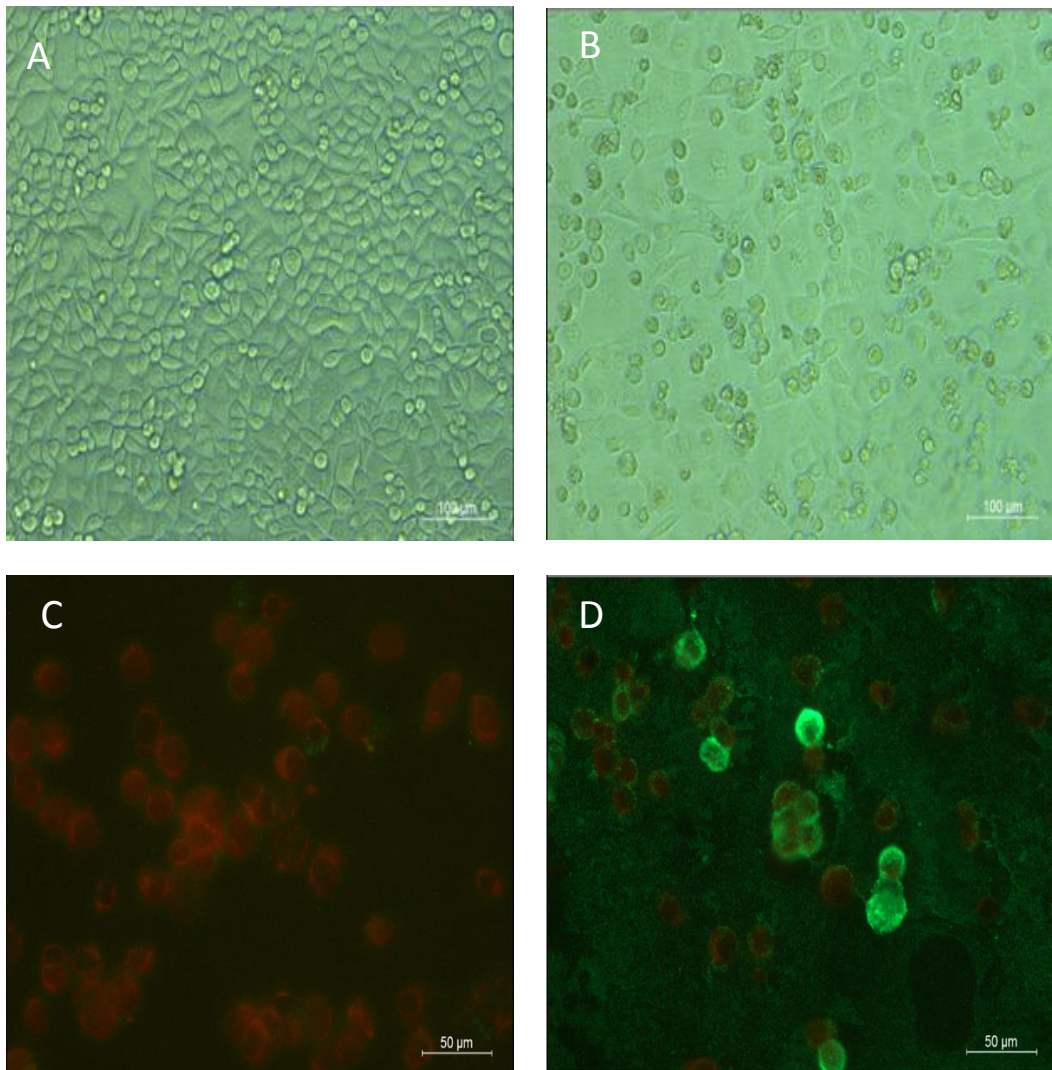
(A) 本中心的 SEM。(B) 奈米金顆粒校正試片 2 萬倍影像。(C) 奈米金顆粒校正試片 10 萬倍影像。(D)  $0.8\mu m$  聚碳酸酯軌道蝕刻膜過濾器鍍金於 SEM 觀察 2 萬倍的影像。





## 圖二、TEM 效能

(A) 本中心的 TEM。(B) 奈米金顆粒校正試片 2 萬倍影像。(C) 0.8 $\mu$ m 聚碳酸酯軌道蝕刻膜過濾器鍍金於 SEM 觀察 2 萬倍的影像。(D) 奈米金顆粒校正試片 10 萬倍影像。



### 圖三、腺病毒培養及鑑定

腺病毒以 HEp-2c 細胞進行培養，(A)是正常的 HEp-2c 細胞在顯微鏡下觀察到的影像，(B)是 HEp-2c 細胞受到腺病毒感染產生細胞病變的影像。應用間接免疫螢光染色法，鑑別腺病毒，(C)為正常細胞，(D)為受腺病毒感染的細胞蘋果綠螢光。



表一、腺病毒去活化條件

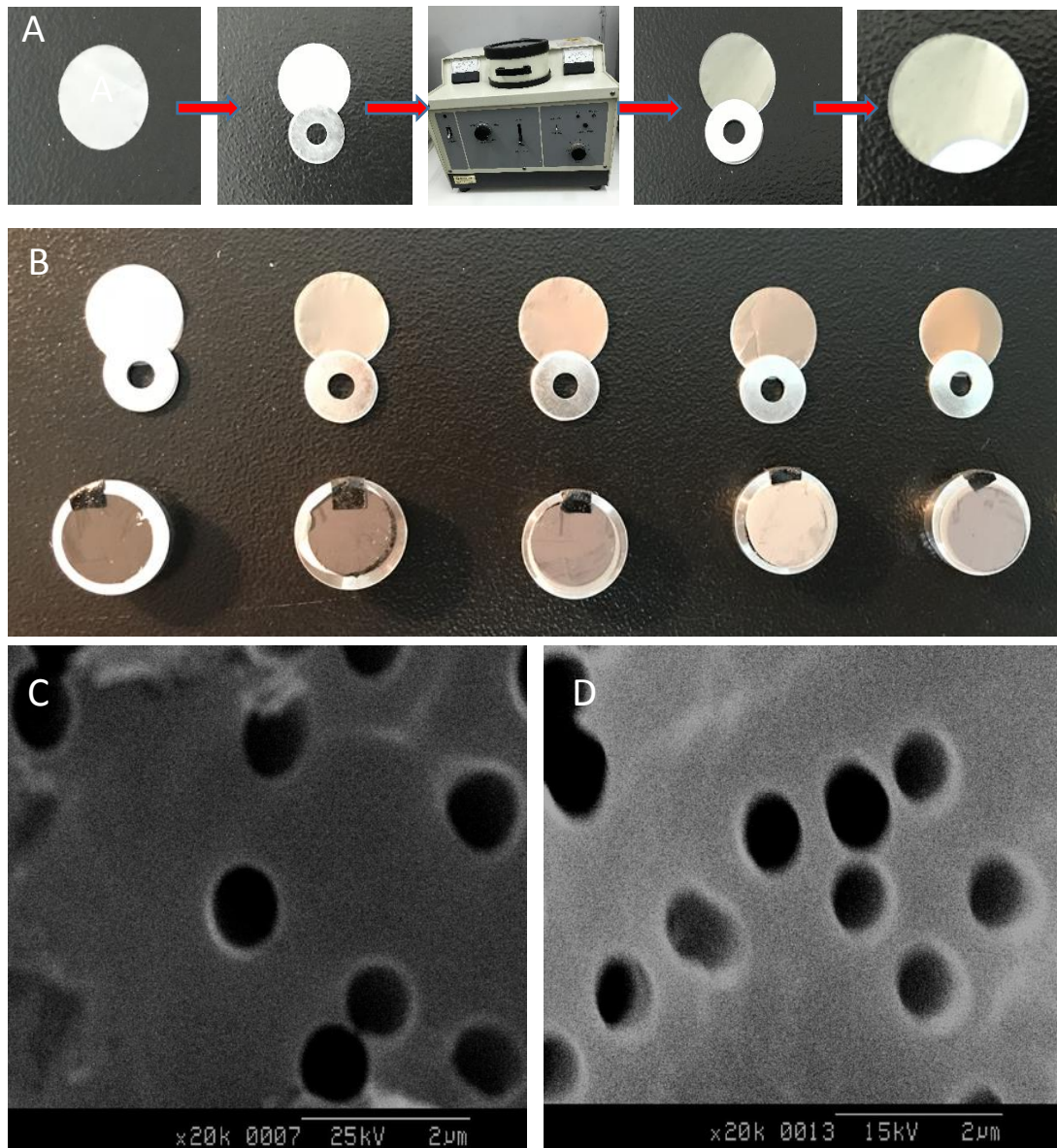
T=60min		virus titer=				10 <sup>-2.5</sup> CCID <sub>50</sub> /50μl
GD <sup>a</sup> (%)	Day	1	2	6	7	IFA
	5	CT <sup>b</sup>	CT	CT	CT	CT
2	- <sup>c</sup>	-	-	-	-	Negative
1	-	-	-	-	-	Negative
0.5	-	-	-	-	-	Negative
DPBS	-	++ <sup>d</sup>	++++	++++	++++	Adenovirus

a: GD 為戊二醛(glutaraldehyde)縮寫

b:CT 為細胞毒性(cell cytotoxicity)縮寫

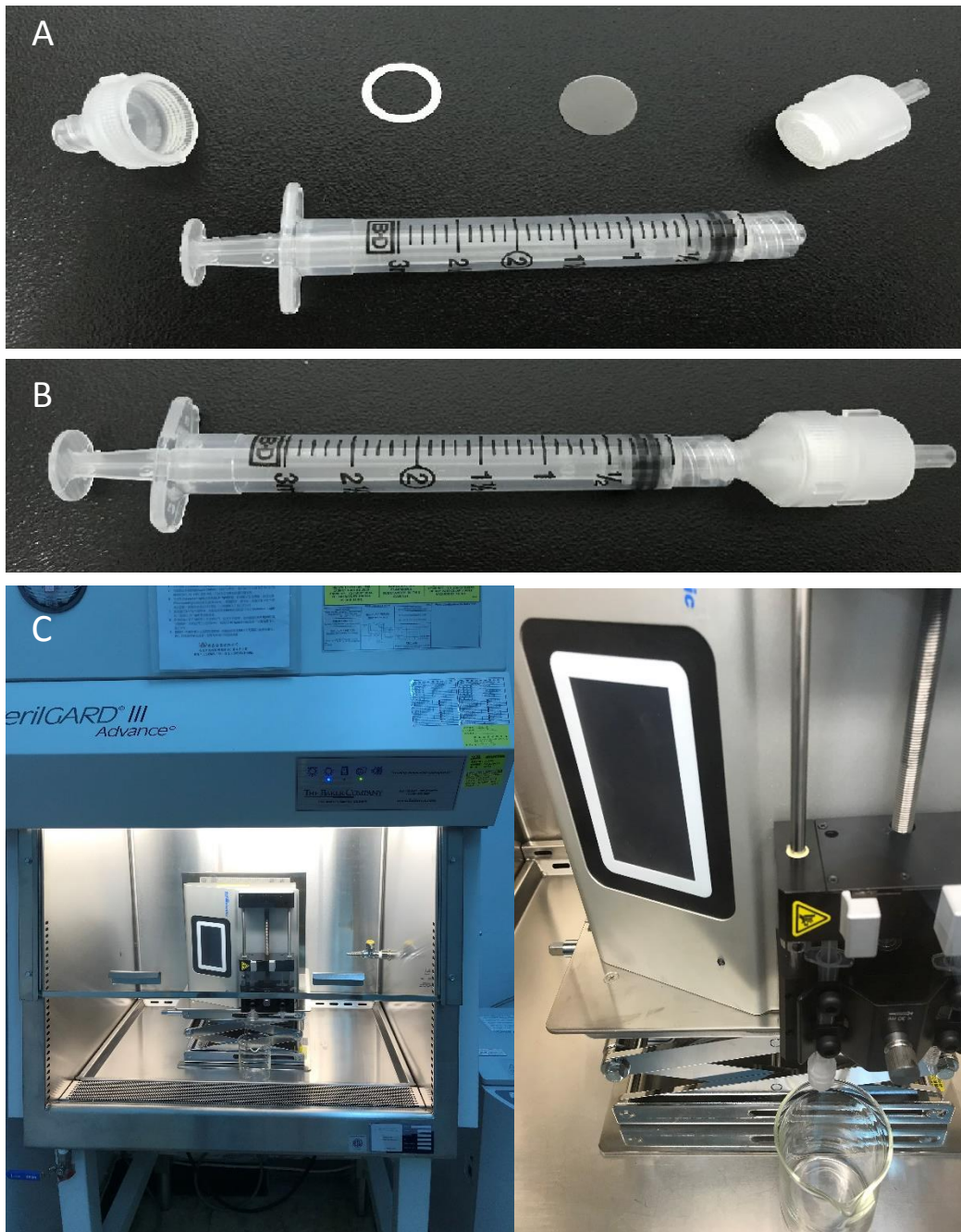
C:-代表無細胞病變效應(cell pathogenic effect)

D:+代表細胞病變效應強度



圖五、製備鍍金聚碳酸酯軌道蝕刻膜過濾器

聚碳酸酯軌道蝕刻膜過濾器置於 SEM 觀察，需鍍金屬導電膜，過程並不會影響膜過濾器過濾液態樣品的能力。(A)為單一金屬鍍膜的過濾器製備過程。(B)鍍不同厚度的金，推估值為 5nm、10nm、20nm、30nm 及 40nm，鍍金膜後用碳膠帶黏置於 SEM 載台，放入 SEM 觀察。(C)及(D)是孔徑 0.8 $\mu$ m 聚碳酸酯軌道蝕刻膜過濾器鍍 5nm 金及 30nm 厚度的金。



圖六、生物樣品製備用於 SEM 觀察

圖六(A)為過濾單元在過濾步驟前，需組合的各個組件。(B)是過濾單元組合好，接上針筒，而後放置於注射針筒幫浦，整個過濾的過程是在生物安全櫃內進行(C)(D)。