



JM 奈米新型複合材料抑制腸病毒懸浮液感染細胞能力之測試結果報告

測試試劑

JM 奈米新型複合材料

計畫委託

京程科技股份有限公司

計畫執行單位

醫學研究部臨床醫學研究中心細胞生物研究室

測試實驗室

汐止國泰綜合醫院病毒實驗室

執行人員

蔡承遠，朱彩雲，凌慶東

計畫主持人

凌慶東

簽名： 凌慶東 2014-03-06



計畫摘要

計畫名稱：JM 奈米新型複合材料抑制腸病毒感染能力測試

實驗設計：本計畫就 JM 奈米材料於病毒懸浮液中對腸病毒抑制作用進行實驗室測試。使用 TCID₅₀ 方法進行抗病毒測試，觀察經 JM 材料作用後之病毒培養液中被感染細胞的細胞病變效應推算抑制病毒能力。

測試目的試劑：JM 奈米新型複合材料

試劑提供：京程科技股份有限公司

桃園縣龜山鄉民生北路一段 40-2 號 5 樓之 3



測試內容

實驗材料

病毒株來源

腸病毒伊科十一型，來自於美國病理學會能力試驗病毒株。

宿主細胞

腸病毒使用 LLC-MK2 細胞株 (BCRC 60092)，購自生物資源保存及研究中心。

實驗方法

甲、 細胞培養

1. 將細胞株接種於 24 孔培養盤。
2. 以 Minimum Essential Medium (MEM) +8% Fetal Bovine Serum (FBS)，36°C、5%CO₂ 培養 48 小時至生長全滿。
3. 丟棄培養液，以 Phosphate Buffer Saline (PBS) 沖洗 2 次備用。

乙、 病毒製備

1. 將病毒接種於含有細胞株之培養管。



2. 以 MEM，36°C、5%CO₂ 培養至 48 小時至生成細胞病變。
3. 刮除細胞，離心 6000 rpm，2 分鐘。
4. 吸取上清液即為病毒懸浮液。
5. 將 120 uL 病毒懸浮液加入 1080 uL MEM，進行 10 倍稀釋。
6. 將 120 uL 稀釋液加入 1080 uL MEM，進行連續 10 倍稀釋。

編號	1	2	...	6	7	8	9
MEM (+ Trypsin)	900	900	...	900	900	900	900
病毒液	100	0	...	0	0	0	0
序列稀釋	 100 100 100 100 100 100						
最終體積	900	900	...	900	900	900	1000
最終濃度	10 ⁻¹	10 ⁻²	...	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹

丙、 病毒 TCID₅₀ 測試

對照組

24 孔培養盤的細胞株，第 1 欄 4 孔不接種為細胞株品管。第 2-6 欄腸病毒分別接種 10⁵ 倍、10⁶ 倍、10⁷ 倍、10⁸ 倍、10⁹ 倍稀釋之病毒懸浮液 200 uL。



實驗組

1. 將 100 uL 病毒懸浮液加入 400 uL MEM，進行 5 倍稀釋。
2. 將 50 uL 稀釋液加入 450 uL MEM，進行連續 10 倍稀釋。
3. 配製 1.25%消毒劑 (75 uL 消毒劑+5925 uL MEM)，上述每個稀釋液加入 450 uL。
4. 另外製備一個 1.25%消毒劑 450 uL 加入 MEM 450 uL，不含病毒，是為 JM 毒性測試。

編號	BC	B1	B2	B3	B4	B5
MEM (+ Trypsin)	450	450	450	450	450	450
病毒液	0	100	0	0	0	0
序列稀釋		50	50	50	50	丟棄 50
1.25%消毒劑	450	450	450	450	450	450
最終體積	900	900	900	900	900	900
病毒最終濃度	0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
消毒劑最終濃度	0.625%	0.625%	0.625%	0.625%	0.625%	0.625%

5. 室溫照 UV 一小時。
6. 24 孔培養盤的細胞株，第 1 欄 4 孔接種 JM 毒性測試，其餘 5 欄分別接種 10^1 倍、 10^2 倍、 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍稀釋之病毒懸浮液與 0.625% JM 作用後產物 200 uL。



實驗組與對照組均於 36°C、5%CO₂ 感染一小時，期間每 20 分鐘搖動混合一次。以每孔加入 MEM (+ Trypsin)，36°C、5%CO₂ 培養至 5 天，每天觀察細胞病變孔數。加入 4% Formaldehyde 1 mL，室溫靜置一小時，以自來水沖洗 2 次再加入 0.5% Crystal violet 1 mL，室溫靜置 5 分鐘。

丁、判讀與計算

1. TCID₅₀ 之計算採用 Reed-Muench method。
2. 抑制病毒效能之計算公式：

$$\text{抑制百分比} = [1 - 10^{-(\text{對照組 Viral load (Log}_{10}\text{TCID}_{50}) - \text{實驗組 Viral load (Log}_{10}\text{TCID}_{50})})}] \times 100$$



測試結果

腸病毒

Group	Viral load (Log ₁₀ TCID ₅₀)		
	1 st	2 nd	3 rd
病毒株	6.7	7.5	6.7
病毒株+JM	4.5	4.3	4.7
細胞株	None	None	None

計算抑制病毒效能：

以三次實驗結果平均值帶入計算：

$$\text{腸病毒抑制百分比} = [1 - 10^{-(7.0 - 4.5)}] \times 100 = 99.68$$

結論

本次實驗結果顯示，0.625%濃度的 JM 材料具有抑制腸病毒感染細胞之能力。經計算抑制能力約為 **99.68%**。