



長庚大學
Chang Gung University

長庚大學委託合作研究計畫書

研究名稱:

病毒崩抗冠狀病毒測試

計畫編號:

執行期間: 109/06/01- 109/07/31 共計 2 個月

計畫主持人: 施信如

執行機構: 長庚大學新興病毒感染研究中心

中華民國 109 年 07 月 15 日



長庚大學
Chang Gung University

一、研究背景

冠狀病毒在許多動物廣泛存在，過去也有數種冠狀病毒(human coronavirus)會感染人類造成普通感冒或肺炎。由於這類的病毒都具有外套膜，病毒顆粒大小約 120 nm，其中包裹一條長度大約 30,000 nucleotides 的正股 RNA，病毒外套膜上嵌有病毒 Spike 蛋白質，在電子顯微照相中看似王冠或日冕形狀，所以被稱為冠狀病毒。

在 SARS (嚴重急性呼吸道症候群) 爆發之前，人類冠狀病毒並未引起大眾注意，但是從 2002 年至 2020 年間連續爆發數起冠狀病毒影響人類健康。在 2002 年底至 2003 年間，中國爆發 SARS 疫情，台灣也在 2003 年 3 月有境外移入案例。因為造成的疾病嚴重，致死率也高(約 10%)，因此在台灣引起極大的恐慌。後來的科學研究發現造成 SARS 的病原為冠狀病毒的一種，並命名為 SARS-CoV。目前的研究認為這個病毒的天然宿主為蝙蝠，可能藉由中間宿主果子狸，傳播到人類。而在 SARS 疫情結束後的 9 年(2012 年)，科學家發現另一種冠狀病毒對人類造成嚴重疾病—MERS(中東呼吸道症候群)冠狀病毒感染症。這個感染症累計到 2019 年 9 月全世界總共約有 2500 人被確診，感染死亡率高達 34%。因此，MERS-CoV 是具有高致病力的冠狀病毒。目前研究認為 MERS-CoV 的最早來源仍為蝙蝠，藉由駱駝當中間宿主傳播到人類。正當 MERS-CoV 疫情受到控制時，在 2019 年底，中國武漢爆發不明原因肺炎，隨後證明這種肺炎是由新型冠狀病毒所引起，此病毒剛開始命名為 2019 novel coronavirus (2019-nCoV)，後來國際病毒命名委員會(ICTV) 將之命名為 SARS-CoV-2，而 WHO 將這個病毒所造成的疾病稱為 Coronavirus Disease-2019，簡稱 COVID-19。短短 6-7 個月內，根據 WHO(世界衛生組織)於 2020 年 7 月 5 所公布的數字全世界已有超過一千一百萬個確診案例，並有超過五十二萬個死亡案例。根據最新的研究，這個病毒的來源可能是蝙蝠，但是中間宿主至今仍未有定論。

本研究的目的是利用已建立之可定量性的冠狀病毒株 (229E)之技術，如病毒斑抑制分析(plaque reduction assay)，用以評估病毒崩是否具有殺滅冠狀病毒科 229E 病毒及抑制病毒活性的能力。期望能找出具有有效抗冠狀病毒能力的產品，對未來的病毒傳播防治工作有所助益。

二、計劃目的

研究病毒崩是否具有殺滅冠狀病毒科冠狀病毒 229E 的效果，並有其宣稱的功效及品質。



長庚大學
Chang Gung University

三、研究方法及執行步驟

I、實驗材料與器材

測試材料名稱: 病毒崩

細胞株 — Huh 7 cell (human liver cell line)

病毒株 — Coronavirus 229E

細胞培養 — Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco	
Fetal bovine serum	Gibco	
Non-essential amino acid	Gibco	
Antibiotic-antimycotic	Gibco	
Sodium bicarbonate	J.T.Barker	
Sodium phosphate	Sigma	
Trypsin-EDTA (2.5%)	Gibco	
Plaque assay — (Neutralization test)	Agarose	Amersco
	Crystal violet	J.T.Barker
	Formalin	Riedel-deHAen

II、實驗流程

1、細胞培養(cell culture)

將細胞培養於 10% FBS DMEM 培養液中，置於含 5% CO₂ 之 37°C 培養箱中培養。細胞繼代培養時先以 PBS wash 細胞兩次，接著加入適量之 trypsin-EDTA 處理細胞，待細胞由培養皿表面脫落後，加入 10% FBS DMEM 培養液，將細胞均勻打散分置於培養皿中，置於含 5% CO₂ 之 37°C 培養箱中培養。

2、病毒培養(virus amplify)

Coronavirus 229E 以 Huh7 cells 培養，將細胞培養於 10% FBS DMEM 培養液中，待其長至約九分滿時，以 PBS 清洗，以 multiplicity of infection (M.O.I) 約 0.01 的病毒量去吸附感染細胞，並加入 0% FBS DMEM 培養液，置於含 5% CO₂ 之 35°C 培養箱中培養約 48 小時。當有 50% 的細胞發生 cytopathic effect (CPE) 時，則收下所有包含病毒及 CPE 細胞的培養液，以 2000rpm 離心 10 分鐘，收集所有上清液並分裝貯存於 -80°C 冰箱中。



3、抗病毒試驗(antiviral assay)

i. 細胞準備

將細胞以 trypsin-EDTA 打下後，用含 10% FBS 之 DMEM 培養液將細胞濃度調成 6×10^5 cells/ml，取 1 mL 接種至 6 孔盤，置於 5% CO₂ 之 37°C 培養箱中培養 18~24 小時備用。

ii. 病毒與待測物作用

病毒崩分別以濃度 100ppm, 300ppm, 及 500ppm 濃度溶於乙醇水溶液(乙醇：水=1:10)中。將此溶液分別與上述含有病毒之細胞培養液 9:1 等量混合，室溫(約 25°C)下靜置 30 分鐘。此為病毒處理組。相同的病毒崩濃度，與等量未添加病毒的細胞培養液進行如上述相同的作用，作為對照組。

iii . Antiviral assay

在已加入細胞的 6 孔盤中，加入已與病毒作用後的病毒崩，當成待測物，並將此待測物作 10 倍序列稀釋至 10 的-8 次方，再置回培養箱培養 48-64 小時。最後用 10%福馬林固定細胞 1 小時，再以 0.1%結晶紫染色 5 分鐘。計數病毒斑相較於對照組的數目，來得知待測樣品之抗病毒能力。

iv. 數據及結果呈現:

以 0.1%結晶紫染色後，並利用公式算出病毒斑抑制的效果。結案報告結果需呈現病毒崩對於 Coronavirus 229E 的抑制效果之結果圖表。

四、研究成果

將病毒崩分別以濃度 100ppm, 300ppm, 及 500ppm 濃度溶於乙醇水溶液(乙醇：水=1:10)中。將此溶液分別與上述含有病毒之細胞培養液 9:1 等量混合，室溫(約 25°C)下靜置 30 分鐘。此為病毒處理組。相同的病毒崩濃度，與等量未添加病毒的 2 倍濃度的細胞培養液進行如上述相同的作用，作為對照組。實驗結果顯示，病毒崩 100ppm, 300ppm, 及 500ppm 皆可抑制病毒產生病毒斑的能力(virus plaque forming)，抑制病毒效果為>99.99 %。綜合以上抑制冠狀病毒 229E 的實驗結果顯示，病毒崩具有抑制冠狀病毒 229E 之功效。



長庚大學
Chang Gung University

五、圖表

表一、病毒崩抑制冠狀病毒 229E 之結果

病毒崩	Viral inhibition rate (%)		
	Test 1	Test 2	Test 3
500ppm	>99.99%	>99.99%	>99.99%
300ppm	>99.99%	>99.99%	>99.99%
100ppm	>99.99%	>99.99%	>99.99%

將曼妮藝能有限公司病毒崩產品，與冠狀病毒 229E，於室溫依實驗室標準作業時間，反應 30 分鐘之後，將液體加入細胞中，觀察病毒產生病毒斑能力(virus plaque forming)，Viral inhibition rate (%)數值越高，代表抑制病毒能力越好。

注意事項:

- 一.本報告僅就委託單位所提供之樣品進行測試。
- 二.本測試報告數據更正無效。

長庚大學
新興病毒感染研究中心