

2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 050001

參展科別 動物學

作品名稱 蚊幼蟲與搖蚊幼蟲在水中分布與其血紅蛋白基因表現之關係

得獎獎項 四等獎

就讀學校 臺北市立華江高級中學

指導教師 黃佳茵、蔡瑞穎

作者姓名 蔡景堯、楊有螢、蕭宜姍

關鍵詞 蚊幼蟲、呼吸、血紅蛋白

作者簡介



圖、華江高中科展團隊
(左)蔡景堯、(中)蕭宜姍、(右)楊有螢

華江科展團隊成員對生命科學研究深感興趣，團員們融合生物、化學和數理專長，分工進行實驗設計和操作、實驗數據統整分析、PPT 簡報製作等。在生物科和化學科二位專題指導老師及大學教授指導下，首次以子子的呼吸為探究主題。過程中除了學習野外採集和生態觀察技巧，同時也自行設計基礎科學實驗，並至大學實驗室研習操作分子生物實驗。在不斷實驗失敗和疫情威脅的雙重打擊下，團隊成員相互勉勵、反覆修正實驗條件，最終獲得可信的證據，解答我們心中的疑問和假說。這些寶貴經驗，都將是我們在生命科學領域持續探索和深入研究的養分和基石。

摘要

蚊蟲呼吸透過氣管系統，本研究假設底棲孑孓與搖蚊幼蟲具備血紅蛋白系統以擷取氧氣。戶外採集 8 種孑孓和 1 種搖蚊幼蟲，錄影觀察白腹叢蚊、竹生翠蚊和鹽埕搖蚊幼蟲長時間停留底層；家蚊、斑蚊則反覆上下至水面呼吸。顯微鏡下發現白腹叢蚊幼蟲體壁內側充滿紅點，色澤隨著富氧或缺氧而變化；然二種斑蚊則不明顯。PCR 增殖 6 種蚊蟲和 1 種搖蚊血紅蛋白基因片段並建構親緣關係樹。定量 RT-PCR 顯示，白腹叢蚊與鹽埕搖蚊在缺氧條件下，血紅蛋白相對表現量分別增加 5 倍和 150 倍，上層埃及斑蚊和白線斑蚊則增加 3.9 倍和 1.5 倍。西方墨點法證實孑孓缺氧條件下，17-kDa 血紅蛋白皆有大量表現。本研究首次確定 6 種蚊蟲具血紅蛋白基因，證明孑孓血紅蛋白基因在缺氧下的表現量增加，包括 mRNA 與蛋白質。此等反應氣候變遷，暖化導致水溫升高與低溶氧條件下，蚊蟲可能有因應環境改變的呼吸機制。未來將進一步標識血紅蛋白在蚊幼蟲體內組織之表現與其他環境變因之影響。

Abstract

Insects breathe through a tracheal system. The hypothesis of this study was that the mosquito larvae which often stay at the bottom of water have a hemoglobin system to help them to acquire oxygen like chironomids. Eight species of mosquito larvae and 1 chironomid larvae were collected in the field. Video recordings showed *Armigeres subalbatus*, *Tripteroides bambusa*, and *Chironomus circumdatus* stayed at the bottom of water most of the time, whereas *Culex* spp. and *Aedes* spp. repeatedly swam to the surface to breathe. Red spots whose darkness changed with oxygen enrichment were observed in the inner side of the body wall of the larva of *Ar. subalbatus* but not in *Aedes* larvae under microscope. Fragments of the hemoglobin gene from 6 species of mosquitoes and *Ch. circumdatus* were amplified by PCR, and their phylogenetic relationship was analyzed. Real-time RT-PCR showed that when hypoxia, the relative expression fold of hemoglobin genes increased by 5 and 150 times in benthic *Ar. subalbatus* and *Ch. circumdatus*, respectively, while it increased in *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* larvae by 3.9 and 1.5 times, respectively. Western blot confirmed a 17-kDa hemoglobin protein was increasingly expressed under hypoxic condition. The study identified hemoglobin genes in 6 mosquitoes for the first time and moreover, proved that the expression of the hemoglobin genes, including both mRNA and protein levels, was affected by hypoxia. The results implied mosquitoes may possess an alternative respiration mechanism in response to changes in the environment, such as rising water temperature and low oxygen concentration resulted from climate warming. In the future, we will use immunofluorescence assay to verify the expression of hemoglobin in various tissues of larvae and further investigate the influence of other environmental factors.

一、 前言

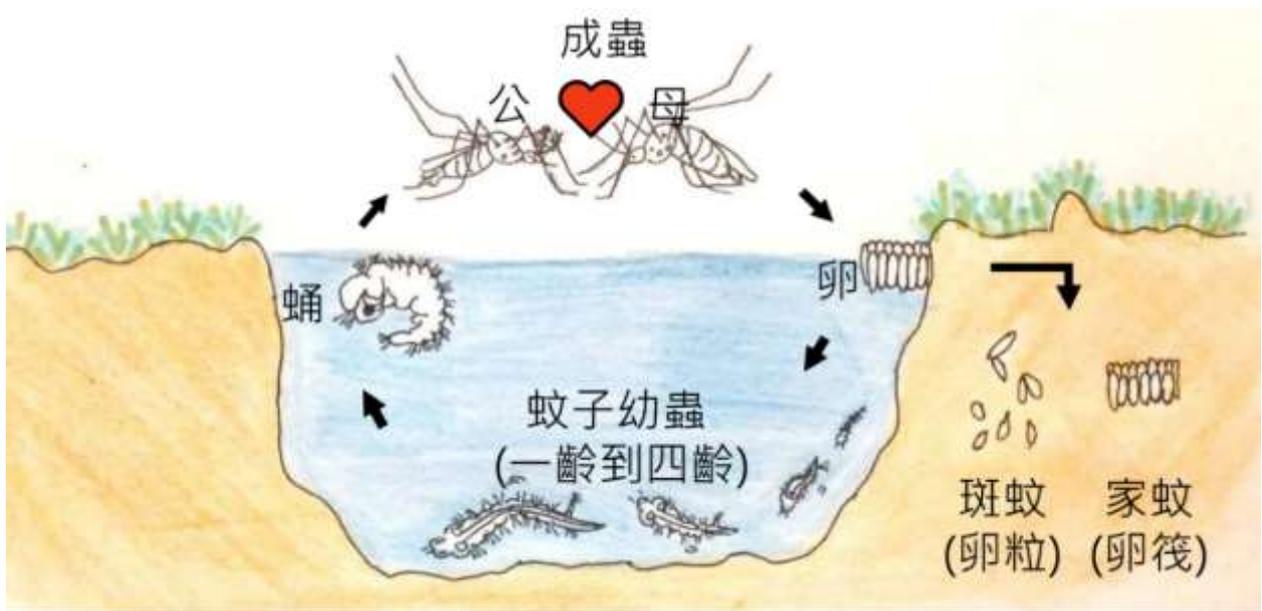
(一) 研究動機

有一次下雨天，我發現我們家旁邊的水桶中有一隻一隻黑色在蠕動的小生物，那是孑孓，蚊子的幼蟲。孑孓只要有積水的環境就能生存，例如社區的積水水桶、花盆底部的凹槽積水、竹子的凹洞口積水，都是得以讓牠們孳生的環境。然而，不同地區積水的孑孓，在水中生活的水層分布好像不大相近。有的浮在水表面、有的躲在落葉樹枝底部、有的生活在水底部或泥土中。像搖蚊幼蟲（紅蟲）就是生活在底層，紅蟲能不上水岸呼吸，在水底就能得到牠所需的氧氣，牠們存活的策略主要依賴體內的血紅蛋白，透過體內的血紅蛋白從水中的溶氧轉換成氧氣。那同樣生活在較底層的孑孓，除了使用呼吸管吸取空氣獲得氧氣，是不是也有相同的機制，讓牠們遭遇缺氧條件的時候得以讓牠們在水中獲得氧氣度過危機？於是我們展開這個题目的探究，透過試驗、與老師討論和文獻閱讀，開啟了這個主題實驗。

(二) 研究目的

蚊蟲的幼蟲主要生活在水中（圖一），本研究想了解孑孓生活水中分布是否與其呼吸管比值、氣管長度、氣泡大小、閉氣換氣頻率有關聯。並且連結搖蚊幼蟲的血紅蛋白，推測孑孓體內是否也有此色素蛋白，釐清孑孓呼吸獲得氧氣的策略，包括 1.用呼吸管到水面呼吸，透過氣管傳送空氣；2.透過體內血紅蛋白捕捉氧氣，成為氧氣的替代來源。

第一階段，探討不同種類的四齡孑孓在水中分布差別的可能原因，確認是否與環境條件、生態習性、呼吸管比值、氣管長度、氣泡大小等有關。第二階段，以 PCR 方法增幅、定序蚊蟲與搖蚊的 *COI* 基因、*housekeeping* 基因和血紅蛋白等基因。第三階段，以定量 RT-PCR 方法，比較富氧和缺氧條件下，蚊蟲與搖蚊血紅蛋白之 RNA 表現量。第四階段，以 *E. coli* 基因重組技術，表現基因重組血紅蛋白，並生產抗血紅蛋白之單（多）株抗體。最後透過西方墨點法分析血紅蛋白表現量之差異。



圖一、手繪蚊蟲生活史

二、 研究方法與過程

(一) 採集器材：滴管 (剪短)、濾網、透明寶特瓶、白色紙碗 (表一)。

(二) 實驗儀器和材料：複式顯微鏡、解剖顯微鏡、單分子生物油膜 (積水防蚊薄膜)、微量吸量器、行車紀錄器、目鏡測微器、二氧化碳、pH 值測量儀器、溶氧測量儀器、懸滴玻片、載物台測微器、自製黑色箱子、甘油、試管、試管架、蓋玻片、壓克力觀察立板、紙 (分層)、250mL 燒杯、25mL 樣本瓶、乾浴槽、蛋白質電泳槽、轉印電泳槽、DNA 電泳槽、定量 PCR 反應器、PCR 反應機器、蛋白質照膠相機組、DNA 照膠相機組 (表二)。

表一、採集器材

			
滴管	濾網	寶特瓶	白色紙碗

表二、實驗儀器和材料

			
複式顯微鏡 (Motic)	解剖顯微鏡 (Motic)	積水防蚊薄膜 (HK pesticide)	微量吸量器 (DLAB) (100~1000 μ L)
			
微量吸量器 (AXYGEN) (0.1-2.0 μ L)	行車紀錄器 (PX)	目鏡測微器 (Motic)	懸滴玻片 (日製)
			
載物台測微器 (日製)	自製黑色箱子	玻璃紙	甘油
			
二氧化碳	pH 值測量儀器 (EXTECH)	溶氧測量儀器 (EXTECH)	自製壓克力 觀察立板

			
乾浴槽 (Thermo)	蛋白質電泳槽 (BIO-RAD)	轉印電泳槽 (Hoefer)	DNA 電泳槽 (Labnet)
			
定量 PCR 反應器 MyiQ Thermal Cycler (BIO-RAD)	PCR 反應機器 Thermal Cycler (Biometra TRIO)	蛋白質照膠相機組 UVP ChemStudio PLUS Touch (Analytik Jena)	DNA 照膠相機組 BioDoc-IT TM Imaging System (Analytik Jena)

(三) 實驗架構

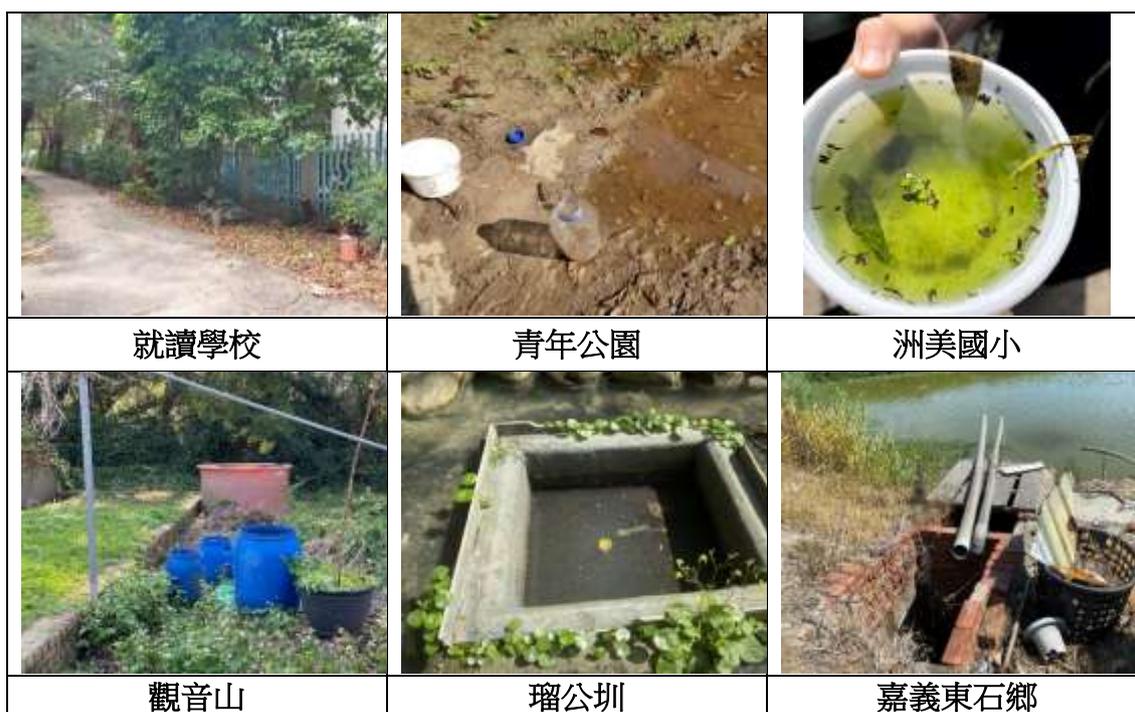


圖二、「蚊幼蟲與搖蚊幼蟲在水中分布與其血紅蛋白基因表現之關係」研究架構

(四) 採集

我們先查閱蚊蟲喜歡孳生環境的文獻，進而尋找目標地點。我們以學校為出發點，延伸至附近周圍 (圖三)。實驗蚊蟲幼蟲齡期皆為四齡。

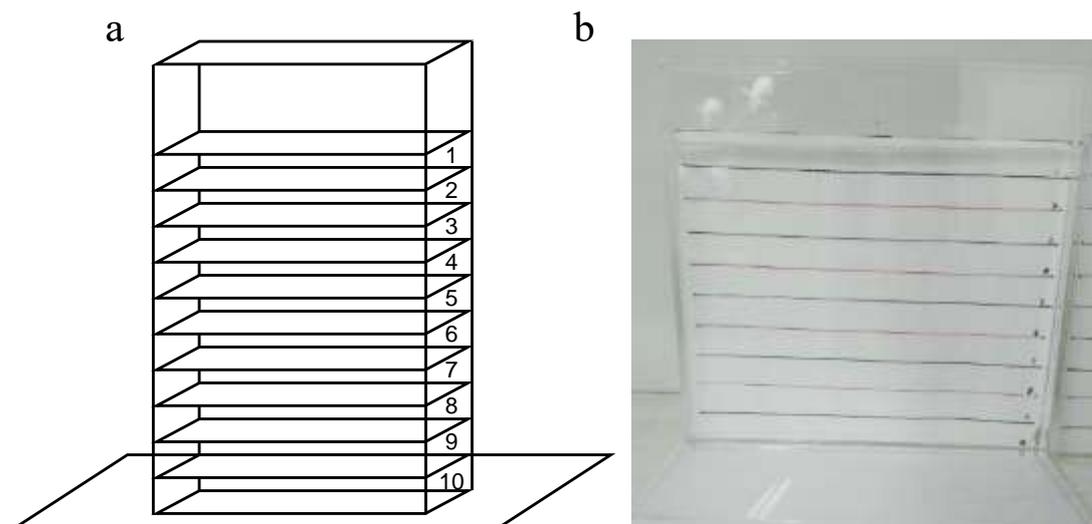
1. 就讀高中：本校所採集到的白線斑蚊幼蟲 (登革熱病媒蚊) (衛生福利部疾病管制署，2017；羅林巧等，2014)，發現位置在樹蔭下的水桶，陰暗較潮濕的地方，水面中較不容易觀察到孑孓，大部分躲在落葉、樹枝下方。
2. 青年公園：位於萬華區，發現孑孓在大型黑色水桶中，採集到白線斑蚊幼蟲及些微的紅蟲，也是喜歡躲在落葉、樹枝底部。
3. 洲美國小：查閱資料發現蚊蟲常生長在農田，我們認為洲美國小附近的農田很有可能蚊蟲孳生，此地點所採的種類為熱帶家蚊幼蟲 (絲蟲病病媒) 及紅蟲，發現在農田旁的臭水溝，可以明顯觀察到孑孓都停留在水面，紅蟲則躲在底層泥土中。
4. 觀音山：位在新北市五股區、八里區，採集到的種類為莫氏家蚊幼蟲，採集位置多在附近農田的儲水桶，莫氏家蚊幼蟲明顯的浮在水面，肉眼可明顯看到。
5. 瑠公圳：位於新北市新店區，發現在瑠公圳的下游水溝，採集種類為白線斑蚊幼蟲。
6. 嘉義東石鄉：在魚塭附近的靜止水面，有腐質物、屍體堆積，屬於鹹水環境，採集到的孑孓為鹹水家蚊 (日本腦炎和馬來絲蟲的病媒)。



圖三、孑孓採集地點照片

(五) 分層積分實驗

畫出 10 個上下等高分區，取 10 隻同種類四齡孑孓放入壓克力觀察立板 (圖四)，以行車紀錄器紀錄，拍下第 30 分鐘孑孓在水中的分布 (無任何干擾的情況)，記錄 10 隻四齡孑孓停留的水層位置並計算積分，可以推論各種類的孑孓待在水中的水層位置，每種孑孓實驗重複三次。



圖四、分層積分實驗壓克力觀察立板示意圖

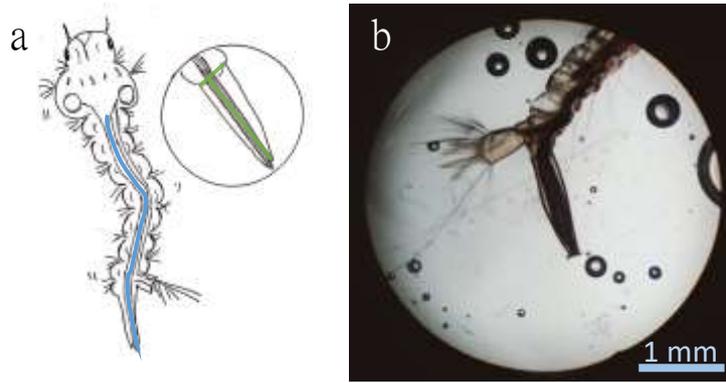
(a) 卡通示意圖；(b) 實體圖

(六) 閉氣換氣實驗

1. 干擾實驗：將十隻同種類四齡孑孓放入黑箱，蓋上不同顏色玻璃紙 (實驗組) 與不蓋玻璃紙 (對照組) 進行實驗，計算閉氣換氣時間。目的為確認紅色玻璃紙蓋在黑箱上可以使孑孓最安定，不受干擾。
2. 閉氣時間：從孑孓呼吸管離開水面開始計時，直到孑孓呼吸管再次碰到水面結束。
3. 換氣時間：從孑孓呼吸管碰到水面開始計時，直到孑孓呼吸管離開水面結束。
4. 取十隻同種類四齡孑孓個別放入試管，放入黑箱，蓋上紅色玻璃紙錄影一小時，利用影片計算孑孓閉氣與換氣時間。

(七) 呼吸管比值量測

我們觀察到不同種類孑孓呼吸管長短、細寬有很大的區別，於是想探討孑孓在水中的分布與呼吸管比值的關聯性。將四齡孑孓製成懸滴玻片標本，放入複式顯微鏡中，使用相機拍下孑孓呼吸管部位，利用量尺計算呼吸管長寬。每一種類量測五隻以上 (圖五)。



圖五、呼吸管長寬比值計算

(a) 四齡子孓呼吸系統；(b) 顯微鏡下四齡子孓的呼吸管

(八) 氣管長度實驗

將四齡子孓製成懸滴玻片標本，放入複式顯微鏡拍照，計算不同種類子孓氣管長度 (圖五 a)。

(九) 氣泡大小實驗

滴 150 微升甘油於帶有子孓的玻片，以 40 倍複式顯微鏡觀察並用相機記錄 (圖六)。

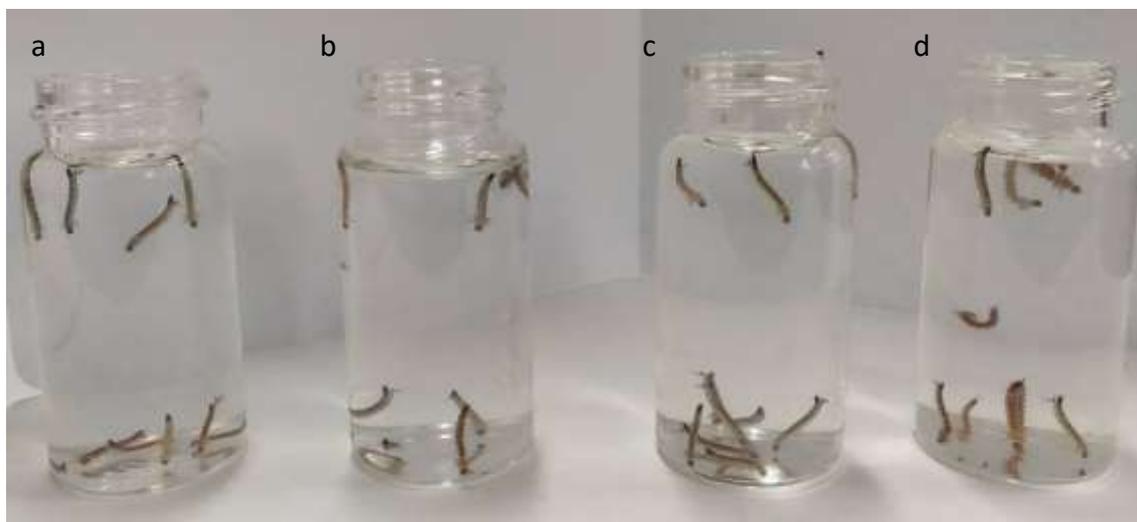


圖六、觀察四齡子孓呼吸管排出的氣泡大小

- (a) 藍色圓圈為家蚊幼蟲排出之氣泡；
- (b) 圓圈為斑蚊幼蟲排出之氣泡；
- (c) 以微量吸量器打入定體積氣泡做線性計算

(十) 單分子生物油膜實驗

將 10 隻四齡孑孓放入 25mL 樣本瓶，實驗組分別滴入 50 μ l 單分子生物油膜阻絕空氣，定時計算孑孓累積死亡率。實驗組三組，一組對照組 (圖七)。



圖七、10 隻四齡孑孓於 25mL 樣本瓶

a-c：實驗組；d：對照組

(十一) 蚊蟲孑孓血紅蛋白之 RNA 表現與蛋白質分析

1. 顯微鏡觀察孑孓體色

將孑孓製成懸滴玻片標本，放入複式顯微鏡拍照，觀察拍照記錄孑孓體色。每一種類觀察五隻。

2. 富氧與缺氧對孑孓體色之影響

以打氣製造富氧水，以二氧化碳製造缺氧水。將白腹叢蚊幼蟲放入燒杯 30 分鐘之後，移至顯微鏡下觀察蟲體，實驗重複三次。

3. 血紅蛋白之文獻回顧

根據 Herhold 等人 (2020) 綜合回顧文獻，雙翅目 (Diptera) 昆蟲已經證實搖蚊科 (*Chironomus* sp.; Chironomidae) 幼蟲具有血紅蛋白基因，並已確認這個血紅蛋白分佈在細胞外；另一種寄生性膚蠅科 (*Gasterophilus intestinalis*; Oestridae) 幼蟲的血紅蛋白則分佈於細胞內。這二種血紅蛋白都與 Fe^{2+} 鍵結有關。除此之外，就沒有進一步的文獻或證據可以證實。相關文獻彙整如下 (表三)：

表三、昆蟲的血紅蛋白研究彙整 (整理自 Herhold 等人 (2020))

雙翅目/物種	科	生活史階段	形式	與呼吸相關?	位置	Fe ²⁺ 鍵結/結構
<i>Chironomus</i> spp.	Chironomidae 搖蚊科	幼蟲	various	是	細胞外	Monomers, dimers
<i>Chironomus tentans</i>	Chironomidae 搖蚊科	成蟲	Ctglob1	否/?	細胞外	
<i>Drosophila melanogaster</i>	Drosophilidae 果蠅科	成蟲	Dmglob1	可能	細胞內	Hexa-coordinate/ Monomer
			Dmglob2	否/?	細胞內	Monomer
			Dmglob3	否/?	細胞內	Monomer
<i>Anopheles gambiae</i>	Culicidae 蚊科	幼蟲	Agglob1	可能	細胞內	
			Agglob2	可能	細胞內	
<i>Aedes aegypti</i>	Culicidae 蚊科	幼蟲	Aaglob1	可能	細胞內	
			Aaglob2	可能	細胞內	
<i>Gasterophilus intestinalis</i>	Oestridae 虜蠅科	幼蟲	Giglob1	是	細胞內	Pentacoordinate/ Dimer
<i>Glossina morsitans</i>	Glossinidae 舌蠅科		Gmglob1	可能	細胞內	

4. 蚊蟲血紅蛋白之 RNA 表現

搜尋 NCBI 網站序列資料庫 (National Center for Biotechnology Information) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)，下載蚊科相關血紅蛋白之 mRNA 序列資料，利用 BioEdit 7.2 軟體編輯血紅蛋白的 mRNA 序列 (<https://bioedit.software.informer.com/7.2/>)。透過 MEGA 軟體進行基因序列排序 (<https://www.megasoftware.net/>)。找出序列規則，以 DNA Star (LaserGene) 設計 RT-PCR 的引子位置，提供後續 RT-PCR 增幅蚊蟲血紅蛋白之 RNA 序列之用。

蚊蟲的血紅蛋白新引子設計分列如下：F1 (5'-CTC AGC ACA GGC ATA ACT CC)；F2 (5'-ATA ACT CCG GAT CAA AGA CAT GTT CT)；R1 (5'-GAA GTT GAG AAA GCG AAG CAT TAG)；R2 (5'-CAT CAG GAA CTA ATA TCG TGT TTG CTA)；R3 (5'-GTC GTC CCG ACA TTT ACG TAG AAG GT)。House keeping 基因 Rp49-F (5'-CCG GAA GGT GTT AGT CCA CAA C)；Rp49-R (5'-CGG CGC AGT ACT TCC TAT TCT G)。

搖蚊的血紅蛋白引子分列如下：CteHb-IIIF (5'-CAT TGG TCC GTG CAT CAT GGA ATC)；CteHb-IIIR (5'-TAG CGA AGA TCA TTG TGA AGG CGT)，預期片段大小為 405-bp。CteHb-IIIIF (5'-GCA CAG TCC AAG CAT CAT TCG ACA) 和 CteHb-IIIR (5'-TGG CGA AGA TCA TTC CGA AGA AGG)，預期片段大小為 384-bp。House keeping 基因 actin forward (5'-GAT GAA GAT CCT CAC CGA ACG)；actin reverse (5'-CCT TAC GGA TAT CAA CGT CGC)，預期片段大小為 201-bp。

RT-PCR 反應之試劑配置如下：Master Mix 12.5 ul、Primer F 1.0 ul、Primer R 1.0 ul、cDNA 1.0 ul、DEPC H₂O 9.5 ul，總體積為 25.0 ul。即時定量 RT-PCR 反應之試劑配置如下：DEPC H₂O 5.4 ul、Primer F 0.4 ul、Primer R 0.4 ul、KAPA 10.0 ul、10X KAPA Buffer 0.4 ul、dUTP 0.4 ul、cDNA 3.0 ul、總體積為 20.0 ul。反應條件參考試劑和引子標準條件修改後測試，確定後上機進行實驗。

5. 基因重組蚊蟲血紅蛋白

以埃及斑蚊 RNA 為材料，利用引子 FIR3 加上 NdeI/XhoI 等限制酶切位，增幅部分片段 417 bp (約 135 a.a.)，與 pET-30a(+) 共同反應酶切、黏合之後，利用 heat shock 方法送入 TOP10 細胞，塗抹於含 Kanamycin 抗生素之洋菜膠盤，於 37°C 中培養過夜。

挑選菌株，於液態培養基中搖菌，加入 IPTG 誘導大量表現目標蛋白質 (約 15.4 kDa)，以 12% SDS-PAGE 分離不同蛋白片段。後續再以含鎳之膠體管柱純化特定重組蛋白質，混加佐劑後免疫兔子二次以生產抗體。

將不同處理組之子子均勻研磨後，以 12% SDS-PAGE 分離不同蛋白片段，轉印蛋白質至 PVDF 試紙，以上述一級抗體 (500X⁻¹) 和二級抗體 (12000 X⁻¹) 加入脫脂奶粉反應後，以 PBS-T 潤洗三次，每次 15 分鐘。最後以 ECL 呈色進行 Western blot 分析。

三、研究結果與討論

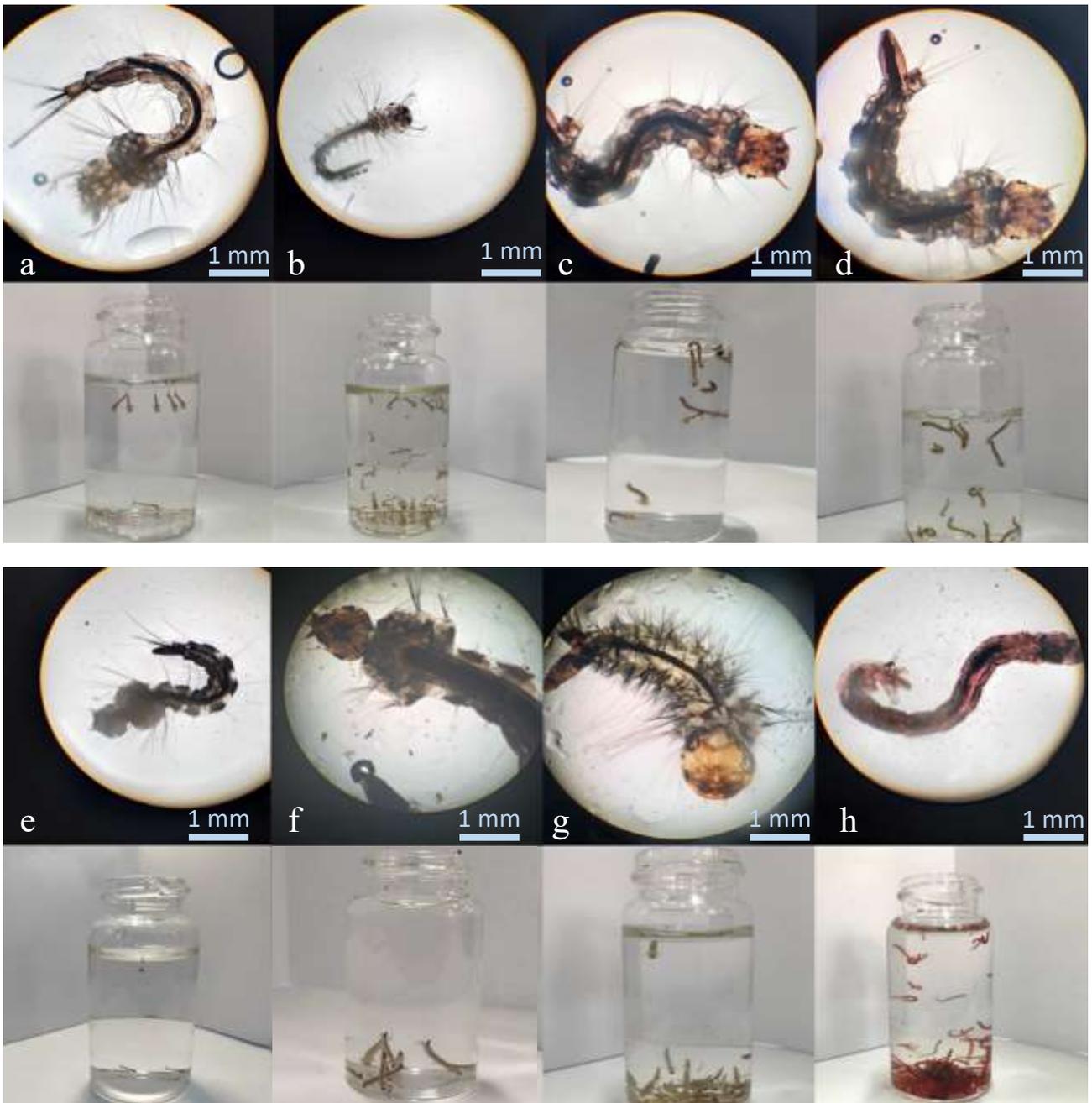
(一) 採集結果

戶外調查記錄 8 種子子和 1 類搖蚊幼蟲，包括家蚊屬的熱帶家蚊、鹹水家蚊、雙角家蚊和莫氏家蚊；斑蚊屬的白線斑蚊；翠蚊屬的竹生翠蚊；叢蚊屬的白腹叢蚊；小蚊屬的新黑小蚊；以及搖蚊幼蟲 (基因序列比對為鹽埕搖蚊 *Chironomus circumdatus*；最高相似 99.85%) 等 (表四、圖八)。

其中熱帶家蚊、埃及斑蚊、白線斑蚊、白腹叢蚊、竹生翠蚊取得數量較多，第三項至第六項實驗結果以此五種蚊蟲四齡子子為主。

表四、戶外蚊幼蟲採集紀錄

地點	時間	生態環境特性	有無光線	物種	水中分布	水面是否靜止
就讀高中 (廢棄積水桶)	下午 5 點	落葉雜樹、 陰暗潮濕	無	白線斑蚊	中上層	是
青年公園 (積水水桶)	早上 9 點	腐質物、 排水道、水桶	有	白線斑蚊 搖蚊幼蟲	中下層 下層泥土	是
洲美國小 (附近農田水溝)	中午 12 點	農田、溪水、 糞便、腐質物	有	熱帶家蚊 雙角家蚊 搖蚊幼蟲	中下層 中下層 下層泥土	是
觀音山 (農田、竹林)	中午 12 點	糞便、 有養牲畜	有	莫氏家蚊 竹生翠蚊 新黑小蚊	上層	是
瑠公圳 (附近水溝)	早上 10 點	大樓排水道 、陰暗潮濕	無	白線斑蚊 白腹叢蚊	上層	是
嘉義東石 (魚塢溝渠)	下午 2 點	海水排水溝、 淡水水溝	有	鹹水家蚊 熱帶家蚊	上層	是

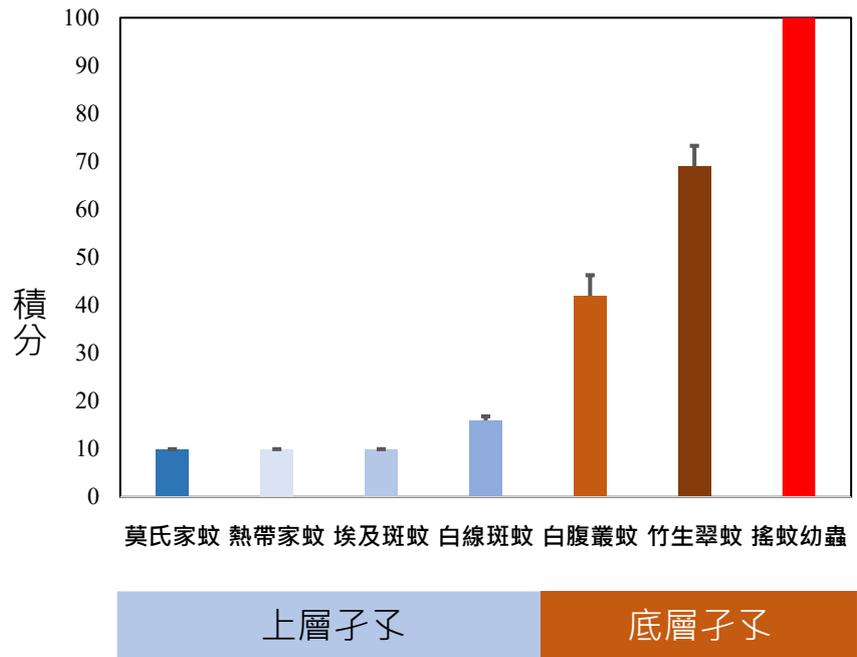


圖八、戶外蚊幼蟲採集與水中活動位置觀察

- a：雙角家蚊 (*Culex bicornutus*)；b：熱帶家蚊 (*Culex quinquefasciatus*)；
c：埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*)；d：白線斑蚊 (*Aedes albopictus*)
e：新黑小蚊 (*Uranotaenia novobscura*)；f：白腹叢蚊 (*Armigeres subalbatus*)；
g：竹生翠蚊 (*Tripteroides bambusa*)；h：搖蚊 (*Chironomidae*)

(二) 孑孓與搖蚊幼蟲水中分布之分層積分

由分層積分的積分結果，我們將積分超過 35 定義為底層孑孓，而積分小於 35 定義為上層孑孓，其中上層孑孓有莫氏家蚊、熱帶家蚊、埃及斑蚊、白線斑蚊，底層孑孓有白腹叢蚊、竹生翠蚊、搖蚊幼蟲，後續研究與統計數據相關說明以上層孑孓與底層孑孓做分類 (圖九)。



圖九、各種類子孑在水中分層積分結果

(三) 不同水層子孑之呼吸管、氣管系統和換氣閉氣之關聯性比較

由統計分析可得知不同水層子孑於氣管長和閉氣平均有顯著差異，所以上層子孑與底層子孑的氣管長和閉氣平均是有分別的(表五)。四齡子孑體內的氣泡大小與其分布位置差異不顯著。

表五、不同水層子孑之呼吸管、氣管系統和換氣閉氣之關聯性比較

	上層子孑 ^a (M±SD)	底層子孑 ^b (M±SD)	p value
呼吸管比值	2.80±0.87	2.54±1.23	0.387
氣管長 (mm)	5.10±0.86	6.01±1.56	0.025*
閉氣平均 (sec)	63.4±54.6	131.7±116.3	0.022*
換氣平均 (sec)	45.4±72.6	40.2±45.2	0.779
氣泡大小 (mm ²)	1.03±2.17	2.15±2.96	0.128

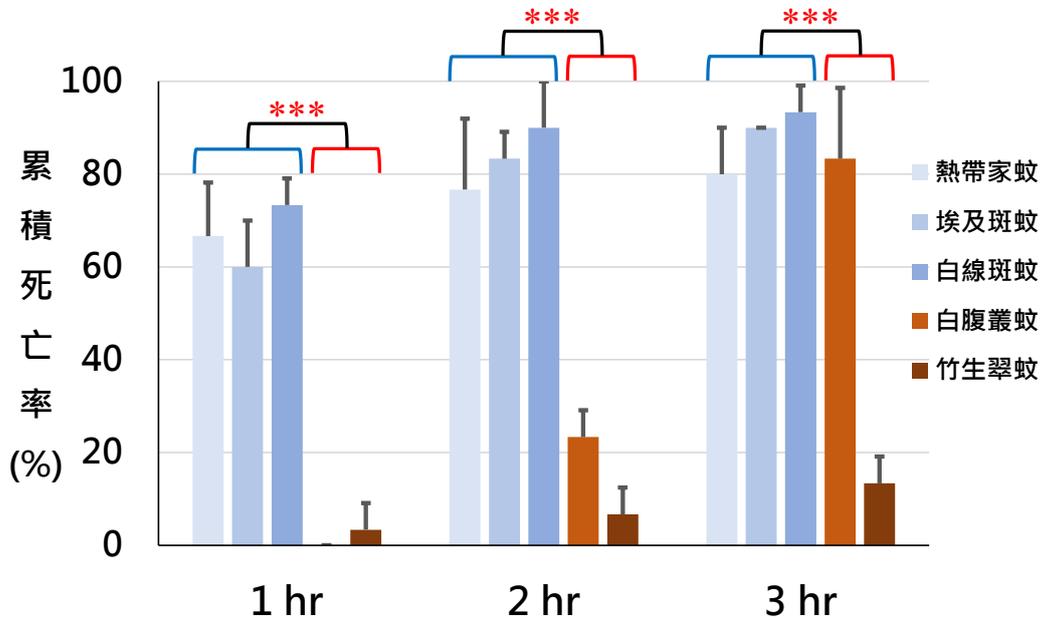
備註：a. 上層子孑以熱帶家蚊、埃及斑蚊、白線斑蚊做統計。

b. 底層子孑以白腹叢蚊、竹生翠蚊做統計。

* = p<0.05 。

(四) 五種蚊蟲四齡子子每小時累積死亡率

由統計分析可得知不同水層子子於 1 小時、2 小時、3 小時的累積死亡率有顯著差異，所以上層子子與底層子子的累積死亡率有很大的差別，特別是 1 小時的累積死亡率上層子子超過 50% 而底層子子低於 20% (圖十)。

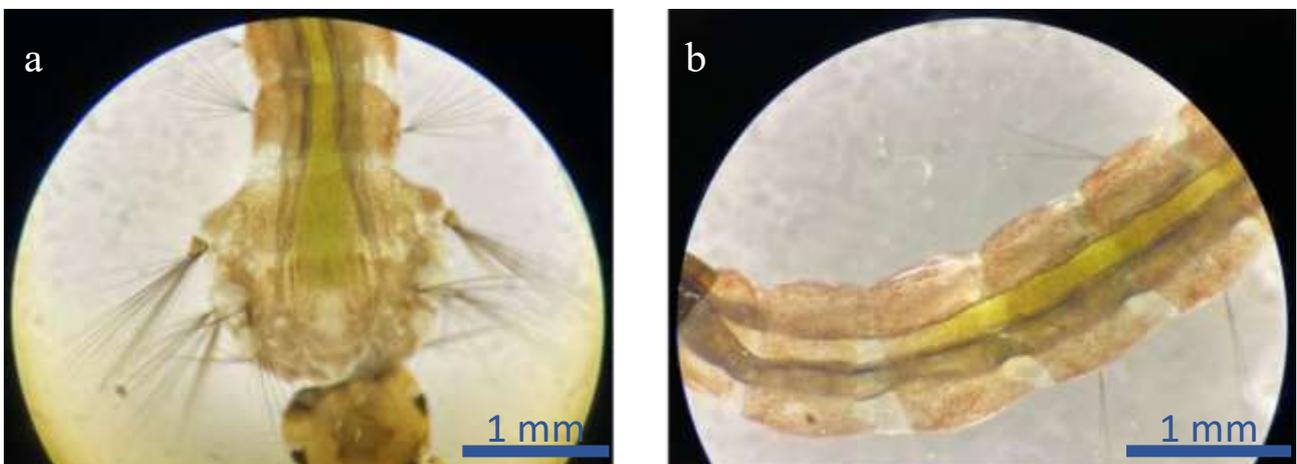


圖十、五種蚊蟲四齡子子每小時累積死亡率 (***) $p < 0.001$

(五) 蚊蟲血紅蛋白之 RNA 表現與蛋白質分析

1. 顯微鏡觀察子子體色

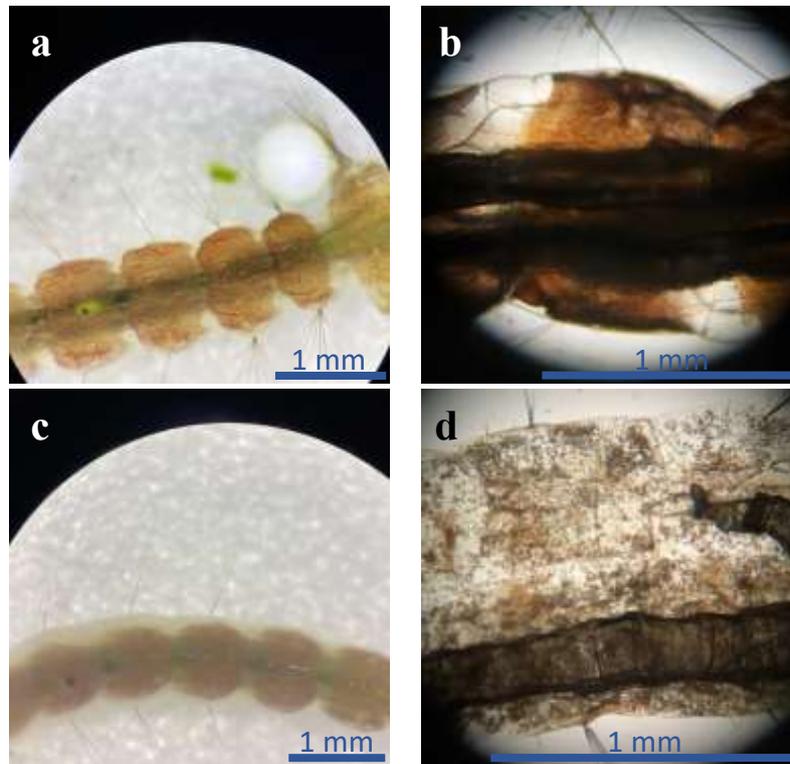
延續上述實驗，白腹叢蚊為底棲停留較久且體色略紅的子子。第一步先將四齡子子製成懸滴玻片標本，放入正立顯微鏡觀察，拍照記錄子子體色，結果發現子子胸部和身體腹部有紅色的點狀物 (圖十一)。



圖十一、觀察白腹叢蚊四齡幼蟲 (a) 頭胸部和 (b) 尾部之紅色點狀物區塊

2. 富氧與缺氧對孑孓體色之影響

利用打氣機和二氧化碳製造分別製作富氧和缺氧的水體環境，將新鮮四齡白腹叢蚊幼蟲放入水體中，三十分鐘後觀察孑孓體色之變化。結果顯示富氧水體的白腹叢蚊身體較鮮紅，缺氧水體之白腹叢蚊體色則是較暗沉（圖十二）。



圖十二、白腹叢蚊四齡幼蟲在顯微鏡底下的體色照片

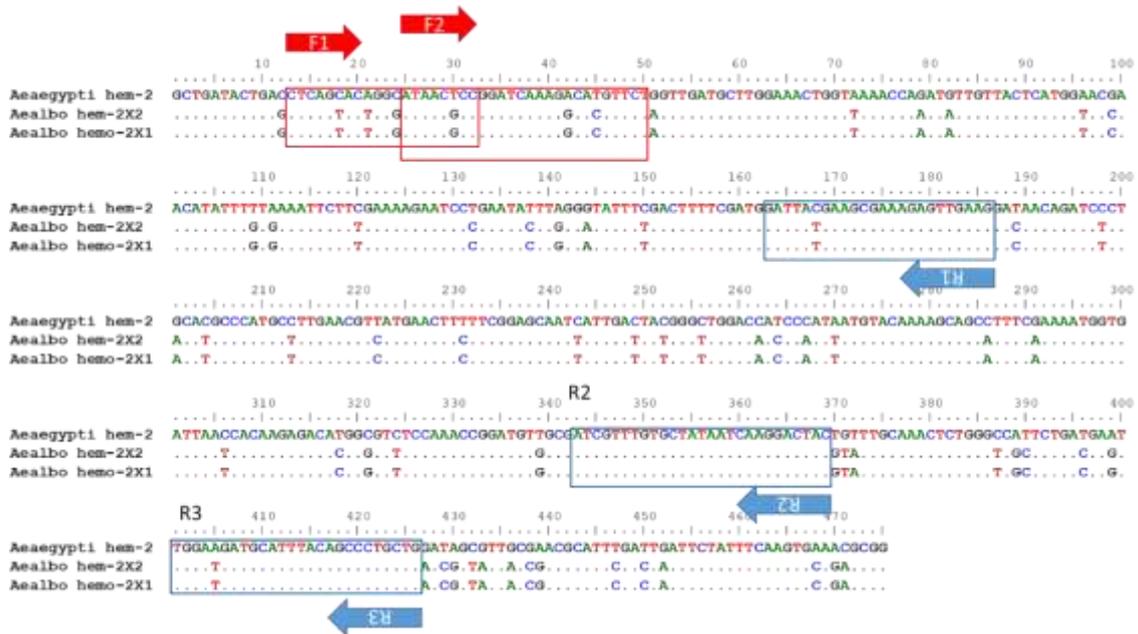
a、b：富氧水中；pH=6.8，溶氧量=7.95 mg / L

c、d：缺氧水中；pH=6.0，溶氧量=5.93 mg / L

3. 蚊蟲血紅蛋白之 RNA

我們從 NCBI 網路資料庫中找到二條埃及斑蚊血紅蛋白的 mRNA 序列：XM_001654393.2 和 XM_001650172；二條白線斑蚊的血紅蛋白的 mRNA 序列：XM_029864593.1 和 XM_029864592.1；三條岡比亞瘧蚊的血紅蛋白的 mRNA 序列：AM182452.1、XM_001238800.2 和 AM182453.1。

經過序列排序後，我們已經設計了二條 Forward 引子和三條 Reverse 引子，結果如圖十三。詳細序列圖示如圖十四。完成抽取八種蚊蟲孑孓 RNA，並以 RT-PCR 分析相關之基因。



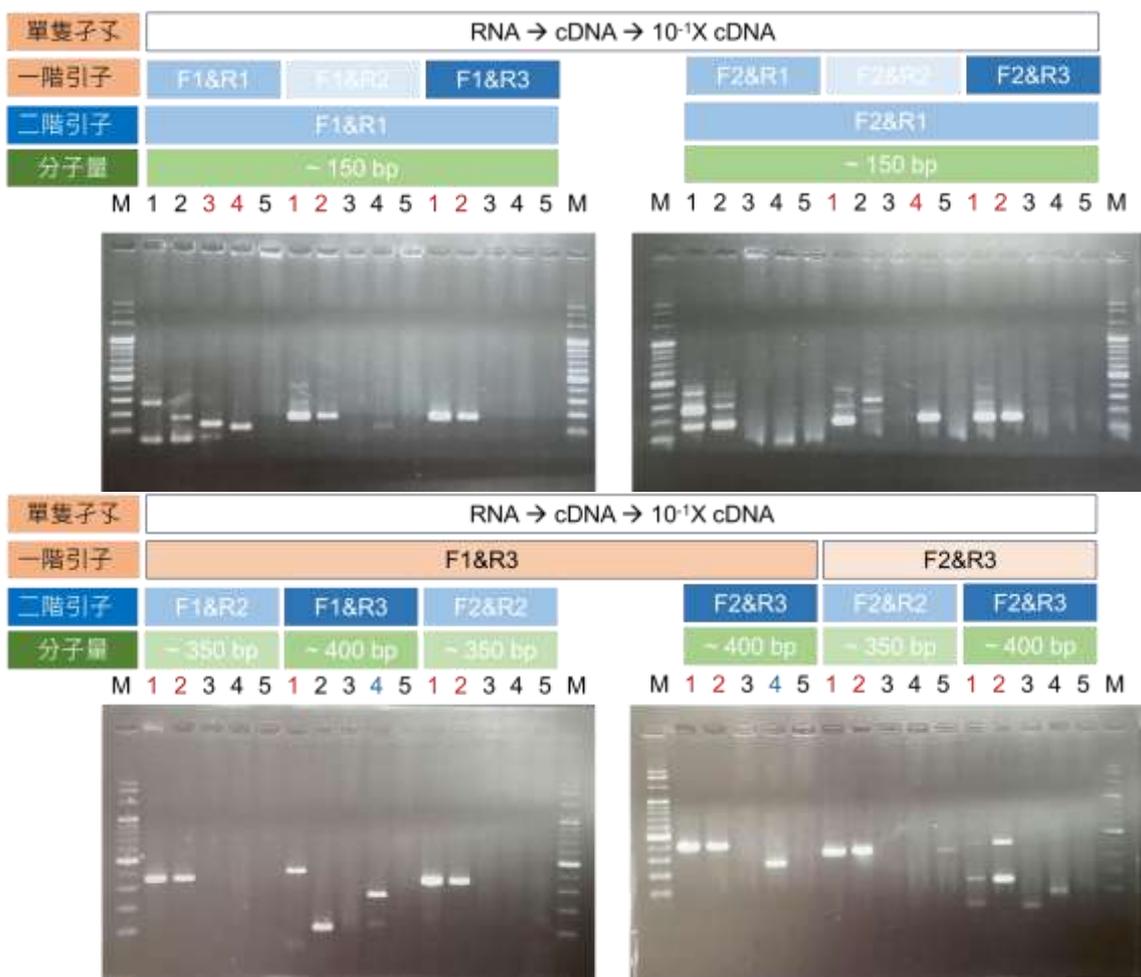
圖十三、以埃及斑蚊和白線斑蚊序列去推測蚊蟲相似的血紅蛋白之 mRNA 序列



圖十四、蚊蟲相似的血紅蛋白之引子序列表示

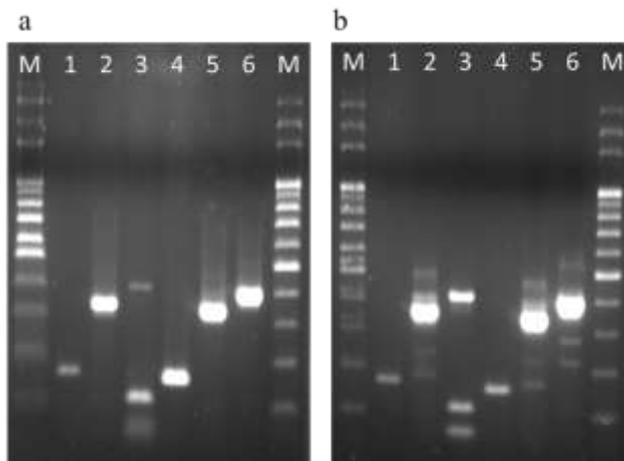
蚊幼蟲 RNA 轉成 cDNA 之後，以二階的 PCR 成功增幅 6 種子子的血紅蛋白基因片段 (圖十五)，並完成白線斑蚊、埃及斑蚊和三斑家蚊的長片段基因定序 (約 400 bp) (圖十六)，以及黃尾掠蚊、白腹叢蚊和竹生翠蚊的短片段基因定序 (約 150 bp)。經 NCBI 比對後，僅有一條或二條序列可供比對，其中埃及斑蚊與網路上的 XM_001654393.2 100% 相似 (圖十七)、白線斑蚊與 XM_029864593.1 99.4% 相似，為首次以 RT-PCR 證明蚊蟲具備血紅蛋白的基因。蚊蟲血紅蛋白基因親緣關係樹形圖請參考圖十八。

而三斑家蚊、黃尾掠蚊、白腹叢蚊和竹生翠蚊等，其可比對片段雖短，但有部分片段相似白線斑蚊之血紅蛋白基因。



圖十五、蚊蟲幼蟲血紅蛋白基因之 nested RT-PCR 結果

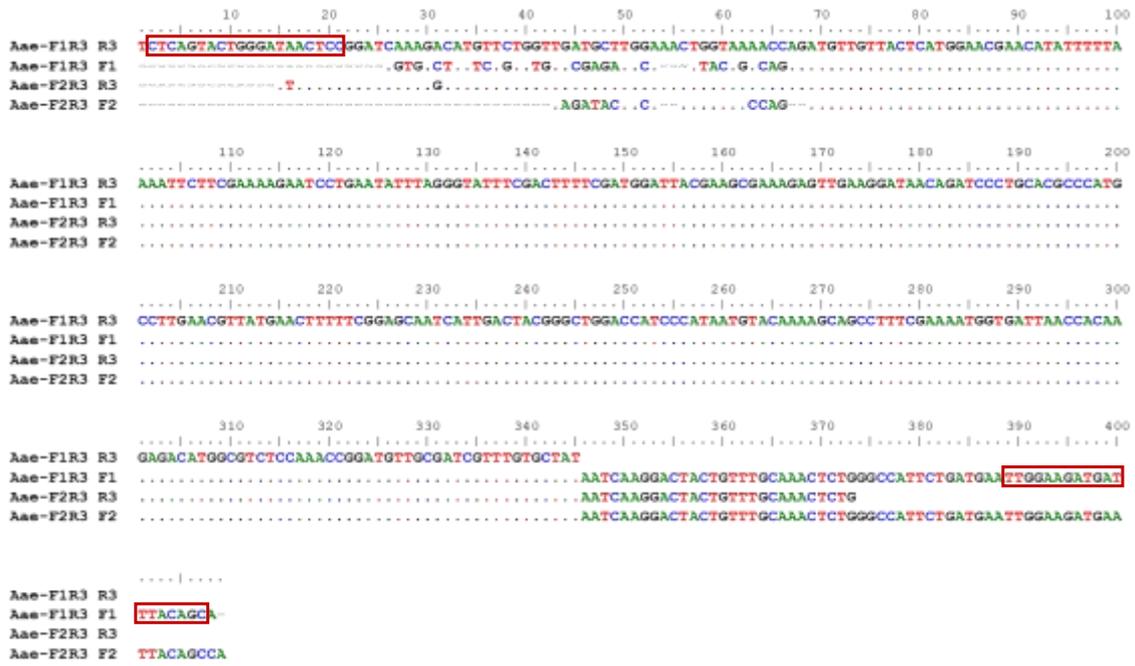
M. 100 bp DNA Marker ; 1. 埃及斑蚊 ; 2. 白線斑蚊 ; 3. 白腹叢蚊 ; 4. 黃尾掠蚊 ; 5. 水



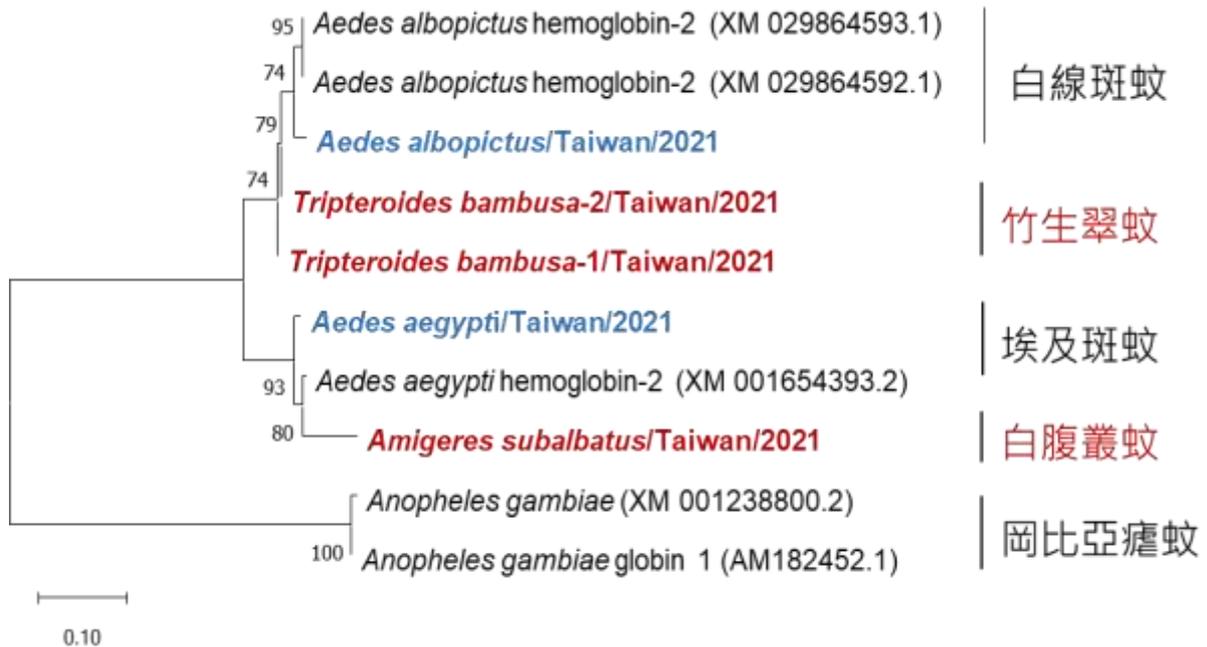
圖十六、蚊幼蟲血紅蛋白基因之 RT-PCR 結果

a. 白線斑蚊 ; b. 埃及斑蚊 ; M. 100 bp DNA Marker ;

1. 1F & 1R ; 2. 1F & 2R ; 3. 1F & 3R ; 4. 2F & 1R ; 5. 2F & 2R ; 6. 2F & 3R



圖十七、埃及斑蚊子子的血紅蛋白基因序列 (紅框為引子所在之處)



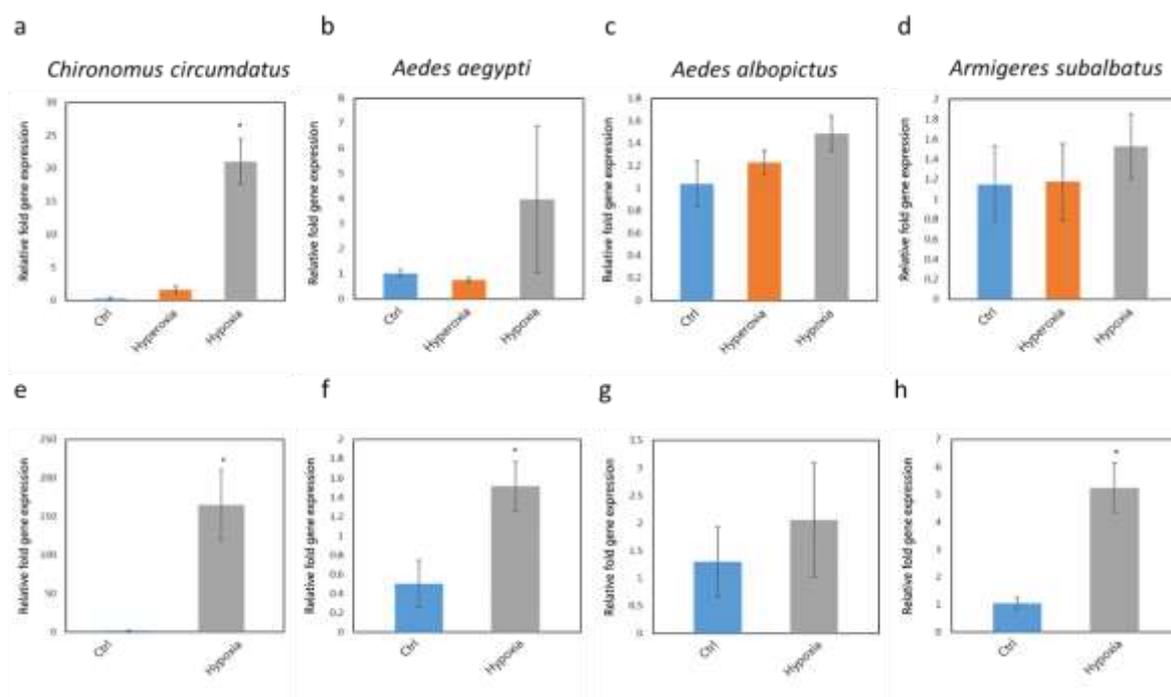
圖十八、蚊蟲血紅蛋白基因親緣關係樹形圖

4. 蚊蟲與搖蚊血紅蛋白之 RNA 基因表現

蚊蟲在三種處理條件下，其血紅蛋白 RNA 之相對表現量倍數如圖十九 a~d，其中鹽埕搖蚊在二氧化碳缺氧條件下 1 小時大量表現血紅蛋白 RNA 基因 CteHb-III，相對

表現量約 20 倍 (圖十九 a); 埃及斑蚊血紅蛋白 RNA 基因 F1R2 相對表現量增高為 3.9 倍 (圖十九 b); 白線斑蚊 (F1R2) 和白腹叢蚊 (F1R1) 相對表現量些微增加至 1.5 倍, 但統計上無差異 (圖十九 c 和 d)。

重複上述實驗, 改以完全密閉瓶罐製造缺氧條件 6 小時, 結果更顯著, 白腹叢蚊之血紅蛋白 RNA 基因 F1R1 相對表現量達約 5 倍 (圖十九 h)。為了了解搖蚊血紅蛋白 RNA 基因 CteHb-III 之相對表現量的趨勢, 初步發現低溶氧量 (3.25 mg/L) 處理 20 小時後, 相對表現量增加約 150 倍 (圖二十)。



圖十九、以即時定量 PCR 分析缺氧處理後血紅蛋白 RNA 之相對表現量

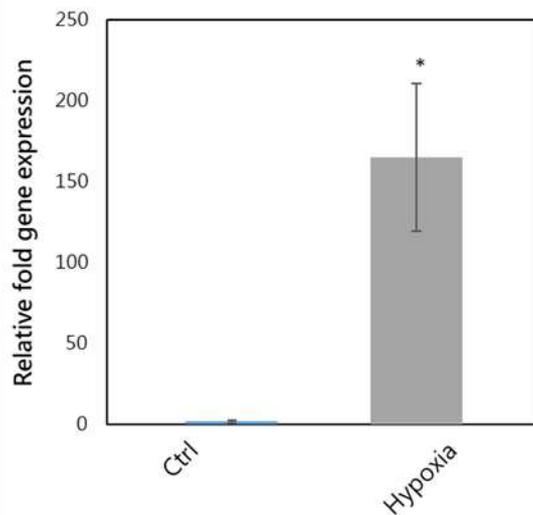
a, e 鹽埕搖蚊; b, f 埃及斑蚊; c, g 白線斑蚊; d, h 白腹叢蚊。

a~d: 對照組 (Ctrl) (pH=6.35; 溶氧 8.40 mg/L), 富氧組

(Hyperoxia)(pH=6.39; 溶氧 9.05 mg/L), 二氧化碳缺氧組 1 小時

(Hypoxia)(pH=4.16; 溶氧 4.63 mg/L)。e~h: 對照組 (Ctrl) (pH=6.37; 溶

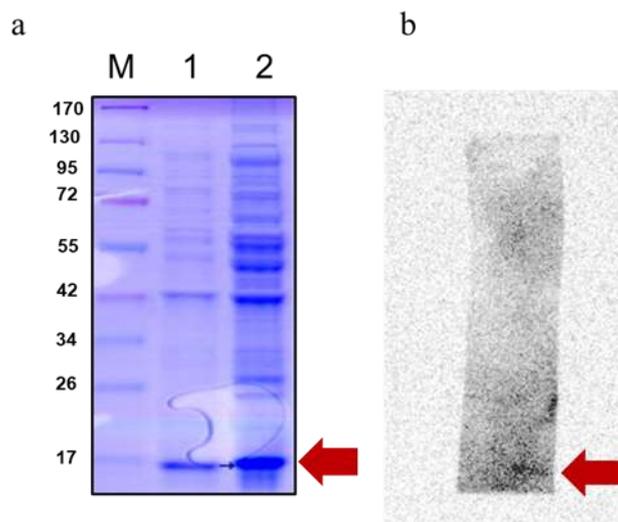
氧 8.60 mg/L), 完全密閉缺氧組 6 小時 (Hypoxia) (pH=6.37; 溶氧 3.25 mg/L)



圖二十、以即時定量 PCR 分析處理 20 小時後的搖蚊血紅蛋白 RNA 之相對表現量
 對照組 (Ctrl) (pH=6.37；溶氧 8.60 mg/L)；
 完全密閉缺氧組 (Hypoxia) (pH=6.37；溶氧 3.25 mg/L)

5. 基因重組蚊蟲血紅蛋之表現

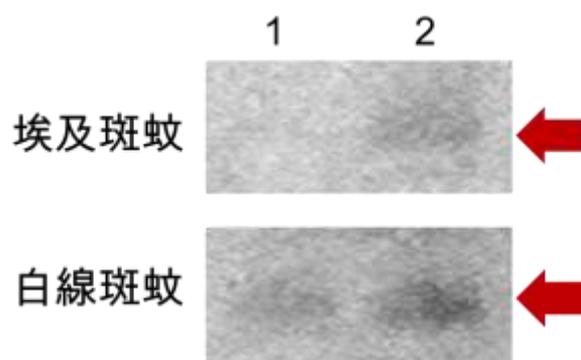
埃及斑蚊血紅蛋白重組基因表現如下，蛋白質分子量大小約為 15.4 kDa (圖二十一 a)。以免疫兔子之抗血清評估抗體之專一性反應，以西方墨點法評估生產之抗體，測試結果抓取到分子量約 17 kDa 的片段 (圖二十一 b)。



圖二十一、表現埃及斑蚊子的 (a) 基因重組血紅蛋白及 (b) 抗體測試

分別取同一批埃及斑蚊和白線斑蚊的四齡幼蟲，一組置於完全密閉的小瓶中 6 小時，另一組控制組則開放式曝氣 6 小時。分別取出 3 隻研磨抽取蛋白質，以 SDS-

PAGE 分離不同大小分子量之蛋白質後，轉印蛋白質置 PVDF 試紙，在一級抗體 ($500X^{-1}$) 和二級抗體 ($12000 X^{-1}$) 反應後，以 ECL 呈色進行 Western blot 分析，結果二種蚊蟲在缺氧條件下，血紅蛋白均大量表現 (圖二十二)。



圖二十二、以 Western blot 分析埃及斑蚊與白線斑蚊缺氧 6 小時之血紅蛋白表現量
1：控制組；2：缺氧組。

5. 討論

水生昆蟲的呼吸，主要透過氣管系統來取得含氧的空氣。然而，不同環境特性的水體，例如乾淨澄清的水、混濁汙臭的水，還有流動富氧的水和靜止缺氧的水，都可以發現很多水生生物和昆蟲，特別是蚊蟲、搖蚊和蝶蠅之類的生物。除了透過氣管系統來呼吸，近期研究的進展顯示，某些類群的昆蟲有程度不等的血紅蛋白基因的表現，顯示某些水生昆蟲可能為了適應環境而發展出這類血紅蛋白，並成功提供水生昆蟲在缺氧環境中獲得氧氣的機會。本研究已證實蚊蟲確實有和搖蚊相似的血紅蛋白基因，而且在不同溶氧條件下，可以偵測到血紅蛋白 RNA 基因之變化，尤其在缺氧逆境下，底層分布之蚊蟲和搖蚊有相對大量的 RNA 基因表現，顯示血紅蛋白基因之表現可能與水體溶氧與氧氣獲取有關。

本研究發現不同種類的雙翅目幼蟲，在水體中上下泳動後的活動分布確實有差別。我們先在校內廢棄澄清積水水桶發現白線斑蚊，然後在附近青年公園找到乾淨積水的白線斑蚊和臭水溝的搖蚊幼蟲。後期，老師帶我們到郊區採集農田的水和排水溝的水，都可以捕獲大量的蚊蟲幼蟲和搖蚊。藉由靜置觀察，我們透過樣本瓶和自己設計的壓克力觀察立板分層積分方式，以照相和統計數值得到明確且有趣的結論。例如 (1) 上層：主要是家蚊屬、斑蚊屬；(2) 中下層：主要是叢蚊屬和小蚊屬；(3) 底層：主要是

翠蚊屬和搖蚊科。由此顯示：上層蚊蟲的生活習性，可能與氧氣的需求有關。對照底層翠蚊屬的蚊蟲，採集環境主要是溶氧量低的竹筒內；搖蚊科的幼蟲，牠的分布環境主要屬於比較低溶氧的汙泥環境。根據文獻指出：斑蚊屬蚊蟲如白線斑蚊，喜歡乾淨的人工容器內孳生，特別是有雨水或澆灌的水，都是斑蚊孳生的地方 (連日清, 2004)。另外像家蚊屬的蚊蟲，如熱帶家蚊喜歡在污染的排水溝環境 (周欽賢等人, 2002)。

孑孓在水體中分布的觀察過程中，我們發現同樣是斑蚊屬蚊蟲或者同樣是家蚊屬蚊蟲，牠們的族群在水體的分布喜好趨勢明顯，但似乎有一些個體就是不一樣，應該是生物間的差異。於是我們好奇這些個體的分布是否與呼吸管的長度或氣管的長度有差異。透過顯微鏡測微器的量測，我們發現孑孓在水中的分布位置與呼吸管比值在統計上沒有顯著差異，應該比較沒有關聯。根據文獻 Al-Khalili (1999) 文章指出，呼吸管指數是鑑定家蚊屬特定物種的一個標準。於是，我們也查閱相關圖鑑，確認每一種蚊蟲的孑孓呼吸管長度和寬度，以及呼吸管的比值。實驗結果顯示：比值與文獻或圖鑑上記錄的數值範圍相似，符合文獻紀錄。

數次的觀察中，我們發現：不同種類蚊蟲的四齡孑孓，牠們在水中漂浮和浮到水面呼吸的頻率好像不一樣。經過討論，我們歸納光影的干擾可能造成影響。於是我們利用不同顏色的玻璃紙來過濾可見光，並設計以行車紀錄器來觀察記錄特定時間孑孓的活動頻率和分布。結果顯示：光影確實會造成干擾，利用行車紀錄器可以清楚區分不同蚊種在水中的分布和浮潛的頻率。接下來，我們透過微量吸量器來校正和分析呼吸管排出來的氣泡大小。因為孑孓呼吸管排出的氣泡很小，不容易每一個小泡泡都被量測到，僅能量測最大的三顆和算小泡泡的數量。未來應再設計用微針排出定量體積的微泡，做更精準的量測。如此不僅能歸納出呼吸管比值或粗細對牠們取得空氣體積的差別，例如：白腹叢蚊個體大隻，氣管組織長，呼吸管所吐出的氣泡也最大。

其中令人感到興趣的是：竹生翠蚊閉氣時間很久，多數時間躲在水體底層。對照野外採集時的紀錄，竹筒水內有很多腐爛的竹葉，溶氧量低，好像很符合竹生翠蚊喜歡或適應在低溶氧的條件下。所以，我們設計了一個吸不到空氣的實驗：在水體表面滴加單分子生物油膜。我們假設孑孓極需氧氣，因此反覆浮到水面呼吸空氣，可是因為生物膜阻隔，導致孑孓缺氧而死。結果顯著，呼應我們之前的推論，有些蚊蟲孑孓

可忍耐低溶氧，即使無法浮出水面也不會立即死亡，例如白腹叢蚊和竹生翠蚊。

令人疑惑的是：為什麼白腹叢蚊和竹生翠蚊可長時間停留在水體底部。根據文獻顯示：搖蚊幼蟲可以透過血紅蛋白提高獲得氧氣的機會。也因為昆蟲有發育良好的氣管系統，因此，可以儲存運送氧氣的呼吸蛋白長期未被深入探討和研究 (Nyberg and Muto, 2020; Willmer et al., 2000)。一般而言，昆蟲有二種呼吸蛋白：(1) 血青素 (hemocyanin) - 含二個亞銅離子的蛋白質，可以和氧氣分子結合以攜帶氧氣。(2) 血紅蛋白素 (hemoglobin)，研究文獻較少。不過，有些長期生活在缺氧環境中的節肢動物近期陸續被證實有呼吸相關的血紅蛋白。根據綜整文章 (Herhold et al., 2020) 目前已知具有細胞內血紅蛋白的昆蟲有黃果蠅 (*Drosophila melanogaster*) (Burmester and Hankeln, 1999; Hankeln et al., 2002; Burmester et al., 2006; Gleixner et al., 2012)、蜜蜂 (*Apis mellifera*) (Hankeln et al., 2006)、甘比亞瘧蚊 (*Anopheles gambiae*) 和埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) (Burmester and Hankeln, 2007) 等。其中果蠅研究比較透徹，只是果蠅身上的血紅蛋白濃度比較低，原因仍屬未知 (Hankeln et al., 2002; Gleixner et al., 2008)。據推測：其實很多昆蟲可能都具有呼吸蛋白的系統 (Burmester and Hankeln, 2007)。

為了延續上述研究和探究在水中呼吸的機制，我們大膽假設蚊蟲幼蟲也有低濃度的血紅蛋白的存在，所根據的證據就是白腹叢蚊幼蟲個體也呈現紅色，可能與雙翅目搖蚊 (Chironomid midges) 的呼吸蛋白機制類似。透過解剖顯微鏡觀察，我們確實觀察到白腹叢蚊幼蟲幾丁質外殼內側有紅色色素匯集的點狀物。透過富氧水與缺氧水的浸泡，我們觀察到白腹叢蚊幼蟲紅色色素點狀物色澤有所改變。藉由分子生物學工具 Q-PCR 的方法，我們透過溶氧的數值和浸泡的時間長短等，發現血紅蛋白基因的大量表現與溶氧量和浸泡時間有關，進一步支持我們的假說：血紅蛋白基因表現量與溶氧高低之間的關係密切，底層分布的蚊蟲可能透過血紅蛋白增加氧氣獲得的機會。目前，團隊持續進行基因轉殖蛋白的實驗，期望能生產蚊蟲血紅蛋白抗血清，以透過免疫學方法，將血紅蛋白在蟲體表現的空間位置和表現強度標定出來。

有鑑於上述新發現，我們閱讀文獻後又發現搖蚊長期躲藏在缺氧的水體，牠的幼蟲和蛹的體腔內血淋巴充滿單體和寡聚體的血紅蛋白 (Anderson et al., 2008)。新近文獻也指出仰泳蟾科 (Notonectidae) 水蟲腹部的氣孔連結至腹腔內的氣管系統，氣管旁

的細胞充滿血紅蛋白 (Wawrowski et al., 2012)。根據綜整文章 (Herhold et al., 2020)，由於血紅蛋白可以透過 heme group 中的 iron-ion (Fe^{2+}) 鍵結氧氣，150 年前科學家就發現昆蟲的紅色體色與 Hb 有關 (Rollett, 1861; Lankester, 1872)。如果比對脊椎動物的血紅蛋白，搖蚊的 Hb 促進提供氧氣，扮演呼吸重要功能 (Osmulski and Leyko, 1986)。除了水生昆蟲，文獻也指出：寄生性馬蠅 (*Gasterophilus intestinalis*) 幼蟲，寄生於缺氧的馬胃部，馬蠅幼蟲細胞內 Hb 出現在脂肪體、橫紋肌、皮下，當馬食入半液態物質含空氣時，Hb 有助於從氣泡中吸附氧氣 (Keilin and Wang, 1946)。因此，我們進一步分析血紅蛋白的 RNA 和蛋白，以釐清血紅蛋白是否出現在蚊幼蟲身上，以及其所扮演的機制和角色。

本計畫已完成 (1) 大規模野外採樣，並量測其地區的水質、濁度、pH 值；(2) 觀察各種類孑孓體內是否含有紅色斑點 (血紅蛋白)；(3) 利用測溶氧實驗驗證孑孓體內的紅色斑點與溶氧的關係；(4) 利用 RT-PCR 偵測血紅蛋白 RNA 之檢測，建立蚊蟲血紅蛋白分子親緣關係圖；(5) 以 Q-PCR 分析孑孓血紅蛋白基因的表現量與溶氧之間的關係；(6) 以基因轉殖技術生產重組蚊蟲血紅蛋白，免疫兔子後獲得專一性的抗血清；(7) 以西方墨點法印證缺氧條件下，蚊蟲血紅蛋白大量表現。未來實驗將可以繼續完備強化和補足實驗數據，包括：增加缺氧的時間和強度、利用蛋白質的抗原抗體反應，以確認蚊蟲體內血紅蛋白之空間分布和表現強度，以進一步確認血紅蛋白的功能。

四、結論與應用

水生昆蟲生活於水中，水中溶氧高低影響其生理和行為，其在水中浮沉更影響其存活和被捕食的風險。本研究除了釐清不同種類孑孓在水中的分布與其呼吸系統形態特徵關係，也嘗試驗證類似特定生物的呼吸蛋白基因和功能發生在孑孓的可能性。具體結論如下：

- (一) 本研究戶外調查記錄 8 種孑孓和 1 類搖蚊幼蟲，於室內以行車紀錄器錄影觀察孑孓之分布和移動，結果發現孑孓和搖蚊幼蟲活動有明顯分層。
- (二) 經過實驗設計，分別量測呼吸管、氣管長度和氣泡大小，結果差異並不顯著，主要原因是量測不同物種之間和同類種內之數據波動太大。但若就閉氣的可能原因，發現孑孓在

水中長時間停留與氣管長度高度相關。

- (三) 本研究發現竹生翠蚊、白腹叢蚊幼蟲和搖蚊幼蟲長時間停留水體底層，牠們所孳生的環境都是腐植質高且溶氧量較低的環境；而白線斑蚊、埃及斑蚊和熱帶家蚊在無干擾下都喜歡在水體上層。
- (四) 本研究假設底層活動的白腹叢蚊幼蟲與搖蚊具備類似的血紅蛋白呼吸機制以提高獲得氧氣的比例。顯微鏡下觀察確實記錄白腹叢蚊幼蟲幾丁質外殼內側充滿紅色素匯集的點狀物。透過富氧和缺氧的實驗調控下，可以發現紅色的色澤產生變化。
- (五) 本研究首次成功增幅 6 種蚊蟲幼蟲的血紅蛋白 RNA 基因，僅有白線斑蚊和埃及斑蚊成功增幅出長片段血紅蛋白基因，其餘蚊種僅有短片段引子能成功增幅。由其成功增幅的片段長短不一來判斷，不同蚊種間之血紅蛋白基因存在多樣性，需再進一步調整修正引子序列，才能釐清血紅蛋白基因的存在和扮演的功能。
- (六) 本研究利用即時定量 RT-PCR 確認底棲型白腹叢蚊與鹽埕搖蚊在缺氧條件下，具備相似血紅蛋白 RNA 基因表現趨勢，血紅蛋白基因相對表現倍數分別增加 5 倍和 150 倍。上層分布的埃及斑蚊和白線斑蚊之基因表現量都有些微上升，但差異不顯著。此結果有助於解釋蚊蟲生態和水體溶氧影響分布之特性，蚊蟲除了利用呼吸管直接吸入空氣，暫時停留於氣管中的氧氣，可能會藉由血紅蛋白加以鍵結而吸收，以維繫生命。
- (七) 蚊蟲具備血紅蛋白來輔助氧氣之獲得為最近五年內新穎的發現，唯有透過操作血紅蛋白的基因分析和蛋白質抗體的分析，才能釐清和完備血紅蛋白存在和扮演的功能。本研究已經完成重組蛋白質表現，抗血清之生產，並以西方墨點法標定血紅蛋白之表現。未來可持續在蚊幼蟲蟲體之組織偵測血紅蛋白之表現強度。
- (八) 生命科學探究上，全球氣候變遷加劇，物種適應環境變化而生存。蚊蟲受誘導而表現功能性血紅蛋白基因，有助其適應缺氧之水體和繁殖。蚊蟲之存活及忍受度極強韌，不可輕忽！未來探討水生生物之生態環境變遷時，將有助於討論和釐清生物適應性變化之重要因素和因果關係。
- (九) 應用上，針對底棲型且耐低氧之騷擾性病媒蚊蟲，本研究成果可提供防治藥劑改良方案，例如：研發沉水劑型藥劑，或阻斷血紅蛋白表現之專一性製劑。此外，發展友善生物防制之策略，例如：透過基因編輯耐缺氧之捕食性蚊蟲或天敵，有效防治有機質高的水溝

和溝渠中之病媒。

五、參考文獻

- Al-Khalili, Y. H., Katbeh-Bader, A., Mohsen, Z. H. (1999). Siphon index of *Culex pipiens* larvae collected from different biogeographical provinces in Jordan. *Zoology in the Middle East*, 17: 71-76.
- Anderson, T. D., Jin-Clark, Y., Begum, K., Starkey, S. R., Zhu, K. Y. (2008) Gene expression profiling reveals decreased expression of two hemoglobin genes associated with increased consumption of oxygen in *Chironomus tentans* exposed to atrazine: A possible mechanism for adapting to oxygen deficiency. *Aquatic Toxicology*, 86: 148-156.
- Burmester, T., and Hankeln, T. (2007). The respiratory proteins of insects. *Journal of Insect Physiology*, 53, 285-294.
- Burmester, T., Klawitter, S., Hankeln, T. (2007) Characterization of two globin genes from the malaria mosquito *Anopheles gambiae*: divergent origin of nematoceran haemoglobins. *Insect Molecular Biology*, 16: 133-42.
- Herhold, H. W., Davis, S. R., Grimaldi, D. A. (2020). Transcriptomes reveal expression of hemoglobins throughout insects and other Hexapoda. *PLoS ONE*, 15(6): e0234272.
- Nyberg, H. J., Muto, K. (2020) Acoustic tracheal rupture provides insights into larval mosquito respiration. *Scientific Report*, 10: 2378.
- Wawrowski, A., Matthews, P. G. D., Gleixner, E., Kiger, L., Marden, M. C., Hankeln, T., Burmester, T. (2012). Characterization of the hemoglobin of the backswimmer *Anisops deanei* (Hemiptera). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42: 603-609.
- 周欽賢、王正雄、連日清 (2002)。醫學昆蟲與病媒管制。臺北市。658 頁。
- 連日清 (2004)。臺灣蚊種檢索。臺北市：藝軒。178 頁。
- 衛生福利部疾病管制署 (2017)。登革熱/屈公病防治工作指引。臺北市：衛生福利部疾病管制署。88 頁。
- 羅林巧、王智源、鄧華真 (2014)。2009-2011 年臺灣地區登革熱病媒蚊分布調查。疫情報導，30 (15)，304-310。

【評語】 050001

1. 相較於其他昆蟲單以複雜的氣管系統作為氣體輸送，水生昆蟲中底棲的蚊蟲幼蟲利用血紅蛋白來攜帶氧氣，目前所知甚少，是有趣的研究題目。
2. 此作品針對 8 種孑孓和 1 種蚊幼蟲進行水中呼吸行為觀察，並以 RT-PCR 分析 RNA 表現發現血紅蛋白基因的相對表現量的差異與水中含氧量多寡有關。從水中分佈的行為觀察到血紅蛋白基因表現的相關實驗設計皆相當適當，且與所探討的問題扣合，因此實驗結果都能釐清所問的問題，顯示研究者經過仔細思考，值得鼓勵。