

中華民國第 61 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學科

佳作

團隊合作獎

052002

深呼吸--子子與搖蚊幼蟲如何在水中呼吸和閉氣

學校名稱：臺北市立華江高級中學

作者： 高二 蔡景堯 高二 楊有螢 高二 蕭宜姍	指導老師： 黃佳茵 蔡瑞穎
---	-----------------------------

關鍵詞：子子、搖蚊、血紅蛋白

摘要

水蟲呼吸主要透過氣管系統，新近發現透過血紅蛋白的機制可在缺氧環境中提高獲氧。戶外調查記錄 8 種子子和 1 類搖蚊幼蟲，室內錄影觀察發現子子和搖蚊幼蟲活動有明顯分層。量測呼吸管、氣管長度和氣泡大小，顯示其與子子在水中分布位置沒有顯著差異，但閉氣與氣管長度高度相關。竹生翠蚊、白腹叢蚊幼蟲和搖蚊幼蟲長時間停留水體底層；反觀家蚊、斑蚊則反覆上下移動至水表面呼吸。本研究假設底層活動的子子與搖蚊幼蟲具備類似的血紅蛋白呼吸機制以獲得氧氣，顯微鏡下觀察發現白腹叢蚊幼蟲幾丁質外殼內側充滿紅色素點狀物，且隨著調控富氧與缺氧而有色澤變化。現階段已成功增幅 6 種蚊幼蟲的血紅蛋白基因，未來將釐清血紅蛋白在子子呼吸所扮演的角色。

壹、研究動機

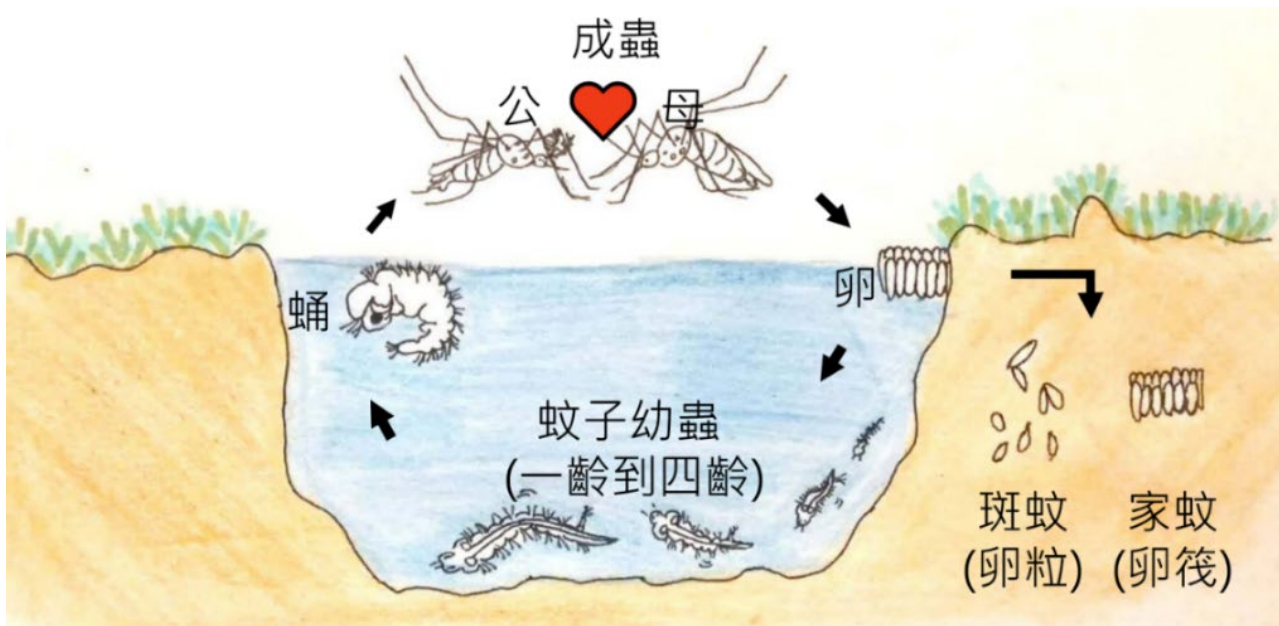
有一次下雨天，我發現我們家旁邊的水桶中有一隻一隻黑色在蠕動的小生物，那是子子，蚊子的幼蟲。子子只要有積水的環境就能生存，例如社區的積水水桶、花盆底部的凹槽積水、竹子的凹洞口積水，都是得以讓牠們孳生的環境。然而，不同地區積水的子子，在水中生活的水層分布好像不大相近。有的浮在水表面、有的躲在落葉樹枝底部、有的生活在水底部或泥土中。像搖蚊幼蟲（紅蟲）就是生活在底層，紅蟲能不上水岸呼吸，在水底就能得到牠所需的氧氣，牠們存活的策略主要依賴體內的血紅蛋白，透過體內的血紅蛋白從水中的溶氧轉換成氧氣。那同樣生活在較底層的子子，除了使用呼吸管吸取空氣獲得氧氣，是不是也有相同的機制，讓牠們遭遇缺氧條件的時候得以讓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

貳、研究目的

蚊蟲的幼蟲主要生活在水中（圖一），本研究想了解子子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，推測子子體內是否也有此色素蛋白，釐清子子呼吸獲得氧氣的策略，包括（一）用呼吸管到水面呼吸，透過氣管傳送空氣；（二）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子子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，透過溶氧試驗探究是否有

特別的血紅蛋白或機制讓孑孓得以在水中得到氧氣。並嘗試透過血紅蛋白基因的分析，深入驗證這一類呼吸色素蛋白基因 RNA 的存在與否和表現量，以及進一步驗證血紅蛋白的表現。



圖一、手繪蚊蟲生活史

參、研究設備及器材

- 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 (表二)。

表一、採集器材

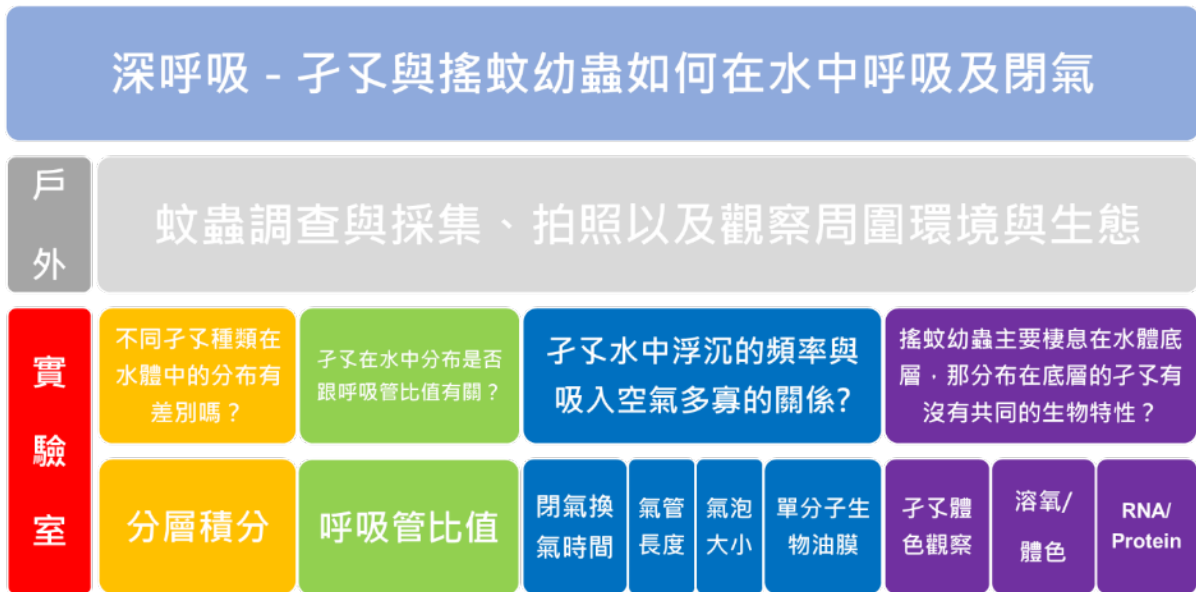
			
滴管	濾網	寶特瓶	白色紙碗

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

肆、研究過程或方法

一、實驗架構

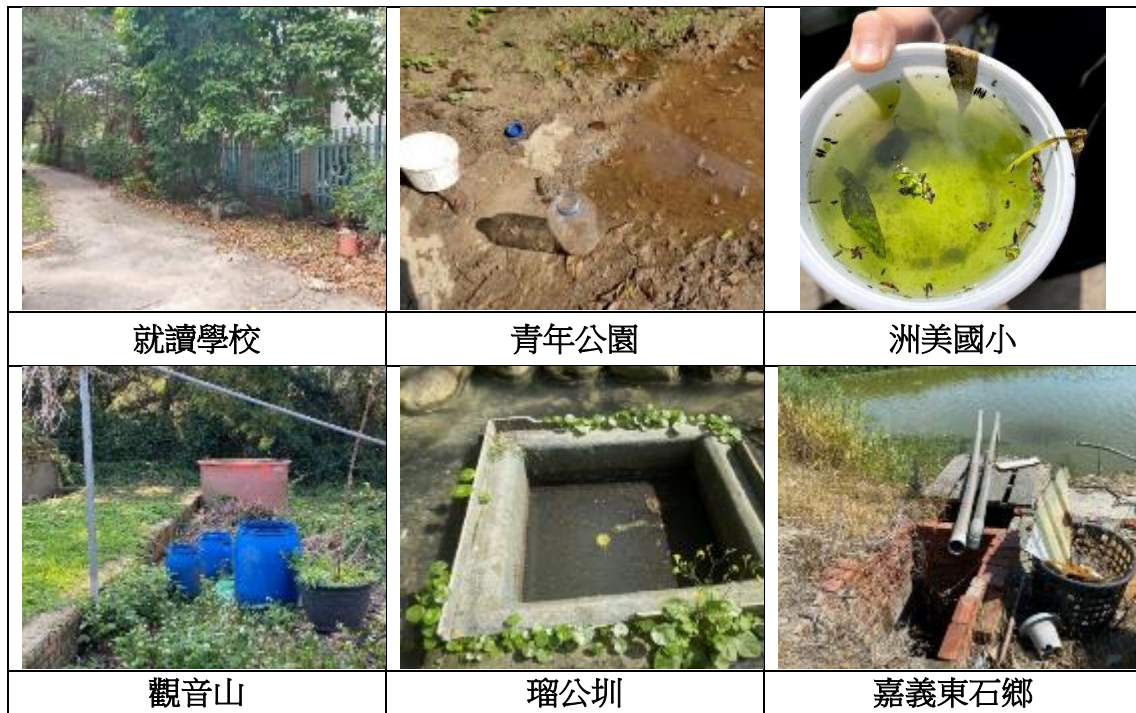


圖二、「深呼吸 - 孑孓與搖蚊幼蟲如何在水中呼吸及閉氣」研究架構

二、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。

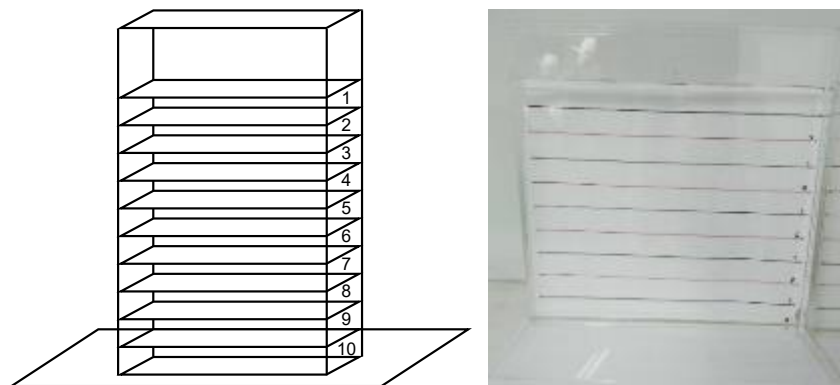
- (一) 就讀高中：本校所採集到的白線斑蚊幼蟲（登革熱病媒蚊），發現位置在樹蔭下的水桶，陰暗較潮濕的地方，水面中較不容易觀察到孑孓，大部分躲在落葉、樹枝下方。
- (二) 青年公園：位於萬華區，發現孑孓在大型黑色水桶中，採集到白線斑蚊幼蟲及些微的紅蟲，也是喜歡躲在落葉、樹枝底部。
- (三) 洲美國小：查閱資料發現蚊蟲常生長在農田，我們認為洲美國小附近的農田很有可能蚊蟲孳生，此地點所採的種類為熱帶家蚊幼蟲（絲蟲病病媒）及紅蟲，發現在農田旁的臭水溝，可以明顯觀察到孑孓都停留在水面，紅蟲則躲在底層泥土中。
- (四) 觀音山：位在新北市五股區、八里區，採集到的種類為莫氏家蚊幼蟲，採集位置多在附近農田的儲水桶，莫氏家蚊幼蟲明顯的浮在水面，肉眼可明顯看到。
- (五) 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。
- (六) 嘉義東石鄉：在魚塢附近的靜止水面，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

三、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

(左) 卡通示意圖；(右) 實體圖

四、閉氣換氣實驗

(一) 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。

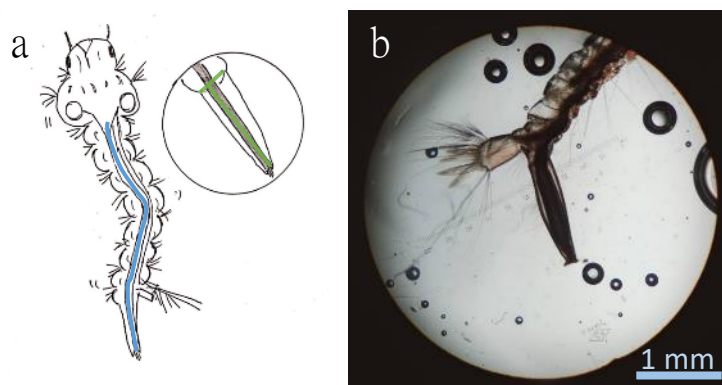
(二) 閉氣時間：從孑孓呼吸管離開水面開始計時，直到孑孓呼吸管再次碰到水面結束。

(三) 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。

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。

五、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) 四齡孑孓呼吸系統；(b) 顯微鏡下四齡孑孓的呼吸管

六、氣管長度實驗

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

七、氣泡大小實驗

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



圖六、觀察四齡孑孓呼吸管排出的氣泡大小

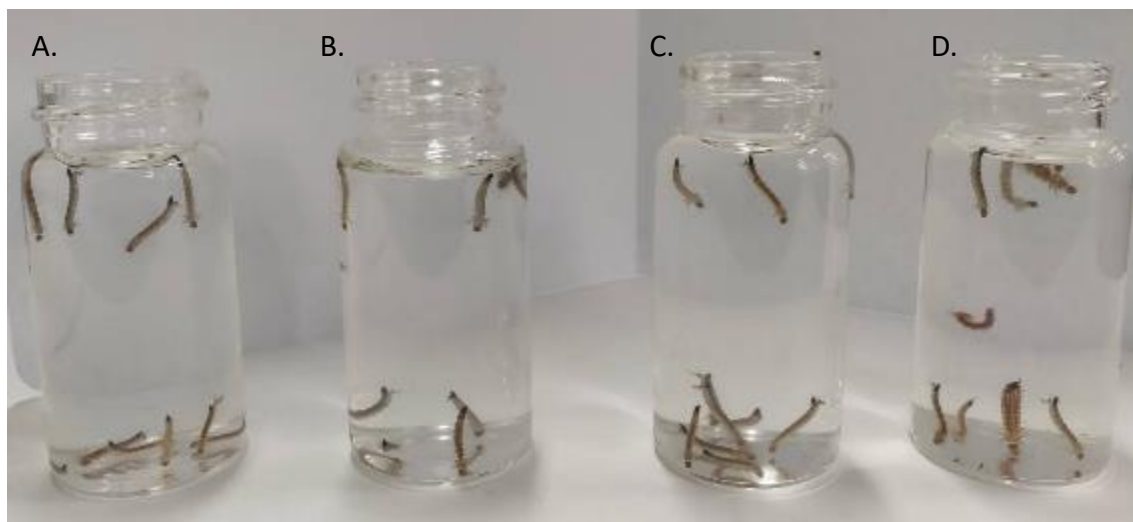
(a) 藍色圓圈為家蚊幼蟲排出之氣泡；

(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

八、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

九、蚊蟲孑孓血紅蛋白之 RNA 表現與蛋白質分析

(一) 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。

(二) 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。

(三) 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 膚蠅科	幼蟲	Giglob1	是	細胞內	Pentacoordinate/ Dimer
<i>Glossina morsitans</i>	Glossinidae 舌蠅科		Gmglob1	可能	細胞內	

(四) 蚊蟲血紅蛋白之 RNA 表現與蛋白質分析

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。

蚊蟲血紅蛋白之蛋白質表現主要利用抗人的 Hemoglobin Monoclonal Antibody (HB11-201.11; ThermoFisher SCIENTIFIC) 或抗節肢動物的抗體, 以西方墨點法加以分析。

伍、研究結果

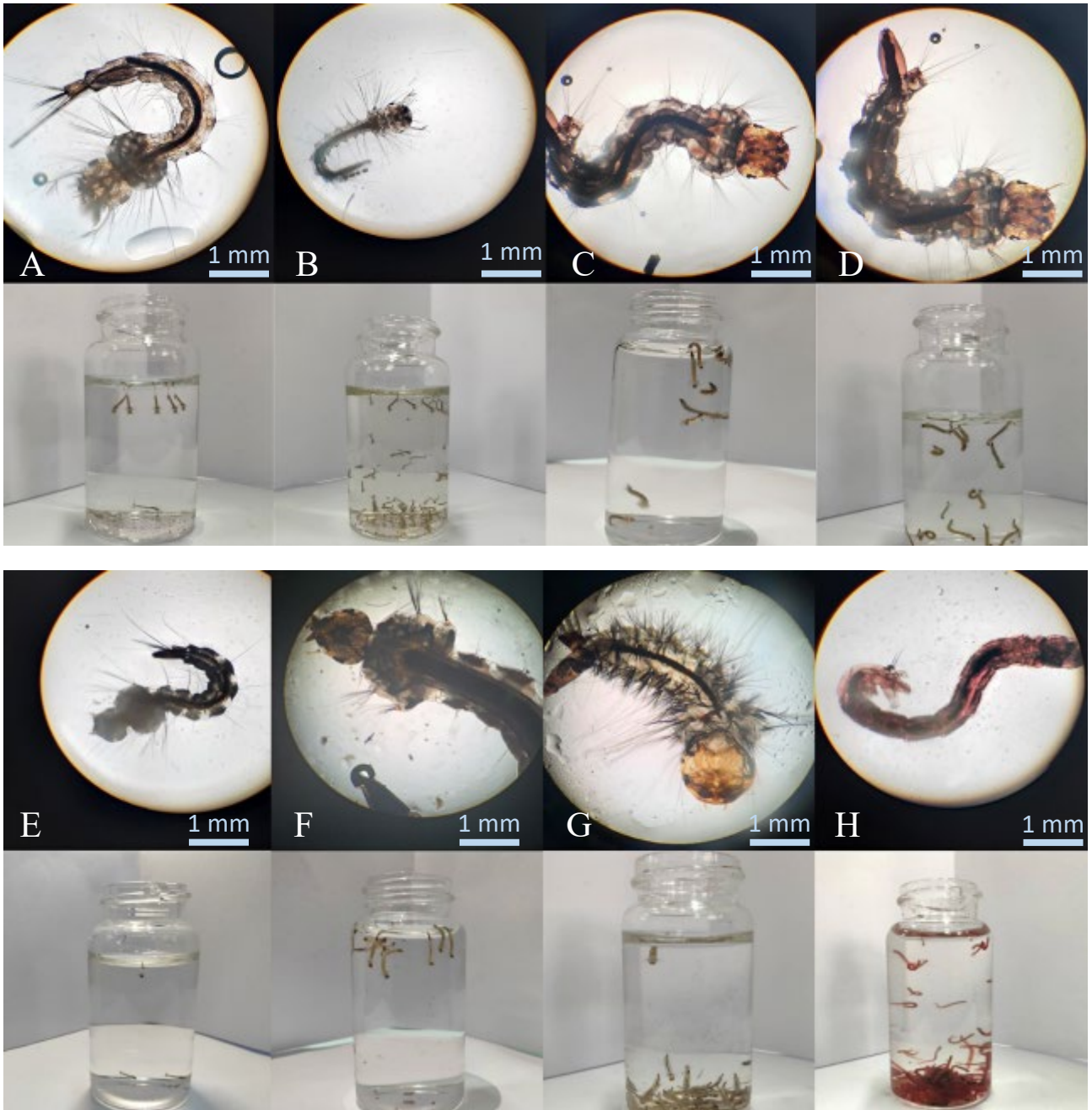
一、採集結果

戶外調查記錄 8 種孑孓和 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；以及搖蚊幼蟲等（表四和圖八）。

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孑孓為主。

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 (魚塭溝渠)	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*)；

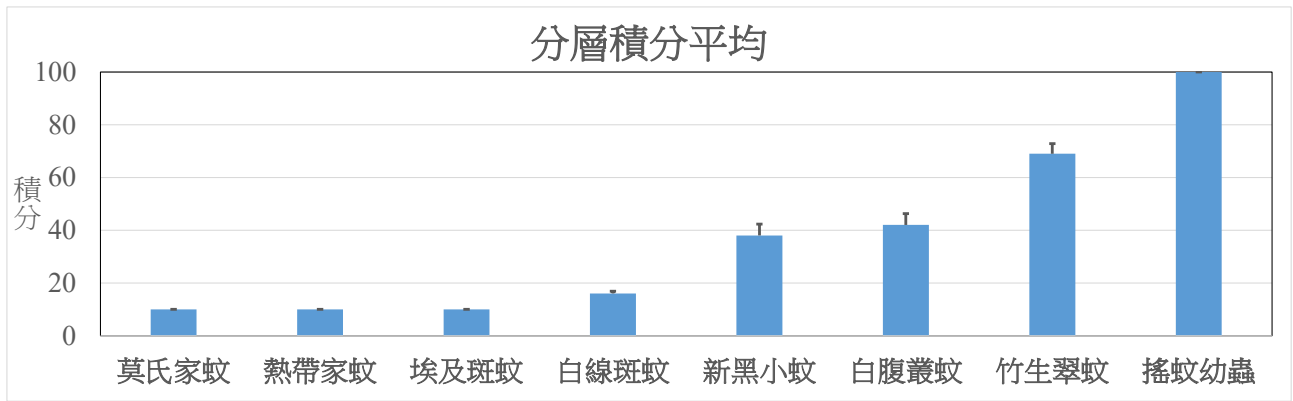
C：埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*)；D：白線斑蚊 (*Aedes albopictus*)

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

實驗結果顯示不同種類四齡孑孓的水層分布，大致可分為上、中、下層（積分低到高），家蚊屬和斑蚊屬於上層，小蚊屬和叢蚊屬於中下層，翠蚊屬和搖蚊幼蟲則屬底層（圖九）。

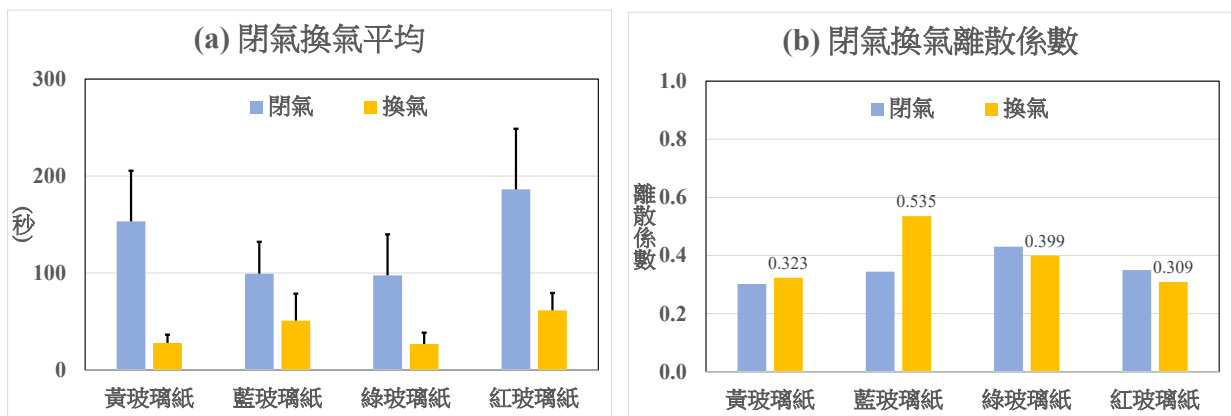


圖九、四齡孑孓與搖蚊幼蟲水中分布之分層積分

三、閉氣換氣實驗

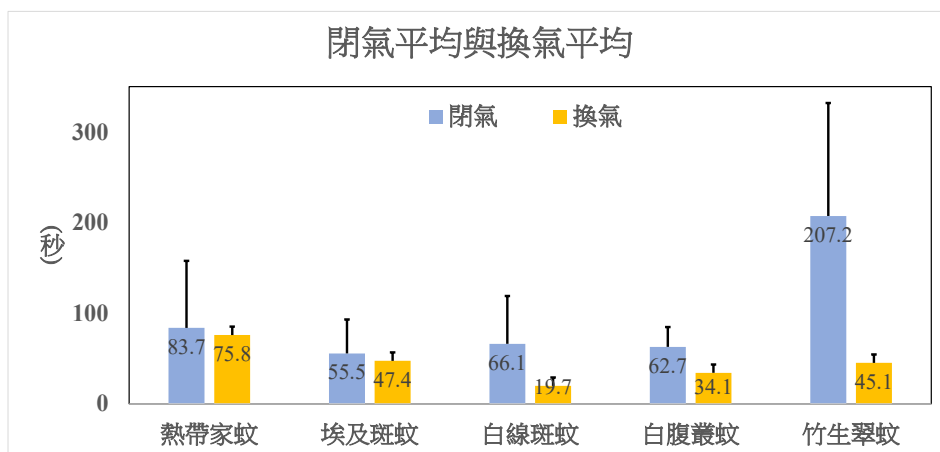
玻璃紙顏色對五隻白腹叢蚊四齡孑孓有不同的干擾實驗結果，由於孑孓換氣時容易受光影干擾而有不穩定的換氣時間，穩定的換氣時間其對應的離散係數會較小(0.309) (圖十)，因此後續閉氣與換氣實驗採用防干擾效果最好的紅色玻璃紙進行實驗 (圖十一)。

(一) 干擾實驗結果



圖十、五隻白腹叢蚊四齡孑孓干擾實驗

(二) 五種蚊蟲四齡幼蟲閉氣換氣實驗

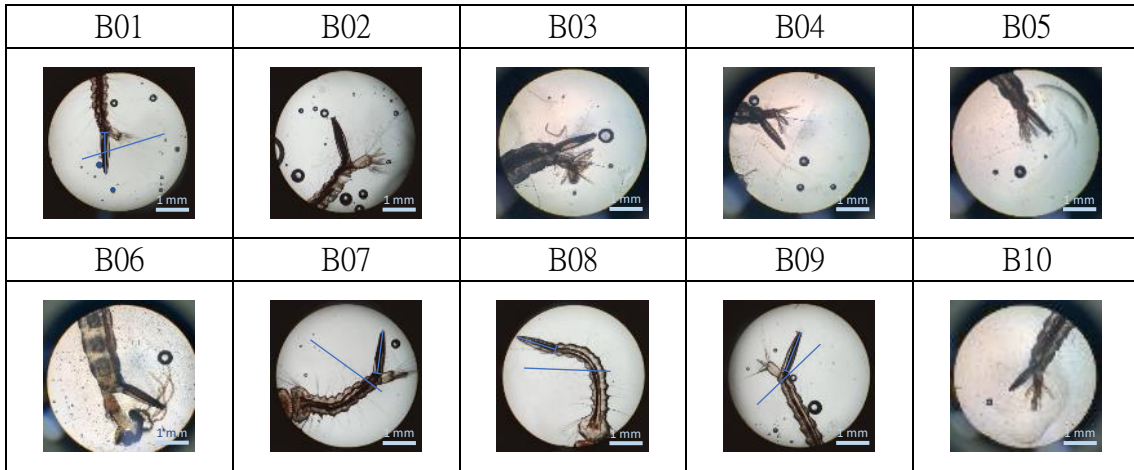


圖十一、五種蚊蟲四齡孑孓閉氣平均與換氣平均

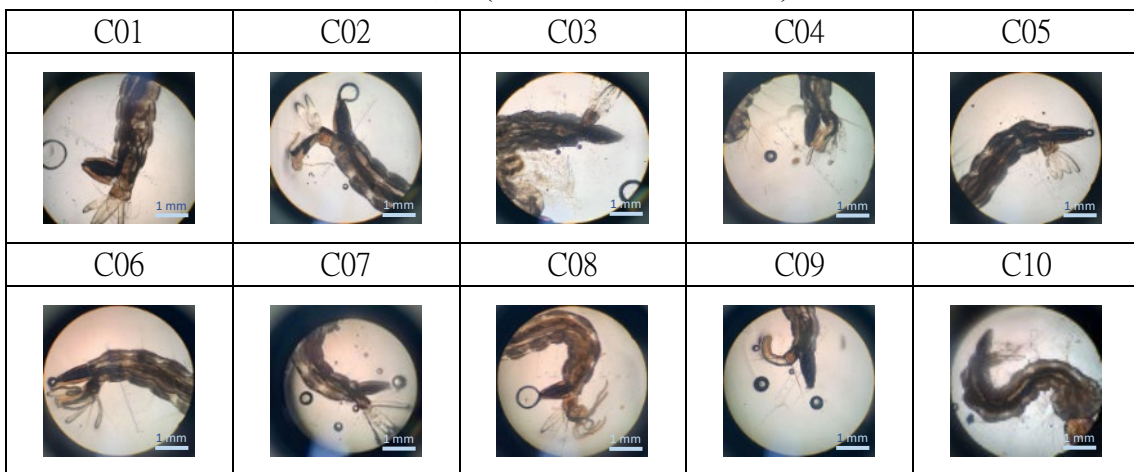
四、呼吸管比值實驗

我們發現閉氣換氣時間與呼吸管比值無關，但呼吸管比值可作為孑孓種類的參考依據，對比文獻資料確定孑孓是同一種類。五種蚊蟲孑孓呼吸管外觀及量測數值如下（圖十二）：

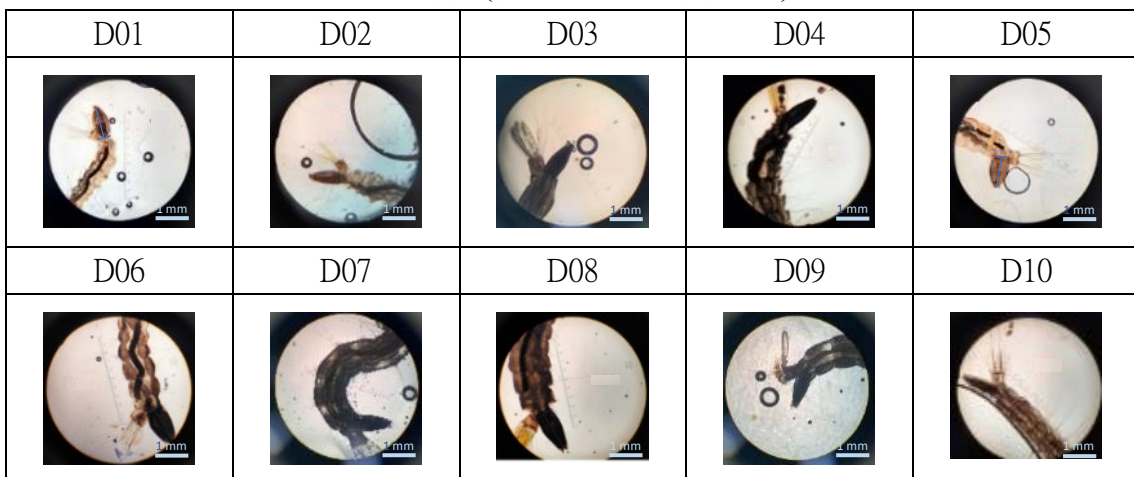
1. 熱帶家蚊四齡幼蟲呼吸管照片（僅各取一張圖片表示）



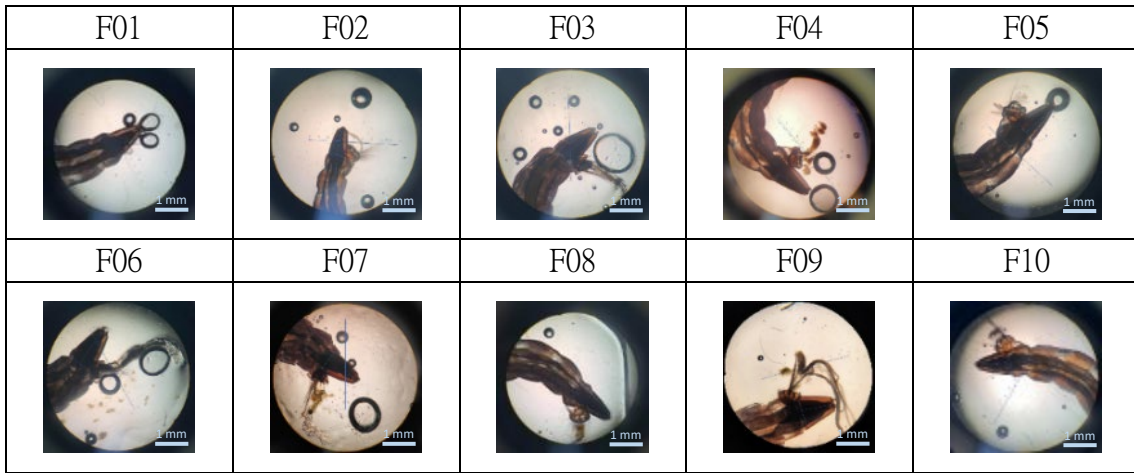
2. 埃及斑蚊四齡幼蟲呼吸管照片（僅各取一張圖片表示）



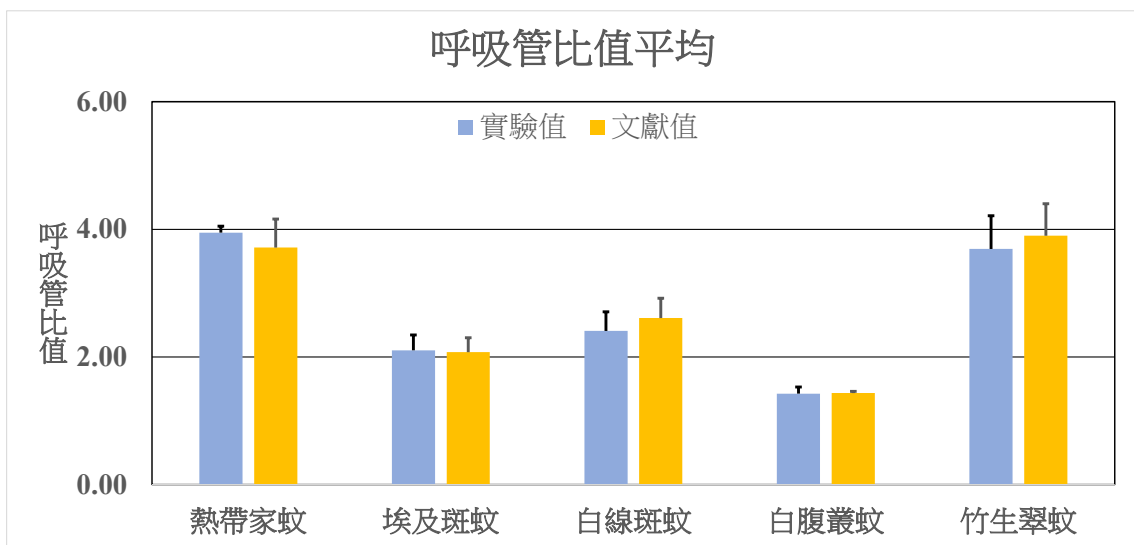
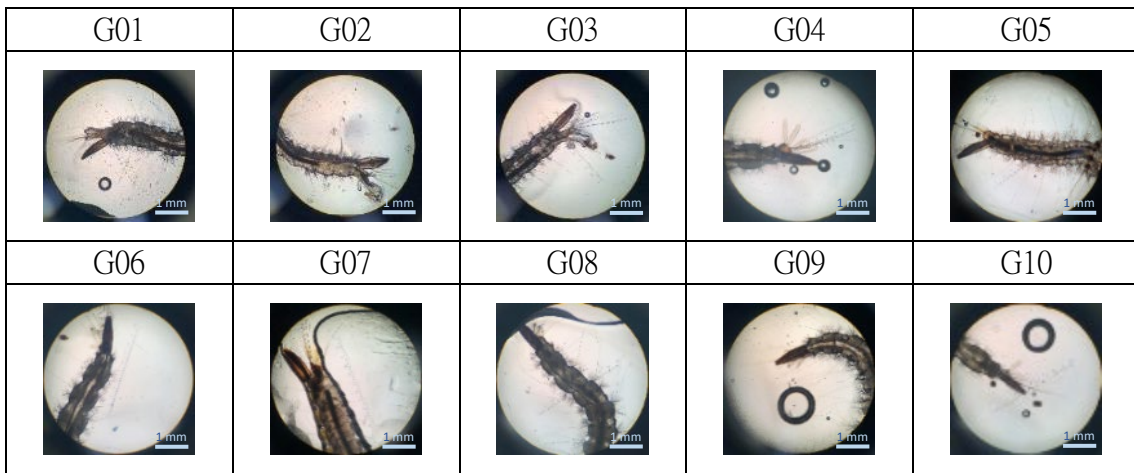
3. 白線斑蚊四齡幼蟲呼吸管照片（僅各取一張圖片表示）



4. 白腹叢蚊四齡幼蟲呼吸管照片 (僅各取一張圖片表示)



5. 竹生翠蚊四齡幼蟲呼吸管照片 (僅各取一張圖片表示)

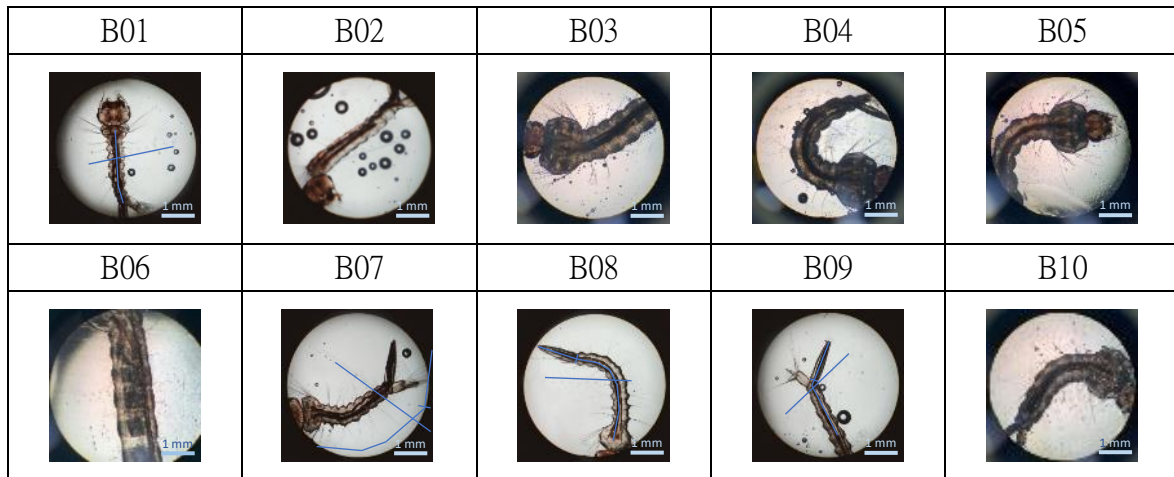


圖十二、五種蚊蟲四齡幼蟲呼吸管比值平均

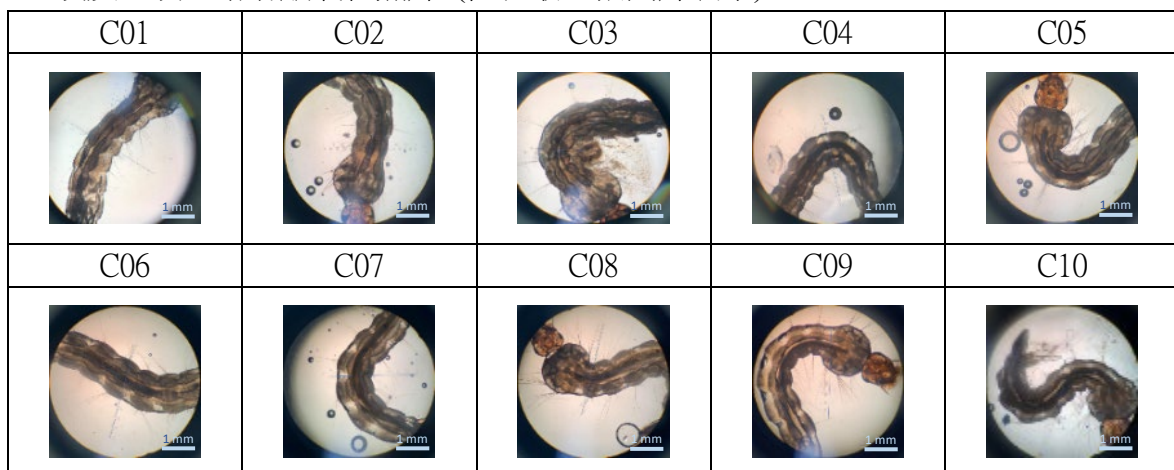
五、氣管長度實驗

我們發現閉氣換氣時間與氣管線性相關程度甚低，而後續以統計分析作數據處理，五種蚊蟲氣管長度外觀及量測數值如下（圖十三）：

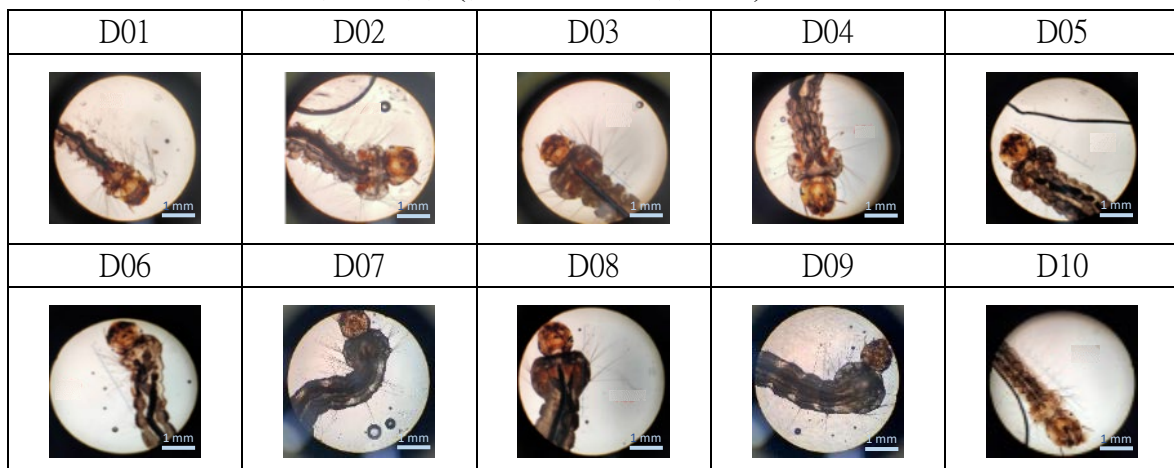
1. 熱帶家蚊四齡幼蟲氣管照片（僅各取一張圖片表示）



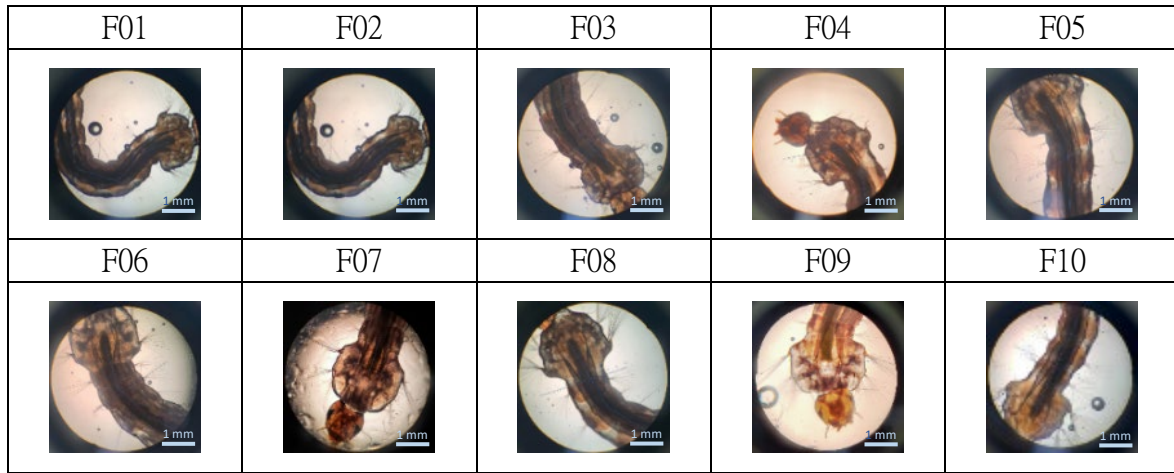
2. 埃及斑蚊四齡幼蟲氣管照片（僅各取一張圖片表示）



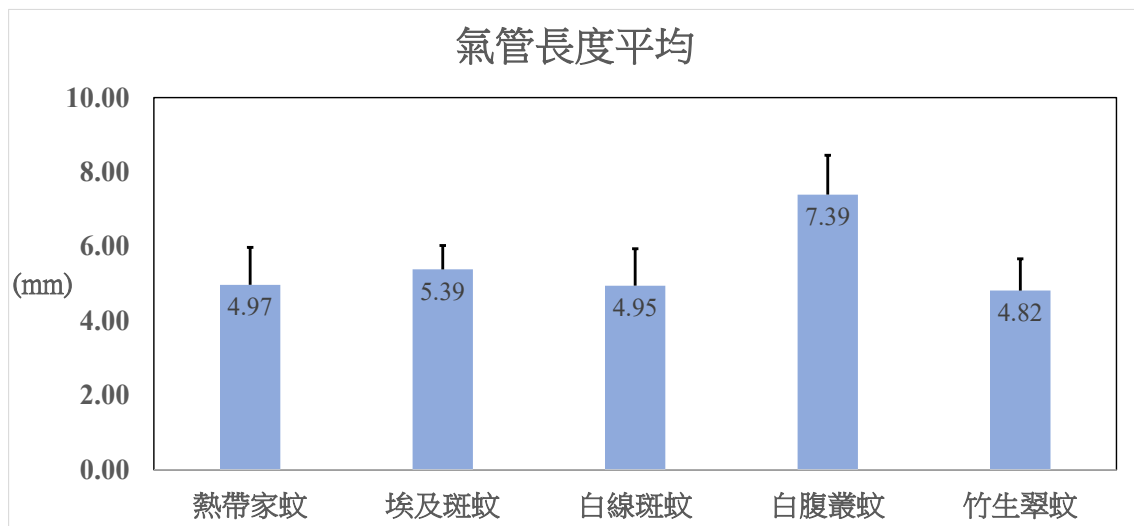
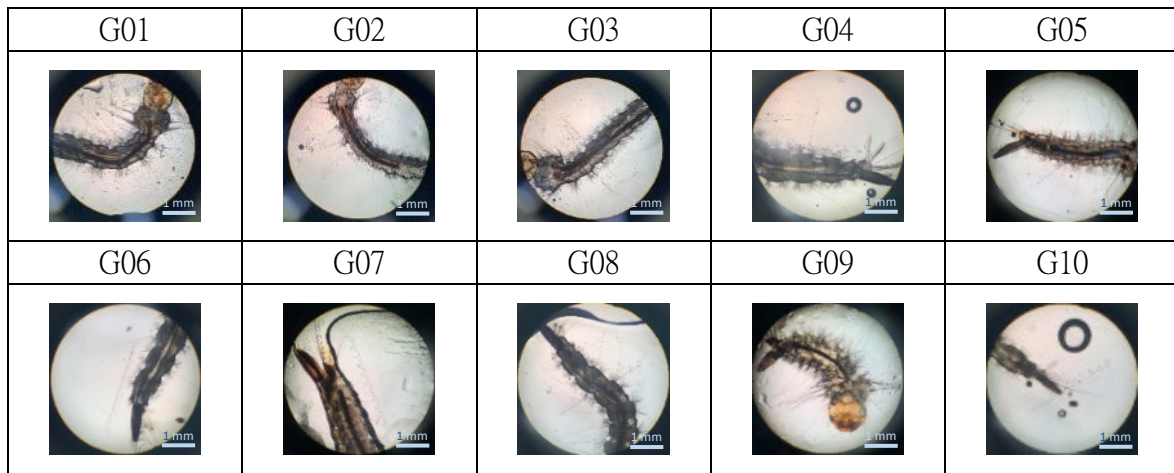
3. 白線斑蚊四齡幼蟲氣管照片（僅各取一張圖片表示）



4. 白腹叢蚊四齡幼蟲氣管照片 (僅各取一張圖片表示)



5. 竹生翠蚊四齡幼蟲氣管照片 (僅各取一張圖片表示)

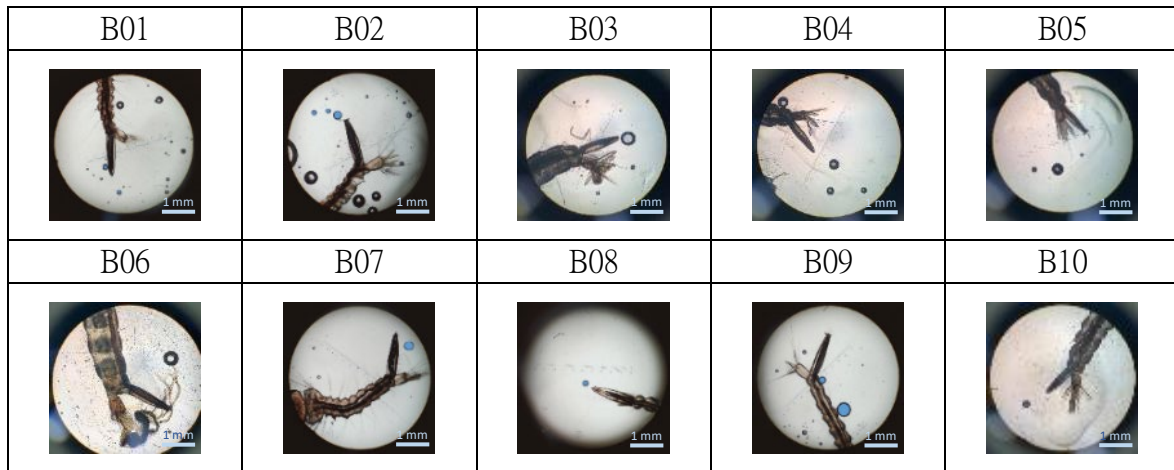


圖十三、五種蚊蟲四齡子氣管長度平均

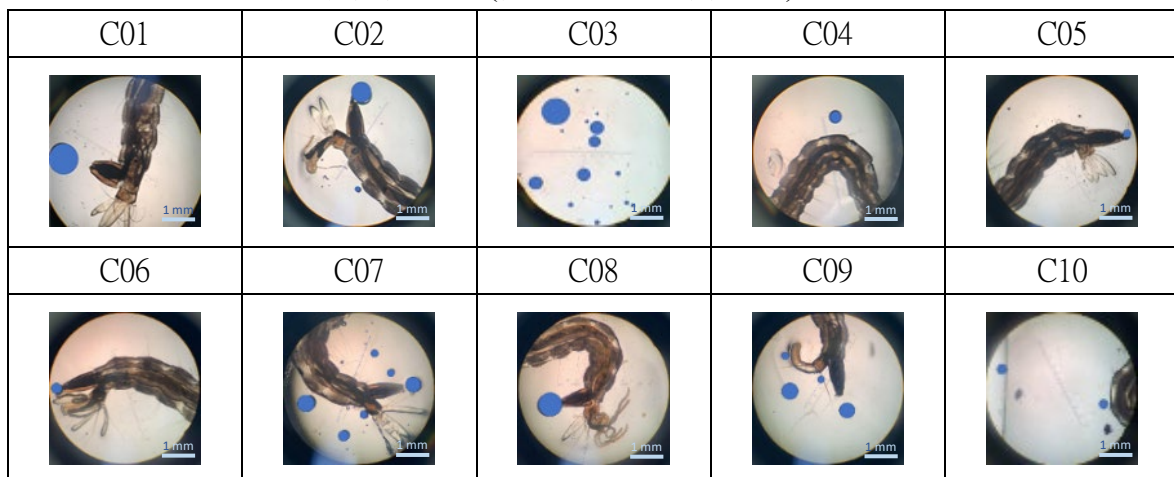
六、氣泡大小實驗

我們發現閉氣換氣時間與氣泡大小線性相關程度甚低，而後續以統計分析作數據處理，五種蚊蟲氣泡大小外觀（藍色圓圈）與量測數值如下（圖十四）：

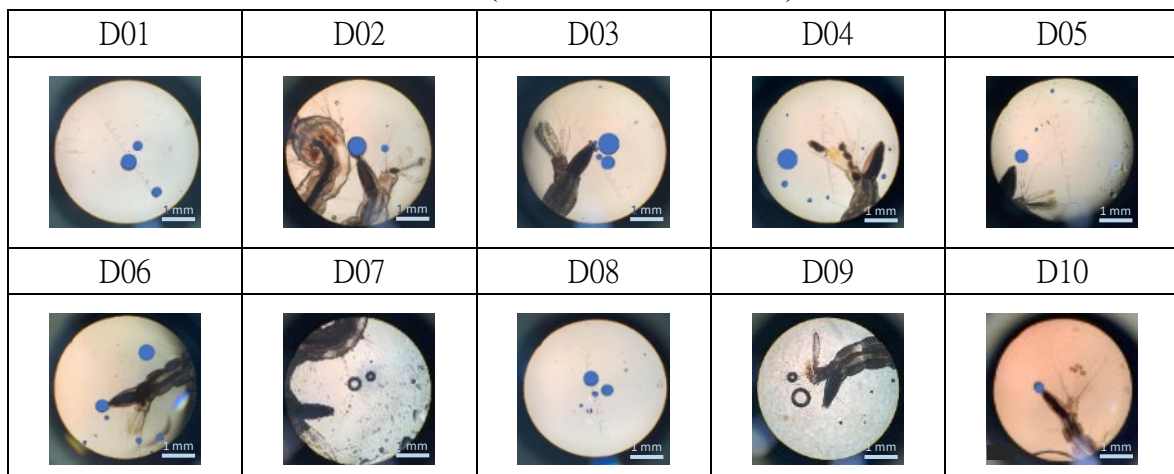
1. 熱帶家蚊四齡幼蟲呼氣氣泡圖（僅各取一張圖片表示）



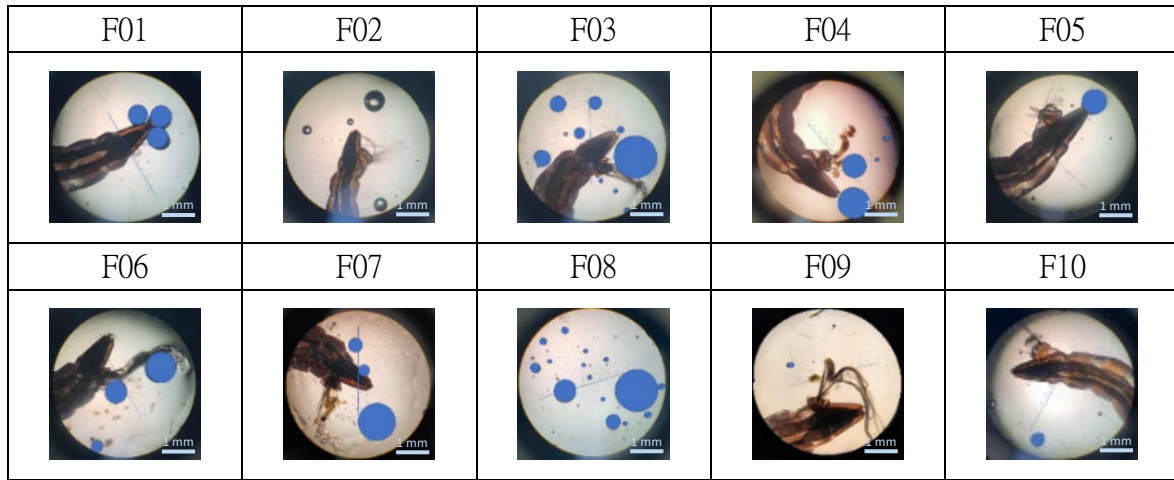
2. 埃及斑蚊四齡幼蟲呼氣氣泡圖（僅各取一張圖片表示）



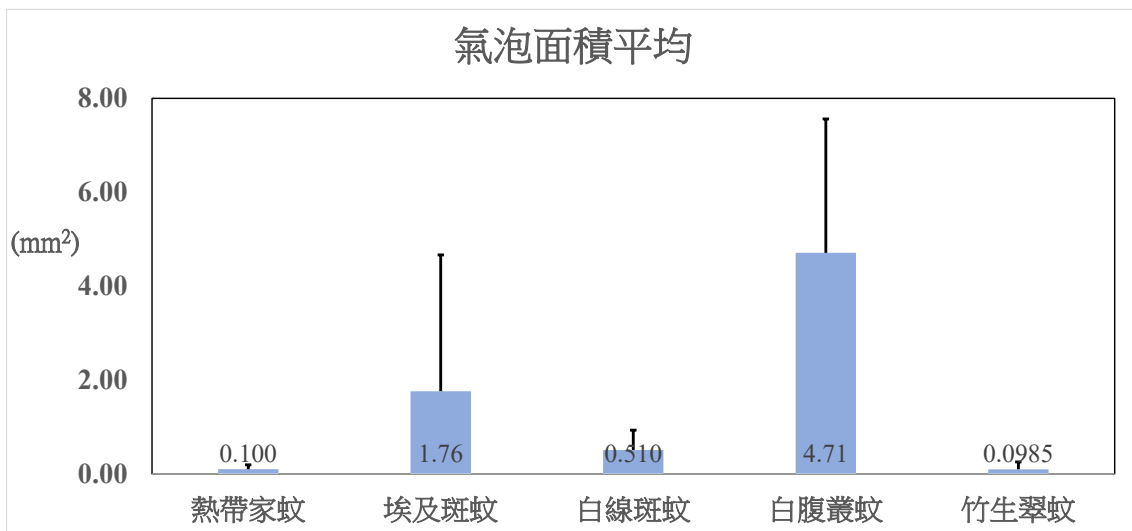
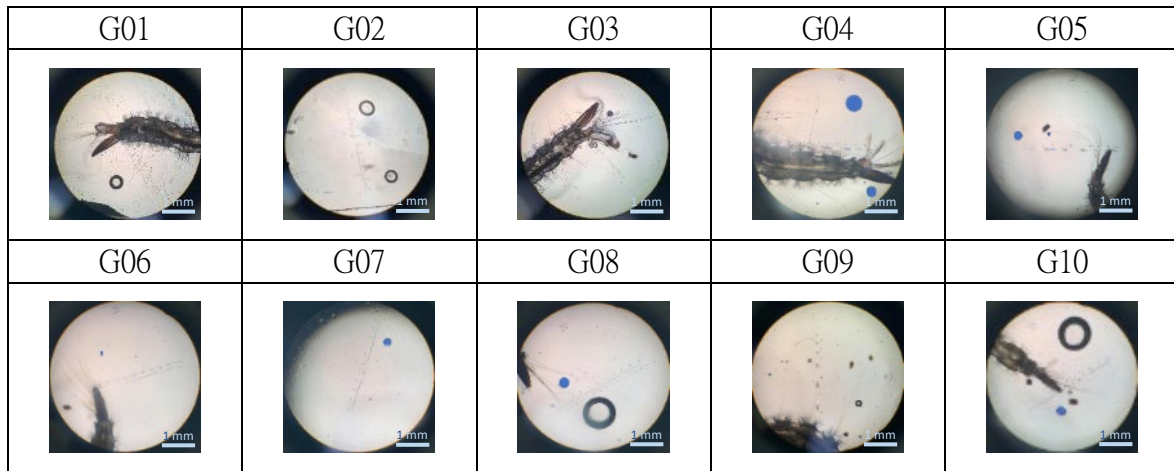
3. 白線斑蚊四齡幼蟲呼氣氣泡圖（僅各取一張圖片表示）



4. 白腹叢蚊四齡幼蟲呼氣氣泡圖 (僅各取一張圖片表示)



5. 竹生翠蚊四齡幼蟲呼氣氣泡圖 (僅各取一張圖片表示)

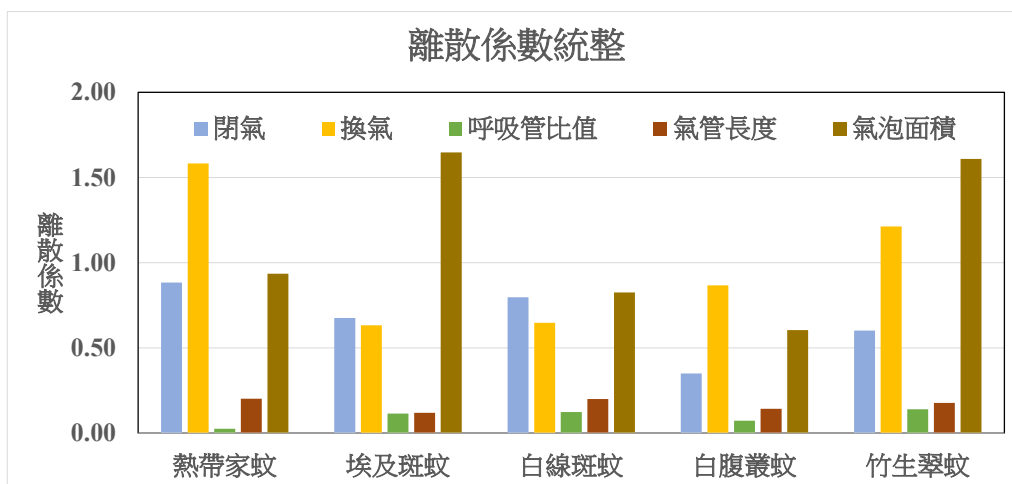


圖十四、五種蚊蟲四齡子氣泡面積平均

七、離散係數統整

由下圖 (圖十五)可知除氣管常數據離散程度較穩定外，其餘四項數據離散程度偏差較大，所以我們採用 t 檢定 (假設變異數相同) 統計分析得到的結果 (表五)。

由統計分析可知五種四齡子子閉氣平均在 $***P<0.001$ 為條件分析下與氣管長有高度相關 (表六)。



圖十五、五種蚊蟲四齡子子的五項量測離散係數統整

表五、五種蚊蟲四齡子子量測項量統計分析 P 值

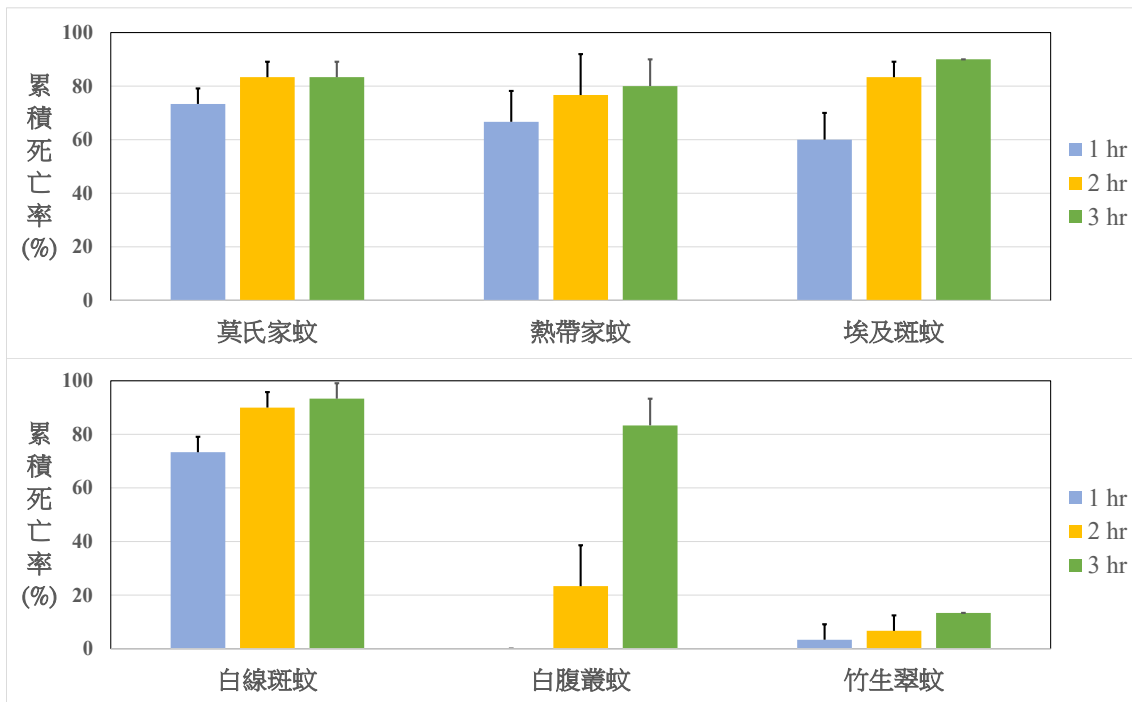
	熱帶家蚊	埃及斑蚊	白線斑蚊	白腹叢蚊	竹生翠蚊
閉氣平均 $***P<0.001=1.00E-03$ (雙尾) 分析閉氣平均是否與其它四個量測項量有關					
對 "換氣平均" 的 P 值	9.82E-01	7.96E-01	2.84E-02	2.02E-01	7.93E-04
對 "呼吸管比值" 的 P 值	8.72E-03	1.26E-05	3.23E-03	3.16E-07	1.11E-04
對 "氣管長" 的 P 值	1.68E-11	3.21E-15	3.10E-11	4.17E-12	6.18E-11
對 "氣泡大小" 的 P 值	2.66E-03	3.42E-02	4.34E-03	1.26E-03	1.10E-01

表六、五種蚊蟲四齡子子閉氣平均與其它四個量測項量統計分析

	熱帶家蚊	埃及斑蚊	白線斑蚊	白腹叢蚊	竹生翠蚊
閉氣平均是否與其它四個量測項量有關 $***P<0.001$					
換氣平均					有相關
呼吸管比值		有相關		高度相關	有相關
氣管長	高度相關	高度相關	高度相關	高度相關	高度相關
氣泡大小					

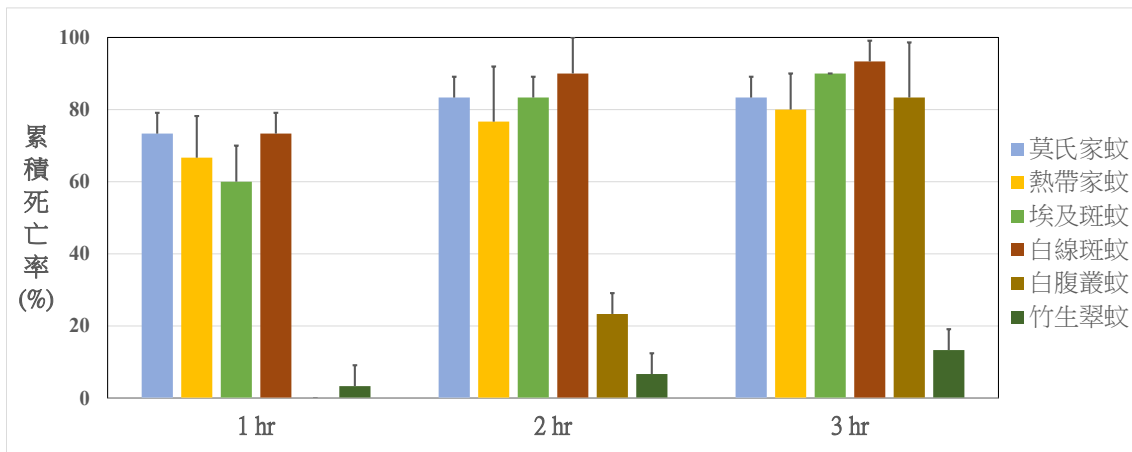
八、單分子生物油膜實驗

使用六種蚊子（新增埃及斑蚊），分析滴加油膜抑制其呼吸空氣，分別觀察第 1、第 2、第 3 小時的死亡率或抑制活動力比率。結果彙整如下（圖十六）：



圖十六、各蚊蟲種類四齡子子在固定時間內累積死亡率

由單分子生物膜實驗發現在不能換氣的情況下，中下層的子子在第一個小時累積死亡率最低（圖十七）。

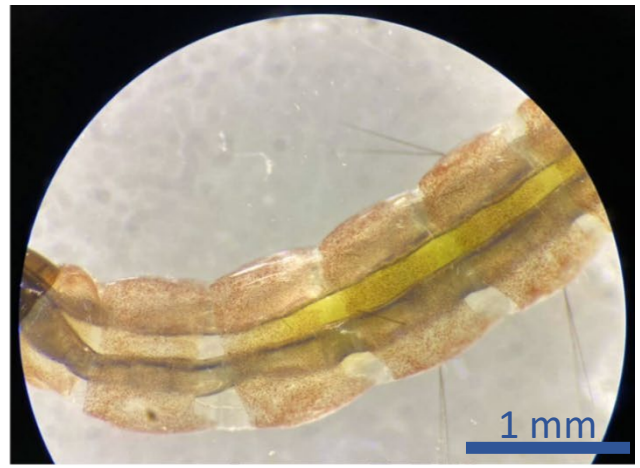


圖十七、六種蚊蟲四齡子子每小時累積死亡率

九、蚊蟲血紅蛋白之 RNA 表現與蛋白質分析

(一) 顯微鏡觀察子子體色

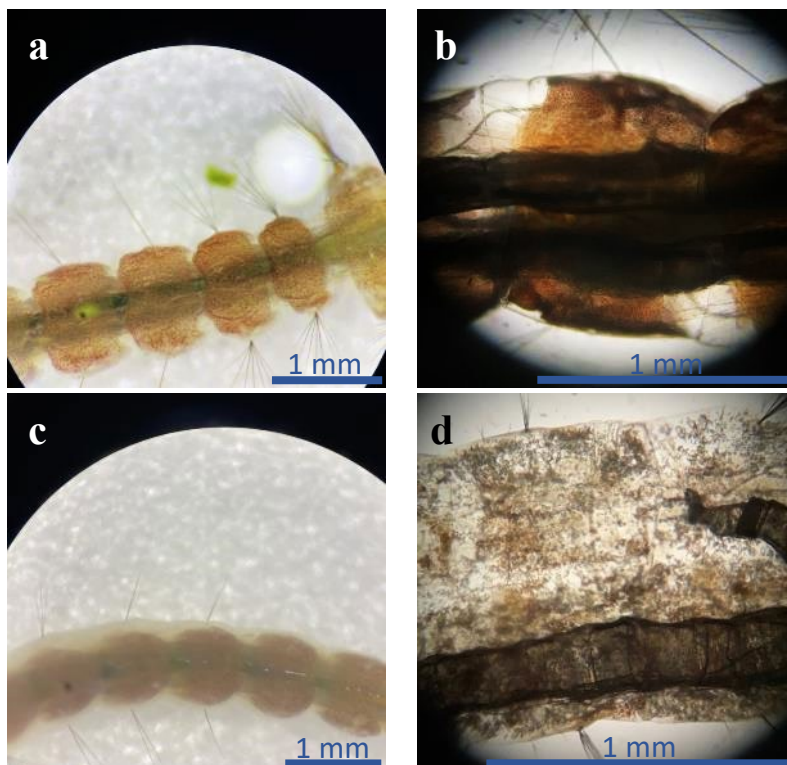
延續上述實驗，白腹叢蚊為底棲停留較久且體色略紅的子子。第一步先將四齡子子製成懸滴玻片標本，放入正立顯微鏡觀察，拍照記錄子子體色，結果發現子子胸部和身體腹部有紅色的點狀物（圖十八）。



圖十八、觀察白腹叢蚊四齡幼蟲頭胸部和尾部之紅色點狀物區塊

(二) 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 (圖十九)。



圖十九、白腹叢蚊四齡幼蟲在顯微鏡底下的體色照片

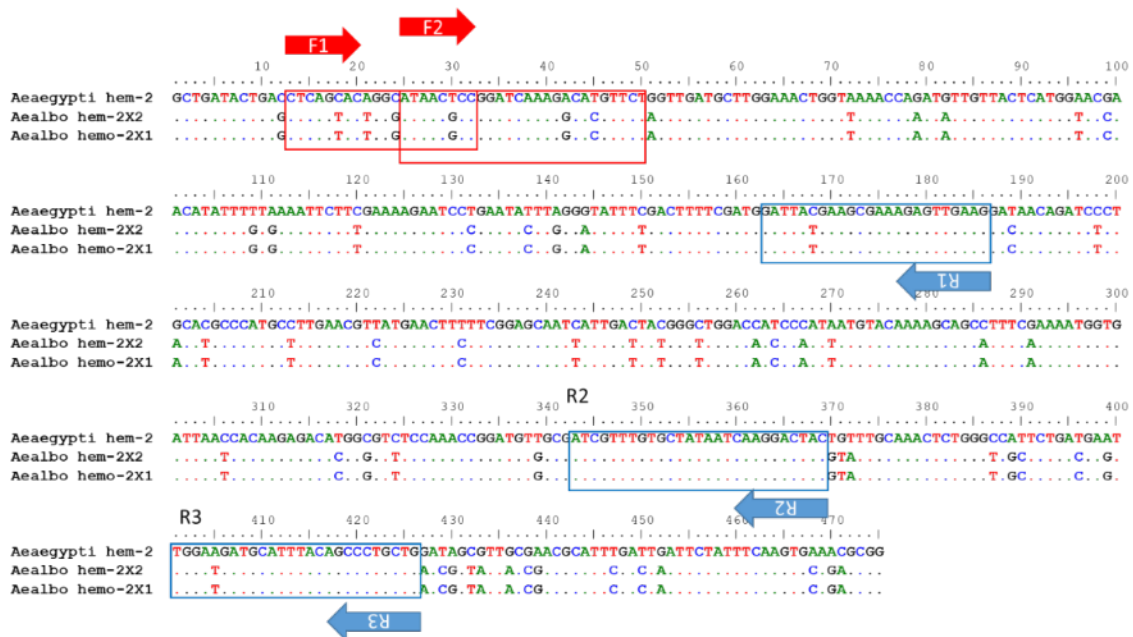
a、b：富氧水中；pH=6.8，溶氧量=7.95 mg / L

c、d：缺氧水中；pH=6.0，溶氧量=5.93 mg / L

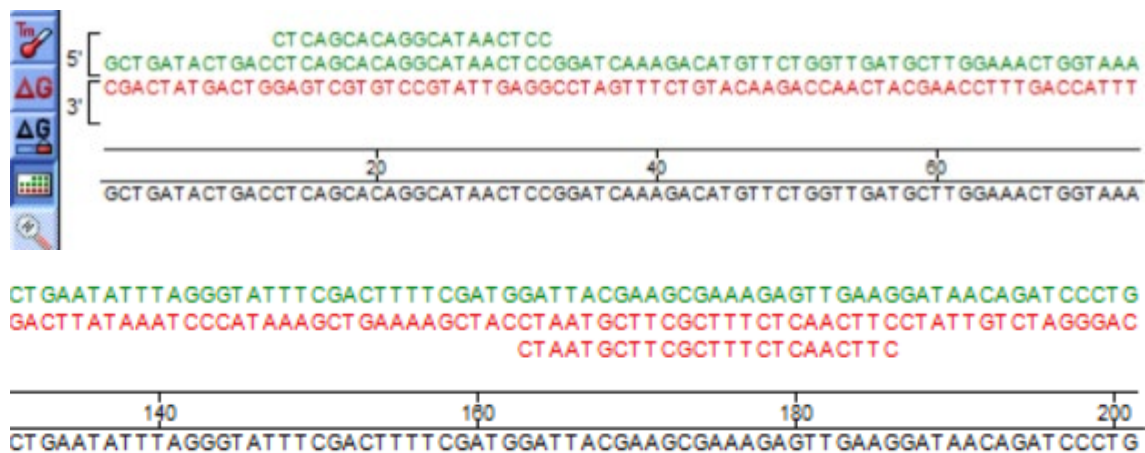
(三) 蚊蟲血紅蛋白之 RNA

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，結果如圖二十。詳細序列圖示如圖二十一。完成抽取六種蚊蟲孑孓 RNA，並以 RT-PCR 分析相關之基因。



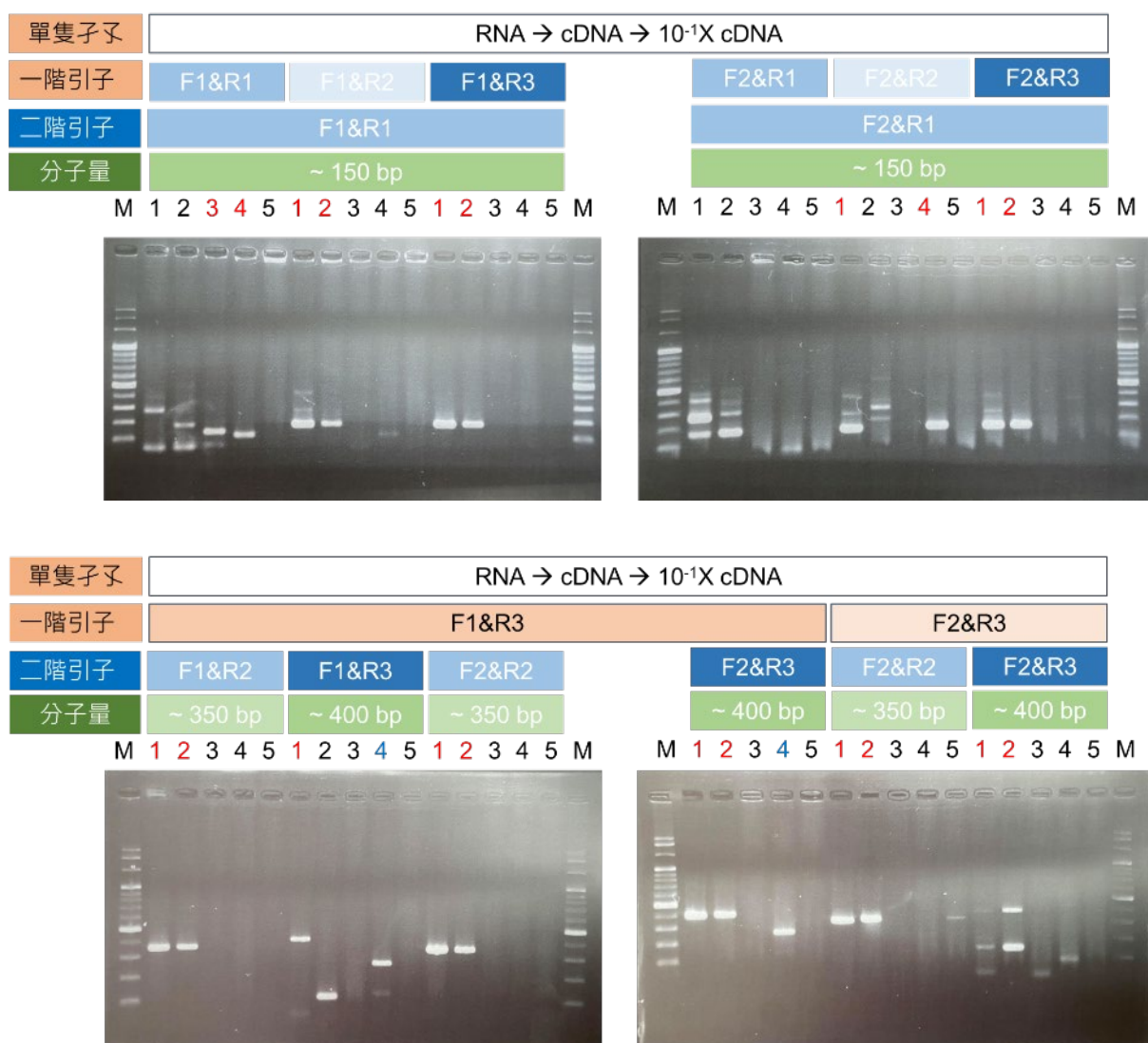
圖二十、以埃及斑蚊和白線斑蚊序列去推測蚊蟲相似的血紅蛋白之 mRNA 序列



圖二十一、蚊蟲相似的血紅蛋白之引子序列表示

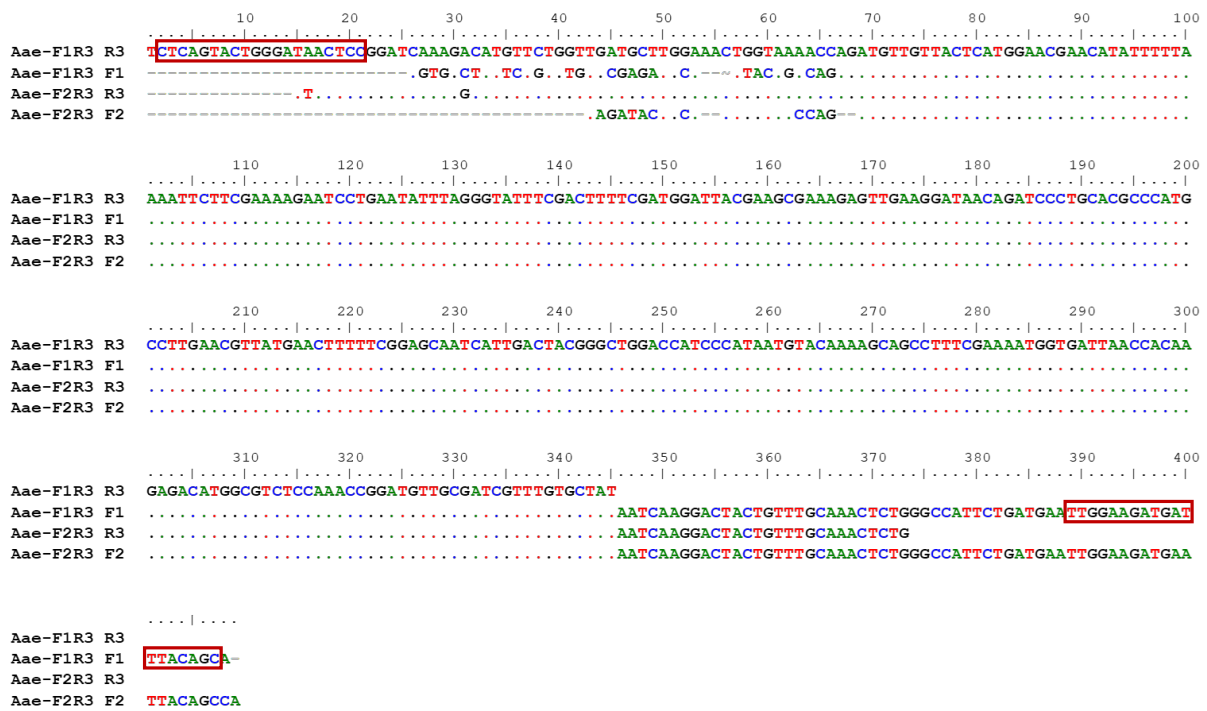
蚊幼蟲 RNA 轉成 cDNA 之後，以二階的 PCR 成功增幅 6 種子子的血紅蛋白基因片段 (圖二十二)，並完成白線斑蚊、埃及斑蚊和三斑家蚊的長片段基因定序 (約 400 bp)，以及黃尾掠蚊、白腹叢蚊和竹生翠蚊的短片段基因定序 (約 150 bp)。經 NCBI 比對後，僅有一條或二條序列可供比對，其中埃及斑蚊與網路上的 XM_001654393.2 100% 相似 (圖二十三)、白線斑蚊與 XM_029864593.1 99.4% 相似，為全球首次以 RT-PCR 證明蚊蟲具備血紅蛋白的基因。

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。



圖二十二、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



圖二十三、埃及斑蚊子子的血紅蛋白基因序列 (紅框為引子所在之處)

(四) 蚊蟲血紅蛋白之蛋白質表現

我們將利用血紅蛋白的保守區特性，以常用的抗人類血紅蛋白抗體、抗昆蟲血紅蛋白抗體等，來進行西方墨點法 (Western blotting)，以雜合抓取蚊蟲的血紅蛋白基因表現。(進行中)

陸、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。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 (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。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，未來仍須進一步確認，在何種條件下可以觀察到該血紅蛋白的表現，例如溶氧的數值和浸泡的時間長短等。未來，更可以透過定量 PCR 的工具，來確認血紅蛋白基因表現量與溶氧高低之間的關係。

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。新近文獻也指出仰泳蝽科 (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。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。

未來實驗將繼續強化和補足實驗數據，包括：(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 RNA 分子檢測，分析孑孓血紅蛋白基因的表現與溶氧之間的關係；(5) 利用蛋白質的抗原抗體反應分析，確認蚊蟲體內有血紅蛋白，以進一步確認血紅蛋白的功能。

柒、結論

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，才能釐清孑孓血紅蛋白基因的存在和扮演的功能。

六、由於蚊蟲具備血紅蛋白是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，才能釐清和完備孑孓血紅蛋白存在和扮演的功能。

捌、參考文獻資料

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.

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】 052002

研究目的為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。

數據應該有統計分析的結果才可信，檢測單純變因（如：溫度、濃度）所造成的影響，創意有限，單純呈現觀察結果但無進一步的探討。

1. 建議可以探討血紅蛋白量的變化，更可進一步探討幼蟲水中分布之分層，血紅蛋白的量是否有變化？
2. 此作品的研究目標明確但不夠深入，目前所得的結果尚屬初步階段，尤其是血紅蛋白基因的分析上，對相關研究領域的貢獻度不高。
3. 探討不同蚊蟲血紅蛋白的 mRNA 序列，雖已有少數報導，若能找出其他未知蚊蟲的基因序列仍具有部分新穎性。應有文獻回顧的段落，並說明此作品探討的方向與過去研究有哪些不同。
4. 此研究所使用的方法大致合理可行，但 mRNA 序列及蛋白質分析的研究策略具有相當的風險，僅用少數蚊科相關血紅蛋白的 mRNA 序列來設計引子，很有可能無法增幅不同蚊蟲的血紅蛋白基因；西方墨點分析也同樣具有類似的風

險。資料分析雖有使用統計方法，但沒有顯著性檢定，以確定該分析是否具顯著性差異。有些數據的變異較大，建議可增加樣本數。僅得到部分的 mRNA 序列，並無法確切的證實該基因是否真的具有血紅蛋白攜氧的功能

5. 簡報資料編排合理，多數圖表內容清晰，少數字體略小。

作品簡報

中華民國第 61 屆中小學科學展覽會

高級中等學校組

動物與醫學學科

編號：052002

深呼吸

孑孓與搖蚊幼蟲

如何在水中呼吸和閉氣

研究背景

- 自然界不同種類子孓於水中分上下層活動，目的為取食、呼吸和避敵等。
- 子孓主要以**氣管系統**呼吸，搖蚊幼蟲則以**血紅蛋白系統**獲得氧氣。



圖一、子孓呼吸方式

子孓

搖蚊
幼蟲
(紅蟲)



圖二、搖蚊幼蟲呼吸方式

研究目的

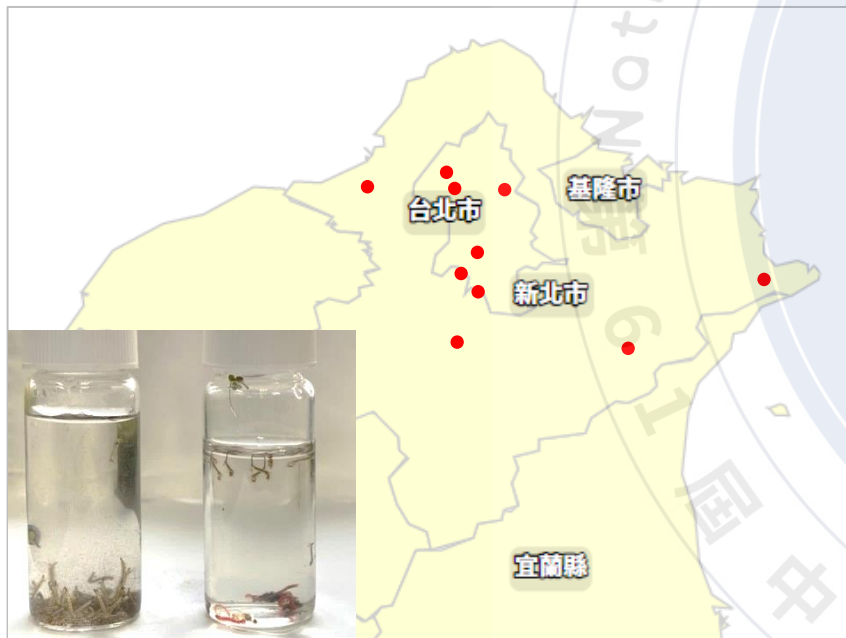
- 了解不同種類孑孓生活水中分層位置是否與其呼吸管比值、氣管長度、氣泡大小、閉氣和換氣頻率有關聯。
- 連結搖蚊幼蟲的血紅蛋白，推測孑孓體內是否也有此類色素蛋白，釐清孑孓呼吸獲得氧氣的策略，包括：
 - (一) 用呼吸管到水面呼吸，透過氣管傳送空氣。
 - (二) 透過體內血紅蛋白捕捉氧氣，成為氧氣的替代來源。
 - (三) 孑孓在富氧環境下大量表現血紅蛋白色素。

問題一

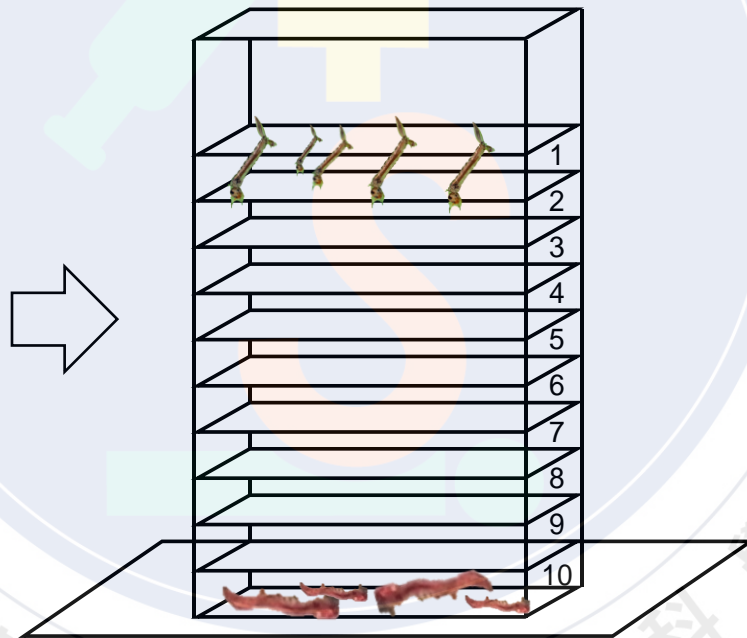
不同種類的四齡孑孓在水中是否會分層分布？
與其體內累積氣體多寡是否有關？

假設 不同種類的孑孓在水裡有明顯之分層特性。而且，分布於上層和底層水體的孑孓，其氣管內累積的氣體體積不同。

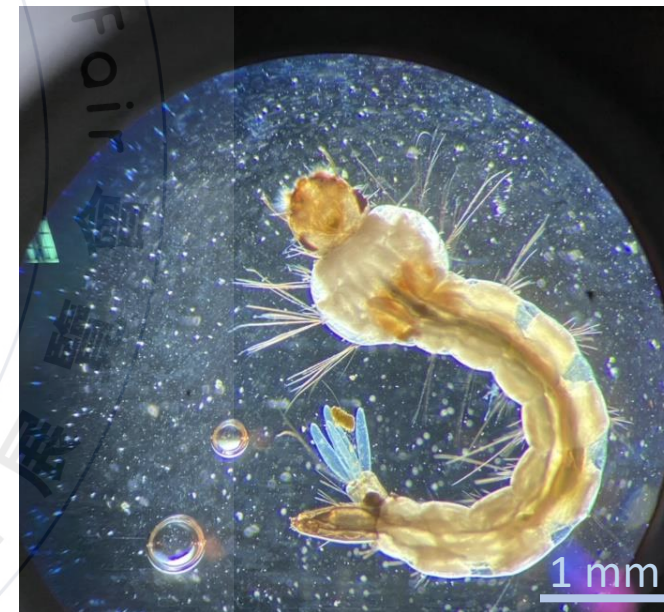
方法 野外採集蚊蟲，觀察其分布。量測孑孓排出的氣泡，推斷其氣管內累積的氣體量。



圖三、孑孓與紅蟲的野外採集地點



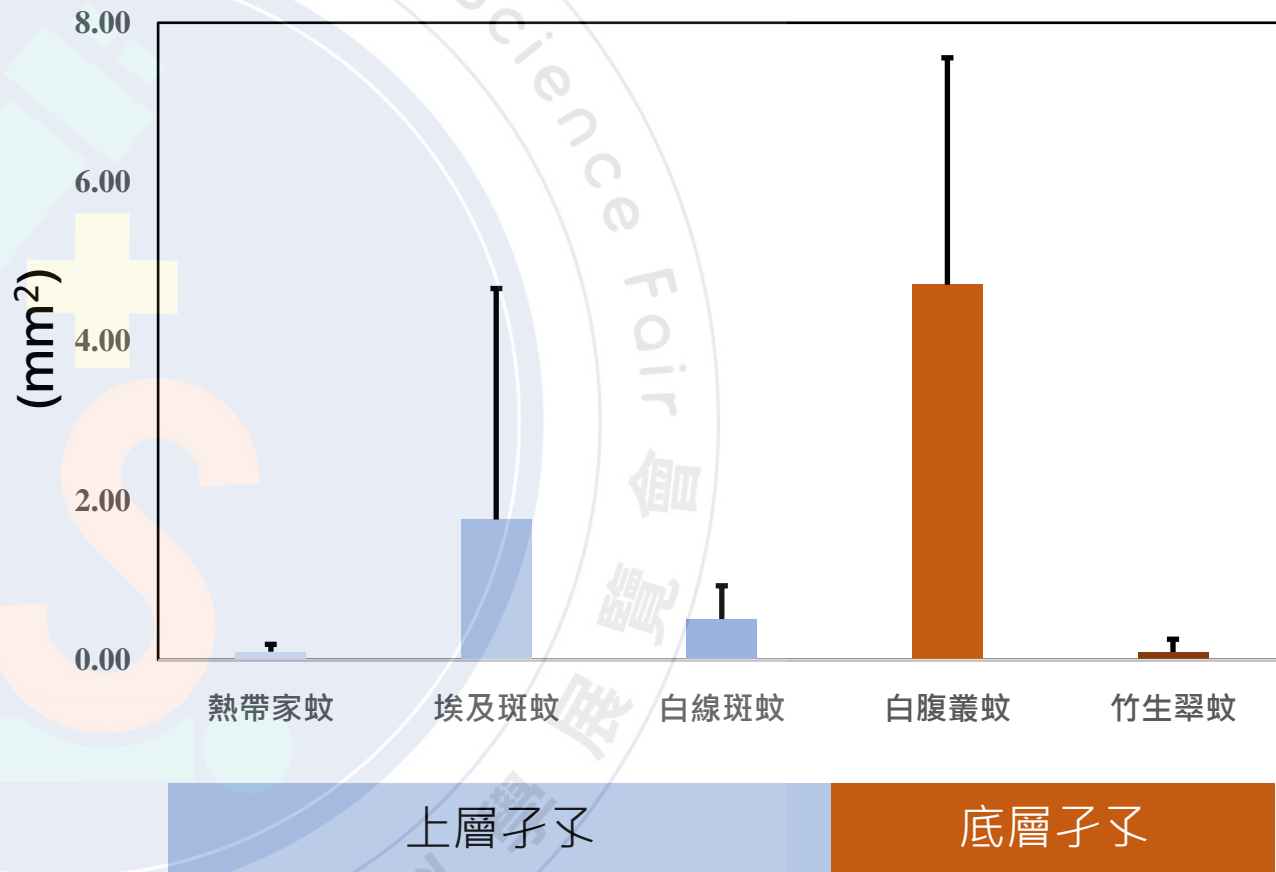
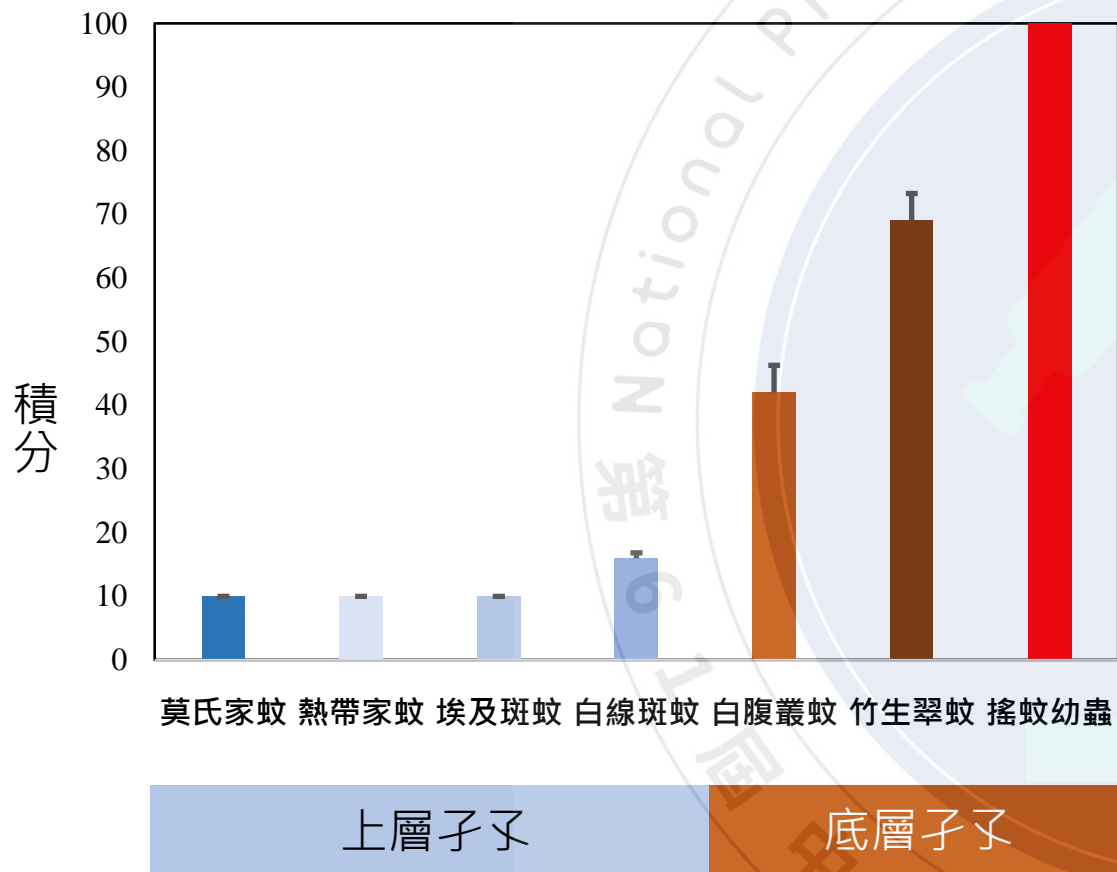
圖四、分層積分實驗示意圖



圖五、孑孓及其排出氣泡 (40X)

結果一

不同種類的四齡孑孓確實在水中有上下分層的狀況。
四齡孑孓體內的氣泡大小與其分布位置差異不顯著。



圖六、各種類孑孓在水中分層積分結果

圖七、各種類孑孓排出氣泡面積平均

問題二

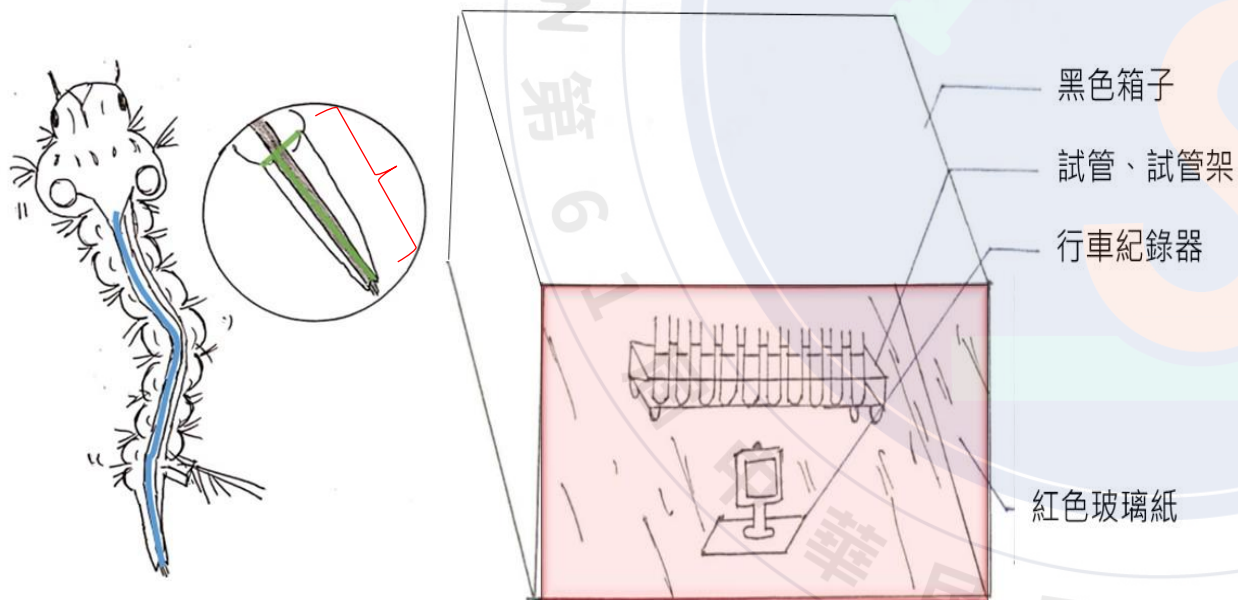
不同蚊種四齡孑孓在水中的分布與其呼吸管、氣管系統及沉浮頻率的關係？阻絕空氣對孑孓存活的影響為何？

假設 不同種類的孑孓在水中之分布位置與其各種生物物理量有相關。

上層的孑孓較需氧氣，而底層孑孓可以耐低氧。

方法1 (自然情況)

量測各蚊種子孓的呼吸管、氣管長度及閉氣換氣時間，統計分析它們與分層的關係。



圖八、孑孓呼吸機制研究方法

方法2 (阻絕空氣)

運用生物油膜使孑孓無法換氣後，計算各種類每小時的累積死亡率。



圖九、單分子生物油膜研究方法

結果二

底層與上層子子的氣管長度及閉氣平均，達統計顯著差異。
 底層子子的累積死亡率遠低於上層子子，達統計極顯著差異。

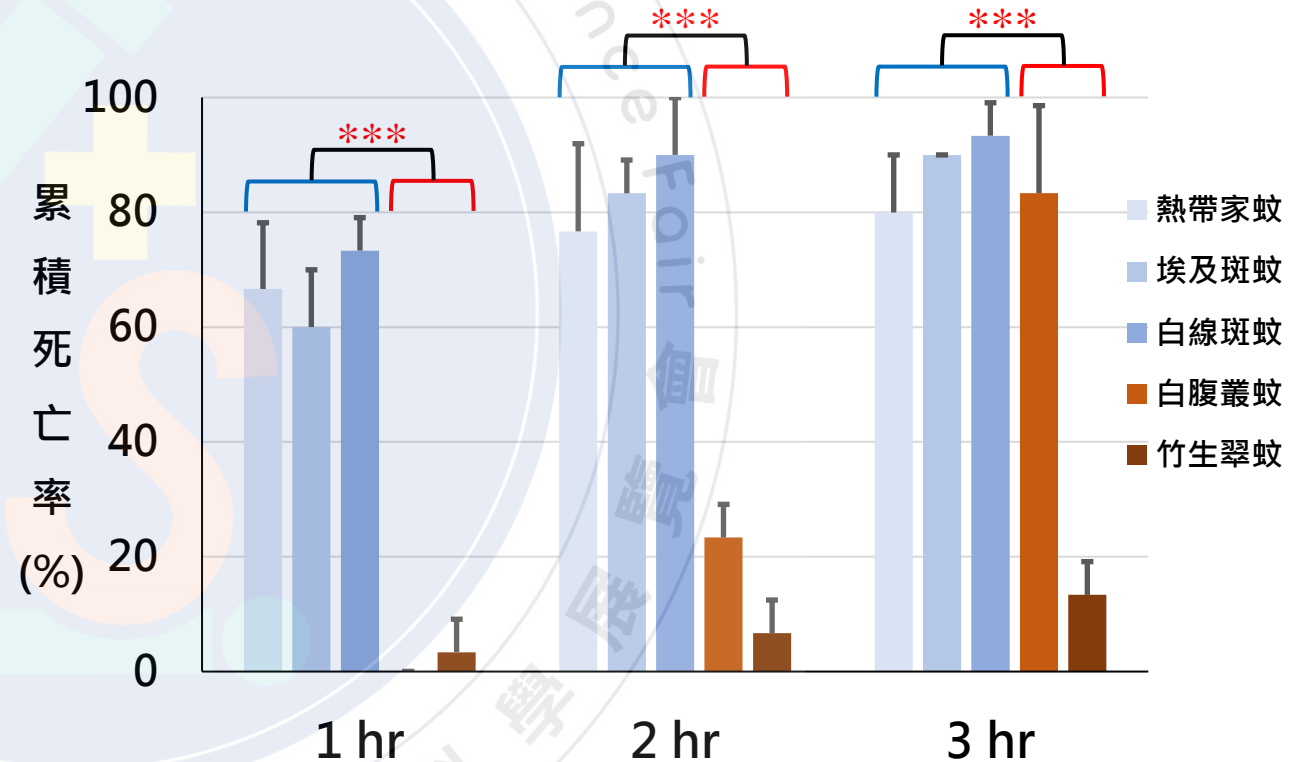
表一、不同水層子子之呼吸管、
 氣管系統和換氣閉氣之關聯性比較

	上層子子 ^a (M±SD)	下層子子 ^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

a 上層：熱帶家蚊、埃及斑蚊、白線斑蚊；

b 下層：白腹叢蚊、竹生翠蚊

*p<0.05



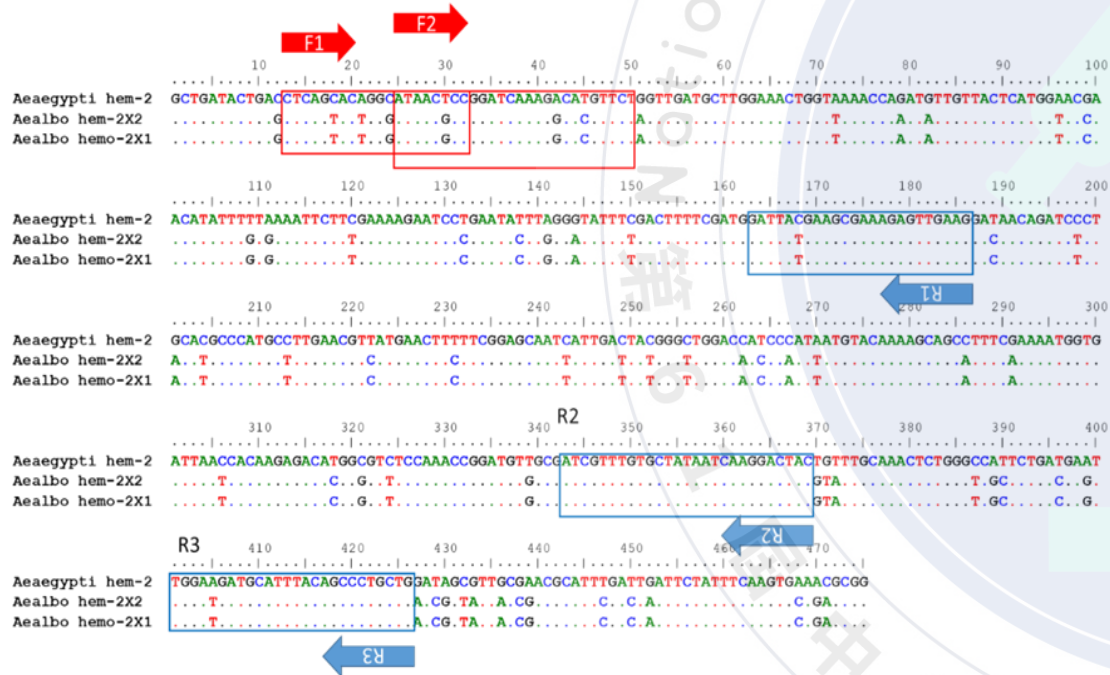
圖十、五種蚊蟲四齡子子每小時累積死亡率
 (***) p<0.001

問題三

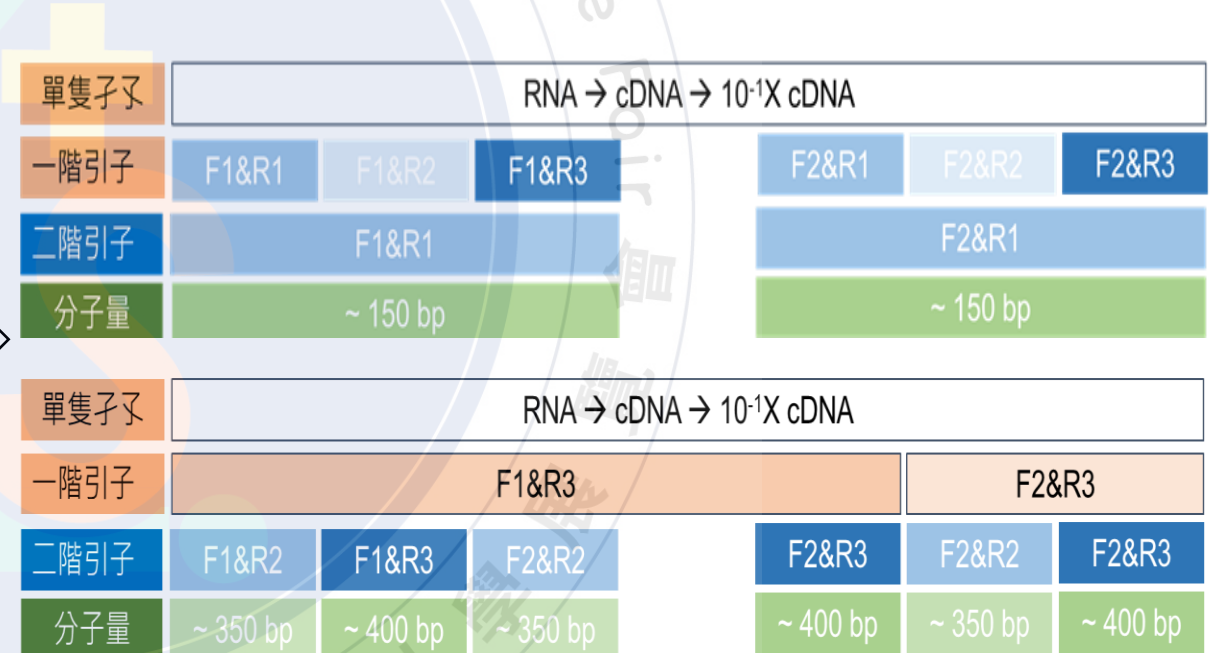
底層的竹生、白腹子子是否有類似搖蚊幼蟲的血紅蛋白？

假設 底層的竹生、白腹子子具有血紅蛋白，並透過此機制來獲得氧氣。

方法 設計廣用引子對後，利用二階 RT-PCR 增幅子子血紅蛋白的基因。



圖十一、以基因組資料庫中埃及斑蚊和白線斑蚊序列去推測相似的血紅蛋白之 mRNA 序列，設計蚊蟲廣用引子對。

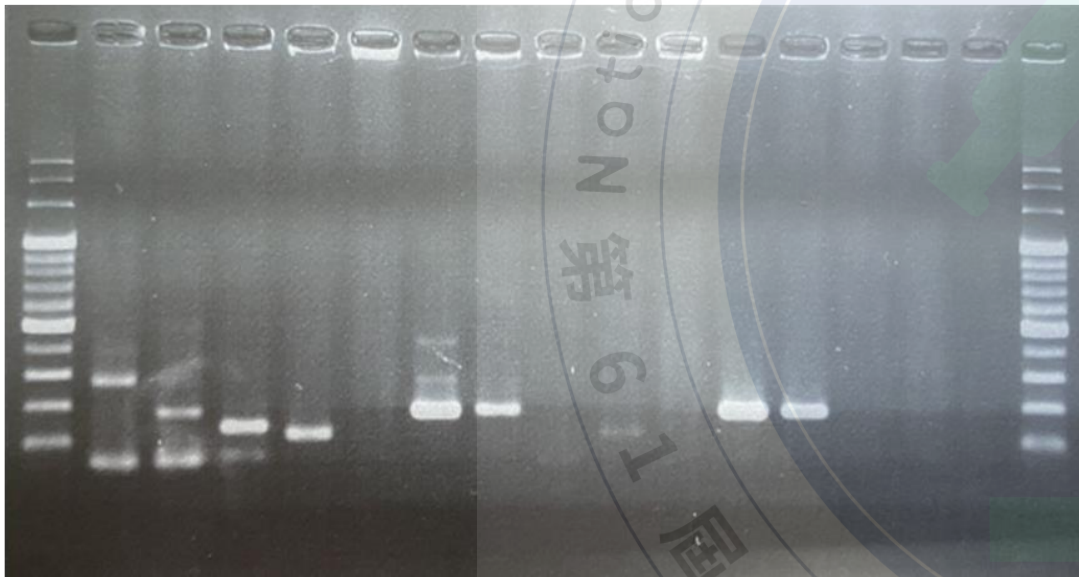


圖十二、利用一階二階引子進行PCR

結果三 底層的竹生、白腹子子具有似搖蚊幼蟲的血紅蛋白基因。

首次成功增幅 5 種蚊蟲四齡子子的血紅蛋白基因。

M 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 M



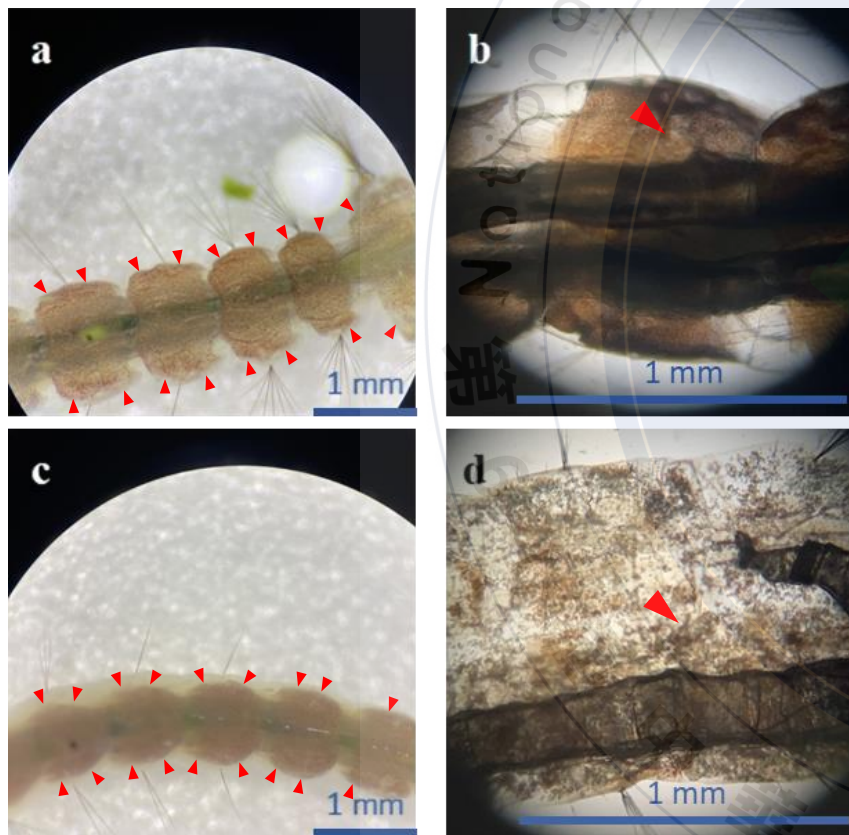
圖十三、蚊幼蟲血紅蛋白基因之 RT-PCR 結果
M. 100 bp DNA Marker ; 1. 埃及斑蚊 ;
2. 白線斑蚊 ; 3. 白腹叢蚊 ; 4. 黃尾掠蚊 ; 5. 水

圖十四、蚊蟲血紅蛋白基因親緣關係樹形圖

問題四 孑孓血紅蛋白基因的功能性表現？

假設 白腹四齡孑孓在富氧環境下，會活化並大量表現血紅色素蛋白。

方法 在顯微鏡底下觀察富氧及缺氧環境下，可以鑑別孑孓體色的變化。



結果四

富氧水體中，體表呈現大範圍亮紅色。

缺氧水體中，體表色澤黯淡無光澤。

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

圖十五、白腹叢蚊四齡幼蟲在顯微鏡下的體色變化

▶ 紅色斑點標記

結論

- 自然界的蚊蟲孑孓在水裡有不同的分層現象
 - 上層：白線斑蚊、埃及斑蚊、熱帶家蚊
 - 底層：白腹叢蚊、竹生翠蚊
- 長時間停留底層的蚊蟲孑孓具有之特性
 - 平均氣管長度較長
 - 平均閉氣時間較久
- 證實五種蚊蟲孑孓具有血紅蛋白基因
 - 血紅蛋白基因序列具有多樣性
- 發現底層蚊蟲孑孓的幾丁質內側具有紅色點狀物
 - 富氧時體表紅色呈現大範圍亮紅色
 - 缺氧時體表色澤黯淡
- 綜合以上，蚊蟲孑孓除了透過氣管系統呼吸，可能同時也以血紅蛋白系統獲得氧氣



圖十六、上層蚊蟲孑孓



圖十七、底層蚊蟲孑孓

未來展望

- 持續建構不同蚊種子血紅蛋白基因之親緣關係
- 建立子體表或體內血紅蛋白之表現強度與分布
 - 以高階顯微鏡觀察血紅蛋白之表現區域
 - 以 RT-qPCR 評估血紅蛋白基因之表現量
 - 以基因轉殖技術免疫小鼠，生產抗體並藉由免疫螢光標定技術，定位子體表現血紅蛋白之空間分布



圖十八、子血紅蛋白表現之免疫螢光標定示意圖

參考資料

- 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.
- 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.
- 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。