

出國報告（出國類別：研習）

研習埃及斑蚊 VGSC 基因的 kdr 突變 偵測實驗

服務機關：衛生福利部疾病管制署 研究檢驗及疫苗研製中心

姓名職稱：陳典煌 研發替代役 博士後研究

派赴國家：日本

出國期間：2014/12/14～2014/12/26

報告日期：2015/01/06

目次

一. 摘要.....	1
二. 目的.....	2
三. 過程.....	3
四. 實驗研習內容.....	4
五. 心得與建議.....	17
六. 參考文獻.....	18

摘要

此次至日本國立感染症研究所進行實驗研習，主要研習的實驗為偵測埃及斑紋內 voltage-gated sodium channel (VGSC) 基因的活性位置發生的 knockdown resistance (kdr) 突變。此次實驗使用 SMK 品系為對照組，從台灣屏東抓到的蚊子為實驗組，以 PCR 實驗及定序找到屏東的蚊子內存有兩個 kdr 的突變點。在實驗過程中，除了完整操作各個實驗步驟外，亦學習到其他新的觀念與實驗技術。以 EVA green 取代 SYBR green，於 QPCR 實驗時便可用 melting curve 的差異判斷出有無突變點的存在。除了一般的染劑外，越來越多實驗使用探針來偵測突變點的存在。Q probe 為一類似引子的 DNA 短片段，將所要偵測的突變點設計於中央，在探針旁接上螢光。當出現突變時，此探針無法與偵測片段完美結合，便會在較低溫時發出螢光，此時便可分辨出突變點的存在。另一探針稱為 E probe，為偵測 TA 之間突變之利器，此探針在 T 鹼基上結合兩個螢光，一樣是利用探針與 DNA 模板間的結合力量強弱來分析突變點的存在與否。若是檢體存在突變點，則此探針與片段無法完美結合，在較低溫時探針與模板便會分離而發出螢光。此類新方法的設計與開發朝向於短時間內進行大量檢體檢測所設計，希望可找到有適合大量篩檢而且準確度高又省錢的方法。

目的：

除蟲菊精類殺蟲劑對哺乳動物毒物低，能有效消滅病媒蚊，是目前公共衛生上最常用的殺蟲劑之一。除蟲菊精類殺蟲劑作用機制為此化學物質進入到神經系統後會引發毒性。除蟲菊精類殺蟲劑會結合上神經細胞裡的鈉離子通道，此鈉離子的通道負責神經訊號的傳遞。一旦除蟲菊精類殺蟲劑結合到鈉離子通道，此鈉離子通道會被阻塞，導致此神經細胞會過度活化（hyperexcitation）然後慢慢失去功能。當昆蟲神經細胞功能被破壞時，便逐漸走向死亡。

常常使用此殺蟲劑會使得有抗藥性的蚊蟲品系增加，所以偵測 genotyping 抗藥性相關的基因可以讓我們在病媒蚊防治策略的擬定上有所助益。而目前對除蟲菊精類殺蟲劑產生抗性的蚊子，大多是 voltage-gated sodium channel (VGSC) 基因的活性位置發生突變，而失去活性。此種突變稱為 knockdown resistance (kdr)，目前的研究在埃及斑蚊的 VGSC 基因上發現多個 kdr 的突變點，而這些突變點的存在會使得除蟲菊精類的殺蟲劑失去效果。因此在本次研習目的為使用 VGSC 的五個基因突變位點檢測登革熱病媒蚊抗藥性，藉以評估除蟲菊類殺蟲劑的效果。

過程：

於 12 月 14 日抵達東京後，在 12 月 15 日進入到日本國立感染症研究所進行實驗研習。此次實驗研習的實驗室為昆蟲醫學部的殺蟲劑實驗室，此實驗室為世界衛生組織的殺蟲劑參考實驗室，實驗室主持人是 Dr. Takashi Tomita。在實驗研習的過程中，和 Dr. Osamu Komagata 討論實驗相關的理論，與 Dr. Tomita 學習實驗操作的過程。在 12 月 19 日進行一場報告，主要的內容為今年登革病毒在台灣傳播的情形，與會人士為醫學昆蟲部部長 Dr. Kyoko Sawabe，第一室（媒介生態室）以及第三室（殺蟲劑室）的研究員，報告時間加上問題與討論約花一個小時。定序結果於 12 月 22 日出來，隨後進行生物資訊分析並找到突變點。在 12 月 24 日使用 EVA Green 染劑，試著用此方法偵測突變點，12 月 25 日取得實驗結果發現使用 EVA Green 染劑後，在 melting curve 分析時的確可看出野生型與突變型的差異。於 12 月 26 日早上搭車前往成田機場，晚上返抵台灣。

實驗研習內容：

此次實驗第一步驟為抽 genomic DNA，使用 REDExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit 進行抽取檢體 DNA 實驗。就日方說法，仿間許多抽取 DNA 的實驗套組，是針對哺乳動物系統所設計，在抽取昆蟲(蚊子)DNA 時，往往效果不是很好。而此實驗套組是他們發現抽取昆蟲 DNA 效果很不錯的套組，而且操作方便，所需時間很短。唯一的缺點就是，此實驗套組中的 Extraction Solution 為強鹼性物質，會影響後續的 PCR 實驗，若是搭配其套組內的酵素，可直接使用此 DNA，但是日方實驗室發現此 DNA 聚合酶效率普通，建議搭配其他 DNA 聚合酶。所以在搭配其他聚合酶時，須先稀釋所萃取的 DNA，避免其鹼性物質影響後續的 PCR 實驗。此次實驗以操作公蚊為佳，因為母蚊可能會有吸血，在 genotyping 的實驗中會影響判斷(吸血動物的序列會與蚊子序列互相干擾)。另外，如果要以母蚊為實驗，最好是用蚊子腳或是直接拉出頭做實驗，最好不要使用全蚊，若是蚊子腹部已有公蚊精子，則此亦會影響結果，所以用蚊子腳或是頭部(只要靠近腹部，就有被汙染的風險)為佳。

在此次抽取 DNA 中分別使用 REDExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit 以及 Dr. Tomita 實驗室使用的 Alkaline extraction method 來抽取成蚊以及子子的 DNA。此二方法操作方法簡單而且所需時間很短。

此次實驗操作步驟分別如下：

REDExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit:

1. 分別取四隻 SMK 品系的公蚊和子子，以及來自台灣屏東的公蚊和子子，加入 20ul 的 Extraction buffer 以及 5ul 的 Tissue Preparation Solution，之後放入到 Qiagen 均質化機器進行均質化。
2. 在室溫下培養 10 分鐘。
3. 放入 95°C 三分鐘。
4. 加入 20ul 的 Neutralization Solution B，並混合均勻。
5. 此 DNA 萃取完成，以 TE buffer 進行四倍稀釋，存放於-20°C 以進行後續實驗。

Alkaline extraction method：

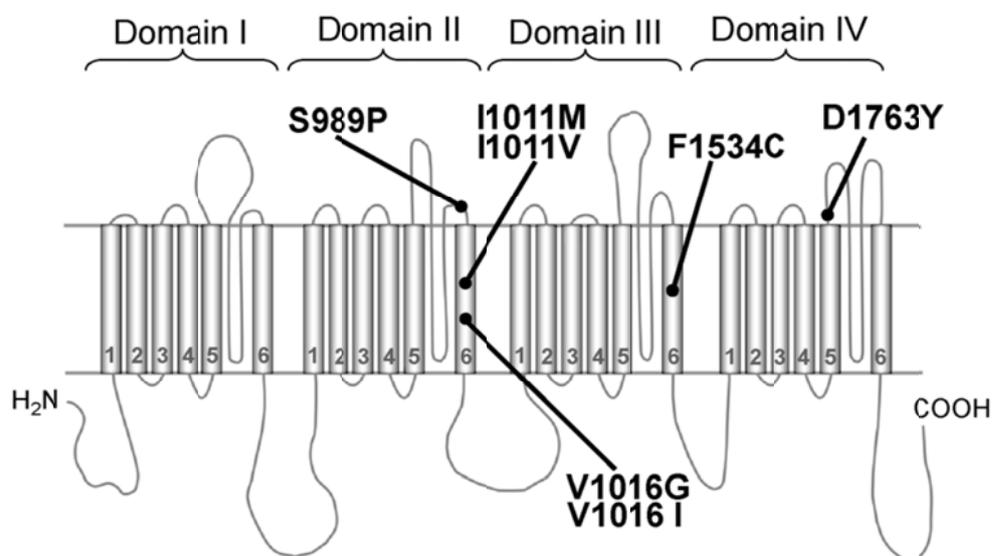
1. 分別取四隻 SMK 品系的公蚊和子子，以及來自台灣屏東的公蚊和子子，加入 40ul，0.2N 的氫氧化鈉溶液，進行均質化。完成後在 70°C 培養 10 分鐘。
2. 加入 40ul 的 360mM Tris-HCl (pH 8.0)+10mM EDTA。
3. 混合均勻後，用 ddH₂O 進行四倍稀釋。
4. 此 DNA 萃取完成，存放於-20°C 以進行後續實驗。

完成 DNA 萃取後，接著進行 PCR 實驗，此次實驗使用的酵素為 KOD FX polymerase，其特性有 3' →5' exonuclease activity 的校正功能，以及高效率，高 PCR 成功率等特性。而此次要增幅的片段是 KDR 基因的 Domain II，III，and IV。

所以分別設計三組引子以增幅我們所需的 domain(如圖一所示)。

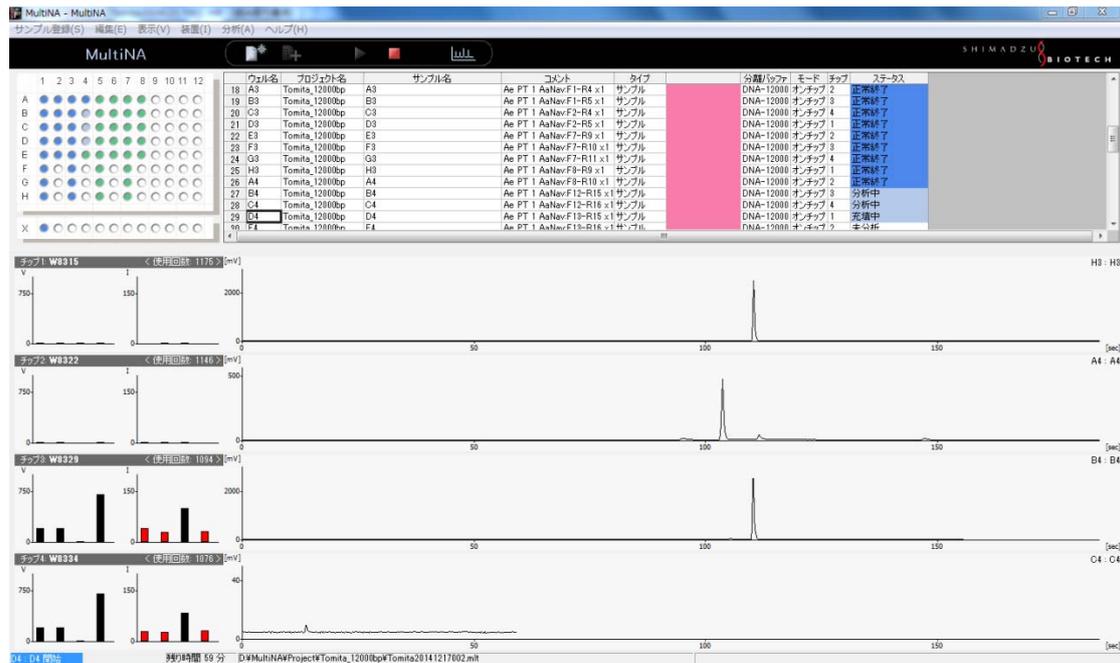
PCR 實驗操作步驟如下：

1. 先配置 pre-mix solution，裡面包含 4.4ul ddH₂O，KOD FX buffer 10ul，dNTP (2.5mM each) 3.2ul，Forward primer (10uM) 0.6ul，Reverse primer (10uM) 0.6ul，DNA 0.8ul，KOD FX polymerase (1U/ul) 0.4ul。乘上所需倍數後，進行分裝，使單一 tube 總體積為 20ul。
2. 進行 PCR 反應，PCR 反應條件為 94°C，2 分鐘→[98°C，10sec→55°C，30sec→68°C，50sec]X40 cycle。
3. 完成 PCR 反應後，存放於 4°C，以便做後續實驗。

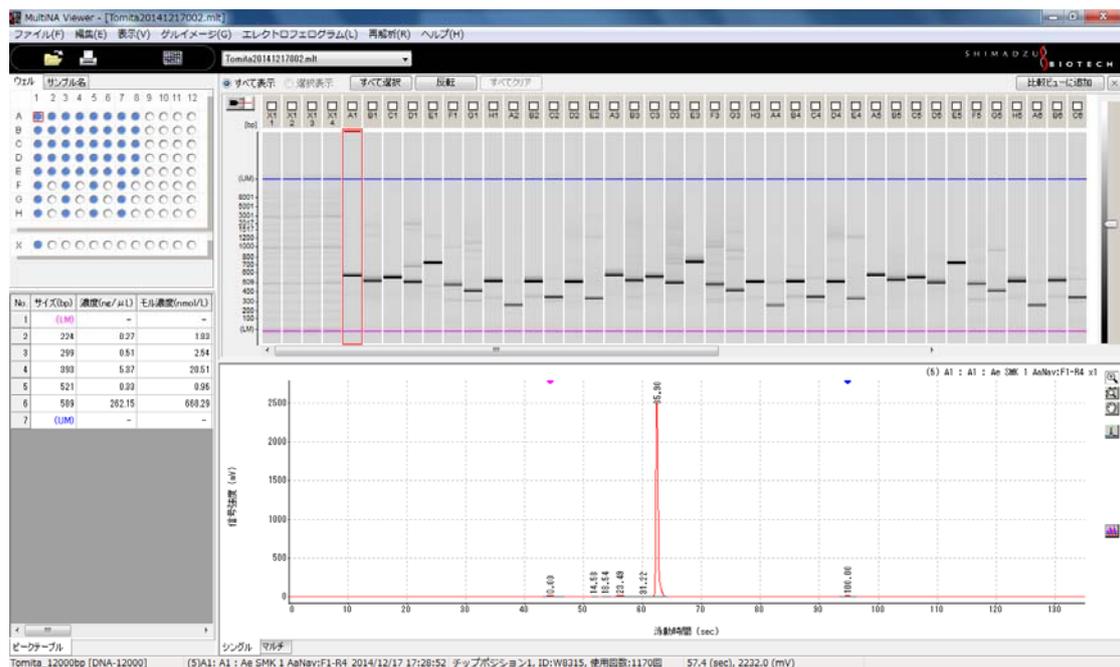


圖一: KDR 基因有四個 domain，其中突變點主要在 domain II，III，IV。圖示中的數字代表突變點的位置，左邊字母表示野生型的胺基酸，右邊的字母表示突變後的胺基酸(Kasai *et al.* 2011)。

完成 PCR 實驗後，不用一般傳統的電泳膠進行 PCR 產物的片段大小檢測。在此實驗室使用 MultiNA-電氣泳動裝置進行片段大小及 PCR 產物的濃度分析，在三個小時內可以對 96 個檢體同時進行 PCR 產物大小及濃度分析(結果顯示如圖二、三所示)。



圖二:此為正在分析的電泳裝置，當機器偵測到螢光物質時，便會出現一個高峰，帶分析完畢後，會數位轉換成我們平時所用的電泳圖顯示方式。



圖三: 此為電泳分析完畢的圖示，機器將所偵測到的螢光訊號轉換為傳統的 agarose gel 電泳圖。此外，在機器內放置有不同濃度的標準品，機器會依此標準品濃度與所偵測到的 PCR product 訊號進行推算，計算出 PCR 產物的濃度。

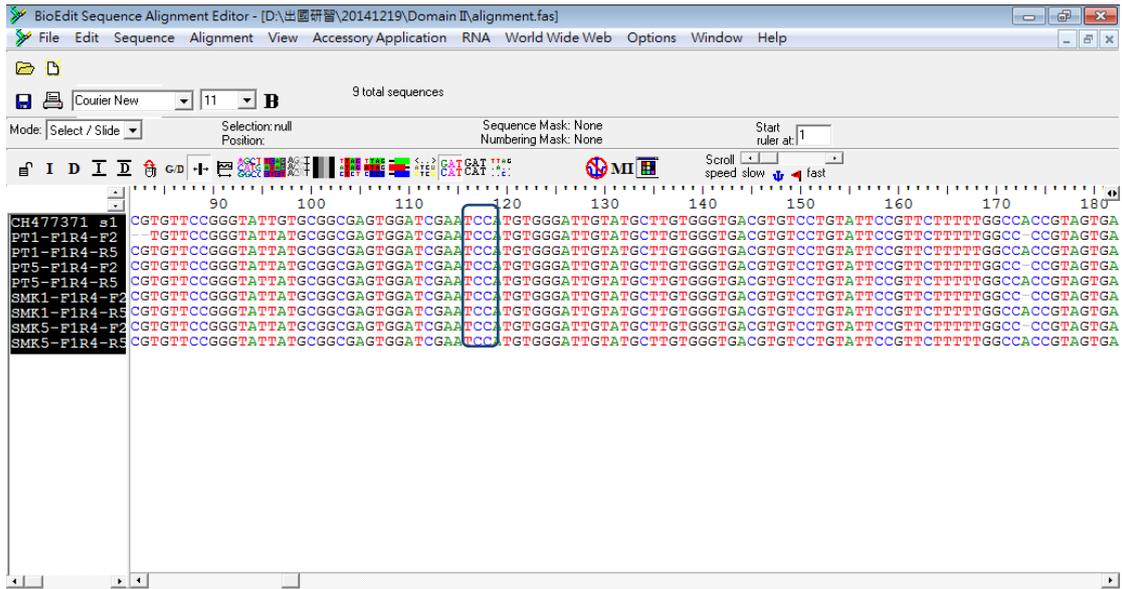
完成 PCR 產物的電泳分析後，因為時間的關係，所以挑出四個檢體進行定序分析。為了讓後續的定序更順利，所以我們要 clean-up 完成的 PCR 產物。在此使用的實驗套組是 USB ExoSAP-IT[®] PCR Product Clean-Up, Affymetrix。在進行定

序實驗之前，必須將多餘的引子以及 dNTP 清除乾淨，避免干擾後續的定序反應。之前所使用的 Clean-Up 實驗套組，大多是使用通 Column 的方式，而此種方法最大的缺點是約有 20% 的 PCR 產物會損失。而此實驗套組可以幾乎完全留住所有的 PCR 產物，將損失降到極低。另一方面，由於此實驗套組是將實驗試劑加到原本的 PCR 反應管，不像使用通 column 的方式，必須要一管一管將 PCR 產物加到 column 內，如此一來可以節省非常多時間。

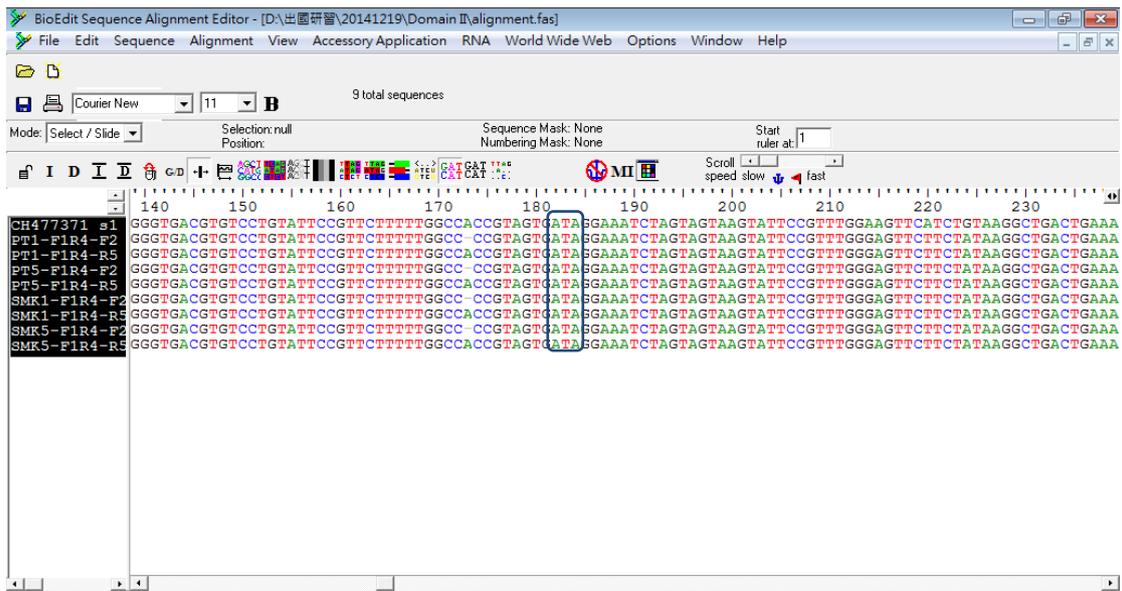
USB ExoSAP-IT^R PCR Product Clean-Up 操作方法如下:

1. 將 5ul 的 PCR 產物與 2ul 的 ExoSAP-IT 試劑混合均勻。
2. 進行反應:37°C，15 分鐘。80°C，15 分鐘。
3. 完成反應即可準備定序。

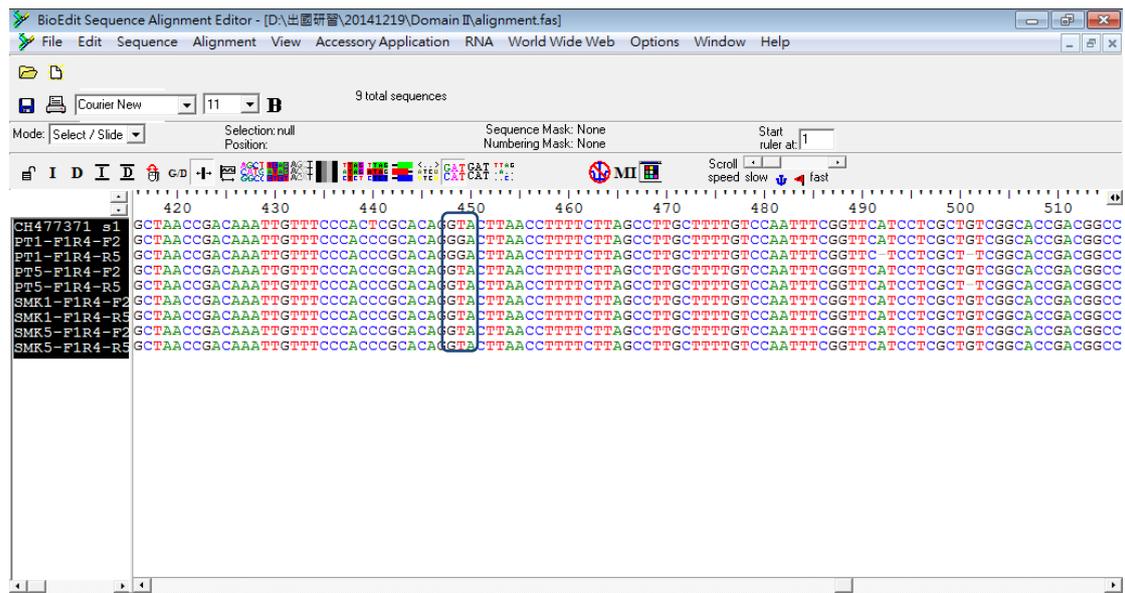
接著，準備開始進行定序反應，分別取兩個檢體進行定序(Pintung 1, Pintung 5, SMK1, SMK5)。完成定序反應後，得到完整 DNA 序列即可與參考序列(reference sequence)進行多重序列比對，找出存在的突變點。在此使用的參考序列為埃及斑蚊的全序列片段(Accession NO: CH477371)。首先，在 domain II 進行分析，如圖四所示最上面的序列為 reference sequence，根據之前的報告指出，在 domain II 的 989 位置會有 TCC->CCC 的突變，而在此次的分析中，未發現這個突變存在，接著尋找第二個突變點為 ATA->ATG or GTA，分析結果顯示亦未發現突變點(圖五所示)。第三個突變位置在 1016，GTA->GGA or ATA，結果顯示從屏東抓到的蚊子品系(Pintung 1)，出現了突變點，與 reference sequence 相比，序列的改變為 GTA->GGA，胺基酸從 Valine 變成 Glycine。仔細分析其序列圖，發現其有兩個波峰，分別為 G 與 T 的訊號，所以這表示此為一異型合子的品系(圖六、七)。接著分析 domain III，先前的研究指出在 1534 的位置會有突變點，序列改變為 TTC->TCC，分析結果顯示並無突變點存在(如圖八所示)。在 domain IV 的突變位置為 1763，突變的序列為 GAC->TAC，從多重序列排序圖的結果可知這個位置亦沒有突變點存在(如圖九所示)。但是，仔細分析其屏東抓到的蚊子品系(Pintung 1)序列圖發現，有兩個訊號存在，分別為 G 與 T 的訊號。所以綜合此結果，我們發現，此處亦為一個突變點，對偶基因中有一條的序列為 GAC，另一條的序列為 TAC。因此這個位置是第二個突變點(如圖十所示)。



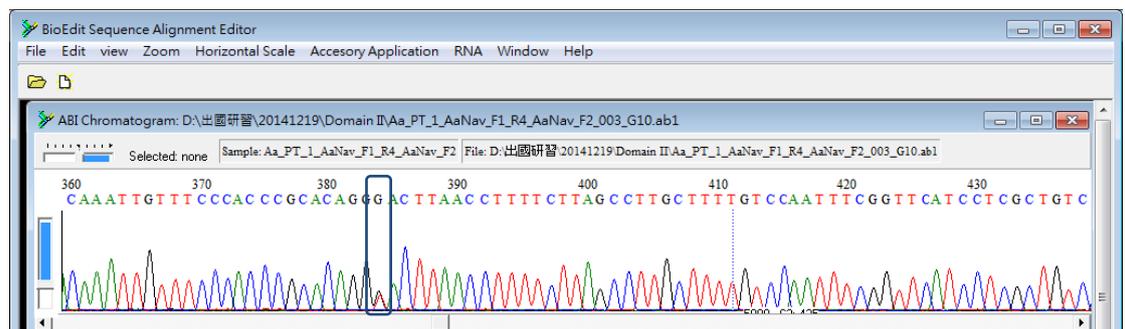
圖四: 先前報導指出 domain II 的 989 位置會有 TCC->CCC 的突變, 而在此次的分析中, 未發現這個突變存在。(最上面的序列為 reference sequence, 依序為 Pintung 1, Pintung 5, SMK 1, SMK 5 四個檢體。)



圖五: 第二個突變點的序列改變為 ATA->ATG or GTA, 分析結果顯示亦未發現突變點。(最上面的序列為 reference sequence, 依序為 Pintung 1, Pintung 5, SMK 1, SMK 5 四個檢體。)



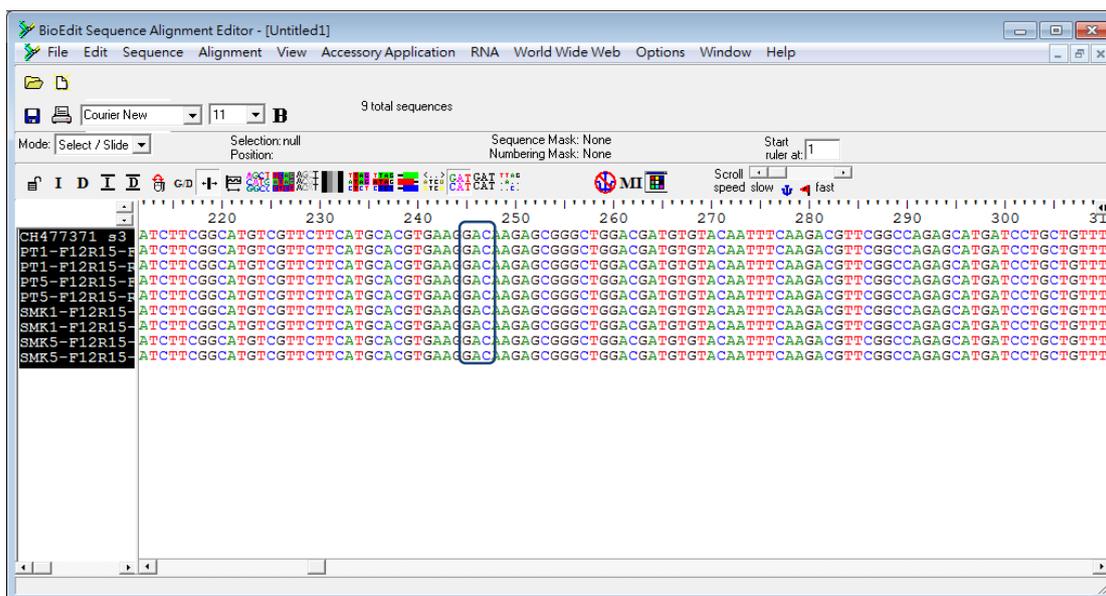
圖六: 第三個突變位置在 1016, GTA->GGA or ATA, 結果顯示從屏東抓到的蚊子品系(Pintung 1), 出現了突變點, 與 reference sequence 相比, 序列的改變為 GTA->GGA。(最上面的序列為 reference sequence, 依序為 Pintung 1, Pintung 5, SMK 1, SMK 5 四個檢體。)



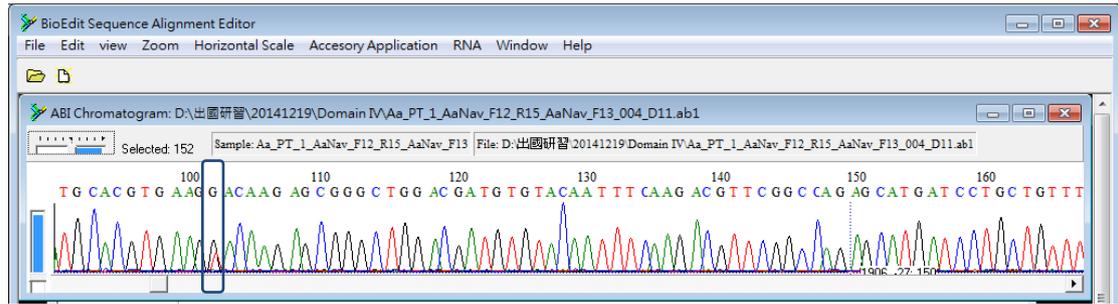
圖七: 分析 Pintung 1 序列圖, 發現其有兩個波峰, 分別為 G 與 T 的訊號, 所以這表示此為一異型合子的品系。



圖八: domain III，先前的研究指出在 1534 的位置會有突變點，序列改變為 TTC->TCC，分析結果顯示並無突變點存在。(最上面的序列為 reference sequence，依序為 Pintung 1，Pintung 5，SMK 1，SMK 5 四個檢體。)

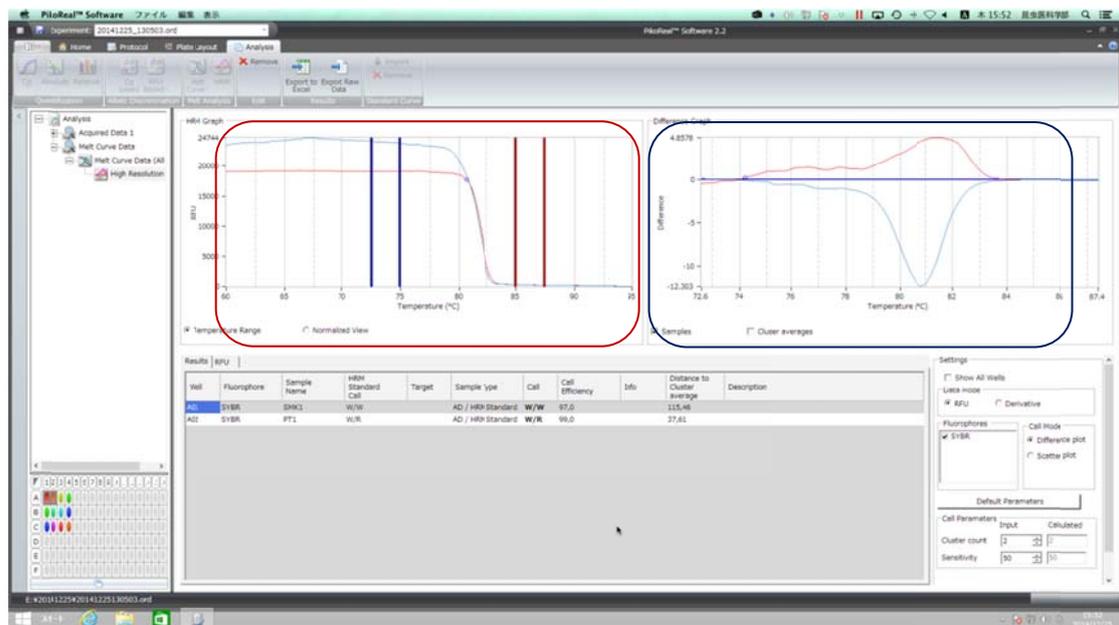


圖九: 在 domain IV 的突變位置為 1763，突變的序列為 GAC->TAC，從多重序列排序圖的結果可知這個位置亦沒有突變點存在，檢體定序結果與 Reference sequence 一致。(最上面的序列為 reference sequence，依序為 Pintung 1，Pintung 5，SMK 1，SMK 5 四個檢體。)



圖十: 分析其屏東抓到的蚊子品系(Pintung 1)序列圖發現，有兩個訊號存在，分別為 G 與 T 的訊號。

當我們已經知道野生型與突變型的 DNA 序列時，可以使用 EVA-Green Fluorescence Dye 進行實驗。EVA Green 的功能類似常使用的 SYBR Green Fluorescence dye，而 EVA Green 有更多的優點可以進行實驗。一般的 SYBR Green 的使用濃度不能太高，因為高濃度的 SYBR Green 會抑制 PCR 的反應，和造成錯誤配對。此外，低濃度的 SYBR Green 並不適合做 DNA melting curve 的實驗。SYBR Green 嵌進 DNA 雙股時，並不會把所有的雙股 DNA 嵌滿，當雙股 DNA 被打開時 SYBR Green 螢光染劑會轉移到旁邊的雙股 DNA，造成一個叫 “dye redistribution” 的現象發生。如果要偵測的突變型 DNA 片段僅有一個核酸發生變異，SYBR Green 的靈敏性無法偵測出這種突變。所以在進行 HRM(High Resolution melting curve analysis)的分析中，SYBR 並不適合用來做實驗。EVA Green 較 SYBR Green 來得穩定，安全，且高濃度的 EVA Green 不會抑制 PCR 反應，加上 EVA Green 嵌入雙股 DNA 時，會把嵌滿雙股 DNA(Saturated)。因此，當雙股 DNA 分開時，掉下來的 EVA Green 染劑無法嵌入旁邊的 DNA 裡，所以適合用來進行 HRM 分析。在此，我們使用了 EVA Green 進行突變點偵測，利用其不同的 melting temperature 進行 HRM 分析。實驗結果如圖十一所示。為了方便說明，僅比較 SMK1 以及 Pintung 1 兩個檢體的結果。首先，拉出 melting curve 的起始溫度與結束溫度(如圖紅色框框內，藍色區域與紅色區域所示)，之後機器會進行分析，找出兩個曲線的平均溫度，並以水平線段呈現(如圖藍色框框所示)。此時可以看到藍色框框內，代表 SMK1 檢體的紅色曲線高於代表 Pintung 1 檢體的藍色曲線。此結果表示所偵測的 SMK1 檢體 DNA 片段，有較高的 melting temperature，而帶有突變點的 Pintung 1 檢體則是較低的 melting temperature。所以，若我們可建立野生型以及突變型的 HRM 結果，一旦有大量檢體需要檢驗，即可用此方法進行分析。若是待測檢體出現與突變型相似的 HRM 結果(包括溫度與曲線圖型)，則我們可以推測此檢體帶有突變點，之後將疑似的檢體進行定序分析，確定其結果。如此便可節省實驗所花的時間與金錢。

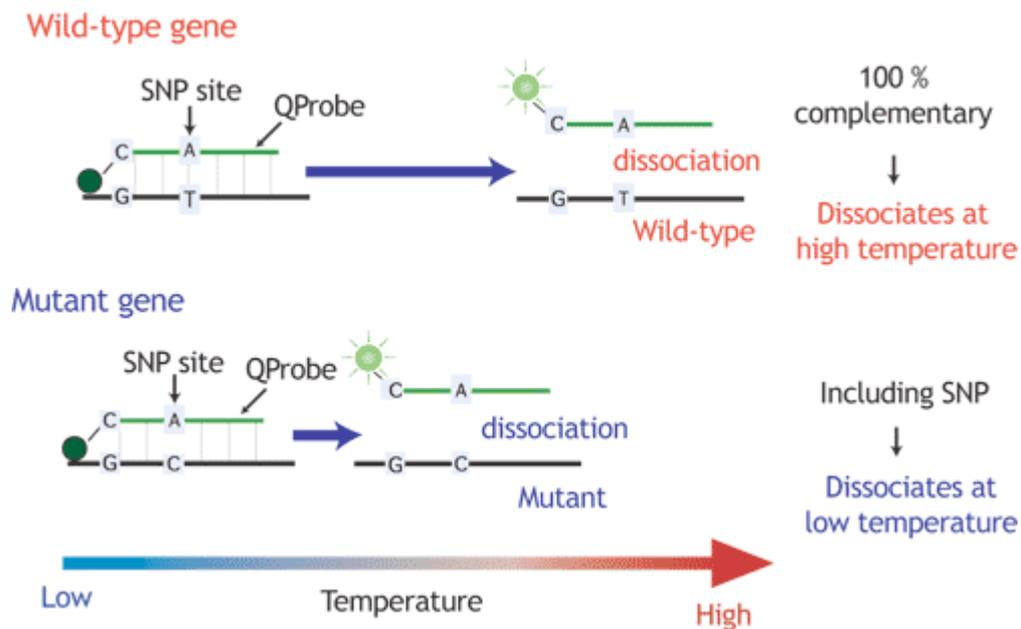


圖十一:此為使用 EVA Green Fluorescence Dye 進行的 HRM 分析結果。左邊紅色框框為設定的 Melting Temperature 的起始與結束溫度。右邊紅色框框則為分析結果，藍色水平粗線為此二檢體的 Melting temperature 平均溫度，代表 SMK1 檢體的紅色曲線高於代表 Pintung 1 檢體的藍色曲線。

使用一般的 PCR 外，越來越多實驗會使用探針(Probe)做為實驗材料，而探針的使用的優點為在相同引子產生的 PCR 產物中，探針可以分辨出不同的 PCR 片段，而且只要在探針結合不同的螢光，也可區分出更多不同的 PCR 產物。因此有越來越多研究人員開始使用探針在蚊蟲裡偵測突變點。

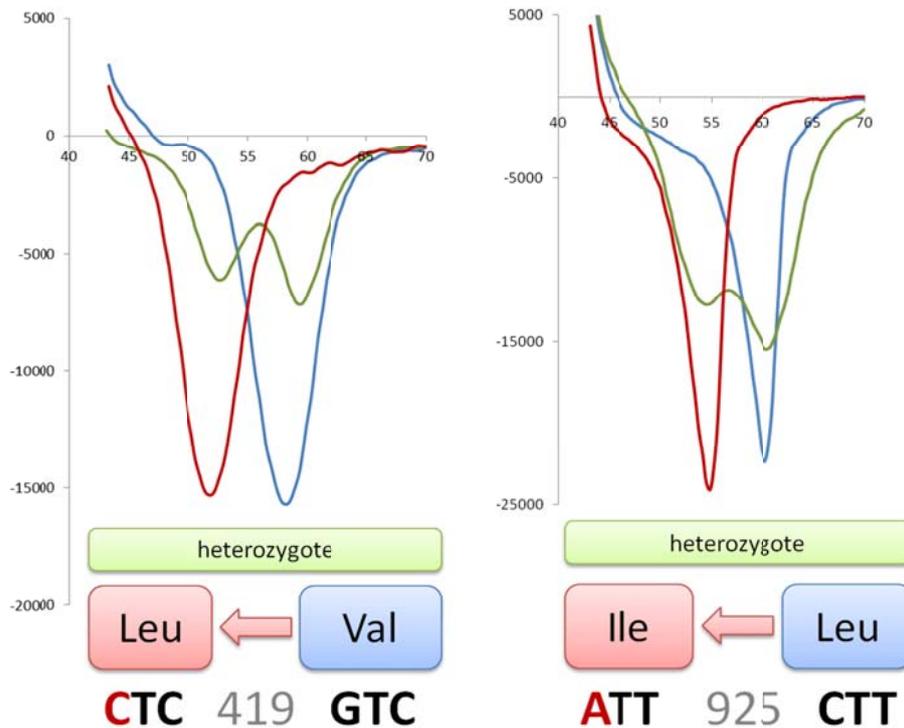
在討論過程中，亦有討論到使用 TaqMan Probe 是否為一個好的實驗材料? TaqMan probe 的原理是在探針上分別加上螢光以及一個 Quencher，當此探針黏合在 DNA 模板上面時，螢光與 Quencher 之間會因為 FRET (Fluorescence resonance energy transfer, 螢光共振能量轉移)的關係，螢光被激發後所發散的訊號(emission)會被 quencher 所吸收，此時不會有訊號產生。PCR 反應初期，探針與目標產物結合，隨著反應開始進行，DNA Taq 聚合酶藉由其外切酶的特性，會使得結合在目標產物上的探針分解。探針分解後，螢光與 quencher 的位置分離，此時即可測得 reporter dye 的發散訊號，因此螢光值愈高表示目標產物的生成量愈多。而這種分析中，並不適合以 TaqMan 這種方法進行實驗，其原因如下: 使用 TaqMan 方法偵測 A 突變成 T 時，會有實驗的難度。因為 A 與 T 之間的鍵結只有雙鍵，鍵結力比較弱，在 AT 之間錯誤的配對，不易明確分辨出是否有突變點存在，縱使是錯誤配對，依然可以鍵結得很好。而在訊號判讀方面亦有些問題，一般來說使用 TaqMan 方法可以明確得知我們所要的目標片段訊號強度為何。但是在此實驗中，若是碰到異型合子(對偶基因上的基因型不相同)，加上 AT 之間鍵結力不強，所以會使得實驗結果難以分析。就日方的經驗得知，有時 dominant type 與 non-dominant 訊號會難以區分。

目前有另一種快速及靈敏的方法。在已知突變點位置的條件下探針與 DNA 模板可以黏合時，在探針上面的螢光無法順利發光，一旦此探針與 DNA 模板分離，就可順利發出螢光。在突變點實驗中則可應用此特性，設計一段長約 20 個鹼基探針，將欲偵測的突變目標點設計在探針中間，若是目標位置有突變點，則此探針的專一性以及互補能力就會降低，在 real time PCR 的實驗中，即可發現 melting curve 的分析中，在較低的溫度即會出現訊號(Tanaka *et al.* 2008)(如圖十二、十三所示)。



圖十二: 此為 Q probe 示意圖，我們根據 wild type 序列設計探針序列。若是待測檢體的序列為 wild type 序列，則此探針可以和 DNA 序列黏合得很好，會需要較高的溫度才會分離，分離後螢光可順利發光。下面圖示顯示設計的探針與突變的序列無法黏合的很好(如 A 與 C 之間的配對)，則在較低的溫度時探針與 DNA 模板就會分離，探針上的螢光此時就會有活性發光

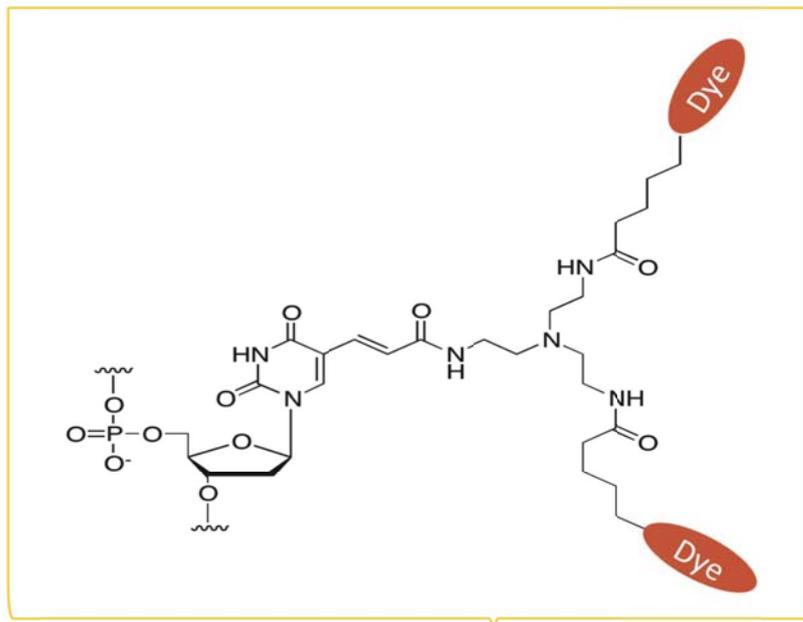
(http://www.aist.go.jp/aist_e/latest_research/2005/20050405/20050405.html)。



圖十三:此為使用 Q probe 在 real time PCR 分析機器裡顯示的結果圖。藍色部分顯示探針黏合到野生型的 DNA 模板，因其黏合較好所以會再較高的溫度才出現分離(約在靠近 60°C 時出現訊號)。紅色的曲線代表探針黏合到有突變點的 DNA 模板，因其不是完美黏合，所以在較低溫度時，Q probe 與 DNA 模板便會分離(約靠近 50°C 時出現訊號)，以此我們便可區別待測檢體中是否有突變點存在。綠色曲線則是代表此為異型合子的突變種，所以在靠近 60°C 與 50°C 都有出現訊號。(此圖為 NIID, Dr. Osamu Komagata 提供)

在上述的各種檢測突變點方法，皆能幫助我們找到基因突變之處。然而，利用野生型與突變型對於不同 melting temperature 造成模板分離，使得螢光強度改變的方法大多存在一個缺點，就是碰到 transition mutation(及 purine 對 purine 的突變，A<->T 突變。或是 pyrimidine 對 pyrimidine 的突變，C<->G 突變)，會有實驗的靈敏性問題。在一般哺乳動物系統，A<->T 之間的突變及影響較少，但是在蚊蟲的突變中，A<->T 突變較為常見，也易造成胺基酸的改變。所以，Dr.Tomita 實驗室將嘗試使用一種新的探針，稱為 E probe (3' end-blocked Exciton-Controlled Hybridization-sensitive fluorescent Oligonucleotide (ECHO))。在此以 Hanami 等人發表在 Plos One 期刊的論文做說明(Hanami *et al.* 2013)。此 E probe 與一般的探針不一樣，此探針會在 T 上面連結兩個螢光物質，而且此螢光物質只會專一性的跟 T 結合(如圖十四所示)。在一般的狀態下，T 上面連結的兩個螢光物質會連結在一起而不會激發出螢光，當此探針與 DNA 模板結合時，兩個螢光物質會分開並卡進 DNA 的鹼基以及 minor groove 之間，此時便可發出螢光(圖十五、十六所示)。在相同序列下，此種探針與 DNA 模板黏合的 melting 溫度較一般的 DNA 的 melting

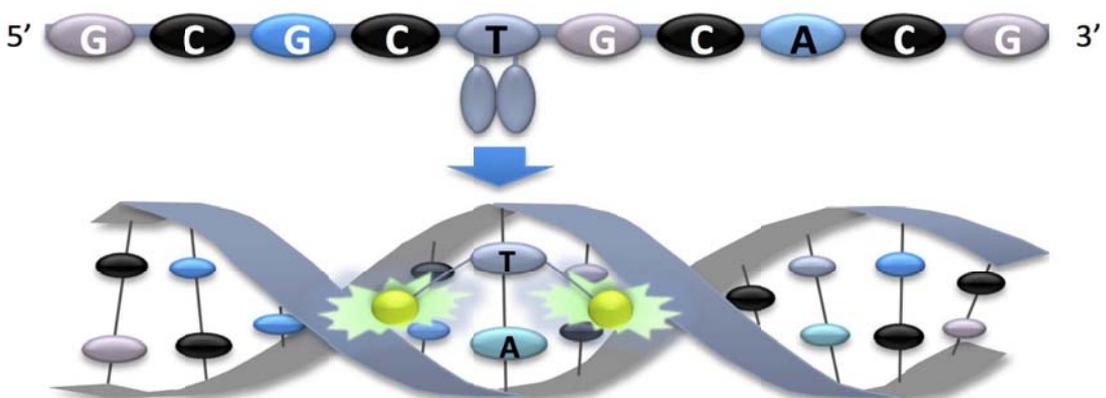
溫度來得高，可供辨識 melting curve 範圍大。因此在分析只有一個鹼基的突變時，此探針依然能夠有很好的靈敏度及準確性(實驗結果如圖十七所示)。



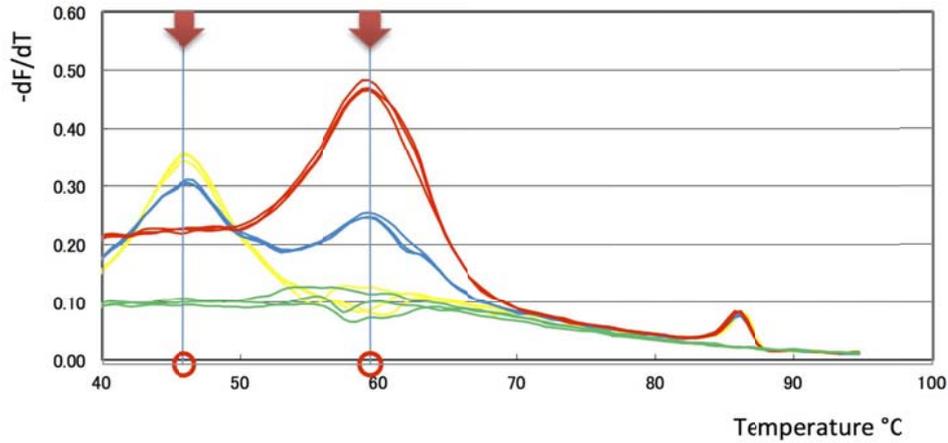
圖十四:此為 E probe 上的 T 鹼基結合兩個不同的螢光染劑



圖十五: 在一般的狀態下，T 上面連結的兩個螢光物質會連結在一起而不會激發出螢光，並且將此探針的 3' 端的結構改變，使得在 PCR 過程中，E 探針不會參與反應。



圖十六: 當此探針與 DNA 模板結合時，兩個螢光物質會分開並卡進 DNA 的鹼基以及 minor groove 之間，此時便可發出強烈螢光。



圖十七: 此為 Hanami 等人發表在 Plos One 期刊的論文結果圖，其中紅色線代表野生型的同型合子品系，黃色線為突變型的同型合子品系，藍色線表示同時帶有野生型與突變型的異型合子，綠色線為負控制組。由此結果可知，探針與 DNA 模板黏合力較好，因為在比較高的溫度模板才會分離，melting temperature 在約 60°C 的位置。而突變型的品系因為探針與 DNA 模板黏合力較差，因此探針與模板在較低的溫度即分開，所以 melting temperature 在約 46°C 的位置。帶有突變型以及野生型的異型合子，則是在兩個溫度都出現訊號。

心得及建議：

這次至日本國立感染症研究所進行實驗研習，日方實驗室所使用的研究試劑與方法都較自己所處的實驗室來的快速，方便。因此，若是在台灣用相同實驗方法也能成功，那會考慮更換一些實驗試劑。日方實驗室的儀器與設備均較本實驗室來的多以及優良。很多實驗試劑與方法的使用均是為了大量檢體的快速檢驗，尤其是在 PCR 產物的定量與純化這兩個實驗步驟，能有效節省實驗時間。另一值得我們學習的地方是，日方實驗室在每個實驗步驟與環節的試劑使用，均有探究試劑的特性，使實驗結果能夠最佳化。在此次的 PCR 實驗中所使用的酵素，就是選用成功率較高而且有校正功能的酵素，在 PCR 產物的定序過程中，對於實驗緩衝液的使用也是針對所定序的片段大小來決定要使用何種緩衝液，就我以前所作過的定序實驗，幾乎是一種緩衝液用到底，沒有考慮所要定序的片段大小，這次實驗研習的感覺是日方在做實驗比較細膩。此外，日方實驗室在新的實驗方法開發也是值得我們學習的地方，對於新的偵測方法，觀念均能不斷更新。與他們討論的過程中，當我提出一些傳統實驗方法也能達到相同實驗目的，而他們會反問我，如果今天是有一百個，一千個，甚至一萬個檢體，我所使用的傳統方法要花多少時間與金錢才能得到答案？因此他們對於新的實驗方法，就是希望能夠幫助他們在最短的時間內，配合適當的實驗經費，得到他們所要的答案。

從此次結果可知，在台灣屏東抓到的蚊子內有存在著 VGSC 的 kdr 突變，這顯示已有突變的品系存在於台灣，由於此檢體為異型合子，所以尚不會對除蟲菊精類的殺蟲劑產生抗藥性。雖然此次實驗未檢測出，不過在自然界中蚊蟲的有性生殖有可能生出對除蟲菊精類有抗性的蚊蟲，而在此品系發現兩個突變點，只要任一個突變點為相同基因型，此品系即可產生抗性。而定期的蚊蟲基因突變檢測可以讓我們瞭解此時此區域的蚊蟲是否已有抗性產生，使得防疫策略的擬定能有不同的思考面向，不同殺蟲劑的使用也是避免有抗性的品系被人擇出來的方法之一。此外，在檢測方法的開發，可以朝著大量篩檢的方向進行，找出省時，省錢，準確的實驗方法，如此不但可應付平時的檢驗工作，若是碰到疫情大規模爆發時，亦可在最短時間內，提供實驗室的檢驗數據，讓決策高層能有正確數據而得以做出更正確的決定。

參考文獻

1. http://www.aist.go.jp/aist_e/latest_research/2005/20050405/20050405.html
2. Hanami T, Delobel D, Kanamori H, *et al.* (2013) Eprobe mediated real-time PCR monitoring and melting curve analysis. *PLoS One* **8**, e70942.
3. Kasai S, Ng LC, Lam-Phua SG, *et al.* (2011) First detection of a putative knockdown resistance gene in major mosquito vector, *Aedes albopictus*. *Jpn J Infect Dis* **64**, 217-221.
4. Tanaka R, Kuroda J, Stevenson W, *et al.* (2008) Fully automated and super-rapid system for the detection of JAK2V617F mutation. *Leuk Res* **32**, 1462-1467.