

計畫編號： DOH98-DC-1011

行政院衛生署疾病管制局 98 年度科技研究發展計畫

以反轉基因法 (reverse genetics) 製造流感疫苗種籽株

研究報告

執行機構：長庚大學生技系

計畫主持人：施信如 教授

研究人員：羅于倫 技士、莫子京 博士生

執行期間：98 年 5 月 12 日至 98 年 11 月 30 日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

目 錄

	頁 碼
封面	
目錄	
中文摘要	(3)
英文摘要	(4)
前言	(5)
材料與方法	(7)
結果	(10)
討論	(11)
參考文獻	(13)
表、圖	(16)
附錄	
一、98 年度執行之目標(milestone)	(20)
二、98 年度預定進度	(21)
三、98 年期末經費使用狀況	(22)
四、98 年期中報告審查委員意見及回復	(23)

中文摘要

禽流感之疫情持續在亞洲地區蔓延，病毒持續進行複製的結果，極可能由基因片段的重組(gene reassortment)或重要位置之突變(key mutations)產生對人類威脅極大的新型流感。且近年來抗藥病毒的產生也嚴重威脅人們的生活。

本計劃之任務即針對新型流感，建立一套工作模式，在最短的時間內將新型流感自病人檢體中分離培養出來，並將其 HA、NA 殖入到反轉基因法(reverse genetics)的系統中，以供病毒基因的修改，製造出減毒且容易培養的疫苗種籽株(seed virus)。

我們預計每年配合疾管局提供的四株流感病毒以反轉基因法製造出流感疫苗種籽株，包括：三株常態性練習製造流感疫苗種籽株，一株配合疾管局於年底實際演練產出疫苗種籽株。

關鍵詞：反轉基因法、疫苗種籽株、重組病毒株

English Abstract

Emerging new strain of influenza virus has been posing a threat to humans. The mission of this project is to establish an experimental platform for generation of the vaccine seed virus from a newly emerging influenza virus. Viral hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) genes will be cloned from the candidate strains provided by CDC. A recombinant influenza A virus by eight plasmids systems will be generated. Viral titer will be evaluated by plaque assay . Four recombinant viruses are planning to be synthesized per year.

Key words: Emerging influenza virus; Reverse genetics; Seed virus

前 言

自 92 年(後 SARS 時期)起，流感病毒於全球施虐的情形有日漸嚴重的趨勢，尤其是禽流感，已造成全球有多起嚴重病例和死亡個案(1-4)。根據世界衛生組織(WHO)截至今(98)年 2 月的統計，已有 408 例經實驗室證實為禽流感病毒感染人類的個案，且有 256 起死亡病例(5)。由於亞洲國家的氣候、經濟和環境等因素，是目前發現禽流感感染人類最多的區域，又以印尼和越南最為嚴重，中國大陸、埃及和泰國次之。隨著病例和控制難度的上升，目前 WHO 已宣佈進入第三期的警戒狀態，為發現新型(禽)流感病毒直接感染人類並造成疾病，但尚未發現有嚴重人傳人或擴大的情形。

另外，從抗流感病毒藥物的監控發現，目前造成人類疾病的流感病毒已對克流感(Tamiflu)和金剛胺(Amantadine)具抗藥性。據今(98)年 1 月 22 日 WHO 於全球流感監控網的實驗室統計顯示，流感病毒(H1N1)對克流感具抗藥性的情形已由第二、第三季的 44%(全球平均值)提升至第四季 92%(全球平均值)。其中加拿大、美國、英國、韓國和日本更高達 97%-100%。而歐洲流感監控計劃的最新報導(98 年 2 月 EISS)，流感病毒 H1N1、H3N2 分別對克流感和金剛胺的抗藥性為 98%和 100%。由於藥物控制的失能，疫苗的開發在預防工作上顯得非常重要(6, 7)。

為防治全球大流行之流感病毒，疾病管制局及國家衛生研究院也於 95 年開始積極推動流感疫苗之發展。在流感疫苗研究發展計劃中，有五大要領：(A)執行病毒分離與特性之篩選，以建立適宜疫苗生產用種株庫；(B)反遺傳方法技術應用(8-11)；(C)建立雪貂動物模式：應用於新型流感之鑑定或相關研究；(D)建立免疫分析技術平台，評估病毒株與誘發免疫反應之關

係；(E)建立流感疫苗效價免疫監測系統。

由於我們實驗室一直從事流感病毒方面之研究，包括：疫情監測(4, 12-16)、病毒之複製機轉(17)、抗病毒藥物篩選、抗藥機制、技術開發等。且在此流感疫苗研發計劃初期，協助完成了 A 及 B 項研究工作(13, 15-17)。目前，我們實驗室已完成建立疫苗種籽株的反轉基因法(reverse genetics)系統，並持續參照近年在流感疫苗發展與應用針對此系統的改善建議作修正與探討(18-28)，以協助和提供疾管局產出近年代後備用的疫苗種籽株。

為了配合國家安全衛生政策，有效預防及控制國內流感之疫情，衛生單位在新型流感病毒發生疫情時，需在極短的時間內產出疫苗種籽株以供製備疫苗用途。由此，我們實驗室在協助提供且維持此產出疫苗種籽株之技術平台上有其必要之價值，並維護其流暢性以達最大的能力效益，包括：將新型流感病毒分離、把其 HA 和 NA 基因組裝至系統中、測試組裝病毒的效價等。

材料與方法

病毒與細胞培養

季節性流感 A/TW/4055/09(H3N2) 、 A/TW/2428/08(H3N2) 、 A/TW/9042/08(H1N1)來自疾病管制局。本實驗所採用的細胞株有狗腎上皮細胞 (Madin-Darby canine kidney cells, MDCK cells)、人類胚胎腎上皮細胞 (293T cells)，細胞培養於含 10%胎牛血清，0.026 M Sodium bicarbonate，100 units/ml penicillin，100 pg/ml streptomycin，0.25 µg/ml amphotericin B，2 mM L-Glutamine，以及 0.1 mM Non-Essential Amino Acids 之 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium，pH 7.4) 培養液中，於含 5% CO₂ 及飽和水蒸氣的 37°C 的培養箱中培養。

以 RT-PCR 偵測季節性流感的 HA 及 NA 基因

RNA 萃取方法參照 RNA 萃取試劑 (Viral RNA Extraction Miniprep System kit, Viogene, Sunnyvale, California) 的步驟。將所得的 12 µl RNA 加入 2 µl dNTP(10mM)、4 µl RT Buffer(5x)、1 µl ReverTra Ace (ReverTra Ace-α-[®], TOYABO, JAPAN) 中，並混以一個正向 1 µl (10 pmol) 的引子，利用 42°C、1 h 來反應，製作出 cDNA。cDNA 片段以含有 2 µg/ml ethidium bromide 之 1% agarose gel 進行分析。自 RT 所得之 DNA 片段，利用

反轉基因法 HA 及 NA 質體的建構

以 RT 所做出來的 cDNA 當模板，HA 及 NA 的 sticky end primer 配合 full length primer(表一)進行 PCR，可以分別獲得兩種 DNA 片段，將所得的 DNA 以 94°C 5 min，65°C 10 min 進行 denature 與 re-nature 後放冰上可得 sticky-end DNA，將 BsmBI 切割後的 pHW2000 載體與 sticky end DNA，以 T4 DNA ligase 進行 ligation 於 16°C 反應 16 小時。以 Heat shock transformation 後，我們將所得的菌落進行 colony PCR 篩選，可能的菌落再培養隔夜後，經質體萃取取得可能的 HA 及 NA 質體後，再以 DNA 定序分析內部基因是否正確。

以反轉基因法產生疫苗種籽株

先取 1 µg 的 HA、NA 質體、以及 PR8 病毒株的其餘質體各 1 µg，加

入 OPTIMEM 至總體積為 50 μ l，再另外取 8 μ l 的 LipofectAMINE 2000 加入 242 μ l 的 OPTIMEM，混合後在室溫下靜置 5 分鐘。將兩種液體混合並靜置 20 分鐘。接著將混合液加入 2 ml 的 293T 細胞懸浮液中，轉染 18-24 小時後，移除上清液，再加入 2 ml 含 0.5% FBS DMEM，培養 48 小時後，再將病毒液以 MDCK 細胞進行增殖後，取 100 μ l 上清液利用 MDCK 細胞做病毒斑分析。

結 果

為了測試 8 個質體的系統是否能將疾管局今年提供的流感病毒— A/TW/4055/09(H3N2) 、 A/TW/2428/08(H3N2)及 A/TW/9042/08(H1N1)以及今年演練的病毒株 F1338 Swan Flu 的 HA 及 NA 基因置入此系統，我們設計了針對 HA 及 NA 基因含有 BsmBI 限制酶切位的 sticky end primer (表一)，經過 PCR 放大後，可分別獲得病毒株 A/TW/4055/09(H3N2)、 A/TW/2428/08(H3N2)之 HA 及 NA 二種 DNA (圖一、A~B)，再經由 denature 及 re-nature 後，1/4 的產物可形成與 pHW2000 在 BsmBI 的切位互補，這個具有 sticky end 的 DNA 片段，可接入 BsmBI 切割後的 pHW2000 質體中。最後利用 PCR 作篩選後選出正確的 clone(圖二、A~B)，再經由基因序列比對，確認為 4055 及 2428 的 HA 及 NA 基因後，配合 PR8 其他 6 個質體 (pHW2000-PR8-PB2、-PB1、-PA、-NP、-M、-NS)，可標示為 4055_HN/PR8 (2:6)及 2428_HN/PR8 (2:6)，經由 293T 細胞中轉染 2 天後，第一次收集之病毒上清液，無法觀察到病毒斑的產生，但是重新經過 MDCK 細胞培養，可以觀察到 A/TW/4055/09(H3N2) 的病毒斑產生 (圖三) (A/TW/2428/08(H3N2)病毒正在製作中)。因此經由幾次的演練，我們已可將近代的流感病毒 HA 及 NA 基因，以反轉基因法置入 PR8 病毒株之基因骨架中，製作出帶有近代的流感病毒抗原基因的疫苗種籽株。

討 論

一般從病人身上 isolated 的病毒 titer 較低，導致抽出的 RNA 濃度會太低進而影響 RT-PCR 的效率及產量因此解決方式是將 isolated 的病毒複製多次後使病毒的 titer 提高，病毒的 titer 提高後會使 RNA 的量增多。再者抽 RNA 所使用 kit 品質的好壞也會影響 RNA 的濃度及品質，因此換較好的 kit 會使 RNA 的濃度及品質提高進而提高 RT-PCR 的產率，我們的經驗是以 QIAGEN 的 kit 抽的 RNA，RT-PCR 的產率較高。

疾管局第一次提供病毒株的量(體積)不足(0.5 ml)導致需先大量複製後才有足夠的病毒量來進行實驗，然而病毒在複製時並無法順利產生病毒，導致病毒量不足無法抽出高濃度的 RNA 來進行 RT-PCR。因此這階段無法做出 A/TW/9042/08(H1N1)的 Recombinant Virus。我們已向疾管局再次申請新的病毒，目前已收到在進行實驗中。

在我們的實驗經驗中，我們以 one-step RT-PCR 將病毒液所抽出的 RNA 直接轉成我們需要的 PCR product，隨後接進 TA clone 中，經由 sticky-end PCR 放大後，可獲得病毒株的 HA 及 NA 之 DNA，再經由 denature 及 re-nature 後，形成具 sticky-end 的 DNA 片段，隨後接入 pHW2000 質體中。但是經由基因序列的比對，發現病毒的 HA 及 NA 基因在某些位置會有突變的現

象，導致質體轉染至 293T 細胞後無法順利產生病毒。經由檢討發現可能是由於 one-step RT-PCR kit 使用的 Taq polymerase，並沒有 proof-reading 的功能，因此容易產生突變。為了解決此問題，我們改採 two-step RT-PCR 的方式，先將病毒 RNA 轉成 cDNA，再利用有 proof-reading 的 polymerase 進行 sticky-end PCR。由此方法產生的 clone 經過基因序列比對後發現突變的現象較無產生，並且 clone 完成的速度也較快。

在進行 8 個質體系統的實驗時，轉染後第一次所收集之病毒液在病毒斑測試下無法觀察到病毒斑的產生，目前我們在 MDCK 細胞培養病毒一週後，將上清液感染另一盤新的 MDCK 細胞，並在原來的培養皿置換新的培養液，這二個方式皆可以觀察到感染性病毒顆粒的產生。目前發現較快使病毒出現的方式為轉染後第一次所收集之病毒液用 500ul 吸附 MDCK 細胞一小時後將病毒液吸掉，再加入 2ml Serum-free DMEM 培養兩天後即會出現 CPE，再經由 Plaque Assay 來測試病毒的 titer。

參考文獻

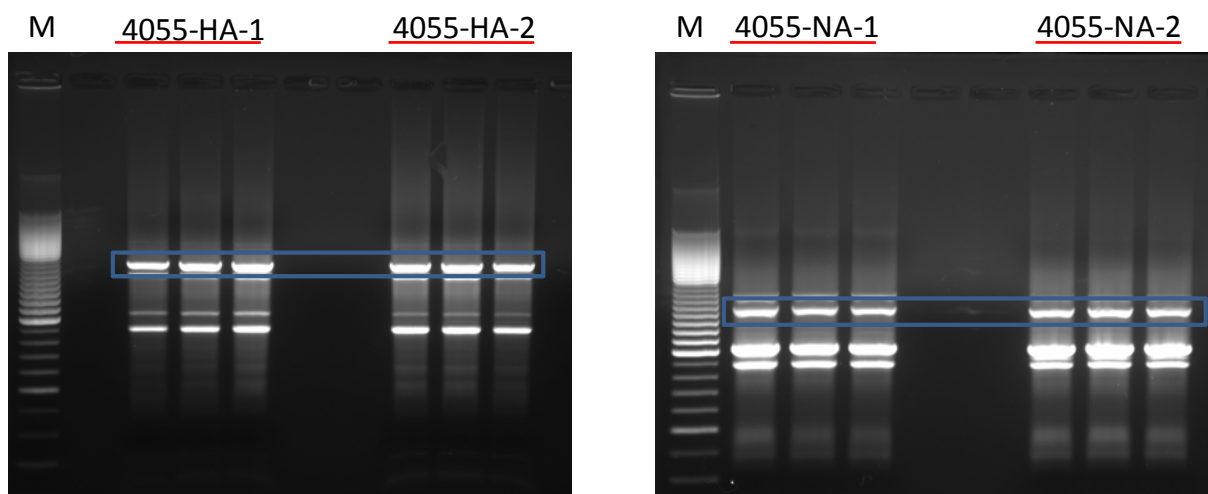
1. Fan S, Deng G, Song J, Tian G, Suo Y, Jiang Y, et al. Two amino acid residues in the matrix protein M1 contribute to the virulence difference of H5N1 avian influenza viruses in mice. *Virology*. 2009 Feb 5;384(1):28-32.
2. Taubenberger JK, Morens DM. The pathology of influenza virus infections. *Annual review of pathology*. 2008;3:499-522.
3. Jiao P, Tian G, Li Y, Deng G, Jiang Y, Liu C, et al. A single-amino-acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice. *Journal of virology*. 2008 Feb;82(3):1146-54.
4. Chang SC, Cheng YY, Shih SR. Avian influenza virus: the threat of a pandemic. *Chang Gung Med J*. 2006 Mar-Apr;29(2):130-4.
5. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO. 2009 April 23, 2009 [cited; Available from: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2009_04_23/en/index.html]
6. Influenza A(H1N1) virus resistance to oseltamivir - Last quarter 2007 to 7 February 2008. World Health Organization; 2008.
7. Influenza A(H1N1) virus resistance to oseltamivir - 2008/2009 influenza season, northern hemisphere. World Health Organization; 2009.
8. Neumann G, Hatta M, Kawaoka Y. Reverse genetics for the control of avian influenza. *Avian diseases*. 2003;47(3 Suppl):882-7.
9. Neumann G, Watanabe T, Ito H, Watanabe S, Goto H, Gao P, et al. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999 Aug 3;96(16):9345-50.
10. Neumann G, Kawaoka Y. Genetic engineering of influenza and other negative-strand RNA viruses containing segmented genomes. *Advances in virus research*. 1999;53:265-300.
11. Fodor E, Devenish L, Engelhardt OG, Palese P, Brownlee GG, Garcia-Sastre A. Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *Journal of virology*. 1999 Nov;73(11):9679-82.
12. Chen GW, Chang SC, Mok CK, Lo YL, Kung YN, Huang JH, et al. Genomic signatures of human versus avian influenza A viruses. *Emerging infectious diseases*. 2006 Sep;12(9):1353-60.
13. Chang SC, Chen GW, Mok CK, Tsao KC, Huang CG, Huang YL, et al. Subtyping of

- influenza A isolates in Taiwan--2003 to 2004. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*. 2006 Nov;105(11):895-910.
14. Shih SR, Chen GW, Yang CC, Yang WZ, Liu DP, Lin JH, et al. Laboratory-based surveillance and molecular epidemiology of influenza virus in Taiwan. *J Clin Microbiol*. 2005 Apr;43(4):1651-61.
 15. Jian JW, Chen GW, Lai CT, Hsu LC, Chen PJ, Kuo SH, et al. Genetic and epidemiological analysis of influenza virus epidemics in Taiwan during 2003 to 2006. *J Clin Microbiol*. 2008 Apr;46(4):1426-34.
 16. Chen GW, Shih SR, Hsiao MR, Chang SC, Lin SH, Sun CF, et al. Multiple genotypes of influenza B viruses cocirculated in Taiwan in 2004 and 2005. *J Clin Microbiol*. 2007 May;45(5):1515-22.
 17. Chiang C, Chen GW, Shih SR. Mutations at alternative 5' splice sites of M1 mRNA negatively affect influenza A virus viability and growth rate. *Journal of virology*. 2008 Nov;82(21):10873-86.
 18. Russell CA, Jones TC, Barr IG, Cox NJ, Garten RJ, Gregory V, et al. Influenza vaccine strain selection and recent studies on the global migration of seasonal influenza viruses. *Vaccine*. 2008 Sep 12;26 Suppl 4:D31-4.
 19. Murakami S, Horimoto T, Yamada S, Kakugawa S, Goto H, Kawaoka Y. Establishment of canine RNA polymerase I-driven reverse genetics for influenza A virus: its application for H5N1 vaccine production. *Journal of virology*. 2008 Feb;82(3):1605-9.
 20. Murakami S, Horimoto T, Mai le Q, Nidom CA, Chen H, Muramoto Y, et al. Growth determinants for H5N1 influenza vaccine seed viruses in MDCK cells. *Journal of virology*. 2008 Nov;82(21):10502-9.
 21. Itoh Y, Ozaki H, Tsuchiya H, Okamoto K, Torii R, Sakoda Y, et al. A vaccine prepared from a non-pathogenic H5N1 avian influenza virus strain confers protective immunity against highly pathogenic avian influenza virus infection in cynomolgus macaques. *Vaccine*. 2008 Jan 24;26(4):562-72.
 22. Subbarao K, Luke C. H5N1 viruses and vaccines. *PLoS pathogens*. 2007 Mar;3(3):e40.
 23. Subbarao K, Joseph T. Scientific barriers to developing vaccines against avian influenza viruses. *Nature reviews*. 2007 Apr;7(4):267-78.
 24. Horimoto T, Murakami S, Muramoto Y, Yamada S, Fujii K, Kiso M, et al. Enhanced growth of seed viruses for H5N1 influenza vaccines. *Virology*. 2007 Sep 15;366(1):23-7.
 25. Langley JM, Halperin SA, McNeil S, Smith B, Jones T, Burt D, et al. Safety and immunogenicity of a Proteosome -trivalent inactivated influenza vaccine, given nasally to healthy adults. *Vaccine*. 2006 Mar 6;24(10):1601-8.

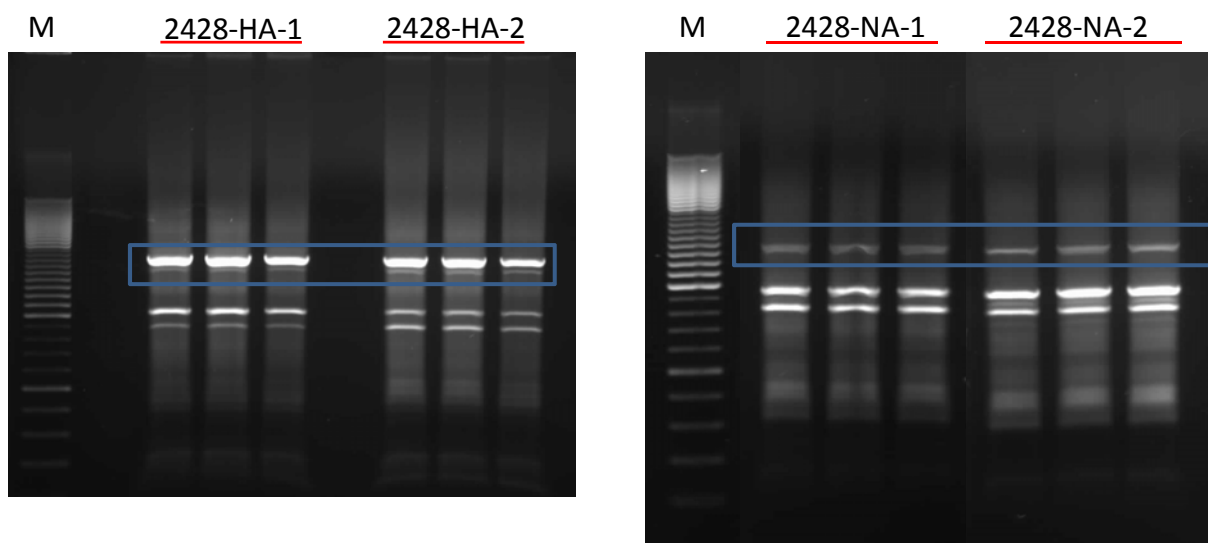
26. Horimoto T, Kawaoka Y. Strategies for developing vaccines against H5N1 influenza A viruses. *Trends in molecular medicine*. 2006 Nov;12(11):506-14.
27. Neumann G, Fujii K, Kino Y, Kawaoka Y. An improved reverse genetics system for influenza A virus generation and its implications for vaccine production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005 Nov 15;102(46):16825-9.
28. Shinya K, Fujii Y, Ito H, Ito T, Kawaoka Y. Characterization of a neuraminidase-deficient influenza A virus as a potential gene delivery vector and a live vaccine. *Journal of virology*. 2004 Mar;78(6):3083-8.
29. Russell CA, Jones TC, Barr IG, Cox NJ, Garten RJ, Gregory V, et al. The global circulation of seasonal influenza A (H3N2) viruses. *Science (New York, NY)*. 2008 Apr 18;320(5874):340-6.
30. Rambaut A, Pybus OG, Nelson MI, Viboud C, Taubenberger JK, Holmes EC. The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus. *Nature*. 2008 May 29;453(7195):615-9.
31. Bragstad K, Nielsen LP, Fomsgaard A. The evolution of human influenza A viruses from 1999 to 2006: a complete genome study. *Virology journal*. 2008;5:40.
32. Holmes EC, Ghedin E, Miller N, Taylor J, Bao Y, St George K, et al. Whole-genome analysis of human influenza A virus reveals multiple persistent lineages and reassortment among recent H3N2 viruses. *PLoS Biol*. 2005 Sep;3(9):e300.
33. Ghedin E, Sengamalay NA, Shumway M, Zaborsky J, Feldblyum T, Subbu V, et al. Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution. *Nature*. 2005 Oct 20;437(7062):1162-6.
34. Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol*. 2001 Dec;146(12):2275-89.

表一、HA 與 NA 基因 sticky end PCR 反應所使用的引子

No.	Gene	Primer Name	Sequence	Mer	Note
HA-1	HA	HA-1FCSC-pHW2000	5' -GGGAAGCAAAAGCAGGGGATAATT-3'	24	5' end 須磷酸化
HA-2		HA-1R-uni-pHW2000	5' -TATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT-3'	24	5' end 須磷酸化
HA-3		HA-1FCSC	5' -AGCAAAAGCAGGGGATAATT-3'	20	
HA-4		HA-1R-uni	5' -AGTAGAAACAAGGGTGTTTT-3'	20	
NA-1	NA	NA-1FCSC-pHW2000	5' -GGGAAGCAAAAGCAGGAGTAAAGA-3'	24	5' end 須磷酸化
NA-2		NA-1R-uni-pHW2000	5' -TATTAGTAGAAACAAGGAGTTTTTT-3'	25	5' end 須磷酸化
NA-3		NA-1FCSC	5' -AGCAAAAGCAGGAGTAAAGA-3'	20	
NA-4		NA-1R-uni	5' -AGTAGAAACAAGGAGTTTTTT-3'	21	

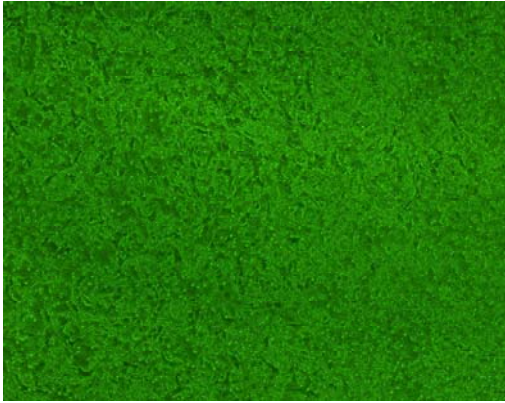


圖一、A. Sticky-end PCR for 4055-HA, -NA

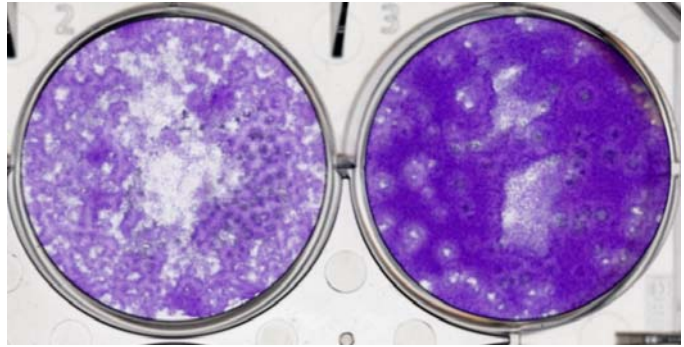


圖一、B. Sticky-end PCR for 2428-HA, -NA

Cell morphology (CPE)



Plaque Assay for
4055 Reverse Genetics Virus



圖三 Plaque assay for A/TW/4055/09 Recombinant Virus

附 錄

一、98 年度執行之目標 (milestone)

一、預定完成工作項目及實際執行情形	
預定完成工作項目	實際執行情形
提供CDC一株疫苗種仔株，其HA及NA基因置換為A/TW/4055/09病毒株的基因	A/TW/4055/09(H3N2)已將HA及NA Clone做出並已確定其序列,且病毒已製作出來。
CDC提供兩株病毒株 A/Taiwan/2428/2008 (H3N2) A/Taiwan/9042/2008 (H1N1) 給予長庚大學製作疫苗種仔株	A/Taiwan/2428//2008 (H3N2)已將HA及NA Clone製作出來並已確定其序列,目前正在產生病毒。 A/Taiwan/9042/2008 (H1N1)因病毒量不足，已向疾管局申請新的病毒株(已在2009/11/24送達)

二、98 年度預定進度

七、98 年度預定進度：以 Gantt Chart 表示本年度之執行進度。屬一年期以上計畫者，應分年度提出預定進度。

月次 工作項目	第 1 月	第 2 月	第 3 月	第 4 月	第 5 月	第 6 月	第 7 月	第 8 月	第 9 月	第 10 月	第 11 月	第 12 月	備註
疾管局提供病毒株(共 三株)				●		●		●					
疫苗種籽株產出					●		●		●		●		
能力測試,由疾管局提 供演練病毒株										●			
報告撰寫												●	

四、98 年期中報告審查委員意見

計畫名稱：新型流感病毒基因體之鑑定及以反轉基因法製造新型疫苗種籽株

計畫編號：DOH98-DC-1011

審查委員意見：

一、以反轉基因法(reverse genetics)製造流感疫苗種籽株：

1. 進度符合

2. 一年四株流感病毒株，以 reverse genetics 置換 HA 及 NA(用 PR8 的 6 段)。未來昆陽實驗室自己做的能力，亦應持續，應每年與長庚演練同一株季節性病毒，並做比對。

3. 請測定 Replication activity 與 Virus titers。

回覆：已用 Plaque Assay 知道病毒量

4. 如能穩定繼代，請測試在蛋的生長能力，並評估感染力。

回覆：本年度無購買雞胚蛋之預算，下一年度若預算足夠可以增加

5. 計畫作業尚符目標，針對種籽株作業宜與 CDC 保持良好互動，並由 CDC 保持製造能量。

6. 轉染過程利用 Vero cell 的成功率有多高，相關 SOP 是否已建立？

回覆: 可成功，但未計算成功率。相關 SOP 日後會建立

7. 增福病毒可否利用 Vero cell? 如何，成功效率有多高?

回覆: 未測試，因今年預算剛好為 4 株病毒之耗材費用

8. 此計畫自流感疫苗研發計畫開始，已建立不錯的技術平台，目前的計畫看來仍延續之前的計畫，在有限的經費下，仍應加入新的想法或創意，讓這計畫有較好的成果展現。

回覆: 有許多新的想法，但一年接近 80 萬之經費無法做太多的實驗，相關實驗會申請國科會計畫。