

中華民國第 60 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

052009

「蜂」狂「白」「老」匯: Hex70a 蛋白作為蜜
蜂長壽因子

學校名稱：桃園市立武陵高級中等學校

作者： 高二 邱柏偉 高二 高語儂 高二 柳凱馨	指導老師： 許根火
-----------------------------------	--------------

關鍵詞：蜜蜂壽命、蜂王乳、Hex70a

摘要

蜂巢中，蜂后與工蜂雖同為雌蜂，但牠們的壽命存在極大差距，前者可存活至三~五年，後者平均最大壽命則約為三十天，造成此差異的主要原因正是蜂王乳(Royal Jelly)的食用：蜂后終其一生不斷地攝取蜂王乳，但工蜂僅有在其幼蟲期的前面三日有攝取蜂王乳。工蜂在食用蜂王乳後，體內蛋白質在表現量及種類上便可觀察到明顯的差異。

本研究觀察蜂后(Queen)、餵食蜂王乳的工蜂(RJ；平均壽命約 90~120 天)、一般工蜂(Control)的體液及細胞全蛋白圖後，選擇大量存在、表現於蜂后(Queen)、餵食蜂王乳的工蜂(RJ)體內 Hex70a 蛋白作為研究對象；同樣攝取蜂王乳的工蜂(RJ)，經過 RNAi 操作抑制 Hex70a 基因表現的實驗組，其壽命較對照組是確實有減少的。

壹、研究動機

老化在醫學先進的今天，是眾所注目的領域：縱使醫療技術的進步，使全人類的平均壽命有所提升，隨著老化而來的各種衍生疾病，包括各種慢性病、身體機能退化等，仍然造成老年人生活中的許多不便。因此，我們對老化這個議題產生了興趣。

接著，我們選擇了蜜蜂作為我們研究老化的對象，原因是蜜蜂壽命短又易於大量飼養，且有明確的壽命變因——蜂王乳的食用與否——所以是老化實驗很好的選擇；在探索過文獻後，我們發現先前針對蜜蜂老化的研究主要聚焦於卵黃生成素(vitellogenin；Vg)這個蛋白質，但是數據中可以看出有另一個蛋白質，也就是我們後來經蛋白質定序所確定的 Hex70a 蛋白，其在餵食蜂王乳的工蜂(RJ)以及蜂后(Queen)的體內也和 Vg 同樣有增產的現象(相較普通工蜂)。所以我們決定對這個蛋白質進行進一步的研究。

貳、研究目的

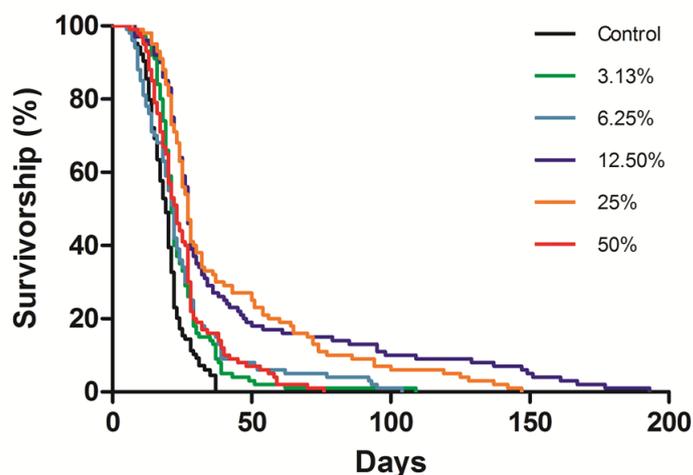
一、研究背景

Hexamerin 蛋白廣泛存在於昆蟲界中，其功能多樣——從參與表皮的形成到協助激素的運輸再到影響昆蟲的變態。Hexamerin 這個蛋白是由昆蟲的脂肪組織所分泌，並由六個次單元所組成，且主要存在於昆蟲幼蟲體內。在昆蟲變態後，其體內 Hexamerin 的含量會隨著各次單元的減產而不斷下降。Hex70a 是 Hexamerin 的所有次

單元中唯一一個昆蟲到了成蟲期、成蟲晚期仍會大量表現的蛋白。根據目前的研究，Hex70a 在蜜蜂成蟲體內會協助蜜蜂性腺的發育。

在確認 Hex70a 對蜜蜂壽命的影響時，我們會餵食不同配方的蜂蜜給蜜蜂，並且記錄牠們的壽命。其中給餵食蜂王乳的工蜂(RJ)食用的蜜我們使用的是前人研究中最有效提升蜜蜂壽命的含 12.5%蜂王乳的花粉蜜，前人的研究結果附圖如下：

The survivorship of worker bees fed with royal jelly (RJ)



圖一、餵食不同濃度蜂王乳+花粉蜜的工蜂之生存曲線圖

二、研究目標：

- (一)觀察普通工蜂(Control)、餵食蜂王乳的工蜂(RJ)及蜂后(Queen)的細胞及體液全蛋白圖並比較其異同
- (二)利用 RNAi 技術抑制餵食蜂王乳的工蜂(RJ)表現 Hex70a 基因，檢視其壽命是否有受到影響

參、研究設備及器材

一、SDS 蛋白質分析:

- (一) 蜜蜂體液及細胞樣本採集: RIPA 裂解液、蛋白酶抑制劑 (Protease inhibitor)、Protein Dye、Sample Buffer
- (二) SDS-page 製膠、跑膠、染色所需的各式器材

二、RNAi(RNA interference)

(一) 抽蜜蜂 RNA

Trizol、Chloroform: Isoamyl alcohol = 24:1 溶液、Locking PLGEL Heavy

(二) RNA 反轉錄

10X TURBO DNase Buffer、TURBO Dnase、10x RT Buffer DTT、RNaseOUT、
SuperScript III RT、Qiagen kit TOPO® vector、One Shot®

(三) 大腸桿菌質體複製

Qiagen Miniprep kit、QIA quick Gel Extraction Kit、AmpliScribe™ T7-Flash™
Transcription Kits

三、蜜蜂壽命實驗

以下是飼養蜜蜂的籠子，材質為壓克力，裡面放置由蜂巢片上取下的部分蜂巢，底下鋪上鐵網，讓蜜蜂能從網子的孔洞間喝到抽屜裡的水，放置在34°C恆溫箱中。



圖二、蜜蜂籠子構造

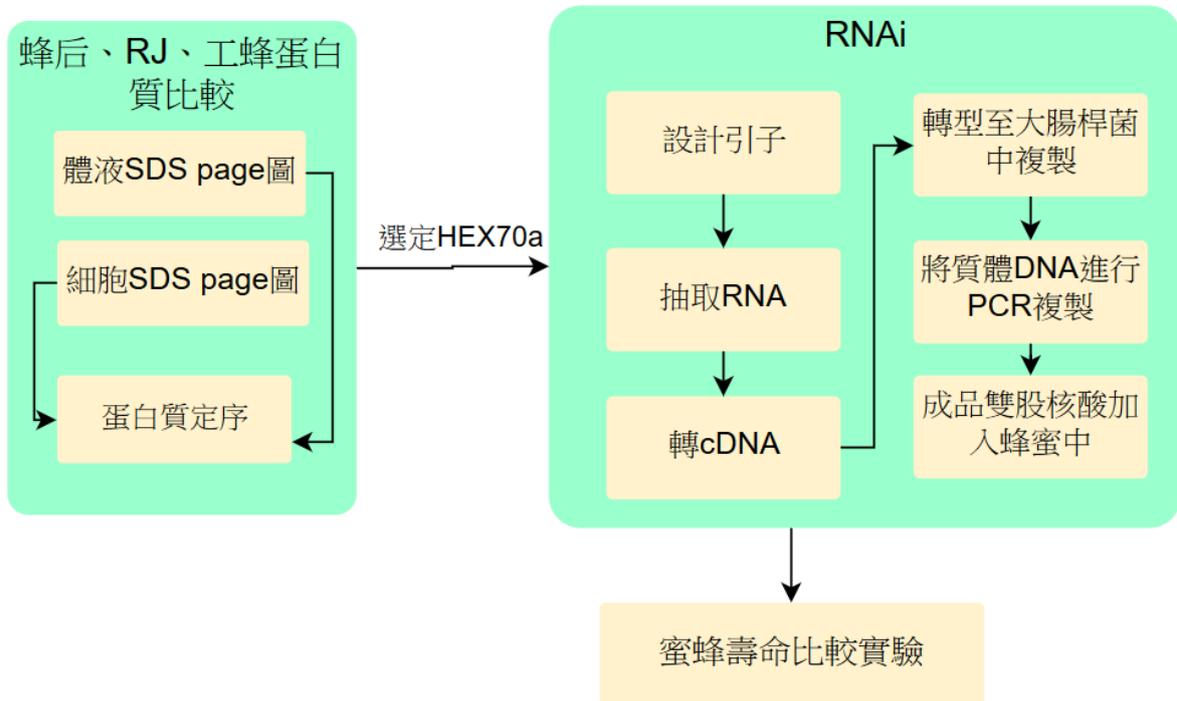
蜜蜂的餵食器:剪下微量吸管尖(Tip)，在離心管的蓋子裡以下圖方式排列，以模擬蜂巢的形狀。每日將餵食器倒滿蜂蜜放回籠子內、將抽屜倒滿水並計算蜜蜂死亡數目。



圖三、餵食器

肆、研究過程或方法

一、實驗流程圖



二、SDS-page蛋白質分析

(一) 體液蛋白質樣本

體液樣本為自工蜂腹部抽取之血淋巴。樣本採集步驟如下:

1. 將蜜蜂以大頭針交叉固定在保麗龍
2. 以一根細針劃開腹部第一和第二節片中間的縫隙
3. 用可調式微量吸管(Pipetman)自傷口吸取滲出的血淋巴2 μ l
4. 加入20 μ l的Sample Buffer稀釋並保存於-20度C冰箱中

(二) 細胞蛋白質樣本

1. 將工蜂放置於冰上使其昏迷
2. 將尾部的毒針連帶消化道和毒囊拔出
3. 將腹部與頭胸部分離
4. 撕開腹部節片並挑去氣囊及其他臟器
5. 將節片以PBS buffer浸潤

6. 在解剖顯微鏡下將氣囊等挑乾淨
7. 以解剖刀刮取節片內側呈淡黃色的絳色細胞(oenocyte)與營養細胞(trophocyte)
8. 收集上述的兩種細胞放進50 μ L RIPA+1 μ L Protease Inhibitor
9. 用軟體lab gen 5測樣本蛋白質濃度
10. 調配樣本溶液使每個樣本的蛋白質濃度皆為30 μ g/ μ L

(三) SDS-page

使用依前述步驟製成的樣本，跑出SDS-page，詳細資訊見於附錄。本研究藉SDS-page分析食用不同蜂蜜的工蜂其Hex70a蛋白在細胞中的表現量及體液中的含量。

三、RNA 干擾技術(RNAi)

(一)取得需要引子

依據前人研究所得 Hex70a 基因，詳見附錄。

依據所欲探討的基因，設計適合操作的引子，序列如下：

HEXi Fp:

5' TAATACGAGTCACTATAGGGAAGGAGTTCGACTGGCAGAAA 3'

HEXi Rp:

5' TAATACGAGTCACTATAGGGAACCAGAATCGATTGCTGCC 3'

(二)抽取 RNA

1. 同蜜蜂細胞蛋白質樣本抽取步驟 1~4
2. 將處理好的節片放進已加入 Trizol 的 Locking PLGEL 微量離心管中
3. 將節片用剪刀剪成碎片
4. 以研磨棒研磨一分鐘接著休息三十秒後再研磨一分鐘
5. 加入 0.2mL 的 Chloroform: Isoamyl alcohol=24:1 溶液並震盪(vortex)
6. 在 4°C 以 14000rpm 離心 10 分鐘
7. 取出上清液並加入 500 μ l 異丙醇(Isopropanol)混合
8. 室溫靜置 10 分鐘後再以 4°C、14000rpm 離心 10 分鐘
9. 使用微量滴管吸走大部分的上清液

10. 加入 1mL 70%酒精並以 4°、14000rpm 離心 5 分鐘
11. 抽掉大部分的液體後真空乾燥
12. 加入 20 μ L DEPC 水回溶

(三)RNA 反轉錄 cDNA

1. 將 1 μ L oligo d(T) primers、1 μ L dNTP mix 加入 RNA 樣本
2. 震盪使其混勻並離心使溶液集中到微量離心管的底部
3. 放置於 65°C 5 分鐘使 RNA 變性
4. 加入 cDNA Synthesis Mix 共 10 μ L
5. 將混和物加熱到 50°C 50 分鐘，使酵素反應而合成 cDNA
6. 加熱到 85°C 5 分鐘，使酵素失去活性 (完成後放回冰上冷卻)
7. 將 cDNA 2.0 μ L、正反向引子各 1.5 μ L、PCR Master mix 25.0 μ L、水 20.0 μ L 混合
8. 進行 PCR
9. 以 Qiagen kit 核酸純化工具組純化產物

(四)利用大腸桿菌複製

1. 將 cDNA 轉型進大腸桿菌後培養一夜
2. 使用 Qiagen Miniprep kit 萃取 plasmid
3. 將 plasmid DNA 1 μ l、正反向引子各 1.5 μ l、水 21 μ l 混勻，進行 PCR
4. 將 PCR 成品以 1% agarose gel 進行電泳
5. 將需要的 DNA 片段用刀片從膠上取下
6. 以 QIA quick Gel Extraction Kit 回收純化 DNA
7. 以離心將 DNA 兩股合併為雙股 DNA(dsDNA)
8. 使用 AmpliScribe™ T7-Flash™ Transcription Kits 將 dsDNA 轉錄為 dsRNA
9. 以 DNase 將 dsDNA 移除

四、蜜蜂壽命實驗

我們將剛羽化、還沒有飛行能力的工蜂成蟲(Day 1)分為控制組(餵食 12.5%蜂王乳)與實驗組(餵食 12.5%蜂王乳+Hex70a dsRNA)，每組各三籠，每籠 70 隻，兩組分別各有 210 隻工蜂。

兩組工蜂分別餵食不同的蜜，它們的配方如下：

	內容	配方
控制組	12.5%蜂王乳	7.02g 蜂王乳+0.83g 花粉+蜂蜜到 50mL
RNAi	12.5%蜂王乳+HEX70a dsRNA	3.51g 蜂王乳+0.415g 花粉+ 40 μ g/ μ L 的 RNAi 5 μ L+蜂蜜到 25mL

表一：兩種不同蜂蜜的配方

將配方加入離心管內後，再用藥匙搗碎混合均勻(花粉亦會確實碾碎)。

五、實驗說明

(一)SDS-page 樣本製備

本研究採用的細胞及體液樣本中，普通工蜂(Control)及餵食蜂王乳的工蜂(RJ)來自實驗室平時飼養的蜜蜂，蜂后(Queen)則是從蜂農處買得。

細胞的蛋白質樣本，我們是採用附著在蜜蜂腹部節片上的絳色細胞(oenocyte)與營養細胞(trophocyte)，原因是因為它們為公認的蜜蜂老化的指標且取得容易。

不論是體液或是細胞的樣本，都是在蜜蜂羽化後的第 30 天製備的(蜂后除外)。

(二)引子的決定

引子的決定應盡量符合以下原則進行:

1. 任五個連續的鹼基裡不應存在超過兩個 C 或兩個 G
2. C 和 G 的總量不應超過 50%

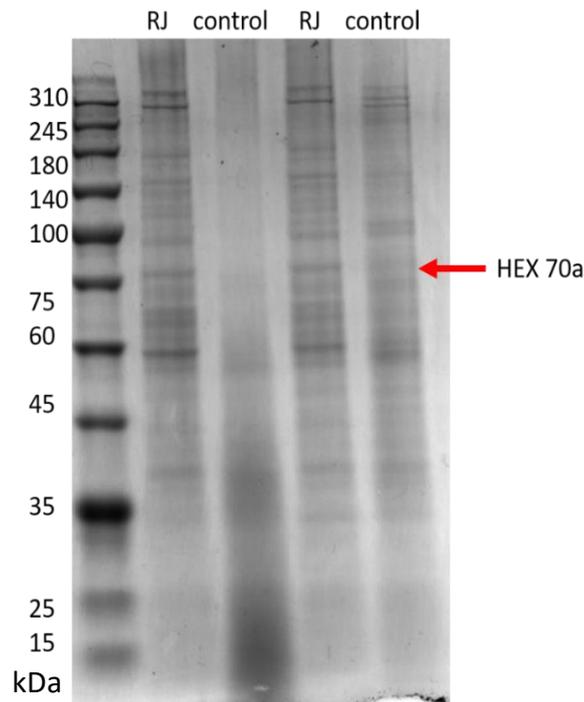
前面的引子(forward primer ; Fp)由 Primer 3 軟體決定；後面的引子(reverse primer ; Rp)自行依上述規則決定。

伍、研究結果

一、觀察普通工蜂、餵食蜂王乳的工蜂(RJ)及蜂后的細胞及體液全蛋白圖並比較其異同

將羽化後第 30 日的工蜂及自蜂農處買來的蜂后解剖後取得其體液或腹部細胞(絳色細胞及營養細胞)製成樣本，接著跑 SDS-page 以對樣本中所含的蛋白質含量及種類進行比較。以下是 SDS-page 結果:

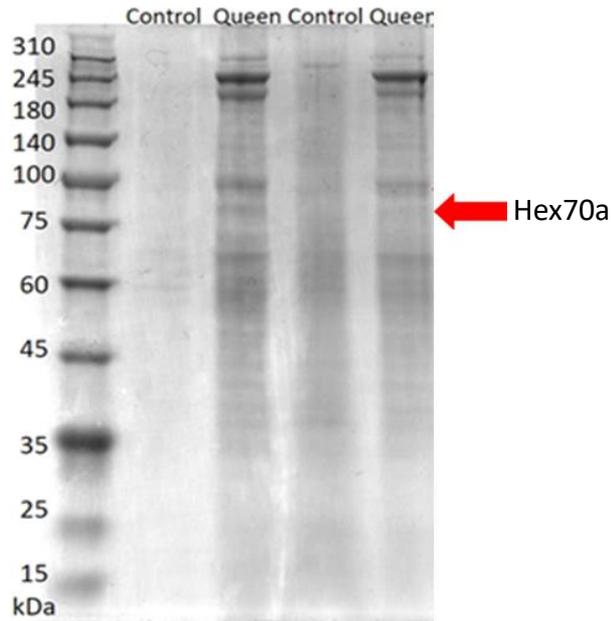
(一) 藉由 SDS-page 比較普通工蜂(Control)及餵食蜂王乳的工蜂(RJ)其細胞中 Hex70a 蛋白的含量:



圖四、普通工蜂及 RJ 之細胞蛋白圖

比較兩組 Control 及 RJ 細胞中 Hex70a 蛋白的含量，可以看出蜂王乳的食用確實會使工蜂脂肪組織對 Hex70a 蛋白的表現量增加。

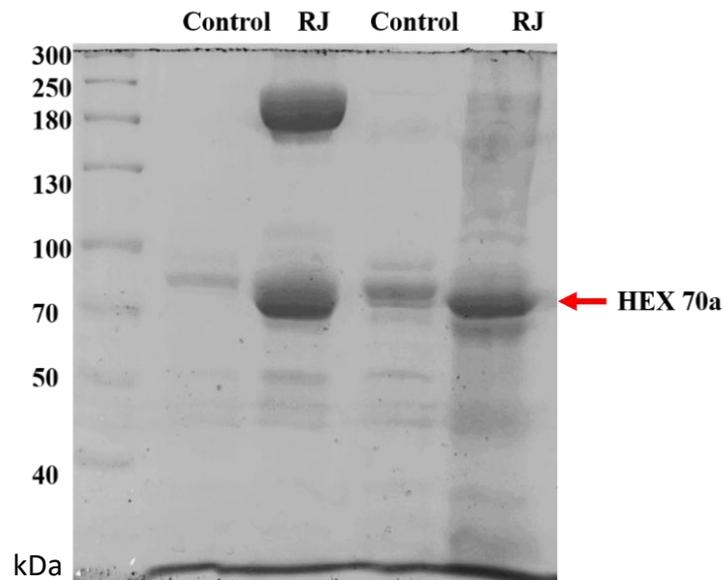
(二) 藉由 SDS-page 比較普通工蜂(Control)及蜂后(Queen)其細胞中 Hex70a 蛋白的含量:



圖五、普通工蜂及 Queen 之細胞蛋白圖

比較兩組 Control 及 Queen 細胞中 Hex70a 蛋白的含量，可以看出終生食用蜂王乳的蜂后其體內細胞對 Hex70a 蛋白的表現量亦會增加。

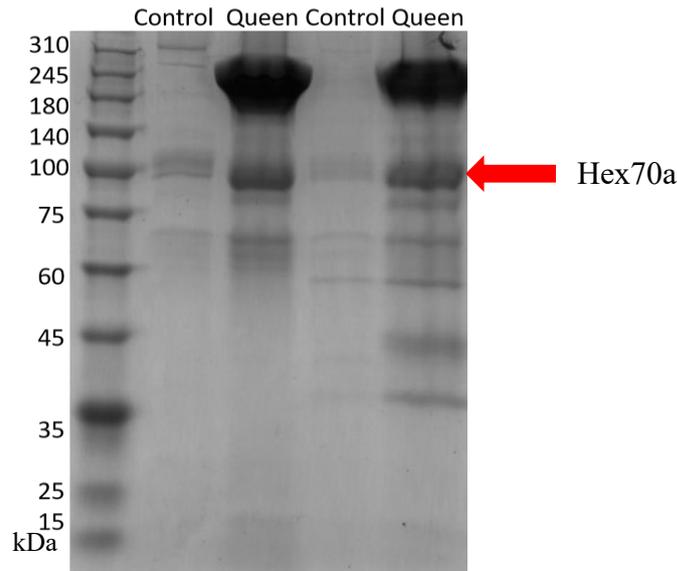
(三) 藉由 SDS-page 比較普通工蜂(Control)及餵食蜂王乳的工蜂(RJ)其體液內 Hex70a 蛋白的含量:



圖六、普通工蜂及 RJ 之體液蛋白圖

比較兩組 Control 及 RJ 體液中 Hex70a 蛋白的含量，可以看出 Hex70a 在 RJ 體液中的含量會隨著其在細胞內的增產而增加。

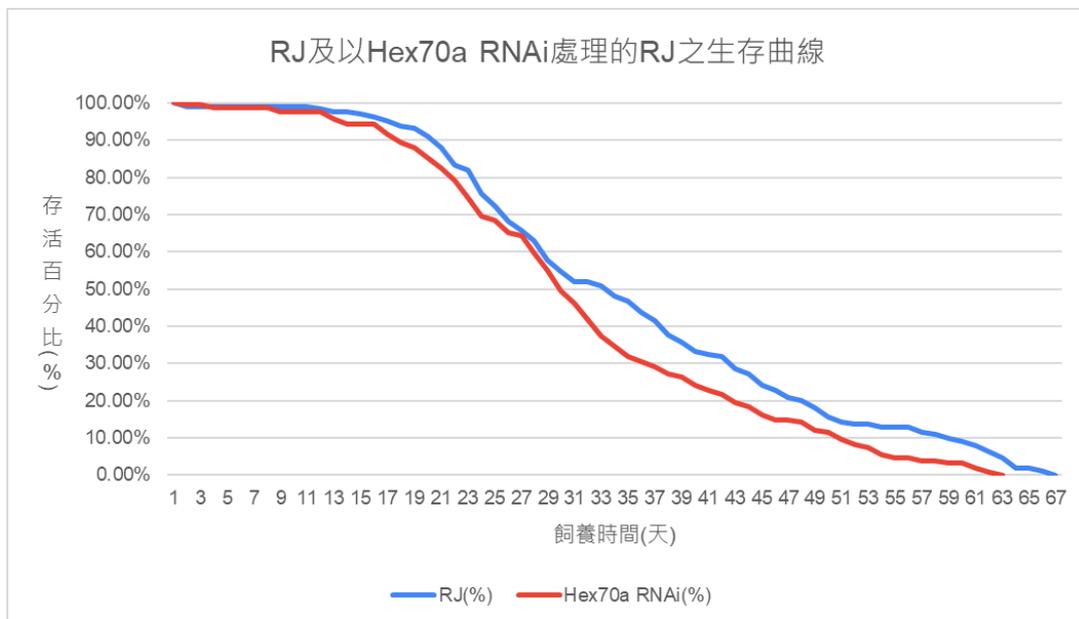
(四) 藉由 SDS-page 比較普通工蜂(Control)及蜂后(Queen)其體液內 Hex70a 蛋白的含量:



圖七、普通工蜂及 Queen 之體液蛋白圖

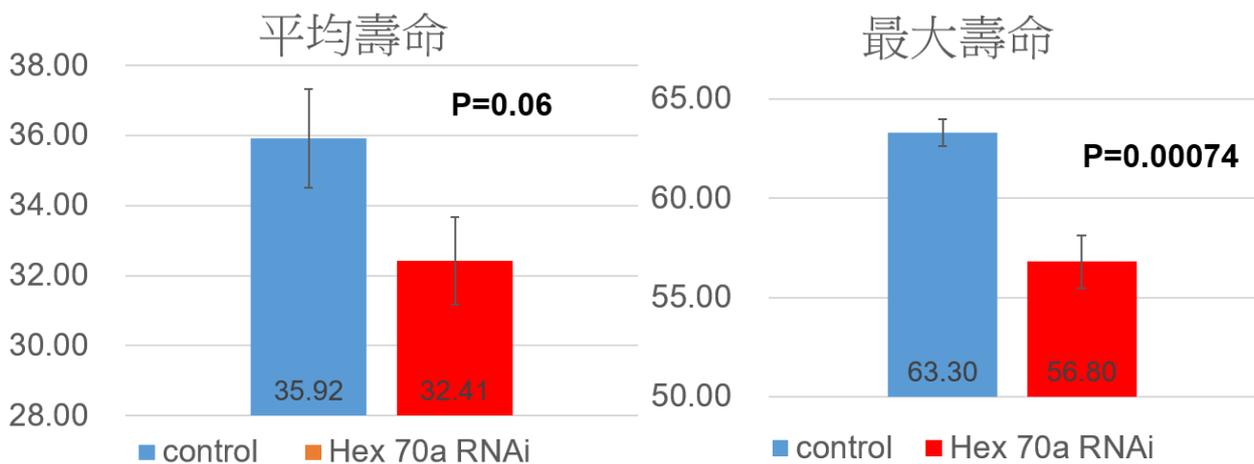
比較兩組 Control 及 Queen 體液中 Hex70a 蛋白的含量，可以看出 Hex70a 在 Queen 的細胞內增產時，其體液中 Hex70a 蛋白的含量亦會隨之增加。

二、利用 RNAi 技術抑制餵食蜂王乳的工蜂(RJ)表現 Hex70a 基因，檢視其壽命是否有受到影響



圖八、餵食蜂王乳的工蜂及餵食 RJ+Hex70a RNAi 的工蜂之生存曲線

我們每日餵食蜜蜂所得出的蜜蜂生存曲線如上圖，可看出兩者有壽命區別，且餵食 Hex70a dsRNA 的實驗組(紅線)壽命較體內仍然可以製造 Hex70a 的控制組(藍線，RJ)短。



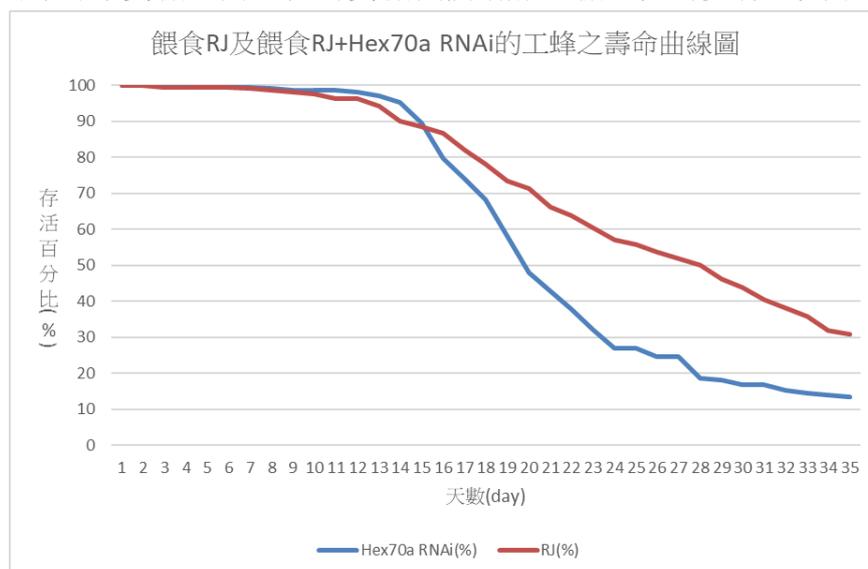
圖九、蜜蜂的平均壽命(左上)及最大壽命(右上)

	最大壽命 平均	最大壽命 標準差	最大壽命 P-value	平均壽命 平均	平均壽命 標準差	平均壽命 P-value
control	63.30	2.16	0.00074	35.92	14.18	0.06
Hex 70a RNAi	56.80	4.21		32.41	12.49	

表二、蜜蜂的平均壽命及最大壽命

上面的兩張圖及表格是我們將蜜蜂的壽命量化後的數據，從這裡我們可以看出兩組蜜蜂的壽命差距是很顯著的。

但由於第一次的蜜蜂壽命實驗我們未能證明我們的 Hex70a dsRNA 確實是因進入蜜蜂細胞內影響蜜蜂細胞對 Hex70a 蛋白的表現，而不是以其他方式影響蜜蜂的壽命。因此，我們開始了第二次的蜜蜂壽命實驗，而這次的實驗我們增加了驗證性的步驟。其結果如下：

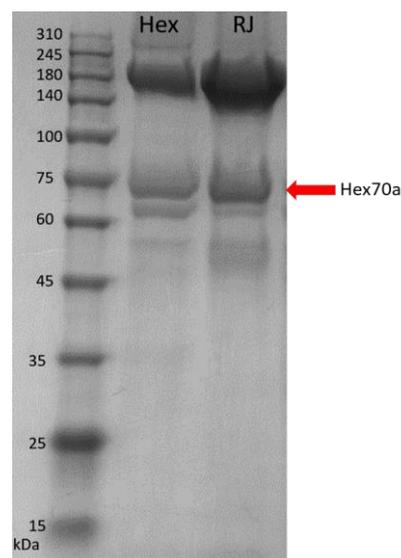


圖十、第二次蜜蜂壽命實驗的蜜蜂生存曲線圖

上圖是我們第二次蜜蜂壽命實驗的結果，紅色的曲線代表的是我們餵食蜂王乳的工蜂(RJ)，藍色的曲線則是我們以 Hex70a dsRNA 抑制其 Hex70a 基因表現的實驗組。從圖中我們可以發現實驗組的壽命比 RJ 的壽命短很多。

在這次的實驗中，我們有多飼養一籠 70 隻的蜜蜂，餵食 12.5%蜂王乳+花粉蜜+Hex70a dsRNA，並在其羽化後的第 30 天收取其細胞及體液樣本，最後利用 SDS-page 來觀察我們的實驗組蜜蜂對 Hex70a 蛋白的表現是否確實有受到 RNAi 的抑制。其結果如下：

在右圖中，我們可以觀察到：Hex70a 基因受到 RNAi 技術抑制表現的 Hex 組，其體液當中 Hex70a 蛋白的含量相對正常餵食蜂王乳的工蜂(RJ)而言是有減少的。因此，我們可以確認我們的 Hex70a dsRNA 確實是有作用的。



圖十一、餵食 12.5%蜂王乳+花粉蜜+Hex70a dsRNA 的工蜂(Hex)及 RJ 的體液蛋白質圖

陸、討論

針對本研究的兩項研究目標進行討論：

一、觀察普通工蜂、餵食蜂王乳的工蜂(RJ)及蜂后的細胞及體液全蛋白圖並比較其異同

觀察上面的四張圖可以發現：餵食蜂王乳的工蜂(RJ)及蜂后(Queen)不論是細胞或是體液中的蛋白質產量均高於普通工蜂(Control)組。其中，分子量略高於 75kDa 的 Hex70a 尤其明顯，這顯示了蜂王乳的食用確實會明顯的增加工蜂對 Hex70a 蛋白的表現量。

二、利用 RNAi 技術抑制餵食蜂王乳的工蜂(RJ)表現 Hex70a 基因，檢視其壽命是否有受到影響

以 RNAi 技術抑制其 Hex70a 基因表現的餵食蜂王乳的工蜂(Hex70a RNAi)，與正常的餵食蜂王乳的工蜂(RJ)相比較，兩者的生存曲線有明顯的差異。這代表 Hex70a 這

個蛋白質在餵食蜂王乳的工蜂(RJ)體內的大量表現有助於工蜂壽命的延長，而造成 Hex70a 增產是蜂王乳延長工蜂壽命的其中一個因素。

柒、結論

本研究：

- 一、藉 SDS-page 發現蜂王乳的食用會導致蜜蜂細胞內對 Hex70a 的表現量增加。
- 二、藉 SDS-page 發現蜜蜂細胞內 Hex70a 的表現量增加會使得其在體液內的含量增加。
- 三、藉著餵食 dsRNA 對特定的基因表現進行抑制，我們發現 Hex70a 的表現量多寡確實與工蜂的壽命有關。

未來，我們計畫進一步對 Hex70a 在生理上的功能及其影響壽命長短的緣由進行研究，深入了解其機轉。例如，Hex70a 根據文獻研究，會參與蜜蜂成蟲性腺的發育；本實驗所發現 Hex70a 對壽命的影響，其與蜜蜂性腺的發育有何關係？抑或是 Hex70a 蛋白有尚未被發現、不為人知的功能呢？此為未來值得我們繼續深入探討的主題之一。

另外，在了解蜜蜂壽命的同時，尋找人類身上類似的系統，或許可以作為研究人類老化機制時的參考。

捌、參考資料

- 一、Burmester, T. H. O. R. S. T. E. N. (1999). Evolution and function of the insect hexamerins. *European Journal of Entomology*, 96, 213-226.
- 二、Kang, L., Chen, X., Zhou, Y., Liu, B., Zheng, W., Li, R., ... & Yu, J. (2004). The analysis of large-scale gene expression correlated to the phase changes of the migratory locust. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(51), 17611-17615.
- 三、Danty, E., Arnold, G., Burmester, T., Huet, J. C., Huet, D., Pernollet, J. C., & Masson, C. (1998). Identification and developmental profiles of hexamerins in antenna and hemolymph of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 28(5-6), 387-397.
- 四、Martins, J. R., Anhezini, L., Dallacqua, R. P., Simoes, Z. L., & Bitondi, M. M. (2011). A honey bee hexamerin, HEX 70a, is likely to play an intranuclear role in developing and mature ovarioles and

玖、附錄

一、SDS-page

本研究所使用的 8% 及 10% 的聚丙烯醯胺膠，其成分如下(單位: ml)：

	8% (下膠)	10% (下膠)	5% (上膠)
水	4.6	3.97	2.72
30% Acrylamide Mix	2.67	3.33	0.68
1.5M TRIS pH8.8	2.5	2.5	0
1.0M TRIS pH6.8	0	0	0.5
10%SDS	0.1	0.1	0.04
10%APS	0.1	0.1	0.04
TEMED	0.006	0.004	0.004

表三:SDS-page 的配方

而我們跑完蛋白質電泳後，使用 Coomassie bright blue 對膠上的蛋白質進行染色 20~30 分鐘，再以 Destain Solution I（三次、每次五分鐘）、Destain Solution II（shake overnight）洗除膠上多餘的染劑，兩種 Destain Solution 的配方如下：

Destain Solution I	400ml 甲醇、70ml 醋酸、加水到 1000ml
Destain Solution II	50ml 甲醇、70ml 醋酸、加水到 1000ml

表四: Destain Solution 的配方

二、Hex70a 基因的 DNA 序列

以下是 Hex70a 的序列(紅字部分為引子結合位或引子結合位的互補片段)：

Hex70a

> Apis mellifera hexamerin 70a (Hex70a) NM_001110764.1

GCCCTTGCATCTCCACTCTCAGATTCTGCCGGTTTTTCATCTTCTCGAAAATATGTTTATAC
 CGTCACATCAAGTATGGCTGGTTGGCTTATTGGCCTTCAGTTTGGTCGGTGCAGAATATT
 ACGACACGAAAACAGCGGACAAGGACTTCCTGTTGAAACAGAAGAAGGTGTACAATCT

GCTTTATCGCGTCGCTCAACCAGCTTTGGCGAACATTACATGGTATAACGAGGGTCAAG
CATGGAACATAGAAGCCAACATCGATTCTACACCAATGCGGCAGCGGTGAAGGAATT
CCTCTCGATATACAAACATGGGATGCTTCCACGTGGAGAATTATTTTCTCTCTATTATCC
GCAACTCCTTAGGGAAATGTCAGCCTTGTTCAAATTGTTCTACCATGCGAAAGATTTCGA
TATTTTCTTCAAGACAGCTCTCTGGGCGAAGAACAACATAAACGAGGCGCAATACATAT
ACAGTTTGTACACAGCCGTGATTACAAGGCCGGATACCAAATTCATTCAATTGCCACCG
CTCTACGAGATGTGCCCTATTTCTTCTTCAATTCAGAAGTATTGCAGAAAGCCAATCAC
GCTCTGATTTTTGGGAAATTAGACACCAAACAAGTGGAAAGTACAAAGAGTACATAAT
TCCGGCAAATTATTCGGGCTGGTATCTGAATCACGATTACAACTTGGAAAATAAACTAA
TTACTTCATCGAAGATATCGGATTAACACTTACTATTTCTTCTTGGCGTCAAGCATTCC
CGTTCTGGTTACCATCGAAGGAATACGACTTGCCGGATTATCGTGGCGAAGAATATTTA
TATAGCCATAAACTATTGTTGAACAGATATTACTTGGAAAGGCTTTCCAATGATTTACCT
CATCTCGAGGAGTTCGACTGGCAGAAAACCATTCTATCCTGGTTATTATCCTACCATGACT
TATTTCCAATGGGCTACCATTCCCCCAAAGGCCGATCTGGAGCAACTTTCCCATCTACAA
ATACAAATACATCAGGGAAATTATGAACAAGGAATCGAGAATATCGGCAGCAATCGAT
TCTGGTTATATTCTGAACAACGATGGAAAATGGCACAATATTTATAGCGAGAAAGGTTT
GAACATTCTTGGAAATATAATCGAAGGTAATGCAGATTTCGTACAACACTGAATTCTATG
GCAGCATCGATACCCTCGCGAGGAAAATCCTTGGTTACAATTTAGAAGCAGCAAGCAAG
TATCAAATTGTTCCAAGCGCCTTGGAAATTTTCTCCACATCTATGAAAGATCCCGCATT
TATCGAATCTATAAAAGAATAATTGATTATTATCACAGTTACAAAATGCATCAGAAACC
GTACAATAAAGATGAAATTATTTATCCGAATTTGAAGATCGAATCTTTTACCGTGGATA
AACTGATTACGTACTTTGAACAATTTGATACAACGATCAACAATGGATTGTTACTTGAA
GAGCAAAGAAACGATGATAAACCGTTTTTAATTTAAAATTAGACAGTATCGTTTTAAATCA
CAAACCGTTTTAACTTCCATATTACTATCAACGCTGATAAACCAATGAAAGCAGCCATTA
GAATTTTTATCGGACCGAAATACGATTCGCATCACAACTGATCGAAATTCAGAAGAT
CTGAAATACTTTTACGAAATTGACAATTGGATGCTAGATTTGAATTCAGGTTTGAACAA

AATTACACGTAACAGTTTAGATTGTTTCTTCACGATGAATGATCTAGAACCGAGCGAGA
TATTCTATGAAAAGATCGAAACGTCTCTCAACAGTGACAAACCATTTACTTACAATGAA
AGAATTTTTGGATTCCCAGGAAGATTGTTATTACCTAGGGGTAAAAAGGAAGGAATGCC
ATTCCAGTTGTTCTTATATGTTAGTCCAGTCTCTTCGGAATACAATCAGTACAATTCGAG
AATATGGGGTGGTTACAAATTTGACAAAAGATCGTTTGGTTTTCCGTTAGATAAACCTCT
CTATGATTTCAATTATGAAGGACCTAATATGTTGTTCAAAGATATTCTTATTTATCACAA
GGATGAATTTGATATGAATATCACTTATTAATTATTTTCTCTTTCCATTTGTATCTTTCAC
GTTTATTTTTATAATATTATAATTTTGTAATAAATGTTTTCTTTTATCCCCCAATATGTTT
TATTTTGTCCATCTTTTTACATGTGGATGTATATATTTTTAAAATTGTAATATATTGTAAT
TTAAAATTACAATATATATAATAAATAAAGAAATAATTAATAAATAAATAAGTAGATT
TTAATAAGTAGAATTAAATAAATAAATAAATGAATAGTTATTATAAAGTAATGTATAA
TGTGTAAAAAATGTTAAATTAATATATATTAATATTAATTTAGAATGTTAAAATAAGT
AATTGATACTATTCTCCGTAATAATAGAATTTATTCAAATATTTGATTTAAATTCATAAT
TTGTCAGAAAAATTTAGATAGAAGATATATTTGATTTTGAAAAACATTGAATGTGTGC
TTAATTAACGTACCTTGTTTGTGAACATGCGTCAAAGCAAAAAGGGCGAA

【評語】 052009

本研究觀察蜂后(Queen)、餵食蜂王乳的工蜂(RJ；平均壽命約 90~120 天)、一般工蜂(Control)的體液及細胞全蛋白圖後，選擇大量存在、表現於蜂后(Queen)、餵食蜂王乳的工蜂(RJ)體內 Hex70a 蛋白作為研究對象；同樣攝取蜂王乳的工蜂(RJ)，經過 RNAi 操作抑制 Hex70a 基因表現的實驗組，其壽命較對照組是確實有減少的。並探討：(一)觀察普通工蜂(Control)、餵食蜂王乳的工蜂(RJ)及蜂后(Queen)的細胞及體液全蛋白圖並比較其異同；(二)利用 RNAi 技術抑制餵食蜂王乳的工蜂(RJ)表現 Hex70a 基因，檢視其壽命是否有受到影響？

1. 建議使用兩種以上的 RNAi 來做實驗比較精確。
2. Hex70a 蛋白的含量應該由西方墨點來測量/證實。
3. Hex70a 蛋白作為研究對象的原因或理由，和蜂王乳的關係如何？蜂王乳如何 induce Hex70a 表現？
4. 大量表現 Hex70a 基因是否可以增加壽命？

摘要

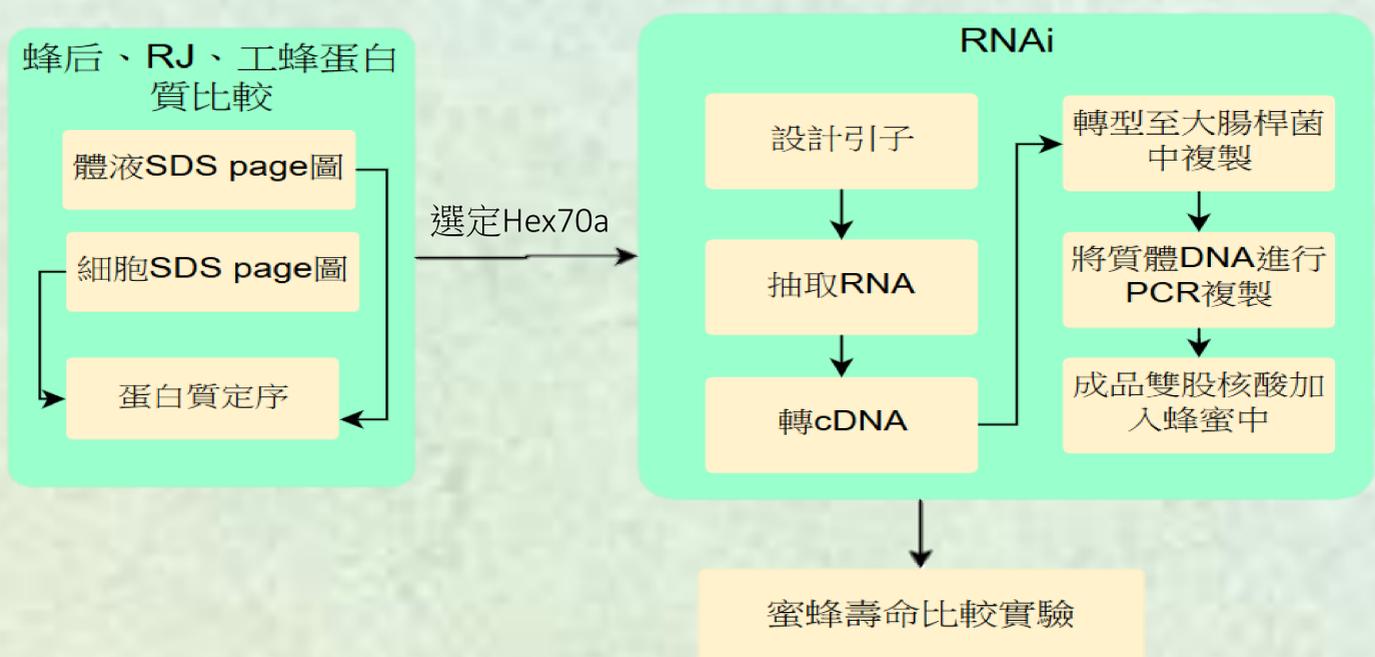
蜂巢中，蜂后與工蜂雖同為雌蜂，但牠們的壽命存在極大差距，前者可存活至三~五年，後者平均約為三十天，造成此差異的主要原因正是蜂王乳(Royal Jelly)的食用：蜂后終其一生不斷地攝取蜂王乳，但工蜂僅有在其出生的前三日有攝取蜂王乳。工蜂在食用蜂王乳後，體內蛋白質在表現量及種類上便可觀察到明顯的差異。

本研究觀察蜂后(Queen)、餵食蜂王乳的工蜂(RJ；平均壽命約90~120天)、一般食用花粉蜜的工蜂(Control)的體液及細胞全蛋白圖後，選擇在蜂后(Queen)、餵食蜂王乳的工蜂(RJ)體內大量表現的Hex70a蛋白作為研究對象；同樣攝取蜂王乳的工蜂(RJ)，經過RNAi操作抑制Hex70a基因表現的實驗組，其壽命較對照組是確實有減少的。

研究目標

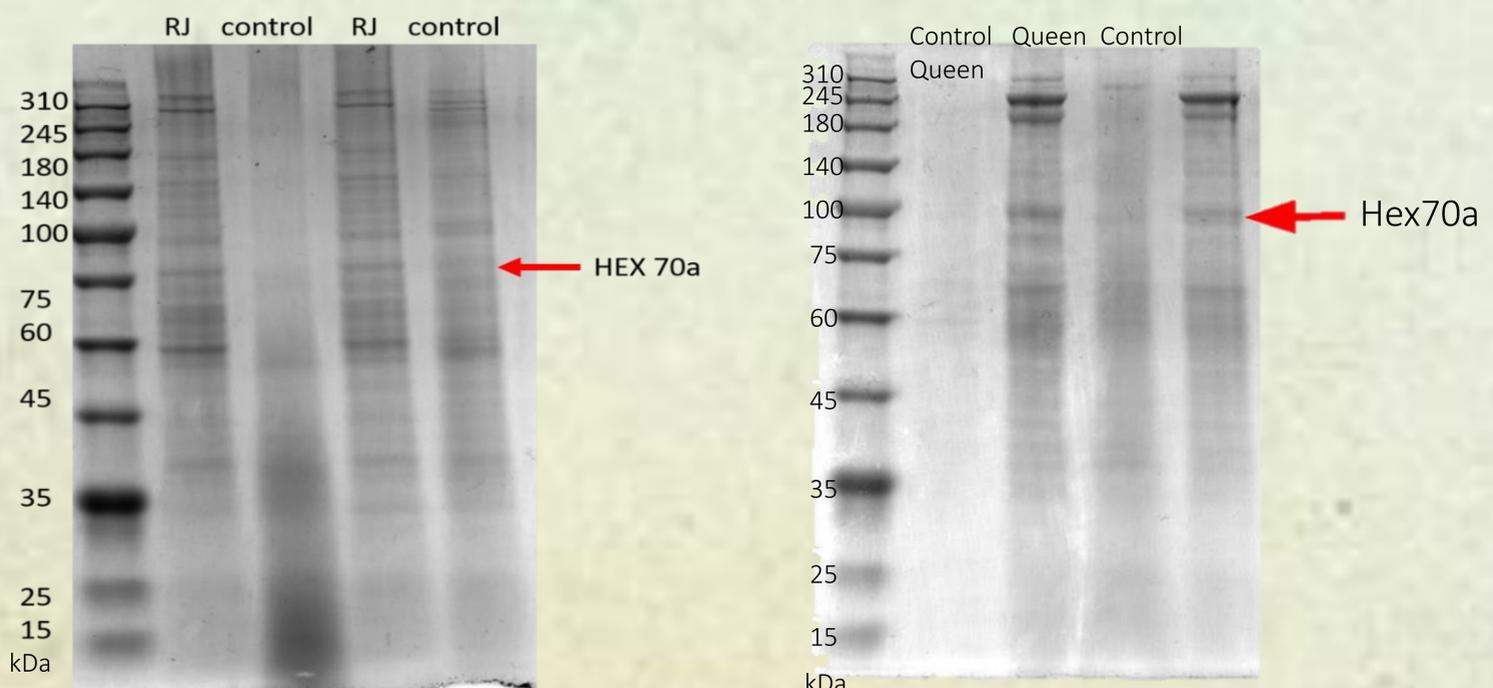
- 一、觀察普通工蜂(Control)、餵食蜂王乳的工蜂(RJ)及蜂后(Queen)的體液及細胞全蛋白圖並比較其異同
- 二、利用RNAi技術抑制餵食蜂王乳的工蜂(RJ)表現Hex70a基因，檢視其壽命是否有受到影響

研究流程



圖一、實驗流程圖

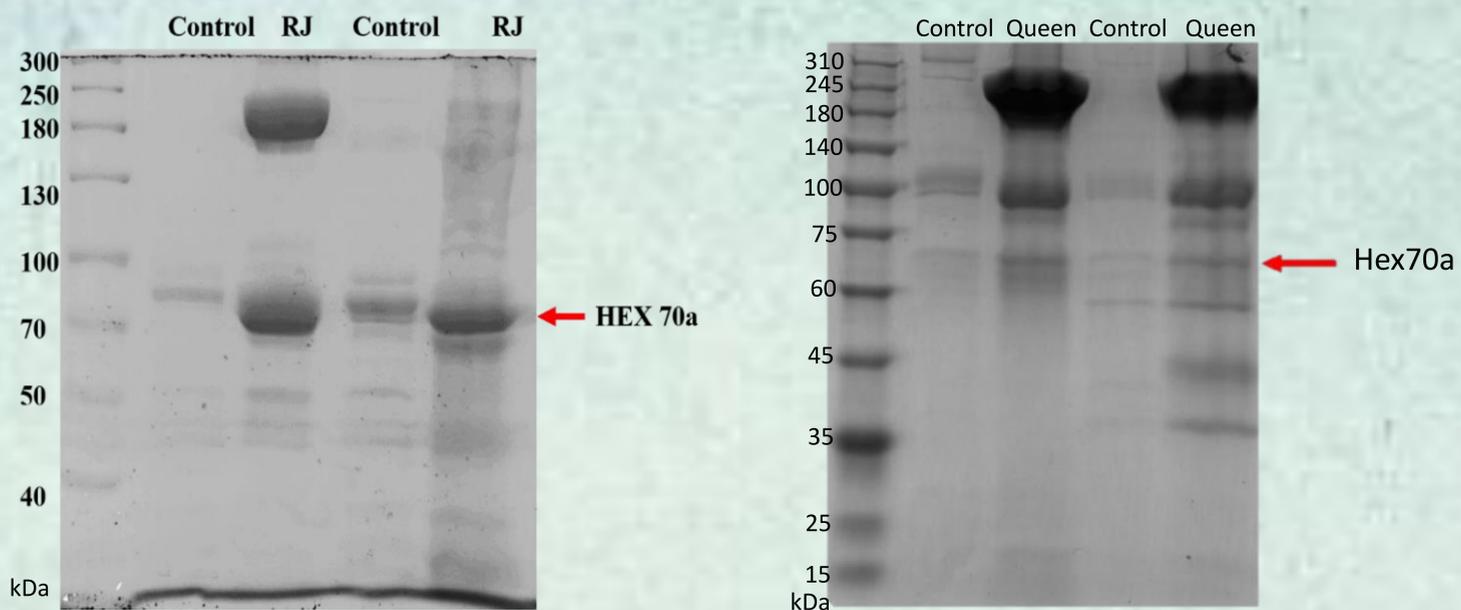
研究結果



圖二、細胞 SDS-page

左:普通工蜂及RJ之細胞蛋白圖 右:普通工蜂及Queen之細胞蛋白圖

研究結果



圖三、體液 SDS-page

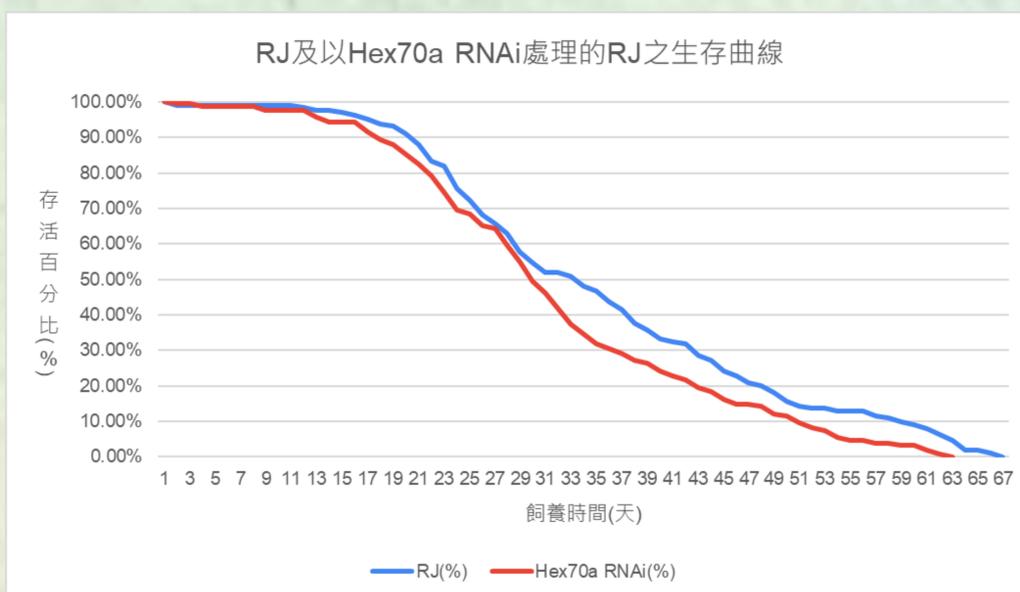
左:普通工蜂及RJ之體液蛋白圖 右:普通工蜂及Queen之體液蛋白圖

我們將剛羽化、還沒有飛行能力的工蜂成蟲(Day 0)分為控制組(餵食12.5%蜂王乳)與實驗組(餵食12.5%蜂王乳+Hex70a dsRNA)，每組各三籠，每籠70隻，兩組分別各有210隻工蜂。

兩組工蜂分別餵食不同的蜜，它們的配方如下：

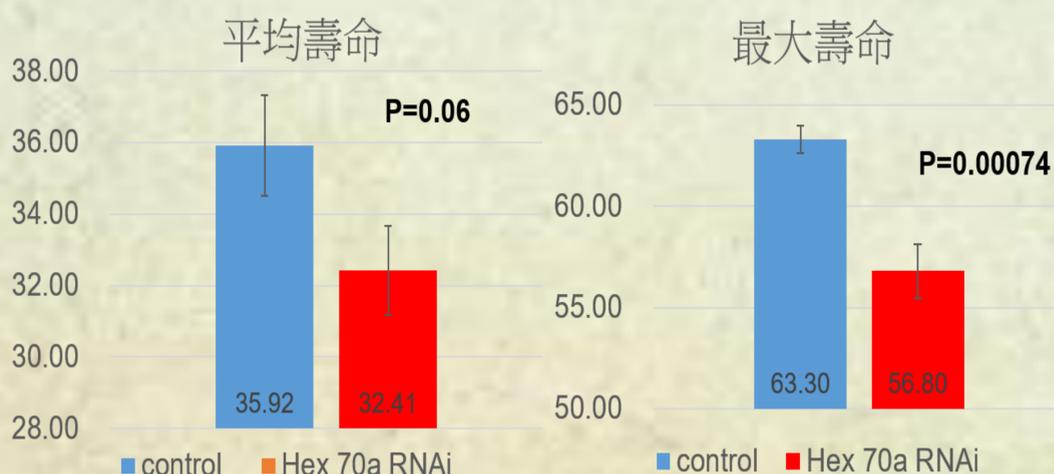
	內容	配方
控制組	12.5%蜂王乳	7.02g蜂王乳 + 0.83g花粉 + 蜂蜜到50mL
RNAi	12.5%蜂王乳 +HEX70a dsRNA	3.51g蜂王乳 + 0.415g花粉 + 40µg/µL的RNAi 5µL + 蜂蜜到25mL

表一：兩種不同蜂蜜的配方



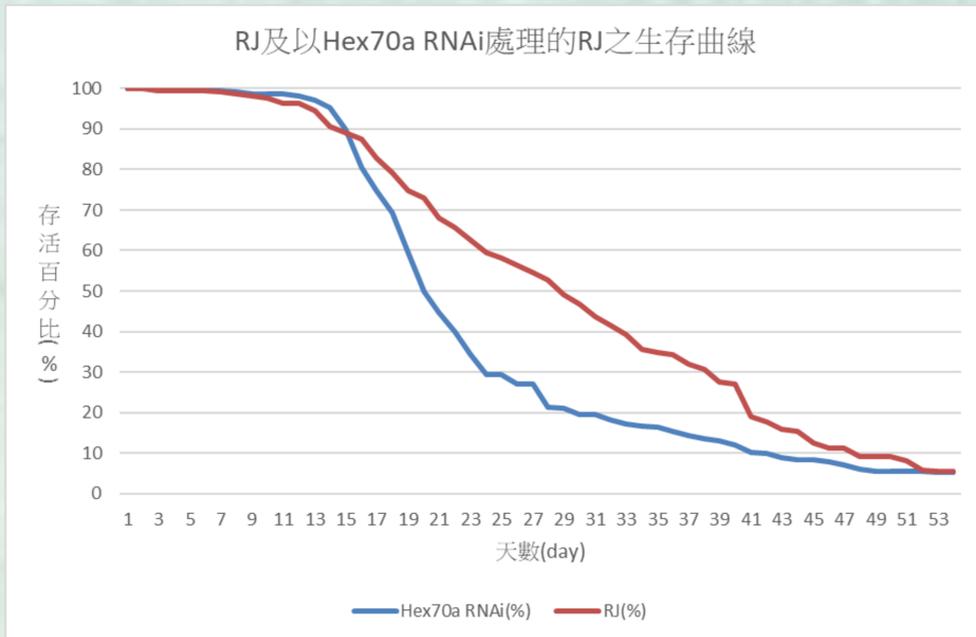
圖四、餵食蜂王乳的工蜂及餵食RJ+Hex70a RNAi的工蜂之生存曲線 (第一次)

我們每日餵食蜜蜂所得出的蜜蜂生存曲線如上圖，可看出兩者已出現壽命區別，且餵食Hex70a dsRNA的實驗組(紅線)壽命較體內仍然可以製造Hex70a的控制組(藍線，RJ)短。而下圖為量化的數據。

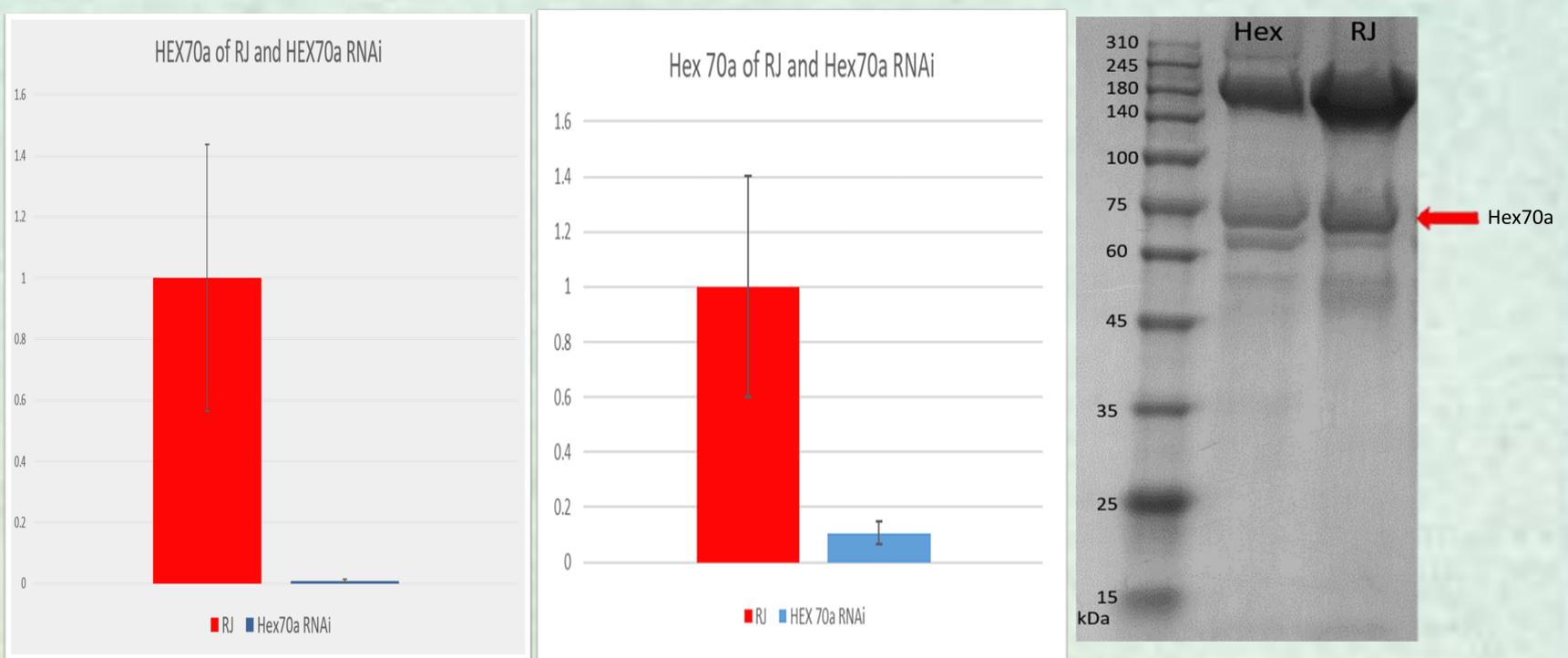


圖五、蜜蜂的平均壽命(左)及最大壽命(右)

研究結果



圖六、餵食蜂王乳的工蜂及餵食RJ+Hex70a RNAi的工蜂之生存曲線 (第二次)



圖七、RJ及以Hex70a RNAi處理的RJ體內的Hex70a mRNA或蛋白質含量比較圖
第一批工蜂之mRNA含量(左)&第二批工蜂之mRNA含量(中)
&第二批工蜂之體液蛋白質含量(右)

討論與結論

觀察上面的四張SDS-page，我們可以發現:餵食蜂王乳的工蜂(RJ)及蜂后(Queen)不論是細胞或是體液中的蛋白質產量均高於普通工蜂(Control)組。其中，分子量略高於70kDa的Hex70a尤其明顯，這顯示了蜂王乳的食用確實會明顯的增加Hex70a蛋白的表現量。

以RNAi技術抑制其Hex70a基因表現的餵食蜂王乳的工蜂(Hex70a RNAi)，與正常的餵食蜂王乳的工蜂(RJ)相比較，兩者的生存曲線有明顯的差異。這代表Hex70a這個蛋白質在餵食蜂王乳的工蜂(RJ)體內的大量表現有助於工蜂壽命的延長，而造成Hex70a增產是蜂王乳延長工蜂壽命的其中一個因素。

本研究：

- 1.藉SDS-page發現蜂王乳的食用會導致蜜蜂體內Hex70a的表現量增加。
- 2.藉SDS-page發現蜜蜂細胞內Hex70a的表現量增加會使得其在體液內的含量增加。
- 3.藉著餵食dsRNA對特定的基因表現進行抑制，發現Hex70a的表現量多寡確實與工蜂的壽命有關。