

中華民國第 53 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 生物（生命科學）科

第二名

040714

借酒澆愁愁更愁

—探討果蠅求偶被拒絕與其飲酒行為之關聯性

學校名稱：國立科學工業園區實驗高級中學

作者： 高二 陳慶豐 高二 陳昌逸	指導老師： 馮蕙卿 揭維邦
-------------------------	---------------------

關鍵詞：果蠅、NPF、Gal4-UAS

摘要

研究指出，公果蠅(*drosophila*)在求偶的過程中若被母果蠅拒絕，將提升其對酒精的攝取量。此研究結果引起了我們的興趣，本實驗就是在探討被拒絕之公果蠅提升酒精攝食量的原因。實驗結果顯示:被拒絕的公果蠅是在攝食酒精後才對酒精產生成癮，而非是在拒絕後直接提升對酒精的趨向。也就是說，被拒絕的公果蠅是在酒精在其腦內產生反應後，才產生行為變化。我們也利用基因調控技術控制果蠅分泌 NPF 的量，探討被母果蠅拒絕的公果蠅的特殊行為是不是受到體內 NPF 的量變化所致。結果顯示:NPF 的缺乏除了會造成公果蠅提升酒精攝取量，還會提升求偶動機。

透過實驗結果，我們可以建構一個包含被拒絕與酗酒的行為模型，希望可將研究結果應用於人類與其他模式生物。

壹、研究動機

2012 年，在國際期刊 *Science* 刊出的一篇研究指出[1]，果蠅在求愛失敗的時候，會比一般果蠅更偏好於食用含有酒精的食物。這令我們十分好奇，昆蟲真的會有人們「借酒澆愁」的行為嗎？酒精在自然界中扮演的角色可是相當的複雜，它是許多生物的食物，卻也是一種無專一性的神經鎮定劑。研究中指出在偏好食用酒精的同時，一種稱為 **NPF** 的神經傳導物會有下降的現象，然而卻沒有明確的指出 **NPF** 作用以及公果蠅食用酒精行為的關連性。因此我們想藉由果蠅行為上的觀察，並利用基因轉殖的技術，找出公果蠅被拒絕、**NPF** 的增減與果蠅「酗酒」之間的關聯性，最後再利用文獻探討找出情緒(emotion)的嚴謹定義，討論公果蠅被拒絕後的行為改變，亦即酒精成癮是否是因為酒精讓其情緒狀態(emotional state)產生轉變。

貳、研究目的

- 一、觀察公果蠅在被拒絕後行為與正常公果蠅的差異
- 二、找出酒精攝食與行為改變之關聯性
- 三、了解酒精對神經細胞電位的影響
- 四、證實行為變化的主因是 **NPF** 在腦中的變化量
- 五、利用實驗結果找出被拒絕的公果蠅提升酒精攝取量的原因
- 六、以情緒觀點探討公果蠅被拒絕後的行為

參、研究設備與器材

- 一、 實驗材料：果蠅(*Drosophila melanogaster*)、飽和葡萄糖溶液、純酒精、乙醚、飼料
- 二、 實驗器材：解剖顯微鏡、毛細管(75mmx1.15mm)、電子秤、玻璃管、玻璃瓶、共軛焦螢光顯微鏡，蓋玻片、觀察操作台、T 型三向管，細鑷子



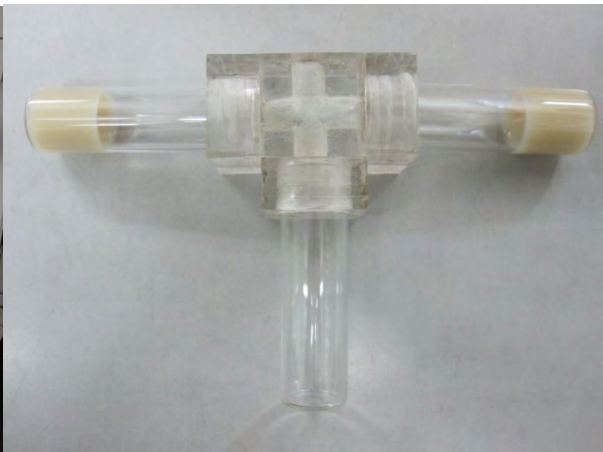
圖三 果蠅管飼養盤 10*10



圖四 玻璃瓶中飼養的果蠅



圖五 觀察操作台、解剖顯微鏡



圖六 自製的 T 型迷宮



圖七 共軛焦螢光顯微鏡



圖八 用蓋玻片製作之標本、準備大腦用的溶液槽

肆、研究過程與方法

一、 實驗項目

階段一：酒精如何在被拒絕的公果蠅腦中產生作用？

- (一) 被拒絕與酒精攝取量實驗
- (二) 正常果蠅對不同濃度酒精食物之趨向實驗
- (三) 被拒絕後大腦指令實驗
- (四) 被拒絕後求偶動機實驗
- (五) 被拒絕後之趨向實驗
- (六) 被拒絕與乙醚實驗
- (七) 攝食酒精與果蠅眼神經電位之相關性

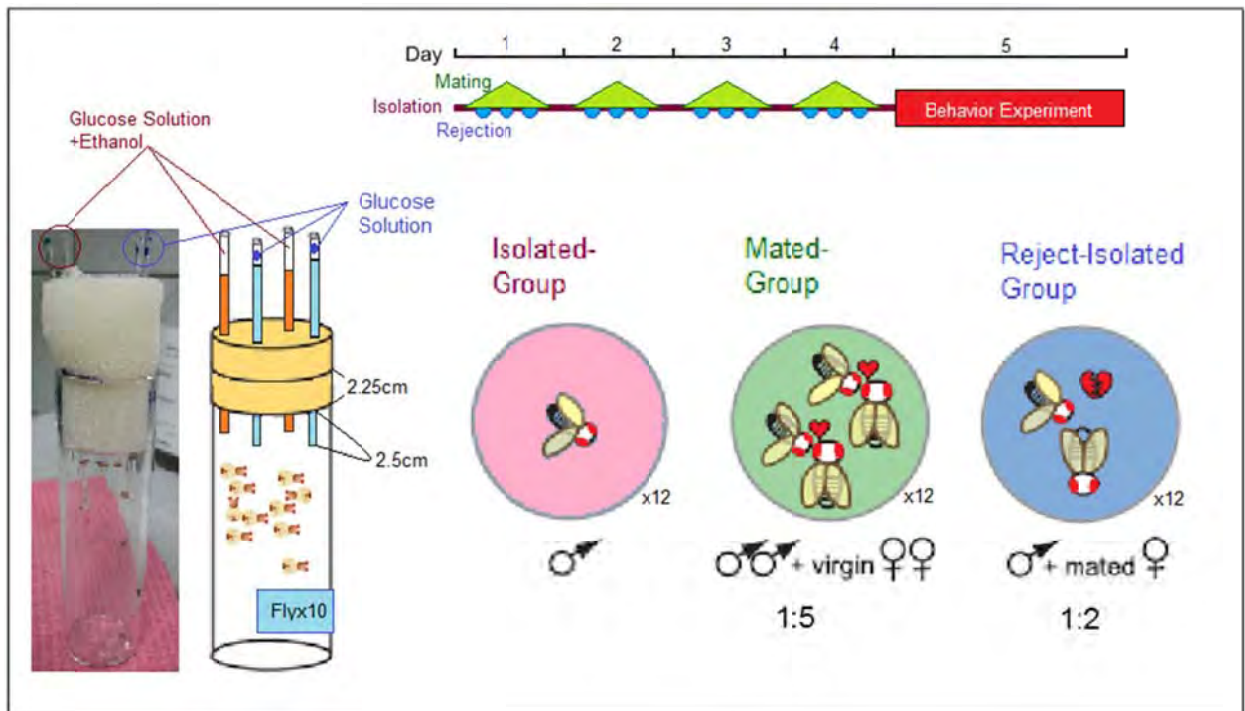
階段二：神經傳導物質 NPF 對公果蠅行為的影響為何？

- (八) 腦內分泌物 NPF 與酒精實驗
- (九) 腦內分泌物 NPF 與求偶動機實驗

階段三：找出 NPF 作用位置

- (十) NPF 在腦中作用位置觀察

二、 階段一之飼養與前置步驟



圖九 被拒絕公果蠅、交配公果蠅與對照組飼養流程

為了確立往後實驗是否具有可靠性，我們照著步驟重複文獻中的實驗。在實驗中，我們準備三組果蠅分別為 Reject, Isolate, Mate, 其中 Reject 組天天以 1:2 的比例混合，讓公果蠅與交配過的母果蠅互動，造成求偶被拒的情況，每次一小時，一天三次，共為期四天。Mate 組一天一次以 1:5 的比例混合，讓公果蠅與處女果蠅進行交配六小時，也是為期四天。Isolate 組則正常飼養四天。在這段時間，所有

公果蠅皆分開飼養。後續實驗的飼養流程皆遵照這個流程。

四、 階段一：被拒絕的公果蠅，酒精如何在體內(腦內)作用？

(一) 公果蠅在求愛被拒絕後是否真的會提升酒精的攝食量？

為了確認文獻的可信性與可重複性，我們重複進行數次實驗。

先從 Isolate、Mate、Reject 三組各挑出十隻果蠅放入分別放入三個飼養管中，禁食二小時，以確保果蠅會食用所供給的飼料。接著在上面插入飽和葡萄糖溶液以及含有酒精 15%的葡萄糖溶液各兩管，放置十小時，後以重量改變觀察各組所食用的量。由於實際減少的量難以用尺測量，我們先測量減少的重量(毫克)，再將其換算為體積(毫升)。

(二) 用 15%的酒精來進行實驗，合理嗎？

果蠅的食物在自然界當中，有許多是以酒精的形式存在，比方說發酵的水果。為了確認使用酒精濃度 15%的飼料是否會造成果蠅的「反感」，我們用自行設計的 T 型迷宮，一邊擺置正常的食物，另一邊則每次擺放不同濃度的酒精(自 100%遞減到 10%)，將 100 隻果蠅放置在下方的空管利用其背地性向上爬迫其選擇左右管的食物，一分鐘後紀錄其在酒精食物管中與正常食物管中之數量。為了確保不會因向光性或左右差異而影響實驗結果，我們接著將左右邊調換重複第二次實驗。

(三) 公果蠅在被拒絕之後，是否是直接想去食用酒精？

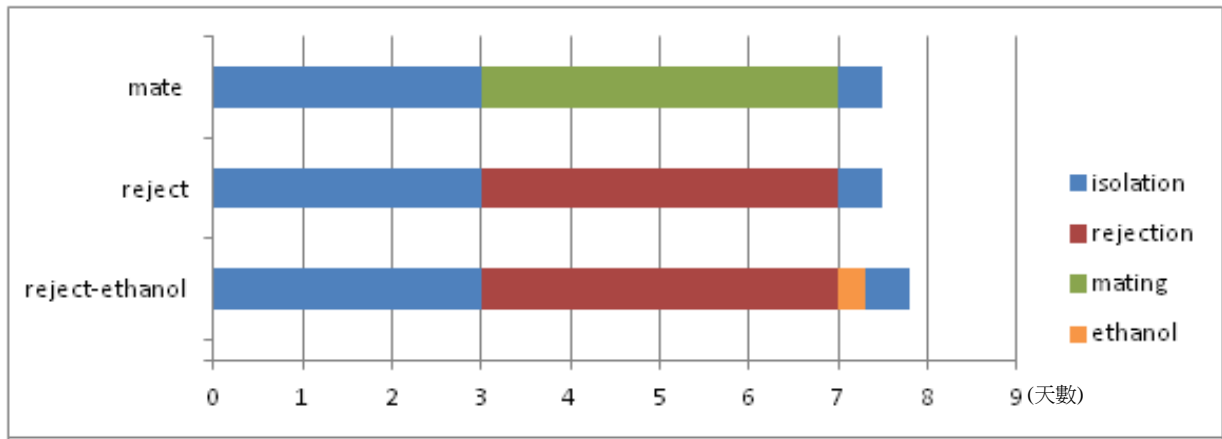
如上個實驗所述，果蠅食用含酒精的發酵水果是常見的現象，因此我們要確認果蠅被拒絕後究竟是經過是「想吃更多食物」所造成，抑或是經過吃了酒精後，腦中產生了某種作用回饋才增加酒精的攝食。

我們將飼養的 reject 公果蠅大約兩百隻從食物管中取出放入空管，讓其不能攝食食物兩小時，然後把兩百隻公果蠅分成兩組。第一組的公果蠅我們將其放入食物管中一小時候，直接將其放入 T 型迷宮下端，左右分別為正常食物以及含酒精食物 15%，讓其選擇。一分鐘後記錄左右管分別有幾隻公果蠅。

第二組公果蠅我們把它們分別放入正常食物管與摻了酒精的食物管各三十分鐘(與第一組的差別在於，第二組的公果蠅除了攝食了正常食物外，還攝食了摻了酒精的食物。) 將其放入 T 型迷宮下端，一分鐘後分別記錄左右管的隻數。

(四) 被拒絕後的公果蠅的求偶動機會不會受影響？

我們想要了解公果蠅在被拒絕之後與被拒絕後的公果蠅在攝食酒精後，求偶動機是否也會被改變?於是我們先取出 Reject 組 20 隻分成兩組。接著再飼養 Mate、Isolate 組各十隻進行實驗。實驗的前置飼養如下：



圖十 此實驗之果蠅飼養流程

1. mate: mate 組
2. reject: reject 組
3. reject-ethanol:同 Reject 組，但在將其放入前偶房前會先餵食其酒精食物一小時

將四組公果蠅在七天飼養期後，將其靜置兩個小時，接著再分別與一隻處女果蠅放置在飼養管中，紀錄公果蠅會多久開始追求母果蠅(秒數)。

(五) 公果蠅被拒絕後大腦下令的指令究竟是什麼？

根據以上兩個實驗結果，公果蠅在被拒絕之後攝食酒精，會增加對酒精的成癮性，並且降低對母果蠅的求偶慾望，由此可以推知，被拒絕的公果蠅攝食酒精會大幅度的降低其在環境中競爭力的。於是我們推測，大腦應該不會直接下達「吃酒精」這個指令。因此我們打算比較一般果蠅和被拒絕果蠅對酒精的趨向。

我們先飼養 Reject 組與正常果蠅各 100 隻。接著放入了 T 型迷宮讓牠們選擇含酒精食物或正常食物，與所有 T 型管實驗相同，我們將左右飼料對調再進行一次實驗。一分鐘後將通道堵住，紀錄兩邊各有幾隻果蠅，最後比較兩組果蠅在選擇摻了酒精食物與正常食物間比例之差異。

(六) 被拒絕的公果蠅，也會增加對乙醚食物的攝食量嗎？

我們不知道果蠅在被拒絕後，會去食用含酒精之食物，原因是出自於酒精能阻卻神經之傳導，使果蠅腦內神經傳導物 NPF 的感覺因阻卻而降低作用，或者為酒精在果蠅腦袋中創造了另外一物質可以與 NPF 產生結抗作用。為了得知是哪個推論造成了被拒絕之公果蠅提升對酒精的攝取量，我們嘗試使用同樣能阻礙神經傳導的乙醚，看被拒絕之公果蠅對乙醚之攝食量是否也是較高的。

此實驗之步驟與前一實驗(被拒絕之公果蠅酒精攝取量實驗)相同，但是將酒精替換成乙醚，觀察果蠅的食用量。

(七) 公果蠅在攝食酒精之後，眼球神經電位在受到光的刺激時，是否會產生異常？

為了確認酒精對公果蠅的作用，我們把公果蠅分成兩組，第一組的公果蠅是正常的公果蠅，而第二組則是餵食了酒精 24hr 的公果蠅，我們將兩組公果蠅取出

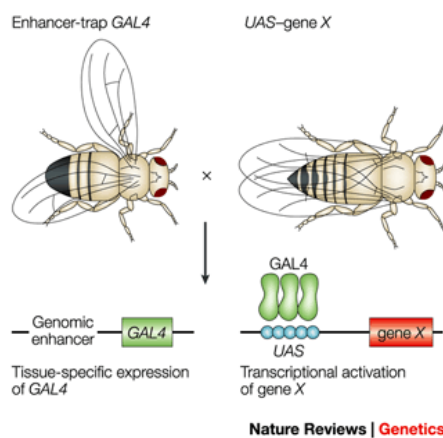
各大約八隻，用果蠅眼電生理設備來測試其眼睛在受光刺激的情況之下，眼睛電位的變化。

我們先將兩根中空的玻璃針拉細拉尖後，浸泡在導電溶液中大約一分鐘，就將白銀製成的電線穿入，固定在電壓器上。

然後分別將兩根針的針尖輕輕碰到公果蠅眼睛以及公果蠅的頭頂，便可以開始記錄其眼睛的電位變化。該設備是在一個暗箱之中，每三十秒會打一次光，其眼睛的對位便會跳動一次，實驗結果的地方會再詳細說明。

五、 階段二之前置飼養步驟

階段二的實驗目的是想要了解 NPF 和果蠅被拒絕之間的關聯，因此除了原本的三組果蠅，我們另外飼養了五組利用 Gal4-UAS 系統配製而成的果蠅。而與原本飼養唯一不同的地方是，這次飼養一直維持在 30 度的溫度下飼養。



圖十一:左邊的公果蠅攜帶著 Gal4 基因，右邊的母果蠅攜帶著 UAS 以及其後接著的 gene X。所以其子代便會同時擁有 Gal4+UAS-gene X。Gal4 基因所製造出的蛋白質如鑰匙，可以開啟 UAS 以及讓其背後的 geneX 大量製造。圖片引用:

http://www.nature.com/nrg/journal/v3/n3/box/nrg751_BX2.html

(一) NPF-Gal4+UAS-kir2.1

這株果蠅在 UAS 上所配置的基因 kir2.1 在溫度到達 28 度以上時，會減少 Gal4 上因子的表現量，因此我們可以順利在不讓公果蠅被拒絕的情況下，直接使其 NPF 下降。

(二) NPF-Gal4+UAS-TrpA1

與上一株果蠅相同，TrpA1 是一種可以利用溫度調控的基因。不過它的功用和 kir2.1 相反，會大量表現 Gal4 上所配置的基因，因此可和 NPF 量較多的 Mate 組做對照。

(三) NPF-Gal4+ w1118

(四) UAS-TrpA1+w1118

(五) UAS-kir2.1+w1118

以上三組(三-五組)果蠅是為了確認果蠅行為上的改變並不是因為擁有單一一個基因(若基因中只有 Gal4 或只有 UAS，其並不會作用，也沒辦法控制 NPF 的表現量)而造成，因此將其與對照組白眼果蠅 w1118 進行交配，使其 Gal4-UAS 系統不會有任何作用，若行為的控制皆是因為 NPF 的量，這三組應該會和對照組 w1118 有類似的行為模式。

六、 階段二：NPF 的改變是否為被拒絕果蠅行為改變之主因？

我們利用八組果蠅(原本三組以及上述五組)將 1. 酒精攝食量 2. 求偶動機，三個實驗重複。後續再進行數據分析，可了解 NPF 的增減究竟是否為公果蠅被拒絕之後行為改變的主因，而不是其他的賀爾蒙或神經傳導物造成的。

七、 階段三：NPF 在腦中那裡作用？

此實驗利用 Gal4-UAS 系統配了兩株果蠅亦即：

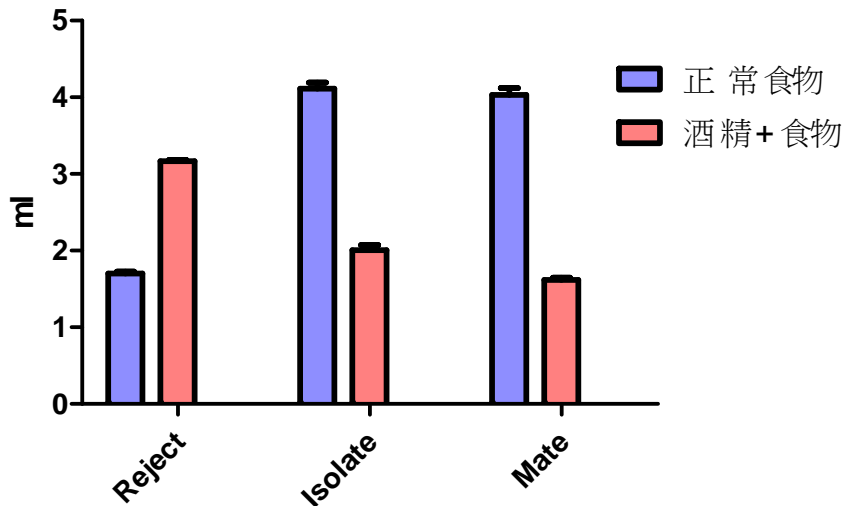
NPF-Gal4+5137；5130 以及 NPFr-Gal4+5137；5130

5137；5130 是一種 UAS 後端會接螢光蛋白的果蠅，因此在與 NPF-Gal4 作用後會再有 NPF 的地方做出螢光蛋白。我們便可利用螢光顯微鏡觀察在 NPF 在果蠅大腦的分布情形。而 NPFr 指的是 NPF receptor，即為果蠅大腦中，神經傳導物 NPF 的接收器。在剖出果蠅大腦後，利用共軛焦螢光顯微鏡比對 NPF 以及 NPFr 的分佈後，我們便可找出 NPF 在大腦中作用的位置。

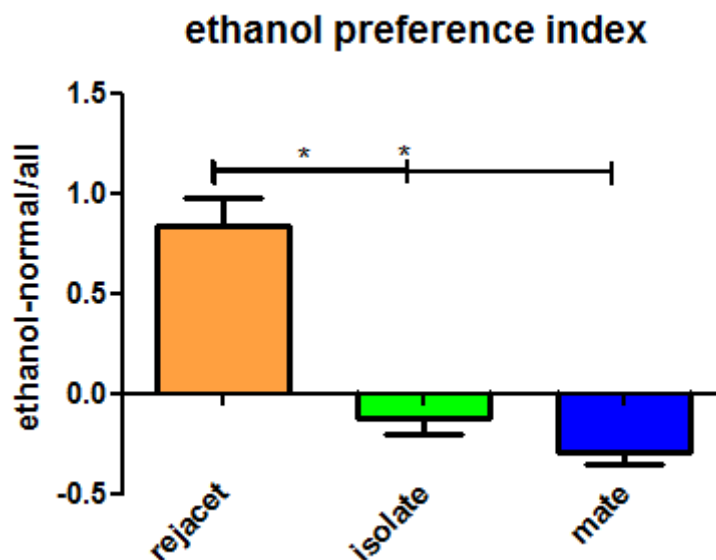
伍、研究結果

一、 被拒絕的果蠅會明顯提升酒精攝取量！

被拒絕的公果蠅會提升酒精攝取量嗎？



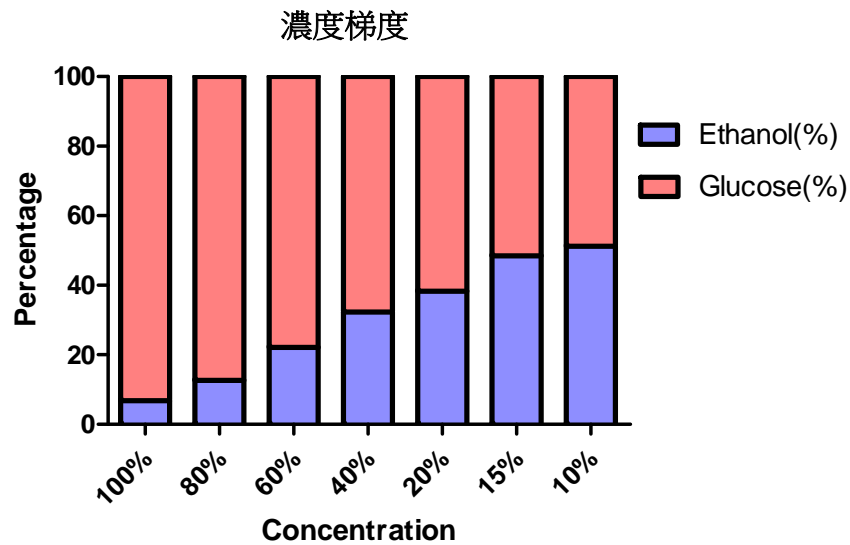
圖十二:酒精實驗三組果蠅之食用量



圖十三 三組果蠅之 PI 值

從圖表中可看出，被拒絕的公果蠅(reject)的確會比正常交配(mate)以及單獨飼養(isolate)的果蠅更為偏好酒精食物。此結果不但印證文獻上指出被拒絕的公果蠅會提升酒精的攝食量，也發現若只有純粹的單獨飼養(isolate group)不使其遭到拒絕，並不會對其食用量產生太大的差異。

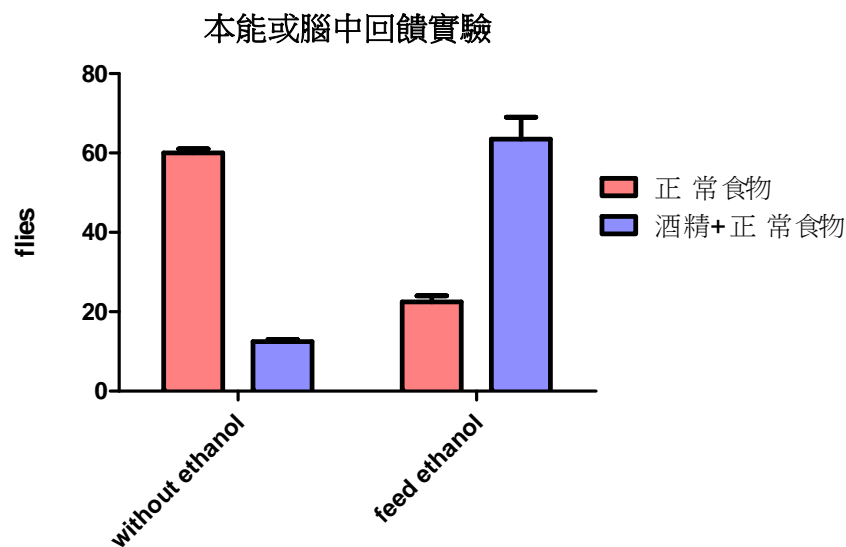
二、 將酒精濃度選定 15%是合理的。



圖十四 果蠅對不同濃度梯度的選擇 (%)

從表中可得知，果蠅會迴避高濃度的酒精，當濃度介於 10~15%之間時，果蠅對各種食物的偏好最接近一比一。由此實驗我們可以推知文獻中所使用以及我們的實驗設定酒精濃度 15%的食物是合理的。

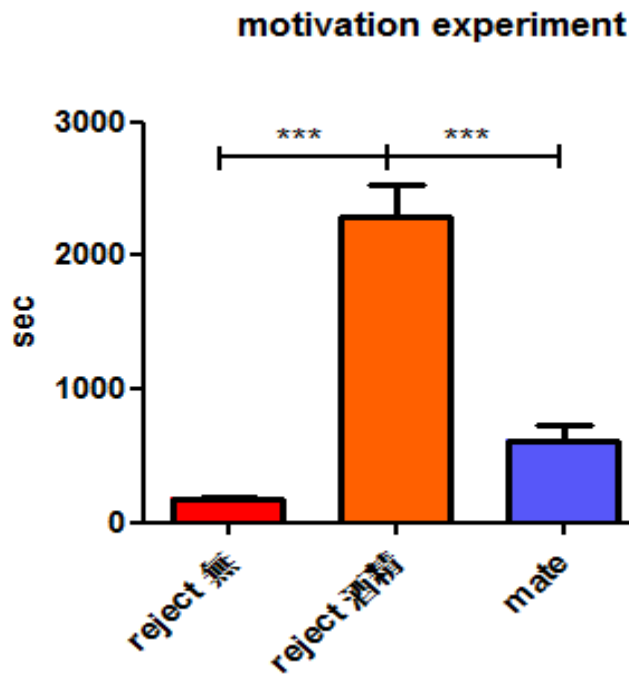
三、 公果蠅被拒絕後並不會馬上提高酒精趨向，而是在吃了酒精之後才產生成癮現象



圖十五 無吃過酒精之公果蠅與吃過酒精之公果蠅對酒精趨向差異

實驗結果顯示:被拒絕的果蠅第一次進入 T 型三向管時，大多數的果蠅皆是往一般的飼料移動。然而在其食用過摻了酒精的飼料再次選擇時，相反的，發現大多數的公果蠅是往含有酒精的方向移動。這兩個測試的差異使我們判定公果蠅被拒絕後提高對酒精的攝食量的原因是出自於:被拒絕之後，酒精在其腦內產生的回饋。

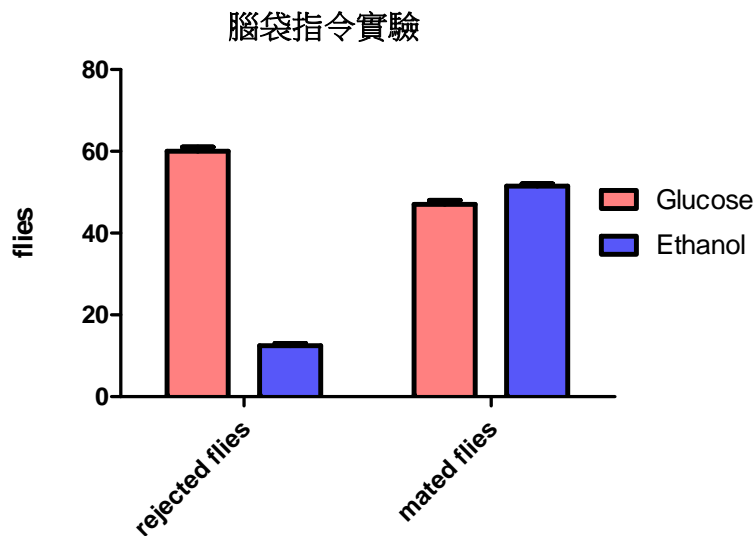
四、公果蠅被拒絕後會更積極追求母果蠅，吃過酒精卻變消極！



圖十六 不同組別之果蠅對母果蠅求偶所需時間的差別(單位：秒)(reject 無組:reject 組在放入求偶房前未攝食酒精。reject 酒精組:reject 組在放入求偶房前，先攝食酒精)

從數據中可看出，被拒絕的果蠅確實比正常交配的果蠅還要更積極的去追求其他的母果蠅，除此之外，若給予被拒絕的果蠅食用過酒精後，直接將其放入求偶房中，其追求對母果蠅反而比正常交配的果蠅還要更低。我們推測原因是出自於，酒精會降低其神經系統效能，造成公果蠅在接收到母果蠅氣味時無追求行為產生。

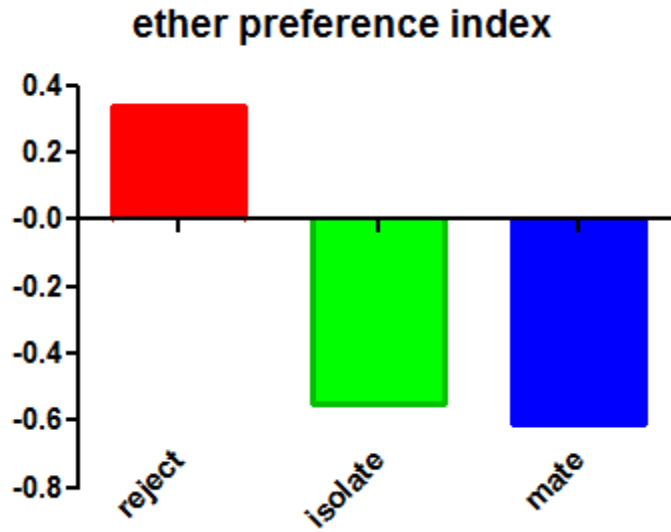
五、果蠅的大腦下令，迴避酒精！



圖十七 將被拒絕之公果蠅，和成功交配公果蠅對酒精趨向比較

實驗的結果顯示，一般公果蠅對一般食物與含酒精食物趨向差異不大，但是被拒絕公果蠅在尚未攝食酒精前做選擇時明顯的會去迴避含酒精食物。

六、酒精的作用可能是阻斷信號！

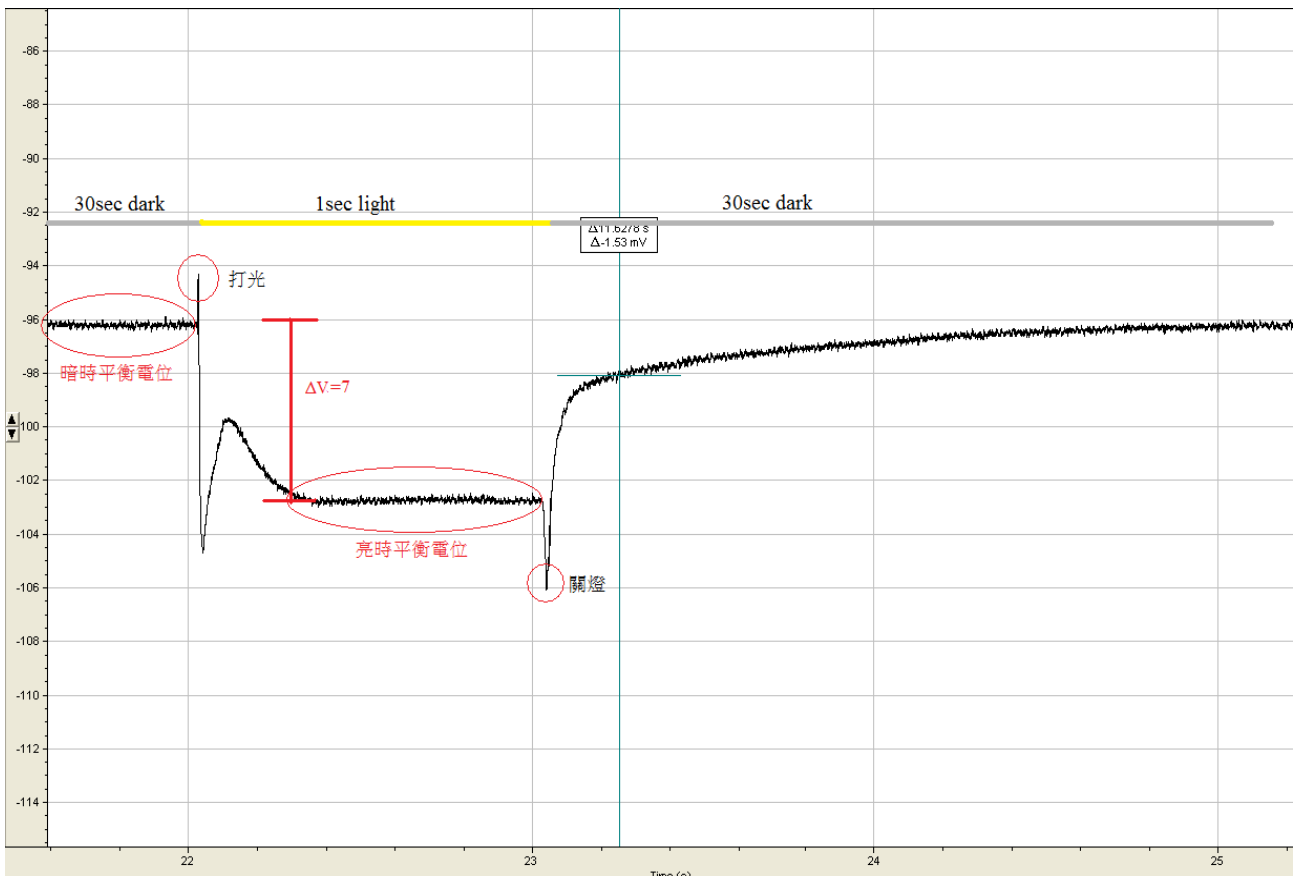


圖十八 乙醚實驗之 PI 值

實驗結果顯示，被拒絕的公果蠅攝食含乙醚食物的量較其他組高，這結果可能暗示：被拒絕的公果蠅提高酒精攝食量原因是出自於酒精與乙醚共有的”非選擇性神經鎮定”功能。

七、攝食酒精的公果蠅眼球電位會產生異常!(我們在此先選各兩張比較有代表性之圖來比較，在本報告書的最後面會把所有圖列出。)

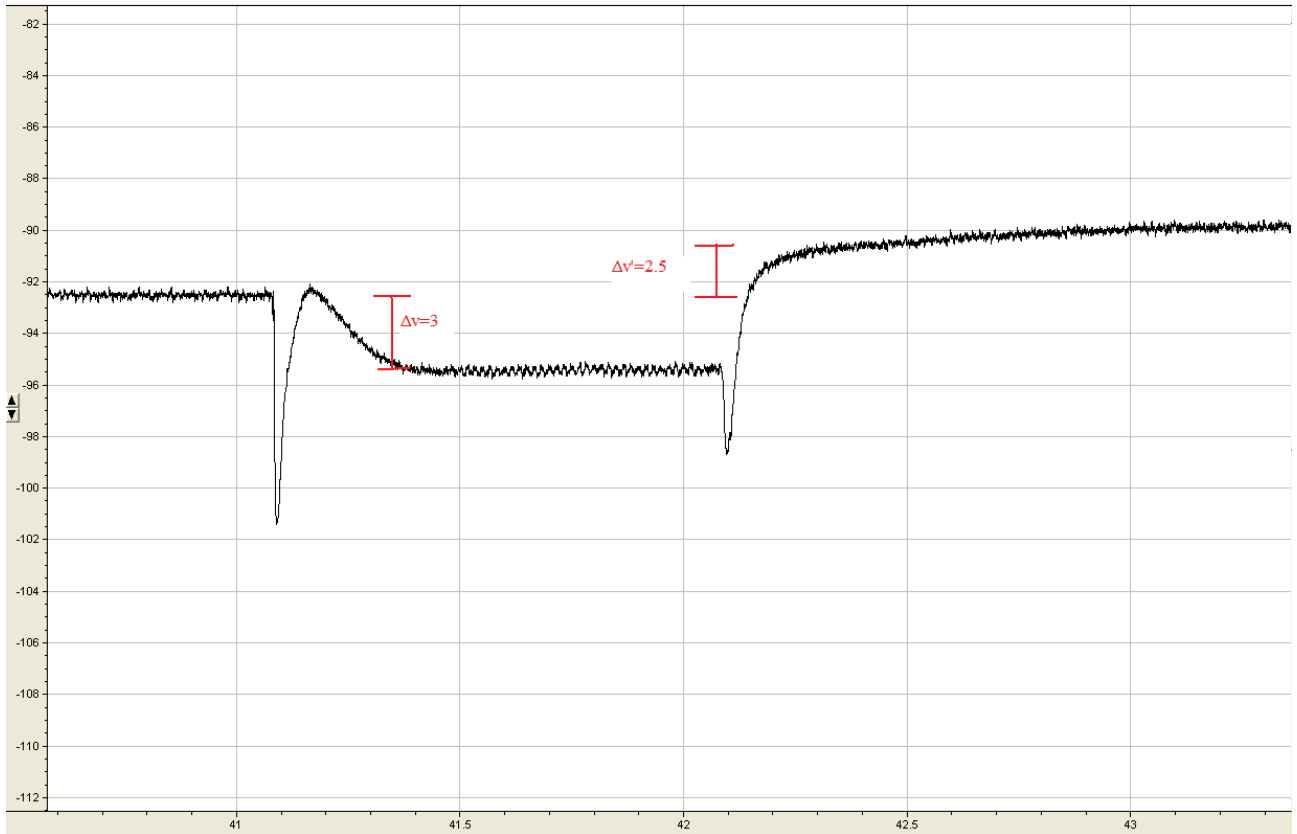
正常公果蠅眼球電位



圖十九:正常公果蠅眼睛受光電位變化圖

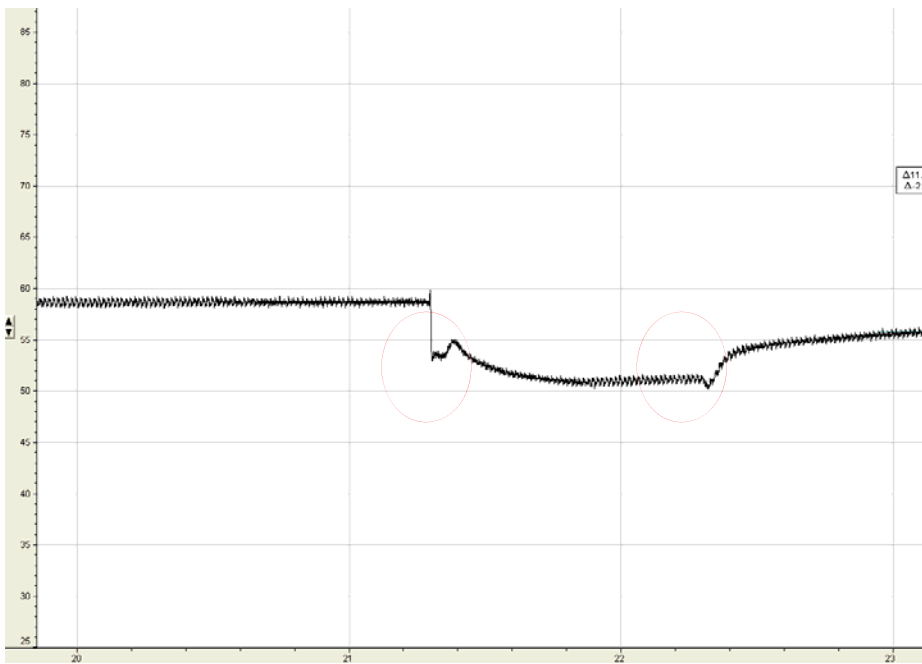
這張圖是典型公果蠅眼睛在受光時的電位變化，最左邊的平衡電位為暗室在未開燈時的平衡電位，在 30 秒後暗室內會對公果蠅眼打一束白光，其眼睛的電位就會產生變化(打光之紅圈)，先向上跑動大約 2v 在往下掉，其在經過兩次震盪之後會進入亮時的平衡電位，關燈後經一次震盪慢慢回到暗時的平衡電位。

攝食酒精 24hr 公果蠅眼球電位-1



圖二十:攝食酒精 24hr 公果蠅眼球電位變化圖

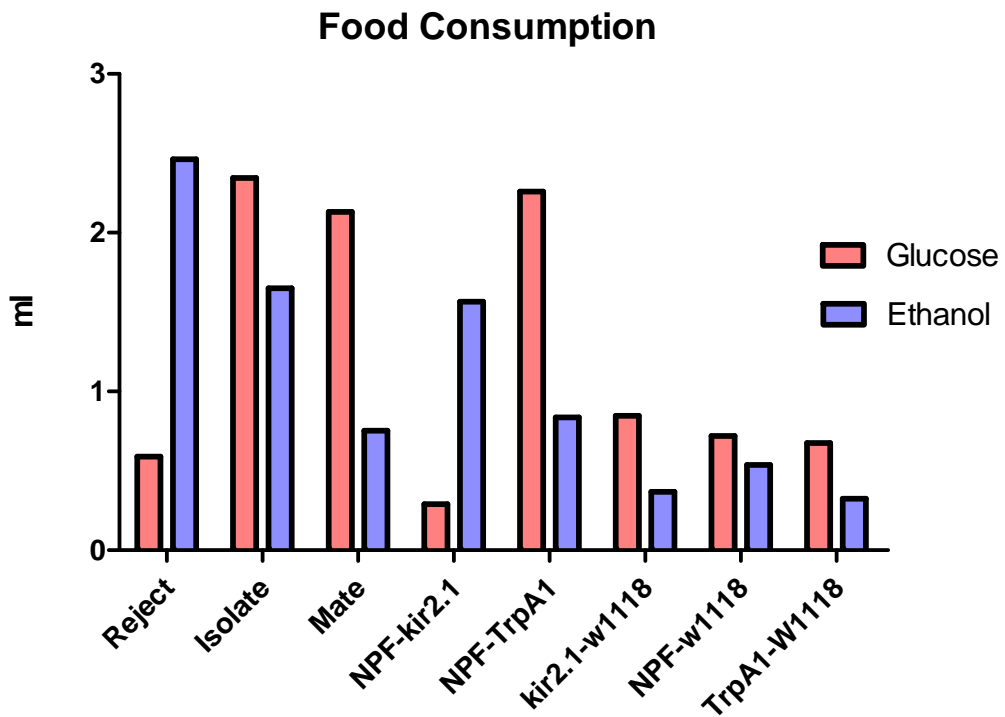
從圖可以明顯其 ΔV 出現了異常偏高，而後面要回復成暗室電位時也出了向上漂移的異常。由此圖可以推測，這隻公果蠅腦袋所被傳送到的光訊號一定是與正常公果蠅不大相同。



圖二十一:攝食酒精 24hr 公果蠅眼睛電位圖-2
 由此圖可以發現打光前期的雙重振盪出現了異常，關燈時要回到暗室平衡電位的震盪也出現了問題。

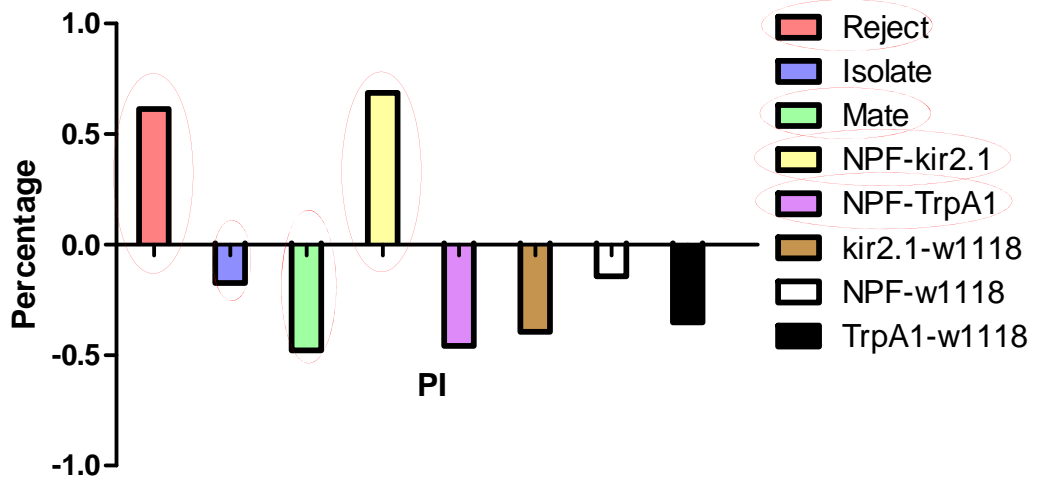
而實驗結果顯示:七隻攝食 24hr 酒精食物的公果蠅中有大於三分之二公果蠅的眼球電位產生異常，但是其異常的點卻沒有規律。我們推測其產生原因為，腦中高濃度乙醇會造成神經細胞在傳輸帶電粒子進出細胞時，產生異常。也就是說酒精的效果從神經細胞的較度觀察，可能會造成神經訊號傳遞上的失敗或者延遲。

八、NPF 降低是攝食行為改變之主因！



圖二十一 各組果蠅對酒精以及糖水之偏好

酒精喜好程度

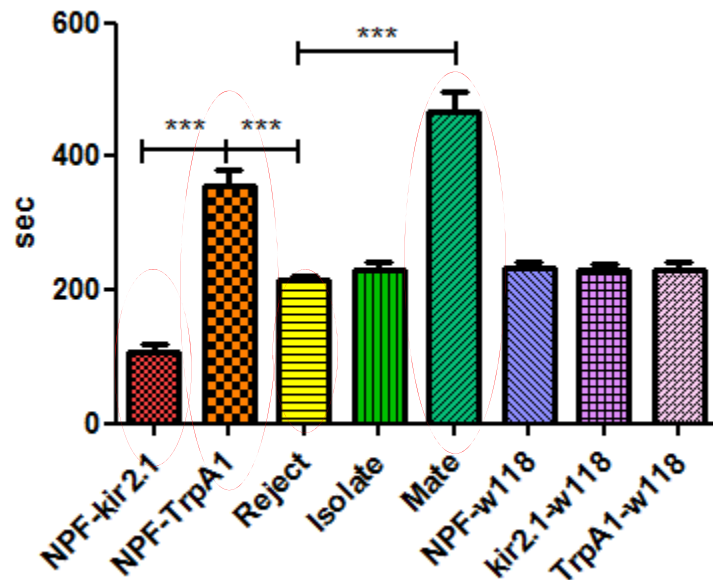


圖二十二實驗八個組之 PI 值(除了紅圈圈起來的組別外，其餘皆是對照組，前的介紹中有說明。)

從 PI 值圖中可看出，Reject 組及 NPF-kir2.1 兩組較其他組對酒精的攝食量較高。重複了 science 期刊中的實驗。

九、NPF 量降低會影響求偶動機！

不同組別之果蠅對母果蠅求偶所需時間的差別

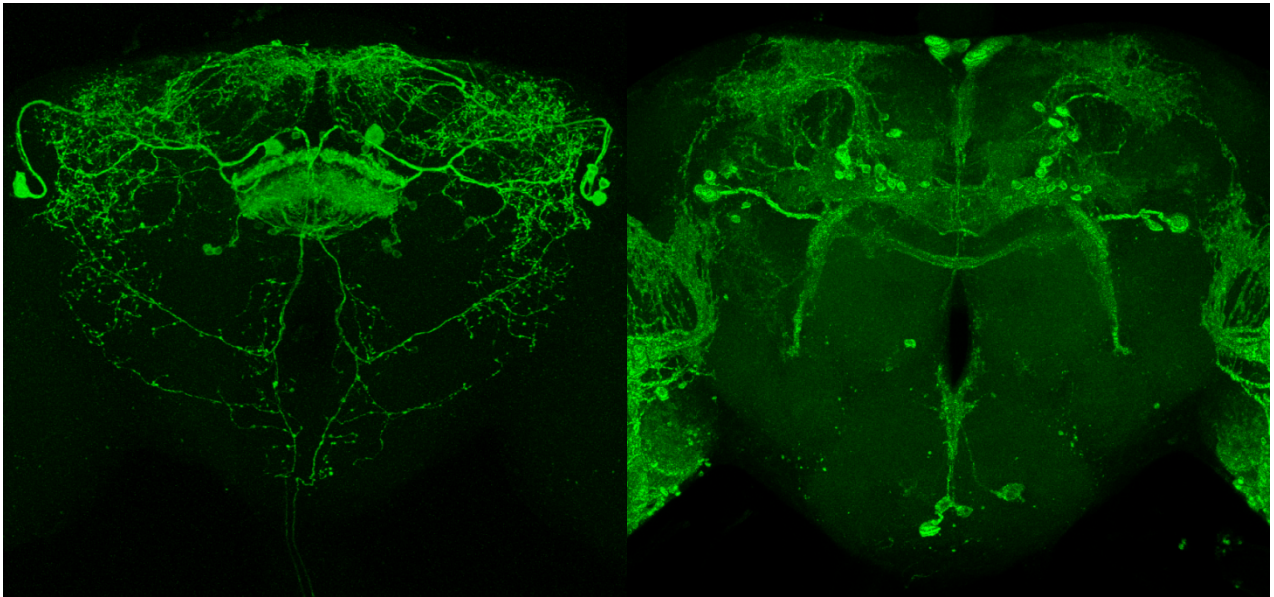


圖二十三 求偶動機

由圖可以發現，NPF-kir2.1 的公果蠅(公果蠅腦中缺乏 NPF 神經傳導物)的求偶動機是所有組中最強的，而 NPF-TrpA1 組的公果蠅(公果蠅腦中大量產生 NPF)跟 mate 組的公

果蠅的求偶動機較接近。由這個結果我們可以推知:被拒絕的公果蠅的求偶動機上升很可能就是被 NPF 的量來控制。

十、NPF 分布區域



圖二十四 左圖為 NPF 分布，右圖為 NPFr 分布

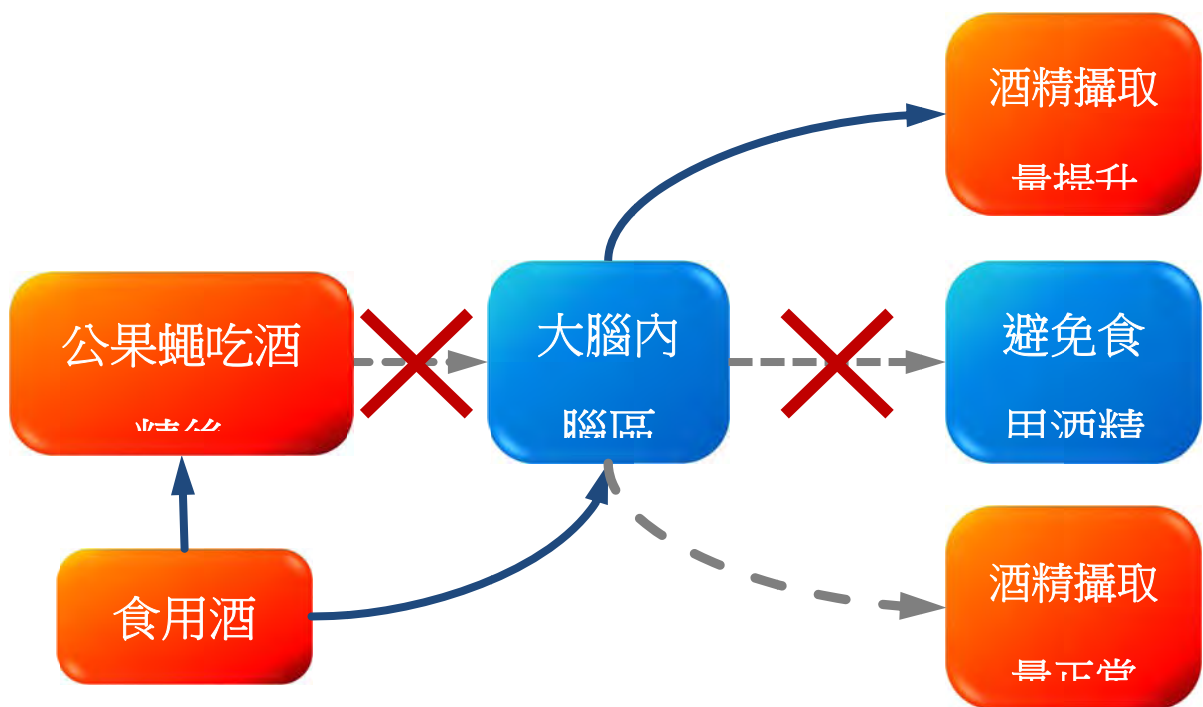
由兩張圖的比較可以發現 NPF 分泌與其接受器主要重疊部分分布於中央以及後方腦區。

陸、問題與討論

一、數據分析與討論



(一) 上圖為根據 Science 期刊中的實驗結果而繪製的流程圖，而經過我們實驗證明後，我們確認被拒絕的公果蠅提升對酒精的攝食量並非是如上圖一般簡單的路徑。透過實驗三「公果蠅在被拒絕之後，是否是直接想去食用酒精？」，我們發現被拒絕的果蠅一開始並不會去食用酒精食物，而是透過攝食酒精後腦中的回饋學習而造成。而經過「求偶動機實驗」以及「趨向實驗」後，我們認為被拒絕的公果蠅的大腦一開始下的指令是「迴避酒精」以及「積極交配」這兩個指令，而在食用酒精後被影響。而「迴避酒精」的原因，我們認為是因為公果蠅被拒絕後，攝食酒精將會造成其個體競爭力下降，因為從求偶實驗可看出，食用酒精的公果蠅會更為消極不去追求母果蠅。導致公果蠅在被拒絕時，大腦會下達「迴避酒精」的指令以減少其吃到酒精的機率。然而在食用酒精後，公果蠅會增加酒精的攝食量，我們從乙醚實驗的結果推測，是因為酒精與乙醚共有的「非選擇性神經鎮定劑」功能，阻斷了「NPF 下降」的信號，因此才會讓「迴避酒精」的指令失效，而為什麼失效反而會“提升”而不是與成功交配果蠅“打平”對酒精的攝食量，我們會在後面討論。而透過第二階段的實驗，我們便能確立被拒絕果蠅與 NPF 量改變有相關性。根據我們的實驗結果，我們繪出一張新的大腦流程圖如下：



圖二十五 根據我們實驗結果繪製的大腦流程圖

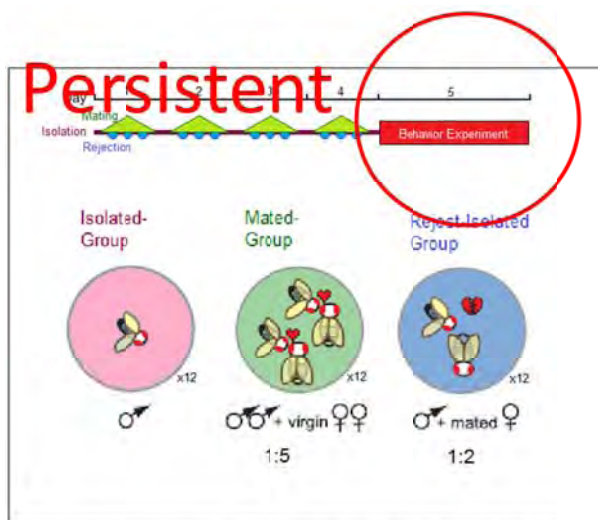
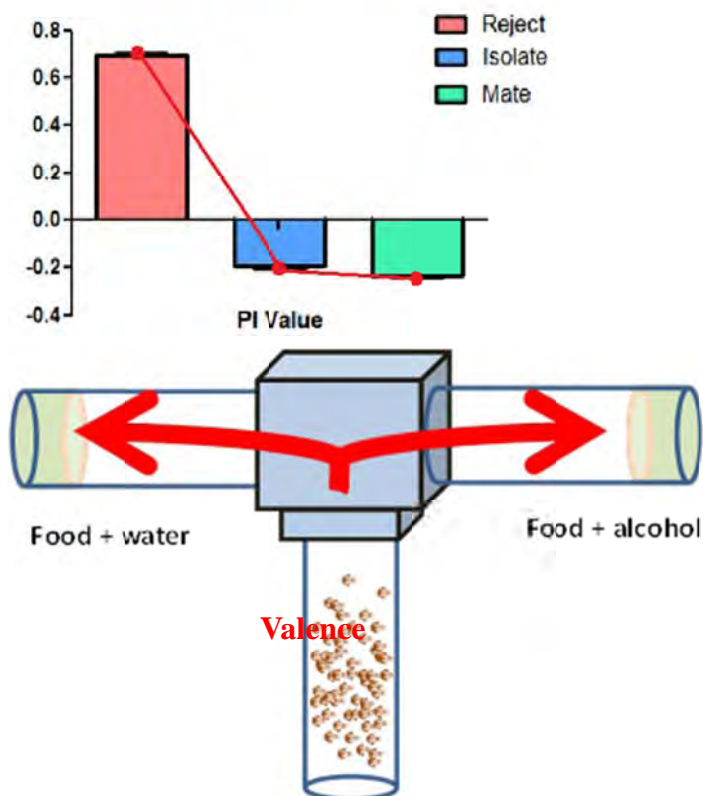
(二) 從階段二的實驗可看出，NPF 的增減確實會改變公果蠅的行為，**但卻不會與被拒絕果蠅完全相符**。第一種可能性是公果蠅在被拒絕的情況下雖然會減少 NPF 在腦中的量，但是減少的量卻不會與 NPF-Gal4+UAS-kir2.1 一樣多，mate 組與 NPF-Gal4+UAS-TrpA1 亦然，也就是說其行為的不同可能是因為不同 NPF 的量所造成。第二種可能是除了 NPF 之外，公果蠅腦中還有其他神經傳導物在影響公果蠅在被拒絕之後的行為。這兩種可能性可以同時存在，我們認為同時存在的可能性最大。

(三) 果蠅是否是一個可以用來討論情緒(emotion)的模式生物呢？

根據我們的實驗結果，我們發現公果蠅在食用酒精後，會阻斷 NPF 信號，進而提升酒精攝取量。然而阻斷信號理論上只會讓被拒絕的公果蠅攝食量恢復與一般果蠅相同，並不會刻意增加飲食。我們懷疑有兩種可能：一、NPF 能讓果蠅產生類似人類的負面情緒，而當公果蠅食用酒精，會使原本的負面情緒因為酒精的麻醉效果而改善，因此公果蠅會如同成癮般不停食用酒精以維持「愉悅的心情」。另一種假設是，酒精和乙醚其實並不是阻斷神經的傳導，而是促使另一種傳導物與 NPF 拮抗，使大腦產生「增加酒精攝取」的指令。

我們認為前者的可能性較大，為了證明這個論點，我們查了許多文獻，想要了解科學上對情緒行為嚴謹的定義。最後找到了一篇文章”Two Different Forms of Arousal in Drosophila Are Oppositely Regulated by the Dopamine D1 Receptor Ortholog DopR via Distinct Neural Circuits”，本文探討了要構成情緒所需要具備的三個要素：1. 反應能夠持續(persistent) 2. 刺激有程度之分(graduation of intensity) 3. 對刺激有正面或負面的傾向(valence)，只要符合這三項條件的行為，就會被稱為被情緒驅動的行為。

Graduation of intensity



(1. persistent:我們是讓公果蠅在被拒絕四天之後，第五天的一整天進行實驗。2. Graduation of intensity:不同程度的拒絕導致酒精攝食量的不同。3. 被拒絕的公果蠅在吃了酒精之後，會對酒精產生正向的趨性。)

由這些結果指出，公果蠅很可能就是因為被拒絕之後產生負面情緒，導致吃了酒精之後對酒精成癮。

柒、結論

透過一連串的實驗，我們可以確定被拒絕之公果蠅提升對酒精的攝取量的原因並非是「大腦在被拒絕之後，直接下達提升酒精攝取量的指令」，而是被拒絕之後，酒精可以影響神經傳導物 NPF 所傳出之訊號，形成像麻醉了負面情緒一般的作用，使得被拒絕的公果蠅對酒精上癮。除此之外，被拒絕的公果蠅對酒精的趨向非但不會直接增加，相反的，還會比正常公果蠅還低，我們推測原因是出自被拒絕的公果蠅在攝食酒精之後會不但會對酒精成癮，也會降低對母果蠅的求偶慾望，形成負面的循環(被拒絕→吃酒精→求偶慾望降低→更想吃酒精→更沒有欲望求偶)降低環境中的生存優勢。

由階段二的實驗我們可以確認，NPF 的確會影響公果蠅的酒精攝食量以及求偶的動機。最後透過文獻探討，我們可以推測被拒絕的公果蠅產生的一連串行為改變，很可能是出自於被拒絕後腦中產生的情緒以及攝食酒精後，酒精又再次影響公果蠅的情緒情緒狀態所致。

透過這些實驗以及對結果的討論，我們有機會塑造一個包含求偶、低落、麻醉以及動機的模型以釐清其之間的相互關係。其望能將整個模型推廣至其他模式生物以及人類身上。

捌、未來展望及應用

我們已在階段三分別觀察 NPF 以及 NPFr 的分布，後續我們將利用 Gal4-UAS 系統讓重疊的腦區(及 NPF 分布且有接受器存在)失去其活性，使其無法接收 NPF 之訊號，便可幫助我們找出流程圖中「大腦內腦區」為何處，以畫出更為完整的流程圖。這個結果不但能讓我們了解被拒絕之公果蠅產生特殊行為的原委，更可以更深入探討”NPF”與”情緒”之間的交互作用。

玖、參考文獻

1. **G. Shohat-Ophir, K. R. Kaun, R. Azanchi, and U. Heberlein (2012)**, Sexual Deprivation Increases Ethanol Intake in *Drosophila*, *Science* 335:1351-1355.
2. **Koen J.T. Venken, Julie H. Simpson, and Hugo J. Bellen (2011)**, Genetic Manipulation of Genes and Cells in the Nervous System of the Fruit Fly, *Neuron* 72:202-230.
3. **Jordon Peugh , and Steven Belenko (2011)**, Alcohol, Drugs and Sexual Function: A Review,*Journal of Psychoactive Drugs* 33:3, 223-232.
4. **Gyunghee Lee, Jae Hoon Bahn, and Jae H. Park (2006)** Sex- and clock-controlled expression of the neuropeptide F gene in *Drosophila* *PNAS* 103:1580-1585
5. **R. J. Greenspan, J. F. Ferveur (2000)** Courtship in *Drosophila*. *Annual review of genetics* 34: 205
6. **J. C. Hall (1994)**, The mating of a fly, *Science* 264: 1702-1714..
7. **David J. Anderson (2009)**Two Different Forms of Arousal in *Drosophila* Are Oppositely Regulated by the Dopamine D1 Receptor Ortholog DopR via Distinct Neural Circuits Volume 64, Issue 4, 25 November 2009, Pages 522–536
8. **Shaw, C. A., Sullivan, J. T., Kadlec, K. E., Kaplan, H. L., Naranjo, C. A. and Sellers, E. M. (1989)**, Ethanol interactions with serotonin uptake selective and non-selective antidepressants: Fluoxetine and amitriptyline. *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.*, 4: 113–120. doi: 10.1002/hup.470040206 *Science* 264: 1702

附錄

階段一、二之酒精實驗(單位:ml)

	reject	isolate	mate	control average	reject eat	isolate eat	mate eat
水-1	2.053798	2.738397	2.053798	1.390592125	0.663205	1.347805	0.663205
水-2	1.625923	3.508571	3.679721	1.732891725	-0.106969	1.775679	1.946829
水 total	3.679721	6.246968	5.733518	3.12348385	0.556237	3.123484	2.610034
酒精-1	3.677028	2.992929	2.992929	1.902648008	1.77438	1.090281	1.090281
酒精-2	3.078442	2.65088	2.223319	1.667489265	1.410952	0.983391	0.55583
酒精 total	6.755469	5.64381	5.216248	3.570137273	3.185332	2.073673	1.646111
差/總	0.294748	-0.05072	-0.04724	0.06672822	0.702672	-0.202	-0.22648
水/總	0.352626	0.525362	0.52362	0.46663589	0.148664	0.600999	0.613239
酒/總	0.647374	0.474638	0.47638	0.53336411	0.851336	0.399001	0.386761

	reject	isolate	mate	NPF-kir2.1	NPF-TrpA1	kir2.1-w118	NPF-w118	TrpA1-w118	control	reject eat	isolate eat	mate eat	NK eat	NT eat	KW eat	NW eat	TW eat
水-1	1.83986	2.995122	2.096585	1.711498	2.781184	2.267735	2.096585	2.01101	1.865533	0.02567	1.129589	0.231052	-0.15403	0.915651	0.402202	0.231052	0.145477
水-2	2.053798	2.652822	3.337421	1.8826478	2.781184	1.882648	1.925435	1.968223	1.437658	0.616139	1.215164	1.899763	0.444989	1.343526	0.444989	0.487777	0.530564
水 total	3.893658	5.647943	5.434006	3.5941458	5.562369	4.150383	4.02202	3.979233	3.86	0.033658	1.787943	1.574006	-0.26585	1.702369	0.290383	0.16202	0.119233
酒精-1	3.377735	3.377735	2.608124	2.5653681	2.351587	2.137807	2.137807	2.052294	1.966782	1.410952	1.410952	0.641342	0.598586	0.384805	0.171025	0.171025	0.085512
酒精-2	2.693637	1.88127	1.753002	2.608124235	2.095051	1.838514	2.009538	1.88127	1.641836	1.051801	0.239434	0.111166	0.966289	0.453215	0.196678	0.367703	0.239434
酒精 total	6.071371	5.259005	4.361126	5.173492335	4.446638	3.976321	4.147345	3.933564	3.608618	2.462753	1.650387	0.752508	1.564875	0.83802	0.367703	0.538727	0.324947
差/總	0.218536	-0.03566	-0.10953	0.180133636	-0.111473	-0.02142	0.015341	-0.00577	-0.03366	0.973035	-0.04001	-0.3531	1.409315	-0.34024	0.117493	0.537579	0.463132
水/總	0.390732	0.51783	0.554766	0.409933182	0.555736	0.510709	0.49233	0.502886	0.516829	0.013483	0.520003	0.676551	-0.20466	0.670121	0.441254	0.231211	0.268434
酒精/總	0.609268	0.48217	0.445234	0.590066818	0.444264	0.489291	0.50767	0.497114	0.483171	0.986517	0.479997	0.323449	1.204657	0.329879	0.558746	0.768789	0.731566

階段一之濃度實驗

階段一之學習實驗

	Ethanol 左	Normal 右	Ethanol 右	Normal 左	Eth 總和	Normal 總和	Ethanol%	Normal%
100%	2	32	3	37	5	69	0.067568	0.932432
80%	6	34	4	35	10	69	0.126582	0.873418
60%	10	43	13	38	23	81	0.221154	0.778846
40%	19	31	13	36	32	67	0.323232	0.676768
20%	27	32	19	42	46	74	0.383333	0.616667
15%	27	24	35	42	62	66	0.484375	0.515625
10%	26	21	38	40	64	61	0.512	0.488

	reject 前	isolate 前	mate 前	reject 後	isolate 後	mate 後
ethanol	12.5	38	51.5	68.5	41.5	41
glucose	60	46	47	22.5	38	40.5
sum	72.5	84	98.5	91	79.5	81.5
差	-47.5	-8	4.5	46	3.5	0.5
PI	-0.65517	-0.09524	0.045685	0.505495	0.044025	0.006135
酒精%	17.24138	45.2381	52.28426	75.27473	52.20126	50.30675
水%	82.75862	54.7619	47.71574	24.72527	47.79874	49.69325

階段一、二之求偶動機實驗(單位:sec)

	re-suc-re	reject	reject ethanol	mate
第一組	131	134	463	267
第二組	137	136	1380	326
第三組	139	145	1740	376
第四組	141	150	2160	380
第五組	148	170	2683	426
第六組	152	180	2747	510
第七組	157	200	2810	589
第八組	160	204	2839	683
第九組	166	216	2877	1197
第十組	173	265	3142	1415
average	150.4	180	2284.1	616.9
standard error	12.9321	39.7165	805.6458837	367.111

	Reject	Isolate	Mate	NPF-kir2.1	NPF-TrpA1	kir2.1-w118	NPF-w118	TrpA1-w118
第一組	170.7	170.81	241.34	20.17	218.35	171.53	174.93	168.63
第二組	187.51	178.17	353.73	30.54	224.41	177.37	179.03	179.55
第三組	200.41	191.48	369.34	60.71	270.08	188.54	194.51	186.9
第四組	208.76	215.46	423.17	82.37	327.93	207.68	203.72	203.58
第五組	216.16	221.81	454.2	104.52	351.1	231.79	227.59	241.59
第六組	218.18	230.63	497.7	123.67	354.14	233.52	231.73	243.73
第七組	222.85	257.07	500.27	129.57	383.59	243.93	252.79	250.04
第八組	229.55	261.6	507.01	141.43	400.01	257.18	260.73	251.78
第九組	234.97	263.47	531.75	144.91	401.52	261.07	262.09	258.73
第十組	236.12	273.52	613.51	152.71	473.84	266.8	279.72	270.12
平均	212.521	226.402	449.202	99.06	340.497	223.941	226.684	225.465
標準差	20.09522	35.452222	100.7547	45.83665	77.91924	33.62534	35.2777979	35.0646287

階段一、二之趨向實驗(單位:隻數)

	reject	isolate	mate
ethanol	16	37	47
glucose	59	44	45
sum	75	81	92
差	-43	-7	2
difference/sum(%)	-0.57333	-0.08642	0.021739
酒精%	0.213333	0.45679	0.51087
水%	0.786667	0.54321	0.48913

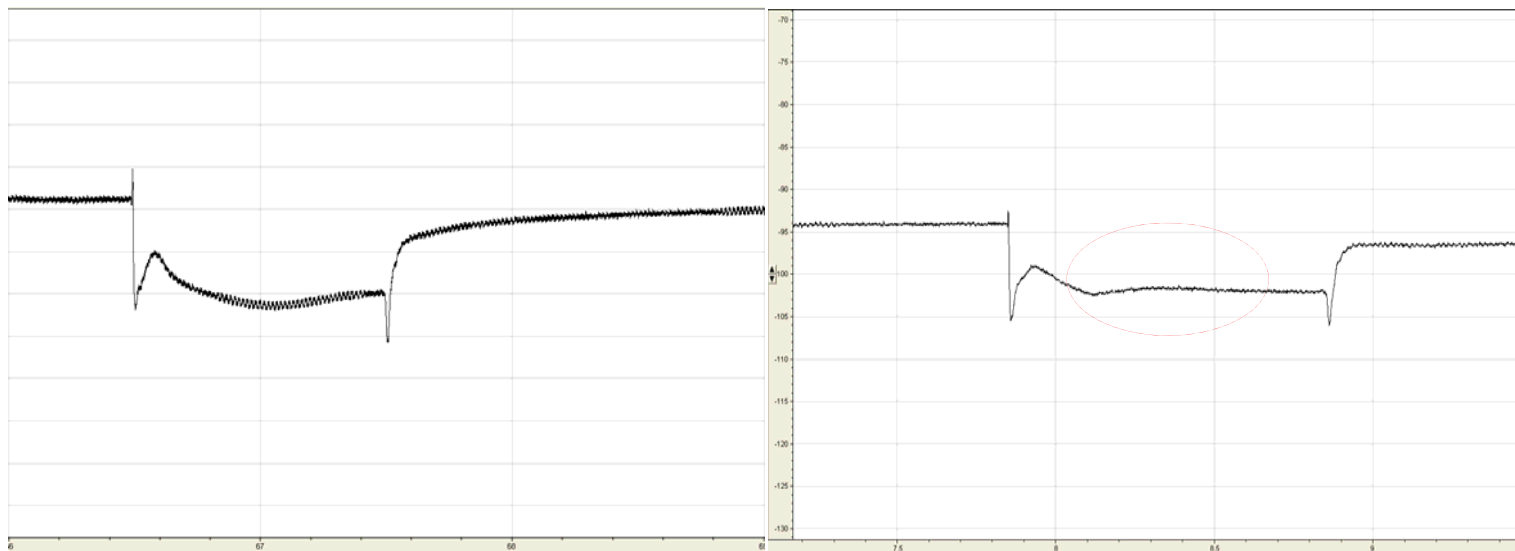
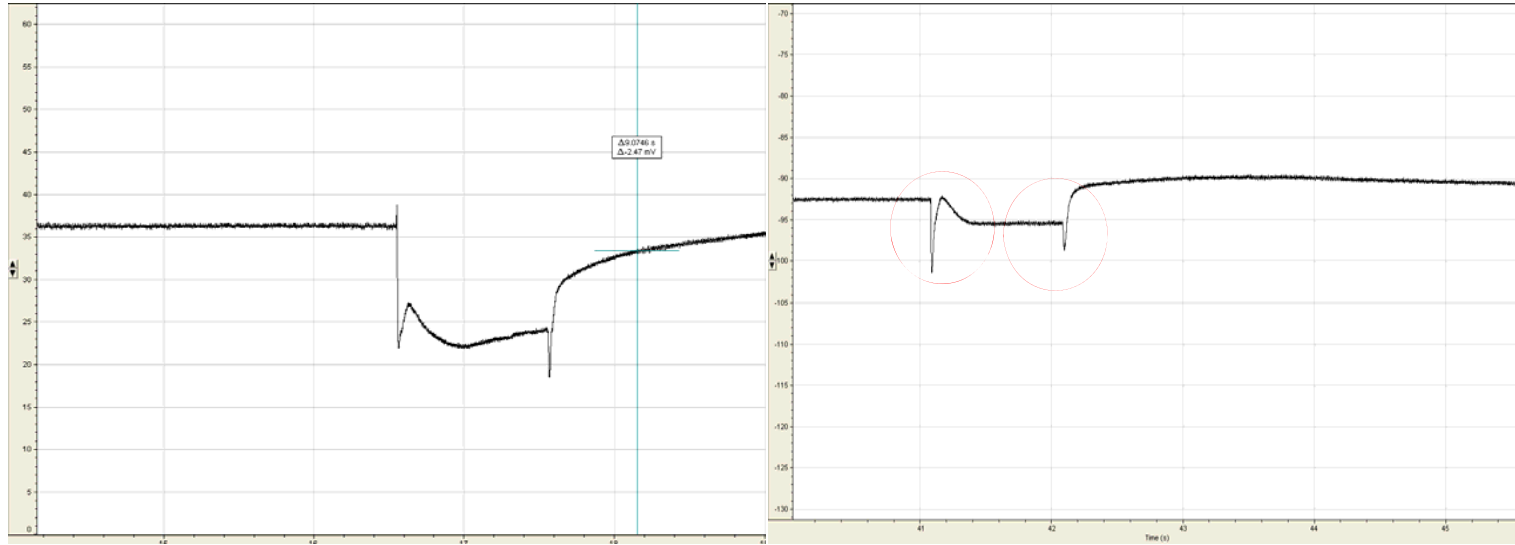
	reject	isolate	mate	NPF-kir2.1	NPF-TrpA1	kir2.1-w118	NPF-w118	TrpA1-w118
ethanol	14	39	41	25.5	39	37	43.5	40
glucose	63	42	36	58	33.5	41	43	43
sum	77	81	77	83.5	72.5	78	86.5	83
差	-49	-3	5	-32.5	5.5	-4	0.5	-3
difference/sum(%)	-0.63636	-0.03704	0.064935	-0.38922	0.075862	-0.05128	0.00578	-0.03614
酒精%	0.181818	0.481481	0.532468	0.305389	0.537931	0.474359	0.50289	0.481928
水%	0.818182	0.518519	0.467532	0.694611	0.462069	0.525641	0.49711	0.518072

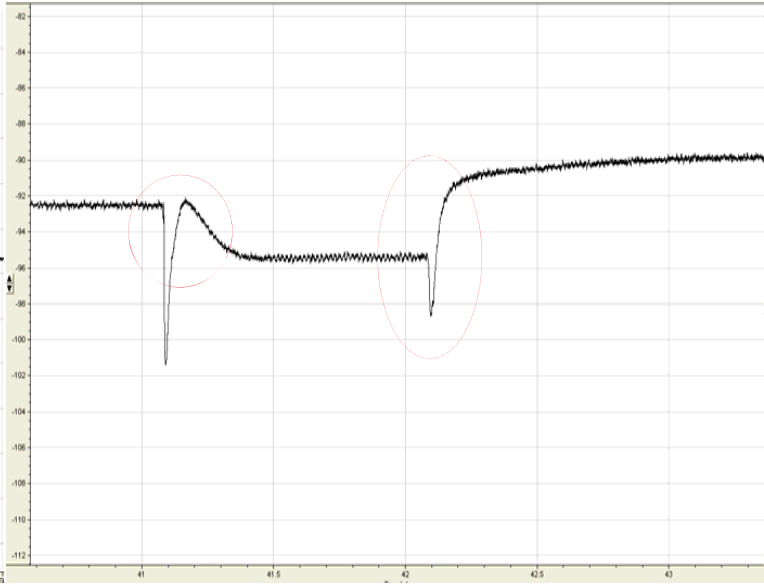
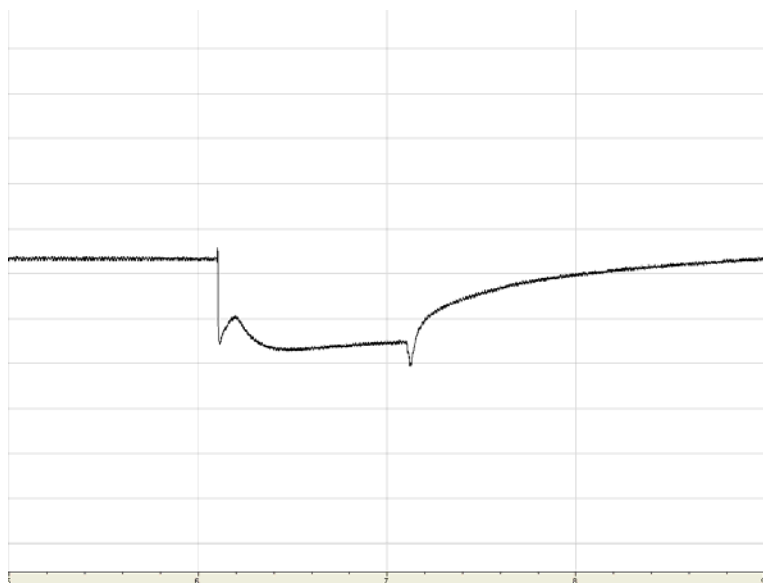
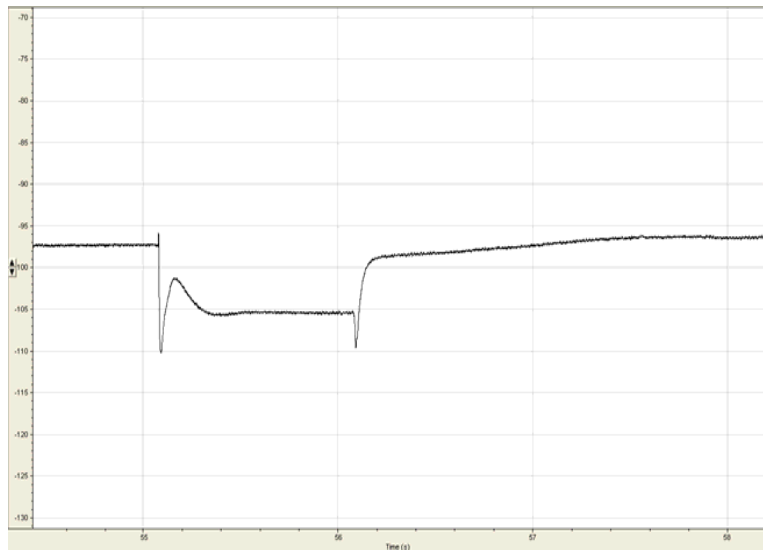
階段一之乙醚實驗(單位:ml)

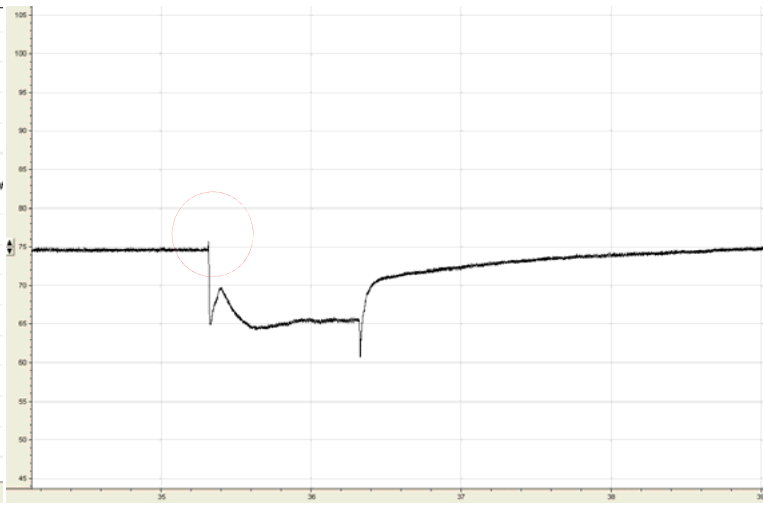
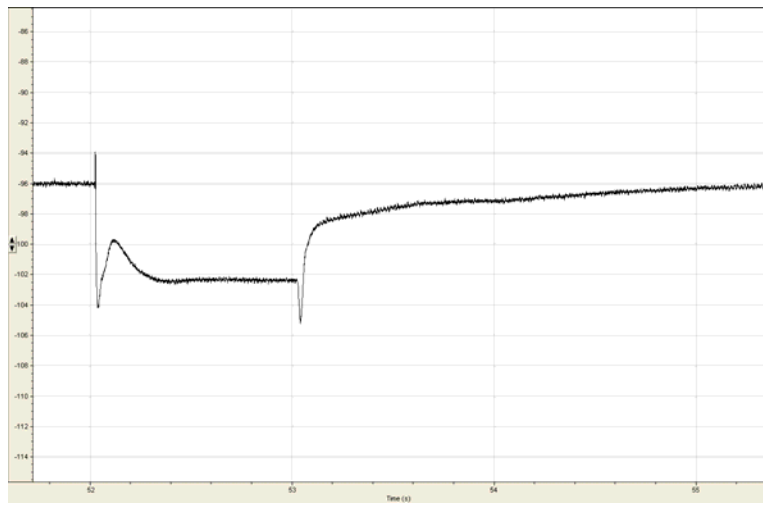
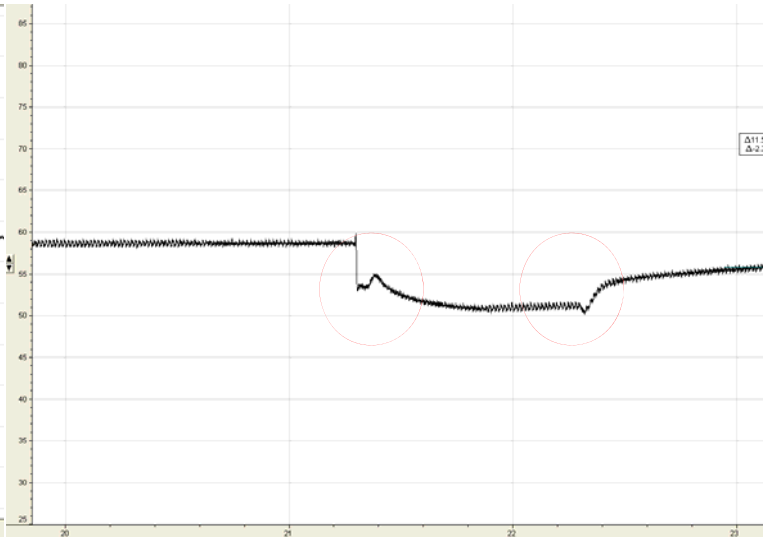
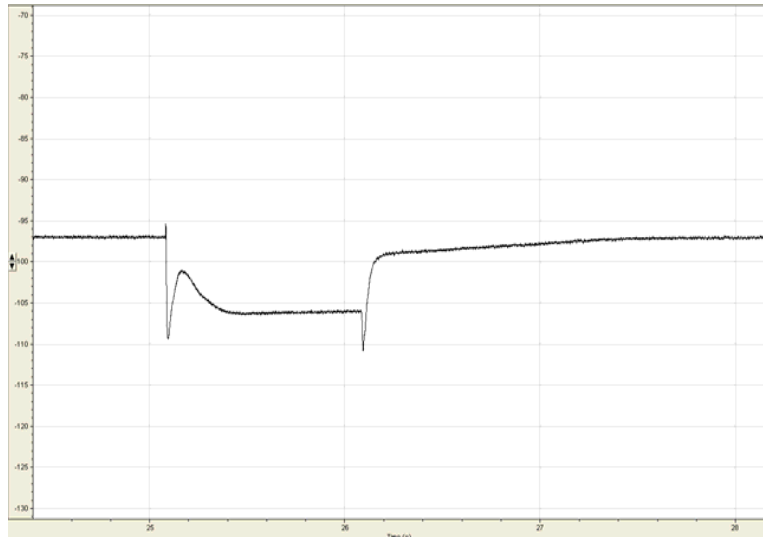
	reject	isolate	mate	control average	reject eat	isolate eat	mate eat
水-1	1.882648	2.481672	2.738397	0.855749	1.026899	1.625923	1.882648
水-2	1.625923	3.337421	3.166271	0.92420892	0.701714	2.413212	2.242062
水 total	3.508571	5.819093	5.904668	1.77995792	1.728613	4.039135	4.12471
乙醚-1	3.65962	2.723438	2.468116	2.04257856	1.617041	0.68086	0.425537
乙醚-2	4.00005	2.553223	2.638331	2.059600048	1.94045	0.493623	0.578731
乙醚 total	7.65967	5.276661	5.106446	4.102178608	3.557491	1.174483	1.004268
差/總	0.371688	-0.04889	-0.07249	0.394792041	0.345978	-0.54946	-0.60839
水/總	0.314156	0.524443	0.536246	0.302603979	0.327011	0.774728	0.804197
乙醚/總	0.685844	0.475557	0.463754	0.697396021	0.672989	0.225272	0.195803

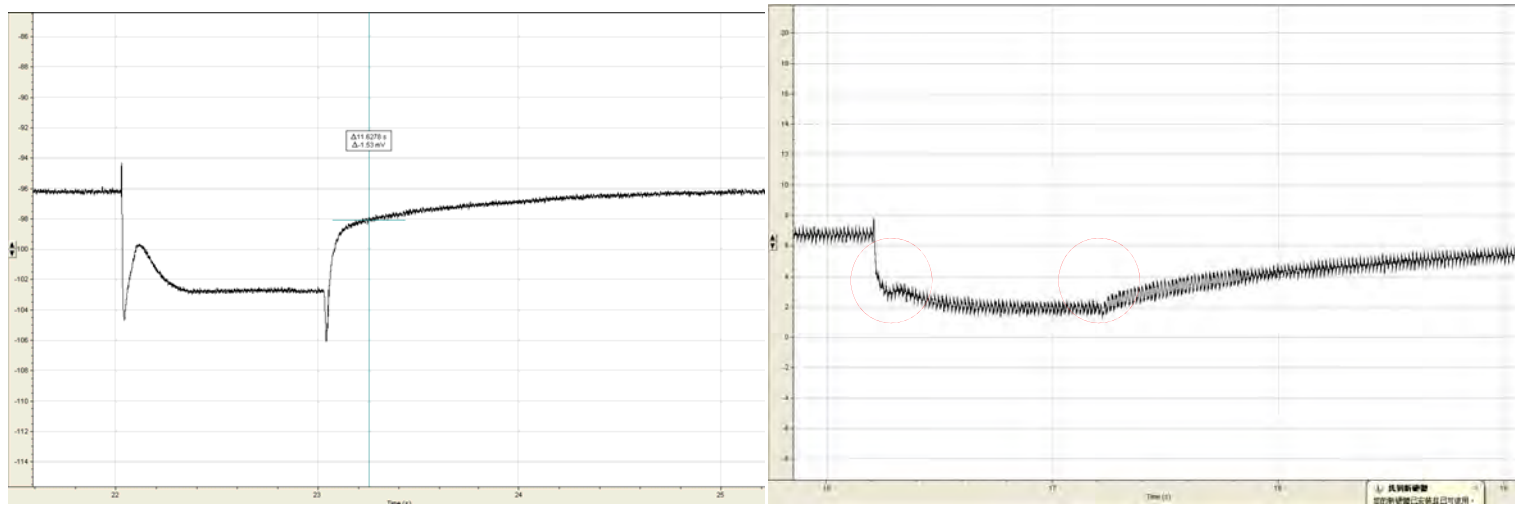
果蠅眼電生理實驗:
正常公果蠅眼球電位

攝食 24HR 酒精公果蠅眼球電位









【評語】 040714

觀察公果蠅在被拒絕後行為與正常公果蠅的差異，和 NPF 的相關性。公果蠅被拒後並不會提高酒精成癮之分子機制，可以繼續探討。