

# 2023 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

- 作品編號 050008
- 參展科別 動物學
- 作品名稱 果蠅(*Drosophila melanogaster*)的習得性無助表現之研究
- 得獎獎項 二等獎  
土耳其音樂科學工程博覽會(Buca IMSEF)代表
- 就讀學校 國立臺灣師範大學附屬高級中學
- 指導教師 林書葦、謝慧齡
- 作者姓名 溫堉佑、郭予佑
- 關鍵詞 果蠅、習得性無助、光遺傳學

## 作者簡介



我們是師大附中溫堉佑(右)&郭予佑(左)，在中央研究院分生所林書葦老師的實驗室進行研究。科學研究是個不斷解決問題的過程，我們在研究過程中遇到許多問題與困難，例如失敗的實驗設計、沒有現成裝置設備等，但都透過審視問題、尋找可用方法，將它們一一解決，整個研究歷程讓我們對科學研究研方法、專業領域知識都有更進一步的了解。

## 摘要

習得性無助是個體經多次追求獎賞或逃離困境失敗後產生的一種消極行為表現。習得性無助的行為研究雖多，但對其神經機制的研究卻甚少。

本研究發現 *273,cha-Gal80>CsC-mCh* 是適合光遺傳學訓練的果蠅殖系。在白光點獎賞記憶訓練中，使 *273,cha-Gal80>CsC-mCh* 果蠅學會白光點視覺訊號代表著獎賞，並發現其白光獎賞記憶能持續 7 分鐘以上但未達 10 分鐘。藉已建立白光視覺訊號與獎賞連結的 *273,cha-Gal80>CsC-mCh*，發現重複追求獎賞失敗的實驗組，相較於持續接受獎賞與完成獎賞記憶訓練而無任何操作的對照組，明顯表現習得性無助，本研究亦發現習得性無助個體也表現了活動力、覓食表現及攝食動機的下降。

本研究成功建立高成效的果蠅成蟲光遺傳學習得性無助訓練，並針對果蠅成蟲的習得性無助行為表現進行完整的研究，未來期望本於此訓練方式進行特定腦區、神經群和神經傳遞物之探究，建構果蠅習得性無助的神經網路機制。

## Abstract

Learned helplessness is a kind of negative behavior which appear after encountering repeated failure in reward pursuit or stress escape. Most studies about learned helplessness were focus on the behavior, while its neural mechanism is almost unknown.

We found that *237,cha-Gal80>CsC-mCh* is a suitable line of our optogenetic training. By reward memory training, we have *237,cha-Gal80>CsC-mCh* learn that white light spot represents the reward, and found that the memory can last for more than 7 minutes but less than 10 minutes. By making *237,cha-Gal80>CsC-mCh* (with reward memory) get repeated failure in reward pursuit, the training group turn into a state of learned helpless. Similar phenomenon did not appear in the control which get reward in every pursuit and the one without any training after finishing reward memory training. We also found that learned-helpless individuals exhibit lower locomotor velocity, food seeking performance and ingesting motivation.

We established a highly efficient optogenetic learned helplessness training method for adult fly. In the future, we plan to test some clusters and transmitters to clarify the neural circuit and mechanism of learned helplessness in *Drosophila melanogaster*.

# 壹、前言

## 一、習得性無助與研究動機

習得性無助(Learned helplessness)是一個廣泛存在於動物或人類的行為表現，個體在經過反覆的嘗試失敗後，會進入一種消極的行為表現狀態，例如一個學生認真念書，考試成績卻總是不盡理想，長期挫折後灰心喪志，這便是一種習得性無助的表現(張春興，1991)。

Brown, G. E. et al. (1996)對果蠅的習得性無助行為進行研究：將果蠅置於具有裹著黑布管臂與白色透明管臂的 Y 型管中，以震動 Y 型管作為困境，若果蠅在機械震動後進入黑布管臂，視為逃離震動來源，並同時停止機械震動的刺激。在機械震動後可逃離組、機械震動後不可逃離組、無機械震動對照組，三組果蠅的測試中發現，機械震動後不可逃離組進入黑布管臂所花的時間明顯高於對照組，而機械震動後可逃離組的果蠅進入黑布管臂所花的時間與對照組沒有顯著差異，這說明了果蠅在不可逃離的困境中，逃離的積極度會降低。

Fei, Y. et al. (2018)對果蠅幼蟲的 RFRP(Repeated Failure in Reward Pursuit)進行了行為與神經科學研究，以乙酸丁酯作為吸引物(source)，當幼蟲蠕動接近吸引物 0.25 cm 時，將吸引物移離幼蟲 1.5 cm 並轉變方位角 45°~90°，使其無法接近吸引物，持續進行訓練，在大約進行 2~6 次後，幼蟲便會放棄追求，此時視為 RFRP 表現。Fei, Y. et al. (2018)後續發現章胺(octopamine, OA)對於這種 RFRP 表現行為有直接的影響，研究發現，RFRP 個體表現較高的 OA，無法產生 OA 的 *tβh* mutant 則不會有 RFRP 的表現。

還有一些有關果蠅習得性無助的文獻(Yang, Z. et al., 2013 ; Vollmayr, B. et al., 2013 ; Batsching, S. et al., 2016)，它們多半是研究逃離困境式(stress escaping)的習得性無助，不過我們感興趣的是類似 Fei, Y. et al. (2018)研究之追求獎賞式(reward pursuing)的習得性無助表現，首段述及之人類學習上習得性無助表現，也屬於追求獎賞式的。

另外，有關果蠅習得性無助行為表現之神經機制相關的文獻甚少，僅 Fei, Y. et al. (2018)有進行深入的神經機制實驗與研究，其餘諸篇均僅限於行為表現的研究，沒有任何以果蠅成蟲為模式的文獻有討論到神經機制，這使我們對果蠅成蟲的習得性無助更為好奇，究竟習得性無助的個體與正常個體有哪些行為表現差異呢？追溯到神經層級又有哪些差異？果蠅成蟲習得性無助表現的神經機制又是如何？

再者，習得性無助有趣的點在於個體在經歷重複挫折後，不僅僅表現對該事物的熱情喪失，更有許多其他的行為表現異常，在哺乳類模式中，表現了整體活動力低下(low general activity)、學習能力下降(poor learning)、睡眠與進食狀況變差(disorders of sleep and feeding)、潰瘍(ulcers)以及免疫力下降(reduced immune status)等心理與生理異常(Yang, Z. et al., 2013)，在果蠅幼蟲模式中，習得性無助個體表現了活動力下降(decreased locomotor speed)、負趨光性行為減少(impaired performance in light avoidance)及對糖的偏愛下降(impaired sugar preference) (Fei, Y. et al., 2018)，習得性無助的廣泛性行為表現異常也引起了我們的興趣。

## 二、果蠅作為行為學與神經科學研究的模式生物

自 Seymour Benzer 及其同事開創性的神經遺傳學研究以來，果蠅便常被用作行為實驗的模式生物，舉凡攝食(feeding)、飲水(drinking)、飛行(flying)、行走(walking)、睡眠(sleep)、性(sex)，甚至是記憶(memory)、學習(learning)、動機(motivation)等較複雜行為的研究，皆適合以果蠅作為模式生物(Lin, S. et al., 2015)。

果蠅具有腦的構造簡單、生命週期短等優點，且果蠅的神經追蹤與操控工具完整且健全，相較於小鼠、靈長類等模式，後者之行為表現雖與人類更為接近，但研究牠們複雜的神經系統卻是不易的，因此果蠅更適合作為行為神經機制研究之模式生物。

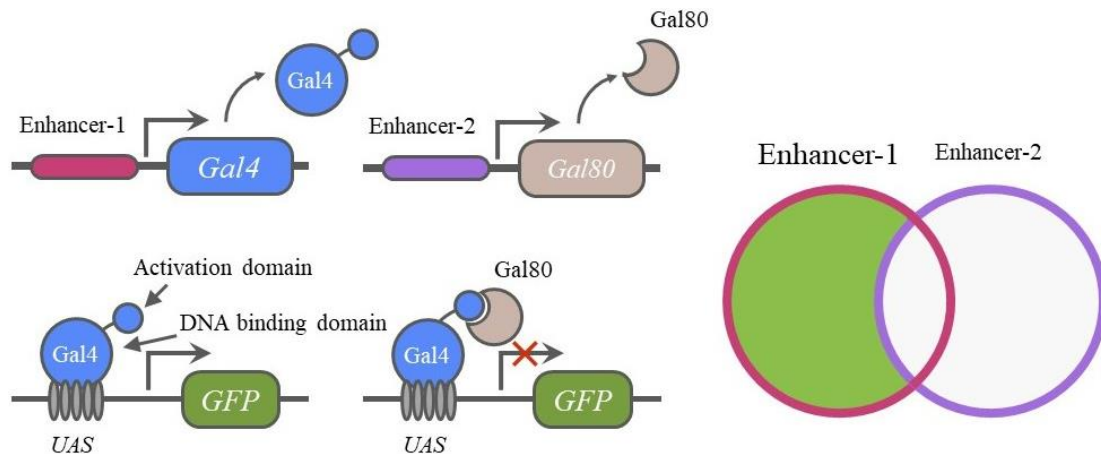
## 三、酵母對飢餓果蠅具有吸引力

酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)對果蠅而言具有濃烈且吸引力強的氣味(Scheidler, N. H. et al., 2015；Tsao, C.-H. et al., 2018)，因此被我們選做習得性無助訓練的引誘源(attractant source)，又酵母氣味對果蠅的吸引力，與果蠅的飢餓程度呈線性正相關(Tsao, C.-H. et al., 2018)，故適當的飢餓對於酵母訓練是必要的。

## 四、Gal4/UAS 系統

Gal4/UAS 是目前常用來操控果蠅基因表現的系統(Rodriguez, A. V. et al., 2012)，其原理大致如下：將 *Gal4* 基因插入特定強化子(enhancer)下游，特定強化子(enhancer)僅在特定組織或細胞中有作用(Reece, J. B. et al., 2013)，*Gal4* 基因插入特定強化子(enhancer)後，特定細胞便能表現 Gal4 蛋白(一種轉錄因子)，這些在基因體中被植入 *Gal4* 基因的果蠅統稱 Gal4 殖系(Gal4 line)；*UAS* 則是特定的基因序列，Gal4 蛋白作為轉錄因子能夠與 *UAS* 結合，開啟 *UAS* 下游的特殊外加基因表現，在神經科學研究常外加的基因有表現螢光蛋

白的基因(*GFP*、*RFP*、*mCherry*)、能使特定基因緘默的基因(*...-RNA i*)和表現特殊膜蛋白的基因(*CsChrimson*、*TrpA1*、*Shi<sup>ts1</sup>*)等。本研究所使用的果蠅殖系又外加了一個稱為 *Gal80* 的基因，*Gal80* 的表現原理與 *Gal4* 相似，*Gal80* 蛋白能和 *Gal4* 蛋白的活化區(activation domain，)結合，使 *Gal4* 蛋白喪失其轉錄因子的功能 (圖 1) (Lin, S. et al., 2015)。



**圖 1 Gal4, Gal80/ UAS system 機制圖。** GAL4 蛋白會與 UAS 結合，開啟下游基因表現，Gal80 蛋白則會抑制 Gal4 的功能，因此表現 enhancer-1，但不表現 enhancer-2 的細胞才會表達 UAS 下游基因(在本圖下游基因為 *GFP*)。(參考自：Lin, S. et al., 2015)

## 五、光遺傳學(Optogenetic)

有些特殊的膜蛋白是具光活性的，配合基因轉殖技術，將表現這些特殊膜蛋白基因轉殖進果蠅的基因體中(多半配合 Gal4/UAS 等系統)，果蠅的特定神經便會表現這些膜蛋白，讓研究者得以用特定的光來刺激特定的神經，達到精準控制(激發或抑制)特定神經的目的(Lin, S. et al., 2015)。

## 六、273-Gal4, cha-Gal80/ UAS-CsChrimson-mCherry 果蠅殖系

果蠅腦 PAM(proto-cerebral anterior medial)中的多巴胺能神經(dopamine neurons，DANs)在果蠅中傳遞獎賞信號(reward signal) (Liu, C. et al., 2012)，因此這群神經被稱為獎賞神經(reward neurons)。我們選用 273-Gal4, cha-Gal80/ UAS-CsChrimson-mCherry 果蠅殖系(以下簡稱 273, cha-Gal80>CsC-mCh)進行光遺傳學訓練。在此殖系的果蠅大腦內，273-Gal4 幾乎標定所有 PAM DANs (Burke, C. J. et al., 2012)。而 cha-Gal80 則可剔除膽鹼性神經(cholinergic neurons)的干擾 (Kitamoto, T., 2002)。另外，UAS-CsChrimson- mCherry 使這些表現 273(但不表現 cha)的神經表現 CsChrimson 紅光光敏通道蛋白以及 mCherry

紅色螢光蛋白(Jovanic, T. et al., 2016)。故 CsChrimson 在紅光刺激下會打開，使鈣離子、鈉離子流入細胞，造成神經去極化，產生神經衝動(Lin, S. et al., 2015)。mCherry 紅色螢光蛋白則能標定表現 CsChrimson 的神經元。273, *cha-Gal80*>*CsC-mCh* 果蠅殖系的獎賞神經(reward neurons)中表現了 CsChrimson 紅光光敏通道蛋白，使得紅光得以成為產生獎賞信號的刺激，這個獎賞信號十分強烈，甚至強過一般的自然獎賞。例如飢餓的雄性果蠅偏愛光刺激獎賞勝過蔗糖，273- Gal4 刺激也優於其他同樣由光遺傳學方式刺激的獎賞訊號(例如糖類訊號、自我刺激訊號)，即使在刺激 273-Gal4 時同時刺激了促進迴避的苦味神經元，果蠅仍具有強烈追求光刺激的行為(Stern, U. et al., 2019)，我們藉這些特性，以刺激 273- Gal4 取代酵母對其吸引的功能。

## 七、研究目的

- (一) 完成適合果蠅成蟲進行習得性無助之酵母訓練(Yeast source training)的裝置。
- (二) 以酵母訓練(Yeast source training)使果蠅成蟲表現習得性無助。
- (三) 確認 273, *cha-Gal80*>*CsC-mCh* 果蠅的神經表現及紅光偏好行為表現。
- (四) 由白光點獎賞記憶訓練(Reward memory training)訓練 273, *cha-Gal80*>*CsC-mCh* 果蠅記得白光點代表著獎賞(reward)，並測試獎賞記憶的持續時間。
- (五) 以光遺傳學訓練(Optogenetic training)使 273, *cha-Gal80*>*CsC-mCh* 果蠅成蟲表現習得性無助。
- (六) 測試習得性無助個體的移動速度、覓食表現及攝食動機狀況。

## 貳、 研究過程與方法

### 一、研究設備與器材

#### (一) 果蠅(*Drosophila melanogaster*)殖系(Fly line)

1. *2u* (Suewei Lin Lab Stock)
2. *273-Gal4* (Flybase ID: FBti0152522)
3. *cha-Gal80* (Flybase ID: FBtp0089249)
4. *20XUAS-CsChrimson-mCherry* Trafficked in vk0005 (Flybase ID: FBti0204688)

#### (二) 食物、化學物質、溶液

1. 乾燥酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) (Cat# FY0050, Fermipan brown, France)
2. Agar (Cat# 214530, BD, NJ, US)
3. All-trans retinal (Cat# R2500, Sigma, MO, US)
4. PBS (Cat# P4417, Sigma, MO, US)
5. Formaldehyde (Cat# F8775, Sigma, MO, US)
6. Triton X-100 (Cat# T8787, Sigma, MO, US)
7. Normal goat serum (RRID: AB\_2336990, Jackson Immuno Research, PA, US)
8. Gold antifade reagent (Cat# S36937, Invitrogen, MA, US)
9. 凡士林(Vaseline, UK)

#### (三) 抗體

1. Rabbit anti-DsRed (RRID: AB\_10013483, Clontech, CA, US)
2. Mouse anti-TH (RRID: AB\_572268, ImmunoStar, WI, US)
3. Goat anti-rabbit(Cy3) (RRID: AB\_2338006, Jackson ImmunoResearch, PA, US)
4. Goat anti-mouse(Alexa 448) (RRID: AB\_2338840, Jackson ImmunoResearch, PA, US)

#### (四) 儀器設備

1. Basler ace USB 3.0 camera (Model# acA2040-90umNIR, Basler, Germany)
2. 620~630 nm 紅光 LED 光板(客製化器材)



3. 解剖顯微鏡(Model# S8 APO, Leica, Germany)
4. 共軛焦顯微鏡(Model# LSM880, Zeiss, Germany)
5. 振盪器(Model# TS-505D, Yihder 裕德, Taiwan)

(五) 電腦軟體

1. GraphPad Prism 9 (RRID: SCR\_002798, GraphPad, CA, US)
2. Fiji/ImageJ (RRID: SCR\_002285, Fiji)
3. Pylon Viewer (Basler, Germany)
4. Tracker (Open Source Physics, US)
5. OpenShot Video Editor (OpenShot, TX, US)
6. Adobe Illustrator CS6 (RRID: SCR\_010279, Adobe, CA, US)

(六) 其他材料

1. 55 ×10 mm 培養皿 (Cat# 430166, Corning, NY, US)
2. 53 ×1.5 mm 培養皿 (Cat# 351007, Falcon, NY, US)
3. 70 GSM, A4 影印紙 (Goldbutterfly, China)
4. 風箏線 (Cat# M01255170, Min Cyuan 旻泉, Taiwan)
5. 隱形膠帶 (Cat# 7000016945, 3M Scotch, MN, US)
6. 黑色絕緣膠帶 (TOYO 東洋, Japan)
7. 白光 LED 燈珠 (Han Lin 翰林, Taiwan)
8. 紅光 LED 燈珠 (Yih Tah 億達, Taiwan)
9. Kimwipes 科學擦拭紙 (Cat# 34155, Kimtech, TX, US)
10. p200 tip (Cat# T110BRN-Q, Thermo Fisher, MA)

## 二、研究流程圖

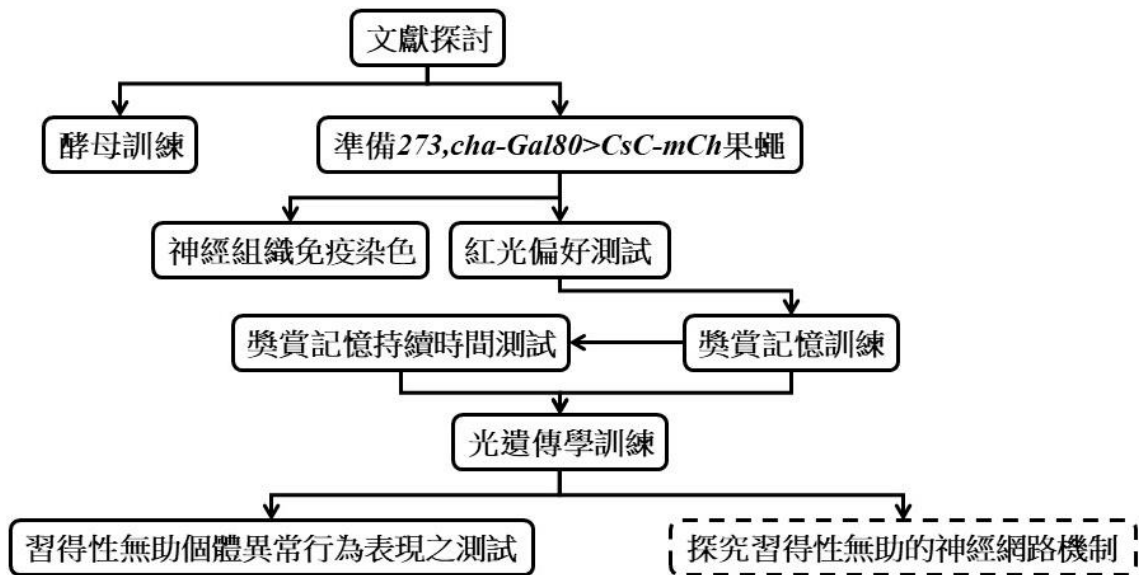


圖 2：研究流程圖。

## 三、果蠅飼養及特定條件果蠅的準備

所有果蠅皆飼養在 23°C、60%濕度、12 小時光亮：12 小時黑暗週期下，果蠅飼養在培養管內，底部加上 5mL 的培養基，所有殖系、條件的果蠅皆是由 5 隻公果蠅、12 隻母果蠅進行交配而來(稱之為 cross)，在實驗 7 天前將 vial 清空，以保證 vial 內剩下的果蠅(在 24 小時內會羽化)為 6~7 天大(年齡為羽化後的天數)；在實驗前 2 天將果蠅由 food vial(由玉米粉、糖、酵母和 agar 組成)移至 1% w/w agar vial，讓果蠅飢餓約 2 天。不論飢餓幾天，在移入 agar vial 的前一天固定將果蠅換到另一管 food vial 內，讓果蠅有新鮮食物，確保果蠅狀態的健康。CsChrimson 紅光光敏通道蛋白要有視黃醛(trans-retinal)才會有正常功能表現(Lin, S. et al., 2015；Stern, U. et al., 2019；Lau, C. K. S. et al., 2021)，因此在實驗前 6 天將果蠅移至 retinal food vial (retinal 濃度為 80  $\mu$ M)，不同條件果蠅準備方式如表 1 所示。

表 1 不同條件之果蠅準備方式列表

條件	餵食一般 fly food	餵食 retinal food
準備方式	10~20 天前 cross	10~20 天前 cross
	7 天前 清空	8 天前 清空
	6 天前 換 Food vial	6 天前 換 Retinal food vial
	3 天前 換 Food vial	3 天前 換 Retinal food vial
	2 天前 換 Agar vial	2 天前 換 Agar vial

273, *cha-Gal80*>*CsC-mCh* 果蠅是由 273-*GAL4*, *cha-GAL80* 公果蠅與 *UAS-CsChrimson-mCherry* 處女蠅交配而來，作為對照組的 273-*Gal4*, *cha-Gal80/+*與 *UAS-CsChrimson-mCherry/+*果蠅分別由 273-*Gal4*, *cha-Gal80* 公果蠅與 2*u* 處女蠅；以及 2*u* 公果蠅與 *UAS-CsChrimson-mCherry* 處女蠅交配而來。

#### 四、酵母訓練(Yeast Source Training)

酵母訓練是一種能訓練果蠅習得性無助表現的簡單方法。剪一段約 20cm 的風箏線，中間用隱形膠帶固定並包裹約 1.5cm × 1.5cm 的紙片(由影印紙剪裁而來)製作成酵母訓練小工具(yeast source training gadget，簡稱 gadget)，在 gadget 的紙片(包裹著膠帶)沾上一小滴(直徑大約 2~3 mm) 1:2.5 酵母(2g 乾酵母溶於 5g ddH<sub>2</sub>O)，gadget 中段置於倒置之 55 × 10 mm 培養皿蓋子內，以影印紙為底，露出前後段用作操控與定位、平衡，放入 2*u* 果蠅(6~7 天大，飢餓 2 天)後開始計時(圖 3)，之後在果蠅每次到 gadget 紙上進行酵母嘗試(attempt，非路過而是停下有短暫攝食行為)時，搖晃 gadget 使其被抖離(或跳離)，並記錄時間，果蠅嘗試攝食酵母 12 次後停止計時並移出果蠅，完成酵母訓練(圖 3)，整個酵母訓練過程均在行為房(Booth)微弱紅光下進行，由於果蠅對紅光不敏感，因此紅光環境對果蠅而言與黑暗無異。

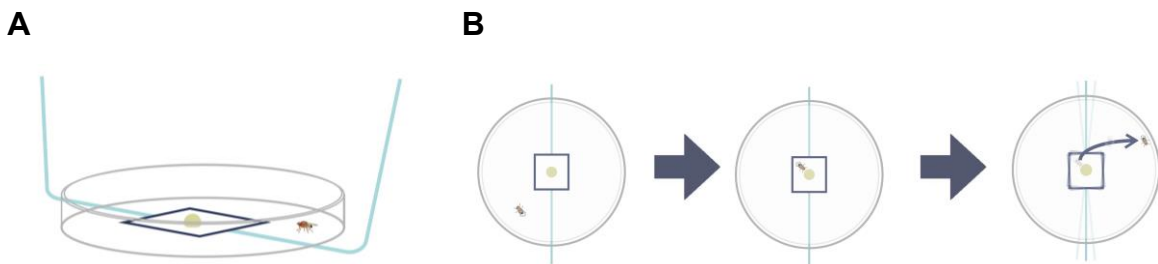


圖 3 酵母訓練。A. 酵母訓練裝置示意圖。B. 酵母訓練過程示意圖(此為俯視圖)，每次果蠅到酵母上做嘗試攝食酵母 (attempt)時，搖晃 gadget 使其被抖離。

#### 五、每次嘗試攝食酵母(Attempt)的花費時間(Spending Time)計量方式

實驗所紀錄的是自果蠅放入培養皿開始到嘗試攝食酵母時的時間，之後將第 *n* 次嘗試紀錄的時間減掉第(*n*-1)次嘗試紀錄的時間，即取果蠅第(*n*-1)次嘗試到第 *n* 次嘗試之間的時間，作為第 *n* 次嘗試的「花費時間」(spending time)進行後續分析，表 2、表 3 以我們其中一組數據為例，顯示了實驗的原始紀錄與轉化後的「花費時間」數據。花費時間的長短可以用來評估果蠅對酵母追求的動機強度，花費時間越長其動機越弱。(註：酵母

訓練的操作方式並不會造成酵母位置有太大的改變，因此 food seeking 的影響在兩次嘗試後對花費時間的影響較少)

**表 2 原始實驗紀錄**

Attempt No.	嘗試時間
1	00: 24
2	02: 03
3	03: 39
4	03: 55
5	04: 16
6	06: 25
7	08: 15
8	09: 38
9	11: 18
10	13: 48
11	15: 28
12	22: 07

**表 3 轉化後數據：花費時間(s)**

Attempt No.	花費時間
1	24
2	99
3	96
4	16
5	21
6	129
7	110
8	83
9	100
10	150
11	100
12	399

第 n 次嘗試的「花費時間」= 第 n 次嘗試紀錄的時間 - 第(n-1)次嘗試紀錄的時間

#### 六、神經組織免疫染色(Antibody Staining)

取 4~7 天大的果蠅，在室溫下裝 1× PBS 溶液的 chamber 裡用鑷子解剖果蠅腦。為了保持果蠅腦的新鮮以確保準確性，將腦泡在放在冰塊上裝 1× PBS 溶液的 chamber 裡，不超過一個小時。神經組織染色分三天完成，步驟如表 4，各溶液配製方式如表 5。

**表 4 神經組織染色步驟**

第一天	解剖果蠅腦 →將原本浸泡的 1× PBS 置換成 100μL 4% Formaldehyde in PBST 裡固定(fix)，置於振盪器在室溫下以 60rpm 搖 20 分鐘 →用 200 μL PBST 沖洗(rinse)腦 3 次，再把腦浸泡於 200 μL PBST 放到振盪器上 20 分鐘，重複 3 次 →將腦浸泡於 100 μL 5% NGS in PBST 放到振盪器上搖 30 分鐘後，將腦放入一抗溶液 50 μL 在 4°C、60rpm 放在不透光黑色盒子裡在振盪器上搖隔夜
第二天	→以 200 μL PBST 沖洗腦 3 次，再把腦浸泡於 200 μL PBST 放到振盪器上 20 分鐘，重複 3 次 →將腦放入二抗溶液 50 μL 在 4°C、60rpm 放在不透光黑色盒子裡在振盪器上搖隔夜
第三天	→以 200 μL PBST 沖洗腦 3 次，再把腦放到 200 μL PBST 放到振盪器上 20 分鐘，重複 3 次 →進行封片

表 5：神經組織染色相關溶液配製方式

1× PBS	以 1:9 混合 10× PBS、ddH <sub>2</sub> O
2× PBS	以 1:4 混合 10× PBS、ddH <sub>2</sub> O
PBST	以 4:1:35 混合 10× PBS、20% Triton X-100、ddH <sub>2</sub> O
4% Formaldehyde in PBS	以 1:2:1 混合 16% Formaldehyde、2× PBS、ddH <sub>2</sub> O
5% NGS in PBST	以 1:19 混合 100% NGS(Normal goat serum)、PBST
一級抗體溶液	以 1:1:100 混合 Rabbit anti-DsRed、Mouse anti-TH、5% NGS in PBST
二級抗體溶液	以 1:1:400 混合 Goat anti-rabbit(Cy3)、Goat anti-mouse(Alexa 448)、5% NGS in PBST

## 七、顯微鏡攝像

完成免疫螢光染色並進行封片後，標本以 Zeiss LSM880 共軛焦顯微鏡(以 ZEN 進行驅動與控制)進行 Z stack，攝像完成後以 Fiji/ ImageJ 與 Adobe Photoshop CS6 進行後製。

## 八、紅光偏好測試(Red Light-Preference Assay)

273, *cha-Gal80>CsC-mCh* 果蠅應對紅光有偏好，因此對紅光偏好狀況可作為確認此殖系是否正確無誤的方式，測試在行為房(Booth)微弱紅光(不足以刺激 CsChrimson)下進行，以去除視覺對此測試的影響，紅光偏好測試裝置如圖 4 所示：果蠅被置於倒置之 55 ×10 mm 培養皿蓋子內，以影印紙為底，紙下為 620~630 nm 紅光 LED 光板，培養皿圓形區域的一半以黑色絕緣膠布覆蓋，使其不透光，培養皿的側壁也以黑色絕緣膠布包裹覆蓋，以確保光板紅光不會從側壁滲入，而是只由下方照射。

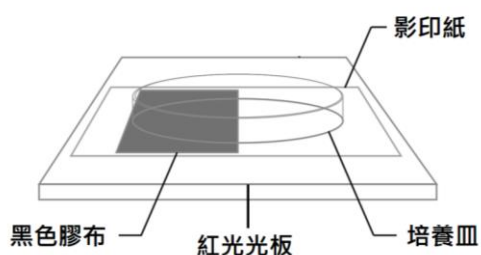


圖 4 紅光偏好測試裝置。

果蠅置入培養皿下之後，能在空間中自由移動 1 分鐘以適應環境，1 分鐘後開始進行測試，打開底下光板並開始自頂部錄影，計時一分鐘後測試結束、錄影結束，觀看影片紀錄果蠅在紅光透光區的時間，並計算偏好指數(Preference Index, PI)，定義如下(Stern, U. et al., 2019):  $PI = \frac{\text{果蠅在紅光透光區的時間}(s) - \text{果蠅在不透光區的時間}(s)}{\text{總時間}(60\text{ s})}$ 。對於未開 LED 光板的對照組(LED off ctr.)，測試過程相同，只是全程未打開光板。

## 九、獎賞記憶觀察

一開始 273, *cha-Gal80>CsC-mCh* 果蠅對白色點光源並無明顯趨向性，但透過果蠅進入白光點獎賞範圍產生獎賞刺激後便移動白光點位置的重複訓練，果蠅變得會主動追求白光點了。為了確認並可視化果蠅在訓練後會有直追白光點獎賞的行為改變，我們進行了錄影，並分析果蠅移動軌跡：在獎賞記憶訓練裝置上方架設 Basler ace USB 3.0 camera 以 Pylon Viewer 驅動，在 20 fps 下錄影 3 分鐘，過程包含未訓練前的一次趨光性觀察，以及數次訓練觀察。影片以 OpenShot Video Editor 進行剪裁以降低影片檔案大小後，由 Tracker 進行手動追蹤軌跡，最後以 Adobe Illustrator CS6 進行軌跡的繪製。

## 十、獎賞記憶訓練(Reward Memory Training)

獎賞記憶訓練之目的在於讓果蠅建立白光點與獎賞之間的連結與記憶，訓練在行為房(Booth)一般日光燈(不會刺激 CsChrimson)下進行，裝置如圖 5 所示：用兩個積木籃將一片 4.4 mm 厚的玻璃板架高約 14 cm，下方區域用來操控點光源位置，玻璃上放一張影印紙，果蠅在 53 × 1.5 mm 培養皿中活動，值得注意的是這個空間的高度只能剛好讓果蠅翻身且不會造成果蠅不適，這個設計讓果蠅在培養皿側壁上移動的機會變小(我們進行實驗時幾乎沒有觀察到果蠅移動到培養皿側壁上)。

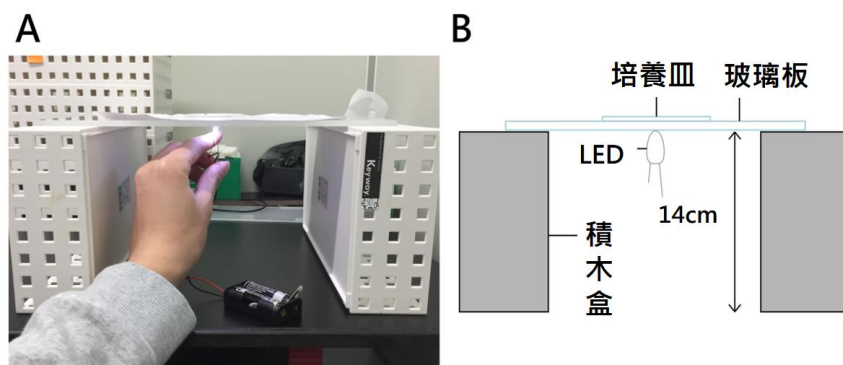


圖 5 獎賞記憶訓練裝置。A. 訓練裝置照片。B. 訓練裝置示意圖

果蠅被置入培養皿下後立即開始進行訓練，先將 LED 白光點自下方(隔著玻璃板與一張影印紙)照射果蠅約 5 秒後將光源(直徑約 6.5 mm 的圓形區域的光強度足夠刺激 CsChrimson)向果蠅前方緩慢移動(光點位置大致在以培養皿中心為圓心、半徑約 15~22 mm 的圓周上移動，每次移動約 45°~75°圓周)，讓果蠅尋找，待其移動至離光源中心距離 < ~5 mm 時，微微移動光源使光源中心位置直接照射果蠅，5 秒後再重複進行同樣動

作，直到果蠅連續 2~3 次徑直朝向光源前進，即視為訓練完成。紅光對照組的光源為紅光 LED 點光源，操作過程與白光 LED 點光源實驗組相同。

#### 十一、 白光趨向測試(White Light-Taxis Assay)

白光趨向測試之目的在於確認白光點獎賞記憶訓練的成效，測試裝置與獎賞記憶訓練裝置相同，測試方法如下：將光點置於果蠅正前方 45°~60°、約 2.5 cm 處，觀察果蠅約 3 秒內是否有趨向光前進的行為，約 3 秒後或是觀察到果蠅有趨向光前進行為後，關閉光源，將光源移至果蠅正前方 45°~60°、約 2.5 cm 處再次打開，重複動作 10 次，紀錄果蠅 10 次內趨向光前進的次數，並計算趨向指數(Taxis Index, TI)，定義如下：TI=果蠅趨向光的次數/總測試次數(10)。

為確定獎賞記憶訓練成效，在訓練前果蠅置入培養皿下後便馬上進行一次趨向測試；訓練後再馬上進行一次趨向測試，對照組則在一定時間與條件狀況後進行趨向測試。

#### 十二、 獎賞記憶持續時間測試(Reward Memory Duration Test)

測試果蠅的獎賞記憶能維持多長時間，測試方法如下：將果蠅置於培養皿下方後馬上進行一次趨向測試，訓練完成指定時間(3、5、7 或 10 分鐘)後再進行一次趨向測試。

#### 十三、 光遺傳學訓練(Optogenetic Training)

完成白光點獎賞記憶訓練(reward memory training, RM training)後(為確定果蠅已然建立獎賞記憶，在完成獎賞訓練後進行白光趨向測試， $TI \geq 0.7$  方視為完成獎賞記憶訓練)，果蠅在原裝置中馬上進行習得性無助訓練(learned helplessness training, LH training)：將白光點置於果蠅正前方約 2.5 cm 處，待其移動至離光源中心距離~10 mm 時，將白光點向果蠅正前方平移直至果蠅不再隨著光點移動，再次將白光點置於果蠅正前方約 2.5 cm 處，重複此步驟直至連續兩次不朝向光點前進，視為果蠅產生習得性無助表現，訓練終止(參考圖 13)。

#### 十四、 移動速度測試(Locomotor Velocity Assay)

移動速度測試的目的在於評估果蠅在特定時間內移動的路徑長，測試在行為房(Booth)一般日光燈(不會刺激 CsChrimson)下進行，讓果蠅在圖 5 裝置的培養皿中自由活動 30 秒，用 Basler ace USB 3.0 camera 自上方以 20 fps 進行錄影，影片以 Tracker 進行手動追蹤，並以 Excel 計算果蠅 30 秒內的移動的總距離及平均速度。

為評估習得性無助訓練前後果蠅移動速度之變化，在訓練前進行一次移動速度測試 ( $v_0$ )，訓練完成後再馬上進行一次 ( $v_f$ )，並計算  $\log(v_f/v_0)$  作為評估前後速度變化的依據(Fei, Y. et al., 2018)， $\log(v_f/v_0)$  小於 0 表示果蠅在訓練後移動速度降低，大於 0 則反之。

#### 十五、 覓食測試(Food-Seeking Assay)

覓食測試之目的在於評估果蠅的覓食表現，測試在行為房(Booth)一般日光燈(不會刺激 CsChrimson)下進行，以影印紙為底、倒置之直徑 55 mm 高 10 mm 培養皿蓋子為果蠅的活動空間，在中央沾上一小滴(直徑大約 2~3 mm) 1:2.5 酵母(2g 乾酵母溶於 5g ddH<sub>2</sub>O)，測試方法如下：將果蠅置入培養皿蓋子下，並貼近邊緣，開始計時，果蠅到達中央食物處停留 3 秒視為其成功找到食物，5 分鐘後測試結束，紀錄果蠅自測試開始至找到食物花費的時間(若 5 分鐘內未找到食物則以 5 分鐘計算)，並計算覓食指數(Food Seeking Index, FSI)，定義如下： $FSI = [測試總時間(300\text{ s}) - 找到食物花費的時間(\text{s})] / 總測試時間(300\text{ s})$ (Tsao, C.-H. et al., 2018)，覓食指數越接近 1 表示果蠅之覓食表現越強烈。

#### 十六、 口吻延伸反應測試(Proboscis Extension Response Assay, PER Assay)&曲線下面積(AUC)定量方式

PER 測試的目的在於評估果蠅的攝食動機，測試在行為房(Booth)一般日光燈(不會刺激 CsChrimson)下進行，測試方法如下：果蠅身體被限制於 200  $\mu$ L 移液器尖端(P200 tip)中，只露出頭部以及可以自由伸縮移動的吻部，以沾上特定蔗糖溶液的小芯(wipe，以 Kimwipes 試鏡紙捲成尖狀製成)觸碰果蠅的唇緣，觀察果蠅是否有口吻延伸反應，重複 5 次測試，計算 PER 次數。口吻延伸反應為全有全無(Shiraiwa, T. et al., 2007；Lin, S. et al., 2014)。

本研究對每一組測試個體按順序測試其對相對濃度 0、1/8、1/4、1/2、3/4、1 之蔗糖溶液(以純水為 0、飽和蔗糖水溶液為 1)的 PER 表現，對於每一測試個體會有一折線(PER 次數對蔗糖濃度)，以 Excel 計算折線與橫軸所夾面積(兩點間連線與橫軸所夾梯形面積的加總)，進行統計分析。



## 十七、 統計方法

本研究根據不同需求與狀況所用到之統計方法有以下幾種：

- (一) D'Agostino & Pearson test：檢驗數據是否符合常態分佈(存在母群)。
- (二) F-test：適用於兩組數據，檢驗變異數是否相等。
- (三) Bartlett's test：適用於多組數據，檢驗變異數是否相等。
- (四) Unpaired t test：適用於不成偶、有母群、變異數相等的兩組數據，檢驗數據間是否存在顯著差異。
- (五) Paired t test：適用於成偶、有母群、變異數相等的兩組數據，檢驗數據間是否存在顯著差異。
- (六) One-way ANOVA：適用於不成偶、有母群、變異數相等的多組數據，檢驗數據間是否存在顯著差異。
- (七) RM one-way ANOVA：適用於成偶、有母群、變異數相等的多組數據，檢驗數據間是否存在顯著差異。
- (八) Welch's ANOVA test：適用於不成偶、有母群、變異數不相等的多組數據，檢驗數據間是否存在顯著差異。
- (九) Kruskal-Wallis test：適用於不成偶、無母群的多組數據，檢驗數據間是否存在顯著差異。
- (十) Tukey's multiple comparisons test：作為 One-way ANOVA 及 RM one-way ANOVA 的事後分析(*post hoc*)，將多組數據做兩兩比較，得出各組數據間的差異狀況。
- (十一) Dunnett's T3 multiple comparisons test：作為 Welch's ANOVA test 的 *post hoc*，將多組數據做兩兩比較，得出各組數據間的差異狀況。
- (十二) ：作為 Kruskal-Wallis test 的 *post hoc*，將多組數據做兩兩比較，得出各組數據間的差異狀況。

本研究使用 GraphPad Prism 9 進行數據分析與作圖，配合 Microsoft Excel 2010 進行簡單的運算。

## 參、 研究結果與討論

### 一、 酵母訓練裝置的設計與果蠅條件的決定

為了尋找合適年齡與能表現適度酵母追求行為的果蠅，我們觀察了飢餓 1、2 或 3 天的果蠅其追尋酵母與是否能因酵母訓練裝置搖晃而離開食物的行為。測試後發現飢餓 1 天的果蠅對酵母氣味並沒有很強烈的食物追求行為(food seeking behavior)。而飢餓 3 天的果蠅，約有三分之一在我們實驗前就餓死，且存活的果蠅也無法因酵母訓練裝置的搖晃而移動位置(即活動力很低落)。相較而言，飢餓 2 天的果蠅其對氣味的追求、尋找食物行為都非常強烈，也會因酵母訓練裝置搖晃而離開食物，因此我們選擇以飢餓 2 天的果蠅進行實驗。此外，因羽化後 6~7 天大的果蠅其對口渴的耐受度較小，故我們使用羽化後 6~7 天大的果蠅進行測試以降低個體差異的影響。而進行實驗的環境則是在微弱紅光(620~630 nm)下的行為實驗房(booth)，以減少視覺訊息對果蠅訓練的干擾(因果蠅在微弱紅光下無法視物)(Tsao, C.-H. et al., 2018)。由圖 6 可以看出，在 Group III 的測試條件(果蠅年紀 6~7 天，飢餓 2 天，在行為房微弱紅光下操作訓練，且定量酵母濃度為 1:2.5)下，果蠅進行 6 次嘗試攝食酵母的總花費時間的變異程度最小。整體而言，我們針對果蠅條件與操作環境所做的調整，達到了降低變異程度與降低操作總費時兩個重要目標(圖 6)。

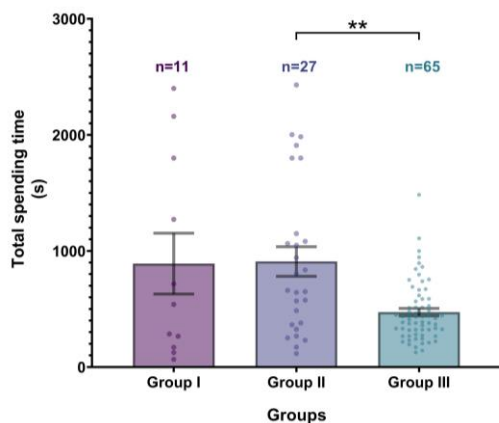


圖 6 果蠅連續六次嘗試(attempt)攝食酵母的總花費時間(spending time)。Group III 的操作條件使操作花費的時間縮短且整體數據較集中( $p < 0.0001$ , Bartlett's test)。三組訓練之各項條件如下：Group I( $n=11$ )：果蠅飢餓 2 天；Group II( $n=27$ )：果蠅年紀 6~7 天，飢餓 2 天；Group III( $n=65$ )：果蠅年紀 6~7 天，飢餓 2 天，在行為房(Booth)紅光下操作訓練，定量酵母濃度(1:2.5) ( $p = 0.0073$ , Group II vs. Group III, Dunnett's T3)。圖中標示 mean±SEM 及所有數據，使用 Welch's ANOVA test 及 *post hoc* Dunnett's T3 multiple comparisons test。 \*\*  $p < 0.01$

## 二、酵母訓練結果

為了初步驗證並觀察果蠅的習得性無助表現，我們進行了酵母訓練及每次嘗試攝食酵母(attempt)花費時間的分析。飢餓果蠅在酵母訓練裝置中會接近酵母，卻因裝置的搖晃而被迫遠離酵母，幾經嘗試後，嘗試攝食酵母所花費時間越長代表其追求酵母的動機越弱。酵母訓練總共讓果蠅「嘗試攝食酵母」12次，結果如表6與圖7所示，發現走勢大致呈U型，前1~2次花比較長時間的因素，可能是果蠅初次在新環境中需要尋找酵母來源，待第3次嘗試攝食酵母後果蠅便不需花太多時間尋找酵母源，而是較單純的被重複的失敗影響。第3次嘗試攝食酵母後的花費時間之上升的同時，我們也觀察到越多次嘗試攝食酵母卻失敗時，果蠅會出現活動量減少、常停在同一地的現象，據此推論果蠅表現了習得性無助。

表6 酵母訓練結果

Attempt No.	Spending time (for each attempt)(s)
1	130.6 ± 16.4
2	77.4 ± 8.3
3	62.6 ± 5.3
4	70.8 ± 9.5
5	77.7 ± 11.9
6	71.2 ± 9.1
7	69.0 ± 8.5
8	83.9 ± 14.4
9	86.7 ± 13.2
10	78.1 ± 9.5
11	95.9 ± 16.1
12	111.9 ± 17.1

註：本表對應圖7，表中標示 mean±SEM (n= 65)。

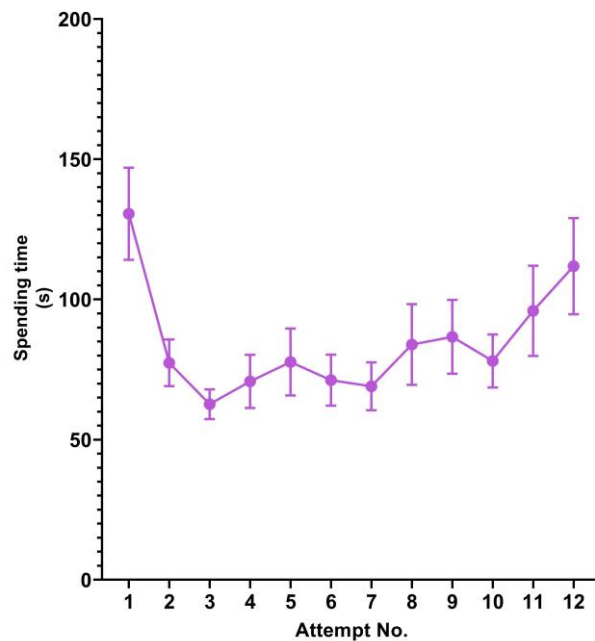
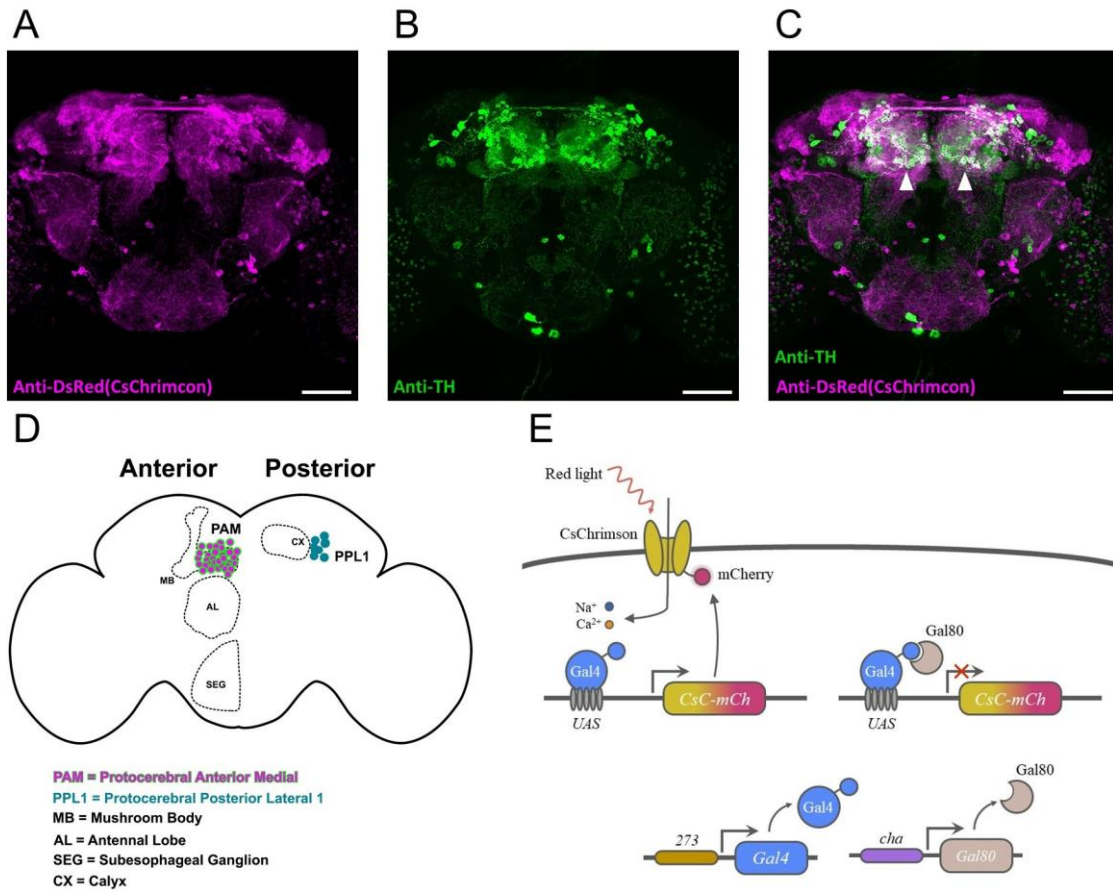


圖7 酵母訓練結果。所有果蠅皆為6~7天大、飢餓約2天，訓練全程在行為實驗房(Booth)微弱紅光無視覺干擾下進行。圖中標示 mean±SEM (n= 65)。

## 三、273, *cha-Gal80*>*CsC-mCh* 果蠅的神經表現

由於酵母源與訓練環境的不穩定性(詳見討論)，我們改以光遺傳方式進行試驗。為了解 273-*Gal4*, *cha-Gal80* 在果蠅大腦中的神經表現狀況，我們將 273, *cha-Gal80*>*CsC-mCh* 果蠅腦部組織進行免疫螢光染色後以共軛焦顯微鏡進行觀察。結果如圖8A~C所示，

Rabbit anti-DsRed 辨認 mCherry 螢光蛋白，標定所有表現 CsChrimson 紅光光敏通道蛋白的神經(洋紅)；Mouse anti-TH 辨認酪氨酸羥化酶(Tyrosine hydroxylase, TH)，標定多巴胺能神經(DA neuron)(綠)，兩者重疊部分主要為 PAM，即是我們所要刺激的獎賞神經(reward neurons)。



**圖 8** *273-Gal4, cha-Gal80/UAS-CsChrimson-mCherry* 果蠅腦部神經表現狀況及基因表現機制。A~C *273, cha-Gal80>CsC-mCh* 大腦(雄性)免疫組織染色結果，洋紅為 anti-DsRed；綠色為 anti-TH。顯微鏡放大倍率為 20x、scale bar=50μm。A. 以 anti-DsRed 標示出表現 CsChrimson 紅光光敏通道蛋白的神經(即 *273-GAL4, cha-GAL80* 的表現狀況)。B. 以 anti-TH 標示出多巴胺神經。C. 重疊影像，中間上方(以白色箭頭提示的位置)的神經群呈現白色，是由於同時有綠色及洋紅的表現，主要為 PAM。D. *273, cha-Gal80>CsC-mCh* 腦部神經表現示意圖，圖中標示出果蠅腦中重要的區域以及兩群多巴胺神經 PAM 及 PPL2。E. *273, cha-Gal80>CsC-mCh* 基因表現機制圖。在表現 Gal4 蛋白且未表現 Gal80 蛋白的神經元中，Gal4 會與 UAS 結合，使該神經元表現 CsChrimson-mCherry 融合蛋白，紅光會使 CsChrimson 開啟，讓 Na<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>流入細胞，使神經去極化；同時表現 Gal4 與 Gal80 的神經元則不會表現 CsChrimson-mCherry 融合蛋白。

(參考：Lin, S. et al., 2015；Mao, Z. et al., 2009)

#### 四、273, *cha-Gal80>CsC-mCh* 果蠅對紅光的偏好狀況

273, *cha-Gal80>CsC-mCh* 果蠅的獎賞神經中表現了 CsChrimson 紅光光敏通道蛋白，使得 LED 紅光得以刺激其產生獎賞信號。而 CsChrimson 紅光光敏通道蛋白要有視黃醛 (trans-retinal) 才會有正常功能表現。為確認 273, *cha-Gal80>CsC-mCh* 果蠅殖系對 LED 紅光的偏好狀態，我們在如圖 4 裝置底部全開或未開 LED 紅光狀態下，測試未攝食與攝食 trans-retinal 的果蠅，了解其對 LED 紅光的偏好情形，結果如表 7 與圖 9 所示。由圖 9A 發現，未攝食 trans-retinal 的 273, *cha-Gal80>CsC-mCh* 果蠅，對紅光的偏好程度(以 PI 衡量)與基因對照組(Geno ctr.，即 273, *cha-Gal80/+*與 *CsC-mCh/+*)沒有顯著差異( $p=0.2323$ )，而攝食 trans-retinal 的 273, *cha-Gal80>CsC-mCh* 果蠅，對紅光的偏好程度(以 PI 衡量)顯著高於對照組(圖 9B)，且其在未開紅光下，273, *cha-Gal80>CsC-mCh* 果蠅對透光區的偏好程度與對照組沒有顯著差異( $p=0.9855$ )(圖 9C)。攝食 trans-retinal 的 273, *cha-Gal80>CsC-mCh* 果蠅在光板紅光 LED 開啟下，對紅光透光區的偏好程度顯著高於光板紅光 LED 未開啟時( $p<0.0001$ )(圖 9D)。

表 7 有無攝食 trans-retinal 的 273, *cha-Gal80*>*CsC-mCh* 果蠅對紅光之偏好程度測試結果

果蠅殖系\處理狀態	No retinal, LED On	Retinal, LED On	Retinal, LED Off
<i>273,cha-Gal80/+</i>	-0.183 ± 0.116	-0.058 ± 0.087	-0.138 ± 0.165
<i>273,cha-Gal80&gt;CsC-mCh</i>	-0.028 ± 0.202	0.698 ± 0.102	-0.132 ± 0.045
<i>CsC-mCh/+</i>	0.228 ± 0.174	-0.061 ± 0.088	-0.153 ± 0.105

註：本表對應圖 9，表中標示 mean±SEM (九組皆 n=12)。

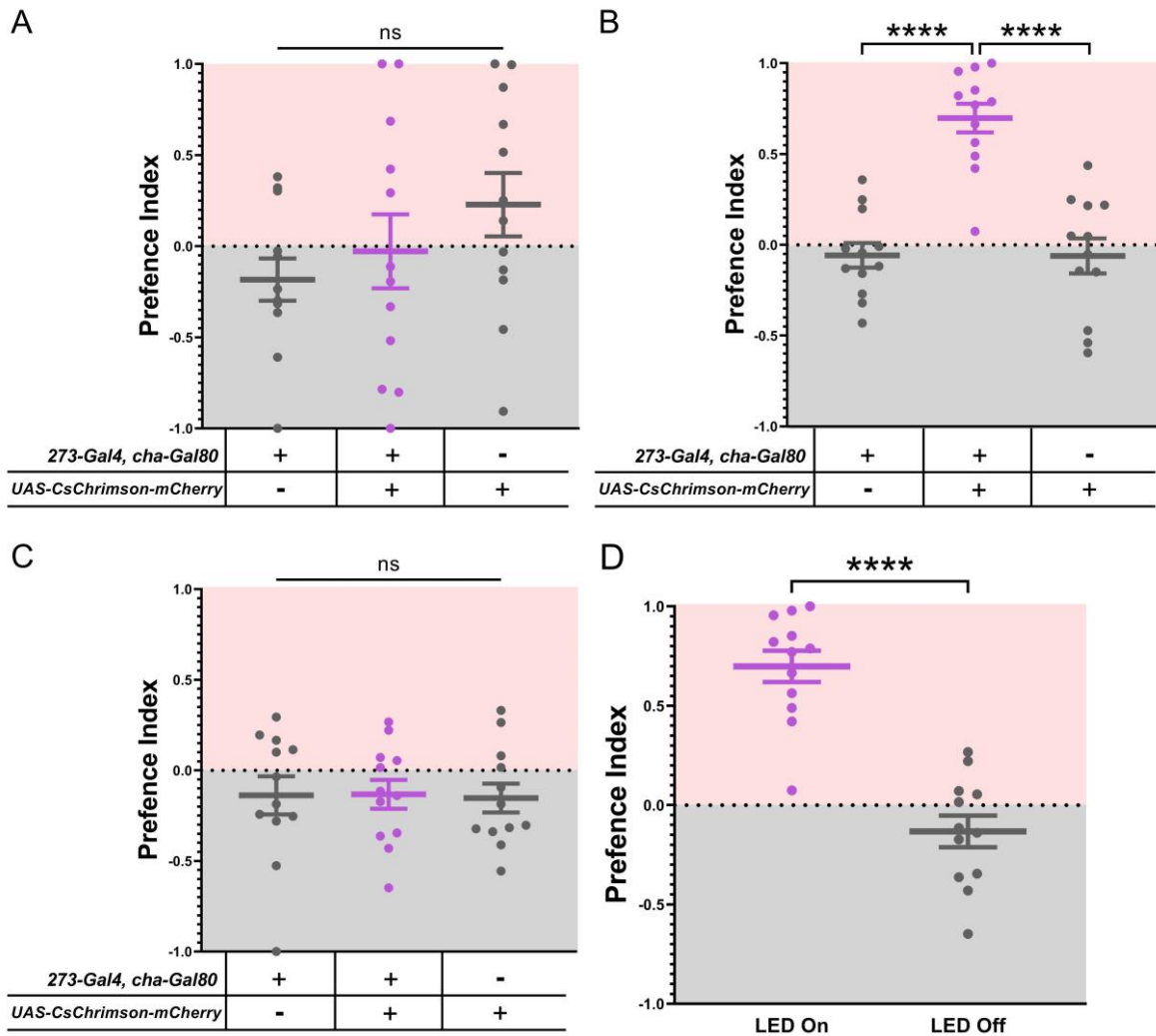


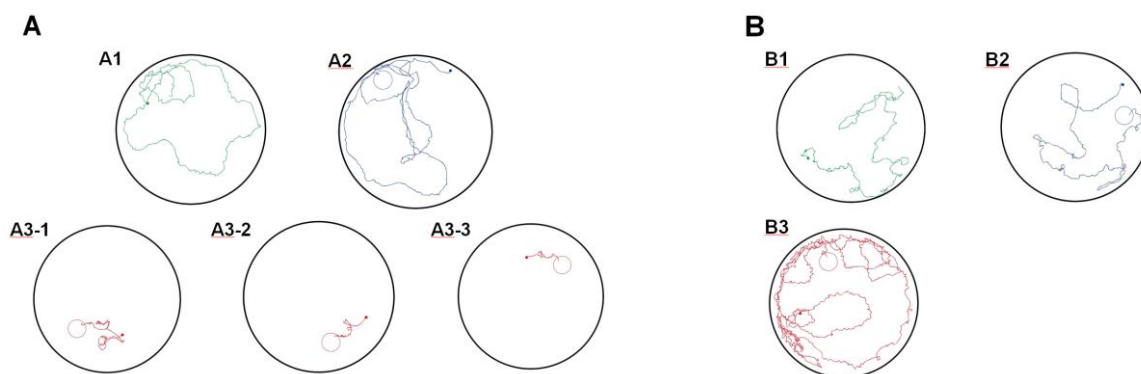
圖 9 有無攝食 trans-retinal 的 273, *cha-Gal80*>*CsC-mCh* 果蠅對紅光之偏好程度測試結果。所有果蠅皆為 6~8 天大、飢餓約 2 天，測試在行為實驗房(Booth)微弱紅光無視覺干擾下進行。A. 果蠅未攝食 trans-retinal 底部光板之紅光 LED 為全開狀態 (三組皆為 n=12, p=0.2323, one-way ANOVA)。B. 果蠅攝食 3 天的 trans-retinal, 底部光板之紅光 LED 為全開狀態(三組皆為 n=12, p< 0.0001, one-way ANOVA)。C. 果蠅攝食 3 天的 trans-retinal, 底部光板之紅光 LED 為關閉狀態(三組皆為 n=12, p=0.9855, one-way ANOVA)。D. 果蠅攝食 3 天的 trans-retinal, 底部光板紅光 LED 全開與未開的比較(兩組皆為 n=12, p<0.0001, paired t test)。圖中標示 mean±SEM 及所有數據，A~C 使用 one-way ANOVA 及 *post hoc* Tuckey's multiple comparison test；D 使用 Unpaired t test, \*\*\*\* p< 0.0001。

由圖 9 結果可知，273, *cha-Gal80>CsC-mCh* 果蠅在攝食 *trans-retinal* 後對紅光是有偏好的，由此可確認紅光能激活 273, *cha-Gal80>CsC-mCh* 果蠅腦部的特定神經以帶來獎賞的刺激。透過實驗中的觀察也讓我們了解 273, *cha-Gal80>CsC-mCh* 果蠅在接受到紅光帶來獎賞時的行為表現，這些表現是顯見的，主要包括：靜止、麻痺(*paralyzed*，即倒下或仰翻)、振翅等。

## 五、獎賞記憶觀察之軌跡分析結果

在訓練 273, *cha-Gal80>CsC-mCh* 果蠅產生習得性無助表現之前，我們希望先使其學習並記得白光點(視覺訊號)代表著獎賞(果蠅對紅光不敏感)，因此本研究設計了白光點獎賞記憶訓練，其目的在於讓果蠅建立白光點與獎賞之間的連結與記憶。我們將 6~8 天大、飢餓 2 天且攝食 3 天的 *trans-retinal* 的 273, *cha-Gal80>CsC-mCh* 果蠅，在不會刺激 *CsChrimson* 紅光光敏通道蛋白的一般日光燈下，置於如圖 5 的裝置中，開啟足以刺激 *CsChrimson* 紅光光敏通道蛋白的白光 LED 5 秒後，觀察果蠅尋找白光 LED 光源的軌跡。

在尚未被白光點照射過之前(即尚未接受過獎賞之前)，果蠅的移動軌跡是隨機而無目的性的(圖 10A2)，正如未出現任何光源的狀況(圖 10A1)。在以白光點進行重複移位訓練(類似獎賞記憶訓練)數次後，果蠅的移動軌跡不再漫無目的，反而變得會直接向白光點前進(圖 10A3-1~A3-3)。若是用紅光點進行相同操作，因果營隊紅光不敏感，故果蠅移動軌跡自始至終皆沒有明顯的改變(圖 10B1~B3)。由圖 10 的結果說明，273, *cha-Gal80>CsC-mCh* 果蠅已建立白光點(視覺訊號)與獎賞之間的連結與記憶。



**圖 10 獎賞記憶觀察白光點實驗組與紅光點對照組之軌跡分析結果。** **A.** 獎賞記憶觀察白光點實驗組之軌跡。**A1.** 無任何點光源下的果蠅移動軌跡。**A2.** 未感受過白光點獎賞刺激的果蠅移動軌跡。**A3-1~A3-3.** 經數次白光點獎賞刺激訓練後的果蠅移動軌跡。(每組實驗  $n=16$ ，僅以代表性例證呈現)**B.** 獎賞記憶觀察紅光點對照組之軌跡。**B1.** 無任何點光源下的果蠅移動軌跡。**B2.** 未感受過紅光點獎賞刺激的果蠅移動軌跡。**B3.** 經數次紅光點獎賞刺激訓練後的果蠅移動軌跡。(每組實驗  $n=5$ ，僅以代表性例證呈現)(實心點:初始位置，圓形圈:光點能帶給果蠅獎賞的範圍，實心線:移動軌跡)

## 六、獎賞記憶訓練達到預期成效

為驗證獎賞記憶訓練之成效，我們設計了白光趨向測試，並以趨向指數(TI)作為定量分析的依據。我們將6~8天大、飢餓約2天、攝食3天的 *trans-retinal* 的 *273, cha-Gal80>CsC-mCh* 果蠅，在一般日光燈下進行 LED 白光點獎賞記憶訓練，結果如表 8 及圖 11 所示。沒有任何操作下適應 3 分鐘的對照組(Adapt ctr.)是為了排除果蠅在訓練環境適應較久造成 TI 上升的可能性；以白光點光源持續照射 3 分鐘(使果蠅持續接受獎賞刺激)的對照組(Exposing ctr)是為了排除果蠅在單純接受過白光刺激造成 TI 上升的可能性(因獎賞記憶訓練大約在 3 分鐘內完成，故以白光點持續照射 3 分鐘以達相同的測驗時間)；以紅光 LED 下進行獎賞訓練的對照組(Red LED ctr)是為了確認在紅光點無法引起其視覺訊號下則無法產生獎賞記憶。

由圖 11A 結果發現，經過白光點獎賞訓練組(Training)的果蠅對白光點的趨向性(以 TI 衡量)顯著高於測試前( $p < 0.0001$ )；而在 Adapt ctr.及 Exposing ctr.和 Red LED ctr.中，處理前、後之 TI 並無顯著差異(其  $p$  值分別為  $p = 0.4374$ 、 $p = 0.6596$ 、 $p = 0.6952$ )。另外圖 11B 的基因對照組也可排除訓練並未與獎賞連結可能性，實驗組訓練前、後的 TI 有顯著差異( $p=0.0025$ )，兩組基因對照組則否(分別  $p=0.4441$  及  $p=0.2560$ )。由此可知，以白光點做為果蠅獎賞記憶的訓練刺激來源是可行有效的。



表 8 獎賞記憶訓練成效測試，不同實驗條件及不同果蠅殖系操作前、後之 TI

操作前 後 TI	不同操作實驗條件				不同果蠅殖系		
	Adapt ctr.	Training	Exposing ctr.	Red LED ctr.	273/+	273>CsC	CsC/+
Before	0.19 ± 0.05	0.16 ± 0.04	0.18 ± 0.23	0.13 ± 0.06	0.32 ± 0.10	0.22 ± 0.08	0.25 ± 0.09
After	0.15 ± 0.04	0.72 ± 0.04	0.23 ± 0.09	0.15 ± 0.04	0.38 ± 0.06	0.75 ± 0.04	0.37 ± 0.12

註：本表對應圖 11，表中標示 mean±SEM (n≥6)。273 表 273,cha-Gal80；CsC 表 CsC-mCh。

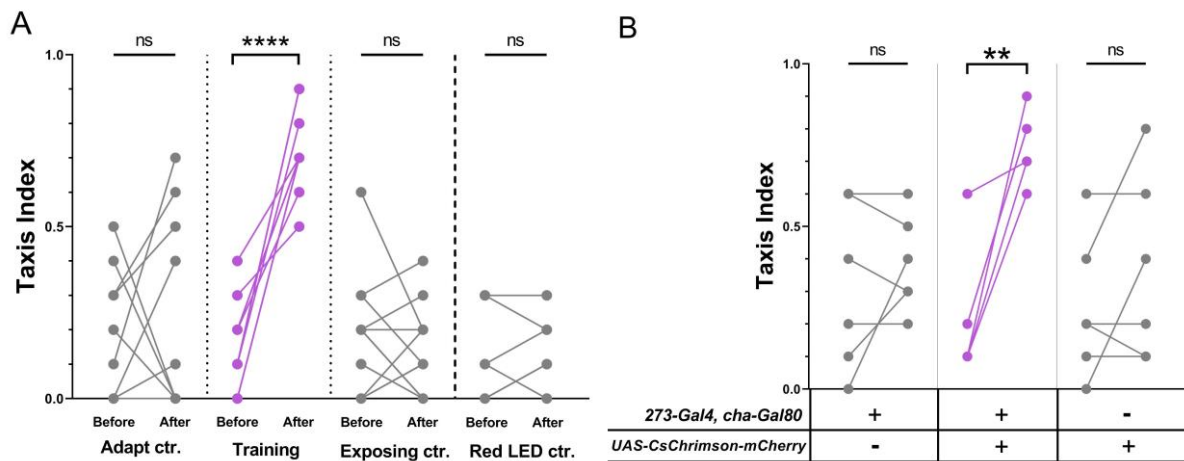


圖 11 獎賞記憶訓練前、後對白光點光源之趨向性比較圖。所有果蠅皆為 6~8 天大、飢餓約 2 天、攝食 3 天的 trans-retinal，測試在行為實驗房(Booth)日光燈下進行，果蠅在被置於培養皿下便馬上進行一次測試；訓練(或特定條件)結束後再馬上進行一次測試。**A**。所有果蠅皆為 273, cha-Gal80>CsC-mCh，Adapt ctr.：果蠅在訓練環境中待 3 min，不進行任何操作(n=11)；Training：果蠅以白光點進行獎賞記憶訓練(n=10)；Exposing ctr.：果蠅以白光持續照射 3 min (n=10)；Red LED ctr.：果蠅以紅光點進行獎賞記憶訓練 3 min (n=6)。**B**。獎賞記憶訓練成效測試的基因對照組(三組皆 n=6)。圖中顯示所有數據訓練前、後的 TI 改變(兩點連線)，若有相同數據則圖形重疊，使用 Paired t test。\*\*p<0.01 \*\*\*\*p<0.0001。

## 七、獎賞記憶持續時間

要讓果蠅發生習得性無助的表現，就得在果蠅忘記獎賞前完成習得性無助的測試，因此我們需要了解果蠅獎賞記憶的持續時間。我們將 6~8 天大、飢餓約 2 天、攝食 3 天的 trans-retinal 的 273, cha-Gal80>CsC-mCh 果蠅在白光點獎賞訓練前測一次 TI，訓練完成特定時間後，再測一次，並比較獎賞記憶訓練前、後的 TI，以此推論獎賞記憶維持的時間，結果如表 9 及圖 12 所示：在白光點獎賞記憶訓練完 3 min(p= 0.0008)、5 min(p= 0.0004)及 7 min(p= 0.0002)後，果蠅的 TI 皆顯著高於訓練前，但在訓練十分鐘後，和訓練前相比，果蠅的 TI 便沒有顯著差異了(p= 0.2468)(圖 12)，由此可知 273, cha-Gal80>CsC-mCh 果蠅的白光點獎賞記憶可維持 7 分鐘以上但未達 10 分鐘。

表 9 白光點獎賞記憶持續時間測試，訓練前及訓練完特定時間後之 TI

測試前後 TI\時間	0 min	3 min	5 min	7 min	10 min	No training
Before	0.16 ± 0.04	0.16 ± 0.03	0.14 ± 0.08	0.15 ± 0.07	0.27 ± 0.07	0.19 ± 0.05
After	0.72 ± 0.04	0.63 ± 0.09	0.61 ± 0.04	0.73 ± 0.05	0.40 ± 0.09	0.15 ± 0.04

註：本表對應圖 12，表中標示 mean±SEM (n≥8)。

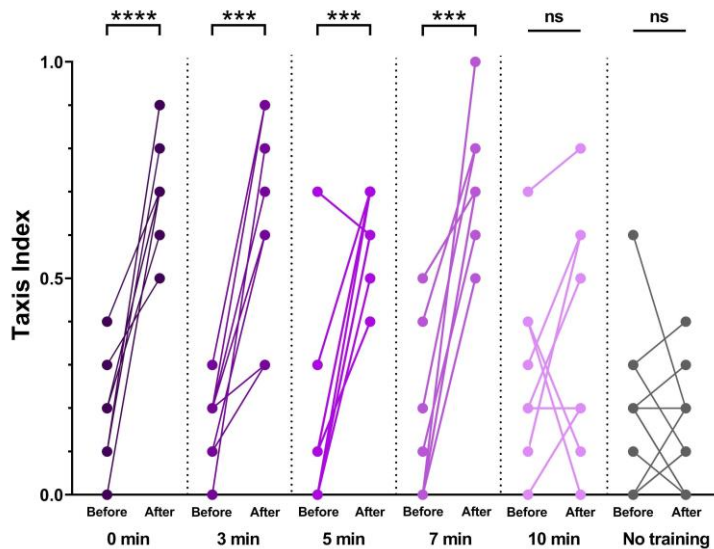


圖 12 白光點獎賞記憶持續時間測試。所有果蠅皆為 *273,cha-Gal80>CsC-mCh*、6~8 天大、飢餓約 2 天、攝食 3 天的 *trans-retinal*，測試在行為實驗房(Booth)日光燈下進行，果蠅在被置於培養皿下便馬上進行一次趨向性測試；獎賞訓練特定時間後再進行一次趨向性測試。(n ≥ 8)。圖中標示所有數據訓練前、後的 TI 改變(兩點連線)，若有相同數據則圖形重疊，使用 Paired t test。\*\*\*p<0.001 \*\*\*\*p<0.0001。

## 八、光遺傳學訓練結果

為瞭解 *273, cha-Gal80>CsC-mCh* 果蠅是否能對白光點獎賞產生習得性無助，我們對其進行光遺傳學訓練並測量其對白光點的趨向性(TI)，以分析結果。實驗組與兩組對照組之完整訓練過程如圖 13 所示，結果如表 10 及圖 14。圖 14A 結果顯示，在進行完白光點獎賞記憶訓練後，果蠅的 TI 顯著高於未進行任何訓練前(p=0.0002)，代表果蠅顯著趨向白光點獎賞。在完成習得性無助訓練後，果蠅的 TI 顯著低於甫進行完白光點獎賞記憶訓練後(p<0.0001)，且與未進行任何訓練前無顯著差異(p=0.8369)，又習得性無助訓練所費時間為  $321.1 \pm 84.2$  秒 (標示 99.9% CI, n=47)，未超過獎賞記憶的持續時間，因此推論 TI 下降的原因是習得性無助的表現。圖 14A 之結果顯示果蠅在追求獎賞失敗後的确會表現習得性無助。另外在持續讓果蠅成功追求到獎賞的對照組(圖 14B)以及在完成獎賞記憶訓練之後未進行任何操作的空白對照組(圖 14C)都未有習得性無助表現。

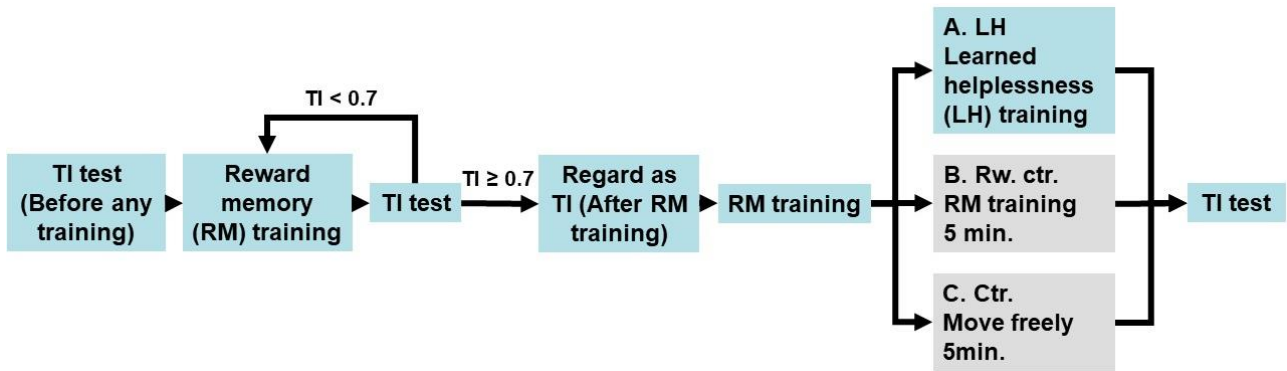


圖 13 以白光為獎賞測試果蠅習得性無助表現的光遺傳學訓練方式。圖 14 與圖 15 的三組果蠅完整訓練過程皆如本圖所示。

表 10 以白光為獎賞測試果蠅習得性無助表現的光遺傳學訓練結果

不同階段之 TI \ 實驗組別	習得性無助訓練組(LH)	成功追求獎賞對照組(Rw. ctr.)	空白對照組(Ctr.)
未進行任何訓練前	0.25 ± 0.07	0.18 ± 0.07	0.14 ± 0.07
甫進行完獎賞記憶訓練後	0.85 ± 0.04	0.82 ± 0.05	0.80 ± 0.05
特定處理後	0.15 ± 0.06	0.75 ± 0.04	0.80 ± 0.04

註：本表對應圖 14，表中標示 mean±SEM (n≥5)。

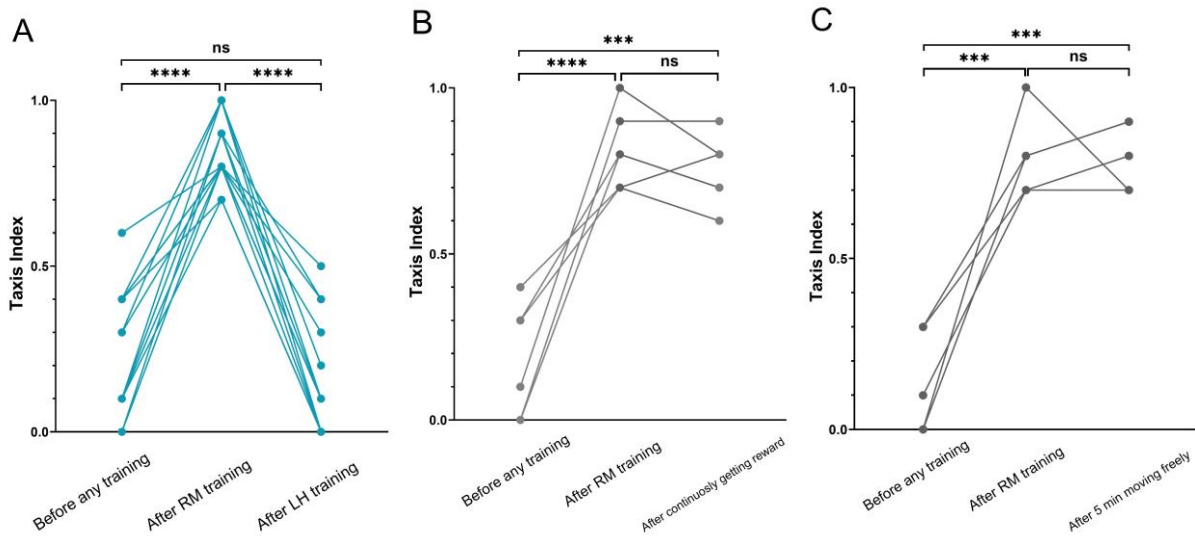


圖 14 以白光為獎賞測試果蠅習得性無助表現的光遺傳學訓練結果。所有果蠅皆為 *273,cha-Gal80>CsC-mCh*、6~8 天大、飢餓約 2 天、攝食 3 天的 trans-retinal，訓練在行為實驗房(Booth)日光燈下進行。A. 實驗組(LH)，整個過程如下：果蠅在被置於培養皿下便馬上進行一次 TI 測試(**Before any training**)，接者進行白光獎賞記憶訓練，完成獎賞記憶訓練後進行第二次 TI 測試(**After RM training**)，之後再進行一次白光獎賞記憶訓練以消除 TI 測試對果蠅獎賞記憶可能造成的影響，並馬上進行習得性無助訓練，完成後進行最後一次 TI 測試(**After LH training**) (n=15)。B. 持續成功追求獎賞之對照組(Rw. ctr.)，整個過程大致與 A 相同，只是原 LH training 的步驟改為 5 分鐘的 RM training (n=6)。C. 空白對照組(Ctr.)，整個過程大致與 A 相同，只是原 LH training 的步驟改為不進行任何操作 5 分鐘 (n=5)。A、B、C 三組的完整訓練過程如圖 13 所示。圖中標示所有數據訓練前、後的 TI 改變(兩點連線)，若有相同數據則圖形重疊，使用 RM one-way ANOVA 及 *post hoc* Tuckey's multiple comparisons test。\*\*\*p<0.001 \*\*\*\*p< 0.0001。

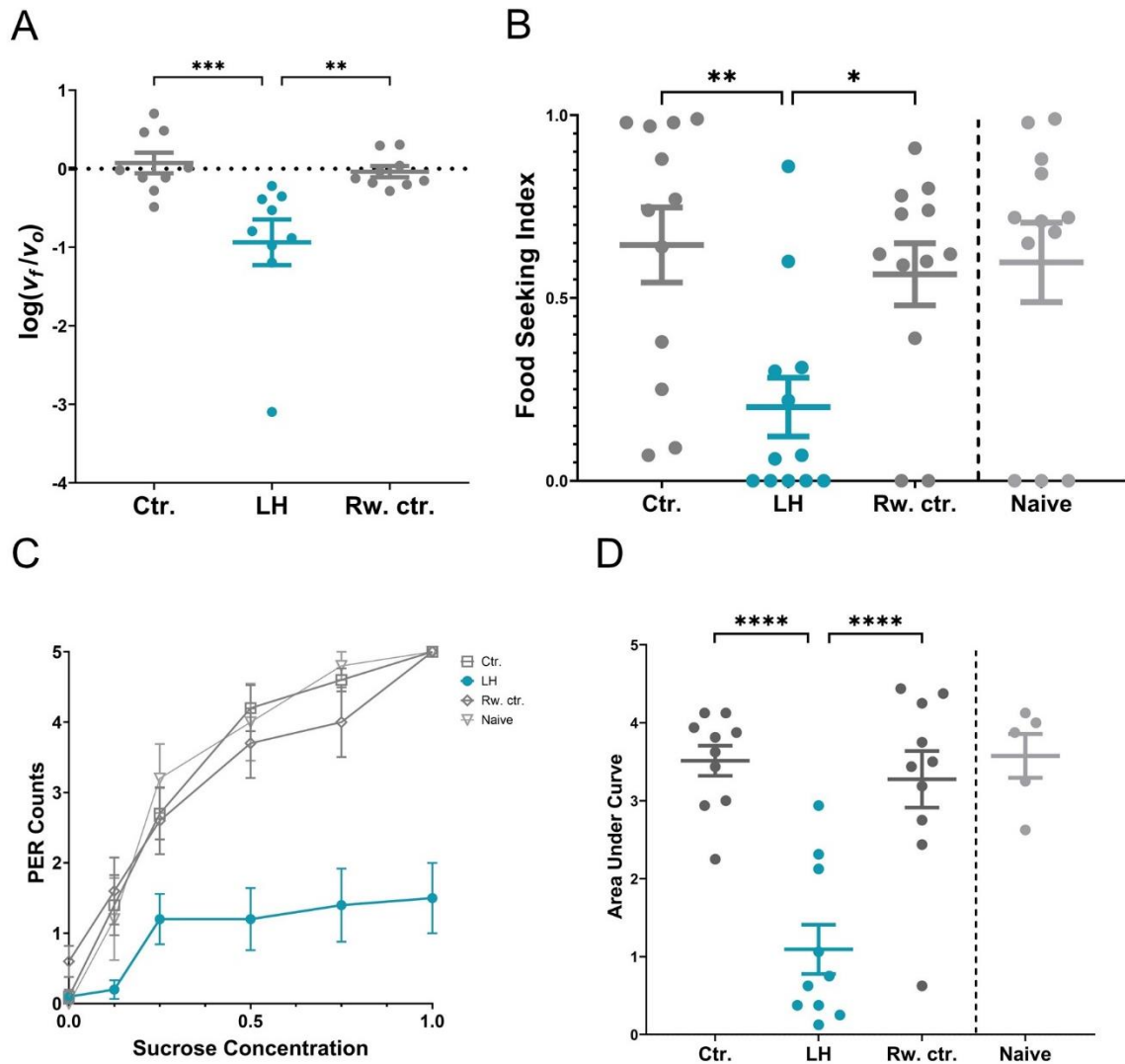
## 九、習得性無助個體的其他異常行為表現

經過對習得性無助訓練組以及對照組的移動速度測試，我們發現習得性無助訓練組在訓練後，其移動速度的下降幅度顯著高於兩組對照組( $p=0.0004$ )(圖 15A)。另外經過習得性無助訓練組經過對習得性無助訓練組以及對照組的覓食測試，發現習得性無助訓練組在訓練後，其覓食表現顯著低於兩組對照組( $p=0.0041$ )(圖 15B)。經過對習得性無助訓練組以及對照組對不同濃度蔗糖 PER 測試，得到如圖 13C 的折線圖，分別計算各組數據折線圖下面積並比較，發現習得性無助組的曲線下面積(AUC)顯著低於兩組對照組( $p<0.0001$ )(圖 13D)。

**表 11 習得性無助個體的移動速度與覓食表現測試結果**

項目\實驗組別	空白對照組 (Ctr.)	習得性無助訓練組 (LH)	成功追求獎賞對照組 (Rw. ctr.)	無任何訓練組 (Naïve)
$\log(v_f/v_o)$	$0.0726 \pm 0.1309$	$-0.9378 \pm 0.2907$	$-0.0370 \pm 0.0709$	-
Food Seeking Index	$0.64 \pm 0.10$	$0.20 \pm 0.08$	$0.57 \pm 0.09$	$0.60 \pm 0.11$
PER Counts	0	$0.1 \pm 0.1$	$0.1 \pm 0.1$	$0.6 \pm 0.2$
	1/8	$1.4 \pm 0.4$	$0.2 \pm 0.1$	$1.6 \pm 0.5$
	1/4	$2.7 \pm 0.4$	$1.2 \pm 0.4$	$2.6 \pm 0.5$
	1/2	$4.2 \pm 0.3$	$1.2 \pm 0.4$	$3.7 \pm 0.5$
	3/4	$4.6 \pm 0.2$	$1.4 \pm 0.5$	$4.0 \pm 0.5$
	1	$5.0 \pm 0.0$	$1.5 \pm 0.5$	$5.0 \pm 0.0$
PER AUC	$3.5125 \pm 0.1932$	$1.0938 \pm 0.3175$	$3.2750 \pm 0.3624$	$4.7750 \pm 0.2250$

註：本表對應圖 15，表中標示  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  ( $n \geq 9$ )。



**圖 15 習得性無助個體的移動速度與覓食表現測試結果。**所有果蠅皆為 *273,cha-Gal80>CsC-mCh*、6~8 天大、飢餓約 2 天、攝食 3 天的 *trans-retinal*，訓練在行為實驗房(Booth)日光燈下進行。**A**。移動速度測試結果， $p=0.0009$ ，LH vs. Ctr.； $p=0.0049$ ，LH vs. Rw. ctr.。**B**。覓食測試結果， $p=0.0025$ ，LH vs. Ctr.； $p=0.0481$ ，LH vs. Rw. ctr.。**C~D** PER 測試結果(Naive  $n=5$ ；其餘  $n=10$ )，**C** 為不同訓練流程組別對各濃度蔗糖溶液的 PER 次數(共測試 5 次；蔗糖濃度以對飽和蔗糖溶液的相對濃度表示)；**D** 為各數據折線下面積的量化結果。**A~D** 各組條件如下：Ctr.：果蠅完成獎賞記憶訓練後置於相同環境中不進行任何訓練操作 5 分鐘；LH：果蠅完成獎賞記憶訓練後馬上進行習得性無助訓練；Rw. ctr.：果蠅完成獎賞記憶訓練後進行獎賞記憶訓練 5 分鐘；Naive：未進行任何訓練操作。Ctr.、LH 與 Rw. ctr.三組的完整訓練流程如圖 13 所示。圖中標示  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  及所有數據，**A** 及 **B** 使用 Kruskal-Wallis test 及 *post hoc* Dunn's multiple comparison test；**D** 使用 One-way ANOVA 及 *post hoc* Tuckey's multiple comparison test。\*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$  \*\*\*\* $p < 0.0001$ 。

## 十、討論

### (一) 酵母訓練花費時間上升的原因

實驗結果發現隨著嘗試攝食酵母次數的增加，果蠅的花費時間也上升，在沒有干擾的情況下，果蠅對同濃度酵母的攝食行為可持續數十分鐘之久，酵母訓練中果蠅的每一次嘗試攝食酵母都不過數秒，不足以使其飽足，因此排除飽足造成牠無覓食意願的可能性。

在酵母訓練中，食物在培養皿中的位置大致固定，因此在第二、三次嘗試攝食酵母後，食物尋找對花費時間之影響便沒那麼重要(從圖 7 中後續幾次嘗試攝食酵母花費時間大多比首次低也能推論)，再者，在實驗中我們觀察到，後幾次嘗試攝食酵母的花費時間較久，是因為果蠅的活動速度(locomotor velocity)很低，即幾乎沒有尋找食物的行為，而非不斷尋找卻無法找到食物，因此有很大的證據能支持我們排除果蠅因 yeast source 定位困難以至於無法做嘗試攝食酵母的可能性。

綜合一、二兩點、現有文獻(Yang, Z. et al., 2013 ; Vollmayr, B. et al., 2013 ; Batsching, S. et al., 2016; Fei, Y. et al., 2018)，以及實驗中的觀察，我們有非常大的信心能推論「在多次嘗試攝食大量酵母失敗後，果蠅進入了習得性無助的狀態，以至於後幾次嘗試攝食酵母之花費時間較前幾次上升」。

### (二) 酵母訓練之缺點

酵母訓練之缺點主要有二：第一，酵母的狀態改變可能影響了果蠅的追求動機；第二，環境狀況的改變可能影響了果蠅對酵母的追求。

縱然我們定量了酵母訓練中使用之酵母濃度，以期控制變因，但實驗中觀察發現，訓練後期 gadget 上的酵母水分有變少，即便我們為此調整了 gadget 的製作方式(原本並無用膠帶包裹整個紙片)以求水分不要被紙所吸收，仍無法完全遏止它變乾，由於果蠅比較喜歡水分高的酵母，訓練後期酵母水分的降低可能會造成它對果蠅的吸引程度降低，進而影響後幾次嘗試攝食酵母之花費時間。

酵母訓練將果蠅限制於一個幾乎密閉的倒蓋培養皿(蓋子)下，因此一定時間後，酵母的氣味應該會充滿整個空間，這可能造成果蠅的味覺疲勞，而使其對空間中酵母存在之意識感下降甚至消失，進而影響後幾次嘗試攝食酵母之花費時間。

### (三) 習得性無助之光遺傳學訓練的優點

光遺傳學方法優點在於全有全無，在沒有照光的情況下，果蠅不會感覺到任何有關食物或氣味的刺激，訓練環境也能較單純，不會有太大的改變，如此便解決了在酵母訓練中，酵母狀態(水分含量改變)、環境狀況(氣味擴散等)會造成訓練困難的因素，也可以避免抖動 gadget(在酵母訓練中)使果蠅產生驚嚇(程度也可能因個體而異)。此種訓練方式的刺激來源，就是單純的光訊號，如此將有利於我們控制獎賞訊號的有無。

### (四) 光遺傳學訓練成效

由白光點獎賞記憶持續時間測試可知，果蠅的獎賞記憶可持續 7 分鐘以上但未達 10 分鐘。而我們在進行習得性無助訓練所花費的時間為  $321.1 \pm 84.2$  秒 (標示 99.9% CI,  $n=47$ )，約為 4~7 分鐘，故白光點獎賞記憶消失並不能作為習得性無助訓練後，趨向白光獎賞(TI)顯著降低的解釋，果蠅在仍記得白光點獎賞作用下，其趨向白光獎賞的意願(TI)下降，代表果蠅產生了習得性無助的現象，再者，活動力與覓食表現降低，也體現了習得性無助的整體性消極行為表現，更進一步驗證光遺傳學習得性無助訓練的成功。

## 肆、 結論與未來應用

### 一、 結論

#### (一) 273, *cha-Gal80*>*CsC-mCh* 果蠅的神經與行為表現

透過免疫螢光染色，本研究得以確定 273-*GAL4*, *cha-GAL80* 在果蠅大腦中的表現狀況，如圖 7 所示。透過紅光偏好的測試，本研究驗證 273, *cha-Gal80*>*CsC-mCh* 果蠅對紅光的偏好性，也觀察到 273, *cha-Gal80*>*CsC-mCh* 果蠅在接受到紅光帶來獎賞時的行為表現包括：靜止、麻痺(paralyzed，即倒下或仰翻)、振翅等。

#### (二) 獎賞記憶訓練成效佳

透過白光點獎賞記憶訓練，本研究成功讓 273, *cha-Gal80*>*CsC-mCh* 果蠅建立由視覺感受到的白光點與獎賞的連結，並證明此獎賞記憶能持續 7 分鐘以上但未達 10 分鐘。

#### (三) 光遺傳學訓練成功使 273, *cha-Gal80*>*CsC-mCh* 果蠅表現習得性無助

透過光遺傳學訓練，我們成功使 273, *cha-Gal80*>*CsC-mCh* 果蠅表現習得性無助，並以 TI 的顯著下降來作為習得性無助表現的定量評估方式。

#### (四) 習得性無助個體的其他異常行為表現

透過光遺傳學訓練產生習得性無助的個體，同時也表現了低靡的活動力、較低的覓食表現攝食動機。

### 二、 未來應用

#### (一) 廣泛測試不同殖系果蠅之光遺傳學習得性無助訓練效果

本研究選用 273-*Gal4* 殖系果蠅進行光遺傳學習得性無助的訓練與研究係因其獎賞刺激之強烈，但僅以單一特殊殖系果蠅進行研究到底不如野生型具有整體代表性(由於我們選用的特殊殖系可能具有會影響本研究之基因背景)，在此兩難下，本研究想到的折衷方法是：選用其他不同於 273-*Gal4*，也能使果蠅產生正向訊號的殖系，例如表達在蔗糖受器的殖系(*Gr5a-Gal4*、*Gr43a-Gal4*.....)進行相同的訓練，讓本研究建立之光遺傳學習得性無助訓練更為嚴謹完備。

#### (二) 習得性無助個體生理表現異常之研究

在哺乳類模式中，習得性無助個體表現了睡眠與進食狀況變差、潰瘍以及免疫力下



降等生理異常(Yang, Z. et al., 2013)，目前針對果蠅習得性無助個體的異常表現研究(不論先前研究或是本研究)，皆著重於行為層面，若能針對果蠅模式，產生習得性無助後的異常生理表現進行研究，對我們掌握習得性無助又將是更進一步。本研究目前想到可測試的生理表現包括：消化狀況、滲透壓調節能力、神經健康狀況等。

### (三) 果蠅習得性無助神經機制之研究

本研究已完善建立果蠅的光遺傳學習得性無助訓練方式，未來能研究習得性無助表現的神經機制，這方面研究會先從神經傳遞物(例如 dopamine、octopamine)及特定腦區或神經群(例如 mushroom body、PPL1、PAM、Calyx)對習得性無助的影響之檢視開始，由於 Gal4/UAS system 已用於光遺傳學殖系之設置，因此特定神經或神經傳遞物的阻斷需要以另一工具——LexA/LexAop system 來完成，神經的阻斷能利用 shibirets1 蛋白，在高於 29°C 下，shibirets1 會透過使突觸無法釋放囊泡的方式來可逆性地阻斷神經的傳遞，shibirets1 的阻斷與恢復都甚是快速，移入高溫環境或移入室溫環境後 2 分鐘內便能使神經阻斷或恢復(Lin, S. et al., 2015)，這讓我們能透過移換操作環境溫度的方式，來精準控制果蠅特定神經阻斷的時機點，確保只有習得性無助訓練階段受到神經阻斷的影響。

找到會影響習得性無助表現的神經傳遞物或特定腦區後，便能進行更進一步的神經研究，確認是哪些神經元真正參與了習得性無助的形成或抑制，並在完整地研究後建立出習得性無助的神經網路機制，這部分研究的困難點在於：由於我們往後只能使用 LexA/LexAop system 來進行特定神經群的標定，但 LexA/LexAop 的發展歷程短於 Gal4/UAS，即 LexA 殖系種類較 Gal4 為少，目前已有許多 Gal4 殖系只標定數個甚至是單個神經元，但 LexA 殖系卻否，因此若欲進行精準神經研究，勢必要解決這個問題，可行的解決辦法是將 273-Gal4 改用 237-LexA，若要精準將 LexA gene 插入與 273-Gal4 的 Gal4 gene 相同的位置，適用的工具為 CRISPR/Cas9，但它的經濟與時間成本非是我們所能負荷。

## 伍、 參考文獻資料

- 一、張春興（主編）（1991）。張氏心理學辭典（初版）。臺北市：東華書局。
- 二、Batsching, S., Wolf, R., & Heisenberg, M. (2016). Inescapable Stress Changes Walking Behavior in Flies -Learned Helplessness Revisited. *Plos One*, *11*(11): e0167066.  
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0167066>
- 三、Brown, G. E., Mitchell, A. L., Peercy, A. M., & Robertson, C. L. (1996). Learned Helplessness in *Drosophila Melanogaster*? *Psychological Reports*, *78*(3): 962–962.  
<http://doi.org/10.2466/pr0.1996.78.3.962>
- 四、Burke, C. J., Huetteroth, W., Oswald, D., Perisse, E., Krashes, M. J., Das, G., Gohl, D., Silies, M., Certel, S., & Waddell, S. (2012). Layered Reward Signalling Through Octopamine and Dopamine in *Drosophila*. *Nature*, *492*(7429): 433-437. <http://doi.org/10.1038/nature11614>
- 五、Fei, Y., Zhu, D., Sun, Y., Gong, C., Huang, S., & Gong, Z.(2018). Repeated Failure in Reward Pursuit Alters Innate *Drosophila* Larval. *Neuroscience Bulletin*, *34* (6): 901-911.  
<http://doi.org/10.1007/s12264-018-0248-0>
- 六、Jovanic, T., Schneider-Mizell, C. M., Shao, M., Masson, J.-B., Denisov, G., Fetter, R. D., Mensh BD, Truman JW, Cardona A, & Zlatić, M. (2016). Competitive Disinhibition Mediates Behavioral Choice and Sequences in *Drosophila*. *Cell*, *167*(3): 858–870.  
<http://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.009>
- 七、Kitamoto, T. (2002). Conditional Disruption of Synaptic Transmission Induces Male-Male Courtship Behavior in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(20), 13232–13237. <http://doi.org/10.1073/pnas.202489099>
- 八、Lau, C. K. S., Jelen, M., & Gordon, M. D. (2021). A Closed-Loop Optogenetic Screen For Neurons Controlling Feeding in *Drosophila*. *G3-Genes Genomes Genetics*, *11*(5): jkab073.  
<http://doi.org/10.1093/g3journal/jkab073>
- 九、Liu, C., Plaçais, P.-Y., Yamagata, N., Pfeiffer, B. D., Aso, Y., Friedrich, A. B., Siwanowicz, I., Rubin, G. M., Preat, T., Tanimoto, H. (2012). A Subset of Dopamine Neurons Signals Reward

for Odour Memory in *Drosophila*. *Nature*, 488(7412): 512–516.

<http://doi.org/10.1038/nature11304>

- 十、 Lin, S., Oswald, D., Chandra, V., Talbot, C., Huetteroth, W., & Waddell, S. (2014). Neural Correlates of Water Reward in Thirsty *Drosophila*. *Nature Neuroscience*, 17 : 1536–1542.  
<https://doi.org/10.1038/nn.3827>
- 十一、 Lin, S., Oswald, D., & Waddell, S. (2015). Light, Heat, Action: Neural Control of Fruit Fly Behaviour. *Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences*, 370 (1677):20140211. <http://doi.org/10.1098/rstb.2014.0211>
- 十二、 Mao, Z. & Davis, R. L. (2009). Eight Different Types of Dopaminergic Neurons Innervate the *Drosophila* Mushroom Body Neuropil: Anatomical and Physiological Heterogeneity. *Frontiers in Neural Circuits*, 3. <http://doi.org/10.3389/neuro.04.005.2009>
- 十三、 Reece, J. B., Wasserman, S. A., Urry, L. A., Minorsky, P. V., Cain, M. L., & Jackson, R. B. (2013). *Campbell Biology* (10th ed.). London, UK: Pearson Education.
- 十四、 Rodríguez, A. V., Didiano, D., & Desplan, C. (2012) Power Tools for Gene Expression and Clonal Analysis in *Drosophila*. *Nature Methods*, 9: 47–55. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1800>
- 十五、 Scheidler, N. H., Liu, C., Hamby, K. A., Zalom, F. G., & Syed, Z. (2015). Volatile codes: Correlation of Olfactory Signals and Reception in *Drosophila*-Yeast Chemical Communication. *Scientific Reports*, 5(1): 14059. <http://doi.org/10.1038/srep14059>
- 十六、 Stern, U., Srivastava, H., Chen, H.-L., Mohammad, F., Claridge-Chang, A., & Yang, C.-H. (2019). Learning a Spatial Task by Trial and Error in *Drosophila*. *Current Biology*, 29 (15): 2517-2525. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2019.06.045>
- 十七、 Shiraiwa, T., & Carlson, J. R. (2007). Proboscis Extension Response (PER) Assay in *Drosophila*. *Journal of Visualized Experiments*, (3): e193. <http://doi.org/10.3791/193>
- 十八、 Tsao, C.-H., Chen, C.-C., Lin, C.-H., Yang, H.-Y., & Lin, S. (2018). *Drosophila* Mushroom Bodies Integrate Hunger and Satiety Signals to Control Innate Food-Seeking Behavior. *eLife*, 7: e35264. <http://doi.org/10.7554/elife.35264>
- 十九、 Vollmayr, B., & Gass, P. (2013). Learned Helplessness: Unique Features and Translational

Value of a Cognitive Depression Model. *Cell and Tissue Research*, 354(1): 171–178.

<http://doi.org/10.1007/s00441-013-1654-2>

二十、 Yang, Z., Bertolucci, F., Wolf, R., & Heisenberg, M. (2013). Flies Cope with

Uncontrollable Stress by Learned Helplessness. *Current Biology*, 23(9): 799–803.

<http://doi.org/10.1016/j.cub.2013.03.054>

## 【評語】 050008

1. 此研究為以果蠅為模式生物，進行動行為習得性無助行為，以進行神經學研究。為連續性研究，研究邏輯清晰，也具體討論其結果，對後續研究也說明。
2. 建議應說明建立高成效的果蠅成蟲光遺傳學習得性無助模式之未來的應用，除了解果蠅神經網絡機制外，是否有其他延伸。
3. 此研究包含酵母訓練、紅光偏好測試和白光獎賞偏好觀察等部分，整體設計難度頗高。酵母訓練部分主要可獲得飢餓最佳時間和嘗試次數最佳次數等。實驗結果「由於酵母源與訓練環境的不穩定性(詳見討論)，我們改以光遺傳方式進行試驗。…」，然而在討論中未說明為何產生不穩定性。
4. 數值資料的紀錄清楚，各項實驗的 N 偏差大。
5. 現階段實驗的設計與未來的方向無連結性，宜在此現階段結果設計深入研究項目，英文報告良好。