

# 中華民國第 64 屆中小學科學展覽會

## 作品說明書

---

高級中等學校組 農業與食品學科

第二名

052207

「蜂」衣足「食」-食用蜂王乳對工蜂體內代謝的影響

學校名稱：桃園市立武陵高級中等學校

作者：  高二 黃宣琪  高二 陳寬綸	指導老師：  林碧晶
---------------------------------	------------------

關鍵詞：蜂王乳、工蜂、代謝

## 摘要

本研究以蜂王乳 (Royal jelly) 作為研究對象，探討餵食蜂王乳之後工蜂 (*Apis mellifera*) 的壽命變化以及脂質與蛋白質的代謝活性變化。研究結果顯示餵食蜂王乳一個月後的工蜂存活率約為一般工蜂的三至四倍。而餵食蜂王乳的工蜂體內的非酯化脂肪酸 (Non-Esterified Fatty Acids, NEFA) 約為一般工蜂的兩倍，且脂肪酸合成酶的活性較一般工蜂也有顯著提升，合理推測出在餵食蜂王乳之後，工蜂對於脂質的需求量增加，因此主動合成了脂肪酸，造成體內的脂質濃度高升。此外，餵食蜂王乳的工蜂體內的蛋白質濃度約為一般工蜂的兩倍，且 S6 基因 mRNA 表現量較一般工蜂也有所提升，由此推論出蜂王乳會對工蜂體內的蛋白質代謝產生影響，且是由工蜂體內主動合成。

# 壹、前言

## 一、研究動機

蜂王乳近年來在各種養生美容的廣告中嶄露頭角，被譽為養顏美容、延緩老化的滋補聖品，而蜂王乳的特殊之處在於它的營養成分非常豐富，包含多種脂肪酸、醣類、礦物質、維生素和蛋白質，並且被認為是較為天然的保健方式，於是我們對蜂王乳的功效產生了興趣。但由於我們不可能採用人體實驗，所以在閱讀眾多文獻後，我們發現蜜蜂（*Apis mellifera*）中的工蜂是比較適合進行研究的模式生物，除了因為蜂王乳原本即為工蜂所分泌出的物質，而較不易對工蜂產生毒性或其他副作用外，也因工蜂以群體生活為特徵，擁有較複雜的社會性行為，並且易於養殖，生命週期短（野生工蜂之壽命約為一個月），基因體已完成定序，顯示部分基因組與脊椎動物相似。根據文獻，工蜂主要代謝醣類、蛋白質和脂質來產生能量，於是我們決定就此三面向展開蜂王乳對於工蜂體內代謝影響的研究。但由於時間考量，我們無法同時完成此三面向的研究，因此我們最終決定將重心放在脂質與蛋白質研究上，希望藉此一窺蜂王乳對於工蜂體內代謝的影響，並由此進一步推論食用蜂王乳在人體內能達到的功效。

## 二、文獻回顧

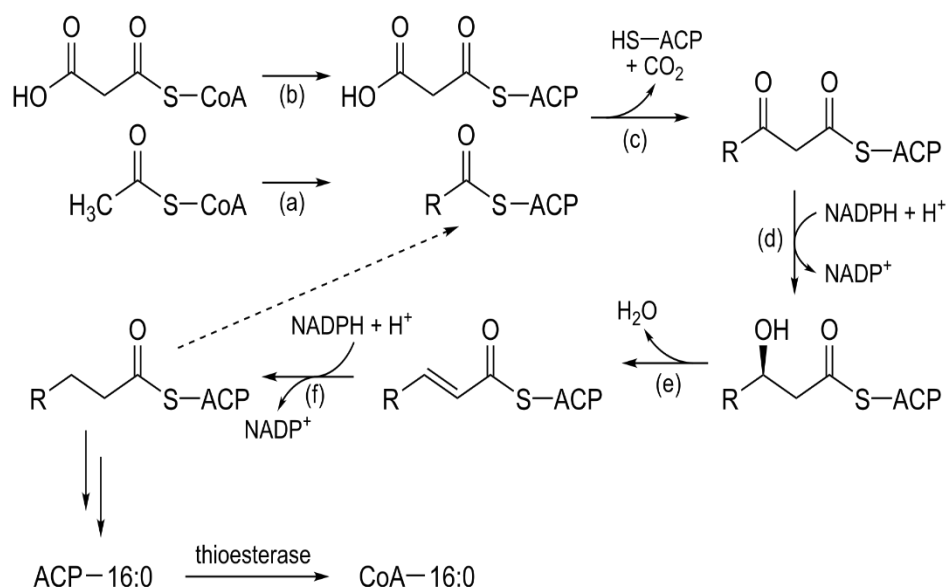
### （一）蜜蜂（*Apis mellifera*）

屬於膜翅目（*Hymenoptera*），蜜蜂科（*Apidae*），蜜蜂具有高度的社會進化，群內有明顯的階級系統，分為蜂王、雄蜂及工蜂三種。為取得本身所需食物，工蜂會整天出入花叢採蜜，此種工作可為數百種植物完成授粉。蜜蜂是繼果蠅及蚊之後第三種有基因圖譜的昆蟲<sup>[1]</sup>。牠們生理節律的基因組與脊椎動物相似，多於昆蟲。另外，控制酶的基因也較接近脊椎動物<sup>[2]</sup>。

### （二）脂肪酸合成酶的介紹及作用原理

脂肪酸合成酶是負責催化脂肪酸合成的一類酵素，使生物體得以合成脂肪酸，並用於建

構細胞膜、產生能量等生理功能<sup>[3]</sup>。



圖一、大腸桿菌藉由脂肪酸合成酶 II 合成飽和直鏈脂肪酸

(圖片來源：維基百科)<sup>[4]</sup>

在 37°C 環境下，提供脂肪酸合成酶作用時所需之基質 malonyl-CoA、acetyl-CoA 及 NADPH 等。利用脂肪酸合成酶反應時需消耗 NADPH 而造成 340nm 吸光值的差異，即可求得細胞質中脂肪酸合成酶的酵素活性<sup>[5]</sup>。

### (三) 布拉德福蛋白質定量法 (Bradford protein assay)

由英國生物化學家 Ernest Thomas Bradford 於 1976 年所發明，用於測定蛋白質溶液中的蛋白質濃度。當考馬斯亮藍 (Coomassie Brilliant Blue G-250) 與蛋白質結合，即形成藍色的複合物，且其顏色變化程度和蛋白質濃度呈線性相關。利用 ELISA reader 測定 595 nm (此波長下會有較高的吸收，以便偵測) 的吸光值，依據標準蛋白質濃度及其吸光值繪製標準曲線圖，再依據標準曲線圖即能估計樣品之蛋白質濃度<sup>[6]</sup>。這種分析方法在生物化學和分子生物學研究中廣泛應用，因其原理簡單、靈敏，且適用於各種類型的蛋白質。

#### （四）蜂王乳（Royal Jelly）

蜂王乳是工蜂下嚙腺分泌的一種乳狀物質<sup>[7]</sup>，將成為蜂王（可育的雌性）的幼蟲被大量餵食蜂王漿分泌物，以刺激蜂王的生長和發育，此外也用於餵養蜂巢中發育成雄蜂（雄性）或工蜂（不孕雌性）的幼蟲，但僅於出生三天內餵食，蜂王乳中刺激和調節幼蟲發育的活性成分被認為是由一系列「主要蜂王乳蛋白」（MRJP）影響。這些 MRJP 改變 DNA 甲基化，導致負責幼蟲發育的基因表現發生表觀遺傳、營養驅動的變化<sup>[8]</sup>。蜂王乳因其保護健康的特性而在人類醫學中有著悠久的歷史，蜂王乳中的脂質主要由非酯化脂肪酸（Non-Esterified Fatty Acids, NEFA）組成，且大多數為中鏈脂肪酸。除了脂肪酸外，蜂王乳中的脂質還含有少量的類固醇。蜂王乳中的脂質可用作預防性藥物，其功能包括潛在的癌症生長抑制劑、免疫系統調節劑、更年期替代療法、皮膚老化保護劑等。綜上所述，有證據表明，蜂王乳的健康保護特性可以部分歸因於蜂王乳中脂質的作用<sup>[9]</sup>。

### 三、研究目的

- （一） 研究食用蜂王乳對於工蜂壽命的影響
- （二） 探討蜂王乳對於工蜂脂肪代謝的影響
- （三） 探討蜂王乳對於工蜂蛋白質代謝的影響




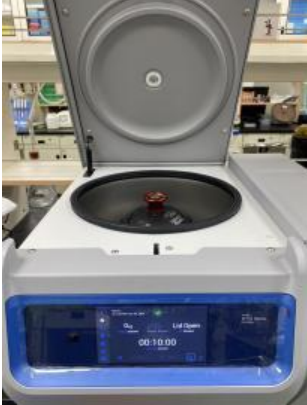


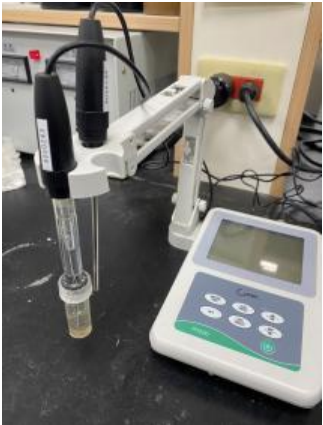


## 二、研究設備與器材


### 一、蜜蜂來源

榮錦養蜂農園

### 二、研究設備

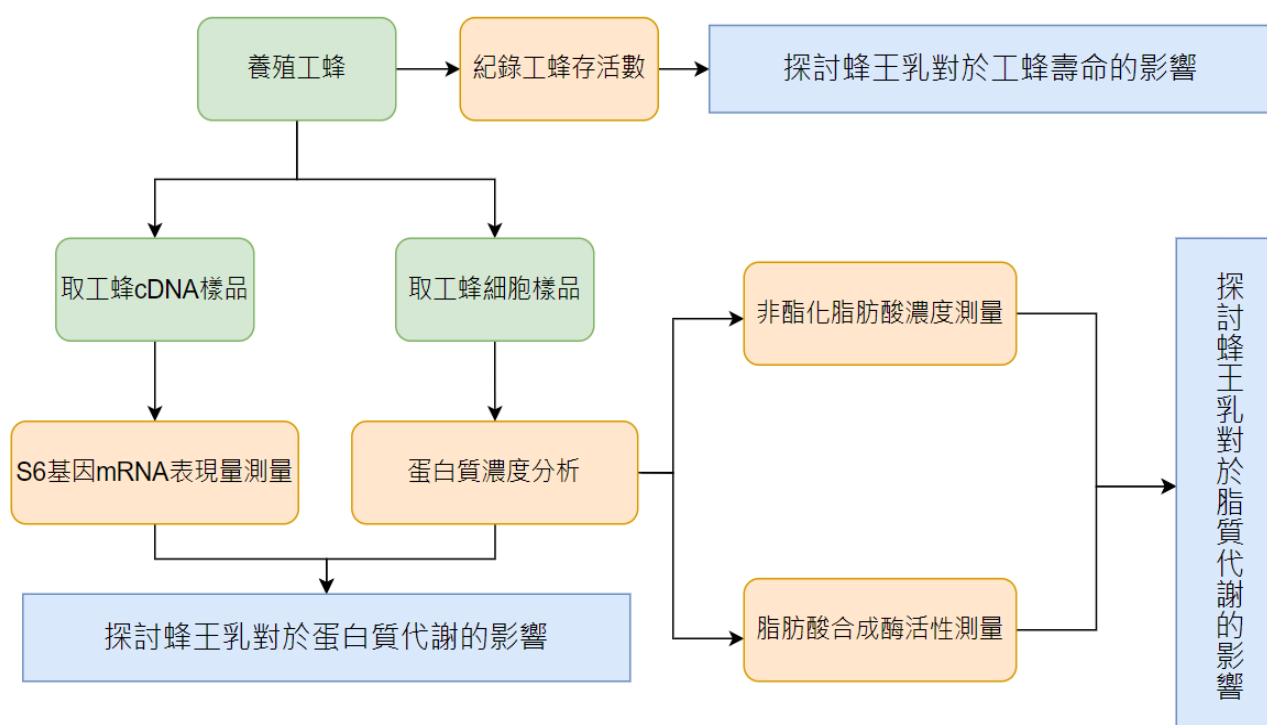
表一、實驗所需設備列表（圖片來源：作者自攝）

<p>設備名稱 (廠商)</p>	<p>蜜蜂養殖恆溫箱 (NKsystem)</p> 	<p>實驗用恆溫箱 (Yihder)</p> 	<p>研究級解剖顯微鏡 (Leica)</p> 
<p>設備名稱 (廠商)</p>	<p>離心機 (ThermoFisher)</p> 	<p>微量移液管 (Gilson)</p> 	<p>試管振盪器 (Digisistem)</p> 
<p>設備名稱 (廠商)</p>	<p>桌上型水質測量儀 (Cleaninst.)</p> 	<p>分光光度儀 (BioTek)</p> 	<p>微量離心機 (GeneReach)</p> 

設備名稱 (廠商)	離心機 (Sorvall) 	螢光定量 PCR 儀 (Bio Rad) 	熱迴圈儀 (Bio Rad) 
--------------	---	---	--

## 參、研究過程或方法

### 一、實驗架構圖



圖二、實驗架構圖（作者自製）

## 二、工蜂養殖

我們在工蜂幼年時將工蜂（向蜂場購入）抓入養殖器內飼養，每 70 隻為一盒，抓取八盒，分為對照組和實驗組各 4 盒。每日餵食並登記盒內工蜂數量，每次養殖持續一個月以上後的工蜂方可用來做實驗。

### （一）飼料置備：

對照組（Ctrl）：在 50ml PP 離心管中加入 0.83g 的花粉，將花粉壓碎，並加蜂蜜至 50ml，最後攪拌均勻。

實驗組（RJ）：在 50ml PP 離心管中加入 0.83g 的花粉，將花粉壓碎，加入 2.808g 的乾蜂王乳，加入 4.212g 的水，加蜂蜜至 50ml，最後攪拌均勻。

### （二）餵食工蜂：

工蜂一天的蜂蜜食用量固定為 0.021g ( $15\mu\text{l}$ )

每日餵食量 (g) = 盒內工蜂數  $\times$  0.021

1. 將飼料（依照計算結果）加入餵食器。
2. 將盒內死亡工蜂之屍體取出，並登記死亡工蜂數。
3. 在下方盤子中加入飲用水。

## 三、脂質代謝

### （一）樣本置備

1. 配置 Honey bee saline buffer：

(1)加入 156.4 mM NaCl 9.15g、2.7 mM KCl 0.2g、1.8 mM  $\text{CaCl}_2$  0.2g、22.2 mM Glucose 4g 後倒入 80 ml 水並攪拌均勻。

(2)以高濃度  $\text{NaHCO}_3$  滴定至  $\text{pH} = 7.3$ ，並加水至 100ml，使最終溶液滲透壓等於 382 mosmol。

2. 自蜂箱抓取工蜂，於冰中低溫處理使之昏迷。取一包裹鋁箔紙的容器加入冰塊，讓整個採細胞的過程保持低溫，以免細胞活性喪失。



3. 將工蜂放在容器上，先以鑷子自尾端取出整條消化道，再將頭胸部和腹部分離，自連接處夾出蜜囊，接著沿縫隙將工蜂腹部分為上下兩片，分別浸入 Honey bee saline buffer（滲透壓和工蜂細胞相近的緩衝溶液，類似工蜂的生理食鹽水）稍微清洗並使細胞維持濕潤。
4. 以鑷子輕輕夾除附於腹部內面的氣囊，再用刀具 45 度傾斜刮出腹部細胞，最後將細胞收集到裝有 49  $\mu$ l RIPA Solution 和 1  $\mu$ l Protein Inhibitor 的 1.5ml 微量離心管中。
5. 將離心管置於冰上，以研磨機研磨 1 分鐘，打碎細胞使胞內蛋白質釋出。完成後放入離心機中，以攝氏 4 度、5000g 離心 10 分鐘分離不需要的胞器和雜質。
6. 離心後取上清液到新的離心管中。（為 sampleA）

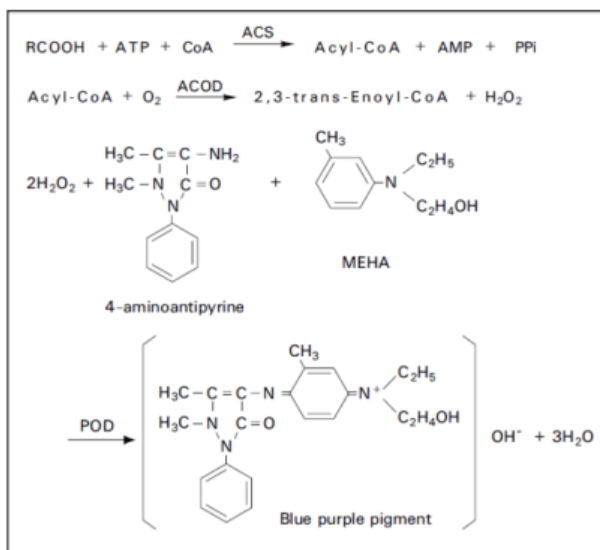
## （二）蛋白質定量

1. 將 sampleA 以 50X 稀釋（sample：雙蒸餾水（ddwater）= 1：49）  
將 1  $\mu$ l sampleA + 49  $\mu$ l ddwater 加入小 PCR 離心管，為 sampleB。
2. 將原濃度為 2mg / ml 牛血清白蛋白（bovine serum albumin , BSA）稀釋成 7 個不同濃度的標準液，分別為 0（ddwater）、20、40、80、120、160、200 ng/ $\mu$ l。
3. 取 96 孔培養盤放上 strips，7 個濃度的 BSA 標準液、sampleB 各滴定 20  $\mu$ l（二重複）。接著在避光環境下，每孔加入 200  $\mu$ l 蛋白定量試劑（Coomassie Brilliant Blue）。
4. 消除產生的氣泡，並放入避光盒反應 10min。
5. 使用分光光度儀（波長 595nm）搭配軟體 lab Gen5 測量蛋白質濃度。
6. 利用標準液測得的吸光值，並做一條回歸直線（ $R^2$  值須大於 0.98），再利用此直線換算 sampleB 的蛋白質濃度，乘以 50 倍即為 sampleA 的原始濃度。
7. 利用電腦計算，將實驗組（RJ）稀釋至與對照組（Ctrl）同濃度（訂為 sampleC），避免因實驗組蛋白質含量較高而遮蔽光線，影響吸光值的測量。

### （三）測量非酯化脂肪酸（Non-Esterified Fatty Acids , NEFA ）含量

#### 1. 原理：

樣品中的遊離脂肪酸（NEFA）在輔酶 A（CoA）和腺苷三磷酸（ATP）存在下，通過醯基輔酶 A 合成酶（Acyl CoA Synthetase ,ACS）的作用產生醯基輔酶 A（Acyl CoA）、腺苷二磷酸（AMP）和焦磷酸鹽（PPi）。生成的醯基輔酶 A 在醯基輔酶 A 氧化酶（Acyl CoA Oxidase ,ACOD）的作用下被氧化，同時產生 2,3-反式烯醯輔酶 A（2,3, -trans-Enoyl-CoA）和過氧化氫（H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）。生成的過氧化氫在過氧化物酶（Peroxidase ,POD）的作用下定量氧化縮合 MEHA 和 4-氨基安替比林（4-aminoantipyrine），生成藍紫色加和物。通過測量這種藍紫色加和物的吸光值，可以確定樣品中 NEFA 的濃度。（Randox 廠商提供）



圖三、非酯化脂肪酸作用原理（Tania Emmanuelle Torchon, 2013）<sup>[10]</sup>

#### 2. 步驟：

##### (1)試劑製備：

R1a：Phosphate Buffer      0.04 mol/l, pH 6.9

Magnesium Chloride      3 mmol/l

Surfactant

R1b：Acyl Coenzyme A Synthetase       $\geq 0.3$  U/ml

Ascorbate oxidase       $\geq 1.5$  U/ml

Coenzyme A      0.9 mmol/l

ATP      5.0 mmol/l

4-aminoantipyrine      1.5 mmol/;

R2a : Phenoxyethanol      0.3% ( w/v )

Surfactant

R2b : Maleimide      10.6 mmol/l

R2c : Acyl Coenzyme A Oxidase       $\geq 10$  U/ml

Peroxidase      7.5U/ml

TOOS      1.2 mmol/l

( TOOS = N-ethyl-N-(2hydroxy-3-suiphopropyl) m-toluidine )

藥品一：10ml R1a + R1b

藥品二：( R2a+R2b ) ( 先混和均勻 ) +R2c

(2)取一新 96 孔培養盤，放上 strips，每三孔為一組，每組的第一孔加入雙餾水，第二孔加入標準液，第三孔加入 sampleC，( 皆為  $4\mu\text{l}$  )，接著在三孔都加入  $80\mu\text{l}$  的藥品一（全程避光）。

(3)放入恆溫箱（37 度）反應 10 分鐘，反應完成後，在每孔中加入  $160\mu\text{l}$  的藥品二，最後再次放入 37 度恆溫箱反應 10 分鐘。

(4)送入分光光度儀測量吸光值（波長 550nm）。

(5)待實驗結束，帶入公式即可得到實驗結果。

#### （四）測量脂肪酸合成酶（Fatty Acid Synthase , FAS）活性

##### 1. 原理：

本試驗設計為提供脂肪酸合成酶作用時所需之基質丙二醯輔酶 A（malonyl-CoA）、乙醯輔酶 A（acetyl-CoA）及 NADPH 等。利用脂肪酸合成酶反應時需消耗 NADPH 而造成 340nm 吸光值的差異，帶入公式後求得細胞質中脂肪酸合成酶的活性。

## 2. 步驟：

- (1)取另一 96 孔培養盤，放上 strips，在每一孔中分別加入 sampleC  $33.3\ \mu\text{l}$ 、 $0.2\text{M}$  pH=7.1 磷酸鉀緩衝溶液 (Potassium phosphate buffer)  $163.3\ \mu\text{l}$ 、 $20\text{mM}$  二硫蘇糖醇 (Dithiothreitol, DTT)  $16.7\ \mu\text{l}$ 、 $0.25\text{mM}$  乙醯輔酶 A (Acetyl-CoA)  $20\ \mu\text{l}$ 、 $60\text{mM}$  乙二胺四乙酸二鈉 (EDTA-2Na)  $16.7\ \mu\text{l}$ 、 $0.39\text{mM}$  丙二醯輔酶 A (Malonyl-CoA)  $33.3\ \mu\text{l}$ 。
- (2)每一孔都加入上述藥品後，最後再加入  $6\text{mM}$  NADPH  $16.7\ \mu\text{l}$ 。
- (3)送入分光光度儀中測量吸光值（設定攝氏 37 度、波長 340nm、每 30 秒讀取一次，共耗時五分鐘）。
- (4)待測量結束，將吸光值變化量帶入公式中即可得到酵素活性。

## 四、蛋白質代謝

### （一）抽取工蜂 RNA

1. 開始前用 RNase eraser 擦拭實驗桌，預冷離心機。
2. 將工蜂置於冰上昏迷後取出，從蜂針處將內臟拉出後將頭胸部與腹部分離。把腹部上下片以 DEPC water 清洗後清除氣囊放在  $0.5\ \text{ml}$  trizol 中並置於冰上。
3. 在冰上用剪刀剪碎再用研磨棒研磨 1 min，休息 30 sec，再研磨 1 min，完成後加入  $0.5\text{ml}$  trizol。
4. 加入  $0.2\ \text{ml}$  chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1)，攪拌混合後置於冰上 5~10 min。
5. 以  $4^{\circ}\text{C}$  14000 rpm 離心 15 min。(離心後分三層，上層水層含 RNA，中層為基因和蛋白質，下層為組織)。
6. 取上清液到新的離心管，加入  $500\ \mu\text{l}$  isopropanol，上下翻轉，在室溫靜置 10min。
7. 以  $4^{\circ}\text{C}$  14000 rpm 離心 10min。去除上清液。
8. 加  $1\ \text{ml}$  冰於  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱的 75% 酒精。
9. 以  $4^{\circ}\text{C}$  14000 rpm 離心 5 min。去除上清液。

10. 真空抽乾直到樣本完全乾燥，以 20 $\mu$ l DEPC water 或 RNase- Free water 回溶。放入-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

## （二）測 RNA 濃度

1. 使用 Biotek cytation 5M，取出 plate 後開啟電腦，啟動 gen 5，選擇 microspots、RNA，下方框出實驗所需的點。
2. 在拭鏡紙噴上酒精擦拭玻璃與 microspot 部分，再將酒精擦乾。
3. 將 2 $\mu$ l nuclease free water 點在需要使用的點上後跑 blank，若結果為綠色表示成功，紅色則重跑。
4. 再次以酒精擦拭後點上 2 $\mu$ l RNA 樣本，接著儲存結果。

## （三）合成互補去氧核糖核酸(Complementary deoxyribonucleic acid, cDNA)

1. 以濃度計算  $X = 1000/\text{RNA}(\text{ng}/\mu\text{l})$ 。
2. 在每管 PCR eppendorf 中加入 5 $\times$  iscript reaction mix 4 $\mu$ l、Iscrip reverse transcriptase 1 $\mu$ l、Nuclease free water (15-X)  $\mu$ l、RNA template X  $\mu$ l。
3. 使用 T100 Thermal Cycler 跑 PCR，完成後放入-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

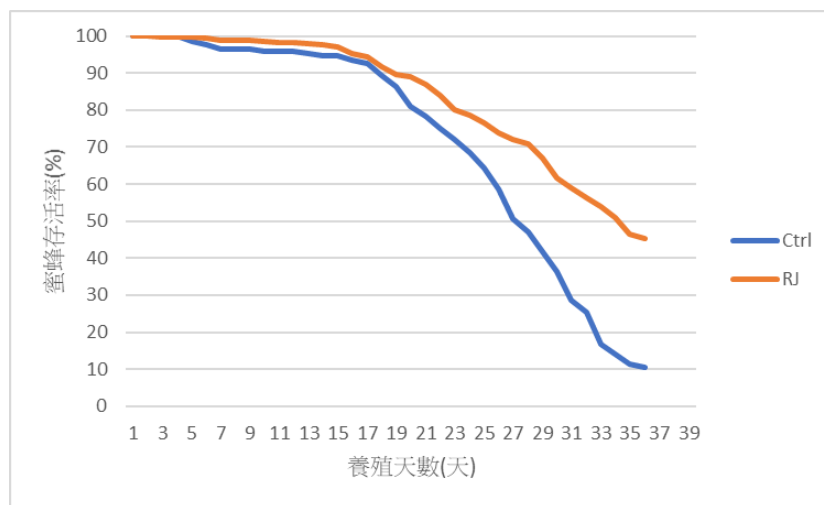
## （四）定量即時聚合酶連鎖反應（Quantitative real time PCR, qPCR）測定

1. 以 SYBR Green 即時定量聚合酶連鎖反應進行基因相對表現量之分析，首先以鑷子取出八連排後放入 rack 上並編號，在每管中加入 ddH<sub>2</sub>O 10.5 $\mu$ l、Sybr green 12.5 $\mu$ l、Forward/reverse primer mix 1 $\mu$ l、Sample cDNA 1 $\mu$ l。
2. 以鑷子將八連排放入小型離心機稍微離心。
3. 開啟螢光定量 PCR 儀，放入八連排壓實並以拭鏡紙擦拭蓋子，關閉蓋子並開始測量。
4. 使用 GADPH 基因當作內控基因（Internal control），之後依據  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  方法計算各組基因之相對表現量<sup>[11]</sup>。

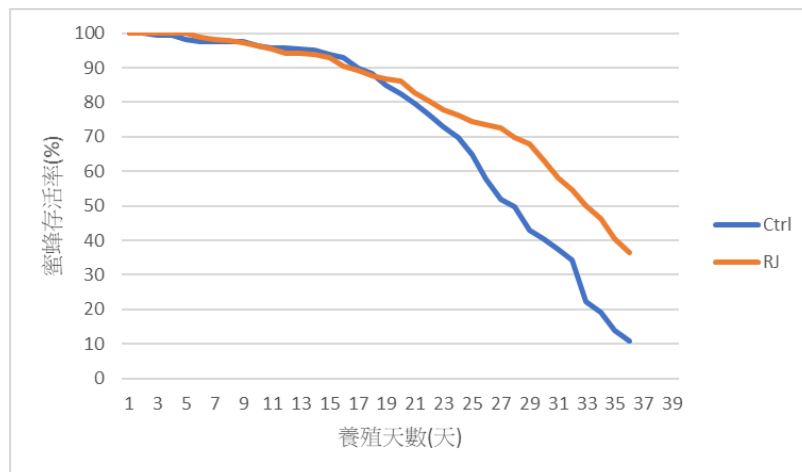
## 肆、研究結果

### 一、蜂王乳對工蜂存活率的影響

由圖四和圖五可以看出工蜂的存活曲線，表明工蜂確實可以在遠離田間蜂巢的實驗室飼養。而養殖 35 天後，對照組 (Ctrl) 的存活率約為 10%，而餵食蜂王乳 (royal jelly) 的實驗組 (RJ)，約有 40% 的工蜂存活。藉由實驗組與對照組的比較可以發現，蜂王乳確實有助於提升工蜂的存活率及延長工蜂的壽命。而藉由觀察工蜂的屍體可以發現，死去的工蜂部分有翅膀出現殘缺的現象 (圖)，但我們在採集工蜂幼蟲時，皆挑選外觀正常的幼蟲，因此推測此部分工蜂並非自然死亡，而是打架所致死。由上述可知，工蜂的實際存活率應該較結果高出一些。



圖四、工蜂存活率對天數作圖 (1~4 組，每組 70 隻)



圖五、工蜂存活率對天數作圖 (5~8 組，每組 70 隻)



圖六、殘翅工蜂屍體（圖片來源：作者自攝）

## 二、食用蜂王乳之工蜂體內非酯化脂肪酸濃度分析

### （一）計算公式

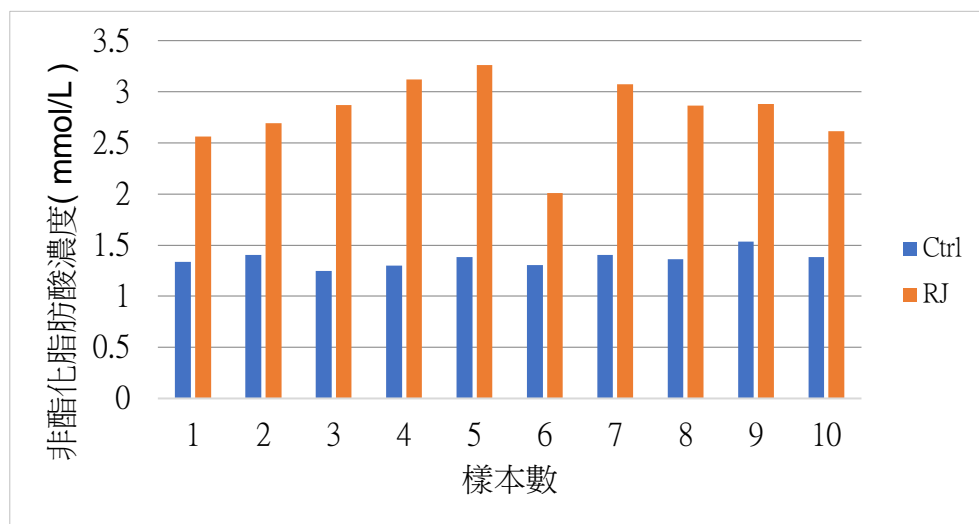
非酯化脂肪酸濃度 (mmol / l) =  $A_{\text{sample}} / A_{\text{standard}} \times \text{std. Conc.}$

$A_{\text{sample}}$  : 550nm 下樣本的吸光值

$A_{\text{standard}}$  : 550nm 下標準品的吸光值

std. Conc. : 標準品的濃度

### （二）非酯化脂肪酸濃度分析



圖七、蜂王乳對工蜂體內非酯化脂肪酸濃度的影響

對圖七數據使用 SPSS 軟體進行初步分析，表二呈現實驗組和對照組在非酯化脂肪酸濃度的平均數及標準差，可看出實驗組的非酯化脂肪酸濃度約為對照組的二倍。

表二、非酯化脂肪酸濃度的平均數及標準差

非酯化脂肪酸濃度 (mmol/L)			
對照組		實驗組	
平均數	標準差	平均數	標準差
1.365	0.078	2.796	0.355

使用 SPSS 軟體進行獨立樣本 T 考驗，分析兩組工蜂體內的非酯化脂肪酸濃度，結果發現  $p$  值達 0.001 的顯著水準 (\*\*\*)，顯示餵食蜂王乳之工蜂體內非酯化脂肪酸濃度顯著高於對照組工蜂之非酯化脂肪酸濃度。

( \* :  $p < 0.05$     \*\* :  $p < 0.01$     \*\*\* :  $p < 0.001$  )

表三、非酯化脂肪酸濃度之獨立樣本 T 考驗

非酯化脂肪酸濃度	
t 值	$p$ 值
-12.436	0.000

### 三、食用蜂王乳之工蜂體內脂肪酸合成酶活性分析

#### (一) 酵素活性公式

$$\text{酵素活性 (nunit/mg protein)} = \left( \frac{\Delta A \times V}{\Delta t \times \epsilon \times L \times V_{enz}} \times \text{dil} \right) \div (\text{mg protein/ml})$$

$\Delta A$  : 340nm 下的吸光值差

$\Delta t$  (min) : 經過時間 (5 分鐘)

$V$  (ml) : 總反應量 (0.3)

$\epsilon$  (ml / (umol  $\times$  cm)) : 吸光係數 (340nm 下值為 6.22)

$L$  (cm) : 光徑長 (0.55)

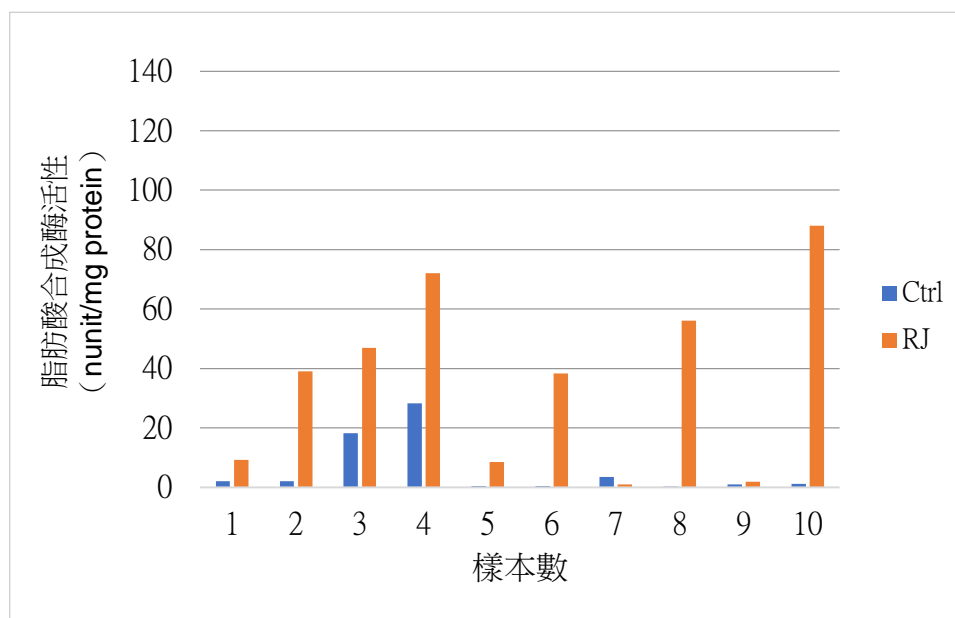


Venz (ml) : sample 加入量 (0.0333)

dil : sample 稀釋倍率

mg protein/ml (mg/ml) : 蛋白質濃度

## (二) 脂肪酸合成酶活性分析



圖八、蜂王乳對工蜂體內脂肪酸合成酶活性的影響

對圖八數據使用 SPSS 軟體進行初步分析，表四呈現實驗組 (RJ) 和對照組 (Ctrl) 在脂肪酸合成酶活性的平均數及標準差，可看出實驗組的脂肪酸合成酶活性約為對照組的七倍，證實蜂王乳可以增加工蜂體內的脂肪酸合成酶活性，加速工蜂脂質的代謝。

表四、脂肪酸合成酶活性的平均數及標準差

脂肪酸合成酶活性 (nunit/mg protein)			
對照組		實驗組	
平均數	標準差	平均數	標準差
5.751	9.556	36.098	30.571

使用 SPSS 軟體進行獨立樣本 T 考驗，分析兩組工蜂的脂肪酸合成酶活性，結果發現  $p$

值達 0.05 的顯著水準 (\*), 顯示餵食蜂王乳之工蜂脂肪酸合成酶活性顯著高於對照組工蜂之脂肪酸合成酶活性。

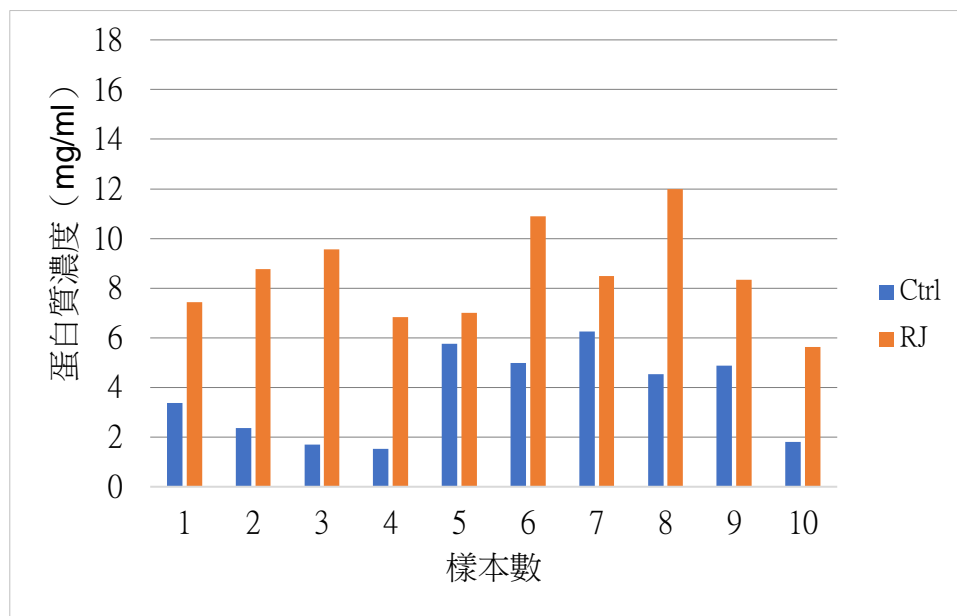
(\*:  $p < 0.05$     \*\*:  $p < 0.01$     \*\*\*:  $p < 0.001$ )

表五、脂肪酸合成酶活性之獨立樣本 T 考驗

脂肪酸合成酶活性	
t 值	p 值
-2.966	0.012

#### 四、食用蜂王乳之工蜂體內蛋白質濃度分析

為瞭解蜂王乳是否對工蜂體內蛋白質濃度產生影響，本試驗採用布拉德福蛋白質定量法 (Bradford Protein Assay)，測量工蜂體內蛋白質濃度。



圖九、蜂王乳對工蜂體內蛋白質濃度的影響

對圖九數據使用 SPSS 軟體進行初步分析，表六呈現實驗組和對照組在蛋白質濃度方面的平均分數及標準差，可看出實驗組 (RJ) 的蛋白質濃度大約為對照組 (Ctrl) 的兩倍，顯示餵食蜂王乳確實能提高工蜂體內的蛋白質濃度。

表六、蛋白質濃度的平均數及標準差

蛋白質濃度 (mg/ml)			
對照組		實驗組	
平均數	標準差	平均數	標準差
3.718	1.787	8.494	1.932

使用 SPSS 軟體進行獨立樣本 T 考驗，分析兩組工蜂的蛋白質濃度，結果發現  $p$  值達 0.001 的顯著水準 (\*\*\*)，顯示餵食蜂王乳之工蜂體內的蛋白質濃度顯著高於對照組工蜂體內的蛋白質濃度。

(\*:  $p < 0.05$     \*\*:  $p < 0.01$     \*\*\*:  $p < 0.001$ )

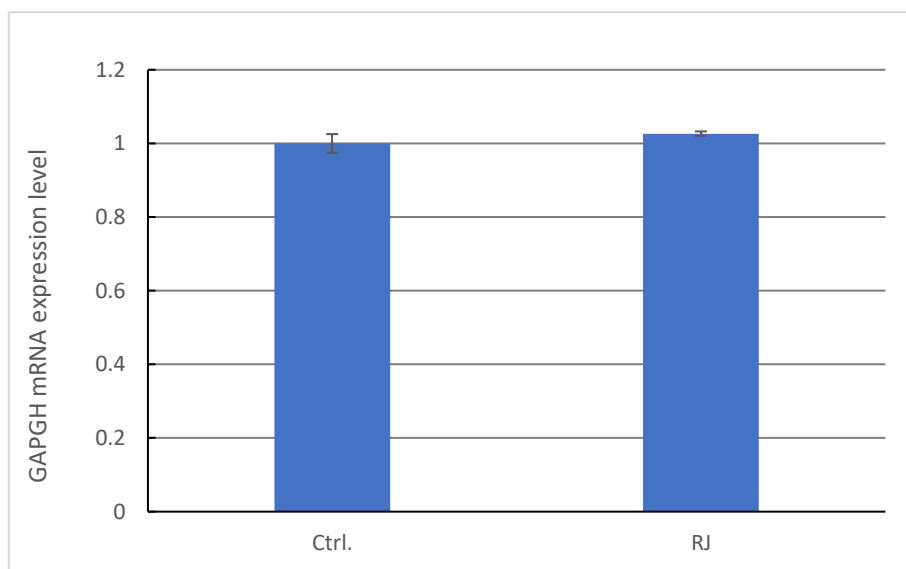
表七、蛋白質濃度之獨立樣本 T 考驗

蛋白質濃度	
t 值	$p$ 值
-5.738	0.000

## 五、食用蜂王乳之工蜂體內 S6 基因 mRNA 表現量分析

### (一) 內控基因 (Internal Control) 的選用

為確立 GADPH 是否能作為本實驗中合適的 (實驗組和對照組中表現量皆穩定) 內控基因，本試驗採用 qPCR 測量實驗組 (Ctrl) 和對照組 (RJ) 中 GADPH mRNA 的表現情形。結果發現實驗組和對照組中 GADPH mRNA 的表現差異未達顯著 ( $p > 0.05$ )，符合實驗預期，即實驗結果證明實驗組和對照組中，GADPH mRNA 表現量穩定相同。

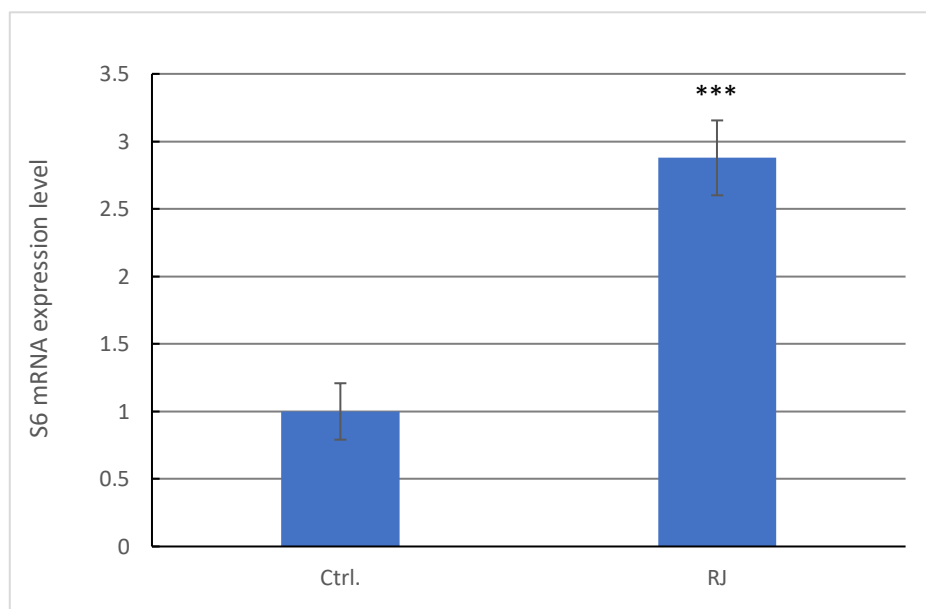


圖十、蜂王乳對工蜂體內 GAPDH mRNA 表現量的影響

(\* :  $p < 0.05$  \*\* :  $p < 0.01$  \*\*\* :  $p < 0.001$ )

## (二) S6 基因的相對表現量

以 GAPDH 基因作為內控基因測量 S6 基因 mRNA 之相對表現量，(圖十一) 實驗結果證實餵食蜂王乳的實驗組 (RJ) 中 S6 mRNA 相對表現量顯著 ( $p < 0.001$ ) 高於對照組 (Ctrl)。



圖十一、蜂王乳對工蜂體內 S6 mRNA 相對表現量的影響

(\* :  $p < 0.05$  \*\* :  $p < 0.01$  \*\*\* :  $p < 0.001$ )

## 伍、討論

本研究旨在探討蜂王乳對工蜂脂質與蛋白質代謝造成的影響。首先我們藉由飼養工蜂一個月的每日紀錄表可以發現，一般工蜂在一個月之後存活率大約落在 10% 左右，由此得知一般工蜂的生命周期約為一個月，然而，餵食蜂王乳的工蜂在經過一個月之後存活率卻仍有 30% 至 40% 不等，故我們確認餵食蜂王乳確實會延長工蜂的壽命。

我們藉由非酯化脂肪酸（Non-Esterified Fatty Acid）的定量來觀察食用蜂王乳之工蜂體內的脂肪濃度差異，發現餵食蜂王乳之工蜂體內的脂肪酸含量顯著高於普通工蜂（大約兩倍左右），因此我們確定了蜂王乳確實對工蜂體內的脂質產生影響。

然而，我們希望知道脂質濃度的變化究竟是蜂王乳本身的含量造成，抑或是因為工蜂食用蜂王乳之後提高合成脂質的酵素活性而造成體內脂質含量增加，因此我們測量脂肪酸合成酶（Fatty Acid Synthase）的活性，從實驗結果中，發現食用蜂王乳之工蜂體內的脂肪酸合成酶活性顯著高於一般工蜂，由此可以得知，在食用蜂王乳之後，工蜂對於脂肪的需求量具有顯著的成長，需要合成更多的脂肪酸，故脂肪酸合成酶的活性具有顯著的提高。而藉由脂肪酸合成酶的實驗，我們可以解答先前我們的疑問，即餵食蜂王乳的工蜂體內脂質具有顯著增長是因為需求量的提高導致酵素活性的上升而非是蜂王乳中原本即有的脂肪酸所造成。

而我們也在測量脂質代謝過程中的蛋白質定量裡發現餵食蜂王乳的工蜂體內的蛋白質濃度大多為普通工蜂的兩倍以上，因此我們希望能瞭解此現象發生的原因。在閱讀文獻後，發現核糖體蛋白 S6（Ribosomal protein S6, S6）為真核小核糖體次單元之必需成分。由此我們打算透過西方墨點法（Western Blotting）來研究工蜂體內蛋白質含量，但在經過使用 NCBI 進行 S6 抗體與蜜蜂（*Apis mellifera*）的胺基酸序列的比對後，發現兩者之間的一致性（選取範圍中一致的核苷酸數目/範圍中總核苷酸數目）極低，容易導致西方墨點法（Western Blotting）在接抗體時難以成功配對，而無法有效地利用西方墨點法進行實驗，故我們最後選擇測量 S6 基因的 mRNA 表現量作為參考。實驗結果發現餵食蜂王乳之工蜂體內的 S6 基因 mRNA 表現量較普通工蜂有顯著提升，由此我們推論在餵食蜂王乳後，工蜂體內的蛋白質濃度高升主要來自於體內的主動合成，而非蜂王乳中原有的蛋白質成分所影響。

## 陸、結論

### 一、實驗結果

- (一) 實驗結果證實食用蜂王乳的工蜂存活率顯著高於普通工蜂。
- (二) 實驗結果證實蜂王乳提高了工蜂體內的非酯化脂肪酸含量，而食用蜂王乳的工蜂其體內脂肪酸合成酶的活性較高，代表食用蜂王乳的工蜂對於脂肪酸的需求量較高，需要合成較大量的脂肪酸，由此證實食用蜂王乳之後會提高脂肪的使用比率。
- (三) 實驗結果證實了蜂王乳提高工蜂體內的蛋白質含量，而食用蜂王乳的工蜂 S6 基因 mRNA 表現量有顯著的提升，因此推測出蜂王乳會影響工蜂體內的蛋白質合成，並且使工蜂主動合成更多的蛋白質。

### 二、未來展望與方向

- (一) 我們知曉工蜂體內的脂質代謝在食用蜂王乳之後產生了重大改變，而解脂酶 (Lipase) 與肉鹼棕櫚醯轉移酶 I (Carnitine Palmitoyltransferase I) 的進一步研究將有助於我們理解工蜂如何將脂肪轉化為能量或其他代謝產物。
- (二) 藉由測量蜂王乳對醣類代謝的改變來完善蜂王乳對於工蜂體內代謝的研究。
- (三) 了解蜂王乳在工蜂體內的作用機制後，設計出能在人體中依循相似代謝路徑的藥物與食品，並將其投入於延緩老化、肥胖與代謝過差方面的治療中。

## 柒、參考文獻資料

- [1] Honeybee Genome Sequencing Consortium.(2006) *Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera**.
- [2] Ying Wang 1, Mireia Jorda, Peter L Jones, Ryszard Maleszka, Xu Ling, Hugh M Robertson, Craig A Mizzen, Miguel A Peinado, &Gene E Robinson.(2006) *Functional CpG methylation system in a social insect*
- [3]Brownsey RW, Boone AN, Elliott JE, Kulpa JE, Lee WM. (2006). *Regulation of acetyl-CoA carboxylase*.
- [4] <https://reurl.cc/Qe39Xp>
- [5] Nepokroeff et al.(1975). *Identification and quantitation of polysomes synthesizing rat liver fatty acid synthetase during nutritional or hormonal regulation*
- [6] Bradford, M. M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*.
- [7] Anna Kurek-Górecka, Paweł Olczyk. (2022).*Bee Products and Their Applications in the Food and Pharmaceutical IndustriesBook*.
- [8] Bethesda. (2012). *LiverTox*
- [9] Xingan Li, Chaoqun Huang, &Yunbo Xue.(2013, February 12). Contribution of Lipids in Honeybee

(Apis mellifera) Royal Jelly to Health. *Journal of Medicinal Food* 16:2, 96-102.

<http://doi.org/10.1089/jmf.2012.2425>

[10] Tania Emmanuelle Torchon.(2013). *Ex-Vivo Characterization of the Lipolytic Response of Mouse Adipose Tissue to Endocrine Stimuli.*

[11] Livak and Schmittgen.(2001). *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method.*



## 【評語】 052207

1. 探討餵食蜂王乳工蜂之壽命變化，獲得可延長工蜂存活率之結果後，進而分析脂肪酸與蛋白質含量之變化，以推測蜂王乳之生理效益與機制。
2. 研究發想符合科學精神、實驗設計合理、數據整理清楚，實驗結果足以支持論證與釋義。
3. 問題回答清楚、切題。

## 作品簡報

「蜂」衣足「食」 -

食用蜂王乳對工蜂體內代謝的影響



# 摘要

本研究以**蜂王乳 (Royal jelly)** 作為研究對象，探討餵食蜂王乳之後工蜂 (*Apis mellifera*) 的壽命變化以及脂質與蛋白質的代謝活性變化。研究結果顯示餵食蜂王乳一個月後的工蜂存活率約為一般工蜂的三至四倍。而餵食蜂王乳的工蜂體內的非酯化脂肪酸 (Non-Esterified Fatty Acids, NEFA) 約為一般工蜂的兩倍，且脂肪酸合成酶的活性較一般工蜂也有顯著提升。推測出在餵食蜂王乳之後，工蜂對於脂質的需求量增加，因此主動合成了脂肪酸，造成體內的脂質濃度高升。此外，餵食蜂王乳的工蜂體內的蛋白質濃度約為一般工蜂的兩倍，且S6基因mRNA表現量較一般工蜂也有所提升，由此推論出蜂王乳會對工蜂體內的蛋白質代謝產生影響，且是由工蜂體內主動合成。

## 壹、研究動機

蜂王乳

營養成分豐富

較天然的保健方式

模式生物：蜜蜂 *Apis mellifera*

• 蜂王乳為蜜蜂所分泌

• 群體生活

• 較複雜的社會性行為

• 易於養殖

• 生命週期短

• 部分基因組與脊椎動物相似

根據文獻，工蜂主要代謝醣類、蛋白質和脂質來產生能量。於是我們決定就此三面向展開蜂王乳對於工蜂體內代謝影響的研究，但由於時間考量，我們最終決定將重心放在脂質與蛋白質研究上，希望藉此一窺蜂王乳對於工蜂體內代謝的影響，及未來應用在人類的健康長壽。

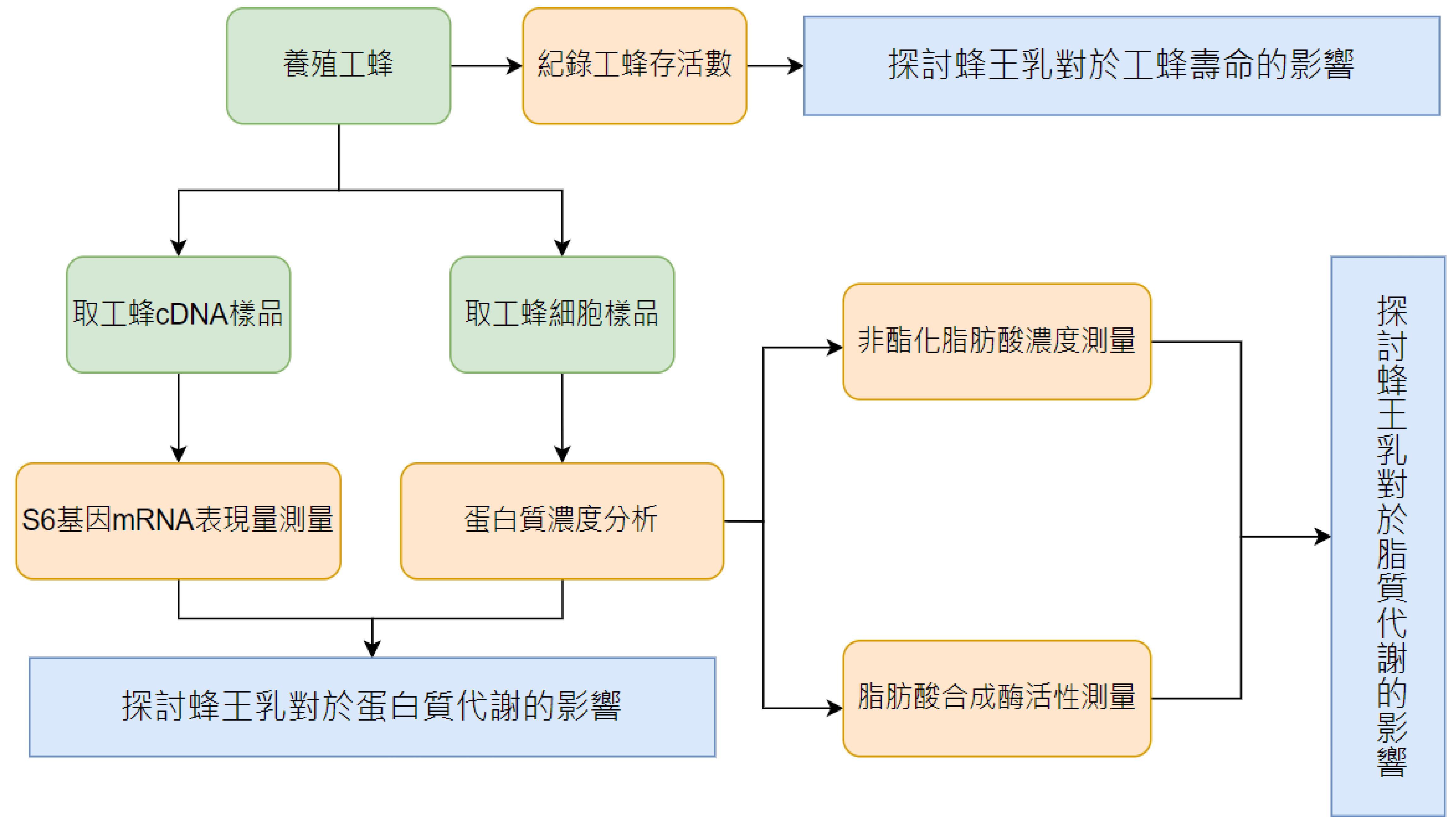
## 貳、研究目的

- 一、研究食用蜂王乳對於工蜂壽命的影響

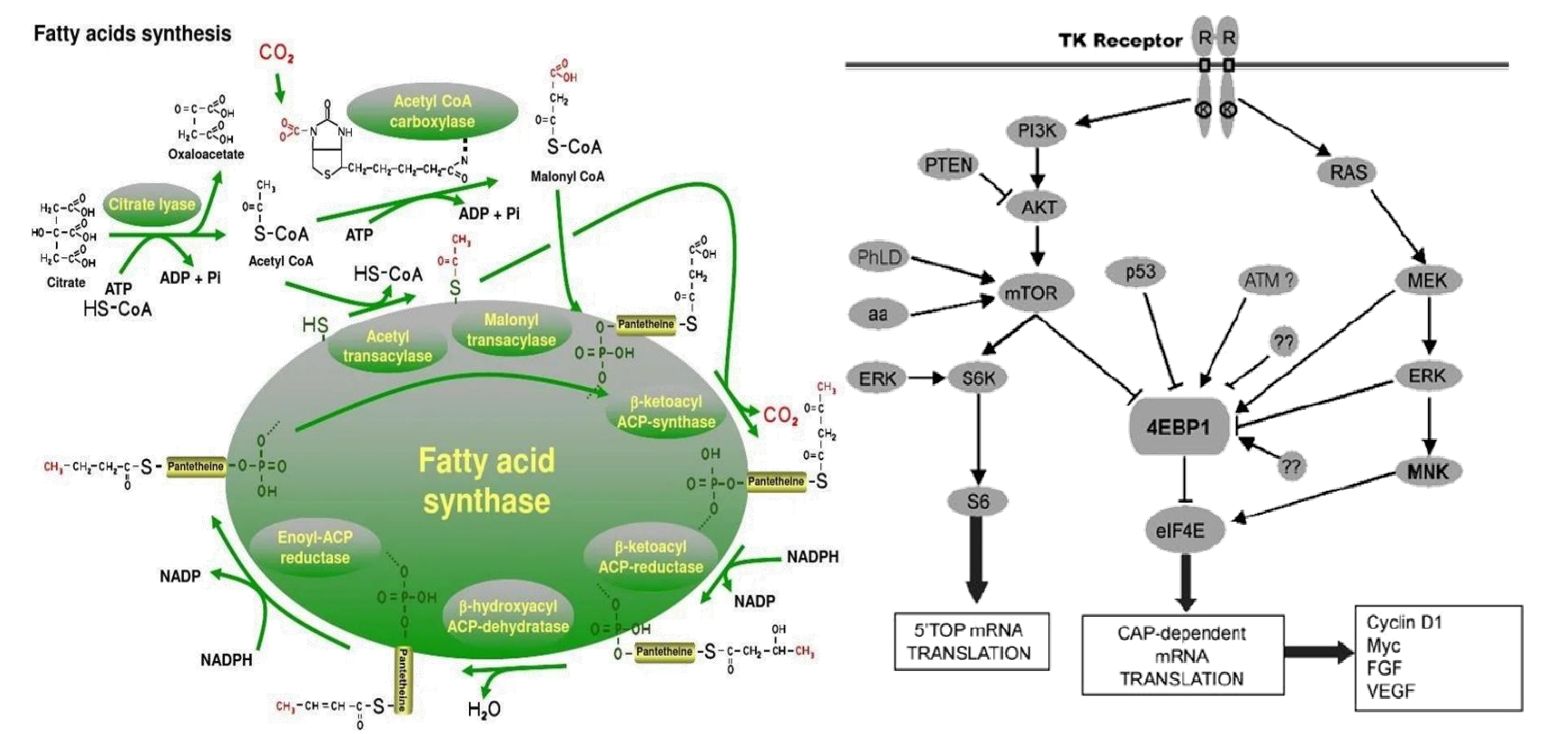
二、探討蜂王乳對於工蜂脂質代謝的影響

三、探討蜂王乳對於工蜂蛋白質代謝的影響

## 參、研究架構

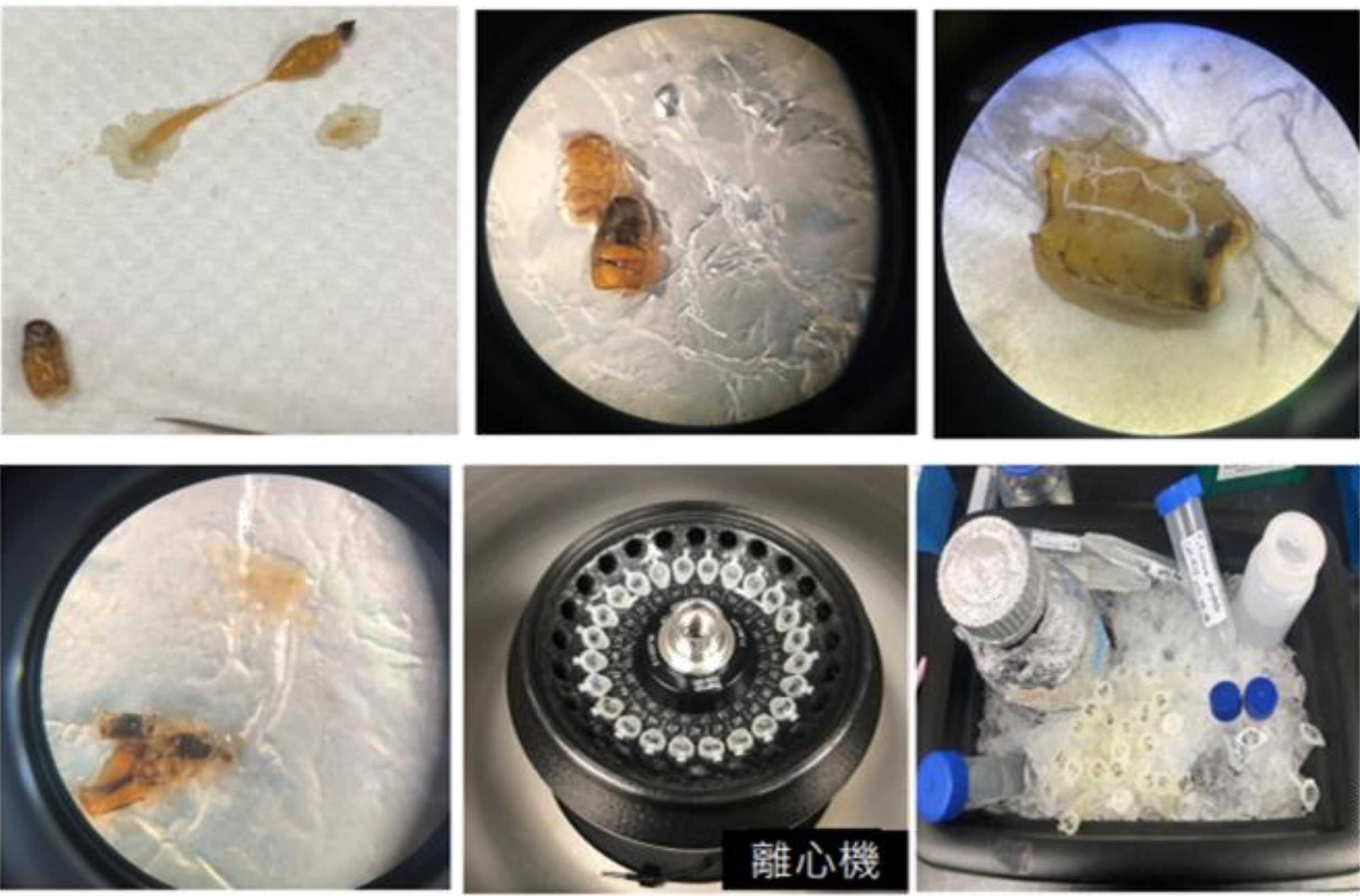


## 肆、研究原理與方法

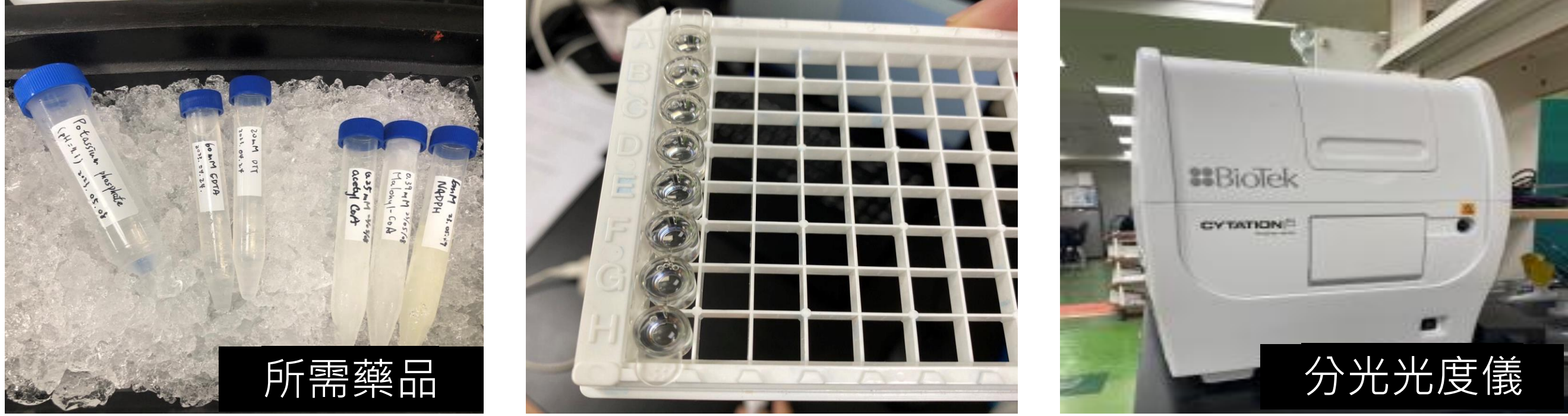




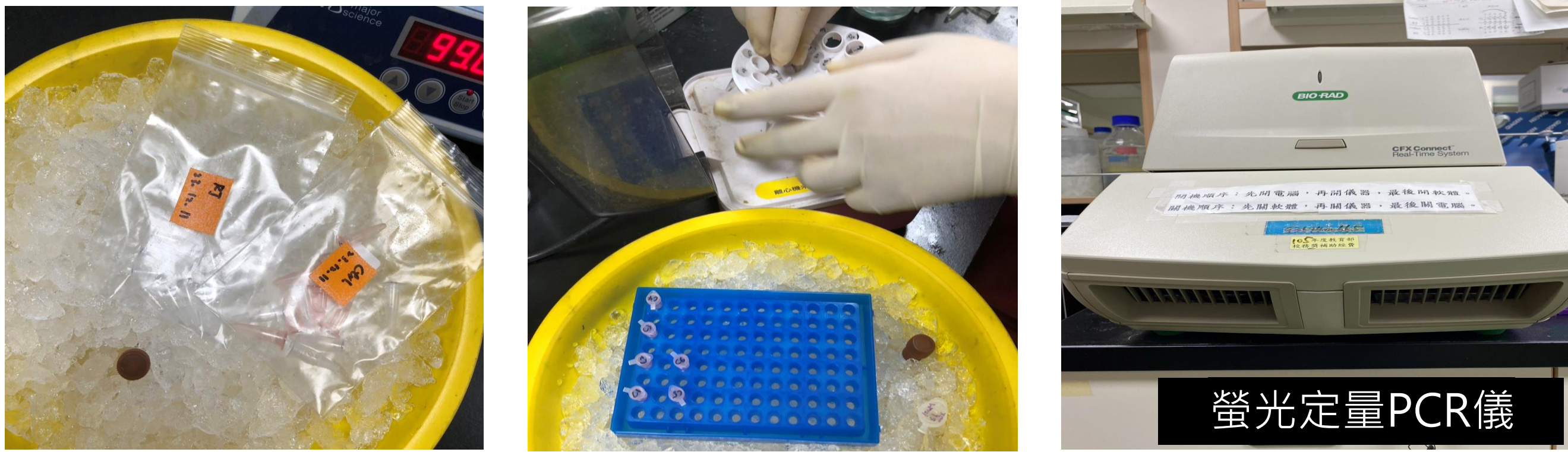
工蜂細胞樣品



脂肪酸合成酶活性測量



cDNA樣品與S6基因mRNA表現量測量



伍、研究結果

一、 飼食蜂王乳對工蜂存活率的影響

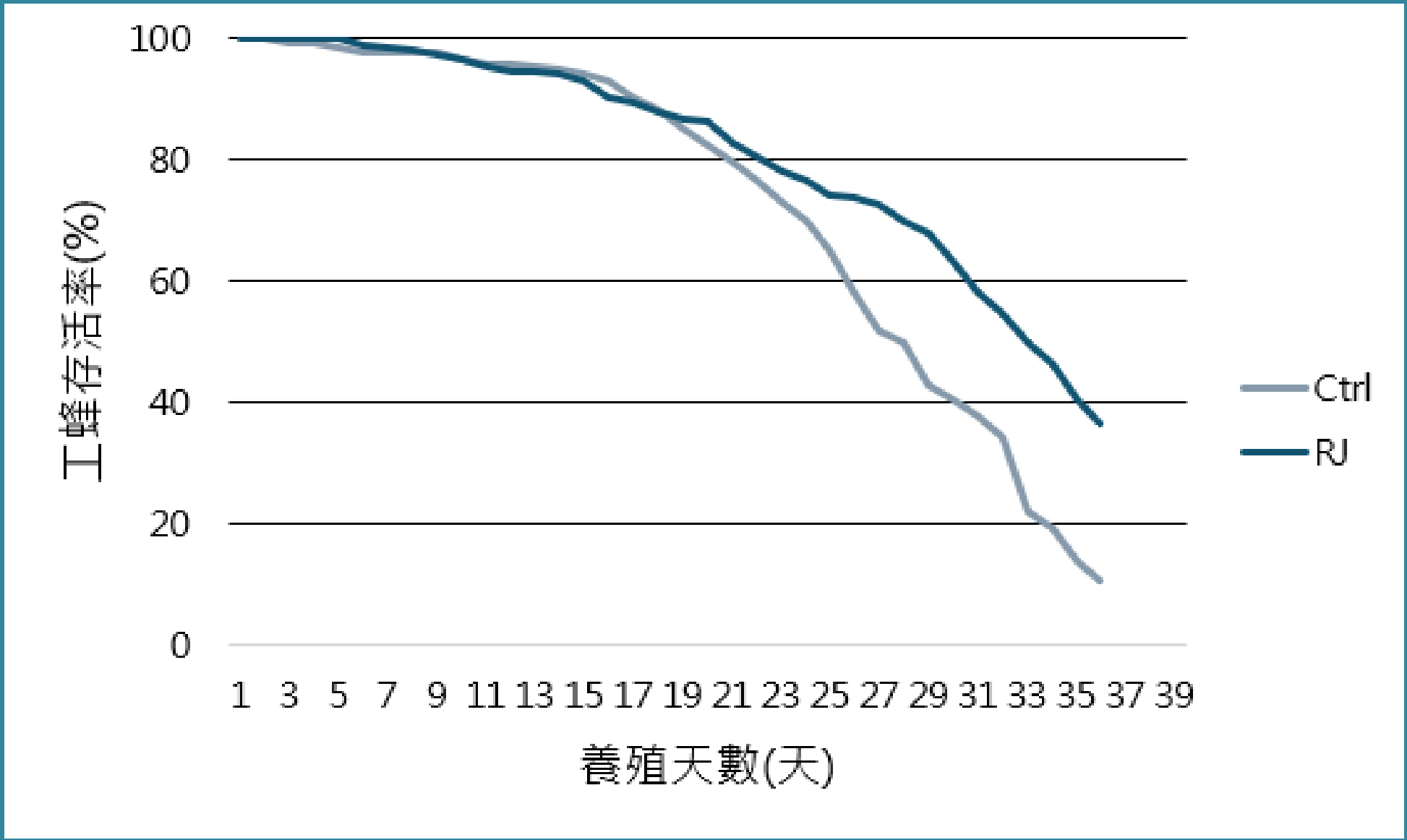
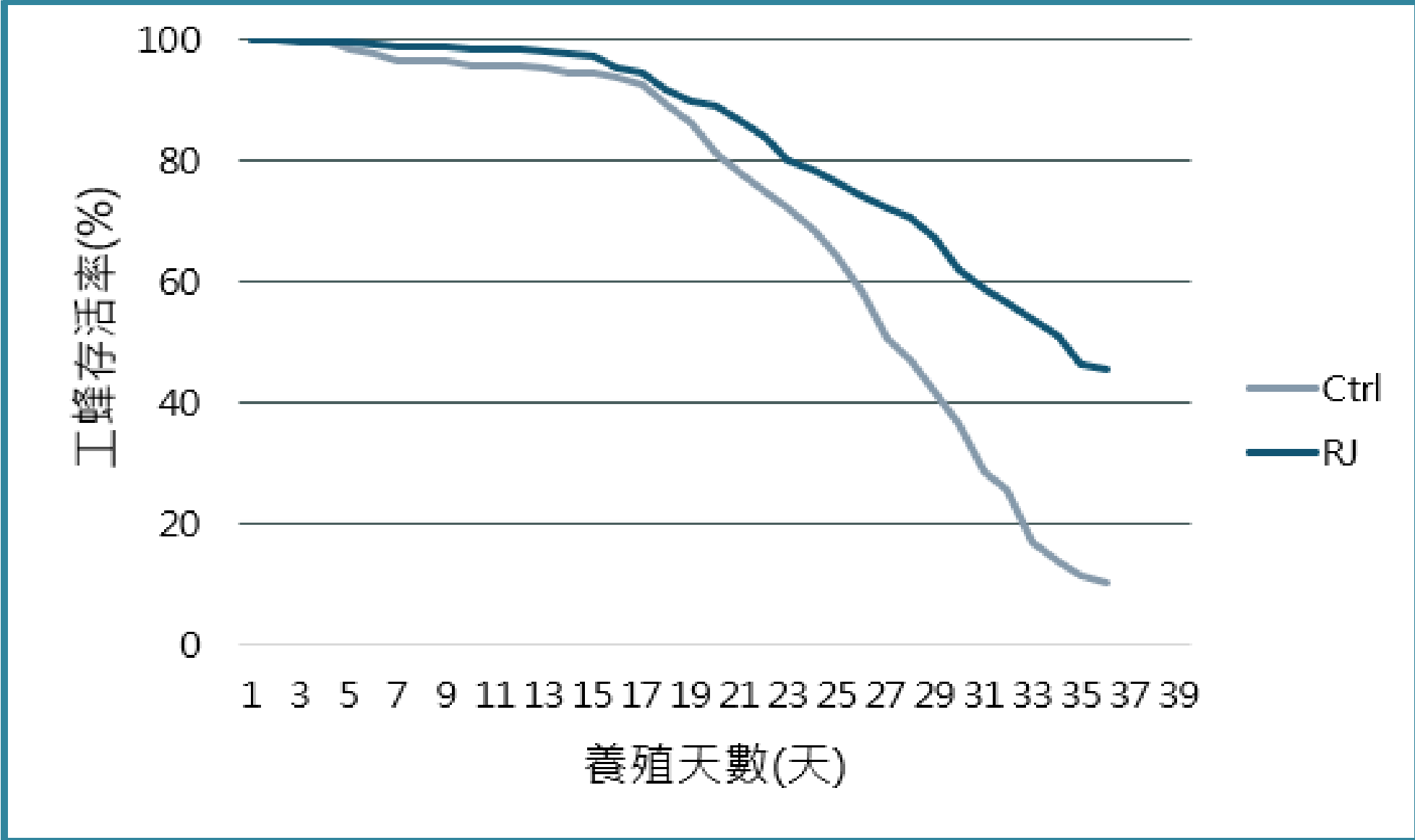


圖 1、工蜂存活率對天數作圖

- 得出工蜂的存活曲線，表明工蜂確實可養殖在實驗室的恆溫飼養箱
- 養殖35天後，對照組 ( Ctrl ) 的存活率約為10%，而飼食蜂王乳的實驗組 ( RJ )，約有40%的工蜂存活

二、 食用蜂王乳之工蜂體內非酯化脂肪酸濃度分析

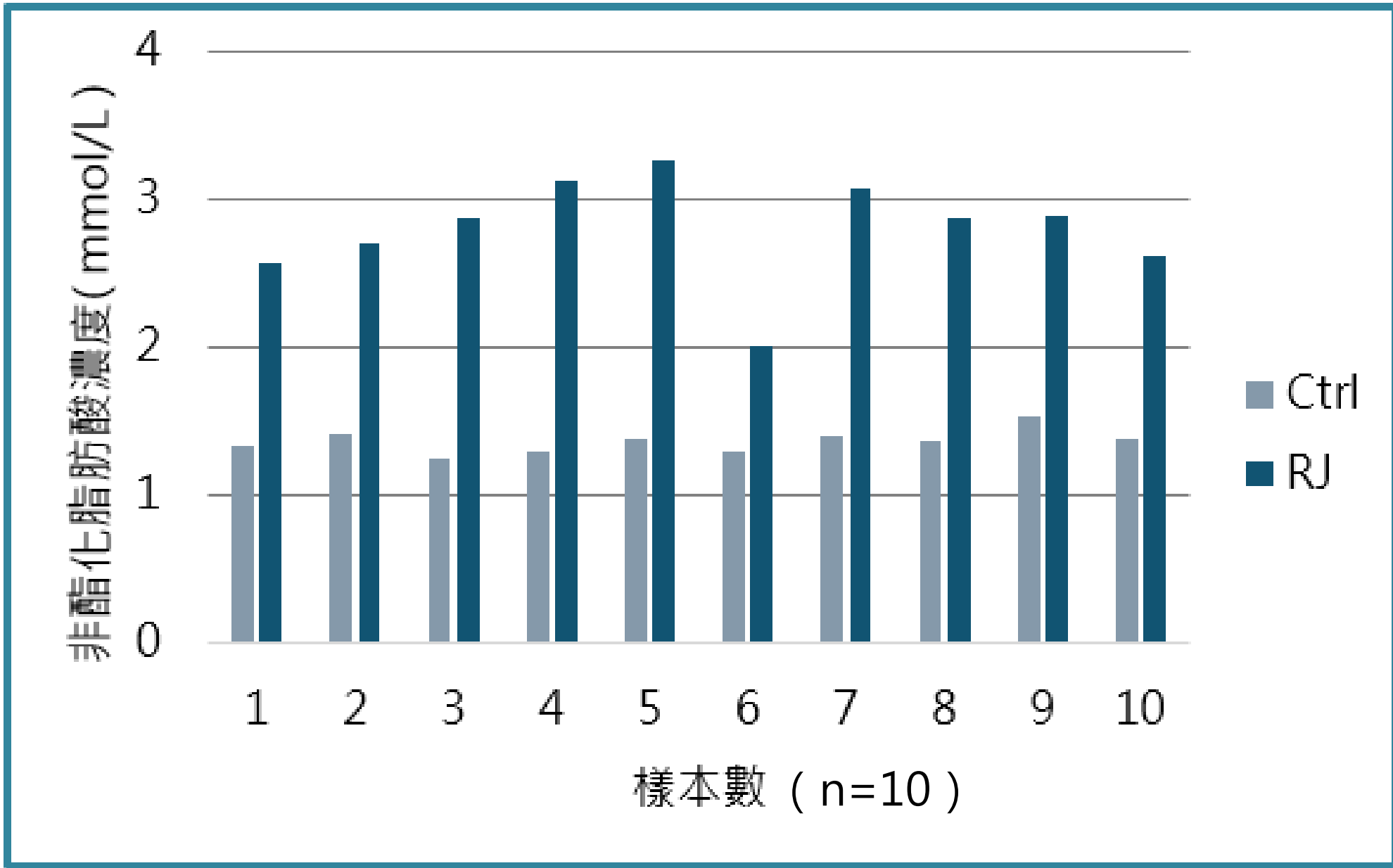


圖2、蜂王乳對工蜂體內非酯化脂肪酸濃度的影響

表1、非酯化脂肪酸濃度的平均數及標準差			
非酯化脂肪酸濃度 ( mmol/L )			
對照組 ( Ctrl )		實驗組 ( RJ )	
平均數	標準差 ( SD )	平均數	標準差 ( SD )
1.365	0.078	2.796	0.355

表2、非酯化脂肪酸濃度之獨立樣本T考驗			
t-test分析-非酯化脂肪酸濃度			
t值	p值	*** 達顯著： p<0.001	
-12.436	0.000		

\* :  $p<0.05$     \*\* :  $p<0.01$     \*\*\* :  $p<0.001$

- 實驗組工蜂的非酯化脂肪酸濃度約為對照組的二倍
- 透過獨立樣本T考驗分析兩組工蜂體內的非酯化脂肪酸濃度，發現 p值達0.001的顯著水準 ( \*\*\* )，顯示飼食蜂王乳之工蜂體內非酯化脂肪酸濃度顯著提高

三、 食用蜂王乳之工蜂體內脂肪酸合成酶活性分析

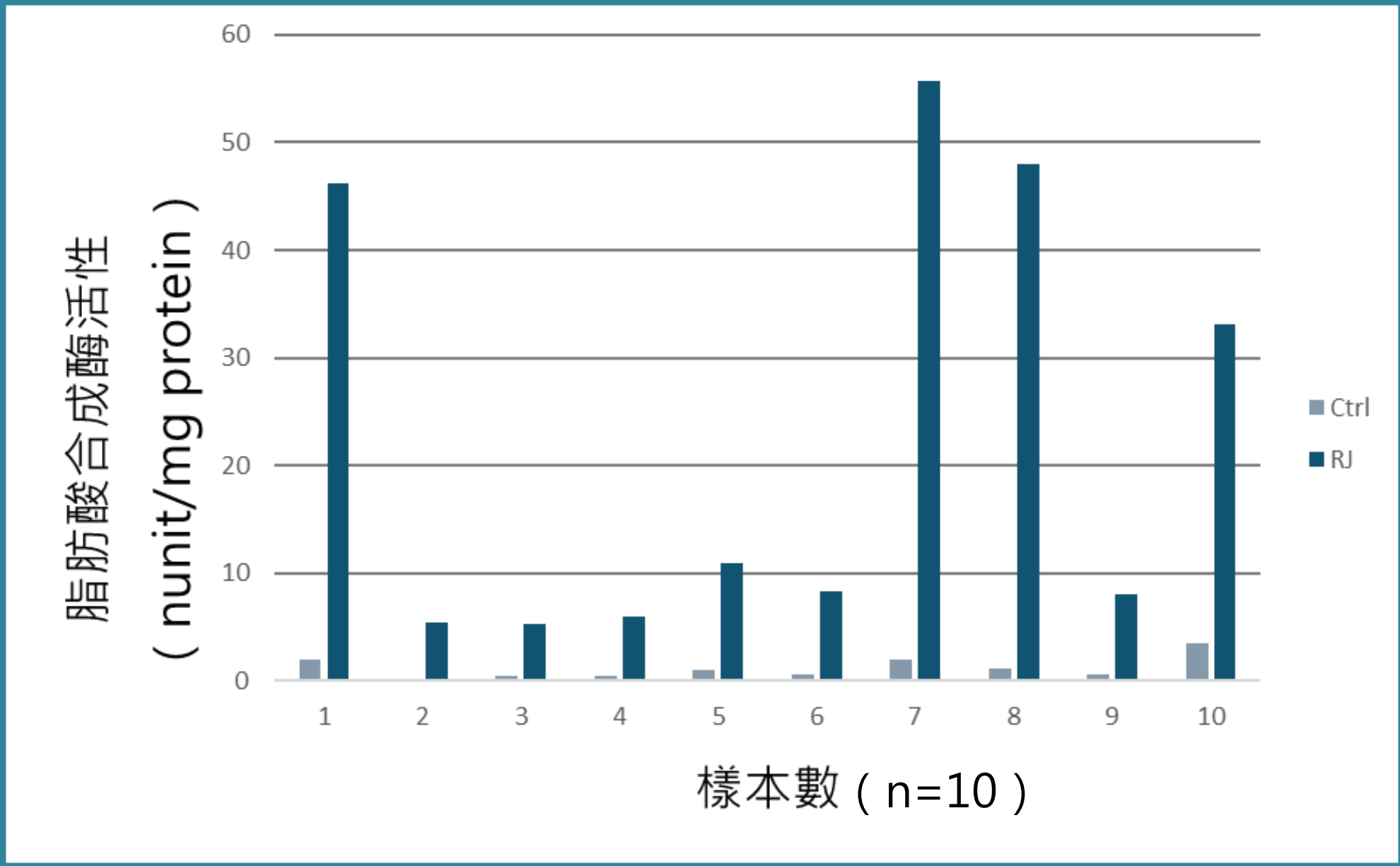


圖3、蜂王乳對工蜂體內脂肪酸合成酶活性的影響

表3、脂肪酸合成酶活性的平均數及標準差			
脂肪酸合成酶活性 ( nunit/mg protein )			
對照組 ( Ctrl )		實驗組 ( RJ )	
平均數	標準差 ( SD )	平均數	標準差 ( SD )
1.225	1.025	22.711	20.644

表4、脂肪酸合成酶活性之獨立樣本T考驗			
t-test分析-脂肪酸合成酶活性			
t值	p值	** 達顯著： p<0.01	
-2.966	0.009		

\* :  $p<0.05$     \*\* :  $p<0.01$     \*\*\* :  $p<0.001$

- 實驗組工蜂的脂肪酸合成酶活性約為對照組的三至四倍
- 透過獨立樣本T考驗分析兩組工蜂體內的脂肪酸合成酶活性，發現 p值達0.01的顯著水準 ( \*\* )，顯示飼食蜂王乳之工蜂體內脂肪酸合成酶活性顯著提高

四、 食用蜂王乳之工蜂體內蛋白質濃度分析

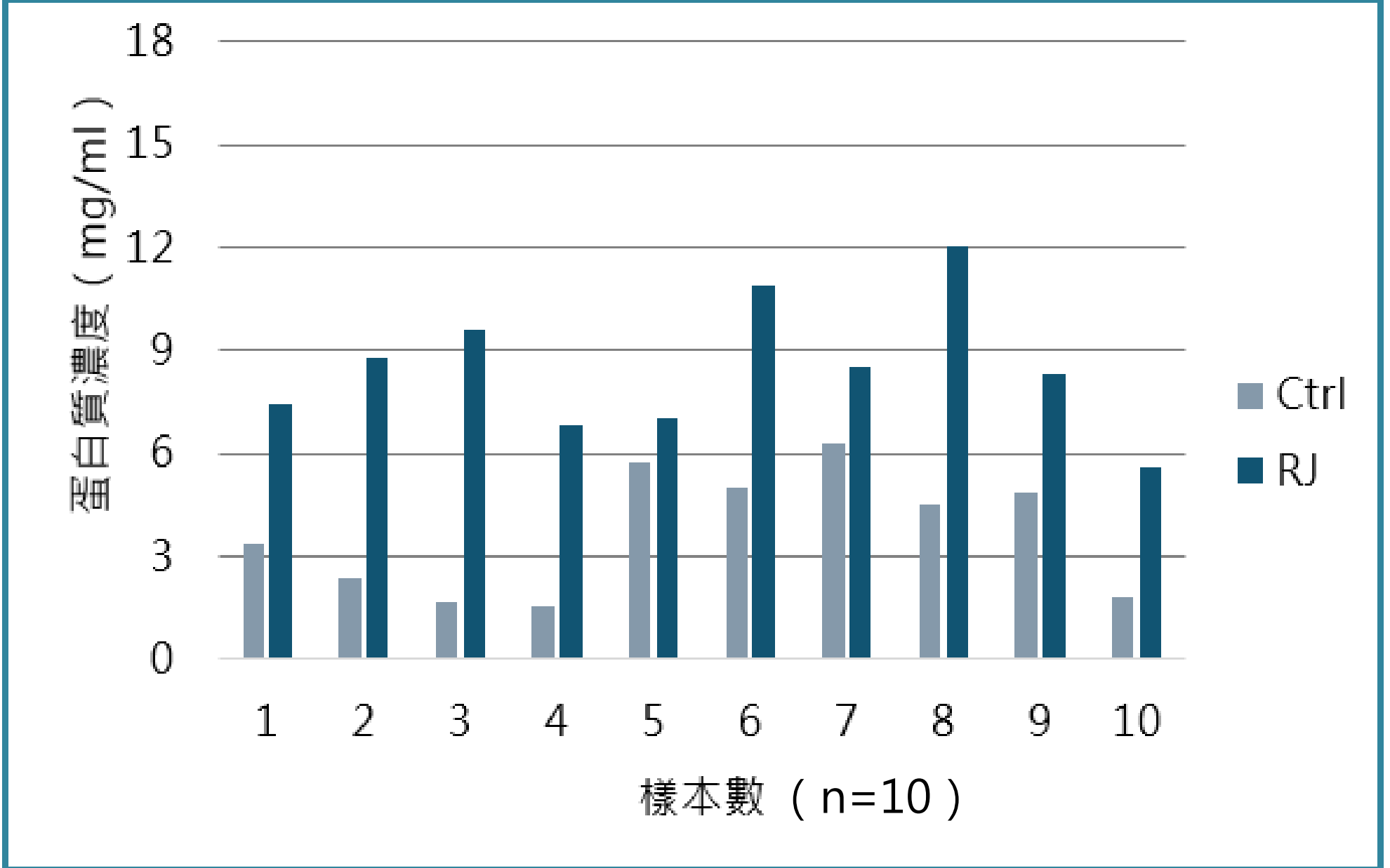


圖4、蜂王乳對工蜂體內蛋白質濃度的影響

表5、蛋白質濃度的平均數及標準差			
蛋白質濃度 ( mg/ml )			
對照組 ( Ctrl )		實驗組 ( RJ )	
平均數	標準差 ( SD )	平均數	標準差 ( SD )
3.718	1.787	8.494	1.932

表6、蛋白質濃度之獨立樣本T考驗			
t-test分析-蛋白質濃度			
t值	p值	*** 達顯著： p<0.001	
-5.738	0.000		

\* :  $p<0.05$     \*\* :  $p<0.01$     \*\*\* :  $p<0.001$

- 實驗組工蜂的蛋白質濃度約為對照組的二倍
- 透過獨立樣本T考驗分析兩組工蜂體內的蛋白質濃度，發現p值達0.001的顯著水準 ( \*\*\* )，顯示飼食蜂王乳之工蜂體內蛋白質濃度顯著提高



# 五、食用蜂王乳之工蜂體內S6基因mRNA表現量分析

## 1. 內控基因 ( Internal Control ) 的選用

實驗組 ( RJ ) 和對照組 ( Ctrl ) 中 GADPH mRNA的表現量差異未達顯著 (  $p>0.05$  ) 。

→ 證明實驗組和對照組中，GADPH mRNA表現量穩定相同

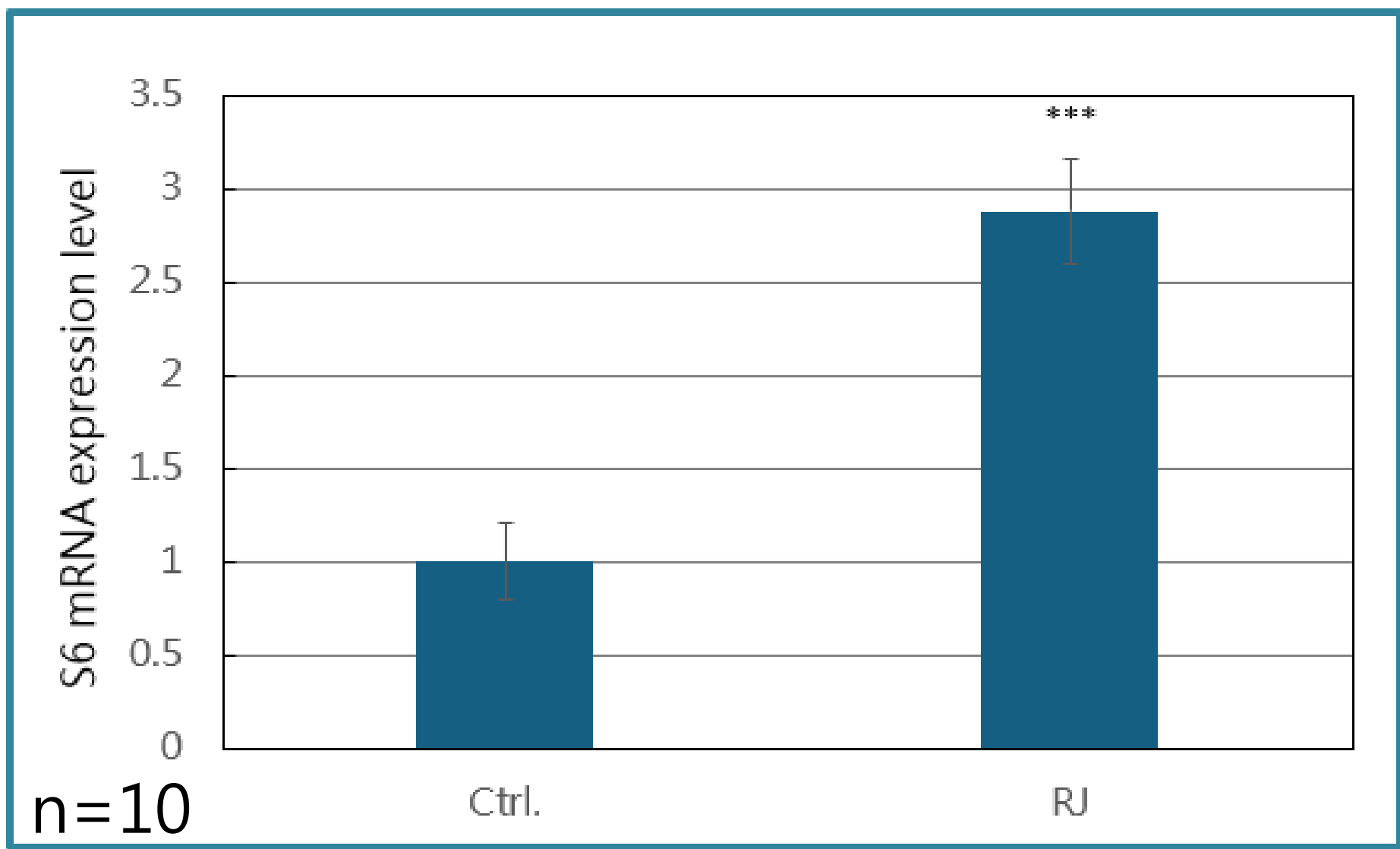


圖6、蜂王乳對工蜂體內S6 mRNA 相對表現量的影響  
\* :  $p<0.05$     \*\* :  $p<0.01$     \*\*\* :  $p<0.001$

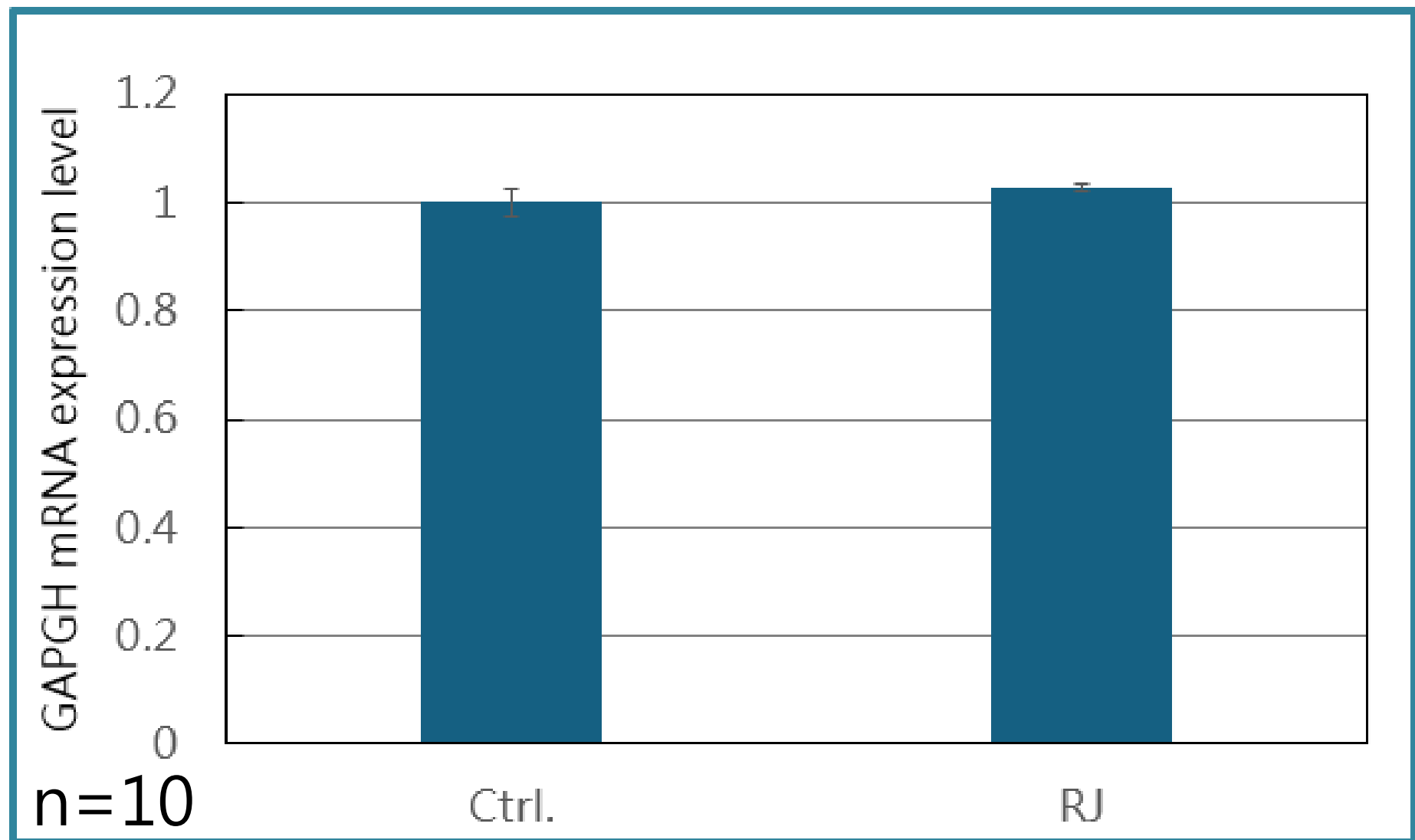


圖5、蜂王乳對工蜂體內GADPH mRNA表現量的影響

## 2. S6基因的mRNA相對表現量

以GADPH基因作為內控基因測量S6基因之mRNA相對表現量，實驗結果證實餵食蜂王乳的實驗組 ( RJ ) 中S6 mRNA相對表現量顯著 (  $p<0.001$  ) 高於對照組 ( Ctrl ) 。

# 陸、討論

### 一、食用蜂王乳對於工蜂壽命的影響

藉由飼養工蜂一個月的每日紀錄表可以發現，一般工蜂在一個月之後存活率大約落在10%左右，而餵食蜂王乳的工蜂經過一個月之後存活率卻仍有40%，故我們確認餵食蜂王乳確實會延長工蜂的壽命。

### 二、食用蜂王乳對於工蜂脂質代謝的影響

文獻表明，蜂王乳中的脂質主要由非酯化脂肪酸 ( Non-Esterified Fatty Acids, NEFA ) 和少量類固醇組成。故我們藉由非酯化脂肪酸的定量來觀察食用蜂王乳之工蜂體內的脂質濃度差異。實驗結果發現餵食蜂王乳之工蜂體內的脂肪酸含量顯著高於普通工蜂，因此我們確定食用蜂王乳確實會提高工蜂體內的脂質含量。

不過，我們希望知道脂質濃度的變化是來源於蜂王乳本身即含有的非酯化脂肪酸，抑或是因為工蜂食用蜂王乳之後主動合成脂肪酸，因此我們測量脂肪酸合成酶 ( Fatty Acid Synthase ) 的活性。實驗結果中發現食用蜂王乳之工蜂體內的脂肪酸合成酶活性顯著高於一般工蜂。可知餵食蜂王乳的工蜂體內脂質具有顯著增長是因為其對脂質的需求量提高，因此主動合成脂肪酸。

### 三、食用蜂王乳對於工蜂蛋白質代謝的影響

我們透過布拉德福蛋白質定量法 ( Bradford protein assay ) 測量工蜂體內的蛋白質濃度，實驗結果發現餵食蜂王乳的工蜂體內的蛋白質濃度顯著高於普通工蜂。

得到上述結果後，我們想進一步了解蛋白質濃度的變化是來源於蜂王乳本身含有的蛋白質，還是是因為工蜂食用蜂王乳後主動進行蛋白質合成而使體內蛋白質濃度上升。因此我們希望以西方墨點法分析工蜂體內核糖體蛋白S6 ( Ribosomal protein S6，為真核小核糖體次單元之必需成分 ) 的含量。但我們在使用NCBI進行S6抗體與蜜蜂的胺基酸序列的比對後，發現兩者之間的一致性極低，無法有效地利用西方墨點法進行實驗。故我們最後選擇以定量即時聚合酶連鎖反應 ( Quantitative real time PCR, qPCR ) 測量S6基因的mRNA表現量作為參考。

實驗結果發現餵食蜂王乳之工蜂體內的S6基因mRNA表現量較普通工蜂有顯著提升，由此我們推論在餵食蜂王乳後，工蜂體內的蛋白質濃度高升是來自工蜂體內的主動合成。

# 柒、結論

### 實驗結果：

- 一、實驗結果證實食用蜂王乳的工蜂壽命顯著高於未餵食蜂王乳之工蜂。
- 二、實驗結果證實蜂王乳提高了工蜂體內的非酯化脂肪酸含量，而食用蜂王乳的工蜂其體內脂肪酸合成酶的活性較高，代表食用蜂王乳的工蜂對於脂肪酸的需求量較高，需要合成較大量的脂肪酸，由此證實食用蜂王乳之後會提高脂質的使用比率。
- 三、實驗結果證實了蜂王乳提高工蜂體內的蛋白質含量，而食用蜂王乳的工蜂S6基因mRNA表現量有顯著的提升，因此推測出蜂王乳會影響工蜂體內的蛋白質合成，使工蜂主動合成更多的蛋白質。

### 未來展望與方向：

- 一、我們知曉工蜂體內的脂質代謝在食用蜂王乳之後產生了重大改變，而解脂酶 ( Lipase ) 與肉鹼棕櫚醯轉移酶 I ( Carnitine Palmitoyltransferase I ) 的進一步研究將有助於我們理解工蜂如何將脂肪轉化為能量或其他代謝產物。
- 二、藉由真核翻譯起始因子 4E 結合蛋白 1 ( 4EBP1 ) 的表現量測量來進一步驗證蛋白質合成量的提高。
- 三、了解蜂王乳在工蜂體內的作用機制後，設計出能在人體中依循相似代謝路徑的藥物與食品，並將其投入於延緩老化與促進代謝方面的治療中，達到健康長壽的目的。