

三、結果

3-1、元素分析(EDS)與分佈(mapping)結果：

我們先對沈積系統提供鈣離子，並於 55°C 中靜置一星期，之後再提供過量的磷離子，同樣在 55°C 中靜置一星期，使鈣、磷離子分別前後滲透進入卵細胞內並依化學反應式形成磷酸鈣。之後的元素分析即可在卵細胞內部測得兩者的訊號(圖一)。

利用掃描式電子顯微鏡(SEM)可以看到卵細胞內充滿大量的蛋黃顆粒(圖二(a))。放大後可看見白色的結晶體，主要沈積於蛋黃顆粒中(圖二(b))。

進一步從元素分佈的結果(圖三)發現，鈣與磷訊號之分佈主要位於蛋黃顆粒當中，與圖二(b)中所見的白色結晶分佈模式相符，由此推論所見的白色結晶應為磷酸鈣晶體。

3-2、石蠟切片染色結果：

將不同沈積條件的卵細胞以石蠟包埋並切片後再染以硝酸銀(AgNO_3)，由於銀離子能取代磷酸鈣中的鈣離子而與帶負電的磷酸根離子(HPO_4^{2-})結合，並利用照光使其氧化變黑以標定出磷酸鈣結晶的沈積處。另以伊紅染劑染細胞質中未被晶體佔據的 granules (如蛋黃顆粒)使成紅色背景，以進行沈積狀況的觀察。

未經沈積的卵細胞，因為無磷酸鈣結晶沈積其中，所以切片染色結果只見被伊紅染劑染成紅色的蛋黃顆粒，並無看見呈現變黑的區域(圖四(a)與(b))。而經過沈積的卵細胞則可在一些蛋黃顆粒內看到較黑的區域(圖五(a)與(b))，也就是磷酸鈣結晶的沈積處。當我們利用 Triton X-100 於沈積前先增加細胞膜的通透性後，再以相同的條件和時間進行沈積，之後的切片染色結果發現呈現黑色的蛋黃顆粒不但數目增加，且顏色亦加深許多(圖六(a)與(b))，也就是說當細胞膜的通透性變大後，在相同的時間內能滲透進入卵內的鈣、磷離子數目相對增多，當然也能沈積出較多的磷酸鈣晶體，所以染色結果才會出現較多又較深的黑色區

域於蛋黃顆粒中。

3-3、穿透式電子顯微鏡(TEM)觀察結果：

利用穿透式電子顯微鏡觀察卵細胞的樹脂切片，可以更清楚觀察到不同條件下其內部蛋黃顆粒礦化的情形。

比較未經沈積與經過兩星期沈積的卵細胞，兩者內部蛋黃顆粒礦化的情形有明顯差異。未經沈積的卵並無看到任何結晶在其內部結構，只有經過沈積的卵才可在切片中看到一粒粒磷酸鈣結晶沈積於其內的蛋黃顆粒裡面(圖七(a)與(b))。

在以 Triton X-100 增加細胞膜通透性的方式處理卵細胞後，一樣經過兩個星期的沈積，結果可在電子顯微鏡底下清楚觀察到大量的磷酸鈣結晶在蛋黃中沈積下來(圖八(a)與(b))，蛋黃顆粒幾乎被完全地填充，沈積於其中的晶體密度明顯高於未使用 triton 的沈積結果。

以重複沈積的方式，比較未經 triton 處理的卵細胞沈積一次與重複沈積三次的差異，發現在只沈積一次的卵中，磷酸鈣還無法完全將蛋黃顆粒填滿，而晶體量在沈積三次後大幅增加並幾乎將蛋黃顆粒填滿(圖九(a)與(b))。放大觀察兩者的晶體密度亦發現，多次沈積的確可使蛋黃中的晶體密度明顯增加(圖十(a)與(b))。而經 triton 改變通透性後再進行重複沈積的卵細胞也有相同結果，在連續沈積三次後，蛋黃顆粒中的結晶量多於只沈積一次的結果(圖十一(a)與(b))，放大後亦可看到其結晶的密度高於只沈積一次的結果(圖十二(a)與(b))。

3-4、感應耦合電漿質譜分析(ICP-MS)分析結果：

以歷經兩星期沈積時間並只沈積一次的卵而言，細胞內鈣的濃度從 30ppb 上升至 160ppb，平均約是未經沈積的卵的 5~6 倍；磷的濃度從 60ppb 上升至 160ppb，約是未經沈積的卵的 2~3 倍。利用 triton 增加通透性後再經過一次兩星期的沈積，發現可使入侵細胞的磷酸鈣量再增高，鈣的濃度升至 280ppb，約是一般細胞的 9 倍；磷的濃度則升至 360ppb，約是一般細胞的 6 倍(圖十三)。

就重複沈積的實驗結果來看，未改變通透性的卵細胞，其內的鈣與磷濃度明顯隨沈積次數增加而上升許多。在沈積三次後鈣的濃度上升至 1550ppb，約是一般細胞的 50 倍以上；磷則升至 1600ppb，約 25 倍以上(圖十四)。而改變通透性再進行連續沈積的卵細胞也有相同情況，沈積三次後鈣的濃度從 30ppb 上升至 1000ppb，約在 30 倍以上；磷則從 60ppb 上升至 1200ppb，大概有 20 倍(圖十五)。

