

鈣離子通道-Ryanodine 接受體之遺傳型對豬 卵母細胞體外成熟、受精與致活之影響

陳銘正^{1*} 林佳靜¹ 林育安¹ 李盈漢¹ 吳伊倫¹ 林明怡¹ 蔡宛蓁¹

1. 國立宜蘭大學動物科技學系

摘要

本試驗之目的為檢測鈣離子通道 Ryanodine 接受體 (Ryanodine receptor, RyR) 之遺傳型對於豬卵母細胞體外成熟、受精與致活之影響。由 69 隻未發身女豬之卵巢收集卵丘卵母細胞複合體，培養於 39°C、5%CO₂ 環境下含激性腺素之 M199 培養液中 44-48 小時。成熟培養後，豬卵母細胞被與濃度為 10⁶/ml 之獲能精子進行 6-8 小時體外受精，或被置於 1.2 kv/cm 電場下進行致活作用，隨後並分別培養於 NCSU-23 培養液中 10 或 16 小時。女豬之基因組 DNA 均萃取自卵巢組織，並應用聚合酶鏈鎖反應與限制切割多型性檢測其 RyR 遺傳型。結果顯示 RyR 遺傳型為正常型 (C/C) 與雜合型 (C/T) 之頻率分別為 85.5 與 14.5%，並未發現 T/T 者；T 之基因頻率為 7.25%。所有卵母細胞之體外成熟率、受精率與致活率分別為 68.2±19.6、74.3±23.1 與 86.0±14.3%，其中遺傳型 C/C 者之體外成熟率、受精率與致活率分別為 70.0±15.8、71.2±23.1 與 85.8±14.5%，與遺傳型 C/T 者之 66.7±24.2、85.1±22.3 與 86.5±10.4% 均無顯著差異 (P>0.05)。然而遺傳型 C/T 之卵母細胞經體外受精後，多精入卵率 (77.4±31.5%) 與雄原核形成率 (52.0±20.0%) 均顯著高於 C/C 者之 56.7±19.7 與 22.4±15.0% (P<0.05)。總結，在肉女豬群中 RyR 遺傳型為 T/T 者極為少見，C/C 型與 C/T 型在卵母細胞之體外成熟、體外受精與致活上並無差異，惟可能影響受精卵之雄原核形成與多精入卵。

關鍵詞：鈣離子通道，豬卵母細胞，體外成熟，體外受精，致活作用

Effects of Genotype of Calcium Release Channel - Ryanodine Receptor on *in vitro* Maturation, Fertilization and Activation of Porcine Oocytes

Ming-Cheng Chen^{1*} Cha-Ching Lin¹ Yi-An Lin¹ Ying-Han Lee¹ Yi-Lun Wu¹
Ming-Yi Lin¹ Wan-Zen Tsai¹

1. Department of Animal Science, National Ilan University

Abstract

The present study examined the effects of genotype of calcium release channel -Ryanodine receptor (RyR) on *in vitro* maturation (IVM), fertilization (IVF) and activation of porcine oocytes. All oocyte-cumulus complexes were collected from

69 gilts' ovaries and cultured in M199 medium supplemented with gonadotrophin at 39°C in 5 % CO₂ in humidified air for 44-48 hours. After maturation culture, the oocytes were penetrated with sperm at 10⁶/ml concentration for 6-8 hours of incubation or activated at field strength of 1.2 kv/cm, and then the oocytes were transferred into NCSU-23 medium for another 10 or 16 hours of incubation. Genomic DNA was isolated from gilts' ovaries and genotypes of RyR were analyzed by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. Analysis of RyR genotypes showed that 85.5 and 14.5 % of gilts exhibited normal homozygous (C/C) and heterozygous (C/T) genotypes, respectively. No T/T genotype of RyR was identified. The frequency of T allele was 7.25 %. The results of IVM, IVF and activation showed that the maturation, fertilization and activation rate of oocytes from all ovaries were 68.2±19.6, 74.3±23.1 and 86.0±14.3%, respectively. There were no differences between C/C (70.0±15.8, 71.2±23.1 and 85.8±14.5%) and C/T (66.7±24.2, 85.1±22.3 and 86.5±10.4%) gilts (P>0.05). However, the polyspermy rate and male pronucleus(ei) formation of oocytes from C/T gilts (77.4±31.5 and 52.0±20.0 %) were significantly higher (P<0.05) than those from C/C gilts (56.7±19.7 and 22.4±15.0 %), respectively. In conclusion, there was few gilts with T/T genotype, and no difference in maturation, fertilization, and activation of oocytes between C/C and C/T genotypes. However, the polyspermy rate and male pronucleus(ei) formation of oocytes were influenced by these RyR genotypes.

Key words: Calcium release channel, Porcine oocyte, In vitro maturation, In vitro fertilization, Activation.

*Corresponding author. E-mail: mcchen@niu.edu.tw

前 言

豬緊迫症 (porcine stress syndrome, PSS) 已被證實為鈣離子通道 (calcium release channel, CRC) 之 Ryanodine 接受體 (RyR) 基因發生點突變所致, 即第 1843 鹼基由 C 突變為 T, 遂致轉譯出之蛋白質在第 615 個胺基酸由精胺酸轉變為半胱胺酸 (Fujii *et al.*, 1991)。發現此一點突變, 使吾人有機會以聚合酶鏈鎖反應結合限制酶切割多型性檢出緊迫敏感豬。RyR 基因型為正常型 (C/C) 與雜合型 (C/T) 之豬隻, 不具有緊迫症狀, 惟基因型若為突變型之純合子 (T/T) 者, 生長及屠體品質受影響 (Simpson and Webb, 1989), 嚴重者導致豬之惡性高溫, 遇緊迫而猝死 (Fujii *et al.*, 1991)。鈣離子對哺乳動物卵母細胞之成熟與受精作用極其重要, 卵母細胞受體內排卵素潮湧之刺激, 細胞內鈣離子上升而恢復減數分裂, 能成熟發育至第二次減數分裂中期 (Homa, 1995)。當卵母細胞進行受精作用時, 細胞內鈣離子濃度增加, 降低成熟促進因子 (maturation promoting factor, MPF) 活性, 促使卵母細胞繼續完成減數分裂, 並導致皮質顆粒反應, 俾防止多精入卵發生 (Sun *et al.*, 1994)。卵母細胞內鈣離子主要儲存於平滑內質網內, 內質網上鈣離子通道有三, 一者為依賴 ATP 促使鈣離子進入內質網之通道, 另外二者為釋放鈣離子至細胞質內之管道, 分別為三磷酸肌醇接受體 (1,4,5-inositol trisphosphate receptor, IP₃R) 與 Ryanodine 接受體 (Miyazaki *et al.*, 1993)。有關豬卵母細胞在成熟與受精過程中, 鈣離子如何釋放入細胞質內, 迄未有明, 為瞭解女豬之 Ryanodine 接受體基因第 1843 鹼基之點突變, 是否影響鈣離子之正常釋放, 進而影響卵母細胞之生殖活動, 因此本試驗之目的為檢測 Ryanodine 接受體遺傳型 (C/C

與 C/T) 對豬卵母細胞體外成熟、受精與致活之影響。

材料與方法

一、Ryanodine 接受體遺傳型之檢測

(一) 萃取卵巢組織之基因組 DNA

取小塊卵巢組織, 置於含有 650 μl 分解緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH7.4) 之離心管中, 將卵巢組織剪碎後, 加入 0.5% SDS 與 35 μl proteinase K (10 mg/ml), 使其混合均勻, 並置於 55°C 乾浴槽中隔夜培養。隔天離心管以 10000 g 離心 3 分鐘, 取上層液, 分別加入等量之酚、酚/氯仿及氯仿混合均勻, 進行 DNA 萃取, 並取其上層液。最後加入 1/10 體積之 3 M 醋酸鈉後, 以等量之異丙醇進行基因組 DNA 之沉澱, 經離心 15-30 分鐘, 將 DNA 沈澱物以 70% 酒精與純酒精各洗一次, 風乾約 30 分鐘。將樣品 DNA 溶於 500 μl 之 TE 溶液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0) 中, 置於 55°C 乾浴槽中 12 小時, 使 DNA 完全溶解。

(二) 聚合酶鏈鎖反應複製 RYR 基因片段

取基因組 DNA 為模板, 依鄭等 (1997) 所述, 設計 Ryanodine 接受體基因 cDNA 之 1614-1633 鹼基為上游引子, 另以 1957-1976 鹼基之互補序列為下游引子, 引子濃度分別為 0.5 μM; PCR 係在 DNA 熱循環器 (PE2400, Perkin Elmer Cetus, USA) 內進行, 先以 95°C 進行 5 分鐘, 使 DNA 變性為單股, 之後進行 35 個循環之 DNA 複製, 每個循環包括 95、60 與 72°C 各 1 分鐘, 分別進行 DNA 變性, 引子煉合與 DNA 增長, 最後以 72°C 持續 5 分鐘, 俾完成 DNA 之增長。反應後之 PCR 產物則應用 2% 之洋菜膠進行電泳, 確認複製 DNA 之長

度為 363 鹼基對 (base pair, bp)。

(三)以 *Hha* I 限制酶切割多型性分析 Ryanodine 接受體之遺傳型

取 16 μ l PCR 產物，分別以 1.5 U 之 *Hha* I 限制酶加以切割；*Hha* I 限制酶係於 37°C 恆溫箱內作用 2 小時。限制酶切割後以 2% 洋菜膠電泳分析，確認 RYR 基因之遺傳型。正常型 (C/C) 與雜合型 (C/T) 之 DNA 片段長度 (bp) 組合，分別為 (231,132)、與 (363, 231, 132) (圖 1)。

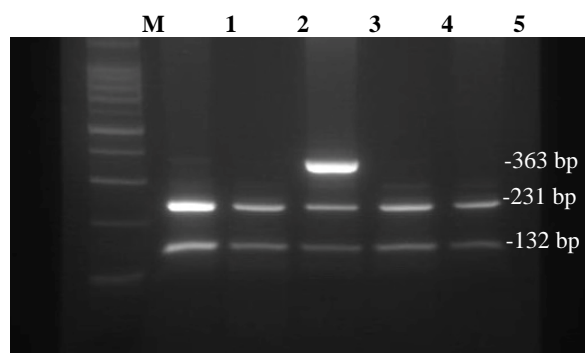


圖 1 不同 RyR 遺傳型之 PCR 產物經 *Hha* I 限制酶切割之電泳圖。M 為 100 bp 之 DNA 長度標記；第 1、2、4 與 5 行為 C/C 型；第 3 行為 C/T 型。

Fig. 1 Gel electrophoresis of PCR products after digestion by *Hha* I restriction enzyme in different RyR genotype. Lane M represented 100 bp DNA ladder marker; Lane 1,2,4 and 5 represented C/C type; Lane 3 represented C/T type.

(四)Ryanodine 接受體基因遺傳型頻率與基因頻率之估算

依照 PCR 與限制酶切割多型性確認個別豬隻 Ryanodine 接受體基因之遺傳型 (C/C 及 C/T) 比例，並依照馬 (1971) 所述方法估算其基因頻率。

二、豬卵母細胞之體外成熟、受精與致活

(一)卵母細胞之收集

自宜蘭縣肉品市場之屠宰場取得未發身肉女豬之卵巢，將同隻女豬之卵巢置於含有 PBS 緩衝液之 50 ml 離心中，並於 1 小時內運回實驗室。於解剖顯微鏡下，選擇外圍包覆有完整卵丘細胞之卵母細胞進行體外成熟培養。

(二)卵母細胞之體外成熟

將卵丘卵母細胞複合體移置到含排卵素 (leutinizing hormone, LH)、激濾泡素 (follicle stimulated hormone, FSH)、泌乳素 (prolactin, PRL)、雌素二醇 (estradiol, E₂) 與 10% 豬濾泡液之 M199 成熟培養液中，於 39°C、5% CO₂ 之培養箱中，培養 44-48 小時以進行卵母細胞之體外成熟。本試驗共取得 69 頭女豬之卵巢除分析 RYR

基因型外，卵巢直徑 2 mm 以上濾泡內之卵母細胞被取出，進行成熟培養。分別使用 22、24 與 17 頭女豬之卵巢，各取得 333、494 與 343 個卵母細胞進行成熟培養，分別比較各種基因型卵母細胞之成熟、受精與致活之情形。

(三)卵母細胞之體外受精

(1)精子之處理與體外獲能

應用手握法採自本校牧場杜洛克公豬之濃厚精液，於 20°C 冰箱中靜置 16 小時。由靜置後之精液中，取出 5 ml 精液加入 5 ml 含 BSA 生理食鹽水洗滌三次，加入 pH7.8 含胎犢血清之精子獲能培養液，調整精子濃度至 2×10⁸/ml，於 37°C、5% CO₂ 培養箱中培養 1 小時，以進行精子之體外獲能作用。

(2)卵母細胞之體外受精與受精後之體外培養

應用上述獲能處理之精液進行卵母細胞之體外受精，首先以受精培養液稀釋，使最終之精子濃度為每毫升含 1×10⁶ 精子，覆蓋 2 ml 礦物油後，於 39°C、5% CO₂ 培養箱中培養 6-8 小時，使精子穿入卵母細胞。經除去外圍精子後，將卵母細胞移置於 NCSU-23 培養液中，繼續培養 10 小時，直至受精卵形成原核。

(3)精子之體外獲能培養液與卵母細胞之體外受精培養液均按照鄭 (1985) 所述之方法配製，其中受精培養液中也添加 2 mM 之咖啡因，俾能提高精子之活動力，順利完成受精作用。

(4)卵母細胞之電激活

去除卵丘細胞之成熟卵母細胞被置於電激活液 (Bavister et al., 1983) 中洗滌 3 次後，排列於含有 20 μ l 電激活液之電極盤中央，使用電場強度 1.2 kv/cm 直流電 (DC) 進行 30 微秒 (μ seconds) 之刺激，經靜置 30 秒後，再將卵母細胞移至 NCSU-23 培養液中洗滌 3 次，於 NCSU-23 培養液中培養 16 小時。

(5)卵母細胞之固定與檢查

將體外成熟、受精或致活之卵母細胞固定於載玻片上，再將載玻片置於含有 3 份純酒精與 1 份冰醋酸之固定液中固定 48 小時，最後使用含有 1% Lacmoid 之 45% 冰醋酸染色劑予以染色，於位相差顯微鏡下檢查卵母細胞之成熟、受精與致活情形。

三、試驗數據之統計分析

試驗數據先經反正旋函數轉換後，採用 SAS (1999) 之統計軟體，以一般線性模式 (general linear model, GLM) 進行變方分析，並以最小顯著差 (least significant difference, LSD) 比較平均值之差異。

結果與討論

本研究逢機檢測宜蘭縣肉品市場 69 頭雌性肉豬之鈣離子通道 Ryanodine 接受體 (RyR) 之遺傳型，依照 Fujii et al. (1991) 檢測 RyR 點突變之方法，將 RyR 遺傳型分為 C/C 正常型、C/T 雜合型與 T/T 突變型三種，T 代表 RyR 之 cDNA 序列第 1843 鹼基發生點突變，而

C 則代表正常者 (Fujii *et al.*, 1991)。RyR 遺傳型為 C/C、C/T 之雌性肉豬分別有 59 與 10 頭，並未發現有 T/T 者，因此 C/C 與 C/T 之遺傳型頻率分別為 85.5 與 14.5%；進一步應用 Hardy-Weinber 定律，計算 T 之交替基因頻率為 7.25%，因此估算，得自宜蘭縣肉品市場雌性肉豬之 T/T 遺傳型頻率約為 0.5%，由此可以說明，何以本研究檢測 69 頭肉豬並未發現任何 T/T 者。取自上述已檢測 RyR 遺傳型之雌性肉豬卵巢內卵母細胞，經 48 小時體外成熟培養之結果如表 1 所示，在 22 頭女豬之卵巢，取得進行培養之 333 個卵母細胞中，扣除 4 個細胞質鬆散明顯退化之卵母細胞，其餘分別位於生發泡、第一次減數分裂中期與第二次減數分裂階段者為 10.9、19.4 與 68.2%；比較 RyR 遺傳型 C/C 與 C/T 卵母細胞之成熟率，分別為 70.0 與 66.7%，兩者間並無顯著差異 ($P>0.05$)，顯然具有點突變之雜合型 RyR 並不影響卵母細胞之體外成熟結果，由於本研究並無 T/T 者，因此無法得知導

致緊迫症之純合子 T/T 型者，是否影響卵母細胞之成熟作用。表 2 所示者為 RyR 遺傳型對體外成熟豬卵母細胞進行體外受精之影響，結果發現 C/T 型與 C/C 型卵母細胞之受精率分別為 85.1 與 71.2% ($P=0.1$)，而 C/T 型者之多精入卵率 (77.4%) 與雄原核形成率 (52%) 均顯著的高於 C/C 型者之 56.7 與 22.4% ($P<0.05$)。當成熟卵母細胞以 1.2 kv/cm 電場強度刺激一次後，有 86.0% 之豬卵母細胞被致活，其中形成一個、二個或二個以上原核之百分比分別為 42.4、39.3 與 18.3% (表 3)；進一步比較 RyR 遺傳型之影響時，發現 C/C 與 C/T 者卵母細胞之孤雌致活率並無顯著差異 ($P>0.05$)，分別為 85.8 與 86.5%，惟致活之卵母細胞中，C/T 型者一個與二個雌原核之形成率，分別為 57.0 與 25.8%，與 C/C 者 (37.8 與 43.5%) 比較，均具有統計上顯著差異 ($P<0.05$)。

表 1 RyR 遺傳型對豬卵母細胞體外成熟之影響

Table 1 The effect of RyR genotype on *in vitro* maturation of porcine oocytes

遺傳型 Genotype	女豬數 No. of gilts	卵母細胞數 No. of oocytes examined	卵母細胞在減數分裂各階段之百分比* No. (%) of oocytes in meiotic stage*		
			GV	MI	MII
CC	12	180	22(12.3±13.4)	31(17.2±14.8)	126(70.0±15.8)
C/T	10	153	14(9.3±13.3)	34(22.1±17.5)	102(66.7±24.2)
Total	22	333	36(10.9)	65(19.7)	228(68.5)

*GV, 生發泡；MI, 第一次減數分裂中期；MII, 第二次減數分裂中期；不含4個退化的卵。

*GV, Germinal vesicle; MI, Metaphase I; MII, Metaphase II.

表 2 RyR 遺傳型對豬卵母細胞體外受精之影響

Table 2 The effect of RyR genotype on *in vitro* fertilization of porcine oocytes

遺傳型 Genotype	卵母細胞					
	女豬數 No. of gilts	數 No. of oocytes examined	孤雌致活率* No. (%) of activated oocytes	受精率* No. (%) of fertilized oocytes	多精入卵率** No. (%) of polyspermic oocytes	雄原核形成率*** No. (%) of oocytes with male pronuclear
C/C	20	386	70(18.1±12.9)	275(71.2±23.1)	156(56.7±19.7 ^a)	62(22.4±15.0 ^b)
C/T	4	108	8(7.5±8.9)	92(85.1±22.3)	71(77.4±31.5 ^b)	48(52.0±20.0 ^b)
Total	24	494	78(15.8)	367(74.3)	227(61.9)	110(30.0)

a,b 同一列中數據無相同字母者表示差異顯著 ($p<0.05$)。

a, b Means without common superscripts (a,b) in the same column differ significantly ($p<0.05$) .

*孤雌致活率 (受精率)：致活 (受精) 卵母細胞數佔總卵母細胞數之百分率

*percentage of activated (fertilized) oocytes: number of activated (fertilized) oocytes / total number of oocytes.

**多精入卵率：多精入卵之卵母細胞數佔受精卵母細胞數之百分率

** percentage of polyspermic oocytes: number of polyspermic oocytes / number of fertilized oocytes.

***雄原核形成率：具有雄原核之卵母細胞數佔受精卵母細胞數之百分率

***percentage of oocytes with male pronuclear: number of oocytes with male pronuclear / number of fertilized oocytes.

表 3 RyR 遺傳型對豬卵母細胞電致活之影響

Table 3 The effect of RyR genotype on electric activation of porcine oocytes

遺傳型 Genotype	女豬數 No. of gilts	卵母細胞數 No. of oocytes examined	孤雌致活率 No. (%) of activated oocytes	原核形成率		
				No. (%) of oocytes with pronuclear		
				IPN	2PN	>2PN
C/C	13	260	223(85.8±14.5)	84(37.8±15.3 ^a)	97(43.5±13.2 ^a)	42(18.7±16.4)
C/T	4	83	72(86.5±10.4)	41(57.0±15.8 ^b)	19(25.8±3.2 ^b)	12(17.2±13.9)
Total	17	343	295(86.0)	125(42.4)	116(39.3)	54(18.3)

a,b 同一列中數據無相同字母者表示差異顯著 ($p<0.05$)。

Means without common superscripts (a,b) in the same column differ significantly ($p<0.05$) .

IPN, 一個原核; 2PN, 二個原核。

IPN, one pronucleus; 2PN, two pronuclei.

哺乳動物卵母細胞之成熟、受精及隨後胚之發育深受細胞內鈣離子濃度之影響，一般卵巢濾泡內之卵母細胞係停頓於第一次減數分裂前期之核網期階段，直到排卵前，因激性腺素刺激，使細胞內鈣離子濃度上升而恢復減數分裂，進行生發泡瓦解、染色質濃縮、紡錘絲形成、染色體排列在赤道板，最後停頓於第二次減數分裂中期階段 (Homa, 1995)。成熟卵母細胞受精後，精子引起卵母細胞內鈣離子波動，導致卵母細胞釋放皮質顆粒，進而引發透明帶反應，防止多精入卵之發生，另一方面鈣離子刺激更多的細胞內貯存鈣被釋放出來，致活組蛋白 H1 激酶活性，降低成熟促進因子之活性，直至原核形成、配子接合而完成受精作用 (Sun *et al.*, 1994)。前述卵母細胞內貯存鈣離子之平滑內質網同時具有 IP₃R 及 RyR (Miyazaki *et al.*, 1993)，惟其分布與作用，隨著卵母細胞成熟發育階段而有不同 (Machaty *et al.*, 1997)；牛卵母細胞從生發泡階段成熟至第二次減數分裂中期，IP₃R 維持一定之數量 (Chang *et al.*, 1997)，而 RyR 則隨著卵母細胞之成熟而增加，於 MetII 達高峰 (Yue *et al.*, 1998)。相類似之研究雖未見之於豬者，惟 Matchaty *et al.* (1997) 之研究顯示，應用 RyR 激動劑 Ryanodine 或 procaine 處理豬卵母細胞，可刺激 MetII 時期之豬卵母細胞產生鈣之波動；而在 GV 時期，除非給予高劑量之激動劑，否則卵母細胞內並不產生鈣之波動 (Machaty *et al.*, 1997)，因此恢復豬卵母細胞減數分裂所需鈣之來源，RyR 應非第一候選者。表 1 結果顯示 RyR 遺傳型為 C/T 或 C/C 之卵母細胞成熟率並無差異，顯然豬卵母細胞成熟過程中，參與調節成熟發育之鈣離子，可能不受 RyR 基因點突變之影響。

本研究中，RyR 遺傳型 C/T 卵母細胞之受精率雖與 C/C 者無顯著差異，惟多精入卵率與雄原核形成率皆顯著高於 C/C 者，可能 RyR 基因點突變雜合子 (C/T) 之成熟卵母細胞內鈣離子釋放與 C/C 者有所不同。蓋正常之鈣離子釋放乃誘發正常受精作用所必需，包括：皮質顆粒釋放、恢復減數分裂、形成雄原核、DNA 合成與細

胞分裂 (Swann and Parrington, 1999)。MacLennan and Phillips (1992) 發現，RyR 點突變之骨骼肌無法管制鈣之釋放，因此當豬受緊迫刺激時，鈣離子釋放通道之一的 RyR 不正常釋放鈣離子，導致肌肉強直收縮並產生惡性高溫症狀 (Fujii *et al.*, 1991)。Fill *et al.* (1990) 亦發現，緊迫敏感豬之肌纖維收縮後，平滑內質網之鈣離子釋放管道 (RyR) 之關閉較抗緊迫豬者為慢；又在體外培養之肌肉細胞中發現，Ryanodine 與緊迫敏感豬之內質網之親和性較抗緊迫豬者為高 (Mickelson *et al.*, 1988)，受刺激後能釋放較多的鈣離子，並在細胞質中維持較長時間的高鈣濃度；惟在卵母細胞內之 RyR 是否具有相似之特性，迄未有明。本試驗所檢測之 RyR 遺傳型僅有 C/C 與 C/T 型，並不包含 T/T 型，因此這些豬並不產生緊迫症，就緊迫症之外表型 (phenotype) 而言，C 屬顯性作用，惟在細胞之層次，是否在 C/T 型卵母細胞中，正常 (C) 與突變 (T) 之 RyR 基因均被表現，造成平滑內質網上同時具有突變型與正常型之 RyR，在受精作用時對鈣離子之釋出作用不同，導致 C/T 與 C/C 型卵母細胞體外受精結果有所差異，仍待進一步研究。

一般卵母細胞之體外受精試驗，為保證獲得良好之受精率，常在培養液中添加 2 mM 之咖啡因，增加精子之活動力，俾能穿過透明帶完成受精作用 (鄭, 1985)，本試驗亦不例外。咖啡因是 RyR 之激動劑，可以刺激細胞釋出鈣離子 (Yue *et al.*, 1995)，因此 RyR 為 C/T 型者可能對咖啡因更為敏感，卵母細胞被精子致活時，細胞內能釋放較多的鈣離子，並維持較長之時間，遂致獲得更高之多精入卵率與雄原核形成率。

電刺激可以導致卵母細胞之致活作用 (Wang *et al.*, 1998)，其原因乃電刺激後卵母細胞內鈣離子被釋放，導致卵母細胞完成減數分裂，並形成原核。本試驗發現，具 C/C 或 C/T 型 RyR 卵母細胞之致活率相同，惟產生原核數目卻不同，是否為電刺激時，因為 C/C 與 C/T 之 RyR 釋放鈣離子之作用不同，亦或是此二型卵母細胞在成熟過程中，由於細胞質成熟作用之差異，導致原核形

成數不同，仍待進一步研究。

結 論

豬卵母細胞體外成熟作用不受鈣離子通道 RyR 遺傳型之影響，惟 C/T 型較 C/C 型者有較高之多精入卵率與雄原核形成率。

參考文獻

- 馬春祥。1971。家畜育種學，第 372-424 頁。國立編譯館，正中書局，台北。
- 鄭益謙、劉名允、劉學陶、黎漢龍。1997。豬緊迫綜合症之基因型檢測技術探討。中華獸醫誌 23: 274-282。
- 鄭登貴。1985。試管豬-豬卵體外受精之研究。畜產研究 18: 99-142。
- Bavister, B. D., M. L. Leibfried, and G. Lieberman. 1983. Development of preimplantation embryos of golden hamster in a defined culture medium. *Biol. Reprod.* 28: 235-247.
- Fill, M., R. Coronado, J. R. Mickelson, J. Vilven, J. J. Ma, B. A. Jacobson, and C. F. Louis. 1990. Abnormal ryanodine receptor channels in malignant hyperthermia. *Bio. J.* 50: 471-475.
- Fujii, J., K. Otsu, F. Zorzato, S. deLeon, V. K. Khanna, J. E. Weiler, P. J. O'Brien, and D. H. MacLennan. 1991. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* 253: 448-451.
- He, C. L., P. Damiani, J. B. Parys, and R. A. Fissore. 1997. Calcium, calcium release receptors, and meiotic resumption in bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 57: 1245-1255.
- Homa, S. T. 1995. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. *Mol. Reprod. Dev.* 40: 122-134.
- Machaty, Z., H. Funahashi, B. N. Day, and R. S. Prather. 1997. Developmental changes in the intracellular Ca^{2+} release mechanisms in porcine oocyte. *Bio. Reprod.* 56: 921-930.
- MacLennan, D. H., and M. S. Phillips. 1992. Malignant hyperthermia. *Science* 256: 789-794.
- Mickelson, J. R., E. M. Gallant, L. A. Litterer, K. M. Johnson, W. E. Rempel, and C. F. Louis. 1988. Abnormal sarcoplasmic reticulum ryanodine receptor in malignant hyperthermia. *J. Biol. Chem.* 263: 9310-9315.
- Miyazaki, S., H. Shirakawa, K. Nakada, and Y. Honda. 1993. Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate / Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev. Biol.* 158:

62-78.

- Simpson S. P., and A. J. Webb. 1989. Growth and carcass performance of British Landrace pigs heterozygous at the halothane locus. *Anim. Prod.* 49: 503-509.
- Sun F. Z., J. P. Bradshaw, C. Galli, and R. M. Moor. 1994. Changes in intracellular calcium-concentration in bovine oocytes following penetration by spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 101: 713-719.
- Swann, K., and J. Parrington. 1999. Mechanism of Ca^{2+} release at fertilization in mammals. *J. Exp. Zoo.* 285: 267-275.
- Wang, W. H., L. R. Abeydeera, R. S. Prather, and B. N. Day. 1998. Functional analysis of activation of porcine oocyte by spermatozoa, calcium ionophore and electrical pulse. *Mol. Reprod. Dev.* 51: 346-353.
- Yue, C., K. L. White, W. A. Reed, and E. King. 1998. Localization and regulation of ryanodine receptor in bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 58: 608-614.
- Yue, C., K. L. White, W. A. Reed, and T. D. Bunch. 1995. The existence of inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors in mature bovine oocytes. *Development* 121: 2645-2654.

97年03月05投稿

97年07月02接受