

## 미꾸라지 난자의 활성화에 의한 처녀발생 유기

이재현 · 최석용\* · 주완중\* · 박홍양 · 이상호\*

건국대학교 동물자원연구센터

## Early Development of Loach Oocytes Activated by Parthenogenetic Agents

Lee, J.H., S.Y. Choi\*, W.J. Joo\*, H.Y. Park and S.H. Lee\*

Animal Resources Research Center, Kon-Kuk University

### SUMMARY

We examined early development in loach (*Misgurnus mizolepis*) embryos with parthenogenetic agents well-known in mammals. Female loach was superovulated with an intraperitoneal injection of 15 IU human chorionic gonadotrophin (hCG) per gram body weight. After 13 h of hCG injection, the oocytes were obtained from the abdomen. The oocytes were activated with 10% ethanol in tap water or fish Ringer's solution for 5, 10 and 15 minutes (eTW5, 10, 15 and eFRS5, 10, 15), respectively. The activation rates were 29% and 10% in eFRS10 and eFRS15, 5% and 6% in eTW10 and eTW15 by judging the cleaved blastomeres. Whereas, no parthenogenetic embryo was produced by tap water or fish Ringer's solution alone. The activation rate with the fish Ringer's solution was higher than that of tap water. No embryonic development was observed by calcium ionophore, A23187, at concentrations of 10, 20, 40 and 100  $\mu$ M when treated for 1, 2.5 and 5 minutes, respectively. The activation agents did not cause early development as in mammalian eggs. Therefore, the results suggest that fresh water fish may have a different egg activation pathway from that of mammals.

**Key words:** parthenogenetic agents, early development, loach eggs

### I. 서론

고등동물로서 양서류, 파충류, 조류의 처녀발생은 비교적 오래 전에 보고된 예가 문헌에 나타나 있으며 (Beatty, 1957) 포유동물에 있어서도 착상전기 및 후기배까지의 발생이 생쥐를 중심으로 햄스터, 돼지, 소 등에서도 보고가 되어 있으며, 특히 초기배발생은 정상적으로 일어나는 것으로 알려져있다 (Austin, 1945; Cuthbertson, 1983; Lee, 1992)

한편 어류에 있어서는 모계발생 (gynogenesis)에 관한 연구는 활발히 진행되어 이용되고 있으나 처녀발생 (parthenogenesis)에 관한 연구가 거의 이루어지지 않고 있다. 이같이 처녀발생에 관한 시험보고가 없는 이유가 모계발생의 유도에 타종의 정자를 이용하여 난자활성화에 의해 발생·분화를 유기하는데 이용하고 있는 것과 관련이 있는 것으로 추정되나 처녀발생의 난자 활성화 경로가 유사한 수정 과정중 담수에서는 각종 ion들의 구성이 전혀 상이하야 그 방법이 확립되어 있지 않다. 따라서 본 실험은 담수어류의 모델로 미

\*고려대학교 자연자원대학 응용동물과학과 (Dept. of Animal Science, College of Natural Resources, Korea University)

꾸라지 난자의 처녀발생의 가능성을 조사하기 위해 기  
타동물에서 기존에 알려져 있는 처녀발생 유기물질에  
의해 초기발생을 검토하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시동물

미꾸라지를 구입하여 암수 분리 후, 수은 24~26℃  
인 수조에 적응 사육시켰다. 사육 기간중 성숙을 유기  
하기 위하여 어류용 배합사료(신촌 사료사, 서울)를  
급여하였으며, 사육수의 정화를 위해 간이형 여과기를  
부착하였다.

### 2. 생식세포의 회수

성숙난자를 회수하기 위해 human chorionic gon-  
adotropin(hCG, Profasi 5000, Serono, Co., Aub-  
onne, Swiss)주입에 의한 과배란 처리를 실시하였다.  
hCG 복강주사를 위해 미꾸라지 암컷을 100ppm의  
2-methylquinoline(Quinaldine, Sigma Chemical  
Co., St. Louis, Mo, USA)에 2~3분간 넣어 마취시  
킨 후, 복강내에 체중 g당 15 IU의 hCG를 주사하였  
다. hCG주사 10~13시간 후에 복부에 부드럽게 압력  
을 가하여 난자를 회수 하였다. 정자의 회수는 수컷의  
복부를 절개하여 정소를 적출한 후 활력검사를 실시하  
여 활력이 좋은 정자를 사용했다.

### 3. 인공수정(Artificial fertilization)

대조구로서 수정에 의한 정상발생은 이미 보고된 방  
법에 준하여 실시하였다(Lee et al., 1993)

### 4. 처녀발생의 유기

#### 1) Ethanol 처리

4군의 활성화 처리구와 1군의 인공수정(artificial  
fertilization, AF) 대조구를 설정하였다. ethanol 처  
리구는 신선한 물(sterilized tap water, TW) 또는  
fish Ringer's 용액(FRS: Yamamoto, 1961)에  
ethanol을 10%을 (v/v)씩 첨가한 용액에서 각각 5,  
10, 15분간(이하 eTW5, eTW10, eTW15, eFRS5,  
eFRS10, 및 eFRS15) 난자를 처리하였으며, etha-  
nol을 첨가하지 않은 신선한 물 또는 fish Ringer's 용

액만으로 (이하 TW5, TW10, TW15, FRS5,  
FRS10, FRS15) 처리하여 대조구에서의 난자 활성화  
가능 여부를 조사하였다. ethanol 처리 후 잔여 etha-  
nol을 제거하기 위하여 신선한 물로 3회 세척한 후, 신  
선한 물에 넣어 배양하였다.

#### 2) Calcium ionophore 처리

ethanol 처리에 의한 처녀발생 유기와 비교하기 위  
해 calcium ionophore A23187를 신선한 물과 fish rin-  
ger's 용액에 각각 초종농도 10, 20, 40, 및 100 μM로  
1, 2.5, 5 및 10분간 처리한 후, 발생을 유기시켰다.

#### 5. 초기배 핵의 가시화

핵을 가시화하여 처녀발생 및 AF 초기배의 특징을  
분석하기 위해 상온에서 20분간 40 μg/ml 농도의  
Hoechst 33258로 염색, 세정한 후, 형광 현미경 하에  
서 관찰하였다.(Lee et al., 1993)

#### 6. 사진 촬영

발달중인 초기배를 Kodak colour film(ASA 100,  
Kodak, Seoul, Korea)과 Wild M8 Stereo micro-  
scope(Wild Heerbrugg Ltd., Switzerland)를 이용  
하여 촬영했다. 형광염색된 초기배의 핵은 Kodak col-  
our film(ASA 400, Kodak)과 Orthoplan Leitz  
microscope(Ernst Leitz GMBH Wetzler, Ger-  
many)를 사용하여 활용하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. Ethanol의 처리효과

미꾸라지의 초기발생에 대한 시간적·공간적 발달  
은 이미 보고되어 확립되어 있다(Lee et. al., 1993).  
따라서 대조구로서 정상 초기발생과 비교하여 조사하  
였다. 처녀발생 난자의 비율은 eFRS10 처리구에서  
41개 난자중 12개(29%)가 활성화되었고 eFRS15 처  
리구에서는 42개의 난자중 5개(10%)가 발생하였다.  
한편 eTW10 처리군에서는 51개의 난자중 3개(5%),  
eTW15 처리군에서는 49개의 난자중 4개(6%)의 난  
자가 활성화되었고 이 중에서 1개의 난자가 초기낭배  
기까지 발달하였다. FRS와 TW만으로 처리한 군에서  
는 처녀발생이 진행되지 않았으므로 이같은 난자의 활

**Table 1. Early development of parthenogenetically activated loach eggs by various concentration of ethanol in different solution**

Treatment <sup>1</sup>	No. of the egg used	No. of the egg activated(%)	No. of the eggs <sup>2</sup> survived(%)
AF	71	0 (0)	49 (60)
TW	39	0 (0)	0 (0)
FRS	46	0 (0)	0 (0)
eTW5 <sup>3</sup>	41	0 (0)	0 (0)
eTW10	51	3 (5.8)	2 (3.9)
eTW15	49	4 (8.1)	2 (4.1)
eFRS5 <sup>4</sup>	35	0 (0)	0 (0)
eFRS10	41	12 (12.3)	5 (12.2)
eFRS15	42	5 (11.9)	2 (4.8)

<sup>1</sup> Abbreviations are AF, artificial fertilization; TW, tap water; FRS, fish Ringer's solution.

<sup>2</sup> Survived egg developed over gastrula stage.

<sup>3</sup> 10% ethanol in tap water.

<sup>4</sup> 10% ethanol in fish Ringer's solution.

성화는 ethanol에 의한 처녀발생이라는 것을 확인할 수 있었다. 즉 포유동물에서와 같이 노화에 의해서는 처녀발생이 유기 되지 않았으며 물과 어류 생리적 식염수와 같이 다른 삼투농도에서도 차이를 보이지 않았다.

eTW 처리군보다 eFRS 처리군의 활성화가 높게 나타난 것은 eFRS 처리시 ethanol에 의해서 난자막에 미세한 구멍이 생성되고 그 곳으로 Ca<sup>2+</sup>가 유입되어 난자의 활성화를 향상시킨 것으로 추정된다(Steinhardt and Epel, 1974). eTW5, eFRS5 처리군은 난자막의 구멍을 활성화에 필요한 적정수준의 보다 적게 형성시켰을 것이며 비록 생겼더라도 활성화시키기에는 짧았을 것으로 생각된다. 단지 신선한 물보다는 fish Ringer's 용액 내에서 수정 전·후의 난자의 fragmentation에 대한 보전이 좋아서 fish Ringer's 용액의 활성화율이 높게 나타난 것으로 보인다. 그러나 신선한 물과 fish Ringer's액 처리구에서는 특별한 처녀발생의 차이를 나타내지 않았다.

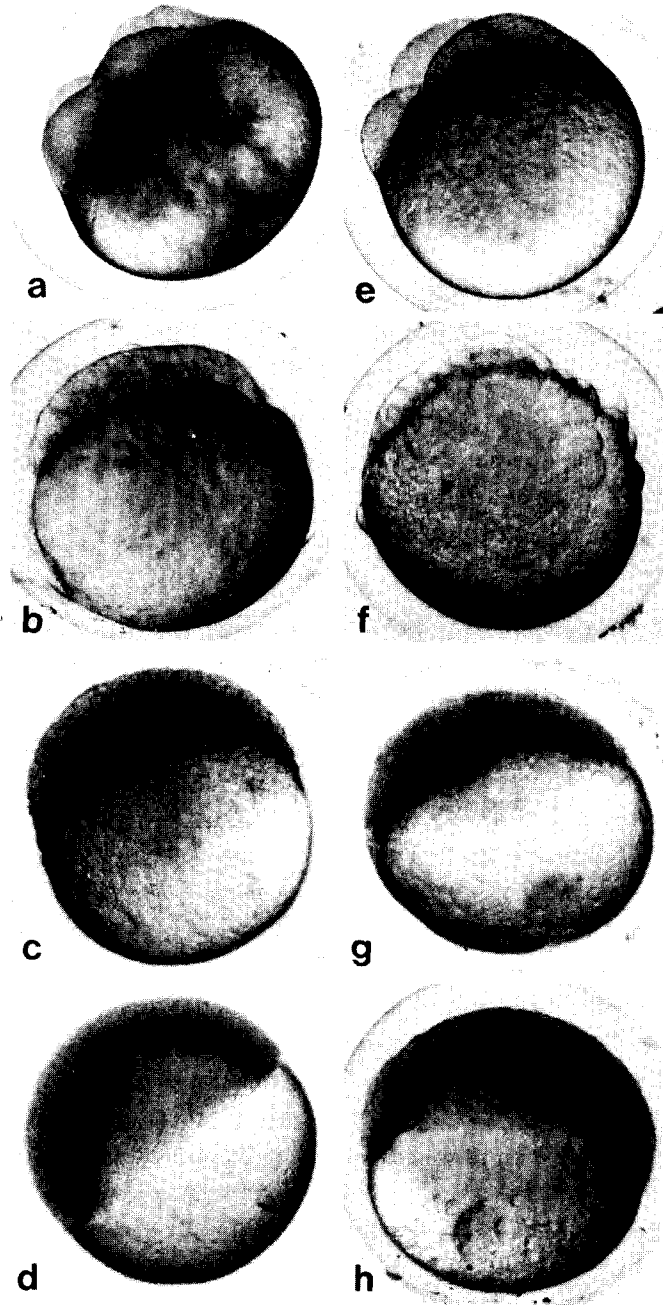
AF 대조구의 수정율이 약 60%로 나타나 난자의 생태가 비교적 양호함을 보여주었다. 포배기까지 발달한 난자를 19시간 후에 관찰한 결과, AF 대조구 난자중 49개의 초기배가 부화되어 치어가 생산되었으나 처녀발생난자는 낭배기이후 모두 사멸하였다. 타종에 있어서는 잉어(*Cyprinus carpi*)의 난자를 사람의 타액으

로 처리한 후 70여일 간 처녀발생개체가 생존한 결과가 보고되었다(Kasansky, 1935; cited in Yamamoto, 1961).

Ethanol 처리에 의해 활성화된 난자와 AF 난자는 발생과정중 형태적 차이를 나타내었다. AF 초기배의 할구는 동일한 형태와 크기로 난할이 이루어지나 처녀발생난은 난할형태가 발생초기에는 이형분열과 유사한 양상을 보이거나 발생이 진행됨에 따라 분열된 할구수가 많아지고 치밀해지기 때문에 발생후기에서는 수정란과 유사한 형태로 발달하였다.

처리 1시간 경과 후 AF 난자는 4 세포기에 도달했으나 ethanol 처리군은 아직 1세포기 단계에 머물러 있어 처녀발생여부를 확인할 수 없었으나, 처리 1시간 40분 후 AF 난자는 16세포기로 발달했고 처으므로 ethanol 처리 난자가 난할을 시작하여 4세포기에 도달하였다. 이와 같이 처녀발생 초기배는 초기발생이 정상 수정된 AF 초기배보다 느리게 진행되는 경향을 나타내었다.

상실기 이후, 동물극의 양쪽에서 활발한 분열이 일어나기 시작하여 점차로 중앙부위로 확산되어 5시간 후 초기포배기의 형태를 나타내고 발생이 계속 진행되다가 후기포배기에서 대다수의 난자가 사멸하였다. 이와 같이 분열 속도는 상실배까지는 처녀발생 초기배가 느리나 포배기에서부터는 거의 동일하게 보이는데 이

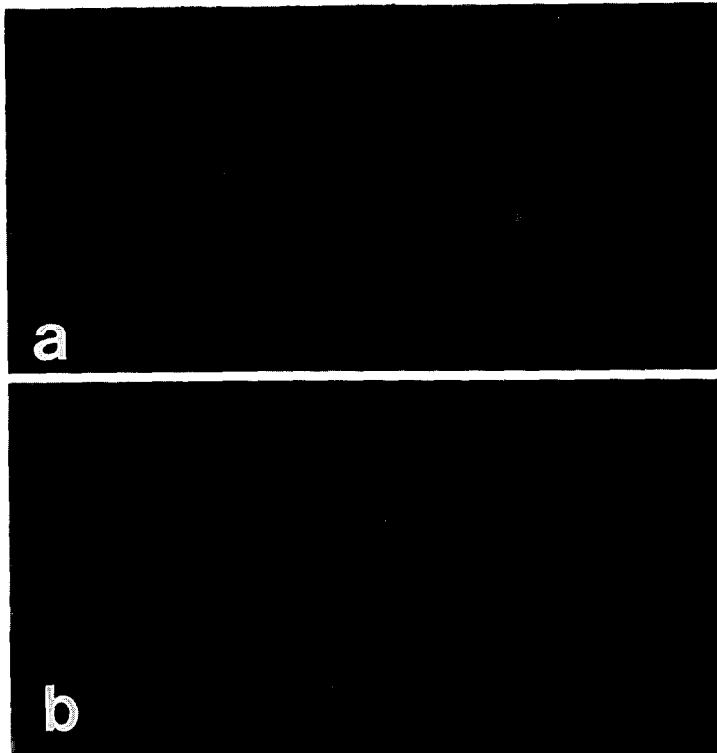


**Fig. 1.** Comparative development of normal fertilized(a, b, c and d) and parthenogenetic embryo(e, f, g and h). Note the various vesicular forms found in the yolk region of parthenogenetic embryos. Parthenogenetic morula(f) and blastula stage embryos(g) showing multiple cellular compartments in the region of animal pole of the embryos. The development pattern is very similar to that found in normal fertilized embryo.

는 치녀발생 초기배의 발생속도가 빨라지는 것이 아니라 AF 초기배의 상실배기가 길고 변화가 미미하기 때문인 것으로 추정된다. 따라서 치녀발생 초기배의 형태는 AF 초기배에 비해 할구수가 적으며 난황부위 면적도 적었다. 또한, 치녀발생 초기배는 난황부위에 크고 작은 여러 개의 vacuole이 나타나 AF 초기배와는 명확한 차이점을 나타내었다(Fig. 1). 앞서 논의한 바와 같이 세포수가 적은 것이 치녀발생배의 특징인 것으로 보여 과연 이같은 형태적으로 정상세포들이 핵을 가지고 있는가를 확인하기 위해 DNA 특이 결합 형광 염료인 Hoechst 33258을 이용하여 조사하였다. 핵을 염색한 결과 치녀발생 초기배는 AF 초기배에 비해 핵의 크기가 일정하지 않고 그 수도 적은 것을 확인하였다(Fig. 2).

## 2. Calcium ionophore의 처리효과

한편 calcium ionophore를 이용한 처리군에서는 농도, 처리시간, media의 종류에 관계없이 치녀발생은 전혀 이루어지지 않았다(Table 2). Steinhardt와 Epel(1974)에 의하면 성계의 난자에 calcium ionophore A23187을 처리하여 치녀발생을 유도하였다고 보고하였으나 이들의 치녀발생 판정기준이 membrane elevation으로 설정되어 위란강의 형성은 관찰되었으나 난황은 진행되지 않았다고 한다. 이같이 해수 및 포유동물에 있어서는 각종 ion의 농도가 높은 환경에 난자가 존재하여 난자활성화시 각종 이온의 유입 유출이 일어나지만 담수어류 난자에 있어서는 이같은 유사한 이온의 유입이 일어나지 않는 것으로 추정된다. 본 실험에 이용된 미꾸라지 미수정란의 경우, 징자 또는 다른 물질의 첨가 없이도 신선한 물에서 자연적



**Fig. 2. Confirmation of numerous nuclei present in the dividing cells in a normal fertilized(a) and a parthenogenetic embryo(b). The number of nuclei are much higher in the normal embryos. However, the Hoechst-stained nuclei demonstrated that parthenogenetic development was not just cell fragmentation. Several mitotic nuclei can be seen in the parthenogenetic embryo.**

**Table 2. The parthenogenetic activation of loach eggs by calcium ionophore(A23187)<sup>1</sup>**

Concentration of A23187( $\mu$ M)	Media <sup>2</sup>	Duration of treatment (min)	No. of the eggs used	No. of the activated eggs(%)
10	FRS	5	108	No development
	FRS	2.5	128	
	FRS	10	150	
	TW	5	124	
20	FRS	2.5	139	No development
	FRS	5	83	
	FRS	10	149	
	TW	2.5	91	
	TW	5	100	
40	FRS	1	97	No development
	FRS	2.5	116	
	TW	5	87	
100	FRS	1	106	No development
	TW	5	97	

<sup>1</sup> The percentage of the hatching of control, artificial insemination, is 89.2%

<sup>2</sup> Abbreviations are TW, tap water; and FRS, fish Ringer's solution.

으로 membrane elevation이 일어나므로 이러한 경향을 처녀발생의 기준으로 설정할 수가 없다. 따라서 효율적인 처녀발생의 유기를 위해서는 ethanol과 calcium ionophore의 공배양 효과가 조사되어야 할 것이다.

본 연구에서는 온수성 어류인 미꾸라지 난자를 처음으로 ethanol에 의한 처녀발생을 유기시켜 앞으로 이들 처녀발생인 난자에 물리·화학적 처리를 이용한 체세포분열 억제에 의해 2 배체 정상개체를 생산함으로써 실험동물로 매우 유용한 유전적으로 동일한 하나의 근교계를 확립하기 위한 연구가 이루어져야 할 것이다.

#### IV. 적 요

미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*)를 수온 25℃의 수조 내에서 적용 시킨 후 hCG를 복강내 주사하여 과배란을 유기하였다. 주사 13시간 후에 난자를 회수하여 10% ethanol이 첨가한 신선한 물(TW), fish Ringer's 용액(FRS)을 이용해서 5분, 10분, 15분간(이하 eTW 5, 10, 15, eFRS5, 10, 15) 처리하여 처녀발생을 유도하였다. eFRS10 처리구에서는 29% eF-

RS15 처리구에서는 10%, 그리고 eTW10 처리구에서는 5%, eTW15 처리구에서는 6%의 처녀발생난자가 발생하였다. 처녀발생난자는 대조군인 인공수정난자에 비해 초기에는 발달이 지연되었으나 포배기 이후는 동일한 발달 속도를 나타냈고 낭배기 이후에 모두 사멸하였다. 또한 현광염색으로 핵을 조사한 결과 처녀발생난자는 핵의 크기가 일정치 않으며, 핵의 수도 대조군에 비해 적은 것을 확인하였다. 반면 calcium ionophore의 처리군에서는 처리시간과 농도에 관계없이 처녀발생은 전혀 이루어지지 않았다. 이와 같은 결과로 볼 때, 미꾸라지 난자는 ethanol처리에 의해 효과적으로 처녀발생을 유기할 수 있는 것으로 확인되었다. 이 기술은 앞으로 어류난자의 다양한 유전적 조작에 의한 이 배수체 및 다배체의 생산에 기여할 것으로 기대된다. 또한 본 결과는 담수어난자의 처녀발생은 포유동물과는 다른 활성화 경로가 있음을 시사한다.

#### V. 인용문헌

1. Austin, C.R. and A.W.H. Braden. 1945. Anomales in rat, mouse and rabbit eggs. Aus. J. Biol. Sci. 7:537.

2. Beatty, R.A. 1957. Parthenogenesis and polyploidy in mammalian development. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
3. Beatty, R.A. 1967. Parthenogenesis in vertebrate. In: Fertilization vol I. Metz, C. B. & Monroy, A. eds. pp. 413~440. Academic Press, New York, NY, U.S.A.
4. Cuthbertson, K.S.R. 1983. Parthenogenetic activation of mouse oocytes *in vitro* with ethanol and benzyl alcohol. U. Exp. Zool. 226:311~314
5. Kasansky, W.J. 1935. Parthenogenetisch entwickelte junge karpfen(*Cyprinus carpio*, L.) Zool. Anz., 110:191.(cited in Yamamoto, 1961).
6. Lee, S.C. 1992. *In Vitro* Development of mouse oocytes activated by ethanol. MSc. Thesis, Korea University, Seoul, Korea.
7. Lee, J.H., H.Y. Park and S.H. Lee. 1993. Spatial and temporal analyses of early embryonic development in loach(*Misgurnus mizolepis*). Korean J. Anim. Sci. 35:155-162.
8. Steinhardt, R.A. and D. Epel. 1974. Activation of sea-urchin eggs by a calcium ionophore. Proc. Natl. Acad. Sci. 71:1915-1919.
9. Yamamoto, T. 1961. Physiology of fertilization in fish eggs. Int. Rev. Cytol. 12:361-405.