생쥐 난자의 활성화에 따른 Ca^{2+}-channel의 분포 변화에 관한 연구

성신여자대학교 생물학과

장연수, 배인하

Studies of changes of Ca^{2+}-channels distribution in the activated mouse ova

Yeon-Soo Chang, In-Ha Bae

Department of Biology, College of Natural Sciences, Sungshin Women's University, Seoul, Korea

Objective: In muscle and neuronal cells, calcium channels have been classified by electrophysiological and pharmacological properties into (1) voltage-dependent Ca^{2+}-channel ① P/Q-type Ca^{2+}-channel ② N-type Ca^{2+}-channel ③ L-type Ca^{2+}-channel ④ T-type Ca^{2+}-channel ⑤ R-type Ca^{2+}-channel.

Method: The immunocytochemical method was used to identify the existence of voltage-dependent Ca^{2+}-channels in parthenogenetically activated 2-cell embryos by ethanol and $SrCl_2$ treatment. These 2-cell embryos were obtained by exposure to 6% ethanol for 6min and to 10mM $SrCl_2$ for 2h.

Results: P/Q-type Ca^{2+} channels and L-type Ca^{2+}-channels have been identified. Whereas, three type of Ca^{2+}-channel P/Q-type, N-type, L-type have been identified in 2-cell embryos fertilized in vivo.

Conclusion: activation by ethanol was faster than those by $SrCl_2$. However, there was difference in DAB staining of the embryos between

ethanol and $SrCl_2$ treatment(87.7% and 54.1%). Intensity of staining was also different between ethanol- and $SrCl_2$-treated group. However, it has not been known why there was some difference in DAB staining and staining intensity in the present study.

Key words: Parthenogenesis, Mouse oocyte, Ca^{2+}-channel

포유류의 배란된 난자(ovulated oocytes)는 활성화(activation)될 때까지 제 2 감수분열 중기(second meiotic metaphase, MII)에 멈춰있게 되는데, 이를 MII arrest라고 한다. 정지된 난자의 활성화는 정자에 의한 수정(fertilization) 또는 다양한 물리、화학、기계적 자극(physical, chemical, mechanical stimuli)에 의한 단위생식 유도에 의해 일어날 수 있다.

한편 세포 내 칼슘을 증가 시켜 단위생식을 유도하는 물질인 ethanol과 strontium은 ethanol의 경우 한번의 Ca^{2+}증가(single Ca^{2+} peak)를 보이는 반면,[1~3] $SrCl_2$는 연속적인 일련의 Ca^{2+} 증감(Ca^{2+} oscillation)을 보여 이 두 가지 물질에 의한 활성화(activation)에는 차이가 있다고 할 수 있다.[4]

이와 같은, 난자 활성화 시의 Ca^{2+} 증가(Ca^{2+} transient)는 부계에 의한 유도 기작(paternally derived mechanism[5])이다. 그러므로 Ca^{2+} 증가 양상에 차이를 보이는 부계에 의한 즉, 정자에 의해서 활성화가 유도된 배와 단위생식적으로 활성화된 배, 그리고 단위생식적으로 활성화가 되었으나 Ca^{2+}의 증감 양상이 다른 배에서의 Ca^{2+}-channel의 비교는 중요하다고 할 수 있겠다. 현재까지 알려진 Ca^{2+}-channel은 근육 세포 및 신경 세포 등에서 크게 (1) Voltage-dependent Ca^{2+}-channel ① P/Q-type Ca^{2+}-channel ② N-type Ca^{2+}-channel ③ L-type Ca^{2+}-channel ④ T-type Ca^{2+}-channel ⑤ R-type Ca^{2+}-channel (2) Ligand-gated Ca^{2+}-channel (3) Ca^{2+} leak channel 등의 세 종류가 알려져 있다. 포유동물의 난자나 수정 후 배에서 어떤 종류의 Ca^{2+}-channel이 존재하는 지에 대해서는 최근 confocal laser scanning microscope와 P-type Ca^{2+}-channel inhibitor인 ω-agatoxin을 이용하여 P-type Ca^{2+}-channel의 존재를 돼지난자에서 입증한 보고가 있으며,[6] 그리고 본 실험실에서도 voltage-dependent Ca^{2+}-channel antibody를 이용한 면역세포화학방법(immunocytochemical methods)으로 여포난자(follicular oocyte)에서의 Ca^{2+}-channel을 동정하여 P/Q-type Ca^{2+}-channel, N-type Ca^{2+}-channel, L-type Ca^{2+}-channel의 세 종류가 존재함을 밝힌 정도이다.[7] 이 이전의 연구들은 Ca^{2+}-channel의 존재를 입증하거나 Ca^{2+}-channel antagonist를 이용한 간접적인 Ca^{2+}-channel의 존재만을 추정한 연구들은 있었지만[8~10] 어떤 type의

Ca^{2+}-channel이라고 밝힌 것은 상기의 두 논문 뿐이다.

따라서 본 실험에서는 voltage-dependent Ca^{2+}-channel antibodies를 이용한 면역세포화학적 방법으로 배란된 생쥐난자를 각각 활성화 속도가 다른 6% ethanol로 6분, 10mM $SrCl_2$로 2시간간 처리하여 단위생식적으로 활성화시킨 뒤 24시간 후의 2세포기 배와 정자에 의해 체내에서 수정된 초기 2세포기 배를 수집하여 Ca^{2+}-channel을 동정, 비교하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 실험 동물

본 실험에 사용한 실험 동물은 광주기를 14시간, 암주기를 10시간으로 조절하고, 물과 먹이가 충분하게 공급된 상태에서 사육된 건강한 생쥐(ICR strain)로 생후 6-8주된 암컷을 사용하였다. 체내에서 성숙되어 배란된 MII 상태의 난자를 획득하기 위하여 생쥐 암컷의 복강에 pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG, Sigma) 5IU(international units)를 주사한 후 48시간 후에 human chorionic gonadotropin(hCG, Sigma) 5IU를 주사하여 과배란(superovulation)을 유도하였다.

2. 난자와 배의 수집

(1) 배란된 난자

hCG 주사 후 15-16시간에 생쥐를 경추파열로 도살하여 수란관을 적출한 뒤 배양액으로 세척한 후 해부현미경(Wild, M5A, Swiss) 하에서 수란관의 팽대부(ampulla region)를 찢는 방법으로 난자-난구 복합체(oocyte-cumulus complex)를 얻었다. 난자-난구 복합체를 0.1% hyaluronidase(Sigma)가 포함된 배양액에서 3분간 처리한 후 3회 세척하였다. 수획한 난자는 해부현미경 하에서 관찰하여 건강한 제 2 감수분열 중기(Metaphase II, MII) 상태의 난자만을 수집하여 실험에 사용하였다.

(2) 초기 2세포기 배

초기 2세포기 배를 얻기 위하여 과배란을 유도한 후 생식력 있는 생후 12주 이상된 수컷과 합사시켜 다음 날 아침 질전(vaginal plug)이 확인된 암컷을 hCG 주사 후 33시간에 생쥐를 경추파열로 도살하여 수란관을 적출한 뒤 배양액으로 세척한 후 해부현미경(Wild, M5A, Swiss) 하에서 수란관의 입구(infundibulum)에 끝을 둥글게 만든 30G 바늘을 삽입하여 씻어 내리는 방법으로 초기 2세포기 배를 수집하

였다.

3. 난자의 단위생식적 활성화와 배양

모든 실험에 사용한 기본 배양액은 M16 배양액[11]으로 하였으며 모든 배양액의 pH는 7.30-7.40, 삼투압은 280-290mOsm[12]이 되도록 하였다. 난구세포를 제거한 난자 중 MII 상태가 확인된 난자만을 선별하여 M16 배양액이 6% ethanol(Carlo Erba Reagenti)을 포함하도록 하여 6분간[13~15] 처리하였다. 그리고 Ca^{2+}이 들어있지 않은(Ca^{2+}-free) M16 배양액에 10mM $SrCl_2$($SrCl_2$、$6H_2O$, Sigma)를 포함하도록 하여 2시간 동안 노출시켜 활성화 시켰다.[4,5,16~19] Ethanol과 $SrCl_2$로 단위생식적으로 활성화시킨 후 기본 배양액으로 3번 세척 한 뒤 light mineral oil(Sigma)로 덮여 있는 배양액에서 37℃가 유지되고 5% CO_2와 95%의 공기가 공급되고 100% 습도가 유지되는 배양기 내에서 24시간 배양하였다.

본 실험에 사용된 모든 초자기구는 건열멸균(160℃, 90min.) 또는 고압멸균(120℃, 15Lb/inch^2, 15min.)하였다. 모든 배양액의 조성성분과 처리물질은 특별한 언급이 없는 한 Sigma제품(Sigma Chemical Co., U.S.A.)을 사용하였다.

4. 관찰

24시간 배양 후 난자의 상태를 간섭 위상차 도립현미경(inverted phase contrast microscope, Leitz, Germany) 하에서 관찰하였다. 관찰 결과는 제 1 극체(polar body, PB)를 갖고 있는 것을 MII시기, 제 2 극체를 갖고 있는 것을 2PB 시기, 전핵(pronucleus, PN)이 보이는 것을 PN시기, 2세포기 배로 분열을 한 것을 2C시기, 3세포기 배는 3C시기, 4세포기 배는 4C시기, 그리고 세포질이 응축되거나 액포가 형성된 비정상적인 것과 비정상적인 발생(fragmentation)을 보인 것을 퇴화(degeneration, Deg)로 분류하였다.

5. 면역조직화학적 방법(Immunocytochemical methods)을 이용한 Ca^{2+}-channel의 동정

1) 항체

일차항체(primary antibody)는 voltage-dependent Ca^{2+}-channel antibodies(Alomone labs, Israel)인, P/Q-type Ca^{2+}-channel, N-type Ca^{2+}-channel, L-type Ca^{2+}-channel을 사용하였는데, P/Q-type Ca^{2+}-channel 항체는 rat brain의 voltage-dependent Ca^{2+}-channel α_{1A} subunit의 865-881 residues에 해당하는 CNA1을 keyhole limpet hemocyanin에 접합(conjugation)한

항원을 토끼에 주사하여 얻은 polyclonal 항체를 이용하였다. N-type Ca^{2+}-channel 항체는 α_{1B} subinit의 851-867 residues를, L-type Ca^{2+}-channel 항체는 α_{1C} subunit의 경우에는 818-835 residues를, α_{1D} subunit는 809-825에 대한 keyhole polyclonal 항체를 사용하였다. 각각의 일차항체를 0.01M PBS와 10% BSA로 anti-α_{1A}의 경우 1:120, anti-α_{1B}와 anti-α_{1C}는 1:400, anti-α_{1D}는 1:300의 농도로 희석하여 사용하였다.

이차항체(secondary antibody)는 biotin-labeled goat anti-rabbit antibody로 1:200으로 희석하여 사용하였다.

2) 면역 염색

단위생식적으로 활성화시킨 후 24시간 뒤 2세포기 배를 수집하여 whole cell mounting 방법으로 고정(fixation)하였다. 초기 2세포기 배는 별도의 배양과정 없이 수집 후 곧바로 고정하였다. 고정액으로는 4% paraformaldehyde(Merck)가 들어 있는 0.1M phosphate buffer(PB, pH 7.40)용액을 사용하여[20] 30분간 실온에서 처리하였다. 고정 후 0.1M PB(phosphate buffer)로 3분간 2번 세척하였고 다시 0.01M PBS(phosphate buffered saline, pH 7.40)로 3분간 1번 세척하였다. 비특이적인(nonspecific) 반응의 억제를 위해 1시간동안 실온에서 normal goat serum을 처리하였다. 1시간 후 0.01M PBS로 3분간 3번 세척하였다. 일차항체(primary antibodies)는 4℃에서 16시간동안 처리하였으며, 일차항체를 처리하지 않은 대조군(control)은 그대로 normal goat serum만을 처리하였다.

이차항체(secondary antibody) 처리 전 0.01M PBS로 3분간 3번 세척하였다. 이차항체를 1시간동안 실온에서 처리하였다. 다시 0.01M PBS로 3분간 3번 세척한 후, ABC(avidin biotin peroxidase complex)를 30분간 처리하였다.[21] ABC 처리가 끝나면 0.01M PBS로 3분간 2번 세척하고 다시 0.1M Tris-buffer로 3분간 3번 세척하였다.

마지막으로 발색시약인 0.05% DAB(diaminobezidine tetrahydrochloride, Sigma)를 처리하여 Ca^{2+}-channel을 동정하였다. 이 발색시약은 0.5% DAB가 들어있는 0.1M Tris-buffer에, 0.1M Tris-buffer, 10% H_2O_2(Merck)를 100:900:1의 비율로 섞어서 사용하였다. 발색 반응 시간은 10분으로 일정하게 하였다. 10분 후 0.01M의 PBS로 3분간 2번 세척하고 사진 촬영을 하였다. 세척용액으로 사용한 0.1M PB, 0.01M PBS(phosphate buffered saline), 0.1M Tris-buffer는 모두 0.1% BSA를 포함한 것을 사용하였다. 또한 본 실험에 사용된 normal goat serum, 이차항체, ABC(avidin biotin peroxidase complex)는 Vectastain ABC Kit(Vector laboratories)를 사용하였다.

3) 관찰

단위생식적으로 활성화된 2세포기 배와 체내에서 수정된 초기 2세포기 배의 면역염색은 간섭 위상차 도립현미경(inverted phase contrast microscope, Leitz, Germany) 하에서 관찰, 사진 촬영하였다.

6. 통계 처리

대조군과 실험군의 통계적 유의성은 SAS(Statistical Analysis System)를 이용하여 ANOVA(analysis of variance)로 하였다.

결 과

1. Ethanol에 의한 단위생식적 활성화

(1) 24시간 배양 후 발달

6% ethanol로 단위생식을 유도 한 뒤 24시간 배양한 후 관찰한 결과는 Table 1과 같다. MII상태 및 2PB 상태에 정지해 있는 것이 7.0%이며, 단위생식적으로 활성화되어 전핵(pronucleus, PN)을 형성하고 2, 3, 4세포기로 분열한 것이 74.8%, 퇴화(degeneration)된 것이 18.2%를 차지하였다.

(2) 면역 염색

1) 대조군(control)

일차항체(primary antibody)를 처리하지 않은 대조군의 경우, 전혀 염색(staining)을 보이지 않았다(Fig. 1A).

2) P/Q-type Ca^{2+}-channel (anti-α_{1A} subunit)

P/Q-type Ca^{2+}-channel 항체인 anti-α_{1A} subunit를 처리한 결과는 Table 2와 같다. 염색된 것이 전체의 87.7%로 대조군과는 아주 유의한 차이를 보였다 ($P<0.001$). 87.7% 중 2세포기의 배의 일부분만이 염색된 localized 염색이 85.7%였으며, 반면 할구 전체가 염색된 homogeneous 염색은 2.0%였다(Fig. 2A).

3) N-type Ca^{2+}-channel (anti-α_{1B} subunit)

N-type Ca^{2+}-channel 항체인 anti-α_{1B} subunit의 경우는 P/Q-type Ca^{2+}-channel 항체를 처리한 것과는 달리 일차항체를 처리하지 않은 대조군과 마찬가지로 전혀 염색을 보이지 않아 대조군과 유의한 차이가 없었다.(Fig. 3A).

4) L-type Ca^{2+}-channel (anti-α_{1C} subunit)

L-type Ca^{2+}-channel 항체인 anti-α_{1C} subunit(corresponding to a residue of 818-835 of α_{1C} subunit)를 처리한 결과는 Table 2와 같다. 염색된 것이 전체의 89.9%로 P/Q-type Ca^{2+}-channel 항체를 처리한 것과 마찬가지로 대조군과 유의한 차이를 보였다($P<0.001$). 염색된 것은 모두 localized 염색이었으며, homogeneous 염색은 보이지 않았다(Fig. 4A).

5) L-type Ca^{2+}-channel (anti-α_{1D} subunit)

L-type Ca^{2+}-channel항체인 anti-α_{1D} subunit(corresponding to a residue of 809-825 of anti-α_{1D} subunit)를 처리한 결과는 Table 2와 같다. 염색된 것이 전체의 86.9%로 대조군과 아주 유의한 차이를 보였다($P<0.001$). Localized 염색이 74.8%였고 homogeneous 염색이 12.1%를 나타내었다(Fig. 5A).

2. Strontium에 의한 단위생식적 활성화

(1) 24시간 배양 후 발달

10mM $SrCl_2$로 단위생식을 유도 한 뒤 24시간 후 관찰한 결과는 Table 1과 같다. 활성화되지 않고 정지된 MII 상태가 전체의 2.9%, 2PB만을 형성한 것이 3.9%였으며, 활성화가 일어나 2세포기, 4세포기로 분열한 것이 88.3%, 1.0%, 퇴화(degeneration)된 상태가 3.9%를 차지하였다. 특히 $SrCl_2$로 유도했을 때 2세포기가 88.3%인 것은 ethanol로 단위생식을 유도한 것의 2세포기가 48.8%인 것과 비교해 볼 때 유의한 차이를 나타내었다($P<0.01$).

(2) 면역 염색

1) 대조군(control)

일차항체(primary antibody)를 처리하지 않은 대조군의 경우, ethanol 처리군과 마찬가지로 전혀 염색(staining)이 되지 않았다(Fig. 1B).

2) P/Q-type Ca^{2+}-channel (anti-α_{1A} subunit)

P/Q-type Ca^{2+}-channel 항체인 anti-α_{1A} subunit를 처리한 결과는 Table 3과 같다. 염색된 것이 전체의 54.1%로 대조군과 아주 유의한 차이를 나타내었다($P<0.001$). 염색된 것은 모두 localized 염색을 보였으며 1개의 localized 염색을 보인 것이 40.8%, 2개가 11.2%, 3개가 2.1%로, 특히 1개의 localized 염색을 보인 것이 많았다. 이는 ethanol 처리군의 P/Q-type은 2개의 localized 염색이 많은 것

과는 뚜렷한 차이를 보였다(P<0.001). 또한 염색의 강도도 ethanol 처리군에 비해 약했다(Fig. 2B).

3) N-type Ca^{2+}-channel (anti-α_{1B} subunit)

N-type Ca^{2+}-channel 항체인 anti-α_{1B} subunit의 경우, 대조군 그리고 ethanol 처리군의 anti-α_{1B} subunit와 마찬가지로 전혀 염색을 보이지 않았다(Fig. 3B).

4) L-type Ca^{2+}-channel (anti-α_{1C} subunit)

L-type Ca^{2+}-channel 항체인 anti-α_{1C} subunit를 처리한 결과는 Table 3과 같다. 염색된 것이 전체의 78.0%로 대조군과 아주 유의한 차이를 나타내었다(P<0.001). 염색된 것은 모두 localized 염색을 보였으며, 1개의 localized 염색을 보인 것이 16.0%, 2개가 56.0%, 3개가 6.0%를 나타내었다(Fig. 4B).

5) L-type Ca^{2+}-channel (anti-α_{1D} subunit)

L-type Ca^{2+}-channel인 anti-α_{1D} subunit를 처리한 결과는 Table 3과 같다. 염색된 것이 전체의 75.8%로 대조군과 아주 유의한 차이를 나타내었다(P<0.001). 염색된 것 가운데 localized 염색이 62.7%였으며 homogeneous 염색은 13.1%였다. 1개의 localized 염색을 보인 것이 19.2%이고, 2개가 36.4%, 3개가 3.0%, 4개가 4.1%로 나타났다(Fig. 5B).

3. 초기 2세포기 배의 면역 염색

1) 대조군(control)

일차항체(primary antibody)를 처리하지 않은 대조군의 경우, 마찬가지로 전혀 염색(staining)이 되지 않았다(Fig. 1C).

2) P/Q-type Ca^{2+}-channel (anti-α_{1A} subunit)

P/Q-type Ca^{2+}-channel 항체인 anti-α_{1A} subunit를 처리한 결과는 Table 4와 같다. 염색된 것이 전체의 88.5%로 대조군과는 아주 유의한 차이를 보였다(P<0.001). 88.5% 중 2세포기의 할구 중 일부분만이 염색된 localized 염색이 85.9%였으며, 반면 할구 전체가 염색된 homogeneous 염색은 2.6%였다(Fig. 2C). 초기 2세포기 배의 염색 양상은 ethanol 처리군과는 거의 유사한 양상을 보여주었으나(P=0.99603), $SrCl_2$ 처리군과는 매우 유의한 차이(P<0.001)를 나타내었다.

3) N-type Ca^{2+}-channel (anti-α_{1B} subunit)

N-type Ca^{2+}-channel 항체인 anti-α_{1B} subunit의 경우, 전혀 염색이 안된 단위생식적으로 활성화된 2세포기 배와는 다르게, 염색된 것이 전체의 83.55%로 대조군과는 아주 유의한 차이를 보였다(P<0.001). 83.55% 중 2세포기의 할구 중 일부

분만이 염색된 localized 염색이 67.1%였으며, 반면 할구 전체가 염색된 homogeneous 염색은16.45%였다(Fig. 3C).

4) L-type Ca^{2+}-channel (anti-α_{1C} subunit)

L-type Ca^{2+}-channel 항체인 anti-α_{1C} subunit를 처리한 결과는 Table 4와 같다. 염색된 것이 전체의 83.5%로 대조군과 아주 유의한 차이를 나타내었다($P<0.001$). 염색된 것은 localized 염색이 78.4%, homogeneous 염색이 5.1%를 보였다. (Fig. 4C).

5) L-type Ca^{2+}-channel (anti-α_{1D} subunit)

L-type Ca^{2+}-channel인 anti-α_{1D} subunit를 처리한 결과는 Table 4와 같다. 염색된 것이 전체의 92.3%로 대조군과 아주 유의한 차이를 나타내었다($P<0.001$). 염색된 것 가운데 localized 염색이 82.1%였으며 homogeneous 염색은 10.2%였다 (Fig. 5C).

고 찰

Ca^{2+}의 증가가 세포 주기(cell cycle)의 진행에 의존적으로 관여하므로, 본 실험에서는 이런 Ca^{2+} 증가의 양상이 서로 다른 ethanol과 strontium으로 단위생식을 유도해 보았다. 결과는 Table 1을 보면 ethanol로 유도한 경우 2세포기 배가 전체의 48.8%, 3세포기 배가 3.3%, 4세포기 배가 20.0%를 차지하였으나, $SrCl_2$로 유도한 경우 전체의 88.3%가 2세포기 배를 차지하였으나 4세포기 배는 1.0%만을 차지하여, ethanol에 의해 유도된 것의 발달 속도가 빠른 차이를 보여 주었으며 특히 2세포기의 경우 아주 뚜렷한 차이를 보여 주었다($P<0.01$).

본 실험에서는 voltage-dependent Ca^{2+}-channel 가운데 HVA(high voltage-activated) channel인 P/Q-type Ca^{2+}-channel, N-type Ca^{2+}-channel, L-type Ca^{2+}-channel을 ethanol과 strontium($SrCl_2$)으로 단위생식을 유도하여 24시간 후 수집한 2세포기 배에 면역염색(immuonostaining)을 하여 Ca^{2+}-channel을 동정하였다. 그 결과 P/Q-type Ca^{2+}-channel과 L-type Ca^{2+}-channel이 존재함을 알 수 있었다.

이러한 ethanol과 $SrCl_2$의 Ca^{2+} 증감양상의 차이가 Ca^{2+}-channel에 어떤 영향을 주었는지는 아직 밝혀진 바가 없으나, 본 실험 결과를 보면 특이한 점이 발견된다. P/Q-type Ca^{2+}-channel 항체인 anti-α_{1A} subunit의 경우, ethanol로 단위생식을 유도시킨 경우 87.7%의 염색(staining)을 보이는 반면, $SrCl_2$로 유도시킨 경우는 54.1%의 염색을 보였다. 또한, localized 염색의 수도 ethanol 처리군의 경우 1개

가 26.5%, 2개가 49.0%, 3개가 10.2%인데 반해 $SrCl_2$ 처리군은 1개인 것이 40.8%, 2개가 11.2%, 3개가 2.1%로 나타났다. 즉, ethanol 처리군은 localized 염색이 2개인 것이 많은 반면 $SrCl_2$ 처리군은 1개인 것이 많은 양상을 보여 주었으며 염색이 되지 않은 것의 비율도 ethanol 처리군은 12.3%, $SrCl_2$ 처리군은 45.9%로 유의한 차이($P<0.001$)를 보여 주었다. 또한, 염색의 강도도 ethanol 처리군이 $SrCl_2$보다 강하게 나타나는 등의 차이를 보였다. 그러나 N-type Ca^{2+}-channel 항체인 anti-α_{1B} subunit의 경우에는 ethanol, $SrCl_2$ 처리군 모두에서 일차항체(primary antibody)를 처리하지 않은 대조군(control)과 같이 어떠한 염색 반응을 보이지 않았다.

또 한가지 본 실험에서 발견한 흥미로운 사실은 ethanol과 $SrCl_2$에 의해 단위생식을 유도한 2세포기 배에서는 P/Q-type Ca^{2+}-channel과 L-type Ca^{2+}-channel 두 종류의 Ca^{2+}-channel이 존재하는 반면, 체내에서 정자에 의해 수정되어 형성된 2세포기 배의 경우에는 P/Q-type Ca^{2+}-channel과 L-type Ca^{2+}-channel 뿐만 아니라 N-type Ca^{2+}-channel 또한 발견되었다는 점이다. 이상의 실험을 종합해 볼 때, 단위생식을 유도 시 그 유도 물질에 따라 Ca^{2+}-channel의 양상이 달라졌으며, 단위생식적으로 활성화된 후의 2세포기 배와 체내 수정된 후의 2세포기 배의 Ca^{2+}-channel의 양상에 차이가 있음을 알 수 있었다. 이러한 양상의 차이에 대한 원인은 밝혀진 바가 없으나, Ca^{2+} 증감 양상의 차이와 부계 영향의 여부가 Ca^{2+}-channel의 발현(expression) 양상에 영향을 끼친 것으로 추정된다.

면역세포화학적 방법(immunocytochamical method)으로 Ca^{2+}-channel을 동정하는 것만으로는 부족한 점이 많다. 하지만 동일한 조건으로 한 실험에서 단위생식을 유도한 물질에 따라 그리고 단위생식적으로 활성화되었느냐, 정자에 의해 수정되었느냐에 따라 그 양상이 다르게 나타났으며 유의성을 갖는다는 것은 의미가 있는 결과라고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구(1999-2-204-001-3), 과학기술부 여자대학교 연구기반확충사업(98-N6-04-01-A-03)과 1998 성신여자대학교 연구소 특별사업지원계획지원으로 수행되었음.

참고 문헌

1. Cuthbertson KSR, Whittingham DG, Cobbold PH. Free Ca^{2+} increase in expotential phase during mouse oocyte activation. Nature 1981; 294: 154-7.
2. Presicce GA and Yang X. Parthenogenetic development of bovine oocytes matured in vitro for 24 hr and activated by ethanol and cycloheximide. Mol Reprod Dev 1994; 38: 380-5.
3. Winston NJ, McGuinness O, Johnson H, Maro B. The exit of mouse oocytes from meiotic M-phase requires an intact spindle during intracellular calcium release. J Cell Sci 1995; 108: 143-51. 12. Bae IH, Foote RH. Maturation of rabbit follicular oocytes in a defined medium of various osmolality. J Reprod Fert 1980; 59: 11-13
4. Bos-Mikich A, Swann K , Whittingham DG. Calcium oscillation and protein synthesis inhibition synergistically activate mouse oocytes. Mol Reprod Dev 1995; 41: 84-90.
5. Kono T, Jones KT, Bos-Mikich A, Whittingham DG, and Carroll J. A cell cycle-associated change in Ca^{2+} releasing activity leads to the generation of Ca^{2+} transients in mouse embryos during the first mitotic division. J Cell Biol 1996; 132: 915-23.
6. Mattioli M, Barboni B, Gioia L. Membrane depolarization triggers maturation in meiotically arrested pig oocytes by activating P-type Ca^{2+}-channels on the oolemma. J Reprod Fert(abstract) series 1998; 21: 27.
7. Bae I-H, Yoon S-Y , Yoon Y-D, Kim MK, Kim H-K. Identification of three types of voltage dependent Ca^{2+}-channels in mouse follicular oocytes. Korean J Biol Sci 1999; 3: 53-8.
8. Yoshida S. Na+ & Ca2+ spike produced by ions passing through calcium channels in mouse ovarian oocytes. Pflugers Arch 1982; 395: 84-86
9. Yoshida S. Action potentials dependent on monovalent cations in developing mouse embryos. Dev Biol 1985; 110: 200-206
10. Blancato JK, Seyler DE. Effect of calcium-modifying drugs on mouse in vitro fertilization and preimplantation development. Int J Fertil 1990; 35: 171-6.
11. Hogan B, Beddington R, Constantini F, Lacy E. Manipulating the Mouse

Embryo (2nd Edition) Cold Spring Harbor Laboratory Press 1994 p.390
12. Bae IH, Foote RH. Maturation of rabbit follicular oocytes in a defined medium of various osmolality. J Reprod Fert 1980; 59: 11-13
13. Cuthbertson KSR. Parthenogenetic activation of mouse oocytes in vitro with ethanol and benzyl alcohol. J Exp Zool 1983; 226: 311-4.
14. Nagai T. Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes in vitro with ethanol. Gamete Res 1987; 16: 243-9.
15. Tateno H and Kamiguchi Y. Parthenogenetic activation of chinese hamster oocytes by chemical stimuli and its cytogenetic evaluation. Mol Reprod Dev 1997; 47: 72-8.
16. Whittingham DG and Siracusa G. The involvement of calcium in the activation of mammalian oocytes. Exp Cell Res 1978; 113: 311-7.
17. O'Neill GT, Rolfe LR, Kaufman MH. Developmental potential and chromosome constitution of strontium-induced mouse parthenogenones. Mol Reprod Dev 1991; 30: 214-9.
18. Bos-Mikich A, Whittingham DG, Jones KT. Meiotic and mitotic Ca^{2+} oscillations affect cell composition in resulting blastocysts. Dev Biol 1997; 182: 172-9.
19. Kono T, Carroll J, Swann K, Whittingham DG. Nuclei from fertilized mouse embryos have calcium-releasing activity. Dev 1995; 121: 1123-8.
20. Hell JW, Westenbroek RE, Warner C, Ahlijanian MK, Prystay W, Gilbert MM, Snutch TP, Catterall WA. Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel α 1 subunits. J Cell Biol 1993; 123(4): 949-62.
21. Hsu SM, Raive L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex(ABC) in immunoperoxidase techniques : A comparison between ABC and unlabeled antibody(PAP) procedures. J Histochem Cytochem 1981; 29: 577-80.

Fig. 1 Microphotographs of control

Mouse 2-cell embryos following by ethanol(A), $SrCl_2$(B), or fertilization(C) showed no staining. Bars, 35 μm

Fig. 2 Microphotographs of P/Q-type Ca^{2+}-channel
(immunostaining with anti α_{1A} subunit antibody)
Mouse 2-cell embryos following by ethanol(A), $SrCl_2$(B), or fertilization(C) showed localized(→), homogeneous(▲) or no(★) staining. Bars, 35 μm

Fig. 3 Microphotographs of N-type Ca^{2+}-channel
(immunostaining with anti α_{1B} subunit antibody)
Mouse 2-cell embryos following by ethanol(A), $SrCl_2$(B) showed no staining and by fertilization(C) showed localized(→), homogeneous(▲) staining. Bars, 35 μm

Fig. 4 Microphotographs of L-type Ca^{2+}-channel
(immunostaining with anti α_{1C} subunit antibody)
Mouse 2-cell embryos following by ethanol(A), $SrCl_2$(B) or fertilization(C) showed localized(→) staining. Bars, 35 μm

Fig. 5 Microphotographs of L-type Ca^{2+}-channel
(immunostaining with anti α_{1D} subunit antibody)
Mouse 2-cell embryos following by ethanol(A), $SrCl_2$(B) or fertilization(C) showed localized(→), homogeneous(▲) staining. Bars, 35 μm