



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

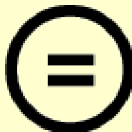
다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

수산학석사 학위논문

형질전환 형광관상 유리메기(*Kryptoterus
vitreolus*) 생산을 위한 기초 연구



2018년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 물 학 과

이 효 빈

수산화석사 학위논문

형질전환 형광관상 유리메기(*Kryptoterus
vitreolus*) 생산을 위한 기초 연구

지도교수 김 동 수

이 논문을 수산화 석사 학위논문으로 제출함

2018년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 물 학 과

이 효 빈

이효빈의 수산학석사 학위논문을 인준함.

2018년 2월 23일



주 심 이 학 박사 김 기 홍



위 원 수 산 학 박사 남 윤 권



위 원 이 학 박사 김 동 수



A Fundamental Study on the Production of Transgenic *Kryptopterus vitreolus*

Hyo Bin Lee

Department of Fisheries Biology, Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

The objective of this study is to establish a basis for producing transgenic fluorescent ornamental fish by using the glass catfish (*Kryptopterus vitreolus*). The glass catfish is a freshwater fish belonging to the family Siluridae. It is transparent, apart from the abdominal cavity, and it has been widely distributed as an ornamental fish since the 1930s.

In this study, the anesthetic effect on glass catfish of MS-222 (Tricaine methanesulfonate), clove oil, 2-phenoxyethanol, NaHCO₃, lidocaine-HCl and lidocaine-HCl/NaHCO₃ was investigated. Based on the induction and recovery time, 200/100ppm of lidocaine-HCl/NaHCO₃ was considered to be an effective agent. To analyze the effects on the maturation inhibition of the gonads from the anesthetics, carp pituitary was injected to the fish via intraperitoneal injection with 200/100ppm of lidocaine-HCl/NaHCO₃ as an anesthetic agent. A histological analysis of the gonads showed that the gonadotropin action of the carp

pituitary was normally observed in all injected fish. Therefore, 200/100 ppm of lidocaine-HCl/NaHCO₃ proved to be an efficient anesthetic agent for induced breeding in this fish species.

An intramuscular injection of DNA containing various promoters (CMV pDs, CMV pAM, pod β -actin, pod mlc2, pAN β -actin) was also administered to the fish to investigate the expression activity of various promoters and several fluorescent genes. The fluorescence activity of experimental groups was increased gradually from 10 days after postinjection with 80 μ g of DNA per fish. This activity persisted in the muscles for as long as 30 days postinjection. The expression of injected DNA was found predominantly within muscle cells along the injection path and in scattered muscle cells anterior to the injection site.

Glass catfish were also injected with carp pituitary (CP), hCG (human chorionic gonadotropin), and LHRH- α (Luteinizing hormone-releasing hormone analog) by using various dosages in order to induce sexual maturation. CP was proven to be more effective than hCG or LHRH- α . In the case of females, ovary maturity was successfully derived at 4mg/g of CP, but final maturation and spawning were not successfully induced. However, the males in all of the CP-treated group were shown to have fully matured and ejaculate testes.

목 차

영문요약 (Abstract)	I
목차 (Content)	III
표 목차 (List of Tables)	VI
그림목차 (List of Figures)	VII
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	6
1. 실험어	6
1-1. 실험어의 확보 및 사육	6
1-2. 형태학적 분석	6
2. 마취	6
2-1. 마취제 및 마취효과	6
2-2. 마취효과 판정 기준	7
3. Direct injection을 통한 유전자 이식	7
3-1. 도입 유전자	7
3-2. 처리 및 분석	7
4. 성 성숙 호르몬 처리에 의한 생존을 조사	10
5. 생식소의 조직학적 분석	10
6. 성숙 유도	12

6-1. 호르몬 종류에 따른 성 성숙 유도	12
6-2. 급격한 수온저하에 따른 잉어뇌하수체호르몬의 성 성숙 유도	12
6-3. 호르몬 복합 처리를 통한 성 성숙유도	12
7. 통계 처리	13
 III. 결과	 14
1. 실험어	14
1-1. 실험어의 형태학적 분석	14
2. 마취	14
2-1. 마취제 및 마취효과	14
2-2. 혼합사용에 따른 마취효과	18
3. Direct injection을 통한 유전자 이식	19
4. 성 성숙 호르몬 처리에 의한 생존율 조사	19
5. 생식소의 조직학적 분석	24
5-1. 대조군의 전장별 생식소 조직	24
6. 성숙 유도	24
6-1. 호르몬 종류에 따른 성 성숙 유도	24
6-1-1. hCG (human Chorionic Gonadotropin)	24
6-1-2. LHRH- α (Luteinizing hormone releasing hormone)	26
6-1-3. CP (Carp pituitary)	26
6-2. 급격한 수온저하에 따른 잉어뇌하수체호르몬의 성 성숙 유도	26
6-3. 호르몬 복합 처리를 통한 성 성숙유도	30
 IV. 고찰	 33

국문 요약	44
감사의 글	46
참고문헌	47



표 목차(List of Tables)

Table 1. Stages of anesthesia and recovery from anesthesia employed as endpoints in the present study	8
Table 2. The effect of five hormones treatments on survival rate (%) of glass catfish (<i>Kryptopterus vitreolus</i>)	11
Table 3. Means of body weight (BW), total length (TL), condition factor (CF) and body width at anus (BWA) in glass catfish (<i>Kryptopterus vitreolus</i>)	15
Table 4. Induction and recovery times in glass catfish (<i>Kryptopterus vitreolus</i>) anaesthetized with various concentrations of five anesthetic agents	16
Table 5. Induction and recovery times in glass catfish (<i>Kryptopterus vitreolus</i>) anaesthetized with lidocaine-HCl/NaHCO ₃ at various concentrations	20

그림 목차(List of Figures)

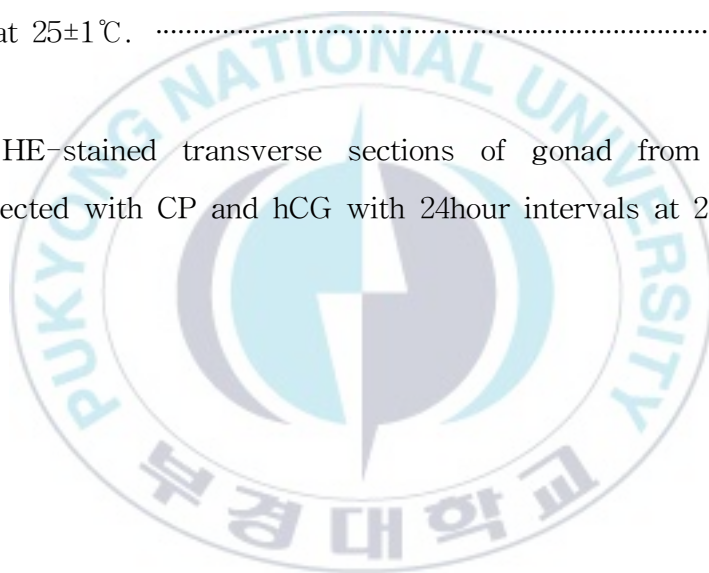
Fig. 1. Glass catfish <i>Kryptopterus vitreolus</i> in a group of schooling (a), lateral view (b) and dorsal view (c).	3
Fig. 2. The constructions of expression vectors used in the direct injection.	9
Fig. 3. Detection of fluorescences expression in glass catfish <i>Kryptopterus vitreolus</i> injected with various types of genes.	21
Fig. 4. Detection of fluorescences expression 2weeks and 4weeks after injection with β -actin promoter from 2 different fish species.	22
Fig. 5. Detection of fluorescences expression 2weeks and 4weeks after injection with 2 types of promoter from <i>O. dancena</i>	23
Fig. 6. HE-stained cross sections of gonad from the glass catfish <i>Kryptopterus vitreolus</i>	25
Fig. 7. HE-stained transverse sections of gonad from the glass catfish injected hCG at 3 different doses with 24hour intervals at $28\pm 1^{\circ}\text{C}$	27
Fig. 8. HE-stained transverse sections of gonad from the glass catfish injected LHRH-analog at 3 different doses with 24hour intervals at	

28±1℃. 28

Fig. 9. HE-stained transverse sections of gonad from the glass catfish injected Carp pituitary at 3 different doses with 24hour intervals at 28±1℃. 29

Fig. 10. HE-stained transverse sections of gonad from the glass catfish injected Carp pituitary at 3 different doses with 24hour intervals at 25±1℃. 31

Fig. 11. HE-stained transverse sections of gonad from the glass catfish injected with CP and hCG with 24hour intervals at 28±1℃. ... 32



I. 서론

유리메기(*Kryptopterus vitreolus*)는 메기목(Siluriformes) 메기과(Siluridae)에 속하는 담수어류로 말레이 반도 북부 및 인도차이나 반도에서 타일랜드 만으로 유입되는 담수에 서식하고 있으며, 그간 *K. bicirrhis* 또는 *K. minor* 로 알려져 왔으나 Ng and Kottelat (2013)에 의해 현재의 학명으로 재 동정되었다. 본종은 복강을 제외한 모든 부위가 투명하며, 그 성체의 크기가 7cm 정도이고 여타 메기과 어류들과는 달리 수면에 서식하며 형태가 아름다워 관상어 애호가들에게 각광받아 이미 1934년 이전부터 국제무역에 의해 전 세계에 유통되고 있는 관상어류이다(Innes, 1934; Chapman et al., 1997; Finley, 2009). 본 종은 이미 신경생물학과 생리학 실험 등에 어류 실험 모델로서 사용된 바 있으며(Steffensen et al., 1986; Jensen et al., 2009; Roth, 1993; Peters et al., 2008; Kolomytkin et al., 2007), 그 자원량이 풍부하여 동남아 등의 원산지에서는 어간장의 주재료로도 사용되고 있다(Ng and Kottelat, 2013).

형광발현 유전자가 이식된 관상어류는 제브라피쉬, 바브 및 테트라와 3종이 최근 미국을 위시한 아시아권에서 야생형의 7배의 높은 가격으로 판매되고 있으며 특히 미국 내에서는 전국적으로 그 판매량이 현저히 증가되고 있다(Bratspies, 2005; Glofish®, 2017). 그러나 기존 판매되고 있는 형광관상 어류들은 자체 색깔을 가지고 있어 형광발현 시 그 효과가 감소되는 문제를 지니고 있어 근육이 투명하고 형태가 탁월한 새로운 형광관상 어류를 개발할 필요성이 제기되고 있다(Dijkstra et al., 2001). 본 연구실에서 해양수산용 LMO의 안전관리를 위해 개발된 형광 바다송사리는 근육이 투명하여 발현되는 형광이 잘 표현되는 장점은 있으나(Cho et al., 2011; Cho et al., 2013), 형태가 소비자의 취향을 만족시키기에는 어려움

을 지니고 있다.

새로운 형광관상어종을 개발하기 위해서는 유전자 개발, 발현 벡터의 활성화 테스트 및 유전자 이식 방법 등을 위한 연구가 필요하다(Iyengar et al., 1996). 발현 벡터와 프로모터의 활성을 테스트하기 위한 방법 중 하나인 Direct injection 방법은 개체의 체세포에 직접 유전자를 주사하는 방법으로 면역 접종(Ulmer et al., 1993; Xiang et al., 1994)과 gene therapy (Raz et al., 1993)에 매우 효과적인 방법으로 알려져 있고, 발현 벡터의 테스트 뿐 아니라 형질전환생물의 개발을 위한 방법으로도 사용되고 있다 (Anderson et al., 1996). 이에 direct injection을 이용한 연구로 Hansen et al. (1991)은 잉어의 등지느러미에 direct injection을 실시하여 gene construct의 발현을 테스트한 연구를 수행한 바 있고, Rahman and Maclean (1992)은 틸라피아의 근육에 direct injection을 수행하여 carp β -actin promoter와 reporter gene인 CAT의 발현을 유도한 바 있다. Dijkstra et al. (2001)은 glass catfish를 DNA 백신용 어류 모델로 개발하기 위해 luciferase 및 이의 발현유전자를 근육에 주사하여 그 발현유무를 관찰한 바 있다. 유리메기는 앞서 언급한 바와 같이 복강을 제외한 모든 부위가 투명하여(Fig. 1a) DNA 백신용 어류 모델 이외에도 이미 그 형태만으로도 관상어 애호가의 기호를 만족시키고 있어 형질전환 기법을 사용하여 형광관상어로 개발한다면 고가의 우수한 상품이 될 수 있을 것으로 기대된다.

형질전환어류를 개발하기 위해서 유전자이식을 위한 양질의 수정란의 대량생산이 필요하다. 그러나 본 종은 서식지 수계에서 산란이 원활히 이루어지나, 실내사육 시 산란 조절이 어려워 인공산란을 통한 수정란의 대량생산한 보고는 없다(Planetcatfish, 2017). 메기과 어류의 산란에 있어 ovaprim, S-GnRH, LHRH-a, hCG 및 잉어뇌하수체의 경우 보고된 모든

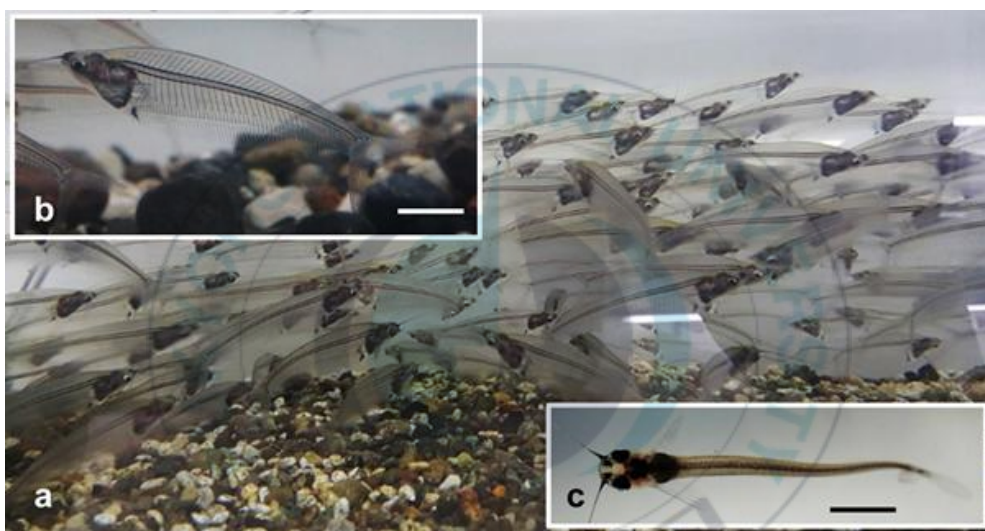


Fig. 1. Glass catfish *Kryptopterus vitreolus* in a group of schooling (a), lateral view (b) and dorsal view (c). All scale bars indicate 1 cm.

중에서 매우 효과적인 것으로 보고되어 있다(Zohar and Mylonas, 2001). 이 중 메기와 어류의 산란에 있어 ovaprim과 S-GnRH는 특히 자연산 메기류를 채집하여 실내에서 인공산란유도 시 매우 효과적인 것으로 보고된 바 있다(Brzuska and Adamek, 1999; Haniffa and Sridhar, 2002; Padmakumar et al., 2011). 이에 산란유도호르몬처리에 의한 인공산란유도 연구가 필요하나 본 종은 스트레스에 매우 민감하고, 특히 체폭이 좁아(Fig. 1b & c) 화학물질의 복강주사 시 폐사율이 높은 단점이 있다(Peters et al., 2001).

어류를 실험실 및 현장에서 다룰 때 스트레스 등 상해를 최소화하기 위해 마취는 필수요건 중에 하나로서, 유리메기의 경우 스트레스를 최소화하기 위해 Saffan®, FA100 및 MS-222 (Tricaine methanesulfonate) 등의 마취제들이 연구에 사용된 바 있다(Peters et al., 2001; Dijkstra et al., 2001; Kolomytkin et al., 2007). 그러나 상기 연구들은 각 마취제의 효과만 보고되어 있을 뿐 마취제의 종류에 따른 마취소요시간 및 회복시간 등 최적 마취제에 대한 연구는 누락되어 있다.

이에 본 연구에서는 첫째, 유리메기에 최적 마취 조건 확립을 위해 기존 개발된 마취제 중 어류에 안전한 것으로 보고되어 있는 5종 마취제 (MS-222, clove oil, 2-phenoxyethanol, NaHCO_3 및 lidocaine-HCl)를 다양한 농도로 침지 처리하여 최적 마취 조건을 확립하였고, 둘째 확립된 마취조건을 이용하여 CMV와 바다송사리의 β -actin 프로모터를 가진 유전자를 주사하여 유리메기 근육에서 발현되는 형광 양상을 조사한 후, 다양한 어종으로부터 유래된 몇 종의 프로모터를 가진 3종의 형광발현 유전자를 주사하여 각 프로모터에 따른 형광 발현양상을 비교하였고 셋째, 형광관상어를 생산하기 위한 유전자이식에 필수적 요건인 양질의 수정란 확보를 위해 인공산란을 유도하기 위해, 인간태반성선자극호르몬(human

Chorionic Gonadotropin, hCG), LHRH- α (Luteinizing hormone releasing hormone) 및 잉어뇌하수체호르몬(Carp pituitary, CP)을 다양한 방법으로 투여하여 각 호르몬 간 성 성숙 유도 효과를 확인하였다.



II. 재료 및 방법

1. 실험어

1-1. 실험어의 확보 및 사육

본 실험에 사용된 유리메기(*Kryptopterus vitreolus*)는 사육수로 2일간 폭기한 시수를 사용하여 30리터 수조에서 수온은 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 유지하면서 저면여과시스템으로 관리하였고 호르몬 처리 시에는 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 및 $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 두 가지 수온 조건에서 사육하였다. '14 hrs : 10 hrs = light : dark'로 광주기 조건을 조절하였으며, 사육수는 3일에 한 번 30~40%씩 환수하였고, 사료는 배합사료 4호(러브라바)를 1일에 3회 이상 공급하였다.

1-2. 형태학적 분석

본 연구에 사용된 유리메기의 어체중(body weight, BW), 전장(total length, TL), 비만도(condition factor, CF) 및 항문에서의 체폭(Body width at anus) 등을 측정하였다.

2. 마취

2-1. 마취제 및 마취효과

실험 시 유리메기의 스트레스를 최소화하기 위해 적합한 마취제를 선정하고자 하였다. 마취제는 MS-222, clove oil, 2-phenoxyethanol, NaHCO_3 및 lidocaine-HCl 등 5종을 사용하였고, 각 마취제 농도별 유리메기의 마취시간 및 회복시간을 측정하여 그 효과를 조사하였다. 또한 마취제 혼합사용에 따른 마취효과의 증대를 위해 다양한 농도의 lidocaine-HCl과 NaHCO_3 의 혼합사용에 따른 마취시간 및 회복시간을 측정하여 단독 처리시의 효과와 비교하였다.

마취효과는 Weber et al. (2009)의 방법에 따라 각 마취제 농도별 6-10마리의 유리메기를 사용하여 조사하였고, 마취에 사용된 유리메기는 실험 전 24시간 동안 절식한 후 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 그 효과를 분석하였고, 이때 각 마취제의 농도별 pH를 아울러 측정하였다.

2-2. 마취효과 판정 기준

마취 및 회복 시기는 Keene et al. (1998) 및 Minter et al. (2014)의 방법을 개선하여 Table 1의 기준에 따라 판정하였다. 마취시간은 마취액에 침지처리한 후 평형감각, 움직임 및 자극에 대한 반응성이 상실된 stage 4 상태까지 소요되는 시간을 측정하였고, 마취시간이 5분 이상 소요되는 경우는 마취효과가 없는 것으로 판단하였다. 회복시간은 마취된 개체를 회복수에 이동한 후 정상적인 수영이 가능한 stage 5 상태까지 소요되는 시간을 측정하였다.

3. Direct injection을 통한 유전자 이식

3-1. 도입 유전자

본 실험에 사용된 도입 유전자는 DNA 백신 신 모델 개발의 가능성을 연구하기 위해 CMV pDS Red2, CMV pAM CFP 그리고 새로운 형질 전환 형광관상어 개발을 위해 pod β -actin RFP, pAN β -actin RFP, pod β -actin GFP 및 pod mlc2 CFP를 사용하였다(Fig. 2).

3-2. 처리 및 분석

유전자의 direct injection은 각 유전자별로 2~4미씩 각 개체 당 $80\mu\text{g}$ 로 주사한 후 2주 간격으로 2회 각 유전자 주입군에 대한 형광단백질 발현 분석을 형광현미경(AZ100, Nikon, Japan)으로 관찰하였다. CMV pDS Red2, pod β -actin RFP와 pAN β -actin RFP 유전자 주입군은 RFP 형광 필터(Tx-Red, Nikon, Japan), pod β -actin GFP 유전자 주입군은 GFP 형

Table 1. Stages of anesthesia and recovery from anesthesia employed as endpoints in the present study (modified from Keene et al., 1998; Minter et al., 2014)

stage	behavior responses in fish
<i>Anesthesia</i>	
3	Partial loss of equilibrium; swimming erratic
4	Complete loss of equilibrium, movement and reactivity
5	Medullary collapse; complete loss of opercular movement
<i>Recovery</i>	
4	Reappearance of avoidance swimming motion and reaction in response to external stimuli, but still behavioural response in stolid
5	Total behavioural recovery. Normal swimming

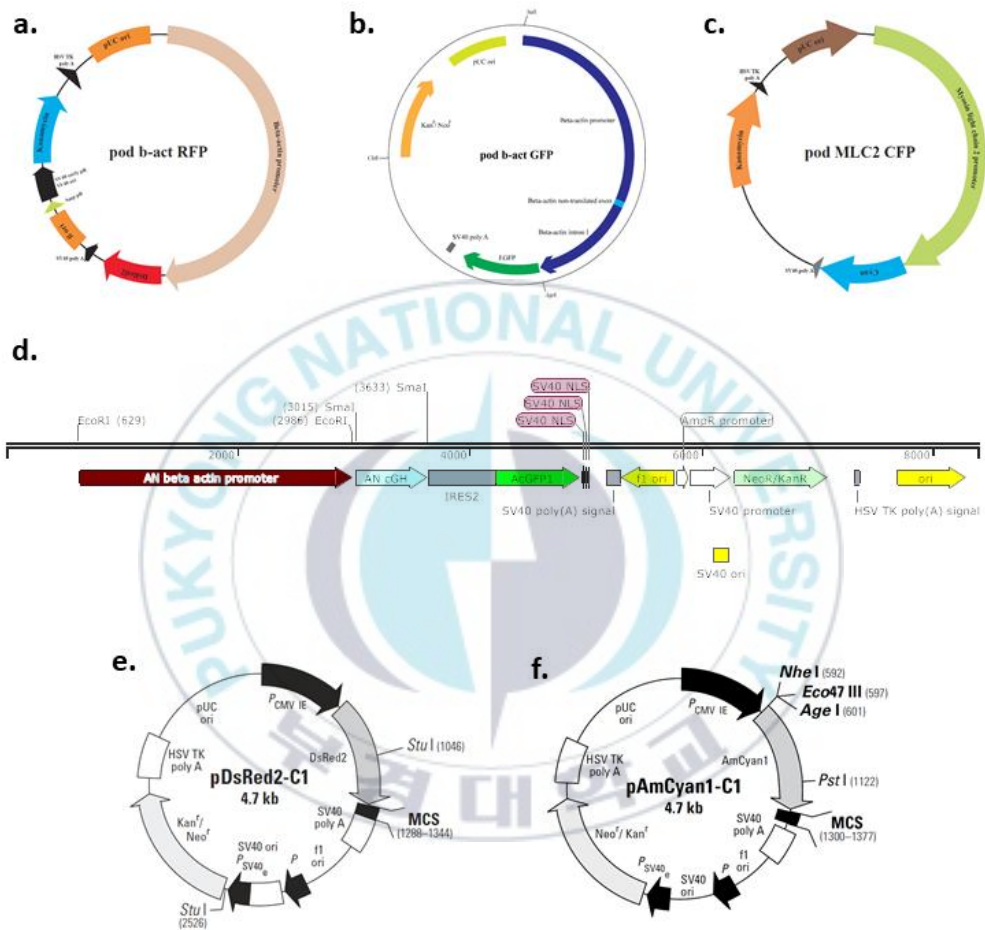


Fig. 2. The constructions of expression vectors used in the direct injection. a, pod β -act RFP; b, pod β -act GFP (Nguyen, 2012) ; c, pod mlc2 CFP; d, pAN β -act RFP; e, pDS Red2-C1 (Clontech, USA) and f, pAm Cyan1-C1 (Clontech, USA).

광 필터(B-2A, Nikon, Japan), CMV pAM CFP와 pod mlc2 CFP 유전자 주입군은 CFP 형광 필터(BV-2A, Nikon, Japan)를 사용하여 관찰하였다.

4. 성 성숙 호르몬 처리에 의한 생존율 조사

본 연구를 통해 확인된 유리메기 적정 마취 조건의 안전성을 확인하기 위해 200 ppm lidocaine-HCl/ 100 ppm NaHCO₃에 유리메기를 마취한 뒤, 25±1℃의 수온 조건으로 Ovaprim (Syndel Laboratories Ltd., Canada), S-GnRHa (salmon Gonadotropin-Releasing Hormone; Sansheng Pharmaceutical Co. Ltd., China), LHRH-α (luteinizing hormone releasing hormone; Sansheng Pharmaceutical Co. Ltd., China), hCG (human chorionic gonadotropin; DAESUNG microbiological labs. Co. Ltd., Korea) 및 잉어뇌하수체(carp pituitary; Argent, USA)를 주사하고 96시간동안의 생존율을 확인하였다. 이 때 각 호르몬별 유리메기를 6~12마리씩 주사하였고, 각 개체 당 복강주사가 가능한 최대 용량인 40μl의 호르몬 및 생리식염수(대조군)를 주사하였으며, 각 호르몬의 농도는 Table 2와 같다.

5. 생식소의 조직학적 분석

조직학적 방법으로 생식소를 분석하기 위하여 머리와 항문 이후의 꼬리 부분을 제거한 복강 부분을 Bouin's 용액에 고정한 후 통상의 조직학적 분석방법에 따라 탈수 및 파라핀을 이용한 포매 과정을 수행하였다. 준비된 표본은 6 μm의 두께로 연속 절편하여 hematoxylin과 eosin으로 염색을 한 후, 광학현미경(Eclipse E400; Nikon Co., Japan) 하에서 검경하였고, 광학현미경에 부착된 디지털 카메라(eXcope K6; DIXI Science, Korea)로 촬영하였다.

Table 2. The effect of five hormones treatments on survival rate (%) of glass catfish (*Kryptopterus vitreolus*)

Experimental group	Dose of injection (40 μl^{-1})	No. of fish treated	Survival rate (%) at 96h after injection
Control*	-	6	100
Ovaprim	20 μl	6	0
S-GnRHa	4 mg	6	0
LHRH-a	4 μg	6	100
hCG	4 IU	6	100
Carp pituitary	4 mg	12	91.7

*Control group was injected with physiological saline water.

6. 성숙 유도

6-1. 호르몬 종류에 따른 성숙 유도

상기 성 성숙 호르몬 처리에 의한 생존율 조사 실험에서 사용된 5가지 호르몬 중 hCG, LHRH- α 및 CP 등을 사용해 호르몬 종류에 따른 성 성숙 유도를 비교하고자 $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 사육 조건에서 각 호르몬의 농도별로 주사를 수행하였다. hCG의 농도에 따른 유리메기의 성숙 유도를 확인하기 위하여 1, 2 및 4Iu/g의 농도로 각 6미씩 3일간 복강주사를 하였고 마지막 주사 24시간 후에 모두 분석하였다. 다음으로 LHRH- α 실험군은 1, 2 및 4 $\mu\text{g/g}$, CP 실험군은 1, 2 및 4mg/g의 농도로 동일하게 주사하여 조직학적 분석을 수행하였다.

6-2. 급격한 수온저하에 따른 잉어뇌하수체호르몬의 성 성숙 유도

급격한 수온 저하가 성 성숙에 미치는 영향을 조사하기 위하여 수온을 $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 3°C 낮추고 CP를 최고농도인 4mg/g의 농도로 1~3회를 주사한 후, 각 회 차별로 6미의 생식소 조직을 분석하여 수온변화와 주사 횟수에 따른 성 성숙 유도 효과를 검토하고자 하였다.

6-3. 호르몬 복합 처리를 통한 성 성숙 유도

호르몬 복합처리를 통한 유리메기의 성 성숙 효과를 확인하기 위해 $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 사육조건으로 세 가지 실험군을 설정하였다. 즉 1번 실험군은 CP 2mg/g와 hCG 5Iu/g를 혼합하여 2회 주사하고 hCG 10Iu/g를 1회 주사한 후 24시간 뒤에 분석하였다. 2번 실험군은 CP 4mg/g를 2회 주사 후 동일하게 hCG 10Iu/g 주사 후 분석하였고, 3번 실험군은 CP 4mg/g와 hCG 혼합액 및 hCG 10Iu/g를 순서대로 1회씩 주사하고 24시간 후 생식소의 조직학적 분석을 실시하였다.

7. 통계 처리

실험결과와 통계적 유의성 검정을 위해서 SAS 프로그램(version 5.1.2600)에 의한 ANOVA test를 이용하여 분산 분석한 후 Duncan의 다중위 검정을 실시하였다. 데이터 값은 유의수준 5% 이내($P < 0.05$)로 각 평균값에 대한 유의적 차이를 조사하였다.



Ⅲ. 결 과

1. 실험어

1-1. 실험어의 형태학적 분석

유리메기의 외형은 Fig. 1과 같이 머리와 복강을 제외한 모든 부분이 투명하고 머리 앞쪽과 눈 주변에 까만 점들이 분포되어 있으며, 한 쌍의 긴 상악 수염(Maxillary barbel)을 가지고 있었다. 등지느러미는 아주 짧고 골화된 정도가 덜 하였고, 가슴지느러미가 뒷지느러미의 기저부로 합입된 모양으로 말단 부분은 둥글고 넓게 돌출되었다. 배지느러미가 볼록하게 형성되어 있고 꼬리지느러미가 뒷지느러미와 분리된 형태를 보였다. 꼬리자루는 가늘고 꼬리지느러미는 두 갈래로 나뉜 형태를 보였으며 꼬리지느러미 기저부의 중앙부분까지 측선이 완전히 연결되어 있었다. 배지느러미 바로 끝에 비뇨 생식돌기가 존재하는 것으로 보이나, 외관상으로 암수 구분은 되지 않았다.

본 연구에 사용된 유리메기의 체중, 전장, 비만도(체중*1000/(전장)³) 및 항문에서의 체폭은 각각 0.98 ± 0.08 g, 54.43 ± 2.64 mm, 0.006 ± 0.001 mm 및 2.81 ± 0.14 mm 이었다(Table 3).

2. 마취

2-1. 마취제 및 마취효과

유리메기의 5가지 마취제(MS-222, clove oil, 2-phenoxyethanol, NaHCO₃ 및 lidocaine-HCl)의 농도별 마취 및 회복 결과는 Table 4와 같다.

MS-222 40~80 ppm에서 유리메기의 마취 시간은 240.5 ± 77.9 초(40 ppm), 142.0 ± 35.9 초(50 ppm), 82.8 ± 17.6 초(60 ppm), 59.1 ± 26.9 초(70 ppm)

Table 3. Means of body weight (BW), total length (TL), condition factor (CF) and body width at anus (BWA) in glass catfish (*Kryptopterus vitreolus*)

	BW (g)	TL (mm)	CF	BWA (mm)
1	1.04	57.96	0.005	3.00
2	1	52.52	0.007	2.72
3	0.99	52.39	0.007	2.71
4	1.11	57.48	0.006	2.97
5	0.87	53.91	0.006	2.79
6	0.93	57.1	0.005	2.95
7	1.01	51.82	0.007	2.68
8	0.91	52.22	0.006	2.70
Mean±S.D	0.98±0.08	54.43±2.64	0.006±0.001	2.81±0.14

Table 4. Induction and recovery times in glass catfish (*Kryptopterus vitreolus*) anaesthetized with various concentrations of five anesthetic agents

Dose (ppm)	pH value*	Induction time (sec)	Recovery time (sec)
MS-222			
40	7.14±0.01	240.5±77.9 ^a	67.5±37.5 ^a
50	7.00±0.01	157.4±52.4 ^b	66.4±18.5 ^a
60	6.95±0.04	82.8±17.6 ^c	80.2±34.7 ^a
70	6.82±0.01	59.1±26.9 ^c	69.7±20.9 ^a
80	6.76±0.01	55.5±16.8 ^c	62.6±25.3 ^a
Clove oil			
20	7.79±0.01	125.2±69.9 ^a	76.2±32.7 ^b
30	7.78±0.01	97.0±18.9 ^{ab}	74.2±27.6 ^b
40	7.75±0.01	70.5±8.2 ^b	83.4±17.7 ^b
50	7.74±0.00	67.3±17.5 ^b	155.5±50.3 ^a
2-phenoxyethanol			
200	7.70±0.01	132.6±44.2 ^a	44.6±14.8 ^b
225	7.70±0.02	109.0±40.4 ^a	52.3±30.7 ^b
250	7.68±0.01	64.3±24.0 ^b	62.8±15.6 ^{ab}
275	7.58±0.01	58.6±9.6 ^b	93.7±46.7 ^a
NaHCO ₃			
200	8.18±0.01	-	-
400	8.27±0.01	-	-
600	8.31±0.01	-	-
800	8.35±0.03	-	-
1,000	8.37±0.01	-	-
Lidocaine-HCl			
100	7.40±0.01	202.0±63.3 ^a	117.4±37.7 ^{ab}
200	7.21±0.01	187.7±65.6 ^a	100.8±33.5 ^b
300	6.96±0.02	127.3±13.3 ^a	107.5±4.8 ^{ab}
400	6.87±0.0	146.0±50.8 ^a	152.3±44.6 ^a

* The pH value of tap water used in the laboratory was 7.90±0.04.

및 55.5 ± 16.8 초(80 ppm)로 관찰되어 MS-222 농도가 증가될수록 마취시간이 유의적으로 단축되는 것으로 관찰되었다. 그러나 회복시간은 $62.6 \sim 80.2$ 초로 농도 증가에 따른 유의적인 차이가 없는 것으로 관찰되었다($P < 0.05$).

Clove oil의 경우, 10 ppm에서는 5분 이상 노출되어도 평형감각 및 움직임이 정상적으로 유지되어 마취효과 없는 것으로 관찰되었다. Clove oil 20~50 ppm에서 마취시간은 125.2 ± 69.9 초(20 ppm), 97.0 ± 18.9 초(30 ppm), 70.5 ± 8.2 초(40 ppm) 및 67.3 ± 17.5 초(50 ppm)로 관찰되어 Clove oil 농도가 증가할수록 평균 마취시간은 증가하였으나, 유의적인 차이는 없는 것으로 확인되었다($P < 0.05$). 또한 회복시간은 20~40 ppm의 경우, $74.2 \sim 83.4$ 초로 확인되어 농도 증가에 따른 유의적 차이는 확인되지 않았으나, clove oil의 최고 실험농도인 50 ppm에서는 155.5 ± 50.3 초로 여타 농도에 비해 회복시간이 급격히 증가하는 것으로 관찰되었다.

2-phenoxyethanol 는 200~275 ppm에서 마취시간은 평균 $132.6 \sim 58.6$ 초로 200 ppm에서 132.6 ± 44.2 초, 225 ppm에서 109 ± 40.4 초, 250 ppm에서 64.3 ± 24.0 초 그리고 275 ppm에서 58.6 ± 9.6 초로 확인되어 농도가 증가할수록 마취시간이 유의적으로 단축되었다($P < 0.05$). 그러나 회복시간은 $44.6 \sim 93.7$ 초로 농도가 증가할수록 평균 회복시간은 증가하였으나 유의적인 차이는 없는 것으로 확인되었다($P < 0.05$).

NaHCO_3 은 200~1,000 ppm에 대한 마취효과를 관찰하였으나, 모든 실험 농도에 5분 이상 노출되어도 정상적인 평형감각, 움직임 및 반응성을 유지하는 것으로 관찰되어 NaHCO_3 은 유리메기에 마취효과가 없는 것으로 확인되었다.

Lidocaine-HCl 100~400 ppm에서 마취시간 및 회복시간을 관찰한 결과 50 ppm에서 260.5 ± 8.8 초 및 79.7 ± 23.9 초, 100 ppm에서는 202.0 ± 63.3 초

및 117.4 ± 37.7 초, 200 ppm에서는 187.7 ± 65.6 초 및 100.8 ± 33.5 초 그리고 400 ppm에서는 146.0 ± 50.8 초 및 152.3 ± 44.6 초로 확인되어, 농도 증가에 따른 마취 및 회복 시간의 유의적 차이는 없는 것으로 확인되었다($P < 0.05$).

각 마취제의 pH를 측정한 결과 NaHCO_3 을 제외한 4가지 마취제는 pH 7.14~6.76 (MS-222), pH 7.79~7.74 (clove oil), pH 7.70~7.58 (2-phenoxyethanol) 및 pH 7.40~6.87 (lidocaine-HCl)로 측정되어 기존 사육수(pH 7.90 ± 0.04)의 pH보다 낮아졌고, 마취제의 농도가 높아질수록 pH가 낮아지는 것으로 확인되었다. 반면에 NaHCO_3 은 pH 8.18~8.37로 측정되어 사육수보다 pH가 높은 것으로 확인되었고 그 농도가 높아질수록 pH가 높아져 염기성을 띄는 것으로 확인되었다.

2-2. 혼합사용에 따른 마취효과

마취수의 중화 및 마취효과 증대를 위해 lidocaine-HCl과 NaHCO_3 의 혼합사용에 따른 마취시간 및 회복시간을 관찰한 결과는 Table 5와 같다. lidocaine-HCl 100 ppm에서는 마취시간이 202.0 ± 63.3 초였으나, 동일 농도의 lidocaine-HCl에 NaHCO_3 을 100 ppm, 300 ppm 및 500 ppm 혼합 사용하는 경우 마취시간이 157.5초, 78.5초 및 53.4초로 단축되었고, lidocaine-HCl 200 ppm는 마취시간이 187.7 ± 65.6 초였으나, NaHCO_3 을 50 ppm, 100 ppm 및 200 ppm 혼합 사용하는 경우, 마취시간이 평균 86.6~66.0초로 관찰되어 NaHCO_3 혼합사용 전과 후의 마취시간이 유의적으로 단축되는 것으로 확인되었다($P < 0.05$). 그러나 회복시간은 lidocaine-HCl과 NaHCO_3 혼합사용 전과 후의 유의적인 차이가 없는 것으로 확인되었다($P < 0.05$).

lidocaine-HCl 100 ppm에 NaHCO_3 을 100 ppm, 300 ppm 및 500 ppm 혼합 사용하는 경우 pH는 pH 7.97 ± 0.04 , pH 8.23 ± 0.03 및 pH 8.35 ± 0.01 로 확인되었고, lidocaine-HCl/ NaHCO_3 3200/50ppm은 pH 7.56 ± 0.03 , 200/100

ppm은 pH 7.80 ± 0.01 및 200/200 ppm은 pH 8.00 ± 0.01 로 확인되었다. lidocaine-HCl에 NaHCO_3 의 혼합 농도가 높아질수록 pH는 증가되어 lidocaine-HCl/ NaHCO_3 200/100ppm과 lidocaine-HCl/ NaHCO_3 200/100ppm이 유리메기의 사육수와 가장 유사한 pH를 보이는 것으로 확인되었다(Table 5).

3. Direct injection을 통한 유전자 이식

유리메기의 등 근육에 개체 당 80mg의 유전자를 주사하고 10일 경과 후 그 발현양상을 형광현미경으로 관찰한 바, 본 연구에 사용된 CMV 및 바다송사리 β -actin 프로모터 모두에서 형광유전자가 발현됨이 관찰되었고, 발현강도는 사용된 세 개의 유전자 중 GFP유전자를 제외하면 두 유전자 간 차이는 색과는 무관하였다(Fig. 3).

이후 어중에 따른 프로모터의 발현양상을 비교하기 위해 RFP유전자를 바다송사리와 화이트니그로의 β -actin 프로모터에 결합시킨 재조합유전자를 주사하여 4주간 발현양상을 비교한 결과, 프로모터 간 발현 강도에 있어 큰 차이가 없었으나 바다송사리의 β -actin 프로모터의 발현강도가 더 강한 것으로 관찰되었다(Fig. 4).

이에 바다송사리의 β -actin 프로모터와 *mlc2* 프로모터에 GFP유전자와 CFP유전자를 각각 연결, 제작하여 동일한 방법으로 주사 후 4주간 발현양상을 관찰한 결과, *mlc2* 프로모터는 β -actin 프로모터보다 강력하게 발현됨을 확인하였다(Fig. 5).

4. 성 성숙 호르몬 처리에 의한 생존율 조사

산란유도 호르몬처리에 앞서 유리메기 복강에 호르몬 주입이 가능한 최대 용량을 확인하고자 생리식염수를 $20 \sim 80 \mu\text{l}$ 를 주입한 결과 최대 $40 \mu\text{l}$

Table 5. Induction and recovery times in glass catfish (*Kryptopterus vitreolus*) anaesthetized with lidocaine-HCl/NaHCO₃ at various concentrations

Dose (mg/L)	pH value*	Induction time (sec)	Recovery time (sec)
100/0	7.40±0.01	202.0±63.3 ^a	117.4±37.7 ^a
100/100	7.97±0.04	157.5±53.4 ^a	77.4±13.5 ^b
100/300	8.23±0.03	78.5±10.2 ^b	77.0±13.1 ^b
100/500	8.35±0.01	53.4±5.8 ^b	101.0±32.4 ^{ab}
200/0	7.21±0.01	187.7±65.6 ^a	100.8±33.5 ^a
200/50	7.56±0.03	86.6±13.7 ^b	93.4±24.8 ^a
200/100	7.80±0.01	81.2±17.2 ^b	98.3±19.7 ^a
200/200	8.00±0.01	66.0±25.4 ^b	97.0±22.9 ^a

* The pH value of tap water used in the laboratory was 7.90±0.04.

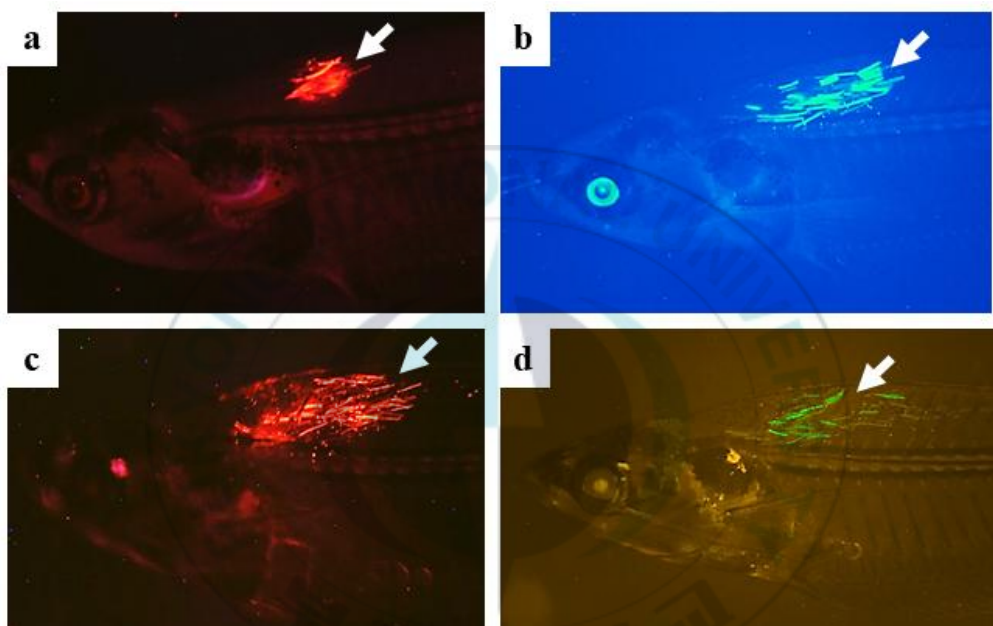


Fig. 3. Detection of fluorescences expression in glass catfish *Kryptopterus vitreolus* injected with various types of genes. a, CMV pDS Red2; b, CMV pAm CFP; c, pod β -actin RFP and d, pod β -actin GFP.

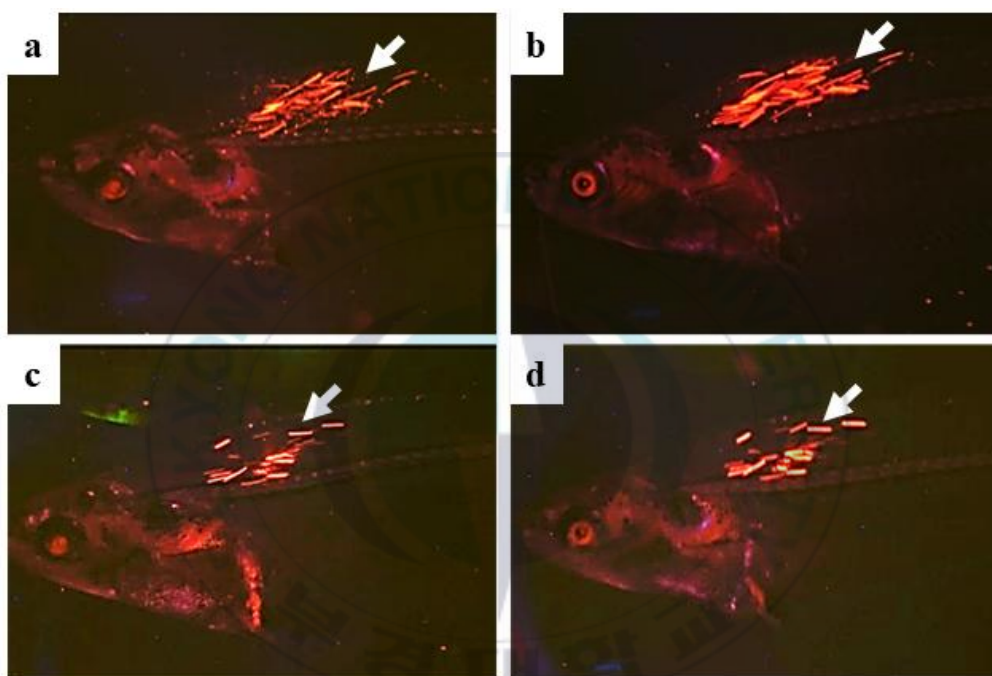


Fig. 4. Detection of fluorescences expression 2weeks and 4weeks after injection with β -actin promoter from 2 different fish species. ab, RFP gene for *O. dancena*; cd, RFP gene for *A. nigrofasciata*.

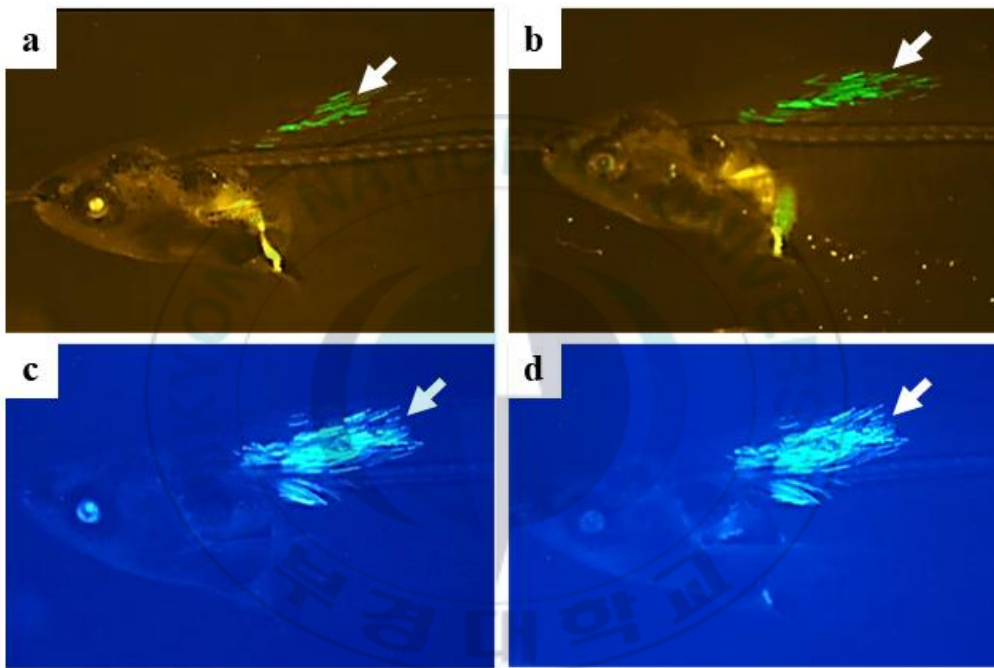


Fig. 5. Detection of fluorescences expression 2weeks and 4weeks after injection with 2 types of promoter from *O. dancena*. ab, pod β -actin GFP; cd, pod mlc2 CFP.

까지 유리메기 복강에 주사가 가능한 것으로 확인되었다(data not shown). 이에 5가지 산란유도호르몬 40 μ l를 마취된 유리메기에 복강 주사하여 96시간동안의 생존율을 분석한 결과, ovaprim과 S-GnRHa 주입군은 주사 후 2시간 이내에 모두 폐사였으나, 잉어뇌하수체 주입군에서 주사직후 폐사한 1미를 제외하고는 모두 생존하였다(Table 2).

5. 생식소 조직학적 분석

5-1. 대조군의 전장별 생식소 조직

유리메기 대조군의 전장별 생식소를 대상으로 조직학적 분석을 수행한 결과, 암컷의 경우 전장이 커질수록 난소조직의 크기가 증가하고 난자의 수도 많아지지만, 난자의 성숙단계는 염색인기와 주변인기로 제 1성장기 상태에 머물러 있어 성숙이 더딘 것으로 나타났다. 반면 수컷의 경우 전장이 5.5cm이상이면 성숙이 진행되면서 정소 내 공간이 생기고 6.0cm 이상의 경우 정소조직 내 정자가 가득 찬 것이 확인되어 전장에 따른 성 성숙이 암컷의 성숙보다 빠른 것으로 확인되었다(Fig. 6).

6. 성숙 유도

6-1. 호르몬 종류에 따른 성숙 유도

6-1-1. hCG (human Chorionic Gonadotropin)

성 성숙 호르몬인 hCG의 효과를 검토하기 위하여 hCG를 개체 당 1,2 및 4Iu/g농도로 주사한 후 생식소를 조직학적 방법으로 분석한 결과, 난소조직은 hCG 2Iu/g 이하의 농도는 대조군과 거의 차이가 없는 주변인기로 관찰되어, 성 성숙에 영향을 미치지 못하는 것으로 판명되었다. 그러나 최고 농도인 4Iu/g 농도에서는 세포질 내에 난황물질의 축적이 시작되는 제 2성장기로 접어들어 주변인기에서 난황포기로 이행 중인 난자가 존재

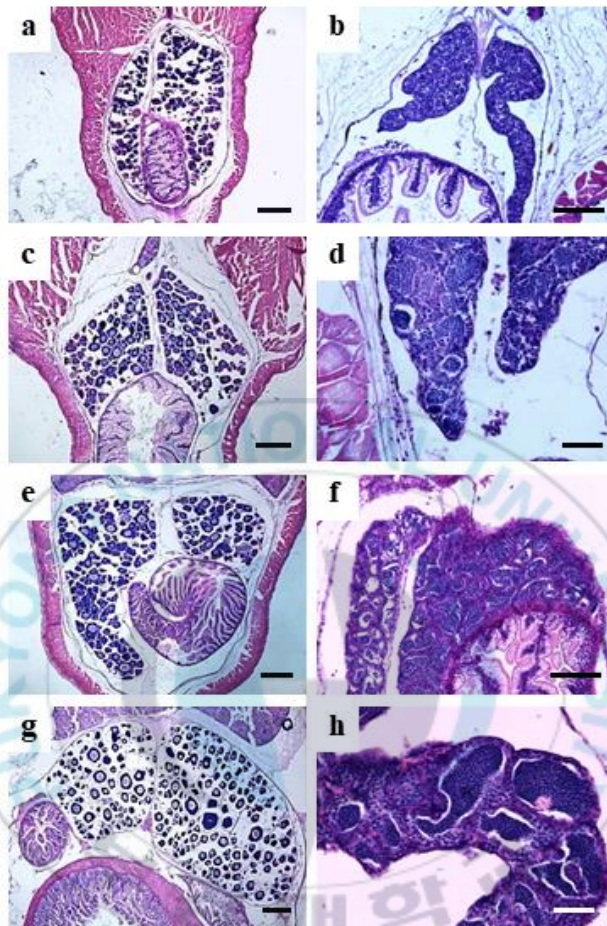


Fig. 6. HE-stained cross sections of gonad from the glass catfish. a, Ovary from a 46.46mm TL individual (Scale bar, 50 μ m); b, Testis from a 46.47mm TL individual (Scale bar, 20 μ m); c, Ovary from a 54.09mm TL individual (Scale bar, 50 μ m); d, Testis from a 54.13mm TL individual (Scale bar, 10 μ m); e, Ovary from a 57.13mm TL individual (Scale bar, 50 μ m); f, Testis from a 57.20mm TL individual (Scale bar, 20 μ m); g, Ovary from a 61.14mm TL individual (Scale bar, 50 μ m); h, Testis from a 62.36mm TL individual (Scale bar, 10 μ m).

하는 것이 확인되었다. 수컷의 경우 대조군과 비교하여 정소조직의 크기 차이는 비슷하나 정자의 방정이 이루어진 것으로 나타났다. 본 연구에서 사용한 hCG의 농도는 수컷에는 효과적이거나 암컷에 그리 크지 않은 것으로 확인되었다(Fig. 7).

6-1-2. LHRH- α (Luteinizing hormone releasing hormone)

LHRH- α 의 성 성숙 유도효과를 검토하기 위하여, LHRH- α 을 개체 당 1, 2 및 4 μ g/g 농도로 주사한 후, 상기 6-1-1과 같은 방법으로 분석한 결과, 암수 모두 대조군과의 성숙 차이가 나타나지 않아 본 연구에서 사용된 농도는 유리메기의 성 성숙에 효과가 없는 것으로 나타났다(Fig. 8).

6-1-3. CP (Carp pituitary)

잉어뇌하수체호르몬을 개체 당 1, 2 및 4mg/g의 농도로 24시간 간격으로 3회 주사 후, 24시간 후에 생식소를 분석한 결과, CP 1mg/g 농도에서는 난소의 성숙이 대조군과 큰 차이가 없는 것으로 보인 반면, 농도가 증가할수록 난소의 크기가 증가하고, 최고 농도인 4mg/g 농도에서는 난황포기의 난소가 다수 관찰되어 농도가 높을수록 성숙이 잘 유도되는 것으로 나타났다. 그러나 수컷의 경우, 농도와 처리횟수에 상관없이 모든 실험군에서 정자의 방출이 확인되어 잉어뇌하수체 호르몬의 농도에 따른 성숙의 정도가 그리 크지 않은 것으로 관찰되어 유리메기 수컷의 경우 29도의 온도조건에서 개체 당 1mg/g의 농도만으로 완전한 성 성숙을 유도할 수 있음이 확인되었다(Fig. 9).

6-2. 급격한 수온저하에 따른 잉어뇌하수체호르몬의 성 성숙 유도

사육수온을 급격히 낮추었을 경우 잉어뇌하수체 호르몬에 의한 성 성숙 효과를 검토하기 위하여, 28 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C도에서 사육하던 어류를 25 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C도로 낮추어 CP를 개체 당 4mg/g 농도로 24시간 간격으로 3회 주사 후 생식소를 분석한 결과, 난소 내 난자의 성숙은 2회까지는 대조군과 큰 차이가

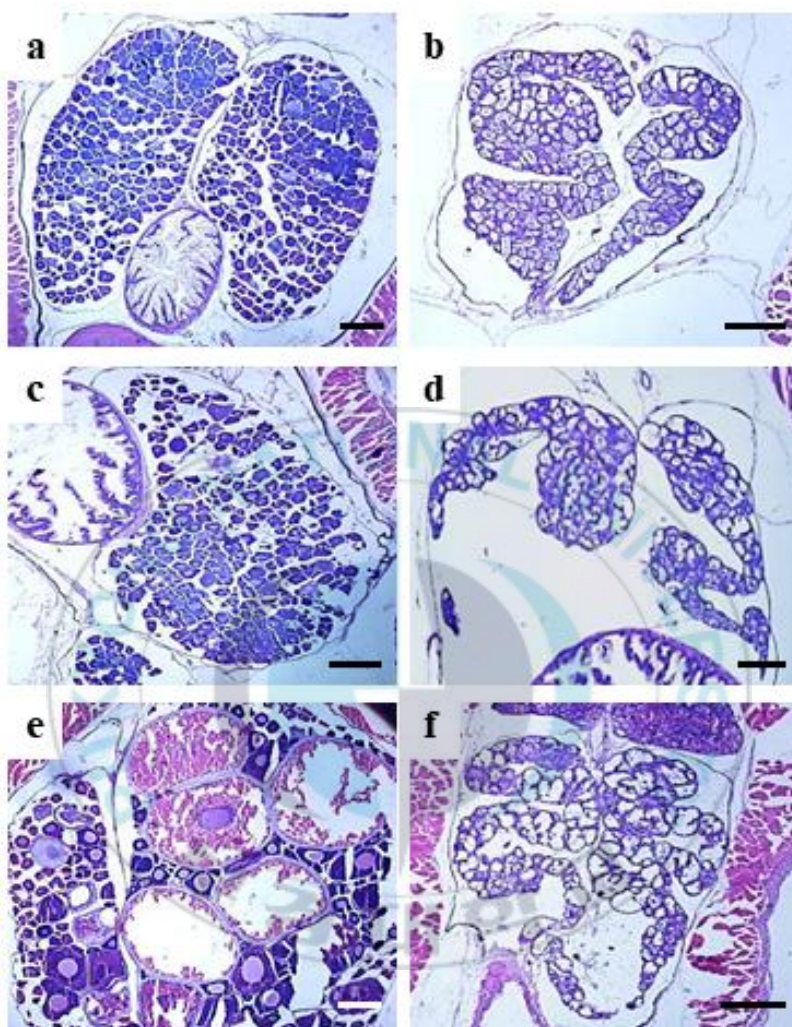


Fig. 7. HE-stained transverse sections of gonad from the glass catfish injected hCG at 3 different doses with 24hour intervals at $28\pm 1^{\circ}\text{C}$. ab, Gonads from the glass catfish injected 1Iu/g of hCG; cd, Gonads from the glass catfish injected 2Iu/g of hCG; ef, Gonads from the glass catfish injected 4Iu/g of hCG; All scale bars indicate $50\mu\text{m}$.

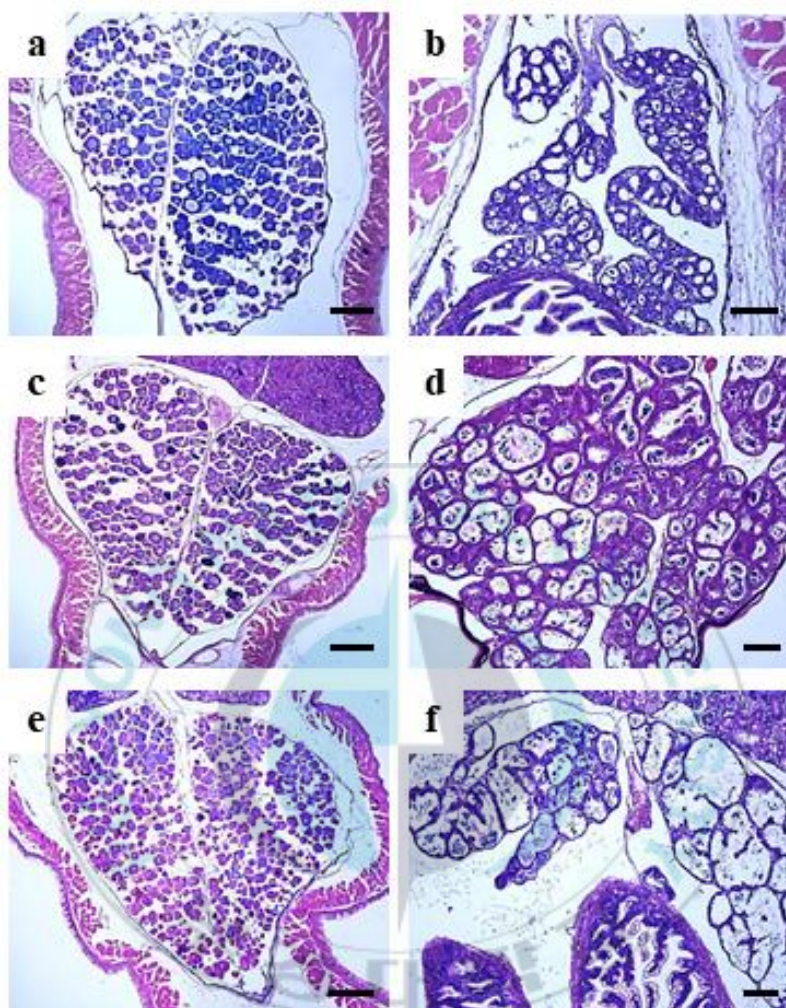


Fig. 8. HE-stained transverse sections of gonad from the glass catfish injected LHRH-analog at 3 different doses with 24hour intervals at $28\pm 1^{\circ}\text{C}$. ab, Gonads from the glass catfish injected $1\mu\text{g/g}$ of LHRH- α (Scale bar, $50\mu\text{m}$ and $20\mu\text{m}$); cd, Gonads from the glass catfish injected $2\mu\text{g/g}$ of LHRH- α (Scale bar, $50\mu\text{m}$ and $20\mu\text{m}$); ef, Gonads from the glass catfish injected $4\mu\text{g/g}$ of LHRH- α (Scale bar, $50\mu\text{m}$ and $20\mu\text{m}$).

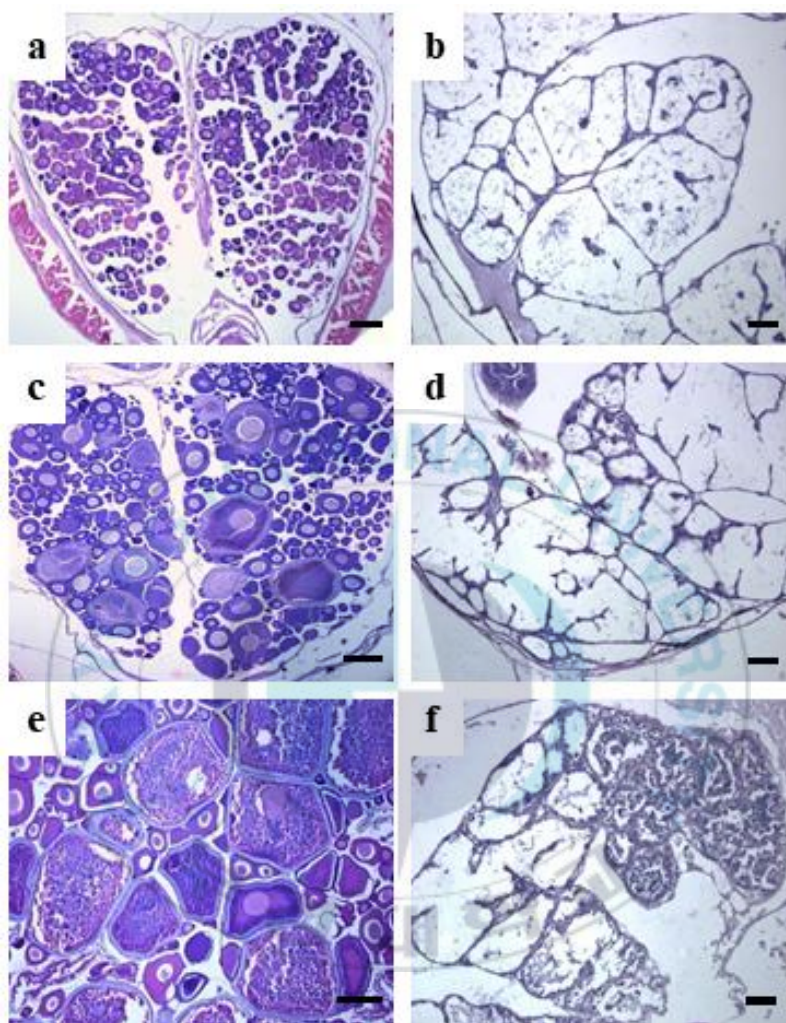


Fig. 9. HE-stained transverse sections of gonad from the glass catfish injected Carp pituitary at 3 different doses with 24hour intervals at $28\pm 1^{\circ}\text{C}$. ab, Gonads from the glass catfish injected 1mg/g of CP; cd, Gonads from the glass catfish injected 2mg/g of CP; ef, Gonads from the glass catfish injected 4mg/g of CP. All scale bars indicate $50\mu\text{m}$.

없었으나 3회 처리한 결과, 성 성숙이 유도되어 50% 정도의 난황포기에 도달한 난들이 다수 관찰되었고 난소의 크기도 증가한 것이 관찰되었다. 반면 수컷의 경우 정자의 방정이 확인되어 수컷은 4mg/g 농도로 24시간 간격으로 3회 주사하면 성 성숙 및 방정이 이루어져 급격한 온도의 변화에 영향을 받지 않는 것으로 나타났고, 처리 횟수를 증가하여도 각 회 차별 성숙도에 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 10).

6-3. 호르몬 복합 처리를 통한 성 성숙 유도

CP와 hCG를 복합 처리한 1번 실험군의 경우, 암수 모두 대조군의 생식소 조직과 차이를 보이지 않아 CP와 hCG를 단독 처리한 경우보다 효과가 없는 것으로 나타났다. 반면 2번 실험군의 경우에는 난소조직에서 yolk vesicle stage의 난자가 다수 관찰되고 난소의 크기도 증가되며 정소 조직에서도 소량의 성숙한 정자가 방출되는 것으로 확인되어 성 성숙 유도 효과가 있는 것으로 나타났으나 상기 처리군과 마찬가지로 CP 호르몬 4mg/g 단독 처리군보다 성 성숙 효과가 미미한 것으로 나타났다. 그러나 3번 실험군에서는 난소조직이 더 커지고 난자의 yolk 크기가 더 커진 것이 관찰되어 가장 성숙이 많이 된 것으로 나타났고 정소조직에서도 정자의 방정으로 저장낭이 비어있는 것이 관찰되어 세 개의 실험군 중 가장 효과적인 것으로 나타났으나 CP 호르몬 4mg/g 3회 단독 처리군보다 효과가 적은 것으로 판명되었다(Fig. 11).

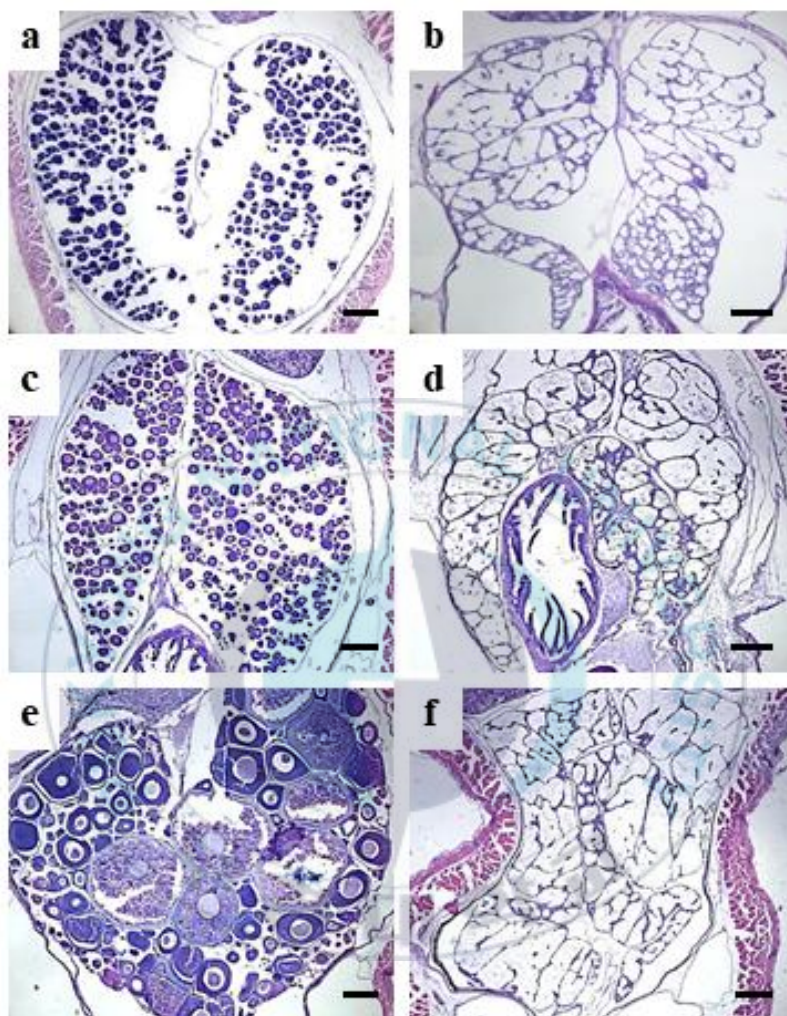


Fig. 10. HE-stained transverse sections of gonad from the glass catfish injected Carp pituitary at 3 different doses with 24hour intervals at $25\pm 1^{\circ}\text{C}$. ab, Gonads from the glass catfish injected 1mg/g of CP; cd, Gonads from the glass catfish injected 2mg/g of CP and ef, Gonads from the glass catfish injected 4mg/g of CP. All scale bars indicate $50\mu\text{m}$.

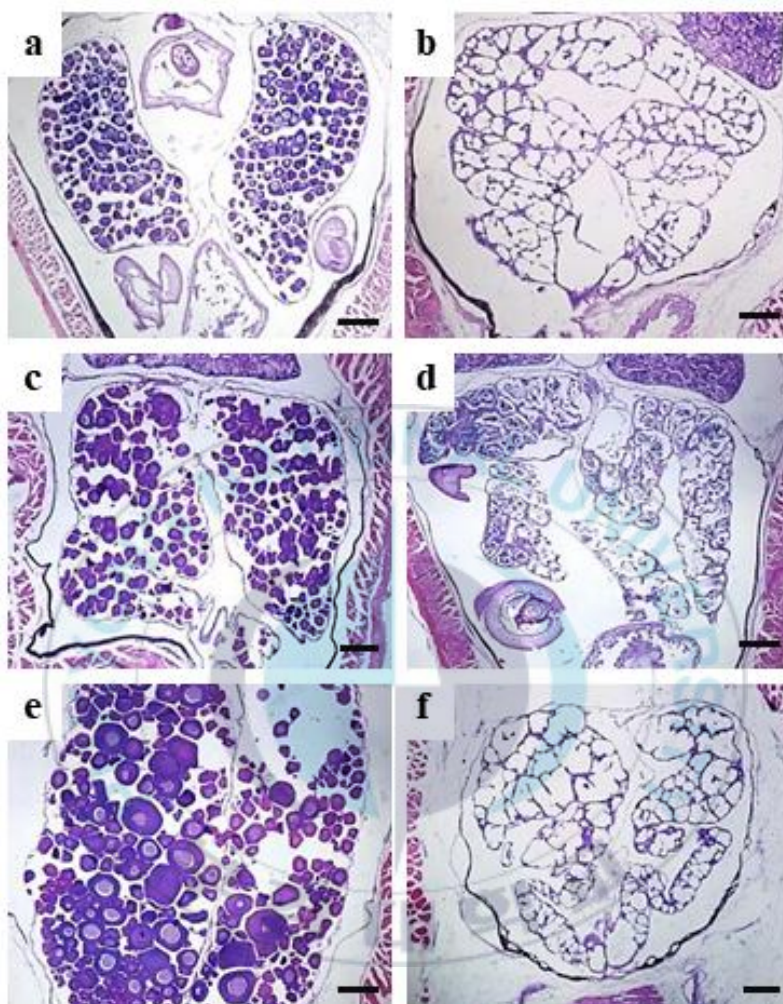


Fig. 11. HE-stained transverse sections of gonad from the glass catfish injected with CP and hCG with 24hour intervals at $28\pm 1^{\circ}\text{C}$. a, Ovary from experimental group 1; b, Testis from experimental group 1; c, Ovary from experimental group 2; d, Testis from experimental group 2; e, Ovary from experimental group 3 and f, Testis from experimental group 3. All scale bars indicate $50\mu\text{m}$.

IV. 고 찰

어류의 실험실 및 현장 연구에서 마취제의 사용은 인공산란, 어체 측정, 해부 및 운반에 있어 어체에 스트레스를 최소화하는 방법으로 매우 중요하다(Mylonas et al., 2005). 이에 어체의 해를 최소화하며 최적의 효과를 얻기 위해 다양한 마취제가 개발되어있다(NRC, 1994). 그러나 동일 마취제에서도 종에 따라 마취제에 대한 마취 효과 및 반응이 광범위하게 나타날 수 있어 다양한 마취제에서 농도 변화에 따른 실험대상종의 반응을 관찰하는 것은 중요하다(King et al., 2005). 특히 유리메기는 Table 3에서 보듯이 여타 어류에 비해 비만도가 낮고 체폭이 좁아 상해를 주지 않고 실험실에서 작업하기에 매우 어려운 어종이다. 따라서 이미 Saffan®, FA100 및 MS-222 (Tricaine methanesulfonate) 등의 마취제들이 사용된 바 있으나 이들은 각 마취제의 효과만 보고되어 있을 뿐 다양한 마취제의 마취 시간 및 회복 시간을 분석하여 최적 마취제를 선정한 결과는 없다(Peters et al., 2001; Dijkstra et al., 2001; Kolomytkin et al., 2007), 이에 본 연구에서는 유리메기에 가장 적합한 마취제 및 최적 농도를 확인하고자 5가지 마취제의 다양한 농도별 마취 효과 및 회복시간을 관찰하였다.

MS-222는 FDA에서 수산용 마취제로 공인되어(Schnick and Meyer, 1978) 어류의 마취에 이용되어 온 의약품으로써 다양한 어종에 대한 마취 효과 및 적정 농도는 물론 유전독성 및 생리활성에 미치는 여러 영향이 보고되어 있다(Topic Popovic et al., 2012). 본 연구에서 MS-222 40 ppm는 실험어의 건강상태에 따라 마취시간의 차이가 많았으며 최대 5분의 마취시간이 측정되는 개체가 관찰되어 해당 농도에서는 마취효과가 거의 없는 것이 확인되었다. 반면, 약 1분에 마취되는 농도는 60~80 ppm

로써(Table 4), 농도 변화에 따른 회복시간의 변화가 없어 해당농도가 유리메기의 적정 MS-222 마취 농도로 확인되어 Kolomytkin et al. (2007)의 결과와 동일하였다.

Clove oil 은 clove 나무(*Eugenia aromatica*)의 꽃과 잎의 증류를 통해 얻어지는 갈색의 액체로서 eugenol [2-methoxy-4-(2-propenyl) phenol] 성분이 마취 및 진정작용에 관여하는 활성물질로 알려져 치과 치료에 있어 마취제와 진통제로 오래 전부터 사용되어 왔다(Keene et al., 1998; Ross and Ross, 1999). 유리메기는 clove oil 에서 여타 4 종의 마취제에 비해 매우 낮은 농도인 20 ppm 부터 마취효과가 있는 것으로 관찰되었다. 본 종이 약 1 분에 마취되는 clove oil 농도는 40~50 ppm 으로 확인되었으나, 50 ppm 에서 회복시간이 2 배 이상 증가함에 따라 유리메기의 적정 마취농도는 40 ppm 으로 확인되었다(Table 4). 각시붕어(*Rhodeus uyekii*) 및 칼납자루(*Acheilognathus koreensis*), 기수어종인 *Oryzias dancena*, 담수어종인 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*), African catfish(*Clarias gariepinus*) 및 angelfish 가 1~2 분 안에 마취되는 clove oil 농도는 80~160 ppm 으로 보고되어 있어 본 종보다는 높은 농도에서 마취 효과가 있는 것으로 확인된다(Keene et al., 1998; Kang et al., 2005; Ogretmen and Gokcek, 2013; Mitjana et al., 2014; Park et al., 2017). 그러나 이들 종 모두 여타 마취제에 비해 낮은 농도에서 마취되는 것으로 보고되어 clove oil 이 본 종을 포함한 다양한 어종에 마취효과가 높은 것으로 보여진다.

2-phenoxyethanol 은 어류에 작용하는 마취 기작은 아직 잘 알려져 있지 않으나, 마취 및 회복시간이 짧고 박테리아와 진균류를 박멸하는 효과도 있어 이미 다양한 어종에 효과적으로 이용되고 있다(Ortuno et al., 2002; Tsantilas et al., 2006). 본 연구에서 유리메기가 약 1 분에 마취되는

농도는 250~275 ppm 으로 관찰되어 MS-222 및 clove oil 에 비해서 비교적 높은 농도에서 마취효과가 있는 것으로 확인되었다(Table. 4). 본 결과는 기존 보고된 African catfish, sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.), Senegalese sole 및 angelfish 의 600~1,200 ppm 의 농도보다 매우 낮아 여타 어종에 비해 유리메기가 2-phenoxyethanol 에 민감한 것으로 나타났다(Marsic-Lucic et al., 2005; Weber et al., 2009; Ogretmen and Gokcek, 2013; Mitjana et al., 2014).

NaHCO₃ 은 인체에 무해한 백색의 가루로 물에 녹아 CO₂ 를 방출하는 물질로써 Fish (1943)에 의해 어류의 마취에 최초로 사용된 이래 그 안전성을 인정받아왔고(Marking and Fred, 1985), 인간과 어류 모두에 안정적이기 때문에 식용으로 사용하기 위한 휴약 기간이 필요 없다는 장점을 가지고 있다(Altun et al., 2009). 나일틸라피아(*Oreochromis niloticus*), 잉어 및 African catfish 등에서 NaHCO₃ 을 이용한 마취효과를 보고한 바 있으나, 2 분 이내의 마취효과가 나타나기 위해서는 30,000 ppm 이상의 농도에 침지처리를 해야 하거나, 2,000 ppm 에서 5 분간 마취하여도 stage 3 단계의 마취효과가 나타나는 등 여타 마취제에 비해 마취효과가 낮은 것으로 보고되고 있다(Altun et al., 2009; Opiyo et al., 2013; Githukia et al., 2016). 본 종에서도 NaHCO₃ 최대 1,000 ppm 에 5 분 이상 노출하여도 마취효과가 나타나지 않는 것으로 관찰되어(Table 4), NaHCO₃ 은 유리메기의 마취제제로 부적합한 것으로 판단되었다.

인체용 마취제로 사용되고 있는 lidocaine-HCl 을 유리메기에 처리 시 100~400 ppm 에서 127.3~202 초의 마취시간을 보였고 100~117.4 초의 회복시간을 보이는 것으로 확인되었으나, 마취농도가 증가함에 따라 마취시간의 단축 및 회복시간의 증가와 같은 마취 증대효과가 크게 나타나지 않는 것으로 확인되었다(Table 4). 본 제제는 이미 1946 년 최초로 발견된

이래 유사 마취제인 tetracaine 이나 benzocaine 과 마찬가지로 혈압을 낮추고 불규칙한 심장박동을 유발하는 부작용이 보고되고 있으나 알레르기의 부작용과 독성이 비교적 적고, 지속시간이 길어 임산부에게도 사용될 만큼 안전한 마취제로 인정받고 있어 인체용 국소마취제로 널리 쓰이며 (Scriabine, 1999), 어류에는 1980년대부터 사용되고 있다(Carrasco et al., 1984).

Ackerman et al. (2005)은 어류의 마취에 있어 lidocaine-HCl 를 단독으로 사용하는 것보다 NaHCO_3 과 혼합하여 사용할 경우 마취효과가 증대된다고 보고한 바 있으며, lidocaine-HCl 이 어류에 미칠 영향을 최소화하고 마취효과의 증대를 위해 이미 잉어, tilapia, 연어, 차넬메기, 쥐노래미(*Hexagrammos otakii*) 및 각시붕어 등 다수의 어종에서 lidocaine-HCl 과 NaHCO_3 을 혼합하여 사용된 바 있다(Kim et al., 1988; Park et al., 2003; Kang et al., 2005). 이에 본 연구에서도 lidocaine-HCl 의 마취효과를 증대시키기 위해 lidocaine-HCl 과 NaHCO_3 을 혼합사용하여 그 마취효과를 확인한 결과, lidocaine-HCl 100 ppm 에서 마취시간이 202 ± 63.3 초였으나 NaHCO_3 을 첨가한 경우 마취시간이 157 초~53.4 초로 확인되었고, lidocaine-HCl 200 ppm 에서는 마취시간이 187 ± 65.6 초였으나 NaHCO_3 을 혼합 사용할 경우 86.6~66.0 초에 마취되는 것으로 나타나, 기존 보고된 타 어종에서와 마찬가지로 본 종에서도 동일 농도의 lidocaine-HCl 에 NaHCO_3 을 혼합사용 할 경우 마취시간이 약 50% 단축되는 것으로 관찰되었고, 이때 회복시간의 증가 없이 마취시간만 단축됨으로써 안정적으로 마취효과가 증대되는 것으로 확인되었다.

Marking and Fred (1985)는 마취시간이 길어질수록 회복시간이 연장되고 어체가 저산소증에 노출될 수 있는 가능성이 높아지므로, 어류 마취제는 3 분 이내의 마취시간과 10 분 이내의 회복시간을 나타내는 것이 적절

하다고 보고한 바 있다. 이러한 조건에 따르면 유리메기의 마취제로써 NaHCO_3 을 제외한 마취제 모두가 적절한 것으로 나타났다. 그러나 MS-222 는 미국의 식약청(FDA)에 식용어의 사용이 인정된 유일한 마취제이지만 식용까지 최소 21 일간의 휴약 기간이 규정되어 있고 (Summerfelt and Smith, 1990; Park et al., 2003), 2-phenoxyethanol 은 어류의 스트레스 작용을 막지 못하여 cortisol 및 glucose 등의 수치를 증가시키며 면역저하를 일으킬 수 있다고 보고되고 있으며 식용어의 마취제로 아직 승인되지 않았기 때문에(Ackerman et al., 2005; Zahl et al., 2012), 식용으로 사용 가능한 유리메기의 마취제로써 두 제제는 부적합한 것으로 판단된다. 반면 Clove oil 과 lidocaine-HCl 은 인체에 사용 가능한 마취제로 잘 알려져 있으나, 이 중 lidocaine-HCl 은 임신부에게도 사용 가능한 안전성이 높은 마취제로 알려져 있어 상기 5 종의 단일 마취제제 중 가장 안전성이 높은 것으로 판단되었다. 특히, lidocaine-HCl 과 NaHCO_3 혼합 마취제는 lidocaine-HCl 의 단독 사용 시보다 저농도에서 동일한 마취 및 회복효과가 관찰됨으로써 두 제제의 혼합사용 마취제가 최적의 마취제로 판명되었고, 다양한 농도로 침지처리 한 결과 이들의 최적 농도는 lidocaine-HCl 200 ppm 과 NaHCO_3 100ppm 혼합액으로 확인되었고, 이때 본 제제의 pH 는 사육수의 pH 와 유사하였다(Table 5).

형질전환 형광 관상 어류의 산업성은 그 형태와 아울러 발현율을 최대화함으로서 그 가치를 최대화할 수 있어 부경대학교 분자유전육종연구실에서는 이미 바다송사리에 다양한 형광유전자를 이식하여 그 산업성을 관찰한 바 있다(Cho et al., 2011). 그러나 본 연구실에서 해양수산용 LMO 의 바이오안전성관리를 위해 개발된 형광 바다송사리는 근육이 투명하여 발현되는 형광이 잘 표현되는 장점은 있으나(Cho et al., 2011; Cho et al., 2013), 그 형태가 소비자의 취향을 만족시키기에는 어려움을 지니고 있고

개체가 성장하며 체폭이 증가되어 그 투명도가 점차 감소되는 단점을 지니고 있다. 그러나 유리메기는 몸을 투명하게 유지하기 위해 지방을 체표면에 분비함으로서 성체로 성장하더라도 그 투명도가 사망 직전까지 유지되는 장점을 지니고 있다(Ng and Kottelat, 2013). 이에 본 연구에서는 본 종을 수산동물의약품의 안전관리를 위한 DNA vaccine 모델 개발과 형질전환 관상어로 개발하기 위한 기초 연구를 위해 다양한 유전자를 근육 주사하여 그 발현양상을 조사한 바, 사용된 4 종의 프로모터와 3 종의 구조유전자 모두에서 높은 발현 강도를 보여, DNA 백신 개발에 있어 유용한 모델이 될 수 있음은 물론, 앞으로 수정란의 유전자 이식에 의한 다양한 색깔의 형질전환 관상어 개발에 유리할 것으로 보인다. 그러나 사용된 프로모터 중 CMV 보다는 어류 유래의 프로모터가 더욱 강력한 발현을 보였고 어류유래의 b-actin 프로모터 중 바다송사리 유래의 프로모터가 화이트 니그로유래의 프로모터보다 조금 더 강력한 발현이 관찰되었으며, 바다송사리 유래의 프로모터 중에는 b-actin 보다 mlc2 프로모터가 더욱 강력한 것으로 나타났다. 또한 구조유전자로 사용된 3 종의 형광유전자 중 GFP 유전자는 여타 유전자에 비하여 발현 강도가 낮은 것으로 관찰되었다. 따라서 앞으로 RFP와 CFP를 DNA 백신 연구모델의 구조유전자로 사용하는 것이 GFP보다 유의할 것으로 보인다. 특히 Dijkstra et al. (2001)은 본 종을 DNA vaccine 개발의 모델로 이용하고자 luciferase와 이의 발현유전자를 근육에 주사하여 그 발현유무를 관찰한 결과, 상기 유전자를 이식받은 모든 개체의 근육에서 발현이 강하게 나타남은 물론 일부 개체에서는 그 발현 양상이 2년 이상 까지도 지속됨을 관찰한 바 있어, 앞으로 본 실험군에 대하여 현재의 발현양상이 지속되는 기간을 조사함으로서 본 종을 수산동물의약품의 안전관리를 위한 DNA vaccine 개발 모델로서 뿐만 아니라 유전자 이식을 위해 개발된 벡터의 발현 유무 및

강도를 측정할 수 있는 유용한 모델 및 산업성이 큰 형광관상어의 개발이 가능할 것으로 생각된다.

어류의 산란유도에 있어 ovaprim, S-GnRH, LHRH-a, hCG 및 잉어뇌하수체의 경우 보고된 모든 종에서 매우 효과적인 것으로 보고되어 있다(Zohar and Mylonas, 2001). 이 중 메기과 어류의 산란에 있어 ovaprim과 S-GnRH는 특히 자연산 메기류를 채집하여 실내에서 인공산란유도시 매우 효과적인 것으로 보고되어 있다(Brzuska and Adamek, 1999; Haniffa and Sridhar, 2002; Padmakumar et al., 2011). 그러나 본 연구결과, ovaprim과 S-GnRH 처리군은 전량 폐사하여 본 종의 산란유도에는 사용이 불가능하였고, LHRH-a, hCG 및 잉어뇌하수체의 경우, 잉어뇌하수체 주사직후 폐사한 1 미를 제외하고 모두 4일 이상 생존하여 유리메기의 산란유도에 사용 가능한 것으로 나타났다(Table 2). Zohar and Mylonas (2001)는 어류의 호르몬 처리에 의한 산란 유도 시 고농도의 경우라도 생존율에는 큰 영향을 끼치지 않음을 보고한 바 있어, ovaprim과 S-GnRH에서 전량 폐사한 결과는 호르몬 농도의 원인보다는 호르몬 제조사에서 사용한 용매 때문일 가능성도 배제할 수 없다. 그러나 앞으로 두 호르몬을 다양한 농도로 처리 한 후 생존율을 비교 분석한다면 그 결과를 확인할 수 있을 것으로 생각된다.

어류의 인공산란 유도는 암수의 성숙시기가 다르거나 실험실 또는 양식장 내에서 자연산란을 하지 못하는 어류를 대상으로 1930년대부터 시작된 이래 최근까지 다양한 어종에서 환경조절 및 호르몬에 의한 산란 유도가 보고되고 있다(Zohar and Mylonas, 2001). 특히 최근에는 성 성숙과 관련된 뇌-뇌하수체-생식소 축을 호르몬 처리에 의해 효과적으로 조절함으로써 난자의 성숙, 배란 및 정자의 유리를 통한 수정란의 생산을 통해 산업성이 높은 어류의 치어생산을 위한 많은 연구가 이루어지고 있다(Kiran

et al., 2013).

본 연구에서 성 성숙 유도에 사용된 Human chorionic gonadotropin (hCG)은 태반의 syncytiotrophoblast 세포에 의해 합성되는 호르몬으로서, 본 연구에서도 사용된 가장 높은 농도인 4Iu/g 의 농도에서 성 성숙이 유도됨을 확인하였으나 본 연구에서 사용된 농도로는 난자의 최종 성숙과 배란을 이루어지지 않았다. Ohta and Tanaka (1997)은 대부분의 어류는 0.1~4Iu/g 의 농도에서 산란이 유도되는 것으로 보고한 바 있어 hCG 는 본 종의 산란유도에는 적합하지 않은 것으로 나타났다. 그러나 정자의 유리 및 방정에는 가장 낮은 농도인 1Iu/g 에서도 효과적으로 나타나 암수 간 성숙유도에 있어 차이를 보였다.

1970 년대부터 어류의 산란유도에 사용된 Gonadotropin-releasing hormone (GnRH- α)는 어종 간의 구조가 서로 유사하기 때문에, 어류로부터 직접 추출하거나 합성된 GnRH- α 의 유사체를 사용하여 어류의 산란 유도에 이용되고 있다(Sherwood et al., 1994). 이 중 LHRH (Luteinizing hormone-releasing hormone)는 시상하부 호르몬의 하나로서 황체형성호르몬(LH) 및 난포자극호르몬(FSH)의 분비를 촉진하는 물질로 알려져 있고, LHRH 의 유사체인 LHRH- α 는 순도가 높고 어류에 의한 신진대사가 빠르지 않아 장기간 체내에 남아있을 수 있어 natural LHRH 이나 GnRH 보다 훨씬 효과적임이 보고되어 있다(Alok et al., 1993; Linhart et al., 2001). Harvey et al. (1985)은 펠렛 형태의 LHRH- α 를 sea bass *Lates calcarifer* 와 rabbitfish *Siganus guttatus* 에 9.0~ 23.5 μ g/kg 의 농도로 주입하여 2~4 일 후 산란을 유도한 바 있다. Ngamvongchon et al. (1988)은 메기 과와 잉어 과의 담수 어류 8 종을 대상으로 LHRH- α 의 효과를 조사한 결과 walking catfish *Clarias macrocephalus* 은 20 μ g/kg 농도로 1 회 주사하여 주사 16~18 시간 후 산란을 시작함을 관찰하였고, 잉

어 과의 silver carp 와 bighead carp 는 5~ 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 농도로 2 회 주사한 후 4~8 시간 내에 효과적으로 산란함을 보고하였다. 본 실험에서는 여타 산란유도가 보고된 어종들에서 처리한 농도보다 매우 높은 1, 2 및 4 $\mu\text{g}/\text{g}$ 의 농도로 LHRH-a 를 주사하였으나 암수 모두 대조군과 성숙도에서 차이가 나타나지 않아 본 호르몬은 유리메기의 성 성숙에 효과가 없는 것으로 판단되었다. 그러나 메기과 어류에서 Tan-Fermin et al. (1993)은 0.05~0.1 $\mu\text{g}/\text{g}$ 의 LHRH-a 와 1 $\mu\text{g}/\text{g}$ 의 pimozone 을 혼합 사용하여 Asian catfish *Clarias macrocephalus* 의 배란을 유도한 바 있고, Leeuw et al. (1985)은 African catfish *Clarias gariepinus* 에 0.05mg/kg 농도의 LHRH-a 과 5mg/kg 농도의 pimozone 을 1 회 주사해 실험군의 100%가 산란함을 관찰하였다. 이에 앞으로 본 호르몬을 도파민 길항제인 pimozone 등과 혼합사용하여 인공산란을 유도할 필요가 있을 것으로 판단된다.

Carp pituitary 잉어뇌하수체호르몬은 1930 년대부터 어류의 인공산란유도를 위해 사용되는 호르몬으로서 다양한 어종에서 흔히 사용되고 있다 (Pullin and Kuo, 1980; Baleri, 1985; Ufodike and Amadi, 1991). 특히 자연서식지에서 채집된 메기과 어류는 양식장이나 연구실에서 자연산란을 유도하기가 잉어 과 어류 등에 비해 어려워 인공산란을 위해 잉어뇌하수체호르몬을 단독으로 처리하거나 타 호르몬과 복합 처리하여 1960 년대부터 많은 연구가 시도되고 있고(Sneed and Clemens, 1960; Bidwell et al., 1985; Busch and Steeby, 1990; Goudie et al., 1992; Kelly and Kohler, 1996), 대부분의 메기과 어류에서 산란에 유효한 농도는 대체로 2~9 $\mu\text{g}/\text{g}$ 에서 산란유도에 효과적임이 보고되어 있다(Obi and Popoola, 1994; Omoregie et al., 1998; Zonneveld et al., 1988). 이에 본 실험에서도 여타 메기과에서 사용된 농도보다 매우 높은 농도인 1, 2 및 4mg/g 로 처리하

여 그 효과를 검토한 바, 수컷의 경우 최저 농도인 1mg/g 에서도 성숙하여 방정함이 확인되었으나 잉어뇌하수체호르몬의 농도에 따른 성숙의 정도가 그리 크지 않아 개체 당 1mg/g 의 농도만으로 완전한 성 성숙을 유도할 수 있음이 확인되었다. 특히 조직학적 관찰 결과(Fig. 9), 본 연구에서 사용된 hCG 와 LHRH-a 보다 정소가 크게 비후화되고 방정 효과도 높음이 확인되어 수컷의 성 성숙 유도에 있어 잉어뇌하수체호르몬이 효과적인 것으로 판단되었다. 암컷의 경우 1mg/g 농도에서 난소의 성숙이 대조군과 큰 차이가 없었으나 2mg/g 농도 이상에서는 난소의 크기가 증가하고, 최고 농도인 4mg/g 농도에서 성숙이 잘 유도되나 산란은 유도되지 않아 잉어뇌하수체 처리 단독으로는 산란효과가 없는 것으로 판단되나 성 성숙 유도 효과는 확인되었다. 따라서 농도를 더 높여 처리하여 그 효과를 검토함이 필요하나 본 종의 어체 크기가 작아 호르몬의 농도를 높이는 데 한계가 있어 앞으로 다양한 환경 조건 및 복합호르몬 처리에 의한 산란유도의 가능성을 검토하여야 할 것으로 판단된다.

어류는 각각의 종마다 산란을 위한 적당한 수온의 범위가 달라 수온은 어류의 산란에 있어 영향을 미치는 주요 환경요인으로 알려져 있다 (Harvey and Hoar, 1979). 성호르몬처리에 의한 인공산란유도 시에도 약간의 온도차로 배란을 지연시키거나 촉진시킬 수 있음도 보고되어 있다 (Phelps et al, 2007). 자연서식지에서 유리메기의 산란기는 우기인 5월부터 8월 사이에 비 온 뒤 이루어지는 것으로 알려져 있다. 이에 급격히 수온을 낮춰 CP 4mg/g 를 3회 주사한 결과, 수컷은 방정 유도가 가능하였으나 암컷의 산란은 이루어지지 않아 실험실 조건에서 수온은 산란에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. Phelps et al. (2007)은 채널메기의 인공산란에 수온이 미치는 영향을 조사하기 위하여 24, 26 및 28 도의 온도조건으로 LHRH-a 를 주사한 결과, 28 도의 수온조건에서 산란율이 가장 높

은 것으로 나타났고, 여타 메기과 어류인 *Pangasius sutchi* 의 경우 28 도와 30 도의 온도조건으로 잉어뇌하수체호르몬을 주사한 결과 30 도 조건에서 더 우수한 결과를 보여(Chattopadhyay et al., 2002) 적정 수온조건 내에서는 높은 온도가 산란율에 더 나은 결과를 보이는 것으로 보고된 바 있어 앞으로 28±1℃보다 더 높은 온도로 사육 후 수온을 급격히 낮추어 다양한 종류의 호르몬 처리에 따른 효과를 검토하여야 할 것 이다.

메기과 어류의 인공산란 유도에 있어 Kutwal et al. (2015)은 African catfish *Clarias gariepinus* 에 3~6mg/kg 의 잉어뇌하수체호르몬과 LHRH-a 유사체인 0.3~0.6mg/kg 의 Ovupin-L (salmon GnRH_a)을 복합 처리하여 성공적으로 산란을 유도하였고, Audo and Ofojekwu (2010)는 4~6mg/kg 농도의 잉어뇌하수체호르몬과 0.4~0.6ml/kg 의 ovaprim 을 복합사용하여 높은 산란 유도율을 얻은 바 있다. 이에 본 연구에서도 CP 와 LHRH-a 및 ovarprim 호르몬을 복합 사용하기 위해 이들의 효과를 검토 하였으나 Table 2 에서 보듯이 유리메기에 복강주사 시 모든 개체가 폐사하였다. 이에 본 연구에서는 유리메기의 생존에 영향을 끼치지 않고 성 성숙에 일부 효과적으로 나타난 CP 와 hCG 를 Lam (1982)과 Andrade-Talmelli et al. (2002)에서 나타난 다양한 방법으로 복합처리 하였으나 산란유도에 실패하였다. 따라서 GnRH 와 ovaprim 이 본 종의 생존에 미치는 원인을 규명한 후, CP 와 이들을 복합 처리하여 인공산란 유도 효과를 검토할 필요가 있을 것으로 생각된다.

앞으로 빛, 수온 및 기타 환경 조절과 함께 다양한 종류의 성 성숙 호르몬을 본 종의 산란기에 집중적으로 처리하여 인공산란을 유도하고 양질의 정자와 난자를 확보하기 위한 후속 연구가 필요할 것으로 사료된다.

국문 요약

유리메기는 복강을 제외한 모든 부위가 투명하고 관상어로서 널리 유통되고 있어, 본 종을 이용하여 형질전환 형광 관상어로 개발할 경우 그 가치가 높을 것으로 예상된다. 이에 본 연구는 유리메기를 형질전환 어류로 개발하기 위한 기초 연구로서, 마취, 유전자의 direct injection 및 성 성숙 유도 등을 연구하였다.

그 결과, 어류에의 스트레스를 최소화하기 위한 최적 마취제로 염산리도카인과 중탄산나트륨을 혼합 사용하였을 시 가장 마취효과가 높은 것으로 나타났고, 그 최적 농도로는 염산리도카인 200ppm 과 중탄산나트륨 100ppm 으로 확인되었다.

확립된 마취조건 하에서 어류의 등 근육에 유전자의 direct injection 을 실시하고 그 발현 양상을 관찰한 결과, 본 연구에 사용된 CMV 및 바다송사리 β -actin 프로모터 모두에서 형광유전자가 발현됨이 관찰되었고, 발현강도는 GFP 유전자를 제외한 CFP 와 RFP 는 비슷한 강도를 보였다. 또한 화이트니그로 프로모터보다 바다송사리 프로모터가 더 잘 발현하는 것으로 확인되어, 가장 발현이 강한 유전자는 바다송사리의 mlc2 CFP 인 것으로 나타났다.

형질전환 어류를 생산하는데 기본적인 조건으로서 수정란의 대량 확보를 위해 본 종의 산란을 위한 성숙을 유도한 결과, 사용된 성숙 유도 호르몬 중에서 잉어뇌하수체 호르몬의 4mg/g 농도가 hCG 나 LHRH-a 보다 효과가 높은 것으로 나타났다. 잉어뇌하수체 호르몬을 어류에 복강 주사하고 조직학적 분석을 수행한 결과, 난황포기의 난소가 관찰되고 난소의 크기가 커진 것을 확인할 수 있었고 정소의 경우에는 개체 당 1mg/g 의 농도만으로도 완전한 성 성숙을 유도하여 방정이 가능함을 확인할 수 있었다.

그러나 온도를 낮추어 처리하거나 호르몬의 복합처리 등을 시도한 결과, 성숙호르몬을 이용한 성 성숙 유도만으로는 최종 성숙과 산란까지 유도할 수 없는 것으로 확인되었다. 따라서 본 종의 수정란 대량 확보를 위한 산란을 유도하기 위하여 앞으로 빛, 수온 및 기타 환경 조건을 조절하는 등의 후속 연구가 필요하다고 판단된다.



감사의 글

이 논문이 완성되기까지 부족한 저에게 아낌없는 지도와 격려로 이끌어 주신 지도 교수 김동수 교수님께 깊은 존경과 감사를 드립니다. 항상 바쁘신 와중에도 논문의 심사를 위해 세심한 교정과 충고를 해주신 김기홍 교수님과 남윤권 교수님께 감사드리며, 많은 가르침과 격려를 해주신 김창훈 교수님, 배승철 교수님, 김종명 교수님, 공승표 교수님, 박정환 교수님과 최윤희 교수님께도 감사의 말씀을 전합니다.

학위 과정 동안 미숙한 저를 인내와 배려로 감싸주시고 끝까지 이끌어 주신 정효선 선배님과 고민균 선배님께 깊은 감사를 드립니다. 실험실 일을 함께 하며 즐거움이 되어준 후배 김나경과 장다희에게도 고마움을 전하고, 가까이에서 큰 힘이 되어주는 아끼는 후배 신미리, 대학원 생활을 지치지 않게 버팀목이 되어준 김정주에게 감사드립니다. 또한 관심과 애정으로 열렬히 응원해준 사랑하는 친구들 김영경, 금지원, 윤지혜와 노지영에게 힘이 돼주어 고맙다는 말을 전하고 싶습니다. 힘든 와중에도 서로 격려를 아끼지 않는 대학원 동기 분들과 선후배님들께도 마음 속 깊은 감사의 정을 보냅니다. 서로 가는 길은 다르지만 각자의 길을 진심으로 응원하는 오랜 친구들 김소연, 이지호, 나한지, 장원정과 전해린에게도 감사하며 많은 분들에게 이 감사함을 보답할 수 있는 사람이 되도록 노력하겠습니다.

마지막으로 늘 저를 걱정하시지만 변함없는 사랑으로 지켜봐주시는 존경하는 부모님과 존재만으로도 힘이 되는 우리 가족에게 사랑과 감사의 마음으로 이 논문을 바칩니다.

V. 참고 문헌

- Ackerman PA, Moragn JD and Iwama GK. 2005. Anesthetics. Canadian Council on Animal Care supplement to Guidelines on the Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing. Canadian Council on Animal Care, Ottawa, Canada, 3-13.
- Alok D, Krishnan T, Talwar GP and Garg LC. 1993. Induced spawning of catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch), using D-Lys6 salmon gonadotropin-releasing hormone analog. Aquaculture 115, 159-167.
- Altun T, Bilgin R and Danabaş D. 2009. Effects of sodium bicarbonate on anaesthesia of common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758) juveniles. Turk J Fish Aquat Sci 9, 29-31.
- Anderson ED, Mourich DV and Leong JAC. 1996. Gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intramuscular injection of DNA. Mol Mar Biol Biotechnol 5, 105-113.
- Andrade-Talmelli EFD, Kavamoto ET, Narahara MY and Fenerich-Verani N. 2002. Induced spawning of “piabanha” (*Brycon insignis* Steindachner, 1876) in captivity. Rev Brasileira de Zoot 31, 803-811.
- Audu IW and Ofojekwu PC. 2010. Comparative Study of Carp Pituitary

Extracts (CPE) and Ovupin-L on Induced Breeding in African Catfish (*Clarias gariepinus*). J Biol Agric Health 5, 29-33.

Baleri EL. 1985. Effect of sheep pituitary extract, common carp pituitary extract and human chorionic gonadotropin on induced spawning of common carp (*Cyprinus carpio*). MSc thesis, University of Jos, Nigeria, 85.

Bidwell CA, Chrisman CL and Libey GS. 1985. Polyploidy induced by heat shock in channel catfish. Aquaculture 51, 25-32.

Bratspies RM. 2005. Glowing in the dark: how America's first transgenic animal escaped regulation. Minn J L Sci Tech 6, 457-504.

Brzuska E and Adamek J. 1999. Artificial spawning of European catfish, *Silurus glanis* L.: stimulation of ovulation using LHRH-a, Ovaprim and carp pituitary extract. Aquacult Res 30, 59-64.

Busch RL and Steeby JA. 1990. An Evaluation of a Leuteinizing Hormone Releasing Hormone Analog to Induce Spawning of Channel Catfish *Ictalurus punctatus*. J World Aquacult Society 21, 10-15.

Carrasco S, Sumano H and Navohro-Fierro R. 1984. The use of lidocaine-sodium bicarbonate as an anesthetic in fish.

Aquaculture 41, 161-163.

Chapman FA, Fitz-Coy SA, Thunberg EM and Adams CM. 1997. United States of America trade in ornamental fish. J World Aquacult Soc 28, 1-10.

Cho YS, Lee SY, Kim YK, Kim DS and Nam YK. 2011. Functional ability of cytoskeletal β -actin regulator to drive constitutive and ubiquitous expression of a fluorescent reporter throughout the life cycle of transgenic marine medaka *Oryzias dancena*. Transgenic Res 20, 1333-1355.

Cho YS, Lee SY, Kim DS and Nam YK. 2013. Characterization of stable fluorescent transgenic marine medaka (*Oryzias dancena*) lines carrying red fluorescent protein gene driven by myosin light chain 2 promoter. Transgenic Res 22, 849-859.

Chattopadhyay NR, Mazumder B and Mazumdar B. 2002. Induced spawning of *Pangasius sutchi* with pituitary extract. Aquaculture asia 7, 43-44.

Clontech®. 2017. Database of fluorescence proteins. Retrieved from <http://www.clontech.com/US/Products>.

Dijkstra JM, Okamoto H, Ototake M and Nakanishi T. 2001. Luciferase expression 2 years after DNA injection in glass catfish (*Kryptopterus bicirrhus*). Fish Shellfish Immunol 11, 199-202.

Finley L. 2009. Catfishes: the complete guide to the successful care

and breeding of more than 100 catfish species. T.F.H. Publications, Neptune City, 127.

Fish FF. 1943. The anaesthesia of fish by high carbon dioxide concentrations. Trans Am Fish Soc 72, 25-29.

Githukia CM, Kembenya EM and Opiyo MA. 2016. Anaesthetic effects of Sodium bicarbonate at different concentrations on African catfish (*Clarias gariepinus*) juveniles. J Aquacult Eng Fish Res 2, 151-158.

Glofish®.2017.Common Question About Glofish®Fluorescent Fish.
Retrieved from <http://www.glofish.comon> July30.

Goudie CA, Simco BA, Davis KB and Parker NC. 1992. Reproductive performance of pigmented and albino female channel catfish induced to spawn with HCG or ovaprim. J World Aquacult Soc 23, 138-145.

Haniffa MAK and Sridhar S. 2002. Induced spawning of spotted murrel (*Channa punctatus*) and catfish (*Heteropneustes fossilis*) using human chorionic gonadotropin and synthetic hormone (ovaprim). Vet Arh 72, 51-56.

Hansen E, Fernandes K, Goldspink G, Butterworth P, Umeda PK and Chang KC. 1991. Strong expression of foreign genes following direct injection into fish muscle. FEBS letters 290, 73-76.

- Harvey BJ and Hoar WS. 1979. Theory and practice of induced breeding in fish. IDRC TS 21, 10-49.
- Harvey B, Nacario J, Crim LW, Juario JV and Marte CL. 1985. Induced spawning of sea bass, *Lates calcarifer*, and rabbitfish, *Siganus guttatus*, after implantation of pelleted LHRH analogue. Aquaculture 47, 53-59.
- Innes WT. 1934. New Importation—*Kryptopterus bicirrhus*. The Aquarium 3, 129.
- Iyengar A, Müller F and Maclean N. 1996. Regulation and expression of transgenes in fish—a review. Transgenic Res 5, 147-166.
- Kang EJ, Kim EM, Kim YJ, Lim SG, Sim DS, Kim YH and Park IS. 2005. Effect of Lidocaine Hydrochloride and Clove Oil as an Anaesthetic on Korean Rose Bitterling, *Rhodeus uyekii* and Oily Bitterling, *Acheilognathus koreensis*. J Aquacult 18, 272-279.
- Keene JL, Noakes DLG, Moccia RD and Soto CG. 1998. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquacult Res 29, 89-101.
- Kelly AM and Kohler CC. 1996. Manipulation of spawning cycles of channel catfish in indoor water-recirculating systems. The

Prog fish-cult 58, 221-228.

Kim DS, Bang IC, Chun SK and Kim YH. 1988. Effects of the anesthetic lidocaine on some fishes. Korean Soc Fish Pathol 1, 59-64.

King W, Hooper B, Hillsgrave S, Benton C and Berlinsky DL. 2005. The use of clove oil, metomidate, tricaine methanesulphonate and 2 phenoxyethanol for inducing anaesthesia and their effect on the cortisol stress response in black sea bass (*Centropristis striata* L.). Aquacult Res 36, 1442-1449.

Kiran BR, Shankar Murthy K and Venkateshwarlu M. 2013. A review on induced breeding of cat fishes, murels and climbing perches in India. Adv Appl Sci Res 4, 310-323.

Kolomytkin OV, Dunn S, Hart FX, Frilot C, Kolomytkin D and Marino AA. 2007. Glycoproteins bound to ion channels mediate detection of electric fields: A proposed mechanism and supporting evidence. Bioelectromagnetics 28, 375-385.

Kutwal BY, Ofojekwu PC, Okunsegbo S, Absalom KV and Sindama A. 2015. Comparative Study of Carp Pituitary Extracts (CPE) and Ovupin-L on Induced Breeding in African Catfish (*Clarias gariepinus*). JBAH 5, 29-33.

Lam TJ. 1982. Applications of endocrinology to fish culture. Can J

Fish Aquat Sci 39, 111-137.

Leeuw DR, Goos HT, Richter CJJ and Eding EH. 1985. Pimozide-LHRHa-induced breeding of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). Aquaculture 44, 295-302.

Limsuwan C, Grizzle JM and Plumb JA. 1983. Etomidate as an Anesthetic for Fish: Its Toxicity and Efficacy. Trans Am Fish Soc 112, 544-550.

Linhart O, Mims SD, Gomelsky B, Hiott AE, Shelton WL, Cosson J and Gela D. 2001. Spermiation of paddlefish (*Polyodon spathula*, Acipenseriformes) stimulated with injection of LHRH analogue and carp pituitary powder. Aquatic Living Resour 13, 455-460.

Marking LL and Meyer FP. 1985. Are better anesthetics needed in fisheries?. Fisheries 10, 2-5.

Marsic-Lucic J, Mladineo I and Tudor M. 2005. Comparative effectiveness of 2-phenoxyethanol and Propiscin as anesthetics for juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax* L. Aquacult Int 13, 543-553.

Minter LJ, Bailey KM, Harms CA, Lewbart GA and Posner L. 2014. The efficacy of alfaxalone for immersion anesthesia in koi carp (*Cyprinus carpio*). Vet Anaesth Analg 41, 398-405.

Mitjana O, Bonastre C, Insua D, Falceto MV, Esteban J, Josa A and

- Espinosa E. 2014. The efficacy and effect of repeated exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil and tricaine methanesulphonate as anesthetic agents on juvenile Angelfish (*Pterophyllum scalare*). Aquaculture 433, 491–495.
- Mylonas CC, Cardinaletti G , Sigelaki I and Polzonetti-Magni A. 2005. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. Aquaculture 216, 467–481.
- National Research Council. 1994. Institute for marine biosciences annual report 1993–1994. IMB, 47–53.
- Ngamvongchon S, Pawaputanon O, Leelapatra W and Johnson WE. 1988. Effectiveness of an LHRH analogue for the induced spawning of carp and catfish in Northeast Thailand. Aquaculture 74, 35–40.
- Ng HH and Kottelat M. 2013. After eighty years of misidentification, a name for the glass catfish (Teleostei: Siluridae). Zootaxa 3630, 308–316.
- Nguyen Thanh Vu. 2012. Generation of various transgenic marine medaka (*Oryzias dancena*) strains harboring different fluorescent transgenic constructs. Master Thesis, University of Pukyong, Busan, Republic of Korea.
- Obi A and Popoola OL. 1994. Effects of Pituitary Extracts of

Oreochromis niloticus, *Cyprinus carpio* and *Clarias gariepinus*.
J Aquacult Sci 9, 19-22.

Ogretmen F and Gokcek K. 2013. Comparative efficacy of three anesthetic agents on juvenile African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). Turk J Fish Aquat Sci 13, 51-56.

Ohta ŽH and Tanaka H. 1997. Relationship between serum levels of human chorionic gonadotropin hCG and 11-ketotestosterone after a single injection of hCG and induced maturity in the male Japanese eel, *Anguilla japonica*. Aquaculture 153, 123-134.

Omorieg E, Ufodike EBC and Jauro A. 1998. Variations in Fecundity and Fertility of Common Carp Primed with Pituitary Extracts of Carp, Tilapia and Clarias. J Aquat Sci 13, 15-18.

Ortuno J, Esteban MA and Meseguer J. 2002. Effects of phenoxyethanol on the innate immune system of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) exposed to crowding stress. Vet Immunol Immunopathol 89, 29-36.

Opiyo MA, Ogello EO and Charo-Karisa H. 2013. Effectiveness of Sodium Bicarbonate as an Anaesthetic for different sizes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L., 1758) Juveniles. Int J Aquat Sci 4, 14-22.

Padmakumar KG, Bindu L, Sreerekha PS, Gopalakrishnan A, Basheer

- VS, Joseph N, Manu PS and Krishnan A. 2011. Breeding of endemic catfish, *Horabagrus brachysoma* in captive conditions. Curr Sci 100, 1232-1236.
- Park IS, Jo JH, Lee SJ, Kim YA, Park KE, Hur JW and Song YC. 2003. Anaesthetic effect of lidocaine hydrochloride-sodium bicarbonate and MS-222 on the greenling (*Hexagrammos otakii*). Korean J Fish Aquat Sci 36, 449-453.
- Park IS, Gil HW, Lee TH, Nam YK, Lim SG and Kim DS. 2017. Effects of Clove Oil and Lidocaine-HCl Anesthesia on Water Parameter during Simulated Transportation in the Marine Medaka, *Oryzias dancena*. Dev Reprod 21, 19-33.
- Peters RC, Van Den Hoek B, Bretschneider F and Struik ML. 2001. Saffan®: A review and some examples of its use in fishes (Pisces: Teleostei). Neth J Zool 51, 421-437.
- Phelps RP, Hastey R, Pendetar A, Linley L, Papanikos N and Dunham RA. 2007. Effects of temperature on the induced spawning of channel catfish and the production of channel×blue catfish hybrid fry. Aquaculture 273, 80-86.
- Planetcatfish. 2017. Cat-eLog Data Sheets of *Kryptopterus vitreolus*. Retrieved from <https://www.planetcatfish.com> on July 30.
- Pullin RSV and Kuo CM. 1980. Development in the breeding of cultured fishes. Symposium on food production Systems for Arid and Semiarid Lands. Kuwait, April 19-23.

- Rahman A and Maclean N. 1992. Fish transgene expression by direct injection into fish muscle. *Mol mar biol biotech* 1, 286-289.
- Raz E, Watanabe A, Baird SM, Eisenberg RA, Parr TB, Lotz M and Carson D A. 1993. Systemic immunological effects of cytokine genes injected into skeletal muscle. *PNAS* 90, 4523-4527.
- Roth A. 1993. Regenerative outgrowth and distribution of the electroreceptive nerve fibers in the catfish *Kryptopterus*. *J Comp Neurol* 328, 473-484.
- Ross LG and Ross B. 1999. Anesthesia of fish. In: Anesthetic and sedative techniques for aquatic animals. Ross LG and Ross B, eds. Blackwell Scientific Publications, Oxford, U.K., 58-88.
- Schnick RA and Meyer FP. 1978. Registration of thirty-three fishery chemicals: status of research and estimated costs of required contract studies. *Invest Fish Con* 86, 1-19.
- Scriabine A. 1999. Discovery and development of major drugs currently in use. In: Pharmaceutical Innovation: Revolutionizing Human Health. Landau R, Achilladelis B and Scriabine A, eds. Chemical Heritage Press. Philadelphia, U.S.A., 148-270.
- Sneed KE and Clemens HP. 1960. Use of fish pituitaries to induce spawning in channel catfish (No. 329). US Department of Interior, Fish and Wildlife Service.

- Sherwood NM, Parker DB, McRory JE and Lescheid DW. 1994. Molecular evolution of growth $\dot{Z}$. hormone-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone. *Molecular Endocrinology of Fish*, vol XIII, Academic Press, New York, 3-66.
- Steffensen JF, Lomholt JP and Vogel WOP. 1986. In vivo observations on a specialized microvasculature, the primary and secondary vessels in fishes. *Acta Zool* 67, 193-200.
- Summerfelt RC and Smith LS. 1990. Anaesthesia, surgery and related techniques. In: *Methods in Fish Biology*. Schreck CB and Moyle PB, eds. American Fisheries Society, Bethesda, U.S.A, 213-272.
- Tan Fermin JD and Emata AC. 1993. Induced spawning by LHRHa and pimozone in the Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Gunther). *J Appl ichthyol* 9, 89-96.
- Topic Popovic N, Strunjak Perovic I, Coz Rakovac R, Barisic J, Jadan M, Persin Berakovic A and Sauerborn Klobucar R. 2012. Tricaine methane sulfonate (MS 222) application in fish anaesthesia. *J Appl Ichthyol* 28, 553-564.
- Tsantilas H, Galatos AD, Athanassopoulou F, Prassinou NN and Kousoulaki K. 2006. Efficacy of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic for two size classes of white sea bream, *Diplodus sargus* L., and sharp snout sea bream, *Diplodus puntazzo* C.

Aquaculture 253, 64-70.

Ufodike E and Amadi O. 1991. Comparative Assessment of the Effects of Homoplastic and Heteroplastic Hypophysation on Ovogenesis, fecundity and fertility of the mirror carp. J Aquat Sci 6, 35-38.

Weber RA, Peleteiro JB, Martín LG and Aldegunde M. 2009. The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). Aquaculture 288, 147-150.

Xiang ZQ, Spitalnik S, Tran M, Wunner WH, Cheng J and Ertl HC. 1994. Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. Virology 199, 132-140.

Zahl IH, Samuelsen O and Kiessling A. 2012. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. Fish Physiol Biochem 38, 201-218.

Zohar H and Mylonas CC. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. Aquaculture 197, 99-136.

Zonneveld N, Viveen WJAR and Mudana W. 1988. Induced Spawning and Egg Incubation of the Asian Catfish, *Clarias batracus*. Aquaculture 74, 41-47.