

## 미꾸라지 발현백터의 활성화 조사

함경훈 · 임학섭 · 황지연 · 박진영 · 김무상 · 이형호

부경대학교 생물공학과

### Activity Analysis of *Misgurnus mizolepis* Expression Vector

Kyung-Hoon Hahm, Hak-Seob Lim, Moo-Sang Kim, Jee-Youn Hwang,  
Jin-Young Park and Hyung-Ho Lee

Department of Biotechnology and Bioengineering, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

An expression vector, pUC19N6-luc, containing nuclear matrix attachment region (MAR) isolated from *Misgurnus mizolepis* liver and control expression vector, pUC19-luc, were constructed. After these vectors were transferred into CHSE-214 cell line by electroporation, the expression rate of luciferase gene, copy number of vectors and chromosome integration of vectors were analyzed by using assay of luciferase activity, PCR and Southern blotting. While the expression pattern of luciferase gene of pUC19-luc was shown in typical transient expression pattern, that of pUC19N6-luc was highly increased at the 5 days after transfection. Although the copy number of pUC19N6-luc vector was higher than that of pUC19-luc vector, these vectors were integrated into chromosome at the same time point in the transfected CHSE-214 cells. In conclusion, the increase of luciferase gene expression of pUC19N6-luc was resulted from not the maintaining of the high copy number but the formation of transcription- favorable structure by MAR effect after chromosomal integration.

Key words : *Misgurnus mizolepis*, MAR, Luciferase gene

### 서 론

가장 크고 광범위한 척추동물 군에 속하는 어류는, 종종 다른 척추동물보다 경제적이고 쉽게 실험실에서 사육이 가능하며, 그 상대적 단순성 때문에 분화 연구 등을 위한 생물학적 모델시스템으로 이용되고 있다(Powers, 1989). 따라서 형질전환어류의 중요성이 높아지고 있는 실정이다.

초기 수많은 형질전환 어류에 대한 연구들에서 transgene들이 서로 다른 genomic loci에 존재하는 형질전환 어류 개체간에 그 발현율이 매우 다양한 것으로 나타났다 (Chourrout et al., 1990 ;

Houdebine and Chourrout, 1991 ; Devlin et al., 1994). 최근 이런 비효율적 위치효과(position effect)를 감소시키거나 제거하기 위해 핵기질 부착부위 (nuclear matrix attachment region : MAR)에 대한 관심이 높아지고 있다 (Mielke et al., 1990 ; Phi-van et al., 1990 ; Liu and Tabe, 1998).

핵내 DNA는 복잡한 작용을 원활히 하기 위해 치밀하고 잘 조절될 수 있는 고차원적 구조(higher order DNA Folding)로 존재해야 되는데, 이 구조는 비슷한 제한정도를 가지는 여러 loop로 구성되어 있으며(Manuelidis, 1990), 이러한

각각의 loop는 DNA 복제와 전사의 기본구조로 작용하는 것으로 생각된다. 이 loop의 형성에 N. matrix가 관여하며 각각의 loop는 그 고정부위가 N. matrix에 결합되어 있으므로(Marilley and Bonnet, 1989), 이 nuclear matrix attachment region (MAR)을 분리하고 그 기능을 규명하는 연구가 최근에 많이 진행되었다(Foster et al., 1985 ; Neri et al., 1992 ; Yu et al., 1994).

지금까지 mapping된 MAR는 0.3-1Kb 정도의 DNA 조각으로, 전체의 70-75%가 AT-rich하며 여러 consensus sequences를 갖는다. 그 중 대표적인 것이  $GTN^A/TA^A/cATTNATNN^G/A$  서열을 가진 topoisomerase II (Topo II) consensus 이다. TopoII는 N. matrix와 metaphase chromosome의 주요 구성성분이며, chromosome folding, DNA 복제와 전사, 재조합(Wang, 1996) 등에 직접적으로 관여하므로 MAR 상의 Topo II consensus는 Topo II 활동을 위해 당연히 존재해야 된다. 초파리에서 분석된 6개의 MAR는 Topo II consensus 외에 부가적인 두 종류의 conserved sequence motif가 존재하는데, 이는  $AATAAA^T/cAAA$ 로 구성된 A-box와  $TTTT^A/TTT^T/ATT$ 로 구성된 T-box이다. T-box에 비해, A-box는 직접 반복적으로 여러 copy가 존재하며, 이 box들은 아마도 복제원점의 기능에 필요한 bent DNA 형성에 주요한 작용을 하리라 여겨진다.

이전 연구에서, (A+T)량이 풍부하고, ARS consensus, Topo II consensus, A-box와 T-box를 가지며, 효모에의 Transfection 효율을 증가시키는 MAR을 미꾸라지 간 DNA로부터 이미 클로닝하여 그 염기서열을 밝힌 바 있다(Lim et al., 1995 ; 임 등, 1996). 따라서 본 연구에서 이 미꾸라지 MAR이 어류 세포 CHSE-214 세포주내로 전달된 luciferase의 발현 및 벡터의 안정성에 미치는 영향을 분석하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

*E.coli* strain인 DH5 $\alpha$  (*supE44*  $\Delta$ *lacU169*

( $\phi$ 80 *lacZ*  $\Delta$ M15) *hsdR* 17 *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*)를 서울대학교 분자생물학과 박상대 교수로부터 분양 받아 필요한 플라스미드들을 증폭하는데 이용하였다. 미꾸라지 MAR이 포함된 벡터의 발현효율을 분석하기 위해 어류 세포주인 CHSE-214를 울산대학교 미생물학과 박정우 교수로부터 분양 받아 본 실험실에서 계대배양하여 사용하였다.

### *E.coli*로 부터 각종 플라스미드의 분리

USBio Clean Kits protocols에 따라 플라스미드 DNA를 분리하였다. 요약하면, 적당량의 항생제가 있는 LB 배지 5ml에 각 colony를 접종후, 진탕 배양으로 하룻밤 동안 배양한 후 각 배양한 대장균을 1.5ml tube에 붓고, 60초동안 원심분리하였다. 그리고 lysis buffer (50mM Sucrose, 25mM tris-HCl, pH8.0, 10mM EDTA, 4mg/ml Lysozyme)를 100 $\mu$ l을 넣은 뒤 대장균을 현탁시키고, 5분간 실온에 두었다. 5분후, alkaline buffer (1% SDS. 0.2N NaOH)를 200 $\mu$ l넣고, 가볍게 혼합후, 얼음에 5분간 두었다. 다시 찬 10 mM ammonium acetate 100 $\mu$ l를 첨가하고 얼음에 5분간 둔 다음 microcentrifuge로 3분간 원심분리 하여 조심스럽게 상등액을 회수하였다. 회수된 상등액 부피의 3배가 되는 6M Na I를 첨가하고 약 20 $\mu$ l의 glass powder를 첨가하여 얼음에 15분간 두었다. 15분 뒤에 microspin으로 잠깐 돌린 뒤, 상등액을 제거하고, 50% ethanol rinse buffer로 2번 씻어냈다. 마지막 원심분리 뒤에 glass powder 침전물에 TE buffer를 약 20  $\mu$ l넣고 55 $^{\circ}$ C에서 5분간 배양시키고, 다시 원심분리를 실시하였다. 그 원심분리 후 DNA가 녹아 있는 상등액을 회수하여, 그 DNA를 전기영동하여 확인하였다.

### *E.coli*의 형질전환

Calcium chloride 방법을 바탕으로 *E.coli*의 형질전환을 수행하였다. LB에 DH5 $\alpha$ 를 종묘배양액 0.5ml을 100ml의 LB 배지에 옮겨 37 $^{\circ}$ C에서

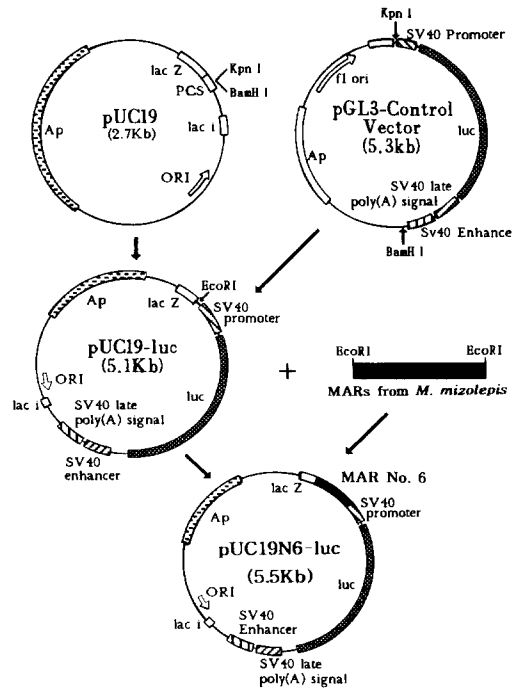
약  $5 \times 10^7$  세포/ml 정도까지 키우고, 2ml ( $1 \times 10^8$  세포수)의 배양액을 수확하여 1.5ml의 찬 50mM  $\text{CaCl}_2$ -10mM Tris buffer를 넣은 후 세포 침전물을 조심스럽게 풀어 얼음 속에서 1시간 방치한 다음 원심분리하였다.  $200 \mu\text{l}$ 의 50mM  $\text{CaCl}_2$ -10mM Tris buffer를 넣은 후 세포를 조심스럽게 풀고, 그리고 형질전환 시키고자 하는 DNA를 15~20ul를 넣은 뒤, 얼음 속에 50분간 방치한 다음  $42^\circ\text{C}$  수조에서 2분간 열 충격을 시켰다. 다시 1ml의 LB 배지를 넣어  $37^\circ\text{C}$  배양기에서 40분 동안 배양시키고, 세포를 수확한 후 적당량의 항생제가 있는 평판선택배지에 도말 하여  $37^\circ\text{C}$ 에서 16~18시간동안 배양하여 확인하였다.

**발현백터의 구성**

대조군 pUC19-luc를 구성하기 위하여 pUC19의 multicloning 부위의 KpnI과 BamHI 부위를 제한효소로 분해한 후 pGL3-Control vector (Promega)에 있는 SV40 프로모터 및 인헨서, 그리고 리포터 유전자로 luciferase를 가진 발현 부위를 삽입하여 pUC19-luc를 구성하였다. 구성된 pUC19-luc의 EcoRI 자리에 EcoRI 단편 MAR를 T<sub>4</sub> DNA ligase를 이용하여 합성한 다음 *E. coli*에 형질전환 시켜 원하는 발현백터를 얻었다(Fig. 1). 이 백터를 다시 같은 대장균에 형질전환, 증폭시켜 다음 실험을 위한 충분한 양의 발현백터를 회수하였다.

**어류 세포주의 형질전환**

배양된 어류 세포주 CHSE-214를 트립신 처리하여 3000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 회수한 다음, PBS로 2회 씻고 최종 농도가  $2 \times 10^7$  /ml 되게 PBS로 현탁하였다. 현탁한 세포  $500 \mu\text{l}$ 와 각  $20 \mu\text{g}$ 의 DNA를 충분히 섞은 다음 4cm 너비의 큐벳속에 넣고 얼음상에서 10분간 유지한 후, 전압공급기(Pharmacia)는 330V, 25mA, 그리고 25W로 고정된 상태에서 Electroporator II (Invitrogen)를  $500 \mu\text{F}$  및  $\infty \Omega$ 로 세팅하여 펄스를 가하였다. 펄스 후 즉시 1 ml의 완전배양



**Fig. 1. Construction of pUC19-luc and pUC19N6-luc vector.**

배지를 큐벳에 첨가하고, 실내온도에서 10분간 둔 다음 큐벳내에 있는 세포를 배양배지가 들어있는 배양용기로 옮겼다. 전달 후 16~24 시간이 지난 후 새로운 배지로 교환하고, 시간경과에 따라 세포 추출물을 추출하여 luciferase 활성을 측정하였다.

**Polymerase Chain Reaction (PCR)**

발현백터들로 전달 후 CHSE-214로부터 시간 경과에 따라 분리한 DNA를 추출하여 PCR을 실시하여 전달된 유전자의 존재여부를 분석하였다. 이때 사용된 primers로는 5'-GTACTGTT-GGTAAAGCCACCATGG (24-mer) 및 3'-ACAACAAGGTAAGGTAGTGCC (21-mer)로 PCR 결과 luciferase 유전자를 포함하는 728 bp의 PCR 산물이 만들어진다. 이들 primers들은 부경대학교 양식학과 김동수 교수로부터 제공받았다. PCR 반응은  $50 \mu\text{l}$ 의 반응 혼합물 (20mM Tris-HCl pH 8.3, 1.75mM  $\text{MgCl}_2$ , 25mM

KCl, 500nM each primer, 400  $\mu$ M each dNTPs, 200 ng template DNA, 2.5 U Taq polymerase)을 이용하여 94°C 1분, 60°C 1.5분, 72°C 2분으로 30 cycles을 수행하였다.

**Southern blot 및 hybridization**

Hybridization 분석을 위해 준비된 1  $\mu$ g DNA를 BamHI으로 절단하여 0.7% 아가로스 겔상에서 전기영동한 후 0.4M NaOH에서 6시간 동안 GeneScreen Plus (DuPont-NEN Research Products)에 blot시켰다. 그 nylon membrane을 2 $\times$ SSC (300mM NaCl, 30mM Sodium citrate, pH 7.0)로 씻고 30분 동안 prehybridization을 이행한 후 DIG Nucleic Acid Labeling Kit (Boehringer Mannheim)를 이용하여 digoxigenin-11-dUTP로 labelling된 probe가 첨가된 hybridization 용액(0.75 M NaCl, 0.075 M sodium citrate, 2% (w/v) N-lauroylsarcosine, Na-salt(Sigma), 0.02% (w/v) SDS, 그리고 1% blocking reagent)으로 68°C에서 16시간동안 이행하였다. Hybridization이 완결된 후 Nylon membrane을 65°C에서 각 5분간 2회 2 $\times$ SSC, 1% SDS로 같은 온도에서 각 15분간 2회 0.1 $\times$ SSC, 1% SDS세척하였다. Immunological detection은 Detection Kit (Boehringer Mannheim)의 절차에 따라 이행하였다.

**Luciferase activity 분석**

분석 할 세포로부터 성장배지를 전부 제거하고 PBS(Mg<sup>2+</sup>와 Ca<sup>2+</sup> free) buffer로 두번 세포를 씻었다. 마지막 PBS를 완전히 제거한 후, 1 $\times$ lysis buffer를 충분히 첨가하였다. 배양접시에 있는 세포가 충분히 섞어질 수 있도록 천천히 흔들어 준 다음, 15분 동안 실내온도에서 배양하여 세포를 lysis시키고, 15분후, cell lysate를 모두 모아서 microcentrifuge tube에 모은 후 얼음에 보관하였다. Vortex로 10~15초 동안 완전 혼합시킨 후, 4°C에서 2분동안 원심분리하여 그 상등액을 새 튜브로 옮겼다. 새 튜브로 옮겨진 세포 추출물 20

$\mu$ l와 luciferase assay reagent 100 $\mu$ l를 실내온도에서 혼합하여 luminometer에서 그 반응 혼합물을 넣고 10초에서 5분동안 방출하는 빛을 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**백터의 발현 양상**

pUC19-luc와 미꾸라지 MAR 클론을 포함한 pUC19N6-luc를 물고기 세포주 CHSE-214세포에 transfection 시킨 후 날짜 경과별로 그 발현 양상을 조사하였다. pUC19-luc 경우 luciferase 활성도는 transfection후 시간 경과에 따라 점차 증가하여 4일째에 최고에 이르렀다가 이후 감소하는 전형적인 transient expression 양상을 나타냈다(Fig. 2). 반면, 미꾸라지 MAR을 포함하는 pUC19N6-luc는 4일째까지 그 발현율이 매우 낮았으나 그 이후, 급격히 증가하여 8일째에도 그 대로 유지되는 특이한 양상이 나타났다(Fig. 2). 이러한 발현 양상의 변화는 벡터에 포함된 MAR

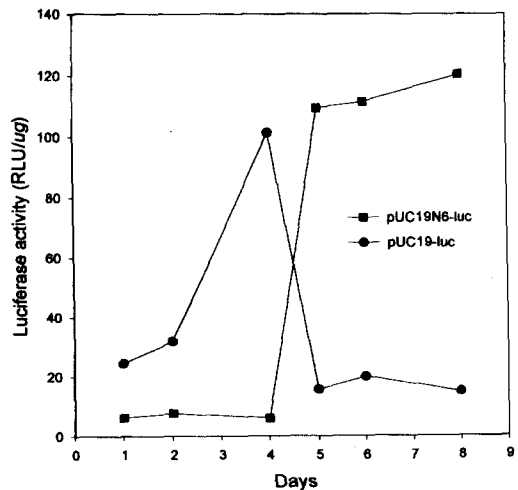


Fig. 2. Comparison of expression of the luciferase gene after electroporation into CHSE-214 cells at time course. RLU/ $\mu$ g, Relative Light Unit/ one  $\mu$ g of total protein.

에 의해 기인한 것으로 판단된다. 즉, pUC19N6-luc의 경우 MAR의 복제원점기능으로 인해 복제기구인 multienzyme complex와 transcription machinery의 경쟁으로 인해 4일째까지의 transient expression이 제한 받으나, 이후 chromosomal integration에 의한 transgene의 발현증가로 인해 luciferase의 안정적인 발현이 증가, 유지되는 것으로 판단된다. MAR의 ARS 기능 및 chromosomal integration기능은 CHSE-214 세포내 벡터의 수 증가 및 genomic DNA에의 integration이 동반될 것으로 판단되어 PCR 산물분석 및 southern blotting을 실시하였다.

#### PCR산물 분석

pUC19-luc와 pUC19N6-luc를 CHSE-214 세포주에 transfection 시킨 후, 이 세포의 DNA를 추출한 후 이를 template DNA로 사용하고 luciferase 유전자내의 염기서열로 구성된 2개의 primer를 이용하여 PCR을 실시하였다. transfection 시킨 후, 8일째까지의 결과는 두 벡터에서 비슷하게 나타났다(Fig. 3A).

이는 CHSE-214 세포내에 포화된 PCR 반응이 일어날 정도로 충분한 량의 vector들이 존재함을 의미한다. 그러나 transfection 후 33일째에는 PCR 산물인 728bp의 DNA 띠 강도가 차이는 것으로 보아 시간 경과에 따라 pUC19N6-luc 벡터가 pUC19-luc 벡터에 비해 많은 수로 유지되고 있음을 알 수 있다(Fig. 3B).

#### Southern blot 분석

Transfection 시킨 세포내에서 벡터의 수의 변화와 chromosomal integration 여부를 조사하기 위해 southern blotting 분석을 실시하였다. 두 벡터를 transfection 시킨 CHSE-214 세포의 DNA를 각각 분리한 후 BamHI으로 자른 후 DIG-system으로 표지된 pUC19-luc를 탐침으로 이용하여 southern blotting을 실시하였다. transfection 시킨 후 1, 2, 4, 6, 8일째까지 각각의 날에서 5.6kb에 위치하는 pUC19N6-luc의 DNA

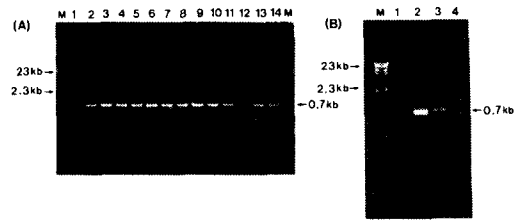


Fig. 3. Electrophoretic analysis of PCR product of genomic DNA extracted from fish cells (CHSE-214). (A) M, marker DNA fragment ( $\lambda$ /HindIII); lane 1, untransfected genomic DNA (negative control); lane 2, pUC19-luc (positive control); lane 3, 5, 7, 9, 11 and 13., 1, 2, 4, 5, 6 and 8 days after transfection with pUC19N6-luc; lane 4, 6, 8, 10, 12 and 14., 1, 2, 4, 5, 6 and 8 days after transfection with pUC19-luc. (B) lane 1, untransfected genomic DNA (negative control); lane 2, pUC19-luc (positive control); lane 3, 33 days after transfection with pUC19N6-luc; lane 4, 33 days after transfection with pUC19-luc.

띠가 5.1Kb에 위치하는 pUC19-luc의 DNA 띠보다 훨씬 강하게 나타났다. 이는 각각의 날에 pUC19N6-luc의 숫자가 훨씬 다량으로 존재함을 의미한다. 따라서, pUC19N6-luc에 포함된 MAR가 벡터의 copy수를 증가시켰음을 알 수 있었다(Fig. 4A : lane 4, 6, 8, 10, 13과 lane 5, 7, 9, 11, 12를 각각 비교). 이 벡터들의 chromosomal integration을 분석한 결과 transfection 시킨 후 5일째에 모두 genomic DNA 띠에 탐침이 결합한 것으로 보아 chromosomal integration이 일어났음을 알 수 있었다(Fig. 4B).

이러한 결과들을 종합해 볼 때 미꾸라지의 MAR는 CHSE-214 세포내에서 pUC19N6-luc 벡터의 copy수를 pUC19-luc 벡터에 비해 증가시키나, 이 벡터의 copy 수 증가가 luciferase 유전자의 발현에 직접적으로 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. Chromosomal integration은 두 벡터의 경우 모두 비슷한 시기에 일어났음을 알 수 있었다. 따라서, pUC19N6-luc의 경우 transfection 5일 이후에 나타나는 luciferase의 발현을 증가는 integration된 luciferase 유전자를

요 약

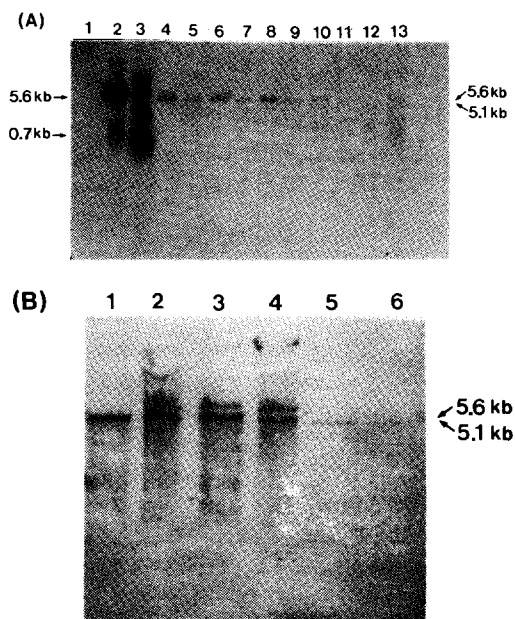


Fig. 4. Southern blotting analysis of pUC19N6-luc and pUC19-luc transformed CHSE-214 genomic DNA. (A) lane 1, untransfected CHSE-214 genomic DNA (negative control) ; lane 2, pUC19N6-luc (positive control) ; lane 3, PCR product ; lane 4, 6, 8, 10, and 13., 1, 2, 4, 6, and 8 days after transfection with pUC19N6-luc (digested with BamHI) ; lane 5, 7, 9, 11, and 12., 1, 2, 4, 6, and 8 days after transfection with pUC19-luc (digested with BamHI). (B) lane 1, 5 days after transfection with pUC19N6-luc (digested with BamHI) ; lane 2, 5 days after transfection with pUC19N6-luc (undigested) ; lane 3, 5 days after transfection with pUC19-luc (digested with BamHI) ; lane 4, 5 days after transfection with pUC19-luc (undigested) ; lane 5, 3ng digested pUC19-luc with BamHI ; lane 6, 1ng digested pUC19-luc with BamHI.

nuclear matrix에 부착시켜 transcription이 잘 일어나게 하는 MAR의 기능에 기인한 것으로 판단된다.

MAR의 이러한 기능은 형질전환된 어류에서 transgene이 genomic DNA상에 존재함에도 불구하고 시간경과에 따라 발현율이 감소하는 현상을 막을 수 있는 방법으로 유용하게 사용될 수 있으리라 생각된다.

미꾸라지(*Misgrunus mizolepis*)의 DNA로부터 클론된 핵기질 부착부위(MAR)를 포함하는 발현벡터인 pUC19N6-luc 벡터를 구성하였다. 이를 물고기 CHSE-214 세포주에 electroporation으로 transfection 시킨 후 유전자의 발현율, 벡터의 copy 수 및 염색체내 삽입 양상을 luciferase 활성도 분석, PCR 및 Southern blotting을 통해 분석하였다. 대조군 발현벡터에 luciferase 유전자는 전형적인 transient 발현양상을 나타내는데 비해, 미꾸라지 MAR가 포함된 pUC19N6-luc 벡터의 luciferase 유전자의 발현은 transfection 후 5일째부터 급격히 증가하는 양상을 보였다. Transfection된 CHSE-214 세포내에서 pUC19N6-luc 벡터는 대조군 벡터에 비해 높은 copy 수를 유지하였으나, 염색체내 삽입은 거의 비슷한 시간에 일어났다.

결론적으로 transfection 후 시간경과에 따른 pUC19N6-luc 벡터내의 luciferase 유전자의 발현 증가에 미치는 MAR의 효과는 벡터 copy수 증가 때문이 아니라, 염색체내 삽입후 형성되는 전사활성구조의 형성에 기인하는 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

Chourrout, D., R. Guyomard, and L. M. Houdebine, 1990. p. 89-99. Transgenic models in medicine and agriculture. R. Church, (Ed.) Wiley-Liss, New York.

Devlin, R. H., T. Y. Yesaki, C. A. Biagi, and E. M. Donaldson, 1994. Extraordinary salmon growth. *Nature*, 371 : 209-210.

Foster, K. A., and J. M. Collins, 1985. The relation between DNA synthesis and DNA polymerases bound to the nuclear matrix in synchronized HeLa cells. *J. Biol. Chem.*, 260 : 4229-4235.

Houdebine, L. M. and D. Chourrout, 1991. Transgenesis in fish. *Experientia*, 47 : 891-897.

- Lim, H. S., M. S. Kim, and H. H. Lee, 1995. Cloning and Characterization of Replication Origins from *Misgurnus mizolepis*. Kor. J. of Aquaculture, 8 : 209-220.
- Liu, J. W. and L. M. Tabe, 1998. The influences of two plant nuclear matrix attachment regions (MARs) on expression in transgenic plants. Plant. Cell Physiol., 39 : 115-123.
- Manuelidis, L., 1990. A view of interphase chromosomes. Science, 250 : 1533-1540.
- Marilley, M., and G. Gassend-Bonnet, 1989. Supercoiled loop organization of genomic DNA : A close relationship between loop domains, expression units and replicon organization in rDNA in *Xenopus laevis*. Exp. Cell Res., 180 : 475-489.
- Mielke, C., Y. Kohwi, T. Kohwi-Shigematsu and J. Bode, J. 1990. Hierarchical binding of DNA fragments derived from scaffold-attached region : Correlations of properties in vitro and function in vivo. Biochemistry, 29, 7475-7485.
- Neri, L. M., G. Mazzoggi, S. Capitani, N. M. Maraldi, C. Cinti, N. Baldini, R. Rana, and A. M. Martelli, 1992. Nuclear Matrix-Bound Replication Sites Detected In Situ by 5-Bromodeoxyuridine. Histochemistry, 98 : 19-32.
- Phi-Van, L., von Kries, J. P., Ostertag, W., and Strling, W. H., 1990. The chicken lysozyme 5' matrix attachment region increases transcription from a heterologous promoter in heterologous cells and dampens position effects on expression of transfected genes. Mol. Cell. Biol., 10 : 2302-2307
- Powers, D., 1989. Fish as model systems. Science, 246 : 352-358.
- Wang, J. C., 1996. DNA topoisomerase. Ann. Rev. Biochem., 65 : 635-692.
- Yu, J., J. H. Bock, J. L. Slightom, and B. Villeponteau, 1994. A 5' beta-globin matrix-attachment region and the polyoma enhancer together confer position-independent transcription. Gene, 139 : 139-145.
- 임학섭 · 김무상 · 석영선 · 박상대 · 이형호. 1996. 미꾸라지의 복제원점에 대한 특성 및 구조 분석. 한국양식학회지, 9 : 93-100.