

미꾸라지의 복제원점에 대한 특성 및 구조 분석

임학섭 · 김무상 · 석영선 · 박상대* · 이형호¹

부산수산대학교 생물공학과 *서울대학교 분자생물학과

Characterization and DNA Structure Analysis of Replication Origin of *Misgurnus mizolepis**

Hak-Seob Lim, Moo-Sang Kim, Young-Seon Seok, Sang-Dai Park* and Hyung-Ho Lee¹

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

* Department of Molecular Biology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Previously, as an effort to make an autonomously replicating expression vector in fish, an ARS (autonomously replicating sequence) was cloned from MAR (matrix attachment region) of *Misgurnus mizolepis*. The DNA fragment composed of 443 base pairs contains ARS core consensus sequences, topoisomerase II consensus sequences, and A or T box sequences which are homologous to the known consensus sequences originated from other organisms. The cloned ARS, as other DNA replication origins, contains inverted repeat sequences and several potential hairpin loop structures. These consensus sequences and hairpin structures may serve as recognition signals for regulatory proteins of DNA replication initiation.

Key words : Replication origin, Mud loach, ARS

서론

인류의 단백질 공급원 및 최근 자원고갈에 따른 어획량 감소에 따라 어류의 경제적 가치의 중요성이 높아지고 있다. 가장 크고 광범위한 척추동물군에 속하는 어류는, 종종 다른 척추동물 보다 경제적이고 쉽게 실험실에서 사육이 가능하기 때문에, 생물학적 연구를 위한 모델 시스템으로 이용되고 있다(Powers, 1989).

최근 도입된 유전자 전달기법은 유용 유전자를 미세주입(microinjection) 이나 electroporation 등의 방법을 통해 직접 수정란이나 초기의

배에 넣어 그 발현을 기대하는 것으로, 현재 인슐린, 성장호르몬, 항동결, metallothionein, crystalline, esterase 등의 유전자들에서 시도되었다. 그러나 여러 어류 중에서 목표유전자의 integration 정도는 낮게 나타났으며, 형질전환된 어류라 할지라도 다음세대에 전달되는 비율이 너무 낮게 나타났다(Chourrout et al., 1990 ; Houdebine and Chourrout 1991 ; Devlin et al., 1994). 유용 유전자를 어류 난에 미세주입하여 그 유전자가 지속적으로 발현하는 형질전환 어류를 가장 높은 수율로 얻기 위해서는 전달된 vector의 안정성 및 integration 정도가 높아야

본 논문은 교육부 유전공학 연구비(1994, 과제번호 127-2) 지원에 의해 수행되었음.

¹ To whom correspondence should be addressed.

하며, 강력한 promoter 및 enhancer를 포함하는 vector가 필요하다.

초기 어류 형질전환 연구에 생쥐의 metallothionein 유전자(Zhu et al., 1985; Dunham and Eash, 1987; Maclean et al., 1987; McEvoy et al., 1988; Brem et al., 1988), rous sarcoma virus (Yoon et al., 1990), 그리고 simian virus 40 (Stuart et al., 1988) 등의 promoter들이 사용되었다. 그러나 이들 대부분의 promoter들은 어류의 발현 시스템에는 부적합하였다. 최근 어류 유래의 히스톤 H3, metallothionein-B, protamin 유전자 등의 promoter들이 클로닝되어 다양한 fish cell lines에서 그 활성을 비교한 결과 어류 유래의 promoter들이 어류 형질전환을 위한 발현 vector의 구성에 더 적합하다는 결과를 얻었다(Chan and Devlin, 1993).

그러나 아직까지 형질전환 어류 생산을 위한 vector의 개발에 있어서 vector의 안정성 및 integration 정도에 관계 있는 DNA 복제원점(replication origin)에 대한 연구는 아주 미흡한 실정이다. 진핵세포에서 DNA 복제 (Foster et al., 1985; Neri et al., 1992), 전사(transcription; Getzenberg, 1994), 그리고 재조합(recombination)등이 모두 핵내 골격 구조물인 nuclear matrix상에서 일어난다는 것을 고려할 때, 어류의 난에 미세주입 했을 경우, 가장 잘 발현하고 재조합 정도가 높은 vector는 nuclear matrix에 잘 결합하는 자체의 복제원점이 필요하다고 판단되어, 이미 미꾸라지의 autonomous replicating sequence (ARS)를 클로닝하여 부분적인 염기서열을 밝힌 바 있다(Lim et al., 1995). 어류의 DNA 복제원점에 대한 더 자세한 정보를 얻기 위해 완전한 염기서열을 결정지어 그 구조를 분석하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 plasmids

대장균 DH5 α [supE 44 Δ lac U169 (Φ 80 lac Z Δ M15) hsd R 17 rec A1 end A1 gyr A 96 thi-l reIA1]는 모든 plasmid 증폭에 사용되었다. plasmid pBluecript II SK (3.0 Kb, amp^r, fl origin, colE1 ori, lac I, lac Z, T7 and T3 promoter)는 DNA sequencing analysis vector로 이용되었다.

사용배지

대장균 DH5 α 를 LB (1% Bacto-tryptone, 1% NaCl, 0.5% yeast extract) 배지에서 37 $^{\circ}$ C에서 진탕배양하였다. 필요에 따라, ampicillin을 최종농도가 50 μ g/ml되게 LB배지에 첨가하여 사용하였다. Screening plate 배양을 위해 액체 LB배지에 2% Bacto-agar, 50 μ g/ml ampicillin, 50 μ g/ml X-gal, 그리고 50 μ g/ml IPTG를 첨가하였다.

Plasmid 추출 및 전기영동

USBio Clean Kits protocols에 따라 plasmid DNA를 분리하였다. 요약하면, plasmid DNA를 가진 대장균 배양액을 1.5 ml tube에 옮긴 다음 12,000 rpm으로 60초간 원심분리하여, pellet을 얻은 다음 4 mg/ml Lysozyme이 첨가된 100 μ l STE buffer (50 mM Sucrose, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0)를 첨가하여 pellet을 푼 다음 실내온도에 5분간 두었다. 0.2N NaOH, 1% SDS 200 μ l를 각 tube에 첨가하여 얼음 상에서 5분간 두었다. 150 μ l 7.8M ammonium acetate를 첨가하여 얼음에서 5분간 둔 다음, 12,000 rpm으로 3분간 원심분리하여 상층액을 각 1.5 ml tube에 취하였다. 이 상층액의 3배 부피에 해당되는 6M NaI를 첨가하여 잘 섞은 다음, 5~10 μ l glass bead를 첨가하여 얼음에 20분 동안 두었다. 각 tube를 12,000 rpm으로 10초간 원심분리한 다음 상층액을 버리고 pellet을 취하였다. 이 pellet을 50% ethanol rinse buffer로 2회 반복하여 불순물을 제거하였다. 10~20 μ l TE buffer (50 mM Tris pH 8.0, 1 mM

EDTA)를 첨가한 다음 55°C에서 5분간 둔 다음, 12,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 분리된 plasmid DNA 2 µl를 0.7% agarose gel로 100V에서 30분간 전기영동 하여 확인하였다.

효소 및 시약

제한효소 EcoR I을 이용하여 pURY19N₆을 절단하여 삽입된 DNA 단편을 분리하였다. DNA sequencing vector인 pBluescript II SK vector를 동일한 제한효소로 처리한 다음, 분리된 DNA 단편과 EcoR I site를 가진 vector를 혼합하여 T₄ DNA ligase를 이용하여 DNA sequencing vector에 염기서열을 분석하고자 하는 DNA 단편을 조합시켰다.

대장균 형질전환

대장균 *E. coli* 형질전환은 CaCl₂ 방법을 약간 변형하여 이행하였다. 요약하면 아래와 같다. *E. coli*를 10 ml LB 배지에 접종하여 37°C에서 12~14시간동안 진탕배양하였다. 이 배양액 100 µl를 취하여 새로운 10 ml LB배지에 첨가한 다음 OD₅₅₀에서 그 값이 0.5에 이를 때까지 배양하였다. 2개의 1.5 ml tube에 이 배양액을 취한 다음 12,000 rpm에서 1분 동안 원심분리 하였다. 50 mM CaCl₂-10 mM Tris (pH 8.0) 용액 1.5 ml를 첨가하여 pellet을 조심스럽게 푼 다음, 얼음에서 60분간 두었다. 12,000 rpm에서 3초간 원심분리하여 상층 액을 버리고 같은 용액 200 µl를 각 tube에 첨가하여 pellet을 아주 조심스럽게 푼 다음, transforming DNA를 각각 첨가하여 얼음에서 50분 동안 두었다. 42°C에서 2분간 열처리한 후, 각 tube에 1 ml LB배지를 첨가한 다음 37°C에서 40분간 두었다. 12,000 rpm으로 5분간 원심분리한 다음, ampicillin 혹은 X-gal/IPTG가 첨가된 LB plate에 도말하였다.

DNA 염기서열 결정 및 구조 분석

pBluescript II SK vector의 제한효소 EcoR I site에 ARS 기능이 있는 DNA 단편이 삽입되어 조합된 vector를 US Bio clean Kits protocols에 따라 그 vector를 추출한 다음, Sanger's dideoxy-chain termination method로 염기서열을 분석 하였다. 완전한 염기서열이 밝혀진 DNA 단편을 인터넷 BLAST를 이용하여 다른 종의 ARS들과 비교하였으며, PC gene program을 이용하여 미꾸라지의 ARS DNA 구조를 분석하였다.

결과 및 고찰

효모에서 ARS 기능이 있는 pURY19N₆에 포함된 DNA 단편을 Top™ DNA sequencing System을 이용하여 부분적인 염기서열이 결정되었다(Lim, 1995). 어류의 DNA 복제원점에 대한 연구가 미흡하기 때문에 더 상세한 정보를 얻기 위해 이들 DNA 단편들의 완전한 염기서열을 분석하였다. 총 443개의 염기 쌍으로 이루어져 있고, 65% AT가 풍부하며, ARS consensus, 그리고 topoisomerase II consensus sequence들이 존재하였다(Fig. 1).

AT-rich한 특성은 DNA 복제초기에 D-loop의 형성을 용이하게 하기 위해 복제원점 부근에 필요한 요소로 보고되어 있다(Gale et al., 1992; Mark et al., 1990; Susan and Ulrich, 1986).

인터넷 BLAST를 이용하여 미꾸라지 유래의 ARS consensus sequence를 여러 종류의 진핵생물, 즉 사람, 효모, 초파리, 시금치, 곰팡이 등의 종들과 비교하여 Fig. 2에 나타내었다.

이러한 ARS consensus sequence는 식물, 효모로부터 사람에게 이르기까지 보존되어 있으며, 이번에 분석된 어류 미꾸라지에서도 상당히 일치하고 있다. 이러한 염기서열은 복제개시에 있어서 필수적이며, 모든 복제원점에서 공통적으로 발견되고 있다.

미꾸라지 유래의 topoisomerase II consensus sequence는 3군데(31-45, 224-238, 351



Fig. 1. Full-length nucleotide sequences in the insert region of pURY19N6. DNA sequence composition : 136 A ; 66 C ; 90 G ; 151 T ; Content of (A+T) = 287/443 × 100 ≃ 65%. **** : ARS consensus sequence, ++++ : Topoisomerase II consensus, : A or T boxes, stippled : AT-rich region.

-365)에 위치하며, 사람 및 초파리의 consensus sequence들과 비교한 결과는 그림 3과 같다. A 혹은 T box 역시 consensus sequence들과 상당한 유사성을 보였다(data not shown).
 ARS DNA 부위내에서 반복 염기서열의 존재 여부와 hairpin loop 구조의 형성 가능성 여부를 PC gene program을 이용하여 분석하였다. 몇몇의 반복되는 염기서열과 7개 이상의 염기로 이루어진 inverted sequence가 13개 존재하였다. 이들 inverted sequence들은 포유동물의 ARS

에서 정규적인 양상으로 발견되고 있다(Rao et al., 1990 ; Landry and Zannis-Hadjopoulos, 1991). 최소의 stem length를 6 염기, unpaired bases number을 5~8로 두었을 때, hairpin loop 구조를 이룰 가능성은 12곳이며, 그중 5군데 (78-96, 235-260, 253-271, 335-353, 344-363)에서 자유에너지가 음의 값을 가지며, 그 가능한 구조는 Fig. 4와 같다(Fig. 4 A~E).
 이들 hairpin loop 구조는 DNA 복제에 관여하는 특정 단백질들의 인지부위 역할을 할 것

ARS core seq.		A	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	references	
Source		T	A	T	T	T	G	T	T	T	A			
<i>Misgurnus mizolepis</i> liver (MARH)		A	T	T	T	A	T	t	T	T	T	A	this study	
		T	T	T	T	A	T	t	g	T	T	T		
		T	T	T	T	t	T	G	T	T	T	T		
Human (HPRT intron I MAR)		T	T	T	T	A	T	c	T	T	T	T	Sykes R. C. <i>et al.</i> , 1988.	
<i>S.cerevisiae</i>	telomere	T	T	T	T	A	T	G	T	T	T	A	Barrell B. <i>et al.</i> , 1994.	
	HO	T	T	T	a	A	T	A	T	T	T	A	Kearsey S. <i>et al.</i> , 1984.	
	rDNA	g	T	T	T	A	T	G	T	T	T	T	Miller C. A. <i>et al.</i> , 1986.	
	J11D1	A	T	c	T	A	T	A	T	T	T	T	Palzkill T. G. <i>et al.</i> , 1986.	
<i>D.melanogaster</i> interband DNA		A	T	T	T	A	T	G	T	g	T	T	Demakov S. A. <i>et al.</i> , 1993.	
	T	T	T	T	A	a	G	T	T	T	T			
Spinach chloroplast DNA		T	T	T	T	c	T	A	T	T	-	A	Briat J. F. <i>et al.</i> , 1986.	
<i>Candida boidinii</i> (strain AOU-1 DNA)		T	T	T	T	t	T	A	T	T	T	T	Sakai Y. <i>et al.</i> , 1993.	
<i>Aspergillus amstelodami</i> mtDNA		T	T	T	T	A	c	A	T	T	T	T	Beri R. K. <i>et al.</i> , 1988.	

Fig. 2. Comparison of *M. mizolepis* ARS consensus sequences with other known ARS core sequences. All sequences within a cloned fragment that are homologous to the ARS core consensus in at least 9 out of 11 positions are shown. Lower case letters in the sequence indicate nucleotides which differ from the core consensus.

Topoisomerase II consensus seq.		G	N	T	A	T	A	T	T	N	A	T	N	N	G	references		
Source		G	N	T	T	C	A	T	T	T	N	A	T	N	A			
<i>Misgurnus mizolepis</i> liver (MAR)		G	C	T	T	t	T	A	T	T	T	A	T	T	T	t	this study	
		G	T	T	T	A	T	c	T	c	T	t	T	G	A	G		
		t	C	T	T	c	a	A	T	T	C	A	T	G	A	A		
		t	G	T	A	A	T	t	T	T	A	A	a	G	T	G		
		G	A	T	A	c	T	A	g	T	G	c	T	C	T	A		
Human (β -globin cluster gene)		a	G	a	T	g	T	A	T	a	T	A	a	A	C	t	Yu J. <i>et al.</i> , 1994.	
		a	C	a	G	A	T	A	a	a	T	A	c	A	T	A		
<i>D.melanogaster</i> interband DNA		a	G	a	A	A	T	A	T	T	C	A	T	T	C	A	Demakov S. A. <i>et al.</i> , 1993.	
		t	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	T	G	T	G		

Fig. 3. Comparison of the Topoisomerase II consensus sequences homology. All sequences within a cloned fragment that are homologous to the topoisomerase II consensus sequence in at least 8 out of 15 positions are shown. Lower case letters in the sequence indicate nucleotides which differ from the consensus sequence.

으로 생각되기 때문에 DNA 복제에 의미가 깊다 (Nielsen *et al.*, 1994). 진핵생물의 복제원점은 nuclear matrix라 부르는 핵내 기능적 구조적 구조물에 결합되어 있다. 복제원점을 포함하여 지금까지 알려진 거의 모든 ARS는 nuclear matrix에 결합한다. Nuclear matrix에 결합되어 있는 DNA 단편들을 MAR (matrix attachment region)로 불러지고 이 MAR은 진화학적으로 보존되어 있기 때문에 고등동물의 ARS도

효모와 같은 하등 진핵생물에서 ARS로서의 기능을 가진다(Cockerill and Garrard, 1986 a & b).

이 ARS는 미꾸라지 MAR로부터 유래된 clone이고, AT-rich, ARS consensus, topoisomerase II consensus sequence, 그리고 A-box 및 T-box들이 존재하기 때문에, 이 ARS를 가진 vector는 미꾸라지의 알에 transfer 되었을 경우 vector의 copy 수 증가, 염색체내 삽입 빈도

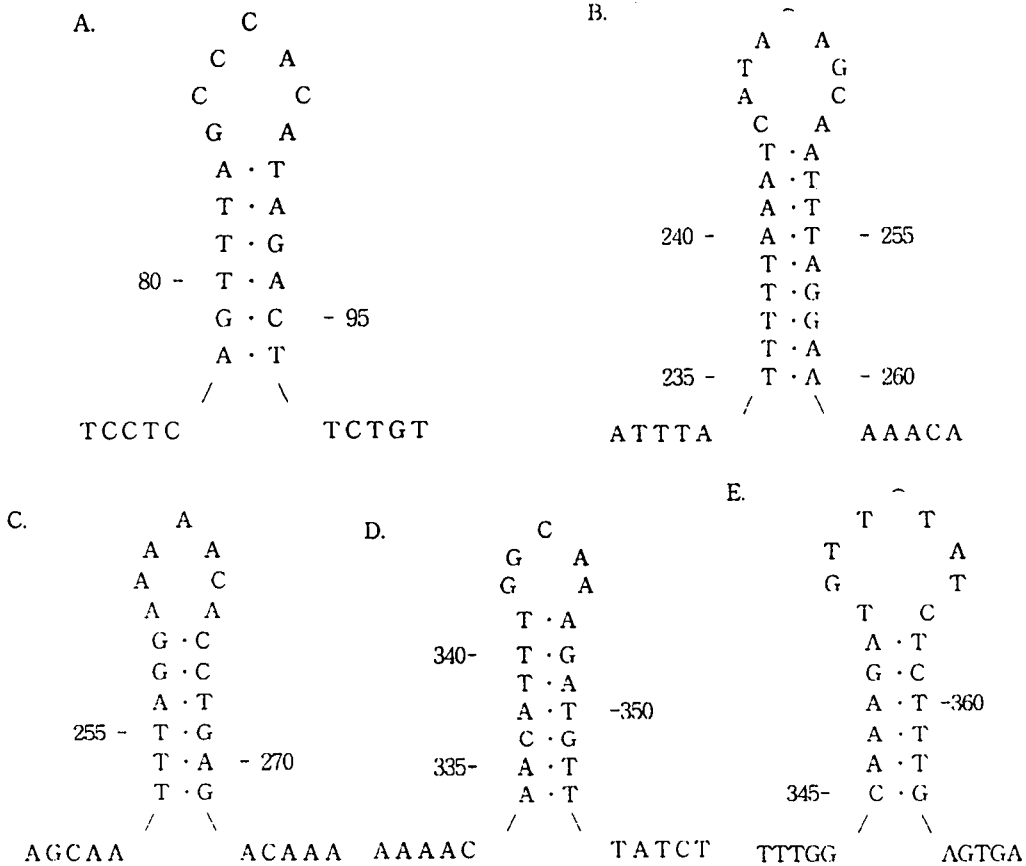


Fig. 4. Search for the potential hairpin loops in the cloned fragment of pURY19N6. Analysis was done on the complete cloned sequences. Allowed base pairs are G-C, A-T (A-U) and G-T (G-U). A; Centered on base: 87, stem size is: 6, number of unpaired bases is: 7, Free energy value is: $\Delta G (25^\circ\text{C}) = -.2 \text{ kcal}$, B; Centered on base: 248, stem size is: 9, number of unpaired bases is: 8, Free energy value is: $\Delta G (25^\circ\text{C}) = -.2 \text{ kcal}$, C; Centered on base: 262, stem size is: 6, number of unpaired bases is: 7, Free energy value is: $\Delta G (25^\circ\text{C}) = -3.2 \text{ kcal}$, D; Centered on base: 344, stem size is: 7, number of unpaired bases is: 5, Free energy value is: $\Delta G (25^\circ\text{C}) = -.4 \text{ kcal}$, E; Centered on base: 354, stem size is: 6, number of unpaired bases is: 8, Free energy value is: $\Delta G (25^\circ\text{C}) = -2 \text{ kcal}$.

증가등의 효과가 있으리라 생각된다. 따라서 적절한 발현 vector와 조합하여 그 유용성에 대한 실험을 진행중에 있다.

요 약

물고기에서 효과적인 발현 vector의 구성을 위해, 미꾸라지 MAR로부터 ARS를 cloning하여, 그 염기서열을 분석하였다. 총 443 염기들로

구성된 미꾸라지의 ARS는 다른 여러종들의 DNA 복제원점에서 나타나는 것 처럼, AT가 풍부하고, ARS consensus sequences, topoisomerase II consensus sequences, 그리고 A 혹은 T-box등을 포함하고 있다. 그리고 그 DNA 단편은 복제원점에서 일반적인 양상으로 나타나는 반복적인 inverted sequence들을 가지고 있고, 5개의 가능한 hairpin loop 구조들을 내포하고 있다. 이들 구조는 DNA 복제개시에

관여하는 단백질들의 인지부위로 작용할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Barrell, B. and M. A. Rajandream, 1994. Direct Submission. Submitted (08-DEC-1994) to the EMBL/GenBank/DDBJ data bases.
- Beri, R. K., E. L. Lewis, and G. Turner, 1988. Behaviour of a replication mitochondrial DNA sequence from *Aspergillus amstelodami* in *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.*, 13 : 479-486.
- Brem, G., B. Brenig, G. Horstgen-Schwark, and E-L. Winnacker, 1988. Gene transfer in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 68 : 209-219.
- Briat, J. F. and J. Dalmon, 1986. *Spinacia oleracea* chloroplast DNA sequence homology with ARS and ARC elements within the inverted repeat, upstream of the rDNA operon. *Nucleic Acids Res.*, 14 : 8223.
- Caddle, M. S., R. H. Lussier, and N. H. Heintz, 1990. Intramolecular DNA Triplexes, Bent DNA and DNA Unwinding Elements in the Initiation region of an Amplified Dihydrofolate Reductase Replicon. *J. Mol. Biol.*, 211 : 19-33.
- Chan, W. K. and R. H. Devlin, 1993. Polymerase Chain reaction amplification and functional characterization of sockeye salmon histone H3, metallothionein-B, and protamine promoters. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 2 : 308-318
- 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.
- Cockerill, P. N. and W. T. Garrard, 1986a. Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. *Cell*, 44 : 273-282.
- Cockerill, P. N. and W. T. Garrard, 1986b. Chromosomal loop anchorage sites appear to be evolutionally conserved. *REBS Lett.*, 204 : 273-282.
- Demakov, S. A., V. F. Semeshin, and I. F. Zhimulev, 1993. Cloning and molecular genetic analysis of *Drosophila melanogaster* interband DNA. *Mol. Gen. Genet.*, 238 : 437-443.
- Devlin, R. H., T. Y. Yesaki, C. A. Biagi, and E. M. Donaldson, 1994. Extraordinary salmon growth. *Nature*, 371 : 209-210.
- Dunham, R. A. and J. Eash, 1987. Transfer of the metallothionein-human growth hormone fusion gene into channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 116 : 87-91.
- 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.
- Gale, J. M., R. A. Tobey, and J. A. D'Anna, 1992. Localization and DNA sequence of a Replication Origin in the Rhodopsin Gene Locus of Chinese Hamster cells. *J. Mol. Biol.*, 224 : 343-358.
- Gasser, S. M., and U. K. Laemmli, 1986. Co-habitation of scaffold linking regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes of *D. melanogaster*. *Cell*, 46 : 521-530.
- Houdebine, L. M. and D. Chourrout, 1991. Transgenesis in fish. *Experientia*, 47 : 891-897.
- Kearsey, S., 1984. Structural requirements for the function of a yeast chromosomal replicator. *Cell*, 37 : 299-307.
- Landry, S., and M. Zannis-Hadjopoulos, 1991. Classes of autonomously replicating sequences are found among early-replication monkey DNA. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1088 : 234-244.
- Lim, H. S., M. S. Kim, and H. H. Lee, 1995. Cloning and Characterization of Replication Origins from *Misgurnus mizolepis*. *Kor. J. Aquacult.*, 8 : 209-220.
- Macleay, N., D. Penman, and Z. Zhu, 1987. Introduction of novel genes into fish. *Bio/Technology*, 5 : 257-261.
- McEvoy, T., M. Stack, B. Keane, T. Barry, J. Screenan, and F. Gannon, 1988. The expression of a foreign gene in salmon embryos. *Aquaculture*, 68 : 27-37.

- Miller, C. A. and D. Kowalski, 1993. cis-Acting components in the replication origin from ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 13 : 5360–5369.
- Neri, L. M., G. Mazzoggi, S. Capitani, N. M. Maraldi, C. Cinti, N. Baldini, R. Rana, and A. M. Martelli, 1992. Nuclear Matrix-Bound Replicational Sites Detected In Situ by 5-Bromodeoxyuridine. *Histochem.*, 98 : 19–32.
- Nielsen, T., D. Bell, C. Lamoureux, M. Zannis-Hadjopoulos, and G. Price, 1994. A reproducible method for identification of human genomic DNA autonomously replication sequences. *Mol. Gen. Genet.*, 242 : 280–288.
- Palzkill, T. G., S. G. Oliver, and C. S. Newlon, 1986. DNA sequence analysis of ARS elements from chromosome II of *Saccharomyces cerevisiae* : identification of a new conserved sequence. *Nucleic acids Res.*, 14 : 6247–6264.
- Powers, D. 1989. Fish as model systems. *Science*, 246 : 352–358.
- Rao B, M. Zannis-Hadjopoulos, G. Price, M. Reitman, and R. Martin, 1990. Sequence similarities among monkey ori-enriched (ors) fragments. *Gene*. 87 : 233–242.
- Sakai, Y., T. K. Goh, and Y. Tani, 1993. High frequency transformation of a methylotrophic yeast, *Candida biodinii*, with autonomously replicating plasmids which are also functional in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 175 : 3556–3562.
- Stuart, G. W., J. V. McMurry, and M. Westfield, 1988. Replication, integration, and stable germ line transmission of foreign sequences into early zebrafish embryos. *Develop.*, 103 : 403–412.
- Sykes, R. C., D. Lin, S. J. Hwang, P. E. Framson, and A. C. Chinault, 1988. Yeast ARS function and nuclear matrix association coincide in a short sequence from the human HPRT locus. *MOI. Gen. Genet.*, 212 : 301–309.
- Yoon, S. J., E. Hallerman, M. Gross, Z. Liu, J. Schneider, A. Faras, P. B. Hackett, A. Kapuscinski, and K. Guise, 1990. Transfer of the gene for neomycin resistance into goldfish, (*Carassius auratus*). *Aquaculture*, 85 : 21–33.
- 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.
- Zhu, Z., G. Li, L. He, S. Chen, 1985. Novel gene transfer into the fertilized eggs of gold fish. *Z. Angew. Ichthyol.*, 1 : 31–34