

## 잉어 (*Cyprinus carpio*)에서 탁수 노출에 의한 아가미 미세구조 변화와 유전자 확인

신 명 자 · 이 종 은 · 서 을 원\*

(안동대학교 자연과학대학 생명과학과)

Changes of Gill Structure and Identification of Genes by Muddy Water Exposure in *Cyprinus carpio*. Shin, Myung Ja, Jong Eun Lee and Eul Won Seo\* (Department of Biological Science, Andong National University, Andong 760-749, Korea)

Present study aimed to investigate morphological change and gene expression in the gill of *Cyprinus carpio* after exposure against muddy water caused by riverbed disturbance with various rearing condition. The gill of *C. carpio* showed abnormal shapes in its secondary lamellae and a rough surface with impure debris after exposed to muddy water for 80 days. In addition, the gills showed the edema, the exfoliation of epithelial cell, and the fusion of the secondary lamellae. Using 20 ACPs, 24 differentially expressed genes (DEGs) exposed to muddy water for 80 days were identified. 17 genes among them were up-regulated, while 7 genes were down-regulated in preterm deliveries. A BLAST searches revealed that 3 genes were revealed known genes as calcium transporter 1 (TRPV6) mRNA, macha mRNA for putative puoindoline b protein, and Efnb3 protein-like. Therefore, it is considered that Efnb3 gene from gill would be a useful indicator for neurobehavioral changes in fish influenced by muddy water.

**Key words :** *Cyprinus carpio*, muddy water, gene expression, gill, DEGs

### 서 론

하천개발로 인한 하상교란은 저니층 미세입자의 현탁에 의한 탁도 증가와 저니층의 입자에 부착되거나 흡수된 영양염의 수계 방출을 통해 수질을 악화시킨다. 이러한 하상교란은 하상 구조와 기질 조성 변화, 하상 경사도 증가, 하상과 제방의 침식 및 붕괴, 인접한 토양이나 구조물의 유실 및 유속 변화로 인한 채취지점 상·하류의 침식을 유발하게 된다. 골재 채취로 인해 발생하는 탁수는 하류에서 정수장해를 유발할 뿐만 아니라 수환경에도 일시에 투명도저하, 생산성 감소, 외부 기원성 유기물 증가, 수중 영양염의 공급 및 저질의 토성을 변화시킴으로써 어류

를 포함한 하천생태계에 커다란 피해를 주고 있다(Ogbeibu and Oribhabor, 2002). 이와 같은 탁수 현상은 낙동강 상류 임하호에서 처럼 연중 고탁도의 탁수가 장기간 유지되는 경우도 있으며(Lee and Cho, 2004), 최근 안동호에서도 저수지 수체의 전도현상으로 장기간 탁수가 유지되어 정상적으로 회복될 때까지 약 3주~2개월간의 기간이 소요되는 경우도 있다. 수중생태계 내에서 최고소비자인 어류는 수환경에 따라 다양한 반응을 보이며, 오염원에 대하여 단시간의 생리·생화학적인 반응을 통해 조직 및 기관내의 변화를 나타내기 때문에 오래 지속되면 개체에 영향을 주어 장기적으로는 개체군, 더 나아가 군집에까지 영향을 미치게 된다(Adams, 2002; Seo, 2005).

어류의 아가미는 호흡 및 질소 노폐물 배설의 중추적인

\* Corresponding author: Tel: 054) 820-5462, Fax: 054) 820-7705, E-mail: ewseo@andong.ac.kr

역할을 수행하는 기관으로 다른 기관에 비해 표면적이 넓고 많은 혈관이 분포하고 있기 때문에 환경변화에 가장 민감하게 반응한다(Lee *et al.*, 1997). 또한 아가미의 구조는 이차새변 상피가 단층내지 두층의 얇은 상피세포로 되어 있기 때문에 효율적인 가스 교환을 할 수 있지만 수환경 오염 시 이차새변 상피의 비대, 곤봉화, 상피세포의 박리 병변이 일어남으로써 가스교환을 하는데 어려움이 있다(Ferguson, 1989). 또한 어류는 척추동물 중 가장 다양한 유전적 다양성을 포함하고 있는 분류군으로서 포유류 등 고등 육상 동물에서는 존재하지 않거나 진화적으로 소실된 유용 유전자들을 보유하고 있음이 보고된 바 있다(Douglas *et al.*, 1999; Nam and Kim, 2001). 현재 어류 유전자 자원을 탐색 및 발굴하고자 하는 많은 노력들이 이루어지고 있으나 아직 미비한 실정이다. Shin *et al.* (2000)은 송사리를 이용하여 신경전달물질의 생성에 중요한 역할을 하는 tyrosine hydroxylase (TH) 유전자의 생물지표 가능성에 대해 보고한 바 있으며, 수환경의 중금속 오염이 생물체에 미치는 영향을 알아보기 위해 여러 종류의 어류에서 metallothionein (MT) 유전자를 클로닝하여 중금속 오염에 따라 MT 유전자의 발현이 증가된다고 보고된 바 있다(Kim *et al.*, 2003). 또한 수환경의 환경오염과 관련하여 어류의 cytochrome P450 1A (CYP1A) 유전자를 이용한 biomarker의 개발 등이 이루어지고 있다(Yoon *et al.*, 2003).

본 연구에서는 하상교란으로 인해 발생한 탁수가 어류에 미치는 영향을 조사하기 위하여 탁수에 노출된 잉어 (*Cyprinus carpio*) 아가미 조직의 미세구조 변화와 이에 따라 발현이 증가되는 유전자를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료 및 노출 실험

본 실험에 사용한 잉어는 경북 의성군 안계면에 위치한 약수 양어장에서 사육한 1년생 암컷(전장  $12 \pm 0.96$  cm, 체중  $30 \pm 1.5$  g)를 실험실 내 유리수조(30×60×45 cm)에서 사육하였으며, 사육수온은 20~22°C를 유지하였다. 유리수조는 6개를 사용하였으며 각 유리수조당 10마리씩 사육하였다. 또한 탁수는 낙동강 살리기 사업의 일환으로 공사가 이루어지고 있는 경북 안동시 정하동에서 다항목측정기(YSI 660, YSD)를 이용하여 200 NTU 이상의 탁수를 채수하였으며, 탁도는 Kim *et al.* (2007)과 Shin *et al.* (2008)의 연구 결과를 참조하여 200 NTU로 조정된 후 유리수조의 탁수로 사용하였다. 유리수조 내 탁수는 2일

간격으로 교체하였으며, 사육시 일정한 탁도를 유지하기 위해 기포기와 교반기를 설치하여 탁수가 침전되지 않고 균등하게 분포할 수 있도록 하였다. 또한 사육기간 동안 사료는 잉어용 부상사료를 사용하여 1일 1회 반복 투여하였다.

잉어의 사육기간은 1, 5, 10, 20, 40 및 80일 간격으로 설정하였으며, 각 사육기간 마다 각기 다른 유리수조에서 1마리씩 3마리를 취하여 아가미 조직을 적출하였다. 적출한 아가미 조직은 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2)에서 혈액 및 기타 이물질 등을 제거한 후 액체질소로 고정하여 -70°C에 보관하였다. 실험에 사용된 시약은 Sigma 사(St. Louis, MO, USA)의 분석용 특급 시약을 사용하였으며, 이외의 시약은 별도로 표시하였다.

### 2. 조직 관찰

광학현미경적 관찰은 잉어 아가미를 절취하여 FAA로 24시간 고정하였으며, 수세와 탈수 과정을 거친 후 일반적인 조직 제작 방법에 따라 조직을 paraffin 포매하였다. 이후 paraffin block은 두께 4~6 μm로 제작하여 hematoxylin과 eosin에 이중염색하였다. 완성된 조직 프레파라트는 광학현미경하에서 관찰하였으며, Olympus DP-71을 사용하여 사진 촬영하였다.

주사전자현미경 관찰은 잉어의 아가미를 절취하여 glutaraldehyde (Ted Pella, Redding, USA)에서 2시간 전고정 후 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)로 15분씩 3회 세척하였다. 후고정은 1% osmium tetroxide (Ted Pella, Redding, USA)에 1~2시간 고정시켜 탈수 과정을 거친 후 냉동건조기에서 완전히 건조하였다. 완전히 동결 건조된 시료는 표면에 금 코팅을 하여 주사전자현미경(S-2500C, Hitachi) 하에서 아가미 표면의 미세구조를 관찰하였다.

### 3. 유전자 발현

#### 1) RNA 추출 및 cDNA 합성

아가미 조직의 total RNA는 TRI reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 제조사의 protocol에 따라 추출하였다. RNA에 증류수를 첨가하여 녹인 후 다목적 리더기(Infinite M200, TECAN)를 이용해 RNA의 농도를 확인하였으며 1% formaldehyde/MOPS 전기영동을 통해 RNA의 순도를 확인하였다.

cDNA 합성은 동량의 total RNA를 oligo-dT ACP1 (Seegene, Korea)와 함께 80°C에서 3분간 반응시킨 후, AccuPower® RT PreMix (Bioneer, USA)를 넣은 다음 42°C에

서 90분간 반응시켜 합성하였고, RTase를 불활성화 시키기 위해 94°C에서 2분간 반응하였다. first-strand cDNA는 멸균된 증류수를 이용하여 녹여 사용하였다.

**2) ACP-based GeneFishing™ PCR**

Differentially expressed genes (DEGs)는 GeneFishing™ DEG Premix kit (Seegene, Korea) oligo-dT ACP1에 의해 합성된 각각의 cDNA를 20개의 arbitrary ACPs (Annealing Control Primers, Seegene, Korea)와 dT ACP2를 포함한 반응액으로 first-stage PCR의 첫 cycle 동안 50°C에서 second-strand cDNA를 합성하였다. Second-strand synthesis를 위한 PCR 방법은 첫 번째 단계에서는 1 cycle로 94°C에서 5분, 50°C로 3분, 72°C에서 1분으로 반응시켰으며, 두 번째 단계에서는 40 cycle로 94°C에서 40초, 65°C에서 40초, 72°C에서 40초로 증폭하였고 마지막 extension은 72°C에서 5분 동안 실시하였다.

**3) 증폭산물의 클로닝 및 염기서열 분석**

증폭된 PCR 산물 중 유전자 발현 양상이 증가한 밴드를 gel extraction kit (Qiagen, valencia, CA)를 사용하여 정제하였다. 또한 염기서열을 분석하기 위하여 pGEM-T easy vector (Promega, USA)을 이용하여 삽입하였으며, cDNA 단편을 DH5α competent cell에 형질 전환시킨 다음 100 µg mL<sup>-1</sup> ampicillin, X-gal과 IPTG가 함유된 LB plate에 도말하였다. LB plate 상의 white colony를 5 mL LB-ampicillin (100 µg mL<sup>-1</sup>) 액체배지에서 overnight 배양한 후에, plasmid extract kit (Bioneer, Korea)을 이용하여 plasmid DNA를 분리 후 확인하였다. 정제된 plasmid DNA는 BigDye 3.1 version kit (Applied Biosystems, FosterCity, CA)를 이용하여 염기서열을 증폭하였고, ABI 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)로 sequencing을 하였다. 또한 sequencing한 후 각 시료의 염기서열 비교는 multiple alignment program CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1997)를 사용하였으며, 얻어진 DNA 염기서열 분석결과는 NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)를 이용하여 분석하였다.

**결과 및 고찰**

탁수에서 사육한 아가미 조직의 미세구조는 사육 후 1일과 5일에 이차새변 사이의 공간이 일정하고 새변 사이에 이물질도 존재하지 않았으며, 이차새변의 표면은 매끄러운 형태를 유지하고 있으며 규칙적으로 배열되어 있다. 그러나 사육 후 20일과 40일에는 이차새변 사이 간격의

불규칙, 이차새변의 끝이 부풀어 오르는 곤봉화와 부종 및 이차새변끼리의 융합이 관찰되기 시작하였다 (data not shown). 아가미 조직의 미세구조 변화는 사육 후 40일까지 미미하였고 가장 두드러진 변화는 80일간 사육한 경우에 나타났기 때문에 본 연구에서는 80일간 사육한 아가미 조직에서의 미세구조 변화와 이에 영향을 받는 유전자를 조사하였다.

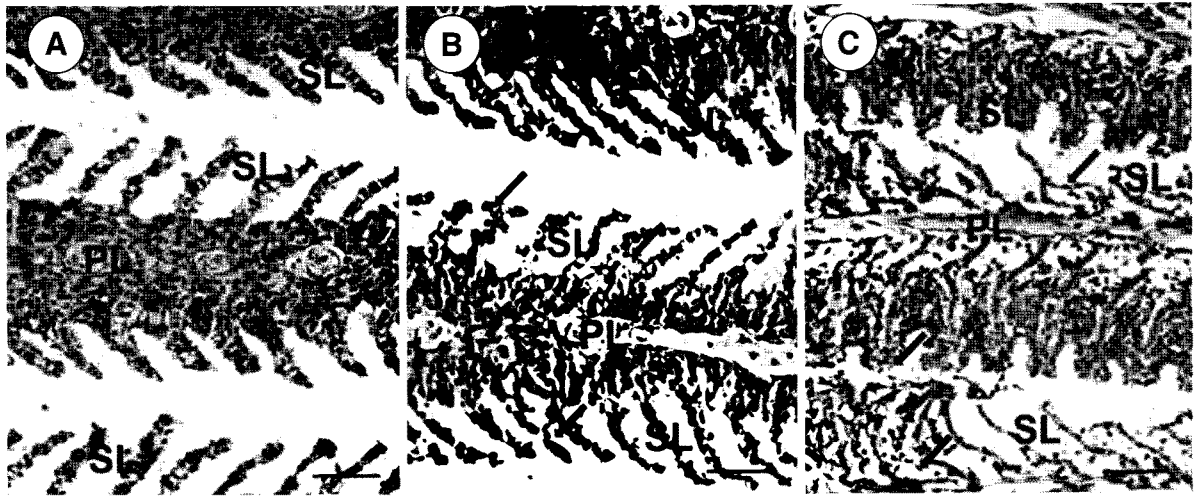
**1. 아가미 조직의 미세구조 변화**

탁수에서 80일간 사육한 잉어 아가미 조직은 대조군 아가미 조직에 비하여 이차새변의 표면이 매끄럽지 못하고 혹처럼 부풀어 있으며, 이차새변 사이의 간격이 불규칙하고 이물질과 미세입자가 확인되었다. 또한 이차새변의 끝부분이 팽대되어 있는 곤봉 형태와 이차새변의 상피세포가 분리되어 있거나 두꺼운 다층의 상피세포로 비대해진 부종도 확인되었다 (Fig. 1).

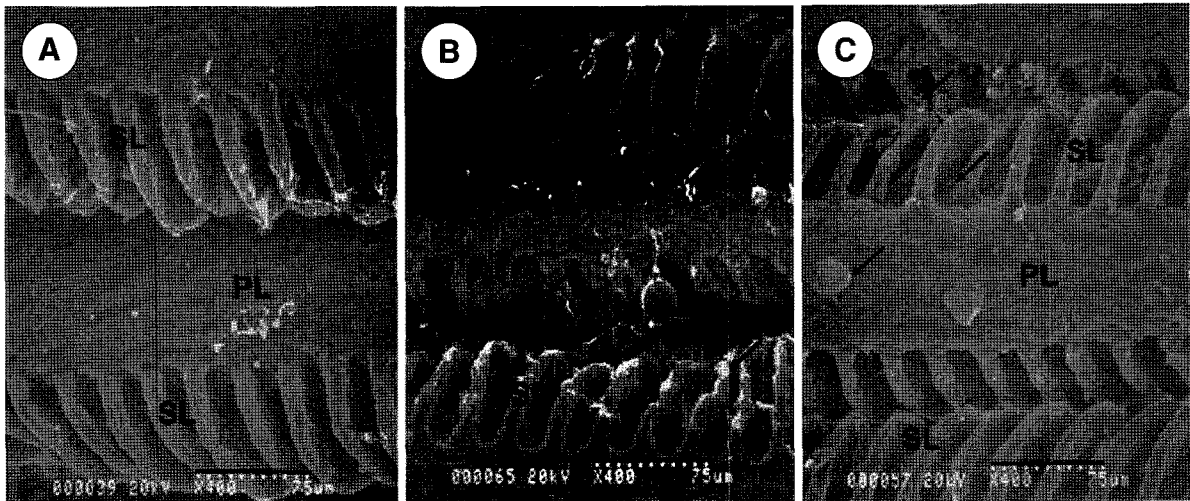
대조군 아가미의 이차새변은 머리 빗과 같이 일정하게 배열하고 있으며 새변사이에 이물질이 없는 깨끗한 형태로 나타났다. 그러나 탁수에서 80일간 사육한 아가미에서는 점토성 부유물로 보이는 이물질이 이차새변과 이차새변 사이에 부착되어 있으며, 이차새변은 두껍게 비대해져 있고 이차새변은 굽어져 있거나 불규칙한 형태를 나타냈다 (Fig. 2).

용담택의 탁수 방류로 인한 하류 하천의 영향을 알아보기 위하여 4, 200, 400 NTU에서 48시간 동안 탁수에 노출된 붕어의 아가미 조직을 전자현미경 관찰을 한 결과 아가미 주름에 탁수의 미세입자들이 대량으로 침적되었으며, 이는 아가미 주름의 표면적을 감소시킴으로써 장기간에 걸친 영향 시 어류의 호흡에 지장을 초래할 것이라고 보고하였다 (Kim *et al.*, 2007). 또한 Yu *et al.* (2009)은 임하호 유입지천에 서식하는 어류에 미치는 탁수의 영향을 분석하기 위하여 탁수수계와 비탁수수계에 서식하는 어류의 아가미 조직을 비교한 결과 탁수수계에 서식하는 어류의 아가미는 이차새변의 간격이 일정하지 않고, 상피세포의 분리와 부종 및 곤봉 형태를 확인하였으며, 이러한 조직학적 변화가 장기간 지속될 경우 어류의 2차 병변의 원인이 될 수 있음을 보고하였다.

본 연구에서도 탁수에서 80일간 사육한 잉어 아가미 조직은 이차새변의 불규칙한 형태와 곤봉화, 상피세포의 분리 및 이물질과 미세입자가 관찰되었다. 이러한 연구결과로 보아 장기간 탁수에 노출이 되면 어류는 아가미 조직에서 미세구조의 변화를 일으키고 더 나아가 어류의 호흡면적이 축소되어 호흡기능의 약화 및 조직의 병리적 영



**Fig. 1.** Micrographs of *Cyprinus carpio* gill between control (A) and exposed to muddy water for 80 days (B, C). B: Fusion and edema was showing between secondary lamella (arrows). C: Respiratory epithelial cells were separated in secondary lamella (arrows). Scale bars: A, B, C=20  $\mu$ m. PL: primary lamella, SL: secondary lamella.



**Fig. 2.** Scanning electron micrographs of *C. carpio* gill between control (A) and exposed to muddy water for 80 days (B, C). B: Winding of secondary lamella and muddy debris were shown (arrows). C: Fusion and muddy debris were shown between primary and secondary lamella (arrows). Scale bars: A, B, C=75  $\mu$ m. PL: primary lamella. SL: secondary lamella.

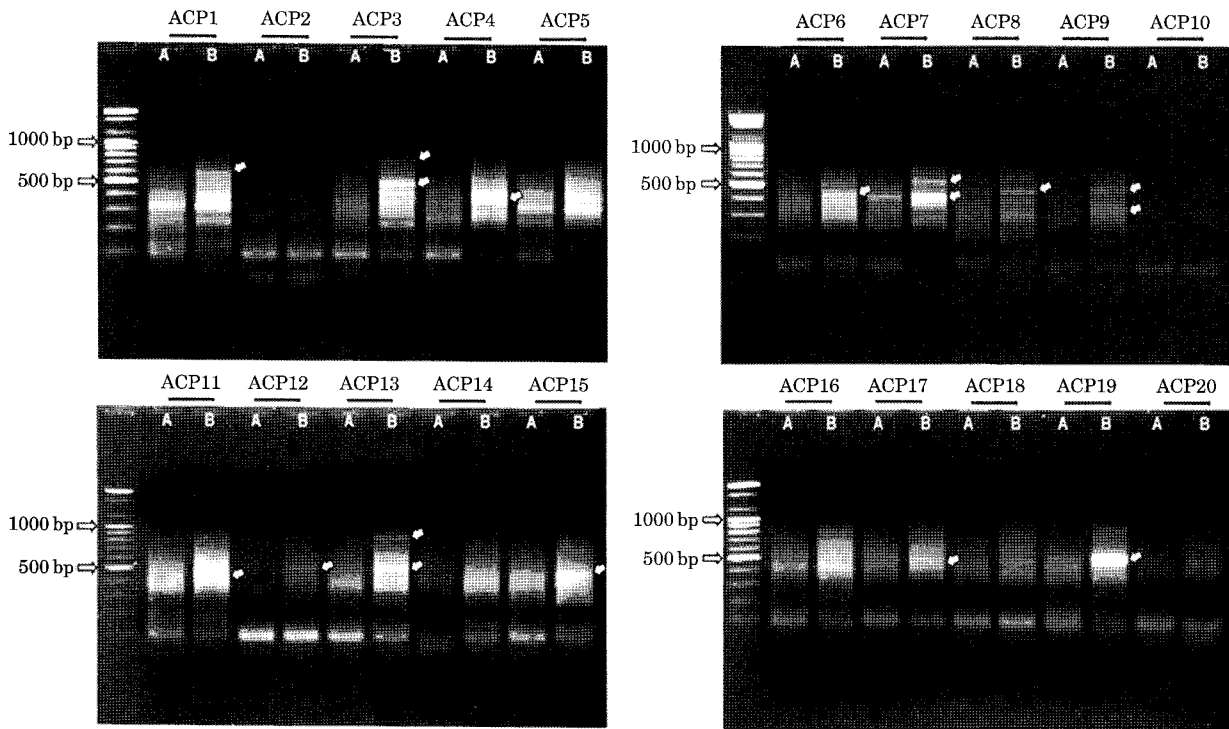
향을 나타낼 것으로 사료된다.

## 2. 유전자 발현 변화 분석

대조군 아가미 조직에 비해 탁수에서 사육한 아가미에서는 새로이 발현되거나 증가된 유전자와 소실되거나 감소된 유전자의 경우와 같이 다양한 유전자의 발현이 확인되었다. 탁수에서 사육한 아가미 조직에서 발현 증가를

보인 유전자는 17개이며, 감소를 보인 유전자는 7개로 확인되었으며, 크기는 300 bp에서 900 bp으로 나타났다 (Fig. 3).

탁수에서 사육된 아가미 조직에서 20개의 ACP를 이용하여 발현의 증가 및 감소한 24개의 유전자를 확인하였다. 이는 대조군 아가미 조직에서는 확인되지 않은 것으로 탁수에 장기간 서식한 경우 새로운 유전자의 발현이 나타난 것으로 생각된다. DEG 실험을 통해 발현이 증가



**Fig. 3.** Differentially expressed genes (DEGs) between control (A) and exposed to muddy water for 80 days (B). More than twenty of DEGs were generated. Among them, 17 DEGs were markedly up-regulated in muddy water. These DEG bands were excised from the gel for further cloning and sequencing. ACP: Annealing Control Primer.

**Table 1.** DEGs sequence analysis using NCBI BLAST search.

ACP No.	Size (bp)	Sequence homology search
ACP 3	87	- ACJ03973 calcium transporter 1 (TRPV6) mRNA, partial CDs [ <i>Sus scrofa</i> ] Length=664, Score=52.8 bits (28), Expect=2e-04 Identities=28/28 (100%), Gaps=0/28 (0%)
ACP 4	180	- CAQ43070 macha mRNA for putative puroindoline b protein (pinb gene) [ <i>Triticum aestivum</i> subsp.] Length=687, Score=154 bits (83), Expect=2e-34 Identities=86/87 (99%), Gaps=1/87 (1%)
ACP 6	623	- LOC564234 Efnb3 protein-like [ <i>Danio rerio</i> ]. Length=92643, Score=355 bits (192), Expect=7e-96 Identities=428/533 (81%), Gaps=51/533 (9%)

한 17개의 유전자 중 10개의 유전자를 sequencing한 결과 5개의 유전자가 확인되었으며, BLAST search를 통하여 검색한 결과 3개의 유전자를 확인하였다. 확인된 유전자는 ACP 3, ACP 4, ACP 6에서 각기 calcium transporter 1 (TRPV6) mRNA, macha mRNA for putative puroindoline b protein 및 Efnb3 protein-like으로 조사되었다 (Table 1).

장기 고온 스트레스에 대한 미꾸라지 (*Misgurnus mizolepis*) 간 조직 내 유전자 발현 반응의 분석을 cDNA

microarray 통해 특이적으로 반응하는 유전자들을 조사한 결과 다양한 유전자들이 고온 노출에 전사 발현의 증가 또는 감소 양상을 보였다. 또한 확인된 유전자들은 에너지 대사, 단백질 대사, 면역/항산화 기능, 세포골격 및 구조, 물질 수송 및 세포 신호전달, vitellogenin 전구체 및 리보솜 단백질류 등에 관여하는 단백질들을 암호화하는 유전자들이었다 (Cho *et al.*, 2006). 본 연구에서는 탁수에 사육한 잉어 아가미 조직에서 발현 증가 및 감소된 24개의 유전자가 확인되어 탁수에 의한 노출이 어류에

스트레스로 작용할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 ACP 6에서 확인된 유전자는 제브라피쉬(*Danio rerio*)의 Efnb3와 유사한 것으로 나타났다(Genebank accession no.= LOC564234). ACP 6에서 확인된 Efnb3 (EphrinB3)는 중추신경계와 혈관 내피 세포에서 발견되며 신경계와 혈관계의 발달과 성장에 핵심적인 인자로 작용을 한다. 또한 Efnb3는 신경섬유를 절연시키는 수초의 구성 성분 가운데 하나로 척수 손상 후 신경세포가 수초를 통해 재생되는 과정을 억제하는 것으로 나타났다(Benson *et al.*, 2005). 본 연구에서 탁수에 사육한 아가미 조직에서 Efnb3 유전자가 확인되었으며, 이 유전자는 세포 신호전달 과정에 관여하는 단백질들을 암호화하는데 영향을 주는 유전자로 생각된다. 그러므로 장기간 탁수의 수환경은 어류에 스트레스로 작용할 수 있으며, 이러한 스트레스는 어류의 새로운 유전자 발현에 영향을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

## 적 요

본 연구에서는 하상교란으로 인해 발생한 탁수가 잉어 아가미 조직의 미세구조와 유전적 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 탁수에 80일간 사육한 잉어 아가미 조직에서는 이차새변의 간격이 불규칙해지고, 곤봉화, 부종, 상피세포의 박리가 나타났으며, 새변사이에는 이물질의 부착이 두드러지게 관찰되었다. 20개의 ACP를 이용하여 대조군과 탁수에 사육한 잉어 아가미 조직에서 발현차이를 보이는 24개의 밴드를 확인하였고, 그 중 탁수에 사육한 잉어 아가미 조직에서 발현이 증가된 것은 17개, 발현이 감소된 것은 7개였다. BLAST search를 이용하여 확인한 결과 이들 중 각각의 유전자를 대표하는 DNA 절편인 unigene 정보가 있는 유전자는 3개였다. 정보가 있는 유전자 중 발현 증가를 보인 것은 calcium transporter 1 (TRPV6) mRNA, macha mRNA for putative puroidoline b protein 및 Efnb3 protein-like 등이었다. 아가미 조직에서 확인된 Efnb3 유전자는 세포 신호전달 과정에 관여하는 단백질들을 암호화하는 유전자로써 장기간의 탁수는 어류에 스트레스로 작용하여 새로운 유전자 발현에 영향을 줄 것으로 사료된다.

## 인 용 문 헌

- Adams, S.M., M.S. Greeley and M.G. Ryon. 2000. Evaluating effects of contaminants on fish health at multiple levels of biological organization: extrapolating from lower to higher levels. *Human and Ecological Risk Assessment* **6**: 15-27.
- Benson, M.D., M.I. Romero, M.E. Lush, Q.R. Lu, M. Henkemeyer and L.F. Parada. 2005. Ephrin-B3 is a myelin-based inhibitor of neurite outgrowth. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* **102**: 10694-10699.
- Cho, Y.S., S.Y. Lee, C.H. Noh, Y.K. Nam and D.S. Kim. 2006. Survey of genes responsive to long-term heat stress using a cDNA microarray analysis in Mud Loach (*Misgurnus mizolepis*) liver. *Korean Journal of Ichthyology* **18**: 65-77.
- Douglas, S.E., J.W. Gallant, C.E. Bullerwell, C. Wolff, J. Munholland and M.E. Reith. 1999. Winter flounder expressed sequence tags: establishment of an EST database and identification of novel fish genes. *Marine Biotechnology* **1**: 458-464.
- Ferguson, H.W. 1989. Gill and pseudobranchs, p. 11-40. *In*: Systematic pathology of fish. Iowa State University Press, Ames.
- Kim, I.C., Y.J. Kim, M.K. Kim, Y.D. Yoon and J.S. Lee. 2003. Fish metallothionein gene: amplification with conserved primers and sequence analysis. *Korean Journal of Ichthyology* **15**: 180-185.
- Kim, J.H., J.W. Seo, Y.E. Na and K.G. An. 2007. Ecological health assessments on turbidwater in the downstream after a construction of Yongdam Dam. *Korean Journal of Limnology* **40**: 130-142.
- Lee, G.S. and G.S. Cho. 2004. Evaluation of GIS-based soil erosion amount with turbid water data. *Journal of Korean Society for Geospatial Information System* **13**: 75-81.
- Lee, Y.C., Y.J. Chang and B.K. Lee. 1997. Osmoregulation capability of juvenile grey mullets (*Mugil cephalus*) with the different salinities. *Journal of the Korean Fisheries Society* **30**: 216-224.
- Nam, Y.K. and D.S. Kim. 2001. Bioinformatics in fish: its present status and perspectives with particular emphasis on expressed sequence tags-brief review. *Journal of Aquaculture* **14**: 9-16.
- Ogbeibu, A.E. and B.J. Oribhabor. 2002. Ecological impact of river impoundment using benthic macro-invertebrates as indicators. *Water Research* **36**: 2427-2436.
- Seo, J.W. 2005. Fish fauna and ecological characteristics of Dark Chub (*Zacco tenminckii*) population in the midupper region of Gam Stream. *Korean Journal of Limnology* **38**: 196-206.
- Shin, M.J., J.S. Kim, Y.H. Hwang, J.E. Lee and E.W. Seo. 2008. Effect of turbidity changes on tissues of *Zacco*

- koreanus. *Korean Journal of Limnology* **41**: 73-80.
- Shin, S.W., O.S. Kwon, J.S. Kim, T.S. Chon, S.K. Lee and S.C. Koh. 2000. Tyrosine hydroxylase in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): cDNA cloning and molecular monitoring of TH gene expression As a biomarker. *The Korean Journal of Environmental Toxicology* **15**: 131-137.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D.G. Higgins. 1997. The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**: 4876-4882.
- Yoon, S.J., I.C. Kim, Y.D. Yoon and J.S. Lee. 2003. Assessment of toxic effects in aquatic environment and the fish cytochrome P450 1A (CYP1A) gene. *Korean Journal of Environmental Biology* **21**: 1-7.
- Yu, S.H., J.S. Kim, M.J. Shin, J.E. Lee and E.W. Seo. 2009. Effect of turbid water on fishes in the streams of Imha reservoir. *Journal of Life Science* **19**: 1410-1416.
- (Manuscript received 1 February 2011,  
Revision accepted 7 March 2011)