

붕어의 Splenocyte 및 Erythrocyte의 Extrachromosomal DNA 관찰

임 숙 자 · 김 우 갑

Electron Microscopic Study on Extrachromosomal DNA from Splenocytes and Erythrocytes of *Carassius carassius* L.

Im, Sook Ja and Woo Kap Kim

(Received October 4, 1988)

Abstract

Extrachromosomal circular DNA complexes from erythrocytes and splenocytes isolated from *Carassius carassius* were examined by mica-press-absorption method. The method was described that released small polydisperse circular DNA molecules *in situ* from the erythrocytes and the splenocytes and that allows selective observation of the small circular DNA complexes bound to cellular components. The released polydisperse circular DNA complexes were absorbed preferentially on mica in a divalent cation-free medium then processed for electron microscopy. Small circular DNAs showed a heterogeneous size distribution of 2~10 μm with a mean contour length of 4.3 μm for the circulating erythrocytes and that of 0.7~3.6 μm with a mean contour of length 2.04 μm for the splenocytes. Cells contained 100~300 copies and 300~700 copies obtained from the erythrocytes and the splenocytes, respectively. Possible biological functional implications for size distribution of extrachromosomal circular DNAs are discussed.

서 론

염색체의 환상 DNA(extrachromosomal DNA)는 특히 세균에서 많은 연구가 이루어지고 있다. 그러나 진핵세포의 환상 DNA는 Radloff들(1967)이 HeLa세포의 환상 DNA를 전자 현미경으로 처음 관찰하고 0.2~2 μm 의 길이이며 그 크기가 다양하다는 것을 보고한 이래 많은 연구가 이루어지고

있다.

진핵생물의 염색체의 환상 DNA는 Neurospora (Agsteribbe들, 1972), Euglena(Naas와 Ben Shaul, 1972), Trypanosomes(Ono들, 1971; Borst와 Hoelijmakers, 1979; Hoelijmakers와 Borst, 1982), 효모(Billheimer와 Avers, 1969; Ballario들, 1983; Jayaram들, 1983), 초파리(Stanfield와 Helinski, 1976; Junakovic과 Ballario, 1984; Mossie들,

고려대학교 이과대학 생물학과
Dept. of Biology, Korea University

1985), 옥수수(Pring들, 1977), 완두콩(Van't Hoff와 Bjercknes, 1982), 사탕무우(Hansen과 Macker, 1984), 담배(Wong과 Wildman, 1972), 밀(Handa들, 1984) 등에서 확인되었으며, 또한, 생쥐, 원숭이, 사람으로부터 분리배양한 세포는 Smith와 Vinograd(1972), DeLap들(1978), Kunisada들(1983), Schindler와 Rush(1985) 등이 연구하였고, *in situ* mouse(Tsuda들, 1983; Shen-Ong과 Cole, 1984; Fujimoto들, 1985)와 원숭이(Bertelsen들, 1982a)와 Chinese hamster 난세포(Stanfield와 Helinski, 1984)와 사람의 spc DNA(Paulson들, 1985) 등도 연구되었다.

염색체의 DNA의 생물학적 기능에 대해서는 rRNA genes의 일련의 처리과정을 거치는 동안 점진적으로 증폭되며(Blackburn과 Szostack, 1984; Stark와 Wahl, 1984), 노화현상에서 DNA 전위와 재조합의 중간산물 및 그 부산물로서 형성되고(Smith와 Vinograd, 1972; Stanfield와 Lengyel, 1979; Bertelsen들, 1982b; Negruk들, 1982; Kunisada들, 1983; Handa들, 1984; Krolewski와 Rush, 1984; Stanfield와 Helinski, 1984) 또한 척추동물에서는 체내외적 환경변화에 따른 면역반응의 항체 형성 유전자의 V(variable chain)와 C(constant chain) 사이의 joining region의 다양한 결실로 인해 생긴다(Tonegawa, 1983; Tsuda들, 1983)는 등 연구자에 따라 그 견해가 다양하다.

진핵세포의 환상 DNA는 dye-CsCl buoyant density 방법이나 alkaline 방법으로 분리하여 cytochrome c와 함께 진개하는 방법(Yamagishi들, 1976)과 세포를 원심분리로 용출시켜 DNA를 grid에 붙이는 방법(French들, 1985), 그리고 분리된 세포를 삼투적으로 용출시켜 mica-press-absorption 방법(Yamagishi들, 1982)에 의한 전자 현미경적 관찰 방법 등이 보고되었다.

이상과 같은 연구방법으로 측정된 염색체의 환상 DNA의 길이는 대체로 $0.1 \sim 10 \mu\text{m}$ 정도의 여러가지 크기로 나타나는데 그 길이는 생물의 종에 따라 또 동일종일지라도 기관 및 조직에 따라 그 크기 및 세포당 존재 갯수가 다르다고 보고되어지고 있다.

이 염색체의 DNA에 관한 연구는 위에서와 같이 주로 고등미생물, 곤충류, 관속식물, 육상포유류에서 관찰되었을 뿐 어류에 대해서는 연구 보고된 바가 없었다.

따라서 본 연구는 담수어류인 붕어에서의 염색체의 DNA의 구조 및 그 크기를 전자현미경으로 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

100~250 g의 산란기 직전의 자성 붕어(*Carassius carassius* L.) 비장을 적출하고 동맥구로부터 혈액을 채취하여 extrachromosomal circular DNA를 분리하였다.

2. 실험 방법

(1) splenocyte의 분리와 blood의 채취

붕어의 비장을 적출하여 Hank's balanced salt solution(HBSS) 2 ml가 담긴 멸균시험관에 넣었다. Teflon homogenizer로 4~5회 homogenize하고 nylon mesh($45 \mu\text{m}$) 2 장을 50 ml원심관 위에 겹쳐 놓고 homogenize한 액을 nylon mesh에 통과시킨 후 15분 동안 4°C 에 보관해 두었다. Cell suspension을 10분 동안 1500 rpm에서 원심 분리하였다.

혈액은 heparin을 넣은 멸균된 1 회용 주사기로 동맥구로부터 채취하여 HBSS 1 ml가 담긴 멸균시험관에 넣고 위와 같은 방법으로 처리하였다.

(2) 전자현미경적 방법

원심 분리한 cell lysate를 10 ml Tris-HCl, 6 ml KCl, 6 ml dithiothreitol(pH 7.4) 및 10 ml MgCl_2 를 함유하는 용액에 희석시켜 1500 rpm에서 2회 10분간 원심 분리하였다. 위의 용액으로 1×10^6 cell로 맞추고 $10 \mu\text{l}$ cell suspension당 $1 \mu\text{l}$ lysozyme (2 mg/ml)를 첨가하여 4°C 에 3분간 보관하였다.

$0.5 \sim 1 \mu\text{l}$ cell suspension을 parafilm 위의 $10 \mu\text{l}$ 의 이차 증류수에 첨가하여 mica sheet($10 \times 10 \text{ mm}^2$)를 접촉시키고 뒷면을 눌러 1~3분간 방치하였다. 이 때 습기가 유지되도록 젖은 솜을 넣고 petri dish로 덮어 두었다. Mica sheet를 1M NaCl 용액으로 5~10초간 세척하고 이차 증류수에 1시

간 담가둔 후 99% 에탄올로 탈수시켜 건조시켰다.

Platinum-carbon shadowing과 carbon-film coating후 replica-film을 물표면 위로 띄워 400 mesh grid로 접착시켜 JEOL 100CX-II 전자현미경으로 80kV에서 1~2만 배율로 관찰하였다. 세포당 copies수와 DNA분자의 크기는 Tsuda들(1983)의 방법을 적용하였다.

결 과

적혈구는 골수에서 생성되어 체내를 순환한 후 비장에서 파괴되는데 적혈구의 분화를 조사하기 위하여 이 실험에서는 동맥구의 혈액내 적혈구와 비장에서 추출한 비장세포로부터의 spc DNA의 분포를 관찰하였다.

비장에서 분리한 splenocyte의 염색체의 환상의 DNA는 Fig. 1~5에서와 같이 관찰되었다. 이 환상 DNA는 300~700copies를 포함했으며 크기는 0.7~3.6 μ m으로서 평균 2.04 μ m이었다(Table 1). 비장세포의 spc DNA는 1 μ m 이하가 3.8%이었고 1~2 μ m은 50%, 2~3 μ m은 30.8%, 3~3.6 μ m은 15.4%이었다(Fig. 1).

순환혈액내의 적혈구세포의 염색체의 DNA는 세포당 100~300copies를 포함했고 크기는 1.8~10 μ m의 범위를 갖고 평균 4.36 μ m이었다. 그 크기 분포는 1 μ m 이하는 없었고 1~2 μ m에서는 4.1%,

2~3 μ m에서는 16.5%, 3~4 μ m에서는 38%, 4~5 μ m에서는 12.5%, 5~6 μ m에서는 12.5%, 6~7 μ m에서는 4.1%, 7~8 μ m에서는 8.2%, 9~10 μ m에서는 4.1%로 나타났다(Fig. 1, Table 1).

또 순환혈액의 적혈구 세포에는 그 크기가 현저히 달라 9.16 μ m에 달하는 DNA분자도 있어 표준편차가 2.93에 달하였다. 이 값은 chicken의 bursa와 비슷한 크기를 보였다(Yamagishi들, 1982).

Spc DNA 관찰과정에서 mica표면은 음이온을 띄는데, 용액내 2가 양이온이 없을 때에는 DNA에 부착된 단백질의 양이온이 mica 표면의 음이온에 부착되어 더욱 선명하게 나타났다(Fig. 1~2). 하지만 용액내 2가 양이온이 있으면 세포내 유전물질들이 엉키어 mica에 부착되므로 덜 선명하게 나타났다(Fig. 3~11).

고 찰

Mica-press-absorption 방법은 적은 양(1000 cells)으로 짧은 시간(약 2시간)에 DNA를 관찰하는 방법이다(Kunisada들, 1983). 이 방법은 세포를 삼투적으로 파열하여 운모 표면에 DNA를 부착시켜 관찰하는 것으로 운모표면은 음이온을 띄는데 세포를 함유한 용액내 2가 양이온이 없으면 DNA에 부착된 단백질의 양이온이 운모 표면의 음이온에 부착되어 선명하게 나타났지만(Fig. 1~2), 용액

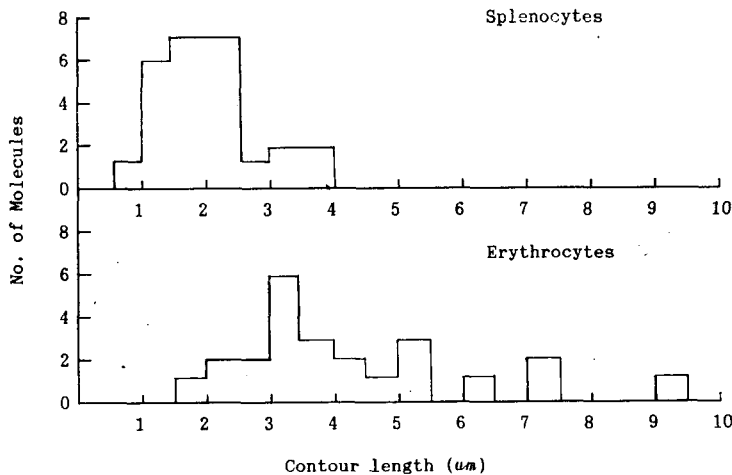


Fig. 1. Contour length distributions of small circular DNA obtained from erythrocytes and splenocytes of *Carassius carassius*.

Table 1. Size distributions of small circular DNAs obtained from erythrocytes and splenocytes of *Carassius carassius* by the mica-press-absorption method. [] Data presented in previous study(Yamagishi들, 1982) are summarized.

Cell	No. of molecules measured	contour length(μm)	Fraction of circles longer than $1\mu\text{m}$ (%)
Spleen	26	2.0 ± 1.9	94%
Blood	24	4.3 ± 2.9	100%
[Chick bursa]	48	3.0 ± 3.2	94%

내 2가 양이온이 있으면 세포의 단백질, 막성물질과 세포내 유전물질 조각들이 엉켜 부착되어 spc DNA의 관별이 용이하지 않았다(Fig. 3~11, Kunisada와 Yamagishi, 1983).

Spc DNA의 각 세포내에서의 정확한 양, 크기 분포, 세포내 위치와 핵산서열의 복잡성은 세포형마다 다르다. 진핵세포의 염색체의 DNA는 핵, 세포내 소기관과 세포질 등 세포의 어느 부위에서도 찾아볼 수 있어 spc(small polydisperse circular) DNA라고도 하며, 그 크기는 몇 백으로부터 수십만 염기쌍의 범위를 포함하고 있어 매우 다양하다(Freifelder, 1983).

Spc DNA의 환상을 이루는 분자적 기전은 아직 불확실하지만 그 기원은 염색체 DNA나 세포내 소기관 DNA에서 유래한다고 보고 있으며(Smith와 Vinograd, 1972), Kunisada들(1983)은 세포내 spc DNA의 기원을 알기 위하여 백서(mouse)의 L6세포를 cytochalasin B로 enucleate하여 핵과 세포질을 각각 분리하고 전세포, 핵, 세포질에 각각 존재하는 spc DNA의 크기 분포를 조사한 결과 전세포에는 $0.2 \sim 2.2 \mu\text{m}$, 핵에는 $0.9 \pm 0.6 \mu\text{m}$, 세포질에는 $0.4 \pm 0.3 \mu\text{m}$ 으로 나타났다. 이처럼 세포질에 있는 spc DNA가 핵의 것보다 작은 반면 copies수가 큰 것은 핵으로부터의 spc DNA가 세포질에서 효소 등에 의해 분해된 후 환상을 이루어 생성된 것이라고 추측하여 그 기원이 핵의 염색체 DNA라고 보고하였다. 또한 그는 *in situ*세포인 경우 spc DNA의 70%가 핵내에 있으나 배양세포의 것은 60%가 세포질에 있다고 하였다.

Wright와 Cummings(1983), Timmis와 Scott(1984)는 노화되는 세포에서의 미토콘드리아 DNA

가 핵내의 염색체 DNA로 전위되는 것을 발견하였고, Tsuda들(1983)은 웅성 mice, BD(C57BL/6*DBA/2, F1)의 골수세포, 홍선세포, 비장세포에서 spc DNA의 크기 및 분포를 관찰한 결과 일차 임파기관인 골수세포의 spc DNA의 크기분포는 $2.6 \pm 1.9 \mu\text{m}$ 이고 홍선세포에는 $2.8 \pm 2.3 \mu\text{m}$ 인 반면에 이차 임파기관인 비장세포에는 $1.0 \pm 0.6 \mu\text{m}$ 으로 반 이상 작아진다고 하였다. 이러한 현상은 골수에서 임파세포의 spc DNA는 크기가 크고 copies수는 적으나 생체내 각 기관을 통과하면서 분화될수록 그 크기는 감소하고 copies수는 증가하는 것이라고 보고하였다.

본 연구에서의 붕어(*Carassius carassius* L.) 순환 혈구 세포의 spc DNA의 크기는 $4.3 \pm 2.9 \mu\text{m}$ 이고 copies수는 100~300인 반면, 비장세포의 spc DNA의 크기는 $2.0 \pm 1.9 \mu\text{m}$ 이고 copies수는 300~700이었다. 이상과 같이 순환혈액 세포의 spc DNA의 크기가 이차 임파기관인 비장세포의 것보다 작아지는 것은 Tsuda들(1983)의 견해와 일치하였다.

Stark와 Wahi(1984)은 spc DNA증폭은 *Xenopus laevis*의 난 발생 초기 3주동안 rDNA의 양이 급격히 증가함과 아울러 인의 수도 증가하나 일단 난자가 성숙되면 여분의 rDNA는 서서히 분해된다고 하였다.

Beverley들(1984)은 배양중인 진핵세포에 특수시약을 처리하면 선택적으로 저항성을 나타내어 유전자가 약 100배 이상 증폭되는데 이 증폭된 유전자들은 염색체 또는 염색체 외의 것일 수 있다고 하였다. 또한 자연적으로 발생하는 증양에서 염색체 또는 염색체의 유전자의 증폭을 일으키는 특

수 기전과 그 DNA구조는 아직 밝혀지지 않았으나 증폭된 염색체의 서열은 배양되어진 포유동물 세포내 dihydrofolate reductase 유전자를 포함한다고 하였다.

Copies수가 수십에서 수백에 이르는 소위 moderately repetitive sequences로는 거의 satellite band를 찾아볼 수 있는데 이는 A+T부위가 97%나 되고 대개 염기 서열들이 simian virus 40, polyoma virus의 복제원기와 매우 유사한 곳으로서 효모에서는 Ty elements, 초파리에서는 copia, 생쥐에서는 intracisternal A형 입자 DNA, 영장류에서는 Alu family, Kpn-1 family, THE-1 family 등으로 지칭되고 있고 이곳에서 spc DNA가 형성된다고 보고되어 있다(Ballario들, 1983; Flavell과 Ish-Horowicz, 1983; Shiba와 Saigo, 1983; Georgiev, 1984; Junakovic과 Ballario, 1984; Shen-Ong과 Cole, 1984; Shepherd와 Finnegan, 1984; Mossie들, 1985; Paulson들, 1985; Rogers, 1985; Lewin, 1987). 이들 repetitive sequences는 역전사로 복제되고 염색체 서열의 부분이 삭제되어 환상으로 유도된다고 Flavell들이 1983년 보고하였다.

이상에서와 같이 진핵세포의 염색체의 DNA의 기원 및 증폭에 대해서 많은 연구가 분자적인 수준에서 이루어지고 있으나 생물학적 개념이 정립되지 않고 있으므로 앞으로 이 분야의 많은 연구가 이루어져야 할 것이다.

결 론

산란기 직전의 자성 붕어(*Carassius carassius*) 동맹구로부터 순환혈액의 혈구세포와 비장세포를 각각 분리하여 1×10^6 cell/ml에 Mg^{+2} 를 함유하는 용액과 없는 용액에 나누어 넣고 mica-press-absorption 방법을 사용하여 mica의 replica에 생긴 spc DNA contour length와 크기 분포와 세포당 들어있는 spc DNA의 copies수를 측정하였다. 순환 혈구세포의 spc DNA 분자들의 길이는 $4.3 \pm 2.9 \mu m$ 로 $1.8 \sim 10 \mu m$ 범위에 있었고 세포당 100~300 copies를 보였으며, $1 \mu m$ 이상의 spc DNA 분자의 분획이 거의 대부분이었다. 비장의 spc DNA의 contour length는 $2.0 \pm 1.9 \mu m$ 이었

고, $0.7 \sim 3.6 \mu m$ 의 크기 분포를 보였으며, 세포당 300~700 copies를 보였다.

References

- Agsteribbe, E., A.M. Kroon and E.F.J. Von Bruggen. 1972. Circular DNA from mitochondria of *Neurospora crassa*. Biochim. Biophys. Acta 269, 299~303.
- Ballario, P., P. Filetici, N. Junakovic and F. Pedone. 1983. Ty1 extrachromosomal circular copies in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 155, 225~229.
- Bertelsen, A.H., M.Z. Humayun, S.G. Karfopoulos and M.G. Rush. 1982a. Molecular characterization of small polydisperse circular deoxyribonucleic acid from an African green monkey cell line. Biochemistry 21, 2076~2085.
- Bertelsen, A.H., M.Z. Humayun, A. Lippman and M.G. Rush. 1982b. Identification of extrachromosomal DNA in hemolymphoid cells of chickens and mice. Biochim. Biophys. Res. Commun. 105, 977~984.
- Beverley, S.M., J.A. Coderre, D.V. Santi and R.T. Schimke. 1984. Unstable DNA amplifications in methotrexate-resistant leishmania consist of extrachromosomal circles which relocate during stabilization. Cell 38, 431~439.
- Billheimer, F.E. and C.J. Avers. 1969. Nuclear and mitochondrial DNA from wide-type and petite yeast: Circularity, length, and buoyant density. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 64, 739~746.
- Blackburn, E.H. and J.W. Szostak. 1984. The molecular structure of centromeres and telomeres. Annu. Rev. Biochem. 53, 163~194.
- Borst, P. and J.H.L. Hoeijmakers. 1979. Kinetoplast DNA. Plasmid 2, 20~40.
- DeLap, R.J., M.G. Rush, D. Zouzias and S.

- Khan. 1978. Isolation and preliminary characterization of the small circular DNA. *Plasmid* 1, 508~521.
- Flavell, A.J. and D. Ish-Horowicz. 1983. The origin of extrachromosomal circular copia elements. *Cell* 34, 415~419.
- Freifelder, D. 1983. *Molecular Biogy. Science Books International, Boston*, pp. 922~970.
- French, S., K. Marin, T. Patterson, R. Bauerle and O.L. Jr. Miller. 1985. Electron microscopic visualization of trp operon expression in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4638~4642.
- Fujimoto, S., T. Tsuda, M. Toda and H. Yamagishi. 1985. Transposon-like sequences in extrachromosomal circular DNA from mouse thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 2072~2076.
- Georgiev, G.P. 1984. Mobile genetic elements in animal cells and their biological significance. *Eur. J. Biochem.* 145, 203~220.
- Handa, H., K. Tsunewaki, T. Kunisada and H. Yamagishi. 1984. Small circular DNA molecules in wheat mitochondria. *Mol. Gen. Genet.* 194, 368~372.
- Hansen, B.M. and K.A. Macker. 1984. DNA sequence and transcription of a DNA minicircle isolated from male-fertile sugar beet mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 12, 4747~4756.
- Hoeijmakers, J.H.J. and P. Borst. 1982. Kinoplast DNA in the Insect Trypanosomes *Crithidia luciliae* and *Crithidia fasciculata*. *Plasmid* 7, 210~220.
- Jayaram, M., Y.Y. Li and J.R. Broach. 1983. The yeast plasmid 2 μ m circle encodes components required for its high copy propagation. *Cell* 34, 95~104.
- Junakovic, N. and P. Ballario. 1984. Circular extrachromosomal copia-like transposable elements in *Drosophila* tissue culture cells. *Plasmid* 11, 109~115.
- Krolewski, J.J., A.H. Bertelsen, M.Z. Humayun, and M.G. Rush. 1982. Members of the *Alu* family of interspersed, repetitive DNA sequences are in the small circular DNA population of monkey cells grown in culture. *J. Mol. Biol.* 154, 399~415.
- Krolewski, J.J., and M.G. Rush. 1984. Some extrachromosomal circular DNAs containing the *Alu* family of dispersed repetitive sequences may be reverse transcripts. *J. Mol. Biol.* 174, 31~40.
- Kunisada, T. and H. Yamagishi. 1983. Rapid microscale procedure for visualizing intracellular plasmid DNA for electron microscopy. *Plasmid* 9, 8~16.
- Kunisada, T., H. Yamagishi and T. Sekiguchi. 1983. Intracellular location of small circular DNA complexes in mammalian cell lines. *Plasmid* 10, 242~250.
- Lewin, B. 1987. Engineering changes in the genome. In: *Genes III*. Jone Wiley & Son. pp. 625~637.
- Mossie, K.G., M.W. Young and H.F. Varnmus. 1985. Extrachromosomal DNA forms of copia-like transposable elements, F elements and middle repetitive DNA sequences in *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.* 182, 31~43.
- Naas, M.M.K. and Y. Ben-Shaul. 1972. A novel closed circular duplex DNA in bleached mutant and green strains of *Euglena gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 272, 130~136.
- Negruk, V.I., D.I. Cherny, I.D. Nikiforova, A.A. Aleksandrov and R.G. Butenko. 1982. Isolation and characterization of minicircular DNAs found in mitochondrial fraction of *Vicia faba*. *FEBS Lett.* 142, 115~117.
- Ono, T., Y. Ozeki, S. Okubo and S. Inoki. 1971. Characterization of nuclear and satellite DNA from trypanosomes. *Biken J.* 14, 203~215.

- Paulson, K.E., N. Deka, C.W. Schmid, R. Misra, C.W. Schindler, M.G. Rush, L. Kadyk and L. Leinwand. 1985. A transposon-like element in human DNA. *Nature* 316, 356~361.
- Pring, D.R., C.S. III. Levings, W.W.L. Hu and D.H. Timothy. 1977. Unique DNA associated with mitochondria in the "S"-type cytoplasm of male-sterile maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 2904~2908.
- Radloff, R., W. Bauer, J. Vinograd. 1967. A dye-buoyand-density method for the detection and isolation of close circular duplex DNA: the closed circular DNA in HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 57, 1514~1521.
- Rogers, J.H. 1985. The origin and evolution of retroposons. *Int. Rev. Cytol.* 93, 187~279.
- Schindler, C.W. and M.G. Rush. 1985. The *Kpn*-I family of long interspersed nucleotide sequences is present on discrete sizes of circular DNA in monkey(BSC-1) cells. *J. Mol. Biol.* 181, 161~173.
- Shen-Ong, G.L.C. and M.O. Cole. 1984. Amplification of a specific set of intracisternal A-particle genes in a mouse plasmacytoma. *J. Virol.* 49, 171~177.
- Shepherd, B.M., and D.G. Finnegan. 1984. Structure of circular copies of the 412 transposable element present in *Drosophila melanogaster* tissue culture cells and isolation of a free 412 long terminal repeat. *J. Mol. Biol.* 180, 21~40.
- Shiba, T. and K. Saigo. 1983. Retrovirus-like particles containing RNA homologous to the transposable element *copia* in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 302, 119~124.
- Smith, C.A. and J. Vinograd. 1972. Small Poly-disperse circular DNA of HeLa cells. *J. Mol. Biol.* 69, 163~178.
- Stanfield, S.W. and D.R. Helinski. 1976. Small circular DNA in *Drosophila melanogaster*. *Cell* 9, 333~345.
- Stanfield, S.W. and D.R. Helinski. 1984. Cloning and Characterization of small circular DNA from Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell Biol.* 4, 173~180.
- Stanfield, S.W. and J.A. Lengyel. 1979. Small circular DNA of *Drosophila melanogaster*: Chromosomal homology and kinetic complexity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 6142~6146.
- Stark, G.R. and G.M. Wahl. 1984. Gene Amplification. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 447~491.
- Timmis, J.N. and N.S. Scott. 1984. Promiscuous DNA: Sequence homologies between DNA of separate organelles. *TIBS* 9, 271~273.
- Tonegawa, S. 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575~581.
- Tsuda, T., H. Yamagishi, N. Ohnishi, Y. Yamada, H. Izumi and K. Mori. 1983. Extrachromosomal circular DNAs from murine hemopoietic tissue cells. *Plasmid* 10, 235~241.
- Van't Hof, J. and C.A. Bjerknes. 1982. Cells of pea(*Pisum sativum*) that differentiate from G2 phase have extrachromosomal DNA. *Mol. Cell Biol.* 2, 339~345.
- Wong, F.Y. and S.G. Wildman. 1972. Simple procedure for isolation of satellite DNA's from tobacco leaves in high yield and demonstration of minicircles. *Biochim. Biophys. Acta* 259, 5~12.
- Wright, R.M. and D.J. Cummings. 1983. Integration of mitochondrial gene sequences within the nuclear genome during senescence in a fungus. *Nature* 302, 86~88.
- Yamagishi, H., H. Inokuchi and H. Ozeki. 1976. Excision and duplication of *su3+*-transducing fragments carried by bacteriophage ϕ 80. I. Novel structure of ϕ 80 *sus* 2*psu3+* DNA molecule. *J. Virol.* 18, 1016~1023.
- Yamagishi, H., T. Kunisada and T. Tsuda. 1982. Small circular DNA complexes in eukaryotic cells. *Plasmid* 8, 299~306.

Figure Legends

- Plate 1.** Small circular DNAs obtained from splenocytes (Fig. 1~5) and blood(Fig. 6~7) of *C. carassius* absorbed on mica in the absent(Fig. 1~3) or presence(Fig. 4~7) of divalent cation, Mg^{+2} , than processed Electron Microscopy. (1) $2.2\mu m$, (2) $2.4\mu m$, (3) $1.28\mu m$, $1.28\mu m$, $2.08\mu m$, (4) $1.29\mu m$, $1.66\mu m$, $3.8\mu m$, (5) $3.30\mu m$, (6) $7.33\mu m$, and (7) $3.52\mu m$.
- Plate 2.** Small circular DNAs obtained from blood(Fig. 8~11) of *C. carassius* absorbed on mica in the presence of divalent cation, Mg^{+2} . (8) $3.04\mu m$, $3.25\mu m$, $2.87\mu m$, $3.5\mu m$, $3.04\mu m$, $2.75\mu m$, (9) $5.12\mu m$, (10) $2.39\mu m$, and (11) $6.4\mu m$.

PLATE . 1

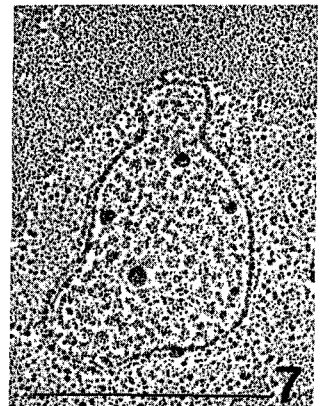
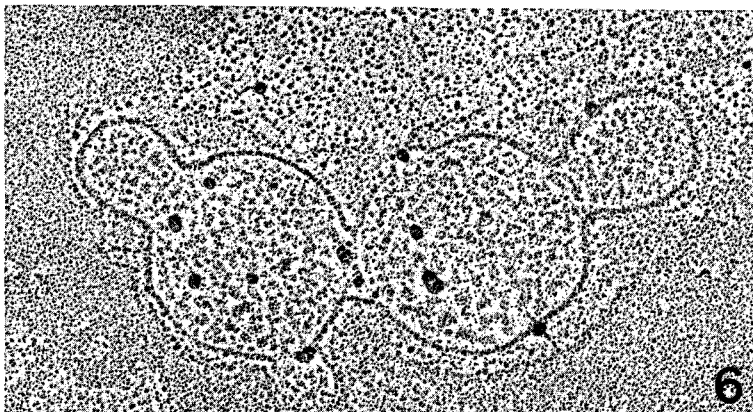
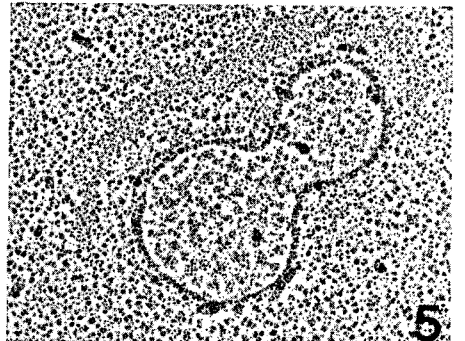
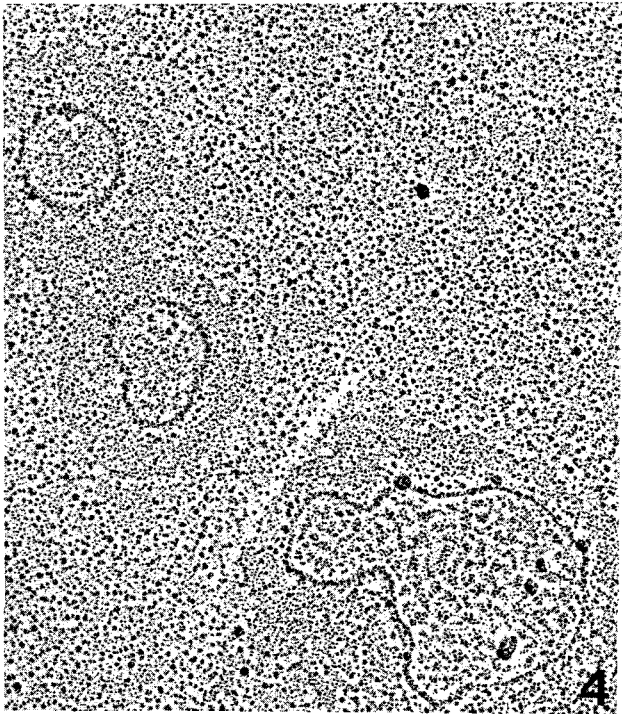
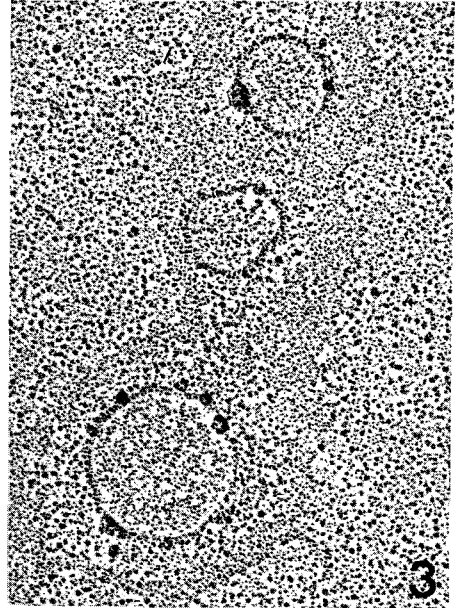
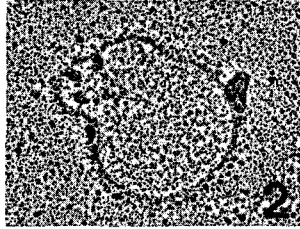
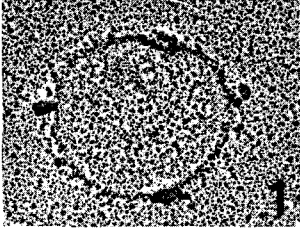


PLATE. 2

