

- 총 설 -

DNA damage와 Apoptosis를 정량화하는 단세포전기영동법

류재천 · 김현주 · 서영록 · 김경란

한국과학기술연구원, 도핑콘트롤센터, 독성연구팀
(1997. 7. 1 접수)

Single Cell Gel Electrophoresis (comet assay) to Detect DNA Damage and Apoptosis in Cell Level

Jae-Chun Ryu*, Hyun-Joo Kim, Young-Rok Seo and Kyung-Ran Kim

Toxicology Laboratory, Doping Control Center, Korea Institute of Science & Technology, P.O. Box 131,
Cheongryang, 130-650, Korea

ABSTRACT : The single cell gel electrophoresis(SCGE) assay, also known as the comet assay, is a rapid, simple, visual and sensitive technique for measuring and analysing DNA breakage in mammalian cells. The SCGE or comet assay is a promising test for the detection of DNA damage and repair in individual cells. It has widespread potential applications in DNA damage and repair studies, genotoxicity testing and biomonitoring. In this microgel electrophoresis technique, cells are embedded in agarose gel on microscope slides, lysed and electrophoresed under alkaline conditions. Cells with increased DNA damage display increased migration of DNA from the nucleus towards the anode. The length of DNA migration indicates the amount of DNA breakage in the cell. The comet assay is also capable of identifying apoptotic cells which contain highly fragmented DNA. Here we review the development of the SCGE assay, existing protocols for the detection and analysis of comets, the relevant underlying principles determining the behaviour of DNA and the potential applications of the technique.

Key words : Comet Assay, Single cell gel electrophoresis, DNA damage, Apoptosis

서 론

인간에게 있어 어떤 화학물질에의 폭로를 감지하고 정량화하는 것은 외부물질에 대한 인간의 생물학적 반응과 화학물질의 특성을 이해하는데 중요한 일이라 할 수 있다. 이러한 면에서 독성, 암발생과 노화 등을 연구하는데 있어서 세포의 DNA 손상을 민감하게 감지해 줄 수 있는 기술들이 유용하게 사용되어져 왔다(Ames *et al.*, 1973, Ishidate *et al.*, 1977, Macgregor *et al.*, 1987). 특히 대부분의 암유발원이나 독성물질들은 특정기관(organ)에 작용하기 때문에 각기관의 세포수준에서 DNA 손상을 감지할 수 있는 기술을 개발하는 것이 중요한 과제라고 할 수 있겠다.

이와 같이 여러원인에 의해 유발되는 DNA damage를 detect해내기 위한 노력으로서 많은 연구 방법들이 개발되어 왔

는데 Single Cell Gel Electrophoresis(SCGE) Assay는 분자독성학을 비롯한 유전자 손상에 관련된 연구에 광범위하게 적용되는 최신 연구기법으로 분석결과 나타나는 모양이 혜성의 모습과 같아 Comet Assay라고도 부르며, 또는 Microgel Electrophoresis Assay라 부르기도 한다. SCGE assay, 일명 comet assay는 처음 Ostling and Johanson(1984)에 의해 각각의 세포수준에서의 DNA 손상을 직접확인 하기위하여 도입된 microgel electrophoresis방법으로 Dr. Singh(1988)에 의해 보다 민감하게 DNA damage를 감지해낼 수 있는 방법으로 발전되었다. 이와같이 세포 level 에서 직접 DNA damage를 측정할 수 있는 single cell gel electrophoresis(Singh *et al.*, 1988)는 방법적인 면에 있어서 간단하고, 눈으로 그 손상정도를 쉽게 볼 수 있어 세포질 유전에 관한 assay중 각각의 세포수준으로 결과를 얻을 수 있는 고유한 방법으로 최근 1-2년 사이에 과학선진

*To whom all correspondence should be addressed.

국에서는 널리 활용되고 있다. 이 기법은 현재 여러 종류의 protocol이 존재하는데, 여러분야에서 다양한 수정 및 고안을 거쳐 그중에서 가장 일반적으로 널리 받아들여지는 Comet Assay version으로서는 University of Washington의 Dr. Singh's version(Singh *et al.*, 1988)과 British Columbia Cancer Research Center의 Dr. Olive's version(Olive *et al.*, 1993)을 들 수 있다. 현재 이 두 version은 각기 사용법과 적용분야에서 약간의 차이를 보이는데, Olive's version은 사용방법이 간편하고 좀더 다양한 연구에 적용가능한 장점이 있는 반면, Singh's version은 보다 매우 민감하게 DNA 손상을 감지할 수 있는 장점을 가지고 있다(Singh *et al.*, 1994).

Comet assay의 원리

이 SCGE의 원리는 핵내의 DNA가 supercoiled되어 tight하게 모여 있는 상태에서 high salt로 lysis 과정을 거치면 핵 단백질이 빠져나가게 되어 핵 모양을 지니면서 내부에 DNA를 포함하는 nucleoid로 된다(Mckelvey-Martin *et al.*, 1993). 이때 기존에는 핵 내의 단백질등이 완전히 제거되는 것으로 여겼으나 실제로는 남아 있는 단백질 등이 tail의 형성을 방해할 수 있다는 이론에 따라 proteinase K(Singh *et al.*, 1995)를 이용하여 단백질 등을 완전히 제거해 주고 있다. 핵은 supercoiled가 완화된 open loop 구조들이 일련의 higher order 구조를 이루고 있게 된다. 이때 nucleoid내에 strand breakage가 있는 경우 alkali상태에서 DNA 염기쌍이 분리되면서 DNA 가닥이 서로 분리되어 molecule의 양쪽 끝이 서로 풀리게 되면서 구조가 변형되어 supercoiling 상태가 완화되면서 결과적으로 DNA의 구조가 relax되고 음극이 외부로 노출되어 전기영동시 양극 쪽으로 이동되어 원래구조로 부터 확장된 tail의 형태를 보임으로써 gel electrophoresis에 의해 쉽게 감지될 수 있도록 한 것이다. 즉, 세포를 Agarose gel 에 섞어 슬라이드에 직접 분주하여 gel layer를 만들고 lysis solution을 처리하여 핵 모양의 nucleoid만 남긴후 전기영동을 하면 DNA breakage 등의 손상을 입은 세포의 경우 그 절편이 양극쪽으로 끌려가고, 이를 형광을 발하는 DNA intercalating agent인 Ethidium Bromide 등으로 처리하여 핵의 모양을 좀더 가시화시켜 DNA strand breakage에 의해 만들어진 comet tail을 측정하므로 해서 단일세포 전체의 DNA 손상을 정량화할 수 있다(Mckelvey-Martin V.J. *et al.*, 1993). 상해를 받은 세포는 밝은 형광을 나타내는 head 부분과 tail로서 나타나게 되고 손상을 받지 않은 세포는 완전한 형태로 head만을 보이게 된다. 처리물질에 의한 손상정도는 tail의 길이와 tail의 형광의 강도 즉 DNA양과 관련이 있으며 특정 처리 물질과 세포종류를 가지고 실험시 tail의 길이가

처리 물질의 농도가 증가함에 따라 증가되는 것이 아니고 일정길이까지 진행되면 더 이상 진행되지 않으므로 tail에 존재하는 DNA 양을 측정하는 것이 오히려 손상을 측정하는 데는 보다 정확한 방법이라고 할 수 있겠다(Hellman *et al.*, 1995). 이에 따라 대부분 실험실에서는 data 분석시 computer software에서 image를 분석하여 비교 가능한 data로서 tail 내의 DNA content를 포함하는 parameter로서 tail moment를 주로 사용하고 있으며 더욱 최근에는 tail inertia가 널리 쓰이고 있고 이를 정량화 해주는 software가 상용화 되어있다.

이 분석법의 이론은 근본적으로 분자량에 따라 그 이동속도가 반비례하는 전기영동의 원리에 기초하고 있다. 즉 DNA 손상을 입은 세포를 lysis하여 핵만 남긴후 전기영동을 하게되면 절단된 DNA 분자량의 크기가 작을수록 핵으로부터 멀리 이동하게될 것이다. 이때 반드시 고려해야 할 점은 핵은 DNA로만 이루어져 있는 것이 아니라 histone과 그외의 여러 단백질이 결합되어 있는 매우 잘 정렬된 Chromatin 구조로 되어 있다는 점이다. 그러므로 DNA가 손상을 입었다더라도 이 결합구조를 풀어주지 않으면 전기영동을 행하더라도 진정한 의미의 DNA 손상을 정량화하는 것은 불가능하다. 이에따라 보다 손상을 민감하게 감지하기 위하여 DNA를 unwinding시키는데 일반적으로 pH12.3 이상의 alkaline 조건의 buffer를 사용하여 single strand breakage를 정량화하고 있고 이러한 방식을 Alkaline Assay라 부르기도 한다. 한편으로는 double strand breakage를 보기위해서 neutral condition에서 전기영동을 하기도 하는데 이는 Neutral Assay라 부르기도 한다(Fairbairn *et al.*, 1995).

SCGE의 실험 방법

1. 시험물질 및 재료

Dimethyl sulfoxide(Sigma Chem. Co.), Disodium EDTA(Sigma Chem. Co.), Ethidium Bromide(Sigma Chem. Co.), Phosphate Buffered Saline (PBS, Ca²⁺, Mg²⁺ free)(Gibco BRL), Sodium Lauryl Sarcosinate(Sigma Chem. Co.), Triton X-100(Sigma Chem. Co.), Tris(Gibco BRL), Coverslip(No.1. 24×50 mm)(Superior), microcentrifuge tube, fully frosted microscope slides(Fisher Scientific Co.), agarose(Amresco Co.).

2. 방법

(1) Cell preparation

Chinese Hamster cell line 등의 경우 10% Fetal Bovine Serum 및 100 unit/ml의 penicilin, 100 µg/ml의 Streptomycin이 포함된 배지에서 5% CO₂가 공급되는 37°C 항온기에서 배양

하였다. human whole blood는 finger prick으로 매 실험마다 10 μ l 정도씩 소량을 채취하여 바로 실험에 사용한다. 실험에 사용되는 세포가 monolayer로 자라는 경우 scraping하거나 trypsinization하여 세포수는 보통 10,000~30,000개가 되게 한다.

(2) Slide preparation

Comet assay를 위하여 본 연구실에서 사용하는 실험 protocol은 다음과 같다.

A) Comet assay for detection of DNA damage(Singh *et al.*, 1988)

1) fully frosted slide에 0.5% agarose 100 μ l를 떨어뜨린 후 coverslip으로 덮어 준 후 상온에서 약 5분정도 두어 굳힌다음 coverslip을 벗기고 2시간 건조시킨다.

2) compound 처리된 세포를 Ca^{2+} , Mg^{2+} 이 없는 PBS로 세척한 후 scraping하거나 trypsinization하여 원심 분리하여 상층액을 제거해 준 다음 50°C, 0.5% agarose 40 μ l와 섞어 1)의 slide 위에 떨어 뜨린후 coverslip으로 덮어 방치한다.

3) 0.5% agarose 200 μ l를 2)에 떨어뜨린 후 coverslip을 덮어 준후 건조시킨다.

4) slide를 lysis buffer(pH 10; 2.5 M NaCl, 100 mM Na_2 EDTA, 10 mM Tris, 1% SLS, 1% Triton X-100)에 담가서 37°C에서 2시간 정도두어 lysis 시킨다.

5) electrophoresis buffer(300 mM NaOH, 10 mM Na_2 EDTA)에 담가 20분간 unwinding 시킨다.

6) electrophoresis apparatus에 slide를 서로 틈이 생기지 않도록 양극쪽으로 배열한 후 12 V, 250 mA에서 40분간 electrophoresis를 해준다(electrophoresis 조건은 각 실험실마다 적정 시간과 voltage를 정하여 사용하고 있음).

7) slide를 꺼내 0.4 M Tris(pH 7.5)에 10분간씩 담가 washing 과정을 3회 반복한다.

8) slide를 건조 시킨후 Ethidium Bromide(2 μ g/ml) 50 μ l로 형광 염색한다.

9) 4)-6)까지 단계는 DNA의 상해를 방지하기 위해 암실에서 실시한다.

B) Comet assay for Apoptosis(Olive *et al.*, 1993)

최근 Comet Assay에 대한 관심이 더욱 증대되고 여러 분야에서 다양하게 활용되고 있는데, Olive's version을 이용하여 apoptosis를 연구하는 도구로서의 comet assay를 활용할 수 있다. Apoptosis는 현대 의학 생물학 분야에서 가장 중요한 연구 대상의 하나로 Apoptosis를 정량화 하기 위해 여러 가지 다양한 실험법이 고안되어 현재까지 DNA agarose gel electrophoresis와 Electron Microscopy, 광학 형광현미경을 이용한 Apoptotic body 관찰, Flow Cytometry, TUNEL Assay 등이 사용되어 왔다. 그러나 최근에 Comet Assay를 이용해 Apop-

tosis를 연구하고자 하는 시도가 본 실험실을 비롯한 외국의 몇 연구소에서 시작되고 있는 바 본 review에서는 apoptosis 연구의 새로운 기법으로서 본 연구실에서 시행하고 있는 실험 방법을 요약소개 한다.

① $1-4 \times 10^4$ 농도로 cell을 PBS에 suspension 시킨다.

② DDW에 녹인 1% LMPA(low melting point agarose)를 40°C로 유지 시키고

③ 0.25 ml Cell suspension에 0.75 ml LMPA를 섞은후 0.5 ml를 slide에 분주한 다음

④ 4°C에서 5분간 방치한다.

⑤ 4°C Dark room에서 1시간 동안 lysis 시킨다.

*lysis buffer: 0.03 M NaOH, 1 M NaCl, 0.1% N-lauroylsarcosinate(Sigma)

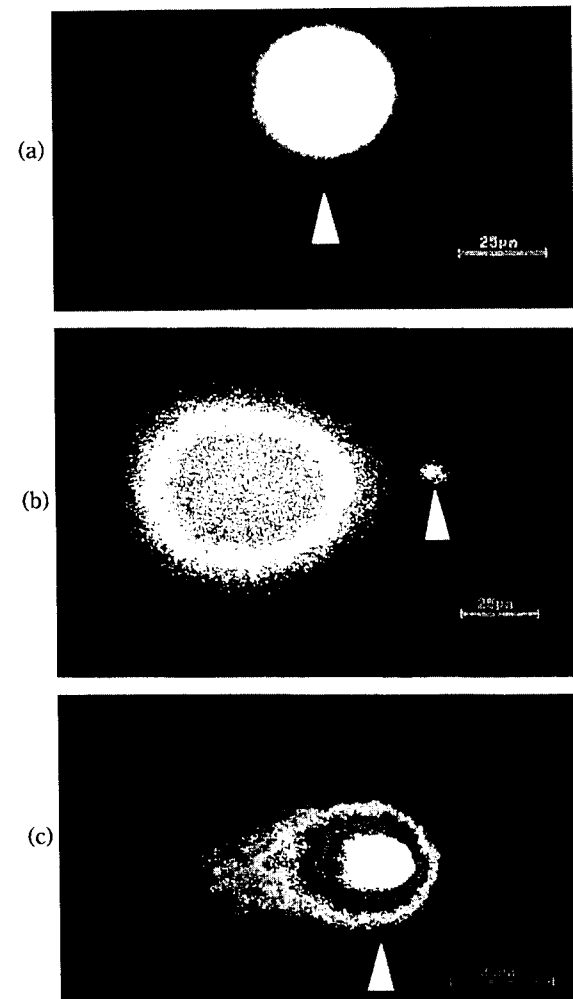


Fig. 1. Typical type of comet in Comet assay. a: Control, b: Apoptotic Comet, c: Necrotic Comet.

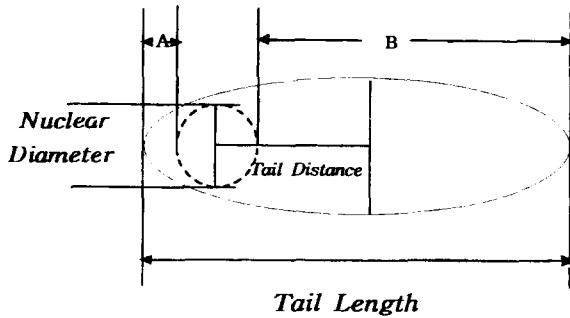


Fig. 2. The definition of parameter of comet assay in Komet 3.0 image analyzer. $A+B$ =DNA migration. Tail moment=Tail Distance \times % DNA in Tail. Tail distance=Center position of tail - Center position of head.

⑥ Alkaline buffer에 옮겨서 15분간 3회 washing으로 unwinding 한후

*alkaline buffer: 0.03 M NaOH, 2 mM EDTA

⑦ 21 Volt로 20분간 electrophoresis 한다.

⑧ DDW로 washing후 50 μ l EtBr(2 μ g/ml)로 Staining 하여

⑨ 관찰 및 정량(Apoptotic Fraction) 한다.

*Apoptosis의 경우에는 DNA fragmentation이 nucleosome에 일정하게 발생되는데 반하여 괴사의 경우는 불규칙하다는 특징 때문에 Comet Assay시에 Comet의 형태로 Apoptosis와 Necrosis를 구별할 수 있다. Comet Assay를 이용한 Apoptosis 연구의 parameter로 apoptotic fraction를 정의하는데 전체 comet에서 apoptotic comet이 차지하는 비율을 의미한다(Fig. 1).

(3) Data analysis

1) 515-560 nm의 excitation filter와 590 nm barrier filter를 이용하여 형광 현미경 하에서 관찰한다.

2) Image analyzer software(Komet 3.1)를 이용하여 slide 당 50개의 세포로부터 tail moment[(center position of head - center position of tail) \times tail%DNA/100] 값을 측정한다(Fig. 2).

3) Data를 Microsoft Excel program 상에서 Student t-test를 이용하여 통계처리 한다.

4) data 산출은 실험실마다 약간의 차이를 보이고 있어 tail length나 tail length/core width ratio 등이 이용되기도 하는데 가장 보편적인 방법으로는 tail moment를 쓰고 있다. 그러나 최근에 tail 내에 DNA fragment 분포를 포함하는 parameter로 tail inertia가 쓰이기도 한다(Hellman *et al.*, 1995).

SCGE assay의 장점

이 SCGE는 Nucleoid sedimentation(Cook and Brazell, 1976)

과 halo assay(Rotti and Wright, 1987) 같은 다른 방법들을 적용하여 alkaline 상태를 만들어 줌으로써 단일 가닥 DNA 손상을 보다 명확하게 만들어 주었고 실제로 nucleoid sedimentation이나 alkaline elution만큼 민감한 방법으로 소수의 strand breakage를 나타내 줄 수 있는 것으로 평가되고 있다. 이제까지 연구된 바로는 pH가 중성인 경우는 double strand breakage를, alkali인 경우는 single strand breakage의 형성을 감지할 수 있는데 많은 물질들이 5-2000배 정도 double strand breakage보다는 single strand breakage를 유발하기 때문에 DNA 손상을 감지하는데 alkali의 경우가 더욱 민감한 방법이라는 보고가 있으나(Singh *et al.*, 1988) 실험 목적에 따라 적절한 방법을 선택하여야 한다. 실험과정에 있어 data 분석까지 하루에 끝낼 수 있어 간단하며 단일세포수준에서 정량이 가능하므로 적은양의 sample수로도 실험이 가능하며 형광염색에 의해 눈으로 직접 확인 할 수 있다는 장점이 있다.

SCGE의 이용과 활용가능성

SCGE assay는 빠른 시간내에 간편하게 세포수준에서 data를 얻을 수 있어 DNA 손상을 유발할 수 있는 물질에 대해 subpopulation에서 저항성이나 민감도를 측정해 볼 수 있고, 적은 수의 세포에서 실험가능하고 DNA 손상을 감지하는데 민감하며 10⁶dalton 당 0.1 DNA breakage를 감지할 수 있는 매우 유용한 장점을 갖고 있다. cell cycle position에 영향을 받지 않는 것으로 보고 되어(Mckelvey-Martin *et al.*, 1993) asynchronous로 배양된 세포에 적용가능하고 세포주기 stage가 동일할 필요가 없는 primary 세포에서도 적용가능하며 장비면에서도 다른 short term test에 요구되는 것보다 훨씬 적다는 장점을 지녀 최근 몇년간 SCGE assay를 통해 DNA 손상을 본 논문들이 과학 선진국을 중심으로 급격하게 증가되고 있다(Fairbairn *et al.*, 1995). 이에 본 연구실에서도(Fairbairn, 1997, Kim *et al.*, 1996a, b, Seo *et al.*, 1996a, b, c, d) 기존에 사용되고 있는 유전독성 평가방법 즉, 염색체 이상, 자매염색체 교환, 소핵, Ames test외에 DNA 손상에 대한 보다 정확한 자료를 얻고자 SCGE라는 새로운 방법을 도입하여 활용중에 있으며 여러 대학 및 연구기관에 기술전수를 하고 있다. 이 분석법의 발전상을 살펴보면 1984년 Ostling과 Johanson(1984)이 초나선형의 DNA가 손상을 입었을 때의 영향을 분석하고자 처음 고안된 이래로 DNA의 denature condition에 따라 매우 낮은 손상을 민감하게 측정하기 위한 분석방법을 고안하려고 하는 방향과(Anderson *et al.*, 1995, Singh *et al.*, 1994), DNA 손상과 관련된 다양하게 적용될 수 있는 간편하고 분석이 용이한 방법을 고안하려는 방향으로(Olive *et al.*, 1994) 각각 발전

되었다. 즉 단순히 완충액의 조건에 따라 절단된 DNA의 변화 양상을 관찰하려는 방식에서, 인간의 정상세포주에서 방사선이나 그의 변이원성 물질의 DNA 손상을 정량화하여 유전독성을 평가하는 방식으로 개선되었고(De Meo *et al.*, 1991, Muller *et al.*, 1994), 세포주를 대상으로 한 *in vitro* 실험에서 혈구 등의 특정조직의 DNA 손상을 직접 정량화하는 *in vivo* 실험으로 발전되었다(Betti *et al.*, 1994, 1995, Green *et al.*, 1992, Ralph *et al.*, 1996).

SCGE assay의 적용가능 한 범위는 아주 다양하여 산소 라디칼의 형성에 의한 DNA 손상과 항산화제의 관계 등이 쉽게 관찰 될 수 있다(Anderson *et al.*, 1994). Benzopyrene, Cyclophosphamide, N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine과 tetrachloroethylene에 의한 유전독성효과를 보기위해 SCGE를 실시한 결과 각각의 물질들에 의해 유도된 DNA 상해의 종류에 따라 monoadduct와 cross linking을 유발한 경우 DNA 이동을 저해하므로 유의한 결과를 위해서는 Sister Chromatid Exchange에 쓰이는 농도보다 고농도가 사용된 것으로 보고 되었다(Hartmann *et al.*, 1995). 이러한 결과로 미루어 볼 때 cross linking을 유도하는 물질인 경우는 radiation 등에 의해 DNA strand breakage를 일어나게 해 주고 cross linking을 유도하는 물질을 처리하여 오히려 tail이 형성되지 않음을 확인해 봄으로써 본 연구 방법으로 그 물질의 특성을 확인할 수 있어 응용적인 연구도 가능하리라 사료 된다. DNA의 excision repair의 생화학적 연구분야에서도 활발히 이용되고 있어 처리물질을 제거하고 repair가 일어날 수 있도록 incubation시기를 달리 하면서 SCGE assay를 수행하므로써 repair의 정도, 유무를 시간별로 확인할 수 있다(Collins *et al.*, 1995). *Streptomyces flocculus*의 대사 물질로 streptonigrin(SN)을 이용하여 영향을 본 결과 SN의 농도증가에 따른 DNA의 손상을 확실하게 감지할 수 있었고 repair를 확인하기 위해 incubation time별로 SCGE를 실시한 결과 SN-DNA의 복합체 형성으로 free radical이 계속적으로 형성되어 repair-damage-repair의 curve가 나타남을 확인 한 보고도 있었다(Testoni *et al.*, 1995). 여러 연령의 human lymphocyte에 UV 조사후 연령별 repair 기능을 본 결과 노령층에서 DNA repair 기능이 감소 된 것을 확인할 수 있었다(Singh *et al.*, 1990).

이와같이 SCGE assay는 인간집단에서 oxidative damage, UV(Gedik *et al.*, 1992), ionizing radiation 등에 대한 민감도를 screening 하는데도 유용하게 적용 가능하다(Fairbairn *et al.*, 1995). 사람의 peripheral lymphocyte 혹은 whole blood 10 µl 정도로써 SCGE를 수행하여 상해의 정도를 screen해 볼 수 있으므로 유전독성을 일으킬 수 있는 유해물질에 폭로된 작업자들을 biomonitoring하는데도 사용 가능하겠고, Chemotherapy

에 유도되는 DNA 손상을 평가하는 진단기술이나 *Xeroderma pigmentosum*같은 excision repair에 결함이 있는 경우를 진단하는데도(Green *et al.*, 1992) 활용이 가능 할 것이다. 100명의 일반인들을 대상으로 흡연자와 비흡연자의 lymphocyte를 이용하여 oxidative stress와 관련된 문제를 확인해 본 결과 흡연에 의해 DNA 이동 정도가 유의하게 증가되었고 여성보다는 남성에서 더욱 유의하게 증가되었다는 보고가 있으며(Betti *et al.*, 1994) 그러나 흡입한 cigarette tar의 양과는 관계가 없음이 보고되었다(Betti *et al.*, 1995). 또한 Vasculitis/collagen disease인 환자에게 cyclophosphamide(CP)를 처리한후 DNA 손상을 측정해본 결과 고농도로 CP를 처리한 multiple sclerosis 환자에서 유의한 DNA 손상효과를 관찰할 수 있었다(Hartmann *et al.*, 1995). 백내장 환자의 lens epithelial cell DNA 손상을 SCGE를 이용하여 확인해 본 결과 DNA strand breakage를 가진 세포가 대조군에 비해 유의하게 증가 하였음을 확인함으로써 백내장환자의 lens epithelial cell내 DNA 손상은 lens fiber cell opacity의 발달과 관련이 있다는 가설을 확인하여 주었다(Kleimen *et al.*, 1993). SCGE assay를 실시하는데 있어 제한점은 lymphocyte를 이용하는 경우 혈액을 공급하는 사람에 따라 개인간 혹은 한사람의 혈액내에서도 variability가 나타나므로 대상자의 생리학적 혹은 체내의 상태까지도 고려하는 것이 필요하겠다.

또한 그 밖에도 유해 물질의 유출 등에 폭로된 물고기로 부터 혈액세포를 분리하여 그 상해의 정도로서 물고기를 채취한 지역의 오염정도를 평가해 볼 수도 있고 알려지지 않은 물질의 유전독성을 평가하는데도 유용하리라 사료 된다(Pandrang *et al.*, 1995, Ralph *et al.*, 1996).

유전 독성의 분야에서 특정세포에 관련한 대사 활성화와 *In vivo*에서 물질 투여 경로에 따른 dose-response relationship 등의 연구에도 적용가능하며 동물에 실험물질을 다양한 경로를 통해 투입하여 짧은 기간동안 노출시킨후 cell을 분리하여 생존률을 측정한 후 바로 SCGE를 실시할 수 있어 *in vivo*에서 물질에 따른 특정기관에의 작용을 용이하게 평가하는데도 사용될 수 있겠다.

이와 더불어 현재 과학선진국에서는 본 SCGE assay에 FISH(fluorescence *in situ* hybridization)를 가미한 방법의 개발과 *in vivo*, 또 organ의 각종 cell에 대한 DNA damage를 측정하는데 본 SCGE assay를 응용하고 있다.

또한 DNA 손상후 유발되는 2차적인 세포방어기작으로서 repair와 apoptosis에 대한 분야가 최근 중요한 관심사가 되는바, Comet Assay를 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다. 즉 단일세포 각각의 DNA 손상을 민감하게 정량화할 수 있다는 장점 때문에 많은 연구자들이 세포주나 혈구를 대상으로 특정

agent에 대한 repair activity를 측정하거나 다양한 변이원에 대한 repair의 mode of action에 대한 연구결과를 발표하였다 (Collins *et al.*, 1995, Fortni *et al.*, 1996, Singh *et al.*, 1990). 또한 apoptosis를 정량화하기 위해서 Necrosis와 Apoptosis를 구별하는데 유용한 기법으로 Comet Assay를 이용해서 Apoptosis를 연구한 결과가 보고되고 있다(Fairbairn *et al.*, 1995). 즉 tumor cell들의 therapy에 대한 반응이나 turnover로써 apoptosis의 역할에 많은 관심이 몰리고 있는데 Radiation에 의해 유도된 apoptosis를 빠른 시간내 확인할 수 있는 방법으로 SCGE를 사용하는 경우 기존의 flow cytometry method보다 훨씬 빨리 감지할 수 있다는 보고가 있다(Olive *et al.*, 1993). 하지만 apoptosis의 정량화를 위한 보다 정교한 실험을 위해서는 confocal이나 image analysis system의 사용이 유리하고, DNA fragmentation assay, 현미경을 통한 apoptotic body 관찰 등과 같은 기존의 방법을 병행함이 필요하다 하겠다.

이와같이 본 SCGE assay는 간편하고 신속하게 다양한 재료들을 가지고 곧바로 DNA 손상에 의해 유발되는 세포반응기작을 cell level에서 감지할 수 있어 매우 유용한 연구 방법으로 자리 매김을 할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E. and Lee, F.D., (1973): Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **70**, 2281-2285.
- Anderson, D., T.-W. Yu, B.J. Phillips and P. Schmezer, (1994). The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay. *Mutat. Res.*, **307**, 261-271.
- Betti, C., (1994). Tania Davini, Liliana Giannessi, Nicola Loprieno and Roberto Barale. Microgel electrophoresis assay (comet assay) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat. Res.* **307**, 323-333.
- Betti, C., (1995): Tania Davini, Liliana Giannessi, Nicola Loprieno and Roberto Barale. Comparative studies by comet assay and SCE analysis in human lymphocytes from 200 healthy subjects. *Mutat. Res.*, **343**, 201-207.
- Collins, A.R., Ma Ai-Guo and Susan J.D., (1995): The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat. Res.*, **336**, 69-77.
- Cook, P.R. and I.A. Brazell, (1976): Conformational constraints in nuclear DNA. *J. Cell. Sci.*, **22**, 287-302.
- De Meo, M., M. Laget, M. Castegnaro and G. Dumenil, (1991): Genotoxicity activity of potassium permanganate in acidic solutions. *Mutat. Res.*, **260**, 295-306.
- Fairbairn, D.W., P.L. Olive, Kim, L. O'neill (1995): The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.*, **339**, 37-59.
- Fairbairn D., B. Poe, Y.R. Seo, J.C. Ryu and K.L. O'Neil (1997): Hyperthermia-induced apoptosis is not dependent upon DNA strand breaks. submitted to *Mol. Cell. Biol.*
- Fortni P., Raspaglio G., Falchi M., and Dogliotti E. (1996): Analysis of DNA alkylation damage and repair in mammalian cells by the comet assay. *Mutagenesis*, **11**, 169-175.
- Gedik, C.M., S.W.B. Ewen and A.R. Collins, (1992): Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and it's repair in human cells. *Int J. Radiat.*, **62**, 313-320.
- Green, M.H.L., J.E. Lowe, S.A. Harcourt, P. Akinluyi, T. Rowe, J. Cole A.V. Austey and C.F. Arlett, (1992): UV-C sensitivity of unstimulated and stimulated human lymphocytes from normal and xerodermal pigmentosum donors in the comet assay: A potential diagnostic technique. *Mutat. Res.*, **273**, 137-144.
- Hartmann, A., Kathleen Herkommer, Michael Gluck and Gunter Speit., (1995): DNA-damaging effect of Cyclophosphamide on human blood cells *in vivo* and *in vitro* studies with the single cell gel test (comet assay). *Environ. Mol. Mutagen.*, **25**, 180-187.
- Hellman, B., H. Vaghef and B. Bostrom, (1995): The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res.*, **336**, 123-131.
- Ishidate, M. and S. Odashima, (1977): Chromosome test with 134 compounds on chinese hamster cells *in vitro*-a screening for chemical carcinogens. *Mutat. Res.*, **48**, 337-354.
- Kim, H.J., K.R. Kim, J.Y. Youn, M.H. Kim and J.C. Ryu (1996a): A new methodology to detect the DNA damages in cell levels-single cell gel electrophoresis (comet assay). The Pharmaceutical society of Korea, spring conference.
- Kim, H.-J., K.-R. Kim, J.-Y. Youn, M.-H. Kim and Ryu, J.-C. (1996b): Genotoxicity of taxol and 10-deacetyl baccatin III using single cell gel electrophoresis (comet assay) in chinese hamster lung fibroblast, The Korean Environmental Mutagen Society, fall conference.
- Kleimen, N.J. and Abraham S., (1993): DNA single strand breaks in human lens epithelial cells from patients with cataract. *Current Eye Res.*, **12**(5), 423-431.
- MacGregor, J.T., J.A. Heddle, Mark Hite, Barry H. Margolin, Claes Ramel, Michael F. Salamone, Raymond R. Tice, and Dieter Wild., (1987): Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutat. Res.*, **189**, 103-112.
- Mckelvey-Martin, V.J., M.H.L. Green, P. Schmezer, B.L., Pool-Zobel, M.P. De Meo and A. Collins, (1993): The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): A european review. *Mutat. Res.*, **288**, 47-63.
- Muller, W.U., T. Bauch, C. Streffer, F. Niedereichholz and W. Bocker, (1994): Comet assay studies of radiation-in-

- duced DNA damage and repair in various tumor cell lines. *Radiat. Res.*, **65**, 315-319.
- Olive, P.L., Garnet F. and Judit P.B., (1993): Radiation-induced apoptosis measured in TK6 Human B lymphocytes cells using the comet assay, *Radiat. Res.* **136**, 130-136.
- Olive, P.L., J.P. Banath and C.D. Fjell, (1994): DNA strand breakage and DNA structure influence staining with propidium iodide using the alkaline comet assay. *Cytometry*, **16**, 305-312.
- Ostling, O. and K.J. Johanson, (1984): Microgel electrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **123**, 291-298.
- Pandrang, R., M. Peters, S. Ralph, and M. Vrzoc, (1995): Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using Bullheads and carp. *Environ. & Mol. Mutagen.*, **26**, 345-356.
- Ralph, S., M., M. Peters, Pandrang, R., and M. Vrzoc, (1996): Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using two species of tadpoles. *Environ. & mol. Mutagen.*, **28**, 112-120.
- Rotti, J.L. and W.D. Wright, (1987): Visualization of DNA loops in nucleoids from HeLa cells: assays from DNA damage and repair. *Cytometry*, **8**, 461-467.
- Seo, Y.-R., J.-C. Ryu and K.L. O'NEill, (1996a): Application of comet assay for quantification of DNA damage and apoptosis-Effect of the genotoxic stress on apoptosis-sensitive cell lines. The fifth symposium of Gyeongsang Institute of Cancer Research.
- Seo, Y.-R., Y.-M. Ryu and J.-C. Ryu, (1996b): The cellular Responses to genotoxic stress by radicals in insect cell line. The Korean Society for Molecular Biology, fall conference.
- Seo, Y.-R., Y.-M. Ryu and J.-C. Ryu, (1996c): The cytotoxicological effect of hydrogen peroxide on *Drosophila* Kc cell line, 1996c, The Pharmaceutical Society of Korea, fall conference.
- Seo, Y.-R., H.-J. Kim, K.-R. Kim, J.-C. Ryu and K.L. O' Neill, (1996d): Introduction of Single cell gel electrophoresis (comet assay) to detect the DNA damages and apoptosis. The Korean Society of Environmental Toxicology, fall conference.
- Singh, P.N., Michael T. McCoy, Raymond R. Tice and Edward L. (1988): Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.*, **175**, 184-191.
- Singh, N.P., D.B. Danner, R. Tice, L. Brant and E.L. Schneider, (1990): DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes, *Mutat. Res.*, **237**, 123-130.
- Singh, P.N., R.E. Stephens and E.L. Schneider, (1994): Modification of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage, *Int. J. Radiat. Biol.*, **66**, 23-28.
- Singh, N.P., H. Lai, and A. Khan, (1995): Ethanol-induced single-strand DNA brekage in rat brain cells, *Mutat. Res.*, **345**, 191-196.
- Testoni, M.L., Nestor O.B. and Martha S.B. (1995): The kinetics of chromosome and DNA damage by streptonigrin in CHO cells. *Mutat. Res.*, **334**, 23-32.