

[특 집]

환경 오염물질의 진보된 독성 평가 기법

류재천*, 최윤정, 김연정, 김형태, 방형애, 송윤선

한국과학기술연구원 독성연구팀

Recent Advanced Toxicological Methods for Environmental Hazardous Chemicals

Jae-Chun Ryu,* Yun-Joung Choi, Youn-Jung Kim,
Hyung-Tae Kim, Hyeong-Ae Bang and Yun-Seon Song

Toxicology Laboratory, Korea Institute of Science and Technology, P.O. Box 131,
Cheongryang, Seoul, 130-650 Korea

ABSTRACT

Recently, several new methods for the detection of genetic damages *in vitro* and *in vivo* based on molecular biological techniques were introduced according to the rapid progress in toxicology combined with cellular and molecular biology. Among these methods, mouse lymphoma thymidine kanase (*tk*) gene forward mutation assay, single cell gel electrophoresis (comet assay) and transgenic animal and cell line model as a target gene of *lac I* (Big Blue) and *lac Z* (Muta Mouse) gene mutation are newly introduced based on molecular toxicological approaches.

The mouse lymphoma *tk*^{+/−} gene assay (MOLY) using L5178Y *tk*^{+/−} mouse lymphoma cell line is one of the mammalian forward mutation assays, and has many advantages and more sensitive than *hprt* assay. The target gene of MOLY is a heterozygous *tk*^{+/−} gene located in 11 chromosome, so it is able to detect the wide range of genetic changes like point mutation, deletion, rearrangement, and mitotic recombination within *tk* gene or deletion of entire chromosome 11. The comet assay is a rapid, simple, visual and sensitive technique for measuring and analysing DNA breakages in mammalian cells. Also, transgenic animal and cell line models, which have exogenous DNA incorporated into their genome, carry recoverable shuttle vector containing reporter genes to assess endogenous effects or alteration in specific genes related to disease process, are powerful tools to study the mechanism of mutation *in vivo* and *in vitro*, respectively. Also *in vivo* acridine orange supravital staining micronucleus assay by using mouse peripheral reticulocytes was introduced as an alternative of bone marrow micronucleus assay.

In this respect, there was an International workshop on genotoxicity procedure (IWGTP) supported by OECD and EMS (Environmental Mutagen Society) at Washington D.C. in March 25-26, 1999. The objective of IWGTP is to harmonize the testing proce-

* To whom correspondence should be addressed

dures internationally, and to extend to finalization of OECD guideline, and to the agreement of new guidelines under the International Conference of Harmonization (ICH) for these methods mentioned above. Therefore, we introduce and review the principle, detailed procedure, and application of MOLY, comet assay, transgenic mutagenesis assay and supravital staining micronucleus assay.

Key words : Mouse lymphoma thymidine kinase gene forward mutation assay, comet assay, supravital micronucleus assay, mouse peripheral reticulocytes, transgenic mutagenesis system, *lac I* gene

I. Mouse Lymphoma L5178Y *tk*^{+/-} (thymidine kinase) Gene forward mutation Assay (MOLY)

1. 서 론

Mouse lymphoma *tk* gene assay (MOLY)는 mouse lymphoma 세포주를 이용한 *in vitro* mutagenicity를 연구하는 시험법으로써 그 유용성이 Clive 등에 의해 1972년 처음으로 소개되었고, 그후 세포주의 개발과 시험법의 보완 등을 거쳐 민감도가 뛰어난 유전독성시험법으로 대두

되고 있고, 현재 ICH를 중심으로 *in vitro* 염색체 이상시험을 대체할 강력한 tool로서 international Harmonization 되고 있는 연구방법이다 (Clive *et al.*, 1987).

2. MOLY의 기본원리

이 MOLY의 기본적인 원리는 mouse lymphoma L5178Y *tk*^{+/-}-3.7.2C cell line을 이용하며, 11번 염색체 내에 heterozygote로 존재하는 thymidine kinase gene (*tk*^{+/-})의 *tk*^{-/-} homozygote로의 mutation을 인식할 수 있는 시험체계를 지닌다.

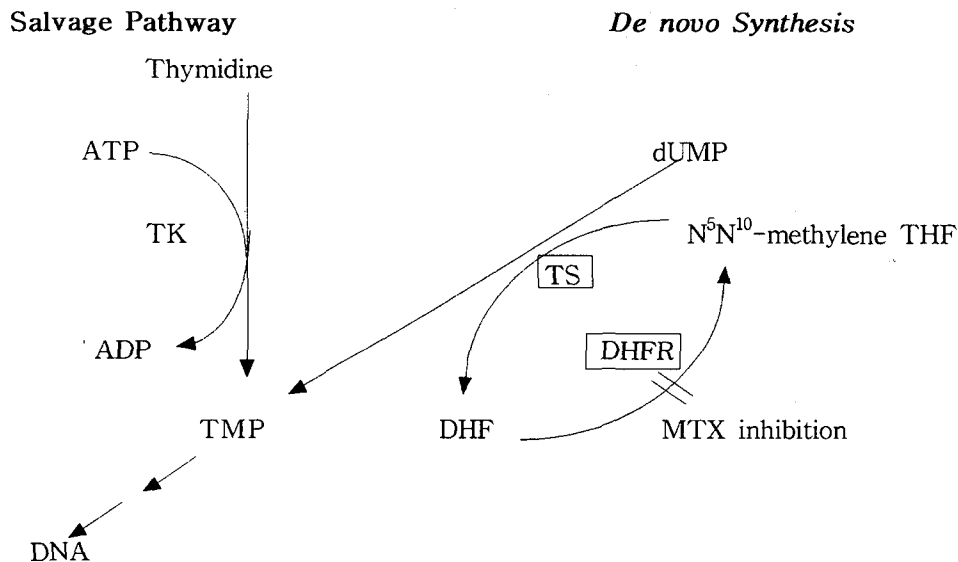


Fig. 1. Biosynthetic pathway of thymidine monophosphate.

TK : thymidine kinase, TMP : thymidine monophosphate, DHFR : dihydrofolate reductase, TS : thymidylate synthase, dUMP : deoxyuridine monophosphate, DHF : dihydrofolate, N⁵, N¹⁰-methylene THF : N⁵, N¹⁰-methylene tetrahydrofolate, MTX : methotrexate

MOLY법의 원리는 thymidine kinase의 역할에 있다. thymidine kinase는 DNA의 생합성시 전구체로 필요한 thymidine monophosphate (TMP)를 만들기 위한 thymidine의 인산화에 관여하는 효소로서 세포 내에서 TMP를 합성하는 과정은 Fig. 1에서 보여지는 바와 같이 *de novo* synthesis와 salvage pathways에 의한 두 가지 경로에 의해 합성될 수 있다.

MOLY는 *de novo* synthesis에 의해서만 TMP를 합성하여 생존할 수 있는 *tk*^{-/-} mutant 세포를 정상적 두 pathway를 통하여 TMP를 합성할 수 있는 *tk*^{+/-} 세포로부터 detection하는 시험체계를 지닌다. 따라서 어떤 시험물질의 mutagenicity를 평가하기 위한 본 실험을 시작하기 전에 L5178Y cell에 *de novo* synthesis를 저해하도록 methotrexate (MTX)를 처리해줌으로써 자연돌연변이에 의해 형성될 수 있는 *tk*^{-/-}의 homozygotes는 생존할 수 없도록 하여 *tk*^{+/-}의 heterozygote만을 선택한 후 본 실험을 실시한다. L5178Y *tk*^{+/-} 세포주에 시험물질을 처리함으로써 *tk*^{-/-} homozygotes로 돌연변이가 유도된 세포는 trifluorothymidine (TFT)를 배양액에 처리함으로써 선택되어진다. 세포내에서 TFT는 *tk*에 대한 기질로 사용되어 인산화되어 TFT-monophosphate (TFTMP)를 생성하게되고 이 산물은 세포의 생존을 방해하여 치사하도록 유도한다 (Fig. 2). 따라서 돌연변이가 유도되지 않은 *tk*^{+/-} heterozygotes들은 생존하지 못하고, thymidine kinase를 합성할 수 없는 *tk*^{-/-} homozygotes는 *de novo*

synthesis에 의해 TMP를 합성하며 생존하게 된다.

3. MOLY의 장점

MOLY는 *tk* gene내의 또는 *tk* gene을 포함하는 11번 chromosome내에서 발생하는 넓은 범위의 유전적 변화를 인식할 수 있다는 장점을 지닌다. 즉, 기존의 변이원성시험으로 널리 이용되어 오고 있는 박테리아 복귀돌연변이 시험법인 Ames test가 point mutation, frameshift mutation 등의 하나 또는 수개의 base 정도의 작은 유전적변이만을 인식할 수 있고, 포유동물세포를 이용한 염색체 이상시험이 염색체 수준에서의 large scale의 구조적, 수적 이상만을 인식할 수 있다는데 반해, MOLY는 두 가지 모두를 인식할 수 있으므로 인해 두 시험법을 동시에 보완할 수 있다는 것이다 (Gorelick, 1995; Toyokuni *et al.*, 1995). 즉, MOLY는 *tk* gene 내부의 point mutation, *tk* gene 전체의 deletion, 11번 염색체 전체의 deletion, 또한 *tk* gene을 포함하는 유전자 재조합 등에 의해서 유도된 *tk*^{-/-} cells을 인식할 수 있는 훌륭한 실험방법으로 대두되고 있다.

4. MOLY의 활용가능성

MOLY는 유전적변이의 양상에 따라 L5178Y *tk*^{+/-} 세포의 성장에 있어서 두 가지 형태의 mutant type을 볼 수 있다. 즉, *tk* gene 내부의 small scale의 변화에 대해서는 정상적인 성장을

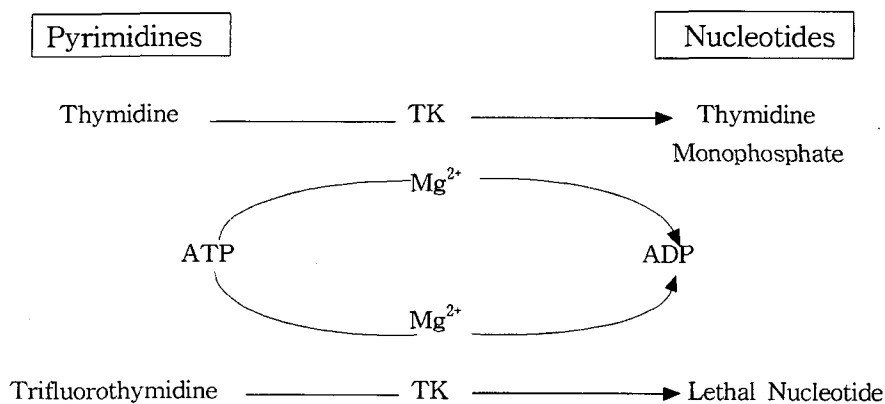


Fig. 2. The enzymatic role of thymidine kinase.

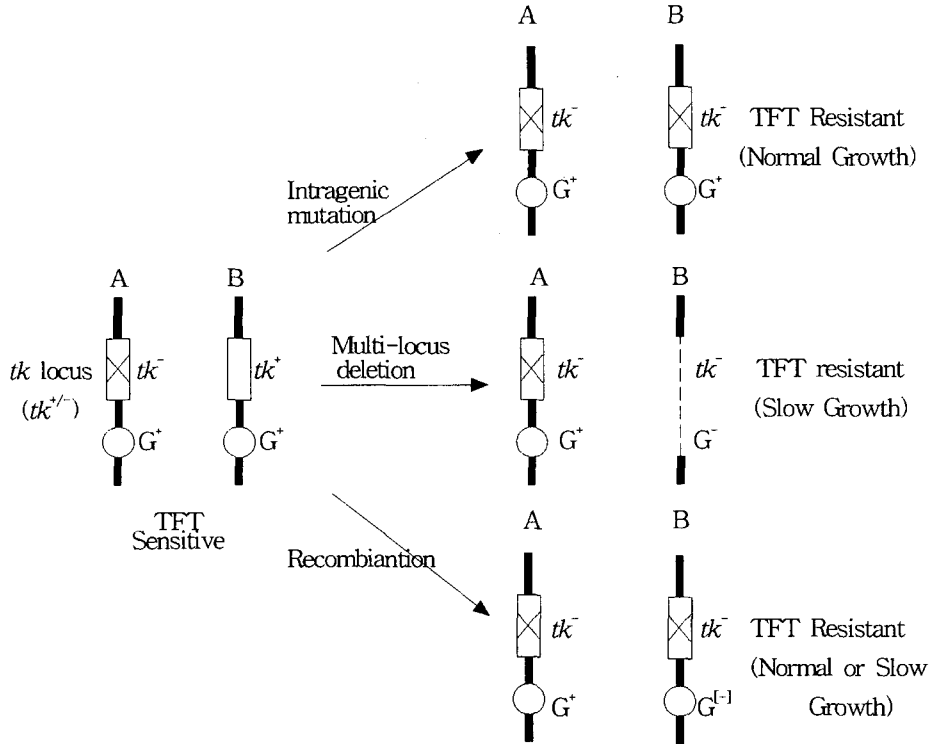


Fig. 3. Genetic mutations in thymidine kinase gene and 11 chromosome, and growth patterns of L5178Y $tk^{+/-}$ cells.

보이는 large colony mutants를 형성하게 되고, tk gene과 함께 염색체 11번 내의 large scale의 손상의 경우에는 성장에도 영향을 미치게 되어 slow growth로 인한 small colony mutants를 형성하게 된다 (Applegate *et al.*, 1990; Moore *et al.*, 1985). 따라서 환경유해물질에 대한 MOLY의 수행결과에 대한 mutant type을 분석함에 따라 환경유해물질이 유도하는 mutation의 특성을 예측할 수 있다 (Fig. 3).

MOLY는 과거에 soft agar 배지상에서 mutant cell이 clone되는 방법 (agar assay)이 이용되어 왔으나, Cole (1986) 등에 의해 96-microwell을 이용한 cloning 법 (microtiter assay)이 개발되어 (Clements, 1990) 최근에는 microtiter assay 법에 따라 수행하고 있다.

MOLY의 결과처리는 UKEMS (United Kingdom Environmental Mutagen Society)에서 Guideline (Robinson *et al.*, 1990)을 제시하고 있는

데, microtiter assay에 있어서 UKEMS Guideline을 바탕으로 한 통계처리 software package가 영국의 Hazleton사에서 개발된 Mutant V2.34으로 제공되어 유용하게 이용되고 있어 앞으로 환경유해물질의 검색 및 통계처리에 유용하게 제공될 수 있으리라 사료된다.

II. Single cell gel electrophoresis assay (comet assay)

1. 서론

인류에 있어 어떤 화학물질에의 폭로를 신속, 정확하게 감지하고 정량화 하는 것은 외부물질에 대한 인간의 생물학적 반응과 화학물질의 특성을 이해하는데 중요한 일이라 할 수 있다. 특히 대부분의 암 유발원이나 독성물질들은 특정기관에 작용하기 때문에 각각의 세포수준에서 DNA 손상을 감지할 수 있는 기술을 개발하는 것은 중요

한 과제이었고 지금까지 여러 원인에 의해 유발되는 DNA 손상들을 탐지해내기 위한 노력으로써 많은 연구 방법들이 개발되어 왔다.

SCGE (single cell gel electrophoresis) assay, 일명 comet assay는 처음 Ostling and Johanson (1984)에 의해 각각의 세포수준에서의 DNA 손상을 직접확인하기 위하여 도입된 microgel electrophoresis 방법으로 N.P. Singh (1988)에 의해 보다 민감하게 damage를 감지해낼 수 있는 방법으로 발전되었다. 이와 같이 세포 level에서의 DNA damage를 측정할 수 있는 single cell gel electrophoresis (Singh N.P., 1988)는 방법적인 면에 있어서 간단히 눈으로 그 손상 정도를 쉽게 볼 수 있어 세포질 유전에 관한 assay중 각각의 세포수준으로 결과를 얻을 수 있는 고유한 방법으로 최근 몇 년 사이에 과학선진국에서는 널리 쓰이고 있으며 최근에는 OECD guideline으로 도입하기 위한 International workshop 개최는 물론 전문가들이 구체적인 Harmonization을 진행 중에 있다.

2. SCGE assay의 원리

세포 핵 안에 존재하는 DNA는 supercoiled되어 tight하게 모여 있다. 여기에 high salt로 lysis 과정을 거치면 핵단백질이 빠져나가게 되어 핵 모양을 지니면서 내부에 DNA를 포함하는 nucleoid가 된다. 이때 핵은 supercoiled가 완화된 open loop 구조들이 일련의 higher order 구조들 이루고 있게 된다. 이때 nucleoid 내에 strand breakage가 있는 경우 alkali 상태에서 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 원래구조로부터 확정된 tail의 형태를 보임으로써 gel electrophoresis에 의해 쉽게 감지될 수 있다(Mckelvey-Martin V.J. *et al.*, 1993). 상해를 입은 세포는 밝은 형광을 나타내는 head 부분과 tail로써 나타나게 되고 손상을 받지 않은 세포는 완전한 형태로 head만을 보이게 된다. 처리물질에 의한 손상정도는 tail의 형광 강도 즉 DNA양과 관련이 있으며 특정 처리 물질과 세포

의 종류에 따라 실험시 tail의 길이가 처리 물질의 농도가 증가함에 따라 증가되는 것이 아니고 일정길이까지 진행되면 더 이상 진행되지 않기 때문에 tail에 존재하는 DNA 양을 측정하는 것이 오히려 손상을 측정하는데는 보다 정확한 방법이라고 할 수 있겠다.

이에 따라 대부분 실험실에서는 data 분석시 computer software에서 image를 분석하여 비교 가능한 data로서 tail 내의 DNA content를 포함하는 parameter로 tail moment를 주로 사용하고 있으며 tail length와 병기하고 있다.

3. SCGE assay의 장점

SCGE는 Nucleoid sedimentation (Cook P.R. and I.A. Brazell, 1976)과 halo assay (Rotti J. L. and W.D. wright, 1987) 같은 다른 방법들을 적용하여 alkaline상태를 만들어 줌으로써 단일 가닥 DNA 손상을 보다 명확하게 만들어 주었고 실제로 nucleoid sedimentation 이나 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 N.P. *et al.*, 1988) 실험 목적에 따라 적절한 방법을 선택하여야 한다. 실험과정은 data 분석까지 하루에 끝낼 수 있어 간단하며, 손상을 단일세포수준에서 정량이 가능하므로 적은 sample의 양으로도 실험이 가능하며 형광염색에 의해 눈으로 직접 확인할 수 있다는 여러 장점이 있다.

4. SCGE의 이용과 활용가능성

Comet assay는 빠른 시간 내에 간편하게 세포 수준에서 data를 얻을 수 있어 DNA손상을 유발할 수 있는 물질에 대해 subpopulation에서 저항성이나 민감도를 측정해 볼 수 있고, 적은 수의 세포에서 실험가능하고 DNA 손상을 감지하는데 민감하여 10⁹ dalton 당 0.1 DNA breakage를 감지할 수 있는 매우 유용한 장점을 가지고 있다.

Cell cycle position에 영향을 받지 않는 것으로 보고되어 asynchronous로 배양된 세포에 적용 가능하고 세포주기 stage가 동일할 필요가 없는 primary 세포에서도 적용가능하며 장비면에서도 다른 short term test에 요구되는 것보다 훨씬 적다는 장점을 지녀 최근 몇 년간 comet assay를 통해 DNA상해를 본 논문들이 과학 선진국을 중심으로 급격하게 증가되고 있다 (Fairbairn D. W. *et al.*, 1995).

이와 같이 본 SCGE assay는 간편하고 신속하게 다양한 재료들을 가지고 곧바로 DNA 손상 여부를 cell level에서 감지할 수 있어 매우 유용한 연구 방법으로 자리 매김을 할 것이고 현재 *in vivo* comet assay가 널리 시도되어 발표되고 있어, *in vivo* DNA damage 측정에도 널리 사용될 것으로 시도된다.

III. *in vivo* Acridine Orange Supravital Staining Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Reticulocytes

1. 서 론

포유동물인 mouse를 이용한 설치류의 골수내 다염색적혈구 (polychromatic erythrocytes, PCE)

를 이용한 소핵시험 (micronucleus assay)이 1975년 Schmid에 의해 개발되어 소개된 이후, 화학물질등의 변이원성을 평가하는 *in vivo* 시험법으로 전세계적으로 활용되어 오고 있다.

2. 소핵시험법의 발달

소핵시험은 적혈구의 분화과정 중에 형성되는 비정상적인 염색체성분인 소핵 (micronuclei)의 유도를 지표로하는 cytogenetic 시험법으로서 소핵 (micronuclei)은, Fig. 4에서 볼 수 있듯이 유핵의 적혈구 모세포로부터 무염색적혈구를 target으로 하여 소핵을 함유한 다염색 적혈구의 출현 빈도로서 변이원성을 판정하였다. 그러나 실제 광학 현미경 하에서의 Giemsa 염색에 의한 소핵의 구별, 골수세포 사용할 때의 번거로움, 또 골수 채취를 위해 실험동물의 도살, 숙련된 관찰을 위한 장기간의 훈련 등 많은 단점을 내포하고 있는 것이 현실이다.

이와 같이 골수세포를 이용한 Giemsa 염색에 의한 소핵시험법의 단점을 보완하고자, 최근 소핵시험에 있어서 골수세포 대신 말초혈액을 이용한 시험법이 1980년 MacGregor 등에 의해 소개되었으나, 미성숙적혈구의 수가 적은 것과 기존의 Giemsa 염색법으로는 미성숙적혈구와 성숙적

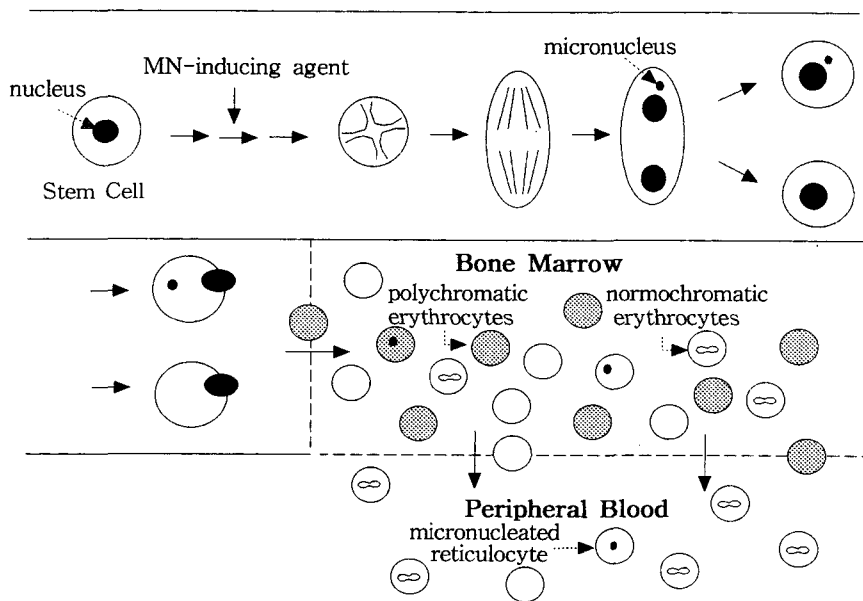


Fig. 4. Micronucleus formation in erythropoiesis.

혈구의 구분이 쉽지 않은 이유로 널리 사용되지 못하였다. 그러나 최근 Hayashi 등(1990)에 의해 말초혈액 내의 망상적혈구 (reticulocyte)를 target으로 하여 acridine orange로 형광염색하는 초생체염색법 (Supravital Staining Method)이 소개되고, 이 시험법의 개발은 기존의 골수내 다염성적혈구의 Giemsa 염색을 통한 소핵시험이 지니고 있는 여러 가지 문제점을 보완해 주며, 골수세포 대신 말초 혈액세포의 대치 유용성이 실험적 검증을 통하여 입증되었다.

3. 소핵시험법의 기본원리

말초혈액내의 망상적혈구는 무핵의 미성숙 적혈구로서 성숙단계에 따라 세포내 RNA 함량에 의해 Fig. 5에서와 같이 acridine orange 형광 염색시 Type I, II, III, IV의 4가지 형태로 구분될 수 있다. 이들은 분화과정에서 핵이 소실되었기 때문에 정상적인 핵은 지니지 않으며, 그러나 분화과정 중 변이원성 물질과 같은 소핵유도물질에 의해 형성된 소핵은 핵소멸시에도 제거되지 않고 적혈구 형성과정에 그대로 존재하게 되어 망상적혈구내에 연녹색으로 관찰되어진다.

말초혈액을 이용한 supravital staining에 의한 소핵시험은 Type I, II, III의 망상적혈구를 계수하며, 이들 중 소핵을 함유하는 망상적혈구(micronucleated reticulocyte)의 빈도를 계수하여 Cochran Armitage법에 의한 통계처리로 유의성을 평가한다.

4. 소핵시험법의 장점

기존의 골수내 다염성적혈구를 통한 Giemsa 염색법의 문제점들은 지방과립, RNA 과립, 비만세포의 파괴로 형성된 과립 등이 소핵과 유사하게 염색이 되어 구분이 어렵다는 것과 관찰자

다 주관적인 차이가 있다는 것이다. 또한 실험동물의 대퇴골로부터 골수를 채취하기 위해 동물을 도살해야만 한다는 것, 또 이로 인해 동일한 개체 내에서의 시간에 따른 적정 소핵 유도시간의 결정이 불가능하다는 것이다.

그러나, 말초혈액내의 망상적혈구의 acridine orange 형광염색시에는, 소핵과 artifacts의 구별이 분명하다는 큰 장점을 지닌다. DNA 성분인 소핵은 acridine orange와 결합하며 520 nm 파장의 황록색의 형광을 발하고, RNA와 결합하게 되면 590 nm의 적색형광을 발하게 된다. 또한 Giemsa 염색시 소핵과 유사하게 염색이 되는 지방과립이나 mucopolysaccharides 성분은 적색의 형광을 발하게 됨으로써 소핵과의 식별이 본 방법에서는 분명하다는 장점이 있다.

말초혈액을 이용한 초생체 염색법의 또 다른 장점으로서 cell population이 일정하고 규칙적이어서 관찰이 쉽고 빠르며, 또한 실험동물을 도살하지 않고 혈액을 반복적으로 채혈할 수 있기 때문에, 예비실험을 별도로 하지 않고도 동일 개체 내에서 최적 소핵유도 시간을 결정할 수 있다는 것이다.

5. 소핵시험법의 활용가능성

초생체 염색법은 실험동물을 죽이지 않고 소량의 혈액만을 필요로 하기 때문에 다른 독성학이나 약리대사 등의 실험과 병행하여 할 수 있다는 장점을 지닌다. 즉 앞서 언급한 transgenic mouse를 이용한 독성 발현기전 연구와 본 소핵시험의 병행이 가능하다는 것이다.

이처럼 기존의 골수내 다염성적혈구의 Giemsa 염색에 의한 소핵시험의 단점들을 말초혈을 이용한 supravital staining법으로 극복할 수 있을 뿐 아니라 여러 가지 장점들을 지니므로, 이 시험법

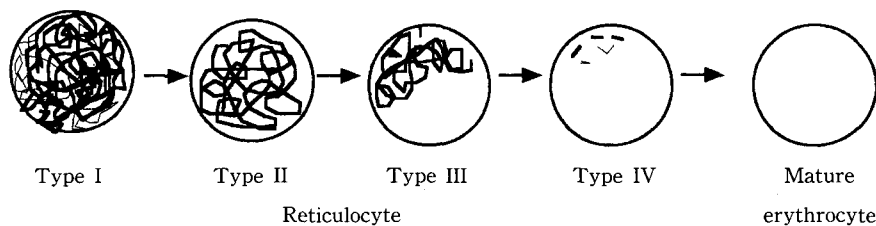


Fig. 5. The types of reticulocyte in erythropoiesis.

에 대해 *in vivo* 실험법으로써 뿐 아니라, 국제적으로도 International Harmonization이 이루어지고 있다.

IV. Transgenic Mutagenesis Assay

1. 서 론

Transgenic animal model은 자신의 genome내에 외부 유전자를 유입시켜 생체 내에서의 돌연변이를 감지할 수 있도록 제작되었으며 현재 mutation assay system으로 가장 많이 이용되고 있는 것은 Big Blue™ mouse (Stratagene)와 Mutamouse (Hazleton)이다. 이들 mouse model은 감지하기 편리하고 분석하기 용이한 *lac I* gene과 *lac Z* gene을 target으로 하는 lambda shuttle vector를 가지고 있어서 생체 내 여러 조직에서의 *in vivo* mutation 측정을 가능하게 해주며 각 compound의 target gene에서의 mutational spectrum을 밝혀주는 데 큰 역할을 하고 있다. 이처럼 target gene에서의 mutation에 따른 reporter gene 발현과 sequence analysis를 가능하게 해주는 transgenic mutagenesis assay는 질병에 관여하는 것으로 여겨지는 특정 gene의 변화와 *in vivo*에서의 효과는 물론 mutation, cancer 발생 mechanism을 이해할 수 있도록 하는 가장 진보된 독성평가기법 중의 하나라 할 수 있다.

2. 원 리

1) Transgenic animal & cell line의 제작

Transgenic animal은 자신의 genome에 외부 DNA fragment (transgenic vector)를 갖고 있다. Big Blue mouse는 lambda/*lacI* shuttle vector를 microinjection으로 integration시키는 기술에 의해 Stratagene사에서 개발되었다. Cell line의 경우도 크게 다르지 않다. 현재 개발된 transgenic cell line으로는 Big Blue cell line (Stratagene)이 있으며 이 cell line에는 Big Blue mouse에 삽입된 것과 동일한 vector가 포함되어 있다. 또한 pSV2Neo plasmid를 lambda shuttle vector와 함께 calcium phosphate cotransfection방법으로 cotransfect시켜 제작되었으며 세포 배양시 항생제 G418 (geneticin)을 이용하여

select 할 수 있다.

2) lambda shuttle vector & *lac I* gene

lambda/*lacI* shuttle vector(λ LIZ)는 size가 약 45.5kb이며 cos site가 있는 일종의 cosmid이다. 각 shuttle vector는 mutagenesis의 target으로 작용하는 *lac I* gene을 가지고 있다. *lac I* gene (약 1080 bp)은 Lac repressor protein을 coding하는 gene으로서, β -galactosidase을 coding하는 *lac Z* gene의 transcription을 억제하는 역할을 한다. 따라서 *lac I* gene에 mutation이 일어나면, β -galactosidase가 발현되어 X-gal 존재시 blue dye를 형성하게 된다. transgenic Big Blue mutation assays는 이러한 *lac I* gene과 *lac Z* gene의 특성에 원리를 두고 있다.

3) Assay & Detection system

시험물질을 여러 경로를 통해서 mouse에 투여하고 연구대상 조직으로부터 DNA를 분리한다. Cell line의 경우는 compound처리 후 cell을 harvest하여 DNA를 분리한다. 분리한 genomic DNA에 shuttle vector에 있는 cos site를 인지하여 이 부위를 절단하고 packaging시키는 transpack extract를 첨가하면 infectious phage particle이 형성된다. lambda head로 package된 phage는 α -complementation되는 host *E. coli*에 infection시키고 X-gal이 포함된 indicator agar 배지에 plating하면 일정시간 배양 후 mutant를 detect할 수 있게 된다.

Mutant frequency는 mutant인 blue plaque와 nonmutant인 colorless plaque의 총수와 blue plaque 수의 비율로 나타낸다.

3. 방 법

1) Test compound처리

(1) Animal

Test compound의 적절한 처리경로, 횟수, 투여량을 결정하고 다른 방법으로 연구되어 있는 조직, 노출경로에 근거하여 target tissue를 선택하고, 원하는 조직세포의 proliferation rate와 compound의 cytotoxicity를 고려하여 expression time을 결정한다.

(2) Big Blue rat cell line

10% fetal calf serum과 200 μ g/ml geneticin,

50 units/ml penicillin, 50 ug/ml streptomycin이 첨가된 DMEM 배지를 사용하고 37°C, 5% CO₂의 조건하의 incubator에서 매 3~4일마다 계대 배양한다. 예비실험을 거쳐 test compound의 농도를 결정한 후 cell이 30~40% confluency를 나타냈을 때 처리한다. 처리가 후 PBS로 washing하고 cell이 confluent하게 자랄 때까지 culture한다.

2) Genomic DNA isolation

Animal의 경우 test compound의 처리 후 DNA replication이 일어날 수 있는 충분한 시간을 둔 후 원하는 조직을 분리하여 DNA를 분리하고 cell line의 경우는 cell을 scraping하여 harvest 한 후 DNA isolation을 수행한다 (-70°C에서 일정기간 보관 가능하다). Genomic DNA isolation은 proteinase K digestion, phenol/chloroform extraction, ethanol precipitation을 차례로 진행하여 수행한다. 기존에 알려져 있는 여러 가지 방법이나 kit 사용을 통해 분리할 수 있다.

3) *in vitro* packaging & plating

분리한 DNA를 정량한 후 적정농도의 DNA를 transpack packaging extract (Stratagene)와 함께 incubation (30°C)하여 shuttle vector를 recovery한다. Packaging으로 인해 형성된 infectious phage stock을 SCS-8 *E. coli* host cell에 infection시키고 chromogenic substrate X-gal이 포함된 top agar를 cell-phage와 혼합하여 bottom agar (25×25 cm² assay tray)plate에 붓는다.

Top agar가 굳어지면 plate를 뒤집어 37°C incubator에서 incubation시킨다.

약 8시간이 지나면 plaque가 나타나기 시작하며, 16~24h 내에 plaque수를 세어 mutant frequency를 결정한다.

4) Lambda plaque의 분리

Plate에서 blue plaque를 picking한 후 plaque의 순수단독분리를 위해 replating을 실시한다.

Picking한 plaque를 SM buffer (chloroform 포함)로 현탁시킨 후 회석하여 host cell에 infection시키고 plating한다. 한 plate에 적정 수의

plaque가 생성되도록 하고 인접부위에 다른 plaque들이 없는 잘 분리된 mutant plaque의 top agar부분만을 분리해 낸다. TE buffer에 분리한 plaque를 첨가하고 boiling하여 phage DNA가 용출되도록 한다.

5) Mutant plaque의 DNA sequence analysis

분석하려는 *lac I* gene에 대한 primer와 잘 분리한 phage DNA를 template로 하여 PCR (polymerase chain reaction)를 실시한다. PCR 수행 후 product일부를 전기영동하여 반응이 제대로 되었는지 확인한 후 DNA를 purify하거나, phage로부터 직접 *lac I* gene을 excision, 분리하여 sequencing한다. 준비한 DNA를 sequence analysis한다. 최근에는 automated fluorescent DNA sequencer를 보편적으로 이용한다.

4. Transgenic mutagenesis assay system의 장점과 응용

Transgenic animal은 transgene의 존재가 생물학적으로 크게 영향을 주지 않으므로 nontransgenic mouse와 거의 동일한 반응을 나타낸다. 따라서 어떤 compound가 유도하는 target gene의 mutation 연구를 통해 endogenous gene에서의 현상을 알 수 있다. Chemical의 조직특이성을 알아낼 수 있으며 다른 여러 가지 endpoint와 더불어 평가할 수 있다(다른 *in vivo* 실험과 병행이 가능). 또한 germ cell을 사용할 경우 heritable effect를 예측할 수 있고, safety testing에 필요한 동물의 수를 줄이는 효과가 되므로 비용절감에도 기여한다. *lac I* gene을 target으로 한 경우 detection이 더욱 쉽고(background white 중에서 blue를 detect) 다른 target gene에 비하여 크기가 작으므로 분석이 용이한 장점이 있다. 또한 direct acting mutagen의 경우는 animal을 이용하지 않더라도 transgenic cell line을 사용하여 mutational spectrum을 규명하는 것이 가능하다. 이 system은 chemical의 effect를 mutational spectrum으로 밝힐 수 있으므로 chemical carcinogenesis에 관여하는 특정 gene의 역할의 이해를 가능하게 해준다.

무엇보다도 양적인 평가(MF)와 질적인 평가(mutational spectrum)가 동시에 빠르게 이루어

질 수 있다는 점에서 높게 평가되는 이 방법은 mutagenesis 연구 뿐 아니라 DNA repair, *in vivo* carcinogenicity 연구 등 다양한 독성학적 연구에 응용될 수 있고, 몇몇 유전독성 연구방법과 이 Transgenic system을 병용한 Battery test를 과학선진국에서 구상하고 있어, 실제 *in vivo* 발암성 시험시의 비용, 기간 등을 극복할 수 있는 유용한 tool로서 빠른시간내에 대체 발암성 시험법의 일환으로 자리매김 하리라 믿는다.

참 고 문 헌

- Anderson D., Yu T.-W., Phillips B.J. and Schmezer P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay, *Mutat. Res.*, 1994; 307: 261-271
- Applegate M.L., Moore M.M., Broder C.B., Burrell A., Juhn G., Kasweck K.L., Lin P.F., Wadhams A., and Hozier J.C. Molecular dissection of mutations at the heterozygous thymidine kinase locus in mouse lymphoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1990; 87: 51-55
- Betti C., Tania D., Liliana G., Nicola L. and Roberto B. Comparative studies by comet assay and SCE analysis in human lymphocytes from 200 healthy subjects, *Mutat. Res.*, 1995; 343: 201-207
- Betti C., Tania D., Liliana G., Nicola L. and Roberto B. Microgel electrophoresis assay (comet assay) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat. Res.*, 1994; 307: 323-333
- Carr G.J. and Gorelick N.J. Mutational spectrum in transgenic animal research: Data analysis and study design based upon the mutant or mutation frequency, *Environmental and Molecular Mutagenesis.*, 1996; 28: 405-413
- Clements J. Gene mutation assays in mammalian cells, In S. O'Hare and C.K. Atterwill (Ed.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 43: *in vitro* Toxicity Testing Protocols, Humana Press Inc., Totowa, NJ., 1990; 277-286
- Clive D., Caspary W., Kirkby P.E., Krehl R., Moore M., Mayo J., and Oberly T.J. Guide for performing the mouse lymphoma assay for mammalian cell mutagenicity, *Mutat. Res.*, 1987; 189: 145-156
- Collins A.R., Ma A.-G., Susan J.D., The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cell. *Mutat. Res.*, 1995; 336: 69-77
- Cook P.R., and Brazell I.A., Conformational constraints in nuclear, DNA, *J. Cell. Sci.*, 1976; 22: 287-302
- De Meo M., Laget M., Castegnaro M. and Dumenil G., Genotoxicity activity of potassium permanganate in acidic solutions *Mutat. Res.*, 1991; 260: 295-306
- Dycaico M.J., Provost G.S., Kretz P.L., Ransom S.L., Moors J.C. and Short J.M. The use of shuttle vectors for mutation analysis in transgenic mice and rats, *Mutation Res.*, 1994; 307: 461-478
- Exerson G.L., Bryant M.F., Kwanyuen P. and Kigerman A.D. Bleomycin sulfate-induced micronuclei in Human, rat and mouse peripheral blood lymphocytes, *Environ. Mol. Mutagen.*, 1995; 25: 31-36
- Fairbairn D.W., Olive P.L., Kim L. O'Neill., The comet assay : a comprehensive review, *Mutat. Res.*, 1995; 339: 37-59
- Gedik C.M., Ewen S.W.B. and Collins A.R., Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and it's repair in human cells, *Int J. Radiat.*, 1992; 62: 313-320
- Gorelick N.J. Overview of mutation assay in transgenic mice for routine testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis* 1995; 25: 218-230
- Gorelick N.J. Genotoxicity of trans-anethole *in vitro*, *Mutation Res.*, 1995; 326: 199-209
- Green M.H.L., Lowe J.E., Harcourt S.A., Akinluyi P., Rowe T., Cole J., Austey A.V. and Arlett C.F., UV-C sensitivity of unstimulated and human lymphocytes from normal and xerodermal pigmentosum donors in the comet assay: A potential diagnostic technique. *Mutat. Res.*, 1992; 272: 137-144
- Hartmann A., Herkommer K., Michael G. and Gunter S., 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.*, 1995; 25: 180-187
19. Hayashi M., Hashimoto S., Sakamoto Y., Hamada C., Sofuni T., and Yoshimura I. Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, *Environ. Health perspect.*, 1994; 102(1): 49-52
 20. Hayashi M., Morita T., Kodama Y., Sofuni T., and Ishidate M. Jr. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutat. Res.*, 1990; 245: 245-249
 21. Hayashi M., Sofuni T. The micro-nucleus assay with rodent peripheral blood and acridine orange supravital staining. In *Chromosomal alterations* (edited by G. Obe and A.T. Natarajan), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1994; 203-213
 22. Hayashi M., Tice R.R., MacGregor J.T., Anderson D., Blakey D.H., Kirsh-Volders M., Oleson F.B.Jr, Pacchierotti F., Romagna F., Shimada H., Sutou S., and Vannier B. *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, *Mutat. Res.*, 1994; 312: 293-304
 23. Hellman B., Vaghef H., Bostrom B., The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay, *Mutat. Res.*, 1995; 336: 123-131
 24. Heo M.Y. and Ryu J.C. The micronucleus formation in peripheral blood of mitomycin C-treated mice using supravital staining with acridine orange, *Environ. Mutagens & Carcinogens.*, 1996; 16: 24-29
 25. Iwakura K., Tamura H., Matsumoto A., Ajimi S., Ogura A., Kakimoto K., Matsumoto T. and Hayashi M. The micronucleus assay with peripheral blood reticulocytes by acridine orange supravital staining with 1- β -D-arabinofuranosylcytosine, *Mutat. Res.*, 1992; 278: 131-137
 26. Kleimen N.J. and Abraham S., DNA single strand breaks in human lens epithelial cells from patients with cataract. *Current Eye Res.*, 1993; 12(5): 423-431
 27. Lotti M. Mechanism of toxicity and risk assessment, *Transgenic models for detection of mutation in tumors and normal tissues of rodents*, *Toxicology letters.*, 1995; 82/83: 131-134
 28. Lundberg K.S., Kretz P.L., Provost G.S. and Short J.M. The use of selection in recovery of transgenic targets for mutation analysis, *Mutation Res.*, 1993; 301: 99-105
 29. MacGregor J.T., Wehr C.M., and Gould D.H. Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test. *Environ Mutagen.*, 1980; 2: 509-514
 30. Mavournin K.H., Blakey D.H., Cimino M.C., Salamone M.F., and Heddle J.A. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report the U.S. environmental protection agency gene-Tox program, *Mutat Res.*, 1990; 239: 29-80
 31. Mckelvey-Martin V.J., Green M.H.L., Schemezer P., Pool-Zobel B.L., De Meo M.P. and Collins A., The single gel electrophoresis assay (Comet assay): A european review. *Mutat. Res.*, 1993; 288: 47-63
 32. Moore M.M., Clive D., Hozier J.C., Howard B.E., Batson A.G., Turner N.T., and Sawyer J. Analysis of TFTr mutants of L5178Y/TK⁺ mouse lymphoma cells, *Mutat. Res.*, 1985; 151: 161-174
 33. Muller W.U., Bauch T., Streffer C., Niedereichholz F. and Bocker W., Comet assay studies of radiation-induced DNA damage and repair in various tumor cell lines. *Radiat. Res.*, 1994; 65(3): 315-319
 34. Olive P.L., Banath J.P. and Fjell C.D., DNA strand breakage and DNA structure influence staining with propidium iodide using the alkaline comet assay, *Cytometry.*, 1994; 16: 305-312
 35. Olive P.L., Garnet F. and Judit P.B., Radiation-induced apoptosis measured in Tk6 Human B lymphocytes cells using the comet assay, *Radiat. Res.*, 1993; 136: 130-136
 36. Pandrang R., Peters M., Ralph S. and Vrzoc M., Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using Bullheads and carp, *Environ. & mol. Mutagen.*, 1995; 26: 345-356
 37. Piegorch W.P., Margolin B.H. *et al.* Study design and sample sizes for a *lac I* transgenic mouse mutation assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis.*, 1995; 25: 231-245
 38. Provost G.S., Kretz P.L., Hammer R.T., Matthews C.D., Rogers B.J., Lundberg K.S.,

- Dycaico M.J. and Short J.M. Transgenic systems for *in vivo* mutation analysis. *Mutation Res.*, 1993; 288: 133-149
39. Ralph S., Peters M., Pandrang R., and Vrzoc M., Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using two species of tadpoles, *Environ. & mol. Mutagen.*, 1996; 28: 112-120
40. Robinson W.D., Green M.H.L., Cole J., Garner R.C., Healy M.J., and Gatehouse D. Statistical evaluation of bacterial/mammalian fluctuation tests, in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data* (Kirkland, D.J., ed.), Cambridge University Press, Cambridge, UK., 1990; 102-140
41. Ryu J.C., Kim K.R., Kim H.J., Ryu E.K., Lee S.Y., Jung S.O., Youn J.Y., Kim M.H. and Kwon O.S. Evaluation of the genetic toxicity of synthetic chemicals (II), a pyrethroid insecticide, fenpropathrin, *Arch. Pharm. Res.*, 1996; 19(4): 251-257
42. Schmid W. The micronucleus test, *Mutat. Res.*, 1975; 31: 9-15
43. Singh N.P., Danner D.B., Raymond R.T., Brant L. and Schneider E.L., DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes., 1990; 237: 123-130
44. Singh N.P., McCoy T. Michael, Raymond R. T. and Schneider E.L., A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.*, 1988; 175: 184-191
45. Singh N.P., Stephens R.E. and Schneider E. L., Modification of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage, *Int. J. Radiat. Biol.*, 1994; 66(1): 23-28
46. Sisk S.C., Pluta L.J., Bond J.A., and Reico L. R. Molecular analysis of *lac I* mutant from bone marrow of B6C3F1 transgenic mice following inhalation exposure to 1, 3-butadiene, *Carcinogenesis.*, 1994; 15: 471-477
47. Sofuni T., Suzuki T., Hayashi M. Initial consideration for use of transgenic mutation in a regulatory submission, *Environmental and Molecular Mutagenesis.*, 1996; 28: 443-446
48. Suzuki T., Hayashi M., Hakura A., Asita A. O., Kodama Y., Honma M. and Sofuni T. Combination effects of clastogens in the mouse peripheral blood micronucleus assay, *Mutagenesis.*, 1995; (10)1: 31-36
49. Suzuki T., Hayashi M., Sofuni T., and Myhr B.C. The concomitant detection of gene mutation and micronucleus induction by mitomycin C *in vivo* using *lac Z* transgenic mice, *Mutat. Res.*, 1993; 285: 219-224
50. Tao K.S., Urlando C. and Heddle J.A. Comparison of somatic mutation in a transgenic versus host locus, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1993; USA 90: 10681-10685
51. Testoni M.I., Nestor O.B. and Martha S.B., The kinetics of chromosome and DNA damage by streptonigrin in CHO cells. *Mutat. Res.*, 1995; 334: 23-31
52. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS, *Mutat. Res.*, 1992; 278: 83-98
53. Toyokuni S., Sagripanti J.L., Hitchins V.M. Cytotoxic and mutagenic effects of ferric nitrioltriacetate on L5178Y mouse lymphoma cells, *Cancer Lett.*, 1995; 88(2): 157-162
54. Wyborski D.L., Malkhosyan S., Moores J., Perucho M. and Short J.M. Development of a rat cell line containing stably integrated copies of a lambda/*lac I* shuttle vector, *Mutation Res.*, 1995; 334: 161-165