

- 단 보 -

Pyrene과 Benzo(a)pyrene에 노출된 굴의 혈구세포와 아가미 세포에서의 DNA 손상 측정을 위한 Comet assay의 이용

김기범* · 배세진¹

경상대학교 해양환경공학과, 해양산업연구소
¹한국해양연구원 생태환경연구본부

Use of the Comet Assay to Assess DNA Damage in Hemocytes and Gill of Oyster(*Crassostrea gigas*) Exposed to Pyrene and Benzo(a)pyrene

Gi Beum Kim* and Se Jin Pae¹

Dept. of Marine Environmental Engineering, Institute of Marine Industry,
Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea
¹Eco-Environment Research Laboratory, KORDI, Seoul 425-600, Korea

Sessile organisms such as the oyster *Crassostrea gigas* have been given much attention as a potential biomonitoring indicator to assess the impact of toxicants on aquatic organism. In this study, we exposed cells isolated from gill of oyster (*Crassostrea gigas*) to hydrogen peroxide *in vitro*. In addition oysters were *in vivo* exposed to pyrene and benzo(a)pyrene at various concentrations for 2 weeks. Comet assay was used to detect DNA single strand breaks and to investigate the application of this technique as a tool for aquatic biomonitoring. Hydrogen peroxide increased DNA single strand break with increasing concentration after 30 minutes exposure *in vitro*. Pyrene and benzo(a)pyrene caused DNA damage only at very high concentration (100 µg/L or 1000 µg/L) at two week exposure *in vivo*. DNA damage was relatively higher at hemocyte than at gill. It suggested that metabolized PAHs are transferred to hemolymph from digestive gland which have a relatively high enzyme activity, and attacked the DNA of hemocyte, while gill accumulated PAHs without degrading them to their metabolites due to low enzyme activity at gill. Both *in vitro* and *in vivo* exposure experiments showed that the comet assay is an effective tool on screening whether the organism are exposed to genotoxic contaminants.

Keywords: DNA damage, Comet assay, Oyster, *Crassostrea gigas*, Hemocyte, Gill, Benzo(a)pyrene, Pyrene

서 론

양식종들의 성장과 생존율에 영향을 미치는 요인으로 수온 및 염분과 같은 자연환경 변화뿐만 아니라(Ryan, 1995; Chang et al., 2002), 유기주석화합물(TBT) 및 다핵성 방향족 탄화수소 화합물(polynuclear aromatic hydrocarbons; PAHs)등의 유해오염물질 또한 큰 영향을 일으킬 수 있다. 특히 PAHs는 산업폐수 및 생활하수, 자연발생적인 산불이나 산업시설내 소각, 유류 및 유류생산품의 유출 등으로 인해 자연환경에 유입되어 여러 생물에 축적된다. 이들 화합물은 국내 육상의 토양(Nam et al., 2003)뿐 아니라, 해양(Kim et al., 1999b; Moon et al., 2001)에서도 검출되어 많은 관심을 가지고 현재 활발한 연구가 진행되고 있다. 굴을 비롯한 여러 이매패류는 PAHs와 같이 해양환경

에 유입된 여러 오염물질을 체내에 높은 농도로 농축하는 고착성 생물로(Farrington and Quinn, 1973), 여러 연구자들에 의해 오염물질의 환경모니터링에 꾸준히 이용되어 왔다(Farrington et al., 1983, Jackson et al., 1994). 생물들의 체내에 PAHs와 같은 유해독성물질이 축적될 때 세포내 소기관 중에서 DNA가 이들 오염물질들의 중요한 표적 기관이 될 수 있고, 이러한 유해물질에 의한 DNA 구조 변형은 DNA에서 mRNA로의 전사를 불완전하게 하여 결국 효소활동저해 등의 많은 대사기능 저하를 일으킨다(Kurelec, 1993). 이에 DNA 가닥 손상(strand breakage)의 정도가 오염물질의 유전독성유무와 환경모니터링을 위한 환경생체지표(biomarker)로서의 사용이 가능하다고 제안된 바 있다(Shugart, 1990).

각각의 세포에서 DNA손상을 시각적으로 형상화하여 보여주는 미세전기영동분석법을 이용한 Östling and Johanson(1984)의 방법을 개량한 comet assay는 분열중인 상태에서의 세포들

*Corresponding author: kgb@nongae.gsnu.ac.kr

이 필요 없기 때문에 염색체이상(chromosomal aberrations), 자매염색체교환(sister chromatid exchange) 그리고 소핵실험(micronucleus test)과 같은 기존의 DNA 손상 측정법에 비해 세포주기에 관계없이 이용될 수 있는 장점이 있다. 또한 핵을 가진 세포라면 어떤 세포에도 적용할 수 있으며, 약 10⁴개의 세포만 있으면 결과를 산출할 수 있어 *in vitro* 실험 뿐만 아니라, *in vivo* 실험에서도 실험생물을 죽이지 않고 실험할 수 있는 장점도 있다. 또한 1Gy를 노출시켰을 때 단일가닥 손상은 600~1000개 정도 나타나는 반면, 이중가닥 손상은 16~40개 정도만 나타나는 것으로 알려져 있으며(Ward, 1988), 실제 0.1Gy 정도의 노출에 의한 DNA 단일가닥 손상도 comet assay에 의해 검출이 가능하다고 보고되었다(Kim et al., 1999a).

이러한 장점으로 인해 comet assay는 1990년대 초반부터 생물학 분야(prenatal diagnosis, DNA repair deficiency syndrome, cancer susceptibility, cancer therapy, diabetes mellitus, rheumatoid arthritis 등)에도 응용, 이용되고 있으며, 최근에는 그 응용범위가 넓어져 해양환경학 등에서도 폭 넓게 이용되고 있다(Lee and Steinert, 2003).

1990년대 후반 comet assay가 국내에 도입되어 방사선에 노출된 식품의 선별방법으로 이용하기 시작하였으며(Jeong et al., 2000; Lee et al., 2001), 수산분야에 적용된 연구로는 어류 혈구세포에서의 DNA 손상 측정을 위해 comet assay를 적용한 Kim et al.(2003b)의 연구가 유일하다. 또한 국내의 대표적 양식굴(*C. gigas*)에 대해서는 아직 연구된 예가 없다.

그러므로 국내 양식생물의 유전독성물질에의 노출 유무를 알아보기 위한 방법으로 DNA 손상 측정법(comet assay)을 이용하기 위한 예비실험 단계로서 실험실에서 굴을 과산화수소와 PAHs에 노출시켜 DNA 손상을 유도하였다. 실험의 정확성을 알아보기 위하여 과산화수소에 굴의 아가미조직에서 분리된 세포를 *in vitro*로 30 분간 노출시켰다. 그리고 이때패류에 고농도로 축적되는 PAHs 화합물 중에서 대표적 발암물질로 규정된 pyrene과 benzo(a)pyrene에 굴을 *in vivo* 노출시킨 후 comet assay를 통해 DNA 손상의 검출가능 여부에 대해 알아보려 하였다.

재료 및 방법

굴의 구입 및 사육

통영 주변 굴 양식장에서 굴(길이 38-44 mm, 무게 7.6-10.4 g)을 공급받아 한 개씩 분리한 후 해수로 깨끗이 세척한 후 40L 수조 당 10 마리씩 넣어 12L/12D조건으로 사육하였다. 실험기간동안 계속적으로 폭기시켰으며, 먹이생물로는 *Pavlova*, *Isochrysis* 그리고 *Nanochloris*를 해양연구원으로부터 공급받아 5×10⁴ cells/ml가 되도록 하루 한차례씩 공급하였다.

in vitro 실험

실험실내에서 3일 정도 순응을 시킨 후, 굴(n=10)에서 아가

미조직을 취해서 phosphate buffer solution으로 씻어준 다음 5 mM EGTA가 첨가된 Earl's salt solution 50 ml에 담았다. 가위로 잘게 조각을 낸 다음 30분간 200 rpm으로 흔들어서 주었다. 그 다음 내용물을 280 μm mesh silk에 부어서 걸러진 고형물 질만 원심분리관에 담았다. 고형물에 Hank's balanced salt solution(HBSS; 5 mM HEPES와 0.16 mg/ml collagenase 포함)을 넣은 후 45분간 200 rpm으로 흔들어서 주며 배양하였다. 배양 후 세포의 부유물질을 다시 280 μm mesh silk에 걸러서 HBSS(5 mM HEPES 포함)을 넣어 1500 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 이 과정을 3회 반복하여 시행하였다. 마지막 원심분리 후 L-Glutamine이 첨가된 Minimum essential media 용액으로 재부유시켜 원하는 세포를 얻었다. 이렇게 얻어진 세포를 과산화수소에 10, 100, 1000 μM 농도로 30분간 노출시켰다.

in vivo 실험

실험실내에서 3일 정도 순응시킨 후, 40L 수조 당 10 마리씩 넣어 12L/12D조건으로 사육하였다. Pyrene에 1, 10, 100, 1000 μg/L로 노출시켰으며, Benzo(a)pyrene에는 0.1, 1, 10, 100 μg/L로 노출시켰다. 이 때 아무 것도 첨가하지 않은 대조구에 대한 실험을 동시에 병행하였다. 1 주일에 두 번씩 해수를 갈아주었으며, 수조에서의 pH는 실험기간동안 7.9에서 8.1 범위 내에 있었으며, 수온은 날씨가 따뜻해짐에 따라 14°C에서 18°C로 상승하였다. 2주간 노출실험 동안에는 어느 수조에서도 치사가 일어나지 않았다. 2주간 노출이 끝난 후 각 수조에서 2 마리씩 꺼내어 아가미와 혈액을 소량 채취하여 comet assay를 시행하였다. 혈액의 경우 패각에 뚫은 구멍을 통해 주사기(25G)를 이용하여 혈액을 채집하였다.

Comet assay

Singh et al.(1988)의 분석법을 따랐으며 약간의 수정을 가하였다. 대략적인 분석절차를 Fig. 1에 나타냈다. 원심분리용 튜브에 HBSS 1 ml를 넣었다. 아가미조직의 경우 tissue grinder로 분쇄한 후 분리되어진 세포를 원심분리하여 가라앉힌 후 사용하였으며, 혈액은 25G 주사기로 채집 후 바로 사용하였다. 원심분리를 통해 분리되어진 세포들을 0.6% low-melting agarose gel(LMA) 30 μl로 재부유시킨 후 미리 1.5% normal-melting agarose gel로 코팅되어진 슬라이드에 놓고 커버글라스를 덮었다. 3분간 슬라이드를 얼음 위에서 응고시킨 후 다시 한번 0.6% LMA로 코팅하여 다시 3분간 얼음 위에서 응고시켰다. 응고시킨 슬라이드는 커버글라스를 제거한 후 lysis buffer solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 10% dimethyl sulfoxide, 1% Triton X-100)이 담긴 coplin jar에 넣고 2 시간 이상 냉장 보관하였다. 그 후, 4°C 증류수가 담긴 coplin jar에 슬라이드를 2분 간격으로 3번 옮기면서 염을 제거하였다. DNA unwinding buffer solution(300 mM NaOH, 1 mM EDTA, >pH 13)을 넣은 4번째 coplin jar에 슬라이드를 15분간 냉장 보관하

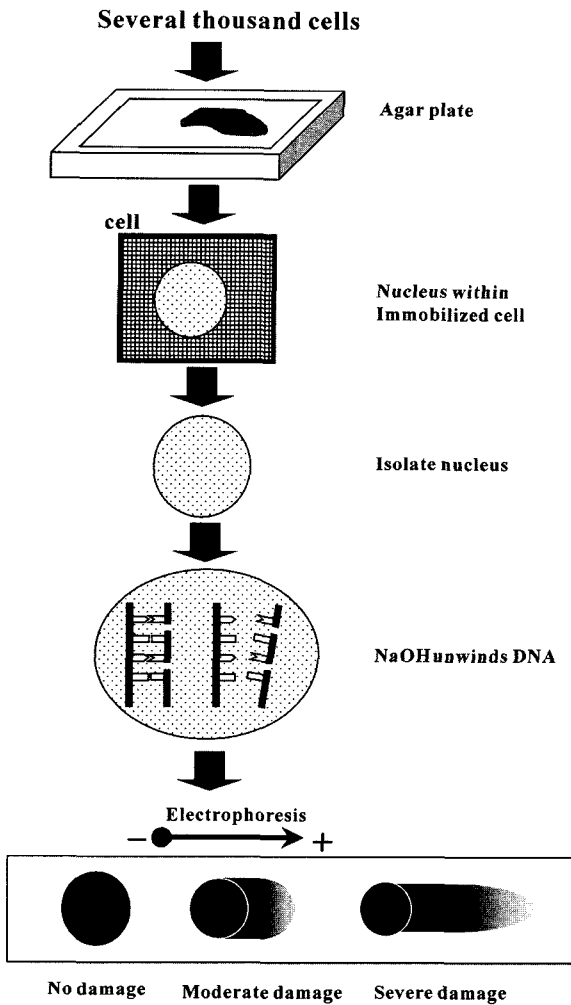


Fig. 1. Procedure for comet assay.

였다. 이 때 DNA 이중가닥은 단일가닥으로 풀어진다. 그 다음 슬라이드를 동일한 DNA unwinding buffer solution로 채워진 전기영동기에 넣고 25분간 25 V, 300 mA에서 전기영동을 실시하였다. 이 때 잘게 부서진 DNA 단일가닥은 (+)극으로 이동하게 된다. 전기 영동한 슬라이드를 중성화시키기 위하여 0.4 M Tris 용액(pH 7.5)에 3회 2분 간격으로 세척하였다. 마지막 tris 용액에서 꺼낸 슬라이드를 찬 에탄올이 담긴 coplin jar에 5분간 담궈둔 후 실온에서 건조시켰다. 건조된 슬라이드는 Ethidium Bromide 용액(20 µg/ml)으로 염색시켜 형광현미경(Nikon Eclipse E200)으로 200배 배율에서 관찰하였다. 염색되어진 DNA의 영상을 CCD카메라를 통해 컴퓨터로 불러들인 후, 이미지 자동분석 소프트웨어(Komet version 5, Kinet Imaging Ltd)로 DNA tail moment(부서진 DNA 꼬리의 길이(µm)×꼬리부분에 있는 DNA(%))를 계산하였다. 각 슬라이드 당 50개의 핵을 분석하였으며, 이로부터 평균과 표준오차를 구하였다. 대조구와 처리구와의 차이는 student t-test를 통하여 산출하였으며, 유의수준(p)은 0.05를 기준으로 하였다.

결과 및 논의

in vitro 노출

DNA 손상을 본 연구실에서 제대로 측정할 수 있는지를 확인하기 위하여 과산화수소수 0, 10, 100, 1000 µM 농도에서 in vitro로 30 분간 굴의 아가미 조직에서 분리된 세포를 노출시켰다. 과산화수소수 노출농도의 증가에 따라 DNA 단일가닥의 손상이 증가하는 것을 보여주었다(Fig. 2). 본 연구의 노출실험에서는 최대 농도인 1000 µM에 이를 때까지 DNA의 단일가닥 손상이 증가하는 것으로 나타났다. in vitro 노출실험에 사용되어진 과산화수소수는 Fenton 반응을 통하여 hydroxyl radical (·OH)로 변화된 후 DNA의 염기에 직접 반응하여 구조를 변화시킨다(Halliwell and Aruma, 1991). 어류 및 이매패류에 있어서 DNA 손상을 측정할 때의 민감도 및 재현성을 알아보기 위하여 in vitro 실험에 과산화수소수는 자주 사용되어져 왔다(Nacci et al., 1996; Mitchelmore and Chipman, 1998). Wilson et al.(1998)과 Mitchelmore et al.(1998a)의 연구에 의하면 과산화수소수의 노출농도가 500 µM 수준에서 DNA 손상이 거의 최대값을 보여 더 이상 증가하지 않는 것으로 보고하였으나, 본 연구에서는 1000 µM까지 농도에 비례하여 DNA 손상이 증가하였다. Steinert(1996)는 구리에 노출된 조개에서 괴사(apoptosis, programmed cell death)가 많이 유도되었으며, 이로 인해 DNA 손상이 크게 나타날 수도 있다고 보고하였다. 본 연구에서도 가장 고농도인 1000 µM에서는 괴사가 많이 발생하여 높은 DNA 손상수치를 나타내었을 가능성도 배제할 수는 없다. 한편 Wilson et al.(1998)은 과산화수소에 in vivo로 담치(Mytilus edulis)를 노출시켰을 때에는 in vitro 노출보다 훨씬 더 낮은 DNA 손상수치를 보여주었다. 이로부터 같은 물질이라도 in vitro 노출실험이 in vivo 노출실험에 비해 낮은 농도에서 더 높은 DNA 손상을 유도하는 것을 보여주었다.

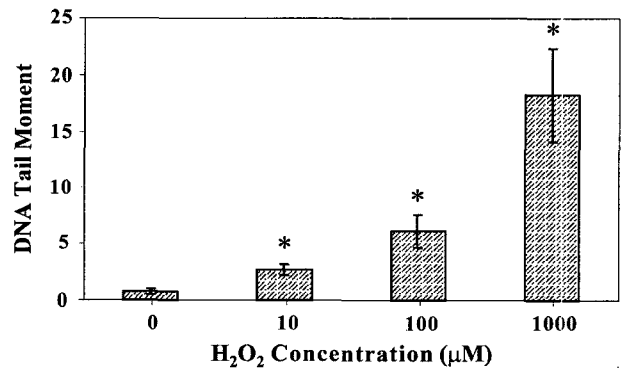


Fig. 2. Results of the comet assay expressed in terms of the tail moment of DNA in the comet tail in oyster gill cell suspensions exposed in vitro to hydrogen peroxide with the range from 0 to 1000 µM. Results are expressed as mean ± standard error (n=50, counted cells per slide). “*” means P<0.05.

in vivo 노출

생물체내에 축적되어진 PAHs는 효소에 의해 반응성이 큰 중간생성물로 대사되어진 후 DNA adduct를 형성하거나 직접 DNA 가닥을 파괴하기도 한다(Imlay and Linn, 1988). DNA에 결합되어진 DNA adduct 또한 불안정하여 alkali-labile abasic site로 변환 후 DNA 가닥을 절단하기도 한다(Phillips, 1983). 본 연구에서 pyrene은 최고 1000 µg/L까지 노출시켰으며, benzo(a)pyrene은 pyrene에 비해 상대적으로 낮은 용해도를 가지기에 (ATSDR, 1995) 최고 100 µg/L까지 노출시켰다. 2주간 노출 후, 노출농도에 따른 굴 아가미 조직에서의 DNA 손상정도를 Fig. 3에 나타내었다. 100 µg/L의 pyrene과 benzo(a)pyrene은 각각 평균 2.2(±0.95, 표준오차)와 2.8(±0.81)의 tail moment를 보여 비슷한 DNA 손상을 유도한 것으로 보였다. 하지만 대조구보다 통계적으로 유의하게 (p<0.05) 높은 DNA 손상을 유도한 처리구는 pyrene 1000 µg/L(5 µM)와 benzo(a)pyrene 100 µg/L뿐이었다. 다른 연구자들의 *in vitro* 실험에서는 benzo(a)pyrene을 5~200 µM의 상당히 높은 농도로 만들어 노출시켜 DNA 손상을 유도하였으나(Mitchelmore and Chipman, 1998; Mitchelmore et al., 1998a, 1998b), 본 연구에서는 *in vitro*보다 약간 감도가 떨어지는 것으로 알려진 *in vivo* 실험이기 때문에 10 µg/L(0.04 µM) 이하의 농도에서 DNA 손상이 유도되지 않은 것으로 판단되었다.

Fig. 4는 굴 혈구세포에서의 DNA 손상정도와 노출농도와의

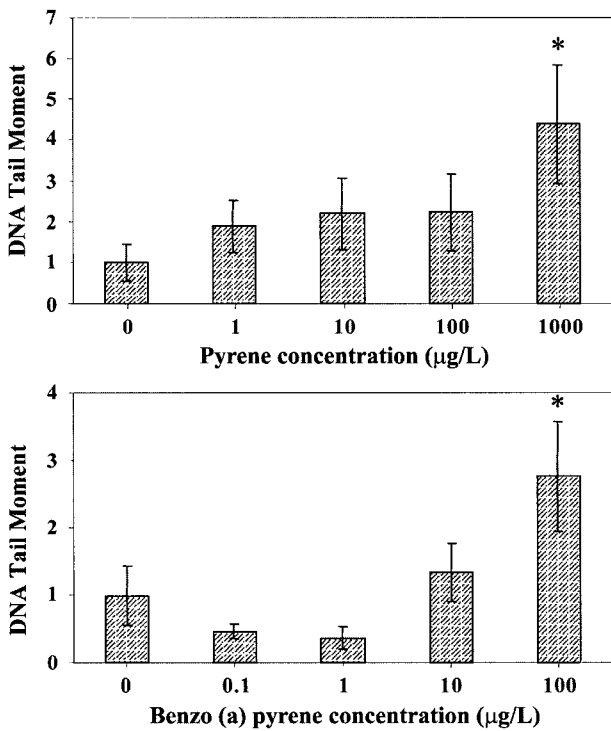


Fig. 3. Results of the comet assay expressed in terms of the tail moment of DNA in the comet tail in gill cell suspensions isolated from oysters exposed *in vivo* to pyrene (0 to 1000 µg/L) and benzo(a)pyrene (0 to 100 µg/L). Results are expressed as mean±standard error (n=50, number of counted cells per slide). “*” means P<0.05.

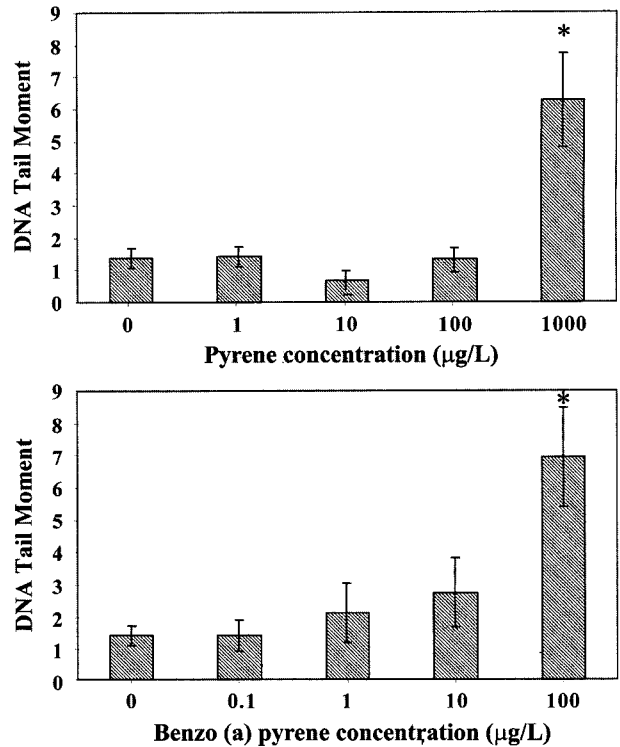


Fig. 4. Results of the comet assay expressed in terms of the tail moment of DNA in the comet tail in hemolymph isolated from oysters exposed *in vivo* to pyrene (0 to 1000 µg/L) and benzo(a)pyrene (0 to 100 µg/L). Results are expressed as mean±standard error (n=50, number of counted cells per slide). “*” means P<0.05.

상관관계를 보여준다. Pyrene과 benzo(a)pyrene의 최대 노출농도(각각 1000과 100 µg/L)에서의 혈구세포 DNA 손상정도는 아가미에서의 DNA 손상정도보다 높게 나타났다. Mitchelmore et al.(1998a)는 benzo(a)pyrene이 quinone, phenol 혹은 diol형태로 대사되는 것을 방해하는 물질을 benzo(a)pyrene 동시에 투여했을 때에는 benzo(a)pyrene 단독으로 투여했을 때보다 최대 94% 만큼이나 DNA 손상을 적게 유도한다고 하였다. 즉, benzo(a)pyrene이 대사되지 않은 채로 아가미에서와 같이 체내로 축적될 경우 DNA 손상이 많이 유도되지 않을 수도 있음을 보여준다. 그러므로 아가미조직은 일반적으로 소화기관과 같은 다른 조직에 비해 P450 계통의 효소활동도가 낮은 것으로 알려져 PAH를 분해하지 못한 채 축적되어 DNA 구조에는 영향을 주지 않은 반면, 혈구세포는 높은 효소활동도를 지닌 소화관에서 P450 계통의 효소에 의해 분해되어진 PAH 대사산물이 혈청 속의 단백질과 결합하여 혈액 속으로 스며들어 혈구세포의 DNA에 많은 손상을 일으킨 것으로 판단된다. 하지만 본 연구와는 다르게 오염된 퇴적물에 노출된 Manila 조개(*Tapes semidecussatus*)의 경우 혈구세포에서 가장 낮은, 그리고 아가미조직에서 가장 높은 DNA 손상이 관찰되었다는 연구도 보고된 바 있으므로(Coughlan et al., 2002), 이에 대한 보다 면밀한 연구가 요구된다.

한편 Fournier et al.(2002)는 PAHs와 유기염소계화합물로 오염된 퇴적물에 이매패류(*Mya arenaria*와 *Mactromeris polynyma*)를 노출하였을 때 그리고 Anderson et al.(1997)은 굴(*C. virginica*)에 고농도의 유기주석화합물을 *in vitro*로 노출하였을 때 모두 면역기능이 저하하였다고 보고하였다. 패류의 혈액이 면역기능 뿐만 아니라, 상처 회복, 폐각 복원, 영양성분의 소화와 운반 등의 중요한 역할을 수행하는 것을 고려한다면 PAHs에 의한 혈구세포의 DNA 손상은 생물의 면역기능을 저하시킬 가능성도 배제할 수 없으므로, 앞으로 이에 대한 보다 많은 연구가 필요한 것으로 생각된다.

본 *in vivo* 실험에 의하면 자연환경보다도 훨씬 높은 농도(100~1000 µg/L)에 노출되었을 때에만 DNA 손상이 유도되어 실제 환경에서 수십에서 수백 ng/L 농도수준으로 존재하는 PAHs에 의한 DNA 손상은 없을 것으로 예상될 수가 있다. 그러나 오염된 퇴적물에 노출되어지거나, 오염지역에서 채취된 이매패류에서 대조지역보다 훨씬 높은 DNA 손상이 검출되는 것(Hamoutene et al., 2002; Large et al., 2002)으로부터 단순한 PAHs의 축적에 의한 것이 아닌 다른 요인이 있을 것으로 사료된다. 그러한 요인들 중 대표적인 것으로 자외선을 들 수 있다. PAHs는 자외선과 함께 노출될 때 훨씬 높은 독성을 보이는 것으로 알려져 있으며(Arfsten et al., 1996), 본 연구에 사용되어진 것과 동일한 종에도 pyrene과 benzo(a)pyrene은 자외선과 함께 노출될 때 배아단계에서 훨씬 높은 치사율을 보였다(Lyons et al., 2002). Lee and Kim(2002)은 pyrene 단독으로 노출시켰을 때보다 pyrene을 자외선과 함께 새우에 노출시켰을 때 훨씬 높은 DNA 단일가닥 손상을 일으켰다고 보고하였다. 그러므로 앞으로 PAHs와 자외선을 실험생물에 동시에 노출시켰을 때의 DNA손상에 있어서 상승효과를 알아보기 위한 실험이 필요할 것으로 생각된다.

결 론

PAHs 화합물 중에서 대표적 발암물질로 규정된 pyrene과 benzo(a)pyrene을 굴에 *in vivo*로 노출시킨 후, 굴의 아가미 조직과 혈구세포로부터 세포를 추출하여 comet assay를 통해 DNA 손상을 측정하였다. 실험의 정확성을 확인하기 위해 과산화수소수를 *in vitro* 노출시켰으며, 그 결과 노출농도에 비례하는 DNA 손상이 관찰되었다. *in vivo* 실험에서는 최대 노출농도(pyrene 1000 µg/L, benzo(a)pyrene 100 µg/L)에서 아가미세포와 혈구세포 모두에서 대조구와는 유의하게 높은 DNA 손상이 관찰되었다. 혈구세포보다 아가미조직에서 상대적으로 낮은 DNA 손상유도는 아가미조직에서의 낮은 효소활성에 의해 PAHs가 대사되지 않고 그대로 축적되어 DNA 구조에는 영향을 주지 않았기 때문으로 사료되었다. 또한 아가미세포에 비해 혈구세포에서 보다 높은 DNA 손상이 유도되어 PAHs에 의한 생물의 면역기능에 심각한 영향이 생길 수도 있다는 가능성을 제시

해 주었다. 본 연구를 통해 과산화수소수와 PAHs에 의한 굴의 DNA 손상이 comet assay에 의해 검출되었으며, 실제 해양환경에서 채취된 양식굴(*C. gigas*)에 있어서도 DNA 손상의 측정에 comet assay가 이용될 수 있음을 처음으로 보여주었다.

사 의

본 연구를 위해 굴의 먹이생물을 공급하여 주신 한국해양연구원원의 최진우 박사님께 감사드립니다. 이 논문은 2001년도 한국학술진흥재단의 지원(KRF-2001-003-H00007)에 의하여 연구되었습니다.

참고문헌

- Anderson R. S., L. L. Brubacher, L. M. R. Calvo, E. M. Bureson and M. A. Unger, 1997. Effect of *in vitro* exposure to tributyltin on generation of oxygen metabolites by oyster hemocytes. *Environ., Res.*, **74**: 84-90.
- Arfsten A. P., D. J. Schaeffer and D. C. Mulveny, 1996. The effects of near ultraviolet radiation on the toxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in animals and plants: A review. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **33**: 1-24.
- ATSDR(Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 1995. Toxicological profile polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs). Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S.
- Chang Y. J., J. W. Hur and P. Chin, 2002. Hematological characteristics of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) in culture farm influenced by heated effluent water from a power plant in summer. *J. Aquaculture*, **15**: 267-273(in Korean).
- Coughlan B. M., M. G. J. Hartl, S. J. O'Reilly, D. Sheehan, C. Morthersill, F. N. A. M. van Pelt, J. O'Halloran and N. M. O'Brien, 2002. Detecting genotoxicity using the comet assay following chronic exposure of Manila clam *Tapes semidecussatus* to polluted estuarine sediments. *Mar. Pollut. Bull.*, **44**: 1359-1365.
- Farrington J. W., E. D. Goldberg, R. W. Risebrough, J. H. Martin and V. T. Bowen, 1983. US Mussel Watch 1976-1978: An overview of the trace metal, DDE, PCB, hydrocarbon and artificial radionuclide data. *Environ. Sci. Technol.*, **17**: 490-496.
- Farrington J. W. and J. G. Quinn, 1973. Petroleum hydrocarbons in Narragansett Bay. I. Survey of hydrocarbons in sediments and clams (*Mercenaria mercenaria*). *Estuar. Coast. Mar. Sci.*, **1**: 71-79.
- Fournier M., J. Pellerin, M. Lebeuf, P. Brousseau, Y. Morin and D. Cyr, 2002. Effects of exposure of *Mya arenaria* and *Mactromeris polynyma* to contaminated marine sediments on phagocytic activity of hemocytes. *Aquat. Toxicol.*, **59**: 83-92.
- Halliwell B. and O. I. Aruma, 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian system. *FEBS Lett.*, **281**: 9-19.
- Hamoutene D., J. F. Payne, A. Rahimtula and K. Lee, 2002. Use

- of the Comet assay to assess DNA damage in hemocytes and digestive gland cells of mussels and clams exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbons. *Mar. Environ. Res.*, **54**: 471–474.
- Imlay J. A. and S. Linn, 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, **240**: 1302–1309.
- Jackson T. J., T. L. Wade, T. J. McDonald, D. L. Wilkinson and J. M. Brooks, 1994. Polynuclear aromatic hydrocarbon contaminants in oysters from the Gulf of Mexico. *Environ. Pollut.*, **83**: 291–298.
- Jeong S. K., J. H. Park, S. T. Ji, K. J. Park, H. H. Kim, C. K. Hyun and H. K. Shin, 2000. Discrimination of irradiated beef using comet assay. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **32**: 747–754 (in Korean).
- Kim G. B., R. F. Lee and K. Maruya, 2003. Application of single cell gel electrophoresis for detection of DNA single strand breaks in DNA of fish blood cell. *J. Korean Fish Soc.*, (submitted) (in Korean).
- Kim G. B., K. A. Maruya, R. F. Lee, J. H. Lee, C. H. Koh and S. Tanabe, 1999b. Distribution and source of polycyclic aromatic hydrocarbons in the vicinity of Incheon Harbor, Korea. *Mar. Pollut. Bull.*, **38**: 7–15.
- Kim J. K., T. W. Park, C. J. Lee and Y. G. Chai, 1999a. Evaluation of protective effect of peach kernel extracts on radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes in the single cell gel electrophoresis assay. *J. Korean Asso. Radiat. Prot.*, **24**: 93–99 (in Korean).
- Kurelec B., 1993. The genotoxic disease syndrome. *Mar. Environ. Res.*, **35**: 341–348.
- Large A. T., J. P. Shaw, L. D. Peters, A. D. McIntosh, L. Webster, A. Mally and J. K. Chipman, 2002. Different levels of mussel (*Mytilus edulis*) DNA strand breaks following chronic field and acute laboratory exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar. Environ. Res.*, **54**: 493–497.
- Lee E., J. Jung, D. Jo and J. H. Kwon, 2001. Detection characteristics of TL, ESR and DNA comet for irradiated peanuts by origins. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **30**: 1076–1081 (in Korean).
- Lee R. and G. B. Kim, 2002. Comet assays to assess DNA damage and repair in grass shrimp embryos exposed to phototoxicants. *Mar. Environ. Res.*, **54**: 465–469.
- Lee R. and S. Steinert, 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res.*, (in press).
- Lyons B. P., C. K. Pascoe and I. R. B. McFadzen, 2002. Phototoxicity of pyrene and benzo(a)pyrene to embryo-larval stages of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.*, **54**: 627–631.
- Mitchelmore C. L. and J. K. Chipman, 1998. Detection of DNA strand breaks in brown trout (*Salmo trutta*) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay. *Aquat. Toxicol.*, **41**: 161–182.
- Mitchelmore C. L., C. Birmelin, J. K. Chipman, and D. R. Livingstone, 1998a. Evidence for cytochrome P-450 catalysis and free radical involvement in the reproduction of DNA strand breaks by benzo[a]pyrene and nitroaromatics in mussel (*Mytilus edulis* L.) digestive gland cells. *Aquat. Toxicol.*, **41**: 193–212.
- Mitchelmore C. L., C. Birmelin, D. R. Livingstone and J. K. Chipman, 1998b. Detection of DNA strand breaks in isolated mussel (*Mytilus edulis* L.) digestive gland cells using the “comet” assay. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **41**: 51–58.
- Moon H. B., H. G. Choi, S. S. Kim, P. J. Kim, P. Y. Lee and G. Ok, 2001. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from the southeastern coastal areas of Korea. *J. Korean Soc. Oceanol.*, **36**: 27–33.
- Nacci D. E., S. Cayula and E. Jackim, 1996. Detection of DNA damage in individual cells from marine organism using the single cell gel assay. *Aquat. Toxicol.*, **35**: 197–210.
- Nam J. J., B. H. Song, K. C. Eom, S. H. Lee and A. Smith, 2003. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in agricultural soils in South Korea. *Chemosphere*, **50**: 1281–1289.
- Östling O. and K. J. Johanson, 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **123**: 291–298.
- Phillips D. H., 1983. Fifty years of benzo(a)pyrene. *Nature*, **303**: 468–472.
- Ryan S. N., 1995. The effect of chronic heat stress on cortisol levels in the Antarctic fish *Pagothenia borchgrevinka*. *Experientia*, **51**: 768–774.
- Shugart L. R., 1990. Biomarkers of Environmental Contamination. Lewis Publisher, Michigan, pp. 205–216.
- Singh N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice and E. L. Schneider, 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, **175**: 184–191.
- Steinert S. A., 1996. Contribution of apoptosis to observed DNA damage in mussel cells. *Mar. Environ. Res.*, **42**: 253–259.
- Ward J. F., 1988. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanism of formation and reparability. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **35**: 95–125.
- Wilson J. T., P. L. Pascoe, J. M. Parry and D. R. Dixon, 1998. Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Pelecypoda). *Mutat. Res.*, **399**: 87–95.

원고접수 : 2003년 4월 2일

수정본 수리 : 2003년 7월 8일

책임편집위원 : 이제희