

식물세포 DNA 손상에 있어서의 방사선과 화학물질의 시너지효과

The Synergistic Effects of Radiation and Chemical on DNA damage in
Plant Cells

김도영, 채영규
한양대학교
안산 사1동

이병현, 김진규
한국원자력연구소
대전시 유성구 덕진동 150

요 약

Alkaline Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) assay는 *in vivo*와 *in vitro*에서 많은 화학적, 생물학적인 인자에 의한 DNA 손상을 감지하는데 유용한 기법으로 각각의 세포에서 DNA 단일 가닥 절단과 알칼리에 약한 장소를 평가하는 새로운 방법으로 인정 되고 있다. 이번 실험은 저준위 방사선을 이용하여 SCGE assay 검출 능력을 증대시키고 돌연변이원인 EMS와의 시너지효과를 평가하였다. 어린 개나리 잎을 실온에서 20 h 동안 EMS 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 mM을 처리한 후, 저준위 방사선 1, 5 Gy를 조사하였다. 다음 SCGE assay를 적용하여 DNA 손상을 측정하였다. 이 때 실험 외적 요인에 의한 DNA 손상 및 repair을 방지하기 위해서 암실 및 전 과정을 4°C에서 실험하였다. 그 결과 SCGE assay에서 DNA 가닥 절단에 대한 표식인 tail moment의 증가는 방사선 및 EMS에 대해 뚜렷한 선량-반응 관계를 나타내었으며, 이들을 동시에 처리했을 경우에도 특정 농도 및 조사 선량에서 시너지효과를 관찰 할 수 있었다. 또한 방사선 1 Gy 조사를 통해 시너지를 유발함으로써 저농도 EMS에 의한 DNA 손상을 효과적으로 검출할 수 있었다.

중심어 : SCGE assay, EMS, radiation, *Forsythia koreana*, DNA damage

Abstract

The alkaline single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay has been applied to the detection

of DNA damage *in vivo* and *in vitro*. The SCGE assay is a novel method to assess DNA single-strand breaks, alkali-labile sites in individual cells. This study deals with the synergistic effect of radiation combined with a mutagenic chemical, EMS, on DNA damage in plant cells. The young leaves of *Forsythia koreana* were immersed in 0.05, 0.1, 0.5, 1 and 2 mM for 20h at room temperature and then irradiated with 1 or 5 Gy. The SCGE assay was applied to measured the induced DNA damage. All the experimental procedures were done at 4°C in a dark room to prevent the induced damage from being repaired. As a results, the tail moments which indicated the DNA strand breaks showed a good dose- and concentration-response relationship for radiation and EMS. Also even the synergistic effects were observed for a specific dose and concentration. Radiation of 1 Gy proved to be effective for a synergistic increase in DNA damage induced by low concentrations of EMS.

Key word : SCGE assay, EMS, radiation, *Forsythia koreana*, DNA damage.

서 론

Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) assay라고 불리는 혜성분석 (Comet assay)은 각각의 세포에서 DNA 손상을 직접 가시화 하는 전기영동 기술로서 1984년 Ostling과 Johanson에 의해서 처음으로 소개되었다 [1]. 그 후, 1989년 Singh에 의해 강알카리 조건으로 변형되어 현재에도 많이 사용되고 있다. 이 때 높은 pH 조건은 DNA 분자의 구조를 풀어주는데 중요한데 [2] 정상적인 조건에서 세포핵에 있는 DNA는 supercoil을 이루고 있으나 높은 pH는 DNA 구조를 완화시켜 DNA의 손상정도를 쉽게 감지하고 측정할 수 있게 해주기 때문이다. 이 기술은 세포를 슬라이드 상의 얇은 아가로즈 겔에 끼워 넣어 세포막의 분해, 전기영동, 그리고 형광염료로 염색하는 단계를 거친다. 전류는 전위를 가진 DNA를 핵으로부터 잡아당김으로써 완화된 DNA와 깨진 DNA 절편들을 이동시키게 된다. 이 때 '혜성' 같은 모양에서 이름 붙여진 이 이미지가 DNA 손상정도를 결정하는데 측정되어 진다. Ostling과 Johanson은 전기영동 동안 head로부터 떨어져 나오는 DNA의 양이 실질적인 방사선의 조사량을 나타냄을 관찰하였다 [3]. 그리고 동물의 림프구 DNA가 유전독성 물질인 EMS와 방사선에 손상된다는 것도 잘 알려진 사실인데[4] 식물핵의 DNA 또한 유전독성 물질 및 방사선 손상 연구에 적용이 가능하다 [5].

지난 수년 동안에 혜성분석에 대해 많은 관심이 증대되어 왔고 많은 연구보고들이 단세포 겔 전기영동법을 사용하여 발표되었을 뿐 만 아니라 새로운 분야에 대한 응용 결과도 점차 확대되고 있다. 혜성분석의 장점은 많은 세포를 필요로 하지 않으며 실험이 24시간 안에 수행이 가능하며 절차가 매우 간단하다. 한 편, 가장 독특한 특징은 각각의 세포에서 DNA 손상의 정도를 직접 보여주기 때문에 한 개체군 안의 모든 세포들이 같은 정도의 손상을 받았는지를 설명하는 것이 가능하다. 이러한 특징적 장점들 때문에 SCGE는 다양한 실험 조건들 하에서 DNA 손상과 수복을

조사하는데 유용하게 사용될 수 있는 수단이다.

한 편, 방사선 및 유전독성 물질인 EMS는 DNA 손상을 연구 할 때 가장 많이 이용하는 mutagen으로서 이번 연구는 이들 상호 연관 관계를 확인함에 있다.

재료 및 방법

공시재료 : 원자력연구소 주변에 있는 야생 개나리(*Forsythia koreana*)를 삼목 형태로 Culture room에서 배양한 뒤 1~1.5 cm 정도의 어린 잎을 사용하였다.

일반시약 : Ethyl methanesulphonate (EMS, cas No. 62-50-0), LMP(Low melting point) agarose, NMP (Normal melting point) agarose는 Sigma Chemical Co.(ST, MO, USA)에서 구입 사용하였다.

유전독성물질처리 : EMS는 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 mM농도로 3차 증류수에 희석하여 60 mm Petri dish에 각각 3ml씩 넣고 잎의 엽병부분을 1/3정도 제거한 어린 개나리 잎을 실온의 암실에서 20 h 방치하였다. 방사선은 한국원자력연구소의 Co 선원 (선원강도 150 TBq, Panoramic Irradiator, AECL)을 이용하여 0, 1, 5 Gy를 조사하였고 선량율의 측정은 Friche dosimeter를 사용하였다.

슬라이드제작 및 전기영동 : EMS처리 및 방사선 조사가 끝난 다음 손상된 DNA 분자의 수복을 방지하기 위하여 모든 절차는 4°C 하에서 실행하였다. 다음 Tris-HCl buffer 300 μ l 넣은 Petri dish에서 개나리 잎을 새 면도날로 얇게 절단을 한 다음 70 μ l 뽑아서 전날 1차 증류수에 녹인 1% NMP로 pre-coating한 slide glass에 뿌린 후 0.5% LMP agarose를 70 μ l와 함께 혼합한 뒤 cover glass로 덮어 준 다음 얼음 위에서 최소 5분간 대기한다. 다음 150 μ l의 0.5% LMP agarose로 한 번더 층을 입힌다. 다음 cover glass 제거 한 후 Electrophoresis buffer (pH > 13)에 15분간 unwinding 시킨다. 그 후 260 mA 0.5 V/cm에서 30분간 전기영동을 한다. 그 후 400 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)에서 5분간 중성화를 세 번 시킨다.

형광염색 및 검경분석 : 중성화 시킨 슬라이드를 80 μ l EtBr (20 μ l / ml, Sigma)로 5분간 염색을 하였다. 그 후 얼음물로 남은 EtBr 용액을 제거 해 주고 다시 새 slide glass로 덮어준다. 그 후 CCD camera (Hitachi Denshi, Ltd., Japan)가 부착된 광학현미경 (Olympus fluorescence microscope, Japan) 하에서 excitation filter (515-560 nm) 와 barrier filter (590 nm)를 사용하여 x 400로 확대하여 검경하고, Image Analysis System Software (Komet 4.0, Kinetic imaging, Ltd, Great Britain)을 통하여 이미지를 분석하였다.

결과 및 고찰

단세포 겔 전기영동법을 이용하여 어린 개나리 잎의 DNA손상을 평가하는 데는 단순히 전기영동후 나타난 DNA 해성의 tail length를 측정하여 평가 기준으로 삼기도 한다. 그러나 단순 측정된 tail length만을 사용할 경우 실제 DNA 분자상에 유발된 손상이 지나치게 확대 해석 될 수 있는 단점을 안고 있다. 전기영동후 얻어진 해성모양의 DNA 상으로부터 측정된 head, tail 그리고 절단된 DNA 조각의 형광염색 밀도 등을 감안한 tail moment 값을 사용하여 앞에서 진술한 단점을 보완 할 수 있으며 본 연구에서도 다음과 같이 (1) 식으로 정의되는 tail moment 값을 사용하였다.

$$\text{Tail Moment (T.M)} = | \text{tail mean} - \text{head mean} | \times \text{tail \% DNA} / 100 \text{ --(1)}$$

방사선과 화학물질의 상호작용 (synergistic interaction)

EMS 전처리 후 방사선을 조사하였을 때 유발되는 어린 개나리 잎의 DNA 손상은 EMS의 농도보다는 방사선량에 크게 의존하는 양상을 나타내었고 더욱이 방사선 5 Gy 경우 EMS 2 mM이하 농도의 손상에 대해서는 반응이 나타나지 않는 것처럼 보였다 (Fig. 1). 반대로 1 Gy 방사선량의 경우 EMS농도-선량에 따른 반응성이 각각의 손상율의 합보다 다소 높은 것으로 나타났는데 이는 두 가지 요인이 복합적으로 작용하여 DNA 손상률을 증가시키는 이른바 상승작용 (synergistic interaction)이 나타남을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 두 가지 요인이 복합적으로 생물체에 영향을 미치는 경우 처리간의 시간 간격은 물론 EMS의 농도와 방사선량이 모두 영향요인으로 작용하기 때문에 각 요인의 영향을 개별적으로 확인하는 것은 매우 어렵다. 그러나 두 가지 요인이 복합적으로 작용하는 경우 각각의 요인에 의한 영향의 합보다 더 큰 영향이 유발될 가능성이 상존하기 때문에 복합적 영향을 해석하기 위해서는 상승작용 또는 길항작용의 여부를 반드시 고려해야 할 것이다.

이번 실험 결과로부터 방사선 및 돌연변이원인 EMS가 특정 조사선량 및 농도에서는 상승효과가 나타남을 확인할 수가 있었고, 이를 바탕으로 상승효과가 나타나는 특정 방사선을 조사강도를 이용하여 SCGE 기법의 DNA 손상도 검출 민감도를 증가시킬 수 있음을 알아내었다. 이는 차후 환경오염을 측정함에 있어서 방사선을 이용하게 되면 좀 더 정확하고 민감하게 측정할 수 있을 것이고 이 분석자료를 바탕으로 특정 오염원의 오염정도를 수치화로의 분석도 가능하게 되어 환경오염정도를 비교 분석도 가능 할 것이다.

결 론

생명체가 살아가는 환경에는 화학물질 및 방사선 등 각종 다양한 돌연변이원이 존재를 한다. 이

때 이 돌연변이원은 단독으로 존재하는 것이 아니라, 여러 물질과 함께 공존을 하기 때문에 이들의 위해성 연구 및 방사선을 다양한 분야에 적용하고 싶어 본 연구를 수행하였다.

실험의 결과 개나리 핵의 DNA손상에 있어서 EMS 2 mM농도 이하에서는 방사선의 5 Gy이상이 DNA 손상에 있어서 직접적인 영향으로 나타난 것으로 보아 DNA 손상은 화학물질의 농도보다는 방사선의 강도에 더 많은 영향을 받는 것으로 나왔고 EMS 2 mM농도 이상에서는 방사선 영향 뿐만 아니라 화학물질 영향 또한 나타나는 것으로 밝혀졌다.

그리고 방사선 1 Gy 경우 1 mM이하의 EMS와 반응하여 그들 합보다 다소 높게 DNA 손상을 가져왔는데 이는 시너지 효과라고 볼 수가 있어 저준위의 방사선도 오염된 지역의 생명체에 치명적인 영향을 줄 수 있다는 단적인 예로 볼 수가 있겠으며 반대로 1 Gy 저준위 방사선을 이용하여 저농도 돌연변이원을 검출 할 수 있다는 것은 장점으로 판단된다. 그리고 앞에서 실험한 단세포 겔 전기영동법은 미세한 수준의 DNA 손상을 감지할 수 있다는 것을 확인 할 수도 있었다.

Table 1. DNA damage as expressed by the average median tail moment value \pm SE (TM) in nuclei isolated from the leaves treated for 20 h with a 0 to 10 mM EMS, and irradiated with 1 and 5 Gy, after 15 min unwinding and 30 min electrophoresis in alkaline buffer (pH > 13)

	Average T.M [μ m]	Max T.M [μ m]	Min T.M [μ m]	
	0-0	1.5441 \pm 0.4730	1.9550	1.0712
	0.05-1	5.4192 \pm 0.5288	5.9480	5.0885
	0.1-1	6.0361 \pm 0.7143	6.7504	5.4558
EMS	0.5-1	6.2593 \pm 0.7802	6.9564	5.4791
/	1.0-1	6.5373 \pm 0.8187	7.3560	5.8809
Radiation	2.0-1	7.6194 \pm 1.0683	8.6878	6.7727
[mM]/[Gy]	0.05-5	10.5913 \pm 0.5567	11.0246	10.0345
	0.1-5	10.9203 \pm 1.0447	11.9650	10.0903
	0.5-5	11.1385 \pm 1.0445	12.1830	10.1390
	1.0-5	11.4401 \pm 1.3584	12.7985	10.6548
	2.0-5	12.9524 \pm 1.7812	14.7336	12.0077

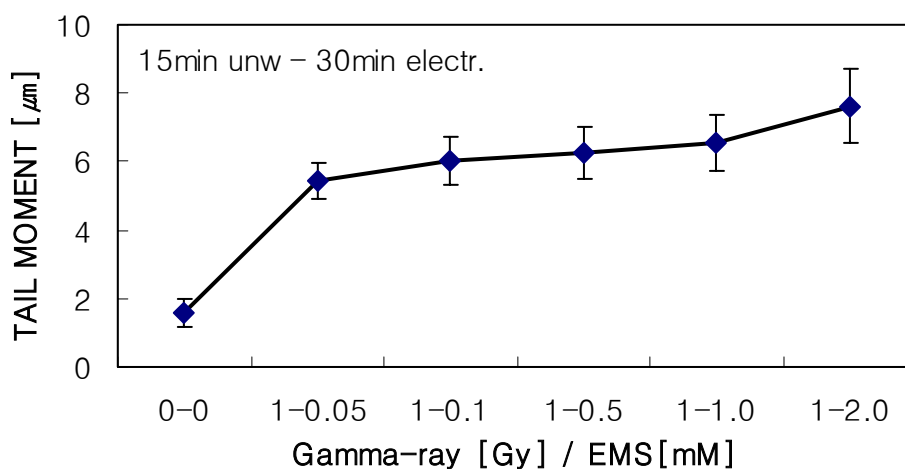


Fig. 1. Dose-response curves of the average medial tail moment values as a function of EMS treatment and γ -ray in the leaves of *Forsythia koreana*. Error bars represent the standard error of the mean among 75 cells (25 cells per each slide).

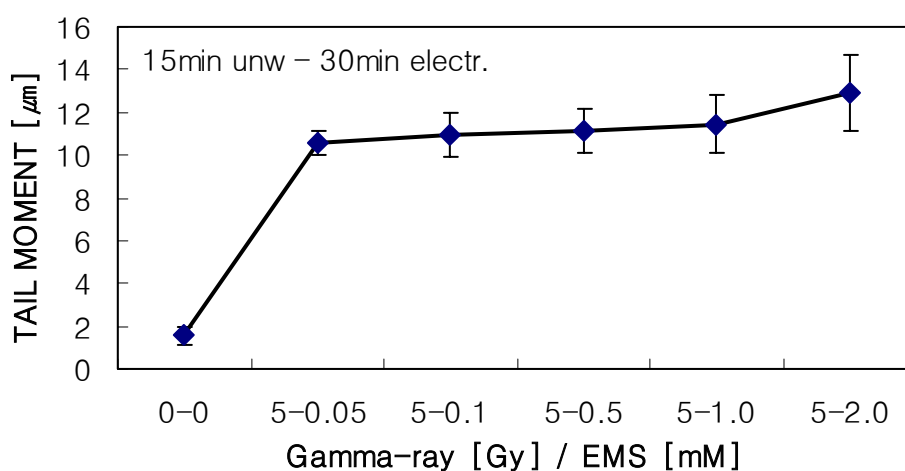


Fig. 2. Dose-response curves of the average median tail moment values as a function of EMS treatment and γ -ray in the leaves of *Forsythia koreana*. Error bars represent the standard error of the mean among 75 cells (25 cells per each slide).

참고문헌

1. O. Ostling and K. J. Johansons, "Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mamalian cells", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123:291-298(1984)
2. N. P. Singh, M. T. McCoy, R. R. Tice and E. L. Schneider, "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells", *Exp. Cell Res.*, 175:184-191(1988)
3. O. Ostling and K. J. Johanson, "Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123:291-298(1984)
4. D. Anderson, T. W. Yu, B. J. Philips and P. Schmezer, "The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygenradical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay", *Mut. Res.*, 307:261-271(1994)
5. F. Cassoni, P. Poli and A. Buschini, "Comet assay application in environmental monitoring : DNA damage in human leukocytes and plant cells in comparison with bacterial and yeast tests", *Mutagenesis.*, 14:547-555(1999)
6. B. Holliwell and O. I. Aruome, "DNA-damage by oxygen-derived species", *FEBS Lett.*, 281:9-19(1991)
7. T. Gichner, Z. Patkova and J. K. Kim, "DNA damage measured by the comet assay in eight agronomic plants", *Biological. Plantarum.*, 47(2):185-188(2003)
8. T. Gichner and Z. Muhlfeldova, "Induced DNA damage measured by the comet assay in 10 weed species", *Biological. Plantarum.*, 45(4):509-516(2002)
9. T. Gichner, "Differential genotoxicity of ethyl methanesulphonate, N-ethyl-N-nitrosourea and maleic hydrazide in tobacco seedlings based on data of the Comet assay and two recombination assays", *Mut. Research*, 538:171-179(2003)
10. Diana A. Stavreva, and T. Gichner, "DNA damage induced by hydrogen peroxide in cultured tobacco cells is dependent on the cell growth stage", *Mut. Research*, 514:147-152(2002)
11. T. Gichner, " DNA damage induced by indirect and direct acting mutagens in catalase-deficient transgenic tobacco Cellular and a-cellular Comet assays", *Mut. Research*, 400585:1-7(2003)
12. T. Gichner, O. Ptacda, Diana A. Stavreva, Elizabeth D. Wagner and Michael J. Plewa, "A comparison of DNA repair using the comet assay in tobacco seedlings after exposure to alkylating agents or ionizing radiation", *Mut. Research*, 470:1-9(2000)
13. S. Wada, M. Natsuhori, N. Ito, T. Funayama and Y. Kobayashi, "Detection of DNA damage induced by heavy ion irradiation in the individual cells with comet assay", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 206:553-556(2003)
14. G. Koppen, L. M. Toncelli, L. Triest and L. Verschaeve, " The comet assay : a tool to study alteration of DNA integrity in developing plant leaves", *Mechanisms of Ageing and*

Development, 110:13-24(1999)

15. G. Koppen and H. Cerda, "Identification of Low-dose Irradiated Seeds using the Neutral Comet Assay", *Lebensm.-Wiss. u.-Technol*, 30:452-457(1997)
16. G. Jovtchev, M. Menke and I. Schubert, "The comet assay detects adaptation to MNU-induced DNA damage in barley", *Mut. Research*, 493:95-100(2001)
17. M. Menke, I-Peng Chen, Karel J. Angelis and I. Schubert, "DNA damage and repair in *Arabidopsis thaliana* as measured by the comet assay after treatment with different classes of genotoxins", *Mut. Research*, 493:87-93(2001)
18. T. Gichner and Michael J. Plewa, "Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants", *Mut. Research*, 401:143-152(1998)
19. O. Ptacek, Diana A. Stavreva, Jin Kyu Kim and T. Gichner, "Induction and repair of DNA damage as measured by the Comet assay and the yield of somatic mutations in gamma-irradiated tobacco seedlings", *Mut. Research*, 491:17-23(2001)
20. Richard F. Lee and Scott Steinert, "Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals", *Mut. Research* 544:43-46(2003)
21. Krzysztof Konca, Anna Lankoff, Anna Banasik, Halina Lisowska, Tomasz Kuszewski, Stanislaw Gozdz, Zbigniew Koza and Andrzej Wojcik, " Across-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay", *Mut. Research*, 534:15-20(2003)
22. S. Cotelle and J. F. Ferard, "Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: a Review", *Environmental and Molecular Mutagenesis* 34:246-255(1999)
23. J. L. He, W. L. Chen, L. F. Jin and H. Y. Jin, "comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation", *Mut. Research*, 469:223-231(2000)
24. P. Poli, M. A. de Mello, A. Buschini, V. L. S. S. de Castro, F. M. Restivo, C. Rossi and T. M. A. D. Zucchi, "Evaluation of the genotoxicity induced by the fungicide fenarimol in mammalian and plant cells by use of the single-cell gel electrophoresis assay", *Mut. Research*, 540:57-66(2003)
25. E. Rojas, M. C. Lopez and M. Valverde, "Single cell gel electrophoresis assay : methodology and applications", *Journal of Chromatography B*, 722:225-254(1999)