

유전자수준에서 돌연변이 유발기전을 밝히는 Transgenic Mutagenesis Assay

류재천¹ · 윤지윤 · 조경혜* · 장일무**

한국과학기술연구원, 독성연구팀, *서울여자대학교 생물학과 **서울대학교 천연물과학연구소
(1997. 12. 30 접수)

Transgenic Mutagenesis Assay to Elucidate the Mechanism of Mutation at Gene Level

Jae-Chun Ryu¹, Ji-Youn Youn, Kyung-Hae Cho* and Il-Moo Chang**

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

*Department of Biology, Seoul Women's University, 126 Kongneung-dong, Nowon-Ku, Seoul 139-744, Korea

**Natural Products Research Institute, Seoul National University, 28 Yungun-dong, Chongro-ku, Seoul 110-460, Korea

ABSTRACT : Transgenic animal and cell line models which are recently developed and used in toxicology fields combined with molecular biological technique, are powerful tools to study the mechanism of mutation *in vivo* and *in vitro*, respectively. Transgenic 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 processes. The *lac I* and *lac Z* gene most widely used as a mutational target in transgenic systems. The assay is performed by treatment with putative mutagenic agents, isolation of genomic DNA from cells or tissues, exposure the isolated DNA to *in vitro* packaging extract, plating and sequencing. The results from these processes provide not only mutant frequency as quantitative evaluation but also mutational spectrum as qualitative evaluation of various agents. Therefore we introduce and review the principle, detailed procedure and application of transgenic mutagenesis assay system in toxicology fields especially in mutagenesis and carcinogenesis.

Key words : Transgenic Mutagenesis, *lac I*, *lac Z*, Mutational spectrum

서 론

최근 분자생물학의 발달과 더불어 독성학 분야에도 분자생물학적 기술의 도입으로 유전자 수준, 분자 수준에서의 독성평가가 가능하게 되었다(Mirsalis, 1995). 유전독성평가는 화학물질의 potential carcinogenicity를 규명하고 어떠한 화학물질이 heritable 유전자 상해를 유발시키는지를 평가하기 위해 필수적으로 수행되어야 한다(Reico, 1995).

분자 수준에서의 유전독성평가가 가능하게 된 것은 최근의 분자생물학등의 발전에 힘입은 transgenic animal model의 개발에 있다(Provost *et al.*, 1993). 기존의 독성평가방법들은 돌

연변이 검색이나 정량평가에 초점을 두고 시행되어져 왔으며 구체적 독성발현기전과 질병과 관련된 특정유전자의 역할을 설명해 줄 수 없는 단점을 가지고 있다. 이에 반해 transgenic animal과 cell line model은 기존 독성평가방법의 단점을 보완하고 화학물질에 의한 돌연변이 유발기전, 발암기전, 특정유전자의 생체 내에서의 역할 등을 설명해 줄 수 있는 매우 중요한 수단을 제공하고 있다(Gorelick *et al.*, 1995, Wyborski *et al.*, 1995).

Transgenic animal model은 자신의 genome내에 외부 유전자를 유입시켜 생체 내에서의 돌연변이를 감지할 수 있도록 제작되었으며 현재 mutation assay system으로 가장 많이 이용되

¹To whom all correspondence should be addressed.

고 있는 것은 미국 Stratagene사에서 개발하여 보급중인 Big Blue™(Provost *et al.*, 1993)와 영국 Hazleton사에서 개발하여 보급중인 Mutamouse®(Gossen *et al.*, 1989)가 대표적이다. 이들 mouse model은 감지하기 편리하고 분석하기 용이한 *lac I* gene과 *lac Z* gene을 target으로 하는 lambda shuttle vector를 가지고 있어서 생체내 여러 조직에서의 *in vivo* mutation측정을 가능하게 해주며 각 compound의 target gene에서의 mutational spectrum을 밝혀주는데 큰 역할을 하고 있다.

lambda shuttle vector는 target DNA sequence를, 분석하기 편리한 organism으로 옮길 수 있다는 것이 큰 장점이며 (Dyaico *et al.*, 1994) shuttle vector에 포함되어 있는 target gene으로 사용되는 *lac I*, *lac Z* gene은 mutation이 일어났을 때 phenotypic response를 할 수 있기 때문에 color screening이 가능하여 쉽게 mutation을 측정할 수 있어서 매우 유용하다 (Lundberg *et al.*, 1993, Heddle *et al.*, 1995, Summers, 1989). 특히 *lac I* gene을 target으로 하는 Big Blue mouse와 Big Blue cell line의 경우, 비교적 크기가 작아 쉽게 excision하여 sequencing될 수 있고 많은 mutation endpoint에 매우 sensitive하다(Kohler *et al.*, 1991, Schaaper *et al.*, 1986).

이처럼 target gene에서의 mutation에 따른 reporter gene발현과 sequence analysis를 가능하게 해주는 transgenic mutagenesis assay는 질병에 관여하는 것으로 여겨지는 특정 gene의 변화와 *in vivo*에서의 효과는 물론 mutation, cancer발생 mechanism을 이해할 수 있도록 하는 가장 진보된 독성평가 기법중의 하나라 할 수 있다.

Transgenic Mutagenesis Assay의 원리

Transgenic animal & cell line의 제작

Transgenic mouse는 원하는 gene을 수정된 single cell mouse embryo의 pronucleus에 microinjection시키는 기술에 의해 개발되었다(Camper, 1987). 삽입된 외부 DNA는 host의 DNA와 재조합되어 host genome내에 integration되고, 이러한 조작으로 유전적으로 변화된 embryo는 계속 발생진행되고 성장하면서 mouse는 모든 세포에 외부 DNA를 포함하고 있게 된다. 유전적으로 조작된 embryo를 대리모에게 착상시켜 출생시킨후 출생된 offspring의 혈액을 이용하여 southern blotting을 수행하면 transgene의 존재여부를 확인할 수 있고 이렇게 확인이 끝난 새로운 mouse strain을 실험에 이용할 수 있게 된다.

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(Wyborgski *et al.*, 1995). 또한 pSV2Neo plasmid

를 lambda shuttle vector와 함께 calcium phosphate co-transfection방법으로 cotransfect시켜 제작되었으므로 세포배양시 항생제 G418 (geneticin)을 이용하여 select할 수 있다. 이들 경우 모두 mutation이 발생하였을 때 phenotypic response를 할 수 있는 target gene을 transgene으로 사용하며, mouse, rat과 같은 organism에서 transgene을 회수하고 bacteria같은 organism으로 옮겨서 screening을 가능하게 하는 유용한 도구로 shuttle vector를 이용하고 있다(Dyaico *et al.*, 1994). 여러 system들이 mutagenesis testing에 이용되어 왔으며 처음 이용되어 상업화 된 것은 영국 Hazleton사에서 개발한 *lac Z* gene을 target gene으로 포함하고 있는 lambda shuttle vector를 가지고 있는 Mutamouse®(Gossen *et al.*, 1989, Short *et al.*, 1988)였다. 그러나 *lac Z* gene을 target으로 한 경우, blue nonmutant에서 colorless mutant를 감지하고 계수하는데 어려움이 있고 gene size가 약 3200 bp 이어서 sequencing하여 분석하는데 비효율적이고 시간이 많이 걸리는 단점이 지적되었다(Provost *et al.*, 1993). 이에 따라 이러한 문제점을 보완할 수 있는 system인 *lac I* gene을 target으로 한 Transgenic Big Blue mutagenesis assay system이 미국 Stratagene사에서 개발되어 현재 가장 많이 이용되고 있다. 따라서 본 review에서는 transgenic mutagenesis assay system중에서도 최근 들어 가장 널리 이용되고 있고, 본 연구실에서도 4-Nitroquinoline N-Oxide의 mutation spectrum연구를 수행하고 있는 Big Blue mutagenesis assay system(Ryu *et al.*, 1998a, Ryu *et al.*, 1998b, Ryu *et al.*, 1996, Youn *et al.*, 1996, Youn *et al.*, 1997a, Youn *et al.*, 1997b, Youn, 1998)을 중심으로 하여 assay system의 원리와 방법에 대하여 설명하고자 한다.

Lambda shuttle vector & *lac I* gene

Transgenic Big Blue animal과 cell line에 포함되어 있는

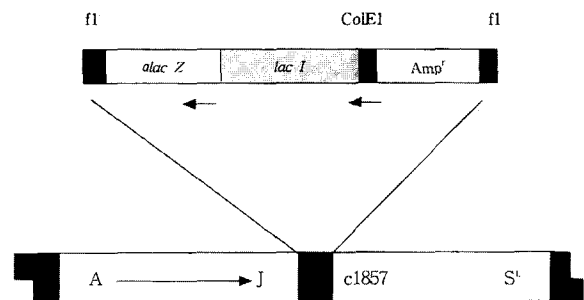


Fig. 1. Big Blue lambda LIZ (*lacI*- α LacZ) shuttle vector The vector carries the bacterial *lac I* gene as a target and α portion of the *lac Z* gene as a reporter (from Instruction manual of Big Blue transgenic mouse mutagenesis assay system, Stratagene Co., p. 3).

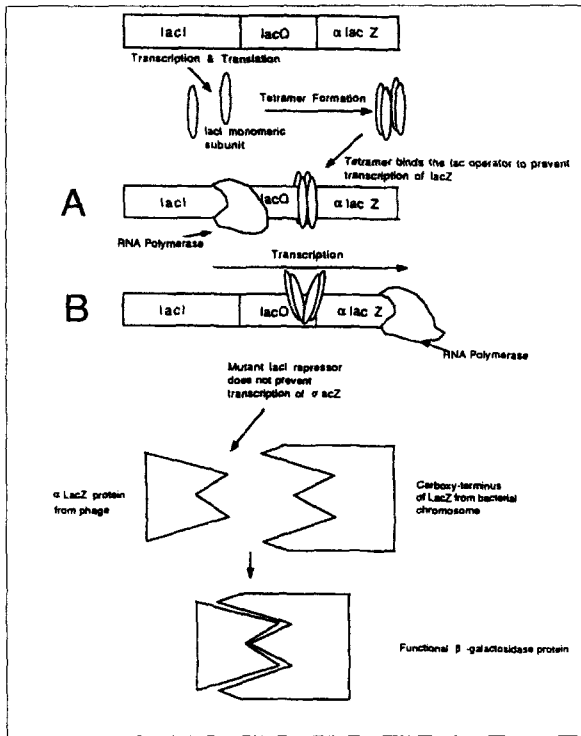


Fig. 2. Alpha complementation (from Instruction manual of Big Blue transgenic mouse mutagenesis assay system, Stratagene Co., p. 4).

lambda shuttle vector는 약 45kb의 크기이며 cos site를 가지고 있는 일종의 cosmid이다(Dycaico *et al.*, 1994) (Fig. 1). 이 vector는 mouse, rat, mammalian cell과 같은 연구대상에서 bacteria같은 분석이 용이한 organism으로 target DNA sequence를 옮길 수 있다는 것이 큰 장점이며 color screening 및 여러 가지 방법으로 mutation을 감지할 수 있는 특징이 있다. 또한 vector내의 α lac Z gene은 carboxy terminus부분이 결여되어 있는 형태로서 반드시 carboxy terminus부분을 포함하고 있는 host *E. coli*의 lac Z와 complementation되었을 때만 온전한 β -galactosidase가 발현되도록 조작되어 있다(Provost *et al.*, 1993) (Fig. 2).

lambda shuttle vector에 포함되어 있는 target으로서의 lac I gene은 박테리아에 존재하는 gene으로서 수년동안 mutation detection에 가장 유용하게 이용되어 왔다. 특히 크기가 1080bp 정도로서 mutagenic target으로 많이 이용되는 lac Z gene(3200bp)에 비해 훨씬 작으므로 sequence analysis가 용이하다. 또한 방대한 database가 존재하므로 결과의 분석, 비교가 가능하고 다양한 mutation endpoint에 매우 sensitive하다(Lundberg *et al.*, 1993).

lac I gene은 lac operon의 일부로서 Lac I repressor protein을 code한다. Lac I repressor protein은 tetramer로 lac Z gene의 transcription을 억제하는 역할을 한다. lac Z gene에 의해 code되는 β -galactosidase는 chromogenic substance X-gal을 분해하여 불용성 blue dye를 형성하게 한다(Kohler *et al.*, 1990). 따라서 어떤 화학물질이 생체내의 DNA에 직접 영향을 미쳐서 mutation을 일으킨다면, genomic DNA를 분리하여 mutation이 일어난 target DNA가 포함되어 있는 lambda shuttle vector를 회수하여 packaging시키고 α -complementation이 가능한 *E. coli*균주에 감염시켰을 때, mutation이 일어나 있는 lac I gene은 온전한 Lac I protein을 형성하지 못하므로 lac Z gene의 발현이 일어나게 되고 그 결과 β -galactosidase의 활성으로 인해 기질 X-gal 존재시 blue dye가 형성되게 되어 bacterial lawn상에 blue plaque가 출현하게 된다. 반대로 lac I gene에 mutation이 일어나지 않았다면 Lac I protein의 작용으로 lac Z gene의 transcription, translation의 억제가 일어나게 되어 X-gal 존재시 colorless plaque를 형성하게 된다.

Transgenic Big Blue mutagenesis assay는 이러한 lac I gene과 lac Z gene의 특성에 원리를 두고 있어서 color screening이 가능하여 쉽게 mutant를 구분할 수 있으며 출현한 모든 plaque수에 대한 blue plaque수의 비율로 Mutant frequency (MF)를 결정하여 정량적인 평가를 할 수 있다. 또한 출현한 mutant인 blue plaque로부터 DNA를 회수하여 target gene을 sequence analysis하면 검색하고자 하는 화학물질이 DNA상에 미치는 영향, 즉 어떤 유형의 mutation을 얼마만큼의 빈도로 발생시키며 어떤 위치에서 발생시키는 지에 관한 mutational spectrum을 밝힐 수 있게 된다.

Assay & Detection system

대략적인 실험방법을 요약하면 다음과 같다. 즉, 시험물질을 여러 경로를 통해서 mouse에 투여하고 연구대상 조직으로부터 DNA를 분리한다. cell line의 경우는 시험물질 처리후 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 agar배지에 plating하여 일정시간 배양후 mutant를 detect할 수 있게 된다.

mutant frequency는 mutant인 blue plaque와 nonmutant인 colorless plaque의 총수와 blue plaque 수의 비율로 나타내며,

mutant plaque로부터 DNA를 분리하여 표적 유전자 서열분석을 실시하면 mutational spectrum을 밝힐 수 있다.

실험방법

실험재료

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) media (Gibco BRL, Inc, USA), Fetal Bovine Serum (Gibco BRL, Inc, USA), Geneticin (G418) (Gibco BRL, Inc, USA), NZY media (Gibco BRL, Inc, USA) Proteinase K (Boehringer Mannheim Co.), Big Blue agar (Stratagene Co. USA), Transpack packaging extract (Stratagene Co. USA), 5-bromo-4-chloro-3-indol- β -galactopyranoside (X-gal) (Stratagene Co. USA), Assay tray (Stratagene Co. USA), Ampli-Taq polymerase (Gibco BRL, Inc, USA)와 LMP agarose (Gibco BRL, Inc, USA), Gene clean II kit (BIO 101 Co.), ABI PRISM TM dye terminator (Perkin Elmer Co. USA)

실험방법

(1) Test compound 처리

1) Big Blue mouse

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.

적은 수의 group, 적은 수의 plaque는 misleading을 초래하므로 지양해야 하고 재현성있는 결과도출을 위해서는 최소한 treatment group당 5~8마리의 mouse, 그리고 mouse당 100,000~150,000이상의 plaque수가 요구되어진다(Gorelick, 1995, Piegorsch *et al.*, 1995).

2) Big Blue rat cell line

Cell culture를 위한 배지로는 10% fetal bovine serum과 200 μ g/ml geneticin, 50 units/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 배지를 사용하고 37°C, 5% CO₂의 조건하의 incubator에서 배양시키며 매 3~4일마다 계대배양한다. test compound의 처리는 예비실험을 거쳐 처리할 compound의 농도를 결정한후 cell이 30~40% confluency를 나타냈을 때 실시한다. 처리가 끝나면 PBS로 washing하고 cell이 confluent하게 될 때까지 계속 배양한다.

(2) Genomic DNA isolation

Animal의 경우 test compound의 처리후 DNA replication이 일어날 수 있는 충분한 시간을 둔 후 원하는 조직을 분리하여

DNA를 분리하고 cell line의 경우는 cell을 scraping하여 harvest한후 DNA isolation을 수행한다. 분리한 조직이나 harvest한 cell은 -70°C에서 일정기간 보관가능하며, 90일 이내로 사용하는 것이 좋다고 권고되고 있다.

Genomic DNA isolation은 proteinase K digestion, phenol/chloroform extraction, ethanol precipitation을 차례로 진행하여 수행하며 기존에 알려져 있는 여러 가지 방법이나 kit사용을 통해 분리할 수 있다. 본 연구실의 축적된 경험에 의하면 분리된 DNA는 상당히 분자량이 큰 상태이므로 균일한 상태를 만들기 위하여 TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) buffer 하에서 최소한 12시간 이상 상온에서 보관한후 다음 실험에 사용하는 것이 좋다.

(3) *In vitro* packaging & plating

1) 균주배양

박테리아 균주는 SCS-8 *E. coli* strain (Stratagene Co. USA)를 사용하며, NZY 배지(5.0 g NaCl, 2.0 g MgSO₄, 5.0 g yeast extract, 10.0 g NZ amine(casein hydrolysate)/L)에 agar(15 g/L)가 포함된 고형배지하에서 배양한다. 실험시에는 하나의 독립된 콜로니를 취하여 10 mM MgSO₄, 0.2% maltose를 첨가한 NZY 액체배지에 접종하고 600 nm에서의 흡광도(O.D. 600)가 1이 넘지 않도록 37°C에서 진탕배양한다. plating시에는 10 mM MgSO₄ 용액으로 O.D값이 0.5가 되도록 희석하여 준비한다.

2) *In vitro* packaging & plating

분리한 DNA를 정량한 후 적정농도의 DNA를 transpack packaging extract(Stratagene)와 함께 incubation(30°C)하여 shuttle vector를 recover한다. transpack packaging extract는 자동적으로 lambda vector target을 절단하고 lambda head로 package되도록 되어있다.

packaging으로 인해 형성된 infectious phage stock을 1)에서 준비한 SCS-8 *E. coli* host cell에 infection시키고 chromogenic substrate X-gal과 top agar를 cell-phage와 혼합하여 미리 만들어 놓은 bottom agar plate에 붓는다. bottom agar는 1)에서 설명한 균주배양시 사용되는 고형배지와 동일하며, assay tray가 25×25 cm의 크기이므로 약 250 ml의 멸균된 배지를 사용하여 만들 수 있다. top agar는 NZY 배지에 0.75% agarose를 첨가하고 멸균하여 제조하며, 50°C로 유지시킨 뒤 X-gal을 최종 1.5 mg/ml top agar의 농도가 되도록 첨가하여 준비한다. 본 연구실의 경험에 의하면 25×25 cm assay tray에 plating하기에 적당한 top agar의 양은 35 ml 정도이다.

Top agar가 굳어지면 plate를 뒤집어 37°C incubator에서 incubation시킨다. 약 8시간이 지나면 plaque가 나타나기 시작하며, 16~24hr내에 plaque수를 세어 mutant frequency를 아래 식에 의해 결정한다.

Mutant frequency (MF)
= number of blue plaques/ number of total plaques

(4) Lambda plaque의 분리

Mutant frequency(MF)를 결정한 후, *lac I* 유전자상에 돌연변이가 유발된 plaque인 blue plaque를 plate에서 picking하고 plaque의 순수단독분리를 위해 replating을 실시한다.

picking한 plaque를 SM buffer(50 mM Tris, 5.8 g NaCl, 2 g MgSO₄, 0.01% gelatin/L, pH 7.5)로 현탁시킨후 희석하여 host cell에 infection시키고, NZY agar plate(100 mm dish)에 plating한다. 한 plate에 적은 수의 plaque가 생성되도록 하고 인접 부위에 다른 plaque들이 없는 잘 분리된 mutant plaque의 top agar부분만을 분리해낸다. TE(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) buffer가 25 µl가 포함되어 있는 eppendorf tube에 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.

참고로, 본 실험실에서 시행하고 있는 sequence 분석에 대해 기술하고자 한다. 본 연구실에서는 Stratagene사의 Big Blue primer를 사용하였으며 20 µl의 crude boiled phage DNA를 template로 하고 5 unit의 Ampli-Taq polymerase(Gibco Ltd.), 3 mM MgCl₂, 10 mM dNTP mixture, 0.5 µM primer, 1X PCR buffer를 첨가하여 다음과 같이 PCR을 수행하였다. 즉, 95°C에서 initial denaturing을 5분간 실시한후, 95°C에서 30초간 denaturing, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension의 cycle을 30회 수행하였고 마지막 과정(72°C)을 10분간 연장하여 증폭된 DNA절편들이 충분히 이중나선을 형성하도록 유도하였다. PCR수행 후 product를 전기영동하여 반응이 제대로 되었는지 확인(1300bp)한 후, 효율적인 sequencing을 위해 원하는 band의 DNA만을 Gene clean II kit (BIO 101 Inc. USA)을 사용하여서 LMP(low melting point) agarose gel로부터 회수하였다. 이와 같이 PCR 수행 후 product일부를 전기영동하여 반응이 제대로 되었는지 확인한다. 본 연구실에서 PCR수행후 전기영동으로 확인한 예를 Fig. 3에 예시하였다. 확인된 증폭DNA를 purify하여 sequencing에 이용하기도 하며, PCR를 수행하지 않고도 phage로부터 직접 *lac I* gene을 직접 절단한 후, 분리하여 sequencing을 하는 것도 가능하다.

위에서 설명한 대로 template DNA의 준비가 완료되면 sequence analysis를 실시한다. 최근에는 automated fluorescent DNA sequencer를 이용하는 것이 보편화되고 있으며 본 실험



Fig. 3. 0.8% LMP agarose gel electrophoresis of PCR products. The first and second lane are molecular weight marker. All bands in other lanes indicate 1300 bp fragments encompassing the *lac I* coding region amplified by Big Blue PCR primer (from our data).

실에서는 dideoxy nucleotide chain termination법을 기초로 하고 있는 automated fluorescent DNA sequencer인 Applied Biosystem 373A DNA sequencer(Perkin Elmer Co. USA)를 사용하여 sequencing을 수행하고 있다(Ryu *et al.*, 1998a, Ryu *et al.*, 1998b, Youn *et al.*, 1997a, Youn *et al.*, 1997b, Youn, 1998).

Transgenic mutagenesis assay system의 장점과 응용

Transgenic animal은 transgene의 존재가 생물학적으로 크게 영향을 주지 않으므로 nontransgenic mouse와 거의 동일한 반응을 나타낸다. 따라서 transgenic animal과 cell line을 이용하여 어떤 화학물질이 target gene에 나타내는 mutation을 연구하면 다른 endogenous gene에서의 현상을 예상할 수 있다.

화학물질의 생체내 영향을 유전자수준에서 평가하는 것은 여러 가지 면에서 필수불가결하다. 대부분의 발암원이 돌연변이원(Koch *et al.*, 1994; McCann *et al.*, 1975; Lawley, 1989)이라는 것이 일반적인 사실로 받아들여지고 있고, 돌연변이원으로는 환경, 식품, 약물 등의 여러 경로에 의한 화학물질이 주가 되고 있다. 따라서 발암기전 연구에 있어서 돌연변이원에 대한 연구가 필수적이며, 특히 최근들어 유전자 지도 작성과 분리의 발전으로 Huntington disease, Alzheimer's disease, cystic fibrosis와 같은 질병과 유방암, 대장암, 폐암을 비롯한 여러 종류의 암 발생에 관여하는 유전자들이 밝혀지고 있고 (Barrett *et al.*, 1997), 암의 경우 p53 유전자와 같은 암억제 유전자나 ras, myc 등의 종양유전자상에 발생한 돌연변이가 다

단계 발암기전에 있어서 가장 중요한 요인이라는 것이 보고되어져 있어서(Wybornski *et al.*, 1995) 유전자 내에서의 돌연변이 유형과 위치, 빈도 등에 대한 상세한 정보를 제공하는 화학물질의 mutation spectrum 연구의 중요성이 강조되고 있다(Gorelick *et al.*, 1995, Erfle *et al.*, 1996).

Mutation spectrum은 돌연변이가 일어나는 과정에 대한 많은 세부사항을 연구하는데 있어서 뿐만 아니라 chemical carcinogenesis에 관여하는 특정 gene의 역할에 대한 이해를 가능하게 해준다. 따라서 mutation spectrum을 효과적으로 발휘할 수 있는 transgenic mutagenesis system은 돌연변이는 물론 발암기전연구에 있어서 매우 유용하다.

특히 animal을 사용할 경우 chemical의 조직특이성을 알아낼 수 있으며 다른 여러 가지 endpoint와 더불어, 즉 다른 *in vivo* 실험과 병행하여 평가할 수 있다. 또한 germ cell을 사용할 경우 heritable effect를 예측할 수 있고, safety testing에 필요한 동물의 수를 줄이는 효과가 되므로 비용절감에도 크게 기여한다(Gorelick *et al.*, 1995).

lac I gene을 target으로 한 transgenic Big Blue mutagenesis assay system의 경우, detection이 더욱 쉽고(background white 중에서 blue를 detect) 다른 target gene에 비하여 크기가 작으므로 분석이 용이한 장점이 있다. 또한 direct acting mutagen의 경우는 *in vitro* system의 최대 결점인 대사활성화(metabolic activation)system 존재유무로 인해 야기될 수 있는 문제점이 제기되지 않으므로 animal을 이용하지 않더라도 transgenic cell line을 사용하여 mutational spectrum을 규명하는 것이 가능하다(Wybornski *et al.*, 1995, Zimmer *et al.*, 1996).

이와 같은 transgenic mutagenesis assay system의 여러 가지 장점(Skopek *et al.*, 1995, Sofuni *et al.*, 1996) 및 활용방안(Yamasaki *et al.*, 1996, Shephard *et al.*, 1993, Shephard *et al.*, 1994, Nisgino *et al.*, 1995, Knöll *et al.*, 1996)과 더불어 무엇보다도 양적인 평가(MF)와 질적인 평가(mutational spectrum)가 빠르게 동시에 이루어질 수 있다는 점에서 높게 평가되며 이 방법은 mutagenesis연구 뿐 아니라 DNA repair, *in vivo* carcinogenicity연구 등 다양한 독성학적 연구에 응용(Shephard *et al.*, 1995, Cunningham *et al.*, 1996, Liu *et al.*, 1996)될 수 있고, 몇몇 유전독성연구방법과 이 Transgenic system을 병용한 Battery test를 ICH를 위시한 과학선진국에서 구상하고 있어, 실제 *in vivo* 발암성 시험(Lyon *et al.*, 1997)시의 비용, 기간등을 극복할 수 있는 유용한 tool로서 빠른시간내에 대체 발암성 시험법의 일환으로 자리잡을 것으로 기대된다.

참고문헌

Barrett, J.C., Vainio, H., Peakall, D. and Goldstein, B.D.

- (1997): 12th Meeting of the Scientific Group on Methodologies for the safety evaluation of chemicals: Susceptibility to environmental hazards, *Environ. Health Perspec.*, **105**(suppl. 4): 699-730.
- Boer, J.G. (1995): Software package for the management of sequencing projects using *lac I* transgenic animals, *Environ. Mol. Mutagen.*, **25**, 256-262.
- Burkhard, J.G., Winn R.N., Anberedem R.V. and Mallin H. V. (1996): The phageX 14 bacteriophage shuttle vector for the study of mutagenesis, *ibid.*, **19** (suppl. 20): 8.
- Cunningham, M.L., Hayward, J.J., Shane, B.B. and Tindall K.R., (1996): Distinction of mutagenic carcinogens from a mutagenic noncarcinogen in the Big Blue transgenic mouse, *Environ. Health Perspec.*, **104**(suppl.3): 683-686.
- Dycaico, M.J., Provost, G.S., Kretz, P.L., Ransom, S.L., Moores, J.C., Short, J.M. (1994): The use of shuttle vectors for mutation analysis in transgenic mice and rats, *Mut. Res.*, **307**: 461-478.
- Erfle, H.L., Walsh, D.F., de Boer, J.G. and Glickman, B.W. (1996): An efficient laboratory protocol for the sequencing of large numbers *lac I* mutants recovered from Big Blue transgenic animals, *Environ. Mol. Mutagen.*, **28**: 393-396.
- Gorelick, N.J. (1995): Overview of mutation assays in transgenic mice for routine testing, *ibid.*, **25**: 218-230.
- Gossen, J.A., deLeeuw, WLF., Tan, CHT., Zworhoff E.C., Berends F., Lohman, PHM., Knook, D.L., and Vijg, J. (1989): Efficient rescue of integrated shuttle vectors from transgenic mice: A model for studying mutations *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **86**: 7971-7975.
- Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M.H., (1994): Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis, *Cancer. Res.*, **54**: 4855-4878.
- Heddle, J.A., Tao, K.S. (1995): The transmission rate of the *lac I* transgene from the Big Blue™ mouse, *Mut. Res.*, **348**, 63-66.
- Kn II, A., Jacobson, D.P., Nishino, H., Fretz, P.L., Short, J. M. and Sommer, S.S. (1996): A selectable system for mutation detection in the Big Blue *lac I* transgenic mouse system: What happens to the mutational spectra over time, *ibid.*, **352**: 9-22.
- Koch, W.H., Henrikson, E.N. and Cebula, T.A. (1994): Salmonella typhimurium strain TA100 differentiates several classes of carcinogens and mutagens by base substitution specificity, *Carcinogenesis.*, **15**(1): 79-88.
- Kohler, S.W., Provost, G.S., Fieck, A., Kretz, P.L., Bullock, W.O., Sorge, J.A. Putman, D.L. and Short, J.M. (1991): Spectra of spontaneous and mutagen-induced mutations in the *lac I* gene in transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**: 7958-7962.
- Lawley, P.D. (1989): Mutagens as carcinogens: development of current concepts. *Mut. Res.*, **213**: 3-25.
- Liu, P.K., Hsu, C.Y., Miral Dizdaroglu, Floyd, R.A., Kow, Y.W., Rabow, L.E. and Cui, J.K. (1996): Damage, repair and mutagenesis in nuclear genes after mouse forebrain ischemia-reperfusion, *J. Neurosci.*, **16**(21): 6795-6806.

- Lundberg, K.S., Provost, G.S., Kretz, P.L. and Short, J.M. (1993): The use of selection in recovery of transgenic targets for mutation analysis, *ibid.* **301**: 99-105.
- Lyon, T. (1997): Carcinogenesis in Transgenic mouse models, *Environ. Health Perspec.*, **105**(9): 912-913.
- McCann J.S., Kabori, N.E. and Ames, B.N. (1975): Detection of carcinogens as mutagens : bacterial tester strains with R-factor plasmids, *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **72**: 979-983.
- Mirsalis, J.C. (1995): Transgenic models for detection of mutations in tumors and normal tissues of rodents, *Toxicology Lett.*, **82/83**: 131-134.
- Nishino, H., Knoll, A., Buettner, V.L., Frisk, C.S., Maruta Y., Haavik, J. and Sommer, S.S. (1995): p53 wild-type and p53 nullizygous Big Blue transgenic mice have similar frequencies and patterns of observed mutation in liver, spleen and brain, *Oncogene*, **11**: 263-270.
- Piegorsch, W.W., Margolin, B.H., Shelby, M.D., Johnson, A., French, J.E., Tennant, R.W. and Tindall, K.R. (1995): Study design and sample sizes for a *lac I* transgenic mouse mutation assay, *Environ. Mol. Mutagen.*, **25**: 231-235.
- Provost, G. S., Kretz, P.L., Hamner, R.T., Matthews, C.D., Rogers, B.J., Lundberg, K.S., Dyaico, M.J. and Short, J. M. (1993): Transgenic systems for *in vivo* mutation analysis, *Mut. Res.*, **288**: 1.
- Recio, L. (1995): Transgenic animal models and their application in mechanistically based toxicology research, *CIIT Activities*, **15**(10): 1-10.
- Ryu, J.-C. (1996): Transgenic systems for *in vivo* mutation analysis, 제 33차 KIST-KITA 협동공개강좌, 109-130.
- Ryu, J.-C., Youn J.-Y., Cho K.-H. and Chang I.-M. (1998a): Mutation spectrum in *lac I* gene in transgenic Big Blue cell line following to short term exposure of 4-Nitroquinoline N-oxide, 29th Annual meeting of the Environmental Mutagen Society, Anaheim, California, Mar. 21-26, Abstract Accepted.
- Ryu, J.-C., Youn J.-Y., Cho K.-H. and Chang I.-M. (1998b): The study of mutation spectrum in *lac I* gene in transgenic Big Blue cell line following to short term exposure of 4-Nitroquinoline N-oxide, manuscript in preparation.
- Schaaper, R.M., Bryan, N.D., and Glickman, B.W. 1986: Mechanisms of spontaneous mutagenesis: An analysis of the spectra of spontaneous mutation in the *Escherichia coli lac I* gene, *J. Mol. Biol.*, **189**: 273-284.
- Shephard, S.E., Sengstag, C., Lutz, W.K. and Schlatter, C. (1993): mutation in liver DNA of *lac I* transgenic mice (Big Blue) following subchronic exposure to 2-acetylaminofluorene, *Mut. Res.*, **302**: 91-96.
- Shephard, S.E., Lutz, W.K. and Schlatter, C. (1994): The *lac I* transgenic mouse mutagenicity assay: quantitative evaluation in comparison to tests for carcinogenicity and cytogenetic damage *in vivo*, *ibid.*, **306**: 119-128.
- Shephard, S.E., Gunz, D. and Schlatter, C. (1995): Genotoxicity of agritine in the *lac I* transgenic mouse mutation assay: Evaluation of the health risk of mushroom consumption, *Fd. Chem. Toxic.*, **33**(4): 257-264.
- Skopek, T.R., Kort, K.L. and Marino, D.R. (1995): Relative sensitivity of the endogenous *hprt* gene and *lac I* transgene in ENU-treated Big Blue B6C3F1 mice, *Environ. Mol. Mutagen.*, **26**: 9-15.
- Sofuni, T., Suzuki, T. and Hayashi M. (1996): Initial consideration for use of transgenic mutation assays in a regulatory submission, *ibid.*, **28**: 443-446.
- Summers, W.C., Glazer, P.M. and Malkevich, D. (1989): Lambda phage shuttle vector for analysis of mutations in mammalian cells in cultures and in transgenic mice, *Mut. Res.*, **220**: 263-268.
- Tao, K.S., Urlando, C. and Heddle, J.A., (1993): Comparison of somatic mutation in a transgenic versus host locus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**: 10681-10685
- Thomas R.S., Kristy L.K. and Deborah R.M. (1995): Relative sensitivity of the endogenous *hprt* gene and *lac I* transgene in ENU-treated Big Blue B6C3F1TM mice, *Environ. Mol. Mutagen.*, **26**: 9-15.
- Wyborski, D.L., Malkhosyan, S., Moores, J.C., Perucho, M., Short, J.M. (1995): Development of a rat cell line containing stably integrated copies of a *lambda/lac I* shuttle vector, *Mut. Res.*, **334**: 161-165.
- Yamasaki, H., Ashby, J., Bignami, M., Jongen, W., Linnainmaa, K., Newbold, R.F., Nguyen-Ba, G., Parodi, S., Rivedal, E., Schiffmann, D., Simons, J.W.I.M. and Vasseeur, P. (1996): Nongenotoxic carcinogens: development of detection methods based on mechanisms: a European project, *ibid.*, **353**: 47-63.
- Youn J.-Y., Kim K.-R., Cho K.-H. and Ryu J.-C. (1996): The study of mutation spectrum in *lac I* gene in transgenic Big Blue cell line following to short term exposure of 4-Nitroquinoline N-oxide, International symposium on "Recent Advances in Molecular Toxicology and Carcinogenesis" and the Fall Conferences of the Korean Society of Toxicology and the Korean Environmental Mutagen Society, p.39 and the 19th symposium of the Korean Society of Environmental Toxicology, p.64.
- Youn J.-Y., Kim K.-R., Cho K.-H. and Ryu J.-C. (1997a): The study of mutation spectrum in *lac I* gene in transgenic Big Blue cell line following to short term exposure of 4-Nitroquinoline N-oxide, The Fall Conferences of the Korean Society of Toxicology and the Korean Environmental Mutagen Society, p.78 and the 20th symposium of the Korean Society of Environmental Toxicology, p.103.
- Youn J.-Y. and Ryu J.-C. (1997b): *lac I* gene을 target으로 한 Transgenic Big Blue Mutation Assay, 제37차 KIST-KITA 협동공개강좌, 149-161.
- Youn J.-Y. (1998): Study of mutation spectrum in *lac I* gene in transgenic Big Blue cell line following to short term exposure of 4-Nitroquinoline N-oxide, Seoul Women's University, Thesis for the master's degree.
- Zimmer, D.M., Zhang, X.B., Harbach, P.R., Mayo, J.K. and Aron, C.S. (1996): Spontaneous an Ethylnitrosourea-induced mutation fixation and molecular spectra at the *lac I* transgene in the Big Blue Rat-2 Embryo cell line, *Environ. Mol. Mutagen.*, **28**: 325-333.