

DNA Comet Assay를 이용한 방사선 조사 쇠고기와 돼지고기의 검지 기술

박준영 · 오경남 · 김경은 · 양재승[†]

한국원자력연구소 방사선조사식품 검지개발실

Detection of Irradiated Beef and Pork by DNA Comet Assay

Jun-Young Park, Kyeong-Nam Oh, Kyeong-Eun Kim and Jae-Seung Yang[†]

Detection Laboratory of Irradiated Food, Korea Atomic Energy Research Institute, Taejon 305-353, Korea

Abstract

This study was conducted to investigate whether a DNA comet assay could be applied for identifying irradiated pork and beef. Pork and beef were irradiated with Co-60 gamma rays at 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 and 1.0 kGy, and stored in a freezer. Cells separated from the samples were embedded in agarose gel on a slide, dissolved in a lysis solution, and electrophoresed at 2 V/cm for 2.0 min by horizontal electrophoresis. The cells were then stained with a silver staining in order to visualize the DNA using a microscope. The DNA fragments of the irradiated cells stretched or migrated out of the cells and formed tails towards the anode, giving the appearance of comets, while unirradiated cells formed very short or no tails. The distance of DNA migration increased with irradiation dose. Since the statistical analysis showed a significant correlation between tail length and irradiation dose, a DNA comet assay could provide not only identification but also estimation of the irradiation dose for irradiated beef and pork.

Key words: irradiation detection, DNA comet assay, beef, pork

서 론

식품의 방사선 조사는 미생물의 생육억제, 해충구제, 발아억제, 숙도조절, 환자식 멸균 등의 목적으로 이용되어 왔으며, 최근에는 식품에 화학물질 처리의 금지가 확산되어 방사선 조사가 병원성 및 부패 미생물을 구제하는데 효과적인 방법으로 인식되고 있다(1,2). 미국에서는 돼지고기에 기생하는 *Trichinella spiralis*를 구제할 목적으로 1985년에 돼지고기의 방사선조사를 허용하였으며, 1992년에는 가금류에 문제가 되어온 *Salmonella*의 생육을 억제할 목적으로 방사선 조사를 허용하였다. 또한 1997년 전세계적으로 문제가 된 *Escherichia coli* O157:H7의 생육을 억제하기 위하여 쇠고기를 비롯한 모든 육류에 방사선 조사를 허용하기도 하였다. 이와 같이 미국을 비롯한 각국에서는 자국의 실정에 맞게 방사선 조사 관련 규정을 정하여 식품을 방사선조사 하고있다.

한편, 방사선 조사공정의 상업화, 조사식품의 대규모 국제교역, 조사기술 이용에 관한 나라별 서로 다른 규제, 그리고 조사식품의 분명한 표시를 바라는 소비자들의 요청으로 식품자체에 적용될 수 있는 조사 검출법의 필요성은 아주 높다(3). 그러나 이를 뒷받침 할 방사선 조사 검지 방법은 아직 확립되지 않은 상태에 있다. 방사선

조사 식품 검지와 관련하여 현재까지 연구되고 있는 방법으로는, 양념류, 건조 채소 등에 대한 thermoluminescence(TL) 분석법(4), 뼈나 씨를 함유한 저수분 함유 식품에 대한 electron spin resonance(ESR) spectroscopy(5), 식품의 지방 중에 함유된 hydrocarbon 이나 cyclobutanone의 GC 분석(6,7), 그리고 식품중의 DNA의 파손 정도를 측정하는 DNA comet 분석법(8-10) 등이 있다.

DNA는 조사에 의하여 민감하게 염기의 손상이나, 일중, 이중나선의 절단 그리고 염기간의 교차결합이 일어나므로 DNA comet 분석을 이용해 단일세포에서 DNA 손상과 회복을 조사할 수 있다. Comet 분석의 장점은 분석에 필요한 세포현탁액의 세포수가 $1 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5$ /mL 정도로 시료의 양이 적다는 점, 세포간 DNA 손상 정도와 회복의 차이점을 알 수 있는 점, 그리고 분석결과는 하루 안에 얻을 수 있다는 점에 있다(11-14).

DNA comet 분석은 Östling과 Johanson에 의해서 1984년에 발표된 이래 radiation biology, oxidation damage 측정, genetic toxicology, apoptosis 등 다양한 분야에 활용되고 있다(13). 조사식품의 국제교역이 증가함에 따라 DNA comet 분석을 이용한 방사선조사 식품의 신속한 검지를 위해 판별하고자 육류, 어류, 곡류, 종실류 등 많은 연구들이 진행되고 있다(15-17). 육류의 경우 Cerda

[†]To whom all correspondence should be addressed

등에 의해서 1~5 kGy까지 고준위로 방사선 조사시 방사선 조사 검지 방법이 보고되었다(9,16). 그러나 아직 1.0 kGy 이하 저선량 조사된 육류의 검지방법에 대해서는 보고되어 있지 않았다. 따라서 본 연구에서는 쇠고기와 돼지고기의 저선량 조사시 DNA comet assay를 이용하여 신속하게 판별할 가능성 및 선량에 대한 육류의 DNA 파손정도를 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

방사선 조사 및 시약

쇠고기와 돼지고기는 대전에 있는 대형매장에서 국내산으로 구입하여 polyethylene film으로 육질 부분만을 30 g 단위로 포장한 후 한국원자력연구소에 있는 50만 Ci의 Co-60 동위원소 조사시설(AECL, Canada)을 이용하여 총 흡수선량($\pm 5.0\%$)이 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 kGy가 되도록 조사하였다. 총흡수선량은 ceric-cerous dosimeter를 이용하여 확인하였으며 조사된 시료는 냉동상태에 보관하면서 실험에 사용하였다.

실험에 사용된 시약은 Sigma Chemical Co. 및 Pharmacia Biotech., FMC Bioproducts에서 구입하여 사용하였다.

Precoated agarose 슬라이드 제조

현미경 슬라이드(Marienfeld Superior, Germany, 76 × 26 mm)를 methanol에 하룻밤 동안 침지 후 건조(air dry)시킨 다음 이 슬라이드에 증류수로 용해시켜 45°C로 유지한 0.5% agarose(normal melting point agarose, FMC Bioproducts, USA)용액 1방울(~50 μ L)을 균일하게 도포하였다. 그 후, 약 30분간 상온건조시켜서 precoated agarose 슬라이드를 제조하였다.

단일세포 현탁액의 제조

시료 2 g을 결방향으로 메스를 이용하여 분리한 후 냉장 보관된 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4, Pharmacia Biotech., Sweden) 10 mL와 혼합한 다음 저온에서 magnetic stirrer(Corning PC-410, USA)를 이용하여 300 rpm에서 5분 동안 균질화하였다. 이 현탁액을 nylon cloth(pore size 200 μ m)로 거른 후 냉장상태에서 10분 동안 정지시킨 다음 이 상정액 3 mL를 취하여 다시 nylon cloth(pore size 100 μ m)로 거른 상정액을 분석용시료로 사용하였다.

단백용해, 전기영동 및 염색

1% low-melting point agarose를 microwave(Samsung, Korea)에서 PBS로 용해시켜 40°C로 보존하고 500

μ L를 취해 세포 현탁액 250 μ L와 혼합한 후 이 중 100 μ L를 취해 precoated agarose 슬라이드에 고르게 퍼 얼음 위에서 굳혔다. 겔이 형성된 슬라이드를 냉장 보관한 lysis buffer(0.1% SDS in TBE)로 5분 동안 용해시켰다. 단백용해된 슬라이드를 4°C 증류수에서 5분 동안 침지하여 염을 제거한 후 SDS가 배제된 TBE buffer(45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA, pH 8.4)용액에 5분 동안 침지시킨 다음, 전기영동(Model B1A, Owl Scientific, Inc., USA) tray 위에 agarose 끝부분을 (+)극 방향을 향하게 놓고, 냉장 보관된 TBE buffer용액이 슬라이드 위로 2~4 mm 정도 올라오도록 채워 넣은 후 2 V/cm로 2분 동안 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후 슬라이드를 5분간 증류수로 세척한 후 60분 동안 건조(air dry)시켰다. 슬라이드는 다시 냉장 보관된 fixing 용액에 10분 동안 침지시켜 DNA를 고정하였다. DNA는 silver staining으로 염색하여 현미경으로 관찰하였다(18-20).

현미경 관찰 및 통계분석

Comet의 분석은 광학현미경(Nikon, Eclipse E400)을 사용하여 배율 ×100에서 일반적인 관찰을 하였고, 배율 ×200에서 comet tail 길이를 측정하였다. Comet tail 길이의 측정은 슬라이드에서 무작위로 선택하여 핵체의 중심에서부터 tail의 끝까지 측정하여 평가하였고(18), 한 시료당 3개의 슬라이드로 2회 반복 실험을 실시하였다. 한 시료당 100개씩 측정된 tail 길이의 통계분석은 SPSS Version 9.0 for windows를 사용하였으며 조사선량간의 tail 길이의 유의성은 일원배치분석(One-Way ANOVA)에서 Scheffe test를 이용하여 검정하였고, 조사선량과 tail 길이간의 상관관계는 Pearson correlation coefficient(r)로 살펴보았다.

결과 및 고찰

방사선 조사의 영향에 의하여 절편된 DNA는 전기영동을 하는 동안 핵체(nuclei)로부터 분리되어 tail을 형성하고 이 DNA는 형광염색이나, silver staining을 하여 현미경으로 관찰이 가능하다. DNA comet assay에 영향을 주는 주요 인자는 단일세포 현탁액의 제조시 외부영향(온도, 충격 등)에 의한 DNA의 파손, agarose gel의 농도, lysis buffer의 pH, 농도 및 시간, lysis 후 슬라이드에 남아있는 염의 농도와 전기영동의 세기 및 시간 등이다(13,15). 본 실험에서는 외부영향에 의한 DNA의 파손을 최소화하기 위해 시료와 시약의 온도는 항상 냉장은 도로 유지하였고, lysis buffer의 pH를 중성(pH 8.4)으로 하였다. 최적조건을 설정하기 위해 lysis buffer의 농도와 시간 그리고 전기영동의 세기와 시간을 변화시켜 측정된 결과, 0.1% SDS/TBE, pH 8.4, 그리고 5분의 lysis와 2

V/cm 및 2분의 전기영동 조건에서 비조사 시료의 경우 tail이 있는 세포가 가장 적게 나타났고, 조사 시료에서는 모든 세포에서 tail이 관찰되었다.

쇠고기의 경우 비조사 시료에서는 tail이 나타나지 않거나 일부 세포에서 매우 작은 tail만이 관찰되었으나, 0.5와 1.0 kGy에서는 모든 세포에서 tail이 관측되었고 조사선량이 증가함에 따라 tail의 길이가 길어지고 tail의 끝이 커지는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 돼지고기의 경우도 비조사 시료에서 tail이 나타나지 않아서 쇠고기와 마찬가지로 비조사 시료, 0.5 kGy 그리고 1.0 kGy를

현미경상으로 식별이 가능하였다(Fig. 2). Cerda의 연구(21)에서는 방사선 조사선량이 본 연구보다 높았으나 조사된 육류가 조사되지 않은 육류보다 tail 길이가 길게 측정되어 비조사 시료와 조사시료의 식별이 가능하다고 하였다.

Fig. 3은 조사선량에 대한 쇠고기와 돼지고기 tail 길이의 변화량을 나타낸 것으로, 쇠고기의 경우 조사 시료 0.1 kGy부터 tail 형성이 관측되기 시작하였고 조사선량에 따른 tail 길이는 비례하게 증가하였다. 돼지고기의 경우 0.5 kGy까지는 tail 길이가 조사량에 비례하게 증가

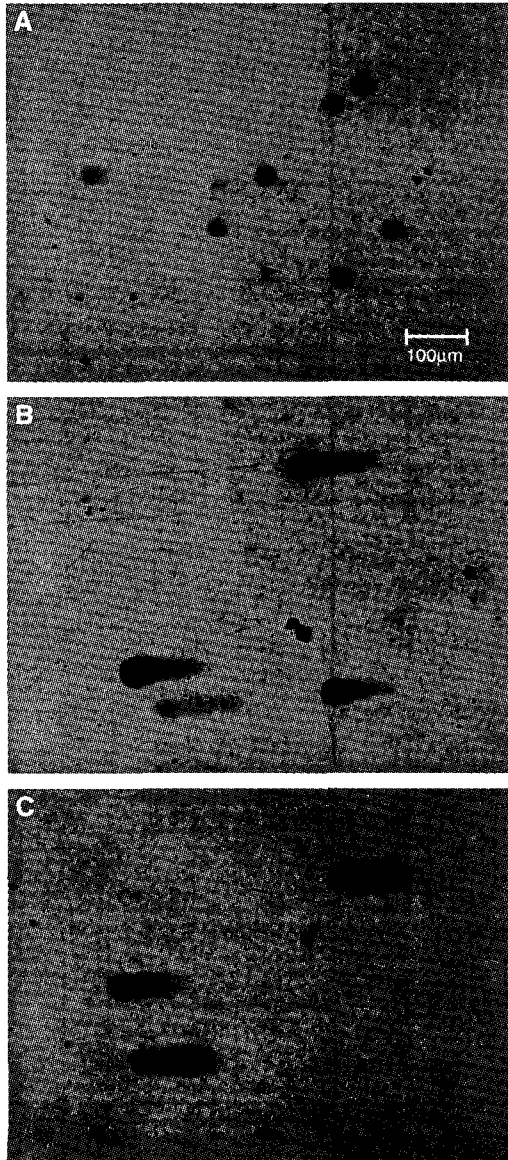


Fig. 1. DNA migration of beef muscle-cells electrophoresed with 2 V/cm, 2 min in neutral assay. A: unirradiated, B: 0.5 kGy, and C: 1.0 kGy. Silver staining. Microscope objective $\times 10$.

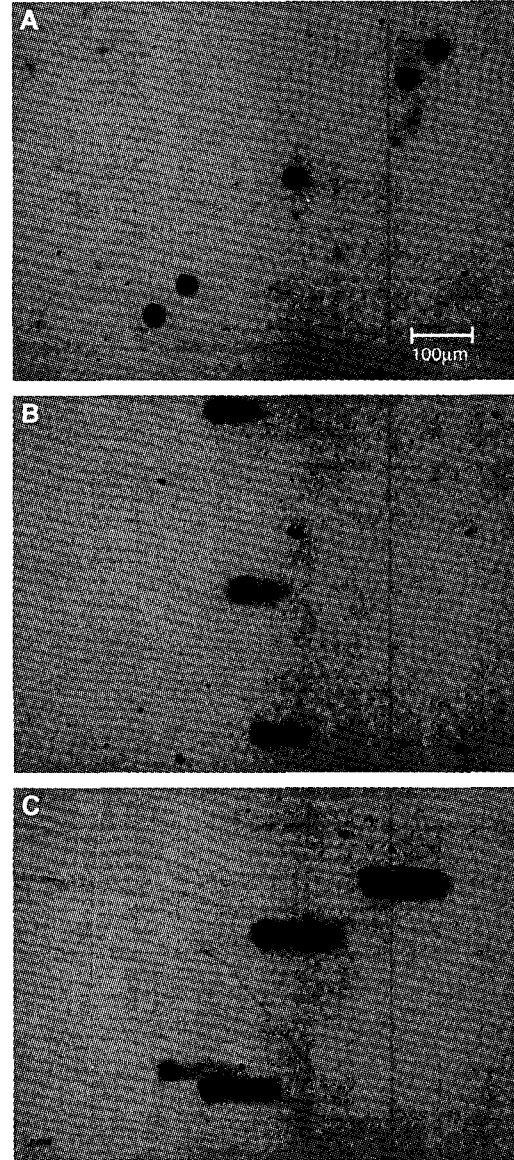


Fig. 2. DNA migration of pork muscle-cells electrophoresed with 2 V/cm, 2 min in neutral assay. A: unirradiated, B: 0.5 kGy, and C: 1.0 kGy. Silver staining. Microscope objective $\times 10$.

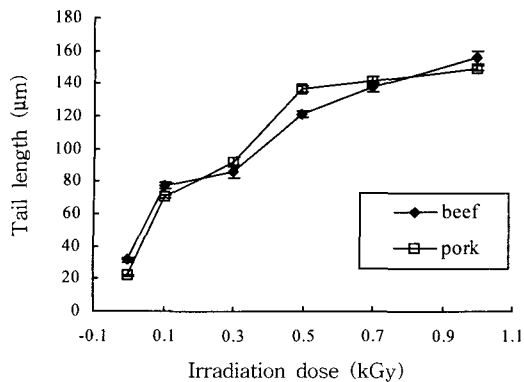


Fig. 3. Dose vs. tail length of the comet from 100 nuclei of beef and pork irradiated at different doses.

Values are the mean and standard error (bars).

하였으나, 0.5 kGy부터 tail 길이의 증가가 적었다.

조사 선량에 대한 쇠고기와 돼지고기 tail 길이를 유의성 검증한 결과, 쇠고기의 경우 0.1과 0.3 kGy, 그리고 0.3과 0.5 kGy 사이를 제외하고는 모든 선량간에 유의적인 차이가 있는 것으로 나타났다($p < 0.05$). 돼지고기의 경우는 0.5 kGy까지는 조사 선량에 대한 tail 길이가 유의적인 차이를 나타냈으나 0.5 kGy 이상의 선량에서는 유의적인 차이가 없었다($p > 0.05$).

조사선량과 tail 길이의 상관관계를 살펴본 결과, 상관계수(r)가 쇠고기의 경우 0.774, 돼지고기의 경우 0.826으로 매우 높아서 조사선량이 tail 길이 결정에 상당한 영향을 미침을 알 수 있었다.

쇠고기와 돼지고기를 구분하지 않고 육류로 묶은 뒤 각 선량간의 tail 길이의 차이가 있는지 알아본 결과 모든 선량 사이에 유의적인 차이를 보였다 ($p < 0.05$). Fig. 4는 육류(쇠고기, 돼지고기)의 조사 선량에 대한 대략적인 tail 길이 변화를 알아보기 위해 조사 선량에 대한 육류의 tail 길이를 boxplot으로 나타내었다. 비조사 시료에서 쇠

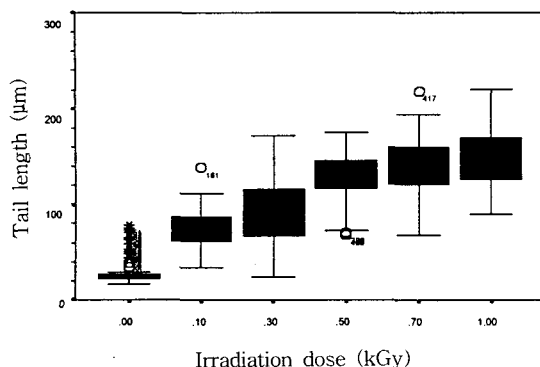


Fig. 4. Boxplot of tail length vs. irradiation dose after combining beef and pork. (n=200 per each dose)

고기와 돼지고기의 핵체 크기가 달라 outlier 값이 많이 나타났지만 tail 길이의 범위가 작았다. 측정된 comet tail 길이 가운데 50%가 비조사 시료인 경우 21.87~26.73 µm, 0.1 kGy는 61.36~87.48 µm, 0.3 kGy는 66.21~116.03 µm, 0.5 kGy는 116.64~145.80 µm, 0.7 kGy는 121.50~160.38 µm 그리고 1.0 kGy는 126.36~170.10 µm에 분포하였다.

이상의 결과를 종합해 보면, DNA comet assay를 이용하여 쇠고기와 돼지고기의 방사선 조사 여부를 확인해 본 결과 두 시료 모두 조사 선량이 증가할수록 tail 길이가 증가하여 현미경상으로 조사시료와 비조사 시료의 뚜렷한 구분이 가능하였다. 그러나 조사선량간의 tail 길이 차이는 현미경상으로 구분하기 어려우나 Scheffe test 결과 쇠고기에서 0.1 kGy와 0.3 kGy사이, 돼지고기 0.5, 0.7, 및 1.0 kGy사이를 제외하고는 다른 조사선량간의 tail 길이가 유의적인 차이가 있었다($p < 0.05$). 따라서 1.0 kGy 이하 저선량으로 방사선 조사된 육류(쇠고기, 돼지고기)의 DNA 손상 정도를 comet assay로 신속하게 검지할 수 있고, 대략적인 조사량을 추정할 수 있어 육류의 수입 통관 절차과정에서 방사선조사 여부의 판별에 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

방사선 조사된 쇠고기와 돼지고기의 방사선 조사 여부를 판별하는데 DNA comet assay의 활용 가능성을 검토하였다. 쇠고기와 돼지고기는 Co-60 동위원소를 조사원으로 하여 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 kGy의 총흡수선량($\pm 5.0\%$)이 되도록 조사하여, 냉동상태로 보관하였다. 시료로부터 분리된 세포는 agarose gel과 혼합하여 슬라이드에 깔아주고, lysis 및 전기영동을 하였다. 방사선 조사된 시료의 경우 세포로부터 끌려나오는 DNA 절편들은 양극을 방향으로 tail이 형성되었고, 비조사 시료의 경우 tail이 없거나, 일부에서만 작은 tail이 관찰되었다. 방사선 조사유무는 0.1 kGy부터 현미경상으로 검지가 가능하였고, 선량간 차이의 유의성 여부는 통계분석을 통하여 검지가 가능하여, 쇠고기와 돼지고기의 신속한 검지 방법으로 DNA comet assay를 활용할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 2000년도 과학기술부의 원자력 중장기 연구비 지원으로 수행된 연구결과의 일부로서 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Diehl, J.F.: Potential and actual applications of food irradiation. *In Safety of Irradiated Food*. Marcel Dekker Inc., New York, p.217-246 (1995)

2. Schreiber, G.A., Helle, N. and Bögl, K.W. : Detection of irradiated food-methods and routine applications. *Int. J. Radiat. Biol.*, **59**, 105-130 (1993)
3. Yang, J.S. : General survey of detection methods for irradiation foods. *J. Korean Nuclear Society*, **29**, 500-507 (1997)
4. Goksu, H.Y., Regulla, D.F., Hietel, B. and Popp, G. : Thermoluminescent dust for identification of irradiated spices. *Radiat. Prot. Dos.*, **34**, 319-322 (1990)
5. Desrosiers, M.F. and Simic, M.G. : Postirradiation dosimetry of meat by electron spin resonance spectroscopy of bones. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 601-603 (1988)
6. Bergaentzle, M., Sanquer, F., Hasselmann, C. and Marchioni, E. : Detection of γ -irradiated raw-milk camembert cheeses by capillary gas chromatographic analysis of volatile hydrocarbons. *Food Chemistry*, **51**, 177-182 (1994)
7. Crone, A.V.J., Hamilton, J.T.G. and Stevenson, M.H. : Effect of storage and cooking on the dose response of 2-dodecylcyclobutanone, a potential marker for irradiated chicken. *J. Sci. Food Agric.*, **58**, 249-252 (1992)
8. Cerda, H., Delincée, H., Haine, H. and Rupp, H. : The DNA 'comet assay' as a rapid screening technique to control irradiated food. *Mutation Research*, **375**, 167-181 (1997)
9. Delincée, H. : Rapid and simple screening tests to detect the radiation treatment of foods. *Radiat. Phys. Chem.*, **46**, 677-680 (1995)
10. Delincée, H. : Detection of irradiated food : DNA fragmentation in grapefruits. *Radiat. Phys. Chem.*, **52**, 135-139 (1998)
11. Koppen, G. and Cerdar, H. : Identification of low-dose irradiated seeds using the neutral comet assay. *Food Sci. Technol.*, **30**, 452-457 (1997)
12. Ahnstrom, G. : Techniques to measure DNA single strand breaks in cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, **54**, 697-702 (1988)
13. Whitaker, S.J., Powell, S.N. and Mcmillan, T.J. : Molecular assay and radiation-induced DNA damage. *Eur. J. Cancer*, **27**, 922-928 (1991)
14. Böcker, W., Bauch, T., Müller, W.-U. and Streffer, C. : Technical report image analysis of comet assay measurements *J. Radiat. Biol.*, **72**, 449-460 (1997)
15. Fairbairn, D.W., Olive, P.L. and O'Neill, K.L. : The comet assay : A comprehensive review. *Mutation Research*, **339**, 452-457 (1997)
16. Cerda, H. : Detection of irradiated frozen food with the DNA 'Comet Assay'. *Radiat. Phys. Chem.*, **52**, 141-144 (1997)
17. Haine, H.E. and Jones, L. : Microgel electrophoresis of DNA as a method to detect irradiated foods. *Food Sci. Technol. Today*, **8**, 103-105 (1994)
18. Black, J.A. : A silver stain for isoelectric focusing in agarose gel and its application for analyzing unconcentrated cerebrospinal fluid. *Electrophoresis*, **6**, 27-29 (1985)
19. Gottlieb, M. and Chavko, M. : Silver staining of native and denatured eucaryotic DNA in agarose gels. *Analytical Biochemistry*, **165**, 33-37 (1987)
20. Cerda, H. : DNA silver staining after electrophoresis in agarose gels. *Changes in DNA for the detection of irradiated food*. Delincée, H. (ed.), Commission of the EUR, Strasbourg, May 1992, EUR 15012, p.25-26 (1993)
21. Cerda, H. : Detection of irradiated fresh chicken, pork and fish using the DNA comet assay. *Lebensm. Wissensch. Technol.*, **31**, 89-92 (1998)

(2000년 7월 18일 접수)