

어류혈구세포에 있어서 Single Cell Gel Electrophoresis를 응용한 DNA Single Strand Break의 측정

김기범* · Richard F. LEE¹ · Keith A. MARUYA¹

경상대학교 해양환경공학과 / 해양산업연구소

¹Skidaway Institute of Oceanography, USA

Application of Single Cell Gel Electrophoresis for Detection of DNA Single Strand Breaks in DNA of Fish Blood Cell

Gi Beum KIM*, Richard F. LEE¹, Keith A. MARUYA¹

Department of Marine Environmental Engineering / The Institute of Marine Industry,

Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea

¹Skidaway Institute of Oceanography, 10 Ocean Science Circle, Savannah, Georgia, 31411, USA

Single-cell gel electrophoresis (comet assay) was used to detect DNA single strand break in blood cells from several marine fish species. Three fish species were collected from Georgia coastal area. Mummichog, *Fundulus heteroclitus* showed higher DNA damage than sea bass, *Lateolabrax japonicus* and trout, *Oncorhynchus masou masou* under the same experimental conditions. Mummichogs had more alkaline-labile sites on their DNA than other fish species. The comet assay with mummichog blood cells at pH 12.5 showed a dose-response curve with the increasing concentrations of hydrogen peroxide. While the isolated leucocytes showed no increase of DNA damage after *in vitro* exposure to 2-methyl-1,4-naphthoquinone (MNQ), erythrocytes showed dose-dependent DNA damage. These results indicate that the comet assay can be applied successfully as a bioassay using erythrocyte for environmental monitoring.

Key words: DNA single strand break, Comet assay, Fish, Leucocyte, Erythrocyte

서 론

자외선 및 여러 유해오염물질들은 생물체내에 흡수되어 칙·간접적으로 DNA에 손상을 일으키며, 대부분 DNA 복구과정을 통해 그 손상이 회복되어지게 된다. 특정 물질의 노출에 의해 유도된 DNA의 약한 손상은 세포내 DNA 수복기구에 의해 완벽한 복구가 가능하나, 손상 정도가 심한 경우에는 복구가 완벽히 되지 않는다. X-선에 노출된 인간 백혈구의 경우 빠른 속도로 회복되지만, 최종적으로는 초기 DNA 손상의 5%는 회복되지 않고 남아있음이 보고된 바 있고 (Banáth et al., 1998), UV에 노출된 새우 알의 경우도 초기 DNA 손상의 50%가 회복되지 않음이 발견된 바 있다 (Kim et al., 2000). 이러한 경우 DNA 복제 억제, 돌연변이 유발 및 DNA로부터 RNA로의 완전한 전사가 일어나지 않아 특정 효소의 발현이 저해되어 생물체에 심각한 악영향을 일으키게 되며, 결국 효소 활동 저해, 일반대사 기능 저하, 세포내 기능손상, 성장 저해, 조직 혹은 기관 위축 및 기능 저하, 성장둔화, 노화, 면역기능 저하, 생식기능 저하, 질병에 잦은 노출, 그리고 주위 환경에 적응력 저하 등을 야기시킬 수 있다. 또한 그 손상 정도가 심각한 경우 결국 종의 소멸을 가져와 먹이 연쇄과정을 타고 생태계 전체에 문제를 일으키게 될 가능성 역시 배제할 수 없다 (Kurelec, 1993). 특히 인근해 표층 해역에서는 UV과 오염물질의 유입이 많아 표층에서 일정기간을 지내는 해양

생물종의 일의 경우 발달단계 초기에 야기된 DNA손상은 성체로의 정상적인 발달을 저해함으로써 양식산업에 큰 영향을 끼칠 수 있다.

단일세포 젤 전기영동법 (single-cell gel electrophoresis), 일명 comet assay는 단일세포 수준에서 DNA 단일가닥 손상 (single strand break)과 alkali-labile site, 그리고 DNA손상부위의 회복중 불완전한 DNA excision부위를 검출할 수 있는 방법으로서 (Koppen and Angelis, 1998; Mohankumar et al., 2002; Nigro et al., 2002; Ünde er and Ba aram, 2002) 본 기법은 수 mg 정도의 소량의 시료로 분석이 가능하고, 분석방법이 경제적이고 간편할 뿐만 아니라 (Singh, et al., 1988, McKelvey-Martin et al., 1993), 10^{10} dalton 당 1개의 DNA 단일가닥 손상을 측정할 수 있을 만큼 뛰어난 감도를 지니고 있다 (Gedik et al., 1992). 이는 일반적으로 많은 물질들이 DNA 이중가닥보다 DNA 단일가닥을 5-2000배 정도 더 유발하기 때문에 DNA 이중가닥 손상을 측정하는 기존의 방법 (Shugart, 1988)에 비해 더욱 유용하다고 할 수 있다.

이러한 장점으로 인해 comet assay는 1990년대 초반부터 다양한 응용과학 분야에 이용되어지기 시작하였으며, 최근 들어 의학의 여러 분야 (prenatal diagnosis, DNA repair deficiency syndrome, cancer susceptibility, cancer therapy, diabetes mellitus, rheumatoid arthritis 등) 뿐만 아니라, 그 응용범위가 넓혀져 생물학이나 독성학 분야 (genotoxicity, aging, exercise, nutrition, cell cycle analysis, free radical biology,

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

nutritional toxicology, phytoprotectants 등)에서도 폭넓게 이용되고 있다. 이 방법은 최근 해양오염 모니터링에서도 적용되어 해양생물에 있어서도 DNA 단일가닥 손상을 감지하는 수단으로 사용되어지기 시작하였다 (Nacci et al., 1996; Steinert et al., 1998; Lee et al., 1999, 2000; Kim et al., 2000; Lee and Kim, 2002).

본 연구에서는 어류 혈구세포에 있어서 DNA 손상유무를 오염지역의 생물학적 환경 모니터링의 도구로서의 이용가능성을 조사하기 위한 연구의 일환으로 미국 조지아주 연안지역의 3종 어류를 가지고 comet assay를 실행하여 최적의 실험 조건과 적합한 표적세포를 제시하였다.

재료 및 방법

어류 채취

미국 조지아주 사바나 인근 연해에서 송어 (*Oncorhynchus masou masou*), 농어 (*Lateolabrax japonicus*) 및 mummichog (*Fundulus heteroclitus*)가 낚시 혹은 어망으로 채취하였다. 혈액의 채취는 항응고제인 EDTA로 처리된 25G 주사기를 항문 뒤쪽으로 주입하여 배주동맥으로부터 10-100 μL 정도를 채취하였다.

in vitro 노출 실험

25G 주사기를 이용하여 채취되어진 혈액을 Hank's balanced salt solution (HBSS; 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM Na₂HPO₄, 0.4 mM KH₂PO₄, 4.2 mM NaHCO₃, 5.6 mM C₆H₁₂O₆)로 약 10⁵ cells/mL가 되도록 희석한 후 100 μL 씩 원심분리용 튜브에 옮겨 담는다. 여기에 H₂O₂ (1-10 μM) 혹은 2-methyl-1,4-naphthoquinone (MNQ, 0.1-10 μM)을 적정 농도가 되도록 첨가한 후 HBSS로 최종부피가 1 mL가 되도록 하여 실온 (약 25°C)에서 1시간 또는 2시간씩 노출하였다.

백혈구 분리

25G 주사기를 이용하여 채취되어진 100 μL 혈액을 1 mL HBSS에 희석하여 원심분리용 튜브에 넣었다. 300 μL Histopaque을 HBSS의 아래층으로 천천히 훌려넣은 후 15,000 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 두 층의 경계면에서 100 μL 를 취하여 새로운 원심분리용 튜브에 옮겨 담고 HBSS를 첨가하였다. 4,500 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 버리고, 이 과정을 한번 더 반복하여 백혈구를 혈액으로부터 분리하였다.

Comet assay

일반적인 분석방법은 Singh et al. (1988)에 의거하여 수행하였다. HBSS 1 mL가 채워진 원심분리용 튜브에 25G 주사기로 뽑은 어류 혈액 수십 μL 를 넣은 후 5분간 2,000 rpm에서 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액은 버리고 가라앉은 혈구를 0.6% low-melting agarose (LMA) gel 30 μL 로 재부유시킨 후 미리 1.5% normal-melting agarose gel로 코팅되어진 슬라이드에 올려놓고 커버글라스를 덮었다. 3분간 슬라이드를 얼음 위에서

웅고시킨 후 다시 한번 0.6% LMA로 코팅하여 다시 3분간 얼음 위에서 웅고시킨다. 웅고시킨 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 2시간 이상 냉장 보관하였다. 그 후, 4°C 중류수가 담긴 coplin jar에 슬라이드를 2분 간격으로 3번 옮기면서 염을 제거하였다. DNA unwinding buffer solution (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, >pH 13)를 넣은 4번째 coplin jar에 슬라이드를 15분간 냉장 보관하였다. 이 때 DNA 이중가닥은 단일가닥으로 풀어진다. 어종에 따라 DNA unwinding buffer solution의 pH를 조절하였으며, pH의 조절은 상기의 방법으로 만든 완충용액에 염산을 첨가하면서 실시하였다. 그 다음 슬라이드를 동일한 DNA unwinding buffer solution로 채워진 전기 영동기에 넣고 25분간 25V, 300mA에서 전기 영동을 실시하였다. 이 때 잘게 부서진 DNA 단일가닥은 (+)극으로 이동하게 된다. 전기 영동한 슬라이드를 중성화시키기 위하여 0.4M 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$)으로 염색시켜 형광현미경 (Nikon Eclipse E200)으로 200배 배율에서 관찰하였다. 염색되어진 DNA의 영상을 CCD카메라를 통해 컴퓨터로 불러들인 후, 이미지자동분석 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, 이들로부터 평균과 표준오차를 구하였다. 대조구와 처리구와의 차이는 student *t*-test를 통하여 산출하였으며, 유의수준 (*p*)은 0.05를 기준으로 하였다.

결과 및 고찰

어종별 DNA 손상 차이

comet assay를 시행한 후 DNA 손상이 전혀 없는 세포핵과 DNA 단일가닥 손상이 많이 나타난 세포핵의 대표적인 이미지를 Fig. 1에 나타내었다. DNA 단일가닥 손상이 많은 경우 상대적으로 단일가닥의 길이가 짧아져 (+)극으로 많이 이동하게 되어 Fig. 1(b)에 나타난 것과 같이 혼성처럼 꼬리가 길어지게 된다. 꼬리부분에 DNA의 양이 많거나 꼬리의 길이가 길어지면 Tail moment의 값 (DNA 손상의 정도)이 커지게 된다. 그러므로 Tail moment 값이 커질수록 DNA 단일가닥 손상이 많음을 의미한다.

뚜렷한 오염원이 없는 사바나 연안에서 잡혀진 3종의 어류 혈액을 대상으로 comet assay를 수행한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 송어와 농어의 경우 대부분의 핵에서 낮은 DNA의 손상을 보였으나, mummichog의 경우 대부분의 핵들이 심각한 DNA 손상을 보여주었다. 일반적인 comet assay의 실험법에서 DNA unwinding buffer solution의 pH는 항상 13보다 높

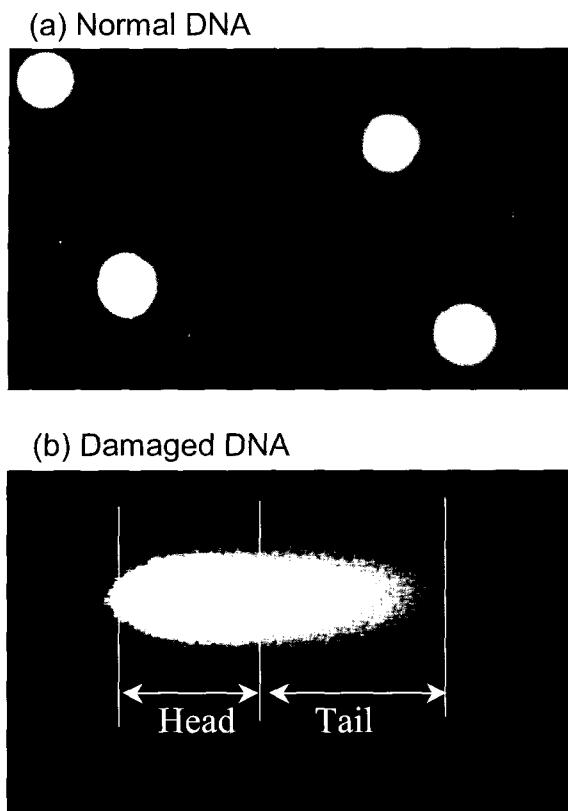


Fig. 1. Images after running the comet assay with fish blood cells.

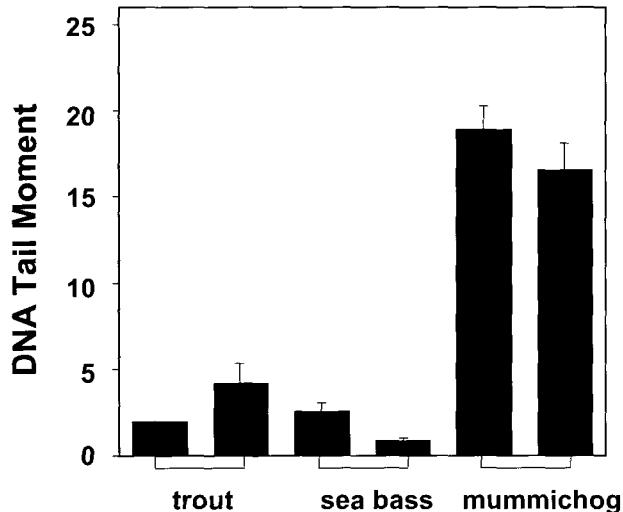


Fig. 2. DNA tail moments from comet assay with three fish species collected from coastal Georgia. The assay was run at $>\text{pH } 13$. Two fish per each species were used for this assay. Error bar means standard error ($n=50$).

다. 이러한 높은 pH 조건에서는 DNA 이중가닥 손상 (DNA double strand break), DNA 단일가닥 손상 (DNA single strand break) 뿐만 아니라, 그리고 alkali-labile site 또한 검출되어질 수 있다. DNA 이중가닥 손상과 단일가닥 손상은 여러 화학

물질 및 자외선, X-선 등에 의해 DNA 가닥 자체가 직·간접적으로 절단되어진 손상이지만, alkali-labile site의 경우 세포 핵내에서는 연결된 상태로 존재하나 높은 pH를 유지하는 comet assay 실험과정에서 절단되어 나타나는 것으로 DNA 단일가닥 손상과 동일하게 검출되어질 수 있다. 본 연구에 사용되어진 어류들의 채취지역이 DNA 단일가닥 손상을 일으킬만한 오염원이 특별히 없는 곳으로 알려져 있으므로, mummichog에서 관찰된 높은 DNA tail moment 값은 다른 2종의 어류에 비해 mummichog가 상대적으로 많은 alkali-labile site를 가짐으로 말미암아 comet assay의 실험과정에 생긴 것으로 사료된다.

DNA unwinding buffer solution의 pH 조절에 따른 DNA 손상

실제 mummichog가 alkali-labile site를 많이 함유하고 있는지를 확인하기 위하여 DNA unwinding buffer solution의 pH 변화에 따른 DNA 손상정도의 변화를 알아보았다 (Fig. 3). 송어 혈액의 경우 DNA unwinding buffer solution의 pH 변화에 별다른 변화를 보이지 않았으나, mummichog의 경우 pH가 높아질수록 훨씬 높은 DNA 손상을 보여주었다. 이 자료로부터 mummichog는 송어와 다르게 자연상태에서부터 alkali-labile site가 상대적으로 많이 존재한다는 사실을 알 수가 있다.

Horváthová et al. (1998)은 햄스터 V79 세포주에 N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine와 methyl methanesulfonate를 노출시켰을 때 alkali-labile site가 주로 유도되며, H_2O_2 를 노출시켰을 때는 DNA 단일가닥 손상이 유도된다고 보고하였다. 이 때 DNA 단일가닥 손상과 alkali-labile site를 구분하기 위하여 pH를 조절하였으며, 그 결과 DNA unwinding buffer solution의

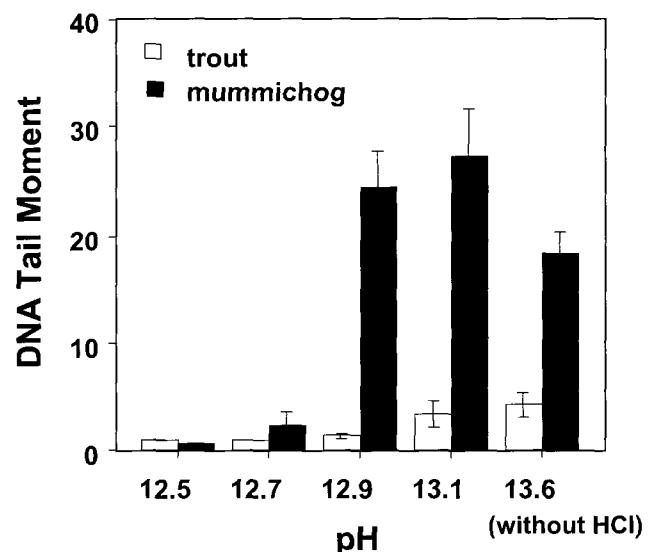


Fig. 3. DNA tail moments of trout and mummichog blood cells when different pHs were used for DNA unwinding and electrophoresis. Error bar means standard error ($n=50$).

pH가 12.1에서 alkali-labile site가 절단되어 나타난다고 보고하였다.

본 연구에서도 alkali-labile site가 절단되기 시작하는 pH를 알아보기 위하여 세분화된 pH 조건에서 comet assay를 실시하였다. Fig. 4(a, b, c)에 $10 \mu\text{M}$ H_2O_2 를 mummichog의 혈액에 노출한 후 여러 수준의 pH에서 comet assay를 수행한 결과를 나타내었다. 첫 번째 실험으로부터 대조시료에서 DNA가 부서지기 시작하는, 즉 alkali-labile site가 절단되는 pH 값이 12.6인 것으로 나타났다 (Fig. 4(a)). pH 12.4에서 대조시료는 아주 낮은 DNA 손상 수치를, 그리고 H_2O_2 로 처리된 혈액에서는 높은 수치를 보여주었다. 이에 따라 두 번째 실험에서는 pH 0.1의 간격으로 다시 실험을 하였으며, 그 결과 가장 적절한 pH의 수준은 12.5인 것으로 나타났다 (Fig. 4(b)). 이 pH 값에서 대조시료는 DNA 손상이 거의 나타나지 않았고, H_2O_2 로 처리된 시료는 높은 DNA 손상을 보여주었으며, pH가 12.5보다 약간 만 더 높아져도 alkali-labile site가 절단되기 시작하여 대조시료에서 높은 값을 보여주었다. pH 12.5가 가장 적절한 pH 값인지 확인하기 위하여 세 번째 실험을 수행하였다 (Fig. 4(c)). 그 결과 pH 12.5에서 대조시료는 상당히 낮은 DNA 손상정도를 보였으며, 반면 $10 \mu\text{M}$ H_2O_2 로 처리된 혈액은 상당-

히 높은 DNA 손상정도를 나타내었다. 앞의 결과와 똑같이 pH 12.6에서는 대조시료에서도 높은 DNA 손상 수치를 보여주었다.

본 실험을 통해 mummichog와 같이 DNA 구조 속에 alkali-labile site를 많이 가지는 어종에 대해 comet assay를 수행하고자 할 경우 기존의 실험법 (DNA unwinding buffer solution의 pH > 13)으로는 오염물질에 노출되지 않은 생물 (대조시료)에서의 DNA tail moment의 수치가 높아 독성을 물질에 의해 유도된 생물 (처리시료)에서의 DNA 손상정도를 정확히 파악할 수가 없으므로 comet assay에 의한 DNA 손상정도가 환경모니터링을 하는데 있어서 생물지시자 (biomarker)로서 사용되어질 수가 없다. 그러므로 각 어종에 대해 comet assay를 생물환경모니터링의 도구로 사용하기 위해서는 각 어종의 혈구세포에 있어서 DNA unwinding buffer solution의 적절한 pH가 우선적으로 연구되어져야 할 것이다.

Fig. 5는 mummichog 혈액을 여러 농도의 H_2O_2 에 2시간 노출시킨 후 pH 12.5에서 comet assay를 실행한 결과이다. 대조구에서는 예상대로 낮은 DNA 손상정도를 보였으며, 노출된 H_2O_2 의 농도가 높아질수록 높은 DNA 손상을 일으키는 것으로 나타났다. UV와 X-ray와 같은 경우는 노출시간이나 노출세기애에 비례하는 DNA 손상이 관찰되었으나 (Koppen and Angelis, 1998; Kim et al., 2000), H_2O_2 와 같은 화학물질을 노출시켰을 때는 본 연구에서와 같이 노출시간이나 노출농도에 정확히 비례하는 DNA 손상이 관찰되지는 않았다 (Pandrangi et al., 1995; Kasamatsu et al., 1996; Michelmore et al., 1998). 본 실험에서도 농도에 비례하는 DNA의 손상이 유도되지 않았으나, 적어도 H_2O_2 에 의한 DNA 단일가닥 손상은 관찰할 수 있었다.

생물환경모니터링에 적합한 혈구세포의 종류를 알아보기 위하여 백혈구와 적혈구로 나누어 *in vitro* 노출실험을 실시하였다. 꼽상어 (백혈구의 수 : 적혈구의 수 = 1:5)와 같은 연

Comet assay에 적합한 표적세포 검색

골어류를 제외한 대부분의 어류는 넙치 (1:130), 잉어 (1:300)

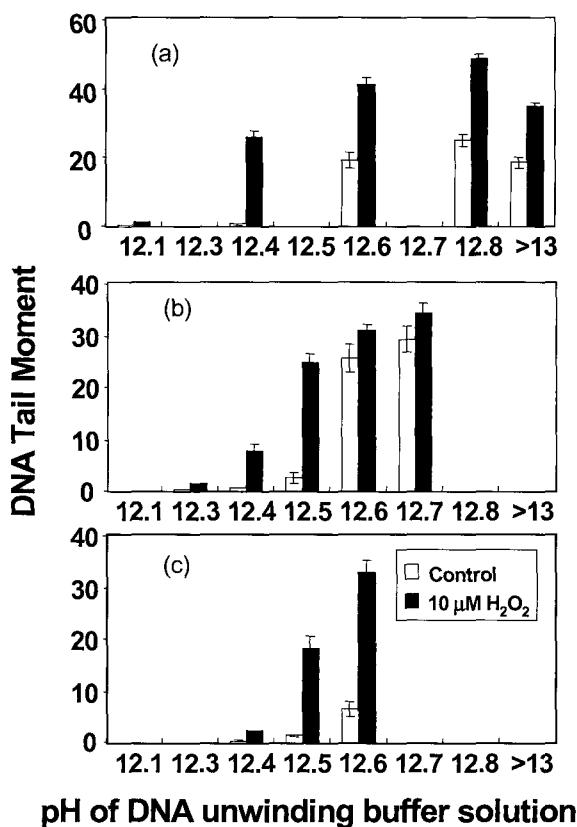


Fig. 4. DNA tail moments after 2 hour *in vitro* exposure of mummichog blood cells to $10 \mu\text{M}$ hydrogen peroxide when different pHs were used for DNA unwinding and electrophoresis. Error bar means standard error ($n=50$).

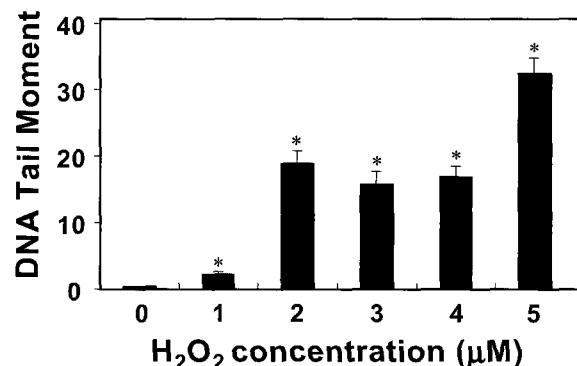


Fig. 5. DNA tail moments after 2 hour *in vitro* exposure of mummichog blood cells to hydrogen peroxide (0-5 μM). Asterisk means $p < 0.05$. Error bar means standard error ($n=50$).

등과 같이 적혈구의 수가 백혈구의 수에 비해 훨씬 많으므로, 적혈구를 가지고 하는 실험은 별도로 혈액으로부터 적혈구를 분리하지 않고 혈액 속에 있는 혈구세포 모두를 적혈구로 간주하여 노출실험을 시행하였다. 송어의 경우 앞의 결과 (Figs. 2, 3)에서 알려진 것처럼 alkali-labile site가 적으로 DNA unwinding buffer solution의 pH를 조절하지 않고 comet assay를 수행하였으며, mummichog의 경우 pH를 12.5로 맞춘 후 실행하였다. 본 연구에 사용되어진 2-methyl-1,4-naphthoquinone (MNQ)는 세포 내에서 semiquinone으로 환원되어 직접 DNA에 손상 (DNA adduct)을 일으키거나, semiquinone이 산소를 활성산소라디칼로 변화시켜 DNA에 손상 (thymine glycol과 같은 염기 변형)을 일으키기도 하는 것으로 알려져 있다 (Thor et al., 1982; Morrison et al., 1984). 기존의 연구에서도 새우 알을 MNQ에 노출시켰을 때 농도에 비례하는 DNA 손상이 comet assay를 통해 검출되었기 때문에 (Kim and Lee, submitted) 본 실험에서도 이용되었다. Fig. 6(a)는 송어의 혈구세포를 *in vitro*로 MNQ에 노출한 결과를 보여준다. 대부분 적혈구로 생각되는 혈구세포는 농도가 증가함에 따라 DNA 손상도 증가하였으나, 백혈구의 경우 그러한 경향이 나타나지 않았다. 본 연구로부터 송어의 경우 백혈구에 비해 적혈구 DNA가 MNQ에 훨씬 더 민감하게 반응한다는 사실을 보여주었다. Mummichog의 경우 크기가 작아 충분한 혈액을 채취할 수 없어 백혈구 분리를 하지 않고 전체 혈액을 가지고 수행하였으며, 그 결과 송어와 비슷한 경향을 보여주었다 (Fig. 6(b)). 혈액을 이용하는 *in vitro* 연구에서는 외부에서 침입한 병원생물 혹은 외래물질을 세포 내로 끌어들여 살균 소화하는 기능을 가진 백혈구가 주로 표적세포로 이용되어졌으나, 본 연구로부터 앞으로 환경 모니터링의 도구로써 comet assay가 적용된다면 어류의 경우 표적세포로서는 적혈구가 적절할 것으로 판단된다. 하지만, 본 연구와는 다르게 잉어 (Kammann et al., 2000)나 사람 (Zhu and Loft, 2001)의 백혈구가 H₂O₂의 노출농도에 따라 DNA 손상정도가 증가하는 경향을 보여 주기도 하였으며, 이렇게 대립되는 결과에 대해서는 보다 면밀한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

한편 10 μM MNQ에 노출되었을 때 mummichog는 낮은 pH에서 comet assay가 시행되었음에도 불구하고 송어 (>pH 13)에 비해 약 4배 가량 높은 DNA 손상을 보여 mummichog의 혈구세포가 상대적으로 DNA에 손상을 유도하는 화학물질에 더 민감하게 반응하는 것으로 나타났다. 이는 동일지역에 여러 종의 어류가 존재한다면 노출된 화학물질에 특별히 민감하게 반응하는 어종을 선택하는 예비실험이 생물환경모니터링을 하는데 있어서 필요하다는 것을 보여준다.

본 연구에 사용되어진 2가지의 화학물질 (H₂O₂와 MNQ)에 의해 유도된 DNA 단일가닥 손상은 comet assay를 통해 측정할 수 있는 것으로 나타났다. 현재 오염원으로부터 해양생태계에 배출되고 있는 수많은 유해화학물질들 중에서 디핵성 방향족

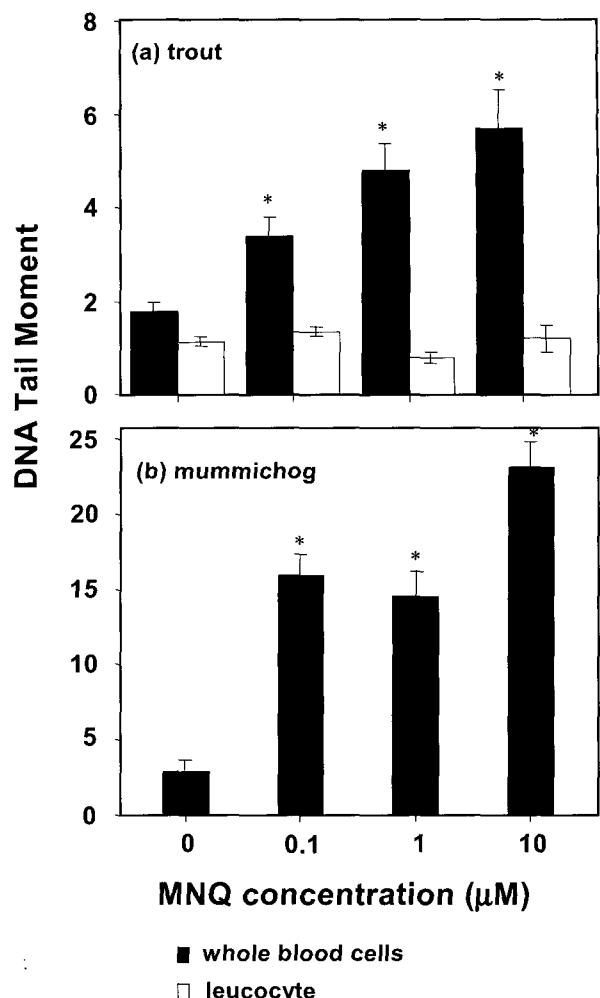


Fig. 6. DNA tail moments after 1 hour *in vitro* exposure of trout (pH of DNA unwinding buffer solution >13) and mummichog (pH of DNA unwinding buffer solution = 12.5) blood cells to 2-methyl-1,4-naphthoquinone. Asterisk means $p < 0.05$. Error bar means standard error ($n = 50$).

탄화수소 화합물 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)과 같은 물질은 해수, 퇴적물 및 해양생물체내에서 검출되며, 이 또한 DNA손상을 유도하는 물질로 알려져 있다. 실험실내에서 DNA 손상을 유도하는 화학물질뿐만 아니라, 해양환경에 유출된 여러 오염물질에 의한 DNA 손상여부를 알아내기 위하여 comet assay를 이용한 폭넓은 연구가 필요하리라 사료된다.

참 고 문 헌

- Banáth, J.P., M. Fushiki and P.L. Olive. 1998. Rejoining of DNA single- and double-strand breaks in human white blood cells exposed to ionizing radiation. Int. J. Radiat. Biol., 73, 649-660.
- Gedik, C.M., S.W.B. Ewen and A.R. Collins. 1992. Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis

- of UV-C damage and its repair in human cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 62, 313-320.
- Horváthová, E., D. Slameňová, L. Hlinčíková, T.K. Mandal, A. Gábelová and A.R. Collins. 1998. The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. *Mutation Res.*, 409, 163-171.
- Kammann, U., J.C. Riggers, N. Theobald and H. Steinhart. 2000. Genotoxic potential of marine sediments from the North Sea. *Mutation Res.*, 467, 161-168.
- Kasamatsu, T., K. Kohda and Y. Kawazoe. 1996. Comparison of chemically induced DNA breakage in cellular and subcellular systems using the comet assay. *Mutation Res.*, 369, 1-6.
- Kim, G.B. and R.F. Lee. Effects of genotoxic compounds on DNA and development of early and late grass shrimp embryo stages. *Mar. Environ. Res.* (submitted)
- Kim, G.B., R.F. Lee and D.L. Mitchell. 2000. Damage to grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) embryo DNA by summer sunlight followed by DNA repair in the dark. *Mar. Biol.*, 137, 675-682.
- Koppen, G. and K.J. Angelis. 1998. Repair of X-ray induced DNA damage measured by the comet assay in roots of *Vicia faba*. *Environ. Mol. Mutagenesis*, 32, 281-285.
- Kurelec, B. 1993. The genotoxic disease syndrome. *Mar. Environ. Res.*, 35, 341-348.
- Lee, R.F. and G.B. Kim. 2002. Comet assay to assess DNA damage and repair in grass shrimp embryos exposed to phototoxins. *Mar. Environ. Res.*, 54, 465-469.
- Lee, R.F., G.B. Kim, K.A. Maruya, S.A. Steinert and Y. Oshima. 2000. DNA strand breaks (comet assay) and embryo development effects in grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) embryos after exposure to genotoxins. *Mar. Environ. Res.*, 50, 553-557.
- Lee, R.F., S.A. Steinert, K. Nakayama and Y. Oshima. 1999. Use of DNA strand damage (comet assay) and embryo hatching effects to assess contaminant exposure in blue crab (*Callinectes sapidus*) embryos. In: Environmental Toxicology and Risk Assessment, Vol 8. ASTM STP 1364, D. Hensel, M.C. Black, eds. American Society of Testing and Materials, West Conshohocken, PA. pp. 341-349.
- McKelvey-Martin, V.J., M.H.L. Green, P. Schmezer, B.L. Pool-Zobel, M.P. De Meo and A. Collins. 1993. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutation Res.*, 288, 47-63.
- Michelmore, C.L., C. Birmelin, D.R. Livingston and J.K. Chipman. 1998. Detection of DNA strand breaks in isolated mussel (*Mytilus edulis* L.) digestive gland cells using the "comet" assay. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 41, 51-58.
- Mohankumar, M.N., S. Janani, B.K. Prabhu, P.R.V. Kumar and R.K. Jeevanram. 2002. DNA damage and integrity of UV-induced DNA repair in lymphocytes of smokers analysed by the comet assay. *Mutation Res.*, 520, 179-187.
- Morrison, H., B. Jernstrom, M. Nordenskjold, H. Thor and S. Orrenius. 1984. Induction of DNA damage by menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.*, 33, 1763-1769.
- Nacci, D.E., S. Cayula and E. Jackim. 1996. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquat. Toxicol.*, 35, 197-210.
- Nigro, M., G. Grenzilli, V. Scarcelli V., S. Gorbi and F. Regoli. 2002. Induction of DNA strand breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla*. *Mar. Environ. Res.*, 54, 517-520.
- Pandrangi, R., M. Petras, S. Ralph and M. Vrzoc. 1995. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carps. *Environ. Mol. Mutagenesis*, 26, 345-356.
- Shugart, L.R. 1988. Quantitation of chemically induced damage to DNA of aquatic organisms by alkaline unwinding assay. *Aquat. Toxicol.*, 13, 43-52.
- 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., R.S. Montee and M.P. Sastre. 1998. Influence of sunlight on DNA damage in mussels exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar. Environ. Res.*, 46, 355-358.
- Thor, H., M.T. Smith, P. Hartzell, G. Bellomo, S.A. Jewell, S. Orrenius. 1982. The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes: a study of the implication of oxidative stress in intact-cells. *J. Biol. Chem.*, 257, 2419-2425.
- Ündeğer, Ü. and N. Başaram. 2002. Assessment of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures by the alkaline comet assay. *Arch. Toxicol.*, 76, 430-436.
- Zhu, C.Y. and S. Loft. 2001. Effects of Brussels sprouts extracts on hydrogen peroxide-induced DNA strand breaks in human lymphocytes. *Food Chem. Toxicol.*, 39, 1191-1197.