

## Comet assay를 이용한 방사선 조사육의 판별

정석규 · 박종흠 · 지승택 · 박금주 · 김해홍 · 현창기\* · 신현길\*  
한동대학교 기능성식품 및 안전성 연구소, \*한동대학교 생물식품공학부

### Discrimination of Irradiated Beef Using Comet Assay

Seok-Kyu Jeong, Jong-Heum Park, Seung-Taek Ji, Kum-Ju Park,  
Hai-Hong Kim, Chang-Kee Hyun\* and Heuyn-Kil Shin\*

*Institute of Functional Foods and Safety, Handong University,*  
*\*School of Bioscience and Food Technology, Handong University*

#### Abstract

DNA damages in post-mortem bovine muscle samples caused by gamma irradiation at doses of 1 to 10 kGy were determined by Comet assay. When the cell extract was prepared in a physical method and followed by neutral lysis and neutral electrophoresis, the optimal comet images could be obtained. DNA damages were evaluated from the mean tail length, the distributions of comet images in 4 groups divided by tail length and the relative damage index (RDI) values calculated from the distribution pattern. The mean tail length and RDI value were increased by increasing the irradiation dose, and the RDI value was found to be useful as an index for discriminating of irradiation and measuring the irradiated dose. Blind tests using Korean domestic (Hanwoo) and imported beef samples showed a higher RDI value for the latter. However, the value was lower than those of irradiated samples indicating that the cause of DNA damages in the imported beef samples might be not irradiation but low-temperature treatments. It was concluded from the results of this study that the irradiated beef and its irradiated dose could be detected and predicted by Comet assay.

Key words : irradiation, Comet assay, DNA damage, beef

## 서 론

현재 방사선 조사가 허용되는 식품은 40여개 국가에서 향신료류, 육류와 육가공품, 신선 야채류, 과일류, 인삼류, 곡류와 잡곡류, 약초와 건조야채류, 생선과 기타 수산물, 발효식품, 사료 등 100여종의 식품항목 또는 식품군으로서 전세계적으로 허용되어 조사되고 있다<sup>(1)</sup>. 또한 97년 멕시코에서의 제14차 식품조사기술 국제자문단회의(ICGFI), 98년 서울에서 열린 UN기구 주최 '조사식품의 국제교역'회의 등 각종 국제회의로부터 이제 방사선 조사식품의 국제적 유통은 기정사실화되고 있는 가운데 방사선 조사식품의 국내 식품시장 점유에 따른 식품환경 변화에 대비책이 요구되고 있는 실정이다<sup>(2)</sup>. 1981년 세계식량농업기구(FAO),

세계보건기구(WHO) 및 국제원자력에너지기구(IAEA)의 합동회의에서 "10 kGy 미만의 식품에 방사선 조사는 어떠한 독성학적 위해와 영양학적, 미생물학적 문제를 일으키지 않는다"고 결론지음으로써<sup>(3)</sup> 방사선 조사식품의 안전성은 국제적으로 공인되어 있으며 방사선의 상업적인 이용에 관한 개략적인 기준도 세워졌다고 볼 수 있다. 그러나 일부 연구자들에 의해서는 방사선 조사에 의한 유해성이 보고되고 있는 가운데<sup>(4)</sup> 몇몇 나라에서는 식품에 따라 10 kGy 이상의 방사선 조사를 허용하고 있는 현실이며<sup>(5)</sup> 특히 허용치 이상 과량을 조사한 식품의 경우 안전성을 보장할 수 없기 때문에 선진국들에서는 식품별 조사허용량 등의 관리 규정을 세워 엄격히 통제하고 있다. 또한 소비자들은 핵실험이나 원자력 발전소의 방사능 물질 누출 사고 등을 연상하여 일반적으로 방사선 조사식품에 대한 거부감을 가지고 있다. 국내 식품시장에서의 또다른 문제점은 바로 식품 유통상의 난맥이다. 국내에서는 1998년 현재 감자, 양파, 마늘, 버섯, 건조 향신료, 건조 채소류 등 19개 식품 또는 식품군에 한해서만 방사선 조

Corresponding author : Chang-Kee Hyun, School of Bioscience and Food Technology, Handong University, Heunghae, Pohang, Kyungbuk 791-708, Korea  
Tel : 82-054-260-1316, 1361  
Fax : 82-054-261-4603  
E-mail : ckhyun@handong.edu

사를 허용하고 있고 그 표기를 의무화하였다<sup>6)</sup>. 이러한 상황에서 일부 식품업체는 외국의 조사처리시설을 이용함으로써 국내의 강화된 규제를 피하는 사례도 있는가 하면 한편으로는 외국에서 저장성 향상을 위해 과도하게 조사된 식품이 수입되어도 검역단계에서 차단할 방법이 없는 형편이다. 이러한 수입 조사식품은 비조사식품과 혼입되거나 또는 비조사 식품으로 둔갑되어 유통될 수 있고 이를 원료로 가공식품을 제조하는 과정에서 또다시 방사선이 조사되어 유해성이 증가될 수도 있게 된다. 따라서 현재 유통되고 있는 식품 중 방사선 조사 의심이 가는 품목에 대한 판별기술이 반드시 개발되어야 하며, 이는 식품의 안전성 검사에서 중요한 항목으로 떠오르고 있는 것이다.

방사선 조사식품의 검지기술에 대한 연구는 조사식품의 국제교역이 증가된 1980년대 중반부터 활발히 진행되어 왔다. 그동안 방사선 조사여부를 판별하기 위해서 방사선 조사로 인해 식품내 지질성분의 변화를 측정하거나 electron spin resonance(ESR), 전기적 impedance, 점도, 전기전위, 근적외선, 열발광(thermoluminescence, TL) 등을 이용한 물리화학적 변화를 측정하는 방법들이 연구 보고되었다<sup>7)</sup>. 또한 방사선 조사에 의해 일어날 수 있는 가장 민감한 변화는 DNA의 손상일 것이기 때문에 DNA 손상도를 측정하기 위한 방법들이 집중적으로 연구되어 왔다. 그 중에는 DNA의 절편에 대한 filter elution 방법<sup>8)</sup>, GC/MS 방법<sup>9,10)</sup>, post labelling assay를 이용한 HPLC 방법<sup>11)</sup>, thymine glycol과 dihydrothymine에 대한 항체를 이용한 면역학적인 방법<sup>12,13)</sup>, DNA polymerase의 Klenow 절편을 이용하는 효소적 방법<sup>14)</sup> 등이 개발되었지만 이들 모두가 각각 낮은 재현성, 복잡성, 식품에의 적용성 등의 문제점을 안고 있어 아직도 세계적으로 표준화된 방사선 조사식품의 검지법은 확립되지 않고 있는 실정이다. 한편 국내에서도 최근 들어 방사선 조사식품에 대한 연구가 활발히 진행되어 방사선 조사식품의 성분 또는 품질변화에 대한 연구결과가 주로 보고되고 있으며, 방사선 조사여부의 검지에 대한 연구도 관심이 모아지면서 육류, 건조소프재료, 조미분말식품 등에서의 방사선 조사유무 확인을 위한 여러 가지 연구결과들이 보고되었다<sup>15-20)</sup>.

그러나 그동안 보고된 검지기술들은 대체적으로 시간, 인력, 비용이 소모적이라는 단점들을 가지고 있는 방법들이어서 본 연구에서는 신속하고 민감하게 DNA 손상도를 측정할 수 있는 특징을 가지고 있는 Comet assay(또는 Single Cell micro-Gel Electrophoresis (SCGE) assay)를 이용하여 식육의 방사선 조사여부를

측정하기 위한 조건을 확립하였다. Comet assay법은 원래 다양한 포유동물세포의 DNA 손상(유전독성)을 측정하는 방법으로서<sup>21)</sup> 그동안 유전독성학, 의학, 환경 monitoring 등 다양한 사용되어 오고 있으며<sup>22,23)</sup>, 식품에로의 응용은 1991년 Johanson이 방사선 조사 근육조직과 골수세포의 DNA 손상을 측정할 것을 비롯하여 여러 연구자들에 의해 식품의 방사선 조사여부에 대한 가능성이 제시된 바 있다<sup>24-31)</sup>. 본 연구는 국내에서 아직 마련되지 않고 있는 방사선 조사식품 검지 및 수입 조사식품 검역에 있어서 Comet assay의 우수한 분석능이 적용된 신속 정확한 판별기술을 확립하고자 수행되었다. 즉 방사선 조사 우육에 대한 검지가 가능하도록 Comet assay의 각 단계에 있어서의 최적조건을 확립하였고, 얻어진 comet image들의 손상도 분포에 대한 새로운 통계분석을 통해 보다 정밀한 판별방법을 제시하였으며, 이 방법을 이용하여 국내의 유통 중인 수입육에 대한 blind test를 통해 방사선 조사여부의 판별을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 시료

본 실험에서 사용한 우육은 포항소재 (주)명신산업에서 구입하였으며 도축 후 10시간이 경과하지 않은 근육조직 *M. triceps brachii*와 *M. semitendinosus* 두 부위에 대하여 각각 9 개체를 반복 실험하였다. 각 시료는 약 200 g 씩 취하여 지방을 가능한 한 제거하고 두께 약 1.5 cm가 되도록 절단한 후 진공포장하여 4°C에서 저온 보관하면서 3일 내에 방사선을 조사하고 실험에 이용하였다.

### 방사선 조사

진공포장된 시료를 한국원자력연구소 방사선식품공학기술개발팀의 도움을 받아 Co<sup>60</sup> 감마선 조사시설(100,000 Ci)을 이용하여 시간당 3 kGy의 조사율로 1, 3, 5, 10 kGy의 총흡수선량을 얻도록 조사하였다. 흡수선량은 ceric cerous dosimeter(Cecil Instruments, U.K.)로 확인하였다.

### Comet assay

**Pre-coated agarose slide의 준비**: Fully-frosted slide glass의 서리가 되어 있는 면에 0.5% normal melting point agarose(NMA) 용액 35  $\mu$ L를 입힌 후에 화염 건조시키고, 다시 75  $\mu$ L의 0.5% NMA 용액을 cover glass를 이용하여 균일하게 입힌 후 얼음수조 위

에서 gel을 형성하였다. 이와 같이 만들어진 pre-coated agarose slide는 humidified slide box에 넣어 실험전까지 4°C에 보관하였다.

**조직으로부터 핵체의 분리** : 근육조직 세포로부터의 핵체 추출은 효소작용에 의해 조직으로부터 분리하는 방법과 물리적인 방법에 의해서 실시하였다. 효소로 분리할 경우, 우선 시료를 surgical blade로 근섬유방향으로 얇게 절편하고, 이 중 1.5 g을 0.006% collagenase P를 포함하는 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) 8 mL에 담가 37°C에서 30 분간 반응시키고, 반응이 완전히 끝난 시료액을 100  $\mu$ m 표준망에 통과시킨 후 이어서 25  $\mu$ m 표준망에 통과시켜 잔사를 제거한 뒤 핵체 현탁액으로 사용하였다. 물리적인 방법으로 분리할 경우에는 Cerda<sup>(32)</sup>의 방법을 수정하여 사용하였다. 즉 절편 시료 1.5 g을 cold PBS 8 mL에 담근 후 hot plate에서 500 rpm의 속도로 5 분간 균질화시키고 앞의 표준망으로 통과시켜 핵체 현탁액을 제조하였다.

**Gel casting** : Delincee<sup>(24)</sup>의 방법을 일부 수정하여 핵체 현탁액을 precoated agarose slide 위에 균일하게 깔아주었다. PBS에 녹아 있는 1% low melting point agarose(LMA) 용액을 microwave로 녹인 후 항온수조 내에서 45°C를 유지하였다. 핵체 현탁액 50  $\mu$ L와 LMA 용액 100  $\mu$ L를 혼합하여 그 중 100  $\mu$ L를 미리 만들어 놓은 precoated agarose slide 위에 흘리고 cover glass를 덮어 균일하게 퍼지게 한 다음 얼음수조 위에서 gel을 형성시켰다.

**Lysis** : 핵체를 lysis하는 방법으로는 두가지 방법을 이용하였다. 첫번째로는 alkali buffer에 lysis하는 방법으로서 2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris base, 1% Na-lauroylsarcosinate를 녹인 용액(pH 10.0)에 사용하기 바로 전에 10%의 DMSO와 1%의 Triton X-100을 첨가하여 slide를 1시간 동안 담구어 lysis하였다. 두번째로는 neutral buffer를 이용하여 lysis하는 것으로서, 0.2% sodium dodecyl sulfate(SDS), 40 mM Tris-acetate, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA를 녹인 neutral lysis 용액(pH 8.0)에 핵체가 깔린 slide를 30분간 담구어 lysis하였다.

**전기영동** : Neutral buffer 및 alkali buffer 하에서의 두가지 전기영동 방법을 모두 실험하여 적절한 조건을 결정하였다. Neutral buffer 하에서의 전기영동은 lysis시킨 slide를 0.1% SDS가 첨가된 pH 8.0의 Tris-acetate buffer에서 2.5 분간 4 V/cm로 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 후에 중류수로 그 slide를 세척하고 습기를 제거한 다음, YOYO-1(10 g/mL in PBS, Molecular Probes, U.S.A.) 80  $\mu$ L로 염색하고 cover

glass를 덮은 후, 상온의 암실에서 40분간 건조시켰다. Alkali buffer 하에서의 전기영동은 lysis시킨 slide들을 buffer(300 mM NaOH, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 12.0)로 slide 표면 위 0.7 cm까지 가득 채운 후 20분간 평형시켰다. 전기 영동은 25 V/300 mA로 20분간 실시하였다. 전기 영동 후, 각각의 slide들은 neutral buffer로 충분히 세척하고 neutral buffer 하에서의 전기영동과 동일하게 염색 및 건조하였다.

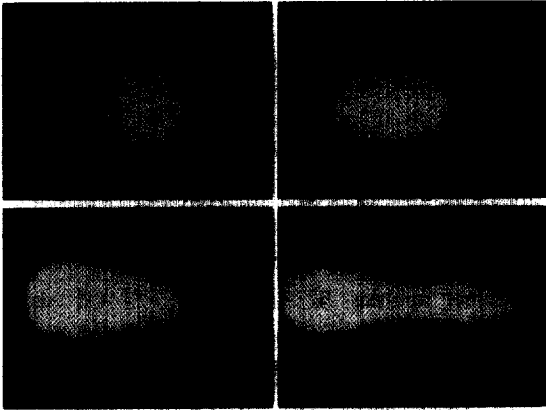
**Comet analysis 및 결과 분석** : 염색된 slide는 200 W mercury lamp(Osram, Germany)가 부착된 형광 현미경(CSB-FEI, China)에서 배율 250 배로 관찰하였으며, CCD camera(COHU, U.S.A.)를 통해서 보내진 각각의 세포핵의 image는 Comet II image analysis system(Perceptive Instruments, U.K.)이 설치된 컴퓨터에서 분석한다. 각각의 세포핵에서 방사선 조사에 의한 손상 정도는 slide당 101개의 세포핵들을 분석함으로써 정량화하고 한 시료당 2 개의 slide에 대하여(총 202개 세포핵) 반복 실험하였다. DNA 손상정도를 정량화하는 기준에는 tail length, percentage DNA in tail, tail moment와 tail inertia<sup>(33)</sup> 등이 있으나, 본 연구에서는 tail length 평균치로서 DNA 손상정도를 수치화하였다. 또한 다음과 같이 구분한 tail length 범위에 속하는 세포(핵체)의 분포도를 비교하여 DNA 손상의 형태와 정도를 비교하였다: T(tail length)<40  $\mu$ m; 40<T<70  $\mu$ m; 70<T<100  $\mu$ m; T>100  $\mu$ m. 통계처리와 유의성 검정에는 Microsoft Excel program의 t-test를 이용하였다.

## 결과 및 고찰

### Comet assay 조건의 확립

Comet assay는 시료로부터의 세포 혹은 핵체의 추출, agarose gel 내에서의 세포막 혹은 핵막의 lysis, 전기영동, 그리고 염색 및 Comet 측정분석 등으로 이뤄진다. 방사선 조사에 의해 생성된 DNA 손상(절편)을 정량화하는 방법으로서 생성된 DNA 절편들에서는 nucleotide간의 결합이 끊어짐으로 인해 노출된 인산기가 음전하를 띠므로써 전기영동시 양극 방향으로 끌리게 된다. 즉 절편의 양이 많을수록 핵체로부터 양극 방향으로 끌리는 길이가 길어지게 되고 저분자량의 절편들은 멀리 끌리게 되어 이를 염색하여 현미경상으로 관찰하였을 때 마치 혜성(comet)의 모양을 나타내게 되며, 그 comet의 길이와 농도를 분석하므로써 DNA 손상 정도를 정량화 할 수 있게 된다<sup>(21,22)</sup>.

우선 우육 근육세포에 있어 Comet assay 실험과정

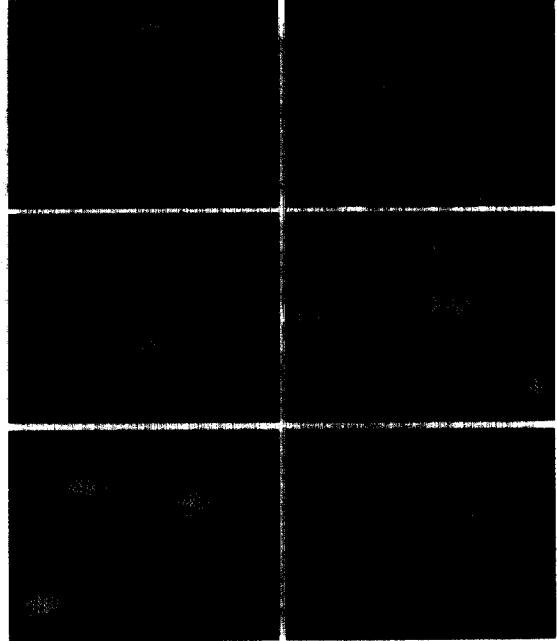


**Fig. 1. Typical comet images of intact and DNA-damaged cells.**

A; intact cell ( $T < 40 \mu\text{m}$ ), B; low damaged cell ( $40 \mu\text{m} < T < 70 \mu\text{m}$ ), C; medium damaged cell ( $70 \mu\text{m} < T < 100 \mu\text{m}$ ), D; high damaged cell ( $T > 100 \mu\text{m}$ ).

자체로 인한 손상을 입지 않는 조건을 확립하는 실험을 진행하였다. 핵체 분리를 위해서는 효소를 이용한 방법과 물리적인 방법, 두가지를 사용하였다. 효소적인 방법에서는 collagenase P를 이용하였는데(neutral lysis 방법을 이용하였음) 분리과정에서 상당한 DNA 손상이 일어남을 볼 수 있었다(결과 생략). 이것은 핵체 분리를 위해 효소를 포함하는 buffer에 조직을 30분간 담구어 놓게 되는데 이 시간동안 DNA가 손상을 입는 것으로 추정되었다. 한편 물리적으로 핵체를 분리하는 방법에 의해서는 핵체 분리과정에 의한 DNA 손상은 전혀 없는 것으로 나타나(결과 생략), 효소로 핵체를 분리하는 것보다 물리적인 방법을 이용하여 핵체를 분리하는 것이 이 실험에서는 적합한 것으로 확인되었으며 이 후의 모든 실험에서 핵체 추출은 이 방법에 의해 진행되었다.

일반적으로 Comet assay에서 분리된 핵체의 lysis를 위해서는 neutral lysis와 alkali lysis, 그리고 전기영동을 위해서는 neutral electrophoresis와 alkali electrophoresis법이 사용되고 있는데 본 연구에서는 이들 조건을 조합하여 neutral lysis-neutral electrophoresis, alkali lysis-alkali electrophoresis, neutral lysis-alkali electrophoresis, alkali lysis-neutral electrophoresis 등 4 가지 방법을 이용하여 Comet assay를 실시하였다. 첫 번째로 neutral lysis와 neutral buffer 하에서의 전기영동의 조건은 comet의 형태 및 그 손상 정도에 대한 image가 매우 뚜렷하게 나타났고, alkali lysis와 alkali buffer 하에서의 전기영동 조건에서는 핵이 완전히 붕괴되어 그 comet의 길이가 평가 상한선인  $100 \mu\text{m}$ 를



**Fig. 2. Typical comet images of cells isolated from beef muscle according to irradiation dose.**

A; non-electrophoresed cells, B; 0 kGy, C; 1 kGy, D; 3 kGy, E; 5 kGy, F; 10 kGy.

초과하였다(결과 생략). 그 이유에 대해서는 아직 명확하지는 않으나 단핵세포와는 달리 근육에 존재하는 다핵세포의 경우 alkali buffer 하에서의 전기영동은 핵의 완전한 붕괴를 일으키고 있음을 추정할 수 있었다. 한편 양쪽조건을 혼합한 조건에서도 앞서의 alkali lysis와 alkali buffer하에서의 전기영동에서와 마찬가지로 실험과정에 의한 심한 DNA 손상현상을 나타내었다(결과 생략). 따라서 본 실험은 가능한 온도를 낮추고 물리적인 조건하에서 핵체를 분리한 후 neutral 조건하에서 실험을 하는 것이 최적 조건임을 확인하고 이후의 모든 실험에 적용하였다. Comet assay에서 얻어진 DNA의 손상 정도를 comet 길이에 따라 4등급으로 나누는 전형적인 근육핵의 comet image를 Fig. 1에 나타내었다.

#### 방사선 조사량에 따른 DNA 손상정도 측정

우육 시료를 방사선 조사한 후 Comet assay를 실시하였을 때 조사량에 따라 DNA 손상도가 증가하면서 Fig. 2와 같은 전형적인 comet image를 관찰할 수 있었다. 방사선 조사량에 따른 각각의 우육 시료로부터 추출된 핵체 현탁액에 대하여 comet이 관찰되는 202 개의 세포에 대한 평균 tail length를 구함으로써 DNA

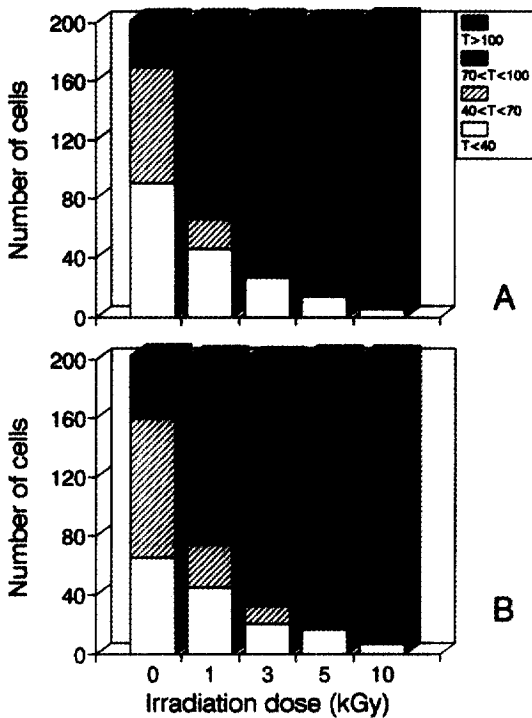


Fig. 3. The changes of comet distributions in beef muscles according to irradiation dose.

A; *M. semitendinosus*, B; *M. triceps brachii*.

손상도를 비교하였다. 그 결과 비조사 우육에 비해 1 및 3 kGy의 조사육까지 급격히 증가하였으나 그 이상의 조사육에서는 완만히 증가추세를 나타내었다(Table 1). 즉 3 kGy 이상의 조사육에서는 조사육에 따른 손상도를 평균 tail length로는 구분하기가 까다로움을 알 수 있었다. 한편 comet image들을 T(tail length)<40  $\mu$ m, 40<T<70  $\mu$ m, 70<T<100  $\mu$ m, T>100  $\mu$ m 등 4 등급으로 나누어 분포도로 나타내어 확인한 결과, 조사육에 따라 높은 손상도 등급으로의 분포가 현저하게 증가함을 나타내었다(Fig. 3). 즉 관찰되는 comet들의 tail length를 단순히 평균내어 산출한 값으로는 이와 같은 손상도 분포에 대하여 정당한 평가할 수 없다고 판단되었다. 따라서 각 등급에 분포된 comet의 분포량(%)에 대하여 높은 손상도 등급에는 높은 가중치를 부여하는 보정방법을 통하여 높은 손상도의 comet들에 대한 수치 반영율을 높여주었다. 가중치는 4개로 나뉜 각 등급에 대하여  $100 \times (1/4)$ ,  $100 \times (2/4)$ ,  $100 \times (3/4)$ ,  $100 \times (4/4)$ 로 계산된 값으로 결정하여 다음과 같은 식을 세움으로써 각 시료에 대한 상대적 손상도를 나타내는 하나의 값, 즉 Relative Damage Index(RDI) 값을 환산하였다:

$$RDI = [(a \times 25) + (b \times 50) + (c \times 75) + (d \times 100)] / 100$$

여기서 a, b, c, d 값은 각각 T<40  $\mu$ m, 40<T<70  $\mu$ m, 70<T<100  $\mu$ m, T>100  $\mu$ m에 해당되는 comet의 분포량(%)이다.

RDI 값을 기준으로 방사선 조사육에 따른 DNA 손상도를 비교한 결과 비조사육에서 1, 3, 5, 10 kGy의 조사육까지 각각의 시료에 대한 DNA 손상도를 수치로 명확하게 구별해 낼 수 있음을 알 수 있었다(Table 1).

한편 *M. triceps brachii*와 *M. semitendinosus* 두 부위에 대하여 부위별에 따른 방사선 조사에 의한 손상도 차를 비교하였으나 유의적으로는 인정되지 않았으므로 이 방법을 방사선 조사여부 및 조사량 검지기술로 이용함에 있어 부위에 따른 변수는 감안하지 않아도 될 것으로 판단되었다(Table 1).

#### 수입육 및 한우육간의 blind test

부산지역에서 판매되고 있는 수입 냉동육 20 개체(우둔 10개체 및 사태 10개체)와 대조육로서 현재 포항시내에서 판매되고 있는 냉장 한우육 15 개체(우둔 5개체 및 사태 10개체)에 대하여 DNA 손상도를 측정 비교한 결과, Table 2에서 나타낸 바와 같이 모든 시료에 대한 총평균 tail length 값을 기준으로 비교할 때 수입육의 경우는 한우육보다 손상도가 크게 나타남을 알 수 있었다. 그러나 각각의 수입육 시료에 대해 얻어진 평균 tail length 값으로는 한우육과 구별할 수 없는 경우가 일부 존재하였다(결과 생략). 하지만 그러한 수입육 시료에 대해서도 tail length로 구분한 손상등급별로 comet(세포핵)들의 분포정도를 비교하였을 때 수입육과 한우육간의 분별이 유의성 있게 가능해짐을 알 수 있었다. 즉, 핵들의 분포에 있어 40  $\mu$ m에서 100  $\mu$ m에 이르는 손상등급 전체적으로는 두 시료가 나타내는 분포가 크게 다르지 않았으나, 70  $\mu$ m 이하의 손상이 미미한 등급에서는 한우육에 비해 수입육이 상대적으로 적은 분포를 보여주었고, 100  $\mu$ m 이상의 심한 손상을 입은 등급에서는 수입육의 경우가 월등히 많은 분포를 나타내었다. 한편으로 손상등급에 따른 분포로부터 계산된 RDI 값을 평가하였을 때 실험에 이용된 수입육은 방사선 조사가 없었던 것으로 판단되었다. 냉동 햄버거 및 쇠고기 등의 *E. coli* O157:H7 오염문제로 인해 FDA는 적색육에 대하여 3~7 kGy의 방사선 조사를 허용하였고<sup>(34)</sup>, 식육의 색조, 조직감, 성분상의 품질저하를 감안할 때 1~3 kGy 수준의 방사선 조사를 추천하고 있다<sup>(35,36)</sup>. 따라서 방사선 조사가 되었다면 적어도 1 kGy 이상 조사되어 앞에서 얻어진

**Table 1. Mean tail lengths ( $\mu\text{m}$ ) and RDI values for the comets obtained from irradiated beef samples** (p<0.05)

Beef sample	Irradiation dose (kGy)				
	0	1	3	5	10
<i>M. semitendinosus</i>	32.4 $\pm$ 7.2 <sup>1)</sup> (50.3) <sup>2)</sup>	56.9 $\pm$ 7.1(75.7)	70.2 $\pm$ 7.1(84.1)	76.5 $\pm$ 5.1(89.8)	80.5 $\pm$ 3.1(92.4)
<i>M. triceps brachii</i>	38.0 $\pm$ 3.7(53.8)	54.3 $\pm$ 3.4(74.9)	69.4 $\pm$ 5.0(83.2)	72.5 $\pm$ 3.3(86.9)	74.8 $\pm$ 1.6(89.3)

<sup>1)</sup>mean tail length  $\pm$  standard deviation<sup>2)</sup>RDI**Table 2. Mean tail lengths and distribution of the comets of Hanwoo and imported beef samples** (p<0.05)

Beef sample	Mean tail length ( $\mu\text{m}$ )	Distribution of comets <sup>3)</sup> (%)				RDI
		T <sup>4)</sup> <40	40<T<70	70<T<100	100<T	
Hanwoo		17.8 $\pm$ 16.8	61.9 $\pm$ 13.3	17.7 $\pm$ 8.5	2.7 $\pm$ 4.8	51.4
<i>M. semitendinosus</i>	38.2 $\pm$ 1.0 <sup>1)</sup>					
<i>M. triceps brachii</i>	35.8 $\pm$ 1.7 <sup>1)</sup>					
Imported beef		16.8 $\pm$ 7.3	45.0 $\pm$ 11.6	9.9 $\pm$ 8.8	28.2 $\pm$ 11.4	62.3
<i>M. semitendinosus</i>	47.0 $\pm$ 4.5 <sup>2)</sup>					
<i>M. triceps brachii</i>	49.4 $\pm$ 5.3 <sup>1)</sup>					

<sup>1)</sup>Mean values for all comets obtained from 10 samples<sup>2)</sup>Mean values for all comets obtained from 5 samples<sup>3)</sup>Mean distributions calculated from the distributions (%) for 20 Hanwoo samples and 20 imported beef samples<sup>4)</sup>tail length ( $\mu\text{m}$ )

RDI 값을 기준할 때 최소 74.9 이상의 값을 보여야 하겠지만 본 blind test에서 실험된 수입육 시료의 RDI 값은 62.3로서 훨씬 낮은 값을 나타내었기 때문에 방사선 조사육이 아닌 것으로 판정할 수 있었다. 수입육 시료가 한우육과 비교할 때 상대적으로 높은 RDI 값을 보여준 것은 아마도 냉장, 냉해동 등의 저온 처리 과정의 영향인 것으로 판단되었다. 본 연구진은 앞서 냉장, 냉동 및 냉동해동 반복 등의 저온처리에 의해서도 상당한 DNA 손상이 발생하는 것을 확인하였고 그 손상도를 측정 비교함으로써 장기간 저온처리되는 수입육과 상대적으로 신선한 한우육을 판별할 수 있음을 알아낸 바 있다<sup>(37,38)</sup>. 그러나 저온처리에 의한 DNA 손상도는 방사선 조사에 의한 것에 비해 낮고 comet의 분포 또한 높은 손상등급으로 이동하는 정도가 현저하지 않음을 알 수 있었다. 본 연구에서는 실제 국내시장에 방사선 조사여부가 표기된 수입육이 없으므로 의도적으로 방사선 조사 수입육을 구할 수는 없었으나 만일 실험에 사용된 수입육이 방사선 조사된 것이었다면 손상등급 분포 및 RDI 값에 있어서 명확한 차이를 나타내며 비조사 한우육과 구분되었을 것으로 예상되었다.

본 연구의 결과에서 나타난 바와 같이 Comet assay는 방사선 조사여부 또는 조사량에 대하여 민감한 검지를 위한 기술로 충분히 이용 가능함을 알 수 있었다. 본 연구에서 제시하는 손상등급별 분포를 보다 세

밀하게 구분하는 방법 등의 개선을 통하여 보다 정밀하게 조사여부와 조사량을 검지해 낼 수 있는 검사기술로 개발될 것으로 기대되었다. 또한 Comet assay는 분석과정이 신속하다는 점과 복잡하거나 어려운 전문 기술적 기술을 요하지 않아 간편한 특성까지 갖추고 있어서 수입식품 등의 방사선 조사 검지기술로 활용될 수 있는 가능성이 높음을 확인하였다.

## 요 약

Comet assay를 이용하여 방사선 조사육의 조사여부 및 조사량을 판별해내는 방법을 개발하기 위해 1-10 kGy의 감마선 조사량으로 조사한 육조직에서 일어나는 DNA 손상을 측정하였다. Comet assay에 있어 최적의 comet image를 얻기 위해 세포 분리, 세포 lysis 및 전기영동에 대한 여러 조건들을 적용하여 최적의 조건을 확립하였다. DNA 손상도는 관찰되는 comet의 평균 tail length와 tail length에 의해 구분된 4 손상등급에의 분포, 그리고 그 분포비율에 의해 본 연구에서 제시한 식에 의해 계산한 relative damage index (RDI) 값 등으로 비교 판정하였다. 평균 tail length와 RDI 값은 조사량이 증가함에 따라 증가하여 DNA 손상도가 증가됨을 나타내었으며, 평균 tail length으로는 조사량 간의 차이를 명확히 분별하기가 어려웠던 반면 RDI 값에 의하면 조사여부 및 조사량을 판별하기

에 적합함을 알 수 있었다. 국내산 한우육과 수입 냉장육에 대하여 blind test를 실시한 결과 수입육이 높은 DNA 손상도를 나타내었는데 그 RDI 값은 방사선 조사에 의한 값보다는 비교적 낮은 것이어서 수입육의 DNA 손상은 방사선 조사가 아닌 저온처리의 결과인 것으로 판단되었다. 본 연구의 결과로부터 Comet assay가 우육의 방사선 조사여부 및 조사량 판별에 유용한 기술로 응용될 수 있을 것으로 판단되었다.

## 감사의 글

본 연구는 1996년도부터 1998년도까지 농림수산특정연구과제개발사업인 “첨단분석기법을 이용한 미량비타민 분석, 원료단백질의 식별 및 수입육의 평가시스템의 개발”의 협동연구과제로 수행된 연구결과의 일부로서 이에 깊은 감사를 드립니다.

## 문헌

- Loaharanu, P. International developments of food irradiation and consumer acceptance of irradiated food. pp. 27-47. In: Acceptance and Trading on Irradiated Foods. Lee, C.H. (ed.). Korea University Press, Seoul, Korea (1998)
- Lee, C.H. Safety of irradiated foods. Food Sci. Industry 31: 2-3 (1998)
- WHO. Wholesomeness of irradiated food, Report of a Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee. Technical Report Series 659, Geneva, Switzerland (1981)
- Delincee, H. and Pool-Zobel, B.L. Genotoxic properties of 2-dodecylcyclobutanone, a compound formed on irradiation of food containing fat. Radiat. Phys. Chem. 52: 39-42 (1998)
- Lee, C.H. WHO report on the safety of 10-70 kGy irradiated foods, pp. 74-141. In: Acceptance and Trading on Irradiated Foods. Lee, C.H. (ed.). Korea University Press, Seoul, Korea (1998)
- Byun, M.W. Domestic investigations on food irradiation. Food Sci. Industry 31: 19-24 (1998)
- Kwon, J.H. and Chung, H.W. Scientific respects of food irradiation. Food Sci. Industry 31: 31-49 (1998)
- Copin, M.-P. and Bourgeois, C.M. Development of DNA elution method to detect irradiated foodstuff, pp. 22-26. In: Potential New Methods of Detection of Irradiated Food. Raffi, J.J. and Belliardo, J.J. (eds.). Commission of the European Communities, EUR13331, Luxembourg (1991)
- Mayer, M. and Bögl, K.W. A first attempt of identifying irradiated foods via the detection of DNA damages with GC-MS, pp. 34-51. In: Potential New Methods of Detection of Irradiated Food. Raffi, J.J. and Belliardo, J.J. (eds.). Commission of the European Communities, EUR13331, Luxembourg (1991)
- Pedersen, C.T. and Fuhlendorff, R. Mass spectrometry, a tool for the detection of irradiated foods, pp. 213-216. In: Potential New Methods of Detection of Irradiated Food. Raffi, J.J. and Belliardo, J.J. (eds.). Commission of the European Communities, EUR13331, Luxembourg (1991)
- Hoey, B.M., Swallow, A.J. and Margison, G.P. Detection of irradiation induced modifications in foodstuff DNA using  $^{32}\text{P}$  post-labelling, pp. 27-29. In: Potential New Methods of Detection of Irradiated Food. Raffi, J.J. and Belliardo, J.J. (eds.). Commission of the European Communities, EUR13331, Luxembourg (1991)
- Jabir, A.W., Deeble, D.J., Wheatly, P.A., Smith, C.J., Parsons, B.J., Beaumont, P.C. and Swallow, A.J. DNA modification as a means of detecting the irradiation of Wheat. Radiat. Phys. Chem. 34: 935-940 (1989)
- Deeble, D.J., Jabir, A.W., Parsons, B.J., Wheatly, P. and Smith, C.J. The detection of irradiated food based on modifications to DNA, pp. 30-33. In: Potential New Methods of Detection of Irradiated Food. Raffi, J.J. and Belliardo, J.J. (eds.). Commission of the European Communities, EUR13331, Luxembourg (1991)
- Harmey, M.A. The effect of irradiation on the DNA of cauliflower, pp. 56-58. In: Potential New Methods of Detection of Irradiated Food. Raffi, J.J. and Belliardo, J.J. (eds.). Commission of the European Communities, EUR13331, Luxembourg (1991)
- Kwak, H.J., Kang, H.J., Kim, H.K., Chang, H.G. and Park, S.A. Changes of physicochemical properties of gamma irradiated pork during storage. Kor. J. Food Sci. Technol. 30: 1276-1272 (1998)
- Kim, K.S., Kim, E.A., Lee, H.J., Yang, J.S. and Byun, M.W. Quantitative comparison of radiation induced hydrocarbons from irradiated beef, pork and chicken. Kor. J. Food Sci. Technol. 31: 301-307 (1999)
- Yang, J.S. Detection methods for irradiated foods. Food Sci. Industry 30: 121-130 (1997)
- Chung, H.W. and Kwon, J.H. Detection of irradiation treatment for seasoned-powdered foods by thermoluminescence measurement. Kor. J. Food Sci. Technol. 30: 509-516 (1998)
- Hwang, K.T., Byun, M.W., Wagner, U. and Dehne, L.I. Detection of post-irradiation of dry soup base ingredients in instant noodle by thermoluminescence technique. Kor. J. Food Sci. Technol. 30: 759-766 (1998)
- Hwang, K.T., Uhm, T.B., Wagner, U. and Schreiber, G.A. Application of photostimulated luminescence to detection of irradiated foods. Kor. J. Food Sci. Technol. 30: 498-501 (1998)
- Östling, O. and Johanson, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 123: 291-298 (1984)
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L. and O'Neill, K. The comet assay: a comprehensive review. Mutat. Res. 339: 37-59 (1995)
- McKelvey-Martin, V.J., Green, M.H.L., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Meo, M.P. and Collins, A. The single cell electrophoresis assay(Comet assay): A Euro-

- pean review. *Mutat. Res.* 288: 47-63 (1993)
24. Delincee, H. Control of irradiated food: Recent developments in analytical detection methods. *Radiat. Phys. Chem.* 42: 351-357 (1993)
  25. Delincee, H. Detection of the irradiation treatment of foods using micro-gel electrophoresis of DNA, pp. 112-116. In: *New Developments in Food, Feed and Waste Irradiation*. Schreiber, G.A., Helle, N. and Bögl, K.W. (eds.). Bericht des Instituts für Sozialmedizin und Epidemiologie des Bundesgesundheitsamtes. *SozEp Heft 16*, Bundesgesundheitsamt, Berlin, Germany (1993)
  26. Delincee, H. Application of the DNA "Comet assay" to detect irradiation treatment of foods, In: *Detection Methods for Irradiated Food-Current Status*. Stevenson, M.H. and McMurray, C. (eds.). Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK (1995)
  27. Cerda, H., Delincee, H., Haine, H. and Rupp, H. The DNA comet assay as a rapid screening technique to control irradiated food. *Mutat. Res.* 375: 167-181 (1997)
  28. Cerda, H. and Koppen, G. DNA degradation in chilled fresh chicken studied with the neutral comet assay. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 207: 22-25 (1998)
  29. Cerda, H. Detection of irradiated fresh chicken, pork and fish using the DNA Comet assay. *Lebensm. -Wiss. Technol.* 31: 89-92 (1998)
  30. Johanson, K.J. The Microelectrophoresis method, a method for determination of irradiated food, pp. 52-54. In: *Potential New Methods of Detection of Irradiated Food*. Raffi, J.J. and Belliardo, J.J. (eds.). Commission of the European Communities, EUR13331, Luxemburg (1991)
  31. Kim, C.K., Yang, J.S. and Lee, H.J. Detection of irradiated grains using the DNA 'Comet assay'. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 31: 906-911 (1999)
  32. Cerda, H. Analysis of DNA in fresh meat, poultry and fish; Possibility of identifying irradiated sample. In: *Changes in DNA for the Detection of Irradiated Food*. Delincee, H., Marchioni, E. and Hasseimann, C. (eds.). Commission of the European Communities, EUR15012, Luxemburg (1993)
  33. Hellman, B., Vaghef, H. and Bostroem, B. The concepts of tail moment and tail moment in the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res.* 336: 123-131 (1995)
  34. Olsen, D.G. Irradiation of food. *Food Technol.* 52: 56-62 (1998)
  35. Thayer, D.W. Extending shelf-life of poultry and red meat by irradiation processing. *J. Food Prot.* 56: 831-833 (1993)
  36. Thayer, D.W. and Boyd, G. Elimination of *Escherichia coli* O157:H7 in meats by gamma irradiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1030-1034 (1993)
  37. Shon, D.H., Chung, G.Y. and Hyun, C.K. Development of systems for the determination of trace vitamins, the speciation of food proteins, and the evaluation of imported meat using biospecific methods. The Final Report for Advanced Research of Agriculture and Forest (GA0052-1016), Korean Ministry of Agriculture and Forest, Seoul, Korea (1998)
  38. Park, J.H., Hyun, C.K., Jeong, S.K., Yi, M.A., Ji, S.T. and Shin, H.K. Use of the single cell gel electrophoresis assay (Comet assay) as a technique for monitoring low-temperature treated muscle tissues. *Int. J. Food Sci. Technol.* In press (2000)

---

(1999년 7월 30일 접수)