

출원번호통지서

출원일자 2025.07.25
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2025-0101172 (접수번호 1-1-2025-0846959-24)
(DAS접근코드D2CE)
출원인명칭 겐트대학교코리아 산학협력단(1-2022-079806-2)
대리인성명 임상엽(9-2009-001943-3)
발명자성명 박준태 소병현 박지호 김민선 이윤행 이호준 박지혜 한태준
발명의명칭 민물고기 세포를 이용한 독성물질의 유전독성 평가방법

특허청장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.
※ 심사제도 안내 : <https://www.kipo.go.kr>-지식재산제도

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【출원구분】	특허출원
【출원인】	
【명칭】	겐트대학교코리아 산학협력단
【특허고객번호】	1-2022-079806-2
【대리인】	
【성명】	임상엽
【대리인번호】	9-2009-001943-3
【포괄위임등록번호】	2022-072387-3
【대리인】	
【성명】	권정기
【대리인번호】	9-2011-000938-5
【포괄위임등록번호】	2022-072388-1
【발명의 국문명칭】	민물고기 세포를 이용한 독성물질의 유전독성 평가방법
【발명의 영문명칭】	Method for evaluating genotoxicity of toxic material using freshwater fish cells
【발명자】	
【성명】	박준태
【성명의 영문표기】	PARK, Joon Tae
【국적】	KR
【주민등록번호】	750404-1XXXXXX

【우편번호】 22000

【주소】 인천광역시 연수구 해송로 143, 101동 703호 (송도동, 송도
웰카운티1단지)

【거주국】 KR

【발명자】

【성명】 소병현

【성명의 영문표기】 SO, Byeong Hyeon

【국적】 KR

【주민등록번호】 010601-3XXXXXX

【우편번호】 61998

【주소】 광주광역시 서구 마북북개로 98, 105동 1401호 (마북동, 상
무 한신희플러스)

【거주국】 KR

【발명자】

【성명】 박지호

【성명의 영문표기】 PARK, Ji Ho

【국적】 KR

【주민등록번호】 980512-1XXXXXX

【우편번호】 06906

【주소】 서울특별시 동작구 매봉로 134, 8동 601호 (본동, 신동아아
파트)

【거주국】 KR

【발명자】

【성명】 김민선
【성명의 영문표기】 KIM, Min Seon
【국적】 KR
【주민등록번호】 020323-4XXXXXX
【우편번호】 22012
【주소】 인천광역시 연수구 아카데미로 119, 인천대학교 제1기숙사
C동 309호 (송도동)
【거주국】 KR

【발명자】

【성명】 이윤행
【성명의 영문표기】 LEE, Yun Haeng
【국적】 KR
【주민등록번호】 950308-1XXXXXX
【우편번호】 06943
【주소】 서울특별시 동작구 여의대방로44길 10, 111동 801호 (대방
동, 대림아파트)
【거주국】 KR

【발명자】

【성명】 이호준
【성명의 영문표기】 LEE, Ho Jun
【국적】 KR

【주민등록번호】 931120-2XXXXXX

【우편번호】 21986

【주소】 인천광역시 연수구 송도국제대로 261, 211동 1002호 (송도동, 송도 더샵 센트럴시티)

【거주국】 KR

【발명자】

【성명】 박지혜

【성명의 영문표기】 PARK, Ji Hae

【국적】 KR

【주민등록번호】 890416-2XXXXXX

【우편번호】 22110

【주소】 인천광역시 미추홀구 염전로168번길 14, 104동 801호 (도화동)

【거주국】 KR

【발명자】

【성명】 한태준

【성명의 영문표기】 HAN, Tae Jun

【국적】 KR

【주민등록번호】 600416-1XXXXXX

【우편번호】 22000

【주소】 인천광역시 연수구 해송로30번길 20, 404동 2503호 (송도동, 송도 웰카운티 4단지)

【거주국】 KR

【출원언어】 국어

【심사청구】 청구

【공지에외적용대상증명서류의 내용】

【공개형태】 학술지 게재

【공개일자】 2024.09.05

【공지에외적용대상증명서류의 내용】

【공개형태】 학술지 게재

【공개일자】 2025.04.04

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 1485019352

【과제번호】 2022003050003

【부처명】 환경부

【과제관리(전문)기관명】 한국환경산업기술원

【연구사업명】 수생태계 건강성 확보 기술개발사업(R&D)

【연구과제명】 국내자생종 기반 하천호소수 생물영향평가 기술개발

【과제수행기관명】 겐트대학교코리아 산학협력단

【연구기간】 2025.01.01 ~ 2025.12.31

【취지】 위와 같이 특허청장에게 제출합니다.

대리인 임상엽 (서명 또는 인)

대리인 권정기 (서명 또는 인)

【수수료】

【출원료】	0 면	46,000 원
【가산출원료】	63 면	0 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	9 항	625,000 원
【합계】	671,000원	
【감면사유】	전담조직(50%감면)[1]	
【감면후 수수료】	335,500 원	

【첨부서류】 1. 공지에외적용대상(신규성상실의예외, 출원시의특례)규정을 적용받기 위한 증명서류_1통 2. 공지에외적용대상(신규성상실의예외, 출원시의특례)규정을 적용받기 위한 증명서류_1통

1 : 공지에외적용대상(신규성상실의예외, _출원시의특례)규정을_적용받기_위한_증명서류

[PDF 파일 첨부](#)

2 : 공지에외적용대상(신규성상실의예외, _출원시의특례)규정을_적용받기_위한_증명서류

[PDF 파일 첨부](#)

【발명의 설명】

【발명의 명칭】

민물고기 세포를 이용한 독성물질의 유전독성 평가방법{Method for evaluating genotoxicity of toxic material using freshwater fish cells}

【기술분야】

【0001】 본 발명은 독성물질의 유전독성 평가방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 독성물질, 독성물질에 의해 오염된 토양, 독성물질에 의해 오염된 물 등의 유전독성을 민물고기 세포를 이용하여 빠르고 정확하게 평가하는 방법에 관한 것이다.

【발명의 배경이 되는 기술】

【0002】 유전독성물질(Genotoxins)은 다양한 수생 식물과 동물에 심각한 영향을 미치는 물질이다. 이들 물질에 지속적으로 노출되면, 수생 생물의 몸속에 유전독성물질이 점차 축적되며, 유전물질이 쉽게 손상된다. 이러한 손상은 형태 이상(morphological deformities)이나 척추 기형(spinal deformities)을 유발하고, 개체의 사망으로 이어질 수 있다. 또한, 유전독성물질은 수생 생물에 해로운 영향을 줄 뿐만 아니라, 이를 섭취하는 인간에게도 독성을 유발할 수 있다. 유전독성물질에 오염된 수생 생물을 섭취할 경우, 불임, 암, 장기 손상, 비정상적인 성장 등 다양한 건강 문제가 발생할 수 있다. 따라서 수생 생물과 인간을 보호하기 위해서는 효과적인 유전독성물질 모니터링 기술의 개발이 필요하다.

【0003】 어류는 유전독성물질에 대해 생리학적으로 매우 민감하게 반응하며, 위해 요소에 대한 조기 탐지 기능을 가진다. 따라서 어류는 수질 평가에 있어 중요한 도구이지만, 그 자체로는 몇 가지 한계가 있다. 어류는 유전독성물질 외에도 다양한 자극에 반응하므로, 측정 결과의 정확도가 떨어지거나 데이터 해석이 어려울 수 있다. 이러한 변수를 고려하면, 어류만을 활용한 유전독성 평가는 신뢰도가 떨어질 수 있으며, 보완 가능한 더 효율적인 평가 방법이 필요하다. 이에 따라 어류 유래 세포(fish-derived cell lines)가 어류의 대체 모델로 유전독성 평가에 활용되고 있다. 어류 세포는 행동에 따른 개체 차이의 영향을 배제하여 더 일관된 실험 조건을 제공한다. 예를 들어, 무지개송어에서 유래된 RTG-2 어류 세포주는 여러 유전독성물질 평가에 사용되었고[Nehls, S.; Segner, H. Comet assay with the fish cell line rainbow trout gonad-2 for in vitro genotoxicity testing of xenobiotics and surface waters. Environ. Toxicol. Chem. 2005, 24, 2078-2087.], PLHC-1 세포주는 벤조[a]피렌(benzo[a]pyrene) 및 에틸 메탄설폰네이트(ethyl methanesulfonate)의 유전독성을 세계 최초로 입증한 사례이다 [Srut, M.; Traven, L.; Stambuk, A.; Kralj, S.; Zaja, R.; Micovic, V.; Klobucar, G.I. Genotoxicity of marine sediments in the fish hepatoma cell line PLHC-1 as assessed by the Comet assay. Toxicol. Vitr. 2011, 25, 308-314].

【0004】 코멧 시험(comet assay)은 개별 세포 수준에서 DNA 손상을 감지하는 민감한 분석 기술로, 모든 세포 유형에서 유전독성 평가에 사용할 수 있다. 특히 DNA 가닥 절단(DNA strand breaks)을 평가하기 위해 유전독성학 및 암 연구에서 널

리 활용되고 있다. 하지만 어류 세포를 사용하는 코멧 분석은 1일에서 최대 36일까지 소요되는 긴 처리 시간 때문에, 단시간 내 여러 유전독성물질을 평가하는 데 제한이 있다. 또한, 현재의 유전독성 평가 시스템은 신속한 결과를 요구하는 현실의 수요를 충족시키지 못하고 있다. 따라서 보다 신속하고 정확하게 유전독성을 테스트할 수 있는 새로운 평가 플랫폼의 개발이 시급하다.

【발명의 내용】

【해결하고자 하는 과제】

【0005】 본 발명은 종래의 기술적 배경하에서 도출된 것으로서, 본 발명의 목적은 민물고기 세포를 이용하여 다양한 독성물질의 유전독성을 빠르고 정확하게 평가할 수 있는 방법을 제공하는데에 있다.

【과제의 해결 수단】

【0006】 본 발명의 발명자들은 다양한 독성물질의 유전독성 평가시 민물고기 세포주를 1차 배양한 후 이를 다양한 독성물질과 접촉시켜 2차 배양할 때 소정 범위의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 함량을 가지는 독성평가용 액체 배지를 사용하면 배양 시간을 크게 줄어 들어 유전독성으로 인한 어류 세포의 사멸을 방지할 수 있고, 코멧 시험(comet assay)에 의해 측정된 유전독성 반응의 민감도가 증가하여 유전독성의 정확도를 높일 수 있으며, 독성물질의 유전독성 평가 시간이 약 10 hr 이내로 크게 단축되는 점을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

【0007】 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 예는 (a) 민물고기 세포주를 어류세포 배양용 액체 배지와 함께 용기에 넣고 배양하여 용기 내부에 민물고기 세포를 부착시킨 후 어류세포 배양용 액체 배지를 제거하여 측정용 용기를 준비하는 제1단계; (b) 상기 측정용 용기에 평가 대상 시료 및 독성평가용 액체 배지를 포함하는 측정용 액체 샘플을 첨가하고 3~10 hr 동안 배양하는 제2단계; 및 (c) 배양이 완료된 후 코멧 시험(comet assay)을 통해 민물고기 세포의 DNA 손상 수준을 측정하는 제3단계를 포함하는 유전독성 평가방법을 제공한다. 상기 독성평가용 액체 배지 내에서 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)의 함량은 0.5~2%(w/v)이다.

【발명의 효과】

【0008】 본 발명의 일 예에 따른 유전독성 평가방법은 독성물질을 민물고기 세포주에 처리할 때 사용하는 배지의 소태아 혈청 함량과 처리 시간을 조절하여 기존 조건의 유전독성 평가 방법에 비해 유전독성 평가 시간이 크게 단축되고 동시에 민감성도 높으며 다양한 유전독성물질에 적용될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 유전독성 평가 방법은 환경 모니터링 및 보호에 기여할 수 있는 도구로 활용될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

【0009】 도 1은 본 발명에서 사용한 전통적 유전독성 평가 방법과 새로운 유전독성 평가 방법의 개요를 도식적으로 나타낸 것이다.

도 2는 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포주를 이용하여 클림바졸(Climbazole)의 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀)를 산출한 결과와, 15%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 클림바졸(Climbazole)로 96 hr 동안 처리한 경우 및 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 클림바졸(Climbazole)로 6 hr 동안 처리한 경우의 유전독성을 코멧 시험(comet assay)으로 분석한 결과이다.

도 3은 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포주를 이용하여 메톨라클로르(Metolachlor)의 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀)를 산출한 결과와, 15%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 메톨라클로르(Metolachlor)로 96 hr 동안 처리한 경우 및 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 메톨라클로르(Metolachlor)로 6 hr 동안 처리한 경우의 유전독성을 코멧 시험(comet assay)으로 분석한 결과이다.

도 4는 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포주를 이용하여 다이벤즈[a,h]안트라센[Dibenz[a,h]anthracene]의 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀)를 산출한 결과와, 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 다이벤즈[a,h]안트라센[Dibenz[a,h]anthracene]으로 6 hr 동안 처리한 조건에서 유전독성을 코멧 시험(comet assay)으로 분석한 결과이다.

도 5는 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포주를 이용하여 에토프로포스(Ethoprophos)의 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀)를 산출한 결과와, 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 에토프로포스(Ethoprophos)로 6 hr 동안 처리한 조건에서 유전독성을 코멧 시험(comet assay)으로 분석한 결과이다.

도 6은 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 부타클로르(Butachlor)로 6 hr 동안 처리한 조건에서 유전독성을 코멧 시험(comet assay)으로 분석한 결과이다.

도 7은 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 2,4,6-트리클로로페놀(2,4,6-Trichlorophenol)로 6 hr 동안 처리한 조건에서 유전독성을 코멧 시험(comet assay)으로 분석한 결과이다.

도 8은 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 플록사피록사드(Fluxapyroxad)로 6 hr 동안 처리한 조건에서 유전독성을 코멧 시험(comet assay)으로 분석한 결과이다.

도 9는 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 피프로닐(Fipronil)로 6 hr 동안 처리한 조건에서 유전독성을 코멧 시험(comet assay)으로 분석한 결과이다.

도 10은 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 클래리트로마이신(Clarithromycin)으로 6 hr 동안 처리한 조건에서 유전독성을 코멧 시험(comet assay)으로 분석한 결과이다.

도 11은 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 2,4-다이-tert-부틸페놀(2,4-Di-tert-butylphenol)로 6 hr 동안 처리한 조건에서 유전독성을 코멧 시험(comet assay)으로 분석한 결과이다.

도 12는 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 퍼플루오로옥탄산(Perfluorooctanoic acid)으로 6 hr 동안 처리한 조건에서 유전독성을 코멧 시험(comet assay)으로 분석한 결과이다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

【0010】 본 발명에서 배지 내 특정 물질의 함량 단위(또는 농도 단위)로 사용되는 "%(w/v)"는 배지 100ml에 함유된 특정 물질의 g수를 의미한다. 즉, 배지 내 특정 물질의 함량이 1%(w/v)인 경우 배지 100ml에 특정 물질 1g이 용해되어 있다는 것이 의미한다.

【0012】 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.

【0014】 본 발명은 민물고기 세포의 DNA 손상 수준을 이용한 유전독성 평가 방법에 관한 것이다.

【0015】 본 발명의 일 예에 따른 유전독성 평가방법은 (a) 민물고기 세포주를 어류세포 배양용 액체 배지와 함께 용기에 넣고 배양하여 용기 내부에 민물고기 세포를 부착시킨 후 어류세포 배양용 액체 배지를 제거하여 측정용 용기를 준비하는 제1단계; (b) 상기 측정용 용기에 평가 대상 시료 및 독성평가용 액체 배지를 포함하는 측정용 액체 샘플을 첨가하고 3~10 hr 동안 배양하는 제2단계; 및 (c) 배양이 완료된 후 코멧 시험(comet assay)을 통해 민물고기 세포의 DNA 손상 수준을 측정하는 제3단계를 포함한다. 이하, 본 발명의 일 예에 따른 유전독성 평가방법을 구성요소별로 나누어 설명한다.

【0017】 민물고기 세포주

【0018】 본 발명에서 유전독성을 평가하기 위해 사용하는 민물고기 세포주는 민물고기에서 분리되고 계대 배양하여도 그 형질이 유지되는 세포 집단이라면 그 종류가 크게 제한되지 않는다. 상기 민물고기는 그 세포주의 생존능 특성 및 유전독성 반응에 의한 DNA 손상 특성이 다양한 독성물질에 대해 비교적 일관성 있는 경향을 보이는 것이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 잉어(*Cyprinus*

carpio), 머들붕어(*Macropodus ocellatus*) 등에서 선택될 수 있다.

【0019】 상기 민물고기 세포주는 (a1) 살아있는 민물고기를 다진 후 튜브 형태의 용기에 옮기고, 콜라겐분해효소를 포함하는 액체 배지를 첨가하고 배양한 후, 콜라겐분해효소를 포함하지 않는 액체 배지를 첨가하고 방치하여 민물고기 조직을 가라앉히는 단계; (a2) 상기 튜브 형태의 용기에서 가라앉은 조직을 제외한 상층액을 새로운 튜브 형태의 용기로 옮기고 원심분리하여 세포 펠렛을 침전시키는 단계; 및 (a3) 상기 새로운 튜브 형태의 용기에서 상층액을 제거하고 세포 펠렛을 세척한 후 어류세포 배양용 액체 배지를 첨가하고 배양하여 세포를 성장시키고 민물고기 세포주를 수득하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제작될 수 있다.

【0020】 상기 민물고기 세포주를 제작하기 위해 사용되는 액체 배지는 세포 배양에 사용되는 통상적인 다양한 배지에서 선택될 수 있고, 예를 들어, 글루코스, 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 항생제가 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 선택될 수 있다. 상기 항생제는 동물 세포 배양에 사용되는 것이라면 그 종류가 제한되지 않으며, 예를 들어 페니실린, 스트렙토마이신, 프리모신(Primocin) 등에서 선택될 수 있다. 상기 항생제는 페니실린 및 스트렙토마이신의 조합으로 구성될 수도 있고, 프리모신(Primocin) 단독으로 구성될 수도 있다. 또한, 상기 콜라겐분해효소를 포함하는 액체 배지는 세포 배양에 사용되는 통상적인 다양한 배지에 콜라겐분해효소가 보충된 배지로서 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 글루코스, 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 항생제, L-글루타민, HEPES[N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid]

및 콜라겐분해효소 A(Collagenase A)가 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 선택될 수 있다. 상기 콜라겐분해효소를 포함하는 액체 배지에 사용되는 항생제는 바람직하게는 페니실린 및 스트렙토마이신의 조합으로 구성된다. 또한, 상기 어류세포 배양용 액체 배지는 어류세포를 배양하기 위해 사용되는 통상적인 다양한 배지에서 선택될 수 있고, 예를 들어 글루코스, 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 항생제, L-글루타민 및 HEPES[N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid]가 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 선택될 수 있다. 상기 어류세포 배양용 액체 배지에 포함된 항생제는 배양되는 어류세포의 종류에 따라 다양하게 구성될 수 있다. 예를 들어, 어류세포 배양용 액체 배지에서 배양되는 어류세포가 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포인 경우 항생제는 페니실린 및 스트렙토마이신의 조합으로 구성되는 것이 바람직하다. 또한, 어류세포 배양용 액체 배지에서 배양되는 어류세포가 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포인 경우 항생제는 프리모신(Primocin) 단독으로 구성되는 것이 바람직하다. 또한, 상기 어류세포 배양용 액체 배지 내에서 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)의 함량은 10~20%(w/v)인 것이 바람직하고, 항생제의 함량은 0.005~0.06%(w/v)인 것이 바람직하고, L-글루타민의 함량은 0.5~2%(w/v)인 것이 바람직하고, HEPES[N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid]의 함량은 0.1~1%(w/v)인 것이 바람직하다. 어류세포 배양용 액체 배지에 포함된 항생제가 페니실린 및 스트렙토마이신의 조합으로 구성되는 경우 페니실린의 함량은 0.001~0.02%(w/v)인 것이 바람직하고, 스트렙토마이신의 함량은

0.005~0.04%(w/v)인 것이 바람직하다. 어류세포 배양용 액체 배지에 포함된 항생제가 프리모신(Primocin)으로 구성되는 경우 프리모신(Primocin)의 함량은 0.005~0.05%(w/v)인 것이 바람직하다.

【0021】 상기 민물고기 세포주를 제작하는 방법에서 잘게 다져진 민물고기 조직에 콜라겐분해효소를 처리하면 민물고기 조직에 존재하는 콜라겐이 분해되어 서로 얽혀있는 조직들이 세포 수준으로 느슨하게 풀리고, 대부분의 세포들은 상층액에 부유된 상태로 존재하게 된다. 상기 민물고기 세포주를 제작하는 방법에서 (a1) 단계의 배양은 20~40℃의 온도, 소정의 진탕 조건(예를 들어 100~300 rpm) 및 CO₂가 존재하지 않는 조건에서 이루어지는 것이 바람직하다. 상기 (a1) 단계의 배양 온도는 35~40℃인 것이 더 바람직하다. 또한, 상기 민물고기 세포주를 제작하는 방법에서 (a3) 단계의 배양은 20~40℃의 온도 및 1~10%(w/v) CO₂ 조건에서 이루어지는 것이 바람직하다. 상기 (a3) 단계의 배양 온도는 배양되는 어류세포의 종류에 따라 선택될 수 있다. 배양되는 어류세포가 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포인 경우 (a3) 단계의 배양 온도는 35~40℃인 것이 더 바람직하다. 또한, 배양되는 어류세포가 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포인 경우 (a3) 단계의 배양 온도는 20~30℃인 것이 더 바람직하다.

【0023】 측정용 용기를 준비하는 제1단계

【0024】 본 발명의 일 예에 따른 생태독성 평가방법에서 측정용 용기를 준비하는 제1단계는 민물고기 세포주를 어류세포 배양용 액체 배지와 함께 용기에 첨가하고 소정의 조건에서 배양하여 용기 내부 바닥에 민물고기 세포를 부착시킨 후 어류세포 배양용 액체 배지를 제거하는 것으로 구성된다. 상기 용기는 민물고기 세포주가 쉽게 부착할 수 있는 재질 및 형태를 가지는 것이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 예를 들어, 웰 플레이트(Well plate)가 있다. 또한, 상기 웰 플레이트는 적어도 6개 이상의 웰(Well)로 구성되는 것이 바람직한데, 1개의 웰에는 후술하는 제2단계에서 대조군으로 독성물질이 포함되지 않은 독성평가용 액체 배지로 구성되거나 민물고기 세포의 DNA 손상을 거의 유발하지 않는 다이메틸 설펍사이드(DMSO) 및 독성평가용 액체 배지로 구성된 대조용 액체 샘플을 넣어 민물고기 세포를 배양하고, 나머지 5개의 웰에는 후술하는 제2단계에서 다양한 평가 대상 시료 및 독성 평가용 액체 배지를 포함하는 측정용 액체 샘플을 넣어 민물고기 세포를 배양한다.

【0025】 상기 제1단계에서 배양은 20~40℃의 온도 및 1~10%(w/v) CO₂ 조건에서 민물고기 세포가 용기 내부, 바람직하게는 용기 하부 바닥에 충분히 부착할 수 있는 시간 동안 이루어지는 것이 바람직하다. 상기 제1단계에서 배양 온도는 배양되는 어류세포의 종류에 따라 선택될 수 있다. 배양되는 어류세포가 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포인 경우 배양 온도는 35~40℃인 것이 더 바람직하다. 또한, 배양되는 어류세포가 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포인 경우 배양 온도는 20~30℃인 것이 더 바람직하다. 상기 제1단계에서 배양 시간은 10~30 hr인 것이 바람직하다.

【0027】 민물고기 세포를 평가 대상 시료가 존재하는 상태에서 배양하는 제2

단계

【0028】 본 발명의 일 예에 따른 유전독성 평가방법에서 민물고기 세포를 평가 대상 시료가 존재하는 상태에서 배양하는 제2단계는 측정용 용기에 평가 대상 시료 및 독성평가용 액체 배지를 포함하는 측정용 액체 샘플을 첨가하고 소정의 조건에서 배양하는 것으로 구성된다.

【0029】 상기 평가 대상 시료는 유전독성 평가의 대상물로서, 독성물질, 독성물질에 의해 오염된 토양 또는 독성물질에 의해 오염된 물(water)에서 선택될 수 있다. 상기 오염된 토양은 바람직하게는 토양 추출액 형태로 독성평가용 액체 배지에 첨가되어 측정용 액체 샘플을 구성할 수 있다. 상기 오염된 물(water)은 물(water)이 주요 부피를 차지하는 피오염물로서, 해수, 하천, 호수, 폐수, 방류수, 슬러지 용출수, 토양 용출수, 퇴적토 용출수 등에서 채취한 수체 샘플을 포함한다. 또한, 상기 독성물질은 민물고기 세포의 DNA 손상을 유발하는 물질이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 중금속, 살충제, 제초제, 항균제, 환경 호르몬, 계면활성제, 과불화화합물, 다환방향족탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 또는 염류화합물 등에서 선택되는 1종 이상일 수 있다. 상기 중금속 독성물질은 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 은(Ag; Silver), 알루미늄(Al; Aluminum), 비소(As; Arsenic), 카드뮴(Cd; Cadmium), 코발트(Co; Cobalt), 크롬(Cr; Chromium), 구리(Cu; Copper), 철(Fe; Iron), 수은(Hg;

Mercury), 니켈(Ni; Nickel), 납(Pb; Lead), 및 아연(Zn; Zinc) 등에서 선택될 수 있다. 또한, 상기 제초제 독성물질은 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 2,4-D(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid), 2,4,5-T(2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid), 2,4-DP(Dichlorprop), MCPA(2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid), MCPP(methylchlorophenoxypropionic acid), MCPB[4-(4-Chloro-2-methylphenoxy)butanoic acid], 글리포세이트(Glyphosate), 글루포시네이트 암모늄(Glufosinate ammonium) 등과 같은 지방족 산제; 아미노피랄리드(Aminopyralid), 클로피랄리드(Clopyralid) 등과 같은 피리딘제; PCP(Pentachlorophenol) 등과 같은 페놀제; 프로파닐(Propanil), 부타클로르(Butachlor, 마세트), 알라클로르(라소) 등과 같은 아마이드제; 클로르프로파ם(chlorpropham), 펜다이메탈린(Pendimethalin), 싸이오벤카브(thiobencarb, 사단) 등과 같은 카바메이트제; 메타벤즈티아주론(methabenzthiazuron, 트리븐닐) 등과 같은 요소제; 아트라진(Atrazine), 시마진(simazine) 등과 같은 트라이아진제; 파라콰트(Paraquat, 그라옥손) 등과 같은 비피리딜리움제; 브로마실(bromacil, 하이바엑스), 벤타존(bentazon, 바사그란) 등과 같은 유라실제; 다이캄바(Dicamba), 플루록시피르(Fluroxypyr), 이마자피르(imazapyr), 이마자픽(imazapic), 이마자목스(imazamox), 리누론(Linuron), 메톨라클로르(metolachlor), 피클로람(picloram) 등과 같은 유기제초제에서 선택될 수 있다. 또한, 상기 계면활성제 독성물질은 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 SDS(Sodium dodecyl sulphate), SLES(sodium lauryl ether sulfate), PFOS(Perfluorooctanesulfonate) 등과 같은 음이온성

계면활성제; , BAC(benzalkonium chloride), BZE(benzethonium chloride), DODAB(dioctadecyldimethylammonium bromide) 등과 같은 양이온성 계면활성제; Triton X-100, Tween 80 등과 같은 비이온성 계면활성제 등에서 선택될 수 있다. 또한, 상기 과불화합물 독성물질은 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 PFOA(Perfluorooctanoic acid), PFOS(Perfluorooctanesulfonic acid) 등에서 선택될 수 있다. 또한, 상기 살충제 독성물질은 에토프로포스(Ethoprophos), 2,4,6-트리클로로페놀(2,4,6-Trichlorophenol), 피프로닐(Fipronil) 등에서 선택될 수 있다. 또한, 상기 항균제 독성물질은 클림바졸(Climbazole), 플록사피록사드(Fluxapyroxad), 클래리트로마이신(Clarithromycin) 등에서 선택될 수 있다. 또한, 기타 독성물질은 다이벤즈[a,h]안트라센[Dibenz[a,h]anthracene], 2,4-다이-tert-부틸페놀(2,4-Di-tert-butylphenol) 등에서 선택될 수 있다.

【0030】 상기 측정용 액체 샘플 내에서 평가 대상 시료의 농도는 제2단계의 배양 조건에서 민물고기 세포를 사멸시키지 않으면서 동시에 민물고기 세포의 DNA에 영향을 주는 범위에서 선택될 수 있다. 예를 들어, 상기 측정용 액체 샘플 내에서 평가 대상 시료의 농도는 바람직하게는 민물고기 세포의 생존 특성을 기초로 산출한 평가 대상 시료의 최소영향농도(EC₁₀) 부터 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀) 까지의 범위에서 선택될 수 있다. 또한, 상기 측정용 액체 샘플 내에서 평가 대상 시료의 농도는 바람직하게는 민물고기 세포의 생존 특성을 기초로 산출한 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀)에서 1/5 내지 4/5 수준으로 희석된 값일 수 있고, 더 바람직하게는 2/5 내지 3/5

수준으로 회석된 값일 수 있다. 상기 민물고기 세포의 생존 특성을 기초로 산출한 평가 대상 시료의 최소영향농도(EC_{10}) 및 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC_{50})는 다양한 농도로 구배된 평가 대상 시료에 민물고기 세포를 노출시킨 상태로 배양한 후 민물고기 세포의 생존수 또는 생존율을 측정하여 산출할 수 있다. 구체적으로 평가 대상 시료의 최소영향농도(EC_{10}) 및 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC_{50})를 산출하는 방법은 평가 대상 시료와 독성평가용 액체 배지를 혼합하여 평가 대상 시료가 5가지 이상의 농도로 구배화된 후 측정용 액체 샘플을 제조하고, 상기 제2 단계와 동일한 배양 온도, 배양 시간, CO_2 및 암 조건에서 민물고기 세포를 배양한 후 DNA 염색 및 형광 측정과 같은 공지의 분석 방법으로 살아있는 세포수를 정량화하는 것으로 구성될 수 있다.

【0031】 상기 독성 평가용 액체 배지는 소정 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 함유하는 것이라면 그 종류가 크게 제한되지 않고 어류세포 배양에 사용되는 통상적인 다양한 배지에서 선택될 수 있다. 상기 독성 평가용 액체 배지 내에서 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 함량은 민물고기 세포주의 독성물질에 대한 반응을 상쇄시킬 만큼 과도한 영양분을 공급하지 않으면서 동시에 민물고기 세포주가 적정 시간 동안 기아에 이르지 않게 하는 특성을 발휘하기 위해 0.5~2%(w/v)인 것이 바람직하고, 0.75~1.5%(w/v)인 것이 더 바람직하다. 예를 들어, 상기 독성 평가용 액체 배지는 글루코스, 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 항생제가 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 선택될 수 있다. 또한, 상기 독성 평가용 액체 배지는 바람직하게는 글루코스, 소태아혈

청(fetal bovine serum, FBS), 항생제, L-글루타민 및 HEPES[N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid]가 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 선택될 수 있다. 상기 독성 평가용 액체 배지에 포함된 항생제는 배양되는 어류세포의 종류에 따라 다양하게 구성될 수 있다. 예를 들어, 독성 평가용 액체 배지에서 배양되는 어류세포가 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포인 경우 항생제는 페니실린 및 스트렙토마이신의 조합으로 구성되는 것이 바람직하다. 또한, 독성 평가용 액체 배지에서 배양되는 어류세포가 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포인 경우 항생제는 프리모신(Primocin) 단독으로 구성되는 것이 바람직하다. 또한, 상기 독성 평가용 액체 배지 내에서 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)의 함량은 0.5~2%(w/v)인 것이 바람직하고, 항생제의 함량은 0.005~0.06%(w/v)인 것이 바람직하고, L-글루타민의 함량은 0.5~2%(w/v)인 것이 바람직하고, HEPES[N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid]의 함량은 0.1~1%(w/v)인 것이 바람직하다. 독성 평가용 액체 배지에 포함된 항생제가 페니실린 및 스트렙토마이신의 조합으로 구성되는 경우 페니실린의 함량은 0.001~0.02%(w/v)인 것이 바람직하고, 스트렙토마이신의 함량은 0.005~0.04%(w/v)인 것이 바람직하다. 독성 평가용 액체 배지에 포함된 항생제가 프리모신(Primocin)으로 구성되는 경우 프리모신(Primocin)의 함량은 0.005~0.05%(w/v)인 것이 바람직하다.

【0032】 상기 측정용 액체 샘플은 세포의 원활한 배양을 위해 평가 대상 시료를 독성 평가용 액체 배지와 혼합하여 제작된다. 또한, 상기 측정용 액체 샘플은 바람직하게는 평가 대상 시료를 포함하지 않는 대조군을 더 포함할 수 있다. 예를

들어 상기 측정용 액체 샘플은 독성평가용 액체 배지로 구성된 대조군 또는 다이메틸 설펍사이드(DMSO) 및 독성평가용 액체 배지로 구성된 대조군을 더 포함할 수 있다. 상기 다이메틸 설펍사이드(DMSO)는 민물고기 세포의 DNA 손상을 거의 유발하지 않는 기준 물질로 사용될 수 있다. 후술하는 민물고기 세포의 DNA 손상 수준을 측정하는 제3단계에서 평가 대상 시료가 존재하는 조건에서 민물고기 세포를 배양하는 실험군과 평가 대상 시료가 존재하지 않는 조건에서 민물고기 세포를 배양하는 대조군의 DNA 손상 수준을 측정하고, 실험군의 DNA 손상 수준을 대조군의 DNA 손상 수준에 대비되는 상대적인 값으로 환산하면 실험 환경에 크게 영향을 받지 않고 평가 대상 시료의 유전독성을 평가할 수 있다.

【0033】 상기 제2단계에서 배양은 20~40℃의 온도, 7~8의 pH, 1~10%(w/v) CO₂ 및 암 조건에서 이루어지는 것이 바람직하다. 상기 제2단계에서 배양 온도는 배양되는 어류세포의 종류에 따라 선택될 수 있다. 배양되는 어류세포가 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포인 경우 배양 온도는 35~40℃인 것이 더 바람직하다. 또한, 배양되는 어류세포가 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포인 경우 배양 온도는 20~30℃인 것이 더 바람직하다. 또한, 상기 제2단계에서 배양 시간은 세포가 기아 상태에 도달하지 않으면서 평가 대상 시료에 대한 충분한 반응을 담보하는 측면에서 4~9 hr인 것이 바람직하고 5~8 hr인 것이 더 바람직하다.

【0035】 민물고기 세포의 DNA 손상 수준을 측정하는 제3단계

【0036】 본 발명의 일 예에 따른 유전독성 평가방법에서 민물고기 세포의

DNA 손상 수준을 측정하는 제3단계는 상기 제2단계에서 배양이 완료된 후 코멧 시험(comet assay)을 통해 민물고기 세포의 DNA 손상 수준을 측정하는 것으로 구성된다. 상기 코멧 시험(comet assay)은 진핵세포의 DNA 손상을 검출하여 유전독성을 평가하는 시험법의 하나로서 단일 세포 젤 전기 이동법(single-cell gel electrophoresis)으로도 불린다. 코멧 시험(comet assay)은 세포를 아가로스와 혼합한 후 용해시키고 전기영동을 실시하여 혜성(Comet) 모양을 형성시키는 것으로 구성된다. 전기영동에 의해 손상되지 않은 DNA는 혜성(Comet)의 머리(head)를 생성하고 손상된 DNA는 세포 밖으로 이동하여 꼬리를 형성한다. 코멧 시험(comet assay)은 중성 조건에서 DNA 이중가닥 절단(DNA DSBs, DNA double-strand breaks)을 감지할 수 있고, 알칼리성 조건에서 단일 및 이중가닥 절단을 포함한 DNA 소량 손상을 감지할 수 있다. 본 발명의 일 예에 따른 유전독성 평가방법에서 사용하는 코멧 시험(comet assay)은 바람직하게는 DNA 이중가닥 절단(DNA DSBs, DNA double-strand breaks)을 감지하는 중성 코멧 시험(Neutral comet assay)이다. 또한, 코멧 시험(comet assay)을 통해 분석한 민물고기 세포의 DNA 손상 수준은 코멧 꼬리 길이, 코멧 꼬리의 DNA 백분율, 코멧 꼬리 모멘트 등으로 정량화될 수 있고, 바람직하게는 코멧 꼬리 길이에 의해 정량화된다.

【0037】 본 발명의 일 예에 따른 유전독성 평가방법에서 평가 대상 시료의 유전독성은 평가 대상 시료가 존재하는 조건에서 배양된 민물고기 세포의 코멧 꼬리 길이 및 평가 대상 시료가 존재하지 않는 대조군에서 배양된 민물고기 세포의 코멧 꼬리 길이를 비교하여 평가될 수 있다. 구체적으로 본 발명의 일 예에 따른

유전독성 평가방법에서 평가 대상 시료의 유전독성은 평가 대상 시료가 존재하지 않는 대조군에서 배양된 민물고기 세포의 코멧 꼬리 길이 대비 평가 대상 시료가 존재하는 조건에서 배양된 민물고기 세포의 코멧 꼬리 길이의 증가 백분율로 나타낼 수 있다.

【0039】 유전독성 평가방법의 활용

【0040】 본 발명의 일 예에 따른 유전독성 평가방법은 유전독성 평가 키트로 제품화될 수 있다. 본 발명의 일 예에 따른 유전독성 평가 키트는 민물고기 세포주; 민물고기 세포 및 측정용 액체 샘플을 투입하고 배양하기 위한 측정용 용기; 민물고기 세포주를 용기 내부 벽에 부착시키기 위해 사용되는 어류세포 배양용 액체 배지; 평가 대상 시료를 현탁하거나 희석하기 위한 독성평가용 액체 배지를 포함한다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 유전독성 평가 키트는 중금속, 살충제, 제초제, 항균제, 환경 호르몬, 계면활성제, 과불화화합물, 다환방향족탄화수소 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 또는 염류화합물 등에서 선택되는 표준 독성물질을 더 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 유전독성 평가 키트는 상기 표준 독성물질 대신 표준 독성물질을 독성평가용 액체 배지에 용해시켜 제조한 독성물질 표준용액을 더 포함할 수 있다. 상기 표준 독성물질 또는 독성물질 표준용액은 평가 대상 시료의 유전독성을 평가하기 전에 민물고기 세포주의 상태, 즉 독성물질에 대한 반응 감응성 여부를 테스트하는데 이용될 수 있다.

【0042】 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명의 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위를 한정하는 것은 아니다.

【0044】 1. 재료 및 방법

【0045】 1.1. 배지의 준비

【0046】 (1) 정상 배지(Normal media)

【0047】 25 mM 농도의 글루코스가 함유된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에 10%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 0.006%(w/v) 농도의 페니실린 및 0.01%(w/v) 농도의 스트렙토마이신을 보충하여 정상 배지(Normal media)를 준비하였다.

【0049】 (2) 콜라겐분해효소 배지(Collagenase media)

【0050】 25 mM의 글루코스가 함유된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에 15%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 0.006%(w/v) 농도의 페니실린, 0.01%(w/v) 농도의 스트렙토마이신, 1%(w/v) 농도의 L-글루타민, 0.5%(w/v) 농도의 HEPES[N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid] 및 0.2%(w/v) 농도의 콜라겐분해효소 A(Collagenase A)를 첨가하여 콜라겐분해효소 배지(Collagenase media)를 준비하였다.

【0052】 (3) 잉어(*Cyprinus carpio*) 배양용 배지

【0053】 25 mM의 글루코스가 함유된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에 15%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 0.006%(w/v) 농도의 페니실린, 0.01%(w/v) 농도의 스트렙토마이신, 1%(w/v) 농도의 L-글루타민 및 0.5%(w/v) 농도의 HEPES[N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid]를 보충하여 잉어(*Cyprinus carpio*) 배양용 배지를 준비하였다.

【0055】 (4) 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 배양용 배지

【0056】 5 mM의 글루코스가 함유된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에 20%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 0.01%(w/v) 농도의 프리모신(Primocin), 1%(w/v) 농도의 L-글루타민 및 0.5%(w/v) 농도의 HEPES[N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid]를 보충하여 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 배양용 배지를 준비하였다.

【0058】 (5) 잉어(*Cyprinus carpio*) 독성평가용 배지

【0059】 25 mM의 글루코스가 함유된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 0.006%(w/v) 농도의 페니실린, 0.01%(w/v) 농도의 스트렙토마이신, 1%(w/v) 농도의 L-글루타민 및

0.5%(w/v) 농도의 HEPES[N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid]를 보충하여 잉어(*Cyprinus carpio*) 독성평가용 배지를 준비하였다.

【0061】 (6) 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 독성평가용 배지

【0062】 5 mM의 글루코스가 함유된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 0.01%(w/v) 농도의 프리모신(Primocin), 1%(w/v) 농도의 L-글루타민 및 0.5%(w/v) 농도의 HEPES[N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid]를 보충하여 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 독성평가용 배지를 준비하였다.

【0064】 1.2. 어류 세포주의 제작

【0065】 (1) 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포주의 제작

【0066】 살아있는 잉어(*Cyprinus carpio*)를 15%(w/w) 농도의 표백제 수용액으로 약 2분 동안 세척하고, 이후 70%(w/w) 농도의 에탄올 수용액으로 약 2분 동안 세척하고, 이후 5%(w/w) 농도의 페니실린/스트렙토마이신이 함유된 인산완충생리식염수(phosphate buffered saline, PBS)로 약 2분 동안 세척하였다. 상기 세척 과정을 2회 반복하였다. 이후, 세척된 잉어를 페트리디쉬에 옮긴 후 정상 배지(Normal media)를 소량 첨가하여 조직이 마르지 않게 한 후, 수술용 칼(Scalpel knife)로 5분 이상 잘게 다져주었다. 이후, 잘게 다져진 잉어 조직을 50 ml 용량의 코니칼 튜

브(Conical tube)로 옮긴 후, 여기에 콜라겐분해효소 배지(Collagenase media) 15 ml를 첨가하였다. 이후, 코니칼 튜브(Conical tube)를 배양기에 넣고, 37°C의 온도, non-CO₂ 및 200 rpm의 조건으로 약 1 hr 동안 진탕배양하였다. 이후, 코니칼 튜브(Conical tube)를 약 1분 동안 볼텍싱(vortexing)하고, 정상 배지(Normal media)를 총 부피가 40 ml가 되게 채워준 후 약 10분 동안 실온(약 25±2°C)에 방치하여 조직을 가라앉혔다. 이후, 가라앉은 조직을 제외한 상층액을 새로운 코니칼 튜브(Conical tube)에 옮겨준 후, 새로 옮긴 상층액을 800×g의 조건으로 2분 동안 원심분리하여 세포 펠렛을 침전시켰다. 이후, 새로운 코니칼 튜브(Conical tube)에서 세포 펠렛(cell pellet)을 제외한 상층액을 버리고, 5%(w/w) 농도의 페니실린/스트렙토마이신이 함유된 인산완충생리식염수(phosphate buffered saline, PBS)로 2번 반복하여 세척하였다. 이후, 세포 펠렛(cell pellet)을 잉어(*Cyprinus carpio*) 배양용 배지에 현탁하고 플라스크에 옮긴 후, 37°C의 온도 및 5%(w/v) CO₂ 조건의 배양기에서 2주 이상 배양하여 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포주를 제작하고, 제작한 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포주를 이후의 실험에 사용하였다. 잉어 세포 수는 Cedex HiRes Analyzer(05650216001; Roche, Basel, Switzerland)를 이용하여 측정하였다.

【0068】 (2) 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포주의 제작

【0069】 살아있는 버들붕어(*Macropodus ocellatus*)를 15%(w/w) 농도의 표백제 수용액으로 약 2분 동안 세척하고, 이후 70%(w/w) 농도의 에탄올 수용액으로 약

2분 동안 세척하고, 이후 5%(w/w) 농도의 페니실린/스트렙토마이신이 함유된 인산완충생리식염수(phosphate buffered saline, PBS)로 약 2분 동안 세척하였다. 상기 세척 과정을 2회 반복하였다. 이후, 세척된 버들붕어를 페트리디쉬에 옮긴 후 정상 배지(Normal media)를 소량 첨가하여 조직이 마르지 않게 한 후, 수술용 칼(Scalpel knife)로 5분 이상 잘게 다져주었다. 이후, 잘게 다져진 잉어 조직을 50 ml 용량의 코니칼 튜브(Conical tube)로 옮긴 후, 여기에 콜라겐분해효소 배지(Collagenase media) 15 ml를 첨가하였다. 이후, 코니칼 튜브(Conical tube)를 배양기에 넣고, 37℃의 온도, non-CO₂ 및 200 rpm의 조건으로 약 1 hr 동안 진탕배양하였다. 이후, 코니칼 튜브(Conical tube)를 약 1분 동안 볼텍싱(vortexing)하고, 정상 배지(Normal media)를 총 부피가 40 ml가 되게 채워준 후 약 10분 동안 실온(약 25±2℃)에 방치하여 조직을 가라앉혔다. 이후, 가라앉은 조직을 제외한 상층액을 새로운 코니칼 튜브(Conical tube)에 옮겨준 후, 새로 옮긴 상층액을 800×g의 조건으로 2분 동안 원심분리하여 세포 펠렛을 침전시켰다. 이후, 새로운 코니칼 튜브(Conical tube)에서 세포 펠렛(cell pellet)을 제외한 상층액을 버리고, 5%(w/w) 농도의 페니실린/스트렙토마이신이 함유된 인산완충생리식염수(phosphate buffered saline, PBS)로 2번 반복하여 세척하였다. 이후, 세포 펠렛(cell pellet)을 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 배양용 배지에 현탁하고 플라스크에 옮긴 후, 25℃의 온도 및 5%(w/v) CO₂ 조건의 배양기에서 2주 이상 배양하여 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포주를 제작하고, 제작한 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포주를 이후의 실험에 사용하였다. 버들붕어 세포 수는 Cedex HiRes

Analyzer(05650216001; Roche, Basel, Switzerland)를 이용하여 측정하였다.

【0071】 1.3. 어류 세포주를 이용한 독성물질의 생태독성 평가

【0072】 (1) 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포주를 이용한 독성물질의 생태독성 평가

【0073】 독성물질을 잉어(*Cyprinus carpio*) 독성평가용 배지에 미리 설정한 농도(0, 62.5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm)가 되게 첨가하고 용해시켜 다양한 농도의 독성물질 표준용액을 제조하였다. 사용한 독성물질은 클림바졸(Climbazole), 메톨라클로르(Metolachlor), 다이벤즈[a,h]안트라센[Dibenz[a,h]anthracene], 에토프로포스(Ethoprophos) 이었다.

【0074】 잉어(*Cyprinus carpio*) 배양용 배지가 들어 있는 96-웰 플레이트에 어류 세포주를 웰당 어류 세포가 2000개가 되게 접종하고 37℃의 온도 및 5%(w/v) CO₂ 조건의 배양기에서 12 hr 동안 배양하여 어류 세포를 웰의 바닥에 부착시켰다. 이후, 웰에서 배양액을 제거하고 다양한 농도의 독성물질 표준용액을 첨가한 후 37℃의 온도, 5%(w/v) CO₂ 및 암 조건의 배양기에서 6 hr 동안 배양하였다. 또한, 대조군(Control)의 경우 웰에서 배양액을 제거하고, 독성물질 표준용액 대신 잉어(*Cyprinus carpio*) 독성평가용 배지를 첨가한 후 37℃의 온도 및 5%(w/v) CO₂ 조건에서 6 hr 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후 배양액을 제거하고 DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)로 2회 세척하여 잔여 성분을 제거하였다. 이후, 세척

이 완료된 세포에 세포 용해를 위해 각 웰에 0.2%(w/v) 농도의 SDS(Sodium dodecyl sulphate) 수용액 50 μ l를 처리하고 37℃의 온도 및 5%(w/v) CO₂ 조건의 배양기에서 1 hr 동안 배양하였다. 이후, 각 웰에 1:1000으로 희석한 Gel Green assay solution(41005; Biotium) 150 μ l를 처리하여 염색하고, 기포가 생기지 않게 잘 섞어준 뒤 VICTOR Multilabel Plate Reader(2030-0050; PerkinElmer)를 사용하여 DNA가 염색된 형광을 분석해 측정하였다. 이때, 여기 485 nm 및 방출 535 nm에서 형광을 측정하여 분석하였다. 분석된 어류 세포의 생존율 값에 기초하여 독성물질의 어류 세포에 대한 반수유효농도(EC₅₀)를 산출하고, 독성물질의 생태독성을 평가하였다.

【0076】 (2) 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포주를 이용한 독성물질의 생태독성 평가

【0077】 독성물질을 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 독성 평가용 배지에 미리 설정한 농도(0, 62.5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm)가 되게 첨가하고 용해시켜 다양한 농도의 독성물질 표준용액을 제조하였다. 사용한 독성물질은 부타클로르(Butachlor), 2,4,6-트리클로로페놀(2,4,6-Trichlorophenol), 플룩사피록사드(Fluxapyroxad), 피프로닐(Fipronil), 클래리트로마이신(Clarithromycin), 2,4-다이-tert-부틸페놀(2,4-Di-tert-butylphenol), 퍼플루오로옥탄산(Perfluorooctanoic acid) 이었다.

【0078】 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 배양용 배지가 들어 있는 96-웰 플

레이트에 어류 세포주를 웰당 어류 세포가 2000개가 되게 접종하고 25℃의 온도 및 5%(w/v) CO₂ 조건의 배양기에서 12 hr 동안 배양하여 어류 세포를 웰의 바닥에 부착시켰다. 이후, 웰에서 배양액을 제거하고 다양한 농도의 독성물질 표준용액을 첨가한 후 25℃의 온도, 5%(w/v) CO₂ 및 암 조건의 배양기에서 6 hr 동안 배양하였다. 또한, 대조군(Control)의 경우 웰에서 배양액을 제거하고, 독성물질 표준용액 대신 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 독성평가용 배지를 첨가한 후 25℃의 온도 및 5%(w/v) CO₂ 조건에서 6 hr 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후 배양액을 제거하고 DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)로 2회 세척하여 잔여 성분을 제거하였다. 이후, 세척이 완료된 세포에 세포 용해를 위해 각 웰에 0.2%(w/v) 농도의 SDS(Sodium dodecyl sulphate) 수용액 50 μ l를 처리하고 25℃의 온도 및 5%(w/v) CO₂ 조건의 배양기에서 1 hr 동안 배양하였다. 이후, 각 웰에 1:1000으로 희석한 Gel Green assay solution(41005; Biotium) 150 μ l를 처리하여 염색하고, 기포가 생기지 않게 잘 섞어준 뒤 VICTOR Multilabel Plate Reader(2030-0050; PerkinElmer)를 사용하여 DNA가 염색된 형광을 분석해 측정하였다. 이때, 여기 485 nm 및 방출 535 nm에서 형광을 측정하여 분석하였다. 분석된 어류 세포의 생존을 값에 기초하여 독성물질의 어류 세포에 대한 반수유효농도(EC₅₀)를 산출하고, 독성물질의 생태독성을 평가하였다.

【0080】 1.4. 중성 코멧 시험(Neutral Comet Assay)을 이용한 유전독성 평가

【0081】 (1) 코멧 시험용 독성물질 표준용액 및 대조군 용액의 제조

【0082】 15%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 잉어(*Cyprinus carpio*) 배양용 배지에 독성물질인 클림바줄(Climbazole), 메톨라클로르(Metolachlor), 다이벤즈[a,h]안트라센[Dibenz[a,h]anthracene], 에토프로포스(Ethoprophos)를 각각 반수유효농도(EC₅₀)의 절반 농도가 되게 첨가하고 용해시켜 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포에 적용할 독성물질 표준용액 I 을 제조하였다. 또한, 15%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 잉어(*Cyprinus carpio*) 배양용 배지에 다이메틸 설펍사이드(DMSO)를 0.01%(w/v)의 농도가 되게 첨가하고 용해시켜 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포에 적용할 대조군 용액 I 을 제조하였다.

【0083】 20%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 배양용 배지에 독성물질인 부타클로르(Butachlor), 2,4,6-트리클로로페놀(2,4,6-Trichlorophenol), 플룩사피록사드(Fluxapyroxad), 피프로닐(Fipronil), 클래리트로마이신(Clarithromycin), 2,4-다이-tert-부틸페놀(2,4-Di-tert-butylphenol), 퍼플루오로옥탄산(Perfluorooctanoic acid)을 각각 반수유효농도(EC₅₀)의 절반 농도가 되게 첨가하고 용해시켜 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포에 적용할 독성물질 표준용액 I 을 제조하였다. 또한, 20%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 배양용 배지에에 다이메틸 설펍사이드(DMSO)를 0.01%(w/v)의 농도가 되게 첨가하고 용해시켜 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포에 적용할 대조군 용액 I 을 제조하였다.

【0084】 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 잉어(*Cyprinus carpio*) 독성평가용 배지에 독성물질인 클림바줄(Climbazole), 메톨라클로르(Metolachlor), 다이벤즈[a,h]안트라센[Dibenz[a,h]anthracene], 에토프로포스(Ethoprophos)를 각각 반수유효농도(EC₅₀)의 절반 농도가 되게 첨가하고 용해시켜 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포에 적용할 독성물질 표준용액 II를 제조하였다. 또한, 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 잉어(*Cyprinus carpio*) 독성평가용 배지에 다이메틸 설펍사이드(DMSO)를 0.01%(w/v)의 농도가 되게 첨가하고 용해시켜 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포에 적용할 대조군 용액 II를 제조하였다.

【0085】 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 독성평가용 배지에 독성물질인 부타클로르(Butachlor), 2,4,6-트리클로로페놀(2,4,6-Trichlorophenol), 플룩사피록사드(Fluxapyroxad), 피프로닐(Fipronil), 클래리트로마이신(Clarithromycin), 2,4-다이-tert-부틸페놀(2,4-Di-tert-butylphenol), 퍼플루오로옥탄산(Perfluorooctanoic acid)을 각각 반수유효농도(EC₅₀)의 절반 농도가 되게 첨가하고 용해시켜 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포에 적용할 독성물질 표준용액 II를 제조하였다. 또한, 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 독성평가용 배지에 다이메틸 설펍사이드(DMSO)를 0.01%(w/v)의 농도가 되게 첨가하고 용해시켜 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포에 적용할 대조군 용액 II를 제조하였다.

【0087】 (2) 독성물질 표준용액 I 및 대조군 용액 I을 이용한 어류 세포의 배양

【0088】 잉어(*Cyprinus carpio*) 배양용 배지가 들어 있는 6-웰 플레이트에 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포주를 웰당 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포가 67,000개가 되게 접종하고 37℃의 온도 및 5%(w/v) CO₂ 조건의 배양기에서 12 hr 동안 배양하여 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 웰의 바닥에 부착시켰다. 이후, 웰에서 배양액을 제거하고 독성물질 표준용액 I 2ml 또는 대조군 용액 I 2ml을 각 웰에 첨가한 후 37℃의 온도, 5%(w/v) CO₂ 및 암 조건의 배양기에서 96 hr 동안 배양하여 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 독성물질로 처리하였다.

【0089】 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 배양용 배지가 들어 있는 6-웰 플레이트에 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포주를 웰당 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포가 70,000개가 되게 접종하고 25℃의 온도 및 5%(w/v) CO₂ 조건의 배양기에서 12 hr 동안 배양하여 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 웰의 바닥에 부착시켰다. 이후, 웰에서 배양액을 제거하고 독성물질 표준용액 I 2ml 또는 대조군 용액 I 2ml을 각 웰에 첨가한 후 25℃의 온도, 5%(w/v) CO₂ 및 암 조건의 배양기에서 96 hr 동안 배양하여 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 독성물질로 처리하였다.

【0091】 (3) 독성물질 표준용액 II 및 대조군 용액을 이용한 어류 세포의 배양

【0092】 잉어(*Cyprinus carpio*) 배양용 배지가 들어 있는 6-웰 플레이트에 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포주를 웰당 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포가 67,000개가 되게 접종하고 37℃의 온도 및 5%(w/v) CO₂ 조건의 배양기에서 12 hr 동안 배양하여 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 웰의 바닥에 부착시켰다. 이후, 웰에서 배양액을 제거하고 독성물질 표준용액 II 2ml 또는 대조군 용액 II 2ml을 각 웰에 첨가한 후 37℃의 온도, 5%(w/v) CO₂ 및 암 조건의 배양기에서 96 hr 동안 배양하여 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 독성물질로 처리하였다.

【0093】 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 배양용 배지가 들어 있는 6-웰 플레이트에 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포주를 웰당 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포가 70,000개가 되게 접종하고 25℃의 온도 및 5%(w/v) CO₂ 조건의 배양기에서 12 hr 동안 배양하여 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 웰의 바닥에 부착시켰다. 이후, 웰에서 배양액을 제거하고 독성물질 표준용액 II 2ml 또는 대조군 용액 II 2ml을 각 웰에 첨가한 후 25℃의 온도, 5%(w/v) CO₂ 및 암 조건의 배양기에서 96 hr 동안 배양하여 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 독성물질로 처리하였다.

【0095】 (4) 중성 코멧 시험(Neutral Comet Assay)

【0096】 어류 세포를 독성물질로 처리한 후 DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)로 세척하여 불순물을 제거하고 각 웰에 트립신을 첨가하여 어류 세포를 웰의 바닥에서 떼어내었다. 독성물질로 처리한 후 어류 세포의 DNA 손상 측정을 위해 CometAssay Single Cell Gel Electrophoresis Assay Kit(4250-050-K; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 전기영동을 실시하였다. 이후, Image J 프로그램(미국 국립보건원, Bethesda, MD, USA)을 이용하여 DNA 코멧(comet) 형상을 분석하고, DNA 코멧 길이를 픽셀 단위로 정량하였다.

【0098】 1.5. 세포 형태 분석

【0099】 세포 형태 변화를 관찰하기 위해 96웰 플레이트에 웰당 2000개의 세포를 분주하였다. 이후, 세포를 0, 62.5, 125, 250, 500, 1000 ppm 농도의 독성물질에 6 hr 동안 노출시키고, 현미경을 통해 세포를 관찰하였다.

【0101】 1.6. 통계 분석

【0102】 표준 통계 소프트웨어 패키지인 GraphPad Prism 9(San Diego, CA, USA)를 사용하여 Student's t-test를 수행하였다. 무영향농도(No observed Effect Concentration, NOEC), 최소영향농도(EC₁₀), 반수유효농도(EC₅₀) 및 95% 신뢰구간(CI)은 동일한 통계 소프트웨어를 사용하여 계산하였다.

【0103】 * 무영향농도(NOEC): 독성물질을 포함하지 않는 대조군과 비교했을 때 통계적으로 유의미한 효과 차이($p < 0.05$)가 없는 최고 테스트 농도

【0104】 * 최소영향농도(EC_{10}): 독성물질을 포함하지 않는 대조군에서 측정된 어류 세포의 생존수를 기준으로 10% 낮은 어류 세포의 생존수를 보이는 배양액의 독성물질 농도

【0105】 * 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC_{50}): 독성물질을 포함하지 않는 대조군에서 측정된 어류 세포의 생존수를 기준으로 50% 낮은 어류 세포의 생존수를 보이는 배양액의 독성물질 농도

【0107】 2. 실험 결과

【0108】 2.1. 새로운 유전독성 평가 방법의 개요

【0109】 본 발명은 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 독성평가용 배지(Toxicant media) 및 6 hr의 배양 조건에서 어류 세포를 배양하여 생태독성을 평가하는 방법에 기반한 것이다. 상기 배양 조건에서는 배지 내 과잉 영양소의 성장 촉진 효과를 줄여주고 더 빠르고 정확한 결과를 얻을 수 있다.

【0110】 도 1은 본 발명에서 사용한 전통적 유전독성 평가 방법과 새로운 유전독성 평가 방법의 개요를 도식적으로 나타낸 것이다. 도 1의 (A)는 전통적 유전독성 평가 방법에 관한 것으로서, 15%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine

serum, FBS) 및 독성물질을 포함하는 배지 용액을 사용하여 어류 세포를 독성물질에 96 hr 동안 노출시키고, 중성 코멧 시험(neutral comet assay) 방법을 통해 DNA 이중가닥 절단(DNA DSBs, DNA double-strand breaks)을 측정하는 것으로 구성된다. 중성 코멧 시험 과정에서는, 전기장 내에서 세포핵으로부터 DNA DSBs가 이동함에 따라, 세포핵(헤드)과 DNA DSBs(꼬리)로 구성된 녹색 형광 코멧이 생성된다. 도 1의 (B)는 본 발명에서 채택하고 있는 새로운 유전독성 평가 방법에 관한 것으로서, 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 독성물질을 포함하는 배지 용액을 사용하여 어류 세포를 독성물질에 6 hr 동안 노출시키고, 중성 코멧 시험(neutral comet assay) 방법을 통해 DNA 이중가닥 절단(DNA DSBs, DNA double strand breaks)을 측정하는 것으로 구성된다.

【0111】 15%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지는 어류 세포의 배양에서 일반적으로 사용되고 있고, 독성물질에 96 hr 동안 노출시키는 시간은 유전독성 평가에 소요되는 1~36일 사이의 기간에 해당한다. 반면, 본 발명에서는 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 어류 세포를 독성물질에 6 hr 동안 노출시키는 조건을 사용하고, 중성 코멧 시험(neutral comet assay) 방법을 통해 세포 단위에서의 DNA 이중가닥 절단(DNA DSBs, DNA double-strand breaks)을 측정하여 독성물질의 유전독성을 평가하였다.

【0112】 하기 표 1은 어류 세포주에서 코멧 시험(comet assay)을 이용하여 유전독성을 평가하는 종래의 연구 결과를 정리한 것이다.

【0113】 【표 1】

세포주/어류 종명	유전독성물질	노출 시간	참조
PAC2/Danio rerio	benzo[a]pyrene ethyl methanesulfonate	6일	R1
Erythrocytes/Danio rerio	α -tocopherol anthocyanin	5, 7, 14 또는 21일	R2
Erythrocytes/Cyprinus carpio	karanjin	1, 7, 14 또는 21일	R3
RTgill-W1/Oncorhynchus mykiss	benzothiazole	12일	R4
RTL-W1/Oncorhynchus mykiss	complex runoff samples	36일	R5

【0114】 * R1: Srut, M.; Bourdineaud, J.P.; Stambuk, A.; Klobučar, G.I. Genomic and gene expression responses to genotoxic stress in PAC2 zebrafish embryonic cell line. J. Appl. Toxicol. 2015, 35, 1381-1389.

【0115】 * R2: Rocco, L.; Mottola, F.; Santonastaso, M.; Saputo, V.; Cusano, E.; Costagliola, D.; Suero, T.; Pacifico, S.; Stingo, V. Anti-genotoxic ability of α -tocopherol and Anthocyanin to counteract fish DNA damage induced by musk xylene. Ecotoxicology 2015, 24, 2026-2035.

【0116】 * R3: Tasneem, S.; Yasmeen, R. Evaluation of genotoxicity by comet assay (single-cell gel electrophoresis) in tissues of the fish Cyprinus carpio during sub-lethal exposure to Karanjin. J. Basic. Appl. Zool. 2018, 79, 19.

【0117】 * R4: Zeng, F.; Sherry, J.P.; Bols, N.C. Evaluating the toxic potential of benzothiazoles with the rainbow trout cell lines, RTgill-W1 and RTL-W1. Chemosphere 2016, 155, 308-318

【0118】 * R5: Kienzler, A.; Mahler, B.J.; Van Metre, P.C.; Schweigert, N.; Devaux, A.; Bony, S. Exposure to runoff from coal-tar-sealed pavement induces genotoxicity and impairment of DNA repair capacity in the RTL-W1 fish liver cell line. Sci. Total Environ. 2015, 520, 73-80.

【0120】 2.2. 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포주를 이용한 유전독성 평가 결과

【0121】 (1) 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포에서 클림바졸(Climbazole)의 유전독성에 대한 평가방법별 비교

【0122】 클림바졸(Climbazole)은 항진균제로 널리 사용되며, 스테롤 생합성 효소를 억제하여 진균 세포막의 구조와 기능을 방해하는 약물이다. 클림바졸(Climbazole)은 샴푸 등과 같은 위생용품에 포함되며, 물 환경 오염원으로 알려져 있다.

【0123】 도 2는 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포주를 이용하여 클림바졸(Climbazole)의 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀)를 산출한 결과와, 15%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 클림바졸(Climbazole)로 96 hr 동안 처리한 경우 및 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 클림바졸(Climbazole)로 6 hr 동안 처리한 경우의 유전독성을 코멧 시험(comet assay)으로 분석한 결과이다. 도 2에서 보이는 바

와 같이 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 다양한 농도의 클림바졸(Climbazole)로 6 hr 동안 처리하여 산출한 클림바졸(Climbazole)의 무영향농도(NOEC)는 10.484 ppm 미만이고, 최소영향농도(EC₁₀)는 20.968 ppm이고, 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀)는 94.079 ppm 이었다. 상기 클림바졸(Climbazole)의 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀)의 절반인 47.0395 ppm 농도로 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 처리하고 중성 코멧 시험(Neutral Comet Assay)을 수행하였다. 15%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 47.0395 ppm 농도의 클림바졸(Climbazole)로 96 hr 동안 처리하는 조건에서는 DNA 코멧 꼬리(comet tail) 길이가 DMSO 대조군 대비 약 24.97% 증가하였다. 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 47.0395 ppm 농도의 클림바졸(Climbazole)로 6 hr 동안 처리하는 조건에서는 DNA 코멧 꼬리(comet tail) 길이가 DMSO 대조군 대비 약 29.03% 증가하였다. 이러한 결과는 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 클림바졸(Climbazole)로 6 hr 동안 처리하는 새로운 평가 방법이 15%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 클림바졸(Climbazole)로 96 hr 동안 처리하는 기존의 평가 방법보다 클림바졸(Climbazole)의 유전독성 반응을 더 민감하게 탐지할 수 있다는 점을 시사한다.

【0125】 (2) 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포에서 메톨라클로르(Metolachlor)의 유전독성에 대한 평가방법별 비교

【0126】 메톨라클로르(Metolachlor)는 잡초의 발아와 성장을 억제하는 작용을 하며, 농업에서 널리 사용되는 제초제이다. 메톨라클로르(Metolachlor)는 수생 생물에 장기적으로 DNA 이상과 돌연변이를 유발할 수 있다.

【0127】 도 3은 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포주를 이용하여 메톨라클로르(Metolachlor)의 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀)를 산출한 결과와, 15%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 메톨라클로르(Metolachlor)로 96 hr 동안 처리한 경우 및 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 메톨라클로르(Metolachlor)로 6 hr 동안 처리한 경우의 유전독성을 코멧 시험(comet assay)으로 분석한 결과이다. 도 3에서 보이는 바와 같이 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 다양한 농도의 메톨라클로르(Metolachlor)로 6 hr 동안 처리하여 산출한 메톨라클로르(Metolachlor)의 무영향 농도(NOEC)는 54.412 ppm 미만이고, 최소영향농도(EC₁₀)는 114.753 ppm이고, 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀)는 714.529 ppm 이었다. 상기 메톨라클로르(Metolachlor)의 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀)의 절반인 357.265 ppm 농도로 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를

처리하고 중성 코멧 시험(Neutral Comet Assay)을 수행하였다. 15%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 357.265 ppm 농도의 메톨라클로르(Metolachlor)로 96 hr 동안 처리하는 조건에서는 세포가 모두 사멸하여 DNA 코멧 꼬리(comet tail)가 관찰되지 않았다. 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 357.265 ppm 농도의 메톨라클로르(Metolachlor)로 6 hr 동안 처리하는 조건에서는 DNA 코멧 꼬리(comet tail) 길이가 DMSO 대조군 대비 약 68.26% 증가하였다. 이러한 결과는 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 메톨라클로르(Metolachlor)로 6 hr 동안 처리하는 새로운 평가 방법이 세포 사멸 없이 유전독성 반응을 효과적으로 측정할 수 있음을 시사한다.

【0129】 (3) 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포에서 다이벤즈[a,h]안트라센 [Dibenz[a,h]anthracene]의 유전독성 평가 결과

【0130】 다이벤즈[a,h]안트라센[Dibenz[a,h]anthracene]는 화석연료 연소 시 생성되는 다환 방향족 탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs)로서 수생 생태계에 심각한 독성을 유발하는 물질이다.

【0131】 도 4는 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포주를 이용하여 다이벤즈[a,h]안트라센[Dibenz[a,h]anthracene]의 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀)를 산출한 결과와, 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine

serum, FBS)을 포함하는 배지에서 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 다이벤즈[a,h]안트라센[Dibenz[a,h]anthracene]으로 6 hr 동안 처리한 조건에서 유전독성을 코멧 시험(comet assay)으로 분석한 결과이다. 도 4에서 보이는 바와 같이 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 다양한 농도의 다이벤즈[a,h]안트라센[Dibenz[a,h]anthracene]으로 6 hr 동안 처리하여 산출한 다이벤즈[a,h]안트라센[Dibenz[a,h]anthracene]의 무영향농도(NOEC)는 123.122 ppm 미만이고, 최소영향농도(EC₁₀)는 189.103 ppm이고, 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀)는 953.417 ppm 이었다. 다양한 농도의 다이벤즈[a,h]안트라센[Dibenz[a,h]anthracene]으로 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 처리한 후 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포의 형태학적 변화를 관찰한 결과, 125 ppm에서 세포 팽창, 250 ppm부터 현저한 팽창, 1000 ppm에서는 세포 파열이 관찰되었다. 상기 다이벤즈[a,h]안트라센[Dibenz[a,h]anthracene]의 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀)의 절반인 476.709 ppm 농도로 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 처리하고 중성 코멧 시험(Neutral Comet Assay)을 수행하였다. 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 476.709 ppm 농도의 다이벤즈[a,h]안트라센[Dibenz[a,h]anthracene]으로 6 hr 동안 처리하는 조건에서 DNA 코멧 꼬리(comet tail) 길이가 DMSO 대조군 대비 약 52.31% 증가하였다.

【0133】 (4) 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포에서 에토프로포스(Ethoprophos)의 유전독성 평가 결과

【0134】 에토프로포스(Ethoprophos)는 토양 해충의 신경계를 억제하는 유기 인계 살충제로 널리 사용되지만, 유전독성은 보고된 바 없었다.

【0135】 도 5는 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포주를 이용하여 에토프로포스(Ethoprophos)의 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀)를 산출한 결과와, 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 에토프로포스(Ethoprophos)로 6 hr 동안 처리한 조건에서 유전독성을 코멧 시험(comet assay)으로 분석한 결과이다. 도 5에서 보이는 바와 같이 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 다양한 농도의 에토프로포스(Ethoprophos)로 6 hr 동안 처리하여 산출한 에토프로포스(Ethoprophos)의 무영향 농도(NOEC)는 15.695 ppm 미만이고, 최소영향농도(EC₁₀)는 31.391 ppm이고, 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀)는 208.226 ppm 이었다. 다양한 농도의 에토프로포스(Ethoprophos)로 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 처리한 후 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포의 형태학적 변화를 관찰한 결과, 250 ppm 이상에서 세포 위축, 500 ppm에서 세포 소실이 관찰되었다. 상기 에토프로포스(Ethoprophos)의 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀)의 절반인 104.113 ppm 농도로 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 처리하고 중성 코멧 시험(Neutral Comet Assay)을 수행하였다. 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포

함하는 배지에서 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 104.113 ppm 농도의 에토프로포스(Ethoprophos)로 6 hr 동안 처리하는 조건에서 DNA 코멧 꼬리(comet tail) 길이가 DMSO 대조군 대비 약 30.29% 증가하였다.

【0137】 2.3. 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포주를 이용한 유전독성 평가 결과

【0138】 (1) 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포에서 독성물질의 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀)

【0139】 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 독성평가용 배지(Toxicant media)에서 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 다양한 농도의 독성물질로 6 hr 동안 처리한 후 세포 생존율을 측정하고, 세포 생존율 값에 기초하여 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포에서 독성물질의 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀)를 산출하였다. 하기 표 2에 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포주를 이용하여 산출한 독성물질들의 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀)를 정리하였다.

【0140】 【표 2】

독성물질	버들붕어(<i>Macropodus ocellatus</i>) 세포에 대한 독성물질의 반수유효농도
Butachlor	248.672 ppm
2,4,6-Trichlorophenol	775.231 ppm
Fluxapyroxad	203.8 ppm
Fipronil	140.51 ppm
Clarithromycin	507.575 ppm
2,4-Di-tert-butylphenol	491.186 ppm
Perfluorooctanoic acid	760.098 ppm

【0142】 (2) 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포에서 독성물질의 유전독성

평가 결과

【0143】 도 6은 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 부타클로르(Butachlor)로 6 hr 동안 처리한 조건에서 유전독성을 코멧 시험(comet assay)으로 분석한 결과이다. 상기 부타클로르(Butachlor)의 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀)의 절반인 124.336 ppm 농도로 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 처리하고 중성 코멧 시험(Neutral Comet Assay)을 수행하였다. 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 124.336 ppm 농도의 부타클로르(Butachlor)로 6 hr 동안 처리하는 조건에서 DNA 코멧 꼬리(comet tail) 길이가 DMSO 대조군 대비 약 28.49% 증가하였다.

【0144】 도 7은 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 2,4,6-트리클로로페놀(2,4,6-Trichlorophenol)로 6 hr 동안 처리한 조건에서 유전독성을 코멧 시험(comet assay)으로 분석한 결과이다. 상기 2,4,6-트리클로로페놀(2,4,6-Trichlorophenol)의 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀)의

절반인 387.6155 ppm 농도로 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 처리하고 중성 코멧 시험(Neutral Comet Assay)을 수행하였다. 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 387.6155 ppm 농도의 2,4,6-트리클로로페놀(2,4,6-Trichlorophenol)로 6 hr 동안 처리하는 조건에서 DNA 코멧 꼬리(comet tail) 길이가 DMSO 대조군 대비 약 7.72% 증가하였다.

【0145】 도 8은 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 플록사피록사드(Fluxapyroxad)로 6 hr 동안 처리한 조건에서 유전독성을 코멧 시험(comet assay)으로 분석한 결과이다. 상기 플록사피록사드(Fluxapyroxad)의 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀)의 절반인 101.9 ppm 농도로 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 처리하고 중성 코멧 시험(Neutral Comet Assay)을 수행하였다. 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 101.9 ppm 농도의 플록사피록사드(Fluxapyroxad)로 6 hr 동안 처리하는 조건에서 DNA 코멧 꼬리(comet tail) 길이가 DMSO 대조군 대비 약 54.78% 증가하였다.

【0146】 도 9는 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 피프로닐(Fipronil)로 6 hr 동안 처리한 조건에서 유전독성을 코멧 시험(comet assay)으로 분석한 결과이다. 상기 피프로닐(Fipronil)의 반수유효농도(Half maximal effective

concentration, EC₅₀)의 절반인 70.255 ppm 농도로 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 처리하고 중성 코멧 시험(Neutral Comet Assay)을 수행하였다. 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 70.255 ppm 농도의 피프로닐(Fipronil)로 6 hr 동안 처리하는 조건에서 DNA 코멧 꼬리(comet tail) 길이가 DMSO 대조군 대비 약 25.3% 증가하였다.

【0147】 도 10은 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 클래리트로마이신(Clarithromycin)으로 6 hr 동안 처리한 조건에서 유전독성을 코멧 시험(comet assay)으로 분석한 결과이다. 상기 클래리트로마이신(Clarithromycin)의 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀)의 절반인 253.7875 ppm 농도로 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 처리하고 중성 코멧 시험(Neutral Comet Assay)을 수행하였다. 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 253.7875 ppm 농도의 클래리트로마이신(Clarithromycin)으로 6 hr 동안 처리하는 조건에서 DNA 코멧 꼬리(comet tail) 길이가 DMSO 대조군 대비 약 39.58% 증가하였다.

【0148】 도 11은 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 2,4-다이-tert-부틸페놀(2,4-Di-tert-butylphenol)로 6 hr 동안 처리한 조건에서 유전독성을 코멧 시험(comet assay)으로 분석한 결과이다. 상기 2,4-다이-tert-부틸페놀(2,4-Di-tert-

butylphenol)의 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀)의 절반인 245.593 ppm 농도로 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 처리하고 중성 코멧 시험(Neutral Comet Assay)을 수행하였다. 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 245.593 ppm 농도의 2,4-다이-tert-부틸페놀(2,4-Di-tert-butylphenol)로 6 hr 동안 처리하는 조건에서 DNA 코멧 꼬리(comet tail) 길이가 DMSO 대조군 대비 약 245.1% 증가하였다.

【0149】 도 12는 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 퍼플루오로옥탄산(Perfluorooctanoic acid)으로 6 hr 동안 처리한 조건에서 유전독성을 코멧 시험(comet assay)으로 분석한 결과이다. 상기 2,4-다이-tert-퍼플루오로옥탄산(Perfluorooctanoic acid)의 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀)의 절반인 380.049 ppm 농도로 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 처리하고 중성 코멧 시험(Neutral Comet Assay)을 수행하였다. 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 버들붕어(*Macropodus ocellatus*) 세포를 380.049 ppm 농도의 퍼플루오로옥탄산(Perfluorooctanoic acid)으로 6 hr 동안 처리하는 조건에서 DNA 코멧 꼬리(comet tail) 길이가 DMSO 대조군 대비 약 112% 증가하였다.

【0151】 3. 토의 및 결론

【0152】 하천 생태계는 인근 농장과 공장에서 배출되는 유전독성물질 (genotoxins)로 인해 위협받고 있다. 어류는 유전독성물질을 탐지하는 감시 생물 (sentinel organism)로서, 환경의 생태학적 균형을 유지하는 데 중요한 역할을 한다. 어류는 유전독성물질에 민감하게 반응하며, 어류 기반의 유전독성 평가는 유전 독성물질을 평가하는 유용한 방법이다. 하지만, 어류를 이용한 유전독성 시험은 윤리적 문제가 발생하며, 개체마다 다양한 반응을 보이기 때문에 평가의 정확성이 떨어질 수 있다. 이러한 한계를 극복하기 위해, 어류 세포 기반 유전독성 시험법이 채택되고 있다. 그러나 기존의 어류 세포 기반 평가 방법은 1~36일이라는 긴 독성 처리 시간이 요구되어, 신속한 유전독성 평가가 필요한 상황에는 부적합하다.

【0153】 본 발명에 따른 유전독성 평가 방법은 평가 속도를 높이기 위해 어류 세포를 1%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 배지에서 독성물질로 6 hr 동안 처리하는 조건을 채택하고, 독성물질의 처리 농도를 독성물질 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀)의 절반 수준으로 설정하였다. 본 발명에 따른 유전독성 평가 방법을 사용하여 세포 DNA 손상 수준을 의미하는 DNA 코멧 꼬리 길이를 측정한 결과, 유전독성으로 인한 어류 세포의 사멸을 방지하면서 동시에 어류 세포가 독성물질의 유전독성 반응에 더 민감하게 작용하였다.

【0154】 본 발명에 따른 유전독성 평가 방법은 기존 조건의 유전독성 평가 방법에 비해 유전독성 평가 시간이 크게 단축되고 동시에 민감성도 높아 다양한 유전독성물질에 적용될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 유전독성 평가 방법은 환경

모니터링 및 보호에 기여할 수 있는 도구로 활용될 수 있다.

【0156】 이상에서와 같이 본 발명을 실시예를 통해 설명하였지만 본 발명이 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 보호범위는 본 발명에 첨부된 특허청구의 범위에 속하는 모든 실시 형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

【청구범위】**【청구항 1】**

(a) 민물고기 세포주를 어류세포 배양용 액체 배지와 함께 용기에 넣고 배양하여 용기 내부에 민물고기 세포를 부착시킨 후 어류세포 배양용 액체 배지를 제거하여 측정용 용기를 준비하는 제1단계;

(b) 상기 측정용 용기에 평가 대상 시료 및 독성평가용 액체 배지를 포함하는 측정용 액체 샘플을 첨가하고 3~10 hr 동안 배양하는 제2단계; 및

(c) 배양이 완료된 후 코멧 시험(comet assay)을 통해 민물고기 세포의 DNA 손상 수준을 측정하는 제3단계를 포함하는 방법으로서,

상기 독성평가용 액체 배지 내에서 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)의 함량은 0.5~2%(w/v)인 것을 특징으로 하는 유전독성 평가방법.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 민물고기는 잉어(*Cyprinus carpio*)인 것을 특징으로 하는 유전독성 평가방법.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 상기 민물고기 세포주는 하기의 단계들에 의해 제작되는 것을 특징으로 하는 유전독성 평가방법.

(a1) 살아있는 민물고기를 다진 후 튜브 형태의 용기에 옮기고, 콜라겐분해 효소를 포함하는 액체 배지를 첨가하고 배양한 후, 콜라겐분해효소를 포함하지 않는 액체 배지를 첨가하고 방치하여 민물고기 조직을 가라앉히는 단계;

(a2) 상기 튜브 형태의 용기에서 가라앉은 조직을 제외한 상층액만을 새로운 튜브 형태의 용기로 옮기고 원심분리하여 세포 펠렛을 침전시키는 단계; 및

(a3) 상기 새로운 튜브 형태의 용기에서 상층액만을 제거하고 세포 펠렛을 세척한 후 어류세포 배양용 액체 배지를 첨가하고 배양하여 세포를 성장시키고 민물고기 세포주를 수득하는 단계.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 상기 평가 대상 시료는 독성물질, 독성물질에 의해 오염된 토양 또는 독성물질에 의해 오염된 물(water)에서 선택되는 것을 특징으로 하는 유전독성 평가방법.

【청구항 5】

제1항에 있어서, 상기 측정용 액체 샘플 내에서 평가 대상 시료의 농도는 민물고기 세포의 생존 특성을 기초로 산출한 평가 대상 시료의 최소영향농도(EC₁₀) 부터 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀) 까지의 범위에서 선택되는 것을 특징으로 하는 유전독성 평가방법.

【청구항 6】

제1항에 있어서, 상기 독성평가용 액체 배지는 글루코스, 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 항생제, L-글루타민 및 HEPES[N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid]가 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)인 것을 특징으로 하는 유전독성 평가방법.

【청구항 7】

제1항에 있어서, 상기 어류세포 배양용 액체 배지는 글루코스, 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 항생제, L-글루타민 및 HEPES[N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid]가 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)이고, 어류세포 배양용 액체 배지 내에서 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)의 함량은 10~20%(w/v)인 것을 특징으로 하는 유전독성 평가방법.

【청구항 8】

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 배양은 20~40℃의 온도, 1~10%(w/v) CO₂ 및 암 조건에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 유전독성 평가방법.

【청구항 9】

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, (b) 단계의 측정용 액체 샘플은 독성평가용 액체 배지로 구성된 대조군 또는 다이메틸 설펍사이드(DMSO) 및 독성평가용 액체 배지로 구성된 대조군을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 유전독성 평가 방법.

【요약서】**【요약】**

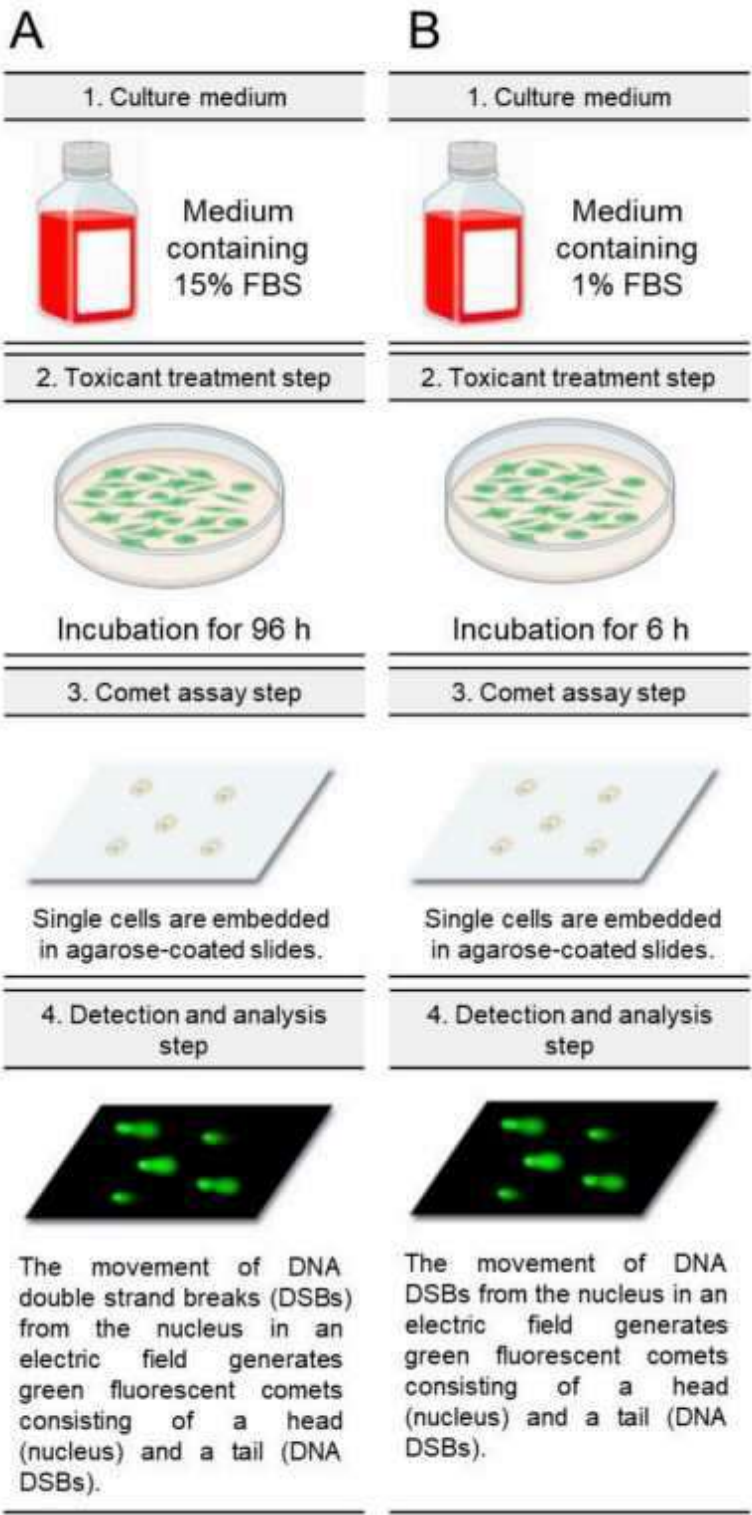
본 발명의 일 예는 민물고기 세포의 DNA 손상 수준을 이용한 유전독성 평가 방법을 제공한다. 본 발명의 일 예에 따른 유전독성 평가방법은 독성물질을 민물고기 세포주에 처리할 때 사용하는 배지의 소태아 혈청 함량과 처리 시간을 조절하여 기존 조건의 유전독성 평가 방법에 비해 유전독성 평가 시간이 크게 단축되고 동시에 민감성도 높으며 다양한 유전독성물질에 적용될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 유전독성 평가 방법은 환경 모니터링 및 보호에 기여할 수 있는 도구로 활용될 수 있다.

【대표도】

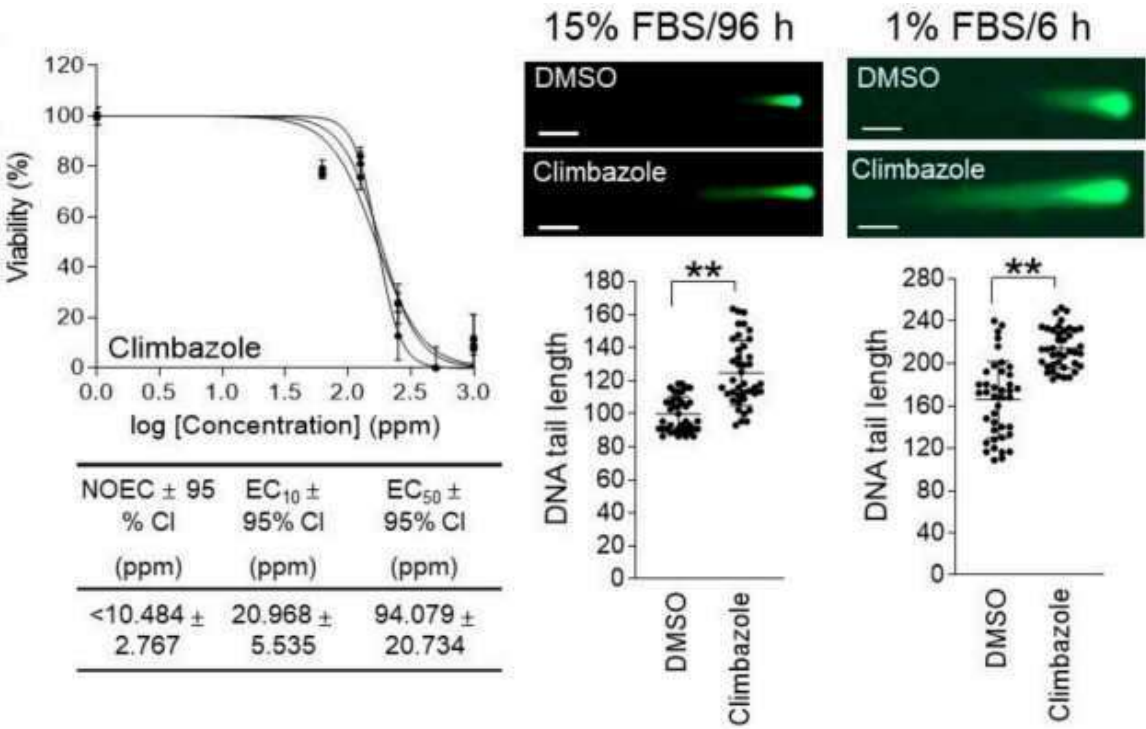
도 1

【도면】

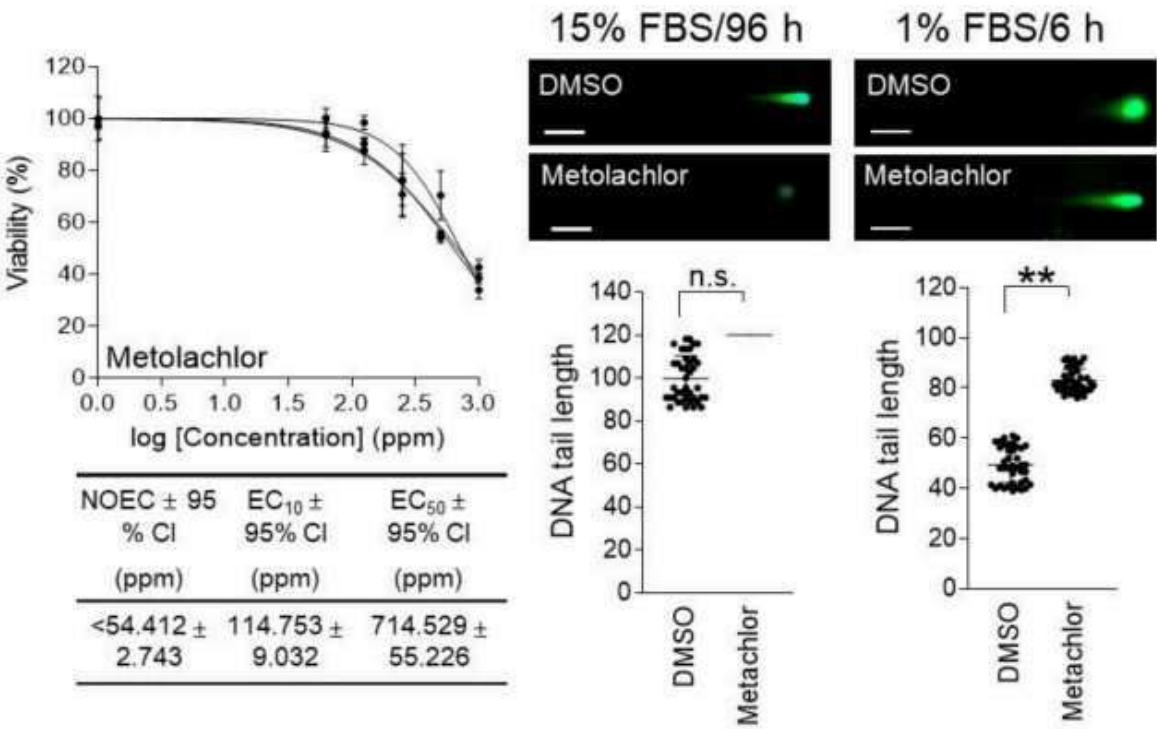
【도 1】



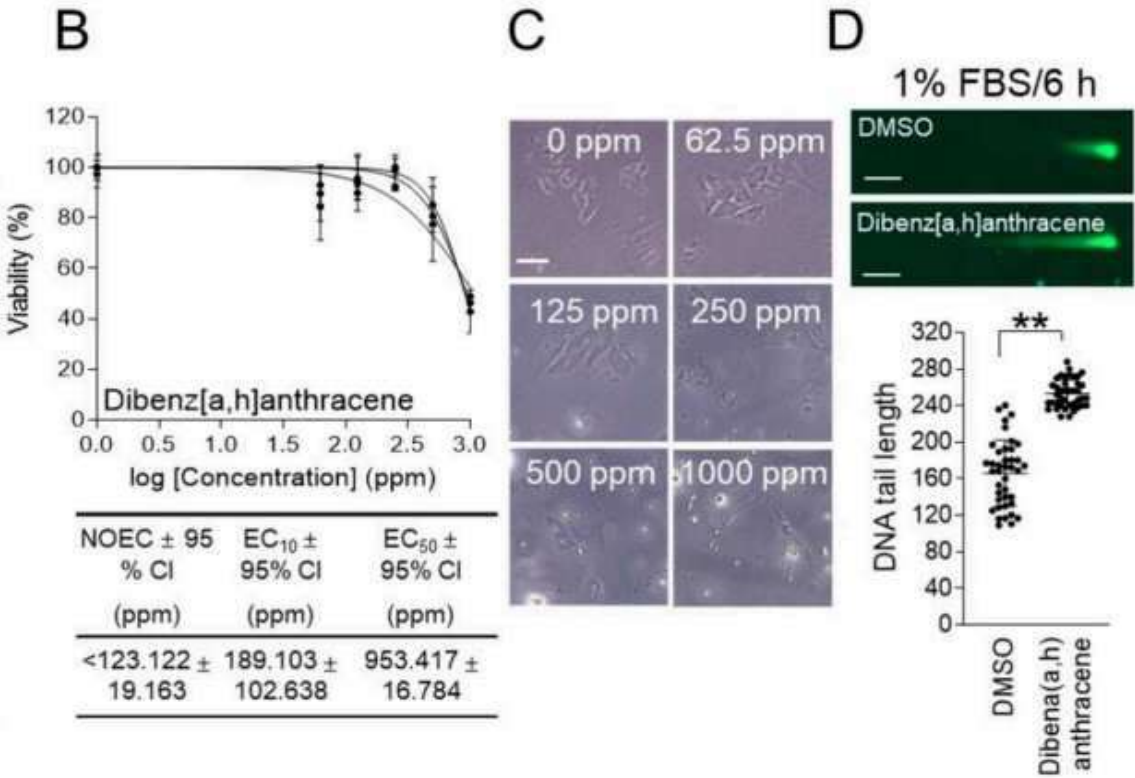
【도 2】



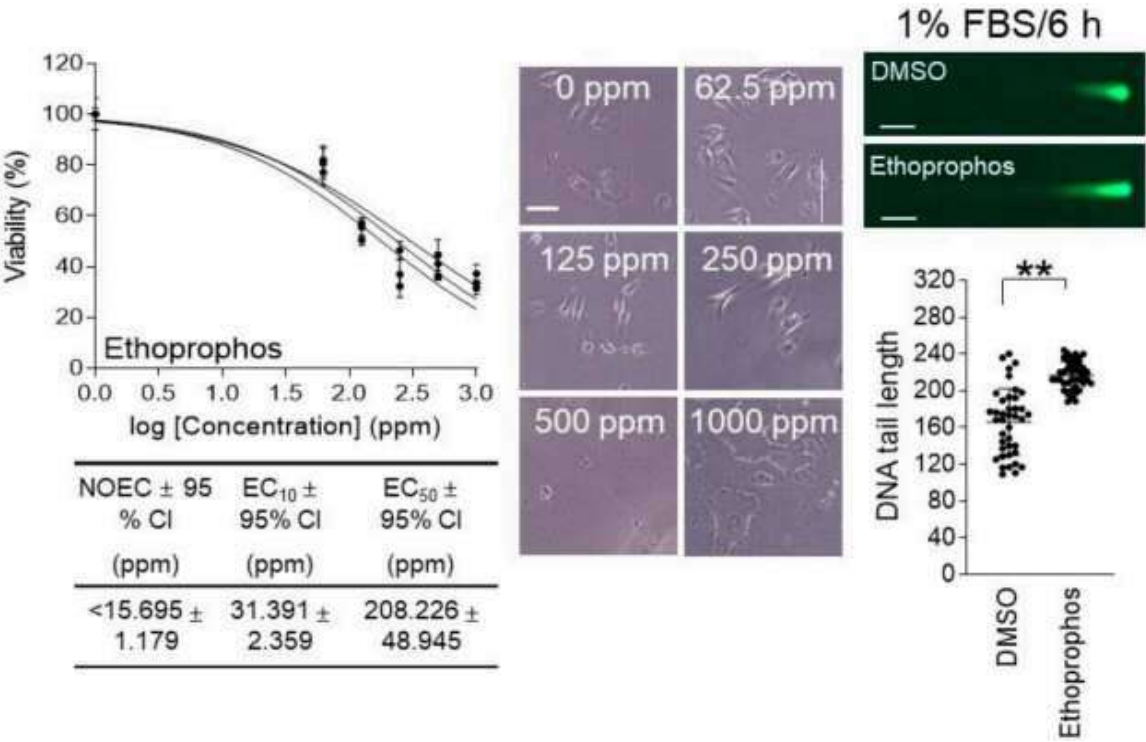
【도 3】



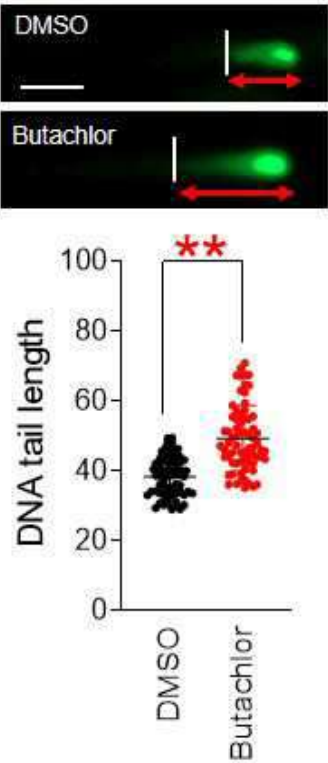
【도 4】



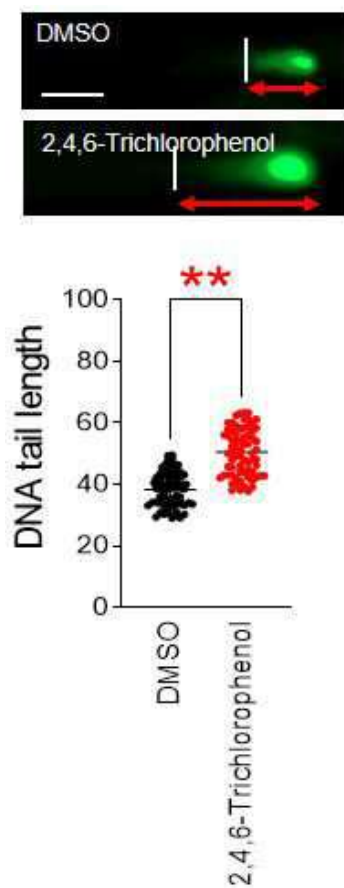
【도 5】



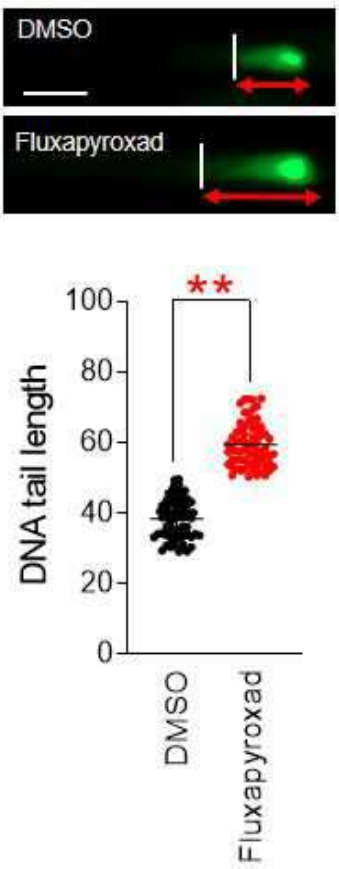
【도 6】



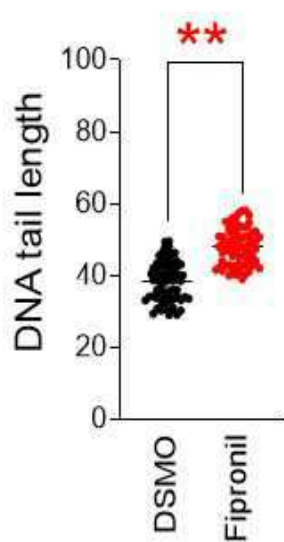
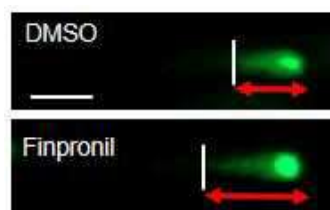
【도 7】



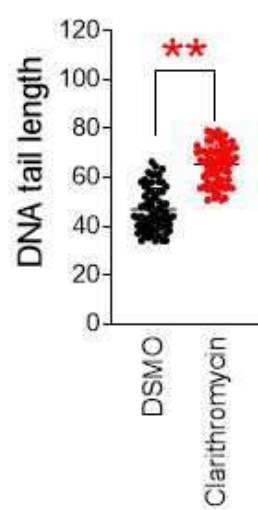
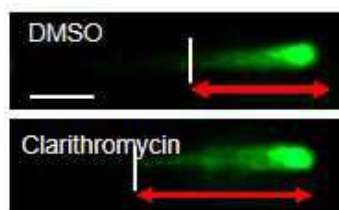
【도 8】



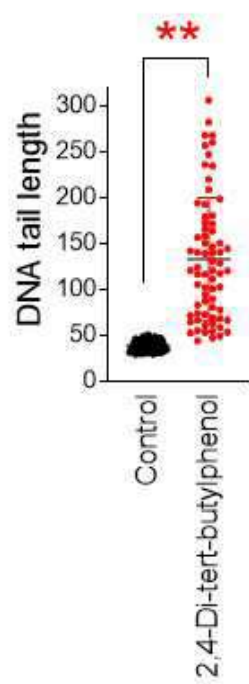
【도 9】



【도 10】



【도 11】



【도 12】

