

LacI gene과 *cII* gene을 target으로 한
Transgenic Big Blue Mutation Assays
- Transgenic Big Blue Mutation Assays
with *lacI* gene & *cII* gene as a target -

류재천, 김연정

한국과학기술연구원
독성연구팀

Tel: 958-5070, 5080

Fax: 958-5059

E mail 류재천 : ryujc@kistmail.kist.re.kr

김연정 : duckyj@kist.re.kr

I. 서론

유전독성평가는 화학물질의 potential carcinogenicity를 규명하고 어떠한 화학물질이 heritable genetic damage를 유발시키는지 평가하기 위해 필수적으로 수행되어야 한다.

분자 수준에서의 유전독성평가가 가능하게 된 것은 최근의 분자생물학 등의 발전에 힘입은 transgenic animal model의 개발에 있다. 기존의 독성평가방법들은 구체적인 독성발현기전과 질병과 관련된 특정 유전자의 역할을 설명해 줄 수 없는 단점을 가지고 있다. 이에 반해 transgenic animal과 cell line model은 기존 독성평가방법의 단점을 보완하고 화학물질에 의한 돌연변이 유발기전, 발암기전, 특정 유전자의 생체 내에서의 역할 등을 설명해 줄 수 있는 매우 중요한 수단을 제공하고 있다.

Transgenic animal model은 자신의 genome 내에 외부 유전자를 유입시켜 생체 내에서의 돌연변이를 감지할 수 있도록 제작되었으며 현재 mutation assay system으로 가장 많이 이용되고 있는 것으로는 *lacI* gene을 target으로 하는 Big BlueTM mouse와 rats (Stratagene) 그리고 *lacZ* gene을 target으로 하는 MutaTM mouse (Hazleton) 이다. 최근에는 이러한 model 이외에도 *cII* gene을 target으로 하는 system을 이용하여 많은 연구가 진행되어오고 있다. 이들 transgenic animal model은 감지하기 편리하고 분석하기 용이한 *lacI* gene, *lacZ* gene 그리고 *cII* gene을 target으로 하는 lambda shuttle vector를 가지고 있어서 생체내 여러 조직에서의 *in vivo* mutation추정을 가능하게 해주며 각 compound의 target gene에서의 mutational spectrum을 밝혀주는데 큰 역할을 하고 있다.

Lambda shuttle vector는 target DNA sequence를, 분석하기 편리한 organism으로 옮길 수 있다는 것이 큰 장점이며, 특히 *lacI* gene과 *cII* gene을 target으로 하는 Big Blue animal과 Big Blue cell line의 경우, 비교적 크기가 작아 excision이나 sequencing이 쉽게 될 수 있고 많은 mutation endpoint에 매우 sensitive하다.

이처럼 target gene에서의 mutation에 따른 reporter gene발현과 sequence analysis를 가능하게 해주는 transgenic mutagenesis assay는 질병에 관여하는 것으로 여겨지는 특정 gene의 변화와 *in vivo*에서의 효과는 물론 mutation과 cancer 발생 기전을 이해할 수 있도록 하는 가장 진보된 독성평가기법 중의 하나라 할 수 있다.

II. 원 리

II-1. Transgenic animal & cell line의 제작

Transgenic mouse는 원하는 gene을 수정된 single cell mouse embryo의 pronucleus에 microinjection시키는 기술에 의해 개발되었다. 삽입된 외부 DNA는 host의 DNA와 재조합되어 host genome내에 integration되고, 이러한 조작으로 유전적으로 변화된 embryo는 계속 발생, 진행되고 성장하면서 mouse는 모든 세포에 외부 DNA를 포함하고 있게 된다. 유전적으로 조작된 embryo를 대리모에게 착상시켜 출생시킨 후 출생된 offspring의 혈액을 이용하여 southern blotting을 수행하면 transgene의 존재여부를 확인할 수 있고 이렇게 확인이 끝난 새로운 mouse strain을 실험에 이용할 수 있게 된다 (Fig 1).

Cell line의 경우도 크게 다르지 않다. 현재 개발된 transgenic cell line으로는 Big Blue cell line (Stratagene)이 있으며 이 cell line에는 Big Blue mouse에 삽입된 것과 동일한 vector가 포함되어 있다. 또한 pSV2Neo plasmid를 lambda shuttle vector와 함께 calcium phosphate cotransfection 방법으로 제작되었으므로 세포 배양 시 항생제 G418 (geneticin)을 이용하여 select할 수 있다.

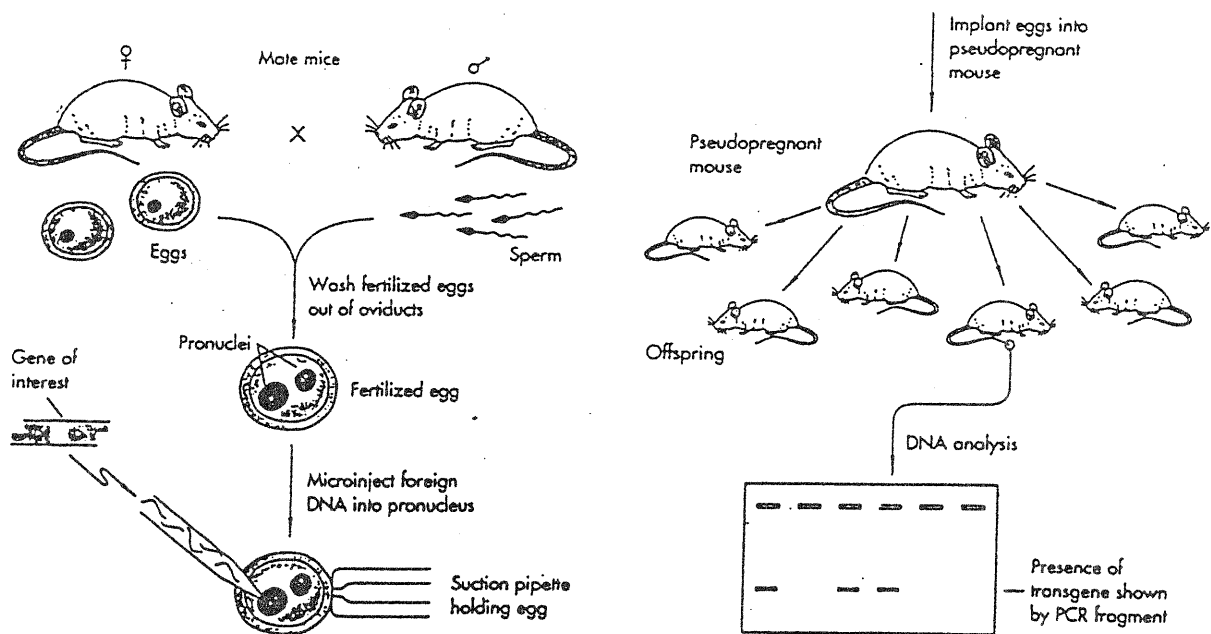


Fig 1. Producing transgenic mice by microinjection

II-2. Lambda shuttle vector & Detection system

Lambda shuttle vector

Lambda shuttle vector는 약 45kb의 크기이며 cos site를 가지고 있는 일종의 cosmid이다 (Fig 2).

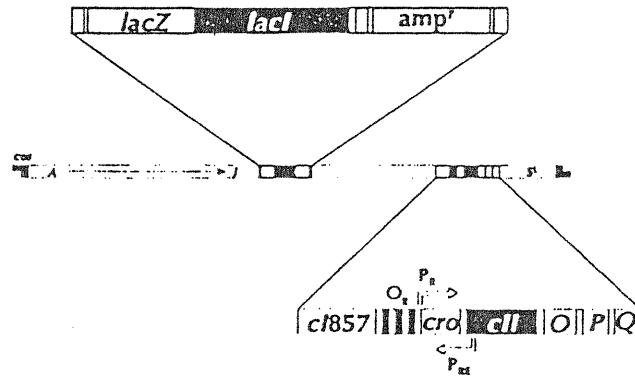


Fig 2. Lambda LIZ shuttle vector

이 vector는 mouse, rat, mammalian cell과 같은 연구대상에서 bacteria같은 분석이 용이한 organism으로 target DNA sequence를 옮길 수 있다는 것이 큰 장점이며 color screening 및 여러 가지 방법으로 mutation을 감지할 수 있는 특징이 있다. 또한 vector 내의 a *lacZ* gene은 carboxy terminus 부분이 결여되어 있는 형태로서 반드시 carboxy terminus 부분을 포함하고 있는 host *E. coli*의 ω *lacZ*와 complementation되었을 때만 온전한 β -galactosidase가 발현되도록 조작되어 있다.

LacI Big Blue[®] transgenic mutagenesis assay

Lambda shuttle vector에 포함되어 있는 target으로서의 *lacI* gene은 박테리아에 존재하는 gene으로서 수년동안 mutation detection에 가장 유용하게 이용되어 왔다.

특히 크기가 1080bp 정도로서 mutagenic target으로 많이 이용되는 *lacZ* gene (3200bp)에 비해 훨씬 작으므로 sequence analysis가 용이하다. 또한 방대한 database가 존재하므로 결과의 분석 및 비교가 가능하고 다양한 mutation endpoint에도 매우 sensitive하다.

LacI gene은 *lac* operon의 일부로서 *lacI* repressor protein을 code한다. *LacI* repressor protein은 tetramer로 *lacZ* gene의 transcription을 억제하는 역할을 한다. *LacZ* gene에 의해 code 되는 β -galactosidase는 chromogenic substance x-gal을 분

THE LAC OPERON

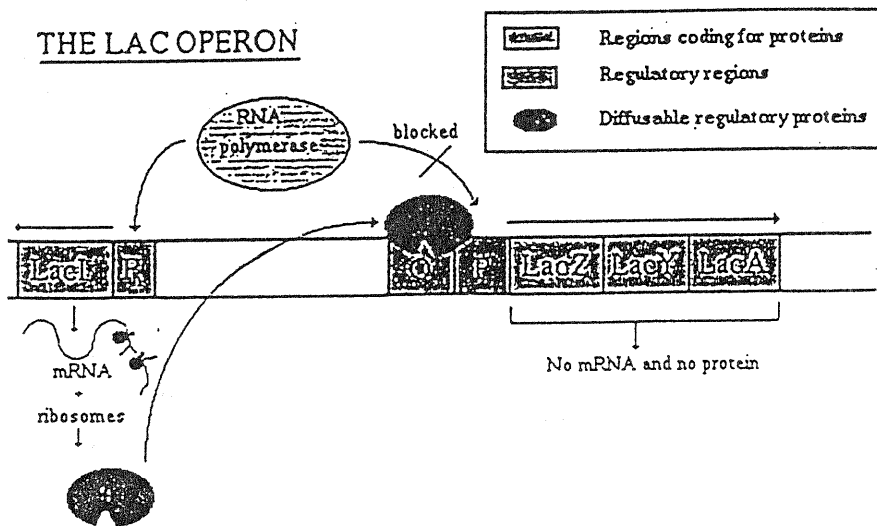


Fig 3. Diagram of the *lac* operon in repressed state

해하여 불용성 blue dye를 형성하게 한다.

따라서 *lacI* gene이 intact 할 경우는 β -galactosidase의 발현이 억제되므로 blue dye가 형성되지 않지만 *lacI* gene에 mutation이 일어나 inactive하게 되면 *lacZ* gene의 transcription 및 translation이 억제 없이 일어나게 되고 그 결과 β -galactosidase 활성으로 인해 x-gal 존재 시 blue dye를 형성하게 된다 (Fig 3).

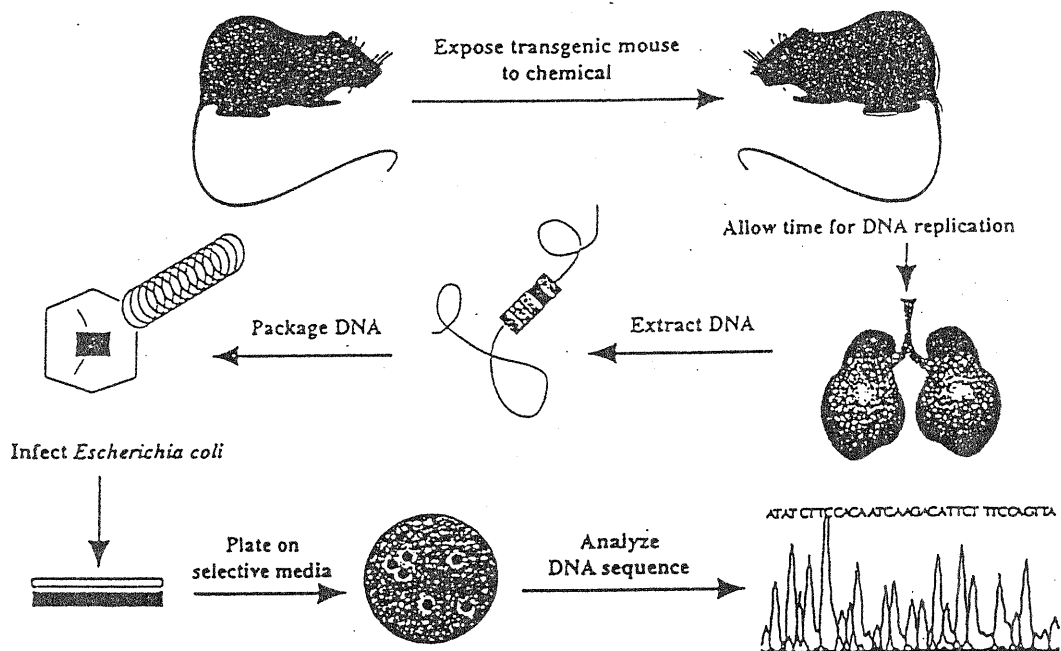


Fig 4. *Lac I* transgenic mouse mutagenicity assay

λ Select- cII^{TM} mutation detection system

cII gene을 이용한 λ Select- cII^{TM} mutation detection system은 위에서 설명한 $lacI$ gene을 이용한 system의 대체로 개발된 것으로, cII gene이 지닌 294 bp의 크기는 DNA sequencing에 의한 mutational analysis의 sensitivity를 향상시킬 수 있도록 한다.

cII gene에서 detection이 가능한 mutation은 cII protein의 기능이나 cI gene의 P_{RE} promoter에 영향을 주어, cI gene의 transcription을 방해한다. 이렇게 cI repressor protein이 발현되지 않으면 phage는 lytic cycle을 통해 증식하게 된다 (Fig 4). 그 반면에, nonmutant cII gene은 functional cI repressor protein을 발현하여 phage genome이 lysogenization을 겪게 된다.

회수된 shuttle vector를 포함한 lambda phage는 mutant $hflA$ 과 $hflB$ gene을 지닌 *E.coli* host strain인 G1250에 infection 되어 lysogeny-favoring condition (24°C)에서 배양된다. 이때 wild-type cII gene을 지닌 phage는 lysogenization을 통해 bacterial lawn의 일부가 된다. 하지만 cII gene에 mutation이 유발된 경우(λcII)에는 lysogeny가 유리한 condition에서도 살아남아 lytic cycle을 거쳐 bacterial lawn에서 plaque를 형성하게 된다 (Fig 5).

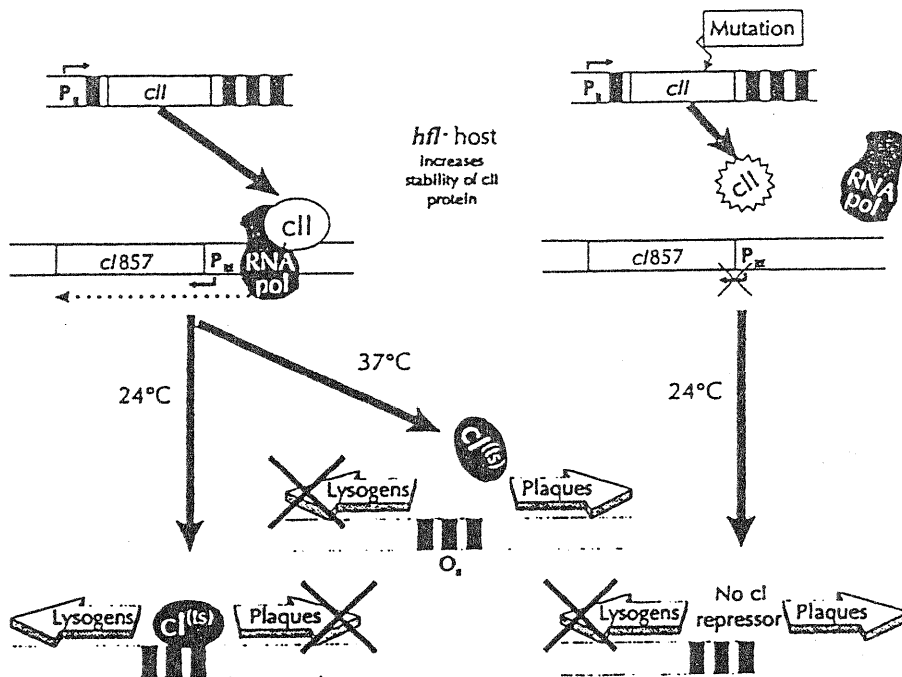


Fig 5. Commitment of λ phage to either the lysogenic or the lytic response

III. 방 법

III-1. Test compound 처리

Big Blue rat cell line

Cell culture를 위한 배지로는 10% fetal bovine serum과 200 $\mu\text{g/ml}$ geneticin, 50 units/ml penicillin, 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin이 첨가된 DMEM배지를 사용하고 37°C, 5% CO₂의 조건하의 incubator에서 배양시킨다. 매 3-4일마다 계대배양한다. Test compound의 처리는 예비실험을 거쳐 처리할 compound의 농도를 결정한 후 cell이 30-40% confluency를 나타냈을 때 실시한다. 처리가 끝나면 PBS로 washing 하고 cell이 confluency에 도달할 때까지 배양한다.

III-2. Genomic DNA isolation

Cell line의 경우 cell을 scraping하여 harvest한 후 DNA isolation을 수행한다.

분리한 조직이나 harvest한 cell은 -70°C에서 일정기간 보관가능하다 (90일 이내로 사용하는 것이 좋음).

Genomic DNA isolation은 proteinase K digestion, phenol/chloroform extraction 및 ethanol precipitation을 차례로 진행하여 수행한다. 기존에 알려져 있는 여러 가지 방법이나 kit 사용을 통해 분리할 수 있다.

III-3. Mutagenesis assay

In vitro packaging

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

Lacl Big Blue[®] transgenic mutagenesis assay

Packaging으로 인해 형성된 infectious phage stock을 SCS-8 *E. coli* host cell에 infection시키고 chromogenic substrate x-gal이 포함된 top agar를 cell-phage와 혼합하여 bottom agar (25x25 cm² assay tray) plate에 붓는다.

Top agar가 굳어지면 plate를 뒤집어 37°C incubator에서 incubation시킨다.

약 8시간이 지나면 plaque가 나타나기 시작하며, 16 ~ 24hr 내에 plaque수를 세어 mutant frequency를 결정한다.

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

λ Select-*cII*TM mutation detection system

Packaged lambda phage를 *E.coli* host strain G1250에 infection 시킨후 plating하여 24°C에서 40-48시간동안 incubation시킨다. 그리고 검색한 total plaque의 수를 측정하기 위해 phage-infected G1250 culture의 일부를 plating하여 37°C에서 overnight incubation 한다 (Fig 6). 이렇게 형성되어진 plaque를 계수하여 mutant frequency를 결정한다.

Mutant frequency (MF)
= number of λ cII⁻ plaques / number of total plaques screened

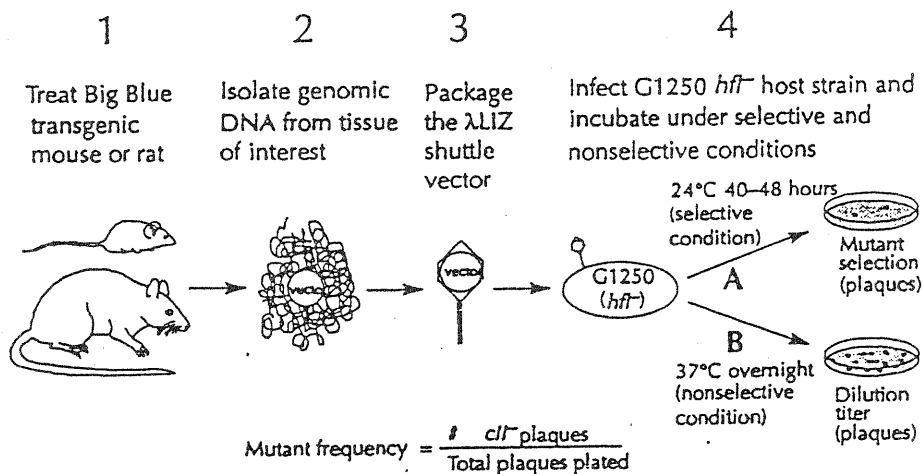


Fig 6. λ Select-*cII* mutation detection system

III-5. Lambda plaque의 분리

Plate에서 mutant plaque를 picking한후 plaque의 순수단독분리를 위해 replating을 실시한다. Picking한 plaque를 SM buffer (chloroform포함)로 현탁시킨 후 희석하여 host cells에 infection시키고 plating한다. 한 plate에 적은 수의 plaque가 생성되도록 하고 인접부위에 다른 plaque들이 없는 잘 분리된 mutant plaque의 top agar 부분만을 분리해낸다. TE buffer에 분리한 plaque를 첨가하고 boiling하여 phage DNA가 용출되도록 한다.

III-6. Mutant plaque의 DNA sequence analysis

분석하려는 *lacI* gene과 *cII* gene 각각에 대한 primer와 잘 분리한 phage DNA를 template로 하여 PCR (polymerase chain reaction)를 실시한다. PCR수행 후 product일부를 전기영동하여 반응이 제대로 되었는지 확인한 후 DNA를 purify한다. PCR를 수행하지 않고도 phage로부터 직접 *lacI* gene이나 *cII* gene을 excision하고 분리하여 sequencing을 하는 것도 가능하다. 준비한 DNA의 sequence를 분석한다. 최근에는 automated fluorescent DNA sequencer를 이용하는 것이 보편화되고 있다.

IV. Transgenic mutagenesis assay system의 장점과 응용

Transgenic animal은 transgene의 존재가 생물학적으로 크게 영향을 주지 않으므로 nontransgenic mouse와 거의 동일한 반응을 나타낸다. 따라서 어떤 compound가 유도하는 target gene의 mutation 연구를 통해 endogenous gene에서의 현상을 알 수 있다.

chemical의 조직특이성을 알아낼 수 있으며 다른 여러 가지 endpoint와 더불어 평가할 수 있다 (다른 *in vivo* 실험과 병행이 가능). 또한 germ cell을 사용할 경우 heritable effect를 예측할 수 있고, safety testing에 필요한 동물의 수를 줄이는 효과가 되므로 비용절감에도 기여한다.

Lacl gene을 target으로 한 경우 detection이 더욱 쉽고 (background white 중에서 blue를 detect함) 다른 target gene에 비하여 크기가 작으므로 분석이 용이한 장점이 있다. 또한 direct acting mutagen의 경우는 실험동물을 이용하지 않더라도 transgenic cell line을 사용하여 mutational spectrum을 규명하는 것이 가능하다.

이 system은 chemical의 effect를 mutational spectrum으로 밝힐 수 있으므로 chemical carcinogenesis에 관여하는 특정 gene의 역할의 이해를 가능하게 해준다.

무엇보다도 양적인 평가 (MF)와 질적인 평가 (mutational spectrum)가 동시에 빠르게 이루어질 수 있다는 점에서 높게 평가되는 이 방법은 mutagenesis 연구 뿐 아니라 DNA repair, *in vivo* carcinogenicity 연구 등 다양한 독성학적 연구에 응용될 수 있고, 몇몇 유전독성연구방법과 이 transgenic system을 병용한 battery test를 과학선진국에서 구상하고 있어, 실제 *in vivo* 발암성 시험시의 비용 및 기간 등을 극복할 수 있는 유용한 tool로서 빠른 시간 내에 대체 발암성 시험법의 일환으로 자리매김하리라 믿는다.

V. 참고문헌

- Bol S.A., Horlbeck J., Markovic J., de Boer J.G., Turesky R.J. and Constable A. (2000) Mutational analysis of the liver, colon and kidney of Big Blue rats treated with 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline. *Carcinogenesis* 21, 1-6.
- Cunningham M.L., Hayward J.J., Shane B.S. and Tindall K.R. (1996) Distinction of mutagenic carcinogens from a mutagenic noncarcinogen in the big blue transgenic mouse [see comments]. *Environ. Health Perspect.* 104 Suppl 3, 683-686.
- Erexson G.L., Watson D.E. and Tindall K.R. (1999) Characterization of new transgenic Big Blue(R) mouse and rat primary fibroblast cell strains for use in molecular toxicology studies. *Environ. Mol. Mutagen.* 34, 90-96.
- Erfle H.L., Walsh D.F., Holcroft J., Hague N., de Boer J.G. and Glickman B.W. (1996) An efficient laboratory protocol for the sequencing of large numbers of *lacI* mutants recovered from Big Blue transgenic animals. *Environ. Mol. Mutagen.* 28, 393-396.
- Gu M., Ahmed A., Wei C., Gorelick N. and Glickman B.W. (1994) Development of a lambda-based complementation assay for the preliminary localization of *lacI* mutants from the Big Blue mouse: implications for a DNA-sequencing strategy. *Mutat. Res.* 307, 533-540.
- Harbach P.R., Zimmer D.M., Filipunas A.L., Mattes W.B. and Aaron C.S. (1999) Spontaneous mutation spectrum at the lambda *cII* locus in liver, lung, and spleen tissue of Big Blue transgenic mice. *Environ. Mol. Mutagen.* 33, 132-143.
- Hill K.A., Nishino H., Buettner V.L., Halangoda A., Li W. and Sommer S.S. (1999) The Big Blue(R) transgenic mouse mutation detection assay: the mutation pattern of sectored mutant plaques. *Mutat. Res.* 425, 47-54.
- Lotti M. (1995) Mechanism of toxicity and risk assessment, Transgenic models for detection of mutation in tumors and normal tissues of rodents, *Toxicology letters* 82/83, 131-134.
- Manjanatha M.G., Shelton S.D., Aidoo A., Lyn-Cook L.E. and Casciano D.A. (1998) Comparison of *in vivo* mutagenesis in the endogenous *hprt* gene and the *lacI*

- transgene of Big Blue(R) rats treated with 7, 12- dimethylbenz[a]anthracene. *Mutat. Res.* 401, 165-178.
- Mittelstaedt R.A., Manjanatha M.G., Shelton S.D., Lyn-Cook L.E., Chen J.B., Aidoo A., Casciano D.A. and Heflich R.H. (1998) Comparison of the types of mutations induced by 7,12- dimethylbenz[a]anthracene in the *lacI* and *hprt* genes of Big Blue rats. *Environ. Mol. Mutagen.* 31, 149-156.
- Monroe J.J., Kort K.L., Miller J.E., Marino D.R. and Skopek T.R. (1998) A comparative study of *in vivo* mutation assays: analysis of *hprt*, *lacI*, *cII/cI* and as mutational targets for N-nitroso-N-methylurea and benzo[a]pyrene in Big Blue mice. *Mutat. Res.* 421, 121-136.
- Morrison V. and Ashby J. (1994) A preliminary evaluation of the performance of the Muta Mouse (*lacZ*) and Big Blue (*lacI*) transgenic mouse mutation assays. *Mutagenesis* 9, 367-375.
- Recio L., Meyer K.G., Pluta L.J., Moss O.R. and Saranko C.J. (1996) Assessment of 1,3-butadiene mutagenicity in the bone marrow of B6C3F1 *lacI* transgenic mice (Big Blue): a review of mutational spectrum and *lacI* mutant frequency after a 5-day 625 ppm 1,3-butadiene exposure. *Environ. Mol. Mutagen.* 28, 424-429.
- Ryu J., Youn J., Kim Y., Kwon O., Song Y., Kim H., Cho K. and Chang I. (1999) Mutation spectrum of 4-nitroquinoline N-oxide in the *lacI* transgenic Big Blue Rat2 cell line. *Mutat. Res.* 445, 127-135.
- Sato H., Sone H., Sagai M., Suzuki K.T. and Aoki Y. (2000) Increase in mutation frequency in lung of Big Blue[®] rat by exposure to diesel exhaust. *Carcinogenesis* 21, 653-661.
- Shane B.S., deBoer J.G., Glickman B.W. and Cunningham M.L. (1999) Oxazepam is mutagenic *in vivo* in Big Blue transgenic mice. *Carcinogenesis* 20, 1315-1321.
- Shane B.S., de Boer J., Watson D.E., Haseman J.K., Glickman B.W. and Tindall K.R. (2000) *LacI* mutation spectra following benzo[a]pyrene treatment of Big Blue[®] mice. *Carcinogenesis* 21, 715-725.
- Shephard S.E., Sengstag C., Lutz W.K. and Schlatter C. (1993) Mutations in liver DNA of *lacI* transgenic mice (Big Blue) following subchronic exposure to

- 2-acetylaminofluorene. *Mutat. Res.* 302, 91-96.
- Skopek T.R., Kort K.L. and Marino D.R. (1995) Relative sensitivity of the endogenous *hprt* gene and *lacI* transgene in ENU-treated Big Blue B6C3F1 mice. *Environ. Mol. Mutagen.* 26, 9-15.
- Skopek T.R., Kort K.L., Marino D.R., Mittal L.V., Umbenhauer D.R., Laws G.M. and Adams S.P. (1996) Mutagenic response of the endogenous *hprt* gene and *lacI* transgene in benzo[a]pyrene-treated Big Blue B6C3F1 mice. *Environ. Mol. Mutagen.* 28, 376-384.
- Stiegler G.L. and Stillwell L.C. (1993) Big Blue transgenic mouse *lacI* mutation analysis. *Environ. Mol. Mutagen.* 22, 127-129.
- Suter W., Ahiabor R., Blanco B., Locher F., Mantovani F., Robinson M., Sreenan G., Staedtler F., Swingler T., Vignutelli A. and Perentes E. (1996) Evaluation of the *in vivo* genotoxic potential of three carcinogenic aromatic amines using the Big Blue transgenic mouse mutation assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 28, 354-362.
- Tao K.S., Urlando C. and Heddle J.A. (1993) Comparison of somatic mutation in a transgenic versus host locus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10681-10685.
- Wang X., Suzuki T., Itoh T., Honma M., Nishikawa A., Furukawa F., Takahashi M., Hayashi M., Kato T. and Sofuni T. (1998) Specific mutational spectrum of dimethylnitrosamine in the *lacI* transgene of Big Blue C57BL/6 mice. *Mutagenesis* 13, 625-630.
- Watson D.E., Cunningham M.L. and Tindall K.R. (1998) Spontaneous and ENU-induced mutation spectra at the *cII* locus in Big Blue Rat2 embryonic fibroblasts. *Mutagenesis* 13, 487-497.
- Wyborski D.L., Malkhosyan S., Moores J., Perucho M. and Short J.M. (1995) Development of a rat cell line containing stably integrated copies of a lambda/*lacI* shuttle vector. *Mutation Res.* 334, 161-165.
- Zimmer D.M., Zhang X.B., Harbach P.R., Mayo J.K. and Aaron C.S. (1996) Spontaneous and ethylnitrosourea-induced mutation fixation and molecular spectra at the *lacI* transgene in the Big Blue rat-2 embryo cell line. *Environ. Mol. Mutagen.* 28, 325-333.

Zimmer D.M., Harbach P.R., Mattes W.B. and Aaron C.S. (1999) Comparison of mutant frequencies at the transgenic lambda *lacI* and *cII/cI* loci in control and ENU-treated Big Blue mice. Environ. Mol. Mutagen. 33, 249-256.