

디지털 전기천공을 이용한 미세조류 내 단백질 전달 연구

임도진[†]

국립부경대학교 화학공학과
48547 부산광역시 남구 신전로 365
(2017년 9월 22일 접수, 2017년 10월 16일 채택)

Delivery of Protein into Microalgae by the Digital Electroporation

Do Jin Im[†]

Department of Chemical Engineering, Pukyong National University, 365, Sinseon-ro, Nam-gu, Busan, 48547, Korea
(Received 22 September 2017; accepted 16 October 2017)

요 약

본 연구에서는 기 개발된 액적 접촉충전 기반의 디지털 전기천공 기술을 이용해 미세조류에 단백질을 전달하는 연구를 수행 하였다. *Chlamydomonas reinhardtii* 중 세포벽이 존재하는 야생종 cc-125에 적용한 결과, 살아 있는 세포의 핵 내부로 형광 단백질 GFP가 10% 이상의 비교적 높은 효율로 전달될 수 있음을 확인하였다. 또한 인가 전기장의 크기 변화에 따른 단백질 전달 효율을 살펴봄으로써 최적의 단백질 전달 효율을 위한 전기천공 전기장 조건을 도출하였다(960 V/cm). 전달 물질의 크기에 따른 영향 분석을 위해 추가로 수행한 핵산 염색 형광 염료 Yo-Pro-1의 전달 특성 분석 결과, 크기에 따른 차이가 존재함에도 최적의 전달 효율을 나타내는 인가 전기장의 세기 조건은 매우 유사한 경향을 보였다. 마지막으로 본 연구 결과의 의미 및 크리스퍼 유전자 가위 기술의 적용 등 향후 활용방안에 대해서 논의 하였다.

Abstract – In the present study, we performed electroporation to deliver protein into microalgae using previously developed digital electroporation system. Green fluorescence protein was successfully delivered into a live microalgae cell nucleus without cell wall removal. By investigating the effects of applied voltage on the protein delivery efficiency, optimal electroporation electric field condition was found (960 V/cm). We also investigated the delivery of Yo-Pro-1 into cell to examine the size effects of delivered materials and found that there is little size effects on the optimal condition. Finally, the implications of the present results and future work are discussed.

Key words: Digital electroporation, Microalgae, Protein delivery, CRISPR/CAS9

1. 서 론

수십 년 이상 많은 연구자들은 미세조류를 이용해 새로운 대체 에너지원으로 활용하기 위한 연구를 수행해 왔다[1]. 최근에는 미세조류를 단순히 새로운 에너지원으로뿐만 아니라 지구 온난화 문제를 해결할 수 있는 방법으로 접근하는 연구들도 많이 진행되는 추세이다[2-4]. 미세조류는 또한 항 산화제나 항생제 등 고부가가치 생산물을 생산하는 바이오 공장으로써의 역할도 매우 주목 받고 있으며 기존 대장균 등으로 합성하기 어려운 물질을 생산하는 수단으로써도 많은 연구들이 진행되고 있다[5-7]. 미세조류의 이러한 특징들을 보다

잘 활용하기 위해서는 기존에 알려진 자연 상태의 야생종을 그대로 사용하기보다는 품종개량이나 형질전환 등을 통해서 보다 우수한 미세조류 종을 선별, 확보하는 것이 필요하다[4]. 품종개량의 경우 많은 시간이 소요되고 특정 기능을 선별적으로 추가 혹은 삭제하는데 많은 제약이 따르기 때문에 최근에는 주로 형질전환을 통한 우수 미세조류 종을 확보하기 위한 연구들이 많이 수행되고 있다[4-8].

형질전환 관점에서 미세조류는 다른 종에 비해 까다롭고 어려운 특징을 많이 가지고 있다. 기본적으로 미세조류는 식물세포이기 때문에 세포벽이 존재하며 이러한 세포벽은 외부 유전체를 전달하는데 있어 매우 큰 장애물이 된다. 따라서 미세조류의 형질전환 과정에는 이 세포벽을 제거하는 공정을 추가하거나 유전공학적으로 세포벽이 생성되지 않는 돌연변이 종을 활용하는 방법 등을 사용해야 해서 형질전환 과정이 보다 복잡하다. 또한 미세조류는 부유 세포(suspension cell)이기 때문에 형질전환에 어려움이 추가로 존재한다. 왜냐하면 일반적으로 부유 세포는 부착형 세포(adherent cell) 대비

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: dj-im@pknu.ac.kr

‡이 논문은 부경대학교 이계근 교수의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

형질전환 효율이 낮기 때문이다[9]. 또한 미세조류의 유전적 특징은 효율적으로 외부 유전체 전달이 이루어 지더라도 기존 유전 정보에 대한 영구적인 수정 및 유치가 잘 되지 않아 형질전환에 추가적인 어려움이 있는 것으로 알려져 있다[10]. 따라서 성공적인 미세조류 형질전환을 위해서는 앞선 문제들을 해결할 수 있는 효율적인 유전자 전달 및 형질전환 방법론 개발이 필요하다.

이전 연구에서 본 연구자는 액적 접촉충전 현상[11-20] 기반의 디지털 전기천공 기술을 미세조류 형질전환에 적용하여 높은 세포 생존율 및 유전체 발현 효율을 달성하였다[21]. 제안된 디지털 전기천공 기술은 기존에 상용화된 전기천공 장치의 단점들을 극복하기 위해 디지털 미세유체 기술을[21-23] 적용한 시스템으로 크기가 매우 작기 때문에 작동 전압과 전류를 획기적으로 낮추어 기존 문제점들을 근본적으로 해결하였다. 또한 하나의 단위 액적 내에 최대 수십만 개의 세포를 담아 실험함으로써 기존 미세유체 전기천공 기술의 한계인 낮은 수율 문제를 해결하였다[21]. 이러한 디지털 전기천공 시스템의 우수성은 동물세포 형질전환에도 적용하여 기존 방법론 대비 뛰어난 형질전환 효율을 달성하였으며 집적화된 세포 형질전환 시스템으로의 발전 가능성 또한 확인하였다[24].

하지만 기존 연구의 경우, 형질전환 결과를 배양된 지 하루 지난 세포에 대해서만 확인하였기 때문에 장기적으로 영구적인 형질전환이 되었는지 여부는 확인되지 않았다. 또한 전달된 유전체가 기존 유전 정보의 특정 부분을 정확히 수정하는 것이 불가능하여 원하는 형질을 나타내는 형질전환 세포를 얻기 위해서는 수 많은 실험과 시행 착오가 필요한 단점이 있다. 최근 크리스퍼 유전자 가위 기술은 기존의 이러한 형질전환 방법의 한계를 극복할 수 있는 새로운 기술로 미세조류 형질전환에도 적용된 사례가 있다[10]. 하지만 기존 크리스퍼 유전자 가위 기술이 적용된 미세조류 형질전환 결과들을 얻기 위해서는 매우 과량의 CAS9 단백질이 요구되는 등 기존 동물세포에 적용할 때와는 효율과 적용방법 등에서 차이를 보인다. 하지만 어떤 원인에 의해 이러한 차이가 나타나는 지 등에 대한 연구가 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 기 개발된 액적 접촉충전 기반의 디지털 전기천공 기술을 이용해 미세조류에 단백질을 전달하는 연구를 수행하였다. 보다 일관되고 안정적인 실험을 위해 기존 칩 제작 방법을 보완하여 3D 프린터를 이용한 칩 제작 방법을 도입, 기존 칩의 문제를 해결한 실험을 수행하였다. 전달되는 물질의 크기에 따른 영향을 살펴보기 위해 단백질보다 크기가 매우 작고 세포 핵 내부로의 전달 유무를 확실히 확인할 수 있는 DNA 형광 염료인 Yo-Pro-1을 이용한 실험을 병행함으로써 물질 크기에 따른 전달 특성 거동을 살펴보았다. 전기장의 크기 변화에 따른 단백질 전달 효율을 살펴봄으로써 최적의 단백질 전달을 위한 전기천공 조건을 도출하고자 하였다. 마지막으로 본 연구 결과의 의미 및 향후 활용방안에 대해서 논의하였다.

2. 실험

2-1. 실험 장치

디지털 전기천공 장치의 전체적인 구성 및 시스템은 Fig. 1에 나타난 바와 같다. 작동 원리 및 기본적인 시스템 구성은 이전 연구에 사용된 것과 동일하다[21]. 하지만 이전 연구에서 사용한 칩 제작 방법의 문제점은 아크릴 구조를 이용해 오일을 담는 구조 제작 시 틈새로 오일이 새는 문제가 발생하는 것이었다. 본 연구에서는 이러한 오일

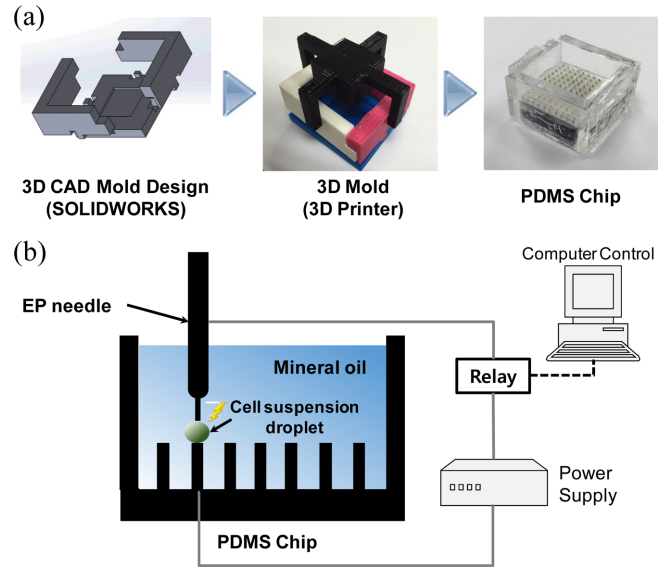


Fig. 1. (a) PDMA chip fabrication procedures. (b) Schematic of the digital microfluidic electroporation system and circuit connections.

누유 문제를 해결하기 위해 칩의 제작 시 PDMS (Polydimethylsiloxane) 재질로 아크릴 구조물을 대체하였다. Fig. 1a에 나타난 바와 같이, 핀헤드 소켓으로 제작된 전극 구조체를 3D 프린터로 제작한 틀에 넣은 후 액체 상태의 PDMS를 전극 구조체가 들어 있는 틀에 부어서 굳히면 그림에 나타난 것과 같은 칩을 제작할 수 있다. 이렇게 제작된 PDMS 칩은 전극 구조체나 벽체 등에 틈이 없기 때문에 오일의 누유 문제를 근본적으로 해결할 수 있다. 하지만 이렇게 제작된 PDMS 칩의 경우, 실리콘 오일을 사용하게 되면 오일이 PDMS에 침투하여 칩이 부풀어 오르는 문제가 생기기 때문에 미네랄 오일을 이용해 실험을 수행하였다.

제작된 PDMA 칩은 Fig. 1b에 나타난 바와 같이 전기천공용 전극 (EP needle)을 추가하여 전기천공용 전원장치와 릴레이 스위치에 연결이 된다. 컴퓨터를 통해 릴레이 스위치를 조작함으로써 전기천공에 인가되는 전기펄스의 횟수와 인가 시간을 조절하였다. 전기천공은 약 2.5 mL 크기의 세포가 포함된 액적을 비전도성인 미네랄 오일에 담지 하여 두 전극 사이에 연결시킨 후 전기펄스를 인가하여 수행하였다. 디지털 전기천공의 기본원리는 기존 상용화 전기천공 장치와 같으나 작은 시스템의 크기로 인해 인가 전압 및 전류를 크게 낮추어 세포의 생존율 및 전달 효율이 높은 장점을 가진다.

2-2. 실험 재료

Chlamydomonas reinhardtii 미세조류 종은 이 분야에서 오랜 시간 많은 사람들에 의해 연구되어 유전정보 등 관련 내용이 잘 알려진 모델 종이다. 디지털 전기천공 기술의 높은 전달 효율을 추가로 검증하기 위해 *Chlamydomonas reinhardtii*의 여러 종들 중 세포벽이 존재하는 야생종인 cc-125를 이용해 단백질 및 Yo-Pro-1 전달 실험을 수행하였다. 세포는 기본적으로 액체 Tris/acetate/phosphate (TAP) 배지 13 mL가 담긴 배양 플라스크 내에서 일정한 조도(1250 lx) 및 온도(25 °C) 유지되는 배양기(JSPC-200C, JSR, Korea) 내에서 배양되었다. 실험 만 하루 전에 세포들의 배지를 새로 교체하여 실험 당시 세포 분열이 충분히 활성화된 상태의 세포를 확보하여 실험을

수행하였다.

세포 내로 전달된 단백질의 전달 효율을 쉽고 빠르게 정량화 하기 위해 형광 단백질을 사용하였다. 실험에 사용된 단백질은 잘 알려진 Green Fluorescence Protein (GFP)를 사용하였으며 이렇게 형광 단백질을 이용하면 전기천공을 통해 세포 내로 전달 후 당일 바로 전달 유무 및 효율을 측정할 수 있는 장점이 있다. 단백질의 전달 효율 실험에서 전달 물질의 크기에 따른 영향을 살펴보기 위해 DNA를 염색하는데 활용되는 형광 염료인 Yo-Pro-1을 추가로 사용하였다. Yo-Pro-1은 DNA 나 RNA와 같은 핵산과 결합할 때만 초록색 형광을 나타내는 형광 염료로 주로 세포의 활성도 및 생존도 등을 테스트 하는 용도로 사용되는 형광염료이다. 정상 세포는 Yo-Pro-1을 흡수 하지 않기 때문에 외부 물질의 세포 내로의 전달 유무를 확인 하는 용도로도 사용되기도 한다[25]. Yo-Pro-1의 형광은 핵산과 결합 후 6 시간 이내에 사라지기 때문에 실험 당일 전기천공 후 곧바로 전달 유무 및 전달 효율을 측정하였다.

2-3. 실험 방법

디지털 전기천공 실험을 위해 약 1×10^6 개의 세포를 9 μL 배지에 준비하였다. 준비된 세포 수용액에 단백질(1.33 mg) 또는 Yo-Pro-1을 (0.1 mmol) 포함한 수용액 1 μL 를 추가하여 혼합된 세포 수용액을 만들었다. 준비된 혼합 세포 수용액을 마이크로 피펫을 이용해 2.5 mL 크기의 액적 형태로 PDMS 칩과 전기천공용 전극(EP needle) 사이 1 mm 간격에 공급한 후 일정 크기의 전기펄스를 인가하여(자세한 전기천공조건은 결과에서 기술) 전기천공을 수행하였다. 준비된 10 μL 혼합 세포 수용액을 모두 처리하기 위해 실험은 총 4회 반복 수행되었다. 전기천공이 완료된 액적은 EP needle에 연결된 주사기를 통해 수집 후 실험 당일 바로 결과 분석을 수행하였다.

각 실험 조건 하에서의 외부 물질 전달 결과는 공초점 현미경과 (LSM 700, ZEISS, Germany) 유세포분석기(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS, FACSVerse, BD)를 이용해 측정하였으며 세포의 생존도(cell viability)는 Propidium Iodide (PI, 1 $\mu\text{g/mL}$) 염색을 한 후 FACS를 통해 측정하였다. 디지털 전기천공 실험 장치, 과정 및 분석 방법에 대한 보다 자세한 내용은 이전 연구에서[21] 찾을 수 있다.

전기천공 결과에 대한 보다 정확한 FACS 분석을 위해 본 연구에서는 총 세 가지 대조군을 준비하였다. 첫 번째 대조군은 1×10^6 개의 세포를 10 μL 배지에 준비하고 아무런 조치도 하지 않은 그룹이다(이후 NC로 명명). 두 번째 대조군은 1×10^6 개의 세포를 9 μL 배지에 준비하고 1 μL 의 단백질 혹은 Yo-Pro-1 수용액을 첨가한 그룹으로 세포가 자연적으로 외부 물질을 받아들이는 정도를 나타내는 대조군 그룹이다(이후 C-EP로 명명). 마지막 세 번째 그룹은 1×10^6 개의 세포를 10 μL 배지에 준비하고 전기천공만을 수행한 그룹으로 전기적 자극에 의해 세포가 손상을 받아 자가형광(autofluorescence)을 나타내는 정도를 측정하기 위한 대조군으로써 통상 전기천공 실험에서 가장 많이 사용되는 대조군 종류이다(이후 C-DNA로 명명).

3. 결과 및 고찰

3-1. Yo-Pro-1의 세포 내 전달

단백질의 세포 내 전달 실험에 앞서, 우선 기존에 전기천공을 통해 세포 내부로의 전달이 가능함이 알려진 핵산 염색 물질인 Yo-Pro-1을 이용해 디지털 전기천공을 이용한 세포 내 물질 전달 특성을 살

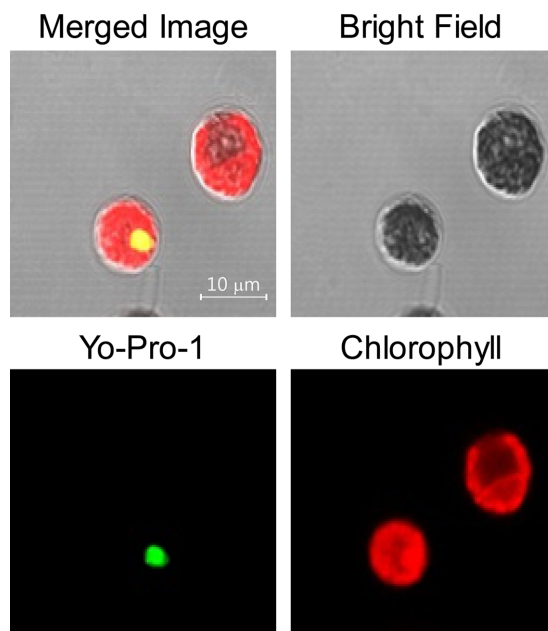


Fig. 2. Confocal microscope images of Yo-Pro-1 delivery into *Chlamydomonas reinhardtii* (cc-125). The applied voltage was 96 V.

펴보았다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 디지털 전기천공을 이용해 세포 내부 특히 세포 내 핵에 Yo-Pro-1이 성공적으로 전달되어 세포 핵에서 초록색 형광을 나타냄을 확인할 수 있다. 근접한 다른 세포의 경우 Yo-Pro-1이 전달되지 않은 것을 확인할 수 있으며 핵에서 초록색 형광을 나타내는 세포의 chlorophyll 형광 강도와 세포의 모양 그리고 세포 움직임에 의해 생성된 세포 외곽의 잔상들로부터 살아 있는 세포의 핵 내부로 Yo-Pro-1이 성공적으로 전달되었음을 확인할 수 있다. 따라서 디지털 전기천공을 통해 살아있는 세포 내 핵에 Yo-Pro-1의 전달이 가능함을 확인하였으며 Yo-Pro-1이 전달된 세포의 생존 또한 확인하였다.

3-2. Yo-Pro-1의 세포 내 전달 최적 조건 도출

Fig. 2의 결과로부터 디지털 전기천공을 이용해 살아 있는 세포에 Yo-Pro-1을 세포를 죽이지 않은 상태에서 세포 핵 내부까지 전달이 가능함을 확인하였으나 정량적으로 얼마만큼의 효율로 세포 내 전달이 가능한 지에 대한 분석을 위해 추가적인 실험을 수행하였다. 외부 물질의 전달 효율은 전체 세포 중 전달 물질을 받아 형광을 나타내는 세포의 수를 백분율로 정의하였으며 FACS를 통해 각각의 실험 조건 당 약 10,000개 세포를 분석하였다. 전기천공의 주요 변수 중 가장 중요하고 큰 영향을 주는 요인은 가해주는 전기장의 세기이기 때문에 인가 전기장의 크기에 따른 전달 효율의 변화를 Fig. 3에 나타난 바와 같이 살펴보았다.

본 연구에서는 총 세 가지 종류의 대조군 실험을 수행하였다. 먼저 NC의 경우, 자연적인 세포 상태를 대변하는 그룹으로 실험에 사용된 세포의 자연적인 생존율과(94.8%) 세포 자체에서 발생할 수 있는 자연 형광 정도를(0.1%) 가늠할 수 있다. C-EP 그룹의 경우 전기천공은 수행하지 않았으나 투입된 Yo-Pro-1을 자연적으로 세포가 섭취해서 형광을 나타낼 수 있는 정도를(0.8%) 가늠해 볼 수 있으며 Yo-Pro-1에 의한 세포 생존을 변화(95.4%) 등을 알 수 있다. 마지막으로 C-DNA 그룹의 경우 전기천공만으로 세포가 자가발광(autofluorescence) 하는

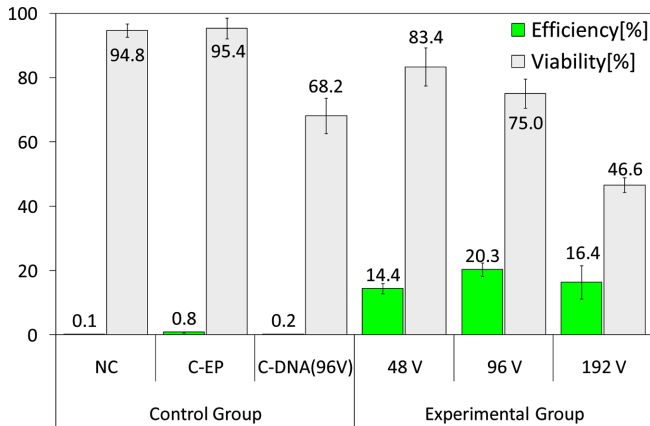


Fig. 3. Yo-Pro-1 delivery efficiency and cell viability depending on applied voltages. C-EP represents the natural uptake of Yo-Pro-1 into cells and C-DNA represents the autofluorescence due to the damage from electroporation.

정도를 확인 할 수 있으며 FACS 기기의 설정을 조정함으로써 이러한 자가발광에 의한 신호를 최소화 하여 실제 Yo-Pro-1에서 발생된 신호와 구분할 수 있게 조절하는 데 기준 역할을 한다. Fig. 3 결과에서 확인할 수 있듯이 전기천공에 의해 손상 받은 세포에서 발생될 수 있는 자가발광 비율은 0.2% 수준으로 Yo-Pro-1에서 발생하는 형광과는 구분됨을 확인할 수 있다.

Fig. 3에 나타난 바와 같이 인가 전압이 두 배씩 증가함에 따라 세포의 생존율은 급격히 감소하는 뚜렷한 경향을 나타내었다. 하지만 인가 전압에 따른 Yo-Pro-1 전달 효율의 변화는 단순히 증가하기 보다 96 V에서 최대 효율을 나타내고 더 높은 전압에서는 오히려 효율이 다소 감소됨을 확인할 수 있다. 일반적으로 인가 전압이 높아짐에 따라 세포의 생존율은 감소하고 외부 물질의 전달 효율은 증가한다. 따라서 이러한 결과는 인가 전압이 높아짐에 따라 Yo-Pro-1의 전달이 될 되어 나타난 결과라기 보다는 증가된 전달효율로 세포의 생존율이 급격히 감소함에 따라 나타난 결과로 판단되며 이러한 가설은 192 V 조건에서 50% 미만의 매우 낮은 세포 생존율 데이터에서 유추가 가능하다. 즉, 너무 많은 Yo-Pro-1의 전달로 많은 수의 세포가 파괴되어 결과적으로 낮은 Yo-Pro-1 전달 효율 결과로 나타난 것으로 추정된다. 따라서 Yo-Pro-1 전달에 있어서는 약 96 V 전압을 (전기장 960 V/cm) 인가하는 것이 최적의 전달 효율을 보임을 확인하였다.

3-3. 형광 단백질의 세포 내 전달

전기천공 방법이 다른 유전자 전달 방법 대비 가지는 큰 장점 중 하나는 DNA 등 유전 물질뿐 아니라 앞선 실험 결과에서 본 바와 같이 염료나 단백질 혹은 미세 입자 등 세포보다 작은 임의의 물질을 전달할 수 있다는 것이다. 하지만 실제 단백질을 직접 세포에 전달하는 연구는 특정 동물 세포에 국한해 매우 제한적으로 이루어지며 식물 세포에의 전달은 사실상 전무한 실정이다. 최근 크리스퍼 유전자 가위 기술의 발달과 관심 증대로 전기천공을 이용한 단백질 전달 연구가 다양한 세포 종에 대해 시도되고 있으나 미세조류에서의 체계적인 단백질 전달 연구는 미흡하다. 따라서 본 연구를 시작으로 미세조류 내 단백질 전달 연구를 체계적으로 접근하고자 하였다.

단백질의 경우 앞서 사용된 형광 염료인 Yo-Pro-1 분자 대비 크기가

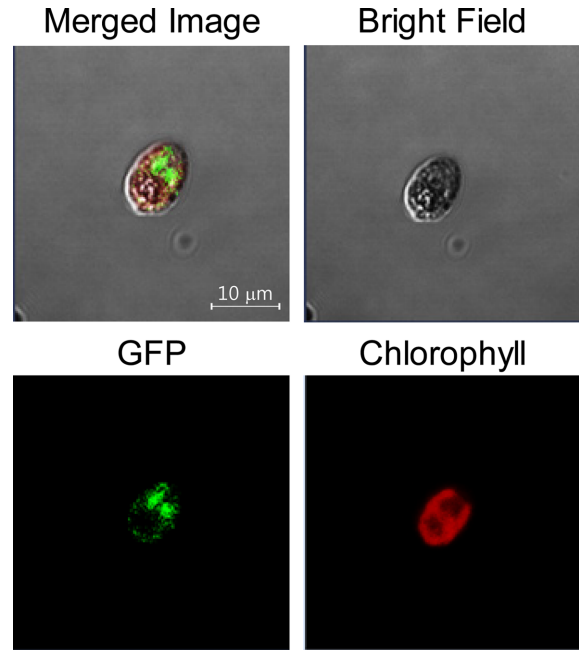


Fig. 4. Confocal microscope images of GFP delivery into *Chlamydomonas reinhardtii* (cc-125). The applied voltage was 96 V.

매우 큰 고분자 물질이기 때문에 세포 핵 내부로의 전달이 상대적으로 쉽지 않다. 미세조류의 경우 컵 모양의 엽록체가 세포 핵을 감싸고 있는 형상을 하고 있어 세포 핵 내부로의 물질 전달이 동물세포 대비 상대적으로 어려운 편이다. 더욱이 매우 단단한 세포 벽이 존재하는 야생종 미세조류의 세포핵에 단백질을 전달하기 위해서는 매우 높은 전달효율을 지닌 시스템이 필요하다. Fig. 4에 나타난 바와 같이 디지털 전기천공 시스템을 이용해 GFP가 살아 있는 세포 핵에 성공적으로 전달됨을 확인하였다. 초록색 형광이 가장 밝게 빛나는 위치는 컵 모양의 엽록체에 싸여 있는 세포 핵의 위치와 일치한다. 또한 Chlorophyll 사진에서 보이는 선명한 모양과 강한 적색 엽록소 형광 신호로부터 단백질이 세포 핵에 전달 되었음에도 세포가 살아 있는 상태로 존재함을 알 수 있다.

3-4. 형광 단백질의 세포 내 전달 최적 조건 도출

형광 단백질 실험에도 세 가지 대조군 실험을 수행하여 Fig. 5에 나타난 것과 같은 결과를 확인하였다. NC 대조군의 상대적으로 낮은 세포 생존율로부터 실험에 사용된 세포의 상태가 이전 Yo-Pro-1 실험군 대비 상대적으로 좋은 있음을 확인 하였다. C-EP 그룹의 단백질 전달효율 1.4%로부터 자연 상태의 식물 세포가 낮은 확률이지만 외부 단백질을 세포 내로 받아들일 수 있음이 확인되었다. C-DNA 대조군 결과로부터 손상된 세포에서 발생하는 자가발광 수준은 형광 단백질 GFP에서 발생하는 형광과 구분됨을 확인하였다.

인가 전압의 증가에 따른 세포 생존율 변화 경향은 이전 Yo-Pro-1과 유사하게 감소 하는 경향을 나타냈으나 그 감소 폭이 훨씬 크게 나타나 192 V 조건에서는 세포 생존율이 20%로 매우 낮게 나타났다. 이는 상대적으로 크기가 매우 큰 단백질이 전달되는 과정에서 많은 수의 세포들이 파괴되어 나타난 결과로 추정된다. 인가 전압 증가에 따른 단백질 전달효율 역시 Yo-Pro-1과 유사한 경향을 나타내며 96 V에서 가장 높은 효율을 보였다. 특히 192 V에서는 48 V 조건에서의

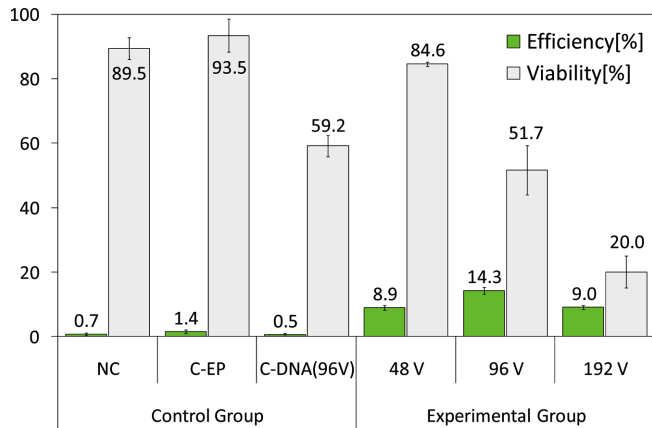


Fig. 5. GFP delivery efficiency and cell viability depending on applied voltages. C-EP represents the natural uptake of GFP into cells and C-DNA represents the autofluorescence due to the damage from electroporation.

결과와 거의 비슷한 수준의 단백질 전달 효율을 보여 앞선 가설을 뒷받침 하는 결과를 확인하였다. 즉, 너무 높은 전달 효율로 다수의 세포들이 전달되는 물질에 의해 파괴되는 영향으로 결과적으로 낮은 전달 효율을 보이게 됨을 본 결과를 통해 다시 한 번 확인하였다. 따라서 단백질 전달 역시 최적의 인가 전압이 존재함을 확인 하였다.

본 연구를 통해 세포벽이 존재하는 야생종 미세조류에 세포벽의 제거 없이 외부 단백질의 전달이 가능함을 확인하였다. 특히 디지털 전기천공 기술의 높은 전달 효율 덕분에 크기가 매우 큰 단백질임에도 전달 효율 14.3%의 비교적 높은 전달 효율을 보임으로써 향후 미세조류 내에 단백질 전달 시 디지털 전기천공 기술의 활용 가능성이 매우 큼을 확인하였다. 특히 실험에 사용된 단백질의 양은 기존 크리스퍼 유전자 가위에 사용한 양 대비 약 100분의 1 수준으로 상대적으로 적은 양을 사용했음에도 시스템의 뛰어난 전달 효율 덕분에 높은 단백질 전달효율 결과를 얻었다. 전달 물질의 크기에 따른 영향 분석을 위해 추가로 수행한 핵산 염색 형광 염료 Yo-Pro-1의 전달 특성 분석 결과, 크기에 따른 차이가 존재함에도 최적의 전달 효율을 나타내는 인가 전기장의 세기 조건은 매우 유사한 경향을 보였다. 이러한 유사성은 상대적으로 비용이 적게 들고 실험 결과의 확인 또한 용이한 Yo-Pro-1 염료의 전기천공 최적화 연구에의 활용 가능성이 높음을 시사한다. 하지만 Yo-Pro-1을 활용한 최적화 연구 시 적절한 Yo-Pro-1 농도를 해당 세포에 맞게 찾는 것이 반드시 필요하다. Yo-Pro-1의 농도가 너무 높으면 대부분의 세포들이 염료에 염색되어 유의미한 차이를 구분하기 어려워지고 또 농도가 너무 낮으면 전달 결과를 확인하기 어려워진다. 따라서 다루고자 하는 세포를 대상으로 최적의 Yo-Pro-1 농도를 결정하는 과정이 반드시 선행되어야 하며 본 연구에서 사용된 0.1 mmol/mL 농도는 실험적으로 결정된 농도이다.

미세조류 내 단백질 전달 연구 결과는 최근 새로운 유전자 편집 기술로 떠오르고 있는 크리스퍼 유전자 가위 기술의 적용에 있어 매우 중요한 단서를 제공해 줄 수 있다. 기존의 유전자 편집 기술은 유전적 변이를 만들고자 하는 대상 세포의 특정 유전 염기 서열을 선택적으로 정확히 편집하는 것이 거의 불가능 하였으며 대부분 수많은 시행착오적 실험들을 통해 원하는 형질의 세포를 확보할 때까지 실험을 반복해야만 했다. 하지만 크리스퍼 유전자 가위 기술은 이러

한 기존 한계를 극복하고 공학자가 원하는 위치의 특정 유전 정보를 편집할 수 있기 때문에 많은 연구자들이 최근 활발히 연구하고 있는 기술이다. 하지만 이러한 기능을 사용하기 위해서는 CAS9 단백질과 이 단백질이 특정 유전 염기서열에 작용하여 유전자를 끊도록 유도하는 가이드 RNA를 결합시킨 단백질 복합체를 세포의 유전 정보가 담긴 핵 내부로 안전하게 전달하는 것이 필수적이다. 하지만 일반적으로 이러한 단백질의 전달은 쉽게 이루어지지 않으며 앞서 언급된 어려움들 때문에 식물세포 특히 미세조류에서는 크리스퍼 유전자 가위 기술 적용이 쉽지 않았다[10].

최근 이러한 어려움을 극복하고 미세조류에서 크리스퍼 유전자 가위 기술을 적용한 결과가 보고 되었는데[10] 기존 크리스퍼 유전자 가위 기술 적용 대비 매우 과량의 단백질 복합체가 요구되는 등 아직 기술적으로 해결되어야 하는 문제들이 남아 있다. 과량의 단백질 복합체가 사용되어야 하는 이유 중 하나로 세포벽과 염색체의 존재 때문에 크기가 큰 단백질의 전달이 방해받아 효율적인 전달이 되지 못하기 때문인 것을 생각할 수 있다. 이 경우 본 연구에 사용된 디지털 전기천공 기술을 적용한다면 본 연구결과에서 확인한 것과 같이 높은 단백질 전달 효율을 바탕으로 보다 효율적인 전달이 가능할 것으로 기대된다. 하지만 단순히 단백질 전달 효율만의 문제로 보기에는 같이 사용되는 가이드 RNA의 손상 문제 등 보다 복합적인 문제들이 혼재되어 있을 수 있는 등 관련한 체계적인 분석 및 연구가 뒷받침 되어야 현재의 문제를 근본적으로 해결할 수 있을 것으로 판단된다.

현재 크리스퍼 유전자 가위 기술 적용을 위해서는 한 번 실험에 수십 만원에 이르는 시약이 사용되어야 하는데 디지털 전기천공 기술의 높은 전달효율과 미세유체 기술의 장점인 적은 시료의 사용으로 실험이 가능한 점 등을 활용한다면 보다 경제적이고 효율적인 적용이 가능할 것으로 기대된다. 또한 미세조류 형질전환에 크리스퍼 유전자 가위를 적용함에 있어 현재의 기술적 어려움 등을 극복하고 근본적인 원인 해결의 실마리를 찾는 데 본 연구결과가 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 향후 본 연구결과를 토대로 CAS9 단백질 전달 효율 및 가이드 RNA 손상 여부 등 관련한 추가적인 연구를 통해 크리스퍼 유전자 가위 기술을 활용한 미세조류 형질전환 기술을 보완, 완성하고자 한다.

4. 결 론

본 연구에서는 크리스퍼 유전자 가위 기술을 디지털 전기천공 기술에 접목하기 위한 사전 연구로 디지털 전기천공을 이용한 미세조류 내 단백질 전달 연구를 수행 하였다. 대표적인 미세조류 종인 *Chlamydomonas reinhardtii* 중 세포벽이 존재하는 야생종 cc-125에 적용한 결과, 살아 있는 세포의 핵 내부로 형광 단백질 GFP가 10% 이상의 비교적 높은 효율로 전달될 수 있음을 확인하였다. 특히 사용된 단백질의 양이 기존 크리스퍼 유전자 가위 기술에 사용되는 양 대비 100분의 1 수준의 낮은 양에서도 높은 단백질 전달 효율을 보인 것은 디지털 전기천공 기술의 뛰어난 외부 물질 전달 능력을 다시 한번 입증한 것으로 판단된다. 또한 인가 전기장의 크기 변화에 따른 단백질 전달 효율을 살펴봄으로써 최적의 단백질 전달 효율을 위한 전기천공 전기장 조건을 도출하였다(960 V/cm). 전달 물질의 크기에 따른 영향 분석을 위해 추가로 수행한 핵산 염색 형광 염료 Yo-Pro-1의 전달 특성 분석 결과, 크기에 따른 차이가 존재함에도 최

적의 전달 효율을 나타내는 인가 전기장의 세기 조건은 매우 유사한 경향을 보였다. 이러한 유사성은 상대적으로 비용이 적게 들고 실험 결과의 확인 또한 용이한 Yo-Pro-1 염료의 전기친공 최적화 연구에의 활용 가능성이 높음을 시사한다. 본 연구 결과는 크리스퍼 유전자 가위 기술의 미세조류 형질전환 적용에 있어 기존에 제기된 문제를 해결하는데 단초를 제공하는 기초 자료로 활용될 것으로 기대된다.

감 사

이 논문은 한국연구재단의 지원을 받아(NRF-2015R1D1A3A01019112) 수행되었습니다. 또한 산업통상자원부(MOTIE)와 한국에너지기술 평가원(KETEP)의 지원을 받아 수행한 연구 과제입니다(No. 20174010201460).

References

- Wijffels, R. H. and Barbosa, M. J., An "Outlook on Microalgal Biofuels," *Science* **329**, 796-799(2010).
- Pires, J. C. M., Alvim-Ferraz, M. C. M., Martins, F. G. and Simões, M., "CarboN Dioxide Capture From Flue Gases Using Microalgae: Engineering Aspects and Biorefinery Concept," *Renew. Sust. Energ. Rev.* **16**, 3043-3053 (2012).
- Guo, S. L., Zhao, X. Q., Tang, Y., Wan, C., Alam, M. A., Ho, S. H., Bai, F. W. and Chang, J. S., "Establishment of an Efficient Genetic Transformation System in *Scenedesmus Obliquus*," *J. Biotechnol.* **163**, 61-68(2013).
- Gimpel, J. A., Specht, E. A., Georgianna, D. R. and Mayfield, S. P., "Advances in Microalgae Engineering and Synthetic Biology Applications for Biofuel Production," *Curr. Opin. Chem. Biol.* **17**, 489-495(2013).
- Scranton, M. A., Ostrand, J. T., Fields, F. J. and Mayfield, S. P., "Chlamydomonas as a Model for Biofuels and Bio-products Production," *Plant J.* **82**, 523-531(2015).
- Specht, E. A., Miyake-Stoner, S. and Mayfield S. P., "Micro-algae Come of Age as a Platform for Recombinant Protein Production," *Biotech. Lett.* **32**, 1373-1383(2010).
- Jo, J., Shin, S., Jung, H., Min, B., Kim, S. and Kim, J., "Process Development for Production of Antioxidants from Lipid Extracted Microalgae Using Ultrasonic-assisted Extraction," *Korean Chem. Eng. Res.*, **55**(4), 542-547(2017).
- Shimogawara, K., Fujiwara, S., Grossman, A., Usuda, H., "High-Efficiency Transformation of *Chlamydomonas Reinhardtii* by Electroporation," *Genetics* **148**, 1821-1828(1998).
- Basiouni, S., Fuhrmann, H. and Schumann, J., "High-efficiency Transfection of Suspension Cell Lines," *Biotechniques* **3**, 1-4(2012).
- Shin, S.-E., Lim, J.-M., Koh, H. G., Kim, E. K., Kang, N. K., Jeon, S., Kwon, S., Shin, W.-S., Lee, B., Hwangbo, K., Kim, J., Ye, S. H., Yun, J.-Y., Seo, H., Oh, H.-M., Kim, K.-J., Kim, J.-S., Jeong, W.-J., Chang, Y. K. and Jeong, B.-R., "CRISPR/Cas9-induced Knockout and Knock-in Mutations in *Chlamydomonas Reinhardtii*," *Sci. Rep.-UK* **6**, 27810(2016).
- Im, D. J., "Next Generation Digital Microfluidic Technology: Electrophoresis of Charged Droplets," *Korean J. Chem. Eng.*, **32**, 1001-1008(2015).
- Im, D. J., "Charging of an Ionic Liquid Droplet in a Dielectric Medium," *Clean Technology* **20**, 354-358(2014).
- Im, D. J., Noh, J., Moon, D. and Kang, I. S., "Electrophoresis of a Charged Droplet in a Dielectric Liquid for Droplet Actuation," *Anal. Chem.*, **83**, 5168-5174(2011).
- Im, D. J., Ahn, M. M., Yoo, B. S., Moon, D., Lee, D. W. and Kang, I. S., "Discrete Electrostatic Charge Transfer by the Electrophoresis of a Charged Droplet in a Dielectric Liquid," *Langmuir* **28**, 11656-11661(2012).
- Im, D. J., Yoo, B. S., Ahn, M. M., Moon, D. and Kang, I. S., "Digital Electrophoresis of Charged Droplets," *Anal. Chem.*, **85**, 4038-4044(2013).
- Ahn, M. M., Im, D. J. and Kang, I. S., "Geometric Characterization of Optimal Electrode Designs for Improved Droplet Charging and Actuation," *Analyst* **138**, 7362-7368(2013).
- Lee, D. W., Im, D. J. and Kang, I. S., "Measurement of the Interfacial Tension in an Ionic Liquid-Dielectric Liquid System Using an Electrically Deformed Droplet," *J. Phys. Chem. C.*, **117**, 3426-3430(2013).
- Ahn, M. M., Im, D. J., Kim, J. G., Lee, D. W. and Kang, I. S., "Extraction of Cations from an Ionic Liquid Droplet in a Dielectric Liquid under Electric Field," *J. Phys. Chem. Lett.*, **5**, 3021-3025 (2014).
- Ahn, M. M., Im, D. J., Yoo, B. S. and Kang, I. S., "Characterization of Electrode Alignment for Optimal Droplet Charging and Actuation in Droplet-based Microfluidic System," *Electrophoresis* **36**, 2086-2093(2015).
- Choi, C. Y. and Im, D. J., "Contact Charging and Electrophoresis of a Glassy Carbon Microsphere," *Korean Chem. Eng. Res.*, **54**(4), 568-573(2016).
- Im, D. J., Jeong, S.-N., Yoo, B. S., Kim, B., Kim, D.-P., Jeong, W.-J. and Kang, I. S., "Digital Microfluidic Approach for Efficient Electroporation with High Productivity: Transgene Expression of Microalgae without Cell Wall Removal," *Anal. Chem.*, **87**, 6592-6599(2015).
- Wang, S. N. and Lee, L. J., "Micro-/nanofluidics Based Cell Electroporation," *Biomicrofluidics* **7**, 011301(2013).
- Jung, J. H. and Lee, C. S., "Droplet Based Microfluidic System," *Korean Chem. Eng. Res.*, **48**(5), 545-555(2010).
- Im, D. J. and Jeong, S.-N., "Transfection of Jurkat T Cells by Droplet Electroporation," *Biochem. Eng. J.*, **122**, 133-140(2017).
- Kurita, H., Takahashi, S., Asada, A., Matsuo, M., Kishikawa, K., Mizuno, A. and Numano, R., "Novel Parallelized Electroporation by Electrostatic Manipulation of a Water-in-Oil Droplet as a Micro-reactor," *PLOS ONE* **10**, e0144254(2015).