

전기천공시스템에서 Propidium Iodide와 Yo-Pro-1의 농도에 따른 세포 생존율과 전달효율 평가

배서준 · 임도진[†]

부경대학교 화학공학과
48513 부산광역시 남구 용소로 45
(2019년 8월 22일 접수, 2019년 9월 19일 수정본 접수, 2019년 9월 20일 채택)

Evaluation of Cell Viability and Delivery Efficiency in Electroporation System According to the Concentrations of Propidium Iodide and Yo-Pro-1

Seo Jun Bae and Do Jin Im[†]

Department of Chemical Engineering, Pukyong National University, 45, Yongso-ro, Nam-gu, Busan, 48513, Korea
(Received 22 August 2019; Received in revised form 19 September 2019; accepted 20 September 2019)

요 약

본 연구에서는 전기천공시스템에서 형광 염료를 사용한 세포 생존율 평가와 형광 염료를 전달 물질로 하여 세포 내 부로의 전달 효율 평가를 통해 세포의 생존율과 전달 물질의 전달 효율 평가에 사용하기 적합한 형광 염료의 선정 및 사용에 적절한 농도에 대한 가이드라인을 제시 할 수 있는 기초 연구를 수행하였다. 형광 염료로는 Propidium Iodide와 Yo-Pro-1을 사용하였다. Propidium Iodide과 Yo-Pro-1을 사용한 세포 생존율 평가와 전달 효율의 평가에서 각 형광 염료의 유세포 분석 히스토그램의 모양은 형광 염료의 종류와 사용한 농도에 따라 다른 것을 확인하였다. 이는 사용하는 형광 염료의 특성과 연관이 있는 것으로 이 결과를 통해 세포 분석에 사용하는 형광 염료의 특성에 따라 분석 결과가 달라지는 것을 알 수 있었다. 형광 염료 자체가 세포 생존율에 미치는 영향은 크지 않음을 확인하였다. 또한 두 종류 이상의 형광 염료를 사용하여 분석을 하는 경우 발생할 수 있는 형광 신호 간의 간섭 영향을 확인하였다. 간섭의 영향은 Yo-Pro-1의 농도가 높을수록 큰 것으로 확인되었으며 Propidium Iodide의 농도는 형광 신호의 간섭에 큰 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 본 연구를 통해 형광 염료의 종류와 농도에 따라 세포 생존율 평가와 전달 효율의 평가 결과가 영향을 받는 것을 확인했으며 이는 형광 염료의 특성과 연관이 있는 것으로 판단된다. 또한, 본 연구 결과를 토대로 세포 생존율 평가와 전달 효율 평가에 적절한 형광 염료의 선정과 사용에 적절한 농도를 제시하였다.

Abstract – In this study, basic research was conducted to provide guidelines for selecting fluorescent dye and using proper concentration of fluorescent dye to use evaluation of cell viability and fluorescent dye delivery efficiency. Propidium iodide and Yo-Pro-1 were used as fluorescent dyes. In the evaluation of cell viability and the efficiency of delivery using Propidium Iodide and Yo-Pro-1, the histogram of each fluorescent dye was different depending on the type of fluorescent dye and the concentration used. These results were related to the characteristics of the fluorescent dyes used. This was related to the properties of the fluorescent dyes used. From these results, it was found that the analytical results depending on the characteristics of the fluorescent dyes used in the cell analysis. The effect of the fluorescent dye on the cell was confirmed, but it was confirmed that it did not affect the analysis result. In addition, the influence of interference between fluorescent signals was confirmed when two or more kinds of fluorescent dyes were used for analysis. The higher the concentration of Yo-Pro-1 was, the larger the effect of interference was, and the concentration of Propidium Iodide did not affect the interference of fluorescence signal. This study confirmed that the evaluation of the cell viability and the evaluation of the delivery efficiency were influenced by the type and concentration of the fluorescent dyes and it was related to the characteristics of the fluorescent dyes. Based on the results, appropriate concentrations of fluorescent dyes suitable for evaluation of cell viability and delivery efficiency were suggested.

Key words: Fluorescent dye, Propidium Iodide, Yo-Pro-1, Cell viability, Delivery efficiency, Electroporation

[†]To whom correspondence should be addressed.

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

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.

1. 서 론

일반적으로 임피던스 세포 측정법, 세포 이동분석 등의 물리적인 방법을 이용한 분석 방법과 유세포 분석, 라만 분광법 등의 화학적인 방법을 이용한 분석 방법 등 다양한 방법으로 세포 분석이 이루어지고 있다[1]. 최근에는 형광 염료를 사용하여 세포를 분석하고 있다. 이 방법은 형광을 나타내지 않는 분자 등을 보기 위하여 형광 물질을 첨가하여 형광 신호를 얻는 방법이다. 이런 형광 염료를 이용하면 원하는 분자의 위치와 정량 정보를 연구자에게 제공할 수 있다. 형광 염료는 형광 현미경으로 관찰 할 때 단일 분자를 확인할 수 있을 정도의 감도를 제공한다. 그러므로 각각의 세포에 대한 분석이 가능하다. 분자생물학에서 형광 염료를 사용한 분석이 가지는 가장 큰 잠재력은 다양한 형광 염료를 사용하여 생물 분자의 특성을 확인 할 수 있는 센서로 사용이 가능하다는 점이다[2]. 이러한 형광 염료의 장점으로는 항체 또는 핵산의 결합 부분과 특이적으로 결합하여 세포 내부의 표적 분자를 선택적으로 검출 할 수 있으며, 여러 종류의 형광 염료를 사용하여 단일 분석에서 여러 표적을 다중으로 검출 할 수 있다는 장점이 있다. 그리고 분석 결과가 실시간으로 수집되기 때문에 분석 결과의 시각화가 가능하다[3]. 세포 분석에 사용되는 형광 염료의 종류는 분석 목적에 따라 다양하게 사용되고 있으며 Propidium Iodide, Yo-Pro-1, PicoGreen, YO-YO-1, SYBR-14 등이 있다[4-14].

Propidium Iodide는 세포 생존 능력평가와 세포 주기 분석에 주로 사용되며 Excitation / Emission (Ex/Em)은 535/617 nm이다[7]. Yo-Pro-1은 주로 세포의 자가 사멸을 분석하는 용도로 사용되며 Ex/Em은 491/509 nm이다[8]. 세포 분석에 사용되는 Propidium Iodide와 Yo-Pro-1은 널리 사용되는 형광 염료이므로 적절 농도를 선택할 때 많은 자료를 참고할 수 있다. 하지만 Propidium iodide는 분석하고자 하는 목적과 사용하는 경우에 따라 500 nM~20 mM의 다양한 농도 범위에서 사용되고 있다. 그렇기 때문에 세포 분석을 위한 Propidium Iodide의 적절 농도의 범위를 제시하기에는 어려움이 있다[10-14]. 보편적으로 Propidium Iodide는 세포 생존율 및 세포 주기 분석을 위해 사용하며, Yo-Pro-1은 세포 자가 사멸 분석을 위해 사용된다. 하지만 보편적으로 사용하는 목적이 아닌 다른 목적으로 분석에 사용할 경우에 대하여 알려진 정보가 부족하다. 보편적으로 사용하는 목적이 아닌 다른 목적으로 분석에 사용하는 예시로는 형광 염료를 전달 물질로 사용하여 형질전환을 연구하는 것이다. 이런 형질전환 연구에서 형광 염료는 전달 물질의 전달 여부를 확인하는 지표로 사용된다. 형광 염료를 사용한 세포 분석은 형광 신호를 사용하여 분석을 한다. 이런 형광 염료를 세포 내부로의 전달 물질로 사용하면, 형질전환 연구에서 전달 물질의 전달 효율을 정량적으로 분석 할 수 있다. 본 연구에서 사용된 Yo-Pro-1의 형광은 세포 내부의 DNA 또는 RNA와 같은 핵산과 결합하여 초록색 형광을 나타낸다. 이 초록색 형광은 공초점 현미경으로 전달 여부를 확인 할 때, 세포의 Chlorophyll의 붉은색 형광과 구분이 용이하므로 전달 물질로 사용하였으며, Propidium Iodide는 선행된 연구에서 세포 생존율 평가를 위한 형광 염료로 사용되었으나 전달 물질로 사용할 경우 Yo-Pro-1과의 비교를 위해 사용하였다. 하지만 형광 염료를 사용하여 전달 효율을 평가하는 것과 같이 보편적으로 사용되는 목적이 아닌 다른 목적으로 형광 염료를 사용하는 경우에는 목적에 맞는 형광 염료의 종류와 적절한 농도에 대한 정보가 부

족하다[15-17].

따라서 본 연구에서는 전기천공시스템에서 형광 염료를 사용한 세포 생존율과 형광 염료를 전달 물질로 하여 세포 내부로의 전달 효율의 평가를 통해 분석에 사용 적합한 형광 염료의 선정 및 적절한 농도에 대한 가이드라인을 제시 할 수 있는 연구를 수행하였다. 형광 염료는 세포 생존능력 평가에 주로 사용되는 Propidium Iodide와 세포의 자가 사멸을 분석하는 용도로 주로 사용되는 Yo-Pro-1을 사용하였다. 다른 형광 염료를 동일한 농도로 사용하여 세포 생존율과 전달 효율을 비교하여 세포 생존율과 전달 효율의 평가에서 형광 염료의 차이를 살펴보았다. 형광 염료의 농도를 달리 하여 세포 생존율과 전달 효율 평가를 비교하여 세포 분석 시 형광 염료의 농도가 세포 분석에 미치는 영향에 대해 살펴보았다. 또한 형광 염료가 세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 형광 염료 농도와 염색 시간에 따른 세포의 생존율을 비교하였다. 마지막으로 형광을 이용하여 세포 분석을 하는 방법이므로 형광 염료 간의 간섭 여부가 분석 결과에 어떠한 영향을 미치는지 살펴보았다.

2. 실 험

2-1. 실험 장치

액적 접촉 충전 현상[18-27] 기반 디지털 전기천공 시스템[28-31]의 개략도는 Fig. 1에 나타난 바와 같다. 디지털 전기천공 칩은 2.54 mm의 핀 헤더 소켓을 5개 연결하여 하단 전극부분을 만들었다. 만들어진 하단 전극부분은 외부에 PDMS (Polydimethylsiloxane)로 케이스를 만들어 미네랄 오일을 채울 수 있도록 하였다. 디지털 전기천공 칩은 상단에 전기천공용 전극(EP needle)을 사용한다. 전기천공용 전극의 표면은 소수성이 요구되므로 시판되는 초소수성 코팅제 스프레이를(Never Wet multipurpose kit, RUST-OLEUM) 이용하여 코팅하였다. 전기천공용 전극과 하단 전극은 전원공급장치(Keithly 2450)와 릴레이 스위치에 연결된다. 전원공급장치는 세포 액적에 가해지는 전압을 조절하고, 전류를 흘려준다. 스위치를 켜고 끄는 역할을 하는 릴레이 스위치를 이용하여 전기 펄스의 횟수와 인가 시간을 조절 하였다. 자세한 펄스 조건은 결과부분에서 다룰 것이다.

기본적으로 디지털 전기천공은 미네랄 오일이 담긴 디지털 전기천공 칩에 Cell/DNA 혼합물의 액적을 넣어 실험한다. Cell/DNA 액적은 상단의 전기천공용 전극과 하단의 전극 부분 사이에 놓인다. 이때, Cell/DNA 액적은 2.5 μ l를 사용하며 전극 사이에 1 mm가 되도록 놓이게 된다. 하지만 이번 연구에서는 Cell/DNA의 혼합물이 아닌 Cell/Fluorescent dye의 혼합물을 사용하여 실험을 진행하였다. 기존 디지털 전기천공실험의 분석은 전기천공이 끝난 Cell/DNA 혼합 액적은 회수 후, 13,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 미네랄 오일을 제거한다. 미네랄 오일을 제거한 Cell/DNA 혼합 액적은 1 ml의 TAP 배양액에서 24시간 배양 후 FACS 분석을 하였다. 이번 디지털 전기천공 실험에서 분석은 전기천공이 끝난 Cell/Fluorescent dye의 혼합 액적 또는 Cell의 액적을 회수 후, 13,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 미네랄 오일을 제거하였다. 미네랄 오일을 제거한 Cell/Fluorescent dye 또는 Cell의 액적에 500 μ l의 TAP 배양액을 사용하여 액적을 풀어준 후 FACS 분석을 하였다. 이번 전기천공실험의 분석은 TAP 배양액에서 24시간의 배양 시간을 거치지 않고 분석을 진행하였다는 점이 기존의 디지털 전기천공실험 후 분석과

결과는 Fig. 2의 아래쪽 히스토그램에서 나타난 바와 기준선을 중심으로 좌, 우에 뚜렷하게 피크가 구분된다.

3. 결과 및 고찰

3-1. Propidium Iodide와 Yo-Pro-1을 동일한 농도로 사용하여 세포 생존율과 전달 효율 평가 비교

세포 생존율 평가 실험과 전달 효율 평가 실험 모두 형광 염료를 사용한다는 공통점을 가지고 있으나 전기천공에 사용되는 액적의 구성과 분석 시 추가적인 염색의 여부에 차이가 있다. 세포 생존율 평가 실험은 형광 염료 없이 세포만으로 이루어진 액적에 전기천공을 하고, FACS분석을 하기 전 형광 염료로 염색을 하여 세포의 생존율을 평가하는 것을 목적으로 실험하였다. 전달 효율 평가 실험은 형광 염료를 전달 물질로 한 Cell/Fluorescent dye 혼합 액적을 세포 내부로 전달하기 위해 디지털 전기천공시스템을 수행하고, FACS 분석을 통해 확인된 세포 내부에서 전달 물질로 사용한 형광 염료의 신호를 이용하여 전달 효율을 평가하였다. 세포 생존율 평가 실험과 달리 전달 효율 평가 실험에서는 전달 물질로 사용된 형광 염료의 신호만을 확인하기 위해 FACS 분석 시에는 추가적인 형광 염료의 염색 없이 실험을 진행하였다. Fig. 3 상단의 2개 히스토그램은 동일한 농도의 Propidium Iodide와 Yo-Pro-1을 사용하여 세포의 생존율을 평가한 결과이며 Fig. 3 하단의 2개 히스토그램은 동일한 농도의 Propidium Iodide와 Yo-Pro-1을 전달 물질로 사용하여 전달 효율을 평가한 결과이다.

전기천공시스템에서 동일한 농도(0.1 mM)의 Propidium iodide와

Yo-Pro-1을 사용하여 세포 생존율 평가를 하였다. 세포 생존율 평가에서 전기천공은 96 V의 전압을 50 ms씩 8회에 나누어 가하였다. 형광 염료의 염색은 FACS 분석 5~10분 전 0.1 mM 농도의 형광 염료를 첨가하여 염색하는 방법으로 실험을 진행하였다. Fig. 3의 세포 생존율 평가 결과에서 나타난 바와 같이 사용한 형광 염료의 종류에 따라 히스토그램의 모양이 다른 것을 확인 할 수 있었다. 두 형광 염료를 동일한 농도로 사용하여 세포 생존율을 평가한 결과의 히스토그램에서 가장 뚜렷하게 확인되는 차이는 히스토그램의 위치였다. Propidium Iodide를 사용하여 세포 생존율 평가 결과 히스토그램은 분석의 기준이 되는 10^2 의 좌측에서 비교적 큰 크기의 히스토그램 피크를 확인할 수 있었으며, 기준의 우측에서는 비교적 작은 크기의 히스토그램 피크가 확인되었다. 반면, Yo-Pro-1을 사용하여 세포 생존율을 평가한 결과 히스토그램은 기준이 되는 10^2 의 우측에 대부분의 집단이 분포하는 것을 히스토그램의 피크와 크기를 통해 확인 할 수 있었다. 세포 생존율 평가에서는 기준이 되는 10^2 의 좌측의 분포를 생존한 세포로 평가한다. 따라서, Fig. 3의 세포 생존율 평가 히스토그램을 통해 동일한 농도의 Propidium Iodide와 Yo-Pro-1을 사용하여 세포 생존율을 평가하면 Yo-Pro-1을 사용하였을 때 세포 생존율이 낮게 평가되는 것을 확인 할 수 있었다.

전기천공시스템에서 동일한 농도(0.1 mM)의 Propidium Iodide와 Yo-Pro-1을 전달 물질로 사용하여 전달 효율 평가를 하였다. 전달 효율 평가에서 전기천공은 96 V의 전압을 50 ms씩 8회에 나누어 가하였다. 전달 효율 평가 실험에서 두 형광 염료를 사용한 실험 결과의 가장 큰 차이점은 히스토그램의 모양과 위치이다. Propidium Iodide를 사용하여 전달 효율을 평가한 히스토그램은 기준인 10^2 의

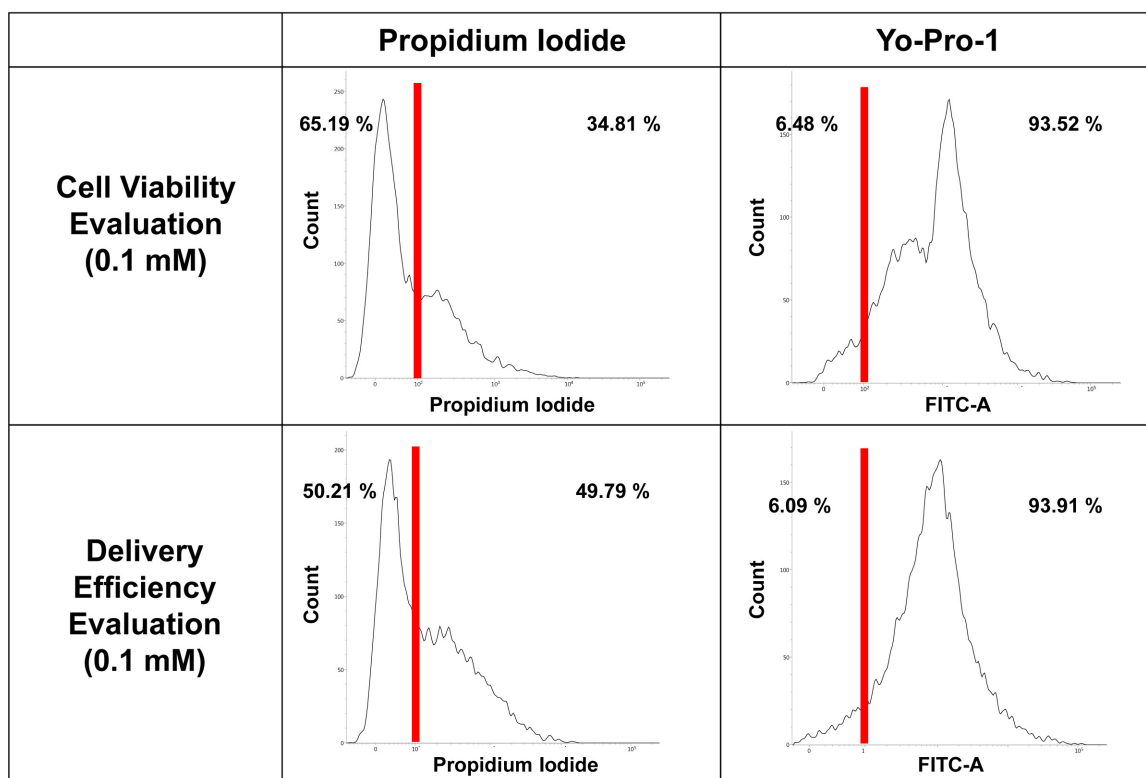


Fig. 3. Histogram of cell viability and delivery efficiency evaluation using Propidium Iodide and Yo-Pro-1 at the same concentration. Histogram at the top was the histogram that performed the cell viability evaluation, and the histogram at the bottom was the histogram that performed the delivery efficiency evaluation. In both evaluations, the reference for the intensity of the fluorescent signal was 10^2 .

좌측에 큰 피크가 위치하며 10^2 의 우측에는 작은 피크가 있는 것을 확인할 수 있었다. 반면, Yo-Pro-1을 사용하여 전달 효율을 평가한 히스토그램에서는 하나의 피크가 기준인 10^2 의 우측에 위치하는 것을 확인할 수 있었다. 전달 효율 평가 실험에서는 기준점인 10^2 의 우측에 위치하는 분포를 전달이 이루어진 것으로 평가한다. 따라서, 동일한 농도를 사용하여 전달 효율을 평가하는 실험에서 Propidium iodide를 사용하면 Yo-Pro-1을 사용하는 경우보다 전달 효율이 낮게 평가되는 것을 의미한다. 즉, 동일한 전기천공조건에서 실험을 진행한 샘플에 대해 세포 생존율과 전달 효율을 평가할 때 동일한 농도의 형광 염료를 사용하더라도 형광 염료의 종류에 따라 평가 결과가 달라 질 수 있음을 확인하였다. 동일한 농도를 사용했을 때 Propidium iodide보다는 Yo-Pro-1이 보다 잘 전달되고 형광 신호도 강하게 나타남을 확인하였다.

3-2. Propidium Iodide와 Yo-Pro-1의 농도에 따른 세포 생존율과 전달효율 평가 비교

전기천공시스템에서 형광 염료의 농도에 따른 세포 생존율과 전달 효율을 비교하였다. 형광 염료는 0.01~1.0 mM의 범위를 사용해 실험을 수행하였다. Fig. 4의 위쪽 히스토그램이 Propidium Iodide와 Yo-Pro-1의 농도에 따른 세포 생존율을 평가한 결과들이다. 각 결과에서 가장 위쪽에 위치하는 히스토그램이 0.01 mM 농도의 히스토그램이며 아래쪽으로 내려갈수록 형광 염료의 농도가 증가하였을 때의 히스토그램이다. Fig. 4의 좌측 상단 위치한 결과에서 나타난 바와 같이 Propidium Iodide의 농도가 높아질수록 히스토그램의 피크가 우측으로 이동하는 것을 확인할 수 있었으며 이는 세포

생존율 평가에 사용된 Propidium Iodide의 농도가 증가할수록 세포 생존율이 낮게 평가되는 것을 의미한다. Fig. 4의 우측 상단에 위치한 Yo-Pro-1을 사용한 세포 생존율 평가 결과에서는 0.01~1.0 mM의 범위에 해당하는 평가 결과 히스토그램의 피크가 모두 기준인 10^2 의 우측에 위치하는 것을 확인할 수 있었다. Yo-Pro-1을 이용한 실험 결과도 Propidium Iodide와 마찬가지로 세포 생존율 평가에 사용된 형광 염료의 농도가 높아질수록 히스토그램의 피크가 우측으로 이동하는 것을 확인할 수 있었으며 이는 평가에 사용된 Yo-Pro-1의 농도가 증가할수록 세포 생존율이 낮게 평가되는 것을 의미한다. 구체적으로 Propidium Iodide를 사용하여 평가한 결과 0.01 mM에서는 세포 생존율이 96%로 평가되었으며 0.1~0.3 mM에서는 세포 생존율이 65~67%로 평가되었고 0.5~1.0 mM에서는 35% 미만으로 평가되었다. Yo-Pro-1을 사용한 평가 결과 0.01~1.0 mM의 범위에서 세포 생존율은 30% 미만인 것으로 평가되었다. 선행된 연구에서 동일한 전기천공조건에서 실험한 결과 세포 생존율이 55~60%임을 고려하면[16] Propidium Iodide를 세포 생존율 평가에 사용하기 위해서는 0.1~0.3 mM의 농도 범위를 사용하는 것이 적절할 것으로 판단되며, Yo-Pro-1은 0.01 mM보다 낮은 농도를 사용하는 것이 적절할 것으로 판단된다.

Fig. 4의 아래쪽 히스토그램이 Propidium Iodide와 Yo-Pro-1을 전달 물질로 하였을 때 전달 효율 평가의 결과이다. 각 결과의 가장 위쪽 히스토그램이 0.01 mM을 사용한 결과이며 아래쪽으로 내려갈수록 사용한 형광 염료의 농도가 높은 결과이다. Fig. 4의 전달 효율 평가 결과에서 나타난 바와 같이 Propidium iodide를 사용하여 전달 효율을 평가한 실험 결과 세포 생존율 평가 실험과 마찬가지로

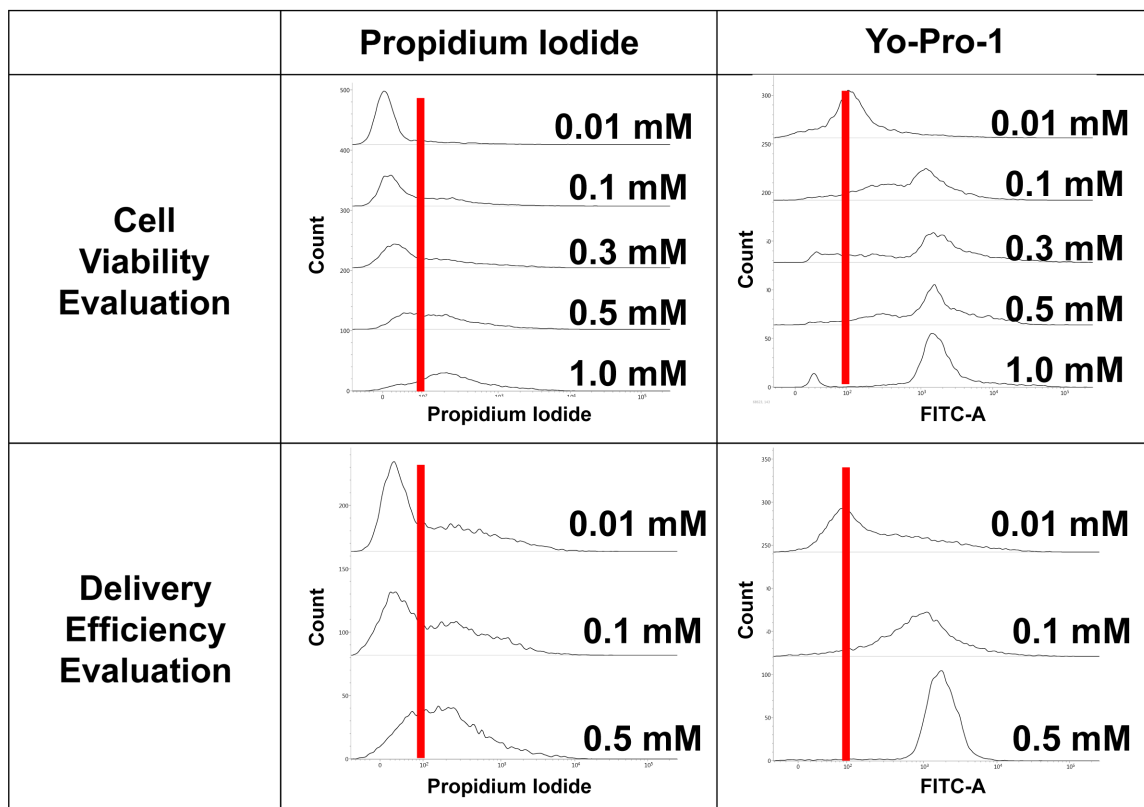


Fig. 4. Comparison of cell viability and delivery efficiency evaluation according to the concentration of Propidium Iodide and Yo-Pro-1. The upper histogram was the result of the cell viability evaluation according to the concentration of the fluorescent dye and the lower histogram was the result of the delivery efficiency evaluation according to the concentration of the fluorescent dye.

지로 사용한 형광 염료의 농도가 증가할수록 히스토그램의 피크가 우측으로 이동하는 것을 확인 할 수 있었다. 0.1 mM까지의 농도 범위에서는 히스토그램의 피크가 기준의 좌측에 위치하였으나 해당 농도보다 높은 농도를 사용하는 경우에는 히스토그램의 피크가 기준의 우측에 위치하는 것을 확인할 수 있었다. Fig. 4의 Yo-Pro-1을 사용한 전달 효율 평가 결과는 Propidium Iodide를 사용한 전달 효율 평가 결과와 마찬가지로 사용한 형광 염료의 농도가 증가할수록 히스토그램의 피크가 기준인 10^2 의 우측으로 이동하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 동일한 조건에서 전기천공실험을 진행하더라도 사용하는 형광 염료의 종류와 농도에 따라서 세포 생존율과 전달 효율의 평가 결과가 달라 질 수 있는 것을 확인하였다. 선행된 연구에서 Yo-Pro-1의 전달 효율은 0.1 mM에서 최적인 것으로 확인되었다. 그러므로 Propidium Iodide를 사용한 전달 효율의 평가에서는 0.1~0.5 mM의 농도 범위를 사용하여 평가를 하는 것이 적절하다 판단되며, Yo-Pro-1을 사용한 전달 효율 평가에서는 0.01~0.1 mM의 농도 범위를 사용하는 것이 전달 효율 평가에 적절하다 판단된다.

3-3. Propidium Iodide와 Yo-Pro-1의 농도가 세포에 미치는 영향 비교

앞선 실험에서 형광 염료의 농도에 따라 세포 생존율 평가 결과 히스토그램이 다른 것을 확인하였다. Propidium Iodide와 Yo-Pro-1의 농도와 염색 시간이 세포에 미치는 영향을 비교하기 위하여 전기천공을 하지 않은 세포에 형광 염료를 0.1~1.0 mM의 농도로 첨가하여 염색을 하여 실험을 진행하였다. 세포 생존을 확인을 위해 광학 현미경을 사용하였으며, Trypan blue로 추가적인 염색을 하여 염색 된 세포의 수를 세는 것으로 세포의 생존율을 확인하였다. 염

색 시간에 따른 세포 생존율의 비교를 위해 형광 염료와 Trypan blue의 염색 후 0~18시간이 경과된 세포의 생존율을 확인하는 방법으로 실험을 진행하였다. Fig. 5의 결과는 각 형광 염료로 염색 후 18시간이 경과된 세포의 생존율을 형광 염료의 농도에 따라 확인한 결과이다.

Fig. 5의 결과에서 확인할 수 있는 것과 같이 18시간이 경과된 세포에서 농도가 높아질수록 Trypan blue로 염색되어 푸른 빛을 띄는 세포가 증가하였다. 하지만 0.1 mM의 농도에서는 Trypan blue로 염색된 세포가 없었다. 이를 통해 형광 염료로 염색 후 18시간이 경과하더라도 0.1 mM까지의 농도 범위를 사용하면 형광 염료 자체가 세포의 생존율에 큰 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있다. 반면에, 1.0 mM의 형광 염료를 사용하여 염색한 경우에는 Trypan blue로 염색된 세포를 확인할 수 있었다. 형광 염료의 종류에 따라 비교를 하면 Propidium Iodide보다 Yo-Pro-1을 사용하여 염색을 한 세포에서 18시간이 지난 후 Trypan blue로 염색된 세포의 수가 더 많았다. 형광 염료의 염색 시간에 따른 결과로는 0~5시간까지의 실험 결과에서 Trypan blue로 염색된 세포를 확인할 수 없었으며 이 결과를 통해 5시간까지는 형광 염료가 세포의 생존율에 영향을 미치지 않는다고 판단할 수 있다. 일반적으로 형광 염료를 사용하여 염색 후 5시간 이내에 분석이 이루어지는 것을 고려하면 형광 염료를 사용하여 세포 생존율을 평가하는 실험에서 형광 염료가 세포의 생존율에 미치는 영향은 고려하지 않아도 될 것으로 판단된다.

3-4. Fluorescent dye의 간섭 영향

두 종류 이상의 형광 염료를 사용하여 분석을 하는 경우에는 각각의 형광 염료에서 확인 되는 신호가 서로 간섭을 일으킬 수 있다. FACS 4분면 점도표를 사용하여 Propidium Iodide와 Yo-Pro-1의 농

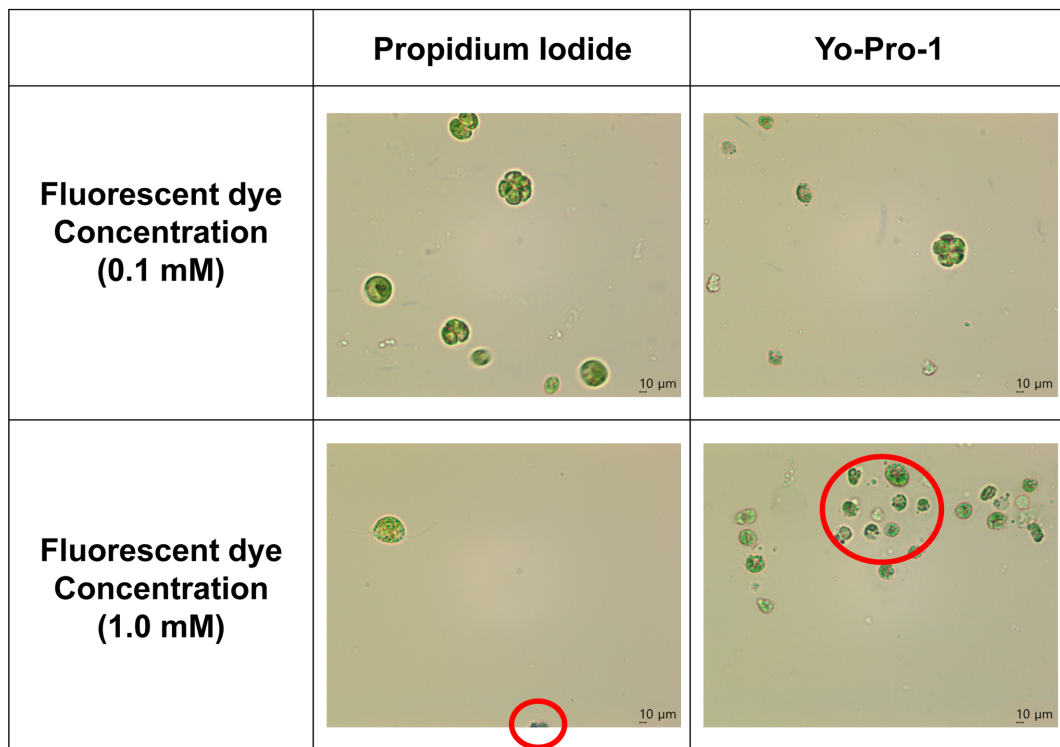


Fig. 5. The effects of fluorescent dyes on the cell viability after 18 hours of dyeing. The top image was 0.1 mM and the bottom image was 1.0 mM. The distinct green oval was a cell, and it was a living cell that maintains its shape. Blue stained cells were dead cells.

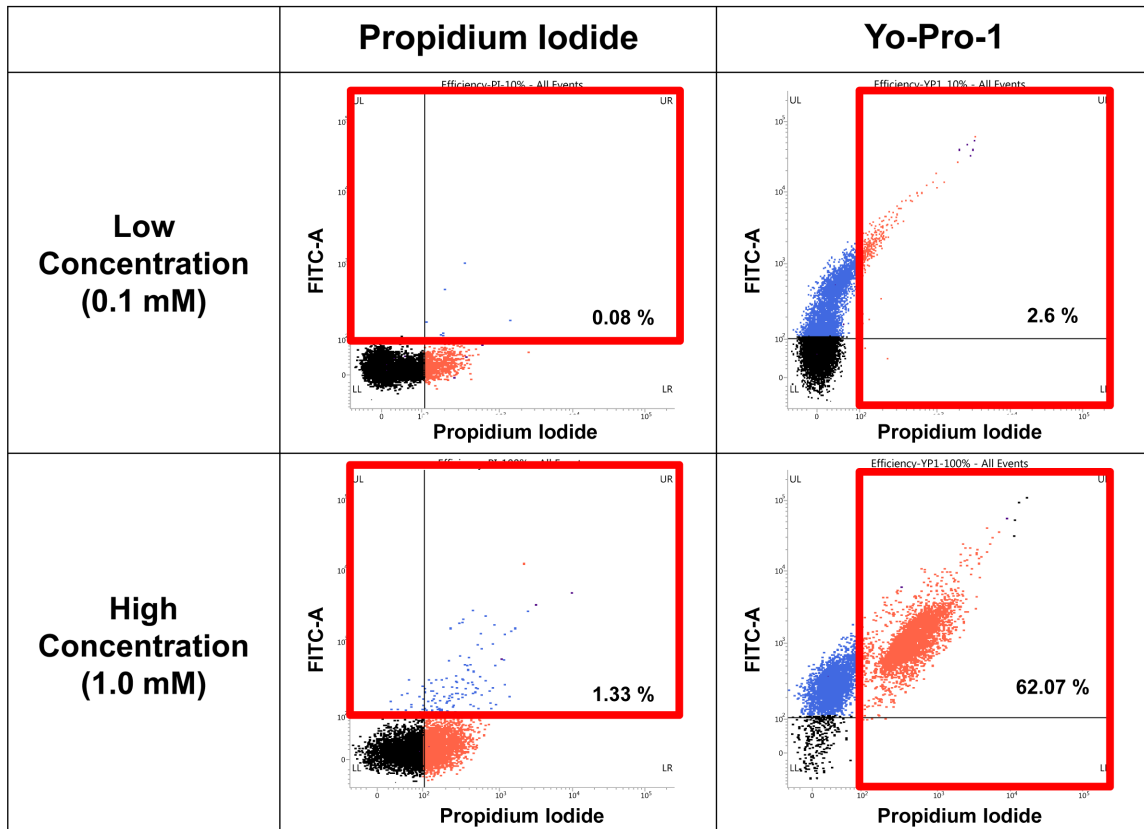


Fig. 6. The results using fluorescent dye with low concentration (0.1 mM) and with high concentration (1.0 mM). The red box portion was where the fluorescent dye interference with the signal of the other fluorescent dye.

도에 따라서 형광 염료 간의 간섭 영향을 비교하였다. Fig. 6의 좌측 점도표는 Propidium Iodide의 농도에 따라서 Propidium Iodide의 형광 신호가 Yo-Pro-1의 형광 신호에 미치는 영향에 대한 결과이다. Fig. 6의 우측 점도표는 Yo-Pro-1의 농도에 따라서 Yo-Pro-1의 형광 신호가 Propidium Iodide의 형광 신호에 미치는 영향에 대한 결과이다. 빨간색 박스 부분이 간섭이 일어나 다른 형광 필터에서 신호가 감지된 것을 의미한다. Fig. 6의 좌측 점도표의 빨간색 박스에서 확인 할 수 있는 것과 같이 Propidium Iodide의 농도에 따른 Yo-Pro-1의 형광 신호에 간섭 영향은 없는 것으로 확인되었다. 하지만 Fig. 6의 우측 점도표의 빨간색 박스에 나타난 바와 같이 Yo-Pro-1을 사용한 결과에서는 0.1 mM과 1.0 mM에서 모두 Propidium Iodide의 형광 신호에 간섭 영향이 발생하였다. 488 nm의 파장을 갖는 레이저를 사용하였을 때 Propidium Iodide의 방출 파장 영역은 550 nm에서 725 nm이며 Yo-Pro-1의 방출 파장 영역은 480 nm에서 650 nm이다. 두 형광 염료의 방출 파장은 550 nm에서 650 nm의 범위에서 겹치는 영역이 있으며 이 영역에서 형광 신호 간의 간섭이 발생한다. 이러한 형광 신호 간의 간섭은 두 가지 형광 염료를 동시에 사용하여 서로 다른 목적의 분석을 진행할 때 분석 결과에 영향을 미치게 된다. 따라서, Yo-Pro-1과 Propidium Iodide를 동시에 사용하여 분석을 하기 위해서는 Yo-Pro-1의 농도에 따른 Propidium Iodide와 간섭을 고려하여 높은 농도(1.0 mM)의 Yo-Pro-1 보다는 낮은 농도(0.1 mM)의 Yo-Pro-1을 사용하는 것이 더 적절하다고 판단된다.

Propidium Iodide와 Yo-Pro-1을 이용한 세포 생존율 평가와 전달 효율 평가에서 동일한 농도를 사용하더라도 형광 염료의 종류에 따

라 히스토그램의 위치와 모양이 다른 것을 확인하였다. 형광 염료의 농도에 따른 세포 생존율 평가와 전달 효율 평가에서 형광 염료의 농도가 증가할수록 세포 생존율과 전달 효율의 평가 히스토그램이 기준의 우측으로 이동하는 것을 확인하였다. Propidium Iodide는 두 가지 분석에서 0.01~0.3 mM의 범위에서는 유사한 모양의 히스토그램을 보였으나 1.0 mM에서는 히스토그램의 피크가 기준의 우측으로 이동하는 것을 확인 할 수 있었다. 반면 Yo-Pro-1은 두 가지 분석에서 모두 0.3 mM이상의 농도에서 히스토그램의 피크가 기준의 우측으로 이동하는 것을 확인하였다. 이를 통해 형광 염료의 종류에 따라 분석에 사용하기 적절한 농도 범위가 다르다는 것을 알 수 있었다. Propidium Iodide와 Yo-Pro-1을 함께 사용하여 세포 분석을 하는 경우에는 형광 염료간의 간섭 현상을 고려해야 한다. Propidium Iodide는 농도에 따른 Yo-Pro-1의 형광 신호에 간섭하는 영향이 없지만 Yo-Pro-1은 농도에 따른 Propidium Iodide의 형광 신호에 간섭이 발생하므로 Yo-Pro-1과 Propidium Iodide를 함께 사용하는 경우에는 Yo-Pro-1의 간섭 영향을 고려하여 Yo-Pro-1의 농도를 선정해야 한다.

4. 결 론

본 연구에서는 디지털 전기천공시스템에서 형광 염료를 사용한 세포 생존율과 전달 효율 평가 실험을 통해 세포 생존율 평가와 전달 효율의 평가에 적합한 형광 염료의 선정과 적정 농도를 제시하고자 기초 연구를 수행하였다. 여러 형광 염료 중 본 연구에서는

Propidium Iodide와 Yo-Pro-1을 사용하여 형광 염료의 종류와 농도에 따른 세포 생존율과 전달 효율의 평가를 비교하였다. 고전압의 전기천공을 수행하는 도중 Cell/Fluorescent dye 혼합 액적 내의 pH 변화가 다소 발생 할 수는 있으나 이 pH의 변화가 형광 염료의 발광에 영향을 미칠 정도가 아니므로 전기천공 후의 혼합 액적의 pH변화는 고려하지 않아도 된다[32]. 동일 농도에서 세포 생존율과 전달 효율 분석 결과, 두 염료는 서로 다른 히스토그램 특성을 보임을 확인하였으며 이는 두 염료의 특성 차이에 기인한 것으로 판단된다. 또한 농도 변화에 따른 히스토그램 특성 분석을 통해 각 염료의 목적에 따른 최적 농도를 찾았다. 세포 생존율 평가에 사용하기에는 Propidium Iodide가 보다 적합하며 사용에 적절한 농도는 0.1~0.3 mM 범위이다. 전달 효율 평가에 사용하기에는 Yo-Pro-1이 보다 적합하였으며 사용에 적절한 농도는 0.01~0.1 mM 범위였다. Propidium Iodide와 Yo-Pro-1을 사용한 세포 분석 결과 Yo-Pro-1이 상대적으로 Propidium Iodide 대비 형광 강도 및 전달 효율이 높아 더 낮은 농도에서 세포 분석을 수행하는 것이 적합함을 확인하였다. 세포 생존율 평가에 있어 형광 염료 자체가 세포 생존율에 미치는 영향에 대한 실험 결과 세포에 미치는 영향은 크지 않음을 확인하였다. 형광 염료 간의 간섭 영향을 확인한 실험 결과 Propidium Iodide의 농도는 Yo-Pro-1의 형광 신호에 영향을 주지 않았으나 Yo-Pro-1의 농도는 Propidium Iodide의 형광 신호에 영향을 주는 것을 확인하였다. 또한 이러한 형광 신호의 간섭은 Yo-Pro-1의 농도가 높을수록 이러한 간섭 영향은 커지는 것으로 확인되었다. 본 연구 결과는 형광 염료를 이용해 세포 분석을 하는 연구에 해당 목적에 적합한 형광염료의 선택과 농도 설정에 필요한 기초 자료로 활용될 것으로 기대된다.

감 사

이 논문은 부경대학교 자율창의학술연구비(2019년)의 지원을 받아 수행되었습니다.

References

- Murphy, T. W., Zhang, Q., Naler, L. B., Ma, S. and Lu, C., "Recent Advances in the Use of Microfluidic Technologies for Single Cell Analysis," *Analyst*, **143**, 60-80(2018).
- Ueno, T. and Nagano, T., "Fluorescent Probes for Sensing and Imaging," *Nat. Methods*, **8**(8), 642-645(2011).
- 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).
- Kim, S. G., Shin, D. K., Choe, J. Y., Lee, J. W., Suh, E. J. and Suh, H. S., "Quantitation of the Early Apoptotic Cells Using Flow Cytometry," *Korean J. Clin. Pathol.* **19**, 108-113(1999).
- Boens, N., Leen, V. and Dehaen, W., "Fluorescent Indicators Based on BODIPY," *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 1130-1172(2012).
- Qian, X., Xiao, Y., Xu, Y., Guo, X., Qian, J. and Zhu, W., "“Alive” Dyes as Fluorescent Sensors: Fluorophore, Mechanism, Receptor and Images in Living Cells," *Chem. Commun.*, **46**, 6418-6436(2010).
- Garenr, D. L. and Johnson, L. A., "Viability Assessment of Malaysian Sperm using SYBR-14 and Propidium Iodide," *Biol. Reprod.*, **53**, 276-284(1995).
- Marie, D., Vault, D. and Partensky, F., "Application of the Novel Nucleic Acid Dyes YOYO-1, YO-PRO-1, and PicoGreen for Flow Cytometric Analysis of Marine Prokaryotes," *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**(5), 1649-1655(1996).
- Sungyl, L., Florian, K., Tsung-Cheng, C., Anupama, S., Beibei, C., Sushama, S., Hongtao, Y., Yang, X. and Joshua, T. M., "Non-coding RNA NORAD Regulates Genomic Stability by Sequestering PUMILIO Proteins," *Cell* **164**, 69-80(2016).
- Stiefel, P., Schmidt-Emrich, S., Maniura-Weber, K. and Ren, Q., "Critical Aspects of Using Bacterial Cell Viability Assays with the Fluorophores SYTO9 and Propidium Iodide," *BMC Microbiol.*, **15**(36), (2015).
- Fujisawa, S., Romin, Y., Barlas, A., Petrovic, L. M., Turkecul, M., Fan, N., Garcia, A. R., Monette, S., Klimstra, D. S., Erinngeri, J. P., Solomon, S. B., Manova-Todorova, K. and Sofocleous, C. T., "Evaluation of YO-PRO-1 as An Early Marker of Apoptosis Following Radiofrequency Ablation of Colon Cancer Liver Metastases," *Biol. Reprod.*, **53**, 276-284(1995).
- Fried, J., Perez, A. G. and Clarkson, B. D., "Flow Cytofluorometric Analysis of Cell Cycle Distributions Using Propidium Iodide. Properties of the Method and Mathematical Analysis of the Data," *J. Cell Biol.*, **71**(1), 172-181(1976).
- Fieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D. and Barreda, D. R., "Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death," *J. Vis. Exp.*, **24**(50), (2011).
- Sadik, M. M., Li, J., Shan, J. W., Shreiber, D. I. and Lin, H., "Quantification of Propidium Iodide Delivery Using Millisecond Electric Pulses: Experiments," *Biochim. Biophys. Acta.*, **1828**(4), 1322-1328(2013).
- Wang, S. N. and Lee, L. J., "Micro-/nanofluidics Based Cell Electroporation," *Biomechanics*, **7**, 011301(2013).
- Kim, Y. H., Kwon, S. G., Bae, S. J., Park, S. J. and Im, D. J., "Optimization of the Droplet Electroporation Method for Wild Type *Chlamydomonas Reinhardtii* Transformation," *Bioelectrochemistry*, **126**, 29-37(2019).
- Kim, Y. H. and Im, D. J., "Control of the Culture Conditions of *Chlamydomonas Reinhardtii* for Efficient Delivery of Exogenous Materials in Electroporation," *Algal Res.* **35**, 288-394(2018).
- 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 Characteriza-

- tion of Optimal Electrode Designs for Improved Droplet Charging and Actuation,” *Analyst*, **138**, 7362-7368(2013).
24. 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).
25. 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).
26. 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).
27. 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).
28. 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).
29. 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 Microreactor,” *PLOS ONE* **10**, e0144254(2015).
30. Jung, J. H. and Lee, C. S., “Droplet Based Microfluidic System,” *Korean Chem. Eng. Res.*, **48**(5), 545-555(2010).
31. Im, D. J. and Jeong, S.-N., “Transfection of Jurkat T Cells by Droplet Electroporation,” *Biochem. Eng. J.*, **122**, 133-140(2017).
32. Saulis, G., Lape, R., Praneviciute, R. and Mickevicius, D., “Changes of the Solution pH Due to Exposure by High-voltage Electric Pulses,” *Bioelectrochemistry*, **67**, 101-108(2005).