

디지털 전기천공시스템에서 형광 염료로 표지 된 DNA 전달 효율의 정량화

배서준 · 임도진[†]

부경대학교 화학공학과
48547 부산광역시 남구 신선로 365
(2020년 3월 25일 접수, 2020년 4월 20일 수정본 접수, 2020년 4월 20일 채택)

Quantification of DNA Delivery Efficiency Labeled with Fluorescent Dye in Digital Electroporation System

Seo Jun Bae and Do Jin Im[†]

Department of Chemical Engineering, Pukyong National University, 365, Sinseon-ro, Nam-gu, Busan, 48547, Korea
(Received 25 March 2020; Received in revised form 20 April 2020; accepted 20 April 2020)

요 약

선행된 연구에서 Yo-Pro-1의 전달 효율의 경향과 CFP 유전자의 발현 효율의 경향이 큰 차이를 보였지만 이 문제에 대한 원인을 제시할 수 없었다. 따라서 본 연구에서는 형광 염료를 이용하여 DNA에 표지 후 전달 효율을 정량화함으로써 이 문제에 대한 원인을 찾고자 한다. 표지를 위한 형광 염료로 Yo-Pro-1을 사용하였으며, Yo-Pro-1과 표지 된 DNA의 전달 효율을 비교하였다. 전압 조건에 따른 전달효율 비교에서는 Yo-Pro-1과 Yo-Pro-1으로 표지 된 DNA의 전달 효율 모두 96 V에서 전달 효율이 최대가 되었으며 전압이 더 증가하면 전달 효율이 오히려 감소하는 경향을 보였다. 전압 인가 횟수 조건에 따른 전달 효율 비교에서는 Yo-Pro-1과 Yo-Pro-1으로 표지 된 DNA의 두 전달 물질 모두 8회의 전압 인가 횟수에서 전달 효율이 최대가 되었으며 전압 인가 횟수가 더 증가하면 전달 효율이 감소하는 경향을 보였다. 두 결과를 통해 디지털 전기천공시스템에서 Yo-Pro-1을 사용한 전달 효율 측정이 DNA의 전달 효율을 잘 대변하는 것을 확인하였다. 또한, 본 연구의 결과를 통해 선행된 연구에서 보인 Yo-Pro-1의 전달 효율의 경향과 CFP 유전자의 발현 효율의 경향 차이는 전달 물질의 전달 효율 차이에서 기인한 결과가 아닌 전달 된 유전 물질의 발현 과정에서 문제로 인한 결과임을 추론해 볼 수 있었다.

Abstract – In the previous study, there was a big difference between the tendency of the delivery efficiency of Yo-Pro-1 and the expression efficiency of the CFP gene, but there was a problem that could not provide a clue to this problem. Therefore, this study aimed to present a clue to this problem by quantifying and comparing the delivery efficiency after labeling DNA using a fluorescent dye, which was one of the methods for quantifying biomolecules. As a fluorescent dye for labeling, Yo-Pro-1 was used, and the delivery efficiency of the fluorescent dye Yo-Pro-1 and the labeled DNA was compared. The delivery efficiency of Yo-Pro-1 and labeled DNA according to the voltage condition of the digital electroporation system was maximized at 96 V, and the delivery efficiency tended to decrease as the voltage increased further. In the comparison of the delivery efficiency of Yo-Pro-1 and labeled DNA according to the number of voltage application conditions, the delivery efficiency was maximized at the number of 8 voltage application times for both delivery materials, and the delivery efficiency tended to decrease as the number of voltage application increases further. Through the two results, it was confirmed that the delivery efficiency using Yo-Pro-1 in the digital electroporation system represents the delivery efficiency of the system well. In addition, through the results of this study, the difference between the tendency of the delivery efficiency of Yo-Pro-1 and the expression efficiency of the CFP gene shown in the preceding study was not the result of the difference in the delivery efficiency of the delivery material, but it can be predicted to be due to a problem with the expression process of the genetic material that had been delivered.

Key words: Labeled DNA, Yo-Pro-1, Delivery efficiency, Electroporation system

[†]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. 서론

생명 과학 연구와 의학 분야의 연구에서 생체 분자를 정확하게 정량화하기 위해 많은 방법이 개발되었다. 일반적으로 겔 전기영동, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), 그리고 비색 분석 등의 방법을 사용하여 왔다. 이러한 방법은 생체 분자를 효율적으로 정량화 할 수는 있으나 정확도가 낮고 절차가 번거롭다는 단점이 있다[1]. 따라서 생체 분자를 정량화 하는 다른 방법과 비교하여 정확성이 높으며 간편하고 신속하며 비파괴적이고 분석 결과를 실시간으로 확인 가능하여 분석 결과를 시각화하기 용이한 장점을 가지고 있는 형광 물질을 사용하여 생체 분자를 정량화 하는 연구가 많이 이루어지고 있다[2,3]. 형광 물질을 표지로 사용한 분석은 기초 생물학적 반응 연구, 효소 활성 측정 여부확인, 단백질 아미노산 서열 분석의 목적으로 사용하는 생명과학분야와 항생제의 체내 작용 기작과 농도 분포 추적, 염색체의 구조 정보 확인, 바이러스의 형태학적 연구의 목적으로 사용하는 의학 및 제약분야 그리고 분석 화학, 환경, 산업 등의 다양한 분야에서 응용되고 있다[4].

형광 물질을 표지로 사용하는 방법 중에서 형광 단백질을 확인하고자 하는 단백질에 결합하도록 하여 생체 내에서 단백질을 추적하고 정량화 하는 방법이 있다. 하지만 형광 단백질을 사용하여 분석하는 경우 형광 단백질보다 목적하는 단백질의 크기가 작은 경우 단백질의 발현, 세포 위치, 활성 또는 기능을 교란시킬 위험이 있다[5-7]. 그러므로 크기가 큰 형광 단백질 대신 크기가 작은 형광 염료를 사용하는 분석 방법으로 이러한 문제를 해결하고자 하는 노력이 이어지고 있다[5-8]. 일반적으로 형광 염료는 그 자체만으로 세포의 생존을 평가, 세포의 자가사멸 평가 등 다양한 용도의 세포 분석에 사용되고 있으며 DNA 또는 RNA와 특이적으로 결합하는 성질이 있으며 DNA 또는 RNA와 결합 시 형광의 강도가 30-40배 증폭되는 특성을 가지고 있다[7-11].

선행된 연구에서 형광 물질인 Yo-Pro-1의 전달 효율과 CFP 유전자 발현 효율을 비교하여 보면 Yo-Pro-1의 전달 효율은 96 V의 전압 조건에서 최대값을 보이고 이 후 전압이 증가하면 전달 효율은 감소하는 경향을 보였으나 반대로 CFP 유전자 발현 효율은 전압에 비례하여 효율이 증가하는 경향을 보였다[12]. 이처럼 전달 물질의 전달 효율과 형질전환을 위해 전달된 DNA의 발현 효율의 경향에는 차이가 있었는데 이러한 차이의 원인이 전달 물질로 사용된 형광 염료와 DNA의 크기 차이로 인한 전달 효율의 차이에 인한 결과인지 아니면 전달 효율은 유사하나 전달 후 DNA의 발현 과정에서의 차이로 인해 발생한 문제인지에 대한 명확한 원인을 제시하기 어려웠다.

따라서 본 연구에서는 형광 염료를 표지로 사용하였을 때의 장점인 작은 크기, DNA와 특이적으로 결합, 결합 시 형광 강도가 30-40배 증폭되는 특성에서 착안하여 형광 염료인 Yo-Pro-1을 표지로 사용하여 Plasmid DNA에 부착시키고 이렇게 표지가 된 DNA를 디지털 전기천공시스템을 이용하여 세포 내부로 도입하는 실험을 수행하여 표지가 된 DNA의 전달 효율과 Yo-Pro-1의 전달 효율을 비교함으로써 선행된 연구에서 보인 Yo-Pro-1의 전달 효율 경향과 CFP 유전자의 발현 효율 경향 차이에 대한 원인을 분석하고자 한다.

2. 실험

2-1. 실험 장치

DNA와 형광 염료의 전달을 위해 사용된 디지털 전기천공 시스템[13-26]의 개략도는 Fig. 1에 나타난 바와 같다. 디지털 전기천공 시스템은 2.54 mm의 핀 헤더 소켓 5개를 결합하여 하단의 전극부분을 구성하고 외부로 PDMS (Polydimethylsiloxane)로 감싼 전기천공용 칩, 전기천공용 전극, 전원공급장치, 릴레이 스위치로 구성된다. 전기천공용 칩 내부는 미네랄 오일을 채워 세포를 포함한 액체가 물방울의 모양을 유지할 수 있도록 하였으며, 전기천공용 전극의 표면은 액체가 달라붙는 것을 방지하기 위해 소수성이 요구된다. 따라서 시판되는 초소수성 코팅제 스프레이(Never Wet multipurpose kit, RUST-OLEUM)를 이용하여 전극 표면에 분사하는 방식으로 소수성 코팅을 수행하였다. 전기천공용 칩과 전극은 전원공급장치(Keithley 2450)와 릴레이 스위치에 연결된다. 전원공급장치는 전기천공과정에 필요한 전압을 공급, 조절하고 전류를 흘려주는 장치이며, 릴레이 스위치는 스위치 내부의 접점이 붙었다 떨어지는 것을 통해 전기천공과정에서 펄스의 횟수와 펄스의 인가시간을 조절하는 역할을 한다. 전기천공의 조건에 대한 자세한 내용은 각 결과 부분에서 다룰 것이다.

일반적으로 디지털 전기천공을 전기천공용 칩 내부에 미네랄 오일을 채운 후 Cell/DNA 혼합 액적을 넣어 전기천공을 수행한다. 이때 사용되는 Cell/DNA 액적은 상단의 전기천공용 전극과 전기천공용 칩의 하단 전극부분 사이에 위치하게 된다. Cell/DNA 액적은 2.5 μ l를 사용하여 1회 전기천공 실험을 수행하며, 4회 전기천공을 진행하여 10 μ g 액적을 해당 전기천공 조건에서의 1회 실험으로 한다. 전기천공이 끝난 Cell/DNA 액적은 회수 후 13,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 미네랄 오일을 제거하고 세포 pellet을 얻는다. 이 세포 pellet에 1 ml의 TAP (Tris/Actate/Phosphate) 배양액을 첨가한 후 Cell growth chamber에서 24시간 배양한다. 하지만 본 실험에서는 형광 염료의 형광이 6시간 정도 유지되는 것을 고려하여,

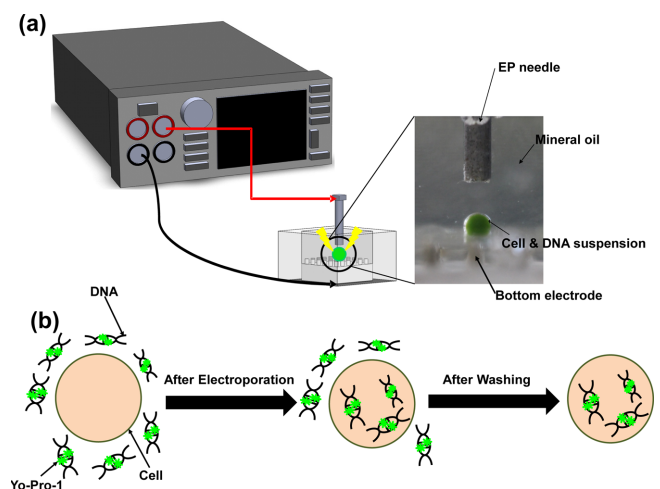


Fig. 1. Schematic diagram of digital electroporation system and Experiment process overview. (a) A schematic diagram of the digital electroporation system, (b) a schematic diagram showing the experimental procedure showing that the DNA labeled with Yo-Pro-1 suspended outside the cell is introduced into the cell through electroporation.

전기천공이 끝난 Cell/DNA 액적을 회수하여 원심분리 후 미네랄 오일을 제거하고 500 μ l의 TAP 배양액을 첨가하여 세포 pellet을 풀어준 후 분석을 수행하였다.

전기천공 후의 세포를 분석하는 방법으로는 FACS (Fluorescent activate cell sorter) 장비를 이용한 유세포 분석 방법을 사용하였으며, 히스토그램에서 피크의 위치와 모양, 그리고 기준점으로부터의 좌, 우측에 위치하는 세포의 비율을 이용하여 전달 효율 분석을 수행하였다.

2-2. 실험 재료

본 실험에는 녹색 미세조류의 한 종인 *Chlamydomonas reinhardtii* (세포벽을 가진 야생종: cc125)를 사용하였으며, 이 세포는 액체 배양액인 TAP 배양액 14 ml에서 일정한 배양조건(조도: 1000~1100 lx, 온도: 25 °C, 습도: 60%)을 유지한 식물 세포 배양기(JSPC-200C, JSR, Korea)에서 배양하였다. 지수 성장기에 해당하는 세포를 사용하여 실험을 수행하기 위해 실험 48~60시간 전 세포를 새 배양액에 옮겨 배양하였다. 실험을 수행하기 전 분광광도계(OPTIZEN NANO Q, Mecasys, Korea)를 사용하여 세포를 포함한 배양액의 흡광도를 측정하는 방식으로 세포의 농도 및 수를 확인하였다. 1.0×10^6 개의 세포를 E-tube에 넣고 원심분리를 하여 배양액을 제거한 후, 형광 염료로 표지가 된 DNA와 배양액을 첨가하여 10 μ l의 Cell/DNA 혼합액을 만들어 실험을 수행하였다. 실험에 표지로 사용된 형광 염료는 Yo-Pro-1 (Excitation/Emission: 491/509, 1 mM solution in DMSO, Thermo Fisher)이다.

표지로 사용된 형광 염료인 Yo-Pro-1은 표지가 된 DNA의 전달 효율과 비교하기 위해 따로 Cell/Fluorescent dye 액적을 만들어 실험을 수행하였다. 이때 사용된 Cell/Fluorescent dye 액적은 1.0×10^6 개의 세포를 E-tube에 넣고 원심분리 하여 배양액을 제거한 후 0.1 mM의 Yo-Pro-1과 새 배양액을 첨가하여 10 μ l 액적을 만들어 실험을 수행하였다[12,27].

2-3. 실험 방법

DNA 표지를 위한 형광 염료의 양을 결정하기 위해 DNA에 결합하는 형광 염료의 수를 계산하였다. 표지를 위해 사용된 형광 염료인 Yo-Pro-1은 DNA의 염기 20개에 한 분자씩 결합하는 것으로 알려져 있다[28]. 그리고 본 연구에서 사용한 DNA의 전체 길이는 6832 bp로 DNA 한 분자당 342개의 Yo-Pro-1 분자가 결합하는 것을 알 수 있다. 이를 이용하여 실험에 사용할 형광 염료의 양을 계산하여 실험을 수행하였다(계산된 농도는 결과부분에서 기술). 기존의 디지털 전기천공을 이용한 세포 형질전환에서는 DNA를 1 μ g 사용하였으나[12], 본 연구에서는 DNA를 형광 염료로 표지 한 후 세척의 과정으로 여분의 형광 염료를 제거하여 Cell/Tagged DNA 혼합액을 준비하였다. 그러므로 세척 과정에서의 DNA 손실을 고려하여 2 μ g의 DNA를 사용하여 실험을 수행하였다. 표지로 사용한 형광 염료의 농도를 결정하기 위해 계산된 농도를 1배로 하였으며, 실험에는 1배, 2배, 5배, 10배로 농도를 변경하였으며 전기천공 조건은 동일하게 유지하여 실험을 수행하였다.

전기천공실험 1회에는 1×10^6 개의 세포가 사용되었으며, 1회 실험에는 10 μ l의 Cell/Tagged DNA 혼합액을 사용하였다. 전기천공 실험은 2.5 μ l의 Cell/Tagged DNA 액적을 EP needle과 하단의 전극 사이에 놓은 후 전압을 가하는 방식으로 수행하였으며, 전기천

공실험 1회는 2.5 μ l씩 4번 반복하여 10 μ l의 액적에 대해 전기천공을 가하는 방법으로 수행하였다. 전기천공이 끝난 액적은 원심분리하여 여분의 미네랄 오일을 제거하고 TAP medium 500 μ l를 이용하여 액적을 풀어주었다. 일반적으로 전기천공실험을 수행한 세포에 대해서는 Propidium Iodide를 이용하여 세포 생존율 평가도 함께 진행하지만 본 연구에서 사용된 Yo-Pro-1은 Propidium Iodide 신호와 간섭영향이 있는 것으로 선행된 연구에서 확인되었으므로[27] 세포 생존율 평가는 생략하고 Yo-Pro-1의 신호를 이용한 전달 효율 평가만 진행하였다.

전달 효율 평가를 위한 FACS 히스토그램의 분석은 전기천공 후 세포의 FACS 분석 결과로 얻어진 히스토그램을 비교하는 방법으로 수행하였다. FACS 분석에서는 Yo-Pro-1의 형광을 확인하기 위한 필터로 FITC (Spectral band transmitted: 530 \pm 30 nm) 필터를 사용하였다. FACS 히스토그램의 분석은 Fig. 2에 붉은색 선으로 표시된 10^2 을 기준으로 좌, 우측의 분포를 비교하였다. 기준인 10^2 의 좌측에 위치하는 분포는 Yo-Pro-1의 신호가 나타나지 않거나 매우 약한 것으로 세포 내부로 전달이 되지 않은 세포로 판단하며, 10^2 의 우측에 위치하는 분포는 Yo-Pro-1의 신호가 강하게 나타나는 세포로 전달이 이루어진 세포로 판단한다. Fig. 2에서 확인 할 수 있는 것과 같이 전기천공 전의 세포는 10^2 의 좌측에 대부분이 위치하고 있으나 전기천공 후의 세포는 일부가 10^2 의 우측에 분포함으로써 형광 신호를 나타냄을 확인할 수 있다.

3. 결과 및 고찰

3-1. DNA의 표지를 위한 형광 염료의 농도 결정

DNA의 표지를 위한 형광 염료의 농도 결정을 위해 DNA 1분자 당 결합하는 형광 염료(Yo-Pro-1)의 수를 계산하였다. 형광 염료인

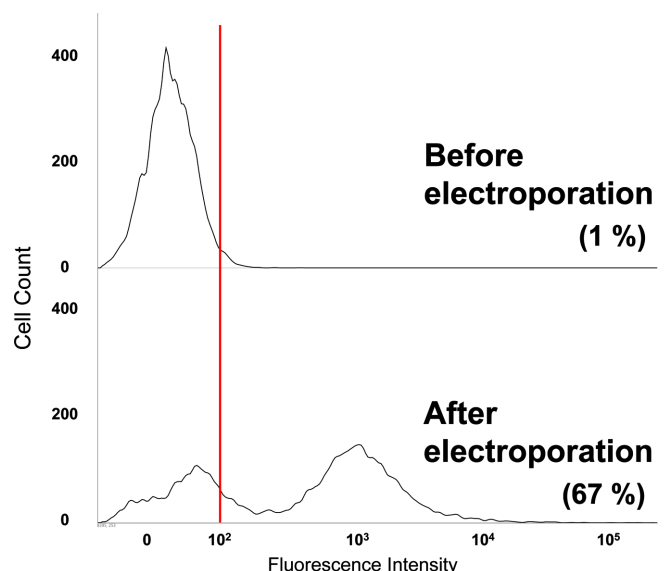


Fig. 2. FACS histogram analysis. The top histogram is before electroporation and the bottom histogram was after electroporation. The right side of the reference (red line) was evaluated for delivery efficiency. Before electroporation, most cells were distributed on the left side of the reference red line (Delivery efficiency 1%), and after electroporation, a large number of cells were distributed on the right side of the reference (Delivery efficiency 67%).

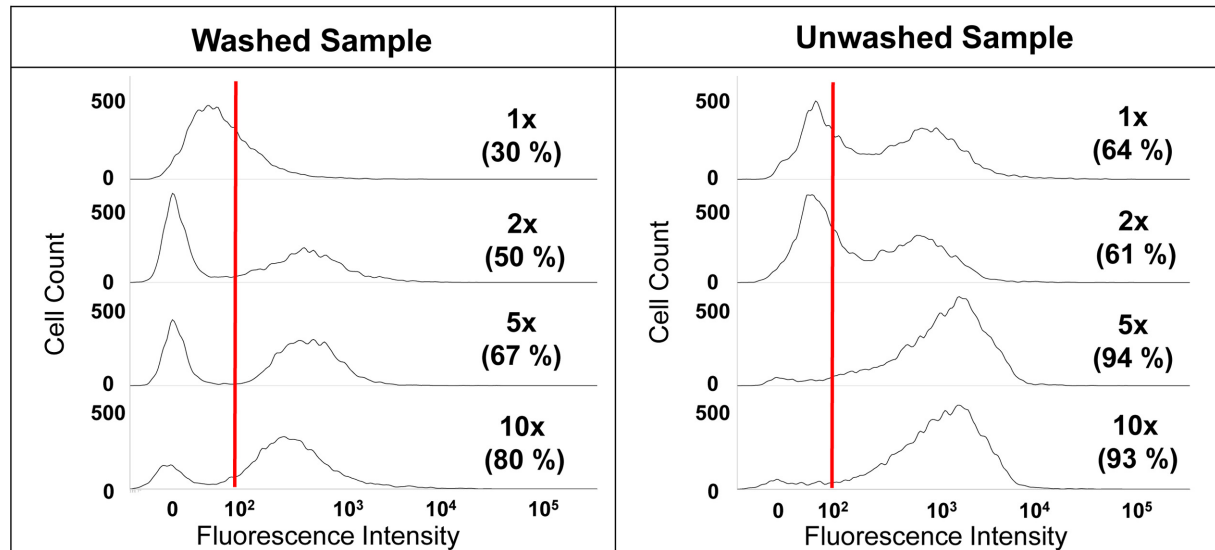


Fig. 3. Histogram comparison of delivery efficiency according to Yo-Pro-1 concentration for DNA labeling. The electroporation condition was 96 V and the number of applied voltage was 8 (N = 8), and the total voltage application time was 400 ms. The left side was the histogram for the sample removed by washing the extra Yo-Pro-1 after labeling, and the right side was the histogram for the sample without washing after labeling. Both histograms had a one-fold concentration at the top, and the bottom histogram was labeled with a ten-fold concentration.

Yo-Pro-1은 염기 20개 당 하나씩 결합하는 것으로 알려져 있으며[28] 본 연구에서 사용한 DNA의 전체 염기의 수가 6832 bp이므로 DNA 1분자 당 342개의 Yo-Pro-1이 결합한다. 이것을 이용하여 DNA 2 μ g과 결합하는 Yo-Pro-1의 분자 수를 구하면 0.1538 nmol이다. 본 연구실에서 보유 중인 Yo-Pro-1의 농도는 1.0 mM이므로 DNA 2 μ g과 결합하기 위한 1 mM Yo-Pro-1 용액의 부피는 0.15 μ l가 된다. Yo-Pro-1의 농도에 따른 히스토그램을 비교하고 표지로 사용하기 적합한 농도를 결정하기 위해 이렇게 계산된 부피를 1배 농도로 하여 2배, 5배, 10배 농도의 Yo-Pro-1을 사용하여 DNA에 표지 후 전달 효율을 비교하였다. Fig. 3의 좌측은 Yo-Pro-1을 사용하여 DNA 표지를 한 후 세척과정을 거친 샘플이며, 우측은 Yo-Pro-1 표지 후 세척과정을 거치지 않은 샘플이다. 그리고 두 히스토그램 모두 가장 상단은 Yo-Pro-1을 1배 농도 사용하여 표지를 한 결과이며 가장 아래쪽 히스토그램은 Yo-Pro-1을 10배 농도 사용하여 표지를 한 결과이다. 이 결과에서 확인할 수 있는 것과 같이 여분의 Yo-Pro-1을 세척하는 과정의 여부와 상관없이 표지로 사용한 Yo-Pro-1의 농도가 증가할수록 기준인 10^2 의 우측에 분포하는 세포의 수가 증가하는 것을 알 수 있다. 특히 5배 농도의 Yo-Pro-1을 표지로 사용한 경우부터는 히스토그램의 모양과 피크의 이동이 낮은 농도를 사용했을 때와는 확연한 차이를 보이는 것을 알 수 있다.

Fig. 3의 결과와 같이 DNA의 표지로 사용하고 남은 여분의 Yo-Pro-1을 세척하는 과정을 거치지 않은 샘플은 기준 1배 농도에서부터 상당히 높은 전달 효율을 나타내며 5배 이상의 농도에서는 대부분의 형광 신호가 기준인 10^2 의 우측에서 나타나 2배 이하의 농도에서 2개로 나뉜 피크가 다시 하나로 합쳐진 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 세척과정을 거치지 않고 실험을 할 경우는 Yo-Pro-1을 2배 농도 이하로 사용하여 표지를 하는 것이 적합하다고 판단해 볼 수 있다. 하지만 2배 이하의 농도에서 기준인 10^2 의 우측에서 나타난 피크가 세포 내부로 도입되어 나타난 형광의 신호와 세포 외부에 부유 중인 Yo-Pro-1으로 표지가 된 DNA에서 나타난 형광의 신

호가 합쳐져 실제 전달효율보다 높게 나타날 위험이 있으므로 세척 과정을 거쳐 여분의 Yo-Pro-1을 제거해주는 것이 필요하다.

DNA를 Yo-Pro-1으로 표지를 한 후 세척과정을 거친 샘플의 경우에는 세척과정을 거치지 않은 샘플과는 달리 1배 농도를 제외한 모든 농도 조건에서 뚜렷한 히스토그램의 피크가 두 개 형성되는 것을 확인할 수 있다. 그리고 앞서 언급한 바와 같이 세척 과정의 여부와 상관없이 표지로 사용된 Yo-Pro-1의 농도가 높아지면 전달된 것으로 평가되는 10^2 의 우측에 분포하는 세포 수가 늘어나는 것을 알 수 있다. 세척 과정을 거치는 경우, 5배나 10배 농도를 사용하여도 피크 지점의 형광 강도가 크게 달라지지 않고 2배 농도에서도 50%의 높은 전달 효율을 보이는 것으로 보아 2배 농도를 사용하는 것이 적합해 보인다.

두 가지 실험 결과를 종합하여 보면 DNA의 표지를 위한 형광 염료의 농도는 DNA의 충분한 표지를 위해 2배 이상 농도의 Yo-Pro-1을 사용하는 것이 적합하며, 표지 후 세척과정을 거쳐 여분의 Yo-Pro-1을 제거해주는 것이 반드시 필요하다. 이후 실험결과는 이 결과에서 얻어진 2배 Yo-Pro-1의 농도를 사용하여 DNA를 표지하고 전달 효율을 확인하는 것으로 실험을 수행하였다.

3-2. 전압 조건에 따른 표지 된 DNA와 형광 염료의 전달 비교

디지털 전기천공시스템의 전압 조건에 따른 표지 된 DNA와 형광 염료인 Yo-Pro-1의 전달 비교를 위해 전기천공의 전압은 48, 96, 192 V로 3가지 전압 조건을 사용하였으며 펄스 횟수는 8회, 인가시간은 400 ms로 고정하여 실험을 수행하였다. DNA 표지에 사용된 Yo-Pro-1은 계산된 농도의 2배 농도를 사용하였으며, 이는 DNA 표지 후 세척 과정에서 발생하는 손실을 고려해 충분한 양의 형광 염료를 사용하기 위해 2배 농도를 사용한 것이다. 이렇게 표지가 된 DNA는 세척 과정을 거친 후 전기천공을 수행하였다. 또한 표지 된 DNA의 전달과 비교를 위해 Yo-Pro-1을 0.1 mM 사용한 샘플과의 전달 효율을 비교하였다. 표지 된 DNA와 Yo-Pro-1을의 전달 효율

비교는 전달 물질로 사용된 물질만 다를 뿐 나머지 조건은 모두 동일하게 유지하였다. 본 연구에서는 전달 효율을 확인하기 위해 사용한 형광 염료인 Yo-Pro-1과 선행된 연구에서 세포 생존율 평가를 위해 사용한 Propidium Iodide 간의 형광 신호 간섭 영향으로 인해 [27] 정확한 분석이 어려울 것으로 판단하여 세포 생존율 평가는 따로 진행하지 않았다. 하지만 본 연구에 사용된 전기천공 조건이 선행된 연구에서의 전기천공과 동일한 점을 고려하면 세포 생존율은 선행된 연구의 결과와 유사하게 평가되었을 것이라 판단된다. 48 V의 전압 조건에서는 Yo-Pro-1과 DNA 모두 세포 생존율이 80~90%로 평가되었으며, 96 V에서는 75~80%로 평가되었고 192 V에서는 Yo-Pro-1을 사용한 경우에는 65%였으나 DNA의 경우는 25%로 세포 생존율이 평가되었다[12].

선행된 연구에서 형광 염료인 Yo-Pro-1의 전달 효율은 낮은 전압에서는 전압이 증가할수록 전달 효율이 증가하는 경향을 보이지만 전달 효율이 최대가 되는 전압 조건이 96 V인 것으로 확인되었으며 이후 전압이 높아지면 전달 효율이 낮아지는 경향을 보였다. 그리고 DNA의 발현 효율은 전압에 비례하여 증가하는 것으로 확인되었다[12].

Fig. 4의 상단 그래프는 Yo-Pro-1과 Yo-Pro-1으로 표지된 DNA의 전기천공 전달 조건에 따른 전달 효율을 나타낸 그래프로 그래프의 초록색 막대는 Yo-Pro-1의 전달 효율을 나타내며 파란색 막대는 표지가 된 DNA의 전달 효율을 나타낸다. Fig. 4의 그래프에서 확인할 수 있는 것과 같이 48 V에서는 Yo-Pro-1의 전달 효율이 표지가 된 DNA보다 높으나 96 V와 192 V의 결과에서는 표지가 된 DNA의 전달 효율이 Yo-Pro-1 보다 높게 나타났다. 이는 전달 물질로 사용된 Yo-Pro-1과 DNA의 특성에 의한 결과라 판단된다. 상대적으로 크기가 작은 형광 염료인 Yo-Pro-1은 비교적 낮은 전압(48 V)에서도 충분히 세포 내부로 도입될 수 있으나 크기가 큰 DNA의 경우 비교적 높은 전압 조건이 되어야 세포 내부로 도입될 충분한 구동력을 얻을 수 있기 때문에 Fig. 4의 그래프와 같은 결과가 얻어진 것이라 판단된다. 그리고 Fig. 4의 하단 표의 히스토그램은 Yo-Pro-1과 표지가 된 DNA의 전달을 히스토그램으로 비교한 것이다. 좌측의 히스토그램은 Yo-Pro-1의 전달을 나타낸 히스토그램이며 우측의 히스토그램은 표지가 된 DNA의 전달을 나타낸 히스토그램이다. Yo-Pro-1의 전달 효율은 선행된 연구에서와 마찬가지로 96 V에서 최고점에 도달하였으며 192 V에서는 전달 효율이 감소하는 것을

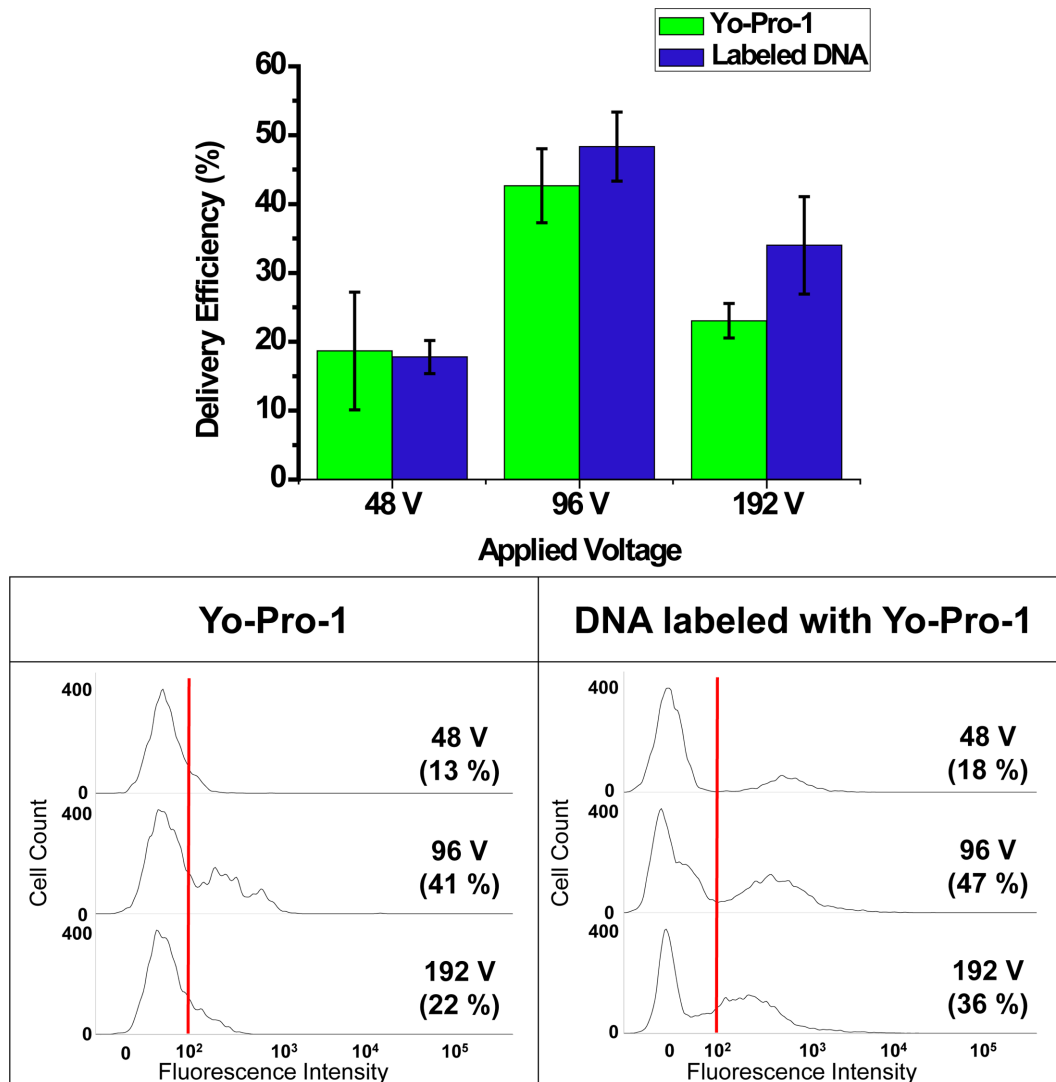


Fig. 4. The graph at the top is a graph showing the delivery efficiency of each delivery material according to voltage conditions, and the histogram at the bottom is a histogram representing the delivery efficiency of each delivery material. On the left are delivery histograms of Yo-Pro-1 and on the right are delivery histograms of DNA labeled with Yo-Pro-1.

확인할 수 있었다. 이는 세포가 살아남을 수 없을 정도의 고전압 조건에서 전기천공이 진행되었기 때문에 대부분의 세포가 죽었고, 이로 인해 살아 남은 세포에 대한 전달 효율이 낮게 평가된 것으로 판단된다.

표지 된 DNA의 경우는 선행된 연구의 결과에서 전압에 비례하여 효율이 증가하는 것과 달리 효율이 최대가 되는 전압조건이 있었으며 그 전압조건은 Yo-Pro-1의 전달 효율이 최대가 되는 96 V와 동일하였다. 이를 통해 전기천공시스템을 이용한 DNA의 형질전환에서 전달 물질의 전달 효율과 발현 효율이 최대가 되는 전기천공의 전압조건은 서로 다를 수 있음을 확인할 수 있다. 또한 Yo-Pro-1을 이용하여 확인한 전달 효율이 DNA의 전달 효율을 대변할 수 있다는 것을 확인하였다.

3-3. 전압 인가 횟수 조건에 따른 표지 된 DNA와 Yo-Pro-1의 전달 비교

디지털 전기천공시스템에서 전압 인가 횟수 조건에 따른 표지 된 DNA와 형광 염료의 전달을 비교하기 위해 전기천공의 전압조건은 96 V로 고정하였으며, 전체 인가시간은 400 ms로 일정하게 유지하

였으며 전압 인가 횟수만 4회, 8회, 16회로 바꾸어 3가지 조건에 대해 전기천공실험을 수행하였다. 이때, 전압의 인가 시간 사이의 휴지 시간은 전압의 인가시간과 동일하게 설정하여 실험을 수행하였다. 즉, 4회의 인가 횟수의 실험에서는 100 ms 씩 4회 전압을 인가 하였으며 전압이 인가되는 사이의 휴지시간을 100 ms로 설정하였다. 전압조건에 따른 비교와 마찬가지로 표지를 위한 Yo-Pro-1은 계산된 농도의 2배 농도를 사용하여 표지를 하였으며, 세척과정을 거쳐 여분의 Yo-Pro-1을 제거 후 실험을 수행하였다. 그리고 표지 된 DNA의 전달과 비교를 위해 Yo-Pro-1을 0.1 mM 사용한 샘플에 대한 전기천공실험을 하여 히스토그램과 전달 효율을 비교하였다. 앞선 실험에서와 같이 전압 인가 횟수 조건에 따른 실험에서도 세포 생존율 평가는 진행하지 않았다. 전압 인가 횟수 조건에 따른 실험에서도 선행된 연구에서 사용한 전기천공 조건과 같은 조건에서의 실험이 수행된 점을 고려하면 선행된 연구에서의 세포 생존율과 유사할 것으로 판단된다. 선행된 연구에서 전압 인가 횟수 조건에 따른 세포 생존율은 Yo-Pro-1을 사용한 경우는 80% (N=4), 75% (N=8), 70% (N=16)로 평가되었으며, DNA를 사용한 경우는 80% (N=4), 60% (N=8), 35% (N=16)로 평가되었다[12].

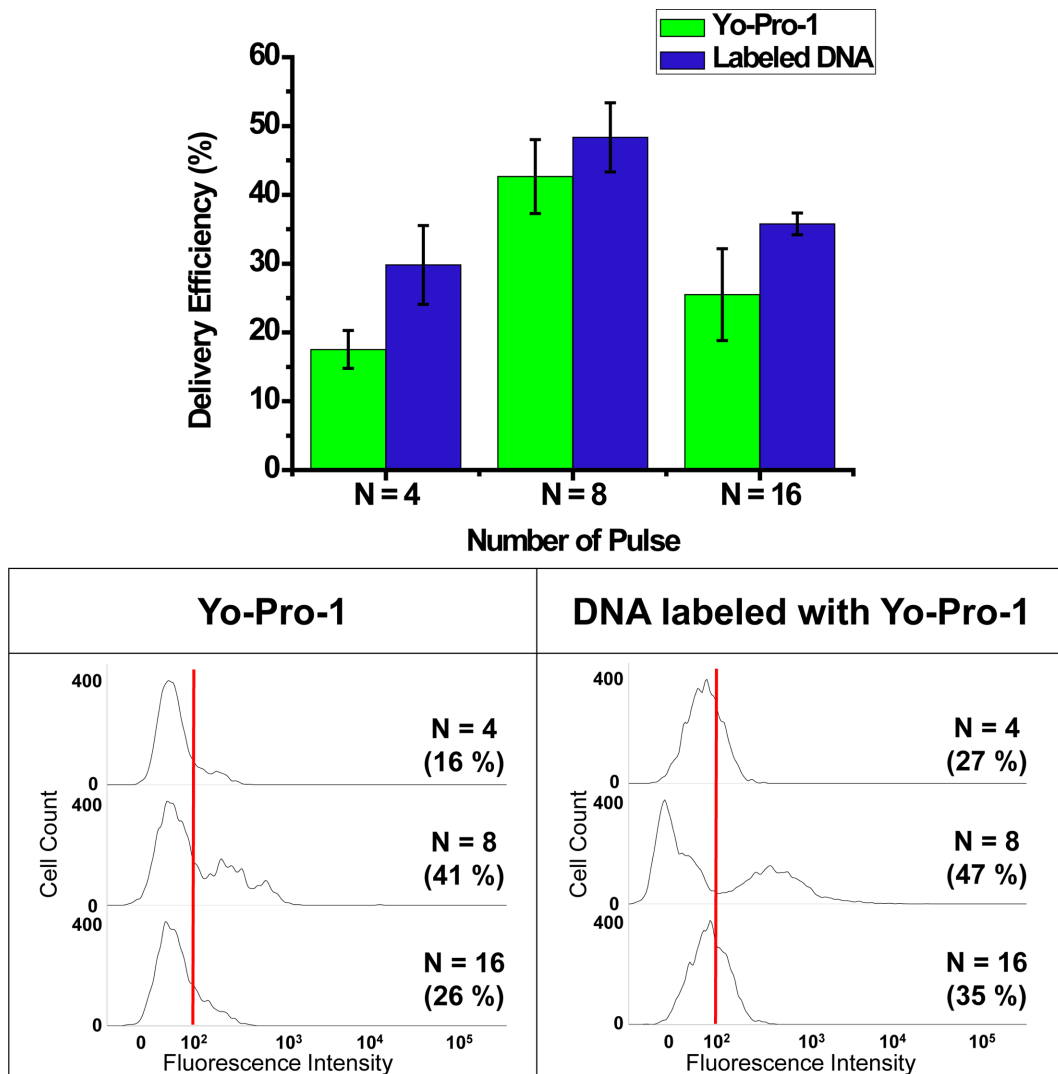


Fig. 5. Comparison of Yo-Pro-1 and Yo-Pro-1 labeled DNA delivery efficiency according to the number of voltage application conditions. The applied voltage was 96 V.

Yo-Pro-1은 선행된 연구에서 전압 인가 횟수에 비례하여 전달 효율이 증가하는 것으로 확인되었다. 반면 디지털 전기천공시스템에서 DNA의 발현 효율은 전압 인가 횟수가 8회까지는 증가하지만 그 이후는 전압 인가 횟수의 증가와는 무관하게 효율은 일정하게 유지되는 것으로 확인되었다. 선행된 연구에서와 달리 본 연구에서는 32회의 조건을 생략하고 4회, 8회, 16회의 결과를 비교하여 전압 인가 횟수 증가에 따른 전달 효율의 변화 경향을 살펴보았다.

Fig. 5의 상단 그래프는 각 전달 물질의 전달 효율을 막대 그래프 형태로 표현한 것으로 초록색의 막대 그래프는 Yo-Pro-1의 전달 효율을, 파란색의 막대 그래프는 Yo-Pro-1으로 표지가 된 DNA의 전달 효율을 나타낸다. 그리고 하단 표의 히스토그램은 각 전달 물질의 경향을 가장 대표적으로 나타내는 각 실험 조건에서의 히스토그램이다. 좌측은 Yo-Pro-1을 전달 물질로 사용한 경우의 히스토그램이며 우측은 Yo-Pro-1으로 표지 된 DNA를 전달 물질로 사용한 히스토그램이다. 각 히스토그램의 가장 상단은 인가 횟수 4회의 결과이며 가장 하단의 히스토그램은 16회의 결과를 나타낸다.

Fig. 5의 상단 막대 그래프에서 확인 할 수 있는 것과 같이 Yo-Pro-1과 표지 된 DNA 모두 전압 인가 횟수가 8회일 때 전달 효율이 최대가 되며 16회로 전압 인가 횟수가 더 증가하면 전달 효율이 오히려 감소하는 경향을 나타냈다. 이는 선행된 연구에서 얻어진 결과와는 상이한 것으로 전기천공 후 세포를 분석하는 과정에서 전기천공을 하지 않은 세포의 크기와 모양을 고려하여 분석을 수행하였으며, 세포의 크기와 모양이 과도하게 변화한 경우는 죽은 세포라 판단하여 결과에 반영하지 않았기 때문에 이러한 차이를 보이는 것이라 판단된다. 또한 96 V라는 충분한 전압 조건에서 전압 인가 횟수 조건의 변화에 대한 비교 실험을 수행한 것이므로 DNA가 세포 내부로 도입되기 충분한 전압이며, Yo-Pro-1이 DNA와 결합하면 형광의 신호가 강해지는 특성[7-11]으로 인해 모든 전압 인가 횟수 조건에서 표지가 된 DNA가 Yo-Pro-1 보다 높은 전달 효율을 보이는 것으로 판단된다. Fig. 5에서 확인 할 수 있는 결과처럼 전압 인가 횟수가 4회일 때는 충분하지 못한 전압 인가 횟수로 인해 전달 효율이 8회의 경우보다 낮으며, 16회의 경우에는 전압 인가 횟수는 충분하지만 전달이 이루어지기엔 부족한 전압 인가 시간으로 인해 전달 효율이 8회의 경우보다 낮은 것으로 판단된다.

또한 앞선 디지털 전기천공시스템의 전압 조건에 따른 전달 효율의 비교 실험 결과에서 Yo-Pro-1이 디지털 전기천공시스템의 전달 효율을 잘 대변할 수 있는 것과 마찬가지로 Fig. 5의 그래프와 히스토그램에서 확인할 수 있는 결과를 바탕으로 전압 인가 횟수 조건에 따른 Yo-Pro-1의 전달 효율이 디지털 전기천공시스템의 전압 인가 횟수 조건에 따른 전달 효율을 잘 대변할 수 있다고 판단된다.

4. 결 론

본 연구에서는 디지털 전기천공시스템을 이용한 형질전환에서 형광 염료인 Yo-Pro-1의 전달 효율과 CFP 유전자의 발현효율의 차이에 대한 원인을 분석하기 위해 디지털 전기천공시스템을 이용한 Yo-Pro-1과 표지 된 DNA의 전달 효율을 비교하는 연구를 수행하였다. 본 연구실에서 기존에 전달 효율을 확인하는 목적으로 사용 중이던 Yo-Pro-1이 DNA와 특이적으로 결합하며, 결합 시 형광 신호의 강도가 증폭되는 점을 이용하여 DNA의 표지를 위한 물질로 사용하였으며 표지 된 DNA와 Yo-Pro-1의 전달 효율을 디지털 전

기천공시스템의 전압 조건과 전압 인가 횟수 조건에 따라 비교하였다. 우선 DNA의 표지를 위한 Yo-Pro-1의 농도를 결정하기 위해 DNA 2 µg과 결합하는 Yo-Pro-1의 농도를 계산하였으며, 실험 결과, 계산된 농도의 2배의 Yo-Pro-1을 DNA의 표지를 위해 사용하는 것이 적합하며 표지 된 DNA는 추가적인 세척과정을 거쳐 잔여 Yo-Pro-1의 제거가 필요하다는 것을 확인하였다. 전압 조건에 따른 전달 효율의 비교에서는 Yo-Pro-1과 표지 된 DNA 모두 96 V에서 전달 효율이 최대값을 나타냈으며, 전압 인가 횟수 조건에 따른 Yo-Pro-1과 표지 된 DNA의 전달 효율의 비교에서는 두 전달 물질 모두 8회의 전압 인가 횟수에서 전달 효율이 최대가 되었다. 두 결과를 종합하면 디지털 전기천공시스템의 전달 효율 확인을 위해 사용해진 Yo-Pro-1이 DNA의 전달 효율 경향을 잘 대변한다는 것을 확인할 수 있다. 본 연구의 결과는 Yo-Pro-1이 세포 분석에 사용되는 대표적인 형광 염료인 것을 고려한다면 본 연구에 사용된 미세조류 외 다른 종류의 세포에도 적용이 가능할 것으로 예측되나 세포마다 전기천공 특성이 다른 것을 감안한다면 보다 정확한 분석을 위해서는 해당 세포를 이용해 추가적인 실험을 진행해 확인하는 것이 필요할 것으로 판단된다. 끝으로, 디지털 전기천공시스템을 이용한 형질 전환에서 외부 물질이 세포 내부로 도입되는 전달 효율과 도입된 외부 물질의 발현 효율을 최대화 할 수 있는 조건은 다를 수 있으며, 선행된 연구에서 Yo-Pro-1의 전달 효율의 경향과 CFP 유전자의 발현 효율의 경향이 차이가 나는 이유는 전달 효율의 문제가 아닌 발현 효율의 문제일 가능성이 있음을 확인할 수 있었다.

감 사

이 논문은 한국연구재단의 지원을 받아(NRF-2018R1D1A3B07047852) 수행되었습니다. 또한 이 연구는 산업통상자원부(MOTIE)와 한국에너지기술평가원(KETEP)의 지원을 받아 수행한 연구입니다(No. 20194010201840).

References

1. Ma, F., Li, Y., Tang, B., and Zhang, C. Y., "Fluorescent Biosensors Based on Single-Molecule Counting," *Acc. Chem. Res.* **49**, 1722-1730(2016).
2. Ueno, T., Nagano, T., "Fluorescent Probes for Sensing and Imaging," *Nat. Methods* **8**(8), 642-645(2011).
3. Proudnikov, D. and Mirzabekov, A., "Chemical Methods of DNA and RNA Fluorescent Labeling," *Nucleic Acids Res.*, **24**(22), 4535-4542(1996).
4. Pieter, E. O., Mohaddeseh, A. A., Ibrahim, K., Nhu, T. N. P., and Andrew, G. E., "Chemical Analysis of Single Cells," *Anal. Chem.* **91**, 588-621(2019).
5. Peng, T. and Hang, H. C., "Site-specific Bioorthogonal Labeling for Fluorescence Imaging of Intracellular Proteins in Living Cells," *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 14423-14433(2016).
6. Schwartz, T., Aloush, N., Goliand, I., Segal, I., Nachmias, D., Arbely, E., and Elia, N., "Direct Fluorescent-dye Labeling of α -tubulin in Mammalian Cells for Live Cell and Superresolution Imaging," *Biol. Cell* **28**, 2747-2756(2017).
7. Weiss, L. E., Naor, T., and Shechtman, Y., "Observing DNA in Live Cells," *Biochem. Soc. Trans.*, **46**(3), 729-740(2018).

8. Marie, D., Vaultot, 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**, 1649-1655(1996).
9. Lee, S., Kopp, F., Chang, T. C., Sataluri, A., Chen, B., Sivakumar, S., Yu, H., Xie, Y. and Mendell, J. T., "Noncoding RNA NORAD Regulates Genomic Stability by Sequestering PUMILIO Proteins," *Cell* **164**, 69-80(2016).
10. Fujisawa, S., Romin, Y., Barlas, A., Petrovic, L. M., Turkecul, M., Fan, N., Xu, K., Garcia, A. R., Monette, S., Klimstra, D. S., Erinjeri, 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," *Cytotechnology*, **66**, 259-273(2014).
11. Larsson, A., Carlsson, C., Jonsson, M., and Albinsson, B. "Characterization of the Binding of the Fluorescent Dyes YO and YOYO to DNA by Polarized Light Spectroscopy," *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 8459-8465(1994).
12. 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).
13. Im, D. J., "Next Generation Digital Microfluidic Technology: Electrophoresis of Charged Droplets," *Korean J. Chem. Eng.*, **32**, 1001-1008(2015).
14. Im, D. J., "Charging of an Ionic Liquid Droplet in a Dielectric Medium," *Clean Technology* **20**, 354-358(2014).
15. 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).
16. 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).
17. 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).
18. 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).
19. 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).
20. 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).
21. 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).
22. Choi, C. Y. and Im, D. J., "Contact Charging and Electrophoresis of a Glassy Carbon Microsphere," Choi, C. Y. and Im, D. J., "Contact Charging and Electrophoresis," *Korean Chem. Eng. Res.*, **54**(4), 568-573(2016).
23. 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).
24. 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).
25. Jung, J. H. and Lee, C. S., "Droplet Based Microfluidic System," *Korean Chem. Eng. Res.*, **48**(5), 545-555(2010).
26. Im, D. J. and Jeong, S.-N., "Transfection of Jurkat T Cells by Droplet Electroporation," *Biochem. Eng. J.*, **122**, 133-140(2017).
27. Bae, S. J. and Im, D. J., "Evaluation of Cell Viability and Delivery Efficiency in Electroporation System According to the Concentration of Propidium Iodide and Yo-Pro-1," *Korean Chem. Eng. Res.*, **57**(6), 898-906(2019).
28. Flors, C., "DNA and Chromatin Imaging with Super-resolution Fluorescence Microscopy Based on Single-molecule Localization," *Biopolymers* **95**, 290-297(2011).