(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0123624
(43) 공개일자 2015년11월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/89 (2006.01) *C12N 15/90* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0050244
(22) 출원일자 2014년04월25일
심사청구일자 2014년04월25일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
최연호
서울특별시 성북구 길음로9길 50, 912동 802호 (길음동, 길음뉴타운9단지아파트)
홍성희
서울특별시 중구 왕십리로39길 30, 102동 508호 (신당동, 한진그랑빌아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이처영, 장제환

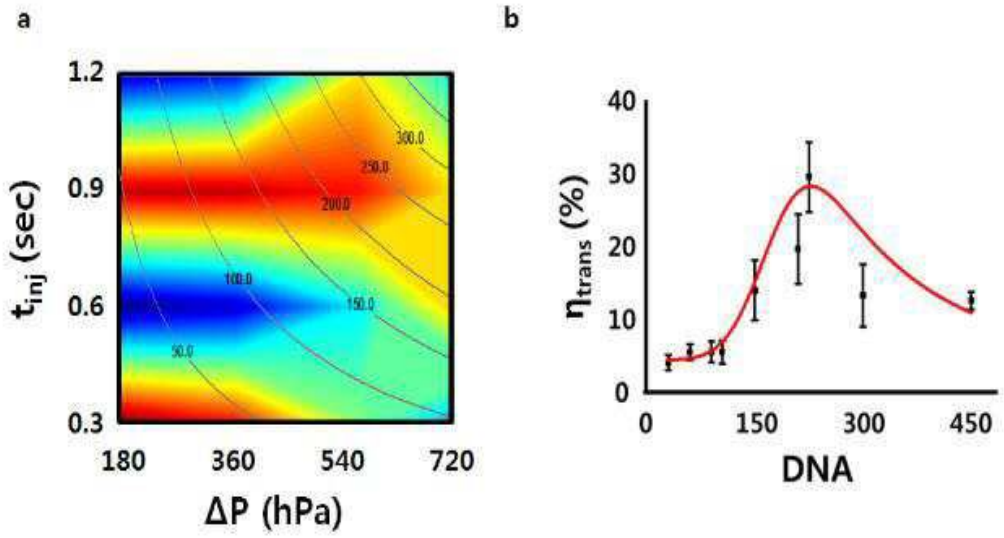
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **유전물질의 단일세포 내 정량적 전달방법**

(57) 요 약

본 발명은 단일세포의 세포질 또는 핵 내부에 정량의 유전물질을 효율적으로 전달하는 방법에 관한 것으로, 특정 단일세포에만 외부의 영향 없이 물질을 전달하고, 도입된 물질의 작용과정을 명확하게 관찰하는데 유용하다.

대 표 도 - 도4



(72) 발명자

권효성

서울특별시 성북구 안암로9가길 76, 609호 (안암동5가, 안암복합빌딩)

박항수

서울특별시 성북구 인촌로10길 19-6, 옥탑 (안암동3가)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013071573
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 원천기술개발사업
연구과제명 역분화 줄기세포의 기전연구를 위한 단일세포내 역분화 인자 나노전달기술 개발
기 여 율 1/2
주관기관 고려대학교산학협력단
연구기간 2013.10.01 ~ 2014.09.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2013071592
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 원천기술개발사업
연구과제명 나노기술을 이용한 역분화 줄기세포의 개발과 기전 연구
기 여 율 1/2
주관기관 고려대학교산학협력단
연구기간 2013.10.01 ~ 2014.09.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

미세조정이 가능한 매니퓰레이터(manipulator); 자체적으로 미세한 압력을 가해 세포 내로 물질 전달을 수행할 수 있는 인젝터(injector); 전달물질이 적재되는 내경이 300~500nm인 팁(tip); 및 상기 매니퓰레이터와 인젝터에 연결되고 상기 팁이 부착되는 지지대를 포함하는 세포 내 물질 전달시스템을 이용한 유전물질의 단일세포 내 전달방법에 있어서, 주입압력 1200~2000hPa, 주입시간 0.3~1.2sec, 및 주입부피 0.1~3.6fL인 조건으로 유전물질을 단일세포 내로 전달하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 팁(tip)은 핵막을 침투하여 핵 내로 직접 유전물질을 주입하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 유전물질의 주입분자수는 200~300인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 두 가지 이상의 유전물질을 동시에 주입하는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 유전물질의 단일세포 내 정량적 전달방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 미세팁에 전달하고자 하는 유전물질을 적재한 다음, 1200hPa 이상의 주입압력으로 유전물질을 세포 내로 전달하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 체세포를 형질전환(transfection)하기 위한 기존의 방법은, 세포가 배양되어 있는 배양접시(culture dish)의 배양액(medium)상에 형질전환인자(transfection factor)를 투여하여 배양접시 내 모든 세포를 형질전환 대상으로 하도록 진행되었다. 주된 방법으로는 전기천공법(electroporation), 리포좀을 이용한 막 융합, 칼슘-인-DNA 침전체를 이용한 배양법, 변형된 바이러스 핵산을 이용한 감염 등이 있으며, 양이온성 지질(cationic lipid)을 이용한 세포내 물질전달방법(US05334761), 자성을 띠는 나노입자를 이용한 세포내 물질전달방법(US09895019) 등은 세포 내 물질전달에 관한 선행기술로 존재하고 있다. 그러나 이러한 기존의 모든 방법들의 문제점은 단일세포에 유전자 및 소분자 화합물 등의 물질들을 정량적으로 전달할 수 없다는 점이며, 또한 전달된 물질의 작용과정을 단일세포 수준에서 명확하게 관찰할 수 없다는 단점이 있다.

[0003] 보다 구체적으로, 세포에 물질을 전달하는 기존의 방법을 크게 바이러스를 이용한 방법과 바이러스를 이용하지 않은 방법으로 나눌 수 있다. 바이러스를 이용한 물질전달방법의 경우, 체세포 형질전환의 높은 효율을 얻기 위해 형질전환 유전자를 바이러스 벡터(viral vector)와 결합하여 레트로바이러스(retrovirus)의 형태로 세포에 투여되어 세포의 형질전환을 유도하게 되며, 이 경우 바이러스를 이용한 변형된 유전자를 사용한 것이므로 세포의 형질전환을 일으킨다 하여도 이는 후에 인체 내 적용에 문제가 있다. 바이러스를 사용하지 않은 물질 전달의 경우, 바이러스를 이용하는 경우보다 물질전달의 효율이 낮은 편이며 사용되는 시약(reagent)들의 성분이 세포

에 영향을 줄 수 있다는 문제점이 있다.

[0004] 예를 들면, 역분화 줄기세포(Induced Pluripotent Stem Cell: iPSc)를 제작하는 경우, Yamanaka factors로 알려진 역분화 인자 (Oct4, Sox2, cMyc, Klf4)를 세포에 투여하면 일반 체세포가 역분화하여 줄기세포가 형성되는데, 이는 레트로바이러스를 사용하여 역분화를 유도한 것이므로 역분화 줄기세포가 형성된다 하여도 그것의 인체 사용에는 문제점이 있으며, 앞서 말한 방식처럼 단일세포 단위로 조절할 수 있는 것이 아니므로, 역분화 과정의 기전도 명확하게 규명되지 않고 있다.

[0005] 이에, 단일세포의 형질전환을 위한 유전자 도입뿐만 아니라 단일세포로 약물과 같은 소분자 화합물을 배양액 성분이나 전달체의 효율에 영향을 받지 않고 단일세포 내에 정량적으로 주입할 수 있는 방법이 필요하고, 미세주입(microinjection)방법을 이용하면 단일세포 내에 100%의 효율로 원하는 양만큼의 물질을 정량적으로 전달 가능하다는 점이 알려져 있다. 미세주입법은 내경이 500nm이하인 미세팁(tip)이 세포막 및/또는 핵막을 침투하여 세포질 및/또는 핵내에 유전물질이나 소분자 화합물을 주입하는 방법이다.

[0006] 미세주입 방법을 이용하여 세포 내에 물질을 주입할 때, 세포막 또는 핵막에 적절한 주입압력(injection pressure)이 가해져야 성공적으로 물질을 전달할 수 있는데, 적절한 주입압력으로 알려진 50-500hPa에서는 (FemtoJet Microinjector From Eppendorf. Biocompare Product Review. Nov 28, 2006) 전달효율이 낮은 편이었다. 또한, 종전의 선행기술은 대부분 세포질(cytoplasm)에 유전물질을 주입하는 것으로, 유전물질이 확산(diffusion)되어 핵내로 도입될 수 있도록 하는 방법이었으나, 이는 유전물질의 크기와 모양이 핵공을 통과하기 어렵고, 세포질 내 중간섬유(intermediate filament)의 방해도 더하여져, 주입된 유전물질은 결국 핵산분해효소(cytoplasmic nuclease)에 의해 소멸하게 되는 경우가 많았다(Shimizu et al., Nucleic Acids Research, 30:6296-6307, 2005).

[0007] 이에, 본 발명자들은 상기 문제점을 해결하기 위하여 예의 노력한 결과, 물체 내외부의 압력이 평형을 이룰 때 물체가 형태를 유지한다는 점을 이용하여 세포내부압력(intracellular pressure)를 정하고, 대기압이 1024hPa인 점을 고려하여 주입압력을 대기압 이상인 1200hPa보다 크게 하였을 때 미세주입에 의한 물질전달의 효율이 더 높아진다는 점을 확인하였다. 아울러, 1200hPa 이상의 주입압력으로 미세팁이 핵막을 침투하여 핵내로 직접 유전물질의 전달이 일어나게 함으로써 세포질에 주입할 때보다 형질전환이 더 용이하게 일어날 수 있다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 단일세포의 세포질 또는 핵 내부에 정량의 유전물질을 효율적으로 전달하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 미세조정이 가능한 매니퓰레이터(manipulator); 자체적으로 미세한 압력을 가해 세포 내로 물질 전달을 수행할 수 있는 인젝터(injector); 전달물질이 적재되는 내경이 300~500nm인 팁(tip); 및 상기 매니퓰레이터와 인젝터에 연결되고 상기 팁이 부착되는 지지대를 포함하는 세포 내 물질 전달 시스템을 이용한 유전물질의 단일세포 내 전달방법에 있어서, 주입압력 1200~2000hPa, 주입시간 0.3~1.2sec, 및 주입부피 0.1~3.6fL인 조건으로 유전물질을 단일세포 내로 전달하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따른 미세팁을 이용한 단일세포 내 물질의 전달방법은 특정 단일세포에만 외부의 영향 없이 성공적으로 물질을 정량적 전달하고, 도입된 물질의 작용과정을 명확하게 관찰하는데 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 본 발명의 미세팁(Femtotip), 매니퓰레이터(manipulator), 및 인젝터(injector)를 이용하여 배양접시에 있는 단일세포 내에 물질을 주입하는 실험에 관한 모식도이다.

도 2는 본 발명의 실험 모습을 나타낸 광학 이미지(좌)와 형질전환이 유도된 세포의 형광 이미지(우)를 나타낸 것이다.

도 3은 주입총량을 결정하기 위한 Poiseuille's Law에 관한 개념도와 본 기술에 사용된 공식을 나타낸 것이다.

도 4는 주입압력과 세포내부압력의 차(ΔP)와 주입시간(sec)에 따른 주입 유전물질의 양을 색깔로 나타낸 것과(a), 주입된 DNA의 개수에 따른 형질전환 성공률을 나타낸 것이다(b).

도 5는 주입된 형광 발현 유전물질의 양에 따른 형질전환 세포가 생성한 형광단백질의 양을 비교한 사진(a)과 그래프(b)이다.

도 6은 형광 발현 유전물질로 형질전환된 세포를 7일간 배양하며 형광단백질 발현강도를 확인한 사진이다.

도 7은 형광 발현 유전물질로 형질전환된 세포를 7일간 배양하며 형광단백질 발현강도의 변화를 주입한 유전물질의 양에 따라 비교한 그래프이다.

도 8은 형광 발현 유전물질로 형질전환된 세포들 중 7일간 형광유전자를 유지하는 세포의 비율을 나타낸 것이다.

도 9는 두 종류 이상의 형광 발현 유전물질이 주입된 단일세포의 형광단백질 발현을 확인한 사진이다.

도 10은 단일세포 내에 DAPI 형광물질을 전달할 때의 주입압력에 따른 전달효율을 나타낸 그래프(a)와, 단일세포 내에 형광단백질 발현 유전자를 전달할 때의 주입압력에 따른 발현효율(형질전환효율)을 나타낸 그래프(b)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0013] 본 발명에서는, 단일세포 내에 형질전환 유전자를 미세주입하기 위하여 주입압력을 1200 이상으로 하고, Poiseuille's Law를 이용하여 주입총량을 계산한 후, 내경이 500nm 이하로 매우 작은 미세팁(tip)과 이를 미세조정하는 매니퓰레이터(manipulator)를 이용하여 유전물질을 세포의 핵 내에 주입하고, 주입된 유전물질의 양에 따른 단일세포의 형질전환 효율을 측정하였다. 또한, 단일세포 내로 두 가지 이상의 유전물질을 동시에 주입하여, 모두 발현되는 것을 확인하였다. 그 결과, 주입압력 1200~200hPa, 분자수 200~300개 범위내에서 가장 성공적으로 단일세포내 유전물질 및/또는 소분자 화합물이 미세주입되는 것을 확인하였다.

[0014] 본 발명은 일 관점에서, 미세조정이 가능한 매니퓰레이터(manipulator); 자체적으로 미세한 압력을 가해 세포 내로 물질 전달을 수행할 수 있는 인젝터(injector); 전달물질이 적재되는 내경이 300~500nm인 팁(tip); 및 상기 매니퓰레이터와 인젝터에 연결되고 상기 팁이 부착되는 지지대를 포함하는 세포 내 물질 전달시스템을 이용한 유전물질의 단일세포 내 전달방법에 있어서, 주입압력 1200~2000hPa, 주입시간 0.3~1.2sec, 및 주입부피 0.1~3.6fL인 조건으로 유전물질을 단일세포 내로 전달하는 방법에 관한 것이다.

[0015] 본 발명에 있어서, 상기 팁(tip)은 핵막을 침투하여 핵 내로 직접 유전물질을 주입하는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 유전물질의 주입분자수는 200~300인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0016] 본 발명에서 "미세팁" 또는 "팁"은 내경이 500nm인 매우 미세한 유리 모세관 (ultra-fine glass capillary)으로, Eppendorf사의 Femtotip을 의미하나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니며, 내경이 500nm이하, 바람직하게는 300 내지 500nm인 팁으로 주입량(부피)을 펨토리터(fL)단위로 적재할 수 있는 팁을 모두 포함한다.

[0017] 본 발명을 실시하기 위해 필요한 기술적 구성은 다음과 같다: (a) 미세주입 과정을 관찰할 수 있는 광학현미경; (b) 세포막 또는 핵막에 가할 미세한 주입압력(injection pressure) 및 주입시간(injection time)을 자체적으로 조절할 수 있는 인젝터(injector); (c) 전달물질이 적재되는 내경이 500nm 이하인 팁; (d) 상기 팁을 로보틱(robotic) 미세 조정이 가능한 매니퓰레이터(manipulator); 및 (e) 상기 매니퓰레이터와 인젝터에 연결되고 상

기 팁이 부착되는 지지대.

[0018] 본 발명의 일 실시예에서, 유전물질을 단일세포 내에 주입하기 전에, 물질의 주입총량을 정량적으로 계산하기 위하여, 미세관내 점성유체의 유량을 구하는 공식인 Poiseuille's Law (도 3)를 이용하였다. 이 공식에서, ΔP는 주입압력(injection pressure; P_i)과 세포내부압력(compensation pressure; P_c)의 차를 의미하며, 주입압력이 세포내부압력보다 클 때 팁이 세포막 또는 핵막을 침투하여 물질을 주입하는 것이 가능하다. 세포내부압력은 직접적으로 측정할 수 없어 대기압과 세포가 담겨있는 배양배지(media)의 압력의 합으로 처리하였고, 대기압이 1024hPa인 점을 감안하여 주입압력을 1200hPa 이상으로 하여 실험하였다. 도 3의 공식에서 Π는 상수이고, D는 팁의 내경, L은 팁 내부 액체의 높이, μ는 DNA의 점성도를 나타낸다. ΔP에 비례하여 주입총량이 결정되고, 주입물질의 농도와 분자량을 알면 유전자 또는 소분자 화합물의 주입량(분자수)을 계산할 수 있다. 그 결과, 1200 내지 2000hPa의 주입압력에서 주입 성공률이 가장 높았으며, 핵 내에 DNA를 200 내지 300분자 주입하였을 때 형질전환이 가장 잘 일어나는 것을 확인하였다.

[0019] 본 발명의 방법을 이용하여, 유전물질 외에도 소분자 화합물을 주입하는 것도 가능하며, 상기 방법으로 단일세포 내에 주입될 수 있는 유전물질 및/또는 소분자 화합물은 DNA, RNA, 단백질, 독소(toxin), 염료(dye)등이 있고, 바람직하게는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 또는 올리고펩타이드(oligopeptide)를 포함한다. 본 발명의 일 실시예에서는, 형광 유전자로 형질전환시키기 위해 GFP(green fluorescent protein)를 발현시키는 pcDNA3.3_eGFP 유전자를 주입하였으나, 이 외에도 RNA간섭(RNA interference, RNAi)에 관여하는 siRNA, miRNA, miRNA의 안티센스 올리고뉴클레오티드(antagomiR) 등의 올리고뉴클레오타이드와, 라이보자임(ribozyme) 및 DNA/RNA 압타머와 같은 기능성 핵산올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 주입할 수 있다. 주입 가능한 올리고펩타이드는 100개 이하의 아미노산으로 구성된 작은 펩타이드로, 펩타이드 압타머 등의 세포 내에서 약물로써 작용 가능한 모든 올리고펩타이드를 포함한다.

[0020] 또한, 본 발명에서 유전물질 및/또는 소분자 화합물이 주입되는 세포는 전핵 단계(pronucleus)의 난세포, 인간 배아줄기세포 및 유도만능줄기세포(induced pluripotent stell cell, iPSc)를 포함하고, 신경줄기세포 (neural stem cells), 성체줄기세포 (adult stem cells), 체세포 (somatic cells), 암세포 (cancer cells)를 포함하는 모든 부착세포(adherent cell) 및 어류의 알 등을 포함하나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 본 발명에 있어서, 두 가지 이상의 유전물질을 동시에 주입하는 것을 특징으로 할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, 녹색형광단백질(GFP)을 발현하는 유전물질과 더불어 붉은형광단백질(Td-tomato) 발현 유전물질과 세포핵 내부로 이동하는 푸른색형광단백질(EBFP2-Nuc)의 유전물질을 섞어서 함께 주입하였다. 그 결과, 성공적으로 유전물질이 전달되어 형질전환된 세포에서 녹색과 붉은색, 푸른색의 형광이 동시에 발현되어, 두 종류 이상의 유전물질을 주입하는 것이 가능함을 확인하였다 (도 9).

[0022] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0023] **실시예 1: 단일세포 내 형질전환 유전자 미세주입**

[0024] 단일 세포 내 형질전환 유전자를 직접 전달하기 위한 본 발명의 기술적 구성은 광학 현미경, 로보틱(Robotic) 미세 조정이 가능한 매니퓰레이터(Manipulator; Sutter Insrument MP-225), 자체적으로 미세한 압력을 가해 세포 내로 물질전달을 가능하게 하는 인젝터(injector; Eppendorf Femtojet®), 전달물질이 적재되는 미세팁(Eppendorf Femtotips®II)으로 이루어져 있다(도 1). 배양배지(cell media) 내 배양된 부착세포(adherent cell)로 물질을 전달하는 과정에서 세포 내 손상이 없도록 내경이 매우 작은(500nm 이하) 미세팁을 사용하며, 이 팁 내에 전달하고자 하는 물질을 적재 후 본 팁을 매니퓰레이터 및 인젝터에 연결된 지지대에 부착한다. 이렇게 연결된 팁은 인젝터로부터 발생된 압력을 받아 적재된 전달물질을 세포 내부로 전달할 수 있게 된다. 본 실험에서 사용된 세포는 표면 부착세포(adherent cell) 이며, 형질전환의 효율을 높이기 위하여 세포의 핵(nucleus) 부분에 직접 팁을 찔러 넣어 형질전환 유전자(pcDNA3.3_eGFP)를 주입하였다. 본 유전자를 통한 형질전환 발현시에 세포는 녹색형광을 나타내며(도 2), 이는 유전자 주입 후 24시간을 기준으로 그 효율을 확인하였

다.

[0025] **실시예 2: 단일세포 내 주입총량의 정량화**

[0026] 단일세포 내 주입총량을 정량화는 미세관내 점성유체의 유량을 구하는 공식인 Poiseuille's law (도 3)를 이용하여 계산하였으며, 이는 주입압력(injection pressure;P_i), 주입시간(injection time)이 주입총량을 결정하는 가장 주요한 변수로 인젝터(injector) 장비를 이용하여 조절할 수 있다. 이때, Poiseuille's law에서 ΔP는 주입압력과 세포내부압력(Intracellular pressure)의 차로 이에 비례해 주입총량이 결정된다. 이때 직접적으로 세포의 내부압력을 각각 측정할 수 없으므로, 세포 내부압력을 대기압과 세포가 담겨있는 media 압력의 합으로 처리하였다. 예를 들어, 풍선의 내부압력이 대기압보다 크면 팽창하고, 대기압이 풍선 내부압력보다 크면 풍선의 크기가 줄어드는 것처럼 물체 내외부의 압력이 평형을 이룰 때 물체가 형태를 유지한다는 점을 이용하였다. 이를 이용하여 대기압이 1024hPa 인점을 감안하여 주입압력을 1200hPa이상으로 두며, 이에 따른 주입총량(표 1)과 그 계산된 주입총량과 주입물질의 농도에 따른 유전자주입량(표 2)을 계산하였다.

표 1

[0027]

	1200hPa	1400hPa	1600hPa	1800hPa	2000hPa
0.3 sec	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
0.6 sec	0.2	0.6	1	1.4	1.8
0.9 sec	0.3	0.9	1.5	2	2.7
1.2 sec	0.4	1.2	2	3	3.6

[0028] 단위: femtoliter (fL)

표 2

[0029]

	1200hPa	1400hPa	1600hPa	1800hPa	2000hPa
0.3 sec	15	44	73	103	132
0.6 sec	30	88	146	205	264
0.9 sec	44	132	219	292	396
1.2 sec	60	176	292	438	528

[0030] 단위: number/fL

[0031] **실시예 3: 단일세포 형질전환의 효율 측정 / 전달된 유전물질의 양과 효율의 상관관계 분석**

[0032] 세포 내로 녹색형광단백질 유전물질이 전달된 단일세포의 형질전환 효율 측정을 위하여 유전물질이 주입된 생쥐의 섬유아세포를 이산화탄소 5%, 37℃의 배양조건에서 하루 동안 배양하였다. 24시간 배양 후 세포에서 해당 형광유전자의 발현 정도를 형광현미경을 통하여 조사하였다. 각 구역에서 유전물질이 주입된 10개의 세포 중 성공적으로 형질전환된 세포에서는 녹색의 형광을 발현하는 것을 확인하였으며 형광을 발현하는 세포의 숫자를 기록하여 형질전환 효율을 측정하였다. 각각의 구역마다 형질전환 효율에 차이를 보였으며, 이때 주입된 유전물질의 정량적인 양에 따라 일정한 경향성을 보이는 것을 확인하였고, 약 200~250분자 사이의 유전물질을 주입하였을 때 가장 효율이 높음을 확인하였다 (도 4a, 도 4b).

[0033] 또한, 주입된 유전물질의 정량적인 양에 따른 형광 단백질의 생산량을 비교하기 위하여 형광을 발현하는 형질전환된 세포의 형광 사진에서 녹색의 강도를 비교하였고, 이를 통하여 주입한 유전물질의 양에 따라 생산물의 양이 달라지는 것을 육안으로 확인하였다 (도 5a). 보다 정량적으로 분석하기 위하여, 녹색의 강도만 수치화하여 비교한 결과 더 많은 유전물질을 주입하였을 때 더 강하게 발현되지만 300분자 이상의 유전물질을 주입하였을 때는 발현량의 증가폭이 감소하는 것을 확인하였다 (도 5b).

[0034] 추가적으로, 한 번 주입된 유전물질의 지속시간을 확인하기 위하여 최대 7일까지 세포를 배양하며 날마다 형광의 발현을 확인하였고, 발현강도가 점점 약해지기는 하지만 7일 동안 형광의 발현이 유지되는 것을 확인하였다 (도 6). 마찬가지로 7일간의 배양기간 동안 주입된 유전자의 양에 따른 유전자의 발현 강도를 측정하였고 그 결

과 225분자의 유전물질을 주입된 조건에서 형광의 강도가 가장 잘 유지되는 것을 확인하였다 (도 7). 또한, 7일간의 배양기간 동안 형광을 유지하고 있는 세포의 비율을 기록하여 비교하였을 때에도 200~250 분자의 유전물질을 주입한 조건에서 가장 높은 유지비율을 나타내는 것을 확인하였다 (도 8). 이를 통하여 200~250 분자 사이의 유전물질을 주입하는 것이 단일세포에서 형질전환의 효율이나 유전자의 발현 강도와 지속성 측면에서 가장 효과적임을 확인하였다.

[0035] **비교예 1: 주입압력 1000hPa 이하에서의 전달효율 및 발현효율 비교**

[0036] (1) 주입압력 1000hPa 이하에서의 전달효율 비교결과

[0037] 단일세포 내에 형광물질인 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)를 전달하기 위해, 미세주입과 동시에 실시간 세포 내 형광을 관찰하는 방법으로 100~2000hPa의 주입압력에서 주입압력 별 전달효율을 확인하였다. 그 결과, 100hPa의 주입압력에서는 약 40%정도의 전달효율을 나타냈으며, 500hPa 이상에서는 100%의 전달효율을 나타냈다 (도 10a).

[0038] (2) 주입압력 1000hPa 이하에서의 발현효율 비교결과

[0039] pcDNA3.3_eGFP 유전자를 세포 내로 전달하고 24시간 후에 단일세포 내 녹색형광 발현효율(형질전환 효율)을 확인하였다. 그 결과, DAPI 전달효율을 통해 확인한 결과와는 달리, 녹색형광 단백질을 발현시키는 유전자 전달에서는 세포 내 유전자 발현효율이 상당히 낮았으며, 600hPa 이하의 주입압력에서는 발현효율이 확인되지 않았다. 700~1000hPa의 주입압력에도 상당히 낮은 발현효율과 재현성을 나타냈다 (도 10b). 이 결과로부터, 실시예 2에서와 같이 대기압보다 큰 1200hPa 이상의 주입압력으로 유전물질을 전달할 때에만 발현효율이 뛰어나다는 사실을 확인할 수 있었다.

[0040] **실시예 4: 세포 내로 두 가지 이상의 물질을 동시에 전달**

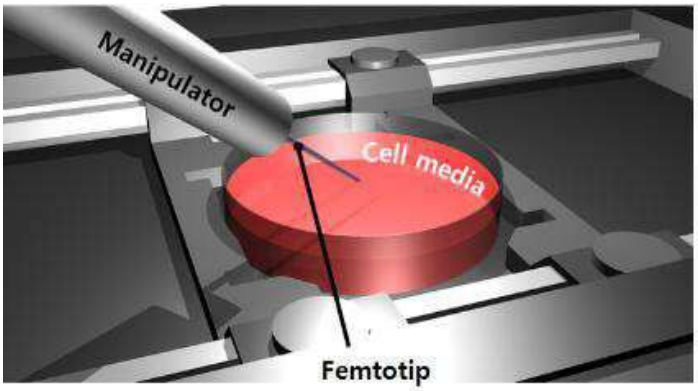
[0041] 앞서 확인한 결과들을 통하여 단일세포에 유전물질을 전달하여 형질전환 시키는 것이 성공적으로 수행 가능한 것을 확인하였다. 보다 다양한 기술로의 적용을 위하여 두 가지 이상의 유전물질의 전달도 가능한지를 확인하였다. 앞서 사용한 녹색형광단백질(GFP) 유전물질과 더불어 붉은색형광단백질(Td-tomato)과 세포핵 내부로 이동하는 푸른색형광단백질(EBFP2-Nuc)의 유전물질을 섞어서 함께 주입하였다. 유전물질이 주입된 생쥐의 섬유아세포는 마찬가지로 이산화탄소 5%, 37의 배양조건에서 하루 동안 배양하였고, 24시간 배양 후 형광현미경을 통하여 형광의 발현을 관찰하였다.

[0042] 그 결과, 성공적으로 유전물질이 전달되어 형질전환된 세포에서 녹색과 붉은색, 푸른색의 형광이 동시에 발현되는 것을 확인하였다 (도 9). 이를 통하여 본 발명의 기술로 두 종류 이상의 유전물질을 주입하는 것도 가능함을 확인하였고, 본 발명을 보다 다양한 세포공학적인 기술에 적용 가능함을 확인하였다.

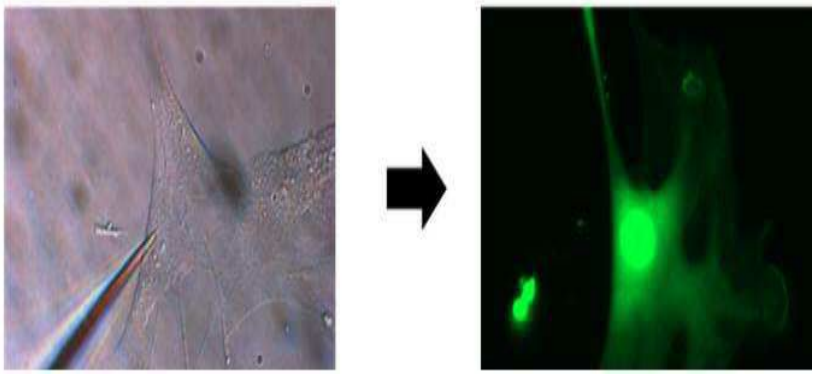
[0043] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

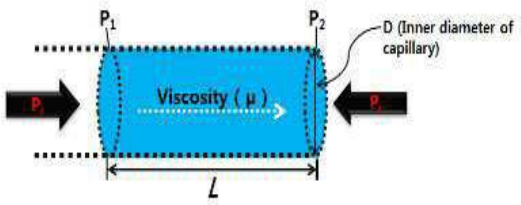
도면1



도면2



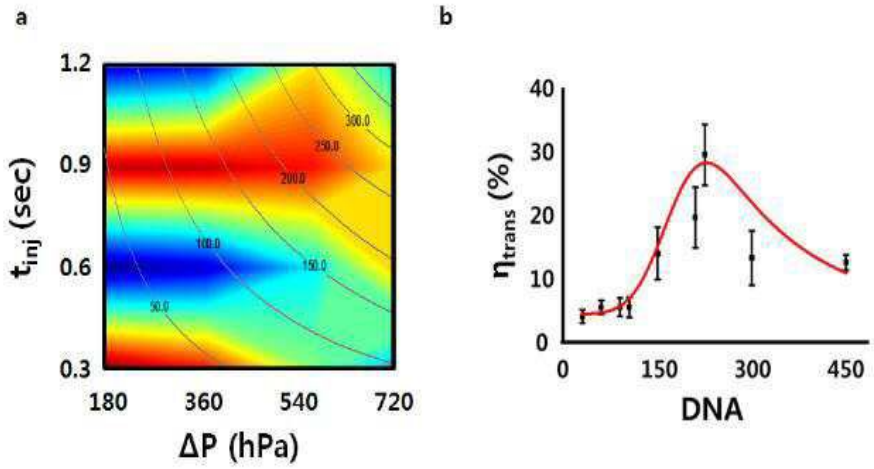
도면3



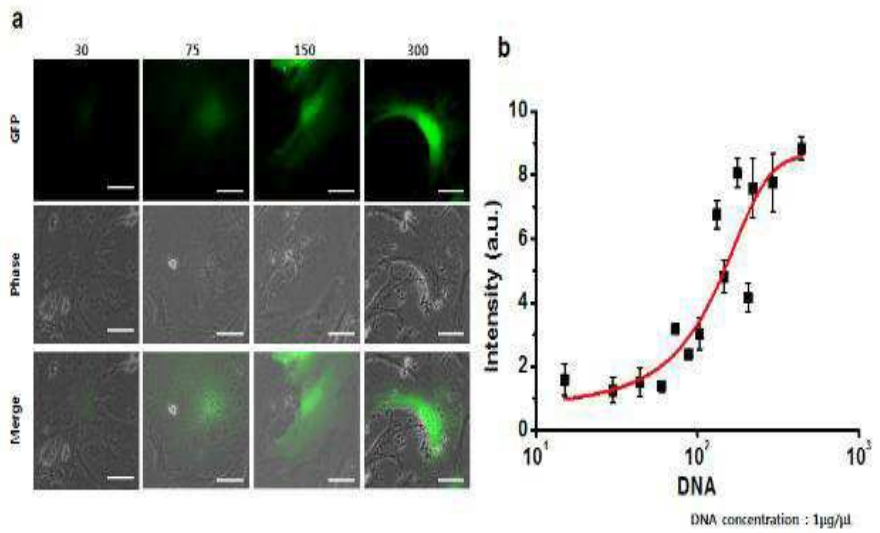
$$V = \frac{\Delta P \pi D^4 t}{128 \mu L}$$ (Poiseuille's Law)

ΔP: $P_i - P_c$
(P_i : 주입압력, P_c : 세포내압)
Π : Constant
D : tip의 내경
L : tip내부 액체의 높이
μ : DNA의 점성도
V = 주입총량

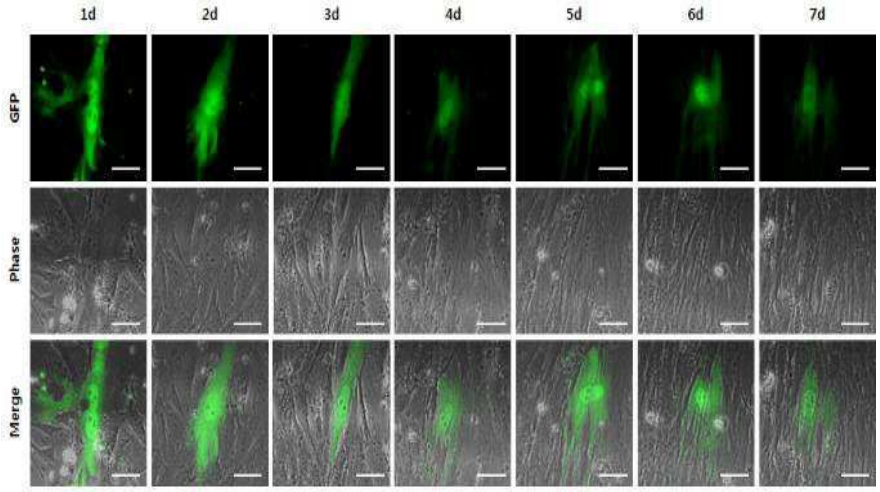
도면4


a
b
1.2
0.9
0.6
0.3
t_{inj} (sec)
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
180
360
540
720
ΔP (hPa)
40
30
20
10
0
η_{trans} (%)
0
150
300
450
DNA

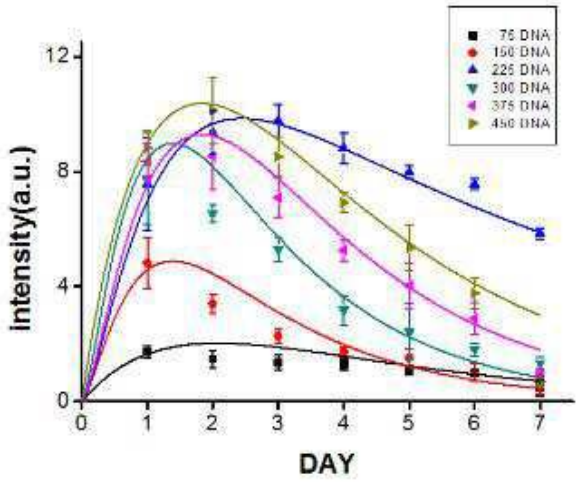
도면5


a
30
75
150
300
GFP
Phase
Merge
b
Intensity (a.u.)
10
8
6
4
2
0
10^1
10^2
10^3
DNA
DNA concentration : 1μg/μl

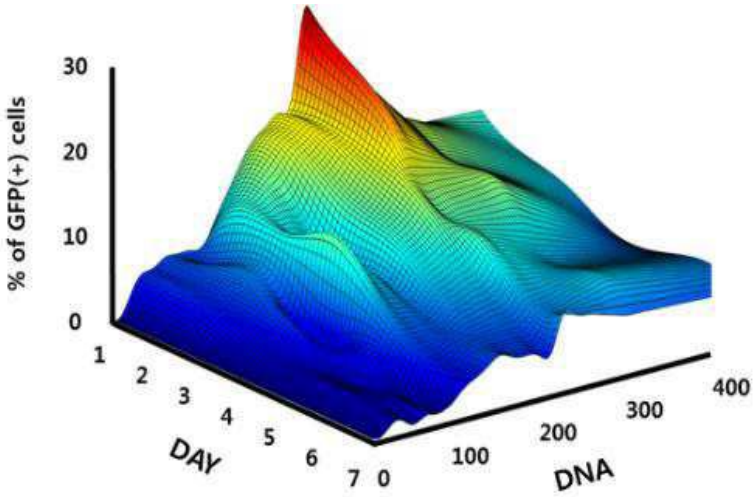
도면6


1d
2d
3d
4d
5d
6d
7d
GFP
Phase
Merge

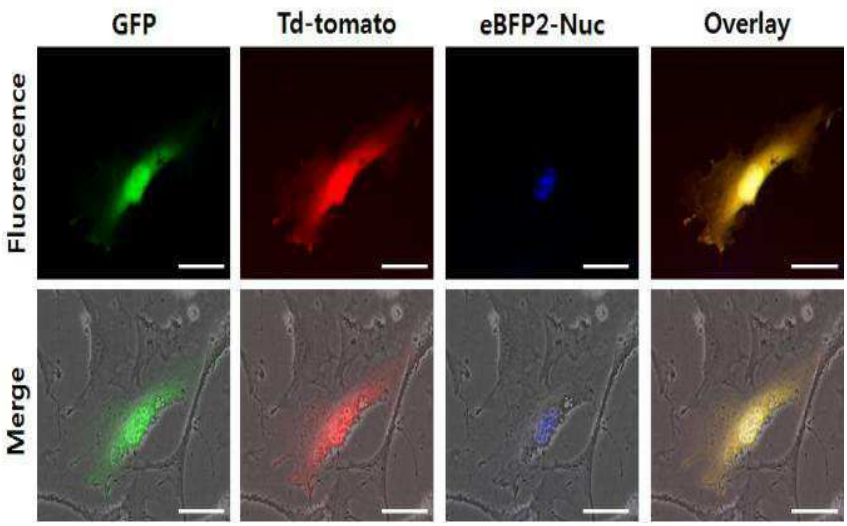
도면7


75 DNA
150 DNA
225 DNA
300 DNA
375 DNA
450 DNA
intensity(a.u.)
DAY
0
4
8
12
0
1
2
3
4
5
6
7

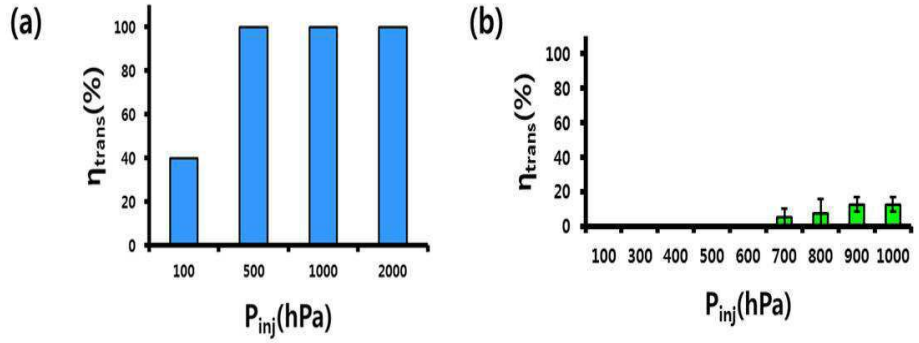
도면8


% of GFP(+) cells
30
20
10
0
1
2
3
4
5
6
7
DAY
0
100
200
300
400
DNA

도면9


GFP
Td-tomato
eBFP2-Nuc
Overlay
Fluorescence
Merge

도면10


(a)
η_{trans}(%)
100
80
60
40
20
0
100
500
1000
2000
P_{inj}(hPa)
(b)
η_{trans}(%)
100
80
60
40
20
0
100 300 400 500 600 700 800 900 1000
P_{inj}(hPa)