

## Green Fluorescent Protein(GFP)의 Fluorescence-Activated Cell Sorter(FACS) 분석을 통한 유전자 이입의 최적화

김태경·박민태·†이균민

한국과학기술원 생물과학과

(접수 : 1999. 2. 23., 게재승인 : 1999. 4. 30.)

### Optimization of Gene Transfection Using Fluorescence-Activated Cell Sorter(FACS) Analysis of Green Fluorescent Protein(GFP)

Tae Kyung Kim, Min Tae Park, and Gyun Min Lee†

Department of Biological Sciences, 373-1, Kusong-Dong, Yusong-Gu, Taejeon 305-701, Korea

(Received : 1999. 2. 23., Accepted : 1999. 4. 30.)

In order to improve the transfection efficiency of CHO/dhfr- cells using cationic lipid, optimal concentrations of the cationic lipid(LipofectAmine™) and DNA(pEGFP-C1) need to be determined. The use of green fluorescent protein(GFP) gene as a reporter gene facilitated the quantification of transfection efficiency. The green fluorescence intensity of each cell transfected at various lipid-DNA concentrations was measured using fluorescence-activated cell sorter(FACS) analysis. A combination of 2.0  $\mu$ L cationic lipid and 0.4  $\mu$ g DNA in a well resulted in the highest transfection efficiency. Taken together, the method using FACS analysis of GFP is simple and fast, facilitating the optimization of transfection.

Key Words : CHO/dhfr-, GFP, FACS, transfection, LipofectAmine™

#### 서론

동물 세포에 외래 유전자를 도입하는 방법은 여러 가지가 있다. 그 중 지질을 이용한 방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘염 침전법(calcium phosphate co-precipitation)이 널리 쓰인다(1). 이중 지질을 이용한 방법은 지질의 조성, 세포주의 특성, 도입되는 DNA등에 따라 유전자 이입 효율이 매우 달라진다(2). 따라서 최적의 유전자 이입 결과를 얻기 위해서는 각 세포주에 대하여 지질과 DNA의 농도가 최적화되어야 한다.

유전자 이입 효율을 정량하기 위해서 secreted alkaline phosphatase[SEAP; (3)],  $\beta$ -galactosidase[ $\beta$ -gal, (4)], firefly luciferase(5), 그리고 chloramphenicol acetyltransferase [CAT; (6)]등의 여러 가지 reporter 유전자가 사용되어 왔다. 특히 최근에는 다양한 세포에서의 유전자 발현과 단백질 분포를 관찰하는데 green fluorescent protein(GFP)가 많이 사용되고 있다(7,8). 이 단백질은 특별한 기질이나 조효소, 효소의 필요없이도 검출이 용이하며, 더욱이 살아있는 세포내에서의 실시간 검출이 가능하다(9) 또한 형광을 띄는 데 걸리는 시간이 비교적 짧아 실험이 신속해진다는 장점들을 가지고 있다(9).

따라서 본 연구에서는 GFP를 이용함으로써 유전자 이입 최적

화를 보다 빠르고 간편하게 하고자 하는 바, 상업적으로 중요한 세포주인 CHO/dhfr- 세포에 대하여 최근 널리 사용되고 있는 지질인 LipofectAmine™을 사용하여 유전자 이입 효율의 극대화를 위한 지질과 DNA의 최적 농도를 구하고자 한다.

#### 재료 및 방법

##### 세포주 및 배양 방법

CHO/dhfr-(ATCC CRL-9096) 세포가 사용되었다. 배양에는 Iscove's modified Dulbecco's medium(IMDM, GibcoBRL)에  $10^{-4}$ M hypoxanthine(GibcoBRL),  $1.6 \times 10^{-5}$ M thymidine(GibcoBRL), 10% fetal bovine serum(FBS, GibcoBRL)를 첨가하여 사용하였다. 모든 세포 배양은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 실시하였다.

##### Vector

GFP의 발현 vector로서는 pEGFP-C1(CLONTECH)가 사용되었다. 이 vector의 GFP 유전자의 발현에는 immediate early promoter인 human cytomegalovirus(hCMV)가 사용되었다.

##### CHO/dhfr- 세포의 유전자 이입 최적화

세포는 배양 접시에 부착된 상태로 유전자 이입 되었다 유전자 이입 하루 전에 세포를 trypsin 처리하여 회수하고, 24-well plate에  $3.4 \times 10^4$  cells/well의 농도로 접종하여, 다음날 세포가 60-80% 포화상태에 도달하도록 하였다. 96-well plate에서 LipofectAmine™(GibcoBRL)과 pEGFP DNA를 OPTI-MEM I

† Corresponding Author Department of Biological Science, 373-1, Kusong-Dong, Yusong-Gu, Taejeon 305-701, Korea  
Tel . 042-869-2618, Fax . 042-869-2610  
e-mail : gmlee@sorak.kaist.ac.kr

배지에 희석하여 각 well 당 각각 25  $\mu$ L씩 들어가도록 준비하였다. LipofectAmine™은 1.0, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0  $\mu$ L/well, DNA는 0.2, 0.3, 0.4, 0.5  $\mu$ g/well의 농도를 사용하였다. 희석된 LipofectAmine™과 DNA 용액을 섞은 후, 실온에서 15분간 방치하여 DNA-LipofectAmine™ 복합체가 형성되도록 하였다. 24-well에서 배양 중인 세포는 Opti-MEM I으로 두 번 씻은 후, 각 well 마다 0.15 mL의 Opti-MEM I을 넣어 세포층 위를 덮어 두었다. 이 중 20개 well에 각 농도의 DNA-LipofectAmine™ 복합체를 첨가하고, 1개 well은 대조구로서 아무것도 첨가하지 않은 채 37°C에서 4시간 배양한 다음, 이 DNA-LipofectAmine™ 복합체 용액을 제거하고, 1 mL의 20% FBS를 넣은 IMDM 배지를 첨가하였다. 48시간 후에 FACS를 이용하여 GFP fluorescence를 측정하였다.

**FACS 분석을 위한 세포의 전처리**

각 well로부터 trypsin 처리를 하여 세포를 회수하였다. Trypan blue dye exclusion 방법 (10)을 이용하여 회수된 각 세포들의 생존 세포수를 측정하고, 분석을 위한 나머지 세포들은 원심분리를 이용하여 phosphate-buffered saline(PBS)으로 두 번 씻어내었다. 0.5% paraformaldehyde를 이용하여 4°C에서 30분간 세포를 고정시킨 후, 다시 PBS로 씻어내고, 200-300  $\mu$ L의 PBS로 resuspend하였다.

**FACS 분석**

FACS 분석은 FACSCalibur™ System(Becton Dickinson, San Jose, CA)을 이용하였다. 각 sample 마다 5000개 세포가 분석되었다. FACS를 통하여 얻은 자료들은 CELLQuest™를 이용하여 아래와 같이 처리되었다. 먼저, pEGFP-C1이 이입되지 않은 대조구 sample로부터 forward scatter(FSC) light와 side scatter(SSC) light를 plot하여 분석조건을 설정하였다. 분석을 위한 기기 설정은 Table 1에 요약해 놓았다. 이렇게 설정된 조건을 이용하여, 대조구 sample과 나머지 20개 sample들의 FL1(green fluorescence) 히스토그램을 차례대로 얻었다. Histogram statistics를 이용하여 green fluorescence intensity를 통계적으로 분석하였다.

Table 1. The instrumental settings of FACSCalibur.™

Detector	Voltage	Detector/Amps	Mode
FSC (forward scatter light)	E-1	5.30	linear
SSC (side scatter light)	410	1.00	linear
FL1 (green fluorescence)	490		log

**결과 및 고찰**

히스토그램 결과를 Figure 1에 나타내었다. Figure 1 (a)는 이입되지 않은 대조구 sample의 auto-fluorescence를 나타내며, Figure 1 (b)는 fluorescence intensity가 가장 낮은 sample의 fluorescence, 그리고 Figure 1 (c)는 fluorescence intensity가 가장 높은 sample의 fluorescence 분포를 나타낸다.

Figure 1의 결과로부터 fluorescence intensity의 분포가 다양

(heterogeneous)함을 볼 수 있는데, 이는 플라스미드가 이입 과정에서 세포내로 들어가는 효율이 다르거나 혹은 세포 내부로 들어간 플라스미드의 GFP 유전자가 발현되는 정도가 다양하기 때문이라고 생각된다.

각 sample의 5000개 세포에 대한 mean fluorescence intensity의 결과는 Figure 2와 같았다. 한편, LipofectAmine™과 DNA의 농도에 따른 세포의 생존율은 Figure 3와 같았다. 이 때 세포의 생존율을 고려했을 때 생존 세포에 대한 최종 mean fluorescence intensity 값의 결과는 Figure 4와 같게 된다. Figure 2와 Figure 4를 비교하여 알 수 있듯이 생존율을 고려하지 않은 경우(Figure 2)와 생존율을 고려한 경우(Figure 4)의 mean fluorescence intensity 양상이 다르게 나타남을 볼 수 있다. 한 예로, 전자의 경우 최고 mean fluorescence intensity가 3.0  $\mu$ L LipofectAmine™과 0.3  $\mu$ g DNA에서 나타나는 반면, 후자의 경우는 2.0  $\mu$ L LipofectAmine™과 0.4  $\mu$ g DNA에서 나타났다. 이같은 현상은 이미 잘 알려진 대로 유전자 이입시 지질을 이용하는 경우 나타나는 세포독성에 의해서 유전자 이입 후 각 LipofectAmine™ 농도에 따라 전체 생존 세포수에 차이가 생기기 때문에 나타나는 결과라 생각된다(11). 따라서 각

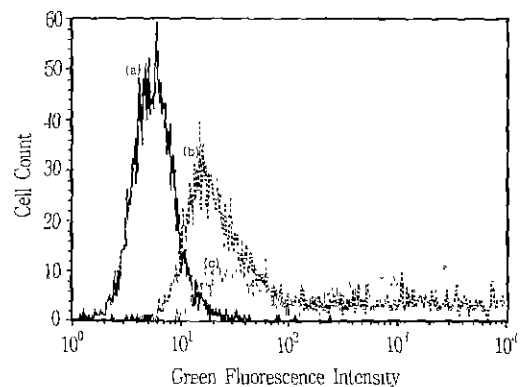


Figure 1. Histograms of auto-fluorescence (a), low fluorescence intensity (1.0  $\mu$ L lipid - 0.5  $\mu$ g DNA) (b), and high fluorescence intensity (3.0  $\mu$ L lipid - 0.3  $\mu$ g DNA) (c) of cells.

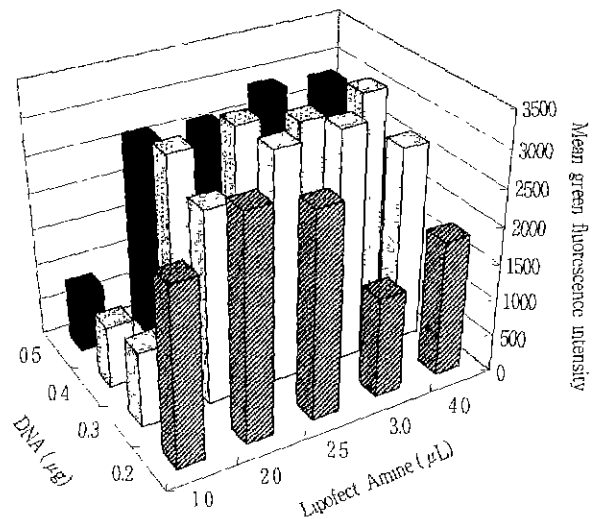


Figure 2. Simultaneous lipid-DNA optimization for 5000 cells

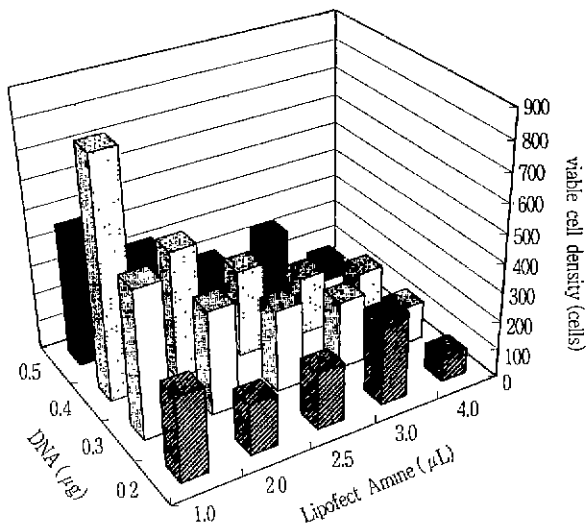


Figure 3. Total viable cell numbers of each well at 48 hrs post-transfection.

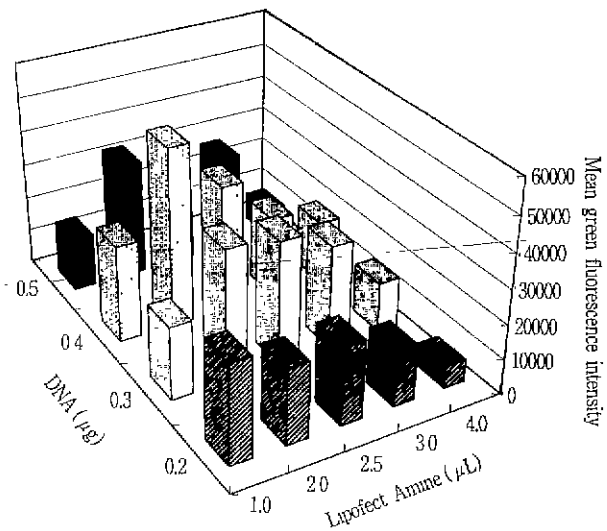


Figure 4. Simultaneous lipid-DNA optimization for viable cells.

well의 전체 세포가 나타내는 유전자 이입 효율은 유전자 이입된 세포의 생존율과 밀접한 관련이 있음을 확인할 수 있었다. 이렇듯 GFP를 이용함으로써 기존의 어떠한 방법보다도 간편하고 빠르게 유전자 이입 최적화를 수행할 수 있었으며, 뿐만 아니라 히스토그램을 분석함으로써 전반적인 유전자 이입 양상을 확인할 수 있었다. 또한 GFP를 이용한 방법은 기타 여러 세포주에 대한 외래 유전자의 이입에 관련하여 앞으로 더욱 다양하게 응용될 수 있다고 사료된다.

요 약

CHO/dhfr<sup>-</sup> 세포에 대해 LipofectAmine<sup>TM</sup>을 이용한 유전자 이입 효율을 증가시키기 위하여 지질과 DNA의 최적 농도를 구하였다. Reporter 유전자로서 GFP 유전자를 이용하였으며, 여

러 농도의 지질-DNA로 유전자 이입된 각 세포군에서 나타나는 green fluorescence intensity를 FACS 분석함으로써 유전자 이입 효율을 정량화 할 수 있었다. 그 결과 24-well plate에서 2.0 µL LipofectAmine<sup>TM</sup>과 0.4 µg DNA를 조합하여 사용했을 때 최적의 유전자 이입 효율이 나타남을 알 수 있었다. 또한, GFP는 유전자 이입 최적화를 수행하는 데에 여러 가지 면에서 유용한 수단이 될 수 있음을 확인할 수 있었다.

감 사

본 연구는 과학기술처, G7과제(08-03-20)와 한국과학재단 지원 핵심전문연구(971-1105-029-2)의 일부에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Gorman, C. (1985), High efficiency gene transfer into mammalian cells, DNA cloning (D. Glover, ed.), Vol. III, pp. 143-190, Academic Press, New York.
- Schifferli, K. P. and V. Ciccarone (1996), Optimization of cationic lipid reagent-mediated transfection for suspension cell lines, *Focus* 18, 45-47.
- Berger, J., J. Hauber, R. Hauber, and B. R. Cullen (1988), Secreted placental alkaline phosphatase: a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells, *Gene*, 66, 1-10.
- Alam, J. and c. J. L. (1990), Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription, *Anal. Biochem.* 188, 245-254.
- de Wet, J. R., K. V. Wood, M. DeLuca, D. R. Helinski, and S. Subramani (1987), Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells, *Mol. Cell. Biol.* 7, 725-737.
- Gorman, C. M., L. G. Moffat, and B. H. Howard (1982), Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells, *Mol. Cell. Biol.* 2, 1044-1051.
- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, and D. C. Prasher (1994), Green fluorescent protein as a marker for gene expression, *Science* 263, 802-805.
- Kain, S. R., M. Adams, A. Kondepudi, T. T. Yang, W. W. Ward, and P. Kitts (1995), Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization, *BioTechniques* 19, 650-655.
- Subramanian, S. and F. Sreenc (1996), Quantitative analysis of transient gene expression in mammalian cells using the green fluorescent protein, *J. Biotechnol.*, 49, 137.
- Freshney, R. Ian (1994), Culture of animal cells, pp. 268-270, Wiley-Liss, Inc., New York.
- van der Woude, I., H. W. Visser, M. B. ter Beest, A. Wagenaar, M. H. Ruiters, J. B. Engberts, D. Hoekstra (1995), Parameters influencing the introduction of plasmid DNA into cells by the use of synthetic amphiphiles as a carrier system, *Biochim. Biophys. Acta* 1240(1), 34-40.