

저분자량 키토산/유전자 나노복합체 제조 및 이를 이용한 293 세포로의 전달

방시원 · 장양수* · 김종현**† · 김우식**

중소기업진흥공단 중소기업연수원 생산기술연수실
425-781 경기도 안산시 원곡동 931

*연세대학교 의과대학 연세심혈관연구소, **화학공학과
120-749 서울시 서대문구 신촌동 134

(2004년 12월 6일 접수, 2005년 1월 17일 채택)

DNA Condensation and Delivery in 293 Cells Using Low Molecular Weight Chitosan/gene Nano-complex

Shi-Won Pang, Yangsoo Jang*, Jung-Hyun Kim**† and Woo-Sik Kim**

Office of Technical Instructors, Small Business Training Institute, 931, Wongok-dong, Ansan, Kyonggi-do 425-781, Korea

*Yonsei Cardiovascular Research Institute, College of Medicine, **Department of Chemical Engineering,

Yonsei University, 134, Shinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-749, Korea

(Received 6 December 2004; accepted 17 January 2005)

요 약

양이온성 고분자와 같은 합성 유전자 전달체들은 음이온성을 지닌 plasmid DNA와 쉽게 복합체를 형성하는 경향이 있다. 이에 키토산은 유전자 전달체 시스템으로써 이용되어 질 수 있는 무한한 가능성을 지닌 polysaccharide이다. 저분자량 키토산이 DNA와 결합을 할 수 있는지 확인하기 위하여 전기영동장치를 이용하여 분석하였다. DLS(dynamic laser scattering)와 SEM(scanning electron microscopy)을 이용하여 키토산/DNA 복합체의 크기와 모폴로지를 조사하였다. 또한, 키토산의 분자량과 전하밀도가 복합체의 크기와 결합된 DNA의 양에 어떻게 영향을 주는지 연구를 수행하였다. 저분자량 키토산은 실험과정에서 사용되는 양을 늘려갈수록 84-108%의 세포 생존율을 보임에 따라 그 독성이 무시할 정도가 됨을 확인할 수 있었다. 키토산/DNA 복합체를 이용한 유전자 발현 효율 실험에서는 lipofecamine에 비해서는 낮은 값을 보였지만, naked DNA를 이용한 경우보다는 상대적으로 높은 값을 나타내었다. 키토산의 분자량에 따른 유전자 발현 효율 연구에서는 평균 분자량이 8,517인 키토산을 사용한 경우가 4,078의 분자량을 이용한 실험 결과보다 높은 값을 보였고, 이는 키토산의 전하밀도가 유전자 발현 효율에 영향을 준다는 것을 확인할 수 있었다.

Abstract – Synthetic gene carriers such as poly-cationic polymers easily form complexes with plasmid DNA which contains negative charge. Chitosan is a polysaccharide that demonstrates much potential as a gene delivery system. The ability of depolymerized chitosan to condense DNA was determined using electrophoresis. Dynamic laser scattering and scanning electron microscopy were used to examine the size and the morphology of the chitosan/DNA complex. Parameters such as chitosan molecular weight and charge density influenced the complex size and the DNA amount condensed with chitosan. The cell viabilities in the presence of chitosan ranged between 84-108% of the control in all experiments. Gene expression efficacy using chitosan/DNA complex was enhanced in 293 cells relative to that using naked DNA, although it was lower than that using lipofecamine. Transfection efficacy using low molecular weight chitosan (Mw=8,517) was higher than those of the control and the other chitosan (MW=4,078). The low molecular weight chitosan (MW=8,517) with a high charge density (18.32 mV) fulfilled the requirements for a suitable model gene delivery system with respect to the condensing ability of DNA, complex formation, and transfection efficacy.

Key words: Gene Delivery, Chitosan, Molecular Weight, Transfection, Nano Complex

† To whom correspondence should be addressed.

E-mail: jayhkim@yonsei.ac.kr

*이 논문은 연세대학교 김우식 교수의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

1. 서 론

최근 들어 치료용 DNA를 세포내로 주입하는 다양한 연구가 진행중에 있다. 이러한 많은 기술 중 하나인 비 바이러스성 전달체계는 거대 분자를 이용하여 어셈블리화하는 방법을 쓰고 있다. 유전자 전달에서의 비 바이러스성 전달체계는 바이러스성 전달체를 대체하는 안전성이 우수한 것으로 그 관심이 증대되고 있다[1, 2]. 비 바이러스성 전달체는 전달받은 모체의 면역반응을 최소화하고 표적화 및 저장 안정성 그리고 대량 생산의 장점이 있다. 이러한 장점들로 인하여 비 바이러스성 전달체의 연구가 계속 진행돼 왔다[3].

양이온성 고분자는 비 바이러스성 유전자 전달체 체계에서 우수한 장점을 가지고 있는데, 특히 다른 비 바이러스성 유전자 전달체 물질인 리포좀 또는 양이온성 리피드 시스템과 비교해 볼 때 양이온성 고분자-DNA 콤플렉스가 일반적으로 더 안정한 것으로 알려져 있다. 유전자 전달체로서 연구된 양이온성 고분자는 polylysine[4], polyethyleneimine[5], polyamidoamine dendrimers[6], poly((4-aminobutyl)-L-glycolic acid)[7] 등이 있다. 이러한 양이온성 고분자들은 정전기적 상호작용 때문에 음이온성을 띠는 DNA와 콤플렉스를 이루고 양이온성을 띠는 DNA 콤플렉스는 세포의 표면 전하가 음이온성을 띠기 때문에 이 또한 정전기적 상호력으로 세포내로의 주입이 용이하게 된다. 이러한 콤플렉스들의 유전자 발현 효율은 *in vivo*와 *in vitro*에서 연구가 진행되어 왔다. 그러나 이러한 양이온성 고분자를 약물 전달체로서의 실용화를 하기 전에 극복되어야 할 몇 가지 문제점이 있다.

우선 낮은 발현 효율, 강한 세포독성, serum에 의한 활동성 저하 등이 있다. Fiona와 Roy 그룹에서는 *in vivo* 상에서 plasmid를 키토산을 이용하여 전달하는 실험을 진행하였다[9]. 또 다른 연구 결과에서도 *in vitro*와 *in vivo* 상에서 키토산을 이용한 유전자 전달이 성공적인 결과를 얻었다는 연구가 나오기도 했다[8-11]. 그러므로 키토산은 실제로 응용할 수 있는 유전자 전달체로서의 물질이 가능하다. 그러나 DNA/키토산 콤플렉스의 발현 효율에 대한 적당한 조건은 명확하게 밝혀져 있지 않다. 일반적으로 고분자의 생물학적 기능은 분자량과 배양액(pH 또는 첨가물)의 실험적 조건에 크게 의존한다. 양이온성 고분자에 의한 DNA 발현 효율을 증대하기 위해서는 고분자의 특성을 조절해야 한다.

본 연구에서는 키토산의 분자량, DNA/키토산 콤플렉스 크기를 변수로 하여 유전자의 발현 효율이 naked DNA와 lipofecamine과의 발현효율과 비교하여 어떻게 다른지에 대하여 고찰하였다.

2. 실험

2-1. 재료 및 시약

본 연구에 사용된 시약은 다음과 같다. 키토산(분자량: 332,094 g/mol, 한국)은 (주)자광에서 공급받았다. 이 키토산의 디아세틸화도는 70% 정도였다. 키토산의 분자량을 조절하기 위하여 화학적 방법을 이용하였다. 사용된 시약은 sodium nitrite(NaNO₂, Sigma, USA)이다. 키토산을 녹이기 위해 사용된 용매는 아세트 산(Glacial, CH₃COOH, Yakuri Pure Chemical Co. Ltd., Japan)이며, 본 실험에 사용된 DNA와 세포는 pcDNA 3.1/Hydro/lacZ(3.5 kb)와 293 세포이며 이들은 연세 심혈관 센터에서 공급해 주었다. 유전자 발현 효율을 비교하기 위하여 사용된 lipofecamine은 Gibco, BRL(Life Technologies

Table 1. Recipes for depolymerized chitosan

Sample	Components					Temp (°C)
	Chitosan (g)	Acetic acid (g)	Sodium nitrate (g)		Water (g)	
			1 step	2 step		
DP-CS I ^d	2	6	0.2565	0.025	100	25
DP-CS II	2	6	0.0855	0.025	100	25

A: DP-CS (Depolymerized chitosan)

Ltd., USA)에서 구하였으며, 분자량이 낮춰진 키토산을 분획하기 위해서 투석막(cut-off=12,000-14,000 Da, Cellu. Sep T3; Membrane Filtration Products, Inc., USA)을 사용하였다. 이외 기술하지 않은 시약들은 Sigma(USA)에서 구입하여 사용하였으며, 본 실험에서 사용된 물은 Milli-Q ZMQS 600 OY (France)를 이용한 D.D.I.급을 이용하였다.

2-2. 실험방법

2-2-1. 키토산의 저분자량화 및 분석

키토산을 저분자량화 하기 위하여 Peniston 그룹에서 한 화학적 방법을 이용하였다[12]. 키토산을 25 °C에서 1시간 동안 6%의 아세트산 수용액에 sodium nitrite와 함께 교반을 시켜서 저분자량화 하였다. 저분자량화 공정에 적용된 정확한 조성은 Table 1과 같다. 이렇게 저분자화 되어 있는 키토산 아세트산 수용액을 분산매를 PBS (pH=7.4)으로 바꾸기 위해 저분자 키토산 용액을 투석막을 이용하여 치환시켰으며 실험에 사용할 때는 더 이상의 조작은 취하지 않았다. 이렇게 분리 및 정제된 저분자량 키토산의 분자량을 분석하기 위하여 gel permeation chromatography(GPC)를 이용하였으며, 칼럼으로는 ultrahydrogel 500과 ultrahydrogel linear를 사용하였으며 이동상액으로는 0.1 M sodium chloride가 함유된 0.1 M 아세트산용액을 1 mL/min의 속도로 분석하였다. 분자량 분석을 위한 표준물질로는 분자량 360, 5,900, 112,000, 788,000의 pullulans를 사용하였다.

2-2-2. 293 세포를 이용한 저분자량 키토산의 독성 실험

정제된 저분자량 키토산의 세포 독성을 측정하기 위하여 *in vitro* 상태에서 293 세포의 생존율을 이용하여 알아보았다. 10%의 FBS (fetal bovine serum)를 함유한 DMEM 배양액에 세포를 3×10⁵개를 6-well plate에 배양하였고, 이 plate를 24시간 동안 37 °C, 5% CO₂ 하의 인큐베이터에 보관하였다. 여기에 저분자량 키토산을 주입한 후, 위의 조건과 같은 인큐베이터 하에서 48시간 동안 배양하였고, 이후 PBS 용액으로 세척한 후, 세포의 생존율을 알아보았다.

2-2-3. DNA/저분자량 키토산 콤플렉스의 제조 및 발현 효율 실험

DNA/저분자량 키토산 콤플렉스는 self-assembly의 이론을 이용하여 제조하였다. 일정한 질량비로의 콤플렉스를 제조하기 위하여 다양한 양의 저분자량 키토산을 5 µg의 plasmid를 함유한 수용액과 혼합한 뒤, PBS를 첨가하여 총 부피를 200 µL로 정하였다. 이 용액을 vortexer를 이용하여 10초간 강하게 교반한 뒤, 30분간 다시 천천히 교반하였다. 그 후 완전한 콤플렉스를 형성하기 위하여 상온에서 다시 30분간 방치하였다. 이렇게 제조된 콤플렉스의 유전자 결합능력을 확인하기 위하여 전기영동장치를 이용하여 분석하였다. 또한, 콤플렉스의 크기와 형상을 확인하기 위하여 SEM을 이용하여 조사하였다.

Table 2. Characterization of depolymerized chitosan

Properties	Samples		
	CS	DP-CS I	DP-CS II
M_w	332,094	4,078	8,517
Zeta potential (mV)		14.06 (± 2.71)	18.32 (± 3.26)

In vitro 하에서 DNA/저분자량 키토산 복합체의 유전자 발현 효율 실험을 하기 위하여 293 세포를 이용하였고, 분석법은 β -galactosidase assay를 사용하였다. 세포 독성 실험과 똑같이 293 세포 plate를 준비한 후, 복합체와 lipofecamine 그리고 naked DNA를 세포 배양액에 투입하였다. 그 후 48시간 동안 배양한 후, PBS로 세척하였고, 유전자의 발현 정도를 확인하기 위하여 X-gal을 이용하였다. 그 후, 광학 현미경을 이용하여 발현의 정도를 정성적으로 확인하였고, 그 정도를 정량화하기 위하여 위에서 기술한 β -galactosidase assay를 사용하였다.

3. 실험 결과 및 고찰

3-1. 저분자량 키토산의 특성 분석 및 293 세포에 대한 세포 독성

화학적 방법으로 키토산을 저분자량화 한 용액의 분산매를 투석막을 이용하여 PBS로 치환하고, 분자량은 GPC로, 키토산의 이온 밀도 정도는 ZetaPlus와 FT-IR, 적정법으로 분석하였다. 키토산의 분자량과 전하도는 Table 2에 나타내었다. Sodium nitrate의 양이 증가할수록 키토산의 분자량은 8,517에서 4,078로 감소하였다. 예상한 대로 키토산의 양이온성 전하량 또한 18.32 mV(± 3.26)에서 14.06 mV(± 2.71)로 감소하였다. 이렇게 만들어진 키토산은 물에 매우 잘 녹으며, PBS에서도 완벽히 용해된다. 저분자량 키토산의 세포 독성 실험에서는 독성의 기준점을 정하기 위하여 세포를 배양할 때 한 곳은 어떠한 첨가제를 넣지 않고 순수하게 세포만 배양하여 48시간이 지난 후, 첨가제를 넣지 않은 세포의 숫자를 100%로 기준을 정하였다. 3×10^5 개의 세포를 뿌린 후에, 키토산을 각각 50, 100, 500 μ g, 1, 2 mg씩 주입하였다. 이 상태에서 48시간 동안 배양한 후, 기준이

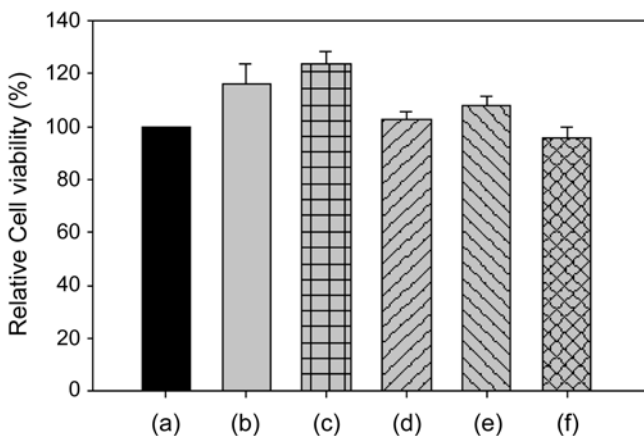


Fig. 1. Cell viability; 3×10^4 293 cells in DMEM were incubated with various amounts of DP-CS in a 24-well in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 at 37 $^\circ\text{C}$ for 24 hrs. Cell toxicity of the DP-CS was measured, and the cell viability compared to the control, which was additive-free cell culture; (a) Control, (b) DP-CS 50 μ g, (c) DP-CS 100 μ g, (d) DP-CS 500 μ g, (e) DP-CS 1 mg, and (f) DP-CS 2 mg (Mean \pm S.D., n=5).

되는 세포 배양 상태와 비교하였다. Fig. 1에서와 보는 바와 같이 저분자량 키토산은 주입되는 양이 증가하여도 눈에 띄게 독성을 주는 경향은 보여 주지 않았다. 유전자 전달 실험에 사용되는 양의 범위에서 저분자량의 키토산은 세포에 독성을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

3-2. DNA/저분자량 키토산 복합체의 특성

음이온성을 띠는 DNA에 대하여 전달체로써 저분자량 키토산의 효력을 확인하기 위하여 DNA/키토산 복합체의 형성 후 전기영동장치를 이용하여 분석하였다. 복합체를 만들기 전에 초음파 분산기를 이용하여 저분자량 키토산을 분산시킨 후, 100 ng의 DNA와 다양한 양의 키토산을 혼합시켰다. 앞에서 기술한 바와 같이 복합체를 만든 후, 1.0%의 agarose gel에서 DNA와의 결합 효율을 확인하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이, DNA/키토산 복합체가 형성될 시, DNA와 분자량이 4,078의 키토산인 경우 질량비가 1:10 일 때, 8517의 키토산인 경우 1:5일 때 키토산이 주입됨에 따라 DNA를 완벽하게 결합하는 것을 볼 수 있었다. 이러한 결과들은 저분자량의 키토산이 이 질량비를 이상에서 완벽하게 유전자를 보호한다는 것을 말해준다. 이렇게 들어가는 질량의 비가 틀린 이유는 분자량이 감소함에 따라 저분자량의 키토산이 가지고 있는 활성 양이온

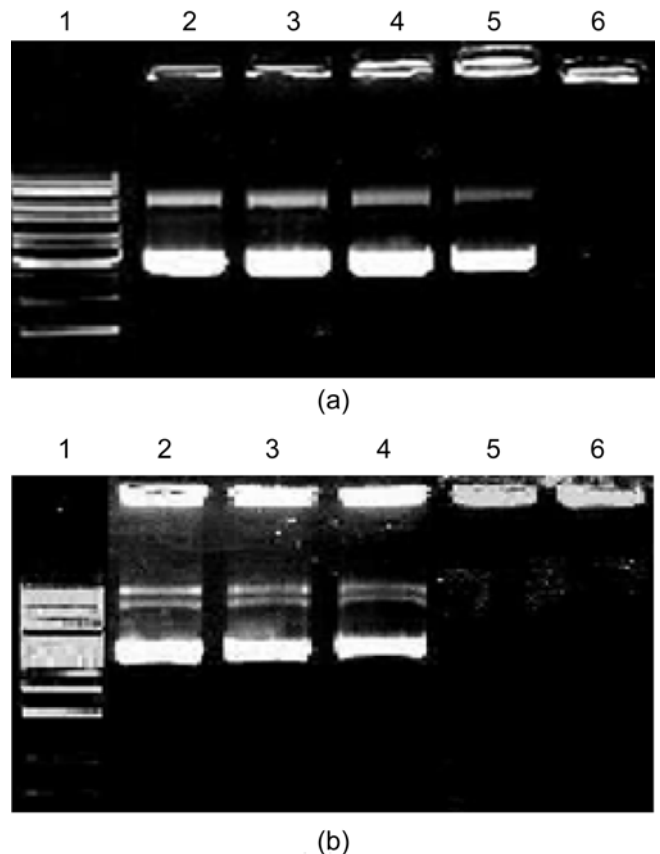


Fig. 2. Gel retardation assay. DNA/DP-chitosan complexes were analyzed on a 1% agarose gel electrophoresis. Lane 1, plasmid alone; lanes 2-6, plasmid/chitosan complexes with progressively increasing proportions of chitosan (1:0.5, 1:1, 1:2, 1:5, and 1:10). The band retardation showed that complete retardation of DP-CS I (a) was achieved at above a 1:10 weight ratio of DNA:chitosan, and in the case of DP-CS II (b), the weight ratio of DNA:chitosan was 1:5.

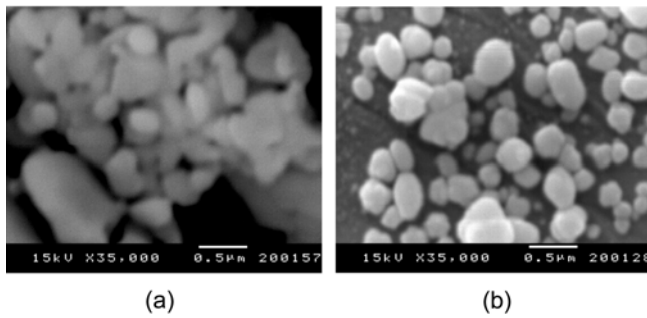


Fig. 3. Scanning electron micrographs of DNA/DP-CS nano-complex; (a) and (b) were formed by DNA (5 µg) and DP-CSs (25 µg) of 4078 and 8517 (MW), respectively.

전하 밀도가 낮아짐에 따라 주입한 유전자를 완벽하게 보호하기 위해서는 더 많은 양이온 전하가 필요로 한다는 것을 말해준다. 전하를 높이기 위해서는 필요한 키토산의 양이 증가하는 것이다. 전기영동법을 이용한 결과는 Table 2에서의 키토산 전하량의 결과와 일치하는 경향을 보인다. 유전자 전달체의 필요 요건으로 전달체의 소재가 세포 독성이 없어야 하며, 유전자와 결합할 수 있는 충분한 양이온 전하 밀도를 가지고 있어야 하는 것이다. 소재의 전하 밀도가 낮으면 유전자와 결합해야 하는 소재의 양이 증가하여 세포의 생존에 영향을 줄 수가 있다. Fig. 3은 DNA/키토산 콤플렉스의 형상을 SEM으로 분석한 결과인데 콤플렉스의 크기는 다분산성을 띄지만, 모양은 구형과 비슷하고 작은 것은 100 nm에서 큰 것은 400 nm 정도의 크기를 보였다.

3-3. DNA/키토산 콤플렉스를 이용한 293 세포로의 유전자 전달

콤플렉스나 전달체 내에 존재하는 DNA 양은 세포내로의 발현 효율을 높이는 데 꼭 필요한 조건이다. DNA의 함유량을 높이기 위해서는 전달체의 양이온 전하 밀도가 높아야 한다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 두 종류의 저분자량 키토산은 DNA를 최대량으로 결합하기 위해서는 각각 1:5와 1:10의 질량 비율이 필요하다. Fig. 4는 이러한 콤플렉스를 이용하여 유전자 전달을 실험한 결과 발현되는 경향을 정성적으로 보여주는 광학현미경 사진이다. 예상한 바와 같이 유전자가 전달되어 발현된 세포의 양은 키토산의 양이온성 전하가 증가할수록 많아지는 경향을 보였다.

전달체를 사용하지 않은 naked DNA로 전달 실험을 한 경우(Fig. 4(a) 참조), 그 발현 효율이 급격히 낮아 있음을 보였다. 그러나 Fig. 4(d)와 4(e)인 경우에는 4(a)에 비하여 전달된 유전자의 양이 매우 많아 보인다. 4,078의 분자량을 가진 키토산(DP-CS I, MW=4,078)인 경우, 키토산의 양이 증가할수록 유전자가 전달된 세포의 수가 증가하는 경향을 보였다. 이 같은 결과는 유전자와 키토산의 질량비가 1:5의 비율로 혼합시켰을 경우, DNA와 충분히 결합할 수 있는 전하량이 주어지지 않아서 이 이상의 비율로 혼합하였을 경우 결합하지 않는 DNA의 양이 줄어들어 세포로의 DNA 전달 효율이 증가하는 것으로 설명할 수 있다.

이러한 결과들로 미루어 볼 때 세포내로의 유전자 전달의 효율을 높이기 위해서는 전달체 내의 유전자 함유량이 높아야 된다는 것이 전달체 설계에서 중요한 요소가 된다는 것을 알 수 있다. 유전자 전달 효율을 정량화하기 위하여 β -galactosidase assay를 사용하였다. Fig. 5는 DNA의 양을 5 µg으로 고정하고 키토산의 양이 증가함에

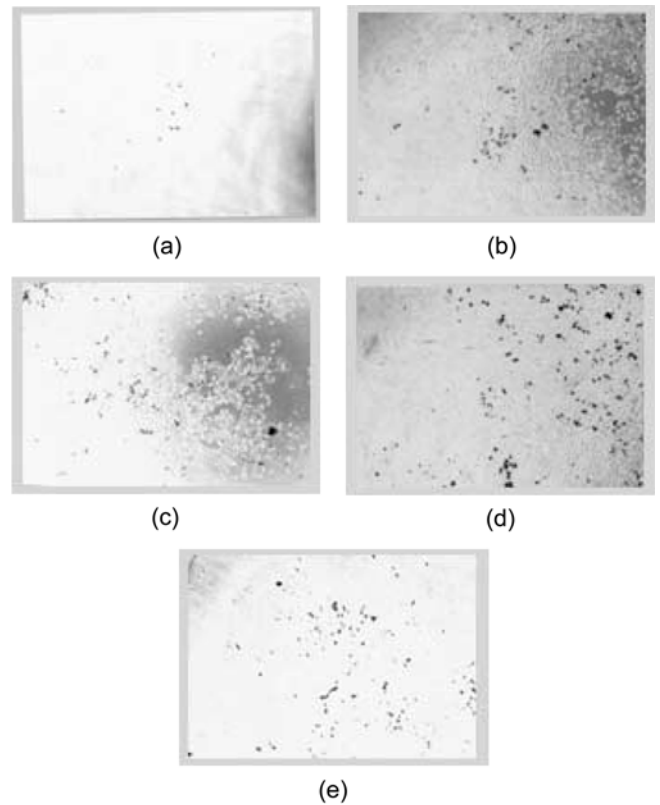


Fig. 4. Optical photographs of transfected 293 cells; 293 cells were seeded in a flat bottom 6-well plate, and DNA/DP-CS complexes or DNA/lipofecamine complexes were added to the 6-well plate. Cells were cultured for 48 hrs, and blue spots represented transfected 293 cells; (a) control (naked DNA (5 µg) only introduced into 293 cells), (b) lipofecamine, (c) DNA: DP-CS I (1:5 (5 µg : 25 µg)), (d) DNA: DP-CS I (1:10), and (e) was DNA: DP-CS II (1:5).

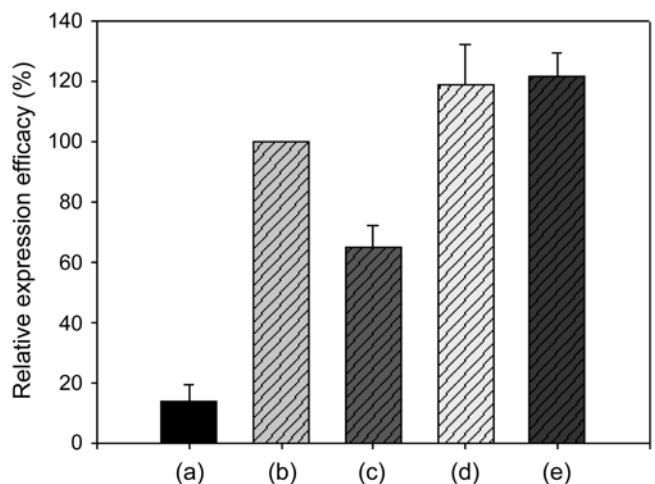


Fig. 5. Transfection efficacy using β -galactosidase assay as a variation of DNA:DP-CS, with a weight ratio as a fixed amount of DNA, 5 µg (a) control (5 µg), (b) lipofecamine, (c) DNA:DP-CS I (1:5), (d) DNA:DP-CS I (1:10), and (e) DNA:DP-CS II (1:5), (Mean±S.D., n=5).

따라 293 세포로의 유전자 발현 효율이 어떻게 변하는지 보여준다. Lipofecamine의 활성도를 100%로 정하고 이것을 표준 값으로 정하

였다. 키토산은 DNA와 결합할 수도 있고, 외부 인자로부터 보호할 수 있기 때문에[13], DP-CS II인 경우 β -galactosidase 활성도가 121.5%가 나왔지만, naked DNA인 경우 13.6%의 값을 보였다. DP-CS II의 경우가 naked DNA인 경우보다 무려 9배 이상의 전달 효율 값을 보여주고 있는 것이다. 양이온성을 띤 DNA/키토산 콤플렉스가 세포막을 통과할 수 있다면, 발현 효율은 콤플렉스 안에 있는 유전자의 양에 따라 결정될 것이다.

Fig. 5의 (c)와 (d)에서 보는 바와 같이 DNA/DP-CS I 콤플렉스의 발현 효율은 65.2%와 118.8%로 각각 다른 값을 보여주고 있다. 이는 Fig. 2(a)에서 lane(5)와 (6)에서 보이는 것과 같이 콤플렉스의 전기영동 분석시, 유전자의 이동 지연 속도와 같은 경향을 보인다. DP-CS I에서 1:10의 비율에서의 활성도는 1:5의 비율에서의 결과에 비해 거의 2배에 가까운 값의 차이를 보여준다. 이러한 결과는 콤플렉스 내에 있는 유전자의 양이 유전자 발현 효율에 큰 영향을 준다는 것을 말해준다. 콤플렉스 내에 유전자의 양이 증가할수록 키토산의 양이온 필요량도 증가하게 된다. 이러한 필요관계는 전달 소재의 투입량을 높이거나 양이온 전하 밀도가 높은 소재를 사용하면 된다. DP-CS II인 경우, 소재의 전하 밀도가 상대적으로 DP-CS I에 비하여 높은 값을 가지고 있기 때문에 필요한 키토산의 양은 크게 줄어들었으며, 이에 따른 유전자 전달 효율 또한 높게 나타났다. 위에서 기술한 바와 같이 콤플렉스 내의 유전자 함유량은 유전자 전달체의 설계에서 꼭 고려되어야 할 부분이다.

4. 결 론

본 연구에서는 유전자 전달체로서 관심을 받고 있는 키토산의 화학적 조작을 통한 저분자량의 키토산이 유전자 전달체로서의 기능을 할 수 있는지, 그리고 높은 효율의 유전자 발현 값을 가지기 위해서는 유전자 전달체를 설계할 때 어떠한 인자를 고려해야 하는가에 대하여 *in vitro* 하에서 293 세포를 대상으로 실험을 진행하였다. 화학적 조작을 통해 낮아진 저분자량 키토산은 투석막을 통하여 분산매를 PBS로 치환할 수 있었고, 분자량별로 분리가 가능하였다. 또한, 이렇게 분리된 키토산은 PBS와 D.D.I. water에 매우 잘 용해되는 것을 확인하였다. 분자량별로 분리와 정제가 끝난 후 *in vitro* 하에서 세포독성 실험을 한 결과, 2 mg까지 투입하여도 세포의 생존율은 90% 이상을 나타냄으로써 실험 과정 중에 전달체 소재에 따른 세포 독성은 거의 없다는 것을 확인하였다. 유전자와 완전히 결합하기 위해서는 소재에 필요한 양이온 전하가 필요하고, 이를 위해서는 DP-CS I인 경우 유전자와의 혼합비가 1:5에서 1:10으로 증가시켜야 한다는 것을 알 수 있었다. 하지만, 높은 전하 밀도값을 가진 DP-CS II인 경우, 1:5인 경우에도 충분히 유전자와 결합한다는 것을 확인하였다. 또한, 유전자 발현 효율을 높이기 위해서는 콤플렉스 내의 유전자 함유량이 많아야 하고 이를 조절하기 위해서는 전달 소재의 전하 밀도가 중요한 요소가 된다는 것을 발현 효율 실험

를 통해 확인하였다. 이전 연구에서는 고분자량의 키토산으로 plasmids와의 결합을 통하여 유전자 실험을 진행했지만, 본 연구 결과에서는 저 분자량 키토산임에도 불구하고 전기영동 분석을 통하여 유전자와 결합할 수 있고 SEM을 통하여 형성된 콤플렉스는 구형화된 모폴로지와 150-450 nm의 크기를 갖는다는 것을 알 수 있었고 이것을 통해 1단계로 저분자량 키토산이 유전자 전달체 소재로 가능성이 있다는 것을 알 수 있었다.

참고문헌

- Crystal, R. G., "The Gene as the Drug," *Nat. Med.*, **1**(1), 15-17 (1995).
- Pouton, C. W. and Seymour, L. W., "Key Issues in Non-Viral Gene Delivery," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **34**(1), 3-19(1998).
- Jones, N. A., Hill, I. R. C., Stolnik, S., Bignotti, F., Davis, S. S. and Garnet, M. C., "Polymer Chemical Structure is a Key Determinant of Physicochemical and Colloidal Properties of Polymer DNA Complexes for Gene Delivery," *Biochim Biophys Acta*, **1517**(1), 1-18(2000).
- Choi, Y. H., Liu, F., Park, J. S. and Kim, S. W., "Lactose-Poly(Ethylene Glycol)-Grafted Poly-L-Lysine as Hepatoma Cell-Targeted Gene Carrier," *Bioconjug. Chem.*, **9**(6), 708-718(1998).
- Gebhart, C. L. and Kabanov, A. V., "Evaluation of Polyplexes as Gene Transfer Agents," *J. Control. Rel.*, **73**(3), 401-416(2001).
- Haensler, J. and Jr. Szoka, F. C., "Polyamidoamine Cascade Polymers Mediate Efficient Transfection of Cells in Culture," *Bioconjug. Chem.*, **4**(5), 372-379(1993).
- Lim, Y. B., Han, S. O. and Kong, H. U., "Biodegradable Polyester, Poly[-(4-Aminobutyl)-l-Glycolic Acid], as a Non-Toxic Gene Carrier," *Pharm. Res.*, **17**(7), 811-816(2000).
- Fiona, C., MacLaughlin, F. C., Mumper, R. J., Wang, J., Tagliaferri, J. M., Gill, I., Hinchcliffe, M. and Rolland, A. P., "Chitosan and Depolymerized Chitosan Oligomers as Condensing Carriers for *in vivo* Plasmid Delivery," *J. Control. Rel.*, **56**(3), 259-272(1998).
- Roy, K., Mao, H.-Q., Huang, S.-K. and Leong, K. W., "Oral Gene Delivery with Chitosan/DNA Nanoparticles Generates Immunologic Protection in a Murine Model of Peanut Allergy," *Nature Med.*, **5**(4), 387-391(1999).
- Lee, K. Y., Kwon, I. C., Kim, Y.-H., Jo, W. H. and Jeon, S. Y., "Preparation of Chitosan Self-Aggregates as a Gene Delivery System," *J. Control. Rel.*, **12**(2), 213-220(1998).
- Mao, H.-Q., Krishnendu, R., Troung-Le, V. L., Kevin, A. J., Kevin, Y. L., Yan, W. J., Thomas, J. A. and Kam, W. L., "Chitosan-DNA Nanoparticles as Gene Carriers: Synthesis, Characterization and Transfection Efficiency," *J. Control. Rel.*, **70**(3), 399-421(2001).
- Peniston, Q. P. and Johnson, E. L., USP, No. 3,922,260, Nov., 25(1975).