

전기화학법을 이용한 DNA Hybridization 특성 검출

김 도균*, 장 정수**, 권 영수*
*동아대학교 전기공학과, **경일대학교 전기공학과

Detection of DNA Hybridization Characteristics Using Electrochemical methods

Do-Kyun Kim*, Jeong-Soo Chang**, Young-Soo Kwon*
*Dept. of Electrical Eng., Dong-A Univ., **Dept. of Electrical Eng., Kyung-II Univ.,

Abstract - The determination of DNA hybridization can apply the molecular biology research, clinic diagnostics, bioengineering, environment monitoring, food science and other application area. So, The determination of hybridization is very important for the improvement of DNA detection system. In this study, we report the characterization of the DNA hybridization by the electricalchemical methods. A new electrochemical biosensor is described for voltammetric detection of gene sequence related to probe oligonucleotide of bacterium *Escherichia coli* O157:H7. The biosensor involves the immobilization of a 18-mer probe oligonucleotide, which is complementary to a specific gene sequence related to *Escherichia coli* O157:H7 on a gold electrode through specific adsorption. The probe oligonucleotide was used to determine the amount of target oligonucleotide in solution using mitoxantrone(MTX) as the electrochemical indicators. The cathodic peak currents (I_{peak}) of MTX were linearly related to the concentration of the target oligonucleotide sequence in the range $1(\mu M) \sim 0.1(nM)$. The detection limit of this approach was $0.01(nM)$. In addition, these indicators were capable of selectivity discriminating against various mismatching condition.

1. 서 론

전기화학법은 분자나 이온뿐만 아니라 구조가 복잡한 금속착체물, 의약, 단백질 등의 생체분자나 생체관련 물질, 고분자 등 많은 종류의 다양한 유기·무기 물질을 대상으로 하고 있다. 이들 물질의 산화 또는 환원반응을 포함하는 화학반응 과정은 전기화학 반응의 대상이 된다 [1].

본 연구는 DNA라는 생체 분자의 hybridization 반응 동안 발생하는 산화환원 특성을 전기화학법으로 검출하였다. DNA hybridization이 실험적으로 유용한 것은 프로브 DNA가 매치 표적 DNA만을 헤테로쌍염기(heteroduplex)로 형성시킬수 있기 때문이다. 따라서 매치 DNA와 미스매치 DNA를 정확히 예측함으로써 유전자 질병 치료에 이용하는 유전자 치료(gene therapy) 뿐만 아니라 분자생물학, 바이오공학, 환경모니터링, 식품공학 등 여러 분야에 응용이 가능할 것으로 생각된다[2].

본 논문에서는 전기화학측정법을 이용한 올리고뉴클레오타이드 hybridization 측정방법을 서술하고 올리고뉴클레오타이드와 indicator 사이의 산화환원 반응을 이용하여 매치 및 각 미스매치 올리고뉴클레오타이드의 반응 특성을 비교 분석한 결과를 나타내었다. 이 결과를 바탕으로 매치 및 각 미스매치 올리고뉴클레오타이드가 전기화학적으로 차이가 있음을 확인하였으며, DNA칩 마이크로어레이를 이용한 DNA 센서 개발의 기초 자료로 이용될 수 있을 것으로 기대된다[3-4].

2. 시료 및 실험 방법

2.1 시료

본 연구에 사용된 모든 올리고뉴클레오타이드는 일본 Nissinbo사에 위탁 합성 및 HPLC 정제하여 사용하였다. 각 올리고뉴클레오타이드의 염기배열은 표 1에 나타내었다. 염기배열중 밑줄친 부분은 미스매치 염기배열을 나타낸다. 미스매치 올리고뉴클레오타이드 MR-2와 MR-3은 중앙 부분과 말단부분에 한 개씩의 미스매치 염기배열을 가졌으며, 미스매치 올리고뉴클레오타이드 MR-22와 MR-33은 중앙 부분과 말단부분에 두 개씩의 미스매치 염기배열을 가졌다. 이 미스매치 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 미스매치 염기배열의 위치 및 개수가 올리고뉴클레오타이드 hybridization에 어떤 영향을 미치는지를 알아볼 수 있다.

모든 올리고뉴클레오타이드는 파우더 형식으로 제공되었으며 TE 완충액(10mM Tris, 1mM EDTA, pH7.4)에 의해 $100\mu M$ 의 농도로 용해해서 사용하였다. 또한 모든 올리고뉴클레오타이드의 농도는 수용성 완충액(10mM Tris-HCl, 0.2M NaCl, pH 7.9)에 의해 0.1nM부터 $10\mu M$ 까지 조정되었으며, 사용하지 않을 경우는 $-20^{\circ}C$ 의 상태에서 보관하였다.

표 1. 프로브 및 각 표적 올리고뉴클레오타이드의 염기배열
Table 1. Sequences of probe and target oligonucleotide

oligonucleotide	base sequence
probe (PB-1)	5' TGCAGAGTGGTATAACTG 3'
complementary (CR-1)	5' CAGTTATACCACTCTGCA 3'
Mismatching 1 (MR-1)	5' <u>G</u> GTTTCCATGACAACGGA 3'
Mismatching 2 (MR-2)	5' CAGTTAT <u>G</u> CCACTCTGCA 3'
Mismatching 3 (MR-2)	5' CAGTTATACCACTCTG <u>G</u> G 3'
Mismatching 22 (MR-22)	5' CAGTTATAGGACTCTGCA 3'
Mismatching 33 (MR-33)	5' CAGTTATACCACTCTG <u>G</u> G 3'

올리고뉴클레오타이드를 금 표면에 고정하는데 사용하는 아비딘 (Mw 67,000, from white egg)은 Wako Pure Chemical Industries, Ltd.의 것을 사용하였으며, 완충액 (pH7.9, 10mM Tris-HCl, 0.2M NaCl)을 이용하여 0.2mg/mL가 되도록 조제하였다.

Indicator로 사용된 MXT은 Anthracenedion계의 약품으로 DNA와의 상호작용에 의해 유방암, 급성 백혈병 및 비호즈킨 림프종의 이차 치료제로 널리 사용된다[5]. MXT는 분자 외부 니트로젠 체인에 양전하인 2차원 이중

환식(heterocyclic) 링 구조를 가지고 있기 때문에 음전하를 띠고 있는 쌍염기 DNA의 염기 사이에 삽입하여 안정화된다[6-7]. 따라서 MTX는 쌍염기 DNA의 수소 결합 사이에서 반응하기 때문에 전기화학측정법에 의한 DNA 바이오센서 연구에 많이 사용되고 있으나 아직 정확한 메커니즘은 밝혀지지 않았다[8]. MTX는 SIGMA CHEMICAL CO.에서 제조되어 파우더 형식으로 제공되었으며, 농도는 수용성 완충액(10mM Tris-HCl, 0.2M NaCl, pH 7.9)에 의해 0.1nM부터 10 μ M까지 조정되었다.

2.2 실험 방법

전기화학측정법은 그림 1에서처럼 금을 작용전극(working electrode)으로, 백금을 상대전극(counter electrode)으로, Ag/AgCl(MW-4130, BAS)을 기준전극(reference electrode)으로하는 3전극셀을 indicator가 담긴 수용성 완충액(10mM Tris-HCl, 0.2M NaCl, pH 7.9) 속에 구성한 후 cyclic voltammetry(CV, model BAS- 50W)를 사용하여 산화환원 반응을 측정함으로써 이루어졌다. 본 연구에서 측정된 scan rate는 100mV/sec였으며, 측정된 전위범위는 -800mV ~ +800mV였다.

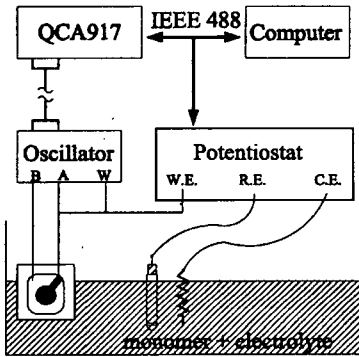


그림 1. 실험 장치 개략도
Fig. 1. Schematic diagram of experimental apparatus

작용전극에 대해서, 티올유도체 및 아비딘을 거쳐 5' 말단에 비오틴을 수식한 올리고뉴클레오타이드를 고정하였다. 우선, 1mM 농도의 3,3'-dithiodipropionic acid 수용액 3mL중에 금을 증착한 작용전극을 실온에서 20분간 담근 후, 이 수용액에 100mg/mL 농도로 만든 NHS와 EDC를 혼합액으로하여 카르복실산과 1시간 반응시킨 후 건조시켰다. 그리고, 아비딘을 완충액 (pH7.9, 10mM Tris-HCl, 0.2M NaCl)으로 0.2mg/mL가 되도록 조제한 1mL 용액에 30분동안 담귀 놓았다. 다음 1M 농도의 에탄올아민 수용액 1mL에 작용전극을 30분동안 담귀 카르복실기를 불활성화하였다. 다음 아비딘을 수식한 작용전극을 1 μ M의 비오틴화 프로브 올리고뉴클레오타이드가 담긴 완충액(pH7.9, 10mM Tris-HCl, 0.2M NaCl) 1mL의 용액에 25 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 담귀 두었다. 여기서, 비오틴화 올리고뉴클레오타이드 체인은 아비딘 분자의 4개 결합 사이트의 하나와 결합된다. 비오틴화 올리고뉴클레오타이드의 고정량은 완충액용액에 담귀되는 시간에 의하여 제어되었다. 마지막으로 각 농도별 매치 올리고뉴클레오타이드와 미스매치 올리고뉴클레오타이드가 담긴 완충액(pH7.9, 10mM Tris-HCl, 0.2M NaCl) 1mL의 용액에 25 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 담귀 hybridization 시킨 후 전기화학측정을 하였다.

3. 결과 및 검토

전기화학측정 시스템을 이용하여 bare 작용전극, 일염기 올리고뉴클레오타이드 및 쌍염기 올리고뉴클레오타이드 상태에서 MXT의 산화환원 전류 곡선을 그림 2에 나타내었다.

일반적으로 MXT-DNA 상호작용은 A.M. Oliveira Brett 등이 제안한 것처럼 다음식으로 표현할 수 있다 [9].

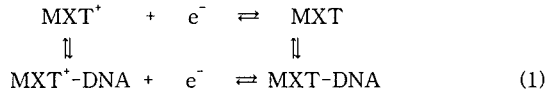


그림 2에서 나타난 것처럼 각 전극 상태에서 측정된 환원 전류의 peak치(전위 540(mV))는 bare($I_{\text{peak}} = -52.339 [\mu\text{A}]$) > 쌍염기 올리고뉴클레오타이드(ssDNA, $I_{\text{peak}} = -37.600 [\mu\text{A}]$) > 일염기 올리고뉴클레오타이드(dsDNA, $I_{\text{peak}} = -14.900 [\mu\text{A}]$) 순이었다. 이 결과로 MXT는 같은 실험 조건에서 일염기 올리고뉴클레오타이드보다 쌍염기 올리고뉴클레오타이드에 더 많이 삽입된다는 것을 알 수 있었으며, 전기화학측정법으로 DNA hybridization 여부를 확인할 수 있었다.

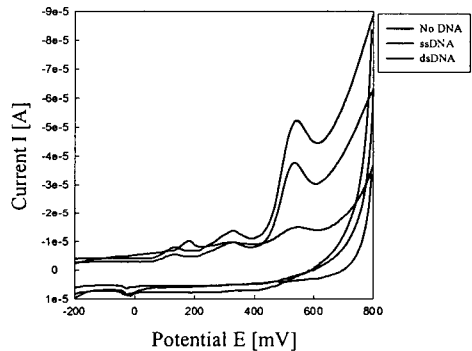


그림 2. 각 전극 상태에서 MXT의 산화환원 전류 곡선
Fig. 2. Cyclic voltammograms of MXT accumulation on bare gold electrode, ssDNA and dsDNA

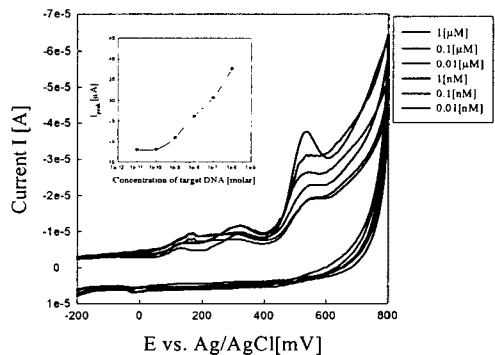


그림 3. 매치 올리고뉴클레오타이드의 각 농도에 따른 MXT의 산화환원 전류 곡선
Fig. 3. Cyclic voltammograms of MXT accumulation as each concentration of complementary oligonucleotide

4. 결 론

매치 올리고뉴클레오타드의 농도에 따른 산화환원 전류 곡선을 그림 3에 나타내었다. 전극에 고정되는 프로브 올리고뉴클레오타드의 양이 일정하다면 매치 올리고뉴클레오타드의 농도에 따라 hybridization되는 상보적 올리고뉴클레오타드의 양이 달라지게되며, 쌍염기 올리고뉴클레오타드 사이에 삽입되는 indicator의 양도 달라지게된다. 즉, 매치 올리고뉴클레오타드의 농도에 따른 인식자의 환원 전류를 분석함으로써 삽입되는 indicator의 양을 정량적으로 분석할 수 있다.

그림 3에서 전기화학법 측정 장치에 의해 구해진 MXT의 환원 전류값은 매치 올리고뉴클레오타드의 농도 증가(0.1nM 이상)에 비례해서 선형적으로 증가하고 있다. 하지만 0.1nM미만에서는 전류의 변화가 없으며, 삽입되는 indicator의 양을 식별할 수 없음을 나타낸다.

그림 4에 매치 및 각 미스매치 올리고뉴클레오타드의 MXT의 산화환원 전류 곡선을 비교하여 나타내었다. 그림 4의 결과를 비교해보면 매치 올리고뉴클레오타드가 각 미스매치 올리고뉴클레오타드에 비해 환원 전류의 peak치가 크며, DNA hybridization 가장 일어나기 쉽다는 것을 알 수 있다.

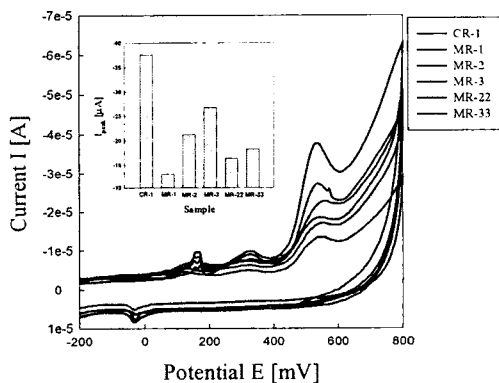


그림 4. 매치 올리고뉴클레오타드 및 각 미스매치 올리고뉴클레오타드에 따른 MXT의 산화환원 전류 곡선

Fig. 4. Cyclic voltammograms of MXT accumulation as complementary and each mismatching oligonucleotide

미스매치 올리고뉴클레오타드 MR-2와 MR-3를 이용하여 미스매치 염기배열의 위치에 대한 환원 전류의 peak치를 비교해 보면, 미스매치 염기배열이 말단부 위치하는 경우가 더 큰 값을 나타내고 있다. 역으로 해석하면, 미스매치 염기배열이 중앙부에 위치할수록 DNA hybridization이 어렵다는 것을 알 수 있다.

다음 미스매치 올리고뉴클레오타드 MR-2와 MR-22 혹은 MR-3와 MR-33를 이용하여 미스매치 염기배열의 개수에 대한 환원 전류의 peak치를 비교해 보면, 미스매치 염기배열의 개수가 적을수록 더 큰 값을 나타내고 있으며, 미스매치 염기배열의 개수가 많을수록 DNA hybridization이 어렵다는 것을 알 수 있다.

본 논문에서는 전기화학측정법을 이용한 올리고뉴클레오타드 hybridization 측정방법을 서술하고 올리고뉴클레오타드와 indicator 사이의 산화환원 반응을 이용하여 프로브 올리고뉴클레오타드와 매치 및 각 미스매치 올리고뉴클레오타드와의 hybridization 반응 특성을 비교 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) MXT는 같은 실험 조건에서 일염기 올리고뉴클레오타드보다 쌍염기 올리고뉴클레오타드에 더 많이 삽입된다는 것을 알 수 있었으며, 전기화학측정법으로 DNA hybridization 여부를 확인할 수 있었다.

2) 전기화학법 측정 장치에 의해 구해진 MXT의 환원 전류값은 매치 올리고뉴클레오타드의 농도 증가(0.1nM 이상)에 비례해서 선형적으로 증가하였다.

3) 매치 올리고뉴클레오타드가 각 미스매치 올리고뉴클레오타드에 비해 환원 전류의 peak치가 크며, DNA hybridization 가장 일어나기 쉽다는 것을 알 수 있었다.

4) 미스매치 올리고뉴클레오타드 MR-2와 MR-3를 이용하여 미스매치 염기배열의 위치에 대한 환원 전류의 peak치를 비교해 보면, 미스매치 염기배열이 말단부 위치하는 경우가 더 큰 값을 나타내었다.

5) 미스매치 올리고뉴클레오타드 MR-2와 MR-22 혹은 MR-3와 MR-33를 이용하여 미스매치 염기배열의 개수에 대한 환원 전류의 peak치를 비교해 보면, 미스매치 염기배열의 개수가 적을수록 더 큰 값을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 학술진흥재단 신진연구인력연구비 (과제번호 : 99-E046) 및 한국과학재단 지정 동아대학교 지능형융합항만관리연구센터의 지원에 의해서 수행되었기에 감사드립니다.

[참 고 문 헌]

- [1] 小山 昇, 逢坂 哲彌, 大坂 武男, "電氣化學法", 講談社, 1989
- [2] 박상대, "분자세포생물학", 아카데미서적, 1998
- [3] D.K. Kim, Y.S. Choi, Y. Murakami, E. Tamiya and Y.S. Kwon, "Real-Time Detection of DNA Hybridization Assay by Using Evanescent Field Microscopy", KIEE, 11C-3, pp.85-90, 2001
- [4] Y.S. Choi, D.K. Kim, and Y.S. Kwon, "Randomly Ordered High-Density DNA Chip Microarrays", KIEE, 11C, pp.23-27, 2001
- [5] C.E. Riggs, "The Chemotherapy Source Book", Williams and Wilkins, Maryland, USA, 1992
- [6] K.Y. millery, D.D. Newton, biopolymers 21, p633, 1982
- [7] K.C.Murdock, et al., J. Med. Chem., 22, p.1024, 1979
- [8] A.M. Oliveira Brett, et al., Biosensor and Bioelectronics, 13, p.861, 1998
- [9] A.M. Oliveira Brett, et al., "Electrochemical oxidation of mitoxantrone at a glassy carbon electrode", Analytica Chimica Acta, 385, pp. 401-408, 1999