

Microchip상에서 효율적인 DNA 분석을 위한 반복단위 단백질의 생산

이현진¹ · 최석진² · 서태석² · 원종인^{1*}

¹홍익대학교 화학공학과, ²한국과학기술원 생명화학공학과

Production of Repetitive Polypeptides for an Efficient DNA Analysis on a Microchip

Hyeonjin Yi¹, Seok Jin Choi², Tae Seok Seo², and Jong-In Won^{1*}

¹Department of Chemical Engineering, Hongik University, Mapo-gu, Seoul 121-791, Korea

²Department of Chemical and Biomolecular Engineering (BK21 program) and Institute for the BioCentry, KAIST, Daejeon 305-701, Korea

Abstract We generated the feasibility of DNA separation in free-solution using genetically engineered repetitive polypeptides as drag-tags. Two different-sized repetitive polypeptides were designed, expressed in *E. coli*, and purified. They were conjugated to a fluorescently labeled DNA (100 base), and the electrophoretic mobilities of these conjugate molecules were analyzed on a microchip. The results of these studies indicate that genetically engineered repetitive polypeptide is a prominent candidate for rapid and high-throughput genetic mutation detection, such as SNP analysis.

Keywords: repetitive polypeptide, end-labeled free-solution electrophoresis (ELFSE), drag-tag, capillary electrophoresis, microchip

서 론

인간에게 발생하는 여러 질병들 중 많은 부분이 유전자 변형에 기인된 것이고, 이러한 유전자 변형을 빠르고 정확하게 분석하는 일은 질병의 조기 진단 측면에서 매우 중요한 일이라 할 수 있다. 인간의 DNA를 분석하는 방법으로는 여러 가지가 있지만, 그 중 모세관 전기영동 장치 (capillary electrophoresis, CE)를 이용하여 염기 서열의 이상 유무를 판별하는 것이 현재 널리 쓰이는 방법 중 하나이다 [1]. CE를 이용하여 DNA를 분석하기 위해서는 먼저 모세관 내부에 점도가 높은 고분자 젤을 충전시킨 후 DNA 샘플을 분석하는데, 이는 일반적으로 DNA의 크기에 따른 분리가 수용액 상에서 불가능하기 때문이다 [2]. 그러나 현재의 이

와 같은 분석 방법은 직경이 좁은 모세관 내부에 고점도의 고분자 젤을 충전시켜야 되는 어려움 때문에 분석 장치를 소형화하는 데에 있어 어려움이 따르며, 특히 길이가 짧은 oligonucleotide의 분리의 경우 분석 한계를 나타내고 있다 [3]. 이러한 문제를 해결하기 위해 DNA 끝에 마찰력을 부여할 수 있는 물질을 연결시킨 후, 수용액 상에서 DNA의 크기에 따른 분리가 가능한 방법이 제안되었다 [4]. 이러한 방법을 End-Labeled Free-Solution Electrophoresis (ELFSE), 또는 Free-Solution Capillary Electrophoresis (FSCE)라 하며 이때 마찰력을 부여하는 물질을 drag-tag이라 명하였다 [5,6]. Drag-tag으로 사용될 수 있는 물질은 여러 가지가 있지만 효과적인 DNA 분석을 위해서는 수용성 (water solubility), 전기적 중성 (charge neutrality), 균일성 (size monodispersity) 등의 조건을 만족시키는 물질이어야 하며, 반복단위 단백질은 이러한 조건들을 만족시킬 수 있는 우수한 후보물질로 제안되었다 [7-9]. 일반적으로 생합성을 통해 생산된 자연계에 존재하는 단백질은 균일한 크기를 갖는다는 장점을

*Corresponding author

Tel: +82-2-320-1672, Fax: +82-2-320-1191

e-mail: jiwon@hongik.ac.kr

가지고 있으나, 수용성 단백질 대부분은 양전하 또는 음전하의 전하를 갖는다는 문제점이 있다. 또한 화학적으로 합성된 고분자 물질의 경우 단량체를 변환시킴으로써 수용성 및 전기적 성질을 조절하는 것이 가능하나 균일한 크기의 고분자 물질을 얻기가 어렵다는 한계가 있다. 하지만 반복단위 단백질의 경우, 유전자 재조합을 통해 원하는 물성을 갖는 아미노산만으로 구성이 가능하며 DNA 조작에 의하여 반복단위를 늘림으로써 다양한 크기의 단백질을 합성하는 것이 가능하다. 이러한 장점을 바탕으로 수용성이며 전기적으로 중성인 아미노산들로 이루어진 반복단위 단백질을 합성함으로써 이상적인 drag-tag에 가까운 물질을 만들 수 있었다.

DNA 염기 분석을 하는 방법으로는 크게 DNA polymerase를 이용하는 방법과 DNA ligase를 이용하는 방법, hybridization을 이용한 방법 등으로 나뉠 수 있다 [10]. DNA polymerase를 이용하는 방법 중 single-base extension (SBE) 기술은 ddNTP만을 이용해 DNA primer의 3' 말단에 오직 하나의 염기만이 덧붙여져 유전자의 이상 유무를 판별하는 방법으로 SNP (single nucleotide polymorphism) 등을 밝혀내고 각각의 영향을 규명하는데 효과적으로 사용될 수 있다 [11]. SNP란 유전체 내에서 개개인의 편차를 나타내는 한 개 또는 수십 개의 염기 변이를 말하는 것으로서, 인간의 경우 30억 개의 염기 서열 중 약 0.1% 정도가 개인마다 차이를 보이고 있으며, 이러한 차이가 인종, 피부색, 체질, 질병 등의 유전적 특징을 나타낸다고 알려져 있다.

CE를 이용한 DNA 분석은 상대적으로 비싼 운전비용과 복잡하고 비싼 장비를 필요로 하기 때문에 현재는 이러한 CE의 단점을 극복할 수 있으며 소형화, 집적화가 가능한 microchip 상에서의 모세관 전기영동이 활발히 연구되고 있다 [12]. Microchip 시스템의 경우 기존의 CE보다 더 적은 양의 샘플로 보다 빠른 DNA 분석이 가능하다는 장점을 가지고 있으나, 장비가 소형화됨에 따라 좁은 모세관 내부를 고점도의 고분자 겔로 충전시켜야 하는 어려움이 발생된다. 또한 SBE 반응 후 전기영동에 의한 분석의 효율성을 증대시키기 위해서는 모세관 하나 당 여러 개의 샘플을 동시에 분석할 수 있는 다중 시스템 (multiplexed system)의 개발이 필요하나 현재의 고분자 겔을 이용한 분석 방법으로는 길이가 같은 SBE의 생성물들의 분리가 불가능하다는 한계가 있어 보다 효율적인 분석 시스템을 구현하는데 어려움이 있었다. 따라서 수용액 상에서 DNA 분리를 수행하는 ELFSE 방법은 이러한 문제점들을 해결할 수 있는 좋은 대안으로 떠오르고 있다.

최근에는 SBE와 ELFSE를 복합적으로 이용하여 DNA 염기 분석을 시도한 SBE-ELFSE 연구가 보고되었다 [11,13]. 다양한 크기의 drag-tag을 DNA primer에 화학적으로 결합시킨 후, 결합된 생성물들을 이용하여 SBE 반응을 수행함으로써 동시에 여러 위치의 염기 분석이 가능하였다. 하지만 사용된 drag-tag 대부분이 화학적으로 합성한 것이기 때문에 그 합성 길이에 제한이 있어 그에 따른 분석 효율에도 한계가 있었다.

따라서 본 연구에서는 대장균을 이용하여 반복단위 단백질을 합성함으로써 보다 큰 크기를 갖는 drag-tag을 생산하였고 이를 DNA와 연결한 후, 모세관 전기영동을 수행하였다. 모세관 내부가 수용액으로 충전된 microchip 상에서 서로 다른 크기를 갖는 반복단위 단백질 drag-tag에 동일한 DNA를 연결시킨 후 전기영동을 통하여 그 이동 속도의 차이를 살펴봄으로써 효율적인 SBE-ELFSE 시스템의 구현을 위한 기초 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

재료

DH5 α , BLR (DE3), pUC18 plasmid, pET-19b plasmid, pET-32a plasmid, recombinant enterokinase는 Novagen (Madison, WI)에서 구입하였고, T4 DNA ligase, *EcoRI*, *BamHI*, *NcoI*, Taq DNA polymerase, Crimson DNA polymerase는 New England Biolabs (Beverly, MA)에서 구입하였으며, *Eam1104I*, *LguI*, *XhoI*은 Fermentas (Ontario, Canada)에서 구입하였다. 또한 Spin miniprep kits, gel extraction kit는 Promega (Madison, WI)에서 구입하였으며, cobalt metal affinity resin과 10 mL disposable columns는 Takara Bio Inc. (Shiga, Japan)에서 구입하였고, Ni-NTA agarose와 5 mL polypropylene columns는 QIAGEN Inc.에서 구입하였다. Dialysis cassettes, Sulfosuccinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate (sulfo-SMCC)는 Thermo scientific (Rockford, IL)에서 구입하였고, Amicon Ultra는 Millipore (Billerica, MA)에서 구입하였으며, 그 외 다른 화학제품들은 Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO)를 통해 구입하였다.

반복단위 단백질의 DNA 준비

Drag-tag으로 사용될 반복단위 단백질 단량체의 아미노산 서열은 [(GA) $_2$ S(GA) $_2$ T(GA) $_2$ S(GA) $_2$ T]로서 이를 단백질로 발현하기 위한 DNA의 염기서열은 Fig. 1에 나타내었다. 목적 유전자를 벡터 내로 삽입하기 위하여 *Eam1104I* 인식 부위 (밑줄)를 포함하도록 디자인하였고 이와 상보적으로 각각 결합하는 두 개의 primer (P1: 5'-ATATAGAATTCCTCTTCAGGT-3', P2: 5'-TATATGAATTCCTCTTCTACC-3')를 이용하여 PCR 하였다. PCR을 통해 이중 가닥의 DNA를 확보하였으며 이를 *Eam1104I*으로 37°C에서 하룻밤 처리하여 양쪽에 점착말단을 갖는 단량체 insert를 얻었다. 이를 *LguI*으로 37°C에서 하룻밤 처리한 클로닝 벡터인 pUC18과 실온에서 T4 DNA ligase를 이용하여 결합시켰다. 일반적인 pUC18은 *LguI* 인식 부위를 포함하지 않기 때문에 *LguI* 인식 부위를 포함하는 두 개의 primer (P3: 5'-AGTTAGGTGGAAGAGCGCCAATACGCA-3', P4:

5'-ATTACCTGAAGAGCTCCTCGCTCACTGACTCGCTG-3')를 이용해 PCR을 수행함으로써 *LguI* 인식 부위를 양 말단에 갖는 선형 벡터를 얻을 수 있었다. 클로닝 후 목적 유전자의 삽입 여부를 확인하기 위해 *LguI*으로 37°C에서 4시간 처리 한 뒤 2% agarose 젤 전기영동을 통해 그 크기를 확인하였고 이를 gel extraction kit를 사용해 목적 DNA만을 확보하였다. 이 때, 단량체의 양끝 돌출 부분은 서로 상보적이기 때문에 T4 DNA ligase를 이용한 단량체끼리의 자가 결합 (self-ligation)이 가능하므로 자가 결합을 거친 뒤 벡터 내로 삽입하였다.

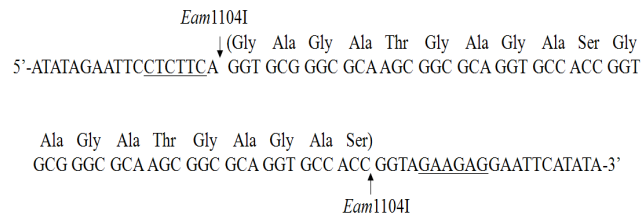


Fig. 1. DNA sequences of a designed gene for a drag-tag.

단백질 발현 벡터의 준비

단백질 발현 벡터인 pET-19b를 사용하여 목적 유전자를 클로닝하기 위해서는 먼저 벡터 내에 존재하는 *LguI* 인식 부위를 없앤 후, multi cloning site (MCS)내에 *LguI* 인식 부위를 새로 만들어주어야 한다. *LguI* 인식 부위를 없애기 위해서 site-directed mutagenesis kit (Stratagene)를 사용하였고 *LguI* 인식 부위 중 GC를 AA로 변이시키도록 두 개의 primer (P5: 5'-ATACCGCATCAGGCAATCTTCCGCTTC CTC-3', P6: 5'-GAGGAAGCGGAAGATTGCCTGATGCG GTAT-3')를 디자인하여 사용하였다. 그 결과 *LguI* 인식 부위가 제거된 변형 pET-19b를 얻을 수 있었다. 그 후, 목적 유전자를 삽입하기 위해 MCS 내에 *LguI* 인식 부위를 생성시키는 실험을 수행하였다. 먼저 *XhoI*으로 pET-19b를 37°C에서 2시간 처리한 뒤 두 개의 primer (P7: 5'-AGTTAGCTC TTCAGGTTAAGGATCCGGCTGCTAACAAAG-3', P8: 5'-AGTTAGCTCTTCAACCCATATGCTTGTCGTCGTCGTC-3')를 사용하여 PCR을 수행하였다. 앞서 준비한 자가 결합을 거친 목적 유전자와 pET-19b를 결합한 뒤 이를 대장균에 형질 전환시켰다. 암피실린이 함유된 고체 LB 배지에 형질 전환시킨 대장균을 도말한 후, 하룻밤 배양한 결과 수 십 개의 콜로니를 얻을 수 있었다. 제한 효소 처리를 통해 각각의 콜로니가 가지고 있는 목적 유전자의 크기를 살펴본 결과 자가 결합에 의하여 dimer와 pentamer가 클로닝된 것을 확인하였다. 이를 이용하여 단백질 발현 실험을 수행한 결과, 발현된 단백질의 크기가 10 kDa 미만으로 작았기 때문에 SDS-PAGE를 통한 시각적인 확인이 불가능했고, 정제 과정에도 어려움이 있었다. 이를 해결하기 위해 벡터 내에 theoredoxin (Trx) 유전자를 포함하여 융합 단백질을 생산하는 pET-32a를 발현 벡터로 선택하였다. pET-19b

와 pET-32a 모두 *BamHI*과 *NcoI*의 인식 부위가 존재하며 pET-19b 내에 삽입된 목적 유전자는 두 제한 효소의 인식 부위 사이에 존재하므로 위 두 제한 효소를 사용하여 pET-19b 내의 유전자를 pET-32a 내로 재삽입시켰다 (Fig. 2).

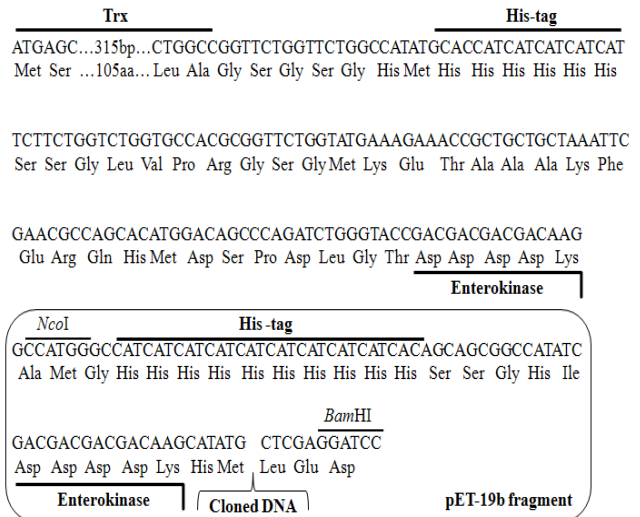


Fig. 2. A genetic map of a modified vector.

반복단위 단백질 발현 및 정제

형질 전환된 대장균을 암피실린 (50 µg/mL)이 섞인 Luria broth (LB) medium 50 mL에서 3시간 배양시킨 뒤 3 L의 LB medium이 담긴 발효기에 재접종하여 37°C, 250 rpm, pH 7으로 일정 조건을 유지해주면서 OD₆₀₀값이 0.6에 이를 때까지 배양하였다. 일정 값에 달하면 isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)를 최종 농도 1 mM이 되도록 넣고 4시간을 추가로 배양한 뒤 5분 동안 4°C에서 원심분리하여 세포만을 확보하였다. 이어 TE buffer (1 M Tris · Cl, 10 mM EDTA; pH 7.4)에 세포를 현탁 시킨 후, -80°C와 50°C를 3회 번갈아 이동한 뒤 35초 동안 세 번 초음파 분쇄 처리를 해줌으로써 세포벽을 분쇄하였다. 이어서 6280 rpm으로 20분 동안 4°C에서 원심분리를 하여 상등액만을 얻었다. Cobalt metal affinity resin을 사용해 His-tag을 포함하는 단백질을 정제하고 12% SDS-PAGE를 이용해 그 발현 여부를 확인하였다. 잔여 염을 제거하기 위하여 10 kDa의 Amicon Ultra를 이용하여 염을 제거하고 정제된 단백질을 동결 건조하여 보관하였다.

Enterokinase 처리 및 정제

발현된 단백질은 Trx이 결합된 융합 단백질이므로 drag-tag으로 사용될 부분만을 얻기 위해 enterokinase 처리를 해주었다. 발현된 단백질에는 enterokinase로 잘리는 부분이 두 군데 존재하기 때문에 enterokinase를 처리하면 3개의 polypeptide 단편을 얻을 수 있었다 (Fig. 2). 그 후, Ni-NTA Agarose가

충진된 컬럼을 이용하면 His-tag을 포함하는 두 단편은 컬럼 내 resin과 강한 결합을 형성하고, His-tag을 포함하지 않는, 즉 drag-tag으로 사용될 단편만을 선택적으로 확보할 수 있었다. Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes (Thermo scientific)를 이용하여 탈염 과정을 진행하였고 이 때 dimer의 경우 2000 MWCO, pentamer의 경우 3500 MWCO의 크기를 갖는 cassette를 이용하였다.

목적 DNA의 제작 및 drag-tag과의 결합

모세관 전기영동을 통해 drag-tag의 크기에 따른 DNA의 분리 효과를 알아보기 위해 5' 말단에 싸이올 (thiol) 작용기가 연결되고 4번째 염기에 형광 dye인 FAM을 포함하는 thiol-[CGCFTCCTCGCTCACTGACT]과 같은 primer를 먼저 디자인하였다. 그리고 pUC18을 주형 가닥으로 삼고 이 primer를 forward primer로, 5'-CCCTGATTCTGTGGATAACCGT-3'을 reverse primer로 사용하여 PCR 작업을 수행하였다. 그 결과 100 base pair의 DNA를 얻을 수 있었다. 목적 DNA와 drag-tag을 연결하기 위해 DNA의 싸이올 작용기와 특이적인 결합을 하고, 또한 polypeptide의 아미노기와 특이적인 결합을 형성하는 sulfo-SMCC를 연결 물질로 사용하였다 [14,15]. 목적 DNA의 경우 싸이올 작용기가 연결된 primer를 구입할 때 싸이올 작용기 사이의 반응을 막기 위해 블로킹 되어 있었다. 이를 다시 활성화시키기 위해 Dithiothreitol (DTT)를 넣고 교반을 한 뒤 실온에서 15분 방치한 후 ethyl acetate를 이용하여 정제하였다. 여기에 tris (2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)을 넣고 37°C에서 2시간 방치한 후 Centri-Sep (Princeton separations)으로 정제하였다. 그 후, sulfo-SMCC와 결합된 drag-tag과 반응 시킴으로써 sulfo-SMCC를 중간 매개체로 사용한 (DNA)-(drag-tag) 연결 물질을 얻었다. 이렇게 얻어진 물질을 다시 Centri-Sep으로 정제한 후 동결건조 하였다. 이 경우 목적 DNA는 PCR을 통해 얻어진 이중 가닥이므로 이를 단일 가닥으로 만들어주기 위해 동결 건조시킨 샘플에 formamide를 넣고 95°C에서 3분간 가열하고 바로 냉각 과정을 거쳤다 [16].

모세관 전기영동

모세관 전기영동 장치는 KAIST NanoBioMEMS 연구실에서 자체 제작한 microchip 상에서 진행하였다. 488 nm의 Ar laser를 사용하였고 탐지는 PMT, 515 ± 15 nm로 하였으며 샘플 주입 시 조건은 60 s, sample reservoir 1000 V, waste reservoir 0 V로 하였고 anode reservoir와 cathode reservoir는 고정시켰다. Backbiasing 조건은 10 s, sample reservoir 900 V, waste reservoir 900 V, anode reservoir 2100 V, cathode reservoir 0 V로 하였다. 분리 시 조건은 시간은 약 6 min, anode reservoir 2400 V, cathode reservoir 0 V로 하였고, sample reservoir와 waste reservoir는 고정시켰다. 전기영동 시의 온도는 70°C로 유지하였고, 7 M urea가

포함된 TTE 완충용액 (50 mM Tris, 50 mM TAPS, 2 mM EDTA, 7 M urea, pH 8.4)을 사용하였다.

결과 및 고찰

반복단위 단백질의 DNA 합성 및 단백질로의 발현

클로닝 벡터인 pUC18 내에 삽입된 단량체로부터 자가 결합 과정을 거친 뒤 단백질 발현 벡터인 pET-19b 내에 클로닝 하였다. *EcoRI*과 *NcoI* 제한효소 처리를 통해 그 크기를 살펴본 결과 dimer와 pentamer 임을 확인할 수 있었다. 이를 *BamHI*과 *NcoI* 제한효소 처리를 통해 pET-19b 내의 DNA 절편을 pET-32a 내로 재삽입하였다. 클로닝 여부를 확인하기 위해 다시 *BamHI*과 *NcoI* 제한효소 처리를 해주었고 그 결과를 Fig. 3(a)에 나타내었다. pET32a 내로 재삽입된 DNA를 두 제한효소로 처리할 경우 클로닝이 된 DNA 길이 외에 79 bp의 길이가 더해지므로 dimer의 경우 60 bp인 단량체가 두 번 반복된 120 bp에 79 bp가 더해진 199 bp에서, pentamer의 경우 다섯 번 반복된 300 bp에 79 bp가 더해진 379 bp에서 그 크기를 확인하였다.

단백질 발현 벡터로 사용한 pET-32a의 경우 Trx 유전자를 포함하고 있기 때문에 Trx과 반복단위 단백질이 융합된 형태의 융합 단백질이 발현된다. 단백질 발현 여부를 12% SDS-PAGE로 확인하였고, 그 결과를 Fig. 3(b)에 나타내었다. 대조군인 pET-32a와 비교실험을 진행한 결과, 클로닝된 DNA가 삽입되지 않은 대조군에서는 이론적 크기가 20.4 kDa 인 반면 dimer가 삽입된 융합 단백질은 22.91 kDa, pentamer가 삽입된 융합 단백질은 27.11 kDa의 크기를 나타낸다. Fig. 3(b)를 통해 융합 단백질의 발현을 확인하였고, 그 융합 단백질만을 얻기 위해 cobalt metal affinity resin을 이용하여 정제하였다.

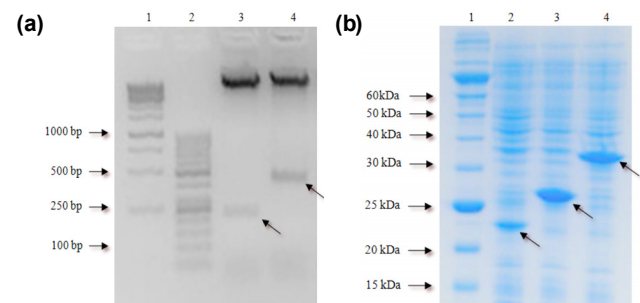


Fig. 3. (a) Agarose gel electrophoresis (1.5%) results of multimerized genes: Lane 1, 1 kb standard DNA ladder; Lane 2, 50 bp standard DNA ladder Lane 3, dimer gene (199 bp); and Lane 4, pentamer gene (379 bp). (b) SDS-PAGE (12%) results of expressed repetitive polypeptides: Lane 1, standard protein marker; Lane 2, expression result for natural pET32a (control, 20.4 kDa); Lane 3, Trx-dipeptide (22.91 kDa); and Lane 4, Trx-pentapeptide (27.11 kDa).

Enterokinase 처리 및 확인

융합 단백질 중 drag-tag으로 사용될 부분만을 얻기 위해 recombinant enterokinase를 이용해 융합 단백질을 세 단편으로 잘랐다. 반복단위 단백질을 포함하는 단편에는 His-tag이 포함되어있지 않고 나머지 두 단편에는 각각 His-tag이 포함되어있기 때문에 Ni-NTA agarose 컬럼을 이용해 His-tag을 포함하는 부분을 제외한 나머지 단편을 확보하였다. 이렇게 얻어진 단편은 반복단위 영역 외에 N-말단 부위에 히스티딘과 메티오닌, C-말단 부위에 글리신을 포함하고 있다. 그러나, 세 아미노산 모두 수용성이며, 전기영동 수행 시 pH 8.4 조건 하에서 전기적으로 중성을 나타내므로 drag-tag으로 사용 시 문제가 없는 것으로 판단되었다. 분리된 단백질은 dialysis cassettes를 이용해 탈염 과정을 거친 뒤 각각의 크기를 MALDI-TOF mass spectrum 분석을 통해 확인하였다. MALDI-TOF mass spectrum 분석 결과, dimer는 3.1458 kDa, pentamer는 7.3500 kDa의 크기를 확인하였고 (Fig. 4) dimer와 pentamer 각각의 이론값인 3.15 kDa, 7.35 kDa과 비교한 결과 원하는 크기의 반복단위 단백질이 생산되었음을 확인할 수 있었다.

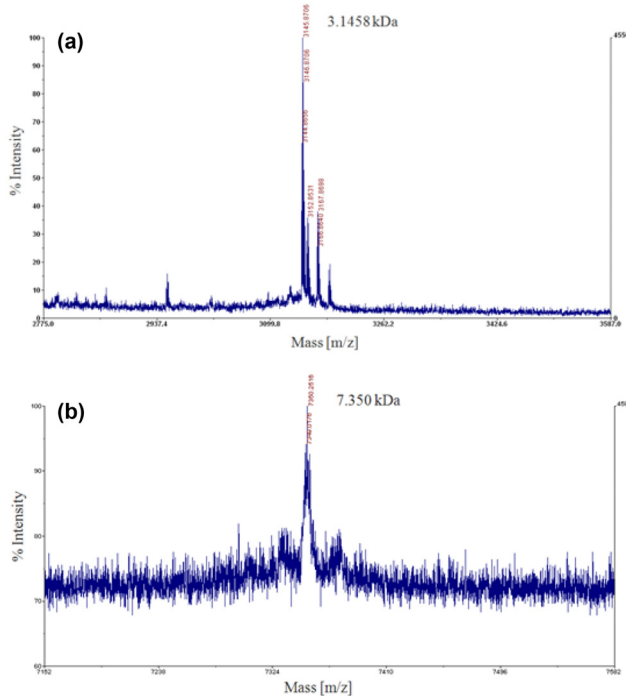


Fig. 4. Mass spectra of the repetitive polypeptides: (a) Purified dimer, (b) Purified pentamer.

목적 DNA의 제작 및 drag-tag과의 결합

모세관 전기영동을 통해 drag-tag의 크기에 따른 이동 속도 차이를 보기 위해 drag-tag과 결합할 목적 DNA를 합성하였다. PCR을 통해 5' 말단에 싸이올 작용기가 연결되

어있고 네 번째 염기에 FAM을 포함하는 100 bp의 DNA를 확보하였다. 이 때 PCR 주형가닥으로는 pUC18을 사용하였으며 forward primer로는 싸이올 작용기와 FAM을 포함하는 oligonucleotide를 사용하였고, reverse primer로는 100 bp의 PCR 결과물이 생성되도록 제작하였다. 실제로 reverse primer를 어떻게 디자인하느냐에 따라 다양한 길이의 목적 DNA를 확보할 수 있었다. Sulfo-SMCC를 이용해 100 bp의 DNA를 앞서 준비한 dimer, pentamer drag-tag과 각각 결합하였다. 모세관 전기영동을 시행하기 위해서는 단일 가닥의 형태를 만들어주어야 하기 때문에 최종적으로 formamide 처리와 냉각 과정을 거쳐 (ssDNA)-(polypeptide) 연결 물질을 얻었다.

모세관 전기영동

먼저 모세관 내부를 urea가 포함된 TTE 완충용액으로 충전한 뒤 drag-tag이 연결된 100 base의 단일 가닥 DNA를 로딩하였다. 이 때 얻은 전기영동도를 Fig. 5에 나타내었다. Drag-tag이 연결되지 않은 free DNA의 경우 주입 후 약 2분 47초가 지난 뒤 피크를 확인할 수 있었다. 뒤이어 dimer가 연결된 DNA의 경우 주입 후 약 3분 30초가 지난 뒤 피크를 보였고, pentamer가 연결된 DNA의 경우 주입 후 약 3분 39초가 지난 뒤 피크를 보였다.

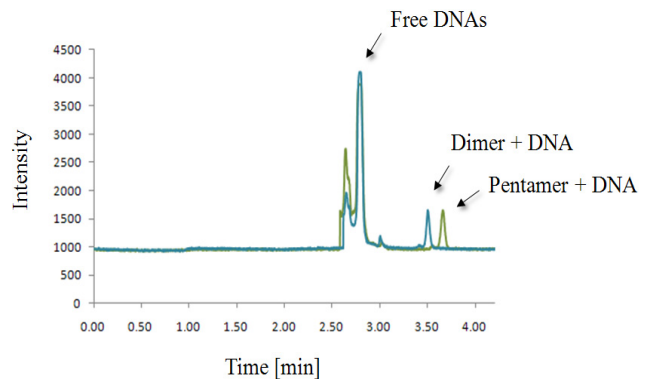


Fig. 5. Capillary electropherogram obtained from the (DNA)-(drag-tag) conjugates on a microchip. The running buffer contains 50 mM Tris, 50 mM TAPS, 2 mM EDTA with 7 M urea, pH 8.4.

Microchip에서 DNA 분석이 이루어지는 경우 CE의 분석 결과에 비하여 해상도가 낮은 것이 일반적이다. 따라서 microchip을 이용하여 여러 개의 샘플을 동시에 분석하고 이를 정확하게 해독하기 위해서는 (DNA)-(drag-tag) 연결 물질간의 전기 이동도 차이가 CE에 비하여 상대적으로 커야 한다. 이를 구현하기 위해서는 drag force의 차이가 큰, 즉 크기의 차이가 큰 drag-tag을 사용하여야 하는데 화학적으로 polypeptide를 생산할 경우, 분자량이 크면서 균일 분자량을 갖는 물질을 합성하는데 어려움이 따른다. 그러나 생물학적인 방법을 통해 생산된 반복단위 단백질은 DNA

조작을 통해 원하는 크기의 polypeptide를 합성하는 것이 가능하므로 이를 이용한 DNA 분석은 향후 microchip에서의 빠르고 효율적인 분석에 이용될 수 있을 것이라 기대된다. 본 연구 결과를 토대로 향후 더 다양한 길이의 DNA와 다양한 크기의 반복단위 단백질을 사용한다면 microchip 상에서 다중 SNP 분석 시스템 구축이 가능하리라 생각된다.

요 약

Drag-tag으로 사용될 반복단위 단백질을 생물학적인 방법을 통해 생산함으로써 수용액 내에서 DNA 분리가 가능함을 확인하였다. 서로 다른 크기를 갖는 두 종류의 반복단위 단백질을 디자인하였고, 이를 발현시킨 뒤 정제하였다. 정제된 반복단위 단백질에 형광 dye를 포함하고 있는 100 base의 DNA를 연결하였고, 이 연결 물질을 모세관 내부가 수용액으로 충전된 microchip 상에서 전기영동 하였다. 그 결과 생물학적으로 생산된 반복단위 단백질이 SNP 분석과 같은 빠르고 효율적인 DNA 분석에 적합한 후보물질로 사용될 수 있음을 확인하였다.

감 사

이 연구 논문은 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 핵심연구지원사업 지원을 받아 연구 되었으며 (R01-2008-000-20516-0) 이에 감사 드립니다.

접수 : 2010년 3월 2일, 게재승인 : 2010년 4월 21일

REFERENCES

- Baba, Y. (1999) Capillary affinity gel electrophoresis: new technique for specific recognition of DNA sequence and the mutation detection on DNA. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 41: 91-101.
- Won, J.-I. (2006) Recent advances in DNA sequencing by end-labeled free-solution electrophoresis (ELFSE). *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 11: 179-186.
- Bruin, G. J. M., T. Wang, X. Xu, J. C. Kraak, and H. Poppe (1992) Preparation of polyacrylamide gel-filled capillaries by photopolymerization for capillary electrophoresis. *J. Microcol. Sep.* 4: 439-448.
- Noolandi, J. (1992) A new concept for sequencing DNA by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 13: 394-395.
- Mayer, P., G. W. Slater, and D. Drouin (1994) Theory of DNA sequencing using free-solution electrophoresis of protein-DNA complexes. *Anal. Chem.* 66: 1777-1780.
- Noolandi, J. (1993) A new concept for separating nucleic acids by electrophoresis in solution using hybrid synthetic end labeled-nucleic acid molecules. *Electrophoresis* 14: 680-681.
- Slater, G. W., T. B. L. Kist., H. Ren, and G. Drouin (1998) Recent developments in DNA electrophoretic Separations. *Electrophoresis* 19: 1525-1541.
- Slater, G. W., C. Desruisseaux, S. J. Hubert, J.-F. Mercier, J. Labrie, J. Boileau, F. Tessier, and M. P. Pepin (2000) Theory of DNA electrophoresis: A look at some current challenges. *Electrophoresis* 21: 3873-3887.
- Meagher, R. J., J.-I. Won, L. C. McCormick, S. Nedelcu, M. M. Bertrand, J. L. Bertram, G. Drouin, A. E. Barron, and G. W. Slater (2005) End-labeled free-solution electrophoresis of DNA. *Electrophoresis* 26: 331-350.
- Chen, X. and P. F. Sullivan (2003) Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput. *Pharmacogenomics J.* 3: 77-96.
- Vreeland, W. N., R. J. Meagher, and A. E. Barron (2002) Multiplexed, high-throughput genotyping by single-base extension and end-labeled free-solution electrophoresis. *Anal. Chem.* 74: 4328-4333.
- Joo, G.-S., S. K. Jha, and Y.-S. Kim (2009) A capillary electrophoresis microchip for amperometric detection of DNA. *Current Appl. Physics* 9: e222-e224.
- Meagher, R. J., J. A. Coyne, C. N. Hestekin, T. N. Chiesl, R. D. Haynes, J.-I. Won, and A. E. Barron (2007) Multiplexed p53 mutation detection by free-solution conjugate microchannel electrophoresis with polyamide drag-tags. *Anal. Chem.* 79: 1848-1854.
- Won, J.-I., R. J. Meagher, and A. E. Barron (2004) Characterization of glutamine deamidation in a long, repetitive protein polymer via bioconjugate capillary electrophoresis. *Biomacromolecules* 5: 618-627.
- Meagher, R. J., J.-I. Won, J. A. Coyne, J. Lin, and A. E. Barron (2008) Sequencing of DNA by free-solution capillary electrophoresis using a genetically engineered protein polymer drag-tag. *Anal. Chem.* 80: 2842-2848.
- Won, J.-I., R. J. Meagher, and A. E. Barron (2005) Protein polymer drag-tags for DNA separations by end-labeled free-solution electrophoresis. *Electrophoresis* 26: 2138-2148.