

Development of DNA Probe Assay System for *Salmonella* Species using Glass as substrate

정우성, 이용희, 백세환

고려대학교 생명공학원, 바이오센서 시스템공학 연구실

전화 (02)3290-3438, Fax (02)927-2797

Abstract

We developed a DNA probe analytical system with a patterned array of oligonucleotide molecules immobilized on glass surfaces. The detection capability of the system depended mainly on the way the capture probes were attached to the support as well as the sequence. We optimized major variables to graft DNA molecules onto a glass support and the DNA probe assay was eventually accomplished without purification of the PCR product.

서론

유전자 탐침 기술은 특정 병원균의 탐지, 유전병 검사 그리고 암 조기검사와 같은 biomedical analysis에 응용되고 있다.¹⁾ 전통적인 병원균 검출 방법으로 사용되던 선택배지를 이용한 배양 검출방법은 2-4일 정도의 많은 시간이 소모되고 많은 노동력을 필요로 한다. 이런 검출 시간을 줄이기 위해 *Salmonella*의 특이 염기 서열인 *invA* gene을 탐지할 수 있는 DNA probe assay 방법을 개발하였다. 이 분석 방법은 평균 3일이 소요되던 검출시간을 현저히 줄여주었고 또한 PCR 후 product의 별도로 분리과정이 필요하지 않는 편의성을 제공해 주었다. DNA probe assay 분석 방법은 gel 전기영동분석법과 비교하여 약 10배 이상의 측정 민감도가 증가되었고 식품 오염물질의 검출 방법으로 높은 특이도를 나타내었다.

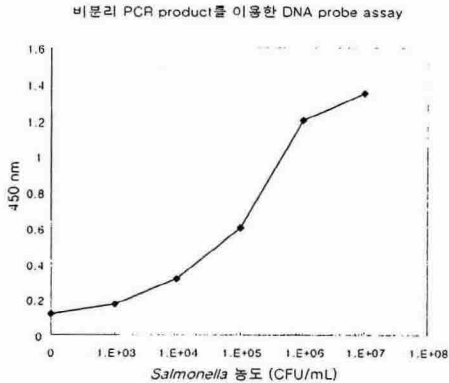
재료 및 방법

DNA 고정화모체로 선택된 slide glass 표면은 HCl:MeOH 혼합용액과 H₂SO₄ 용액을 이용하여 세척되었고²⁾ silanization 과정을 통하여 표면을 amination시켰다. 이 slide에 glutaraldehyde (GA)를 처리한 후 streptavidin (SA)을 고정화시켰다.^{3,4)} 그 위에 biotin이 표지된 capture probe를 avidin-biotin 반응을 이용하여 결합시켰다. Target DNA는 FITC-primer를 이용하여 PCR 과정을 이용하여 증폭되었고 이 PCR product를 single strand로 만든 후 glass에 고정화된 capture probe와 hybridization을 시켰다. DNA의 확인을 위해 분자상의 FITC와 anti-FITC IgG의 항원-항체 반응을 이용하였고 신호발생은 Ab-horseradish peroxidase (HRP) 중합

체와 효소기질 (tetramethyl benzidine)과의 반응을 이용한 방법을 선택하였다.

결과 및 토의

Glass 표면에 고정화된 cell 농도에 따른 PCR product의 농도를 대표하는 신호 발색의 변화를 측정하였다. 반응된 DNA를 탐지하기 위해 FITC를 항원으로 인지하는 항체를 이용하였고 신호 발색은 효소-기질 반응을 이용하였다. Fig. 1은 항체에 표지된 HRP와 TMB 기질용액을 이용하여 신호 변화를 보았는데 민감도는 10^3 CFU/mL까지의 높은 민감도를 나타내었다.



위의 검출방법이외에도 colloidal gold를 silver로 증폭시키는 방법, gold에 전도성고분자를 coupling 하여 전기 전도도를 측정하는 방법, 그리고 ruthenium (Ru)을 이용한 광학검출방법을 이용할 수 있다. 이 방법들을 이용한 전기적 혹은 광학적 유전자센서는 정성 분석이 아닌 정량 분석을 가능하게 하고 반도체 기술과의 결합으로 소형화된 시스템의 개발에 응용될 수 있다.

요약

유전자 분석 기술은 biomedical analysis를 위해 일반적으로 고체 상에 고정화된 DNA 분자를 이용한다. 이 센서의 검출능력은 주로 capture probe의 서열뿐만 아니라 oligonucleotide의 고체 상에 고정화 방법에 달려있다. 본 연구에서는 glass 표면에 DNA 분자를 고정화시키는 방법과 PCR product를 정제하지 않고 직접 검출할 수 있는 DNA probe assay방법을 개발하였다.

참고문헌

1. H.berney, "A DNA diagnostic biosensor: development, characterisation and performance" (2000), Sensors and Actuators B, 68, 100-108
2. J. J. Cras, "Comparison of chemical cleaning methods of glass in preparation for silanization", (1999), Biosensors and Bioelectronics, 14, 683-688
3. M. Nisnevitch, "Immobilization of antibodies onto glass wool, Journal of Chromatography" (2000), B, Biomedical Sciences and Applications, 738, 217-223
4. Cass Ligler, "Immobilization Biomolecules in Analysis" (1998), Oxford University Press, 9-10