

전기화학법을 이용한 DNA Hybridization 검출 센서의 개발 및 특성 해석

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

Development of DNA Hybridization Detection Sensors and Analysis of Characteristics Using Electrochemical methods

Jin-Young Ock*, Do-Kyun Kim*, Jeong-Soo Chang**, Young-Soo Kwon*
 *Dept. of Electrical Eng., Dong-A Univ., **Dept. of Electrical Eng., Kyung-Il 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. The probe oligonucleotide was used to determine the amount of target oligonucleotide in solution using Methylene Blue(MB) as the electrochemical indicators. The cathodic peak currents (I_{peak}) of MB 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 $0.01[nM]$. As a result, the match oligonucleotide (CR-1) was most stable state and the peak of redox current measured by DNA hybridization detection sensors by using electrochemical method seem to be similar to 1-mer terminal mismatch oligonucleotide (MR-3). The MR-2, MR-3, MR-22 and MR-33 have each mismatching sequence of central and terminal. With this set the role of point mutations was to be investigated. Terminal mismatch oligonucleotide (MR-3, 33) is shown more stable state than central mismatch oligonucleotide (MR-2, 22). And 1-mer mismatch oligonucleotide (MR-2 or 3) is shown more stable state than 2-mer mismatch oligonucleotide (MR-22 or 33).

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].

전기화학법을 이용하여 여러 생체물질을 검출할 수 있는 검출 센서는 계속한다는 관점에서 생체반응의 정보(예컨대 산화환원전위 또는 전자가 흐르는 방향)나 전자가 이동하는 속도 및 메카니즘에 관한 정보를 얻는 수단 이 된다. 막전위나 이온 이동에 관한 전기화학법의 기초 적인 개념은 생체막의 기능을 이해하기 위한 중요한 기 초이다. 생명과학의 중요한 영역으로서의 생체정보의 검 출, 변환 및 의료 분야의 응용에 전기화학법을 이용한 검 출센서의 역할은 크다[2].

본 연구는 DNA라는 생체분자의 hybridization 반응 에 의한 산화환원 특성을 검출하기 위해 새로운 전기화학

법을 이용한 DNA 검출 센서를 구성하는 것이며, 이 DNA 검출 센서를 사용하여 전위가 주사된 후, 올리고뉴 클레오티드와 이온과의 메카니즘, 전자 이동, 지시제의 표면 coverage 등 생체반응의 기본 정보를 얻는 것이다. 본 연구의 중심이 되는 DNA hybridization이 실험적으 로 유용한 것은 프로브 올리고뉴클레오티드가 매치 표적 올리고뉴클레오티드만을 헤테로쌍염기(heteroduplex)로 형성시킬수 있기 때문이다. 따라서 매치 올리고뉴클레오 티드와 미스매치 올리고뉴클레오티드를 정확히 예측함으 로써 유전자를 질병 치료에 이용하는 유전자 치료(gene therapy) 뿐만 아니라 분자생물학, 바이오공학, 환경모 니터링, 식품공학등 여러 분야에 응용이 가능할 것으로 생각된다. 이 결과를 바탕으로 매치 및 각 미스매치 올리 고뉴클레오티드가 전기화학적으로 차이가 있음을 확인하 였으며, DNA칩 마이크로어레이를 이용한 DNA 센서 개 발의 기초 자료로 이용될 수 있을 것으로 기대된다[3-4].

2. 시료 및 실험 방법

2.1 시료

본 연구에 사용된 모든 올리고뉴클레오티드는 일본 Nisshinbo사에 위탁 합성 및 HPLC 정제하여 사용하였 다. 각 올리고뉴클레오티드의 염기배열은 표 1에 나타내었 다. 염기배열중 밑줄친 부분은 미스매치 염기배열을 나타낸 다. 미스매치 올리고뉴클레오티드 MR-2와 MR-3은 중앙 부분과 말단부분에 한 개씩의 미스매치 염기배열을 가졌 으며, 미스매치 올리고뉴클레오티드 MR-22와 MR-33은 중 앙 부분과 말단부분에 두 개씩의 미스매치 염기배열을 가졌 다. 이 미스매치 올리고뉴클레오티드를 사용하여 미스매 치 염기배열의 위치 및 개수가 올리고뉴클레오티드 hybridization에 어떤 영향을 미치는지를 알아볼 수 있 다.

표 1. 프로브 및 각 표적 올리고뉴클레오티드의 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>GGTTTCCATGACAACGGG</u> 3'
Mismatching 2 (MR-2)	5' CAGTTAT <u>G</u> CCACTCTGCA 3'
Mismatching 3 (MR-2)	5' CAGTTATACCACTCTG <u>C</u> G 3'
Mismatching 22 (MR-22)	5' CAGTTATAG <u>G</u> CACTCTGCA 3'
Mismatching 33 (MR-33)	5' CAGTTATACCACTCTG <u>G</u> G 3'

4. 결 론

고뉴클레오티드의 양이 일정하다면 매치 올리고뉴클레오티드의 농도에 따라 hybridization되는 상보적 올리고뉴클레오티드의 양이 달라지게 되며, 쌍염기 올리고뉴클레오티드 사이에 삽입되는 indicator의 양도 달라지게 된다. 즉, 매치 올리고뉴클레오티드의 농도에 따른 indicator의 환원 전류를 분석함으로써 삽입되는 indicator의 양을 정량적으로 분석할 수 있다.

그림 2에서 전기화학법 측정 장치에 의해 구해진 MB의 환원 전류값은 매치 올리고뉴클레오티드의 농도 증가(0.1nM 이상)에 비례해서 선형적으로 증가하고 있다. 하지만 0.1nM미만에서는 전류의 변화가 없으며, 삽입되는 indicator의 양을 식별할 수 없음을 나타낸다.

표 1에 나타난 각 올리고뉴클레오티드 중 프로브(PB-1) 올리고뉴클레오티드와 중앙 부분과 말단 부분에 미스매치 염기배열을 가진 미스매치 (MR-2~MR-33) 올리고뉴클레오티드의 hybridization 반응 특성을 cyclic voltammetry를 사용하여 측정된 결과를 그림 3에 나타내었다. 그림 3에 나타난 것처럼, cyclic voltammetry에 의해 구해진 매치 및 각 미스매치 올리고뉴클레오티드의 환원전류 피크치는 확실한 차이를 보이고 있다. 따라서 본 연구에 사용된 cyclic voltammetry를 사용하여 매치 및 각 미스매치 올리고뉴클레오티드의 hybridization에 따른 형광 강도를 비교함으로써 미스매치 염기배열의 위치 및 개수가 DNA hybridization에 어떤 영향을 미치는지를 관측할 수 있다.

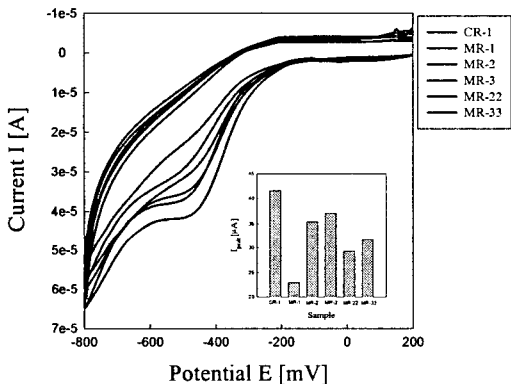


그림 3. 매치 올리고뉴클레오티드 및 각 미스매치 올리고뉴클레오티드에 따른 MB의 산화환원 전류 곡선

Fig. 3. Cyclic voltammograms of MXT accumulation as complementary and each mismatching oligonucleotide

그림 3의 결과를 비교해보면 매치 올리고뉴클레오티드가 각 미스매치 올리고뉴클레오티드에 비해 환원 전류의 peak치가 크며, DNA hybridization 가장 일어나기 쉽다는 것을 알 수 있다.

미스매치 올리고뉴클레오티드 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 올리고뉴클레오티드 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 올리고뉴클레오티드 hybridization 측정방법을 서술하고 올리고뉴클레오티드와 indicator 사이의 산화환원 반응을 이용하여 프로브 올리고뉴클레오티드와 매치 및 각 미스매치 올리고뉴클레오티드와의 hybridization 반응 특성을 비교 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) MB는 같은 실험 조건에서 일염기 올리고뉴클레오티드보다 쌍염기 올리고뉴클레오티드에 더 많이 삽입된다는 것을 알 수 있었으며, 전기화학측정법으로 DNA hybridization 여부를 확인할 수 있었다.

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

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

4) 미스매치 올리고뉴클레오티드 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 올리고뉴클레오티드 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 한국과학재단 지정 동아대학교 지능형통합항만관리연구센터의 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] 남종우, "현대의 전기화학", 청문각, 1995, pp.209-230
- [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] 理化學大辭典編纂委員會, "理化學大辭典", 集文社, 1996, p.956
- [6] A.M. Oliveira Brett, *et al.*, Biosensor and Bioelectronics, 13, p.861, 1998
- [7] A.M. Oliveira Brett, *et al.*, "Electrochemical oxidation of mitoxantrone at a glassy carbon electrode", Analytica Chimica Acta, 385, pp.401-408, 1999