

DNA Hybridization 검출 센서를 이용한 매치 및 미스매치 DNA hybridization 특성 연구

김도균*, 권영수
 동아대학교 전기공학과

A Study on Match and Mismatch DNA Hybridization properties
 Using DNA Hybridization Detection Sensor

Do-Kyun Kim*, Young-Soo Kwon
 Dept. of Electrical Eng., Dong-A University

Abstract - The determination of DNA hybridization reaction can apply the molecular biology research, clinic diagnostics, bioengineering, environment monitoring, food science and other application area. So, the improvement of DNA detection system is very important for the determination of this hybridization reaction. In this study, we report the characterization of the probe and target oligonucleotide hybridization reaction using the evanescent field microscopy. First, we have fabricated DNA chip microarray. The particles which were immobilized oligonucleotides were arranged by the random fluidic self-assembly on the pattern chips, using hydrophobic interaction. Second, we have detected DNA hybridization reaction using evanescent field microscopy. The 5'-biotinylated probe oligonucleotides were immobilized on the surface of DNA chip microarray and the hybridization reaction with the Rhodamine conjugated target oligonucleotide was excited fluorescence generated on the evanescent field microscopy. In the foundation of this result, we could be employed as the basis of a probe oligonucleotide, capable of detecting the target oligonucleotide and monitoring it in a large analyte concentration range and various mismatching condition.

1. 서론

표면 플라즈몬 공진(Surface Plasmon Resonance)을 이용한 생체 분자 검출 센서는 Abbe의 굴절계로부터 시작되었다. Abbe의 굴절계는 유리 프리즘 표면의 극미량 시료의 농도를 굴절률 변화로서 검출하는 굴절계로 알려져 있으며, 당도계 등에 이용되고 있다. 원리적으로 Abbe의 SPR을 이용한 검출 센서는 현재 사용되고 있는 검출 센서와 거의 같은 형태를 가지고 있으며, 다만 프리즘 표면에 금속막을 도포하지 않은 점이 다르다[1].

현재 가장 많이 사용되고 있는 SPR을 이용한 생체 분자 검출 센서는 BIACORE라는 장치이다. BIACORE는 SPR을 측정 원리로 이용하여 생체분자간의 상호작용을 특별한 표식자가 없이 실시간으로 모니터링할 수 있는 장치이다[2]. 하지만 이 장치는 측정 대상이 되는 생체 분자의 측정량과 측정속도를 micro flow system을 통해 조정하기 위해 센서 채널을 늘림으로서 제작 공정이 복잡하게되며, micro flow system의 수에 따라 센서 칩의 사용 횟수가 선택됨으로서 제작 단가가 증가하는 단점이 있다.

따라서, 본 연구에서는 다항목 측정 및 고집적화 DNA칩 마이크로어레이와 SPR에 의해 발생하는 에바네센트파를 이용한 새로운 고집적 DNA hybridization 검출 센서를 개발하였다. 즉, 에바네센트 형광 현미경은 SPR에 의해 발생하는 에바네센트파를 이용하여 표적

분자에 수식된 형광 물질을 여기시킴으로서 생체 분자간의 상호작용을 실시간으로 모니터링할 수 있는 장치이다. 에바네센트 형광 현미경의 측정 원리는 측정 대상이 되는 생체 분자를 DNA칩 마이크로어레이 표면에 고정화한 후, 이 분자와 상호작용을 하는 분자를 포함한 시료를 주입시켜 두 분자간의 hybridization에 따른 DNA칩 마이크로어레이 표면에서의 미량의 형광 강도 변화를 고성능 CCD 카메라로 검출하여 이 신호의 미량 변화를 이미지로 표시하는 것이다. 즉, BIACORE의 방식과 달리 소량의 시료를 이용해서 생체 분자의 상호작용을 실시간으로 이미지화 하여 측정하는 것이 가능하다. 이에 의해, 여러 조건의 DNA에 대한 분석을 동시에 할 수 있으며, 미소화에 의하여 시약이나 시료 소비량의 억제와 복합적 정보의 취득이 가능할 것으로 기대하고 있다. 고집적 DNA hybridization 검출 센서에 의해 검출된 결과는 열역학법이나 전기화학법을 이용한 DNA hybridization 검출 센서 개발의 기초 자료로 이용될 수 있을 것으로 기대된다[3].

2. 시료 및 실험 방법

2.1 시료

본 연구에 사용된 모든 DNA는 0.2[μ M] 스케일의 이중나선 DNA를 일본 Nisshinbo에 위탁 합성 및 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)로 정제하여 사용하였다. 각 DNA의 염기배열을 표 1에 나타내었다. 여기서 매치 DNA(CR-1)와 미스매치 DNA(MR-1)은 대장균 O157:H7의 subunit A 부분의 DNA 염기배열의 일부분이다. 염기배열 중 밑줄 친 부분은 미스매치 염기배열을 나타낸다.

표 1. 각 DNA의 염기배열

Oligonucleotide	Base sequence
Probe (PB-1)	5' Bio-TGCAGAGTGGTATAACTG 3'
match (CR-1)	5' CAGTTATACCACTCTGCA 3'
Mismatch 1 (MR-1)	5' <u>GGTTTC</u> CATGCAACCGGA 3'
Mismatch 2 (MR-2)	5' CAGTTATAGCACTCTGCA 3'
Mismatch 3 (MR-3)	5' CAGTTATACCACTCTGCG 3'
Mismatch 22 (MR-22)	5' CAGTTATAGCACTCTGCA 3'
Mismatch 33 (MR-33)	5' CAGTTATACCACTCTGGG 3'

여기서 미스매치 DNA 중 MR-2와 MR-3은 중앙 부

분과 말단부분에 한 개씩의 미스매치 염기배열을 가졌으며, 미스매치 DNA 중 MR-22와 MR-33은 중앙 부분과 말단부분에 두 개씩의 미스매치 염기배열을 가졌다. 이 미스매치 DNA를 사용하여 미스매치 염기배열의 위치 및 개수가 DNA hybridization에 어떤 영향을 미치는지를 알아보았다.

모든 DNA는 파우더 형식으로 제공되었으며 TE 완충액(10[mM] Tris, 1[mM] EDTA, pH 7.4)에 의해 100 [μM]의 농도로 용해해서 사용하였다. 또한 모든 DNA의 농도는 수용성 완충액(10[mM] Tris-HCl, 0.2[M] NaCl, pH 7.9)에 의해 0.1[nM]부터 10[μM]까지 조정되었으며 사용하지 않을 경우는 4°C 상태에서 보관하였다.

2.2 DNA의 고정

티올유도체 및 아비딘을 거쳐 5'말단에 비오틴을 수식한 프로브 DNA를 고정하였다. 우선, 1[mM] 농도의 3,3'-dithiodi propionic acid 수용액 3[mL]중에 담체를 실온에서 20분간 담근 후, 이 수용액에 100[mg/mL] 농도로 만든 NHS와 EDC를 혼합액으로하여 카르복실산과 1시간 반응시킨 후 건조시켰다.

그리고, 아비딘은 수용성 완충액을 0.2[mg/mL]가 되도록 조제한 1[mL] 용액에 30분동안 담귀 놓았다. 다음 1[M] 농도의 에탄올아민 수용액 1[mL]에 담체를 30분동안 담귀 카르복실기를 불활성화하였다.

마지막으로 아비딘을 수식한 담체를 수용성 완충액에 비오틴화 프로브 DNA를 1[μM]이 되도록 1[mL]의 용액에 25[°C]에서 1시간동안 담귀 두었다. 여기서, 비오틴화 프로브 DNA 체인은 아비딘 분자의 4개 결합 사이트의 하나와 결합된다. 비오틴화 프로브 DNA의 고정량은 DNA 용액에 담귀되는 시간에 의하여 제어되었다.

2.3 Evanescent 형광 현미경

본 연구에서는 SPR에 의해 발생하는 에바네센트파를 이용하여 표적 DNA에 수식된 형광 물질을 여기시킴으로서 DNA간의 상호작용을 실시간으로 모니터링하기 위해 에바네센트 형광 현미경(Y-FL, Nikon)을 사용하였다. 에바네센트 형광 현미경의 주요 구성 장치는 광원(YAG 레이저, 532[nm]), 프리즘, 프로브 DNA가 고정된 DNA칩 마이크로어레이, 형광 물질을 관측하는 대물 렌즈와 PC와 연결된 CCD카메라로 이루어져 있다. 이 중에서 DNA가 고정된 DNA칩 마이크로어레이의 제작 및 특성에 대해서는 이미 발표한 바가 있다[4, 5]. 532[nm]의 파장을 가진 YAG 레이저에서 방출된 광은 반사 거울을 통해 프리즘까지 도달하고 반사된다. 본 연구에 사용된 YAG 레이저의 입력 전력은 10[mW]이며, 입사각은 72[°]를 유지하였다. 여기된 형광 물질의 존재 여부는 0.45인치 f/10× 대물렌즈를 사용하여 관측할 수 있다. 관측된 형광 물질은 CCD카메라에 의해 이미지화되며, PC에 자동적으로 저장된다. 따라서 에바네센트 형광 현미경을 사용하여 DNA칩 마이크로어레이상에 고정된 프로브 DNA와 형광 물질이 수식된 표적 DNA간의 hybridization을 실시간으로 모니터링할 수 있다.

2.3 DNA hybridization 측정

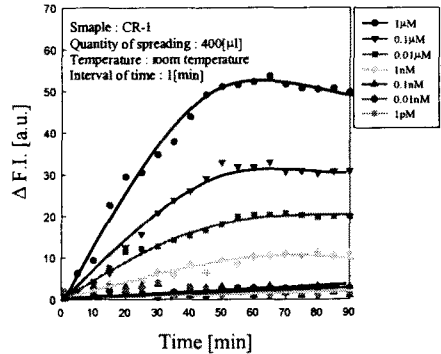
수용성 완충액에 의해 1[μM]의 농도로 조정된 프로브 DNA는 DNA칩 마이크로어레이 표면의 아비딘과 결합하여 고정되었다. 프로브 DNA가 고정된 DNA칩 마이크로어레이는 광의 산란을 막기 위해 오일($n_d = 1.516$, 23[°C])이 주입된 프리즘 위에 고정되었다. 다음, 0.1[nM]부터 10[μM]의 농도로 조정된 매치 및 각 미스매치 DNA 400[μL]를 DNA칩 위에 주입한 후, 프로브 DNA와 표적 DNA의 hybridization에 따른 형광 물질의 존재 여부를 CCD카메라로 이미지화하고, 형광 이미지에 의해 구해진 형광 강도의 변화값은 PC의 Histogram 프로그램에 의해 자동적으로 기록되었다. 모든 연구의 측정 시간은 90분, 측정 온도는 실온 (23[°C])의 조건하

에서 수행되었다. 매치 및 각 미스매치 DNA의 hybridization에 따른 형광 강도의 변화값으로부터 미스매치 염기배열의 위치 및 개수가 DNA hybridization에 어떤 영향을 미치는지를 관측할 수 있었다.

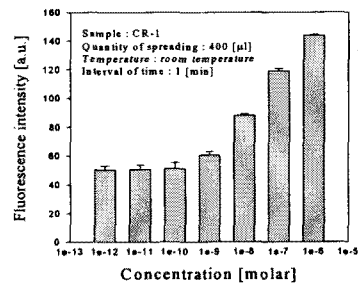
3. 결과 및 검토

표 1에 나타난 각 DNA 중 프로브 DNA(PB-1)와 매치 DNA(CR-1)의 hybridization에 따른 형광 이미지를 여러 농도로 측정하여 그 결과를 그림 1에 나타내었다.

그림 1 (a)는 프로브 DNA와 매치 DNA의 농도에 따른 hybridization을 실시간으로 측정된 결과를 나타낸 것이다. 여기서, ΔF.I.는 형광 강도의 변화값을 나타내며, 이 값은 표적 DNA를 주입한 후의 형광 강도에 주입전의 형광 강도를 뺀 값이다. 그림 1 (a)의 결과는 시간이 증가할수록 형광 강도의 변화값 ΔFI이 비례적으로 증가하지만 약 45분 정도에서 포화되고 있음을 보여주고 있다. 이것은 시간이 증가할수록 프로브 DNA 및 매치 DNA의 hybridization에 의한 DNA칩 마이크로어레이 표면의 굴절률이 증가하기 때문에 선형적으로 증가하며, 약 45분 후에는 DNA의 hybridization에 의한 DNA칩 마이크로어레이 표면의 굴절률 변화가 없기 때문에 ΔFI가 포화되는 것으로 생각된다.



(a) 매치 DNA의 농도에 따른 hybridization을 실시간으로 측정된 결과



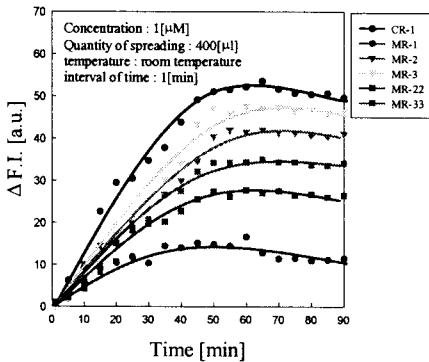
(b) 매치 DNA의 농도에 따른 형광 강도 비교

Fig. 1. 매치 DNA(CR-1)의 농도에 따른 hybridization 비교

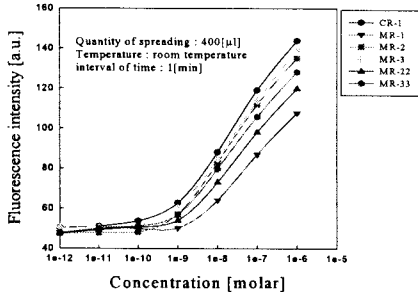
그림 1 (b)는 표적 DNA의 농도에 따른 형광 강도를 나타낸 것이다. 에바네센트 형광 현미경에 의해 구해진 형광 강도는 매치 DNA의 농도에 비례하여 증가하고 있으며, 약 1[nM]의 농도까지는 형광 이미지가 확인이 된다. 따라서 본 연구에 사용된 에바네센트 형광 현미경의 측정 가능 농도는 약 1[nM]이상이며, BIACORE 장

치보다 1000배 정도의 낮은 농도로도 결과값을 구할 수 있다.

표 1에 나타난 각 DNA 중 프로브 DNA(PB-1)와 중앙 부분과 말단 부분에 미스매치 염기배열을 가진 미스매치 DNA(MR-2~MR-33)의 hybridization을 실시간으로 측정 한 결과를 그림 2 (a)에 나타내었다. 그림 2 (a)의 결과를 비교해보면 매치 DNA가 각 미스매치 DNA에 비해 형광 강도의 변화값 ΔFI 가 가장 크며, DNA hybridization 가장 일어나기 쉽다는 것을 알 수 있다. 이와 반대로, 12[mer]의 미스매치 DNA 염기배열을 가지고 있는 MR-1의 경우에는 형광 강도의 변화값 ΔFI 가 가장 작으며, DNA hybridization이 가장 일어나기 어렵다는 것을 의미한다.



(a) 매치 및 각 미스매치 DNA에 따른 hybridization을 실시간으로 측정 한 결과



(b) 매치 및 각 미스매치 DNA의 농도에 따른 형광 강도 비교

Fig. 2. 매치 및 각 미스매치 DNA에 따른 hybridization 비교

미스매치 DNA 중 MR-2와 MR-3를 이용하여 미스매치 염기배열의 위치에 대한 형광 강도의 변화값 ΔFI 를 비교해 보면, 미스매치 염기배열이 말단부 위치하는 경우가 더 변화값이 크다. 역으로 해석하면, 미스매치 염기배열이 중앙부에 위치할수록 DNA hybridization이 어렵다는 것을 알 수 있다.

다음, 미스매치 DNA 중 MR-2와 MR-22 혹은 MR-3와 MR-33를 이용하여 미스매치 염기배열의 개수에 대한 형광 강도의 변화값 ΔFI 를 비교해 보면, 미스매치 염기배열의 개수가 적을수록 더 변화값이 크며, 미스매치 염기배열의 개수가 많을수록 DNA hybridization이 어렵다는 것을 알 수 있다. 따라서 본 연구에 사용된 에바네센트 형광 현미경을 사용하여 매치 및 각 미스매치 DNA의 hybridization에 따른 형광 강도를 비교함으로써

미스매치 염기배열의 위치 및 개수가 DNA의 hybridization에 어떤 영향을 미치는지를 관측할 수 있다.

그림 2 (b)는 프로브 DNA와 매치 및 각 미스매치 DNA의 농도에 따른 형광 강도를 나타낸 것이다. 에바네센트 형광 현미경에 의해 구해진 형광 강도는 농도에 비례하여 거의 선형적으로 증가하고 있으며, 각 미스매치 DNA의 경우에도 매치 DNA와 같이 약 1[nM]의 농도까지는 농도 의존성이 있음을 확인할 수 있다.

4. 결 론

본 논문에서는 어떤 대상 생물의 매치 및 각 미스매치 DNA 염기배열을 동시에 검출 할 수 있는 수단으로 고집적 DNA칩 마이크로어레이와 에바네센트 형광 현미경을 결합하여 새로운 검출 센서를 구성하고, 이 센서를 이용하여 DNA hybridization 특성을 검출·해석 하였다.

본 연구에 사용된 시료인 미스매치 DNA 중 MR-2와 MR-3은 중앙 부분과 말단부분에 한 개씩의 미스매치 염기배열을 가졌으며, 미스매치 DNA 중 MR-22와 MR-33은 중앙 부분과 말단부분에 두 개씩의 미스매치 염기배열을 가졌다. 본 연구에서는 DNA hybridization 검출 센서를 사용하여 미스매치 염기배열의 위치 및 개수가 DNA hybridization에 어떤 영향을 미치는지를 알아보았다.

이와 같이 여러 가지 DNA hybridization 검출 센서를 이용하여 매치 DNA와 각 미스매치 DNA를 정확히 예측함으로써 유전자 치료 등 분자생물학, 의학·의공학, 약학, 환경공학, 농축산학, 식품공학, 전기·전자공학 등 여러 분야에 응용이 가능할 것으로 생각된다. 또한 DNA뿐만 아니라 RNA, 단백질과 같은 생체 물질의 상호작용을 실시간으로 분석할 수 있는 생체 물질 검출 센서도 개발이 가능할 것으로 생각된다. 이를 위해서는 수천 가지의 각종 생체 물질을 고정시킬 수 있는 바이오칩과 검출 장치의 연구가 중요하며, 특히 전기 및 광학적 방법을 이용하여 수 nm 크기의 생체 물질을 검출할 수 있는 검출 장치를 개발한다면 생체 물질이 가지는 특성을 해석하고 이해하는데 큰 역할을 할 것으로 기대한다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 지정 동아대학교 지능형통합물관리 연구센터의 지원에 의해서 수행되었기에 감사드립니다.

[참 고 문 헌]

- [1] J.J.A. Steyer and W. Almers, "A real-time view of life within 100nm of the plasma membrane", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* y, 2, pp. 268-275, 2001
- [2] M. Oda et. al., "Kinetic analysis of DNA binding by the C-M yb DNA-binding domain using surface plasmon resonance", *F EBS letters*, 454, pp. 288-292, 1998
- [3] 김도균, 권영수, "열역학법을 이용한 DNA hybridization 특성 검출 및 해석", *대한전기학회 논문지*, 51C-6, pp. 256-270, 2002
- [4] 김도균, 최용성, 권영수, "담체자기조직화법에 의한 고집적 DNA 어레이형 마이크로칩의 개발", *대한전기학회 논문지*, 51C-7, pp.328-334, 2002
- [5] D. -K. Kim, E. Tamiya, Y. -S. Kwon, "Development of a New DNA Chip Microarray Using RFSA Method", *Synthetic Metals*, 137, pp.1423-1424, 2003