

DNA 염기서열 분석을 위한 전기화학적 신호 검출 방법

조성보*, 홍진섭**, 양송주**, 권광민*, 한승오*, 김영미**, 박정호*
 고려대학교 전기공학과*, 국립 보건원**

Electrochemical Signal Detecting Method for DNA Sequencing

S.B. Cho*, J.S. Hong**, S.J. Yang**, K.M. Kwon*, S.O. Han*, Y.M. Kim**, J.H. Pak*
 Department of Electrical Engineering of Korea University*, National Institute of Healthcare**

Abstract - DNA 센서의 중요한 역할 중의 하나는 염기서열을 분석함으로써 유전적인 질병이나 돌연변이를 찾아낸다는 점이다. 염기서열 분석법으로 질량, 광학, 전기 화학적 측정법 등이 있는데, 그 중 전기 화학적 측정법이 타 방법에 비해 간편하고 비용도 저렴해서 전망이 매우 밝다. 전기 화학적 측정을 위해서는 전극의 표면 처리 공정과 전극 표면에서의 DNA immobilization, hybridization 공정 및 전기적 신호를 발생시키는 intercalator, 그리고 전기적 신호 검출을 위한 측정 장비가 필요하다. 본 논문에서는 전극의 표면 처리 물질로서 2-mercaptoethanol을 사용했고 double strand DNA의 intercalator로써 methylene blue를 사용했으며, methylene blue의 환원 전류값을 측정하여 double strand DNA를 bare Au 또는 single strand DNA와 구분할 수 있었다. 이러한 연구 결과를 토대로 하여 전기 화학적 신호 검출을 이용한 DNA 센서의 가능성과 개발 방향을 제시하고자 한다.

1. 서 론

최근 생명공학 기술의 발달로 생명체의 DNA 염기서열을 분석하고 이를 기반으로 유전적인 질병이나 돌연변이를 찾아내거나 생명체의 기능을 개선하고자 하는 노력이 시도되고 있다[1]. 이들 노력이 성공하기 위해서는 성공적인 DNA 염기 서열 분석이 필수적인데, 이때 사용되는 방법으로는 질량 측정의 의한 방법[2], 광학적 측정 방법[3], 그리고 전기 화학적인 방법[4] 등이 있다.

이중에서 전기 화학적 측정법은 질량, 광학적 측정법에 비해 여러 가지 장점이 있는데, 첫째, 전기화학 분석기와 컴퓨터만으로 측정 시스템이 갖춰지므로 가격이 저렴하고 큰 공간을 차지하지 않는다. 둘째 측정 절차가 간단하며 결과를 빠르게 얻을 수 있다. 마지막으로, 출력되는 신호는 전기 신호이므로 전기적 시스템과의 호환성이 높다. 이러한 전기 화학적 측정을 위해서는 전극의 선택 및 전극의 표면 처리 공정, 표면 처리된 전극면에 probe DNA를 immobilization하는 공정, probe DNA에 target DNA를 hybridization하는 공정 및 hybridization된 DNA에 선택적으로 결합할 수 있는 intercalator가 필요하며 이 물질을 산화시켜 발생된 전류를 측정할 수 있는 장비가 필요하다.

본 논문에서는 측정 전극으로 Au를, 전극 표면 처리 물질로서 2-mercaptoethanol을, double strand DNA의 intercalator로서 methylene blue를 사용하는 경우의 전기 화학적 측정 방법 및 연구 결과를 설명하고자 한다. 이 결과로부터 double strand DNA와 single strand DNA를 판별할 수 있는 가능성을 보이고 이러한 전기 화학적 신호 검출을 이용한 DNA 센서의 가능성과 개발 방향을 제시하고자 한다.

2. 실험 절차

2.1 Preparation of Electrodes

2 mm²의 면적을 갖는 원형 Au 전극 (MF2014, BAS) 을 끓는 2 M NaOH 용액과 질산으로 세척한 후 물 속에서 3분간 2번 sonication한다. 전극을 0.1 M 황산용액에서 전기화학 분석기 (CV-50W, BAS)를 이용하여 -0.1 V에서 -1.5 V까지 (vs. Ag/AgCl) cyclic voltammogram을 측정한다. 이상의 과정에서 일정한 산화-환원 곡선이 얻어진 전극을 1 mM의 2-mercaptoethanol (2-ME) 수용액에 2시간 동안 담겨 Au 전극 면에 2-mercaptoethanol 층을 형성시킨다 (2-ME 전극) [5].

2.2 Probe DNA Immobilization

2-ME 전극면에 1 nmol의 probe DNA (5'-TCT TTT GGC GGT ATG CAC TT-3') 와 1 μg 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDAC), 40 pmol 2-[N-morpholino]ethanesulfonic 산 (MES) 완충 용액 (pH 4.5) 을 포함한 1 μL의 용액을 상온에서 24 시간 동안 2-ME 전극 면과 반응시킨다 (ss-DNA 전극).

2.3 Hybridization

ss-DNA 전극을 1 nmol target DNA (5'-AA GTG CAT ACC GCC AAA AGA-3') 와 2.7 μg salmon sperm DNA, 75.3 μg MES 산, 481.3 μg MES potassium 염, 26.6 μmol NaCl, 0.6 μmol ethylene diaminetetraacetate (EDTA), 0.1% Tween 20이 포함된 30 μL의 hybridization 용액에 37°C에서 24시간 동안 담겨 반응시킨다. Hybridization 후 비 특정적으로 결합된 DNA 및 불순물들을 제거하기 위해 83.3 mL 12X MES, 5.2 mL 5 M NaCl, 1.0 mL 10% Tween 20이 포함된 10 mL의 수용액으로 세척한다 (ds-DNA 전극).

2.4 Methylene Blue 삼입 및 전기 화학 측정

이상에서 만들어진 2-ME, ss-DNA, ds-DNA 전극을 5 mM 인산 염 완충 용액 (pH 7.0), 50 mM NaCl, 0.2 mM potassium ferricyanide, 0.5 μM methylene blue가 포함된 전해질 용액에 10분 동안 담겨 둔 후 이 전극을 working 전극으로, Ag/AgCl (MW-4130, BAS) 전극을 reference 전극으로, Pt wire (MF-2052, BAS) 전극을 counter 전극으로 하는 3전극 시스템을 구성한 뒤 전기화학 분석기 (CV-50W, BAS) 로 -100 mV에서 -400 mV까지 -100 mV/sec의 scan rate을 갖는 1 cycle cyclic voltammetry로 methylene blue의 환원 전류를 측정한다. 또한 -220 mV에서 10초 동안 methylene blue에서 발생한 전하량을 chronocoulometry로 측정한다. 측정된 값들은 전기 화학 분석기와 연결된 컴퓨터

를 통해 저장된다.

3. 실험 결과 및 분석

전기 화학적 측정을 위해서는 DNA와 전극의 결합을 최적화하기 위한 전극의 표면처리가 먼저 고려되어야 한다. 이를 위해 본 실험에서는 전극의 재료로 Au를 선택했고 Au 전극면에 2-ME층을 형성하였다. 2-ME 전극에 probe DNA를 immobilization 한 후, 동일 농도의 target DNA로 probe DNA와 hybridization 하였다. 각각의 공정 상에서 제작된 2-ME, ss-DNA, ds-DNA 전극을 potassium ferricyanide와 methylene blue가 포함된 전해질 용액에 10분 동안 담가 두었다. 이 과정에서 methylene blue는 double strand DNA의 염기 사이에 결합이 된다. Fig. 1은 이상의 공정을 마친 후 전극 면의 상태를 모식도로 나타낸 것이다.

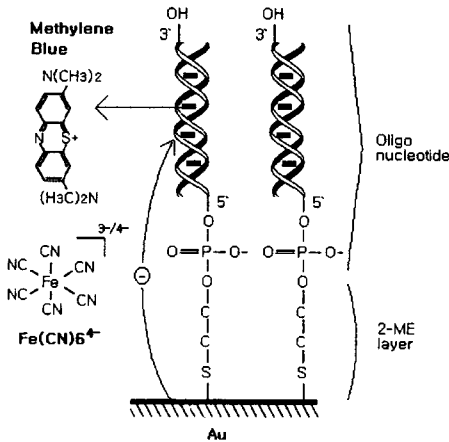


Fig. 1. 2-ME layer modified on Au surface and double strand DNA immobilized on 2-ME layer. Methylene blue is bound between base pairs of DNA.

전기 화학 측정 시 methylene blue는 전극으로부터 전자를 획득함과 동시에 potassium ferricyanide에 전자를 보낸다. 따라서 potassium ferricyanide는 methylene blue의 산화제로 사용된다. Methylene blue가 double strand DNA에 선택적으로 결합한다면 ds-DNA 전극에서 출력되는 전류의 크기는 2-ME 전극이나 ss-DNA 전극보다 크게 나타날 것이다. Fig. 2는 전기 화학적 측정을 위한 3전극 전해 전량계가 포함된 전기 화학 측정 시스템을 나타낸다.

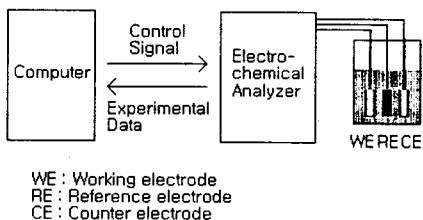


Fig. 2. Electrochemical measurement system includes three-electrode voltammetric electrode.

Fig. 3은 각 전극의 cyclic voltammetry에 의한 methylene blue의 최대 환원 전류 값을 나타낸다. Methylene blue는 - 220 mV 정도에서 최대 환원 전류 값을 나타내었는데, 6회 반복한 실험에서 평균값과 편차를 계산하여 각각 검은 사각형과 직선으로 표시하였다. 결과로부터 methylene blue의 최대 환원 전류의 평균값들은 18 nA (2-ME), 22 nA (ss-DNA), 124 nA (ds-DNA) 정도임을 볼 수 있다. 따라서 methylene blue가 double strand DNA에 선택적으로 결합하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로부터 3초 이내에 double strand DNA와 single strand DNA 및 bare Au를 구분 할 수 있는 DNA sensor의 제작이 가능하다.

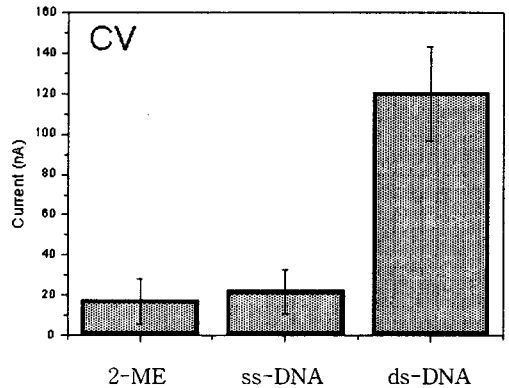


Fig. 3. The average values (black rectangle) of maximum reduction current caused by methylene blue in 2-ME, ss-DNA, ds-DNA electrode. The lines are distribution. The result was calculated after six times measurement by one cycle cyclic voltammetry with - 100 mV/sec scan rate.

Fig. 4는 각 전극의 chronocoulometry에 의한 methylene blue 환원 전류의 평균값들을 보여준다.

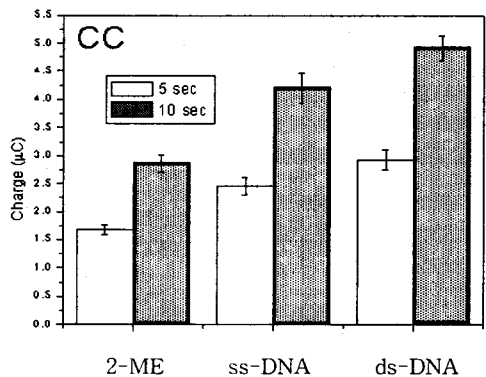


Fig. 4. The average values of charge caused by methylene blue in 2-ME, ss-DNA, ds-DNA electrodes. The results was calculated after six times measurement by chronocoulometry for 5 seconds (white rectangle) and 10 seconds (black rectangle) at - 220 mV. The lines are distribution.

- 220 mV에서 10초 동안 측정하였고 동일 실험을 6회 반복하였다. 흰 사각형은 5초 후에 측정된 값들의 평균이고, 검은 사각형은 10초 후에 측정된 값들의 평균이며, 직선은 측정값들의 편차를 나타낸다. 결과로부터 5초 후에 측정 시 methylene blue의 평균 전하량은 1.4 μC (2-ME), 2.4 μC (ss-DNA), 3.0 μC (ds-DNA)이고 10초 후에는 2.7 μC (2-ME), 4.5 μC (ss-DNA), 5.0 μC (ds-DNA) 정도임을 볼 수 있다. 그러므로 chronocoulometry에 의해서도 ds-DNA에 methylene blue가 선택적으로 결합된다는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 앞서 실험했던 cyclic voltammetry에 의한 결과를 뒷받침 해준다.

4. 결론 및 향후 연구 방향

이상의 실험 결과를 통해 전기 화학 분석기와 컴퓨터, 3전극 시스템만으로 전기 화학적 신호 검출을 이용하여 불과 수초 이내에 double strand DNA와 single strand DNA 및 bare Au의 구분이 가능함을 확인할 수 있었다. 이는 기존의 질량, 광학적 염기 서열 분석법들에 비해 경비와 시간의 소요를 크게 절감시킨다. 또한 출력되는 신호가 전기적인 신호이므로 값이 싸고 크기가 작은 전기적 시스템과의 호환성이 높다.

향후 연구방향으로서 미세한 크기의 출력 전류 신호를 탐지하고 분석하는 전기 제어 시스템과 MEMS 기술을 응용한 초소형 전극을 제작한다면 출력 신호가 좋은 초소형화된 칩 제작이 가능하리라고 본다. 이러한 전기 화학적인 방법을 이용하여 염기 서열을 분석하고 유전적 질병이나 돌연변이의 검출을 통해 생명체의 손상된 기능을 복원하거나 향상시키는 날이 머지 않았다고 본다.

본 연구는 Mitocon LTD.와 2001년도
두뇌한국21사업의 지원 하에 수행되었음

{참 고 문 헌}

- (1) Susan R. Barnum, *Biotechnology*, Wadsworth Publishing Company, 1998.
- (2) Bardea, A., Dagan, A., Ben-Dov, I., Amit, B. and Willner, I., "Amplified microgravimetric quartz crystal-microbalance analyses of oligonucleotide complexes: a route to a Tay-Sachs biosensor device." *Chem. Commun.*, Vol. 7, pp. 839-840, 1998.
- (3) Storhoff, J., Elghanian, R., Mucic, C., Mirkin, C. and Letsinger, R., "One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probes." *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 120, pp. 1959-1964, 1998.
- (4) Elizabeth M. Boon, Donato M. Ceres, Thomas G. Drummond, Michael G. Hill, and Jacqueline K. Barton, "Mutation detection by electrocatalysis at DNA-modified electrodes," *Nature Biotechnology*, Vol. 18, pp. 1096-1100, 2000.
- (5) Yuan-Di Zhao, Dai-Wen Pang, Shen Hu, Zong-Li Wang, Jie-Ke Cheng, and Hong-Ping Dai, "DNA-modified electrodes: part4: optimization of covalent immobilization of DNA on self-assembled monolayers," *Talanta*, Vol. 49, pp. 751-756, 1999.