

측방유동방식 신속 DNA 교잡 분석법의 개발

정동석¹ · 최의열^{1,2*}

¹바디텍 중앙연구소, ²한림대학교 유전공학과

유전자의 기능을 분석하는 과정에서 특정한 염기 서열의 존재여부를 확인하는 분석법은 필수적이다. 현재 사용되고 있는 Southern 및 Northern blotting 방법은 시간이 오래 걸리며, 온도 등과 같은 외부 조건을 엄격하게 조절하여야 한다. 본 연구에서는 측방유동방식을 이용한 크로마토그래피법을 응용하여 새로운 간편용 DNA 분석법을 개발하였다. 이 측방유동형 DNA 분석 스트립은 시료가 적용되는 샘플패드, 이동하여 분리되고 교잡반응이 일어나는 전개용 막, 그리고 시료가 계속하여 이동하기 위한 흡수패드로 구성되어 있다. 모델 시스템으로 HIV와 HCV에 대한 포획 및 표적 DNA를 합성하고 스트립을 제조하였다. 시료를 샘플패드에 적하한 후 교잡반응체의 생성여부와 상대적인 양은 GSI 형광 스캐너로 분석하였다. 교잡반응이 매우 빠르게 진행되고 세척과정이 없음에도 불구하고 비특이적인 교차 반응이 거의 관찰되지 않았다. 기존의 DNA 교잡방법과 비교하여 볼 때 이 새로운 방법으로 DNA/DNA 교잡 실험을 보다 더 쉽고, 간편하고, 그리고 빠르게 할 수가 있을 것으로 예상된다.

Key words □ DNA analysis, hybridization, lateral flow

유전자의 발현이나 그 기능을 분석하는 과정에서 특정한 염기 서열의 존재여부를 확인하는 간편한 분석법은 아주 중요하며 필요하다. 이러한 분석에서 현재 많이 사용되고 있는 간편한 방법 중의 하나는 DNA 또는 RNA로부터 역전사된 cDNA를 주형으로 원하는 부분을 증폭시키는 중합효소연쇄반응법(PCR법)이다(3, 8). PCR법은 분석하고자 하는 DNA 또는 cDNA의 주형으로부터 특정한 primer에 대한 상보적인 서열을 갖고 있는 특정 서열만을 선택적으로 증폭시켜준다. 증폭된 PCR 산물 내에 특정 DNA가 존재하는지를 확인하기 위하여 젤 전기영동을 이용하여 band를 확인하게 된다.

PCR법 이외에 Southern 및 Northern blotting 방법이 보다 정확하게 특정한 유전자 기능분석과 확인에 사용되고 있다(4, 8). 그 과정을 살펴보면 먼저 추출한 DNA나 RNA를 전기영동하여 분자량에 따라서 전개시킨 다음 젤 상의 DNA를 나일론 막이나 니트로셀룰로오스 막으로 옮긴다. 방사성동위원소 또는 형광물질, 효소 등과 같은 신호물질을 oligonucleotide 또는 polynucleotide에 삽입 또는 부착시킨 후 표지 탐침으로 사용하여 나일론 막이나 니트로셀룰로오스 막에 이적 고정된 DNA 또는 RNA와 교잡시킴으로써 원하는 크기의 표적 핵산이 있는지, 있으면 그 양이 얼마나 되는지를 알아낼 수 있다. 그러나 이러한 방법들은 전기영동이나 blotting 등과 같은 과정에 소요되는 시간이 많고, 교잡반응 시간이 길며, 교잡반응을 하는 동안에 온도 등과 같은 외부 조건을 엄격하게 조절하여야 한다. 더욱이 정확한 시험 결

과를 얻기 위해서는 특별히 잘 훈련된 전문가를 필요로 하는 등의 문제가 있다.

핵산이 아닌 단백질의 경우 표적단백질의 존재 유무를 확인하는 방법으로 면역분석법이 많이 사용되고 있다(2, 6). 핵산과는 달리 단백질은 상보성을 보여 주는 짝이 없으므로 표적단백질을 동물에 주사하고 얻어진 항체를 표지자로 사용하여 추적한다. 1950년대에 처음으로 개발된 이래로 면역분석법(immunoassay)은 기초 및 응용분야에서 필수적인 도구로 되었으며 현재 광범위하게 사용되고 있다. 이 면역분석법도 Southern이나 Northern blotting과 유사하게 탐침을 시료에 처리하고 세척하는 과정이 길고 아주 복잡하다. 이 세척과 탐침처리 과정을 단순화하고 빠르게 하려는 다양한 시도가 있어 왔는데 그 중에서 면역크로마토그래피법이 가장 효율적인 방법으로 사용되고 있다(1, 7). 이 방법은 니트로셀룰로오스 막 위에 표적단백질이 전개되면서 분리되는 측방 유동(lateral flow) 방식으로 기존의 ELISA 등과 같은 면역 분석 방법과 비교하면 민감도나 특이도가 떨어지는 단점이 있지만, 시험에 소요되는 시간이 적으며, 저렴한 가격과 비전문가도 쉽게 사용할 수가 있다는 장점이 있어 여러 분야에서 많이 사용되고 있다. 가장 대표적인 예가 임신진단키트이다.

항체를 이용한 면역크로마토그래피법으로 특정한 단백질의 존재 유무를 10~15 분 이내에 탐지가 가능하고 전 과정에서 세척 과정이 필요 없다는 장점을 가지고 있다. 본 연구에서는 이 측방 유동방식을 이용한 크로마토그래피법을 응용하여 DNA 분석에 활용하고자 하였다. 특정한 DNA 등을 확인하는 시험이나 기존의 복잡하고 반응 조건이 까다로운 DNA 교잡 실험에 적용하면 소요되는 시간을 줄이고 비전문가도 시험이 가능하도록 개발하고자 하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
 Tel: 033-240-1465, Fax: 033-258-6888
 E-mail: euichoi@hallym.ac.kr

Table 1. Oligonucleotides for capture and target DNA

Oligo	Sequences	bp
HIV target	Cy5-5'-AGT GGG GGG ACA TCA AGC AGC CAT GCA AAT-3'	30
HIV capture	5'-AAT AGG CCC TGC ATG --- ATG TCC CCC CAC T-3'	100
HCV target	Cy5-5'-CAC GCA GAA AGC GTC TAG CCA TGG CGT TAG-3'	30
HCV capture	5'-ACT CAC CGG TTC CGC --- AGA TTT CTG CGT G-3'	100

재료 및 방법

Oligonucleotide의 준비

사용된 각각의 HIV와 HCV에 대한 포획(capture) 및 표적(target) oligonucleotide는 주문 제작하였다(Table 1). HIV는 gag 유전자의 말단 부위를, HCV의 경우에는 5' UTR을 선택하여 각각의 sense sequence를 포획자로 anti-sense서열을 표적자로 제작하였다. 형광표지 물질로는 Molecular Probes사의 Cy5를 (Ex:650, Em:680) 사용하였다.

니트로셀룰로오스 막상의 DNA 고정화

니트로셀룰로오스 막 위에 DNA를 고정하기 위한 조건을 설정하기 위하여 포획 oligonucleotide를 최종 농도가 90 pM이 되도록 증류수에 희석하였다. 희석된 oligonucleotide를 95°C에서 5 분간 방치한 후 425 mm의 크기로 준비된 니트로셀룰로오스 막 위에 1 µl씩 분주 하였다. 첫번째로 분주된 막을 42°C에서 1 시간 동안 건조한 후에 바로 제습 장치에서 보관하였다. 두번째는 oligonucleotide가 분주된 막을 42°C에서 1 시간 동안 건조 후에 UV를 1200 J로 30 초 동안 조사한 다음 제습 장치에서 보관하였다. 세번째는 니트로셀룰로오스 막 위에 포획용 oligonucleotide를 분주한 다음 42°C에서 건조과정 없이 바로 UV cross linker로 1200 J에서 30 초 동안 조사하였다. UV 처리 후 42°C에서 1 시간 동안 건조 후에 사용하기 전까지 상온에서 보관하였다.

샘플패드의 전처리

니트로셀룰로오스 막을 통한 용액 성분들의 이동을 용이하게 하며, 또한 반응의 민감도를 유지하고 표적 DNA와 포획 DNA, 니트로셀룰로오스 막과의 비특이반응을 최소화하기 위하여 샘플패드를 전처리하였다(5). 샘플패드(2.5×30 cm)를 전처리 용액(PBS, 10 mM phosphate, 150 mM NaCl, 1% BSA, 0.05% Tween 20, 0.05% NaN₃, pH 7.4)에 충분히 적셔 10 분간 평형화시켰다. 이어 샘플패드의 과도한 용액을 제거하고 열에 의한 샘플패드의 변형을 막기 위해 50~60°C의 온도에서 진공 건조하였다. 준비된 패드는 위의 포획 oligonucleotide가 고정된 막과 동일한 조건의 보관용기에서 사용 전까지 보관하였다.

결과 및 고찰

측방유동 교잡 반응의 원리

본 연구에서 사용한 측방유동분석 타입의 키트구조를 살펴보

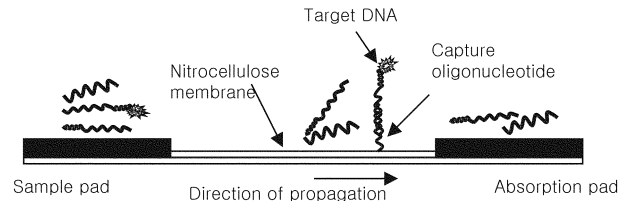


Fig. 1. A schematic diagram of lateral-flow DNA hybridization strip. The strip is composed of a sample pad, a nitrocellulose-based detection zone, and an absorption pad for the generation of capillary action. After a sample is applied into the sample pad, the target DNA in the sample is separated during propagation and captured on the NC-based detection zone.

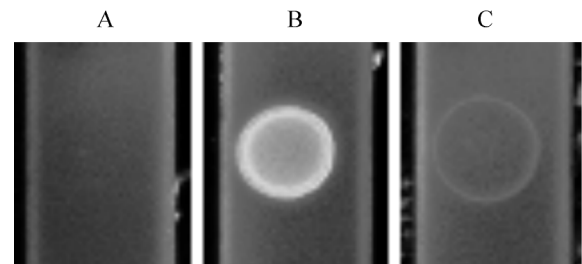


Fig. 2. Comparison among the immobilization conditions for capture DNA on the detection zone of a nitrocellulose membrane. (A) no UV exposure (B) UV exposure after drying 42°C for 1 h. (C) UV exposure without drying. Treatment of DNA with both UV exposure and heat treatment showed the maximum immobilization efficiency.

면 시료가 적용되는 샘플패드(sample pad), 시료가 이동하여 분리되고 항체 항원 반응이 일어나는 전개용 막(니트로셀룰로오스), 그리고 시료가 계속하여 이동하기 위한 흡수패드(absorption pad)로 되어 있다(Fig. 1). 시료 속에 형광으로 표지된 분석물은 샘플 패드에 적용되어 이동하여 전개막에 고정되어 있는 포획 DNA와 교잡 반응을 하여 이중 나선의 DNA 복합체를 만든다. 포획 DNA는 전개막에 고정되어 있기 때문에 교잡반응이 계속하여 일어나면 복합체의 축적이 포획 DNA의 고정면에서 이루어진다. DNA는 육안으로는 투명하기 때문에 복합체의 생성 여부와 복합체의 상대적인 양을 부착된 형광의 양을 GSI 형광 스캐너를 사용하여 판단하였다.

DNA 고정 방법 설정

DNA를 니트로셀룰로오스 막 위에 고정하는 방법으로는 고온에서 고착시키는 방법과 UV를 조사하여 고정화 하는 방법이 주로 사용되고 있다. 니트로셀룰로오스 막을 고온 처리를 하면 쉽

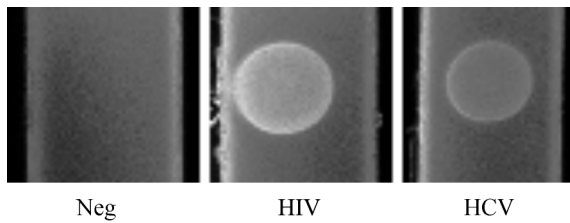


Fig. 3. Lateral flow DNA hybridization of HIV and HCV DNA. Samples containing target DNAs were applied into the strips and incubated for 15 min for the separation and formation of a complex between the complementary sequences. Unlike the Southern hybridization, the overall process is completed in just 20 min. Neg: negative control.

게 부서지기 때문에 전개막으로 사용하기에는 적합하지 않다. 따라서 분주 한 후에 UV를 사용하여 고정화 하였다. 고정화 정도를 쉽게 알아 보기 위하여 형광이 부착된 표적 DNA를 여러 조건에서 분주하여 고정 방법을 비교하여 보았다. 예측한 대로 건조에 의한 흡착법 만으로 DNA를 고정 하였을 때 DNA를 분주한 위치에서 형광을 거의 탐지할 수 없었다(Fig. 2). 두 번째로 DNA를 니트로셀룰로오스 막에 분주한 후에 UV를 사용하여 고정한 경우에는 DNA가 분주된 위치에서 강한 형광을 관찰할 수 있었다. 건조 조건을 비교하여 보았는데 분주 후 건조 없이 UV에 조사시킨 경우보다 42°C에서 1 시간 동안 건조시킨 상태에서 UV를 조사하는 경우에서 형광의 세기가 더욱 강하게 관찰 되었다.

측방 유동 DNA 교잡 반응

니트로셀룰로오스 막 위에서 교잡 반응을 진행하기 위하여 HIV와 HCV 표적 DNA를 1/2,000의 비율로 1xSSC로 희석하고 100 µl를 샘플패드에 적하한 후 15 분 동안 반응시켰다. 전개가 완료된 스트립은 GSI scanner를 사용하여 이미지를 스캐닝하였다(Fig. 3). 표적 DNA를 포함하지 않은 시료를 적용한 스트립은 원형의 형광 무늬가 전혀 관찰되지 않은 반면 표적 DNA가 적하된 스트립은 HIV와 HCV 모두 강한 형광 신호를 보여주었다. 교잡용액의 성분에 따른 교잡반응의 차이를 비교하기 위하여 2xSSC, 3xSSC 용액과 PBS를 표적 DNA의 적용 완충용액으로 사용하였다. 표적 DNA를 준비된 스트립에 적하 후에 scanner를 사용하여 형광의 세기를 측정한 결과 각각의 희석 용액의 조건에 따라서 형광의 세기가 크게 다르지 않은 것이 관찰 되었다. 다만 SSC용액과 PBS용액을 비교하였을 때에는 SSC 용액을 사용하였을 때 형광의 세기가 조금 강하였다.

HIV와 HCV 간의 교차 교잡 반응

교차반응 정도를 알아 보기 위하여 HIV 포획 DNA가 고정되어 있는 스트립에 HCV 표적 DNA를 적하하였다. 그와 반대로 HIV 표적 DNA는 HCV 포획 DNA가 고정 되어있는 스트립에 적하하여 측방유동 방식에 의한 니트로셀룰로오스 막에서의 DNA/DNA 간의 교잡반응이 DNA 간의 상보적인 결합과는 상관

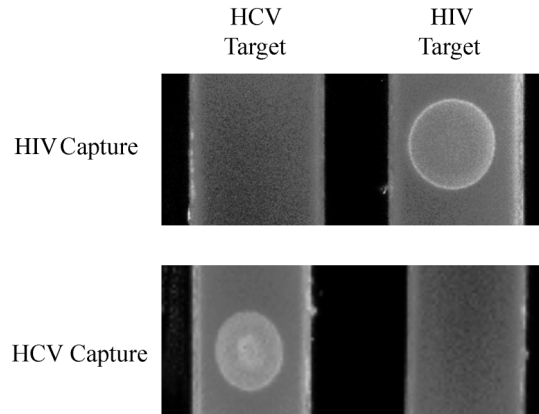


Fig. 4. Cross hybridization test. Little cross hybridization between the HIV and HCV DNA has been observed.

없이 비특이 반응에 의하여 발생하는 교잡반응인지 여부를 알아 보았다. 반응 후 스캐너 레이저의 효율과 PMT(photomultiplier)의 gain 값을 조절해 가면서 관찰하여 보았으나 분주된 위치에서 형광을 전혀 관찰할 수 없었다. 이는 포획 oligonucleotide의 순서와 표적 probe의 염기 순서가 서로 상보적이지 않은 DNA인 경우에는 측방유동에 의한 순간적인 교잡반응과 세척과정이 전혀 없는 조건에서도 교차 반응이 거의 일어나지 않는 것으로 판단 된다(Fig. 4).

니트로셀룰로오스 막 위에 고정하기 위해서는 UV 조사가 이상적인 방법으로 확인되었으며, 니트로셀룰로오스 막에 분주된 포획 oligonucleotide 용액이 건조되지 않은 상태 보다는 완전히 건조된 상태에서 UV를 조사시키는 것이 고정에 좋다는 것을 알 수 있었다. 또한 순간적인 교잡반응이 일어나며 세척과정이 없음에도 불구하고 비특이적인 교차 반응이 거의 관찰되지 않았다. 방법이 복잡하고 반응 조건이 까다로운 기존의 DNA 교잡방법과 비교하여 볼 때 이 새로운 DNA 교잡 방법으로 DNA/DNA 교잡 실험을 보다 더 쉽고 빠르게 할 수가 있을 것으로 판단된다. 또한 형광 물질을 사용하는 시스템을 이용함으로써 종래에 정성 시험의 한계에서 벗어나 정량적으로 분석 할 수 있을 것이다.

감사의 말

본 연구는 과학기술부의 국가 지정 연구실 사업에(M1-0104-00-0164) 의하여 수행됨을 감사드립니다.

참고문헌

1. Harvey, M.A., C.A. Audette, and R. McDonogh. 1996. The use of microporous polymer membranes in immunoassays. *IVD Technol.* 2, 34-40.
2. Ishikawa, E and T. Kohno. 1989. Development and applications of sensitive enzyme immunoassay for antibodies: a review. *J. Clin. Lab. Anal.* 3, 252-65.
3. Landegren, U. 1993. Molecular mechanics of nucleic acid

- sequence amplification [Review]. *Trends Genet.* 9, 199-204.
4. Lupski, J.R. 1996. DNA diagnosis for Charcot-Marie-Tooth disease and related inherited neuropathies. *Clin. Chem.* 42, 995-998.
5. Millipore Co. 1996. *A Short Guide: Developing Immunochromatographic Test Strips*.
6. Oellerich, M. 1984. Enzyme-immunoassay. *Clin. Chem. Clin. Biochem.* 22, 895-904.
7. Oku, Y., K. Kamiya, H. Kamiya, Y. Shibahara, T. Ii, and Y. Uesaka. 2001. Development of oligonucleotide lateral-flow immunoassay for multi-parameter detection. *J. Imm. Methods* 258, 73-84.
8. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

(Received March 21, 2003/Accepted May 7, 2003)

ABSTRACT : Development of a Method for Rapid Analysis of DNA Hybridization

Dong Serk Chung¹ and Eui Yul Choi^{1,2*} (¹Central Research Institute of Boditech, ²Dept Genetic Engineering, Hallym University, Chuncheon 200-702, Korea)

In molecular biology, it is necessary to develop an easy and rapid method to identify a specific DNA sequence. Though Southern and Northern blot techniques have been used widely for the analysis of gene structure and function, those methods are inconvenient in the points that we need to control incubation temperature, time, and other parameters to get the final result. In this study, we report a new method for the rapid analysis of specific DNA sequence with the modification of an immunochromatographic method. The lateral flow DNA analysis strip is composed of a sample pad, a nitrocellulose membrane for the separation and propagation of analytes, and an absorption pad for the generation of capillary action. Capture DNA was immobilized on the membrane by UV cross-linking and target DNA was labeled with Cy-5 for signaling. The samples containing target DNA were applied onto the sample pad, incubated for 15 min for separation, and scanned with a GSI fluorescence scanner. Though the hybridization reaction occurs in a short time without any washing steps, there appears to be little cross hybridization between the different sequences. The result showed a possibility that the new method can be used for the rapid identification of specific DNA sequence among the samples.