

## 평형 상수를 이용한 DNA chip에서의 반응시간 계산

박수영, 박선아, 유영수, 박연규, 이효성, 제갈성준, 문일<sup>†</sup>  
연세대학교 화공생명공학부

### Reaction time calculation using equilibrium constant on DNA chip

Soo-young Park, Sun-ah Park, Young-Su Ryu, Yon-kyu Park, Hyu-sung Lee,  
Sungjoon Chegal and Il Moon<sup>†</sup>  
School of Chemical Engineering and biotechnology, Yonsei University

#### 서론

DNA chip은 probe와 target DNA의 hybridization으로 인해 생기는 signal을 분석하여 염기서열 분석이나 유전병의 발견 등과 같은 여러 유전적 연구의 목적으로 쓰이고 있다. 그러나 이러한 chip에 관한 열역학적 변수에 관한 연구는 많이 진행되고 있지만 실제적으로 chip상에서의 운동론이나 반응 시간에 관한 연구는 부족하다. 운동론에 관한 연구로 반응시간을 보다 정확히 알 수 있다면 불필요한 시간낭비나 발현에 필요한 시간만큼 실험을 하지 못하는 일은 피할 수 있을 것이다.

#### 1. 반응속도에 관한 개관

DNA chip은 고체 표면에 고정되어 있는 probe에 우리가 알고자 하는 sample DNA를 뿌려주면 두 DNA의 상보성에 의하여 서로 가까워지며 결합하게 된다. 따라서 DNA probe와 target DNA의 반응을 설명할 때에는 두 가지 속도가 필요하다[8]. 먼저 고정된 probe로 target DNA가 접근하는 흡착에 의한 확산 속도와 충돌 후 hybridization을 일으키는 속도이다. 특히 여기에서는 hybridization 속도만을 논하는데 hybridization 반응 속도는 실험을 통하여 차수와 속도 상수를 구해낸다. Probe와 target DNA가 association 될 때의 반응차수는 en DNA의 농도에 의존하므로 2차 반응이다[2, 4, 7]. 그러나 2차 반응의 반감기는 직접적으로 구해낼 수 없기 때문에 이것을 1차 반응으로 바꾸어서 반감기를 구해낸다[7]. 반응속도에 영향을 미치는 요인으로는 probe의 길이, 용액의 점도, 온도, ionic strength, base의 조합, pH 등이 있지만[5] 길이와 온도를 제외하고는 여기서는 고려하지 않는다. 또한 열역학적 변수와는 달리 운동론은 용액 상이나 고체 표면, DNA chip에 관계없이 유사하므로 그것을 언급하지는 않는다[5].

#### 2. Calculation

##### 1) Non-complementary sequence 경우

Probe와 target DNA가 association 될 때의 반응식을 써 보면 다음과 같은 2차 반응이다.



$$v = k_a [A][B] \quad (2)$$

association 될 때의 반응속도 상수를  $k_a$ , dissociation 될 때의 반응속도 상수를  $k_d$ 라고 하면 평형상수는

$$K = \frac{k_a}{k_d} \quad (3)$$

로 표현된다. Van't Hoff equation으로  $\Delta G^\circ$  와 평형상수 K와의 관계를 구할 수 있다.

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln K \quad (4)$$

평형상태이므로  $\Delta G = 0$ 로 두고 최종적으로

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (5)$$

이용한다.  $\Delta G^\circ$  는 Nearest Neighbor model을 이용하여 계산한다[6]. 여기에서 구해진 평형상수 K 값과 실험으로 구해진 association반응속도 상수  $k_a$ 를 이용하여 dissociation될 때의 반응속도 상수  $k_d$ 를 구한다. Dissociation은 hybridization되어 있는 것을 해리하는 반응이므로 결합되어 있는 AB의 농도에 의존한다. 따라서 1차 반응이라고 생각하고 반감기를 구한다[7].

$$v = k_d [A] \quad (6)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} \quad (7)$$

sequence	$\Delta G^\circ$ <sup>c</sup> (kcal/mol)	$k_a$ (M <sup>-1</sup> S <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (S)	오 차
CAAAAAG <sup>a</sup>	-8.0225	8.3*10 <sup>6</sup>	0.064	11.1%
TTCTTTCTTTTC <sup>b</sup>	-11.9	4.4*10 <sup>6</sup>	83.5	2.5%
a ref. 3(1.0M NaCl, 25°C, pH 7)		b ref. 7(1.0M NaCl, 25°C, pH 7)		c ref. 6

Table 1. Non-complementary sequence

## 2)complementary sequence

Complementary sequence의 경우에는 한가지 종류의 DNA로 반응하는 것이므로 반응에 참여하는 DNA의 농도는 하나이다. 2차 반응이므로 이 경우의 반응속도와 반감기는 다음과 같다.

$$v = k_a [A]^2 \quad (8)$$

$$t_{1/2} = \frac{1}{k_a [A]_0} \quad (9)$$

이 경우는 반감기가 DNA의 초기농도  $[A]_0$ 에 의존한다.  $k_a$ 는 또한 실험으로 구한다.

## 결과 및 토론

지금까지 Probe와 target DNA가 hybridization 될 때 반응에 소요되는 시간에 대해 계산해 보았다. 전체적으로 Hybridization 반응 차수는 2차라고 간주한다. 특별히 complementary sequence일 경우에는 probe와 target간에 결합하는 것 이외에 스스로 붙어서 hairpin과 같은 모양을 만들므로 일반적인 경우와 다르다. 일반적으로 반응시간은 dissociation 이 1차 반응이 된다고 생각하여 역으로 해리되는 시간을 구하였다[7](6)(7). 이 때 Association시간과 Dissociation시간은 유사하다고 가정한다.

Table 1에서 알 수 있듯이 probe의 길이는 반응시간에 영향을 준다. 길이가 길어질수록 각각의 염기가 결합하는데에 시간이 걸리므로 반응시간은 길어지게 된다. 이것을 나타내어 주는 식[5]은 다음과 같다.

$$k_a = k'_N L^{0.5} N^{-1} \quad (10)$$

$k'_N$ 은 온도, 점도, 이온 세기, pH를 포함하는 식이고 L은 probe의 길이, N은 반복되지 않은 염기의 수를 의미한다. 그러나 이 부분에 대해서 정확한 설명을 위해서는 더 많은 연구가 필요하다고 생각한다.

Figure 1에서는 Association과 Dissociation의 활성화 에너지를 나타낸다[1]. 이 그래프에서는 다음의 Arrhenius Equation을 이용하여 속도상수의 온도 의존성과 활성화 에너지의 대략적인 크기를 볼 수 있다.

$$\ln k_a = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (11)$$

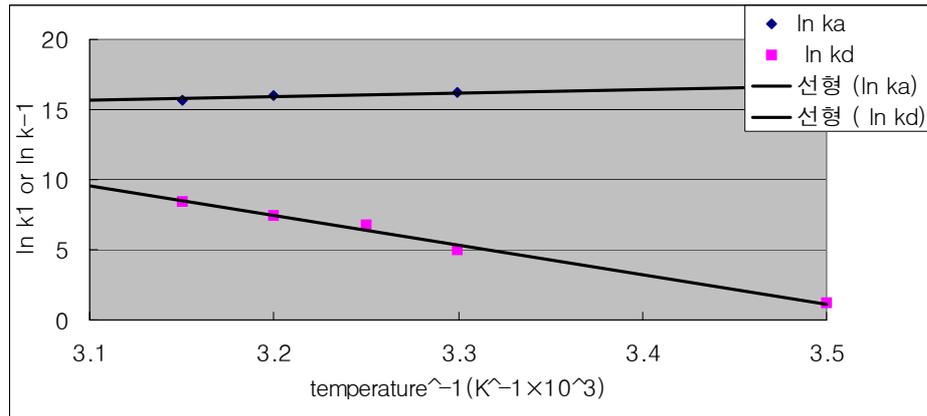


Figure 1. Arrhenius Equation을 이용한 반응 온도와 반응 차수와의 관계

y축 절편은 Arrhenius 상수를 의미하고 기울기는 활성화 에너지를 포함하고 있다. Association의 경우에는  $E_a$ 가 음의 값을 가지고 크기는 크지 않다. Dissociation은  $E_a$ 가 양의 값을 가지며 큰 절대값을 가진다. 해리되는 것은 결합하는 것보다 더 큰 에너지를 필요로 한다는 것을 의미한다. 또한 결합곡선을 보면 기울기가 작아 Association의 속도 상수가 온도에 대해 크게 변하지 않는다는 것을 뜻한다. 반면에 Dissociation의 속도 상수는 온도에 대해 크게 변한다. 이것은 Table 2.에서도 나타난다.

sequence	$E_a$ (kcal/mol)	$E_d$ (kcal/mol)
CAAAAAG <sup>a</sup>	-0.5	43
GCGCGC <sup>a</sup>	1	40.5
ATGCAT <sup>a</sup>	-1	38
GCATGC <sup>b</sup>	-5	40
a ref, 5		b ref, 1
(1.0M NaCl)		

Table 2. 각 서열에 대한 Association과 Dissociation의 활성화 에너지 비교

Ed는 모두 양의 값을 가지고 있다는 사실에서 보듯이 온도가 증가하면 반응속도도 역시 증가한다. 그러나 Ea값은 대체로 음의 값을 가지는데 이것은 온도가 증가하면 반응속도는 감소함을 의미한다. 즉, 온도가 증가하면 쉽게 해리되고 hybridization 되기는 힘들다는 것을 여기서 설명할 수 있다.

대체적으로 hybridization의 속도 상수에 대한 문헌값은  $0.3 \sim 12 \times 10^6 \text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ [7]을 나타내고  $12^\circ\text{C}$ 에서 8 ~ 9mer에 대한  $\Delta G^\circ$  값은  $-12.0475 \sim -7.605 \text{kcal/mol}$ 이므로[9] 반감기는 대체로 0.039s ~ 1h가 된다. 따라서 DNA chip에서 반응하는 시간은 위와 같이 생각해도 무방하다. Immunoassay같은 경우는 반응이 적은 비율로 일어나더라도 연구가 가능하지만 다른 목적으로 DNA chip을 사용하는 경우에는 충분히 반응 시간을 주어야 하므로 이 분야에 대해서는 더 많은 연구가 필요하다 하겠다.

### 참고문헌

1. Alison P. Williams, et al. Turner Laser Temperature-Jump, Spectroscopic, and Thermodynamic Study of Salt Effect on Duplex Formation by dGCATGC, *Biochemistry* **28**, 4283-4291, (1989)
2. Brett A. Stillman, et al. Expression Microarray Hybridization Kinetics Depend on Length of the Immobilized DNA but Are Independent of Immobilization Substrate, *Analytical Biochemistry* **295**, 149-157, (2001)
3. Jeffrey W. Nelson, et al. Comparison of the Kinetics of Ribooligonucleotide, Deoxyribloigonucleotide, and Hybrid Oligonucleotide Double-Strand Formation by Temperature-Jump Kinetics, *Biochemistry* **21**, 5289-5295, (1982)
4. Makoto Tsuruoka, et al. Optimization of the rate of DNA hybridization and rapid detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* DNA using Fluorescence polarization, *Journal of Biotechnology* **48**, 201-208, (1996)
5. Meinkoth. J, et al. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Analytical Biochemistry* **138**, 267-284, (1984)
6. SantaLucia, et al. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **95**, 1460-1465, (1998)
7. Shaohui Wang, et al. Origins of High Sequence Selectivity : A Stopped-Flow Kinetics Study of DNA/RNA Hybridization by Duplex- and Triplex-Forming Oligonucleotides, *Biochemistry* **34**, 9774-9784, (1995)
8. Vincent Chan, et al. The Biophysics of DNA Hybridization with Immobilized Oligonucleotide Probes, *Biophysical Journal* **69**, 2243-2255, (1995)
9. Zaklina Strezoska, et al. DNA sequencing by hybridization : 100 bases read by a non-gel-based method, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10089-10093, (1991)