진단 및 검출을 위한 비색 PCR 기반 기술 개발 동향

The technique of colorimetric PCR for diagnostic and detection

문효영[1]

Hyoyoung Mun[1]

압티지엠제이 주식회사, 광주광역시 북구 첨단과기로 333, 생활로봇지원센터 205호

Apteasy MJ inc. 205, Robot center, Gwangju technopark, 333 Cheum-dan gwagi-ro, Buk-gu, Gwangju, Republic of korea

서론

Covid19 시대를 일상으로 살고 있는 현 사람에게는 과거에 비해 분자진단이라는 단어가 그다지 어렵지 않은 시기임은 확실하다. 분자진단에는 다양한 방법의 접근이 가능하고 분자진단에 해당하는 기술은 PCR, CRISP/CAS9, Microarray 등 다양한 기술로 세분화할 수 있다. 이 중 가장 핵심이며 보편화되어 있는 기술은 PCR(Polymerase chain reaction)이다.

PCR 기술은 1984년 개발된 이래 DNA, RNA를 이용하여 검출하는 기술에 일반적으로 사용되어지고 있다. 주요 단계로는 변성 (Denaturation), 결합 (Annealing), 신장 (Elongation)의 과정으로 나눠져 있으며 각각의 과정은 다른 온도에서 반응을 진행한다. 그리고, 일반적으로 Cycle 수에 따라 증폭량이 결정되어 진다.

또한, PCR은 발전을 거듭하여 온도의 변이 과정을 가지지 않는 등온 PCR(Isotheraml PCR)도 개발되어 사용되어지고 있다. 등온 PCR은 표현대로 온도를 바꾸지 않고 특정한, 일정한 온도에서 반응을 수행하는 PCR 기법이다. 주요한 특징으로는 DNA, RNA의 변성을 위하여 다양한 효소들이 이용되거나 기존의 변성 온도가 아닌 낮은 온도에서 DNA, RNA가 풀리는 특성을 이용하여 자기 스스로 변성되는 특성을 이용한 형태 등 다양한 형태의 등온 PCR이 개발되었다.

이러한 다양한 증폭 방법을 이용하여 Covid19에 대한 진단이 이루어지고 있다. 하지만, 단순히 새로운 효소의 개발, 새로운 증폭 방법의 개발로만 질병의 진단이 이루어지진 않을 것이다.

분자 진단에는 크게 3가지 과정이 있다. 1) 시료채취 및 전처리, 2) 시료의 증폭, 3) 증폭 산물의 확인이다. PCR은 이중 시료의 증폭에 해당한다. 나머지 시료 채취 및 전처리 기술, 증폭 산물을 확인하는 검출 결과 확인 기술 등 역시 없어서는 안되는 필수 기술들이다.

본 논단에서는 PCR 증폭 기술에 포함된 혹은 PCR 증폭

* Corresponding author : Hyoyoung Mun
Apteasy MJ inc. 205, Robot center, Gwangju technopark, 333 Cheum-dan gwagi-ro, Buk-gu, Gwangju, Republic of korea
Tel: +82-62-971-5273 Fax: +8262-971-5274 E-mail:lok103@hanmail.net

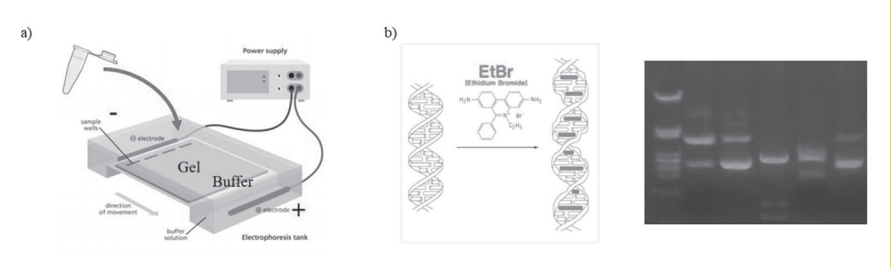

그림 1. a) 전기영동 방법의 원리, b) Intercalating dye의 구동 원리 및 실제 결과[1]

기술과는 별개로 검출을 할 수 있게끔 개발되어진 기술들에 대해서 소개하고자 한다.

2. 일반적인 PCR 기술의 검출 결과 확인 기술

1) Traditional PCR 기반 검출 결과 확인 기술

전통적인 PCR을 이용한 진단, 검출 방법은 앞서 말한 분자진단 3가지 과정 중 2번째인 시료의 증폭만 수행한다. 시료의 채취 및 전처리는 증폭을 진행하기 전에 별도의 과정을 통해서 진행하고 본 논단에서 다루게 되는 검출 기술 및 검출 결과의 확인도 별도의 시스템을 통해서 확인을 진행한다.

전통적인 PCR을 수행한 후 검출 결과를 확인하는 가장 일반적이고 보편적인 방법은 전기영동(Electrophoresis)이다. 전기영동의 기본적인 원리는 그림 1, a)에서 처럼 DNA, RNA가 각각의 화학적 특성을 기반으로 하여 (−)에 해당하는 전기적 성질을 가지고 있다는 점과 길이에 따라 일정 부피를 가지고 있다는 점이다. 또한, 전기영동을 하기 위해서는 젤(Gel)이 필수로 사용이 되는데 그림 1-b)에서 처럼 이 젤(Gel)은 다공성 구멍(Pore)를 가진 형태이며 Gel을 제조하기 위해 사용한 물질의 농도에 따라 해당 다공성 구멍의 크기는 조절이 가능하다. 대표적으로 많이 사용하는 젤(Gel)은 아가로스젤(Agarose), 폴리아마이드젤(Polyamide gel)이다. 또한, 이렇게 구분되어진 결과물은 증폭된 DNA의 이중나선과 반응하는 intercalating dye라는 물질에 의해 확인이 가능하며 초기 intercalating 물질의 대부분은 형광물질이었다[1].

해당 intercalating dye Et-Br, SYBR green, SYBR gold, SYBER safe, Eva green[2] 등 다양한 종류와 형태의 물질들이 존재하고 있다. 다만, Et-Br의 경우에는 정소암을 유발시킬 수 있는 인자로 인해 현재는 사용률이 줄어 든 상태이다[2,8].

위 방법을 통한 유전자 증폭 및 확인은 PCR이 개발된 이후 현재까지 연구 개발 용도로 가장 많이 사용되는 방법 중 하나이다. 하지만, PCR 후 전기영동을 하기 위해서 gel을 제작해야하고 전기영동을 진행한 후 staining 및 검출 장비를 이용한 이미지 확인 등의 번거러움이 있다.

2) Real-time PCR

Real-time PCR 방법은 유전자 증폭을 진행하는 3가지 단계 내에 기기의 도움을 받아 측정 단계를 추가하여 실시간으로 유전자의 증폭 유무를 측정하는 방법이다. 현재 covid 19의 검사 결과의 대다수는 real-time PCR에 의해 수행되어지고 있다.

Real-time PCR에서 핵심은 DNA와 결합하면 형광을 띄는 형광 염료(fluorescent dye)와 DNA의 증폭량이다. 앞서 말한 것처럼 대다수의 유전자 증폭은 변성(Denaturation), 결합(Annealing), 신장(Elongation)으로 나눠져 있는데 real-time PCR은 세 과정 내에 측정 혹은 검출(Detection) 과정이 존재하며 증폭된 DNA와 형광 intercalating dye의 결합으로 인한 발생되는 형광을 cycle 단위로 측정하여 결과를 보여줌으로서 PCR의 결과를 보다 빠른 시간 내에 확인 할 수 있게 한다.

실시간 측정으로 결과를 신속하게 확인한다는 점 외에도 real-time PCR을 사용하는 경우 검출하고자 하는 검출물의 양을 상대적으로 확인할 수 있다. 양을 알고 있는 표준시료를 이용하여 같이 증폭 반응을 진행하는 경우 검출되는 검출 신호에 기반하여 표준 시료 대비 얼마만큼의 양으로 검출하고자 하는 시료가 검체 시료 내 존재함을 확

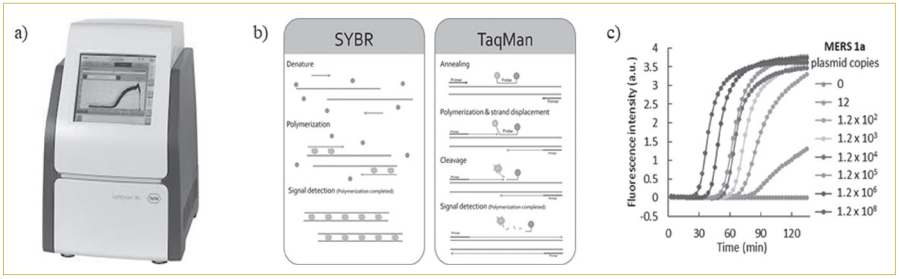

그림 2. a) Real-time PCR 장치 (LighCycler @96, Roche), b) Real-time PCR 형광 검출 원리 (형광 dye vs. TaqMan probe), c) 실제 real-time PCR 검출 결과

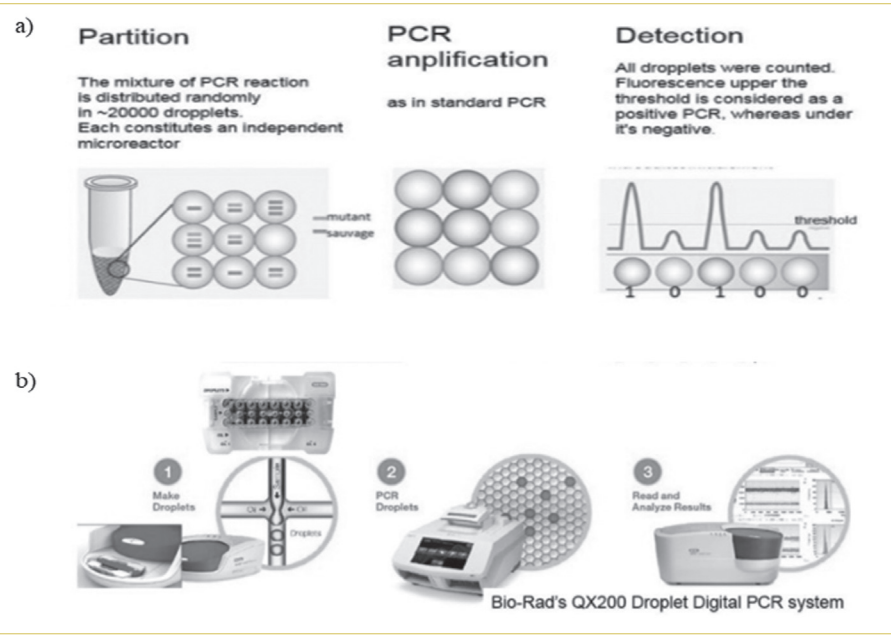

그림 3. a) 디지털 PCR work-flow, b) Biorad사의 디지털 PCR 시스템 (기름방울생성기, PCR 증폭기, 검출기)

인할 수 있다(그림 2).

편리성 및 다양한 활용성으로 인해 상당수 진단 및 검출 기술에서는 real-time PCR이 표준화 되었지만, 고가의 real-time PCR, 위양성 및 비특이적 증폭이 발생되는 경우에 보정이 어려움, 현장화의 어려움 등 단점이 있으며 이를 보완하기 위해서 TaqMan probe 등 다양한 방법의 응용법이 개발되어져 있다.

3) ddPCR (Droplet Digital PCR)

ddPCR은 흔히 디지털 PCR로 명명하는 방법으로 특정 장비를 이용하여 기름 방울 내에는 한 개의 유전자만 들어가게 만든 후 PCR을 수행한 후 각각의 방울 내에 형광 신호를 증폭함으로서 검출하고자 하는 유전자가 몇 개 존재하였는지 확인할 수 있게하는 기술이다(그림 3).

ddPCR도 검출은 real-time PCR과 동일하며 형광 염료 및 DNA 증폭으로 생긴 형광 신호를 검출기가 하나하나 확인하여 검출 진행했던 시료 내에 정확하게 몇 개의 검출하고자 하는 유전자가 있는지 확인하는 방법으로 Hetero-type의 유전형, 복합 시료 내에 검출하고자 하는 유전자의 절대량 등을 확인하는데 사용되어 진다.

4) 비색 PCR (Colometric PCR)

비색 PCR은 말 그대로 유전자 증폭 결과가 눈에 보이는 색변화로 확인되는 기술을 총칭하여 말하고 있다. 예를 들어 리트머스 시험지와 동일하다고 할 수 있다 유전자가 증폭되면 증폭된 유전자와 결합 혹은 반응하여 해당 물질의 색이 변화되어 검출 결과를 확인할 수 있는 방법이다.

해당 방법이 개발되게 된 배경은 현재까지의 유전자진단은 실험실이 잘 갖춰져 있는 In-house 검사라면 앞으로는 유전자진단도 임신진단키트와 같이 현장에서 진행할 수 있는 On-site 진단으로 바뀔 것이라는 점이다. 현장에서 검사하기 위해서는 앞서 확인한 유전자 증폭 장비, 검출 장비의 경량화 혹은 사용하지 않아도 되는 대체 기술의 개발일 것이다.

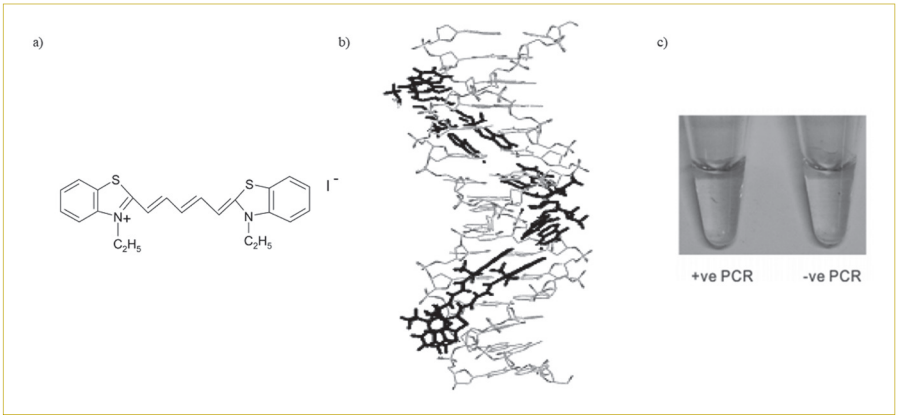

그림 4. a) $DiSC_2(5)$ 화학구조식, b) $DiSC_2(5)$와 DNA 이중나선에 결합 모식도, c) $DiSC_2(5)$ 비색 검출 예시

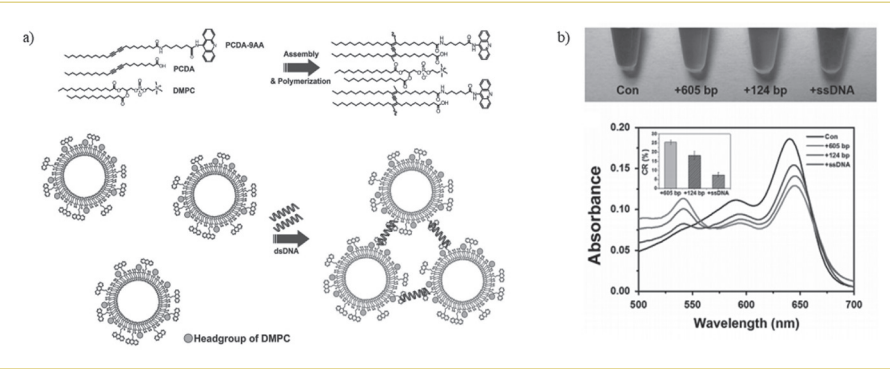

그림 5. a) PDA를 이용한 DNA 측정 기술 모식도, b) PDA를 이용한 DNA 측정 결과

유전자를 검출하기 위해서는 유전자 증폭장비를 사용하지 않고서는 유전자를 증폭하기 어려지만, 검출 시스템은 일정한 변형을 가함으로서 사용하지 않게 할 수 있다. 이러한 방식을 총칭하여 비색 PCR로 명명하고 있다.

이러한 비색 PCR은 Chemical reagent, Metal nanoparticle, DNAzyme 기반의 효소반응 등 다양한 방법을 이용하여 활용되고 있다.

가. Chemical reagent based

가장 많이 사용되는 화학 화합물에 의한 비색 PCR 반응은 2가지 방향으로 구분 할 수 있다. 첫째는 화학화합물이 직접적으로 DNA와 결합함으로서 색변화가 발생되는 기술, 두 번째로는 PCR이 진행되면서 발생된 부산물 (PPi, pH change 등)와 결합하여 색변화를 일으키는 기술이다.

1-1) Direct intercalating reagent

Intercalatin dye를 이용하는 방법은 가장 먼저 개발된 방법으로 그림4의 대표적인 물질로는 3,3'-Diethylthiadicarbocyanine, iodide로 $DiSC_2(5)$로 명명되는 물질이다.

위 그림처럼 DNA에 $DiSC_2(5)$가 결합하면 색변화를 통해서 색변화를 통해 이중 나선 구조의 DNA의 형성 유무를 가지고 결과를 확인할 수 있다(그림 4). 이러한 형태의 Dye로는 $DiSC_2(5)$의 파생형인 $DiSC_2(3)$, $DiSC_2(7)$ 등의 물질이 있다[7].

이 외에도 특정 구조를 이루고 있고 해당 구조가 변형이 생기면 색변화를 유도하는 Polydiacetylene(PDA)의 말단에 DNA와 결합 할 수 있는 intercalating dye를 같이 결합시킨 후 이중 나선 DNA와 결합하는 경우 PDA의 구조가 변형이 생기고 이로 인해 색변화가 발생되는 특성을 이용한 직접적 비색 반응이 개발되어져 있다[6](그림 5).

1-2) Indirect reagent

DNA에 직접결합하지 않고 증폭 과정 중에 발생되는 전자 혹은 생성 물질을 기반으로 측정하는 방법이다. 대표적인 방법으로는 pH의 변화, PPi와 결합 등의 방법으로 구분할 수 있다.

대표적인 물질로는 Phenol red, Natural red와 같이 pH 변화에 반응 하는 물질(그림 6, c),d))과 Calcein과 같

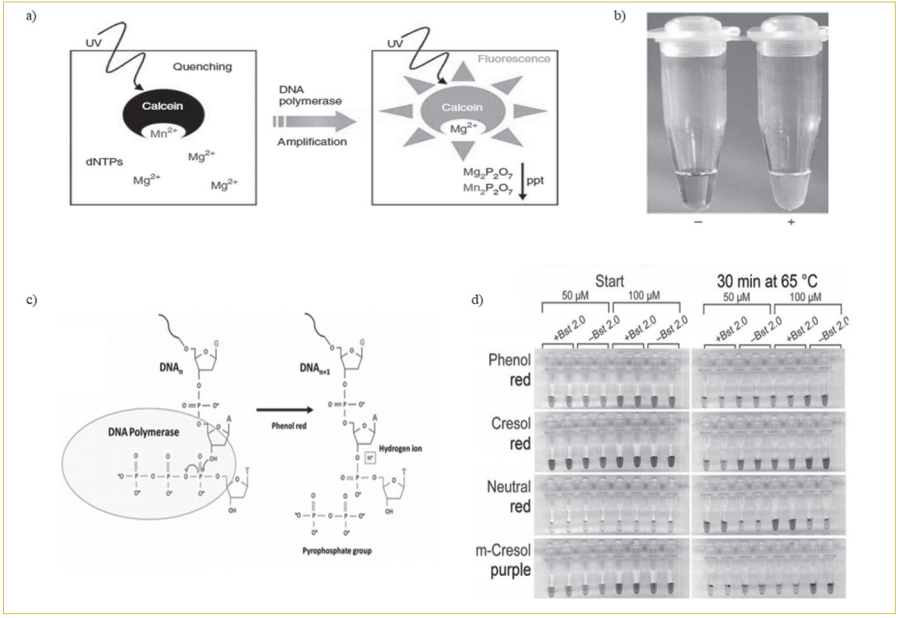

그림 6. a) Calcein의 비색 반응 원리, b) Calcein 비색 반응 결과, c) DNA가 증폭됨에 따라 발생되는 pH 비색 반응 원리, d) pH 변화에 따른 비색 시약 반응 결과

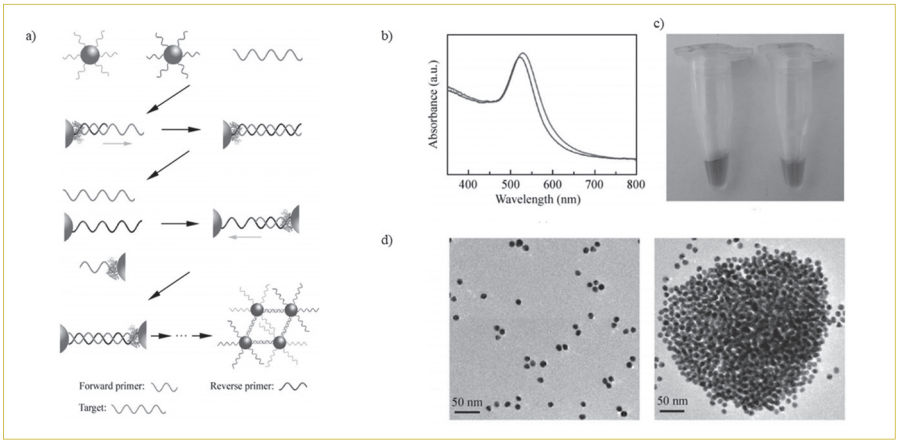

그림 7. a) 금나노입자표면의 Primer 개질을 통한 비색 측정 PCR 기술 모식도, b) 금나노입자표면의 Primer 개질을 통한 비색 측정 PCR 결과 흡광도 측정, c) 금나노입자표면의 Primer 개질을 통한 비색 측정 PCR 검출 결과, d) 비색 측정 PCR 후 금나노입자의 엉김현상 확인 결과

이 DNA의 원료 물질은 dNTP가 신장(Elongation) 단계에서 소모되면서 발생되는 PPi와 Mn이 떨어지고 Mg가 결합하여 발색 혹은 탁도가 발생되는 Calcein 같은 부산물과 결합하는 방식으로 나눌 수 있다[9,10,11,12,13,14,15,17] (그림 6 , a), b)).

나) Metal nano-particle based

금속 나노입자를 기반으로 하는 비색 PCR 기법은 대체적으로는 금나노입자를 사용하고 있다. 금 나노입자는 입자가 엉겨져 있지 않는 경우에는 붉은 색을 엉겨 있는 경우에는 보라색을 띄는 특성을 활용하여 다양한 형태의 PCR 방법이 개발되어 있다.

대표적인 방법으로는 DNA primer를 금나노입자표면에 표면개질을 진행 한 후 PCR을 수행하는 방법이다. PCR이 수행되는 경우 금나노입자 간의 간격이 가까워지게 되고 이는 엉긴 현상과 유사한 결과물에 도달하여 PCR에 의해 검체가 증폭되는 경우에는 보라색을 검체가 존재하지 않아 증폭되지 않는 경우에는 붉은 색을 띄게 된다된다[4,5](그림 7).

이와 상반된 결과를 가지는 또 하나의 방법은 금나노입자의 표면에 단일 가닥 DNA(Single strand DNA)가 흡착되는 성질을 이용하여 PCR을 수행 후 소모되지 않은 단일 가닥 DNA primer가 금나노입자표면에 흡착됨으로서 금나노입자가 염에 의해 엉기지 않아 PCR로 인해 검체가 증폭되는 경우 단일 가닥 DNA인 primer가 소모되어 염으로부터 금나노입자를 보호하지 못하게 되어 엉기게 되어 색 변화를 유도하는 방식이다[3,16](그림 8).

금나노입자를 기반으로 비색 측정을 하는 경우 비색의 방향성이 양방향이 가능하다는 특성이 있으나 금나노입

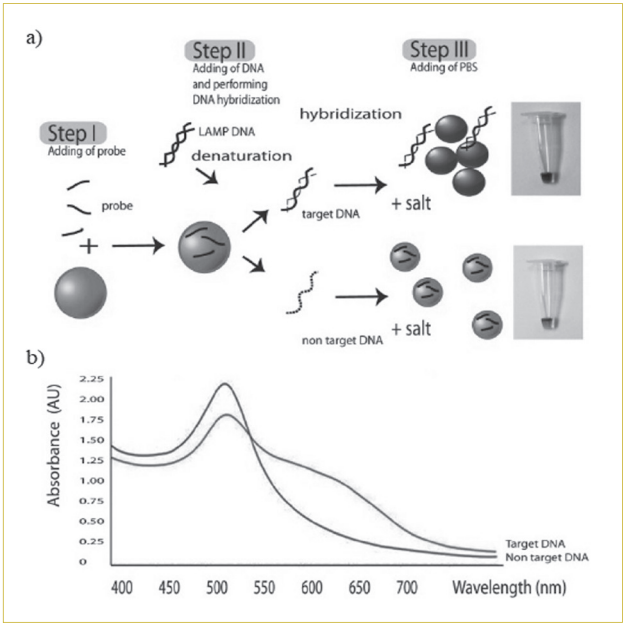

그림 8. a) 금나노입자와 DNA 흡착을 기반으로한 비색 PCR 기술 모식도, b) 금나노입자와 DNA 흡착을 기반으로한 비색 PCR 기술 결과 흡광도 측정

자가 외부 요인에 의해 자체적으로 엉기는 현상이 발생되기 쉬운 부분이 있어 안정성 및 표면개질 등 제작에 복수의 단계를 거쳐야한다는 부분은 상용화로 접근하기 쉽지 않다.

다) Enzymatic reaction based

효소 기반 비색 PCR은 HRP-like DNA mimic (HRPzyme)으로 명명되어 불리는 G-rich DNA 서열을 활용함에 있다. HRPzyme은 DNA로 구성할 수 있으며 Hemin과 결합하여 HRP 효소와 유사한 특성을 보인다. 그리고, HRPzyme은 ssDNA 형태일 때 Hemin과 결합하여 효소 활성을 가지지만 dsDNA 형태로 되어 있는 경우 Hemin과 결합하지 못하여 HRP효소의 활성을 가지지 못한다.

이러한 특성에 기반하여 다양한 개발이 진행되었는데 대표적인 방법으로는 Primer 5' 말단에 HRPzyme의 서열 혹은 상보적인 서열을 임의로 합성 진행하고 PCR을 수행한 후 ssDNA 형태의 Primer와 dsDNA primer의 생성 유무를 효소 기질을 통해 비색 반응을 통해 확인한다. 앞서 말했듯이 dsDNA 형태일 때는 HRPzyme의 활성이 나타나지 않기 때문에 증폭이 되는 경우 효소 활성이 나타나지 않으나 증폭이 되지 않은 경우에는 효소의 활성이 나타나게 된다[12](그림 9, a), b)).

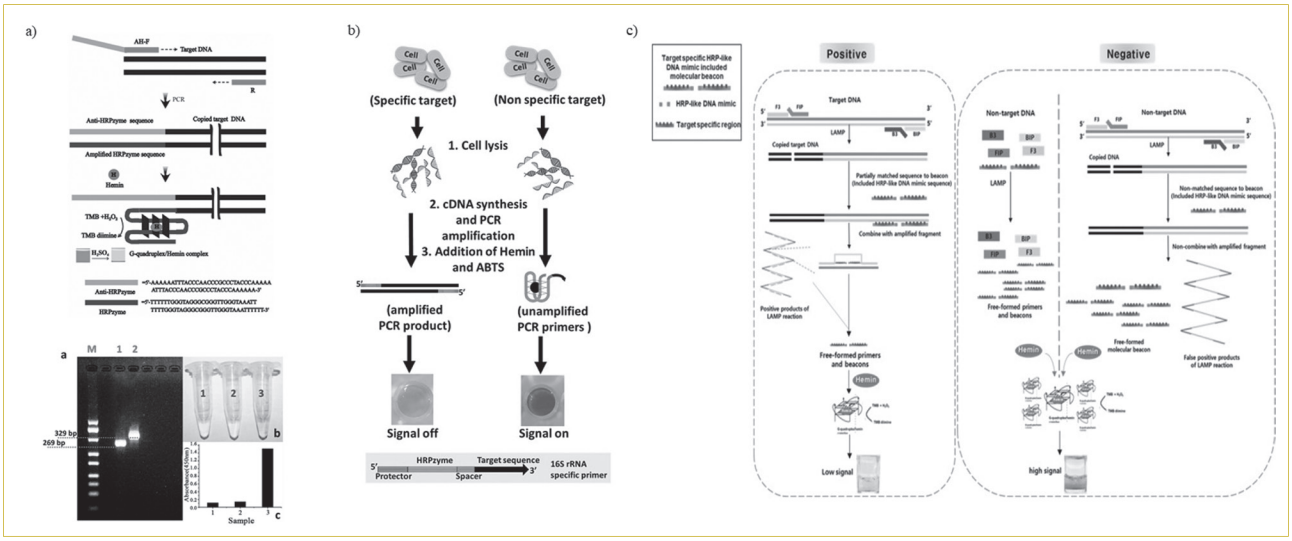

그림 9. a) 상보적 서열을 통한 HRPzyme 증폭을 통한 비색 PCR, b) HRPzyme 증폭을 통한 비색 PCR, c) Probe 형태의 HRPzyme을 통한 비색 PCR

또한, Molecular beacon과 같이 probe 내에 HRPzyme을 임의로 합성하고 이를 기반으로 하여 DNA의 증폭 여부를 확인하는 방법도 개발되었다. 해당 기술의 경우에는 위양성을 보정할 수 있는 부분이 장점이라 할 수 있다(그림 9, c)).

효소 기반 증폭법의 경우 발색도 차이가 크게 나타나기 때문에 검출에는 용이하나 복수의 단계를 거쳐 시료반응을 확인하여야하는 단점도 존재한다.

4. 결론

본 글을 통해 본 비색 PCR을 일부는 사용화되어 판매되어지고 있고 일부는 기술 개발 수준에서 머물러 있다. 다만, 앞으로의 진단시장은 개개인이 스스로 진단하는 자가검출형 진단 시장으로의 확장이 이루어 질 것으로 보인다. 특히, Covid 19 시대를 지나고 나면 자가검출 진단에 대한 소요는 더 요구될 것이다. 분자진단 시장이 성장하기 위해서는 고가의 검출 장비를 사용하지 않는 비색 PCR에 대한 수요는 증가할 것으로 보인다. 특히, 식품 관련 환경 내에서는 저가의 비색 PCR 및 저가 증폭 기술은 식품 산업 전반에 걸쳐 발생되는 식중독 등의 위해요소의 저감을 위한 예찰 활동에 필수 불가결한 요소가 될 것으로 보인다.

참고 문헌

1. 한국과학. 전기영동의 원리와 실험. https://local.koreasci.com/download/manual/101_kor.pdf

2. ThougtCo. 5 Common Dyes for Visualizing and Staining DNA. 2021. https://www.thoughtco.com/visualizing-dna-375499

3. nature middle east. Nanoscale gold to help diagnose HCV infection. 2011. https://www.natureasia.com/en/nmiddleeast/article/10.1038/nmiddleeast.2011.27

4. Elahi N, Kamali M, Baghersad MH. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. Talanta. 2018 Jul 1;184:537-556.

5. Cai, M., Li, F., Zhang, Y. et al. One-pot polymerase chain reaction with gold nanoparticles for rapid and ultrasensitive DNA detection. Nano Res. 3, 557 - 563 (2010).

6. Jung YK, Park HG. Colorimetric detection of clinical DNA samples using an intercalator-conjugated polydiacetylene sensor. Biosens Bioelectron. 2015 Oct 15;72:127-32.

7. Millar JK, James R, Brandon NJ, Thomson PA. DISC1 and DISC2: discovering and dissecting molecular mechanisms underlying psychiatric illness. Ann Med. 2004;36(5):367-78.

8. Arindam Chowdhury, Liping Yu, Izzat Raheem, Linda Peteanu, L. Angela Liu, and David J. Yaron. Stark Spectroscopy of Size-Selected Helical H-Aggregates of a Cyanine Dye Templated by Duplex DNA. Effect of Exciton Coupling on Electronic Polarizabilities. *The Journal of Physical Chemistry A* 2003 *107* (18), 3351-3362

9. Juan Dong, Gangyi Chen, Wei Wang, Xin Huang, Huipan Peng, Qinlin Pu, Feng Du, Xin Cui, Yun Deng, and Zhuo Tang. Colorimetric PCR-Based microRNA Detection Method Based on Small Organic Dye and Single Enzyme. *Analytical Chemistry* 2018 *90* (12), 7107-7111

10. Dao Thi VL, Herbst K, Boerner K, Meurer M, Kremer LP, Kirrmaier D, Freistaedter A, Papagiannidis D, Galmozzi C, Stanifer ML, Boulant S, Klein S, Chlanda P, Khalid D, Barreto Miranda I, Schnitzler P, Kräusslich HG, Knop M, Anders S. A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. Sci Transl Med. 2020 Aug 12;12(556):eabc7075.

11. Tanner NA, Zhang Y, Evans TC Jr. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. Biotechniques. 2015 Feb 1;58(2):59-68.

12. Yang L, Li M, Du F, Chen G, Yasmeen A, Tang Z. A Novel Colorimetric PCR-Based Biosensor for Detection and Quantification of Hepatitis B Virus. Methods Mol Biol. 2017;1571:357-369.

13. Alhassan A, Osei-Atweneboana MY, Kyeremeh KF, Poole CB, Li Z, Tettevi E, Tanner NA, Carlow CK. Comparison of a new visual isothermal nucleic acid amplification test with PCR and skin snip analysis for

diagnosis of onchocerciasis in humans. Mol Biochem Parasitol. 2016 Nov-Dec;210(1-2):10-12.

14. Ding S, Chen R, Chen G, Li M, Wang J, Zou J, Du F, Dong J, Cui X, Huang X, Deng Y, Tang Z. One-step colorimetric genotyping of single nucleotide polymorphism using probe-enhanced loop-mediated isothermal amplification (PE-LAMP). Theranostics. 2019 May 31;9(13):3723-3731.

15. Everardo Gonzalez-Gonzalez, Itzel Montserrat Lara-Mayorga, Iram Pablo Rodrıguez-Sanchez, Yu Shrike Zhang, Sergio O. Mart' ı nez-Chapa, Grissel Trujillo-de Santiago and Mario Moises Alvarez. Colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for cost-effective and quantitative detection of SARS-CoV-2: the change in color in LAMP-based assays quantitatively correlates with viral copy number. Cite this: Anal. Methods, 2021, 13, 169

16. Wachiralurpan S, Sriyapai T, Areekit S, Sriyapai P, Augkarawaritsawong S, Santiwatanakul S, Chansiri K. Rapid Colorimetric Assay for Detection of Listeria monocytogenes in Food Samples Using LAMP Formation of DNA Concatemers and Gold Nanoparticle-DNA Probe Complex. Front Chem. 2018 Apr 3;6:90.

17. Ran, X., Qiongqiong Gao, Y. Zhang and Lijun Guo. "Colorimetry and phase transition characteristics in sensing fluoride anion based on hydrazide organogelators." RSC Advances 7 (2017): 56016-56022.