

## 비수식화 DNA를 이용한 SNP의 검출

최용성, 박대희, 권영수\*

원광대학교, 동아대학교\*

### SNP (Single Nucleotide Polymorphism) Detection Using Indicator-free DNA

Yong-Sung Choi, Dae-Hee Park, and Young-Soo Kwon\*

Wonkwang Univ., Dong-A Univ.\*

#### Abstract

In this paper, we succeeded SNP discrimination of DNA hybridization on microarray using new electrochemical system. Using the electrochemical method with a label-free DNA has performed DNA chip microarray. This method is based on redox of an electrochemical ligand. We developed scanning system with high performance.

**Key Words** : Single Nucleotide Polymorphism, Indicator-free DNA, Microarray, Hybridization

#### 1. 서론

바이오칩은 질병의 판정·예방을 목적으로 한 유전자진단을 추진하고, 생물의 유전자다형(SNP)에 관한 각종 지식을 가져올 것으로 기대된다<sup>[1-4]</sup>. 종래의 형광검출형 바이오칩을 사용하여 대상 유전자의 발현을 해석하기 위해서는 수만개의 유전자 단편을 준비하여 기판상에 고밀도로 배치시킬 필요가 있으나, 제조장치와 해석장치가 고가이므로, 일부 연구기관이나 병원에서만 사용되고 있지 않다.

따라서, 본 연구는 형광검출형 바이오칩에 비하여 간편성, 휴대성, 개발코스트의 면에서 우수하고, 비수식화된 DNA를 이용하여 SNP의 검출을 할 수 있는 미세전극어레이형 바이오칩의 개발을 목적으로 한다. 이 목적을 실현시키기 위하여 고집적형 바이오센서의 제작에 필수불가결한 미세가공기술에 의하여 복수의 미세전극을 병렬로 배치시킨 바이오칩을 제작하였다. 전극상에는 각종 유전자를 고정화하고 복수의 유전자를 동시에 검출하였다. 그리고, 최종적으로 제작된 바이오칩을 사용하여 신속·간편한 임상유전자 검사에 응용하고자 한다.

금번에는 이와 같은 시스템 구축의 일단계로서 1) assay plate상의 probe DNA와 target DNA를 식별하는 것, 2) target DNA의 분자수가 산화·환원전류값에 반비례하는 결과가 얻어졌다. 이 방법은 특이적 target DNA를 hybridization시켜 검출에

이용하므로 비특이적 ds DNA의 노이즈를 감소시켜 고감도의 검출이 가능하다.

#### 2. 실험

##### 2.1 미소전극형 DNA칩어레이의 제작

유리기판을 적당한 크기로 절단하고 순수, 초순수, 아세톤, 초순수에서 각각 30분 동안 초음파 세척하였다. RF 스퍼터링 장치를 사용하여 SUS 금속마스크를 통하여 기판상에 200Å의 Ti과 2000Å의 Au박막을 증착하였다. 이 위에 포토레지스트를 스펀코팅하여 건조시킨 후, 포토마스크를 통하여 UV를 조사하였다. 그리고, 현상액 및 순수로 현상하여, 직경 700 $\mu$ m의 working전극, 절연된 리드부분 및 패드부를 갖는 8채널의 미소전극형 DNA칩어레이를 얻었다.

##### 2.2 probe DNA의 고정화 및 target DNA의 hybridization화

probe DNA의 고정화는 마이크로피펫을 사용하여 금전극에 5.0 $\mu$ M, 1.0 $\mu$ l의 용액을 스폿하여 25 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 반응시켜 고정화시켰다. 고정화반응 후, 순수로 금전극을 세척하여 비특이적으로 결합한 probe DNA를 제거하였다.

hybridization 버퍼로서 Tris-HCl를 조제하여 사용하였다. 1aM~5 $\mu$ M 농도의 target DNA를 마이크로 피펫을 사용하여 금전극에 스폿하고, 프로브스테이션을 사용하여 금전극에 (+)0.3V의 전압을

5초간 인가하여 probe DNA와 hybridization시켰다. 그리고, 금전극은 순수로 세척하여 비특이적으로 결합한 target DNA를 제거하였다.

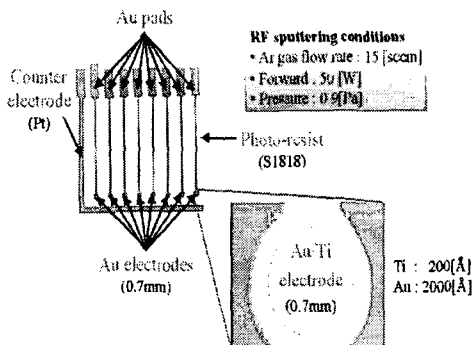
### 2.3 전기화학적 측정

전기화학적 측정에는 CHI의 Model 1030와 컴퓨터 시스템을 사용하였다. Cyclic-voltammetric (CV) 측정에는 전형적인 셀, counter 전극인 Pt, reference 전극인 Ag/AgCl 및 working 전극으로 Au를 사용하였다. 전기화학측정은 500mM의 황산 용액으로 전형적인 황산의 산화·환원피크가 관측될 때까지 25°C, -0.2~1.7V범위에서 100mV/s의 조건으로 스캔하여 표면을 cleaning한 후에 실시하였다. CV측정은 ferricyanide  $[K_3Fe(CN)_6]$  용액중에서 금전극, probe DNA고정후 및 target의 DNA hybridization후 실시하였다. ferricyanide용액의 5회째CV의 산화·환원값을 피크값으로 하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 미소전극형 DNA칩어레이

그림 1은 제작된 미소전극형 DNA칩어레이를 나타낸다. DNA칩어레이는 유리기판상에 SUS금속 마스크를 통해 Ti과 Au를 스퍼터링증착하고, SU-8을 스핀코팅한 후, photo-lithography로 에칭하였다. 금전극의 직경은  $700\mu m$ 이며, 리드선은 레지스트로 절연되어 있으며, 각각의 패드를 potentiostat에 연결하여 전기화학적 측정을 실시할 수 있다. 금전극은 8개의 채널을 형성한다.



### 3.2 칩어레이의 안정성

그림 2는 칩어레이의 ferricyanide용액에 대한 산화·환원피크의 안정성을 측정한 결과이다. 8개의 채널의 산화와 환원값이 0.26[V]와 0.146[V]서 나타나고 있으며, 전형적인 ferricyanide용액

산화·환원값을 나타내고 있다. 또한, 채널1부터 8까지 8개의 채널별이 동일한 피크값을 나타내므로, 안정적이다. 한편, bare상태의 금전극에 대하여 probe DNA의 고정후 및 target DNA의 hybridization후, ferricyanide용액의 산화값은 -4.82(%), -2.45(%로 감소하였으며, 안정적이었다. 채널1부터 7까지 probe DNA의 고정화 및 target DNA의 hybridization화후에, 채널 8을 reference전극으로 사용하였다.

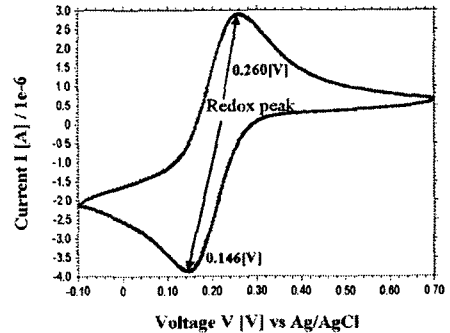


Fig. 2. Stability of biochip array aga ferricyanide solution.

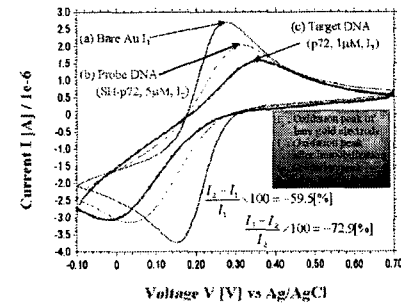
### 3.3 전기화학적 유전자 검출

그림 3은 bare 금전극에 probe DNA를 고정화하고, target DNA를 hybridization시켰을 때, ferricyanide용액의 산화·환원피크의 변화를 측정한 결과이다. 그림 3 (a)는 SH-p72의 probe DNA를 고정화하고, 이의 target DNA (p72)를 hybridization시켰을 때, ferricyanide용액의 산화·환원피크의 변화를 측정한 결과이다. 그림 3 (a)에서 probe DNA를 고정하였을 때, 산화피크 ( $I_{pa}$ )는 59.5% 감소하였다. 또한, peak-to-peak separation ( $E_p$ )는 증가하였다. 이는 probe DNA가 금전극에 고정되어 ferricyanide 이온의 산화·환원을 방해한 것으로 생각된다. 한편, probe DNA가 고정된 전극에 target DNA를 hybridization시켰을 때는 산화피크는 72.9% 감소하였다.

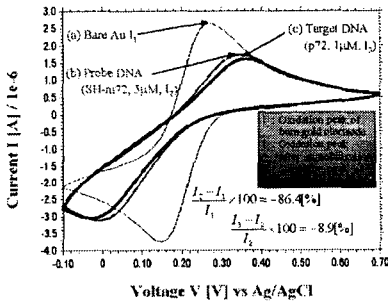
한편, SH-m72, SH-R72를 probe DNA로 하고, 이것과 비상호적인 target DNA인 p72를 hybridization시켰을 때, ferricyanide용액의 산화·환원피크의 변화를 측정한 결과를 그림 3 (b)와 (c)에 각각 나타내었다. 금전극에 probe DNA를 고정하였을 때, 산화피크는 각각 86.4%, 21.1% 감소하였다. 또한, peak-to-peak separation ( $E_p$ )는 증

가하였다. 한편, probe DNA가 고정된 전극에 비상호적인 target DNA를 hybridization시켰을 때는 산화피크는 각각 8.9%, 21.5% 감소하였다.

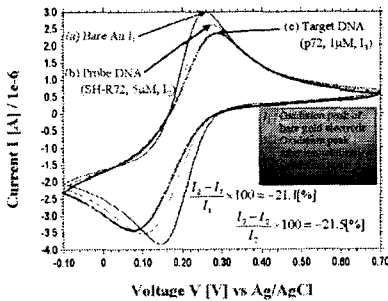
그림 3 (a), (b) 및 (c)의 결과로부터, 상호적인 DNA (SH-p72:p72)를 hybridization시켰을 때, 산화값이 가장 많이 변화하였으며, 다음으로 SH-R72와 p72이었다. 이는 SH-R72와 p72가 guanine 2중나선을 형성하기 때문으로 생각된다.



(a) SH-p72



(b) SH-m72



(c) SH-R72

Fig. 3. Cyclic-voltammograms of 5mM ferri- cyanide in 100mM KCl at 100mV/s using a bare gold, probe-modified electrode and after hybridization with target DNA.

#### 4. 결론

본 연구에서는 비수식화 DNA를 이용하여 SNP를 검출하기 위하여 1) probe DNA 고정화법의 검토, 2) target DNA에 일체의 수식을 하지않는 비수식DNA를 이용한 미소전극여레이형 바이오칩을 제작 및 3) 동시에 복수의 유전자를 전기화학적으로 검출하는 방법에 대하여 검토하였다. 즉, 1) 기관상에 정량적으로 고정화된 probe DNA에 대해서 target DNA를 hybridization시키고, 2) 전기화학적 측정에 의하여 hybridization을 정량화하는 실험계를 개발하여, probe DNA와 target DNA를 식별하였다.

#### 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구 (R08-2003-000-10312-0) 지원으로 수행되었음.

#### 참고 문헌

- [1] S.P.A. Fodor, J.L. Read, M.C. Pirrung, L. Stryer, A.T. Lu, D. Solas, "Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis", *Science*, 251, 767-773, 1991.
- [2] S.P.A. Fodor, R.P. Rava, X.C. Juang, A.C. Pease, C.P. Holmes, C.L. Adams, "Multiplexed biochemical assays with biological chips", *Nature*, 364, 555-556, 1993.
- [3] Emil Palecek, Miroslav Fojta, Miroslav Tomschik, Joseph Wang, "Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage", *Biosensors & Bioelectronics*, 13, 621-628, 1998.
- [4] Dean H. Johnson, Katherine C. Glasgow, and H. Holden Thorp, "Electrochemical Measurement of the Solvent Accessibility of Nucleobases Using Electron Transfer between DNA and Metal Complexes", *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 8933-8938, 1995.