

## 미소전극형 DNA칩 어레이를 이용한 유전자의 검출

최 용성, 이 경섭  
 동신대학교 전기공학과

### A Study on Electrical Properties of Dendrimer

Yong-Sung Choi, and Kyung-Sup Lee  
 Department of Electrical Engineering, DongShin University

**Abstract** - In this study, an integrated microelectrode array was fabricated on glass slide using microfabrication technology. Probe DNAs consisting of mercaptohexyl moiety at their 5'-end were spotted on the gold electrode using micropipette or DNA arrayer utilizing the affinity between gold and sulfur. Cyclic voltammetry in 5mM ferricyanide/ferrocyanide solution at 100 mV/s confirmed the immobilization of probe DNA on the gold electrodes. When several DNAs were detected electrochemically, there was a difference between target DNA and control DNA in the anodic peak current values. It was derived from specific binding of Hoechst 33258 to the double stranded DNA due to hybridization of target DNA. It suggested that this DNA chip could recognize the sequence specific genes. It suggested that multichannel electrochemical DNA microarray is useful to develop a portable device for clinical gene diagnostic system.

#### 1. 서 론

DNA칩은 복수의 유전자를 동시에 해석하는 수단으로서 개발되었다. DNA칩의 주요 응용 분야로서는 유전자의 발현 해석과 유전자 다형 (SNP)의 해석이 주목받고 있다. DNA칩의 검출방법은 형광측정법 [1]~[5], 전기화학측정법 [6]~[9]으로 나눌 수 있다. 형광측정법 DNA칩은 수만개의 유전자 단편을 준비하여 기판상에 고밀도로 배치시켜야 하지만, 제작장치나 해석장치가 고가이므로, 일부 연구기관이나 병원에서만 사용되고 있다.

따라서, 최근에는 표적 유전자의 검출을 형광측정이 아닌 전기화학적 측정에 의하여 검출하려는 목적으로 전기화학적 DNA칩에 대한 연구도 이루어지고 있다. 전기화학 측정법은 형광측정에 비하여 전 검출 시스템의 저비용화, 조작의 간편성의 향상, 휴대화, 고감도 등이 가능하기 때문이다.

따라서, 본 논문에서는 형광검출형 DNA칩과 비교하여 간편성, 휴대성, 개발 비용의 면에서 우수한 미소전극어레이형 DNA칩을 개발하는 것을 목적으로 하였다. 이를 위하여 고정적형 바이오센서의 제작에 필요불가결한 미세가공기술에 의하여 복수의 미소전극을 병렬로 배치시킨 DNA칩을 제작하였다. 전극상에는 여러 가지 유전자를 공유결합에 의하여 고정화하고, 복수의 유전자를 동시에 검출하였다. 그리고, 최종적으로 제작된 DNA칩을 이용하여, 신속 및 간편한 임상유전자검출에 응용하는 것을 목적으로 하였다.

#### 2. 시료 및 실험방법

##### 2.1 시약

기판의 세척에는 초순수 (milliQ), 특급 아세톤 (Wako Pure Chemicals, Ltd.) 또는 전자공업용 아세톤이 사용되었다. 미소전극의 제작에 필요한 금, 크롬은 각각 순도 99.99 %의 것을 사용하였다. 포토리소그래픽에 사용된 레지스트는 positive형의 OFPR 800 및 현상액은 NMD-3 (Tokyo Kasei Co.)를 사용하였다. 금 에칭액으로는 potassium iodide (Wako Pure Chemicals, Ltd.) 40 g, iodine (Wako Pure Chemicals, Ltd.) 10 g을 초순수 400 ml에 용해한 것을 이용하였다. 크롬 에칭액으로는 수산화나트륨 (Wako Pure Chemicals, Ltd.) 40 g, 페리시안화칼륨 (Wako Pure Chemicals, Ltd.) 100 g을 초순수 400 ml에 용해한 것을 이용하였다.

전기화학측정을 위한 인산 버퍼 (pH7)는 인산2수소나트륨2수화물 (Wako Pure Chemicals, Ltd.) 과 인산수소나트륨12수화물 (Wako Pure Chemicals, Ltd.) 을 조제하여 이용하였다. 참조전극 (은/염화은 전극)은 한천파우더 (Wako Pure Chemicals, Ltd.), 염화칼륨 (Wako Pure Chemicals, Ltd.), 은선 (직경 = 0.5 mm)을 사용하여 제작하였다. 제작한 전극의 전처리를 위하여, 염산 (Wako Pure Chemicals, Ltd.)을 1 M로 희석하여 이용하였다.

probe DNA로 사용한 올리고뉴클레오타이드는 국제시약바이오사 업무에 합성을 위탁하여, 5' 말단을 mercaptohexyl기를 수식한 것을

이용하였다. DNA 어레이에 의하여 스폿된 어레이상을 DNA 마이크로 어레이 스캐너를 이용하여 해석하기 위하여 Cy3 또는 Cy5 로 라벨화한 올리고뉴클레오타이드의 혼합용액을 이용하였다. 합성된 올리고뉴클레오타이드의 보존액으로서 TE 버퍼 (Tris-HCl 버퍼와 EDTA용액의 혼합액, (Wako Pure Chemicals, Ltd.))를 조제하여 이용하였다. probe DNA 고정화후의 전극의 표면처리를 위하여, 6-mercapto-hexyl (Aldrich)을 초순수로 1 mM로 조제하여 이용하였다.

전극상에 probe DNA의 고정화를 전기화학적으로 확인하기 위하여 5 mM ferricyanide/ferrocyanide를 이용하였다. 유전자 검출을 위한 검출 마커 (DNA minor groove binder)로서 2'-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bis-(1H-benzimidazoletrihydrochloride (Hoechst 33258) (SIGMA)을 사용하였다. Hoechst 33258은 intercalator가 아니지만, double strand (ds, 이중나선) DNA (ds-DNA)의 A-T 염기쌍에 대해서 선택적으로 결합하는 성질이 있는 물질로서, 핵 염색을 위한 형광색소로 사용되고 있다. 반응 버퍼로서 5×SSC (standard saline citrate 또는 saline sodium citrate) 용액 (3 M 염화나트륨, 0.3 M 쿠엔산나트륨, (Wako Pure Chemicals, Ltd.))을 조제하여 이용하였다. 반응용 세척액으로서 10 % SDS (도데실황산나트륨, (Wako Pure Chemicals, Ltd.)) 용액을 조제하여 이용하였다.

##### 2.2 미소전극어레이형 DNA칩의 제작

칩 기판은 슬라이드 유리 (Matsunami, 76 mm×27 mm, 두께 1.2 mm) 또는 베이크판 (Sunhayato, 두께 10 mm)을 적당한 크기로 절단하여 세척한 후, 초순수에서 15분, 아세톤에서 15분, 초순수에서 15분의 순으로 초음파 세척하였다. 금전극은 진공증착 장치를 사용하여 약 10<sup>-6</sup> Torr의 진공상태에서 기판상에 증착층으로서 크롬을 약 200 nm 증착하고, 계속하여 이 위에 금을 약 2000 nm 증착한 것을 사용하였다.

패턴 제작을 위한 포토마스크는 Adobe Illustrator 8로 디자인하여 Yamada Film에 필름을 출력하여 직접 유리판에 고정해서 사용하였다. 스펀코터를 사용하여 positive형 레지스터 OFPR 800을 기판상에 균일하게 도포하였다. 이 기판을 오븐에서 가열한 후, 미리 제작된 마스크패턴을 이용하여 노광하고, 현상에칭하여 미소전극어레이를 제작하였다. 리드선 부분을 피복하기 위하여 다시 positive형 OFPR 800을 도포하고 오븐에서 가열한 후, 별개의 마스크패턴을 사용하여 노광현상하고, 전극부분 및 외부접속전극 (커넥터) 부분을 노출시켰다.

##### 2.3 전기화학측정

전기화학측정은 3전극법으로 하였다. 참조전극으로서 은/염화은 전극을 사용하였고, 비교전극을 사용하여 비교하였으며 전위차가 ±1 mV 이내인 것을 확인하고 사용하였다. counter 전극으로는 백금선을 사용하였다. 측정시에는 DNA칩의 끝에 있는 외부접속 전극 부분을 커넥터에 삽입하여 전기화학측정장치 (BAS, CV-50W)에 접속하여 사용하였으며, GPIB인터페이스로 접속한 PC (Gateway2000 4DX2-66)에 의하여 제어하고 정전 차폐된 환경에서 측정하였다. 전기화학측정은 0.2 M 인산버퍼용액중 (pH7)에서 실시하였으며, 스캔 속도는 100 mV/s로서 300 800 mV의 범위내에서 측정하였다. 전기화학측정법으로는 cyclic-voltammetry (CV) 또는 linear sweep voltammetry (LSV)에 의하여 측정하였다.

Hoechst 33258 물질을 포함하는 용액중에서 CV를 하면 550 mV 부근의 전위에서 산화반응을 일으키므로, 이 산화전류를 측정하여 ss-DNA와 ds-DNA를 식별할 수 있다. 본 논문에서는 probe DNA의 5' 말단을 티올기 (-CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>SH)로 수식하고, 황과 금의 결합을 이용하여 금전극상에 고정화하였다. target DNA를 반응시켜서 유전자 hybrid 생성물을 형성시킨 후, Hoechst 33258을 반응시켰다. LSV에 의하여 Hoechst 33258 유래의 전기신호를 측정하여 산화전류값의 차이로부터 ss-DNA와 ds-DNA를 식별할 수 있었다.

### 3. 결과 및 검토

#### 3.1 다른 배열의 probe DNA를 고정화한 경우

실험으로서 칩의 각 미소전극상에 다른 염기배열을 갖는 4종류의 probe DNA를 DNA어레이어를 이용하여 고정화하였다. probe DNA의 고정화후, 칩상의 전극 전면에 10 nM의 target DNA (HIV SK39 target)를 적하하여 반응시키고, LSV를 측정하였을 때의 결과를 그림 1에 나타내었다. probe DNA를 고정화한 4종류의 전극중에서 target DNA에 상보적이지 않은 배열을 갖는 3종류의 probe DNA (HIV SK38 probe, HCV 1a probe, C<sub>20</sub>T<sub>20</sub>-SH probe)를 고정화한 전극에서는 각각 거의 같은 산화전류값을 나타내었다. 이에 대하여, target DNA에 상보적인 배열을 갖는 probe DNA (HIV SK39 probe)를 고정화한 전극에서는 다른 전극과 비교하여 높은 산화전류값이 얻어졌다. 이 결과는 ds-DNA (유전자 hybrid)에 특이적으로 Hoechst 33258이 결합하였기 때문으로 생각된다.

이 결과로부터, DNA 어레이어를 이용하여 다른 염기배열을 갖는 probe DNA를 고정화하여도 염기배열을 식별할 수 있음을 알 수 있다. 단, 콘트롤 DNA로 이용한 3종류의 probe DNA의 산화전류값에는 다소의 차이를 보이고 있다. 이것은 Hoechst 33258의 A-T 염기쌍에의 우선적 결합과 probe DNA 염기쌍의 길이의 영향 등, 몇가지의 변수가 관여한 것으로 생각된다. 그러므로, 금후의 과제로서 ds-DNA의 염기쌍 (A-T 결합 및 G-C 결합)에 대한 Hoechst 33258의 결합성의 평가, ds-DNA의 길이에 의한 전류값의 차이 등의 영향을 검토할 필요가 있다.

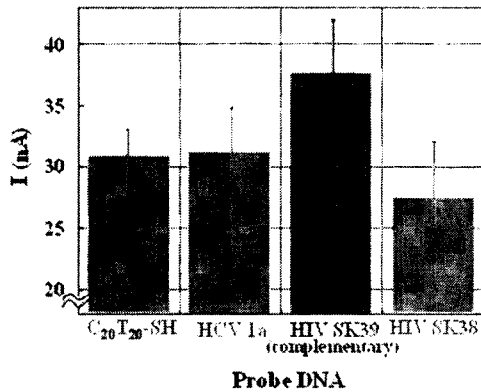


그림 1. Target DNA와 1염기 상이한 mismatch DNA의 반응후 Hoechst 33258의 LSV.

Fig. 1 Linear sweep voltammogram of Hoechst 33258 after hybridization of target DNA and 1 base pair mismatched DNA.

#### 3.2 염기 mismatch DNA의 검출

칩의 각 미소전극상에 100 nM의 probe DNA (HIV SK38 probe)를 고정화한 후, 다른 염기배열을 갖는 target DNA (HIV SK38 target) 또는 콘트롤 DNA (HIV SK39 target)를 반응시켜, LSV를 측정하였을 때의 결과를 그림 2에 나타내었다.

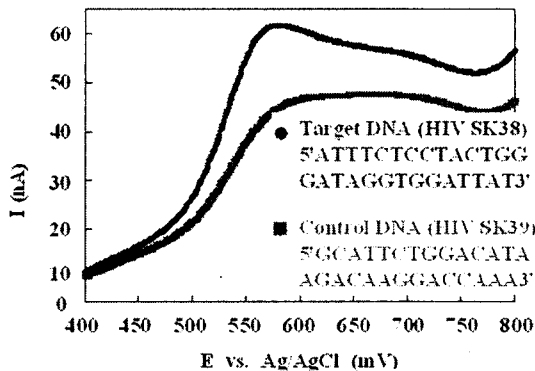


그림 2. Target DNA와 1염기 상이한 mismatch DNA의 반응후 Hoechst 33258의 LSV.

Fig. 2. Linear sweep voltammogram of Hoechst 33258 after hybridization of target DNA and 1 base pair mismatched DNA.

그림 2에 나타내었듯이, 약 450 mV 부근에서부터 양자의 산화전류값에 차이가 발생하기 시작하며, 550/600 mV의 범위내에서 그 차

이가 가장 크게 되었다. 이 결과는 probe DNA에 상보적인 배열이 아닌 콘트롤 DNA를 반응시킨 경우, 반응이 거의 발생하지 않으므로 전극상에서는 거의 ss-DNA (probe DNA)만이 존재하는 상태가 되기 때문으로 생각된다. 그러므로, ds-DNA에 특이적으로 결합하는 Hoechst 33258는 거의 결합하지 않았다. 이에 대하여, probe DNA에 상보적인 배열을 갖는 target DNA를 반응시킨 경우는 전극상에서 ds-DNA (유전자 hybrid)를 형성하므로, Hoechst 33258이 보다 많이 결합하여 전극상에서 농축되어 산화전류값이 증대한 것으로 생각된다. 그러나, 콘트롤 DNA를 반응시킨 경우라도, 다소 전류값은 상승한다.

#### 3.3 Target DNA의 정량

칩상의 각 미소전극상에 100 nM의 probe DNA (HIV gag SK38 probe)를 고정화한 후, 0.01, 0.1, 1, 10 및 100 nM의 농도에서 target DNA (HIV gag SK38 target) 또는 콘트롤 DNA (HIV gag SK39 target)를 반응시켜, LSV를 측정하였을 때의 결과를 그림 3에 나타내었다. target DNA에 대하여 측정된 결과, 농도가 증가함에 따라 Hoechst 33258의 산화전류값도 상승하였다. 반응은 거의 정량적으로 진행하였으며, 전극표면의 ds-DNA의 양에 대응하여 Hoechst 33258이 결합되었다고 생각된다. 한편, 콘트롤 DNA에 대해서도 농도의 증가에 대하여 미량의 산화전류값의 증가가 상승하였으나, target DNA에 비하여 그 기울기는 작았다. 이상의 결과에서 농도범위가 0.1/100 nM에서 산화전류값에 차를 볼 수 있어, 다른 염기배열을 인식할 수 있었다.

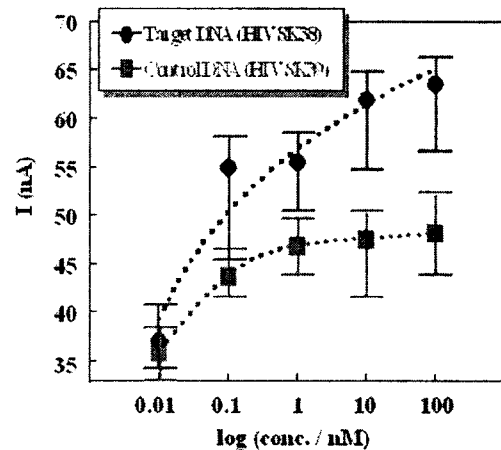


그림 3. Target DNA와 콘트롤 DNA에 대한 농도의존성.

Fig. 3. Calibration curves for concentration of target DNA and control DNA.

본 연구 결과는 임상유전자검출에서 수요가 높은 SNP 해석을 가정한 것이며, 유전병이나 암유전자의 검출 등, 여러 가지 유전자 검사 분야에 응용할 수 있다. 금후의 과제로서, 저농도에서 1염기 mismatch의 검출을 하기 위해서는 반응의 최적 조건 (온도, 시간, 반응 버퍼의 조성 등)을 검토할 필요가 있다.

### 4. 결 론

본 논문에서는 간편성, 휴대성, 개발 비용의 면에서 우수한 미소전극어레이형 DNA칩을 개발하는 것을 목적으로 하여, 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) 포토리소그래픽 및 진공증착기술을 이용하여 복수의 미소전극을 병렬로 배치시킨 미소전극어레이형 DNA칩을 제작하였다.
- 2) 금 전극상에 티올기를 수식한 probe DNA를 고정화한 후, ferricyanide/ferrocyanide 용액중에서 CV를 측정된 결과, probe DNA를 고정화하지 않은 전극과 고정화한 전극에서는 Fe<sup>2+/3+</sup>의 CV에 차이를 볼 수 있었으며, probe DNA가 전극표면에 고정화되어 있음을 확인하였다. 또한, 형광수식한 probe DNA를 고정화한 경우에도 고정화를 확인할 수 있었다.
- 3) probe DNA의 고정화 농도에 대해서 검토하여 최적의 probe DNA의 농도는 100 nM이었다.
- 4) probe DNA (HIV SK38 probe)에 다른 염기배열을 갖는 target DNA (HIV SK38 target) 또는 콘트롤 DNA (HIV SK39 target)를 반응시켜, LSV를 측정된 결과, 양자의 산화전류값에 차이가 발생하여, target DNA를 전기화학적으로 검출할 수 있었다.

### 감사의 글

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

### [참 고 문 헌]

- [1] 古庄敏行 他, 臨床DNA診斷法 金原出版, 1995.
- [2] 江刺正喜 他, マイクロマシーニングとマイクロメカトロニクス, 培風館, 1992.
- [3] T. Livache, B. Fouque, A. Roget, J. Marchand, G. Bidan, R. Téoule, and G. Mathis, "DNA Chip on a Silicon Device: Example of Hepatitis C Virus Genotyping", *Analytical Biochemistry*, **255**, pp.188-194, 1998.
- [4] D.Y. Guschin, B.K. Mobarry, D. Proudnikov, D.A. Stahl, B.E. Rittmann, and A.D. Mirzabekov, "Oligonucleotide Microchips as Genosensors for Determinative and Environmental Studies in Microbiology", *Appl Environ Microbiol.*, **63**(6), p.2397-2402, 1997.
- [5] 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**, pp.767-773, 1991.
- [6] 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**, pp.555-556, 1993.
- [7] M. Schena, D. Shalon, R.W. Davis, P.O. Brown, "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray", *Science*, **270**, pp.467-470, 1995.
- [8] G. Marrazza, I. Chianella, M. Mascini, "Disposable DNA electrochemical sensor for hybridization detection", *Biosensors & Bioelectronics*, **14**, pp.43, 1999.
- [9] S.O. Kelly, E.m. Boon, J.K. Barton, N.M. Kackson and M.G. Hill, "Single-base mismatch detection based on change transduction through DNA", *Nucleic Acids Research*, **27**, pp.4830-4837, 1999.