

전기화학적 방법에 의한 신규 바이오칩의 SNP 검출

SNP Detection of Array-type DNA Chip using Electrochemical Method

최용성^{1,a}, 권영수², 박대희¹
(Yong-Sung Choi^{1,a}, Young-Soo Kwon², and Dae-Hee Park¹)

Abstract

High throughput analysis using a DNA chip microarray is powerful tool in the post genome era. Less labor-intensive and lower cost-performance is required. Thus, this paper aims to develop the multi-channel type label-free DNA chip and detect SNP (Single nucleotide polymorphisms). At first, we fabricated a high integrated type DNA chip array by lithography technology. Various probe DNAs were immobilized on the microelectrode array. We succeeded to discriminate of DNA hybridization between target DNA and mismatched DNA on microarray after immobilization of a various probe DNA and hybridization of label-free target DNA on the electrodes simultaneously. This method is based on redox of an electrochemical ligand.

Key Words : DNA chip microarray, SNP (Single nucleotide polymorphisms), Lithography technology, Hybridization, Immobilization

1. 서론

바이오센서는 생체재료가 갖는 매우 우수한 분자인식능력을 이용하여 화학물질의 농도를 측정하는 센서이다. 원리적으로는 바이오센서의 채널수를 늘리고 집적형[1,2]으로 함으로써, 측정대상물질의 종류를 증가시킬 수 있다. 바이오센서를 이용하여 각종 효소기질, 항원, DNA 등을 동시에 측정할 수 있을 뿐만 아니라, 냄새나 맛을 감지할 수 있는 디바이스[3]도 구축할 수 있다. 이러한 센서를 제작하는 데는 생체재료인 효소나 항원 등 식별물질의 고정화가 필요하다.

한편, 바이오칩은 질병의 판정·예방을 목적으로 한 유전자진단을 추진하고, 생물의 유전자다형(SNP)에 관한 각종 지식을 가져올 것으로 기대된

다 [4-9]. 종래의 형광검출형 바이오칩[3,4]을 사용하여 대상 유전자의 발현을 해석하기 위해서는 수만개의 유전자 단편을 준비하여 기관상에 고밀도로 배치시킬 필요가 있으나, 제조장치와 해석장치가 고가이므로, 일부 연구기관이나 병원에서만 사용되고 있지 않다.

따라서, 본 연구에서는 형광검출형 바이오칩에 비하여 간편성, 휴대성, 개발코스트의 면에서 우수한 미세전극어레이형 바이오칩을 개발하며, 비수식화한 DNA를 사용하여 유전자다형을 검출하는 것을 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 일 단계로서 assay plate상의 probe DNA와 target DNA 및 mismatch DNA를 indicator없이 식별하

1. 원광대학교 전기전자 및 정보공학부
(전북 익산시 신용동 344-2)

2. 동아대학교 전기전자 및 컴퓨터공학부

a. Corresponding Author : biochips@wonkwang.ac.kr

접수일자 : 2003. 12. 24

1차 심사 : 2004. 2. 2

최종심사 : 2004. 2. 11

었다. 이 방법은 특이적 target DNA를 hybridization시켜 검출에 이용하므로 비특이적 ds (double strand, 이중나선) DNA의 노이즈를 감소시켜 고감도의 검출이 가능하다.

2. 실험

2.1 시약

5'에 SH기가 수식된 5'-HS-AGGCTGCTCCC CCCGTGGCC-3'의 염기배열을 갖는 SH-p72, 5'-HS-AAGCTGCTCCCCCGTGGCC-3'의 염기배열을 갖는 SH-m72 및 5'-HS-AGGCTGCTCCC CGCGTGGCC-3'의 염기배열을 갖는 SH-R72이 probe DNA로 사용되었다. 그리고, 이들 probe DNA와 상호적인 target DNA [p72; 3'-TCCGAC GAGGGGGGCACCGG-5', m72; 3'-TTCGACGA GGGGGGCACCGG- 5' 및 R72; 3'-TCCGACGA GGGGCGCACCGG-5']를 합성하고 정제하여 5.0 μM의 농도로 하여 사용하였다. 합성된 DNA는 TE버퍼 (10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA pH 8.0)에 보존하였다.

기판의 세척은 초순수 및 특급아세톤·에탄올 (Wako Pure Chemical Co., Inc.) 또는 전자공업용 아세톤 (Kanto Chemical Co., Inc.)을 사용하였다. 포토리소그라피에 사용한 포토티브용 레지스트는 S1818 (SHIPLEY), 현상액은 MF-319 (SHIPLEY) 및 remover는 1165 (SHIPLEY)를 사용하였다. 센서기판을 제작하기 위하여 두께 1.2~1.5mm, 76x26mm의 SLIDE GLASS (MATSUNAMI)를 사용하였다.

2.2 미소전극형 DNA칩어레이의 제작

그림 1은 DNA칩 마이크로 어레이의 제작 공정을 나타내고 있다 [9]. 유리기판을 적당한 크기로 절단하고 순수, 초순수, 아세톤, 초순수에서 각각 30분 동안 초음파 세척하였다. RF 스퍼터링 장치를 사용하여 SUS 금속마스크를 통하여 기판상에 200 Å의 Ti과 2000 Å의 Au박막을 증착하였다. 이 위에 포토레지스트를 스핀코팅하여 건조시킨 후, 포토마스크를 통하여 UV를 조사하였다. 그리고, 현상액 및 순수로 현상하여, 직경 700 μm의 working전극, 절연된 리드부분 및 패드부를 갖는 8채널의 미소전극형 DNA칩어레이를 얻었다.

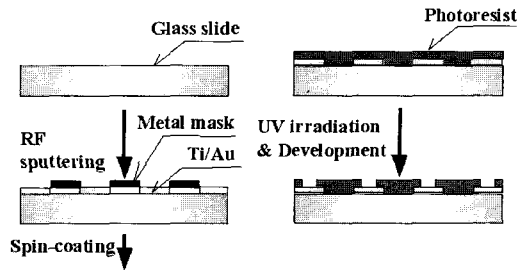


그림 1. 미소전극어레이형 DNA칩 제작을 위한 공정.

Fig. 1. Fabrication process of microelectrode array for DNA chip.

2.3 Probe DNA의 고정화 및 target DNA의 hybridization

그림 2는 비수식화 DNA에 의한 DNA칩 마이크로어레이의 전기화학적 측정 공정을 나타내고 있다. probe DNA의 고정은 마이크로피펫을 사용하여 금전극에 5.0 μM, 1.0 μl의 용액을 스폿하여 25 °C에서 2시간동안 반응시켜 고정화시켰다. 고정화반응 후, 순수로 금전극을 세척하여 비특이적으로 결합한 probe DNA를 제거하였다.

Hybridization 버퍼로서 Tris-HCl를 조제하여 사용하였다. 1 μM 농도의 target DNA를 마이크로 피펫을 사용하여 금전극에 스폿하고, 프로브스테이션을 사용하여 금전극에 (+0.3 V의 전압을 5초간 인가하여 probe DNA와 hybridization시켰다. 그리고, 금전극은 순수로 세척하여 비특이적으로 결합한 target DNA를 제거하였다.

2.4 전기화학측정

전기화학측정에는 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 500 mM의 황산용액으로 전형적인 황산의 산화·환원피크가 관측될 때까지 25 °C, -0.2~1.7 V범위에서 100 mV/s의 조건으로 스캔하여 표면을 cleaning한 후에 실시하였다. CV측정은 ferricyanide [K₃Fe (CN)₆] 용액중에서 금전극, probe DNA를 고정화한 후 및 target의 DNA hybridization후에 실시하였다. ferricyanide 용액의 5회째 CV의 산화·환원값을 피크값으로 하였다.

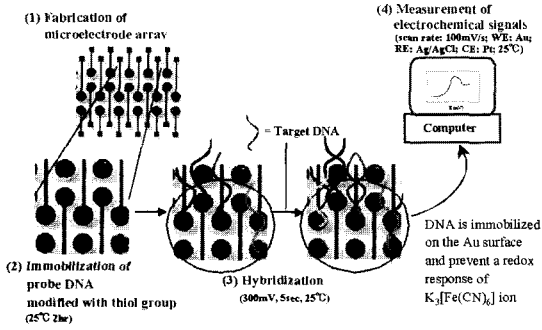


그림 2. 전기화학 신호측정을 이용한 미소전극어레이형 DNA칩의 원리도.
 Fig. 2. Principle of microelectronic DNA chip array using electrochemical response.

3. 결과 및 검토

3.1 미소전극형 DNA칩어레이

그림 3은 제작된 미소전극형 DNA칩어레이를 나타낸다. DNA칩어레이는 유리기판상에 SUS 금속마스크를 통해 Ti과 Au를 스퍼터링증착하고, SU-8을 스핀코팅한 후, photolithography로 에칭하였다. 금전극의 직경은 700 μm 이며, 리드선은 레지스트로 절연되어 있으며, 각각의 패드를 potentiostat에 연결하여 전기화학적 측정을 실시할 수 있다. 금전극은 8개의 채널을 형성한다.

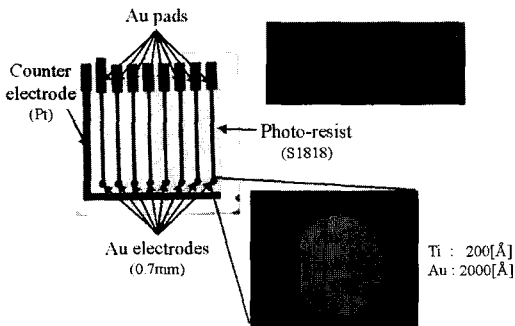


그림 3. 8채널 바이오칩 어레이.
 Fig. 3. 8 channel biochip array.

3.2 칩어레이의 안정성

그림 4는 칩어레이의 ferricyanide용액에 대한 산화·환원피크의 안정성을 측정한 결과이다. 8개의 채널의 산화와 환원값이 0.26 V와 0.146 V에서

나타나고 있으며, 전형적인 ferricyanide용액의 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 hybridization후에, 채널 8을 reference전극으로 사용하였다.

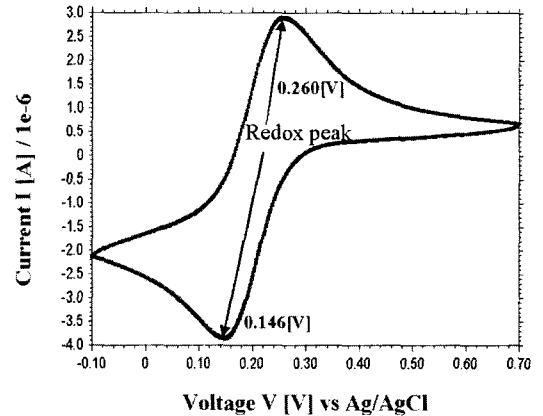
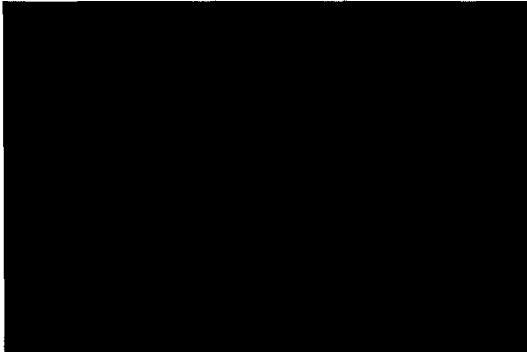


그림 4. Ferricyanide 용액에 대한 바이오칩 어레이의 안정도.
 Fig. 4. Stability of biochip array against ferricyanide solution.

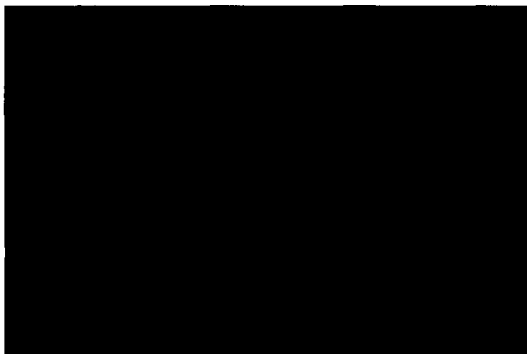
3.3 Probe DNA의 고정 및 target DNA의 hybridization의 확인

그림 5 (a) 및 (b)는 SH기와 FITC (fluorescence isothio-cyanate)가 수식된 probe DNA를 금전극에 고정화시키고, FITC수식된 target DNA를 hybridization시킨 후에 각각의 상태에서 형광현미경에 의하여 각각의 고정화와 hybridization을 확인한 결과를 나타내고 있다. 그림 5의 (a) 및 (b)의 원에서 형광물체가 확인되었으므로, probe DNA가 금전극에 고정화된 것과, target DNA가 hybridization된 것을 알 수 있다.

그러나, SH기가 수식되지 않은 경우에는, 형광물질이 관측되지 않았으므로, SH기에 의하여 금전극에 probe DNA가 고정된 것을 알 수 있었다. 한편, probe DNA와 비상호적인 target DNA를 hybridization시켰을 경우에도 형광물질이 관측되지 않았다.



(a) SH기와 FITC로 수식된 probe DNA의 고정화

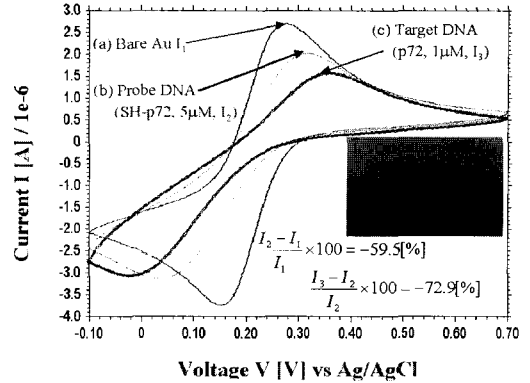


(b) FITC로 수식된 target DNA의 hybridization

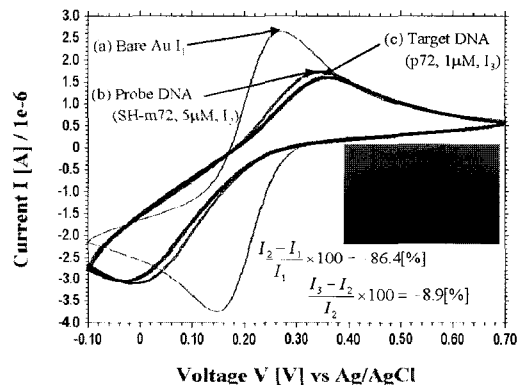
그림 5. 고정화와 hybridization의 확인.
Fig. 5. Confirmation of immobilization and hybridization.

3.4 전기화학적 유전자 검출

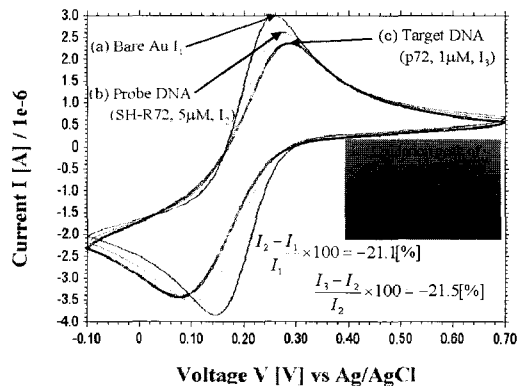
그림 6은 bare 금전극에 probe DNA를 고정화하고, target DNA를 hybridization시켰을 때, ferricyanide용액의 산화·환원피크의 변화를 측정할 결과이다. 그림 6 (a)는 SH-p72의 probe DNA를 고정화하고, 이의 target DNA (p72)를 hybridization시켰을 때, ferricyanide용액의 산화·환원 피크의 변화를 측정할 결과이다. 그림 6 (a)에서 probe DNA를 고정하였을 때, 산화피크 (I_{pa})는 59.5 % 감소하였다. 또한, peak-to-peak separation (E_p)는 증가하였다. ferricyanide의 산화 피크가 감소되는 이유는 DNA의 phosphate backbone의 negative charge와 ferricyanide의 negative charge의 repulsion에 의한 diffusion 감소때문이다. 한편, probe DNA가 고정된 전극에 target DNA를 hybridization시켰을 때는 산화피크는 72.9 % 감소하였다.



(a) SH-p72



(b) SH-m72



(c) SH-R72

그림 6. 5 mM ferricyanide과 100 mM KCl 수용액 및 100 mV/s에서 미소전극, probe DNA가 수식된 미소전극 및 target DNA를 hybridization하였을 때의 Cyclic-voltammograms.

Fig. 6. Cyclic-voltammograms of 5 mM ferricyanide in 100 mM KCl at 100 mV/s using a bare gold, probe-modified electrode and after hybridization with target DNA.

한편, SH-m72, SH-R72를 probe DNA로 하고, 이것과 비상호적인 target DNA인 p72를 hybridization시켰을 때, ferricyanide용액의 산화·환원 피크의 변화를 측정한 결과를 그림 6 (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 증가하였다. 한편, probe DNA가 고정된 전극에 비상호적인 target DNA를 hybridization시켰을 때는 산화피크는 각각 8.9 %, 21.5 % 감소하였다.

그림 6 (a), (b) 및 (c)의 결과로부터, 상호적인 DNA와 비상호적인 DNA를 hybridization시켰을 때, 산화값은 72.9 %, 8.9 % 및 21.5 % 감소하였으며, 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.

이상으로 고정적형 바이오칩을 제작하고, target DNA에 일체의 수식을 하지 않는 비수식DNA를 이용하여, 상호적인 DNA의 검출을 확인하였다.

4. 결론

본 논문에서는 형광검출형 바이오칩에 비하여 간편성, 휴대성, 개발 비용의 면에서 우수한 마이크로어레이 DNA칩을 개발하고 비수식화한 DNA를 사용하여 유전자다형 (SNP)을 검출하기 위하여, 1) 미세가공기술에 의하여 복수의 미세전극을 병렬로 배치시킨 바이오칩을 제작하고, 2) probe DNA 고정화법의 검토하였으며, 3) target DNA에 일체의 수식을 하지 않는 비수식DNA를 이용한 미소전극어레이형 바이오칩을 제작하였으며, 4) 동시에 복수의 유전자를 전기화학적으로 검출하는 방법에 대하여 검토하여, 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) 기판상에 정량적으로 고정화된 probe DNA에 대해서 target DNA를 hybridization시켰다.
- 2) 전기화학적 측정에 의하여 hybridization을 정량화하는 실험계를 개발하여, 1염기 차이의 probe DNAs와 비수식화된 target DNA를 동시에 식별 및 검출하였다.

향후에는, 제작된 바이오칩을 사용하여 신속·간편한 임상유전자 검사에 응용하고자 한다.

감사의 글

“이 논문은 2002년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구 되었음 (KRF-2002-050-D00004)”

참고 문헌

- [1] S. M. Chang, K. Y. Kim, J. M. Kim, Y. S. Choi, and Y. S. Kwon, "Detection of odorants and study on the odorant sensor system by using SAW device", J. KIEEME, Vol. 8, p. 48, 1995.
- [2] Y. S. Choi, H. K. Shin, Y. S. Kwon and, B. J. Lee, "Fabrication and organic response characteristics of the copolymer LB films", J. KIEEME, Vol. 9, p. 180, 1996.
- [3] 최낙진, 반태현, 박준현, 백원우, 김재창, 허중수, 이덕동, "산화주석을 기반으로 한 DMMP 후막가스센서 제작", 전기전자재료학회논문지, 16권, p. 1217, 2003.
- [4] S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, and D. Solas, "Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis", Science, Vol. 251, p. 767, 1991.
- [5] S. P. A. Fodor, R. P. Rava, X. C. Juang, A. C. Pease, C. P. Holmes, and C. L. Adams, "Multiplexed biochemical assays with biological chips", Nature, Vol. 364, p. 555, 1993.
- [6] E. Palecek, M. Fojta, M. Tomschik, and J. Wang, "Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage", Biosensors & Bioelectronics, Vol. 13, p. 621, 1998.
- [7] D. H. Johnson, K. C. Glasgow, and H. H. Thorp, "Electrochemical Measurement of the Solvent Accessibility of Nucleobases Using Electron Transfer between DNA and Metal Complexes", J. Am. Chem. Soc., Vol. 117, p. 8933, 1995.
- [8] M. I. Pividori, A. Merkoçi, S. Alegret, "Electrochemical genosensor design: immobilization of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods", Biosensors & Bioelectronics, Vol. 15, p. 291, 2000.
- [9] 최용성, 박대희, 권영수, T. Kawai, "비수식화 DNA를 이용한 유전자 검출 및 새로운 DNA칩의 개발", 대한전기학회 논문지, Vol. 52C, p. 365, 2003.