

## 2단계 고정화법을 이용한 DNA칩 마이크로어레이의 개발

윤 희찬\*, 김 도균\*, 신 훈규\*\*, 권 영수\*

\*동아대학교 전기공학과

## Development of DNA Chip Microarray by Using Secondary-step immobilization methods

Hee-Chan Yoon\*, Do-Kyun Kim\*, Hoon-Kyu Shin\*, Young-Soo Kwon\*

\*Dept. of Electrical Eng., Dong-A Univ.

**Abstract** - We have used the secondary-step immobilization methods based on the chip pattern of hydrophobic self-assembly layers to assemble microfabricated particles onto the chip pattern. Immobilization of DNA, fabrication of the particles and the chip pattern, arrangement of the particles on the chip pattern, and recognition of each using DNA fluorescence measurement were carried out. Establishing the walls, the arrangement stability of the particles was improved. Each DNA is able to distinguish by using the lithography process on the particles. Advantages of this method are process simplicity, wide applicability and stability. It is thought that this method can be applicable as a new fabrication technology to develop a minute integration type biosensor microarray.

## 1. 서 론

최근, DNA칩을 비롯한 다종류의 생체재료를 마이크로 머신 기술 (Micro Electro Mechanical System, MEMS)을 이용하여 하나의 칩에 집적화한 디바이스가 주목받고 있다[1]. DNA칩 마이크로어레이는 1995년에 미국에서 개발된 이후 급속히 발전되어 의학, 약학, 생물학 등의 연구분야에서 가장 주목받고 있는 기술중의 하나이다[2]~[4]. DNA칩 마이크로어레이에 대한 DNA의 고정화 및 안정화는 다기능 DNA칩 마이크로어레이를 이용한 다양한 응용을 위해서 매우 중요한 과제이다. 만약 이와 같은 문제가 해결된다면 동시에 많은 양의 정보를 분석할 수 있을 뿐만 아니라, DNA칩 마이크로어레이의 미소화에 의한 시약이나 시료의 소비량을 억제하고, 단일종 또는 수종류의 DNA로는 알 수 없는 복합적인 정보를 얻을 수 있다.

DNA칩 마이크로어레이는 크게 DNA를 칩상에서 합성시키는 방법 (포토리소그래픽 합성법; photolithography synthesis method)과 DNA를 미세한 탐침을 이용하여 칩상에 고정시키는 방법 (순차고정화법; sequential immobilization method), 잉크젯법 (inkjet method)으로 나뉘어진다. 현시점에서는 정량성과 편리성의 관점에서 어느쪽이 우수한가를 판단하는 것은 매우 어렵지만, DNA 분석을 위한 DNA칩 마이크로어레이의 주류를 이루고 있다. 그러나 포토리소그래픽 합성법은 길이가 20~30mer 정도로 짧은 DNA 분자의 고정화는 가능하지만, 효소나 항체와 같은 긴 분자에는 적합하지 않으며, 순차고정화법과 잉크젯법은 탐침을 조정하기 위한 센서 채널을 늘림으로서 제작 공정이 복잡하게 되며, 제작 단가가 증가하는 단점이 있다[5].

따라서, 본 연구에서는 다항목 측정 및 고집적화 DNA칩 마이크로어레이의 개발을 위하여 새로운 방법을 제안하였다. 즉, DNA를 칩상에 직접 고정화하지 않고 담체 (particles)에 고정화한 후, 담체를 다시 칩상에 고정화

하는 2단계 고정화법이다. 제2단계 고정화법은 미소화된 담체군(群)의 소수성상호작용 (hydrophobic interaction)에 의한 무작위액중자기조직화법 (random fluidic self-assembly method)을 이용하는 방법으로 고정화의 복잡한 과정을 감소시킬 수 있는 방법이다. 이 방법은 여러 조건의 DNA가 고정된 담체가 현탁 상태에서 칩상의 사이트에 무작위 배치되므로 DNA의 종류나 개수가 증가하여도 조각이 복잡하게 되지 않고, DNA의 변성이 발생하지 않도록 고정화할 수 있는 장점이 있다.

## 2. 시료 및 실험 방법

## 2.1 시료

생체재료로서는 5'말단에 각각 비오틴 및 FITC (fluorescence isothiocyanate)를 수식한 0.2 $\mu$ M 스케일일의 이중나선 DNA를 Nissinbo에 위탁합성하여 사용하였다. 염기배열은 각각 5'GAAAAAAAAATGACGTCATCCG3' (A, Mw 6,436.2, Tm 64.9°C), 5'AGGAATTCCCAAGCTTGGCA3' (B, Mw 6,107, Tm 68.2°C) 및 5'GAAAAAAAAATGACGTCATCCG-AGGAAT TCCCAAGCTTGGCA3' (A+B, Mw 12,604.2, Tm 83°C)이다.

DNA를 고정하는데 사용하는 아비딘 (Mw 67,000, from white egg)은 Wako Pure Chemical Industries, Ltd.의 것을 사용하였다.

## 2.2 담체 (particles)의 제작

Cover glass 기판 (0.13~0.16mm, 18mm $\times$ 18mm)의 한쪽면은 스피코팅기를 이용하여 500rpm에서 10초, 1,000~4,000rpm에서 20초간으로 회전하면서 (C<sub>4</sub>F<sub>9</sub>)<sub>3</sub>N 용제액으로 0.45~9.0wt-%의 농도로 희석시킨 CPFPL을 피펫으로 100 $\mu$ L 적하시킴으로서 0.5~2.0 $\mu$ m의 두께로 코팅하여 소수성으로 하였다. 그리고, 그 반대면에 텅스텐 보트를 이용한 저항가열형의 소형진공증착장치를 이용하여 크롬을 약 200Å 증착하고, 그 후 진공을 계속 유지하면서 금 (2 $\phi$  $\times$ 500L)을 약 2,000Å 증착하였다. 진공도는 이온진공계이지로 측정하였고, 10<sup>-6</sup>Torr 이하를 유지하였다. 계속해서, cover glass를 점착성의 다이싱테이프에 붙인 후, 다이싱머신을 이용하여 다이아몬드 커터로 0.5mm/s의 속도로 순수를 뿌리면서 100~400 $\mu$ m의 크기로 잘라서 미소담체를 제작하였다. 이 공정에 의하여 1,000~8,000개 정도의 미소담체를 제작할 수 있었다.

## 2.3 DNA의 고정

다음으로 제작된 담체에 대해서, 아비딘을 거쳐 5'말단에 비오틴을 수식한 DNA를 고정하였다. 우선, 아비딘을 완충액 (pH7.9, 10mM Tris-HCl, 0.2M NaCl)으로 0.2mg/mL가 되도록 조제한 1mL 용액에 2시간동안 담귀 놓았다. 아비딘을 수식한 금을 완충액 (pH7.9, 10mM Tris-HCl, 0.2M NaCl)에 비오틴화 DNA를 1

$\mu\text{M}$ 이 되도록 1mL의 용액에 25°C에서 1시간동안 담귀 두었다. 여기서, 비오틴화 DNA 체인은 아비딘 분자의 4개 결합 사이트의 하나와 결합된다. 비오틴화 DNA의 고정량은 DNA 용액에 담귀지는 시간에 의하여 제어되었다.

## 2.4 패턴칩(pattern chip)의 제작

우선, 유리기판 (1.2~1.5mm, 76mm×26mm)의 한 쪽면에 대하여 스프린코팅기를 이용하여 담체의 제작때와 같은 방법으로 소수성으로 처리하였다. 이 위에 크롬과 금을 각각 약 200Å과 2,000Å으로 증착한 후, class 10의 클린룸에서 positive형의 포토레지스트인 OFPR-800을 7~8 방울 떨어뜨려 스프린코팅하고, 오븐중에서 pre-baking 하였다. 그리고, 마스크얼라이너를 이용하여 8초간 노광한 후, 현상액인 NMD-3에 30초간 담귀어 현상하고, 초순수로 2번 세정한 후 질소가스를 붙여 건조시켰다. 이후, post-baking한 후, 금 에칭액 (요화칼륨 40g, 요소 10g, 물 400mL)으로 금을 에칭하고, 현상액 세정과 동일한 과정으로 건조시켰다. 다음으로, 아세톤 세정으로 포토레지스트를 제거한 후, 현상액 세정과 동일한 과정으로 건조시켰다. 계속해서, 크롬에칭액 (수산화나트륨 40g, 페린화칼륨 100g, 물 400mL)으로 크롬을 에칭하고, 현상액 세정과 동일한 과정으로 건조시켰다. 또한,  $2 \times 10^{-5}\text{Torr}$  이하에서 산소플라즈마를 2분간 조사함으로써, CFPF를 에칭시켰다. 다시, 남아 있는 크롬과 금을 모두 에칭시켰다. 이 공정에 의하여 유리기판의 한 쪽면에 친수성 및 소수성 부분으로 나누어 수많은 사이트를 제작할 수 있었다.

## 2.5 DNA칩 마이크로어레이의 제작

패턴칩에 미소담체를 소수성상호작용에 의한 무작위적 중자기조직화법으로 고정화하기 위하여 그림 1과 같이 사례에 패턴칩을 놓고, 현탁액 (suspension, 에탄올 90% + 순수 10%)중에 넣는다. 그리고, 현탁액에 1500~4000개 정도의 미소담체를 넣고 흔들면 그림 1의 확대도와 같이 중력에 의하여 담체가 가라앉으며, 소수성 상호작용에 의하여 패턴칩과 비오틴화 DNA가 수식된 담체의 소수성부분끼리가 무작위로 수많은 사이트에서 결합되어 담체가 고정화되었다.

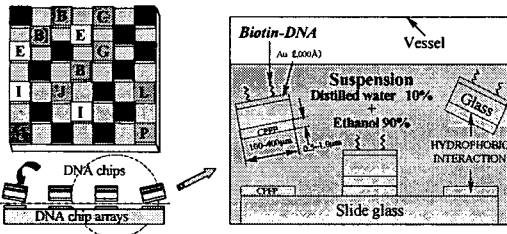


그림 1. DNA칩 마이크로어레이의 제작 공정  
Fig. 1. Production procedure of DNA chip microarray

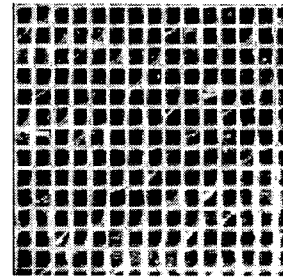
## 2.6 DNA hybridization

본 연구에서 제작한 DNA칩 마이크로어레이에 완충액 (pH7.9, 10mM Tris-HCl, 0.2M NaCl)중에서 FITC 수식한 DNA를 적당한 농도로 30분간 반응시켜 이중나선을 결합시켰다. 이중나선 DNA가 결합되었는가는 암실에서 FITC용 형광필터가 있는 형광현미경 (여기광 : 450~490nm, 흡수광 : 515~565nm, 분광 : 510nm)으로 여기시키면 형광을 확인할 수 있으며, 형광의 밝기에 의하여 농도를 알 수 있다.

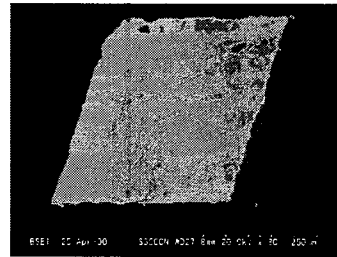
## 3. 결과 및 검토

그림 2 (a)는 디지털카메라로 촬영한 cover glass를

접착성 다이싱테이프에 붙인 후, 다이싱머신으로 400 $\mu\text{m}$ 의 크기로 잘라서 제작한 담체로서, 1,300~4,000개 정도를 제작할 수 있었다. 그림 2 (a)에서 금색 부분은 제작된 담체이고, 흰색부분은 다이싱테이프이다. 다이싱테이프상의 담체는 핀셋 등으로 쉽게 박리될 수 있으므로 DNA칩으로서 활용할 수 있을 것으로 생각된다. 한편, 그림 2 (b)는 180배로 확대한 제작된 담체의 SEM (S-3500, HITACHI) 이미지로서, 가로·세로 모두 깨끗하게 다이싱되어 있다.



(a)



(b)

그림 2. 다이싱 머신을 이용한 담체의 제작  
(a) 다이싱 후 담체  
(b) 비오틴화 DNA의 고정 후 담체의 SEM 이미지  
Fig. 2. Fabrication of particles by using dicing machine  
(a) Particles after dicing  
(b) SEM images of particles after immobilization of biotinylated DNA

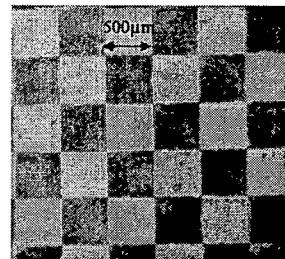


그림 3. 포토리소그래피와 O<sub>2</sub> 플라즈마 처리에 의해 제작된 패턴칩  
Fig. 3. Pattern-chip after etching by processing of photolithography and O<sub>2</sub> plasma

한편, 포토리소그래피 및 산소플라즈마 처리로 에칭한 후 500 $\mu\text{m}$  크기의 패턴칩을 만들었으며 그림 3에 나타내었다. 그림 3에서 검정 부분은 금/CFPF로서, 산소플라즈마 처리에 의하여 친수성 처리되어 있다. 또한, 투명하게 보이는 부분은 CFPF만의 부분으로서 소수성이며,

2,600~67,000개 정도의 친·소수성 부분이 격자상 모양으로 되어 있다. 이 패턴칩은 담체군의 무작위액중자기 조직화법을 이용한 소수성상호작용의 응용이 가능할 것으로 생각된다.

소수성상호작용에 의한 무작위액중자기조직화법을 이용하여 패턴칩 (500 $\mu\text{m}$ )상에 미소담체 (400 $\mu\text{m}$ )를 고정하기 위하여, 아래에 패턴칩을 고정하고 에탄올 90%, 순수 10%의 현탁액을 넣었다. 여기에 1,500~4,000개 정도의 담체를 넣고 흔들면, 수면에 떠있던 담체군이 중력 및 소수성상호작용에 의하여 그림 4와 같이 패턴칩의 소수성 부분에 고정된다. 그림 4에서 대부분의 담체는 패턴칩과 소수성 부분끼리 접하고 있다.

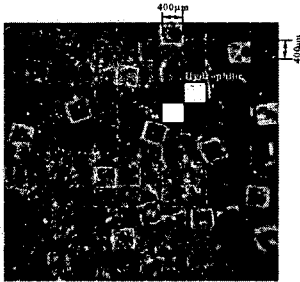


그림 4. 소수성 상호작용에 의해 패턴칩 위에 고정된 담체  
Fig. 4. Particles after immobilization on pattern-chip by hydrophobic interaction

현탁액중에서 화학·생화학적으로 성질이 다른 생체 재료를 고정화한 담체 혼합물을 이용하면, 최종적으로 그림 5 (a)와 같은 다중류의 생체 재료를 고밀도로 고정화한 다항목측정 및 고집적마이크로어레이형 DNA칩을 얻을 수 있었다.

여기에 각종 FITC화 DNA를 차례대로 결합시키고, 형광현미경으로 형광 유무를 확인함으로써, 담체상의 DNA를 확인할 수 있다. 형광현미경으로 2분의 해상도로 본 담체의 형광 결과를 그림 5 (b)~(d)에 나타내었다. 그림 5 (a)에서 원부분이 비오틴화 DNA가 수식된 담체로서, DNA와의 결합이 없으므로 형광을 확인할 수 없다.

그림 5 (b)는 A DNA를 결합시킨 경우로서, 원부분에서만 형광을 볼 수 있으며, 이곳에 A DNA가 고정되어 있음을 알 수 있다. 마찬가지로, 그림 5 (c) 및 (d)에서 그림 5 (b) 이외의 담체에서도 원부분에서 형광을 볼 수 있었으며, 이곳에 B 및 A+B DNA가 고정되어 있음을 알 수 있다. 이 결과를 수만의 DNA종에 확대하면, 간단, 신속, 안정성 등이 뛰어난 다항목측정 및 고집적 마이크로어레이형 DNA칩으로서 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

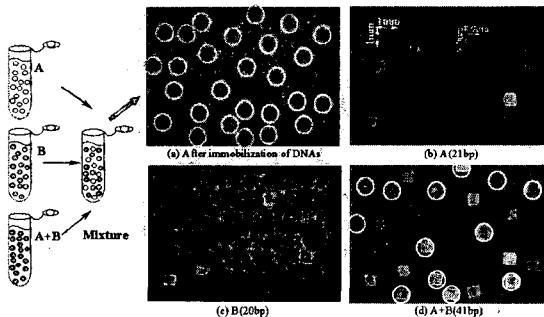


그림 5. DNA칩 마이크로어레이와 형광 특성  
Fig. 5 DNA chip microarray and fluorescence

#### 4. 결 론

본 연구에서는 후막용 CFP를 이용하여 제작한 소수성막을 갖는 패턴칩에, 다이싱에 의하여 얻은 미소담체에 DNA를 고정화하고, 현탁액중에서 소수성상호작용에 의한 무작위액중자기조직화법을 이용하여 임의의 위치에 배치할 수 있었다.

또한, 본 연구에서 나타난 새로운 생체재료 고정화 방법은 배치 직후 어느 재료가 어디에 배치되어 있는가의 정보는 없으나, 생체재료 그 자체의 응답을 이용한 캘리브레이션 등에 의하여 최종적인 위치를 확인하거나, 형광체의 종류, 담체의 크기 및 종류, 담체에 각인을 하는 등의 방법을 이용하면 해결할 수 있을 것으로 기대한다.

#### 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 지정 동아대학교 지능형통합항만관리연구센터의 지원에 의해서 수행되었기에 감사드립니다.

#### [참 고 문 헌]

- [1] P. O. Brown *et al.*, "Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray", *Science*, Vol.270, pp.467-470, 1995
- [2] Marshall A., Hodgson J., "DNA chips: an array of possibilities", *Nature Biotech.*, **16**, pp.27-31, 1998
- [3] Ramsay G., "DNA chips: state-of-the art", *Nature Biotech.*, **16**, pp.40-44, 1998
- [4] Editorial, "Getting hip to the chip", *Nature Genet.*, **18**, pp.195-197, 1998
- [5] Chee M., Yang R., Hubbell E., Bernon A., Huang X. C., Stern D., Winkler J., Lockheart D. J., Morris M. S., Fodor S. P. A., "Accessing Genetic Information with High-Density DNA Arrays", *Science*, **274**, pp.610-614, 1996