

전기화학적 바이오칩의 개발에 관한 연구

최 용성, 권 영수**, 박 대희*

*원광대학교 전기전자및정보공학부, **동아대학교 전기전자및컴퓨터공학부

A Study on the Development of Electrochemical Biochip

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

*School of Electrical, Electrical and Information Engineering, Wonkwang University

Abstract - This research aims to develop the multi-channel type label-free DNA chip that has the above characteristics and be able to solve the problems. At first, we fabricated a high integrated type DNA chip array by lithography technology. It is able to detect a various genes electrochemically after immobilization of a various probe DNA and hybridization of label-free target DNA on the electrodes simultaneously.

1. 서 론

바이오칩은 질병의 판정·예방을 목적으로 한 유전자 진단을 추진하고, 생물의 유전자다형 (SNP)에 관한 각종 지식을 가져올 것으로 기대된다[1~5]. 종래의 형광검출형 바이오칩을 사용하여 대상 유전자의 발현을 해석하기 위해서는 수만개의 유전자 단편을 준비하여 기판상에 고밀도로 배치시킬 필요가 있으나, 제조장치와 해석장치가 고가이므로, 일부 연구기관이나 병원에서 밖에 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.

본 연구에서는 이와 같은 전기화학적 바이오칩 시스템 구축의 일단계로서 assay plate상의 probe DNA와 target DNA를 식별하는 것, 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. 실험방법

2.1 시약

5'에 SH기가 수식된 5'-HS-AGGCTGCTCCCCCGTGGCC-3'의 염기배열을 갖는 SH-p72, 5'-HS-AAGCTGTCCCCCGTGGCC-3'의 염기배열을 갖는 SH-m72 및 5'-HS-AGGCTGCTCCCCGC GTGGCC-3'의 염기배열을 갖는 SH-R72이 사용되었다. 그리고, 이들 probeDNA와 상호적인 target DNA [p72; 3'-TCCGACGAGGGGGGCACCGG-SH-5', m72; 3'-TTTCGACGAGGGGGGCACCGG-5' 및 R72; 3'-TCCGACGAGGGGGGCACCGG

-5']를 합성하고 정제하여 5.0μM의 농도로 하여 사용하였다. 합성된 DNA는 TE버퍼 (10mmol/L Tris-HCl pH8.0, 1mmol/L EDTA pH8.0)에 보존하였다. 기관의 세척은 초순수 및 특급아세톤·에탄올 (Wako Pure Chemical Co., Inc.) 또는 전자공업용 아세톤 (Kanto Chemical Co., Inc.)을 사용하였다. 포토리소그라픽에 사용한 포토디브롬 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

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 스핀코팅하여 건조시킨 후, 포토마스크를 통하여 UV를 조사하였다. 그리고, 현상액 및 순수로 현상하여, 직경 700μm의 working전극, 절연된 리드부분 및 패드부를 갖는 8채널의 미소전극형 DNA칩어레이를 얻었다.

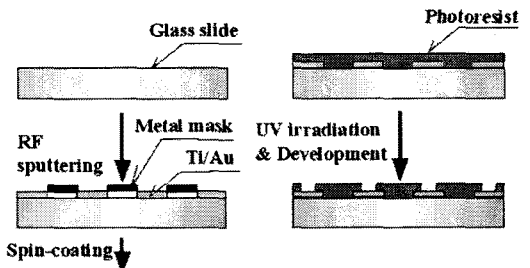


Figure 1. Fabrication process of microelectrode array for DNA chip.

2.3 probe DNA의 고정화 및 target DNA의 hybridization

그림 2는 전기화학적 반응에 의한 미소전극 DNA칩의 원리를 나타내고 있다. probe DNA의 고정에는 마이크로 피펫을 사용하여 금전극에 5.0μM, 1.0μl의 용액을 스폿하여 25℃에서 2시간동안 반응시켜 고정화시켰다. 고정화반응 후, 순수로 금전극을 세척하여 비특이적으로 결합한 probe DNA를 제거하였다.

hybridization 버퍼로서 Tris-HCl를 조제하여 사용하였다. 1aM~50μM 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.

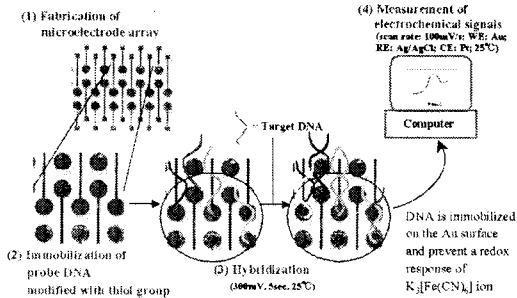


Figure 2. Principle of microelectronic DNA chip array using electrochemical response.

2.3 전기화학적 측정

전기화학적 측정에는 CHH의 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 황산용액으로 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 5회제CV의 산화·환원값을 피크값으로 하였다.

3. 결과 및 검토

3.1 미소전극형 DNA칩어레이

그림 3은 제작된 미소전극형 DNA칩어레이를 나타낸다. DNA칩어레이는 유리기판상에 SUS금속마스크를 통해 Ti과 Au를 스퍼터링증착하고, SU-8을 스퀴모팅한 후, photo-lithography로 에칭하였다. 금전극의 직경은 700 μ m이며, 리드선은 레지스트로 절연되어 있으며, 각각의 패드를 potentiostat에 연결하여 전기화학적 측정을 실시할 수 있다. 금전극은 8개의 채널을 형성한다.

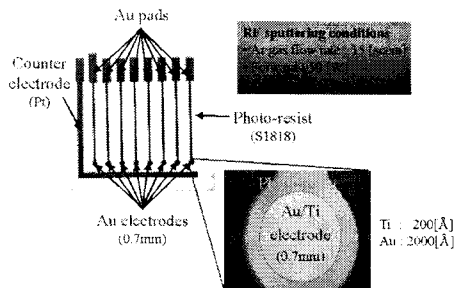


Figure 3. 8 channel biochip array.

3.2 전기화학적 유전자 검출

그림 4는 bare 금전극에 probe DNA를 고정화하고, target DNA를 hybridization시켰을 때, ferricyanide용액의 산화·환원피크의 변화를 측정된 결과이다. 그림 4 (a)는 SH-p72의 probe DNA를 고정화하고, 이의 target DNA (p72)를 hybridization시켰을 때, ferricyanide용액의 산화·환원피크의 변화를 측정된 결과이다. 그림 4 (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 고정화되어 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 측정된 결과를 그림 4 (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 4 (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.

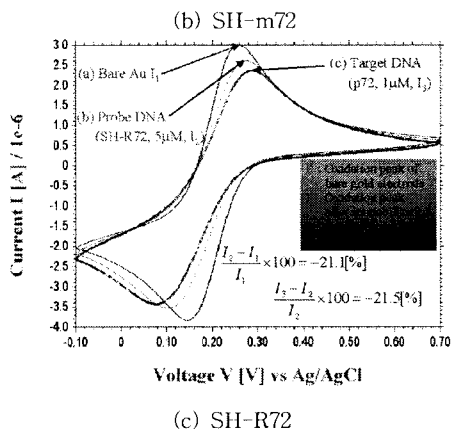
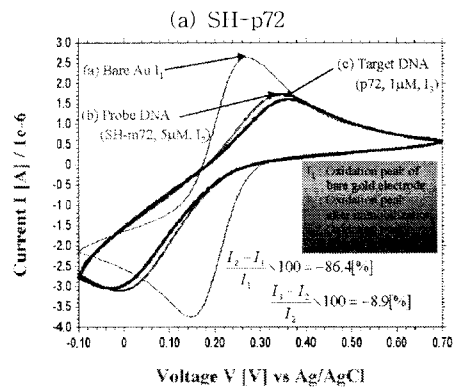
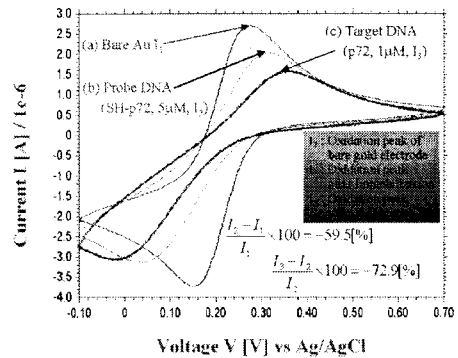


Figure 4. Cyclic-voltammograms of 5mM ferri-cyanide in 100mM KCl at 100mV/s using a bare gold, probe-modified electrode and after hybridization with target DNA.

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

4. 결 론

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

감사의 글

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

[참 고 문 헌]

- [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*, Vol.251, pp.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*, Vol.364, pp.555-556, 1993.
- [3] Emil Palecek, Miroalav Fojta, Miroslav Tomschik, Joseph Wang, "Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage", *Biosensors & Bioelectronics*, Vol.13, pp.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.*, Vol.117, pp.8933-8938, 1995.
- [5] M.I. Pividori, A. Merkoçi, S. Alegret, "Electrochemical genosensor design: immobilization of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods", *Biosensors & Bioelectronics*, Vol.15, pp.291-303, 2000.