

미소전극어레이형 DNA칩을 이용한 유전자의 전기화학적 검출

최 용성, 박 대희
원광대학교

Electrochemical Detection of Genes Using Microelectrode Array DNA Chip

Yong-Sung Choi and Dae-Hee Park
Wonkwang University

Abstract - In this paper, a DNA chip with a microelectrode array was fabricated using microfabrication technology. Several probe DNAs consisting of mercaptohexyl moiety at their 5' end were immobilized on the gold electrodes by DNA arrayer. Then target DNAs were hybridized and reacted with Hoechst 33258, which is a DNA minor groove binder and electrochemically active dye. Linear sweep voltammetry or cyclic voltammetry showed a difference between target DNA and control DNA in the anodic peak current values. It was derived from Hoechst 33258 concentrated at the electrode surface through association with formed hybrid. It suggested that this DNA chip could recognize the sequence specific genes.

1. 서 론

DNA칩은 복수의 유전자를 동시에 해석하는 수단으로서 개발되었다. 유전학의 진보에 의하여 유전병이나 암과 같은 유전자가 직접 관여하는 유전자 질병에 한정되지 않고, 고혈압이나 당뇨병 등의 생활습관병에 대해서도 유전자가 영향하여 발병됨이 밝혀지고 있다 [1]. 이때문에, 질병에 관여하는 유전자의 해석은 병의 조기발견·조기치료를 하는데 매우 중요하다. 아직 윤리적으로 해결해야 할 문제는 남아있으나, 급후 유전자 진단에의 기대는 높아지고 있다. 또한, 유전자다형, 특히 일염기치환다형 (Single Nucleotide Polymorphism : SNP)의 해석은 생물종 개체간의 다양성을 고찰하는데 도움이 되며, 계통학·분류학에 중요한 지식을 줄 것이다.

DNA의 고정화 담체로서 니트로셀룰로스막 등의 막필터, 실리콘기판, 유리기판, 고분자, 전극 등 여러 가지의 것이 이용되고 있으며, 또한 DNA를 기판상에 배치시키는 방법이 다양하게 사용하는 장치도 다양하다 [2-4]. 현재, 주류가 되어 있는 DNA칩은 배열이 다른 다수의 유전자 단편 주형을 기판상에 정렬·고정화하고 있다. 형광표식한 표적 유전자 (target DNA)를 칩상에서 반응시키면, 서로 상호적인 유전자만이 double strand (ds) DNA (ds-DNA)를 형성하므로, 그 부분의 형광강도를 측정함으로써 유전자 기능의 해석이나 질환에 관여하는 유전자를 검출한다 [3-7].

한편, 최근에는 표적 유전자의 검출을 형광측정이 아닌 전기화학적 측정에 의하여 검출하려는 목적으로 전기화학적 DNA센서의 연구도 이루어지고 있다. 전기화학적 측정은 형광측정에 비하여 검출 시스템의 저코스트화, 조작의 간편성의 향상, 휴대화 등이 가능하기 때문이다.

전기화학적 DNA센서의 연구로서는 DNA 분자의 남색 산화전류값에 주목하여 single strand (ss) DNA (ss-DNA)를 식별한 보고 [8]나, 수정전동자를 이용하여 DNA센서를 개발한 보고 [9]가 있으나, 가장 많이 연구되고 있는 것은 intercalator를 이용한 전기화학적 DNA

센서이다. 전기화학적 DNA센서에 이용되는 intercalator로서 금속착체화합물을 이용한 연구로서, Wang [10] 등은 카본페이스트 전극상에 probe DNA를 흡착 고정하고, 검출 마커로서 Co(phen)_3^{3+} 를 이용하여 에이즈 바이러스 (human immunodeficiency virus : HIV) 유전자의 일부를 검출하였다. Thorp [11] 등은 검출 마커로서 Ru(bpy)_3^{2+} (bpy=2,2'-bipyridine)와 Os(bpy)_3^{2+} 와 같은 intercalator를 이용하여, 염기쌍의 조합을 인식할 수 있는 1염기 mismatch 검출을 가능하게 하였다.

집적화된 전극의 전기화학적 측정을 할 때 필요한 미소전극어레이의 제작 방법으로서 가장 유효한 것이 반도체제조기술의 하나인 photofabrication 기술을 이용한 것으로서, 이것은 photo-lithography 기술, 증착기술, 에칭 기술 등을 조합시킨 것이다. photofabrication 기술은 이미 IC나 LSI의 제조기술로서 확립되어 있어, 종래의 DNA칩과 같이 소형화나 제조고정의 자동화가 가능하므로, 칩의 대량생산이나 저코스트화가 가능하다.

따라서, 본 논문에서는 형광검출형 DNA칩과 비교하여 간편성, 휴대성, 개발코스트의 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 실험 방법

2.1 시 약

probe DNA로 사용한 올리고뉴클레오타이드는 국제시약바이오사업부에 합성을 위탁하여, 5' 말단을 mercaptohexyl기를 수식한 것을 이용하였다. DNA 어레이에 의하여 spot된 어레이상을 DNA 마이크로 어레이 스캐너를 이용하여 해석하기 위하여 Cy3 또는 Cy5로 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-mercaptohexyl (Aldrich)을 초순수로 ImM로 조제하여 이용하였다. 전극상에 probe DNA의 고정화를 전기화학적으로 확인하기 위하여 5mM ferricyanide/ferrocyanide를 이용하였다. 유전자 검출을 위한 검출 마커 (DNA minor groove binder)로서 2'-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazole trihydrochloride (Hoechst 33258)을 사용하였다. Hoechst 33258은 intercalator가 아니지만, ds-DNA의 A-T 염기쌍에 대해서 선택적으로 결합하는 성질이 있는 물질로서, 핵 염색을 위한 형광색소로 사용

되고 있다. hybridization 버퍼로서 5×SSC (standard saline citrate 또는 saline sodium citrate) 용액 (3M 염화나트륨, 0.3M 쿠엔산나트륨, (Wako Pure Chemicals, Ltd.))을 조제하여 이용하였다. hybridization용 세척액으로서 10% SDS (도데실황산나트륨, (Wako Pure Chemicals, Ltd.)) 용액을 조제하여 이용하였다.

2.2 미소전극어레이형 DNA칩의 제작

칩 기판은 slide glass (Matsunami, 76mm×27mm, 두께 1.2~1.5mm) 또는 베이크판 (Sunhayato, 두께 10mm)을 적당 크기로 절단하여 세척한 후, 초순수에서 15분, 아세톤에서 15분, 초순수에서 15분의 순으로 초음파 세척하였다. 금전극은 진공증착 장치를 사용하여 약 10^{-6} Torr의 진공상태에서 기판상에 집착층으로서 크롬을 약 200Å 증착하고, 계속하여 이 위에 금을 약 2000Å 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, 현상·에칭하여 미소전극어레이를 제작하였다. 리드선 부분을 피복하기 위하여 다시 positive형 OFPR 800을 도포하고 오븐에서 가열한 후, 별개의 마스크패턴을 사용하여 노광·현상하고, 전극부분 및 외부접속 전극 (커넥터) 부분을 노출시켰다.

2.3 probe DNA의 고정화

본 논문에서는 바이러스성 질환을 검출하기 위한 DNA 칩을 개발하는 것을 최종 목적으로 하고 있으므로, 바이러스 유전자에 특유한 염기배열을 사용하였다. 본 논문에서 사용된 probe DNA (HIV SK38) 및 target DNA는 4 종류로서, 올리고뉴클레오타이드중에서 같은 종류의 probe DNA와 target DNA는 서로 상보적인 염기배열을 갖고 있으며, 배열이 다른 유전자를 control DNA (HIV SK39)로 하여 사용하였다.

금 전극 표면의 전처리로서 3N H₂SO₄ 용액을 전극상에 적하하여 30분 방치하였다. 금 전극을 초순수로 세척한 후, 마이크로피펫 또는 DNA어레이를 사용하여 티올기를 수식한 probe DNA 용액을 전극상에 스코트하고, 10°C에서 12시간 반응시켜 금 전극상에 probe DNA를 고정화하였다. 고정화 반응후, 초순수로 전극을 세척하고, 비특이적으로 결합하여 있는 DNA를 제거한 후, N₂로 건조시켰다.

다시 비특이적으로 결합하여 있는 probe DNA를 충분히 제거하여 hybridization의 효율을 향상시키기 위하여, 금 전극상에 1mM 6-mercaptohexanol (MCH) 용액을 적하하여 1시간 반응시켰다. 이 MCH 처리에 의하여 금 표면에는 황과의 화학적 친화력에 의하여 특이적으로 probe DNA 분자가 고정화되어 있으나, 통상은 비특이적 결합도 일어난다. 따라서, 금 표면에서 자기조직화단분자막 (self-assembly monolayer : SAM)을 형성하는 MCH로 처리하면 비특이적 probe DNA 분자를 치환해서 제거한다. probe DNA에 상보적인 target DNA를 반응시키면, 효율이 높아져 ds-DNA가 형성되며, background 전류를 저감할 수 있다. 본 논문에서는 이와 같은 방법으로 유전자검출의 고감도화를 도모하였다.

2.4 전기화학측정

전기화학측정은 3전극법으로 하였다. 참조전극으로서 은/염화은 전극을 사용하였고, 비교전극을 사용하여 비교하였으며 전위차가 ±1mV 이내인 것을 확인하고 사용하였다. counter 전극으로는 백금선을 사용하였다. 측정시에는 DNA칩의 끝에 있는 외부접속전극부분을 커넥터에 삽입하여 전기화학측정장치(BAS, CV-50W)에 접

속하여 사용하였으며, GPIB인터페이스로 접속한 PC에 의하여 제어하고 정전 차폐된 환경에서 측정하였다. 전기화학측정법으로서는 cyclic-voltammetry (CV) 또는 linear sweep voltammetry (LSV)에 의하여 측정하였다.

Hoechst 33258 물질을 포함하는 용액중에서 CV를 하면 550mV 부근의 전위에서 산화반응을 일으키므로, 이 산화전류를 측정하여 ss-DNA와 ds-DNA를 식별할 수 있다. 본 논문에서는 probe DNA의 5' 말단을 티올기 (-CH₂)₆SH로 수식하고, 황과 금의 결합을 이용하여 금 전극상에 고정화하였다. target DNA를 반응시켜서 유전자 hybrid 생성물을 형성시킨 후, Hoechst 33258을 반응시켰다. linear sweep voltammetry (LSV)에 의하여 Hoechst 33258 유래의 전기신호를 측정하여 산화전류값의 차이로부터 ss-DNA와 ds-DNA를 식별할 수 있었다.

3. 결과 및 검토

3.1 고정화 농도의 최적화

1, 10, 100nM, 1μM의 각 probe DNA (HIV SK38 probe) 용액을 각각 별개의 전극상에 스코트하여 고정화한 후, probe DNA의 배열에 상보적인 배열을 갖는 target DNA (HIV SK38 target)를 37°C에서 1시간 hybridization시켰다. 그 후, 100μM Hoechst 33258 수용액을 실온·암실에서 10분간 방응시켜 세척하고, 전기화학측정 (LSV)을 하였다. 측정은 모두 0.2M 인산 버퍼중에서 하였으며, 소인속도 100mV/s과 300~800mV에서 소인하였다. 그림 1과 같이 1, 10, 100nM, 1μM의 probe DNA를 전극상에 고정화한 경우는 농도가 증가함에 따라 Hoechst 33258 유래의 산화전류 피크도 상승하였으나, 1μM의 probe DNA를 고정화하였을 때는 산화전류 피크가 100nM일 때보다도 감소하였다. 이와 같은 결과에 기인한 원인으로 과잉량의 probe DNA가 고정되어 probe DNA층이 두껍게 되어 Hoechst 33258의 산화반응이 발생하기 어려운 상태가 되었다고 생각된다. 이 결과로부터 probe DNA가 전극 표면에 고정화되어 있음을 확인할 수 있으므로 이후 동일 반응조건으로 전극상에 probe DNA의 고정화를 할 것이다.

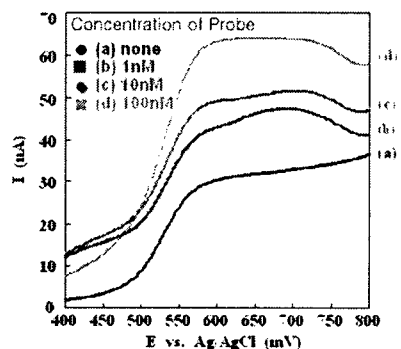


그림 1. Probe DNA의 고정화후 Hoechst 33258의 LSV. Fig. 1. Linear sweep voltammogram of Hoechst 33258 after immobilization of probe DNA.

3.2 복수 유전자의 동시검출

칩의 각 미소전극상에 100nM의 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 5에 나타내었다.

그림 2에 나타내었듯이, 약 450mV 부근에서부터 양자의 산화전류값에 차이가 발생하기 시작하며, 550~600mV의 범위내에서 그 차이가 가장 크게 되었다. 이

결과는 다음의 요인에 의한 것으로 추측된다. probe DNA에 상보적인 배열이 아닌 콘트롤 DNA를 반응시킨 경우, hybridization 반응은 거의 발생하지 않으므로 전극상에서는 거의 ss-DNA (probe DNA)만이 존재하는 상태가 되는 것으로 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. 이것의 원인으로서는 이 전위 부근에서 background 전류 자체가 증가하는 것으로 생각된다. 이 background 전류는 금 전극표면의 전기용량에 의한 것으로 생각되며, LSV 측정을 할 때에 반드시 발생하는 것이다. 또 하나의 원인으로서는, Hoechst 33258의 이따다 줄환이 부분적으로 정전하를 띠므로 DNA의 인산기의 부전하와 정전기적으로 결합하여 ss-DNA의 상태로 어느 정도 Hoechst 33258이 결합한 것으로 생각된다. 이것은 정전기적인 결합의 영향을 미치지 않도록 반응조건을 설정하거나, ds-DNA에 의하여 특이적으로 결합하는 검출 마커를 개발하여 해결할 수 있는 문제이다.

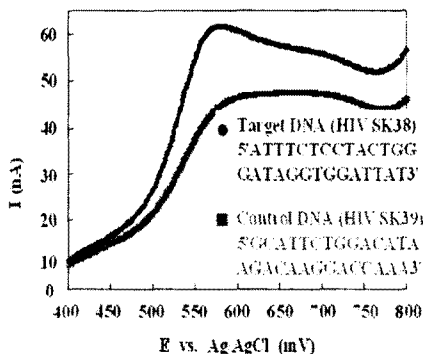


그림 2. Target DNA와 mismatched DNA의 반응 후 Hoechst 33258의 LSV.

Fig. 2. Linear sweep voltammogram of Hoechst 33258 after hybridization with target DNA and mismatched DNA.

4. 결 론

본 논문에서는 간편성, 휴대성, 개발코스트의 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) probe DNA의 고정화 농도에 대해서 검토하여 최적의 probe DNA의 농도는 100nM이었다.

- 3) probe DNA (HIV SK38 probe)에 다른 염기배열을 갖는 target DNA (HIV SK38 target) 또는 콘트롤 DNA (HIV SK39 target)를 반응시켜, LSV를 측정 한 결과, 양자의 산화전류값에 차이가 발생하여, target DNA를 전기화학적으로 검출할 수 있었다.

감사의 글

“이 논문은 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), pp.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.
- [10] E. Palecek, M. Fojta, M. Tomschik, J. Wang, “Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage”, *Biosens & Bioelectron*, **13**, pp.621-628, 1998.
- [11] 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.*, **117**, pp.8933-8938, 1995.