

## DNA칩을 이용한 SNP의 검출

최 용성, 문종대, 이 경섭  
동신대학교 전기공학과

### SNP Detection Using DNA Chip

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

**Abstract** - This research aims to develop the multiple channel electrochemical DNA chip that has the above characteristic and be able to solve the problems. At first, we fabricated a high integration type DNA chip array by lithography technology. It is able to detect a plural genes electrochemically after immobilization of a plural probe DNA and hybridization of non-labeling target DNA on the electrodes simultaneously. 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

바이오센서는 생체재료가 갖는 매우 우수한 분자인식능력을 이용하여 화학물질의 농도를 측정하는 센서이다. 원리적으로는 바이오센서의 채널수를 늘리고 집적형으로 함으로써, 측정대상물질의 종류를 증가시킬 수 있다. 바이오센서로서 DNA, 효소, 항체, 펩타이드 등의 생체분자는 독자의 특이적 분자 인식능을 갖고 있으며, 최근 바이오센서에의 응용이 활발히 시도되고 있다. 지금까지 다양한 바이오센서가 개발되어 왔으나, 그 기본 구성은 신호변환기(트랜스듀서)와 각종 생물소자를 조합시킨 것이다. 거의 모든 생명체는 유전자정보인 DNA를 갖고 있다. 이 DNA를 생물소자로 이용한 바이오센서는 DNA센서, 특히 집적화된 것은 DNA칩 또는 DNA마이크로어레이라고 한다. 최근, 인체의 설계도인 인간게놈을 중심으로 한 생물의 유전자 구조해석은 전세계적으로 신속히 전개되고 있으며, DNA칩은 이 유전자의 기능을 신속히 해명하는 수단으로서 기대되고 있다.

형광표식한 표적 유전자(target DNA)를 칩상에서 반응시키면, 서로 상호적인 유전자만 double strand(ds) DNA(ds-DNA)를 형성하므로, 그 부분의 형광강도를 측정함으로써 유전자 기능의 해석이나 질환에 관여하는 유전자를 검출한다 [1-5]. 형광검출형 DNA칩의 큰 특징은 미리 Rhodamine, Cy3, Cy5 등과 같은 형광색소로 표적 유전자를 표식하는데 있다. 이 표식된 유전자를 칩상에서 반응시킨 표적 유전자에 상호적인 배열을 갖는 probe DNA만이 결합(hybridization)하고, 유전자 hybrid(ds DNA)를 형성한다. 이 유전자 hybrid가 형성된 장소만이 칩상에서 형광신호를 발현하므로, 이것을 공초점 레이저 현미경 등을 탑재한 해석장치로 측정한다. 형광신호의 강도를 해석함으로써 질환의 원인이 되는 유전자를 신속히 알 수 있다. 그러나, 수만개의 유전자 단편을 준비하여 기판상에 고밀도로 배치시켜야 하지만, 조작장치나 해석장치에 코스트가 필요하여 일부 연구기관이나 병원에서만 사용되고 있다.

전기화학적 DNA센서의 연구로서는 DNA 분자의 당쇄 산화전류 값에 주목하여 single strand(ss) DNA(ss-DNA)를 식별한 보고 [6]나, 수정전동자를 이용하여 DNA센서를 개발한 보고 [7]가 있으나, 가장 많이 연구되고 있는 것은 intercalator를 이용한 전기화학적 DNA센서이다. 전기화학적 DNA센서에 이용되는 intercalator로서 금속착체화합물을 이용한 연구로서, Wang [18, 9] 등은 카본페이스트 전극상에 probe DNA를 흡착 고정하고, 검출 마커로서 Co(phen)<sub>3</sub><sup>3+</sup>를 이용하여 에이즈 바이러스(human immunodeficiency virus : HIV) 유전자의 일부를 검출하였다. Co(phen)<sub>3</sub><sup>3+</sup>(phen=phenanthroline)의 전기화학 측정법으로서 chrono-potentiometric stripping analysis(PSA)를 이용하였으며, 1.35ng/50 $\mu$ l의 유전자를 검출하였으며, 감도적으로는 상당히 낮다. Thorp [10, 11] 등은 검출 마커로서 Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>(bpy=2,2'-bipyridine)와 Os(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>와 같은 intercalator를 이용하여, 염기쌍의 조합을 인식할 수 있는 1염기 mismatch 검출을 가능하게 하였다.

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, 복

수의 유전자를 동시에 검출하였다. 그리고, 최종적으로 제작된 DNA칩을 이용하여, 신속 및 간편한 임상유전자검출에 응용하는 것을 목적으로 하였다.

## 2. 시료 및 실험 방법

### 2.1 전극제작, DNA고정화 장치 및 평가 장치

기판상에 금속박막을 증착하기 위하여 터버식 진공증착장치(SANYU, SVC-700 TURBO-TM) 및 박막두께 측정장치(일본전자, JTM200R)를 사용하였다. photofabrication을 위한 장치로서 레지스트를 도포하기 위하여 스펀코터(MIKAS, Si-DX), 베이킹을 위하여 오븐(YAMATO, DK300), 노광하기 위한 UV-크얼라이너(Karl Suss, MUB3)를 사용하였다. 제작된 미소전극어레이의 형상관찰에는 고정밀디지털마이크로현미경(KEYENCE, VH-6300) 및 실체현미경(Leica, MZFLIH)을 사용하였다. probe DNA를 어레이상에 고정화하기 위하여 Stanford대학의 Brown 등이 개발한 DNA어레이 시스템을 사용하여, PC(HewlettPackard Vectra VE)에 의하여 제어하였다. DNA 어레이를 사용하여 slide glass상에 spot한 형광색소의 관찰에는 DNA 마이크로스캐너(Axon, GenePix4000A)를 사용하여 PC(intermediate IMC-DIANA)에 의하여 제어하였다. probe DNA의 고정화 반응의 확인에는 형광현미경/냉각CCD카메라를 이용하였으며, 형광현미경은 ZEISS사의 Axiovert 135, 냉각CCD카메라는 Photometrics사의 Model CH1을 사용하였다.

### 2.2 probe DNA의 고정화

본 논문에서는 바이러스성 질환을 검출하기 위한 DNA칩을 개발하는 것을 최종 목적으로 하고 있으므로, 바이러스 유전자에 특유한 염기배열을 사용하였다. 본 논문에서 probe DNA(HIV SK38: 5'-ATTCTCTACTgggATAggTggATTAT-3', HIV SK39: 5'-gCATTCTggACATAAACAAG ACCAAA-3') 및 target DNA(target DNA: 5'-C CCCCCCTCCCGgAgGCCA TAGTTggT-3', 1 mismatched DNA: 5'-CCCCCCTCCCGgAAAAGCCATAgTTgg T-3')이다. 사용된 올리고뉴클레오타이드중에서 같은 종류의 probe DNA와 target DNA는 서로 상보적인 염기배열을 갖고 있으며, 배열이 다른 유전자를 control DNA(HIV SK39)로 하여 사용하였다. 여기서, -SH는 probe DNA의 5' 말단이 티올기에 의하여 수식되어 있음을 의미한다. 또한, 그림 2는 HIV, HCV의 유전자 구성도에서 본 연구에서 사용한 올리고뉴클레오타이드의 위치를 나타내고 있다. 이들 올리고뉴클레오타이드를 TE 버퍼(pH8.0)를 적당한 가하여 희석하고, 각 농도의 probe DNA 용액을 조제하였다.

금 전극 표면의 전처리로서 3N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액을 전극상에 적하하여 30분 방치하였다. 금 전극을 초순수로 세척한 후, 마이크로피펫 또는 DNA 어레이를 사용하여 티올기를 수식한 probe DNA 용액을 전극상에 스푼하고, 10 $^{\circ}$ C에서 12시간 반응시켜 금 전극상에 probe DNA를 고정화하였다. DNA 어레이를 사용하여 probe DNA를 스푼할 경우, 통상은 스푼직경을 작게 하기 위하여 가는 슬릿가든 프린팅(type 1)을 사용한다. 그러나, 전극표면이 크므로 스푼직경도 크게 할 필요가 있으므로 슬릿이 두꺼운 프린팅(type 2)을 사용하였고, 침관을 연마하여 스푼직경을 크게(type 3) 하였다. 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-mercaptophexanol(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 자기조직화분자막(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.

### 2.3 Hybridization

반응 버퍼는 2×SSC 용액을 사용하였다. 반응에 대한 반응에서 특히 기술하지 않는 경우는 온도 37 ℃에서 1시간 반응시켰다. 칩의 세척방법으로는 2×SSC 용액에 0.1 % SDS를 가한 용액, 2×SSC 용액에 0.01 % SDS를 가한 용액, 2×SSC 용액을 계속해서 세척하여 N<sub>2</sub>로 건조시켰다. Intercalator는 100 μM Hoechst 33258 용액을 실온 암실에서 5분 반응시켜 초순수로 세척하고, N<sub>2</sub>로 건조시켰다.

### 2.4 형광현미경 관찰

probe DNA (HIV SK38 probe)의 3' 말단을 FITC 수식한 probe DNA (HIV SK38 probe-FITC)를 이용하였다. 2.4와 같은 방법으로 probe DNA를 전극상에 고정화하고 세척하였다. 세척 전후에서 형광현미경/냉각CCD카메라를 사용하여 전극상에서 발생하는 형광신호를 관찰하였다. 또한, 얻어진 형광신호의 화상해석을 하여 세척 전후에 있어서 형광강도의 차이, 즉 probe DNA의 고정화량을 비교하였다.

## 3. 결과 및 검토

### 3.1 DNA칩의 제작

제작된 미세전극어레이형 DNA칩을 그림 1에 나타내었다. 미세전극의 면적은 200×200 μm<sup>2</sup>이며, 32개의 전극을 병렬시켰다. 본 논문에서는 복수의 유전자를 동시에 검출하기 위하여, 리드선을 각 커넥터에 납땜하여 접착하는 복잡한 공정을 생략하고, 간단히 전기화학측정을 할 수 있는 카트리지형 DNA칩을 설계하였다. 보통은 기판으로서 베이크판과 같은 수지를 사용하지만, 실제 제작한 결과, 수지 표면이 약간의 요철이 있으므로, 리드선 부분에 단선이 많이 있었다. 슬라이드 유리를 기판으로 하여 사용한 경우는 거의 단선이 발생하지 않았으므로, 슬라이드 유리를 기판으로 사용하였다.

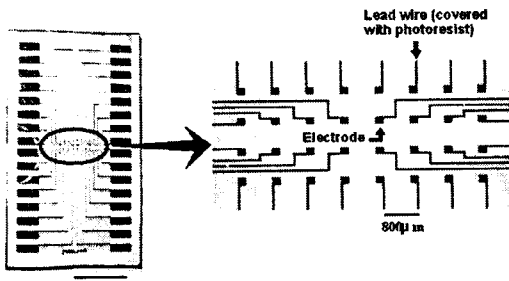


그림 1. 32채널 미세전극어레이.  
Fig. 1. 32 channels microelectrode array.

### 3.3 probe DNA 고정화의 확인

형광현미경/냉각CCD카메라를 사용하여 전극상에서 발생하는 Hoechst 33258 유래의 형광신호를 관찰한 결과를 그림 2에 나타내었다. probe DNA를 수식하지 않은 전극에서는 형광이 관찰되지 않았으나, 수식한 전극은 반점상으로 Hoechst 33258 유래의 형광신호가 관찰되었으며, probe DNA가 고정화되어 있음이 확인되었다.

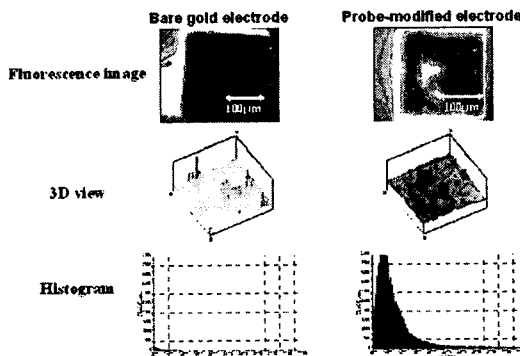


그림 2. 전극상에서 hybridization후의 Hoechst 33258의 형광 이미지.  
Fig. 2. Fluorescence image of Hoechst 33258 after hybridization on the electrode.

### 3.3 고정화 농도의 최적화

1, 10, 100 nM 및 1 μM의 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 ℃에서 1시간 hybridization시켰다. 그 후, 100 μM Hoechst 33258 수

용액을 실온 암실에서 10분간 반응시켜 세척하고, 전기화학측정 (LSV)을 하였다. 측정은 모두 0.2 M 인산 버퍼중에서 하였으며, 소인속도 100 mV/s와 300-800 mV에서 소인하였다. 그림 3과 같이 1, 10, 100 nM 및 1 μM의 probe DNA를 전극상에 고정화한 경우는 농도가 증가함에 따라 Hoechst 33258 유래의 산화전류 피크도 상승하였으나, 1 μM의 probe DNA를 고정화하였을 때는 산화전류 피크가 100 nM일 때보다도 감소하였다. 이와 같은 결과에 기인한 원인으로서 과잉량의 probe DNA가 고정화되어 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.

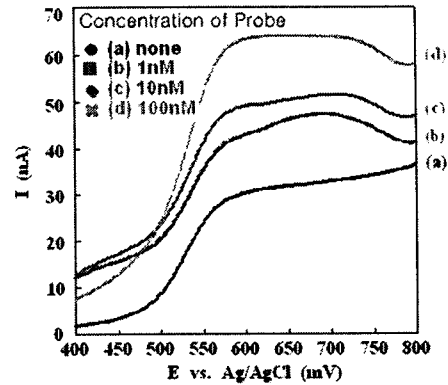


그림 3. Probe DNA의 고정화후 Hoechst 33258의 LSV.  
Fig. 3. Linear sweep voltammogram of Hoechst 33258 after immobilization of probe DNA.

### 3.4 1염기 mismatched DNA의 검출

칩의 각 미세전극상에 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 4에 나타내었다. 그림 4에 나타내었듯이, 약 450 mV 부근에서부터 양자의 산화전류값에 차이가 발생하기 시작하며, 550/600 mV의 범위내에서 그 차이가 가장 크게 되었다. 이 결과는 3.5절에서 설명한 것과 같이, 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.

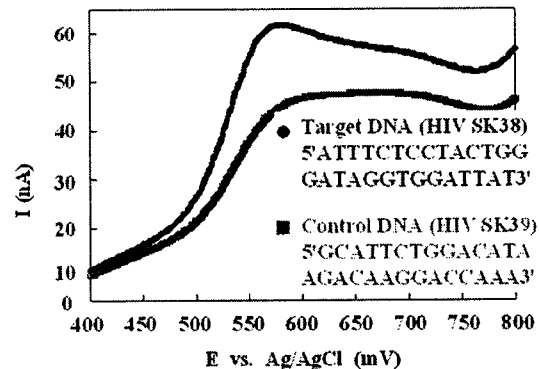


그림 4. Target DNA와 1염기 상이한 mismatch DNA의 반응후 Hoechst 33258의 LSV.  
Fig. 4. Linear sweep voltammogram of Hoechst 33258 after hybridization of target DNA and 1 base pair mismatched DNA.

## 4. 결 론

본 논문에서는 간편성, 휴대성, 개발 비용의 면에서 우수한 미세전극어레이형 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 100 nM이었다.
- 3) probe DNA (HIV SK38 probe)에 다른 염기배열을 갖는 target DNA (HIV SK38 target) 또는 콘트롤 DNA (HIV SK39 target)를 반응시켜, LSV를 측정한 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] 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.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.