

# Hoechst 33258 Groove Binder를 이용한 DNA칩

최 용성, 이 경섭  
동신대학교 전기공학과

## Genome Detection Using Hoechst 33258 Groove Binder

Yong-Sung Choi, and Kyung-Sup Lee  
Department of Electrical Engineering, DongShin 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.

**Key Words :** Microelectrode array, DNA chip, Microfabrication technology, Mercaptohexyl moiety, Hoechst 33258

### 1. 서 론

DNA의 고정화 담체로서 니트로셀룰로스막 등의 막필터, 실리콘기판, 유리기판, 고분자, 전극 등 여러 가지의 것이 이용되고 있으며, 또한 DNA를 기판상에 배치시키는 방법이나 사용하는 장치도 다양하다 [1, 2]. 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].

따라서, 본 논문에서는 형광검출형 DNA칩과 비교하여 간편성, 휴대성, 개발코스트의 면에서 우수한 미소전극어레이형 DNA칩을 개발하는 것을 목적으로 하였다. 이를 위하여 고집적형 바이오센서의 제작에 필요불가결한 미세 가공기술에 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

probe DNA로 사용한 올리고뉴클레오타이드는 국제시약바이오사업부에 합성을 위탁하여, 5' 말단을 mercaptohexyl기를 수식한 것을 이용하였다. DNA 어레이

어에 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-mer captohexyl (Aldrich)을 초순수로 1mM로 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 사용되고 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.

### 3. 결과 및 검토

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 1에 나타내었다.

그림 1에 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 이미다졸환이 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.

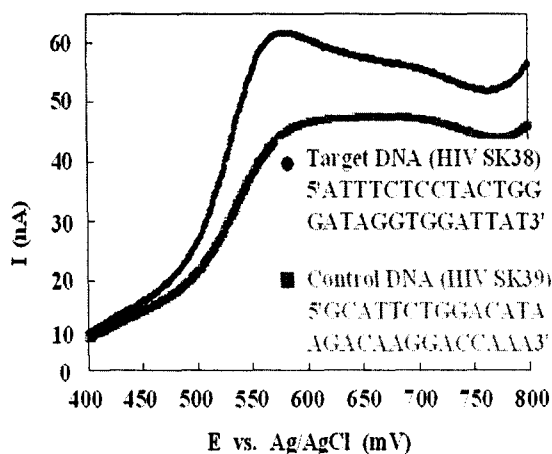


그림 1. Target DNA와 mismatched DNA의 반응후 Hoechst 33258의 LSV.

Fig. 1. 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) 포토리소그래피 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 측정한 결과, 양자의 산화전류값에 차이가 발생하여, target DNA를 전기화학적으로 검출할 수 있었다.

#### 감사의 글

"본 연구는 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.