

비수식화 DNA를 이용한 유전자 검출

최 용성, 문 종대, 이 경섭
동신대학교 전기공학과

SNP Detection Using Indicator-free DNA Chip

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

Abstract : High throughput analysis using a DNA chip microarray is powerful tool in the post genome era. Less labor-intensive and lower cost-performance is required. Thus, this paper aims to develop the multi-channel type label-free DNA chip and detect SNP (Single nucleotide polymorphisms). At first, we fabricated a high integrated type DNA chip array by lithography technology. Various probe DNAs were immobilized on the microelectrode array. We succeeded to discriminate of DNA hybridization between target DNA and mismatched DNA on microarray after immobilization of a various probe DNA and hybridization of label-free target DNA on the electrodes simultaneously. This method is based on redox of an electrochemical ligand.

Key Words : DNA chip microarray, SNP (Single nucleotide polymorphisms), Lithography technology, Hybridization, Immobilization

1. 서 론

바이오센서는 생체재료가 갖는 매우 우수한 분자인식능력을 이용하여 화학물질의 농도를 측정하는 센서이다. 원리적으로는 바이오센서의 채널수를 늘리고 집적형 [1, 2]으로 함으로써, 측정대상물질의 종류를 증가시킬 수 있다. 바이오센서를 이용하여 각종 효소기질, 항원, DNA 등을 동시에 측정할 수 있을 뿐만 아니라, 냄새나 맛을 감지할 수 있는 디바이스 [3]도 구축할 수 있다. 이러한 센서를 제작하는 데는 생체재료인 효소나 항원 등 식별물질의 고정화가 필요하다.

한편, 바이오칩은 질병의 판정·예방을 목적으로 한 유전자진단을 추진하고, 생물의 유전자다형 (SNP)에 관한 각종 지식을 가져올 것으로 기대된다 [3]. 종래의 형광검출형 바이오칩 [3, 4]을 사용하여 대상 유전자의 발현을 해석하기 위해서는 수만개의 유전자 단편을 준비하여 기판상에 고밀도로 배치시킬 필요가 있으나, 제조장치와 해석장치가 고가이므로, 일부 연구기관이나 병원에서만밖에 사용되고 있지 않다.

따라서, 본 연구에서는 형광검출형 바이오칩에 비하여 간편성, 휴대성, 개발코스트의 면에서 우수한 미세전극어레이형 바이오칩을 개발하며, 비수식화한 DNA를 사용하여 유전자다형을 검출하는 것을 목적으로 한다. 이 목적을 실현시키기 위하여 고집적형 바이오센서의 제작에 필수불가결한 미세가공기술에 의하여 복수의 미세전극을 병

렬로 배치시킨 바이오칩을 제작하였다. 전극상에는 각종 유전자를 고정화하고 복수의 유전자를 동시에 검출하였다. 그리고, 최종적으로 제작된 바이오칩을 사용하여 신속·간편한 임상유전자 검사에 응용하고자 한다.

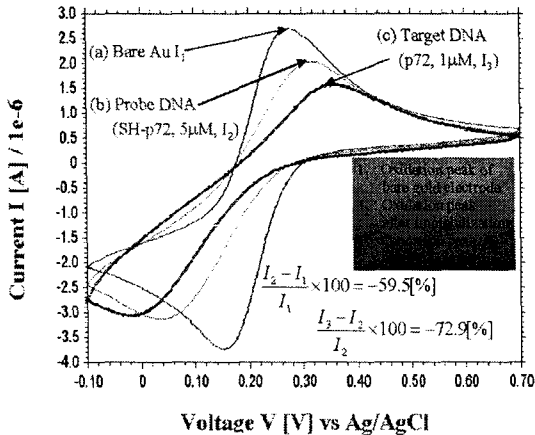
2. 실험

전기화학측정에는 CHI의 Model 1030와 컴퓨터 시스템을 사용하였다. Cyclic-voltammetric (CV) 측정에는 전형적인 셀, counter 전극인 Pt, reference 전극인 Ag/AgCl 및 working 전극으로 Au를 사용하였다. 전기화학측정은 500 mM의 황산용액으로 전형적인 황산의 산화·환원피크가 관측될 때까지 25 °C, -0.2~1.7 V범위에서 100 mV/s의 조건으로 스캔하여 표면을 cleaning한 후에 실시하였다. CV측정은 ferricyanide [K₃Fe (CN)₆] 용액중에서 금전극, probe DNA를 고정화한 후 및 target의 DNA hybridization후에 실시하였다. ferricyanide용액의 5회째 CV의 산화·환원값을 피크값으로 하였다.

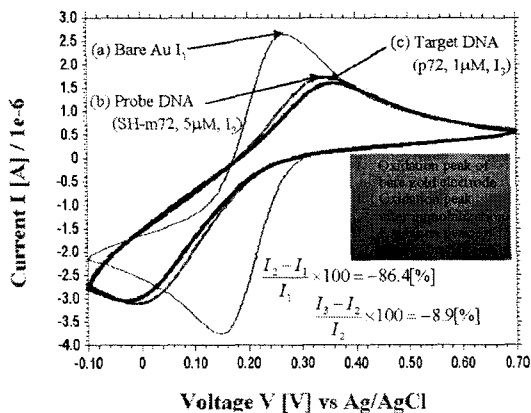
3. 결과 및 검토

그림 1은 bare 금전극에 probe DNA를 고정화하고, target DNA를 hybridization시켰을 때, ferri-cyanide용액의 산화·환원피크의 변화물 측정된 결과이다. 그림 1 (a)는 SH-p72의 probe DNA를 고정화하고, 이의 target DNA (p72)를 hybridization시켰을 때, ferricyanide용액의 산화·환원피크의 변화물 측정된 결과이다. 그림 1 (a)

에서 probe DNA를 고정하였을 때, 산화피크 (I_{pa})는 59.5 % 감소하였다. 또한, peak-to-peak separation (E_p)는 증가하였다. ferricyanide의 산화 피크가 감소되는 이유는 DNA의 phosphate backbone의 negative charge와 ferricyanide의 negative charge의 repulsion에 의한 diffusion 감소때문이다. 한편, probe DNA가 고정된 전극에 target DNA를 hybridization시켰을 때는 산화피크는 72.9 % 감소하였다.



(a) SH-p72



(b) SH-m72

그림 1. 5 mM ferricyanide과 100 mM KCl 수용액 및 100 mV/s에서 미소전극, probe DNA가 수식된 미소전극 및 target DNA를 hybridization하였을 때의 Cyclic-voltammograms.

Fig. 1. Cyclic-voltammograms of 5 mM ferricyanide in 100 mM KCl at 100 mV/s using a bare gold, probe-modified electrode and after hybridization with target DNA.

한편, SH-m72를 probe DNA로 하고, 이것과 비상호적인 target DNA인 p72를 hybridization시켰을 때, ferricyanide용액의 산화·환원피크의 변화를 측정된 결과를 그림 1 (b)에 나타내었다. 금전극에 probe DNA를 고정하였을 때, 산화피크는 86.4 % 감소하였다. 또한,

peak-to-peak separation (E_p)는 증가하였다. 한편, probe DNA가 고정된 전극에 비상호적인 target DNA를 hybridization시켰을 때는 산화피크는 8.9 % 감소하였다.

그림 1 (a), 및 (b)의 결과로부터, 상호적인 DNA와 비상호적인 DNA를 hybridization시켰을 때, 산화값은 72.9 % 및 8.9 % 감소하였으며, 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.

4. 결론

본 논문에서는 형광검출형 바이오칩에 비하여 간편성, 휴대성, 개발 비용의 면에서 우수한 마이크로어레이 DNA 칩을 개발하고 비수식화한 DNA를 사용하여 유전자다형 (SNP)을 검출하기 위하여, 1) 미세가공기술에 의하여 복수의 미세전극을 병렬로 배치시킨 바이오칩을 제작하고, 2) probe DNA 고정화법의 검토하였으며, 3) target DNA에 일체의 수식을 하지 않는 비수식DNA를 이용한 미소전극어레이형 바이오칩을 제작하였으며, 4) 동시에 복수의 유전자를 전기화학적으로 검출하는 방법에 대하여 검토하여, 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) 기판상에 정량적으로 고정화된 probe DNA에 대해서 target DNA를 hybridization시켰다.
- 2) 전기화학적 측정에 의하여 hybridization을 정량화하는 실험계를 개발하여, 1염기 차이의 probe DNAs와 비수식화된 target DNA를 동시에 식별 및 검출하였다.

감사의 글

“본 연구는 한국과학재단 목적기초연구 (R08-2003-000-10312-0) 지원으로 수행되었음.”

참고 문헌

- [1] S.M. Chang, K.Y. Kim, J.M. Kim, Y.S. Choi and Y.S. Kwon, "Detection of Odorants and Study on the Odorant Sensor System by using SAW Device", J. KIEEME, Vol. 8, p. 48, 1995.
- [2] Y.S. Choi, H.K. Shin, Y.S. Kwon and B.J. Lee, "Fabrication and Organic Response Characteristics of the Copolymer LB Films", J. KIEEME, Vol. 9, p. 180, 1996.
- [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, Vol. 251, p. 767, 1991.
- [4] 최 낙진, 반 태현, 곽 준현, 백 원우, 김 재창, 허 중수, 이 덕동, "산화주석을 기반으로 한 DMMP 후막가스센서 제작", 전기전자재료학회논문지, Vol. 16, p. 1217, 2003.