

DNA chip의 개발 동향과 기술

이 중 은*

(* (주)마이크로젠 부설 생명과학연구소 소장)

전기화학회의 학회지에 DNA chip에 관한 글을 부탁 받은 후로 줄곧 머리를 떠나지 않은 걱정은 어떻게 글을 시작하여야 하며 독자들의 생물학적 수준을 어디에 맞추어야 하는지에 대한 걱정이었다. 또한 DNA chip의 응용 분야가 생물학 분야이지만 실제로 이를 개발하는데 필요한 요소 기술들의 대부분의 나의 전공 분야가 아닌 공학 분야에 기초를 두고있다는 사실이 매우 부담스러웠다. 따라서 드러날 수밖에 없는 필자의 공학에 대한 무식함에 대하여는 미리 독자들의 양해를 구하는 바이고 DNA chip의 이해에 필요한 정도만큼의 기초 생물학적 지식에 대한 간단한 review로 이 글을 시작하려 한다.

일부 바이러스를 제외한 모든 생물체는 유전 물질로서 DNA(deoxyribonucleic acid)라는 분자를 갖고 있다. 이 DNA를 바탕으로 RNA(ribonucleic acid)라는 중간 물질이 생성되고 RNA를 바탕으로 단백질(protein)이 생성됨으로써 비로소 생체내의 모든 현상에 필요한 역할을 하는 물질이 만들어지게 된다. 현대 생물학에서는 DNA로부터 protein이 합성될 때까지의 일련의 과정을 monitoring하는 것이 매우 중요한 과정으로 인식되고 있다. 즉 DNA로부터 특정 RNA가 언제 얼마만큼 생성되어 궁극적으로 단백질의 생성시기 및 양이 결정되는지에 대한 정보가 매우 요긴하게 사용된다. 특정 질병 상황에서의 유전자들의 움직임의 변화를 감지할 수 있으면 그 정보를 질병의 진단 및 치료제 개발에 사용할 수 있기 때문이다. 이를 위하여 기존의 방법들은 관심 있는 유전자를 한 번에 하나씩 조사하는 방법을 사용하였다. 그러나 특정 시기 및 특정 조직에서 RNA로 생성되는 유전자의 종류가 최소한 5,000개에서 수 만여 개에 달하는 상황에서 한 두 개의 유전자만을 monitoring하는 것은 매우 불충분하여 한 번에 보다 많은 유전자를 monitoring할 수 있는 방법의 개발이 대두되었다. 또한 high-throughput sequencing technology의 발전에 따른 genome project의 급속한 발전과 함께 유전자상의 변이와 질병과의 상관 관계가

매우 빠른 속도로 밝혀지고 있다. 특정 유전자의 변이를 보다 빠르고 정확하게 그리고 많은 수의 유전자를 한번에 검색할 수 있는 system의 개발 필요성 또한 매우 중요하게 대두되고 있다. 이러한 필요에 맞추어 개발된 기술로 현재 까지 가장 기대되는 기술로 생각되고 있는 것이 DNA chip 기술이다.

1995년 미국 Stanford 대학의 Pat Brown의 실험실에서 유전자의 발현 변화를 monitoring하기 위한 cDNA microarray chip이 개발된 후 DNA chip의 개발은 Affymetrix, Gene Logic, Hyseq, Nanogen, ProtoGene 등 미국 내 벤처기업과 Hewlett-Packard 와 Motorola 등의 대기업을 중심으로 유전체 연구용과 함께 감염성 질병 진단 및 암 진단용으로 실용화하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 현재의 개발 동향은 DNA 분자의 집적도를 높이고 가격을 낮추기 위한 제조공정의 개선, hybridization 반응의 최적화, hybridization을 고감도, 고 신뢰성으로 검출해 내는 새로운 측정법 개발, DNA chip으로부터 얻어진 막대한 양의 데이터를 처리해주는 소프트웨어 개발 등에 연구가 집중되고 있다.

DNA chip은 제작 방법과 chip에 올려놓는 DNA의 형태에 따라 분류될 수 있다. 첫 번째의 경우는 pin microarray 방식, inkjet printing 방식, photolithography 방식, 그리고 electronic array 방식 등으로 분류될 수 있다. Pin microarray 방식은 준비된 DNA 시료를 만년필 촉과 같은 형태의 pin을 이용하여 slide 위에 일정 형태로 나열하는 방식이다. 사용하는 pin의 형태에 따라 만년필 촉과 같은 pin을 이용하는 quill 방식, 그리고 끝에 홈이 없는 막대기 형식의 pin과 DNA 시료를 pick-up 할 수 있는 ring을 부착한 pin and ring 방식의 arrayer가 현재 개발이 된 상태이다. (그림 1a, 1b 참조) Pin microarray 방식은 가장 간단한 형태의 DNA chip 개발 방식으로 x,y,z 세 축으로 정확하게 제어될 수 있는 plotter의 제작, 일정 지름을 가지고 있는

정교한 pin의 제작, 다른 DNA 시료를 나열하기 전에 필요한 pin washing station의 제작, 그리고 이 모든 과정을 제어할 수 있는 computer program의 제작 등의 필수 기술을 필요로 하고 있다. 기존의 plotter 제작 기술 및 제어 기술과 미세 기계 제작 기술의 간단한 조합으로 개발이 비교적 용이하여 이미 많은 종류의 arrayer들이 국내외에서 개발되어 시판되고 있는 상태이다. 개발이 비교적 쉬운 반면 나열되는 DNA 시료의 양이 일정하게 전달되지 않을 수 있으며 pin의 마모에 따른 DNA spot의 형태 변화 등의 단점들이 알려져 있다. Inkjet printing 방식에 의한 DNA chip의

제작은 위에서 설명한 pin microarray 방식과 plotter를 사용하는 점에서는 거의 유사하나 DNA 시료를 slide 위에 직접 접촉적인 물리적 접촉에 의하여 전달하기보다는 inkjet printer head의 분사장치를 이용하여 slide 표면에 직접 접촉을 하지 않고 시료를 나열하는 점이 다르다. (그림 2 참조) 이 방식의 장점으로는 전달하는 시료의 양을 매우 정확하게 조절할 수 있으며 모든 spot의 형태가 일정하다는 점을 들 수 있으나, 시료를 바꿀 때 cartridge 안의 잔여 DNA 시료를 깨끗하게 제거하고 새로운 시료를 넣기가 어렵다는 단점을 갖고 있다. 이상의 두 가지 제작 방법들은 비교적 개발이 쉽고 비용이 적게드는 장점이 있는 반면 chip의 고밀도화가 어려운 단점을 같이 갖고 있다.

미국의 silicon valley에 있는 Affymetrix라는 회사에 의하여 개발된 photolithography 방식을 이용한 DNA chip의 제작 방법은 지금까지 설명한 DNA chip의 제작 방식과는 전혀 새로운 차원의 DNA chip 제작 방법이다. 반도체 공정에서 사용되어오던 photomask를 이용한 photolithography 기술을 DNA 합성 기술에 접목함으로써 지금까지는 전

혀 불가능했던 새로운 형태의 DNA chip을 개발하였다

. Photolithography를 이용한 DNA chip 제작 기술의 핵심은 DNA를 합성할 때 다음 염기와 결합하는데 필수적인 염기상의 side chain을 빛에 민감한 화합물(blocking agent)로 덮은 다음 필요할 때 이 화합물을 빛을 이용하여 없애는 방법이다. 원하는 부위에만 photomask를 이용하여 빛을 가한 후 원하는 nucleotide를 넣어주고 합성 반응을 일으키면 빛에 의하여 blocking agent가 없어진 부위에서만 합성반응이 일어난다. 이때 넣어주는 nucleotide는 역시 빛에

민감한 blocking agent로 반응에 필요한 side chain이 덮여 있는 것을 이용한다. DNA는 adenine(A), guanine(G), thymine(T), cytosine(C) 등의 네 개의 염기서열로 이루어져 있으므로 한 층의 염기서열을 만드는데 네 장의 photomask를 사용하여 위의 과정을 4회 되풀이할 때 비로소 한 층의 염기서열을 합성할 수 있게 된다. 그러므로 25개의 염기서열로 이루어진 oligonucleotide들을 만드는데는 100장의 photomask가 필요하게 된다. 현재 개발된 oligonucleotide chip의 대부분은 25개의 염기서열을 가진 chip들이다. 기술적으로 합성 효율이 100%에 달하지 못하는 문제점으로 인하여 DNA의 길이를 이보다 더 길게 하는 것이 바람직하지 않다는 이유에서 인 것으로 이해되고 있다. 또한 4^{25} 이라는 숫자는 그 특정 염기서열의 조합이 전체 유전체 안에서 거의 유일하게 나타날 수 있는 충분한 확률을 나타내고 있다는 점 또한 DNA의 길이를 25개로 제한한 이유일 것이다.

Photomask를 이용하여 선택적인 부위에서만의 DNA 합성이 가능하게 되므로 동일한 표면 위에서 여러 가지의 염기서열을 가진 DNA를 동시에 합성할 수 있게 된다. 지금까지의 시험관 내에서의 DNA 합성은 화학 반응

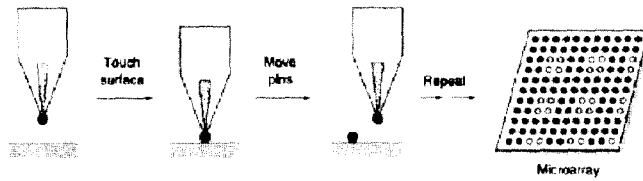


그림 1a. Quill type pin microarrayer

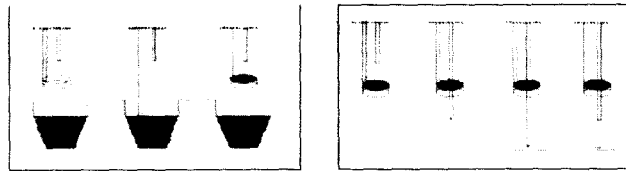


그림 1b. Pin and ring type pin microarrayer

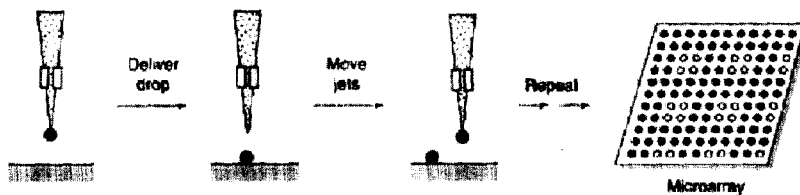


그림 2. Inkjet type microarrayer



에 의한 protective group의 제거 방법을 사용하였으므로 한 번에 한 개의 염기서열에만 맞는 DNA를 합성할 수밖에 없었다. Affymetrix사는 이러한 photolithography 방법을 사용하여 1.28 cm X 1.28 cm 크기의 유리면 위에 약 65,000여 개의 각기 다른 염기서열을 가진 DNA chip을 생산하였고 지금은 같은 면적 위에 400,000만 개의 DNA 분자를 합성할 수 있는 기술을 개발하였다. (그림 3a, 3b 참조)

지금 까지 설명한 방법들 중 pin microarray 방법이나 inkjet printing 방법은 두 방법 모두 고밀도로 DNA chip을 제조할 수 없고, 대량생산에 제약이 되는 단점이 있어 연구용 목적으로 주로 활용되고 있는 실정이고, photolithography 방식은 washing, mask aligning 단계 등의 복잡한 공정과 주문에서 생산까지 소요되는 시간과 photomask 제작에 따르는 과도한 경비 문제 등으로 인해 다품종 소량생산에 대응할 수 없어 상용화에 어려움을 겪고 있는 실정이다.

제조 방법상에 따른 분류중 마지막으로 설명할 방법은 미국의 nanogen사에 의하여 개발된 electronic microarray 방식이다. 이는 DNA 분자가 전기적으로 음성(-)을 띠고 있는 성질을 이용하여 (+)전기를 걸어서 원하는 부위로 DNA를 농축시켜서 chip을 제작하는 방법이다. 이러한 방법을 electronic addressing이라고 부르는데 이러한 형태의 chip을 제작하기 위하여서는 원하는 위치에 전기를 가할 수 있는 기관 형태의 chip을 design하여야 하며 전극 윗부분은 DNA와 결합할 수 있는 물질로 coating 되어있어야 한다. chip상의 특정 부위(address)에 특정 DNA 분자를 나열하려면 chip 위에 원하는 DNA 용액을 흘리고 전기를 특정

address에 가하게 된다. 이렇게되면 원하는 address로 DNA들이 짧은 시간 내에 모이게 되고 전극 상부를 coating 하고있는 DNA binding matrix에 결합하게 된다. 남은 DNA 용액을 제거한 후 다음 address에 다른 DNA를 같은 방법으로 결합시키게 된다. 이러한 작업을 반복하여 한 종류의 DNA chip을 완성할 수 있게 된다.(그림 4a 참조) 전기를 이용한 DNA의 농축은 chip을 제작하는데만 사용되는 것이 아니라 chip 위에서 chip의 DNA와 표지 DNA(probe)와의 결합(hybridization)을 촉진시키는데도 매우 유용하게 사용될 수 있다. 즉 chip을 제작할 때와는 달리 이번에는 전체 전극에 전기를 고루 가하게 되면 용액 상에 골고루 분포해있는 probe DNA들이 전극 위로 농축되게 되고 전극 위에

존재하고있는 DNA chip 상의 DNA들과 더욱 용이하게 결합할 수 있게된다. 따라서 일반적인 hybridization condition 하에서는 최소한 12시간 이상이 걸리는 hybridization 반응 시간이 수 분내에 일어날 수 있으며 또한 전기를 조절하여 결합반응 조건을 매우 예민하게 만들어서 단 한 개의 염기서열의 차이도 용이하게 구별할 수 있는 조건을 만들어 낼 수 있다.(그림 4b, 4c 참조)

이러한 nanogen사의 electronic addressing에 의한 DNA chip 제작 방식은 chip 생산에 필요한 전극 기관의 회로 배선 문제로 인하여 Affymetrix사의 chip과 같은 고밀도 chip을 생산하는데 어려움이 있는 상태이다. 현재 개발된 chip의 집적도는 10,000개의 spot을 가진 chip이 개발된 상태이다.

이상에서 DNA chip의 제조 방법상에 따른 분류를 검토해 보았으며 각각의 방법에 대한 장 단점들을 살펴 보았다.

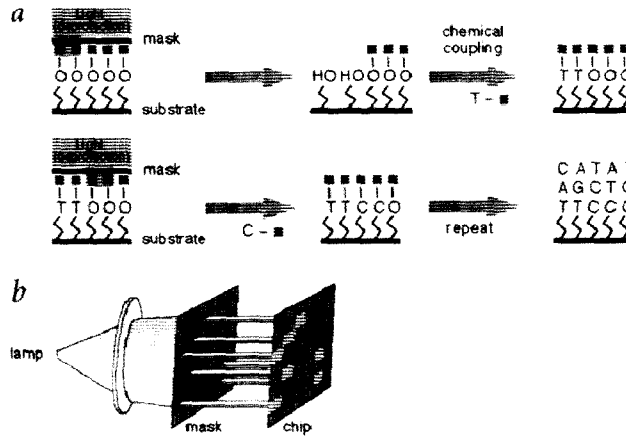


그림 3. Photolithographic synthesis of oligonucleotide DNA chip



그림 4a. Electronic addressing

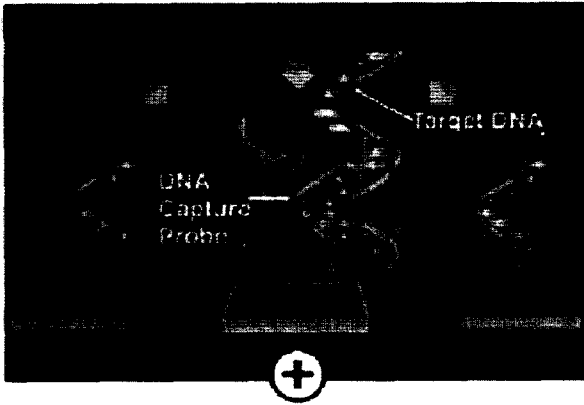


그림 4b. Electronic concentration of probe DNA

• Discriminates single base pair mismatch

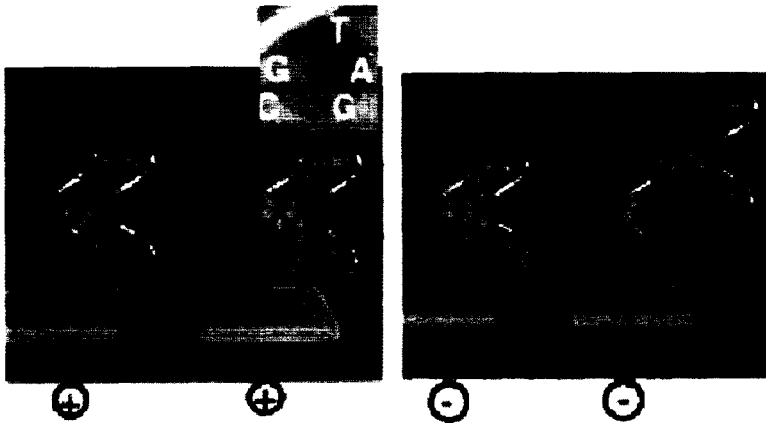


그림 4c. Electronic mismatch discrimination

DNA chip에 올려놓는 DNA의 형태에 따른 chip의 분류는 두 가지로 분류할 수 있다. 하나는 평균 500 base pair 이상의 염기서열을 가진 cDNA를 나열하는 cDNA microarray chip이고 다른 하나는 짧은 DNA 조각인 oligonucleotide를 chip 위에 나열하는 oligonucleotide chip을 들 수 있다. cDNA microarray chip의 제작을 위해서는 대개 pin microarray, inkjet microarray 등을 사용하고 있으며 electronic addressing 방법도 사용될 수 있다. Oligonucleotide chip의 제작은 가장 대표적인 방법으로 Affymetrix 사의 photolithography를 이용한 합성 방법이 사용되고 있으나 pin microarray, inkjet microarray, 그리고 electronic addressing 방법도 쉽게 사용될 수 있다. Affymetrix 사의 방법이 chip 위에서의 직접 합성 방법에 의한 제작 방법인 반면 다른 방법들은 이미 시험관 내에서

각각 합성한 여러 가지의 oligonucleotide 들을 cDNA microarray 방법과 같이 나열하는 점이 다르다고 할 수 있다.

개발된 DNA chip을 이용한 실험과정은 DNA chip과 probe와의 hybridization 과정을 필수로 요하고 있다. DNA chip 상의 DNA와 검사 sample의 probe 사이의 반응의 결과가 있어야 그 결과를 여러 가지 방법을 통하여 측정할 수 있기 때문이다. 대부분의 cDNA microarray를 이용한 실험은 연구원들의 수작업에 의하여 hybridization 반응을 실시한다. DNA chip 기술이 비교적 새로운 기술이고 기술의 보급이 아직은 보편화되지 않은 상태여서 실험 결과가 연구자의 기술에 따라 많은 차이를 보이고 있는 상태이다. 이러한 인적인 요소를 줄이기 위하여 hybridization 과정을 자동화할 필요가 있다. 이를 위하여서는 유체의 흐름을 제어하고 hybridization 조건을 매우 정밀하게 조절할 수 있는 온도 control 기술 등이 집적된 fluidics station의 개발을 필요로 한다.

Hybridization용 자동화기는 Affymetrix 사가 자사의 GeneChip 제품에 사용할 수 있는 제품(genechip fluidic station)을 개발하였고, 24개의 독립적인 시료를 hybridization 할 수 있는 high throughput hybridizer를 Intelligent automation system에서 생산하고 있다.

일반적으로 DNA hybridization 반응결과를 알기 위해서는 시료 DNA를 방사선 동위원소로 표지(labeling)하는 방사능 감광법이 기존의 분자생물학에서 가장 널리 사용되어오고 있는 방법이다. 방사선 동위원소로는 ^{32}P 등이 사용되며, 표지된 target DNA와 탐침(probe) DNA의 결합 상태는 X-ray film을 이용하여 검출한다. 이 방법은 많은 기초지식이 필요하지 않으므로 쉽게 적용할 수 있으나 분석시간이 몇 시간에서 며칠 정도 걸리므로 곧바로 결과를

알 수 없고 방사선 동위원소의 안전성에 문제가 있다. 따라서 최근에는 confocal 레이저 유발 형광법 (laser-induced fluorescence)이 가장 많이 사용되고 있는데 형광물질을 사용하면 여러 형광 물질을 사용할 수 있고 분해능이 좋으며 즉시 결과를 알 수 있는 장점이 있다. 이러한 장치들은 General Scanning, Genetic Micro System, Hewlett-Packard, Molecular Dynamics, Norgen Systems, Incyte 등의 회사에서 개발 판매 중에 있다. 이러한 형광법은 가장 많이 사용되는 방법임에도 불구하고 미지의 시료 DNA를 측정 전에 형광물질로 표지 시키는 비교적 까다로운 과정이 필요하며 레이저, 광학 측정용 부속 장치 등의 고가의 장비를 필요로 한다. Hybridization의 측정전 표지 시키는 과정을 제거한 방법이 Sequenom 사에서 사용하는 MALDI-TOF Mass 분광법이다. 이방법은 표지과정이 필요 없고 감도가 좋은 장



점이 있으나 장비가 거대하며 매우 고가이다. 따라서 이러한 단점을 극복하기 위한 방법으로 전기화학적 방법에 의한 DNA hybridization 검출법이 최근 학계, 연구소, 벤처기업을 중심으로 연구되고 있다. Clinical Micro Sensor 사의 DNA chip은 target DNA에 전기화학적 활성이 있는 유기금속물로 DNA를 표지시켜 hybridization 반응 후 유기금속물의 산화전류를 측정하는 방식을 사용한다. 또 다른 방식으로는 DNA duplex에 유기금속착물을 intercalation시킨 후 그 산화전류를 측정하는 방식으로 일본의 도시바 등에서 주로 연구되어 오고 있다. 이는 매우 간단한 시스템으로 측정장치의 저가화가 가능하나 감도를 향상시키기 위한 연구가 더 진행되어야 한다. 따라서 위에서 살펴본 바와 같이 표지과정 없이 DNA의 hybridization을 고감도로 빠르게 검출할 수 있으며 소형저가인 측정시스템이 요망되나 현재까지의 기술로는 이러한 요구사항을 충족시키는 검출기술이 개발되지 못하고 있다. 따라서 이러한 상기 문제점 중 우선 먼저 DNA chip의 폭넓은 사용을 위해서는 기존의 레이저형광 검출법에 비해 가격이 저렴한 검출시스템이 필요하며 또한 향후 DNA chip이 point-of-care진단이나 환경 분석 등에 응용이 되기 위해서는 휴대용 소형 측정 시스템의 개발이 필수적이며 이를 위한 연구들이 매우 활발하게 진행되고 있다.

지금까지 DNA chip의 제작 과정 및 hybridization 반응 결과를 판독하는 방법들에 대하여 살펴보았다. DNA chip을 이용한 실험이나 응용에 이에 못지 않게 중요한 과정이 chip과 반응시킬 시료의 준비 과정이다. 특정 DNA를 DNA chip을 이용하여 검출하기 위해서는 그 DNA를 생체로부터 분리하여 정제하고 증폭하는 과정을 거쳐야만 한다. 이런 일련의 과정들은 매우 복잡하고 숙련된 연구원의 노력이 필요로 하고있어 현재 개발되어 있는 단순히 DNA만 고정화 한 DNA chip은 연구 분야 외에 응용성을 가지기가 힘들다. 현재 예상되는 DNA chip의 응용성은 이러한 학문적인 연구분야에만 국한되는 것이 아니라 일반인들이 임신진단 kit와 같이 가정에서 간단히 자신의 신체 이상 유무를 자가진단 할 수 있는 정도로까지 넓은 범위에 이를 것이라고 예상되고 있다. 그러므로 이러한 일반적인 용도의 수요를 충족시키기 위해서는 DNA chip의 개념이 현재의 DNA만 고정화한 것과는 차별화 되어 시료 전처리 기능까지 집적화 된 Lab-on-a-Chip(LOC) 형태로 개발되어야 하는 필요성이 대두되고 있다. 즉 혈액과 같은 시료로부터 DNA를 추출하는 일련의 화학적 반응을 포함하고 추출된 DNA를 thermocycling 방식에 의하여 증폭시켜서 이를 DNA chip 위에 올려놓을 수 있도록 하는 일련의 과정들을 모두 한 개의 포장에 모아놓은 장치가 필요하다. 이를 위해서는

micropump 등을 이용한 microfluidics station 및 정확한 온도조절을 할 수 있는 unit 그리고 여러 가지의 효소반응을 실행할 수 있는 미세공간의 개발을 필요로 하고 있다. 미국 Caliper technology 사의 LabChip과 같은 LOC가 개발되어 있으나 LOC와 DNA chip을 결합한 형태의 장치는 아직까지는 개발되어 있지 않은 상태이다. Nanogen사에서 LOC 형태의 DNA chip을 개발하여 미국 일선의 경찰차에 범인 인식용으로 2년 내에 공급하는 것을 목표로 개발중인 것으로 알려져 있다. DNA chip의 무한한 활용 가능성과 분자화학의 발전에 의한 미래 진단 의학의 발전은 보다 정확하고 사용하기 쉬운 LOC 형태의 DNA chip 장치를 필요로 할 것이다.

위에서 열거한 요소 기술들 이외에도 DNA chip의 개발에 필수적인 요소로 computer software의 개발을 들 수 있다. Chip 디자인, display, 데이터 mining에 관련된 프로그램은 Pangea, Silicon genetics (Genespring data warehouse & analysis software), Biodiscovery (BioDiscoverys ImaGene Image analysis software), Affymetrix, Rosetta informatics 사 등에서 개발하여 판매하고 있다.

DNA chip의 개발은 생물학 관련 연구자들, 전자 전기 공학자들, computer software 연구자들 등을 포함한 multi-disciplinary research team의 구성을 요구하는 매우 특이한 형태의 분야라고 할 수 있다. 이를 위하여 외국의 기업들은 대규모 연구 team을 구성하여 제품의 개발에 나서고 있으며 제품의 개발 및 test에 전략적 제휴나 outsourcing 등의 적극적인 방법들을 동원하여 개발에 총력을 기울이고 있다. 이번 특집호를 통하여 우리 나라에서도 학제간 연구가 활발히 진행될 수 있는 기회가 되었으면 하는 것이 필자의 바람이다.

저 자 소 개



이종은(李宗殷)

1963년 1월 27일생. 1985년 서울대 수의학과 졸업. 1994년 George Washington University Ph.D. 취득 (Genetics 전공). 1987년-1993년 미국 NIH National Cancer Institute 연구원. 1994년-1995년 미국 NIH National Cancer Institute Post-Doc. 1996년-1997년 서울 대학교 암연구소 선임 연구원. 1997년-현재 (주) 마크로젠 부설 생명과학 연구소 소장.