

담체자기조직화법에 의한 고집적 DNA 어레이형 마이크로칩의 개발

論 文

51C-7-9

Development of High-Intergrated DNA Array on a Microchip by Fluidic Self-assembly of Particles

金道均*·崔龍成**·權寧守***

(Do-Kyun Kim · Yong-Sung Choi · Young-Soo Kwon)

Abstract - The DNA chips are devices associating the specific recognition properties of two DNA single strands through hybridization process with the performances of the microtechnology. In the literature, the "Gene chip" or "DNA chip" terminology is employed in a wide way and includes macroarrays and microarrays. Standard definitions are not yet clearly exposed. Generally, the difference between macro and microarray concerns the number of active areas and their size. Macroarrays correspond to devices containing some tens spots of $500\mu\text{m}$ or larger in diameter. microarrays concern devices containing thousands spots of size less than $500\mu\text{m}$. The key technical parameters for evaluating microarray-manufacturing technologies include microarray density and design, biochemical composition and versatility, reproducibility, throughput, quality, cost and ease of prototyping. Here we report, a new method in which minute particles are arranged in a random fashion on a chip pattern using random fluidic self-assembly (RFSA) method by hydrophobic interaction. We intend to improve the stability of the particles at the time of arrangement by establishing a wall on the chip pattern, besides distinction of an individual particle is enabled by giving a tag structure. This study demonstrates the fabrication of a chip pattern, immobilization of DNA to the particles and arrangement of the minute particle groups on the chip pattern by hydrophobic interaction.

Key Words : Random fluidic self-assembly method (RFSA), hydrophobic interaction, Particles, Pattern-chip, DNA chip microarrays

1. 서 론

최근, DNA칩을 비롯한 여러 종류의 바이오재료를 마이크로머신 기술 (Micro Electro Mechanical System, MEMS)을 이용하여 하나의 칩에 집적화한 디바이스가 주목받고 있다 [1~3]. 여기서, 디바이스의 트랜스듀스(or particle)에 대한 바이오재료의 고정화(immobilization) 및 안정화(stability)는 다기능 DNA칩 마이크로어레이를 이용한 다양한 응용을 위해서 매우 중요한 과제이다. 만약 이와 같은 문제가 해결된다면 동시에 많은양의 정보를 분석할 수 있을 뿐만 아니라, 미소화에 의한 시약이나 시료의 소비량을 억제하고, 단일종 또는 수종류의 인식재료서는 알 수 없는 복합적인 정보를 얻을 수 있다.

순차 고정화법 (Sequential immobilization method)은 각각의 바이오재료를 고정화하는데 가장 많이 사용되고 있는 방법이다. 이 방법은 자동화된 로봇장치의 probe 끝에 바이오재료를 붙여 칩상에 옮기는 것이다. Brown은 여러 종류의 분자를 동시에 이동시킬 수 있는 sixteen pen-type probe를 이

용하여 1cm^2 의 트랜스듀스에 백만개의 바이오재료를 배열할 수 있는 순차 고정화 장치를 개발하였다[4]. 그러나, 이 방법은 probe를 조정하기 위한 센서 채널을 늘림으로서 제작 공정이 복잡하게 되며, 제작 단가가 증가하는 단점이 있다. 포토리소그래픽 합성법 (Photolithography synthesis method)은 칩상에 광의 조사(照射) 위치를 결정하는 마스크패턴의 조합에 의하여 임의의 배열을 미소한 지점에 형성할 수 있는 방법이다[5~6]. 그러나, 이 방법은 Peptide나 nucleotide와 같이 길이가 20~30mer 정도로 짧은 분자의 고정화는 가능하지만, 효소나 항체와 같은 긴 분자에는 적합하지 않은 단점이 있다.

따라서, 본 연구에서는 다항목 측정 및 고집적 어레이형 DNA칩의 개발을 위하여 바이오재료의 새로운 고정화 방법을 제안하였다. 즉, 바이오재료를 칩상에 직접 고정화하는 것이 아니고 미소담체 (particles)에 고정화한 후, 담체를 칩상에 고정화하는 2단계 고정화법이다. 제2단계 고정화법은 복잡한 과정을 감소시키는 방법으로서 미소화된 담체군 (群)의 소수성상호작용 (hydrophobic interaction)에 의한 무작위액중 자기조직화법 (random fluidic self-assembly method)을 이용하는 방법이다. 이 방법에 의하면 고정화되는 재료의 증가나 고정화 영역의 미소화에 대해서도 그 공정이 복잡하게 되지 않고, 바이오재료의 변성이 발생하지 않도록 고정화할 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 동시에 많은양의 정보를 분석할 수 있으며, 미소화에 의하여 시약이나 시료 소비량의 억제와

* 正會員 : 東亞大學校 電氣工學科 博士修了

** 正會員 : 日本 大阪大學 産業科學研究所 研究員 · 工博

*** 正會員 : 東亞大學校 電氣工學科 教授 · 工博

接受日字 : 2001年 9月 26日

最終完了 : 2002年 4月 30日

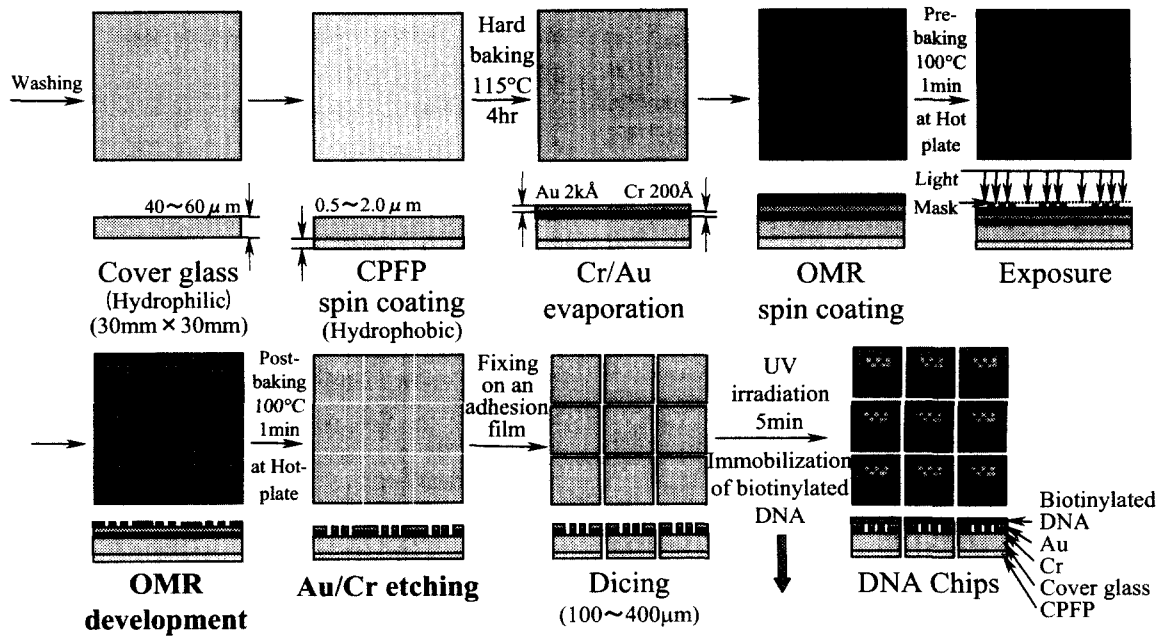


그림 1 담체 및 Tag의 제작 공정
 Fig. 1 Procedure of particles and Tag fabrication

복합적 정보의 취득이 가능할 것으로 기대되고 있다.

2. 시료 및 실험 방법

2.1 시료

본 연구에 사용된 바이오재료는 5'말단에 각각 비오틴 및 FITC (fluorescence isothiocyanate)를 수식한 0.2 μM 스케일의 이중나선 DNA로서 Nisshinbo사에 위탁하여 합성하였다. 염기배열은 각각 5'GAAAAAAAAATGACGTCATCCG3' (A, Mw = 6,436.2, Tm 64.9°C), 5'AGGAATTCCCAAGCTTGGCA3' (B, Mw = 6,107, Tm 68.2°C) 및 5'GAAAAAAAAATGACGTCATCCG-AGGAATTCCCAAGCTTGGCA 3' (A+B, Mw = 12,604.2, Tm 83°C)이다.

소수성 처리를 위해 사용된 시약인 CPFP (cyclized perfluoro polymer, 상품명 : CYTOP, 형번:CTL-809M) 및 CPFP의 용제액인 (C₄F₉)₃N (형번:CT-Solv180)은 Asahi Glass Co.의 것을 사용하였다. DNA의 고정화를 위해 사용된 시약인 3,3'-dithiodipropionic acid는 PFALTZ&BAUER사의 것을 사용하였다. 또한, NHS(N-hydroxysuccinimide, C₄H₅NO₃), 아비딘 (Mw = 67,000, from white egg), Tris[2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol], H₂NC(CH₂OH)₃, 염화나트륨 (NaCl), 2-아미노에탄올 (H₂NCH₂CH₂OH), 요화칼륨 (KI), 수산화나트륨 (NaOH), 페리시안화칼륨 (K₃[Fe(CN)₆])은 Wako Pure Chemical Industries, Ltd.의 것을 사용하였다. EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylamino propyl)carbodiimide hydrochloride, C₈H₁₇N₃·HCl)은 Tokyo Kasei Organic Chemistry사의 것을 사용하였다. negative 레지스트인 OMR

83과 그 전용현상액은 Tokyo Applied Chemistry의 것을 사용하였다. 그리고, negative 레지스트인 XP SU-8(50)과 전용현상액은 MicroChem Co.의 것을 사용하였다. 요소 (I)는 안진화학의 것을 사용하였다. 기관세정용 용매로는 전자공업용 (Kanto Chemistry) 아세톤을, 기타 시약으로는 화학·생화학용 특급 또는 그 상당품을 사용하였다. 물은 클린룸 프로세스에서는 초순수 (18.0MΩ·cm)를, 기타의 경우에는 증류수 (49.5×10⁶S/cm, pH4.86)를 사용하였다.

2.2 담체 (Particle)의 제작

담체의 제작 공정을 그림 1에 나타내었다. cover glass 기판 (0.13~0.16mm, 18mm×18mm, Takahashi Giken, Glass Co.)의 표면은 초음파세척기 (W-222, Honda)를 이용하여 순수, 아세톤, 에탄올의 순서로 각각 30분간 세정하였다. 그리고, cover glass의 한쪽면은 CPFP를 피펫으로 100 μL정도 전개시킨 후 스핀코팅기 (1H-D3, MIKASA)를 이용하여 500rpm에서 10초, 4,000rpm에서 20초간으로 회전시키면서 0.5~2.0 μm의 두께로 소수성 처리하였다. 다음에, 115°C의 항온오븐 (DS64, YAMATO SCIENFITIC)중에 넣고 4시간 hard-baking하였다. 그 반대면은 텅스텐 보트를 이용한 저항 가열형의 진공증착장치 (SVC-700TURBO-TM, SANYU)를 이용하여 크롬을 약 200Å 증착한 후, 진공을 계속 유지하면서 금(2φ×500L)을 약 2,000Å 증착하였다. 막두께는 수정진동자 (6MHz, PKG 10, LEYBOLD INFICON)를 이용한 막두께 모니터 (TM-200R, Maxtek)로 측정하고, 증착속도를 크롬의 경우는 0.5~1.0Å/s으로, 금의 경우는 5.0~10.0Å/s의 범위가 되도록 조절하였다. 진공도는 이온진공계이지 (ULVAC GI-TL3)로 측정하였고, 10⁻⁶Torr 이하를 유지하였다.

담체 위에 새겨진 Tag는 포토리소그래피법에 의해 만들어졌다. 우선 크롬과 금이 증착된 기판위에 negative형 포토레지스트인 OMR 83을 7~8 방울 떨어뜨려 스핀코팅 (1H- DXII, MIKASA) (1st:500rpm/10s, slope:10s, 2nd:4000 rpm/20s, slope:5s) 후, 오븐 (DK300, YAMATO SCIENTIFIC)중에서 pre-baking (100℃, 1min)하였다. 그리고, 마스크얼라이너 (MJB3 UV400, Karl Suss)를 이용하여 4초간 노광한 후, OMR 83 전용현상액에 30초간 담구어 현상하고, OMR 린스를 이용하여 2번 세정하였다. 다시 post-baking (100℃, 1min)한 후, 금에칭액 (요화칼륨 40g, 요소 10g, 물 400mL)으로 금을 에칭하고, 질소가스로 건조시켰다. 또한 크롬을 크롬에칭액(수산화나트륨 40g, 페린화칼륨 100g, 물 400mL)으로 에칭하고, 질소가스로 건조시켰다. 다음으로, OMR 83 세정액으로 레지스트를 제거한 후, 세정액 린스와 아세톤을 이용하여 2번씩 세정하였다.

cover glass를 점착성의 다이싱테이프 (Adwill D-210, LINTEC)에 붙인 후, 다이아몬드 커터 (52D-0.1T-40H, Asahi Diamond)가 부착된 다이싱머신 (A-WD-10A, Tokyo Seimitsu)을 이용하여 0.5mm/s의 속도로 잘라서 담체를 제작하였다. 그 후, 5분간 다이싱테이프에 UV를 조사하여 점착성을 UV조사전 19,600mN/25mm (카탈로그값)에서 UV조사후 250mN/25mm로 약화시켜 담체가 점착성테이프에서 쉽게 떨어지도록 하였다. 이 공정에 의하여 Tag가 새겨진 담체를 제작할 수 있었다.

2.3 DNA 고정

제작된 담체에 대해서, 티올유도체 및 아비딘을 거쳐 5'말단에 비오틴을 수식한 DNA를 고정하였다. 우선, 1mM 농도의 3,3'-dithiodipropionic acid 수용액 3mL중에 금을 증착한 cover glass를 실온에서 20분간 담구 후, 이 수용액에 100mg/mL 농도로 만든 NHS와 EDC를 혼합액으로하여 카르복실산과 1시간 반응시킨 후 건조시켰다. 그리고, 아비딘을 완충액 (pH7.9, 10mM Tris-HCl, 0.2M NaCl)으로 0.2mg/mL가 되도록 조제한 1mL 용액에 30분동안 담구 놓았다. 다음 1M 농도의 에탄올아민 수용액 1mL에 cover glass를 30분동안 담구 카르복실기를 불활성화하였다. 마지막으로 아비딘을 수식한 금을 완충액 (pH7.9, 10mM Tris-HCl, 0.2M NaCl)에 비오틴화 DNA를 1μM이 되도록 1mL의 용액에 25℃에서 1시간동안 담구 두었다. 여기서, 비오틴화 DNA 체인은 아비딘 분자의 4개 결합 사이트의 하나와 결합된다. 비오틴화 DNA의 고정량은 DNA 용액에 담구지는 시간에 의하여 제어되었다.

2.4 패턴 칩 (Pattern chip)의 제작

유리기판 (1.2~1.5mm, 76mm×26mm, S-1225, Matsunami Glass)을 다이아몬드 커터로 3등분한 후, 표면은 초음파세척기를 이용하여 순수, 아세톤, 에탄올의 순서로 각각 30분간 세척하였다. 그리고, 유리기판의 한쪽면에 스핀코팅기를 이용하여 500rpm에서 10초, 4,000rpm에서 20초간, CPF를 0.5~2.0μm의 두께로 코팅함으로써 소수성으로 처리하였다. 다음에

115℃의 항온오븐중에 넣고 4시간 hard-baking하였다. 이 위에 진공증착장치를 이용하여 크롬과 금을 각각 약 200Å과 2,000Å으로 증착하였다.

이 기판위에 negative형의 레지스트인 SU-8(50)를 떨어뜨려 스핀코팅 (1st:500rpm/10s, slope:10s, 2nd:4000rpm/20s, slope:5s, 3rd:5000rpm/2s, slope:5s) 후, 오븐중에서 pre-baking (100℃, 30min)하였다. 그리고, 마스크얼라이너를 이용하여 20초간 노광한 후, 다시 pre-baking (100℃, 30min)을 하고 자연 건조시켰다. SU-8 현상액에 30분간 담구어 현상과 세정 후, 질소가스로 건조시켰다. 또한, 2×10⁻⁵Torr 이하에서 산소플라즈마(1SCCM, 500V, 이온류 밀도 1.0mA/cm² 이하, RF power 100W) (EIS-200ER, ELIONIX)를 5분간 조사함으로써, 현상되지 않은 레지스트 부분을 친수성 처리하였다. 이후, 금에칭액으로 금을 에칭하고, 크롬에칭액으로 크롬을 에칭한 후, 질소가스로 건조시켰다. 이 공정에 의하여 유리기판의 한쪽면에 친수성 및 소수성 부분으로 나누어진 수많은 사이트를 제작할 수 있었다.

2.5 DNA칩 마이크로어레이의 제작

패턴칩에 담체를 소수성상호작용에 의한 무작위액중자기조직화법으로 고정화하기 위하여 그림 2와 같이 현탁액 (suspension, 에탄올 90%+순수 10%)중에 패턴칩을 넣고, 1500~4000개 정도의 담체를 넣고 흔들면 그림 2의 확대도와 같이 중력에 의하여 담체가 가라앉게된다. 또한 소수성 상호작용에 의하여 패턴칩과 비오틴화 DNA가 수식된 담체의 소수성부분끼리가 무작위로 수많은 사이트에 결합되어 담체가 고정화되었다.

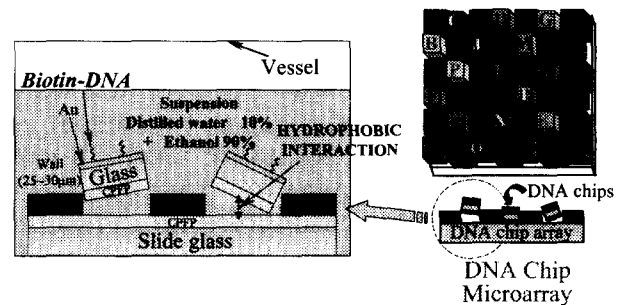


그림 2 소수성상호작용에 의한 무작위액중자기조직화법을 이용하여 패턴칩에 고정된 담체의 DNA칩 마이크로어레이

Fig. 2 DNA chip microarrays of particles on pattern chip using random fluidic self-assembly method by hydrophobic interaction

패턴칩의 CPF면상에 담체가 소수성상호작용에 의하여 어느 정도의 힘으로 고정되어 있는가를 조사하기 위하여 그림 3과 같이 스핀코팅기의 회전부에 샤프를 얹고, 그 중앙부에 DNA칩 마이크로어레이를 움직이지 않도록 고정시켰다. 그리고, 원심력 및 소수성상호작용력에 의하여 패턴칩의 담체가 어느 정도의 힘으로 고정되어 있는가는 100~900rpm 속도로 6분간 스핀코팅기를 회전시켜 그림 3의 확대도와 같이 패턴칩의 CPF면에서 박리된 담체의 수를 세어서 측정하였다.

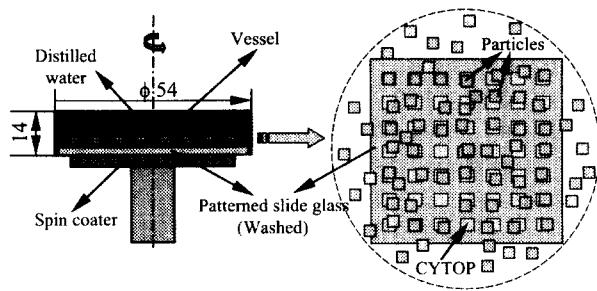


그림 3 스프인코팅기의 원심력을 이용하여 담체군의 소수성 상호작용 결합력 측정

Fig. 3 Measurement of bonding force of hydrophobic interaction of particles using centrifugal force of spin-coating machine

2.6 DNA hybridization

한편, 현탁액에 화학·생화학적으로 성질이 다른 DNA를 고정화한 담체의 혼합물을 이용하여, 최종적으로 다종류의 바이오재료를 고밀도로 고정화한 DNA칩 마이크로어레이를 얻을 수 있었다. 본 연구에서 제작한 DNA칩 마이크로어레이에 완충액 (pH7.9, 10mM Tris-HCl, 0.2M NaCl)중에서 FITC수식한 cDNA를 적당한 농도로 60℃, 64℃ 및 78℃에서 30분간 반응시켜 이중나선을 결합시켰다. 이중나선 DNA가 결합되었는가는 암실에서 FITC용 형광필터가 있는 형광현미경 (여기 광 : 450~490nm, 흡수광 : 515~565nm, 분광 : 510nm) (LEICA MZ FLIII, Leica)으로 여기시키면 형광을 확인할 수 있으며, 형광의 밝기에 의하여 농도를 알 수 있다.

3. 결과 및 검토

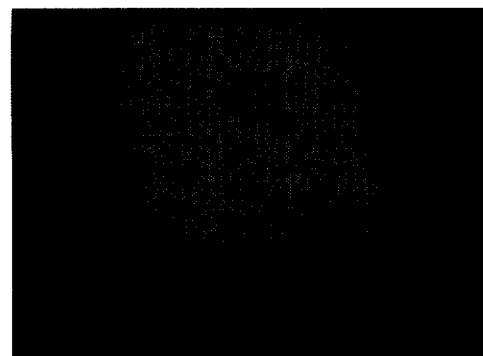
그림 4 (a)는 리소그래피법에 의해 담체 위에 새겨진 Tag의 각 비트를 나타내는 수이다. 즉, 각 8개의 구획을 1~128까지 지정함으로써, 8비트로 0~255까지의 수를 표현할 수 있다. 여기서, SP와 EP는 Tag의 시작점과 끝점을 각각 나타내고 있다. 그림 4 (b)는 그림 4 (a)에 표현된 비트를 기준으로 만들어진 Tag이며, 2진수의 '010110001'(10진수의 88)를 나타낸 것이다. 또한 그림 4(c)는 리소그래피법에 의해 그림 4 (b)의 Tag가 새겨진 cover glass 기판을 다이싱머신으로 300×300μm²의 크기로 제작한 담체를 180배로 확대해서 찍은 SEM (S-3500, HITACHI) 이미지이다. 담체에 새겨진 Tag의 크기는 10×10μm²이며, 담체는 다이싱머신의 조작에 의해 다양한 크기로 제작되어질 수 있다. 그림 4(c)에서 보여지듯이, 담체는 가로·세로 모두 깨끗하게 다이싱되어 있으며, Tag의 모양도 비교적 깨끗하게 제작되었다. 이밖에 다른 수의 Tag도 모두 이런 방식으로 제작되었다.



(a)



(b)



(c)

그림 4 (a) 담체 위에 새겨진 Tag의 비트를 나타내는 수

(b) 2진수 '010110001'를 나타낸 Tag

(c) (b)의 Tag가 새겨진 담체의 SEM 이미지

Fig. 4 (a) number that shows bit of Tag write on particle

(b) Tag that shows '010110001' of binary system

(c) SEM images of particle that was written Tag of (b)

한편, 포토리소그래피 및 산소플라즈마 처리로 에칭한 후 500μm 크기의 패턴칩을 만들었으며 그림 5에 나타내었다. 그림 5에서 별표 부분은 금/CPFP로서, 산소플라즈마 처리에 의하여 친수성 처리되어 있으며, 투명하게 보이는 부분은 CPFP에 의해 소수성 처리된 부분이다. 이 패턴칩은 2,600~67,000개 정도의 친·소수성 부분이 격자상 모양으로 되어 있으며, 담체군의 무작위액중자기조직화법을 이용한 소수성상호작용의 응용이 가능할 것으로 생각된다. 그림 5 (a)는 제작된 패턴칩의 벽부분을 확대해서 찍은 SEM 이미지이며, 소수성 부분과 벽사이의 에칭이 깨끗하게 되었음을 보여준다. 소수성 부분의 크기는 리소그래피 과정의 조작에 의해 다양한 크기로 제작되어질 수 있다.

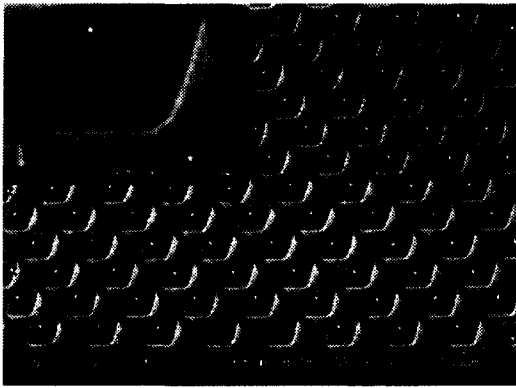


그림 5 포토리소그래픽 및 산소플라즈마 처리로 애칭한 후의 패턴칩의 SEM 이미지

Fig. 5 SEM image of pattern chip after etching by processing of photolithography and O₂ plasma

(a) SEM image of expanded aspect of hydrophilic part

소수성상호작용에 의한 무작위액중자기조직화법을 이용하여 패턴칩 상에 담체를 고정하기 위하여, 아래에 패턴칩을 고정하고 에탄올 90%, 순수 10%의 현탁액을 넣었다. 여기에 1,500~4,000개 정도의 담체를 넣고 흔들면, 수면에 떠있던 담체군이 중력 및 소수성상호작용에 의하여 그림 6과 같이 패턴칩의 소수성 부분에 고정된다. 그림 6에서 별표와 십자표는 각각 친수성 부분과 소수성 부분을 나타내며, 패턴칩 위의 소수성 부분에 배열된 담체의 고정율은 약 83~88% 정도였다. 각 담체의 표면에는 '01011000' (88)과 '01100011' (99)와 같은 Tag가 표시되어 있기 때문에 무작위액중자기조직화법에 의해 고정된 담체가 기관상의 어디에 배치되는가가 확인되며, 따라서 각 담체위에 고정된 DNA의 종류를 확인하는 것이 가능하다.

소수성상호작용에 의한 무작위액중자기조직화법을 이용하여 그림 7 (a)의 우측과 같이 패턴칩에 담체의 CPFPP면이 접할 확률과 패턴칩에 담체가 어느 정도의 힘으로 고정되어 있는가를 그림 3과 같은 스펀코팅기를 이용하여 원심력과 유속에 의하여 패턴칩에서 담체가 박리하는 비율을 조사하였다.

먼저, 그림 7 (a)와 같이 9.0wt-% 농도로 CPFPP를 코팅한 패턴칩과 담체에 대해서, 패턴칩에 담체의 CPFPP면이 접할 확률은 80% 정도였다. 그러나, 그림 7 (b)와 같이 패턴칩과 담체 모두 친수성으로 처리하면 담체의 친수성 부분이 접할 확률은 70% 정도로 소수성 보다 감소하였고, 그림 7 (c)와 같이 cover glass에 CPFPP를 코팅하지 않으면 40% 정도까지 감소하였다.

다음으로, 소수성상호작용에 의하여 패턴칩에 담체가 어느 정도의 힘으로 고정되어 있는가를 CPFPP의 농도를 0.45~9.0wt-%로 바꾸어 코팅한 패턴칩과 1,500~4,000개의 담체에 대해서 조사하였다. 그림 7(a)와 같이 9.0wt-% 농도의 CPFPP를 코팅한 패턴칩과 담체에 대해서는 100~900rpm에서 스펀코팅기의 원심력과 유속에 의해서도 패턴화칩에 담체가 95% 이상까지 고정되었다. 또한, 패턴화칩과 담체에 CPFPP의 농도를 약하게 하거나 다르게 하여 (각각 0.45와 9.0wt-%) 코팅

하면 담체의 패턴칩으로의 고정력이 80~90% 정도까지 감소하였으나, 같은 농도와 두께에 대해서는 결합력의 차이는 거의 없었다. 그리고, 그림 7(b)와 같이 패턴칩과 담체 모두 친수성으로 처리하면 친수성상호작용력은 50% 정도까지 감소하였으며, 소수성상호결합력보다 뒤떨어짐을 알 수 있다. 한편, 그림 7(c)와 같이 CPFPP를 코팅하지 않은 담체 (친수성)에 대해서는 소수성상호결합력은 30% 이하까지로 감소하였으며, 소수성상호결합력이 약함을 알 수 있다. 이상의 결과로부터 본 연구에서는 패턴칩과 담체에 9.0wt-% 농도의 CPFPP를 4,000rpm로 스펀코팅하여 사용하였다.

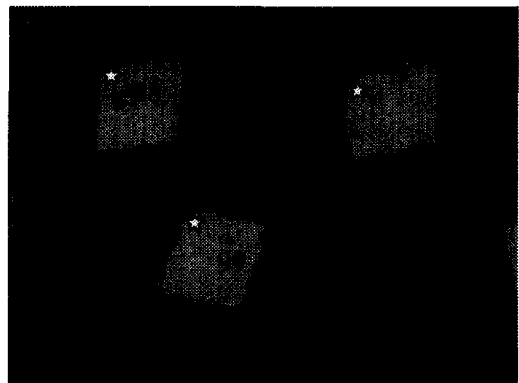


그림 6 소수성 상호작용에 의하여 패턴칩에 고정된 담체의 SEM 이미지

Fig. 6 SEM image of particles after immobilization on pattern-chip by hydrophobic interaction

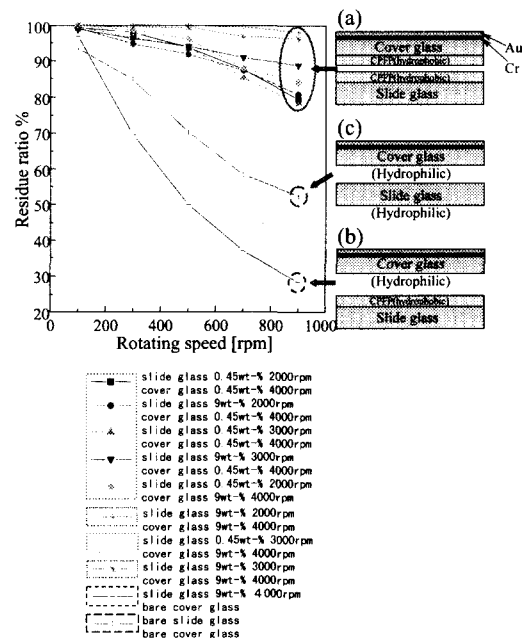


그림 7 스펀코팅기의 원심력을 사용한 패턴칩 위 담체의 박리 비율

Fig. 7 Residue ratio of particles onto pattern-chip using by bonding force of spin-coating machine

현탁액중에서 화학·생화학적으로 성질이 다른 바이오재료를 고정화한 담체 혼합물을 이용하면, 최종적으로 그림 8 (a)와 같은 다종류의 바이오재료를 고밀도로 고정화한 다항목 측정 및 고집적 마이크로어레이형 DNA 칩을 얻을 수 있었다.

여기에 각종 FITC화 cDNA를 차례대로 결합시키고, 형광현미경으로 형광 유무를 확인함으로써, 담체상의 DNA를 확인할 수 있다. 형광현미경으로 2분의 해상도로 본 담체의 형광 결과를 그림 8 (b)~(d)에 나타내었다. 그림 8 (a)에서 원부분이 비오틴화 DNA가 수식된 담체로서, cDNA와의 결합이 없으므로 형광을 확인할 수 없다.

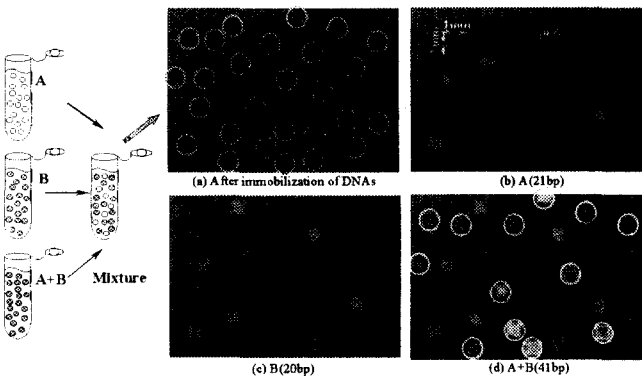


그림 8 DNA칩 마이크로어레이 및 형광

- (a) DNAs의 고정화 후 (b) A cDNA 결합 후
- (c) B cDNA 결합 후 (d) A+B cDNA 결합 후

Fig. 8 DNA chip microarr and fluorescence

- (a) After immobilization of DNAs
- (b) After hybridization with A cDNA
- (c) After hybridization with B cDNA
- (d) After hybridization with A+B cDNA

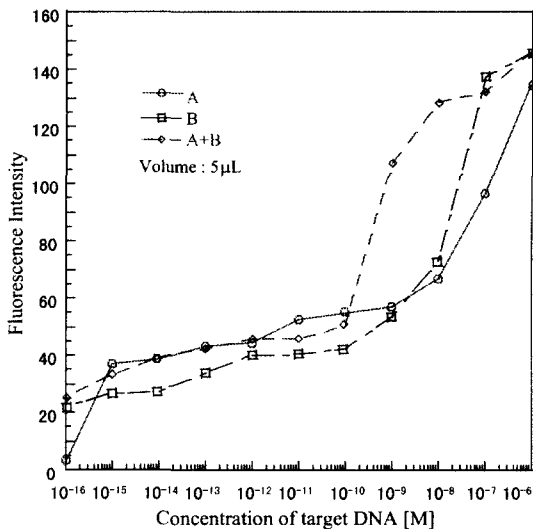


그림 9 형광도의 농도의존성

Fig. 9 Fluorescence intensity dependence on concentration

그림 8 (b)는 A cDNA를 결합시킨 경우로서, 원부분에서 한 형광을 볼 수 있으며, 이곳에 A cDNA가 고정되어 있음을 알 수 있다. 마찬가지로, 그림 8 (c) 및 (d)에서 그림 8 (b) 이외의 담체에서도 원부분에서 형광을 볼 수 있었으며, 이곳에 B 및 A+B cDNA가 고정되어 있음을 알 수 있다. 이 결과를 수만의 DNA종에 확대하면, 간단, 신속, 안정성 등이 뛰어난 다항목 측정 및 고집적 마이크로어레이형 DNA 칩으로서 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

한편, 1μM의 A, B 및 A+B cDNA에 대하여, 5μl, 10¹⁶~10¹⁵ 농도의 cDNA를 각각 결합시켰을 때, 형광도의 세기를 그림 9에 나타내었다. 형광의 세기는 background에 의한 기본값을 빼고 plot하였다. 그림 9에서, A, B 및 A+B cDNA 모두 비오틴화 DNA와 결합하였을 때, 형광도의 세기는 10¹⁵~10¹⁴M과 그 이상의 농도 부분에서 직선적인 관계를 볼 수 있었다. 그러나, 형광농도가 강함으로서 발생하는 형광의 quenching 현상은 발생하지 않았다.

4. 결 론

본 연구에서는 후막용 CFP를 이용하여 제작한 소수성막을 갖는 패턴칩에, 다이싱에 의하여 얻은 담체에 DNA를 고정화하고, 현탁액중에서 소수성상호작용에 의한 부작용억제 조건조각법을 이용하여 임의의 위치에 배치할 수 있었다. 액체중에서 패턴칩과 담체와의 소수성상호작용력은 기타 다른 작용력보다 우수하였으며, 다항목측정용의 고집적형 마이크로어레이형 DNA 칩으로서 응용 가능한 기술임을 알았다. 따라서, 생체재료의 2단계 고정화방법은 간단, 신속, 안정성 등이 뛰어난 다항목측정 및 고집적마이크로어레이형 DNA 칩으로서 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

또한, 본 연구에서 나타낸 새로운 바이오재료 고정화 방법은 배치 직후 어느 재료가 어디에 배치되어 있는가의 정보는 없으나, 각 담체에 미리 적당한 tag를 부여하여 각각의 배치 패턴을 알 수 있게 하였다. 이에 의해, 여러 바이오재료에 대한 분석을 동시에 할 수 있으며, 미소화에 의하여 시약이나 시료 소비량의 억제와 복합적 정보의 취득이 가능할 것으로 기대하고 있다.

감사의 글

본 연구는 학술진흥재단 신진연구인력연구비 (과제번호 : E046) 및 한국과학재단 지정 동아대학교 지능형통합항관리연구센터의 지원에 의해서 수행되었기에 감사드립니다.

참 고 문 헌

[1] M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, P. O. Brown, "Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray",

Science, Vol.270, pp.467-470, 1995

- [2] S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, ; D. Solas, "Light-Direct, Spatially Addressable Parallel Chemical Synthesis", *Science*, Vol.251, pp.767-773, 1991
- [3] S. P. A. Fodor, R. P. Rava, X. C. Huang, A. C. Pease, C. P. Holmes, C. L. Adams, "Multiplexed biochemical assays with biological chips", *Nature*, Vol.364, pp.555-556, 1993
- [4] C. A. Browne, D. H. Tarrant, M. S. Olteanu, J. W. Mullens and E. L. Chronister, "Intrinsic Sol-Gel Clad Fiber-Optic Sensors with Time-Resolved Detection", Vol. 68, *Anal. Chem.*, pp.2289-2295, 1996.
- [5] M. Chee, R. Yang, E. Hubbell, A. Bernon, X. C. Huang, D. Stern, J. Winkler, D. J. Lockheart, M. S. Morris, S. P. A. Fodor, "Accessing Genetic Information with High-Density DNA Arrays", *Science*, Vol.274, pp.610-614, 1996
- [6] G. McGall, J. Labadie, P. Brock, G. Wallraff, T. Nguyen, W. Hinsberg, "Light-directed synthesis of high-density oligonucleotide arrays using semiconductor photoresists", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol.93, pp.13555-13560, 1996

저 자 소 개



김도균 (金道均)

1971년 3월 25일생. 1996년 동아대학교 전기공학과 졸업. 1998년 동 대학원 전기공학과 졸업(석사). 2001년 동 대학원 전기공학과 박사과정 수료. 현재 동아대학교 지능형통합항만관리연구센터 상임 연구원
 Tel : 051-200-6742, Fax : 051-200-7743
 E-mail : kdk-mail@hanmail.net



최용성 (崔龍成)

1967년 11월 14일생. 1991년 동아대학교 전기공학과 졸업. 1993년 동 대학원 전기공학과 졸업(석사). 1998년 동 대학원 전기공학과 졸업(공박). 1998년~1999년 동아대학교 전기공학과 인턴연구원. 일본 JAIST Post-Doc. 현재 일본 오사카대학 산업과학연구소 연구원
 Tel: +81-06-6879-8447
 Fax: +81-06-6875-2440
 E-mail : taewon@mail.taegu.net



권영수 (權寧守)

1950년 1월 17일생. 1973년 영남대학교 전기공학과 졸업. 1983년~1988년 일본 동경공업대 대학원 전기·전자공학과 졸업(공박). 1990년, 1992년, 1994년 동경공업대 객원연구원. 현재 동아대학교 전기공학과 교수
 Tel : 051-200-7738, Fax : 051-200-7743
 E-mail : yskwon@mail.donga.ac.kr