

소수성 Template를 이용한 DNA Chip Microarray의 개발

최용성, 박대희
원광대학교

Development of DNA Chip Microarray Using Hydrophobic Template

Yong-Sung Choi and Dae-Hee Park
Wonkwang University

Abstract - Microarray-based DNA chips provide an architecture for multi-analyte sensing. In this paper, we report a new approach for DNA chip microarray fabrication. Multifunctional DNA chip microarray was made by immobilizing many kinds of biomaterials on transducers (particles). DNA chip microarray was prepared by randomly distributing a mixture of the particles on a chip pattern containing thousands of m-scale sites. The particles occupied a different sites from site to site. The particles were arranged on the chip pattern by the random fluidic self-assembly (RFSA) method, using a hydrophobic interaction for assembly.

1. 서 론

최근, DNA칩을 비롯한 다종류의 생체재료를 마이크로머신 기술 (Micro Electro Mechanical System, MEMS) 을 이용하여 하나의 칩에 집적화한 디바이스가 주목받고 있다. 단순히 많은 분석을 동시에 할 수 있을 뿐만 아니라, 미소화에 의한 시약이나 시료의 소비량을 억제하고, 단일종 또는 수종류의 인식재료로부터는 알 수 없는 복합적인 정보를 얻을 수 있을 것으로 기대되고 있다.

DNA칩의 제작 방법은 크게 나누어 리스그래픽을 이용한 방법과 스텝프를 이용한 방법의 2종류로 나눌 수 있다 [1-3]. 전자는 고상합성에서 신장말단의 탈보호기 반응을 광반응으로 행하는 것으로, 조사 (照射) 위치를 결정하는 마스크패턴의 조합에 의하여 임의의 배열을 미소한 spot으로서 형성할 수 있다 [2-9]. 그러나, 고상합성의 제한으로서 신장가능한 길이가 20 30mer 정도로 짧고, 큰 분자의 구축에는 적합하지 않다. 후자는 미리 준비한 다종류의 재료를 단순한 자동화된 장치에 의해 칩 끝에 붙여 칩상에 옮기는 것이다. 이 방법은 재료의 제약이 없으나, 옮기는 전량이 고정화되지 않거나 인접 사이트와의 contamination 등의 문제가 있다 [7-15].

따라서, 본 연구에서는 다항목측정 및 고집적어레이형 DNA칩의 개발을 위하여 생체재료의 새로운 고정화 방법을 제안하였다. 즉, 생체재료를 칩상에 직접 고정화하는 것이 아니고 미소담체(particles)에 고정화한 후, 담체를 칩상에 고정화하는 2단계고정화이다. 제2단계고정화법으로서는 번잡함을 경감하는 방법으로서 미소화된 담체군 (群)의 무작위액중자기조직화법 (random fluidic self-assembly method)에 의한 소수성상호작용 (hydrophobic interaction)을 이용하였다. 이 방법에 의하면 고정화 재료 종류의 증가나 고정화 영역의 미소화에 대해서도 그 공정이 번잡하게 되지 않고, 생체재료에 변성이 발생하지 않고 고정화할 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 많은 분석을 동시에 할 수 있으며, 미소화에 의하여 시약이나 시료 소비량의 억제나 복합적 정보의 취득이 기대되고 있다. 본 연구는 이를 위한 미소담체의 제작, 배치의 친화력으로서 얇은 판 (plate)을 다이싱 (dicing)하

여 얻은 미소담체와 패턴화 소수성막을 갖는 기판과의 소수성상호작용을 이용한 방법과 그 결과에 대하여 기술 하겠다.

2. 시약 및 실험방법

2.1 시약

CPFP (cyclized perfluoro polymer, 상품명 : CYTOP, 형번:CTL-809M) 및 CPFP의 용매액인 (C₄F₉)₃N (형번:CT-Solv180)은 Asahi Glass Co.의 것을 사용하였다. 3,3'-dithiodipropionic acid는 PFALTZ&BAUER사의 것을 사용하였다. 기관 초음파세척용의 아세톤 (CH₃CO CH₃), NHS(N-hydro xysuccinimide, C₄H₅ NO₃), 아비딘 (Mw 67,000, from white egg), Tris[2-Amino-2-hydroxy methyl-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-dimethylaminopropyl) carbodiimidehydrochloride, C₈H₁₇N₃HCl)은 Tokyo 화성공업의 것을 사용하였다. 생체재료로서는 5'말단에 각각 비오틴 및 FITC (fluoresceinisoithio cyanate)를 수식한 0.2μm 스케일의 이중나선 DNA를 Nissinbo에 위탁합성 하여 사용하였다. 염기배열은 각각 5'-GAAAAAAAAT GACGTCATCCG-3' (A, Mw 6,436.2, Tm 64.9), 5'-AGGAATTCCTCCAAAGCTTGGCA-3' (B, Mw 6,107, Tm 68.2) 및 5'-GAAAAAAAATGACGTCATCCGA GGAATTCCTCCAAAGCTTGGCA-3' (A+B, Mw 12,604.2, Tm 83)이다.

후막용 positive 레지스트인 OFPR-800과 그 전용현상액인 NMD-3:2.38 (산용용)은 Tokyo Applied Chemistry 의 것을 사용하였다. 그리고, negative레지스트인 XP SU-8(50)와 전용현상액은 MicroChem Co.의 것을 사용 하였다. 요소(I)는 안전화학의 것을 사용하였다. 기관세 정용 용매로는 전자공업용 (Kanto Chemistry) 아세톤을, 기타 시약으로는 화학-생화학용특급 또는 그 상당품을 사용하였다. 물은 칼린롤 프로세스에서는 초순수 (18.0M Ω·cm)를, 기타의 경우에는 증류수 (49.5×10⁻⁶S/cm, pH4.86)를 사용하였다.

2.2 cover glass의 미소가공

cover glass의 미소가공에 대한 모식도를 그림 1에 나타내었다. 우선, cover glass 기판 (0.13 0.16mm, 18mm×18mm, Takahashi Giken, Glass Co.)이 표면은 초음파세척기 (W-222, Honda)를 이용하여 순수, 아세톤, 순수의 순서로 각각 30분간 세정하였다. 그리고, cover glass의 한쪽면은 스핀코팅기 (1H-D3, MIKASA)를 이용하여 500rpm에서 10초, 1,000 4,000rpm에서 20초간으로 회전하면서 (C₄F₉)₃N 용제액으로 0.45 9.0wt-%의 농도로 희석시킨 CPFP를 피펫으로 100μL 적하시킴으로서

0.5 2.0 μ m의 두께로 코팅하여 소수성으로 하였다. 다음에, 115 의 항온오븐 (DS64, YAMATO SCIENTIFIC) 중에 넣고 4시간 하드베이킹하였다. 그리고, 그 반대면에 탭스텐보트를 이용한 저항가열형의 소형진공증착장치 (SVC-700TURBO-TM, SANYU)를 이용하여 크롬을 약 200 증착하고, 그 후 진공을 계속 유지하면서 금(2 Φ × 500L)을 약 2,000 증착하였다. 막두께는 수정진동자 (6MHz, PKG 10, LEYBOLD INFICON)를 이용한 막두께 모니터 (TM-200R, Maxtek)로 측정하고, 증착속도를 클롬의 경우는 0.5 1.0 /s으로, 금의 경우는 5.0 10.0 /s의 범위가 되도록 조절하였다. 진공도는 이온진공계이지 (ULVAC GI-TL3)로 측정하였고, 10⁻⁶Torr 이하를 유지하였다. 증착후, 어닐링 등의 열처리는 실시하지 않았다.

계속해서, cover glass를 점착성의 다이싱테이프 (Adwill D-210, LINTEC)에 붙인 후, 다이싱머신 (A-WD-10A, Tokyo Seimitsu)을 이용하여 다이아몬드 커터 (52D-0.1T-40H, Asahi Diamond)로 0.5mm/s의 속도로 순수를 뿌리면서 100 400 μ m의 크기로 잘라서 미소담체를 제작할 수 있었다. 그후, 5분간 다이싱테이프에 UV조사하여 점착성을 UV조사전 19,600mN/25mm (카탈로그값)에서 UV조사후 250mN/25mm로 약화시켜 담체가 점착성테이프에서 쉽게 떨어지도록 하였다. 이 공정에 의하여 1,000 8,000개 정도의 미소담체를 제작할 수 있었다.

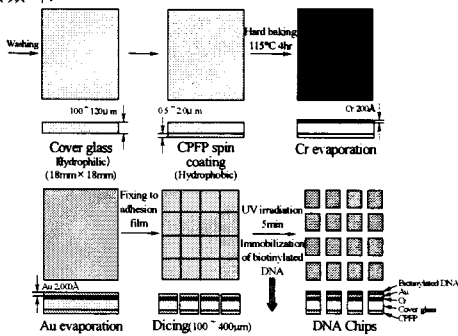


그림 1. DNA칩의 제작 공정.

2.3 DNA의 고정화

그림 2와 같은 과정으로 티올유도체 및 아비딘을 거쳐 5'말단에 비오틴을 수식한 DNA를 고정하였다. 우선, 1mM 농도의 3,3'-dithiodipropionic acid 수용액 3mL중에 증착한 cover glass를 실온에서 40분간 담근다. 수용액에 100mg/mL 농도로 반응 NHS와 EDC를 혼합액으로 하여 카복실산과 1시간 반응시킨 후 건조시켰다. 아비딘을 완충액 (pH7.9, 10mM Tris-HCl, 0.2M NaCl)으로 0.2mg/mL가 되도록 조절한 1mL 용액에 2시간 담구어 놓았다. 1M농도의 에탄올아민 수용액 1mL에 cover glass를 1시간 담그고 카복실기를 불활성화하였다.

아비딘을 수식한 금을 완충액 (pH7.9, 10mM Tris-HCl, 0.2M NaCl)에 비오틴화 DNA를 1 μ M이 되도록 1mL의 용액에 25 에서 1시간 담구어 두었다. 여기서, 비오틴화DNA 체인은 아비딘 분자의 4개 결합 사이트의 하나와 결합된다. 비오틴화 DNA의 고정량은 DNA 용액에 담구는 시간에 의하여 제어되었다. 이후, 3-4와 같은 방법으로 제작된 DNA칩 마이크로어레이에 완충액 중의 FITC수식된 complementary DNA (cDNA)를 primary DNA와 30분간 반응시켜 결합 (hybridization)시키고, 형광현미경으로 반응을 확인하였다.

2.4 패턴칩의 제작

패턴칩의 제작에 대한 모식도를 그림 3에 나타내었다. 우선, 유리기판 (1.2 1.5mm, 76mm×26mm, S-1225, Matsunami Glass)을 다이아몬드커터로 3등분한 후, 표

면은 초음파세정기를 이용하여 순수, 아세톤, 순수의 순서로 각각 30분간 세정하였다. 그리고, 유리기판이 형광을 가지고 있으므로, 크롬/금/크롬을 차례로 200 /2,000 /200의 두께로 증착하여 유리기판에 의한 형광의 영향을 방지하였다. 그리고, 유리기판의 한쪽면에 대하여 스펀코팅기를 이용하여 500rpm에서 10초, 1,000 4,000rpm에서 20초간, (C₄F₉)₃N 용제액으로 9wt-%의 농도로 희석시킨 CPFP를 피펫으로 100 μ L 적하하여 0.5 2.0 μ m의 두께로 코팅함으로써 소수성으로 처리하였다. 다음에 115 의 항온오븐중에 넣고 4시간 하드베이킹하였다. 이 위에 크롬과 금을 각각 약 200 과 2,000 으로 증착한 후, class 10의 칼린룸에서 positive형의 포토레지스트인 OFPR-800을 7 8 방울 떨어뜨려 스펀코팅 (1H-DXII, MIKASA) (1st:500rpm/10s, slope:10s, 2nd:4000rpm/20s, slope:5s)하고, 오븐 (DK300, YAMATO SCIENTIFIC)중에서 pre-baking (80 , 30min)하였다.

그리고, 마스크얼라이너 (MJB3 UV400, Karl Suss)를 이용하여 8초간 노광한 후, 현상액인 NMD-3에 30초간 담구어 현상하고, 초순수로 2번 세정하였다. 계속하여, 질소가스를 불어 건조시켰다. post-baking (80 , 30min)한 후, 금에칭액 (요화칼륨 40g, 요소 10g, 물 400mL)으로 금을 에칭하고, 현상액 세정과 동일한 과정으로 건조시켰다. 다음으로, 아세톤 세정으로 포토레지스트를 제거한 후, 현상액 세정과 동일한 과정으로 건조시켰다. 계속해서, 크롬에칭액(수산화나트륨 40g, 페린화칼륨 100g, 물 400mL)으로 크롬을 에칭하고, 현상액 세정과 동일한 과정으로 건조시켰다. 또한, 2×10⁻⁵Torr 이하에서 산소플라즈마 (1SCCM, 500V, 이온류 밀도 1.0mA/cm² 이하, RF power 100W) (EIS-200ER, ELIONIX)를 2분간 조사함으로써, CPFP를 에칭시켰다. 다시, 남아 있는 크롬과 금을 모두 에칭시켰다. 이 공정에 의하여 유리기판의 한쪽면에 친수성 및 소수성 부분으로 나누어 수많은 사이트를 제작할 수 있었다.

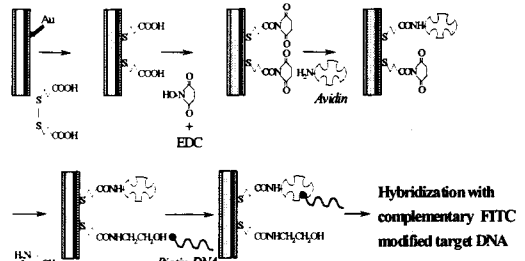


그림 2. 아비딘 수식한 금에 비오틴화 DNA의 고정 및 FITC cDNA의 결합 과정.

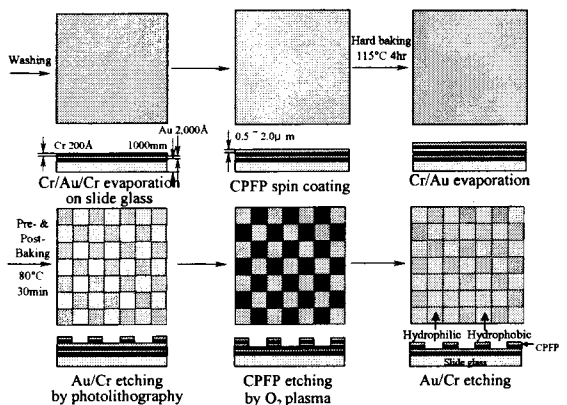


그림 3. 패턴칩의 제작 공정.

2.5 무작위액중자기조직화법을 이용한 소수성상호작용에 의한 패턴칩에 담체의 고정

패턴칩에 미소담체를 소수성상호작용에 의한 무작위액중자기조직화법으로 고정화하기 위하여 사래에 패턴칩을 놓고, 현탁액 (suspension, 에탄올 90%+순수 10%)중에 넣는다. 그리고, 현탁액에 1500 4000개 정도의 미소담체를 넣고 흔들면 중력에 의하여 담체가 가라앉으며, 소수성 상호작용에 의하여 패턴칩과 비오턴화 DNA가 수식된 담체의 소수성부분끼리가 무작위로 수많은 사이트에서 결합되어 담체가 고정화되었다.

2.6 DNA칩 마이크로어레이와 cDNA의 반응

현탁액에 화학·생화학적으로 성질이 다른 생체재료를 고정화한 담체의 혼합물을 이용하여, 최종적으로 다종류의 생체재료를 고밀도로 고정화한 DNA칩 마이크로어레이를 얻을 수 있었다. 본 논문에서 제작한 DNA칩 마이크로어레이에 완충액 (pH7.9, 10mM Tris-HCl, 0.2M NaCl)중에서 그림 2의 마지막 부분과 같이 FITC수식한 cDNA를 적당한 농도로 60, 64 및 78 에서 30간 반응시켜 이중나선을 결합시켰다. 이중나선 DNA가 결합되었는가는 암실에서 FITC용 형광필터가 있는 형광현미경 (여기광 : 450 490nm, 흡수광 : 515 565nm, 분광 : 510nm) (LEICA MZ FLIII, Leica)으로 여기서키면 형광을 확인할 수 있으며, 형광의 밝기에 의하여 농도를 알 수 있다.

3. 결과 및 검토

3.1 cover glass의 미소가공

그림 4는 180배로 확대한 제작된 담체의 SEM (S-3500, HITACHI) 이미지로서, 다이싱머신으로 400 μ m의 크기로 잘라서 제작하였으며, 1,300 4,000개 정도를 제작할 수 있었다. 담체에 UV를 조사한 후, 그림 2와 같은 공정으로 티올유도체 및 아비딘을 통하여 5'말단에 비오턴화 DNA를 수식하여 고정하였다.

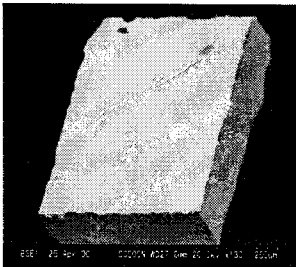


그림 4. 다이싱메이프에 붙이고 다이싱머신으로 400 μ m의 크기로 자른 UV조사후의 담체.

3.2 패턴칩의 제작

포토리소그래픽 및 산소플라즈마 처리하여 에칭한 후의 500 μ m의 크기의 패턴칩을 그림 5에 나타내었다. 그림 4에서 검정 부분은 금/CPFP로서, 산소플라즈마 처리에 의하여 친수성 처리되어 있다. 또한, 투명하게 보이는 부분은 CPFP만의 부분으로서 소수성이며, 2,600 67,000개 정도의 친·소수성 부분이 격자상 모양으로 되어 있다. 이 패턴칩은 담체군의 무작위액중자기조직화법을 이용한 소수성상호작용의 응용이 가능할 것으로 생각된다.

3.3 무작위액중자기조직화법을 이용한 소수성상호작용에 의한 패턴칩에 담체의 고정

무작위액중자기조직화법을 이용한 소수성상호작용에 의하여 패턴칩 (500)상에 미소담체 (400)를 고정하기 위하여, 사래에 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 대부분의 담체는 패턴칩과 소수성 부분끼리 접하고 있다.

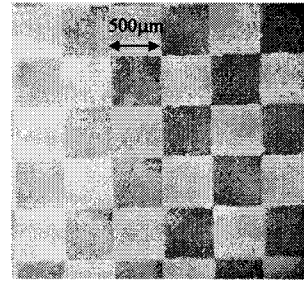


그림 5. 포토리소그래픽 및 산소플라즈마 처리로 에칭한 후의 패턴칩.

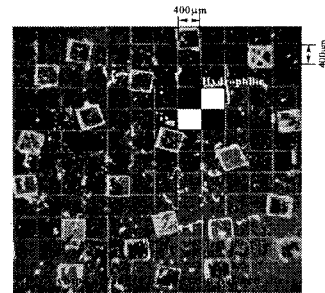


그림 6. 소수성상호작용에 의하여 패턴칩에 고정된 담체.

3.4 DNA칩 마이크로어레이와 cDNA의 반응

현탁액중에서 화학·생화학적으로 성질이 다른 생체재료를 고정화한 담체 혼합물을 이용하면, 최종적으로 그림 7 (a)와 같은 다종류의 생체재료를, 고밀도로 고정화한 다항목측정 및 고집적마이크로어레이형 DNA칩을 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 7 (b) (d)에 나타내었다. 그림 7 (a)에서 원부분이 비오턴화 DNA가 수식된 담체로서, cDNA와의 결합이 없으므로 형광을 확인할 수 없다.

그림 7 (b)는 A cDNA를 결합시킨 경우로서, 원부분에서만 형광을 볼 수 있으며, 이곳에 A DNA가 고정되어 있음을 알 수 있다. 마찬가지로, 그림 7 (c) 및 (d)에서 그림 7 (b) 이외의 담체에서도 원부분에서 형광을 볼 수 있었으며, 이곳에 B 및 A+B DNA가 고정되어 있음을 알 수 있다. 이 결과를 수많은 DNA종에 확대하면, 간단, 신속, 안정성 등이 뛰어난 다항목측정 및 고집적마이크로어레이형 DNA칩으로서 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

4. 결론

본 논문에서는 후막용 CPFP를 이용하여 제작한 소수성막을 갖는 패턴칩에, 다이싱에 의하여 얻은 미소담체에 DNA를 고정화하고, 현탁액중에서 무작위액중자기조직화법을 이용하여 소수성상호작용에 의하여 임의의 위치에 배치할 수 있었다.

그리고, 액체중에서 패턴칩과 담체와의 소수성상호작용력은 기타 다른 작용력보다 우수하였으며, 다항목측정의 고집적형 마이크로어레이형 DNA칩으로서 응용 가능한 기술임을 알았다.

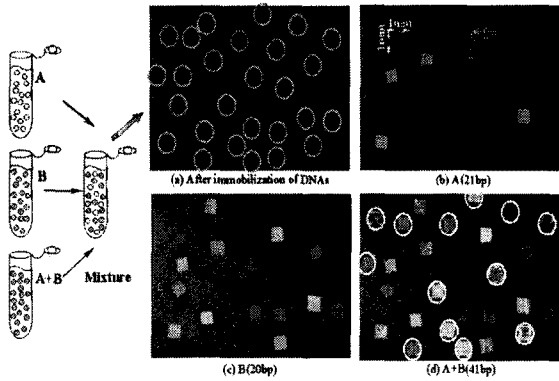


그림 7. DNA칩 마이크로어레이 및 형광. (a) cDNA 결합전. (b) A cDNA 결합후. (c) A cDNA 결합후. (d) A cDNA 결합후.

또한, 본 논문에서 나타난 새로운 생체재료 고정화 방법은 배치 직후 어느 재료가 어디에 배치되어 있는가의 정보는 없으나, 생체재료 그 자체의 응답을 이용하여 캘리브레이션 등에 의하여 최종적인 위치를 확인하거나, 형광체의 종류, 담체의 크기 및 종류, 담체에 각인을 하는 등의 방법을 이용하면 해결할 수 있다. 한편, 보다 많은 담체를 배치, 고정화하기 위하여 안정한 패턴칩의 형상을 제작할 필요가 있음을 알았다.

생체재료의 2단계고정화방법은 간단, 신속, 안정성 등이 뛰어난 다항목측정 및 고집적마이크로어레이형 DNA 칩으로서 활용할 수 있을 것으로 기대된다. 본 방법은 원리적으로 미소담체는 미세가공기술과의 정합성이 좋고, 보다 정밀한 가공을 하여 해결 가능한 문제일 것으로 생각된다.

[참 고 문 헌]

- [1] M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, P. O. Brown, *Science*, **270**, 467, 1995.
- [2] Fodor, S. P. A.; Read, J. L.; Pirrung, M. C.; Stryer, L.; Lu, A. T.; Solas, D. *Science*, **251**, 767, 1991.
- [3] S. P. A. Fodor, R. P. Rava, X. C. Huang, A. C. Pease, C. P. Holmes, C. L. Adams, *Nature*, **364**, 555, 1993.
- [4] Zellers, E. T.; Han, M. *Anal. Chem.*, **68**, 2409, 1996.
- [5] E. T. Zellers, S. A. Batterman, M. Han, S. J. Patrash, *Anal. Chem.*, **67**, 1092, 1995.
- [6] A. E. Bruno, S. Barnard, M. Rouilly, A. Waldner, J. Berger, M. Ehrat, *Anal. Chem.*, **69**, 507, 1997.
- [7] Lin, L.; Walt, D. R. *Anal. Chem.*, **67**, 3746, 1995.
- [8] Healey, B. G.; Walt, D. R. *Anal. Chem.*, **67**, 4471, 1995.
- [9] Dickinson, T. A.; White, J.; Kauer, J. S.; Walt, D. R. *Nature*, **382**, 697, 1996.
- [10] C. A. Browne, D. H. Tarrant, M. S. Olteanu, J. W. Mullens, E. L. Chronister, *Anal. Chem.*, **68**, 2289, 1996.
- [11] A. V. Lemmo, J. T. Fisher, H. M. Geysen, D. J. Rose, *Anal. Chem.*, **69**, 543, 1997.
- [12] A. C. Pease, D. Solas, E. J. Sullivan, M. T. Cronin, C. P. Homes, S. P. A. Fodor, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**, 5022, 1994.
- [13] 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, *Science*, **274**, 610, 1996.
- [14] G. McGall, J. Labadie, P. Brock, G. Wallraff, T. Nguyen, W. Hinsberg, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**, 13555, 1996.
- [15] Michael, K. L.; Taylor, L. C.; Schults, S. L.; Walt, D. R. *Anal. Chem.*, **70**, 1242, 1998.