

Hoechst groove binder를 이용한 유전자의 전기화학적 검출

최 용성, 이 우기, 이 경섭

동신대학교 전기공학과

Electrochemical Gene Detection Using Hoechst Groove Binder

Yong-Sung Choi, Woo-Ki Lee, and Kyung-Sup Lee

Department of Electrical Engineering, DongShin University

Abstract : In this study, 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, Microfabrication technology, Mercaptohexyl moiety, Hoechst 33258

1. 서 론

DNA칩은 복수의 유전자를 동시에 해석하는 수단으로서 개발되었다. 유전의학의 진보에 의하여 유전병이나 암과 같은 유전자가 직접 관여하는 유전자 질병에 한정되지 않고, 고혈압이나 당뇨병 등의 생활습관병에 대해서도 유전자가 영향하여 발병됨이 밝혀지고 있다^[2]. 이 때문에, 질병에 관여하는 유전자의 해석은 병의 조기발견·조기치료를 하는데 매우 중요하다. 아직 윤리적으로 해결해야 할 문제는 남아있으나, 금후 유전자 진단에의 기대는 높아지고 있다. 또한, 유전자다형, 특히 일염기치환다형 (Single Nucleotide Polymorphism : SNP) 해석은 생물종 개체간의 다양성을 고찰하는데 도움이 되며, 계열학·분류학에 중요한 지식을 줄 것이다.

DNA의 고정화 담체로서 니트로셀룰로스마 등의 막필터, 실리콘기판, 유리기판, 고분자, 전극 등 여러 가지의 것이 이용되고 있으며, 또한 DNA를 기판상에 배치시키는 방법이나 사용하는 장치도 다양하다^{[3]-[5]}. 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 DNA (ds-DNA)를 형성하므로, 그 부분의 형광강도를 측정함으로써 유전자 기능의 해석이나 질환에 관여하는 유전자를 검출한다^{[4]-[8]}. 형광검출형 DNA칩의 큰 특징은 미리 Rhodamine, Cy3, Cy5 등과 같은 형광색소로 표적 유전자를 표시하는 데 있다. 이 표시된 유전자를 칩상에서 반응시키면 표적 유전자에 상호적인 배열을 갖는 probe DNA만이 결합 (hybridization)

하고, 유전자 hybrid (ds DNA)를 형성한다. 이 유전자 hybrid가 형성된 장소만이 칩상에서 형광신호를 발현하므로, 이것을 공초점 레이저 형미경 등을 탐지한 해석장치로 측정한다. 형광신호의 강도를 해석함으로써 질환의 원인이 되는 유전자를 신속히 알 수 있다. 그러나, 수만개의 유전자 단편을 준비하여 기판상에 고밀도로 배치시켜야 하지만, 조작장치나 해석장치에 코스트가 필요하여 일부 연구기관이나 병원에서만 사용되고 있다.

한편, 최근에는 표적 유전자의 검출을 형광측정이 아닌 전기화학적 측정에 의하여 검출하려는 목적으로 전기화학적 DNA센서의 연구도 이루어지고 있다. 전기화학 측정은 형광측정에 비하여 전 검출 시스템의 저가화, 조작의 간편성의 향상, 휴대화 등이 가능하기 때문이다.

전기화학적 DNA센서의 연구로서는 DNA 분자의 낭쇄 산화전류에 주목하여 single strand DNA (ss-DNA)를 식별한 보고^[9]나, 수정진동자를 이용하여 DNA센서를 개발한 보고^[10]가 있으나, 가장 많이 연구되고 있는 것은 intercalator를 이용한 전기화학적 DNA센서이다. 전기화학적 DNA센서에 이용되는 intercalator로서 금속착화합물을 이용한 연구로서, Wang^{[11], [12]} 등은 카본페이스트 전극상에 probe DNA를 흡착 고정하고, 검출 마커로서 $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ 를 이용하여 에이즈 바이러스 (human immunodeficiency virus : HIV) 유전자의 일부를 검출하였다. $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ ($\text{phen}=\text{phenanthrolin}$)의 전기화학 측정법으로서 chronopotentiometric stripping analysis (PSA)를 이용하였으며, $1.35\text{ng}/50\mu\text{l}$ 의 유전자를 검출하였으나, 감도적으로는 상당히 낮다. Thorp^{[13], [14]} 등은 검출 마커로서 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ($\text{bpy}=2,2'-bipyridine$)와 $\text{Os}(\text{bpy})_3^{2+}$ 와 같은 intercalator를 이용하여, 염기쌍의 조합을 인식할 수

있는 1염기 mismatch 검출을 가능하게 하였다.

또한, probe DNA 수식 전극의 표면처리법에 있어서, 자기조직화 단분자막 (self-assembly monolayer : SAM)법을 이용하여 효율이 좋게 hybridization을 하는 방법이 연구되고 있다. 본 연구에서도 제작된 미소전극어레이에 이 표면처리를 하여 DNA의 고감도화를 실시하였다.

집적화된 전극의 전기화학적 측정을 할 때 필요한 미소전극어레이의 제작 방법으로서 가장 유익한 것이 반도체 제조기술의 하나인 photofabrication 기술이다. 이 기술에 의하여 종래의 DNA칩을 소형화하거나 제조공정의 자동화가 가능하므로, 칩의 대량생산이나 저가화가 가능하다. 또한, 바이러스나 세균에 의한 감염병을 검출할 경우, 측정에 필요한 probe의 수 (전극의 수)는 비교적 소수로 충분하므로 장치 구성 전체의 간략화나 소형화가 가능하며 DNA칩과 해석장치를 일체화한 휴대형 DNA칩에 응용할 수 있다.

따라서, 본 논문에서는 형광검출형 DNA칩과 비교하여 간편성, 휴대성, 개발비의 면에서 우수한 미소전극어레이형 DNA칩을 개발하는 것을 목적으로 하였다. 이를 위하여 고집적형 바이오센서의 제작에 필요불가결한 미세가공 기술에 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. 실험방법

2.1 전극제작 및 DNA고정화 평가

기판상에 금속박막을 증착하기 위하여 터보식 전공증착장치 (SANYU, SVC-700 TURBO-TM) 및 박막두께 측정장치 (일본전자, JTM200R)를 사용하였다. photofabrication을 위한 장치로서 레지스트를 도포하기 위하여 스픬코터 (MIKASA, IH-DX), 베이킹을 위하여 오븐 (YAMATO, DK300), 노광하기 위한 마스크얼라이너 (Karl Suss, MUB3)를 사용하였다. 제작된 미소전극어레이의 형상관찰에는 고정밀디지털마이크로현미경 (KEYENCE, VH-6300) 및 실체현미경 (Leica, MZFLIH)을 사용하였다. probe DNA를 어레이상에 고정화하기 위하여 Stanford대학의 Brown 등이 개발한 DNA어레이어 시스템을 사용하여, PC (HewlettPackard Vectra VE)에 의하여 제어하였다. DNA 어레이어를 사용하여 slide glass상에 spot한 형광색소의 관찰에는 DNA 마이크로스캐너 (Axon, GenePix4000A)를 사용하여 PC (intermedical IMC-DIANA)에 의하여 제어하였다. probe DNA의 고정화 반응의 확인에는 형광현미경/냉각CCD카메라를 이용하였으며, 형광현미경은 ZEISS사의 Axiovert 135, 냉각CCD카메라는 Photometrics사의 Model CH1을 사용하였다.

2.2 미소전극어레이형 DNA칩의 제작

칩 기판은 slide glass (Matsunami, 76mm×27mm, 두께 1.2~1.5mm) 또는 베이크판 (Sunhayato, 두께 10mm)을 적당 크기로 절단하여 세척한 후, 초순수에서 15분, 아세톤에서 15분, 초순수에서 15분의 순으로 초음파 세척하였다. 금전극은 전공증착 장치를 사용하여 약 10^{-6} Torr의 전공상태에서 기판상에 접착층으로서 크롬을 약 200Å 증착하고, 계속하여 이 위에 금을 약 2000Å 증착한 것을 사용하였다.

패턴 제작을 위한 포토마스크는 Adobe Illustrator 8로 디자인하여 Yamada Film에 필름을 출력하여 직접 유리판에 고정해서 사용하였다. 스픬코터를 사용하여 positive 형 레지스터 OFPR 800을 기판상에 균일하게 도포하였다. 이 기판을 오븐에서 가열한 후, 미리 제작된 마스크패턴을 이용하여 노광하고, 현상·예칭하여 미소전극어레이를 제작하였다. 리드선 부분을 피복하기 위하여 다시 positive 형 OFPR 800을 도포하고 오븐에서 가열한 후, 별개의 마스크패턴을 사용하여 노광·현상하고, 전극부분 및 외부접속전극 (커넥터) 부분을 노출시켰다.

2.3 probe DNA의 고정화

본 논문에서는 바이러스성 질환을 검출하기 위한 DNA칩을 개발하는 것을 최종 목적으로 하고 있으므로, 바이러스 유전자에 특유한 염기배열을 사용하였다. 본 논문에서 probe DNA (HIV SK38) 및 target DNA로서 사용된 4종류의 올리고뉴클리오파이드의 염기배열은 그림 1에 나타내었듯이 gas SK38 : 5'-ATTCTCTCTAC TgggATAggTggATTAT-3', gas SK39 : 5'-gCATT CTggACATAAgACAAggACCAAA-3', 5'-CCCCCCC TCCGggAgAgCCATAgTTggT-3' 및 5'-CCCCCCC TCCGggAAAGCC ATAgTTggT-3'이다. 사용된 올리고뉴클리오파이드중에서 같은 종류의 probe DNA와 target DNA는 서로 상보적인 염기배열을 갖고 있으며, 배열이 다른 유전자를 control DNA (HIV SK39)로 하여 사용하였다. 여기서, -SH는 probe DNA의 5' 말단이 티올기에 의하여 수식되어 있음을 의미한다. 이를 올리고뉴클리오파이드를 TE 버퍼 (pH8.0)를 적당량 가하여 회석하고, 각 농도의 probe DNA 용액을 조제하였다.

금 전극 표면의 전처리로서 3N H₂SO₄ 용액을 전극상에 적하하여 30분 방치하였다. 금 전극을 초순수로 세척한 후, 마이크로피펫 또는 DNA어레이어를 사용하여 티올기를 수식한 probe DNA 용액을 전극상에 스詈하고, 10°C에서 12시간 반응시켜 금 전극상에 probe DNA를 고정화하였다. DNA 오레이어를 사용하여 probe DNA를 스詈할 경우, 통상은 스詈직경을 크게 하기 위하여 가는 슬릿이든 프린팅칩 (type 1)을 사용한다. 그러나, 전극표면이 크므로 스詈직경도 크게 할 필요가 있으므로 슬릿이 두꺼운 프린팅칩(type 2)을 사용하였고, 칩끌을 연마하여 스詈직경을 크게 (type 3) 하였다. 고정화 반응 후, 초순수로 전극

을 세척하고, 비특이적으로 결합하여 있는 DNA를 제거한 후, N_2 로 건조시켰다.

다시 비특이적으로 결합하여 있는 probe DNA를 충분히 제거하여 hybridization의 효율을 향상시키기 위하여, 금 전극상에 1mM 6-mercaptophexanol (MCH) 용액을 적하하여 1시간 반응시켰다. 이 MCH 처리에 의하여 금 표면에는 황화의 화학적 친화력에 의하여 특이적으로 probe DNA 분자가 고정화되어 있으나, 통상은 비특이적으로 결합도 일어난다. 따라서, 금 표면에서 자기조직화단분자막 (self-assembly monolayer : SAM)을 형성하는 MCH로 처리하면 비특이적 probe DNA 분자를 치환해서 제거된다^[15]. probe DNA에 상보적인 target DNA를 반응시키면, 효율이 높아져 ds-DNA가 형성되며, background 전류를 저감할 수 있다. 본 논문에서는 이와 같은 방법으로 유전자검출의 고감도화를 도모하였다.

2.4 전기화학측정

전기화학측정은 3전극법으로 하였다. 참조전극으로서는 은/염화은 전극을 사용하였고, 비교전극을 사용하여 비교하였으며 전위차가 $\pm 1\text{mV}$ 이내인 것을 확인하고 사용하였다. counter 전극으로는 백금선을 사용하였다. 측정시에는 DNA칩의 끝에 있는 외부접속전극부분을 커넥터에 삽입하여 전기화학측정장치(BAS, CV-50W)에 접속하여 사용하였으며, GPIB인터페이스로 접속한 PC (Gateway2000 4DX2-66)에 의하여 제어하고 정전 차폐된 환경에서 측정하였다. 전기화학측정법으로서는 cyclic-voltammetry (CV) 또는 linear sweep voltammetry (LSV)에 의하여 측정하였다.

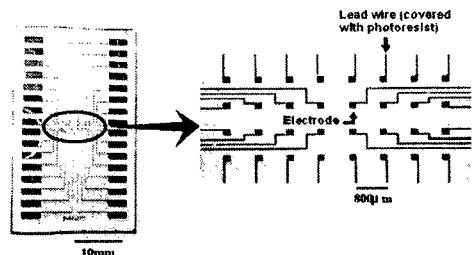
Hoechst 33258 물질을 포함하는 용액중에서 CV를 하면 550mV 부근의 전위에서 산화반응을 일으키므로, 이 산화전류를 측정하여 ss-DNA와 ds-DNA를 식별할 수 있다. 본 논문에서는 probe DNA의 5' 말단을 티올기 ($-(\text{CH}_2)_6\text{SH}$)로 수식하고, 황화 금의 결합을 이용하여 금 전극상에 고정화하였다. target DNA를 반응시켜서 유전자 hybrid 생성물을 형성시킨 후, Hoechst 33258을 반응시켰다. linear sweep voltammetry (LSV)에 의하여 Hoechst 33258 유래의 전기신호를 측정하여 산화전류값의 차이로부터 ss-DNA와 ds-DNA를 식별할 수 있었다.

3. 결과 및 검토

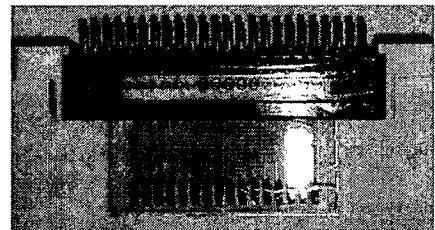
3.1 DNA칩 제작법의 검토

제작된 미소전극어레이형 DNA칩을 그림 1 (a)에 나타내었다. 미소전극의 면적은 $200 \times 200\mu\text{m}^2$ 이며, 32개의 전극을 병렬시켰다. 본 논문에서는 복수의 유전자를 동시에 검출하기 위하여, 리드선을 각 커넥터에 납땜하여 접착하는 복잡한 공정을 생략하고, 간단히 전기화학측정을 할 수 있는 그림 1 (b)와 같은 카트리지형 DNA칩을 설계하였다. 보통은 기판으로서 베이크판과 같은 수지를 사용하지만, 실제 제작한 결과, 수지표면이 약간의 요철이 있으므로,

리드선 부분에 단선이 많이 있었다. slide glass를 기판으로 하여 사용한 경우는 거의 단선이 발생하지 않았으므로, 기판으로 사용하였다.



(a) 32 channels microelectrode array



(b) cartridge type microelectrode array

Fig. 1. 32 channels microelectrode array.

3.2 Hoechst 33258의 전기화학적 특성

0.2M 인산 버퍼중에서 ds-DNA의 검출 마커인 Hoechst 33258의 CV를 측정한 결과가 그림 2이다. 용액 중에 Hoechst 33258를 포함하지 않는 경우에는 약 140mV, -30mV 부근에 불순물로 생각되는 피크가 나타났다. 이 피크는 제작된 전극에 의하여 다르므로, 제작시의 표면상태의 차이에 의한 것으로 생각된다. Hoechst 33258를 용액중에 첨가한 경우, 약 550mV 부근에서부터 급격히 전류가 증가하며, Hoechst 33258가 산화반응을 일으킨 것으로 생각된다. 그러나, 환원피크는 측정되지 않으므로, 불가역적으로 산화반응이 진행하였다고 생각된다. 또한, Hoechst 33258의 산화된 부위에 대해서는 Ishimori^[16] 등이 이미 다출환의 N원자 부근일 것으로 추정하고 있다.

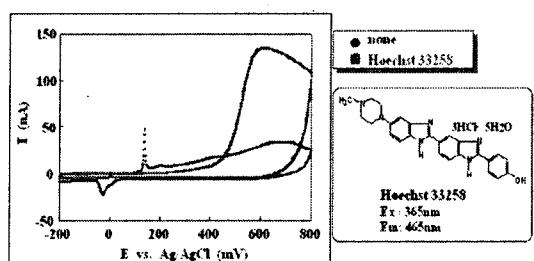


Fig. 2. Cyclic voltammograms of Hoechst 33258 at microelectrode array.

3.3 probe DNA 고정화의 확인

3.3.1 형광측정에 의한 고정화의 확인

100nM (약 0.1ng)의 probe DNA (HIV SK38 probe-FITC)를 각 전극상에 스트레이트하여 10°C에서 12시간 반응시켜 고정화하였다. 세척 전후에 있어서 형광현미경/냉각CCD카메라를 사용하여 전극상에서 발생하는 형광신호를 관찰하였다 (데이터 미제시). 세척전에는 probe DNA의 형광이 확실히 확인되었다. 그러나, 세척후에는 감도를 올려도 거의 형광신호가 확인되지 않았다. 이것은 전극표면에 고정화된 DNA량이 너무 적은 것과 사용한 probe DNA의 FITC의 형광강도가 금전극상에서 약한 것으로 생각된다. 특히, 금 등의 금속표면에 형광물질을 부착시켜 형광물질로부터 금속으로 에너지 전이가 발생하여 형광이 소광되는 것도 생각할 수 있다.

이와 같이 FITC 표식한 probe DNA의 형광측정에 의한 고정화 확인은 곤란함을 시사하므로, probe DNA 유래의 형광신호가 아닌, ds-DNA 결합물질인 Hoechst 33258의 형광신호를 관찰하였다. 본 논문에서는 Hoechst 33258을 전기화학측정할 때의 검출 마커로서 사용하는 것을 목적으로 하고 있으나, 이 물질은 본래 형광을 발생하는 핵산 염색체로서 사용되고 있다. 이 물질의 여기 파장은 365nm, 형광파장은 465nm이며, 핵염색제인 DAPI와 같은 필터로 관찰할 수 있다. probe DNA (HIV SK38 probe)를 고정화후, 상보적인 배열을 갖는 target DNA (HIV SK38 target)를 37°C에서 1시간 hybridization시켰다. hybridization 버퍼로서 2×SSC 용액을 사용하였다. 침의 세척 방법으로서는 2×SSC에 0.1% SDS를 첨가한 용액, 2×SSC에 0.01% SDS를 첨가한 용액, 2×SSC 용액으로 계속하여 세척하였다. 다음으로 100μM Hoechst 33258 수용액을 실온·암실에서 10분간 반응시켜 세척하였다. 형광현미경/냉각CCD카메라를 사용하여 전극상에서 발생하는 Hoechst 33258 유래의 형광신호를 관찰한 결과를 그림 3에 나타내었다. probe DNA를 수식하지 않은 전극에서는 형광이 관찰되지 않았으나, 수식한 전극은 반점상으로 Hoechst 33258 유래의 형광신호가 관찰되었으며, probe DNA가 고정화되어 있음이 확인되었다.

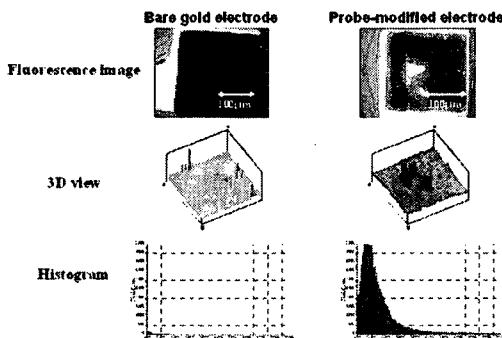


Fig. 3. Fluorescence image of Hoechst 33258 after hybridization on the electrode.

3.3.2 전기화학측정에 의한 고정화의 확인

마이크로 피펫 또는 DNA어레이어를 사용하여 probe DNA (HIV SK38 probe)를 고정화한 후, 5mM ferricyanide/ferrocyanide 용액중에서 CV를 측정한 결과를 그림 4에 나타내었다. 소인속도 100mV/s이며 -200~800mV의 범위에서 측정하였다. probe DNA를 고정화하지 않은 전극에서는 CV의 파형에 $\text{Fe}^{2+/\text{3}+}$ 유래의 산화·환원 피크가 나타난다. 이에 대하여, probe DNA를 고정화한 전극에서는 $\text{Fe}^{2+/\text{3}+}$ 유래의 산화·환원 피크가 작아졌다. 이것은, probe DNA의 고정화에 의하여 철이온의 산화·환원 반응이 일어나는 금 전극부분의 표면적이 감소하였기 때문으로 생각된다.

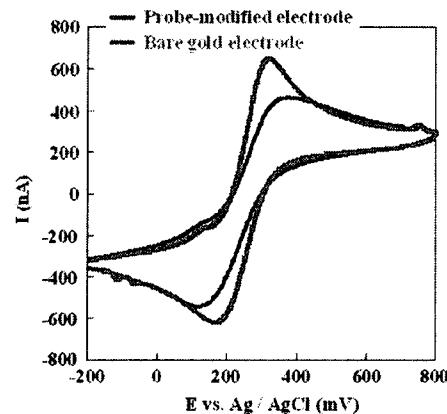


Fig. 4. Cyclic voltammograms of probe modified electrode.

3.4 고정화 농도의 최적화

1, 10, 100nM, 1μM의 각 probe DNA (HIV SK38 probe) 용액을 각각 별개의 전극상에 스트레이트하여 고정화한 후, probe DNA의 배열에 상호적인 배열을 갖는 target DNA (HIV SK38 target)를 37°C에서 1시간 hybridization 시켰다. 그 후, 100μM Hoechst 33258 수용액을 실온·암실에서 10분간 반응시켜 세척하고, 전기화학측정 (LSV)을 하였다. 측정은 모두 0.2M 인산 버퍼중에서 하였으며, 소인속도 100mV/s과 300~800mV에서 소인하였다. 그림 5와 같이 1, 10, 100nM, 1μM의 probe DNA를 전극상에 고정화한 경우는 농도가 증가함에 따라 Hoechst 33258 유래의 산화전류 피크도 상승하였으나, 1μM의 probe DNA를 고정화하였을 때는 산화전류 피크가 100nM일 때보다도 감소하였다. 이와 같은 결과에 기인한 원인으로서 과잉량의 probe DNA가 고정화되어 probe DNA층이 두껍게 되어 Hoechst 33258의 산화반응이 발생하기 어려운 상태가 되었다고 생각된다. 이 결과로부터 probe DNA가 전극 표면에 고정화되어 있음을 확인할 수 있으므로 이후 동일 반응조건으로 전극상에 probe DNA의 고정화를 할 것이다.

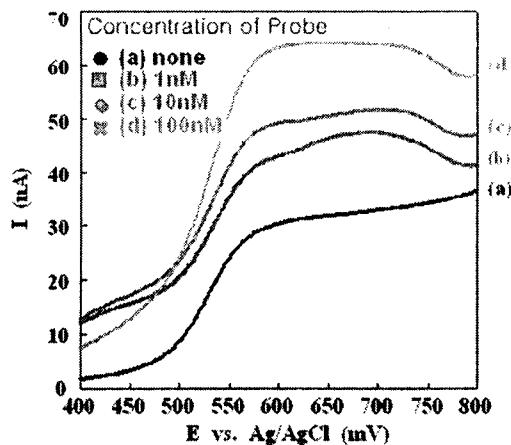


Fig. 5. Linear sweep voltammogram of Hoechst 33258 after immobilization of probe DNA.

3.5 HIV 유전자 검출

침의 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 6에 나타내었다.

그림 4에 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 원인으로는 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 원인으로서, 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 접출 마커를 개발하여 해결할 수 있는 문제이다.

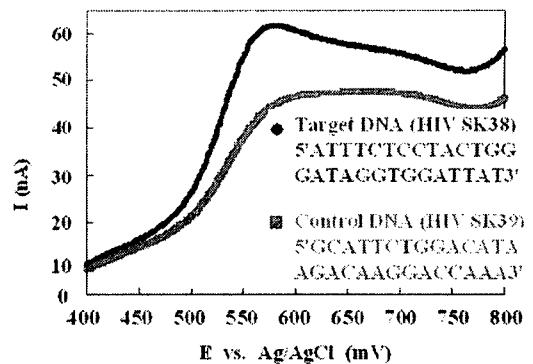


Fig. 6. Linear sweep voltammogram of Hoechst 33258 after hybridization with target DNA and mismatched DNA.

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) 금 전극상에 티올기를 수식한 probe DNA를 고정화한 후, ferricyanide/ferrocyanide 용액중에서 CV를 측정한 결과, probe DNA를 고정화하지 않은 전극과 고정화한 전극에서는 $\text{Fe}^{2+/\text{3}+}$ 의 CV에 차이를 볼 수 있었으며, probe DNA가 전극표면에 고정화되어 있음을 확인하였다. 또한, 형광수식한 probe DNA를 고정화한 경우에도 고정화를 확인할 수 있었다.
- 3) probe DNA의 고정화 농도에 대해서 검토하여 최적의 probe DNA의 농도는 100nM이었다.
- 4) 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] 日本化學會編, 化學總說No.1「バイオセンシングとそのシステム」, 學會出版センター, 1988.
- [2] 古庄敏行 他, 「臨床DNA診断法」、金原出版, 1995.
- [3] 江刺正喜 他, 「マイクロマシーニングとマイクロメカトロニクス」, 培風館, 1992.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] S.P.A. Fodor, R.P. Rava, X.C. Juang, A.C. Pease, C.P. Holmes, C.L. Adams, "Multiplexed biochemical assays with biological chips", *Nature*, 364, pp.555-556, 1993.
- [8] M. Schena, D. Shalon, R.W. Davis, P.O. Brown, "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray", *Science*, 270, pp.467-470, 1995.
- [9] G. Marrazza, I. Chianella, M. Mascini, "Disposable DNA electrochemical sensor for hybridization detection", *Biosensors & Bioelectronics*, 14, pp.43, 1999.
- [10] S.O. Kelly, E.m. Boon, J.K. Barton, N.M. Kackson and M.G. Hill, "Single-base mismatch detection based on charge transduction through DNA", *Nucleic Acids Research*, 27, pp.4830-4837, 1999.
- [11] E. Palecek, M. Fojta, M. Tomeschik, J. Wang, "Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage", *Biosens & Bioelectron*, 13, PP.621-628, 1998.
- [12] J. Wang, X. Cai, G. Rivas, H. Shiraishi, P.A.M. Farias, and N. Dontha, "DNA Electrochemical Biosensor for the Detection of Short DNA Sequences Related to the Human Immunodeficiency Virus", *Anal. Chem.*, 68, pp.2629, 1996.
- [13] D.H. Johnson, K.C. Glasgow, and H.H. Thorp, "Electrochemical Measurement of the Solvent Accessibility of Nucleobases Using Electron Transfer between DNA and Metal Complexes", *J. Am. Chem. Soc.*, 117, pp.8933-8938, 1995.
- [14] P.A Ropp and H.H. Thorp, "Site-selective electron transfer from purines to electrocatalysts : voltammetric detection of a biologically relevant deletion in hybridized DNA duplexes", *Chem Biol.*, 6, pp.599-605, 1999.