

# 미소전극어레이형 DNA칩을 이용한 유전자다형의 전기화학적 검출

論 文  
53C-5-10

## Electrochemical Detection of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Using Microelectrode Array on a DNA Chip

崔龍成\* · 權寧守\*\* · 朴大熙\*  
(Yong-Sung Choi · Young-Soo Kwon · Dae-Hee Park)

**Abstract** - In this study, an integrated microelectrode array was fabricated on glass slide using microfabrication technology. Probe DNAs consisting of mercaptohexyl moiety at their 5-end were spotted on the gold electrode using micropipette or DNA arrayer utilizing the affinity between gold and sulfur. Cyclic voltammetry in 5mM ferricyanide/ferrocyanide solution at 100 mV/s confirmed the immobilization of probe DNA on the gold electrodes. When several DNAs were detected electrochemically, there was a difference between target DNA and control DNA in the anodic peak current values. It was derived from specific binding of Hoechst 33258 to the double stranded DNA due to hybridization of target DNA. It suggested that this DNA chip could recognize the sequence specific genes. It suggested that multichannel electrochemical DNA microarray is useful to develop a portable device for clinical gene diagnostic system.

**Key Words** : DNA chip microarray, Microfabrication technology, Mercaptohexyl moiety, Hoechst 33258, Linear sweep voltammetry, Ferricyanide/ferrocyanide solution

### 1. 서 론

DNA칩은 복수의 유전자를 동시에 해석하는 수단으로서 개발되었다. 유전학의 진보에 의하여 유전병이나 암과 같은 유전자가 직접 관여하는 유전자 질병에 한정되지 않고, 고혈압이나 당뇨병 등의 생활습관병에 대해서도 유전자가 영향하여 발병됨이 밝혀지고 있다[1]. 이 때문에, 질병에 관여하는 유전자의 해석은 병의 조기발견·조기치료를 하는 데 매우 중요하다. 아직 윤리적으로 해결해야할 문제는 남아있으나, 금후 유전자 진단에의 기대는 높아지고 있다. 또한, 유전자다형, 특히 일염기치환다형 (Single Nucleotide Polymorphism : SNP) 해석은 생물종 개체간의 다양성을 고찰하는 데 도움이 되며, 계통학·분류학에 중요한 지식을 줄 것이다.

일반적인 유전자 진단 방법은 폴리머라제 연쇄 반응 (Polymerase Chain Reaction : PCR)을 이용한다. 이 방법은 검출하고자 하는 유전자를 100만배 이상으로 양을 증폭할 수 있으므로, 샘플양이 매우 소량이라도 매우 고감도의 분석이 가능하다. 현재 유전자 진단에서는 PCR로 증폭한 표적 유전자를 겔 전기영동으로 분리하여 해석하지만, 조작이 복잡하고 동시에 해석할 수 있는 유전자의 수가 적은 등의 문제가 있다.

DNA칩은 복수의 유전자를 동시에 해석하는 수단으로서 개발되었다. DNA칩의 주요 응용 분야로서는 유전자의 발현 해석과 유전자 다형 (SNP)의 해석이 주목받고 있다. DNA칩의

검출방법은 형광측정법 [2]~[5], 전기화학측정법 [6]~[9]으로 나눌 수 있다. 형광측정법 DNA칩은 수만개의 유전자 단편을 준비하여 기관상에 고밀도로 배치시켜야 하지만, 제작장치나 해석장치가 고가이므로, 일부 연구기관이나 병원에서만 사용되고 있다.

따라서, 최근에는 표적 유전자의 검출을 형광측정이 아닌 전기화학적 측정에 의하여 검출하려는 목적으로 전기화학적 DNA칩에 대한 연구도 이루어지고 있다. 전기화학 측정법은 형광측정에 비하여 전 검출 시스템의 저비용화, 조작의 간편성의 향상, 휴대화, 고감도 등이 가능하기 때문이다.

전기화학적 DNA센서의 연구로서는 DNA 분자의 당쇄 산화 전류값에 주목하여 single strand (ss, 단일나선) DNA (ss-DNA)를 식별한 보고 [8]나, 수정전동자를 이용하여 DNA센서를 개발한 보고 [10]가 있으나, 가장 많이 연구되고 있는 것은 intercalator를 이용한 전기화학적 DNA센서이다. 전기화학적 DNA센서에 이용되는 intercalator로서 금속착체화합물을 이용한 연구로서, Wang[10, 11] 등은 카본페이스트 전극상에 probe DNA를 흡착 고정하고, 검출 마커로서  $Co(phen)_3^{3+}$ 를 이용하여 에이즈 바이러스 (human immunodeficiency virus : HIV) 유전자의 일부를 검출하였다.  $Co(phen)_3^{3+}$  (phen=phenanthroline)의 전기화학 측정법으로서 chronopotentiometric stripping analysis (PSA)를 이용하였으며, 1.35 ng/50  $\mu$ l의 유전자를 검출하였으나, 감도적으로는 상당히 낮다. Thorp [12, 13] 등은 검출 마커로서  $Ru(bpy)_3^{2+}$  (bpy=2,2'-bipyridine)와  $Os(bpy)_3^{2+}$ 와 같은 intercalator를 이용하여, 염기쌍의 조합을 인식할 수 있는 1염기 mismatch 검출을 가능하게 하였다.

또한, probe DNA 수식전극의 표면처리법에 있어서, 자기조립화 단분자막 (self-assembly monolayer : SAM)법을 이용하여

\* 正 會 員 : 圓光大學校 電氣電子및情報工學部 教授 · 工博

\*\* 正 會 員 : 東亞大學校 電氣電子및컴퓨터工學部 教授 · 工博

接受日字 : 2004年 1月 2日

最終完了 : 2004年 2月 11日

효율 좋게 hybridization (반응)을 하는 방법이 연구[14, 15]되고 있다. 본 연구에서도 제작된 미소전극어레이에 이 표면처리를 하여 DNA의 고정도화를 실시하였다.

지금까지 보고된 집적형전극센서에 의한 유전자 검출의 예 [3], [4], [16]는 미소전극어레이상에 probe DNA의 고정화법으로서 전기화학적 방법을 이용하며, 최종적으로는 형광측정에 의하여 유전자를 검출한다. 집적화된 전극의 전기화학적 측정을 할 때 필요한 미소전극어레이의 제작 방법으로서 가장 유효한 것이 반도체제조기술의 하나인 포토리소그래픽 기술을 이용한 것으로서, 이것은 증착기술, 노광, 현상, 에칭기술 등을 조합시킨 것이다. 포토리소그래픽 기술은 종래의 DNA칩과 같이 소형화나 제조정도의 자동화가 가능하므로, 칩의 대량생산이나 저비용화가 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, 개발 비용의 면에서 우수한 미소전극어레이형 DNA칩을 개발하는 것을 목적으로 하였다. 이를 위하여 고정형 바이오센서의 제작에 필요불가결한 미세가공기술에 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. 시료 및 실험 방법

### 2.1 시약

기판의 세척에는 초순수 (milliQ), 특급 아세톤 (Wako Pure Chemicals, Ltd.) 또는 전자공업용 아세톤이 사용되었다. 미소전극의 제작에 필요한 금, 크롬은 각각 순도 99.99 %의 것을 사용하였다. 포토리소그래픽에 사용된 레지스트는 positive형의 OFPR 800 및 현상액은 NMD-3 (Tokyo Kasei Co.)를 사용하였다. 금 에칭액으로는 potassium iodide (Wako Pure Chemicals, Ltd.) 40 g, iodine (Wako Pure Chemicals, Ltd.) 10 g을 초순수 400 ml에 용해한 것을 이용하였다. 크롬 에칭액으로는 수산화나트륨 (Wako Pure Chemicals, Ltd.) 40 g, 페리시안화칼륨 (Wako Pure Chemicals, Ltd.) 100 g을 초순수 400 ml에 용해한 것을 이용하였다.

전기화학측정을 위한 인산 버퍼 (pH7)는 인산2수소나트륨2수화물 (Wako Pure Chemicals, Ltd.) 과 인산수소2나트륨12수화물 (Wako Pure Chemicals, Ltd.) 을 조제하여 이용하였다. 참조전극 (은/염화은 전극)은 한천파우더 (Wako Pure Chemicals, Ltd.), 염화칼륨 (Wako Pure Chemicals, Ltd.), 은선 (직경 = 0.5 mm)을 사용하여 제작하였다. 제작한 전극의 전처리를 위하여, 염산 (Wako Pure Chemicals, Ltd.)을 1 M로 희석하여 이용하였다.

probe DNA로 사용한 올리고뉴클리오타이드는 국제시약바이오사업부에 합성을 위탁하여, 5' 말단을 mercaptohexyl기를

수식한 것을 이용하였다. DNA 어레이어에 의하여 스폿된 어레이상을 DNA 마이크로 어레이 스캐너를 이용하여 해석하기 위하여 Cy3 또는 Cy5로 라벨화한 올리고뉴클리오타이드의 혼합용액을 이용하였다. 합성된 올리고뉴클리오타이드의 보존액으로서 TE 버퍼 (Tris-HCl 버퍼와 EDTA용액의 혼합액, (Wako Pure Chemicals, Ltd.))를 조제하여 이용하였다. probe DNA 고정화후의 전극의 표면처리를 위하여, 6-mercaptohexyl (Aldrich)을 초순수로 1 mM로 조제하여 이용하였다.

전극상에 probe DNA의 고정화를 전기화학적으로 확인하기 위하여 5 mM ferricyanide/ferrocyanide를 이용하였다. 유전자 검출을 위한 검출 마커 (DNA minor groove binder)로서 2'-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazoletrihydrochloride (Hoechst 33258) (SIGMA)을 사용하였다. Hoechst 33258은 intercalator가 아니지만, double strand (ds, 이중나선) DNA (ds-DNA)의 A-T 염기쌍에 대해서 선택적으로 결합하는 성질이 있는 물질로서, 핵 염색을 위한 형광색소로 사용되고 있다. 반응 버퍼로서 5×SSC (standard saline citrate 또는 saline sodium citrate) 용액 (3 M 염화나트륨, 0.3 M 쿠엔산나트륨, (Wako Pure Chemicals, Ltd.))을 조제하여 이용하였다. 반응용 세척액으로서 10 % SDS (도데실황산나트륨, (Wako Pure Chemicals, Ltd.)) 용액을 조제하여 이용하였다.

### 2.2 전극제작 및 측정 장치

기판상에 금속박막을 증착하기 위하여 터비식 진공증착장치 (SANYU, SVC-700 TURBO-TM) 및 박막두께 측정장치 (일본전자, JTM200R)를 사용하였다. 포토리소그래픽을 위한 장치로서 레지스트를 도포하기 위하여 스펀코터 (MIKASA, IH-DX), 베이킹을 위하여 오븐 (YAMATO, DK300), 노광하기 위한 마스크얼라이너 (Karl Suss, MUB3)를 사용하였다. 제작된 미소전극어레이의 형상관찰에는 고정밀디지털마이크로 현미경 (KEYENCE, VH-6300) 및 실체현미경 (Leica, MZFLH)을 사용하였다. probe DNA를 어레이상에 고정화하기 위하여 Stanford대학의 Brown 등이 개발한 DNA어레이어 시스템을 사용하여, PC (HewlettPackard Vectra VE)에 의하여 제어하였다. DNA 어레이어를 사용하여 슬라이드 유리상에 스폿한 형광색소의 관찰에는 DNA 마이크로스캐너 (Axon, GenePix4000A)를 사용하여 PC (intermedical IMC-DIANA)에 의하여 제어하였다.

### 2.3 미소전극어레이형 DNA칩의 제작

미소전극어레이 제작 공정을 그림 1에 나타내었다. 칩 기판은 슬라이드 유리 (Matsunami, 76 mm×27 mm, 두께 1.2~1.5 mm) 또는 베이크판 (Sunhayato, 두께 10 mm)을 적당한 크기로 절단하여 세척한 후, 초순수에서 15분, 아세톤에서 15분, 초순수에서 15분의 순으로 초음파 세척하였다. 금전극은 진공증착 장치를 사용하여 약  $10^{-6}$  Torr의 진공상태에서 기판상에 접착층으로서 크롬을 약 200 Å 증착하고, 계속하여 이 위에 금을 약 2000 Å 증착한 것을 사용하였다.

패턴 제작을 위한 포토마스크는 Adobe Illustrator 8로 디자인하여 Yamada Film에 필름을 출력하여 직접 유리판에 고정해서 사용하였다. 스펀코터를 사용하여 positive형 레지스터

OFPR 800을 기판상에 균일하게 도포하였다. 이 기판을 오븐에서 가열한 후, 미리 제작된 마스크패턴을 이용하여 노광하고, 현상·에칭하여 미세전극어레이를 제작하였다. 리드선 부분을 피복하기 위하여 다시 positive형 OFPR 800을 도포하고 오븐에서 가열한 후, 별개의 마스크패턴을 사용하여 노광·현상하고, 전극부분 및 외부접속전극(커넥터) 부분을 노출시켰다.

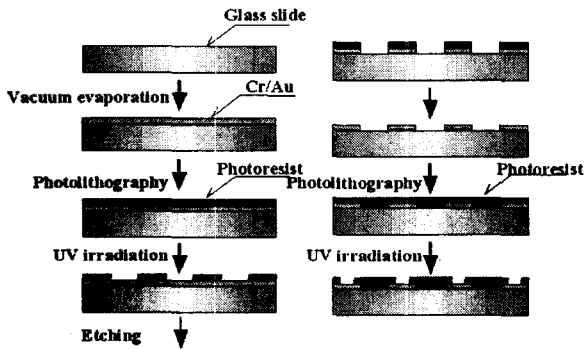


그림 1 미세전극어레이의 제작 공정.  
Fig. 1 Fabrication process of microelectrode array

#### 2.4 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 : 5'-ATTCTCCTACTgggATAggTggATTAT-3', HIV SK39 : 5'-gCATTCTggACATAgACAAggACAAA -3') 및 target DNA (target DNA : 5'-CCCCCCTCCgAgAgCCATAgTTggT-3', 1 mismatched DNA : 5'-CCCCCCTCCgAgAAgCCATAgTTggT-3')로서 사용된 4종류의 올리고뉴클레오타이드의 염기배열을 사용하였다. 사용된 올리고뉴클레오타이드중에서 같은 종류의 probe DNA와 target DNA는 서로 상보적인 염기배열을 갖고 있으며, 배열이 다른 유전자를 콘트롤 DNA (HIV SK39)로 하여 사용하였다. 여기서, -SH는 probe DNA의 5' 말단이 티올기에 의하여 수식되어 있음을 의미한다. 이들 올리고뉴클레오타이드를 TE 버퍼 (pH8.0)를 적당량 가하여 희석하고, 각 농도의 probe DNA 용액을 조제하였다.

금 전극 표면의 전처리로서 3 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액을 전극상에 적하하여 30분 방치하였다. 금 전극을 초순수로 세척한 후, 마이크로피펫 또는 DNA어레이를 사용하여 티올기를 수식한 probe DNA 용액을 전극상에 스폿하고, 10 °C에서 12시간 반응시켜 금 전극상에 probe DNA를 고정화하였다. DNA 어레이를 사용하여 probe DNA를 스폿할 경우, 통상은 스폿직경을 작게 하기 위하여 가는 슬릿가 든 프린팅칩 (type 1)을 사용한다. 그러나, 전극표면이 크므로 스폿직경도 크게 할 필요가 있으므로 슬릿이 두꺼운 프린팅칩 (type 2)을 사용하였고, 칩끝을 연마하여 스폿직경을 크게 (type 3) 하였다. 고정화 반응후, 초순수로 전극을 세척하고, 비특이적으로 결합하여 있는 DNA를 제거한 후, N<sub>2</sub>로 건조시켰다.

다시 비특이적으로 결합하여 있는 probe DNA를 충분히 제거하여 반응 효율을 향상시키기 위하여, 금 전극상에 1mM 6-mercaptohexanol (MCH) 용액을 적하하여 1시간 반응시켰

다. 이 MCH 처리에 의하여 금 표면에는 황과의 화학적 친화력에 의하여 특이적으로 probe DNA 분자가 고정화되어 있으나, 통상은 비특이적 결합도 일어난다. 따라서, 금 표면에서 자기조직화단분자막 (self-assembly monolayer : SAM)을 형성하는 MCH로 처리하면 비특이적 probe DNA 분자를 치환해서 제거한다<sup>[15]</sup>. probe DNA에 상보적인 target DNA를 반응시키면, 효율이 높아져 ds-DNA가 형성되며, 노이즈 전류를 저감할 수 있다. 본 논문에서는 이와 같은 방법으로 유전자검출의 고감도화를 도모하였다.

#### 2.5 Hybridization

반응 버퍼는 2×SSC용액을 사용하였다. 반응에 대한 반응에서 특히 기술하지 않는 경우는 온도 37 °C에서 1시간 반응시켰다. 칩의 세척방법으로서는 2×SSC용액에 0.1 % SDS를 가한 용액, 2×SSC용액에 0.01 % SDS를 가한 용액, 2×SSC용액을 계속해서 세척하여 N<sub>2</sub>로 건조시켰다. Intercalator는 100 μM Hoechst 33258 용액을 실온·암실에서 5분 반응시켜 초순수로 세척하고, N<sub>2</sub>로 건조시켰다.

#### 2.6 전기화학측정

전기화학측정은 3전극법으로 하였다. 참조전극으로서는 은/염화은 전극을 사용하였고, 비교전극을 사용하여 비교하였으며 전위차가 ±1 mV 이내인 것을 확인하고 사용하였다. counter 전극으로는 백금선을 사용하였다. 측정시에는 DNA칩의 끝에 있는 외부접속 전극부분을 커넥터에 삽입하여 전기화학측정장치(BAS, CV-50W)에 접속하여 사용하였으며, GPIB 인터페이스로 접속한 PC (Gateway2000 4DX2-66)에 의하여 제어하고 정전 차폐된 환경에서 측정하였다. 전기화학측정은 0.2 M 인산버퍼용액중 (pH7)에서 실시하였으며, 소인속도는 100 mV/s로서 300~800 mV의 범위내에서 측정하였다. 전기화학측정법으로서는 cyclic-voltammetry (CV) 또는 linear sweep voltammetry (LSV)에 의하여 측정하였다.

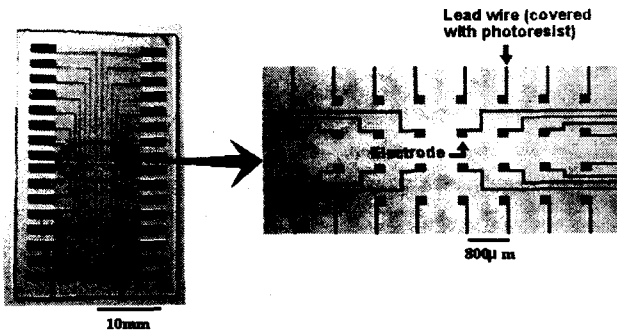
Hoechst 33258 물질을 포함하는 용액중에서 CV를 하면 550 mV 부근의 전위에서 산화반응을 일으키므로, 이 산화전류를 측정하여 ss-DNA와 ds-DNA를 식별할 수 있다. 본 논문에서는 probe DNA의 5' 말단을 티올기 (-CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>SH)로 수식하고, 황과 금의 결합을 이용하여 금전극상에 고정화하였다. target DNA를 반응시켜서 유전자 hybrid 생성물을 형성시킨 후, Hoechst 33258을 반응시켰다. LSV에 의하여 Hoechst 33258 유래의 전기신호를 측정하여 산화전류값의 차이로부터 ss-DNA와 ds-DNA를 식별할 수 있었다.

### 3. 결과 및 검토

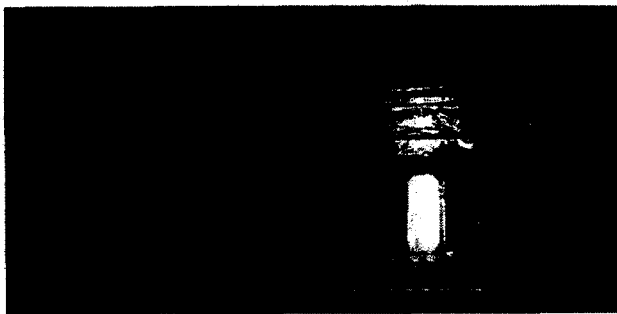
#### 3.1 DNA칩 제작법

제작된 미세전극어레이형 DNA칩을 그림 2 (a)에 나타내었다. 미세전극의 면적은 200×200 μm<sup>2</sup>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 2 (b)

와 같은 카트리지형 DNA칩을 설계하였다. 보통은 기관으로서 베이크판과 같은 수지를 사용하지만, 실제 제작한 결과, 수지표면이 약간의 요철이 있으므로, 리드선 부분에 단선이 많이 있었다. 슬라이드 유리를 기관으로 하여 사용한 경우는 거의 단선이 발생하지 않았으므로, 슬라이드 유리를 기관으로 사용하였다.



(a) 32 channels microelectrode array



(b) cartridge type microelectrode array

그림 2 32채널 미소전극어레이

Fig. 2 32 channels microelectrode array

### 3.2 고정화 농도의 최적화

1, 10, 100 nM 및 1 µM (데이터 미제시)의 각 probe DNA (HIV SK38 probe) 용액을 각각 별개의 전극상에 스코트하여 고정화한 후, probe DNA의 배열에 상호적인 배열을 갖는 target DNA (HIV SK38 target)를 37 °C에서 1시간 반응시켰다. 그 후, 100 µM Hoechst 33258 수용액을 실온·암실에서 10분간 반응시켜 세척하고, 전기화학측정 (LSV)을 하였다. 측정은 모두 0.2 M 인산 버퍼중에서 하였으며, 소인속도 100 mV/s과 300~800 mV에서 소인하였다. 그림 3과 같이 1, 10 및 100 nM의 probe DNA를 전극상에 고정화한 경우는 농도가 증가함에 따라 Hoechst 33258 유래의 산화전류 피크도 상승하였다. 그러나, 1 µM의 probe DNA를 고정화하였을 때는 산화전류 피크가 100 nM일 때보다도 감소하였다. 이와 같은 결과에 기인한 원인으로서는 과잉량의 probe DNA가 고정되어 probe DNA층이 두껍게 되어 Hoechst 33258의 산화반응이 발생하기 어려운 상태가 되었다고 생각된다. 이 결과로부터 probe DNA가 전극 표면에 고정되어 있음을 확인할 수 있으므로 이후 동일 반응조건으로 전극상에 probe DNA의 고정화를 할 것이다.

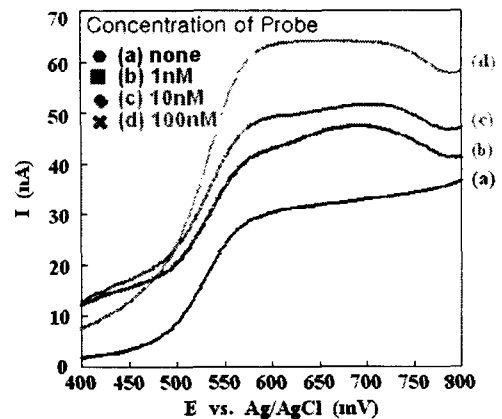


그림 3 Probe DNA 고정화후 Hoechst 33258의 LSV

Fig. 3 Linear sweep voltammogram of Hoechst 33258 after immobilization of probe DNA.

### 3.3 같은 배열의 probe DNA를 고정화한 경우

칩의 각 미소전극상에 100 nM의 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 4에 나타내었다.

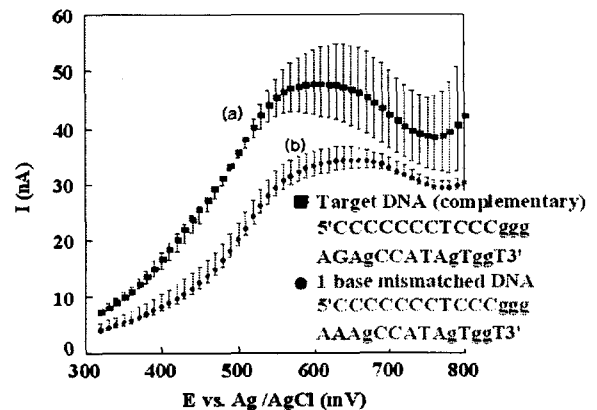


그림 4 Target DNA와 1염기 상이한 mismatch DNA를 반응한 후 Hoechst 33258의 LSV

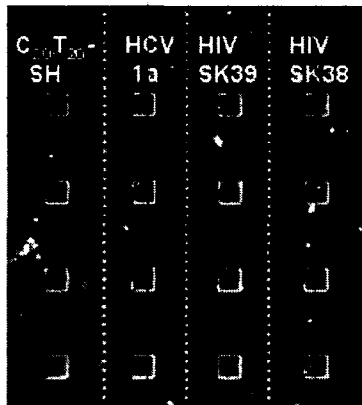
Fig. 4 Linear sweep voltammogram of Hoechst 33258 after hybridization of target DNA and 1 base pair mismatched DNA

그림 4에 나타내었듯이, 약 450 mV 부근에서 산화전류값의 차이가 발생하며, 550~600 mV의 범위내에서 그 차이가 가장 크게 되었다. 이 결과는 이하의 요인에 의한 것으로 추측된다. probe DNA에 상보적인 배열이 아닌 콘트롤 DNA를 반응시켰을 경우, 반응은 거의 발생하지 않으므로, 전극상에서는 거의 ss-DNA에 특이적으로 결합하는 Hoechst 33258은 거의 결합하지 않았다. 이에 대해서, probe DNA는 상보적인 배열을 갖는 target DNA를 반응시켰을 경우에는, 전극상에서 ds-DNA (유전자 hybrid)를 형성한다. 이 때문에 Hoechst 33258이 보다 많이 결합하여 전극상에서 응축되어, 산화전류값이 증대하게 되었다고 생각된다.

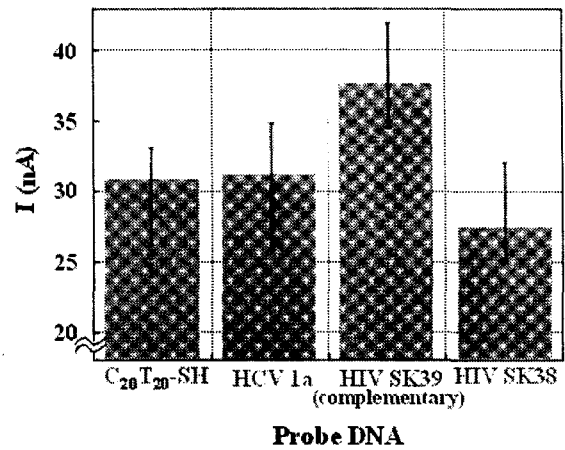
그러나, 콘트롤 DNA를 반응시킨 경우라도, 다소 전류값은 상승한다. 이것의 원인으로서는 이 전위 부근에서 노이즈 전류 자체가 증가하는 것으로 생각된다. 이 노이즈 전류는 금 전극 표면의 전기용량에 의한 것으로 생각되며, LSV 측정을 할 때에 반드시 발생하는 것이다. 또 하나의 원인으로서는, Hoechst 33258의 이미다졸환이 부분적으로 정전하를 띠므로 DNA의 인산기의 부전하와 정전기적으로 결합하여 ss-DNA의 상태로 어느 정도 Hoechst 33258이 결합한 것으로 생각된다. 이것은 정전기적인 결합의 영향을 미치지 않도록 반응조건을 설정하거나, ds-DNA에 의하여 특이적으로 결합하는 검출 마커를 개발하여 해결할 수 있는 문제이므로 금후 검토할 필요가 있다.

**3.4 다른 배열의 probe DNA를 고정화한 경우**

실험으로서 칩의 각 미소전극상에 다른 염기배열을 갖는 4 종류의 probe DNA를 DNA어레이어를 이용하여 고정화하였다. 칩상에 배치하여 고정화한 probe DNA의 위치에 대해서 그림 5 (a)에 나타내었다. probe DNA의 고정화후, 칩상의 전극 전면에 10 nM의 target DNA (HIV SK39 target)을 적하하여 반응시키고, LSV를 측정하였을 때의 결과를 그림 5 (b)에 나타내었다. probe DNA를 고정화한 4종류의 전극중에서 target DNA에 상보적이지 않은 배열을 갖는 3종류의 probe DNA (HIV SK38 probe, HCV 1a probe, C<sub>20</sub>T<sub>20</sub>-SH probe)를 고정화한 전극에서는 각각 거의 같은 산화전류값을 나타내었다. 이에 대하여, target DNA에 상보적인 배열을 갖는 probe DNA (HIV SK39 probe)를 고정화한 전극에서는 다른 전극과 비교하여 높은 산화전류값이 얻어졌다. 이 결과는 ds-DNA (유전자 hybrid)에 특이적으로 Hoechst 33258이 결합하였기 때문으로 생각된다. 이 결과로부터, DNA 어레이어를 이용하여 다른 염기배열을 갖는 probe DNA를 고정화하여도 염기배열을 식별할 수 있음을 알수 있다. 단, 콘트롤 DNA로 이용한 3종류의 probe DNA의 산화전류값에는 다소의 차이를 보이고 있다. 이것은 Hoechst 33258의 A-T 염기쌍에의 우선적 결합과 probe DNA 염기쌍의 길이의 영향 등, 몇가지의 변수가 관여한 것으로 생각된다. 그러므로, 금후의 과제로서 ds-DNA의 염기쌍 (A-T 결합 및 G-C 결합)에 대한 Hoechst 33258의 결합성의 평가, ds-DNA의 길이에 의한 전류값의 차이 등의 영향을 검토할 필요가 있다.



(a) Arrangement of probe DNA



(b) Anodic peak at 550 mV

그림 5 Target DNA와 1염기 상이한 mismatch DNA의 반응후 Hoechst 33258의 LSV

Fig. 5 Linear sweep voltammogram of Hoechst 33258 after hybridization of target DNA and 1 base pair mismatched DNA

**3.5 1염기 mismatch DNA의 검출**

칩의 각 미소전극상에 100 nM의 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.

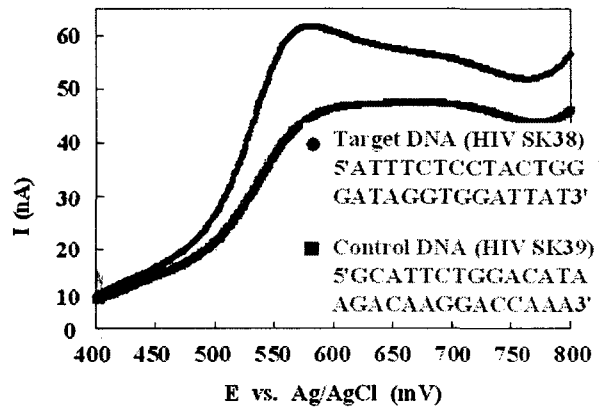


그림 6 Target DNA와 1염기 상이한 mismatch DNA의 반응후 Hoechst 33258의 LSV

Fig. 6 Linear sweep voltammogram of Hoechst 33258 after hybridization of target DNA and 1 base pair mismatched DNA

그림 6에 나타내었듯이, 약 450 mV 부근에서부터 양자의 산화전류값에 차이가 발생하기 시작하며, 550~600 mV의 범위 내에서 그 차이가 가장 크게 되었다. 이 결과는 3.3절에서 설명한 것과 같이, probe DNA에 상보적인 배열이 아닌 콘트롤 DNA를 반응시킨 경우, 반응이 거의 발생하지 않으므로 전극상에서는 거의 ss-DNA (probe DNA)만이 존재하는 상태가 되기 때문으로 생각된다. 그러므로, ds-DNA에 특이적으로 결

합하는 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.

### 3.6 Target DNA의 정량

칩상의 각 미소전극상에 100 nM의 probe DNA (HIV gag SK38 probe)를 고정화한 후, 0.01, 0.1, 1, 10 및 100 nM의 농도에서 target DNA (HIV gag SK38 target) 또는 콘트롤 DNA (HIV gag SK39 target)를 반응시켜, LSV를 측정하였을 때의 결과를 그림 7에 나타내었다. target DNA에 대하여 측정된 결과, 농도가 증가함에 따라 Hoechst 33258의 산화전류값도 상승하였다. 반응은 거의 정량적으로 진행하였으며, 전극표면의 ds-DNA의 양에 대응하여 Hoechst 33258이 결합되었다고 생각된다. 한편, 콘트롤 DNA에 대해서도 농도의 증가에 대하여 미량의 산화전류값의 증가가 상승하였으나, target DNA에 비하여 그 기울기는 작았다. 이상의 결과에서 농도범위가 0.1~100 nM에서 산화전류값에 차를 볼 수 있어, 다른 염기배열을 인식할 수 있었다.

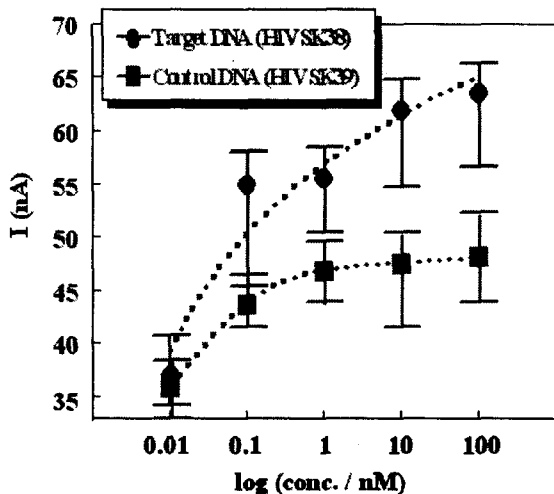


그림 7 Target DNA와 콘트롤 DNA에 대한 농도의존성

Fig. 7 Calibration curves for concentration of target DNA and control DNA

본 연구 결과는 임상유전자검출에서 수요가 높은 SNP 해석을 가정한 것이며, 유전병이나 암유전자의 검출 등, 여러 가지 유전자 검사 분야에 응용할 수 있다. 금후의 과제로서, 저농도에서 1염기 mismatch의 검출을 하기 위해서는 반응의 최적 조건 (온도, 시간, 반응 버퍼의 조성 등)을 검토할 필요가 있다.

### 4. 결 론

본 논문에서는 간편성, 휴대성, 개발 비용의 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  $Fe^{2+/3+}$ 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 100 nM이었다.
- 4) probe DNA (HIV SK38 probe)에 다른 염기배열을 갖는 target DNA (HIV SK38 target) 또는 콘트롤 DNA (HIV SK39 target)를 반응시켜, LSV를 측정된 결과, 양자의 산화전류값에 차이가 발생하여, target DNA를 전기화학적으로 검출할 수 있었다.

### 참 고 문 헌

- [1] 古庄敏行 他, 「臨床DNA診断法」、金原出版, 1995.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] G. Marrazza, I. Chianella, M. Mascini, "Disposable DNA electrochemical sensor for hybridization detection"

tion", *Biosensors & Bioelectronics*, **14**, pp.43, 1999.

[9] S.O. Kelly, E.m. Boon, J.K. Barton, N.M. Kackson and M.G. Hill, "Single-base mismatch detection based on change transduction through DNA", *Nucleic Acids Research*, **27**, pp.4830-4837, 1999.

[10] E. Palecek, M. Fojta, M. Tomschik, J. Wang, "Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage", *Biosens & Bioelectron*, **13**, PP.621-628, 1998.

[11] 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.

[12] 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.

[13] 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.

[14] A.B. Steel, T.M. Herne, and M.J. Tarlov, "Electrochemical Quantification of DNA Immobilized on Gold", *Anal. Chem.*, **70**, pp.4670-4677, 1998.

[15] P.N. Gilles, D.J. Wu, C.B. Foster, P.J. Dillon, and S.J. Chanock, "Single nucleotide polymorphic discrimination by an electronic dot blot assay on semiconductor microchips", *Nature Biotechnology*, **17**, pp.365-370, 1999.

**감사의 글**

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

**저 자 소 개**

**최 용 성(崔龍成)**



1967년 11월 14일생. 1991년 동아대학교 전기공학과 졸업(학사). 1993년 동 대학원 전기공학과 졸업(석사). 1998년 동 대학원 전기공학과 졸업(공박). 1999년~2001년 JAIST Post-Doc., 2001년~2003년 Osaka Univ. Post-Doc., 2002년~현재 원광대학교 공업기술개발연구소 교수.

Tel : 063-850-6349, Fax: 063-857-6890  
E-mail : biochips@wonkwang.ac.kr

**권 영 수(權寧守)**



1950년 1월 17일생. 1972년 영남대학교 전기공학 졸업(학사). 1976년 경북대학교 대학원 전기공학과 졸업(석사). 1988년 일본 동경공업대학 전자물리부 졸업(공박). 1990년, 1992년, 1994년 동경공업대 객원연구원. 현재 1988년~현재 동아대학교 전기전자및컴퓨터공학부 교수. 1998년~현재 지능형통합항만관리연구센터 소장. 2000년~현재 재단법인 부산 테크노파크 사업단장.

Tel: 051-200-7738, Fax: 051-200-7743  
E-mail : yskwon@mail.donga.ac.kr

**박 대 희(朴大熙)**



1954년 11월 10일생. 1979년 한양대학교 전기공학과 졸업(학사). 1983년 동 대학원 전기공학과 졸업(석사). 1989년 일본 오사카대학 대학원 졸업(공박). 1979년~1991년 LG전선연구소 선임연구원. 1999년~2000년 미국 미시시피 주립대학교 교환교수. 1992년~현재 원광대학교 전기전자및정보공학부 교수.

Tel: 063-850-6349, Fax: 063-857-6890  
E-mail : parkdh@wonms.wonkwang.ac.kr