

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.	(45) 공고일자	2006년10월12일
<i>C12Q 1/68</i> (2006.01)	(11) 등록번호	10-0633048
<i>G01N 27/26</i> (2006.01)	(24) 등록일자	2006년09월29일

(21) 출원번호	10-2005-0029471	(65) 공개번호
(22) 출원일자	2005년04월08일	(43) 공개일자

(73) 특허권자

최용성
전라북도 익산시 어양동 652-1번지 부영아파트 105-803

윤희태
서울특별시 서초구 잠원동 63-2번지(81/7) 신반포청구아파트102-1703

(72) 발명자

최용성
전라북도 익산시 어양동 652-1번지 부영아파트 105-803

윤희태
서울특별시 서초구 잠원동 63-2번지(81/7) 신반포청구아파트102-1703

(74) 대리인 김원준

심사관 : 이충호

(54) 비수식화된 유전자의 전기화학적 검출방법

요약

본 발명은 비수식화된 유전자의 전기화학적 검출방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 본 발명은 프로브 핵산을 고정화한 핵산 고정화 미소전극에 목표 핵산과 반응 유무를 전기화학적으로 검출하는 방법에 관한 것이다.

본 발명은 핵산 고정화 미소전극의 전기화학적 측정을 하는 단계와; 목표 핵산을 핵산 고정화 미소전극에 전계에 의하여 반응시켜, 동일한 방법으로 전기화학적 측정을 하는 단계로 구성되는 것을 특징으로 한다.

본 발명에 의하면, 프로브 핵산과 목표 핵산의 표식을 필요로 하지 않으며, 상호적 핵산 염기쌍을 간편하고, 정확하게 검출할 수 있다. 또, 본 발명에 의하여 제조되는 핵산칩을 소형화할 수 있고, 생산 가격을 낮출 수 있는 효과가 있다.

대표도

도 1

색인어

유전자, 핵산칩, 프로브핵산, 타겟핵산, 미소전극, 전기화학검출.

명세서

도면의 간단한 설명

- 도 1은 비수식화된 유전자의 전기화학적 검출공정,
- 도 2는 본 발명의 핵산칩의 제조공정 개요 모식도,
- 도 3은 실시예의 하나인 일체형 미소금속어레이의 사진,
- 도 4는 상호적 핵산 염기쌍의 전기화학적 측정에 이용된 장치의 모식도,
- 도 5는 전기화학 측정으로 얻어진 사이클릭 볼타모그램,
- 도 6은 금전극, 프로브 DNA를 고정화한 후, 목표 DNA를 반응한 후의 사이클릭 볼타모그램,
- 도 7은 목표 DNA를 전계에 의하여 반응하기 위한 프로브스테이션장치,
- 도 8a 및 도 8b는 제어DNA와 목표DNA를 반응시켰을 때 사이클릭 볼타모그램.
- 도 9는 목표 DNA의 농도와 산화·환원전류 피크 변화의 비율의 관계를 도시한 사이클릭 볼타모그램.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 비수식화된 유전자의 전기화학적 검출방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 프로브 핵산을 고정화한 핵산 고정화 미소전극에 목표 핵산과의 반응의 유무를 전기화학적으로 검출하는 방법과 이를 위한 핵산칩에 관한 것이다.

일반적으로 DNA, 효소, 항체, 펩타이드 등의 생체분자가 특이적 분자인식 능력을 갖고 있음은 잘 알려져 있으며, 이들 분자 인식능력의 바이오센서로의 응용이 연구·보고되어 있다.

최근 인간게놈을 비롯한 생물의 유전자 구조가 규명되어, 여러 가지 유전적 질환과 바이러스성 질환에 관하여 유전자의 변이가 관여하고 있음이 밝혀지고 있다. 이 때문에 DNA를 생물소자로서 이용하는 바이오센서, 그중에서도 DNA센서가 집적화된 DNA칩은 다수의 유전자의 배열과 변이 또는 기능을 신속하게 해석하는 방법으로서 주목받고 있으며, 의학·분자생물학 등의 넓은 분야에서 기반기술이 될 것으로 기대되고 있다.

현재, 실용화되어 있는 DNA칩으로서는 DNA 고정화 기판으로서 니트로셀로로스막, 실리콘기판, 유리기판, 고분자, 전극 등을 이용하고 있다. 또한, DNA의 기판상에의 고정화 방법도 화학적 결합법과 DNA가 부전하를 띠고 있는 성질을 이용해서 특정 위치에 정전위를 인가함으로써 전극상에 프로브 DNA를 고정화하는 전기화학적 고정화법이 알려져 있다.

이와 같은 DNA칩은 일반적으로 배열이 다른 다수의 프로브 DNA가 정렬·고정화되어 있다. 이것에 형광표식된 목표 DNA를 반응시키면 서로 상호적인 유전자만이 이중나선의 DNA를 형성하므로, 그 부분의 형광강도를 측정함으로써 유전자 기능의 해석과 질환에 관여하는 유전자를 검출할 수 있다.

그러나, 이와 같은 종래의 형광검출형 DNA칩은 미리 fluorescence, Rhodamine, Cy3, Cy5 등의 형광색소를 목표 DNA를 표식하여 둘 필요가 있으므로, 작업성이 복잡한 문제점이 있다. 또한, DNA칩상에서 발생하는 형광신호는 공집점 레이저 현미경, 형광스캐너 등을 탑재한 해석장치로 검출, 화상화, 해석되므로 대형이며, 이러한 설비를 필요로 한다는 문제점도 있다.

또한, 질환이나 약제반응성에 관련하는 유전자의 탐색에 있어서 다형마카로서 최근 주목받고 있는 일염기다형 (SNPs)의 검출에서는 안정성이 미묘하게 다른 다종류의 DNA를 특정온도에서 용액 중에서 동시에 측정할 필요가 있으나, 종래의 형광검출형 DNA칩은 건조한 상태에서 측정하므로 이와 같은 측정이 불가능하였다.

이들 문제를 해결하는 방법으로서, 전기화학적으로 유전자를 검출하는 방법이 연구되고 있다. 전기화학적 유전자 검출방법은 비표식화로 유전자의 검출이 가능하고, 범용의 장치를 이용할 수 있으므로 저가격이 실현되며, 장치 전체를 단순하게 하고 소형화를 할 수 있는 등의 많은 이점이 있다.

지금까지 보고 된 유전자의 전기화학적 검출방법으로서는 예를 들면, 금전극상에 SH기를 통하여 비오틴 (biotin)화된 프로브 핵산을 고정화하고, 프로브와 목표 핵산을 반응시킴으로서 반응을 형성시키며, biotin과 특이적으로 상호 작용하는 아비딘 (avidin)을 결합한 효소를 반응시켜, 효소반응에 기초한 전기신호로부터 유전자를 검출하는 것이다(Fernando Patolsky, Eugenii Katz, Amos Bardea, and Itamar Willner, Enzyme-Linked Amplified Electrochemical Sensing of Oligonucleotide-DNA Interactions by Means of the Precipitation of an Insoluble Product and Using Impedance Spectroscopy, Langmuir, Vol. 15, pp. 3703-3706, 1999). 그러나 이와 같은 방법은 프로브 핵산의 고정화, 반응, 단백질 상호작용, 효소반응, 생성물의 전극상으로서 석출이라는 많은 조작이 필요한 문제가 있다.

또한, 금전극상에 SH기를 통하여 화학흡착시킨 프로브 핵산을 이용하여 나프탈렌 페로센 산화·환원 인터칼레이터 (intercalator)에 의하여 유전자를 검출하는 방법이 보고되어 있다(Takenaka, S., Yamashita, K., Takagi, M., Uto, Y., Kondo, H., DNA Sensing on a DNA Probe-Modified Electrode Using Ferrocenylnaphthalene Diimide as the Electrochemically Active Ligand, Anal. Chem., Vol. 72 (6), pp. 1334-1341, 2000). 그러나, 인터칼레이터 (intercalator)를 전극 활성 프로브로서 이용하는 방법은 일반적으로 단일나선 DNA와 이중나선 DNA의 식별은 가능하지만, 인터칼레이터(intercalator)의 결합영역에 배열의존성이 있으므로, 분석물에 대응한 인터칼레이터(intercalator)를 선택해야만 하는 문제점이 있다.

또한, 유리상 카본 전극상에 전도성 산화·환원 고분자막을 형성하고, 효소 (HRP)로 라벨한 (dT)₂₅₋₃₀ 또는 (dA)₂₅₋₃₀를 공유결합시켜, 상호적 핵산과의 반응에 의하여 효소반응에 기초한 전기신호를 검출하는 방법(de Lumley-Woodyear, T., Caruana, D. J., Campbell, C. N., Heller, A., Reactive Electrophoretic Activation of a Microelectrode for Enzyme-Amplified Recognition and for Melting-Temperature Determination of 105 Copies of a Simple Oligonucleotide, Anal. Chem., Vol. 71(2), pp. 394-398, 1999)은 핵산을 효소로 라벨할 때에 복잡한 조작이 필요하며, 과잉의 라벨효소를 세척·제거할 필요가 있으며, 측정 감도가 안정하지 않다는 문제점이 있다.

이상과 같은 종래의 전기화학적 검출방법은 산화·환원물질과 인터칼레이터(intercalator)를 사용하므로 복잡한 조작을 필요로 하며, 측정 가격도 높아지는 문제점도 있다.

유전자의 전기화학적 검출 방법으로서 intercalator-free한 방법도 보고되어 있으나(Takenaka, S., Yamashita, K., Takagi, M., Uto, Y., Kondo, H., DNA Sensing on a DNA Probe-Modified Electrode Using Ferrocenylnaphthalene Diimide as the Electrochemically Active Ligand, Anal. Chem., Vol. 72 (6), pp. 1334-1341, 2000), 이것은 염기배열에 구아닌(guanine, G)이 없으면 산화·환원 반응의 측정이 안되는 등의 제한이 있으며, 범용성이 작다는 문제점이 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여 안출한 발명으로 본 발명의 목적은 상호적 핵산 염기쌍을 전기화학적으로 검출하는 방법으로 미소전극에 프로브 핵산을 고정화하여 얻어지는 핵산 고정화 미소전극에 목표 핵산을 반응시키는 공정과, 핵산 고정화 미소전극에서 산화·환원 전위의 변화를 측정하는 공정을 갖는 비수식화된 유전자의 전기화학적 검출 방법을 제공하는 데에 있다.

본 발명의 다른 목적은 상호적 핵산 염기쌍을 전기화학적으로 검출하기 위한 칩으로서 기판상에 미소전극에 SH기를 통하여 프로브 핵산이 결합고정화된 핵산 고정화 미소전극이 설치되어 있는 것이 특징인 핵산칩을 제공하는 데에 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 핵산 고정화 미소전극이 복수 설치되어 있는 핵산칩과, 미소전극의 면적이 각각 0.385mm² 미만인 핵산칩을 제공하는 데에 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 상호적 핵산 염기쌍을 전기화학적으로 검출하는 장치로서, 전술한 핵산칩과 전기화학 측정수단과 해석결과 표시수단을 갖는 자동 유전자 진단장치를 제공하는 데 있다.

발명의 구성 및 작용

본 발명의 목적을 구현하기 위한 본 발명의 구성은 상호적 핵산염기쌍을 전기화학적으로 검출하기 위하여 미소전극에 하나의 프로브 핵산을 고정화하여 얻어진 핵산 고정화 미소전극에 비수식화된 목표 핵산을 반응시키는 공정과, 상기 핵산 고정화 미소전극의 산화·환원 전위의 변화를 측정하는 공정을 포함하는 것을 특징으로 하는 유전자의 전기화학적 검출방법에 있어서, 상기 산 고정화 미소전극과 목표 핵산을 반응시키는 공정은 후보가 되는 목표 핵산을 함유하는 용액에 핵산 고정화 미소전극을 침적시키는 방법, 핵산 고정화 미소전극 표면에 목표 핵산을 함유하는 용액을 적하·도포하는 방법, 전계에 의하여 목표 DNA를 반응 방법 중 어느 하나인 것을 특징으로 한다.

이하 본 발명의 실시예를 도면을 근거로 상세히 설명한다.

도 1은 비수식화된 유전자의 전기화학적 검출공정 도면이고, 도 2는 본 발명의 핵산 칩의 제조공정 개요 모식도이고, 도 3은 본 발명의 실시예에 의하여 얻어진 일체형 미소금속어레이의 사진이고, 도 4는 상호적 핵산 염기쌍의 전기화학적 측정에 이용된 장치의 모식도이고, 도 5는 전기화학 측정로 얻어진 사이클릭 볼타모그램(CV)이고, 도 6은 금전극, 프로브 핵산을 고정화한 후, 목표 핵산을 반응한 후의 사이클릭 볼타모그램이고, 도 7은 타겟 DNA를 전계에 의하여 반응하기 위한 프로브스테이션 장치이고, 도 8a와 8b은 제어DNA와 타겟DNA를 반응시켰을 때 사이클릭 볼타모그램이며, 도 9는 목표 DNA의 농도와 산화·환원전류 피크 변화의 비율의 관계를 도시한 사이클릭 볼타모그램이다.

도 1은 유전자의 전기화학적 검출공정으로 비수식화된 유전자의 전기화학적 검출 방법에 관한 본 발명의 기본 개념을 나타낸다.

유전자의 전기화학적 검출방법은 먼저, 핵산 고정화 미소전극의 전기화학적 측정을 하고, 그 후에 목표 핵산을 핵산 고정화 미소전극에 전계에 의하여 반응시켜, 동일한 방법으로 전기화학적 측정을 한다. 이 때에 핵산 고정화 미소전극상의 프로브 핵산과 목표 핵산이 상호성을 갖고, hybrid를 형성하면 산화·환원전위에 변화가 나타난다. 그러나, 핵산 고정화 미소전극상의 프로브 핵산과 목표 핵산이 반응하지 않을 경우에는 산화·환원 전위에 변화는 볼 수 없다.

유전자의 전기화학적 검출방법은 이상과 같이, (1) 핵산 고정화 미소전극과 목표 핵산을 반응시키는 공정과 (2) 전기화학적 측정을 하는 공정으로 구성된다. 생화학 실험조작에서 통상 사용되는 각종의 공정을 포함하지 않아도 된다. 구체적으로는 목표 핵산을 핵산 고정화 미소전극과 반응시킨 후, 일정온도에서 전계에 의하여 목표 DNA를 반응 반응시키는 공정과, hybrid를 형성하지 않는 프로브 핵산에 물리 흡착하여 있는 목표 핵산을 제거하기 위한 세척공정이 예시된다.

상기 유전자의 전기화학적 검출방법에서 상기 (1)의 핵산 고정화 미소전극과 목표 핵산을 반응시키는 방법으로서서는 각종의 것이 고려되며, 그 상세한 조건 등은 한정되지 않는다. 예를 들면, 후보가 되는 목표 핵산을 함유하는 용액에 핵산 고정화 미소전극을 침적시키는 방법, 핵산 고정화 미소전극 표면에 목표 핵산을 함유하는 용액을 적하, 도포하는 방법, 전계에 의하여 목표 DNA를 반응 것 등을 들 수 있다. 이때 사용되는 목표 핵산을 함유하는 용액으로는 pH 조정액(완충액)과 각종 염류 등이 함유되어 있거나 용액의 온도를 제어하여 반응 반응을 일으킨다.

본 발명인 유전자의 전기화학적 검출방법은 종래의 검출방법과 달리, 용액중에서의 정밀도가 높은 상호적 염기쌍의 검출이 가능한 점이 특징적이다. 따라서, 상기 (2)의 전기화학적 측정으로서는 전해질 용액중에서 이루어지는 일반적인 전기화학적 측정방법을 적용할 수 있다. 예를 들면, 전기 핵산 고정화 미소전극을 작동 전극으로서, 대극을 동일 기관상에 일체화하여 전해질 용액중에 설치하고, 전원과 해석장치에 접촉하는 방법을 들 수 있다. 구체적으로는 potentiostat와 galvanostat를 이용한 전기화학적 측정법이 예시된다. 이와 같은 종래의 전기화학적 측정법은 전해질 용액중의 pH나 염농도, 용액온도 등의 각종 조건을 적정 선택할 수 있으므로, 본 출원 발명인 유전자의 전기화학적 검출방법은 특수한 측정조건을 필요로 하는 유전자의 검출에도 적용할 수 있다.

도 1에 도시된 바와 같이, 유전자의 전기화학적 검출방법을 위하여 핵산칩은 기관상에 상기 핵산 고정화 미소전극을 구축한다. 즉, 기관상에 미소전극을 설치하고, 그 표면에 프로브 핵산을 고정화시킬 수 있다. 이 때, 기관은 유리, 실리콘, 각종 플라스틱 등으로 적정 선택할 수 있다. 그중에서도 유리는 각종 방법에 의하여 미소가 공할 수 있고, 저가이므로 이용되고 있다.

기관상에 미소전극을 구축하는 방법으로는 진공증착법, RF스퍼터링과 반도체 미소가공기술을 응용한 포토리소그래피 (photolithography)법이 있다. 특히, 미세한 전극과 배선을 제작하고, 하나의 기관상에 많은 미소전극을 만들기 위하여는 포토리소그래피 기술, 진공기술, RF스퍼터링 기술 및 에칭 기술 등을 조합시킨 포토미소제조법이 적용된다.

구체적으로는 진공증착과 RF스퍼터링 등의 진공기술에 의하여 기관상에 전극재료가 되는 금속박막을 형성시키는 단계와, 스피코팅을 이용하여 금속박막상에 감광성 재료(photoresist)를 도포하는 단계, 이때 사용되는 감광성 재료는 감광에 의하여 재료가 분해하여 현상액에 용해하는 것(positive형)이나 감광에 의하여 중합해서 용해하지 않는 것(negative형)도 좋다. 이어서 감광성 재료막 위에 미세한 전극과 회로를 디자인한 포토마스크를 설치하고, 노광함으로써 패턴을 전사하는 단계와, 현상액에 담가 레지스터를 패터닝하고 에칭액에 담가 금속박막을 에칭하는 단계를 포함한다. 이러한 공정을 거친 후 디자인한 미세전극 어레이가 제작된다.

이와 같은 포토리소그래피법은 IC나 LSI의 제작기술로서 확립되어 있다. 따라서, 이 방법을 이용하면 핵산칩의 자동생산, 대량생산이 용이하게 되며, 제조코스트를 저하시킬 수 있다. 그리고, 형성하는 금속박막의 종류를 변화시킴으로써 전극재료와 배선 재료를 각종 재료로부터 선택할 수 있다.

구체적으로는 금, 은, 백금, Al, 유리상 카본 디스크, 도전성 고분자 필름 등이 있다. 그 중에서도, 금은 취급하기 쉽고, DNA의 고정화를 안정하게 할 수 있으므로 전극재료로서 바람직하다. 또한, 포토마스크의 디자인을 바꿈으로써 하나의 기관상에 설치되는 미소전극수를 필요에 응하여 설정할 수 있다. 예를 들면, 본 발명에서는 이미 24mm×24mm의 유리기관상에 320~360개의 미소전극을 구축하였다.

본 발명의 핵산칩은 이상과 같은 방법에 의하여 기관상에 구축된 미소전극상에 프로브 핵산을 고정화하여 얻어진다. 이 때 사용되는 프로브 핵산은 단일나선 DNA에 한정되지 않고, RNA나 PNA 등이라도 관계없다. 예를 들면, 목표 핵산이 상호성을 나타내고, 반응하는 유전자를 조사하고자 할 경우에는, 후보가 되는 핵산을 프로브 핵산으로서 미소전극상에 고정화하면 된다. 핵산칩상의 기관에 복수의 미소전극이 구축되어 있을 경우에는 각 전극에 다른 프로브 핵산을 설치하고, 각 전극에 대해서 산화·환원전위의 변화를 측정하면 간단히 단시간에 상호적 핵산 염기쌍을 검출할 수 있다.

본 발명의 핵산칩에서 미소전극에 프로브 핵산을 고정화시키는 방법은 어떠한 것이라도 된다. 본 출원 발명은 상기와 같이 용액중에서 상호적 핵산 염기쌍을 검출할 수 있으므로, 전해액 등의 용액중에서 한번 고정화된 프로브 핵산이 유리하지 않는 방법을 선택할 필요가 있다. 구체적으로, 프로브 핵산의 말단에 SH기를 결합시켜, 미소전극에 결합고정화시키는 방법 (예를 들면, Takenaka, S., Yamashita, K., Takagi, M., Uto, Y., Kondo, H., DNA Sensing on a DNA Probe-Modified Electrode Using Ferrocenylnaphthalene Diimide as the Electrochemically Active Ligand, Anal. Chem., Vol. 72 (6), pp. 1334-1341, 2000)이 있다. 물론, 이 이외의 공지 또는 신규의 전극재료에 핵산의 고정화 방법을 적용할 수도 있다.

이상과 같이 본 발명의 핵산칩은 소형의 기관상에 다수의 핵산고정화 미소전극을 갖는 것이다. 또한, 본 출원 발명인 유전자의 전기화학적 측정방법은 종래법과 같이 효소반응이나 산화·환원물질, 인터칼레이터 등을 사용하지 않으므로, 복잡한 조작을 필요로 하지 않고, potentiostat 등의 범용의 전기화학 측정장치를 이용하여 간편하고 정밀도가 높은 측정을 할 수 있다. 후술하는 실시예에서도 알 수 있듯이, 본 출원 발명인 유전자의 전기화학적 검출방법에서는 1aM까지의 검출범위를 가지므로, 미량 (극저농도)의 시료로부터 유전자 진단을 할 수 있다.

그리고, 본 발명은 이상과 같은 핵산칩을 이용하여 유전자의 전기화학적 검출을 하기 위한 장치를 제공한다. 이와 같은 자동 유전자 진단장치는 전기화학 측정 수단, 해석수단, 해석결과 표시수단을 갖는 되며, 예를 들면 전원, 발신기, 해석용칩, 액정모니터, 프린터 등으로 구성될 수 있다. 또한, 이와 같은 자동 유전자 진단 장치는 전원, 발신기, 해석 장치 등을 간략화한 회로를 구축함으로써 소형화할 수 있다. 따라서, 최근 의료현장에서의 중요성이 높아지고 있는 휴대용 진단 (point-of-care-test (POCT))을 가능하게 하는 휴대형 자동 유전자 진단장치로서도 기대된다.

이하, 첨부한 도면에 따라서 실시예를 나타내며, 본 발명의 실시 형태에 대해서 자세히 설명한다. 물론, 본 발명은 이하의 예에 한정되는 것은 아니며, 세부적으로는 여러 가지의 형태가 가능하다.

< 실시예 1 : DNA칩의 제작 >

본 실시예에 있어서는 DNA 칩의 제작을 나타낸다. 도 2는 본 발명의 DNA칩의 제조공정 개요를 보여주는 모식도이다.

1) 미소전극어레이의 제작

- (a) 슬라이드 기판(Matsunami사, 76mm×27mm, 두께 1.2~1.5mm)을 적당한 크기로 절단해서 약 24mm×24mm로 하고, 세척한 후, 초순수(Milli Q)로 30분, 전자공업용 아세톤(關東化學)으로 30분, 다시 초순수로 30분 초음파 세척하였다.
- (b) RF 스퍼터링 장치(SANYU사, SVC-700 LRF)를 이용하여 약 5×10^{-4} Pa 이하의 진공상태, 15sccm의 Ar가스, 50W에서 순도 99.95%의 Ti 표적을 약 200Å 증착하고, 계속하여 순도 99.95%의 금 목표물을 2000Å 증착하여 Ti/Au 박막을 형성하였다.
- (c) 기판상에 스피코터(초속 500rpm×2sec, slope 3sec, 본속 3000rpm×20sec, slope 3sec)로 포지티브형 레지스트(S1818, Shipley)를 균일하게 도포하고, 레지스트층을 형성하였다.
- (d) 이 기판을 110°C에서 1분간 가열한 후, 미리 Adobe illustrator로 디자인하여 필름출력(山田製版)한 포토마스크를 고정하고, 노광(25초)해서 현상액(MF-319, Shipley)×30sec, 순수×30sec로 현상하였다.
- (e) H₂SO₄나 HF등으로 Ti을 에칭하였다.
- (f) 리무버(remover : 1165, Shipley) 60°C×10sec, 아세톤, 에탄올의 순으로 회생층을 없애므로써 미소전극어레이를 제작하였다.
- (g) 리드선 부분을 피복하기 위하여 다시 포지티브형 레지스트(S1818, Shipley)를 도포하여 레지스트층을 형성한 후, 오븐에서 가열한 후, 별도의 마스크패턴을 이용하여 노광, 현상하여 미세전극 부분 및 외부접속전극(리드와이어) 부분을 노출시킨다.
- (h) 대극을 일체화하기 위하여 백금(Pt)를 RF스퍼터링하여, 도 3과 같은 8채널의 미소전극어레이를 얻었으며, 참조전극으로는 은/산화은(Ag/AgCl) 전극을 사용하였다.

2) 프로브 DNA의 고정

21mer의 SH-p72, SH-m72 및 SH-R72를 프로브 DNA로 하고, 각각의 염기배열은 다음과 같다.

HS-p72: 5` -HS-AGG CTG CTC CCC CCG TGG CC-3`

HS-m72: 5` -HS-AAG CTG CTC CCC CCG TGG CC-3`

HS-R72: 5` -HS-AGG CTG CTC CCC GCG TGG CC-3`

한편, 목표 DNA로서는 HS-p72와 상호적인 21mer의

p72: 3` -TCC GAC GAG GGG GGC ACC GG-5` 를 준비하였다.

먼저, SH-p72, SH-m72 및 SH-R72 뉴클레오타이드의 5' 말단에 SH기를 도입한 것[0.2μg 역상HPLC 정제한 프로브 DNA (日清紡研究開発センタ)]에 SH보호기를 제거한 후에 TE buffer [10mM Tris-HCl (pH8.0) and 1mM EDTA (pH8.0), 和光純藥工業]를 적당량 가하여 희석하였다. 마이크로피펫을 이용하여 SH기를 수식한 프로브 DNA (5μM, 1μl) 용액을 미소 금전극상에 스폿하여 25°C에서 2시간 반응시켜 프로브 DNA를 고정화하였다. 고정화반응후, 초순수를 이용하여 전극을 세척하여, 미소전극상에 결합고정화되어 있지 않는 프로브 DNA를 제거하였다.

<실시예 2 : DNA칩을 이용한 전기화학측정>

1) DNA칩의 산화·환원전위의 확인

도 4에 도시된 바와 같은 상호적 핵산 염기쌍의 전기화학적 측정에 이용된 장치(모식도)를 이용하여 프로브 DNA(SH-p72, SH-m72 및 SH-R72)를 고정화하지 않는 미소금전극어레이 및 프로브 DNA를 고정화한 DNA칩을 각각 25°C의 5mM K₃[Fe(CN)₆]+ 100mM KCl에 침적하여 3전극법에 의한 cyclic-voltammetry(CV)를 실시하였다. 참조전극은 은/

산화은(Ag/AgCl)로서, 비교전극을 이용하여 전위차를 $\pm 1\text{mV}$ 이내인 것을 확인한 후에 사용하였으며, 대극으로는 백금을 사용하였다. 측정은 DNA칩으로부터 리드와이어를 만들어 potentiostat에 접속하고, sweep speed 100mV/sec 로 $-100\sim 700\text{mV}$ 의 범위에서 4회 반복한다. 채널 1에서 채널 8까지의 결과를 컴퓨터로 해석하여 얻어진 사이클릭 볼타모그램을 도 5에 나타내었다. 또한, 금전극, 프로브 DNA를 고정화한 후의 사이클릭 볼타모그램을 도 6의 (a) 및 (b)에 각각 나타내었다.

도 5에 도시된 바와 같이, 측정결과 채널 1에서 채널 8까지의 CV가 모두 일치하고, 2.60[V] 와 1.46[V] 에서 산화·환원피크가 나타나며, 안정된 결과를 얻었다.

도 6의 (a)와 같이, 프로브 DNA를 고정화하지 않은 미소전극어레이에서는 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 에 유래한 산화·환원피크(약 $3.4\ \mu\text{A}$)가 얻어진다. 한편, 도 6의 (b)와 같이, 프로브 DNA를 고정화한 DNA칩에서는 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 에 유래한 피크가 50% 정도로 감소하였으며, 0.26V 에서 0.31V 로 시프트하였다. 이로부터 프로브 DNA의 고정화로부터 미소금전극이 절연된 것을 확인할 수 있다.

2) 반응(hybridization)

실시에 1에서 제작한 DNA칩에 반응버퍼(hybridization buffer)(TE)로 조제한 목표 DNA($1\text{aM}\sim 50\ \mu\text{M}$, $1\ \mu\text{l}$)를 마이크로 피펫으로 스폿하고, 도 7과 같은 프로브스테이션 장치를 이용하여 0.3V , 5sec 의 조건하에서 pad에 (+)전압을, working 전극에 (-)전압을 인가하여 목표 DNA(target DNA)를 반응시켰다. 반응후, 반응버퍼(hybridization buffer) 및 역전압을 인가하여 미소금전극을 세척하고 비특이적으로 흡착한 DNA를 제거하였다. 얻어진 사이클릭 볼타모그램을 도 6의 (c)에 나타내었다.

도 6의 (c)와 같이, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 유래의 산화·환원피크는 프로브 고정화 때보다도 27.2% 정도 더욱 감소하였으며, 0.31V 에서 0.37V 로 시프트하였다. 이로부터 프로브 DNA에 목표 DNA가 반응(hybridization)하여, 미소금전극상의 DNA의 밀도가 높아져서 미소금전극이 완전히 절연됨을 알 수 있다.

3) 비교예 1

실시에 1에서 제작한 DNA칩에 실시예 2와 같은 방법으로 제어 DNA(SH-m72 및 SH-R72)와 p72 목표 DNA(target DNA)를 반응시켜 각각 도 8a와 도 8b의 사이클릭 볼타모그램에 도시하였다.

도 8a 및 도 8b에 도시된 바와 같이, SH-m72와 SH-R72의 경우, 사이클릭 볼타모그램의 산화·환원전류가 91%와 80%로서 상호적 핵산에 비해서 변화가 거의 없었다. 즉, SH-m72와 SH-R72에 p72 DNA가 반응(hybridization)하지 않음이 전기화학적으로 확인되었고, 이 조작을 수십회 반복하여도 재현성이 확인되었다.

<실시예 3 : 목표 DNA(target DNA)의 농도 측정>

실시에 1에서 제작된 SH-p72, SH-m72 및 SH-R72 DNA를 프로브 DNA로 하는 DNA칩에 대해서 목표 DNA의 농도를 $1\text{aM}\sim 50\ \mu\text{M}$ 로 바꾸어서, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 의 사이클릭 볼타모그램을 얻었다. 목표 DNA의 농도와 산화·환원전류 피크 변화의 비율의 관계를 도 9에 나타내었다.(도 9의 (a)는 SH-p72, (b)는 SH-m72 및 (c)는 SH-R72 프로브 DNA에 대하여 목표 DNA의 농도를 $1\text{aM}\sim 50\ \mu\text{M}$ 로 바꾸었을 때, 산화전류 피크 변화율의 관계를 나타낸다.)

도 9의 (a)와 같이 SH-p72에 대해서 목표 DNA의 농도를 $1\text{aM}\sim 50\ \mu\text{M}$ 까지 변화하였을 때, 산화피크의 변화율이 75%~27%로서 직선적인 관계가 나타났다. 한편, 도 9의 (b) 및 (c)와 같이 SH-m72와 SH-R72 DNA에 대해서는 80% 이상으로서 거의 변화가 없었다.

이상의 본 출원 발명인 DNA칩을 이용함으로써 상호적 핵산 염기쌍을 1aM 이라는 극미량의 목표 DNA를 검출할 수 있었다. 즉, 본 발명의 상호적 핵산염기쌍의 전기화학적 측정방법은 종래법에 비교하여 넓은 검출 감도를 갖음이 확인할 수 있었다.

발명의 효과

본 발명에 의하면, 프로브 핵산과 목표 핵산의 표식이 필요 없으며, 상호적 핵산 염기쌍을 간편하고, 정확하게 검출할 수 있다. 또, 본 발명의 방법에 의하여 제조되는 핵산칩을 소형화할 수 있고, 생산 가격을 낮출 수 있는 효과가 있다.

특히, 본 발명은 형광검출형 DNA칩에 비하여 간편성, 휴대성, 개발코스트의 면에서 우수한 미소전극어레이형 바이오칩으로 감도가 높고, 간편한 핵산칩이다.

한편, 본 발명의 핵산칩은 프로브 핵산과 목표 핵산을 표식할 필요 없이 전기화학적으로 반응을 검출할 수 있으므로, 측정에는 범용의 장치를 이용할 수 있다 따라서, 복잡한 조작이나 시약, 설비 등을 필요로 하지 않는다.

그리고, 본 발명의 핵산칩을 이용하여 유전자 진단장치의 소형화, 휴대화가 가능하므로 유전자 질환이나 바이러스성 질환의 POCT 검사 또는 조기진단에 매우 유용하다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

삭제

청구항 2.

삭제

청구항 3.

삭제

청구항 4.

상호적 핵산염기쌍을 전기화학적으로 검출하기 위하여 미소전극에 하나의 프로브 핵산을 고정화하여 얻어진 핵산 고정화 미소전극에 비수식화된 목표 핵산을 반응시키는 공정과,

상기 핵산 고정화 미소전극의 산화·환원 전위의 변화를 측정하는 공정을 포함하는 유전자의 전기화학적 검출방법에 있어서, 상기 핵산 고정화 미소전극에 비수식화된 목표 핵산을 반응시키는 공정은 후보가 되는 목표 핵산을 함유하는 용액에 핵산 고정화 미소전극을 침적시키는 방법, 핵산 고정화 미소전극 표면에 목표 핵산을 함유하는 용액을 적하·도포하는 방법 또는 전계에 의하여 목표 DNA를 반응시키는 방법 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 비수식화된 유전자의 전기화학적 검출방법.

청구항 5.

삭제

청구항 6.

삭제

청구항 7.

삭제

청구항 8.

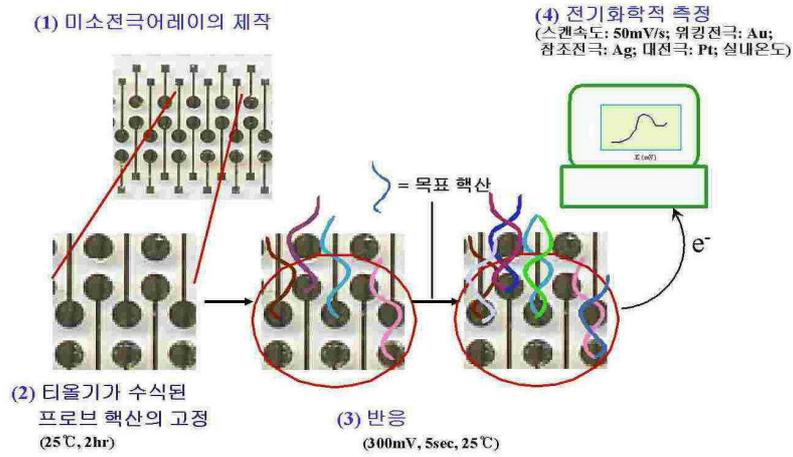
삭제

청구항 9.

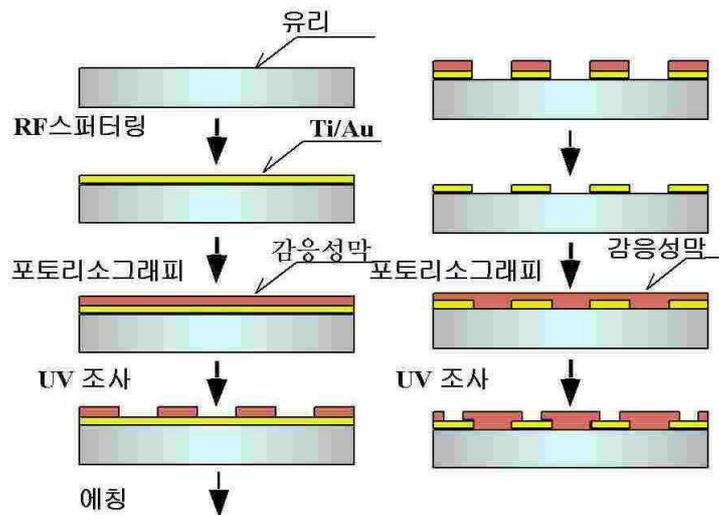
삭제

도면

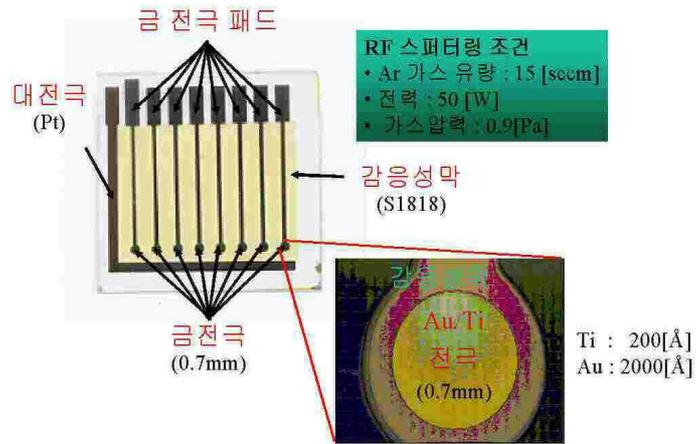
도면1



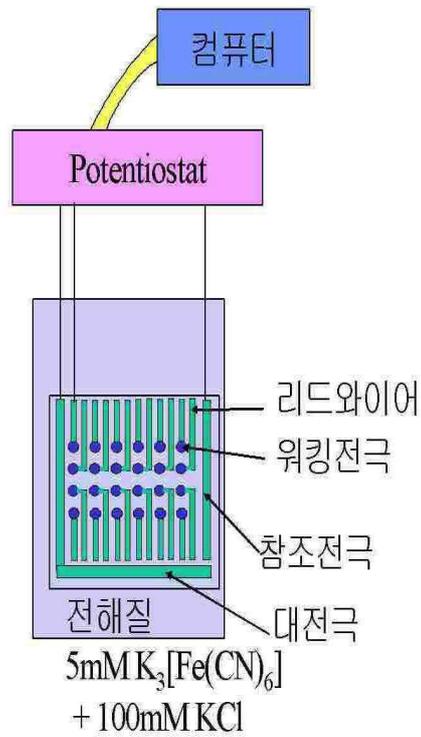
도면2



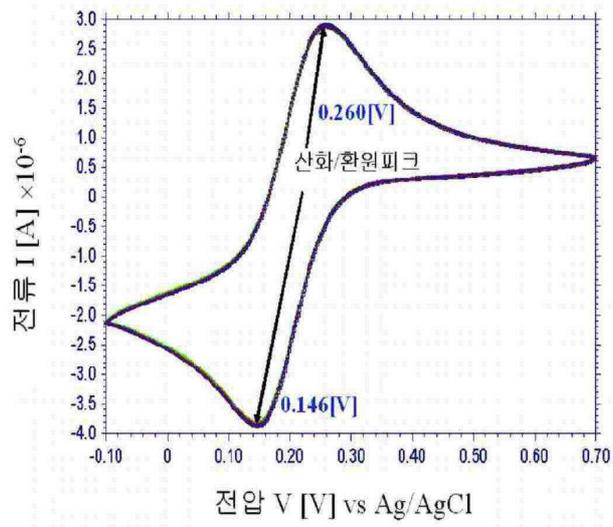
도면3



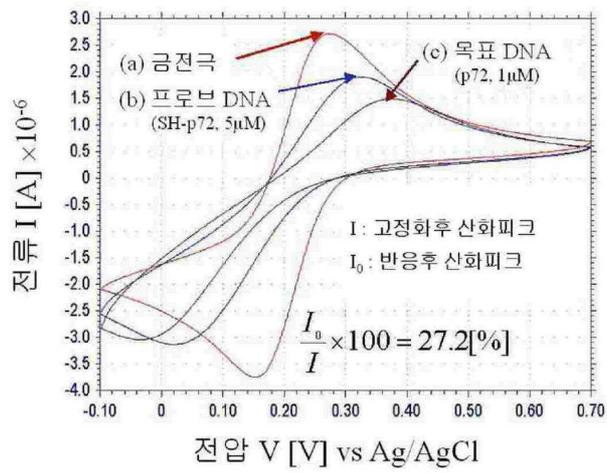
도면4



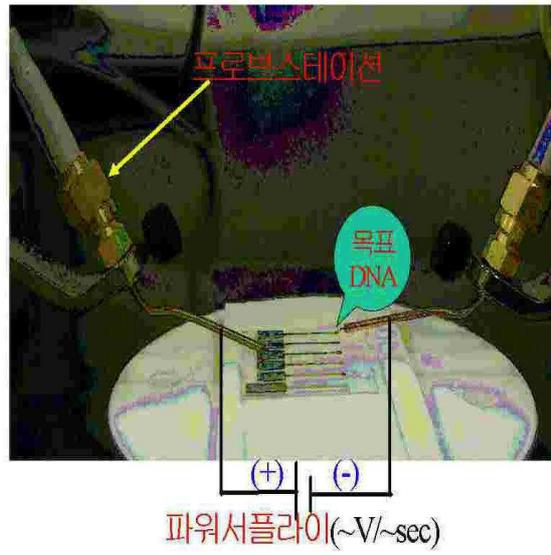
도면5



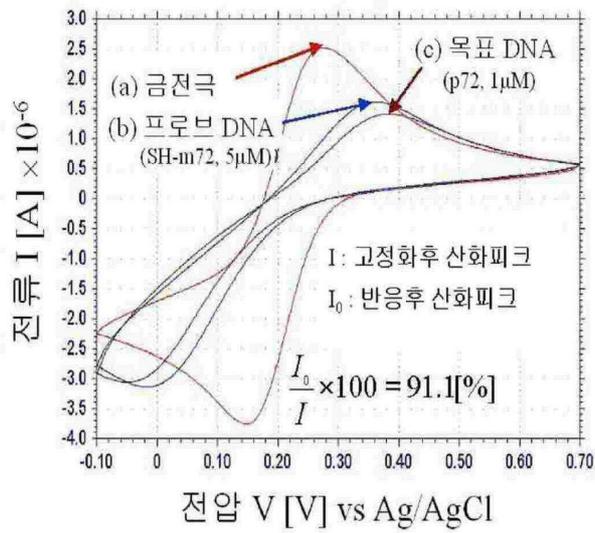
도면6



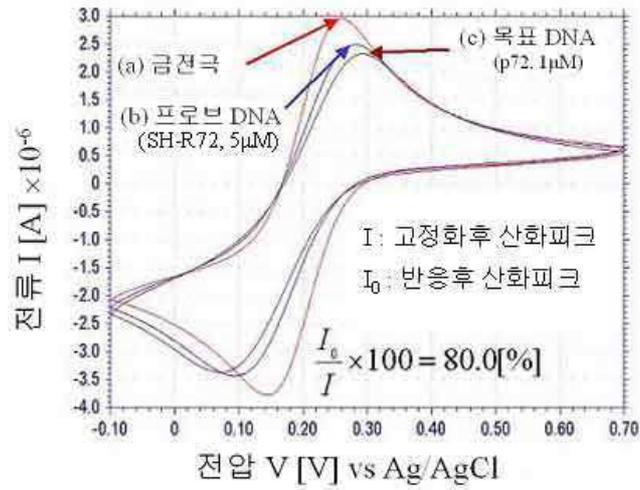
도면7



도면8a



도면8b



도면9

