

## DNA Chip과 고정화 기술

박현규<sup>†</sup> · 지홍석<sup>\*</sup> · 임성춘 · 장호남

한국과학기술원 생명화학공학과

\*삼성종합기술원

(2001년 12월 8일 접수, 2002년 2월 6일 채택)

## DNA Chip and Immobilization Technologies

Hyun Gyu Park<sup>†</sup>, Hong-Seok Ji<sup>\*</sup>, Seong-Chun Yim and Ho Nam Chang

Department of Chemical and Biomolecular Engineering, KAIST, Daejeon 305-701, Korea

<sup>\*</sup>Samsung Advanced Institute of Technology, Daejeon 305-380, Korea

(Received 8 December 2001; accepted 6 February 2002)

### 요 약

DNA chip 기술은, 인간 DNA 염기 서열상의 이상징후와 관련된 질병을 진단하거나 신약 개발을 위하여 특정 DNA 발현의 분석 등에 응용될 수 있다. 현재, DNA chip을 제작하고 DNA hybridization 반응 신호를 감지하는 방법에는 다양한 기술들이 있다. 본 글에서는 급성장하고 있는 DNA 칩의 전반적인 원리, 제조기술, 그리고 DNA를 chip에 고정화 시키는 기술을 중점적으로 소개하고자 한다. 또한 젊은 나이에서의 당뇨 발병과 관련된 유전자인 MODY의 유전자 변이를 진단하는 oligonucleotide DNA chip의 예를 보여주하고자 한다.

**Abstract** – The application of DNA chip technology includes the diagnosis of various human diseases associated with DNA sequence anomalies and the comprehensive analysis of expressed sequences with regard to newer drug designs. There are a variety of options for making DNA chips and detecting hybridized signals. Here, we take a close look at the principles and manufacturing technologies of this rapidly growing area, highlighting the DNA immobilization technology on the chip. Finally we present an example of oligonucleotide chip for the analysis of multiple MODY gene mutations, which are related with diabetes of the young.

**Key words:** Biochip, DNA Chip, DNA Immobilization

### 1. 서 론

1953년 Watson과 Crick이 이중나선 형태의 DNA helix 구조를 발표한 후 50여년이 지난, 지난 2001년 2월 인간의 모든 유전 정보를 담고 있는 30억개의 염기쌍을 읽어 내는 작업인 human genome project가 완성되어, 그 정보가 각각 Science (Feb. 16, 2001)와 Nature (Feb. 15, 2001)에 발표되었다. 1990년 시작된 인간 유전체 연구(human genome project, HGP)는 유전 정보의 총체인 유전체(genome)를 해석 하는 연구로써 생명 현상의 수수께끼를 풀고자 하는 인류 역사상 커다란 프로젝트이다. 아폴로호의 달 착륙에 견줄 만큼 커다란 계획인 인간 유전체 연구의 성과로, 2001년 2월 생명현상을 결정짓는 게놈 지도가 완성되어, 배일에 가려졌던 '신의 영역'인 생명의 설계도를 인간의 손에 넣게 되었다. 이렇듯 급격히 발전하는 생명공학의 발달과 더불어 멀지 않아 인간 유전자의 기능을 모두 이해하고 생명현상을 인위적으로 조작할 수 있는 유전자 혁명을 비롯한 생명공학 혁명의 시대가 도래할 것이다. Microsoft

사의 빌게이츠도 다음과 같은 표현으로 생명공학 시대의 도래를 예측하였다. "Two technologies will dominate 21st century scientifically and industrially; Biotechnology and Information Technology" 또한 세계적인 잡지인 TIME지에서도, "Ring farewell to the century of physics, it's time to ring in the century of biotechnology."의 표현으로(TIME, March. 22, 1999) 생명공학 시대의 도래를 일찍이 예견했다.

이러한 생명공학의 혁명시대에 가장 부각 받는 기술중의 하나가 바로 바이오칩이다. 바이오칩이란 유리나 실리콘과 같은 고체 기판 위에 많은 종류의 DNA나 protein 같은 바이오 물질을 고밀도로 집적시켜 붙여 놓은 것으로, DNA를 집적시켜 놓으면 DNA chip, protein을 집적시켜 놓으면 protein chip이라 명명한다. 2000년 기준 바이오칩의 세계 시장은 5천억원을 상회하는 것으로 추정되고 있으며, 향후 매년 20-70%의 높은 성장률을 보이며 2005년경에는 현재 세계시장의 10 배 가량 증가된 5조원 정도의 시장을 형성할 것으로 예측되고 있다 (Fig. 1).

본 글에서는 DNA chip의 원리, 종류, 그리고 핵심 기술과 동향 등에 대해서 살펴볼 것이다. 또한 화학공학자가 핵심적으로 기여할 수 있는 DNA 고정화 기술 분야에 대해서, 그 실 예를 들어 논의할 것이다.

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: hgpark@mail.kaist.ac.kr

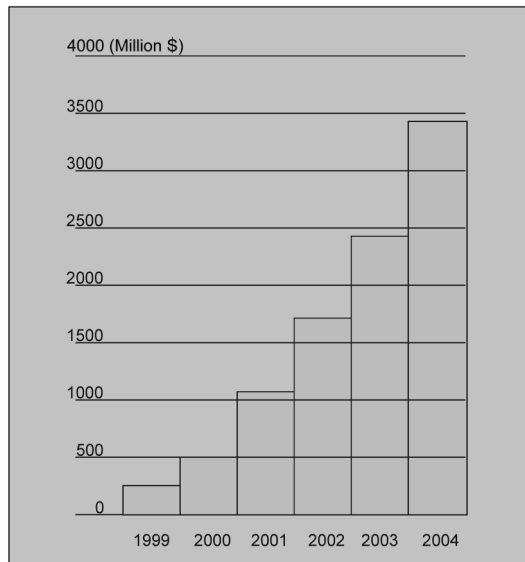


Fig. 1. Total biochip market: revenue forecasts(world), 1999-2004.

Note: all figures are rounded; the base year is 1999

Source: frost and sullivan(June 1, 2001 bioarray news)

## 2. DNA chip system

DNA chip은, comma 고체 기질 위에 붙여 놓은 capture probe DNA와 검색하고자 하는 target probe DNA 사이의 선택적인 혼성화(hybridization)를 통해서 target DNA 내에 특정 DNA의 sequence가 존재하는지, 또는 target DNA의 염기배열이 어떻게 되어 있는지 등의 유전 정보를 얻기 위해서, 많은 종류의 DNA를 고밀도로 붙여 놓은 chip을 말한다. DNA는 혼성화 반응을 통해서 서로 염기서열이 상보적인 것끼리(A & T 그리고 G & C) 결합하려는 성질이 있는데, DNA chip은 이러한 혼성화 반응의 유무와 정도를 통해서 유전 정보를 얻는 것이다. 이러한 DNA chip의 가장 큰 장점은 기존에 사용하였던 유전 공학적인 방법인

Southern과 Northern blot, 돌연변이 검색, 그리고 DNA sequencing 방법들보다 훨씬 짧은 시간에 적은 시료를 가지고 많은 유전자를 검색할 수 있다는 것이다. 하루에도 수 백 개 이상 밝혀지는 새로운 유전 정보들이나 모든 유전 암호가 밝혀진 생물들을 기존의 방법들로 연구한다는 것은 너무나 많은 시간과 노력을 요구하기 때문이다.

DNA chip system의 전체 원리를 Fig. 2를 참고로 하여 이해해 보기로 하자. DNA chip을 형성하는 가장 첫 단계는 어떤 content의 유전자를 심을 것인가를 결정하는 것이다. 즉 어떤 질병을 진단하는 DNA chip을 제작하고자 한다면, 그 질병의 발병 유무나 가능성을 진단할 수 있는 유전 정보를 확보해야 한다. 이는 컴퓨터 산업에 있어서 software에 해당하는 것으로 비유될 수 있다. HGP의 완성과 더불어 가장 활발히 연구되고 있는 SNP(single nucleotide polymorphism) 연구도, DNA chip system에 있어서 content를 찾고자 하는 연구의 일환으로도 이해할 수 있다. 즉 특정 질병과 연관이 있는 SNP이 규명된다면, 그 정보를 알 수 있게 디자인된 DNA chip을 제작하여 그 특정 질병을 진단할 수 있는 것이다. DNA chip에 담을 content가 정해지면, 그 content의 유전 정보를 가장 효과적이고 정확하게 제공해줄 수 있는 capture probe DNA들을 디자인해야 한다. 다시 말해서, 실제로 DNA chip상에 고정화될 DNA들을 결정하는 것이다. 이때 고정화되는 capture probe DNA의 개수가 작게는 수백에서 많게는 수십 만개에 이르는 대단히 많은 수이고, 또한 이러한 probe DNA를 결정하기 위해서는, 각각 DNA의 길이, melting point, 그리고 secondary structure의 형성 유무 등 고려해야 할 인자들이 매우 많기 때문에 bioinformatics 학문의 도움 없이는 불가능하다. Bioinformatics 분야와의 공동 연구가 필요한 첫 단계가 바로 capture probe selection 단계인 것이다.

DNA chip 상에 올라갈 capture probe DNA들이 결정되면, 다음 단계는 이들을 합성 등의 방법을 이용하여 확보한 후에, DNA chip 상에 고정화 시키는 것이다. 고정화 방식은 다음 장에서 자세히 논의될 것이다. Capture probe DNA가 고정화된 DNA chip이 우리가 말하는 협의의 DNA chip이 되는 것이다.

유전 정보를 얻고자 하는 target probe sample을 준비하는 것이 다음 단계이다. 암을 진단하는 DNA chip을 예로 들면, 암 환자로 의심되는

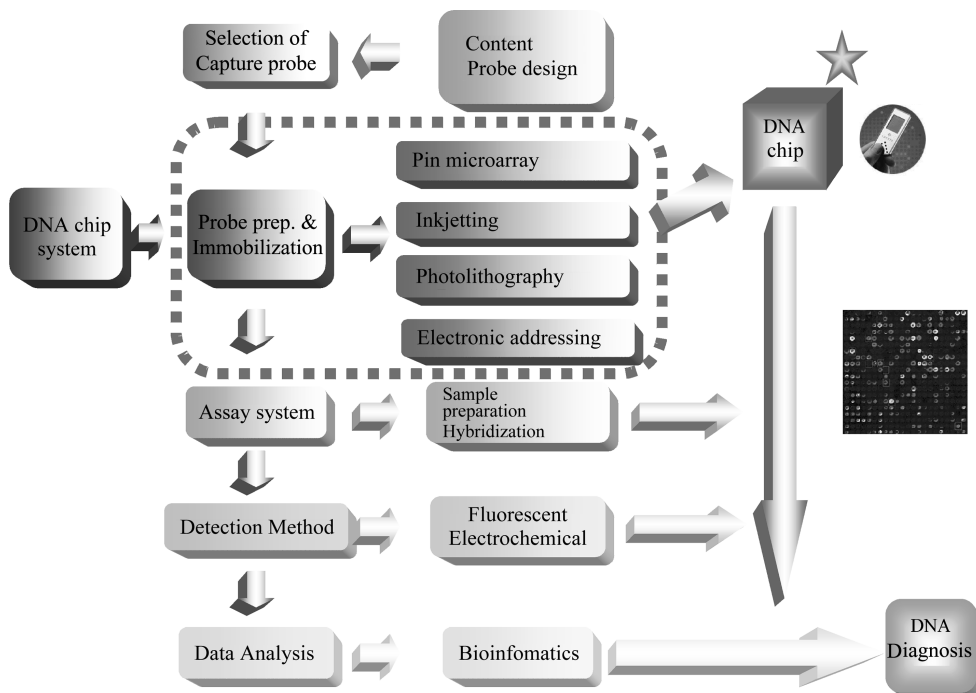


Fig. 2. DNA chip system.

사람의 혈액 등으로부터 DNA를 추출, 증폭하여 chip상에 고정화된 capture probe DNA와 상보적인 결합을 할 수 있도록 만들어야 한다. Target probe DNA와 capture probe DNA 간의 상보적인 결합의 여부를 정확하고 민감하게 감지할 수 있는 측정 기술이 매우 중요한 요소 기술 중의 하나인데, 현재 형광물질을 target DNA에 미리 결합 시킨 후, 형광 scanner로 감지하는 방법이 가장 널리 사용되고 있다[1]. Fig. 2 오른쪽 부분에 scanning된 형광사진의 예가 포함되어 있다. 형광사진에서 각 위치의 spot이 서로 다른 형광 세기를 나타내고 이러한 각각의 형광 세기가 그 위치에 해당하는 특정 DNA의 유무 또는 발현 정도에 대한 정보를 제공하는 것이다.

이밖에도 DNA가 전하를 띠는 물질인 점을 이용하여, 전기화학적인(electrochemical) 방법을 이용하여 감지하는 방법도 현재 활발히 연구 중이다[2]. 이러한 방법의 가장 큰 장점은, target DNA에 별도의 형광 물질을 결합시키는 단계가 필요 없이 바로 혼성화 결합을 시킬 수 있다는 점이다. 반면, 측정 민감도(detection sensitivity)와 특이성(specificity)의 향상 등 해결해야 할 점들이 많이 남아 있다. 최근에는 DNA-modified gold nanoparticle을 이용하여 간단히 color image나[3] reflective image[4]로 감지하는 방법도 개발되고 있다.

DNA chip에서는 한 가지의 유전 정보에 대해서 여러 spot의 결과가 조합되어 정보를 제공하는 경우가 대부분이고 또한 DNA chip상의 DNA 물질은 고밀도로 많은 수의 양이 침적되어 있으므로, 이 결과를 컴퓨터의 도움 없이 분석하는 것은 불가능하다. 이 단계는 DNA chip의 유전정보를 최종 판정하는 단계이므로 분석하는 프로그램의 적합성과 효용성에 따라서 DNA chip의 전체 성능을 좌우할 수 있다. 따라서 마지막 데이터 분석 단계에서의 bioinformatics 기술은 DNA chip system의 전체 성능을 좌우할 수 있는 매우 중요한 핵심 기술이다. DNA chip system은 위에서 설명한 5개의 큰 분야로 분류할 수 있는데, 이들 세부 분야 중에서 DNA 고정화 부분에 초점을 두고 자세히 살펴보기로 하자.

### 3. DNA chip의 종류

#### 3-1. Capture probe DNA의 종류에 따른 분류

DNA chip은 고정화 되는 capture probe DNA의 종류에 따라서 cDNA chip과 oligonucleotide chip으로 분류될 수 있다. 통상 cDNA는 500 bp (base pair) 이상의 유전자이고, oligonucleotide는 통상 15-25개의 염기(base)로 이루어진 유전자이다.

cDNA chip은 생물체의 mRNA로부터 역전사된 cDNA를 capture probe DNA로 chip상에 고정화시켜서 제작한다[5]. 여기에 유전 정보를 알고자 하는 조직으로부터 얻은 mRNA를 가하여 특정 조직의 mRNA 발현 양상과 정도에 대한 정보를 얻는 것이다. 이러한 cDNA chip 기술은, 기존의 방법인 Northern blot 방법과는 달리 수많은 유전자 probe를 동시에 사용할 수 있어 최근에는 수천 또는 수만개의 유전자 발현을 동시에

검증할 수 있다.

이에 반해서 oligonucleotide chip은, 15-25 base 정도 길이의 DNA를 화학적으로 합성하여 chip에 고정화시켜 제작한다[6]. Oligonucleotide chip은 cDNA chip과 같이 DNA의 발현 정도뿐 아니라, 유전자의 변이 여부와 같은 유전자 sequence에 대한 정보를 얻는 용도로도 사용될 수 있다.

#### 3-2. Capture probe 본질에 따른 분류

DNA chip에서 유전정보를 얻는 것은, capture probe DNA를 chip에 고정화 시키고 여기에 target probe sample인 DNA 또는 RNA를 가하여 이들간의(DNA-DNA or DNA-RNA) 상보적인 결합을 기본으로 하고 있다. 하지만 최근에는 capture probe로 DNA 대신 이와 유사한 특성을 가지는 nucleic acid analogue 물질을 사용하여 DNA chip을 개발하려는 연구도 활발히 진행되고 있다. 이러한 물질 중에 대표적인 것이 바로 PNA (peptide nucleic acid) 이다[7, 8]. PNA는 peptide-like backbone을 가지고 있기 때문에 전하를 띄지 않는 물질로서, N-(2-aminoethyl) glycine 반복 단위가 아미이드 결합으로 연결되어 있고 염기는 methylene carbonyl linkage에 의해서 backbone에 결합되어 있다(Fig. 3). DNA oligonucleotide와 같이 PNA도, 상보적인 염기서열을 가지는 DNA 또는 RNA와 혼성화 결합을 하는 특성을 유지하면서도 Table 1에서와 같이 특유의 장점을 가지고 있다. 대표적인 장점으로 PNA/DNA duplex가 DNA/DNA duplex에 비해 결합력이 더 강하다는 사실이다. PNA는 전하를 띄지 않기 때문에, PNA와 DNA strand간에는 전기적인 반발력이 없기 때문이다. Table 2는 이러한 duplex간의 결합력의 차이의 잘 나타내 준다[9]. 100 mM NaCl 조건하에서 통상 PNA/DNA duplex의 Tm은

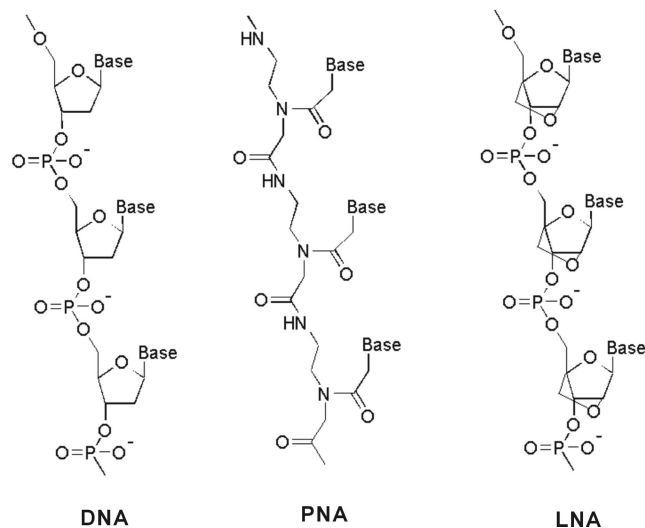


Fig. 3. Structure of DNA, PNA & LNA.

Table 1. Comparison of DNA chip & PNA chip

	DNA	PNA
Binding affinity force	H-bonding/charge repulsion	H-bonding/no charge repulsion
Hybridization affinity	-	1 °C higher per base
Hybridization rate	-	100-50,000 times higher
Salt concentration	Highly dependent	Independent
Tm for single mismatch	4-11 °C	8-20 °C lower
Typical length for DNA chip	25-40 bases	12-15 bases
Chemical stability	Depurination with strong acid	Stable
Water solubility	High	Low
Max. base length	No limit	18 bases due to self-aggregation
Cost	Low	High
Process	Established	Difficult

**Table 2. Melting points(Tm) of various kinds of duplex\***

Duplex	Tm
15-mer PNA/RNA	72 °C
15-mer PNA/DNA	69 °C
15-mer DNA/RNA	50 °C
15-mer DNA/DNA	54 °C

\*Studies in 10 mM phosphate buffer, 0.1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 7.0[9]

그에 상응하는 DNA/DNA duplex에 비해서 한 개의 base pair당 1 °C의 Tm 상승 효과를 보인다. PNA/DNA duplex의 이러한 강한 결합력 때문에, 통상 15-25 mer 길이의 DNA probe를 사용하는 DNA chip의 경우에 비해 PNA chip의 경우는 그보다 짧은 PNA probe로도 동일한 감도의 성능을 구현할 수 있다. 그밖에도 PNA chip은 DNA chip에 비해 single base mismatch에 대한 높은 변별력 등의 장점이 있는 반면, 아직은 PNA 제조 공정이 어렵고 비용이 많이 든다는 단점이 있다.

또 다른 nucleic acid analogue로 LNA(locked nucleic acid)가 있다[10]. LNA가 DNA와 다른 점은, 2'-O, 4'-C methylene bridge로 bicyclic monomeric unit을 포함한다는 것이다(Fig. 3). LNA 역시 PNA와 같이 상보적인 서열의 DNA나 RNA에 대한 결합력이 강하다는 장점을 가지고 있다. 이는 LNA의 bicyclic 구조의 제한된 conformational flexibility에 기인한다고 설명될 수 있다. 즉, LNA의 bicyclic 구조가 hybridization 과정에서 conformational transition을 감소시키기 때문이다. DNA monomer를 LNA monomer로 치환할 경우, medium salt 조건하에서 3-8 °C 정도의 Tm 상승 효과를 보인다[11]. 흔히 PNA를 capture probe로 심으면 PNA chip, LNA를 capture probe로 심으면 LNA chip이라 명명한다. 현재 PNA chip은 국내의 경우 삼성에서 개발하고 있다.

#### 4. DNA chip 제작 방식

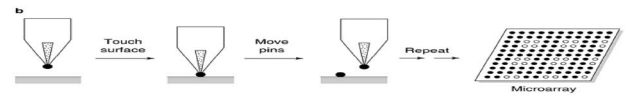
DNA chip을 제작하는 방법은 Table 3에서와 같이 크게 4가지로 나눌 수 있는데, 이들 4가지 방법에 대한 대략적인 도식도가 Fig. 4에 나타나 있다. 대표적인 방법으로는 미리 합성되거나 준비된 DNA를 표면에 붙이는 방법(microspotting and microdropping)과 고체 기질 위에서 화학적인 방법으로 DNA를 하나씩 합성하여 붙여가는 방법(photolithography)으로 나눌 수 있다. 이들 방법을 간단히 설명하면 다음과 같다.

##### 4-1. Pin microarray

미리 합성하거나 준비된 DNA(cDNA나 oligonucleotide)를 pin microarray 방식이나[12-14] inkjet 방식으로 고체 표면에 붙여 DNA chip을 제작할 수 있는데, pin microarray 방식은 Stanford 대학의 생화학과 교수인 Patrick O. Brown 교수에 의해 개발되어 현재 많이 사용되고 있는 방법으로 pin의 끝부분에 미리 준비된 DNA의 샘플 용액의 일정량을 loading 한 후 고체기질과 접촉함으로써 원하는 위치에 원하는 probe DNA를 배열시킬 수 있는 방법이다. 고체기질과 DNA 용액과의 직접적인 접촉에 의해서 DNA 용액이 spotting되므로 contact 방식이라고도 한다. 이 방식은 작동이 간편하고 적은 양의 샘플만으로도 spotting이 가능하다는 장점이 있는 반면, spotting되는 DNA 용액의 양이 접촉되는 고체기질의 표면 특성에 민감하게 좌우되므로, spotting 양을 세밀하게 제어할 수 없다는

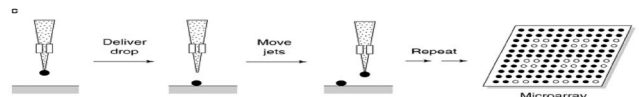
##### Pin microarray:

- Incyte, Hyseq, Molecular Dynamics, etc
- 10,000 probe/cm<sup>2</sup>



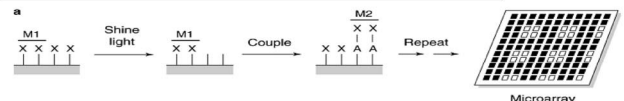
##### Inkjetting:

- Photogene, Incyte, etc
- 50,000 probe/cm<sup>2</sup>



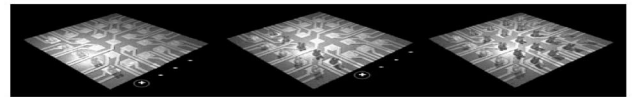
##### Photolithography:

- Affymetrix
- 400,000 probe/1.28 cm<sup>2</sup>



##### Electronic Addressing:

- Nanogen, CMS (Clinical Micro Sensors)

**Fig. 4. Manufacturing techniques of DNA chip.**

단점이 있다. 현재 사용되고 있는 pin에 의해서, 이러한 방식으로 spotting되는 DNA 용액의 최저 부피는 0.5-1.0 nl 수준이고 이때 만들어지는 통상의 glass 상에서의 spot size는 지름이 100-200 μm 정도이다.

##### 4-2. Inkjetting

Inkjet 방식은 pin 방식과 거의 유사하나 pin 대신에 inkjet printer에서 쓰이는 것과 같은 원리의 cartridge를 사용하여 고체기질과의 접촉 없이 DNA를 고체기질 위에 뿌리는 방법이다[15]. Microspotting 방식에 비해 고체기질과의 직접적인 접촉이 없어 noncontact 방식이라고도 한다. 뿌리는 방법에 따라서 thermal, solenoid, 그리고 piezoelectric의 3가지 방법이 있다. 이 방식은, DNA 용액이 고체 기질 표면에 닿지 않고 압전(piezoelectric) 등의 현상을 이용하여 뿌려 주기 때문에 dropping 양을 정량적으로 제어할 수 있다는 장점이 있다. 또한 압전 현상을 이용한 방식의 경우, 현재 수 pl의 극소량까지 dropping 할 수 있도록 개발되어 pin 방식에 비해서 고밀도의 DNA chip을 제작할 수 있다. 하지만 아직까지는 많은 종류의 유전자를 가진 DNA chip을 제작하기 위해서 필요한 cartridge 안의 유전 물질 교환과 같은 기술적인 문제가 남아 있다.

##### 4-3. Photolithography

Photolithography 방식은, 고체기질 위에서 화학적인 방법으로 DNA

**Table 3. Manufacturing techniques of DNA chip**

Technique	Feature	Chip	DNA chip Manufacturer
Pin microarray	Pin microspotting(contact type)	cDNA, oligonucleotide	Hyseq, Incyte, Molecular Dynamics
Inkjetting	Inkjet micro-dropping	cDNA, oligonucleotide	Proton, Incyte
Photolithography	In situ synthesis of oligonucleotide	Oligonucleotide	Affymetrix
Electronic addressing	Electronic binding & concentration	Oligonucleotide	Nanogen Clinical Micro Sensor(CMS)

Table 4. Comparison of microspotting and photolithography

	Photolithography	Microspotting
Probe Immobilization	In-situ synthesis of oligomer	Binding of prepared cDNA or oligomer
Quality control	Difficult	Possible
Probe density	High density (250,000 probes/cm <sup>2</sup> )	Low density (10,000 probes/cm <sup>2</sup> )
Chip to chip variation	Low	High
Cost	High	Low
Process	Complex	Simple
System throughput	Low (8~12 arrays/day)	High

를 하나씩 합성해 나가는 방법으로, DNA 합성과 고체기판 위에서의 고정화를 동시에 수행하는 방식이다[6]. 현재 DNA chip 분야에 있어서 선두 주자로 할 수 있는 미국의 Affymetrix라는 회사가 개발한 기술로서 photolithography에 의한 DNA chip 합성과정은 빛에 민감한 물질인 감광체로 protection되어 있는 linker를 기판 위에 붙이는 것으로 시작한다.

(a) 이 기판 위에, 특정 패턴의 DNA를 합성할 수 있도록 설계된 마스크를 덮는다.

(b) 노광을 한다. 특정 파장의 빛을 쏘여 줌으로써, 마스크의 열린 공간으로 빛이 들어가 특정 부분 위의 감광물질을(photolabile group) 제거하여 DNA 물질이 반응할 수 있도록 deprotection한다.

(c) DNA monomer 4가지 종류 중(A, C, G, T), 원하는 한 종류를 반응시킨다. 이때 DNA monomer 역시 한 쪽 끝은 감광물질로 protection되어 있어 한 step에 한 개의 monomer만이 반응할 수 있다.

(d) 미 반응 물질을 씻어 낸다.

(e) 다르게 설계된 포토 마스크를 이용하여, 위의 a-d step을 반복하여 원하는 길이의 DNA를 원하는 패턴으로 합성한다.

Affymetrix는 위의 기술을 사용하여 현재 1.28 cm<sup>2</sup> 안에 400,000개의 oligonucleotide를 가진 고밀도의 칩을 제작할 수 있다.

#### 4-4. Electronic addressing

미국 샌디에고에 위치한 Nanogen이라는(<http://www.nanogen.com>) 회사에서는 반도체 제작공정의 미세 식각 기술과 가공기술을 이용하여 microchip을 제작하고 여기에 electronic addressing 기법을 이용하여 DNA chip을 개발하였다. Electronic addressing이란 전하를 띤 probe들의 전기적 특성을 이용하여 특정한 위치에 놓는 것을 말한다. DNA는 강한 음전하를 띠기 때문에 전기적으로 양전하를 띤 위치에 끌려 이동한다 [16, 17]. 이를 이용하여 chip상에 capture probe를 생성하는 과정은 다음과 같다. Microchip 위의 한 시험위치나 한 열을 전기적으로 양전하를 띠도록 활성화시키고 DNA probe solution을 넣는다. 그러면 음전하를 띤 probe들이 빠르게 양전하를 띤 곳으로 이동하여 화학적으로 결합하고 그 위치에 농축되므로 microarray의 원하는 위치에 원하는 DNA probe를 위치시킬 수 있다. 이러한 기술은 DNA chip상에 target probe를 가하여 hybridization 반응을 시킬 때도 중요하게 이용된다.

DNA는 phosphate group을 가지고 있기 때문에 negative charge를 띠게 되므로 capture probe와 target probe가 hybridization을 할 때 이들 전기적 반발력이 방해로 작용한다. 기존 방식의 경우에는 이를 안정화시키기 위해 salt를 많이 첨가한다. 그러나 nanogen chip에서는 positive potential을 이용하여 특정 capture probe로 target probe들이 집중될 수 있도록 할 수 있다. 따라서, 그곳에 sample이 농축되고 상대적으로 hybridization을 촉진시켜 기존의 수동적 hybridization 과정이 수시간으로 필요한 것에 비해 수분 내에 빠르게 진행시킬 수 있다. 또한 시료를 시험위치에 농축시킬 수 있기 때문에 낮은 농도로도 검사가 가능하며 이로 인해 기존의 방법에 비해 시료 전처리에 드는 시간과 비용을 줄일 수 있는 장점을 가지고 있다.

현재 가장 많이 사용되고 있는 두가지 기법인 pin을 이용한 microspotting 방식과 photolithography 방식의 특징을 Table 4에 정리하였다. Table 4에서 알 수 있듯이, Affymetrix사에서 사용하고 있는 photolithography 방식은 고밀도의 chip을 제작할 수 있다는 큰 장점이 있다. 또한 동일한 조건하에서 probe DNA를 하나씩 화학적으로 합성하면서 chip을 만들어 가기 때문에 chip to chip variation이 적다는 장점이 있다. 하지만 공정이 복잡하고 비용이 상대적으로 많이 소요되며, chip이 제작된 후, 원하는 염기서열의 probe DNA가 제대로 합성되었는지의 여부를 검사할 방법이 아직은 없다는 단점이 있다. 또한 photolithography 방식으로 염기를 붙여나갈 때, 공정상 합성할 수 있는 염기의 길이가 제한되기 때문에 photolithography 방식으로는 oligonucleotide chip 만을 제작할 수 있다. 예를 들어, 매 단계의 수율이 98%라 해도 50 base 길이의 probe DNA를 합성한 후의 최종 수율은 36%에 불과하다.

Microspotting의 경우 공정이 단순하여 적은 비용이 들고 high throughput 제작이 가능한 반면, 집적도가 상대적으로 낮고 chip to chip 또는 spot to spot variation이 크다는 단점이 있다. Microspotting이나 Inkjet을 이용한 microdropping의 기법을 이용하여, spot size가 nano scale 정도인 고집적의 chip을 제작하기 위해서는, 몇 가지 기술적인 문제들이 해결되어야 한다. 먼저 spot size가 nm scale이 되도록 샘플을 spotting할 수 있는 미세한 pin을 제작하거나 picoliter에서 femtoliter(pL-fL) 수준의 용액을 분주할 수 있는 미세한 노즐이 제작되어야 하고, 또한 이들이 재현성 있게 작동될 수 있어야 한다. 그리고 이렇게 적은 양의 샘플이 표면에 spotting되거나 분주 되었을 때 고체 기판 표면의 반응기와 고정화 반응이 진행되는 동안 용매의 증발을 방지할 수 있어야 한다. 또한 microarray에서 사용되는 robot arm의 공간정밀도가 매우 높아서 수십 또는 수백 nm 간격을 정확하게 유지하면서 spotting 할 수 있어야 한다.

## 5. DNA 고정화(Immobilization)

위에서 언급한 대표적인 DNA chip 제작 방법 4가지 중에서 microspotting과 microdropping 방법의 경우, DNA 용액이 고체 기판 위에 떨어진 후 DNA가 기판 위에 고정화 되는 단계를 거친다. DNA의 고정화 기술은, 전체 DNA chip 기술을 형성하는 하나의 중요한 핵심 기술이다. 어떤 고정화 기술을 적용하는가에 따라서 동일 면적의 spot에서의 capture probe의 용량과 hybridization 효율이 결정되기 때문이다.

DNA chip의 기판으로는 유리 외에도 실리콘이나 membrane 등도 사용된다. 이상적인 고체기판은, 일차적으로 capture probe DNA가 효과적으로 고정화될 수 있어야 하며 target DNA의 hybridization 효율이 좋아야 한다. DNA chip의 기판으로 유리가 가장 널리 사용되고 있는 이유는 다음과 같은 장점들을 가지고 있기 때문이다[18].

- (1) DNA가 유리표면에서 공유결합 반응을 할 수 있도록, 유리 표면을 화학적으로 변형시키는 silane chemistry가 잘 정립되어 있다.
- (2) 우리는 견고하기 때문에 고온이나 높은 강도의 이온 용액에 의한 세척에도 견딜 수 있다.
- (3) Background fluorescence가 낮다. 현재 가장 많이 쓰이는 형광에

의한 측정 방법을 사용할 경우, 이러한 특성은 기관으로서 갖추어야 할 필수 요소이다.

(4) Porous membrane과 비교할 때, 유리 속으로는 용액이 스며들 수 없기 때문에 target probe가 internal diffusion 없이 capture probe에 바로 접근할 수 있어 hybridization 속도가 빠르다.

(5) 가격이 싸다.

DNA를 유리 위에 고정화 시키는 기술은 크게 공유결합에 의한 방법과 비공유결합에 의한 방법으로 나눌 수 있다. 비공유결합에 의한 방법으로는 hydrophobic interaction[19] 이나 poly-L-lysine coating[12]에 의한 방법 등이 있다. 그러나 비공유결합으로 고정화된 DNA는 고온이나 고농도의 salt 조건 하에서는 기관 표면으로부터 떨어져 나올 가능성이 있기 때문에 공유결합에 의한 고정화가 선호되는 추세이다. 일반적으로 널리 사용되는 방법중의 하나가, UV를 조사함으로써 유리 표면 위의 양전하를 갖는 아민기와 DNA 내부에 존재하는 Thymidine residue간의 공유결합을 형성하여 DNA를 유리 표면에 가교 결합시키는 방법이다[20]. 그러나 이런 방법을 사용할 경우 DNA 내의 공유결합의 위치와 수를 조절하거나 알 수 없기 때문에 최종 target probe와의 hybridization 효율이 실험조건에 따라서 변할 가능성이 크다는 문제점이 있다. 이러한 문제점은 DNA 말단의 반응기와 유리표면을 공유결합으로 고정화 시키는 방법으로 해결할 수 있다. 이 경우에는 유리 표면과 DNA 말단이 아래와 같이 서로 반응할 수 있는 반응기를 보유하고 있어야 한다.

#### 1) For aminated DNA

- A. aldehyde(CHO)-activated glass
- B. Isothiocyanate(NCS)-activated glass
- C. Epoxide modified glass
- D. Carboxylated or phosphorylated glass

#### 2) For carboxylated or phosphorylated DNA

##### A. Aminated glass

DNA 말단에(보통 5' 위치) amine기를 붙이는 합성 공정은 잘 정립되어 있어 aminated DNA는 국내 대부분의 DNA 제조 회사에서도 손쉽게 주문제작할 수 있다. 따라서 aminated DNA를 이용한 고정화 방법 중에서 대표적인 방법인 CHO glass[21]와 NCS glass[22]에 공유결합시키는 고정화 방법에 대해서 좀더 자세히 설명하고자 한다.

### 5-1. Immobilization of aminated DNA on CHO glass

CHO glass는 amine glass와 함께 가장 널리 상업화된 glass이므로 aminated DNA를 CHO glass위에 바로 spotting하여 반응을 시킨다. DNA 말단의 aliphatic amine이 nucleophile로 작용하여, 유리 표면 CHO기의 반응성 있는 탄소를 공격하여 공유결합이 형성된 후 탈수 반응을 거쳐 schiff base를 형성한다. 이렇게 DNA가 결합된 CHO glass에  $\text{NaBH}_4$ 를 가하여 환원반응을 시킨다(Fig. 5). 이때  $\text{NaBH}_4$ 는 유리 표면 위의 미반응된 CHO기를 반응성이 없는 일차 알콜로 환원하여 background fluorescence를 감소시키는 역할을 한다. 또한, schiff base를 보다 안정된 결합으로 환원시키는 작용도 한다. 이때 DNA 내에 존재하는 A, C, G 염기의 aromatic amine이 유리 위의 CHO와 반응하는 부반응(side reaction) 일어날 수 있다. 이러한 부반응은, 길이가 짧은 oligonucleotide의 경우 -0.01% 정도이고 double stranded PCR product의 경우는 -10% 정도로 발생한다.

### 5-2. Immobilization of aminated DNA on NCS glass

Isothiocyanate activated glass(NCS glass)는 상업적으로 널리 유통되지 않기 때문에 먼저 유리 기관 위에 NCS기를 붙여 주어야 한다(Fig. 6). NCS glass가 제작되면, 이 유리 위에 aminated DNA 용액을 spotting하여 고정화 반응을 진행시킨다. NCS glass 표면의 NCS 반응기와 DNA 말단의 아민기와와의 반응에서 형성된 isothiourethane bond( $\text{-NH-C(S)-NH-}$ )는 매우 안정한 결합이기 때문에 별도의 후 처리가 필요 없다. 또한 유리 표면에 미반응된 NCS기에 대한 별도의 blocking 공정이 없이도 background fluorescence가 매우 적다. 하지만 위에서 언급한 바와 같이 NCS glass의 경우 널리 상업화 되어 있지 않아 유리에 미리 NCS를 결합시키는 공정이 필요하다.

위에서 설명한 CHO와 NCS glass 고정화 방법으로, Type II 당뇨병 중에서 25세 이하의 젊은 나이에서 당뇨병을 유발하는데 연관성이 있는 MODY(maturity onset diabetes of the young)[23] 유전자 중에서 유전 변이 site 6부분을 포함하는 당뇨병 진단 DNA chip을 제작하였다. 각각 제작된 DNA chip 위에, 정상으로 판단되는 사람의 혈액으로부터 분리, 증폭시킨 DNA를 반응시키고 이를 형광 scanning 방법으로 분석한 결과가 Fig. 7이다. 6가지의 서로 다른 MODY 유전자 각각에 대해서, mutation site에 해당하는 부분이 4가지 염기(A, G, C, T)로 되어 있는 4종류의

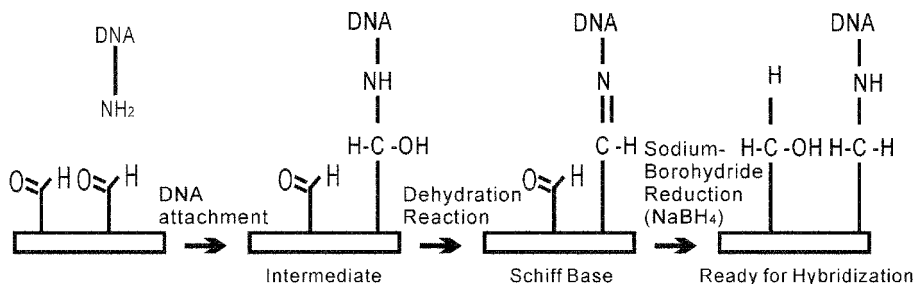


Fig. 5. DNA immobilization on aldehyde-activated glass.

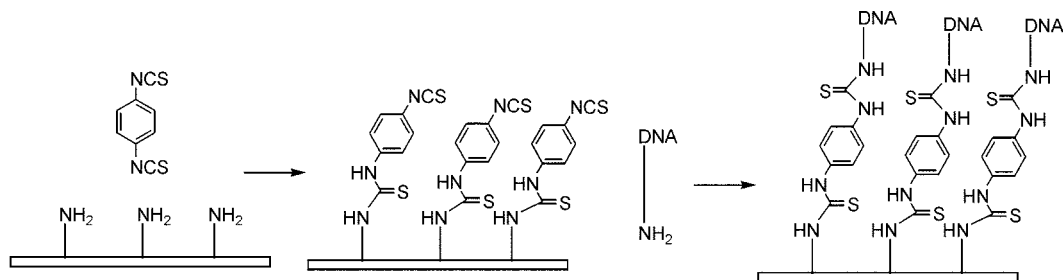
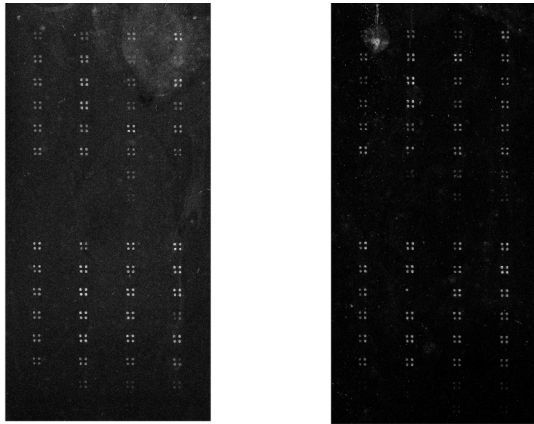


Fig. 6. DNA immobilization on isothiocyanate-activated glass.



(a) MODY chip on CHO glass (b) MODY chip on NCS glass

Fig. 7. Fluorescence image of DNA chips for the diagnosis of diabetes

DNA를 한 행에 고정화 시켰으며 같은 유전자를 정사각형 모양으로 4번 반복해서 spotting을 하였다. MODY 유전자가 있는 6개의 행 아래인 7번째와 8번째 행에는 MODY 유전자와 관련이 없는 control 유전자를 같은 방식으로 고정화시켰다. DNA chip 상단부는 유전자의 길이가 15 mer인 것을, 하단부에는 길이가 25 mer인 것을 고정화시켰다. 따라서 Fig. 7에서 동일한 행의 4개의 DNA spot group는, 총 15 mer 혹은 25 mer의 DNA 중에서 정 가운데 한 개의 염기만이 서로 틀린 유전자인 것이다. MODY 유전자에 변이가 없이 정상일 경우 6개의 행에 대해서 순서대로 각각 4번째-3번째-2번째-3번째-2번째의 DNA spot의 형광세기가 같은 행의 다른 3개의 유전자 형광세기보다 더 강해야 한다. 형광세기가 강할 수록 밝은 색 쪽인 빨간색과 하얀색을 띠게 된다. 형광 이미지를 정량한 결과(data not shown) 6개의 유전자 중에서 5개 혹은 6개 모든 유전자에 대해서는 정상으로 판정하는 결과가 나왔다. 그리고 그림에서와 같이 MODY 유전자와 관련이 없는 control 유전자가 고정화된 7과 8번째 행에서 hybridization이 거의 일어나지 않았다. Capture probe의 길이는 probe design을 할 때 고려되어야 할 중요한 요소중의 하나이다. Fig. 7에서 25 mer DNA를 사용할 경우 형광세기는 다소 증가하나 perfect match와 mismatch간의 변별력은 줄어든다. 이는 15개의 base중에 하나의 base가 맞지 않는 것이 25개 중에서 한 개가 틀린 것을 감지하는 것보다는 구분이 잘되는 논리와 같은 실험 결과이다.

전체적으로 CHO glass와 NCS glass 고정화 방법을 비교할 때, background fluorescence는 NCS가 우수하다. 그리고 probe capacity와 hybridization efficiency를 반영하는 형광세기는 거의 비슷한 수준으로 판단된다. 하지만 이 결과는 특정 probe DNA set에 대해서 얻어진 결과이므로 자신의 system에 적합한 고정화 방법을 판단하기 위한 실험이 선행된 후에 고정화 방법을 선정해야 할 것이다.

## 6. DNA chip 기술 개발 동향과 화학공학자의 역할

향후 DNA chip 기술 개발 동향은, 크게 다음의 세가지 핵심 요소를 향상시키는 방향으로 전개될 것이다.

1. 정확성 (accuracy): DNA chip 제품의 유용성을 결정하는 핵심 요소로서, 유전자 발현의 유무에 대한 정량적 분석과 단일 염기서열 차이도 정확히 구분해 낼 수 있는 변별력 있는 기술의 개발이 선행되어야 한다. 이는 nucleic acid analogue를 이용하는 방법이나 DNA 혼성화 반응을 정확히 감지하는 새로운 감지 기술의 개발 등을 통해서 이루어질 것이다. 2. 감도 (sensitivity): 적은 양의 DNA 반응을 통해서도 결과를 충분히 감지할 수 있게 만드는 기술로서 감도의 향상을 통해서 DNA chip의 경제성을 크게 향상시킬 수 있다. 이는 주로 새로운 고정화 방법

과 샘플 준비 방법의 개발 등을 통해서 이루어질 수 있다. 3. 재연성 (reproducibility): 재연성은 정확성에도 영향을 크게 미치는 요소이다. 현재 시판되고 있는 DNA chip용 pin과 slide glass 등은 제품의 균일성에 문제가 있다. DNA chip의 재연성을 향상시키기 위해서는 핵심 원료 물질인 pin과 slide glass의 성능이 크게 향상되어야 한다. Plasma 중합법을 이용한 균일한 표면의 slide glass 개발 등이 한 예라 하겠다. 또한 샘플을 균일하게 준비하는 기술개발과 공정관리 방법이 확립되어야 한다.

위의 기술들 중에서도 특히 바이오품질을 고정화시키는 고정화 기술은, 전통적으로 화학공학자들이 가장 크게 기여한 기술 분야 중의 하나이다. 바이오품질의 고정화에는 여러 가지 기술이 복합적으로 고려되어야 하기 때문이다. 즉, 화학, 생물학, 유체의 흐름을 연구하는 유체역학, 그리고 diffusion 등의 물질 이동현상 등이 관여되는 분야이기 때문이다.

화학공학자가 가장 크게 기여할 수 있는 기술분야 중의 하나인 DNA chip의 DNA 고정화 기술에 있어서는 다음과 같은 사항들이 고려되어야 한다.

(1) Probe capacity가 커야 한다. 다시 말해서 동일 크기의 spot에 많은 양의 capture probe가 고정화되어 있어야 sensitivity가 높은 DNA chip을 제작할 수 있다.

(2) 일정하게 제어될 수 있는 coupling 방법을 사용해야 한다. DNA chip은 대량 생산에 의해서 생산되어 최종적으로 일반인의 진단에 까지 사용될 제품이다. 만일 고정화 coupling 방법이 균일하게 제어되지 못한다면, 최종 DNA chip의 해석이, 사용자의 유전정보에 의해서가 아닌 고정화에 따른 variation의 영향을 받게 되어 제품의 성능을 저하시킬 것이다.

(3) 고정화 반응이 용이하고 비용이 적게 들어야 한다.

(4) 고정화된 capture probe의, target probe에 대한 hybridization 활성이 높아야 한다. 고체 기판과 capture probe 사이에 최적화된 linker를 개발하는 것이 하나의 접근 방법이 될 수 있다.

(5) 고정화 표면으로 사용되는 기판의 background fluorescence가 작아야 한다.

위에서 첫번째 항목인 probe capacity를 증가시킬 수 있는 방법 중의 하나는 반응 표면적을 증가시키는 것이다. 평면상의 동일한 면적에 보다 많은 DNA를 고정화 시키기 위해서 개발된 것이 바로 gel 타입의 3차원 고정화 기술이다. 이 기술은, 고체 기판 위에 수십 micrometer size의 미세한 gel pad 패턴을 제작한 후에 각각의 gel pad에 서로 다른 capture probe를 고정화시켜 DNA chip을 제작하는 방식이다. 기존의 이차원적인 고정화 방식을 흔히 2D 방식이라 하고 gel type의 삼차원적인 고정화 방법을 3D 방식이라 말한다. 3D 방식으로 고정화된 probe DNA의 capacity는, 기존의 2D 방식에 비해 100배 이상 증가할 수 있다고 알려져 있다[24]. 3D gel 고정화 기술로 DNA chip을 개발하고 있는 대표적인 기업인 Motorola는 polyacrylamide gel[25]을 이용한 기술로 DNA chip을 개발하고 있다. Polyacrylamide gel외에 polyurethane gel 등에 의한 기술 개발도 활발히 진행되고 있다. 3D 고정화 기술은 화학공학자들의 역할이 더욱 요구되는 기술분야이다. 3D gel 물질 자체가 고분자 물질이며 삼차원적 구조로 인해서 이동현상 등 화학학적 지식이 더욱 요구되기 때문이다.

## 7. 결 론

바이오 기술은 장기적으로 디지털에 버금가는 파급효과가 예상되는 기술로, 디지털, 나노 기술과 함께 21세기를 이끌어갈 3대 기술로 손꼽힌다. 21세기 주도산업으로 부각되고 있는 바이오 산업에서 가장 각광을 받고 광범위하게 사용될 상품으로는 단연 'DNA chip'이다. DNA chip 기술은 다수의 DNA를 일괄적으로 해석하고 분석할 수 있는 가장 효과적인 수단으로 여겨지고 있어, Human Genome Project가 완료된 현 상황에서 향후 유전자의 기능이 밝혀진 후에는 그 수요가 폭발적으로 늘어날 것으로 예상되기 때문이다.

DNA chip은, 화학, 생물학, 전자공학, 컴퓨터 프로그래밍 그리고 미세

유체역학 등의 여러 가지 고도의 기술을 종합적으로 구사함으로써 비로서 가능한 기술 분야이다. 이렇게 여러 가지 학문을 종합적으로 활용하는 DNA chip 분야에 있어서 화학공학자는 여러 가지 측면에서 크게 기여할 수 있는 강점을 가지고 있다. 특히 DNA 고정화 기술은 화학공학자들의 재능을 가장 폭 넓게 발휘할 수 있는 기술이다. 21세기 가장 각광 받는 제품으로 누구도 의심할 여지가 없는 DNA chip 기술 분야에 화학공학자들이 많은 관심을 가지고 기술적인 기여를 할 수 있기를 바란다.

## Glossary

- Genome: 유전정보의 총체
- Human genome project: 인간 유전정보의 총체인 30억개의 염기쌍을 읽어 내는 프로젝트
- DNA(deoxyribonucleic acid): 당, 염기, 인산기로 이루어진 nucleotide가 일정한 방향으로 연결되어 유전정보를 담고 있는 물질. 염기의 종류에 따라서 4가지의(A, T, G, C) 서로 다른 단위로 형성된다.
- Capture probe(탐침): 염기서열을 이미 알고 있는 DNA, 또는 DNA 조각으로 DNA chip 상에 고정화 시키는 물질(흔히 probe라고 생략해서 말한다).
- Target probe: DNA chip 위에 고정화된 capture probe DNA와 hybridization 시키는 DNA로, 유전정보를 알고자 하는 DNA 물질(흔히 target이라고 하기도 한다).
- Hybridization: DNA나 RNA가 서로 염기 서열이 상보적인 것끼리(즉, A와 T, 그리고 G와 C) 결합하는 것
- Southern hybridization: DNA 조각을 전기영동하여 분리한 후 nitrocellulose filter에 옮겨서 특정 DNA 조각을 확인하는 것이다.
- Northern hybridization: RNA 조각을 전기영동하여 분리한 후 nitrocellulose filter에 옮겨서 특정 RNA 조각을 확인하는 것이다.
- Contents: DNA chip위에 고정화된 capture probe와 target probe와의 hybridization을 통해서 알고자 하는 유전자 정보
- SNP(Single nucleotide polymorphism): 어떤 집단 내에서 가장 적은 frequency를 보이는 single base allele의 빈도가 최소 1% 이상 관찰되는, nucleotide level에서의 polymorphism이다. 유전체의 경우 각 개 인마다 99.9% 정도는 동일하고 0.1%가 차이(사람과 사람이 서로 다른 이유)가 나는데, 이러한 차이가 바로 SNP를 가지게 한다. SNP는 single nucleotide polymorphism이라는 엄밀한 의미보다는 single nucleotide variation에 가까운 다소 포괄적인 의미로 사용되고 있다.
- Bioinformatics(생물정보학): 생물체가 가진 정보를 컴퓨터를 이용하여 다루는 학문
- Tm(melting point): 혼성화에 의해서 결합된 DNA-DNA 또는 DNA-RNA duplex는 온도를 증가시키기에 따라서 결합이 해체되어 single strand로 분리되기 시작한다. 이때 혼성화로 결합된 duplex의 50%가 single strand로 떨어지게 되는 온도이다. Tm이 높을 수록 duplex의 결합이 강하다는 것을 의미한다.
- Immobilization(고정화): 고체 표면 위에 생물학적 물질(DNA, 단백질, 세포) 등을 물리, 화학적인 결합을 통해서 고정시키는 것
- Photolithography: 고체상 반응의 일종으로, masking과 노광을 연속적으로 수행하여 고밀도로 서로 다른 화합물을 합성함과 동시에 고정화 시키는 방법
- Linker: 고체 표면과 고정화 되는 물질(DNA)을 연결해 주는 물질로서, 고정화 반응을 용이하게 하거나, 고정화되는 생물학적 물질의 활성을 향상시키기 위해서 도입된다.
- Hydrogel: 가교 결합된 고분자로서, 많은 양의 수분을 흡수하여 gel 형태를 이루는 물질
- cDNA chip: 최소 500 bp 이상의 유전자(full-length open reading frame or EST)가 고정화된 칩

- Oligonucleotide chip: 통상 15-25개의 염기 서열로 이루어진 oligonucleotide가 고정화된 칩
- Microarray: spot size<200  $\mu$ m(macroarray: spot size>300  $\mu$ m)

## 참고문헌

1. Shalon, D., Smith, S. J. and Brown, P. O.: *Genome Research*, **6**, 639 (1996).
2. Yu, C. J., Wan, Y., Yowanto, H., Li, J., Tao, C., James, M. D., Tan, C. L., Blackburn, G. F. and Meade, T. J.: *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 11155 (2001).
3. Taton, T. A., Mirkin, C. A. and Letsinger, R. L.: *Science*, **289**, 1757(2000).
4. Kohler, J. M., Csaki, A., Reichert, J. and M, R.: *Sensors and Actuators B*, **76**, 166(2001).
5. Derisi, J., Penland, L., Brown, P. O., Bittner, M. L., Meltzer, P. S., Ray, M., Chen, T., Su, Y. A. and Trent, J. M.: *Nature genetics*, **14**, 457(1996).
6. Lipshutz, R. J., Fodor, S. P. A., Gingeras, T. R. and Lockhart, D. J.: *Nature*, **21**, 20(1999).
7. Lim, T. K., Karube, I., Masuda, Y., Ikebukuro, K., Oyama, M. and Ikeda, T.: *Biotechnol. & Bioeng.*, **71**, 217(2001).
8. *Lab on a chip miniaturation for chemistry and biology*, **1**, 61(2001).
9. Egholm, M., Buchardt, O., Christensen, L., Behrens, C., Freier, S. M., Driver D. A., Berg, R. H., Kim S. K., Norden, B. and Nielsen P. E.: *Nature*, **365**, 566(1993).
10. Kumar, R., Singh, S. K., Koshkin, A. A., Rajwanshi, V. K., Meldgaard, M. and Wengel, J.: *Bioorganic and medicinal chemistry letters*, **8**, 2219 (1998).
11. Koshkin, A. A., Singh, S. K., Nielsen, P., Rajwanshi, V. K., Kumar, R., Meldgaard, M., Olsen, C. E. and Wengel, J.: *Tetrahedron*, **54**, 3607(1998).
12. Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. and Brown, P. O.: *Science*, **270**, 467(1995).
13. Shalon, D., Smith, S. J. and Brown P. O.: *Genome Research*, **6**, 639(1996).
14. Cheung, V. G., Morley, M., Aguilar, F., Massimi, A., Kucherlapati, R. and Childs, G.: *Nature genet.(Suppl.)*, **21**, 15(1999).
15. Okamoto, T., Suzuki, T. and Yamamoto, N.: *Nature biotechnology*, **18**, 438(2000).
16. Forster, A. H., Krihak, M., Swanson, P. D., Young, T. C. and Ackley, D. E.: *Biosensors & Bioelectronics*, **16**, 187(2001).
17. Cuzin, M.: *Transfus. Clin. Biol.*, **8**, 291(2001).
18. Zammateo, N., Jeanmart, L., Hamels, S., Courtois, S., Louette, P., Hevesi, L. and Remacle, J.: *Analytical Biochemistry*, **280**, 143(2000).
19. Allemand, J. F., Bensimon, D., Jullien, L., Bensimon, A. and Croquette, V.: *Biophys.*, **73**, 2064(1997).
20. Duggan, D. J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P. and Trent, J. M.: *Nature genet.(Suppl.)*, **21**, 10(1999).
21. Schena, M., Shalon, D., Heller, R., Chai, A., Brown, P. and Davis, R.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**, 10614(1996).
22. Guo, Z., Guifoye, R. A., Thiel, A. J., Wang, R. and Smith, L. M.: *Nucleic Acids Res.*, **22**, 5456(1994).
23. Froguel, P. and Velho, V.: *TEM.*, **10**, 142(1999).
24. Guschin, D., Yershov, G., Zaslavsky, A., Gemmell, A., Shick, V., Proudnikov, D., Arenknov, P. and Mirzabekov, A.: *Analytical Biochemistry*, **250**, 203(1997).
25. Proudnikov, D., Timofeev, E. and Mirzabekov, A.: *Analytical Biochemistry*, **259**, 34(1998).