

실리카로 코팅된 나노입자를 이용한 DNA 추출 방법

정승욱, 이진성
코아바이오시스템(주)
jslee@corebio.com

DNA isolation using silica-coated magnetic nano particles

Seung-Wook Chung, Jin-Sung Lee
Research Institute of Bioscience & Biotechnology,
CoreBioSystem Co., Ltd

요 약

본 논문은 실리카 코팅 자성 나노입자를 이용한 새로운 DNA의 정제에 관한 것으로 기존의 negative-charged polyanion 형태의 수지 및 실리카 멤브레인 기술을 이용한 제품의 단점인 저속, 고비용의 정제방법을 개선할 수 있는 새로운 정제법을 기술한 것이다.

1. 서론

핵산의 분리정제는 크기, 정전기적 결합, 친화성 등의 특성에 따라 다양한 소재가 개발되어 왔으며 그 기본 소재는 연질 담체를 응용한 것이다. 예를 들면 폴리머 및 실리카 젤 등의 물리적 강도와 단백질의 비특이적 특성이 큰 계열과 아가로스, 덱스트란, 셀룰로오스 등의 강도와 단백질의 비특이적 흡착성이 작은 계열 및 이들 다당류 계열과의 혼합 연질 계열의 담체들이 핵산 분리 소재로서 이용되고 있다.(1)

그러나 상기에 열거한 담체는 한 종류의 핵산을 대량으로 정제하는 데에는 유용하지만 많은 종류의 핵산을 분리 정제하는 데에는 효과적인 방법이 아니다. 왜냐하면 현재 다양한 유전자의 기능 연구를 위해서는 빠른 시간에 많은 종류의 정제된 핵산이 필요하기 때문이다. 이러한 분야에 적용 가능한 정제법은 재조합 DNA 기법을 이용한 affinity tag 방법 등이 있지만 그 중에서 차세대 핵산 분리정제 소재로서 각광 받고있는 것은 마그네틱 비드(magnetic bead)를 이용한 다양한 적용 기술이 활발히 진행되고 있다(2,5,6). 자성 나노입자의 적용은 기존의 방법인 멤브레인에 핵산을 고정하고 원심력이나 진공압

압을 통해 잔존물을 용출한 다음 적절한 완충용액으로 멤브레인에 결합되어 있는 목적의 핵산을 다시 원심력이나 진공압을 이용하여 분리 정제하는 방법을 보다 효율적이며 고속 분리 정제를 가능하게 한다(3). 즉, 자성 실리카 코팅 나노입자에 아민(amine) 치환기등의 기능기를 붙여 핵산과의 정전기적 인력을 이용하여 핵산이 자성 나노 입자에 흡착하게 되는 원리를 이용하는 것이다. 따라서 자성 나노입자는 high throughput system(HTS) 기반의 핵산 자동 추출 과정에 시간적, 비용적 장점을 줄 것이다. 본 연구에서는 자성 나노입자 제조 및 이들의 핵산 추출 등에 관한 일부의 결과를 보고 하고자 한다.

1.1 재료 및 실험방법

본 실험에 사용된 자성 나노입자는 마그네타이트(Magnetite) 나노 입자로서 습식법을 이용하여 제조하였다. 즉, FeCl₂와 FeCl₃를 3차 증류수에 녹인다음 빠르게 혼합, 교반하면서 NH₄OH용액을 적당량 떨어뜨리면서 용액의 색깔이 검정색으로 변하는 시점에서 반응을 끝내고 원심분리하여 물과 에탄올로 세척한 다음 진공 건조시켜 마그네타이트를 제조하였

다. 제조한 마그네타이트 나노 입자를 3차 증류수에 넣고 초음파 분산 시키고 PVP(polyvinylpyrrolidone)를 첨가하여 실온에서 24시간 교반시킨 다음 아세톤을 첨가하여 원심분리한 후 에탄올을 세척하였다. 이후 적당 농도의 TEOS(tetraethyl orthosilicate)를 첨가하여 교반하면서 NH₄OH용액으로 pH를 11로 맞추어 에탄올로 세척 후 진공 건조하여 최종적으로 자성 입자를 제조하였다. 이렇게 제조한 입자에 Monoamine, Diamine, Triamine 작용기를 갖는 기능성 나노입자의 부착은 APTES(3-Aminopropyltriethoxysilane)를 사용하여 톨루엔에 분산시켜 교반하여 제조하였다(4).

1.2.1 용액의 제조

먼저 자성 나노 입자 분산 용액은 나노 입자 20 mg을 3차 증류수 1ml에 분산 시켜 제조하였고 세포 파쇄용액은 다음과 같이 제조하였다. 3M GuHCl, 20% Tween 20 수용액을 만들어 멤브레인 필터 0.22 μm 에 통과시켜 제조하였다. DNA 결합 용액은 10% PEG(polyethylene glycol), 1.5 M NaCl 의 농도로 멤브레인 필터 0.22 μm 에 통과시켜 제조하였으며 세척용액은 10% PEG, 2.5 M NaCl의 농도로 멤브레인 필터 0.22 μm 에 통과시켜 제조하였다. 마지막으로 DNA 용출 용액은 증류수 또는 TE 버퍼(10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 사용하였다.

1.2.2 기능성 나노 입자를 사용한 사람 혈액에서의 DNA 추출

상기의 과정으로 제조한 자성 나노 입자를 사용하여 사람의 전혈에서 genomic DNA를 추출 하였다. 먼저 준비된 사람 혈액을 1.5ml 튜브에 100 μl 넣고 300 μl의 세포 파쇄용액과 Proteinase K 10 μl를 넣은 후 잘 섞어준 다음 56°C에서 10분간 반응시킨다. 이후 340 μl의 DNA 결합 용액과 자성 나노 입자 분산 용액을 넣고 상온에서 5분간 교반하면서 항온한다. 이 튜브를 마그네틱 스텐드에 고정 후, 1분간 정치시킨 다음 상등액을 제거한다. 600 μl 의 세척 버퍼로 자성입자를 현탁시킨 다음 이를 다시 마그네틱 스텐드에 고정하여 세척액을 버리고 잘 건조시키고 50 μl 의 3차 증류수를 적당량 넣어 56°C에서 5분간 항온한 후 스텐드에 고정하여 상등액을 분리하여 최종적으로 전혈 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 EtBr이 첨가된 1.0% agarose gel에서 전

기영동하여 DNA band를 확인하였다. 또한 추출된 DNA를 안정성을 검토하기 위하여 6가지의 제한효소를 사용하여 37°C에서 2시간 반응시켜 간접적인 순도를 분석하였다.

2. 결과 및 토의

다음은 사람 전혈에서부터 genomic DNA를 추출한 전기영동 사진 결과이다.

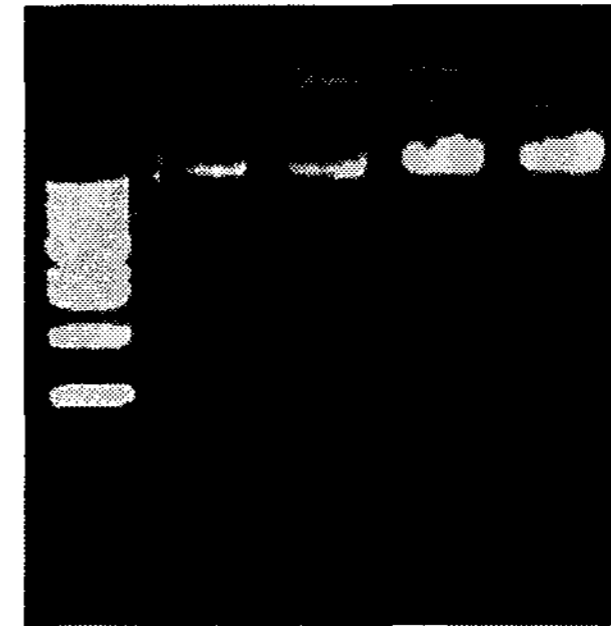


그림. 1 기존 상용 제품과의 비교
lane M DNA size marker(1kb ladder)
lane 1. 독일 Qiagen사 멤브레인 필터 소재
lane 2. 코아바이오시스템사 멤브레인 필터 소재
lane 3. 독일 코텍스사 자성 나노입자 소재
lane 4. 본 기술의 자성 나노입자 소재

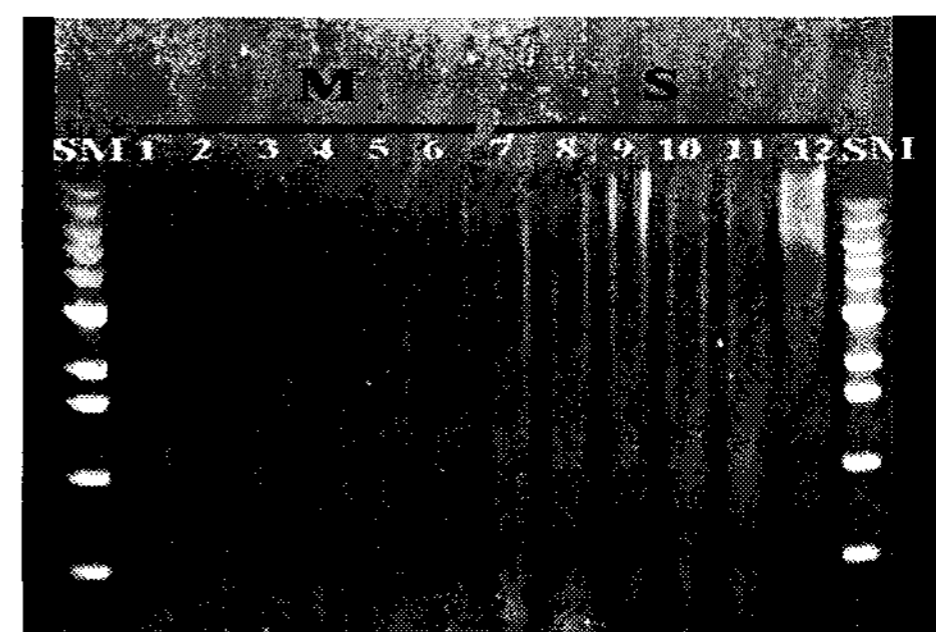


그림. 2 제한효소 처리에 의한 DNA 순도 분석
lane SM 1kb DNA size marker
lane 1,7 : HamHI, lane 2,8 : EcoRI
lane 3,9 : ClaI, lane 4,10 : NcoI
lane 5,11: PstI, lane 6,12 : XbaI

사람 전혈로 부터 genomic DNA를 추출하는 방법을 마그네틱 비드로 대체할 경우 기존의 멤브레인형 방식보다 더 빠른 추출을 할 수 있다. 본 연구에서는 자성 나노 입자를 사용하여 DNA의 추출양과 순도를 기존 제품과 비교한 것이다. 본 연구의 DNA 추출 방식은 기존의 방식보다 DNA 추출 효율과 시간에서 더 좋은 효율과 짧은 시간이 소요되는 장점이 있다. 향후, DNA 추출 방식은 멤브레인 방식에서 고효율의 마그네틱 비드 방식으로 대체될 전망이다.

참고문헌

- [1] Ginestra E., Trapani C., Martino D., Saravo L.
(2004) *Forensic Sci Int.* 146. S145-6
- [2] Min C., Verdine GL. (1996) *Nucleic Acids Res.*
1;24(19): 3806-10
- [3] Mygind T., Ostergaard L., Birklund S.,
Lindholt JS. Christiansen G. (2003) *BMC
Microbiol.* 2;3:19
- [4] Zhang Z., Zhang L, Chen L., Wan QH. (2006)
Biotechnol Prog. Mar-Apr ;22(2):514-8
- [5] Bruce IJ., Sen T. (2005) *Langmuir.* Jul
19;21(15): 7029-35
- [6] Tan W., Wang K., He X., Zhao ZJ., Drake T.,
Bagwe RP. (2004) *Med Res Rev.*
Sep;24(5):621-38