

## High Throughput Magnetic Separation for Human DNA by Aminosilanized Iron Oxide Nanoparticles

Ki Ho Kang and Jeong Ho Chang<sup>†</sup>

Eco·Biomaterials Laboratory, Korea Institute of Ceramic Engineering and Technology, Seoul 153-801, Korea  
(Received September 25, 2008; Revised October 14, 2008; Accepted October 16, 2008)

### 아미노실란화 철산화물 나노입자를 이용한 Human DNA의 초고속 자성분리

강기호 · 장정호<sup>†</sup>

요업기술원 나노소재응용본부 청정·바이오소재팀  
(2008년 9월 25일 접수 ; 2008년 10월 14일 수정 ; 2008년 10월 16일 승인)

#### ABSTRACT

This work describes the preparation of functionalized magnetic nanoparticles (MNPs) and their bioapplication to human DNA separation. Silica coated MNPs were prepared by changing the volume ratio of tetraethyl orthosilicate (TEOS) for controlled coating thickness on the original nanoparticle of MNPs. The sol-gel process in silica coating on MNPs surface was adapted for relatively mild reaction condition, low-cost, and surfactant-free. And then amino functionalized magnetic nanoparticles were synthesized using amine groups as surface modifiers. The result of adsorption efficiency for human DNA with amino-functionalized silica coated MNPs was calculated as a function of the number of amine groups.

**Key words :** DNA, Magnetic separation, Nanoparticle, TEOS, Sol-gel

#### 1. 서 론

초고속 핵산 검사의 필요성은 많은 분야에서 점점 증가하고 있다. 핵산 검사는 궁극적으로 병의 조기 발견을 통해 전체 의료비용을 낮추는 목적으로 사용되고 있으며, 향후 병원균 검사, 제노타이핑, 암 진단 등을 위한 여러 종류의 핵산에 대한 동시 분석·수요·증가와 현장 검사용으로 사용할 수 있는 제품에 대한 수요가 급증할 것으로 기대된다. 이를 해결하기 위해서는 제노타이핑 및 암 진단에 대한 특이성과 민감도가 높은 DNA 표지의 개발이 많이 이루어져야 할 것이다. 핵산 검사가 널리 이용되기 위해서 해결해야 할 문제들이 많이 남아있지만, 시기만 문제일 뿐 핵산 검사가 진단 시장을 지배하는 시대가 곧 올 것으로 기대되며, 그 시기를 앞당기기 위해 저비용의 핵산 검사를 위한 장치와 효율적인 DNA 표지를 개발하는 것이 연구의 중심으로 자리매김하고 있다. 핵산검사는 민감도, 특이성, 정밀성, 정확성 등의 분석적 타당성 (analytical validity)과 임상적 민감도와 특이성, 음성예측률 (negative predictive value) 등의 임상적 타당성 (clinical va-

lidity) 및 유용성 (clinical utility)을 만족하여야 한다. 핵산 검사의 대상을 크게 두 가지로 나누면 인체에 감염된 미생물에서 유래된 핵산과 인체에서 직접 유래된 핵산이다. 전자는 감염 여부를 진단하는 검사로 핵산검사 시장의 80% 이상을 차지하고 있다. 후자는 질환 유발과 치료에 관련된 핵산을 분석하는 유전자검사 (genetic test)이며 시장점유율은 20% 미만이지만 잠재적 가치와 시장성은 매우 높을 것으로 전망하고 있다.

자성 나노입자를 이용한 새로운 핵산 및 단백질 정제 기술은 기존의 음전하 형태의 수지 (negative charged poly-anion) 및 실리카 막 (silica membrane) 기술을 이용한 방법의 단점인 저속, 고비용 정제방법을 획기적으로 개선할 수 있는 차세대 정제기술로서, 대상 타겟 분자의 특성에 따라 자성 나노입자를 합성하면 단백질, mRNA 등 생체 고분자 물질을 고순도로 정제할 수 있어 기존의 고성능 액체 크로마토그래피, 전기영동법 등의 생화학적 방법에서 분리속도를 획기적으로 개선할 수 있는 장점이 있다.

이러한 특성을 이용하여 본 연구에서는 일정한 크기를 갖는 철 산화물 자성 나노입자를 제조하고, 실리카로 코팅한 후, 표면에 아미노 기능성을 부여하여 대상 DNA 분자와 선택적으로 결합하여 분리 시키는 자성 분리시스템에 관한 연구를 보고하고자 한다.

<sup>†</sup>Corresponding author : Jeong Ho Chang  
E-mail : jhchang@kicet.re.kr  
Tel : +82-2-3282-2459 Fax : +82-2-3282-7811

2. 실험 방법

2.1. 자성나노입자 제조

철 산화물 자성 나노입자는 여러 가지 방법으로 합성이 가능하나 본 실험에서는 습식법을 이용하여 입자를 합성하였다.<sup>1-3)</sup> 이염화철 (FeCl<sub>2</sub>)과 삼염화철 (FeCl<sub>3</sub>)을 물에 녹여 2M의 FeCl<sub>2</sub>와 1M의 FeCl<sub>3</sub> 용액을 제조하였다. FeCl<sub>2</sub> 수용액 80 mL와 FeCl<sub>3</sub> 수용액 320 mL를 함께 섞었다.<sup>4)</sup> 혼합된 용액을 빠르게 교반하면서 0.7M 수산화암모늄 (NH<sub>4</sub>OH) 용액 4L를 한방울씩 떨어뜨렸다. 이때 반응이 일어나면서, 색깔은 점점 검정색으로 변하며, 반응 후에 생긴 생성물은 원심분리 하였다. 원심분리 후, 물과 에탄올로 세척한 다음 진공 건조시켜 마그네타이트 화합물을 얻었다.

2.2. 자성나노입자의 실리카 코팅

제조한 마그네타이트 나노입자를 증류수(1 g/50 mL solution in water)에 넣고 초음파분산기로 30분 이상 분산시켰다. 폴리비닐피롤리딘(polyvinyl-pyrrolidone)을 첨가 (0.936 mL, Mw 55,000, 25.6 g/L in water)하여 실온에서 24시간 동안 교반 시킨 다음 아세톤을 첨가(H<sub>2</sub>O/acetone=1/10, v/v)하고 원심 분리하여 상층액은 버리고 에탄올로 2~3회 세척하였다.<sup>3-4)</sup> 마그네타이트에 10~50 mM의 테트라에틸올쏘실리케이트(TEOS, tetraethyl orthosilicate)를 첨가하여 교반하면서, 0.7 M 수산화암모늄 용액을 천천히 가하여 pH를 11로 유지한 후, 24시간 동안 100°C에서 환류 시킨 후, 에탄올로 2~3회 세척 후 진공 건조하였다.

2.3. 아미노실란화 자성 나노입자 합성

실리카 코팅 자성나노입자 0.1 g을 톨루엔 100 mL에 각

각 분산시킨 후, 분산된 용액에 3-모노아미노프로필실란 (Aminopropyltriethoxysilane, monoamine), 디아미노프로필실란 (N-[3-(Tri-methoxysilyl)propyl]ethylene diamine, diamine), 트리아미노프로필실란(N-[3-(Trimethoxysilyl) propyl] diethylene triamine, triamine)을 각각 0.1 g씩 넣고 교반하였다. 130°C로 승온하여 빠른 교반과 함께 혼합물을 7시간 동안 환류시켜 반응시킨 후, 원심분리하고 진공 건조하였다.<sup>5,6)</sup>

2.4. 아미노실란화 자성 나노입자와 DNA의 분리 실험

아미노실란화 자성나노입자 10 mg을 정확하게 취하여 각각 1.5 mL 마이크로튜브에 넣고 멸균 증류수 1 mL를 첨가하여 자성 나노입자 용액을 준비하였다. 미리 준비된 DNA 용액을 96 웰플레이트에 일정량을 각각 넣은 다음 자성 나노입자 용액을 피펫을 이용하여 정확히 취한 다음 각 웰플레이트에 접종하였다. 자성 나노입자와 DNA와의 접착성을 높이기 위하여 1분간 고르게 교반 하였으며, 충분한 반응을 위하여 교반 후 5분간 정치하였다. 이때 DNA 및 자성 나노입자의 농도에 따른 결합력을 비교하기 위하여 DNA 농도는 각각 15 ng/μL가 되게 하였으며 자성나노 입자의 농도는 1~30 μL를 각각 첨가하였다. 이렇게 취합한 용액은 DNA 확인을 위하여 1% 아가로스 겔에서 전기영동 하였으며, 이를 통하여 자성나노입자와 DNA와의 결합력을 간접적으로 평가하였다. 탈착 실험은 염화나트륨 용액을 사용하였으며, 탈착 효율도 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 자성나노입자와 실리카 코팅 자성나노입자의 분석

Fig. 1은 기능성 자성 나노입자를 제조하는 과정을 메

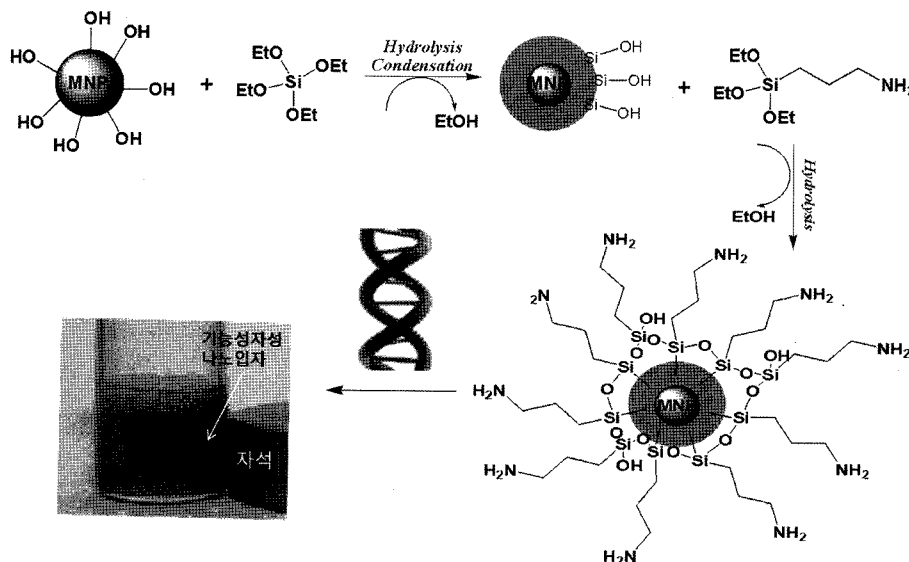


Fig. 1. Schematic diagram of DNA separation with with amino functionalized magnetic nanoparticles.

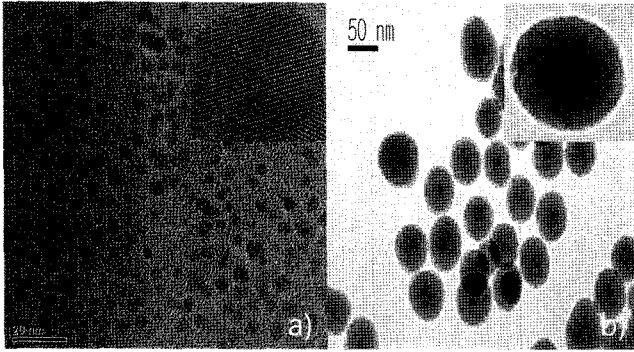


Fig. 2. TEM images of (a) magnetite and (b) silica coated magnetite.

카니즘으로 나타내었다. 제조한 자성 나노입자에 실리카 전구체를 사용하여 금속 알콕사이드의 가수분해(hydrolysis)와 축합(condensation) 반응을 통해서 금속산화물을 제조하는 솔-겔법을 사용하였다. 실란화 반응 커플링 시료로서 실란 고분자가 응축되어 실리카 코팅 자성나노입자 표면의 Si-OH와 반응하는 것으로, 탈수반응을 통해서 실리카 코팅 자성 나노입자 표면의 OH기와 공유 결합을 형성한다.<sup>7-10)</sup> 이런 과정을 통하여 제조된 실리카 코팅 자성 나노입자 표면에 아민기를 합성하여 대상 DNA와 결합할 수 있는 기능성 자성 나노입자를 제조하였다.

Fig. 2는 제조된 자성 나노입자와 실리카 코팅 자성 나노입자의 미세구조를 관찰하기 위해 투과전자 현미경으로 찍은 이미지이다. 자성 나노입자에서 선명한 큐빅구조를 가지는 마그네타이트 결정을 확인하였고, 평균 입자크기는 6~7 nm 정도의 완전한 구형은 아니지만, 거의 구형에 가까운 형태를 띠고 있었다. 실리카 코팅 자성 나노입자는 가운데 점 같은 마그네타이트를 중심으로 구형의 실리카가 코팅되었고, 실리카 코팅 막의 두께에 의해 입자의 크기가 증가하였다.

Fig. 3은 제조한 자성 나노입자의 구조를 X선 회절법을 이용하여 분석한 것으로서,  $Fe_3O_4(Fe^{II}Fe^{III}O_4)$ 의 역스피넬(inverse spinel) 구조를 가지고 있는 것을 확인하였다.  $2\theta=35.57^\circ$ 에서 peak의 intensity가 가장 센 (311)면이 발달해 있었고,  $2\theta=62.80^\circ$ 에서 (440)면이,  $2\theta=30.35^\circ$ 에서 (220)이 차례대로 피크의 크기가 나타났고, JCPDS 카드에 수록된 데이터 비교로 마그네타이트의 결정이 확인되었다. 실리카 코팅 자성 나노입자의 XRD pattern은  $2\theta=20\sim30^\circ$ 에서 broad한 무정형의 피크가 나타난 것으로 볼 때, 자성 나노입자에 실리카가 코팅이 되었다는 것을 확인할 수 있었다. 자성 나노입자의 실리카 코팅에서 중요한 점은 코팅에 의한 자성 나노입자의 구조적 변화이다. 즉 온도가 올라갈수록 산화가 되어서 마그네타이트가 마헤마이트(maghemite), 헤마타이트(hematite)로 구조적 전이가 일어나서 물리화학적 성질과 자성 나노입자의 고유한 XRD 패턴이 변한다는 것이다. XRD 패턴의 변화가

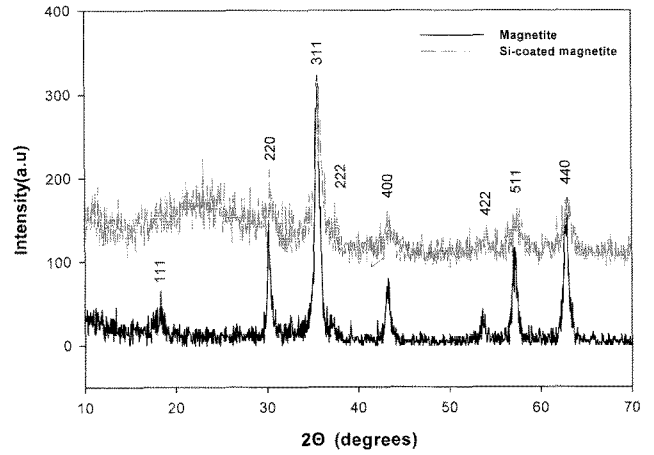


Fig. 3. X-ray diffraction patterns of magnetite and silica coated magnetite.

일어나는 것은 자성나노입자가 가진 고유의 결정상의 변화를 의미하며 이는 자성의 세기에도 큰 영향을 미치게 된다. 이것은 DNA, RNA, 단백질 등의 분리 정제 시 흡/탈착 효과에 매우 큰 영향을 미치게 된다. 실리카 코팅 자성 나노입자의 XRD 패턴은 코팅 전 자성나노입자 고유의 XRD 패턴을 그대로 유지 하고 있어 구조적 변화가 없었다.

Fig. 4는 300 K에서 자성나노입자와 실리카 코팅 자성 나노입자의 진동시료 자력계(VSM) 분석을 나타낸 것이다. 마그네타이트는 초상자성으로서, 외부 자성의 힘에 의해 반응을 하는데, 이는 자화를 측정을 통해 알 수 있다. 자화율은 VSM(Vibrational Sample Magnetometer)을 이용하여 측정하였다. Fig. 4에서 (a)는 자성나노입자의 자화 및 자화 곡선을 보여주며 (b), (c), (d), (e), (f)는 실리카 코팅 자성나노입자의 자화 곡선을 나타내고 있다. 실리카 코팅 전후의 자화율 변화를 살펴보면, Ms의 값이

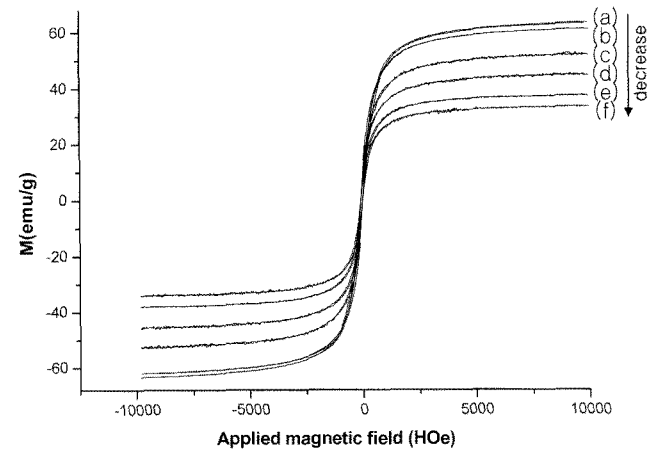
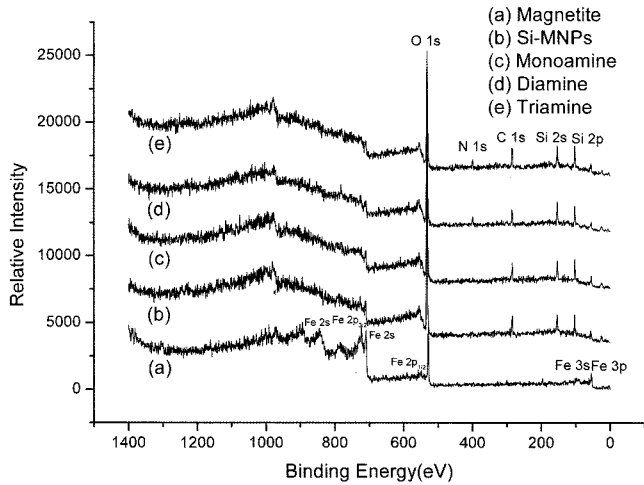


Fig. 4. VSM analysis ; (a) magnetite, (b) silica-coated MNPs (10 mM), (c) silica-coated MNPs (20 mM), (d) silica-coated MNPs (30 mM), (e) silica-coated MNPs (40 mM), and (f) silica-coated MNPs (50 mM).



**Fig. 5.** XPS analysis of amine groups modified silica coated magnetite.

63.73 > 61.42 > 52.83 > 45.48 > 37.91 > 33.87 emu/g의 크기를 가지는 것으로 나타났다. 전체적으로 값이 작아지는 이유는 자성 나노입자의 고유 자화율에서 실리카 층에 의해 코팅이 두껍게 되면서 감소하게 된다.

**3.2. 아민기가 치환된 기능성 자성나노입자**

Fig. 5는 실리카 코팅 자성나노입자에 아민 그룹이 합성되었는지를 확인하기 위하여 X-선 광전자 분광기(X-ray Photoelectron Spectroscopy)를 측정하였다. 조사스펙트럼(Survey spectrum)의 결과로 마그네타이트에서 검출되던 Fe의 원소들이 실리카 코팅을 한 후에는 검출이 되지 않았고 Si의 원소가 검출됨을 확인하였고, 아민 그룹을 합성한 기능성 자성나노입자에서는 N의 원소가 검출됨을 명백히 알 수 있었다. 이것은 아민 그룹이 실리카 코팅 자성나노입자의 표면에 공유결합 되었다는 것을 의미한다. 또한 Table 1에서 정량적 평가로 원소분석을 실시하였다. 협소 스펙트럼(Narrow spectrum)의 결과 모노아민에서 디아민, 트리아민으로 갈수록 C, N의 함량 비율은 점차적으로 증가함을 볼 수 있었고, Si, O의 함량 비율이 감소하는 것을 확인하였다. 이는 같은 크기와 같은 성질을 갖는 실리카 입자에 같은 양의 아민 치환기를 붙였을 때 모노아민보다는 디아민, 디아민보다는 트리아민의 C, N

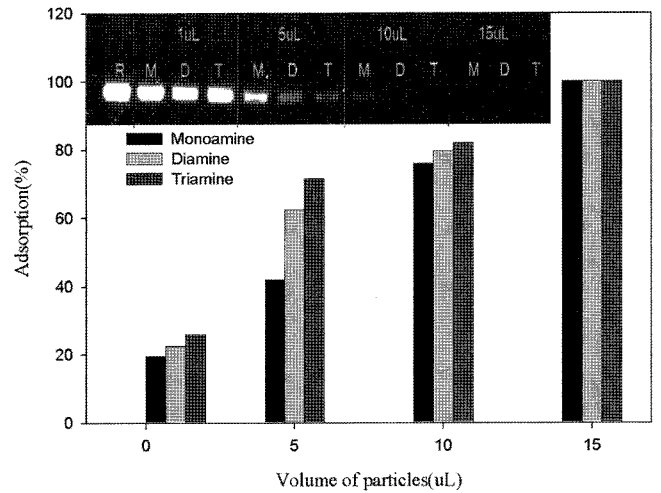
**Table 1.** Atomic Concentration of Surface Modified Silica-coated Magnetites (Si-MNPs)

Name	Atomic Cons. %			
	Si-MNPs	Monoamine	Diamine	Triamine
O 1s	62.76	58.36	56.29	54.63
C 1s	17.72	17.01	18.61	21.55
N 1s	0	3.32	4.50	5.56
Si 2p <sub>1/2</sub> 2p <sub>3/2</sub>	19.52	21.31	20.60	18.26

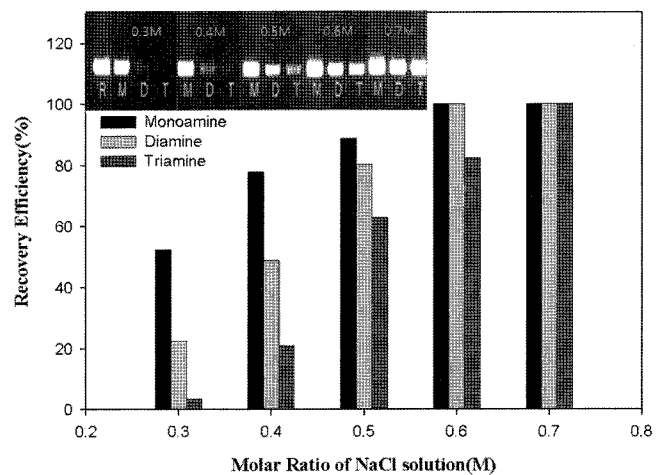
의 함량이 크다는 것을 의미하였다.

**3.3. 기능성 자성나노입자와 DNA간의 상호작용**

Human DNA와 기능성 자성나노입자의 결합은 정전기적 상호작용(Electrostatic interaction)의 작용으로 흡착이 일어나게 된다. DNA는 전체적으로 5'말단의 포스페이트(phosphate) 그룹으로 인하여 음전하를 가지며 아민 그룹이 치환된 기능성 자성 나노입자는 양전하를 가지게 된다. 이 양전하의 차이로 인해 서로 끌어 당겨서 입자표면에 DNA가 흡착하게 되는 것이다. 전위차가 클수록 정전기적 상호작용은 더욱 커져서 흡착효율(adsorption efficiency)은 크게 나타나게 된다.



**Fig. 6.** Electrophoresis image and adsorption efficiency of human DNA with amino functionalized silica coated magnetite. (R: Reference, M: Monoamine, D: Diamine, T: Triamine)



**Fig. 7.** Electrophoresis image of recovery efficiency human DNA with amino functionalized silica coated magnetite. (R: Reference, M: Monoamine, D: Diamine, T: Triamine)

Fig. 6은 추출한 human DNA와 아민기가 합성된 기능성 자성나노입자의 결합력을 비교하기 위하여 전기영동을 이용하여 흡착력을 확인하였다. Fig. 6에서 나타난 바와 같이 모노아민보다 디아민이 흡착이 잘 되었고, 디아민 보다 트리아민의 흡착이 더 잘되는 것을 확인하였다. 이것은 아민의 그룹의 수가 human DNA와의 흡착과 관련이 있다는 것을 보여준다. 아민의 그룹의 수가 많을수록 음전하를 갖는 human DNA와 보다 강한 상호작용이 일어나며, 이는 모노아민, 디아민, 트리아민 순으로 human DNA 흡착에 훨씬 좋은 작용기라는 것을 보여준다. 즉 human DNA의 흡착효율은 아민 그룹의 수에 영향을 받는다는 것을 확인하였다. 또한 입자의 수가 증가할수록 흡착률이 증가하였고 15  $\mu$ L일 때 모두 100% 흡착률을 보임을 확인하였다.

Human DNA와 기능성 자성 나노입자와의 흡착도 중요하지만 탈착 역시 중요하다. Fig. 7은 기능성 자성 나노입자와 DNA와의 탈착을 전기영동으로 확인하여 분리효율(recovery efficiency, desorption/adsorption)을 그래프로 나타내었다. 흡착 원리는 정전기적 상호작용이지만 탈착 원리는 염화나트륨에 의한 염효과(salt effect)가 크게 작용한다. 탈착할 때는 염화나트륨을 사용하게 되는데 상호 정전기적 인력보다 이온들이 입자의 표면에 붙는 성질이 더 강하게 된다. 염화나트륨이 물에 녹아 이온화가 되면 이온들이 입자의 표면을 감싸게 되고 기능성 자성 나노입자에 붙어있는 human DNA를 떼어내게 된다. 이때 NaCl의 농도에도 영향을 받게 되는데 농도가 진해 질수록 탈착률이 증가하였다. Fig. 7 결과에서 모노아민의 탈착율이 디아민이나 트리아민보다 크다는 것을 확인하였고, 이는 상대적으로 human DNA와 기능성 자성나노입자간의 정전기적 상호작용이 작기 때문이다. 즉, human DNA가 강하게 결합되어 있으면 탈착률이 감소하지만 상호작용이 작은 모노아민의 경우 큰 탈착율을 보이는 것으로 나타났다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는  $Fe^{II}$  이온과  $Fe^{III}$  이온을 출발물질로 하여 6~7 nm 크기의 초상자성의 자성 나노입자를 합성하였으며, 실리카 전구체의 양을 조절하여 입자의 크기가 10~60 nm 정도의 크기를 갖는 실리카 코팅 자성나노입자를 만든 후 모노, 디, 트리 아민기를 붙여서 기능성 자성 나노입자를 제조하였다. 이 아미노 실란화 자성 나노입자를 이용하여 대상 human DNA의 초고속 자성 분리를 보고하였다. 본 기술은 기존의 실리카 멤브레인을 이용하던 방법에서 나노입자를 이용하여 반응 표면적을 증대시켰다. 또한 세라믹 코팅층의 두께를 조절함으로써 안

정화 효과를 증진 시켰고, 최종적으로 세라믹 코팅 자성 나노입자의 표면에 기능성 분자를 자기조립 시킴으로써 대상 바이오 분자와의 결합력을 증진시켜 고효율 및 초고속 분리가 가능하게 한 방법이다. 향후 자성 나노입자 크기의 표준화 및 균질화 등에 관한 연구가 단계적으로 수행된다면, 탄수화물 및 지방 등 기타 생체 고분자 분리 정제 분야에서 자성 분리 활용성은 매우 커질 것으로 기대된다.

#### Acknowledgment

본 연구는 지식 경제부 소재원천기술개발사업의 연구비 지원으로 수행 되었습니다.

#### REFERENCES

1. W. Stober, A. Fink, and E. J. Bohn, "Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range," *J. Colloid and Interface Sci.*, **26** 62-9 (1968).
2. T. Yoon, J. S. Kim, B. G. Kim, K. N. Yu, M. Cho, and Jin-Kyu Lee, "Multifunctional Nanoparticles Possessing A Magnetic Motor Effect for Drug or Gene Delivery," *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44** 1068-71 (2005).
3. M. E. Park, K. H. Kang, K. J. Kim, and J. H. Chang, "High Efficient DNA Purification with Organosilanes Grafted Nanoparticles," *Solid State Phenomena*, **124** 903-6 (2007).
4. S. A. Iakovenko, A. S. Trifonov, M. Giersig, A. Manedov, D. K. Nagesha, V. V. Hanin, and N. A. Soldatov, "One- and Two-Dimensional Arrays of Magnetic Nanoparticles by the Langmuir-Blodgett Technique," *Adv. Mater.*, **11** 388-92 (1999).
5. K. H. Kang, J. Choi, J. H. Nam, S. C. Lee, K. J. Kim, S. W. Lee, and J. H. Chang, "Preparation and Characterization of Functionalized Silica Coated Magnetic Nanoparticles as a DNA Separator," *J. Phys. Chem. B* 2008, in press.
6. A. Ulman, "Modifying the Surface Properties of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles through A Sol-Gel Approach," *Chem. Rev.*, **96** 1533-54 (1996).
7. Y. Lu, Y. Yin, B. T. Mayers, and Y. Xia, "Modifying the Surface Properties of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles through A Sol-Gel Approach," *Nano Lett.*, **2** 183-6 (2002).
8. M. A. Correa-Duarte, M. Giersig, N. A. Kotov, and L. M. Liz-Marzan, "Control of Packing Order of Self-Assembled Monolayers of Magnetite Nanoparticles with and without  $SiO_2$ ," *Langmuir*, **14** 6430-5 (1998).
9. Kros, M. Gerritsen, V. S. I. Sprakel, N. A. J. M. Sommerdijk, J. A. Jansen, and R. J. M. Nolte, "Silica-based Hybrid Materials as Biocompatible Coatings for Glucose Sensors," *Sens. Actuators B*, **81** 68-75 (2001).
10. Y. Shchipunov, "Sol-gel-derived Biomaterials of Silica and Carrageenans," *J. Colloid and Interface. Sci.*, **268** 68-76 (2003).