

올리고-dT 자성입자와 측면방향 자기영동을 이용한 초고속 RNA 추출 기술

이환용* · 한송이* · 한기호**

* 인제대학교 나노공학부

High-Speed RNA Isolation Using Magnetic Oligo(dT) Beads and Lateral Magnetophoresis

Hwanyong Lee*, Song-I Han* and Ki-Ho Han**

* Dept. of Nano Engineering, Inje Univ.

(Received June 7, 2011 ; Revised September 19, 2011 ; Accepted September 20, 2011)

Key Words: Extraction(추출), Lateral-driven Magnetophoresis(측면방향 자기영동), Magnetic Oligo-dT Beads (올리고-dT 자성입자), RNA(리보핵산)

초록: 본 논문에서는 올리고-dT 자성입자와 측면방향 자기영동 기술을 기반으로 하는 초고속 RNA 추출 칩을 소개한다. 센자성 와이어에 유도된 고구배자장에 의해 RNA가 결합된 올리고-dT 자성입자를 분리함으로써 용해된 혈액으로부터 고속으로 RNA를 추출하였다. 유속이 20 ml/h까지 자성입자를 80% 이상의 효율로 분리할 수 있었으며, 분리시간은 총 1분 이내였다. 추출된 시료로부터 단백질에 대한 RNA 흡광비율(absorbance ratio of RNA to protein: A260/A280)이 1.7 이상임을 확인하였고, 따라서 추출된 RNA가 매우 순수함을 보였다. 추출된 RNA를 사용하여 cDNA 합성과 PCR을 수행하였으며, 이로부터 개발된 초고속 RNA 추출칩이 적은 양의 시료만으로 간편하며 빠르고 정교한 RT-PCR을 수행하는데 실용적임을 확인하였다.

Abstract: This paper presents a high-speed RNA microextractor for the direct isolation of RNA from blood lysate using magnetic oligo(dT) beads. The extraction is performed through lateral magnetophoresis, which is induced by a ferromagnetic wire array inlaid. With this RNA microextractor, more than 80% of the magnetic beads could be separated at a flow rate up to 20 ml/h, and the overall extraction procedure was completed within 1 min. The absorbance ratio of RNA to protein(A260/A280) was greater than 1.7, indicating that the extraction technique yields pure RNA. The feasibility of using this technique in reverse transcription polymerase chain reaction procedures was investigated by cDNA synthesis and PCR processes. The results confirmed that the RNA microextractor is a practical device for easy, fast, and high-precision RT-PCR using minimal amounts of reagent.

- 기호설명 -

1. 서론

- F_{mx} : x -방향 자기력
- F_l : 측면방향 자기력
- B_0 : 외부 자속
- F_d : 유체항력
- μ_B, μ_W : 버퍼용액과 센자성 와이어의 투자율
- M_{PS} : 포화 자기화

역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR; reverse transcription polymerase chain reaction)은 유전자 발현을 분석하는 기술로써, 의학진단⁽¹⁻³⁾ 및 범죄수사^(4,5) 등에 폭넓게 활용되고 있다. 성공적인 RT-PCR 수행을 위해서는 무엇보다 바이오시료로부터 높은 순도의 RNA를 정제하는 기술이 매우 중요하다. RNA는 핵산가수분해효소(exonucleases; RNases)에 의해 쉽게 분해되는 특성이 있다. 더욱이 RNase는 사람의 피부나 주변 환경에 흔히 존재하며 쉽게 활성화되는 효소이기 때문에 RNase에 의한 오염 없

† Corresponding Author, mems@inje.ac.kr

© 2011 The Korean Society of Mechanical Engineers

이 높은 순도의 RNA를 정제하는 것은 매우 까다로운 기술이다.

RNA 추출을 위한 방법으로는 일반적으로 실리카를 기반으로 한 고체상추출법(solid-phase extraction)⁽⁶⁻¹¹⁾이 있다. 이는 고형지지체와 핵산 간의 상호작용을 이용하는 방법으로, 우선 용해된 바이오시료를 RNA와 선택적으로 결합하는 고형지지체에 주입한다. 이때 지질, 단백질, 작은 대사물질 그리고 무기이온과 물질들은 자연스럽게 걸러지게 되고, 지지체에 결합된 RNA는 추출용액을 사용하여 지지체로부터 따로 추출된다. 이 방법은 추출과정에서 RNA를 외부환경에 자주 노출시키게 됨으로써 RNase에 의해 쉽게 오염될 수 있다. 따라서 RNase에 의한 오염을 피하기 위해서는 RNA를 외부환경에 노출하지 않고 빠르게 추출하는 것이 필수적이다. 이러한 문제를 해결하기 위해 초소형가공기술(Microelectromechanical systems; MEMS) 기반의 소자들⁽¹²⁻¹⁷⁾이 개발되었으며, 개발된 소자는 RNase에 의한 오염을 막기 위해 밀폐된 구조를 가지며, 숙련된 전문가 없이도 높은 순도의 RNA 추출이 가능하였다.

본 논문에서는 올리고-dT 자성입자(Dynabeads[®] oligo(dT)₂₅; Invitrogen Dynal As)⁽¹⁸⁾와 측면방향 자기영동⁽¹⁹⁾을 이용한 초고속 RNA 추출칩을 소개한다. 측면방향 자기력이 유리기관에 상감된 센자성 와이어에 의하여 발생되었다. 센자성 와이어를 지나가는 자성입자의 측면방향 이동거리를 측면방향 자기력의 분석모델을 활용하여 예측하였으며, 시물선 결과와 비교·분석 되었다. 유속에 따른 자성입자의 분리효율 및 분리된 RNA의 순도가 측정되었으며, 또한 추출된 RNA를 이용한 RT-PCR 과정을 성공적으로 수행하였다. 결론적으로 본 연구에서는 제안된 RNA 추출칩을 이용하여 간편하고 빠르게 RNA를 분리할 수 있을 뿐만 아니라, 이를 이용하여 RT-PCR을 성공적으로 수행할 수 있음을 보였다.

2. 이론 및 설계

2.1 동작원리

센자성 와이어에 외부 자기장이 인가되면 Fig. 1(a)과 같이 와이어 주위의 자기장이 굽어지게 되고, 따라서 강한 고구배자장(high gradient magnetic field)이 형성된다. 이로 인해 센자성 와

이어를 지나가는 자성입자는 강한 자기력을 받게 된다. Fig. 1(b)와 같이 유체방향과 각도 θ 를 이루는 센자성 와이어가 채널 전체에 걸쳐 형성되어 있을 경우, 와이어를 통과하는 자성입자는 유체항력(F_d)과 자기력(F_m)의 벡터합인 측면방향 자기력(F_l)을 받게 된다. 측면방향 자기력 F_l 은 가해진 외부 자기장, 유체흐름과 와이어 사이의 각도 θ , 그리고 자성입자의 자기 자화율에 의해 결정되는 자기력, F_m ,의 영향을 받게 되고, 측면방향 자기력에 의해 자성입자는 측면방향으로 힘을 받게 된다. 결과적으로 RNA가 결합된 올리고-dT 자성입자는 출력채널 1번으로 추출되며, 자성입자를 제외한 시료의 나머지 물질들은 출력채널 2번으로 배출된다. 이때 측면방향 자기력은 채널 전체에 걸쳐서 고루 발생하기 때문에 제안된 RNA 추출칩은 하나의 와이어만 사용한 이전의 마이크로칩들^(20,21) 보다 우수한 분리효율과 시료처리능력(throughput)을 가질 수 있다.

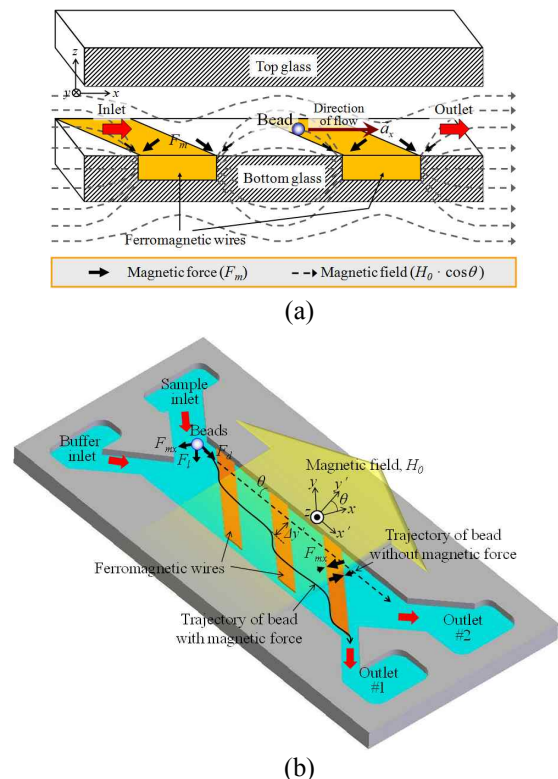


Fig. 1 Working principle of the high-speed RNA microextractor. (a) Cross-sectional view of the ferromagnetic wire array and the gradient magnetic field. (b) Top view of the inlaid ferromagnetic wire array placed at an angle of θ to the direction of flow under an applied external magnetic field H_0

2.2 시물선

Fig. 1(b)에서 센자성 와이어 주위의 자성입자에 작용하는 x 방향 자기력, F_{mx} ,은 다음식과 같이 유도된다.⁽²²⁾

$$F_{mx} = -\frac{2V_p M_{PS} x k r^2 B_0 (x^2 - 3z^2 + kr^2)}{(x^2 + z^2)^2 \sqrt{(x^2 + z^2)^2 + 2kr^2(x^2 - z^2) + k^2 r^4}},$$

$$k = \frac{\mu_W - \mu_B}{\mu_W + \mu_B} \quad (1)$$

여기서 V_p 는 자성입자의 부피, M_{PS} 는 자성입자의 포화자화(saturation magnetization), μ_B 는 버퍼 용액의 투자율, μ_W 는 센자성 와이어의 투자율, r 는 센자성 와이어의 유효반지름, B_0 는 인가된 외부 자속, 그리고 x 와 z 는 좌표계의 축들이다.

이론예측과 시물선에 사용된 자성입자의 포화자화 M_{PS} 는 $30 \text{ kA m}^{-1(23)}$ 이었으며, 영구자석을 이용하여 인가된 외부 자속($B_0 = \mu_0 H_0$)은 0.14 T 로 측정되었다. 자성입자의 x 방향 자기력은 ANSYS(ANSYS Inc.)를 이용하여 시물선되었으며 이론예측치와 비교·분석되었다(Fig. 2(a)). 원형의 센자성 와이어를 이용하여 계산된 자기력의 이론값에 사각 와이어에서 발생하는 자기력의 이론값을 얻기 위해 보정계수 $4/\pi$ 를 곱하였다.⁽²⁰⁾ 결론적으로 Fig. 2(a)는 이론예측과 시물선 결과가 잘 일치하고 있음을 보이고 있으며, 이로부터 유도된 이론모델이 자성입자에 작용하는 자기력을 이론예측하기 위해 유용함을 알 수 있다.

자성입자에 작용하는 측면방향 자기력, \vec{F}_l ,은 다음식과 같이 유도된다.

$$\vec{F}_l = \vec{F}_{mx} + \vec{F}_d = (F_{mx} + F_d \sin\theta) \vec{a}_x - F_d \cos\theta \vec{a}_y \quad (2)$$

여기서 \vec{a}_x 와 \vec{a}_y 는 각각 x 축과 y 축의 단위벡터이다.

자성입자의 측면방향 속도, \vec{v}_l ,는 다음식과 같다.

$$\vec{v}_l = \frac{dx}{dt} \vec{a}_x + \frac{dy}{dt} \vec{a}_y = \frac{\vec{F}_l}{6\pi\eta d}$$

$$= \beta [(F_{mx} + F_d \sin\theta) \vec{a}_x - F_d \cos\theta \vec{a}_y], \beta = \frac{1}{6\pi\eta d}$$

여기서 η 는 용액 내 자성입자가 느끼는 점성이고, d 는 자성입자의 반지름이다. 수식 (3)의 2번째 식과 4번째 식의 x 축 및 y 축 항이 각각 같아야하므로, 만약 자성입자의 부양높이(z)가 일정하다면, x 와 y 방향으로의 이동거리는 다음 식들로부터 얻어진다.

$$dx = \beta(F_{mx} + F_d \sin\theta) dt \quad (4)$$

$$y = -\beta F_d \cos\theta t \quad (5)$$

수식 (4)와 (5)에서 x 와 y 방향의 이동거리에 대한 이론결과를 이용하면 자성입자의 측면방향 (y') 이동거리, $\Delta y'$ (Fig. 1(b)),는 다음 식과 같다.

$$\Delta y' = x \cos\theta + y \sin\theta \quad (6)$$

수식 (4)와 (6)으로부터 측면방향 이동거리 $\Delta y'$ 는 자성입자에 작용하는 자기력, F_{mx} ,이 증가하거나, 유체의 흐름방향과 와이어가 이루는 각도 θ 가 감소함에 따라 증가하는 것을 알 수 있다. 특히 $F_{mx} + F_d \sin\theta < 0$ 의 경우, 자성입자는 센자성 와이

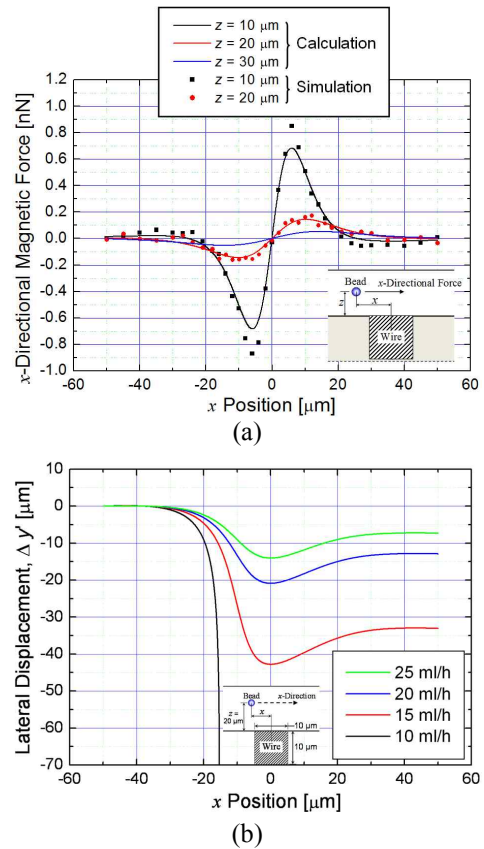


Fig. 2 (a) Analytical and numerical values for the x -directional magnetic force F_{mx} on the magnetic beads for varying levitated heights z from the bottom substrate. (b) Analytical values of the lateral displacement, $\Delta y'$, for various flow rates at the region of $\theta=5.7^\circ$ and $z=20\mu\text{m}$. The hatched squares in the inset represent the cross-section of the square ferromagnetic wire, taken perpendicular to the x -axis in Fig. 1(b)

어를 통과하게 되며, 따라서 측면방향 이동거리는 이론적으로 무한대가 된다. 따라서 이 경우 자성입자는 유체채널의 한쪽 끝까지 이동하게 된다. 또한, 유속이 감소함에 따라 유체항력은 감소하며, 측면방향 이동은 증가한다(Fig. 2(b)).

2.3 설계

초고속 RNA 추출칩은 두개의 입구, 두개의 출구, 그리고 바닥기판에 상감 형성된 니켈(Ni) 센자성 와이어로 구성된다(Fig. 3). 시료와 버퍼 입구는 용해된 혈액에 올리고-dT 자성입자가 혼합된 시료와 PBS(phosphate Buffered saline) 용액이 각각 주입되었다. 출구 1번에서는 분리된 자성입자가 추출되었고, 출구 2번으로는 자성입자를 제외한 시료의 나머지 물질들이 제거되었다. 자성입자를 농축하기 위해 출구 1번 채널 폭을 출구 2번 채널 폭 800 μm 의 4분에 1인 200 μm 로 설계하였다. 센자성 와이어의 폭과 두께를 각각 50 μm , 10 μm 로 설계함으로써 강한 고구배자장을 형성하였다.

센자성 와이어에 형성된 강한 자기력으로 인해 일부 자성입자는 와이어 모서리에 쌓일 수 있으며 이는 자성입자의 손실을 유발한다. 자성입자의 회수율(recovery rate)을 향상시키기 위해 센자성 와이어는 유체방향과 5.7°, 7.1°, 그리고 11.3° 각도를 이루도록 설계되었으며, 와이어의 끝부분은 채널의 한쪽 측면 벽에서 부터 100 μm 떨어지도록 하였다.

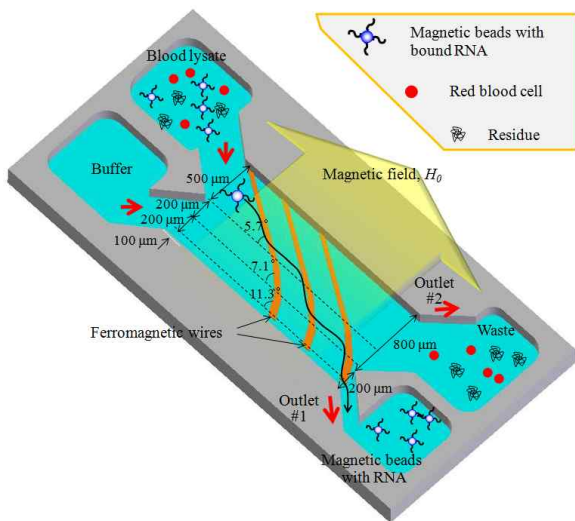


Fig. 3 Architecture of the high-speed RNA microextractor

3. 제작

외부자기장을 구배시킴으로써 자성입자에 강한 자기력을 발생시킬 수 있는 마이크로미터 크기의 센자성 와이어를 형성하기 위해 Ti/Cu/Cr seed-layer 층을 하부유리기판(Borofloat33 Purex, Schott AG) 위에 증착(Fig. 4(a))하고 두께 30 μm 의 니켈 와이어를 전기도금 하였다(Fig. 4(b)). 표면의 평탄화를 위해 에폭시 코팅 후 니켈 와이어를 10 μm 두께로 연마하였다(Fig. 4(c)). 유체채널을 형성하기 위해 상부유리기판 위에 SU-8 감광제를 코팅하였고, 노광공정을 이용하여 채널을 형성하였다(Fig. 4(d)). 센자성 와이어가 상감된 하부유리기판과 채널이 형성된 상부유리기판을 자외선 접착제를 이용하여 접합하여(Fig. 4(e)) 유리칩을 제작하였다. 이렇게 제작된 유리칩 위에 쾌속조형(rapid prototype) 기술로 제작된 유체커넥터를 자외선 접착제를 이용하여 접합함으로써(Fig. 4(f)), 초고속 RNA 추출칩이 Fig. 5와 같이 완성되었다.

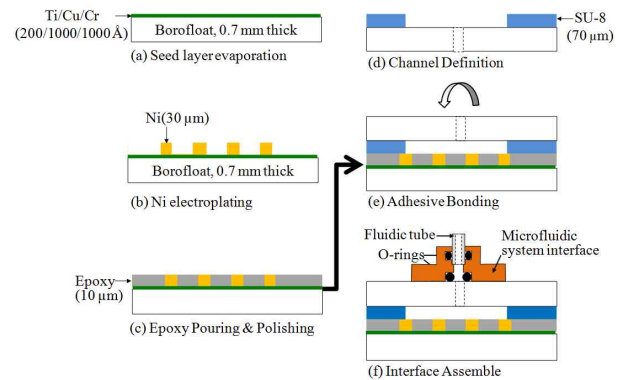


Fig. 4 Fabrication process for the high-speed RNA microextractor

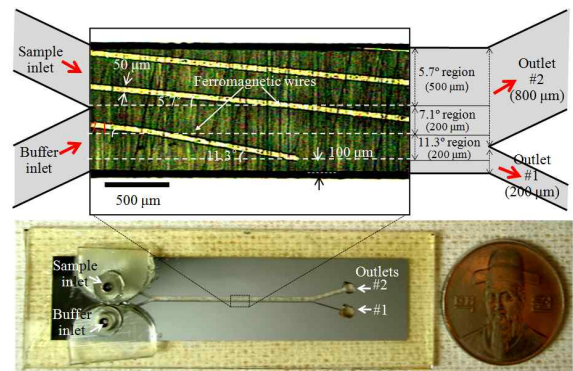


Fig. 5 Photographs of the fabricated high-speed RNA microextractor

4. 실험 및 결과

4.1 자성입자의 분리효율

일반적으로 mRNA의 한쪽 끝은 다중 A 꼬리구조를 이루고 있어 이의 상보염기서열인 올리고-dT에 쉽게 결합된다. 따라서 RNA를 추출하기 위해 표면에 올리고-dT가 결합된 직경 2.8 μm의 자성입자가 사용되었다. 실험 전 일정한 농도의 자성입자를 얻기 위해 자성입자가 담긴 용액을 균일하게 부유하였다. 100 μl의 부유된 자성입자 액체는 1.5 ml 튜브로 옮겨졌다. 이때 100 μl 액체 내에는 약 4×10⁴개 μl⁻¹ 자성입자가 포함되어 있으며 8 ng μl⁻¹ 이상의 mRNA 정제가 가능하다. 자성입자를 세척하기 위해 lysis/binding 버퍼(Dynabeads mRNA Direct kit; Invitrogen Dynal AS)가 사용되었으며, 2회 세척 후 자성입자는 얼음에 보관되었다. 사람의 혈액 50 μl를 용해하기 위해 백혈구 용해액(Buffer RLT, QIAamp RNA Blood Minikit Qiagen) 175 μl가 사용되었다. 자성입자와 RNA의 결합을 위해 앞서 세척된 자성입자의 액체가 제거되고 이미 용해된 혈액에 자성입자를 첨가하였다. 다음으로 피펫을 이용하여 균일하게 용액을 섞은 후 RNA와 자성입자의 충분한 결합을 위해 5분간 상온에 보관하였다.

외부자기장을 인가하기 위해 Ne-Fe-B 영구자석이 이용되었다. 바이오시료와 PBS 용액을 같은 속도로 유체채널에 주입하기 위해 주사기 펌프(Legato 200, KD Scientific Inc.)가 사용되었다. 유체채널을 통해 자성입자가 분리되는 모습을 관찰하기 위해 광학현미경(ME600; Nikon Instruments Inc.)이 사용되었다. 자성입자의 분리 효율을 측정하기 위해 출구 1번과 출구 2번으로 배출되는 용액이 각각 수집되

었으며, 혈구계(hemocytometer, Paul Marienfeld GmbH)를 사용하여 출력 채널 1번과 2번으로 부터 수집된 자성입자의 개수가 측정되었다.

Fig. 6은 유체채널을 통해 시료와 PBS 용액이 유속 15 ml h⁻¹로 흐르는 모습이다. 외부자기장이 인가되지 않은 경우 바이오시료는 모두 출구 2번으로 흘러들어갔다(Fig. 6(a)). 반면 외부자기장이 인가된 경우, 자성입자는 측면방향으로 이동되어 출구 1번으로 흘러갔으며, 시료의 나머지 물질은 출구 2번으로 흘러갔다(Fig. 6(b)). Fig. 7은 다양한 유속에 따른 자성입자의 분리 효율을 보이고 있다. 그림에서 보이는 바와 같이 RNA 추출침은 유속이 20 ml h⁻¹까지 80% 이상의 자성입자를 분리하였다.

4.2 RNA의 순도측정

용해된 혈액 내에는 핵산뿐만 아니라 지질, 단백질, 작은 대사물질 그리고 무기이온 등과 같은 물질들이 존재한다. 이러한 물질들은 자성입자 표면에 불특정 결합을 할 수 있으며, 그 결과 자성입자에 결합된 RNA와 작용하여 PCR 및 뉴클레오티드 배열(nucleotide sequencing)⁽²⁴⁾과 같은 유전자분석의 억제제(inhibitor)로 작용할 수 있다. 따라서 안정된 유전자분석을 위해 바이오시료로부터 높은 순도의 RNA의 추출하는 것은 매우 중요하다.

RNA 추출침으로부터 추출된 RNA의 순도를 측정하기 위해 먼저 분리된 자성입자로부터 RNA를 추출하였다. 이를 위해 먼저 RNA가 추출된 용액을 담은 튜브에 추출버퍼(10mM Tris-HCl, Dynabeads mRNA Direct kit, Invitrogen Dynal AS)

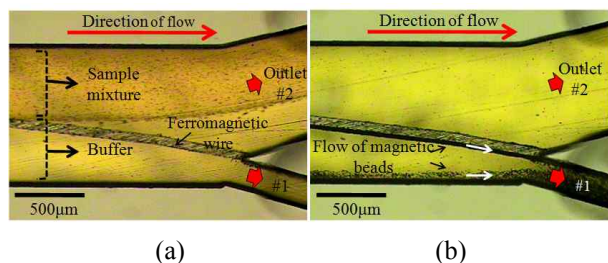


Fig. 6 Sample and buffer solutions passing through the microchannel of the microchip (a) without an external magnetic field; and (b) with an external magnetic flux of 0.14 T at each sample and buffer flow rates of 15 ml h⁻¹

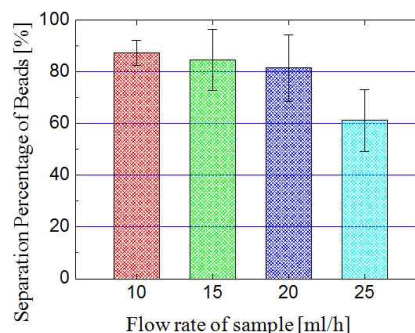


Fig. 7 Relative separation percentage of the beads extracted from outlet #1 with various sample flow rates. The error bars represent one standard deviation calculated from three data sets

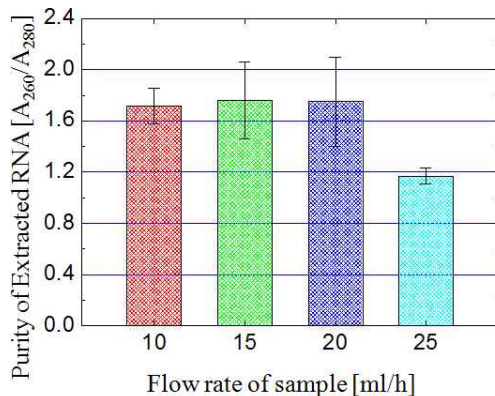


Fig. 8 Purity of the RNA preparation for various sample flow rates. The error bars represent one standard deviation calculated from three data sets

를 1:1 비율로 섞고, 72°C에 2분 동안 두었다. 이후 튜브를 빠르게 영구자석에 옮긴 다음, 자성 입자가 충분히 침전된 이후 RNA가 포함된 상층액을 새로운 튜브로 옮겼다. 추출된 RNA의 순도를 측정하기 위해 분광광도계(spectrophotometer, GeneQuant Pro; Amersham Biosciences)가 사용되었으며, 유속이 20 ml h⁻¹ 이하에서 단백질에 대한 RNA 흡광비율이 평균 1.7 이상임을 확인하였다(Fig. 8). 따라서 추출된 RNA는 RT-PCR을 수행하기에 충분히 순도가 높음을 확인하였다.⁽²⁵⁾

초고속 RNA 추출칩을 사용하여 수행된 실험에서 시료의 최대유속은 25 ml h⁻¹이었으며, 이때 Reynolds 수는 대략 13이었다. 따라서 최대유속에서도 채널 내의 유체는 층류를 형성할 것으로 예상된다.⁽²⁶⁾ 이러한 층류는 자성입자만 선택적으로 출구 1번로 이동하도록 하기 때문에 높은 순도의 RNA를 얻는데 중요하다.

4.3 RT-PCR 결과

제안된 RNA 추출칩의 유용성을 확인하기 위하여 추출된 RNA를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. 자성입자에 결합된 RNA는 추출과정 없이 직접 cDNA 합성에 사용되었으며, 이를 위하여 10× buffer RT 2 μl, dNTP mix 2 μl, Omniscript 역전사효소 2.5 μl, RNase 억제제 1 μl, 그리고 출구 1번에서 추출된 12.5 μl의 용액이 혼합된 후 37°C, 60분 동안 배양되었다

PCR 수행을 위해 219-bp human β-actin 유전자가 사용되었으며 순방향(forward)와 역방향 프라이머(reverse primer)의 염기서열은 각각 5'-GAC-

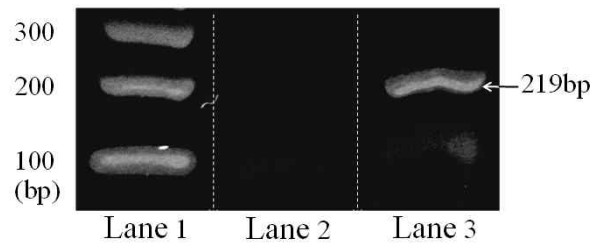


Fig. 9 RT-PCR results using RNA extracted from the high-speed RNA microextractor

TAC-CTC-ATG-AAG-ATC-3'과 5'-GAT-CCA-CAT-CTG-CTG-GAA-3'이었다. 5× Taq-PCR mix(GenoTech) 4 μl, 순방향(forward)과 역방향 프라이머(reverse primer)(100 μmol μl⁻¹; Genotech) 각각 1 μl, cDNA 1 μl, 그리고 13 μl의 멸균수를 혼합하여 20 μl의 PCR 시료가 준비되었다. PCR은 94°C에서 30초, 55°C에서 1분, 72°C에서 30초의 열 반복이 35회 수행되었다. PCR 결과분석을 위해 2% 아가로스젤이 사용되었다. Fig. 9의 RT-PCR 결과를 보면 네거티브 컨트롤(lane 2)은 아무런 증폭된 신호가 보이지 않는 반면, 추출된 RNA를 사용하여 RT-PCR을 수행한 결과(lane 3)는 219-bp에서 선명한 형광신호를 보이고 있다. 이로부터 추출된 RNA를 사용하여 성공적으로 RT-PCR이 수행되었음을 확인할 수 있다. 결과적으로, 제안된 초고속 RNA 추출칩을 이용하여 분리된 RNA의 순도는 이후 유전자 분석의 적용에 충분히 적합함을 실험적으로 보였다.

5. 결 론

본 논문은 올리고-dT 자성입자와 측면방향 자기영동을 이용한 초고속 RNA 추출칩을 제안하고, 이를 설계, 제작, 평가하였다. 자기력의 이론 예측과 시뮬레이션 결과의 비교는 유도된 이론모델을 이용하여 센자성 와이어 주위의 자성입자에 작용하는 자기력을 이론 예측할 수 있음을 보였다. 외부자기장을 인가하기 위해 영구자석이 이용되었으며, 20 ml h⁻¹의 유속까지 용해된 혈액으로부터 80% 이상의 입자를 분리하였으며, 총 분리시간은 1분 이내였다. 추출된 시료의 단백질에 대한 RNA 흡광비율(A_{260}/A_{280})이 1.7 이상이었으며, 이로부터 추출된 RNA의 순도가 RT-PCR을 수행하기에 적합함을 확인하였다. 나아가 추출된

RNA를 이용한 cDNA 합성 및 PCR 실험결과를 통해, 제안된 초고속 RNA 추출칩을 이용한 RT-PCR 수행이 유용함을 실험적으로 입증하였다.

컬럼(Column)형 RNA 정제 방법⁽²⁷⁾과 비교하여 제안된 초고속 RNA 추출칩은 RNA 추출과정이 간단할 뿐 아니라 속도가 빠르다. RNA는 시료가 유체채널로 주입되는 동시에 연속적으로 추출될 수 있으며, 외부환경으로부터 RNA 노출이 차단된다. 결과적으로 제안된 초고속 RNA 추출칩은 숙련된 전문가의 도움 없이, 적은양의 시료를 사용하여 빠르고 간편하게 RT-PCR을 수행하기 위한 실용적인 기술을 제공할 것으로 예상된다. 나아가 다른 마이크로크기의 유전자처리를 위한 기능적 요소(예: cDNA 합성, PCR)들과 쉽게 집적될 수 있어 유전자분석을 위한 랩온어칩 형태의 마이크로유체시스템개발 등에 널리 활용될 것으로 기대된다.

후 기

이 논문은 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업 지원을 받아 수행된 것임(No. 2011-0008248).

참고문헌

(1) Liao, C.-S., Lee, G.-B., Liu, H.-S., Hsieh, T.-M. and Luo, C.-H., 2005, "Miniature RT-PCR System for Diagnosis of RNA-based Viruses," *Nucleic Acids Res*, Vol. 33, pp. e156.

(2) Takano, T., Miyauchi, A., Yokozawa, T., Matsuzka, F., Liu, G., Higashiyama, T., Morita, S., Kuma, K. and Amino, N., 1998, "Accurate and Objective Preoperative Diagnosis of Thyroid Papillary Carcinomas by Reverse Transcription-PCR Detection of Oncofetal Fibronectin Messenger RNA in Fine-Needle Aspiration Biopsies," *Cancer Res.*, Vol. 58, pp. 4913-4917.

(3) Burchill, S., Bradbury, M., Pittman, K., Southgate, J., Smith, B. and Selby, P., "Detection of Epithelial Cancer Cells in Peripheral Blood by Reverse Transcriptase-polymerase Chain Reaction," *Br. J. Cancer*, Vol. 71, No. 2, pp. 278-281.

(4) Setzer, M., Juusola, J. and Ballantyne, J., 2008, "Recovery and Stability of RNA in Vaginal Swabs

and Blood, Semen, and Saliva Stains," *J. Forensic Sci*, Vol. 53, No. 2, pp. 296-305.

(5) Juusola, J. and Ballantyne, J., 2003, "Messenger RNA Profiling: A prototype Method to supplant Conventional Methods for Body Fluid Identification," *Forensic Sci. Int*, Vol. 135, No. 2, pp. 85-96.

(6) Han, S.-I., Han, K.-H., Frazier, A. B., Ferrance, J. P. and Landers, J. P., 2009, "An Automated Micro-solid Phase Extraction Device Involving Integrated High-pressure Microvalves for Genetic Sample Preparation," *Biomed. Microdevices*, Vol. 11, No. 4, pp. 935-942.

(7) Zhang, C. and Xing, D., 2007, "Miniaturized PCR Chips for Nucleic Acid Amplification and Analysis: Latest Advances and Future Trends," *Anal. Chem*, Vol. 35, No. 13, pp. 4223-4237.

(8) Wu, Q., Bienvenue, J. M., Hassan, B. J., Kwok, Y. C., Giordano, B. C., Norris, P. M., Sanders, J. P. and Ferrance, J. P., 2006, "Microchip-Based Macroporous Silica Sol-Gel Monolith for Efficient Isolation of DNA from Clinical Samples," *Anal. Chem*, Vol. 78, No. 16, pp. 5704-5710.

(9) Cady, N. C., Stelick, S. and Batt, C. A., "Nucleic acid Purification Using Microfabricated Silicon Structures," *Biosens. Bioelectron*, Vol. 19, No. 1, pp. 59-66.

(10) Breadmore, M. C., Wolfe, K. A., Arcibal, I. G., Leung, W. K., Dickson, D., Giordano, B. C., Power, M. E., Ferrance, J. P., Feldman, S. H., Norris, P. M. and Landers, J. P., 2003, "Microchip-Based Purification of DNA from Biological Samples," *Anal. Chem*, Vol. 75, No. 8, pp. 1880-1886.

(11) Wolfe, K. A., Breadmore, M. C., Ferrance, J. P., Power, M. E., Conroy, J. F., Norris, P. M. and Landers, J. P., 2002, "Toward a Microchip-Based Solid-phase Extraction Method for Isolation of Nucleic Acids," *Electrophoresis*, Vol. 23, No. 5, pp. 727-733.

(12) Hagan, K. A., Meier, W. L., Ferrance, J. P. and Landers, J. P., 2009, "Chitosan-Coated Silica as a Solid Phase for RNA Purification in a Microfluidic Device," *Anal. Chem*, Vol. 80, No. 13, pp. 5249-5256.

(13) Hagan, K. A., Bienvenue, J. M., Moskaluk, C. A. and Landers, J. P., 2008, "Microchip-Based

- Solid-Phase Purification of RNA from Biological Samples," *Anal. Chem*, Vol. 80, No. 22, pp. 8453~8460.
- (14) Lien, K.-Y., Lin, J.-L., Liu, C.-Y., Lei, H.-Y. and Lee, G.-B., 2007, "Purification and Enrichment of Virus Samples Utilizing Magnetic Beads on a Microfluidic System," *Lab Chip*, Vol. 7, No. 7, pp. 868~875.
- (15) Marcus, J. S., Anderson, W. F. and Quake, S. R., 2006, "Microfluidic Single-Cell mRNA Isolation and Analysis," *Anal. Chem*, Vol. 78, No. 9, pp. 3084~3089.
- (16) Marcus, J. S., Anderson, W. F. and Quake, S. R., 2006, "Parallel Picoliter RT-PCR Assays Using Microfluidics," *Anal. Chem*, Vol. 78, No. 3, pp. 956~958.
- (17) Hong, J. W., Studer, V., Hang, G., Anderson, W. F. and Quake, S., 2004, "A Nanoliter-Scale Nucleic Acid Processor with Parallel Architecture," *Nat. Biotechnol*, Vol. 22, pp. 435~439.
- (18) Fonnum, G., Johansson, C., Molteberg, A., Mørup, and Aksnes, E., 2005, "Quality of Cardiopulmonary Resuscitation During Out-of-Hospital Cardiac Arrest," *F. Magn. Magn. Mater*, Vol. 293, No. 3, pp. 41~47.
- (19) Jung, J. and Han, K.-H., "Lateral-Driven Continuous Magnetophoretic Separation of Blood Cells," *Appl. Phys. Lett*, Vol. 93, No. 22, pp. 223902
- (20) Han, K.-H. and Frazier, A. B., 2005, "Diamagnetic Capture Mode Magnetophoretic Microseparator for Blood Cells," *J. Microelectromech. Syst*, Vol. 14, No. 6, pp. 1422~1431.
- (21) Han, K.-H. and Frazier, A. B., 2004, "Continuous Magnetophoretic Separation of Blood Cells in Microdevice Format," *J. Appl. Phys*, Vol. 96, pp. 5797~5802.
- (22) Lee, H., Jung, J., Han, S.-I. and Han, K.-H., 2010, "High-Speed RNA Microextraction Technology using Magnetic Oligo-dT Beads and Lateral Magnetophoresis," *Lab on a Chip*, Vol. 10, pp. 2764~2770.
- (23) Pamme, N., Eijkel, J. C. T. and Manz, A., 2006, "On-Chip Free-Flow Magnetophoresis: Separation and Detection of Mixtures of Magnetic Particles in Continuous Flow," *J. Magn. Magn. Mater*, Vol. 307, No. 2, pp. 237~244.
- (24) Hämäläinen, M. M., Eskosla, J. U., Hellman, J. and Pulkki, K., 1999, "Major Interference from Leukocytes in Reverse Transcription-PCR Identified as Neurotoxin Ribonuclease from Eosinophils: Detection of Residual Chronic Myelogenous Leukemia from Cell Lysates by Use of an Eosinophil-depleted Cell Preparation," *Clin. Chem*, Vol. 45, pp. 465~471.
- (25) Sambrook, J. and Russell, D. W., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn, Cold Spring Harbor laboratory Press, New York, Vol. 1.
- (26) Bousse, L., Cohen, Nikiforov, T., Chow, A., Kopf-Sill, A. R., Dubrow, R. and Parce, J. W., 2000, "Electrokinetically Controlled Microfluidic Analysis Systems," *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct*, Vol. 29, pp. 155~181.
- (27) QIAGEN, QIAamp[®] RNA Blood Mini Handbook: For Total RNA Purification from Human Whole Blood. 2nd edn, 2006.