Printed in the Republic of Korea
ANALYTICAL SCIENCE & TECHNOLOGY
Vol. 29, No. 2, 79-84, 2016
http://dx.doi.org/10.5806/AST.2016.29.2.79

Performance of MiniPCR™ mini8, a portable thermal cycler

Han-Sol Kwon, Hyun-Chul Park, Kyungmyung Lee, Sanghyun An, Yu-Li Oh, Eu-Ree Ahn, Ju Yeon Jung and Si-Keun Lim★

Forensic DNA Division, National Forensic Service, Wonju 220-170, Korea

(Received November 24, 2015; Revised March 20, 2016; Accepted April 20, 2016)

휴대용 DNA증폭기 MiniPCR™ mini8 Thermal Cycler의 성능 검토

권한솔 · 박현철 · 이경명 · 안상현 · 오유리 · 안으리 · 정주연 · 임시근★

국립과학수사연구원 법유전자과

(2015. 11. 24. 접수, 2016. 3. 20. 수정, 2016. 4. 20. 승인)

Abstract: A small and inexpensive thermal cycler (PCR machine), known as the MiniPCR™ Mini8 Thermal Cycler (Amplyus, Cambridge, MA, USA), was developed. In this study, the performance of this PCR machine was compared with the GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystems) using four autosomal short tandem repeat (STR) kits, a Y-chromosome STR kit, and a mitochondrial DNA HV1/HV2 sequence analysis. The sensitivity and stochastic effects of the STR multiplex kits and the quality of the DNA sequence analysis were similar between the two PCR machines. The MiniPCR™ Mini8 Thermal Cycler could be used for analyses at forensic DNA laboratories and crime scenes. The cost of the PCR is so economical that school laboratories and individuals could use the machines.

요 약: 최근 손안에 들어올 정도로 크기가 작아 범죄현장 등에서 사용이 가능하며, 다른 일반적인 장비들에 비해 가격이 1/10이하로 저렴하여 누구나 사용할 수 있는 MiniPCR™ mini8 Thermal Cycler (Amplyus, Cambridge, MA, USA)가 개발되었다. 본 연구에서는 DNA감식에 일반적으로 사용되고 네 가지 종류의 상염색체 STR 다중증폭 키트들과 한 종류의 Y 염색체 STR 증폭키트, 그리고 미토콘드리아 DNA HV1/HV2의 염기서열 분석법을 사용하여 MiniPCR™ mini8 Thermal Cycler의 성능을 Applied Biosystems사의 GeneAmp® PCR system 9700와 비교하였다. STR 다중증폭키트 키트들의 민감도와 증폭 불균형 정도를 비교한 결과 두 PCR 장비에서 큰 차이가 없었으며, 미토콘드리아 DNA HV1/HV2의 염기서열 분석 결과도 동등하였다. MiniPCR™ mini8 Thermal Cycler는 DNA 감식 실험실은 물론이고, 가격이 저렴해 학교와 개인이 간편하게 사용할 수 있으며, 휴대가 간편해 차량이나 야외에서 활용 될 수 있을 것으로 기대된다.

Key words: MiniPCR™ mini8 Thermal Cycler, GeneAmp® PCR system 9700, performance, STR multiplex kits, mtDNA HV1/HV2

★ Corresponding author
Phone : +82-(0)33-902-5721 Fax : +82-(0)33-902-5941
E-mail : neobios@korea.kr

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons. org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서 론

1983년 Kary Mullis에 의해 개발된 중합효소연쇄반응(PCR; Polymerase chain reaction)은 DNA의 일부분을 증폭시키는 기술로서 분자생물학 발전에 큰 영향을 끼쳐왔다[1]. PCR은 사용 목적에 따라 다양한 분석 방법이 개발되어 왔다.[2-4] DNA감식에 의한 개인식별과 신원확인은 법과학 분야에 혁명적 발전을 가져왔으며, 지문분석과 함께 막강한 도구로 자리 잡고 있다. 현재 STR좌위의 분석은 개인식별에 가장 유용하게 사용되는 DNA감식 수단이며,[5-7] PCR 증폭기는 성공적인 DNA감식을 결정하는 가장 중요한 장비 중 하나이다.

최근 미국의 스타트업 기업인 Amplyus사(Cambridge, MA, USA)에서 손 안에 들어올 정도로 크기가 작고, 스마트폰 어플을 이용해 PCR 증폭조건을 설정하고 모니터링 할 수 있으며, 기존의 일반적인 PCR장비에 비해 가격이 1/10정도로 저렴한 MiniPCR™ mini8 Thermal Cycler (이하 MiniPCR)를 개발하였다(*Fig.* 1).

Fig. 1. MiniPCR™ mini8 Thermal Cycler (source: http://www.minipcr.com)

본 연구에서는 MiniPCR의 성능을 현재 많은 DNA감식 실험실에서 사용 중인 GeneAmp PCR systems 9700 thermal cycler (Life Technologies, 이하 9700)와 비교해 보았다. 이를 위해 개인식별과 신원확인에 주로 사용되고 있는 상 염색체 STR 다중증폭키트인 AmpF*l*STR Identifiler amplification kit (이하 ID), AmpF*l*STR Identifiler Plus amplification kit (이하 ID plus), GlobalFiler™ PCR amplification kit(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, 이하 GF), PowerPlex® Fusion system (Promega, Madison, WI, USA, 이하 Fusion)과 Y 염색체 STR 다중증폭키트인 PowerPlex®Y23 system (Promega, Madison, WI, USA, 이하 Y23)를 사용하여 DNA 농도에 따른 증폭 민감도 및 대립유전자 증폭 불균형(Stochastic effect)정도를 분석하였다. 또한 분해된 시료 등과 모계 혈통 확인에 주로 사용되는 미토콘드리아 DNA의 HV1과 HV2의 염기서열을 분석하여 두 PCR 장비의 성능을 비교하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. DNA 시료

본 실험에서는 DNA감식의 표준 DNA인 2800M DNA (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하였다. DNA는 연속 2배 희석하여 1,000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 pg/μL의 농도로 준비하였다.

Table 1. Constitution of PCR mixtures and PCR protocols for STR Multiplex kits

		ID[a]	ID plus[b]	GF[c]	Fusion[d]	Y23[e]
Reagents (μL)	Master mix	6.3	8	7.5	5	5
	Primer Set	1.8	4	2.5	5	2.5
	Taq gold	0.3	-	-	-	-
	D.W.	4.6	6	13	13	15.5
	Target DNA	2	2	2	2	2
	Total Volume	15	20	25	25	25
PCR Protocol	Initial step	95 °C (11 min)	95° C (11 min)	95 °C (1 min)	96 °C (1 min)	9 5°C (2 min)
	Denaturation	94 °C (1 min)	94 °C (20 sec)	94 °C (10 sec)	94 °C (10 sec)	94 °C (10 sec)
	Annealing	59 °C (1 min)	59 °C (3 min)	59° C (90 sec)	59 (1 min)	61 °C (1 min)
	Extension	72 °C (1 min)			72 (30 sec)	72 °C (30 sec)
	Final	60 °C (60 min)	60 °C (10 min)	60 °C (10 min)	60 °C (10 min)	60 °C (20 min)

[a]AmpF*l*STR Identifiler amplification, [b]AmpF*l*STR Identifiler Plus amplification, [c]GlobalFiler™ PCR, [d]PowerPlex® Fusion system amplification, [e]PowerPlex®Y23 system

2.2. 증폭 및 모세관 전기영동

각 STR 다중증폭 키트들의 반응액 조성과 증폭 조건은 제조자의 지시에 따랐다(*Table* 1). 각 PCR 장비에서 증폭된 PCR 산물 1 μL에 GeneScan 600 LIZ size standard (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 0.4 μL 그리고 Hi-Di Formamide (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 9.6 μL를 혼합한 후, 3500 xl genetic analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 전기영동을 수행하였으며, GeneMapper ID-X 소프트웨어 v1.4 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)와 엑셀 프로그램(Microsoft)을 사용하여 결과를 분석 하였다.

2.3. 미토콘드리아 DNA HV1/HV2 염기서열 분석

미토콘드리아 DNA의 과변이부위(Hypervariable region)인 HV1과 HV2의 증폭과 염기서열 분석을 위

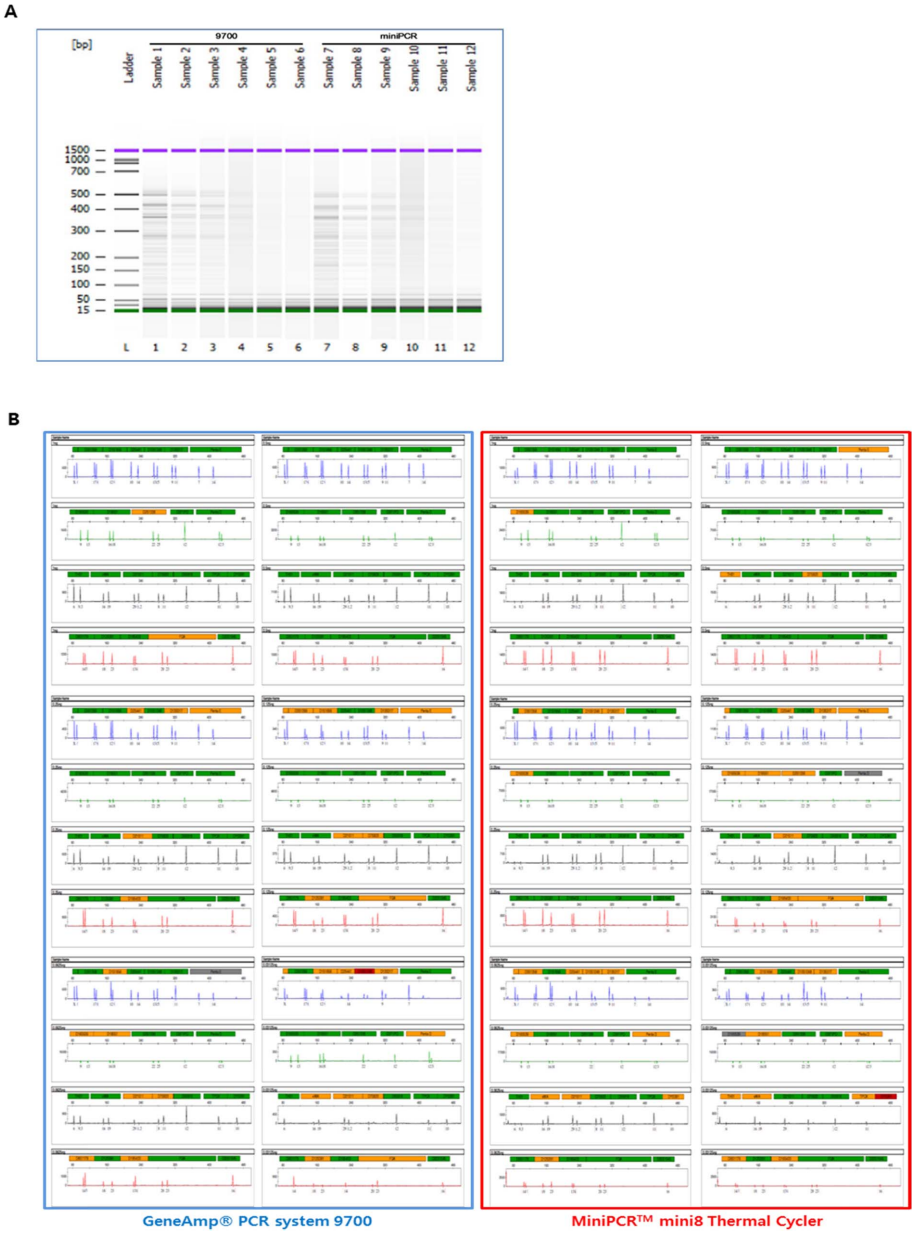

Fig. 2. PCR product (A) and plot of PowerPlex Fusion system(B) amplified by MiniPCR and 9700.

해 Gold ST★R 10X buffer (PROMEGA, Madison, WI, USA), AmpliTaq DNA polymerase 1.25 unit에 프라이머(F15910/R16410 및 F15/R484, 10 mM each)를 넣고 반응 시켰다.[8] PCR산물의 확인을 위해 Agilent DNA kits(Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) 및 Agilent 2100 Bioanalyzer를 사용하였다.

3. 결 과

3.1. 민감도

MiniPCR과 9700을 이용해 STR 다중증폭키트를 각 농도 별 표준 DNA시료에서 증폭한 후, 피크의 높이(peak height)와 대립유전자의 검출율을 비교하였다. Agilent 2100 Bioanaylzer를 이용해 확인한 PCR 증폭산물과 Genetic analyzer와 GeneMapper를 이용해 분석한 STR plot은 *Fig.* 2와 같다. 실험에 사용한 네 가지 종류의 상 염색체 STR 다중증폭키트들은 모두 31.25 pg/μL 이상의 DNA에서 MiniPCR과 9700사이에 피크 높이에 큰 차이 없이 성공적으로 증폭되었다(*Fig.* 3). 그러나 Y23 키트의 경우에는 MiniPCR에서 9700에 비해 상대적으로 낮은 피크 높이를 보여주었다. 또한 각 STR 다중 키트 별로 대립유전자 검출율을 비교한 결과 MiniPCR과 9700 사이에 큰 차이가 없었다(*Fig.* 4).

3.2. 대립유전자 증폭 불균형 분석

DNA의 농도가 낮을 경우에 나타나는 이형접합 대립유전자의 증폭 불균형 현상(stochastic effect)은 PCR 다중증폭키트는 물론이고 PCR 증폭기의 성능을 비교할 수 있는 기준이 된다. MiniPCR과 9700을 사용해 증폭한 다섯 가지의 STR 다중증폭키트 모두에서 이형접합 대립유전자 증폭 산물의 피크 및 좌위의 균형에 큰 차이가 없었다(*Fig* 5).

3.3. 미토콘드리아 DNA HV1/HV2 염기서열 분석

법과학 분야에서 미토콘드리아 DNA 분석은 오래되거나 변질되어 핵 DNA의 분석이 불가능할 경우나 신원확인을 위해 모계 혈통 분석이 필요한 경우에 사

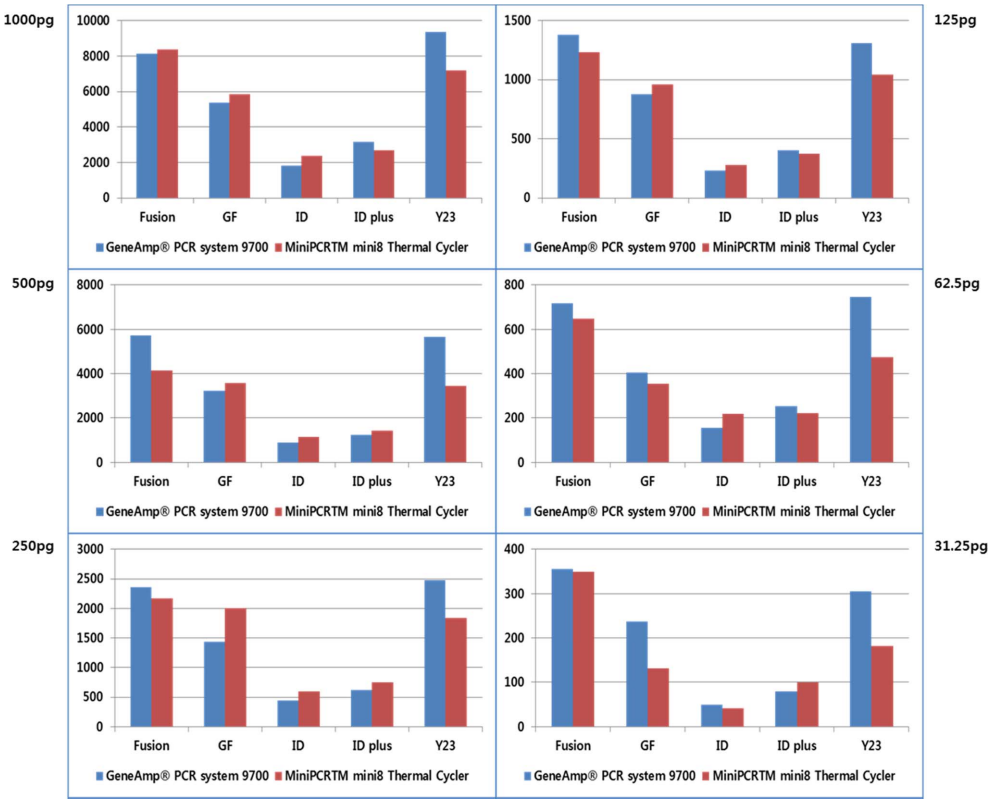

Fig. 3. Comparison of peak heights with regard to six STR multiplex kits using MiniPCR and 9700.

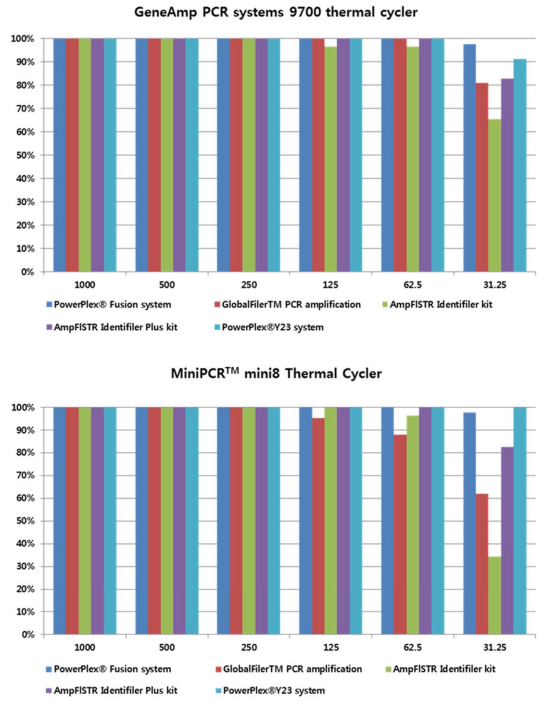

Fig. 4. Comparison of detected allele ratio with regard to five autosomal STR multiplex kits using MiniPCR and 9700.

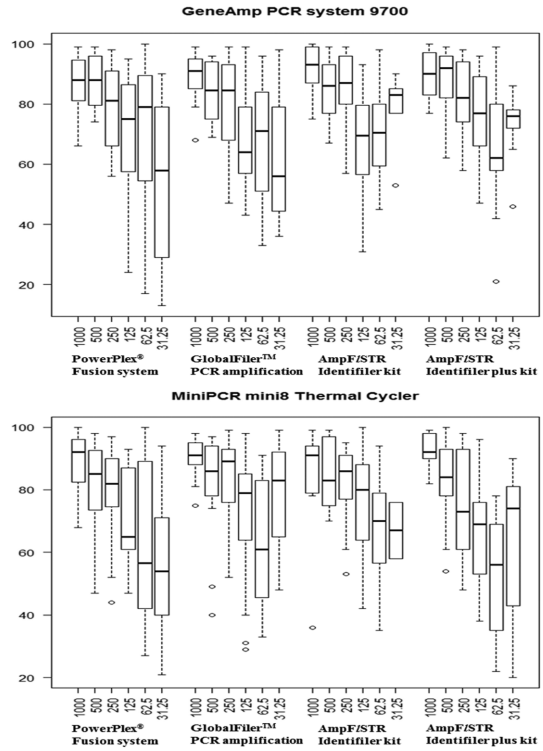

Fig. 5. Comparison of peak balance of heterozygous alleles from STR multiplex kits amplified by MiniPCR and 9700.

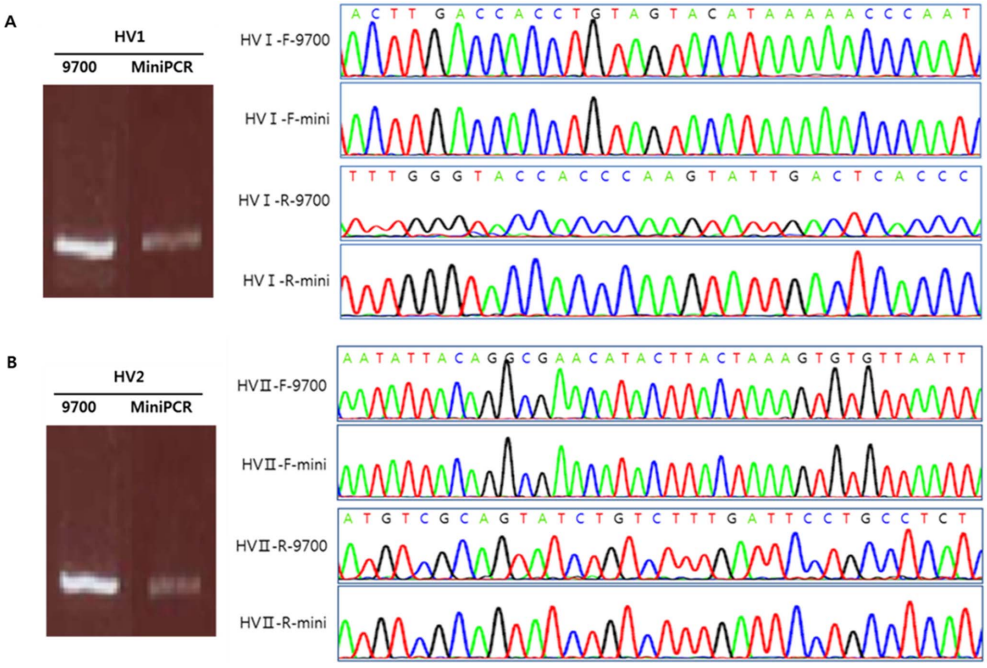

Fig. 6. PCR products and DNA sequence of mtDNA HV1(A), and HV2(B) amplified by MiniPCR and 9700.

용된다. 미토콘드리아 DNA의 HV1 (16024-16365)과 HV2 (73-340)은 사람마다 염기서열에 차이가 있는데, 염기서열 분석을 위해 먼저 PCR을 통해 두 부분을 증폭해야 한다. MiniPCR과 9700을 이용해 HV1과 HV2를 증폭한 후 염기서열을 분석해 비교한 결과, 모두 동일한 염기서열을 얻을 수 있었다(*Fig*. 6).

4. 고 찰

PCR은 DNA 감식은 물론이고 거의 모든 생명과학 분야에서 필수적인 분석 방법이 되었다. 지금까지 수많은 PCR 증폭기가 개발되어 실험실에서 사용되고 있는데, 대부분 가격이 비싸고 부피가 커서 실험실이 아닌 곳에서는 사용할 수 없었다. 본 연구에서는 작고 저렴한 MiniPCR 장비의 성능을 검토하기 위해 DNA 감식 실험실에서 개인식별과 신원확인을 하기 위해 일반적으로 수행되고 있는 STR 다중증폭과 DNA 염기서열 분석을 수행하여 기존의 일반적인 PCR 증폭기와 비교하였다. 본 연구에 사용된 STR 다중증폭키트들은 최소 15 개에서 23 개의 좌위를 동시에 증폭할 수 있는데, MiniPCR과 9700에서 거의 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 또한 두 장비를 사용해 미토콘드리아 DNA HV1/HV2의 염기서열 분석을 위한 PCR을 수행하여 그 결과를 비교한 결과도 큰 차이가 없었다. 본 연구에서 수행한 MiniPCR의 성능은 가격과 작은 부피를 감안하면 현재 사용되고 있는 고가의 PCR 장비를 충분히 대체할 수 있으며, 나아가 범죄현장 등 야외에서도 유용하게 사용할 수 있을 것으로 사료 된다.

감사의 글

이 논문은 정부의 재원으로 국립과학수사연구원 과학수사 감정기법 연구개발사업의 지원을 받아 수행한 연구임.

References

1. Bartlett, J. M. S. and Stirling, D. “A Short History of the Polymerase Chain Reaction”. *PCR Protocols*. Methods in Molecular Biology, **226** (2nd ed.). pp. 3-6. doi: 10.1385/1-59259-384-4:3. ISBN 1-59259-384-4 (2003).
2. Newton, C. R. Graham, A., Heptinstall, L. E., Powell, S. J., Summers, C., Kalsheker, N., Smith, J. C., and Markham, A. F., *Nucleic Acids Research*, **17**(7), 2503-2516 (1989).
3. Stemmer, W. P., Crameri, A., Ha, K. D., Brennan, T. M., and Heyneker, H. L., *Gene*, **164**(1), 49-53 (1995).
4. Hayden, M. J., Nguyen, T. M., Waterman, A., and Chalmers, K. J., *BMC Genomics,* **9**, 80, doi: 10.1186/1471-2164-9-80 (2008).
5. Bartlett, J. M. *J. Forensic Sci.,* **51**, 253-265 (2006).
6. Hammond, H. A., Jin, L., Zhong, Y., Caskey, C. T., and Chackraborty, R., *Am J. Hum. Genet*., **55**, 175-189 (1994).
7. Tautz, D., *Nucleic Acids. Res.*, **17**, 6463-6471 (1989).
8. Lee, E. J., Choung, C. M., Moon, S. H., Chung, J. Y., Jin, G. N., Kim, M. I., Lee, J. Y., Kim, S. H., and Lee, Y. H., *Korean J. Forensic Sci*., **15**(1), 87-90 (2014).