



검찰  
PROSECUTION SERVICE

# 상염색체 STR DNA감식키트의 개발 및 실용화

심정은<sup>1</sup>, 이은영<sup>2</sup>, 김세라<sup>3</sup>, 양영근<sup>3</sup>, 박수정<sup>1</sup>, 이승환<sup>1</sup>, 이승덕<sup>4</sup>, 신경진<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>대검찰청 디엔에이수사담당관실, <sup>2</sup>연세대학교 의과대학 법의학과  
<sup>3</sup>바이오퀘스트(주), <sup>4</sup>서울대학교 의과대학 법의학교실

## Introduction

2010년 범죄자 DNA데이터베이스가 구축 개시된 이래, 국내의 DNA감식 수요는 매년 빠른 속도로 증가하고 있다. 현재 데이터베이스 구축이나 사건 감정물 감식을 위하여 국내 대부분의 실험실에서 사용되는 DNA감식키트는 AmpFSTR Identifiler®(Applied Biosystems) 나 PowerPlex® 16 System (Promega)으로 모두 해외에서 개발된 고가의 상용 키트들이다. 본 연구에서는 DNA감식 비용 및 해외 수입 시약에 대한 의존도를 낮추기 위해 가칭 Kplex-15 상염색체 STR(Autosomal STR)감식키트를 개발하였다.

Kplex-15 시스템은 현재 국내의 DNA 데이터베이스 구축에 사용되는 13개의 CODIS STR 마커와 동아시아인에 대한 연구가 많이 수행된 D6S1043 마커, 그리고 Amelogenin을 한 번에 증폭할 수 있도록 구성되어 있으며, 분리된 DNA로부터 PCR을 수행하는 시스템과 DNA분리과정 없이 구강세포 시료로부터 직접 PCR을 수행할 수 있는 direct PCR 시스템의 두 가지가 모두 개발되었다. 특히 PCR 산물의 크기(amplicon size)가 기존의 상용키트에 비해 작아지도록 모든 마커의 프라이머를 새롭게 설계하여, 분해된 시료에 대해서도 상대적으로 개선된 결과를 얻을 수 있도록 하였다. 또한 PCR 완충액 및 DNA 중합효소는 모두 자체 개발된 시약을 사용하였으며, allelic ladder나 bin set 구축에는 한국인에게 존재하는 희귀 대립유전자들을 망라하여 적용하였다.

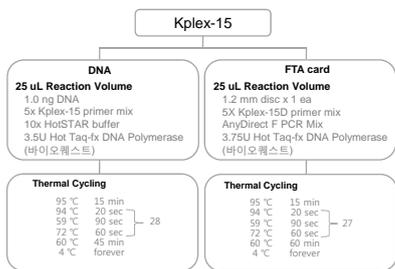
또한 본 연구에서는 개발된 Kplex-15 시스템을 실용화하기 위해, allele concordance, 민감도 실험, PCR 저해제 저항성 실험을 수행하였고, direct PCR성공률을 평가하여 DB 적용가능여부를 검증하였다.

## Materials and Methods

### Samples

: 한국인 830명의 시료 분석(DNA 367명, FTA card 463명)

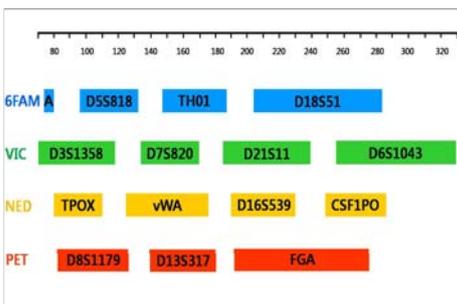
### PCR Amplification



### Amplicon Size Differences

Locus	Size differences relative to Kplex-15(bp)	
	Identifiler®	PowerPlex 16
Amelogenin X	+29	+29
Amelogenin Y	+32	+32
D5S818	+34	+19
TH01	+14	+6
D18S51	+46	+68
D3S1358	+27	+29
D7S820	+123	+81
D21S11	+1	+18
D6S1043	-	-
TPOX	+135	+180
vWA	+26	-3
D16S539	+63	+75
CSF1PO	+57	+43
D8S179	+44	+124
D13S317	+57	+21
FGA	+6	+118

### Kplex-15 System



- Kplex-15 : Sequence based size , 기존 상용키트보다 amplicon size를 작게 설계
- Identifiler, PowerPlex 16 : PCR product size (STRbase)

### Ladder, Panel, Bin set for Kplex-15 Analysis

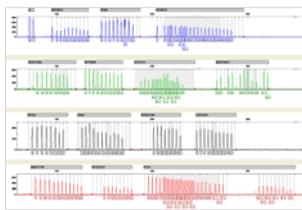
- Allelic ladder, Panel, Bin 제작
- 분석시스템 : Genetic Analyzer 3130xl  
GenMapperID v3.2 (Applied Biosystems)

### Kplex-15 and Kplex-15D(direct PCR) Validation

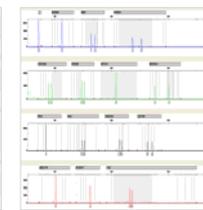
- 결과의 동일성 : 기존 상용키트(Identifiler)로 분석된 대립 유전자형과 비교
- 민감도 : 희석된 DNA(500 pg, 250 pg, 100 pg, 63 pg, 32 pg)를 사용
- PCR 저해제 저항성 : 휴믹산(humic acid)을 0 ng/μL, 50 ng/μL, 100 ng/μL, 150 ng/μL 사용
- 분석 성공률 조사 : Kplex-15D 시스템에 대하여 조사

## Results

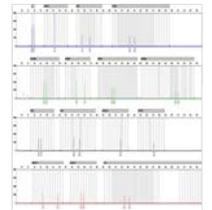
### Kplex-15 Allelic Ladder



### DNA Profile (Kplex-15)

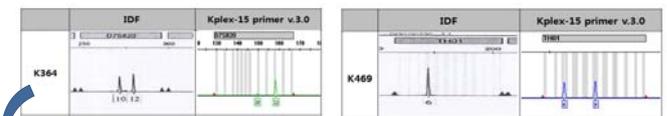


### DNA Profile (Kplex-15D)

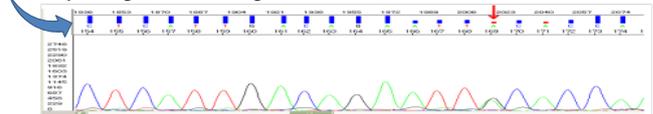


### Examples of Mismatch

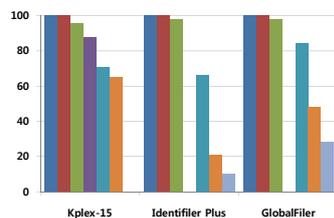
(Percentage: 0.73% (6/830))



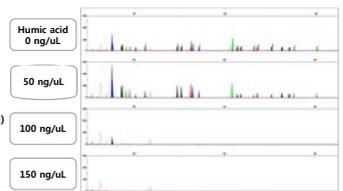
### Sequencing (Primer Binding Site Mutation)



### Effect of DNA Input



### Inhibitor Tolerance



Identifiler Plus & GlobalFiler data from product information  
Kplex-15 : control DNAs (Threshold=50RFU)

### Kplex-15D Success Rate

현 상	처 리	2 <sup>nd</sup> 분석결과(판정)	최종평가	1 <sup>st</sup> success	2 <sup>nd</sup> success	count
Bad injection	-	-	평가제외	-	-	4
Low yield (25~100RFU) dye blobs	Post-PCR 정제 →re-run	If, full profile(success)	2 <sup>nd</sup> success	-	8	8
		If, not(fail)	fail	-	-	15
Full profile (100RFU이상, pull-up peak 2이하)	-	-	1 <sup>st</sup> success	238	-	238
Off-scale (Pull-up peak 3이상, bad SQ)	Dilution →re-run	If, full profile(success)	2 <sup>nd</sup> success	-	39	39
		If, not(fail)	fail	-	-	6
No or extremely low peaks	DNA extraction	-	fail	-	-	0
OL/abnormal	Simple re-run	-	1 <sup>st</sup> success	2	-	2
<b>Total counts= (# of runs) - (# of bad injections)</b>						<b>308</b>
				1 <sup>st</sup> success rate(①)	77.9%	
				2 <sup>nd</sup> success rate(②)	15.3%	
				<b>Total success rate(①+②)</b>	<b>93.2%</b>	

## Conclusion

- Kplex-15 결과 동일성 : AmpFSTR Identifiler® primer binding site 차이에 의한 일부 변이를 제외하고 동일한 결과임(→ 향후 개선 예정).
  - Kplex-15 민감도: 100 pg의 미량 DNA 사용시 모든 마커에서 유전자형 검출됨. 상용키트와 비교 시 낮은 농도에서도 peak 검출률이 높음.
  - Kplex-15의 PCR 저해제 저항성: 50 ng/μL의 휴믹산 첨가 시 대립유전자형 소실 없이 모든 유전자형 검출.
  - Kplex-15 Direct PCR: 간단한 post-PCR 정제과정을 거치는 2차 분석을 포함하여 약 93.2%의 최종분석성공률을 나타냄.
- ⇒ 그러므로, Kplex-15 시스템은 기존의 상용 키트의 대체 혹은 보완 가능함.

Email address: 심정은 sje0720@spo.go.kr 신경진\* kjshin@yuhs.ac