

Evaluation of DNA Extraction Methods from Low Copy Number (LCN) DNA Samples for Forensic DNA Typing

Yong-Bin Eom[†]

Department of Biomedical Laboratory Science, Korea Nazarene University, Cheonan 330-718, Korea

DNA isolation for PCR-based short tandem repeat (STR) analysis is essential to recover high yields of amplifiable DNA from low copy number (LCN) DNA samples. There are different methods developed for DNA extraction from the small bloodstain and gloves, commonly found at crime scenes. In order to obtain STR profiles from LCN DNA samples, DNA extraction protocols, namely the automated iPrep[™] ChargeSwitch[®] method, the automated QIAcube[™] method, the automated Maxwell[®] 16 DNA IQ[™] Resin method, and the manual QIAamp[®] DNA Micro Kit method, were evaluated. Extracted DNA was quantified by the Quantifiler[™] Human DNA Quantification Kit and DNA profiled by AmpFISTR[®] Identifiler[®] Kit. Results were compared based on the amount of DNA obtained and the completeness of the STR profiles produced. The automated iPrep[™] ChargeSwitch[®] and QIAcube[™] methods produced reproducible DNA of sufficient quantity and quality from the dried blood spot. This two automated methods showed a quantity and quality comparable to those of the forensic manual standard protocols normally used in our laboratory. In our hands, the automated DNA extraction method is another obvious choice when the forensic case sample available is bloodstain. The findings of this study indicate that the manual simple modified QIAamp[®] DNA Micro Kit method is best method to recover high yields of amplifiable DNA from the numerous potential sources of LCN DNA samples.

Key Words: DNA extraction, low copy number (LCN) DNA, short tandem repeat (STR) analysis

서 론

각종 범죄 현장 증거물에서 유전자형 검출에 의한 개인식별은 범인의 사건 현장 존재여부를 확정하는데 중요하다. 그러나, 최근 들어 범죄 사건들이 첨단 지능화 되고 있어 범인이 증거물을 남기지 않으려 노력하거나 인위적으로 파괴하기 때문에 사건 현장에 남겨진 증거물에서 미량 (low copy number) DNA의 효과적인 분석이 더욱 중요해지고 있다. 또한 사건 현장에서 채취되어 유전자 분석의 대상이 되는 증거물은 그 양이 한정되어 있어 한번 사용되면 재 실험을 시행할 수 없는 경우가 많다. 예를 들어 범죄 현장에서 범인이 사용한 것으로 추정되는 면장갑이 발견되었을 때 장갑의 안쪽에 남아있는 미량의 피부 탈락세포로부터 사용자의 유전자 프로

파일을 확보하기 위해서는 단 한번의 실험으로 미량 DNA를 추출하여 용의자들의 개인식별에 사용하여야 한다 (Wichkenheiser, 2002). 범죄 현장에서 채취된 소량의 건조된 혈흔이나 범인이 남기고 간 장갑의 안쪽에서 유전자형 검출은 얼마나 많은 양의 온전한 DNA을 분리할 수 있는가에 따라 그 성패가 좌우된다. 따라서 다중 중합효소 연쇄반응 (multiplex PCR)에 기반한 단기일렬반복 (short tandem repeat, STR)의 법과학적 분석 과정에서 DNA 분리 과정이 가장 중요한 단계이다.

최근 범죄 현장의 법과학적 검체로부터 DNA 추출을 위한 다양한 방식의 자동화 장비가 개발되어 있다 (Moss et al., 2003; Nagy et al., 2005; Silva et al., 2003). 개인식별을 목적으로 하는 유전자 분석을 위한 DNA 분리 자동화 장비는 대량의 검체를 단시간에 처리할 뿐만 아니라 처리 과정에서 에러를 줄이는데 유용한 수단이 되고 있다 (Nagy et al., 2005).

사건 현장에서 채취되는 증거물에서 DNA 추출을 위한 여러 가지 자동화 기기 방법과 기준에 수행하여 오던 사람에 의한 DNA 추출 방법들을 비교 연구함으로써 유전자 감식의 효율성 향상에 도움이 되고자 하였다. 본 연

*Received: 30 July, 2009 / Revised: 1 September, 2009

Accepted: 18 September, 2009

[†]Corresponding author: Yong-Bin Eom, Department of Biomedical Laboratory Science, Korea Nazarene University, 456 Ssangyong-Dong, Seobuk-Gu, Cheonan 330-718, Korea.

Tel: +82-41-570-1482, Fax: +82-41-570-4260

e-mail: omnibin@kornu.ac.kr

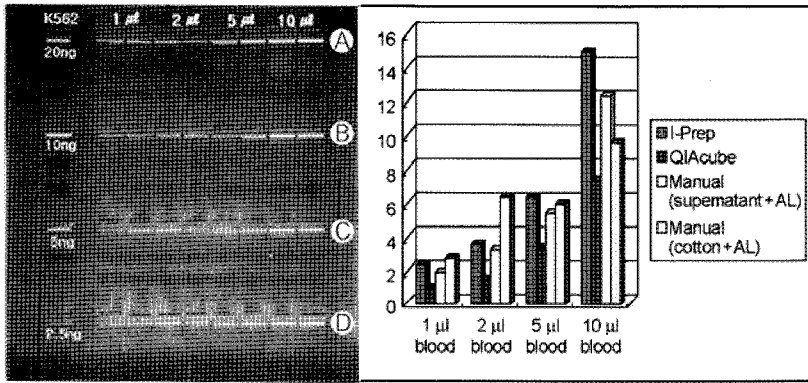


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis and real-time quantitative PCR results of DNA isolated from bloodstains. A, automated iPrep™ ChargeSwitch® method, B, automated QIAcube™ spin-column method, C, QIAamp® DNA Micro Kit (supernatant + AL buffer), D, QIAamp® DNA Micro Kit (cotton + AL buffer).

구에서는 전혈 1 µl, 2 µl, 5 µl, 10 µl씩을 멸균 면봉에 묻힌 후 건조시킨 것과 2시간 착용했던 면장갑의 안쪽을 닦은 면봉을 시료로 하여 자동화 iPrep™ ChargeSwitch® 방법, 자동화 QIAcube™ spin-column 방법, 자동화 Maxwell® 16 DNA IQ™ Resin 방법과 수기에 의한 QIAamp® DNA Micro Kit 방법들을 사용하여 DNA를 분리, DNA 회수율 및 유전자형 검출률을 비교 실험하였다.

재료 및 방법

1. 혈흔 및 면장갑 시료

전혈 1 µl, 2 µl, 5 µl, 10 µl씩을 각각 멸균된 면봉에 묻혀 건조시킨 것과 2시간 동안 착용했던 면장갑의 안쪽을 멸균 면봉으로 닦아 시료로 실험에 사용하였다. 이때 실험은 동일 시료에 대해 중복 실험을 원칙으로 하여 실시하였다.

2. 혈흔에서 DNA의 추출

iPrep™ ChargeSwitch® Forensic Kits (iPrep™ Forensic Cartridge Kit, ChargeSwitch® Lysis Buffer L13, Proteinase K 20 mg/mL, iPrep™ Sample and Elution Tubes, iPrep™ Tips, iPrep™ Tips Holders)를 iPrep™ Purification instrument (Invitrogen™, CA, USA)에서, QIAcube™ spin-column 방법은 QIAamp® DNA Micro Kit를 QIAcube™ (QIAGEN® Hilden, Germany) 자동화 기기에서, Maxwell® 16 DNA IQ™ Resin 방법은 DNA IQ Casework Sample Kit를 Maxwell® 16 LEV 장비 (Promega, WI, USA)에서 각각의 사용자 매뉴얼에 따라 Genomic DNA를 추출하였다.

3. 면장갑에서 DNA의 추출

2시간 동안 착용했던 면장갑 안쪽을 닦은 멸균 면봉에

서 QIAamp® DNA Micro Kit 사용자 매뉴얼 중, '용해 면봉에 직접 AL 완충액을 첨가하는 방법'과 '용해 상층액에 AL 완충액을 첨가하는 방법'으로 실험 방법을 각각 달리하여 실험을 실시하였다.

4. DNA 정량

추출한 DNA는 2% agarose gel에서 control DNA (K562)와 함께 전기 영동하여 육안으로 확인한 후, Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit (Promega, WI, USA)를 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, CA, USA)에서 사용하여 정량하였다.

5. DNA 프로파일링

정량된 DNA를 1 ng 농도로 맞추어 AmpFISTR® Identifier® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, CA, USA)의 사용자 매뉴얼에 따라 GeneAmp® 9700 system (Applied Biosystems, CA, USA)을 이용하여 증폭하였다. 증폭 산물의 유전자형은 ABI Prism® 3730/3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA)를 사용하여 분석하였고, DNA profiles은 GeneMapper™ ID Software를 사용하여 결정하였다.

결 과

1. 자동화 장비를 이용한 DNA 추출 방법의 비교

자동화 iPrep™ ChargeSwitch® 방법과 QIAcube™ spin-column 방법이 1 µl의 혈흔 면봉에서도 유전자형 분석에 필요한 충분한 양의 DNA를 재현성 있게 추출하였다 (Fig. 1). DNA 회수율은 자동화 iPrep™ ChargeSwitch® 방법 > QIAcube™ spin-column 방법 > Maxwell® 16 DNA IQ™ Resin 방법 순으로 확인되었다 (Data not shown).

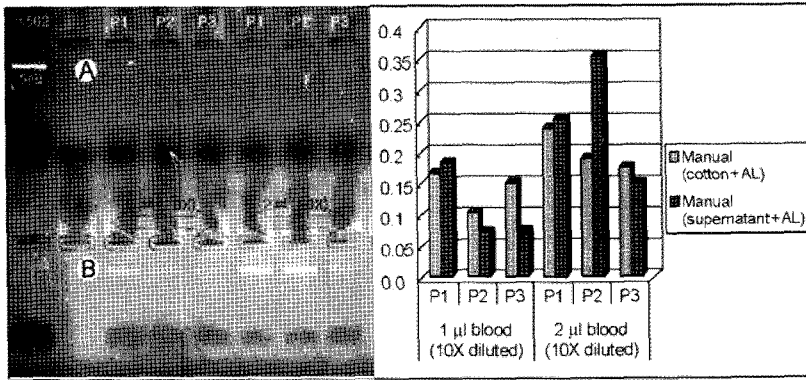


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis and real-time quantitative PCR results of DNA isolated from 10× diluted bloodstains by manual DNA preparation. **A.** manual QIAamp® DNA Micro Kit (supernatant + AL buffer), **B.** manual QIAamp® DNA Micro Kit (cotton + AL buffer).

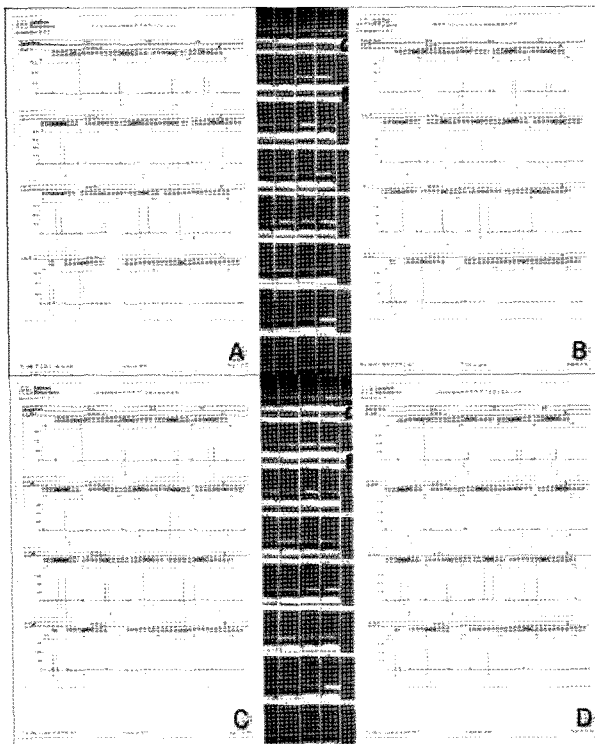


Fig. 3. STR profiling after automated and manual DNA preparation. DNA samples from bloodstains and gloves were analyzed on an ABI PRISM™ 3730 Genetic Analyzer after co-amplification of fifteen STRs plus the amelogenin system with AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplification Kit. **A.** automated iPrep™ ChargeSwitch® method, **B.** automated QIAcube™ spin-column method, **C.** manual QIAamp® DNA Micro Kit (supernatant + AL buffer), **D.** manual QIAamp® DNA Micro Kit (cotton + AL buffer).

2. 혈흔 면봉에서 수기에 의한 DNA 추출 방법

10배 희석된 혈흔 면봉에서 QIAamp® DNA Micro Kit 방법 중, '용해 면봉에 직접 AL 완충액을 첨가하는 방법'과 '용해 상층액에 AL 완충액을 첨가하는 방법' 사이에는 DNA 회수율이 유의한 차이를 보이지 않았다 (Fig. 2).

3. DNA 추출 방법에 따른 STR profiling

자동화 iPrep™ ChargeSwitch® 방법과 QIAcube™ spin-column 방법에 의해 1 µl의 혈흔 면봉에서 추출된 DNA와 2시간 착용 후 면장갑 안쪽을 닦은 면봉에서 QIAamp® DNA Micro Kit를 사용하여 수기에 의해 추출된 DNA 모두에서 성공적으로 DNA profiling을 얻을 수 있었다 (Fig. 3).

4. 면장갑에서 수기에 의해 추출된 DNA의 정량

2시간 착용 후 면장갑 안쪽을 닦은 면봉에서 QIAamp® DNA Micro Kit 방법 중, '용해 면봉에 직접 AL 완충액을 첨가하는 방법'보다 '용해 상층액에 AL 완충액을 첨가하는 방법'이 더 많은 DNA 회수율을 보였다 (Table 1).

고 찰

미량 (LCN) DNA 증거물로부터 DNA 회수율을 증가시키고 보다 완전한 유전자 프로파일 (DNA profiles)을 확보하기 위하여 적절한 DNA 추출 방법의 선택은 매우 중요하다.

대부분의 DNA 추출 자동화 시스템은 높은 DNA 회수율과 신속성 (McHale et al., 1991), 대용량 처리와 높은 품질의 DNA를 목표로 하였다 (Akane et al., 1994; Klintschar et al., 2000). 자동화 장비를 사용하여 DNA를 추출, DNA 회수율 및 유전자형 검출률을 비교 실험한 결과 iPrep™ ChargeSwitch® 방법 (iPrep™ purification instrument - iPrep™ ChargeSwitch® Forensic kit protocol), QIAcube™ spin-column 방법 (QIAamp DNA Micro Kit Handbook)이 1 µl의 혈액에서도 유전자형 분석에 필요한 충분한 양의 DNA를 재현성 있게 추출하였고 DNA profiles을 성공적으로 확인할 수 있었다. 따라서 사건 현장에서 채취한 소량의 혈흔에

Table 1. Real-time quantitative PCR results of DNA isolated from the gloves

Protocol	Individual	P1	P2	P3	P4
Manual (cotton+AL buffer) [†]		0.032 ng/μl	0.066 ng/μl	0.062 ng/μl	0.114 ng/μl
Manual (supernatant+AL buffer) [‡]		0.165 ng/μl	0.230 ng/μl	0.100 ng/μl	1.034 ng/μl

[†] AL buffer was added to the cotton and DNA was extracted by QIAamp[®] DNA Micro Kit manually,

[‡] AL buffer was added to the supernatant and DNA was extracted by QIAamp[®] DNA Micro Kit manually.

서도 DNA 분리를 위해 자동화 장비를 적용함으로써 유전자 감식의 효율성을 높일 수 있을 것으로 판단된다.

혈흔 면봉에서 QIAamp[®] DNA Micro Kit 방법 (QIAamp DNA Micro Kit Handbook) 중, '용해 면봉에 직접 AL 완충액을 첨가하는 방법'과 '용해 상층액에 AL 완충액을 첨가하는 방법' 사이에는 DNA 회수율이 유의한 차이를 보이지 않았지만, 면장갑 안쪽을 닦은 면봉에서 DNA를 추출하는 QIAamp[®] DNA Micro Kit 방법에서는 '용해 상층액에 AL 완충액을 첨가하는 방법'이 보다 많은 DNA 회수율을 보였다. 면장갑 같은 단순 접촉 (touch) DNA 증거물로부터 면봉을 이용한 DNA 추출 과정에서 면봉의 숨이 용해되어 세포부터 유리된 DNA를 물리적으로 잡아 DNA 회수율에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 따라서 사건 현장에서 수거된 면장갑 등의 미량 DNA 증거물 (LCN DNA samples)에서 QIAamp[®] DNA Micro Kit 방법을 사용하는 경우 '용해 상층액에 AL 완충액을 첨가하는 방법'이 보다 많은 DNA를 확보하는데 효율적일 것으로 판단된다. 그러나 혈흔과 같이 비교적 많은 양의 DNA가 있는 증거물에서는 DNA 추출 과정에서 상층액을 채취하는 과정을 생략함으로써 실험 과정의 신속성과 효율성을 높이고, 상층액을 채취하는 방법의 실험자간 차이로 인한 DNA 회수율 변동을 줄일 수 있을 것으로 판단된다.

혈흔 이외에도 사건 현장에서 채취된 모발, 담배꽂초, 컵, 음료수병 입구 및 출입문 손잡이 등 미량 (LCN) DNA 검체에서도 자동화 장비 적용 가능성을 위해 추가적인 실험이 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2009년도 나사렛대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

Akane A, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K.

Identification of the heme compound co-purified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains: a major inhibitor of the polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J Forensic Sci.* 1994. 39: 362-372.

AmpFISTR[®] Identifier[®] PCR Amplification Kit User's Manual. Foster City (CA). Applied Biosystems 2001.

DNA IQ[™] System - Small Sample Casework Protocol for Maxwell[®] 16. Madison (WI). Promega Corporation. 2007.

iPrep[™] purification instrument - iPrep[™] ChargeSwitch[®] Forensic kit protocol. Carlsbad (CA). Invitrogen Corporation. 2008.

Klitschar M, Neuhuber F. Evaluation of an alkaline lysis method for the extraction of DNA from whole blood and forensic stains for STR analysis. *J Forensic Sci.* 2000. 45: 669-673.

McHale R, Stapleton PM, Bergquist PL. A rapid method for the preparation of samples for PCR. *Biotechniques* 1991. 10: 20-22.

Moss D, Harbison SA, Saul DJ. An easily automated, closed-tube forensic DNA extraction procedure using a thermostable proteinase. *Int J Legal Med.* 2003. 117: 340-349.

Nagy M, Otremba P, Kruger C, Bergner-Greiner S, Anders P, Henske B, Prinz M, Roewer L. Optimization and Validation of a fully automated silica-coated magnetic beads purification technology in forensics. *Forensic Sci Int.* 2005. 152: 13-22.

QIAamp DNA Micro Kit Handbook. Valencia (CA). Qiagen. 1999.

Silva JT, Wong CY, Dileanis JL, Dunn CM, Imprim CC. Automated DNA extraction from frozen blood using the abbot M 1000 for HLA-DRB sequencing based typing. *Hum Immunol.* 2003. 64: 85-95.

Wickenheiser RA. Trace DNA: a review, discussion of theory, and application of the transfer of trace quantities of DNA through skin contact. *J Forensic Sci.* 2002. 47: 442-450.