醫工學會誌 : 第12卷, 第4號, 1991
J. of KOSOMBE : Vol. 12, No. 4

研究論文
91-12-4-04

개인용 컴퓨터를 이용한 PCR System 개발에 관한 연구

최 성 길

=Abstract=

A Study on the Development of the PCR System Using Personal Computor

Soung-Gill Choi

A system using a personal computer has been developed for Polymerase Chain Reaction, an amplifying process of specific DNA. This system is composed of software and hardware which contains a control system, a heating and cooling system, a multichannel A/D converter, and a personal computor. The software is programmed in assembly and basic language. The newly developed PCR system which is controlled by the program of the personnal computor can be applied to the amplification of various DNA. This system was tested by using Mycobacterium tuberculosis DNA and showed the DNA band on the UV transilluminator.

1. 서 론

중합효소 연쇄 반응(Polymerase Chain Reaction : PCR)은 1983년 미국 Cetus회사의 Kary B. Mullis에 의하여 처음 개발되었으며[1] 그 기본 원리는 관찰하고자 하는 세포나 미생물 등의 특정 DNA segment 양쪽 말단 부위와 결합할 수 있는 한쌍의 oligonucleotide primer를 사용하여 만든 2가닥의 DNA에 열을 가하여 변성시키는 denaturation과정과 denaturation되어 한 가닥으로 된 DNA를 첨가된 DNA 중합효소(polymerase)에 의하여 primer를 상보적인(complemetary) DNA sequence에 붙이는 annealing과정 그리고 이 primer로부터 다시 연장되어 증폭시키는 elongation과정으로 설명할 수 있으며, 그 반복 회수에 따라서 특정 DNA sequence에 붙이는 annealing과정 그리고 이 primer로 부터 다시 연장되어 증폭시키는 elongation과정으로 설명할 수 있으며, 그 반복 회수에

〈접수 : 1991년 11월 15일〉
전남대학교 의과대학 · 병원 의공학실
Dept. of Biomed. Eng. College of Medicine and Hospital, Chonnam National University

따라서 특정 DNA를 2^n만큼 증폭시킬 수 있어 30회 정도 반복하면 수억배 이상으로 증폭된 DNA를 얻을 수 있게 된다. 따라서 극소량의 DNA로부터 얼마든지 원하는 양의 DNA를 얻을 수 있게 되므로 증폭된 DNA는 손쉽게 적당한 벡터에 클로닝할 수 있다[2, 3].

PCR system의 가장 주요한 부분은 증폭시키기 위하여 반복하는 온도 cycle을 조절하는 것으로 30회 반복되는 시간이 일반적으로 5시간 정도 필요한 것으로 보고 되었다. 이것은 종래 클로닝 방법으로 몇 주일 이상 걸리던 것에 비하면 불과 하루만에 해결할 수 있게 된 것이므로 PCR은 최근 수년간에 질병의 진단, 유전자 지도 작성, AIDS 연구, 생물의 진화, 법의학 등에 사용되고 있다[3, 4, 5, 6, 7]. 그러나 최근에 짧은 시간내에 핵산을 증폭시켜 검사흐는데 소요되는 시간을 줄이면 열에 의한 damage를 줄일 수 있고 응용하기에 편리함이 보고되었다[8]. 따라서 본 연구에서는 개인용 컴퓨터를 사용하여 필요한 조건의 온도 cycle을 대화 방식으로 설정하고 moniterring하면서 자동 조절될 수 있도록 system을 구축하여 PCR방법에 적합한 denaturation, annealing 그리고 elongation의 온도와 시간 등의 조건을 찾아내고 응용할 수 있는 개발 system을 제작하였다. 그리고 결핵균 DNA를 증폭하여 증폭된 DNA band를 관찰함으로써 제작된 PCR system의 유용성을 확인하였다.

2. 실험 및 방법

2·1 SYSTEM. 구성원리

PCR 방법을 이용한 DNA 증폭장치의 가장 중요한 부분은 시료를 원하는 온도로 조절하는 것이다. 온도조절이라 함은 일정한 시간동안 원하는 온도에 도달시키는 것과 원하는 온도를 일정하게 유지시키는 것을 말하며 두 종류의 열에너지가 필요하게 된다. 그중 온도를 주위의 온도(T_1)에서 원하는 온도(T_2)까지 올리는데 필요한 열(Q)은 식1과 같이 주어진다.

$$Q = C \cdot \triangle T \qquad (1)$$

여기서 C는 온도를 올리고자하는 물질의 heat capacity이고 $\triangle T = (T_2 - T_1)$이다. 그리고 외부에서 필요한 열이 공급될 수 있도록 조절할 수 있는 것은 단위 시간당 열, 즉 $P = dQ/dt$, 이다. 그러므로 원하는 온도까지 올리기 위하여는 식 2와 같은 시간의 함수를 갖는 단위 시간당 열이 필요하게 된다.

$$P_u = a[T_2 - T(t)] \qquad (2)$$

여기서 a는 상황과 주위 환경에 따라 정해지는 비례 상수이며 T(t)는 시간에 따라 변화하는 시료의 온도이다.

또한, 주위로 향하는 열 흐름이 발생하므로 원하는 온도를 유지하려면 이를 보충해야 할 단위 시간당 열(P_{in})이 필요하게 되는데 이는 식 3와 같이 주어진다.

$$P_{in} = b[T_2 - T(t)] \qquad (3)$$

여기서 b는 주위 환경에 의하여 결정되는 비례 상수이다.

그리고 온도의 급격한 변화는 필연적으로 열 관성에 의한 온도의 진동을 수발하게 되므로 이것을 방지하기 위해서는 온도의 변화속도를 관찰하여 이 속도의 역으로 비례하는 열을 시료에 가함으로써 달성할 수 있으며 식 4와 같이 표현될 수 있다.

$$P_d = -D \cdot dT/dt \qquad (4)$$

여기서 D는 주위 환경에 따른 상수이고 -부호는 온도의 변화속도, dT/dt, 에 역으로 작용하는 것을 나타내고 있다.

그러므로 총 단위 시간당 열량(P_t)은 식 5와 같이 주어진다.

$$P_t = P_{in} + P_u + P_d \qquad (5)$$

따라서 사용하고자 하는 시료의 양과 시료의 holder 열용량을 고려하여 식 5의 총 단위 시간당 열량에 적합하도록 자체 제작한 가열장치와 냉각장치를 사용하여 온도와 시간을 monitering하면서 대화 방식으로 조절할 수 있도록 개발 system을 제작하여 실험하였다.

2·2 시료의 가열 및 냉각장치 제작

시료의 온도를 빠른 시간내에 조절하기 위해서는 가열장치와 시료 holder의 열용량이 가능한 최소화되어야 한다. 그러나 가열장치와 시료의 holder열용량이 너무 적으면 주변 변화와 시료의 양에 따라 영향을 크게 받으므로 시료들에 균일하

게 전달될 수 있도록 열 전도가 가장 좋은 silver를 사용하여 20개의 시료 열용량의 약 1000배가 되도록 제작하였으며 식 5에 적합한 열량을 낼 수 있도록 특별히 코안한 150 watt heater를 사용하였다. 또한 냉각장치는 온도범위(상온－100℃)내에서 식(4)의 P_d에 알맞도록 냉각 팬(3200/rpm, 2.54m³/min.)을 선택하여 사용하였다.

2 · 3 Control system 제작 및 software 개발

Control system은 온도를 측정하여 증폭하는 증폭회로와 상온 보정회로 그리고 컴퓨터로부터 나오는 신호를 받아 비교하는 비교회로 등으로 구성하였으며 온도 측정은 시료와 함께 넣어둔 thermocuple(K－type)을 이용하였다. 그리고 가열장치와 냉각장치는 12 bit multichannel A/D converter를 이용하여 컴퓨터와 연결하였다.

그림 1은 system전체의 block diagram이며 사진 1은 제작된 system의 사진이다. 온도 조절용 software는 측정된 주위 온도에 따라 프로그램을 조절할 수 있도록 하였으며 시료의 온도를 monitoring하고 가열장치와 냉각장치를 구간별로 조정할 수 있도록 대화 방식으로 구성하였다.

사진 2－a는 IBM 호환 기종이면 사용가능 하도록 basic program으로 짜여진 menu를 나타낸 것으로 step인 denaturation온도를 대화 방식으로 설정

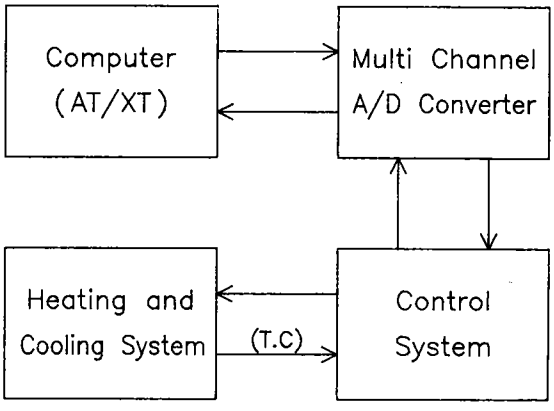

그림 1 시스템 구성도

Fig.1 System block diagram

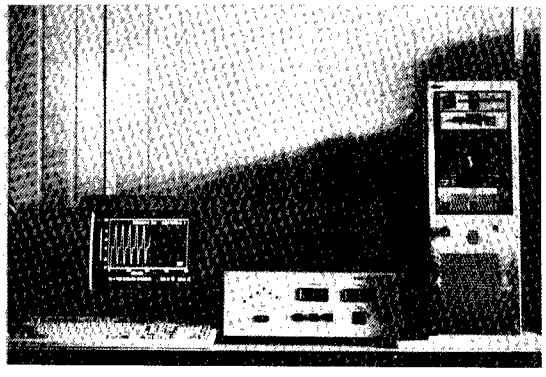

사진 1 구성된 시스템 사진

Photo.1 System picture

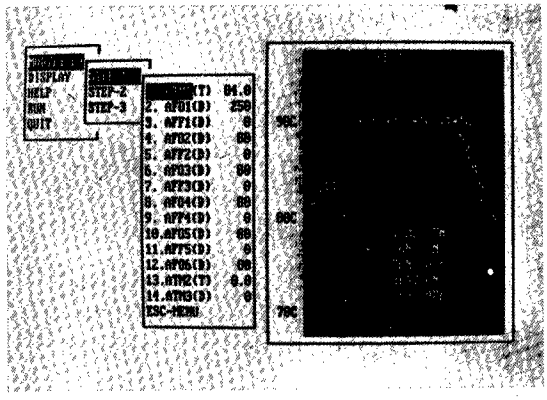

사진 2(a) PCR의 온도주기를 수정하고 시뮬레이션 하기 위한 메뉴스크린

Photo.2(a) Menu screen for modification and simulation of PCR temperature cycle

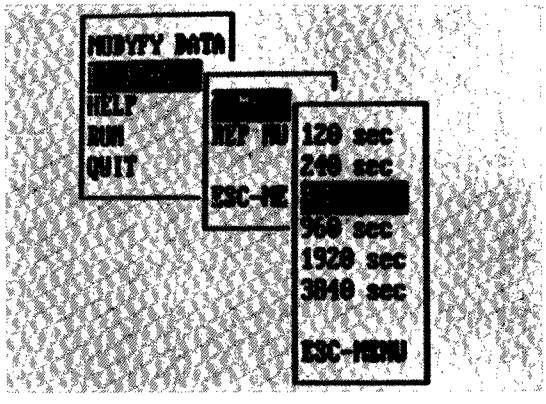

사진 2(b) 감시 시간의 설정을 위한 메뉴 스크린

Photo.2(b) Menu screen for modification of monitoring time

하거나 수정할 수 있도록 선택되어진 것을 보여주고 있다. 사진 2-b는 반복되는 시간에 따라서 전체 횟수를 설정하거나 monitering할 수 있는 총 시간을 선택할 수 있고 이에 따라서 사진 3이나 사진 4에서 보여주는 X축의 시간 좌표를 결정하거나 수정할 수 있도록 되어 있음을 나타내고 있다.

3. 실험 결과및 고찰

PCR system의 가장 핵심된 부분은 정확한 온도 조절이며 이 과정은 일반적으로 3단계로 구성이된다. 첫번째 단계는 DNA의 변성 단계로써 DNA templates들이나 DNA template와 PCR 산물들을 해리시키는 것이며 일반적으로 DNA를 변성시키는 온도는 95℃부근으로 더 높은 온도를 필요로 하는 경우도 있다. 높은 해리 온도에서는 순시간에 변성이 일어나지만 해리 온도에 도달하려면 지체 시간이 필요하게 되는데 만약 이 과정에서 불완전 변성이 일어나면 DNA가 두 가닥으로 나누어지다가 중단하고 반응 산물의 생산량이 감소되며, 변성시키는 온도가 너무 높거나 너무 길면 효소 손실이 야기되므로 시료에 적합한 온도와 시간이 유지되어야 한다. 변성 다음 단계는 primer annealing을 시키는 단계로 온도가 낮으면 primer가 잘못 붙은 핵산이 만들어지므로 annealing온도를 정확하게 함으로써 특이성(specificity)를 올릴 수 있으며 일반적으로 annealing온도는 55℃일때가 좋은 것으로 알려져 있다. 그리고 마지막 증폭 단계에서는 elongation시키는 온도를 보통 72℃로 하며 지속시간은 증폭 하고자하는 DNA부분의 길이와 용도에 따라서 달라진다[3].

사진 3은 Carl T. Witter등이[8] 최근 보고한 human genomic DNA의 PCR에 적용한 optimal temperature 조건(denaturation, <1s, 92±1 ℃ ; annealing, <1s, 55±1℃ ; and elongation, 10s 72±2 ℃)과 유사하게 본 연구에서 제작된 PCR 개발 system을 simulation하여 monitering한 것을 나타낸 것으로 elongation시간 동안 온도 변화의 오차가 적고 반복 시간의 정확도가 좋음(denaturation, <1s 92±0.5 C ; annealing, <1s, 55±0.5 C ; and elongation, 10s, 72±1 C)을 알 수 있었으며 20-25분 정도의 시간이 소요되었다.

사진 4는 제작된 PCR개발 system을 실험하기 위하여 본교 의과대학 미생물학 교실에서 결핵균 DNA를 PCR할때 monitering한 온도 cycle을 나타낸 것으로 조건은 denatuaration, 10s, 93℃ ; annealing, 5s 55℃ ; and elogation, 30s, 72℃,으로 조절된 것이며 소요시간은 45분 정도였다.

사진 5은 사진 4에서 monitering된 PCR방법으

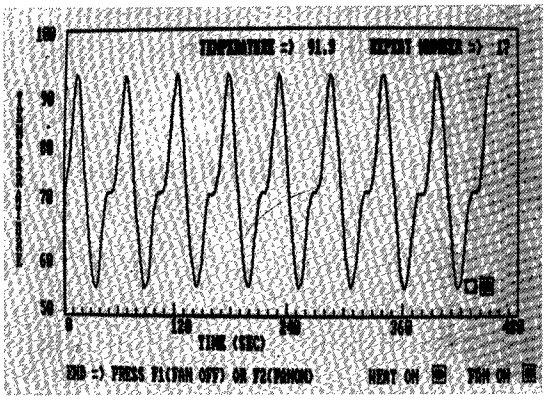

사진 3 최적온도 조건으로 시뮬레이션한 PCR감시 스크린

Photo.3 PCR monitoring screen simulated by optimal temperature condition. (denaturation, <1s, 92℃ ; annealing, <1s, 55℃ ; elongation, 10s, 72℃)

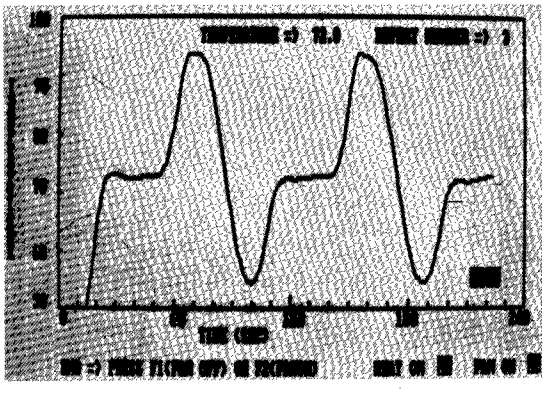

사진 4 결핵균 DNA를 증폭하기 위하여 사용한 PCR감시 스크린

Photo.4 PCR monitoring screen for amplification of Mycobacterium tuberculosis DNA

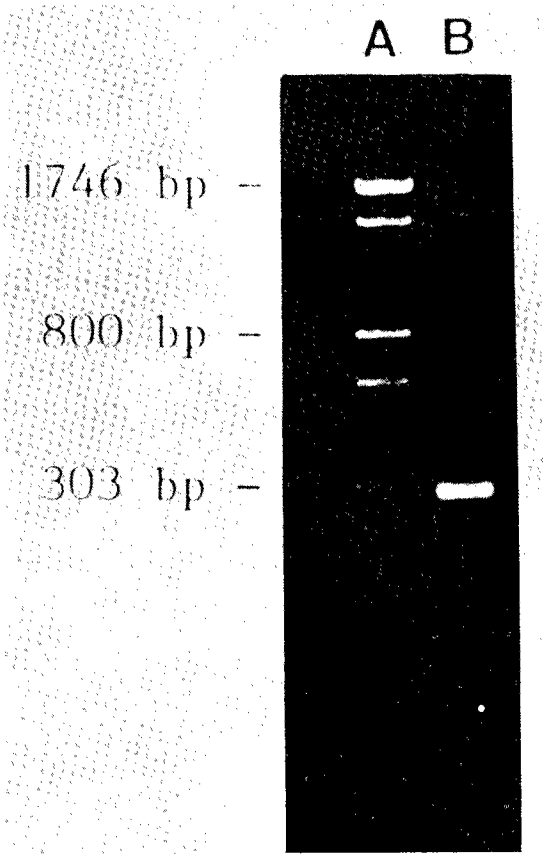

사진 5 제작된 PCR시스템을 사용하여 증폭한 결핵균DNA 벤드

Photo.5 DNA band of Mycobacterium tuberculosis amplified by PCR system

로 증폭한 결핵균 DNA를 확인하기 위하여 전기영동시켜 자외선 투사기 상에서 관찰된 328base pairs의 DNA band를 UV Photographic Apparatus (Polaroid, Cambrige, MA, USA)를 사용하여 찍은 사진으로 A는 DNA size standard이며 B는 증폭된 결핵균의 DNA band를 나타내고 있으며 또한 이 system의 유용성을 입증하고 있다.

따라서 본 연구에서 제작한 개인용 컴퓨터를 이용한 PCR개발 system은 시료의 조건에 따라서 자유로이 온도 cycle을 simulation하여 사용할 수 있고, 지금까지 보고된 system들과 비교하여 상대적으로 오차가 적으므로 새로운 시료나 다른 hardware적인 조건에 대하여 광범위하게 응용할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 더욱 짧은 시간대의 PCR방법을 구현하기 위해서는 새로운 가열장치와 시료 holder등을 개발하여 system열용량을 줄이고 system의 시료 holder와 시료사이의 열 교환이 잘되도록 시료 container의 형태와 재질 등을 개발하여야 할 것이다.

4. 결 론

본 연구에서 제작한 PCR을 위한 개발 system은 개인용 컴퓨터를 이용하여 구축하였고 이 system은 여러 조건의 PCR들에 대한 온도 cycle을 simulation할 수 있으며 hardware부분인 가열 system과 냉각 system의 변화에도 대응할 수 있는 개발 system이다. 따라서 시료의 용량과 수량 그리고 시료를 넣는 용기에 따라 변화하는 열용량에 적합하게 대응할 수 있으며 제작된 system은 100μl짜리 20개를 30회 반복하는 PCR을 20분 정도이면 실행할 수 있다. 그리고 제작된 PCR개발 system을 이용한 결핵균 DNA에 대한 실험을 통하여 증폭된 결핵균 DNA band를 관측함으로써 개발 system의 유용성을 확인할 수 있었다. 본 연구는 현재 계속 진행중에 있으며 이 개발 system의 사용자가 의료분야의 종사자이거나 컴퓨터 비전문가임을 감안하여 효율적으로 사용할 수 있도록 간편한 system을 구성중이다.

> 감사의 글 <

본 연구를 위하여 조언을 아끼지 않고 system의 실험을 도와주신 본교 미생물학 교실의 오종석 교수님께 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1) Saiki R.K. et al., "Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for diagnsis of Sickle Cell Anemia", Science, Vol. 230, pp.1350-1354, 1985.
2) Saiki R.K. et al., "Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostatable

DNA Polymerase", Science, Vol.239, pp.487－491, 1988.

3) Saiki R.K. et al: PCR Technology. Erlich H.A., Stockton Press, New York, 1989.

4) Ou C.Y. et al., "DNA Amplification for Direct Detection of HIV－1 in DNA of Peripheral Blood Mononuclear Cell", Sciencce, Vol.239, pp.295－297, 1987.

5) Wrischnik L.A., Higuchi R.C., Stoneking M., Erlich H.A., Arnheim N. and Wilson A.C., Nucleic Acid Research, Vol.15, pp.529－542, 1987.

6) Chehab F.F., Doherty M., Cai S., Kan Y.W., Cooper S. and Rubin E.M., "Detection of Sickle Cell Anaemia and Thalassaemias", Nature, Vol.329, pp.293－294, 1987.

7) Levinson B., Janco R., Phillips J. and Gitschier J., Nucleic Acid Research, Vol.15, pp.9786－9797, 1987.

8) Wittwer C.T., Fillmore G.C. and Garling D.J., "Minimizing the Time Required for DNA Amplification by Efficient Heat Transfer to Small Samples", Analytical Biochistry, Vol.186, pp.328－331, 1990.