# 치아에서의 DNA 분석에 의한 개인식별

조선대학교 치과대학 구강진단 · 구강내과학 교실

윤 창 륙

국립과학수사연구소 · 연세대학교 치과대학 구강내과학 교실

김 종 열

목 차

Ⅰ. 서 론
Ⅱ. 연구재료 및 방법
Ⅲ. 연구성적
Ⅳ. 총괄 및 고찰
Ⅴ. 결 론
참고문헌
영문초록

## Ⅰ. 서 론

법의학 분야에서 개인식별은 대단히 중요한 과제이다. 법의치과학 전문가들에게 주로 감정 의뢰되는 백골화된 사체나 분쇄되어 단지 사체의 극히 일부만 잔존한 경우 성별검사를 포함한 개인식별은 법의치과학적 난제라 할 수 있다.

성별감정은 최근까지 다른 뚜렷한 증거가 없는 경우, 두개골, 골반골을 비롯한 전체 골조직의 특징[75]과 치아를 검사하는 방법이 주로 이용되어 왔다. 이 중 치아를 이용한 방법으로는 치아의 크기 등에 대한 계량통계학적 분석[11,23,46], 법랑질의 분광투과율[87], 상아질 비중[89], 상아질이나 치조골내 유기질 분해후 산에 의한 중화량측정 등의 방법[88]이 있으나, 치아에서의 성별추정시 일치하지 않는 경우가 가끔 있고[2] 두개골을 이용한 성별판정도 불확실한 경우가 있음[48]이 보고되었다. 좀 더 확실한 방법으로 Barr[9]가 성숙한 자성고양이의 설하 신경세포핵중 성염색질의 존재를 제창한 후 성염색질은 여성의 체세포 핵중에 있고 핵막과 접하여 반구상의 돌기물질로 존재하는 것으로 밝혀져[48] 체세포를 이용한 성별추정에 대한 여러 연구가 진행된 바, 末永[86], Dixon & Torr[19], 横山[90]등은 치수세포의 성염색질을 성별판정에 이용하여 세포핵중 성염색질이 높은 배율로 검출될 경우 여성으로, 극히 일부만 검출되거나 검출되지 않을 경우 남성으로 판정하였다. 그러나 이 방법에 의한 남성판정은 음성소견에 의하기 때문에 증거로서 설득력이 미약하다 할 수 있다. 반면, Caspersson[14]등은 사람의 Y염색체가 다른 염색체들 보다 자외선하에서 훨씬 뚜렷하게 관찰되어 남성세포핵내 Y염색체의 long arm의 말단부위가 quinacrine dihydrochloride와 선택적으로 잘 결합하여 자외선하에서 강한 형광을 발하여 뚜렷이 관찰됨을 밝히고 이를 fluorescence body(F-body)라 하였으며, Seno와 Ishizu[64,65], Whittaker[79], 박[95]등은 이 방법을 성별판정에 응용하여 남성에서는 F-body 출현률이 높았으나 여성에서는 거의 발견할 수

*이 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

없었다고 보고하였다. 이 방법 역시 여성판정은 음성소견에 의한다는 단점이 있다.

이러한 성별검사는 보통 생물학적 시료에서 핵분열 중간기의 세포핵내에서 성 특이성이 있는 염색질검사를 시행하는 것인데 염색질 수준에서 비특이적인 형태가 존재하고, 정상 남녀에서 Y, X chromocenter가 반드시 존재해야 하며, 개체의 성별과는 관계 없는 염색질과 유사한 구조가 종종 존재한다[72]는 약점이 있고, 성염색질이나 F-body 검사가 매우 정확한 방법이라 할지라도 시간경과에 따른 부패는 필연적 수순으로 세포핵이 붕괴될 경우 판정이 어려운 경우가 많은 것이 사실이다.

그러나 1980년대 들어 DNA수준에서의 유전적 변이(genetic variation)분석은 유전자와 유전병 지도 작성뿐만 아니라 극히 소량의 법의학적 시료로부터 성별감별, 개인식별이 가능하게 되어 이러한 문제점들이 해결되었으며 생물학적 증거물의 분석은 분자수준에서 검사하는 방법으로 발전되었다.[24,25,32 35,78]

1953년 Watson과 Crick[76]이 DNA의 2중 나선구조를 규명한 이래 분자생물학은 급속히 발전하여 단백질(total protein)이나 동위효소(isoenzyme)의 분석에 의존해 왔던 사람 핵게놈(human nuclear genome)에 대한 유전정보의 간접적인 분석으로 부터 실제로 게놈을 구성하고 있는 DNA분석을 가능하게 함으로써 유전자의 구조나 기능을 보다 심도있게 이해할 수 있게 되었고 의학, 생물학 및 법의학 분야에 커다란 전기가 마련되었다.

1970년 Smith와 Wilcox[67]에 의하여 DNA염기배열중에서 특정 염기부위만을 인식하여 그 부위를 절단시키는 제한효소(restriction enzyme)가 발견됨으로써 DNA다형성에 대한 연구가 급진전되었다. 즉, 유전자 재조합기술(recombinant DNA technology)와 유전자클로닝(gene cloning)기법은 한두개의 유전자 연구에서 한 개체에 존재하는 게놈전체에 대한 연구로 발전시켰을 뿐만 아니라 DNA수준에서의 다형성분석이 가능하게 되었다.

DNA염기배열은 생물 종간, 동일한 종이라도 개체간에 많은 차이가 있다는 사실이 밝혀지고[8,78] 돌연변이에 의하여 DNA염기배열에 변이가 일어날 수 있기때문에 제한효소를 이용하여 DNA를 절단할 경우 길이가 서로 다른 DNA단편들이 생성되며[35] 이러한 DNA 다형이 단편길이다형(Restriction Fragment Length Polymorphism(RFLP))으로서 단편들은 멘델의 유전법칙에 의하여 유전된다는 사실도 규명되었고 염색체 DNA(genomic DNA)를 제한효소로 절단한 후 생성되는 RFLP를 확인함으로써 DNA수준에서의 개인식별뿐만 아니라 유전질환의 진단 및 원인유전자를 규명하는 것이 가능하게 되었다.

유전자 분석법의 발달에 따라 사람 성염색체의 구조도 점차 규명되었으며 Y염색체는 사람 반수체 게놈(human haploid genome)중 약 2%를 차지하며 4-6 x $10^7$ base pairs(bp)크기를 갖고 있으며 long arm(Yq)의 이염색질부(heterochromatic region)와 short arm(Yp), 중심절 및 long arm의 일부분을 차지하는 진정염색질부(euchromatic region)등 두 부분으로 구분된다.[22,26,63] Yq 이염색질부에는 Y염색체에 특이성이 있는 반복 DNA family인 DYZ 1 sequence와 DYZ 2 sequence가 존재하는데 이중 DYZ 1은 남성 게놈을 Hae Ⅲ[13,16]로 처리할 경우 3.5 kb크기에서 나타나고 Y염색체상에 800-5000 copy로 존재한다.[52,77] Lau등[43]은 DYZ 1의 DNA단편을 클로닝하고 DNA probe(pY3.4)를 이용하여 DNA수준에서의 태아 성별검사를 처음으로 시도한 바 있다. 법의학적 분야에서는 pY3.4 나 pHY10과 같은 DYZ 1 sequence로부터 추출한 DNA 소식자(probe)를 사용하여 Y 염색체를 검색하여 성별검사를 시도한 많은 보고가 있다.[3 5,21,27,38,63,71,72]

이러한 성별검사는 Y 염색체에 특이성이 있는 탐침[16]을 사용하여 처음에는 주로 southern-hybridization, dot blot hybridization이나 in situ hybridization 법으로 검사하였으나 false-negative를 배제할 수 없는 단점이 있어, 최근에는 치아발생기에 법랑질을 만드는 amelogenin gene을 남녀가 다르게 나눠 가짐이 밝혀져[3,51,52,68] 이 유전좌위를 polymerase chain reac-

tion(PCR)으로 증폭하여 pg단위의 소량의 DNA에 의해서도 성별판정이 가능하게 되었다.

한편, Jeffrey[24,32,35]등이 사람의 myoglobin gene의 염기배열을 연구하던중 우연히 DNA의 염기구조에는 손가락 문형인 지문과 같이 각 개체마다 서로 다른 유전 표식자, 즉, RFLP patterns가 존재한다는 사실을 발견하고 이러한 유전표식자를 이용한 개인식별법을 유전자 지문이라 명명하였으며 유전적으로 연관성이 있는 각 개체가 동일한 DNA단편을 공유할 확률은 5 x $10^{-19}$이라 하였으며 형제간에도 동일한 DNA단편을 공유할 확율은 100만분의 1이라 하여 개인식별 방법중 가장 우수한 것임을 보고하였다.

이후 유전자 지문에 대한 연구는 법의학적 개인식별 분야에 있어서 거대한 주류를 형성하고 오늘날 분자수준 에서의 DNA에 의한 개인식별은 전성기를 맞이하고 있다.

일반적으로 유전자 표식자를 이용한 연구에서 주로 쓰이는 분자 생물학적 방법으로는 제 1세대의 southern-hybridization법[25,50]과 제 2세대의 polymerase chain reaction(PCR)법[49,56], 그리고 PCR을 개발시킨 minisatellate variant repeat-PCR(MVR-PCR)[30,69], mitochondrial DNA sequencing법[20,29,80]등이 개발되고 있으며 극미량의 DNA가 포함되어 있어도 RFLP 검색이 가능하게 되었다.[43,68] 법의학적 영역에서 이러한 RFLP 검사는 많은 시간이 소요되며 실험방법에 따라 정확한 결과를 얻어내기 위하여는 southern-hybridization법에서는 다좌위 탐침을 이용하는 경우 μg단위의 비교적 많은 양의 분해되지 않는 고분자 DNA가 필요하고, 단좌위 탐침을 이용할 경우 수백 ng의 DNA가 필요하기 때문에 감정실무에 있어 혈흔, 모발, 타액, 장기간 경과되어 부패된 치아 같은 극소량의 DNA만을 얻을 경우나 다량의 균유래의 DNA가 있는 경우는 이러한 유전자지문법을 적용하기가 곤란하였다. 그러나 PCR방법을 시행하게 되면 수십 ng이하의 DNA로도 충분히 특정 유전자를 분석할 수 있기 때문에 PCR 방법은 제 1세대인 southern hybridization법으로는 불가능한 분석을 할 수 있는 새로운 검색법이라 하겠다.[3,59,68,74]

이러한 PCR은 1983년 미국 Centus사의 Mullis[49]에 의해 고안된 방법으로 열내성을 갖는 DNA 중합효소로 짧은 시간 내에 소량의 DNA를 수백만배로 증폭시키는 중합효소 연쇄반응을 말하며 특정 DNA 단편의 효소합성을 위한 자동화된 기계를 이용하여 유전자 분석에 관한 여러가지 연구와 진단분야 특히 유전자형의 결정에 널리 사용되고 있다. Saiki[57]등이 Thermus aquaticus(Taq)에서 열에 안정한 Taq-DNA polymerase를 분리하여 PCR에 응용하여 human β-globulin DNA의 증폭과 겸상적혈구성 빈혈증의 산전진단에 최초로 적용하여 생체 밖에서 사람의 게놈DNA(human genomic DNA)의 특정부위를 중합효소를 이용하여 증폭이 가능함을 보고하였다. 그후 PCR법은 생물학 전 분야에 적용되어 유전적 변이를 검사하는 능력에 커다란 변화를 가져와 southern-hybridization법과는 달리 매우 소량의 분해된 DNA를 이용한 개체식별이 가능하게 되었다. 이 방법은 특히 법의학 분야에서 Apo B, COL2A1, P17S30, D1S80 등의 길이다형성 VNTR(variable number of tandem repeats) 부위의 분석에 널리 응용되어 왔다.

사람의 DNA위에는 약 $10^5$ 개 정도의 길이가 서로 다른 무수한 유전자가 존재할 것으로 추산되고 있으나 현재 약 6000개 정도의 유전자들의 구조일부가 알려져 있는데 법의학 분야에서 개인식별에 응용되는 유전좌위는 D2S44[8], D14S18, Apo B[61], D17S79[8], Collagen type II[91], Alpha 1(COL2A1)[57], D2S44(YNH24)[8,13], D1S8(MS32)[69,83,84], D17S30[21], D17S5[18], HLA DQα[17,39,41,59], HLA DQB[6,17], D1S80(pMCT118)[7,10,12,15,36,58,60,70,92,96] 등 여러 유전좌위가 이용되고 있다.

이들 중 D1S80 유전좌위는 사람 염색체 1번에 위치하며 30개 이상의 여러가지 다형대립유전자를 가지며 각각의 대립유전자는 16bp 크기의 규칙적인 반복염기 서열로 구성되고 있고 이들의 조합에 의하여 형성되는 유전자형은 80% 이상의 높은 이형접합도를 나타내므로 법의학적 감정에 유용하여 이에 관한 많은 연구가 진행되었으나[7,12,15] 이들은 대부분 혈액이나 타액을 대상으로 연구였다.[54,73]

국내에서도 최근들어 각종 유전자형 검사가 활발히 이루어지고 있는데 1991년 문[93] 등이 유전자 조작을 이용한 혈흔의 개인식별에 관한 연구를 시작으로 D1S80[92,94,96,97], COL2A1의 대립유전자 빈도[91], pV47-2 다좌위 탐침검색[98,99] 등의 보고가 있으며 윤등[97]은 타액반 피검물에서 유전자형 검사를 시행한 바 있다. 그러나 범죄현장에 잔존해 있는 혈액이나 타액 등은 시간경과에 따라 부패, DNA변성등으로 인하여 시간이 경과하게 되면 PCR에 저해작용을 하여 검색자료로서 가치를 상실하게 될 것으로 사료되나 다양한 PCR 시행조건, 외부환경 요소의 변화에 따른 연구만 다양할 뿐[1,20,40 42,47,53,55,62,85,96] 시간경과에 따른 검색여부에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

반면, 치아는 물리적, 화학적 저항성이 강하고 부패에 대하여도 장기간 보존될 수 있는 조직으로 알려졌음에도 불구하고 치아에서의 DNA수준에서의 연구는 미미한 편이고[66,81,82], 국내에서는 보고된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 발거 직후의 치아와 발거 후 10년 경과한 치아에서 DNA를 추출하고 PCR법을 이용하여 증폭절편다형(AMP-FLPs)을 실시하고 성별검사, D1S80 유전좌위의 VNTR대립유전자를 검색하여 법의치과학적 감정실무에 응용할 수 있는지 알아보고자 본 연구를 실시하였다.

## Ⅱ. 연구재료 및 방법

### 1. 연구재료

20대에서 60대까지 남녀 각각 2명씩 4명으로부터 발거한 치아 4개를 발거 후 즉시 법랑질, 상아질, 치수층으로 분리한 치아조직과 20대에서 60대까지 남자 5명, 여자 2명으로 부터 각각 발거한 치아 7개를 10년동안 건조한 실온에 보관한 후 법랑질, 상아질, 치수층등 세층으로 분리한 치아조직을 연구재료로 하였다.

### 2. 연구방법

#### 가. DNA 추출

치아에서 중합효소 반응(PCR)을 이용한 성별검사와 AMP-FLPs 유전좌위의 다형성검사를 위해 발거한 직후의 치아와 10년동안 실온에 방치한 치아들로부터 DNA를 추출하였다. 남녀 각각 2명씩 4명으로부터 발거한 치아 4개의 법랑질, 상아질, 치수층으로 부터 DNA를 추출하였는데 각 치아들은 먼저 세 부위로 분리시키기 전에 치아표면의 치주인대, 혈흔, 연조직, 치석, 타르 등 이물질들을 고속회전 치과용 바를 이용하여 깨끗이 제거한 후 멸균된 증류수로 세척하고, 다시 고속회전 치과용 바를 이용하여 치아장축에 수직으로 절단하고 외과용 끌로 분리시킨 후 노출된 치수층을 수집하고 나머지 부분은 치수강을 세척한 후 각각 상아질, 법랑질층으로 분리하여 수집하였다.

분리된 치수, 상아질, 법랑질은 각각 1.5ml eppendorf tube에 잘게 분쇄하여 담고, 멸균된 증류수 200μl씩을 분주하여 4℃에서 하루동안 방치한 다음 이 표본에 50μl 용해완충액(nucleo-lysis buffer, 0.5% S.D.S. 10mM Tris. Cl, 0.1M EDTA, pH 8.0)과 5μl proteinase K(12μg/μl)를 혼합하여 37℃에서 24시간 부란하였다. 이렇게 처리된 표본을 10분간 14,000 rpm으로 원심분리 후 상층액을 취하여 새로운 eppendorf tube에 옮겼다. 분리된 상층액에 50μl Nacl(5M)을 혼합하여 잘 섞어준 후 침전물을 제거하고 남은 부유액을 실온의 100% ethanol로 침전시켜 DNA를 추출하였다. 이를 다시 70% ethanol로 세척하고 dry vaccum으로 완전히 건조시킨 후 멸균증류수에 용해하였다.

성별결정의 대조군으로 사용하기 위하여 남, 여 학생으로부터 무균적으로 채혈한 정맥혈 각 2ml에 동량의 적혈구 용해 완충액(RBC lysis buffer)으로 적혈구를 용해한 후 상기한 방법으로 DNA를 추출하여 멸균증류수에 용해하였다.

발거한 후 실온에서 10년동안 보관한 치아 7개에 대하여도 각 치아를 치수, 상아질 및 법랑질층으로 분류하고 동일한 방법으로 DNA를 추

출하여 멸균증류수에 용해하였다.

나. DNA 농도측정

DNA의 농도는 Hewlettpackard® spectrophotometer를 이용하여 260 nm에서의 흡광도를 조사하여 결정하였다. 처음에는 1ml 증류수로 spectrophotometer에서 blank를 잡은 후 DNA를 1:100의 비율로 희석하여 UV visible spectrophotometer에서 각각 260nm와 280nm에서 그 결과를 측정하였다. DNA의 양은 희석비율과 260nm의 양을 곱한 후 그 값을 0.023으로 나눈 값이 ng/μl의 양으로 결정되었다. 또한 순수도는 260nm의 양에 대한 280nm양의 비율로 결정되었다.

다. X-Y homologous amelogenin gene 검색(성별검사)

성별검사를 위한 DNA의 PCR 증폭은 Sullivan등[68]이 제시한 primers (5′- CCCTGGGCT CTGTAAAGAATAGTG-3′와 5′-ATCAGA GCTTAAACTGGGAAGCTG-3′)를 이용하여 수행하였다. 염기증폭은 Perkin-Elmer thermal cycler 480을 이용하여 50μl의 반응량(reaction volume)으로 실행하였으며 각 PCR 반응 혼합물에는 치아에서 추출한 DNA시료와 대조군으로 사용하기 위해 남,여 혈액에서 추출한 DNA 시료를 포함하였다. 이때 사용한 PCR 완충액은 POSCO 화학제품인 buffer(100mM Tris-HCl, (pH9.0), 500mM KCl, 1.0% Triton) 와 1.5mM $MgCl_2$, 각각 0.2μM primer, 각각 200μM의 dNTPs 그리고 1.5 unit의 Taq. DNA polymerase를 포함하였다.

PCR 반응은 94℃에서 1분, 60℃에서 1분, 그리고 72℃에서 1분으로 이루어진 온도순환을 35회 시행하였고 첫 온도순환에 앞서 다음과 같은 전처리를 수행하였다. 즉 Taq. polymerase만을 제외한 PCR 혼합물을 94℃에서 5분간 가열한 후 Taq. polymerase를 주입하는 hot start PCR을 시행하였고 총 35회의 온도순환후 72℃에서 10분간 반응시간을 추가적으로 주었다.

PCR 반응 후 증폭된 산물들은 vertical electrophoresis unit(SE-410, Hoefer scientific instrument)를 사용하여 1mm두께의 12% natural polyacrylamide gel을 만들어 10μl씩 loading하였다. gel과 전극의 완충용액으로 TBE 완충용액(90mM Tris-Borate, 2mM EDTA)을 사용하여 80V의 일정한 전압에서 6시간동안 전기영동을 시행한 후 Ethidium Bromide(0.5μg/ml)로 염색하여 분리된 띠를 UV transilluminator상에서 판독하여 성별을 결정하였다.

라. D1S80 유전좌위의 VNTR 부위 증폭 및 AMP-FLPs검색

D1S80 유전좌위의 AMP-FLPs검색을 위해 Kasai등[36]에 의해 제시된 primers(5′-GAAACT GGCCTCCAAACACTGCCCGCCG-3′와 5′-G TCTTGTTGGAGATGCACGTGCCCCTTGC -3′)를 이용하여 Perkin-Elmer thermal cycler 480에서 다음과 같이 PCR을 수행하였다. 각 PCR 반응혼합물에는 성별검사시와 동일한 양의 template DNA를 이용하였으며 PCR 완충액 역시 성별검사시와 동일한 POSCO 화학제품의 buffer (100mM Tris-Hcl, (PH 9.0), 500mM Kcl, 1.0% Triton)를 사용하였고 1.5mM $MgCl_2$, 각각 0.2μM primer, 각각 200μM의 dNTPs 그리고 1.5 unit의 Taq. DNA polymerase를 성별검사시와 동일하게 사용하여 최종용량 50μl를 혼합하였다.

모든 시료는 94℃에서 1분, 65℃에서 1분, 72℃에서 2분의 온도순환 후, 72℃에서 10분간 반응시간을 추가로 시행하였고 성별검사시와 마찬가지로 첫 순환에 앞서 94℃에서 5분간 반응후 hot start PCR을 시행하였다. 온도순환 횟수는 spectrophotometer에서 측정된 DNA양을 고려하여 발거한 즉시 DNA를 추출한 치아의 시료에서는 34회의 온도순환을, 10년된 치아의 시료에서는 40회의 온도순환을 진행시켰다.

증폭된 각각의 PCR 산물들은 vertical electrophoresis unit(SE-410, Hoefer scientific instrument)를 이용한 6% natural polyacrylamide gel에서 10μl의 양을 시적하여 50V의 일정한 전압에서 6시간동안 전기영동 하였고 Horizontal electrophoresis unit(Bio-Rad®)를 이용하여 2%

agarous겔에서 DNA 크기 표식자인 Psi x 174와 함께 80V의 일정한 전압에서 2시간동안 전기영동 후 Ethidium Bromide(0.5μg/ml)로 염색하여 분리된 띠를 UV transilluminator상에서 판독하여 AMP-FLPs를 결정하였다.

## Ⅲ. 연 구 성 적

### 1. Spectrophotometer상에서 측정된 DNA concentrations

발거후 즉시 DNA를 추출한 치아에서의 DNA 농도는 치수에서 83-278ng/μl, 상아질에서 16-83 ng/μl, 법랑질에서 0-46ng/μl로 나타났으며, 순수도는 1.2에서 2.3으로 나타났다. 발거하여 10년동안 실온에 방치한 치아에서는 치수에서 15-179 ng/μl로 모든 치수에서 DNA가 추출되었으며 상아질에서 4개 치아는 DNA가 추출되지 않았으며 3개 치아는 16-577ng/μl로 다양하게 나타났고 법랑질에서는 추출되지 않았다. (Table 1, 2)

**Table 1.** DNA concentrations extracted from the fresh teeth.

| Sample No | Sex | Specimens | DNA concentrations (ng/μl) | DNA Purity |
|---|---|---|---|---|
| 1 | M | pulp | 278 | 1.4 |
| | | dentin | 16 | 2.3 |
| | | enamel | 0 | 0 |
| 2 | M | pulp | 143 | 1.8 |
| | | dentin | 35 | 1.4 |
| | | enamel | 46 | 1.2 |
| 3 | F | pulp | 83 | 1.8 |
| | | dentin | 83 | 1.3 |
| | | enamel | 0 | 0 |
| 4 | F | pulp | 198 | 1.5 |
| | | dentin | 30 | 1.7 |
| | | enamel | 43 | 1.2 |
| 5 | M | Blood | 221 | 1.5 |
| 6 | F | Blood | 1443 | 1.5 |

**Table 128.** DNA concentrations extracted from the teeth left at room temperature for 10 years.

| Sample No | Sex | Specimens | DNA concentrations (ng/μl) | DNA Purity |
|---|---|---|---|---|
| 1 | M | pulp | 179 | 1.7 |
| | | dentin | 16 | 3.7 |
| | | enamel | 0 | 0 |
| 2 | M | pulp | 97 | 1.6 |
| | | dentin | 0 | 0 |
| | | enamel | 0 | 0 |
| 3 | M | pulp | 25 | 1.6 |
| | | dentin | 0 | 0 |
| | | enamel | 0 | 0 |
| 4 | M | pulp | 14 | 3.0 |
| | | dentin | 109 | 2.4 |
| | | enamel | 0 | 0 |
| 5 | M | pulp | 15 | 2.5 |
| | | dentin | 0 | 0 |
| | | enamel | 0 | 0 |
| 6 | F | pulp | 84 | 1.9 |
| | | dentin | 577 | 1.9 |
| | | enamel | 0 | 0 |
| 7 | F | pulp | 147 | 1.7 |
| | | dentin | 0 | 0 |
| | | enamel | 0 | 0 |

2. X-Y homologous amelogenin gene 검색 (성별검사)

가. 발거 후 즉시 DNA를 추출한 치아

발거 후 즉시 DNA를 추출하고 PCR에 의해 증폭한 PCR산물 10㎕씩을 사용하여 X-Y homologous amelogenin gene을 전기영동하여 관찰한 결과 전 치아에서 법랑질을 제외한 치수 및 상아질에서 106bp와 112bp 크기의 뚜렷한 band를 관찰할 수 있었다. 대조군으로 사용한 남, 녀 혈액시료에서 추출한 PCR산물에서 남자는 106 bp와 112bp 크기의 두 DNA band가, 여자는 106 bp 크기의 단일 band가 관찰되어 치아와 비교할 때 4개 치아의 치수, 상아질에서 남, 녀를 뚜렷이 구별할수 있었다. (Table 3, Fig. 1)

나. 발거 후 실온에 10년간 방치한 치아

7개 전 치아의 법랑질에서는 band를 관찰할 수 없었으며 5개의 남자치아 중 2개 치아의 치수와 상아질에서 106bp와 112bp 크기의 뚜렸한 band가 관찰되었고 1개 치아에서는 상아질은 뚜렸한 band가 나타났으나 치수층에서는 확인이 가능할 정도였으며 1개 치아에서는 치수, 상아질 모두 band가 나타나지 않았다.

한편 2개의 여성치아에서는 치수 및 상아질 모두에서 106bp 크기의 뚜렷한 band가 나타났다. 특기할 것은 남자치아 2개와 여자치아 1개의 상아질에서 spectrophotometer상에서 DNA가 추출되지 않았으나 band가 뚜렷이 나타나 성별 판정이 가능하였다. (Table 4, Fig. 2, 3)

3. VNTR D1S80 유전좌위의 AMP-FLPs검색

발거 후 즉시 DNA를 추출하고 PCR로 증폭한 다음 전기영동하여 D1S80 유전좌위의 대립유전자를 관찰한 결과 4개 치아 모두 법랑질에서는 대립유전자가 관찰되지 않았으나 치수와 상아질에서는 band가 선명하게 관찰되었고 3개의 치아는 이형접합자 (heterozygote)로서 나타났으며 동일인의 치수와 상아질은 같은 대립유전자임을 확인할 수 있었고, 1개 치아는 동형접합자 (homozygote)로 나타났다. (Fig. 4)

**Table 3.** Results of the detection of X - Y homologous amelogenin gene by PCR from the fresh teeth.

| Sample No. | Sex | Specimens | Detection |
|---|---|---|---|
| 1 | M | Pulp | ++ |
| | | Dentin | ++ |
| | | Enamel | - |
| 2 | M | Pulp | ++ |
| | | Dentin | ++ |
| | | Enamel | - |
| 3 | F | Pulp | ++ |
| | | Dentin | ++ |
| | | Enamel | - |
| 4 | F | Pulp | ++ |
| | | Dentin | ++ |
| | | Enamel | - |

++ : A distinct band was observed

- : No specific band was observed

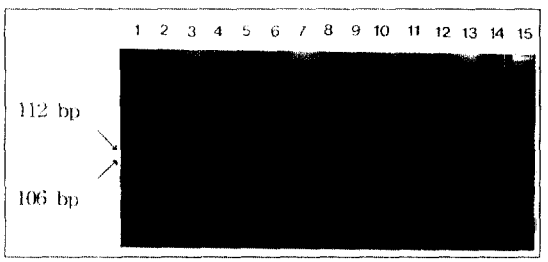


**Fig 1.** 12% Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products of X-Y homologous amelogenin gene from the fresh teeth.

Lanes 1, 2 : male pulp, Lanes 3, 4 : female pulp, Lane 5 : male blood control, Lane 6 : female blood control, Lanes 7, 8 : male dentin, Lanes 9, 10 : female dentin, Lanes 11, 12 : male enamel, Lane 13, 14 : female enamel, Lane 15 : size marker Pst 1, ※ Lanes 11, 12, 13, 14 -- Band was not observed

그리고 실온에 10년간 방치한 치아의 법랑질에서도 대립유전자는 관찰되지 않았으며 1번 및 6번 치아의 치수와 상아질에서 각각 뚜렷하고

**Table 4.** Results of the detection of X - Y homologous amelogenin gene by PCR from the teeth left at room temperature for 10 years

| Sample No. | Sex | Specimens | Detection | Presence of DNA |
|---|---|---|---|---|
| 1 | M | Pulp | ++ | Presence |
| | | Dentin | ++ | Presence |
| | | Enamel | - | ※ |
| 2 | M | Pulp | ++ | Presence |
| | | Dentin | ++ | ※ |
| | | Enamel | - | ※ |
| 3 | M | Pulp | + | Presence |
| | | Dentin | - | ※ |
| | | Enamel | - | ※ |
| 4 | M | Pulp | + | Presence |
| | | Dentin | ++ | Presence |
| | | Enamel | - | ※ |
| 5 | M | Pulp | - | Presence |
| | | Dentin | - | ※ |
| | | Enamel | - | ※ |
| 6 | F | Pulp | ++ | Presence |
| | | Dentin | ++ | Presence |
| | | Enamel | - | ※ |
| 7 | F | Pulp | ++ | Presence |
| | | Dentin | ++ | ※ |
| | | Enamel | - | ※ |

\+ : A faint band was observed
++ : A distinct band was observed
\- : No specific band was observed
※ : DNA was not extracted

동일한 대립유전자가 관찰되었으며 7번 치아의 치수에서는 뚜렷한 대립유전자가 관찰되었으나 DNA가 검출되지 않은 상아질에서 대립유전자는 관찰되지 않았다. (Table 5, Fig. 5)

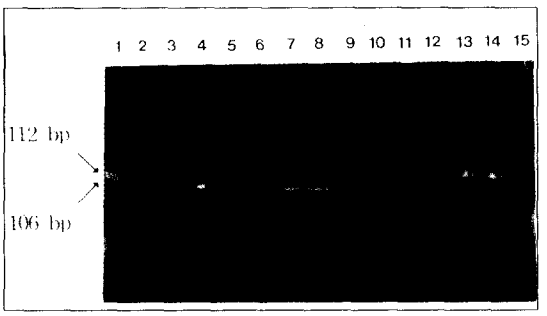


**Fig 2.** 12% Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products of X-Y homologus amelogenin gene from the teeth left at room temperature for 10 years.

Lanes 1, 2 : male pulp, Lane 3 : female pulp( questionable), Lane 4 : female pulp, Lanes 5, 6 : male dentin, Lanes 7, 8 : female dentin, Lanes 9, 10 : male enamel, Lanes 11, 12 : female enamel, Lane 13 : male blood, Lane 14 : female blood, Lane 15 : size marker Pst 1, ※ Lanes 9,10,11,12 : Band was not observed

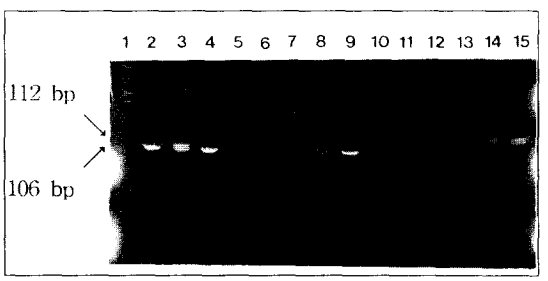


**Fig 3.** 12% Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products of X-Y homologous amelogenin gene from the teeth left at room temperature for 10 years.

Lane 1 : size marker Pst 1, Lane 2 : female blood, Lane 3 : male blood, Lane 4 : female dentin, Lanes 5, 6 : male dentin, Band was not observed, Lanes 7, 8 : male dentin, Lane 9 : female pulp, Lane 10 : female pulp(questionable), Lane 11 : male pulp, Band was not observed, Lanes 12, 13 : male pulp -- A faint band was observed, Lanes 14, 15 : male pulp

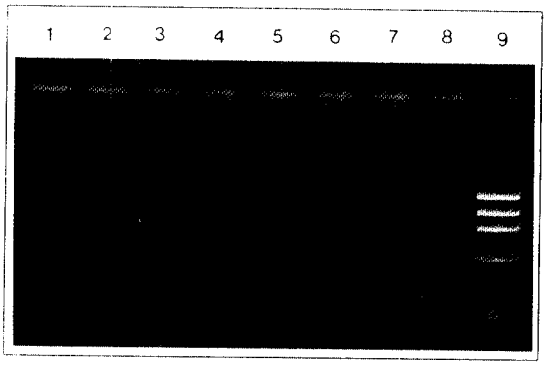


**Fig.4.** 2% Agarous gel electrophoresis of PCR products of D1S80 locus from the fresh teeth.

Lanes 1-2, 3-4, 5-6 and 7-8 : pulp and dentin of the same teeth, respectively, Lane 9 : size marker Psi x 174.

**Table 131.** Results of the detection of the alleles of D1S80 locus from the teeth left at room temperature for 10 years

| Sample No. | Specimens | Result | Concentrations of DNA (ng/μl) |
|---|---|---|---|
| 1 | pulp | ++ | 179 |
| | dentin | ++ | 16 |
| 2 | pulp | - | 97 |
| | dentin | - | 0 |
| 3 | pulp | - | 25 |
| | dentin | - | 0 |
| 4 | pulp | - | 14 |
| | dentin | - | 109 |
| 5 | pulp | - | 15 |
| | dentin | - | 0 |
| 6 | pulp | ++ | 84 |
| | dentin | + | 577 |
| 7 | pulp | ++ | 147 |
| | dentin | - | 0 |

+ : A faint band was observed
++ : A distinct band was observed
- : No specific band was observed

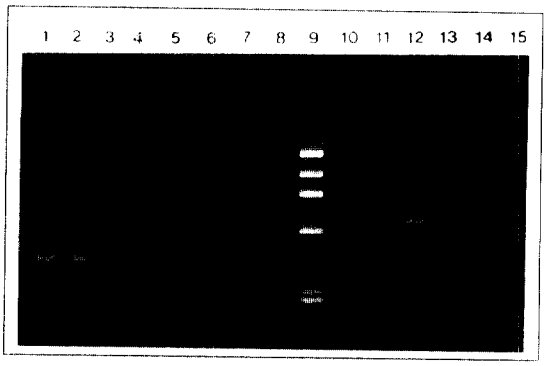


**Fig.5.** 2% Agarous gel electrophoresis of PCR products of D1S80 locus from the teeth left at room temperature for 10 years.

Lanes 1-2, and : pulp and dentin of the same teeth --A distinct band was observed, Lanes 3-4, 5-6, 7-8, and 10-11 : pulp and dentin of the same teeth, respectively, --No specific band was observed, Lane 9 : size marker Psi x 174. Lane 12 : pulp --A distinct band was observed, Lane 13 : dentin of the same tooth of Lane 13--A faint band was observed, Lane 14 : pulp--A distinct band was observed, Lane 15 : dentin of the same tooth of Lane 14--No specific band was observed

## Ⅳ. 총괄 및 고찰

치아는 생체조직 중 파괴에 대한 저항력이 가장 강하여 부패 등 사후 변화에도 연조직은 물론 골조직까지도 풍화되어 일부만 잔존한 경우에도 그 특징이 남아있어 개인식별에 자주 이용되어 왔으나 주로 형태학적, 생화학적 관점에서의 연구였고 분자생물학적 관점에서의 연구는 거의 전무하였다.

분자 생물학 영역에서 지금까지 법의학적 증거물에서 개인식별에 이용되어지는 다형성 유전표식자의 검사는 주로 혈액형, 효소형, 혈청단백질형, HLA형 등이 주체이며 이들 유전 표식자의 다형성은 단백질 수준에서의 항원성이나 전기영동에 의한 이동성의 차이에 의해서 검출되었다. 따라서 그 다형성의 근거는 단백질을 구성하는 아미노산의 조성의 차이나 당쇄(sugar chain)의 변이에 있는 것이기 때문에 단백질 수준에서의

다형성은 결국 그 단백질을 부호화하고 지배하는 유전자의 변이에 의한 것이다. 사람의 염색체를 구성하는 DNA는 반수체 당 3 x $10^9$의 염기배열을 갖고 있지만 그 중 10%미만이 형질발현에 관여하는 유전자이고 나머지 약 90%는 생명유지에 직접 관여하지 않는 인트론이라 불리는 염기배열이 존재하기 때문에 이 인트론 부분에서도 다형성이 존재한다는 사실이 밝혀졌다[93].

이와 같이 DNA수준에서의 다형성을 모두 고려하면 동일한 염기배열을 갖는 개체가 동시에 출현하는 확률은 일란성 쌍둥이를 제외하면 없기 때문에 DNA수준에서의 다형성은 개인식별에 있어 가장 확실한 방법이 되지만 사람의 DNA 염기배열을 모두 조사하는 데는 너무나 많은 시간과 노력이 필요하게 되어 불가능하다 하겠다.

그러나 Smith등[67]에 의하여 DNA의 염기배열 중에서 특정 염기부위만을 인식하고 그 부위를 절단하는 제한 효소가 발견됨으로써 DNA수준에서의 연구가 급진전되었다.

사람을 포함한 진핵생물 DNA의 염기배열을 보면 약 10%는 10쌍 이하의 동일 염기군이 수백만번이나 반복되는 고빈도 반복배열(highly repetitive sequence), 약 20%에서는 동일 염기군이 100-1,000번 정도 반복되는 중빈도 반복배열(moderately repetitive sequence), 그리고 나머지 70%에서는 반복배열 되지 않는 특이배열(unique or nonrepetitive sequence)로 구성되어 있으며 고빈도 반복배열을 초위성 DNA(mini-satellite DNA)라 한다[56].

이러한 염기배열은 생물 종간, 동일한 종이라 하더라도 개체간 많은 차이가 있다는 사실이 밝혀졌을 뿐만 아니라 돌연변이에 의해서는 DNA 염기배열의 변이가 생기기 때문에 제한효소를 이용하여 DNA를 절단할 경우 길이가 다른 DNA단편들이 생성된다. 이 길이가 다른 다형을 restriction fragment length polymorphism(RFLP)이라 하였고 이 단편들은 멘델의 유전법칙에 따른다는 사실도 규명되었다[8,35,78]. 따라서 염색체DNA를 제한 효소로 절단한 후 생성되는 RFLP를 확인하므로써 DNA수준에서의 개인식별 뿐만 아니라 유전질환의 진단, 원인유전자 검색이 가능하게 되었다. 그러나 제한효소 절단부의 돌연변이로 인하여 생성된 RFLP는 한 유전집단에서 이형접합이 나타날 확률은 많아야 50%이고 동형접합이 될 확률은 25% 밖에 되지 않기 때문에 대부분의 RFLP는 유전학적 분석에 이용하기에는 적합하지 못하지만 인트론 부위에 존재하는 위성DNA는 10염기쌍 이하의 동일염기군이 무수히 반복배열 되어 있어 그 동일염기군의 수의차이(variable number of tandem repeats, VNTR)에 의해 생성되는 RFLP는 고도의 다형성을 나타낸다. 따라서 VNTR을 갖고 있는 RFLP는 실제로 한 유전집단내에서 평균 이형접합체로 나타내는 확률은 100%에 이른다고 하겠다[35]. 이러한 것을 이용하여 Jeffrey등[32,34]은 제한효소 Hinf I를 사용하여 VNTR을 포함한 RFLP를 얻은 후 스스로 개발한 탐침 33.15 와 33.6으로 확인한 후 유전자 지문이라 자신있게 발표하였으며 두 개체에서 우연히 유전자 지문이 일치할 수 있는 가능성은 5 x $10^{-19}$ 이라 보고하였다.

이후 법의학 및 법의치과학 분야에서 유전자 검색을 이용하여 많은 연구와 감정이 시행되어 왔는데 처음에는 주로 혈액을 대상으로 하였으나 점차 골조직과 치아를 대상으로 다양한 연구가 진행되고 있다[28,44,45].

Walsh등[74]은 일반적으로 southern blotting hybridization을 사용할 때 단좌위탐침으로 완전한 DNA의 유전자형을 검색하기 위하여는 대략 30-60ng의 DNA가 필요하다 하였으며 본 연구에 사용된 치아에서는 발거후 즉시 DNA를 추출한 치수에서는 모두 60ng 이상이었으나 그외 치아조직에서 추출된 DNA양은 15-179ng으로 다양하여 이 방법에 의한 DNA분석시 RFLP 검색은 false-negative로 나올 가능성이 높아 PCR방법에 의한 AMP-FLPs 검사법으로 유전자형을 검색하는 것이 보다 정확한 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료되어 본 연구에 적용하였다.

이 PCR법이란 세포나 미생물의 특정 DNA segment를 증폭시키고자 할 때 열을 가하여 두 가닥의 DNA를 한 가닥으로 변성시킨 후 온도를

낮추어주면 primer(시발체)가 한가닥이던 상보적인 DNA sequence에 결합하게 되고 이렇게 결합된 primer로 부터 nucleotide가 연장되게 되는데 이와같은 3단계를 한 cycle로 하여 30회 이상 반복하면 pg단위의 DNA도 증폭시킬수 있는 방법으로 DNA 이중나선의 문제, primer의 결합, DNA사슬의 연장이라는 3단계 반응을 온도변화를 자동적으로 해주는 기계(thermal cycling heating block)에 의하여 시행된다[49]. 이 방법을 이용하므로써 범죄현장 등에 잔존하게 되는 극미량의 생물학적,법의학적 시료로부터 유전자 분석이 가능하게 되었다.

성별검사를 위한 분자생물학적 접근 방법은 성염색체에 있는 VNTR의 southern-hybridization법에 의한 검사가 주종을 이루어 왔다[4,5,16,51]. 그중 DYZ1 유전좌위는 Y 염색체상에 존재하는 3564 bp의 긴 염기서열로 pHY10 탐침으로 매우 민감하게 찾을 수 있지만, 검색되지 않은 경우에는 여자이기 때문인지, 시료의 양이 적어서인지 여부를 알 수 없다는 단점이 있다. 그러나 중합효소반응에 의한 X-Y homologous amelogenin gene의 AMP-FLPs 검사는 X,Y gene을 동시에 검사할수 있어 Y 염색체 특이성 탐침 사용시 발생되는 false-negative를 배제할 수 있기 때문에 많이 사용되고 있다[3,5,27,63,64,68]. X-homologue의 인트론 1에 6 bp 크기의 염기서열이 삭제되어 있어 Sullivan등[68]이 제안한 primer를 사용하여 중합효소반응으로 증폭하면 X 염색체는 106bp, Y 염색체는 112bp 크기의 DNA띠가 전기영동 상에서 관찰되어 성별을 감별할 수 있다.

본 실험에서는 사용된 모든 시료에서 X,Y 염색체 중 primer에 의해 증폭되는 DNA 띠(band)로서 남,여의 비교를 명확하게 관찰할 수 있었다. 6 bp를 분리시키기 위해 4% nusieve-agarose (3% nusieve GTG 와 1% Seakem GTG agarose) gel을 사용하여 분리를 시도하였으나 제대로 분리되지 않았고 gel이 너무 단단하여 polyacrylamide gel을 사용하였다. 6%, 10% polyacrylamide gel에서도 어느 정도는 분리되나 더욱 분리능력을 높이기 위해 12% gel을 사용하였다. 20%의 polyacrylamide gel은 12% gel보다 분리능력과 결과에 있어 별 차이가 없었으며 전기영동 시간이 너무 많이 걸리는 불편감이 있었다. 그리고 PCR thermal cycler의 순환횟수는 윤등[97]의 타액에서의 성별검사시와 같이 35회로 시행하였을 때 뚜렷한 band를 관찰할 수 있어 전 표본에서 35회 온도순환을 시켰으며 전기영동시 전압은 80, 100, 150v로 시행하였는데 80v에서 가장 뚜렷한 band가 나타났다.

10년된 치아에서는 치아 자체의 DNA농도가 작아 온도 순환횟수를 38회로 증가시켰지만 35회를 하였을 때와 비교하여 차이가 없었기 때문에 온도순환을 35회 까지만 진행시켰다.

사람의 염색체 1번에 위치하는 D1S80 유전좌위는 16bp 크기의 규칙적인 반복염기서열로 구성되어 하나의 대립인자가 약 350-900bp의 크기로 존재한다[12, 36,70]. 현재까지 한국인에서는 29개의 대립유전자(n)가 확인되었으며 이들 조합에 의해 형성되는 유전자형(N= n(n-1)/2)은 406종으로 기대되나 한국인 804명을 대상으로 실험한 결과 146종류의 유전자형이 밝혀졌고, 한국인을 대상으로 한 연구 뿐만 아니라 Baechtel등[7], Budowle등[12], Chuah등[15], Sajantila등[59], Schneeweiss-Griese등[61] 여러 연구에서도 D1S80 유전좌위는 80% 이상의 높은 이형접합도를 나타내 D1S80유전자는 대립유전자가 다양하고 이형접합도가 높아 현재 법의학적 감정에 널리 사용되고 있다.

본 실험에서도 발거 후 즉시 실험한 치아의 전치수와 상아질에서 D1S80 유전좌위의 AMP-FLPs를 보여 주고 있으며 10년된 치아에서도 일부 나타난 바 장기간 방치한 치아내 DNA가 잘 보존되고 있음이 밝혀졌다. 그러나 일부 치아에서 DNA가 검출되었음에도 불구하고 대립유전자를 전기영동상에서 관찰할 수 없는 것으로 미루어 DNA가 변성되었거나 RNA나 다른 단백질이 포함되어 있으며 또한 X, Y homologous amelogenin gene은 DNA가 극미량만 있어도 PCR증폭 후 관찰할 수 있으나 D1S80 유전자검색은 X, Y homologous amelogenin gene보다 다량의 DNA가 필요하여 본 실험에서 관찰되지 않은 것으로 사료되었다.

PCR 과정에서 가장 중요한 과정은 이중나선의 두가닥 DNA를 한가닥으로 완전히 분리하는 변성단계(denaturation)이다. 이때 온도가 너무 높게 되면 반응액에 가한 Taq DNA polymerase가 파괴되고 DNA가 분절되며, 온도가 낮거나 시간이 짧으면 DNA의 완전한 변성이 이루어지지 않아 증폭이 잘되지 않으므로 적절한 온도와 시간은 필수적이라 할 수 있다[40]. D1S80 유전좌위의 증폭은 발거 직후의 치아에서는 33-38회의 온도순환으로 PCR을 시행하였는데 결과에 있어 차이는 없었으나 34회의 온도순환시 시간을 절약할 수 있고 가장 뚜렷한 band 상을 나타낸 바 송등[96]의 DNA가 풍부한 혈액시료에서 25-27회의 온도순환이 가장 적절한 횟수로 나타난 것과 비교할 때 적정 온도순환 횟수는 큰 차이를 보였다. 반면, 발거후 10년간 실온에 방치한 치아에서는 추출된 DNA의 양이 적어 온도순환을 40회까지 증가시켰을 때 더 뚜렷한 band가 관찰되어 시료에 따라 온도순환 횟수를 조정할 필요성이 큰 것을 알 수 있었다. 전기영동은 바로 발거한 치아나 실온에 10년간 방치한 치아 모두 3.5%, 6%의 polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)와 2% agarous gel electrophoresis를 각각 시행하였는데 큰 차이는 없었으며 2% agarous gel이 조작이 편리하고 전기영동 시간이 PAGE 6시간에 비하여 2시간 정도 소요되어 실제 2% agarous gel을 사용하는 것이 유리한 것으로 사료되었다.

그리고 치아를 비롯한 법의학적 증거물은 사건현장에 방치되어 PCR 억제물질로 오염될 가능성이 많고, 또한 DNA가 변성되어 그 양이 극히 미량일 가능성이 많아진다[1,41,46,62]. 본 실험에서는 이러한 문제점을 해결하기 위하여 PCR의 시작시에 mis-priming을 방지하기 위해 hot start PCR을 시행하였으며, bovine serum albumin(BSA)를 첨가하여 중합효소를 안정화시켜 인공산물의 형성을 최소화 하였다.

PCR은 극미량의 DNA를 수백만배 증폭시킬 수 있기 때문에 그 예민도와 특이도가 매우 우수하다 할 수 있다. 그러나 PCR법의 탁월한 예민도는 그 자체가 단점이 될수도 있는데 이는 이론적으로는 1개의 표적 DNA만 있어도 검출이 가능하게 되어 실험실이나 다른 기구들 위에 묻은 미량의 DNA, 공기중에 떠다니는 DNA나 그 반응산물에 의해서도 위양성이 나올 수 있기 때문에 주의를 기울여야 한다.

본 연구결과 법의학적 현장에서 중요한 증거물의 하나인 치아로부터 DNA를 추출하여 각 시료의 성별 검사, D1S80 유전좌위의 AMP-FLPs 검색을 성공적으로 수행할 수 있음이 규명되었다. D1S80 유전좌위의 AMP-FLPs 검색은 본 연구에서는 성공적으로 수행되었으나 D1S80 유전좌위는 약 30개 정도의 대립인자로 약 80% 정도의 이형접합도를 보여 이 유전자형의 검색만으로는 다수의 인구를 상대로 할 때 그 개인식별이 곤란해 질 수 있다. 이때 다좌위탐침에 의한 유전자형을 검색하면 다른 사람이 동일한 유전자형 다형성을 나타낼 확률이 매우 낮기 때문에 정확하게 개인식별을 할 수 있으나, 혈흔, 정액, 모발, 타액반, 오래된 유골과 치아 같은 법의학적 시료에서는 추출할 수 있는 DNA양은 극히 미량일뿐만 아니라 분해된 경우가 많아 대개 중합효소반응법에 의한 유전자형을 검사하게 된다.

중합효소반응법에 의한 검사의 경우에는 1ng 이하의 매우 소량의 DNA만으로도 유전자형을 검사할 수 있으나, 대립인자의 길이가 대략 5kb 이상의 경우에는 중합효소반응에 의한 검색이 불가능한 경우가 많으며, 이형접합도가 100%에 달하는 유전좌위는 아직 발견되지 않은 상태이다. 따라서 AMP-FLPs 검사에서는 이형접합도가 80%이상을 나타내는 다른 여러 유전좌위의 검사를 병행할 필요가 있다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 10년된 치아에서도 성공적으로 DNA를 추출할 수 있으며, 법의학적 개인식별에 사용되는 대표적인 유전자인 homologous amelogenin gene 과 D1S80 유전좌위의 다형성을 중합효소반응법에 의해 검색할 수 있었으나 다수의 사람이나 시료를 대상으로 개인식별을 해야할 경우에는 다른 유전좌위의 AMP-FLPs 검색을 추가적으로 실시하여야 한다. 이와 더불어 AMP-FLPs의 단점을 보완할수 있는 방법들 즉 mitochondria sequencing, MVR

-PCR 등과 같은 방법을 적용함으로써 법의학적 시료에서 완전한 개인식별이 가능하도록 좀 더 확실한 방법들을 도입하고, 치아조직으로 부터 DNA를 다량 추출할 수 있도록 salting-out법, phenol 추출법,비등법 등을 비교 실시할 필요가 있다.

## V. 결 론

치아에서 DNA 분석에 의한 개인식별을 위하여 치아발거 후 즉시 그리고 발거 후 실온에서 10년이상 방치한 치아(각각 4개, 7개)의 법랑질, 상아질, 치수로부터 DNA를 추출하고 중합효소반응을 이용한 증폭절편다형(AMP-FLPs)을 실시하고 성별검사를 위한 X-Y homologous amelogenin gene 검색 및 D1S80 유전좌위의 VNTR대립유전자를 검색하는 실험을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 발거직후 치아의 치수조직, 상아질에서 DNA를 추출하여 중합효소반응에 의한 X-Y homologous amelogenin gene과 D1S80 유전좌위의 AMP-FLPs 검색으로 성별검사 및 개인식별이 가능하였다.
2. 실온에서 10년간 방치한 치아의 치수와 상아질 일부에서도 DNA가 추출됨으로써 성별검사가 대부분 가능하였고 중합효소반응의 온도순환을 40회로 증가시킴으로써 D1S80 유전좌위를 증폭하여 AMP-FLPs 검색이 가능하였다.
3. DNA 추출은 발거 직후의 치아나 실온에서 10년간 방치한 치아 공히 법랑질에서는 가능하지 않았으며 10년간 방치한 치아의 상아질에서는 일부(3/7)만이 추출되었으나 발거 직후 치아의 상아질에서는 전부 추출되었고 치수에서는 모든 표본에서 DNA가 추출되어 법의학적 개인식별에 이용할 수 있음이 확인되었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 치아에서 DNA를 추출하여 중합효소반응을 통한 성별검사, D1S80 유전좌위의 AMP-FLPs 검색은 10년이 경과한 치아에서도 성공적으로 수행되며, 특히 치수내 DNA는 잘 보존되어 법의치과학적 개인식별을 위한 자료로서의 가치가 매우 높은 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌


1. Adams, D. E. et al : Deoxyribonucleic acid(DNA) analysis by restriction fragment length polymorphisms of blood and other body fluid stains subjected to contamination and environmental insults, J. Forensic Sci., 36(5) ; 1284-1298, 1991.
2. Aitchison, J.: Dent. Practit., 14 ; 52, 1963.
3. Akane, A. et al : Purification of forensic specimens for the polymerase chain reaction(PCR) analysis, J. Forensic Sci., 38(3) ; 691-701, 1993.
4. Akane, A. et al : Sex identification of forensic specimens by polymerase chain reaction(PCR) : Two alternative methods, Forensic Science International, 49 ; 81-88, 1991.
5. Akane, A. et al : Sex determination of forensic samples by dual PCR amplification of an X-Y homologous gene, Forensic Science International, 52 ; 143-148, 1992.
6. Akiyama, K. et al : Polymerase chain reaction(PCR)/single-strand conformation polymorphism(SSCP) analysis of the human HLA- DQB regions, Jpn. J. Legal Med., 48(1) ; 38-43, 1994.
7. Baechtel, F. S., Smerick, J. B., Presley, K. W. and Budowle, B. : Multigenerational amplification of a reference ladder for alleles at locus D1S80, J. Forensic Sci., 38(5) ; 1176-1182, 1993.
8. Balazs, I., Baird, M., Clyne, M. and Meade, E. : Human population genetic studies of five hypervariable DNA loci, Am. J. Hum. Genet., 44 ; 182-190, 1989.
9. Barr, M. L. and Bertram, E. G. : Morphological distinction between neurons of the male and female and behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis, Nature, 163 ; 676-677, 1949.
10. Barros, F., Lareu, M. V. and Carracedo, A. : Detection of polymorphisms of human DNA after polymerase chain reaction by miniaturized SDS-PAGE, Forensic Science International, 55 ; 27-36, 1992.

11. Black Ⅲ, T. K. : Sexual dimorphism in the tooth crown diameters of the deciduous teeth, Am. J. Phys. Anthrop., 48 ; 77-82, 1978.
12. Budowle, B. et al : Analysis of the VNTR locus DIS80 by the PCR followed by high-resolution PAGE, Am. J. Hum. Genet., 48 ; 137- 144, 1991.
13. Budowle, B., Waye, J. S., Shutler, G. G. and Baechtel, F. S. : Hae III - A suitable restriction endonuclease for restriction fragment length polymorphism analysis of biological evidence samples, J. Forecsic Sci., 35(3) ; 530-536, 1990.
14. Caspersson, T. et al: Chemical differentiation along metaphase chromosomes, Exptl. Cell Res., 49 ; 219-222, 1968.
15. Chuah, S. Y. et al : Analysis of the D1S80 locus by amplified fragment length polymorphism technique in the Chinese, Malays and Indians in Singapore, Forensic Science International, 68 ; 169-180, 1994.
16. Cooke, H. J. : Repeated sequences specific to human males, Nature, 262 ; 182-186, 1976.
17. Crouse, C. A., Vincek, V. and Caraballo, B. K. : Analysis and interpretation of the HLA DQ$\alpha$ "1.1 weak-signal" observed during the PCR-based typing method, J. Forensic Sci., 39(1) ; 41-51, 1994.
18. Deka, R., Croo, S. D., Yu, L. M. and Ferrell, R. E. : Variable number of tandem repeat(VNTR) polymorphism at locus D17S5(YNZ22) in four ethnically defined human populations, Hum. Genet., 90 ; 86-90, 1992.
19. Dixon, A. D. and Torr, J. B. D. : Sex chromatin in oral smears, Brit. Med. J., 4996 ; 799-800, 1949.
20. Fisher, D. L. et al : Extraction, evaluation, and amplification of DNA from decalcified and undecalcified united states civil war bone, J. Forensic Sci., 38(1) ; 60-68, 1993.
21. Fukushima, H., Hasekura, H. and Nagai, K. : Identification of male bloodstains by dot hybridization of hyman Y chromosome-specific DNA probe, J. Forensic Sci., 33 ; 621-627, 1988.
22. Gaensslen, R. E. et al : A polymerase chain reaction (PCR) method for sex and species determination with novel controls for deoxyribonucleic acid(DNA) template length, J. Forensic Sci., 37(1) ; 6-20, 1992.
23. Garn, S. M. et al : Sex discriminatory effectiveness using combinations of root length and crown diameters, Am. J. Phys. Anthrop., 6 ; 199-207, 1948.
24. Gill, P., Jeffreys, A. J. and Werrett, D. J. : Forensic application of DNA 'fingerprints', Nature, 318 ; 577-579, 1985.
25. Gill, P., Sullivan, K. and Werrett, D. J. : The analysis of hypervariable DNA profiles : Problems associated with the objective determination of the probability of a match, Hum. Genet., 85 ; 75-79, 1990.
26. Goodfellow, P. N., Darling, S. M. and Wolfe, J. : The human Y chromosome, J. Med. Genet., 22 ; 329-344, 1985.
27. Ishizu, H. : Special communication 1 - sex identification of forensic biological materials, Jpn. J. Legal Med., 47(6) ; 423-424, 1993.
28. Hochmeister, M. N. et al : Typing of deoxyribonucleic acid(DNA) extracted from compact bone from human remains, J. Forensic Sci., 36(6) ; 1649-1661, 1991.
29. Holland, M. M. et al : Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains : Identification of remains from the Vietnam war, J. Forensic Sci., 38(3) ; 542-553, 1993.
30. Hopkins, B. et al : The use of minisatellite variant repeat- polymerase chain reaction(MVR-PCR) to determine the source of saliva on a used postage stamp, J. Forensic Sci., 39(2) ; 526-531, 1994.
31. Ivey, J. N., Atchison, B. A. and Georgalis, A. M. : Assessment of PCR of the D17S30 locus for forensic identification, J. Forensic Sci., 39(1) ; 52-63, 1994.
32. Jeffreys, A. J., Brookfield, J. F. Y. and Semeonoff, R. : Positive identification of an innigration test-case using human DNA fingerprints, Nature, 317 ; 818-819, 1985.
33. Hill, A. V. S. and Jeffreys, A. J. : Use of minisatellite DNA probes for determination of twin zygosity at birth, Lancet, 21(28) ; 1394-1395, 1985.
34. Jeffreys, A. J., Wilson, V. and Thein, S. L. : Individual-specific 'fingerprints' of human DNA, Nature, 316 ; 76-81, 1985.
35. Jeffreys, A. J., Wilson, V. and Thein, S. L. : Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA, Nature, 314 ; 67-73, 1985.
36. Kasai, K., Nakamura, Y. and White, R. : Amplification of a variable number of tandem repeats( VNTR) locus(pMCT118) by the polymerase chain

reaction(PCR) and its application to forensic science. J. Forensic Sci., 35(5) ; 1196-1200, 1990.
37. Katsuura, Y. and Maeiwa, M. : VNTR polymorphism of the collagen type II, alpha(COL2A1) gene detected by PCR, Jpn. J. Legal Med., 46(5) ; 297-300, 1992.
38. Kobayashi, R. et al : Sex identification in fresh blood and dried bloodstains by a nonisotopic DNA analyzing technique, J. Forensic Sci., 33 ; 613-620, 1988.
39. Kojima, T. et al : DNA typing of the three HLA -class II loci from saliva stains, Jpn. J. Legal Med., 47(5) ; 380-386, 1993.
40. Kwork, S. and Higuchi, R. : Avoiding false positives with PCR, Nature, 339 ; 237-238, 1989.
41. Laber, T. L., Giese, S. A., Iverson, J. T. and Liberty , J. A. : Validation studies on the forensic analysis of restriction fragment length polymorphism(RFLP) on LE agarose gels without ethidium bromide : Effects of contaminants, sunlight, and the electrophoresis of varying quantities of deoxyribonucleic acid(DNA), J. Forensic Sci., 39(3) ; 707-730, 1994.
42. Laber, T. L. et al : Evaluation of four deoxyribonucleic acid(DNA) extraction protocols for DNA yield and variation in restriction fragment length polymorphism(RFLP) sizes under varying gel conditions. J. Forensic Sci., 37(2) ; 404-424, 1992.
43. Lau, Y. F. et al : A rapid screening test for antenatal sex determination, Lancet. 1 ; 14-16, 1984.
44. Lee, H. C. et al : Genetic markers in human bone : I. Deoxyribonucleic acid(DNA) analysis, J. Forecsic Sci., 36(2) ; 320-330, 1991.
45. Lewis, M. E. et al : Restriction fragment length polymorphism DNA analysis by the FBI laboratory protocol using a simple, convenient hardware system, J. Forensic Sci., 35(5) ; 1186-1190, 1990.
46. Lorber, M., Alvo, G. and Zontine, W. J. : Sexual dimorphism of canine teeth of small dogs, Archs. Oral Biol., 24 ; 585-589, 1979.
47. Ludes, B., Pfitzinger, H. and Mangin, P. : DNA fingerprinting from tissues after variable postmortem periods, J. Forensic Sci., 38(3) ; 686-690, 1993.
48. Moore, K. L. and Barr, B. L. : Smears from the oral mucosa in the detection of chromosomal sex, Lancet, 57-58, July, 1955.
49. Mullis, K. B. and Faloona, F. A. : Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, Methods in Enzymology, 155 ; 335-350, 1987.
50. Nagao, M. et al : Personal identification from human remains using morphological characteristics and DNA analysis, Jpn. J. Legal Med., 48(2) ; 87-91, 1994.
51. Naito, E., Dewa, K., Yamanouchi, H. and Kominami, R. : Sex typing of forensic DNA samples using male-and female-specific probes, J. Forensic Sci., 39(4) ; 1009-1017, 1994.
52. Nakahori, Y., Mitani, K., Yamada, M. and Nakagome, Y. : A human Y-chromosome specific repeated DNA family(DYZ 1) consists of a randem array of pentanucleotides, Nucleic Acid Res., 14 ; 7569 -7580, 1985.
53. Niederhauser, C. et al : Reliability of PCR decontamination systems, PCR Methods and Applications, 117-122, 1994.
54. Ohhashi, A., Aoki, T., Matsugo, S. and Simasaki, C. : PCR-based typing of human buccal cell's DNA extracted from whole saliva and saliva stains, Jpn. J. Legal Med., 47(2) ; 108-118, 1993.
55. Phang, T. W., Shi, C. Y., Chia, J. N. and Ong, C. N. : Amplification of cDNA via RT-PCR using RNA extracted from postmorten tissues, J. Forensic Sci., 39(5) ; 1275-1279, 1994.
56. Reynolds, R. and Sensabaugh, G. : Analysis of genetic markers in forensic DNA samples using the polymerase chain reaction, Anal. Chem., 63 ; 2-15, 1991.
57. Saiki, R. K. et al : Enzymatic amplification of $\beta$ -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, Science, 230 ; 1350-1354, 1985.
58. Sajantila, A. et al : PCR amplification of alleles at the D1S80 locus : Comparison of a finnish and a north american caucasian population sample, and forensic casework evaluation, Am. J. Hum. Genet., 50 ; 816-825, 1992.
59. Sajantila, A. et al : The polymerase chain reaction and post-mortem forensic identity testing : Applocation of amplified D1S80 and HLA- DQ$\alpha$ loci to the identification of fire victims, Forensic Science

International, 51 ; 23-34, 1991.
60. Schnee-Griese, J. et al : Frequency distribution of D1S80 alleles in the German population, Forensic Science International, 59 ; 131- 136, 1993.
61. Schnee-Griese, j. and Teifel-Greding, J. : DNA length polymorphism of the APO B 3′ region : Frequency distribution of the alleles in the German population, Forensic Science International, 51 ; 173-178, 1991.
62. Schwartz, T. R. et al : Characterization of deoxyribonucleic acid (DNA) obtained from teeth subjected to various environmental conditions, J. Forensic Sci., 36(4) ; 979-990, 1991.
63. Semba, S., Yamamoto, Y. and Ishizu, H. : Sex determination from blood and bloodstains by polymerase chain reaction(PCR), Jpn. J. Legal Med., 48(1) ; 7-18, 1994.
64. Seno, M. and Ishizu, M. : Sex identigication of a human tooth, INT. J. FORENS. DENT., 1 ; 8-11, 1973.
65. Seno, M., Ishizu, M. and Mikami, Y. : Sex determination method of human blood stains, 科警研報告, 25(3), 1972.
66. Smith, B. C. et al : A systematic approach to the sampling of dental DNA, J. Forensic Sci., 38(5) ; 1194-1209, 1993.
67. Smith, H. O. and Wilcox, K. W. : A restriction enzyme from haemophilus influenza, I. Purification and general properities, J. Mol. Biol., 51 ; 379-389, 1970.
68. Sullivan, K. M., Mannucci, A., Kimpton, C. P. and Gill, P. : A rapid and quantitative DNA sex test : Fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin, BioTechniques, 15(4) ; 636- 642, 1993.
69. Tamaki, K. et al : DNA typing and analysis of the D1S8(MS32) allele in the Japanese population by the minisatellite variant repeat(MVR) mapping by polymerase chain reaction(PCR) assay, Jpn. J. Legal Med., 46(6) ; 474-482, 1992.
70. Thymann, M. et al : Analysis of the locus D1S80 by amplified fragment length polymorphism technique(AMP-FLP). Frequency distribution in Danes. Intra and inter laboratory reproducibility of the technique, Forensic Science International, 60 ; 47-56, 1993.
71. Tyler, M. G., Kirby, L. T., Wood, S. and Vernon, S. : Human blood stain identification and sex determination in dried blood stains using recombinant DNA technique, Forensic Sci. Int., 31 ; 267-272, 1986.
72. Verbovaya, L. V. and Ivanov, P. L. : "Sexing" deoxyribonucleic acid (DNA) on DNA fingerprint gel : An internal control for DNA fingerprint evidence, J. Forensic Sci., 36(4) ; 991-998, 1991.
73. Walsh, D. J. et al : Isolation of deoxyribonucleic acid(DNA) from saliva and forensic science samples containing saliva, J. Forensic Sci., 37(2) ; 387-395, 1992.
74. Walsh, P. S., Metzger, D. A. and Higuchi, R. : Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material, BioTechniques, 10 ; 506-513, 1991.
75. Washburn, S. L. : Sex differences in the pubic bone, Am. J. Phys. Anthrop., 6 ; 199-207, 1948.
76. Watson, J. D. and Crick, F. H. C. : Molecular structure of nucleic acids : A structure for deoxyribonucleic acid, Nature, 171 ; 737-738, 1953.
77. Waye, J. S. and Willard, H. F. : Chromosome-specific alpha satellite DNA : Nucleotid sequence analysis of the 2.0 kilobasepair repeat from the human X chromosome, Nucleic Acids Res, 13 ; 2731-2743, 1985.
78. White, R. et al : Construction of linkage maps with DNA markers for human chromosomes, Nature, 313 ; 101-105, 1985.
79. Whittaker, D. K., Llewelyn, D. R. and Johens, R. W. : Sex determination from necrotic pulpal tissue, British Dental Journal, 139(10) ; 403-405, 1975.
80. Yamada, Y. et al : Experience with cloned mitochondrial DNA analysis to forensic practice, Jpn. J. Legal Med., 48(1) ; 44-48, 1994.
81. Yamada, Y., Yamanoto, K., Yoshi, T. and Ishiyama, I. : Analysis of DNA from tooth and application to forensic dental medicine, Jpn. J. Legal Med., 43(5) ; 420-423, 1989.
82. Yamamoto, K. : Molecular biological studies on teeth inquests, Jpn. J. Legal Med., 46(6) ; 349-355, 1992.
83. Yamamoto, T. et al : Potential forensic applications of minisatellite variant repeat(MVR) mapping using the polymerase chain reaction (PCR) at

D1S8, J. Forensic Sci., 39(3) ; 743-750, 1994.
84. Yamamoto, T. et al : DNA typing of the D1S8 (MS32) locus by rapid detection minisatellite variant repeat(MVR) mapping using polymerase chain reaction(PCR) assay, Forensic Science International, 66 ; 69-75, 1994.
85. Yoshi, T. et al : Water-soluble eumelanin as a PCR-inhibitor and a simple method for its removal, Jpn. J. Legal Med., 47(4) ; 323-329, 1993.
86. 末永四郎 : 齒牙による性別判定について, 日法醫誌, 21(3) ; 293-294, 1967.
87. 山本勝一 : 法醫齒科學 180-182, 醫齒藥出版社, 第5版, 1988.
88. 山岸章二 : 齒牙硬組織による化學的性別判定について, 日法醫誌, 13(5) ; 664-679, 1959.
89. 羽賀通大 : 齒牙にぬける性差の研究, 日法醫誌, 13(5) ; 590-617, 1959.
90. 横山修一 : 齒髓からの性別判定について, 科醫研報告, 27(2) ; 9-12, 1974.
91. 곽 명재, 명 현군, 이 희석, 황 적준 : 한국인에서 중합효소 반응으로 검색되는 COL2A1 유전 좌위의 대립유전자 빈도, 대한 법의학회지, 18(2); 1-8, 1994.
92. 김 치홍, 명 현군, 홍 용표, 황 적준 : 한국인에서 VNTR D1S80 유전좌위의 유전적 다양성 및 집단의 균질성 검정, 대한법의학회지, 18(1) ; 60-70, 1994.
93. 문 국진, 황 적준, 김 종열, 박 의우 : 유전자조작을 이용한 사람 혈흔의 개인식별에 관한 연구, 대한법의학회지, 15(1) ; 14-24, 1991.
94. 명 현군, 김 경훈, 황 적준 : 단일 모발로 부터 DNA의 유전자형 검사, 대한법의학회지, 17(2) ; 1-7, 1993.
95. 박 동호, 김 종열 : 치수조직 염색체에서의 F-body 검출에 의한 성별판정에 관한 연구, 대한구강내과학회지, 9(1) ; 127-134, 1984.
96. 송 은섭, 정 재안, 이 희석, 황 적준 : D1S80의 유전자형 결정을 위한 PCR법의 조건에 관한 내용, 대한법의학회지, 18(1) ; 45-59, 1994.
97. 윤 경규, 황 적준, 김 종열 : 타액반 피검물에서 개인식별을 위한 DNA의 유전자형검사, 대한구강내과학회지, 19(2) ; 205-217, 1994.
98. 이 승섭, 정 재안, 황 적준 : 한국인에서 pV47-2 다좌위탐침으로 검색되는 VNTR유전좌위의 대립유전자 빈도, 대한법의학회지, 18(1) ; 21-32, 1994.
99. 임 양희, 정 재안, 황 적준 : 한국인에서 pV47-2 다좌위탐침으로 검색되는 유전자지문의 유전적 특성, 대한법의학회지, 18(1) ; 33-44, 1994.

ABSTRACT

# Individual identification by analysis of DNA from the teeth

**Chang - Lyuk Yoon**, D.D.S., M.S.D., Ph. D.

*Department of Oral Diagnosis & Oral Medicine, College of Dentistry, Chosun University*

**Chong-Youl Kim**, D.D.S., M.S.D., Ph. D.

*National Institute of Scientific Investigation Department of Oral Medicine, College of Dentistry, Yonsei University*

The deoxyribonucleic acid(DNA) was isolated from the pulp, dentin and enamel of the 4 fresh teeth and the 7 teeth left in room temperature for 10 years. Then it was examed to find out the usefulness for forensic dental medicine.

Samples of the tooth-derived DNA amplified by polymerase chain reaction(PCR), electrophosed for sex determination by detection of X-Y homologous amelogenin gene and D1S80 locus detection.

The following results have been achieved.

1. DNA extraction was possible in pulp and dentin of the fresh teeth, so it could be applicatable to detection of X-Y homologous amelogenin gene for sex determination, amplification of D1S80 locus by PCR.
2. Sex determination was possible in pulp and dentin of the teeth left at room temperature for 10 years. Also, possible the detection of AMP-FLPs to increase PCR cycling up to 40.
3. DNA was isolated from all pulp of the fresh teeth and the teeth left in room temperature for 10 years, and also isolated from the dentin of the fresh teeth, partially isolated(3/7) from the dentin of the teeth left in room temperature for 10 years, but DNA was not isolated from the enamel.

From the above investigation, DNA extraction, sex determination, amplification of D1S80 locus were successfully accomplished even though the teeth were left for 10 years at room temperature. Therefore, teeth, especially pulp, are highly reliable and applicatable as molecular biological samples for individual identification.

Key words : teeth, polymerase chain reaction(PCR), AMP-FLPs, sex determination, X-Y homologous amelogenin gene, D1S80 locus VNTR