

치아에서의 DNA 유전자지문 분석

-Chelex[®] 100을 매개체로 한 DNA추출-

조선대학교 치과대학 구강진단·구강내과학 교실

윤창륙·허용·이영수·안종모

목 차

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

I. 서 론

법의치과학 전문가들에게 의뢰되는 감정물들은 단지 치아에 국한되거나 백골화 또는 분쇄, 부패되어 시체의 일부 조각만 남아있는 경우가 많으며 때로는 수백년 이상 경과한 경우도 드물지 않다. 이때 성별검사를 포함한 개인식별은 필수적이며 법의치과학적 난제라 할 수 있다.

성별감정은 두개골, 골반골, 장골을 비롯한 전체골조직의 특징⁵¹⁾과 치아를 이용한 방법이 이용되어 왔다. 이 중 치아에서의 성별추정은 계량통계학적 분석^{7,16,30)}, 법랑질의 분광투과율⁵⁶⁾, 상아질 비중⁵⁸⁾, 상아질이나 치조골내 유기질 분해후 산에 의한 중화량측정방법⁵⁷⁾이 있으나 정확도가

다소 떨어지고 末永⁵⁶⁾, Dixon과 Torr¹⁴⁾, 横山⁵⁹⁾ 등은 치수세포의 세포핵중 성염색질을 검토하여 여성판정에 이용하였고 Caspersson¹⁰⁾, Seno와 Ishizu⁴²⁾, Whittaker⁵³⁾, 박등⁶²⁾은 남성세포핵내 Y 염색체의 long arm의 말단부위에서 fluorescence body(F-body)를 검출하여 남성 판정에 응용하였으나 각각 그 반대의 성을 판정함에 있어서는 음성소견에 의한다는 약점이 있고 사후 시간경과에 따라 세포가 부패되거나 변성될 경우 성염색질이나 F-body 검출이 어렵고, 이러한 성별검사는 보통 생물학적 시료에서 핵분열 중간기의 세포핵내 성특이성이 있는 염색질검사를 시행하는 것인데 염색질 수준에서 비특이적 형태가 존재하고 정상 남녀에서 Y, X Chromocenter가 반드시 존재해야 하며 개체의 성별과는 관계없는 염색질과 유사한 구조가 종종 존재하기도 한다⁴⁶⁾.

1980년대 들어 분자생물학적 기법의 눈부신 발달로 DNA 수준에서의 유전적 변이 분석은 의학 및 생물학분야에 획기적 변화를 일으키며 각종 미생물의 검출, 암을 포함한 질병의 진단, 원인규명뿐만 아니라 법의학 개인식별이 가능케 되어 생물학적 증거물의 분석은 분자수준에서 검사하는 단계에 이르렀다^{17,18,23,26,52)}.

1970년 Smith와 Wilcox⁴⁴⁾에 의하여 DNA의 염기배열중 특정 염기만을 인식하여 그 부위를 절단시키는 제한효소가 발견된 이후 한 두 개의

* 이 논문은 1994년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

유전자 연구에서 한 개체에 존재하는 게놈 전체에 대한 연구로 발전되었다. DNA 염기배열은 생물종간, 동종이라도 개체사이에 차이가 많다는 사실이 규명되었고^{5,52)} 제한효소를 이용하여 DNA를 절단할 경우 길이가 서로 다른 DNA 단편들이 생성되며²⁶⁾ 이러한 DNA다형이 단편길이 다형(Restriction Fragment Length Polymorphism(RFLP))으로서 맨델의 유전법칙에 따라 유전되며 이 RFLP를 확인함으로써 DNA수준에서의 개인식별 뿐 아니라 유전질환의 진단 및 원인 유전자를 규명하는 것이 가능하게 되었다.

현재까지 사람의 게놈에서 1500개 정도의 다형성 유전자좌위(polymorphic locus)가 발견되었으나 이들 좌위의 유전표식자는 대부분 2개의 대립유전자만으로 구성되어 이형접합(heterozygosity)이 50%를 넘지 못하기 때문에 DNA다형성의 연구에 효과적이지 못하다⁶⁰⁾. 그러나, 진핵생물에서 유전형질의 발현에 관여하지 않는 9-50개의 염기수를 단위로 하는 특정 염기부위가 반복배열되는 과변이 초위성좌위(hypervariable minisatellite locus) 또는 variable number of tandem repeat 유전자좌위(VNTR locus)의 반복되는 염기구조의 차이에 의하여 발생하는 단편길이 다형(amplified fragment length polymorphism, AMP-FLPs)의 차이를 이용하여 개인식별을 시행한다. 사람 게놈에 분포되어 있는 VNTR 유전자좌위중 ApoB³⁹⁾, D17S30²²⁾, HLA-DQ α ^{13,28,29,37)}, D2S44^{5,9)}, D1S80^{4,6,8,11,27,36,38,47)} 등의 많은 유전자좌위가 개인식별에 이용되고 있으며 이중 D1S80 유전자좌위는 사람염색체 1번에 위치하며 30개 이상의 여러가지 다형대립유전자를 가지며 각각의 대립유전자는 16bp크기의 규칙적인 반복염기서열로 구성되어 있고 이들의 조합으로 형성되는 유전자형은 80% 이상의 높은 이형접합도를 보이므로 법의학적인 개인식별에 자주 이용되고 있다^{4,8,11)}.

법의학적인 시료에 대한 분자생물학적 성별판정은 Y염색체에 특이성이 있는 탐침을 사용하였으나¹²⁾ 최근, 치아 발생기에 범람질을 만드는 amelogenin gene을 남녀가 다르게 나뉘 가짐이

밝혀진^{1,33,34,45)} 이래 이 유전자좌위를 중합효소반응법(polymerase chain reaction, PCR)으로 증폭하여 pg단위의 소량의 DNA에 의해서도 성별판정이 가능하게 되었다.

이와같이 성별검사, 개인식별을 위한 amelogenin gene, D1S80 유전자좌위에 대한 연구는 대부분 혈액과 연관된 검체들에 관한 것이나 치아에서도 일련의 연구가 시도되어 Yamada등⁵⁴⁾은 치수에서 DNA를 추출하여 RFLPs 검사를 이용한 개인식별 및 Y염색체 상에서 DNA탐침을 이용한 성별검사를, Schwartz등⁴⁰⁾은 다양한 환경하에서 치아로부터 얻을 수 있는 DNA의 특징에 대하여 조사하였으며 윤등⁶⁴⁾은 발거후 10년 이상 경과된 치아의 치수 및 상아질에서도 DNA를 추출하여 유전자를 검색할 수 있음을 밝혔다.

치아에서 DNA를 추출하여 RFLPs 검색을 시행할 때 순수한 다량의 DNA를 추출하는 것이 감정의 관건이 되며 이 때 DNA검출은 전통적으로 페놀법, 침전법 및 비등법이 널리 사용되고 있으며 허등⁶⁵⁾의 연구에서 치아에서 4가지 DNA 추출방법에 따른 유전자좌위의 검색을 비교한 결과 침전법, 페놀법이 가장 우수한 것으로 나타났다.

이러한 전통적인 두 방법은 시료로부터 고분자량의 DNA를 추출할 수 있지만 복잡한 과정이 필요하고 DNA추출물을 여러 시험관을 통해 이동시켜야 하고 수세나 탈염과정에 부가적인 여과장치 등 기구들을 필요로 한다. 이 과정 때문에 시료들이 교차이동할 가능성도 있고 오염의 여지가 있게 된다⁵⁰⁾.

Singer-Sam등⁴³⁾은 끓였던 소수의 조직배양 세포에서 추출한 소량의 DNA의 PCR증폭시 Chelex[®] 100의 사용을 처음 보고한 수, Walsh등⁵⁰⁾은 다양한 법의학적인 시료로부터 DNA추출시 매개물로서 Chelex[®] 100을 HLA-DQ α 를 검색하여 좋은 결과를 보고한 바, 이 킬레스법은 전통적인 DNA추출법에 비하여 매우 쉽고 간편하며 페놀 등에 의한 환경오염을 줄일 수 있는 방법이기도 하다. 킬레스법이 법의학적인 검체에서 DNA를 간편하게 추출할 수 있는 방법이기도 하나 치수, 상아질등 치아조직에 적용할 때 그

효과가 어떠할지 아직 보고된 바 없다.

본 연구에서는 Salsh⁵⁰⁾가 시도한 킬렉스법을 두가지로 변형시켜 치아에서 DNA를 추출한 후 amelogenin gene, D1S80 유전자좌위의 검색여부를 비교 검사하여 차이점을 알아보고 법의치과학적 감정실무에서 응용해 본 연구를 실시하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

20에서 40대 사이의 남녀에서 발거한 구치로서 킬렉스만 처리한 군 10개, proteinase K 및 킬렉스를 동시에 처리한 군 4개, 페놀법을 적용한 군 8개 등 총 22개의 치아들을 대상으로 하였으며 각 치아들은 발거후 즉시 치수, 상아질 두층으로 분리하였다.

2. 연구방법

가. 치아의 분리

각 치아를 치수, 상아질의 두 부분으로 분리하기 전에 치아의 외면에 부착된 치석, 니코틴, 색소, 치주인대, 혈흔, 연조직 등을 고속회전 치과용 바를 이용하여 깨끗이 제거하고 멸균된 증류수로 세척한 후 다시 고속 회전치과용 바를 이용하여 치아 장축에 평행하게 절단하고 외과용 치즐을 이용하여 두 조각으로 분리시킨 후 치수를 치과용 탐침으로 분리하여 1.5ml eppendorf tube에 담고, 나머지 부분은 치수관을 멸균 증류수로 세척한 후 잘게 분쇄하여 1.5ml eppendorf tube에 수집하였다.

나. 각 방법에 따른 DNA 추출

① 킬렉스법

Walsh등³⁰⁾이 제안한 Clelex[®]100을 사용한 DNA추출법을 다음과 같이 두가지 방법으로 변형하여 시행하였다.

i) 킬렉스만 처리한 군

10개 치아들을 각각 치수 및 상아질로 분리하여 1.5ml eppendorf tube에 담고 멸균한 증류수 100 μ l를 분주하여 실온에서 24시간 방치하였다. 검체를 부드럽게 혼합하고 2-3분간 9,000rpm으로 원심분리한 후 20-30 μ l만 남기고 상층부를 제거하였다. 5% 킬렉스 200 μ l를 첨가하고 56 $^{\circ}$ C에서 30분간 부란한 후 5-10초간 강하게 혼합하고 8분간 끓는 물에 다시 부란하였다. 5-10초간 강하게 혼합하고 2-3분간 9,000rpm으로 원심분리한 후 상층부를 추출하여 유전자 검색 전까지 -20 $^{\circ}$ C 냉동고에 보관하였다.

ii) Proteinase K 및 킬렉스를 동시에 처리한 군

4개 치아들을 각각 치수 및 상아질로 분리하여 1.5ml eppendorf tube에 담고 멸균된 증류수 1000 μ l를 분주하여 실온에서 30분간 방치하였다. 검체를 2분간 부드럽게 혼합하고 1분간 9,000rpm으로 원심분리한 후 50 μ l만 남기고 상층부를 제거하였다. 5% 킬렉스 150 μ l와 2 μ l의 10mg/ml proteinase K를 첨가하였고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 부란한 후 5-10초간 강하게 혼합하고 9,000rpm으로 10-20초간 원심분리하였으며 8분간 끓는 물에 다시 부란하였다. 5-10초간 강하게 혼합하고 2-3분간 9,000rpm으로 원심분리한 후 유전자 검색전까지 -20 $^{\circ}$ C 냉동고에 보관하였으며 상층부를 PCR 증폭에 사용하였다.

② 페놀법에 적용한 군

8개 치아들은 각각 치수 및 상아질로 분리하여 1.5ml eppendorf tube에 담고 멸균된 증류수 100-200 μ l를 분주하여 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 방치하였다. 검체에 50 μ l nucleolysis buffer와 5 μ l proteinase K(12 μ g/ μ l)를 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 부란한 후 원심분리시켜 상층부를 취하여 새로운 eppendorf tube에 옮겨 담았다. 이렇게 처리된 상층액에 phenol/chlorform/isoamylalcohol(25:24:1) 혼합액을 넣어 잘 흔든 후 약 15분간 원심분리한 다음 상층액을 분리한 상층액에 phenol/chlorform/isoamylalcohol 혼합물을 넣어 다시 한번 상층액을 분리하는 과정을 반복

하였다. 이 검체에 1/10 부피의 3M sodium acetate를 넣은 다음 잘 흔들어 혼합한 후 2배 부피의 100% 에탄올을 혼합시켜 15분간 14,000 rpm으로 원심분리 후 DNA를 추출하였다.

얻어진 DNA를 70% 에탄올로 세척하여 실온에 건조시키고 멸균 증류수에 용해하였다. 용해된 DNA를 역시 유전자 검색 전까지 -20°C 냉동고에 보관하였다.

다. DNA 농도 측정

DNA의 농도는 Bekman[®] 자외선 분광기를 이용하여 260nm에서의 흡광도와 280nm에서의 흡광도를 조사하였다. DNA를 1:50의 비율로 희석 후 통과되는 자외선의 파장에 따라 얻어지는 260nm, 280nm의 수치로 DNA농도 및 순수도를 계산하였다.

라. 성별검사

성별검사를 위한 DNA의 PCR증폭은 Sullivan 등⁴⁵⁾이 제시한 프라이머(5' -CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG-3' 와 5-ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG-3')를 이용하여 Perkin-Elmer thermal cycler 480시스템으로 다음과 같이 각 군에 따라 PCR증폭을 수행하였다.

* 킬렉스만 처리한 군의 각 PCR혼합물에는 DNA시료가 치수의 PCR혼합물에서는 10 μ l씩, 상아질의 PCR혼합물에서는 20 μ l씩 포함되었고, POSCO 화학제품인 완충액(100mM Tris-HCl (pH 9.0), 500mM KCl, 1.0% Triton)과 1.5mM MgCl₂, 각각의 0.3 μ M 프라이머, 200 μ M의 dNTPs 그리고 1.5unit의 taq. DNA polymerase를 포함하여 최종 용량은 50 μ l로 하였다.

모든 시료는 첫 온도순환에 앞서 95°C에서 5분간 가열한 후, 94°C에서 1분, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분으로 이루어진 온도순환을 치수에서는 30회, 상아질에서는 35회를 시행하였고, 온도순환 후 72°C에서 10분간 반응시간을 추가로 주었다. 첫 온도 순환에 앞서 taq DNA polymerase

만을 제외한 PCR 혼합물을 94°C에서 5분간 가열한 후 taq DNA polymerase를 주입하는 hot start PCR을 시행하였다. PCR 반응후 증폭된 산물들은 vertical electrophoresis unit(GIBCO BRL Ins.)를 사용하여 1mm 두께의 12% natural polyacrylamide gel을 만들어 15 μ l씩 시적하였다. gel과 전극의 완충용액으로 1 \times TBE완충액(0.09M Tris-Borate, 0.002 EDTA)을 사용하여 100V의 일정한 전압에서 5시간동안 전기영동을 하였으며, 이때 size marker인 Pst1 2 μ l를 함께 시적하였다. 전기영동을 한 후 ethidium bromide(0.5 μ g/ml)로 염색하여 분리된 띠를 UV transilluminator상에서 판독하였다.

* proteinase K와 킬렉스를 동시에 처리한 군의 각 PCR혼합물에는 DNA시료가 40 μ l씩 포함되었고, 나머지 혼합물들은 킬렉스만 처리한 군과 동일하게 혼합하였다. PCR과정은 온도순환을 38회로 하였고 킬렉스만 처리한 군과 동일하게 시행하였다.

* 페놀방법의 각 PCR혼합물은 DNA시료가 1 μ l씩 포함되었고, 나머지 혼합물은 킬렉스방법과 동일하게 혼합하였으며, PCR온도순환을 33회로 하고 PCR의 다른 과정은 킬렉스방법과 동일하게 시행한 후 증폭된 산물들은 vertical electrophoresis unit(GIBCO BRL Ins.)를 사용하여 1mm 두께의 12% natural polyacrylamide gel을 만들어 15 μ l씩 시적하였다. gel과 전극의 완충용액으로 1 \times TBE완충액(0.09M Tris-Borate, 0.002 EDTA)을 사용하여 100V의 일정한 전압에서 5시간동안 전기영동을 하였으며, 이때 size marker인 Pst1 2 μ l를 함께 시적하였다. 전기영동을 시행한 후 ethidium bromide(0.5 μ g/ml)로 염색하여 분리된 띠를 UV transilluminator상에서 판독하였다.

마. DIS80 유전좌위의 VNTR 부위 증폭 및 AMP-FLPs검색

DIS80 유전좌위의 AMP-FLPs검색을 위해

Kasai 등²⁷⁾에 의해 제시된 프라이머(5' -GAAA CTGGCCTCCAAACACTGCCCGCCG-3' 와 5' -GTCTTGTGGAGATGCACGTGCCCT TGC-3')를 이용하여 Perkin-Elmer thermal cyclor 480 시스템에서 다음과 같이 각 군에 따라 PCR 증폭을 수행하였다.

* 킬렉스만 처리한 군의 각 PCR 반응혼합물에는 30 μ l의 주형 DNA를 이용하였으며 PCR 완충액 역시 성별검사시와 동일한 POSCO 화학제품의 완충액(100mM Tris-HCl(pH 9.0), 500mM KCl, 1.0% Triton)을 사용하였고 1.5mM MgCl₂, 각각 0.2 μ M primer, 각각 200 μ M의 dNTPs 그리고 1.5unit의 taq DNA polymerase를 성별검사시와 동일하게 사용하여 최종용량 50 μ l를 혼합하였다.

모든 검체는 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 66 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 2분의 온도순환을 35회를 시행하였으며, 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시간을 추가로 시행하였고 성별검사시와 마찬가지로 첫 순환에 앞서 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응 후 hot start PCR을 시행하였다. 증폭된 각각의 PCR 산물들은 horizontal electrophoresis unit(Bio-rad[®])를 이용한 5mm 두께의 2% agarous gel과 vertical electrophoresis unit(GIBCO BRL Ins.)를 이용한 1mm 두께의 5% natural polyacrylamide gel에서 DNA 크기 표시자인 Pst 1과 함께 10 μ l의 양을 100V의 일정한 전압에서 2시간 동안 전기영동 후 ethidium bromide 염색하여 분리된 띠를 UV transilluminator 상에서 판독하였다.

* proteinase K 및 킬렉스 처리군의 각 PCR 반응혼합물에는 40 μ l의 주형 DNA를 이용하였으며 온도순환을 40회로 하여 PCR을 시행하였고 나머지 조건은 킬렉스만 처리한 군과 동일하게 시행하였고 증폭된 각각의 PCR 산물들은 horizontal electrophoresis unit(Bio-rad[®])를 이용한 5mm 두께의 2% agarous gel과 vertical electrophoresis unit(GIBCO BRL Ins.)를 이용한 1mm 두께의 5% natural polyacrylamide gel을 만들어서 DNA 크기 표시자인 Pst 1과 함께 12 μ l의 양을

100V의 일정한 전압에서 3시간 동안 전기영동 후 ethidium bromide 염색하여 분리된 띠를 UV transilluminator 상에서 판독하였다.

* 페놀법의 각 PCR 반응혼합물에는 1 μ l의 주형 DNA를 이용하였으며 나머지 혼합물은 킬렉스법과 동일하게 사용하여 최종용량 50 μ l를 혼합하였다. 온도순환은 치수에서는 27회, 상아질에서는 33회로 하였고 반응과정은 킬렉스법과 동일하게 시행한 후 1mm 두께의 12% natural polyacrylamide gel과 2% 5mm 두께의 agarous gel을 만들어 15 μ l씩 시적하였다. gel과 전극의 완충용액으로 1 \times TBE 완충액(0.09M Tris-Borate, 0.002 EDTA)을 사용하여 100V의 일정한 전압에서 2시간 30분 동안 전기영동을 시행하였으며, 이때 size marker인 Pst 1 2 μ l를 함께 시적하였다. 전기영동을 시행한 후 ethidium bromide(0.5 μ g/ml)로 염색하여 분리된 띠를 UV transilluminator 상에서 판독하여 AMP-FLPs 검색 가능여부를 확인하였다.

III. 연구성적

1. 킬렉스법에 의해 추출된 DNA 농도 및 순수도

킬렉스만 처리한 군의 치아에서 DNA를 추출한 결과 DNA 농도는 치수에서 평균 16.25ng/ μ l, 상아질에서 3.25ng/ μ l로 나타났으며 순수는 각각 0.64, 0.18로 나타났다(Table 1)

Table 1. DNA concentrations extracted from the teeth by chelex method

specimens	DNA concentrations (ng/ μ l)	DNA purity
pulp	16.25 \pm 12.65	0.64 \pm 0.37
dentin	3.25 \pm 7.46	0.18 \pm 0.39

Table 2. DNA concentrations extracted from the teeth by phenol method

specimens	DNA concentrations (ng/ μ l)	DNA purity
pulp	126 \pm 99.38	1.56 \pm 0.22
dentin	14 \pm 15.83	0.67 \pm 0.18

Table 3. Results of detection of the X and Y specific sequences by chelex method from the teeth

Sample No.	Sex	Specimens	Detection
1	Male	Pulp	++
		Dentin	++
2	Male	Pulp	++
		Dentin	++
3	Male	Pulp	++
		Dentin	++
4	Male	Pulp	++
		Dentin	++
5	Male	Pulp	++
		Dentin	++
6	Female	Pulp	++
		Dentin	++
7	Female	Pulp	++
		Dentin	++
8	Female	Pulp	++
		Dentin	++
9	Female	Pulp	-
		Dentin	++
10	Female	Pulp	++
		Dentin	++

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

DNA농도 및 순수도의 측정시 킬렉스만 처리한 군은 페놀법을 적용한 군보다 현저하게 낮은 수치로 나타났으며, 순수도에 있어서 DNA 성분의 표준지표인 1.8에 페놀법을 적용한 치수층에서는 1.56으로 아주 근접한 결과로 나타났다 (Table 2).

2. 킬렉스법에 의한 성별검사

가. 킬렉스만 처리한 군

킬렉스만 처리한 군에서 추출한 DNA시료를 이용하여 X-Y homologous amelogenin gene을 중합효소 반응에 의해 증폭한 결과 전 치아에서 치수 1개 시료를 제외하고 치수, 상아질 모든 시료에서 106bp와 112bp크기의 PCR산물들을 전기영동후 ethidium bromide염색으로 관찰할 수 있었다. 얻어진 PCR산물에서 남자시료는 106bp와 112bp 크기의 두 DNA띠로 나타났으며, 여자시료에서는 106bp 크기의 단일 DNA띠로 나타나 남, 녀 성별검사를 정확히 수행하였다(Table 3, Fig. 1,2).

나. proteinase K 및 킬렉스를 동시에 처리한 군
 proteinase 및 킬렉스를 동시에 처리한 군에서 추출한 DNA 시료를 이용하여 X-Y homologous amelogenin gene을 중합효소 반응에 의해 증폭한 결과 상아질 검체 1개에서 상부띠가 불투명하게 나온 것을 제외하고 치수, 상아질 모든 시료에서 106bp와 112bp 크기의 PCR 산물들을 전

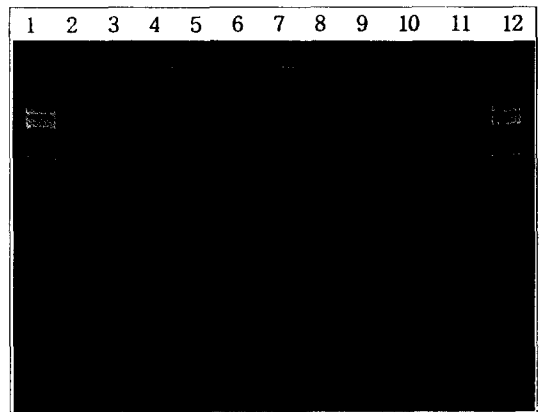


Fig. 1. 12% polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products of the X, Y homologous amelogenin gene by chelex method from the pulp.
 Lane 1, 12: size marker Psi \times 174.
 Lane 2,3,4,5,6: male,
 Lane 7,8,9,10,11: female.

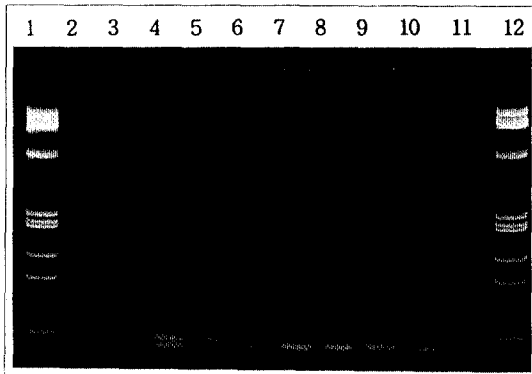


Fig. 2. 12% polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products of the X, Y homologous amelogenin gene by chelex method from the dentin.

Lane 1, 12: size marker Psi×174.

Lane 2,3,4,5,6: male.

Lane 7,8,9,10,11: female.

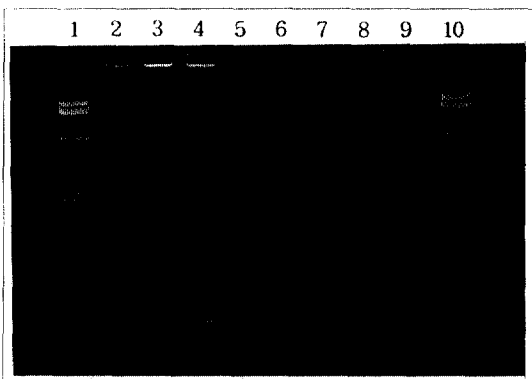


Fig. 3. 12% polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products of the X, Y homologous amelogenin gene by proteinase K and chelex method from the pulp and dentin.

Lane 1, 10: size marker Psi×174.

Lane 2,3: pulp-male,

Lane 4,5: pulp-female,

Line 6,7: dentin-male,

Lane ,8,9: dentin-female.

기영동후 ethidium bromide 염색으로 관찰할 수 있었다(Table 4, Fig. 3).

Table 4. Results of detection of the X and Y specific sequences by proteinase K and chelex method from the teeth

Sample No.	Sex	Specimens	Detection
1	Pulp	Male	++
		Female	++
2	Pulp	Male	+-
		Female	++
3	Dentin	Male	+
		Female	+-
4	Dentin	Male	++
		Female	++

+ :A faint band was observed

++:A distinct band was observed

다. 페놀법을 적용한 군

페놀법을 적용한 군에서 추출한 DNA 시료를 이용하여 X-Y homologous amelogenin gene을 증합효소 반응에 의해 증폭한 결과 치수, 상아질 모든 시료에서 106bp와 112bp 크기의 PCR 산물들을 전기영동후 ethidium bromide 염색으로 관찰할 수 있었다(Table 5, Fig. 4).

3. D1S80 유전자위의 AMP-FLPs 검색

발거후 즉시 킬렉스만 처리한 군과 preteinase K 및 킬렉스를 동시에 처리한 군에서 DNA을 추출하고 PCR로 증폭한 다음 전기영동하여 D1S80 유전자위의 대립유전자를 관찰한 결과 치수, 상아질 등 모든 시료에서 DNA띠가 나타나지 않았다(Table 6,7, Fig. 5).

그러나 페놀법을 적용한 군의 치수, 상아질 등 모든 시료에서는 뚜렷한 DNA띠를 관찰할 수 있었다(Table. 8, Fig. 5).

한편 페놀법을 적용한 군의 1-2(M32/M19), 3-4(M41/M12), 5-6(M35/M21), 7-8(M28/M20) 번 치아는 같은 대립유전자로 나타난 바, 동일개체에서 발거한 치아임을 확인하였고 모두 이형 접합자였다(Table 9, Fig.5).

Table 5. Results of detection of the X and Y specific sequences by phenol method from the teeth

Sample No.	Sex	Specimens	Detection
1	Male	Pulp	++
		Dentin	++
2	Female	Pulp	++
		Dentin	++
3	Male	Pulp	++
		Dentin	++
4	Female	Pulp	++
		Dentin	++
5	Male	Pulp	++
		Dentin	++
6	Male	Pulp	++
		Dentin	++
7	Male	Pulp	++
		Dentin	++
8	Male	Pulp	++
		Dentin	++

+ :A faint band was observed
 ++:A distinct band was observed

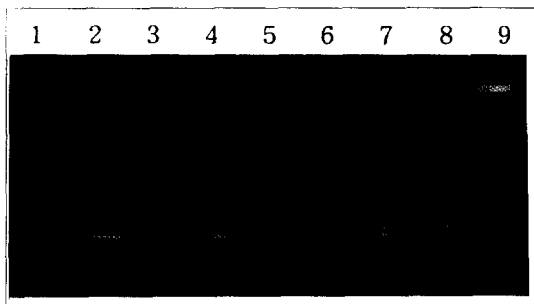


Fig. 4. 12% polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products of the X, Y homologous amelogenin gene by phenol method from the dentin.
 Lane 9: size marker Psi×174.
 Lane 1,3,5,6,7,8: male,
 Lane 2,4: female.

Table 6. Results of detection of the alleles of D1S80 locus by chelex method from the teeth

Sample No.	Specimens	Detection
1	Pulp	-
	Dentin	-
2	Pulp	-
	Dentin	-
3	Pulp	-
	Dentin	-
4	Pulp	-
	Dentin	-
5	Pulp	-
	Dentin	-
6	Pulp	-
	Dentin	-
7	Pulp	-
	Dentin	-
8	Pulp	-
	Dentin	-
9	Pulp	-
	Dentin	-
10	Pulp	-
	Dentin	-

- :No specific band was observed

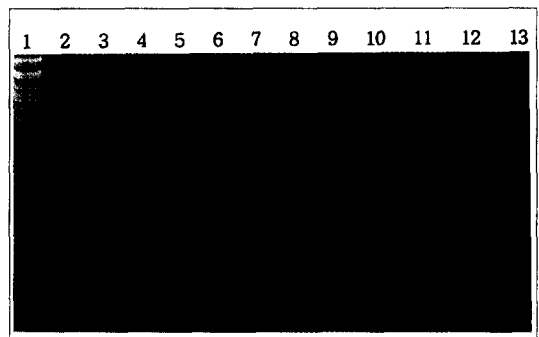


Fig. 5. 5% polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products of D1S80 locus by chelex method and phenol method.
 Lane 1: size marker Psi 1,
 Lane 2,4,6,8: phenol-pulp,
 Lane 3,5,7,9: phenol-dentin,
 Line 10,12: chelex-pulp, No specific band was observed,
 Lane 11,13: chelex-dentin, No specific band was observed.

Table 7. Results of detection of the alleles of D1S80 locus by proteinase K and chelex method from the teeth

Sample No.	Specimens	Detection
1	Pulp	-
		-
2	Pulp	-
		-
3	Dentin	-
		-
4	Dentin	-
		-

- :No specific band was observed

Table 8. Results of detection of the alleles of D1S80 locus by phenol method from the teeth

Sample No.	Specimens	Detection
1	Pulp	++
	Dentin	++
2	Pulp	++
	Dentin	++
3	Pulp	++
	Dentin	++
4	Pulp	++
	Dentin	++
5	Pulp	++
	Dentin	++
6	Pulp	++
	Dentin	++
7	Pulp	++
	Dentin	++
8	Pulp	++
	Dentin	++
9	Pulp	++
	Dentin	++
10	Pulp	++
	Dentin	++

+ :A faint band was observed

++:A distinct band was observed

IV. 총괄 및 고찰

개인식별을 위한 분자생물학적 방법의 법의학 적 응용은 Smith⁶⁷⁾ 등에 의하여 DNA염기배열

Table 9. Typing of D1S80 gene amplified from the teeth by phenol and chelex method.

Sample No.	Phenotype	Remark
1	M32 /M19-	Heterozygote
2	M32 /M19-	Heterozygote
3	M31 /M12+	Heterozygote
4	M31 /M12+	Heterozygote
5	M35 /M21++	Heterozygote
6	M35 /M21++	Heterozygote
7	M28 /M20+++	Heterozygote
8	M28 /M20+++	Heterozygote

* -, +, ++, +++ is sample from same individuals respectively.

중에서 특정 염기 부위만을 인식하고 그 부위를 절단하는 제한효소가 발견되면서 DNA수준에서의 연구가 급진전되었다. 이러한 제한효소를 발견하고 유전표식자를 이용한 분자생물학적방법의 1세대의 southern-hybridization법^{18,32)}과 제2세대의 polymerase chain reaction(PCR)법^{31,35)}, 그리고 PCR을 개발시킨 다른 여러 방법들^{15,20, 21,46)}이 있어 질병의 연구, 개인식별 및 친자감별 등에 응용하고 있다.

법의학적 검체는 소량의 혈흔, 정액, 단일 모발, 부패된 골 조직, 및 치아등으로 대부분 극소량이나 분해, 변성된 상태의 DNA만을 얻을 수 있다. 이러한 검체들에서 되도록 많은 양의 DNA를 추출하여 순수화시키는 것이 법의 감정을 수행하는데 중요한 열쇠가 된다.

DNA를 추출하는 전통적방법으로 phenol/chloroform/isoamylalcohol 혼합물을 이용한 페놀법을 주로 사용하고 있으나 이 방법에서는 DNA를 회수하는 과정이 복잡하여 검체가 시험관을 여러번 이동하기 때문에 DNA의 손실이 많고 페놀로 인한 환경오염의 문제도 생기게 된다⁵⁰⁾.

에탄올 침전법등 무기침전법은 고농도의 염의 사용, proteinase K 처리, glass powder의 사용 등 역시 복잡한 분리 및 순수화 과정을 거치게 된다. 여러 단계를 거치는 동안 검체들의 교차이

동가능성이 높아지고 오염될 수도 있다.

이에 반해 Singer-Sam⁵⁰⁾이 보고한 Chelex[®] 100의 이용은 소량의 DNA의 PCR증폭을 증가시킬 수 있는 방법으로 Chelex[®] 100은 다원자가 금속이온과 친화력이 높은 chelating resin으로 1쌍의 이미노디아세테이트(iminodi-acetate)이온을 포함하는 styrene divinyl benzene copolymers로 구성되어 있으며 킬레이트군으로 작용한다. 또한, chelating resin은 검체를 킬렉스 처리하여 끓이는 동안 저이온 강도의 용액에서 고온을 적용하여 DNA분해시 chelating 금속이온이 촉매로써 작용하여 DNA의 변성을 방지한다고 주장하였다.

추출된 DNA농도에 있어 킬렉스법과 전통적인 페놀법을 비교할 때 킬렉스법에서는 치수에서는 평균 16.25ng/ μ l이고 상아질에서는 3.25ng/ μ l로 페놀법에서 치수 및 상아질에서 각각 126ng/ μ l, 14ng/ μ l로 나타난 것보다 현저히 낮았고 DNA순수도 역시 킬렉스법의 치수, 상아질에서 각각 평균 0.64, 0.18로 나타나 1.63, 0.91과 큰 차이를 보였다. 킬렉스법을 적용할 때 치수에서는 수치상 DNA가 대부분 나타났으나 상아질에서는 DNA농도가 대부분 0으로 나타났다. 이러한 결과는 amelogenin gene 및 DIS80 유전좌위 검색시 그대로 반영되었다. 즉, pg단위의 극소량에서는 PCR증폭이 잘 되는 amelogenin gene은 킬렉스법과 페놀법에서 모두 검색이 가능하였고 킬렉스법에서 DIS80은 증폭되지 않았다.

Salsh⁵⁰⁾은 킬렉스법을 적용한 혈흔으로부터 DNA추출시 proteinase처리나 페놀법을 적용한 추출물보다 PCR반응 억제물질을 덜 생성한다고 하였고 두 혈흔에서 전통적 페놀법으로는 초기에 PCR반응억제물질이 보이나 킬렉스법에서는 보이지 않는다고 보고하였다. 혈액내 porphirin compound가 억제물질로 작용하게 되는데 proteinase 처리를 하지 않으면 혈액내 globin으로부터 heme이 유리되지 않기 때문에 킬렉스법을 적용한 추출물에서 유리 porphirin compound가 더 적게 되고 이러한 억제물질들도 킬렉스와 결합하게 되어 극소량이 혈흔에서 킬렉스법이 유용하다고 보고하였다. 그러나 상아질에서도 이

러한 작용을 하지 않는 것 같다. 킬렉스법이 혈액에서는 DNA순수도를 높이는 것으로 보고되었으나 상아질 치수에서 오히려 페놀법에 비하여 순수도가 떨어진 결과로 나타났다. 과거에 성별검사를 위한 분자생물학적 접근방법은 Y염색체상에 존재하는 DYZ1 유전좌위를 pHY10 탐침으로 민감하게 찾았지만 검색되지 않을 경우 여자이기 때문인지 아니면 검체의 양이 적어서인지 알 수 없는 단점이 있다^{2,3,12,33)}

그러나, 중합효소반응에 의한 X-Y homologous amelogenin gene의 AMP-FLPs 검색은 X, Y gene을 동시에 검사할 수 있어 Y염색체 특이성 탐침 사용할 때 발생하는 가성음성반응을 배제할 수 있는 우수한 방법이다^{1, 3,19,41,42,45)}

X-homologue의 인트론1에 6bp크기의 염기서열이 삭제되어 Sullivan⁴⁵⁾이 제시한 프라이머를 사용하여 중합효소반응으로 증폭하면 X염색체는 106bp, Y염색체는 112bp 크기의 DNA띠가 전기 영동상에서 관찰되어 성별판정을 하게 된다.

amelogenin gene 검색시 온도순환을 살펴보면 모든 군에서 온도순환을 30회로 하였을 때 대부분 증폭이 잘 되었고 증폭이 되지 않았을 경우 킬렉스 처리군에서는 35회로, 킬렉스와 proteinase K 동시처리군에서는 38회로 증가시켰을 때 정확히 나타났다.

한편, DIS80 유전좌위는 사람의 염색체 1번에 위치하는 16bp 크기의 규칙적인 반복염기서열로 구성되어 하나의 대립유전자가 약 350- 900bp의 크기로 존재한다^{8,27,47)}. 현재까지 한국인에서는 29개의 대립유전자가 확인되었으며, 이들 조합에 의하여 형성되는 유전자형은 406종으로 기대되나 한국인에서는 146종의 유전자형이 현재 밝혀졌고^{61,63)} 한국인 뿐만 아니라 Baechtel⁴⁾, Budowle⁸⁾, Chuah¹¹⁾, Sajantila²⁶⁾의 연구에서도 DIS80유전자위 이형접합도는 80%이상으로 높아 법의학적 감정에 널리 이용되고 있다.

본 연구에서는 페놀법을 제외한 킬렉스로 처리한 군에서 모두 DIS80이 증폭되지 않았는데, Walsh⁵⁰⁾에 의하여 킬렉스현탁액의 알칼리도 (pH 10-11)와 100°C 처리는 세포막의 파괴와

DNA의 변성을 야기시키고 킬렉스 처리과정이 DNA를 변성시키기 때문에 킬렉스법은 RFLP분석에는 적합하지 않다고 주장하였다.

따라서, 킬렉스법은 HLA-DQ α 나 amelogenin gene 검색시에는 유용하나 DIS80 등의 증폭에는 적합하지 않은 것으로 알려진 바 본 연구에서도 이와 같은 결과로 나타났다.

킬렉스법에 의해서 DIS80의 증폭은 이루어지지 않았으나 amelogenin gene 검색에는 우수한 결과를 보여 킬렉스법이 간편하고, 신속하며, 유기용매가 필요치 않을 뿐만 아니라 조작이 단순하기 때문에 검체 조작시 외부의 관계없는 DNA가 부주의하게 오염될 수 있는 기회도 감소하는 등 여러 가지 장점이 있으므로 RFLP분석을 제외한 amelogenin gene 등의 유전자 검사에 앞으로 유용할 것으로 사료된다.

V. 결 론

치아에서 DNA분석에 의한 개인식별을 하기 위하여 22개 치아의 치수와 상아질에서 킬렉스법(14개) 및 페놀법(8개)을 이용하여 DNA를 추출하고 증합효소반응을 통한 증폭절편다형(AMP-FLPs)을 시행하고 성별검사를 위한 X-Y homologous amelogenin gene 검색 및 DIS80 유전자위의 VNTR 대립유전자 검색을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 증합효소반응에 의한 X-Y homologous amelogenin gene 증폭시 킬렉스법 및 페놀법을 적용하여 치수, 상아질에서 공히 성별판별이 가능하였다.
2. 킬렉스법은 DIS80 유전자위의 AMP-FLPs 검색에는 적합하지 않았다.
3. 자외선분광기를 이용한 DNA양 및 순수도 측정시 킬렉스법이 페놀법에 비해 DNA양 및 순수도가 낮았다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 치아에서 DNA 추출시 킬렉스법은 전통적인 페놀법에 비하여 신속하고 간편한 방법으로서 성별검사에는 매우

유용하나 VNTR 대립유전자위의 검색에는 적당치 않음을 확인하였다.

참 고 문 헌

1. Akane, A. et al.:Purification of forensic specimens for the polymerase chain reaction(PCR) analysis, J.Forensic Sci., 38(3):691-701, 1993.
2. Akane, A. et al:by polymerase chain reaction(PCR) :Two alternative methods, Forensic Science International, 49:81-88, 1991.
3. 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.
4. Baechtel, F.S., smerick, J.B., Presley, K.W. and Budowle, b.:Multigenerational amplification of a reference ladder for alleles at locus DIS80, J. Forensic Sci., 38(5):1176-1182, 1993.
5. 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.
6. 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.
7. Black III, T.K.:Sexual dimorphism in the tooth crown diameters of the deciduous teeth, Am. J. Phys. Anthropol., 48:77-82, 1978.
8. 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.
9. Budowle, B., Wayne, 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. Forensic Sci., 35(3):530-536, 1990.
10. Caspersson, T. et al:Chemical differentiation along metaphase chromosomes, Exptl. Cell Res., 49:219-222, 1968.
11. Chuah, S.Y. et al:Analysis of the DIS80 locus by amplified fragment length polymorphism technique in the Chinese, Malays and Indians in Singapore, Forensic Science International, 68:169-180, 1994.
12. Cooke, H.J.:Repeated sequences specific to human

- males, *Nature*, 262:182-186, 1976.
13. Crouse, C.A., Vincek, V. and Caraballo, B.K.: Analysis and interpretation of the HLA DQ α "1.1 weak-signal" observed during the PCR-based typing method, *J. Forensic Sci.*, 39(1):41-51, 1994.
 14. Dixon, A.D. and Torr, J.B.D.: Sex chromatin in oral smears, *Brit. Med. J.*, 4996:799-800, 1949.
 15. 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.
 16. Garn, S.M. et al: Sex discriminatoly effectiveness using combinations of root length and crown diameters, *Am. J. Phys. Anthrop.*, 6:199-207, 1948.
 17. Gill, P., Jeffreys, A.J. and Werrett, D.J.: Forensic application of DNA 'fingerprints', *Nature*, 318:577-579, 1985.
 18. 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.
 19. Ishizu, H.: Special communication 1-sex identification of forensic biological materials, *Jpn. J. Legal Med.*, 47(6):423-424, 1993.
 20. 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.
 21. 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):526-951, 1994.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. Jeffreys, A.J., Wilson, V. and Thein, S.L.: Individual-specific 'fingerprints' of human DNA, *Nature*, 316:76-81, 1985.
 26. Jeffreys, A.J., Wilson, V. and Thein, S.L.: Hyper-variable 'minisatellite' regions in humna DNA, *Nature*, 314:67-73, 1985.
 27. 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.
 28. 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.
 29. 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.
 30. Lorber, M., Alvo, G. and Zontine, W.J.: Sexual dimorphism of canine teeth of small dogs, *Archs. Oral Biol.*, 24:585-589, 1979.
 31. Mullis, K.B. and Faloona, F.A.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Methods in Enzymology*, 155:330-350, 1987.
 32. Nagao, M. et al: Personal identification from human remains using morphological characteristics and DNA analysis, *Jpn. J. Legal Med.*, 48(2):87-91, 1994.
 33. 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.
 34. Nakahori, Y., Mitani, K., Yamada, M. and Nakagome, Y.: A human Y-chromosome specific repeated DNA family(DYZ 1) consists of a random array of pentanucleotides, *Nucleic Acid Res.*, 14:7569-7580, 1985.
 35. Reynolds, R. and Sensabaugh, G.: Analysis of genetic markers in forensic DNA samples using the polymerase chain reaction, *Anal. Chem.*, 63:2-15, 1991.
 36. 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.
 37. Sajantila, A. et al: The polymerase chain reaction and post-mortem forensic identity testing: Application of amplified D1S80 and HLA-DQ α loci to

- the identification of fire victims, *Forensic Science International*, 51:23-34, 1991.
38. Schnee-Griese, J. et al: Frequency distribution of D1S80 alleles in the German population, *Forensic Science International*, 59:131-136, 1993.
 39. 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.
 40. 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.
 41. 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.
 42. Seno, M. and Ishizu, M.: Sex identification of a human tooth, *INT. J. FORENS. DENT.*, 1:8-11, 1973.
 43. Singer-Sam, J., R.L., Tanguay R.L. and Riggs, A.D.: Use of chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. *Amplifications: A Forum for PCR Users*, cited from #50.
 44. Smith, H.O. and Wilcox, K.W.: A restriction enzyme from haemophilus influenza, I. Purification and general properties. *J. Mol. Biol.*, 51:379-389, 1970.
 45. 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.
 46. 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 reactin (PCR) assay, *Jpn. J. Legal Med.*, 46(6):474-482, 1992.
 47. 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.
 48. 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.
 49. 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, 1995.
 50. 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.
 51. Washburn, S.L.: Sex differences in the pubic bone, *Am. J. Phys. Anthropol.*, 6:199-207, 1948.]
 52. White, R. et al: Construction of linkage maps with DNA markers for human chromosomes, *Nature*, 313:101-105, 1985.
 53. Whittaker, D.K., Llewelyn, D.R. and Johens, R.W.: Sex determination from necrotic pulpal tissue, *British Dental Journal*, 139(0):403-405, 1975.
 54. 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):402-423, 1989.
 55. 末永西郎: 歯牙による性別判定について, *日法醫誌*, 21(3):293-294, 1967.
 56. 山本勝一: 法醫齒科學 180-182, 醫齒藥出版社, 第5版, 1988.
 57. 山岸章二: 歯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.
 58. 羽賀通大: 歯牙にぬける性差の研究, *日法醫誌*, 13(5):590-617, 1959.
 59. 横山修一: 齒髓かちの性別判定について, *科警研報告*, 27(2):9-12, 1974.
 60. 곽명재, 명현군, 이희석, 황적준: 한국인에서 중합효소 반응으로 검색되는 COL2A1 유전 좌위의 대립유전자 빈도, *대한법의학회지*, 18(2):1-8, 1994.
 61. 김치홍, 명현군, 홍용표, 황적준: 한국인에서 VNTR D1S80 유전좌위의 유전적 다양성 및 집단의 균질성 검정, *대한법의학회지*, 18(1):60-70, 1994.
 62. 박동호, 김종열: 치수조직 염색체에서의 F-body 검출에 의한 성별판정에 관한 연구, *대한구강내과학회지*, 9(1):127-134, 1984.
 63. 송은섭, 정재안, 이희석, 황적준: D1S80의 유전자형 결정을 위한 PCR법의 조건에 관한 내용, *대한법의학회지*, 18(1):45-59, 1994.
 64. 윤창륙, 김종열: 치아에서의 DNA 분석에 의한 개인식별, *대한구강내과학회지*, 2(1):229-246, 1995.
 65. 허웅, 윤창륙: 치아를 이용한 성별검사 및 D1S80 유전좌위의 검색시 4가지 DNA 추출방법에 따른 비교, *대한구강내과학회지*, 20(1), 1995, 인쇄중.

ABSTRACT

Analysis of the DNA fingerprints from the teeth

-Using Clelex[®] 100 as a medium of simple extraction of DNA from the teeth-

Chang-Lyuk Yoon, D.D.S., M.S.D., Ph.D., **Jong-Mo Ahn**, D.D.S., M.S.D.,
Woong Hur, D.D.S., M.S.D., **Young-Su Lee**, D.D.S.

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

The human genomic deoxyribonucleic acid(DNA) was extracted from the pulp, dentin of 22 teeth by chelex, phenol methods. Samples of the tooth-derived DNA were amplified by polymerase chain reaction(PCR), electrophoresed for sex determination by detection of X-Y homologous amelogenin gene and D1S80 locus detection.

The following results have been achieved.

1. Chelex and phenol method are effective to sex determination in the pulp and dentin.
2. Chelex method is not suitable for detection of D1S80 locus.
3. Concentration and purity of DNA for teeth using chelex method is lower than using phenol method.

From the above investigation, chelex method is simple, rapid for sex determination, but it is not suitable for detection of VNTRs.

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