ANALYTICAL SCIENCE & TECHNOLOGY
Vol.17, No.3, 211-216, 2004
Printed in the Republic of Korea

신속 FOB(분변 잠혈) 검사 키트를 이용한 혈흔 검출 및 인혈 검사

임시근★ · 박기원 · 최상규
국립과학수사연구소 생물학과
(2004. 3. 9 접수, 2004. 5. 14 승인)

Identification of human blood using Rapid FOB (Fecal Occult Blood) Test Kit

Si Keun Lim★, Ki Won Park and Sang Kyu Choi
Division of Biology, National Institute of Scientific Investigation
331-1, Shinwol 7-dong, Yangchun-gu, Seoul, 158-707, Korea
(Received Mar. 9, 2004, Accepted May. 14, 2004)

요 약 : 본 연구는 분변 잠혈 검출 키트 (one-step FOB(Fecal Occult Blood) kit)가 법생물학적으로 매우 중요한 혈흔 검출 및 사람 혈흔 판정에 적용 가능한지 알아보고자 하였다. 먼저 FOB 키트의 민감도를 결정하고 기존의 혈흔 검사법인 LMG 검사와 비교한 결과 1,000,000배 희석된 혈액까지도 검출 되었는데 이는 LMG 검사에 비해 약100배 정도 예민한 것이었다. 다른 동물 혈액에 대한 교차 반응 여부를 실험한 결과 FOB 키트는 사람의 혈액과만 반응하여 높은 특이성을 보여주었다. 또한 혈액의 보관 온도 및 경과 시간의 영향, 고온 처리의 영향을 알아보았으며, LMG 및 Luminol 시약의 영향에 대해서도 실험하였다. 사람 혈액 특이 항원은 매우 높은 안정성을 보여주었으며, 전통적인 혈흔 검사 시약인 LMG 및 Luminol에 대해서도 영향을 받지 않았다. 따라서 FOB 키트는 LMG 검사 및 Luminol 검사와 병행하여 사용하면 보다 신속하고 정확하게 사람 혈흔 여부를 판정할 수 있어 법과학 실험실에서는 물론 사건 현장에서의 혈흔 검사에 크게 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

Abstract : Commercial one-step rapid fecal occult blood (FOB) kit which was used as a screening test to detect traces of blood in stool samples was evaluated for the feasibility of the forensic identification of human blood. The sensitivity was determined and compared with the conventional Leucomalichite green (LMG) method. In addition, the specificity of the kit and the effects of various chemicals and environmental factors were examined. FOB kit was specific for human hemoglobin and more sensitive than LMG test (approximately 100 times). FOB kit showed positive band using at least 1,000,000-fold diluted human blood. The antigen was very stable regardless of storage temperature and boiling. The positive reaction was not affected by LMG and Luminol, the traditional tests for identification of

★ Corresponding author
Phone : +82+(0)2-2600-4861 Fax : +82+(0)2-2600-4866
E-mail : lskpmr@nisi.go.kr

bloodstain. As a results, FOB test kit could be effectively applied to identification of human blood at crime scene and crime laboratories.

Key words : Blood stain, FOB kit, LMG, Luminol, Sensitivity, Human-specificity

1. 서 론

범죄의 현장에 남겨져있는 많은 생물학적 증거물 중에 혈흔 (Blood stain)이 있는데, 피의자 및 피해자와의 대조를 통해 개인식별 (Individual identification)이 가능하다. 각종 사건 현장으로부터의 혈흔 증거물은 혈액형 및 유전자 분석 시행 전에 혈흔 여부 및 인혈 여부를 검사하게 된다. 혈흔의 검출은 사건 초동수사에 매우 중요하며, 특히 동물 혈흔과의 식별은 이후 실험의 방향을 결정해 준다. 육안으로 확인이 가능한 혈흔의 검사를 위해서는 LMG (Leucomalachite Green)을 이용한 정색반응법이 일반적으로 사용되고 있는데, 몇 가지 한계점을 가지고 있다.[1] 즉, 무색의 LMG가 과산화수소 (H_2O_2) 존재 하에서 혈색소의 촉매작용에 의해 청색의 LMG로 변화하게 되는데, 과산화효소 (peroxidase) 활성을 지닌 효소류나 일부 금속이온에 영향을 받는 것으로 알려져 있다.[2] 혈흔이 육안으로 식별되지 않는 경우에는 Luminol 시약을 사용하여 혈흔을 찾을 수 있다. 혈흔 검사에서 양성 반응을 나타낸 혈흔은 사람의 혈흔인지를 검사하게 되는데, 이는 증거물이 다른 동물의 혈액으로 오염될 수 있기 때문이다. 전통적인 인수혈 검사 방법으로 이차원 평판 겔 확산법 (Ouchterlony 법)이 주로 사용되고 있다.[3] 이는 사람의 헤모글로빈에 특이적인 항체와의 반응으로 생성되는 침강선 (precipitatin line)의 유무로 판정할 수 있다. 그러나 이러한 인수혈 검사는 시간이 오래 걸리고, 반응하는 항원과 항체의 비율을 잘 맞추어야하는 단점이 있다. 최근에 면역크로마토그래피 기술을 이용한 신속 진단 시약들이 많이 개발되고 있다.[4,5] 분변 내 함유되어있는 극미량의 혈액을 검출하는 키트인 FOB (Fecal Occult Blood) 검출키트도 그 중 하나인데, 원래 소화관 출혈, 대장암의 조기 발견을 위한 스크리닝을 목적으로 개발되었다. FOB 키트는 사람의 헤모글로빈에 대한 모노클로날 항체를 이용하므로 사람이외의 동물 혈액에 대해서는 반응하지 않으며, 수 분 이내로 신속하게 검사할 수 있다. 본 연구에서는 FOB 키트의 법생물학적 이용 가능성을 알아보고자 하였다. 즉, 사건 현장으로부터의 증거물에서 혈흔이 검출되는지, 그리고 더 나아가 검출된 혈흔이 사람의 것인지를 현장에서 검사하는데 응용될 수 있는지 알아보고자 하였다.

2. 실 험

2.1. 검체 및 재료

실험에 사용된 사람 혈액은 감정 의뢰된 증거물을 사용하였으며, 동물 혈액 (소, 돼지, 말, 사슴, 개, 쥐, 닭, 오리, 전어, 꼬막)은 구매하거나, 직접 채취하여 사용하였다. 혈흔 검사 시약인 LMG, Hydrogen peroxide 및 Luminol, 에탄올과 계면 활성제인 SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)는 실험실에서 제조하여 사용하였다. 정액과 뇨와 같은 인체분비물은 3명의 남성으로부터 채취하여 사용하였다. 비타민 C, 각종 채소류 및 과일 (무우, 배추, 오이, 당근, 파, 고추, 양파, 마늘, 귤)은 구매하여 사용하였다.

2.2. LMG 시약을 이용한 혈흔 검사

전통적인 혈흔 검사 방법인 LMG (Leucomalachite Green) 검사는 먼저 혈흔을 거름종이 위에 올려놓고 검사시약 1 (LMG; 0.1 g의 LMG를 10 mL acetic acid와 15 mL의 증류수에 녹인 용액)를 1방울 적하하고, 이어 그 위에 검사시약 2 (H_2O_2; Hydrogen peroxide, 3%)를 1방울 적하하여 수초 내에 청록색의 정색반응이 나타나는지를 관찰하였다.

2.3. FOB 키트를 이용한 혈흔 검사

본 연구에 사용된 FOB 키트는 에스디(주)에서 제공받아 사용하였다. FOB 키트는 면역 크로마토그래피 방법 (immuno-chromatographic sandwich capture method)를 이용하여 헤모글로빈 농도가 50 ng/mL 이상인 경우 검출될 수 있도록 고안되었다. 검사용 디바이스는 플라스틱 카세트 외부에 타원형의 검사용액 점적 부위 (S)가 있고, 직사각형의 표시창에 대조선 (C)과 검사선 (T) 위치가

표시되어 있으며, 대조선과 검사선 밴드의 현출에 따라 음성과 양성으로 판정한다. 혈흔 검체의 검사를 위해서는 혈흔부위를 오리거나 면봉으로 채취하여 2 mL의 검체 희석액이 담긴 용기에 넣고 뚜껑을 닫은 후 수회 강하게 흔들어준 다음 검액 점적부위(S)에 4방울(120 ㎕)을 떨어뜨렸다.

2.4. FOB 키트의 검출 민감도

FOB 키트의 검출 민감도 (sensitivity)를 알아보기 위해 전혈 (whole blood)을 증류수를 사용해 연속적으로 10배씩 희석하여 사용하였다. 먼저 희석된 혈액 50 ㎕를 FOB 키트의 점적부위(S)에 적하하고, 검체 희석액(전개액) 4방울을 추가로 적하하였다. 또한 혈액 희석액 10 ㎕를 거름종이 위에 적하해 말린 혈흔은 LMG 방법으로 검사하여 FOB 키트와 검출 민감도를 비교하였다. 또한 묻어있는 검체 종류에 따른 혈흔의 용출 정도를 알아보기 위해 거름종이, 화장지, 거즈, 복사용지, 면봉, 천에 혈액을 묻혀 실험하였다.

2.5. 저해 물질 및 온도의 영향

먼저 다양한 화학물질들이 FOB 키트에 미치는 영향을 조사하기위해 LMG, Luminol, Hydorgen peroxide, Ethanol, 및 SDS를 10배 희석된 혈액과 동량 혼합하여 FOB 키트에 적하하였다. 또한 항원의 열 안정성 (Heat stability)을 알아보기 위해 혈액을 담은 튜브를 끓는물에 담구고 일정 시간 (5분, 10분, 15분 및 20분) 별로 FOB 키트 및 LMG 검사를 수행하였다. 혈액 및 혈흔을 다양한 온도 (-20 ℃, 4 ℃, 상온, 37 ℃, 56 ℃) 하에서 보관하면서 일정 시간 (5일, 10일) 별로 FOB 키트 및 LMG 검사를 수행 하였다.

2.6. FOB 키트의 사람 특이성

FOB 키트의 사람 특이성 (specificity)을 알아보기 위해 사람 이외의 동물 (사슴, 개, 말, 소, 돼지, 쥐, 닭, 오리, 전어, 꼬막) 혈액에 대한 교차반응 (cross reaction) 여부를 검사하였다. 이를 위해 동물 혈액을 거즈에 묻혀 말린 후 검체 희석액에 잘라 넣고 FOB 키트로 검사하였다. 또한 정액이나 뇨와 같은 인체분비물과 비타민 C, 채소류 및 과일즙 (무우, 배추, 오이, 당근, 파, 고추, 양파, 마늘, 귤)과의 교차반응 여부를 검사하였다.

3. 연구 결과

3.1. FOB 키트의 검출 민감도

혈액 희석액을 사용해 검출 민감도를 실험한 결과 FOB 키트는 10^{-6} 희석된 혈액까지 양성반응을 보였으며, LMG 시험법은 FOB 키트에 비해 약 100배 정도 덜 민감하게 반응하였다 (*Table* 1). FOB 키트의 경우 혈액 원액이나 10^{-2} 까지 희석된 혈액의 경우 소위 "Hook effect"에 의한 위음성 (false negative) 반응을 볼 수 있었다. 부패된 정도별로 다른 혈액을 대상으로 동일한 방법으로 실험한 결과 FOB 키트와 LMG 검사 모두 신선한 혈액과 큰 차이를 나타내지 않았다 (*Fig.* 1). 또한 혈흔이 묻어있는 검체의 종류별로 FOB 키트의 결과에 미치는 영향을 알아보았는데, 거름종이, 화장지, 거즈, 복사용지, 면봉, 천에 혈액을 묻혀 말린 후 검체 희석액에 넣고 FOB 키트로 검사한 결과 거의 차이가 없었다.

Table 1. Sensitivity of FOB kit

Tests \ Concentrations	1X	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
FOB	-	-	±	+	+	+	+	±	-
LMG	+	+	+	+	+	±	-	-	-

+: positive, ±: weak positive, -: negative

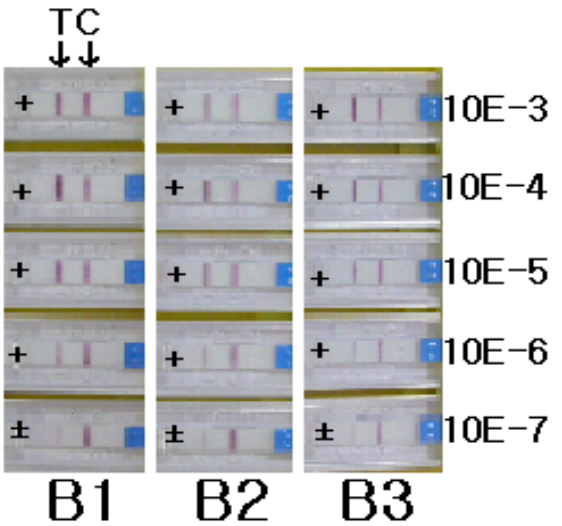

Fig. 1. **Sensitivity of FOB**. B1 was fresh whole blood, B2 was three month-old whole blood, and B3 was one year-old rotten whole blood.

3.2. 각종 화학 물질의 영향

Luminol 및 hydrogen peroxide는 FOB 키트의 결과에 거의 영향을 주지 않았으며, LMG와 ethanol은 검사선 (T) 밴드가 더욱 진하게 나타났으며, 특히 에탄올의 경우에 가장 진한 양성 밴드를 보여주었는데, 증거물로부터의 혈흔 채취 시 에탄올을 사용하면 매우 유용하리라 생각된다. 또한 SDS를 첨가한 혈액은 FOB 키트 및 LMG 검사 모두음성의 결과를 나타내었다 (*Table* 2).

Table 2. Effects of various chemicals

Tests \ Chemicals	LMG	H_2O_2	LMG + H_2O_2	Luminol	EtOH, Absolute	SDS (10%)
FOB	++	+	++	+	+++	-
LMG	+	+	+	+	+	-

+: positive, ++: strong positive, +++: very strong positive, -: negative

3.3. 온도의 영향

혈액 및 혈흔을 다양한 온도 하에서 보관 후 FOB 키트 및 LMG로 검사한 결과 모두 보관 온도의 영향을 받지 않았다 (*Table* 3). FOB 키트 검사결과 중 56 ℃에서 보관된 혈액의 경우 특이하게 시간이 경과할수록 더욱 진한 검사선 밴드를 보여주었다. 또한 혈액을 tube에 담아 끓이면서 시간별로 FOB 키트 및 LMG로 검사하였다 (*Table* 4). FOB 키트의 경우 5분간 끓인 혈액도 거의 영향을 받지 않았으나, 10분 이상 끓인 혈액의 경우에서는 검사선 밴드의 강도가 다소 약해짐을 볼 수 있었다 (*Fig.* 2).

Table 3. Effect of storage temperature

Time \ Temperature	-20 ℃	4 ℃	Room Temperature	37 ℃	56 ℃
5 days	+	+	+	+	+
10 days	+	+	+	+	++

+: positive, ++: strong positive

Table 4. Effect of boiling

Test \ Time	5min	10min	15min	20min
FOB	+	+	+	+
LMG	+	+	+	+

+: positive

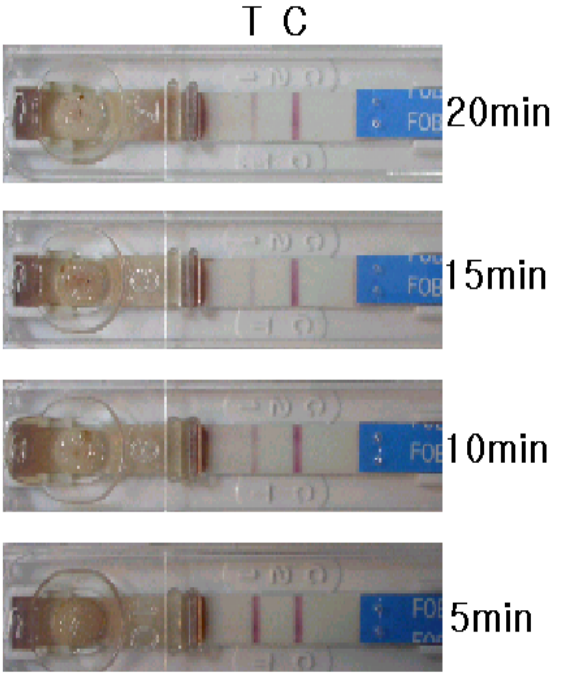

Fig. 2. Effect of boiling on FOB kit.

3.4. FOB 키트의 사람 특이성

FOB 키트의 사람 특이성을 알아보기 위해 동물 혈액과의 교차반응 여부를 조사하였다 (*Table* 5). 사슴, 소, 말, 돼지, 개, 쥐, 닭, 오리, 전어 및 꼬막의 혈액은 모두 LMG 양성이었으나, FOB 키트에서는 모두 음성을 나타내어 높은 사람 특이성을 보여주었다. 또한 정액, 뇨와 같은 인체분비물과 비타민 C 및 각종 채소류에 대한 실험결과 비타민 C에 대해서만 위양성 (false positive) 반응을 나타내었다. 그러나 LMG 검사의 경우에는 무우,, 파, 양파, 오이, 배추에 대해서 위양성 (false positive) 반응을 나타내었다 (*Table* 6). 일부 야채류에 대한 LMG 검사의 위양성 반응은 퍼옥시다아제 (peroxidase) 활성에 의한 것으로 추정되었다.

Table 5. Human-specificity of FOB

Test \ Animals	사슴	소	돼지	말	개	쥐	닭	오리	전어	꼬막
FOB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+: positive, -: negative

Table 6. Effect of body fluids and vegetables

Test \ samples	정액	뇨	Vit.C	무우	당근	파	양파	귤	오이	고추	배추	마늘
FOB	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMG	-	-	-	+	±	+	+	-	+	±	+	-

+: positive, ±: weak positive, -: negative

4. 고 찰

4.1. FOB 키트의 법생물학적 응용

FOB 키트를 이용한 혈흔 검사 및 인수혈 검사는 기존의 LMG 검사 및 Ouchterlony 검사의 단점을 보완할 수 있으며, 사건 현장이나 실험실에서 짧은 시간 내에 손쉽게 검사를 수행할 수 있는 좋은 방법으로 생각된다. 실험결과 FOB 키트는 혈흔에 대해 높은 민감도를 가져 극소량의 혈흔도 검출이 가능하였으며, 사람 혈흔에 대해 특이성이 높아 다른 동물의 혈흔과 쉽게 식별이 가능하였다. 또한 FOB 키트에 대한 항원은 매우 안정하여, 특히 현장에서의 검사에 유용할 것으로 기대된다. FOB 키트는 LMG 검사에서 양성 반응을 나타내는 검체를 다시 한번 검사하여 사람 혈흔임을 확증하는데 사용될 수 있으며, LMG 검사에서 양성 혹은 음성을 확실히 판정하기 어려운 경우에도 유용하게 사용될 수 있다. LMG 검사에서 양성 반응을 나타내었지만 FOB 키트에서 음성 반응을 나타내는 경우 사람의 혈흔이 아니며, 이러한 경우에는 보다 정확한 감정을 위해 종식별(species identification)을 수행하여야 할 것이다 (*Fig.* 3). FOB 키트의 사용 시 가장 주의할 사항은 과량의 혈흔에 대해서는 위 음성반응을 나타내므로, *Table* 1을 참고하여 충분히 희석하여 사용하여야 한다는 점이다.

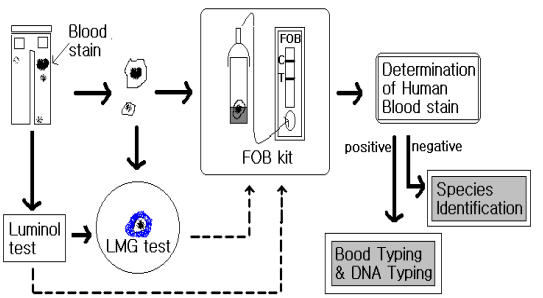

Fig. 3. Schematic diagram of blood stain identification and determination of human blood.

4.2. 감정 사례

각종 사건 현장으로부터의 증거물 중에는 혈흔이 관련되는 경우가 많다. 강도, 강간 및 살인사건은 물론이고, 교통사고 차량에서도 혈흔의 검출은 사건 해결의 결정적 실마리를 제공할 수 있다. 그러나 사건과 관계없는 혈흔도 어렵지 않게 볼 수 있는데. 각종 축산물과 어류 등 우리의 식생활과 관련된 동물의 혈흔을 비롯해 동물과 관련되어 발생하는 사건도 많다. 예를 들면, 살인사건 현장에서 발견된 적색 반흔이 LMG 검사 양성으로 반응하여 유전자형 분석을 시행하였으나, 증폭산물이 나타나지 않은 경우이다 (*Fig.* 4.). 이 사건의 혈흔을 FOB 키트로 검사한 결과 음성이었으며, 사이토크롬 b (cytochrome b) 유전자의 염기서열 분석을 통한 종식별 실험 결과 개(dog)의 혈흔으로 밝혀졌다. 또한 살인사건에 사용된 차량의 안전벨트 부위에 묻은 적색 이물질을 FOB 키트를 이용해 즉석에서 신속하게 검사를 수행하여 사람의 혈흔임을 알 수 있었다 (*Fig.* 5). 먼저 혈흔 검사를 위해 LMG 시험을 시행하였으며, 인혈 검사를 위해서는 FOB 키트를 사용하였다. 혈흔으로부터

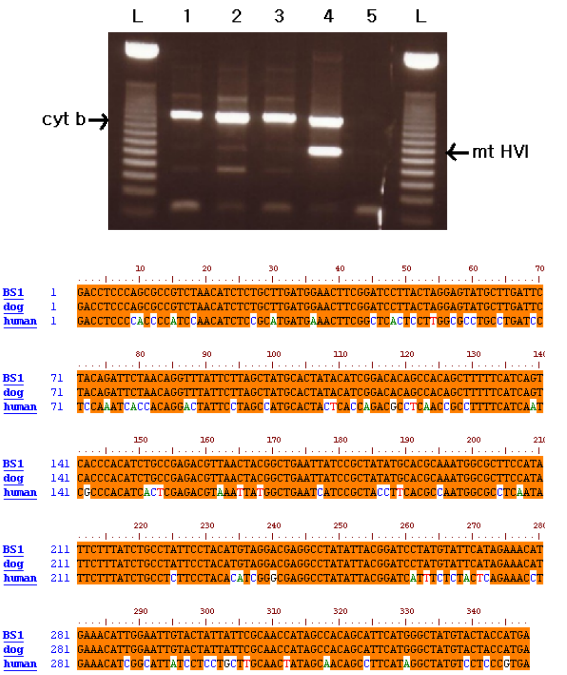

Fig. 4. **Case study 1**. Blood stain(BS1) was extracted from the shirt of a suspected person, then tested using LMG and FOB kit.

미토콘드리아 DNA를 분리하기 위해 QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN Inc.)를 사용하였으며, 미토콘드리아 DNA 상의 사이토크롬 b 유전자와 조절부위 (control region)에 존재하는 과변이부위1 (hypervariable region 1; HV1)의 동시증폭 (co-amplification)을 수행하였다. 혈흔에서 분리된 DNA는 HV1 증폭산물이 생산되지 않았으며, 사이토크롬 b 유전자의 증폭산물은 정제하여 그 염기서열을 분석하였다. 염기서열 분석을 위해서는 Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Mix (Applied Biosystems)와 ABI 310 Genetic Aanlyzer (Applied Biosystems)를 사용하였다. 혈흔의 정확한 종식별을 위해 결정된 사이토크롬 b 유전자의 염기서열을 미국 NCBI Genome Database의 BLAST 검색을 수행하였으며, Clustal W 서버 (http://www.ch.embnet.org)와 BioEdit software (North Carolina State University)를 이용해 염기서열을 정렬하였다.

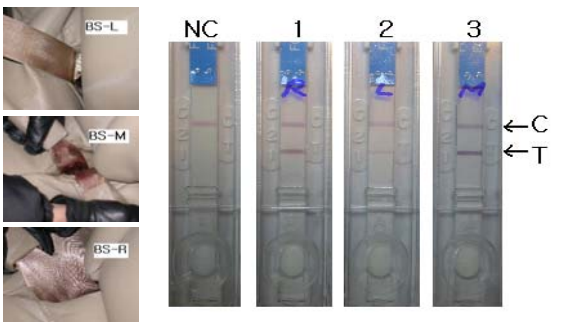

Fig. 5. **Case study 2**. Three blood stains(BS) were extracted from seatbelt of a car with saline and tested using FOB kit and LMG. Lane 1, 2 and 3 indicated BS-R, BS-L and BS-M, respectively. NC indicated negative control.

참고 문헌

1. 최상규. "과학수사 이론과 실제; 법의혈청학과 유전자 지문", 법문사, 대한민국, 1998.
2. R. Safersterin "Criminalistics: An Introduction to Forensic Sciences", 7th ed., Upper Saddle River, NJ, Prentice Hall. 2001.
3. 일본과학경찰연구소. "혈청학적 물체 검사법", 일본, 1974.
4. M. N. Hochmeister, B. Budowle, R. Sparkes., O. Rudin, C. Gehrig, M. Thali, L. Schmidt, A. Cordier, and R. Dirnhofer. *Journal of Forensic Sciences.* **44**, 3, 597-601(1999).
5. S. Tomoko, S. Kazumasa, and O. Takeshi. *Japanese Journal of Science and Technology for Identification.* **7**, 2, 159-165(2003).