

치아를 이용한 성별검사 및 D1S80 유전좌위의 검색시 4가지 DNA추출방법에 따른 비교

조선대학교 치과대학 구강진단·구강내과학 교실
법의치과학 연구소

허 용 · 윤 창 룩

목 차

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

I. 서 론

치아는 인체의 기관중 가장 단단한 기관이며 법랑질, 상아질, 백악질 등의 경조직으로 둘러싸여 있어 물리적, 화학적 저항성이 높고 부패에 가장 오래 견딜 수 있기 때문에 법의학 분야에서 개인식별시 중요한 증거물이 되며 치아에서 성별, 연령, 혈형검사는 물론 최근 유전자까지 추출하여 개인식별에 응용할 수 있게 되었다.

치아에서의 법의학적 개인식별법으로 치아의 크기에 대한 계량통계학적 분석^{6,36,41)}, 법랑질의 분광투과율 검사⁶⁾, 상아질 비중측정^{6,40)}, 상아질, 치조골내 유기질 분해후 산에 대한 중화량 측정^{6,39)}, 성염색체 및 성염색질 검사⁶⁾등을 이용하여 성별감정을 시행하고, 치아의 생리적 교모도 및

마모도 측정⁶⁾, 성장과 발육 양상에 근거한 치아의 검사^{6,7)}, 치아의 생리적 변화 양상에 따른 조직학적 검사^{6,14,22)}, 아스파라진산등 아미노산의 이성질체 성질을 이용한 라세미화(racemization) 방법 등⁶⁾이 치아를 이용한 연령감정에 적용되고 있다.

개인식별시 연령, 성별을 포함한 생전의 치과 자료를 치아를 포함한 두개골에 대한 사후 검사 후 얻은 제 결과와 서로 비교하여 시행하는 것인데 이러한 치아 및 두개골을 이용한 기존의 개인식별 감정방법은 먼저 성별감정에 있어, 인종에 따른 다양성과 검사자의 숙련정도, 방법의 복잡성, 조직의 손상등으로 인하여 정확도가 다소 떨어질 수 있다는 단점이 있고 골반골, 두개골이 함께 존재할 경우 이에 대한 해부학적 양상을 종합하여 감정을 시행하고 있으나 부패나 파손이 심할 때 역시 판정이 어려운 경우가 많은 것이 사실이다. 또한 개인식별에 있어 얻을 수 있는 생전 자료가 미비된 경우 개인식별이 곤란하여 법의치과학적 방법 이외에 법의학정확적, 법의학사선적 방법 등을 비롯한 여러 방법들을 병행하여 개인식별 감정에 응용하고 있다.

최근 분자생물학의 기술적 발달로 DNA분석의 정확도가 높아진 바 이를 이용한 개인식별이 활발히 시도되고 있다^{13,17)}. 이러한 DNA의 분석

이 가능하게 됨으로써 의학 및 생물학 분야연구에 일대 혁신을 가져왔으며 특히 의학적으로 각종 미생물 검출과 암을 포함한 각종 유전변이에 의한 질병의 진단, 예후 판단에 유용하게 사용되고 있으며, 질병의 원인규명과 치료의 범위가 넓어짐은 물론 법의학적 개인식별에도 다양하게 적용하고 있다.

분자생물학적 방법의 법의학적인 응용은 Jeffrey 등^{12,15,18)}이 DNA의 염기구조에서 각 개체마다 서로 다른 유전 표식자인 제한효소 분절다형양상 (Restriction Fragment Length Polymorphism pattern, RFLP pattern)을 발견하고 사람의 지문과 같이 모든 개체가 서로 상이함을 보여 이를 유전자지문(DNA fingerprint)이라 명명하여 유전적 개인식별, 가족관계의 규명, 친생자 감정 등에 성공적으로 응용되고 있으며, 또한 혈흔, 타액, 모발, 유골 및 치아와 같이 분해되어 소량의 DNA만이 존재하는 법의학적 시료에서도 기존의 southern-hybridization 법^{12,13,17)}을 이용한 제한효소 분절다형법(RFLP)으로는 다량의 DNA가 필요하여 검색이 불가능하다는 단점을 보완하여 수십 ng이하의 DNA로도 충분한 유전자의 분석을 할 수 있는 중합효소반응법(polymerase chain reaction, PCR)^{8,9,27)}이 개발되어 개인식별을 성공적으로 수행할 수 있게 되었다. 이러한 분자생물학적 기법, 특히 PCR을 이용한 개인식별에는 유전형질 발현에는 관여하지 않는 특정 염기부위가 반복배열되는 과변위초과성 좌위(hypervariable minisatellite locus) 또는 variable number of tandem repeat 유전좌위(VNTR locus)의 반복되는 염기구조의 차이에 의해 발생하는 단편길이다형(amplified fragment length polymorphism, AMP-FLPs)의 차이에 의해 개인식별을 시행한다. 이렇게 개체특이성을 나타내는 사람의 VNTR 유전좌위는 약 1,500개 정도로 추정되나¹⁾ 개인식별에 흔히 이용되는 인체게놈(genome)에 분포되어 있는 VNTR 유전좌위는 ApoB, COL2A1, D17S30, HLA -DQ α , DIS80 등 다수 존재하며 이중 특히, DIS80 유전좌위는 30개이상의 길이 다형 대립유전자를 가지며, 각각의 대립유전자는 16bp 크기의 규칙적인 반복

염기 서열로 구성되어 이들의 조합에 의한 유전자형은 80%이상의 높은 이형접합도를 보이기 때문에 법의학적 감정에 매우 유용하게 사용되고 있다.

성별감정에 있어서도 종래의 인체의 해부학적 특징을 이용한 복합유전형질의 계량통계학적 분석법을 이용하고 있으나 정확도가 떨어지는 단점이 있어 분자생물학적 방법에 의한 성별감정이 시도되었다. 법의학적 검체의 분자생물학적 성별 감정은 Y염색체에 특이성이있는 탐침(probe)을 사용한 southern-hybridization법²⁶⁾을 주로 이용하여 검사하였으나 이 방법은 검사결과가 음성이면 검체가 여성인지, 아니면 검체의 양이 적어서 검색이 되지않는지 여부를 알 수 없는 가성-음성소견을 배제할 수 없는 단점이 있어 최근 치아발생기에 범랑질을 만드는 amelogenin gene을 남녀가 다르게 나눠 가짐이 밝혀진 이후^{8, 25,32)} 이 유전좌위를 중합효소 반응법(PCR)으로 증폭하여 X-Y homologous amelogenin gene을 검색하는 방법이 주로 이용되고 있다.

이 방법은 단일 프라이머쌍을 이용하여 X-Y homologous amelogenin gene부분의 증폭후 성별검사에 사용하는데 이것은 X, Y염색체로부터 서로 다른 길이의 산물이 생성되기 때문에 X, Y염색체를 동시에 검색하며 2쌍의 프라이머를 이용한 Dual PCR⁹⁾을 시행할 경우 pg 단위의 극미량의 DNA에서도 성별 검사가 가능하고 정확한 방법이다.

치아에서 DNA 유전자 검색, 성별검사를 비롯한 분자생물학적 연구를 살펴보면, Yamada 등³⁶⁾은 치수층에서 DNA를 추출하여 RFLPs검사를 이용한 개인식별과 Y염색체 특히, DNA탐침을 이용한 성별검사를, Yamamoto 등³⁷⁾은 라세미화를 통한 연령감정, 치수 DNA에서 Y-특이성 탐침을 이용한 성별검사 및 생전기록을 이용한 개인식별에 대한 비교연구를, Smith 등³⁰⁾은 DNA 추출시 접근 방법, Schwarzh 등²⁹⁾은 다양한 환경하에서 치아로부터 얻어지는 DNA의 특징에 대한 연구를 보고하였으며 국내에서 치아를 이용한 DNA분석에 대한 연구로는 윤 등⁵⁾이 치아

에서 성별검사를 포함한 DNA유전자형의 검색을 통한 개인식별을 시행하여 발거후 10년이 경과된 치아에서도 개인식별이 가능함을 보고한 것이 유일하다.

이상과 같이 기존의 치아를 이용한 DNA유전자 검색에 대한 국, 내외 연구로는 RFLPs검색을 통한 개인식별, Y-specific probe를 이용한 성별 검사, 환경적 요인, 시간경과에 따른 치아에서의 DNA유전자형 검색가능여부 등 치아의 법의학 적 분석에 적용 가능여부 만을 제시하는데 국한 되어 있는 바, 치아에서 분자생물학적 방법을 이용하여 실제 개인식별 감정업무를 시행할 때 순수한 다량의 DNA를 추출하는 것이 감정의 관건이 되며 검사결과에 영향을 미치는 다양한 조건을 조절하는 것이 중요한 문제가 된다. 왜냐하면 치아에서 추출되는 DNA양은 소량이기 때문에 치아에서 순수하고, 많은 양의 DNA를 검출하는 것이 정확한 유전자 검색을 시행하는 데 필수적인 선결조건이기 때문이다.

따라서 본 연구에서는 비등법³⁵⁾, 침전법^{5,35)}, 폐놀법, 비등후 폐놀법 등 다양한 방법으로 치아에서 DNA를 추출한 후 제 조건에 따라 성별검사, 개인식별을 위한 Homologous amelogenin gene 과 D1S80 유전자좌위의 검색정도를 비교검사하여 개인식별 감정실무시 기술적 지침을 확립하여 감정에 응용하고자 본 연구를 수행하였다.

II. 연구대상 및 방법

1. 연구대상

20대 연령군 남자와 여자에서 발거한 구치부 치아 40개를 대상으로 하였으며 각 치아들은 DNA추출방법에 따라 10개씩 4군으로 분류하고 발거후 즉시 법랑질, 상아질, 치수층 등 세층으로 분리한 치아조직을 연구대상으로 하였다.

2. 연구방법

가. 치아의 분리

각 치아를 치수, 상아질, 법랑질의 세 부분으로

분리하기 전에 치아의 외면에 부착된 치석, 니코틴, 색소, 치주인대, 혈흔, 연조직 등을 고속 회전 치과용 바를 이용하여 깨끗이 제거하고 멸균된 증류수로 세척한 후 다시 고속 회전 치과용 바를 이용하여 치아 장축에 평행하게 절단하고 외과용 치즐로 분리시킨 후 치수를 치과용 탐침으로 분리하여 1.5ml eppendorf tube에 담고, 나머지 부분은 치수강을 멸균 증류수로 세척한 후 각각 상아질, 법랑질층으로 분리하여 수집하였다.

분리된 상아질, 법랑질을 각각 1.5ml eppendorf tube에 담기 위하여 잘게 분쇄하였고, 멸균된 증류수 100-200 μ l을 분주하여 4 $^{\circ}$ C에서 하루 방치하였다.

나. 각 방법에 따른 DNA 추출

① 비등법

4 $^{\circ}$ C에서 하루동안 방치한 표본에 검체 30 : 완충액 8의 비율로 27-54 μ l 양의 용해완충액(Nucleolysis buffer, 0.5% S.D.S., 10mM Tris. cl, 0.1M EDTA, PH 8.0)을 분주한 후 잘 섞어준 다음 끓는 물에 20분간 비등하였다. 비등후 4,000 rpm으로 10분간 원심분리후 상층액을 취하여 새로운 eppendorf tube에 옮긴 후 DNA 유전자 검색전까지 -20 $^{\circ}$ C 냉동고에 보관하였다.

② 침전법

4 $^{\circ}$ C에서 하루동안 방치한 표본에 50 μ l 용해완충액과 5 μ l proteinase K (12 μ g/ μ l)를 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 부란하였다. 이렇게 처리된 표본을 10분간 10,000 rpm으로 원심분리후 상층액을 취하여 새로운 eppendorf tube에 옮겼다. 분리된 상층액에 검체 : NaCl(5M)을 3.85 : 1의 비율로 26-52 μ l씩 분주하고 잘 혼합한 후 4,500 rpm으로 10분간 원심분리 후 상층액에 실온의 2배 부피 100% 에탄올을 침전시킨 후 15분간 14,000 rpm으로 원심분리 후 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA를 70% 에탄올로 세척하고 실온에서 건조 후 멸균 증류수에 용해하였다. 얻어진 DNA를 역시 DNA유전자 검색전까지 -20 $^{\circ}$ C 냉동고에 보관하였다.

③ 페놀법

4°C에서 하루동안 방치한 표본에 침전법과 동일한 양의 비율로 용해완충액과 proteinase K 처리 후 원심분리 시킨 후 상층부를 취하여 새로운 eppendorf tube에 옮겨 담았다. 이렇게 처리된 상층액에 phenol/chloroform/isoamylalcohol(25 : 24 : 1)혼합액을 넣어 잘 흔든 후 약 15분간 원심분리한 다음 상층액을 분리하여 새로운 eppendorf tube에 옮겼다. 분리된 상층액에 phenol/chloroform/isoamylalcohol혼합물을 넣어 다시 한번 상층액을 분리하는 과정을 반복하였다. 이 시료에 1/10 부피의 3M sodium acetate를 넣은 다음 잘 흔들어 혼합한 후 2배 부피의 100% 에탄올을 혼합시킨 후 15분간 14,000 rpm으로 원심분리 후 DNA를 추출하였다.

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

④ 비등후 페놀법

4°C에서 하루동안 방치한 표본에 비등법과 동일한 과정을 시행한 후 얻어진 검체를 페놀법을 이용하여 phenol/chloroform/isoamylalcohol 혼합물 처리과정과 3M sodium acetate, 100% 에탄올 처리 후 DNA를 추출하였다. 얻어진 DNA를 앞의 방법 등과 마찬가지로 유전자검색 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 PCR 증폭은 Sullivan^등³²⁾이 제시한 프라이머 (5'-CCCTGG-GCTCTG TAAAGAATAGTG-3'와 5-ATC-

AGAGCTTA AACTGGGA AGCTG-3')를 이용하여 Perkin- Elmer Thermal cyler 480 시스템으로 다음과 같이 PCR을 수행하였다.

각 PCR 혼합물에는 자외선 분광기상에서 0값을 나타내는 시료에서 최고 348ng/ μ l를 나타내는 DNA시료가 각각 1 μ l씩 포함되었고, 사용된 완충액은 POSCO 화학제품인 완충액(100mM Tris- HCl(pH9.0), 500mM KCl, 1.0% Triton)과 1.5mM MgCl₂, 각각 0.3 μ M 프라이머, 각각 200 μ M의 dNTPs 그리고 1.5 unit의 taq. DNA polymerase가 포함되었으며 최종 용량은 50 μ l이다.

모든 시료는 첫 온도순환에 앞서 95°C에서 5분간 가열한 후, 94°C에서 1분, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분으로 이루어진 온도순환을 38회 시행하였고 온도순환 후 72°C에서 10분간 반응시간을 추가로 주었다. 첫 온도 순환에 앞서 taq. 중합효소만을 제외한 PCR 혼합물을 94°C에서 5분간 가열한 후 taq. 중합효소를 주입하는 hot start PCR을 시행하였다. PCR 반응 후 증폭된 산물들은 vertical electrophoresis unit (GIBCO BRL Ins.)를 사용하여 1mm두께의 12% natural polyacrylamide gel을 만들어 10 μ l씩 시적하였다. gel과 전극의 완충용액으로 1X TBE 완충액(0.09M Tris-Borate, 0.002 M EDTA)을 사용하여 60V의 일정한 전압에서 3시간동안 전기영동을 시행하였으며, 이때 118 bp를 나타내는 size marker인 Psi x 174 2 μ l를 함께 시적하였다. 전기영동을 시행한 후 ethidium bromide (0.5 μ g/ml)로 염색하여 분리된 띠를 UV transilluminator 상에서 판독하여 성별판독 가능여부를 검사하였다.

마. DIS80 유전자위의 VNTR 부위 증폭 및 AMP-FLPs검색

DIS80 유전자위의 AMP-FLPs검색을 위해 Kasai^등¹⁹⁾에 의해 제시된 프라이머(5'-GAAA-CTGGCCTCCAAACTGCCCCGCG-3'와 5'-GTCTTGTGGAGATGCACGTGCCCTTG C-3')를 이용하여 Perkin-Elmer Thermal cyler 480시스템에서 다음과 같이 PCR을 수행하였

다.

각 PCR 반응혼합물에는 성별검사시와 동일한 양의 주형 DNA를 이용하였으며 PCR 완충액 역시 성별검사시와 동일한 POSCO 화학제품의 완충액 (100mM Tris-Hcl(PH9.0), 500mM KCl, 1.0 % Triton)을 사용하였고 1.5mM MgCl₂, 각각 0.2μM primer, 각각 200μM의 dNTPs 그리고 1.5 unit의 taq. DNA 중합효소를 성별검사시와 동일하게 사용하여 최종용량 50μl를 혼합하였다.

모든 시료는 94℃에서 1분, 66℃에서 1분, 72℃에서 2분의 온도순환을 총 33회 시행하였고, 72℃에서 10분간 반응시간을 추가로 시행하였고 성별검사시와 마찬가지로 첫 순환에 앞서 95℃에서 5분간 반응 후 hot start PCR을 시행하였다. 증폭된 각각의 PCR 산물들은 horizontal electrophoresis Unit(Bio-Rad[®])를 이용하여 2% agarous 겔에서 DNA 크기 표식자인 Psi x 174, PstI과 함께 80V의 일정한 전압에서 3시간동안 전기영동하였고 vertical electrophoresis unit(GIBCO BRL instrument)를 이용한 5% natural polyarylamide gel에서 10μl의 양을 동일한 DNA크기 표식자와 함께 60V 일정한 전압에서 3시간 동안 전기영동한 후 ethidium bromide 염색하여 분리된 띠를 UV transilluminator상에서 판독하여 AMP-FLPs검색 가능여부를 확인하였다.

III. 연구성적

1. DNA추출방법에 따라 추출된 DNA농도 및 순수도

4가지 방법을 적용하여 치아에서 DNA를 추출한 결과 비등법을 적용한 경우 DNA농도는 치수에서 평균 145ng/μl, 상아질에서 106ng/μl, 법랑질에서 14ng/μl로 나타났으며 순수도는 각각 1.27, 0.93, 0.62로 나타났다.(Table 1) 침전법을 적용한 치아에서 얻어진 DNA 농도 및 순수도는 치수에서 평균 174ng/μl, 상아질에서 21ng/μl, 법랑질에서 1.7ng/μl의 DNA농도와 1.63, 0.91, 0.14의 순수도를 보였으며, 페놀법을 적용한 치

아에서는 치수 126ng/μl, 상아질14ng/μl, 법랑질 1ng/μl의 평균 DNA농도를, 그리고 1.56, 0.67, 0.12의 DNA순수도를 나타냈다.(Table 2, 3)

비등후 페놀법을 적용한 차아에서는 치수, 상아질, 법랑질 각각 44, 10, 5 ng/μl 의 DNA농도와 1.28, 0.75, 0.38의 순수도를 나타냈다.(Table 4) DNA농도 및 순수도의 측정에서 침전법을 적

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

investigative section specimens	DNA concentrations (ng/μl)	DNA purity
pulp	145 ± 56.92	1.27 ± 0.08
dentin	106 ± 63.55	0.93 ± 0.08
enamel	14 ± 13.18	0.62 ± 0.28

Table 2. DNA concentrations extracted from the teeth by salting-out method

investigative section specimens	DNA concentrations (ng/μl)	DNA purity
pulp	174 ± 117.53	1.63 ± 0.15
dentin	21 ± 30.87	0.91 ± 0.57
enamel	1.7 ± 4.72	0.14 ± 0.37

Table 3. DNA concentrations extracted from the teeth by phenol method

investigative section specimens	DNA concentrations (ng/μl)	DNA purity
pulp	126 ± 99.38	1.56 ± 0.22
dentin	14 ± 15.83	0.67 ± 0.58
enamel	1 ± 1.41	0.12 ± 0.18

용한 치수에서 가장 많은 양의 DNA를 추출하였으며 순수도는 DNA성분의 표준지표인 1.8²¹⁾에 침전법을 적용한 치수층과 페놀법을 적용한 치수층에서 각각 1.63과 1.56으로 가장 근접한 결과를 얻어냈다.

Table 4. DNA concentrations extracted from the teeth by boiling-phenol method

investigative section specimens	DNA concentrations (ng/ μ l)	DNA purity
pulp	44 \pm 27.11	1.28 \pm 0.22
dentin	10 \pm 4.99	0.75 \pm 0.33
enamel	5 \pm 5.85	0.38 \pm 0.31

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

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

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

2. DNA추출 방법에 따른 성별검사

40개의 치아를 DNA 추출방법에 따라 10개씩 4군으로 분리한 후 각각의 치아를 치수, 상아질, 법랑질로 분리한 검체를 비등법, 침전법, 페놀법, 비등후 페놀법을 적용하여 추출한 DNA 시료를 이용하여 X-Y homologous amelogenin gene을 중합효소 반응에 의해 증폭한 결과 전 치아에서 법랑질 및 비등법을 적용한 치수일부(5/10)를 제외한 4가지 방법을 적용한 치수, 상아질 모든 시료에서 106bp와 112bp크기의 PCR산물들을 전기영동후 ethidium bromide염색으로 관찰할 수 있었다. 얻어진 PCR 산물에서 남자시료는 106bp와 112bp 크기의 두 DNA 띠로 나타났으며, 여자시료에서는 106bp 크기의 단일 DNA 띠로 나타나 남, 녀 성별검사를 정확히 수행하였다. (Table 5, 6, 7, 8, Figure 1, 2)

Table 6. Results of detection of the X and Y specific sequences by salting-out 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	Male	Pulp	++
		Dentin	++
9	Male	Pulp	++
		Dentin	++
10	Male	Pulp	++
		Dentin	++

++ : A distinct band was observed

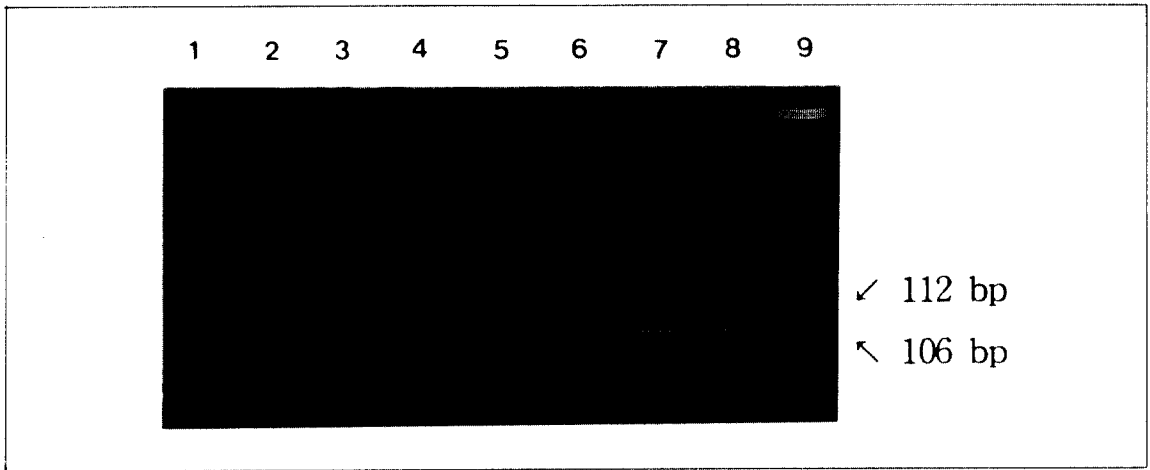


Fig 2. 12% polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products of the X, Y homologous amelogenin gene by boiling, salting-out, phenol, boiling-phenol methods from the dentin.

Lane 9 : size marker Psi x 174, Lane 1, 2 : boiling method - males , Lane 3, 4 : salting-out method - males, Lane 5, 6 : phenol method - males, Lane 7, 8 : boiling-phenol method - females

3. DNA 추출방법에 따른 DIS80 유전좌위의 AMP-FLPs 검색

발거후 즉시 4가지 방법을 적용하여 DNA를 추출하고 PCR로 증폭한 다음 전기영동하여 DIS80 유전좌위의 대립유전자를 관찰한 결과 4가지 방법을 적용한 치아 모두 범랑질에서는 대립유전자가 관찰되지 않았으며 비등법을 적용한 치수를 제외하고 나머지 4가지 방법을 적용한 치수, 상아질 모든 시료에서 뚜렷한 DNA띠가 관찰되었다.(Table 9, 10, 11, 12, Figure 3, 4, 5, 6)

한편 4가지 방법을 적용한 40개 치아의 표현형 검색에서 비등법을 적용한 3개의 치아, 침전법을 적용한 1개의 치아, 비등후 페놀법을 적용한 2개의 치아는 동형접합자(Homozygote)로서 나타났으며 동일인에서 발거한 후 침전법을 적용한 6-7번 치아(M29/M24), 9-10번 치아(M30/M25)와 페놀법을 적용한 2-3(M28/ M25), 4-9(M26/M24), 6-7번 치아(M28/ M17)는 같은 대립유전자를 나타낸 바, 동일개체에서 발거한 치아임을 확인하였으며, 40개 치아에 대한 DIS80 유전좌위의 유전자형은 총 30개로 나타났다.(Table 13, 14, 15, 16)

Table 9. Results of the detection of the alleles of D1S80 locus by boiling method from the teeth

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

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

Table 7. Results of detection of the X and Y specific sequences by phenol method from the teeth

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

++ : A distinct band was observed

Table 8. Results of detection of the X and Y specific sequences by boiling- 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	++
9	Female	Pulp	++
		Dentin	++
10	Female	Pulp	++
		Dentin	--

++ : A distinct band was observed

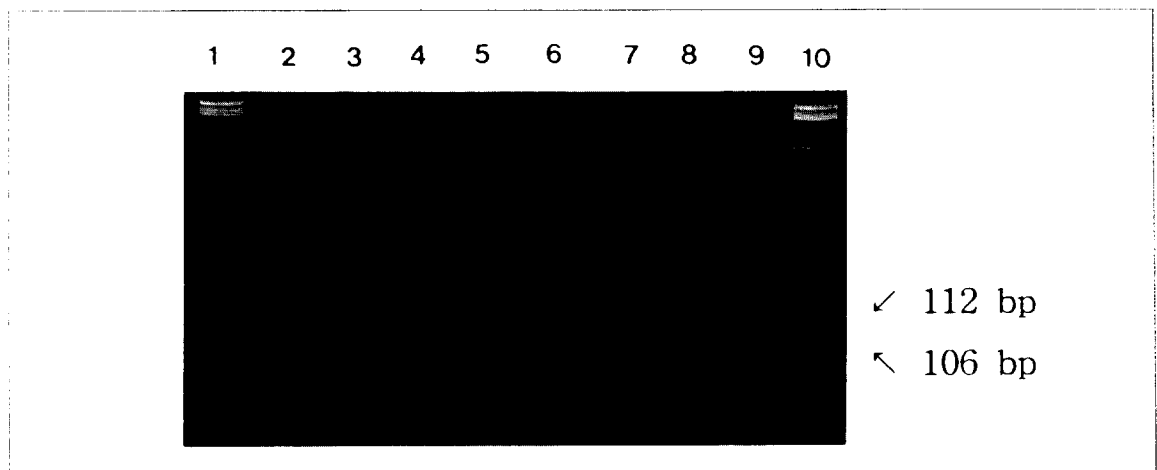


Fig 1. 12% polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products of the X, Y homologous amelogenin gene by boiling, salting-out, phenol, boiling-phenol methods from the pulp. Lane 1, 10 : size marker Psi x 174, Lane 2, 3 : boiling method - male and female respectively, Lane 4, 5 : salting-out method - male and female respectively, Lane 6, 7 : phenol method - male and female respectively, Lane 8, 9 : boiling-phenol method - male and female respectively.

Table 10. Results of the detection of the alleles of D1S80 locus by salting-out method from the teeth

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

++ : A distinct band was observed

Table 11. Results of the 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 distinct band was observed

Table 12. Results of the detection of the alleles of D1S80 locus by boiling- phenol method from the teeth

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

++ : A distinct band was observed

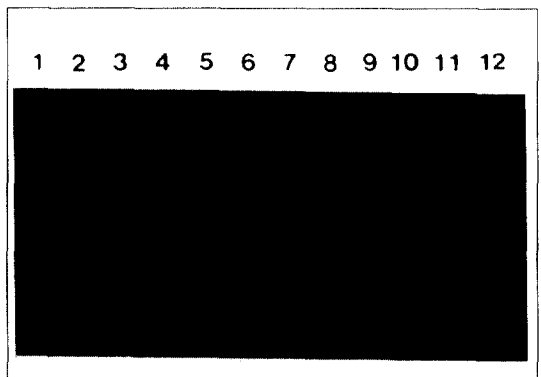


Fig. 3 2% agarous gel electrophoresis of PCR products of D1S80 locus by boiling method from the pulp Lane 1, 12 : size marker psi x 174, other lanes no specific band was observed

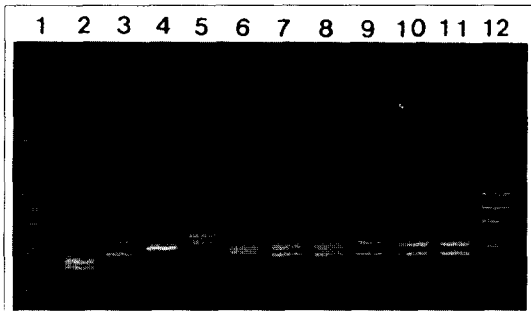


Fig. 4 2% agarous gel electrophoresis of PCR products of D1S80 locus by salting-out method from the pulp. Lane 1, 12 : size marker psi x 174, other lanes a distinct band was observed

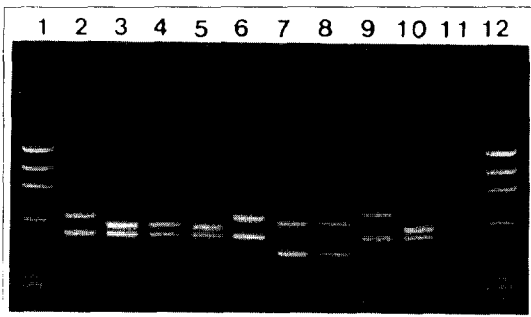


Fig. 5 2% agarous gel electrophoresis of PCR products of D1S80 locus by phenol method from the pulp. Lane 1, 12 : size marker psi x 174, other lanes a distinct band was observed

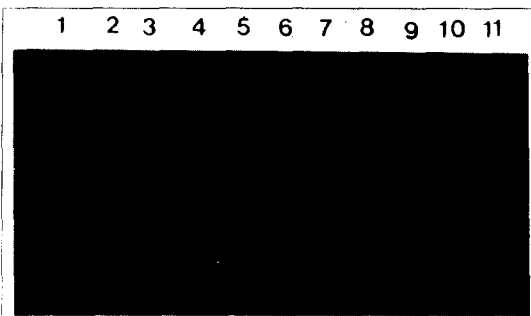


Fig. 6 2% agarous gel electrophoresis of PCR products of D1S80 locus by boiling-phenol method from the pulp. Lane 11 : size marker psi x 174, other lanes a distinct band was observed.

Table 13. Typing of D1S80 gene amplified from the teeth by boiling method.

Sample No.	Phenotype	Remark
1	M25 / M18	Heterozygote
2	M25 / M24	Heterozygote
3	M31 / M30	Heterozygote
4	M24 / M24	Homozygote
5	M29 / M24	Heterozygote
6	M35 / M18	Heterozygote
7	M39 / M39	Homozygote
8	M22 / M22	Homozygote
9	M31 / M25	Heterozygote
10	M30 / M16	Heterozygote

Table 14. Typing of D1S80 gene amplified from the teeth by salting-out method.

Sample No.	Phenotype	Remark
1	M22 / M19	Heterozygote
2	M32 / M25	Heterozygote
3	M28 / M28	Homozygote
4	M36 / M32	Heterozygote
5	M30 / M27	Heterozygote
6	M29 / M24	Heterozygote
7	M29 / M24	Heterozygote
8	M31 / M24	Heterozygote
9	M30 / M25 ⁺⁺	Heterozygote
10	M30 / M25 ⁺⁺	Heterozygote

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

Table 15. Typing of D1S80 gene amplified from the teeth by phenol method.

Sample No.	Phenotype	Remark
1	M31 / M25	Heterozygote
2	M28 / M25	Heterozygote
3	M28 / M25	Heterozygote
4	M26 / M24 ⁺⁺	Heterozygote
5	M30 / M24	Heterozygote
6	M28 / M17 ⁺⁺⁺	Heterozygote
7	M28 / M17 ⁺⁺⁺	Heterozygote
8	M31 / M23	Heterozygote
9	M26 / M24 ⁺⁺	Heterozygote
10	M31 / M25	Heterozygote

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

Table 16. Typing of D1S80 gene amplified from the teeth by boiling-phenol method.

Sample No.	Phenotype	Remark
1	M29 / M29	Homozygote
2	M25 / M18	Heterozygote
3	M29 / M25	Heterozygote
4	M30 / M30	Homozygote
5	M28 / M20	Heterozygote
6	M25 / M18	Heterozygote
7	M30 / M24	Heterozygote
8	M29 / M18	Heterozygote
9	M27 / M17	Heterozygote
10	M31 / M18	Heterozygote

IV. 총괄 및 고찰

법의치과학적 개인식별은 현재 기술적인 전환점에서 있다.

생전 개인 신상기록, 치과기록, 방사선학적 치아분석, 치아의 해부학적 양상에 대한 고찰 및 이것의 계량통계학적 분석은 정확도에 있어 한계성을 가지고 있는 반면 분자생물학적 감정은 그 효율성과 유용성 및 정확도가 높으므로 필요성이 급속히 증가하는 추세이다.

이러한 분자생물학적 방법의 법의학적 응용은 Smith등³¹⁾에 의하여 DNA 염기배열중에서 특정 염기부위만을 인식하고 그 부위를 절단하는 제한효소가 발견되면서 급속한 발전이 이루어졌다. 이러한 제한효소를 발견하고 유전자표식 (genetic marker)를 이용한 분자생물학적 방법은 1세대 방법인 Southern hybridization법과 2세대 중합효소반응(PCR)법으로 발전되어 친자감별, 가족관계규명등이 실험실에서 가능하게 되었다.

그러나 법의학적 분석에 사용되는 대부분의 시료는 사건현장에서 발견되는 소량의 혈흔이나, 단일모발, 손톱, 부패된 조직, 치아를 포함한 유골등 극히 소량이거나 분해된 상태의 DNA만을 얻을 수 있는 시료 경우가 대부분이다. 이러한 미량의 DNA만으로 단좌위탐침을 이용하여

Southern-hybridization에 의한 RFLPs를 검사하기에는 부적절하다는 연구가 보고되었고³³⁾ PCR법을 적용시에도 시간의 경과, 검체의 보관 조건, 검체의 종류에 따라 DNA의 유전자형을 검색하는 것이 불가능하다는 것이 보고되어²⁰⁾ 분해된 상태의 DNA를 가지고 있는 검체에서 많은 양의 DNA를 분리하고 순수화시키는 과정이 개인식별을 성공적으로 수행하는데 중요한 열쇠라고 할 수 있다.

다량의 DNA검출이 가능한 혈액, 조직등에서는 DNA 이외의 성분인 단백질등 PCR 반응억제 물질을 제거하여 순수한 DNA만을 검출하는 방법으로 대부분 phenol/chloroform/isoamylalcohol 혼합물을 이용한 페놀법을 사용하고 있으나 페놀법을 이용할 경우 DNA를 회수하는 과정이 길어서 검체가 여러번 시험관을 이동하기 때문에 손실되는 DNA양이 많고 페놀 오염등이 문제가 되기 때문에 분해된 검체에서 DNA를 추출하는데 문제점이 있다고 생각된다. 또한 검체에서 DNA를 추출하는 방법은 페놀법 이외에도 다른 여러가지 방법이 있는데 치아에서는 어떠한 방법이 DNA를 가장 많이, 순수하게 추출할 수 있는지 아직 규명된 바 없다.

따라서, 본 연구에서는 다양한 방법, 즉 100℃에서 단순히 끓이는 비등법과 에탄올로 침전시키는 침전법을 이용하여 기존의 페놀법을 적용한 방법과 비교하였으며 과정을 단순화 시키기 위하여 비등후 페놀을 적용한 방법으로 DNA를 추출하여 비교 분석하였다.

자외선 분광기를 통하여 측정된 DNA농도 및 순수도에서는 에탄올 침전법을 적용할 때 가장 많은 양의 DNA를 얻었으며(Table 2), DNA성분의 표준지표인 1.8²¹⁾에 에탄올 침전법이 가장 근접하여 비교적 단백질, 알칼, 염등의 불순물이 잘 제거된 것으로 나타났다.(Table 2) 그러나 방법이 간편하고 짧은 DNA 추출과정을 갖는 비등법에서는 적은 양의 DNA 농도 및 낮은 DNA 순수도를 보였다.(Table 1) 비등법의 이러한 문제점들은 100℃ 비등과정중 높은 열에 의해서 PCR 반응 억제물질이 생성되는 결과로 Walsh등³⁵⁾이 언급한 보고와 일치하며 향후 비등법을 적용하

기 위해서는 PCR 반응억제물을 제거하여 DNA 변성을 예방하는 Chelex resin 사용을 고려하여야 할 것으로 사료된다.

한편, 에탄올 침전법을 적용하여 DNA를 추출하는 침전법에서는 우수한 DNA 순수도 및 비교적 많은 양의 DNA를 확보하였으며 X-Y homologous amelogenin gene 검사와 DIS80 VNTR 유전좌위 검색결과 침전법을 적용한 치수, 상아질에서 정확히 검색하여 감정실무에 이미 적용한 윤등⁵¹⁾의 연구보고와 일치하는 결과를 얻었기 때문에 감정실무에 안정하게 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

분자생물학적 방법의 비약적인 발전으로 성별 검사를 비롯한 개인식별에 있어 수많은 연구가 이루어져 감정실무에 적용하고 있는데 성별검사를 위한 분자생물학적 접근방법은 Y 염색체상에 존재하는 DYZ1 유전좌위를 이용한 Southern hybridization법에 의한 검사가 초기에는 주종을 이루어왔다. 그러나 DYZ1 유전좌위는 Y염색체상에만 존재하기 때문에 여자의 경우 가성-음성 반응을 배제할 수 없다는 단점이 있어 현재는 중합효소반응에 의한 X-Y homologous amelogenin gene의 amplified fragment length polymorphism(AMP-FLPs) 검사를 통해 X,Y gene을 동시에 검사함으로써 가성-음성 반응을 배제할 수 있기 때문에 성별검사에 주로 이용하고 있다. 본 연구에서도 4가지 방법을 적용하여 DNA를 추출한 후 X-Y homologous amelogenin gene 검색을 통해 비등법을 적용한 치수 일부만을 제외한 모든 방법에서 성별검사가 가능함을 관찰할 수 있었다. 이것은 페놀법을 적용하여 미량의 타액반에서 성별검사를 수행한 윤등⁴⁾의 연구 및 침전법을 적용하여 10년이 경과된 치아에서 성별감정을 수행한 윤등⁵¹⁾의 연구결과와도 일치한다.

비등법을 적용한 치수일부에서의 중합효소반응의 음성결과는 역시 Walsh등³⁵⁾이 언급한 100℃ 고온에서 DNA 추출과정 중 중합효소반응 억제물질이 생성되고, 이러한 DNA변성으로 음성결과를 나타낸다고 사료되기 때문에, 본 연구에서는 치수에서의 음성결과를 검증하기 위하여

성별판별이 불가능한 비등법을 적용한 치수검체를 페놀처리한 결과 모두 성별판별이 가능하다는 결과를 얻었으며 이것은 페놀이 중합효소반응 억제물질인 유기물을 제거함으로 순수도를 높여 중합효소반응이 가능하게 되었으며 비등과정에서 발생하는 물질이 중합효소반응의 억제물질로 작용한다는 사실을 확인하였다. 한편 비등법을 적용한 치수층에 비해 상아질층에서 X-Y homologous amelogenin gene 검색과 DIS80 유전좌위의 검색이 성공적으로 이루어진 것은 상아질의 상아세관내에 존재하는 조상아세포등 상아질층의 세포가 열에 의한 영향을 치수에 비해 덜 받음으로서 중합효소반응에 억제물질이 비교적 적기 때문에 개인식별 검색이 성공적으로 수행된 것으로 사료된다. 또한 비등법을 적용한 치수일부와 상아질 전부에서 성별검사가 가능한 것은 X-Y homologous amelogenin gene 검색이 비교적 소량의 DNA로도 가능하다는 Akane⁹⁾, Sullivan등³²⁾의 연구보고와도 일치한다.

본 연구에서는 6 bp차이의 남녀 DNA띠를 더욱 빠르고 정확하게 관찰하기 위하여 minigel vertical electrophoresis unit(Hoefler scientific Ins.)상에서 12% polyacrylamide gel 두께를 각각 1.0mm 와 0.7mm로 하여 전기영동을 시행한 결과 0.7mm두께의 gel에서 더욱 뚜렷한 양상의 DNA띠를 관찰하였으며(fig. 2), large vertical electrophoresis unit(Gibco BRL[®])를 이용한 1.0 mm 두께의 gel에서도 뚜렷한 DNA 띠를 관찰할 수 있었다. (fig.1) 또한 DNA띠가 나타나지 않아 성별검사를 할 수 없었던 비등법을 적용한 치수 검체에서 주형 DNA 양을 2배 증가시켜 PCR시행 후 전기영동을 시행한 결과 처음과 마찬가지로 음성소견을 나타내어 중합효소반응 억제물질 존재를 확인하였다.

사람의 게놈 DNA에서 VNTR 다형성을 나타내는 유전좌위는 1,500개로 추정되나 그 중 법의학 분야에서 개인식별에 이용되고 있는 VNTR 유전좌위는 pY3(D7S22), MS32(D1S 8)³⁸⁾, pMS 51(D11S97), pMCT118(D1S 80)^{2 5)}, pYNZ22(D17 S30), Type II collagen(COL2A1)¹⁾등이다. 이들 중 사람의 염색체 1번에 위치하는 D1S80 유전좌

위는 16bp 크기의 규칙적인 반복염기 서열로 구성되어 하나의 대립인자가 약 350-900bp의 크기로 존재한다. 현재까지 알려진 대립유전자는 한국인에서 29개로 밝혀졌으며²⁾ 이들의 조합에 의해 형성되는 유전자 형은 406종으로 기대되나 현재까지 한국인 804명을 대상으로 실험한 결과 146종류의 유전자형만이 밝혀졌고, 또한 한국인에서 DIS80 유전좌위는 85.3-87.4%의 이형접합도를²⁾ 나타내고 외국인에서의 DIS80 유전좌위의 이형접합도는 덴마크인에서 77%³³⁾, 독일인에서 86%³⁸⁾, 동남아 및 인도인에서 각각 76, 88%¹¹⁾ 등 높은 이형접합도를 나타내므로 법의학적 감정에 가장 유용하고 빈번히 사용되는 VNTR 유전좌위라 할 수 있다. 본 연구에서도 총 40개의 치아에서 비등법을 적용한 치수를 제외한 모든 시료에서 DIS80 유전좌위의 AMP-FLPs를 보여주고 있으며 이들로부터 얻어진 19개의 대립유전자로부터 30개의 유전자형을 관찰하였으며 이중 6개의 시료에서는 동형접합체(Homozygote)를 나타내 윤등⁴⁾의 5개의 시료중 동형접합체가 1개로 나타난 연구결과와 비슷한 비율의 동형접합체를 관찰하였다.

DIS80 유전좌위의 증폭은 33회의 온도순환으로 PCR을 시행하였는데 4가지 방법 모두 상아질층에서 약간씩의 PCR 인공산물들이 관찰된 바 상아질층에서는 송등³⁾이 제시한 인공산물이 생기지 않는 온도순환 조건인 25회-27회에 근접하게 온도순환 횟수를 줄여보는 것이 바람직하다고 생각된다.

한편, 각 방법에 따라 검출된 DNA를 치수층에서는 2% agarous gel 상에서 전기영동을 시행하였고, 상아질층에서는 한국인의 DIS80 유전좌위의 대립인자 크기인 350-900 bp에 적용되는 범위인 8%, 6%, 5%, 3.5% polyacrylamide gel 상에서 각각 전기영동을 시행하여 검색한 결과 agarous gel과 polyacrylamide gel 상에서는 별다른 차이를 나타내지 않았으나 polyacrylamide gel 상에서 좀 더 뚜렷한 DNA띠 양상을 보였으며, polyacrylamide gel의 농도에 따른 차이는 5% 와 3.5% 상에서 가장 뚜렷한 DNA띠를 관찰하였으나 3.5% gel을 사용하였을 때 조각이 어

렵고 염색과정에서 gel이 잘 찢어지는 단점이 있기 때문에 5% polyacrylamide gel을 사용하는 것이 가장 좋은 결과를 얻을 것으로 사료된다. 유일하게 DNA띠를 관찰하지 못한 비등법을 적용한 치수층에서 주형 DNA양을 2배로 증가시키고 순환횟수를 38회 까지 증가시켜 PCR후 전기영동을 시행한 결과 역시 10개의 시료 모두 음성소견으로 나타난 바 X-Y homologous amelogenin gene 검색보다 훨씬 민감한 조건을 나타내며 또한 Walsh등³⁵⁾이 언급한 100°C 고온처리 후 중합효소반응 억제물질의 생성으로 인한 DNA 변성결과에 기인한 것으로 사료된다.

본 연구에서 소량의 DNA를 함유하고 있는 치아에서 4가지 DNA 추출방법에 따라 DNA를 추출한 후 각 방법에 따라 추출된 DNA를 이용하여 X-Y homologous amelogenin gene 검색을 통한 성별검사와 DIS80 VNTR locus 검색을 통한 개인식별을 시행한 결과 기존에 주로 적용하여 왔고 현재도 가장 많이 적용하고 있는 페놀법과 비교하여 침전법으로도 훌륭하게 성별검사 및 개인식별 감정이 가능하다는 것이 밝혀졌고 비등법을 적용한 경우에도 검체의 일부를 제외하고 성별검사 및 개인식별 감정이 가능하다는 것이 밝혀졌다.

그러나 심하게 변성되고, 다양한 환경적 요인에 의해 부패되는 극미량의 검체에서도 순수하고 많은 양의 DNA를 성공적으로 추출하여 개인식별 감정실무에 응용하기 위해서는 향후 Chelex³⁵⁾를 이용하여 DNA 순수도를 높이고, mitochondria sequencing, MVR-PCR³⁸⁾ 등과 같은 방법도 적용하여 치아에서 분자생물학적 방법을 이용한 완벽한 개인식별이 가능한 지 향후 이에 대한 연구를 시행해야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

40개 치아의 치수, 상아질, 법랑질 각각의 부위에서 비등법, 침전법, 페놀법, 비등후 페놀법 등 4가지 방법으로 DNA를 추출한 후 얻은 DNA 양, 순수도 등을 비교 분석하고, 성별검사, DIS80 유전좌위와 AMP-FLPs의 검색을 시행하여

다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 자외선 분광기를 이용한 DNA 양 및 순수도 측정시 치수에서 침전법(salting-out 방법)을 적용한 경우 가장 많은 양의 DNA를 검출하였으며 순수도는 치수에서 침전법과 페놀법을 적용할 때 DNA 성분의 표준지표인 1.8에 가장 근접하였다.
2. 중합효소반응에 의한 X-Y homologous amelogenin gene 증폭시 법랑질에서는 성별판별이 불가능하였으나 치수, 상아질에서는 비등법을 적용한 치수 일부를 제외하고 모든 방법에서 성별판별이 가능하였다.
3. D1S80 유전자좌위의 AMP-FLPs 검색은 법랑질 및 비등법을 적용한 치수에서는 가능하지 않았으며 침전법, 페놀법, 비등후 페놀법을 적용한 치수, 상아질과 비등법을 적용한 상아질에서는 검색이 가능하였다.
4. X-Y homologous amelogenin gene과 D1S80 유전자좌위의 AMP-FLPs가 검색되었을 때 X-Y homologous amelogenin gene은 gel상에서 모두 정확한 DNA띠로 나타났고, D1S80 유전자좌위는 침전법과 페놀법을 적용하였을 때 gel상에서 가장 깨끗하고 정확한 DNA 띠로 나타났다.

본 연구결과를 종합하여 볼 때 치아에서 성별 판별은 침전법, 페놀법, 비등후 페놀법에서 모두 정확히 성공적으로 수행할 수 있었고, D1S80 유전자좌위의 AMP-FLPs 검색은 침전법 및 페놀법을 적용할 때 법의학과학적 감정실무에 응용성이 높은 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. 광 명재, 명 현군, 이 희석, 황 적준 : 한국인에서 중합 효소 반응으로 검색되는 COL2A1 유전자좌위의 대립 유전자 빈도, 『대한 법의학회지』, 18(2); 1-8, 1994.
2. 김 치홍, 명 현군, 홍 용표, 황 적준 : 한국인에서 VNTR D1S80 유전자좌위의 유전적 다양성 및 집단의 규질성 검증, 『대한법의학회지』, 18(1); 60-70, 1994.
3. 송 은섭, 정재안, 이 희석, 황 적준 : D1S 80의 유전자 형 결정을 위한 PCR법의 조건에 관한 내용, 『대한법 의학회지』, 18(1); 45-59, 1994.
4. 윤 경규, 황 적준, 김 종열 : 타액반 피검물에서 개인 식별을 위한 DNA의 유전자형검사, 『대한 구강내과 학회지』, 19(2); 205- 217, 1994.
5. 윤 창륙, 김 종열 : 치아에서의 DNA 분석에 의한 개 인식별, 『대한 구강내과학회지』, 20(1) : 229-245, 1995.
6. 윤 창륙, 김 종열 : 『법의치과학』, 서울, 이우문화사 ; 151-194, 1995
7. 대한소아치과학회 편 : 『소아치과학』, 서울, 이화출판 사 ; 72-73, 1990.
8. Akane, A., Shiono, H., Matsubara, K., Nakamura, H., Hasegawa, M., and Kagawa, M. : Purification of forensic specimens for the polymerase chain reaction (PCR) analysis, J. Forensic Sci., 38(3) ; 691-701, 1993.
9. Akane, A., Seki, S., Shiono, H., Nakamura, H., Hasegawa, M., Matsubara, K., Nakahori, Y., Nagafuchi, S., and Nakagome, Y. : Sex determination of forensic samples by dual PCR amplification of an X-Y homologous gene, Forensic Science International, 52; 143-148, 1992.
10. Caspersson, T. : Chemical differentiation along metaphase chromosomes, Exptl. Cell Res., 49 ; 219-222, 1968.
11. Chuah, S. Y., Tan, W. F., Yap, K. H., Tai, H. E., and Chow, S. T. : 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.
12. Gill, P., Jeffreys, A. J., and Werrett, D. J. : Forensic application of DNA 'fingerprints', Nature 318 ; 577- 579, 1985.
13. 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.
14. Gösta gustafson : Age determination on teeth, J. of american dental association 41 ; 45-54, 1950.
15. Jeffreys, A. J., Brookfield, J. F. Y., and Semeonoff, R. : Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints, Nature, 317 ; 818- 819, 1985.
16. Hill, A. V. S., and Jeffreys, A. J. : Use of minisatel-

- lite DNA probes for determination of twin zygosity at birth, Lancet, 21(28) ; 1394-1395, 1985.
17. Jeffreys, A. J., Wilson, V., and Thein, S. L. : Individual-specific 'fingerprints' of DNA, Nature, 316 ; 76-81, 1985.
 18. Jeffreys, A. J., Wilson, V., and Thein, S. L. : Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA, Nature, 314 ; 67-73, 1985.
 19. 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.
 20. Ludes, B., pfitzinger, H., and Mangin, P. : DNA fingerprinting from tissues after variable post-mortem period, J. Forensic Sci., 38(3) ; 686-690, 1993
 21. Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. : Molecular cloning : A laboratory manual, Cold spring Harbor ; E.5-E.6, 1989
 22. Metzger, Z., Buchner, A., and Gorsky, M. : Gustafson's method for age determination from teeth - A modification for the use of dentists in identification teams, J. Forensic Sci., 25(4) ; 742-749, 1980
 23. 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.
 24. Nagao, M., Yamada, Y., Zhang, W. D., Kobayashi, M., Oono, T., Iwadate, K., Yagi, K., and Takatori, T. : Personal identification from human remains using morphological characteristics and DNA analysis, Jpn. J. Legal Med., 48(2) ; 87-91, 1994.
 25. Naito, E., Dewa, K., Yamanouchi, H., and Komina-mi, R. : Sex typing of forensic DNA samples using male-and female-specific probes, J. Forensic Sci., 39(4) ; 1009-1017, 1994.
 26. 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.
 27. Reynolds, R., and Sensabaugh, G. : Analysis of genetic markers in forensic DNA samples using the polymerase chain reaction, Anal. Chem., 63 ; 2-15, 1991.
 28. Schnee, G. J., and Teifel, G. J. : Frequency distribution of D1S80 alleles in the German population, Forensic Science International, 59 ; 131-136, 1993.
 29. Schwartz, T. R., Schwartz, E. A., Mieszerski, L., McNally, L., and Kobilinsky, L. : Characterization of deoxyribonucleic acid (DNA) obtained from teeth subjected to various environmental conditions, J. Forensic Sci., 36(4) ; 979-990, 1991.
 30. Smith, B. C., Fisher, D. L., Weedn, V. W., Warnock, G. R., and Holland, M. M. : A systematic approach to the sampling of dental DNA, J. Forensic Sci., 38(5) ; 1194- 1209, 1993.
 31. Smith, H. O., and Wilcox, K. W. : A restriction enzyme from haemophilus influenza, Purification and general properties, J. Mol. Biol., 51 ; 379-389, 1970.
 32. 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.
 33. Thymann, M., Nellemann, L. J., Masumba, G., Irgens, L. M., and Morling, N. : 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, 1992.
 34. Walsh, D. J., Corey, A. C., Cotton, R. W., Forman, L., Herrin, G. L., Jr., Word, C. J., and Garner, D. D. : Isolation of Deoxyribonucleic acid (DNA) from saliva and forensic science samples containing saliva, J. Forensic Sci., 37(2); 387-395, 1992.
 35. 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.
 36. Yamada, Y., Yamamoto, 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.
 37. Yamamoto, K. : Molecular biological studies on teeth inquests, Jpn. J. Legal Med., 46(6) ; 349-355, 1992.
 38. Yamamoto, T., Tamaki, K., Kojima, T., Uchihi, R., and Katsumata, Y. : 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.
39. 山岸章二 : 歯牙硬組織による化学的性別判定について, 日法醫誌, 13(5) ; 664-679, 1959.
40. 羽賀通大 : 歯牙にぬける性差の研究, 日法醫誌, 13(5) ; 590-617, 1959.
41. 青山敏男 : 日本人 個體齒の大きさの 性別的差異 に つびて, 齒科醫學, 20(3) ; 344-353, 昭32.

ABSTRACT

Comparison of 4 methods of DNA extraction for sex determination and D1S80 locus detection in teeth

Woong Hur, D.D.S., Chang- Lyuk Yoon, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Department of Oral Medicine and Diagnosis, College of Dentistry, Chosun National University

Human genomic Deoxyribonucleic acid(DNA) was extracted from teeth by boiling, salting-out, phenol, boiling-phenol methods. The author compared DNA concentration and its purity, the accuracy of sex determination and the results of the D1S80 locus detection among above 4 methods.

The following results were obtained.

1. DNA concentration was the highest in pulp with salting-out method and DNA purity was higher in pulp with salting-out and phenol methods than other 2 methods.
2. Sex determination was possible using of the pulp and the dentin of the teeth with four methods but, it was impossible in the enamel and some pulp with boiling method.
3. Amplification of D1S80 locus occurred from pulp and dentin with salting- out, phenol, and boiling-phenol methods.
4. There are no differences among the amplification of X-Y homologous amelogenin gene by application of 4 methods and salting-out, phenol methods efficiently makes available to amplification of D1S80 locus.

From the investigation DNA extraction, sex determination, amplification of D1S80 locus was successfully accomplished with salting-out, phenol, boiling- phenol methods. Therefore above 3 methods are available and applicable as forensic odontology for individual identification.