

한국인에서 중합효소반응을 이용한 short tandem repeat 유전좌위 F13A01 유전자형 및 대립유전자 빈도

조선대학교 치과대학 구강내과학 교실

이 영 수 · 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

Watson과 Crick⁵⁰⁾이 DNA(deoxyribonucleic acid)의 2중 나선구조를 밝혀낸 이래 급속하게 발전한 분자생물학은 인간 핵게놈(human nuclear genome)에 대한 유전정보의 간접적인 분석법으로부터 실제적으로 게놈을 구성하고 있는 DNA의 분석을 가능하게 하였다. 그러므로써, 분자생물학은 생명과학에 대한 폭을 넓혀 유전자의 구조나 기능을 보다 심도있게 이해할 수 있게 되었고 의학 및 생물학 분야연구에 일대 혁신을 가져왔으며, 특히 의학적으로 각종 미생물 검출과 암을 포함한 각종 유전변이에 의한 질병의 진단, 예후 판단에 유용하게 사용되고 있고^{25,47)} 법의학적인 개인식별에도 다양하게 적용하고 있다.²⁸⁾

최초의 DNA분석의 법의학적인 응용은 Jeffrey 등^{19,27,28,29)}이 DNA의 염기구조에서 각 개체마다

서로 다른 유전 표식자인 제한효소 분절다형 양상(restriction fragment length polymorphism pattern ; RFLP pattern)을 발견하고 사람의 지문과 같이 모든 개체가 상이함을 보여 이를 유전자지문(DNA fingerprint)이라고 명명함으로써 시작되었다. 이후 DNA분석을 통한 분자생물학적 방법은 법의학분야에 있어서 유전적 개인식별, 가족관계의 규명 그리고 친생자 감정¹⁵⁾ 등에 성공적으로 이용되고 있다.

일반적으로 유전자 표식자(genetic marker)를 이용한 연구에서 주로 쓰이는 분자생물학적 방법으로는 초기의 Southern-hybridization법^{19,28,29)}과 1980년대 중반에 개발된 중합효소반응법³⁾ (polymerase chain reaction ; PCR), PCR법을 응용한 minisatellite variant repeat-PCR법²⁴⁾ (MVR-PCR), mitochondrial DNA sequencing법^{7,8)} 등이 있다. 개인 식별에 이용되었던 초기의 단백질검사법 보다 높은 다형성의 RFLP-VNTR (variable number of tandem repeat)과 Southern-blot기법을 이용한 DNA검사법이 훨씬 더 효과적이었다. 그렇지만 법의학적인 영역에서 이러한 RFLP검사는 많은 시간이 소요되며, 실험방법에 따라 정확한 결과를 얻어내기 위하여는 Southern-hybridization법에서는 다좌위 프로우브(multi-locus probe)를 이용하는 경우 μg 단위의 비교적 많은 양의 분해되지 않는 고분자 DNA가 필요하고 단좌위 프로우브(singlelocus probe)를 이용

할 경우 수백 ng의 DNA가 필요하게 된다. 따라서 법의학적 감정실무에 있어 혈흔, 모발, 타액, 장기간 경과하여 부패된 치아와 같이 극소량의 DNA만이 추출되는 경우는 이러한 유전자지문법을 적용하기가 곤란하였다^{1,2,6)}. 그러나 PCR법은 수십 ng이하의 DNA로도 충분히 특정 유전자를 분석할 수 있기 때문에 기존의 Southern-hybridization법으로는 불가능한 분석을 할 수 있는 유용한 검색법이라 하겠다^{5,12)}.

Mullis 등에 의해 고안된 PCR법은 분자생물학적 기법 중 감수성과 특이성이 가장 높은 DNA분석법의 하나로서, 생물체의 게놈 DNA (genomic DNA)로부터 특정의 DNA 절편만을 시험관내에서 선택적으로 복제하고 증폭함으로써, 단시간 내에 특정 유전자를 다양한 방법으로 분석하여 유전자에 대한 정보를 얻어내는 기법이다. PCR 기구, 시약 그리고 방법의 발전과 더불어 증폭된 DNA 산물에 대한 염기서열 분석의 보편화로 여러 분야에서 PCR법의 특이성과 유용성이 날로 증가되고 있으며, 현재 PCR을 이용한 DNA염기서열 분석은 돌연변이의 특성 규명, 유전자 다형성(polymorphism) 검색, DNA염기의 진화적 변화, 질병의 감수성 검색을 포함한 의학적 진단 등에 활발히 응용되고 있다⁴⁴⁾. 이러한 PCR법은 법의학분야에 적용되어 주로 VNTR 다형성을 나타내는 특정 유전좌위만 증폭, 전기영동하여 증폭절편 길이다형성(amplified fragment length polymorphisms, AMP-FLPs)을 검색하므로써 실험방법상 어려운 점이 있었고 많은 시간이 소요되었던 종래의 Southern blot법에 비해 비교적 간단하게 VNTR 유전좌위의 다형성을 확인할 수 있게 되었다^{1,45)}.

그러나 VNTR 유전좌위 대립인자의 길이가 매우 큰 경우 증폭이 불가능할 뿐 아니라 고순도의 DNA가 필요하고 DNA가 변질하면 AMP-FLP에서 분자량이 작은 대립유전자는 증폭되나 분자량이 큰 대립유전자는 증폭하지 않게 되며 RFLP와 같이 DNA의 변질에 영향을 받게된다⁴⁵⁾. DNA가 어느정도 변질되더라도 VNTR 유전자보다 분자량이 작은 대립유전자는 증폭이 가능하기 때문에 이러한 반복 기본단위 염기수가

적은 유전좌위를 찾고자 하는 연구가 진행되면서 길이가 3~7염기쌍의 짧은 반복 서열을 함유하고^{16,49)} 있는 수많은 short tandem repeat (STR) 유전좌위가 밝혀지고 이러한 STR 유전좌위는 유전자 지도작성, DNA 지문검사, 개인식별, 친생자 감정 등에 활발하게 적용되고 있다.

인간 게놈은 약 500,000개의 STR를 갖는다고 평가되고 있으며^{10,16,36)}, STR 유전좌위는 인간 게놈에서 균일하고 풍부하게 분포되어 있다^{31,36)}.

STR 유전좌위는 높은 다형성 표식자로서 변이율이 낮고 PCR증폭이 가능하기 때문에 법의학적 검체에 적용 및 유전자배열 연구에 적합하며, 또한 VNTR 유전좌위에 비하여 크기가 작기 때문에 생물학적 검체로부터 추출할 수 있는 DNA가 제한되어 있거나 DNA가 부분적으로 부패되었을 때 훨씬 유용하다^{6,21,43)}. 또한 일반적으로 증폭산물의 크기가 350염기쌍 이하로 검색되므로 VNTR영역보다 PCR을 할 경우 DNA 증폭 효율성이 높고 전기영동 후 질산은염색을 하여 분석하면 검출특이성이 기존의 ethidium bromide 염색법 보다 높고 자기방사선법(autoradiography)보다 실험시간이 짧으며 방사성동위원소를 사용하지 않아도 되는 장점이 있다^{41,1)}. 그리고 STR 유전좌위 검색법은 특이성 대립유전자 표식자(specific allelic marker)를 함께 사용하여 유전자정보 검색이 단순하고 제한된 해상력을 갖는 VNTR-Southern hybridization법에 비해 정확하게 대립유전자의 검색이 가능하다^{6,43)}.

Edwards 등¹⁶⁾은 DNA검사 및 유전자 지도작성을 위한 유전자의 빈도와 분포, 유용성 및 적합성을 위하여 여러 trimeric, tetrameric STR을 연구하여 STR 유전좌위가 매우 다형성이 높고 안전하게 유전되며 유전자 지도작성에 유용하고 다중중합효소반응(multiplexed PCR)이 가능함을 보고하였고, Hurbert 등²⁶⁾은 STR 유전좌위가 방사능 물질이나 denaturing 겔을 사용하지 않고 단일 세포에서 분석될 수 있으며 STR 유전좌위의 단일세포 분석이 유전질환의 진단 및 매우 소량의 핵산을 함유한 오래된 DNA 검체나 법의학적 검체의 분석에 유용하다고 하였다.

Stewart 등⁴⁷⁾은 유용한 다형성 STR 표식자를 이용하여 유전질환 중의 하나인 Wilson 병에서 임상적 검사 전에 부모로부터 DNA를 이용한 예측검사가 99%이상의 정확성을 갖을 것이라고 보고하였다. 또한 Hammond 등²¹⁾은 13개의 STR 유전좌위에서 PCR을 이용하여 DNA 검사를 시행하여 STR 유전좌위가 친자감별, 법의학 적 개인식별 및 의학적 진단을 위한 신속, 민감하고 신뢰할 만한 방법임을 제시하였으며, Alford 등¹³⁾은 9개의 STR 유전좌위를 이용한 친자감정을 시행하여 STR 유전좌위가 기존의 VNTR 유전좌위를 이용한 방법보다 유용성, 정확성, 민감성이 높고 신속한 평가를 제공한다고 보고하였다. Schmitt 등⁴⁶⁾은 법의학 적 검체의 분석을 위한 유전자 검사법에 대해 VNTR과 STR의 다형성을 비교하였으며, 선 등⁴⁾은 한국인에서 STR 표식자의 DNA 다형현상에 관하여 보고한 바 있다. 또한 Nishimura 등^{34,35)}은 F13B 및 DIS53, Zulaini 등⁵²⁾은 LPL, Warne 등⁴⁹⁾은 AC-TBP2, Watkins 등⁵⁰⁾은 ACTC, Hearne 등^{22,23)}은 HPRT 및 CRYG1, Puer 등^{42,43)}은 HUMTH01 및 F13A01, Lorente 등³²⁾과 Kimpton 등²⁹⁾은 HumvWA, Edwards 등¹⁷⁾은 Human CD4, Polymeropoulos 등^{37,41)}은 CYP 19, TH, F13A1, HMG14 및 TRML, Bodfish 등¹⁵⁾은 SPTA1, Anker 등¹⁴⁾은 hTPO, Granqvist 등²⁰⁾은 GLUT2, 한 등^{9,11)}은 TH01과 CD4, HumvWA, HUMTH01, 권 등¹⁾은 CSF1PO, TPOX, TH01 등 여러 STR 유전좌위에 대한 대립유전자 및 유전자형의 분포에 관한 연구를 보고하였다.

법의학 적 개인식별에 폭넓게 이용되고 있는 STR 유전좌위 중 하나인 F13A01 유전자는 염색체 6p24-p25에 위치하는 human coagulation factor XIII A subunit 유전자로서 [AAAG]의 반복 염기서열을 가지고 있고 현재 3, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16의 총 14개 대립 유전자가 알려졌으며 각 대립유전자의 길이는 181bp(base pair)에서부터 231bp에 해당되며^{37,42)} 여러 민족의 유전자분포 등이 보고되었으나 한국인에서의 이에 대한 연구는 현재 보고된 바 없다.

법의학 적 개인식별 및 친생자감정시 VNTR 및 STR 유전좌위의 여러 유전자를 검출하여 감정을 시행하게 되는데 이를 위해서는 먼저 각각의 유전자에 대한 대립유전자의 발현, 유전자형의 빈도, 다양성 등에 대한 기초자료를 확보하는 것이 선행되어야 한다. 따라서 본 연구에서는 STR 유전좌위 F13A01의 법의학 적 이용을 위하여 한국인 집단에서 F13A01의 대립유전자 빈도 및 유전자형 분포를 구하고 타 민족에서의 출현 빈도와 비교하여 실제 감정시 기초자료로 활용하고자 본 연구를 수행하였다.

II. 연구대상 및 방법

A. 연구대상

서로 혈연관계가 없는 광주에 거주하는 한국인 성인 205명을 연구대상으로 하였으며 전혈 1.5ml~2ml을 채혈하여 사용하였다.

B. 연구방법

1. DNA 추출

채혈된 전혈 1.5ml~2ml에 3~4배의 적혈구용해완충액(0.16M ammonium chloride : 0.17M Tris = 9 : 1, pH 7.2)을 잘 혼합하여 shaking water bath(Mono-tech co.)에서 반응(37°C, 15분)시킨 다음 원심분리(1,500rpm~2,000rpm, 15분 ; HA-1000-3[®], Hanil Science Industrial Co.) 후 적혈구가 용해된 상층액을 제거하고 6~7ml의 적혈구 용해완충액을 넣어 다시 한번 상층액을 분리하는 과정을 반복하였다. 이렇게 얻어진 백혈구 덩어리를 2ml의 phosphate-buffered saline (0.01M phosphate buffer, 0.0027M potassium chloride, 0.137M sodium chloride, pH 7.4 at 25°C ; Sigma[®])으로 세척(1,500rpm~2,000rpm, 10분)하였다. 얻어진 검체에 500 μ l nucleolysis buffer (10mM Tris-Cl, 0.1M EDTA, 0.5% SDS, pH 8.0)와 15 μ l Proteinase K(10 μ g/ μ l ; Gibco BRL[®])를 첨가하여 잘 혼합하고 shaking water bath에서 반응(55°C, 2시간)시킨 후 원심분리(1,500

rpm~2,000rpm, 1분)하였다. 처리된 검체에서 상층부를 취하여 새로운 eppendorf tube (1.5ml ; eppendorf®)에 옮겨 담았다. 옮겨진 상층액에 200 μ l 5M NaCl(Sigma®)용액을 넣어 잘 흔든 후 원심분리(12,000rpm, 10분 ; Centrifuge 5415 C, eppendorf®) 한 다음 상층액을 다시 다른 eppendorf tube에 옮기고 여기에 100% 에탄올 1ml을 넣어서 잘 혼합하였다. 이때 얻어진 DNA 가닥을 1ml용 pipette tip을 이용하여 새로운 eppendorf tube로 옮긴 다음 70% 에탄올로 세척(12,000rpm, 10분)하여 건조기(model : SDO -2, Sae-Kwang Scientific Co.)에서 건조(70°C, 15분)시키고 200 μ l의 멸균 증류수를 첨가하였다. 추출된 DNA가 멸균된 증류수에 잘 용해되도록 shaking water bath에서 반응(37°C, 24시간)시킨 후 냉장보관 하였다.

2. DNA농도 측정

PCR을 하기 전에 추출된 DNA를 멸균된 증류수로 100배 희석한 다음 자외선 분광기(Ultrospec® 2000, Pharmacia Biotech)를 이용하여 260nm에서의 흡광도(optical density)와 280nm에서의 흡광도를 조사하였다. DNA를 1 : 100의 비율로 희석후 통과되는 자외선의 파장에 따라 얻어지는 260nm, 280nm의 흡광도수치로 DNA농도 및 순수도를 계산하였다(DNA농도=260nmO.D/0.023 \times 희석배율, DNA순수도=260nmO.D/280nmO.D). 구해진 DNA농도를 이용하여 10ng/ μ l이나 20ng/ μ l의 주형 DNA를 만들어 이를 중합효소반응에 이용하였다.

3. PCR에 의한 F13A01의 증폭

DNA의 PCR증폭은 F13A01유전자 프라이머(5'-GAGGTTGCACTCCAGCCTTTGCAA-3'; forward primer, AAAG strand와 5'-TTCTG-AATCATCCCAGAGCCACA-3';reverse primer, CTTT strand; Promega®)를 이용하여 PCR 기기(Perkin Elmer DNA thermal cycler 480®) 상에서 다음과 같이 PCR증폭을 수행하였다.

각 PCR 혼합물에는 10ng/ μ l이나 20ng/ μ l 농도의 DNA시료가 각각 2.5 μ l(25~50ng)씩 포함

되었고, 각각 1 μ M의 primer, 0.01 unit의 Taq DNA polymerase/ul(Promega®), 10 \times Taq DNA polymerase buffer(500mM KCl, 100mM Tris-HCl[pH 9.0 at 25°C], 1% Triton® X-100, 15mM MgCl₂, 2mM의 각각 dNTPs; Promega®)가 포함되었으며 최종 용량은 25 μ l로 하였다.

온도순환 반응조건은 96°C에서 2분간 pre-denaturation처리한 후 94°C에서 1분간 denaturation, 64°C에서 1분간 annealing, 그리고 70°C에서 1.5분의 extension과정을 10회 순환한 후, 90°C에서 1분, 64°C에서 1분, 70°C에서 1.5분의 조건으로 20회 순환하여 총 30회 순환과정을 거쳐 DNA를 증폭하였다.

4. 전기영동

PCR로 증폭한 DNA산물 2.5 μ l와 동량의 2배 농축된 loading 용액(10mM NaOH, 95% formamide, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol FF; Promega®)을 혼합하여 95°C에서 3분간 처리한 후 얼음에서 냉각한 다음 7M urea(Promega®)가 포함된 4% denaturing polyacrylamide 겔(acrylamide : bis-acrylamide = 19 : 1)상에서 40 Watts로 1시간 30분동안 전기영동 하였다.

전기영동 겔은 20분간 10% acetic acid로 고정 한 후 염색 용액(0.5g silver nitrate, 500ml deionized H₂O, 750 μ l 37% formaldehyde)에 30분, 그리고 현상 용액(30g sodium carbonate, 200 μ l 10% sodium thiosulfate, 1000ml deionized H₂O, 1.5ml 37% formaldehyde)에서 2~5분간 처리하여 검색되는 DNA 단편을 F13A01 대립유전자 특이성 표식자(F13A01 ladder, Promega®)와 비교하여 F13A01 유전자좌위의 대립유전자들을 확인하였다.

5. 통계분석

본 연구에서는 한국인 205명에 대해 F13A01 유전자좌위에서 발견되는 유전자형의 빈도가 Hardy-Weinberg Equilibrium을 유지하는 지를 확인하기 위해 유전자형의 관찰치와 각각의 대립유전자 빈도를 이용하여 얻은 기대치간의 오차에 대한

Table 1. Frequency of F13A01 alleles

| allele | Number of alleles observed | allelic frequency |
|--------|----------------------------|-------------------|
| 3.2 | 149 | 0.363 |
| 4 | 43 | 0.105 |
| 5 | 26 | 0.063 |
| 6 | 191 | 0.466 |
| 7 | 0 | 0.000 |
| 8 | 0 | 0.000 |
| 9 | 0 | 0.000 |
| 10 | 0 | 0.000 |
| 11 | 0 | 0.000 |
| 12 | 0 | 0.000 |
| 13 | 0 | 0.000 |
| 14 | 0 | 0.000 |
| 15 | 0 | 0.000 |
| 16 | 1 | 0.002 |
| all | 410 | 1.000 |
| h | | 0.639 |

h ; allelic diversity value = $(1 - \sum Xi^2)/(N/N-1)$

Xi ; allelic frequency, N ; sample size(205)

유의성 검정을 χ^2 test를 이용하여 시행하였다. 또한 혈연관계가 없는 두 개체에서 동일한 유전자형을 갖지 않을 확률은 개인식별력(power of discrimination value : PD)으로 나타내는 데 $PD = 1 - \sum Pj^2$, (Pj ; genotype frequency)의 공식^{1,8,10)}으로 구하였으며 대립유전자다양성(allelic diversity value)은 $h = (1 - \sum Xi^2) / (N/N-1)$, (Xi ; allele frequency, N ; sample size)의 식^{1,10)}으로 구하였다.

III. 연구성적

A. F13A01 유전자좌위의 대립유전자 및 유전자형 빈도

한국인 205명을 대상으로 F13A01 유전자좌위를 PCR로 증폭하여 polyacrylamide 겔 상에서 전

Table 2. Distribution of F13A01 genotypes

| Genotypes | Number observed | Frequency |
|--------------|-----------------|-----------|
| 3.2-3.2 | 27 | 0.132 |
| 3.2-4 | 15 | 0.073 |
| 3.2-5 | 14 | 0.068 |
| 3.2-6 | 65 | 0.317 |
| 3.2-16 | 1 | 0.005 |
| 4-4 | 1 | 0.005 |
| 4-5 | 4 | 0.020 |
| 4-6 | 22 | 0.107 |
| 4-16 | 0 | 0.000 |
| 5-5 | 1 | 0.005 |
| 5-6 | 6 | 0.029 |
| 5-16 | 0 | 0.000 |
| 6-6 | 49 | 0.239 |
| 6-16 | 0 | 0.000 |
| homozygote | 78 | 0.380 |
| heterozygote | 127 | 0.620 |
| total sample | 205 | 1.000 |
| PD | | 0.804 |

PD ; power of discrimination value

= $1 - \sum Pj^2$, Pj ; genotype frequency

기영동 후 질산은 염색을 통하여 분석한 결과 F13A01 유전자좌위에서 검색된 대립유전자는 3.2, 4, 5, 6, 16 등 총 5개가 나타났다(Fig. 1). 그 중 대립유전자 6은 191개로 발현빈도가 가장 높았으며(0.466), 대립유전자 4는 43개(0.105), 대립유전자 3.2는 149개(0.363), 대립유전자 5는 26개(0.063)가 관찰되었고, 가장 드물게 관찰되었던 대립유전자는 대립유전자 16(0.002)이었다(Table 1).

그리고 F13A01 유전자좌위에서 발견되는 유전자형은 동형접합체(homozygote)가 4종이고, 이형접합체(heterozygote)가 7종으로 모두 11종의 유전자형이 관찰되었다. 각 유전자형 중에서 3.2-6형이 65명(0.317)으로 유전자형 빈도가 가장 높았고, 6-6형이 49명(0.239), 3.2-3.2형이 27명(0.132), 4-6형이 22명(0.107), 3.2-4형이 15명(

Table 3. Hardy-Weinberg Equilibrium test of F13A01 genotypes

| Genotypes | No. observed(frequency) | No. expected(frequency) | χ^2 |
|--------------|-------------------------|-------------------------|----------|
| 3.2-3.2 | 27(0.132) | 27.0(0.132) | 0.00 |
| 3.2-4 | 15(0.073) | 15.6(0.076) | 0.02 |
| 3.2-5 | 14(0.068) | 9.4(0.046) | 2.25 |
| 3.2-6 | 65(0.317) | 69.4(0.339) | 0.28 |
| 3.2-16 | 1(0.005) | 0.3(0.001) | 1.63 |
| 4-4 | 1(0.005) | 2.3(0.011) | 0.73 |
| 4-5 | 4(0.020) | 2.7(0.013) | 0.63 |
| 4-6 | 22(0.107) | 20.1(0.098) | 0.18 |
| 4-16 | 0(0.000) | 0.1(0.000) | 0.10 |
| 5-5 | 1(0.005) | 0.8(0.004) | 0.05 |
| 5-6 | 6(0.029) | 12.0(0.059) | 3.00 |
| 5-16 | 0(0.000) | 0.1(0.000) | 0.10 |
| 6-6 | 49(0.239) | 44.5(0.217) | 0.46 |
| 6-16 | 0(0.000) | 0.4(0.002) | 0.40 |
| homozygote | 78(0.380) | 74.6(0.364) | 1.24 |
| heterozygote | 127(0.620) | 130.1(0.634) | 8.59 |
| total | 205(1.000) | 204.7(0.998) | 9.83 |

0.25 < P < 0.50 , d.f. = 13

0.073), 3.2-5형이 14명(0.068), 5-6형이 6명(0.029), 4-5형이 4명(0.020) 순이며, 4-4, 5-5, 3.2-16형이 각 1명(0.005)으로 가장 빈도가 낮았고 4-16, 5-16, 6-16형은 나타나지 않았다(Table 2).

B. F13A01 유전자좌위에서 검색되는 유전자형 빈도의 검정

한국인에서 F13A01 유전자좌위 유전자형은 동형접합체가 4종이고, 이형접합체가 7종으로 모두 11종의 유전자형이 관찰되었다. 각 유전자형의 빈도는 0.005에서부터 0.317까지로 나타났다(Table 2). 한국인 205명에 대해 F13A01 유전자좌위에서 발견되는 유전자형의 빈도가 Hardy-Weinberg Equilibrium을 유지하는지를 확인하기 위해 유의성 검정을 시행한 결과는 Table 3과

같다. 이형접합체와 동형접합체의 총 관찰치는 127명과 78명이었고, 기대치는 각각 130.1과 74.6이었으며 각각의 유전자형의 관찰치와 기대치를 비교한 결과 관찰치와 기대치간에는 통계학적으로 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$).

IV. 총괄 및 고찰

DNA검사는 친생자감정 및 범의학에서 개인 식별과 이식술에서 공여자(sample-source)의 결정, 출생전 진단, 그리고 혈통확인(pedigree validation) 등에 적용된다¹⁶⁾. 최근 범의학적 DNA 검사법으로써 가장 많이 이용되는 VNTR 과 STR 표식자는 유전자 지도작성, 염기서열 분석, 개인식별 등 유전적 연구에 폭넓게 사용되고 있다^{2,25,44)}. 특히 높은 다형성의 STR 유전자좌위는

매우 유용성이 높은 표식자로서 보통 3개에서 7개의 반복되는 염기서열^{16,21,31)}을 포함하고 PCR을 이용하여 증폭할 수 있으며¹⁸⁾ 표본 DNA에서 증폭된 대립유전자를 관찰하기 위해 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동과 질산은염색이 이용될 수 있다¹⁶⁾. 또한 크기 표식자(size marker)로서 특이성 대립유전자 표식자를 활용하여 대립유전자의 검색을 단순화시킬 수 있으며, 이러한 방법들은 Edwards 등¹⁶⁾에 의해 STR 유전좌위인 HPRTB, HUMTH01에서, Puers 등⁴³⁾에 의해 HUMTH01에서 기술된 바 있다.

F13A01 유전좌위는 현재까지 총 14개의 대립유전자가 알려져 있고 각각의 대립유전자들은 포함하고 있는 반복염기서열의 반복수에 따라서 명명된다. 이 중 한 개의 microvariant가 관찰되는데, 이 microvariant는 5번 반복되는 염기서열을 포함하는 대립유전자의 반복서열이 끝나는 주변부위(flanking region)에서 6개의 염기가 삭제되어(HUMF13A01 대립유전자; [GAAA]₄₋₁₆GAGTAAAA, 염기가 삭제된 181bp의 대립유전자; [GAAA]₅-----AA 전기영동시 3번 반복되는 염기서열을 포함하고 2개의 염기가 삽입된 대립유전자만큼 이동하기 때문에 대립유전자 3.2로 명명된다^{42,48)}. 이는 1993년 베니스에서 열린 DNA Commission of the International Society of Forensic Haemogenetics에 의해 제공된 STR 유전좌위의 표준 명명법에 관한 추천을 따른 것이다.

특정 유전좌위로부터 대립유전자가 발견되는 정도를 대립유전자 빈도(allele frequency)로 표시하는데, 이것은 한 유전집단의 유전적 다양성(genetic diversity)을 측정하는 기본적인 지표이다. 이러한 대립유전자 빈도를 이용하여 개개인 계층상에서의 변이를 분석함으로써 개인식별에 적합하게 응용할 수 있다. 그러나 동일성 유무판정에 앞서 선행되어야 할 조건은 한 유전집단내에서 발견되는 특정 유전좌위의 대립유전자 빈도가 신뢰성이 있는지 그리고 다음 세대에도 그 빈도가 동일하게 유지되는 Hardy-Weinberg Equilibrium 상태에 있는지가 먼저 규명되어야 하며 이를 위한 다수의 표본으로부터 집단유전

학적 분석이 필요하다.

한국인 205명에서 F13A01 유전좌위는 5개의 대립유전자와 이 대립유전자로부터 관찰 가능한 15개의 유전자형 중 11개의 유전자형이 검출되었고, 혈연관계가 없는 두 개체에서 동일한 유전자형을 갖지 않을 확률인 개인식별력은 0.804로 나타났으며 관찰되는 이형접합자가 127개로 이형접합도는 62.0%로 나타났는데, Hardy-Weinberg 법칙에 근거해서 계산된 기대치(130개, 63.4%)와 큰 오차가 없음이 확인되었다. 한국인 205명에 대해 F13A01 유전좌위에서 발견되는 유전자형의 빈도가 Hardy-Weinberg Equilibrium을 유지하는 지를 확인하기 위해 Table 3과 같이 각 유전자형의 관찰치와 각각의 대립유전자 빈도를 이용하여 얻은 기대치간의 오차에 대한 유의성 검정을 위해 χ^2 test를 한 결과 통계학적으로 유의성이 없었음이 밝혀졌다($p>0.05$).

그러므로 본 연구에서 분석한 표본은 유전적으로 균질한 모집단으로부터 추출되었으며, 모집단이 Hardy-Weinberg Equilibrium 상태에 있다는 가정하에 본 연구에서 관찰된 대립유전자 빈도를 이용해서 집단유전적 변수들(이형접합도, 대립유전자 다양성, 개인식별력 등)을 계산한 결과의 신빙성이 인정됨을 확인하였다.

Table 4는 본 연구에서 얻은 한국인에서의 F13A01 대립유전자의 빈도를 포함하여 여러 민족집단에서 F13A01 유전좌위의 대립유전자 빈도를 나타내고 있다. 흑인에서는 대립유전자 16을 제외한 총 13개의 대립유전자를 보여 가장 다양하게 대립유전자를 관찰할 수 있었고 독일 코카시안에서 12개, 미국 코카시안에서 9개, 멕시코인에서 8개, 아시아인에서 7개, 일본인에서 6개의 순이며 본 연구에서는 5개의 대립유전자만이 관찰되어 가장 낮은 대립유전자 다양성(0.639)을 보였다^{21,33)}.

본 연구에서는 대립유전자 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15이 관찰되지 않았다. 그러나 한국인에서 관찰되지 않았던 대립유전자 8부터 15까지는 다른 민족에서도 아주 낮은 빈도로 관찰되었거나 관찰되지 않았다^{21,33)}. 본 연구에서 관찰되지 않는 대립유전자의 수가 많은 이유는 유전집단

Table 4. Allelic frequency of F13A01 locus in 7 race groups

| race allele | Korean | German Caucasians | American Caucasians | Blacks | Mexican-Americans | Asians | Japanese |
|-------------|--------|-------------------|---------------------|--------|-------------------|--------|----------|
| 3.2 | 36.3 | 5.5 | 8.3 | 11.1 | 25.4 | 27.8 | 32.8 |
| 4 | 10.5 | 1.8 | 2.0 | 5.7 | 10.1 | 8.7 | 9.8 |
| 5 | 6.3 | 18.7 | 19.2 | 34.0 | 16.1 | 10.3 | 2.8 |
| 6 | 46.6 | 32.5 | 34.5 | 14.6 | 19.9 | 50.8 | 54.3 |
| 7 | 0 | 35.9 | 32.5 | 20.3 | 26.2 | 0.8 | 0.1 |
| 8 | 0 | 1.2 | 0.6 | 7.7 | 0.8 | 0 | 0 |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 1.1 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 0.6 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | 0.3 | 0.3 | 1.1 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 0 | 0.3 | 0 | 0.3 | 0 | 0.8 | 0.1 |
| 13 | 0 | 0.9 | 0 | 2.0 | 0.8 | 0 | 0 |
| 14 | 0 | 0.6 | 0.9 | 1.1 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 0 | 1.2 | 1.7 | 0.3 | 0.5 | 0 | 0 |
| 16 | 0.2 | 0.9 | 0 | 0 | 0 | 0.8 | 0 |
| all | 205 | 163 | 348 | 350 | 366 | 126 | 392 |

의 유전적 다양성의 차이 및 대립유전자수에 비해 분석된 표본의 수가 적었기 때문이라고 추정되며 더 많은 한국인 집단에서의 F13A01 유전좌위에 대한 조사가 필요하리라 사료된다.

한편 대립유전자 3.2, 5와 7에서 각 민족집단간의 큰 차이가 관찰되는데 대립유전자 3.2의 빈도를 비교해 보면 독일 코카시안(5.5%), 미국 코카시안(8.3%) 및 흑인(11.1%)에서는 그다지 높지 않은 빈도를 보였으나 멕시코인(25.4%), 아시아인(27.8%), 일본인(32.8%) 및 한국인(36.3%)에서는 상당히 높은 빈도를 보였으며, 대립유전자 7의 경우 독일 코카시안(35.9%), 미국 코카시안(32.5%), 흑인(20.3%), 멕시코인(26.2%)에서는 높은 빈도를 보인 반면 아시아인에서는 0.8%, 일본인에서는 0.1%의 빈도를 보였고 한국인(0%)에서는 관찰되지 않았다. 특히 독일 코카시안에서는 대립유전자 7이 F13A01 유전좌위에서 가장 높은 빈도를 나타냈으나 본 연구의 한국인에서는 전혀 발견되지 않는 등 민족간의 큰 차이를 보였다^{21,33)}.

대립유전자 다양성은 한국인과 독일 코카시안에서 0.639 및 0.731로, 이형접합도는 0.620 및 0.740으로 나타나 F13A01 유전좌위에서 한국인은 독일 코카시안보다 대립유전자 다양성과 이형접합도가 낮은 것으로 나타났다.

본 연구에서 관찰된 대립유전자수와 이형접합도를 토대로 볼 때, 기존의 다른 연구에서 나타난 다른 민족들이 유전적으로 보다 단순하리라 기대되는 한국인보다 유전적으로 다분화되어 있음을 추정해 볼 수 있었으며, 특히 독일 코카시안, 미국 코카시안 및 흑인과 한국인사이에 민족간 집단유전학적 차이가 있음을 시사하였다.

한편 본 연구에서 3 가족에 대한 F13A01 유전좌위를 이용한 분석을 시행하였는데 첫 번째의 경우 유전자형이 F(father)는 3.2-5, M (mother)은 3.2-3.2, O(offspring)는 3.2-3.2였고, 두 번째의 경우 F는 3.2-3.2, M은 3.2-6, O는 3.2-6이었으며, 마지막의 경우 F는 3.2-6, M은 3.2-6, O는 3.2-6으로 모든 경우에서 다른 유전적 변이 없이 멘델의 유전법칙에 따라 유전되었음을 보여 준

- Nucleic Acids Research. 19(19), 5450, 1991.
18. Frégeau, C. J. and Fourney, R. M. : DNA Typing with Fluorescently Tagged Short Tandem Repeat : A Sensitive and Accurate Approach to Human Identification. *BioTechniques*. 15(1), 100~119, 1993.
 19. Gill, P., Jeffreys, A. J. and Werrett, D. J. : Forensic Application of DNA 'Fingerprints'. *Nature* 318, 577~579, 1985.
 20. Granqvist, M., Xiang, K., Seino, M., Fukumoto, H. and Bell, G. I. : Dinucleotide Repeat Polymorphism in Human GLUT2/ liver Facilitative Glucose Transporter Gene on Chromosome 3. *Nucleic Acids Research*. 19(17), 4791, 1991.
 21. Hammond, H. A., Jin, L., Zhong, Y., Caskey, T. and Chakraborty, R. : Evaluation of 13 Short Tandem Repeat Loci for Use in Personal Identification Applications. *Am. J. Hum. Genet.* 55, 175~189, 1994.
 22. Hearne, C. M. and Todd, J. A. : Tetranucleotide Repeat Polymorphism at the HPRT Locus. *Nucleic Acids Research*. 19(19), 5450, 1991.
 23. Hearne, C. M. and Todd, J. A. : Trinucleotide Repeat Polymorphism at the CRYG1 Locus. *Nucleic Acids Research*. 19(19), 5450, 1991.
 24. Hopkins, B., Williams, N. J., Webb, M. B. T., Debenham, P. G. and Jeffreys, A. J. : The Use of Minisatellite Variant Repeat- Polymerase Chain Reaction(MVR- PCR) to Determine the Source of Saliva on a Used Postage Stamp. *Journal of Forensic Science, JFSCA*. 39(2), 526~531, 1994.
 25. Huang, T. H-M., Hejtmancik, J. F., Edwards, A., Pettigrew, A. L., Herrera, C. A., Hammond, H. A., Caskey, C. T., Zoghbi, H. Y. and Ledbetter, D. H. : Linkage of the Gene for an X-linked Mental Retardation Disorder to a Hypervariable(AGAT)_n Repeat Motif within the Human Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase(HPRT) Locus (Xq26). *Am. J. Hum. Genet.* 49, 1312~1319, 1991.
 26. Hubert, R., Weber, J. L., Schmitt, K., Zhang, L. and Arnheim, N. : A New Source of Polymorphic DNA Markers for Sperm Typing : Analysis of Microsatellite Repeats in Single Cells. *Am. J. Hum. Genet.* 51, 985~991, 1992.
 27. Jeffreys, A. J., Brookfield, J. F. Y. and Semeonoff, R. : Positive Identification of an Immigration Test-Case Using Human DNA Fingerprints. *Nature*. 317(31), 818, 1985.
 28. Jeffreys, A. J., Turner, M. and Debenham, P. : The Efficiency of Multilocus DNA Fingerprint Probes for Individualization and Establishment of Family Relationships, Determined from Extensive Case-work. *Am. J. Hum. Genet.* 48, 824~840, 1991.
 29. Jeffreys, A. J., Wilson, V. and Thein, S. L. : Individual-Specific 'Fingerprints' of Human DNA. *Nature*. 316, 76~81, 1985.
 30. Kimpton, C., Walton A. and Gill, P. : A Further Tetranucleotide Repeat Polymorphism in the vWF Gene. *Human Molecular Genetics*. 1(4), 289, 1992.
 31. Litt, M. and Luty, J. A. : A Hypervariable Microsatellite Revealed by in Vitro Amplification of a Dinucleotide Repeat within the Cardiac Muscle Actin Gene, *Am. J. Hum. Genet.* 44, 397~401, 1989.
 32. Lorente, J. A., Lorente, M., Budowle, B., Wilson, M. R. and Villanueva, E. : Analysis of Short Tandem Repeat(STR) HUMVWA in the Spanish Population. *Forensic Science International*. 65, 169~175, 1994.
 33. Nagai, A., Yamada, S., Watanabe, Y., Bunai, Y. and Ohya, I. : Analysis of the STR loci HUMF1301, HUMFXIII B, HUMLPOL, HUMTH01, HUMTPOX and HUMVWFA31 in a Japanese Population. *Int. J. Legal Med.* 109, 34~36, 1996.
 34. Nishimura, D. Y. and Murray, J. C. : A Tetranucleotide Repeat for the F13B Locus. *Nucleic Acids Research*. 20(5), 1167, 1992.
 35. Nishimura, D. Y., Leysens, N. J. and Murray, J. C. : A Dinucleotide Repeat for the D1S53 Locus. *Nucleic Acids Research*. 20(5), 1167, 1992.
 36. Perlin, M. W., Lancia, G. and See-Kiong Ng : Toward Fully Automated Genotyping : Genotyping Microsatellite Markers by Deconvolution. *Am. J. Hum. Genet.* 57, 199~1210, 1995.
 37. Polymeropoulos, M. H., Rath, D. S. and Merrill, C. R. : Tetranucleotide Repeat Polymorphism at the Human Coagulation Factor XIII A Subunit Gene(F13A1). *Nucleic Acids Research*. 19(15), 4306, 1991.
 38. Polymeropoulos, M. H., Xiao, H., Rath, D. S. and Merrill, C. R. : Dinucleotide Repeat Polymorphism at the Human Non-Histone Chromosomal Protein HMG14 Gene. *Nucleic Acids Research*. 19(13), 3753, 1991.
 39. Polymeropoulos, M. H., Xiao, H., Rath, D. S. and Merrill, C. R. : Tetranucleotide Repeat Polymor-

- phism at the Human Tyrosine Hydroxylase Gene (TH). *Nucleic Acids Research*, 19(13), 3753, 1991.
40. Polymeropoulos, M. H., Xiao, H., Rath, D. S. and Merrill, C. R. : Trinucleotide Repeat Polymorphism at the Human Met-tRNA-i Gene 1(TRMI). *Nucleic Acids Research*. 19(15), 4306, 1991.
 41. Polymeropoulos, M. H., Xiao, H., Rath, D. S. and Merrill, C. R. : Tetranucleotide Repeat Polymorphism at the Human Aromatase Cytochrome P-450 Gene(CYP 19). *Nucleic Acids Research*. 19(1), 195, 1991.
 42. Puers, C., Hammond, H. A., Caskey, T., Lins, A. M., Sprecher, C. J., Brinkmann, B. and Schumm, J. W. : Allelic Ladder Characterization of the Short Tandem Repeat Polymorphism Located in the 5' Flanking Region to the Human Coagulation Factor XIII A Subunit Gene. *Genomics*. 23, 260~264, 1994.
 43. Puers, C., Hammond, H. A., Jin, L., Caskey, T. and Schumm, J. W. : Identification of Repeat Sequence Heterogeneity at the Polymorphic Short Tandem Repeat Locus HUMTH01[AATG]_n and Reassignment of Alleles in Population Analysis by Using a Locus-Specific Allelic Ladder. *Am. J. Hum. Genet.* 53, 953~958, 1993.
 44. Sajantila, A., Patek, P., Lukka, M., Syvänen, A. C., Nokelainen, P., Sistonen, P., Peltonen, L. and Budowle, B. : A Microsatellite Polymorphism in the von Willebrand Factor Gene : Comparison of Allele Frequencies in Different Population Samples and Evaluation for Forensic Medicine. *Forensic Science International*. 68, 91~102, 1994.
 45. Sajantila, A., Ström, M., Budowle, B., Karhunen, P. J. and Peltonen, L. : 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.
 46. Schmitt, C., Schmutzler, A., Prinz, M. and Staak, M. : High Sensitive DNA Typing Approaches for the Analysis of Forensic Evidence : Comparison of Nested Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) Amplification and a Short Tandem Repeats (STR) Polymorphism. *Forensic Science International*. 66, 129~141, 1994.
 47. Stewart, E. A., White, A., Tomfohrde, J., Osborne-Lawrence, S., Prestridge, L., Bonne-Tamir, B., Scheinberg, I. H., St George-Hyslop, P., Giagheddu, M., Kim, J. W., Seo, J. K., Lo, W. H.-y., Ivanova-Smolenskaya, I. A., Limborska, S. A., Cavalli-Sforza, L. L., Farrer, L. A. and Bowcock, A. M. : Polymorphic Microsatellites and Wilson Disease (WD). *Am. J. Hum. Genet.* 53, 864~873, 1993.
 48. Urquhart, A., Kimpton, C. P., Downes, T. J. and Gill, P. : Variation in the STR Sequences. *Int. J. Leg. Med.* 107, 13~20, 1994.
 49. Warne, D., Watkins, C., Bodfish, P., Nyberg, K. and Spurr, N. K. : Tetranucleotide Repeat Polymorphism at the Human Beta-actin Related Pseudogene 2(ACTBP2) Detected Using the Polymerase Chain Reaction. *Nucleic Acids Research*. 19(24), 6980, 1991.
 50. Watkins, C., Bodfish, P., Warne, D., Nyberg, K. and Spurr, N. K. : Dinucleotide Repeat Polymorphism in the Human Alpha-Cardiac Actin Gene, Intron IV (ACTC), Detected Using the Polymerase Chain Reaction. *Nucleic Acids Research*. 19(24), 6980, 1991.
 51. Watson, J. D. and Crick, F. H. C. : Molecular Structure of Nucleic Acids : A Structure for Deoxyribonucleic Acid. *Nature*. 171, 737~738, 1953.
 52. Zuliani G. and Hobbs, H. H. : Tetranucleotide Repeat Polymorphism in the LPL Gene. *Nucleic Acids Research*. 18(16), 4958, 1990.

- ABSTRACT -

Genotype and allele frequency of the short tandem repeat F13A01 locus by polymerase chain reaction in Korean

Young-Su Lee, D.D.S. **Chang-Lyuk Yoon**, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Dept. of Oral Diagnosis and Forensic Odontology, College of Dentistry, Chosun University

Allelic frequency and genotype distribution of short tandem repeat (STR) F13A01 locus was analysed by polymerase chain reaction, polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining from human genomic deoxyribonucleic acid (DNA) was extracted from 205 unrelated Korean to be applied to forensic identification and parentage testing as a database.

The results were as follows :

1. 5 alleles and 11 genotypes of F13A01 locus were detected and heterozygosity value was 62.0% and the observed each alleles and allelic frequency was 3.2(0.363), 4(0.105), 5(0.063), 6(0.466), 16(0.002).
2. The allelic diversity value was 0.639 and the power of discrimination was 0.804.
3. Compared with observed number of alleles and allele frequency in ethnic difference, result was appeared to be similar to that of Japanese and Asians, while was appeared to be much different to that of Blacks and Caucasians in the observed number of alleles and frequency of allele 3, 5, 7.

From the above result of this investigation, the allelic frequency of STR F13A01 locus in the Korean was considered to be useful for individual identification and parentage testing as a database.