

유전자형 분석법

한 면 수

국립과학수사연구소 유전자분석실

Forensic Analysis of Human DNA

Myun-Soo Han

DNA Analysis Section, National Institute of Scientific Investigation, Seoul 158-097, Korea

1. 서 론

금세기 유전자 조작기술의 발전은 여러 응용분야에 영향을 미치게 되어 법과학(Forensic Science) 분야의 인체구성 물질에 대한 개인식별(Personal Identification)¹⁻⁹에도 활용할 수 있게 되었다. 이전의 개인식별은 Mendel의 유전법칙에 의거한 혈액형검사법¹⁰에 의존하였으며 그 뒤 cytogenetic의 범주로 유전효소형(genetic enzyme types) 및 단백질형(protein types)의 다형성¹¹을 이용하였다. 이러한 개인식별법은 1985년 영국 Leicester대학의 A.J. Jeffery가 human genome의 myoglobin gene에서 고 변이 유전자좌위(hypervariable region)를 제한효소(restriction enzyme)로 처리하고 southern hybridization에 의해 나타나는 다형성을 보고¹²하면서 비로서 DNA수준에서 분석이 가능하여졌으며 1988년 미국의 플로리다주 법정(Andrew v. State of Florida, 1988)¹³에서 최초로 증거자료로 채택되게 되었다.

유전자분석(DNA analysis)에 의한 개인식별은 영국 Leicester 대학 연구진의 Multilocus Probe(MLP-RFLP) System¹⁴과 미국 FBI연구진의 Single Locus Probet(SLP-RFLP) Sysetm¹⁵으로 발전되었다. 곧이어 1985년 K.B. Mullis에 의해 DNA를 Polymerase Chain Reaction(PCR)으로 증폭하는 방법이 보고¹⁶되고 미국 Cetus사¹⁷에서 DNA thermal cycler를 사용하여 자동화시킴에 따라 유전자분석에 의한 개인식별은 보다 원할하고 광범위한 방법¹⁸으로 발전하게 되었다. 즉, 일부 Minisatellite DNA와 Microsatellite DNA 다형성의 반복수 길이차이를 검출하는 AmpFLP

(Amplification Fragment Length Polymorphism)법을 적용하게 되어 보다 빠른시간내에 개인식별 및 친생자 확인 등의 신원확인이 가능한 범용적인 방법으로 사용하게 되었다. 이외에도 PCR법은 염기치환을 검출하는 Human Leucocyte Antigen(HLA) 분석,¹⁹⁻²¹ Mitochondria DNA 다형성 식별²²과 남녀식별²³ 뿐만 아니라 기존의 혈액형²⁴과 효소형 gene의 다형성²⁵도 식별할 수 있게 되었다. 그리고 Minisatellite의 반복단위의 변이를 검출하는 Minisatellite Variant Repeat (MVR)-PCR²⁶도 보고되어 법과학분야의 개인식별에 활용하고 있다. 특히 AmpFLP법의 경우 최종 전기영동결과를 레이저검출기로 확인한 후 소프트웨어로 분석함으로써 동시에 여러 유전자형을 검출하게 하는 자동검출시스템^{27,28}이 개발되어 실제 사용되고 있다. 이에 따라 고전적인 방법으로는 신원확인이 불가능하였던 것도 유전자(DNA)분석법을 택하면서 그 확인이 가능하여지고 정확도에서 엄청난 성과를 얻게 되어 현재 우리나라를 비롯하여 미국, 영국 및 유럽각국, 캐나다, 일본 등에서 증거자료의 개인식별 또는 대형참사 시 발생하는 신원미확인자의 확인에 활용하고 있고 점진적으로 세계 각국으로 확대되고 있는 추세이다

2. 유전자분석법

생화학적 인체구성물인 혈액, 혈흔, 타액, 정액, 모발, 골, 조직, 치아 등에는 DNA가 존재한다. 물론 소변 등에도 존재하지만 이들은 먼저 농축을 해야만 하는 문제점도 있어 분석자료로는 의미가 낮다. 그러므로 이들의 생물학적 보존상태는 범죄수사 및 신원확인 과정에 있어 차차하는 비중이 매우 크다. DNA에

는 개인차가 나타나는 유전자좌위를 지니고 있으며 이들의 차이를 유전자재조합법에 의하여 분석²⁹하여 개인식별을 하는 것이 유전자분석법이다.

2.1. 혈청학적 분석방법(Serological Methods)

개인식별법으로는 종래부터 ABO혈액형을 비롯하여 다른 몇가지 혈액형과 적혈구 및 혈장이 지니는 유전효소형을 분석하므로써 사람에 따라 서로 다르게 나타나는 다형성(polymorphisms)을 확인하므로써 개인식별에 이용하는 방법으로 이를 혈청학적 분석법이라고 부른다. 이들 혈청학적 분석법을 분류하면 Fig. 1과 같다. 그러나 실제 법과학에서 혈청학적 분석법은 지금까지의 경험에 의하면 원칙적인 몇가지 결합에 의해 시험이 불가능한 경우가 많았다. 즉, 분석시료의 보존상태, 혈청형이 지닌 다형성의 저하, 시험시 비교적 다량의 시료가 요구되고, 2인 이상의 시료가 혼합된 경우 분석이 곤란하여 이용에 제한을 받게 된다.

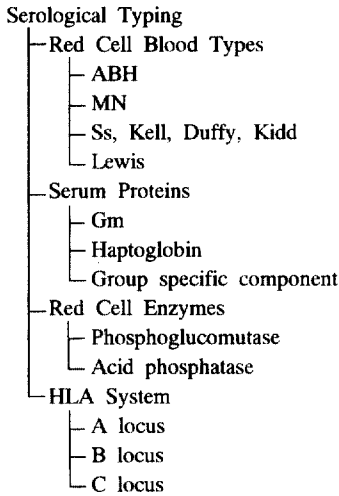


Fig. 1. Serological types using forensic science.

2.2. 핵유전자형 분석법

모든 세포는 핵(nuclear)을 지니고 있고, 핵내에는 염색체가 존재하여 생물체 특이성을 지니고 있고 동일 개체의 모든 조직내에서 구조는 동일한 특징을 지니고 있다. 그러므로 유전자분석법은 어떤 생물체의 genome 또는 유전적 구조가 상대적으로 회귀한 한가지나 그 이상의 양상을 특성화시켜서 확인하는 것을 의미한다.

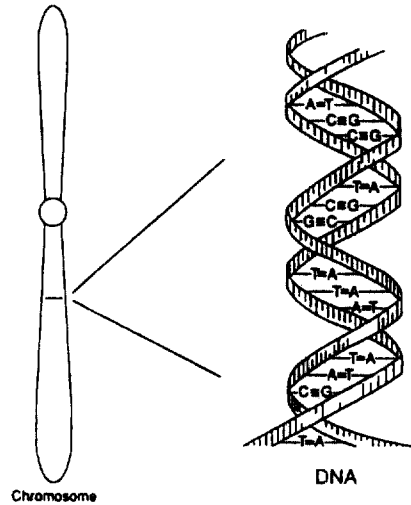


Fig. 2. Diagram of the double-helical structure of DNA in a chromosome.

사람은 정자와 난자의 결합으로 태어난다. 정자와 난자는 똑같이 23개의 DNA조각을 가지고 있고 수정으로 46개의 DNA 조각을 가지게 된다. 이 46개의 DNA는 Fig. 2와 같이 이중나선의 구조를 지닌 화학물질로서 총30억개의 염기쌍으로 이루어져 있다. 이중 10% 미만이 형질전환에 관여하는 gene이고 나머지 90% 정도는 생명유지에는 전혀 관여하지 않는 intron이라 부르는 염기배열이 존재한다. 이러한 intron부위에서 약 30% 정도는 특별한 유전정보없이 일정한 염기들이 반복적으로 배열되어 다형성을 지니고 있다. DNA의 다형성은 1970년 H.O. Smith 등⁶⁵에 의해 DNA의 염기배열에서 특정 염기부위만을 인식하여 절단시키는 제한효소(restriction enzyme)가 발견됨으로 급격히 연구가 진행되었고 1980년 R.A. White와 A. Whyman에 의해 사람의 다형성 DNA좌위를 보고⁶⁶하였다. 다형성 DNA는 Fig. 3과 같이 분류³⁰되는데 이러한 영역을 반복서열이 아주 다양하다 하여 고변이 유전자좌위(hypervariable region)라 부른다.

반복서열을 지닌 고변이 유전자좌위는 현재 수만개 이상이 알려져 있고 이들을 우리는 통상 유전자형(DNA types)이라 하며 하나의 유전자형은 또 다시 몇 개의 형태로 나타나는 다형성을 지니고 있다. 각 개인이 지닌 각 유전자형의 반복서열의 차이에 의한 이들 다형성을 분석함으로써 개인식별을 하는 것이

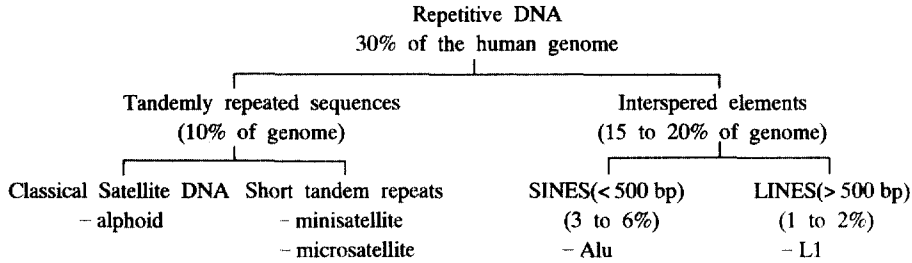


Fig. 3. Repetitive DNA in the human genome.

유전자분석법의 기본원리³¹이다. 특히 법과학 분야의 인체구성물질로부터 추출된 DNA의 고변이 유전자좌위를 분석하는 방법으로는 Fig. 4와 같이 크게 2종류로 대별하여 분류하게 된다.

먼저 영국 Leicester 대학의 A.J. Jeffrey 등¹⁴이 시도한 Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP)/Multilocus Probe Hybridization에 의한 분석방법과 미국의 FBI 법과학연구소의 B. Budowle 등¹⁵이 시도한 Restriction Fragment Length Polymorphisms(RFLP)/Single locus Probe Hybridization 분석방법을 RFLP법이라 한다. 다른 방법은 PCR (Polymerase Chain Reaction)법으로 기존의 RFLP법이 많은 양 및 커다란 길이의 DNA를 요구³²하여 재해현장이나 범죄현장에서 채취된 시료에 일괄적으로 분석하기에는 제한이 따르므로 고변이 유전자좌위를 양적으로 증폭시켜 아주 소량의 시료(DNA 1 ng)에서도 유전자형을 분석할 수 있는 방법이다.

PCR법은 Amplification Hybridization(Amp Hybr-

idization),³³ Amplified Fragment Length Polymorphisms(AmpFLP),³⁴ Amplification Sequencing,³⁵ Amplification RFLP,³⁶ PCR-SSCP(Single Stranded Conformation Polymorphisms),³⁷ PCR-RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)³⁸ 등을 들 수 있다. 이같이 PCR법은 분석시료에서 추출 분리되는 DNA가 극히 미량이고 분해율이 높다는 특수성에 따라 범용화되어 가고 있는 추세이다.

2.2.1. RFLP(제한효소절단)법에 의한 유전자형 분석

초기에 핵DNA를 분석하여 유전자형을 식별하는 방법으로는 반복서열의 고변이 유전자좌위를 특정 제한효소로 먼저 절단한 후 전기영동시켜 나열한 후 nylon 또는 cellulose막에 전사시켜 blotting한 후 방사선물질로 표식화된 상보적인 probe(Table 1과 Table 2)^{39,40}를 사용하여 hybridization하고 이를 autoradiography로 만들어 분석하는 방법인 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms)법을 사용하였다. 이같은 RFLP법에 의한 유전자분석법⁴¹을 도해상으로 설명하면 Fig. 5와 같다.

RFLP법은 DNA의 특정 염기서열만을 절단하는 제한효소의 작용으로 형성된 서로 다른 길이의 DNA단편이 지니는 다형성에 근거한 유전적 marker를 검출하는 것이다. 따라서 RFLP 분석에 사용되는 많은 protocol은 비용, 검출 예민도, 총 분석시간, 그리고 노동강도의 수준등 마땅히 고려해야만 하는 사항을 염두에 두지 않고 지금까지 이용해 왔던 유전자재조

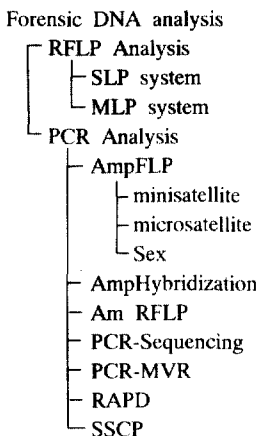


Fig. 4. Classification of forensic DNA analysis.

Table 1. Multilocus probes used in RFLP-hybridization

Probes	Size of insert (bp)	Size of repeating core (bp)
33.15	600	16
33.6	720	37

Table 2. Single locus probes used in RFLP hybridization

Probes	Locus	Allele No.	Insert size (kb)	Source
MS1	D1S7	123	4.6	Cellmark
YNH24	D2S44	40	2.0	Promega/GenMark
pH30	D4S139	50		Genelex/BRL
3'HVR	D16S85			Collaborative
VI	D17S79			Lifecodes
CMM101	D14S13	30	2.2	Promega
TBQ7	D10S28		1.9	Promega
EFD52	D17S26			Promega
MS31	D7S	76	5.7	Cellmark
MS43	D12S	81	6.3	Cellmark
g3	D7S	109	7.1	Cellmark
MS8		45	7.0	Cellmark
CMM86	D17S74	20		Promega
CMM6	D20S19	10		Promega

합기술들을 총 집합한 것이다. 물론 이러한 요인들이 기초연구실험실과는 밀접한 관계가 없을 수도 있으나, 응용 지향성의 유전자분석업무에 이용하는 데는 불필요한 과정을 생략하고, 최대의 확실성과 최고의 예민도를 유지하면서 실행시간과 비용절감의 분야를 최적화시킨 protocol이 요구된다.

2.2.2. PCR(중합효소연쇄반응)법에 의한 유전자형 분석

PCR은 1985년에 K.B. Mullis와 R.K. Saiki 등에 의해 처음 보고¹⁶가 된 비교적 새로운 유전자 재조합기술로서 매우 간단하면서도 검출감도가 높아 생명과학에서 DNA분석이 요구되는 모든 응용분야에 광범위하게 적용되고 있다. 온천지역에서 분리된 *Thermus aquaticus*에서 생성된 내열성 *Taq* DNA Polymerase를 이용한 시험관내 DNA증폭반응을 PCR이라 하며 이를 미국 Cetus사¹⁷에서 자동화된 DNA thermal cycler를 개발하므로 더욱 발전되었다. PCR에서 DNA Polymerase는 표적 DNA와 반응을 시작하기 위하여 primer와 합성의 재료인 nucleotides를 필요로 한다. Primer는 인공적으로 합성된 단일나선의 짧은 2개의 oligonucleotide로 고변이 유전자좌위를 사이에 둔 일정부분의 염기서열과 상보적으로 만들어진다. 이중나선의 표적 DNA를 변성(denaturation)시켜 단일나선으로 만든 후 Polymerase Chain Reaction을 행하여 다시 이중나선의 DNA를 증폭하게 되는데 이를 1 cycle이라 한다. 생성된 이중나선의 DNA를 다시 단일나선으로 변성시킨 후 반응액 중의 잔존하는 DNA Polymerase에 의하여 1 cycle과 같은 2번째 PCR반응

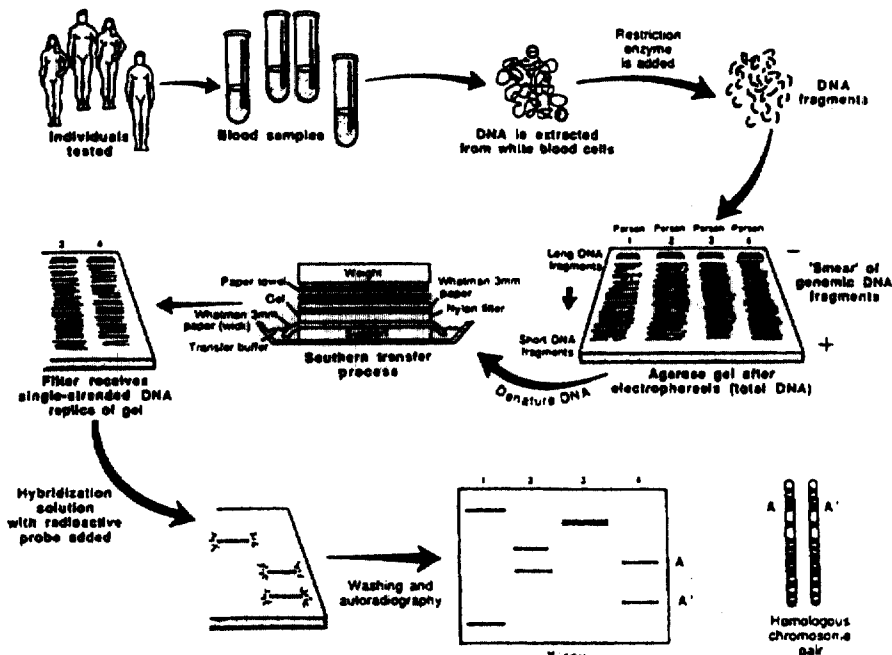


Fig. 5. Schematic representation of RFLP-hybridization.

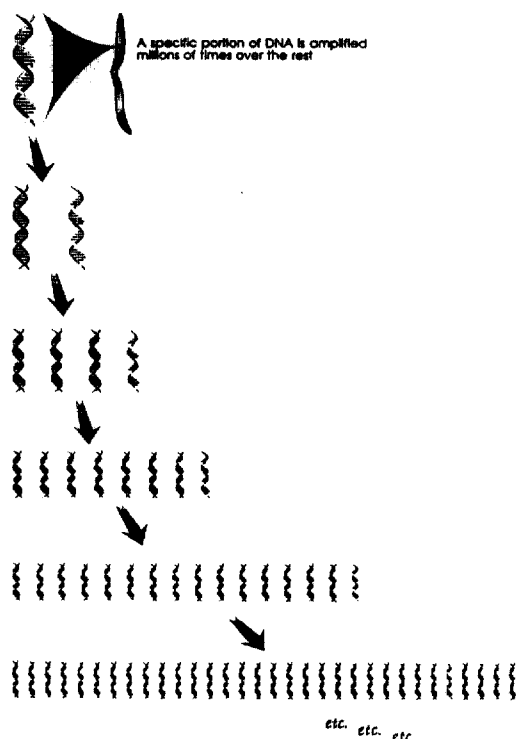


Fig. 6. Amplification of DNA using the polymerase chain reaction.

을 행하게 된다. 이 반응에서 DNA는 4배로 증가하게 된다. 이러한 과정을 n회 반복하면 Fig. 6과 같이 DNA를 2ⁿ배로 증가시킬 수 있게 된다. 반복횟수시간에 따라 약 30회의 반응에 2~5시간 정도 소요된다. 그러므로 극소량의 DNA로부터 얼마든지 원하는 양의 DNA를 얻을 수 있고, 이를 적당한 벡터에 클론화 할 수 있으며 RFLP법으로 몇 주일 이상 걸리던 것을 하루만에 해결⁴²할 수 있게 되었다.

PCR법이 개발됨으로서 기존의 RFLP법에 의한 고변이 유전자좌위의 유전자형 검출법을 보다 더 진보시켰다. 즉, 표적 DNA를 증폭하므로서 검출감도⁴³를 비약적으로 높일 수 있게 되었다. DNA의 검출한계는 ³²P 방사성표식화의 경우 10⁻⁸ mole(6×10⁶ 분자) 정도 가능하다. 그러나 PCR법의 경우 20 cycle을 반복하면 2²⁰=10⁶배로 증폭한다. 실험적으로 25~30 cycle을 반복하면 10⁶배 이상 증폭이 가능하므로 1분자의 DNA는 10⁶분자로 증폭되어 역으로 ³²P의 검출한계에 도달할 수 있게 된다. 실제 한개의 정자(DNA 1분자)로부터 DNA를 분석하는 것이 가능하

므로 PCR법은 DNA 1분자를 검출할 수 있는 예민도를 지니고 있다⁵⁴고 본다.

2.2.2.1. AmpFLP에 의한 VNTR형 분석

고변이 유전자좌위를 이루고 있는 각 유전자좌위의 염기서열은 제각기 다르며 경우에 따라서는 2~70 bp의 염기쌍이 반복서열의 단위로 구성되어 있다. 이러한 반복서열 부위에서 반복단위(core repeat)의 반복횟수로 표현되는 것을 대립유전자 또는 대립형질(alleles)이라 하는데 사람에 따라서는 적게는 1회에서 많게는 수십회까지 이루어져 여러 형태로 나타나게 되므로 이를 VNTR(Variable Number of Tandem Repeat)이라 한다. VNTR 유전자좌위에서 반복단위의 염기서열이 대개 14~70 bp인 것을 Minisatellite, 2~7 bp인 것을 Microsatellite라 부르고 있다. AmpFLP법은 이들 유전자좌위에 각각의 특이 primer를 사용하여 증폭한 후 전기영동시켜 이동된 증폭산물의 분자량(Molecular Weight) 차이에 의해 식별하는 방법으로 양부모로부터 유전된 대립유전자를 검출하는 방법이다. 실제 VNTR 유전자좌위의 유전자형으로 보고된 수는 수만가지에 이르고 있으므로 비교적 대립유전자가 많은 유전자형이 선택되어 유전자분석에 사용되고 있다. 그 예로 Minisatellite 영역으로는 D1S80,⁴⁴ D17S5,⁴⁵ ApoB,⁴⁶ Co2A1⁴⁷ 등이, Microsatellite영역에서는 특히 4염기가 반복되는 유전자좌위^{48,49}의 검출이 원할하여 TH01, TPOX, CSF1PO, VWA, F13A01, FES/FPS, F13B, LPL, HPRTB, D21S11, FGA 등을 들 수 있다. Table 3은 주요 Minisatellite좌위를 Table 4는 주요 Microsatellite좌위의 특징을 나타낸 것이다.

이들 유전자형의 일부는 상품화되어 세계적으로 표준화가 이루어지고 있다. 그리고 사전에 형광물질(FAM, JOE, TAMRA, ROX)로 표식된 primer를 가하여 PCR증폭을 시키고 대립유전자를 검출하여 유전자형을 확인하는데 있어 레이저검출기 및 컴퓨터프로

Table 3. Specific information of minisatellite loci

Minisatellite loci	Chromosome location	Number of alleles	Allele length range (bp)	Repeat unit (bp)
D1S80	1p	18	340~780	16
D17S5	17p13	14	170~1080	70
ApoB	2p23-p24	5	500~950	14~16
Col2A1	12q14.3	5	500~800	31~34

Table 4. Specific information of microsatellite loci

Microsatellite loci	Chromosome location	Allele length range (bp)	Allele No.	K562 allele	Anneal. temp. (°C)
CSF1PO	5q33.3 - 34	299-323	9	9 - 10	64
F13A01	6p24 - 25	283-331	12	4 - 5	60
F13B	1q31 - q32.1	169-185	5	10 - 10	60
FESFPS	15q25 - qter	222-250	8	10 - 12	60
LPL	8p22	105-133	7	10 - 12	60
TH01	11p15.5	179-203	7	9.3 - 9.3	64
TPOX	2p13	224-252	8	8 - 9	64
vWA	12p12 - pter	139-167	8	16 - 16	60
HPRTB	X	259-303	12	13 - 13	60
D21S11	21q11 - 21q21	211-247	12	-	60
FGA	4q28	254-294	14	-	60
Amelogenin	X:p22.1 - p22.3	212	-	212bp	64
	Y:p11.2	218	-	-	-

그램(Genescan 672 software Kit)⁶⁷을 이용하므로 여러개의 유전자형을 동시에 자동 검출하는 방법

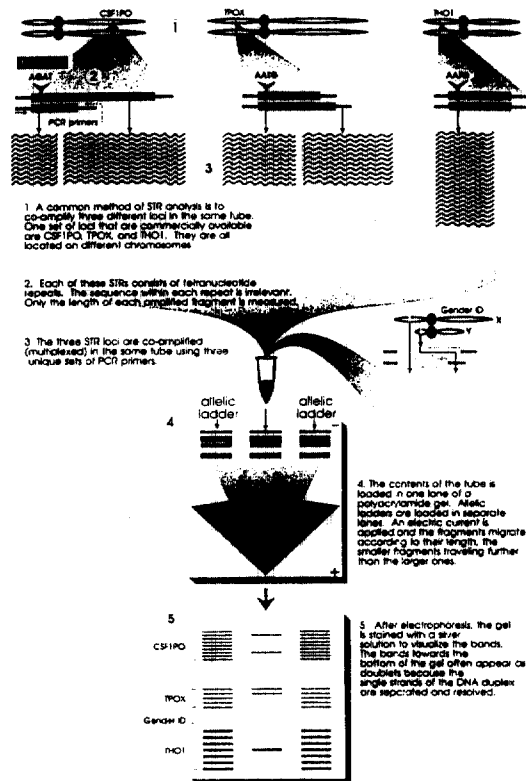


Fig. 7. Diagram of the main steps in STR analysis with gender ID using AmpFLP, PCR amplification, gel electrophoresis, and manual detection by sliver staining of an STR triplex with gender ID (amelogenin).

(AmpF/STR Profiler PCR Amplification Kit)⁶⁸이 개발되어 실용화²⁷되고 있다. 또한 AmpFLP법에 의하여 성염색체상의 유전자좌위인 Amelogenin⁵⁰ 및 Alphoid Satellite Family Gene(ASFG)⁵¹을 검출하므로 개인식별과 동시에 남녀를 식별할 수 있다. 뿐만 아니라 Y염색체상에 존재하는 Microsatellite형⁶⁹을 분석함으로써 부계유전을 식별할 수 있어 개인식별 및 친생자확인에 정확도를 높여주고 있다. 이같은 AmpFLP에 의한 유전자분석법 과정을 도해상으로 설명하면 Fig. 7과 같다.

2.2.2.2. AmpHybridization에 의한 HLA-DQ α 형 및 PM형 분석

HLA-DQ α 좌위는 사람 제6번 염색체의 MHC class II영역에 존재하며 HLA-DQ α 분자의 α 사슬로 발현되고 다형성은 두번째 exon에 의해 나타난다. S.J. Scharf⁵² 등은 이 영역의 다형적인 서열을 지난 242 또는 239염기쌍의 단편을 PCR증폭하고 염기서열을 분석하여 4가지의 주요 대립유전자 DQA1, DQA2, DQA3 및 DQA4로 분류하였다. 그리고 U.B. Gyllensten과 H.A. Erlich⁵³는 DQA1은 1.1, 1.2, 1.3 DQA4는 4.1, 4.2, 4.3의 각각 3가지의 아형으로 분류하였다. HLA-DQ α 형을 분석하는 방법으로는 DQ α 좌위에서 대립유전자 형을 분석하기 위하여 방사성물질 또는 Horseradish Peroxidase(HRP)로 표식한 probe를 고정시킨 증폭 DNA와 hybridization(dot-blot)시키거나, Fig. 8과 같이 oligonucleotide를 filter에 고정시키고 biotin으로 표식을 한 증폭된 DNA에 hybridization(reverse dot-blot)시켜 검출하는 방법²⁰이다. 그리고

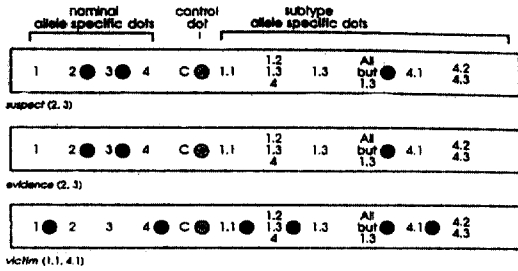


Fig. 8. Representation of a HLA-DQα reverse dot blot. A total of 11 probe are present on each strip.

특정 제한효소(Dde I, Fok I, Hae III, ScrI, Rsa I)로 증폭된 DNA를 먼저 절단한 후 전기영동하여 대립유전자를 확인하는 AmpRFLP 방법⁵⁵이 있다.

PM(Poly Marker)형은 여러개의 유전자형을 동시에 분석하게 하는 multi-PCR과 hybridization을 이용한 방법³³으로 Fig. 9와 같이 Low Density Lipoprotein Receptor(LDLR), Glycophorin A(GYPA), Hemoglobin G gammaglobin(HBGG), Group Specific Component(GC), D7S8 등 동시에 5개의 유전자형을 분석할 수 있다.

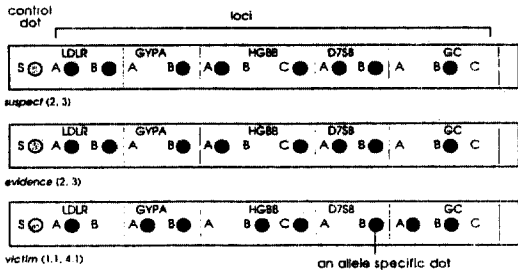


Fig. 9. Representation of a polymarker reverse dot blot. A total of 11 probe are present on each strip.

2.2.2.3. MVR형 분석

VNTR 유전자좌위내의 염기서열의 특징에 따른 바코드형태의 밴드를 측정하는 것을 MVR(Minisatellite Variant Repeat)형⁵⁶이라 한다. MVR의 경우 반복되는 염기서열에 따라 Fig. 10과 같이 숫자 또는 바코드화할 수 있어 각개인마다 고유번호를 지정할 수 있기 때문에 유전자 자료은행(DNA DATABANK)⁷⁰을 구성하는데 아주 편리한 시스템을 제공해 준다. AmpFLP법이나 RFLP법이 대립유전자가 지니고 있는 반복서열의 반복횟수 차이를 이용하는데 반해 MVR은 연쇄반복 내부에 존재하는 다형성을 확인하는 것이다.

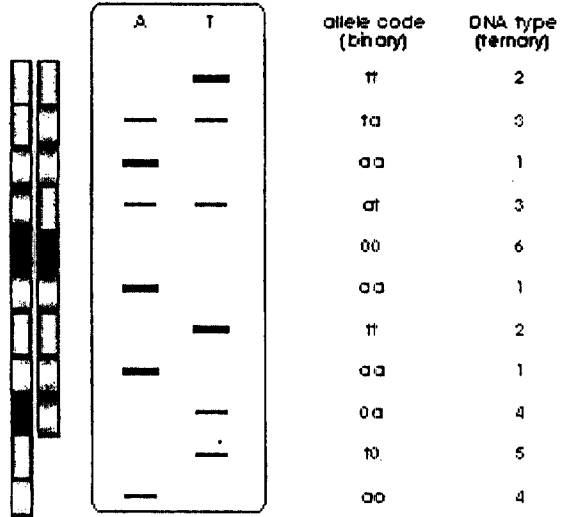


Fig. 10. MVR detection and analysis. At each repeat position, 6 different states are possible; (1) two As, (2) two Ts, (3) one A and one T, (4) one A and one null (5) one T and one null, (6) two nulls. Two of the same repeat variants are seen as a double intensity band.

2.3. 미토콘드리아 DNA형 분석법

미토콘드리아(Mitochondria: Mt)는 모든 동물세포 내 호흡기관으로 존재하며 Fig. 11과 같이 원형의 이중나선 DNA를 지니고 있다.⁵⁷ Mt DNA는 전체세포 DNA의 약 1%를 차지하는 적은 양으로 존재하나 고도의 반복수(high copy number)를 지니고 있다. 일반적으로 포유동물세포는 수백개의 미토콘드리아를 지니고 있고 한개의 미토콘드리아는 수개의 반복수를 지니고 있어 전체세포에는 약 1,000내지 10,000개의

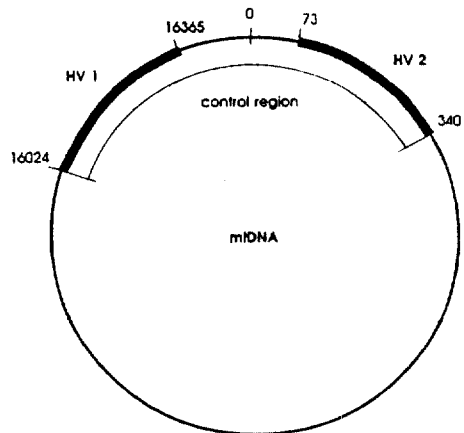


Fig. 11. Locations of the two hypervariable regions on the mitochondrial DNA circle.

반복수를 지니고 있다. 수정시 미토콘드리아는 약 99.9%를 난자로부터 형성하여 모계유전만을 하게 된다. 따라서 각 개인의 형제, 자매, 남매 및 어머니 그리고 어머니와 관계되는 모든 가족은 Mt DNA의 일치하는 반복수를 지니고 있게 된다. 또 다른 특징은 Mt DNA는 genomic DNA에 비하여 5~10배 정도 빨리 변이가 일어난다는 것이다. 그리고 세포내에 많은 수가 존재하므로 유골⁵⁸같이 오래되었거나 극히 미량인 시료로부터도 추출이 일부 가능하다. 따라서 핵 DNA에 의한 유전자분석이 곤란한 경우 Mt DNA의 반복수를 개인식별이나 가족관계규명의 자료로 이용할 수 있다.

인간의 Mt DNA 길이는 16,569 bp이며 이중나선에서 염기의 분포는 각각 다르게 존재한다. 이중나선 중 하나는 purine rich부위로 heavy chain이라 하며 다른 하나는 pyrimidine rich부위로 light chain(또는 complementary)이라 부른다. 이러한 구조를 지닌 Mt DNA의 genome에는 두개의 주요한 부위가 있는데 하나는 형질발현에 필요한 rRNA, tRNA 및 oxidative phosphorylation에 이용되는 protein인 large cording부위이고 나머지 하나는 전사와 복제를 조절하기 위한 조절부위(control region)로 smaller region이라 부른다. Mt DNA의 분석에 의한 개인식별은 이 조절부위에 초점을 맞춘다. 조절부위에는 길이 1.2 Kb의 displacement loop(D-loop)가 있고 여기에 두 종류의 고변이부위(HV)인 HV1, HV2로 존재하며 다형성을 지니고 있다. Mt DNA 분석법은 이 고변이(HV)부위가 지나는 염기서열의 차이⁵⁹에 의하는데 HV1과 HV2는 각각 길이가 약 400 bp 정도이다. 미국의 유전자분석 표준화위원회(TWGDAM; Technical Working Group on DNA Analysis Methods)는 HV1의 경우 16024에서 16365위치, HV2는 00073에서 00340위치의 최저 염기서열을 Mt DNA database로 택하기를 제안하고 있다.

3. 유전자분석의 적용사례

3.1. 범죠후사의 개인식별

PCR법에 의한 VNTR 유전자좌위를 분석함으로써 범죠후사의 해결에 이용하는 예는 Table 5와 같다. Table 5는 현장에 남아있던 혈흔에서 검출된 유전자형이 피해자의 것인지 또는 가해자의 것인지 여부를 확인한 예이다.

Table 5. Results of forensic DNA testing using AmpFLP

DNA loci	Evidence blood stain	Victim	Suspect 1	Suspect 2
Amelogenin	M	M	M	M
D1S80	27-31	16-24	29-31	27-31
HumTH01	7-9	6-7	9-9	7-9
HumTPOX	8-11	8-8	8-11	8-11
HumCSF1PO	9-12	9-12	10-12	9-12
HumvWA	16-16	14-16	15-17	16-16
HumFESFPS	11-13	10-11	10-12	11-13
HumF13A01	4-6	4-4	4-6	4-6

현장 증거시료인 혈흔에서 검출된 유전자형은 일단 Amelogenin에서 남성(M)으로 확인되었고 D1S80형 27-31, HumTH01형 7-9, HumTPOX 8-11, Hum-CSF1PO형 9-12, HumvWA형 16-16, Hum-FESFPS형 11-13, HumF13A01형 4-6으로 검출되었다. 따라서 이 검출된 유전자형이 피해자의 것인지 가해자의 것인지 여부를 비교한 바 지목된 용의자 2의 혈액에서 검출된 유전자형과 정확히 일치함을 보여주고 있다.

3.2. 친생자관계에 의한 신원확인

친생자확인인 양부모로부터 각 유전자좌위의 대립 유전자를 유전받았는지를 확인하여 자식 또는 부모여부를 식별하는 것이다. PCR법에 의한 VNTR 유전자좌위를 분석함으로써 친생자 확인을 하는 예는 Table 6과 같다.

Table 6에 의하면 미확인된 희생자의 유전자형은 멘델의 법칙에 의해 부와 모로부터 각각 대립적으로 형성되었음을 나타내고 있다. 예로 D1S80형의 경우 이

Table 6. Results of paternity testing using AmpFLP

DNA loci	Unidentified victim	Father	Mother
Amelogenin	F	M	F
D1S80	16-31	16-24	29-31
HumTH01	6-9	6-7	9-9
HumTPOX	8-11	8-8	8-11
HumCSF1PO	9-10	9-12	10-12
HumvWA	14-17	14-16	15-17
HumF13B	9-10	10-10	9-10
HumFESFPS	10-12	10-11	10-12
HumF13A01	4-6	4-4	4-6
D21S11	27-29	26-27	29-30
FGA	17-19	17-23	19-25

Table 7. Sequence analysis of the HVI amplified from mt DNA isolated from mother blood and victim tooth and aligned against the reference sequence(ANDERSON)

Ref. sequence	16111	120	130	140	150	160
Anderson(1981)	CCACCATGAATATTGTACGGTACCATAAATACTTGACCACCTGTAGTACATAAC					
Tooth	-----					
Blood	-----					
	170	180	190	200	210	220
	CCTCAAAAACCCAATCCACATCAAAAACCCCTCCCATGCTTACAAGCAAGTACAGCAATCAACTAT					
	-----TC-----					
	-----TC-----					
	240	250	260	270	280	290
	CACACATCAACTGCAACTCCAAAGCCACCCCTCACCCACTAGGATACCAACAAACCTACCCACCCTTA					
	-----G-----					
	-----G-----					
	300	310	320	330	340	360
	ACAGTACATAGTACATAAAGCCATTTACCGTACATAGCACATTACAGTCAAATCCCTTCTCGTCCCC					

	370	380	390	16399		
	ATGGATGACCCCTCAGATAGGGGTCCCTTGAA					

부모의 자식은 16-29, 16-31, 24-29, 24-31 등 4가지 형 중 하나이어야 하므로 추정되는 희생자의 유전자형 16-31은 바로 이 경우에 해당된다. 즉, 부모의 어느 한쪽이나 양쪽 모두에 존재하지 않는 대립유전자를 그 자식은 가질 수 없다. D1S80형의 대립유전자 16과 31이 부모의 어느 한쪽이나 양쪽 모두에 존재하지 않는 한 자식에게서 나타날 수 없다는 것이다. 다른 유전자형에서도 마찬가지로 이 법칙이 성립해야만 자식으로 인정된다.

3.3. 미토콘드리아 DNA의 분석

핵 DNA형의 분석이 곤란하거나 모계유전을 확인할 필요시 Mt DNA형을 확인하는 유전자분석의 예는 Table 7과 같다. Table 7에 의하면 주장하는 어머니의 혈액에서 분석한 결과와 미확인된 희생자의 치아에서 분리된 MtDNA의 염기서열 16,111에서 16,399 base 까지 얻어진 결과가 서로 일치함을 알 수 있다. 따라서 이 경우는 희생자와 모자간임이 성립되는 것이다.

4. 결 론

유전자분석법의 대상은 사람 세포내 DNA이고 인체를 구성하는 모든 종류의 세포에서 얻어지며 특히

혈액내의 백혈구, 모근, 타액, 정자, 태아의 용모막 세포, 골수 등이 흔히 접하게 되는 시료이다. 이들로부터 얻어진 결과의 최종목적은 법정에서 채택하여 증거로서 인정되는 것이다. 그러기 위해서는 일단 유전자분석법의 기본원리가 정당하고, 시험방법이 적합해야 하며, 당해사건에 적합한 시험법이 구사되어야만 한다. 지금까지 많은 유전자분석방법이 개발되어져 있고 또한 많은 유전자형이 보고되어 있다. 그러므로 소개한 방법들을 총 망라하여 유전자분석을 시도하면 그 정확도는 증거시료의 개인식별 또는 신원미확인자의 신원확인에 가장 효과적이고 신뢰적인 방법이 될 수 있다. 그러나 개개의 사건에서 실험이 제대로 실시되지 않으면 안된다는 사실이다. 왜냐하면 인적인 오류일 수도 있고 실험의 복잡한 구성과 과정으로 인하여 통제가 불가능한 자연적 오류가 존재하여 판이하게 다른 양상의 결과를 나타낼 수도 있는 것이 분자생물학적 기법인 것이다. 모든 유전자분석법은 인체 DNA에 고변이 유전자좌위가 존재한다는 특이구조에 입각한 방법들이다. 그러나 고변이 유전자좌위를 확인하기 위해 첨단방법들이 개발되고 검토되었지만 한편으로 문제점이 있는 것은 유전자분석을 요하는 시료의 상태와 양 및 각 유전자좌위에서 발생하는 돌연변이⁶⁾이다. 시료의 상태는 가장 1차적으로 유전자분

석의 성공을 가능하므로 가능한 한 다른 시료와의 오염과 부패에 대응하여야 한다. 다른 시료와 혼합되게 되면 2인 이상의 유전자형이 검출되어 그 결과를 고찰하는데 무리가 따르므로 서로 섞이지 않도록 주의할 것을 기울여야 하며, 시료가 심하게 부패되면 화학적으로 비교적 강한 결합력을 지니고 있는 DNA도 결국 분해되어 유전자형의 분석이 불가능해지게 되는 것이다. 그리고 돌연변이는 증거시료의 개인식별에는 문제가 되지 않으나 친생자확인에는 문제점으로 지적되고 있어 주의를 요하게 된다.

따라서 유전자분석은 종래의 방법보다 식별능력이 지극히 높고 결과가 안정성이 있는 반면 반복수가 많은 유전자좌위^{62,64}를 택하여야 하며, 전문성이 결여된 일반인이 그 결과를 이해하기 곤란하고, 실험과정이 쉽게 범용화하다보니 검사기관이 난립할 수 있어 이에 따른 인권문제가 야기될 가능성을 지니므로 결과의 재현성과 정확성에 엄정한 실험결과의 정도 관리⁶⁴가 요구되는 바이다.

참 고 문 헌

1. B. Olaisen, M. Steneersen and B. Mevag, Identification by DNA analysis of the victims of the August 1996 spitsbergen civil aircraft diaster. *Nature Genetics*, **15**, 402-405(1997).
2. O. Handt, M. Richards, M. Trommsdorff, C. Kilger, J. Simanainen, O. Georgiev, K. Bauer, A. Stone, R. Hedges, W. Schaffner, G. Utermann, B. Sykes and S. Paabo, Molecular genetic analysis of the tyrolean ice man. *Science*, **264** 1775-1778(1994).
3. D. Corach, A. Sala, G. Penacino and A. Sotelo, Mass disaster: Rapid molecular screening of human remains by means of short tandem repeats typing. *Electrophoresis*, **16**, 1617-1623(1995).
4. T. M. Clayton, PerkinElmer, J. P. Whitaker, D. L. Fisher, D. A. Lee, M. M. Holland, V. W. Weedn, C. N. Maguire, J. A. DiZinno, C. P. Kimpton and P. Gill, Further Validation of a quadruplex STR DNA typing system: a collaborative effort to identify victims of a mass diaster. *Forensic Sci. Int.*, **76**, 17-25(1995).
5. T. M. Clayton, J. P. Whitaker and C. N. Maguire, Identification of bodies from the scene of a mass disaster using DNA amplification of short tandem repeat(STR) loci. *Forensic Sci. Int.*, **76**, 7-15(1995).
6. M. S. Han, M. S. Seon, Y. H. Lee, K. W. Park and S. K. Choi, The individual identification of victims in the crumbled Sampoong department store using DNA typing. *Ann. Report of NISI*, **28**, 72-82(1996).
7. M. S. Han, M. S. Seon, J. S. Seo and S. K. Choi, Paternity test by DNA typing in a sexual assault. *Ann. Report of NISI*, **29**, 159-164(1996).
8. L. Koblinsky, Recovery and stability of DNA in samples of forensic significance. *Forensic Sci. Rev.*, **4**, 68-87(1992).
9. B. Budowle, F. S. Baechtel, C. T. Comey, A. M. Giusti and L. Klevan, Simple protocols for typing forensic biological evidences. *Electrophoresis*, **16**, 1559-1567(1995).
10. R. E. Gaensslen, Sourcebook in forensic serology, immunology, and biochemistry. *Washington, DC: Superintendent of documents*, **261**, 629-630(1983).
11. G. F. Sensabaugh, Biochemical markers of individuality. In Saferstein R., ed *Forensic science handbook*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall International Inc. (1982).
12. A. J. Jeffreys, V. Wilson and S. L. Thein, Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature*, **314**, 67-73(1985).
13. *Andrews v. State of Florida*, 553 So. 2d 841 (Fla. App. 5 Dist. 1988).
14. A. J. Jeffrey, V. Wilson and S. L. Thein, Individual specific fingerprints of human DNA. *Nature*, **316**, 76-79(1985).
15. B. Budowle, The RFLP technique. *Crime Lab. Digest.*, **15**, 97-98(1988).
16. R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, G. T. Horn, H. A. Erlich, N. Arnheim and K. B. Mullis, Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354(1985).
17. K. B. Mullis, U.S. patent 4,683,195, July 1987; U.S. patent 4,683,202, July (1987).
18. M. S. Han, DNA typing of D17S30 VNTR locus in Korean population using AmpFLP. *Ann. Report of NISI*, **28**, 293-298(1996).
19. M. S. Han, M. S. Seon, K. W. Park, Y. H. Lee, S. K. Choi and S. J. Kang, HLA-DQ allele and genotype frequencies in the Korean population. *Korean J. Genetics*, **15**, 31-38(1993).
20. The Cetus Corp, AmpliType User Guide, Version 2. Emeryville, Calif(1990).
21. E. Blake, J. Milhalouich and R. Higuchi, Polymerase chain reaction amplification and human leukocyte (HLA-DQa) oligonucleotide from biological evidence samples. *J. Forensic Sic.*, **37**, 700-726(1992).
22. P. L. Ivanov, M. J. Wadhams, M. J. Roby, M. M. Holland, V. W. Weedn and T. J. Parsons, Mi-

- tochondrial DNA sequence heteroplasmy in the grand duke of russia georgij romanov establishes the authenticity of the remains of tsar nicholas II. *Nature Genetics*, **12**, 339-420(1996).
23. M. S. Han, M. S. Seon and S. K. Choi, Gendering of X,Y-specific alphoid repeat sequence by PCR. *Ann. Report of NISI*, **29**, 165-169(1997).
 24. G. Watanabe, K. Umetsu, M. Sato and T. Suzuki, Three cases of recombinated gene in the ABO blood group system. *Jpn. J. Legal Med.*, **51**, 205-210(1997).
 25. S. Ameno, K. Ameno, H. Kinoshita and N. Tanaka, Lewis genotyping by the PCR-RFLP method in a japanese population and its evaluation in forensic analysis. *Int. J. Legal Med.*, **110**, 232-234(1997).
 26. A. J. Jeffreys, A. Macleod, K. Tamaki, D. L. Neil and D. G. Monkton, Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. *Nature*, **354**, 204-209(1991).
 27. C. J. Fregeau and R. M. Fourney, DNA typing with fluorescently tagged short tandem repeats. A sensitive and accurate approach to human identification. *BioTechniques*, **15**, 100-119(1993).
 28. K. M. Sullivan, A. Mannucci, C. P. Kimpton and P. Gill, A rapid and quantitative DNA sex test: Fluorescence-based PCR analysis of X, Y-homologous gene amelogenin. *BioTechniques*, **15**, 636-641(1993).
 29. L. F. Alan, New approach and technologies in criminal forensic DNA typing. *The Forensic Examiner*, **May-June**, 23-25(1997).
 30. J. C. S. Fowler, L. A. Burgoyne, A. C. Scott and H. W. J. Harding, Repetive deoxyribonucleic acid and human genome variation-A concise review relevant to forensic biology. *J. Forensic Sci.*, **33**, 1111-1126(1988).
 31. L. Y. Kirby, DNA Fingerprinting, New York, Stockton Press (1990).
 32. V. W. Weedn, Forensic DNA Tests. *Clinics in laboratory medicine*, **16**, 187-196(1987).
 33. Perkin Elmer, AmpliType, PM+DQA1 PCR amplification and typing kits (1995).
 34. Promega, Technical Manual, GenePrint STR Systems (1995).
 35. M. A. Innis, K. B. Myambo, D. H. Gelfand and M. A. D. Brow, DNA sequencing with Thermus aquaticus DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 9436-9440(1988).
 36. Z. Lin, T. Ohshima and T. Kondo, Species identification based on the point mutations of histo-blood group ABO genes by PCR-RFLP and direct sequencing. *Int. J. Legal Med.*, **110**, 254-259(1997).
 37. M. Lucas, C. Munoz, E. Pintado and F. Solano, Highly informative single-stranded conformation polymorphism (SSCP) of short tandem repeats in DNA identification. *J. Forensic Sci.*, **42**, 118-120(1997).
 38. G.E. Corley-Smith, Efficiency detection of DNA polymorphisms by fluorescent RAPD analysis. *BioTechniques*, **22**, 690-699(1997).
 39. A. J. Jeffrey, Hypervariable DNA and genetic fingerprints. In DNA Probes, ed L. S. Lerman, Cold Spring Harbor Laboratory (1986).
 40. N. Dimo-Simonin, C. Brandt-Casadevall and H. R. Gujer, Chemiluminescent DNA probes: Evaluation and usefulness in forensic cases. *Forensic Sci. Int.*, **57**, 119-127(1993).
 41. National Research Council, National Academy of Sciences: DNA technology in Forensic Science. Washington, DC. National Academy Press (1992).
 42. R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. L. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn K. B. Mullis and H. A. Erlich, Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491(1988).
 43. K. B. Mullis, The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, **April**, 56-64(1990).
 44. K. Kasai, Y. Nakamura and R. White, Amplification of a variable number of tandem repeats (VNTR) locus (pMCT118) by the polymerase chain reaction and its application to forensic science. *J. Forensic Sci.*, **35**, 1196-1200(1990).
 45. G. T. Horn, B. Richards and K. W. Klinger, Amplification of highly polymorphic VNTR segment by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acid Res.*, **17**, 2140(1989).
 46. E. Boerwinkle, W. Xiong, E. Fourest and L. Chan, Rapid typing of tandemly repeated hypervariable loci by the polymerase chain reaction: application to the apolipoprotein B 3'hypervariable region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 212-216(1989).
 47. E. S. Berg and B. Olaisen, Characterization of the Col2A1 VNTR polymorphism. *Genomics*, **16**, 350-354(1993).
 48. A. Mannucci, K. M. Sullivan, P. L. Ianov and P. Gill, Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X, Y-homologous gene amelogenin. *Int. J. Leg. Med.*, **106**, 190-193(1994).
 49. Y. H. Lee, K. L. Lee, D. H. Choi, H. S. Baik and S. K. Choi, A study on the HumTH01, HumTPOX and CSF1PO STR system in a Korean population. *Ann.*

- Report of NISI*, **28**, 281-285(1996).
50. Perkin Elmer, ABI PRISM STR Primer Set Protocol, PCR amplification and typing of amelogenin, D21S 11 and FGA(1995).
 51. M. S. Han, M. S. Seon and C. Y. Kim, Sex determination from preheated teeth using polymerase chain reaction. *Ann. Report of NISI*, **29**, 15-20(1997).
 52. S. J. Scarf, G. T. Horn and H. A. Erlich, Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science*, **223**, 1076-1078(1986).
 53. U. B. Gyllensten and H. A. Erlich, Generation of single stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7652-7656(1988).
 54. A. J. Jeffreys, V. Wilson, R. Nrumann and N. Keyte, Amplification of human minisatellites by polymerase chain reaction: Towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acid Res.*, **16**, 10953-10971(1988).
 55. M. Ota, H. Inoko, K. Honda and H. Fukushima, Application of HLA-DQA1 genotyping by PCR RFLP method to forensic science. *Act. Crim. Japan*, **58**, 76-84(1992).
 56. K. Tamaki, X. L. Huang, T. Yamamoto, R. Uchihi, H. Nozawa and Y. Katsumata, Applications of minisatellite variant repeat (MVR) mapping for maternal identification from remains of an infant and placenta. *J. Forensic Sci.*, **40**, 695-700(1995).
 57. S. Anderson, A. T. Bankier, M. H. Barrell, M. H. L. Bruijn, A. R. Coulson, J. Drouin, I. C. Eperon, D. P. Nierlich, B. A. Roe, F. Sanger, P. H. Schreier, A. J. H. Smith, R. Staden and I. G. Young, Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, **290**, 457-469(1981).
 58. M. M. Holland, D. L. Fisher and L. G. Mitchell, Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: Identification of remains from the Vietnam War. *J. Forensic Sci.*, **38**, 532(1992).
 59. K. W. P. Miller, J. L. Dawson and E. Hagelberg, A concordance of nucleotide substitutions in the first and second hypervariable segments of the human mtDNA control region. *Int. J. Legal Med.*, **109**, 107-113(1996).
 60. C. P. Kimpton, P. Gill, A. Urquhart, E. S. Millican and M. Adams, Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR Meth. Appl.*, **6**, 16-22(1993).
 61. J. C. Smith, R. Anwar, J. Riley, D. Jenner and A. F. Markhan, Highly polymorphic minisatellite sequences-allele frequencies and mutation rates for five locus specific probes in a caucasian population. *J. Forensic Sci. Soc.*, **30**, 19-32(1990).
 62. A. Edwards, A. Civitello, H. A. Hammond and C. T. Caskey, DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.*, **49**, 746-756(1991).
 63. A. Edwards, A. Civitello, H. A. Hammond, L. Jin, C. T. Caskey and R. Chakraborty, Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics*, **12**, 173-175(1992).
 64. N. Fildes and R. Reynolds, Consistency and reproducibility of AmpliType PM results between seven laboratories. *J. Forensic Sci.*, **40**, 279-286(1995).
 65. H. O. Smith and K. W. EWilcox, A restriction enzyme from *Hamophilus influenzae*. *J. Mol. Biol.*, **51**, 379(1970).
 66. A. Wyman and R. A. White, A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **77**, 6754-6758(1980).
 67. PerkinElmer, GENESCAN 672 Software Kit (1995).
 68. PE Applied Biosystems, AmpFISTR Profiler PCR Amplification Kit (1997).
 69. M. A. Jobling, A. Pandya and C. Tyler-Smith., The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing. *Int. J. Legal Med.*, **110**, 118-124(1997).
 70. J. E. McEwen and P. R. Reilly, Stored Guthrie cards as DNA banks. *Am. J. Hum. Genet.*, **55**, 196-200(1994).