



CONSERVATION STUDIES 29

초음파를 이용한  
출토 인골 DNA 추출법 연구

*Applied Research of Ultra Sonication for  
Ancient DNA Preparation of Excavated Human Skeletal Remains*

김윤지 · 지상현 · 홍종욱

## 초음파를 이용한 출토 인골 DNA 추출법 연구

*Applied Research of Ultra Sonication for  
Ancient DNA Preparation of Excavated Human Skeletal Remains*

김윤지 · 지상현 · 홍종욱 (국립문화재연구소 보존과학연구소)

Kim Yun-Ji · Jee Sang-Hyun · Hong Jong-Ouk  
(National Research Institute of Cultural Heritage)

### <Abstract>

Analyses of ancient DNA (aDNA) from archaeological and historical skeletal material are characterized by low quality. Many soil contaminants such as humic acid, fulvic acid, and bone collagen are often co-extracted with aDNA and inhibit amplification by polymerase chain reaction (PCR). In this study, we compared with two methods of DNA extraction by phenol-chloroform extraction and silica-bead extraction. In addition, we applied new protocol, ultra sonication based silica-bead extraction method to extract aDNA from some ancient human skeletal remains. This method was more effective by both mitochondrial DNA (mtDNA) and amelogenin gene amplification.

### <국문초록>

고고 유적지에서 출토된 뼈에서 추출한 DNA는 부식산과 풀빅산 등의 토양성분과 콜라겐 등 다양한 오염물질이 포함되어 있어 DNA의 추출 및 분석이 매우 어렵다. 본 연구에서는 phenol 추출법, silica 추출법 등 두 가지 대표적인 고대 DNA 추출법의 효율을 DNA 증폭 결과에 의하여 비교하였다. 또한 울트라급의 초음파를 시료 용해에 적용한 후 silica 추출법으로 DNA를 분리한 방법이 기존의 phenol 및 silica 추출법에 비하여 미토콘드리아 DNA와 아밀로제닌 유전자 증폭 결과가 더 우수한 것으로 나타났다.

## I. 서론

고고 유적지에서 출토되는 인골, 동물의 뼈, 식물의 종자 등 생물 유체(biological remains)에서 추출되는 DNA를 보통의 DNA와 구분하여 고대 DNA(ancient DNA, aDNA)라고 정의하고 있다. 고대 DNA에 대한 연구는 진화유전학(evolutionary genetics), 분자생물학(molecular biology), 유전체학(genomics) 등의 이론과 방법론이 급속도로 발전하면서 근래 20년 동안 획기적으로 진전되었다(Cann et al., 1987; Larsen 1997; Pääbo et al., 2004). 그러나 고대 시료에 남아 있는 DNA는 일반적인 DNA 분석법을 그대로 적용할 수 없는데 그것은 고대 DNA 분석에서 필연적으로 수반되는 몇 가지 문제점 때문이다. 그 첫 번째는 물리화학적인 변성, 손상(modification, damage), 고도의 분해(high degradation), 극미량의 잔존량(low copy number) 등 오랜 시간이 경과하면서 자연적으로 나타나는 고대 DNA의 이질적인 특성 때문이다. 두 번째는 토양에 장기간 노출되어 있었기 때문에 토양 성분 가운데 부식산(humic acid)과 풀빅산(fulvic acid) 등의 오염 물질이 유체에 다량 침투되어 있어 DNA와 함께 추출되는데 이것이 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)에 의한 DNA의 증폭을 저해하는 방해물질(PCR inhibitor)로 작용할 수 있다는 점이다. 세 번째는 고대 인골과 동물의 뼈에 과거 미상의 접촉자, 발굴자, 실험자 등에 의하여 매우 치명적인 인간 DNA의 오염이 빈번히 일어나고 있다는 점이다. 이러한 외부 DNA의 오염은 결과의 신뢰성과 직결되는 문제로서 종종 논란이 되고 있다. 생물 유체의 DNA 정보를 성공적으로 복원하기 위해서는 일반적인 분자생물학 연구법을 적용하는 것 이상으로 해결해야 할 기술적 난제가 존재하며, 오염을 방지하고 분석 결과를 논리적으로 입증할 수 있는 실험 절차 및 분석 전략이 고려되어야 한다.

오래된 생물 유체의 DNA 정보 복원의 성공 여부는 DNA 추출과정에 달려 있다고 해도 과언이 아니다. 위에서 제시한 문제를 해결하는데 있어서 DNA 추출 효율은 매우 중요하다. 고대 DNA 연구의 무한한 가능성을 제공한 것은 바로 DNA를 증폭할 수 있는 PCR법의 개발인데, PCR 증폭이 가능할 뿐만 아니라 오염원을 변별할 수 있을 정도의 DNA량을 확보해야한다. 출토 인골에서 DNA를 추출하는 실험은 일반적인 생체시료를 대상으로 하는 것에 비하여 훨씬 더 많은 비용과 노력이 소모되지만, 추출되는 DNA 양이 적어 PCR 증폭의 실패율이 높다. 따라서 어떤 DNA 추출법을 적용하고 이를 적절히 응용하여 고대 DNA 추출에 최적화 시킬지 결정하는 것이 무엇보다 중요하다(Hofreiter et al., 2001).

본 연구는 출토 인골의 잔존 DNA를 추출하기 위하여 고전적으로 폭넓게 이용되는 phenol 추출법(phenol-chloroform extraction method)과 최근 독일 막스플랑크 연구소의 Rohland 가 제시한 silica 추출법(silica-bead extraction method)을 비교하였다(Rohland et al., 2007). 특히 뼈 조직을 단기간에 용해 시키고 DNA를 효과적으로 용출시키기 위하여 울트라급의 초음파를 인골 분말에 집중적으로 처리한 후 silica 추출법과 결합하여 DNA를 추출함으로써 출토 인골에 잔존하는 고대 DNA의 추출 효율을 개선하고자 하였다.

## II. 본 론

### 1. 재료 및 방법

#### (1) 시료의 전처리

본 연구는 Table 1과 같이 조선시대 중~후기 인골 2구를 대상으로 수행하였다. DNA를 추출하기 위한 인골 시편은 대퇴골을 약 5cm×2cm 크기로 절단하여 준비하였으며, DNA 추출에 앞서 표면오염물질(토양, 미생물 등)을 제거하기 위하여 치과용 연마기로 표면을 약 1mm 정도 제거하였다. 이후 6% 차아염소산나트륨(sodium hypochlorite)을 시료가 잠길 정도로 분주하여 상온에서 15분간 교반한 다음 멸균 증류수로 2~3회 세척하였다. 시료를 무균상자 안에서 5시간 이상 자연 건조시켜 수분을 완전히 제거한 후 시료의 각 표면에 자외선을 40분간 방사하여 표면 오염원을 제거하였다. 오염물이 제거된 인골 시료는 분말제조기 MM301(Retsch, Germany)로 30초 동안 분쇄한 후 DNA 추출 전까지 -20℃에서 보관하였다.

Table 1. 분석 시료 목록

시료명	매장방식	추정연대	DNA 추출부위	비고
KAB0003	회곽묘	조선시대	대퇴골	가족묘 (이혈합장묘) 부부관계 추정
KAB0004	회곽묘	조선시대	대퇴골	

#### (2) DNA의 추출 및 정제

##### ① Phenol 추출법

분말 상태의 인골 시료를 0.5g씩 정량하여 pH8.0 0.5M EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)에 의하여 탈칼슘화반응(decalcification)을 48시간 이상 상온에서 실시한 후 단백질분해

제(proteinase K) 3mg과 SDS(sodium dodecyl sulfate)를 0.5%가 되도록 추가하여 4~5시간 동안 65℃ 항온수조에서 진탕하였다. DNA를 추출하기 위하여 동일한 양의 phenol : chloroform : isoamyl alcohol(25:24:1)을 처리한 다음 13,000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상층액을 수거한 후 이 과정을 한 번 더 반복하였다. 수거한 상층액에 동량의 chloroform : isoamyl alcohol(24:1)을 처리한 후 13,000rpm에서 5분간 원심분리하고, 상층액을 수거하였다. 회수된 상층액 1/2 부피만큼의 5M ammonium acetate를 첨가한 후 이것과 동량의 isopropanol을 다시 첨가하여 상온에서 18~24시간 동안 반응시킨 다음 13,000rpm에서 30분간 원심분리 하였다. 상층액을 완전히 제거하고 상온에서 15분간 자연건조 한 다음 80% ethanol을 1ml 첨가한 후 13,000rpm에서 30분간 원심분리 하였다. Ethanol을 완전히 제거한 후 다시 15분 동안 자연건조 한 다음 삼차증류수(nuclease free ddH<sub>2</sub>O)를 100 $\mu$ l 첨가하여 다음 실험 전까지 4℃에 보관하였다.

## ② Silica 추출법

Silica 추출법은 Rohland의 방법을 이용하였으며, 다음과 같다(Rohland et al., 2007). 분말 상태의 인골 시료를 0.5g씩 정량하여 15ml tube에 옮긴 후 extraction solution (0.45M EDTA, 0.25mg/ml proteinase K, pH8.0) 10ml을 첨가한 다음 탈칼슘화반응을 1시간 동안만 정치시킨 것과 18~24시간 동안 천천히 교반하여 유도한 것으로 나눠 실험하였다. DNA의 수율을 높이기 위해 56℃에서 1~3시간 동안 반응시킨 후 5,000 $\times$ g에서 2분 동안 원심분리하고 상층액을 50ml 원심분리용 튜브에 옮긴 다음 binding buffer(5M GuSCN, 25mM NaCl, 50mM Tris) 40ml와 silica 현탁액 100 $\mu$ l를 첨가한 후 30% HCl로 pH4.0으로 맞추었다. Parafilm으로 tube의 뚜껑을 잘 봉합한 다음 빛을 차단한 상태로 실온에서 3시간 동안 반응시킨 후 5,000 $\times$ g에서 2분 동안 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 50ml tube에 남아있는 silica pellet에 binding buffer 1ml를 첨가하여 잘 섞어준 다음 2ml microtube로 옮겨 16,000 $\times$ g에서 15초 동안 원심분리한 후 binding buffer를 완전히 제거하였다. DNA의 정제를 위해 washing buffer(50% ethanol, 125mM NaCl, 10mM Tris, 1mM EDTA, pH8.0)를 1ml 첨가하여 잘 섞어준 후 16,000 $\times$ g에서 15초 동안 원심분리한 다음 washing buffer를 제거하고, 다시 한번 더 반복하였다. Washing buffer를 완전히 제거한 후 silica pellet을 실온에서 15분 동안 자연건조 시켰고 1% TE buffer(10mM Tris, 1mM EDTA, pH8.0) 100 $\mu$ l를 첨가하여 10분 동안 교반한 다음 16,000 $\times$ g에서 15초 동안 원심분리한 후 상층액을 새로운 microtube로 옮겨 다음 실험 전까지 4℃에 보관하였다.

③ 초음파에 의한 인골시료의 용해

10ml의 AFA(Adaptive Focused Acoustics) system 전용 tube에 인골 분말 시료 0.5g과 0.5M EDTA 2.5ml을 넣고 초음파(1MHz)를 duty cycle 20%, intensity 10, cycles/burst 500의 조건에서 1분~2분 30초 내로 처리한 후 0.5M EDTA를 10ml까지 채워준 다음 별도의 반응시간 없이 바로 silica 추출법으로 DNA를 추출하였고, 추출한 DNA는 다음 실험 전까지 4℃에 보관하였다.

(3) 미토콘드리아 DNA 및 아밀로제닌 유전자 증폭

추출된 미토콘드리아 DNA(mtDNA)를 주형으로 과변이지역(hyper variable region, HVR)을 PCR에 의하여 증폭하였다. PCR에 사용된 프라이머는 Table 2에서와 같이 forward/reverse 2쌍을 사용하였으며, 중합효소로는 HotStart Taq(Qiagen, Germany)를 사용하였다. PCR 반응액은 12.5pmol 프라이머는 forward/reverse 각 2 $\mu$ l, HotStart Taq 5unit, 2.5mM dNTP 3 $\mu$ l, 10 $\times$  buffer 5 $\mu$ l, 1 $\mu$ g/ $\mu$ l BSA 5 $\mu$ l를 첨가한 후 최종 50 $\mu$ l에 맞추어 제조하였다. PCR 반응액을 증폭하기 위하여 95℃에서 predenaturation 15분 후 95℃에서 denaturation 30초, 58℃에서 annealing 30초, 72℃에서 extension 30초를 40회 반복하고 72℃에서 10분간 final extension의 조건으로 ABI veriti(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 PCR 반응을 실시하였다. 성결정을 위한 아밀로제닌(amelogenin)의 유전자 증폭은 annealing 58℃ 20초에서 수행하였으며, 나머지 과정은 mtDNA HVR의 증폭 조건과 동일하게 하였다. 증폭된 DNA 산물은 전기영동장치 HDA-GT12(eGene, USA)를 이용하여 확인하였다.

Table 2. DNA 증폭을 위한 PCR 프라이머 염기서열 목록

no.	application	name	sequences (5'-3')	size (bp)
01	mtDNA HVR1	H1-3F	CACCATTAGCACCCAAAGCT	176
02		H1-3R	CAGGTGGTCAAGTATTTATGGT	
03		H1-4F	GCCAGCCACCATGAATATTGT	153
04		H1-4R	TGGCTTTGGAGTTGCAGTTG	
05	Amelogenin	Amelo01	CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG	X ch, 106 bp
06		Amelo02	ATCAGAGCTTAACTGGGAAGCTG	Y ch, 112 bp

#### (4) 시료의 오염방지

출토 인골 시료의 전처리 및 DNA 추출의 전 과정과 PCR 반응액 조성 등의 모든 과정은 오염방지를 위하여 두 대의 무균작업대에서 각각 실행하였으며, 실험에 필요한 모든 시약과 삼차 증류수 및 용기는 고온 또는 자외선 조사에 의해 멸균하여 사용하였다. 분석 결과의 재현성 확인 및 검증을 위하여 동일한 시료에 대하여 1개월 간격으로 동일한 방법을 2차에 걸쳐서 실시하였다. 모든 실험과정은 음성대조군을 설정하여 외부 DNA에 의한 오염여부를 확인하였다. 또한 본 연구와 관련된 실험자뿐만 아니라 실험실의 모든 출입인원에 대한 mtDNA를 분석하여 비교함으로써 실험자의 부주의 및 외부인에 의한 오염여부를 검증하였다.

## 2. 연구결과

### (1) 인골의 보존 상태 및 시료의 전처리

KAB0003과 KAB0004는 치아를 포함하여 두개골 등 전신의 유골이 거의 완전하게 출토되었으며, 골밀도와 강도가 높아 DNA의 보존상태가 양호할 것으로 예측되었다. 특히 DNA 분석용 시편으로 사용한 두 시료의 대퇴골 단면 부위는 Figure 1에서 보는 바와 같이 골원(osteons)과 주변 골세포조직의 원형이 온전히 남아 있는 것으로 확인되었다.

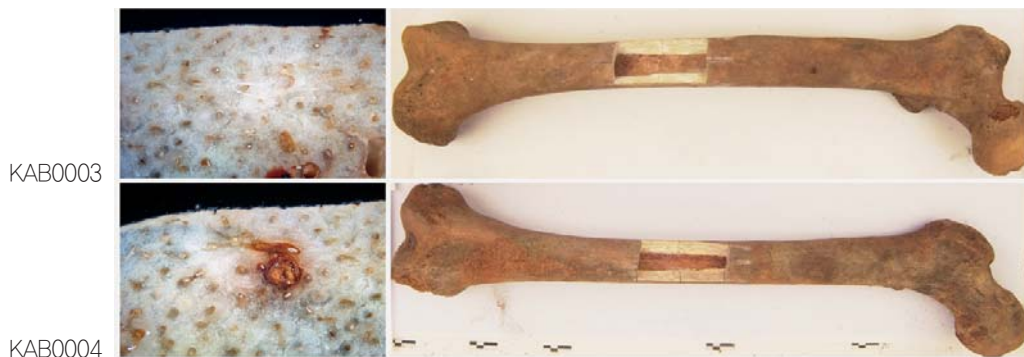


Figure 1. 출토 인골 KAB0003과 KAB0004의 대퇴골(오른쪽)과 골조직 단면에 대한 실제 현미경 관찰(X50)(왼쪽)

### (2) DNA 추출법에 따른 mtDNA HVR 증폭 결과

#### ① 초음파 처리의 최적 시간 결정

출토 인골 KAB0003과 KAB0004의 분말 0.5g에 대한 초음파 처리의 최적조건을 결정하기

위하여 다음과 같이 실험하였다. AFA system을 이용하여 초음파를 1분, 1분 30초, 2분, 2분 30초로 각각 처리한 후 별도의 탈칼슘화반응 없이 silica 추출법으로 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA를 주형으로 프라이머 H1-4F와 H1-4R로 mtDNA의 HVR1의 nt16106-nt16258 부분 153bp를 증폭하였다. Figure 2에서와 같이 초음파를 처리한 후 탈칼슘화반응을 생략하였음에도 불구하고 모든 반응에서 DNA의 추출과 증폭이 이루어진 것을 확인할 수 있었다. 또한 처리시간이 증가함에 따라 DNA 증폭결과가 양호한 것으로 나타났는데, 2분 30초 이상의 처리 시간에서는 대체로 비슷한 증폭 결과를 보임에 따라 이후 초음파의 적정 처리 시간을 2분 30초로 정하여 실험하였다.

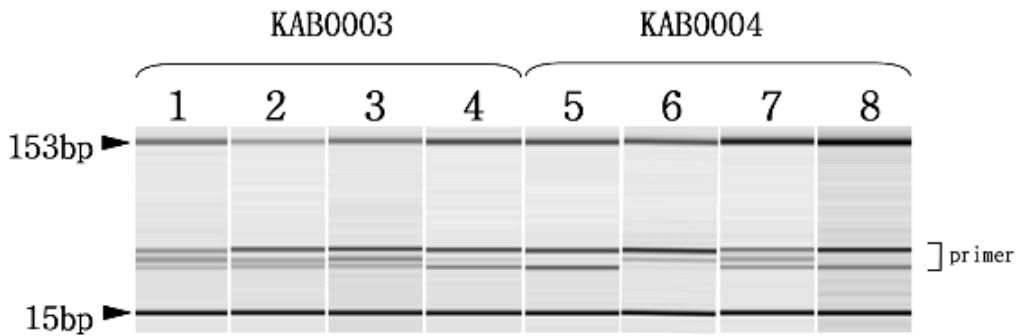


Figure 2. KAB0003과 KAB0004 출토 인골의 DNA 추출과정에 적용한 초음파 처리 시간에 따른 mtDNA HVR1 nt16106-nt16258 부분의 PCR 증폭 산물(153bp)에 대한 전기영동 결과. Lane 1, 5: 1분, lane 2, 6: 1분 30초, lane 3, 7: 2분, lane 4, 8: 2분 30초. 15bp는 alignment marker임

② Phenol 추출법, silica 추출법 및 초음파-silica 추출법의 효율 비교

출토 인골의 DNA를 추출하기 위하여 phenol 추출법, silica 추출법과 초음파-silica 추출법 등 세 가지 방법을 이용하였다. DNA 추출 효율은 mtDNA HVR1의 프라이머 H1-3F와 H1-3R로 mtDNA의 HVR1의 nt15978-nt16153 부분 176bp를 증폭하여 비교하였다(Figure 3).

전반적으로 phenol 추출법보다 2007년 막스플랑크 연구소 Rohland에 의하여 제시된 silica 추출법을 이용했을 때, 출토 인골 KAB0003과 KAB0004의 mtDNA HVR1의 증폭 효율이 더 좋은 것으로 나타났다. 그러나 silica 추출법에서 18~24시간 동안의 0.5M EDTA 처리시간을 1시간으로 줄인 경우 증폭 산물이 관찰되지 않았다. 초음파를 처리한 후 silica 추출법을 적용한 경우는 단백질제거제의 사용 유무와 상관없이 mtDNA의 증폭이 이루어지는 것으로 확인되었다.



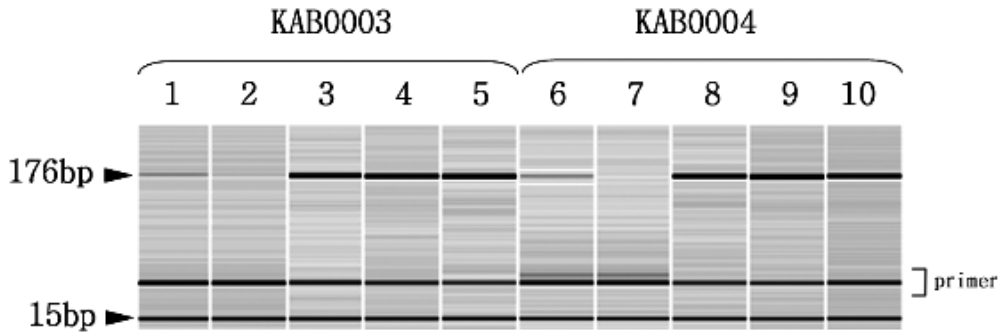


Figure 3. KAB0003, KAB0004 출토 인골의 DNA 추출법에 따른 mtDNA HVR1 nt15978-nt16153 부분의 PCR 증폭 산물(176bp)에 대한 전기영동 결과. Lane 1, 6: phenol 추출법, lane 2, 7: silica 추출법(탈칼슘화반응 1시간), lane 3, 8: silica 추출법(탈칼슘화반응 18~24시간), lane 4, 9: AFA system 2분 30초 처리 후 단백질분해제 무 첨가(탈칼슘화반응 18~24시간), lane 5, 10: AFA system 2분 30초 처리 후 단백질분해제 첨가(탈칼슘화반응 18~24시간). 15bp는 alignment marker임

## (2) 아미로제닌 유전자 증폭에 의한 성별분석 결과

복제 수가 많은 mtDNA는 분리할 수 있는 DNA 양이 더 많을 뿐만 아니라 증폭 효율도 높다. 그러나 성염색체와 상염색체 등의 핵 DNA는 세포 당 복제수가 적기 때문에 출토 인골과 같이 오래된 뼈에서 추출되는 양이 더 적고 PCR에 의한 증폭이 잘 이루어지지 않는 경우가 흔하다. 본 실험에서는 염색체 X와 Y에 존재하는 아미로제닌 유전자 증폭을 통하여 출토 인골의 성결정을 시도하였으며, 이를 각각의 추출법에 따른 핵 DNA의 증폭 효율과 비교하였다. 프라이머 Amelo01과 Amelo02는 X 염색체에서 106bp, Y 염색체에서 112bp의 아미로제닌 유전자의 일부를 증폭할 수 있다. 따라서 XY의 성염색체를 가지고 있는 남성의 경우 106bp와 112bp의 두 가지 증폭산물이 확인되며, XX의 성염색체를 가지고 있는 여성의 경우 106bp의 산물만이 증폭되는 원리를 이용하여 출토 인골의 성에 대한 판별을 시도하였다. 본 연구에서는 핵 DNA인 X와 Y 염색체의 아미로제닌 유전자 증폭에 보다 효율적인 추출법을 결정하기 위하여 다음과 같이 실험하였다. 출토 인골 KAB0003과 KAB0004에 EDTA와 단백질분해제를 첨가한 후 1시간 동안 정치시키며 탈칼슘화반응을 한 silica 추출법을 적용한 것, 18~24시간 동안 천천히 교반하여 탈칼슘화반응을 유도시킨 후 silica 추출법을 적용한 것, 2분 30초 동안 초음파 처리한 후 탈칼슘화반응 없이 silica 추출법을 적용한 것, 2분 30초 동안 초음파 처리하고 0.5M EDTA를 18~24시간 동안 탈칼슘화반응을 수행한 후 단백질분해제를 처리한 것과 그렇지 않은 것 등 모두 5가지의 조건으로 구분하여 아미로제닌 유전자 증폭을 수행하였다.

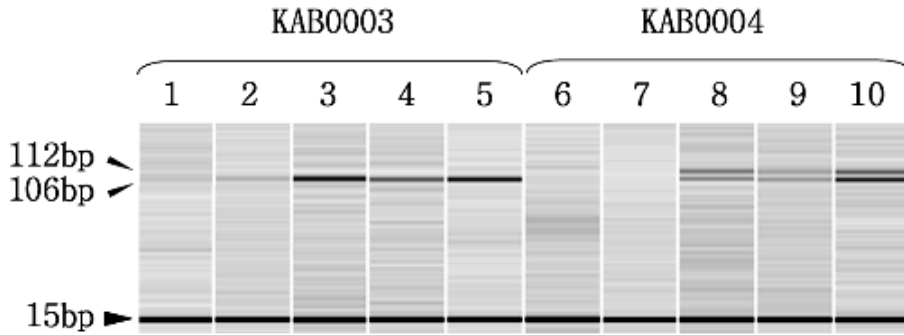


Figure 4. KAB0003, KAB0004 인골의 DNA 추출법에 따른 아밀로제닌 유전자의 증폭 산물의 전기영동 결과. Lane 1, 6: silica 추출법(탈칼슘화반응 1시간), lane 2, 7: silica 추출법(탈칼슘화반응 18~24시간); lane 3, 8: AFA system 2분 30초 처리(탈칼슘화반응 없음), lane 4, 9: AFA system 2분 30초 처리 후 단백질분해제 무 첨가(탈칼슘화 반응 18~24), lane 5, 10: AFA system 2분 30초 처리 후 단백질 분해제 첨가(탈칼슘화반응 18~24시간). 15bp는 alignment marker임

Figure 4와 같이 silica 추출법만으로 DNA를 추출하여 아밀로제닌 유전자를 증폭한 경우 탈칼슘화반응을 18~24시간 동안 유도시켜 추출한 유전자는 증폭되었지만 그 증폭 산물의 양이 매우 미약한 것을 확인할 수 있었다. 탈칼슘화반응을 1시간 동안만 수행한 경우 KAB0003, KAB0004 인골 시료 모두의 아밀로제닌 유전자 증폭에 실패하였다. 탈칼슘화반응을 18~24시간 수행한 silica 추출법의 경우 KAB0003에서만 106bp의 증폭산물을 확인하였다. 그러나 초음파를 처리한 경우에는 KAB0003, KAB0004 모두 아밀로제닌 유전자 증폭에 성공하였다. 특히 초음파를 2분 30초 처리 후 탈칼슘화반응 없이 곧바로 silica 추출법을 적용한 경우에서도 아밀로제닌 유전자가 증폭된 것은 초음파 처리가 인골의 DNA 추출을 위한 전처리에 매우 효과적임을 나타내는 중요한 결과였다. 그러나 전체적인 비교에서 초음파 처리 후 18~24시간의 탈칼슘화반응과 단백질분해제를 처리한 경우 가장 증폭 효율이 양호한 것으로 나타났다. 아밀로제닌 유전자의 분석 결과, KAB0003은 106bp의 증폭 산물만이 확인되어 여성으로 판명되었으며, KAB0004는 106bp와 112bp가 모두 증폭되어 남성으로 확인되었다.

### Ⅲ. 결 론

DNA는 고대 유기체의 유전자 정보와 유전적 특징을 해석할 수 있는 중요한 생체분자로 부상하였다. 고대 DNA의 연구는 대부분 발굴지에서 출토된 인골과 동물의 뼈에 의해서 이루어진다. 뼈는 수산화인회석이 거의 대부분의 구성물질이며, 단백질 섬유조직인 콜라겐은 뼈의 주요 단백질 성분이다. 또한 다른 조직과 마찬가지로 많은 세포와 DNA를 포함하고 있으며, 어떤 생체조직 보다 DNA의 보존에 유리한 환경을 제공한다. 그러나 이상적인 환경조건에서도 DNA가 수 만년 동안 존재할 가능성은 상당히 희박하다(Hoss et al., 1996; Hedges 2002). 오랜 매장환경 속에서 DNA의 손상과 분해는 필연적일 수밖에 없으며, 점차 보유하고 있던 유전 정보를 잃어버리게 된다. 이는 DNA의 추출을 어렵게 하며, 유전자 증폭을 저해하거나 에러를 유발하여 염기서열의 정확한 결정을 불가능하게 한다. mtDNA는 핵 DNA에 비하여 10배 이상의 복제 수를 갖기 때문에 고대 DNA의 연구에 있어서 핵 DNA보다 mtDNA의 분석이 더 수월한 것으로 알려져 있다. X와 Y염색체에 존재하는 아미로제닌의 유전자 증폭이 어려운 것도 그러한 복제 수 차이에서 비롯된 것으로 볼 수 있다. 본 연구에 이용된 KAB0003, KAB0004는 조선시대 회곽묘 출토 인골로서 보존상태가 양호하여 phenol 추출법 및 silica 추출법의 적용과 mtDNA 및 아미로제닌 유전자와 같은 핵 DNA의 증폭실험에 적절하였다.

출토 인골뿐만 아니라 많은 조직의 핵산 추출에 이용되는 phenol 추출법은 핵산의 회수율이 가장 좋은 것으로 알려져 있으나 매장된 뼈와 같이 토양 환경에서 유래한 시료의 경우 토양 오염물의 제거가 수월하게 이루어지지 않는 문제점이 있다. KAB0003과 KAB0004 모두 phenol 추출법과 silica 추출법으로 DNA 추출에 성공하였으나 증폭 효율에서는 많은 차이를 보였다. 이것은 DNA의 양적 회수율보다 DNA 순도의 영향인 것으로 판단된다. 그러나 본 실험에서는 추출된 DNA를 정량하거나 순도를 측정하지 않고 PCR 증폭에 의하여 간접적으로 DNA의 추출 효율을 예측하였으므로 향후(UV-spectrophotometer와 real-time PCR 등에 의한) 부가 연구를 통해서 DNA의 정량적인 추출량을 그 근거로 제시하여야 할 것이다.

출토 인골 DNA 추출을 위하여 초음파를 사용함으로써 기존의 silica 추출법 보다 mtDNA 및 핵 DNA 증폭에 보다 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 특히 초음파의 적정 처리시간을 결정하기 위한 실험에서 초음파 처리 후 별도의 탈칼슘화반응 없이 silica 추출법을 적용하였음에도 불구하고 DNA의 추출과 증폭이 이루어진 것은 초음파에 의하여 골조직의 용해가 일어날 수

있음을 나타내는 결과이다(Figure 2). 또한 동일한 silica 추출법을 수행하더라도 초음파에 의하여 처리된 시료의 핵 DNA 증폭 결과가 더욱더 양호하게 나타났는데(Figure 4), 이는 초음파 처리와 silica 추출법을 함께 사용 하는 것이 가장 효과적이라고 결론내릴 수 있는 중요한 근거가 될 수 있다.

〈참고문헌〉

1. Cann, R.L., Stoneking, M., Wilson, A.C., 1987, 'Mitochondrial DNA and human evolution', Nature, 325, p.31~36.
2. Larsen, C.S., 1997, 'Bioarchaeology: interpreting behavior from the human skeleton', Cambridge University Press.
3. Hofreiter, M., Serre, D., Poinar, H.N., Kuch, M., Pääbo, S., 2001, 'Ancient DNA', Nature Reviews Genetics, 2, p.353~359.
4. Rohland, N., Hofreiter, M., 2007, 'Ancient DNA extraction from bones and teeth', Nature, 2, p.1756~1762.
5. Pääbo, S., Poinar, H., Serre, D., Jaenicke-Despres, V., Hebler, J., Rohland, N., Kuch, M., Krause, J., Vigilant, L., Hofreiter, M., 2004, 'Genetic analyses from ancient DNA', Annual Review of Genetic, 38, p.645~679.
6. Hedges, R.E.M., 2002, 'Bone diagenesis: an overview of processes' Archaeometry, 44, p.319~328.
7. Hoss, M., Dilling, A., Carrant, A., Pääbo, S., 1996, 'Molecular phylogeny of the extinct ground sloth Mylodon darwini', Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, p.181~185.