

# Gum guaiac 혼합물을 이용한 혈흔검출 예비시험의 평가와 혈흔의 유전자 분석에 미치는 효과

대구지방경찰청 과학수사계<sup>1</sup>, 광양보건대학 임상병리과<sup>2</sup>

임 채 원<sup>1</sup>·김 양 호<sup>2</sup>·김 진 각<sup>2</sup>

## Preliminary Test of Forensic Identification Bloodstain Using Guaiac Mixture and It's Effect on Genetic Analysis

Chae-Won Lim<sup>1</sup>, Yang-Ho Kim<sup>2</sup>, and Jin-Gak Kim<sup>2</sup>

*Department of Scientific Investigation Section, Daegu Metropolitan Police Agency, Daegu, 706-705, Korea<sup>1</sup>*  
*Department of Clinical Laboratory Science, Kwangyang Health College, Kwangyang, 545-703, Korea<sup>2</sup>*

The most common sources of biological trace material which are found in crime scene are the human bloodstains. Reliable identification in the forensic casework is important as it provides crucial insights into crime scene reconstruction and can thus contribute towards solving crimes. Blood- stains are routinely tested in forensic practise using various methods including the leucomalachite green (LMG) test, Kastle-Meyer phenolphthalein test, tetramethylbenzidine test, orthotolidine test, or the luminol chemoluminescence test with the latter cleaning attempts. All these presumptive thus indicative but not identifying tests take advantage of the peroxidase-like activity of the heme unit of the hemoglobin molecule in human blood. Therefore, false-positive results can be caused by the presence of strong oxidants, such as chlorine-containing detergents or by true peroxidases (e.g., from plants). In this study, composition for Gum guaiac was evaluated for the forensic identification of bloodstain and compared with the LMG. The sensitivity and specificity of the composition for Gum guaiac were examined more stable in bloodstain. The positive of Composition for Gum guaiac shown even with the 100,000-fold diluted bloodstain, which was no difference in comparison with LMG test. It was shown that composition for Gum guaiac was very stable to resist boiling for 20 minutes and the effect of bacteria did not affect the genetic analysis as well. The above result of the crime scene investigation, composition for Gum guaiac is easily expected to help identifying bloodstain in the evidences.

Received 29 JAN 2010 / Returned for modification 15 MAR 2010 / Accepted 27 APR 2010

**Key Words** : Bloodstain, Gum guaiac, Sensitivity, Specificity, Stability, Genetic analysis

### I. 서 론

교신저자 : 임채원, (우)706-705 대구광역시 수성구 지산동 720,  
대구지방경찰청 과학수사계  
TEL : 053-763-9564, 010-7290-0677  
E-Mail : dlacodnjs@hanmail.net

살인 및 강력사건 현장에서 혈흔유무 감별은 초기수사  
방향 설정 및 사건 해결에 매우 중요한 부분을 차지하고  
있다. 일단 혈흔을 찾게 되면 혈청학적 분석과 유전자 분

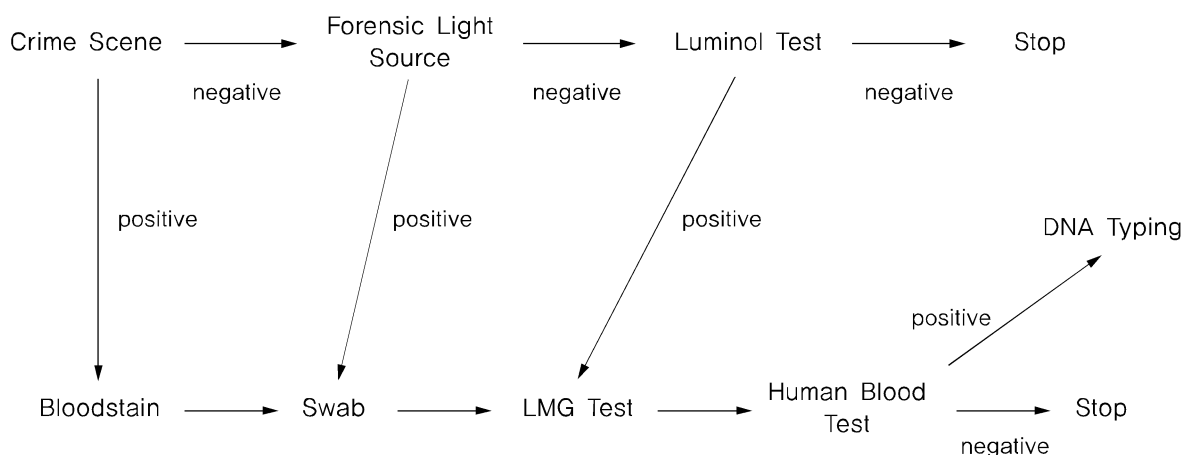


Fig. 1. Schematic diagram of the bloodstain identification process.

석을 통해 혈흔의 유래와 사건과의 관련성을 찾을 수 있기 때문이다(Lim 등, 2004). 일반적으로 사건 현장에 혈흔의 양이 많아 육안으로 식별이 가능한 경우에는 발색 반응을 이용한 혈흔예비검사를 수행할 수 있지만, 혈흔의 양이 적거나 육안으로 혈흔을 식별할 수 없는 경우에는 형광 발광을 이용한 시약을 이용해 혈흔을 찾게 된다(Fig 1).

혈흔예비검사 방법은 기본적으로 퍼옥시다제(oxidase) 활성을 갖는 혈액과 반응해 색의 변화를 일으키는 화학물질(발색제, chromogen; leucomalachite green, luminol 등)을 이용한다(Lee 등, 1999; Zubakov 등, 2008). 즉 산화제인 과산화수소( $H_2O_2$ )와 퍼옥시다제 활성을 갖는 촉매(적혈구의 헤모글로빈)의 존재 하에서 화학물질이 산화되면서 발색하거나 발광을 하게 된다(Kohn 등, 1955; Garner 등, 1976; Lomholt 등, 1977; Lee 등, 1999; Lim 등, 2004; Tobe 등, 2007). 형광 발광을 이용한 혈흔예비검사 방법의 대표적인 루미놀(luminol)은 주로 육안으로 식별되지 않을 정도의 혈흔을 검출하기 위해 사용되는데, 헤모글로빈의 촉매작용으로 루미놀이 화학발광을 하게 된다. 즉, 헤모글로빈의 철이 과산화수소와 루미놀 사이의 산화반응을 촉매 하는데 이때의 화학반응 과정 중에 발생하는 에너지 차이가 빛 광자(light photon)의 형태로 나타나는 것을 원리로 하고 있으며(Dilbeck, 2006; Barni 등, 2007; Zubakov 등, 2008), leucomalachite green (LMG)와 더불어 현재까지 사건 현장에서 대표적으로 사용되고 있는 혈흔예비검사 시약이다. 그러나 LMG나 루

미놀의 퍼옥시다제(oxidase) 활성은 채소(무, 시금치 등)나, 금속물질, 황산동( $CuSO_4$ ) 등 몇 가지의 화학물질 등에도 존재하여 위양성 등의 비특이적 반응을 보일 수 있으며(Lee 등, 1999; Zubakov 등, 2008; Marrone 등, 2009), 이 두 시약을 이용하여 혈흔예비검사 실시 후 채취된 혈흔의 유전자 분석에도 영향을 미칠 수 있다고 보고되고 있다(Nagy 등, 2005; Marrone 등, 2009). 특히 높은 원가 비용과 인체유해성으로 혈흔예비검사 용도로 반드시 사용하여야 함에도 불구하고 사건현장에서 활용성이 떨어지고 있는 것이 현실이다(Valko 등, 2005; Bae 등, 2008).

이에 본 연구에서는 LMG와 루미놀과 같은 퍼옥시다제 활성물질을 함유하고 있고, 향수 등 화장품, 의약품, 진단검사이약 등의 제조에 첨가원료로 사용되어지며, 버섯 자실체 검사이약의 제조에 사용되어지고 있는 남아메리카 지역에서 자생하는 유창목(학명 : *Bulnesia sarmienti*)에서 추출한 천연수지 물질인 guaiac resin 분말을 첨가하여 제조한 Guaiac 혼합물 시약을 이용하여, 법의학 실험실은 물론 사건현장에서 일반적으로 사용하고 있는 LMG 시약과 민감도, 특이성, 그리고 DNA 정제 및 유전자형 분석에 미치는 영향 등을 비교, 분석하여 기존 혈흔예비검사 시약들의 문제점을 해결하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

혈흔예비검사 시약 LMG와 Guaiac 혼합물 시약의 민감도 측정을 위해 먼저 신선한 전혈을 1/10배씩 계단 희석해 직경 5 mm의 거름종이 등 6종에 10 µL씩 떨어뜨린 후 건조하였다. 혈흔예비검사 시약 LMG와 Guaiac 혼합물 시약의 비특이적반응(위양성 반응)을 알아보기 위해 채소류(무, 시금치, 양배추 등) 및 과일류(오렌지, 참외 등) 25종의 조각 및 채소즙과 과일즙 원액, 상품화된 주방 및 세탁세제 8종, 화학약품 및 금속류(CuSO<sub>4</sub> 등 14종), 부패미생물(*Staphylococcus aureus* 등 3종)을 준비하였다. 또한 Guaiac 혼합물 시약이 DNA정제 및 유전자형 분석에 미치는 영향을 보기 위해 Guaiac 혼합물 시약을 처리한 희석혈흔과 처리하지 않은 희석혈흔을 준비하였다.

### 2. 검사방법

이 연구에 사용된 혈흔예비검사 시약 제조에 필요한 LMG(Sigma-Aldrich Corp., Louis, USA) 및 glacial acetic acid(Sigma-Aldrich Corp), 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(Sigma-Aldrich Corp), Gum guaiac 분말시약(Hayashi Inc. Osaka, Japan) 그리고 ethanol(Samchun Inc. Sungnam, Korea)을 사용하여 제조하였으며, 각 시약의 사용설명서에 따라 제조하였으며, 전개액으로 0.1% Tween 20을 사용하였다, 어떠한 반응도 나타나지 않은 경우나, 후크(hook) 효과에 의해 위음성이나 위양성의 결과를 보인 경우 FOB test kit(Asan Pharm Co. Ltd, Seoul, Korea)로 확인 시험을 하였다(Table 1).

### 3. 민감도

혈흔의 유류대상 별 검출 감도를 보기 위해 100배 희석된 혈흔 10 µL를 떨어뜨려 건조한 시료(여과지 등 7종)와 신선한 혈액에 증류수를 이용하여 연속적으로 10배씩 계단 희석하여 준비한 혈흔 시료에 혈흔 예비검사 시약 LMG와 Guaiac 혼합물 시약을 처리하고 육안으로 색의 변화를 관찰하여 각 시약별 검출 한계를 결정하였다.

### 4. 특이성

혈흔예비검사 시약의 혈흔 특이성을 알아보기 위하여 채소 및 과일류의 조각 및 원액즙, 상품화된 주방세제 및 세탁세제, 화학물질류, 금속류를 동량으로 100배 희석된 혈흔과 혼합한 시료와 혼합하지 않은 시료를 거름종이 위에 놓고 LMG와 Guaiac 혼합물 시약을 떨어뜨려 육안으로 색의 변화를 관찰하였으며, 위음성이나 위양성의 결과를 보인 경우 FOB test kit(Asan Pharm Co. Ltd, Seoul, Korea)로 확인 시험을 하였다.

### 5. 안전성

혈흔의 보관온도 및 시간에서의 안전성을 관찰하기 위해 혈액을 100배 희석하여 다양한 온도(-20°C, 4°C, 상온, 37°C, 56°C)에서 보관하면서 1주와 2주 후 LMG와 Guaiac 혼합물 시약에 적용, 반응 결과를 비교하였다. 9°C에서 5분, 10분, 15분, 20분간 끓인 후 두 시약에 적용하여 열 안전성을 평가하였다. 오염세균에 대한 안전성을 평가하기 위하여 *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*를 멸균증류수에 0.5 McFaland 탁도로 부유하여 사용하였다(신 등, 1999). 2009년 1월에 채취하여 상온에서 4개월간 혈액반이 아닌 액체상태로

**Table 1.** The characteristics of bloodstain identification reagents used in this study.

Reagents	Characteristics	Test result (positive)	Composition
LMG (Leucomalachite green)		Change of blue-green	* Solution 1 : 2% (w/v) LMG in acetic acid, glacial * Solution 2 : 3% Hydrogen peroxide
Guaiac (Composition for Gum guaiac)		Change of blue	* Solution 1 : 1% (w/v) Guaiac in DT* ethanol * Solution 2 : 5% Hydrogen peroxide in DT* ethanol
Human blood test kit (FOB test kit)		Control and test of Two band	* immunochromatography onestep device test kit and dilution buffer (PH 6.8 ~ 7.2)

DT\* : Denaturation

보관하여 부패시킨 100배 희석한 혈액과 균액을 1:1 비율로 혼합한 검체와 혼합하지 않은 균 부유액 두 가지를 각각 LMG와 Guaiac 혼합물 시약에 적용하여 미생물의 영향을 평가하였다.

6. 혈흔 예비검사 시약이 DNA에 미치는 영향

Guaiac 혼합물 시약이 DNA 정제 및 유전자형 분석에 미치는 영향을 보기 위해 Guaiac 혼합물 시약을 처리한 희석혈흔과 처리하지 않은 희석혈흔을 준비하였다. 이는 DNA 정제부터 유전자형 분석까지 전 과정을 국립과학수사연구소 유전자분석과에 의뢰하여 실시하였다.

가. DNA의 정제

Guaiac 혼합물 시약이 DNA정제와 유전자감식에 미치는 영향을 보고자 혈흔(5 µL, 10 µL) 및 K562 DNA 10 µL에 Guaiac 혼합물 시약 30 µL를 첨가한 후 상용 DNA 분리 키트(QIA quick micro kit, Qiagen Co.)를 이용해 DNA를 정제하였다. 대조로 Guaiac 혼합물 시약을 처리하지 않은 혈흔(5 µL, 10 µL)을 이용하였다.

나. DNA 정량

정제된 DNA는 2% agrose gel에서 control DNA(K562)와 함께 전기영동 및 EtBr(ethidium bromide) 염색 후 image analyzer를 이용해 육안으로 확인한 후, 인간 DNA 정량키트(Quantifiler Human DNA Quantification kit, Applied Biosystems) 및 실시간 PCR 장비(7500 Real-time PCR system, Applied Biosystems)을 이용하여 정량하는 방법을 병행하였다.

다. 유전자형 분석

정제된 DNA의 유전자형 분석은 AmpFISTR identifier kit(Applied Biosystems)을 GeneAmp 9700 system(Applied Biosystems)으로 PCR하고, ABI prism Genetic analyzer 3730(Applied Biosystems)으로 분석하였으며, 그 결과를 GeneMapper Softwear(Applied Biosystems)를 이용해 유전자형의 결과를 관찰하였다.

III. 결 과

1. 혈흔예비검사 시약의 민감도

혈흔의 유류대상에 따른 검출 감도를 보기 위해 100배 희석된 혈흔 10 µL를 떨어뜨려 건조한 시료(여과지 등 7종)와, 연속적으로 10배씩 희석한 혈흔에 대한 민감도 분석 결과 혈흔이 유류된 대상에 관계없이 두 시약 청색으로 발색반응 하는 것을 관찰하였으며(Table 2, Fig 2), Guaiac 혼합물 시약의 경우 100,000배 희석된 혈흔 10 µL까지 검출, 발색 변화를 육안으로 식별할 수 있었으며, 이는 동일한 시료의 LMG 시약의 결과와 크게 차이를 보이지 않았다(Table 3).

2. 혈흔예비검사 시약의 특이도

가. 세탁세제 및 주방세제의 영향

Guaiac 혼합물 방법에서는 락스를 제외한 6종류의 주방 및 세탁세제 자체는 모두 음성의 결과를 보였으며, 혈액이 혼합된 경우에는 모두 양성인 보여 이 주방 및 세탁 세제들이 반응에 영향을 주지 않음이 관찰되었다. 반면

Fig. 2. Positive reaction of bloodstain identification reagent by specimens.

Sample Reagents	Filter paper	Soil	Copy paper	Swab	Toilet paper	Rug*	Fiber
LMG (leucomalachite green)							
Guaiac (composition for Guaiac)							

\*Rug : a coating rubber floor

**Table 2.** Detection-sensitivity of bloodstain by specimens

Reagents \ Sample	Filter paper	Soil	Copy paper	Swab	Toilet paper	Rug*	Fiber
LMG (leucomalachite green)	+	+	+	+	+	+	+
Guaiac (composition for Gum guaiac)	+	+	+	+	+	+	+

\*Rug : a coating rubber floor. +, positive; -, negative

**Table 3.** Detection-sensitivity of blood preliminary test reagents

Reagents \ Dilutions	1x	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
LMG (leucomalachite green)	+++	+++	++	+	+	+	±
Guaiac (composition for Gum guaiac)	+++	+++	++	+	+	+	-

+ : reaction intensity (positive). -, negative, ±, trace

LMG 방법에서는 혈흔이 포함되지 않은 주방세제, 세탁 세제(분말·용해액), 액상세제(피죤)에서 위양성을 보였으며 락스의 경우 혈액을 혼합한 경우에도 위음성의 결과를 보였다(Table 4).

나. 화학물질의 영향

사건현장에서 증거수집용으로 사용하는 여러가지 화학 물질 및 중금속류를 이용한 혈흔 검출에의 영향력 시험을 Table 5에 나타내었다. Guaiac 혼합물 시약법은 FeCl<sub>3</sub>, CuSO<sub>4</sub>, iodine 등에서 위양성, sodium peroxide(Na<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), fuschin acid 등에서 위음성의 결과를 보였으나, 혈액을

함유한 경우 양성의 결과를 나타냈다. LMG법은 Indomethacin, FeCl<sub>3</sub>, CuSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, iodine 등에서 위양성, LCV(leucocrystal violet), fuschin acid 등에서 위음성의 결과를 보였다(Table 5). Amido black에 대한 시험에서는 발색반응과 시약 자체의 색이 동일한 관계로 두 방법에서 모두 판정불가의 결과를 보였다.

다. 채소 및 과일의 영향

야채 및 과일 25종에 대해서는 절단, 파쇄하지 않은 상태에서는 모두 음성의 결과를 보였으나, 절단하거나 파쇄한 경우 Guaiac 혼합물 시약은 무우, 양배추에서 위양성,

**Table 4.** Effect of various detergents

Reagents \ Detergent	Tap water (10 <sup>5</sup> )	Tap water (5×10 <sup>5</sup> )	Kitchen detergent	Laundry detergent (powder)	Laundry detergent (lysis)	Bathroom detergent (NaOCl)	Liquid detergent
<b>LMG</b>							
Detergent only	-	-	+	+	+	-	+
Blood with detergent	+	+	+	+	+	-	+
<b>Guaiac</b>							
Detergent only	-	-	-	-	-	+	-
Blood with detergent	+	+	+	+	+	+	+

+, positive; -, negative

**Table 5.** Effect of various chemicals

Reagents	chemicals	Mg	Amido black	Indo methacin	FeO	Luminol	Na <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	FeCl <sub>3</sub>	CuSo <sub>4</sub>	Iodine	LCV*	Fuschin acid
LMG												
Chemical only		-	±	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Blood with chemical		+	±	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Guaiac												
Chemical only		-	±	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Blood with chemical		+	±	+	+	+	-	+	+	+	+	-

\*LCV : Leucocrystal violet. +, positive; -, negative; ±, trace

**Table 6.** Effect of storage temperature on the stability of bloodstain

Tests	Temperature Days	-20°C		4°C		RT*		37°C		56°C	
		7	14	7	14	7	14	7	14	7	14
LMG		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Guaiac		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

\* RT : room temperature. +, positive; -, negative

**Table 7.** Heat stability of bloodstain

Tests	Boiling time (min)	5	10	15	20
LMG		+	+	+	+
Guaiac		+	+	+	+

+, positive; -, negative

LMG 시약의 경우 버섯, 양배추에서 위양성을 보였으나, human blood test kit(FOB kit) test 결과 음성의 결과를 나타냈다. 또한 대부분의 사람들이 위의 채소 등을 조리된 상태로 섭취하는 경우가 많으므로 100°C에서 30분간 조리 후 두 가지 시약 모두에 다시 적용한 경우에는 음성의 결과를 보여 이는 조리되지 않은 상태에서는 peroxide 활성물질을 함유하고 있는 관계로 위양성의 결과를 보였으나 조리된 상태에서는 peroxide 활성물질이 모두 파괴되어 음성으로 관찰되었다(Data not shown).

### 3. 혈흔예비검사 시약의 안전성

혈액을 100배 희석하여 다양한 온도(-20°C, 4°C, 상온, 37°C, 56°C)에서 1주와 2주간 보관한 경우(Table 6), 96°C에서 5분, 10분, 15분, 20분간 끓인 경우(Table 7), 부패에

관여하는 세균 *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*에 적용한 경우(Table 8) 모두에서 LMG 시약과 Guaiac 혼합물 시약 모두 아무런 영향을 받지 않는 것으로 관찰되었다.

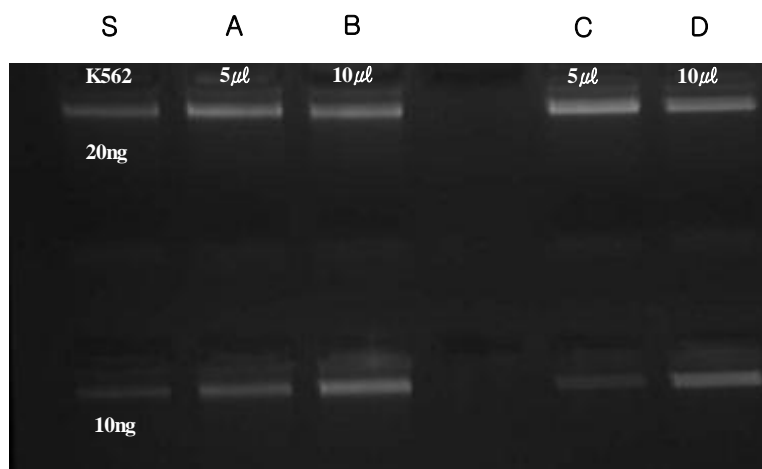
### 4. 혈흔예비검사용 Guaiac 혼합물 시약이 DNA에 미치는 영향

DNA를 분리 후 2% agarose 전기영동과 real-time PCR로 DNA를 정량하였을 때 Guaiac 혼합물 시약을 처리한 혈흔 시료가 처리하지 않은 시료에 비해 약 10% 정도 회수율이 감소하였으나, 이는 PCR에 있어서는 별다른 차이를 보이지 않았으며(Fig 3), DNA profiling에 있어서도 별다른 차이 없이 유전자형이 검출 및 분석 가능하여 Guaiac 혼합물 시약은 범죄현장에서 채취한 혈흔에 대해 예비검사 시약으로 사용하여도 아무런 영향을 미치지 않

**Table 8.** Effect of bacteria on the stability of blood stain

Tests	Bacteria		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>
LMG			
bacteria only	-	-	-
bloodstain with bacteria	+	+	+
Guaiac			
bacteria only	-	-	-
bloodstain with bacteria	+	+	+

+, positive; -, negative



**Fig. 3.** Agarose gel electrophoresis and real-time quantitative PCR results of DNA isolated from bloodstain. A, B : bloodstain with Guaiac, C, D : bloodstain only.

는 것으로 나타났다(Fig 4).

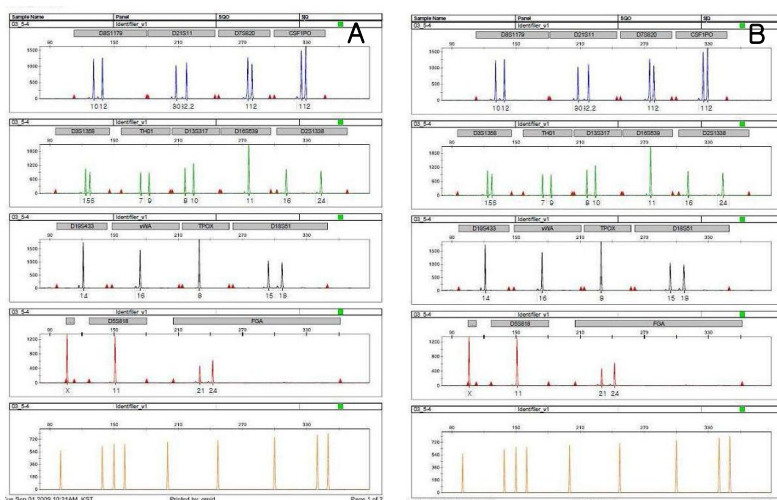
#### IV. 고 찰

범죄현장에 남겨져 있는 혈흔은 피의자 및 피해자와의 대조를 통해 개인 식별이 가능하다(Klitschar, 2000; Lim 등, 2004; Zubakov 등, 2008), 이러한 이유로 사건 현장이나 증거물에서 혈흔을 찾고 확인하는 것은 매우 중요하다(Kent 등, 2003; Creamer 등, 2005). 일단 혈흔을 찾게 되면 LMG나 루미놀 등 여러 가지 혈흔예비검사와 FOB kit로 인혈검사 실시 후 유전자 분석을 실시하게 된다. 그러나 현재 국내뿐만 아니라 전 세계적으로 혈흔예비검사에 사용되어지는 대부분의 시약들이 비특이적 반응과 혈흔의 유전자 분석에 영향을 미칠 수 있다고 보고되고 있

다(Lee 등, 1999; Zubakov 등, 2008; Marrone 등, 2009).

본 연구에서는 대변 내 잠혈을 검출하는 시약(Johne 등, 2001; Kronborg, 2002; Gondal 등, 2003; Hoff 등, 2004) 등에 이용되고 있는 Guaiac resin을 첨가하여 제조한 혼합물 시약으로 LMG와 루미놀 등 기존 시약들의 문제점을 해결하여 법의학적 혈흔검사 시약으로 적용하였다.

병원에서 대장암을 1차 선별검사 하는데 Guaiac을 이용한 시약은 대변 내 잠혈을 검출하는데 있어 매우 유용한 것으로 보고되었다(Johne 등, 2001; Gondal 등, 2003; Hoff 등, 2004). 본 연구결과에서도 Guaiac 혼합물 시약의 민감도는 최소  $1 \times 10^5$ 배 까지 희석된 혈액도 검출 가능하였으며, 이는 Lim 등(2004)이 보고한 최소  $1 \times 10^2$ 배 까지 희석된 혈액까지 검출 가능한 기존 혈흔예비시험 시약인 LMG보다 훨씬 더 우수한 결과를 보였다. 혈흔이 묻어 있는 기질의 종류에 따라서도 결과에 영향을 받지 않고



**Fig. 4.** DNA profiling after automated DNA preparation. DNA sample from bloodstains were analyzed on an ABI prism™ 3730 Genetic analyzer and GeneMapper Software. A : bloodstain with Guaiac, B : bloodstain only.

LMG나 Guaiac 혼합물 모두 반응하였다.

LMG나 루미놀의 경우 혈흔 이외에 금속류와 화학물질, 과산화 물질을 함유한 채소류나 과일 등에도 반응할 수 있어 높은 위양성률을 보일 수 있다고 보고되고 있다 (Lee 등, 1999; Zubakov 등, 2008; Marrone 등, 2009). Guaiac 역시 병원에서 대변 내 잠혈검사에서도 금속류나 육류섭취, 시금치 등 대부분의 채소류나 과일 등에도 반응할 수 있어 대장암 1차 선별검사에서도 위양성을 보일 수 있다고 보고되고 있다 (Mandel 등, 2000; Vilkin 등, 2005; Smith 등, 2006; Yoo 등, 2009). 그러나 본 시험에서는 우리가 흔히 섭취하는 버섯과 양배추, 무를 제외한 채소류나 과일 21종에 대해서 교차반응을 보이지 않고 두 시약 모두 특이성이 뛰어난 것으로 나타났으며, 무우, 양배추, 버섯의 경우 조리되지 않은 상태에서는 위양성을 보였으나, 조리된 상태에서는 반응을 하지 않아 실제 사건 현장에서는 대부분 조리된 상태로 섭취한 경우가 대부분이므로 병원에서 위양성 반응의 경우가 실제 법의학적 검사용으로 적용하는데 크게 문제가 되지 않을 것으로 판단된다. 금속류나 화학물질에 있어서는 LMG의 경우 현저하게 특이성이 떨어지는 반면, Guaiac 혼합물의 경우 몇 가지 금속과 화학물질을 제외한 대부분에서 더 우수한 결과를 보였으며, 위양성을 보인 경우에는 매 시험마다 Guaiac 혼합물과 특이성과 민감도가 우수한 면역크로마토그래피 검사원리의 인혈확인 검사를 실시 (Castiglione

등, 1992; Lim 등, 2004)한다면 해결될 수 있을 것으로 판단된다.

또한 미생물에 의한 교차반응을 확인하고자 사건현장에서 채취한 인체분비물에서 *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* 등의 대표적인 미생물을 분리하여 보고한 (Kim, 2001) 연구결과와 같이 실제 사건현장에서 채취한 인체분비물을 배양하여 분리된 여러 미생물 중 *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* 등을 LMG와 Guaiac 혼합물에 적용한 결과 미생물과 부패된 혈액에 대해서도 전혀 영향을 받지 않는 등, 온도, 열, 보관기간에도 전혀 영향을 받지 않고 양성으로 반응하는 것을 확인, Lim 등(2004)이 보고한 LMG의 실험 결과에 비하여 특이성이나 안전성 면에서 크게 차이가 없거나 더 우수한 결과를 확인할 수 있었으며, 또한 Guaiac 혼합물 시약의 경우 Lim 등(2004)이 혈흔에 민감도가 높은 시약일수록 위양성 반응에 대한 민감도도 높아진다고 보고한 연구결과와 대조적으로 민감도는 높은 반면, 위양성 반응은 적게 나타났다.

혈흔예비검사 시약과 Guaiac 혼합물 시약이 DNA 정제 및 유전자형 분석에 미치는 영향을 알아보았다. 최근의 연구결과를 보면 암실 조건 하에 형광반응을 이용하여 혈흔을 검출하는 루미놀 등의 경우 아무런 시약도 처리하지 않은 혈액에 비해 50% 정도 DNA 정제 및 유전자형 분석에 영향을 미칠 수 있다고 보고되었으며 (Walsh 등 1992; Nussbaumer 등, 2006; Zubakov 등, 2008; Marrone



등, 2009), Lim 등 (2004)은 루미놀 등을 제외한 LMG 등 대부분의 혈흔예비검사 시약의 경우 DNA 정제 및 유전자형 분석이 불가능하다는 연구결과를 보고하였다. 그러나 Guaiac 혼합물 시약의 경우 시약을 처리한 혈흔 시료가 처리하지 않은 시료에 비해 약 10% 정도 DNA 회수율이 감소하였으나, 이는 PCR에 있어서는 별다른 차이를 보이지 않았으며, DNA profiling에 있어서도 별다른 차이 없이 유전자형이 검출 및 분석 가능하여 범죄현장에서 채취한 혈흔에 대해 예비검사 시약으로 사용하여도 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

지금까지의 연구결과에서 혈흔에 대한 민감도, 특이성, 안정성, 인체유해성, 제조비용 등을 고려할 때 LMG 등 기존 혈흔예비검사 시약보다는 Guaiac 혼합물 시약이 법의학 실험실과 법과학 실험실, 사건현장에서의 혈흔예비검사 시약으로 가장 적합할 것으로 판단되어지며, 혈흔 검출 후 사건 해결에 가장 결정적인 단서를 제공 가능한 유전자감식에 있어 기존의 혈흔예비검사 시약들의 경우 미량의 혈흔에 직접 처리하면 이어지는 DNA 정제와 유전자 감식이 불가능할 수 있으므로 천연물질로서 유전자 분석에 전혀 영향을 미치지 않는 Guaiac 혼합물 시약을 적용하는 것이 가장 효율적일 것으로 사료되어진다.

## 감사의 글

본 연구는 2009년 경찰청 과학수사 기법개발 연구지원에 의한 것으로 특허출원 완료된 것임.

## 참 고 문 헌

1. Castiglione G, Grazzini G, Ciatto S. Guaiac and immunochemical tests for faecal occult blood in colorectal cancer screening. *Br J Cancer* 65:942-944, 1992.
2. Creamer JJ, Quickenden TI, Crichton LB, Robertson P, Ruhayel RA. Attempted cleaning of bloodstains and its effect on the forensic luminol test. *Luminescence* 20(6):411-413, 2005.
3. Lee DS, An HJ, et al. The study on the nonspecific reactions of vegetables and soil for the bloodstain examination. *Kor Annu Rept Natl Inst Sci Invest* 31:182-188, 1999.
4. Barni F, Lewis SW, Berti A, Miskelly GM, Lago G. Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta* 72(3):896-913, 2007
5. Garner DD, Cano KM, Peimer RS, Yeshion TE. An evaluation of tetramethylbenzidine as a presumptive test for blood. *J Forensic Sci* 21:816-821, 1976.
6. Gondal G, Grotmol T, Hofstad B, Bretthauer M, Eide TJ, Hoff G. The Norwegian Colorectal Cancer Prevention (NORCCAP) screening study: baseline findings and implementations for clinical work-up in age groups 50-64 years. *Scand J Gastroenterol* 38:635-642. 2003.
7. Hoff G, Grotmol T, Thiis-Evensen E, Bretthauer M, Gondal G, Vatn MH. Testing for faecal calprotectin (PhiCal) in the Norwegian Colorectal Cancer Prevention trial on flexible sigmoidoscopy screening: comparison with an immunochemical test for occult blood (FlexSure OBT). *Gut* 53(9):1329-1333, 2004.
8. Bae JH, Yun YS, Yoon SH, et al. Extraction Methods for Recovering Malachite Green and Leucomalachite Green. *J Kor Fish Soc* 41(1):13-19. 2008.
9. Johne B, Kronborg O, Tøn HI, Kristinsson J, Fuglerud P. A new fecal calprotectin test for colorectal neoplasia. Clinical results and comparison with previous method. *Scand J Gastroenterol* 36:291-296, 2001.
10. Kent EJ, Elliot DA, Miskelly GM. Inhibition of bleach-induced luminol chemiluminescence. *J Forensic Sci* 48(1):64-67, 2003.
11. Klintschar M, Neuhuber F. Evaluation of an alkaline lysis method for the extraction of DNA from whole blood and forensic stains for STR analysis. *J Forensic Sci* 45:669-673, 2000.
12. Kohn J, O'Kelly T. An ortho-tolidine method for the

- detection of occult blood in faeces. *J Clin Pathol* 8:249-251, 1955.
13. Kronborg O. Screening for colorectal cancer in the average-risk population. *Semin Colon Rectal Surg* 13:16-30, 2002.
  14. Kim KH. Study on the various body fluid culture. *Kor Annu Rept Natl Inst Sci Invest* 33:149-155, 2001.
  15. Dilbeck L. Use of Bluestar Forensic in Lieu of luminol at Crime Scenes. *J Forensic Identif* 56(5):706, 2006.
  16. Lomholt B, Keiding N. Tetrabase, an alternative to benzidine and orthotolidine for detection of hemoglobin in urine. *Lancet* 1:608-609, 1977.
  17. Mandel JS, Church TR, Bond JH, Ederer F, Geisser MS, Mongin SJ, Snover DC, Schuman LM. The effect of fecal occult-blood screening on the incidence of colorectal cancer. *N Engl J Med* 343:1603-1607, 2000.
  18. Marrone A, Ballantyne J. Changes in dry state hemoglobin over time do not increase the potential for oxidative DNA damage in dried blood. *PLoS One* 4:1-8, 2009.
  19. Nagy M, Otremba P, Krüger C, Bergner-Greiner S, Anders P, Henske B, Prinz M, Roewer L. Optimization and validation of a fully automated silica-coated magnetic beads purification technology in forensics. *Forensic Sci Int* 152:13-22, 2005.
  20. Nussbaumer C, Gharehbaghi-Schnell E, Korschneck I. Messenger RNA profiling: a novel method for body fluid identification by real-time PCR. *Forensic Sc. Int* 157(2-3):181-186, 2006.
  21. Walsh PS, Varlaro J, Reynolds R. A rapid chemiluminescent method for quantitation of human DNA. *Nucleic Acids Res* 20(19):5061-5065, 1992.
  22. Tobe SS, Watson N, Daéid NN. Evaluation of six presumptive tests for blood, their specificity, sensitivity, and effect on high molecular-weight DNA. *J Forensic Sci* 52(1):102-109, 2007.
  23. Lim SK, Park KW, Choi SK. Identification of human blood using Rapid FOB (Fecal Occult Blood) test kit. *Anal Sci Tech* 17(3):211, 2004.
  24. Smith A, Young GP, Cole SR, Bampton P. Comparison of a brush-sampling fecal immunochemical test for hemoglobin with a sensitive guaiac-based fecal occult blood test in detection of colorectal neoplasia. *Cancer* 107:2152-2159, 2006.
  25. Yoo SJ, Moon SJ, Gwack EH, Shin BM. Influence of the pre-analytical specimen storage conditions on the fecal occult blood test results *Korean J Lab Med* 29:262-267, 2009.
  26. Vilkin A, Rozen P, Levi Z, Waked A, Maoz E, Birkenfeld S, Niv Y. Performance characteristics and evaluation of an automated-developed and quantitative, immunochemical, fecal occult blood screening test. *Am J Gastroenterol* 100:2519-2525, 2005.