

권은실, 조은민
김수훈, 강소영

출토 인골
DNA의 real-time
PCR 정량에 의한
보존상태
평가 연구

- 부여 오수리 출토 인골을 중심으로

13»

출토 인골 DNA의 real-time PCR 정량에 의한 보존상태 평가 연구 - 부여 오수리 출토 인골을 중심으로 -

권은실, 조은민, 김수훈, 강소영¹

국립문화재연구소 보존과학연구실



Evaluation of the preservation state of human skeletal remains using real-time PCR

Eun-Sil Kwon, Eun-Min Cho, Sue-Hoon Kim, Soyeong Kang¹

Conservation Science Division, National Research Institute of Cultural Heritage

¹Corresponding Author : soyeong. kang@korea.kr

| 초록 |

본 연구는 충청남도 부여군 규암면 오수리 유적에서 발굴된 인골 4개체를 대상으로 조직학, 분자유전학, 골화학 분석 등 종합적인 연구를 통해 이들의 상관관계를 규명하고자 하였다. 실체현미경을 통해 인골 시료의 골조직 단면 구조를 관찰함으로써 각 시료의 조직학적 보존 상태를 단계별로 구분하였고, 잔존하는 단백질의 보존 상태는 콜라겐을 추출하여 수율을 측정함으로써 평가하였다. 또한 미토콘드리아 *cytochrome b* 유전자를 이용한 실시간 유전자 증폭법을 이용하여 각각의 인골 시료에 잔존하는 미토콘드리아 DNA의 상대적 보존량 및 복제수를 분석하였으며, 미토콘드리아 과변위부위의 염기서열을 동정하였다. 본 연구 결과 인골 시료의 조직학적 보존정도, 콜라겐 단백질의 잔존량, 미토콘드리아 DNA의 복제수는 상호 긍정적인 연관관계로 나타났다. 이 연구는 출토 인골의 생물·화학적 분석 가능성을 예측하기 위한 특성지표 연구의 중요 자료로 활용 될 수 있을 것이다.

주제어: 미토콘드리아 DNA, 조직학 분석, 콜라겐, 중합효소연쇄반응, 실시간 유전자 증폭법

| ABSTRACT |

In this study molecular genetic analysis was carried out on 4 human skeletal remains from Osuri, Buyeo. We showed that real-time PCR is the method of the choice to assess the initial number of genuine ancient DNA molecules. Human mitochondrial DNA quantification was accomplished by

*접수: 2011. 9. 30 *수정: 2011. 10. 27 *게재확정: 2011. 11. 10

the real-time PCR for the *cytochrome b* gene of the mitochondria. Histological results proved to be a good potentiality for biochemical analysis using biomolecule. The level of specimen's preservation state was proved that level of quantitative result was BO-04, BO-01, BO-03, BO-02. Continually, we showed that biochemical and biomolecule results for the level of preservation state were similar. This study will be useful to important material for predicting biochemistry and biology analysis of the ancient bone.

Key Words: mitochondrial DNA, histological analysis, bone collagen, polymerase chain reaction, real-time PCR

1. 서론

뼈 조직의 기본 단위인 골공동계(haversian system)는 치밀골(compact bone)을 구성하는 뼈 조직의 기본 단위로서 뼈의 긴 장축과 평행한 방향의 원통형의 구조로 이루어져 있다. 뼈에는 DNA를 포함하고 있는 세포가 지나가는 자리가 존재하는데 이를 세분해서 보면 골아세포, 골세포(osteocyte within a lacuna), 파골세포 등이 있다. 여기에서 골소강에 위치하는 골세포에서 대부분의 DNA가 추출된다. Hedges 등(1995)에 따라 인골 조직의 보존상태를 단계적으로 구분하여 평가하기 위해 조직학 지수를 사용하였다(Table 1). 그러나 고인골의 조직분석

만으로 분자 수준의 보존상태까지 평가하는데 한계가 있으므로 골화학 및 분자유전학적 분석의 보완이 필요한 것으로 알려져 있다(Hofreiter et al., 2001).

중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 기술은 극소량의 고인골 DNA 증폭을 위해 상당히 유용한 기술로 활용되고 있다.(Holland et al., 1991). 특히 실시간유전자 증폭법(real-time PCR)은 극소량 남아 있는 고인골 DNA의 초기 농도를 측정함으로써 고인골 DNA의 정량적인 보존 상태를 판별 할 수 있는 매우 유용한 방법이다(Ian et al., 2002).

미토콘드리아 DNA의 과변이부위는 유전자 변이가 많은 부위로서, 개인마다 다른 DNA 변

Table 1. Histological Index values assigned to summarize the degree of diagenetic change(Hedges, 1995)

Index	Approx. % of intact bone	Description
0	< 5	No original features identifiable, other than Haversian canals
1	< 15	Small areas of well preserved bone present, or some lamellar structure preserved by pattern of destructive foci
2	< 33	Clear lamellate structure preserved between destructive foci
3	> 67	Clear preservation of some osteocyte lacunae
4	> 85	Only minor amounts of destructive foci, otherwise generally well preserved
5	> 95	Very well preserved, virtually indistinguishable from fresh bone

이 유전자를 보유하고 있으며, 모계로부터만 유전되기 때문에 모계 계통학적 연구에 유용하게 쓰인다(Lee et al., 2006)

본 연구는 부여 오수리에서 출토된 4구의 인골을 대상으로 조직학 분석, 콜라겐 수율 분석, 하플로그룹 분석을 수행함과 동시에 real-time PCR법을 통해 인골 시료에 잔존하는 미토콘드리아 DNA의 상대적 보존량 및 복제수를 분석함으로써 각각의 특성지표와 보존상태 간의 종합적인 상관관계를 밝히고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 분석대상

충남 부여 오수리 해발 20~41m 내외의 남동 사면에 걸쳐 분포한 A-3 지점에서 고려~조선 시대로 추정되는 고분이 조사되었다(한얼문화유산연구원, 2010). 이 가운데 회곽묘 112호, 121호, 126호에서 출토된 인골과 석곽묘 116호에서 출토된 인골 등 총 4개체를 대상으로 분석

Table 2. The information of excavated human bones

No.	Site area	Site name	Sample number	Burial type
1	A-3	112 site	BO-01	Lime layered tomb
2		116 site	BO-02	Stone-lined tomb
3		121 site	BO-03	Lime layered tomb
4		126 site	BO-04	Lime layered tomb

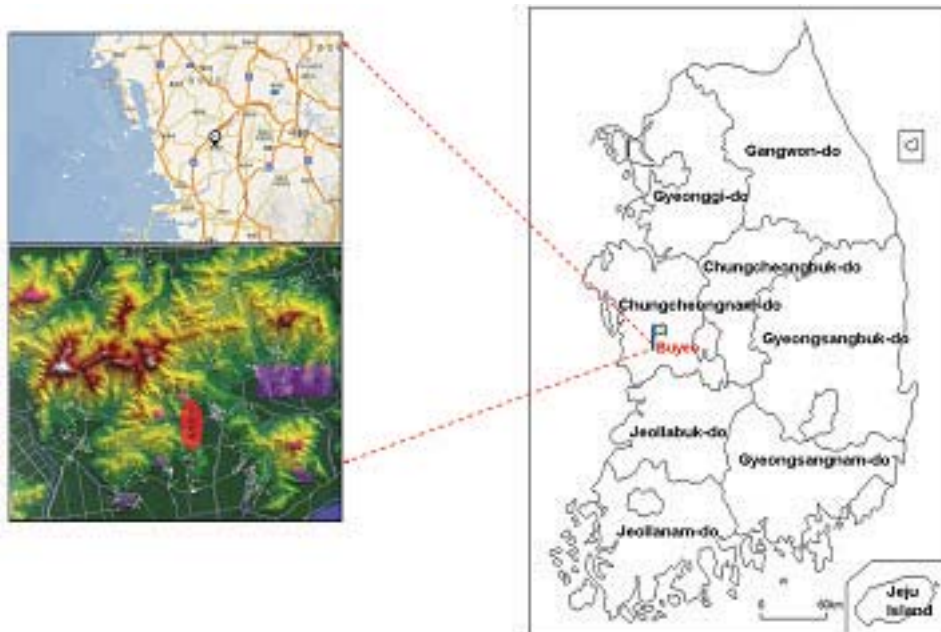


Fig. 1. The map of the Osu-ri site, Buyeo that was located in the middle western part of Korea

하였다(Fig. 1, Table 2). 발굴된 인골은 별도의 전처리 및 수세 과정 없이 멸균된 시료봉투에서 25-30%의 습도와 상온 상태를 유지하면서 보관되었다.

2.2 출토 인골의 오염방지 및 전처리

인골 시료의 DNA 분석 시 실험용 방진복 및 마스크를 착용하여 실험자에 의한 오염을 차단하였으며, 실험 기구는 DNA-OFF™(Takara) 처리 및 멸균 소독 후 30분 동안 자외선을 처리하여 외부 오염원을 가급적 제거하였다. 또한 DNA 추출 및 증폭 과정과 증폭 후 과정은 서로 분리된 공간에서 진행하였다.

DNA 및 조직학 분석을 위한 시편은 모두 대퇴골에서 분리하였다. 치과용 연마기를 이용하여 표면을 약 1mm 정도 연마함으로써 인골의 표면오염물질(토양, 미생물 등)을 제거하였다. DNA 분석용 시료는 6% 차아염소산나트륨(sodium hypochlorite, Sigma)을 10분간 처리한 후 자외선을 15분 처리하여 오염물을 제거하였으며 조직학 분석을 위한 시편은 오염물 제거를 위한 별도의 과정을 거치지 않았다. DNA 분석을 위한 인골시편은 동결분쇄기(Freezer/Mill 6770, SPEX SamplePrep)를 이용하여 분말 상태로 제조된 후 실험 전까지 -20℃에서 보관되었다.

2.3 조직학적 분석

조직 분석용 시편은 대퇴골 중앙의 수직 단면을 원호(약 5×7mm)모양으로 절단하여 에폭시수지로 고착하고 연마지로 연마한 후 3μm와 1μm의 광택천으로 가공하여 준비되었다. 연마한 조직

표면은 실체현미경(Axiotech 100HD, Carl Zeiss)을 이용하여 x10, x20 배율로 관찰한 후 골공동계의 보존상태에 따라 조직학적 지수를 평가하였다.

2.4 콜라겐 추출

콜라겐 추출을 위한 인골의 전처리는 6% 차아염소산나트륨 수용액 처리 과정을 제외하고 DNA 분석과 동일하게 수행하였다. 인골에 남아있는 콜라겐의 수율을 확인하기 위하여 Lon-gin 방법을 개선한 추출법으로 콜라겐을 분리하였다(Brown et al., 1988; Richards and Hedges, 1999). 탈광화(demineralization)를 위해 인골 시료의 가루 약 500mg을 시험관에 넣고 0.5M HCl을 첨가하여 4℃에서 시료 상태에 따라 16~24시간 동안 반응하였다. 반응된 시료는 원심분리하여 상층액을 제거한 후 washing 과정을 2회 반복하였다. pH 3 HCl을 넣은 후 75℃에서 48시간 동안 가열하여 콜라겐 단백질을 젤라틴화(gelatination)하였고, 젤라틴화된 콜라겐은 불순물을 제거한 후 동결건조(lyophilization)하였다. 최종적으로 확보한 콜라겐은 분석 전까지 -20℃까지 보관하였다.

2.5 출토 인골 DNA 추출

Yang 등(1998)이 제시한 방법을 변형하여 다음과 같이 DNA를 추출하였다. 0.5g의 인골 분말 시료에 Lysis buffer(2mg proteinase K, 10% SDS, 0.5M EDTA pH 8.0)를 혼합하여 탈칼슘화 및 세포용해 반응을 상온에서 48시간 동안 수행하였다. 반응이 끝난 혼합액을 14,000rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액만 추출한 후

컬럼(QIAquick spin column, Qiagen)을 이용하여 최종 100 μ l로 정제하였다.

2.6 실시간 유전자 증폭을 통한 DNA 양 정량

1) 표준물질 제작

인골 당 미토콘드리아 DNA를 정량하기 위해 미토콘드리아 DNA 유전자 중 변이가 거의 없는 것으로 알려진 Cyt b(*cytochrome b*)를 선택하였다(Fig. 2). 실시간 유전자 증폭에 필요한 표준물질 제작을 위해 현대인의 혈액으로부터 추출한 미토콘드리아 DNA를 주형으로 하고 Cyt b 증폭에 forward primer: 5'-GGAC-TATTCCTAGCCATGCACTACT-3'과 reverse primer: 5'-GTAGCGGATGATTCAGC-CATAAT-3'을 고안하여 미토콘드리아 DNA

부위 중 102 bp를 증폭하였다. PCR 증폭 후 QIAquick PCR purification kit로 정제하였으며 pGEM-T easy vector system(Promega)을 이용하여 pGEM-T easy vector에 삽입하였다. 형질전환이 일어난 colony 중 5개를 선택하여 LB 배지에 18시간 배양한 뒤 플라스미드 DNA를 추출하였다. Cyt b 부위가 삽입된 플라스미드 DNA는 *Eco*RI 제한효소 분석으로 확인하였다(Seong et al., 2004).

자외선 분광광도계(Eppendorf)를 이용하여 플라스미드 DNA의 농도를 측정 후 이 중 높은 농도의 플라스미드 DNA를 선택하여 1 μ l당 복제수(copy numbers)를 계산하였다[1 μ l당 복제수(number of copies/ μ l) = (concentration of DNA)/(660 x size of dsDNA / Avogadro's number)]. 표준곡선에 포함될 표준물질의 농도 범위를 정하기 위해 10⁸~10² 배로 1/10씩 단계

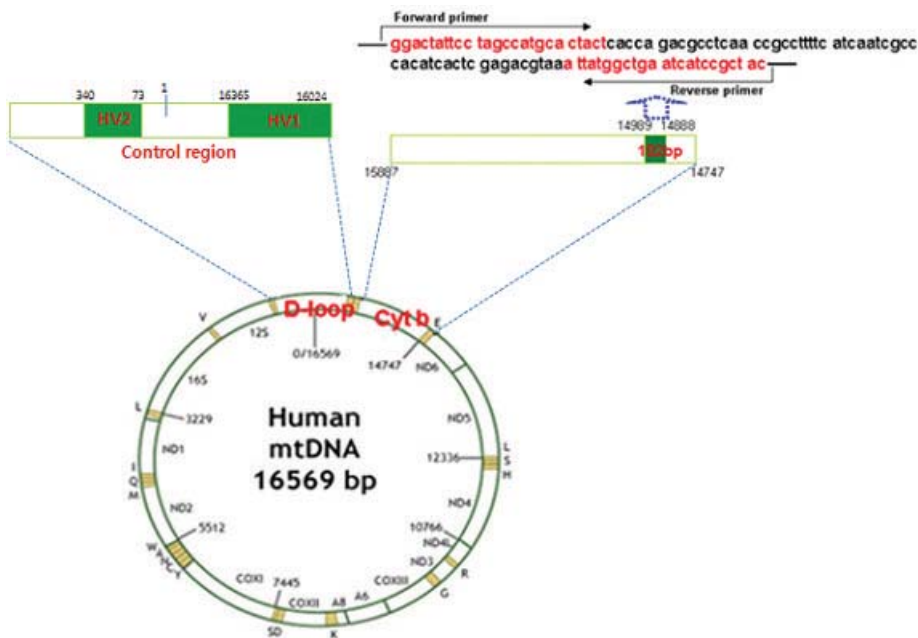


Fig. 2. The human mitochondrial genome

별로 희석한 물질을 주형으로 실시간 유전자 증폭을 실시해 각각의 Ct값(cycle threshold)을 산출하였다. 상관계수 R²은 0.98이상을 사용하였다.

2) 미토콘드리아 DNA 실시간 유전자 증폭

Cyt b를 포함하여 증폭한 DNA의 측정량을 실시간으로 모니터링이 되기 위하여 SYBR green 1을 사용하였다. Cyt b 정량에 이용된 PCR primer는 표준물질제작에 이용된 것과 동일하게 사용하였다. PCR 반응액은 DNA 2 μ l, 2xSYBR Premix-Ex Taq II (Takara) 12.5 μ l, primer를 각각 1 μ l 포함하여 총 25 μ l를 만들었다. Smart Cyclyer II system(Takara)에서 95 $^{\circ}$ C에서 30초간 denature시킨 후, 95 $^{\circ}$ C에서 5초간 rednature 된 후, 58 $^{\circ}$ C에서 30초 동안 annealing 되어 총 45회의 증폭을 시행하였다. 모든 반응은 정량 결과에 대한 확실성 평가를 위해 각 시료에 대한 증폭을 2번 반복하여 정량하였다.

2.7 미토콘드리아 DNA 하플로그룹 결정을 위한 종합효소연쇄반응 및 염기서열 분석

미토콘드리아 DNA의 하플로그룹을 결정하기 위하여 과변이부위(hyper variation region, HVR)를 분석하였다(Fig. 2). 미토콘드리아 DNA 증폭에 사용된 primer는 지상현 등(2008)을 참고하여 증폭 산물이 185~215bp가 되도록 제작하였다(Table 3). 인골에서 추출한 DNA를 증폭하기 위해 AmpliTaq Gold DNA polymerase 3units, 10pmol primer pairs 3 μ l, 2.5mM dNTPs 3 μ l, 10x gold buffer 3 μ l, MgCl₂ 2 μ l를 첨가 한 후, 3차 증류수를 이용해 최종 30 μ l에 맞추어 제조하였다. DNA 증폭장치(Veriti Thermal Cyclyer, Applied Biosystems)를 사용하여 94 $^{\circ}$ C에서 30초 denaturation, 54~56 $^{\circ}$ C에서 30초 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 extension의 주기로 40회 반응하였으며, 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 last extension시켰다. PCR 반응을 수행 한 후, 자동

Table 3. Primers used for HVR region amplification of mitochondrial DNA

Region	Sequence(5'-3')	Amplicon Size(bp)
HVR I	TAAAACGACGGCCAGTTTAACTCCACCATTAGCACC	215
	AACAGCTATGACCATGCAGGTGGTCAAGTATTATGGT	
	TAAAACGACGGCCAGTGCCAGCCACCATGAATATTGT	185
	AACAGCTATGACCATGTGGCTTTGGAGTTGCAGTTG	
	TAAAACGACGGCCAGTCCCATTGCTTACAAGCAAGT	198
AACAGCTATGACCATGGGGATTTGACTGTAATGTGCTAT		
TAAAACGACGGCCAGTCAACTGCAACTCCAAGCCA	204	
AACAGCTATGACCATGGAGGATGGTGGTCAAGGGAC		
HVR II	TAAAACGACGGCCAGTCACCCTATTAACCACTCACG	203
	AACAGCTATGACCATGCCTGTAATATTGAACGTAGGTGCGAT	
	TAAAACGACGGCCAGTCCCTATGTCGAGTATCTGTCTTT	195
	AACAGCTATGACCATGTGTGTGGAAGTGGCTGTGC	
	TAAAACGACGGCCAGTGGCGAACATACTTACTAAAGTGTGT	202
	AACAGCTATGACCATGGTTTGGCAGAGATGTGTTTAAG	
TAAAACGACGGCCAGTCTTAAACACATCTCTGCCAAAC	185	
AACAGCTATGACCATGTGAGATTAGTAGTATGGGAG		

전기영동장치(HDA-GT12, eGene)를 이용하여 증폭산물을 확인하였다. 확인된 증폭산물은 정제 후 자동염기서열 분석 장치(Applied Biosystems)를 이용하여 분석하였다.

3. 결과

3.1. 조직 분석에 의한 인골의 보존상태

부여 오수리 인골 골조직의 보존상태를 분석한 조직학 사진과 조직학 지수 평가표를 나타냈다. 이 사진은 실체현미경을 사용하여 x10과 x20으로 촬영하였다. BO-01은 손상된 부위가 관찰되지만 골층판(lamella), 골세포가 모두 잘 남아 있고 85% 이상 보존 상태가 관찰됨으로 조직학 지수 4로 평가하였다. BO-02는 골층판과 골세포 모두 손상된 모습을 보이고 전체적으로 15% 이하의 보존 상태가 관찰되어 조직학 지수 1로 평가하였다. BO-03는 인골의 중심관(haversian canal)이 잘 남아 있고, 손상된 골소강 내 골세포 안에서도 골층판은 잘 남아 있는 것으로 보아 조직학 지수 3으로 평가하였다.

BO-04는 골층판, 골세포, 중심관이 거의 완전한 형태로 보존이 되어 있고 전체적으로 95% 이상의 완전한 보존상태가 관찰되어 조직학 지수 5로 평가하였다(Fig. 3, Table 6).

3.2. 콜라겐 수율

약 500mg의 골조직으로부터 콜라겐을 추출한 후 동결 건조하여 수율을 계산하였다. BO-04가 5% 이상의 수치로 최대의 값을 산출한 것과 상반되게 BO-02는 0.07%로서 0%에 가까운 최소값의 결과를 얻었으며 BO-01과 BO-03은 각각 4.94%, 3.90%의 수율값을 산출하였다(Table 6).

3.3. 실시간 유전자 증폭을 통한 옛날 DNA 정량

부여 오수리 출토 인골에서 추출한 DNA 시료의 real-time PCR 결과를 표준 곡선(Fig. 4)에 대입하여 각 시료의 미토콘드리아 DNA 복제수를 확인하였다(Fig. 5, Table 4). BO-01,

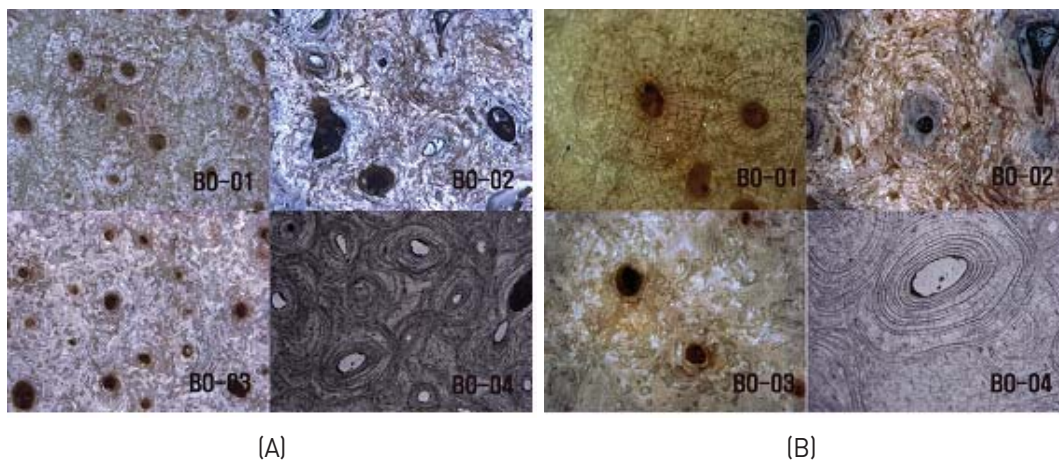


Fig. 3. Histological pictures of ancient bone samples. (A) ×10, (B) ×20

BO-03, BO-04의 복제수는 평균 3491.16 copies/ μ l, 2303.87 copies/ μ l, 19806.86 copies/ μ l의 값을 얻을 수 있었지만, BO-02는

표준물질 농도보다 적은 복제수를 가지고 있어 표준물질 농도 범위에서는 측정 할 수 없었다.

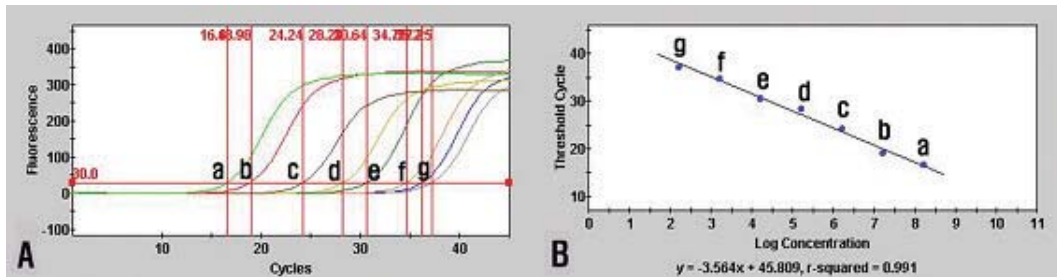


Fig. 4. Amplification plot(A) and standard curve(B) of the Cyt b as a mitochondrial target with concentrations of a: 1.62×10^8 copies/ μ l, b: 1.62×10^7 copies/ μ l, c: 1.62×10^6 copies/ μ l, d: 1.62×10^5 copies/ μ l, e: 1.62×10^4 copies/ μ l, f: 1.62×10^3 copies/ μ l, g: 1.62×10^2 copies/ μ l

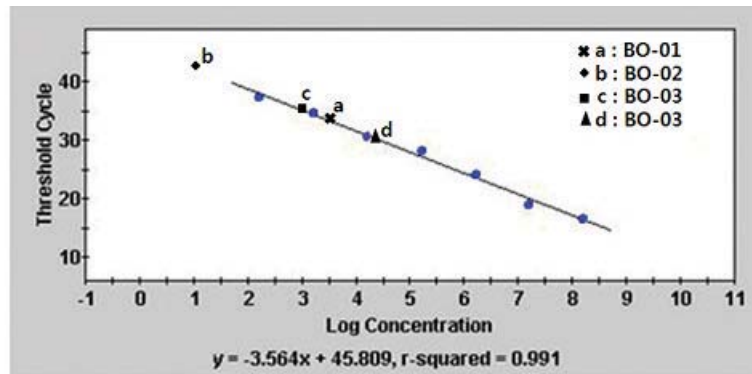


Fig. 5. Mitochondrial DNA quantification curve of ancient bones

Table 4. Quantification of ancient DNA using real-time PCR

Sample No.	Repeat number	Cycle threshold (Cp)	The amount of copy numbers (copies / μ l)	Average of copy numbers (copies / μ l)
BO-01	2	33.09 33.40	3836.90 3145.42	3491.16
BO-02	2	ND* 41.38	ND ND	ND
BO-03	2	34.77 33.32	1307.90 3299.84	2303.87
BO-04	2	30.69 30.37	17802.54 21811.18	19806.86

*ND : non detected

3.4 피장자의 미토콘드리아 DNA 변이형 분석과 하플로그룹 동정

부여 오수리 유적 피장자의 미토콘드리아 DNA 변이형은 Table 5와 같이 분석되었다. 인골의 보존상태가 양호했던 것과 같이 DNA분석이 양호하였다. 4구의 인골 중 회곽묘에서 출토된 3구 인골의 미토콘드리아 DNA 과변이부위 I, II의 염기서열분석에 성공하였으며 석곽에서 출토된 BO-02 인골은 미토콘드리아 DNA분석에 실패하였다. 분석에 성공한 3구의 인골은 표준염기서열(rCRS)과 비교하여 각각의 변이에 대한 하플로그룹을 분석할 수 있었다. 회곽묘 피장자들을 분석한 결과, 각각 D4/G, A, D4j의 하플로그룹에 속하는 것을 확인하였다. D4/G, A, D4j그룹의 경우 한국, 중국 등 동아시아에 널리 분포하는 하플로그룹이며 동일한 모계관계가 성립되는 분석결과는 나타나지 않았다.

3.5 조직학적 분석, 콜라겐 수율, 미토콘드리아 DNA 양, 미토콘드리아 DNA 분석 성공률의 상관관계

조직학 지수, 콜라겐 수율, 미토콘드리아

DNA의 real-time PCR을 통한 미토콘드리아 DNA 정량 및 하플로그룹 분석결과의 상관관계를 비교한 결과를 Table 6에 나타내었다. 조직학 지수 평가 결과 BO-04 > BO-01 > BO-03 > BO-02의 순으로 판별되었다. 이어 이번 실험에 중점을 둔 real-time PCR로 얻을 수 있었던 인골 내의 미토콘드리아 DNA양을 직접 수치화하여 얻을 수 있었는데 그 DNA양 비교 결과 BO-04 > BO-01 > BO-03 > BO-02의 순으로 조직학 지수에서 일차 판별한 수치와 일치함을 알 수 있었다. 또한 콜라겐 수율 분석 결과 BO-04 > BO-01 > BO-03 > BO-02의 순으로 조직학 지수, 미토콘드리아 DNA양의 순과 모두 일치하는 결과를 얻을 수 있었다. 이어 미토콘드리아 DNA 분석 성공률에 있어서 조직학 지수가 1로 판별 되고, 미토콘드리아 DNA의 양과 콜라겐 수율도 최소인 결과를 얻었던 BO-02의 시료는 미토콘드리아 DNA 분석 결과를 얻을 수 없었다. 이 결과는 인골 조직 상태가 잘 남아 있을수록 손상되지 않은 미토콘드리아 DNA와 콜라겐을 함유하고 있음을 나타내고 있고, 조직 시료 상태와 DNA양 그리고 콜라겐의 수율이 미토콘드리아 DNA 성공률에 영향을 미치고 있음을 나타내 주고 있다.

Table 5. Results of nucleotide changes observed in the Osu-ri site individuals

Sample No.	HVR* I	HVR II
BO-01	73, 263	16223, 16362
BO-02	ND	ND
BO-03	73, 152, 235, 263	16223, 16290, 16319
BO-04	73, 263	16223, 16293, 16362

*HVR : hyper variable region

4. 고찰

최근까지 고인골 시료를 대상으로 옛날 DNA 분석은 PCR법에 의해 활발히 이루어져 왔다. PCR법을 이용하여 수백년 전의 인골을 대상으로 적은양의 DNA 분자를 증폭하여 기하급수적인 DNA양을 얻을 수 있게 되었다. 그러나 이는 시료가 오랜 시간 거쳐 오면서 외부 환경에 노출되어 있던 오염물과 현대 DNA의 오염원도 함께 증폭이 될 수 있기 때문에 목적하는 DNA만을 확인 할 수 있는 결과가 필요하다. 실시간 유전자 증폭 방법은 목적하는 DNA 증폭을 실시간으로 모니터링 할 수 있으며 DNA양을 수치화하여 얻을 수 있는 장점을 가지고 있어 PCR법의 한계를 보완할 수 있다(Hesibe, 2009). 본 연구는 부여 오수리에서 발굴된 조선시대 인골을 대상으로 특성 지표 결과와 미토콘드리아 DNA 분석 성공률의 비교를 통해 보존상태와의 상관관계를 연구하였다.

조직학 지수는 Hedges(1995)의 논문을 근거로 하여 조직의 보존상태를 판별하였으나 실험자의 숙련도 차이와 겉보기의 근본적인 부정확성에 의해 오차를 낳을 수 있다. 실험 결과를 볼 때에 조직학 지수의 순서와 미토콘드리아 DNA

정량, 콜라겐 수율이 일치하는 것을 확인하였다. 또한 real-time PCR로 인한 미토콘드리아 DNA 정량값과 콜라겐 수율 분석 후 얻은 결과를 근거로 하여 상대적 평가를 내렸을 때 그 순서가 일치하는 결과를 확인하였다. 이는 인골의 보존상태를 판별함에 있어 특성지표와 미토콘드리아 DNA 정량의 상관관계를 제시 할 수 있음을 의미한다. 조직학 지수 1인 BO-02 인골은 조직학 지수가 3-5인 인골 시료들에 비해 미토콘드리아 DNA양과 콜라겐 수율 결과 또한 현저하게 낮은 값을 얻었고, 미토콘드리아 DNA를 근거로 한 하플로그룹 분석 결과는 도출하지 못하였다. 이를 근거로 하여 특성지표와 미토콘드리아 DNA 양의 결과에 이어 미토콘드리아 DNA의 하플로그룹 분석의 성공률까지도 이 상관관계를 통하여 연관성이 있음을 나타내고 있다.

본 실험에서 real-time PCR은 미토콘드리아 DNA의 Cyt b 부위를 증폭하고 하플로그룹 분석에는 과변이부위 I, II 지역을 증폭하였다. 두 지역 모두 미토콘드리아 DNA에 속해 있는 부위이므로 미토콘드리아 DNA의 보존상태를 예측하는 것이 가능하였지만, 차후에는 real-time PCR과 하플로그룹 분석에 과변이부위의

Table 6. Correlation of success rate of mtDNA analysis with quality indicators

Sample No.	HI*	Average of copy numbers (copies/ μ l)	Collagen Yield(%)	Haplogroup
BO-01	4	3491.16	4.94	D4/G
BO-02	1	ND	0.07	ND
BO-03	3	2303.87	3.90	A
BO-04	5	19806.86	5.42	D4j

*HI : histological index

동일한 부분을 분석하여 비교할 예정이다. 그리고 real-time PCR에 있어서 melting curve를 보이지 못하였다. Melting curve는 primer간의 이중결합과 DNA 이중결합의 구분을 가능하게 하여 real-time PCR 산물의 결과가 목적하는 DNA의 정량값인지를 증명해준다. 향후 실험에 있어서 DNA 정량값에 대한 정확성을 더하기 위해 melting curve를 충분히 고려할 필요가 있다(Ririe, 1997).

5. 결론

부여 오수리에서 출토된 인골 4개체의 조직학적 지수, real-time PCR을 통한 잔존해 있는 DNA 정량, 콜라겐 수율, 미토콘드리아 DNA를 근거로 한 하플로그룹 분석 결과를 종합하여 볼 때 시료의 보존 상태 순서는 BO-04, BO-01, BO-03, BO-02로 모두 일치함을 볼 수 있었다. 이는 각 실험의 결과가 연관성이 있음을 증명해 주고 있으며 특히 real-time PCR을 통해 미토콘드리아 DNA 정량값을 제시함으로써 시료의 보존 상태와의 상관관계를 규명 할 수 있다.

사사

본 연구는 국립문화재연구소의 지원을 받아 문화유산 융복합연구(R&D)사업의 일환으로 수행되었으며, 본 연구를 위해 인골 시료를 제공해 주신 (재)한얼문화유산연구원에 감사드린다.

참고문헌

- 부여 고령 친화모델 시범사업지구 내 문화유적 발굴조사 「부여 오수리 큰독골 · 오실골 유

적」현장설명회 자료집. 2010, 한얼문화유산연구원.

- 지상현, 김윤지, 정용재, 서민석, 박양진, 2008, 아산 명암리 출토 인골의 고유전학적 연구. 보존과학회지 23, 81-93.
- Brown, T.A., Nelson, D.E., Vogel, J.S., Southon, J.R., 1988. Improved collagen extraction by modified Longin method. Radiocarbon 30, 171-177.
- Hedges, R.E.M., Millard, A.R., Pike A.W.G., 1995. Measurements and relationships of diagenetic alteration of bone from three archaeological sites. Journal of Archaeological Science 22(2), 201-209.
- Hesibe, V., 2009. Quantification and presence of human ancient DNA in burial place remains of human ancient DNA in burial place remains of Turkey using real time polymerase chain reaction. African Journal of Biotechnology 8, 5163-5168.
- Hofreiter, M., Serre, D., Poinar, H.N., Kuch, M., Pääbo, S., 2001. Ancient DNA. Nature Reviews Genetics 2, 353-359.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H., 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proceedings of the National Academy of sciences of the United States in America 88, 7276-7280.
- Ian, M.M., Katherine, E.A., Andreas, N., 2002. Real-time PCR in virology. Nucleic

- Acids Research 30(6), 1292–1305.
- Lee, H.Y., Yoo, J.E., Park, M.J., Chung, U., Shin, K.J., 2006. Mitochondrial DNA control region sequences in Koreans: identification of useful variable sites and phylogenetic analysis for mtDNA data quality control. *International Journal of Legal Medicine* 120, 5–14.
 - Richards, M.P., Hedges, R.E.M., 1999. Stable isotope evidence for similarities in the types of marine foods used by late mesolithic human at sites along the atlantic coast of Europe. *Journal of Archaeological Science* 26, 717–722
 - Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., Wittwer, C.T., 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytic Biochemistry* 245, 154–160.
 - Seong, M.W., Kim, J.Y., Ko, H.S., Hwang, J.M., Park, S.S., 2004. Mitochondrial DNA content and the MTND4 Gene Expression in Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *The Korean Journal of Laboratory Medicine* 24(6), 439–445.
 - Yang, D.Y., Eng, B., Wayne, J.S., Dudar, J.C., Saunders S.R., 1998. Improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *American Journal of Physical Anthropology* 105, 539–543.