

법의 분야에서 RNA를 이용한 체액식별

이환영^{1,2} · 신경진^{1,2} · 양우익¹

¹연세대학교 의과대학 법의학과

²연세대학교 개인식별연구센터

접 수 : 2009년 5월 1일

게재승인 : 2009년 5월 9일

본 논문은 한국과학재단의 특정연구개발사업 (과제번호 : M10640030002-08N4003-00210)의 지원에 의하여 이루어졌음.

책임저자 : 양우익

(120-752) 서울시 서대문구 성산로 250

연세대학교 의과대학 법의학과

전화 : (02) 2228-1765

FAX : (02) 362-0860

E-mail : wiyang9660@yuhs.ac

RNA for Body Fluid Identification in Forensics

Hwan Young Lee^{1,2}, Kyoung-Jin Shin^{1,2}, Woo Ick Yang¹

¹Department of Forensic Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

²Human Identification Research Center, Yonsei University, Seoul, Korea

Lately, there seems to be a growing interest in the forensic community for RNA analysis. Especially, body fluid identification using cell-specific RNA expression profiles is expected to present a new technique that will supplement DNA analysis in forensic casework. Several RNA markers specific to blood, saliva, semen, menstrual blood and vaginal secretions have been identified and their specificities and sensitivities have been confirmed using various forensic samples. Therefore, this review provides an overview of the present knowledge and the most recent developments in RNA analysis for the body fluid identification and discusses its possible and practical use in forensics.

Key words : RNA, Body fluid identification, mRNA, microRNA

서 론

지난 수십 년 동안 법의유전학은 유전자 분석기법의 진보에 힘입어 매우 빠르게 발전해 왔으며, 대부분 DNA를 그 분석 대상으로 해왔다. 이는 DNA가 RNA에 비하여 상대적으로 안정하여 보존이 용이하고 다양한 기술을 이용한 분석이 가능하기 때문이다. 하지만 최근 RNA도 현재까지 알려진 바와는 달리 어느 정도의 조건 하에서는 상당히 높은 안정성을 나타내고 법의 분야에의 응용 가능성도 매우 높다는 인식이 차츰 확산됨에 따라 법의유전학자들의 새로운 관심사로 대두되고 있다.

DNA와 달리 RNA 프로파일은 세포의 유형, 외부자극 또는 질병 유무에 따라 다르게 나타나는 유전자 발현 패턴 및 RNA 분해정도를 반영하기 때문에, 이를 이용한 체액의 식별, 사후 경과시간 및 사인의 추정, 상처의 발생 시간 추정 등에 관한 연구가 가능할 것으로 전망된다.¹⁾ 특히, 15년 이상 경과 된 매우 오래된 혈흔에서도 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)을 수행할 수 있는 RNA의 추출이 가능하게 됨으로써,²⁾ 세포 유형에 따라 특이적으로 발현되는

mRNA를 높은 특이성과 민감도를 가지고 분석할 수 있게 되었고, 이를 바탕으로 법의 실무에서 유용하게 사용될 것으로 기대되는 체액식별에 관한 RNA 연구가 활발히 진행되었다.³⁻¹³⁾

법의 분야에서 체액식별은 DNA를 이용하는 개인식별과 함께 범죄현장에서 발견된 증거물과 범죄 간의 연관성을 밝히는 데 있어 매우 중요한 역할을 한다. 성폭행 사건의 경우, 피해자의 내의에서 발견된 용의자의 DNA 프로파일 정보가 정액으로부터 얻어진 것인지 다른 체액이나 피부 접촉에 의한 것이었는지 여부에 따라 성폭행 사실 존재 여부에 관한 판단에 영향을 줄 수 있고, 범죄 현장에서 발견된 피해자의 혈흔이 월경혈인지가 사건의 본질 파악에 있어 중요할 수 있다.

RNA를 이용한 법의 분야의 체액식별에 관한 연구는 2002년 Bauer와 Patzelt³⁾가 월경혈을 식별하기 위하여 처음으로 mRNA 표지자를 사용한 것을 시작으로, 이후 많은 연구가 수행되었다. Juusola와 Ballantyne⁴⁾은 2003년 아가로스 겔 전기영동법을 이용하여 혈액, 타액 및 정액을 식별할 수 있는 mRNA 분석법을 보고하였고, 2005년에는 추가적으로 월경혈과 질분비액을 식별할 수 있는 mRNA 표지자를 포함하는 multiplex를 구축하고 이를 형광 프라이머와 모세관 전기영동

(capillary electrophoresis)을 이용하여 분석하였다.⁵⁾ 미량의 mRNA 분석에서 민감도를 높이기 위하여 2006년에는 Nuusbaumer 등⁶⁾이 real-time RT-PCR을 이용한 분석법을 보고하였고, 2007년에 Juusola와 Ballantyne⁷⁾은 여러 가지 형광을 이용하여 다시 한 번 multiplex quantitative RT-PCR을 이용한 체액 분석방법을 보고하였다. 또한, 최근에 Zuvakov 등⁸⁾은 보존 기간이 다양한 혈액과 타액에서 전체 유전자 발현 (whole genome expression) 패턴을 microarray를 이용하여 분석하고 6개월 이상 안정한 mRNA 표지자를 보고하였다. 한편, Hanson 등⁹⁾은 기존의 mRNA 분석법이 200-300 bp 크기의 비교적 큰 증폭산물을 분석 대상으로 하기 때문에 분해된 시료에는 적합하지 않을 것을 고려하여, small non-coding RNA인 microRNA (이하 miRNA로 표기)를 대상으로 각 체액에서 발현 패턴을 분석하고 체액의 식별에 사용될 수 있는 miRNA 표지자를 선택하여 이를 분석하는 multiplex quantitative RT-PCR 방법을 보고하였다.

이에 본 종설에서는 RNA를 이용한 체액식별과 관련하여 현재까지 보고된 RNA 표지자 및 이를 분석하기 위한 방법에 관하여 알아보고, 법의 분야의 적용 가능성 및 전망에 관하여 논의해 보고자 한다.

본 론

1. 체액식별을 위한 RNA 표지자

법의 분야의 체액식별을 위하여 지금까지 보고된 mRNA 및 miRNA 표지자는 Table 1에 나타내었다. 초기에 보고된 mRNA 표지자는 일반적으로 각 체액과 관련된 세포 및 조직의 기능적 차이에 바탕을 두어 선택하였고,^{2, 4, 5, 6, 12, 13)} 식별하고자 하는 체액에 특이적으로 발현하지만 이를 제외한 다른 체액에

서는 발현되지 않은 표지자이다. 다만 월경혈은 여러 유형의 세포가 혼재되어 있어 정맥혈 및 질 분비액에서 보이는 mRNA 프로파일을 동시에 나타내므로, 정맥혈 또는 질 분비액에서 특이하게 발현되는 표지자를 검출하였다고 하여 월경혈일 가능성을 배제할 수 없다.

한편, 이렇게 보고된 mRNA 표지자들은 자외선, 습기 등 외부환경의 영향에 따라 짧게는 하루, 길게는 500일 이상까지 다양한 안정성을 나타낸다는 사실이 여러 조건의 모의실험을 통하여 알려졌고,¹⁰⁾ 이러한 점을 보완하기 위하여 Zuvakov 등⁸⁾과 Hanson 등⁹⁾은 체액식별을 위한 보다 안정한 mRNA 표지자와 분해된 시료에서도 분석이 용이할 것으로 기대되는 miRNA 표지자를 스크리닝을 통하여 선별하고 각 체액에서의 특이성을 검증하였다.

Zuvakov 등⁸⁾은 외부 환경에 보다 안정한 mRNA 표지자를 선별하기 위하여 Affymetrix U133plus2.0 GeneChip array (Affymetrix, Santa Clara, CA)를 이용하여 다양한 시간 간격 (0-180일)을 두고 환경에 노출된 혈액과 타액 시료에서 유전자 발현패턴을 분석하였다. 이를 바탕으로 180일 이상 경과된 시료에서도 안정한 체액 특이적 mRNA 표지자를 혈액과 타액에서 각각 9개와 5개씩 보고하였다. 그리고 이후 좀 더 다양한 시료를 대상으로 수행한 안정성 평가 연구에서는 혈액에 특이적인 mRNA 표지자가 타액 특이적인 mRNA 표지자에 비해 좀 더 민감하고 (picogram 범위 vs. nanogram 범위) 안정적 (13-16년 vs. 2-6년)임을 보고하였다.¹¹⁾

또한, Hanson 등⁹⁾은 분해된 법의 분야의 시료에서 분석이 용이할 것으로 기대되는 약 ~20-25 bases 길이의 miRNA를 대상으로 체액 특이적 표지자를 발굴하고자 miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 다양한 체액에서 452 miRNAs (~67% of the known miRNAome)의 발현 패턴을 분석하였다. 그 결과, 50 pg 정도의 소량의

Table 1. Compilation of Putative RNA Markers for the Identification of Various Types of Body Fluids

Body Fluid	mRNA		microRNA
	Functional Selection*	WGE Screening ^{8)**}	WGE Screening ^{9)**}
Blood	β -spectrin (SPTB) ⁵⁾ Porphylinogen-deaminase (PBGD) ⁵⁾ Hemoglobin alpha locus 1 (HBA) ⁶⁾	CASP1, AMICA1, C1QR1, ALOX5AP, AQP9, C5R1, NCF2, MNDA, ARHGAP26	hsa-miR-451 hsa-miR-16
Saliva	Statherin (STATH) ⁵⁾ Histatin 3 (HTN3) ⁵⁾	SPRR3, SPRR1A, KRT4, KRT6A, KRT13	hsa-miR-658 hsa-miR-205
Semen	Protamine 1 (PRM1) ^{5, 12)} Protamine 2 (PRM2) ^{5, 12)} Kallikrein 3 (KLK = PSA) ⁶⁾		hsa-miR-135b hsa-miR-10b
Menstrual Blood	Matrix metalloproteinase 7 (MMP-7) ^{2, 5)} Matrix metalloproteinase 11 (MMP-11) ^{2, 13)}		hsa-miR-412 hsa-miR-451
Vaginal Secretions	Human beta-defensin 1 (HBD-1) ⁵⁾ Mucin 4 (MUC4) ^{5, 6)}		hsa-miR-124a hsa-miR-372

*Functional Selection: RNA markers for forensically relevant body fluid based on functional differences of the cells and tissues involved;

**WGE Screening: RNA markers for forensically relevant body fluid based on results from Whole Genome Expression Analysis

RNA에서도 혈액, 타액, 정액, 질 분비액, 월경혈의 구별이 가능한 9개의 체액 특이적 miRNA 표지자를 밝히고, FirstChoice® Human Total RNA Survey Panel (Ambion, Austin, TX) 등을 이용하여 20 종류 이상의 다른 조직에서 이들의 체액 특이성을 검증하였다.

2. 체액 특이적 RNA 표지자의 분석방법

체액식별을 위하여 RNA 표지자를 분석하는 방법은 RNA를 DNA와 함께 하나의 시료로부터 동시에 추출하여 사용할 수 있는 장점을 가지고 있으며,^{14, 15)} RNA 추출, 정량, cDNA 합성, PCR 증폭 및 검출의 일련의 과정이 상업용 kit와 법의 실험실에서 사용하는 일반적인 기기를 사용하여 수행되므로 기존의 DNA 분석과 병행하여 어렵지 않게 이루어질 수 있다(Fig. 1).

일반적으로 각 시료로부터 추출한 RNA는 random hexamer 또는 oligo dT 프라이머와 역전사 효소(reverse transcriptase)를 이용하는 cDNA 합성과정을 거친 후, PCR을 통하여 각 체액에 특이적인 RNA 표지자를 증폭하고 이를 분석함으로써 체액을 식별하게 된다.

cDNA로부터 PCR을 통하여 증폭된 RNA 표지자를 검출하는 방법은 연구자의 선택에 의하여 다양한 방법으로 수행될 수 있으나, 현재 가장 널리 사용되는 검출방법은 multiplex로 구현되는 endpoint PCR과 quantitative real-time PCR이다. Endpoint PCR의 경우, 분석을 위한 충분한 양의 RNA가 존재할 경우 효과적으로 수행될 수 있으나, 미량의 RNA로 분석을 수행할 경우에는 quantitative real-time PCR이 보다 효과적이다.¹⁶⁾ 한편 효과적인 multiplex 구현을 위하여 PCR 반응을 설계할 때에는 다양한 체액의 식별을 위하여 다수의 형광을 적절히 이용하고, DNA 오염에 의한 위양성 결과가 나타나는 것을 피하기 위한 추가적인 PCR 프라이머 설계 전략을 필요로 한다.

특정 RNA 표지자의 증폭산물을 PCR이 끝난 후 전기영동을 이용하여 최종적으로 분석하는 endpoint PCR은 여러 체액에 특이한 RNA 표지자가 증폭산물의 유무, 크기와 부착된 형광에 따라 electropherogram에서 구분 가능하도록, 하나 혹은 다수의 multiplex PCR set로 설계한다. 정확한 체액식별을 위하여 일반적으로 한 종류의 체액 당 둘 이상의 RNA 표지자를 지정하며, DNA 오염에 의한 위양성 결과를 피하기 위하여 다음과 같은 몇 가지 전략들이 제시되었다.⁹⁾ 즉, 오염된 DNA로부터 발생하는 PCR 증폭산물과 mRNA 표지자의 증폭산물을 구별하기 위하여 PCR 증폭을 위한 각각의 프라이머가 서로 다른 exon 상에 위치하거나, 적어도 하나의 프라이머를 exon-exon boundary에 위치하도록 하는 것이다. 또한, multiplex 구축을 위하여 체액 특이적 mRNA 표지자를 선택할 때는 DNA 상에 mRNA 표지자와 동일한 증폭산물을 발생시키는 pseudogene이 존재하지 않는 것을 확인한다. 그리고 cDNA를 합성하기 전에 반드시 DNase I을 처리하여 DNA를 완전히 제거하고, 역전사효소를 처리하지 않은 대조표준을 사용하여 PCR 증폭산물이 발생하지 않는 것을 확인하도록 한다.

Quantitative real-time PCR은 각 시료에서 internal positive control에 대한 RNA 표지자의 상대적인 발현 정도를 정량적으로 측정하는 방법으로, multiplex의 설계는 기본적으로 endpoint PCR과 다르지 않다. 그러나 PCR 증폭산물의 크기가 50-200 bp로 제한되고, 프라이머 설계에 추가적으로 형광을 나타내는 탐침의 설계를 필요로 한다. 또한, real-time PCR이 동시에 분석할 수 있는 형광이 네 종류로 제한되므로, 다양한 체액을 분석하기 위해서는 internal reference dye, internal positive control과 함께 각 체액에 특이적인 두 개 이내의 mRNA 표지자를 포함하는 다수의 multiplex PCR set를 설계한다. Internal positive control로는 house keeping gene인 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), β -actin 또는 S15를 사용하는 것이 일반적이며, internal positive control에 대한 RNA 표지자의 상대적인 발현 정도를 측정하기 위하여 housekeeping gene이 나타내는 C_T 값에서 각각의 mRNA 표지자가 나타내는 C_T 값을 뺀 차이값(ΔC_T)을 구하여 이것으로 체액을 식별하게 된다. 보통 각 체액에 특이적인 mRNA 표지자는 식별하고자 하는 체액에서 internal positive control보다 높은 발현 수준을 나타내어 양성의 ΔC_T 값을 보이는 반면, 그 외 다른 체액에서는 internal positive control보다 낮은 발현 수준을 나타내어 음성의 ΔC_T 값을 보이게 되므로, 각 체액에서 조사된 ΔC_T 값의 분포로부터 미지의 시료를 식별할 수 있게 된다.

최근에 보고된 miRNA의 경우도 quantitative real-time PCR의 부분적으로 다른 기술을 이용하는 miScript SYBR Green PCR Kit를 이용하여 분석하였다.⁹⁾ 다만, miRNA의 경우, poly(A) tail을 가지고 있지 않아 oligo dT 프라이머를 이용하여 cDNA를 합성할 수 없으므로, ATP와 poly(A)

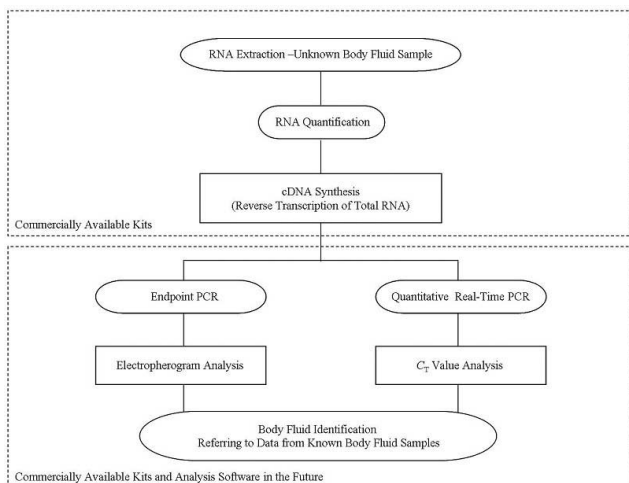


Fig. 1. Schema for body fluid identification using RNA profiling

polymerase를 이용하여 poly(A) tail을 미리 합성한 후 random hexamer 또는 oligo dT 프라이머와 역전사 효소 (reverse transcriptase)를 이용하여 cDNA 합성한다. 또한, quantitative real-time PCR의 internal positive control로는 U6b를 사용한다.

3. 체액 특이적 RNA 표지자의 법의 분야 적용 가능성 및 전망

체액식별을 위한 RNA 표지자의 발굴 및 검증에 관한 연구가 지난 몇 년간 매우 활발히 이루어져 왔으며, 최근 새로운 RNA 표지자의 발굴을 위하여 전체 유전자 발현 패턴을 스크리닝 하는 등의 보다 체계적인 접근이 이루어지고 있는 것은 이러한 RNA 표지자의 법의분야에서의 적용 가능성을 단적으로 증명하는 것이다. 하지만, 이러한 체액 특이적 RNA 표지자를 효과적으로 법의 실무에 적용하기 위해서는 여러 가지 환경 및 질병 조건을 포함하는 보다 다양한 조건 하에서 안정적인 RNA 표지자를 발굴하고 심도 있게 평가해 보는 것이 필요하다. Zuvakov 등⁸⁾이 혈액과 타액을 대상으로 매우 분해되고 오래된 시료에서도 안정적인 mRNA 표지자를 발굴하여 보고한 것은 매우 고무적이며, 향후 법의 분야에서 중요성을 가지는 다양한 체액에 대한 추가적인 연구도 기대된다. 또한, Hanson 등⁹⁾이 분해된 시료에서의 효과적인 체액식별을 위하여 새로이 제시한 miRNA 표지자는 식별하고자 하는 체액 이외의 다른 체액에서도 미량 발현하는 단점을 가지고 있으며, 월경혈 및 정액에 특이한 표지자는 정확한 분석을 위하여 좀 더 찾아낼 필요가 있지만, miRNA가 의생명과학 분야에서 현재 매우 활발히 연구되고 있으며 최근 300개 이상의 miRNA가 새롭게 보고되는 등의 상황(<http://microrna.sanger.ac.uk>)을 고려해 본다면 향후 이에 관한 법의 분야에서의 연구도 좀 더 가속화 될 수 있을 가능성이 있을 것으로 본다.

한편, RT-PCR을 이용하는 RNA 분석방법은 각 체액에서의 서로 다른 유전자 발현패턴을 바탕으로 정량적 분석을 수행하기 때문에, 의음성 결과를 나타낼 수 있는 가능성이 있으므로 결과의 해석에 있어 세심한 주의를 요한다. 특히, 둘 이상의 체액이 혼합되어 있는 경우, 이를 분석하고 올바르게 해석하기 위한 방안에 관하여 추가적인 논의도 필요할 것으로 본다. 또한, 각각의 RNA 표지자가 다양한 민감도와 안정성을 나타내므로,¹⁰⁾ 시료의 양이 매우 적은 경우에서 DNA 분석과 병행하여 체액식별을 수행하고자 할 때에는 이러한 사항을 고려하여 각 상황에 알맞은 효과적인 결과를 얻기 위한 실험을 계획하여야 할 것이다. 하지만, RNA를 이용한 체액식별은 DNA 프로파일링과 마찬가지로 일련의 분석과정을 자동화할 수 있으므로, 효과적인 분석 소프트웨어 및 해석 지침 등의 개발이 뒷받침된다면 향후 보다 체계적으로 법의 분야의 실무에 적용할 수 있을 것으로 사료된다. 이러한 RNA 분석기법의 발전은 체액

식별 뿐 아니라 RNA를 이용하여 사후 경과시간 및 사인의 추정, 상처의 발생 시간 추정 등에 관한 연구를 수행하는 데도 많은 기여를 할 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

그동안 RNA는 법의유전학 분야에서 상대적으로 관심의 대상에서 벗어나 있었으나, 최근 이를 이용한 체액의 식별, 사후 경과시간 및 사인의 추정, 상처의 발생 시간 추정 등이 가능할 것으로 전망됨에 따라 새로운 연구 대상으로 떠오르고 있다. 특히, 세포의 유형에 따라 다르게 나타나는 유전자 발현 패턴을 이용하여 체액을 식별하고자 하는 연구가 매우 활발히 진행되고 있으므로, 본 중설에서는 지금까지 보고된 체액 특이적 RNA 표지자와 이를 효과적으로 분석하기 위한 분석방법 및 향후 전망에 관하여 논의하였다.

RNA를 이용하는 법의 분야의 체액식별은 시료의 출처와 유형이 중요한 법의 실무에서 효과적으로 DNA 분석을 보완할 수 있을 것으로 기대된다. 하지만 실제 법의 분야의 현장에 효과적으로 적용하기 위해서는 지금까지 보고된 여러 체액 특이적 RNA 표지자에 관한 추가적인 발굴과 검증이 필요하고, 최적의 RNA 표지자를 선택하여 상업적 kit로 개발하는 등 분석을 간소화하고 자동화할 수 있는 시스템의 구축을 위한 노력이 뒤따라야 할 것으로 사료된다. 또한 정량적 분석의 특성 상, 분석 결과의 정확한 해석을 위한 소프트웨어와 해석 지침도 함께 개발하여야 할 것이다. 마지막으로, 향후 보다 활발한 연구를 통하여 RNA 연구가 법의유전학의 새로운 지평을 열고, 법의학 및 의생명과학을 포함하는 다양한 분야에 기여할 수 있기를 기대해 본다.

참 고 문 헌

1. Bauer M. RNA in forensic science. *Forensic Sci Int Genet* 2007;1:69-74.
2. Bauer M, Polzin S, Patzelt D. Quantification of RNA degradation by semi-quantitative duplex and competitive RT-PCR: a possible indicator of the age of bloodstains? *Forensic Sci Int* 2003;138:94-103.
3. Bauer M, Patzelt D. Evaluation of mRNA markers for the identification of menstrual blood. *J Forensic Sci* 2002;47:1278-82.
4. Juusola J, Ballantyne J. Messenger RNA profiling: a prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification. *Forensic Sci Int* 2003;135:85-96.
5. Juusola J, Ballantyne J. Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluids. *Forensic Sci Int* 2005;152:1-12.
6. Nussbaumer C, Gharehbaghi-Schnell E, Korschineck I. Messenger RNA profiling: a novel method for body fluid identification by real-time PCR. *Forensic Sci Int* 2006;157:181-6.

7. Juusola J, Ballantyne J. mRNA profiling for body fluid identification by multiplex quantitative RT-PCR. *J Forensic Sci* 2007;52:1252-62.
8. Zubakov D, Hanekamp E, Kokshoorn M, van Ijcken W, Kayser M. Stable RNA markers for identification of blood and saliva stains revealed from whole genome expression analysis of time-wise degraded samples. *Int J Legal Med* 2008;122:135-42.
9. Hanson EK, Lubenow H, Ballantyne J. Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. *Anal Biochem* 2009;387:303-14.
10. Setzer M, Juusola J, Ballantyne J. Recovery and stability of RNA in vaginal swabs and blood, semen, and saliva stains. *J Forensic Sci* 2008;53:296-305.
11. Zubakov D, Kokshoorn M, Kloosterman A, Kayser M. New markers for old stains: stable mRNA markers for blood and saliva identification from up to 16-year-old stains. *Int J Legal Med* 2009;123:71-4.
12. Bauer M, Patzelt D. Protamine mRNA as molecular marker for spermatozoa in semen stains. *Int J Legal Med*. 2003;117:175-9.
13. Ferri G, Bini C, Ceccardi S, Pelotti S. Successful identification of two years old menstrual bloodstain by using MMP-11 shorter amplicons. *J Forensic Sci* 2004;49:1387.
14. Bauer M, Patzelt D. A method for simultaneous RNA and DNA isolation from dried blood and semen stains. *Forensic Sci Int* 2003;136:76-8.
15. Alvarez M, Juusola J, Ballantyne J. An mRNA and DNA co-isolation method for forensic casework samples. *Anal Biochem* 2004;335:289-98.
16. Haas C, Klesser B, Maake C, B?r W, Kratzer A. mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and realtime PCR. *Forensic Sci Int Genet* 2009;3:80-8.