韓 法 醫 誌 : 第27卷 · 第2號
Kor. J. Legal Med. Vol. 27, No. 2

350년 전 미라 조직에서의 유전자검사

연세대학교 의과대학 법의학과, [2]연세대학교 개인식별연구소, [3]국립과학수사연구소 법의학과
신경진[2] · 양윤석 · 한길로[2, 3] · 김종열[2]

= Abstract =

Analysis of Mitochondrial and Y-chromosomal DNA from 350-Year-Old Mummified Human Tissue

Kyoung-Jin Shin[2], Yun-Seok Yang, Gil-Ro Han[2, 3], Chong-Youl Kim[2]
[1]Department of Forensic Medicine, College of Medicine, Yonsei University
[2]Human Identification Research Institute, Yonsei University
[3]Department of Forensic Medicine, National Institute of Scientific Investigation

This paper describes the successful DNA extraction and amplification, and analysis of mitochondrial and Y-chromosomal DNA from an approximately 350-year-old mummy exhumed from Gyunggi-do, South Korea in 2001.

Sample tissue was obtained from internal organs such as lung, liver, and muscle of the mummy. Mummy tissue was rehydrated in trisodium phosphate solution, and protein was digested by proteinase K. Sample DNA was extracted using phenol-chloroform-isoamyl alcohol and silica column. Every step of DNA extraction and PCR was cautiously carried out according to general guideline to prevent contamination of the sample DNA.

PCR products of mitochondial DNA (mtDNA) were observed with good yield, and sequence analysis of the mtDNA was successfully accomplished in the control regions (HV1, HV2, and HV3). In addition, minimal haplotype Y-STRs were tried to analysis. However, DYS19, DYS389Ⅰ, DYS390, DYS391, DYS392 and DYS393 were only amplified and clearly genotyped. Sequence analysis of mtDNA and Y-STR genotyping were performed more than twice with time intervals, and the results were accepted only when they showed the even profile for authenticating mummy DNA.

There are some difficulties in the analysis of DNA from ancient mummified human remains has well-known problems, such as low template quantity, poor quality of DNA, and the presence of PCR inhibitors. This implies that the most critical factor for ancient DNA analysis is extraction of DNA. In order to overcome these troubles, we used DNA extraction using phenol-chloroform-isoamyl alcohol and silica column and optimized PCR condition. Therefore, the analysis of mtDNA and Y-STRs from mummy was successfully performed.

책임저자: 신 경 진
서울시 서대문구 신촌동 134, 연세대학교 의과대학 법의학과
전화 : (02) 361 - 5775, FAX : (02) 362 - 0860, E - mail : kjshin@yumc.yonsei.ac.kr

Key Words : Mummy, mtDNA, Y-STRs

서 론

2001년 11월에 경기도 양주군 해평 윤씨 문중의 선산에서 분묘 이장 작업 중 17세기 조선 중기 의 것으로 추정되는 전통의복을 입은 소년 미라가 발굴되었다. 이 미라는 보존 상태가 매우 양호하여 아동복식에 대한 연구 분야에서뿐만 아니라, 조선시대 한국인에 대한 의학적, 인류학적, 법의학적 연구 분야에서도 관심의 대상이 되었다. 이에 법의학적 관점에서는 소년 미라의 신원을 밝히는 데 있어 보다 과학적인 근거를 제시해보고자 약 350년 전 미라 조직에서의 유전자검사를 시도하게 되었다.

현대의 개인식별과 친자검사 등에 널리 응용되는 유전자검사는 핵 유전자의 짧은연쇄반복(short tandem repeats; STR) 유전좌와 미토콘드리아 유전자(mitochondrial DNA; mtDNA) 과변이 영역(hypervariable region; HV)에 대한 분석으로 대별된다[1]. 최근에 인체 유전자에 대한 연구가 활발히 진행되면서 새로운 유전적 다형성이 밝혀지기 시작하였고, 그 중에서 일부 유전자들은 규칙적으로 일정한 염기단위가 반복적으로 배열한다는 것이 밝혀졌다. 특히, 반복되는 염기서열이 2 - 6bp(base pair)인 STR 유전자[2, 3]는 대립유전자의 크기가 작기 때문에 소량의 시료나 분해된 시료에서도 중합효소연쇄반응 (Polymease Chain Reaction; PCR) 증폭이 가능하다는 장점 때문에 법의학적 개인식별에서 매우 유용하게 이용되고 있다[4]. 한편, 일반적인 개인식별이나 친자검사를 위한 유전자검사에서는 상염색체 STR을 많이 이용하고 있으나, 역사적 사건과 관련되어 수 대에 걸친 부계 혈통을 추적하는 것이 필요한 경우에는 Y 염색체 STRs(Y - STRs)의 분석을 하면 보다 유용한 정보를 획득할 수 있다[5, 6].

한 개체 혹은 세포가 죽음에 이르면 자신의 세포 내에 있는 핵산분해효소에 의해 유전자는 자가분해 되며, 시간이 경과함에 따라 외부의 온도, 습도, pH, 자외선 혹은 미생물에의 노출과 같은 환경 요인에 의해 서서히 분해되어 파괴된다. 따라서 사후 오래된 시료에서의 핵 유전자는 거의 대부분 분해되거나 파괴되어 사실상 분석이 어렵게 되는데, 이 때에는 mtDNA를 분석하여 가족관계의 확인이나 개인식별을 수행하는 것이 일반적인 방법이다[7 - 10]. mtDNA는 한 개의 세포 내에 그 수가 많을 뿐만 아니라 핵 유전자 보다 안정성이 높아 오랜 기간이 지나도록 파괴되지 않고 남아 있을 수 있기 때문에 오래된 시료의 분석에서 가장 문제가 되는 시료의 양적인 문제도 어느 정도 제한 받지 않고 분석될 수 있다. 특히, mtDNA의 tRNA proline과 tRNA phenylalanine 유전자 사이에 위치하는 전사조절부위로서 약 1.1 kb 크기의 D - loop (displacement loop)에 있는 과변이 영역은 염기의 삽입이나 소실, 혹은 점 돌연변이에 의한 유전자 다형성이 나타나고 있어 법의학적 개인식별에 있어 매우 유용하다.

오래된 시료의 유전자 분석에서는 추출된 유전자의 양적인 문제뿐만 아니라 질적인 문제도 고려하여야 한다. 오래된 유골이나 미라와 같은 시료에서 추출된 DNA는 매우 미량이며 더구나 심하게 분해된 경우가 많고, 유전자 추출물에는 PCR 방해 물질이 포함된 경우가 흔하기 때문에 유전자 분석에 많은 문제점이 따르게 된다[11 - 13]. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 최적화된 유전자 추출법과 PCR 전략의 도입이 필요하다. 이에 본 연구에서는 문헌 고찰과 반복적인 비교 실험 과정을 통하여 분해된 미량의 유전자 분석에 최적화된 유전자 추출법과 PCR 프로토콜(protocol)을 완성하였고, 이것을 약 350년 전의 미라 조직에서 미토콘드리아 유전자 및 Y 염색체 STR 유전자 분석에 적용하여 상당한 성과가 있었기에 그 결과를 보고하는 바이다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

미라의 유전자검사를 위한 시료는 미라의 등쪽에 있는 연조직 소실 부위에서 피부와 연조직을 좀 더 절단한 후, 흉강과 복강이 동시에 개방되어 있는 상태에서 기구를 이용하여 폐, 간, 근육 등의 내부장기 조직으로부터 채취하였다.

2. 연구방법

가. 오염 방지

본 연구의 대상은 약 350년 된 미라 조직이므로 실험을 수행함에 있어 실험 수행자를 비롯하여 실험에 사용되는 기구와 시약 등으로부터의 오염방지를 위해 각별히 유의하였다. 이를 위하여 유전자 추출과 유전자 증폭, 유전자 증폭 후 분석과정은 각각 다른 실험실에서

서로 분리하여 실시되었다. 뿐만 아니라 실험에 사용되는 효소를 제외한 모든 시약과 기구는 30분 이상 자외선을 처리하였고 기구는 에탄올 등으로 세척 후 사용하였으며, 실험자는 일회용장갑을 착용하고 barrier tip을 사용하여 오염을 최소한으로 줄이고자 노력하였다[11]. 또한 이를 위해 International Society for Forensic Genetics(ISFG)의 mtDNA typing을 위한 지침에 의거하여 모든 실험이 진행되었다[14].

나. 유전자 추출

미라의 폐, 간, 근육 등 내부장기로부터 채취된 조직을 잘게 잘라 1.5 ml microcentrifuge tube에 약 반 정도 채운 후 0.5% trisodium phosphate solution 1 ml를 넣고 4℃에서 이틀 동안 방치하였다15). 이 시료를 1,500 g에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 버린 후 1 ml TENS(TrisHCl 50 mM, EDTA 50 mM, NaCl 100 mM, SDS 0.5%, pH 8.0) 용액과 20 μℓ proteinase K(10 mg/ml)를 넣고 56℃에서 하루동안 잘 섞이도록 처리한 후, 매일 proteinase K를 첨가하여 2-3일 동안 용해를 계속하였다. 그 후 2,000 g에서 5분간 원심 분리하고 그 후 상층액만을 옮겨서 다시 12,800 g에서 5분간 원심 분리한 후 상층액만을 다른 tube로 옮겼다. 동량의 phenol-chloroform-isoamyl alcohol(25:24:1)을 넣어 잘 섞이게 한 후 13,000 rpm에서 2분간 원심분리 하였다. 또 상층액을 취하여 위와 같은 방법으로 2번 이상 반복하여 시행하였다. 그 뒤 Yang 등[12]의 방법을 변형하여 QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용한 정제 과정을 거쳐 50 μℓ 부피의 유전자 추출물을 얻었다.

다. 미토콘드리아 유전자 분석

mtDNA 과변이 영역의 염기서열 결정을 위한 PCR은 HV1과 HV2 영역을 각각 2부위로 나누어 중첩되도록 primer set를 설계하였고[10], HV3 영역[16]은 1개의 작은 PCR 절편이 생성되도록 primer set를 준비한 후 수행되었으며, 이에 이용된 primer의 염기서열은 Table 1과 같다. PCR 혼합물에는 5 μℓ의 주형 DNA, 각각 0.2 μM의 forward와 reverse primer, 200 μM dNTPs, 10 mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 1.5 mM MgCl2, 200 μg/mL BSA, 2.5 U AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, CA, U.S.A.)가 포함되어 있으며 최종 부피는 25 μℓ가 되도록 하였다. PCR은 GeneAmp PCR system 9600(Applied Biosy-stems, CA, U.S.A.)을 이용하여 95℃에서 11분간 변성시키고 94℃에서 20초, 56℃에서 20초, 72℃에서 30초의 조건으로 총 40회의 온도순환 후, 최종적으로 72℃에서 7분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 2% agarose gel 상에서 전기영동하여 ethidium bromide 염색으로 증폭여부 및 그 정도를 확인하였다.

증폭여부가 확인된 증폭산물을 QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN, Hilden, Germany)로 정제하여 최종부피가 50 μℓ가 되도록 하였다. 정제된 유전자를 주형으로 하여 PCR에 사용된 primer 중 한쪽 primer와 BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit V2.0(Applied Biosystems, CA, U.S.A.)으로 염기서열결정반응을 수행하였다. 염기서열결정반응 혼합물은 2 μℓ Terminator Ready Reaction Mix, 1 μℓ primer (3.2 pmol), 2-5 μℓ 주형 유전자를 포함하여 최종부피가 10 μℓ가 되도록 하였으며, 염기서열결정반응을 위한 PCR은 GeneAmp PCR system 9600 (Applied Biosystems, CA, U.S.A.)에서

Table 1. Primer Sequences Used for PCR and Sequencing of mtDNA Control Region

Control region	Primer Set	Name	Sequence	Product (bp)
HV1	P11	F15989	5'-CCC AAA GCT AAG ATT CTA AT	249
		R16237	5'-TGT GTG ATA GTT GAG GGT TG	
	P12	F16144	5'-TGA CCA CCT GTA GTA CAT AA	267
		R16410	5'-GAG GAT GGT GGT CAA GGG AC	
HV2	P21	F015	5'-CAC CCT ATT AAC CAC TCA CG	226
		R240	5'-TAT TAT TAT GTC CTA CAA GCA	
	P22	F155	5'-TAT TTA TCG CAC CTA CGT TC	227
		R381	5'-GCT GGT GTT AGG GTT CTT TG	
HV3	HV3	F374	5'-ACA CCA GCC TAA CCA GAT TTC A	255
		R628	5'-GCC CGT CTA AAC ATT TTC AGT G	

96℃에서 10초, 50℃에서 5초, 60℃에서 2분의 조건으로 총 30회의 온도순환으로 수행하였다. 반응산물은 에탄올 침전법으로 정제하여 20 ㎕ deionized formamide (Amresco, Ohio, U.S.A.)와 혼합한 후 95℃에서 3분간 가열하고 얼음에서 급냉하여 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems, CA, U.S.A.) 자동염기서열 분석기를 이용하여 전기영동하였다. 전기영동 중에 발생되는 정보는 ABI PRISM 310 Data Collection Software 1.2 (Applied Biosystems, CA, U.S.A.)에 실시간으로 입력되었으며, Sequencing Analysis Software 3.4 (Applied Biosystems, CA, U.S.A.)를 이용하여 염기서열을 결정하였다.

라. Y 염색체 STR 분석

Y-STR 검사를 위한 예비실험에서 9개의 minimal haplotype Y-STRs를 분석하려고 시도하였으나, DYS19, DYS389-Ⅰ, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393 등 6개의 유전좌위만 PCR 증폭할 수 있었다. 이에 본 연구에서 사용된 6개 Y-STRs의 PCR 증폭을 위한 primer의 염기서열[17]은 Table 2와 같으며, 각 primer의 한쪽 5'말단에 각각 형광물질 HEX 혹은 FAM을 부착하여 사용하였다. PCR 혼합물에는 5 ㎕의 주형 DNA, 각각 0.1 μM의 forward와 reverse primer, 10mM Tris-HCl(pH8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl2, 200 μg/mL BSA, 200 μM dNTPs, 2.5 U AmpliTaq Gold DNA polymerase(Applied Biosystems, CA, U.S.A.)가 포함되어 있으며 최종 부피는 25 ㎕가 되도록 하였다. PCR은 GeneAmp PCR system 9600(Applied Biosystems, CA, U.S.A.)을 이용하여 95℃에서 11분간 변성시키고 94℃에서 20초, 55℃에서 20초, 72℃에서 30초의 조건으로 총 45회의 온도순환 후, 최종적으로 60℃에서 45분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 2% agarose gel 상에서 전기영동하여 ethidium bromide 염색으로 증폭여부 및 그 정도를 확인하였다.

Y-STR 유전좌 검사를 위한 PCR이 끝난 증폭산물 1㎕와 내부크기표식자GeneScan-500[ROX] Size Standard(Applied Biosystems, CA, U.S.A.) 1 ㎕를 deionized formamide(Amresco, Ohio, U.S.A.) 20 ㎕에 넣고 95℃에서 3분간 가열하고 얼음에서 급냉하여 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems, CA, U.S.A.)를 이용하여 전기영동하였다. 증폭산물의 크기는 GeneScan software 3.1(Applied Biosystems, CA, U.S.A.)을 이용하여 측

Table 3. Mitochondrial DNA Sequence of a Mummy Sample in Comparison with the Anderson's Reference Sequence

	HV1		HV2				HV3
Anderson's Reference Sequence	1	1	0	0	0	0	0
	6	6	0	0	0	0	0
	2	3	0	2	3	3	4
	2	6	7	6	0	1	8
	3	2	3	3	$9._1$	$5._1$	9
	C	T	A	A	-	-	T
Mummy	T	C	G	G	C	C	C

Table 2. Primer Sequences Used for PCR and Genotyping of Y-STRs

Primer	Sequence	Allele in Koreans[18]
DYS19-F	5'-FAM-CTA CTG AGT TTC TGT TAT AGT	13-18
DYS19-R	5'-ATG GCA TGT AGT GAG GAC A	
DYS389-F	5'-FAM-CCA ACT CTC ATC TGT ATT ATC T	Ⅰ: 11-15
DYS389-R	5'-TTA TCC CTG AGT AGT AGA AGA AT	Ⅱ: 27-32
DYS390-F	5'-HEX-TAT ATT TTA CAC ATT TTT GGG CC	20-26
DYS390-R	5'-TGA CAG TAA AAT GAA CAC ATT GC	
DYS391-F	5'-HEX-CTA TTC ATT CAA TCA TAC ACC CAT AT	8-11
DYS391-R	5'-ACA TAG CCA AAT ATC TCC TGG G	
DYS392-F	5'-FAM-AAA AGC CAA GAA GGA AAA CAA A	11-16
DYS392-R	5'-AAA CCT ACC AAT CCC ATT CCT T	
DYS393-F	5'-HEX-GTG GTC TTC TAC TTG TGT CAA TAC	11-17
DYS393-R	5'-AAC TCA AGT CCA AAA AAT GAG G	

정하였고, 증폭산물의 유전자형은 Genotyper software 2.5(Applied Biosystems, CA, U.S.A.)를 사용하여 동시에 전기영동된 유전자크기표식자(Allelic ladder)와 그 크기를 비교하여 명명하였다.

결 과

1. 미토콘드리아 유전자 분석

mtDNA의 과변이 부위 즉 HV1, HV2, HV3에 대한 PCR은 Fig. 1과 같이 성공적으로 수행되었다. 그림 1에서 보는 바와 같이 HV1에서는 P11과 P12에 의해 각각 249bp, 267bp의 증폭산물을 확인할 수 있었고, HV2에서는 P21과 P22에 의해 226bp, 227bp의 증폭산물을, HV3에서는 255bp의 증폭산물을 확인할 수 있었으며 그 양도 적지 않음을 알 수 있었다.

미라 mtDNA 과변이 영역의 염기서열을 Sequence Navigator Software 1.0(Applied Biosystems, U.S.A.)을 이용하여 Anderson 등[19]의 참고 염기서열과 비교해 보았을 때, 모두 7부위에서 염기 치환 혹은 삽입이 나타났다 (Table 3).

2. Y 염색체 STR 분석

Y 염색체 STR의 PCR 증폭은 Fig. 2와 같이 DYS19, DYS389 - Ⅰ, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393 등 6개 유전자에 대하여 성공적으로 수행되었으며, 그 유전자형은 Table 4와 같이 결정되었다.

고 찰

본 연구에서와 같이 유전자가 분해되어 그 양이 적은 오래된 시료의 유전자 분석에서는 유전자 추출 방법의 최적화를 통하여 PCR 방해 물질을 제거하고 순수한 유전자만을 얻어내는 것이 중요하다. 이를 위하여 먼저 시료를 0.5% trisodium phosphate solution에 넣고 4 ℃에서 2일 정도 방치하여 조직을 rehydration한 후[15], phenol - chloroform - isoamyl alocohol 방법과 silica

Table 4. Genotype of Y-chromosomal STRs from the 350-year-old Mummy Tissue

Locus	DYS19	DYS389-I	DYS390	DYS391	DYS392	DYS393
Genotype	15	14	22	10	13	13

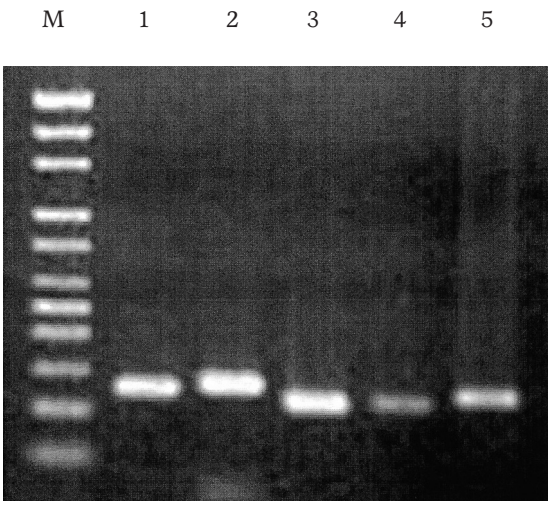

Fig. 1. PCR products of hypervariable control region from the mummy sample.
M: 100bp ladder
1, 2, 3, 4, 5 : PCR products by primer set P11, P12, P21, P22, HV3 respectively.

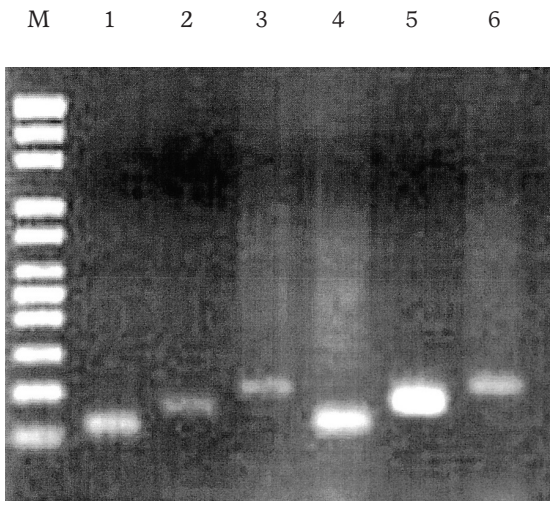

Fig. 2. PCR products of Y-STR loci from the mummy sample.
M : 100bp ladder
1, 2, 3, 4, 5 ,6 : PCR products by primer set DYS392, DYS389-I, DYS19, DYS393, DYS391, DYS390 respectively.

purification을 결합한 방법을 적용하여 유전자를 추출하였다[12]. 또한 PCR은 BSA(Bovine Serum Albumin)와 같은 PCR enhancer를 첨가하고 AmpliTaq Gold DNA polymerase를 1 반응당 2.5 U를 사용하는 전략으로 각각의 유전자를 증폭하였는데, 이러한 최적화된 유전자 추출법과 PCR 조건의 조합에서 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었다[7].

부계 또는 모계의 한 방향으로만 유전되는 Y-chromosomal DNA나 mitochondrial DNA는 그 유전적 특징으로 인해 법의학적 개인식별이나 친족관계 분석에 매우 유용하며, mtDNA와 Y-STRs 분석이 함께 이루어지면 많은 이점이 있다. 파괴나 손상이 심한 시료에서도 mtDNA는 비교적 양이 많고 안정성이 높으므로 분석이 용이하게 이루어질 수 있고, STR의 경우 mtDNA만으로는 부족한 식별력을 높여 줄 수 있다. 상호 보완적인 이 두 가지 유전자를 동시에 분석함으로써 오래되어 파괴나 손상 정도가 심한 시료로부터 좀 더 많은 유전자 정보를 획득할 수 있으리라 예상되는 바[20], 본 연구에서도 이들 유전자를 분석하여 보았다.

미토콘드리아 과변이 영역(HV1, HV2, HV3)의 염기서열을 결정하기 위해 5쌍의 primer set을 사용하여 PCR을 수행한 후 agarose gel 상에서 원하는 크기의 DNA 절편을 확인함으로써 PCR이 모두 성공적으로 수행되었음을 확인하였다. 또한, 각 실험의 단계별로 모두 negative control을 첨가함으로써 각 단계에서의 오염여부를 판단할 수 있었으며, 그 결과 DNA 추출과 PCR 과정 전반에 걸쳐 오염에 의한 오류를 배제할 수 있었다. 이 증폭산물을 대상으로 forward와 reverse primer를 이용하여 염기서열을 결정하고 Anderson의 참고 염기서열과 비교하여 보았을 때 7 부위에서 염기치환 혹은 삽입이 일어났음을 확인할 수 있다. 즉, HV1에서는 16223C가 T로, 16362T가 C로, HV2에서는 73A가 G로, 263A가 G로 치환되었고 309와 315에는 C가 삽입되었으며, HV3에서는 489T가 C로 각각 치환되었다 (Table 3). mtDNA 분석은 일정한 시간 간격을 두고 유전자 추출, PCR 증폭, 염기서열 결정을 2번 이상 독립적으로 시행하고 그 결과를 비교하여 실험의 재현성을 평가하였으며, 실험에 참가한 모든 사람들의 염기서열과 비교하여 서로 다른 염기서열임을 확인함으로써 술자의 오염에 의한 위양성 결과을 배제할 수 있도록 노력하였다[14].

Y-STR 검사에서는 주형 DNA의 양이 mtDNA에 비해 적을 것을 고려하여 PCR cycle을 45-50회 정도로 늘려서 수행하였다. 또한 mtDNA와 마찬가지로 실험의 각 단계별로 모두 negative control을 첨가함으로써 각 단계에서 오염여부를 판단할 수 있도록 하였으며, 2번 이상 전 실험 과정을 반복하여 동일한 결과가 나타났을 때 Y-STR 유전자형으로 결정하였다. 한편, 일반적으로 오래된 시료는 핵 DNA의 파괴나 손상이 심하여 증폭산물이 큰 PCR은 잘 되지 않는 경우가 많다. 따라서 이러한 시료를 대상으로 검사를 수행할 때에는 증폭산물의 크기가 작은 STR 유전좌를 선택하는 것이 중요하다[6, 21]. 본 연구에서도 9개의 minimal haplotype Y-STRs를 분석하려고 시도하였으나, 250bp 이하의 크기를 가지는 DYS19, DYS389-I, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393 등 6개의 유전좌위만 PCR 증폭할 수 있었다. 반복된 실험 결과 130-170bp 정도 크기에 해당하는 DYS389-I와 DYS391에서 PCR이 가장 잘 되고 STR 분석 결과도 매번 동일하게 이루어졌다. 즉, DYS392와 DYS393과 같이 130 bp 이하의 작은 절편의 PCR은 잘 이루어지나 상대적으로 오염의 빈도가 높아 STR 유전자형 결정에 어려움이 있었고, DYS19와 DYS390과 같이 200 bp 정도에 해당하는 절편은 유전자의 손상 및 파괴 정도에 따라 PCR이 잘 이루어지지 않아 유전자형의 결정에 어려움이 따르기도 했다.

미라와 같이 오래된 시료에서 추출된 DNA는 매우 미량이고 더구나 심하게 분해된 경우가 많으며, 유전자 추출물에는 PCR 방해 물질이 포함된 경우가 흔하기 때문에 유전자 분석에 많은 어려움이 따르게 된다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 본 연구에서는 phenol-chloroform-isoamyl alcohol 방법과 silica purification을 결합한 방법을 사용하여 유전자를 추출하였으며, 미량의 DNA 주형으로부터 유전자증폭을 효율적으로 수행하기 위하여 최적화된 PCR 전략을 도입하였다. 본 연구에서 제시한 방법들은 고도로 분해된 시료로부터의 유전자 추출과 증폭에 아주 적합한 방법이라고 사료되는 바, 향후 미라 혹은 오래된 유골의 유전자검사에 유용하게 응용될 수 있을 것으로 본다. 또한 역사학적 자료에 나타난 본 미라에 대한 정보와 법치학적 분석에 의한 추정 연령[22] 그리고 유전자검사 결과를 종합적으로 판단한다면, 미라의 신원을 밝히는 데 있어 보다 과학적인 근거를 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. Butler JM. Forensic DNA typing. Academic Press. 2001
2. Fowler JC, Burgoyne LA, Scott AC, Harding HW. Repetitive deoxyribonucleic acid (DNA) and human genome variation - a concise review relevant to forensic biology. J Forensic Sci 1988;33:1111-26
3. Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. Am J Hum Genet 1991;49: 746-56
4. Urquhart A, Kimpton CP, Downes TJ, Gill P. Variation in short tandem repeat sequences: a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. Int J Legal Med 1994;107:13-20
5. Jobling MA, Pandya A, Tyler-Smith C. The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing. Int J Legal Med 1997;110:118-24
6. Schultes T, Hummel S, Herrmann B. Amplification of Y-chromosomal STRs from ancient skeletal material. Hum Genet 1999;104:164-6
7. Holland MM, Fisher DL, Mitchell LG, Rodriquez WC, Canik JJ, Merril CR, Weedn VW. Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: identification of remains from the Vietnam War. J Forensic Sci 1993;38:542-53
8. Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, et al. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. Nat Genet 1994;6:113-4
9. Wilson MR, DiZinno JA, Polanskey D, Replogle J, Budowle B. Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. Int J Legal Med 1995; 108:68-74
10. Holland MM, Parsons TJ. Mitochondrial DNA sequence analysis - validation and use of forensic casework, Forensic Sci Rev 1999;11:21-50
11. Handt O, Krings M, Ward RH, Paabo S. The retrieval of ancient human DNA sequences. Am J Hum Genet 1996; 59:368-76
12. Yang DY, Eng B, Waye JS, Dudar JC, Saunders SR. Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. Am J Phys Anthropol 1998;105:539-43
13. Schmerer WM, Hummel S, Herrmann B. Optimized DNA extraction to improve reproducibility of short tandem repeat genotyping with highly degraded DNA as target. Electrophoresis 1999;20:1712-6
14. Bar W, Brinkmann B, Budowle B, et al. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. Int J Legal Med 2000;113:193-6
15. Guhl F, Jaramillo C, Vallejo GA, et al. Isolation of Trypanosoma cruzi DNA in 4,000-year-old mummified human tissue from northern Chile. Am J Phys Anthropol 1999;108:401-7
16. Lutz S, Weisser HJ, Heizmann J, Pollak S. A third hypervariable region in the human mitochondrial D-loop. Hum Genet 1997;101:384
17. Kayser M, Caglia A, Corach D, et al. Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study. Int J Legal Med 1997;110:125-33, 141-9
18. Shin DJ, Jin HJ, Kwak KD, Choi JW, et al. Y-chromosome multiplexes and their potential for the DNA profiling of Koreans. Int J Legal Med 2001;115:109-17
19. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 1981;290:457-65
20. Goodwin W, Linacre A, Vanezis P. The use of mitochondrial DNA and short tandem repeat typing in the identification of air crash victims. Electrophoresis 1999;20: 1707-11
21. Hummel S, Schultes T, Bramanti B, Herrmann B. Ancient DNA profiling by megaplex amplications. Electrophoresis 1999;20:1717-21
22. Shin DH, Choi YH, Shin KJ, et al. Radiological analysis on a mummy from a medieval tomb in Korea. Ann Anat 2003;18:377-82