체액 식별을 위한 DNA 메틸화 분석법과 체액 특이 미생물 확인법의 융합 및 유용성 평가

연세대학교 대학원

의 과 학 과

최 아 진

체액 식별을 위한 DNA 메틸화 분석법과 체액 특이 미생물 확인법의 융합 및 유용성 평가

지도교수 신 경 진

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2012년 12월

연세대학교 대학원

의 과 학 과

최 아 진

최아진의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2012년 12월

감사의 글

우선 막연하게 관심만 있던 법의학을 공부할 수 있는 기회를 주시고, 많은 지도와 조언을 아끼지 않으신 신경진 교수님께 깊은 감사 드립니다. 그리고 항상 격려를 아끼지 않으시고 바쁘신 와중에 세심하게 지도해주신 양우익 교수님, 좋은 논문이 될 수 있도록 많은 조언해주시고 심사해주신 김형표 교수님께도 감사의 말씀을 전합니다. 또한 깊이 있는 연구를 할 수 있도록, 여러 기회를 통하여 발전할 수 있도록 항상 격려해주시고 세심하게 지도해주신 이환영 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 뒤에서 함께 고민해 주시고 조언해 주셨던 양인석 박사님, 처음 왔을 때부터 하나하나 가르쳐 주시고 도와주셨던 박명진 선생님, 같은 methylation 팀으로 어려울 때마다 도움주신 안자현 선생님, 미생물에 대해 아무것도 모르던 저에게 도움주시고 격려해주신 이은영, 박성규 선생님, 함께 공부하고 도움이 필요할 때마다 언제나 군말없이 도와줬던 은혜씨와 유나씨, 비록 다른 실험실 이지만 대학원에서 다시 만나 서로 의지할 수 있었고 힘이 되어준 지혜에게 감사의 말을 전합니다. 그리고 멀리서 도움 주시고 격려해 주신 윤정아, 김나영 선생님, 정은언니에게도 고마움을 전합니다.

마지막으로 멀리 떨어져 있지만 항상 기도해주시고 아낌없는 사랑과 믿음을 보내주셨던 부모님, 늘 힘이 되어준 동생에게 깊은 감사의 말을 전합니다. 가족들의 든든한 지원이 있었기에 무사히 마칠 수 있었습니다.

그리고 여기에 모두 언급하지 못하였지만 저를 아껴주시고 도움 주시고 기도해 주셨던 모든 분들께 이 결실을 바칩니다.

2012년 12월 저자 씀

<차례>

국문요약····· 1

Ⅰ. 서론····· 4
II. 재료 및 방법 ····· 9
1. 연구대상 ····· 9
2. DNA 추출 및 정량····· 10
3. 체액 식별을 위한 표지자 선정 ····· 10
4. Primer 설계 ····· 13
5. Methylation sensitive restriction enzyme 처리 ····· 16
6. 중합효소연쇄반응 증폭 ····· 17
7. 중합효소연쇄반응 증폭산물의 유전자형 결정 ····· 18
8. 대립유전자 사다리와 표지자 사다리와 체액 식별을 위한 패널 생성·····18
9. 다중중합효소연쇄반응검사의 식별력 검사 ·····19
10. 75일간 실내 환경에 노출시킨 시료에서의 체액 감별 효율 확인 ····· 20
11. 새로 구축된 다중중합효소연쇄반응의 민감도 확인 ····· 20
12. 혼합된 체액의 다중중합효소연쇄반응 검사 ····· 21
III. 결과 ····· 22
1. Methylation-sensitive restriction enzyme-polymerase chain reaction (MSRE-PCR) 구축 ····· 22
2. 박테리아 존재 확인을 위한 중합효소연쇄반응 시스템 구축··22
3. 다중중합효소연쇄반응 구축 및 체액별 프로파일링 ····· 23
4. 정액 DNA의 다양한 메틸화 패턴 ····· 28
5. 75일간 실내 환경에 노출시킨 시료에서의 체액 감별 효율 확인 ····· 30
6. 새로 구축된 다중중합효소연쇄반응의 민감도 확인 ····· 32
7. 혼합된 체액의 다중중합효소연쇄반응 검사····· 40
IV. 고찰····· 43

V. 결론 ····· 57

참고문헌····· 59
영문요약····· 64
게재 리스트····· 67

그림 차례

그림 1. Conversion of cytosine to 5-methylcytosine by methyltransferase ····· 5

그림 2. Principle of methylation-sensitive restric-tion enzyme-polymerase chain reaction (MSRE-PCR) ····· 16

그림 3. Scheme of multiplex PCR system for body fluid identification ····· 24

그림 4. Result of MSRE-PCR (left) and a body fluid-specific bacteria presence test (right) in each body fluid ····· 25

그림 5. Various DNA methylation patterns of semen ····· 29

그림 6. Body fluid identification of samples exposed to indoor environment for 75 days ····· 31

그림 7. Sensitivity test results of the developed multiplex PCR system in saliva ····· 34

그림 8. Sensitivity test results of the developed multiplex PCR system in semen ····· 35

그림 9. Sensitivity test results of the developed multiplex PCR system in vaginal fluid …· 36

그림 10. Sensitivity test results of the developed multiplex PCR system using various concentrations of saliva DNA with different PCR cycles …… 37

그림 11. Sensitivity test results of the developed multiplex PCR system using various concentrations of semen DNA with different PCR cycles …… 38

그림 12. Sensitivity test results of the developed multiplex PCR system using various concentrations of vaginal fluid DNA with different PCR cycles …… 39

그림 13. Results of mixture sample multiplex PCR test …… 41

표 차례

표 1. Multiplex PCR primers for DNA methylation profiling using MSRE-PCR ····· 14

표 2. Multiplex PCR primers for amplification of bacterial 16S ribosomal RNA gene ····· 15

표 3. The profile of bacteria in each body fluid ·· 28

국문요약

체액 식별을 위한 DNA 메틸화 분석법과 체액 특이 미생물 확인법의 융합 및 유용성 평가

범죄 현장에서 발견된 체액의 종류를 확인하는 것은 체액의 제공자와 실제 범죄 행동을 연관 짓는데 중요한 정보를 제공한다. DNA를 기반으로 체액을 식별하는 방법들 중 DNA 메틸화 프로파일링은 tDMRs (tissue-specific differentially methylated regions)에서의 DNA 메틸화 정도의 차이를 이용하는 방법으로, 현재까지 발굴된 tDMR 표지자는 정자가 존재하는 정액을 성공적으로 식별 할 수 있으며 혈액과 타액으로부터 질분비액과 생리혈을 구별할 수 있다. 다른 방법은 체액의 종류에 특이적으로 존재하는 박테리아 DNA를 검출하는 방법으로 타액과 질분비액을 식별할 수 있다. 따라서, 이 2가지 방법을 융합하는 것은 한번의 반응으로 좀더 다양한 체액을 효과적으로 식별하도록 할 것이다.

이러한 목적을 달성하기 위하여, 이전에 보고된 tDMRs 표지자들을 이용하여 DNA 메틸화 정도를 분석하는 MSRE-PCR (methylation-sensitive restriction enzyme-polymerase chain reaction)에 타액과 질분비액에 존재할 것이라 예상되는 박테리아의 16S rRNA gene에 대한 표지자를 추가하여 체액 유형 감별의

변별력을 개선한 다중중합효소연쇄반응 방법을 구축하였다. 새로운 방법을 이용하여 정액은 USP49, DACT1, PFN3 tDMRs의 unmethylation과, L81528의 methylation으로 쉽게 식별할 수 있었다. 타액은 타액 특이적 박테리아인 *Streptococcus salivarius*나 *Veillonella atypica*를 검출함으로써 구별할 수 있었으며, 질분비액과 생리혈은 PFN3 tDMR이 hypomethylation되고, 질분비액 특이적 박테리아인 *Lactobacillus crispatus*나 *Lactobacillus gasseri*의 존재를 확인함으로써 다른 유형의 체액으로부터 구분할 수 있었다.

75일간 실내 환경에 노출된 체액 또한 성공적으로 분석할 수 있어 본 연구를 통해 구축된 다중중합효소 연쇄반응은 오래되고 분해된 체액에서도 유용하게 사용할 수 있을 것이라 예상된다.

또한, 구축된 다중중합효소연쇄반응 시스템은 표준 조건일 경우, 타액과 정액은 DNA 500 pg 이상에서, 질분비액은 DNA 250 pg 이상에서 분석 가능함을 보였다. 중합반응 횟수를 늘림으로써 31 pg의 DNA으로도 체액을 구분할 수 있었다. 이러한 높은 민감도를 나타내는 것은 DNA 메틸화 분석법과 체액 특이 박테리아 확인법이 서로의 단점을 상호보완하여 가능하였다.

본 연구에 의해 구축된 다중중합효소연쇄반응은 개인 식별 프로파일링을 위해 사용하는 동일한 생물학적 시료인 DNA를 사용한다는 점과 한번의 반응으로 다양한 유형의 체액을 동시에 식별할 수 있다는 점을 고려하였을 때 법의 실제 영역에서 좀더

효과적인 체액 식별 방법으로 사용할 수 있을 것이다.

핵심되는 말: 체액 식별, DNA 메틸화, methylation-sensitive restriction enzyme 중합효소연쇄반응, 타액 특이 박테리아, 질분비액 특이 박테리아

체액 식별을 위한 DNA 메틸화 분석법과 체액 특이 미생물 확인법의 융합 및 유용성 평가

<지도교수 신 경 진>

연세대학교 대학원 의과학과

최 아 진

Ⅰ. 서론

범죄 현장에서 발견되는 체액은 범죄 과학 수사의 가장 중요한 증거물 중 하나로 용의자나 피해자의 신원을 확인할 수 있는 가치 있는 정보를 포함한다. 또한 특정 체액의 종류를 확인하는 것만으로도 그 체액의 제공자와 실제 범죄 행동을 연관 지어 범죄 현장을 재구성하는데 도움이 될 수 있다.[1]

현장에서 주로 발견되는 체액은 혈액, 타액, 정액이며 질분비액이나 소변, 땀과 같은 체액들 또한 가치 있는 DNA 증거물을 포함하여 중요한 역할을 할 수 있다. 예를 들어, 현장에서 발견된 혈흔이 혈액인지 생리혈인지 구분함으로써 폭행 여부 등 사건의 본질을 판별할 수 있고, 정액이나 질분비액이 발견된다면 성범죄 또는 성적 접촉이 있었음을 입증할 수 있을 것이다. 또한 피해자의 피부에서 범인의 타액을 증명할 수 있으면 범인과 피해자가 접촉했다는 증거

를 제시하거나 교흔(bite marks)의 존재 사실을 뒷받침 할 수 있다.

현재까지 법과학 영역에서 조직 및 체액을 효과적으로 식별할 수 있는 방법은 지속적으로 개발되고 있다. 주로 특정 조직이나 체액에서 특이적으로 발현되는 단백질 또는 효소를 검출하는 방법을 사용해 왔으며, 최근에는 조직 특이적으로 발현되는 messanger RNA 또는 micro RNA를 대상으로 하는 연구가 많이 수행되었다.[2-4] 하지만 개인 식별 프로파일링 등 법과학 영역에서 생물학적 시료로서 DNA를 주로 사용한다는 점 등을 고려하여 DNA를 기반으로 한 체액 식별 방법도 최근 발표되고 있다.

현재까지 보고된 DNA를 기반으로 하는 체액 식별 방법에는 DNA 메틸화 정도의 차이를 이용하는 방법과 체액의 종류에 특이적인 박테리아를 확인하는 방법이 있다.

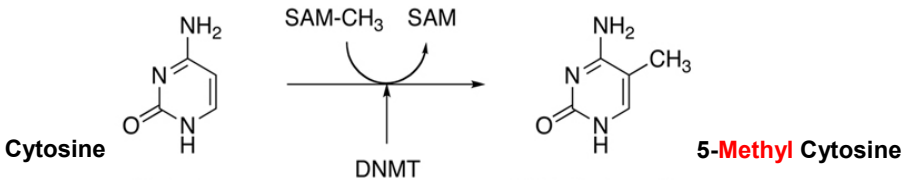


그림 1. Conversion of cytosine to 5-methylcytosine by methyltransferase

DNA 메틸화는 기본적인 DNA 서열의 변화 없이 유전자 발현 조

절에 영향을 미치며, 조직이나 세포에 따라 서로 다른 패턴을 가지고 있다. 특히 tDMRs (tissue-specific differentially methylated regions)로 알려진 유전자상의 영역은 조직마다 차이를 보이는 메틸화 패턴을 나타내는 것으로 알려져 있다.[5-7] 이 영역의 DNA 메틸화 정도의 차이를 분석하여 조직 혹은 체액을 식별하는 방법들이 법과학 영역에서 보고가 되었으며,[8-9] 대표적인 분석방법으로는 methylation sensitive restriction enzyme-polymerase chain reaction (MSRE-PCR) 방법과 bisulfite SNaPshot이 있다.[10-11] 최근 개발된 Nucleix DSI-Semen kit (Nucleix, Tel Aviv, Israel)는 MSRE-PCR 방법을 이용하여 정액을 특이적으로 식별할 수 있는 상용화 된 키트로, 적은 양의 DNA로 정액 식별이 가능하며 짧은 크기의 중합효소연쇄반응 증폭산물로 구성되어 분해된 DNA에서도 분석이 가능하다. 게다가 상용화된 개인 식별 테스트 키트와 기기 장비를 동일하게 사용할 수 있다는 장점이 있다.[12-13] 또한 연세대 연구진에 의해 위 2가지 방법을 이용하여 tDMRs에서의 메틸화 정도의 차이를 분석하는 체액 식별 방법이 제시 되었으며, 이들은 정자를 포함하고 있는 정액의 식별이 가능하고, 질분비액과 생리혈을 혈액과 타액으로부터 구별할 수 있었다.[10] 하지만 DNA 메틸화 분석법은 아직 개발 초기 단계이며, 좀더 세부적으로 체액을 식별하기 위해서는 다양한 체액에 특이적인 tDMR을 보다 많이 발굴할 필요가 있다.

반면에 DNA를 기반으로 하는 최근의 연구 방법 중 하나는 특정

체액 내에 존재하는 미생물을 확인하는 방법으로,[14-19] 박테리아의 종 특이적 영역을 가지고 있는 16S ribosomal RNA (rRNA) gene이나 16S-23S rRNA intergenic spacer region을 중합효소연쇄반응으로 증폭함으로써 이루어진다. 특히 박테리아의 16S rRNA gene은 여러 박테리아 사이에서 매우 잘 보존되는 영역이 있는 반면 여러 가지 박테리아 사이에 염기서열의 다양성을 가지는 초가변영역을 가지므로 이를 이용하여 박테리아를 효과적으로 구별할 수 있다.[20-21] 법과학 영역의 체액 식별에서는 주로 타액과 질분비액에 초점이 맞춰져 있으며, 타액의 경우 *Streptococcus salivarius*와 *Streptococcus mutans* 종이 대표적으로 이용되고[14-16] 질분비액의 경우 *Lactobacillus crispatus, Lactobacillus gasseri, Lactobacillus iners, Lactobacillus jensenii* 등을 이용하여 다른 체액으로부터 질분비액을 식별할 수 있다.[17-19] 또한 가임 여성에게서 가장 빈번하게 나타나는 질 감염 질환인 세균성 질염과 관련된 *Gardnerella vaginalis*와 *Atopobium vaginae*도 질분비액을 식별하는데 유용한 표지자로 사용될 수 있음이 보고되었다.[17] 하지만 박테리아의 존재 유무를 통한 체액 식별 방법은 타액과 질분비액등 박테리아가 존재하는 체액에 그 사용이 국한되어 있으므로 정확한 체액 식별 방법을 위해서는 혈액이나 정액 등도 확인할 수 있는 다른 체액 식별 방법과 함께 사용해야 할 것이다. 또한 인접한, 혹은 접촉 가능한 곳에 박테리아가 옮겨 가서 체액 식별의 정확도가 떨어질 수 있는 가능성도 있으므로 분석시 이를 염두에 두어야 한다.[18]

따라서 본 연구에서는 DNA 메틸화 분석 방법과 체액특이 박테리아의 존재 확인법을 융합하여 이들의 한계점을 보완하고 기존의 체액 식별 방법을 개선하고자 한다. 현재 DNA를 기반으로 하는 체액 식별 방법에는 한번의 반응으로 동시에 여러 체액을 정확하고 효과적으로 식별할 수 있는 방법은 없다. 따라서, 두 가지 체액 식별 방법을 융합한다면 DNA 메틸화를 기반으로 한 체액 식별의 한계점을 타액과 질분비액에 존재하는 박테리아를 확인하여 보완함으로써 한번의 분석으로 5가지 체액을 효과적으로 구별할 수 있을 것이다. 이에, MSRE-PCR 방법을 이용한 DNA 메틸화 분석법과 체액 내 특정 미생물 존재 여부를 동시에 분석 할 수 있는 다중중합효소연쇄반응을 구축함으로써 모든 체액을 한번의 반응으로 동시에 식별할 수 있는 방법을 제시하고자 한다. 또한 개발된 다중중합효소연쇄반응 분석법의 식별력, 민감도 확인 및 혼합된 체액 검사 등을 통하여 법의 실제 영역에서의 유용성을 평가하고자 한다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 연구대상

본 연구에서는 기원을 알고 있는 체액을 테스트 하기 위해 총 5가지 체액(혈액, 타액, 정액, 질분비액, 생리혈)을 모집하여 구축된 다중중합효소연쇄반응의 정확도를 평가하고자 하였다. 이를 위해 피험자 모집 공고문을 통하여 20대에서 50대까지 다양한 연령대의 건강한 한국인을 모집하였으며, 남성으로부터 혈액, 타액, 정액을, 여성으로부터 혈액, 타액, 질분비액과 생리혈을 기증 받았다. 혈액은 주사기를 이용하여 2 ㎖씩 얻고, 타액과 정액은 각각 미세원심분리 튜브에 1 ㎖, 전용용기에 1회 분비량을 얻었다. 질분비액과 생리혈은 각각 4개의 멸균된 면봉을 통해 얻었다. 기증 받은 혈액, 타액, 정액은 200 ㎕씩 미세원심분리 튜브에 분주한 채로, 질분비액과 생리혈의 경우 각각 채취된 면봉 채로 DNA를 추출할 때까지 -20℃ 냉동고에 보관하였다. 본 연구는 연세대학교 의과대학 연구심의위원회와 유전자연구 생명윤리심의위원회의 승인을 받아 수행되었다(승인번호 4-2012-0247).

2. DNA 추출 및 정량

보관된 시료들은 체액의 타입에 따라 혈액, 타액, 정액은 QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)에서 Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin protocol)에 따라 추출하였고, 질분비액과 생리혈은 QIAamp® DNA Investigator Kit (QIAGEN)에서 Protocol: Isolation of Total DNA from Surface and Buccal Swabs에 따라 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA 시료는 Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 정량 한 후, -20℃에서 보관하였다.

3. 체액 식별을 위한 표지자 선정

DNA 메틸화 정도를 통해 체액을 식별하기 위해 4개의 tDMRs (tissue-specific differentially methylated regions)를 선정하였다.

USP49와 DACT1은 Kitamura 등[8]에 의해 보고된 tDMRs 중 하나로 고환에만 특이적으로 unmethylation 됨으로써 발현되는 유전자이다. 따라서 연세대 연구팀에서 정액 또한 이와 관련이 있을 것이라 여겨 실제 혈액, 타액, 정액, 질분비액 그리고 생리혈에서의 메틸화 패턴을 분석하였고,[9] 연령에 관계 없이 정액에서만 unmethylation 패턴을 보임을 확인한 바 있다.[10] 따라서, USP49와

DACT1을 정액 식별을 위한 tDMR 표지자로 선정하였다.

Frumkin 등[11]에 의해 제시된 L81528 표지자는 USP49, DACT1과 반대로 정액에서 methylation 되어 있음으로써 다른 체액들과 구별된다. L81528 표지자를 USP49, DACT1과 함께 정액 식별을 위한 tDMRs 표지자로 선정함으로써 서로 반대되는 패턴으로 좀더 확실하게 정액을 식별할 수 있도록 하였다.

마지막으로 PFN3는 Illingworth 등[7]에 의해 혈액에 특이적인 메틸화 패턴을 보인다고 보고되었으나, 연세대 연구진의 실험 결과에 따르면 정액 특이적으로 unmethylation 경향을 보이고, 질분비액과 생리혈에서도 hypomethylation 경향을 보이는 것으로 나타났다.[9] 따라서 정액을 식별하고, 질분비액과 생리혈을 혈액과 타액으로부터 식별할 수 있는 표지자로써 선정하였다.

체액 특이 박테리아의 존재 확인을 위하여 타액과 질분비액에 대하여 각각 2개의 박테리아 표지자를 선정하였다. 박테리아 선정에 있어서 되도록 표적 체액 내에만 존재하고 다른 체액에서 존재하지 않는 박테리아를 표지자를 선정하였다.

타액 특이 박테리아의 경우 법의 영역에서 타액을 식별하기 위해 주로 이용하는 *Streptococcus salivarius*를 우선 선정하였다.[14-16] 또한 법의 영역에서는 보고된 바 없으나 다양한 연령대의 한국인에서 빈번하게 나타난다고 보고된 *Veillonella atypica*를 선정하였다.[22]

질분비액 특이 박테리아로 질 정상세균종인 *Lactobacillus*

*crispatus*와 *Lactobacillus gasseri*를 선정하였다. 이 두 종은 질분비액 내에 항상 둘 중 하나의 종이 존재 한다고 보고된 바 있다.[19]

양성 대조군으로 methylation sensitive restriction enzyme인 Hha I 의 인지 부위를 포함하지 않아 항상 증폭하는 Amelogenin과 D3S1358 표지자를 선정하였다. 이들은 양성 대조군의 역할 외에 성별을 확인하고, 개인 식별 표지자인 짧은연쇄반복 표지자를 확인함으로써 샘플이 바뀌는 것을 막을 수 있다.

제한효소인 Hha I 의 완전한 절단을 확인하기 위하여 인위적으로 만들어진 DNA의 증폭산물인 Digestion control 표지자가 음성 대조군으로써 사용하였다. 중합효소연쇄반응 증폭산물은 모든 CpG 부위에 메틸기가 붙지 않으므로,[23] pCR®2.1-TOPO® vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)의 중합효소연쇄반응 증폭산물인 인위적으로 만들어진 DNA는 Hha I 처리시 항상 절단되어 이후 중합효소연쇄반응에서 증폭되지 않는 음성 대조군이 된다.

또한 인위적으로 만들어진 DNA의 투입을 확인 하기 위하여 Hha I 인지 부위를 포함하지 않는 영역을 증폭시키는 Amplification control 표지자 또한 선정하였다.

4. Primer 설계

DNA의 메틸화 패턴을 확인하는 methylation-sensitive restriction enzyme-polymerase chain reaction (MSRE-PCR) 영역의 4가지 tDMRs 표지자에 대한 primer는 증폭되는 영역 안에 Hha I 인지 부위인 GCGC 염기서열을 포함하도록 설계한 반면 양성 대조군인 Amelogenin과 D3S1358은 Hha I 의 인지영역을 포함하지 않는 영역을 증폭하도록 설계하였다. 이들의 primer를 설계하기 위한 각 유전자에 대한 DNA 염기서열은 UCSC genome browser (http://genome. ucsc.edu/)에서 얻을 수 있었다. 인위적으로 만들어진 DNA에서도 음성 대조군인 Digestion control은 Hha I 인지 영역이 포함된 부분을 증폭하도록 하였고, 또 하나의 양성 대조군인 Amplification control의 경우 인간 DNA에 대한 양성 대조군과 마찬가지로 Hha I 의 인지 영역을 포함하지 않는 부분을 증폭하도록 primer를 설계하였다. 모든 primer는 획득된 염기서열 정보를 Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm)에 적용하여 설계하였다. Melting temperature (Tm)는 57℃에서 63℃ 사이이면서 적정 값은 60℃, primer의 최소 크기는 18 nucleotide bases, primer의 GC% 범위는 20에서 80이 되도록 하는 Primer3 상에 내정된 조건을 따랐으며, 중합효소연쇄반응 증폭 산물의 크기가 80-150 bp가 되도록 지정하여 채택하였다. MSRE-PCR에 사용한 primer는 표 1에 나타내었다.

표 1. Multiplex PCR primers for DNA methylation profiling using MSRE-PCR

Gene	Primer sequences (5'>3')	Conc. (μM)	Size (bp)
USP49	F: GTAGCAGGTGTTGCCCAGGTT	1.0	107
	R: (FAM)CCCTCCCTACCTCACGCAGA	1.0	
DACT1	F: (FAM)CACTCCTCCCCTGCTGTCTA	0.7	118
	R: GATAAACTGGGCCTTGACCA	0.7	
L81528	F: (FAM)CTTCTGGGGCGACTACCTG	0.4	128
	R: AGTCAGCCTCATCCACACTGA	0.4	
PFN3	F: CCTGGCAGCCTCTAGACTCA	0.15	137
	R: (FAM)GGGCCAAATAAACTGTGACC	0.15	
Amelogenin	F: CCCCTTTGAAGTGGTACCAGAG	0.25	81,84
	R: (FAM)GCATGCCTAATATTTTCAGGGAATAA	0.25	
D3S1358	F: GAGCAAGACCCTGTCTCATAGA	0.27	83-111
	R: (HEX)TCAACAGAGGCTTGCATGTAT	0.27	
Amplification control	F: CTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTT	0.15	131
	R: (HEX)CAACCCGGTAAGACACGACT	0.15	
Digestion control	F: GGTGAAGATCCTTTTTGATAATCT	1.0	144
	R: (HEX)TTTGTTTGCAAGCAGCAGAT	1.0	

박테리아의 16S ribosomal RNA (rRNA) gene은 여러 가지 박테리아 사이에 염기서열의 상당한 다양성을 가지는 초가변영역을 가지며, 또한 같은 박테리아임에도 불구하고 서로 다른 염기 서열을 가지는 영역도 있다. 따라서 선정된 후보 박테리아의 gene 중에서 종특이적 영역을 가지고 있는 bacterial 16S ribosomal RNA gene 내에서 분석할 영역을 결정하였다. 우선 Ribosomal Database Project (http://rdp.cme.msu.edu/)에서 여러 계통의 동일 박테리아 종의 염

기서열을 얻은 후 ClustalW2 프로그램 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)을 사용하여 동일 박테리아 종 사이의 서로 다른 염기서열을 있는 부분을 구분하여 이 부분을 피해서 primer를 디자인 하였다. Primer3 프로그램을 이용하여 디자인된 primer들은 Ribosomal Database Project 웹사이트에서 probe match를 시킴으로써 디자인된 primer가 어떤 박테리아와 match되는지 여부를 확인하여 선정된 primer쌍을 사용했을 때 가장 적은 종을 특이적으로 증폭시키는 primer를 선정하였다. Primer 조건은 MSRE-PCR과 동일한 조건이 되도록 지정하여 채택하였다. 박테리아 다중중합효소연쇄반응에 사용된 primer는 형광 dye로 TAMRA를 사용하여 DNA 메틸화 분석 영역과 구별되도록 하였고, 이들의 염기 서열 및 표적 박테리아는 표 2에 나타내었다.

표 2. Multiplex PCR primers for amplification of bacterial 16S ribosomal RNA gene

Marker	Target bacteria	Primer sequences (5'>3')	Conc. (μM)	Size (bp)
V. aty	*V. atypica*	F: TTAATAGACGGAAGCGAAACC	0.12	127
		R: (TAMRA)CCGCAGTATGCTGACCTGC	0.12	
S. sal	*S. salivarius*	F: (TAMRA)TACCGCATAACAATGGATGAC	0.2	98
		R: TTACCTCACCTACTAGCTAATACAACG	0.2	
L. cri	*L. gallinarum* *L. helveticus* *L. crispatus* *L. acidophilus*	F: (TAMRA)TGCCCCATAGTCTGGGATAC	0.2	107
		R: CATCCCATAGCGACAGCTTA	0.2	
L. gas	*L. johnsonii* *L. gasseri*	F:(TAMRA)GACGGTAATTACTTAGAAAGT CACGG	0.4	117
		R: CTTATTGAACCGCCTGCACT	0.4	

5. Methylation sensitive restriction enzyme 처리

DNA 메틸화 분석을 위하여 메틸화 되어 있지 않은 CpG 인지 부위를 인식하여 절단하는 methylation sensitive restriction enzyme을 사용하였다. 그 중 메틸화 되어 있지 않은 GCGC 인지 부위를 절단하는 Hha I 을 사용하였다.

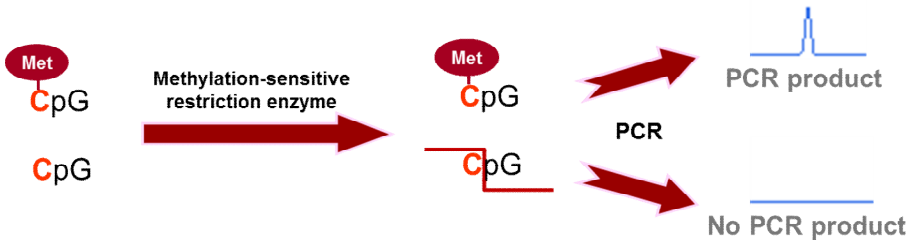


그림 2. Principle of methylation-sensitive restriction enzyme -polymerase chain reaction (MSRE-PCR)

1 ng의 주형 DNA가 10 U의 Hha I (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) 및 1.0 ㎕의 Gold ST*R 10X Buffer (Promega, Madison, WI, USA)에 인위적으로 만들어진 DNA 1 ㎕를 포함하여 총 10 ㎕의 혼합물에서 절단되었다. 인위적으로 만들어진 DNA는 항상 메틸화 되어 있지 않도록 만든 DNA로 pCR®2.1-TOPO® vector (Invitrogen)의 Hha I 인지 부위를 포함하는 481 bp 부분을 중합효소연쇄반응으로 인한 증폭에 의해 얻은 후 genomic DNA 1 ng에 상응하도록 희석하여 사용하였다. 이들은 37℃에서 30분동안

효소 처리 한 후 65℃에서 20분동안 배양함으로써 열에 의해 비활성화 시켰다.

6. 중합효소연쇄반응 증폭

중합효소연쇄반응 증폭을 위한 혼합물에는 표 1, 2의 최종 농도에 해당하는 primer와 1.0 ㎕의 Gold ST*R 10X Buffer (Promega) 및 2.0 U AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems)가 포함되도록 하였고, DMSO를 5 % 추가하여 GC 함량이 높은 곳에서도 주형 DNA가 잘 증폭 될 수 있도록 하였다. 이 혼합물에 효소가 처리된 DNA 10 ㎕를 첨가한 후, 최종 부피는 멸균된 3차 증류수로 20 ㎕가 되도록 맞추어 잘 섞어 주었다. 중합효소연쇄반응 혼합물은 PTC-200 DNA engine (MJ Research, Waltham, MA, USA)에 장착하여, 95℃에서 11분간 변성시키고 94℃에서 20초, 59℃에서 1분, 72℃에서 30초의 조건으로 28회 중합반응 후 최종적으로 60℃에서 60분간 반응시킨 후 4℃에 잠시 보관하였다.

7. 중합효소연쇄반응 증폭산물의 유전자형 결정

중합효소연쇄반응 증폭산물 1.0 ㎕를 0.2 ㎕의 GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems)와 20.0 ㎕의 Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems)와 혼합하여 95℃에서 5분간 반응시켜 변성시키고 얼음에 넣어 2분 30초간 방치하였다. 1.0 ㎕의 대립유전자 사다리도 중합효소연쇄반응 증폭산물과 동일한 방법으로 준비한 후, 준비된 시료들을 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)에 장착하여 Performance Optimized Polymer 4 (POP4; Applied Biosystems)와 47 cm x 50 ㎛의 310 capillary (Applied Biosystems)를 사용하여 전기영동 하였다. 중합효소연쇄반응 증폭산물과 대립유전자 표지자 사다리 및 내부크기표식자의 DNA 단편 크기는 전기영동 중 실시간 ABI Prism 310 Data Collection Software 1.2 (Applied Biosystems)에 입력시킨 후 GeneMapper ID 3.2 (Applied Biosystems)를 이용하여 형광상 측정법으로 내부 크기 표식자에 대한 상대적인 크기로 각각의 체액 식별용 표지자의 크기를 측정하였다.

8. 대립유전자 사다리와 체액 식별을 위한 패널 생성

대립유전자 사다리는 체액 식별을 위한 모든 12개의 체액 식별용 표지자를 포함하도록 각각의 표지자에 해당하는 시료를 따로따로

중합효소연쇄반응을 수행한 후 그 증폭산물을 취합하여 만들었다. 취합된 중합효소연쇄반응 증폭산물은 QIAquick® PCR purification Kit (Qiagen)을 이용하여 정제한 후, GeneMapper ID 3.2 (Applied Biosystems)를 이용하여 체액 식별을 위한 패널을 정함으로써 분석을 정확하고 용이하도록 하였다.

9. 다중중합효소연쇄반응검사의 식별력 검사

본 연구를 통하여 구축된 다중중합효소연쇄반응이 어느 정도 체액 식별이 가능한지 확인하기 위하여, 기원을 알고 있는 체액들을 이용하여 증폭하였다. 혈액 20명, 타액과 정액 21명, 질분비액과 생리혈 14명의 체액을 사용하여 측정하였으며, 정액에는 정관수술을 한 2명의 남자가 포함되어 있다. 중합효소연쇄반응의 증폭조건은 앞서 설명한 중합효소연쇄반응 조건과 동일하며, 좀더 정확한 측정을 위하여 제한효소 HhaI을 처리하지 않은 체액도 동시에 진행하였다. HhaI을 처리하지 않을 경우, 중합효소연쇄반응 증폭을 위한 혼합물에는 1 ng의 주형 DNA와 1 ul의 인위적으로 만들어진 DNA에 표 1, 2의 최종농도에 해당하는 primer와 2.0 ㎕의 Gold ST*R 10X Buffer 및 2.0 U AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems)가 포함되도록 하였고, DMSO를 5 % 추가하여 GC 함량이 높은 곳에서도 주형 DNA도 잘 증폭 될 수 있도록 하였다. 제한효소 처리 전후를 동시에 중합효소연쇄반응하여 어느정도 차이를

보이는지 확인하였다.

10. 75일간 실내 환경에 노출시킨 시료에서의 체액 감별 효율 확인

본 연구를 통해 구축된 다중중합효소연쇄반응이 오래되고 분해된 시료에서도 체액 식별이 가능한지 확인하기 위하여 각각의 체액을 75일간 실내 환경에 노출시켰다. 혈액과 타액은 10 ㎕를 거즈에 묻혀 노출시켰고, 정액과 질분비액, 생리혈은 면봉에 묻힌 채로 노출시켰다. 75일이 지난 후 QIAamp® DNA Investigator kit (QIAGEN)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 DNA를 추출하였다. 각 체액의 DNA를 주형으로 동일한 방법으로 중합효소연쇄반응을 위한 혼합물을 만들고, 29회의 중합효소연쇄반응을 수행하였다.

11. 새로 구축된 다중중합효소연쇄반응의 민감도 확인

본 연구를 통해 구축된 다중중합효소연쇄반응이 어느 정도의 민감도를 나타내는지 확인하기 위하여, 각각 2명의 타액, 정액, 질분비액의 DNA를 1 ng부터 500 pg, 250 pg, 125 pg, 62 pg, 31 pg, 15 pg으로 차례로 희석하여 증폭하였다. 다중중합효소연쇄반응의 증폭조건은 앞서 설명한 중합효소연쇄반응 조건과 동일하며, 온도순환 반복 횟수 또한 28회로 동일하게 수행하였다. 그리고 각 주형 DNA의 농도에 따라 온도순환 반복 횟수를 달리함으로써 더

낮은 농도에서도 분석가능한지 확인하기 위하여 500 pg과 250 pg은 30회, 125 pg과 62 pg은 32회 그리고, 31 pg은 34회로 차등을 두어 수행하였다. 각각의 농도 별 주형 DNA를 이용한 다중중합효소연쇄반응은 3회 반복하여 수행하였다.

12. 혼합된 체액의 다중중합효소연쇄반응 검사

본 연구를 통해 구축된 다중중합효소연쇄반응이 두가지의 체액이 혼합된 경우에도 식별 가능한지 확인하기 위하여, 타액과 정액, 질분비액과 타액, 질분비액과 정액 혼합물을 인위적으로 만들어 확인하고자 하였다. 타액과 정액의 경우 거즈 위에 타액 10 ㎕와 정액 10 ㎕로 1:1의 비율로 섞은 시료와 타액 10 ㎕, 정액 20 ㎕로 1:2의 비율로 섞은 시료를 만들었다. 또한 질분비액이 묻혀진 4개의 면봉 위에 타액과 정액을 각각 5 ㎕와 10 ㎕씩 분주하여 혼합물 시료를 만들었다. 이들을 하루 동안 건조한 후에 QIAamp® DNA Investigator kit (QIAGEN)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 DNA를 추출하였다. 각 혼합 체액의 DNA를 주형으로 앞서 설명한 동일한 방법으로 중합효소연쇄반응을 수행하였다.

Ⅲ. 결과

1. Methylation-sensitive restriction enzyme-polymerase chain reaction (MSRE-PCR) 구축

선정된 4개의 tDMRs 표지자에 대하여 각각 설계된 primer가 Hha I 처리된 체액에서 예상된 메틸화 패턴을 보이는지 확인하였다. 몇 tDMRs에서 GC 함량이 높아 증폭 효율이 떨어지는 것은 DMSO를 추가함으로써 보완하였다. 그 후 4개의 표지자들의 증폭산물 크기를 고려하여 FAM lane에 배치하였다.

양성 대조군인 Amelogenin과 D3S1358을 각각 FAM과 HEX lane에 배치하고, 완전한 제한효소 처리를 확인하기 위한 음성 대조군인 Digestion control과 인위적으로 만들어진 DNA의 투입을 확인하기 위한 Amplification control을 HEX lane에 배치하여 다중중합효소연쇄반응을 구축하였고, 이들 사이에 간섭현상이 없는지 확인하였다.

2. 박테리아 존재 확인을 위한 중합효소연쇄반응 시스템 구축

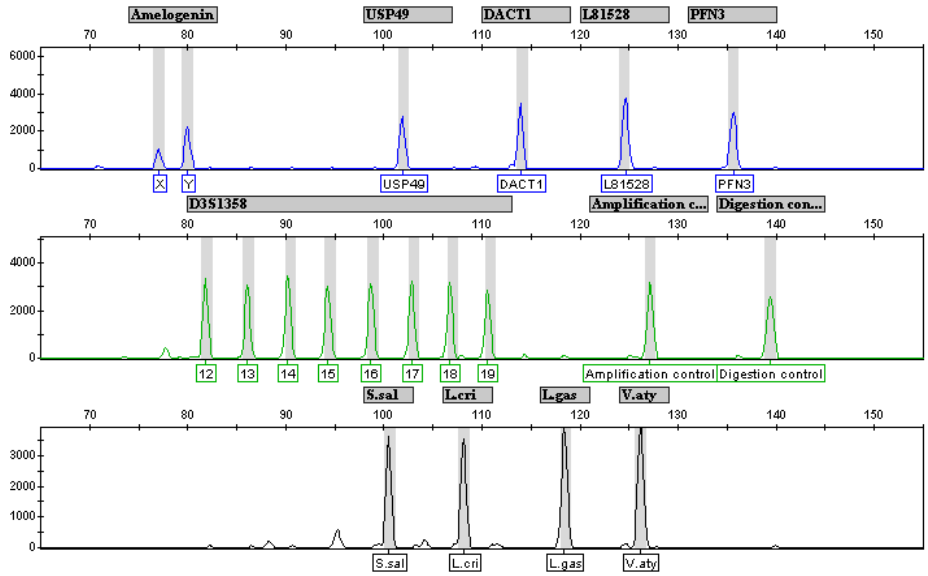
기존 논문에 보고된 primer들[14,15,17,19]을 사용하여 몇몇 시료을 대상으로 스크리닝을 진행하여, 체액 내의 박테리아 존재 여부를 확인한 후 자체적으로 설계된 primer를 이용하여 동일한 결과가

나오는지 확인하였다. 표적이 되는 체액에서 잘 증폭하는지, 반대로 표적이 아닌 체액에서 증폭되지 않는지 여부를 확인하였다. 그와 동시에 MSRE-PCR의 경우 GC 함량이 높은 tDMR 표지자들의 증폭을 위하여 DMSO를 추가하므로 각 박테리아 표지자들이 DMSO의 영향을 받는지 여부도 동시에 평가하였고 문제없이 진행되는 것을 확인하였다. 그 후 후보 primer set의 특이성과 증폭산물의 크기를 고려하여 다중중합효소연쇄반응을 구축하였고, 이들 사이에 간섭현상이 없는지 확인 하였다.

3. 다중중합효소연쇄반응 구축 및 체액별 프로파일링

한번의 반응으로 좀더 식별력이 높고 효율적인 체액 식별을 하기 위하여 독립적인 두 가지 다중중합효소연쇄반응을 융합하였고, 이때 간섭현상 없이 독립적으로 정확하게 분석됨을 확인 할 수 있었다. 구축된 다중중합효소연쇄반응의 대립유전자 사다리와 Hha I 처리 후의 대표적인 결과는 그림 3에 나타내었으며, 각 체액에 대한 MSRE-PCR과 체액 특이 박테리아 존재에 대한 결과는 그림 4에 나타내었다.

A.



B.

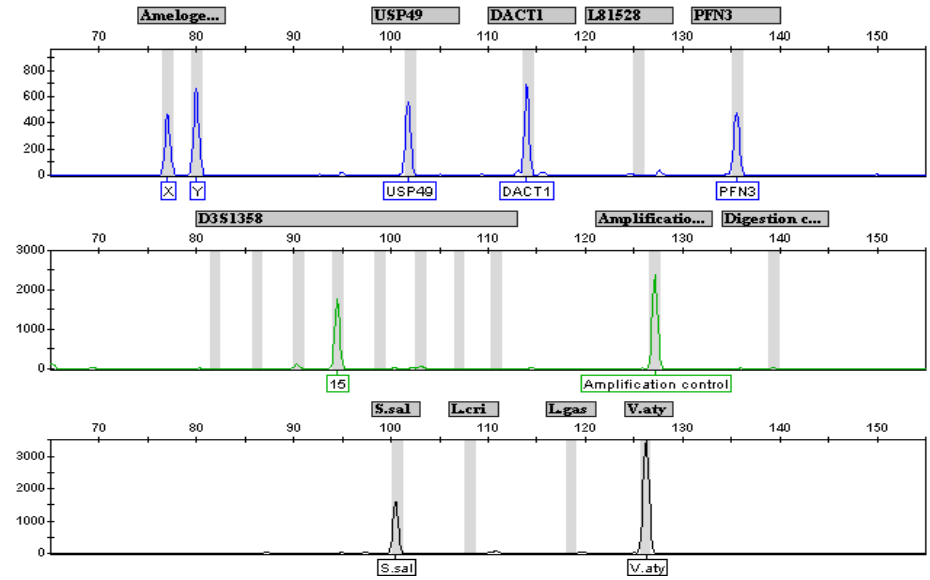
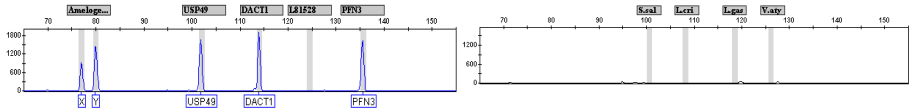
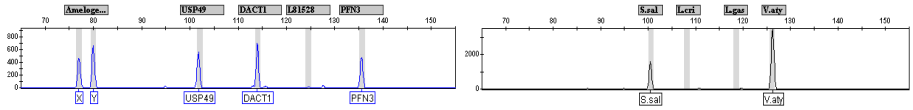


그림 3. Scheme of multiplex PCR system for body fluid identifycation (A) The allelic ladder of multiplex PCR system (B) The analysis result of saliva after Hha I treatment

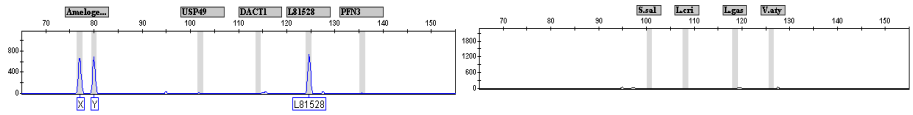
A. Blood



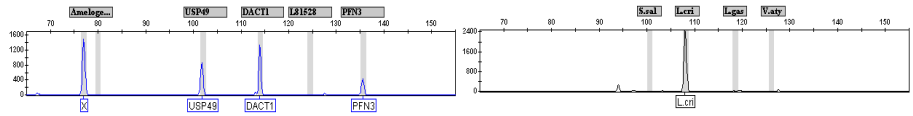
B. Saliva



C. Semen



D. Vaginal fluid



E. Menstrual blood

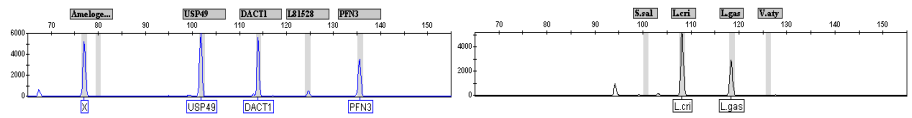


그림 4. Result of MSRE-PCR (left) and a body fluid-specific bacteria presence test (right) in each body fluid

Methylation state is indicated as peak height in MSRE-PCR. The tDMRs markers for USP49, DACT1, and PFN3 genes can identify semen by indicating unmethylated patterns. And L81528 marker shows methylated pattern in only semen. Vaginal fluid and menstrual blood is distinguished from blood and saliva by PFN3 markers. And Amelogenin is positive control. In saliva,

Streptococcus salivarius or *Veillonella atypica* can be detected as saliva-specific bacteria. And vaginal fluid and menstrual blood can be identified by detecting *Lactobacillus crispatus* or *Lactobacillus gasseri*.

혈액은 3개의 tDMR인 USP49, DACT1, PFN3에서 메틸화된 결과를 보이며 DNA가 증폭되는 반면, L81528은 Hha I 에 의해 절단된 unmethylation 결과를 보였다. 박테리아 존재 확인 결과에서는 어떠한 표지자도 증폭하지 않는 결과를 보였다.

타액의 경우 혈액과 동일한 MSRE-PCR 결과를 보였으나, 박테리아 중합효소 연쇄반응에서 *Streptococcus salivarius*와 *Veillonella atypica*가 둘 중 하나 혹은 둘 다 증폭함으로써 타액임을 식별할 수 있었다. 특히 *S. salivarius*의 경우 박테리아가 발견된 모든 타액 시료에서 관찰됨을 확인 할 수 있었다. PFN3의 경우 Hha I 처리 전과 비교했을 때 70% 이하로 낮아진 sample이 21명 중 2명 있었으나, 이들을 모두 타액 특이 박테리아를 확인함으로써 타액임을 확인할 수 있었다. 박테리아가 증폭되지 않는 결과를 보여준 2명의 시료를 제외하고 모두 타액 특이 박테리아의 증폭으로 인해 더 명확하게 타액임을 예측할 수 있었다. 하지만 타액 중 한 시료에서 *S. salivarius*와 *V. atypica*가 관찰되고 동시에 *Lactobacillus crispatus*가 약간 증폭되는 결과를 보였다.

정액은 MSRE-PCR에서 혈액, 타액과 정반대의 결과를 보여주었다. USP49, DACT1, PFN3에서 peak가 확인되지 않음으로써 unmethylation 되어 있음을 알 수 있으며, L81528에서는 메틸화 되어 Hha I 에 의한 절단 없이 증폭됨을 확인 할 수 있었다. 혈액과 마찬가지로 박테리아 존재 확인 결과에서는 어떠한 표지자도 증폭하지 않는 결과를 보였다.

질분비액과 생리혈은 거의 동일한 결과를 보였다. USP49와 DACT1에 대하여 hypermethylation 경향을 보였으며, L81528은 unmethylation 결과를 보였다. PFN3의 경우 생리혈에서 한명을 제외하고, Hha I 처리 전후를 비교했을 때 30-70% unmethylation을 보였다. 질분비액 특이 박테리아의 경우 *Lactobacillus crispatus*와 *Lactobacillus gasseri* 둘 중 하나 혹은 둘 다 증폭되었다. 두가지 박테리아가 모두 강하게 증폭되는 시료는 거의 없었으며, 동일인의 질분비액과 생리혈이 항상 동일한 박테리아를 가지고 있는 것은 아니지만 강한 증폭을 보이는 질분비액 특이 박테리아는 거의 동일하였다.

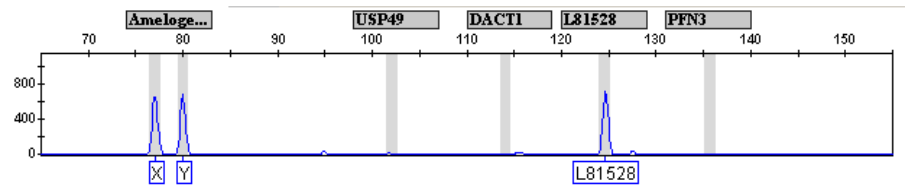
표 3. The profile of bacteria in each body fluid

Body fluid	N	Number of positive samples				Number of negative samples
		L.crispatus	*L.gasseri*	*S.salivarius*	*V.atypica*	
Blood	20	0	0	0	0	0
Saliva	21	1	0	19	13	2
Semen	21	0	0	0	0	0
Vaginal fluid	14	8	9	0	0	1
Menstrual blood	14	8	8	0	0	3

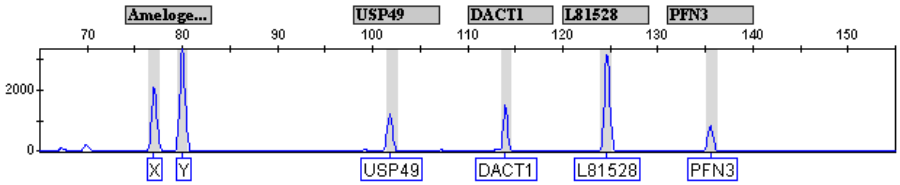
4. 정액 DNA의 다양한 메틸화 패턴

다른 체액과 달리 정액에서는 다양한 메틸화 패턴을 보였으며 대표적인 결과는 그림 5에 나타냈다. 21명 중 10명이 일반적으로 예상했던 메틸화 패턴대로 4개의 tDMRs 중 L81528만 증폭되는 결과를 보였다. 9명은 그림 5의 B와 같이 L81528을 제외한 3개의 tDMRs도 약간의 메틸화 패턴을 보이면서 증폭되었으나 L81528이 증폭된 결과를 통해 정액임을 예측할 수 있었다. 마지막으로 2명의 정관 수술한 남성의 정액은 다른 체액과 유사한 패턴을 보이며 L81528이 그림 5의 C와 같이 완전히 unmethylation 상태이거나 약간 메틸화된 결과를 보였다.

A. Semen



B. Methylated semen



C. Semen of vasectomized male

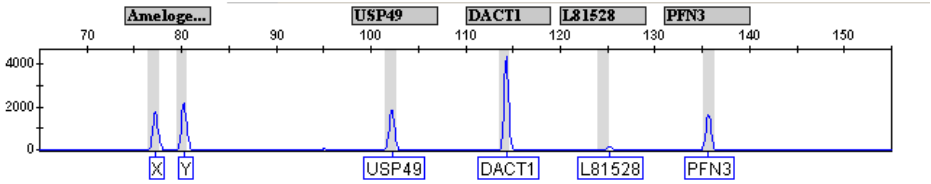


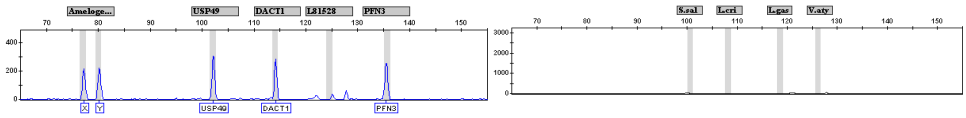
그림 5. Various DNA methylation patterns of semen

Semen that has sperm cells can be distinguished from other body fluids by amplifying L81528 marker. But, semen from vasectomized male shows a very weak L81528 peak.

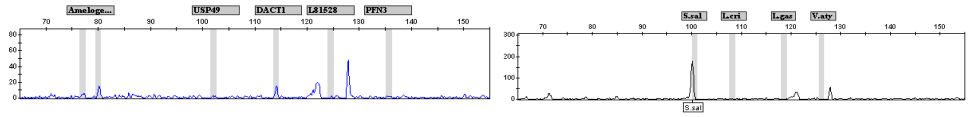
5. 75일간 실내 환경에 노출시킨 시료에서의 체액 감별 효율 확인

실내 환경에 75일간 노출시킨 DNA를 이용하여 오래되고 분해된 시료에서도 DNA 메틸화의 안정성과 박테리아의 존재 여부를 확인하고자 하였다. 타액을 제외한 체액에서는 DNA 메틸화를 확인할 수 있었으며 타액에서는 인간 DNA가 완전히 분해된 것처럼 거의 어떠한 amplicon도 생성되지 않는 결과를 보여주었다. 하지만 *S. salivarius*의 증폭으로 이 체액이 타액임을 확인할 수 있었다. 나머지 체액에 대해서는 그림 6에서 나타냈듯이 노출 시키지 않은 DNA 결과와 거의 동일한 결과를 보였으며, 생리혈에서 질분비액 특이 박테리아는 확인할 수 없었다.

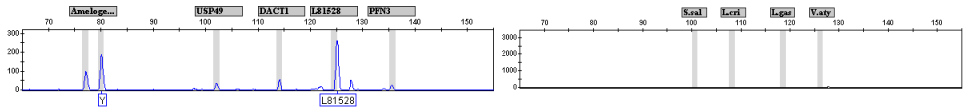
A. Blood



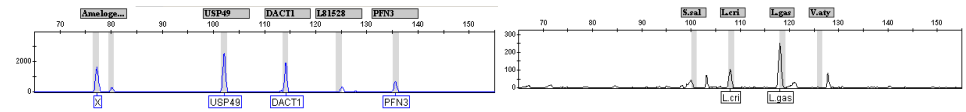
B. Saliva



C. Semen



D. Vaginal fluid



E. Menstrual blood

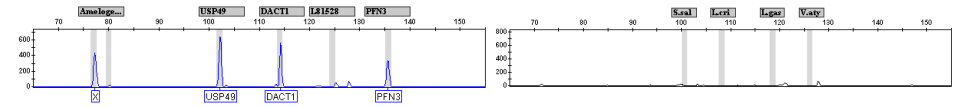


그림 6. Body fluid identification of samples exposed to indoor environment samples for 75 days

DNA from body fluids exposed in indoor environment for 75 days shows almost similar methylation pattern and body fluid-specific bacteria comparing with DNA from fresh body fluid.

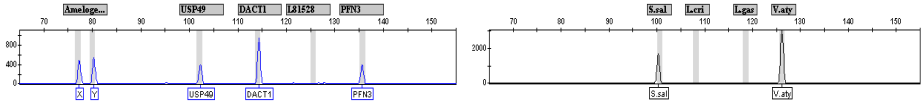
6. 새로 구축된 다중중합효소연쇄반응의 민감도 확인

타액, 정액, 질분비액에 대하여 각각 2명의 시료를 이용하여 1 ng부터 15 pg까지 연속적으로 희석하여 3회반복 확인하였다. 100 relative fluorescent units (RFUs)값을 넘는 peak에 한하여 유효한 peak로 보았다. 타액의 경우 두 시료 모두 500 pg 이상에서 4개의 표지자 중 L81528을 제외한 3개의 표지자가 증폭 되는 것을 확인할 수 있었다. 정액의 경우 1 ng의 DNA에서는 DACT1이 약하게 증폭되지만, 정액 특이 메틸화 표지자인 L81528의 증폭을 기준으로 하였을 때 500 pg 이상에서는 분석 가능함을 확인하였다. 질분비액의 경우 250 pg 이상까지 분석 가능하였으며 125 pg 이하에서는 PFN3가 인지되지 않았다. 박테리아의 경우 타액과 질분비액에서만 증폭하며 개인에 따라 다른 양상을 보이지만, 대부분의 타액과 질분비액 시료에서 62 pg 이상의 DNA로 증폭할 경우 체액 특이 박테리아가 하나 이상 증폭함으로써 체액을 식별할 수 있었다. 박테리아 양이 적은 시료의 경우 250 pg 이하에서 증폭되지 않는 경우도 존재 하였다. 타액, 정액, 질분비액의 각 민감도 확인 결과는 그림 7, 8, 9에 나타내었다.

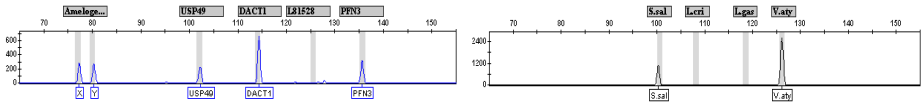
동일한 시료에 대하여 500 pg부터 31 pg까지 연속적으로 희석한 후 중합반응 횟수를 달리하여 민감도를 확인하였다. 메틸화 정도를 보는 MSRE 영역에서 타액은 31 pg으로 희석된 시료에서 L81528의 증폭이 확인 되었고, 정액은 125 pg으로 희석된

시료에서부터 DACT1 등 L81528이 아닌 다른 peak들이 관찰되었으며 질분비액에서는 모든 시료에서 예상되는 동일한 메틸화 패턴을 보였다. 체액 특이 박테리아 영역에서는 타액에서 62 pg의 DNA에서 *V. atypica*가 증폭되지 않는 경향을 보였다. 정액에서는 31 pg에서 타액 특이 박테리아인 *S. salivarius*가 증폭되었으며, 질분비액에서도 125 pg 이하의 DNA에서 *S. salivarius*가 증폭됨을 확인할 수 있었다. 양성대조군인 D3S1358은 시료와 상관없이 125 pg 이하의 DNA에서는 19 allele이 증폭되는 결과를 보였으며, 음성대조군인 Digestion control 또한 125 pg 이하의 DNA에서는 중합반응 횟수가 늘어남에 따라 약간 증폭되는 결과를 보였다. 중합반응 횟수를 달리한 민감도 확인 결과는 그림 10, 11, 12에 나타내었다.

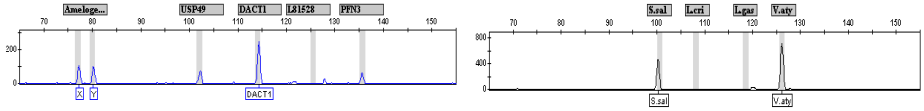
A. 1 ng



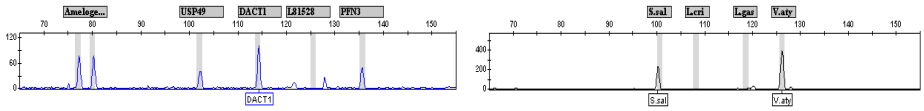
B. 500 pg



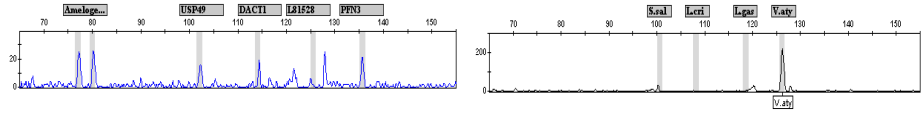
C. 250 pg



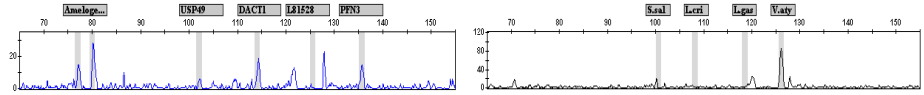
D. 125 pg



E. 62 pg



F. 31 pg



G. 15 pg

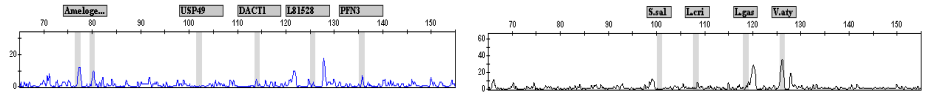
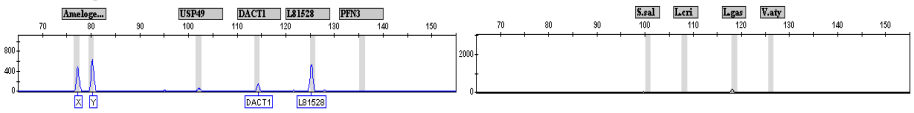


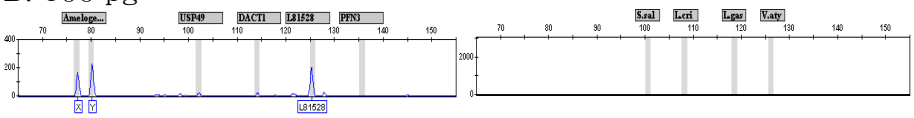
그림 7. Sensitivity test results of the developed multiplex PCR system in saliva

When the cut-off value was settled as 100 RFUs, more than 500 pg of DNA from saliva can be analyzed by amplifying USP49, DACT1, and PFN3 without drop-in and drop-out.

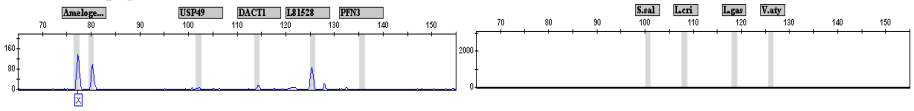
A. 1 ng



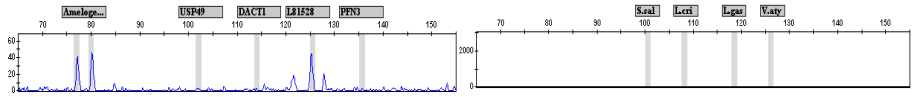
B. 500 pg



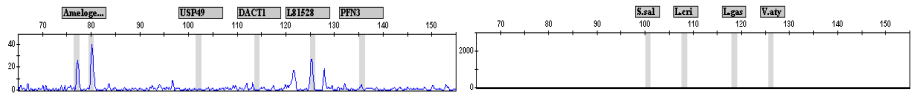
C. 250 pg



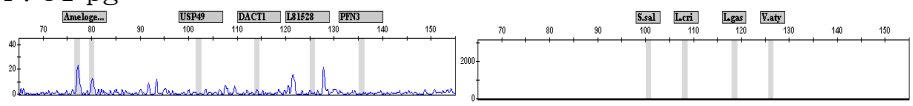
D. 125 pg



E. 62 pg



F. 31 pg



G. 15 pg

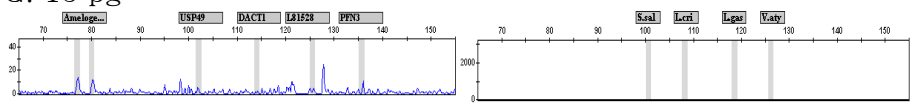
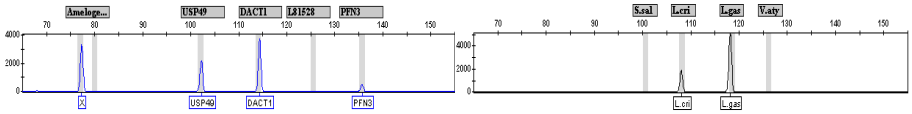


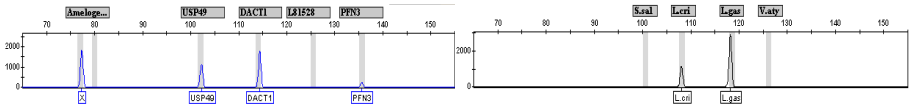
그림 8. Sensitivity test results of the developed multiplex PCR system in semen

When the cut-off value was settled as 100 RFUs, more than 500 pg of DNA from saliva can be analyzed by amplifying L81528 without drop-in and drop-out.

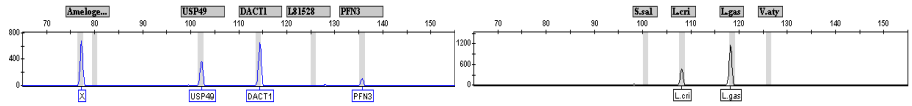
A. 1 ng



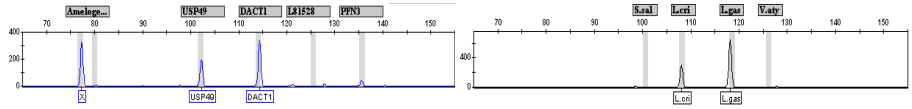
B. 500 pg



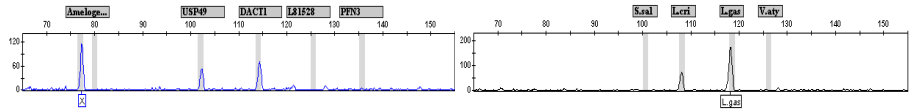
C. 250 pg



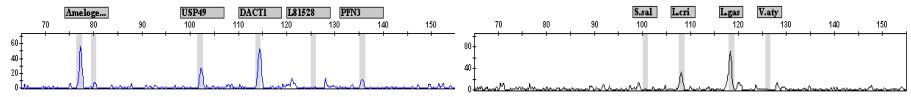
D. 125 pg



E. 62 pg



F. 31 pg



G. 15 pg

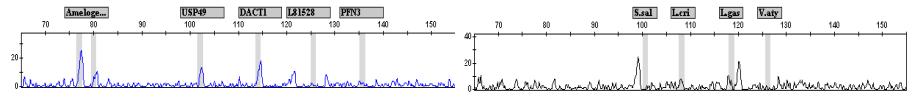
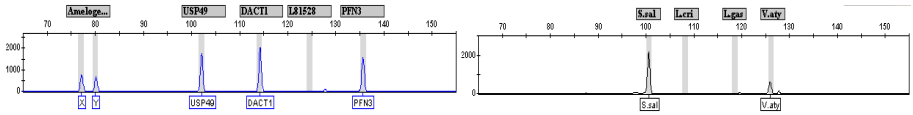


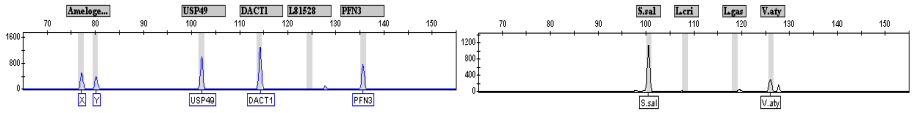
그림 9. Sensitivity test results of the developed multiplex PCR system in vaginal fluid

When the cut-off value was settled as 100 RFUs, more than 250 pg of DNA from saliva can be analyzed by amplifying USP49, DACT1, and PFN3 without drop-in and drop-out.

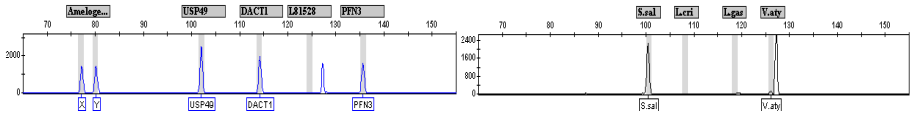
A. 500 pg



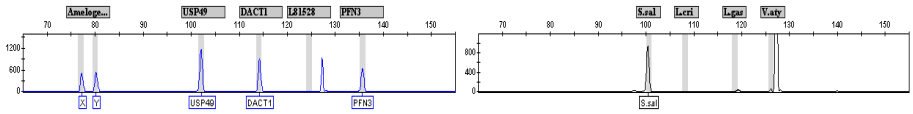
B. 250 pg



C. 125 pg



D. 62 pg



E. 31 pg

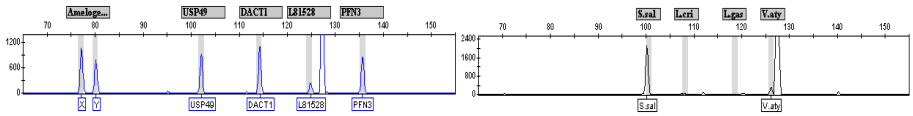
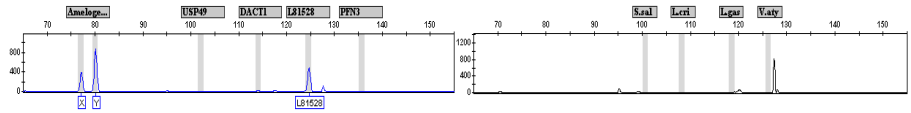
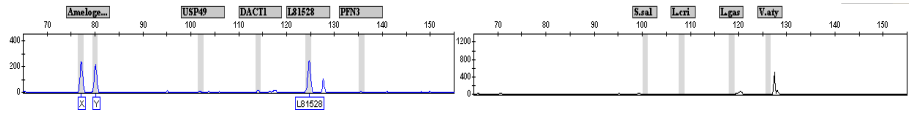


그림 10. Sensitivity test results of the developed multiplex PCR system using various concentrations of saliva DNA with different PCR cycles 30 cycles for 500, 250 pg of template DNA; 32 cycles for 125, 62 pg; 34 cycles for 31 pg.

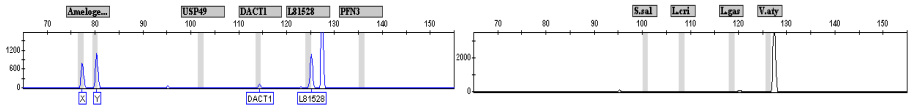
A. 500 pg



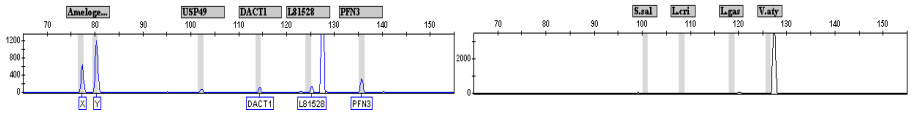
B. 250 pg



C. 125 pg



D. 62 pg



E. 31 pg

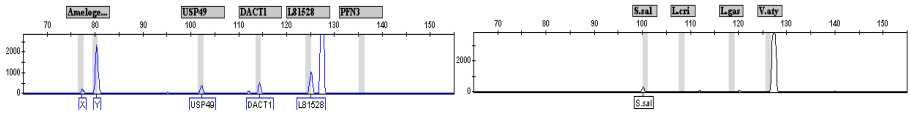
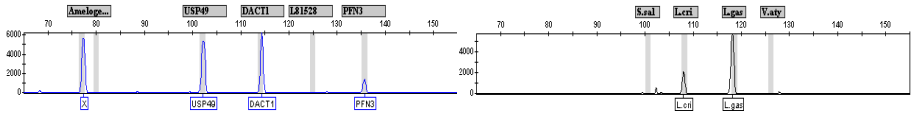
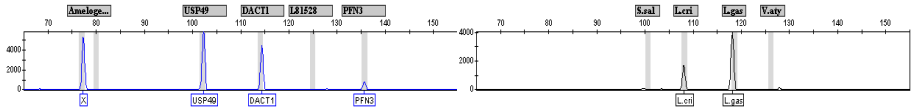


그림 11 Sensitivity test results of the developed multiplex PCR system using various concentrations of semen DNA with different PCR cycles 30 cycles for 500, 250 pg of template DNA; 32 cycles for 125, 62 pg; 34 cycles for 31 pg.

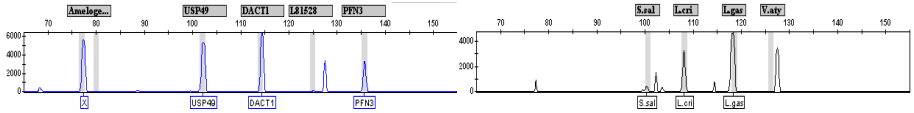
A. 500 pg



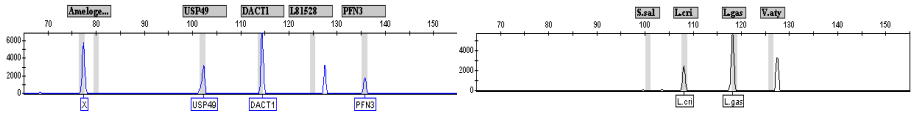
B. 250 pg



C. 125 pg



D. 62 pg



E. 31 pg

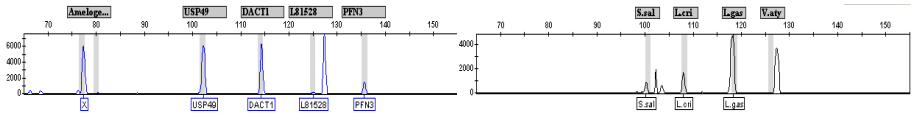


그림 12. Sensitivity test results of the developed multiplex PCR system using various concentrations of vaginal fluid DNA with different PCR cycles 30 cycles for 500, 250 pg of template DNA; 32 cycles for 125, 62 pg; 34 cycles for 31 pg.

7. 혼합된 체액의 다중중합효소연쇄반응 검사

5가지 체액의 여러 가지 조합 중 실제 현장에서 발견될 수 있을 법한 조합을 선택하여 진행하였다. 타액과 정액을 1:1과 1:2의 비율로 혼합한 시료의 경우 둘 사이에 큰 차이는 보이지 않았으며, 정액의 표지자인 L81528 표지자가 증폭되고 타액 특이 미생물인 *S. salivarius*가 증폭됨을 두 체액이 혼합된 시료임을 알 수 있었다. 질분비액과 타액을 혼합한 시료에서는 질분비액 특이 박테리아인 *L. gasseri*와 타액 특이 박테리아인 *S. salivarius*가 증폭됨으로써 질분비액과 타액의 혼합 시료임을 확인 할 수 있었다. 5 ㎕와 10 ㎕의 타액을 혼합한 시료에서 모두 극소량의 *S. salivarius*가 증폭되었으나 100 RFUs 값보다 높으므로 실제 타액이 혼합되어 있다고 결론 내릴 수 있었다. 하지만 질분비액과 정액을 혼합한 시료의 경우, 질분비액 특이 박테리아인 *L. gasseri*가 증폭되고 DNA 메틸화 정도 또한 질분비액의 대표적인 패턴을 보였으나 정액에 특이적인 표지자의 증폭은 확인할 수 없었다.

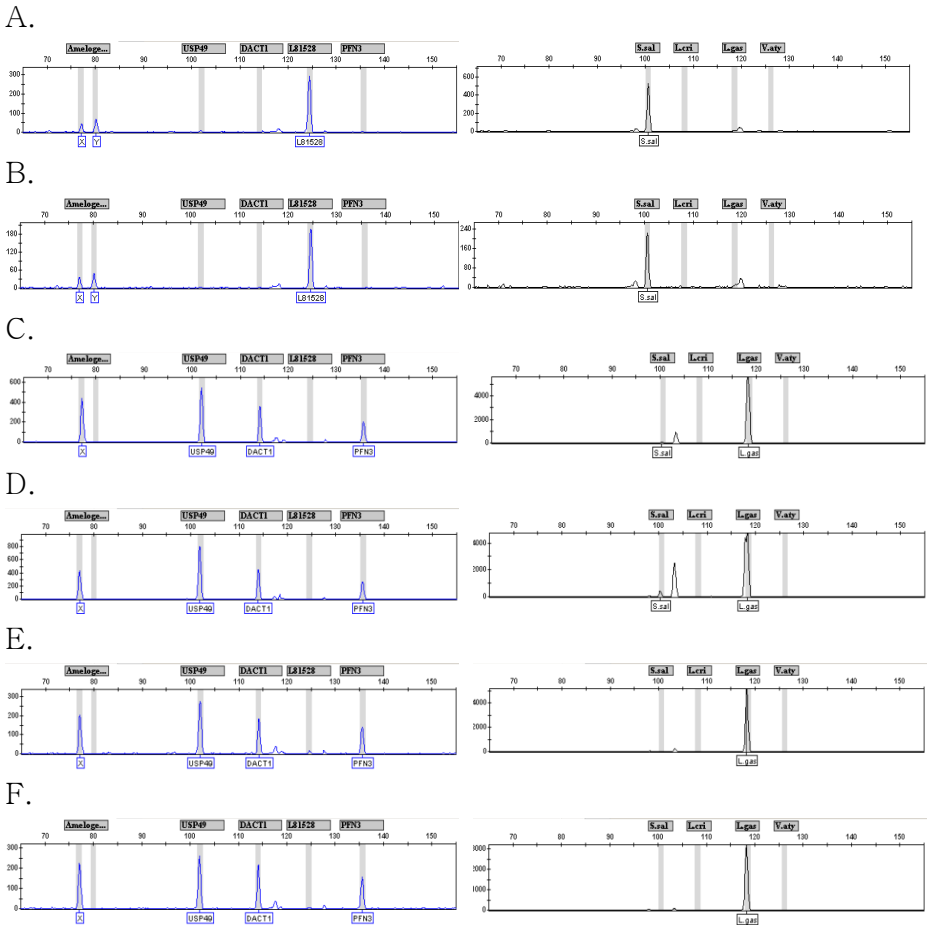


그림 13. Results of mixture sample multiplex PCR tests

Mixture of saliva and semen is detected *S. salivarius*, saliva-specific bacteria, and L81528 that shows semen-specific methylated pattern. (A) Mixture of saliva 10 ㎕ and semen 10 ㎕ (B) Mixture of saliva 10 ㎕ and semen 20 ㎕; Mixture of vaginal fluid and saliva can be confirmed by each body fluid-specific bacteria, *L. gasseri* and *S. salivarius* (C) Mixture of vaginal fluid

swab and saliva 5 ㎕ (D) Mixture of vaginal fluid swab and Saliva 10 ㎕; Mixture of vaginal fluid and semen can be confirmed by each body fluid-specific bacteria, *L. gasseri* and *S. salivarius* (E) Mixture of vaginal fluid swab and semen 5 ㎕ (F) Mixture of vaginal fluid swab and semen 10 ㎕

Ⅳ. 고찰

범죄 현장에서 체액을 증명하고 그 유형을 식별하는 것은 용의자의 추적을 위한 DNA 정보를 제공할 뿐만 아니라 체액 시료 제공자와 실제 범죄 행동을 연결 짓는 중요한 정보를 제공한다. 체액 식별 자체만으로도 범죄를 해결하는데 많은 도움을 주므로 현재 체액 식별에 대한 많은 연구들이 진행되고 있으며, DNA를 기반으로 법의영역에서 체액을 식별할 수 있는 방법은 조직 특이적으로 다른 메틸화 패턴을 보이는 tDMRs를 분석하는 방법과 체액 특이 박테리아의 존재 여부를 확인함으로써 체액을 식별하는 방법이 있다. 본 연구는 2가지 체액 식별 방법을 융합하여 각각의 단점을 보완하고, 한번의 반응으로 보다 높은 식별력을 가지는 체액 식별용 다중중합효소연쇄반응을 구축하였다.

새롭게 구축된 체액 식별용 다중중합효소연쇄반응의 methylation-sensitive restriction enzyme-polymerase chain reaction (MSRE-PCR) 영역은 기존의 보고된 MSRE-PCR 들[10,12,13]과 비교했을 때 몇가지 개선된 점들이 있다.

첫째로, 이전에 연세대 연구진이 구축한 MSRE-PCR은 정액을 확인하기 위하여 모두 unmethylation 경향을 띠는 4개의 표지자가 선정하였다. 대부분의 정액 시료는 4가지 표지자에 대하여 모두 unmethylation 경향을 보이며 peak가 뜨지 않는 패턴을 보이지만,

드물게 메틸화 되어있는 경우 정액인지 다른 체액인지 구분하기 힘들었다. 본 연구에서는 체액 식별하는데 큰 영향력이 없는 PRMT2를 제외하고, 정액에서만 메틸화 패턴을 보이는 L81528 표지자를 추가하였다. 정액을 제외한 다른 체액에서는 L81528이 unmethylation 되어 있어 HhaI 처리에 의해서 모두 절단되어 결과적으로 peak가 관찰되지 않지만, 정액은 메틸화 되어 있어 Hha I 에 영향을 받지 않아 정액인 경우에만 L81528 peak를 관찰할 수 있었다. 하나의 다중중합효소연쇄반응에 정액에 대하여 서로 반대되는 2가지 메틸화 패턴을 보이는 표지자들을 선정함에 따라, 다른 3가지 표지자들이 약한 메틸화 경향을 보이더라도 L81528의 증폭을 통해 정액임을 확실하게 예상할 수 있게 되었다. 하지만 정관수술을 한 남성의 정액은 L81528에 대하여 정자를 지닌 정액과 비교하여 매우 약한 메틸화 반응을 보였다. 따라서 본 연구를 통해 구축된 다중중합효소연쇄반응은 정자를 가지고 있는 정액에 대하여 식별이 가능하고 정관수술을 받았거나 무정자증 정액을 확인하기 위해서는 새로운 시스템의 개발이 필요하다.

두번째로 Amplification control 표지자가 추가되었다. 이전 연세대 연구진이 구축한 MSRE-PCR에는 중합효소연쇄반응의 증폭산물은 주형 DNA와 달리 메틸기가 붙지 않는다는 이론을 근거로 제한효소의 완전한 반응을 확인하기 위해 벡터 DNA의 증폭산물을 이용하여 인위적으로 만들어진 DNA를 사용한 Digestion control 표지자가 포함되어 있다. 하지만 이는 주형 DNA

외에 추가적으로 들어가는 DNA이므로 제한효소 처리가 끝났을 때 실제로 제한효소가 완전히 작용하여 절단되어서 peak가 관찰 되지 않는 것인지 DNA 자체가 투입되지 않은 것인지 확인할 수 있는 방법이 없었다. 그래서 인위적으로 만들어진 DNA 영역 내에 HhaI 인지부위를 포함하지 않는 Amplification control을 추가함으로써 DNA의 투입 여부를 확인할 수 있도록 하였다.

마지막으로, 정액 식별을 위한 상용화된 MSRE-PCR kit인 DSI-Semen™ kit (Nucleix)는 정액을 구분하는 3가지 표지자와 정액이 아님을 구분하는 2가지 표지자로 구성된 다중중합효소연쇄반응이다. 이 다중중합효소연쇄반응 시스템은 본 연구진이 구축한 시스템에서 정액을 좀더 명확하게 식별하기 위해 서로 반대되는 메틸화 패턴을 이용하는 것과 동일한 원리로 정액 특이 표지자는 L81528 표지자와 같이 정액에서만 methylation 되어 있는 표지자를, 비 정액 특이 표지자는 USP49 등의 표지자와 같이 정액에서만 unmethylation 되어 있는 표지자를 사용하였다. 이들은 5개의 표지자를 이용하여 좀더 명확하게 정액을 식별할 수 있다는 장점이 있지만, 또한 정액만을 식별할 수 있기에 정액이 아닌 다른 체액의 경우 추가적인 검사가 필요하다. 하지만 본 연구를 통해 구축된 다중중합효소연쇄반응 시스템은 정액 특이 표지자이면서 질분비액과 생리혈에서도 다른 비율의 메틸화 정도를 보이는 PFN3를 포함함으로써 정액외에도 질분비액과 생리혈이 혈액과 타액으로부터 구별될 수 있도록 하였다.

현장에서 발견되어 분석되는 체액 시료의 경우, 그 양이 적고 상태가 좋지 않아 한번 이상의 DNA 추출이 어려울 것으로 여겨진다. 본 연구의 경우 인간 DNA와 박테리아 DNA가 동시에 분석되어야 하므로, 일반적으로 사용되는 개인 식별을 위한 인간 DNA 추출 방법으로도 동시에 추출 가능한 미생물을 선택해야 한다. 현재까지 법의 영역에서 가장 빈번하게 사용되는 체액 특이 박테리아는 타액 특이 박테리아인 *Streptococcus salivarius*와 *Streptococcus mutans*이고, 질분비액 특이 박테리아는 *Lactobacillus crispatus*와 *Lactobacillus gasseri*이다. 하지만 *S. mutans*의 경우 박테리아 DNA 추출 방법으로 진행해 보았을 때 많은 양의 DNA를 얻을 수 있었으나, 인간 DNA 추출 방법으로 진행하면 DNA 추출이 불가능 했다. 현장에서 들어온 시료는 가장 기본적으로 개인 식별을 위한 작업이 진행되므로 박테리아 DNA보다 인간 DNA가 우선적으로 필요하다. 게다가 인간 DNA의 메틸화 패턴을 함께 확인 해야 하는 시스템이므로 이러한 특성을 고려했을 때 최소한의 조건에서도 증폭이 가능한 박테리아를 선별하여야 했고, 따라서 *S. mutans*를 대신하여 타액에서 흔히 나타나는 *Veillonella atypica*를 타액 특이 박테리아 후보로 선정하게 되었다.

체액 특이 박테리아의 표지자에 대한 primer를 설계할 때 각 박테리아에만 특이적으로 증폭되는 primer를 설계하기 쉽지 않았다. 그리하여 타액 특이 박테리아인 *S. salivarius*와 *V. atypical*의 경우

표적 박테리아만 증폭되도록 설계할 수 있었으나, 질분비액의 경우 *L. crispatus*는 4개의 Lactobacillus 종이 증폭되고, *L. gasseri*는 2개의 Lactobacillus 종이 함께 증폭되는 primer가 설계되었다. 하지만 이들 모두 질분비액에 존재하는 박테리아이므로 비록 표적 박테리아 이외의 것이 증폭되더라도 질분비액과 생리혈에서만 증폭되므로 체액을 식별하는데 문제 없었다.

박테리아 존재 여부로 확인 할 수 있는 체액은 타액과 질분비액, 생리혈이다. 21명의 타액을 조사해본 결과 2명은 *S. salivarius*와 *V. atypica* 모두 증폭되지 않았다. 나머지 19명 중 *S. salivarius*는 모든 시료에서 발견되었고, *V. atypica*는 13명의 시료에서 발견되었다. 특히, *V. atypica*는 연령별로 차이를 보였고, 연령대가 높아질수록 검출빈도가 낮아졌다. 현재 연구에 사용된 체액은 20대에서 50대까지의 남성과 20대에서 40대까지의 여성의 체액이 사용되었다. 각 표지자들은 연령대에 상관없이 체액 식별하는데 큰 무리가 없었으나 *V. atypica*의 경우 연령대가 높아질수록 나타나는 빈도수가 줄어듦을 확인 할 수 있었다. 20대와 30대에서는 각각 6명과 4명 모두에서 확인 되었으며, 40대는 3명 중 2명에게서, 50대는 6명 중 1명에게서만 나타났다. 본 연구의 결과는 한국인을 대상으로 다양한 연령대의 타액에서 발견되는 박테리아를 조사한 결과와 동일하였다.[22]

또한 한 명의 타액에서 질분비액 특이 표지자인 *L. crispatus*가 발견되었다. *S. salivarius*와 *V. atypica*에 비해 peak 높이가 현저히

낮아 *L. crispatus*의 양이 적은 것으로 보이나 100 RFUs를 기준으로 했을 때 유효한 peak으로 나타났다. *Lactobacillus*는 모든 유산균이 들어있는 식품에서 쉽게 발견되는 박테리아다. 실제 Giampaoli 등[19]의 논문에서 2개의 요거트를 대상으로 박테리아를 검사했을 때 *L. gasseri*는 2개에서 모두 나오고, *L. crispatus*가 1개의 요거트에서 발견되는 결과를 보였다. 실제로 타액에서 *L. crispatus* 양성 반응을 보인 기증자가 이전에 무엇을 먹고 타액을 기증했는지는 알 수 없었다. 유산균이 들어간 제품이 요거트 외에도 김치 등 여러 음식이 있다는 것을 가정했을 때 약간의 *Lactobacillus*가 존재하는 것을 배제할 수는 없을 것으로 보인다. 결과적으로 타액에는 적은 양의 *Lactobacillus*가 존재할 가능성이 있으므로 *Lactobacillus*가 있다고 해서 타액임을 배제하는 것보다 다른 추가적인 검사를 통하여 검증하는 것이 필요할 것으로 보인다.

질분비액에는 *L. crispatus*와 *L. gasseri*가 둘 중 하나는 항상 존재한다고 알려져 왔다. 하지만 본 연구 결과 한명의 질분비액에서 둘 중 어떤 박테리아도 검출되지 않았다. 하지만 이 시료의 경우 DNA 메틸화 결과만으로도 질분비액-생리혈임을 확인 할 수 있었다. 생리혈의 경우 14명 중 3명에서 박테리아가 검출되지 않았으나 마찬가지로 MSRE-PCR을 이용한 DNA 메틸화 결과에서 질분비액-생리혈의 패턴을 확인할 수 있었다. RNA 분석법와 박테리아 분석법을 융합한 Fleming 등[24]의 연구 결과를 봤을 때에도 질분비액은 모든 시료에서 질분비액 특이 박테리아가

관찰되는 반면 생리혈의 경우 몇 시료에서만 관찰됨을 보고한바 있다. 이는 질분비액에 비해 생리혈의 양이 많아 희석되는 경우와 관계가 있을 것으로 생각된다.

질분비액과 생리혈은 분비되는 곳은 다르나 서로 통해 있기 때문에 유사한 메틸화 패턴과 박테리아 분포를 보인다. *L. crispatus*와 *L. gasseri*가 둘 다 분포하는 경우는 많지 않다고 알려져 있고, 한 체액 내에 둘 다 분포하더라도 *L. crispatus*와 *L. gasseri* 중 하나가 많은 양을 차지하고 있다. 표 3에서 보듯이 질분비액과 생리혈은 약간의 차이가 있으나 동일인이라면 우세한 박테리아 종이 동일한 결과를 보였다. 하지만 생리 주기에 따라 질 내 박테리아의 분포가 달라지기 때문에[25-27] 동일인이라 할지라도 질분비액과 생리혈을 기증 받은 시기가 다른 생리 주기이므로 박테리아 종의 차이는 존재할 수 있다.

혈액과 정액에서는 예상했던 것처럼 4개의 표적 박테리아가 모두 발견되지 않았으며, 박테리아를 통해서도 체액을 식별하는데 도움이 되는 것을 확인할 수 있었다.

DNA 메틸화 분석법과 체액 특이 박테리아 확인 방법을 융합하기 위하여 인간 DNA와 박테리아 DNA의 메틸화되는 부위가 다르기 때문에 고려해야 할 점이 있었다. 인간 DNA의 경우 일반적으로 cytosine (C)과 guanine (G)이 연속적으로 나타나는 염기서열인 CpG 부위라고 불리는 곳의 C에 주로 메틸화 되어 있다. 반면

박테리아의 경우 GATC 염기서열에서 adenine (A)에 메틸기가 붙는 것으로 알려져 있다. GATC이 외에도 박테리아 DNA 내에 메틸기가 붙는 부위는 몇가지 더 있으나 본 연구에서 인간 DNA 메틸화 정도를 알아보기 위해 사용한 Hha I 의 인지부위인 GCGC에는 메틸화가 되지 않는다. 따라서 체액 특이 박테리아의 표적 증폭영역 내에 GCGC 인지부위가 존재한다면 Hha I 의 영향을 받아 증폭되지 않을 수 있으므로 박테리아 DNA 증폭 영역은 Hha I 인지 부위를 피하여 증폭하였다.

DNA 메틸화 패턴 분석하는 방법과 박테리아 존재 여부를 확인하는 방법을 융합한 다중중합효소연쇄반응에서 둘 사이의 간섭현상은 발견되지 않았으며, 이 두 가지 분석법이 함께 진행되었을 때 보다 여러 가지 체액을 한번의 분석으로 구분 할 수 있었다. 기존 MSRE-PCR을 이용하였을 때 구분되지 않았던 혈액과 타액이 타액 특이 박테리아를 통하여 구분 할 수 있었다. 또한 개선된 MSRE-PCR에서 L81528을 통하여 메틸화 패턴을 보이는 정액까지도 완전히 식별 할 수 있었다. 또한 혈액-타액으로부터 구분하였던 질분비액-생리혈을 구별하는 PFN3는 타액 시료에서 hypomethylation 패턴을 보임으로써 명확하게 구분되지 않는 시료들이 있었다. 하지만 타액 특이 박테리아와 질분비액 특이 박테리아를 함께 분석함으로써 보다 명확하게 체액을 식별 할 수 있게 되었다. 따라서 본 연구의 다중중합효소연쇄 반응은 혈액,

타액, 정자가 존재하는 정액 그리고 질분비액-생리혈을 식별 할 수 있다.

현장에서 발견되는 시료로부터 얻어진 DNA는 다소 오래되고 분해된 시료일 가능성이 높다. 따라서 본 연구에서는 각 체액을 실제 실내 환경에 75일간 방치시킴으로써 오래되고 분해된 시료에서도 분석이 가능한지 확인하였다. 본 연구에서의 표적이 되는 체액은 주로 현장에서 발견되는 것이므로 현장이 발견되는 시간은 오래 걸리지 않을 것이라 여겨져 75일간 방치하여 실험을 진행하였다. 기존에 연세대 연구진에 의해 구축된 MSRE-PCR에서는 타액이 모두 분해되어 인간 DNA가 증폭되지 않았으나, 본 연구에서 구축된 다중중합효소연쇄 반응에서는 타액 특이 박테리아인 *S. salivarius*의 증폭을 통하여 타액임을 확인할 수 있었다. 다른 체액에서는 MSRE-PCR 영역은 모두 증폭되었으나, 생리혈에서 질분비액 특이 박테리아가 증폭되지 않는 결과를 보여주었다. 하지만 실제 생리혈 시료들에서 박테리아가 존재하지 않는 경우가 종종 있었으므로 생리혈이 아니라고 단정지을 수는 없었다. 결과적으로, MSRE-PCR 영역에서 75일 노출 전 후를 비교하였을 때 분해된 타액을 제외하고 메틸화 정도에 큰 차이가 없는 것을 확인할 수 있었고, 체액 특이 박테리아의 경우도 동일하게 증폭됨을 확인할 수 있었다. 따라서 75일간 실내 환경에 방치된 시료에서도 두 가지 방법을 융합함으로써 체액을

효과적으로 식별 할 수 있었다.

법의 영역에서는 획득되는 DNA 양이 많지 않기 때문에 구축된 다중중합효소 연쇄반응이 얼마만큼의 민감도를 가지는지 확인할 필요가 있다. 박테리아의 경우 사람에 따라 체액 내에 존재하는 양이 다르기 때문에 박테리아 분석 영역의 민감도 확인은 큰 의미가 없을 것으로 여겨졌고, 따라서 DNA 메틸화 분석 영역의 민감도를 중점적으로 확인하고자 하였다. 5가지 체액에 대하여 DNA 메틸화 분석법으로 식별 가능한 3가지 패턴에 대하여 각각 대표적인 체액인 타액, 정액, 질분비액을 대상으로 민감도 확인을 진행하였다. 3가지 체액에 대하여 동일하게 제한효소를 처리한 후 28회의 동일한 중합반응 횟수로 진행한 결과 타액과 정액은 500 pg 이상에서, 질분비액은 250 pg 이상에서 분석 가능할 것이라 확인되었다. 250 pg 이하의 DNA에서 별다른 비특이적 peak가 생성되거나 사라지지는 않았으나 기준점인 100 RFUs 값을 넘지 못하여 유효값으로 보기 어려웠다. 이처럼 250 pg 이하로 DNA 양이 적을 때에는 중합반응 횟수를 늘림으로써 분석 가능할 것으로 보인다. 체액 특이 박테리아는 사람에 따라 존재하는 양이 다르므로 각 시료에 따라 다른 민감도를 보였으며, 31 pg 이상의 DNA를 식별 가능한 시료에서부터 250 pg 이상의 DNA에서 식별 가능한 시료까지 다양했다. 하지만 대부분의 시료의 경우 62 pg 이상의 DNA에서 하나 이상의 체액 특이 박테리아가 증폭됨으로써 사람

DNA로 증폭하는 DNA 메틸화 패턴을 통해 체액 식별하는 MSRE-PCR 방법 보다 높은 민감도를 보였다. 비록 구축된 다중중합효소연쇄반응 시스템이 MSRE-PCR 영역에서 민감도가 높진 않지만, 체액 특이 박테리아가 부분적으로 높은 민감도를 가짐으로써 새로운 체액 식별 방법의 민감도를 개선할 수 있었다.

또한 동일한 시료를 이용하여 중합반응 횟수를 늘림으로써 민감도를 개선할 수 있는지 확인하고자 하였다. MSRE-PCR 영역에서는 비특이적으로 생성되거나 사라지는 peak는 많지 않아 비교적 민감도가 높아짐을 확인할 수 있었다. 하지만 peak 높이의 비율로 메틸화 정도를 확인하는 방법임을 고려할 때 적은 양의 DNA일수록 상대적으로 많은 제한효소 Hha I 이 처리됨으로써 메틸화의 안정화가 완전히 유지되지는 않는 결과를 보여주었다. 그러나 MSRE-PCR의 주 표적인 정액의 경우 낮은 농도의 DNA로도 L81528의 증폭을 통하여 식별 가능하였다. 체액 특이 박테리아의 경우 모든 농도에서 하나 이상의 표적 박테리아가 증폭되었다. 정액에서 비특이적으로 31 pg의 DNA에서 타액 특이 박테리아인 *S. salivarius*가 약간 증폭되었으나, MSRE-PCR 결과를 통해 31 pg의 DNA에서도 정액임을 입증할 수 있었다. 또한 질분비액에서는 125 pg과 31 pg의 DNA에서 *S. salivarius*가 증폭되었다. Rabe 등[28]은 *S. salivarius*가 그 양은 적으나 질 내에 군집하고 있다고 보고한바 있으며, 본 결과 또한 중합반응 횟수를 늘림으로써 적은 양의 *S. salivarius*가 인지된 것이 아닌가 여겨진다.

음성대조군인 Digestion control은 125 pg 이하의 DNA의 경우 100 RFUs 이상의 peak 높이를 보임으로써 peak로 인지되었고, Amplification control의 경우 peak 높이가 너무 높아져 pull-up 현상을 보였다. 이 경우, Amplification control과 Digestion control은 희석된 인간 DNA가 아닌 인위적으로 1 ng 정도로 만들어진 벡터 DNA가 주형 DNA로 사용되므로 cycle이 늘어남으로써 너무 많은 양의 DNA가 증폭되면서 발생된 문제로 보여진다. 또한 양성대조군인 D3S1358의 경우 125 pg 이하의 DNA에서 비특이적으로 19 allele이 증폭되는 결과를 보였다. 이는 양성대조군의 역할만을 봤을 때 다른 allele이 증폭됨으로써 인간 DNA가 투임 되었다는 것은 입증할 수 있으므로 본 역할을 다했다고 볼 수 있으나, 시료가 바뀌는 것을 막는 역할을 보았을 때는 DNA 농도가 낮을 경우 주의 깊게 확인해 볼 필요가 있을 것으로 보여진다. 결론적으로 구축된 다중중합효소연쇄반응 시스템은 적은 양의 DNA를 중합반응 횟수를 32회까지 늘렸을 때 62 pg의 DNA까지 각 체액을 식별 할 수 있을 것으로 보인다. 이는 DNA 메틸화 분석법과 체액 특이 박테리아 방법을 융합함으로써 서로의 단점으로 보완하여 가능하게 할 수 있었다.

또한 법의 실제 영역에서 발견되는 체액은 한가지 체액만 남아 있는 경우도 있겠지만, 혼합물로 존재하는 경우도 많다. 예를 들어 성범죄의 경우 정액만 떨어져 있는 경우도 있으나 많은 경우 속옷

내에 질분비액과 섞여 있는 정액을 식별함으로써 이를 증명할 수 있다. 따라서 본 다중중합효소연쇄반응 시스템으로 혼합물 또한 식별가능한지 여부를 확인하고자 타액과 정액, 질분비액과 타액, 질분비액과 정액 혼합물을 만들어 진행하였다. 주로 박테리아의 존재를 통해서 서로 다른 체액이 혼합되어 있음을 확인할 수 있었다. 질분비액은 면봉으로 받은 시료 전체에 타액이나 정액을 추가 하는 것이므로 Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit (Applied Biosystems)으로 인간 DNA를 정량 해본 결과 질분비액이 다른 체액에 비해 60~3000배 정도 더 많은 DNA가 추출되는 결과를 보였다. 따라서 박테리아가 아닌 DNA 메틸화 정도를 통해 식별해야 하는 정액의 경우 질분비액과 정액 혼합물에서 이들이 혼합물임을 증명하는데 어려움이 있었다. 따라서 이러한 시료의 경우 원심분리를 이용하여 정자와 상층액을 분리 시켜서 DNA를 추출하는 방법을 이용하여 따로 분석한다면 두 가지 혼합물에 대하여 식별 가능할 것으로 여겨진다.

현재까지 개발된 체액 식별 방법 중 Fleming 등[24]은 본 연구와 유사하게 mRNA를 방법과 질분비액 특이 박테리아의 16S-23S rRNA intergenic spacer region 분석법을 융합하여 다중중합효소연쇄반응을 구축한 바 있다. 하지만 이 방법은 질분비액 특이 박테리아만 추가된다는 점과 법의 영역에서 아직까지 RNA가 익숙하지 않다는 단점이 있다. 본 연구는 법의

영역에서 익숙하게 사용하고 mRNA에 비해 안정적인 DNA를 사용한다는 점과 한번의 반응으로 여러 가지 체액을 동시에 분석 가능하다는 점을 고려할 때 실제 법의 영역에서 효과적인 체액 분석 방법으로 사용될 수 있을 것으로 보인다.

Ⅴ. 결론

1. 기존의 DNA를 기반으로 하는 체액 식별 방법보다 효율적인 방법을 개발하기 위해 조직 특이적인 DNA 메틸화 패턴을 보이는 tDMRs 분석법과 체액 특이 박테리아의 존재 여부를 확인하는 방법을 융합한 다중중합효소연쇄반응을 구축하였다.

2. 4개의 메틸화 패턴을 분석하는 표지자와 4개의 체액 특이 박테리아를 이용하여 혈액, 타액, 정액 그리고 질분비액-생리혈을 모든 시료에서 식별할 수 있었다.

3. 75일간 실내 환경에 노출시킨 체액을 이용하여 본 연구에 의해 구축된 다중중합효소연쇄반응으로 분석한 결과, 75일이 지난 후에도 메틸화의 안정성을 보이고, 박테리아가 관찰됨으로써 오래되고 분해된 시료에서도 체액 식별이 가능할 것으로 기대된다.

4. 구축된 다중중합효소연쇄반응은 동일 조건일 경우, 타액과 정액은 DNA 500 pg 이상에서 분석 가능하며, 질분비액에서는 DNA 250 pg 이상에서 분석 가능함을 보였으며, 중합반응 횟수를 늘릴 경우 31 pg 이상의 DNA에서 모두 식별 가능함을 보임으로써 적은 양의 DNA에서도 체액 식별이 가능할 것으로

기대된다.

5. 본 연구를 통해 구축된 다중중합효소연쇄반응은 법의 영역에서 익숙하게 사용하는 DNA를 사용한다는 점과 한번의 반응으로 여러 가지 체액을 동시에 분석 가능하다는 점을 고려할 때 실제 법의 영역에서 효과적인 체액 분석 방법으로 향후 사용될 수 있을 것으로 보인다.

참고문헌

1. Virkler K, Lednev IK. Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. Forensic Sci Int 2009;188:1-17.
2. 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.
3. 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.
4. Fleming RI, Harbison S. The development of a mRNA multiplex RT-PCR assay for the definitive identification of body fluids. Forensic Sci Int Genet 2010;4:244-56.
5. Song F, Smith JF, Kimura MT, Morrow AD, Matsuyama T, Nagase H, et al. Association of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) with differential gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:3336-41.
6. Ohgane J, Yagi S, Shiota K. Epigenetics: the DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated

regions in cells. Placenta 2008;29:S29-35.

7. Illingworth R, Kerr A, Desousa D, Jørgensen H, Ellis P, Stalker J, et al. A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci. PLoS Biol 2008;6:e22.

8. Kitamura E, Igarashi J, Morohashi A, Hida N, Oinuma T, Nemoto N, et al. Analysis of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) in humans. Genomics 2007;89:326-37.

9. Lee HY, Park MJ, Choi A, An JH, Yang WI, Shin KJ. Potential forensic application of DNA methylation profiling to body fluid identification. Int J Legal Med 2012;126:55-62.

10. An JH, Choi, Shin KJ, Yang WI, Lee HY. DNA methylation-specific multiplex assays for body fluid identification. Int J Legal Med In press.

11. Frumkin D, Wasserstrom A, Budowle B, Davidson A. DNA methylation-based forensic tissue identification. Forensic Sci Int Genet 2011;5:517-24.

12. Larue BL, King JL, Budowle B. A validation study of the Nucleix DSI-Semen kit-a methylation-based assay for semen identificaiton. Int J Legal Med In press.

13. Wasserstrom A, Frumkin D, Davidson A, Shpitzen M, Herman Y, Gafny R. Demonstration of DSI-semen-A novel DNA

methylation-based forensic semen identification assay. Forensic Sci Int Genet In press.

14. Nakanishi H, Kido A, Ohmori T, Takada A, Hara M, Adachi N, et al. A novel method for the identification of saliva by detecting oral streptococci using PCR. Forensic Sci Int 2009;183:20-3.

15. Nakanishi H, Ohmori T, Hara M, Takada A, Shojo H, Adachi N, Saito K. A simple identification method of saliva by detecting Streptococcus salivarius using loop-mediated isothermal amplification. J Forensic Sci 2011;56 Suppl 1:S158-61.

16. Hsu L, Power D, Upritchard J, Burton J, Friedlander R, Horswell J, et al. Amplification of oral streptococcal DNA from human incisors and bite marks. Curr Microbiol 2012;65:207-11.

17. Akutsu T, Motani H, Watanabe K, Iwase H, Sakurada K. Detection of bacterial 16S ribosomal RNA genes for forensic identification of vaginal fluid. Leg Med (Tokyo) 2012;14:160-2.

18. Benschop CC, Quaak FC, Boon ME, Sijen T, Kuiper I. Vaginal microbial flora analysis by next generation sequencing and microarrays; can microbes indicate vaginal origin in a forensic context? Int J Legal Med 2012;126:303-10.

19. Giampaoli S, Berti A, Valeriani F, Gianfranceschi G, Piccolella A, Buggiotti L, et al. Molecular identification of vaginal fluid by microbial signature. Forensic Sci Int Genet 2012;6:559-64.

20. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. J Microbiol Methods 2007;69:330-9.

21. De Backer E, Verhelst R, Verstraelen H, Alqumber MA, Burton JP, Tagg JR, et al. Quantitative determination by real-time PCR of four vaginal Lactobacillus species, Gardnerella vaginalis and Atopobium vaginae indicates an inverse relationship between L. gasseri and L. iners. BMC Microbiol 2007;7:115.

22. Kang JG, Kim SH, Ahn TY. Bacterial diversity in the human saliva from different ages. J Microbiol 2006;44:572-6.

23. Frumkin D, Wasserstrom A, Davidson A, Grafit A. Authentication of forensic DNA samples. Forensic Sci Int Genet 2010;4:95-103.

24. Fleming RI, Harbison S. The use of bacteria for the identification of vaginal secretions. Forensic Sci Int Genet 2010;4:311-5.

25. Gajer P, Brotman RM, Bai G, Sakamoto J, Schütte UM, Zhong X, et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. Sci Transl Med 2012;4:132ra52

26. Witkin SS, Linhares IM, Giraldo P. Bacterial flora of the female genital tract: function and immune regulation. Best Pract Res

Clin Obstet Gynaecol 2007;21:347-54.

27. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. Proc Natl Acad Sci U S A 2011;108:4680-7.

28. Rabe LK, Winterscheid KK, Hillier SL. Association of viridans group streptococci from pregnant women with bacterial vaginosis and upper genital tract infection. J Clin Microbiol 1988;2:1156-60.

ABSTRACT

Convergence of DNA methylation analysis and body fluid-specific microbial identification for body fluid discrimination and its forensic evaluation

Ajin Choi

Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Kyoung-Jin Shin)

Identification of the type of body fluids found at crime scenes provides important information that can support a link between sample donors and actual criminal act. Among several techniques based on nucleic acid analysis, DNA methylation profiling uses differences in DNA methylation status at tDMRs (tissue-specific differentially methylated regions) and can successfully discriminate semen including sperm cells. In addition, the method based on the detection of bacterial DNA specific for certain body fluid types can identify saliva and vaginal fluid. Therefore, integration of the two methods in a single reaction will allow more efficient discrimination of body fluids. To that end, previously reported multiplex MSRE PCR (methylation-sensitive restriction

enzyme polymerase chain reaction) was improved by the addition of a new semen-specific marker and by including amplicons for 16S rRNA gene of bacteria which are expected to be present in saliva and vaginal fluid. Since the bacterial DNA analysis regions don't have HhaI recognition sites, its amplification was not affected by MSRE treatment. Using the developed multiplex system, semen was distinguishable by unmethylation at the USP49, DACT1, PFN3 tDMRs and hypermethylation at L81528, saliva could be identified by detection of saliva-specific bacteria, *V. atypica* and/or *S. salivarius*, and vaginal fluid and menstrual blood were differentiated from other body fluids by hypomethylation at the PFN3 tDMR and the presence of vaginal fluid-specific bacteria, *L. crispatus* and/or *L. gasseri*. Moreover, 75-day-old samples can be successfully analyzed using this multiplex system, indicating the possible useful application of the multiplex for old and degraded samples. The multiplex PCR system has high sensitivity in 31 pg of DNA by increasing PCR cycles. This high sensitivity enables to overcome the weakness of both DNA methylation analysis and body fluid-specific bacteria identification and demonstrates complementary effects.

Because developed multiplex system uses the same biological source of DNA for individual identification profiling and

simultaneously analyzes various body fluids in one reaction, the method will facilitate more efficient body fluid identification in forensic casework.

Key Words: Body fluid identification, DNA methylation, methylation-sensitive restriction enzyme polymerase chain reaction, saliva-specific bacteria, vaginal fluid-specific bacteria.

게재 List

1. Lee HY, Park MJ, Choi A, An JH, Yang WI, Shin KJ. Potential forensic application of DNA methylation profiling to body fluid identification. Int J Legal Med 2012;126:55-62.
2. An JH, Choi A, Shin KJ, Yang WI, Lee HY. DNA methylation-specific multiplex assays for body fluid identification. Int J Legal Med In press.