

타액반 피검물에서 개인식별을 위한 DNA의 유전자형 검사

연세대학교 치과대학 구강진단학교실

윤 경 규 · 신 경 진 · 김 중 열

고려대학교 의과대학 법의학교실

황 적 준

= Abstract =

Typing of DNA Extracted from Cigarette Butts for Individual Identification

Kyong-Kyue Yoon, D.D.S., Kyung-Jin Shin, D.D.S., Chong-Youl Kim, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Department of Oral Diagnosis, Dental College, Yonsei University

Juck-Jun Hwang, M.D., Ph.D.

Department of Legal Medicine, Korea University College of Medicine

Cigarette butts from 5 smokers were gathered and then, placed in room temperature for 1, 3, 5, 7, 15 days. The possible use of the cigarette butts for individual identification was evaluated in sex determination, amplification of D1S80 locus, polymorphisms of HLA-DQA1 gene from the extracted DNA.

1. DNA extraction was possible in cigarette butts left in room temperature for 15 days, so it can be applicable to individual identification by polymerase chain reaction (PCR).

2. Amplification of X-Y homologous amelogenin gene by PCR made it possible to identify the sex in saliva stains (cigarette butts).

3. Amplification of D1S80 locus can be acquired from adding the bovine serum albumine and hot start PCR procedures from forensic samples such as saliva stains (cigarette butts), so the AMP-FLPs examining is possible.

4. Genotype could be determined simply and rapidly using Amplitype™ HLA-DQ α forensic kit in examining the HLA-DQA1 gene.

From the investigation, DNA extraction, sex determination, amplification of D1S80 locus, polymorphisms of HLA-DQA1 gene were successfully done even though the cigarette butts were left for 15 days at room temperature. Therefore cigarette butts are highly reliable and applicable as molecular biological samples for individual identification.

Key Words : Cigarette butt, DNA, PCR, X-Y homologous
amelogenin gene, D1S80, HLA-DQA1

서 론

범죄현장에서 채취한 담배꽂초가 사건해결의

귀중한 단서를 제공하는 경우가 종종 있으며, 이는 담배꽂초에 잔존하는 치흔 및 타액에 대한 감정으로 가능한 것이다. 그러나 담배꽂초의 치흔은 개인의 껌연 습관에 따라 존재하지 않는 경우도

있으며, 가령 있다 하더라도 그 잔존 상태에 따라 식별이 곤란한 경우가 많으며, 타액의 부착 정도도 양적으로 매우 다양하여 타액에 의한 혈형물질의 분리나 타액단백질의 다형에 따른 개인식별이 용이하지 않은 경우가 많다. 즉 다량의 신선한 타액에서 혈형물질의 분리^{57, 65)} 및 타액단백질의 다형성^{4, 62)}에 대한 연구 및 감정사례는 많으나, 극히 미량의 타액이 묻어 있는 담배꽂초와 같은 타액반피검물에서는 개인식별에 성공을 거두기가 매우 어려운 실정인 것이다. 그러나 최근 DNA 수준에서의 유전적 변이(genetic variation)의 분석은 유전자와 유전병 지도작성뿐만 아니라 소량의 법의학적 시료로부터 개체의 법의학적 식별이 가능할 정도로 많은 발전을 가져왔으며, 이러한 분자유전학적 방법으로 타액 및 탈락세포가 부착된 담배꽂초와 같은 타액반으로부터 개인식별이 가능하게 되었다.

분자유전학은 1953년 Watson과 Crick⁵⁰⁾이 DNA의 2중 나선구조를 밝혀낸 이래 급속하게 인체 핵게놈(Human nuclear genome)에 대한 유전정보의 간접적인 분석법으로부터 실제로 게놈을 구성하고 있는 DNA의 분석을 가능하게 함으로써, 생명과학 분야 연구의 폭을 넓혀 유전자의 구조나 기능을 보다 심도 있게 이해할 수 있게 되었고 의학 및 생물학 분야의 연구에 혁신을 가져왔다. 일반적으로 유전자 표식자(genetic marker)를 이용한 연구에서 주로 쓰이는 분자유전학적 방법으로 제1세대의 Southern-hybridization법⁴³⁾과 제2세대의 중합효소반응(polymerase chain reaction, 이하 PCR)법³⁹⁾을 들 수 있다.

1970년 Smith등⁴²⁾이 DNA의 염기배열 중 특정 염기를 인식하여 그 부위만을 절단하는 제한효소(restriction enzyme)를 발견한 후 개발된 재조합 기술(recombinant DNA technology)과 유전자 클로닝(gene cloning)기법은 한두 개의 유전자 연구에서 한개체에 존재하는 게놈 전체에 대한 연구 단계로 발전시켰을 뿐만 아니라 DNA 수준에서의 다형성 분석(polymorphism analysis)도 가능하게 되었다. DNA 다형성은 특정 제한효소로 절단하여 생성되는 길이가 다른 DNA 단편(restriction fragment length polymorphisms, 이하 RFLPs)을 전기영동, Southern blot 혼성화(hybridization) 과정으로 다좌위탐침(multi-lo-

cus probe)과 단좌위탐침(single-locus probe)을 이용하여 검색할 수 있으며, 특정 제한효소에 의해 생성되는 RFLPs는 멘델의 유전법칙으로 한 세대에서 다음 세대로 유전된다는 사실도 밝혀졌다^{33, 53)}. 인체의 게놈에 있는 다형성 유전좌위(polymorphic locus)들의 유전표식자는 대부분이 2개의 대립유전자만으로 구성되어 이형접합도(heterozygosity)가 50%를 넘지 못하기 때문에 DNA의 다형성 연구에는 효율성이 떨어진다. 그러나 진핵생물(eukaryote)에서 유전형질 발현에 관여하지 않는 9~50개의 염기수를 1단위로 하는 염기구조가 가로로 반복배열된 DNA 구조를 과변이초과성 좌위(hypervariable minisatellite locus) 또는 VNTR 좌위(variable number of tandem repeat locus)라 하며, 이 좌위를 구성하는 DNA의 염기배열은 특정제한 효소가 인식하여 절단하는 염기부위는 일정하나 감수분열 시기에 자매 염색체간에 일어나는 불균등 교차(unequal crossover)로 인해 반복되는 염기단위가 추가되거나 삭제되어 "단편길이 다형"(fragment length polymorphism)이 생성되므로 이형접합도가 높은 DNA 다형성을 나타낸다. 인체 게놈에 산재해 있는 VNTRs의 특징은 어떤 제한효소에 의해서도 검출이 가능할 뿐만 아니라 대립인자의 수가 많고 또 이형접합도가 높기 때문에 유전형질 연구뿐만 아니라 법의학 분야에서는 개체특이성 유전표식자(individual-specific genetic marker)로서 개인식별과 친생자 감정에 이용된다^{1, 35)}. 1985년 Jeffery등²²⁾은 사람의 myoglobin 유전자 중에서 33 염기수를 한 단위로 하는 반복염기배열(repetitive sequence)을 재조합 기술을 이용하여 탐침을 만들어 DNA단편의 다형성을 검색한 결과 혈연관계가 없는 사람간에 동일한 DNA 단편을 공유할 확률은 약 5×10^{-19} 라 보고하면서, 이 다형성은 사람의 지문과 필적할 정도의 개체특이성을 나타내므로 유전자지문(DNA fingerprints)이라 하였다^{12, 20, 22)}. 국내에서도 pV47-2 다좌위탐침을 이용하여 이⁵⁹⁾등은 친생자 감정의 적용 여부를, 이⁶¹⁾등은 한국인에서 검사되는 VNTRs의 빈도를, 임⁶³⁾등은 유전자지문의 유전적 특성을 보고한 바 있다.

그러나, 법의학 분야에서 이러한 RFLPs 검사는 많은 시간이 소요되며, 실험방법상 정확한 결

과를 얻어내기 위해서는 다좌위탐침을 이용하는 경우 *ug* 단위의 비교적 많은 양의 분해되지 않은 고분자 DNA (high molecular-weight DNA)를 필요로 하며, 단좌위탐침을 이용할 경우에는 수백 *ng*의 DNA를 필요로 하기 때문에 범죄현장에서의 혈흔, 모발, 타액, 정액, 유골과 같은 매우 소량의 분해된 상태의 DNA만을 얻을 경우 이러한 방법을 적용하기에는 어려움이 많았다. 그러나 중합효소반응을 이용한 DNA 다형성 검사에서는 수십 *ng* 이하의 DNA로도 충분히 특정 유전자의 분석을 할 수 있으므로 Southern-hybridization법의 단점을 보완할 수 있는 새로운 방법으로 등장했다. 중합효소반응법은 유전자분석에 관한 여러가지 연구와 진단분야 특히 유전자형의 결정에 폭넓게 사용되고 있다. 1985년 Saiki등³⁹⁾은 human β -globulin DNA의 증폭과 겸상 적혈구성 빈혈증 (sickle cell anemia)의 산전 진단에 최초로 적용하여 생체밖에서 인체 계놈의 특정 부위를 중합효소반응법을 이용하여 증폭이 가능하다는 보고를 하였다. 이러한 중합효소반응법은 법의학분야에 적용되어 주로 VNTRs를 나타내는 특정 유전좌위만 증폭, 전기영동하여 증폭된 길이다형성 (amplified fragment length polymorphisms, 이하 AMP-FLPs)을 비교적 간단하게 검색할 수 있으며, HLA-DQA1 유전좌위와 같이 개체마다 다른 유전자를 증폭하여 그 염기서열을 분석할 수 있게 되어 RFLPs 분석과는 달리 한개의 체세포 만으로도 한 개체식별이 가능하게 되었다.

사람의 계놈 DNA에서 VNTRs 다형성을 나타내는 유전좌위는 약 1,500개로 추정되나 그 중 법의학분야에서 개인식별에 이용되는 유전좌위는 *prg3*(D7S22)²⁴⁾, *MS32*(D1S8)²⁴⁾, *pMS51*(D11S97)²⁴⁾, *apolipoprotein B*(ApoB)⁶⁾, *pYNZ22*(D17S30)¹⁹⁾, *pMCT118*(D1S80)^{7, 40)}, *type II collagen*(CL2A1)^{44, 52)} 등이다. 한편 국내에서도 명등⁵⁶⁾이 모발로부터 HLA-DQA1, D1S80, COL2A1의 유전자형을 검색하였으며, 송등⁵⁸⁾은 D1S80 유전자형 결정을 위한 PCR법의 조건에 대하여, 김등⁵⁵⁾은 D1S80 유전좌위의 유전적 다형성 및 집단내의 균질성 검증에 대하여, 이등⁶⁰⁾은 한국인에서 D1S80 유전좌위의 대립유전자 탐색과 돌연변이율의 측정에 대하여, 정등⁶⁴⁾은 COL2A1 유전좌위의 대립인자 유전자 빈도를 보고한 바 있다.

한편 HLA-DQA1 유전자는 인간의 6번 염색체의 HLA complex class II gene 중 HLA α -chain을 발현하는 유전자¹⁰⁾로서 VNTRs과는 달리 개인마다 그 염기서열이 다른 대립인자들이 존재한다. 이 HLA-DQA1 유전자를 sequencing 없이 간편하고 빠르게 검색할 수 있도록 Amplitype™ HLA-DQ α Forensic Kit (Perkin Elmer Cetus Co.)가 제작되어 있어 법의학적인 개인식별에 많이 사용되고 있으며⁸⁾, 강등⁵⁴⁾은 한국인의 HLA-DQ α 의 유전자형 빈도에 관한 연구를 보고한 바 있다.

개인식별의 중요한 한 부분인 성별의 감정은 종래에 골반골, 두개골, 치아와 같은 인체의 해부학적 특징과 같은 복합유전형질 (multifactorial inheritance)에 대한 계량통계학적 분석이 일반적으로 적용되고 있으나 정확도가 다소 떨어진다. 그러나 분자유전학의 발전에 따라 주로 성염색체에 기초한 접근이 가능하게 되었다. 성별은 Y 염색체에 특이성이 있는 탐침을 사용하여 Southern-hybridization법으로 주로 검사하였으나, false-negative를 배제할 수 없는 단점이 있었다^{28, 31)}. 그러나 최근 치아 발생기에 법랑질을 만드는 amelogenin gene을 남자가 다르게 나뉘어 가짐이 밝혀졌으며^{30, 32)}, 이 유전좌위를 중합효소반응법으로 증폭하면 *pg*의 소량의 DNA에서도 성별 판별이 가능하고, 또한 정확한 방법이다³⁾.

타액이나 타액반 물질에서의 DNA 유전자형 검색에 관한 연구를 살펴보면 Walsh등⁴⁸⁾은 RFLPs 검사, Ohhashi등³⁶⁾, Kloosterman등²⁷⁾은 D1S80 유전좌위의 AMP-FLPs, Schneider등⁴¹⁾, Plesley³⁸⁾등은 HLA-DQA 유전자의 다형성, Hochmeister등¹⁷⁾은 HLA-DQA1 D1S80 유전좌위의 다형성을 연구하여 법의학적인 개인식별의 재료가 될 수 있음을 보고한 바 있으나, 국내에서는 아직 보고된 바 없다. 특히 시간 경과에 따른 DNA 유전자형의 검색 정도에 대한 연구는 국내외에서 아직 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 시간대별로 담배꽂초로부터 추출된 DNA를 중합효소반응법을 이용하여 성별을 검사하고, HLA-DQA1 유전자의 다형성 뿐만 아니라 D1S80 유전좌위에서의 AMP-FLPs를 검사하여 법의학적인 개인식별에 그 이용성을 조사하려고 한다.

실험재료 및 방법

1. 타액과 담배꽁초로부터의 DNA 추출

깍여올리는 5사람의 남자로부터 담배꽁초를 수거하여 실온에서 방치한 다음 1, 3, 5, 7, 15일이 경과된 후에 다음과 같이 DNA를 추출하였다.

담배꽁초 중 구강 및 입술에 접촉되어 타액이 묻어있다고 생각되는 필터(filter)의 끝 2/3 부분을 절단한 다음 내부의 내용물을 버린 후 외면의 종이 부분을 모아 가로, 세로 3mm 이하의 크기로 잘게 절단하였다. 이 종이 부분을 모아 Eppendorf tube에 담은 후 1.4ml의 3차 증류수를 넣고 4°C에서 약 1시간 동안 흔들어 준 다음 10cc 주사기로 종이를 부유액을 분리하였다. 부유액은 새로운 Eppendorf tube에 넣어 14,000 r.p.m.에서 약 10분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 나머지 부분에 phosphate buffered saline(PBS) 470 μ l, 10% sodium dodecyl sulfate(SDS) 25 μ l, proteinase K(20mg/ml) 5 μ l를 가하여 56°C에서 2시간 이상 부양시켰다. 이 시료 Tris-HCl(pH 8.0)로 포화시킨 phenol/chloroform/isoamylalcohol(25:24:1)을 500 μ l를 넣어 잘 흔든 후 약 5분간 원심분리한 다음 상층액을 micropipet로 분리, 새로운 Eppendorf tube에 옮겼다. 분리된 상층액에 phenol/chloroform/isoamylalcohol을 다시 넣어 다시 한번 상층액을 분리하는 과정을 총 3회 반복하였다.

이 시료에 2배 부피의 100% ethanol, 1/10 부피의 3M의 sodium acetate를 넣은 다음 -20°C에서 1시간 이상 보관한 다음 30분간 원심분리하여 상층액을 버리고, 침전물에 400 μ l의 70% ethanol을 넣고 잘 혼합하여 10분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 55°C heat block에서 건조하였다. 건조한 침전물에 50 μ l의 TE buffer(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)을 가하여 DNA를 용해시켜 260nm 파장의 분광계(spectrophotometer)로 농도를 측정하였다.

대조군으로 사용하기 위해 동일인으로부터 200 μ l의 타액을 얻은 다음 상기의 방법으로 DNA를 추출한 후 200 μ l의 TE buffer에 용해시키고 동일한 방법으로 DNA 농도를 측정하였다.

2. 성별 검사

성별 판별을 위해 Sullivan등⁴⁵⁾ (1993)에 의해 제시된 primers(5'-CCCTGGGCTCTGTAAA GAATAGTG-3'과 5'-ATCAGAGCTTAAAC TGGGAAGCTG-3')을 이용하여 Ericomp™ 시스템에서 다음과 같이 PCR을 수행하였다. 각 PCR 혼합물에는 약 10ng의 시료 혹은 대조군으로 사용하기 위한 남, 여 혈액에서 추출된 DNA 10mM Tris-HCl(pH 8.8), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 각각 0.2 μ M의 primer, 각각 200 μ M의 dNTP 그리고 1 unit의 DynaZyme DNA polymerase(FINNZYMES OY)가 포함되어 있으며 최종 용량은 50 μ l이었다. 모든 시료는 첫 온도순환에 앞서 95°C에서 5분간 가열한 후, 95°C에서 1분, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분으로 이루어진 총 40회의 온도순환 후 72°C에서 10분간 반응시간을 추가적으로 주었다.

증폭된 각각의 PCR 산물들은 BioRad Mini Trans-Blot Cell에서 1mm 두께의 12% polyacrylamide gel을 만들어 5 μ l씩 loading하였다. Gel과 전극의 완충용액(buffer)으로 90mM Tris-Borate, 2mM EDTA를 사용하여, 100bp ladder와 함께 150V의 일정한 전압에서 1시간 동안 전기영동한 후 ethidium bromide(0.5 μ g/ml)로 염색하여 분리된 띠를 판독하여 성별을 결정하였다.

3. D1S80 유전좌위의 PCR 증폭 및 AMP-FLPs 검색

D1S80 유전좌위의 AMP-FLPs 검색을 위해 Kasai등²⁵⁾(1990)에 의해 제시된 primers(5'-GA AACTGGCCTCCAAACACTGCCCGCCG-3'과 5'-GTC'TTGTTGGACATGCACGTGCCCTT GC-3')를 이용하여 Ericomp™ 시스템에서 다음과 같이 PCR을 수행하였다. 각 PCR 혼합물에는 약 10ng의 DNA 시료, 10mM Tris-HCl(pH 8.8) 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.5 μ g/ μ l의 bovine serum albumine(BSA), 각각 0.2 μ M의 primer, 각각 200 μ M의 dNTP 그리고 1 unit의 DynaZyme DNA polymerase(FINNZYMES OY)가 포함되어 있으며 최종 용량은 50 μ l이었다. 모든 시료는 95°C에서 1분, 65°C에서 1분, 72°C에서 2분으로 이루어진 총 32회의 온도순환 후 72°C에서 10분간 반응시간을 추가적으로 주었다. 첫 순환에

앞서 다음과 같이 hot start를 수행하였다¹¹⁾. Dynazyme DNA polymerase 만을 제외한 PCR 혼합물을 95°C에서 5분간 가열한 후 온도를 80°C로 내려 DynaZyme DNA polymerase를 넣어준 후 나머지 온도순환을 진행시켰다.

증폭된 각각의 PCR 산물들은 BioRad Mini Trans-Blot Cell에서 2mm 두께의 6% polyacrylamide gel을 만들어 10 μ l씩 loading하였다. Gel과 전극의 완충용액(bufer)으로 90mM Tris-Borate, 2mM EDTA를 사용하여, 100bp ladder와 함께 150V의 일정한 전압에서 45분 동안 전기영동한 후 ethidium bromide(0.5 μ g/ml)로 염색하여 AMP-FLPs를 결정하였다.

4. HLA-DQA1 유전자의 PCR 증폭 및 유전자형 검색

HLA-DQA1 유전자의 PCR 증폭 및 증폭된 산물들의 유전자형 결정은 Amplitype™ HLA-DQ α Forensic Kit (Perkin Elmer Cetus Co.)을 이용하여 Perkin Elmer Cetus GeneAmp PCR 9600™ 시스템에서 다음과 같이 수행하였다. 약 20 ng의 DNA 시료와 2 \times Premixes와 8mM MgCl₂를 각각 35 μ l씩 동량씩 넣고 첫 온도순환에 앞서 95°C에서 5분간 가열한 후 95°C에서 1분, 60°C에서 30초 그리고 72°C에서 30초로 이루어진 온도순환을 35회 시행한 후 72°C에서 10분간 반응시간을 주어 수행하였다.

증폭된 HLA-DQA1 유전자의 PCR 산물들은 1%(w/v) agarose gel에서 40mM Tris-Acetate, 1mM EDTA buffer를 사용하여 100bp ladder와 함께 전기영동한 후 ethidium bromide(0.5 μ g/ml)로 염색하여 DNA 단편의 증폭여부를 확인하였다.

HLA-DQA1 대립 유전자를 검색할 수 있는 sequence-specific oligonucleotide 탐침(probe)이 도말된 나이론 막(nylon strip)을 Amplitype DNA tray의 각 홈에 넣고, 혼성화 용액(hybridization solution) 3.3ml, enzyme conjugate(horseradish peroxidase) 27 μ l를 가하고 여기에 95°C에서 5분간 변성시킨 PCR 산물 (PCR product) 70 μ l 넣은 후 55°C에서 20분간 혼성화를 수행하였다. 세척용액(washing solution)으로 혼성화된 나이론막을 수초간 씻어준 후 새로운 용액으로 55°C

에서 12분간 그리고 다시 새 용액으로 실온에서 5분간 씻어준다. 0.1M citrate buffer(pH 5.0) 10ml로 5분간 씻어준 후 0.1M citrate buffer(pH 5.0) 10ml, chromogen(3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine) 0.5ml, 28% H₂O₂ 5 μ l가 포함된 발색 용액 10ml을 넣어 실온에서 10~20분간 푸른색으로 변화될 때까지 반응시켰다. 증류수로 각 strip을 씻어주어 발색반응을 중지시킨 다음 HLA-DQA1 유전자의 유전자형은 Amplitype™ HLA-DQ α Forensic Kit 에서 제시한 방법으로 결정하였다.

연구성적

1. 담배꽂초로부터 추출된 DNA의 양

5명의 타액에서 추출한 DNA 양은 14~37 ng/ μ l 였으며, 동일인에서 얻어진 담배꽂초를 1, 3, 5, 7, 15일간 실온에서 방치한 후 각 시료로부터 DNA를 추출한 결과 최소 10ng에서 최고 180ng 정도로 평균 37~100ng의 DNA가 추출되었고, 3일째, 5일째의 각 시료에서는 다른 날의 것보다 약 2배에 달하는 DNA가 추출되었다(Table 1).

Table 1. DNA concentrations extracted from each sample of cigarette butts.

Sample	Saliva ^a		Days ^b			
	1	3	5	7	15	
1	20	40	35	63	50	25
2	37	80	180	125	130	30
3	25	40	150	80	15	60
4	23	10	25	70	25	40
5	14	20	100	165	20	30
Average	23.8	38.0	98.0	100.6	48.0	37.0

a: ng/1 μ l saliva

b: ng/1 cigarette butt

2. 성별 검사

5명의 시료를 1, 3, 5, 7, 15일간 실온에 방치한 25개의 담배꽂초로부터 추출한 DNA 시료를 이용하여 X-Y homologous amelogenin gene을 중합효소반응에 의해 증폭한 결과 모든 시료에서 106bp와 112bp 크기의 PCR 산물들을 전기영동으로 관

찰할 수 있었다. 한편 대조군으로 사용한 남, 여 혈액시료에서 추출한 각각의 DNA를 중합효소반응을 한 후 그 생성물을 12% polyacrylamide gel에서 전기영동한 결과 남자는 112bp와 106bp 크기의 DNA 띠 2개가, 여자는 106bp 크기의 단일 DNA 띠만이 관찰되었다. 따라서 이를 대조군과 25개의 시료를 비교한 결과 모두 남자임을 확인할 수 있었다(Fig. 1a, b).

3. D1S80 유전자좌위의 AMP-FLPs 검색

각 담배꽂초로부터 추출한 DNA 시료를 중합효소반응으로 증폭하여 전기영동한 결과 시료 1의 유전자형은 M18/M18, 시료 2는 M24/M18, 시료 3은 M31/M16, 시료 4는 M32/M30, 그리고 시료 5는 M30/M18로서 시료 1을 제외하고는 모두 이형접합자(heterozygote)였다(Table 2, Fig. 2a).

Table 2. Typing of D1S80 locus amplified from each sample of cigarette butts.

Sample	Genotype	Remark
1	M18/M18	Homozygote
2	M24/M18	Heterozygote
3	M31/M16	Heterozygote
4	M32/M30	Heterozygote
5	M30/M18	Heterozygote

한편 각 시료를 1, 3, 5, 7, 15일간 실온 방치한 후 D1S80유전자의 대립유전자를 중합효소반응으로 증폭한 결과 15일이 경과한 시료에서도 동일인에서 같은 대립유전자를 확인할 수 있었다(Fig. 2b).

4. HLA-DQA1 유전자의 유전자형 검색

담배꽂초에서 얻어진 DNA 시료를 이용하여 HLA-DQA1 유전자를 중합효소반응으로 증폭한 결과 25개의 시료 모두에서 242bp의 PCR 산물이 관찰되었다(Fig. 3). Amplitype™ HLA-DQα Forensic Kit의 탐침 strip을 이용하여 PCR 산물들의 유전자형을 검색한 결과 시료 1은 1.2/3형, 시료 2는 1.2/4형, 시료 3은 1.1/1.2형, 시료 4는 3/3형, 시료 5는 1.3/4형으로써 시료 4를 제외하고는 모두 이형접합체로 관찰되었다(Table 3, Fig. 4a).

타액과 1, 3, 5, 7, 15일간 실온에서 방치한 담배꽂초에서 추출된 DNA의 HLA-DQA1 유전자형은 모두 동일하였다(Fig. 4b).

총괄 및 고찰

염색체수가 반배체인 사람의 정자 1마리에서 추출할 수 있는 DNA의 양은 2.5×10^{-3} ng으로 추산되므로¹⁴⁾, 구강의 점막에서 탈락되는 상피세포

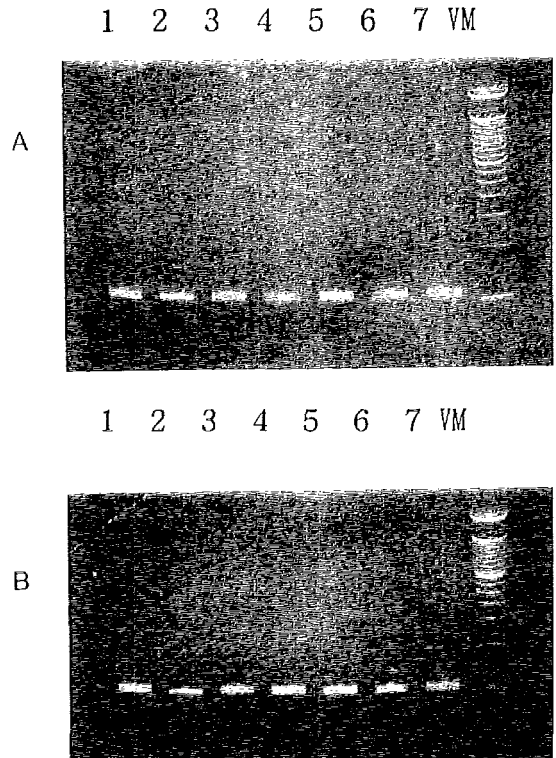


Fig. 1. A polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products of X-Y homologous amelogenin gene.

A. DNA bands amplified from 5 days elapsed-cigarette butts.

Lane 1: male control
Lane 2: female control
Lane 3~7: sample 1 to 5
VM: 100 bp ladder

B. DNA bands amplified from sample 2 of cigarette butts.

Lane 1: male control
Lane 2: female control
Lane 3~7: 1, 3, 5, 7, and 15 days elapsed-samples
VM: 100 bp ladder

Table 3. Typing of HLA-DQA1 gene amplified from each sample of cigarette butts.

Sample	Genotype	Remark
1	1.2/3	Heterozygote
2	1.2/4	Heterozygote
3	1.1/1.2	Heterozygote
4	3/3	Homozygote
5	1.3/4	Heterozygote

는 체세포로서 염색체수가 이배체이기 때문에 추출할 수 있는 DNA양은 구강점막에서 탈락된 2,000~36,000개 정도의 상피세포에서 얻은 양이라 생각되며, 대략 타액 1~5 μ 에 해당되는 양이었다 (Table 1). 그러나 추출된 DNA의 양은 사람마다 다소 차이가 있었는데, 이것은 껍연습관에 의한 것이라 생각된다. 즉 입안에 담배를 머물고 있는 시간, 얼마의 길이로 담배를 태우는가, 입술만 닿는가 아니면 혀가 닿는가 등 개인의 선호도에 따른 것으로 추정된다. 시간대 별로 살펴 보았을 때도 일정한 변화의 양상은 관찰되지 않았으나, 3일째와 5일째 시료에서 다소 많은 양이 검출된 것은 껍연습관에 따른 개인차뿐만 아니라 또한 DNA 추출시의 기수상의 차이로써 phenol/chloroform/isoamylalcohol로 처리하여 단백질을 제거하고 DNA만을 회수하는 과정, 100% ethanol로 DNA를 침전시키는 과정에서 차이가 발생한 것으로 생각된다. 이러한 차이를 줄이기 위해서는 본 실험에서 처럼 긴 과정의 DNA 추출과정 보다는 Chelex법과 같은 짧고 간단한 과정으로 DNA를 추출하는 것이 바람직하다고 생각된다⁴⁹⁾.

Walsh등⁴⁸⁾의 연구에서 일반적으로 단좌위탐침으로 완전한 DNA의 유전자형을 검색하기 위해서

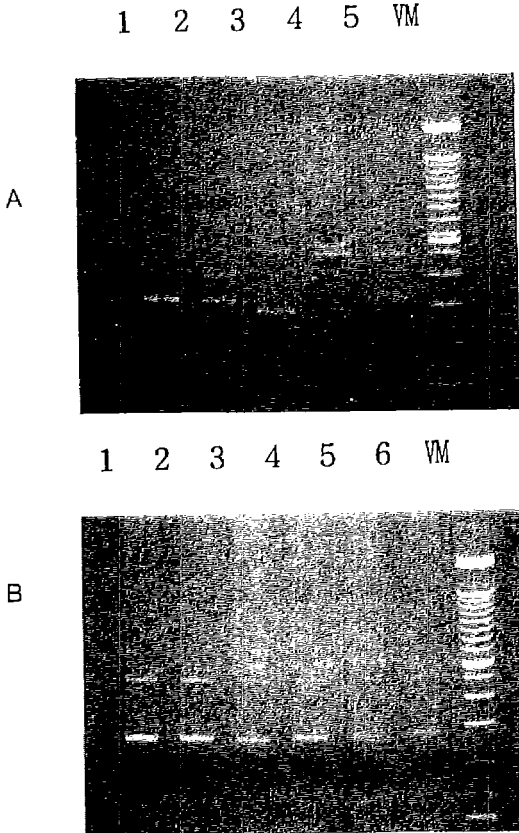


Fig. 2. A polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products of D1S80 locus.

A. Alleles of D1S80 amplified from 3 days elapsed-cigarette butts.

Lane 1~5: sample 1 to 5

VM: 100bp ladder

B. Alleles of D1S80 amplified from sample 3 of cigarette butts.

Lane 1: whole saliva of sample 3

Lane 2~6: 1, 3, 5, 7, and 15 days elapsed-sample

VM: 100bp ladder

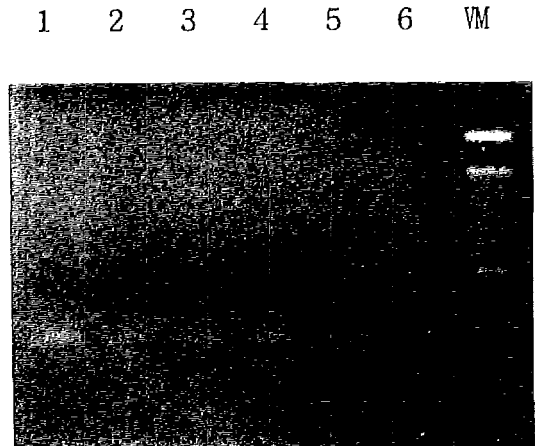


Fig. 3. An electrophoresis of PCR products of HLA-DQA1 gene amplified from sample 5 of cigarette butts.

Lane 1: whole saliva of sample 5

Lane 2~6: 1, 3, 5, 7, and 15 days elapsed-sample

VM: 100bp ladder

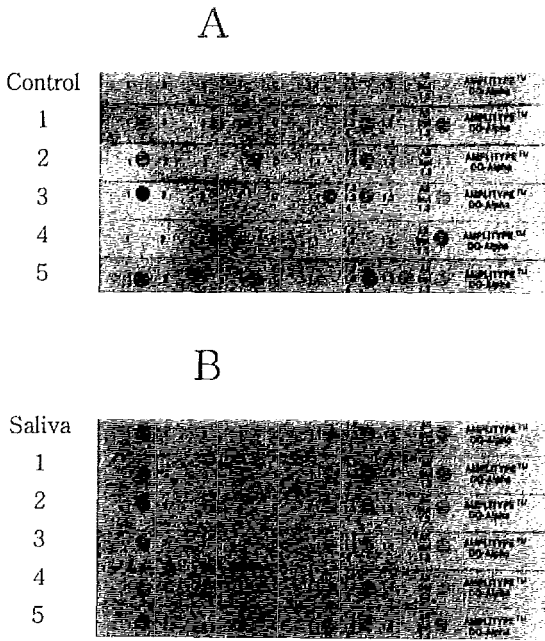


Fig. 4. Dot hybridization of PCR products of HLA-DQA1 gene with sequence-specific oligonucleotide probes.

A. Allels of HLA-DQA1 amplified from 15 days elapsed-cigarette butts.

Lane 1: cigarette control
Lane 2~6: sample 1 to 5

B. Alleles of HLA-DQA1 amplified from sample 3 cigarette butts.

Lane 1: whole saliva

Lane 2~6: 1, 3, 5, 7, and 15 days elapsed-sample

는 대략 30~60 ng이 필요하며, 타액반에서 추출되는 DNA의 양으로 단좌위탐침을 이용하여 Southern-hybridization에 의한 RFLPs를 검사하기에는 부적절하다고 보고하였고 본 실험에서도 대부분의 경우 추출된 DNA의 양이 60 ng보다 적었다 (Table 1). 즉 한개의 담배꽂초로부터 추출된 DNA의 양으로 불때 RFLPs 검색은 어려우며 중합효소반응에 의한 AMP-FLPs 검사법으로 유전자형을 검색해야한다 할 수 있겠다.

성별 검사를 위한 분자유전학적인 접근 방법은 성염색체에 있는 VNTRs의 Southern-hybridization법에 의한 검사가 주종을 이루어 왔다. 그 중 DYZ1 유전좌위는 Y 염색체상에 존재하는 3564 bp의 긴 염기서열로 pHY10 탐침으로 매우 민감하게 찾을 수 있지만, 검색되지 않은 경우에는 여

자이기 때문인지, 시료의 양이 적어서인지 여부를 알 수 없다는 단점이 있다³¹⁾. 그러나 중합효소반응에 의한 X-Y homologous amelogenin gene의 AMP-FLPs 검사는 X, Y gene을 동시에 검사가 가능하여 Y 염색체 특이성 탐침 사용시 발생하는 false-negative를 배제할 수 있어 많이 사용되고 있다^{2, 3, 5, 29)}. X-homologue의 intron 1에 6 bp 크기의 염기서열이 삭제되어 있어 Sullivan등⁴⁵⁾이 제안한 프라이머를 사용하여 중합효소반응으로 증폭하면 X 염색체는 106 bp, Y 염색체는 112 bp 크기의 DNA 띠가 전기영동 상에서 관찰된다. 본 실험에서는 25개의 모든 시료에서 X, Y 염색체 중 프라이머에 의해 증폭되는 2개의 DNA 띠(band)로써 모두가 남자임을 대조군의 남, 여 혈액과 비교하여 명확하게 관찰할 수 있었다. 6 bp를 분리시키기 위해 4% Nusieve-Agarose(3% NuSieve GTG와 1% SeaKem GTG agarose) gel을 사용하여 분리를 시도하였으나 제대로 분리되지 않아 polyacrylamide gel을 사용하였다(Fig. 1). 6%, 10% polyacrylamide gel에서도 어느정도는 분리되나 더욱 분리능력을 높이기 위해 12% gel을 사용하였다. 더욱 높은 %의 polyacrylamide gel은 12% gel보다 분리능력은 별차이가 없었으며 전기영동 시간이 너무 많이 걸리는 불편감이 있었다.

사람의 염색체 1번에 위치하는 D1S80 유전좌위는 16 bp 크기의 규칙적인 반복염기서열로 구성되어 하나의 대립인자가 약 350~900 bp의 크기로 존재한다^{7, 25, 26, 47)}. 현재까지 한국인에서는 29개의 대립유전자(n)가 밝혀졌으며 이들의 조합에 의해 형성되는 유전자형($N=n(n-1)/2$)은 406종으로 기대되나 한국인 804명을 대상으로 실험한 결과 146 종류의 유전자형만이 밝혀졌고, 또한 한국인에서 D1S80 유전좌위는 85.3~87.4%의 높은 이형접합도들 나타내므로 법의학적 감정에 유용하게 사용될 수 있다⁶⁰⁾. 본 실험에서도 5명의 시료에서 D1S80 유전좌위의 AMP-FLPs를 보여 주고 있다 (Table 2 및 Fig. 2). 1번 시료의 경우 동형접합체(homozyote)를 나타내고 있는데, 김등의 연구에 의하며 총 276개의 유전자형 중에서 3개의 유전자형이 동형접합체로 관찰되었다고 보고하였다⁵⁵⁾. D1S80 유전좌위의 증폭은 32회의 온도순환으로 PCR을 시행하였는데, 이 보다 더 많은 온도순환에서는 PCR 인공산물이 형성되었으며, 더 적은

온도순환시에는 때가 관찰되지 않았는데, Kasai 등²⁶⁾, 송등⁵⁸⁾의 연구 보고와 유사한 결과였다. 법의학적 증거물의 경우 사건현장에 방치되어 PCR 억제물질로 오염될 가능성이 많고, 또한 DNA가 변성되어 그 양이 극히 미량일 가능성이 많아진다. 본 실험에서는 이러한 문제점을 해결하기 위하여 DNA의 양이 적어 PCR의 시작시에 mis-priming을 방지하기 위해 hot start PCR을 시행하였으며¹¹⁾, bovine serum albumin(BSA)를 첨가하여 중합효소를 안정화시켜 인공산물의 형성을 최소화하기 위해 노력하였다^{17, 37)}.

HLA-DQA1 유전자형을 검사하기 위한 Ampli-type™ HLA-DQα Forensic Kit로는 1.1, 1.2, 1.3, 2, 3, 4의 6개의 대립인자를 검색할 수 있어 총 21개의 유전자형 표현이 가능하다. HLA-DQA1 유전자의 크기는 242bp로써 이형접합도는 민족에 따라 약간의 차이는 나타내지만 대략 60~80%이다^{9, 15, 16, 46, 51)}. 한편 강등⁵⁴⁾(1992)에 의하면 한국인 206명을 대상으로 HLA-DQA1 유전자를 검사한 결과 한국인에서 발견되는 대립인자로부터 계산된 이형접합도는 83.5%로써 이들의 개인식별력(discrimination power)은 92%라고 하였다. 본 실험에서도 총 25개의 시료에서 모두 유전자형의 결정이 가능하였으며(Table 3), 15일간 실온에서 방치한 담배꽁초로부터 추출된 DNA 시료도 타액의 유전자형과 일치함을 알 수 있었다(Fig. 3 및 Fig. 4).

이상의 연구에서 법의학적 현장에서 중요한 증거물의 하나인 담배꽁초로부터 추출할 수 있는 DNA의 양, 각 시료의 성별 검사, D1S80 유전자위의 AMP-FLPs 검색, HLA-DQA1 유전자의 유전자형 검색은 성공적으로 이루어 질 수 있음을 알 수 있었다. D1S80 유전자위의 AMP-FLPs와 HLA-DQA1 유전자의 다형성만으로도 5명의 사람을 충분히 식별할 수 있었으나, HLA-DQA1은 21가지의 유전자형만이 존재하며, D1S80 유전자위는 약 30개 정도의 대립인자로 약 80% 정도의 이형접합도를 보여 두가지 유전자형의 검색만으로는 다수의 인구를 상대로 할 때 그 개인식별이 곤란해 질 수 있다. 따라서 다좌위탐침에 의한 유전자형을 검색하면 다른 사람이 동일한 유전자형 다형성을 나타낼 확률이 매우 낮기 때문에 정확하게 개인식별을 할 수 있으나, 혈흔, 정액, 모발, 타

액반, 오래된 유골과 같은 법의학적 시료에서는 추출할 수 있는 DNA 양이 극히 미량일 뿐더러 분해(degradation)된 경우가 많아 불가피하게 중합효소반응법에 의한 유전자형 검사를 하게 된다. 중합효소반응법에 의한 검사의 경우에는 1ng이하의 매우 소량의 DNA 만으로도 유전자형을 검사할 수 있으나, 대립인자의 길이가 대략 5kb 이상의 경우에는 중합효소반응에 의한 검색이 불가능한 경우가 많으며, 그 이형접합도가 100%에 달하는 유전자위는 아직 발견되지 않은 상태이다. 따라서 AMP-FLPs 검사에서는 이형접합도가 80% 이상을 나타내는 여러 유전자위의 검사가 필요하게 된다.

본 연구에서는 한개의 담배꽁초로부터 성공적으로 DNA를 추출할 수 있으며, 법의학적 개인식별에 사용되는 대표적인 유전자위의 다형성을 중합효소반응법에 의해 검색가능하다는 것을 알았다. 그러나 다수의 인구를 상대로 개인식별을 해야 할 경우에는 더 많은 유전자위의 AMP-FLPs 검색을 추가적으로 실시하여야 하겠으며, 더 나아가 AMP-FLPs의 단점을 보완할 수 있는 방법들, 즉 mitochondria sequencing^{13, 18)}, MVR-PCR(minisatellite variant repeat mapping PCR)^{22, 34)} 등과 같은 방법을 적용함으로써 법의학적 시료에서 완전한 개인식별이 가능하도록 연구되어야 하겠다.

결 론

본 연구에서는 5명의 사람으로부터 찍연 후 남은 담배꽁초를 수거하여 1, 3, 5, 7, 15일간 실온에서 방치한 다음 DNA를 추출, 성별 검사, D1S80 유전자위 AMP-FLPs의 검색, HLA-DQA1 유전자의 다형성을 검색하여 법의학적 개인식별에 응용할 수 있는지 여부를 조사한 바 다음과 같은 연구 결과를 얻었다.

1. 15일간 실온에서 방치한 담배꽁초에서도 DNA 추출이 가능하므로 중합효소반응을 이용한 법의학적 개인식별에 이용할 수 있다.
2. 중합효소반응에 의한 X-Y homologous amelogenin gene을 증폭하면, 타액반 피검물(꺾연)에서 성별의 판별이 가능하다.
3. 타액반 피검물(꺾연)과 같은 법의학적 시료

에서 D1S80 유전자좌위의 증폭은 bovine serum albumin의 첨가와 hot start PCR을 시행함으로써 AMP-FLPs 검색이 가능하다.

4. HLA-DQA1 유전자좌위의 다형성 검사는 Ampli-type™ HLA-DQ α Forensic Kit를 사용하여 타액반 피검물(질연)에서 간편하고 빠르게 유전자형의 결정이 가능하다.

이상의 연구를 종합해 볼때, 담배꽂초에서의 DNA의 추출, 성별검사, D1S80 유전자좌위의 AMP-FLPs 검색, HLA-DQA1 유전자좌위의 다형성 결정은 15일 지난 담배꽂초 시료에서도 성공적으로 수행될 수 있으므로, 담배꽂초는 법의학적인 개인식별을 위한 훌륭한 분자생물학적 시료가 될 수 있다고 사료된다.

참 고 문 헌

1. Akane, A., Matsubara, K., Shiono, H., Yuasa, I., Yokota, S., I., Yamada, M., and Nakagome, Y. : Paternity testing : Blood group system and DNA analysis by variable number of tandem repeat markers, *Journal of Forensic Science*, 230 : 1217-1225, 1990
2. Akane, A., Seki, S., Shioni, H., Nakamura, H., Haegawa, M., Kagawa, M., Matsubara, Y., Nakahori, Y., Nagafuchi, S., and Nakagome, Y. : Sex determination of forensic samples by dual PCR amplification of an X-Y homologous gene, *Forensic Science International*, 52 : 143-148, 1992.
3. Akane, A., Shiono, H., Matsubara, K., Nakahori, Y., Seki, S., Nakafucho, S., Yamada, M., and Nakagome, Y. : Sex identification of forensic specimens by polymerase chain reaction(PCR) : Two alternative methods, *Forensic Science International*, 49 : 81-88, 1991.
4. Azen, E. A. : Genetic polymorphism of basic proteins from parotid saliva, *Science*, 176 : 673-674, 1972.
5. Bailey, D. M., Affara, N. A., and Ferguson-Smith, M. A. : The X-Y homologous amelogenin maps to the short arms of both the X and Y chromosomes and its highly conserved in primates, *Genomics*, 14 : 203-205, 1992.
6. Boerwinkle, E., Xiong, W., Fourest, E., and Chain, L. : Rapid typing of tandemly repeated hypervariable DNA loci by the polymerase chain reaction : Application to the apolipoprotein B 3' hypervariable region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 : 212-216, 1989.
7. Budowle, B., Chakraborty, R., Giusti, A. M., Eisenberg, A. J., and Allen, R. C. : Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR following by high-resolution PAGE, *Am. J. Hum. Genet.* 58 : 137-144, 1991.
8. Comey, C. T., Budowle, B., Adams, D. E., Baumstark, A. L., Lindsey, J. A., and Presley, L. A. : PCR amplification and typing of the HLA DQ α gene in forensic samples, *Journal of Forensic Sciences*, 38(2) : 239-249, 1993.
9. Crouse, C. A., Feuer, W. J., Nippes, D. C., Hutto, S. C., Barnes, K. S., Coffman, D., Livingston, S. H., Binsberg, L., and Glidewell, D. E. : Analysis of HLA-DQ α allele and genotype frequencies in populations from florida, *Journal of Forensic Sciences*, 39(3) : 731-742, 1994.
10. Crouse, C. A., Vincek, V., and Caraballo, B. K. : Analysis and interpretation of the HLA DQ α '1.1 Weak-Signal' observed during the PCR-based typing method, *Journal of Forensic Sciences*, 39(1), 41-45, 1994.
11. D'Aquila, R. T., Bechtel, L. J., videler, J. A., Eron, J. J., Gorczyca, P., Kaplan, J. C. : Maximizing sensitivity and specificity of PCR by preamplification heating, *Nucleic Acids Res.*, 19 : 3749, 1991
12. Gill, P., Jeffreys, A. J., and Werrett, D. J. : Forensic application of DNA fingerprints, *Nature*, 318 : 577-579, 1985.
13. Ginther, C., Issel-Tarver, L., and King, M. C. : Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth, *Nature Genetics*, 2 : 135-138, 1992.
14. Guisti, A., Basis, M., Pasquale, S., Balazes, I., and Glossberg, J. : Application of deoxyribonucleic acid(DNA) polymorphisms to the analysis of DNA recovered from sperm, *Journal of Forensic Science*, 31(2) : 409-417 1986.
15. Helmuth, R., Fildes, N., Blake, E., Luce, M. C., Chimera, J., Madej, R., Gorodezky, C., Stoncking, M., Schmill, N., Klitz, W., Higuchi, R. and Erlich, H. A., HLA-DQ allele and genotype frequencies in variation human population, determined by using enzymatic amplification and oligonucleotide probes, *Am. J. Hum. Genet.*, 46 : 515-523, 1990.
16. Higuchi, R., von Beroldigen, C. H., Sensabaugh, G. F., and Erlich, H. A. : DNA typing from single hairs, *Nature*, 332, 543-546, 1988.
17. Hochmeister, M. N., Budowle, B., Jung, J., Borer, U. V., Comey, C. T., Dirnhofer, R. : PCR-based typing of DNA extracted from cigarette butts, *International Journal of Legal Medicine*, 104(4) : 229-233, 1991.
18. Holland, M. M., Fisher, D. L., Mitchel, L. G.,

- Rodriguez, W. C., Canik, J. J., Meril, C. R., and weedn, V. W.: Mitochondrial DNA sequence and analysis of human skeletal remains: Identification of remains from the vietna war, *Journal of Forensic Sciences*, 38(3) : 52-543, 1993.
19. Horn, G. T., Richards, B., Erlich, H. A., and Tepitz, R. L.: Analysis of a highly polymorphic VNTR segment by the polymerase chain reaction, *Nucleic Acids Res.*, 17 : 2140, 1989.
 20. Jeffreys, A. J., Brookfield, J. F. Y., and Som-eonoff, R.: Positive identification of an immi-gration test-Case using human DNA finger-prints, *Nature*, 317 : 818-819, 1985.
 21. Jeffreys, A. J., MacLeod, A., Tamaki, K., Neil, D. L., and Monckton, D. G.: Minisatellite re-peat coding as a digital approach to DNA typing, *Nature*, 354(21) : 204-209, 1991.
 22. Jeffreys, A. J., Wilson, V., and Thein, S. I., Indi-vidual-specific fingerprints of human DNA, *Nature*, 316 : 76-79, 1985.
 23. Jeffreys, A. J., Wilson, V., and Thein, S. L.: Hypervariable 'Minsatellite' regions in human DNA, 314(7) : 67-73, 1985.
 24. Jeffreys, A. J., Wilson, V., Neuman, R., and Keyte, J.: Amplification of human minisate-llites by the polymerase chain reaction: To-wards DNA fingerprinting of single cell, *Nucleic acids Res.*, 16 : 10953-10871, 1988.
 25. Kasai, K., Nakamura, Y., and White, R.: Ampli-fication of variabel number of tandem repeats (VNTR) locus (pMCT118) by the polymerase chanin reaction (PCR) and its application to forensic science, *Journal of Forrensic Science*, 35 : 1196-1200, 1990.
 26. Kasai, K., Yoshida, K., Sakai, I., and Muko-yama, H.: Polymorphysm of VNTR locus(D1S8 0) detected by the PCR amplification in Japa-nese population, *Am. J. Hum. Genet*, 49 : 409, 1991.
 27. Kloosterman, A. D., Budowle, B., Daselaar, P.: PCR-amplification and detection of the human D1S80 locus: Amplification conditions, popu-lation genetics and application in forensic analy-sis, *International Journal of Legal Medicine*, 105(5) : 257-264, 1993.
 28. Kobayashi, R., Nakauchi, H., Nakahori, Y., Nakagome, Y. and Matusuzawa: Sex identifi-cation in fresh blood and dried bloodstains by a nonisotopic deoxyribonucleic acid(DNA) ana-lysing technique, *Journal of Forensic Science*, 33 : 613-620, 1988.
 29. Mannucci, A., Sullivan, K. M., Ivanov, P. L., Gill, P.: Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplication of X-Y homologous gene amelogenin, *Inter-national Journal of Legal Medicine*, 196(4) : 190-3, 1984.
 30. Nakahori, Y., Hamano, K., Awaya, M., and Nakagome, Y.: Sex identification by polymerase chain reaction using X-Y homologous primers, *Am. J. Med Genet*, 39 : 472-473.
 31. Nakahori, Y., Mitani, K., Yamada, M., and Na-kagome, Y.: A human Y-chromosome specific repeated DNA family(DYZ1) consists of a tan-dem array of pentanucleotides, *Nucleic Acids Res.*, 14 : 7469-7580, 1986.
 32. Nakahori, Y., Takenaka, O., and Nakagome, Y.: A human X-Y homologuus region encodes 'amelogenin', *Genomics*, 9 : 264-269, 1991.
 33. Nakamura, Y., Leppert, M., O'Connell, P., Wolff, R., Holm, R., Culver, M., Martin, C., Fujimoto., Hoff, M., Kumlin, E., and White R.: Variable number of tandem repeat(VNTR) markers for human gene mapping, *Science*, 237 : 1616-1622, 1987.
 34. Neil, D. L., and Jeffreys, A. J.: Digital DNA typing at a second hypervariable locus by minisatellite variant repeat mapping, *Human Molecular Genetics*, 2(8) : 1129-1135, 1993.
 35. Odelberg, S. J., Demers, D. B., Westin, E. H., and Hossaini, A. A.: Establishing paternity using minisatellite DNA probes when the puta-tive farther is unavialaable for testing, *Journal of Forensic Science*, 33 : 921-929, 1988.
 36. Ohhashi, A., Aoki, R., Matsugo, S., Simasaki, C.: PCR-based typing of human buccal cell's DNA extracted from whole and saliva stains, *Japanese Journal Legal Medicine*, 47(2) : 108-118, 1993.
 37. Pflug, W., Mai, G., Wahl, G., Aab, S., Eber-spacher, B., Keller, U.: A simple method to pre-vent inhibition of Taq polymerase and Hinf I restriction enzyme in DNA analysis of stain material, *Advances in Forensic Haemogenetics*, Vol. 4, Springer, Berlin, 163-165, 1992.
 38. Presley, L. A., Baumstark, A. L., and Dixon, A.: The effect specific latent fingerprint and questioned document examinations on the amplification and typing of the HLA DQ alpha gene region in forensic casework, 35(5) : 1028-1036, 1993.
 39. Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, H., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N.: Enzymatic amplification of β -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diag-nosis of sickle cell anemia, *Science*, 230 : 1350-1354, 1985.
 40. Sajantila, A., Budowle, B., Strom, M., Johnsson,

- V., Lukka, M., Peltonen, L., and Ehnholm, C. : PCR amplification of allele at the D1S80 locus : Comparison of a Finnish and a North american caucasian population sample, and forensic casework evaluation, *Am. J. Hum. Genet.*, 50 : 816-825, 1992.
41. Schneider, P. M., Rittner, Co., : Experience with the PCR-based HLA-DQ alpha DNA typing system in routine forensic casework, *International Journal of Legal Medicine*, 105(5) : 295-299, 1993.
42. Smith, H. O., and Wilcox, K. W. : A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*, I. Purification and general properties, *J. Mol. Biol.*, 51 : 379-, 1970.
43. Southern, E. M. : Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J. Mol. Biol.*, 98 : 503-507, 1975.
44. Stoker, N. G., Cheah, K. S. E., Griffin, J. R., Pope, F. M., and Solomon, E. : A highly polymorphic region 3' to the human type II collagen gene, *Nucleic Acids Res.*, 13 : 4613-4622, 1985.
45. Sullivan, K. M., Mannucci, A., Kimpton C. P., and Gill, P. : A Rapid and Quantitative DNA Sex Test : Fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene Amelogenin, *BioTechniques*, 15 : 6360-641, 1993.
46. Tamaki, K., Yamamoto, T., Uchili, R., Katsumata, Y., Kondo, K., Mizuno, S., Kimura, A. : Frequency of HLA-DQA1 alleles in the Japanese population, *Human Heredity*, 41 : 209-214, 1991.
47. Thymann M., Nellemann, L. J., Masaba, G., Irgens-Moller, L., and Morling, N., : Analysis of the locus D1S80 by amplified fragment length polymorphism technique (AMP-FLP). Frequency distribution in Danes. Intra and Inter laboratory reproducibility of the technique, *Forensic Science International*, 60 : 47-56, 1993.
48. Walsh, D. J., Corey, A. C., Cotton, R. W., Forman, L., Herrin, G. L., Jr., Word, C., J., and Garner, D. D., : Isolation of Deoxyribonucleic acid (DNA) from saliva and forensic science samples containing saliva, *Journal of Forensic Sciences*, 37(2) : 387-395, 1992.
49. Walsh, P. S., Metzger, D. A., Higuchi, R. : Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material, *BioTechniques*, 10(4) : 506-513, 1989.
50. Watson, J. D., and Crick, F. H. C. : Molecular structure of nucleic acids : A structure for deoxyribonucleic acid, *Nature*, 171 : 737-738, 1953.
51. Westwood, S. A., and Werrett, D. J. : An evaluation of the polymerase chain reaction method for forensic applications, *Forensic Science International*, 45 : 201-215, 1990.
52. Wu, S., Seino, S., and Bell, G. I. : Human collagen, type II, alpha 1(COL2A1) gene VNTR polymorphism detected by gene amplification, *Nucleic Acids Res.*, 18 : 3102, 1990.
53. Wylman, A. R., and White, R. : A highly polymorphic locus in human DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 : 6754-6758, 1980.
54. 강순자, 최상규, 한면수, 신분숙 : 개인식별을 위한 한국인의 HLA-DQ α 유전자형 빈도 분포에 관한 연구, 국립과학수사연구소 용역보고서, 1992.
55. 김치홍, 명현균, 홍용균, 황적준 : 한국인에서 VNTR D1S80 유전자위의 유전적 다형성 및 집단내 유전적 구조, *대한법의학회지*, 18(1) : 60-70, 1994.
56. 명현균, 김경훈, 황적준 : 단일모발로부터 DNA의 유전자형 검사, *대한법의학회지*, 17(2) : 1-7, 1993.
57. 山本勝一 : 唾液中の 血液型物質分泌形, 非分泌形, *法醫學*, 東京, 醫齒 牙藥出版, 40-41, 1965.
58. 송근섭, 정재안, 이희석, 황적준 : D1S80의 유전자형 결정을 위한 PCR법의 조건에 관한 연구, *대한법의학회지*, 18(1) : 45-59, 1994.
59. 이 경, 정재안, 명현균, 황적준 : pV47-2 다좌위 탐침을 이용한 친생자감정, *대한법의학회지*, 17(1) : 24-34, 1993.
60. 이승덕 : 한국인에서 VNTR D1S80 유전자위의 대립유전자 탐색과 돌연변이의 측정, 서울대학교 대학원, 박사학위 논문.
61. 이승섭, 정재안, 황적준 : 한국인에서 pV47-2 다좌위탐침으로 검색되는 VNTR 유전자위의 대립유전자 빈도, *대한법의학회지*, 18(1) : 21-32, 1994.
62. 이하규 : 한국인 집단에서의 타액내백질 다형과 유전적 변이에 대한 연구, 서울, 서울대학교, 1989.
63. 임양희, 정재안, 황적준 : 한국인에서 pV47-2 다좌위탐침으로 검색되는 유전자지문의 유전적 특성, *대한법의학회지*, 18(2) : 1-8 : 1994.
64. 정재안, 명현균, 이희석, 황적준 : 한국인에서 중합효소반응으로 검색되는 COL2A1 유전자위의 대립유전자 빈도, *대한법의학회지*, 18(2) : 1-8 : 1994.
65. 한동호, 김종열 : 한국인에서 타액내 혈형물질 분포에 관한 연구, 연세대학교 대학원, 서울, 1989.