

복구효소를 이용한 손상된 DNA의 STR 유전자형 분석

심정은^{1,2} · 이환영¹ · 양우익¹
이승환² · 신경진¹

¹연세대학교 의과대학 법의학과 및
BK21 연세의과학사업단
²대검찰청 DNA수사담당관실
DNA감식실

접 수 : 2011년 10월 25일
게재승인 : 2011년 11월 8일

본 연구는 BK21 연세의과학사업단과 대
검찰청 (2009) 연구비의 지원을 받아 수행
되었음.

책임저자 : 신경진
(120-752) 서울시 서대문구 연세로 50
연세대학교 의과대학 법의학과
전화 : (02) 2228-2481
FAX : (02) 362-0860
E-mail: kjshin@yuhs.ac

Application of a Repair Enzyme to STR Analysis of Damaged DNA

Jeong Eun Sim^{1,2}, Hwan Young Lee¹, Woo Ick Yang¹, Seung Hwan Lee²,
Kyoung-Jin Shin¹

¹Department of Forensic Medicine and Brain Korea 21 Project for Medical Science, Yonsei
University College of Medicine, Seoul, Korea

²DNA Analysis Laboratory, Division of Forensic DNA, Supreme Prosecutors' Office, Seoul,
Korea

DNA found at the scene of a crime is often damaged and degraded to small fragments and remained in low quantity. Therefore, there are some difficulties in forensic STR typing of these DNA samples. In this study, to overcome these limitations as different approach, we applied repairing enzyme to damaged DNA. The efficacy of a repair enzyme system (PreCR Repair Mix) was evaluated by using several types of artificially damaged and naturally damaged DNA. The results showed that autosomal STR amplification produced increased yield in the DNA damaged by UV irradiation, oxidation, or acid/heat, and DNA from dried blood spot and dried saliva spot by treatment of a repair enzyme, but not in DNA extracted from old skeletal remains. In conclusion, a repair enzyme will be efficiently applied to forensic samples which were damaged by UV irradiation, oxidation, and acid/heat.

Key words : repair enzyme, STR, damaged DNA

서 론

범죄현장에서 발견되는 시료는 불안정한 환경에 노출된 후에 발견되는 경우가 많다. 이 때문에 이들 시료에서 추출한 DNA는 여러 손상원에 의해 분해되었을 가능성이 크며,¹⁾ DNA 가닥의 길이는 짧고 증폭에 이용할 수 있는 DNA 총량은 매우 적다. 그러므로 증합효소 연쇄 반응 (polymerase chain reaction; PCR)을 통한 STR 유전자 검사를 실시하고자 할 경우, 성공률이 낮으며 유전자 분석이 어렵게 된다.²⁾ 현재까지 이러한 문제점을 극복하기 위하여 miniSTRs에 대한 연구가 활발하게 진행되어 왔으나,³⁻⁵⁾ PCR 증폭산물의 크기를 작게 구축하는 것은 한계가 있어 동시에 많은 STR을 증폭할 수 없다는 단점이 있다.¹⁾ 또한 miniSTR 전략으로는 DNA의 손상된 부

분을 개선하지 못하며, DNA의 손상된 부분이 PCR 증폭을 방해하는 요인이 되므로 이를 보완하고자 하는 노력이 필요하다.

DNA는 여러 가지 내적·외적 요인들에 의해 다음과 같은 DNA 손상 과정이 진행된다.^{6,7)} 생리적 조건에서 DNA는 H₂O에 의해 탈퓨린/탈피리미딘 부위 (apurine/apyrimidine, AP site)가 형성되고, 하이드록시 라디칼(hydroxyl radical)과 같은 활성 산소종(reactive oxygen species; ROS)과 가수분해 반응에 의해 구아닌, 시토신과 같은 염기는 변형이 된다.^{8,9)} 건조한 환경에 노출된 DNA는 틱새(nick)가 형성되고 분절화가 진행된다. 또한 산과 열은 DNA에 AP site를 형성하며, 포르말린(formalin) 노출에 의해 DNA는 교차연결(cross-link)된다. 자외선(ultraviolet)에 노출된 티민 염기는 인접한 티민 염기와 이량체를 형성한다.¹⁰⁾ 여기서는 각 손상원에 의한 대표적인 손상만을 나열한 것이나 실제 DNA 손상은 복합적으로 진행된

다. 살아있는 세포 내에서 이러한 손상은 DNA 복구 과정을 통하여 복구가 가능하지만, 죽은 세포에서는 복구 과정이 일어날 수 없으므로 외부에 노출된 시료의 DNA는 시간이 지남에 따라 지속적인 분해가 진행되게 된다.

근래에 시험관내에서 DNA 손상을 회복시키는 PreCR Repair Mix (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) 라는 복구효소(repair enzyme)가 개발되었다. 이에 따라 손상된 시료에서 복구효소의 복구 효과를 검증하기 위한 이전의 연구들이 있었으나,^{11, 12)} 대상 시료의 손상 종류가 제한적이었으므로 복구효소의 실제 사용을 위하여 더 다양한 손상 시료에서 추가적인 검증이 필요할 것이다.

따라서 본 연구에서는 다양한 방법으로 손상된 시료를 대상으로 복구효소를 이용한 복구 반응을 수행하고, 15개 상염색체 STR 유전자의 증폭률을 비교함으로써 복구효소의 복구 효율을 정량화하였다. 또한 자연적으로 분해된 시료에서 복구효소를 적용시켜 복구효소가 실제로 얼마나 유용성이 있는지에 대해서 평가하였다.

재료 및 방법

1. 인위적으로 손상된 DNA 준비

인위적으로 손상된 DNA는 다음과 같은 방법으로 준비되었으며, 시료의 개수는 각 손상 종류에 따라 5개씩 준비하였다.

자외선에 의해 손상된 DNA 시료를 만들기 위하여 1 ng/ μ l 농도의 9948 표준 DNA (Promega, Madison, WI, USA)를 CL-1000 Ultraviolet Crosslinker (UVP, Upland, CA, USA)를 이용하여 2분간 자외선을 조사하였다. 분절된 DNA 시료를 만들기 위하여 1.7 μ g의 K562 high molecular DNA (K562 DNA; Promega)에 0.006 unit의 DNase I (New England Biolabs)을 37°C에서 10 ~ 15분간 처리함으로써 DNA를 절단하였고, 이어 75°C에서 10분간 처리하여 효소의 절단 작용을 중지시켰다. 산화에 의해 손상된 DNA는 펜톤 반응(Fenton reaction)에 의해 생성되었다.^{13, 14)} 1.0 mM의 ferric chloride (FeCl₂; Sigma-Aldrich, Strinheim, Germany) 와 2.0 mM의 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; USB corporation, Cleveland, OH, USA)의 혼합물에 3.0 mM의 hydrogen peroxide (H₂O₂; Sigma-Aldrich)와 1.7 μ g의 K562 DNA를 넣고 37°C에서 15분간 처리하여 DNA를 산화 시켰다.^{15, 16)} 산과 열에 의한 손상 시료를 만들기 위하여 최종 농도 0.1 M, 0.01 M 이 되도록 sodium chloride (NaCl; Sigma-Aldrich)와 sodium-citrate (Na citrate; Sigma-Aldrich)를 넣고 탈퓨린화 완충액(pH 5.0)을 만들었다. 여기에 1.7 μ g의 K562 DNA를 넣어 70°C에서 10시간 동안 처리하여 DNA가 산과 열에 의해 손상을 받도록 하였다.^{15, 17)} 산화 시료와 산/열 손상시료는 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden,

Germany)를 이용하여 정제함으로써 손상 반응을 정지시키고 염 이온을 제거하였다. 각각의 반응에서 얻어진 DNA는 1.5% 아가로즈 젤에서 전기영동 하여 DNA의 손상정도를 확인하였다.

2. 자연적으로 손상된 DNA 준비

피험자 모집 공고를 통하여 건강한 한국인 5명의 자원자부터 각 100 μ l의 혈액과 타액을 기증 받았다. 본 과정은 연세대학교 의과대학 연구심의위원회와 유전자연구 생명윤리심의위원회의 승인을 받아 수행되었다(승인번호 4-2009-0671). 수집된 혈액과 타액 시료는 세포 배양 시 주로 사용되는 6 well Nunc Multidish (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)에 각각 10 μ l 씩 분주하여 자연광 및 대기 중에 2주간 노출시켰으며, 비 또는 눈이 내리는 날은 25°C의 실내에 두어 자연 건조되도록 하였다. 시료의 노출 기간 동안 외부 온도는 영하 2.9 ~ 영상 13.8°C의 범위였으며, 비 또는 눈이 내린 날은 총 8일이었다. QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen)를 이용하여 건조된 혈액과 타액 시료로부터 DNA를 추출하였으며, 추출된 시료는 NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo. Fisher scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 정량 한 후, -20°C에서 보관하였다.

매우 오랜 시간에 걸쳐 자연적으로 분해된 시료에서도 복구효소의 효율을 평가하기 위하여 50년 이상 된 유해로부터 Lee 등¹⁸⁾의 방법에 따라 추출된 DNA도 실험대상에 포함되었다.

3. 손상된 시료의 복구 반응 및 PCR 증폭

앞서 준비한 손상시료는 다음과 같은 방법을 통해 복구 및 PCR 증폭되었다. AmpF l STR® Identifiler® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)에 포함된 Identifiler Reaction Mix 9.5 μ l와 10× NAD+ 2.5 μ l, 2.5 unit의 AmpliTaq Gold® DNA polymerase (Applied Biosystems), 0.5 μ l의 PreCR Repair Mix를 넣고 손상된 DNA 1.0 ~ 5.0 ng을 넣어 37°C, 20분간 복구 반응을 수행하였다. 복구 반응 후 5.0 μ l의 Identifiler Primer Set 첨가하여, 총량을 25.0 μ l로 하여 PCR 증폭을 시작하였다. PCR 증폭은 95°C에서 11분간 변성시킨 뒤, 94°C에서 1분, 59°C에서 1분, 72°C에서 1분의 조건으로 총 28회 중합하였으며, 최종적으로 60°C에서 60분간 유지한 후 반응을 종결시켰다.

오래된 유해에서 추출된 DNA는 그 양이 매우 적어 총 33 cycle로 PCR 증폭하였고, PCR 증폭 저해제가 포함되어 있을 가능성을 고려하여 AmpliTaq Gold® DNA polymerase의 양을 늘려 3.5 unit을 사용하였다.

복구 및 PCR 증폭을 위한 반응 총량은 25.0 μ l 또는 10.0 μ l로 수행되었으며(Table 1), 복구 반응을 수행하지 않고 PCR

증폭만 수행한 대조군 역시 같은 반응 총량으로 수행하여 복구 전과 후의 증폭량을 비교하는데 반응 총량의 변화에 영향을 받지 않도록 하였다.

각 시료에 대한 복구 및 PCR 증폭은 한번 수행되었으나, 복구 효과가 없는 것으로 확인될 경우 두 번의 반복시험을 통해 같은 결과를 나타내는지 확인하였다.

4. PCR 증폭산물의 유전자형 결정 및 증폭 효율 비교

PCR 증폭산물은 ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)에서 형광 측정법으로 그 크기를 측정하였고, ABI Genotyper[®] software version 3.7 (Applied Biosystems)을 사용하여 AmpF l STR[®] Identifiler[®] PCR Amplification Kit에 포함된 대립유전자 사다리와 비교하여 유전자형을 결정하였다.

복구 및 PCR 증폭 반응을 수행한 증폭물과 PCR 증폭만을 수행한 대조군에서 각 STR 유전자에서 측정된 대립유전자형의 피크 높이를 비교함으로써 손상에 따른 복구효소의 복구 효율을 비교하였다. 이때 각 결과에서 GeneScan[™] 500 LIZ[®] Internal Size Standard (Applied Biosystems)의 높이를 비교하여 전기영동 기기의 해상도에 차이가 없음을 확인하였다.

결 과

1. 인위적으로 손상된 시료의 복구 효율 평가

자외선 조사 시료와 DNase I 처리된 시료, 산화된 시료, 그리고 산/열 손상된 시료를 대상으로 복구 반응 및 상염색체 STR

증폭 반응을 수행한 후 형광 측정법으로 측정된 손상 시료의 복구 전과 후의 대립유전자 피크 높이를 각 STR 유전자별로 비교하였다(Fig. 1). DNase I 처리된 시료의 경우는 복구 반응 후에 오히려 다소 낮은 증폭률을 보였으나, 자외선이 조사된 시료와 산화된 시료, 산/열 손상된 시료에서는 복구 과정 후에 대립유전자 피크 높이가 증가된 것을 관찰할 수 있었다.

복구 효과를 나타낸 시료에서 대립유전자 피크 높이 증가율을 비교하였을 때, 자외선이 조사된 시료에서는 최소 1.4배 ~ 최대 7.6배의 증가율을 보였으며, 평균 4.0배의 증가율을 나타내었다. 산화된 시료의 경우는 최소 1.1 ~ 최대 2.7배의 증가율을 보이며, 평균 1.8배의 증가율을 나타내었다. 또한 산/열 손상된 시료에서는 최소 1.3배 ~ 최대 4.7배의 증가율을 보였으며, 평균 2.2배의 증가율을 가졌다. 종합해보면, 자외선이 조사된 시료에서 복구효소의 복구율이 가장 크게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

2. 자연적으로 손상된 시료의 복구 효율 평가

건조된 혈액 및 타액시료의 복구 전과 후의 증폭물의 양을 비교하였을 때, 건조된 혈액 및 타액 시료는 복구 반응 후 STR 증폭된 반응물의 대립유전자 피크 높이가 다소 증가한 것을 볼 수 있었으며, 증가율을 비교하였을 때에는 건조된 혈액 DNA에서 최소 1.1배 ~ 최대 1.6배의 증가율을 보였고, 평균 1.3배의 증가율을 가졌다. 건조된 타액 시료의 경우는 최소 1.6배 ~ 최대 5.6배의 증가율을 보이며, 평균 2.3배의 증가율을 나타내어 혈액 시료보다 건조된 타액 시료에서 조금 더 높은 증가율을 보이는 것을 확인하였다(Fig. 2a, b).

또한 오래된 유해에서 추출한 DNA 시료를 사용하여 같은

Table 1. Compositions of Reaction Mixture and Steps for Autosomal STR Amplification after Application of a Repair Enzyme

Reagents	Repair ($\mu\ell$)		Control ($\mu\ell$)	
dH ₂ O	6.0	1.5	9.0	2.8
Identifiler Reaction Mix	9.5	3.8	9.5	3.8
10 × NAD ⁺	2.5	1.0	-	-
AmpliAq Gold [®] DNA polymerase (5 unit/ $\mu\ell$)	0.5	0.4	0.5	0.4
PreCR Repair Mix	0.5	0.3	-	-
Damaged DNA ¹	1.0	1.0	1.0	1.0
Place in ice after incubation at 37° C, 20 min for repairing			-	-
Identifiler Primer Set	5.0	2.0	5.0	2.0
Total reaction volume	25.0	10.0	25.0	10.0

Thermal cycling for PCR amplification²
 95° C for 11 min;
 94° C for 1 min: 59° C for 1 min: and 72° C for 1 min × 28 cycles;
 a final extension at 60° C for 60 min.

¹Concentration of damaged DNA was 1 ng/ $\mu\ell$. UV damaged DNA, DNase I treated DNA, oxidized DNA, and acid/heat damaged DNA were tested in this study.

²In case of DNA obtained from skeletal remains, 3.5 unit of AmpliAq Gold[®] DNA polymerase and 2.0 $\mu\ell$ of template DNA was used with 5 more amplification cycle.

방법으로 증폭률을 비교하였을 때, 복구 후에 오히려 낮은 대립유전자 피크 높이를 나타내었으며 PCR 증폭물 말단에 아데닌 염기가 붙지 않아 생기는 갈라진 대립유전자 피크와 시료와는 관계없는 비 특이적인 피크들이 관찰되었다. 그러나 5개의

시료 중, 분해의 정도가 덜 하다고 생각되었던 3개의 시료에서는 10개의 유전자 좌에서 관찰되던 대립유전자 불균형 현상이 복구 반응 후에 5개로 감소된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2c).

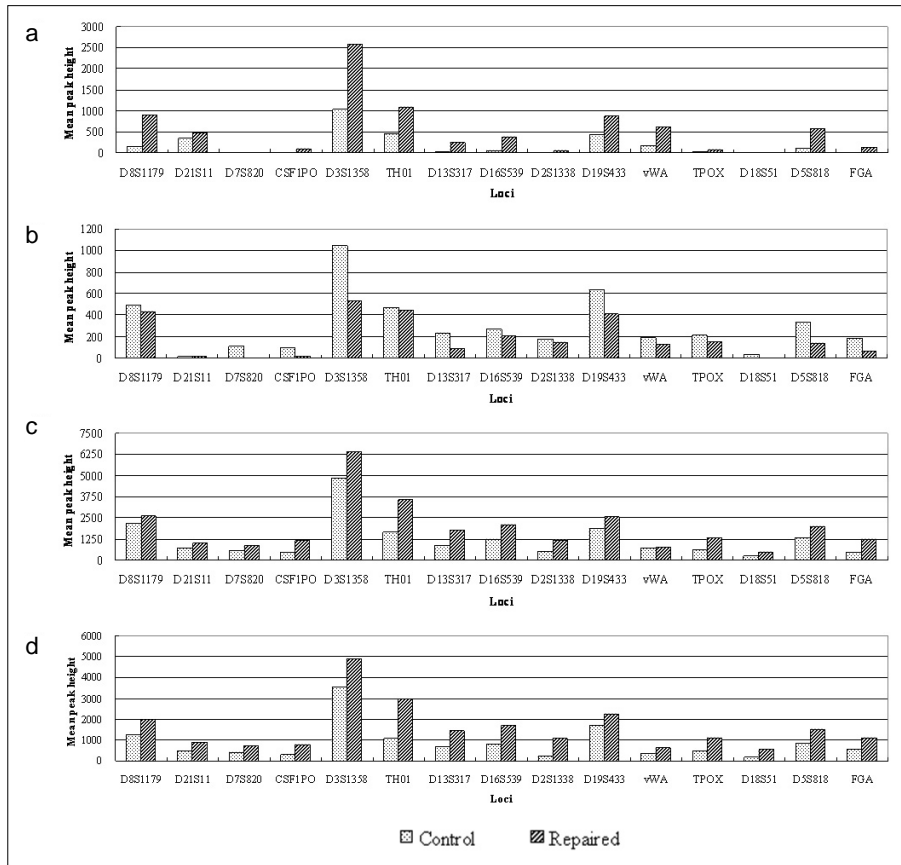


Fig. 1. Comparison of peak heights after DNA amplification of artificially damaged DNA between those with and without a repair enzyme in autosomal STR analysis; a: UV damaged DNA; b: DNase I treated DNA; c: oxidized DNA; d: acid/heat damaged DNA.

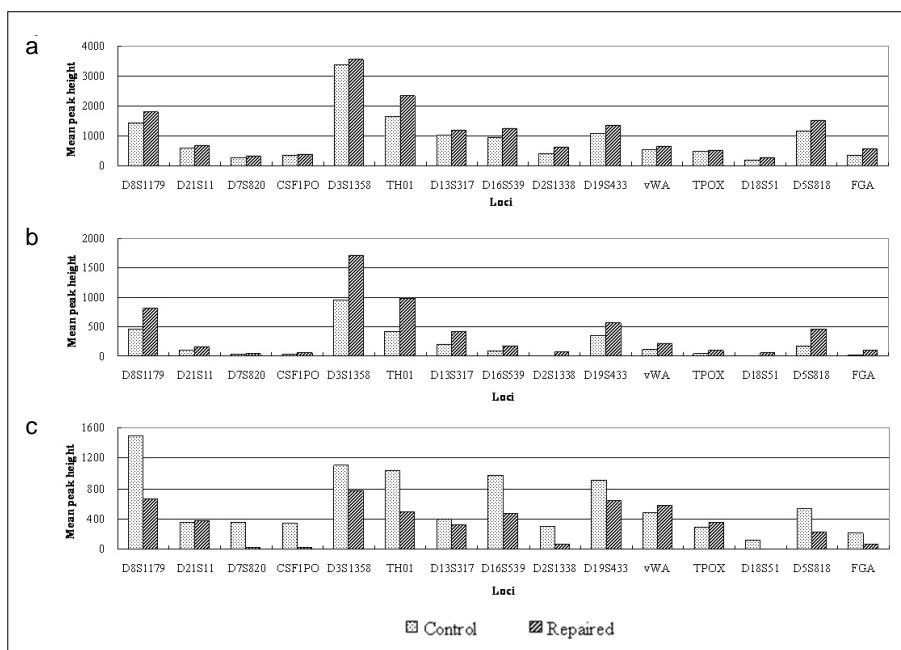


Fig. 2. Peak height comparison of naturally damaged DNA amplification with or without application of a repair enzyme in autosomal STR analysis; a: DNA from dried blood spots; b: DNA from dried saliva spots; c: DNA from skeletal remains.

고 찰

현재 법의학 분야에서 STR의 유전자형 분석을 위한 PCR은 고온 개시(hot start)법에 기반하여 수행되는 경우가 대부분이다. 특히 DNA가 매우 양이 적거나 분해되었을 경우에는 비특이적인 반응을 막기 위하여 PCR 수행 시 고온 개시법을 사용하는 것이 필수적이며, 이러한 용도로 사용되는 가장 대표적인 중합효소로 AmpliTaq Gold[®] DNA polymerase가 있다. AmpliTaq Gold[®] DNA polymerase는 pH 7.0 이하에서 활성화되는 효소로,¹⁾ 중합효소가 활성화되기 위해서는 함께 사용되는 반응 완충액의 역할이 중요하다. 그러나 손상된 DNA의 복구와 PCR 증폭을 연계하기 위하여 복구효소 키트에 포함된 ThermoPol Reaction Buffer와 AmpliTaq Gold[®] DNA polymerase를 함께 사용하여 PCR을 수행하는 경우에 반응물의 pH가 7.0 이하로 되지 않아 AmpliTaq Gold[®] DNA polymerase가 활성화되지 못하여 복구 반응이 일어나더라도 PCR에 의한 주형 DNA를 증폭할 수 없는 제한점이 있었다. 그러므로 본 연구에서는 STR 증폭에 이용되는 PCR 완충액(i.e., Identifiler Reaction Mix)을 복구 과정에 사용하여 복구 후 바로 PCR 증폭을 수행하도록 실험과정을 설계하여 진행하였다(Table 1). 그 결과 복구 반응의 완충액을 PCR 완충액으로 교체하여도 복구 효과가 나타남을 확인하였으며, PreCR Repair Mix를 구성하는 효소들은 복구 반응을 수행하는데 있어 완충액의 조성과 같은 환경에 영향을 크게 받지 않는 것으로 생각할 수 있었다.

복구효소인 PreCR Repair Mix는 효소 혼합물이며, 이를 구성하는 효소들은 우라실-DNA 글리코실화효소(uracil DNA glycosylase, UDG), formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg), 핵산내부가수분해효소 IV, VIII, T4 핵산내부가수분해효소 V(T4 PDG), Bst DNA 중합효소, 그리고 Taq DNA 연결효소(ligase)이다. 각 효소들이 가지는 효소활성을 근거로 본 연구에서 대상이 된 손상시료들 중 복구 효과를 보였던 시료들(i.e., 자외선에 의해 손상된 시료, 산화된 시료, 산/열 손상시료)은 다음과 같은 복구 반응이 수행되었을 것으로 생각해볼 수 있다. 자외선이 조사된 DNA에 생성된 비정상적인 티민 이량체는 T4 PDG에 의해 절단되고, 인산이에스테르 결합을 잘라 틱새를 형성한다. 산화에 의해 생성된 8-옥소-구아닌 및 변형된 염기는 Fpg, UDG, 핵산내부가수분해효소 VIII 등에 의해 제거되고, AP site가 형성된다. 이렇게 형성된 AP site 및 산/열 손상에 의해 형성된 AP site는 핵산내부가수분해효소 IV에 의해 인식되고 3'과 5'의 인산이에스테르 결합을 잘라 DNA 단일가닥에 틱새를 형성한다. 이러한 과정을 통해 형성된 틱새는 최종적으로 Bst DNA 중합효소에 의해 틱새번역(nick translation)을 통해 제거되고 신생 가닥과 본래 가닥 사이에 생성된 간격은 Taq DNA 연결효소에 의해 연결

되어 복구 반응이 마무리 된다. 그러므로 손상된 DNA를 복구하고 STR 분석을 수행한 경우 PCR 증폭량이 증가되고 소실되었던 대립유전자가 일부 회복되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 1). 그러나 아예 분절된 시료는 앞서 본 반응에 의해서 회복될 수 없는 손상이므로 핵산분해효소를 처리하여 분절된 DNA 시료에서는 복구효소를 이용한 복구 반응에 효과가 없었던 것으로 짐작해 볼 수 있다.

직사광선 및 대기 중에 건조된 혈액 및 타액에서 추출된 DNA의 복구 전 후 증폭 결과를 비교해 보았을 때, 복구 후에 증폭률이 다소 증가한 것을 알 수 있었다(Fig. 2a, b). 복구된 과정을 짐작해보면, 혈액 및 타액은 직사광선에 노출되었으므로 자외선에 영향을 받았을 것이며, 대기 중에 노출되어 수분이 증발하고, 영상과 영하의 기온을 반복하면서 물리적인 스트레스를 받았을 것으로 예상할 수 있다. 이로써 자외선에 의해 티민 이량체가 형성되었으며, 건조와 물리적인 스트레스에 의해 DNA 산화, AP site 형성, 그리고 틱새 및 DNA 절단과 같은 손상이 발생되었을 것으로 생각된다. 여기서 DNA 절단을 제외한 나머지 손상들은 복구효소로 복구가 가능한 손상이므로 복구효소를 이용하여 복구 반응을 수행한 후, PCR 증폭하였을 때 증폭률이 상승하는 효과를 보였던 것으로 생각할 수 있다.

그러나 오래된 유해에서 추출한 DNA를 대상으로 복구 및 PCR 증폭하였을 때, 복구 효과는 미미하게 나타났다(Fig. 2c). 유해에서 추출된 DNA는 대체로 짧게 분절되어 있고 DNA 총량이 적어 복구효소가 복구 반응을 수행하는데 한계가 있어 부분적인 복구 효과만을 나타냈을 것으로 생각된다.

본 연구에서는 복구효소의 효과를 확인하고자, 전기영동 상에서 나타난 STR 대립유전자의 대립유전자 피크 높이를 비교하는 방법을 사용하였다. 시료의 상태가 좋은 경우 관찰된 피크 높이가 일부 증가하는 것은 큰 의미를 가지지 않는다. 그러나 DNA가 분해되어 유전자 분석이 어려운 상황에서 STR 대립유전자의 피크 높이 증가는 검출한계선(analytic threshold) 이상으로 나타날 수 있는 대립유전자 수를 증가시켜 대립유전자 소실을 감소시켜 줄 수 있다. 그러므로 피크 높이 증가는 결과적으로 식별력 증가라는 큰 의미를 가져올 수 있어, 본 연구에서 검증된 복구효소의 작용이 극적인 증폭 향상 결과를 가져오지 않더라도 이를 법의학 분야 시료에 이용할 만한 이유는 충분하다고 생각한다.

정리하면, 분해의 정도가 심해 이미 분절된 시료나 농도가 매우 낮은 시료에서는 복구효소의 복구 효과가 낮게 나타났으며, 그 외에 자외선이 조사된 시료, 산화된 시료, 산과 열에 손상을 받은 시료에서는 복구효소의 복구 효과가 있는 것으로 나타났다. 그러므로 복구효소는 이러한 손상들에 노출된 실제 법의학 분야 시료의 분석에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다. 한편, 현장 증거물은 습도와 온도에도 많은 영향을 받으므로 본 연구 결과를 바탕으로 습도 및 온도의 변화와 시간 경과에 따른 복구효소의 복구 효과에 대한 평가가 필요할 것

로 판단된다.

참 고 문 헌

1. Butler JM. Forensic DNA typing. Biology, technology and genetics of STR markers. 2nd ed. Burlington: Elsevier Academic Press; 2005.
2. Gill P, Whitaker J, Flaxman C, Brown N, Buckleton J. An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. *Forensic Sci Int* 2000;112:17-40.
3. Butler JM, Shen Y, McCord BR. The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *J Forensic Sci* 2003;48:1054-64.
4. Lee HY, Kim NY, Park MJ, Yang WI, Shin KJ. A modified mini-primer set for analyzing mitochondrial DNA control region sequences from highly degraded forensic samples. *Biotechniques* 2008;44:555-6,8.
5. Park MJ, Lee HY, Chung U, Kang SC, Shin KJ. Y-STR analysis of degraded DNA using reduced-size amplicons. *Int J Legal Med* 2007;121:152-7.
6. Thomas C. Evans, Jr. NEB Expressions-DNA damage. Ipswich: New England Biolabs 2007;2:1-3.
7. Pääbo S, Poinar H, Serre D, et al. Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet* 2004;38:645-79.
8. Tsurudome Y, Hirano T, Yamato H, et al. Changes in levels of 8-hydroxyguanine in DNA, its repair and OGG1 mRNA in rat lungs after intratracheal administration of diesel exhaust particles. *Carcinogenesis* 1999;20:1573-6.
9. Suzuki J, Inoue Y, Suzuki S. Changes in the urinary excretion level of 8-hydroxyguanine by exposure to reactive oxygen-generating substances. *Free Rad Biol Med* 1995;18:431-6.
10. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 2004;73:39-85.
11. Westen AA, Sijen T. Degraded DNA sample analysis using DNA repair enzymes, mini-STRs and (tri-allelic) SNPs. *Forensic Sci Int Genet Supplement* 2009;2:505-7.
12. Diegoli TM, Farr M, Cromartie C, Coble MD, Bille TW. An optimized protocol for forensic application of the PreCRTM Repair Mix to multiplex STR amplification of UV-damaged DNA. *Forensic Sci Int Genet* In press.
13. Matsufuji H, Shibamoto T. The role of EDTA in malonaldehyde formation from DNA oxidized by Fenton reagent systems. *J Agric Food Chem* 2004;52:3136-40.
14. Wang W, Lee GJ, Jang KJ, Cho TS, Kim SK. Real-time detection of Fe · EDTA/H₂O₂-induced DNA cleavage by linear dichroism. *Nucleic Acids Res* 2008;36:e85.
15. Nelson J. Repair of damaged DNA for forensic analysis. 2009; Available from <http://www.ncjrs.gov/pdffiles1/nij/grants/227498.pdf>
16. Baron CP, Refsgaard HH, Skibsted LH, Andersen ML. Oxidation of bovine serum albumin initiated by the Fenton reaction-effect of EDTA, tert-butylhydroperoxide and tetrahydrofuran. *Free Radic Res* 2006;40:409-17.
17. Murphy TM, George A. A comparison of two DNA base excision repair glycosylases from *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;329:869-72.
18. Lee HY, Park MJ, Kim NY, Sim JE, Yang WI, Shin KJ. Simple and highly effective DNA extraction methods from old skeletal remains using silica columns. *Forensic Sci Int Genet* 2010;4:275-80.