

# 소사체 치아에서의 유전자지문 분석을 위한 실험적 연구

\* 연세대학교 치과대학 구강내과학교실

\*\* 국립과학수사연구소 생물학과

최 중 훈\* · 한 면 수\*\* · 선 문 숙\*\* · 김 중 열\*

## 목 차

- I. 서 론
- II. 연구대상 및 방법
- III. 결 과
- IV. 총괄 및 고찰
- V. 결 론
- 참고문헌
- 영문초록

## I. 서 론

화염, 고온고체 및 복사열에 의한 장애를 화상이라 하며, 고온의 증기 또는 액체에 의한 장애를 탕상이라 한다. 특히 고온의 열에 의해 사람이 탄화되어 사망한 시체를 소사체라 한다<sup>77)</sup>.

소사체의 법의학적 개인식별에 있어서 소사정도에 따라 시체의 심한 형태학적 변형이 감정을 불가능하게 하기도 하며, 또한 열에 의한 시체 조직의 탄화가 유전자분석과 같은 법의분자생물학적 감정을 불가능하게 하기도 한다.

실제로 각종 사고나 사건으로 인한 시체의 상태중에서, 특히 화재나 붕괴와 같은 대량 재해인 경우 소사체가 상당한 비중을 차지하고 있으며, 이때 혈액이나 각종장기가 쉽게 열성 변형 및 파괴되어 실질적인 개인식별과 같은 법의학

적 감정이 어렵게 된다.

이런 경우, 특히 치아는 인체의 기관중 가장 견고한 구조 및 성분으로 구성된 기관으로서 법랑질, 상아질, 백악질같은 경조직으로 구성되었기 때문에 물리적, 화학적 저항성이 높고 부패 및 열에 가장 오래 견딜 수 있는 특성을 가지므로 법의학 분야에서 개인식별에 매우 중요한 정보를 제공한다. 즉, 치아는 개인식별에 중요한 성별과 연령의 추정은 물론 혈형검사와 유전자 추출까지 가능하게 하여 다양한 개인식별을 시행할 수 있는 중요한 법의치과학적 자료가 된다<sup>73)</sup>.

이러한 치아에서의 법의치과학적 개인식별법은 매우 다양하고 정확하며, 성별감정을 위하여 치아의 크기에 대한 계량통계학적 분석<sup>63,71,82)</sup>, 법랑질의 분광투과율 검사<sup>82)</sup>, 상아질 비중측정<sup>70,82)</sup>, 상아질 및 치조골내 유기질 분해후 산에 대한 중화량 측정<sup>67,82)</sup>, 성염색체 및 성염색질 검사<sup>82)</sup>등을 응용하여 감정 할수 있고, 치아의 생리적 교모도 및 마모도 측정<sup>82)</sup>, 성장양상에 근거한 치아의 석회화 및 치아발육 검사<sup>75,82,89)</sup>, 치아의 생리적 변화 양상에 따른 조직학적 검사<sup>22,37,82)</sup>, 아스파라진 산등 아미노산의 이성질체 성질을 이용한 라세미화(racemization) 방법 등<sup>82)</sup>을 이용하여 연령 감정을 시행할 수 있다.

이와 같이 치아는 일반적인 법의치과학적 방법과 더불어 혈청학적 분석과 방사선적 분석 등

을 비롯한 여러 방법들을 병행하여 개인식별 감정에 응용되고 있으며, 요즘에 와서는 분자생물학적 분석을 이용한 법의치과학적 개인식별도 시도 되고 있다.

치아에서의 법의치과학적 분자생물학 감정이 가능한 것은 치아를 구성하는 성분과 치아의 구조가 법랑질등과 같은 경조직으로 구성된 이유로 물리, 화학적 저항성이 높고 부패 및 열에 가장 오래 견딜 수 있으면서 치수와 같은 세포성분이 존재하는 구조가 있기 때문이다<sup>82,94</sup>.

한편 유전자는 1953년 Watson과 Crick<sup>59</sup>이 DNA의 2중 나선구조를 규명한 이래 분자생물학이 급속히 발전하여 유전자와 유전병 지도 작성뿐만 아니라 극히 소량의 법의학적 시료로부터 성별감별, 개인식별이 가능하게 되어 이러한 문제점들이 해결되었으며 생물학적 증거물의 분석은 분자수준에서 검사하는 방법으로 발전되었다<sup>19,21,28-30,60</sup>.

특히 1970년 Smith등<sup>53</sup>이 DNA의 염기배열 중 특정염기를 인식하여 그 부위만을 절단하는 제한효소(restriction enzyme)를 발견한 후 한두 개의 유전자 연구에서 한 개체에 존재하는 게놈 전체에 대한 연구단계로 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 RFLP)을 전기영동, southern blot, 혼성화(hybridization) 과정으로 다좌위탐침(multi-locus probe)과 단좌위탐침(single-locus probe)을 이용하여 검색할 수 있으며, 이들은 한 세대에서 다음 세대로 유전된다는 사실도 밝혀졌다<sup>54,62</sup>.

또한 진핵생물(eukaryote)에서 유전형질 발현에 관여하지 않는 14-70개의 염기수를 1 단위로 하는 염기구조가 가로로 반복배열된 DNA 구조를 과변이초과성 좌위(hypervariable minisatellite locus) 또는 variable number of tandem repeat locus(VNTR)라 하며 이들은 어떤 제한효소에 의해서도 검출이 가능할 뿐만 아니라 대립인자의 수가 많고 또 이형접합도가 높기 때문에 유전형질 연구뿐만 아니라 법의학 분야에서

는 개체특이성 유전표식자(individual-specific genetic marker)로서 개인식별과 친생자 감정에 이용된다<sup>3,39,74,76,78,80,84,86</sup>.

한편, Jeffrey<sup>19,28-31</sup> 등이 사람의 DNA의 염기 구조에는 손가락 문형인 지문과 같이 각 개체가 다 서로 다른 유전표식자가 존재한다는 사실을 발견하고 이러한 유전표식자를 이용한 개인식별법을 유전자 지문이라 명명하였다.

그러나 VNTR 유전좌위의 대립유전자들은 그 PCR산물의 크기가 short tandem repeat(STR)로 통칭되는 microsatellite 유전좌위에 비해서 상대적으로 크다. 따라서 심하게 분해된 DNA를 대상으로 이러한 유전좌위들을 증폭할 경우 큰 크기의 대립 유전자들은 작은 것들에 비해 증폭이 잘 되지 않으므로 유전자형의 결정에 어려움을 초래 할 수 있다.

그러나 STR 유전좌위는 2-7개의 염기를 반복 단위로 하는 다형성 유전자위로서 손상된 DNA로 인한 minisatellite 유전좌위의 증폭시 발생하는 문제점들을 제거 할수 있기 때문에 현재 많은 법의학적 시료의 유전자 검사에 이용되고 있으며 THO1<sup>16</sup>, CD4<sup>17</sup>, VWA<sup>91</sup>, D21S11<sup>51</sup>, MBP<sup>41</sup>, F13 A01<sup>42</sup>, FES/FPS<sup>41</sup>, CSF1PO<sup>23</sup> 등 여러 유전좌위가 이용되고 있다. 더구나 이들 유전자형의 일부는 Kit화 되어 세계적으로 표준화가 이루어지고 있는 상태이며, 한편에서는 형광 부착 primer에 의한 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 증폭<sup>1,2,9,43</sup>과 대립유전자의 검출을 형광검출기 및 software를 이용하므로 10개이상의 다좌위 동시 자동검출법<sup>18,20,25,36</sup>이 개발되어 실용화되고 있다.

본 연구에서 다룬 STR 유전좌위는 Hum-THO1 (human tyrosinehydroxylase theta 1)와 HumCD4 (human cluster gene 4) 영역로서 HumTHO1의 반복영역 서열은 [TCAT]<sub>n</sub>이고, HumCD4의 반복영역 서열은 [TTTTC]<sub>n</sub>이며, 이들 HumTHO1과 HumCD4는 특히 삼봉백화점 붕괴사고의 가족관계 확인을 위한 유전자분석에 중요한 STR 유전좌위로 실제 법의학적 개인식별에 다양하게 응용되었다<sup>88</sup>.

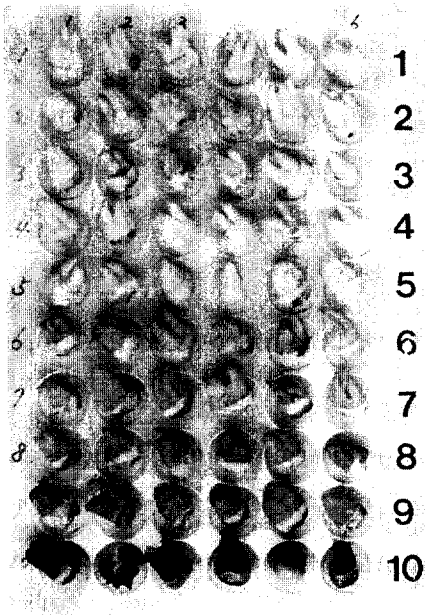
이와 같은 분자생물학적 분석들은 법의학 분야

**Table 1** . Conditions of heating temperature and exposure time to the tooth

| Temperature,<br>°C | Exposure | time | minite |
|--------------------|----------|------|--------|
|                    | 45       | 90   | 120    |
| 100                | 6*       | 6    | 6      |
| 150                | 5        | 6    | 6      |
| 200                | 5        | 6    | 6      |
| 250                | 6        | -    | -      |

※ : tooth No.

- : no test



**Fig. 1.** The teeth on various conditions of heating temperature and exposure time.

- |                       |                       |
|-----------------------|-----------------------|
| 1 : 100°C, 45minutes  | 2 : 100°C, 90minutes  |
| 3 : 100°C, 120minutes | 4 : 150°C, 45minutes  |
| 5 : 150°C, 90minutes  | 6 : 150°C, 120minutes |
| 7 : 200°C, 45minutes  | 8 : 200°C, 90minutes  |
| 9 : 200°C, 120minutes | 10 : 250°C, 45minutes |

적 개인식별 분야에도 응용할 수있는 계기를 마련하였다. 최근에 들어서 치아에서의 DNA 유전자 검색과 같은 분자생물학적 분석이 연구되었으며 Yamada 등<sup>63)</sup>은 치수층에서 DNA를 추출하여 RFLPs검사를 이용한 개인식별과 Yamamoto 등<sup>64)</sup>은 치수 DNA에서 Y-특이성 탐침을 이용한 성별검사에 대한 연구를, Smith 등<sup>52)</sup>은 DNA추출시 접근 방법, Schwarzh 등<sup>50)</sup>은 다양한 환경하에서 치아로 부터 얻어지는 DNA의 특징에 대한 연구를 보고하였다. 국내에서는 1995년 윤등<sup>81)</sup>에 의해 처음으로 치아를 이용한 DNA 분석에 대한 연구를 하였는데 치아에서 성별검사를 포함한 DNA유전자형의 검색을 통한 개인식별을 시행하여 발거후 10년이 경과된 치아에서도 개인식별이 가능함을 보고였고, 이후 허등<sup>93)</sup>이 치아를 이용한 성별검사 및 DIS80 유전자위의 검색시 DNA추출방법에 따른 비교를 하였고, 윤등<sup>83)</sup>이 치아에서의 DNA 유전자지문 분석을 위해 Chelex<sup>®</sup>100을 매개체로 DNA를 추출 보고하였다.

이상과 같이 치아를 이용한 분자생물학적 법의치과학 연구가 활발히 진행되었으며, 특히 윤등<sup>81)</sup>에 의하여 생치에서의 유전자 검색뿐만 아니라 시간이 오래 경과된 치아에서의 유전자 검출을 성공함으로써, 실제 개인식별 감정에 적용할수 있도록 하여 법의치과학의 응용 분야를 보다 넓게 하였다. 더불어 최근에는 분자생물학의 발전과 더불어 유전자 검출 기법도 점차적으로 발전하고 있으며 이들의 법의치과학 적용도 다양해 지므로, 여러 조건에서의 개인식별에 필요한 치아의 유전자 분석이 필요하게 되었다.

그러나 실제로 각종 사고나 사건으로 발생한 시체중 화재로 인한 소사체가 상당한 비중을 차지하고 있음에도 불구하고, 열에 의한 다른 인체 조직에서의 DNA검출 뿐만 아니라 치아에서의 DNA 검색에 대한 연구<sup>67,68)</sup>도 매우 미미한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 치아가 타장기에 비해 가장 견고하고 열과 같은 외부적 환경에 안정성이 높은 구조와 조직으로 이루어 졌으면서 치아 구조내에 유전자분석에 필요한 세포들이 존재하는 특성을 이용하여, 소사체의 경우에 타조직이

**Table 2.** Synthetic oligonucleotide primer used for PCR

| primer | sequence   |
|--------|--|
| TH01.1 | 5'-GTG GGC TGA AAA GCT CCC GAT TAT-3'            |
| TH01.2 | 5'-ATT CAA AGG GTA TCT GGG CTC TGG-3'            |
| CD4.1  | 5'-TTA CGC GTT TGG AGT CGC AAG CTG AAC TAG CG-3' |
| CD4.2  | 5'-CCA GGA TGA GGC TGC AGT GAA-3'                |

나 장기에서 검출되지 않는 온도나 조건에서 개인식별에 중요한 STR 유전자의 검출여부를 확인함으로써, 실제 개인식별 감정업무에 응용하고자 본 연구를 시행하여 다소의 지견을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

20대 전후의 남녀로부터 발거한 제3대구치 64개를 열처리를 하지않은 치아(6개)와 각온도 및 시간 조건에 맞게 vaccum oven(Model 5851 vaccum oven, Napco, U.S.A.)에서 열처리를 시행하여 소사시킨 치아(58개)로 구분(Fig. 1)하고 이를 강압력기를 이용하여 완전 분쇄한 후 얻은 치아조직을 연구재료로 하였다(Table 1).

### 2. 실험방법

#### 가. DNA 추출

PCR을 이용한 STR 유전좌위의 다형성검사를 위해 분쇄된 치아를 각각 1.5ml eppendorf tube에 담고, 멸균된 증류수 200 $\mu$ l씩을 분주하여 4 $^{\circ}$ C에서 하루동안 방치하였다. 4 $^{\circ}$ C에서 하루동안 방치한 표본에 50 $\mu$ l 용해완충액(Nucleolysis buffer, 0.5% S.D.S. 10mM Tris. Cl, 0.1M EDTA, pH 8.0)과 5 $\mu$ l proteinase K(12 $\mu$ g/ $\mu$ l)를 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 부란하였다. 이렇게 처리된 표본을 10분간 14,000 rpm으로 원심분리 후 상층액을 취하여 새로운 eppendorf tube에 옮겼다. 분리된 상층액에 50 $\mu$ l NaCl(5M)을 혼합하

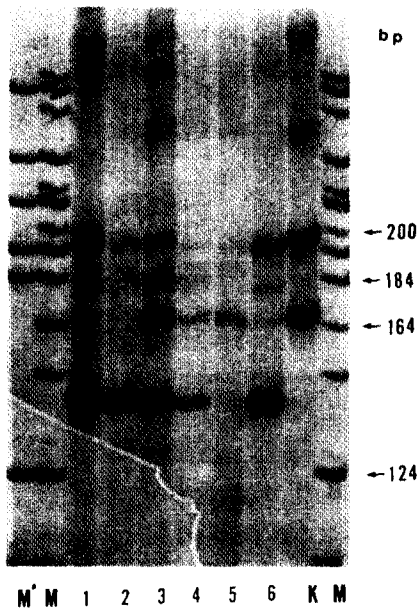
여 잘 혼합한 후 침전물을 제거하고 남은 부유액을 실온의 100% ethanol로 침전시켜 DNA를 추출하였다. 이를 다시 70% ethanol로 세척하고 dry vaccum으로 완전히 건조시킨 후 멸균증류수에 용해하였다<sup>81)</sup>.

#### 나. Primer 합성

HumTH01형과 HumCD4형을 동시 검출하기 위한 primer<sup>90)</sup>는 phosphoramidite법에 의하여 DNA synthesizer(ABI 391A PCR Mate, Biosystems, U.S.A.)에서 합성하였고 C<sub>18</sub>로 탈염시켜 사용하였다(Table 2).

#### 다. Multiplex PCR

분리된 치아의 DNA 3 $\mu$ l(50ng)를 PCR 증폭에 사용하였다. PCR buffer는 50mM KCl, pH 9.0, 0.01% Triton-X 100의 조성으로 하고 1 $\mu$ M 농도의 TH01 primer 2종류와 CD4 primer 2종류 200 $\mu$ M의 dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dCTP : Progmege, U.S.A.)를 가하였다. 여기에 Tag polymerase(Promega, U.S.A.) 1 unit, MgCl<sub>2</sub> 1.6mM 농도로 조정하여 최종 반응량을 15 $\mu$ l로 하였다. 이 15 $\mu$ l를 0.2ml Thinwalled tube에 넣고 DNA thermal cycler(Perkin Elmer 9600 model)에서 95 $^{\circ}$ C/5분간 hot soaking시키고, 94 $^{\circ}$ C/45초, 64 $^{\circ}$ C/45초, 72 $^{\circ}$ C/1분의 주기로 10회, 다음에 90 $^{\circ}$ C/45초 64 $^{\circ}$ C/30초, 72 $^{\circ}$ C/1분의 주기로 20회 반응시킨후 72 $^{\circ}$ C/10분 지체시켜 4 $^{\circ}$ C로 냉각하였다. 이 PCR산물을 HumTH01형과 HumCD4형을 동시에 검출하기 위해 polyacrylamide gel에 주입하여 전기영동하였다<sup>92)</sup>.



Lane 1~6 : fresh teeth  
 K : K562 control DNA ( HumTH01, HumCD4 )  
 M : standard size marker ( Marker V,  $\lambda$ DNA/Pst I )  
 M' : standard size marker ( Marker V )

Fig. 2. Detection of HumTH01 and HumCD4 from the fresh teeth.

라. Polyacrylamide gel 전기영동 및 질산은 염색

Native Polyacrylamide gel은 17cm × 32cm × 0.8cm 크기로 하여 다음과 같이 두 종류를 각각 준비하였다. 최종농도 6.5%의 polyacrylamide에 35mM의 Tris-sulfate, pH 9.0, 7%의 glycerol 농도로 혼합하여 제조하였고 전기영동용 완충액은 TBE(Tris : 6.3g, Boric acid : 0.8g, EDTA : 0.3g /1, pH 9.0)를 사용하였다. 전기영동장치(Gibco-BRL SA32 model, U.S.A.)에 준비된 겔을 설치하고 15mA의 일정전류로 약 15시간 동안 전기영동하였다.

다음은 염색을 위해 10% ethanol에서 5분간 고정후 1% nitric acid solution에서 3분간 산화시키고 증류수로 2회 수세한 후 0.012M silver nitrate solution으로 20분간 염색을 하고 증류수로 2회 수세하고 발색을 위해 developer(0.28M anhydrous sodium carbonate, 0.019% formalin)에서 band 형상이 관찰되면 stopper(10% glacial acetic acid)를 가지고 약 2분간 환원후 증류수에 겔을 위치 시키는 silver staining을 실시하였다<sup>92)</sup>.

### III. 결 과

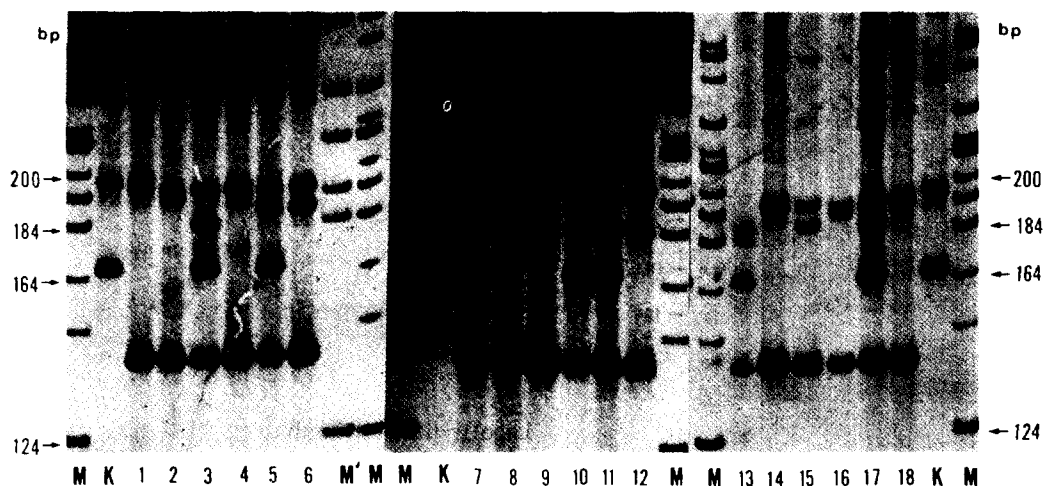
#### 1. STR HumTH01과 HumCD4 유전좌위의 AMP-FLPs검색

가. 발거후 열처리를 시행하지 않은 치아

열처리를 시행하지 않은 치아로 부터 추출한 DNA를 PCR방법으로 증폭시킨후 전기영동하여 관찰한 결과, 6개 치아 모두에서 179~207bp 사이에 존재하는 HumTH01 유전좌위와 140~170bp 사이에 존재하는 HumCD4 유전좌위의 대립 유전자에 해당하는 뚜렷한 band들을 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

나. 100℃의 열처리를 시행한 치아

발거후 100℃에서 45분간, 90분간, 120분간 열처리를 시행한 후 DNA를 추출하여 PCR에 의해 증폭한 PCR산물을 전기영동하여 관찰한 결과, 각 조건에 따른 6개 치아 모두에서 HumTH01 유전좌위와 HumCD4 유전좌위의 대립유전자에 해당하는 뚜렷한 band들을 관찰할 수 있었다(Table



**Fig. 3.** Detection of HumTH01 and HumCD4 from the teeth on 100°C heating temperature, various exposure time.

Lane 1~6 : 45 minutes

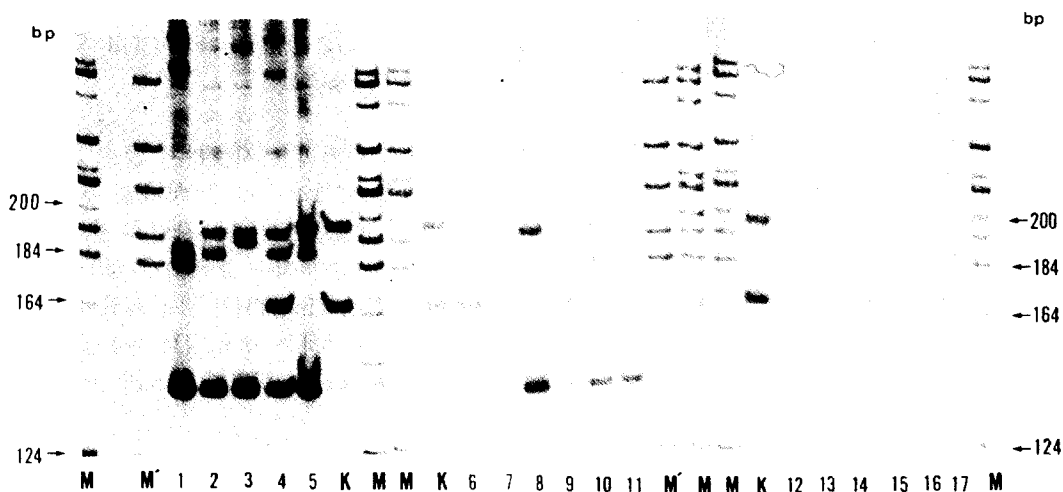
Lane 7~12 : 90 minutes

Lane 13~18 : 120 minutes

K : K562 control DNA ( HumTH01, HumCD4 )

M : standard size marker ( Marker V,  $\lambda$  DNA/Pst I )

M' : standard size marker ( Marker V )



**Fig. 4.** Detection of HumTH01 and HumCD4 from the teeth on 150°C heating temperature, various exposure time.

Lane 1~5 : 45 minutes

Lane 6~11 : 90 minutes

Lane 12~17 : 120 minutes

K : K562 control DNA ( HumTH01, HumCD4 )

M : standard size marker ( Marker V,  $\lambda$  DNA/Pst I )

M' : standard size marker ( Marker V )

적 자료가 되기 때문이다.

치아는 치아의 외측에 존재하고 무기 성분이 대부분인 가장 견고한 법랑질과 치아에서 가장 부피를 많이 차지하고 특징적으로 경조직 구조 안에 조상아세포를 함유할수 있는 상아세관이 존재하는 상아질, 그리고 상아질이나 치조골과 유사한 백악질과 특히 각 경조직에 의해 치아의 내면에 보호되고 있고 조섬유세포, 미분화간엽세포, 기질과 같은 많은 세포 성분으로 이루어진 치수가 존재한다<sup>82,94)</sup>. 결국, 치아가 법의치과학적 가치가 높은 것은 그 구성이 타장기에 비해 특별한 구조와 성분을 갖는 단단한 무기성분이 주를 이루면서 아울러 치아의 각 부위별 특징에 따라 각종 성분을 함유한 유기질, 세포성분이 존재하며 특히 이들 중 유전자를 포함하는 세포성분들은 단단한 법랑질, 상아질과 같은 구조속에서 외부로부터 보호될수 있는 특징적 구조가 갖기 때문이다.

그러나, 이런 특징을 갖는 치아라도 외부 환경 중 특히 열에 의한 소사인 경우 다른 검체와 마찬가지로 유전자 감식에 필요한 구조나 성분을 잃어 버릴수 있으므로 이에 대한 평가가 매우 중요하다. 일반적으로 치아에 열이 가해진 경우 치아색상의 변화와 치아외형의 변화(Fig. 2) 그리고 치아조직상의 변화가 나타나게 된다. 보통 100~500℃까지의 각 온도에서의 치아의 변화를 보면 다음과 같다<sup>82)</sup>. 100℃에서는 치관부는 가열전에 비하여 백색빛이 증가하고 투명도는 저하되며 반상치처럼 되는데 외형의 변화는 없으며 법랑소주의 배열은 흐트러지지만 균열은 생기지 않는다. 치근부는 담황색을 보이고 투명성을 가지고 외형의 변화도 없다. 상아질은 제2상아질과의 구별은 확실해지며 제2상아질의 미립모양구조가 거칠고 커진다.

200℃에서는 치관부가 중등도의 동황색을 띠는데 외형의 변화는 없으며 법랑소주의 배열이 흐트러지고 구조가 분명해지며 균열을 만드는 전단계양 변화를 보인다. 치근부는 동황색, 투명도는 커지나 외형의 변화는 없다. 열 때문에 상아섬유말초는 법랑상아 경계부 가까운 곳에서 급한 커브를 그리고 굽어진다. 300℃에서는 치관

부는 황갈색으로 변화하며 법랑소주의 배열은 완전히 흐트러지고 균열이 생기기 시작한다. 치근부는 전체적으로 암갈색을 띠고 있는데 균열은 적다. 상아질의 조직구조는 흐트러지기 시작하고 법랑상아 경계부는 이미 균열이 생긴다. 400℃에서는 치관부는 흑갈색 광택이 있고 전면에 걸쳐 방향이 난잡한 균열이 나타나고 특히 순설면의 원심축에 0.5~1mm정도의 균열이 생긴다. 치근표면에서의 균열도 치아의 장축을 따라 크게 나타난다. 더욱이 이때 고유 법랑질의 조직구조는 남아 있는데 상아질의 균열은 법랑상아경계보다 치수강쪽으로 향하고 있다. 500℃에서는 치관부는 회백색, 순면에 갈색의 횡선이 나타난다. 치근부도 같은색인데 그 근단부에서는 회백색의 정도가 강하며 균열의 수도 많아지고 그 방향은 난잡하며 치아축에 따라서 생기는 것이 많다. 치경부 법랑질은 외측으로 변전되어 있으며 이 현상 변전은 순설축에 강하다. 상아질 기질은 완전히 흐트러지고 분리되어 상아세관은 완전히 파괴된다. 그러나 이 경우에도 상아질이라는 것은 불선명하지만 알 수가 있다.

본 연구에서도 열처리 온도 및 조건에 따라 치아 색상의 변화와 외형의 변화가 있었고 특히 열처리 시간이 증가함에 따라 치아의 변화가 뚜렷이 나타나서 열처리 온도와 더불어 열에 노출되는 시간이 탄화의 정도에 영향을 끼치는 것을 관찰할 수 있었으며, 250℃에서는 열처리 시간이 비교적 짧았으나 치관부와 치근부 모두 흑갈색으로 탄화되는 양상이 관찰되었다.

이러한 열적 변화에서 온도에 따라 치아내부 조직에 존재하는 각종 성분이 보호되고 외부의 여러 조건에도 쉽게 파괴되지 않고 유지될수 있는 상태의 유전자가 존재할 수 있으므로, 이러한 치아를 이용하여 개인식별의 여러 방법을 시행하는 것이 큰의미가 있다. 특히 개인식별과 관계된 유전자 감식에는 이러한 특징적 구조를 갖아 세포성분을 유지할 수 있는 치아는 매우 중요한 검체가 될 수 있다.

일반적으로 분자생물학적 방법의 법의학적 응용은 Smith등<sup>53)</sup>에 의하여 DNA 염기배열중에서 특정 염기부위만을 인식하고 그 부위를 절단하

는 제한효소가 발견되면서 급속한 발전이 이루어졌다. 이러한 제한효소를 발견하고 유전표식자 (genetic marker)를 이용한 분자생물학적 방법은 1세대 방법인 southern hybridization법과 2세대 PCR법으로 발전되어 친자감별, 가족관계 규명등이 실험실에서 가능하게 되었다<sup>6,13,34,35,38,46)</sup>.

즉 법의학 분야에서 이러한 RFLP 검사는 많은 시간이 소요되며, 실험방법상 정확한 결과를 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 PCR을 이용한 DNA 다형성 검사에서는 수십 *ng* 이하의 DNA로도 충분히 특정 유전자의 분석을 할 수 있으므로 southern-hybridization법의 단점을 보완할 수 있는 새로운 방법으로 등장했다. PCR은 유전자분석에 관한 여러가지 연구와 진단분야 특히 유전자형의 결정에 폭넓게 사용되고 있다. 1985년 Saiki등<sup>44)</sup>은 human  $\beta$ -globulin DNA의 증폭과 겸상 적혈구성 빈혈증 (sickle cell anemia)의 산전 진단에 최초로 적용하여 생체밖에서 인체 게놈의 특정 부위를 PCR을 이용하여 증폭이 가능하다는 보고를 하였다. 이러한 PCR은 법의학분야에 적용되어 주로 VNTR를 나타내는 특정 유전좌위만 증폭, 전기영동하여 증폭된 길이다형성을 비교적 간단하게 검색할 수 있으며, HLA DQA1 유전좌위와 같이 개체마다 다른 유전자를 증폭하여 그 염기서열을 분석할 수 있게 되어 RFLP 분석과는 달리 한 개의 체세포만으로도 한 개체식별이 가능하게 되었다<sup>79)</sup>.

사람의 DNA위에는 약  $10^5$  개 정도의 길이가 서로 다른 무수한 유전자가 존재할 것으로 추산되고 있으며 이들중 개체특이성을 나타내는 사람의 VNTR 유전좌위는 약 1,500개 정도로 추정되나 개인식별에 흔히 이용되는 인체 게놈에 분

포되어 있는 VNTR 유전좌위는 D2S44<sup>6)</sup>, D14S1<sup>8,40)</sup>, Apo B<sup>49)</sup>, D17S79<sup>6)</sup>, Collagen type II Alpha 1(COL2A1)<sup>33,61,87)</sup>, D2S44(YNH24)<sup>6,10)</sup>, D1S8(MS32)<sup>55,65,66)</sup>, D17S30<sup>27)</sup>, D17S5<sup>15)</sup>, D1S80(pMCT118)<sup>5,7,11,14,32,45, 56,74,84)</sup> 등이 있다.

인체세포내에 DNA의 반복된 염기서열이 지니는 다형성인 VNTR과 STR 영역의 특이성을 이용한 유전자분석법은 현재 법의학 분야에서 개인식별 및 친생자확인에 주로 이용되고 있으며<sup>24-26,46,85,86)</sup>, 특히 STR은 염색체 DNA 전체에 고루 존재하고 있고 VNTR 영역보다 PCR를 할 경우 증폭효율성이 높다. 그리고 STR 영역은 PCR 증폭이 가능하며 증폭부위에 포함되어 있는 반복 염기의 수에 따라 분류되고, 전기영동 후 질산은 염색을 하여 분석하면 검출특이성이 기존의 EtBr 염색법보다 높고 autoradiography보다 실험시간이 짧으며 방사선 동위원소를 사용하지 않아도 되는 장점이 있다<sup>4,36,38,47)</sup>. STR 유전좌위는 반복염기의 수가 다양하기 때문에 고도의 길이다형성을 나타낸다<sup>16)</sup>. 이러한 STR 유전좌위는 사람에게 있어서 상당히 많이 존재하고 있고 따라서 선택의 폭이 매우 넓다<sup>8)</sup>. 그러나, 법의학적 분석에 있어 가장 유용한것은 enzyme slippage에 기인한 증폭artifacts가 감소하기 때문에 최소한 4-5bp의 반복단위로 구성된 좌위이다<sup>12,16,20)</sup>. STR typing은 사람 DNA인 경우 1ng 정도의 미량의 증거물에서도 검출이 가능하며, 고도로 분해된 DNA인 경우에도 VNTR<sup>8)</sup> 등 다른 방법에 비해 보다 효율적이다. 따라서 STR typing은 수 많은 법의학 실험실에서 널리 이용되고 있다.

본 연구에서 다른 STR 유전좌위는 HumTH01와 HumCD4으로서 HumTH01 영역은 사람의 11번째 염색체에 위치하며 반복영역의 서열은 [TCAT]*n*이고 PCR 산물의 크기는 179~207bp정도이며 이때 검출되는 대립유전자는 한국인의 경우 5종류가 검출<sup>90)</sup>되고 있다. HumCD4 영역<sup>90)</sup>은 12번째 염색체에 위치하고 반복영역의 서열은 [TTTTTC]*n*이고 PCR 산물의 크기는 140~170bp에 이르며 이때 검출되는 대립유전자의 수는 7개 정도로 알려져 있다. 그리고 이 두 영역



|            |   |
|------------|---|
| HumTH01    | (TCAT) <sub>5-11</sub>                          |
| allele 9.3 | (TCAT) <sub>4</sub> CAT (TCAT) <sub>5</sub>     |
| HumCD4     | (TTTTC) <sub>3-13</sub>                         |
| allele 12  | (TTTTC) <sub>3</sub> CTTTC (TTTTC) <sub>8</sub> |

Fig. 7. Simple repeat sequences of HumTH01 and HumCD4

은 nonconsensus allele가 각각 검출되는 특징 (Fig. 7)을 지니고 있다.<sup>92)</sup>

이들 HumTH01과 HumCD4는 현재 법의학적인 개인식별에 다양하게 응용되는 중요한 STR 유전좌위로 취급되고 있으며 MultiPlex PCR방법을 이용하여 소량의 시료에서도 동시에 분석이 가능한 장점을 가지고 있다.

Walsh 등<sup>57,58)</sup>의 연구에서는 일반적으로 단좌위탐침으로 완전한 DNA의 유전자형을 검색하기 위하여는 대략 30-60ng이 필요하다 하였으며 본 연구에서도 RFLP 검색은 false-negative로 나올 가능성이 높아 PCR방법에 의한 AMP-FLPs 검사법으로 유전자형을 검색해야 할 것으로 사료되었다.

치아에서의 DNA농도를 보면 윤등<sup>81)</sup>에 의해 조사된 바 발거후 즉시 DNA를 추출한 치아에서의 DNA농도는 치수에서 83-278ng/ $\mu$ l, 상아질에서 16-83ng/ $\mu$ l, 법랑질에서 0-46ng/ $\mu$ l를 보였고, 허등<sup>93)</sup>에 의하면 일반적인 비등법에 의한 DNA 추출시 치아에서의 DNA농도는 치수에서 평균 145ng/ $\mu$ l, 상아질에서 106ng/ $\mu$ l, 법랑질에서 14ng/ $\mu$ l로 나타났다고 보고 하였다.

그러나 치아에 열이 가해져서 소사될 경우처럼 심하게 분해된 DNA를 대상으로 이러한 유전좌위들을 증폭할 경우 큰 크기의 대립 유전자들은 작은 것들에 비해 증폭이 잘 되지 않으므로 유전자형의 결정에 어려움을 초래 할 수 있다. 그러므로 본연구에서는 현재 개인식별에 대표적으로 이용하고 증폭성이 좋은 STR 유전좌위인 TH01과 CD4를 검출 대상으로 조사하였다. 또한 본실험에서는 MultiPlex PCR방법을 이용했는데 이는 annealing 온도가 비슷하고 PCR 산물의 크기(bp)가 다른 두 영역 이상의 primer를 조합하

여 한 튜브에서 동시에 PCR을 실시하는 경우로 실험시간이 단축되고 한번의 PCR/전기영동에 의해 두 영역 이상의 유전자형을 동시분석할 수 있는 장점이 있다. 따라서 HumTH01, HumCD4의 두 영역은 PCR 산물의 차이가 달라 한개의 튜브 및 한장의 전기 영동겔에서 동시 분석이 가능하였다.

소사조건에 따른 시체에서 혈액의 유전자 검색을 시도한 연구를 보면 安積順一 등<sup>68)</sup>에 의하면 혈액이 열에 노출될 경우 약 114℃까지 온도가 증가하다가 탄화되며 그일부에서 유전자로 추정되는 물질이 분석된다고 하였고, 横田 등<sup>72)</sup>은 시체에서 혈액, 근육 및 피부를 소사시켜 온도에 따른 HLA DQ와 DIS80 유전좌위를 검색한 결과 약 100℃에서는 두유전좌위가 검출되었고, 150℃에서는 약간의 DIS80유전좌위만이 검출되었으나 판단하기가 어려웠으며 200℃에서는 유전좌위가 검출되지 않았다고 보고하였다.

열에 의한 치아에서의 DNA검출에 대한 연구로는 伊東 勳 등<sup>69)</sup>이 치아에 각온도별, 시간별로 열처리를 하여 성별판정에 이용되는 Amelogenin locus를 검색 여부를 조사하였다. 연구 결과 150℃에서는 120분까지 열처리를 하여도 성별판정이 가능했으나, 열처리 온도를 높인 경우에는 200℃로 30분과 250℃로 15분간 열처리한 경우만 성별판정이 가능한 고분자DNA가 검출되었고 그 이상의 온도와 열처리 시간조건에는 검색되지 않았다.

이에반해 본 실험에서는 150℃로 45분, 90분, 120분간 열처리를 한 경우에 HumTH01과 HumCD4 유전좌위 모두가 검출되었으며, 200℃로 처리한 경우에도 伊東 勳 등<sup>69)</sup>의 연구와 달리, 열처리를 45분과 90분, 120분간 시행한 경우에 HumTH01과 HumCD4 유전좌위 모두가 검출되었다. 그러나 250℃에서 45분간 열처리한 경우에는 두유전좌위로 인정할 수 있는 뚜렷한 band가 검출되지 않았다. 이때, 200℃에서 120분간 열처리한 경우와 250℃에서 45분간 열처리한 경우에 많은 band들이 같은 위치에서 검색된 것은 열에 의해 변형된 DNA산물에 의한 non-specific band로 추측되어, 진정한 HumTH01과 Hum-

CD4 유전좌위로 평가하지 않았다. 특히 유전좌위가 검출된 각조건의 치아에서의 HumTH01과 HumCD4 유전좌위는 한등<sup>90,92)</sup>이 보고한 한국인 HumTH01형과 HumCD4형의 대립유전자 분포 내의 유전자형을 보였다.

이상의 결과를 종합하여 불때 열처리하여 소사시킨 치아에서는 가해지는 열의 온도와 시간에 따라 검출에 영향을 받으나 타장기나 조직에 비해 비교적 높은 온도에서도 성공적으로 DNA를 추출할 수 있으며, 법의학적인 개인식별에 중요하게 다뤄지는 대표적인 유전좌위의 다형성을 PCR에 의해 검색이 가능하다는 것이 밝혀졌다. 이는 치아의 각 조직, 즉 법랑질, 상아질, 백악질, 치수내에 존재하는 유전자들이 치아의 견고하고 치밀한 구조속에서 열과 같은 화학적, 물리적 외부 환경에서도 인체의 다른 조직에 비해 월등히 그 성질과 성분을 유지할 수 있다는 것을 증명한 것이다. 특히, 소사체의 경우에 치아들은 연조직 및 악골내에 위치하므로 실험적으로 직접 치아에 열처리를 시행한 경우보다 열에 의한 치아조직의 변성이 적을 것으로 생각되어, 실제 법의치 과학적 감정 실무에서는 유전자 검출에 대한 결과가 보다 나올 것으로 기대된다.

본 연구에서는 소사된 치아로부터 성공적으로 DNA를 추출하여 검색이 가능하다는 것을 알았다. 그러나 실제 감정에서 적용하려면 다양한 STR 유전좌위는 물론, 각종 VNTR 유전좌위에 대한 더 많은 유전좌위의 검색을 추가적으로 실시하여야 하겠으며, 더 나아가 최근 활발히 연구되는 mitochondrial DNA 분석과 같은 방법을 연구함으로써 치아에서 얻어지는 많은 법의치 과학적 감정 방법과 더불어 개인식별에 응용 할 수 있는 수준이 되어 할 것이다.

## V. 결 론

법의학 분야의 개인식별에 있어서 소사체의 경우, 그 정도에 따라 시체의 심한 형태학적 변형이 감정을 불가능하게 하기도 하며, 또한 열에 의한 혈액과 근육 및 뼈와 같은 조직의 탄화는 유전자분석과 같은 법의분자생물학적 감정도 불

가능하게 한다. 그러나 치아는 인체에서 가장 견고하고 열과 같은 외부적 환경에 쉽게 파괴되지 않는 구조와 성분으로 구성되어 있으면서도 유전자분석에 필요한 세포들이 존재한다.

이에 본 연구에서는 이러한 치아의 특성을 이용하여, 소사체의 경우에 다른 장기나 조직에서 검출되지 않는 온도에서 개인식별에 관련된 유전자가 검출되는지 여부를 확인하고자 실험을 시행하였다.

실험은 남,여에서 발치한 제3대구치 64개를 열처리 시행하지 않은 치아와 100℃, 150℃, 200℃에 각각 45분, 90분, 120분 및 250℃에 45분 열처리한 치아로 구분하여, 각치아에서 DNA를 추출한 후 중합효소연쇄반응을 이용한 증폭절편다형(AMP-FLPs)을 실시하고, 현재 개인식별을 위한 유전자분석에서 중요하게 다루는 HumTH01과 HumCD4 유전좌위의 STR 대립유전자의 검출여부를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 발거후 특기할 열처리를 시행하지 않은 치아에서는 모든 치아에서 HumTH01과 HumCD4 유전좌위의 대립유전자를 검색할 수 있었다.
2. 100℃로 45분, 90분, 120분 열처리한 치아에서도 모든 치아에서 HumTH01과 HumCD4 유전좌위의 대립유전자를 검색할 수 있었다.
3. 150℃, 200℃로 열처리한 치아에서 HumTH01과 HumCD4 유전좌위의 대립유전자는 45분, 90분, 120분 처리한 경우에 검색이 가능했다.
4. 250℃로 열처리한 치아에서는 HumTH01과 HumCD4 유전좌위의 대립유전자를 검색할 수 없었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 어느 정도의 열에 의해 발생한 소사체의 경우에 타장기에서 개인식별에 필요한 DNA가 검출되지 않더라도 치아에서는 DNA검출이 가능하므로, 치아가 법의치 과학적 분자생물학 개인식별을 위한 자료로서의 가치가 매우 높은 것으로 생각되어 앞으로 실제 감정에 적용할 수 있으리라 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Akane, A., Shiono, H., Matsubara, K., Nakamura, H., Hasegawa, M., and Kagawa, M. : Purification of forensic specimens for the polymerase chain reaction (PCR) analysis, *J. Forensic Sci.*, 38(3) ; 691-701, 1993.
2. Akane, A., Seki, S., Shiono, H., Nakamura, H., Hasegawa, M., Matsubara, K., 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. Akiyama, K. et al : Polymerase chain reaction (PCR)/single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of the human HLA-DQB regions, *Jpn. J. Legal Med.*, 48(1) ; 38-43, 1994.
4. Ausubel, F. M. et al. : The polymerase chain reaction, In : *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, 1992.
5. Baechtel, F. S., Smerick, J. B., Presley, K. W. and Budowle, B. : Multigenerational amplification of a reference ladder for alleles at locus D1S80, *J. Forensic Sci.*, 38(5) ; 1176-1182, 1993.
6. Balazs, I., Baird, M., Clyne, M. and Meade, E. : Human population genetic studies of five hyper-variable DNA loci, *Am. J. Hum. Genet.*, 44 ; 182-190, 1989.
7. Barros, F., Lareu, M. V. and Carracedo, A. : Detection of polymorphisms of human DNA after polymerase chain reaction by miniaturized SDS-PAGE, *Forensic Science International*, 55 ; 27-36, 1992.
8. Beckman J.S. and J. L. Weber : Survey of human and rat microsatellite, *Genomics*, 12 ; 627, 1992.
9. 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.
10. Budowle, B., Wayne, J. S., Shutler, G. G. and Baechtel, F. S. : Hae III - A suitable restriction endonuclease for restriction fragment length polymorphism analysis of biological evidence samples, *J. Forensic Sci.*, 35(3) ; 530-536, 1990.
11. Chuah, S. Y. et al : Analysis of the D1S80 locus by amplified fragment length polymorphism technique in the Chinese, Malays and Indians in Singapore, *Forensic Science International*, 68 ; 169-180, 1994.
12. Clark, J. M.(1988). Novel non-templated nucleotide addition reactions catalysed by prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases, *Nucleic Acids Res.*, 16, 9677.
13. Crouse, C. A., Vincek, V. and Caraballo, B. K. : Analysis and interpretation of the HLA DQ  $\alpha$  "1.1 weak-signal" observed during the PCR-based typing method, *J. Forensic Sci.*, 39(1) ; 41-51, 1994.
14. D1S80 amplification kit, AmpFLP User Guide, Perkin Elmer Cetus, 1992.
15. Deka, R., Croo, S. D., Yu, L. M. and Ferrell, R. E. : Variable number of tandem repeat(VNTR) polymorphism at locus D17S5(YNZ22) in four ethnically defined human populations, *Hum. Genet.*, 90 ; 86-90, 1992.
16. Edwards, A.L., Civitello, A., Hammond, H.A., and Caskey, C.T. : DNA typing and netic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats, *Am. J. Hum. Genetics*, 49, 746, 1991.
17. Edwards, M.C., Clements, P.R., Tristan, M., Pizzuti, A., and Gibbs, R.A., Petanucleotide repeat length polymorphism at the human CD4 locus, *Nucleic Acid Res.*, 19, 4791, 1991.
18. GenePrint STR system, Technical Manual, Promega, U.S.A., 1995.
19. Gill, P., Jeffreys, A. J. and Werrett, D. J. : Forensic application of DNA 'fingerprints', *Nature* 318 ; 577- 579, 1985.
20. Gill, P., Kimpton, C.P., Urquhart, A., Oldroyd, N., Millican, E.S., Watson, S.K., and Downers, T.J., Automated short tandem repeats(STR) analysis in forensic casework-a strategy for the future, *Electrophoresis*, 16, 1453-1552, 1995.
21. Gill, P., Sullivan, k. and Werrett, D. J. : The analysis of hypervariable DNA profiles : problems associated with the objective determination of the probability of a match, *Hum. Genet.*, 85 ; 75-79, 1990.
22. Gösta gustafson : Age determination on teeth, *J. of american dental association*, 41 ; 45-54, 1950.
23. Hammond, H., and C.T. Caskey, Personal identification via short tandem repeats, In : *The 3rd international symposium on human identification*, Pro-

- mega, U.S.A., 1992.
24. Hill, A. V. S. and Jeffreys, A. J. : Use of minisatellite DNA probes for determination of twin zygosity at birth, *Lancet*, 21(28) ; 1394-1395, 1985.
  25. 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.
  26. Hummel, K. : Biostatistical approaches using minisatellite DNA patterns in paternity cases, *Advances in Forensic Haemogenetics*, 3, 17, 1990.
  27. Ivey, J. N., Atchison, B. A. and Georgalis, A. M. : Assessment of PCR of the D17S30 locus for forensic identification, *J. Forensic Sci.*, 39(1) ; 52-63, 1994.
  28. Jeffreys, A. J., Brookfield, J. F. Y. and Semeonoff, R. : Positive identification of an innigration test-case using human DNA fingerprints, *Nature*, 317 ; 818- 819, 1985.
  29. Jeffreys, A. J., Wilson, V. and Thein, S. L. : Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA, *Nature*, 314 ; 67-73, 1985.
  30. Jeffreys, A. J., Wilson, V. and Thein, S. L. : Individual-specific 'fingerprints' of human DNA, *Nature*, 316 ; 76-81, 1985.
  31. Jeffreys, A. J., Wilson, V., Neuman, R., and Keyte, J. : Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction : Towards DNA fingerprinting of single cell, *Nucleic acids Res.*, 16: 10953 -10971, 1988.
  32. Kasai, K., Nakamura, Y. and White, R. : Amplification of a variable number of tandem repeats (VNTR) locus(pMCT118) by the polymerase chain reaction (PCR) and its application to forensic science, *J. Forensic Sci.*, 35(5) ; 1196-1200, 1990.
  33. Katsuura, Y. and Maeiwa, M. : VNTR polymorphism of the collagen type II, alpha(COL2A1) gene detected by PCR, *Jpn. J. Legal Med.*, 46(5) ; 297-300, 1992.
  34. Kojima, T. et al : DNA typing of the three HLA-class II loci from saliva stains, *Jpn. J. Legal Med.*, 47(5) ; 380-386, 1993.
  35. Laber, T. L., Giese, S. A., Iverson, J. T. and Liberty, J. A. : Validation studies on the forensic analysis of restriction fragment length polymorphism(RFLP) on LE agarose gels without ethidium bromide : Effects of contaminants, sunlight, and the electrophoresis of varying quantities of deoxyribonucleic acid (DNA), *J. Forensic Sci.*, 39(3) ; 707-730, 1994.
  36. Mayrand, P.E., Robertson, J., Ziegler, J., Hoff, L.B., McBride, L.J., Chamberlain, J.S., and Kronick, M.N., Automated genetic analysis, *Annales de Biologic Clinique*, 4, 224-230, 1991.
  37. Metzger, Z., Buchner, A., and Gorsky, M. : Gustafson's method for age determination from teeth - A modification for the use of dentists in identification teams, *J. Forensic Sci.*, 25(4) ; 742-749, 1980.
  38. Moon Suk Seon, Soon Ja Kang : Dimeric Short Tandem Repeat Polymorphism Analysis Using Automated Fluorescent Detection in Korean Population, *Mol. Cells*, Vol. 6, No. 3 ; 266-270, 1996.
  39. Odelberg, S. J., Demers, D. B., Westin, E. H., and Hossaini, A. A. : Establishing paternity using minisatellite DNA probes when the putative father is unavailable for testing, *Journal of Forensic Science*, 33; 921-929, 1988.
  40. Oldberg, S.J., Plaetke, R., Eldrige, J.R., Ballard, L., O'Connell, P., Nakamura, Y., Leppert, M., Lalouel, J.C., and White, R. : Characterization of eight VNTR loci by agarose gel electrophoresis, *Genomics*, 5, 915, 1989.
  41. Polymeropoulos, M.H., Tetranucleotide repeat polymorphism at the c-fes/fps Proto-Oncogene (FES), *Nucleic Acid Res.*, 19, 4018, 1991.
  42. Polymeropoulos, M.H., Tetranucleotide repeat polymorphism at the human coagulation factor VIII subunit gene(F13A01), *Nucleic Acid Res.*, 19, 4306, 1991.
  43. Reynolds, R., and Sensabaugh, G. : Analysis of genetic markers in forensic DNA samples using the polymerase chain reaction, *Anal. Chem.*, 63 ; 2-15, 1991.
  44. Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, H., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N. : Enzymatic amplification of  $\beta$ -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, 230: 1350-1354, 1985.
  45. 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 case-work evaluation, *Am. J. Hum. Genet.*, 50: 816-825, 1992.
46. Sajantila, A., Strom, M., Budole, B., Karhunen, P.J., and Peltonen, L., : The Polymerase Chain Reaction and postmortem forensic identity testing, *Forensic Science International*, 51, 23-34, 1991.
47. Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. Chapter 14 : In vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction, In *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
48. Schnee-Griese, J. et al : Frequency distribution of D1S80 alleles in the German population, *Forensic Science International*, 59 ; 131-136, 1993.
49. Schnee-Griese, j. and Teifel-Greding, J. : DNA length polymorphism of the APO B 3' region : Frequency distribution of the alleles in the German population, *Forensic Science International*, 51 ; 173-178, 1991.
50. Schwartz, T. R., Schwartz, E. A., Mieszerski, L., McNally, L., and Kobilinsky, L., : Characterization of deoxyribonucleic acid(DNA) obtained from teeth subjected to various environmental conditions, *J. Forensic Sci.*, 36(4) ; 979-990, 1991.
51. Sharma, V., and Litt, M., Tetranucleotide repeat polymorphism at the D21S11 locus, *Hum. Mol. Genet.*, 1, 658, 1993.
52. Smith, B. C., Fisher, D. L., Weedn, V. W., Warnock, G. R., and Holland, M. M., : A systematic approach to the sampling of dental DNA, *J. Forensic Sci.*, 38(5) ; 1194-1209, 1993.
53. Smith, H. O., and Wilcox, K. W. : A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*, I. Purification and general properties, *J. Mol. Biol.*, 51: 379-, 1970.
54. 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.
55. Tamaki, K. et al : DNA typing and analysis of the D1S8(MS32) allele in the Japanese population by the minisatellite variant repeat (MVR) mapping by polymerase chain reaction (PCR) assay, *Jpn. J. Legal Med.*, 46(6) ; 474-482, 1992.
56. Thymann, M. et al : 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.
57. 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.
58. Walsh, P. S., Metzger, D. A. and Higuchi, R. : Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material, *BioTechniques*, 10 ; 506-517 , 1991.
59. Watson, J. D. and Crick, F. H. C. : Molecular structure of nucleic acids : A structure for deoxyribonucleic acid, *Nature*, 171 ; 737-738, 1953.
60. White, R. et al : Construction of linkage maps with DNA markers for human chromosomes, *Nature*, 313 ; 101-105, 1985.
61. 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.
62. Wylman, A. R., and White, R. : A highly polymorphic locus in human DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77; 6754-6758, 1980.
63. Yamada, Y., Yamamoto, K., Yoshi, T., and Ishiyama, I. : Analysis of DNA from tooth and application to forensic dental medicine, *Jpn. J. Legal Med.*, 43(5) ; 420-423, 1989.
64. Yamamoto, K. : Molecular biological studies on teeth inquests, *Jpn. J. Legal Med.*, 46(6) ; 349-355, 1992.
65. Yamamoto, T. et al : Potential forensic applications of minisatellite variant repeat(MVR) mapping using the polymerase chain reaction (PCR) at D1S8, *J. Forensic Sci.*, 39(3) ; 743-750, 1994.
66. Yamamoto, T. et al : DNA typing of the D1S8(MS32) locus by rapid detection minisatellite variant repeat (MVR) mapping using polymerase chain reaction (PCR) assay, *Forensic Science International*, 66 ; 69-75, 1994.
67. 山岸章二 : 歯牙硬組織による化学的性別判定について, *日法醫誌*, 13(5) ; 664-679, 1959.
68. 安積順一, 池田草也, 丹由真人, 查田弓 : PCR法によ

- る加熱された血液からの性別判定, 日法醫誌, 49, 1995.
69. 伊東 勳, 渡邊 麻子, 山本 勝一: 齒からの性別判定に關する法醫齒科學的研究, DNA polymorphism, Vol.3 ; 285-287, 1995.
70. 羽賀通大: 齒牙にぬける性差の研究, 日法醫誌, 13(5) ; 590-617, 1959.
71. 青山敏男: 日本人 個體齒の大きさの 性別的差異についで, 齒科醫學, 20(3) ; 344-353, 昭32
72. 横田 信, 長井 横有, 井村 万龜雄, 前井 均: PCR法を用いたヒト組織からのDNA多形検査 におよぼす温熱曝露の景嚮, 日法醫誌, 49, 1995.
73. 김 종열, 이 영석, 윤 창륙, 허 응, 최 중훈, 김 재홍: 삼풍백화점 붕괴 대참사의 법의치 과학적 개인식별, 국립과학수사연구소연보, 28 ; 37-71, 1996.
74. 김 치홍, 명 현균, 홍 용표, 황 적준: 한국인에서 VNTR DIS80 유전자위의 유전적 다양성 및 집단내 규질성 검정, 대한법의학회지, 18(1) ; 60-70, 1994.
75. 대한소아치과학회 편: 소아치과학, 서울, 이화출판사 ; 72-73, 1990.
76. 명 현균, 김 경훈, 황 적준: 단일모발로부터 DNA의 유전자형 검사, 대한법의학회지, 17(2) ; 1-7, 1993.
77. 문 국진: 최신법의학, 제3판, 서울, 일조각 ; 57- 113, 1994.
78. 문 국진, 황 적준, 김 종열, 박 의우: 유전자조작을 이용한 사람 혈흔의 개인식별에 관한 연구, 대한법의학회지, 15(1) ; 14-24, 1991.
79. 선 문숙, 한 면수, 박 기원, 이 양한, 최 상규, 강 순자: 한국인 집단의 HLA-DQ $\alpha$  대립 유전자와 유전자형 빈도, Korean J. Genetics, 15(1) : 31-38, 1993.
80. 윤 경규, 황 적준, 김 종열: 타액반 피검물에서 개인 식별을 위한 DNA의 유전자형검사, 대한구강내과학회지, 19(2) ; 205-217, 1994.
81. 윤 창륙, 김 종열: 치아에서의 DNA 분석에 의한 개인식별, 대한구강내과학회지, 20(1) : 229-245, 1995.
82. 윤 창륙, 김 종열: 법의치과학, 서울, 이우문화사 ; 295-317, 1995
83. 윤 창륙, 허 응, 이 영수, 안 종모: 치아에서의 DNA 유전자지문 분석, 대한구강내과학회지, 20(2) ; 515-528, 1995.
84. 이 승덕: 한국인에서 VNTR DIS80 유전좌위의 대립 유전자 탐색과 돌연변이의 측정, 서울대학교 대학원, 박사학위 논문.
85. 이 승섭, 정 재안, 황 적준: 한국인에서 pV47-2 다좌 위탐침으로 검색되는 VNTR 유전좌위의 대립유전자 빈도, 대한법의학회지, 18(1) ; 21-32, 1994.
86. 임 량희, 정 재안, 황 적준: 한국인에서 pV47-2 다좌 위탐침으로 검색되는 유전자지문의 유전적 특성, 대한법의학회지, 18(1); 33-44, 1994.
87. 정 재안, 명 현균, 이 희석, 황 적준: 한국인에서 중합 효소반응으로 검색되는 COL2A1 유전좌위의 대립 유전자 빈도, 대한법의학회지, 18(2); 1-8; 1994.
88. 최 상규, 한 면수, 선 문숙, 이 양한, 박 기원: 유전자 (DNA)분석에 의한 삼풍백화점 붕괴 희생자의 가족 관계 확인 사례, 국립과학수사연구소연보, 28 ; 72-82, 1996.
89. 최 중훈, 김 종열: 제 2대구치 및 제 3대구치 발육에 따른 연령 감정에 관한 연구, 대한 구강내과학회지, 16(1) ; 121-136, 1991.
90. 한 면수, 이 양한, 박 기원, 선 문숙, 최 상규: STR 좌위 HumTH01형의 AMP-FLP 분석법, 국립과학수사연구소연보, 26 ; 149, 1994.
91. 한 면수, 이 양한, 선 문숙, 박 기원, 최 상규: Humv WA형의 AMP-FLP분석 및 한국인 집단에서 출현빈도, 국립과학수사연구소연보, 27 ; 180-187, 1995.
92. 한 면수, 이 양한, 선 문숙, 박 기원, 최 상규: Multiplex PCR과 전기영동법에 의한 STRTH01과 CD4유전자형의 동시분석법, 국립과학수사연구소연보, 27 ; 188-194, 1995.
93. 허 응, 윤 창륙: 치아를 이용한 성별검사 및 DIS80 유전좌위의 검색시 4가지 DNA추출 방법에 따른 비교, 대한구강내과학회지, 20(2) ; 515-528, 1995.
94. 황 성명: 구강조직학, 제2판, 서울, 과학서적센타, 115 -230, 1988.

---

- ABSTRACT -

## Experimental Study for DNA Fingerprint from Teeth of Charred Body

**Jong-Hoon Choi\***, D.D.S., M.S.D., Ph.D., **Myon-Soo Han\*\***, M.S.D., Ph.D.  
**Moon-Sook Sun\*\***, M.S.D., Ph.D. **Chong-Youl Kim\***, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

\* *Department of Oral Medicine, College of Dentistry, Yonsei University*

\*\* *National Institute of Scientific Investigation*

In the field of individual identification in forensic science, if the body is charred, it is sometimes impossible to identify the morphologic changes and charred tissue such as blood, muscle and bone can not be identified by forensic microbiologic method such as DNA typing.

So the author used the characteristics of teeth which is relatively firm compare to other organs and stable to external environment such as heat and also possess cells needed for the DNA typing. The author conducted the experiment on teeth to detect DNA related to individual identification regarding to temperature in which other charred organs can not be detected.

The experiment was done on 64 extracted third molars consisted of unheated ones, and heated teeth to 100°C, 150°C, 200°C for 45 min, 90 min, and 120 min respectively and to 250°C for 45 min. DNA was extracted from each tooth and amplified fragment length polymorphism procedure(AFP-FLPs) using polymerase chain reaction(PCR) was applied and observed for the matching DNA in HumTH01 and HumCD4 locus and the followings are the results :

1. It was able to detect matching DNA in HumTH01 and HumCD4 locus in every teeth which no heating has been done.
2. It was able to detect matching DNA in HumTH01 and HumCD4 locus in every teeth heated to 100°C for 45, 90 and 120 min.
3. It was able to detect matching DNA in HumTH01 and HumCD4 locus in teeth heated to 150°C, 200°C for 45, 90, 120 min.
4. It was impossible to detect matching DNA in HumTH01 and HumCD4 locus in teeth heated to 250°C.

So, it is possible to extract DNA from teeth that otherwise can not be extracted from other organs in the charred body and it can be concluded that teeth are highly reliable and applicable as forensic odontology for individual identification.

---

**Key words** : charred body, tooth, individual identification, DNA fingerprint, HumTH01, HumCD4