

시흥 목감동 출토 인골의 미토콘드리아 DNA와 STR의 유전적 특징

Genetic Characteristics of mtDNA and STR marker in Human Bone
Excavated from Mokgam-dong, Siheung in Korea

徐民錫 · 鄭容在 · 李奎植 · 朴起源*

Min Seok Seo, Yong Jae Chung, Kyu Shik Lee and Ki Won Park*

ABSTRACT

We performed nuclear DNA typing and mitochondrial DNA sequencing analysis based on PCR from an ancient Korean remains excavated from Siheung in Korea. 7 bones were collected and partially STR(short tandem repeat) systems, Sex determination Amelogenin kit (Promega co, USA), were used in this study. Mitochondrial DNAs were also amplified and sequenced by ABI 310 DNA sequencer. We know that sample no. 2 and no. 3 were females and also sample no. 2 and no. 7 possessed the same maternal inheritance by mitochondrial DNA sequencing results.

Throughout this research, the mitochondrial DNA sequencing of human in the middle of Joseon Dynasty in Korea is obtained. In addition, this finding will be an important foundation for the future research.

I. 서론

인류의 조상은 2백 만년 전 아프리카에서 진화를 거듭하며 구대륙으로(유럽과 아

* 국립과학수사연구소(National Institute of Scientific Investigation)

시아) 퍼져나갔다는 사실과 인류의 조상은 아프리카뿐만 아니라 각 대륙에서 진화하여 동시에 약 10만 년 전 호모 사피엔스로 진화해 나갔다는 사실이 알려져 있다. 물론 두 가지 사실을 정확히 파악할 수 있는 사람은 현재까지 없을 것이다. 하지만, 유적의 조사나 인골의 발굴을 통하여 인류사의 근원을 여기까지 밝힐 수 있었다는 것은 다행스러운 결과라 할 수 있다. 역사학적인 관념과는 다르게, 생물학 특히 유전학에서는 인류의 조상은 아프리카에서 진화를 거듭하며 유라시아 대륙으로 퍼져나갔고 점점 인류는 대규모 이동의 역사를 지속하다가 1만년 전부터 인류가 농경을 시작하며 정착 생활을 하게 된 것이라고 주장하고 있다. 더욱이, 흑인종과 백인종은 약 12만년 전에, 백인종과 황인종은 약 6만년 전에 인종적으로 분화됐다는 실험 결과를 제시하고 있으며, 아프리카의 강렬한 태양 광선 속에서 진화한 최초의 인류는 모두 검은 피부색을 가졌고, 아프리카를 벗어난 인류의 집단은 보다 적은 태양 광선을 받으며 생존하기 위해 덜 짙은 피부색으로 바뀌어나갔다는 가능성을 생물학적인 지식 기반으로 조심스럽게 이야기하고 있다. 물론, 일조량이 훨씬 적은 빙하기의 유럽으로 진출한 인류는 백인종의 조상으로, 아시아의 해안가와 내륙으로 진출한 인류 집단은 황인종의 조상으로 각각 선택 진화한 것은 기존의 진화설을 통해서 익히 알 수 있는 내용들이다. 하지만, 여기서 중요한 내용은 우리 인류의 역사를 볼 때, 그 시기가 생각했던 것보다는 그렇게 오래되지는 않았으면서도 다양한 지역과 다양한 인종으로 살아가고 있다는 사실에 그 초점을 맞추어야 한다. 과거 우리 인류는 지속적으로 이동을 하였으며, 그 수의 팽창으로 서로 다른 지역으로 퍼져나가게 되었다는 것이다. 더욱이, 다른 지역과의 교류가 요즘처럼 빈번하지 못했던 그 당시의 상황을 보았을 때 서로 다른 집단 내에서 유전자의 변화는 당연한 결과라고 말할 수 있을 것이다. 그러므로써, 현재 존재하는 지역마다의 독특한 인종과 생활 풍습, 그리고 다양한 유전자의 차이를 볼 수 있게 된 것이다³⁾.

생물학적인 사실을 통해서 인류의 기원을 밝히고자 하는 학문적 성과가 현재 진행되고 있으며 그러한 생물학적인 분석법을 DNA Typing(유전자 분석법)이라고 한다. DNA Typing이란 염기서열 다형성이 높은 DNA의 특정 부위의 변이 양상을

비교, 분석함으로써 각 개인을 구분하고 그들의 유연관계를 조사하는 분석 방법이다. 이전에는 주로 개인 동정(personal identification)에 안면검사, 혈액형 검사, 혈청 검사와 같은 형태학적, 생리학적 특성을 검사하는 방법이 이용되었다. 그러나 형태학적 분석의 경우는 분석 결과의 구분이 모호하다는 단점이 있고 생리학적 분석의 경우는 동일 분석형을 갖는 다수의 개인이 존재할 수 있다는 단점이 있다. 반면 DNA 분석은 수십, 수백 개의 다형성 부위를 동시에 비교, 분석, 통계 처리함으로써 수치화 된 명확한 결과를 산출할 수 있고 수 백 억 분의 일에 이르는 극도의 정확성을 보인다. 이런 장점에 따라 DNA Typing은 친자 확인(parentage identification), 범죄자 확인(criminal identification), 개인 신분 확인(personal identification), 고고학(archeology) 등의 여러 분야에서 그 이용 사례가 급격히 증가하고 있다. 이러한 DNA Typing에 있어서 가장 관심을 끄는 부분은 여러 DNA 중에서도 부계유전과 관련된 Y-염색체상의 DNA 서열과 모계유전과 관련된 미토콘드리아 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)상의 DNA서열이다.

분자생물학적인 연구는 현존하는 인류 집단들 사이의 유전적인 관계를 동정하는데 기여하고 있다. 그러나 인류 집단의 역사는 아직도 정확히 알지 못하는 논쟁거리이다. 과거 민족의 이동과 민족의 융합 등을 알 수 있는 직접적인 방법은 극히 드물다. 또한 현존하는 인류의 유전자를 통해서 확인하는 것에도 과학적인 모호함을 함유하고 있다. 그러므로, 고대 인류 집단의 유전학적 연구에는 과거의 사건을 밝혀내고 인류의 역사를 조사하는 것이 절대적으로 필요하다⁴⁾. 한 예로써, 네안데르탈인의 미토콘드리아(mitochondria) DNA를 분석해본 결과 현존하는 인류의 미토콘드리아 DNA의 염기 서열과 상이하다는 사실을 알게되면서 인류의 아프리카 기원설(Out of Africa)을 뒷받침했다²⁾.

이 논문에서는 조선 시대 세조 이후(1455년)에 조성된 회곽묘에서 출토된 인골을 이용하여 유전자 분석을 수행하였다. 이번에 출토된 인골은 한국문화재보호재단(조사 단장 김 정기)에서 발굴, 조사한 경기도 시흥시에 위치한 목감중학교 부지로 총 7기의 회곽묘가 발굴되었으며, 그 중 5호 회곽묘는 합장된 상태로 발굴되었다.

발굴된 인골들은 500년정도의 세월속에서 많은 부패와 손상으로 3호 인골을 제외하고 모두 토양화의 단계에 접어들어 있었다. 따라서, 이번 인골들의 DNA 상태를 먼저 확인하고, 핵 유전자형과 미토콘드리아 유전자형의 패턴을 확인함으로써, 가까운 거리에 매장된 유구들의 혈연관계를 규명하는데 그 초점을 맞추었다.

II. 본론

본 연구에서는 시흥시 목감중학교 부지에서 출토된 7구의 인골을 이용하여 제반 실험에 사용하였다. 시흥시 목감중학교 부지에서 출토된 인골은 한국문화재보호재단의 협조로 2003년 3월에 얻을 수 있었으며, 예비적인 실험을 통한 DNA 추출 가능성을 확인 후, 본격적인 실험은 2003년 4월부터 8월까지 5개월간 진행되었다. 출토 인골 상태가 육안으로 보아도 토양화 양상을 확인 할 수 있었기에, 실험의 오차를 줄이기 위해서 3회 이상 반복적으로 수행되었다. 또한, 합장묘인 5호 회곽묘는 발굴당시에 인골이 서로 섞인 상태로 발굴 되었기에 이번 유전자 분석 연구에서는 1구의 인골로 인식하고 1편의 인골만을 제반 실험에 사용하였다.

1. 출토 인골의 전처리과정

출토 인골들의 상태를 육안 관찰하여 부패와 손상의 정도가 적을 것으로 예상되는 단단한 뼈 부분을 전기 드릴로 5X2 cm 정도의 크기로 갈아낸 후, 멸균된 D.W(distilled water)로 3회 세척하였다. 세척시 표면의 이물질을 떨어지게 하고 자 vortexing을 수회 수행하였다. 세척된 인골 시료는 무균상자(Clean bench)의 UV(ultra violet)등 아래에서 상하 각각 30분 동안 방치하여 표면 오염원을 제거하였다. 이는 매장당시에 오염되었을 표면 미생물의 제거와 동시에 출토시 또는 운반 보관시 발생할 수 있는 다른 사람에 의한 오염을 사전에 방지하고자 시료 전처리 전

에 수행하였다. 무균상자에 1시간 방치된 인골들은 UV가 꺼진 상태로 12시간 동안 무균 상자 내에서 상온 건조되었다. 건조된 인골들은 50ml 원심 분리 시험관에 넣어져서 멸균 상태를 유지 하였으며, -78°C 냉동고에 장시간 보관하여 DNA의 손상을 최소화하였다.

2. 인골의 탈칼슘화

전처리된 인골 시료들은 다양한 방법으로 탈칼슘화에 응용되었다. 우선 확보된 인골들을 LockLabs(Rocklabs LTD, New Zealand)를 이용하여 5초동안 잘고 고른 분말로 만들어 제반 실험에 이용하였다. 남은 인골 시료는 -78°C 냉동고에 보관하였다. 고른 분말로 만들어진 치아 시료들을 50 ml 원심분리 시험관에 옮겨 놓은 후, 멸균된 0.5M EDTA(pH 8.0)용액 20 ml을 첨가하여 10일이상 상온에서 회전시켰다. 또 다른 방법으로, 전처리된 인골 시료들을 고른 분말로 만들지 않고 그대로 50 ml 원심분리 시험관에 넣은 후, 0.5M EDTA(pH 8.0)용액 20 ml을 첨가하여 10일이상 상온에서 회전시켰다. EDTA용액이 들어간 인골 시료들의 내부에서 칼슘(Ca^{2+})이 빠져나와 인골 시료들은 세포를 포함한 조직만으로 이루어지므로 다음에 수행될 DNA 추출과정에 유용하게 사용됐다. 정기적으로 EDTA용액을 교환 해주어서, 칼슘이 잘 빠져 나오도록 유도했다. 10일정도 탈칼슘화가 진행된 인골 시료들은 다음의 제반 실험들을 위해 멸균 3차 증류수를 이용하여 3회 세척하고 DNA 추출과정에 이용되었다.

3. 출토 인골의 DNA 추출

탈칼슘화가 이루어진 된 인골 시료들은 DNA의 추출 효율을 최대한 높여서 뽑을 수 있게 상품화된 시약(NucleoSpin DNA Trace Kit와 QIAamp DNA mini Kit)을 이용하여 DNA를 시료에서 추출하였다. 추출된 DNA는 1% agarose gel에서

100volt의 전압을 이용하여 전기영동 한 후, EtBr(ethidium bromide)로 염색하여 UV 램프로 DNA의 존재 여부를 확인하였다(Photo 1). 두 시약을 사용하여 확인해본 결과 다량의 DNA가 육안으로 확인이 되었으나, 이렇게 보이는 DNA는 예비실험으로 미생물에 동일하게 존재하는 16S RNA PCR(polymerase chain reaction) 실험 결과, 인골 시료의 부패를 유도한 미생물 DNA로 확인 되었다(Photo 생략). 결국 추출된 DNA에는 다량의 미생물 DNA가 함유되어 있어서 다음 실험 과정의 오차를 높일 가능성이 높은 것으로 판단이 되어, 추출된 DNA를 희석시켜서 다음 제반 실험에 사용하였다.

4. 중합효소 연쇄 반응(PCR; polymerase chain reaction)

추출 DNA는 개인에 따라 다르게 나타나는 연쇄반복서열 부분을 확인하고자 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 원하는 부위를 증폭하였다. 증폭에 이용된 핵 DNA 부위는 짧은 연쇄반복 서열을 가지는 STR(short tandem repeat)좌위를 이용하였다. STR 좌위 중에서도 미국 Perkin Elmer사에서 제품화한 10개의 좌위를 동시에 확인 할 수 있는 Profiler 10과 성별을 구분 할 수 있는 Promega사의 Sex determination (amelogenin) Kit을 이용하여 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 중합효소 연쇄반응에 사용되는 중합효소는 고온에 안정적인 중합효소(Hotstart Taq polymerase, Qiagen)를 사용하였으며, 반복적인 실험의 최상 결과치를 얻고자 각각 다른 cycle 온도를 책정하여 최상의 상태를 얻어냈다. 중합효소 연쇄반응으로 증폭된 산물의 확인을 위하여 2% agarose gel에서 100volt의 전압을 흘려주면서 전기 영동한 후, EtBr로 염색하여 UV등에서 확인하였다. 증폭 산물을 제반 실험에 사용하고자 -20℃에 냉동 보관하였다.

또한 모계유전의 관계를 확인하고자 미토콘드리아 DNA(mtDNA) 염기 서열을 수행하였다. 기존에 추출된 DNA중 5ul를 이용하여 mtDNA 중합효소 연쇄반응을 수행하였는데, 사용되어진 primer sequence로써는 mtDNA 염기 서열 중 다변이

성이 강한 HV1(15971~16410)부위에서 F15989/R16258부위를 사용하여 실험하였다. 증폭조건은 95℃에서 15분, 그리고 94℃에서 20초, 56℃에서 30초, 72℃에서 45초 과정을 32번 반복하는 조건을 잡았으며 마지막으로 72℃에서 7분의 조건을 이용하였다.

5. 전기 영동

다음으로 냉동 보관된 핵 DNA 증폭 산물을 이용하여 성별 유전자 분석(Sex DNA Typing) 실험을 하고자, 6% acrylamide-urea sequencing gel을 이용하여 45watt 1200volt에서 sequencing용 전기영동을 수행하였다. 4% gel보다 6% gel의 분리능이 STRⅢ 좌위를 확인하는데 더욱 우수할 뿐 아니라, gel을 다루는데 있어서도 안전하기에 6% gel을 sequencing용으로 사용하였다. 6% gel은 0.5M TBE(Trisma-base, Boric acid, EDTA혼합 용액)용액을 이용하여 30분 정도 사전 전기영동을 수행하여 gel 상태를 안정화 시켰다. 증폭 산물과 좌위 표시자(loci ladder)들이 서로 결합하여 2중 결합이 이루어지는 것을 방지하기 위해 주입 염색약(loading dye)을 첨가하여 95℃에서 2분 동안 증탕시켜 단일결합으로 변형시켰다. 변형된 증폭 산물과 좌위 표시자들은 바로 -4~0℃로 냉각시켰다. 30분 정도의 시간이 흐른 뒤에 gel 표면의 유리온도가 50℃가 될 때, 주사기로 증폭 산물 시료를 주입할 부분을 0.5M TBE용액으로 세척한 후 증폭 산물 시료를 주입하였다. 주입된 시료가 30cm gel의 2/3부분에 염색약이 내려올 때까지 지속적으로 전기를 gel에 공급해 주었다.

6. Silver 염색

전기 영동이 끝난 후, 전기 영동장치에서 유리판을 제거하여 유리판사이에 들어가 있는 gel을 흐르는 물과 얇은 플라스틱판으로 조심스럽게 gel을 떼어냈다. 떨어

진 gel은 잘 절단되거나 부서지기 쉬우므로 증류수가 들어있는 넓은 유리용기에 담가두었다. 유리용기에 담겨진 gel을 비닐장갑(poly-glove)을 낀 채로 부드럽게 포개놓은 후 증류수를 제거하고, Silver염색법에 따라 염색을 수행하였다. 증폭 산물과 좌위 표시자가 눈으로 확연히 보일 때까지 Silver 염색을 수행하였는데, 최종 염색까지는 1~2분 정도의 시간만 소모되기 때문에 gel이 과염색(over staining)되어 검게 변하지 않게 하기 위하여, 염색을 억제하는데 필요한 10% 아세트산(acetic acid)을 사전에 만들어 놓았다.

Silver 염색법으로 염색된 gel에서 보여지는 밴드들의 위치를 통하여 각각의 인골 시료에서 유전자 분석이 이루어졌음을 확인할 수 있었다. 염색후 미약한 밴드들이 보였으나, 그 밴드들은 증폭시 실수로 된 것이거나, 염색시 과염색된 것으로 인하여 분석에 이용하지 않았다.

7. 미토콘드리아 DNA의 염기 서열 분석

증폭된 산물을 Qiagen PCR purification kit을 이용하여 oligomer를 제거, 순수 정제한 후, BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit(ABI Biosystems)로 반응시켜 ABI Prism 310 DNA Sequencer에 전기영동 시켰고, 염기서열은 Sequence Data Collector로 분석하였다. 분석된 DNA의 forward 및 reverse sequence는 표준 Anderson sequence와 비교하여 mtDNA가 정확한지를 결정하였다.

Ⅲ. 결과 및 토의

고대 출토 인골 시료의 DNA는 일반적으로 손상되고 몇 백개의 핵산으로 쪼개져 있다. 따라서 이러한 출토 인골 시료의 DNA는 분자생물학적 기술인 중합효소 연

쇄반응(PCR)으로 증폭이 되어야만 분석이 가능하다. 하지만, 출토 인골의 DNA에는 알려져 있지 않은 화학물질이 포함되어있어서 중합효소 연쇄반응을 수행할 때에 방해하는 영향력을 행사한다고 알려져 있다⁴⁾.

고대 출토 인골의 유전자 분석은 항상 성공적인 실험 결과를 야기시키지는 않는다. 일반적으로 DNA가 생물, 화학적 환경 조건에 따라 많이 파괴 되어 있으므로, 모든 발표 논문에서는 성공한 경우만을 보고하고 있다⁶⁾. 매장환경의 영향 뿐만 아니라, DNA 추출시에 사용하는 화학물질의 영향도 무시할 수 없기에, 탈칼슘화에 EDTA를 처리하지 않는 것이 중합효소 연쇄반응에 더 효과적이라는 연구도 보고 되고 있다⁹⁾. 아직까지 현대 생명과학적 기술로 분석하는데 상당히 어려움이 있는 고대 출토 인골의 유전자 분석은 점점 기술적으로 발전해가고 있으며, 그 분석법에 있어서도 다양한 상품화에 성공하고 있다.

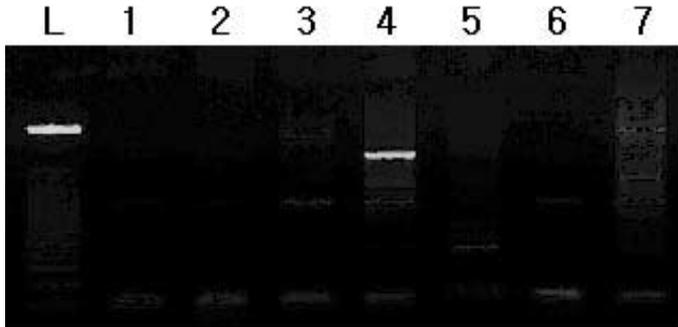
이번 시흥시 목감중학교 부지 출토 인골의 유전자 분석은 고도의 민감도와 DNA 추출량을 높일 수 있는 시약 Kit로 사용하였다. 출토 인골의 상태가 워낙 안 좋았지만, 남아있을 수도 있는 인골 유전자의 존재를 찾고자 DNA 추출을 실시하였다. 하지만, 초기에 뽑힌 DNA는 육안으로 보기에 상당히 많은 양이 포함되어 있는 것을 알 수 있었지만, 미토콘드리아 DNA 중합효소 연쇄반응을 수행해 본 결과, 올바른 반응이 일어나지 않았다(Photo 2). 그래서, 박테리아 DNA의 존재를 알아보기 위해서 16S RNA 중합효소 연쇄반응을 수행해본 결과, 반응이 상당히 많이 일어나는

L 1 2 3 4 5 6 7 4-15-17-1 L



Photo 1.
1차 시도로 뽑은 시흥시 목감중학교 부지 출토 인골 DNA의 전기영동 사진. 양쪽 끝에 DNA Ladder를 놓았고, 인골 시료에서 뽑은 DNA를 차례로 배열하였다. DNA 추출과정에서 4, 5, 7번 시료는 중복되어 뽑았다. 중합효소 연쇄반응(PCR)을 수행해 본 결과 이 DNA들은 모두 박테리아 DNA라는 것이 밝혀졌다.

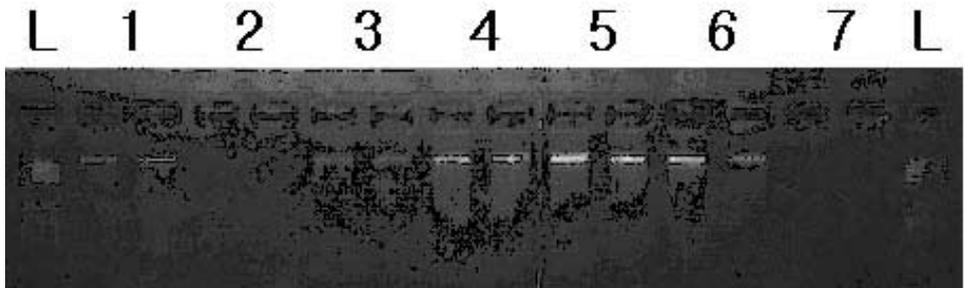
Photo 2.
1차 시도로 뽑은 시흥시
목감중학교 부지 출토 인골
DNA의 미토콘드리아
다형성부위(HV1)의
중합효소 연쇄반응 후
전기 영동 사진. 중합효소 연쇄
반응에 간섭이 심하게 일어나
다양한 패턴으로
반응 산물을 확인 할 수 있다.



것을 확인할 수 있어서, 초기에 뽑힌 DNA는 미생물의 DNA라는 것을 알 수 있었다(결과 생략).

DNA의 추출에 있어서 좀더 효과적이고, 오염이 덜 된 곳에서 뽑고자, 1차 세척된 인골들을 모두 0.5M EDTA에 3~5일동안 처리한 후 얇게 절개한 후, 각 인골에서 오염이 덜 되어 보이는 부분을 400mg 정도씩 2부분을 선택하여 유전자 추출 Kit(QIAamp DNA mini Kit)에 적용시켰다. 추출된 DNA는 상당히 적은 양의 DNA가 추출됨을 확인 할 수 있었고, 특히 2번, 7번 시료에서는 거의 추출 DNA 형태가 보여지지 않았다(Photo 2).

Photo 3.
2차 시도로 뽑은 시흥시
목감중학교 부지 출토 인골
DNA의 전기 영동 사진. 양쪽
끝에 DNA Ladder를 놓았고,
인골의 시료에서 뽑은 DNA를
차례로 배열하였다.
모든 인골 시료는 2부분씩
나누어서 DNA를 추출하였다.



2차 시도로 뽑은 DNA를 이용하여 먼저 성별을 구분하고자 성 결정 중합효소 연쇄반응(Amelogenin PCR)을 실시하고, 6% acrylamide-urea sequencing gel을 이용하여 전기 영동을 수행하였다. 중합효소 연쇄반응 결과 2번과 3번 시료에서만 이 증폭이 이루어졌으며, 그 결과 2번과 3번 모두 여성으로 확인되었다(Photo 4). 나머지 인골 시료들은 성 결정 중합효소 반응이 이루어지지 않았기에 그 성별을 구분하지는 못했다.

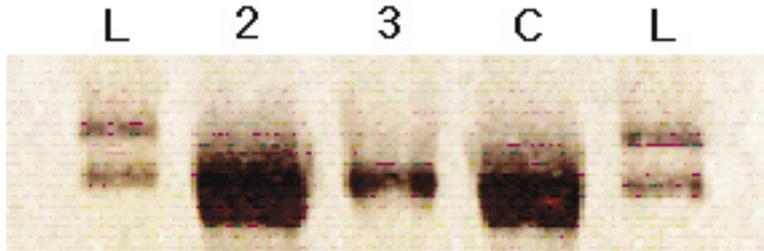


Photo 4.
시흥 목감중학교 부지 출토 인골의 성결정 유전자 중합효소 연쇄반응(amelogenin PCR) 후 6% acrylamide-urea sequencing gel로 전기 영동한 2, 3번 인골 시료가 여성으로 나타남을 알 수 있다.

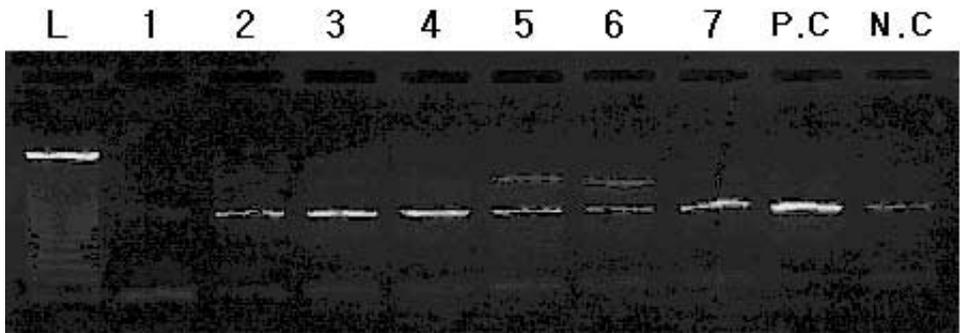
미토콘드리아는 D 루프라는 영역이 존재하는데, 이 영역은 유전정보를 담당하지 않는다. 이런 영역을 과변이 부위(hypervariable region)라고 하는데, 이 영역은 유전 물질을 발현시키지 않기에 이 부분의 염기서열이 변한다 하더라도 유전물질 발현에는 차이가 없다고 볼 수 있다. 고작 16,569 염기, 그리고 37개의 유전자를 갖는 작은 DNA인 mtDNA에는 낭비라는 것이 거의 없다. 유전 정보가 없는 것은 겨우 D루프 영역뿐이고 미토콘드리아 DNA 전체의 93%가 유효하다¹⁾. 하지만, 여러 사람들을 비교 분석해 봤을 때 이 D루프 영역이 서로 다르다는 것을 알 수 있다. 그래서 이러한 차이가 DNA Typing에 이용되는 것이다. 또한 미토콘드리아 DNA는 어머니 쪽에서만 유전되기에, 모계유전을 밝히는데도 중요한 역할을 하고, 쉬운 변위과정이 이루어지기에 민족의 기원 뿐 만 아니라 인류의 기원을 밝히는 중요한 자료로 활용되고 있다.

시흥 목감중학교 부지 출토 인골의 상태가 많이 오염되고, 토양화가 상당히 진척

되어 가기에 핵 유전자형의 동정은 불가능할 것으로 판단하여, 상대적으로 한 세포 속에 많이 존재하는 미토콘드리아 DNA를 이용한 유전자 분석을 수행하였다. 분석 결과 2, 3, 4, 5, 6, 7번의 인골 시료에서 미토콘드리아 DNA가 중합효소 연쇄반응으로 증폭이 이루어졌으며(Photo 5), 그 중에서 5번과 6번은 다른 크기의 DNA도 증폭이 되었기에 염기서열분석에는 사용하지 않았다.

미토콘드리아 DNA 중합효소 연쇄반응으로 나온 증폭 산물(2, 3, 4, 7번 시료)을

Photo 5.
시흥 목감중학교 부지 출토 인골의 미토콘드리아 DNA 중합효소 연쇄반응후 전기영동 사진. 표시 L은 DNA Ladder를 말하고, 인골의 시료에서 뽑은 DNA를 차례로 배열하였으며, 대조군(positive control, negative control)4를 함께 실험하였다. 2, 3, 4, 5, 6, 7번 시료에서 증폭이 이루어졌지만, 5번과 6번 시료는 다른 크기의 DNA도 동시에 증폭되었다.



Qiagen PCR purification kit을 이용하여 oligomer를 제거, 순수 정제한 후, BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit(ABI Biosystems)로 반응시켜 ABI Prism 310 DNA Sequencer에 전기영동 시켰고, 염기서열은 Sequence Data Collector로 분석하였다(Photo 6). 분석된 DNA의 forward 및 reverse sequence는 표준 Anderson sequence와 비교하여 mtDNA가 정확한지를 결정하였다.

시흥 목감중학교 부지 출토 인골의 미토콘드리아 염기서열을 표준 Anderson



Photo 6.
 시흥 목감중학교 부지 출토 인골 2, 3, 4, 7번 시료의 미토콘드리아 DNA 염기 서열 분석. 사용한 primer sequence는 mtDNA 염기 서열 중 다변이성이 강한 HV1 (15971~16410)부위에서 F15989/R16258부위를 사용하였다.

Table 1. 시흥 목감중학교 부지 출토 인골 2, 3, 4, 7번 시료의 미토콘드리아 DNA 염기 서열과 표준 염기서열(Anderson sequence)의 비교 결과

Mitochondria DNA HV I (16021 ~ 16380)	시흥 목감중학교 출토 인골							
	No. 2		No. 3		No. 4		No. 7	
	16078	A→C						
		16162	A→G	16162	A→G	16162	A→G	
		16172	T→C			16172	T→C	

* A : 아데닌(adenine) T : 티민(thymine)
 C : 시토신(cytosine) G : 구아닌(guanine)

sequence와 비교하여 분석한 결과, 시료 2번의 미토콘드리아는 16078번 염기에서 아데닌(adenine; A)이 시토신(cytosine; C)으로 치환되어있었고, 시료 3번, 4번, 7번의 미토콘드리아에서 16162번 염기가 아데닌(adenine; A)이 구아닌(guanine; G)으로 동일하게 치환되어있었다. 또한, 16172번 염기가 시료 3번과 7번에서 티민(thymine; T)이 시토신(cytosine; C)으로 치환되어있었다(Table 1).

이러한 표준 염기서열과 비교해 본 결과, 시료 3번, 4번, 7번의 모계는 유사한 것으로 판단이 되며, 더욱 가깝게는 시료 3번과 7번의 모계 관계가 일치하는 사실을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

이번 시흥 목감중학교 출토 인골의 미토콘드리아 DNA는 양적인 면과 상태가 좋은 편이 아니기에 더 많은 염기의 분석이 어려웠다는 점을 무시할 수 없다. 더욱 정확한 관계 분석을 위해서는 더 많은 염기 서열이 분석이 되어야 하지만, 시흥 목감중학교 출토 인골의 미토콘드리아 염기서열 분석에서는 200염기 이상 분석되는 시료가 적었다는 점이 아쉬움으로 남는다. 하지만, 이런 부분적인 결과만으로도 일치하는 부분이 존재한다는 사실은 고대 출토 인골의 모계관계, 더 나아가서는 민족의 이동과 집단의 형성 관계에 보다 중요한 자료를 제공할 것으로 생각되어지며, 또한 출토 인골의 다양한 복원 과정에서 친족관계의 유사성을 나타낼 수 있는 기본적인 과학적 증빙 자료가 될 것으로 기대한다.

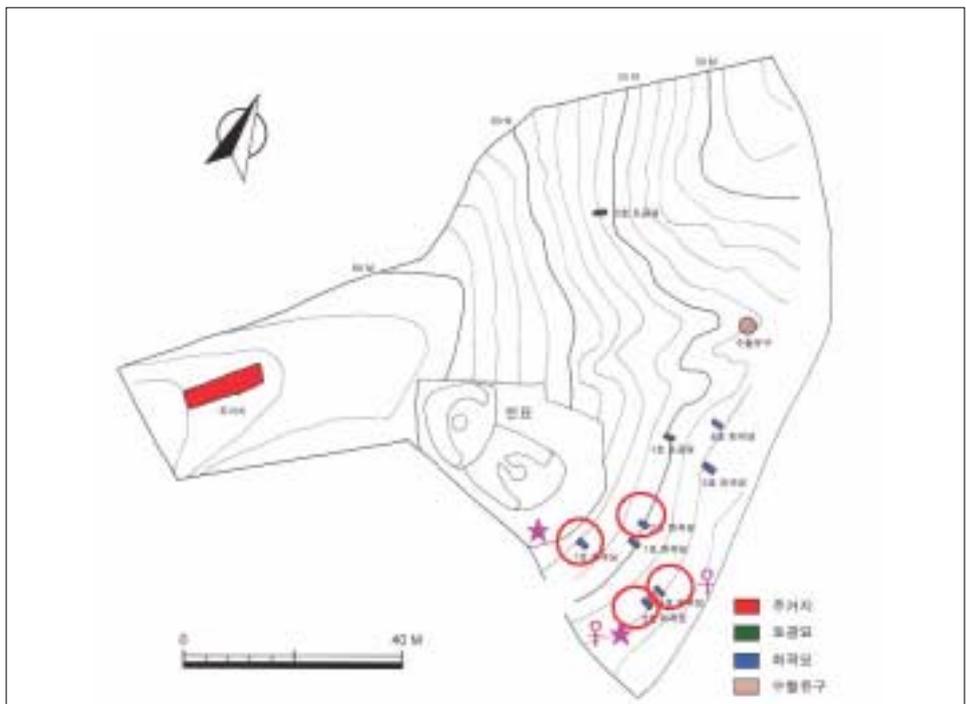


Fig. 1. 시흥 목감중학교 부지 출토 인골의 발굴 지역 및 유전자 분석 결과. 총 7구의 출토 인골 (회곽묘 1호~7호)의 유전자 분석 실험을 통하여 2구의 인골 (2호와 3호)에서 여성의 성별(♀)을 구분할 수 있었다. 또한, 4구(○: 2호, 3호, 4호, 7호)의 인골에서 미토콘드리아 DNA의 분석이 가능하였으며, 그 중 2호 인골을 제외한 나머지 인골의 모계 관계 가능성을 알 수 있었고, 특히 2구(★: 3호와 7호)의 모계 혈연관계 일치도가 더 높게 나타났다.

참고 문헌

1. Anderson S, Bankier AT, Barrell GB, de Bruijn MHL., 1981, Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290: 457
2. Krings, M., A. Stone, R. W. Schmitz, H. Krainitzki, M. Stoneking, and S. Paabo, 1997, Neanderthal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell.*, 90: 19-30.
3. Lee KS, Seo MS, Chung YJ., 2002, Archeological Consideration of DNA Typing, *Annual Review in Cultural Properties Studies*, 35: 120-137.
4. Li Wang, Hiroki Oota, Naruya Saitou, Feng Jin, Takayuki Matsushita, and Shintaroh Ueda, 2000, Genetic structure of a 2,500-year-old human population in China and its spatiotemporal changes. *Mol. Biol. Evol.*, 17(9): 1396-1400.
5. Pfeiffer H., Huhne J., Seitz B., Brinkmann B., 1999, Influence of soil storage and exposure period on DNA recovery from teeth. *Int. J. Legal. Med.*, 112: 142-144.
6. Woodward SR, Weyand NJ, Bunnell M., 1994, DNA sequence from cretaceous period bone fragments. *Science*, 266: 1229-1232.