

혈청(serum)을 이용한 STR분석 사례보고

이지현¹ · 이혜영¹ · 조소희¹
조주연³ · 장인진³ · 이승덕^{1,2}

¹서울대학교 의과대학 법의학교실

²서울대학교 의학연구원 법의학연
구소

³서울대학교 의과대학 약리학교실

접 수 : 2013년 9월 16일
수 정 : 2013년 10월 14일
게재승인 : 2013년 11월 25일

이 논문은 약물유전체센터:약물유해반응
연구센터(800-20130245)와 2012년도 한
국연구재단 바이오·의료기술개발사업
(No. 2012-0009833)의 지원을 받아 수행
되었습니다.

책임저자 : 이승덕
(110-799) 서울시 종로구 연건동 대학로
103번지, 서울대학교 의과대학 법의학교
실
전화 : +82-2-740-8359
FAX : +82-2-764-8340
E-mail : sdlee@snu.ac.kr

DNA Profiling via Short Tandem Repeat Analysis by Using Serum Samples

Ji Hyun Lee¹, Hye Young Lee¹, Sohee Cho¹, Joo Youn Cho³, In Jin Jang³,
Soong Deok Lee^{1,2}

¹Department of Forensic Medicine, ²Institute of Forensic Science, Seoul National University,
College of Medicine, Seoul, Korea

³Department of Pharmacology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

Serum is free of cellular components. Because DNA is located in the nuclei or mitochondria of cells, serum could be assumed DNA free. Few previously published case reports to date have used serum for DNA typing. Here, we report on human genotyping via short tandem repeat (STR) analysis using serum as a sample, and discuss problems involved in the process.

Key Words : Serum, DNA Extraction, STR

서 론

일반적으로 혈청에는 세포가 포함되어 있지 않고 이에 따라 DNA가 존재하지 않는다고 알려져 있지만, DNA typing과 분석이 가능함을 몇몇 논문에서 제기해 왔다. 혈액 응고 과정 중 남아있는 세포 조각(debris)들이 유전자 분석을 하기에 충분한 양을 제공해 준다는 것이다¹⁻⁵⁾. 그러나 아직 혈청에서 DNA typing이 얼마나 가능한지에 대해서는 자료들이 충분하지 않다.

진단 검사와 면역 등 다양한 분야에서 혈청을 대상으로 연구를 하고 있다. 이러한 연구 중 시료가 바뀌었다고 의심을 가지

게 되는 경우나 혈청이 누구의 것인지 다시 한번 확인하는 것이 필요한 상황에서는 혈청만이 시료를 확인하는 유일한 대상일 수 있다. 지금까지 혈청은 DNA가 존재 하지 않거나, 매우 적다는 이유로 DNA typing 또는 분석을 하지 않았다. 하지만 혈청에 존재하는 소량의 DNA로도 친자 확인이나 개인 식별을 위한 유전자 검사가 가능하다면 혈청도 법의학적 DNA source 중 하나가 될 수 있을 것이다.

본 연구에서는 혈청의 유전자를 이용한 개인식별을 진행하여 효과적으로 혈청들을 구분하였다. 이런 과정에서 일상적인 유전자 검사가 가능할 정도로 혈청에서도 DNA를 추출할 수 있었고, 상용화된 PCR(polymerase chain reaction) kit를 사용해 유전자 분석을 시행할 수 있었다. 이를 증례의 형태로 보고

하고자 한다. 본 보고에 대한 사항은 서울대학교 의과대학 및 서울대병원 IRB (institutional review board) 심의 면제 과정을 거쳤다.

증 례

다른 목적으로 혈액과 혈청을 채취하여 연구를 진행하는 과정에서 혈청이 누구의 것인지 재확인 필요하였고, 이를 위해 혈청에서 유전자를 채취하여 개인을 구별하여 보고자 하였다. 혈액과 혈청 각각 13개의 시료가 대상이었다. 시료들은 혈청을 사용하여 원 연구를 진행하는 연구자로부터 열려진 형태로 유전자 검사를 진행하는 연구자들에게 전달되었는데, 개인식별 검사를 시행하는 연구자들은 시료들이 누구에게서 유래하였는지와 관련된 모든 인적 사항에 대해서는 모르는 상태에서 검사가 진행되었다.

혈청에서의 DNA 추출은 QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, LA, USA)를 이용하였다. Kit 제조자가 권하는 방법을 사용하여 혈청 200 μ l에서 DNA를 추출하였고, 정량 분석을 위해 자동화 장비인 NanoDrop (Thermo Fisher, Scientific Inc., Waltham, MA, USA)을 이용하였다. 정량 결과 각 시료에서 추출된 DNA의 농도는 0.9~5.7 ng/ μ l의 분포를 보였고, 평균 3.72 ± 1.08 ng/ μ l의 농도가 나왔다 (Table 1). 혈청의 특성 상 DNA가 깨져서 이러한 농도가 나온 것으로 판단해 최종 농도를 1 ng/ μ l로 희석하는 과정 없이 PCR을 진행하였다. 개인식별을 위한 유전자 검사는 법의학 분야에서도 흔히 사용되는 상업용 kit인 PowerPlex® Fusion kit (Promega Corporation, Madison, WI)를 사용하였다. 이 kit는 상염색체의 24개 STR (Short Tandem Repeats) 유전자위를 검사할 수 있다.

본 건 시료와 같이 유전자 검사를 위해 적은 양만의 유전자

가 사용되는 경우에는 대립유전자 모두가 증폭되지 않거나 각 대립유전자 크기의 변화 등이 흔한 것으로 알려져 있다. 이를 위해 전기영동도 (electropherogram) 상에서 관찰되는 peak의 양성으로의 판단 기준을 다음과 같이 정했다. (1) 양성 peak의 기준은 50 fluorescence unit 이상으로 한다. (2) 주된 peak (major peak)의 20% 이하인 작은 peak은 배제한다. (3) 한 유전자위에 세 개 이상의 peak이 나타날 경우, 제일 높은 두 개의 peak을 선택한다. DNA 추출과 유전자 검사는 한 혈청 당 두 번씩 반복하였다.

본래 개인 식별을 위해서는 각 유전자 peak에 대해 통계적인 분석이 수반되어야 한다. 하지만, 본 실험에서는 확인하여야 하는 시료의 수가 많지 않아 통계적인 접근에 충분하지 않은 것으로 생각하였고, 간단히 일치하는 유전자위의 수를 세는 일반적인 접근으로도 서로의 구분이 가능하였다.

시료의 구분 기준은 다음과 같다. 혈액과 혈청의 결과를 비교 하여 (1) allele drop-in과 drop-out은 고려하지 않는다. (2) locus당 두 개의 peak가 모두 불일치 할 때만 불일치로 판정한다. (3) 두 번의 혈청 분석 결과 모두 세 개 이상의 locus가 불일치 할 경우 배제한다. 위의 구분 기준의 따라 13개의 시료 모두 본인 확인이 가능하였다. 그러나, 절반 이상의 시료에서 allele drop-out과 allele drop-in 현상이 나타났고, 드물게 한 locus에서 drop-out 과 drop-in이 동시에 나타난 경우도 있었다 (Fig. 1).

각 혈청 시료의 drop-out, drop-in 비율은 Table 1에 정리하였다. Table 1의 결과는 각 혈청당 모든 과정을 두 번 반복하여 나온 결과이다. 몇몇 시료의 allele drop-out, drop-in 수를 제외하고는 반복 시료의 큰 차이는 없었다. 시료들은 평균 46.5 ± 3.1 개의 Amplified allele를 나타냈다. 시료의 상태에 따라 차이는 있었지만 약 10.3%의 allele drop-out, 약 8.7%의 allele drop-in을 보였다.

Table 1. The Number of Amplified Allele and the Percentage of Drop-out, Drop-in Ratio

	Mean concentration (ng/ μ l)	The number of peaks	Allele drop-out	Allele drop-in
serum-1	5.65	48, 48	0/48, 0/48 (0%)	0/48, 0/48 (0%)
serum-2	3.9	48, 48	7/48, 3/48 (14.6%, 6.3%)	2/48, 3/48 (4.2%, 6.3%)
serum-3	4.2	46, 48	13/46, 8/48 (28.3%, 16.7%)	12/46, 4/48 (26.1%, 8.3%)
serum-4	3.85	48, 48	1/48, 0/48 (2.1%, 0%)	1/48, 0/48 (2.1%, 0%)
serum-5	3.8	46, 48	1/46, 1/48 (2.2%, 2.1%)	2/46, 2/48 (4.3%, 4.2%)
serum-6	4.15	48, 48	0/48, 0/48 (0%)	1/48, 0/48 (2.1%, 0%)
serum-7	3.5	44, 48	4/44, 2/48 (9.1%, 4.2%)	6/44, 3/48 (13.6%, 6.3%)
serum-8	8.1	48, 48	4/48, 0/48 (8.3%, 0%)	3/48, 0/48 (6.3%, 0%)
serum-9	2.2	48, 48	3/48, 0/48 (6.3%, 0%)	0/48, 0/48 (0%)
serum-10	3.15	48, 48	3/48, 3/48 (6.3%, 6.3%)	6/48, 2/48 (12.5%, 4.2%)
serum-11	3.9	36, 42	13/36, 11/42 (36.1%, 26.2%)	8/36, 7/42 (22.2%, 16.7%)
serum-12	2.1	42, 48	9/42, 7/48 (21.4%, 14.6%)	6/42, 6/48 (14.3%, 12.5%)
serum-13	3.9	40, 48	13/40, 18/48 (32.5%, 37.5%)	11/40, 20/48 (27.5%, 41.7%)

The percentage of drop-out, drop-in peaks was determined by dividing the number of peaks by the total number of real peaks. This table is represents the results of repeated experiments.

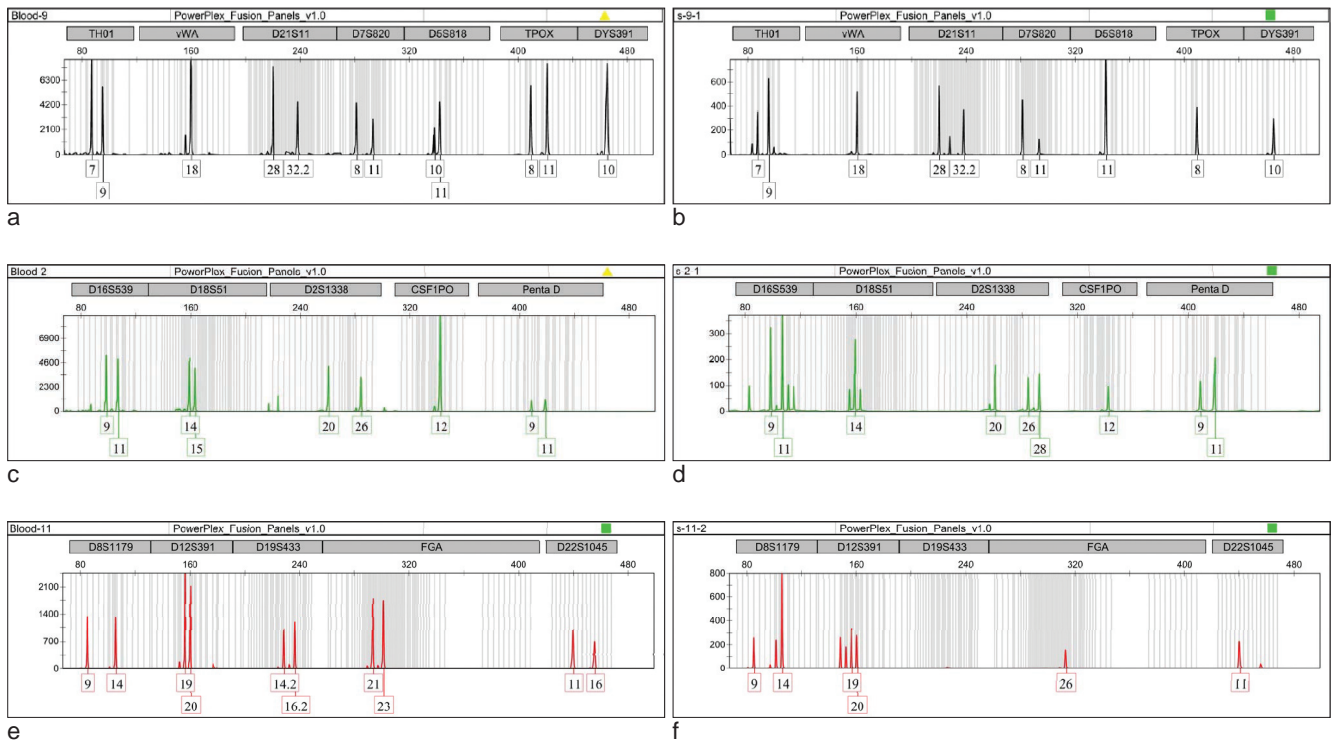


Fig. 1. The former electropherogram (a, c, e) obtained from blood, and the latter (b, d, f) obtained from serum. (b) indicates allele drop-out of the serum's 11 allele at locus TPOX and 10 allele at locus D5S818. (d) indicates allele drop-in of the serum's 28 allele at locus D2S1338 and allele drop-out of the serum's 15 allele at locus D18S51. (f) indicates drop-in of the serum's 26 allele and drop-out of the 21, 23 allele at locus D22S1045. Also indicates unamplified at locus D19S433.

고찰

본 사례에서는 혈청 샘플과 혈액 샘플을 열린 상태에서 제공 받아 실험을 수행하였기에 샘플의 채취과정이나 혈청의 분리 과정에 대해 세부적인 실험을 진행하지는 못하였다. 그러나 검사 결과들을 종합하여 보았을 때 혈청의 DNA로도 유전자 분석이 가능하고 개인 식별이 가능함을 확인하였다.

혈청에서의 DNA 추출은 원래 세균이나 바이러스의 염기 서열의 검출에서 처음 사용되었지만, 산모의 혈청에서 태아 DNA의 존재를 발견한 이후로 세포 조각 또는 혈액의 흐름에 의해 DNA가 용해되어 혈청에서도 DNA의 추출이 가능하다고 알려져 있다. 하지만 아직 혈청내의 DNA 양과 질이 법과학적인 개인 식별을 수행하기에 적합한지는 명확하지 않다⁶⁻⁸⁾.

본 사례의 혈청에서는 일반적인 LCN(low copy number) DNA의 특성인 allele drop-out, drop-in 현상이 나타났다⁹⁾. 이러한 특징들이 DNA의 양과 관련한 문제인지, 체내 손상과 저하(degradation)의 문제인지는 지금으로써는 명확하게 알 수 없다. 추후 다른 연구를 통해 밝혀질 것으로 기대한다. 혈청에서의 DNA 추출이 가능하고 추출된 DNA를 이용한 STR분석이 개인 식별을 할 수 있을 만큼 가능하였다는 것으로 본 사

례의 의미가 있다고 하겠다.

참고문헌

1. Takayama T, Yamada S, Watanabe Y, et al. Origin of DNA in human serum and usefulness of serum as a material for DNA typing. *Leg Med (Tokyo)* 2001;3:109-13.
2. Lo YM, Tein MSC, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998;62:768-75.
3. Honda H, Miharu N, Ohashi Y, et al. Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. *Hum Genet* 2002;110:75-9.
4. Bischoff FZ, Sinacori MK, Dang DD, et al. Cell-free fetal DNA and intact fetal cells in maternal blood circulation: implications for first and second trimester non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update* 2002;8:493-500.
5. Allen RW, Pritchard JK. Resolution of a serum sample mix-up through the use of short tandem repeat DNA typing. *Transfusion* 2004;44:1750-4.
6. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*

- 1997;350(9076):485-7.
7. Ravard-Goulvestre C, Crainic K, Guillon F, et al. Successful extraction of human genomic DNA from serum and its application to forensic identification. *J Forensic Sci* 2004; 49:60-3.
 8. Emanuel SL, Pestka S. Amplification of specific gene products from human serum. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 1993;10:144-6.
 9. J.M. Butler. *Fundamentals of forensic DNA typing*. Access Online via Elsevier; 2009. p. 330-39