

개선된 아밀로제닌 PCR을 이용한 우즈베키스탄 출토 고인골의 형태학적 성별과 유전자형 성별의 비교

김기정^{1,2}, 아리오나 톡림^{1,2}, 전은희^{1,2}, 이민수¹, 조연옥¹, 가와치멘 르학와수렝¹,
민나영³, 최지혜³, 김종대⁴, 김근철⁵, 김재현⁶, 노맹석⁷, 박기원⁸, 박애자⁹, 유권종^{1,10},
사마르딘 무스타포콜로프¹¹, 이광호^{1,3}, 정상인², 이원복¹², 김경용^{1,12}

¹중앙대학교 대학원 문화과학학과, ²의과대학 미생물학교실

³자연과학대학 생명과학과, ⁴문과대학 민속학과

⁵강원대학교 자연과학대학 생명과학부, ⁶동아대학교 인문과학대학 고고미술사학과

⁷부경대학교 자연과학대학 수리과학부, ⁸국립과학수사연구소

⁹중앙대학교 의과대학 진단검사의학과, ¹⁰문과대학 철학과

¹¹우즈베키스탄 국립과학원 ¹²중앙대학교 의과대학 해부학교실

간추림 : 체질인류학, 고고학, 법의학 등의 분야에서 사람의 뼈에서 남성과 여성을 구별하는 것은 매우 중요하다. 본 연구에서는 고인골 머리뼈에서 측정하는 방법에 근거를 둔 형태학적 성별의 판단법과 기존의 amelogenin PCR 증폭방법을 더욱 개량한 유전학적 성별 결정법을 비교하고자 하였다.

재료는 우즈베키스탄에서 출토된 청동기시대부터 20세기 이전에 이르는 고인골 중 머리뼈가 보존된 60예를 대상으로 하였다. 형태학적 성별구분은 우즈베키스탄 학자의 결정을 따랐고, 유전학적 성별결정은 본 연구에서 개선한 amelogenin PCR 증폭방법을 사용하였다.

본 연구에서 형태학적 남자에서 유전학적으로 남자로 판명된 경우는 20예 중 13예였다. 형태학적 여자에서 유전학적으로 여자로 판명된 경우는 40예 중 20예였다.

결론적으로 개선된 아밀로제닌 PCR 증폭방법을 이용한 고인골 남녀 성별 판별법은 매우 유용할 것으로 생각된다.

찾아보기 낱말 : 고인골, 성별구분, 아멜로제닌 PCR, 형질 성별, 유전 성별

서 론

체질인류학을 비롯한 고고학이나 법의학에서 사람의 뼈에서 남성과 여성을 구별하는 것은 매우 중요하다. 골반이나 머리뼈의 형태나 측측을 통한 비

교가 성별을 구분하는 중요한 방법으로 여겨지고 있고, 뼈에서 나타나는 다양한 요소들의 길이를 측정하는 것이 알려져 있다. 또한 인구집단들마다 이러한 측정치들에 차이가 있는 것이 알려져 있다 (King 등 1998, Stojanowski와 Seidemann 1999, Alunni-Perret 등 2003). 비록 다양한 사람의 뼈에 남성과 여성의 독특한 성적 특징이 많이 남아 있지만 (Giles 1963, Steele 1976, İşcan와 Miller-Shaivitz 1984, İşcan 1998), 많은 연구자들은 골반이 성을 결정하는데 가장 도움이 되는 뼈라고 보고되고 있다

*본 연구는 문화재청 국립문화재연구소의 지원을 받아 문화재 보존기술연구개발(R & D)사업의 일환으로 이루어졌다. 이 논문은 2007년도 중앙대학교 우수연구자연구비 지원에 의한 것이다.
교신저자: 김경용(중앙대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편: skull@cau.ac.kr

(Stewart 1954, Phenice 1969, Oberlaker와 Volk 2002).

1980년대에 분자생물학의 기법이 발달하면서 죽은 생명체의 잔재물에서 유전물질의 분석이 가능해졌다. 따라서 체질인류학자들을 포함하는 많은 분야에서 고대 생명체의 잔재물로부터 유전정보를 획득하고자 하는 시도들이 끊임없이 진행되고 있다 (Kaestle과 Horsburgh 2002).

고인골 DNA는 뼈에서 성공적으로 분리되며 역사 속의 궁금증을 해결하는데 큰 도움을 준다 (O'Rourke 등 2000). 그러나 고인골에서 분리된 DNA는 유전물질의 양이 적고, 심하게 분해가 되어 있어서 (Pääbo 1990, Lindahl 1993), 유전정보의 분석은 발굴과 연구과정 중 일어난 현대인의 DNA의 유입으로 인해 오염될 소지가 매우 높다. 현대인의 DNA가 고대유전자에 오염되면 PCR (polymerase chain reaction) 증폭과정에서 현대인의 DNA와 경쟁하여 잘못된 결과를 도출할 수 있다. 법의학자들은 종종 제한된 양의 분해된 DNA를 처리하지만 (Alonso 등 2001), 오염된 DNA에 대한 PCR의 민감성에 대해 유의해야 하며, 고대 DNA를 연구하는 학자들이 적용하는 주의사항들을 따라야 한다 (Bar 등 2000, Car-

PELLI 등 2003, Alonso 등 2004).

고고학적으로 사람의 잔재물에서 성별을 결정하는 측정법은 온전한 뼈 외에도 파손 등으로 인해 불완전한 재료를 바탕으로 성별을 결정해야 했다. 하지만 X 염색체 및 Y 염색체에 6개의 염기쌍 수에 차이가 나는 아밀로제닌 (amelogenin) 을 PCR에 이용하면서부터 고인골의 성별결정은 더욱 분명하게 되었다 (Faerman 등 1995, Stone 등 1996).

본 연구에서는 고인골 머리뼈에서 나타나는 특징을 계측하는 방법에 근거를 둔 형태학적 성별의 결정법과 기존의 아밀로제닌 PCR 증폭방법을 더욱 개량한 유전학적 성별 결정법을 비교하여 그 결과를 발표하고자 한다.

재료 및 방법

1. 머리뼈의 형질분석

연구는 우즈베키스탄에서 출토된 청동기시대부터 20세기 이전에 이르는 고인골 중 머리뼈가 보존된 것을 대상으로 하였다 (Table 1). 표현형의 성별은 우즈베키스탄 학자의 고인골 성별결정을 존중하였으며, 계측길이를 인용할 수 없었다. 머리뼈의 계측점은 Martin과 Saller (1959)과 Howell (1989)의 것을 참조하였으며 (Table 2), 대표적인 지수 (index)도 비교하여 남녀성별을 결정하였다 (Table 3).

2. 고인골의 처리

재료는 우즈베키스탄에서 출토된 고인골에서 머리뼈에서 채취한 치아를 대상으로 하였다. PrePCR room에서 약 3g 정도의 뼈조각을 2~4개로 조각내어 대조군을 제외한 실험군은 고온습윤멸균한 (121°C, 15분) 사포로 뼈 표면을 1~2 mm 깎아 내었다. 이후의 과정은 다시 고압습윤멸균한 3차 증류수 30ml로 각 3회 세척하였다. 뼈조각들은 차하염소 산나트륨 (5.4%, w/v)에 30분 처리하고, 청정실 (Clean room)로 반입하였다. 청정실에서 다시 세척한 후, UV 소독기 (254 nm)에서 12시간 소독 후 뼈조각을 뒤집어 다시 12시간 소독하였다. 시료가 들어 있는

Table 1. Materials under study

Locations of excavation in Uzbekistan	No. of cases
Andijan	4
K-Sufan	10
Andij.vodoh.reka Kurshay	1
Pap	1
Djarkutan	2
Dashti-Kozi	3
Sarazm	1
Bustan	1
Stariy Termez	2
Drarkutan	2
Parhai	1
Soh oasis, Fergana	1
Sohskaya oasis, Fergana, east Uzbekistan	3
Kulagaytepa, Napay region.Samarkand	3
Pastdargom, Samarkand region	1
Kulsuyuksoi, Djizak	3
Kaltepa, Djizak	3
Shoxruhiya	1
Hozrati-imam mousoleum, Buhara	16
ChorBakir, Buhara	1

Table 2. Items of the craniometrical traits under study used in this study

Broad anatomical location	Description variable	No of Martin & Saller (1959)	Code from Howell (1989)
Vault	Maximum cranial length (g-op)	1	GOL
	Maximum cranial breadth (eu-eu)	8	XCB
	Frontal chord (n-br)	29	FRC
	Parietal chord (br-l)	30	PAC
	Min. frontal breadth (btw frontotemporalia)	9	—
	Total cranial height (ba-br)	17	BBH
Base	Foramen magnum length (ba-op)	7	FOL
	Foramen magnum breadth (perpendicular to FOL)	16	FOB
	Bizygomatic breadth (zy-zy)	45	ZYB
	Total facial length (ba-na)	5	BNL
	Lower facial length (ba-pr)	40	BPL
Face	Upper facial height (na-pr)	48	NPH
	Interorbital breadth (dac-dac)	49a	DKB
	Maxillo-alveolar breadth (ect-ect)	61	MAB
	Orbital height (btw inferior and superior margins)	52	OBH
	Nasal height (nasion to lowest point of nasal roof)	55	NLH
	Nasal breadth (al-al)	54	NLB

Table 3. Craniometric indexes under study

Cranial length breadth index
Cranial length height index
Cranial breadth height index
K facial index
K upper facial index
V facial index
V upper facial index
Orbital index
Nasal index

시험관들을 액체 질소에 10분간 담근 후 Mixer Mill MM301 시료파쇄기 (Retsch, Germany)를 이용하여 고운 분말을 얻었다.

3. DNA 추출과 정제

핵산 추출 방법으로 ion-exchange column kit (Qia-gen G-tip 20G, USA)를 이용하였다. QIAquick® spin column과 ion-exchange column을 이용한 핵산 추출 과정은 다음과 같다. 인골의 칼슘을 제거하기 위하여 3g의 뼈분말을 멸균 50mL 폴리프로필렌 시험관에 옮기고 pH 8.0, 40mL 0.5 M EDTA를 가하였다. 시험관을 24시간동안 느린 속도로 회전시키며 실온

에 방치하였다. 시료를 2,000×g에서 15분 원심분리하고 상청액을 제거하였다. 이와 같은 탈칼슘과정을 3회 반복하였다. 칼슘이 제거된 시료에 15 mL의 DNA 용출 완충액 (20 mM EDTA pH 8.0, 50 mM Tris HCl pH 8.0, 1% sodium dodecyl sulfate, 0.1 M NaCl, 0.5 mg/mL proteinase K)을 가하고 55°C에서 12시간 느린 속도로 진탕하며 방치하였다. 동량의 페놀 클로로포름 이소아밀알코올 (25:24:1, v/v/v)을 첨가하고 섞은 후 원심분리하여 상청액을 모았고 상청액에 동량의 클로로포름 이소아밀알코올 (24:1, v/v)을 가하고 섞은 후 원심분리하여 상청액을 모았다.

상청액을 Amicon® Ultra PL-30 filters (Millipore, USA)을 이용하여 400 µL로 농축하였다. 농축액 절반 (200 µL)은 QIAquick® spin column을 이용하여 제조사 제공 방법에 따라 DNA 정제를 시행하였으나 마지막 DNA 회수는 100 µL의 EB 완충액을 이용하였다. 나머지 절반의 농축액은 Qiagen G-tip 20 G 컬럼을 이용하여 제조사 제공 방법을 조금 변경하여 정제하였다. 간단히 말하자면, 200 µL 농축액에 6 mL QBT 완충액을 섞고 이 완충액으로 평형화시킨 위 컬럼에 중력을 이용하여 통과시켰다. 컬럼을 15 mL QC 완충액으로 세척한 다음 6 mL QF 완충액

Table 4. Primers used for the amplification of amelogenin

Target	Primer name	Sequence (5' → 3')	Product (bp)
Amelogenin	F_amel	GGGCACCCTGGTTATATCAAC	201 ¹ , 195 ²
	R_amel	AGGCCAACCATCAGAGCTT	
Amelogenin (nested)	F_amXY	GGTTATATCAACTTCAGCTATGAG	190 ³ , 92 ¹
	F_amY	GGATTCTTCATCCCAAATAAAGT	
	R_amXY	GCCAACCATCAGAGCTTAAAC	

¹Male only, ²Female only, ³Both male and female

으로 DNA를 용출시켰다. 용출액을 Amicon® Ultra PL-30 filters를 이용하여 세척과 농축을 시행하였다.

4. PCR

고인골에서 single copy인 아멜로제닌의 PCR은 적은 양, 절편화, 오염 등의 문제로 매우 어렵다. 본 연구자들은 multiplex PCR의 방법을 이용하여 남성 고인골인 경우 두 개의 밴드가 나타나도록 제작한 새로운 아멜로제닌 프라이머 (primer)를 제작하였다 (Table 4). 또한 고인골에서 성공적인 PCR 조건을 찾아냈다. PCR은 GeneAmp® 9700 (Applied Biosystems, USA) 장치를 사용하였고 반응 부피는 20 µL 이었다. 1 × AmpliTaq Gold® 완충액 (Applied Biosystems, USA), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 1 M, 0.8 u AmpliTaq® Gold 중합효소, 0.625 mg/mL BSA 와 멸균 증류수를 사용하였다. 검체 DNA 는 4 µL 양을 실험에 이용하였다. 증폭주기조건은 95°C에서 10분간 1 주기, 95°C 30초, 60°C 30초, 72°C 1분의 40 주기, 72°C에서 7분의 1주기로 구성하였다. PCR 증폭산물 확인은 반응물 5 µL를 브롬산 에티디움에 포함된 1.5% 아가로스 젤을 이용한 전기영동 분석법에 의하여 이루어졌다.

5. DNA 염기서열 분석

Amelogenin 증폭산물의 염기서열을 확인하기 위해 증폭산물을 AccuPrep® PCR Purification Kit (Bio-ner, Korea)를 이용하여 정제하였고 Big Dye terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Korea)와 ABI PRISMs 3700 DNA (USA) 분석기를 이용하여 염기서열을 결정하였다.

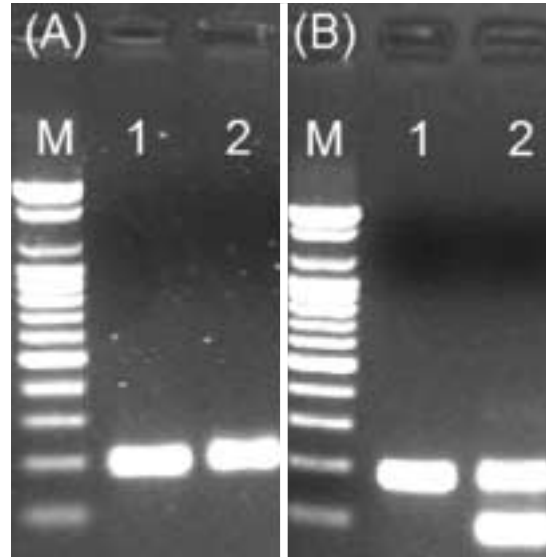


Fig. 1. (A) Agarose gel electrophoresis analysis of PCR products targeting amelogenin DNA fragment (201 bp) and (B) the nested duplex PCR products from ancient DNAs extracted by using silica plus ion-exchange column method. Lanes 1 identified the sample 1 as female showing a sex-common product (190 bp). Lane 2 identified the sample 2 as male showing an additional lower size male marker product (92 bp) as well as a sex-common product. Lane M, 100-bp size.

결 과

1. 아멜로제닌에 의한 성별 결정

아멜로제닌 DNA의 증폭은 기존에 알려진 방법에 의해 시행한 결과 전기영동상에서 염기쌍 수의 차이에 의한 크기를 근거로, PCR에 의해서는 남녀의

Table 5. Phenotype sex and genotype sex

Sample	Phenotype sex	Genotype sex	Match	Sample	Phenotype sex	Genotype sex	Match
1	M	F	-	31	F	F	+
2	M	F	-	32	F	F	+
3	M	F	-	33	M	M	+
4	F	F	+	34	M	M	+
5	M	F	-	35	M	M	+
6	M	F	-	36	M	M	+
7	M	F	-	37	F	F	+
8	F	F	+	38	M	M	+
9	M	F	-	39	F	F	+
10	M	F	-	40	M	F	-
11	F	F	+	41	M	M	+
12	F	F	+	42	F	M	-
13	F	F	+	43	M	M	+
14	M	F	-	44	F	F	+
15	M	F	-	45	F	M	-
16	F	M	-	46	F	F	+
17	M	F	-	47	M	M	+
18	F	F	+	48	M	M	+
19	F	F	+	49	F	F	+
20	M	F	-	50	F	F	+
21	M	F	-	51	F	F	+
22	M	F	-	52	M	F	-
23	F	F	+	53	M	M	+
24	M	F	-	54	F	F	+
25	F	F	+	55	M	M	+
26	M	M	+	56	M	M	+
27	M	M	-	57	F	M	-
28	M	M	-	58	F	M	-
29	F	F	-	59	F	M	-
30	M	M	-	60	F	F	+

+: match, - : mismatch

구분이 어려웠다 (Fig. 1A). 이는 남성에서의 아멜로제닌이 여성의 아멜로제닌보다 6개의 염기쌍이 더 많다는 것을 근거로 한 것으로 전기영동상에서 육안적으로 뚜렷한 구분은 어려웠다.

이러한 한계점을 극복하고자 1차 PCR 산물을 가지고 nested duplex PCR을 시행한 결과 남녀의 뚜렷한 성별을 결정할 수 있었다. 전기영동도에서 알 수 있듯이 여성에서는 단지 한 개의 190개의 염기쌍을 가진 PCR 증폭산물만 관찰되었다. 그러나 남성에서는 한 개의 190개의 염기쌍을 가진 PCR 증폭산물 외에도 92개의 염기쌍을 가진 증폭산물이 관찰되었다 (Fig. 1B). 이는 의도적으로 여성에서는 190개의 염기쌍 하나만이 증폭되도록 하였고, 그리고 남성에서는 이 외에도 92개의 염기쌍이 하나 더 증폭되

록 고안한 결과로서, 이 방법에 의해 남녀의 성별구분을 뚜렷이 할 수 있었다.

2. 고인골의 표현형 성과 유전자형 성

고인골의 머리뼈에서 형태학적 성별과 유전자형 성을 비교하여 정리하였다 (Table 5). 유전자형 성이 옳다는 가정하에 여성은 모두 40예가 있고 남성은 모두 20예가 있다. 그러나 형태학적 성별을 보면 남성은 33예이고 여성은 27예가 있다.

3. 유전자형 성별과 형태학적 성별 비교

아멜로제닌 PCR에 의한 성별이 옳다는 가정하에 형태학적 성별의 일치도를 보면 남성을 남성으로

Table 6. Discrimination Rate between phenotype sex with genotype sex

	Rate (%)
Male match	65
Female match	50
Male mismatch for female	35
Female mismatch for male	50

확인할 수 있는 일치도는 65%이었다. 또한 여성을 여성으로 확인할 수 있는 일치도는 50%였다. 남성을 여성으로 확인한 것은 35%였으며 여성을 남성으로 확인한 것은 50%였다(Table 6).

고 찰

인류학에 있어서 체질인류학적 관찰에 의해 성별을 판정하는 방법은 기본적으로 숙달과정을 요구한다. 사람의 관찰을 통해 남성인가, 여성인가를 판단하는 것은 사실상 통계나 기준에 의한 수치로 나누어진 것은 없고 단지 막연하게 크다↔작다, 발달되었다↔발달되지 못했다, 또는 각이 벌어졌다↔각이 좁다라는 식의 막연한 표현에 의존한다. 이외에도 인종차이에 의한 여러 유형과 개인 및 지역, 환경에 의한 개인차이가 크게 작용하고 있다. 예를 들면 아시아인을 주로 연구한 사람의 경우는 서양인을 판정할 경우 대부분을 남성으로 판정할 수 있으며 반대로 서양인을 주로 판정한 사람은 아시아인 인골 대부분을 여성으로 판정할 수 있는 경우를 보아도 알 수 있다(Howell 1989).

간략하게 소개하면 머리뼈는 눈썹활과 꼭지돌기, 바깥뒤통수뼈용기 부위가 주된 판정의 포인트로 이들 부위가 발달한 것, 또는 용기되어 있는 것이 남성이다. 볼기뼈는 큰궁동패임과 두덩밀각의 각이 작은 것이 남성이다. 그 외에 넓다리뼈의 거친선과 정강뼈의 가자미근선, 위팔뼈의 세모근거친면 발달 유무에 따라 남성과 여성을 구분한다. 그러나 그 어느 것도 하나의 측정치만으로 판정하기는 어렵고 대개 남아있는 모든 측정치를 관찰하여 성별을 판정한다.

본 연구자들은 우즈베키스탄에서 발굴한 고인골에서 뼈 표본을 채취하면서 우즈베키스탄 학자로부터

남녀 성별을 기록한 자료를 받았으나, 계측치수에 관한 자료는 구할 수 없었다. 다양한 연구를 위하여 먼저 남녀 성별을 정확히 구분할 필요가 있어 기존의 아멜로제닌 DNA를 PCR 증폭하여 성별을 결정하는 방법 (Faerman 등 1995, Stone 등 1996))을 선택하였다. 그러나 이 방법 또한 앞서 언급한 바와 같이 남녀성별을 정확하게 구분할 수 없는 약점을 가지고 있어 개선된 새로운 방법이 필요했다.

고인골에서 DNA 연구를 할 때에는 많은 제한점이 있다. 살아있는 조직과 달리 수백 또는 수천년이 지난 고인골에 남아있는 극소량의 DNA를 효율적으로 추출하기는 쉽지 않으며 상당수의 고인골들은 보존상태가 좋지 않다. 보존 상태가 좋지 않은 고인골의 경우 DNA의 순수정제가 더욱 쉽지 않으며, 이들 DNA에는 흔히 PCR 증폭을 억제하는 물질들이 다량 함유되어 있다. 이 고인골 시료들은 일반적인 분자생물학적 기법으로 세포 DNA 분리방법인 페놀-클로로포름 DNA 추출법과 에탄올 농축시 세포 유래 DNA와 달리 육안으로도 쉽게 확인가능할 정도로 짙은 갈색을 띠어 PCR 억제물질들이 다량 함유되어 있음을 시사하는 시료들이다. 이는 토양에 다량 존재하는 휴민산(humic acid) 및 풀브산(pulvic acid)에 의해 오염된 DNA 추출물 역시 짙은 갈색을 띠는 것과 유사하다.

기존의 기법으로 고인골에서 추출된 DNA 시료로부터 PCR 증폭이 어려웠다. 따라서 이 연구에서는 고인골 순수 DNA 추출에 효율이 좋은 것으로 보고된 Qiaquick® 컬럼(Yang 등 1998)을 이용하였다. 더불어 이온교환수지를 이용한 고인골 DNA 추출법을 새로이 시도하였다.

아멜로제닌 PCR 증폭결과 여성으로 확인된 일부의 시료들은 미발표한 자료 중 M175 Y SNP 표지 PCR 증폭산물이 미약하게 존재하였다. 이 시료들은 Qiaquick® 컬럼을 이용하여 추출한 DNA도 유사한 결과를 나타내었다. 이 시료들에서 남성성별표지의 증폭산물이 약하게 생성된 것은 남성이 아니지만 이 PCR에 이용된 프라이머와 유사한 염기서열을 가지고 있어 증폭효율은 낮지만 생산물이 형성된 것으로 생각된다. 따라서 성별결정에 있어 이 프라이머들은 정확도가 떨어지는 것으로 생각된다. 실험

실에서 얻은 지금까지의 결과는 남성 성별 결정 PCR에서 강한 증폭산물을 생산한 시료들은 모두 M175 Y SNP 표지 PCR이 성공적이었음을 이를 지지하는 소견이다.

뿐만 아니라 고인골의 성별을 결정하는데 있어 남성에서만 증폭되는 산물을 검출하고자 고인된 위와 같은 프라이머는 시료의 PCR 억제물질이 효과적으로 제거되지 않은 경우 남성임에도 불구하고 증폭산물의 생산이 매우 미약하거나 없을 수 있다. 이러한 경우에 고인골의 시료상 문제로 인한 PCR 실패인지 시료가 여성이기 때문에 증폭산물이 생성되지 않았는지 판정하기가 어려운 점이 있다. 따라서 우선 일차적으로 남성과 여성에서 모두 증폭되는 산물을 이용하여 성별을 구별할 수 있는 전략이 더 적합한 것으로 생각된다.

본 연구에서 형태학적 남자에서 유전학적으로 남자로 판명된 경우는 20예 중 13예였다. 또한 형태학적 판별로 판단한 여자에서 유전학적으로 여자로 판명된 경우는 40예 중 20예였다. 반대로 이외에는 남자를 여자, 여자를 남자로 판단한 예가 27예였다.

형태학적 남녀구분의 신뢰도가 떨어지는 이유는 연구자가 고인골 계측에 있어서 충분한 훈련을 받지 못하였거나, 경험이 부족하다거나 계측장비의 부실을 들 수 있다. 이외에도 고인골의 보존상태에 그 이유를 들 수 있다. 대부분은 땅속에 매장되어 있는 상태라 머리뼈의 변형이 있을 수 있고, 부분적으로 파손되어 정확한 계측을 수행할 수 없는 경우도 있을 것이다.

결론적으로 이 연구에서는 개선된 amelogenin PCR 증폭방법을 이용한 고인골 남녀 성별을 결정하는 것은 매우 유용할 것이며, 외국 고인골 자료 중에는 남녀의 성별만 기록되어 있고 그 근거자료가 미약한 경우에 도움이 될 것으로 생각된다. 특히 한국에서 뼈의 보존상태가 좋지 못한 경우 남녀의 구분이 매우 어려운 상황이 많아 새로이 개발된 이 방법을 이용하면 고인골 성별판정에 크게 보탬이 되리라 생각한다. 우리는 이 연구에서 개발된 방법이 인류학, 고고학 및 범죄수사학 분야에서 특히 잘 보존되지 않은 고인골 시료의 유전학적 연구에 유

용하게 쓰일 수 있을 것으로 기대한다.

참 고 문 헌

- Alonso A, Andelinovic S, Martin P, Sutlovic D, Erceg I, Huffine E, de Simon LF, Albarran C, Definis-Gojanovic M, Fernandez-Rodriguez A, Garcia P, Drmic I, Rezic B, Kuret S, Sancho M, Primorac D : DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples. *Croatian Med J* 42: 260-266, 2001.
- Alonso A, Martin P, Albarran C, Garcia P, Garcia O, de Simon LF, Garcia-Hirschfeld J, Sancho M, de la Rua C, Fernandez-Piqueras J : Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. *Forensic Sci Int* 139: 141-149, 2004.
- Alunni-Perret V, Staccini P, Quatrehomme G : Reexamination of a measurement for sexual determination using the supero-inferior femoral neck diameter in a modern European population. *J Forensic Sci* 48: 517-520, 2003.
- Bar W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Holland M, Lincoln PJ, Mayr W, Morling N, Olaisen B, Schneider PM, Tully G, Wilson M : Guidelines for mitochondrial DNA typing. *Vox Sanguinis* 79: 121-125, 2000.
- Capelli C, Tschentscher F, Pascali VL : Ancient protocols for the crime scene? Similarities and differences between forensic genetics and ancient DNA analysis. *Forensic Sci. Int* 131: 59-64, 2003.
- Faerman M, Filon D, Kahila G, Greenblatt CL, Smith P, Oppenheim A : Sex identification of archaeological human remains based on amplification of the X and Y amelogenin alleles. *Gene* 29: 327-332, 1995.
- Giles E : Sex determination by discriminant functional analysis of the mandible. *Am J Phys Anthropol* 22: 129-135, 1963.
- Howells WW : Skull shapes and the map: craniometric analyses in the dispersion of modern homo. *Papers of the Peabody Museum of Archaeology and Ethnology* 79. Cambridge, MA: Peabody Museum, 1989.
- Işcan MY : Rise of forensic anthropology. *Yrbk Phys Anthropol* 31: 203-230, 1998.
- Işcan MY, Miller-Shaivitz P : Determination of sex from the tibia. *Am J Phys Anthropol* 64: 53-58, 1984.

- Kaestle FA, Horsburgh KA : Ancient DNA in anthropology: methods, applications and ethics, *Am J Phys Anthropol* 45: 92-130, 2002.
- King CA, İşcan MY, Loth SR : Metric and comparative analysis of sexual dimorphism in the Thai femur. *J Forensic Sci* 43: 954-958, 1998.
- Lindahl T : Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709-715, 1993.
- Martin R, Saller K : *Lehrbuch der Anthropologie*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1959.
- O'Rourke DH, Hayes MG, Carlyle SW : Ancient DNA studies in physical anthropology. *Ann Rev Anthropol* 29: 217-242, 2000.
- Pääbo S : Amplifying ancient DNA. In: MA Innis, Editor, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* pp 159-166, 1990.
- Steele DG : The estimation of sex on the basis of the talus and calcaneum. *Am J Phys Anthropol* 45: 581-588, 1976.
- Stewart TD : Sex determination in the skeleton by guess and by measurement. *Am J Phys Anthropol* 12: 385-392, 1954.
- Stojanowski CM, Seidemann RM : A reevaluation of the sex prediction accuracy of the minimum supero-inferior femoral neck diameter for modern individuals. *J Forensic Sci* 44: 1215-1218, 1999.
- Stone AC, Milner GR, Pääbo S, Stoneking M : Sex determination of ancient human skeletons using DNA. *Am J Phys Anthropol* 99: 231-238, 1996.
- Uberlaker D, Volk C : A test of Phenice method for the estimation of sex. *J Forensic Sci* 47: 19-24, 2002.
- Yang DY, Eng B, Wayne JS, Dudar JC, Saunders SR : Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *Am J Phys Anthropol* 105 : 539-543, 1998.

Abstract

Comparison between Morphological Sex and Genotype Sex of Uzbekistan Ancient Bones Using Improved Amelogenin PCR Amplification Method

Kijeong Kim^{1,2}, Ariunaa Togloom^{1,2}, Eunhee Jeon^{1,2}, Min-Soo Lee¹, Youn-Ock Cho¹,
Gavaachimed Lkhagvasuren¹, Na-Yung Min³, Jee-Hye Choi³, Jong-Dae Kim⁴,
Keun-Cheol Kim⁵, Jae-Hyun Kim⁶, Maengseok Noh⁷, Ki-Won Park⁸, Ae-Ja Park⁹,
Kwon-Jong Yoo^{1,10}, Samardin Mustafokulov¹¹, Kwang-Ho Lee^{1,3}, Sang-In Chung²,
Won-Bok Lee¹², Kyung-Yong Kim^{1,12}

¹Department of Science & Culture Graduate School, ²Department of Microbiology, College of Medicine,

³Department of Life science, College of Natural Science, Chung-Ang University,

⁴Department of Anthropology and Archeology, School of Social Sciences, National University of Mongolia,

⁵Department of Biology, Institute for Life Science, College of Natural Sciences,

Kangwon National University, ⁶Department of Archaeology and Art History,
College of Humanities, Donga University,

⁷Division of Mathematical Science, College of Natural Sciences, Pukyong National University,

⁸DNA Analysis Section, National Institute of Scientific Investigation,

⁹Department of Laboratory Medicine, College of Medicine,

¹⁰Department of Philosophy, College of Liberal Arts, Chung-Ang University,

¹¹Academy of Sciences of Republic of Uzbekistan,

¹²Department of Anatomy, College of Medicine, Chung-Ang University

Determination of male and female is important in anthropology, archeology and forensic science. This study was designed to compare genotype sex of improved amelogenin PCR amplification method with morphological sex of ancient human bones.

Sixty human skulls which lived from the Bronze Age to twenties centuries and excavated in Uzbekistan were used in this study. Morphological sex was determined by Uzbekistan scientist, and genotype sex was determined by improved amelogenin PCR amplification developed in this study.

Among 20 morphological males, 13 samples (65%) were genotypical male. Among 40 morphological females, 20 samples (50%) were genotypical male.

In conclusion, morphological method might be inadequate for sex determination of ancient bones. The improved amelogenin PCR method will be useful in sex determination of ancient bones.

Key words : Ancient DNA, Sex determination, Amelogenin PCR, Phenotype sex, Genotype sex