대 한 체 질 인 류 학 회 지
Korean J Phys Anthropol
20(4): 267 ~ 281, 2007

고인골 유전자 증폭 효율이 높은 핵산 분리 방법

김기정[1,2], 아리오나 턱럼[1,2], 전은희[1,2], 이민수[1], 조연옥[1],
가와치멘 르학와수렝[1], 최지혜[3], 다스제벡 투멩[4], 김근철[5], 김재현[6],
노맹석[7], 박기원[8], 박애자[9], 유권종[1,10], 김종대[1,11] 이광호[1,3], 김경용[1,12]

[1]중앙대학교 대학원 문화과학학과, [2]의과대학 미생물학교실,
[3]자연과학대학 생명과학과, [4]몽골국립대학 사회과학대학원 인류고고학부,
[5]강원대학교 자연과학대학 생명과학부, [6]동아대학교 인문과학대학 고고미술사학과,
[7]부경대학교 자연과학대학 수리과학부, [8]국립과학수사연구소,
[9]중앙대학교 의과대학 진단검사의학과, [10]문과대학 철학과,
[11]민속학과 [12]의과대학 해부학교실

간추림 : 고인골 핵산(DNA)분석은 인류학 및 고고학에서 인류의 진화 및 계통발생학적 연구에 널리 이용되고 있다. 그러나 이러한 분석을 위한 고인골 핵산 추출은 보존이 잘 안된 고인골 시료에서 성공적이지 못한 경우가 흔하다.

이 연구에서는 이러한 고인골로부터 핵산 분석의 성공율을 높이기 위하여 이온교환수지를 이용한 고순도 핵산 추출법을 시도하였다. 이 방법과 기존에 고인골 핵산 추출법으로 쓰여온 GENECLEAN® 키트(Qbiogene)와 Qiaquick® 컬럼(Qiagen)방법을 이용하여 한국과 몽골의 약 500년에서 5000년 된 12개 고인골 검체들로부터 핵산 분석의 성공율을 비교하였다. 핵산 분석 방법으로서 사립체 핵산, 남성 결정 표지 핵산 및 한국인에서 흔한 Y 염색체 일배체그룹 O 표지(M175) 핵산 증폭 방법을 이용하였다.

이 연구에서 개발된 방법은 기존 방법들에 비하여 핵산분석의 성공율을 현저히 증가시켰다. GENECLEAN® 키트 이용 방법으로 사립체 핵산 증폭은 두 시료에서만 가능하였고, 남성 결정 표지 핵산과 M175 표지 핵산의 증폭은 모든 검체에서 없었다. Qiaquick® 컬럼 방법은 9개 시료에서 사립체 핵산 증폭, 9개 시료에서 남성 결정 표지 핵산 증폭, 6개 시료에서 M175 표지 핵산 증폭이 가능하였다. 이 연구에서 개발된 방법은 모든 시료에서 사립체 핵산 증폭, 10개 시료에서 남성 결정 표지 핵산 증폭, 8개 시료에서 M175 표지 핵산 증폭이 가능하였다.

이 결과는 이온교환수지를 이용한 핵산 추출법이 고인골 핵산분석을 위해 향상된 핵산 분리법으로서 인류학 연구에서 유용하게 쓰일 수 있음을 시사한다.

찾아보기 낱말 : 고인골 핵산, 핵산 추출, 이온교환수지, 중합효소연쇄반응

서 론

고인골 핵산(DNA) 분석 기법은 인류학, 고고학, 수사학, 진화학 등의 분야에서 그 이용이 증가되고 있는 추세이다. 이 분석에서 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 기법은 제한된 양의 고인골 시료와 DNA량 때문에 필수적으로 요구된다. 고인골의 핵산 염기서열 정보를 얻기 위해서는 성공적인 PCR 증폭산물을 획득하는 것이 일차적으로 중요하다. PCR이 성공적이지 못할 경우 잠재적으로 중요한 의미를 지니는 많은 고인골 시료들로부터

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

www.kci.go.kr

인류학, 진화학적 유전정보를 얻을 수가 없다.

고인골로부터 성공적인 PCR 증폭에 적합한 핵산의 추출은 고인골 시료 자체가 가지는 여러 내인적 요소들 때문에 결코 쉽지 않다. 즉, 고인골 DNA는 질적으로 매우 저하되어 있고 손상되어 있으며 (Pääbo 1989, Hagelberg와 Clegg 1991, Handt 등 1994, Höss 등 1996, O'rourke 등 1996, Keyser-Tracqui와 Ludes 2005, Mulligan 2005) 카피 수가 적고 (Handt 등 1994, O'rourke 등 1996, Poinar 등 1996, Yang 등 1998, Kumar 등 2000), 고인골 자체의 DNA가 아닌 미생물이나 현대인 등 외부에서 유래된 DNA로 오염되어 있고(Kolman과 Tuross 2000, Pääbo 등 2004, Calacal과 De Ungria 2005, Kemp와 Smith 2005, Mulligan 2005, Hunter 2006) 휴민산(humic acid), 풀브산(fulvic acid), 생물학적 부산물, 콜라젠 등과 같은 잠재적 PCR 억제물질들이 다량으로 고인골 내에 공존한다(Hänni 등 1995, Kalmar 등 2000, Keyser-Tracqui와 Ludes 2005).

이러한 복잡성 때문에 지금까지 많은 고인골 DNA 추출 방법들이 시도되어왔다. 예를 들면, 페놀-클로로포름 추출법(Blake 등 1992, Kurosaki 등 1993, Faerman 등 1995, Hänni 등 1995) 에탄올 또는 이소프로파놀 침전법(Kurosaki 등 1993, Cattaneo 등 1995, Hänni 등 1995, Cattaneo 등 1997), 덱스트란 블루를 사용한 변형 에탄올 침전법(Kalmar 등 2000), 아가로스 젤 추출법(Fischer 등 2001), 미량농축기(microconcentrator)의 사용(Hagelberg와 Clegg 1991, Blake 등 1992, Yang 등 1998), 킬렉스(Chelex) 이용법(Walsh 등 1991, Faerman 등 1995), 실리카(silica) 이용법(Höss와 Pääbo 1993, Kurosaki 등 1993, Cattaneo 등 1997, Evison 등 1997, Prado 등 1997, Yang 등 1998, Rohland와 Hofreiter 2007) 등이 이용되어 왔다. 이 방법들은 공통적으로 고인골로부터 성공적인 PCR 증폭을 위해 PCR 억제물질의 제거에 목표를 두고 있다. 고인골 DNA의 추출 목적으로 상업적으로 개발된 제품들로서 GENECLEAN® 키트(QBIOGENE)와 Qiaquick® 컬럼(Qiagen)이 흔히 이용되고 있으며 핵산 정제에 모두 실리카를 이용하고 있다. 최근에 보고된 논문에 의하면 실리카를 이용한 핵산분리가 PCR 증폭효율이 높은 것으로 알려져 있다(Yang 등 1998, Rohland와 Hofreiter 2007).

Table 1. List of ancient human bone samples used in this study

Sample code	Bone	Excavated site	Estimated age
K01	Left femur	Korea	Chosun Dynasty
K02	Left femur	Korea	Chosun Dynasty
K03	Left tibia	Korea	Three Kingdoms
K04	Right femur	Korea	Three Kingdoms
K05	Left tibia	Korea	Bronze age
K06	Left femur	Korea	Bronze age
M01	Right femur	Mongolia	12～14C
M02	Left femur	Mongolia	12～14C
M03	Right femur	Mongolia	Bronze age
M04	Right femur	Mongolia	Bronze age
M05	Left femur	Mongolia	Neolithic age
M06	Right femur	Mongolia	Neolithic age

본 연구자들은 앞에서 기술한 방법들을 이용하여 상당히 오염된 고인골로부터 핵산을 정제한 결과 많은 고인골 시료에서 PCR 억제 물질들이 효율적으로 제거되지 않았으며 PCR 증폭도 성공적인 결과를 얻지 못하였다. 따라서 본 연구에서 PCR 성공율을 높이기 위한 목적으로 PCR 억제 물질의 제거를 위한 이온교환수지 컬럼을 이용하였다. 이온교환수지를 이용한 핵산 정제는 토양으로부터 유래된 많은 PCR 억제물질들로 오염된 토양 미생물로부터 DNA를 추출하는 목적으로 사용된 보고가 있다(Tebbe와 Vahjen 1993, Zaporozhenko 등 2006).

이 연구에서는 고인골 시료로부터 PCR 성공율을 향상시키기 위한 목적으로 이온교환수지 컬럼을 핵산 정제법으로서 도입하여 고인골 핵산 분리 기법을 확립하고 기존의 고인골 핵산 분리 기법들과 비교하여 PCR 증폭 성공율을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 고인골 시료

이 연구에서는 고고학적으로 100년에서 8000년 이전의 것으로 추정되는 한국과 몽골에서 출토된 12개의 고인골 시료를 사용하였다(Table 1).

www.kci.go.kr

2. DNA 추출

시료로부터 핵산을 추출하는 모든 과정 동안에 현대인 DNA의 오염을 방지하기 위하여 멸균된 환경하에 실험을 수행하도록 주의를 기울였다. 실험자는 장갑과, 얼굴 마스크와, 실험복을 착용하였다. 실험에 앞서 모든 장비, 무균 작업대, PCR 작업대 등은 상품화된 락스 원액으로 세척하였고 자외선소독을 1시간 이상 하였다. 고압습윤멸균법(autoclave)으로 멸균이 가능한 모든 재료들, 예를 들어 파쇄기, 금속기구, 완충액, 용액 등은 121˚C에서 최소 30분간 멸균하였다. 멸균에 의해 손상되는 플라스틱 소모품들은 멸균 보증된 제품들 또는 사람 DNA와 DNA 분해효소가 없는 것으로 보증된 일회용 제품들을 구입하여 사용하였다. 모든 과정(골절단, 골표면 절삭, 분쇄작업, DNA 추출, PCR 작업, PCR 후 작업)은 분리된 청정실에서 기류식무균실험대안에서 시행하였다. 모든 작업 동안에 멸균된 에어로졸 방지 피펫 또는 피펫팁을 사용하였다. 잠재적 재료 또는 실험자로부터 유래되는 사람 DNA오염을 추적하고자 모든 과정에서 고인골이 제외된 모든 재료들이 포함되어 있는 추출대조(extraction control)들을 포함시켰다.

고인골을 멸균톱을 이용하여 작은 크기로 절단하고 골 표면을 멸균 사포로 수 밀리미터를 깍아내었다. 잠재적인 외인성 오염 DNA를 제거하고자 Kemp와 Smith (2005)에 의해 소개된 방법을 이용하였다. 골 조각들을 락스원액(약 5.4% w/v sodium hypochlorite)에 30분간 담그고 멸균 증류수로 세척하였다. 무균작업대안에서 자외선조사하에 최소 1시간 이상 건조시켰다. 시료가 들어 있는 시험관들을 액체질소에 10분간 담근 후 Mixer Mill MM301 (Retsch) 시료파쇄기를 이용하여 고운 분말을 얻었다.

핵산추출방법으로 GENECLEAN® kit for an ancient DNA (Qbiogene), Qiaquick® 컬럼 kit (Qiagen)과 이온교환수지컬럼(Qiagen G-tip 20G, Qiagen)를 이용하였다. GENCLEAN® kit을 이용한 방법은 제조사가 제공하는 방법에 의거하여 0.5 g의 골분말로부터 핵산추출을 시행하였다. Qiaquick® 컬럼과 이온교환수지 컬럼을 이용한 핵산 추출과정은 다음과 같다. 인골의 칼슘을 제거하기 위하여 3 g의 골분말을 멸균 50 mL 폴리프로필렌 시험관에 옮기고 pH 8.0의 40 mL 0.5 M EDTA를 가하였다. 시험관을 24시간 동안 느린 속도로 회전시키며 실온에 방치하였다. 시료를 2,000 × g에서 15분 원심분리하고 상청액을 제거하였다. 이와 같은 탈칼슘과정을 3회 반복하였다. 칼슘이 제거된 시료에 15 mL의 DNA용출완충액(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 이소아밀 알코올(25 : 24 : 1, v/v/v)을 첨가하고 섞은 후 원심분리하여 상청액을 모았고, 상청액에 동량의 클로로포름 이소아밀 알코올(24 : 1, v/v)를 가하고 섞은 후 원심분리하여 상청액을 모았다. 상청액을 Amicon® Ultra PL-30 filters (Millipore)을 이용하여 400 μL로 농축하였다. 농축액 절반(200 μL)은 Qiaquick® 컬럼을 이용하여 제조사 제공방법에 따라 DNA정제를 시행하였으나 마지막 DNA회수는 100 μL의 EB 완충액을 이용하였다.

나머지 절반량의 농축액은 Qiagen G-tip 20G 컬럼을 이용하여 제조사 제공방법을 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 완충액으로 DNA를 용출시켰다. 용출액을 Amicon® Ultra PL-30 filters를 이용하여 세척과 농축을 시행하였다.

3. PCR

위 세 가지 고인골 DNA추출방법들의 PCR 성공율의 비교는 추출대조, 음성 물대조(negative water control)와 12개의 고인골 시료로부터 비교적 카피수가 많은 사람 사립체 DNA의 과변이부위 1 (hypervariable segment 1, HV1) DNA (440 bp), 카피수가 적은 남성 성별 결정표지 DNA (200 bp) (Neeser와 Liechti-Gallati 1995)와 사람 진화 및 유연관계 연구에 이용되는 표지 중 하나인 M175 Y염색체 단일염기변이(single nucleotide polymorphism, SNP) 표지

www.kci.go.kr

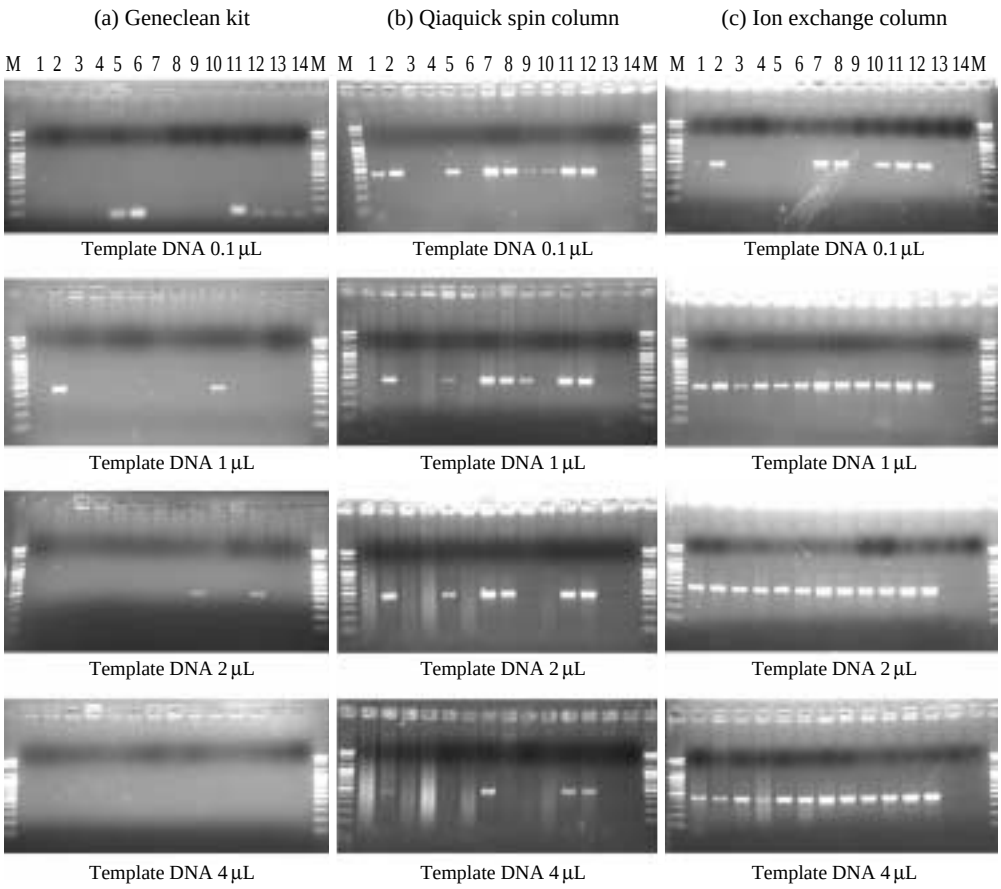

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis analysis of PCR products targeting mitochondrial HV1 DNA fragment (440 bp) from ancient DNAs extracted by using Geneclean kit (a), Qiaquick spin column (b) and ion exchange column (c). Lane M, 100-bp size marker. Lanes of ancient bone samples: 1, K1; 2, K2; 3, K3; 4, K4; 5, K5; 6, K6; 7, M1; 8, M2; 9, M3; 10, M4; 11, M5; 12, M6; 13, extraction control; 14, distilled water.

DNA (231 bp) (Underhill 등 2001)의 증폭능력에 기초하여 이루어졌다.

PCR을 위한 기기로서 GeneAmp® 9700 장치를 사용하였고 반응부피는 20 μL이었다. Taq 중합효소로서는 AmpliTaq Gold® DNA 중합효소를 사용하였다. 사립체 HV1의 증폭을 위해서 1× AmpliTaq Gold® 완충액, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 1 μM 프라이머 쌍으로서 F15971 (5′-TTA ACT CCA CCA TTA GCA CC-3′)와 R16410 (5′-GAG GAT GGT GGT CAA GGG AC 3′) (Edson 등 2004), 0.8 u AmpliTaq® Gold 중합효소, 0.625 mg/mL BSA와 멸균증류수를 사용하였다. 검체 DNA양에 따른 증폭률의 비교를 고려하기 위하여 고인골추출 DNA의 양으로서 0.1 (1 : 10 희석 1 μL), 1, 2, 4 μL 양을 실험에 이용하였다. 증폭주기조건은 95°C에서 10분간 1주기, 95°C 30초, 60°C 30초, 72°C 1분의 40주기, 72°C에서 7분의 1주기로서 구성하였다. PCR 증폭산물확인은 반응물 5 μL를 브롬산 에티디움(ethidium bromide)이 포함된 1.5% 아가로스젤을 이용한 전기영동 분석법에 의하여 이루어졌다. 남성 성별 결정표지증폭을 위한 반응액 조성은 1× AmpliTaq Gold® 완충액, 2 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 1 μM 프라이머 쌍으로서

www.kci.go.kr

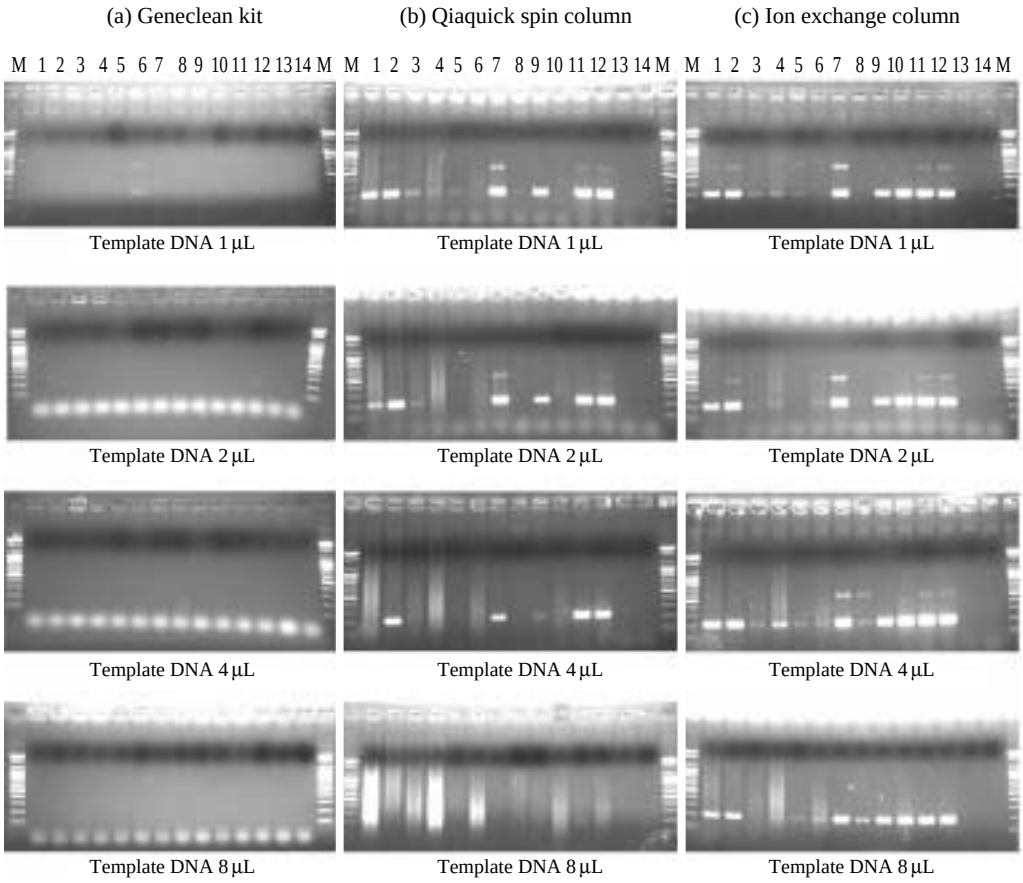

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis analysis of PCR products targeting male sex determination marker DNA fragment (200 bp) from ancient DNAs extracted by using Geneclean kit (a), Qiaquick spin column (b) and ion exchange column (c). Lane M, 100-bp size marker. Lanes of ancient bone samples: 1, K1; 2, K2; 3, K3; 4, K4; 5, K5; 6, K6; 7, M1; 8, M2; 9, M3; 10, M4; 11, M5; 12, M6; 13, extraction control; 14, distilled water.

Y3 (5′-GTG TAT TCA CCT CCG GGA G-3′)와 Y4 (5′-ACA AAA GGT TCA ATT CTG TGA G-3′) (Neeser와 Liechti-Gallati 1995), 1 u AmpliTaq® Gold 중합효소, 0.625 mg/mL BSA와 멸균 증류수로 구성하였다. 검체 DNA양에 따른 증폭률의 비교를 고려하기 위하여 고인골추출 DNA의 양으로서 1, 2, 4, 8 μL를 실험에 이용하였다. 증폭주기조건은 95°C에서 10분간 1 주기, 95°C 30초, 60°C 1분, 72°C 1분의 40 주기, 72°C에서 7분의 1주기로서 구성하였다. PCR 증폭산물 확인은 반응물 5 μL를 ethidium bromide가 포함된 2% 아가로스젤을 이용한 전기영동분석법에 의하여 이루어졌다.

M175 증폭을 위한 반응액조성은 1 × AmpliTaq Gold® 완충액, 2 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 1 μM 프라이머 쌍으로서 본 연구에서 디자인한 M175-F (5′-AAA ATA GTA CCC AAA TCA ACT CA-3′)와 M175-R (5′-TTC TCT TGC AGC ATT TTC AGT T-3′), 1.2 u AmpliTaq® Gold 중합효소, 0.625 mg/mL BSA와 멸균증류수로 구성하였다. 검체 DNA양에 따른 증폭률의 비교를 고려하기 위하여 고인골 추출 DNA의 양으로서 1, 2, 4, 8 μL를 실험에 이용하였다. 증폭주기조건은 95°C에서 10분간 1주기, 95°C

www.kci.go.kr

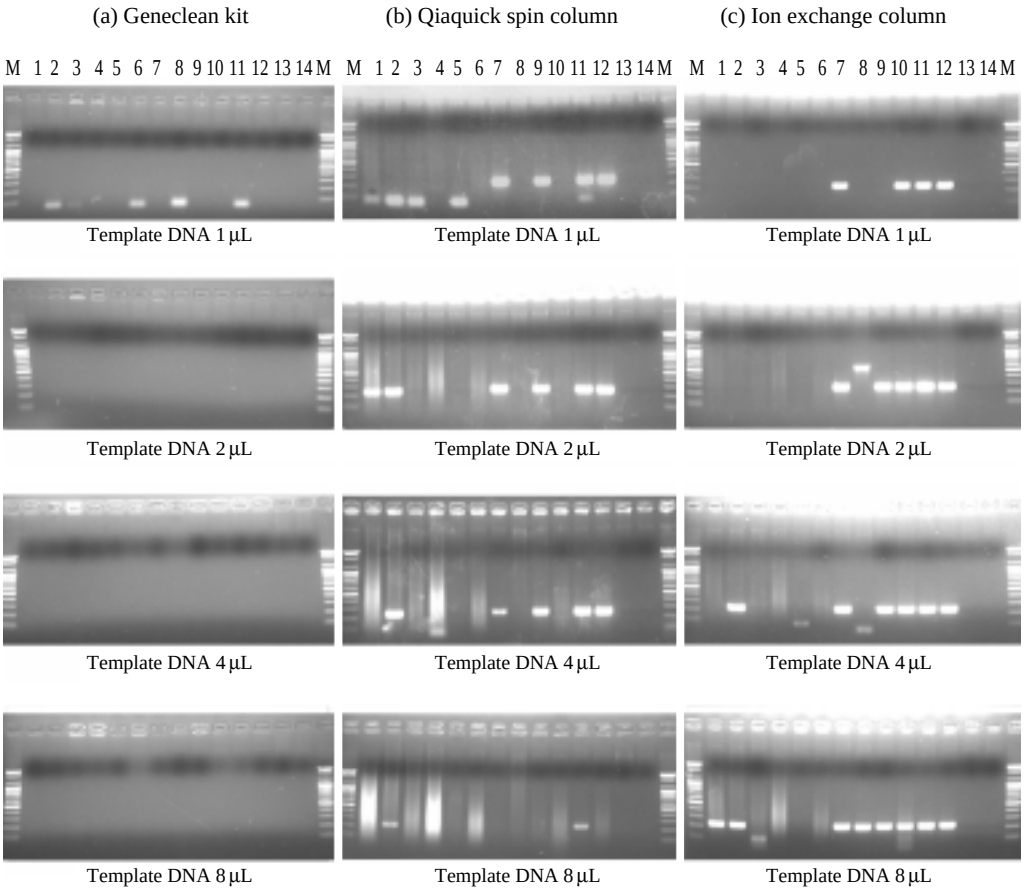

Fig. 3. Agarose gel electrophoresis analysis of PCR products targeting M175 Y SNP marker DNA fragment (231 bp) from ancient DNAs extracted by using Geneclean kit (a), Qiaquick spin column (b) and ion exchange column (c). Lane M, 100-bp size marker. Lanes of ancient bone samples: 1, K1; 2, K2; 3, K3; 4, K4; 5, K5; 6, K6; 7, M1; 8, M2; 9, M3; 10, M4; 11, M5; 12, M6; 13, extraction control; 14, distilled water.

30초, 60°C 1분, 72°C 1분의 45주기, 72°C에서 7분의 1주기로서 구성하였다. PCR 증폭산물 확인은 반응물 5 μL를 ethidium bromide가 포함된 2% 아가로스 젤을 이용한 전기영동분석법에 의하여 이루어졌다.

4. DNA 염기서열 분석

HV1 증폭산물의 염기서열의 확인과 M175 표지 단일염기변이 (Jobling과 Tyler-Smith 2003)를 확인하기 위하여 증폭산물을 AccuPrep® PCR Purification Kit (바이오니아)를 이용하여 정제하였고 Big Dye terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)와 ABI PRISMs 3700 DNA 분석기 (Applied Biosystems)를 이용하여 염기서열을 결정하였다.

결 과

1. 사립체 HV1 증폭

세가지 DNA 추출법에 의하여 고인골 시료로부터 추출된 DNA를 이용하여 사립체 HV1 DNA 440 bp

www.kci.go.kr

Table 2. Results of PCR for mitochondrial DNA HV1 using ancient bone DNAs extracted by using Geneclean ancient silica-based purification method and a combination of silica and ion exchange column purification method

Ancient bone	Geneclean kit Template DNA (μL)				Qiaquick spin column Template DNA (μL)				Ion exchange column Template DNA (μL)			
	0.1[1]	1	2	4	0.1	1	2	4	0.1	1	2	4
K01	−[2]	−	−	−	+[3]	−	−	−	−	+	+	+
K02	−	+	−	−	+	+	+	w+[4]	+	+	+	+
K03	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+
K04	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+
K05	−	−	−	−	+	w+	w+	−	−	+	+	+
K06	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+
M01	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+
M02	−	−	−	−	+	+	+	−	+	+	+	+
M03	−	−	w+	−	w+	w+	−	−	−	+	+	+
M04	−	+	−	−	w+	−	−	−	+	+	+	+
M05	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+
M06	−	−	w+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
E.C.[5]	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
D.W.[6]	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

[1]1 μL of 1 : 10 dilution of the original DNA extract; [2]PCR product of expected size is not visible based on agarose gel electrophoresis analysis; [3]PCR product of expected size is strongly stained based on agarose gel electrophoresis analysis; [4]PCR product of expected size is relatively weakly stained based on agarose gel electrophoresis analysis; [5]Extraction control; [6]Distilled water

절편의 PCR 증폭결과는 Table 2와 같다. 고인골 DNA 추출용으로 상품화되어 있는 GENECLEAN® kit를 이용하여 추출된 고인골 DNA를 이용한 PCR에서는 고인골 DNA양 0.1 μL와 4 μL를 사용하였을 때 실험에 이용된 모든 고인골 시료로부터 증폭산물이 생성되지 않았으며, 1 μL와 2 μL를 사용시 서로 다른 두 시료에서 증폭산물이 생성되었다. 다양한 시료 양을 이용한 PCR을 시행한 결과 12개의 시료 중 단지 4개의 시료에서만 증폭산물이 형성되었다. 흔히 DNA추출에 널리 사용되고 있는 Qiaquick® 컬럼을 이용하여 추출된 고인골 DNA를 이용한 PCR에서는 고인골 DNA양 0.1 μL 사용시 3개의 고인골 시료에서 증폭산물이 생성되지 않았고, 1 μL 사용시 5개의 시료에서, 2 μL 사용시 6개의 시료에서, 4 μL 사용시 8개의 시료에서 증폭산물이 생성되지 않았다.

결과적으로 다양한 양의 시료를 이용하여 시행한 PCR에 의해 12개의 시료에서 9개의 시료에서만 증폭산물이 생성되었다. 시료 양이 증가됨에 따라 PCR 성공율이 떨어졌다. 고인골 두 시료(M03, M04)에서는 적은 양의 DNA를 이용시에 PCR산물이 관찰되었으나 생성된 산물의 양도 상대적으로 적었다. 고인골 여섯 시료(K01, K02, K05, M02, M03, M04)에서는 시료 양을 증가시켰을 때 오히려 증폭산물의 양이 적게 생산되거나 성공적이지 못하였다. 이온교환수지를 이용하여 추출된 고인골 DNA를 이용한 PCR에서는 고인골 DNA양 0.1 μL 사용시 6개의 시료에서 증폭산물이 생성되었고, 1 μL, 2 μL와 4 μL 사용시 실험에 사용된 모든 고인골 시료에서 증폭산물이 생성되었다. 시도된 세가지 고인골 DNA 추출방법에 의한 사립체 HV1 PCR 증폭의 성공율이 이온교환수지를 사용한 경우가 우수하였다. 추출대조와 증류수에서는 프라이머 중합체를 제외한 증폭산물이 생성되지 않았다.

2. 고인골 사립체 DNA HV1 염기서열 분석

생성된 고인골 HV1 DNA 증폭산물의 확인을 위하여 DNA 염기서열분석 결과는 분명한 DNA 전기영동도를 나타내었다(Fig. 4). 시료들의 결정된 염기서열은 사람 사립체 염기서열로 확인이 되었고 시료간 서로 일치하는 서열은 없었고 실험자의 사립

www.kci.go.kr

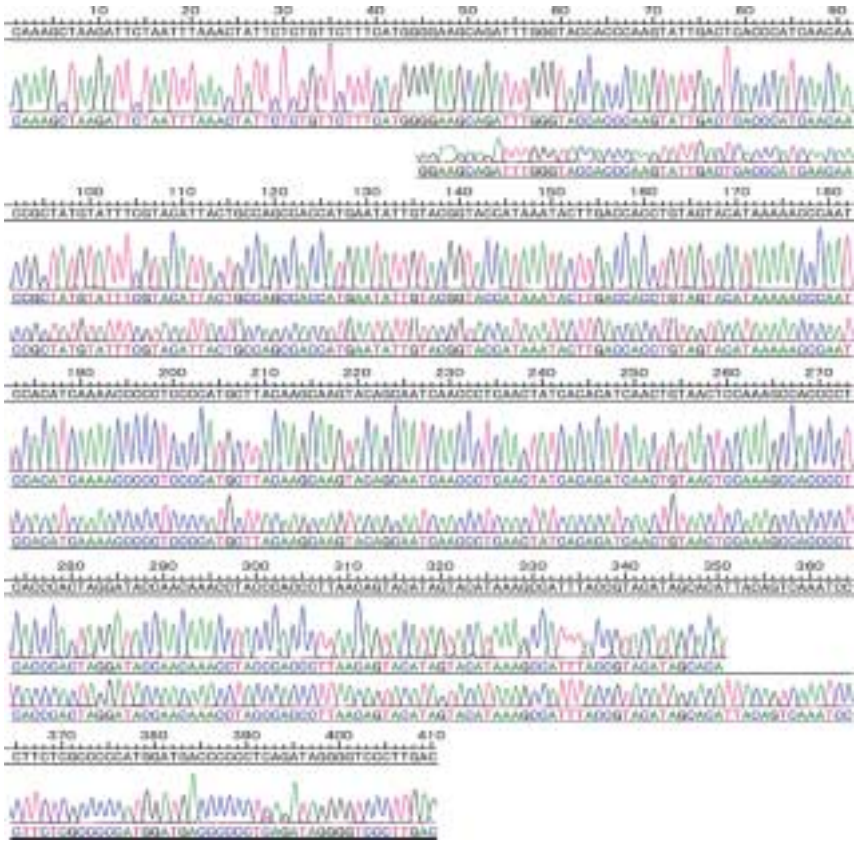

Fig. 4. DNA sequencing electrophotograms of mitochondria HV1 DNA of ancient bone K1 sample. DNA sequences are obtained by direct bidirectional sequencing of the PCR amplicon and were aligned by using Seqman software (DNASTAR).

체 DNA 염기서열과 일치하는 서열도 발견되지 않았다.

3. 고인골 남성 성별 결정 표지 증폭

세가지 DNA 추출법에 의하여 고인골 시료로부터 추출된 DNA를 이용하여 남성 성별결정 표지 DNA를 PCR 증폭하였다(Table 3). GENECLEAN® kit를 이용하여 추출된 고인골 DNA를 이용한 PCR에서는 시도된 고인골 DNA양 모두에서 증폭산물의 생성이 관찰되지 않았다. Qiaquick® 컬럼을 이용하여 추출된 고인골 DNA를 이용한 PCR에서는 고인골 DNA양 1 μL 사용시 10개 시료에서 증폭산물 생성이 관찰되었고, 2 μL에서는 7개 시료에서, 4 μL에서는 5개의 시료에서, 8 μL에서는 1개의 시료에서만 증폭산물 생성이 관찰되었다. 시료 양이 증가됨에 따라 PCR 성공율이 떨어진 결과가 관찰되었다. 증폭산물이 생성된 시료들 모두가 시료 양을 증가시켰을 때 오히려 증폭산물의 양이 적게 생산되거나 성공적이지 못하였다. 종합적으로 9개의 시료에서 증폭산물의 생성이 관찰되었다. 이온교환수지를 이용하여 추출된 고인골 DNA를 이용한 PCR에서는 고인골 DNA양 1 μL 사용시 1개의 시료만이 증폭산물 생성이 관찰되지 않았고, 2 μL에서 2개의 시료에서, 4 μL에서 1개의 시료에서, 8 μL에서 1개의 시료에서 증폭산물 생성이 관찰되지 않았다. 종합적으로

www.kci.go.kr

Table 3. Results of PCR for male sex determination marker DNA using ancient bone DNAs extracted by using Geneclean ancient silica-based purification method and a combination of silica and ion exchange column purification method

Ancient bone	Geneclean kit Template DNA (μL)				Qiaquick spin column Template DNA (μL)				Ion exchange column Template DNA (μL)			
	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	8
K01	−[1]	−	−	−	+[2]	w+[3]	−	−	+	+	+	+
K02	−	−	−	−	+	+	+	−	+	+	+	+
K03	−	−	−	−	w+	w+	−	−	w+	w+	w+	−
K04	−	−	−	−	w+	−	−	−	w+	w+	w+	w+
K05	−	−	−	−	w+	−	−	−	w+	−	w+	w+
K06	−	−	−	−	−	−	−	−	−	w+	−	w+
M01	−	−	−	−	+	+	+	−	+	+	+	+
M02	−	−	−	−	−	−	−	−	w+	−	w+	+
M03	−	−	−	−	+	+	w+	−	+	+	+	+
M04	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+
M05	−	−	−	−	+	+	+	w+	+	+	+	+
M06	−	−	−	−	+	+	+	−	+	+	+	+
E.C.[5]	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
D.W.[6]	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

[1]PCR product of expected size is not visible based on agarose gel electrophoresis analysis; [2]PCR product of expected size is strongly stained based on agarose gel electrophoresis analysis; [3]PCR product of expected size is relatively weakly stained based on agarose gel electrophoresis analysis; [5]Extraction control; [6]Distilled water

Table 4. Results of PCR for M175 Y SNP marker DNA using ancient bone DNAs extracted by using Geneclean ancient silica-based purification method and a combination of silica and ion exchange column purification method

Ancient bone	Geneclean kit Template DNA (μL)				Qiaquick spin column Template DNA (μL)				Ion exchange column Template DNA (μL)			
	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	8
K01	−[1]	−	−	−	−	+[2]	−	−	−	−	−	+
K02	−	−	−	−	−	+	+	+	−	−	+	+
K03	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
K04	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
K05	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
K06	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
M01	−	−	−	−	+	+	w+[3]	−	+	+	+	+
M02	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+
M03	−	−	−	−	+	+	+	+	−	+	+	+
M04	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+
M05	−	−	−	−	+	+	+	−	+	+	+	+
M06	−	−	−	−	+	+	+	−	+	+	+	+
E.C.[5]	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
D.W.[6]	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

[1]PCR product of expected size is not visible based on agarose gel electrophoresis analysis; [2]PCR product of expected size is strongly stained based on agarose gel electrophoresis analysis; [3]PCR product of expected size is relatively weakly stained based on agarose gel electrophoresis analysis; [5]Extraction control; [6]Distilled water

12개의 시료에서 증폭산물의 생성이 관찰되었다. 시도된 세가지 고인골 DNA 추출 방법에 의한 남성 성별 결정 PCR 증폭의 성공율이 이온교환수지를 사용한 경우 현저히 성공율이 높았다. 추출대조와 증류수에서는 프라이머 중합체를 제외한 증폭산물이 생성되지 않았다.

www.kci.go.kr

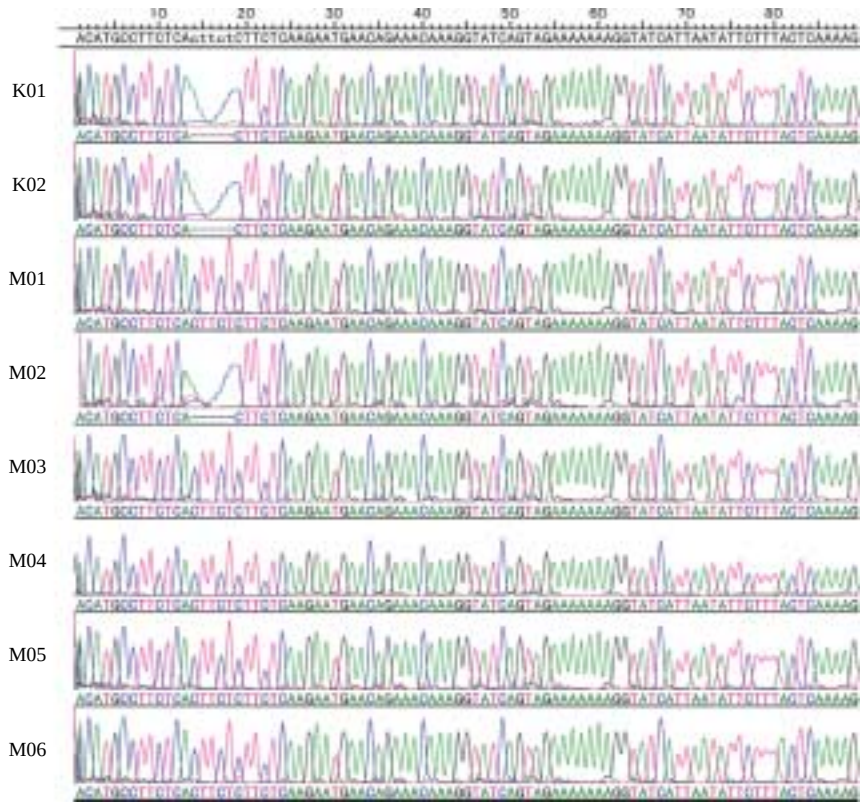

Fig. 5. Alignment of DNA sequencing electrophotograms of M175 Y SNP marker DNA of Korean ancient bones and Mongolian ancient bones. Five base pair ('CTTCT') deletion indicates O haplogroup.

4. 고인골 M175 Y 염색체 SNP 표지 증폭

세가지 DNA 추출법에 의하여 고인골 시료로부터 추출된 DNA를 이용하여 남성 성별결정표지 DNA PCR 증폭하였다(Table 4). GENECLEAN® kit를 이용하여 추출된 고인골 DNA를 이용한 PCR에서는 시도된 고인골 DNA양 모두에서 증폭산물의 생성이 관찰되지 않았다. Qiaquick® 컬럼을 이용하여 추출된 고인골 DNA를 이용한 PCR에서는 고인골 DNA양 1 μL 사용시 4개 시료에서 증폭산물 생성이 관찰되었고, 2 μL에서는 6개 시료에서, 4 μL에서는 5개의 시료에서, 8 μL에서는 2개의 시료에서 증폭산물 생성이 관찰되었다. 시료 양이 증가됨에 따라 PCR 성공율이 떨어진 결과가 관찰되었다. 두 개의 시료(K01, K02)에서 DNA 양이 2 μL 이상일 때 증폭산물이 생성되었다. 세 개의 시료에서는 시료 DNA양이 증가되었을 때 증폭산물의 양이 적거나 생성되지 않았다. 종합적으로 6개의 시료에서 증폭산물의 생성이 관찰되었다. 이온교환수지를 이용하여 추출된 고인골 DNA를 이용한 PCR에서는 고인골 DNA양 1 μL 사용시 4개의 시료에서 증폭산물 생성이 관찰되었고, 2 μL에서 5개의 시료에서, 4 μL에서 6개의 시료에서, 8 μL에서 8개의 시료에서 증폭산물 생성이 관찰되었다. 종합적으로 8개의 시료에서 증폭산물의 생성이 관찰되었다. 시도된 세가지 고인골 DNA 추출 방법에 의한 남성 성별결정 PCR 증폭의 성공율이 이온교환수지를 사용한 경우가 가장 성공율이 높았다. 추출대조와 증류수에서는 프라이머 중합체

www.kci.go.kr

를 제외한 증폭산물이 생성되지 않았다.

5. 고인골 M175 Y 염색체 SNP 분석

고인골 시료들의 M175 Y SNP를 DNA 염기서열 분석에 의한 결과 M175 Y SNP 표지 PCR이 성공한 K01, K02 한국 고인골 시료들은 다섯개의 염기('CTTCT')가 결손된 모두 우리나라 현대인에 많은 그룹으로 보고된 O 일배체그룹(haplogroup)에 속하였고, 몽골 고인골 시료에서는 M02만 O 일배체그룹에 속하였다(Fig. 5).

고 찰

살아있는 조직과 달리 수백 또는 수천년이 지난 고인골에 남아있는 극소량의 DNA를 효율적으로 추출하기는 쉽지 않다. 더욱이 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 연구에서는 실험실에 보유하고 있는 보존 상태가 좋지 않은 12개 고인골 시료들로부터 고순도의 DNA를 분리하고자 하였다. 이 고인골 시료들은 일반적인 분자생물학적기법으로서 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 및 풀브산에 의해 오염된 DNA 추출물 역시 짙은 갈색을 띠는 것과 유사하다.

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

이 연구에서 PCR 성공율을 평가하기 위한 척도로서 세포내 다수 존재하기 때문에 고인골에서도 PCR 증폭이 쉬운 편인 사립체 DNA와 세포내 소수로 존재하여 고인골의 경우 PCR 증폭이 훨씬 더 어려운 DNA로서 남성 성별결정표지 DNA와 세포내 단일 카피로 존재하는 M175 표지 DNA를 이용하여 위 세가지 방법들의 PCR 증폭 성공율을 비교하였다. 또한 살아있는 세포와 달리 고인골 DNA의 정량이 어렵기에 다양한 양의 DNA로 PCR 증폭 성공율을 비교하였다. 이는 PCR 억제물질이 효율적으로 제거되지 않을 경우에는 오히려 적은 양의 DNA를 이용시 PCR이 성공하는 경우가 많으며, 이와 달리 PCR 억제 물질이 효율적으로 제거된 경우에는 DNA양을 증가시킬 경우 억제 효과없이 강한 PCR 증폭을 나타냄으로 PCR 억제물질의 효율적인 제거여부를 판단하고자 하였다. 또한 다양한 양의 DNA를 검사함으로써 PCR 민감도를 간접적으로 추정하고자 하였다.

이 연구에서 시도한 세가지 방법에 의한 PCR 증폭결과를 보면 세가지 표적 DNA에서 모두 이온교환수지를 이용한 DNA 추출법이 다른 두 가지 방법보다 우수하게 나타났다. 세 개의 고인골 시료(K03, K4, K06)는 이온교환수지를 이용하여 추출한 DNA만이 사립체 DNA의 증폭이 가능하였다. 이 방법에 의하여 카피수가 많은 사립체 DNA PCR의 경우 모든 고인골 시료에서 PCR 증폭산물 생성이 관찰되었을 뿐만 아니라 시도된 다양한 양의 DNA에서 DNA 양에 따른 PCR억제 반응이 나타나지 않았으며 0.1 μL를 제외하고는 모두 일관성있게 증폭 산물이 생성되었다. 이는 고인골에 공존하는 잠재적 PCR 억제물질이 상당히 제거되었음을 시사하는 소견이다. 이에 반해 Qiaquick® 컬럼에 의해 추출된 DNA를 이용한 PCR에서는 3개 시료에서는 시도된 어떠한 양의 DNA에서도 PCR 증폭산물을 얻을 수 없었으며 증가된 DNA양을 사용한 경우 오히려 PCR이 억제됨으로 이 방법에 의해 추출된 고인골 DNA는 PCR 억제물질이 효율적으로 제거되지 않았음을 시사한다. 따라서 적은 양의 DNA를 사용할 경우 증폭산물을 얻을 수 있을 확률이 높아졌지만 두 시료에서 증폭산물의 양이 적음으로 적정량의 PCR산물이 요구되는 PCR 분석 후 작업에는 바람직하지 못할 수가 있다.

상업적으로 시판되는 고인골 DNA 분리용 GENE-

www.kci.go.kr

CLEAN® kit는 가장 성공율이 낮았다. 남성 성별결정표지 PCR의 경우에서도 이온교환수지를 이용한 DNA 추출법이 시료 DNA양에 거의 상관없이 일관된 성공율을 보이며 가장 우수한 결과를 나타내었다. 그러나 4개의 시료들(K03, K04, K05, K06)은 DNA양을 증가시켰음에도 불구하고 PCR 생산물의 양이 적었다. 이 시료들은 M175 Y SNP 표지 PCR 증폭산물의 생성이 없었다. 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. 남성 성별 결정 PCR에서 강한 증폭산물을 생산한 시료들은 모두 M175 Y SNP 표지 PCR이 성공적이었음은 이를 지지하는 소견이다. 뿐만 아니라 고인골의 성별을 결정하는데 있어 남성에서만 증폭되는 산물을 검출하고자 고안된 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 PCR이 어려운 고인골에서 더 적합한 것으로 생각된다.

고인골 시료의 DNA분석에 있어 우선 해결해야 할 점은 현대인 DNA의 오염문제이다. 비록 이 연구는 세가지 DNA 추출방법의 PCR 효율성을 비교판정하는 것이 목적이지만 우리는 현대인 DNA의 오염을 방지하고자 매우 강력한 탈오염방법을 취하였다. 즉, 이러한 목적으로 인골의 표면을 절삭하였고, 락스원액과 자외선조사를 통한 복합적 처치를 시행하였다. 또한, DNA 추출과정 중에 다수의 추출대조들을 포함시켰다. 추출대조들은 세가지 DNA 추출방법들에서 모두 증폭산물이 생성되지 않았다. 또한 사립체 DNA HV1 PCR 산물의 염기서열분석결과를 보면 실험에 참여한 연구원들의 염기서열과 일치하는 고인골 염기서열은 발견되지 않았고, 고인골 시료간에 서로 일치하는 염기서열들도 발견되지 않았다. 이러한 결과들은 실험 중에 DNA 오염이 일어나지 않았음을 지지하는 소견이다.

결론적으로 이 연구에서는 이온교환수지를 이용한 고인골 DNA 추출법이 최근 흔히 이용되는 두 방법보다 PCR 성능이 우수한 것으로 밝혀졌고 이는 이 방법이 고인골에 공존하는 PCR 억제물질을 효과적으로 제거한 것으로 시사된다. 우리는 이 연구에서 개발된 방법이 인류학, 고고학 및 범죄수사학 분야에서 특히 잘 보존되지 않은 고인골 시료의 유전학적 연구에 유용하게 쓰일 수 있을 것으로 기대한다.

참 고 문 헌

Blake E, Mihalovich J, Higuchi R, Walsh PS, Erlich H : Polymerase chain reaction (PCR) amplification and human leukocyte antigen (HLA)-DQ alpha oligonucleotide typing on biological evidence samples: casework experience. J Forensic Sci 37: 700-726, 1992.

Calacal GC, De Ungria MC : Fungal DNA challenge in human STR typing of bone samples. J Forensic Sci 50: 1394-1401, 2005.

Cattaneo C, Craig OE, James NT, Sokol RJ : Comparison of three DNA extraction methods on bone and blood stains up to 43 years old and amplification of three different gene sequences. J Forensic Sci 42: 1126-1135, 1997.

Cattaneo C, Smillie DM, Gelsthorpe K, Piccinini A, Gelsthorpe AR, Sokol RJ : A simple method for extracting DNA from old skeletal material. Forensic Sci Int 74: 167-174, 1995.

Edson SM, Ross JP, Coble MD, Parsons TJ, Barritt SM : Naming the dead-confronting the realities of rapid identification of degraded skeletal remains forensic. Science Review 16: 63-90, 2004.

Evison MP, Smillie DM, Chamberlain AT : Extraction of single-copy nuclear DNA from forensic specimens with a variety of postmortem histories. J Forensic Sci 42: 1032-1038, 1997.

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

www.kci.go.kr

alleles. Gene 167: 327-332, 1995.

Fischer GF, Fae I, Mann D, Kriks D, Jager W, Platzer W, Mayr WR, Volc-Platzer B : An HLA class-II allele frequent in Eskimos and Amerindians is found in the Tyrolean Ice Man. Ann Hum Genet 65: 363-369, 2001.

Hagelberg E, Clegg JB : Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. Proc Biol Sci 244: 45-50, 1991.

Handt O, Höss M, Krings M, Pääbo S : Ancient DNA: methodological challenges. Experientia 50: 524-529, 1994.

Hänni C, Brousseau T, Laudet V, Stehelin D : Isopropanol precipitation removes PCR inhibitors from ancient bone extracts. Nucleic Acids Res 23: 881-882, 1995.

Höss M, Pääbo S : DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. Nucleic Acids Res 21: 3913-3914, 1993.

Höss M, Jaruga P, Zastawny TH, Dizdaroglu M, Pääbo S : DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. Nucleic Acids Res 24: 1304-1307, 1996.

Hunter P : Ancient DNA research goes nuclear : A new technique to extract sequence data from nuclear DNA may reveal exciting new insights into evolution and phylogeny. EMBO Rep 7: 136-139, 2006.

Jobling MA, Tyler-Smith C : The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. Nat Rev Genet 4: 598-612, 2003.

Kalmar T, Bachrati CZ, Marcsik A, Rasko I : A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones. Nucleic Acids Res 28: E67, 2000.

Kemp BM, Smith DG : Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. Forensic Sci Int 154: 53-61, 2005.

Keyser-Tracqui C, Ludes B : Methods for the study of ancient DNA. Methods Mol Biol 297: 253-264, 2005.

Kolman CJ, Tuross N : Ancient DNA analysis of human populations. Am J Phys Anthropol 111: 5-23, 2000.

Kumar SS, Nasidze I, Walimbe SR, Stoneking M : Brief communication: discouraging prospects for ancient DNA from India. Am J Phys Anthropol 113: 129-133, 2000.

Kurosaki K, Matsushita T, Ueda S : Individual DNA identification from ancient human remains. Am J Hum Genet 53: 638-643, 1993.

Mulligan CJ : Isolation and analysis of DNA from archaeological, clinical, and natural history specimens. Methods Enzymol 395: 87-103, 2005.

Neeser D, Liechti-Gallati S : Sex determination of forensic samples by simultaneous PCR amplification of a-satellite DNA from both the X and Y chromosomes. J Forensic Sci 40: 239-241, 1995.

O'rourke DH, Carlyle SW, Parr RL : Ancient DNA: methods, progress, and perspectives. Am J Hum Biol 8: 557-571, 1996.

Pääbo S, Poinar H, Serre D, Jaenicke-Despres V, Hebler J, Rohland N, Kuch M, Krause J, Vigilant L, Hofreiter M : Genetic analyses from ancient DNA. Annu Rev Genet 38: 645-679, 2004.

Pääbo S : Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. Proc Natl Acad Sci U S A 86: 1939-1943, 1989.

Poinar HN, Höss M, Bada JL, Pääbo S : Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA. Science 272: 864-866, 1996.

Prado VF, Castro AK, Oliveira CL, Souza KT, Pena SD : Extraction of DNA from human skeletal remains: practical applications in forensic sciences. Genet Anal 14: 41-44, 1997.

Rohland N, Hofreiter M : Comparison and optimization of ancient DNA extraction. Biotechniques 42: 343-352, 2007.

Tebbe CC, Vahjen W : Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. Appl Environ Microbiol 59: 2657-2665, 1993.

Underhill PA, Passarino G, Lin AA, Shen P, Mirazon Lahr M, Foley RA, Oefner PJ, Cavalli-Sforza LL : The phylogeography of Y chromosome binary haplotypes and the origins of modern human populations. Ann Hum Genet 65 (Pt 1): 43-62, 2001.

Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R : Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques 10: 506-513, 1991.

Yang DY, Eng B, Waye 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.

Zaporozhenko EV, Slobodova NV, Bulygina ES, Kravchenko IK, Kuznetsov BB : Method for rapid DNA extraction from bacterial communities of different soils. Mikrobiologiia 75: 127-134, 2006.

www.kci.go.kr

Korean J Phys Anthropol
20(4): 267 ~ 281, 2007

Abstract

Development of Ancient DNA Isolation Method for Improved PCR Amplification

Ki-Jeong Kim[1,2], Ariunaa Togloom[1,2], Eun-Hee Jeon[1,2], Min-Soo Lee[1], Youn-Ock Cho[1], Gavaachimed Lkhagvasuren[1], Jee-Hye Choi[3], Dashtseveg Tumen[4], Keun-Cheol Kim[5], Jae-Hyun Kim[6], Maeng-Seok Noh[7], Ki-Won Park[8], Ae-Ja Park[9], Kwon-Jong Yoo[1,10], Jong-Dae Kim[1,11], Kwang-Ho Lee[1,3], Kyung-Yong Kim[1,12]

[1]*Department of Science & Culture, Graduate School,* [2]*Department of Microbiology, College of Medicine,*
[3]*Department of Life science, College of Natural Science, Chung-Ang University,*
[4]*Department of Anthropology and Archeology, School of Social Sciences,*
National University of Mongolia, Ulaanbaatar,
[5]*Department of Biology, Institute for Life Science, College of Natural Sciences, Kangwon National University,*
[6]*Department of Archaelogy and Art History, College of Humanities, Donga University*
[7]*Division of Mathematical Science, College of Natural Sciences, Pukyong National University*
[8]*DNA Analysis Section, National Institute of Scientific Investigation,*
[9]*Department of Laboratory Medicine, College of Medicine,* [10]*Department of Philosophy,*
College of Liberal Arts, [11]*Department of Folklore Studies, Chung-Ang University*
[12]*Department of Anatomy, College of Medicine, Chung-Ang University*

Ancient DNA analyses are widely used for evolutionary and phylogenetic study of mankind in anthropology and archeology. However, the DNA extraction from particularly poorly preserved ancient human samples is often unsuccessful in these analyses.

In the present study, to improve the success rate of ancient DNA analysis, we introduced a high grade ancient DNA purification method using ion-exchange columns. We compared the success rate of ancient DNA analysis of this new method with that of the two methods that have been used for ancient DNA extraction, GENECLEAN® kit (Qbiogene) and Qiaquick column (Qiagen). Twelve ancient bone samples from Korea and Mongolia that are about 500 to 5,000 years old by an archeological estimation were used. As the DNA analysis methods, polymerase chain reaction (PCR) methods for the amplification of a mitochondrial DNA HV1 segment, a male sex determination marker DNA and M175 marker DNA that is used for the determination of O haplogroup of Y chromosome that is reportedly a common one in modern Korean people.

The method developed in this study remarkably increased the success rate of DNA analysis compared with the other two methods. Using the GENECLEAN® kit, only two samples were amplifiable for the mitochondrial DNA, no sam-

Correspondence to : Kyung-Yong Kim (Department of Anatomy, College of Medicine, Chung-Ang University)
E-mail : skull@cau.ac.kr

www.kci.go.kr

ples for the male sex determination marker and M175 marker DNAs. Using the Qiaquick columns, nine samples were amplifiable for mitochondirial DNA, nine samples for male sex determination marker and six samples for M175 marker. The developed method allowed for the amplification of mitochondrial DNA from all samples, male sex determination marker from eight samples and M175 marker from eight samples.

The results demonstrate that ion-exchange columns can be useful for the improved ancient DNA extraction in anthropology and archeology.

Key words : Ancient DNA, DNA extraction, Ion-exchange column, Polymerase chain reaction

www.kci.go.kr