

## 고인골 유전자 증폭 효율이 높은 PCR 반응 조건

김경용<sup>1,2</sup>, 우지영<sup>3</sup>, 김기정<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>중앙대학교 의과대학 해부학교실, <sup>2</sup>중앙대학교 의학연구소

<sup>3</sup>한림대학교 의과대학 강남성심병원 영상의학과

<sup>4</sup>중앙대학교 의과대학 미생물학교실

**간추림** : 고인골의 시료 및 핵산의 양적 제한 때문에 표적핵산의 PCR 증폭이 고인골 핵산 분석에 필수적으로 요구되는 전제 조건이다. 현대인의 신선한 핵산과는 달리, 사후 보존에 불리한 환경 속에 오랜 시간 동안 방치되어 온 고인골 시료로부터의 PCR 증폭은 성공적이지 못한 경우가 흔하다. 따라서 고인골 DNA에 적합한 PCR 증폭 방법의 시행이 요구된다. 그러나 고대 시료에 적합한 향상된 PCR 증폭 기법에 대한 체계적인 연구가 시행된 보고가 없다.

이 연구에서는 한국과 몽골의 약 500년에서 3300년 된 PCR 증폭이 어려운 8개 고인골 검체들로부터 광범위한 PCR 조건들을 체계적으로 시도하고 PCR 증폭의 성공율을 비교하였다. PCR 조건들의 증폭율을 비교하기 위한 표적 핵산으로서는 카피수가 많은 사립체 핵산과 세포내 단일 카피 DNA로서 현대 한국인에서 흔한 Y 염색체 일배체 그룹으로 알려진 O 일배체 그룹 표지 (M175) 핵산을 이용하였고, 성공적인 증폭산물의 형성의 검증은 증폭산물들의 염기서열을 분석을 통하여 시행하였다.

이 연구를 통하여 고인골에서 핵산을 증폭하기 위한 최적의 PCR 조건을 확립하였고, 결정된 방법은 검사한 모든 샘플에서 사립체 핵산을 성공적으로 증폭시켰고, M175 Y 염색체 일배체 표지 핵산의 증폭은 검사된 시료수의 50% 성공율을 나타냈지만 시도된 조건들에서 가장 높은 성공율을 나타내었다.

이 결과는 성공적인 고인골 핵산분석을 위한 최적의 PCR 조건으로 분자 유전학적 인류학 연구에 유용하게 쓰일 수 있음을 시사한다.

**찾아보기 낱말** : 고인골 핵산, PCR, 사립체 핵산, Y 염색체 이중 대립유전자 표지

### 서론

최근 급속히 발전한 분자생물학적 기법들은 의학을 포함한 생명과학 분야에서 유전학적 분석을 가속화시켰을 뿐만 아니라 인류학, 고고학, 범죄 수사학, 진화학 등의 분야에서도 흔히 단순 형질학적 기초만으로는 분명한 결론에 도달할 수 없을 때, 보다 자연과학적이고 심층적인 유전학적 증거를 제시할 수 있는 훌륭한 대체 또는 보충적 도구를 제공하였

다. 특히 PCR의 도래 후 이전에는 불가능하였던 고대 시료의 유전학적 분석은 지금으로부터 수천 수만년 전까지 걸친 고대 시대와 지역에 따른 고대인의 숨겨져 있는 유전정보를 획득할 수 있게 하였다. 이러한 정보들은 현대인의 유전정보 분석에 의존해서 유추될 때 발생될 수 있는 인류 계통발생학적 결론의 오류, 편차, 왜곡 또는 모호성 등을 극복하는데 중요한 역할을 할 것으로 여겨지고 있다 (O'Rourke 등 2000). 따라서 이러한 목적으로 고인골 핵산 (DNA) 분석 기법의 이용이 전세계적으로 증가되고 있는 추세이다.

고인골 DNA는 PCR 증폭을 어렵게 하는 고인골

\*이 논문은 2006년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임  
교신저자: 김기정 (중앙대학교 의학연구소)  
전자우편: kimkj@cau.ac.kr

시료 자체의 내인적인 문제점들을 상당히 가지고 있음이 잘 보고되고 있다. 즉, 고인골로부터 DNA를 추출하였을 때 고인골 DNA는 질적으로 심히 손상되어 있고, 그나마 극미량으로 존재하며, 추출된 DNA 대부분의 구성이 현대인을 포함한 외부 기원 생물의 DNA로 오염되어 있고, 게다가 PCR 억제 물질이 다량 함유되어 있기 때문에 고인골로부터 성공적인 PCR 증폭은 결코 단순하지 않다(Kim 등 2007b). 이러한 고인골 DNA의 복잡성은 최근 개발된 적절한 DNA 추출 방법에 의해 상당히 해결되어 다수의 고인골 시료로부터 PCR 성공률이 높아졌다(Kim 등 2007b, Rohland와 Hofreiter 2007).

그러나 아무리 고인골 DNA가 적절하게 분리되었다 하더라도 PCR 기법의 조건에 따라 PCR 성공률이 다른 소견을 나타내기 위해 고인골 DNA의 경우 신선한 조직 추출 DNA와 달리 적절한 PCR 조건이 중요하게 요구된다. 일례로 고인골 DNA의 경우 대부분의 실험실에서 PCR 반응액 내에 불가피하게 존재하는 잔여 PCR 억제물질의 효과를 극복하기 위해 소 혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA)을 추가로 첨가하는 것은 일반화되어 있으나 그 외 PCR 반응액 필수 성분들인 dNTP, MgCl<sub>2</sub>, primer, Taq DNA 중합효소 등은 실험실마다 다양한 농도로 특별히 표준화된 방법이 없이 이용되고 있는 실정이다(Krings 등 1997, Yang 등 1998, Kalmár 등 2000, Kumar 등 2000, Wang 등 2000, Adachi 등 2001, Kaestle과 smith 2001, Izaguirre 등 2002, Yang 등 2003, Edson 등 2004, Rohland와 Hofreiter 2007, Kim 등 2007b). 본 연구 저자들은 기존 고인골 PCR 실험 과정 중에 PCR 반응액 성분들의 농도를 임의적으로 조정할 때 고인골 PCR 성공률 및 증폭산물의 양이 증가되거나 또는 감소되는 변화를 관찰하였고 이 성분들이 각각 농도에 따라 PCR 성공에 있어 서로 복잡하게 상호작용하는 양상이 있음을 인지하였다. 그러나 고인골 PCR에 적합한 이 모든 성분들의 적절한 양에 대한 체계적인 조사는 여태까지 보고된 바가 없으며 고인골 PCR에 정형화된 반응액 조성도 존재하지 않는다.

따라서 이 연구에서는 PCR 반응액 성분들 각각의

농도를 체계적으로 변화시켜 각각의 PCR 반응액 조합들이 PCR 성공률에 어떠한 영향을 나타내는가를 평가하고, 궁극적으로 향상된 PCR 성공률을 나타내는 최적이며 일반화된 고인골 DNA PCR 반응액 조성을 확립하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 고인골 시료

이 연구에서는 고고학적으로 500년에서 3300년 이전의 것으로 추정되는 한국과 몽골에서 출토되고 기존의 PCR 방법에 의해 증폭이 안되는 8개의 고인골 시료를 사용하였다(Table 1).

### 2. DNA 추출

시료로부터 핵산을 추출하는 모든 과정 동안에 현대인 DNA 오염을 방지하기 위하여 Kim 등의 방법을 따라 시행하였다(Kim 등 2007b). 고인골의 DNA 추출과 정제 역시 Kim 등의 방법에 따라 시행하였다(Kim 등 2007b).

### 3. PCR

이 연구에서 시행한 고인골 PCR의 표적 DNA는 비교적 카피수가 많은 사람 사립체 DNA의 과변이 부위 1(hypervariable segment 1, HV1) DNA(263 bp)와 사람 진화 및 유연관계 연구에 이용되는 표지 중 하나인 M175 Y 염색체 일배체 표지 DNA(231 bp)(Underhill 등 2001)의 증폭능력에 기초하여 이루어졌다. primer 염기서열 정보는 Table 2와 같다.

고인골 PCR에 최적의 PCR 기법을 결정하기 위하여 PCR 반응액에 포함되는 성분들인 dNTP, MgCl<sub>2</sub>, primer, Taq DNA 중합효소 등의 특정량들을 모두 조사하는 것은 무수히 많은 조합들을 양산하기에 최적의 효율적인 변수들을 결정하기 위하여 최근까지 보고된 고인골 사립체 핵산 증폭 PCR에서 사용된 반응액 조성들을 조사하였다(Table 3). 그 결과 dNTP의 농도는 0.2 mM이 절대적으로 우세하

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

Sample code	Bone	Sex		Excavated site	Estimated age*	Reference
		M <sup>†</sup>	G <sup>‡</sup>			
KR0010	Left femur	ND <sup>¶</sup>	M**	Tumuli at Chuam-dong, Donghae Si, Gangwon-Do, Korea	6th C. Silla kingdom (5th~7th C. AD)	Kim 1994
KR0067	Left femur	F <sup>‡</sup>	M	Tumuli at Chuam-dong, Donghae Si, Gangwon-Do, Korea	6th C. Silla kingdom (5th~7th C. AD)	Kim 1994
KR0071	Right femur	M	M	Neukdo-dong, Sacheon Si, Gyeongsangnam-Do, Korea	Early Iron age	Shim and Kim 2001
KR0072	Left femur	M	M	Tumuli at Chuam-dong, Donghae Si, Gangwon-Do, Korea	6th C. Silla kingdom (5th~7th C. AD)	Kim 1994
KR0151	Left tibia	ND	M	Baekgok-ri Mado-myeon, Hwaseong Si, Gyeonggi-Do	Chosun dynasty (14th~19th C. AD)	
MN0026	Left femur	M	M	Western Mongolia	Bronze age	Tumen 1978
MN0026	Left tibia	M	M	Western Mongolia	Bronze age	Tumen 1978
MN0226	Left tibia	M	M	Central Mongolia	Mongol age	Tumen 2007

\*Based on the archeological findings of discovered artifacts during excavations such as coins, potteries and grave types

<sup>†</sup>Based on morphology

<sup>‡</sup>Based on amelogenin sex marker DNA analysis (Kim et al. 2007a)

<sup>¶</sup>Not determined

\*\*Male

<sup>‡</sup>Female

**Table 2.** Primers used for the amplification and sequencing of DNA fragments of mtDNA HV1 and M175 Y chromosomal biallelic marker

Target	Primer name	Sequence (5'→3')	Product (bp)	Reference
mtDNA HV1	F15989	CCCAAAGCTAAGATTCTAAT	263*	Edson et al. 2004
	R16251	GGAGTTGCAGTTGATGT		
M175 marker	M175-F	AAAATAGTACCCAAATCAACTCA	231	Kim et al. 2007b
	M175-R	TTCTCTTGACAGCATTTTCAGTT		
M175 sequencing	M175-R1	TTCAGTTAGCCTTGATTGACTGT		This study

\*Based on the revised Cambridge reference sequence (Andrews et al. 1999)

**Table 3.** Recently attempted PCR master mix conditions for amplification of aDNA

dNTP (mM)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Primer (μM)	BSA (mg/mL)	Taq* (U/50 μL)	Taq brand name	Reference
0.25	1.5	1	0.625	ND	Ampli Taq Gold	Edson et al. 2004
0.2	2	1	1.5	1.25	ND	Yang et al. 1998
0.2	2.5	0.2	1	2.5	Ampli Taq Gold	Rohland and Hofreiter 2007
0.2	2.5	0.3	1	1.25	Ampli Taq Gold	Yang et al. 2003
0.2	2.5	0.2	0.8	2.5	Ampli Taq Gold	Kumar et al. 2000
0.2	2	1	1	0.75	Ampli Taq	Krings et al. 1997
0.2	2	0.5	0	2.5	Ampli Taq Gold	Wang et al. 2000
0.2	1.5	0.4	0.16	2.5	ND	Kalmár et al. 2000
0.2	1.5	0.6	1	1.5	Ampli Taq Gold or Platinum Taq (Gibco BRL)	Kaestle and Smith 2001
0.2	1.5	0.2	0.1	1.25	HotStar Taq <sup>TM</sup> (Qiagen)	Adachi et al. 2004
0.2	2	0.4	0.57	2	Ampli Taq	Izaguirre and De La Rua 2002

\*Taq DNA polymerase

게 사용되었고, MgCl<sub>2</sub>는 1.5~2 mM 범위, primer는 대부분 0.2~1 μM 범위, BSA 함량은 0~1.5 mg/mL 범위, Taq DNA 중합효소는 1.25~2.5 U/50 μL 범위 내에서 다양한 농도로 사용되었다. 따라서 본 연구에서는 dNTP의 농도는 0.2 mM로 고정시켰으며, MgCl<sub>2</sub>는 1.5 또는 2 mM, primer는 0.5 또는 1 mM, BSA는 0.1 또는 1 mg/mL, Taq DNA 중합효소는 1.25 또는 2 U/50 μL의 변수들을 조사할 것으로 결정하였다 (Table 4). 이들 변수들의 가능한 모든 조합을 통하여 16가지의 반응액 조성의 조합을 검사하였다 (Table 5). 카피수가 적은 M175 Y 염색체 일배체 표지 DNA의 증폭의 경우 위의 방법에 의해서 결정된 최적의 조건에서 Taq DNA 중합효소 변수 검사 양

의 수를 더 늘려 Taq DNA 중합효소의 양에 의한 PCR 증폭 영향에 대한 상세한 조사를 시행하였다 (Table 6).

PCR을 위한 기기로서 GeneAmp® 9700 장치 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA)를 사용하였고 반응부피는 20 μL이었다. Taq 중합효소로서는 AmpliTaq Gold® DNA 중합효소 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA)를 사용하였다. 고인골 추출 DNA의 양으로서 사립체 핵산 증폭 실험에는 1 μL을, M175 Y 염색체 일배체 표지 DNA 증폭 실험에는 4 μL을 사용하였다. 증폭주기 조건은 사립체 핵산 증폭 실험은 95°C에서 10분간 1주기, 95°C 30초, 60°C 30초, 72°C 1분의 40주기, 72°C에서 7분의 1주기로서 구성하였고, M175 Y 염색체 일배체 표지 DNA 증폭 실험은 95°C에서 10분간 1주기, 95°C 30초, 60°C 1분, 72°C 1분의 45주기, 72°C에서 7분의 1주기로서 구성하였다. PCR 증폭산물 확인은 반응물 5 μL를 브롬산 에티디움 (ethidium bromide)이 포함된 1.7% 아가로스젤을 이용한 전기영동 분석법에 의하여 이루어졌다.

**Table 4.** Variables of PCR reaction components and their tested concentrations

PCR buffer	dNTP (mM)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Primer (μM)	BSA (mg/mL)	Taq* (U/50 μL)
1 ×	0.2	1.5	0.5	0.1	1.25
1 ×	0.2	2	1	1	2

\*Ampli Taq Gold polymerase (Applied Biosystems, Foster City, California, USA)

**Table 5.** PCR mastermix compositions tested in this study to determine the most optimized condition for the successful PCR for mtDNA amplification from the ancient bone samples

Mastermix No.	Template DNA (μL)	PCR buffer	dNTP (mM)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Primer (μM)	BSA (mg/mL)	Taq* (U/50 μL)
1	2	1 ×	0.2	1.5	0.5	0.1	1.25
2	2	1 ×	0.2	2	0.5	0.1	1.25
3	2	1 ×	0.2	1.5	1	0.1	1.25
4	2	1 ×	0.2	1.5	0.5	1	1.25
5	2	1 ×	0.2	1.5	0.5	0.1	2
6	2	1 ×	0.2	2	1	0.1	1.25
7	2	1 ×	0.2	2	0.5	1	1.25
8	2	1 ×	0.2	2	0.5	0.1	2
9	2	1 ×	0.2	1.5	1	1	1.25
10	2	1 ×	0.2	1.5	1	0.1	2
11	2	1 ×	0.2	1.5	0.5	1	2
12	2	1 ×	0.2	2	1	1	1.25
13	2	1 ×	0.2	2	1	0.1	2
14	2	1 ×	0.2	2	0.5	1	2
15	2	1 ×	0.2	1.5	1	1	2
16	2	1 ×	0.2	2	1	1	2

The shades indicate the concentration changes relative to mastermix combination No. 1.

\*Ampli Taq Gold polymerase (Applied Biosystems, Foster City, California, USA)

**Table 6.** PCR mastermix compositions tested in this study and the results to determine the most optimized condition for the amplification of M175 Y chromosomal biallelic marker DNA from the ancient bone sample

Mastermix No.	dNTP (mM)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Primer (μM)	BSA (mg/mL)	Taq* (U/50 μL)	PCR success (%)	Product yield
1	0.2	2	1	1	1.5	50	++++ <sup>†</sup>
2	0.2	2	1	1	2	25	++++
3	0.2	2	1	1	2.5	25	++++
4	0.2	2	1	1	3	25	++++

\*Taq, Ampli Taq Gold polymerase (Applied Biosystems, Foster City, California, USA)

<sup>†</sup> Strongly stained amplified products based on the agarose gel electrophoresis

**Table 7.** The change of PCR success rates and yields by the change of concentrations of PCR mastermix reaction components in mtDNA amplification from the ancient bone samples

Mastermix No.	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Primer (μM)	BSA (mg/mL)	Taq* (U/50 μL)	PCR success (%)	Product yield <sup>†</sup>
12	2	1	1	1.25	100	+++
16	2	1	1	2	88	++++
6	2	1	0.1	1.25	75	+++
14	2	0.5	1	2	75	++
7	2	0.5	1	1.25	75	++
2	2	0.5	0.1	1.25	75	+
9	1.5	1	1	1.25	63	++
15	1.5	1	1	2	63	++
3	1.5	1	0.1	1.25	63	+
1	1.5	0.5	0.1	1.25	50	+
8	2	0.5	0.1	2	50	+++
13	2	1	0.1	2	50	+++
10	1.5	1	0.1	2	50	+++
4	1.5	0.5	1	1.25	38	+
5	1.5	0.5	0.1	2	38	+
11	1.5	0.5	1	2	25	++

The shades indicate the concentration changes relative to mastermix combination No. 1.

\*Taq, Ampli Taq Gold polymerase (Applied Biosystems)

<sup>†</sup> Relative amount of positive amplicons determined by agarose gel electrophoresis; +, low; ++, medium; +++, high; +++++, very high

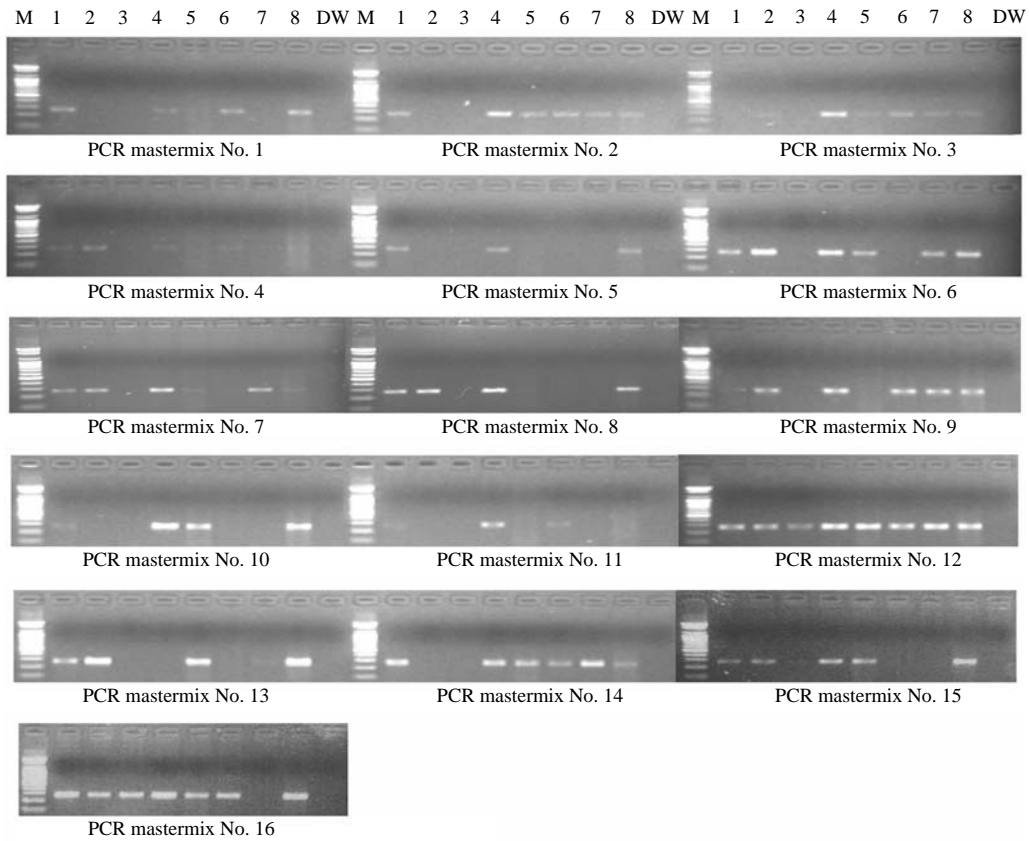
#### 4. DNA 염기서열 분석

HV1 증폭산물의 염기서열의 확인과 M175 Y 염색체 일배체 표지 단일염기변이를 확인하기 위하여 증폭산물을 AccuPrep® PCR Purification Kit (바이오니아, 대전광역시, 대한민국)를 이용하여 정제하였고 Big Dye terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA)와 ABI PRISMs 3700 DNA 분석기 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA)를 이용하여 염기서열을 결정하였다.

## 결 과

### 1. 고인골 시료로부터 사립체 핵산 증폭의 최적 PCR 반응액 조성

고인골 시료로부터 사립체 핵산 증폭에 있어서 가장 높은 성공율을 보이는 최적의 PCR 반응액 조성을 알아보하고자 16개의 반응액 조합들을 가지고 동일한 8개의 고인골 추출 DNA들로 조사한 결과 가장 높은 성공율(100%)을 보인 반응액 조성은 12 번째 조합으로 0.2 mM dNTP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 μM

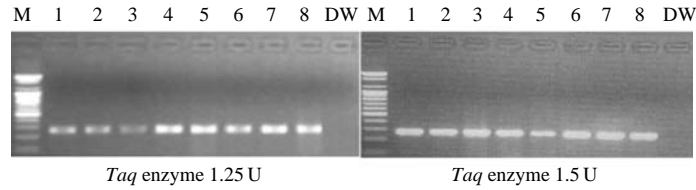


**Fig. 1.** Agarose gel electrophoresis analysis of PCR products targeting mitochondrial HV1 DNA fragment (263 bp) from ancient DNAs amplified using a variety of different reaction conditions. See table 5 for the mastermix compositions. Lane M, 100-bp size marker. Lanes of ancient bone samples: 1, KR0062; 2, MN0026 left femur; 3, MN0226; 4, MN0026 left tibia; 5, KR0015; 6, KR0071; 7, MR0010; 8, KR0072. Lane DW, distilled water.

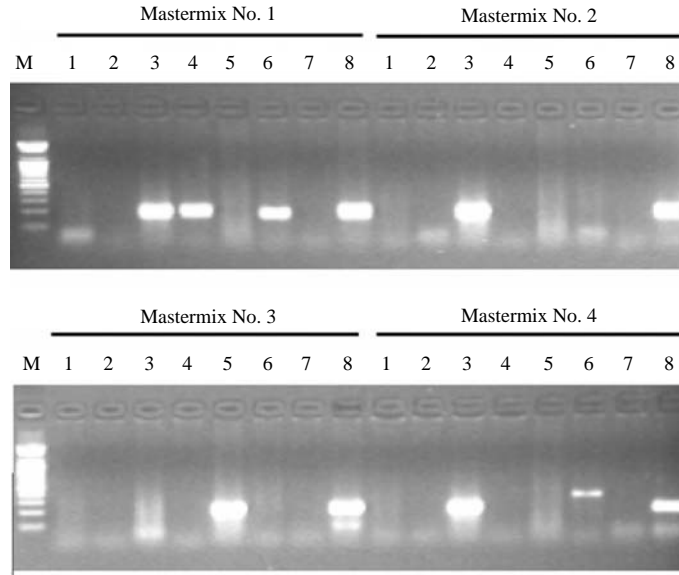
primer, 1 mg/mL BSA, 1.25 U/50  $\mu$ L *Taq* DNA 중합효소로 구성되었다 (Table 7, Fig. 1). 그 다음으로 가장 높은 성공율(88%)을 보인 반응액 조성은 16번째 조합으로 0.2 mM dNTP, 2 mM  $MgCl_2$ , 1  $\mu$ M primer, 1 mg/mL BSA, 2 U/50  $\mu$ L *Taq* DNA 중합효소로 구성되었다. 이 두 조합의 차이점은 *Taq* DNA 중합효소만의 양적 차이를 보였다. 다른 성분의 양과 상관없이  $MgCl_2$ 의 양에 따른 성공율을 비교했을 때  $MgCl_2$ 의 농도가 1.5 mM이었을 때의 성공율은 평균 48.8%이었고  $MgCl_2$ 의 농도가 2 mM이었을 때는 평균 73.5%의 성공율을 나타내어 2 mM의  $MgCl_2$ 가

고인골 PCR에 더 크게 효율적임을 시사하였다. Primer의 농도에 따른 성공율을 비교했을 때 primer의 농도가 0.5  $\mu$ M일 때 평균 53.3%의 성공율을 보였고 1  $\mu$ M일 때는 69%의 성공율을 보여 primer의 농도도 1  $\mu$ M로 증가시켰을 때 더 성공적이었다. BSA만의 농도에 따른 성공율은 농도가 1 mg/mL이었을 때가 0.1 mg/mL일 때 보다 더 성공적이었다 (평균 각각 65.9%, 56.4%). *Taq* DNA 중합효소만의 양에 따른 PCR 성공율은 1.25 U/50  $\mu$ L일 때가 2 U/50  $\mu$ L에 비해 더 높은 성공율을 나타냈다 (평균 각각 67.4%, 54.9%). 증폭된 PCR 생산물의 양적 비

— 고인골 DNA PCR —



**Fig. 2.** Agarose gel electrophoresis analysis of PCR products targeting mitochondrial HV1 DNA fragment (263 bp) from ancient DNAs amplified using the most optimized condition but modified amounts of only *Taq* DNA polymerase, 1.25 and 1.5 U/50  $\mu$ L. Lane M, 100-bp size marker. Lanes of ancient bone samples: 1, KR0062; 2, MN0026 left femur; 3, MN0226; 4, MN0026 left tibia; 5, KR0015; 6, KR0071; 7, MR0010; 8, KR0072. Lane DW, distilled water.



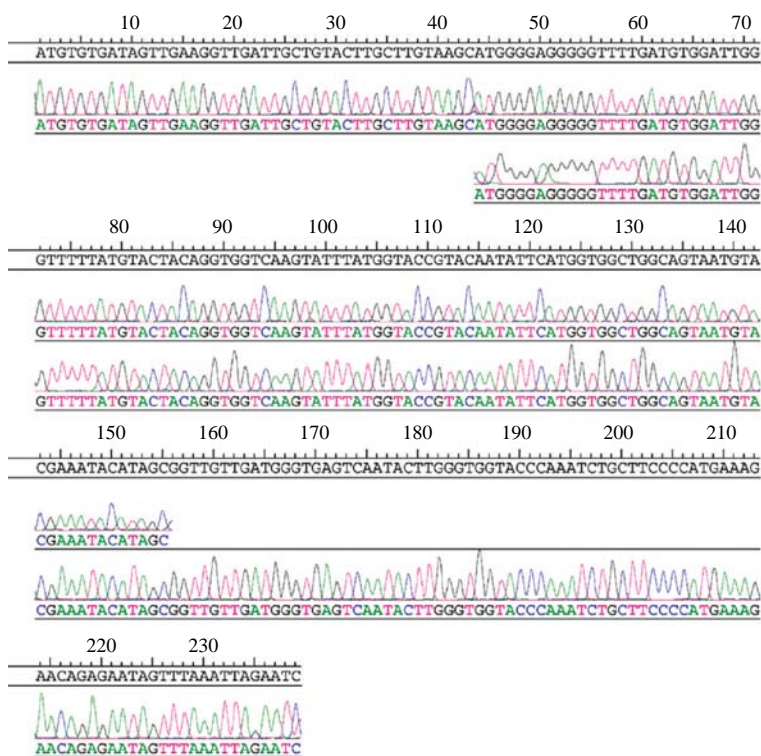
**Fig. 3.** Agarose gel electrophoresis analysis of PCR products targeting M175 Y chromosomal biallelic marker DNA from ancient DNAs amplified using different reaction conditions. See Table 6 for the mastermix compositions. Lane M, 100-bp size marker. Lanes of ancient bone samples: 1, KR0062; 2, MN0026 left femur; 3, MN0226; 4, MN0026 left tibia; 5, KR0015; 6, KR0071; 7, MR0010; 8, KR0072. Lane DW, distilled water.

교에서는  $MgCl_2$ , primer, *Taq* 효소는 많은 양을 사용했을 때 그리고 BSA는 적은 양을 사용했을 때가 상대적으로 가장 많은 생산량을 나타내는 경향을 보였다.

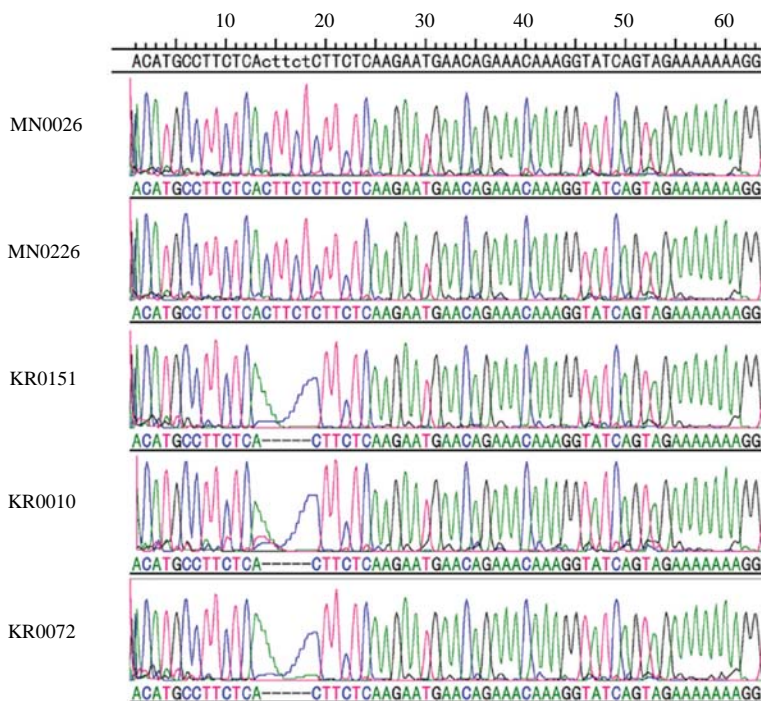
추가적인 실험으로 가장 높은 성공율을 보인 12번 조합의 *Taq* DNA 중합효소의 양을 1.5 U로 상승시켰을 때 높은 성공율은 그대로 유지하면서 산물의 양이 증가되었다(Fig. 2)

## 2. 고인골 시료로부터 M175 Y 염색체 일배체 표지 DNA의 증폭

카피수가 적어서 고인골로부터 증폭이 특히 어려운 것으로 알려진 Y 염색체 일배체 그룹 표지 DNA의 증폭의 경우에 위에서 결정된 최적의 조건에 *Taq* 효소의 증가에 따른 PCR 성공율을 비교한 결과 가장 높은 성공율과 생산량을 나타낸 반응액 성분의 조성은 0.2 mM dNTP, 2 mM  $MgCl_2$ , 1  $\mu$ M primer,



**Fig. 4.** DNA sequencing electropherograms of mitochondria HV1 DNA of ancient bone KR0010 sample. DNA sequences are obtained by direct bidirectional sequencing of the PCR amplicon and were aligned by using Seqman software (DNASTAR Madison, WI, USA).



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

1 mg/mL BSA, 1.5 U/50  $\mu$ L *Taq* DNA 중합효소이었으며 *Taq* DNA 중합효소의 양을 점차적으로 증가시켜도 PCR 성공율은 향상되지 않는 일관성 있는 결과를 나타내었다(Table 6, Fig. 3). PCR 생산물의 양은 검사한 모든 조건에서 다량의 소견을 보였다.

### 3. 증폭산물의 동정

생성된 고인골 HV1 DNA 증폭산물의 확인을 위하여 DNA 염기서열분석 결과는 분명한 DNA 전기영동도를 나타내었다(Fig. 4, Fig. 5). 증폭산물의 특이성을 검증하기 위하여 DNA 염기서열 분석을 한 결과 사립체 DNA, M175 Y 염색체 일배체 표지 DNA 모두 정확하게 생산되었음이 검증되어 비특이적 산물이 생산된 것이 아님을 나타내었다. 시료들의 결정된 염기서열은 사람 사립체 염기서열로 확인이 되었고 시료간 서로 일치하는 서열은 없었고 실험자의 사립체 DNA 염기서열과 일치하는 서열도 발견되지 않았다.

고인골 시료들의 M175 Y 염색체 일배체 표지의 DNA 염기서열분석에 의한 결과 M175 Y 염색체 일배체 표지 PCR이 성공한 KR0151, KR0010, KR0072 한국 고인골 시료들은 다섯개의 염기('CTTCT')가 결손된 모두 우리나라 현대인에 많은 그룹으로 보고된 O 일배체그룹(haplogroup)에 속하였고(Jobling과 Tyler-Smith 2003), 증폭이 성공적인 몽골 고인골 시료 MN0026, MN00226 모두 O 일배체그룹에 속하지 않았다(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 휴민산(humic acid)과 같은 잠재적 PCR 억제물질들이 다량 함유되어 있다(Hänni 등 1995, Kalmár 등 2000, Keyser-Tracqui와 Ludes

2005). 따라서 고인골 DNA의 분리시 가능한한 PCR 억제물질들을 제거하기 위한 고순도의 DNA 분리가 성공적인 PCR 증폭을 위해 필수적이다. 이러한 목적으로 고인골 DNA를 초순수로 분리하는 방법들이 시도되어 왔다(Hagelberg와 Clegg 1991, Walsh 등 1991, Blake 등 1992, Höss와 Pääbo 1993, Kurosaki 등 1993, Cattaneo 등 1995, Faerman 등 1995, Hänni 등 1995, Cattaneo 등 1997, Evison 등 1997, Prado 등 1997, Yang 등 1998, Rohland와 Hofreiter 2007, Kalmár 등 2000). 다음으로 고인골 DNA의 PCR 증폭 기법도 적절한 전략이 요구된다. 아무리 고순도로 고인골 DNA를 정제하였다 하더라도 미량이나마 PCR 증폭을 방해하는 억제물질이 잠재적으로 존재할 수 있기에 신선한 조직에서 분리한 DNA의 PCR 증폭 조건과는 달리 PCR 억제 효과를 극복할 수 있는 민감도가 향상된 증폭 기법이 요구된다.

고인골 PCR에서 가장 필수적으로 포함되는 성분으로서 BSA가 있다. Table 3에서 보는 바와 같이, 거의 모든 고인골 DNA PCR에서 BSA가 함유되고 있음을 알 수 있다. 그러나 이러한 BSA의 함량에 대해서는 정해진 규칙이 없다. 보통 판매되는 키트(Qiagen)에서 추천하는 예는 0.1 mg/mL 이다. 그러나 고인골 PCR에서는 Table 3에서 보는 바와 같이 0.1 mg/mL보다는 더 많은 양으로 다양하게 사용되고 있음을 알 수 있다. 저자들의 기존 연구에서도 최소한 0.1 mg/mL BSA를 첨가하여야지만 PCR이 성공적인 예가 많았다.

다음으로  $MgCl_2$ 도 성공적인 PCR에서 없어서는 안 될 중요 성분으로서 보통 1.5 mM이 표준량으로서 가장 흔하게 사용된다. 형광염료가 첨가되는 실시간 PCR 같은 경우에는 3 mM이 흔히 사용된다. 일반적으로  $MgCl_2$ 의 양이 많으면 PCR의 민감도는 상승되나 원하지 않는 산물이 생성되어 증폭 산물 특이성이 감소할 수 있는 위험이 있다. 고인골 DNA와 같이 민감도가 높게 요구되는 경우에는 표준량보다 많은 양을 쓰는 것이 선호될 수 있으며 이는 Table 3에서 보는 바와 같이 많은 학자들이 1.5 mM보다 더 많은 양을 사용하고 있음을 알 수 있다.

Primer의 경우에는 보통 0.5  $\mu\text{M}$ 이 처음 PCR 시도에 사용된다. PCR이 성공적이면 0.2  $\mu\text{M}$  까지도 용량을 낮추어 흔히 사용한다. 1  $\mu\text{M}$  까지도 많은 양이 사용되기도 한다. 그러나 필요이상으로 많은 양의 primer의 사용은 바람직하지 못하다. Primer의 양이 너무 많으면 비특이적인 산물이 생산될 수 있으며 게다가 primer 중합체의 형성이 심하게 일어날 수 있다. 고인골 PCR의 경우에는 Table 3에서 보는 바와 같이 0.2  $\mu\text{M}$  보다는 더 많은 양을 사용하는 학자들이 많은 것을 알 수 있다.

다음으로 *Taq* DNA 중합효소는 50  $\mu\text{L}$  반응 부피 조건에서 흔히 1.25 unit가 표준량으로 알려져 있다. 일반적으로 *Taq* DNA 중합효소의 양이 많으면 생산물의 양이 많아질 수 있지만 더불어 비특이적인 산물이 생성될 가능성이 높은 것으로 알려져 있다. 고인골 PCR의 경우 Table 3에서 보는 바와 같이 1.25 U/50  $\mu\text{L}$  에서 2.5 U/50  $\mu\text{L}$ 까지 다양하게 시도되고 있음을 알 수 있다.

dNTP는 핵산의 기질 성분으로서 PCR시 0.2 mM이 표준량으로 사용된다. 고인골 PCR의 경우에도 dNTP의 양은 대부분 변함없이 0.2 mM이 사용된다 (Table 3). 따라서 dNTP의 양은 PCR의 성능을 좌우하는데 결정적이지 않음을 시사한다.

이상과 같이 PCR 반응액에 필수적인 성분들의 일반적으로 사용되는 양과 고인골 PCR에서 시도된 양을 알아보았지만 이들 각 성분들의 양의 변화에 따른 체계적인 조합에 의한 PCR 성공률에 대한 조사는 이루어지지 않았다. 각각 성분들의 양에 따라서는 PCR의 민감도와 효율성이 증가되거나 또는 감소될 수 있다는 것은 암시될 수 있으나 서로 다른 양의 성분들이 혼합되는 경우에 잠재적으로 일어날 수 있는 PCR 성공률에 대한 예측은 할 수 없다. 특히 고인골 PCR의 경우에는 Table 3에서 보는 바와 같이 PCR 반응액 성분들의 양을 다양하게 시도되고 있으므로 본 연구에서와 같이 각각 성분들의 양에 따른 PCR 성공률을 체계적으로 조사해볼 필요성을 갖게 하였다.

고인골 시료의 유전자분석을 위한 PCR 증폭 기법에 있어 전세계적으로 많은 학자들에 의해 수용될

만한 표준적인 방법의 확립은 아직 초기 단계에 있다. 최근에 성공적인 고인골 DNA PCR 증폭을 위하여 고인골에서 가장 효율적인 DNA의 분리방법이 시도되었고 일부 증폭 방법의 비교가 소개되었지만 반응액 성분의 체계적인 비교 조사는 이루어지지 않았다 (Kim 등 2007b, Rohland와 Hofreiter 2007).

본 연구에서는 고인골 PCR에 가장 적합한 PCR 반응액 조건을 알아보기 위하여 PCR에 필수적인 반응액 구성 성분들의 양의 변수를 대표적으로 각각 두 개씩 정하여 Table 5에서 보는 바와 같이 이 변수들의 가능성 있는 모든 조합의 수인 16개의 반응액들을 고인골 PCR에서 검사하여 보았다. PCR이 잘 되는 고인골 시료와 비교적 안 되는 고인골 시료들을 적절히 포함한 8개의 시료를 선정하여 이 모든 조합의 PCR 반응액들을 동일한 양의 시료 DNA로 동일한 PCR 주기 조건과 동일한 PCR 장치를 이용하여 반응액만의 PCR 영향을 조사하였다. 그 결과 고인골 사립체 핵산 PCR의 경우 검사된 모든 시료에서 성공적인 PCR을 보인 조합이 결정될 수 있었다 (Table 7). 이 조합은  $\text{MgCl}_2$ , primer, BSA 모두 많은 양을 썼을 때였으나 반대로 *Taq* DNA 중합효소는 더 적게 썼을 때의 조합 (조합 번호 12) 이었다. 두 번째로 가장 높은 성공율을 보인 조합은 위의 조합에서 *Taq* DNA 중합효소의 양을 많이 사용하였을 때이다 (조합 번호 16). 두 번째 높은 성공율을 보인 16번 조합은 대신 PCR 생산량이 성공율이 가장 높은 12번 조합보다 많은 양상을 나타내었다. 이는 성공율에 상관없이 증폭산물의 양만을 관찰하였을 때 보면, 전체적으로 2U를 사용하였을 때가 1.5U를 사용하였을 때보다 산물의 양이 많은 경향을 나타남과 일치하였다. 산물의 양이 너무 적을 때는 염기서열 분석과 같이 이후 작업에 있어 번거로움을 제공할 수 있겠지만 산물이 생성되지 않으면 이후 분석 작업이 아예 불가능하므로 산물의 양보다는 시료 수에 따른 PCR 성공율이 더욱 중요하다 하겠다. 그러나 두 번째 조합이 산물의 양이 증가된 것의 장점을 고려하여 두 번째 조합의 PCR 성공율을 더 향상 시킬 수 있는 조건을 고려해 볼도 바람직하다. 실제로 *Taq* DNA 중합효소의 양을

1.25와 2 U 사이의 양인 1.5 U을 사용하였을 때 모든 시료에서 성공을 할 수 있었고, 동시에 산물의 생산량도 증가되었다(Fig. 2).

고인골로부터 카피 수가 적은 DNA의 증폭 성공율을 높이기 위하여 위에서 결정된 최적의 조건에서 *Taq* DNA 중합효소의 양을 점차로 증가시켰을 때 오히려 성공율이 저하되는 결과를 보였다. 이는 카피수가 적은 DNA라 할 지라도 효소의 증가로 PCR 성능의 향상을 기대할 수 없을 보여주는 결과이며 오히려 더 저하되는 결과를 초래함을 시사한다.

본 연구를 통하여 고인골 PCR에 적합할 PCR 반응액 조성 성분의 함량을 체계적으로 조사하였고 그 결과로서 최적의 PCR 반응액 조성 성분의 양을 결정하였다. 생산물의 동정은 염기서열을 통해서 특이적인 산물이었음을 입증하였다. 그러나 카피 수가 적은 DNA의 증폭 조건에 대해서는 성공율을 향상시키기 위하여 반응액 뿐만 아니라 다른 조건의 조정에 대한 연구가 추후 행해져야 할 것으로 생각된다.

본 연구의 결과는 고인골 핵산 분석에 필수적인 고인골 DNA PCR에서 최적의 반응액 조성의 조건을 확립하는데 기초적인 자료를 제공함으로써 인류학, 고고학 및 범죄수사학 분야에서 특히 잘 보존되지 않은 고인골 시료의 유전학적 연구에 유용하게 쓰일 수 있을 것으로 기대한다.

## 참 고 문 헌

- Adachi N, Umetsub K, Takigawaa W, Sakauea K : Phylogenetic analysis of the human ancient mitochondrial DNA. *J Archaeol Sci* 31: 1339-1348, 2004.
- Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N : Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 23: 147, 1999.
- 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.
- 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.
- 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.
- Edson SM, Ross JP, Coble MD, Parsons TJ, Barritt SM : Naming the dead-confronting the realities of rapid identification of degraded skeletal remains. *Forensic Sci Rev* 16: 64-89, 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 alleles. *Gene* 167: 327-332, 1995.
- Hagelberg E, Clegg JB : Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proc Biol Sci* 244: 45-50, 1991.
- 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.
- Izaguirre N, de la Rúa C : Ancient mtDNA haplogroups: a new insight into the genetic history of European populations. *Int J Anthropol* 17: 27-40, 2002.
- Jobling MA, Tyler-Smith C : The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nat Rev Genet* 4: 598-612, 2003.
- Kaestle FA, Smith DG : Ancient mitochondrial DNA evidence for prehistoric population movement: the Numic expansion. *Am J Phys Anthropol* 115: 1-12, 2001.
- Kalmár T, Bachrati CZ, Marcsik A, Raskó I : A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones. *Nucleic Acids Research*. 28: e67-e67, 2000.
- Keyser-Tracqui C, Ludes B : Methods for the study of ancient

- DNA. *Methods Mol Biol* 297: 253-264, 2005.
- Kim JH : The burial process of the Chuam-Dong tumuli, Dong-Hae city, Korea: in the case of the KA-31 location B tomb. *Journal of The society of Kyushu Prehistoric and Ancient Cultural Studies* No.33. KOBUNKA DANSO. Japan, pp 205-221, 1994
- Kim K, Togloom A, Jeon E, Lee MS, Cho YO, Lkhagvasuren G, Min NY, Choi JH, Kim JD, Kim KC, Kim JH, Noh MS, Park AJ, Yoo KJ, Mustafokulov S, Lee SH, Chung SI, Lee WB, Kim KY : Comparison between morphological sex and genotype sex of uzbekistan acient bones using improved amerogenin PCR amplication method. *Kor J Phys Anthropol* 20: 257-265, 2007a
- Kim K, Togloom A, Jeon E, Lee MS, Cho YO, Lkhagvasuren G, Choi JH, Tumen D, Kim KC, Kim JH, Noh MS, Park KW, Park AJ, Yoo KJ, Lee KH, Kim KY : Development of ancient DNA isolation method for improved PCR amplification. *Korean J Phys Anthropol* 20: 267-281, 2007b.
- Krings M, Stone A, Schmitz RW, Krainitzki H, Stoneking M, Pääbo S : Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* 90: 19-30, 1997.
- 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.
- O'Rourke DH, Hayes MG, Carlyle SW : Ancient DNA studies in physical anthropology. *Ann Rev Anthropol* 29: 217-242, 2000.
- 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.
- Shim BK, Kim, JH : A Significance of Nuk-Do Site, Sa-Cheon. The Research report of Graduate School of Kyushu University. Japan, pp 139-153, 2001.
- Tumen D : Paleanthropology of Western Mongolia. *Studia Archeologica, Institute Historiae Academiae Scientiarum, Mongolia. T- VII*, 1978. (in Russian)
- Tumen D : Anthropology of human remains from Mongolian Period in Sharga mountain site, Asgat sum, Sukhbaatar aimag. Research report of "Eastern Mongolia: archaeology and Anthropolog perspective", pp 15-16, 2007.
- 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 : 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.
- Wang L, Oota H, Saitou N, Jin F, Matsushita T, Ueda S : Genetic Structure of a 2,500-Year-Old Human Population in China and Its Spatiotemporal Changes. *Mol Biol Evol* 17: 1396-1400, 2000.
- 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.
- Yang DY, Eng B, Saunders SR : Hypersensitive PCR, ancient human mtDNA, and contamination. *Hum Biol.* 75: 355-364, 2003.

Abstract

## Establishment of PCR Reaction Condition for Highly Successful Ancient DNA PCR

Kyung-Yong Kim<sup>1,2</sup>, Ji-Young Woo<sup>3</sup>, Kijeong Kim<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>*Department of Anatomy, College of Medicine*

<sup>2</sup>*Institute of Medical Sciences, Chung-Ang University*

<sup>3</sup>*Department of Radiology, Kangnam Hospital, College of Medicine, Hallim University*

<sup>4</sup>*Department of Microbiology, College of Medicine, Chung-Ang University*

---

The ancient bone DNA analysis essentially requires PCR amplification of the targeting genes of study due to the limitation of the ancient bone sample and DNA amounts. In contrast to the fresh living human DNA, it is common to face failing in amplifying the poorly preserved ancient DNA after death. Therefore, the optimized PCR methods appropriate for ancient DNA are required. However, there is no report to date that a systemic investigation of enhanced PCR amplification methods suitable for ancient samples has been conducted

Approximately 500 ~ 3,300-year-old Korean and Mongolian ancient bones that are resistant to PCR were selected and an extensive number of PCR conditions were systematically investigated for the comparison of PCR success rates. For the PCR analysis, a mitochondrial DNA fragment as a multicopy DNA and a M175 Y chromosome biallelic marker DNA fragment as a single copy DNA that is the marker of the prevalent Y haplogroup (haplogroup O) in Korea were targeted. The identity of the amplified products were confirmed by DNA sequencing.

Through this study, we established the optimized PCR conditions for the highly successful amplification of ancient bone DNAs. This established method allowed for the successful amplification of mitochondrial DNAs from all the ancient bone samples tested and the amplification by 50% success rates in the amplification of M175 Y chromosome biallelic marker DNA but with the highest success rates.

These results demonstrate that the optimized PCR condition will be useful for the promising ancient DNA analysis in the fields of molecular genetic anthropological studies.

---

**Key words :** Ancient human bone, DNA, PCR, Mitochondria, Y chromosome biallelic marker