

Validation of new saliva test using SALIgAE[®]

Si-Keun Lim[★], Kyung-Don Kwak, Dong-Ho Choi, Myun-soo Han
DNA Analysis Division, National Institute of Scientific Investigation
(Received 9/12/2007; accepted 12/27/2007)

Abstract: A new forensic saliva test method using SALIgAE[®] was evaluated in this study. The sensitivity and specificity of SALIgAE[®] were examined and compared to those of other saliva test methods such as agarose gel diffusion method and Phadebas[®] test sheet method. SALIgAE[®] showed high sensitivity and specificity to human saliva in addition to quickness. SALIgAE[®] was modified so that test is done in a less costly and quick manner at the crime scene. It was observed to show positive response with 1;600 dilution within 5 minutes. Other human secretions (semen, vaginal fluid, urine, sweat and nasal discharge) didn't show positive reaction within 5 minutes. Moreover modified SALIgAE[®] method was cheap and easy to use in crime scene and DNA laboratory. SALIgAE[®] was very stable at room temperature and had no effect on STR typing.

Key words : forensic saliva test, amylase, SALIgAE[®], Phadebas[®], modification

1. Introduction

There are many cases in which saliva is left on the objects that are submitted for genetics identification.

For examples, anything with saliva detected on the surface could be used as vital evidence such as cigarette butts from the criminals, masks, cups used by criminals, beverage containers, or even toothpick or spoon (**Fig. 1**). Especially, for sexual crimes such as rape,

★ Corresponding author
Phone : +82-(0)2-2600-4860 Fax : +82-(0)2-2600-4866
E-mail : lskpmr@nisi.go.kr

Examining effectiveness of the modified SALigAE[®] for saliva testing at the crime scene



Fig. 1. Various crime-scene evidences containing saliva on the surface.

the culprit's saliva stain left on various parts of the victim is directly linked to the criminal investigation. Saliva contains amylase, a type of enzyme, which decomposes starch. Most of the forensic saliva tests rely on looking for body parts with saliva stains, or detecting saliva left on the surfaces. Amylase is produced at the salivary glands and from the pancreas also. However, pancreas amylase and saliva gland amylase are two separate enzymes showing different structures coded at different locations of number 1 chromosome. Saliva gland amylase is found not just in saliva, but also in sweat and milk. Pancreas amylase is found also in semen, feces and vaginal fluids. Methods widely used in forensic saliva test are **Phadebas[®] Method**(2, 3) and **starch/agarose test sheet diffusion method**(4). Blue starch is decomposed by the activation of amylase in the saliva, and takes on blue color. However, these two methods cannot differentiate human amylase from amylase found in micro-organism, plants and non-human animals. Also, those two methods require longer test hours and additional equipment, and show low specificity(5, 6). Therefore there has been a need for a new method with higher specificity and a faster outcome. **SALigAE[®]** developed by Abacus Diagnostics(West Hills, CA91307 USA) draws attention as a new replacement to the existing methods (7). This thesis aims at examining validity of **SALigAE[®]** method as a possible new saliva test method for forensics evidence. The test procedure was partially modified so that saliva test could be run not just in the lab but out on the field of crime scene.

Vol. 21, no. 1, 2008

2. Materials and Methods

2-1. Samples

Reference saliva sample was taken from three healthy male individuals, the reason being activation of saliva amylase could differ by person. The saliva sample was diluted at 1:5 ratio subsequently using sterilized physiological saline. Saliva stains were prepared by smearing 10 μ l of the saliva dilution on a Wattman filter paper by 5 mm in diameter and drying up in open atmosphere. Samples of semen, vaginal fluids, urine, nasal discharge, sweat, dog's sample and rat's sample were applied on cotton swabs and dried so that specificity by test method could be examined.

2-2. Blue-Starch Agarose Gel Diffusion Method

0.5g of agarose(1%) was put into 50ml of physiological saline and melted using microwave oven. A single pill of blue-starch was grinded, poured into plastic container and hardened in an open atmosphere, so as to produce blue-starch agarose gel. The prepared saliva stain sample was put on the gel, put into activation for 12 hours inside a room temperature (37°C) incubator so that round-shaped clear zones can be observed as they appear when the blue-starch is decomposed.

2-3. Phadebas[®] Method

Phadebas[®] test followed the procedures given by the manufacturer. 10 μ l of saliva dilution was dropped onto a Phadebas[®] sheet, and it was observed if it took on blue color within 5 minutes.

2-4. SALIgAE[®] Method

SALIgAE[®] test also followed the procedures given by the manufacturer. Saliva stain was put into 50 μ l of distilled water for milking for 30 minutes at room temperature. And 8 μ l of it was taken to be added into a vial(300 μ l) of SALIgAE[®]. The vial was shaken well, and it was observed if it changed color from transparent to yellow within 10 minutes.

2-5. Modified SALIgAE[®] Method

For the purpose of defining a simpler, faster and less costly saliva test at the crime scene, the test method of SALIgAE[®] by the manufacturer was partially modified and tested for its efficiency. Saliva stain was carved out and directly put into a transparent plastic tube containing 1/10(30 μ l) of SALIgAE[®], without any extraction procedure, for observation of any change in color(Fig. 2). Also, it was compared with the existing blue-starch agarose gel diffusion method and Phadebas[®] method for its sensitivity and specificity.

2-6. Specificity Comparison for Human Saliva among SALIgAE[®], Blue-Starch Agarose Gel Diffusion, and Phadebas[®]

For the comparison of specificity among the three saliva test methods (SALIgAE[®], blue-starch agarose gel diffusion and Phadebas[®]), each of the prepared samples – semen, vaginal fluid, urine, nasal discharge and sweat – was tested by each of the above test methods.

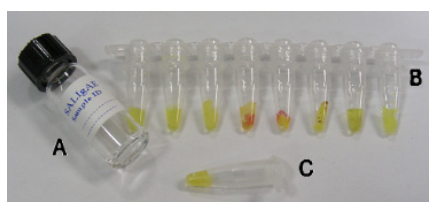


Fig. 2. SALIgAE[®] vial(A) and small aliquots of the solution(B and C) for the modified method.

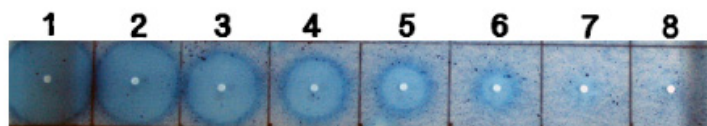


Fig. 3. Sensitivity of Blue-Starch agarose gel plate method. The number indicates saliva dilutions. 1;1X, 2;1/5X, 3;1/25X, 4;1/125X, 5;1/625X, 6;1/3,125X, 7;1/15,625X, 8;D.W. The plate was incubated for 12 hours at 37°C.

Also, saliva samples of dog and rat were also taken with cotton swab to examine the reaction to saliva of non-human animals.

3. Outcome and Analysis

3-1. Sensitivity Comparison of Blue-Starch Agarose Gel Diffusion, Phadebas[®] and SALIgAE[®]

Blue-starch agarose gel diffusion method showed a relatively high sensitivity by identifying 1:3,000+ saliva dilution(Fig. 3). SALIgAE[®] Method, according to the manufacturer, can detect saliva in up to 1:2,500 dilution, and works pretty well at 1:500 dilution. This experiment produced a similar outcome (Fig. 4). Phadebas[®] Method was the lowest in sensitivity as color change was observed with gross examination at 1/5 dilution. Modified SALIgAE[®] method could identify 1:600 saliva dilution(Fig. 5). To sum up sensitivity of the three test methods, blue-starch agarose gel diffusion showed high sensitivity, however it required a room-temperature incubator and took a long reaction time. Phadebas[®] was the fast working method taking only 5 minutes, however sensitivity was low. On the contrary, SALIgAE[®] was fast and high in sensitivity, proving itself



Fig. 4. Sensitivity of SALIgAE[®] test. The numbers indicate saliva dilutions;1;1X, 2;1/5X, 3;1/25X, 4;1/125X, 5;1/625X, 6;1/3,125X, 7;1/15,625X, 8;D.W. 8 μ l of saliva dilution solutions were injected into SALIgAE[®] test vial, then the color change was checked after 10 minutes.

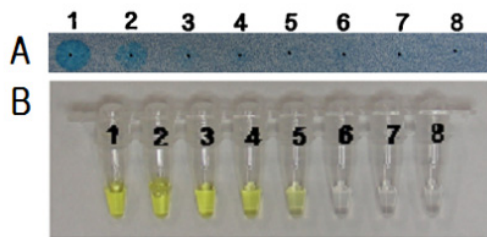


Fig. 5. Comparison of sensitivity of Phadebas® paper(A) and modified SALIgAE® test(B). The number indicates saliva dilutions; 1;1X, 2;1/5X, 3;1/25X, 4;1/125X, 5;1/625X, 6;1/3,125X, 7;1/15,625X, 8;D.W. For Phadebas® test, 10 μ l of saliva dilutions were plated onto the paper and incubated for 5 min at room temperature. For modified SALIgAE® test, 5 μ l of saliva dilutions were directly injected into the test tube containing 30 μ l of SALIgAE® solution and stand for 5 min at room temperature.

as the most efficient forensic saliva test method (Table 1).

3-2. Human Saliva Specificity by SALIgAE® Test

SALIgAE® test was conducted on semen, vaginal fluid, urine, sweat and nasal discharge. All of the samples didn't show any visible color change within 5 minutes. However, as time lapsed further, change in color was detected. As for nasal discharge, the color started changing after 5 minutes and in 10 minutes' time it could be evaluated as positive. Sweat and urine showed a slight color change in 1-2 hours, and were taken as showing positive reaction after 3 hours. Semen and vaginal fluids took 5 or more hours before any color change, and after a day has passed, they took on yellow color. Also, reaction to other animals' saliva was observed. Dog's saliva didn't show any change in color within 5 minutes, however rat's saliva sample showed the similar reaction time for color change with human saliva.

Phadebas® method showed the same outcome. It was recommended that further experiments be conducted on saliva samples taken from various animals. Given the facts above, reaction time could be considered a very important reference for detecting human saliva using SALIgAE® method. It was also considered that the observed reaction time be confined to 5 minutes or less to prevent false positive reaction.

3-3. Sensitivity by Dilution of SALIgAE® Test Sample

SALIgAE® sample was diluted by 1:2 ratio using distilled water, and 5 μ l of saliva was added for observing color change. All the diluted SALIgAE® test samples didn't show any color change. This is interpreted that SALIgAE® sample has lost its property in the course of dilution.

3-4. Stability of SALIgAE® Test Sample

Stability of SALIgAE® sample was observed at a room temperature. SALIgAE® was divided by 30 μ l each and kept under room temperature for observation of any color change, as diluted saliva solution was added every 10 days. The result was no difference in sensitivity even after 30 days have lapsed, proving high stability even at room temperature (Fig. 6).

3-5. Effect of SALIgAE® Test Sample on Analysis of STR Genotype

For the purpose of observing the effect of SALIgAE® test sample on genotype, 30 μ l of SALIgAE® was mixed with saliva, and put in the QIAgen DNA micro kit(Qiagen Co., Hilden, Deutschland) for DNA separation, and then amplified using AmpFSTR Identifier kit(Applied Biosystems, Foster City, CA94404 USA) for the analysis of STR genotype.

Table 1. Summary of test time, sensitivity, specificity and stability of four saliva test methods

Saliva test methods	Test Time ^a	Sensitivity ^b	Specificity ^c	Stability ^d
Blue-Starch agarose gel plate	Long (app. 12 hours)	1/3,000	specific	not stable*
Phadebas® paper	Very Short (5 minutes)	1/5	specific	stable
SALIgAE® vial	Short (30 minutes)	1/2,500	specific	stable
Modified SALIgAE® tube	Very Short (5 minutes)	1/2,500	specific	stable

a; Time for tests.

b; Sensitivity means the detection limit of saliva dilution.

c; Specificity for saliva.

d; Stability at room temperature.

*; requires cold chamber and incubator

Si-Keun Lim[★], Kyung-Don Kwak, Dong-Ho Choi, Myun-soo Han

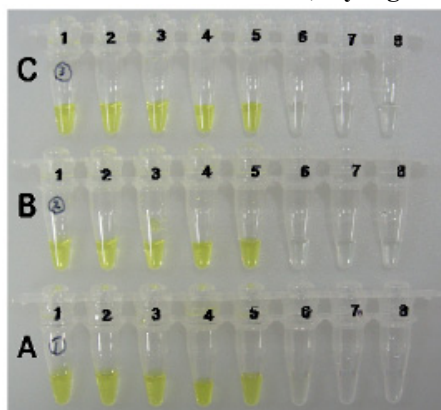


Fig. 6. Stability of SALIgAE[®] solution. SALIgAE[®] solution was stored in room temperature for 30 days. Panel A; SALIgAE[®] solution stored for 10 days at RT, B; 20 days, and C; 30 days. The number indicates saliva dilutions; 1; 1X, 2; 1/5X, 3; 1/25X, 4; 1/125X, 5; 1/625X, 6; 1/3,125X, 7; 1/15,625X, 8; D.W.

The result was that SALIgAE[®] sample didn't cause any effect on the genotype analysis (data not shown).

4. Conclusions

Timely collection of various evidences from crime scenes and/or saliva stain from victims could be truly vital in the early stage of crime investigation. It would be even further useful if the saliva samples taken from the crime scene could be tested quickly and on the spot. Blue-starch agarose gel diffusion method and Phadebas[®] method

take long reaction times, require separate equipment and show low sensitivity. However, modified SALIgAE[®] method is less costly and high in stability and sensitivity, therefore considered easily usable not just in the forensics lab but out in the field at the crime scene. It should be noted, however, that in using the modified SALIgAE[®] method, the reaction time is to be confined to 5 minutes, and that even with a negative reaction outcome, a genotype analysis is still to follow.

References

1. D. Merri, M. L. Rivas, D. Bixler, R. Newell. *American Journal of Human Genetics* **25**, 510-522(1973)
2. M. Willott. *J Forensic Sci Soc* **14**, 3414(1974)
3. W. Schill, G. F. B. Schumaker. *Anal Biochem* **46**, 50233(1972).
4. E. Camilleri, E. Silenieks, J. Henry. Locating saliva stains using Polylight[®] and SALIgAE[®] Spray. Evidence Recovery and Biology Analytical Groups. Government of South Australia. 2006.
5. L. Quarino, Q. Dang, J. Hartmann, N. Moynihan. *Journal of Forensic Science*, **50**(4), 1101-1104(2005)
6. SALIgAE[®] Test for the forensic identification of saliva. Technical Information Sheet. Abacus Diagnostics PTY. LTD.

사건현장 검사를 위해 변형된 SALIgAE[®] 타액검사법의 유효성 검토

임시근* · 광경돈 · 최동호 · 한면수

국립과학수사연구소 유전자분석과
(2007. 9. 12. 접수. 2007. 12. 27. 승인)

Validation of new saliva test using SALIgAE[®]

Si-Keun Lim*, Kyung-Don Kwak, Dong-Ho Choi and Myun-soo Han

DNA Analysis Division, National Institute of Scientific Investigation

(Received September 12, 2007; Accepted December 27, 2007)

요 약: 본 연구에서는 사건 현장 증거물에서 타액반의 확인을 위해 개발된 SALIgAE[®] 시약의 유효성을 검토하였다. SALIgAE[®] 검사법의 상세한 작용 기작에 대해서는 상업적 이유 등으로 잘 알려져 있지 않아 실험을 통해 민감도와 특이성을 검토하였으며, 이를 기존의 타액검사 방법인 아가로스 겔 확산법 및 Phadebas[®] 검사법과 비교하였다. 사건 현장에서 경제적이며 쉽고 신속하게 타액검사를 수행할 수 있도록 SALIgAE[®] 검사법을 변형하였는데, 5분 이내에 1/600 이상 희석된 타액까지 확인이 가능하였다. 타액 이외의 인체 분비물(정액, 질액, 뇨, 땀, 콧물)은 5분 이내에 SALIgAE[®] 검사 양성반응을 보이지 않았다. 또한 SALIgAE[®] 검사 시약은 상온에서도 높은 안정성을 보여 법과학 실험실에서는 물론 사건 현장에서 유용하게 사용할 수 있을 것으로 판단되었다.

Abstract: A new forensic saliva test method using SALIgAE[®] was evaluated in this study. The sensitivity and specificity of SALIgAE[®] were examined and compared to those of other saliva test methods such as agarose gel diffusion method and Phadebas[®] test sheet method. SALIgAE[®] showed high sensitivity and specificity to human saliva in addition to quickness. Moreover modified SALIgAE[®] method was cheap and easy to use in crime scene and DNA laboratory. SALIgAE[®] was very stable at room temperature and had no effect on STR typing.

Key words: forensic saliva test, amylase, SALIgAE, Phadebas, modification

1. 서 론

각종 사건 현장에서 유전자감식을 위해 의뢰되는 증거물 중에는 타액(saliva)이 묻어있는 경우가 많다.

예를 들면, 범인이 피우고 버린 담배꽂초, 마스크, 범인이 마신 컵이나 음료수 병에서 이쑤시개나 수저 등에 이르기까지 타액이 묻을 수 있는 모든 것들이 중요한 증거물이 될 수 있다(Fig. 1). 특히 강간과 같은

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)2-2600-4860 Fax : +82-(0)2-2600-4866

E-mail : lskpmr@nisi.go.kr



Fig. 1. Various crime-scene evidences containing saliva on the surface.

성범죄 사건에서 피해자의 신체 각 부위에서 채취된 범인의 타액반(saliva stain)은 사건 해결과 직결되어 있다. 타액에는 전분(starch)을 분해하는 아밀라아제(amylase)라는 효소가 포함되어 있는데, 대부분의 법과학적 타액검사법은 증거물에서 아밀라아제의 활성을 검사하여 타액이 묻은 부위를 찾거나 타액의 존재 여부를 검사하는 것이다. 아밀라아제는 침샘외에도 땀샘에서도 분비되는데, 땀샘 아밀라아제와 침샘 아밀라아제는 1번 염색체의 서로 다른 부분에서 코딩되는 구조적으로 서로 상이한 효소이다.¹ 침샘 아밀라아제는 침은 물론 땀이나 젖 등에서도 발견되며, 땀샘 아밀라아제는 정액, 대변, 질액에서도 발견된다. 현재 법과학적 타액검사법으로 널리 사용되고 있는 방법으로는 Phadebas® 검사법^{2,3}과 전분/아가로스 배지 확산법⁴이 있는데, 타액 속의 아밀라아제 활성으로 blue starch가 분해되어 청색을 띠게 된다. 그러나 이 두 타액 검사법은 미생물, 식물, 사람이 아닌 다른 동물에서 발견되는 아밀라아제와 사람의 아밀라아제를 구별할 수 없으며, 검사 시간이 길고 별도의 장비가 필요하거나 특이성이 낮은 단점이 있다.^{5,6} 따라서 특이성이 높고 신속히 타액반을 검사할 수 있는 방법의 개발이 요구되어 왔는데, Abacus Diagnostics사(West Hills, CA91307 USA)에서 개발된 SALigAE® 검사는 기존의 검사법을 대체할 새로운 방법으로 주목받고 있다.⁷ 본 논문에서는 SALigAE® 검사법의 유효성 검토를 통해 법과학 증거물의 타액검사법으로 사용하는 데 문제가 없는지 알아보고자 하였으며, 실험실은 물론 사건현장에서도 간편하게 타액검사를 수행할 수 있도록

시험과정을 일부 변형하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시 료

표준 타액 시료는 건강한 남성 3인의 타액을 섞어 사용하였다. 이는 타액 내 아밀라아제 활성이 개인별로 차이가 날 수 있기 때문이다. 타액 희석액은 멸균 생리식염수를 이용해 연속적으로 5배씩 희석하여 준비하였다. 타액반은 타액 희석액 10 µL를 직경 5 mm의 Wattman 필터페이퍼에 묻혀 공기 중에서 건조시켜 준비하였다. 타액검사법에 따른 특이성을 검사하기 위한 정액, 질액, 뇨, 콧물, 땀, 개, 쥐(rat) 시료는 면봉에 묻혀 건조한 후 사용하였다.

2.2. Blue-Starch 아가로스 겔 확산법

0.5 g 아가로스(1%)를 생리식염수 50 mL에 넣고 전자레인지를 이용해 녹인 후 Blue-starch 1알을 막자사발에 갈아 넣고 플라스틱 용기에 붓고 공기 중에서 굳혀 Blue-starch 아가로스 겔을 제조하였다. 준비한 타액반 시료를 겔 위에 올려놓고 37°C 항온배양기에서 12시간 반응시켜 blue-starch가 분해되면서 생기는 원형의 clear zone을 관찰하였다.

2.3. Phadebas® 검사법

Phadebas® 검사는 제조사의 시험법에 따랐다. Phadebas® sheet 위에 타액 희석액 10 µL를 떨어뜨리고 5분 이내에 청색으로 변화되는지 관찰하였다.

2.4. SALIgAE[®] 검사법

SALIgAE[®] 검사는 제조사의 시험법에 따라 수행하였다. 먼저 타액반을 50 μ L의 증류수에 넣고 상온에서 30분간 용출시킨 후 8 μ L를 취해 SALIgAE[®] 바이알(300 μ L)에 첨가하였다. 바이알을 흔들어 섞어준 후 10분 이내에 무색에서 노란색으로 변화되는 정도를 관찰하였다.

2.5. 변형 SALIgAE 검사법

본 연구에서는 사전현장에서 간편하고 신속하게 사용할 수 있으며, 보다 저렴한 타액검사를 위해 제조사의 SALIgAE[®] 검사법을 일부 변형하여 유효성을 검토하였다. 변형된 검사법은 타액반을 올려내어 별도의 추출과정 없이 1/10량(30 μ L)의 SALIgAE[®] 용액이 담긴 투명 플라스틱 튜브에 직접 넣고 색의 변화 정도를 관찰하였다(Fig. 2). 또한 기존의 blue-Starch 아가로스 겔 확산법 및 Phadebas[®] 검사법과 민감도 및 특이성을 비교하였다.

2.6. SALIgAE[®] 검사법, Blue-Starch 아가로스 겔 확산법, Phadebas[®] 검사법의 사람 타액 특이성 비교

세 가지 타액 검사법(SALIgAE[®] 검사법, blue-Starch 아가로스 겔 확산법, Phadebas[®] 검사법)의 타액 특이성을 비교하기 위해 준비된 정액, 질액, 뇨, 콧물, 땀 시료를 각 검사 방법에 따라 시험하여 비교하였다. 또한

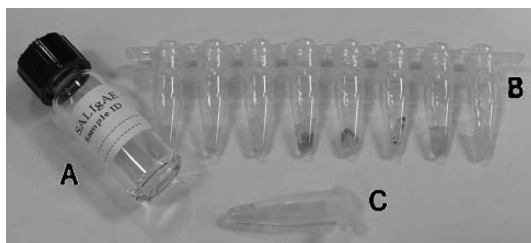


Fig. 2. SALIgAE[®] vial(A) and small aliquots of the solution (B and C) for the modified method.

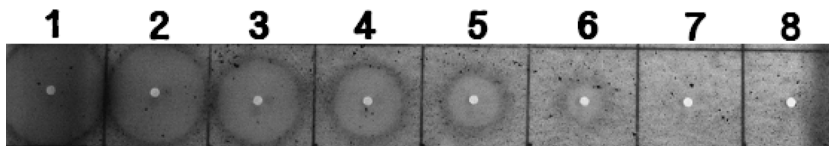


Fig. 3. Sensitivity of Blue-Starch agarose gel plate method. The number indicates saliva dilutions. 1; 1X, 2; 1/5X, 3; 1/25X, 4; 1/125X, 5; 1/625X, 6; 1/3, 125X, 7; 1/15, 625X, 8; D.W. The plate was incubated for 12 hours at 37 $^{\circ}$ C.

동물 타액에 대한 반응을 알아보고자 개와 쥐의 타액을 면봉으로 채취하여 실험에 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Blue-Starch 아가로스 겔 확산법, Phadebas[®] 검사법 및 SALIgAE[®] 검사법의 민감도 비교

Blue-starch 아가로스 겔 확산법을 이용한 타액 검사에서는 약 3,000배 이상 희석된 타액까지도 검출되어 비교적 높은 민감도를 보여주었다(Fig. 3). SALIgAE[®] 검사법은 제조사의 자료에 따르면 약 1/2,500배 희석된 타액까지가 검출 한계이며, 1/500배 희석된 타액까지 잘 검출된다고 하였는데, 본 실험에서도 비슷한 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 4). Phadebas[®] 검사에서는 약 5배 희석된 타액까지 육안으로 색의 변화를 판별할 수 있어 민감도가 가장 낮았으며, 변형 SALIgAE[®] 검사법에서는 약 600배 희석된 타액까지 검출되었다(Fig. 5). 세 가지 타액검사법에 대한 민감도 비교 실험 결과를 요약하면, blue-starch 아가로스 겔 확산법은 민감도는 높으나, 별도의 항온배양기가 필요하고 반응시간이 긴 단점이 있었으며, Phadebas[®] 검사법은 짧은 시간(5분) 내에 타액검사를 수행할 수 있었으나 민감도가 낮은 단점이 나타난 반면 SALIgAE[®] 검사법은 신속하면서도 높은 민감도를 보여주어 법과학적으



Fig. 4. Sensitivity of SALIgAE[®] test. The numbers indicate saliva dilutions; 1; 1X, 2; 1/5X, 3; 1/25X, 4; 1/125X, 5; 1/625X, 6; 1/3, 125X, 7; 1/15, 625X, 8; D.W. 8 of saliva dilution solutions were injected into SALIgAE test vial, then the color change was checked after 10 minutes.

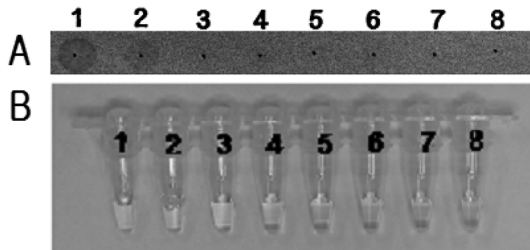


Fig. 5. Comparison of sensitivity of Phadebas[®] paper(A) and modified SALIgAE[®] test(B). The number indicates saliva dilutions; 1; 1X, 2; 1/5X, 3; 1/25X, 4; 1/125X, 5; 1/625X, 6; 1/3, 125X, 7; 1/15, 625X, 8; D.W. For Phadebas[®] test, 10 μ L of saliva dilutions were plated onto the paper and incubated for 5 min at room temperature. For modified SALIgAE[®] test, 5 μ L of saliva dilutions were directly injected into the test tube containing 30 μ L of SALIgAE[®] solution and stand for 5 min at room temperature.

로 가장 효과적인 타액검사법으로 판단되었다(Table 1).

3.2. SALIgAE[®] 검사법의 사람 타액 특이성

정액, 질액, 소변, 땀, 콧물에 대해 SALIgAE[®] 검사를 시행한 결과 모두 5분 이내에 뚜렷한 색의 변화를 나타내지 않았다. 그러나 시간이 경과할수록 색의 변화가 나타나는데, 특히 콧물의 경우 5분 이후부터 색의 변화가 나타나며 10분 정도 시간이 경과되면 양성 반응으로 판정될 수 있었다. 땀이나 소변의 경우에는 1-2시간 후에 약하게 색의 변화가 나타나며, 3시간 정도 경과 후에는 양성반응으로 판정될 수 있었다. 정액과 질액은 5시간 정도 이상 경과하면서 색의 변화를 보이며, 하루가 지나면 모두 노란색으로 변화되었다. 또한 동물 타액과의 반응성을 검사하였는데, 개의 타액은 5분 이내에 색의 변화를 보이지 않았지만 쥐의 타액은 사람의 타액과 유사한 정도의 시간 내에 색의

변화를 보였으며, Phadebas[®] 검사법에서도 동일한 결과를 보여주었다. 다양한 동물 종에 대한 타액 검사는 추후 더 많은 실험이 필요할 것으로 사료되었다. 이상의 결과에서 SALIgAE[®] 검사법을 이용한 사람 타액의 존재 여부를 판정하는데 있어 반응 시간은 매우 중요한 기준이 될 수 있는데, 위양성 판정을 방지하기 위해서는 판정 기준 시간을 5분 이내로 하여야 할 것으로 판단되었다.

3.3. SALIgAE[®] 검사 시약 농도에 따른 민감도

SALIgAE[®] 시약을 증류수를 이용해 1/2배 씩 희석한 후 타액 원액 5를 첨가하고 색의 변화 정도를 관찰하였는데, 희석된 SALIgAE[®] 시약은 모두 색의 변화를 보이지 않았다. 이는 SALIgAE[®] 시약의 희석으로 인해 본래의 기능이 상실된 것으로 추정되었다.

3.4. SALIgAE[®] 검사 시약의 안정성

SALIgAE[®] 시약을 상온에서 보관할 경우 어느 정도의 안정성을 갖는지 알아보았다. 30 μ L씩 분주된 SALIgAE[®] 시약을 상온에서 보관하면서 10일 마다 타액 희석액을 첨가해 색의 변화를 관찰한 결과 30일이 지나도 민감도에 변화가 없어 상온에서도 높은 안정성을 보여주었다(Fig. 6).

3.5. SALIgAE[®] 검사시약이 STR 유전자형 분석에 미치는 영향

SALIgAE[®] 검사시약이 유전자형 분석에 미치는 영향을 알아보기 위해 SALIgAE[®] 검사시약 30 μ L을 타액과 섞어 QIAGEN DNA micro kit (Qiagen Co., Hilden, Deutschland)를 이용해 DNA를 분리하고 AmpFSTR Identifier kit (Applied Biosystems, Foster City, CA 94404 USA)를 사용해 증폭하여 STR 유

Table 1. Summary of test time, sensitivity, specificity and stability of four saliva test methods

Saliva test methods	Test Time ^a	Sensitivity ^b	Specificity ^c	Stability ^d
Blue-Starch agarose gel plate	Long (app. 12 hours)	1/3,000	specific	not stable*
Phadebas [®] paper	Very Short (5 minutes)	1/5	specific	stable
SALIgAE [®] vial	Short (30 minutes)	1/2,500	specific	stable
Modified SALIgAE [®] tube	Very Short (5 minutes)	1/2,500	specific	stable

a; Time for tests.

b; Sensitivity means the detection limit of saliva dilution.

c; Specificity for saliva.

d; Stability at room temperature.

*; requires cold chamber and incubator

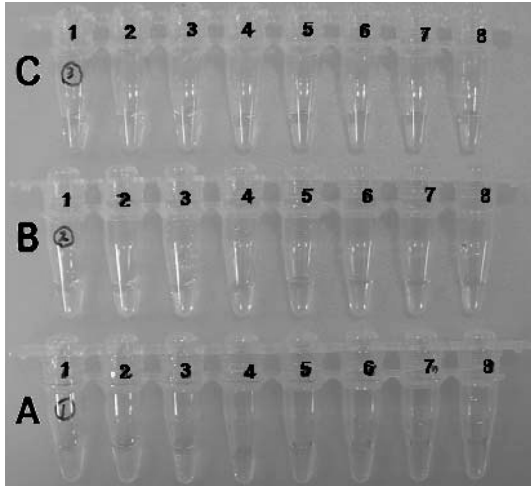


Fig. 6. Stability of SALIgAE[®] solution. SALIgAE[®] solution was stored in room temperature for 30 days. Panel A; SALIgAE[®] solution stored for 10 days at RT, B; 20 days, and C; 30 days. The number indicates saliva dilutions; 1; 1X, 2; 1/5X, 3; 1/25X, 4; 1/125X, 5; 1/625X, 6; 1/3, 125X, 7; 1/15, 625X, 8; D.W.

전자형을 분석한 결과, SALIgAE[®] 검사시약은 유전자형 분석에 어떠한 영향도 주지 않았다.

4. 결 론

사건의 현장에서 발견되는 각종 증거물 혹은 변사체에서 타액을 검출하는 것은 초동 수사에서 매우 중요한 역할을 할 수 있다. 특히 사건 현장에서 빠르고 쉽게 타액을 검사할 수 있다면 더욱 유용할 것이다. Blue-starch 아가로스 겔 확산법이나 Phadebas[®] 검사

법과 같은 타액 검사법은 시간이 오래 걸리고, 별도의 장비가 필요하거나 민감도가 낮은 단점을 갖는데 비해, SALIgAE[®] 검사 시약을 이용한 변형된 타액검사법은 비용이 저렴하고, 안정성과 민감도가 높아 법과학 실험실에서는 물론 사건 현장에서도 쉽게 사용이 가능할 것으로 판단되었다. 그러나, 변형된 SALIgAE[®] 검사법을 이용한 타액 검사 시에는 반응 시간을 5분 이내로 제한해야 하며, 반응 결과가 음성으로 나오더라도 유전자형 분석 과정을 수행해야한다는 점을 유의해야 할 것이다.

참고문헌

1. A. D. Merri, M. L. Rivas, D. Bixler and R. Newell, *American Journal of Human Genetics* **25**, 510-522(1973).
2. G. M. Willott, *J. Forensic Sci. Soc.* **14**, 3414(1974).
3. Forensic Examination of items for the presence of saliva. Phadebas[®] Forensic Protocol.
4. B. W. Schill and G. F. B. Schumaker, *Anal Biochem* **46**, 50233(1972).
5. E. Camilleri, E. Silenieks and J. Henry, Locating saliva stains using the Polylight[®] and SALIgAE[®] Spray. Evidence Recovery and Biology Analytical Groups. Government of South Australia. 2006.
6. L. Quarino, Q. Dang, J. Hartmann and N. Moynihan, *J. Foren. Sci.*, **50**(4), 1101-1104(2005).
7. SALIgAE[®] Test for the forensic identification of saliva. Technical Information Sheet. Abacus Diagnostics PTY. LTD.