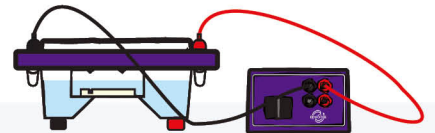


효소학으로 교통사고 가해자 찾기

Forensic Enzymology

ED193



☎ 02-929-1110 ✉ info@koreasci.com

🛒 www.koreasci.com

※ 이 문서는 교육적 목적으로만 사용되어야 하며 그 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

실험 목표

가상의 교통사고에서 두 명의 운전자 중 한 명이 수면부족으로 사고를 유발하게 됩니다. 수면 부족시에 아밀레이스 수치가 높아지는 것을 이 실험에서 이용하여 사고의 책임이 더 많은 운전자를 가려냅니다. 사람의 침에서 발견되는 아밀레이스 효소가 전분 분자를 가수 분해하는 특성을 연구합니다. 학생들은 전분의 존재에 대한 아이오딘 테스트와 아밀레이스와 전분의 반응으로 나온 3,5-Dinitrosalicylic acid 테스트를 하게됩니다.

제품 구성품

A	Simulated Negative Control saliva sample	가상의 음성 대조 타액 샘플
B	Simulated Positive Control saliva sample	가상의 양성 대조 타액 샘플
C	Simulated Driver #1's saliva sample	가상의 #1번 운전자 타액 샘플
D	Simulated Driver #2's saliva sample	가상의 #2번 운전자 타액 샘플
E	Starch solution	녹말 용액
F	Iodine solution	아이오딘 용액
G	Acid Color Reagent G	산성 색상 시약 G
H	Acid Color Reagent H	산성 색상 시약 H

Microtiter plates (마이크로 플레이트)

Transfer pipets (피펫)

Microtest tubes with attached caps (원심분리기 튜브와 뚜껑)

필요 장비 및 준비물

시험관, 시험관 랙, 네임펜, 2ml 피펫, 증류수, 비커, 일회용 장갑, 고글, 마이크로피펫, 뜨거운물

배경 지식

법의학 기초

증거 확보 및 처리

법의학자는 범죄 현장에서 증거를 수집하고 분석하여 증거의 성격과 출처를 파악합니다. 이 수집 과정이 진행되는 동안, 과학자는 증거의 본질에 대해 확정적인 진술을 할 수 없습니다. 어떤 결론을 내리기 전에, 그는 광범위한 테스트를 통해 증거의 본질과 그로부터 얻을 수 있는 정보를 밝혀야 합니다. 바닥에 있는 붉은 얼룩이나 다른 탐지 방법으로 발견된 얼룩이 실제로 혈액이라고 가정할 수 없습니다. 증거의 정확한 성격이 결정된 후 해야 추가 정보를 생성하기 위한 추가 테스트를 수행할 수 있습니다. 증거의 성격을 결정하는 것은 복잡한 다단계 과정입니다. 법의학자는 다양한 분석법을 사용하여 물질의 정체를 빠르고 정확하게 결정하며, 이 테스트는 빠르고 저렴해야 하고, 가장 중요한 것은 증거에 최소한의 영향을 미쳐야 합니다. 초기 테스트는 조사의 방향을 결정하기 위해 빠르고 저렴하게 수행되어야 합니다. 길고 비싼 테스트는 테스트 중인 샘플이 예상과 다른 것으로 판명될 경우 시간과 돈을 낭비하게 됩니다. 예를 들어, 잠재적인 혈흔에서 DNA 프로파일을 생성하려고 하면 얼룩의 특징에 대한 결론적인 결과를 얻을 수 있지만, 그렇게 하는 데 수많은 시간과 돈을 소비하게 됩니다.

증거의 무결성 유지

증거를 수집하고 테스트하는 것 외에도, 법의학자는 증거 자체의 무결성을 유지하는 책임을 지는 많은 사람 중 하나입니다. 증거의 가치를 최소화하거나 감소시키는 일이 없도록 조치를 취해야 하며, 이는 법정/재판과 같은 중요한 상황에서 덜 유용하게 만들 수 있습니다. 증거가 수집되면, 수집 가방에 넣어져 밀봉되고 테이프로 봉인되며, 수집자의 이니셜과 수집 날짜가 테이프에 적힙니다. 이는 잠재적인 증거 조작에 대한 첫 번째 방어선입니다. 증거에 접근하기 위해서는 가방/용기의 봉인을 깨야 합니다. 그런 다음 증거는 보안된 증거실로 옮겨져 도착 기록이 서명됩니다. 방에 대한 접근은 모든 항목을 기록하는 소수의 사람들로 제한됩니다. 증거에 대한 테스트를 수행하려는 과학자는 제거한 항목에 대해 서명하고 날짜와 시간도 기록해야 합니다. 결국, 이러한 기록은 증거가 수집된 시점과 테스트를 위해 이동되거나 접근된 모든 시간을 자세히 보여줍니다.

테스트 절차는 다양한 방식으로 영향을 받습니다. 보관실에서 증거를 가져온 후, 법의학자는 용기의 상태를 기록합니다. 용기가 제대로 밀봉되어 있습니까? 개구부를 봉인한 증거 테이프가 손상되지 않았습니까? 용기에 새로운 개구부가 있습니까? 이러한 모든 질문에 답해야 하며, 과학자의 노트북에 용기의 상태를 기록해야 테스트를 시작할 수 있습니다. 다음으로, 과학자는 다른 사람들이 한 이전 봉인을 방해하지 않고 용기를 열어야 합니다. 가능하다면 새로운 개구부를 만들어야 합니다. 이는 개구부를 만들고 봉인한 다른 사람들이 그들의 봉인이 이후에도

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

손상되지 않았다고 말할 수 있도록 합니다. 이는 증거가 조작되지 않았음을 보여주고, 증거를 테스트한 모든 사람을 문서화하는 데 중요합니다. 종종 증거 가방에는 여러 번의 개구부가 재봉인되고 서명되어 있습니다.

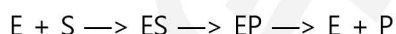
과학자들은 증거가 오염될 수 있는 지점까지 절대적으로 손상되지 않도록 주의해야 합니다. 오염은 한 증거에서 다른 증거로 미세한 물질이 이동하여 증거의 가치를 크게 변경할 수 있는 것입니다. 테스트가 완료된 후, 모든 항목은 제거한 과학자에 의해 다시 증거실에 서명됩니다. 이 절차는 증거에 접근한 모든 사람을 문서화하는 데 사용됩니다.

생물학적 촉매는 미량으로 사용되어 반응 중에 소비되거나 변형되지 않고 생화학 반응의 속도를 가속화합니다. 촉매는 반응의 평형 상수를 변화시키지 않으며, 평형에 도달하는 속도만 변화시킵니다. 세포 내 반응은 효소라고 알려진 생물학적 촉매에 의해 촉진되며, 이는 반응 속도를 최대 10^{14} 에서 10^{20} 배까지 가속할 수 있습니다. 효소는 중성 pH 와 37°C 의 생리적 조건에서 가장 잘 작용합니다. 효소는 일반적으로 촉매하는 반응에 대해 매우 특이적입니다. 특정 효소는 그들이 촉매하는 반응에 직접 관여하지 않는 주요 대사물질의 세포 내 농도에 의해 조절됩니다. 이러한 조절(효소 활성의 증가 또는 감소)은 종종 특정 시점에서 세포의 생리적 요구에 의해 조절됩니다. 이렇게 조절되는 효소를 알로스테릭 효소라고 합니다.

효소 활성 측정

효소 촉매 반응에서 반응물 분자는 기질이라고 불립니다. 기질(S)은 생성물(P)로 변환됩니다. 효소가 기질을 변환하기 전에 먼저 기질에 결합해야 합니다. 효소 분자의 비교적 작은 부분만이 기질 결합과 촉매 작용에 관여합니다. 이 영역을 활성 부위라고 합니다. 활성 부위는 중요한 아미노산 잔기와 필요한 경우 활성에 필요한 보조 인자를 포함합니다.

초기 결합은 비공유 결합이며 빠른 평형 상태에 있을 수 있습니다. 생산적인 결합이 이루어진 후, 효소-기질 복합체는 생성물(P)을 생성하기 시작하고, 이는 이후 방출됩니다. 자유 효소(E)는 추가 기질(S)과 반응할 수 있으며, 이 반응은 빠르고 효과적으로 반복됩니다. 이 반응은 단일 기질, 단일 생성물의 비가역 반응으로 요약됩니다.



이 실험에서 아밀레이스는 다당류인 전분을 이당류인 맥아당으로 가수분해하는 효소입니다. 침 아밀레이스는 침샘에서 생성됩니다. 아밀레이스를 전분 용액에 추가하면 전분이 소화되어 맥아당이 형성됩니다.

기질 Substrate (S)	효소 Enzyme (E)	생성물 Product (P)
Starch	-----→ 아밀레이스 Amylase	맥아당 Maltose

효소와 기질 혼합물을 체온(37°C)으로 올리면 반응 속도가 실온보다 증가합니다.

반응 중 생성물(P)의 생성 또는 기질(S)의 소멸은 시간의 함수로 측정할 수 있습니다. 일정한 간격으로 생성된 생성물의 양이나 감소한 기질의 양을 측정할 수 있으며, 이 양은 그래프로 나타낼 수 있습니다.

이 정면 충돌 교통사고에서 두 운전자는 각각 상대방이 졸음운전을 했다고 주장했습니다. 두 차량의 승객은 중상을 입었지만 운전자들은 경미한 부상을 입었습니다. 경찰관이 사고 현장에 도착했을 때, 필요한 정보를 기록하고 모두를 구급차로 지역 병원으로 이송하도록 조치했습니다. 응급실 담당 의사는 두 운전자를 철저히 검사하고, 분석을 위해 혈액과 소변 샘플을 채취했으며, 일회용 플라스틱 혀 누르개를 사용하여 입과 치아의 손상을 검사하기 위해 체온을 측정했습니다. 그는 첫 번째 사용한 혀 누르개를 원래의 플라스틱 포장에 넣고 전용 폐기물 용기에 버렸습니다. 두 번째 운전자에게 사용한 두 번째 혀 누르개도 같은 방법으로 처리했지만, 버리는 것을 잊고 검사대에 두었습니다. 병원에 도착한 지 4 시간 후, 중상을 입은 두 명의 승객은 중환자실에서 사망하여 사건이 잠재적인 살인 사건이 되었습니다.

응급실 담당 의사는 의대 시절에 수면 부족으로 인해 침 아밀레이스 수치가 증가한다는 것을 기억했습니다. 그는 두 개의 혀 누르개를 회수하여 운전자 이름인 John Smith 와 Sam White 로 라벨을 붙이고, 당국에 연락하여 두 운전자의 침 아밀레이스 수치를 테스트하기 위해 법의학 실험실에 혀 누르개를 제공했습니다.

인간은 하루에 1~1.5 리터의 침을 생성합니다. 침은 약간 알칼리성 pH를 가지며 물, 점액, 단백질, 염 및 효소로 구성됩니다. 침은 음식을 윤활하고 삼키는 것을 돕고, 아밀레이스 효소에 의해 음식 소화를 시작하는 데 사용됩니다. 아밀레이스는 식물과 동물 모두에서 발견되는 효소입니다. 이 효소는 인간의 침에서 쉽게 검출 가능한 양으로 풍부하게 존재합니다. 아밀레이스는 알파 및 베타 하위 유형으로 나뉩니다. 알파는 동물에서 발견되고, 베타는 식물에서 발견됩니다. 인간 침에 존재하는 알파 아밀레이스의 촉매 기능은 다양한 음식에서 얻은 전분을 소화하는 것입니다.

아밀레이스는 전분 사슬 내에서 작용하여 맥아당으로 알려진 작은 이당류를 생성합니다. 이 이당류는 두 개의 포도당 단위로 구성되어 있으며, 추가 가수분해를 통해 에너지원으로 사용할 수 있는 포도당을 생성할 수 있습니다. 알파 아밀레이스는 많은 인간 조직과 분비물에 존재하며, 법의학에서 유용한 도구가 될 수 있습니다. 침에서 다른 인간 분비물보다 50 배 높은 농도로 존재하는 것으로 추정됩니다. 인간에게는 아밀레이스를 암호화하는 두 개의 DNA 위치가

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

있습니다. AMY1 과 AMY2 는 염색체 1 에 위치합니다. AMY1 은 침, 모유 및 땀에 존재하는 아밀레이스를 암호화하고, AMY2 는 침샘 및 기타 인간 분비물에서 발견되는 아밀레이스를 암호화합니다.

이 시뮬레이션 실험에서 학생들은 혀 누르개에서 회수한 두 운전자의 침 아밀레이스 수치를 측정하여 졸음운전으로 인해 사고를 유발한 사람이 누구인지 확인할 것입니다. 반응은 (1) 기질(전분)의 소멸 또는 (2) 생성물(맥아당)의 생성을 테스트하여 시각화할 수 있습니다. 전분에 대한 테스트는 요오드 테스트를 사용하고, 맥아당에 대한 테스트는 디니트로살리실산 테스트를 사용할 것입니다.

이 실험의 첫 번째 모듈에서는 전분 용액에 요오드 한 방울을 추가하면 전분 농도에 따라 특유의 짙은 갈색 또는 파란색을 띠게 됩니다. 아밀레이스가 존재하면 전분을 소화하여 전분의 복잡한 구조가 파괴되고 짙은 갈색(또는 파란색) 색상의 강도가 사라집니다. 전분 요오드 테스트에서 파란색 색상의 강도를 낮추면 침 샘플에 존재하는 아밀레이스의 양과 상관관계를 가질 수 있습니다. 이 실험에서는 전분 테스트를 위해 파란색을 제공하는 안전한 대체물인 포비돈-요오드를 사용할 것입니다. 전분의 완전한 가수분해는 요오드와 결합했을 때 노란색으로 표시됩니다.

이 실험의 두 번째 모듈에서는 3,5-디니트로살리실산(노란색)이 아밀레이스 반응에서 색상 시약으로 사용됩니다. 이 모듈에서는 환원당인 맥아당의 존재가 산화-환원 반응을 수행하여 감지됩니다. 탄소일 그룹($C=O$)의 존재로 인해 맥아당은 디니트로살리실산과 산화-환원 반응에 참여합니다. 이 반응은 생성된 맥아당의 농도에 따라 노란색에서 주황색 또는 빨간색으로 색상이 변합니다.

실험 전 준비 (지도 교사용)

1. 펜으로 10개의 원심분리기 튜브에 "A"라고 표기합니다.
2. 펜으로 10개의 원심분리기 튜브에 "B"라고 표기합니다.
3. 펜으로 10개의 원심분리기 튜브에 "C"라고 표기합니다.
4. 펜으로 10개의 원심분리기 튜브에 "D"라고 표기합니다.
5. 펜으로 10개의 원심분리기 튜브에 "E"라고 표기합니다.
6. 펜으로 10개의 원심분리기 튜브에 "F"라고 표기합니다.
7. 펜으로 10개의 원심분리기 튜브에 "Acid"라고 표기합니다.
8. 가상의 음성 대조군 타액 샘플(A튜브) 160 μ l (0.16mL)씩을 "A"로 표기한 각 원심분리튜브에 분주합니다.
9. 가상의 양성 대조군 타액 샘플(B튜브) 160 μ l (0.16mL)씩을 "B"로 표기한 각 원심분리튜브에 분주합니다.
10. 가상의 1번 운전자 타액 샘플(C튜브) 160 μ l (0.16mL)씩을 "C"로 표기한 각 원심분리튜브에 분주합니다.
11. 가상의 2번 운전자 타액 샘플(D튜브) 160 μ l (0.16mL)씩을 "D"로 표기한 각 원심분리튜브에 분주합니다.
12. 녹말용액(E튜브) 700 μ l를 "E"로 표기한 원심분리튜브에 분주합니다.
13. 아이오딘 용액(F튜브) 50 μ l를 "F"로 표기한 원심분리튜브에 분주합니다.
14. 산성색상시약(G튜브)는 냉장고에 제대로 보관하고 있었다면 침전이 되기도 합니다. 잘 녹도록 따뜻한 물에 튜브를 두도록 합니다.
15. 잘 녹은 산성색상시약(G튜브) 모두를 산성색상시약(H튜브)에 넣고 잘 섞습니다. 이 튜브를 "Acid"로 표기합니다. "Acid"라고 표기했던 10개의 원심분리기 튜브에 850 μ l (0.85mL)씩을 분주합니다.
16. 각 학생그룹에 다음 준비물을 나눠줍니다.
 - A. 각 A, B, C, D, E, F, Acid 튜브 한 개
 - B. 4개의 well이 있는 마이크로 플레이트 한 줄



C. 4개의 시험관

D. 피펫(transfer pipet) 8개

- A, B, C, D, E 튜브는 실험 모듈1, 모듈2에서 모두 사용됩니다.
- F는 실험 모듈1 에서만 사용됩니다.
- "Acid" 튜브는 실험 모듈2 에서만 사용됩니다.

***온도는 실험의 반응속도에 영향을 끼치기에 모든 실험은 실온에서 이뤄져야합니다. 이 키트의 몇몇 시약은 냉장보관이지만 실험 사용 전에는 실온에 두셔야 합니다.**

실험 과정 (학생 수행)

펜으로 피펫 4개에 각각 -, +, D1, D2 를 표기합니다. 실험에서 사용되는 시약에 맞는 피펫을 사용합니다.

(-) : 음성

(+) : 양성

D1 : Driver#1 (1번 운전자 타액)

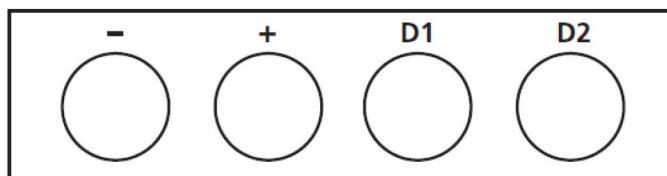
D2 : Driver#2 (2번 운전자 타액)

실험 모듈 1 : 기질(전분)의 유무 판별

1. 자신의 마이크로 플레이트에 다음의 그림처럼 펜으로 -, +, D1, D2를 표기합니다.

*주의 : 피펫으로 시약을 마이크로 플레이트 well마다 넣을 때 주변 well에 닿거나 시약이 섞이지 않도록 주의하십시오.

2. 마이크로 플레이트의 (-) well에 피펫을 사용해 음성 샘플용액 3방울(50 μ l)을 넣습니다. 다른 샘플 용액(양성, 운전자1, 운전자2)도 다른 피펫들을 사용해 각 well마다 동일한 양을 넣습니다.
3. 녹말용액(E튜브) 50 μ l씩 각 well에 넣습니다.
4. 아이오딘 용액(F튜브) 10 μ l씩 각 well에 넣습니다.
5. 색 변화를 기록합니다.

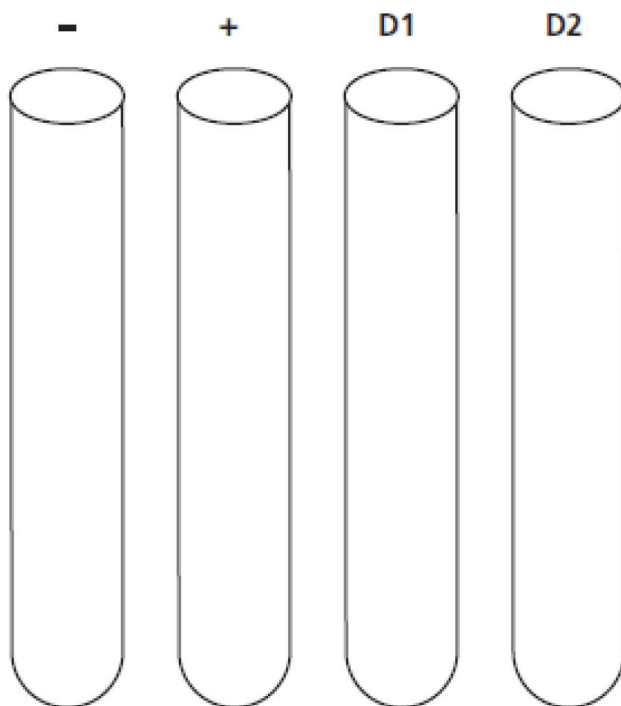


실험 모듈 II : 말토스(Maltose) 유무 판별

1. 펜을 사용해 4개의 비어있는 시험관에 -, +, D1, D2를 표기합니다.

실험용 장갑을 착용합니다.

2. 각 시험관에 맞는 샘플용액(-, +, D1, D2)을 100 μ l씩 넣습니다.
3. 녹말 용액을 6방울(100 μ l) 씩 각 시험관에 넣고 잘 섞습니다. 5분간 실온에 놔둡니다.
4. 산성 색상 용액 200 μ l씩 각 시험관에 넣습니다. 잘 섞은 후에 작은 호일로 시험관 입구를 덮습니다. 시험관을 1분간 끓는 물에 넣습니다.
5. 실온에 다시 식히도록 합니다.
6. 각 시험관에 2ml 증류수를 넣고 잘 섞습니다.
7. 색 변화를 기록합니다.



실험 결과

모듈 I:

마이크로 플레이트의 기질(전분)의 사라짐을 관찰한 결과 각 웰마다 어떤 색이 나타납니까? 두 운전자 중 누가 잠들었을 것이라고 생각합니까?



수면 부족으로 인해 사람의 타액의 아밀레이스 수치는 증가합니다. 일반적으로 전분 용액은 아이오딘과 결합하면 짙은 갈색(또는 파란색)을 띕니다. 반응 후 갈색은 전분이 존재함을 나타냅니다.(운전자#1) 반면에 아밀레이스가 전분과 작용하여 복잡한 구조가 파괴되어 가수분해되면 아이오딘과 결합 될 때 황색으로 표시됩니다.(운전자#2)

모듈 II:

이 모듈에서는 3,5-Dinitrosalicylic acid(노란색)가 전분분해효소 아밀레이스의 반응에서 산성 색상 시약으로 사용됩니다. 환원당인 맥아당의 존재는 산화 반응을 통해 검출됩니다. 이 반응에서 만들어진 맥아당 농도에 따라 노란색에서 주황색(또는 빨간색)으로 색상이 변합니다.



법의학 데이터 분석:

실험 결과에 따르면 운전자2의 타액 샘플은 운전자1보다 더 많은 맥아당을 생성하며 이는 운전자2의 타액에 더 많은 아밀레이스가 존재하다는 것을 보여줍니다.

따라서 운전자 2가 수면부족이었다는 것을 의미하며 사고에 대한 책임이 있을 수 있습니다.