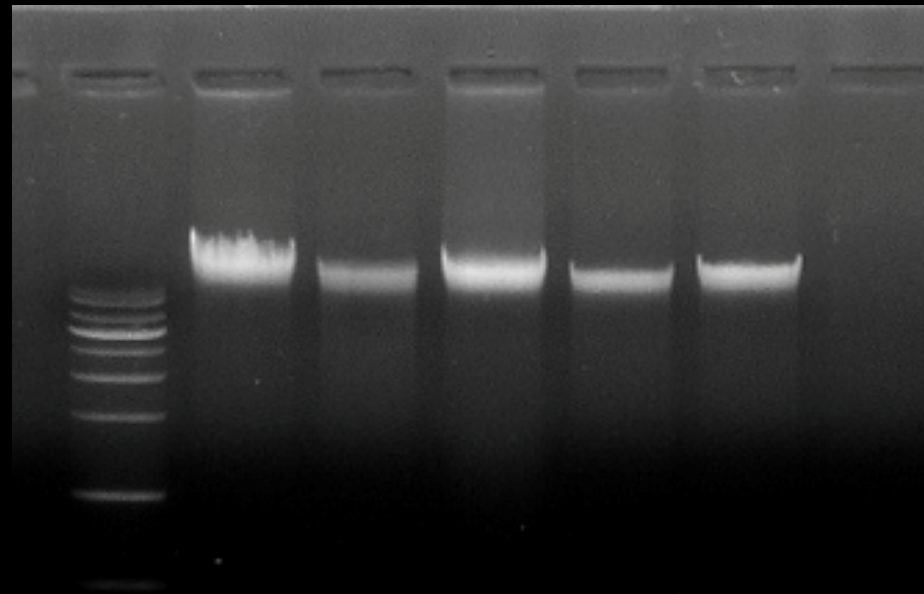


잎으로부터 DNA 추출 및 전기영동



실험 목적

- 식물 잎으로부터 직접 DNA를 추출해 봄으로서 DNA의 성질을 이해하고, 이를 수행함에 있어서 기본적인 분자실험 장비인 피펫, 원심분리기, 전기영동기 등의 사용법을 숙지한다.

Background

액체질소 (Liquid Nitrogen)

- 식물은 세포벽을 갖고 있어 세포벽을 파쇄하여야 세포 내 내용물이 나와 DNA 추출이 가능하다. 이를 위해 액체질소를 이용하여 막자사발로 식물조직을 분쇄할 수 있다.
- 액체상태의 질소는 **-196°C 의 극저온** 상태 임으로 **매우 조심하여 취급**하여야 한다. 특히 피부에 직접 닿을 경우 피부가 심하게 손상 됨으로 저온장갑을 착용하고, 안구에 튀는 것을 방지하고자 안전고글을 착용하고 취급한다.
- 액체질소는 극저온 상태를 유지시켜 줌으로 여러 가지 산업적으로 이용된다. 특히 생물분야에 있어서는 전기가 많이 소요되는 -80°C 의 초저온냉동고(deepfreezer)를 대신하여 장기보관 냉동생체 시료를 액체질소 속에 담그어 보관하기도 한다.

(예: 냉동정자, 냉동난자의 저장)

※ 참조: 생물학 실험실에서 일반적으로 사용하는 냉장 및 냉동고의 온도

- 일반 냉장고: 4 °C
- 초저온 냉동고 (deepfreezer): -80 °C
- 일반 냉동고: -20 °C
- 극저온 생체보존장치 (Cryo-Biological System): -196 °C

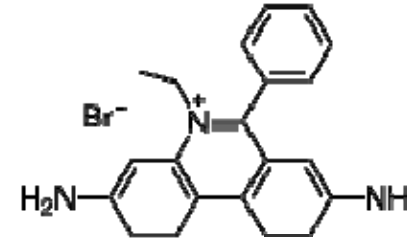


DNA의 추출:

- 파쇄된 조직을 extraction buffer (CTAB buffer) 와 섞으면 조직으로부터 DNA가 분리된다 (버퍼속의 EDTA가 **킬레이트(chelate) 작용**을 함)
※ 킬레이트: 한 개의 리간드가 금속 이온과 두 자리 이상에서 배위결합을 하여 생긴 착이온을 뜻한다.
- 조직이 파쇄되면 DNase가 세포내에서 빠져나와서 DNA를 파괴하게 된다. 그러므로 chloroform등의 **단백질 비활성화 물질을 처리**함으로써 모든 효소작용을 정지시킨다.
- DNA는 염(salt)의 존재 하에서 70%정도의 EtOH에서 엉기는 (pellet을 형성) 성질을 갖고 있다. 이 때 원심분리를 하면 엉긴 DNA는 가라앉고 다른 이물질은 용액속에 남아있게 된다. 이러한 성질을 이용하여 순수한 DNA를 추출할 수 있다.
- DNA는 TE (Tris-EDTA) buffer에서 매우 잘 녹는다.

손쉬운 DNA의 확인과 정량 방법

- TE buffer 또는 물에 녹은 DNA는 무색으로 눈으로 보이지 않는다. 그러므로 일반적으로 **EtBr (Ethidium bromide)**을 이용하여 간접적으로 DNA의 존재와 농도를 확인 할 수 있다.



- EtBr은 두개의 염기가 결합한 DNA 사다리의 가로대와 비슷한 크기와 구조를 갖고 있어 DNA 염기쌍 사이로 잘 삽입된다. EtBr은 자외선(ultra-violet ray)을 받으면 가시광선으로 전환시켜 발광하는 성질을 갖는 일종의 형광물질이다. 추출된 DNA를 EtBr을 포함한 agarose gel 상에서 전기영동 시키면, DNA에 EtBr이 결합하게 되고 이를 자외선 하에서 관찰하면 발광하는 EtBr의 밝기로서 상대적인 DNA의 양을 측정할 수 있게 된다.
 - 일반적으로 이미 그 양을 알고 있는 DNA와 동일한 조건에서 같이 전기영동하여 그 밝기를 비교함으로써 정량한다.
- ※ EtBr은 DNA에 삽입되는 intercalating agent로서 틀변환돌연변이(**frame-shift mutation**)를 일으키는 **발암물질**이다. 그러므로 제한된 구역에서 조심하여 사용하여야 한다. EtBr은 수용성으로 신체가 오염되었을 시에는 즉시 물로 닦아내고, 빛에 의해 파괴됨으로 항상 어두운 곳에 보관하여야 한다.

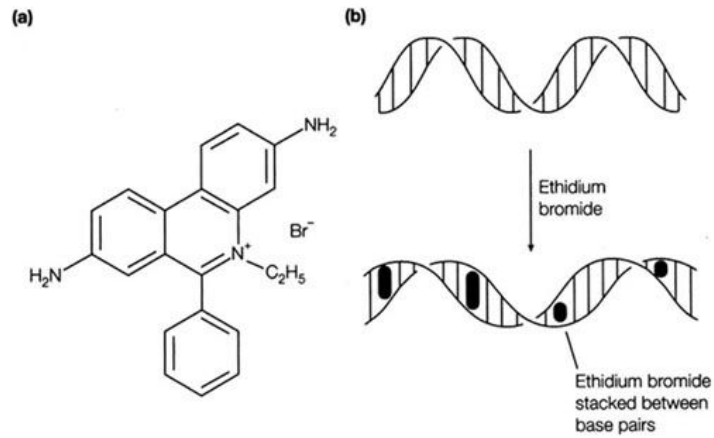
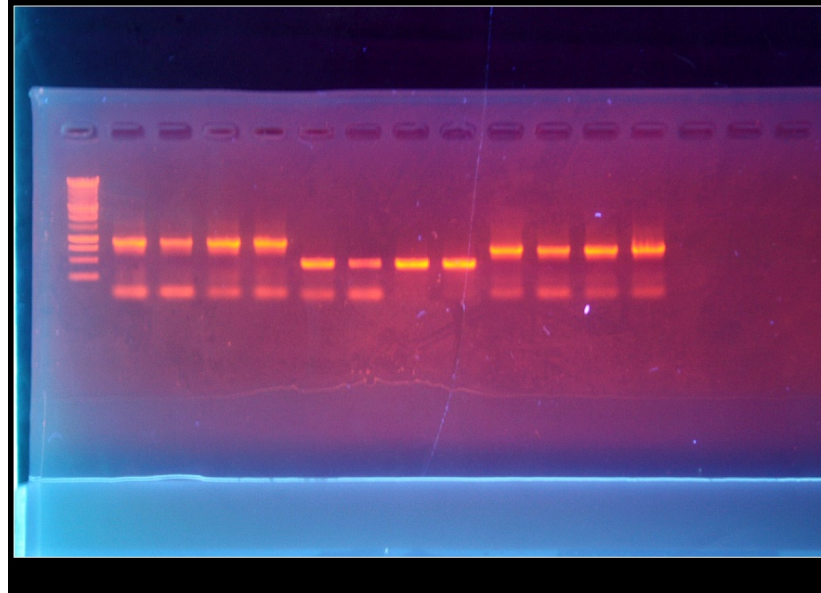


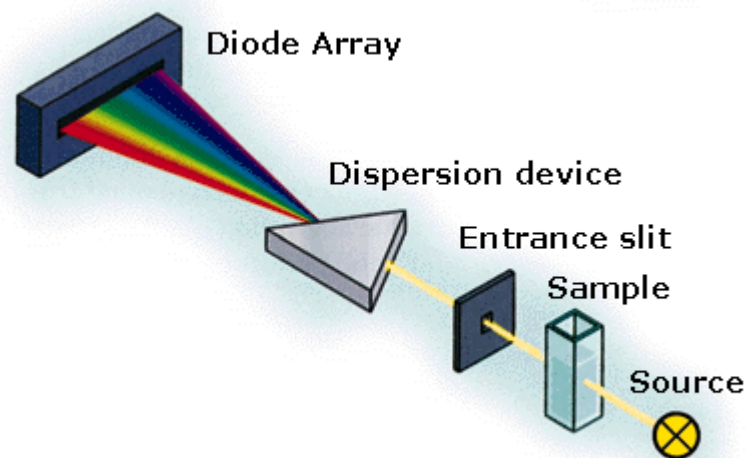
Fig. 3. (a) Ethidium bromide; (b) the process of intercalation, illustrating the lengthening and untwisting of the DNA helix.



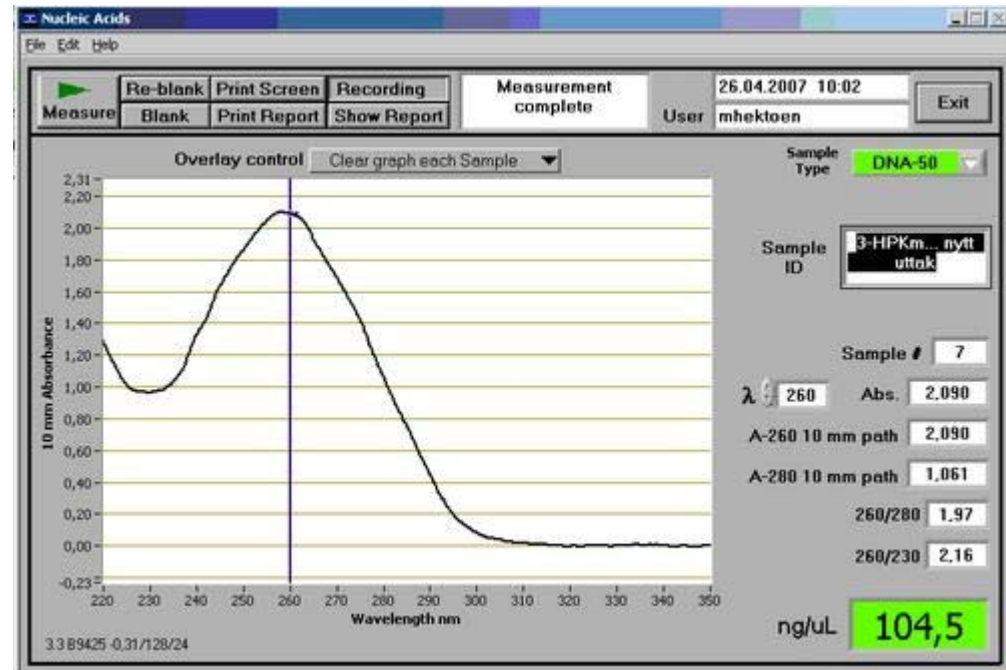
정확한 DNA 정량법

- 일반적으로 추출된 DNA를 정확히 정량하기 위해서는 spectrophotometer를 이용한다. DNA는 **260nm**의 파장을 흡수하기 때문에 그 양은 260nm에서의 **OD (optical density)값에 비례한다**. 이를 이용하여 DNA의 양을 측정한다.
- 단백질의 흡수파장은 280nm로서 OD 260/280 값은 추출된 DNA가 얼마나 순수한지를 측정하는 지표이다.
- 그러나 spectrophotometer를 이용하기 위해서는 일정부피 (cuvette의 크기에 따라 약 1ml~100ul 정도)이상이 필요하며, OD 값 또한 측정을 위한 유효한 범위가 존재하기 때문에 일반적으로 추출된 DNA는 1/10~1/100정도로 희석하여 측정한다.
- 그러므로 spectrophotometer는 소량의 DNA의 정량에는 한계가 있다.
- 최근 개발된 특수한 형태의 spectrophotometer인 Nanodrop과 같은 측정장치는 1ul정도라도 정량이 가능하므로 소량의 DNA의 정밀한 정량이 가능해 졌다.

UV-visible Spectrophotometer

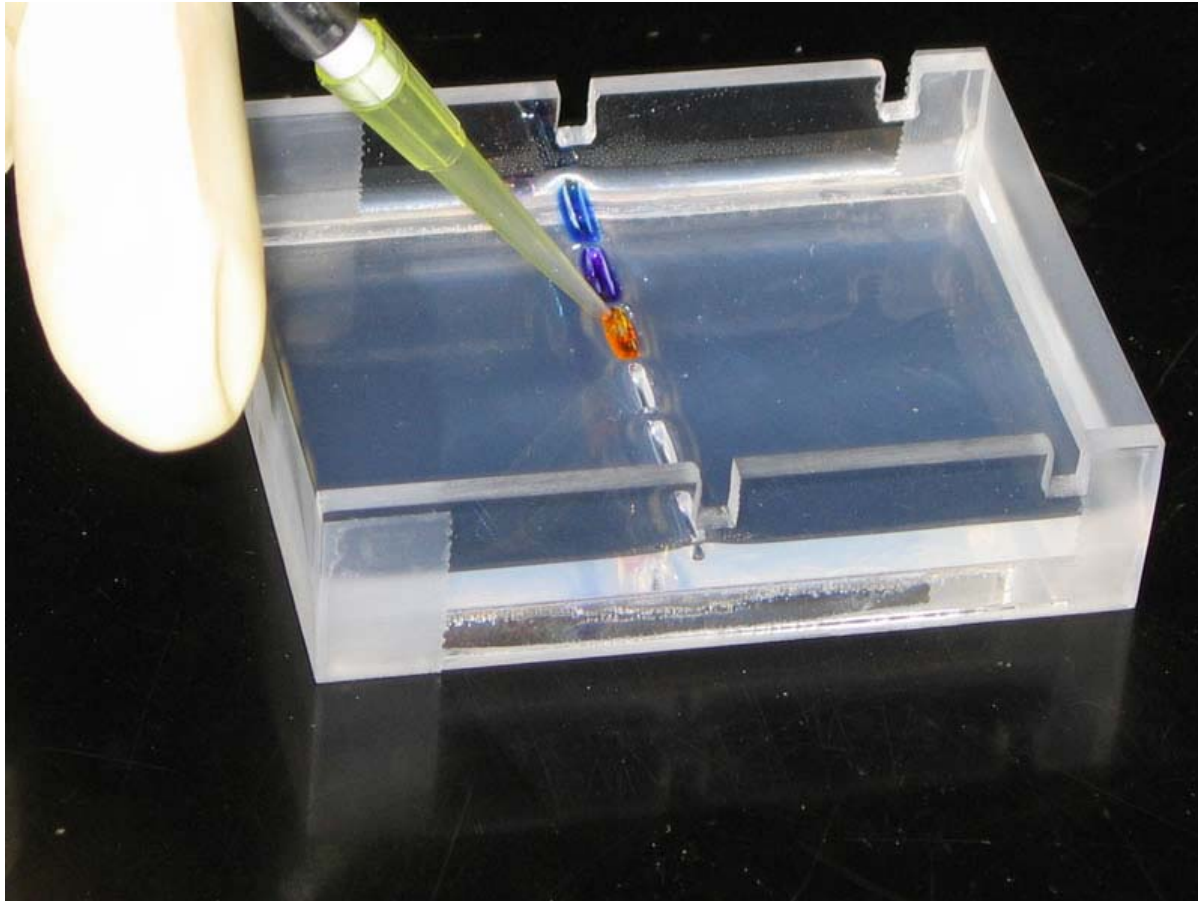


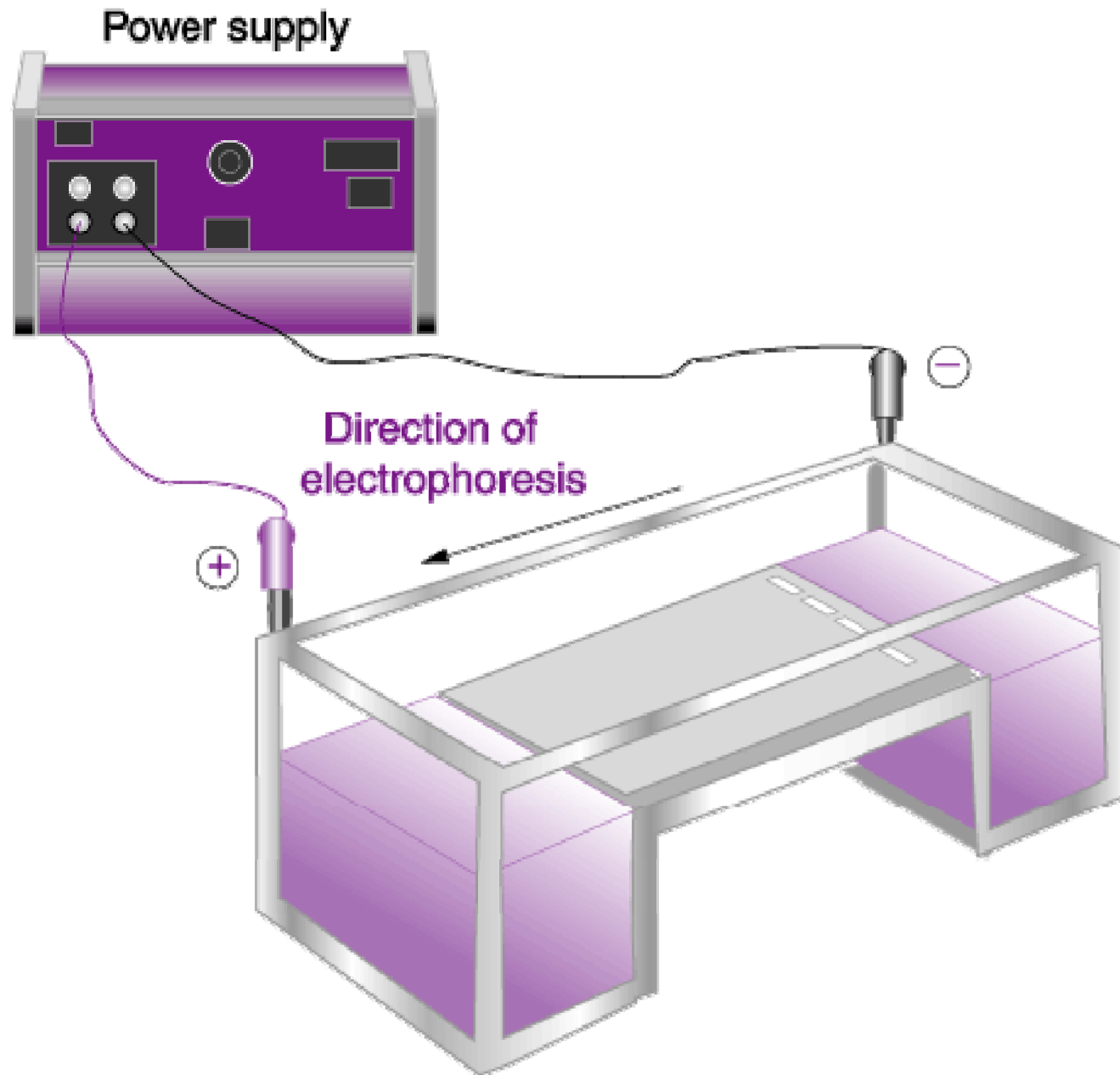
Nanodrop spectrophotometer

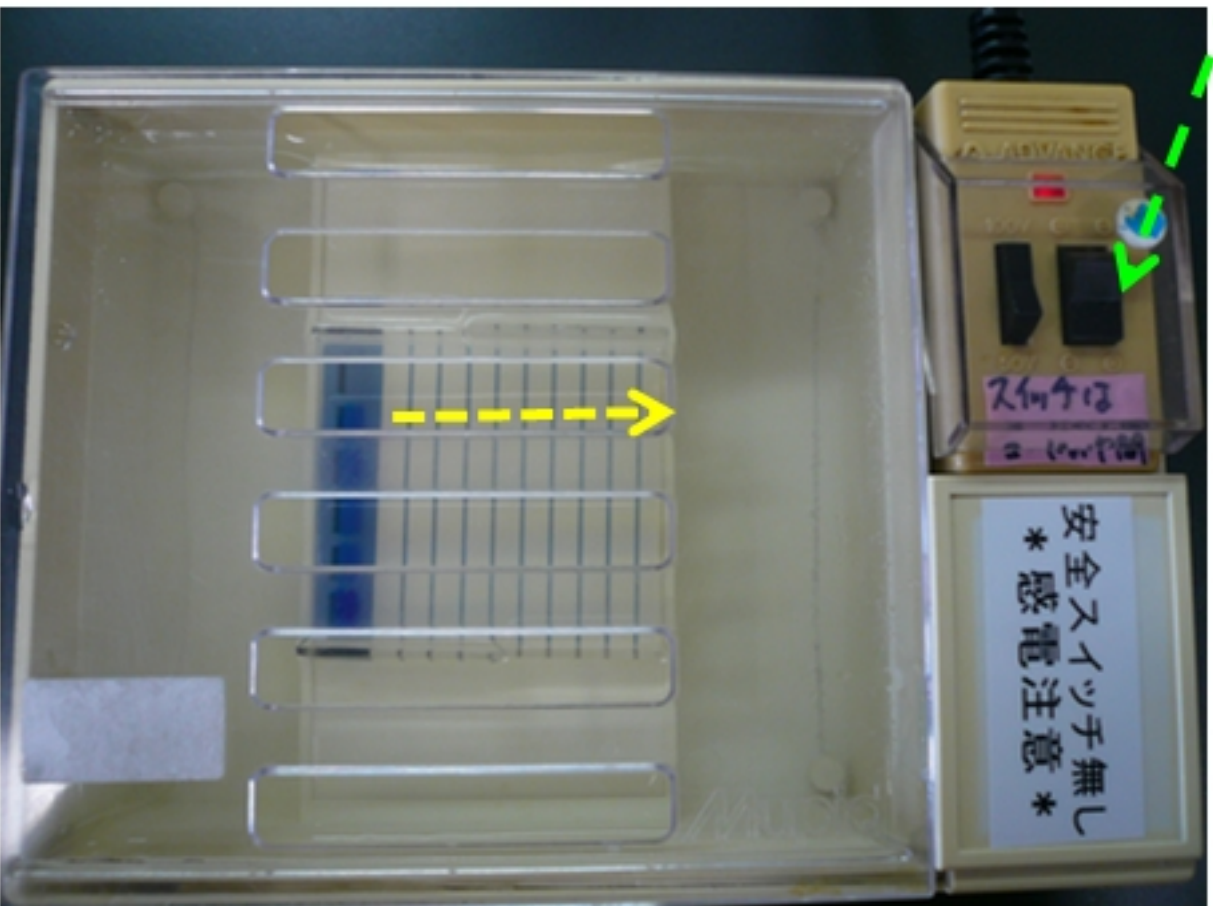


전기영동(electrophoresis)

- **정의:** DNA나 RNA, protein과 같은 큰 분자들을 전기적인 힘을 이용하여 gel에서 이동시켜 크기에 따라 서로 분리하는 기술이다.
- **Agarose gel:** 추출된 DNA의 확인이나, PCR product의 확인 등을 위해서는 0.005%정도의 EtBr을 포함한 1~1.5% 정도의 agarose gel 을 이용하여 전기영동하며 한다.
- **완충액:** 전기영동을 위한 buffer는 1X TAE (Tris base, Acetic acid, EDTA) 또는 1X TBE (Tris base, Boric acid, EDTA)를 사용하며, 10X로 만들어 사용전 1X로 희석하여 사용한다.
※ "X"라 함은 농도를 뜻하고, 10X 용액이란 10배 농도의 저장용액을 말한다.
- **DNA의 이동방향:** 전기영동 시에는 시료의 이동방향에 주의한다: DNA는 "-" 전하를 띠고 있으므로 전기영동을 하면 "+" 극으로 이동한다.
- **염료와 침강제:** DW (distilled water) 또는 TE (Tris-EDTA)에 녹아있는 DNA는 무색이고, 전기영동 buffer에 들어가면 즉시 확산된다. 그러므로 DNA를 전기영동 할 때에는 loading buffer와 섞어 함께 loading 한다. Loading buffer에는 bromophenolblue라는 파란색의 염료가 들어있어 이것과 섞인 DNA의 위치를 눈으로 확인할 수 있게 하고, 또한 sucrose 등의 고분자물질을 넣어 DNA가 buffer 속에서 확산되지 않고 well 으로 가라앉을 수 있게 침강제의 역할을 한다.







ス何ヶは

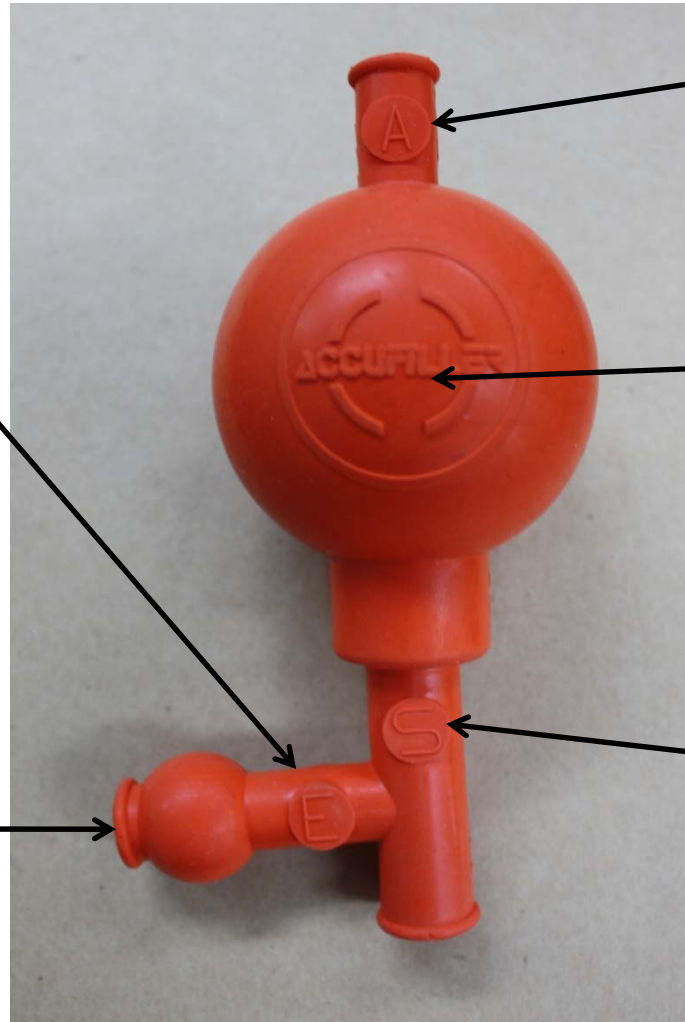
コ 10.07

安全スイツチ無し
* 感電注意 *

피펫 사용법 복습!

피펫에 담긴
용액을 내보낼 때
누름

마지막 한방울
떨구어 낼 때
살짝 눌러줌



공기가 나오는 곳

압력조절 부위
; 'A'를 누르면서
동시에 눌러줌

Storage;
이곳을 누르면
피펫으로 용액이
올라옴

여러 가지 피펫 종류들



Basic type

- P10 white tip
- P20 yellow tip
- P100 yellow tip
- P200 yellow tip
- P1000 blue tip



Multi-channel pipette





Auto-pipettes

원심분리기

- g value: gravity
- rpm: round per minutes
- Rotor: 고정식과 swing bucket
- 원심분리기 사용시 주의사항:
 - 축을 중심으로 항상 좌우가 같은 무게가 되도록 한다.
 - 시료가 하나밖에 없을 경우에는 같은 blank tube를 넣어 무게를 맞춘다.
- 고속이나 대용량의 원심분리기에서는 열이 많이 발생함으로 일반적으로 냉각장치가 부착되어 있다.



Vortex Mixer 또는 Touch Mixer

시험관 혼합기

Vortex Mixer

Model KMC-1300V

시험관 혼합기

- 시험관으로 Cup을 누르면 자동으로 동작 (Touch On)
- 스위치를 작동하면 계속 동작 (Constant On)
- 3000RPM까지 속도 조절
- 다양한 약세서리 선택 가능
- 고품질의 안전 설계
- CE 인증



Vortex Mixer, Platform Head



Vortex Mixer, Mixing Cup Head

Fumehood



공기의 흐름

이곳에 주로 부식성 또는 인화성 시약들을 보관

DNA의 추출

실험 방법

1. 실험 시작 전 중탕기를 65도에 맞추어 놓는다.
2. 약 4X7cm 정도 되는 여러가지 식물 잎을 막자사발에 넣고 저온장갑을 끼고 액체질소를 부은 후 파쇄시킨다. **액체질소가 피부에 닿으면 피부조직이 파괴됨으로 장갑을 끼고 매우 주의하여 파쇄시킨다.**
3. 파쇄한 즉시 약수저를 이용하여 50 ml tube에 약 0.5g을 넣고 즉시 준비된 추출용액 (CTAB buffer) 10ml을 넣는다.
4. Vortexing 한 후 65도 중탕기에서 10분간 중탕. 5분 경과 시 꺼내어 흔들어 준 후 중탕 계속.
5. 10ml의 chloroform/Isoamylalcohol (24: 1) 액을 넣고 뚜껑을 닫고 서너번 뒤집어 주어 잘 섞이게 한다. **Chloroform과 Isoamylalcohol은 냄새가 심한 유독성 물질이므로 fumehood내에서 다룬다.**
6. Swing-bucket centrifuge를 이용하여 3,000 rpm에서 5분간 원심분리

7. 스포이드를 이용하여 상등액만 새 tube로 옮긴다. 이때 아래로 가라앉은 식물조직, chloroform, isoamylalcohol은 나중에 폐기통에 폐기한다.
8. 옮겨진 상등액 부피에 대한 2/3 부피의 isopropanol을 피펫을 이용하여 넣고 뚜껑을 닫고 서너번 뒤집어 주어 DNA가 엉기는 것을 확인한다.
9. 3000rpm 5분간 원심분리 (4도 유지).
10. 뚜껑을 열고 상등액을 따라낸다. 이때 DNA pellet은 바닥에 붙어 떨어지지 않는다.
11. 페이퍼타월을 이용하여 tube벽의 액체를 제거한다.
12. 5ml의 TE buffer를 넣고 DNA pellet을 완전히 녹인다. (잘 녹지 않을 경우에는 65도의 중탕기로 열을 가해 녹여도 된다)
13. 7.5M ammonium acetate 2.5ml과 95% ethanol 15ml 을 넣은 후 서너번 뒤집어 DNA를 다시 침전시킨다.
14. 3000rpm 5분간 원심분리 함 (4도 유지).
15. DNA pellet을 완전히 건조시킨 후 약 1ml 의 TE로 완전히 녹인다.

전기영동

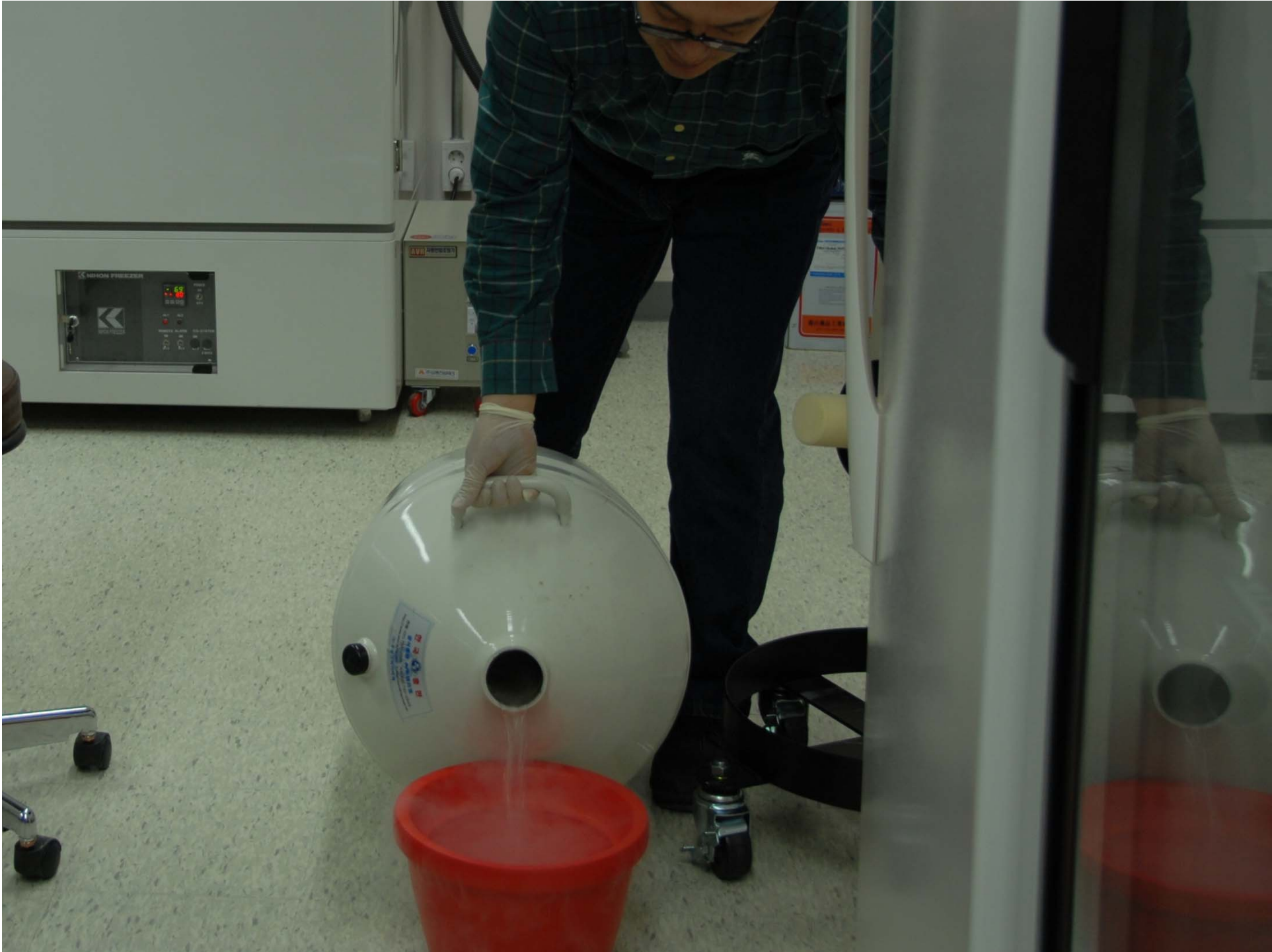
준비물:

추출된 DNA, 전기영동 장치, power supply, agarose, 1XTAE buffer, 전자레인지, 피펫, EtBr, 침강제 및 염료, parafilm, UV gel-documentation system

실험 방법

1. EtBr을 첨가하여 1.5% agarose gel을 만든 후 충분히 온도를 내려 굳힌다.
2. Agarose gel을 전기영동기에 거치시킨다.
3. 추출된 DNA 5ul와 침강/염료 1ul를 parafilm 상에서 피펫을 이용하여 섞은 후 agarose gel의 well에 넣는다.
4. 100V에서 약 15분간 전기영동 시킴.
5. UV illuminator 상에서 DNA 추출을 확인함. **UV 광선을 맨눈으로 보는 것은 매우 위험하므로 항상 UV protector를 통하여 UV 상에서 gel을 관찰한다.**

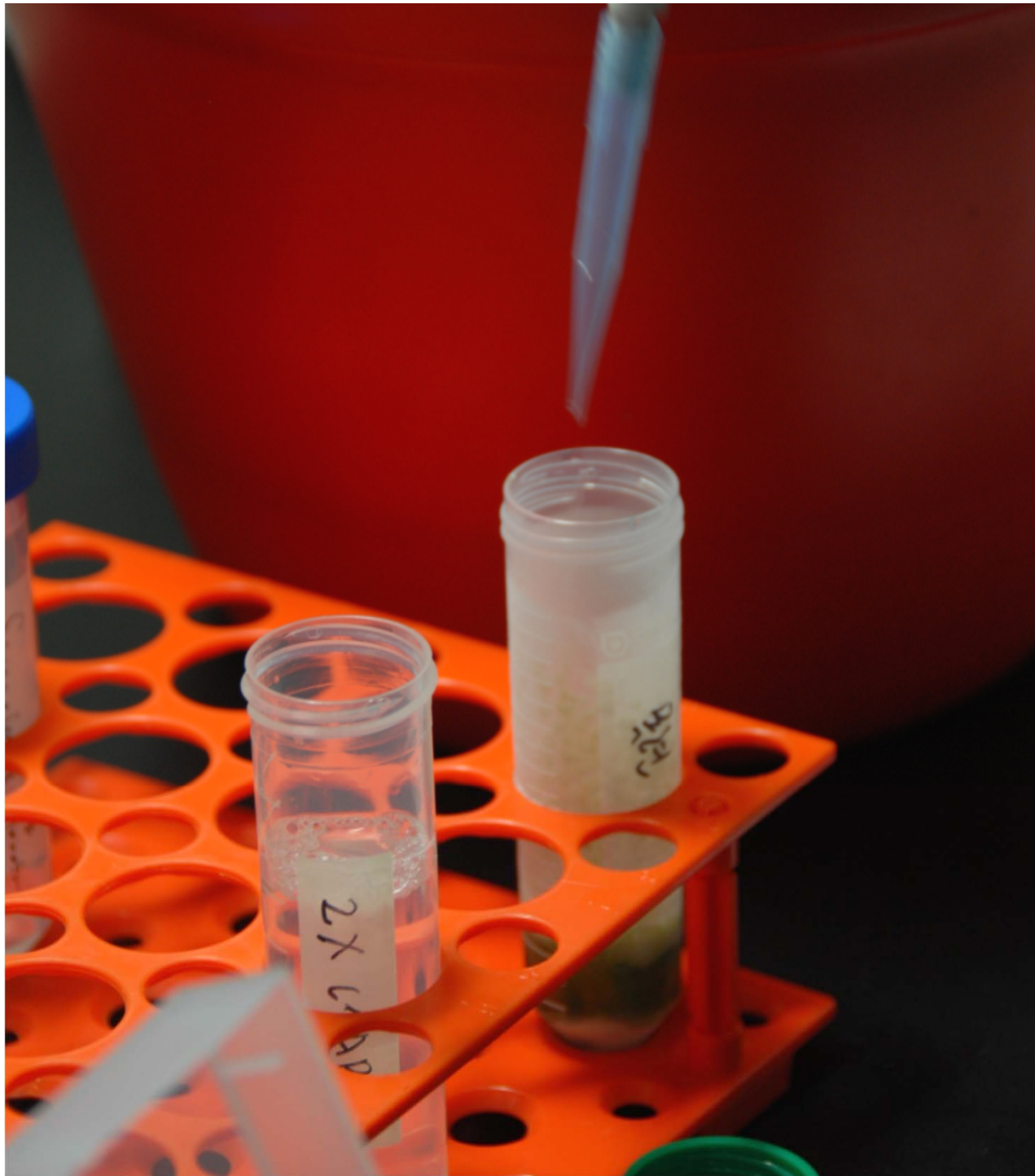
DNA 추출 과정











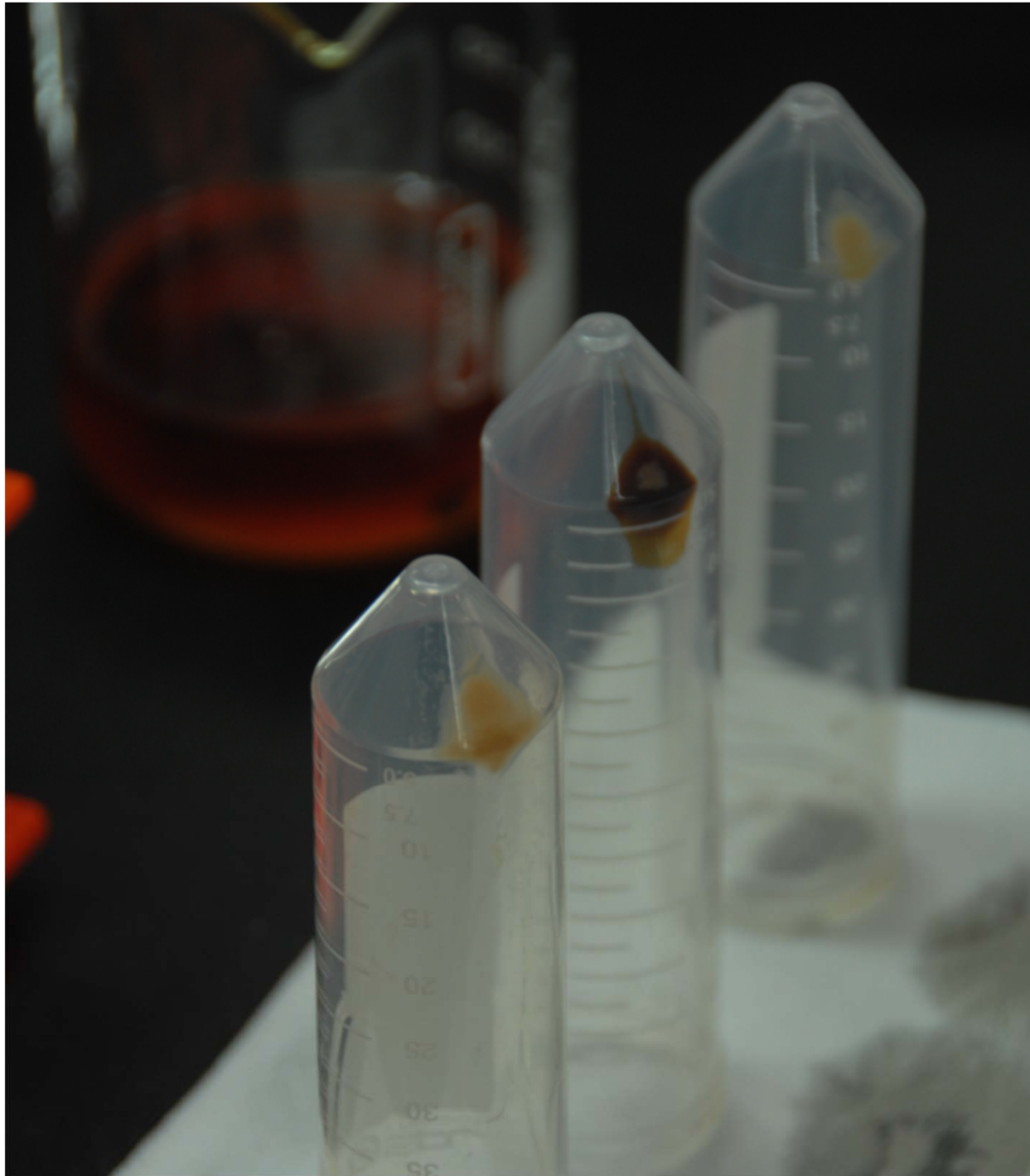


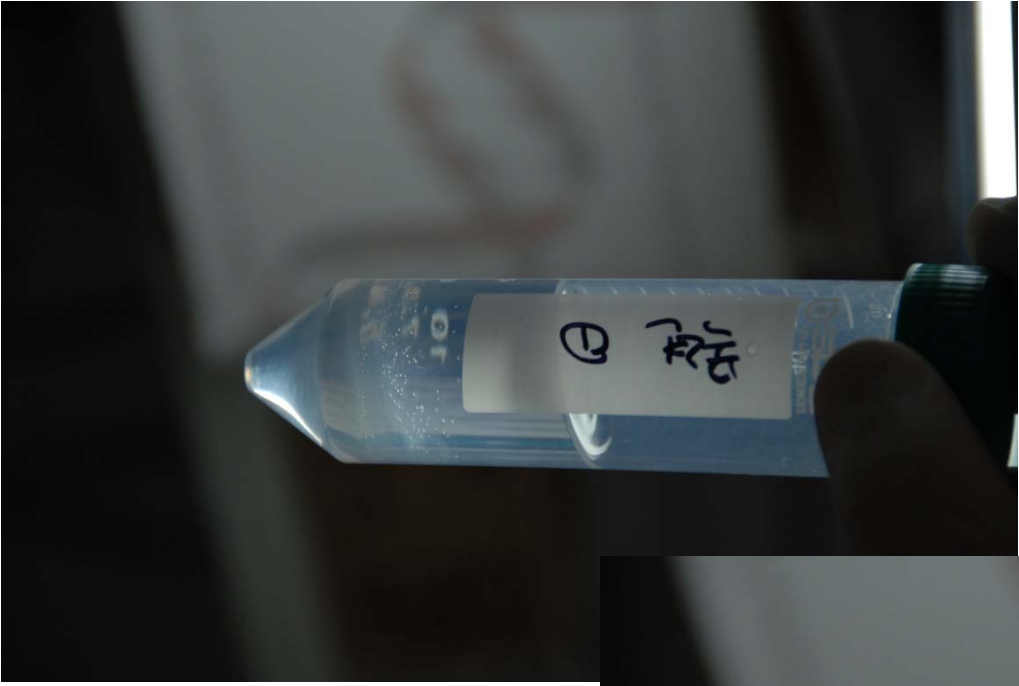












전기영동 과정



Mini Gel Migration Trough
WARNING
HIGH VOLTAGE
Turn off power before opening
Main unit cover
COSMO BIO CO., LTD. ESTABLISHED IN 1982


Mupid-2
Mini Gel Migration Trough
WARNING
HIGH VOLTAGE
Turn off power before opening
Main unit cover
COSMO BIO CO., LTD. ESTABLISHED IN 1982

한국과학기술연구원
KRISS

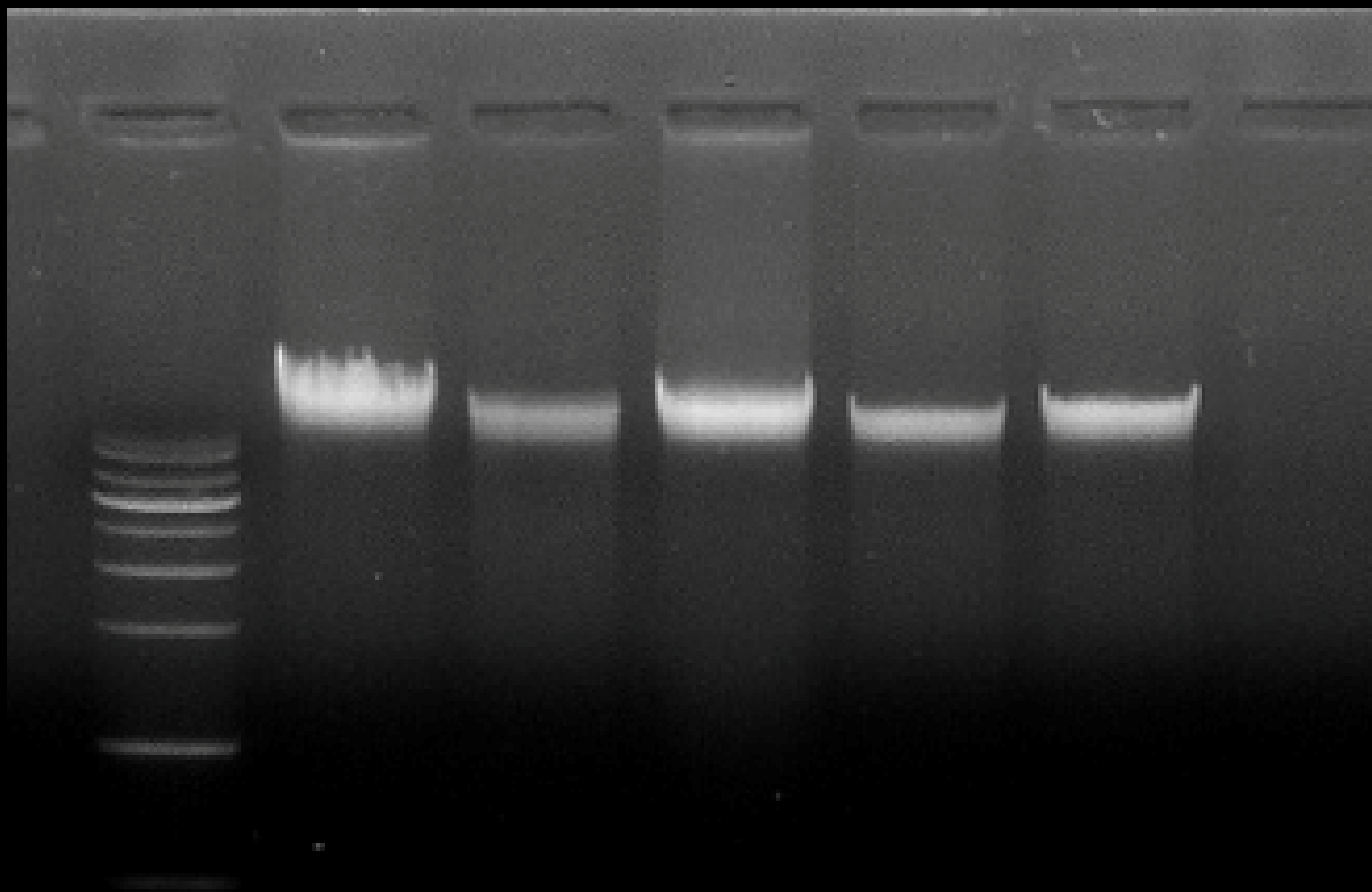
PARAFILM M33
PARAFILM M33






CAUTION
When polarity is set to the position, molecules which are negatively charged will migrate in the direction of arrow
Use only 0.5 x TAE or 0.5 x TBE buffer for electrophoresis
CHECK POLARITY
Turn power off before opening the lid





보고서

실험의 Background 설명을 참조하여 아래 질문에 대한 해답을 정확히 이해한 후 답을 2페이지 정도 작성해서 제출하시오 (기말고사문제가 될 수 있음).

1. 생체시료의 초저온 장기보존을 위해 deepfreezer를 이용하는 것과 액체질소보존탱크를 이용하는 경우 각 system의 성질과 장단점을 비교설명 하시오.
2. 식물시료로부터 DNA를 추출하는 과정과 그 원리를 단계별로 설명하시오.
3. 추출된 DNA를 어떻게 정량할 수 있는지 각각의 방법과 그 원리를 설명하시오.
4. DNA를 전기영동 할 때 DNA는 어떤 방향으로 이동하는가와 그 이유에 대하여 설명하시오.