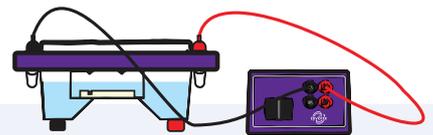

전기영동의 원리와 실험

Principles and Practice of Agarose Gel Electrophoresis

#ED101



☎ 02-929-1110 ✉ info@koreasci.com

🛒 www.koreasci.com

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

아가로스 겔 전기영동의 원리와 연습

[제품 구성]

전기영동을 위한 Ready-To-Load 염색 샘플

- A Orange
- B Purple
- C Red
- D Blue 1
- E Dye Mixture
- F Blue Dye Mixture(Blue 1 + Blue 2)

시약&기구

- 연습용 겔로딩 용액
- 아가로스 분말
- 전기영동 버퍼
- 1ml 피펫
- 분주용 피펫

[기타 실험에 필요한 장비 - 별도 구매]

- DNA 전기영동 장치
- D.C 전원 공급장치
- 마이크로 파이펫 & 팁
- 저울
- 전자레인지 혹은 핫플레이트
- 250ml 플라스크 혹은 비커
- 장갑
- 겔 염색약 제거를 위한 플라스틱 통
- 백색광 조명 (White LED 트랜스 일루미네이터)
- 증류수

※ 주의

모든 제품 구성품은 교육적 연구를 목적으로 개발되었으며 인간 또는 동물의 진료용으로 사용될 수 없습니다.

[실험 목적]

이 실험의 목적은 학생들이 다음의 내용을 배우는 것이다.

- DNA 아가로스겔 전기영동을 직접 실행하여 DNA 전기영동의 기초적인 이론을 이해한다.

[배경지식]

1. 전기영동(Electrophoresis)이란?

전기영동은 주로 생체 고분자들의 성질을 연구하고, 그것들을 분석, 분리, 정제하는 중요한 방법중에 하나이다. 전기영동은 DNA, RNA나 단백질 같은 것들이 고유의 전하를 띠고 있고, 그것들이 어떤 전기장에 놓이게 되면 이동할 수 있다는 사실을 기본으로 하고 있다.

DNA 전기영동은 크기, 전하 또는 구조가 다른 DNA 조각을 분리하는 기본적인 방법입니다. DNA는 구조상 Backbone의 Phosphate group을 가지고 있어 전기영동에 사용되는 Buffer안에서 음전하를 띠고 있으며 두 전극 사이에 위치했을 때 (+)극으로 움직이는 기본적인 원리를 가지고 있다. 이때, Agarose나 Polyacrylamide와 같은 Gel Matrix 사이를 DNA 분자가 통과하는 속도는 분자량이 커질수록, Gel의 농도가 높을수록 늦어지게 된다.

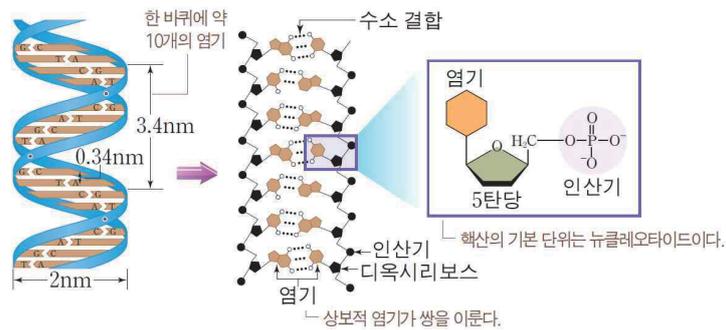


그림 1. DNA의 구조

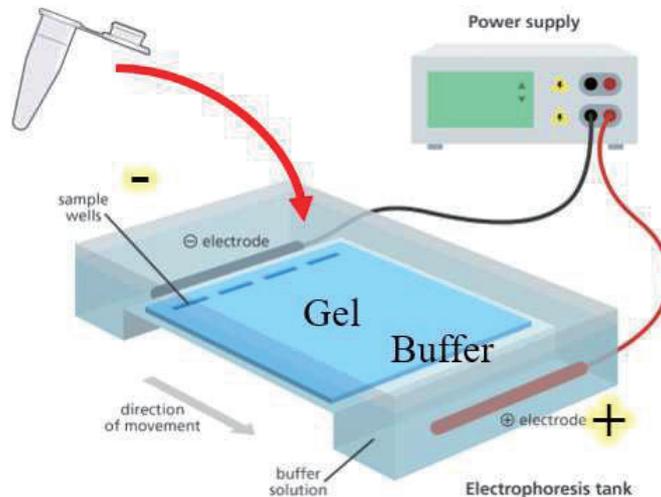


그림 2. 핵산을 분리하기 위한 전기영동

2. 아가로스 겔 전기영동

아가로스 겔은 해상도는 낮지만, DNA 단편을 200 bp에서부터 50 kb까지 분리할 수 있으며 사용이 간편하고, 다루기가 쉽기 때문에 현재 가장 많이 사용되고 있는 전기영동이다. 아가로스는 해초로부터 추출되는 물질로서 선형 중합체의 형태를 하고 있다. 아가로스 겔은 적당한 완충용액(TAE buffer)에 녹여서 원하는 크기의 틀에 부어지며, 겔이 굳은 후에 사용된다. 겔이 굳는 동안 아가로스는 지지체(matrix) 형태가 되며, 그 밀도는 아가로스 농도(%)에 따라 정해진다. 이러한 겔에 전기장이 주어진다면, 음전하를 띠는 DNA는 양극으로 이동한다. 이때 DNA가 이동하는 정도는 여러 가지 요인의 영향을 받는다

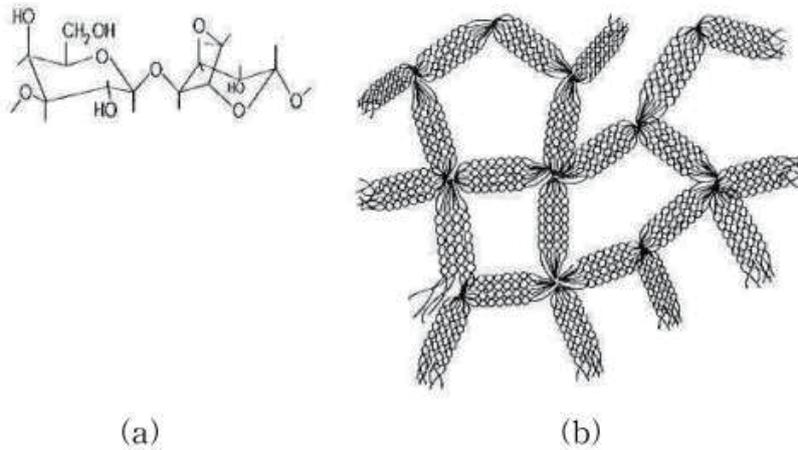


그림 3 . 아가로스의 화학적 구조(a)와 겔을 형성할 때 만들어지는 중합체의 구조(b)

3. 아가로스 겔 전기영동 시 DNA의 이동에 영향을 주는 요인들

1) DNA 분자의 크기가 클수록 느리게 이동한다.

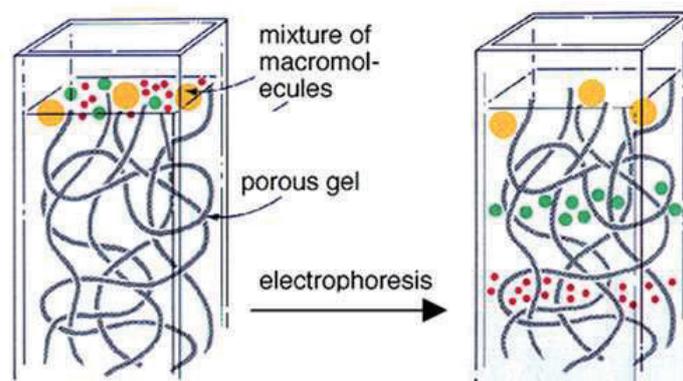


그림 4. 아가로스 겔 내에서의 분자이동

2) Agarose의 농도가 높을수록 느리게 이동한다.

3) DNA 형태(구조)에 따라 이동속도가 다르다. 일반적으로 supercoiled DNA가 가장 빨리, 그다음 linear DNA, open circular DNA의 순으로 빠르게 이동한다.

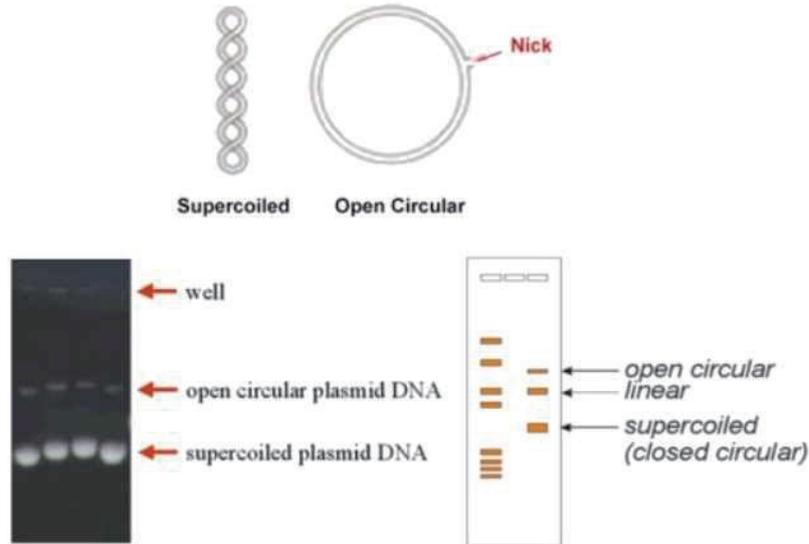


그림 5. 아가로즈 젤에서 DNA의 이동순서

4) 부하되는 전압이 높을수록 이동속도가 빠르다.

4. TAE 버퍼 (TAE buffer)

TAE buffer에는 Tris, Acetate, EDTA라는 세가지 성분이 들어있는데, Tris는 양이온을 공급하여 (-) charge를 띠고 있는 DNA를 끌어주는 역할을 합니다. 그러나 Tris는 pH가 11에 가까울 정도로 높기 때문에 DNA가 해리될 수 있습니다. 따라서 이 높은 pH를 낮추기 위해 Acetate가 들어갑니다.

EDTA의 역할은 두가지로 다음과 같습니다.

1) DNase inhibition에 의한 DNA 분해 방지

DNA sample prep 과정에 포함될 수 있는 DNase는 전기영동 중에 DNA를 분해할 수 있습니다. DNase의 활성에는 Mg^{2+} 와 같은 2가 양이온이 필요한데, EDTA는 ethylenediamine tetraacetic acid로 4개의 (-) charge를 띤 acetate기를 가져 Mg^{2+} 와 같은 양이온을 잡아주는 chelate로 작용하며, 결과적으로 DNase의 활성을 억제하고 전기영동 중 DNA 분해를 방지하게 됩니다.

2) 전기영동에 필요한 DNA의 (-) charge 유지

DNA는 당, 염기, 인산으로 구성되어 있는데, 그 중 인산은 당과 당을 연결하는 backbone구조를 형성하고 있고 DNA에 (-) charge를 띠게 합니다. 앞서 언급한 2가 양이온 (Mg^{2+} , Ca^{2+})은 DNA의 backbone에 존재하는 phosphate의 (-) charge를 중화시킴으로써 DNA 구조를 안정화시키는 역할을 합니다. 이러한 DNA backbone의 (-) charge는 DNA 전기영동시 agarose gel에서 (-)극에서 (+)극으로 이동하게 합니다. 따라서 DNA 구조에서 (-) charge를 중화시키는 2가 양이온을 EDTA로 제거해 주면 DNA의 구조는

염기를 제외하고는 일정하므로 분자량에 따라 일정하게 (-) charge를 띠게 되며, agarose gel 상에서 분자량에 따라 분리되게 됩니다. 이는 단백질 전기영동시 SDS를 sample buffer에 포함시켜 단백질이 균일하게 (-) charge를 띠게 하는 것과 유사한 역할을 하게 됩니다.

5. TBE 버퍼 (TBE buffer)

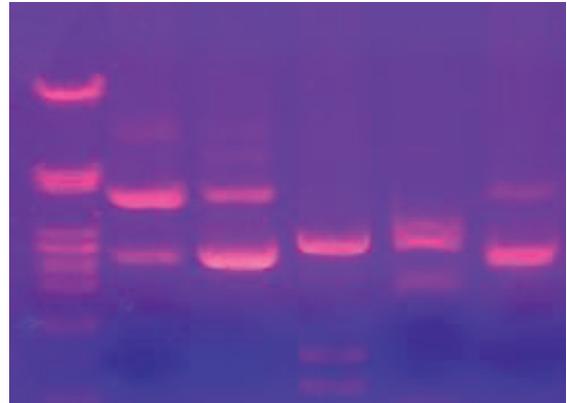
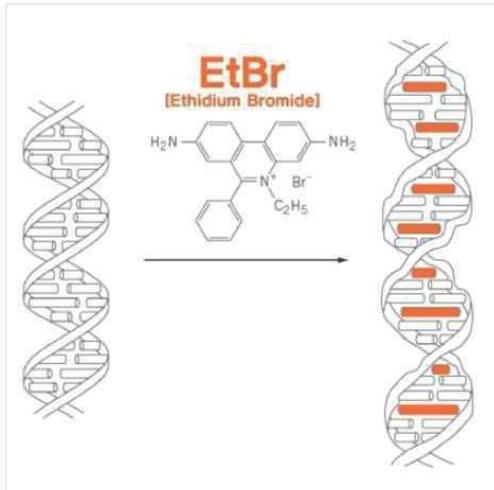
TBE 버퍼에는 Tris-borate-EDTA 세가지 성분이 들어있습니다. 일반적으로 TBE 버퍼가 TAE 버퍼 보다 Gel에서의 Resolution이 좋습니다. 그래서 TAE 버퍼는 DNA 분자량이 큰 agarose electrophorsis에서 주로 사용되고 TBE는 DNA 분자량이 작은 경우에 쓰이며 주로 DNA sequencing 할 때 씁니다.

6. DNA staining dye

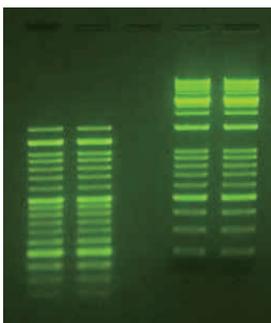
1) EtBr

EtBr은 실험실에서 많이 사용되는 대표적인 staining dye로써, 얇은 판 모양의 고리화합물로, DNA 나선의 염기 사이에 들어가 결합하므로 강력한 발암물질이자 돌연변이원(mutagen)으로 알려져 있으며, UV에 노출되면 결합한 DNA를 통해 가시광선으로 변화시켜 발광 된 band를 확인할 수 있습니다.

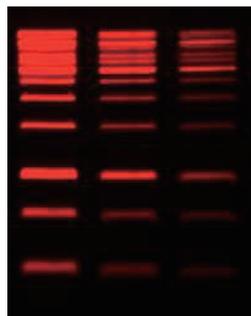
또한, EtBr은 DNA의 이동속도를 10~15% 감소시키며, 취급 시 반드시 glove 및 mask를 착용 해야 하고 사용 후에는 폐기해야 합니다.



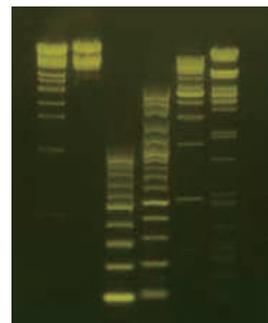
2) 다양한 DNA staining dye



Green

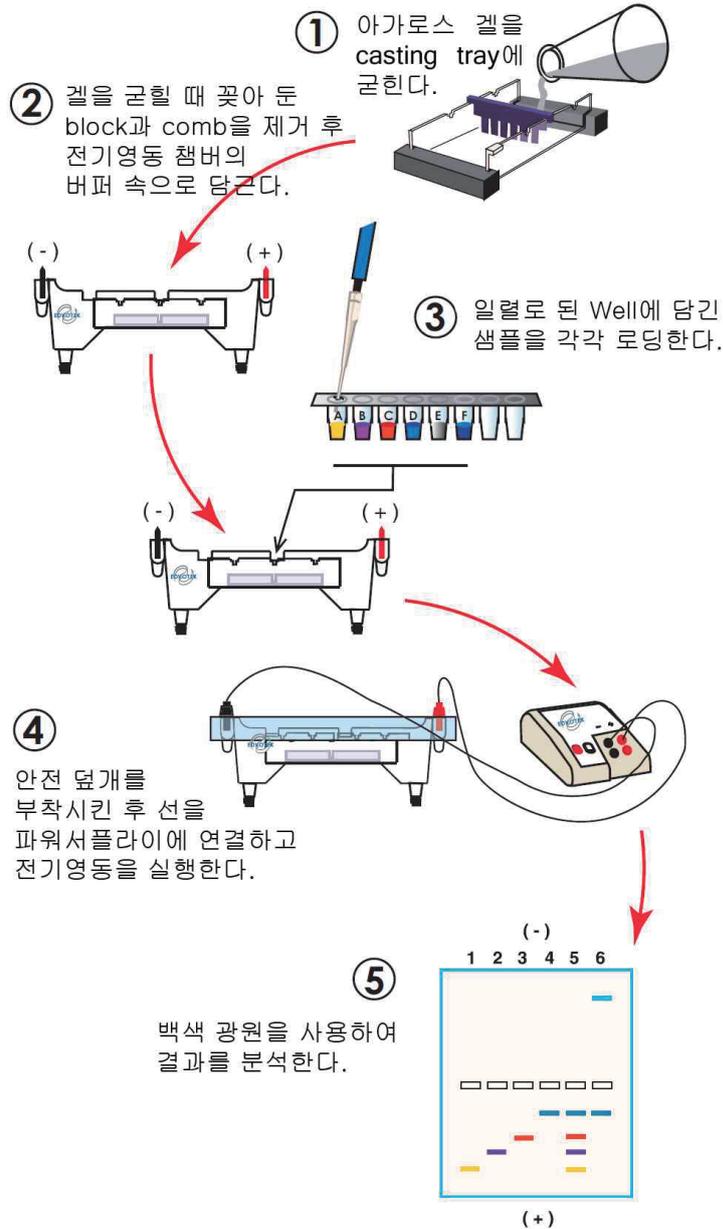


Red



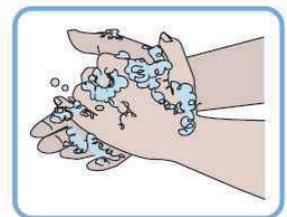
Yellow / Gold

[실험과정 Overview]



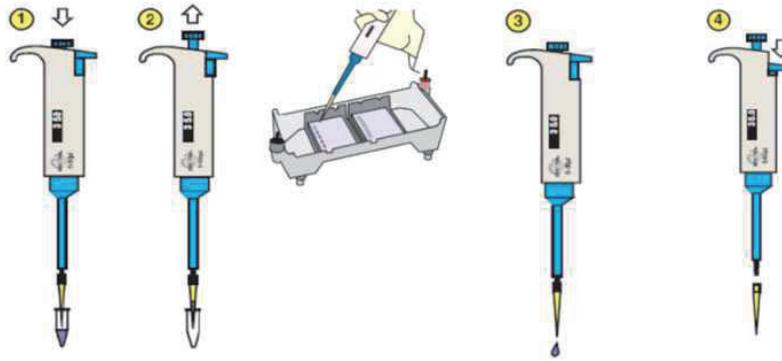
[안전 유의사항]

1. 보호장갑 및 보호안경을 반드시 착용한다.
2. 시약을 가열하거나 녹이는 장비를 다룰 때에는 특별히 주의해야 한다.
3. 입으로 피펫을 사용하지 않는다. 피펫 펌프나 밸브를 사용한다.
4. 전기 장비를 사용할 경우 특별히 조심한다.
 - 항상 파워소스의 전원을 끄고 전기영동기의 커버를 벗긴다.
 - 사용하지 않을 때는 파워를 끄고 플러그를 뽑는다.
5. EDVOTEK 전기영동 실험 장치는 전기가 켜 이음매가 없다. 그러나 만약에 전기영동 실험 중 전기가 샌다고 생각하면 즉시 전원을 끄고 장비를 사용하지 않는다.
6. 항상 시약이나 생물학적 물질을 다루는 실험이 끝나면 비누로 손을 깨끗이 닦는다.



[마이크로피펫으로 샘플 이동하기]

1. 마이크로피펫의 용량을 적당히 설정하고 깨끗한 팁을 마이크로피펫에 연결한다. 버튼을 1단계까지 누르고 팁을 샘플에 담근다.
2. 팁이 샘플에 잠기면 버튼을 천천히 놓아 샘플을 팁으로 빨아들인다.
- 3-1. 피펫 팁을 들어 올려 겔의 홈에 이동시킨다. 이 때 팁이 홈을 상하지 않도록 조심한다.
- 3-2. 피펫 버튼을 2단계 까지 눌러 샘플을 분주시킨 후 내용물을 완전히 비운다.
- 3-3. 샘플을 이동시킨 후 팁이 버퍼에서 완전히 나올 때까지 피펫 버튼을 놓지 않는다.
4. 버튼을 눌러 팁을 제거한다. 다음 샘플에는 새 팁을 사용한다.



[Notice]



마이크로피펫의 버튼은 최초 Rest Position과 1단계 멈춤 단계와 , 2단계 멈춤 단계로 구분된다. 피펫의 버튼을 눌렀을 때 1단계 멈춤 단계까지가 정확한 용량이며 더 세게 눌렀을 경우 2단계 멈춤 단계까지 눌러지는 것은 용액을 옮길 때 피펫팁에 남아있는 용액을 내보낼 때 사용한다. 따라서 1단계 멈춤 단계까지만 눌러 용액을 취하고 옮길 때는 2단계 멈춤 단계까지 눌러 피펫팁 안에 남아있는 용액을 모두 내보낸다.

또한 팁에 용액이 담긴 상태에서 피펫을 거꾸로 세워서 피펫의 팁 홀더로 용액이 흘러 들어가지 않도록 조심해야 한다.

[실험과정]

[겔 트레이 준비하기]

1. 깨끗하고 물기가 없는 겔 트레이의 열린 부분을 넓은 고무캡 또는 테이프를 이용해 막는다.

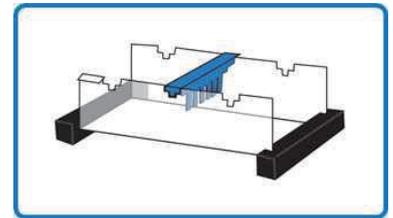
A. 고무 막이 이용하기

- 트레이의 양쪽을 고무캡으로 막는다. 고무캡을 트레이의 양쪽과 하단에 잘 맞춘다.

B. 테이프를 이용하기

- 폭이 약 2cm 넓이인 테이프를 이용해 트레이의 양쪽과 하단에 맞게 붙인다.
- 테이프를 붙이고 옆으로 빠져나온 부분은 트레이의 옆면이나 아래 부분에 붙인다.

2. 콤 (comb) 또는 well-former template을 겔 트레이의 가운데 홈에 끼워 넣는다. 콤 (comb)은 한쪽으로 기울어지지 않도록 트레이에 정확하고 고르게 놓는다. 일반적인 전기영동 실험의 경우 콤을 트레이의 가장 바깥 홈에 끼우지만 이번 실험에서는 가운데 홈에 끼워 넣는다.



[아가로스 겔 캐스팅하기]

3. 250ml 플라스크를 사용해 겔 용액을 준비한다. [표 A]를 참조하고 실험에 필요한 다음 내용물을 플라스크에 첨가한다.

- 버퍼 농축액
- 증류수
- 아가로스 파우더

[표 A] 0.8% 울트라스펙 아가로스 겔

겔 트레이 크기	50× 버퍼	증류수	아가로스	총 부피
7 × 7	0.6ml	29.4ml	0.23g	30ml
7 × 10	1.0ml	49.0ml	0.39g	50ml
7 × 14	1.2	58.8ml	0.46g	60ml

4. 혼합물을 충분히 저어 아가로스 파우더가 뭉치지 않게 한다.
5. 펜으로 플라스크 외벽에 용액의 용량을 표시해 둔다.
6. 혼합물에 열을 가해 아가로스 파우더를 용해시킨다. 용해되지 않은 분자 없이 모두 투명하게 용해되어야 한다.

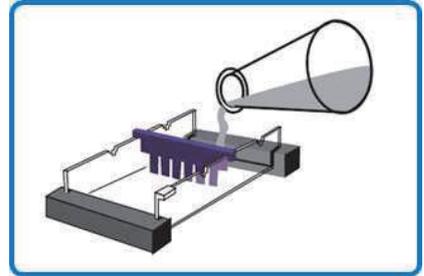
[A. 전자레인지 이용 방법]

- 플라스틱 랩으로 플라스크를 막아 증발을 최소화시킨다.
- 혼합물에 1분 동안 열을 최대한 가한다.
- 혼합물을 젓고 열을 25초 동안 최대로 가해 아가로스가 완전히 용해되도록 한다.

[B. 핫플레이트를 이용하는 방법]

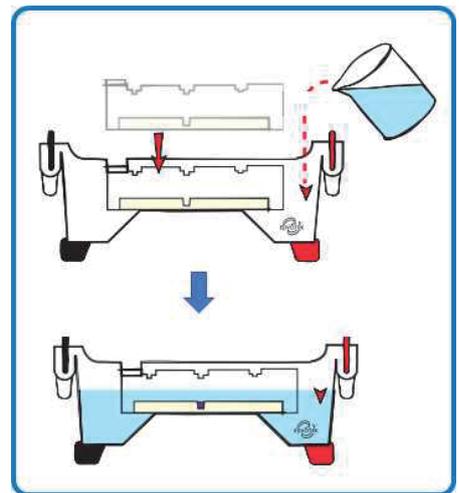
- 알루미늄 호일로 플라스크를 막아 증발을 최소화시킨다.
- 버너로 혼합물에 열을 가해 간간히 저으면서 끓인다. 아가로스가 완전히 용해되도록 한다.

7. 아가로스 파우더를 용해시킨 후 용액의 증발이 감지되면 증류수를 넣어 5단계에서 표시한 원래 높이를 유지한다. 아가로스 용액을 천천히 저어 용액의 온도를 60°C까지 낮춘다.
8. 냉각된 아가로스 용액을 트레이에 붓는다. 트레이는 평평한데 놓여 있어야 한다.
9. 겔이 굳도록 기다린다. 약 20분 후면 겔은 단단하면서도 차가워진다.
10. 겔이 두꺼우면 20분 이상 충분히 굳도록 기다린다.



[전기영동 준비하기]

11. 겔이 완전히 굳어지면 조심스럽게 고무캡 또는 테이프를 겔 트레이에서 떼어낸다. 이 때 겔 웰 (well)이 상하지 않도록 각별히 조심한다. 특히 로딩 시 피펫의 끝 등으로 겔 사이를 찌를 수 있으니 조심한다.
12. 콤 (comb)을 천천히 수직으로 들어올린다. 마찬가지로 겔 웰 (well)이 상하지 않도록 각별히 조심한다.
13. 겔을 전기영동기 챔버 내의 트레이에 방향을 맞추어 겔이 찢기지 않도록 올려놓는다.
14. 전기영동기 챔버에 겔이 충분히 잠길 만큼 1x 버퍼를 넣는다. EDVOTEK 50x 농축 버퍼를 1x 버퍼로 희석시키는 비율은 [버퍼 농축액 : 증류수 = 1 : 49]이다.
15. 겔이 버퍼에 충분히 담겨지는지 확인한다.
16. 샘플을 로딩하고 전기영동을 실시한다.



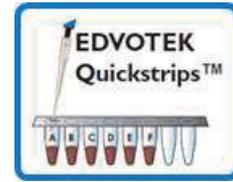
[참고] 아래 표 B에 따라 1x 전기영동 버퍼를 만들 수 있다.

[표 B] 1x 전기영동 버퍼

전기영동기	50x 버퍼	증류수	총 부피
M12	8ml	392ml	400ml
M36	20ml	980ml	1000ml

[전기영동 샘플]

1. 퀵스트립™ 튜브에서 샘플을 꺼내려면 마이크로 피펫 끝으로 호일 상단을 찌른 후 샘플을 빨아들인다.



2. 때로는 많은 양의 샘플이 튜브 벽면에 붙어 있다. 샘플을 젤에 로딩하기 전에 튜브를 원을 그리며 돌리거나 튜브를 가볍게 두드려 샘플이 튜브 하단에 떨어지게 한다.

3. 튜브에 있는 샘플을 젤의 두께에 따라 30~40µl 정도 웰에 로딩한다.

[샘플 로딩하기]

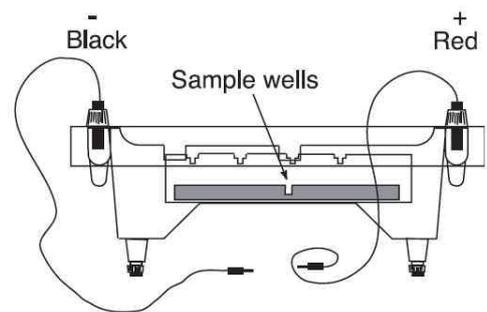
A~E 튜브에 있는 염료 샘플을 각각 순서대로 홈에 로딩한다. 이 때 로딩할 양은 35~38µl 정도면 된다.

- 1번 : A튜브 : 오렌지색
- 2번 : B튜브 : 보라색
- 3번 : C튜브 : 빨간색
- 4번 : D튜브 : 파란색 1
- 5번 : E튜브 : 혼합 염색
- 6번 : F튜브 : 혼합 파란색

[전기영동]

3. 샘플을 올린 후 조심스럽게 커버를 전극 터미널 위로 눌러 내린다. 커버에 있는 +, - 칼라 인디케이터와 챔버의 방향이 맞아야 한다.
4. 검정색 선 플러그를 파워 소스의 검정색 입력 단자(-)에 연결한다. 적색 선 플러그를 파워 소스의 적색 입력 단자(+)에 연결한다.
5. 파워 소스의 전압에 설정하고 실험시간에 따라 전기영동을 실시한다. 일반적인 내용은 아래 표C와 같다.

전기영동 실험동안 염색 샘플은 아가로스 겔의 양극쪽으로 이동하게 된다. 샘플을 로딩하기 전에 겔이 적절한 방향으로 위치하도록 유의한다.



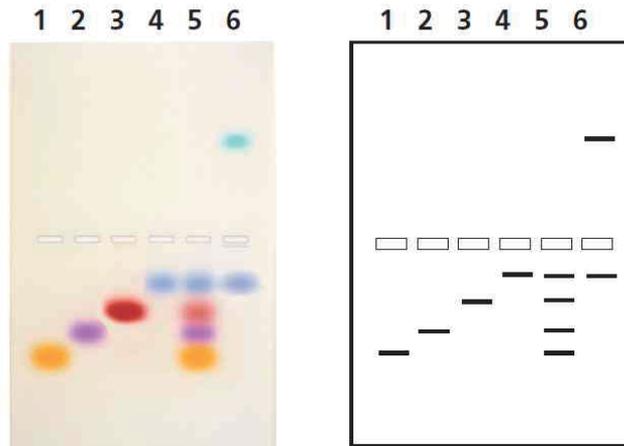
[표 C] 전기영동에 필요한 시간 및 전압

전압	권장 실험시간
150	20분
70	45분
50	90분

6. 전류가 잘 흐르고 있는지 확인한다. 플래티넘 전극에 공기방울이 형성되는 것이 보여야 한다.
7. 약 10분 후에 색깔 있는 염료가 분리되는 것을 보게 될 것이다.
8. 전기영동이 끝나면 전원을 끄고 플러그를 뽑고 전선을 분리한 후 커버를 연다.
9. 겔 결과를 정리한다. 문서화하는 방법은 다양하다. 겔 사진을 넣거나 사진을 찍거나 겔 이미지를 스캔할 수 있다.

[실험결과 및 분석]

- 1번 : A튜브 : 오렌지색
- 2번 : B튜브 : 보라색
- 3번 : C튜브 : 빨간색
- 4번 : D튜브 : 파란색 1
- 5번 : E튜브 : 혼합 염색
- 6번 : F튜브 : 혼합 파란색



[Question]

다음 문제에 답한다. 필요하다면 별도 용지에 기록한다.

1. 어떻게 아가로스 겔 전기영동이 DNA를 분리 시키는가?

2. 샘플 F의 결과에서 어떤 결론을 얻을 수 있는가?

3. 버퍼용액 대신에 챔버용액 혹은 겔 용액에 증류수로 대체시킨다면 어떤 일이 발생할까?

전기영동의 원리와 실험

Principles and Practice of Agarose Gel Electrophoresis

#101

교사용 가이드북

[실험준비 소요시간]

1. 아가로스 겔 준비 : 스케줄에 따라 아가로스 겔을 언제 준비할 것인지를 결정합니다. 직접 아가로스 겔을 준비하든 아니면 학생들에게 준비하도록 지시하든 아가로스 겔을 준비하는데 약 30~40분이 필요합니다. 일반적으로 이 시간 중 약 20분은 겔이 응고되는데 걸리는 시간입니다.
2. 전기영동에 걸리는 시간은 약 20분에서 1시간까지 차이가 발생할 수 있습니다.

[실험 준비]

퀵스트립™ 튜브

만일 퀵스트립™ 샘플이 잘 분리되지 않으면

1. 가위 등 날카로운 도구를 이용해 튜브를 하나씩 떼어냅니다.

※ 주의 : 실험키트에 따라 비어있는 튜브도 있다.

2. 각 실험그룹 당 한 개의 스트립을 사용합니다.
3. 겔 로딩을 하기 전에 튜브나 호일을 살짝 두드려 모든 샘플이 튜브 바닥에 모이도록 합니다.



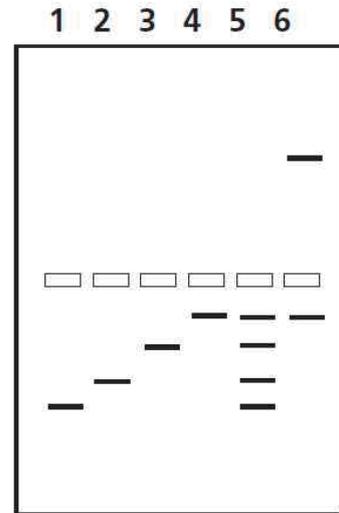
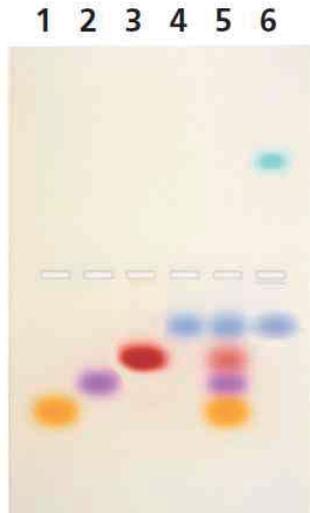
[일반적인 위험요소 회피방법]

다음과 같은 방법으로 위험요소 또는 잠재적인 문제를 피할 수 있습니다.

- 염료가 잘 용해될 수 있도록 겔의 혼합 비율을 잘 맞추고 (표 A 참조) 그리고 전기영동은 권장 시간을 기준으로 샘플의 전개 상황에 따라 시간을 조절하시면 됩니다.
- 버퍼 준비에 증류수만 사용하고 수돗물은 절대 사용하지 않도록 합니다.
- 최상의 결과를 얻기 위해서는 항상 새로운 전기영동 버퍼를 사용합니다.
- 샘플이 유실되는 것을 방지하기 위해 아가로스 겔이 적절하게 위치가 되었는지 확인합니다.

[실험결과 및 분석]

- 1번 : A튜브 : 오렌지색
- 2번 : B튜브 : 보라색
- 3번 : C튜브 : 빨간색
- 4번 : D튜브 : 파란색 1
- 5번 : E튜브 : 혼합 염색
- 6번 : F튜브 : 혼합 파란색



[학습관련 질문 및 그에 대한 해답]

1. 어떻게 아가로스 겔 전기영동이 DNA를 분리 시키는가?

- DNA는 음극 전하를 가지고 있어서 양극 전극을 향해 이동한다. 이 때 아가로스 겔 전기영동은 크기, 전하, 모양을 토대로 DNA를 분리한다.

2. 샘플 F의 결과에서 어떤 결론을 얻을 수 있는가?

- 파란색 2는 양전하를 갖는다. 파란색1은 음전하를 갖는다.

3. 버퍼용액 대신에 챔버용액 혹은 겔 용액에 증류수로 대체시킨다면 어떤 일이 발생할까?

- 증류수에는 이온이 없다. 따라서 전기영동이 이루어지지 않는다.