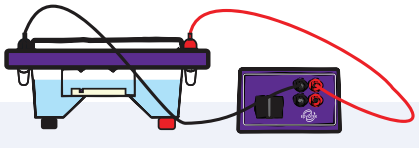
실험 가이드북

플라스미드와 람다DNA의 제한효소 분절

RESTRICTION ENZYME CLEAVAGE OF PLASMID AND LAMBDA DNA

#ED102



KOREA SCIENTIFICS (주)한국과학

02-929-1110 info@koreasci.com

www.koreasci.com

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

실험 목표

특정 서열에서 DNA를 절단하는 도구인 제한효소(restriction endonuclease)의 사용을 학습합니다.

제품 구성품

A Plasmid DNA

B *Bgl* I 로 절단한 Plasmid

C *Eco* RI 로 절단한 Plasmid

D Lambda DNA

E *Eco* RI 로 절단한 Lambda DNA

F *Bgl* I 로 절단한 Lambda DNA

UltraSpec-Agarose

Electrophoresis buffer (50x)

Practice Gel Loading Solution

FlashBlue DNA stain

InstaStain Blue cards

1ml pipet

Transfer pipet

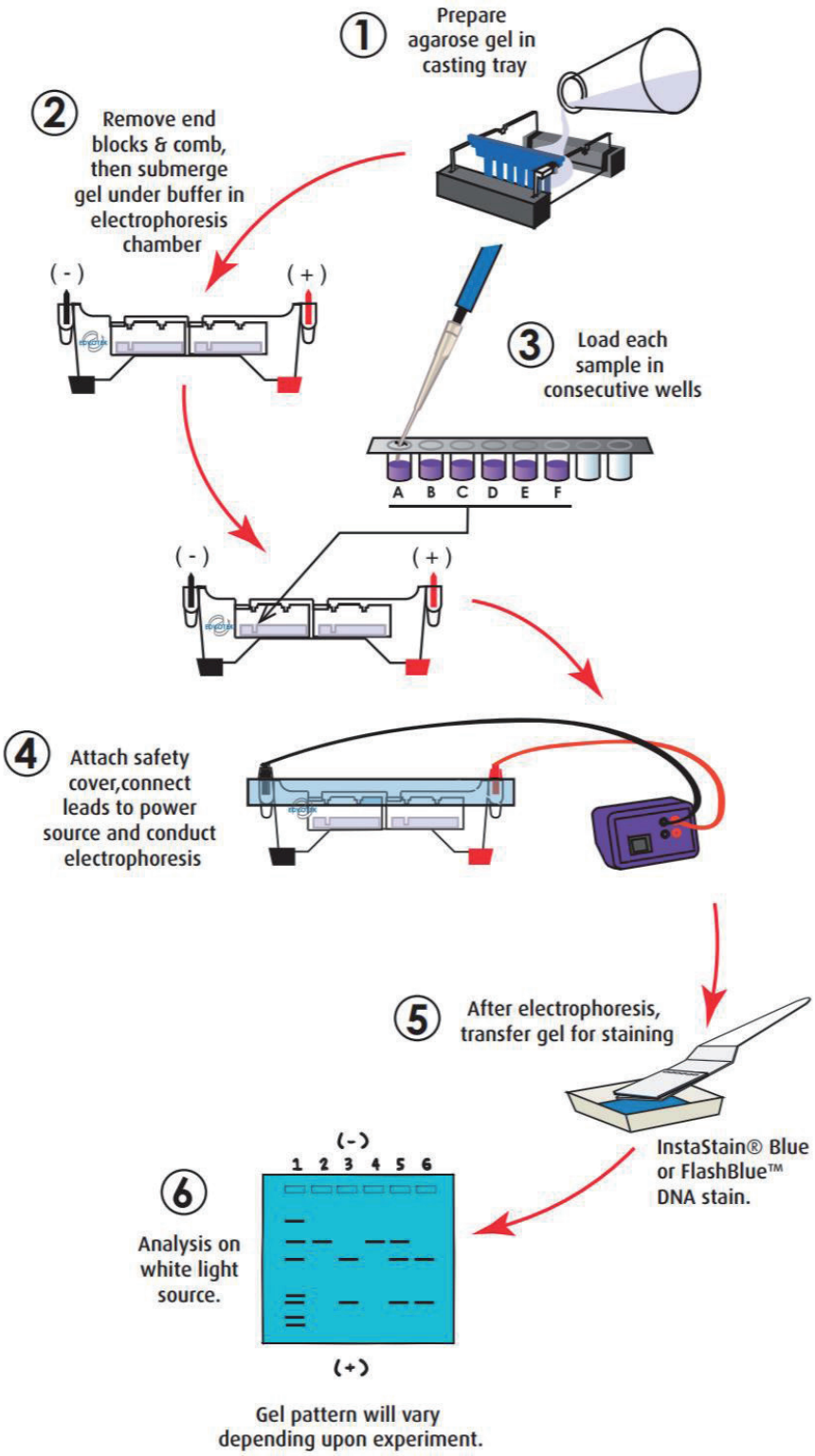
Restriction Enzyme	Organism
Bgl I	*Bacillus globigii*
Bam HI	*Bacillus amyloliquefaciens H*
Eco RI	*Escherichia coli,* strain RY 13
Eco RII	*Escherichia coli,* strain R 245
Hae III	*Haemophilus aegyptius*
Hind III	*Haemophilus influenzae* R_d

필요 장비 및 준비물

전기영동 장치, 전원공급장치, 피펫과 피펫팁, 전자저울, 전자레인지(핫플레이트), 250mL삼각플라스크, 안전장갑, 증류수, 염색용 트레이

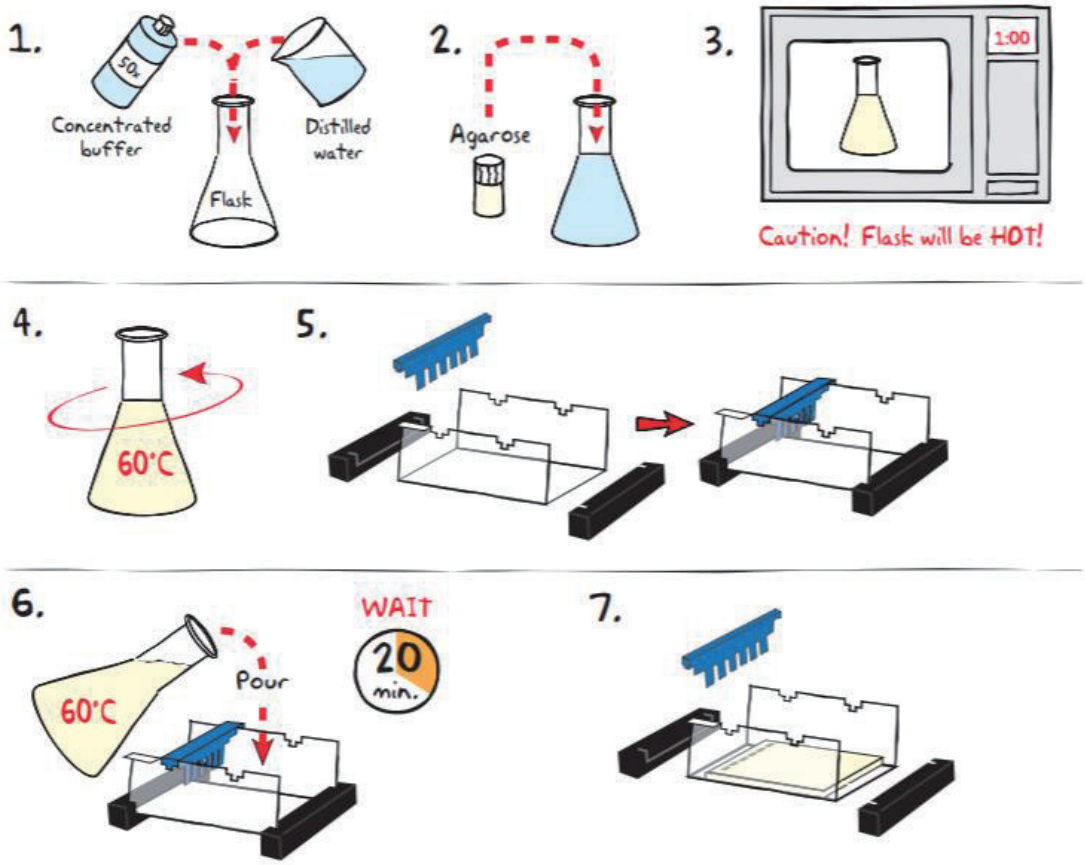
★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

전체 실험 개요



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

아가로스 겔 전기영동

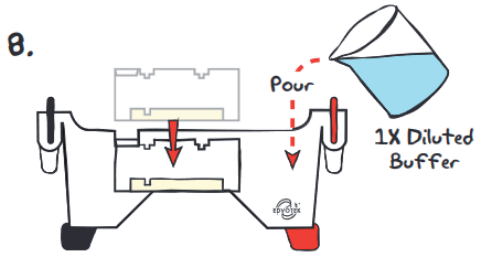


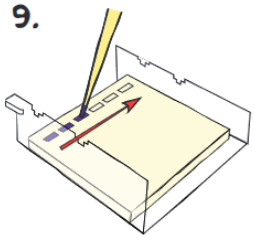
1. Concentrated buffer(50X)를 1X버퍼로 만들기 위해 Table A 표를 참고하여 희석합니다.
2. 250ml 플라스크에 1X 버퍼를 넣고 agarose powder를 섞습니다. (Table A참조)
3. 플라스크를 전자레인지에 1분간 넣고 돌립니다. 플라스크를 돌려가며 아가로스 분말이 충분히 녹아 안보일 때까지 15초 간격으로 전자레인지에 돌려 완전히 용해시킵니다.
4. 완전히 용해된 후 60℃ 까지 식혀줍니다.
5. 용액이 식는 동안 겔 캐스팅 트레이에 고무 마개와 comb을 결합합니다. Comb 결합 방향을 트레이에 표시된 노치 쪽으로 잘 맞춰 끼워 샘플로딩 well의 위치가 (-)극에 위치하게 합니다.
6. 어느 정도 용액이 식으면 트레이에 붓고 20분 이상 놔둬 굳게 합니다.
7. 완전히 굳은 후 고무 마개와 comb을 제거합니다. 이 때 조심하여 겔에 손상이 가지 않게 합니다.

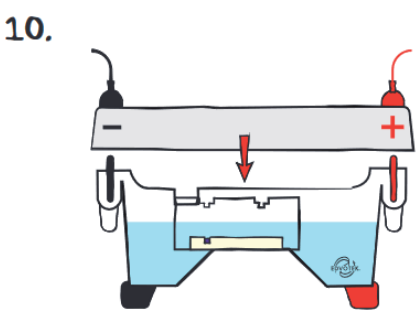
Table A — Individual 0.8% UltraSpec-Agarose™ Gel

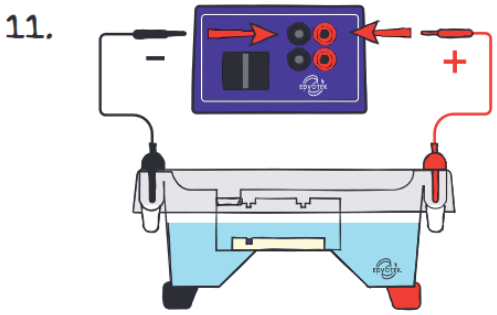
Size of Gel Casting tray	Concentrated Buffer (50x)	+ Distilled Water	+ Amt of Agarose	= TOTAL Volume
7 x 7 cm	0.6 ml	29.4 ml	0.23 g	30 ml
7 x 10 cm	1.0 ml	49.0 ml	0.39 g	50 ml
7 x 14 cm	1.2 ml	58.8 ml	0.46 g	60 ml

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









8. 전기영동 챔버에 겔과 트레이를 고정시키고 준비된 용량만큼의 버퍼(Table B. 참조)를 붓습니다. 겔이 충분히 잠겨야합니다.

9. 35µL Standard Dye Marker를 첫 번째 well에 분주합니다. 준비한 샘플 5개를 나머지 well에 분주합니다.

10. 전기영동장치의 덮개를 덮습니다. 전극의 방향(+, -)이 알맞게 연결되었는지 확인합니다.

11. 전원공급장치에 연결하여 전기영동을 시작합니다. (Table C. 의 공급전압과 구동 시간 참조)

12. 모두 마치고 나면 겔과 트레이를 빼내 결과를 관찰합니다.

Table 1: Gel Loading

Lane		
1	Tube A	Plasmid DNA (uncut)
2	Tube B	Plasmid cut with *Bgl* I
3	Tube C	Plasmid cut with *Eco* RI
4	Tube D	Lambda DNA (uncut)
5	Tube E	Lambda DNA cut with *Eco* RI
6	Tube F	Lambda DNA cut with *Bgl* I

Table B 1x Electrophoresis Buffer (Chamber Buffer)

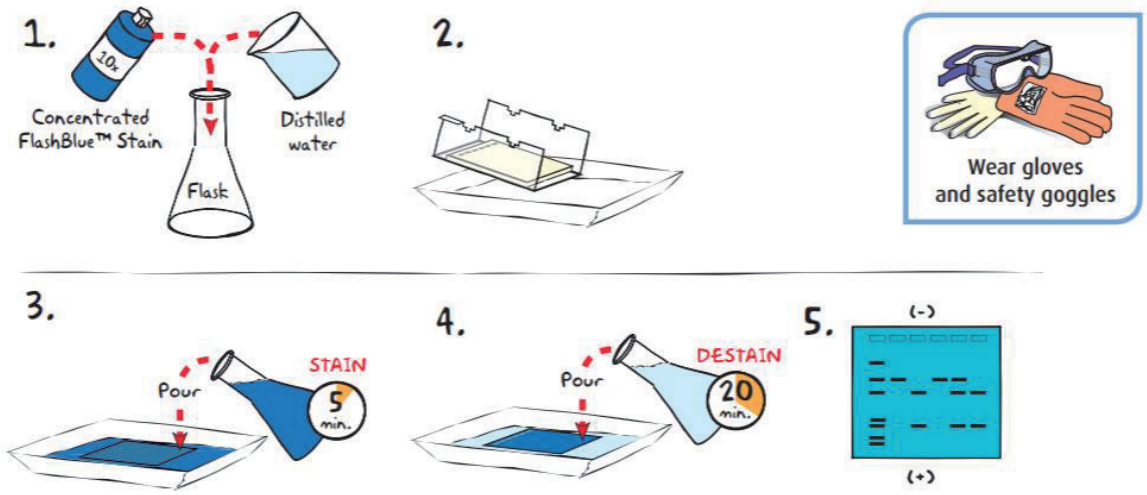
EDVOTEK Model #	Total Volume Required	Dilution: 50x Conc. Buffer	+ Distilled Water
M6+ & M12 (new)	300 ml	6 ml	294 ml
M12 (classic)	400 ml	8 ml	392 ml
M36	1000 ml	20 ml	980 ml

Table C Time and Voltage Guidelines (0.8% Agarose Gel)

	Electrophoresis Model: M6+	M12 (new)	M12 (classic) & M36
Volts	Min. / Max.	Min. / Max.	Min. / Max.
150	15/20 min.	20/30 min.	25 / 35 min.
125	20/30 min.	30/35 min.	35 / 45 min.
75	35 / 45 min.	55/70 min.	60 / 90 min.

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

FlashBlue를 이용한 아가로스 겔 염색

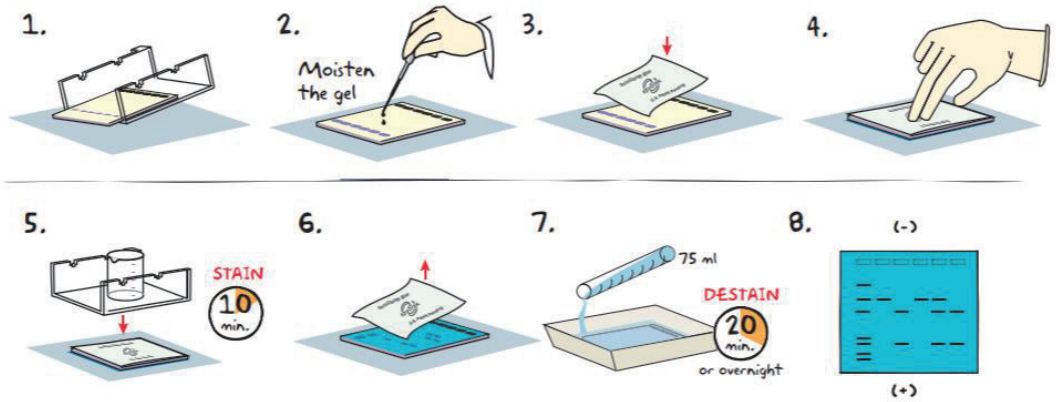


1. FlashBlue (10배 농축) 10ml와 증류수 90ml를 플라스크에 넣고 희석시킵니다.
2. 아가로스 겔과 캐스팅 트레이를 전기영동 장치에서 빼냅니다. 깨끗한 염색용 트레이 위에 겔만 미끄러뜨려 떨어뜨립니다.
3. 섞어놓은 Staining(염색)용액을 겔이 충분히 담길 정도로 붓고 5분간 놔둡니다. 5분을 넘어가게 되면 더 많은 destaining(탈색) 시간을 요구하게 됩니다.
4. 다른 트레이로 겔을 옮긴 후 증류수를 붓습니다. destaining은 최소 20분동안 이뤄져야합니다. 시간을 단축하려면 물을 자주 교체하십시오.
5. 겔을 꺼낼 때는 손상되지 않게 조심히 꺼냅니다. 더 나은 겔 결과 관찰을 위해 Transilluminator에서 관찰합니다.

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

InstaStain Blue를 이용한 아가로스 겔 염색

가장 사용이 쉽고 편리한 DNA염색입니다. 기존의 염색양은 많은 양을 만들고 보관하고 폐기하였지만 이 카드는 소량으로 충분히 DNA 염색이 가능합니다. Staining(염색)과 destaining(탈색) 작업이 동시에 진행되어 최소한의 용액 낭비를 유지합니다.



1. 조심스럽게 아가로스겔과 트레이를 전기 영동장치에서 꺼낸 후 깨끗한 트레이 위에 겔만 올립니다.
2. 전기영동 버퍼 몇 방울을 겔에 떨어뜨려 수분을 유지합니다.
3. 장갑을 착용하고 InstaStain Blue 카드의 파란 면을 겔 위해 올립니다.
4. 장갑을 착용한 손으로 눌러가며 염색카드와 겔 사이의 공기를 없앱니다. 공기방울로 인해 염색이 안될 수 있습니다.
5. 겔과 카드에 트레이와 비커같이 가벼운 것을 올려놓아 잘 붙어있도록 합니다. 염색은 10분동안 진행합니다.
6. InstaStain Blue 카드를 제거합니다. 만약 색상이 매우 옅게 되었다면 다시 염색카드를 올리고 5분간 반복합니다.
7. 카드를 제거한 겔을 깨끗한 트레이로 이동시키고 증류수를 붓고 20분간 destaining 합니다. 최상의 결과를 위해 오비탈 쉐이커를 이용하셔도 됩니다. 빠른 탈색을 원하시면 37도의 증류수로 자주 교체합니다.
8. 겔을 꺼내고 Transilluminator위에 올려 관찰합니다.

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

Experiment Results and Analysis

In the idealized schematic, the relative positions of DNA fragments are shown but are not depicted to scale.

Lane	Tube	Sample	Molecular Weights (in bp)
1	A	Plasmid DNA (uncut)	S - Supercoiled N - Nicked X - Dimers or Higher catenanes
2	B	Plasmid cut with *Bgl* I	4282
3	C	Plasmid cut with *Eco* RI	3000 1282
4	D	Lambda DNA (uncut)	48502
5	E	Lambda DNA cut with *Eco* RI	21226 7421 5804 5643 4878 3530
6	F	Lambda DNA with *Bgl* I	*

* *Smaller DNA fragments may not be visible after staining since they will bind only a small amount of the stain. Fragments that are close in size may not be resolved as individual bands. Molecular weights for Lambda DNA cut with Bgl I are: 16179, 9649, 3009, 2481, 2256, 1650, 1446, 1441, 1249, 1203, 1138, 790, 773, 669, 621, 562, 499, 489, 447, 404, and 366.*

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