

---

---

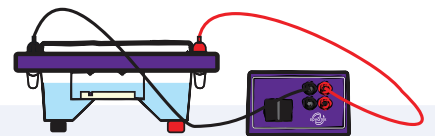
# 제한효소 패턴에 의한 DNA 지문분석

DNA Fingerprinting by Restriction Enzyme Patterns

---

---

# ED109



## 제한효소 패턴에 의한 DNA 지문분석

### [ 제품 구성 ]

#### 전기영동을 위한 Ready-To-Load DNA 샘플

- A : 효소1로 자른 범 죄 현장의 DNA
- B : 효소2로 자른 범 죄 현장의 DNA
- C : 효소1로 자른 용의자 1의 DNA
- D : 효소2로 자른 용의자 2의 DNA
- E : 효소1로 자른 용의자 2의 DNA
- F : 효소2로 자른 용의자 2의 DNA

#### 시약 & 기구

- 아가로스 분말
- 50X 전기영동 버퍼
- FlashBlue DNA 염색약
- InstaStain Blue 카드
- 연습용 겔 로딩 용액
- 1ml 파이펫
- 분주용 파이펫

### [ 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 지문분석의 기본적인 실험방법을 이해한다.
- 제한효소로 절단되는 DNA 패턴의 다양성을 분석한다.
- DNA 지문분석을 이용해 범인을 식별한다.

## [ 배경지식 ]

### 1. DNA 지문분석

DNA 프로파일 분석(DNA 지문분석)은 게놈 전체에 위치한 몇 가지 특정 가변 DNA 서열을 검사하여 유기체의 게놈 DNA를 분석하는 프로세스이다. 현재 인간의 경우 DNA 지문은 다양한 식별 목적으로 일상적으로 사용된다.

인간 DNA 지문분석은 1984년 레스터 대학의 Alex Jeffreys 박사에 의해 개척되었으며, 이로 인해 영국에서 1987년 9월 최초의 DNA 지문분석으로 살인범이 체포되었다. 두 달 후, 플로리다 올랜도에서 DNA 지문에 근거한 미국 최초의 유죄 판결이 났다. 그 이후로 DNA 지문의 사용은 수천 건의 범죄 유죄 판결을 받았으며 수십 건의 면죄 판결도 받았다.

피의자를 제외할 수 있는 혈액형과 같은 이전의 방법론과는 대조적으로 DNA 지문 감식은 매우 정확하게 신원확인을 제공할 수 있다. 범죄 식별 사례 외에도, DNA 지문 감식은 현재 아버지의 결정과 유전병 "표지자"의 식별에 일상적으로 사용된다. 전쟁 사상자 등 유해 확인에도 사용되며 2001년 9월 11일 세계무역센터(WTC)와 펜실베이니아주 산크스빌 인근 야적장에서 추락한 비행기에 탑승한 승객과 희생자를 확인하는 데 광범위하게 사용됐다.

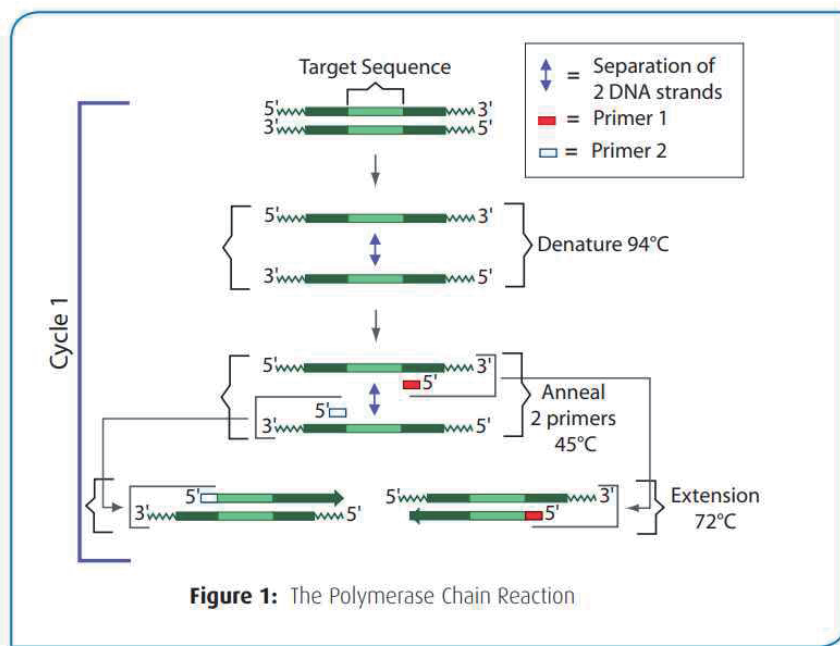
인간 세포에는 두 가지 유형의 DNA가 있다. 첫 번째 유형은 세포핵에 있는 23개의 염색체 세트에 포장된 체세포 염색체 DNA이다. 양쪽 부모로부터 얻은 이 DNA는 개인의 결합된 부모의 유전적 정보를 반영한다. 체세포 DNA를 활용한 DNA 지문은 특정 유전자에 대한 두 대립 유전자의 서열 분석을 포함한다.

두 번째 유형의 DNA는 체세포 DNA와는 다르며 세포의 에너지를 생산하는 기관인 미토콘드리아에만 존재한다. 미토콘드리아 DNA는 남성과 여성 모두에게 모성적으로 유전된다. 예를 들어, 같은 어머니를 공유하는 형제, 자매, 이복 형제 또는 이복 자매는 같은 미토콘드리아 DNA를 물려받게 된다. 식별은 1만6569개의 염기쌍으로 구성된 단일 원형 염색체인 미토콘드리아 DNA 내의 특정 부위를 염기서열을 분석하여 결정한다.

Jeffreys 박사가 개발한 DNA 지문분석은 제한효소 분해 및 Southern blot 분석에 체세포 염색체 DNA를 사용한다. 인간 DNA가 제한효소에 의해 절단되면 매우 많은 수의 DNA 단편이 생성된다. 아가로스 겔 전기영동으로 분리하면 수많은 DNA 단편이 겔에 나타난다. 라벨링된 프로브는 DNA 내의 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphic) 영역을 감지하는 데 사용되며, DNA RFLP 분석은 통계적으로 매우 정확하지만 상대적으로 많은 양의 DNA가 필요하고 수행하는 데 며칠이 걸린다.

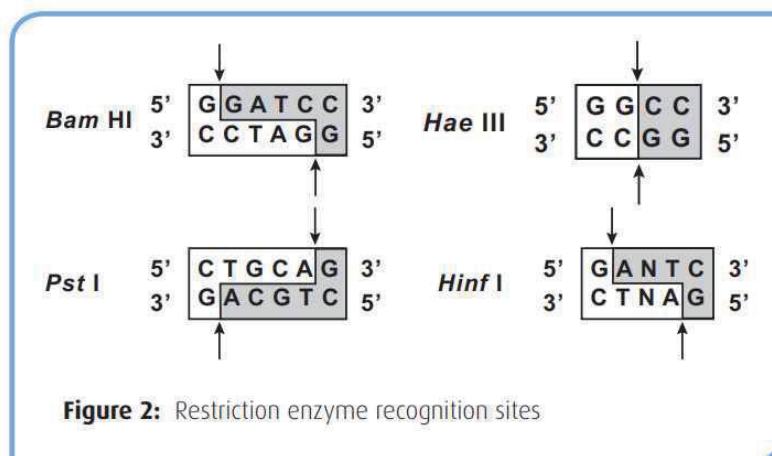
최근에는 RFLP 방법 대신 PCR(Polymerase Chain Reaction) 방법이 주로 사용되고 있다. PCR은 훨씬 적은 양의 DNA를 사용하여 DNA 지문분석이 가능하다. PCR은 적은 양의 DNA를 증폭해 분석을 용이하게 하기 때문이다. 또한 PCR은 Southern Block보다 분석 속도가 더 빠르다는 장점도 있다. 한 PCR 사이클에는 세 단계가 있어 DNA 양이 두 배로 증가한다. 중합효소 연쇄반응(PCR) 방법은 표적 DNA 시퀀스를 증폭시켜 AMRFLP라고 한다. PCR은 범죠헌장에서 발견된 극소량의 DNA를 DNA 지문분석을 위해 증폭시킬 수 있도록 했다.

이 실험에서는 RFLP 분석과 관련된 개념에 중점을 둔다. 실험 활동은 아가로스겔 전기영양증으로 분리된 제한 단편화 패턴을 분석하여 DNA 식별에 초점을 맞출 것이다.

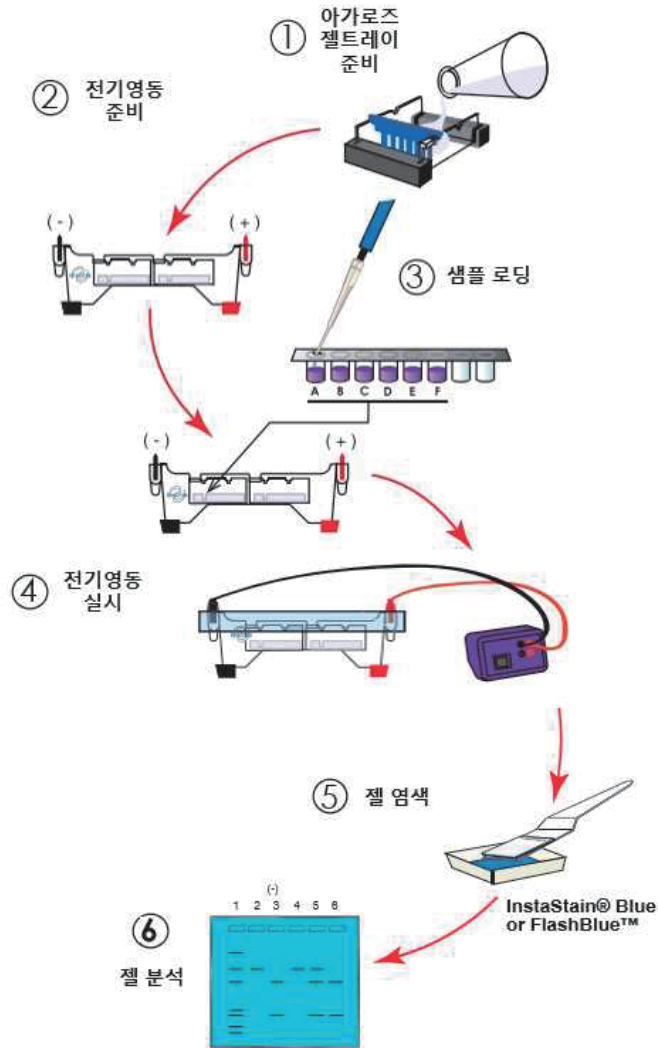


## 2. 제한효소

DNA 지문은 제한효소에 의해 생성된 DNA 단편 크기의 전기영동을 통해 분석한다. 제한효소는 두 DNA 가닥 내에서 인산염 결합의 절단을 촉매하는 '엔도뉴클레아제'이다. 각각의 제한효소는 일반적으로 길이가 4~8 염기쌍인 각각의 인식 부위의 매우 특정한 염기서열만 절단한다.



## [ 실험과정 Overview ]



## [ 전기영동 샘플 ]

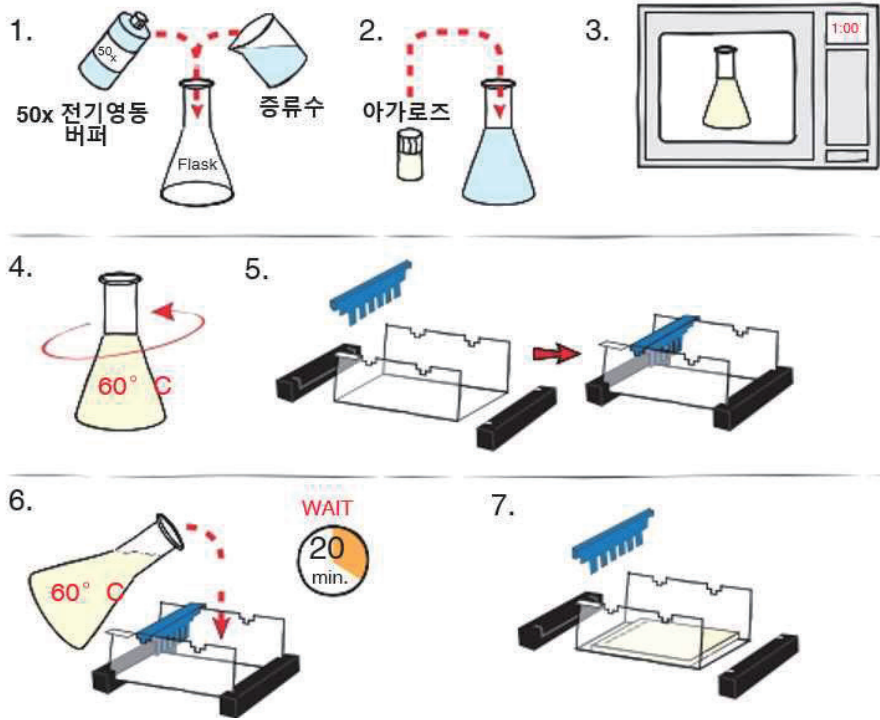
1. 퀵스트립™ 튜브에서 샘플을 꺼내려면 마이크로 피펫 끝으로 호일 상단을 찌른 후 샘플을 빨아들인다.



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 30~40 $\mu$ l 정도 웰에 로딩한다.

[ 실험과정 1 : 전기영동 ]



1~2. 50x 전기영동 버퍼와 증류수, 아가로스를 [표1]에 따라 혼합하여 삼각플라스크에 넣는다.

3. 삼각플라스크를 전자렌지에 넣고 아가로스가 완전히 녹아 투명해질 때 까지 가열한다.

[주의] 한번에 가열하면 버퍼가 끓어 넘칠 수 있으니 30씩 나눠서 가열.

4. 아가로스가 완전히 녹은 다음 60°C까지 냉각시킨다.

5. 아가로스가 냉각되는 동안 젤트레이를 조립한다.

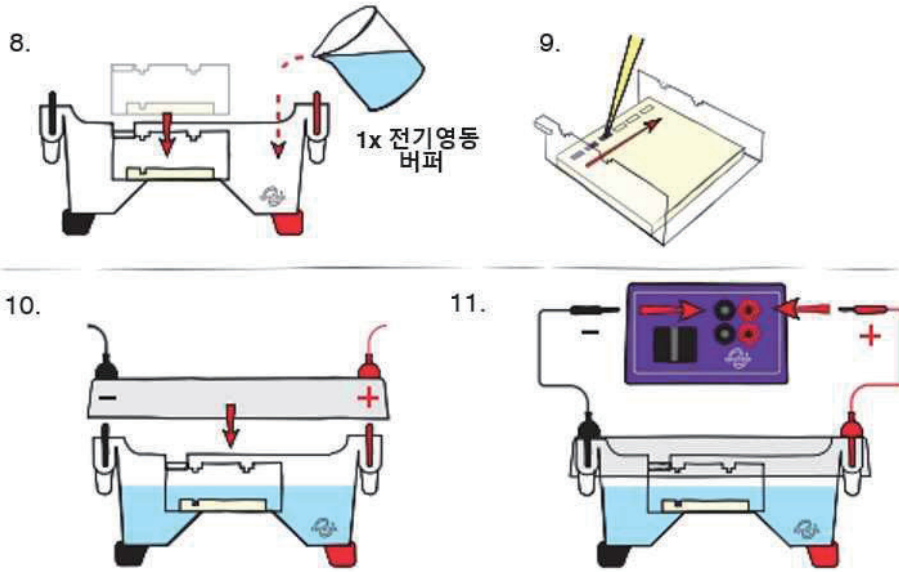
6. 아가로스를 젤트레이에 붓고 20분동안 굳힌다.

[주의] 아가로스를 굳히는 동안 젤 트레이는 수평을 유지해야 한다.

7. 아가로스가 완전히 굳은 다음 젤트레이에서 고무캡과 콤을 제거한다.

[표A] 0.8% 울트라스펙 아가로스 겔

겔 트레이 크기	50x 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



8. [표B]에 따라 1x 전기영동 버퍼를 만들어 전기영동 챔버를 채운다.

[표B] 1x 전기영동 버퍼

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

9. 아래의 순서로 35 $\mu$ l의 샘플을 각 웰에 로딩한다.

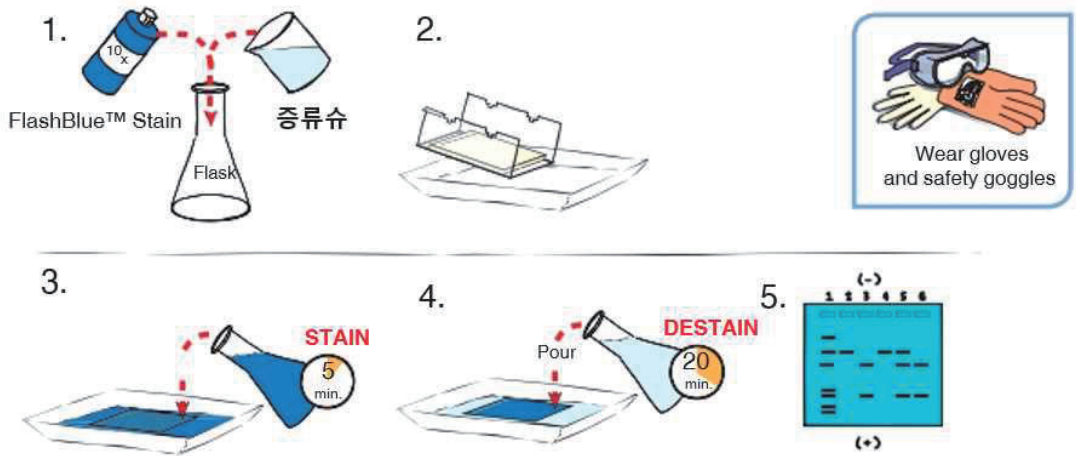
Lane	Tube	Sample
1	A	효소1로 자른 범죄 현장의 DNA
2	B	효소2로 자른 범죄 현장의 DNA
3	C	효소1로 자른 용의자 1의 DNA
4	D	효소2로 자른 용의자 2의 DNA
5	E	효소1로 자른 용의자 2의 DNA
6	F	효소2로 자른 용의자 2의 DNA

10. 전극방향을 잘 맞추어 두껍을 덮는다.

11. 전원공급장치에 전극을 연결하고 전기영동을 실시한다.

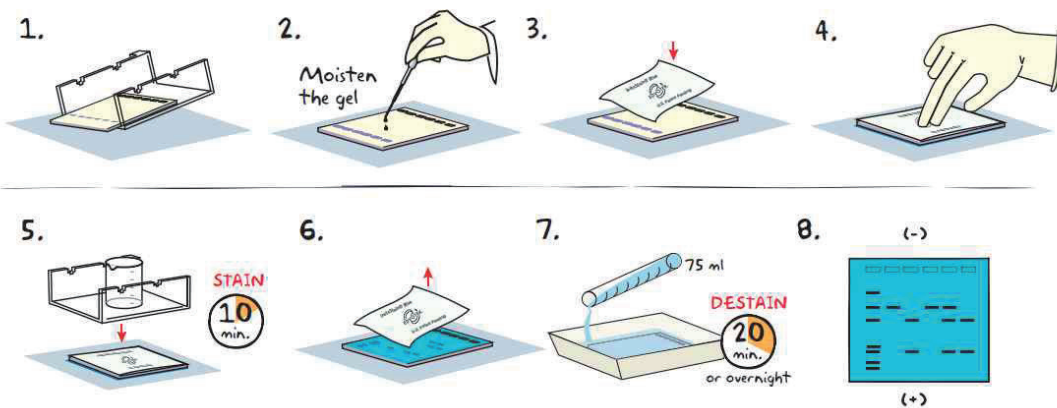
## [ 실험과정 2 : 젤 염색 ]

### ● FlashBlue™ Stain



1. 10ml의 10x FlashBlue™ 와 90ml의 증류수를 삼각플라스크에 잘 혼합하여 1x 염색버퍼를 만든다.
2. 전기영동을 마친 아가로스젤을 염색 트레이로 옮긴다.
3. 염색 트레이에 젤이 충분히 잠길 정도로 염색버퍼를 넣고 5분 동안 염색한다. **[참고] 최상의 결과를 위해서는 3시간 이상 염색하는 것이 좋다.**
4. 염색된 아가로스젤을 새로운 트레이에 옮겨담고 젤이 충분히 잠길 정도로 증류수를 채워 20분 간 탈색한다.
5. 젤을 White LED 트랜스 일루미네이터에 올려 놓고 관찰한다.

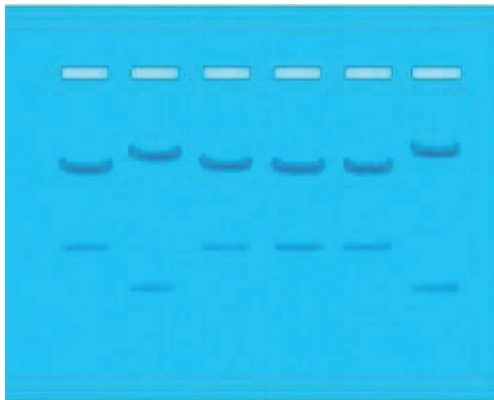
### ● InstaStain® Blue



- 1~2. 전기영동을 마친 아가로스젤을 평평한 트레이로 옮긴 후 전기영동 버퍼를 몇방울 떨어뜨린다.
- 3~4. InstaStain® Blue 카드를 젤위에 올린다음 손으로 잘 펴준다.
5. InstaStain® Blue 카드 위에 젤 트레이와 비이커를 올려 젤과 InstaStain® Blue 카드가 잘 밀착 되도록 하여 10분간 염색한다. **[참고] 최상의 결과를 위해서는 3시간 이상 염색하는 것이 좋다.**
- 6~7. InstaStain® Blue 카드를 제거하고 젤이 충분히 잠길 정도로 증류수를 채워 20분간 탈색한다.
8. 젤을 White LED 트랜스 일루미네이터에 올려 놓고 관찰한다.



[실험결과 분석]



Lane	Tube	Sample
1	A	효소1로 자른 범 죄 현장의 DNA
2	B	효소2로 자른 범 죄 현장의 DNA
3	효소1로 자른 용의자 1의 DNA	
4	D	효소2로 자른 용의자 1의 DNA
5	E	효소1로 자른 용의자 2의 DNA
6	F	효소2로 자른 용의자 2의 DNA

1. 레인 1과 2 (세트 1)는 두 개의 다른 제한효소에 의해 절단된 범 죄 현장 DNA를 나타내며, 이는 뚜렷하게 다른 DNA 밴딩 패턴을 생성한다.
2. 레인 3과 4 (세트 2)는 용의자 1의 DNA를 나타낸다. 용의자 1의 DNA는 레인 1과 2에서와 동일한 두 가지 제한효소로 절단되었다.
3. 레인 5와 6 (세트 3)은 용의자 2의 DNA를 나타낸다. 또한 범 죄 현장 DNA (레인 1 및 2)와 용의자 1 (레인 3 및 4)의 DNA와 동일한 2개의 효소로 절단되었다.
4. DNA 지문분석 결과 범 죄 현장 DNA와 용의자 2의 일치는 용의자 2가 현장에 있었다는 강력한 증거를 제공합니다.



TEL. 02-929-1110      FAX. 02-929-0966  
info@koreasci.com      www.koreasci.com

이 실험서는 (주)한국과학에 의해 작성되었으며 저작권법에 의해 보호를 받습니다.  
무단복제를 금하며, 무단복제 및 배포 시 저작권법에 의해 처벌 받을 수 있습니다.