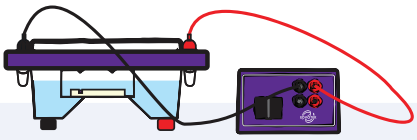
실험 가이드북

암 유발 유전자 검출

Cancer Gene Detection

ED115



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

암은 통제되지 않은 세포분열이 끊임없이 이뤄지는 특징이 있으며 이것을 방지하는 것이 p53 종양 억제 유전자입니다. 이 유전자의 돌연변이는 암의 50% 이상에 존재하여 암발병 위험증가를 보여주는 검사에 사용됩니다. 이 실험에서 p53 유전자에서 돌연변이를 물려준 것으로 의심되는 가족의 혈통을 찾고 여러 DNA샘플을 전기영동으로 분석합니다.

가상의 주인공에서 채취한 DNA 샘플은 돌연변이 p53 유전자의 특정 부위를 자르는 제한효소로 처리되어 제공됩니다.

제품 구성품

A Standard DNA Marker

B Control DNA (정상인의 대조군 DNA)

C Patient Peripheral Blood DNA (환자의 말초혈액 DNA)

D Patient Breast Tumor DNA (환자의 유방종양 DNA)

E Patient Normal Breast Tissue DNA (환자의 정상적인 유방조직 DNA)

UltraSpec-Agarose

Electrophoresis buffer (50x)

Practice Gel Loading Solution

FlashBlue DNA stain

InstaStain Blue cards

1ml pipet

Transfer pipet

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.

배경 지식

가상의 환자 Valerie Brown(36세)은 자가 진단으로 자신의 유방에 몽우리를 발견하였습니다. 그녀의 아버지와 친가쪽에서 암은 없었지만 그녀의 어머니가 삼십후반의 나이에 유방절제술을 받았고 외가쪽에서 여러 건의 암이 발생하였다는 것을 알게되어 걱정되었습니다.

이 실험에서는 Valerie의 말초혈액 DNA, 유방 종양 DNA, 정상 유방 조직DNA 그리고 대조군으로 사용될 정상인의 DNA샘플들이 제한효소(비정상적으로 돌연변이된 p53유전자의 특정부위를 자르는 제한효소)로 절단되어 전기영동으로 분석됩니다.

Li-Fraumeni 증후군(가계(Family Pedigrees)내에 육종, 유방암, 뇌종양, 부신피질종양, 백혈병을 포함하는 다양한 종류의 종양 발생이 특징적인 유전성암소인증후군)에서 가족 혈통의 암 패턴은 우성유전을 말해줍니다. 그것은 특정 유형의 암을 유발하는 유전적인 소인입니다.

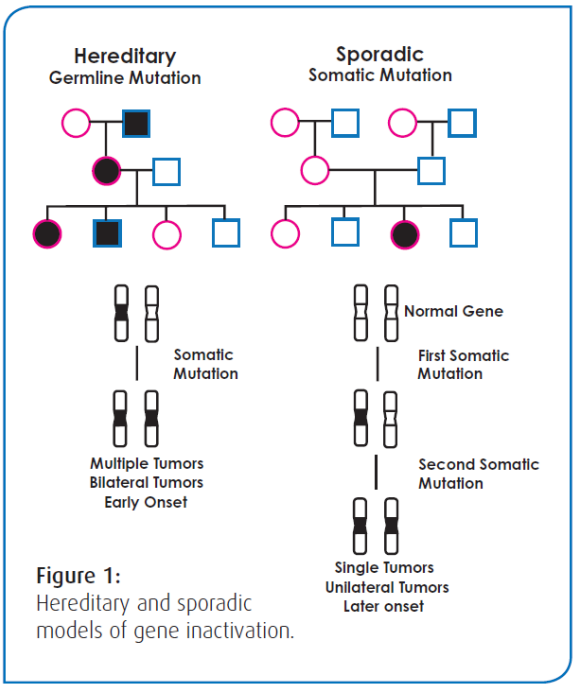


Figure 1: Hereditary and sporadic models of gene inactivation.

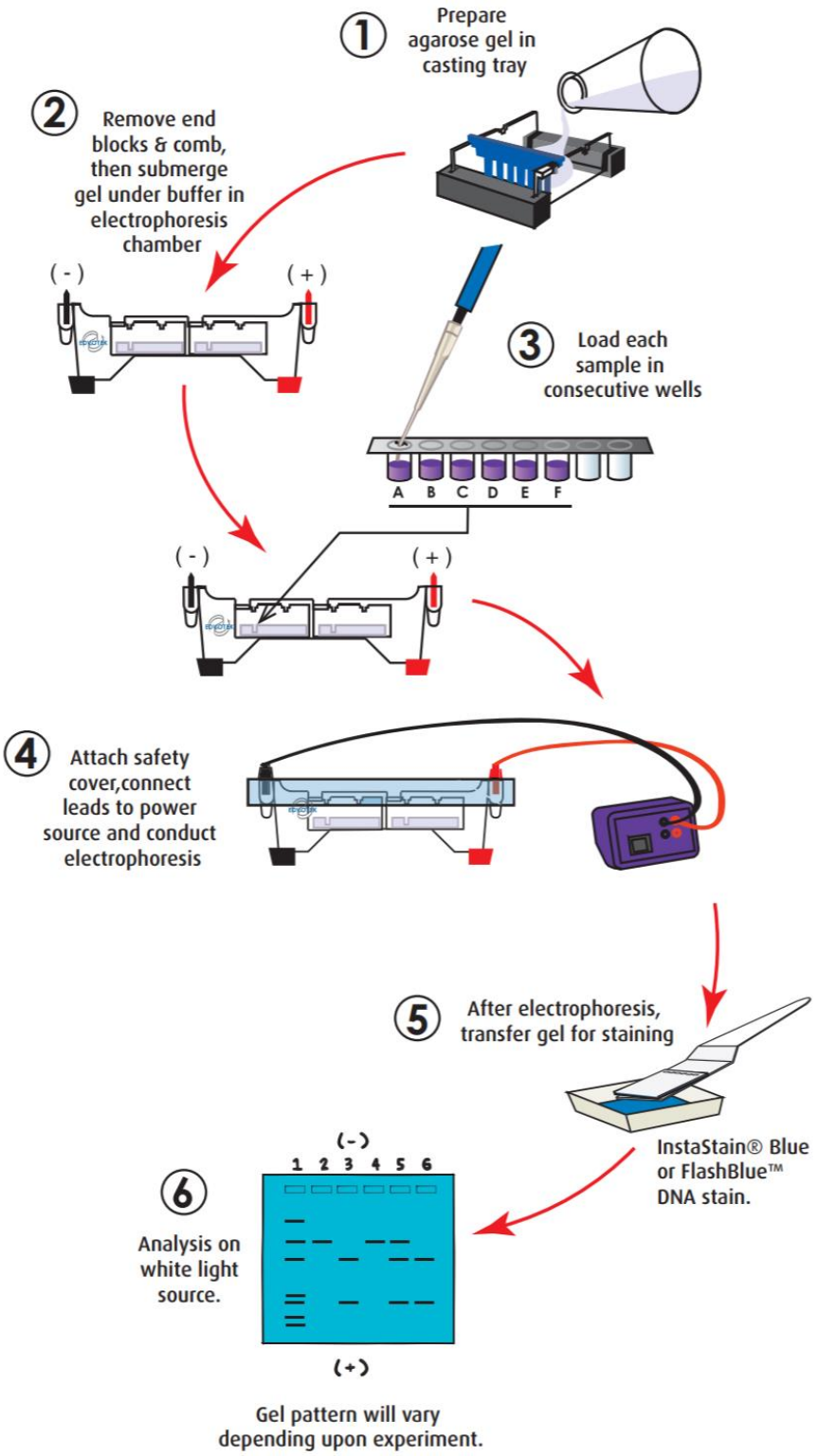
Hereditary Germline Mutation(유전적인 생식계통 돌연변이): 우성유전패턴으로 발생하며 직접 유전되어 가족혈통에서 발견됩니다. 유전된 돌연변이가 있는 생식계열에서 억제유전자내의 단일 체세포 돌연변이는 두 대립 유전자 모두를 비활성화 합니다.

Sporadic Somatic Mutation(산발적인 체세포 돌연변이): 직접적인 유전적 연결이 없으며 개인의 인생동안 얻게 됩니다. 돌연변이가 없는 유전된 정상적인 억제 유전자는 종양이 생기기위해서는 연속적인 돌연변이가 생겨야합니다. 이 모델을 2회충격가설(Two-Hit hypothesis)이라고 합니다.

분자수준에서 암의 형태에 영향을 주는 것은 우성의 종양유전자이기도 하고 p53과 같은 종양억제유전자이기도 합니다. 억제제는 세포 성장의 제한을 관여하는 정상적인 세포 단백질입니다. 대조적으로 종양유전자는 세포성장의 촉진에 관여합니다.

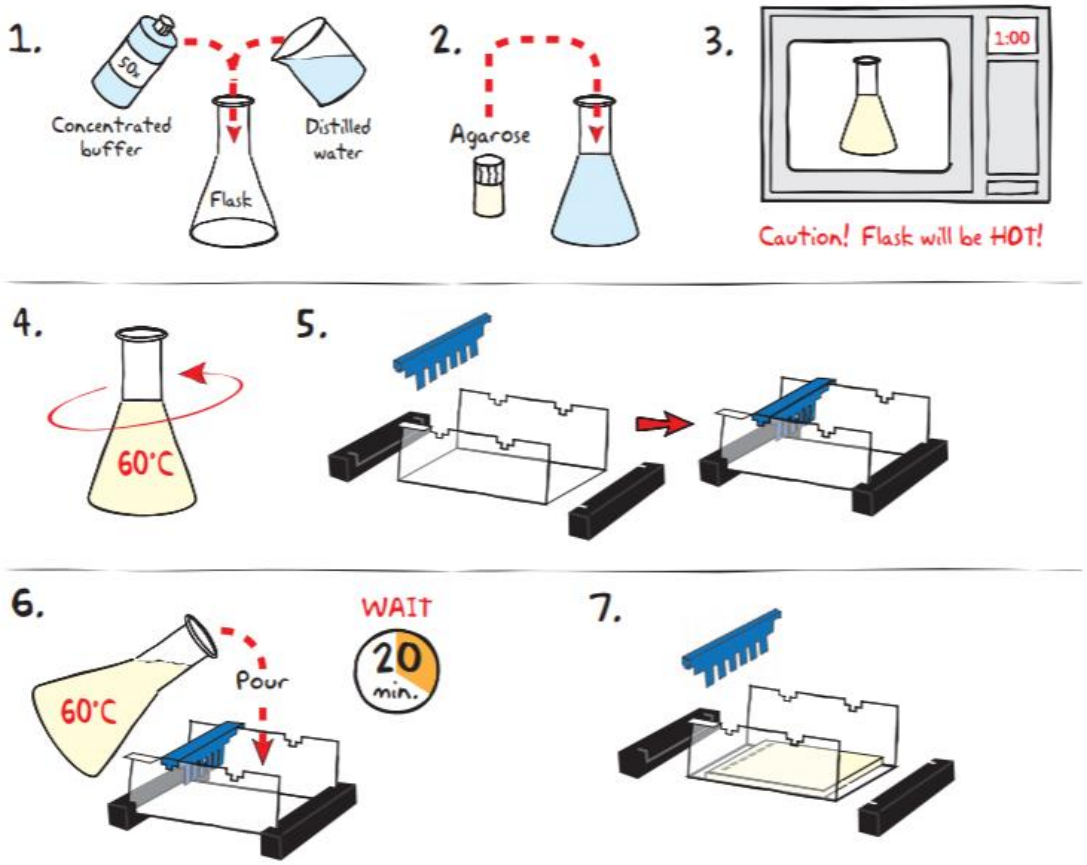
★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

전체 실험 개요



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

아가로스 겔 전기영동

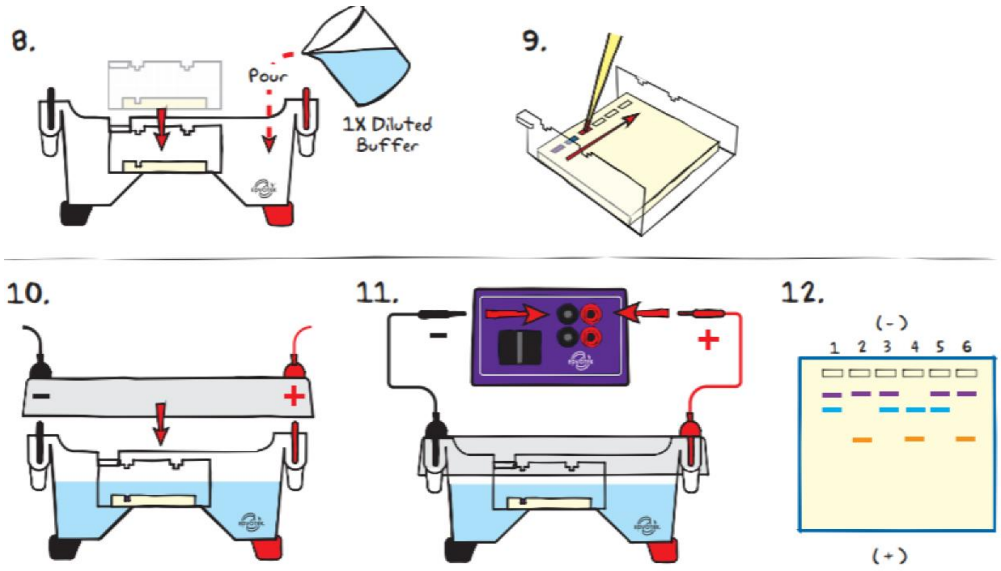


1. Concentrated buffer(50X)를 1X버퍼로 만들기 위해 Table A 표를 참고하여 희석합니다.
2. 250ml 플라스크에 1X 버퍼를 넣고 agarose powder를 섞습니다. (Table A참조)
3. 플라스크를 전자레인지에 1분간 넣고 돌립니다. 플라스크를 돌려가며 아가로스 분말이 충분히 녹아 안보일 때까지 15초 간격으로 전자레인지에 돌려 완전히 용해시킵니다.
4. 완전히 용해된 후 60℃ 까지 식혀줍니다.
5. 용액이 식는 동안 겔 캐스팅 트레이에 고무 마개와 comb을 결합합니다. Comb 결합 방향을 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

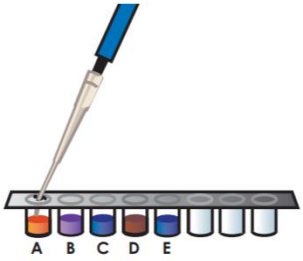
Size of Gel Casting tray	Concentrated Buffer (50x)	+	Distilled Water	+	Amt of Agarose	=	TOTAL Volume
7 x 7 cm	0.6 ml		29.4 ml		0.23 g		30 ml
7 x 10 cm	1.0 ml		49.0 ml		0.39 g		50 ml
7 x 14 cm	1.2 ml		58.8 ml		0.46 g		60 ml

★ 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	Standard DNA Marker
2	Tube B	Control DNA
3	Tube C	Patient Peripheral Blood DNA
4	Tube D	Patient Breast Tumor DNA
5	Tube E	Patient Normal Breast Tissue DNA

Table B — 1x Electrophoresis Buffer (Chamber Buffer)

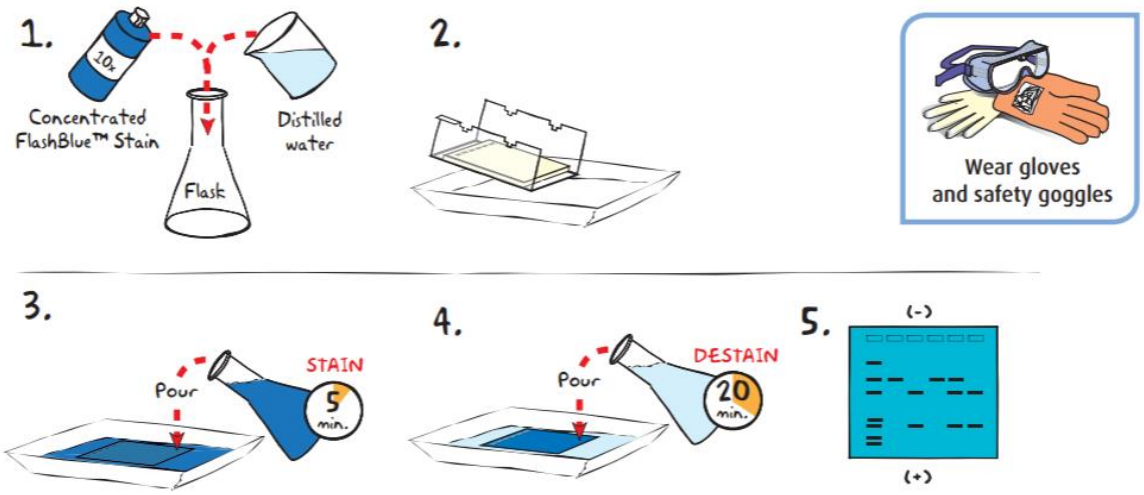
EDVOTEK Model #	Total Volume Required	Dilution: 50x Conc. Buffer	+ Distilled Water
M6+ & M12 (new)	300 ml	6 ml	294 ml
M12 (classic)	400 ml	8 ml	392 ml
M36	1000 ml	20 ml	980 ml

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.

염색선택 1: FlashBlue 를 이용한 아가로스 겔 염색

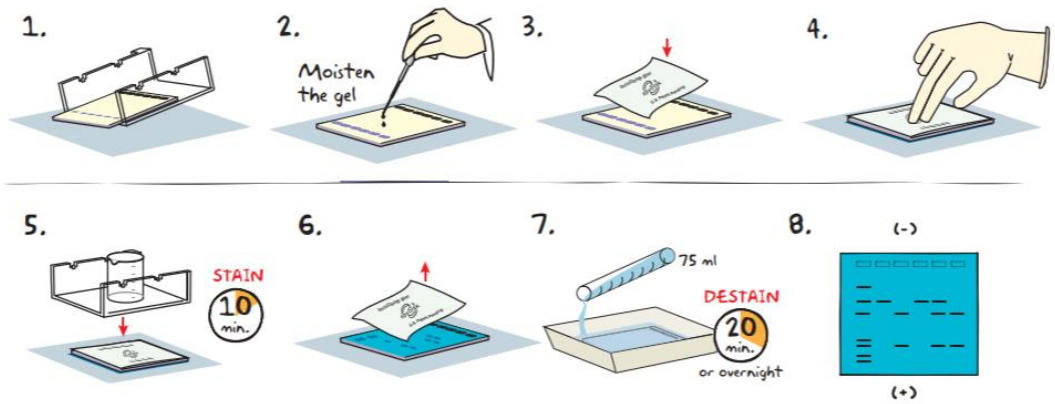


1. FlashBlue (10배 농축) 10ml와 증류수 90ml를 플라스크에 넣고 희석시킵니다.
2. 아가로스 겔과 캐스팅 트레이를 전기영동 장치에서 빼냅니다. 깨끗한 염색용 트레이 위에 겔만 미끄러뜨려 떨어뜨립니다.
3. 섞어놓은 Staining(염색)용액을 겔이 충분히 담길 정도로 붓고 5분간 놔둡니다. 5분을 넘어가게 되면 더 많은 destaining(탈색) 시간을 요구하게 됩니다.
4. 다른 트레이로 겔을 옮긴 후 증류수를 붓습니다. destaining은 최소 20분동안 이뤄져야합니다. 시간을 단축하려면 물을 자주 교체하십시오.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

염색선택2: InstaStain Blue를 이용한 아가로스 겔 염색

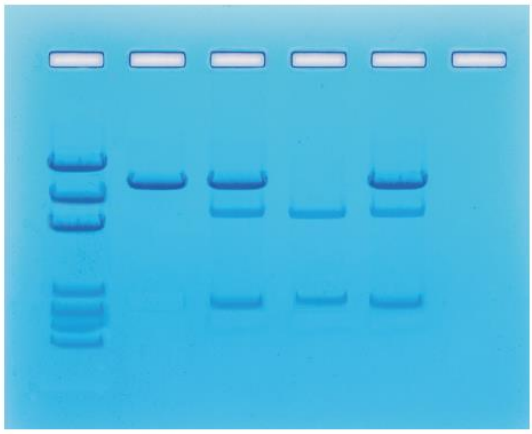
가장 사용이 쉽고 편리한 DNA염색입니다. 기존의 염색양은 많은 양을 만들고 보관하고 폐기하였지만 이 카드는 소량으로 충분히 DNA 염색이 가능합니다. Staining(염색)과 destaining(탈색) 작업이 동시에 진행되어 최소한의 용액 낭비를 유지합니다.



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 illuminator위에 올려 관찰합니다.

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

결과 및 분석



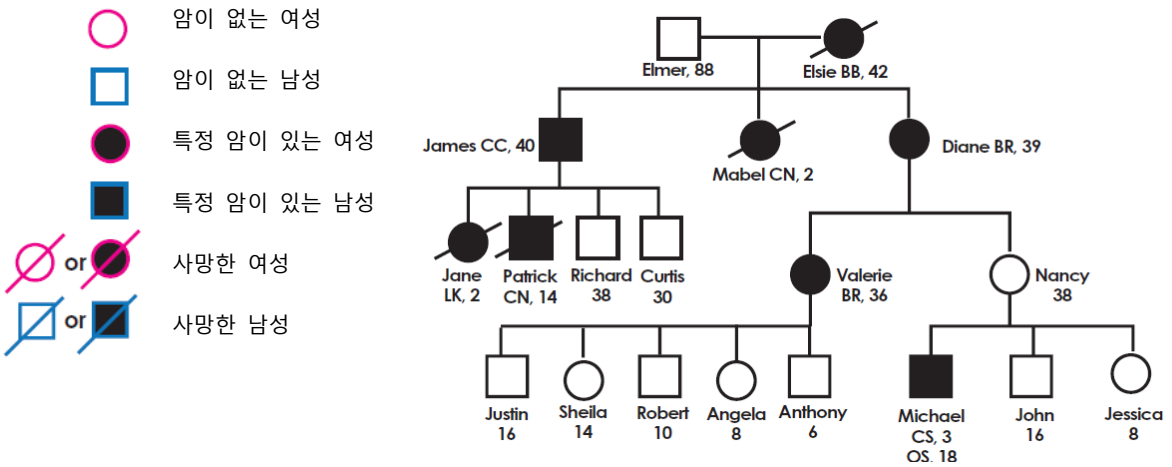
Lane	Tube	Sample	Molecular Weights (in bp)
1	A	DNA Standard Markers	---------
2	B	Control DNA	4282
3	C	Patient Peripheral Blood DNA	4282 3000 1282
4	D	Patient Tumor DNA	3000 1282
5	E	Patient Breast Normal DNA	4282 3000 1282

정상 환자 세포의 DNA는 p53돌연변이가 없기에 제한효소가 반응하는 특정부위의 부재로 증폭된 DNA는 절단되지 않고 하나의 밴드(2번째 줄)로 나오게 됩니다.

환자의 종양 DNA는 이 특정 부위에서 p53 둘다에 돌연변이가 있어서 DNA가 잘려져 두 개의 DNA 밴드가 나타납니다. (4번째 줄)

환자의 말초혈액(3번째 줄)과 정상유방조직 DNA(5번째 줄)는 정상유전자(2번째줄), 돌연변이유전자(4번째줄)에서 나온 패턴이 합쳐져서 3개의 밴드로 나오게 됩니다.

추가 토론 : 아래의 가계도를 보고 논의해 봅니다. (성별, 이름, 병명, 나이, 생존여부)



BB: 유방양쪽 유방암, BR: 유방암, CN: 뇌종양

LK: 백혈병, OS: 골육종, SS: 연조직 육종

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