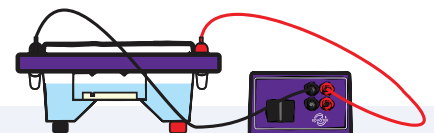


겸형 적혈구 유전자 검출

Sickle Cell Gene Detection (DNA-based)

ED116



☎ 02-929-1110 ✉ info@koreasci.com

🛒 www.koreasci.com

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

실험 목표

학생들은 건강과 질병, 특히 겸형 적혈구와 관련된 돌연변이가 영향을 끼치는 것을 이해하게 됩니다.

제품 구성품

- A 겸형 적혈구 유전자 샘플
- B 겸형 적혈구 trait (carrier) 샘플
- C 정상 유전자 샘플
- D 어머니 DNA 샘플
- E 자녀 DNA 샘플
- F 아버지 DNA 샘플

UltraSpec-Agarose

Electrophoresis buffer (50x)

Practice Gel Loading Solution

FlashBlue DNA stain

필요 장비 및 준비물

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

배경 지식

겸형적혈구병(SCD)는 전 세계적으로 약 5백만명의 사람들에게 영향을 끼치는 유전성 혈액 장애입니다. 이 질병은 산소를 운반하는 단백질 헤모글로빈에 대한 생성능력을 방해하는 개인의 유전 암호의 작은 변화로 인해 발생합니다. 헤모글로빈의 변화는 적혈구에 영향을 끼칩니다. SCD가 있는 사람은 기형적이고 뻣뻣하며 끈적거리는 짧은 수명의 적혈구를 가지게 됩니다. 그 결과 낮은 적혈구 수와 낮은 혈중 산소 수치인 의학적인 상태로 빈혈을 앓게

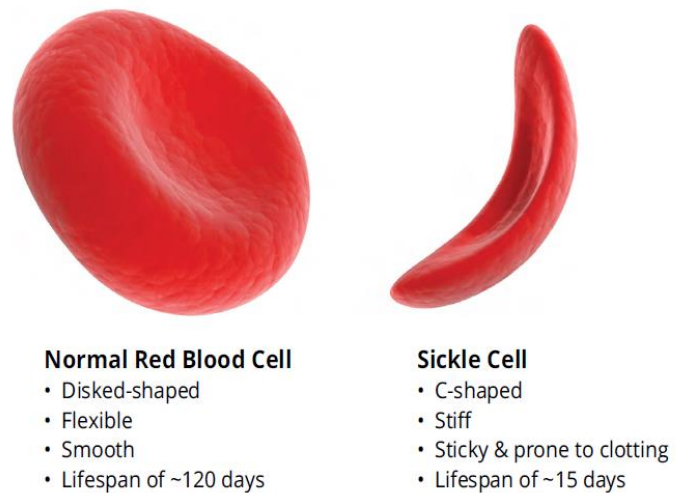


Figure 1

됩니다. SCD를 가진 많은 사람들은 다른 중요한 기관으로 산소흐름이 차단되고 비장을 손상시키는 주기적인 혈전을 경험하게 됩니다. 이러한 상태는 만성 피로에서 심장 마비까지 다양한 증상을 유발합니다.

겸상 적혈구 질환의 증상은 일반적으로 출생 후 5-6개월 후에 나타납니다. 아이에서 이 장애는 성장 및 발달 지연, 피부와 눈의 황변, 폐렴과 같은 2차 감염 및 '통증위기'라는 고통의 연속을 유발할 수 있습니다. 치료되지 않으면 시간이 지날수록 악화됩니다. SCD가 있는 중증 성인환자의 경우 만성통증, 피로, 무균괴사(뼈 구성성분에 괴사), 시력상실, 생명을 위협하는 폐 및 심장의 손상 등을 겪을 수 있습니다. 덜 심한 경우 피로, 현기증, 호흡 곤란, 약화된 면역체계 등이 주요 증상으로 나타납니다.

의학 연구원은 현재 이 질병에 대한 치료법을 찾기 위해 노력하고 있습니다. 한 가지 옵션은 골수 이식입니다. 그러나 이를 위해서는 매우 일치하는 골수 기증가가 필요하며 여러 번의 화학 요법 및 수년간의 면역억제제를 복용해야 합니다. 그래서 건강하고 젊은 환자가 아닌 경우 SCD 중증환자를 위해 이식장기들은 보관됩니다. 또다른 치료방식은 유전자요법-CRISPR와 같은 생명공학 기술로 돌연변이된 헤모글로빈 유전자의 건강한 복사본을 환자의 게놈에 삽입합니다. 이러한 방법은 유망하지만 여전히 신중하게 테스트를 진행하고 있습니다. 그동안 의료 관리와 생활방식의 변화는 SCD환자가 합병증을 예방하는데 도움이 될 수 있습니다.

SCD를 초기에 정확하게 발견하는 것은 질병 치료에 필수적이지만 개인이 광범위한 증상을 보이기에 잘 구별되지 않습니다. 혈액의 헤모글로빈 수치를 측정하거나 현미경으로 적혈구를 관찰하기도 합니다. 더 정확한 검사는 근본 원인에 대한 개인의 DNA를 살펴보는 것입니다.

유전성 장애

연구원들은 SCD로 이어질 수 있는 약 400가지의 다른 DNA 변화를 확인했습니다. 가장 흔한 것은 베타 글로빈으로 알려진 단백질의 아미노산 서열을 변경하는 A에서 T로의 단일 뉴클레오타이드 돌연변이입니다. 구체적으로 이 DNA 코딩의 변화는 세포가 Glutamic acid 대신에 Amino acid Valine을 가진 글로빈 단백질을 만들게 합니다(Figure 2). 이 두 아미노산은 다른 전하를 가지기에 사람의 베타글로빈과 헤모글로빈의 주요 특성을 변경합니다(Figure 3). 질병의 하위 유형은 같은 유전자 내의 유사 뉴클레오타이드 변화에 의해 발생합니다.

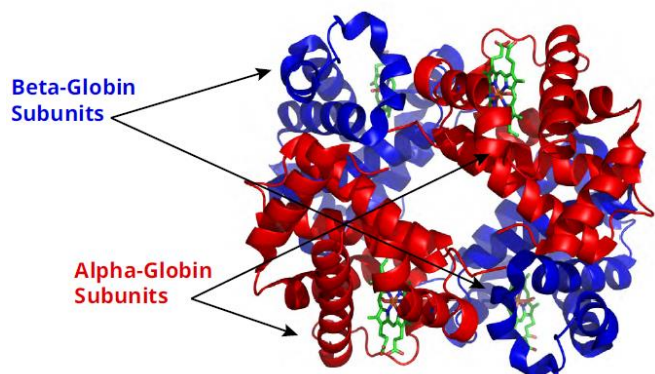
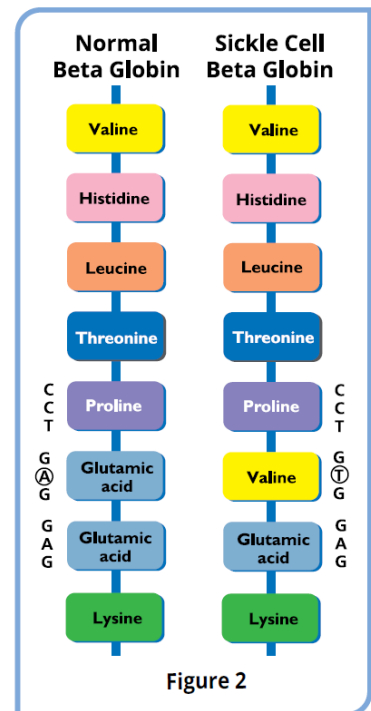
베타-글로빈 유전자는 11번 염색체에서 발견되며 대부분의 헤모글로빈 단백질의 필수 부분을 만들기 위한 신체의 유일한 설명서를 포함하고 있습니다. 이것은 상염색체 (또는 쌍을 이루는)에 위치해 있기에 사람은 두 개의 복사본을 가지고 있습니다. 하지만 우리는 건강한 헤모글로빈의 충분한 공급을 위해 하나의 정상 베타 고블린 유전자만 있으면 됩니다. 이러한 경우 정상유전자는 그

효과가 돌연변이 유전자를 보상할 수 있기 때문에 “우성”이라고 합니다. 유사하게 SCD는 누군가가 베타-글로빈 유전자의 두 가지 돌연변이 버전을 가질 때만 증상이 나타나기 때문에 “열성”질환이라고 합니다.

SCD같은 열성 질병은 여러 세대를 건너뛸 수 있기 때문에 가계도를 통해 추적하기 어렵습니다. 이것은 질병을 유발하는 돌연

변이의 지속적인 존재를 은폐하는 우성의 정상 유전자를 가진 이형접합 개인 보인자 세대가 있을 때마다 발생합니다. 동시에 이 질병은 유전 패턴을 예측하기 쉽게 만드는 상염색체에 위치한 단일 유전자에 의해 발생합니다.

단일 유전자의 유전은 Punnett Square(Figure 4)로 알려진 2x2 표로 나타낼 수 있습니다. 한 부모가 가진 대립유전자는 열 상단에 배치되고 다른 부모가 제공한 대립유전자는 행 아래에 배치됩니다. 일반적으로 우성은 대문자, 열성은 소문자로 표시합니다.



		Genotype	
T	T	1/4	TT
	t	1/2	Tt
t	T	1/4	tT
	t	1/4	tt
		Phenotype	
		3/4	dominant
		1/4	recessive

Figure 4

생명공학을 이용한 겸형적혈구병 진단

양수로부터 얻어지는 세포에서 부모 또는 태아 DNA를 높은 정확도로 분석할 수 있습니다. 이러한 DNA는 중합효소연쇄반응(PCR)을 사용해 증폭하기에 충분한 DNA를 얻을 수 있습니다. 또한 세포는 다량의 게놈 DNA 생성을 위해 배양액에서 키울 수 있습니다. 환자로부터 DNA를 수집하면 임상적은 개인의 유전자형을 구성하는 특정 뉴클레오티드를 시각화하기 위해 다양한 생명공학을 이용합니다.

개인의 뉴클레오티드 DNA 서열에서 작은 차이를 구별하는 방법은 제한효소를 사용하는 것입니다. 제한효소는 두 DNA 가닥 내에서 phosphodiester bond를 절단하는 endonuclease입니다. 이 과정을 digestion이라고 하며 매우 특정한 부위에서 절단되는 DNA분자를 만들어 냅니다. 이 절단 부위는 일반적으로 길이가 4~8 염기쌍인 인식인 palindromic(회문) 서열 또는 그 근처에서 발생합니다. 많은 제한 효소 인식 부위도 다형성이기 때문에 제한 효소 digestion은 각 개인마다 서로 다른 크기의 DNA 조각을 생성합니다. RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)라고 하는 이러한 변형을 통해 SCD와 같은 유전 질환을 구별할 수 있습니다.

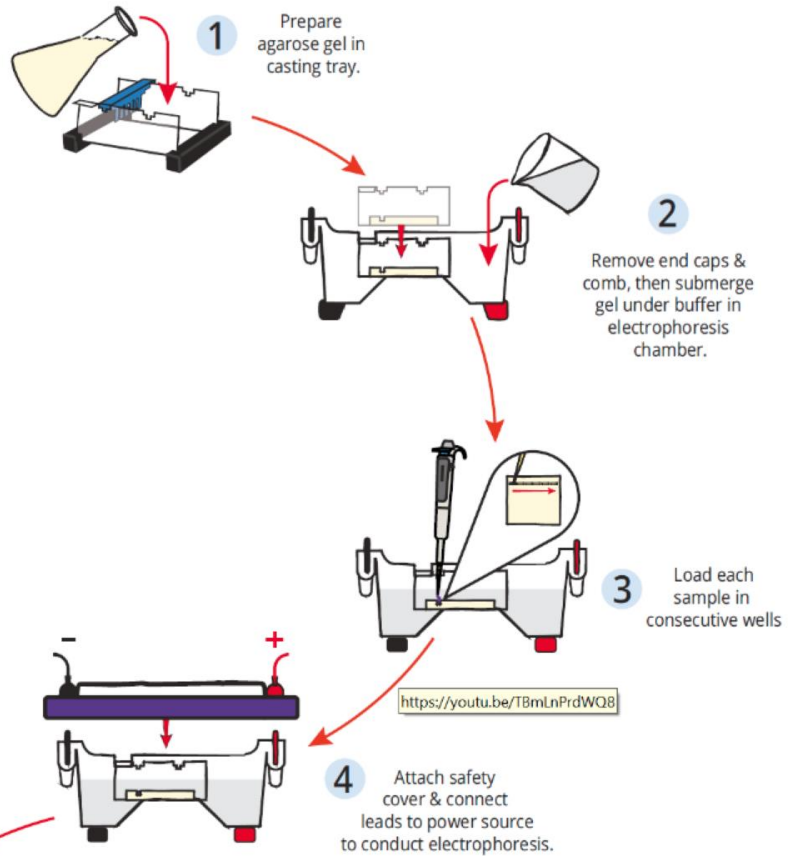
이 키트의 실험의 기초는 베타 글로빈 유전자의 회문 서열에 대한 제한효소 인식입니다. 정상 유전자에서 아미노산 5, 6, 7(Pro-Glu-Glu)의 염기서열은 CCT-GAG-GAG 입니다(Figure 2). 코돈 6의 점 돌연변이는 A를 T로 변환하고 서열은 CCT-GTG-GAG 로 변경됩니다. 제한 효소 Mst II의 회문 인식 부위는 CCTNAGG 입니다. 여기서 N 은 뉴클레오티드를 뜻하며 4개의 ATGC 중 한 개입니다. 따라서 Mst II는 정상 베타 글로빈 CCT-GAG-G를 인식할 수 있음을 알 수 있습니다. 하지만 돌연변이는 인식하지 못합니다. 따라서 환자의 샘플을 Mst II와 섞게되면 효소는 정상 유전자를 두 개의 조각으로 자르지만 돌연변이 유전자는 잘리지 않습니다.

이 조각들을 전기영동을 통해 시각화하고 길이를 계산할 수 있습니다.

전체 실험 개요

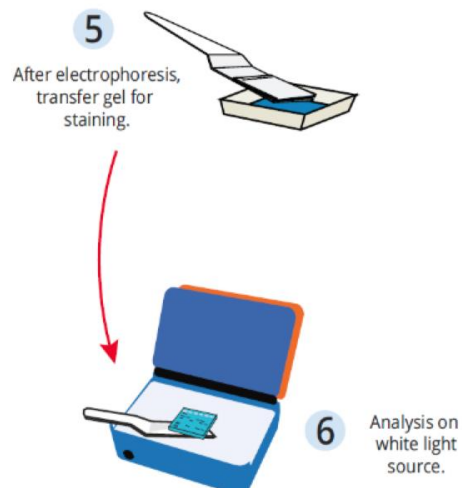
MODULE I: Agarose Gel Electrophoresis

Time required: See Table C

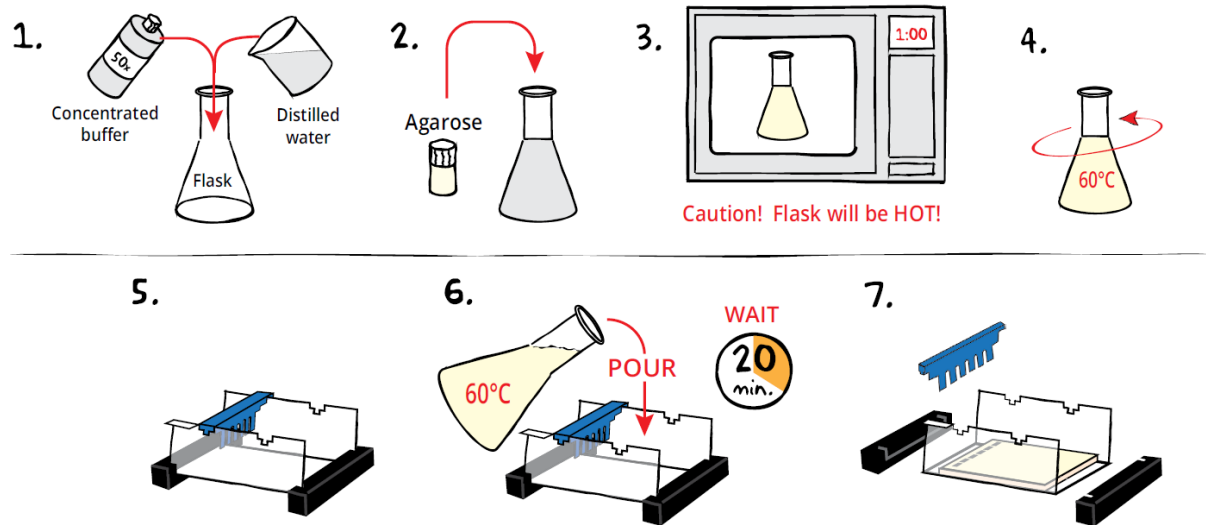


MODULE II: Staining Agarose Gels Using FlashBlue™

Time required: 30 min.



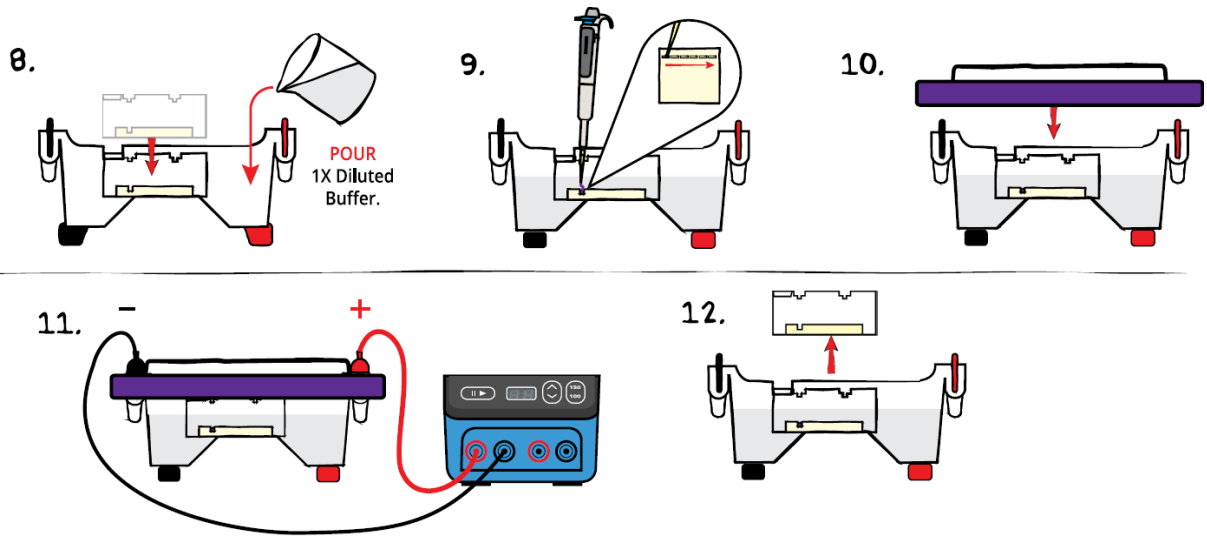
아가로스 겔 전기영동



1. Concentrated buffer(50X)를 증류수와 섞어 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°C 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™ Gels				
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	0.24 g	30 mL
10 x 7 cm*	0.9 mL	44.1 mL	0.36 g	45 mL
14 x 7 cm	1.2 mL	58.8 mL	0.48 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. 샘플 스트립에 피펫팁을 찔러넣어 샘플(대략 35 μ L)을 각 well에 분주합니다.
10. 전기영동장치의 덮개를 덮습니다. 전극의 방향(+, -)이 맞게 연결되었는지 확인합니다.
11. 전원공급장치에 연결하여 전기영동을 시작합니다. (Table C. 의 공급전압과 구동 시간 참조)
12. 모두 마치고 나면 겔과 트레이를 빼내 결과를 관찰합니다.

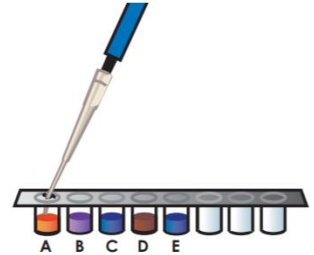
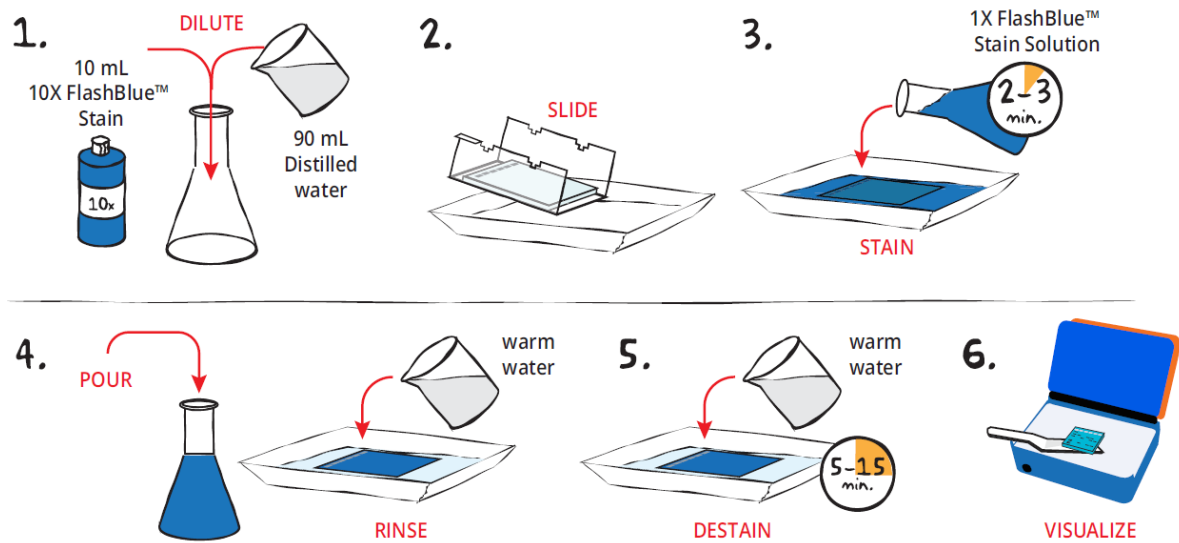


TABLE 1: GEL LOADING		
Lane 1	Tube A	Sickle cell gene sample
2	Tube B	Sickle cell trait (carrier) sample
3	Tube C	Normal gene sample
4	Tube D	Mother's DNA sample
5	Tube E	Child's DNA sample
6	Tube F	Father's DNA sample

Table B	1x Electrophoresis Buffer (Chamber Buffer)		
EDVOTEK Model #	Total Volume Required	Dilution 50x Conc. Buffer + Distilled Water	
EDGE™	150 mL	3 mL	147 mL
M12	400 mL	8 mL	392 mL
M36	1000 mL	20 mL	980 mL

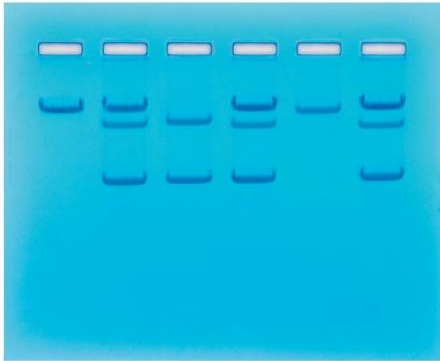
Table C	Time and Voltage Guidelines (0.8% Agarose Gel)	
	Electrophoresis Model	
	EDGE™	M12 & M36
Volts	Min/Max (minutes)	Min/Max (minutes)
150	10/20	20/35
125	N/A	30/45
100	15/25	40/60

염색: 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 2-3분간 놔둡니다. 3분을 넘어가게 되면 더 많은 destaining(탈색) 시간을 요구하게 됩니다.
4. FlashBlue를 다시 플라스크에 넣거나 겔을 다른 트레이로 옮긴 후 40~45°C 따뜻한 물로 20-30초간 부드럽게 행군 후 물을 버립니다.
5. 다시 40~45°C 따뜻한 물을 붓습니다. Destaining은 5-15분 동안 이뤄져야합니다. 시간을 단축하려면 물을 자주 교체하십시오.
6. 겔을 꺼낼 때는 손상되지 않게 조심히 꺼냅니다. 더 나은 겔 결과 관찰을 위해 transilluminator에서 관찰합니다.

결과 및 분석



Lane 1: 대조군 샘플 (겸형적혈구 환자)

제한효소가 인지하는 부위가 없어 잘린 부위가 없이 하나의 밴드로 나옵니다.

Lane 2: 이형접합 겸상적혈구 형질에 대한 대조군 샘플

한 쌍의 유전자 중 한 개(정상 유전자)가 제한 효소 부위를 가집니다. 제한효소로 잘려 두 개의 작은 DNA 조각이 생성됩니다. 다른 한 개의 유전자에는 돌연변이가 있어 제한효소가 잘르지 않기에 3개의 DNA 밴드가 나옵니다.

Lane 3: 정상 동형접합 환자에 대한 대조군 샘플

두 정상 유전자 모두 제한효소 인지 부위를 가지며 모두 잘려 두개의 더 작은 DNA 밴드가 생성됩니다.

Lane 4: 어머니의 DNA 샘플

Lane 5: 아이의 DNA 샘플

Lane 6: 아버지의 DNA 샘플