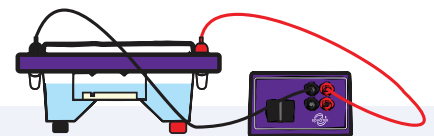


광우병 진단실험

Detection of Mad Cow Disease

ED117



☎ 02-929-1110 ✉ info@koreasci.com

🛒 www.koreasci.com

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

실험 목표

학생들은 이 실험으로 광우병-BSE(Bovine Spongiform Encephalopathy)에 대해 이해하게 됩니다.

제품 구성품

- A DNA 마커(DNA Standard Marker)
- B 소 단백질 양성 대조군 (Positive bovine protein control)
- C 소 단백질 음성 대조군 (Negative bovine protein control)
- D 공장에서 얻은 #1번 사료 (Feed sample from mill #1)
- E 공장에서 얻은 #2번 사료 (Feed sample from mill #2)
- F 공장에서 얻은 #3번 사료 (Feed sample from mill #3)

아가로스 분말 (UltraSpec-Agarose)

50X 전기영동용 버퍼 (Electrophoresis buffer (50x))

로딩연습용 용액 (Practice Gel Loading Solution)

플래쉬블루 염색약 (FlashBlue DNA stain)

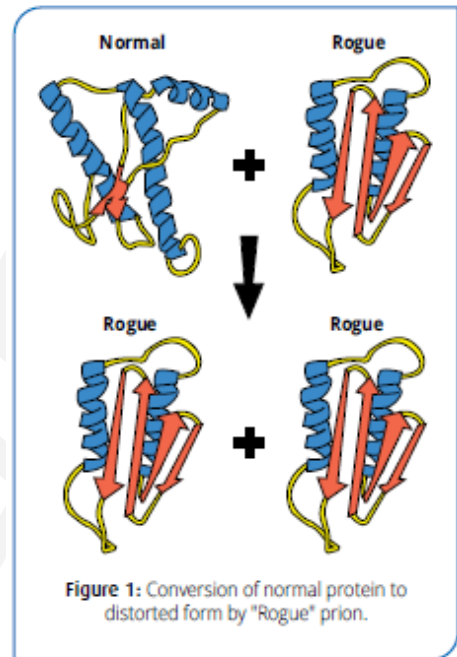
필요 장비 및 준비물

전기영동 장치, 전원공급장치, 피펫과 피펫팁, 전자저울, 전차레인지(핫플레이트), 250mL삼각플라스틱, 안전장갑, 증류수, 염색용 트레이

배경 지식

광우병으로 더 잘 알려진 소 해면상뇌증(BSE)은 신경 세포 질 내에 형성되는 액포(빈 공간)가 특징인 치명적인 질환으로 액포(빈 공간)가 특징인 치명적인 질환입니다. 이러한 액포는 감염된 뇌의 스펀지 같은 스펀지 모양으로 변합니다. BSE의 전염병은 수만 마리의 소가 도살되었습니다.

소해면상뇌증(BSE)의 전염이 핵을 매개로 하지 않는다는 강력한 증거가 있는데, BSE의 전파는 바이러스와 같은 핵산 벡터가 아닌 프리온(Prion)이라는 단백질 입자를 통해 이루어집니다. 프리온은 내장된 막단백질의 변형된 형태로, 감염 후 자체 복제하는 것으로 보이며(Figure 1 참조), 원래 형태를 왜곡시키면서 복제됩니다. BSE는 처음에 편도와 다른 림프기관에서 발견되며, 그런 다음 신경계로 확산되어 신경세포의 프로그래밍 세포사멸인 아포토시스를 유발합니다. 감염된 소는 무기력해지며 나중에는 불규칙한 행동을 나타내게 됩니다("광우병"의 기원입니다).



소뿐만 아니라 프리온은 양, 사슴, 미스키, 그리고 인간에서도 신경변성 질환을 일으킵니다. 일반적으로 45세 이상의 인간에게 발병하는 드문하면서 파괴적인 인간 질환인 크로이츠펠트-야콥병(Creutzfeldt-Jakob disease, CJD)이라고 알려져 있습니다. 환자들은 거의 30세 미만이 거의 없습니다. 그러나 1996년에 영국에서 25세 미만 환자 몇 명에게 이 질환의 증상이 나타났습니다. 이러한 환자들의 뇌병변은 고전 CJD와 다른데, 이 질환은 새로운 변종 CJD 또는 "nvCJD"로 불렸습니다. 분석 결과, 이러한 환자의 프리온 감염체가 BSE 감염된 소의 프리온과 동일하다는 것을 나타내어, 이러한 환자들이 오염된 쇠고기를 섭취함으로써 감염되었을 가능성을 제기했습니다. 다른 연구들은 프리온 감염이 양의 프리온 유전자를 마우스에 발현함으로써 종 간 장벽을 넘어갈 수 있다는 것을 시사했는데, 이로 인해 마우스 스폰지포름 뇌염증이 발생했습니다. 영국에서 BSE의 기원 중 하나로는 소의 사료에 감염된 양의 반추가 포함되었을 가능성이 있는데, 이로 인해 양의 프리온이 소로 이중종으로 전파되었다고 합니다. 게다가, BSE 감염된 소의 주견지체가 사료 제조에 사용되었다고 여겨져 이 질병이 대규모로 전파되었습니다.

영국과 프랑스에서 발생한 nvCJD로 인한 인간 사망 사례가 보고되었으며, 이는 소에서 인간으로의 종 간 전파로 인한 것으로 여겨집니다. 유럽에서는 대규모 공포가 유발되어 소고기 산업에 큰 타격을 입히고 미국에서도 BSE 발생을 두려워하게 만들었습니다. 국내 소 감염을 방지하는 한 가지 방법은 소 또는 양 부분을 소의 사료에 사용하지 않도록 하는 것인데, 미국 식품의약국(FDA)은 이 관행을 1997년에 금지시켰습니다.

이 금지 조치를 시행하기 위해 검사관들은 소 사료에 소단백질의 존재 여부를 확인합니다. 검사

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

의 한 방법은 사료에 대한 중합효소 연쇄반응(PCR)을 사용하는 것입니다. PCR은 특정 서열에서 DNA를 강력하게 증폭하는 데 일반적으로 사용되는 강력한 기술입니다. PCR은 Taq DNA 폴리머라스라고 불리는 열안정성 효소를 사용합니다. 반응 혼합물에는 폴리머라스와 "프라이머"라고 하는 두 개의 합성 올리고뉴클레오티드가 포함되어 있으며, 이 프라이머는 증폭될 서열, 즉 "템플릿"을 둘러싸고 있습니다. 소 사료 준수의 경우, 템플릿은 다양한 사료 공장의 사료이며, 프라이머는 소 특정 유전자와 상호 보완적인 것일 것입니다.

PCR 반응의 첫 번째 단계(Figure 2, 다음 페이지)에서는 Taq DNA 중합효소가 안정적으로 유지되는 온도인 94°C에서 주형 상보성 DNA 가닥이 서로 녹아 분리됩니다. 어닐링으로 알려진 두 번째 단계에서는 샘플을 냉각하여 프라이머가 표적 염기서열의 두 가닥에 섞일 수 있도록 합니다. 배경 정보 그림 1: 정상 단백질이 "로그 단백질"에 의해

"불량" 프리온에 의한 왜곡된 형태.

확장으로 알려진 세 번째 단계에서는 온도를 72°C로 올리고 Taq 중합효소가 프라이머에 뉴클레오타이드를 추가하여 새로운 상보 가닥의 합성을 완료합니다. denaturation, annealing, extension의 세 단계가 하나의 PCR '사이클'을 구성합니다. 이 과정은 일반적으로 20~30사이클 동안 반복되어 표적 서열을 기하급수적으로 증폭합니다(그림 2, 하단). PCR은 다양한 시간 동안 지정된 온도에서 샘플을 빠르게 가열, 냉각 및 유지하도록 프로그래밍된 PCR기기에서 수행됩니다.

이 실험에서는 여러 사료 공장에서 소 사료 샘플을 확보한 미국 식품의약국(FDA) 실험실을 가상 시나리오로 설정했습니다. 소 특이 프라이머를 사용하여 각 샘플에 대해 PCR을 수행했습니다. 학생들은 샘플을 아가로스 겔 전기 영동에 로딩하여 소 사료 샘플에 광우병을 전파할 수 있는 소 단백질이 포함되어 있는지 확인합니다. 증폭된 산물이 있으면 사료에 소 단백질이 포함되어 있음을 나타냅니다.

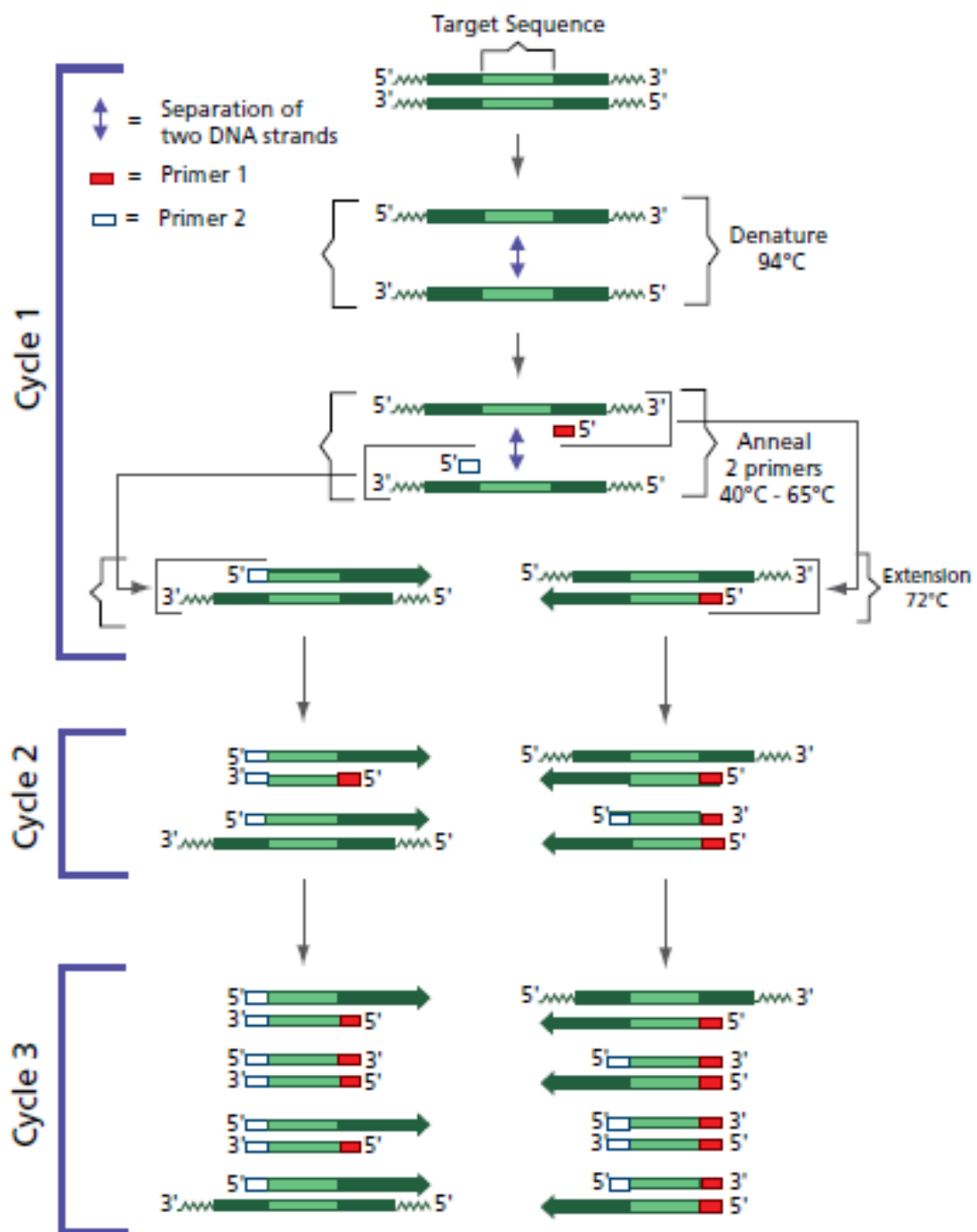


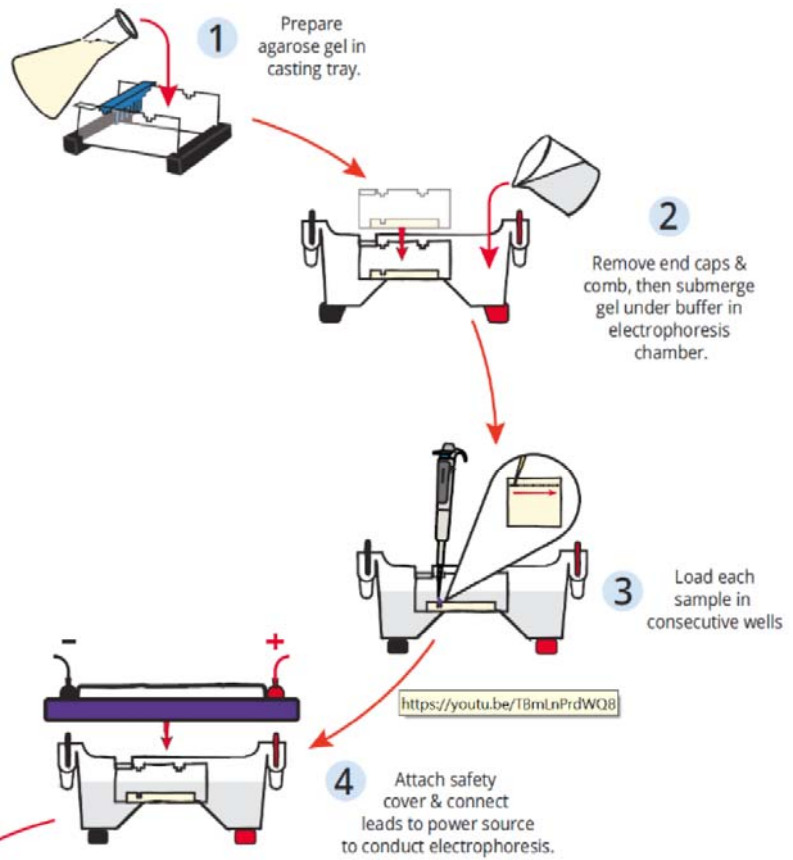
Figure 2: DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction

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

전체 실험 개요

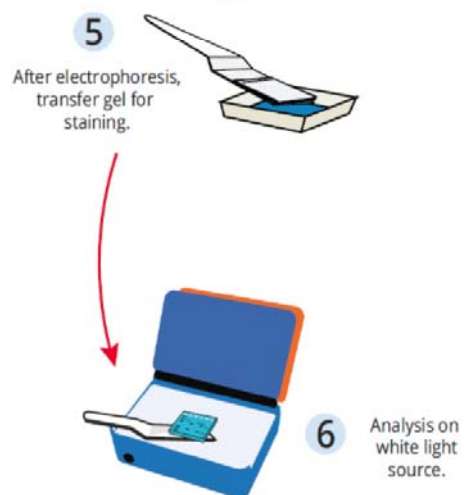
MODULE I: Agarose Gel Electrophoresis

Time required: See Table C

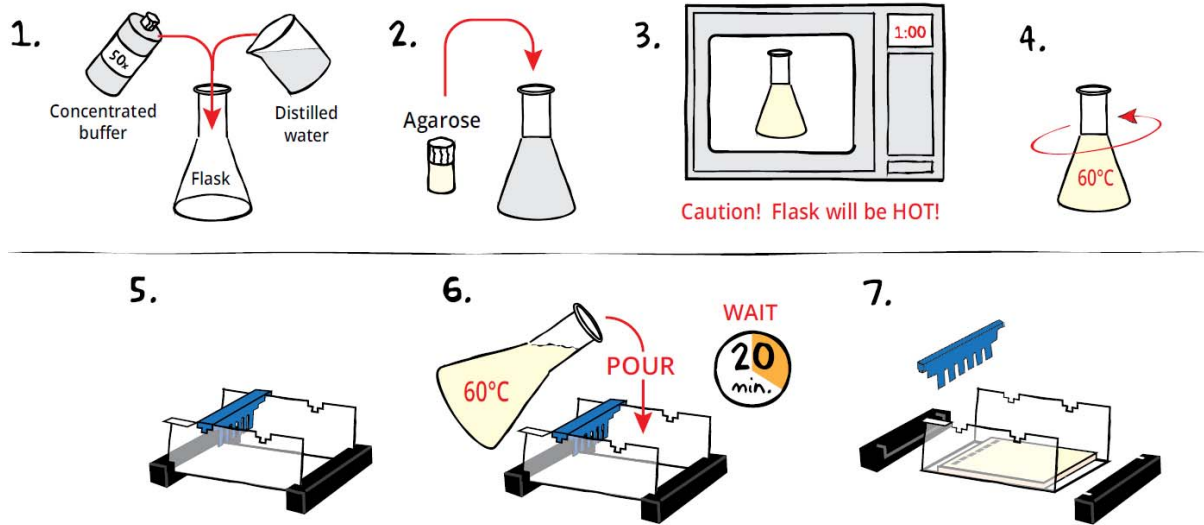


MODULE II: Staining Agarose Gels Using FlashBlue™

Time required: 30 min.



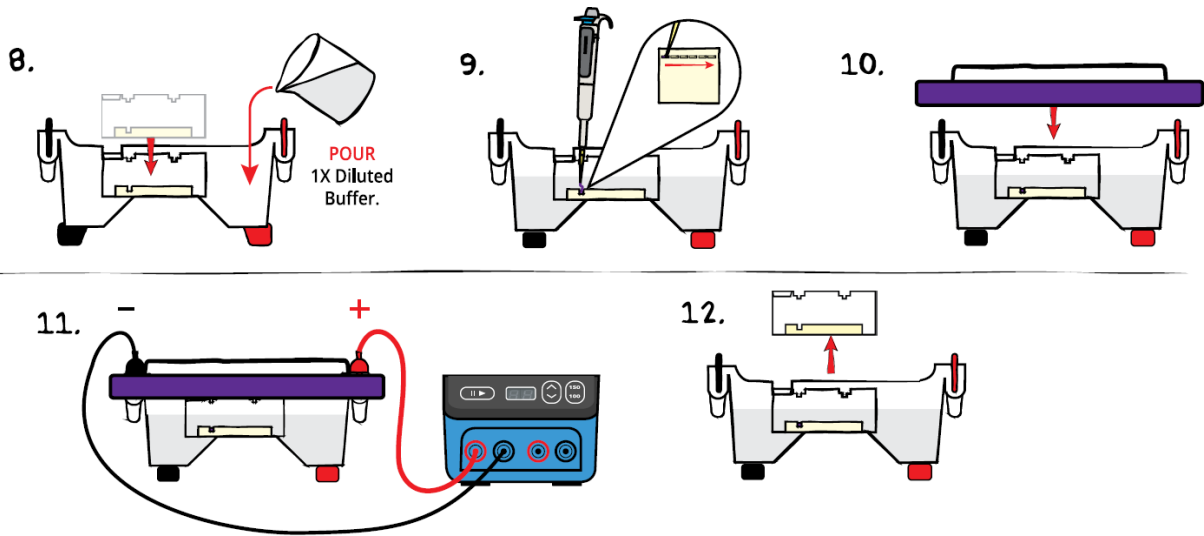
아가로스 겔 전기영동



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 찌러넣어 샘플(대략 35 μ L)을 각 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.

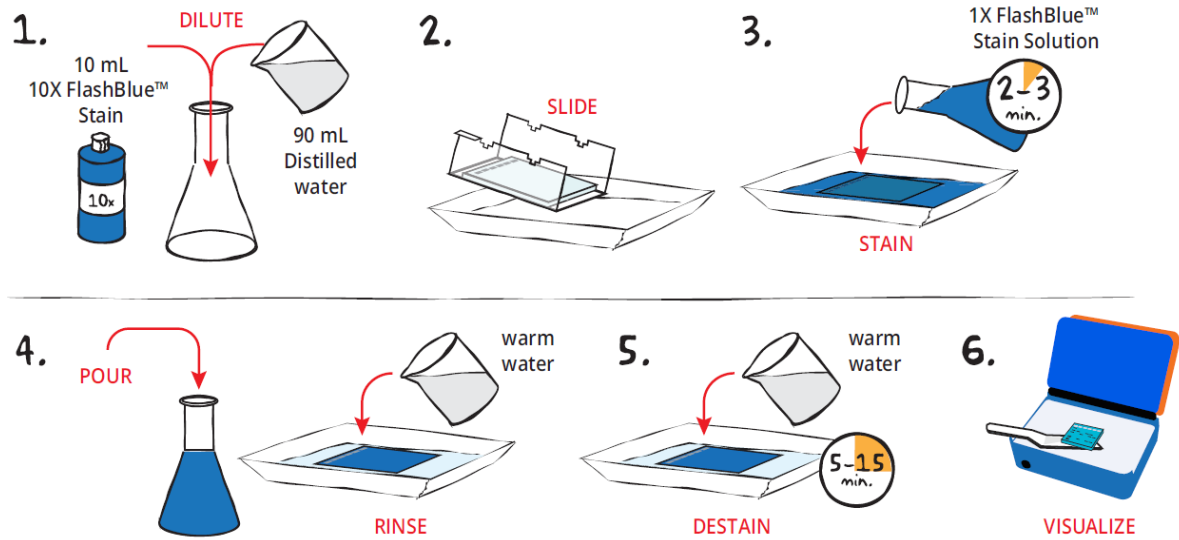
TABLE 1: GEL LOADING		
Lane 1	Tube A	DNA Standard Marker
2	Tube B	Positive bovine protein control
3	Tube C	Negative bovine protein control
4	Tube D	Feed sample from mill #1
5	Tube E	Feed sample from mill #2
6	Tube F	Feed sample from mill #3

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)		
Volts	Electrophoresis Model	
	EDGE™	M12 & M36
	Min/Max (minutes)	Min/Max (minutes)
150	10/20	20/35
125	N/A	30/45
100	15/25	40/60

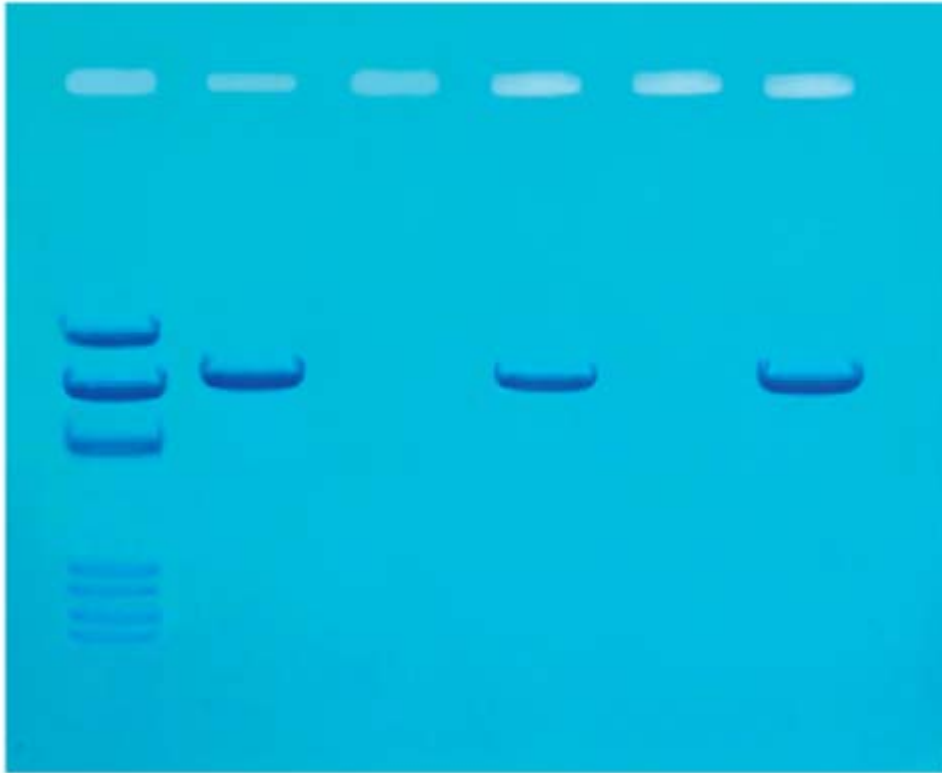
★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

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 헹군 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	Tube	Sample	Molecular Weights (in bp)
1	A	DNA Standard Markers	6751, 3652, 2827, 1568 1118, 825, 630
2	B	Positive Bovine Protein Control	4282
3	C	Negative Bovine Protein Control	No Bands
4	D	Feed Sample from Mill #1	4282
5	E	Feed Sample from Mill #2	No Bands
6	F	Feed Sample from Mill #3	4282

Mill #1과 #3번의 사료 샘플은 양성입니다. Mill #2번 사료 샘플은 음성으로 나타납니다.

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