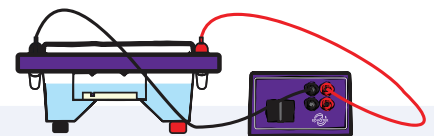


콜레스테롤 진단실험

Cholesterol Diagnostics

ED118



☎ 02-929-1110 ✉ info@koreasci.com

🛒 www.koreasci.com

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

실험 목표

학생들은 아가로스 젤 전기영동법을 이용해 유전학적 고지혈증의 유전자 및 질환을 찾아내는 분자적 방법을 찾습니다.

제품 구성품

- A DNA Standard Marker
- B Normal DNA Sample
- C FH Control
- D Patient #1 DNA Sample
- E Patient #2 DNA Sample
- F Patient #3 DNA Sample

UltraSpec-Agarose

Electrophoresis buffer (50x)

Practice Gel Loading Solution

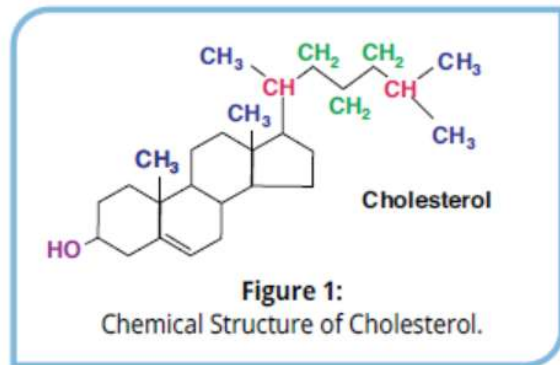
FlashBlue DNA stain

필요 장비 및 준비물

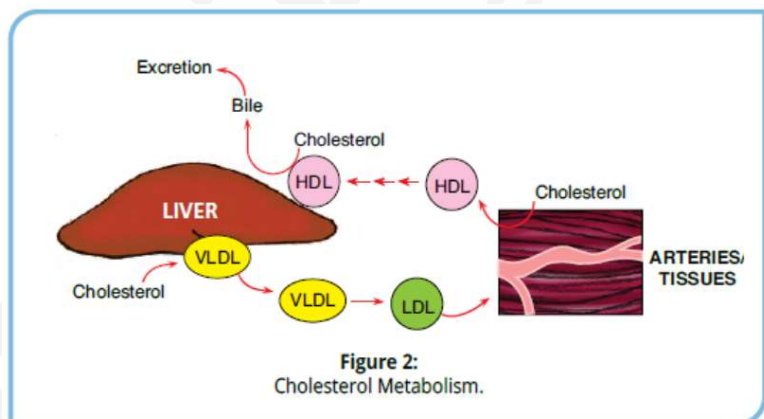
전기영동 장치, 전원공급장치, 피펫과 피펫팁, 전자저울, 전자레인지(핫플레이트), 250mL삼각플라스틱, 안전장갑, 증류수, 염색용 트레이

배경 지식

콜레스테롤은 모든 동물 세포의 생존에 필수적인 복잡한 지질입니다. 그 주요 기능은 플라스마 (plasma) 및 오르가넬라(organelle) 막의 안정화입니다. Figure 1에 나와있는 콜레스테롤의 구조는 테스토스테론 및 에스트로겐과 같은 스테로이드 호르몬에서 발견되는 4개의 고리 뼈대를 보여줍니다. 콜레스테롤은 비타민D 및 지방의 소화를 촉진하는 담즙 염의 전구체 역할도 합니다.



콜레스테롤은 각 동물 세포의 생존에 필수적인 복잡한 지질입니다. 그 주된 기능은 플라스마 및 오르가넬라 멤브레인을 안정화하는 것입니다. 테스토스테론 및 에스트로겐과 같은 스테로이드 호르몬에서 발견되는 4개의 링 뼈대를 보여주는 구조(Figure 1)로 나타냅니다. 콜레스테롤은 비타민D 및 장에서 지질 소화를 용이하게 하는 담즙 염의 전구체로도 사용됩니다. 콜레스테롤은 간에서 합성되며 섭취한 음식에서 장으로 흡수됩니다. 지방방울 입자라고도 알려진 지질단백질 입자를 통해 체액에서 순환됩니다. 이 지질단백질은 경사력 원심분리법에 의해 결정된 밀도에 따라 분류됩니다. 간에서 처리된 콜레스테롤은 혈액 내에서 저밀도 지질단백질 (low-density lipoproteins-LDL)으로 형성되기 위해 매우 저밀도 지질단백질 (VLDL)로 포장됩니다. 고밀도 지질단백질 (High-density



lipoproteins- HDL)은 LDL과 주변 조직에서 콜레스테롤을 흡수하여 간으로 되돌려 보내거나 배출합니다(그림 2). HDL은 순환 내 콜레스테롤을 제거하기 때문에 "좋은 콜레스테롤"로 자주 언급됩니다. 반면, LDL은 간에서 동맥으로 콜레스테롤을 운반하므로 "나쁜 콜레스테롤"로 불리기도 합니다.

Lipoproteins- HDL)은 LDL과 주변 조직에서 콜레스테롤을 흡수하여 간으로 되돌려 보내거나 배출합니다(그림 2). HDL은 순환 내 콜레스테롤을 제거하기 때문에 "좋은 콜레스테롤"로 자주 언급됩니다. 반면, LDL은 간에서 동맥으로 콜레스테롤을 운반하므로 "나쁜 콜레스테롤"로 불리기도 합니다.

콜레스테롤은 생명에 필수적이지만, 혈중 콜레스테롤 과잉은 심각한 부정적 영향을 미칠 수 있습니다. 높은 혈중 콜레스테롤(특히 LDL)이 심혈관 질환과의 관련성은 잘 알려져 있습니다. LDL 은 동맥 벽에 축적될 수 있으며, 동맥 벽막에서 방출된 자유 라디칼 분자들에 의해 산화됩니다. 이 산화 과정은 염증 세포의 축적으로 이어지며, 이는 지질 물질인 플라크의

형성으로 이어집니다. 플라크의 축적은 결국 심장 또는 뇌로의 혈액 공급을 제한하여 심근경색 또는 뇌졸중을 유발할 수 있습니다.

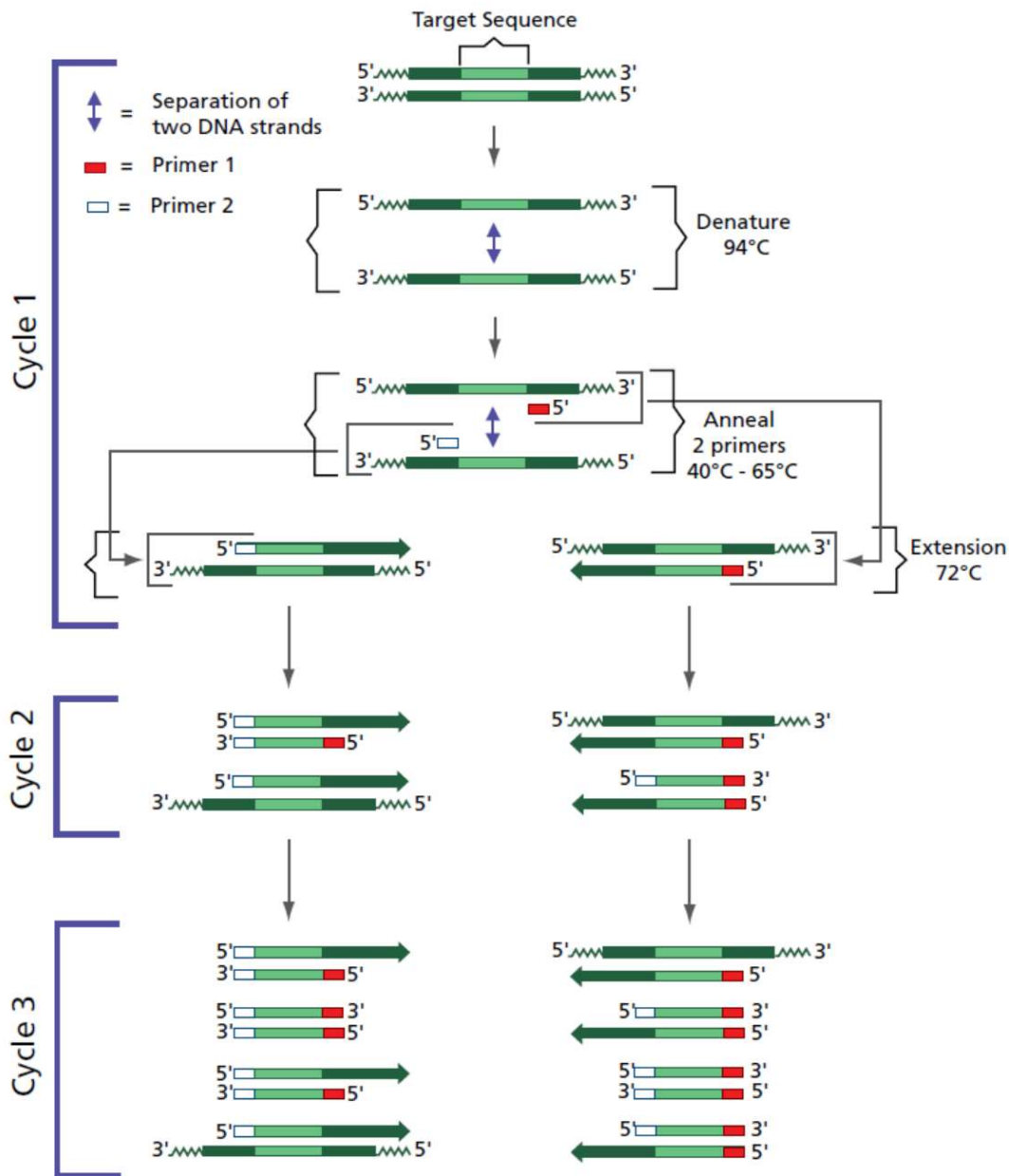


Figure 3:
DNA Amplification by the Polymerase
Chain Reaction

위에서 언급한 대로, 대부분의 순환 콜레스테롤은 LDL 입자에서 발견됩니다. 동물 세포는 특정 수용체를 통해 순환혈액 속의 LDL 입자를 흡수합니다. 친인자간 고콜레스테롤혈증(familial hypercholesterolemia, FH)이라는 상태의 개인들은 LDL 수용체에 대한 유전자 돌연변이를 지니고 있으며, 따라서 효율적으로 LDL 을 순환혈액에서 제거할 수 없습니다. 이러한 수용체 결핍으로 인해 LDL 은 순환혈액 속에 유지되고 동맥벽에 축적됩니다. 이 돌연변이의 염색체가 다른 환자는 여전히 하나의 기능적인 유전자를 가지고 있기 때문에 비영향자들보다 50%의 수용체 수준을

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

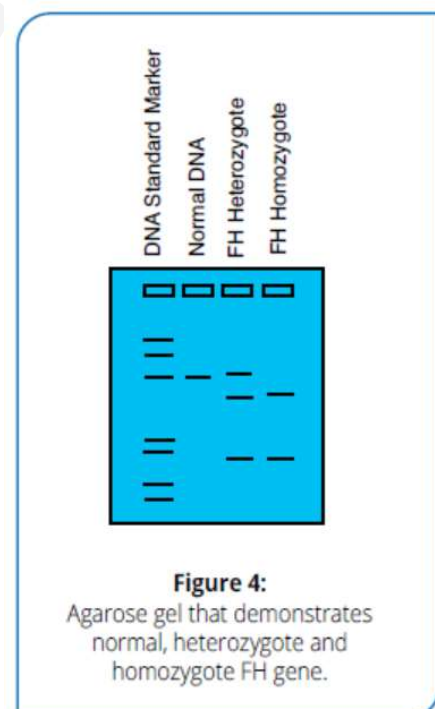
보유하게 됩니다. 그러나 이 돌연변이에 대해 이형증인 환자는 완전히 LDL 수용체가 결여되어 있으며, 따라서 혈중 콜레스테롤 수치가 매우 높아져 종종 혈청 100 ml 당 600 mg 이상으로 측정됩니다(혈청 100 ml 당 150-200 mg 는 정상적으로 간주됩니다). 이러한 환자들은 치료를 받지 않으면 심장동맥질환으로 어린 시절에 사망할 가능성이 높습니다.

FH 는 FH 유전자의 수백 가지 다른 돌연변이 중 하나로 인해 발생합니다. 그러나 일부 인종군에서는 한 가지 돌연변이로 전달될 수 있습니다. 이 돌연변이는 Polymerase Chain Reaction (PCR) 및 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 분석과 같은 유전학적 진단의 조합으로 감지될 수 있습니다.

PCR 에서는 보통 질병 유발 유전자 내부나 인근 특정 영역을 우선 증폭합니다. PCR(Figure 3)은 Taq DNA polymerase 라는 효소를 사용합니다. 이 효소는 온천에서 발견되는 세균에서 정제된 것으로, 고온에서 안정적입니다. PCR 의 첫 번째 단계(denaturation)에서는 DNA 보조 가닥이 94°C 에서 분리되지만 Taq DNA polymerase 는 안정적인 상태를 유지합니다. 두 번째 단계(annealing)에서는 샘플이 42°C 에서 65°C 사이의 온도로 냉각됩니다. 이 "냉각"은 "프라이머"라고 하는 두 개의 작은 (15-30) 합성 올리고뉴클레오티드가 대상 영역에 결합되도록 합니다. 이 실험에서 대상은 FH 유전자입니다. 세 번째 단계(extension)에서는 온도가 72°C 로 올라가면서 Taq DNA 폴리머라아제가 프라이머에 뉴클레오티드를 첨가하여 대상의 새로운 보조 가닥을 완성합니다. 이 세 단계는 하나의 PCR "주기"를 구성합니다. 이 과정은 일반적으로 25-40 회사이클을 반복하여 대상을 지수적으로 증폭합니다(Figure 3). PCR 은 각 단계별 지정된 온도에서 PCR 반응을 가열하거나 냉각하는 방식으로 작동하는 PCR(thermal cycler)에서 수행됩니다.

일반적으로, 유전자 내 특정 영역의 PCR 후 증폭된 DNA 는 RFLP 분석을 통해 더 자세히 조사됩니다. RFLP 는 질병 환자와 건강한 개인 간에 특정 DNA 영역 내 제한 효소 부위 수의 차이를 나타냅니다. 증폭된 DNA 는 특정 제한 효소로 소화됩니다. 만약 환자가 LDL 수용체 유전자의 돌연변이를 가지고 있다면, 소화 패턴은 비정상적인 개인과 달라질 것입니다.

이 실험에서는 FH 돌연변이에 대해 세 명의 환자로부터 시뮬레이션 된 DNA 샘플이 분석됩니다. 각 샘플은 이전에 증폭되고 제한 효소로 소화되어 아가로스 겔 전기영동을 위해 준비가 되어 있습니다. 염색된 겔에서는 환자가 정상인지, 이형접합자인지, 동형접합자인지를 결정할 수 있습니다. 돌연변이에 대해 이형 접합자인 환자의 DNA 는 그림 4 와 같이 정상적인 돌연변이와 돌연변이가 하나씩 나타납니다. 돌연변이에 대해 동형 접합자인 환자는 두 개의 돌연변이를 가지게 됩니다.

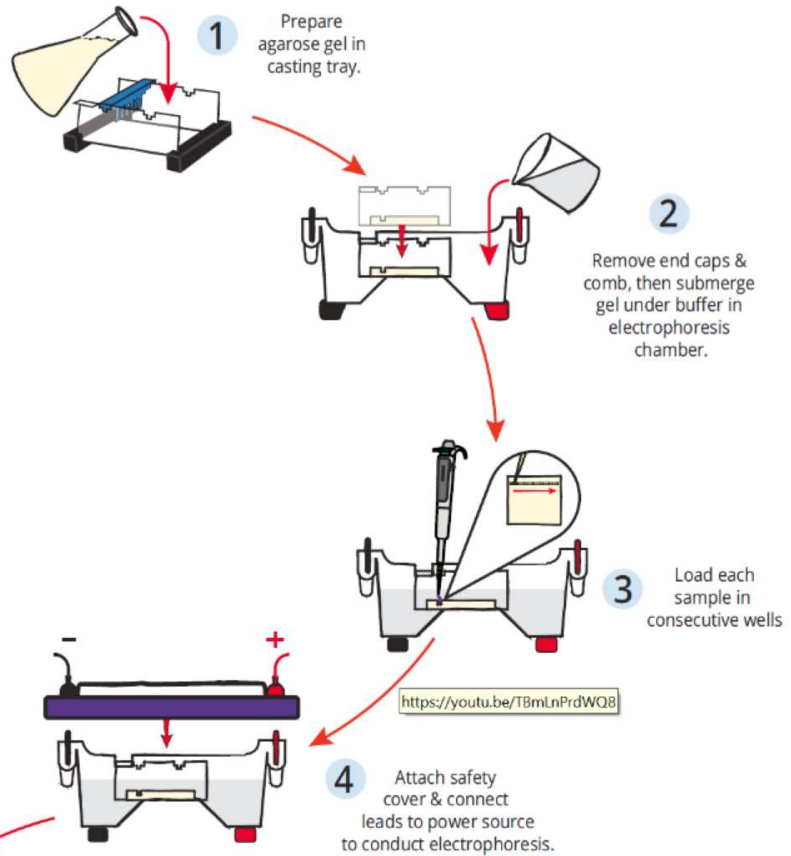


★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

전체 실험 개요

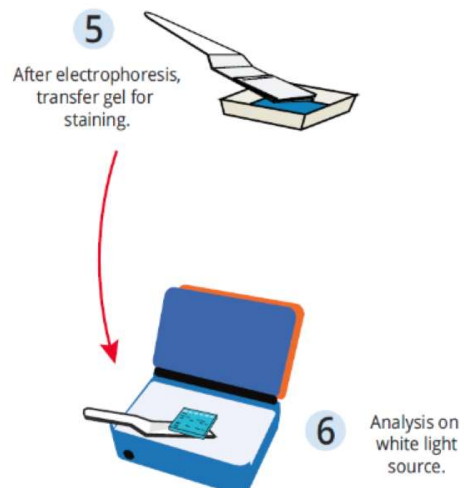
MODULE I: Agarose Gel Electrophoresis

Time required: See Table C

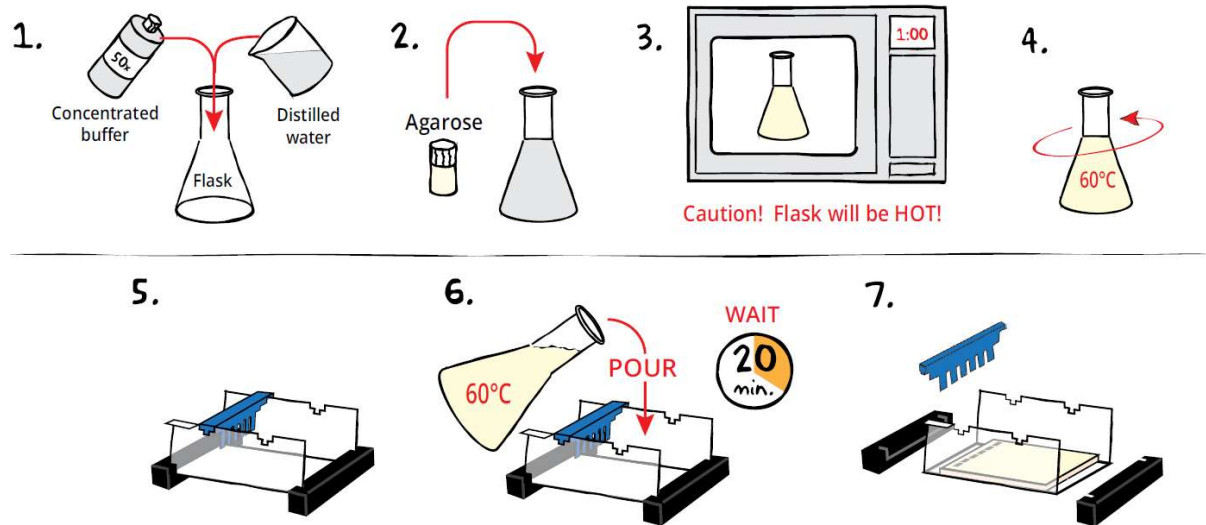


MODULE II: Staining Agarose Gels Using FlashBlue™

Time required: 30 min.



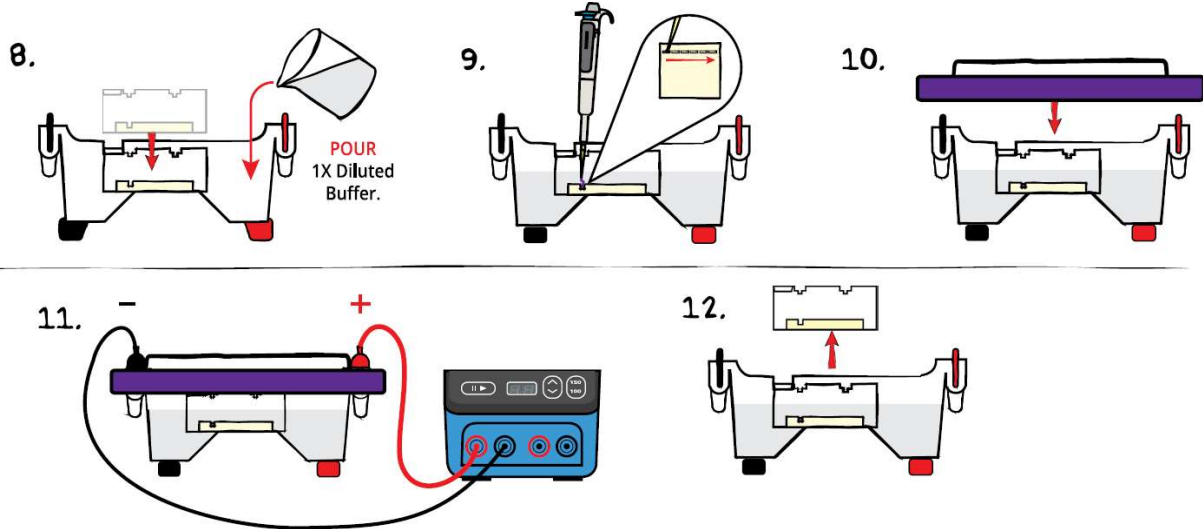
아가로스 겔 전기영동



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.

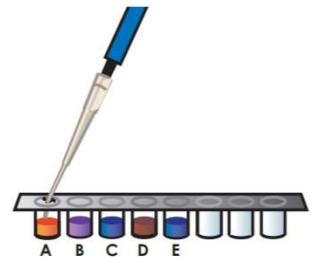


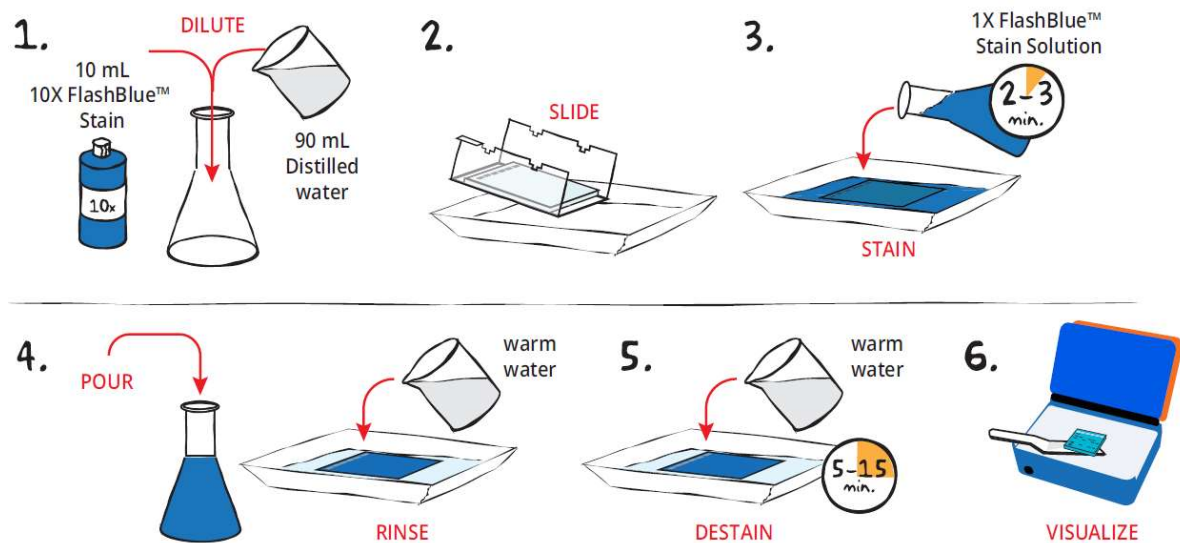
TABLE 1: GEL LOADING		
Lane 1	Tube A	DNA Standard Marker
2	Tube B	Normal DNA Sample
3	Tube C	FH Control
4	Tube D	Patient #1 DNA Sample
5	Tube E	Patient #2 DNA Sample
6	Tube F	Patient #3 DNA Sample

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

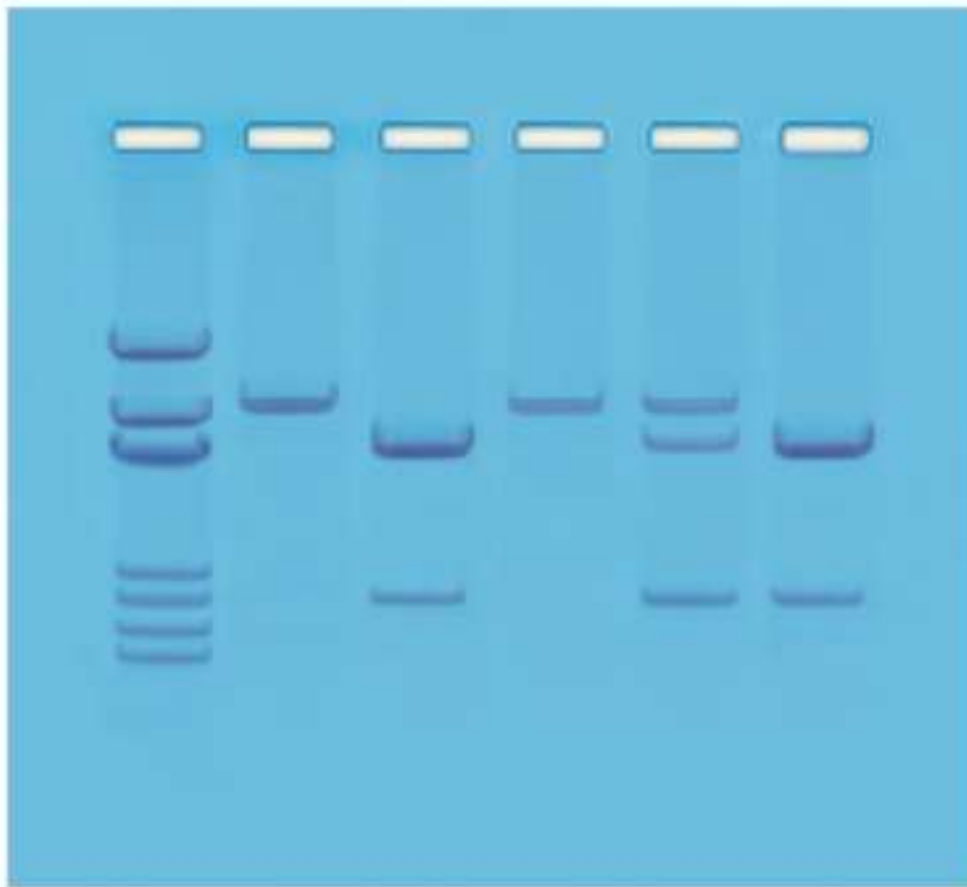
★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

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	Result	Molecular Weights (in bp)
1	A	DNA Standard Markers	-----	6751, 3652, 2827, 1568 1118, 825, 630
2	B	Normal Control Sample	FH Normal	4282
3	C	FH Control	Homozygous for FH mutation	3000, 1282
4	D	Patient #1	FH Normal	4282
5	E	Patient #2	Heterozygous for FH mutation	4282, 3000, 1282
6	F	Patient #3	Homozygous for FH mutation	3000, 1282

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