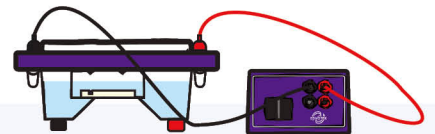


플라스미드 DNA의 소량 분리

Mini-Prep Isolation of Plasmid DNA

ED202



실험 목표

이 실험은 세균 세포로부터 플라스미드 DNA 추출의 원리를 소개하는 것입니다. 학생들에게 플라스미드 DNA의 구조와 기능에 대한 이해를 도와줍니다.

제품 구성품

튜브	시약	보관방법
	Plasmid Extraction LyphoCells™	-20°C 냉동보관
A	Tris Buffer concentrate	실온보관
B	Sodium Hydroxide solution	실온보관
C	SDS solution (Sodium dodecyl sulfate, 10%)	실온보관
D	Resuspension buffer	실온보관
E	Potassium Acetate solution	실온보관
F	RNase solution	실온보관

시약 (실온보관)

10X Gel Loading Solution

Practice Gel Loading Solution

UltraSpec-Agarose

Electrophoresis Buffer (50x)

FlashBlue DNA stain

SYBR Safe Stain

Microtest tubes with attached caps

필요 장비 및 준비물

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

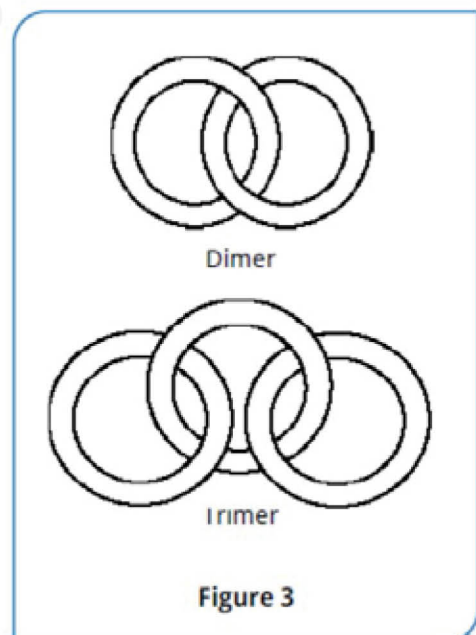
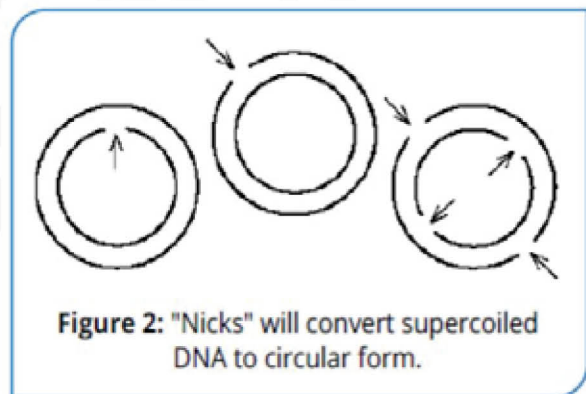
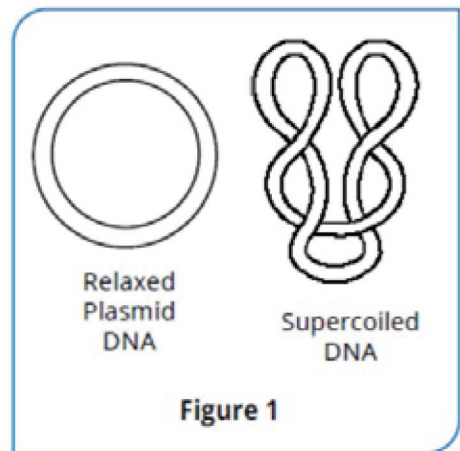
원심분리기, 95-100% Isopropanol, 70% 에탄올

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

배경지식

다양한 종류의 박테리아는 플라스미드 DNA 를 포함하고 있습니다. 플라스미드는 일반적으로 1,000 에서 100,000 개의 염기 서열을 포함하는 외부염색체이며, 이 중 가장 큰 플라스미드라도 박테리아의 염색체 DNA 보다 훨씬 작습니다. 특정 플라스미드는 염색체 DNA 와 독립적으로 복제되며 세포 당 수백 개의 사본이 존재할 수 있습니다. 다양한 유전자가 플라스미드에서 발견되었습니다. 이 중 일부는 항생제 저항성 및 제한 효소를 암호화합니다. 플라스미드는 외부 유전자를 복제하는 데 유용하기 때문에 분자 클로닝에서 매우 중요한 도구입니다. 이러한 용도로 플라스미드를 사용할 때는 벡터라고 합니다. 재조합 DNA 기술을 이용하여 수백 개의 인공 벡터가 자연적으로 발생하는 플라스미드 요소로부터 구성되었습니다. 이러한 벡터들은 특정 실험적 문제 해결에 유용한 특수한 속성을 가지고 있습니다. 예를 들어, 많은 플라스미드 벡터에는 합성 올리고뉴클레오타이드 링커가 포함되어 있습니다. 이러한 링커에는 다양한 제한효소 인식부위가 있어 외부 DNA 삽입이 쉬워집니다. 이러한 링커는 일반적으로 특성 마커 유전자나 고효율 전사 조절자 근처에 배치되며, 둘 다 클론된 DNA 의 분리 및 발현에 도움을 줍니다.

플라스미드 DNA 는 자연적으로 supercoiled 분자로 존재합니다. 이것은 두 개의 DNA 염기사슬이 서로 감긴 정도가 변경되어 발생합니다. 분자의 특정 영역에서는 DNA 염기사슬이 non-supercoiled DNA 보다 적게 감겨 있습니다. 이러한 변경으로 인해 발생하는 strain 은 DNA 의 변형을 야기합니다. 이러한 변형은 일부로 인해 strain 을 완화시키고 궁극적으로 초코일링으로 이어집니다. 초코일링된 DNA 는 자신에게 접힌 구조를 가지며 완화된 DNA 보다 더 밀집하고 뒤엉킨 구조를 가지고 있습니다. 초코일링에 대한



비유로는 고무줄을 생각해 볼 수 있습니다. 고무줄을 비틀면 결국 뒤엉킨 공처럼 말려들게 됩니다.

정제된 DNA 는 고리 형태로 존재하여 수퍼코일링이 발생할 수 있습니다. 수퍼코일링이 발생한 플라스미드 DNA 를 일반적으로 Form I DNA 라고 합니다. 세포 내에서 수퍼코일링은 DNA 지르아제라는 효소들에 의해 유발됩니다. 이 효소들은 ATP 의 화학 에너지를 이용하여 느슨한 분자에 수퍼코일링을 도입합니다. 또한, 수퍼코일링을 푸는 효소도 존재하며, 이러한 효소들은 언바인딩(unwinding) 또는 릴렉싱(relaxing) 효소라고 합니다. 수퍼코일링은 중요한 생물학적 영향을 미칩니다. 매우 큰 DNA 분자는 수퍼코일링이 없으면 세포 내에 맞출 수 없을 것입니다. 또한, 수퍼코일링은 유전자 발현에 영향을 미칠 수 있습니다.

슈퍼코일된 DNA 의 백본 어디에서든 하나 이상의 인산 결합이 깨어지면, 분자는 열린 원형 DNA 또는 Form II DNA 로 완화된 형태로 풀리게 됩니다. 이 인산 결합의 깨어짐을 닉(nick)이라고 부릅니다. 닉(nick)된 이중 가닥 DNA 는 공유 결합되어 있지 않습니다.

닉이 발생한 DNA 의 두 염색체는 여전히 염기들 간의 수소 결합으로 연결되어 있습니다. 시간이 지남에 따라, 정제된 supercoiled DNA 는 천천히 닉이 생기며 형태 II 로 전환됩니다. 이는 supercoiled DNA 가 릴렉스 또는 열린 원형 형태보다 안정성이 떨어지기 때문입니다. DNase I 와 같은 엔도뉴클레아제는 소량으로 사용될 때 supercoiled DNA 를 무작위로 닉을 발생시킵니다. 닉은 플라스미드 정제 중 기계적 조작으로도 발생할 수 있습니다.

복제과정에서 같은 플라스미드 분자들이 상호 작용하여 서로 엮인 링 형태로 형성될 수 있습니다. 이러한 플라스미드의 다중체를 케테난(catenane)이라고 합니다. 같은 플라스미드 분자 2 개를 포함하는 케테난을 이중체(dimer)라고 하며, 3 개 또는 4 개의 분자를 포함하는 케테난은 각각 삼중체(trimer)와 사중체(tetramer)라고 합니다. 케테난 안의 각각의 플라스미드 분자는 슈퍼코일링 될 수 있지만, 명확성을 위해 보통 이완된 원형(relaxed circle)으로 나타냅니다.

Supercoiled > linear > Nicked Circles > dimer > trimer > etc.

플라스미드의 다른 형태들 중에서 슈퍼코일드 DNA 가 가장 빠른 이동율을 가집니다. 이번 플라스미드 추출 실험에서는, 전이 RNA 와 소화된 리보솜 및 메신저 RNA 으로 이루어진 일부 잔여 분해 RNA 이 있을 것입니다. 분해된 RNA 는 크기가 작기 때문에 슈퍼코일드 플라스미드 DNA 보다 더 빠른 이동율을 가집니다.

이 실험의 시작에서는 RNase 와 세포 용해용액이 분산된 세균 세포에 첨가됩니다. RNase 는 강한 단백질이므로 이러한 조건에서도 생존합니다. 세포 용해용액에는 세포막을 용해시키고 단백질을 변성시키는 계면활성제인 소듐 도데실설페이트(SDS)가 포함되어 있습니다. 이 용액은 소듐 하이드록사이드가 존재하여 매우 알칼리성 (pH > 12)입니다. 높은 pH 는 단백질을 변성시키고 RNA 의 인산 결합을 가르는 데 도움을 줍니다. 이로 인해 플라스미드 정제 과정에서 고분자 ★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

크기의 RNA 로 인한 간섭이 제거됩니다. 고알칼리 조건에서, 선형 염색체 DNA 의 단편, 이완 및 닉 형태의 원형 DNA 는 두 개의 염기 서열이 분리되어 용액에서 일부 제거됩니다. 그러나 이는 슈퍼코일 형태의 플라스미드 DNA 에서는 일어나지 않습니다. 슈퍼코일 형태에서는 두 개의 염기 서열이 서로 얽혀서 분리되지 않게 엮여있기 때문입니다.

The potassium acetate neutralization buffer 는 식초산과 포타슘 염을 함유합니다. 산성 버퍼는 나트륨 하이드록사이드에 의해 생성된 알칼리 조건을 중화시킵니다. 포타슘은 막 단편과 단백질로 이루어진 SDS 를 침전시킵니다. E. coli 의 염색체 DNA 는 여러 지점에서 세포막에 부착되어 있습니다. 따라서, 포타슘-SDS-막 복합체를 원심분리하면 상당량의 포획된 염색체 DNA 도 제거됩니다.

Isopropanol 을 첨가하면 플라스미드와 남아 있는 RNA 이 침전합니다. RNase 용 희석 버퍼 농축액인 Tris 버퍼를 사용하여 DNA 침전물을 농도를 높여 재분산합니다. 이 버퍼에는 RNA 를 더 분해하는 효소인 RNase 가 함유되어 있습니다. 농축된 겔 로딩용 용액은 전기영동 버퍼보다 더 농도가 높게 만들어 샘플이 잠수한 겔의 우묵에 침강하도록 합니다. 음이온화 된 파란색 트래킹 염료가 전기영동을 모니터링하고 샘플 로딩을 더욱 쉽게합니다.

이 실험에서는 E. coli 세포에서 3000 베이스 페어 플라스미드를 추출할 것입니다. 이 플라스미드의 제한 맵에는 Eco RI 의 단일 사이트가 있습니다. 이 효소로 소화하면 $3,000 \pm 300$ 뉴클레오타이드를 측정할 수 있는 단일 밴드가 생성됩니다. 플라스미드의 다양한 형태는 선형 형태로 변환됩니다.

모듈 I: 실험 전 준비

DNA 분리 (DNA Isolation)

생물 시료 및 시약의 일반적인 준비

- 배송 중 SDS 용액(튜브 C) 및 칼륨 아세테이트 중화 버퍼(튜브 E)의 구성 요소들이 용액에서 침전될 수 있습니다. 침전된 성분이 다시 용해될 때까지 용액을 녹입니다.

플라스미드 추출 LyphoCell 복원

실험 두 시간 이내에 준비:

1. Plasmid Extraction LyphoCell 병에 4.7mL 증류수를 넣습니다.
2. 모든 물질이 용해될 때까지 혼합합니다. 세포의 용액은 탁해 보일 것입니다.
3. 세포에 Tris 버퍼 농축액(튜브 A) 0.5 mL 을 첨가합니다. 뚜껑을 닫고 잘 섞어줍니다.
4. 복원된 세포 용액을 20 개의 원심분리기튜브 각각에 0.2 mL 씩 분주합니다.
5. 필요할 때까지 세포를 얼음 위에 둡니다.

주의: 플라스미드 추출 Lyphocell 의 복원은 실험실에서 2 시간 이내에 수행되어야 합니다. 다른 시약은 실험실 당일 언제든지 준비할 수 있습니다

다음 실험 시약들은 조마다 줄 수 있습니다. 또는 학생들은 원액에서 직접 시약을 계량할 수 있습니다. 각각의 시약에 대해 지정된 1 mL 로 설정된 피펫을 사용하세요.

1. Resuspension Buffer (튜브 D)를 각 학생 그룹에 1 mL 씩 줍니다. 이 5 개의 튜브에 "Resuspension Buffer"라고 씁니다.
2. 세포 용해 용액의 준비
 - 비커에 Sodium Hydroxide Solution (튜브 B) 전체를 8 mL 증류수에 첨가합니다.
 - SDS 용액 (튜브 C) 전체를 추가합니다. 혼합합니다.
 - 이것을 "Cell Lysis Solution"으로 라벨링하고 실온에서 보관합니다.
 - 각 학생 그룹에 1.6 mL 씩 배치하세요. 이 5 개의 튜브에 라벨을 붙여 "Lysis Solution"이라고 씁니다.

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

3. 학생 그룹마다 1mL 의 Potassium Acetate Solution(튜브 E)을 분주하고, 5 개의 각 튜브에 "Potassium Acetate"라고 적습니다.
4. 1X TE 용액의 제조
Tris 버퍼 농축액(튜브 A) 1mL 을 9mL 증류수에 넣고 잘 섞습니다. 학생 그룹마다 400μL 씩 분주하고, 각 튜브에 "1X TE"라고 적습니다.
5. 학생 그룹마다 20μL 의 RNase 용액(튜브 F)을 분주하고, 각 튜브에 "RNase"라고 적습니다.
6. 2mL isopropanol 용액을 5 개의 튜브에 분주하고, 각 튜브에 "isopropanol"이라고 적습니다.
7. 1.5mL 의 에탄올을 5 개의 튜브에 분주하고, 각 튜브에 "에탄올"이라고 레이블을 붙입니다.
8. 5 개의 튜브에 각각 50μL 의 10x Gel Loading Solution 을 분주하고, 각 튜브에 "10X Gel"이라고 표기합니다.

모듈 I 을 위한 각 조별 받아야하는 시약

0.2mL Resuspended cell 이 담긴 튜브 1 개

스크류캡이 달린 1.5mL 원심분리기 튜브 1 개

Resuspension Buffer	1 mL
Prepared Cell Lysis Solution	1.6 mL
Potassium Acetate Solution	1 mL
1X TE Solution	400 μL
95-100% Isopropanol	2 mL
70% Ethanol	1.5 mL
RNase Solution	20 μL
10X Gel Loading Solution	50 μL

모듈 II: 아가로스젤 준비

이 실험에서는 학생 그룹당 0.8% 아가로스 겔이 필요합니다. 충분한 시약이 제공되어 7 x 7 cm 겔 8 개, 10 x 7 cm 겔 8 개 또는 14 x 7 cm 겔 4 개를 제작할 수 있습니다. 겔을 미리 준비하거나 학생들이 직접 준비할 수 있습니다. 이 과정에 대해 약 30 분 정도 소요됩니다.

4 명으로 구성된 실험 1 조는 각 학생당 샘플 2 개씩 준비됩니다. 7x7cm 겔 제작시 8 개의 well 이 있는 comb 을 이용해 굳힙니다. 총 8 개의 샘플을 1 장의 겔에 로딩 할 수 있습니다.

Quick Reference for EDVO-Kit #202			
Size of gel casting tray	Groups per gel	Placement of comb	Wells required per group
7 x 7 cm	2 - 3 groups	1st set of notches	2
10 x 7 cm	2 - 3 groups	1st set of notches	2
14 x 7 cm	4 - 6 groups	1st and 3rd sets of notches	2

*겔 트레이에는 comb 을 결합하는 홈(notch)위치가 위쪽과 가운데쪽에 있습니다. 제작하는 겔과 필요한 well 의 개수에 맞게 위의 표에서처럼 선택합니다.

개별 겔 제작

각 학생은 실험을 수행하기 전 각자 개별 겔을 만들어야 합니다. 학생 실험 절차에서의 모듈 II 을 참조하세요. 학생들은 50 배 농도의 버퍼, 증류수, 아가로스 분말 및 SYBR 염색액이 필요합니다.

일괄 겔 제작

시간을 절약하기 위해 수업에서 공유할 수 있는 더 많은 양의 아가로스 용액을 준비할 수 있습니다. 마지막 페이지 **부록 B** 를 참조하세요.

미리 겔을 준비하기

겔은 냉장고에서 최대 2 주까지 보관할 수 있습니다. 겔이 마르지 않도록 밀봉 가능한 봉지에 전기 영동용 버퍼용액 1-2 mL 을 넣어 보관하십시오. 과도한 용액은 SYBR® Safe 가 겔에서 확산되게 합니다. -20°C 에서 보관하지 마세요. 겔을 파괴할 수 있습니다. 트레이에서 제거된 겔은 트레이에 몇 방울의 용융 아가로스를 떨어뜨려 다시 고정시켜 주십시오. 이렇게 하면 겔이 트레이와 챔버에서 미끄러지는 것을 방지할 수 있습니다.

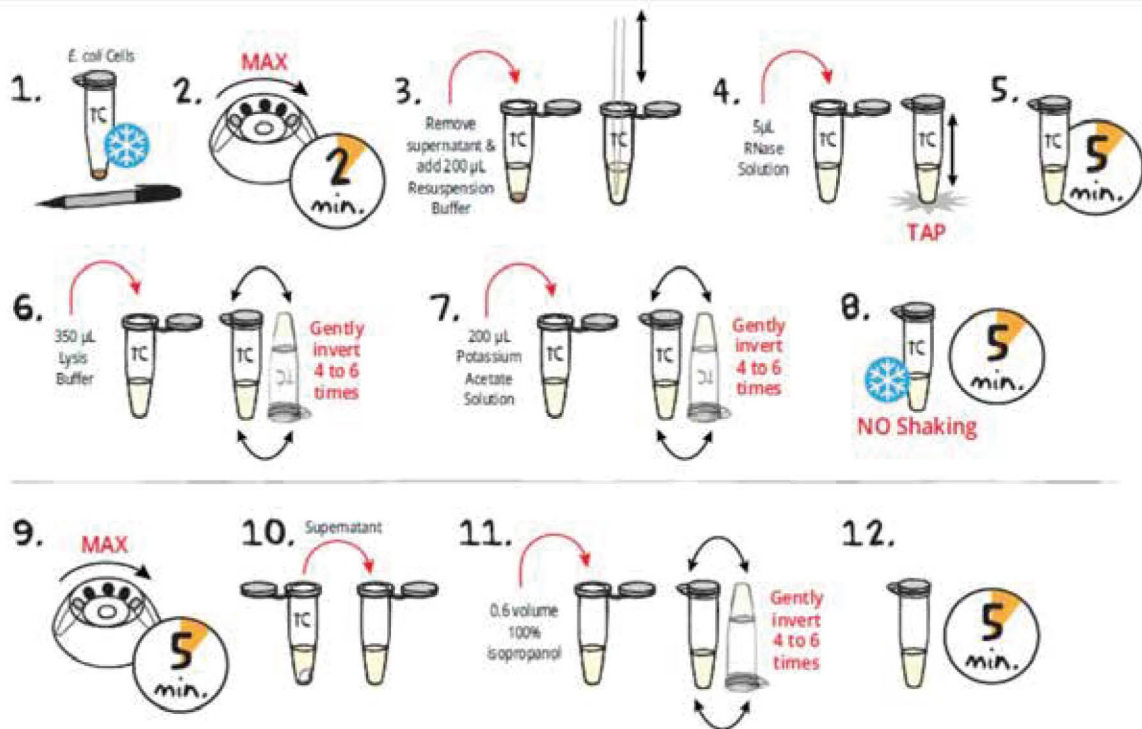
★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

모듈 III: 염색 준비

"FlashBlue™ 염료는 염색 및 탈색 단계에 필요한 시간을 단축시키도록 최적화되었습니다. 아가로스 젤은 희석된 FlashBlue™를 5 분간 염색하고 20 분만에 탈색 할 수 있습니다. 최상의 결과를 얻으려면 젤을 염료에 하룻밤 놔두십시오. 이렇게하면 염색된 젤이 탈색용 용액에서 "균형"을 이루어 균일한 밝은 파란색 배경과 대조되는 짙은 파란색 DNA 밴드가 생깁니다. FlashBlue™로 염색된 젤을 잘보기 위해 White 트랜스일루미네이터 (Cat. ED552)를 권장합니다."

- 염색된 젤은 냉장 보관을 함으로써 몇 주간 탈색용 액체에 보관될 수 있지만 시간이 지남에 따라 밴드가 흐릿해질 수 있습니다. 이러한 경우 젤을 다시 염색하십시오.
- 탈색된 젤은 일반 폐기물 처리 시 버릴 수 있습니다. 탈색 용액은 배수로 버릴 수 있습니다

모듈 I: 플라스미드 DNA 추출



1. E. coli 세포가 든 원심분리기 튜브에 조별 번호를 표시하고 냉장고에 넣습니다.
2. 시료를 상온에서 2 분간 최대 속도(10,000-14,000 rpm)로 원심분리합니다.
3. 상층액을 제거하고, 200 µL 의 Resuspension Buffer 를 첨가 후 pipetting 으로 풀어줍니다.
- 4~5. RNase 용액 5µL 을 넣고, 튜브를 두드려 섞습니다. 5 분간 상온에서 인큐베이션합니다.
6. Lysis Buffer 350 µL 를 넣고, 뚜껑을 덮고 4~6 회 정도 부드럽게 뒤집어 섞습니다. 플라스미드 DNA 가 손상되지 않도록 샘플을 부드럽게 섞습니다.
7. Potassium Acetate 용액 200 µL 를 첨가하고, 뚜껑을 덮고 4~6 회 정도 천천히 뒤집어 섞습니다. 하얀 침전물이 생겨납니다.
8. 5 분간 얼음에 샘플을 인큐베이션하세요. 이 기간 동안 튜브를 흔들거나 움직이지 마세요.
9. 샘플을 상온에서 5 분간 최대 속도로 원심분리하세요.
10. 상층액을 하얀 세포 잔여물이 떨어지지 않도록 하여 새로운 원심분리기 튜브에 넣고 남은 펠렛이 든 튜브는 버립니다.
11. 상등액에 100% 이소프로판올(isopropanol)의 0.6 비율을 첨가하세요(즉, 1 mL 상등액에 0.6 mL 이소프로판올을 첨가하세요). 튜브를 4~6 회 뒤집어 부드럽게 섞어주세요.
12. 샘플을 상온에서 5 분간 인큐베이션하세요.

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

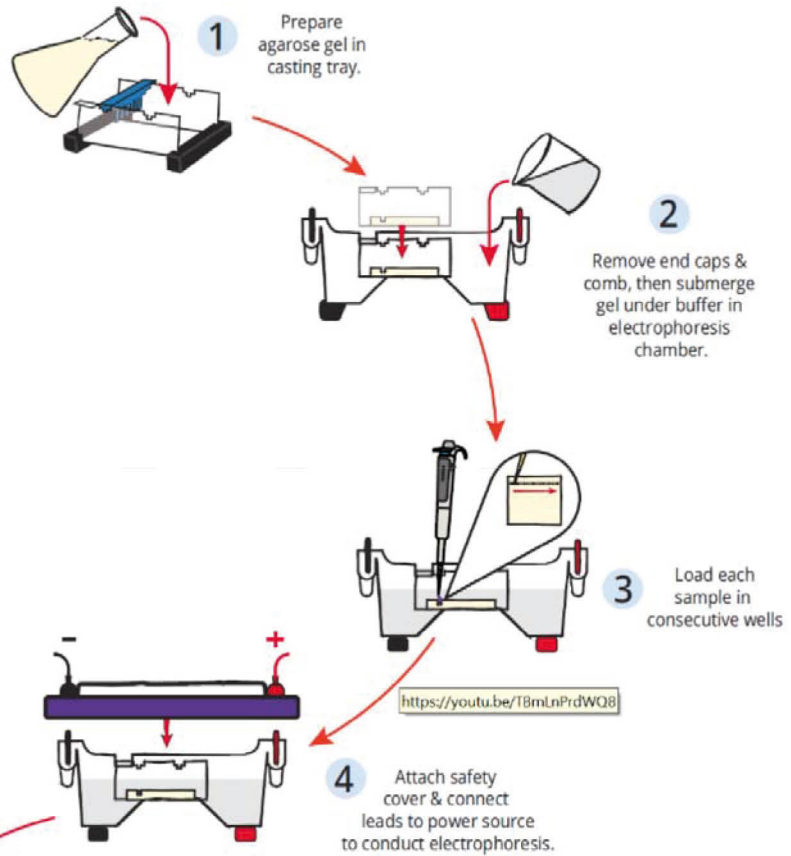


13. 원심분리기에 튜브 끝부분을 바깥쪽으로 향하도록 넣고, 최대 속도로 5 분 동안 돌립니다. 원심분리기 후, 침전한 플라스미드 DNA 는 튜브의 바닥에 작고 흰색으로 생성됩니다.
 14. 상등액을 제거하고 폐기하십시오. 펠릿 손실을 방지하기 위해, 상등액을 종이 수건에 부드럽게 부어서 처리하십시오.
 15. DNA 펠릿을 세척하기 위해 350 µL 의 차가운 70% 에탄올을 튜브에 넣고, 최대속력으로 3 분간 원심분리하십시오.
 16. 상등액을 제거하고, 잔류 에탄올을 제거하기 위해 5-10 분간 공기에 증발 건조하십시오.
 17. 60 µL 의 1x Tris-EDTA 버퍼에 침전물을 재분산시키십시오. 튜브를 뚜껑으로 덮고 흔들거나 섞어 혼합하십시오. 모든 내용물이 튜브 하단에 모이도록 잠시 원심분리하십시오. 이것이 정제된 플라스미드 DNA 입니다.
 18. 전기영동을 위해 정제된 플라스미드 DNA 를 준비하고 전기영동을 실시합니다.
 - a. 샘플 1: 농축된 플라스미드
 - 정제된 플라스미드 DNA 40 µL 을 새로운 마이크로센트리퓨지 튜브에 옮깁니다.
 - 젤 적재 용액 10 배 농도의 5 µL 을 튜브에 첨가합니다.
 - 이 튜브에 "S1"라고 레이블링하고 샘플을 얼음 위에 놓습니다.
 - b. 샘플 2: 희석된 플라스미드
 - 나머지 20 µL 의 정제된 플라스미드 튜브에 20 µL 의 1X TE 와 10X Gel Loading 용액 5 µL 을 첨가합니다.
 - 이 튜브에 "S2"라고 레이블링하고 샘플을 얼음 위에 놓습니다.
- ★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

전체 실험 개요

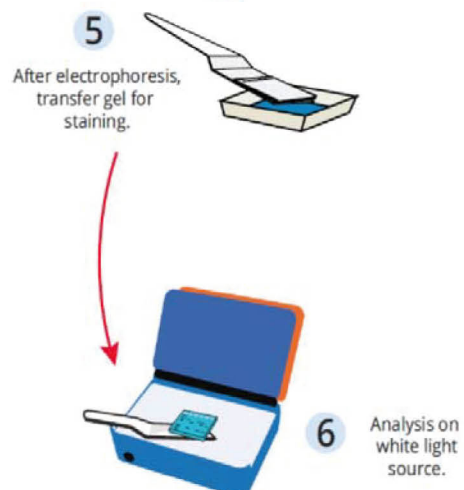
MODULE I: Agarose Gel Electrophoresis

Time required: See Table C

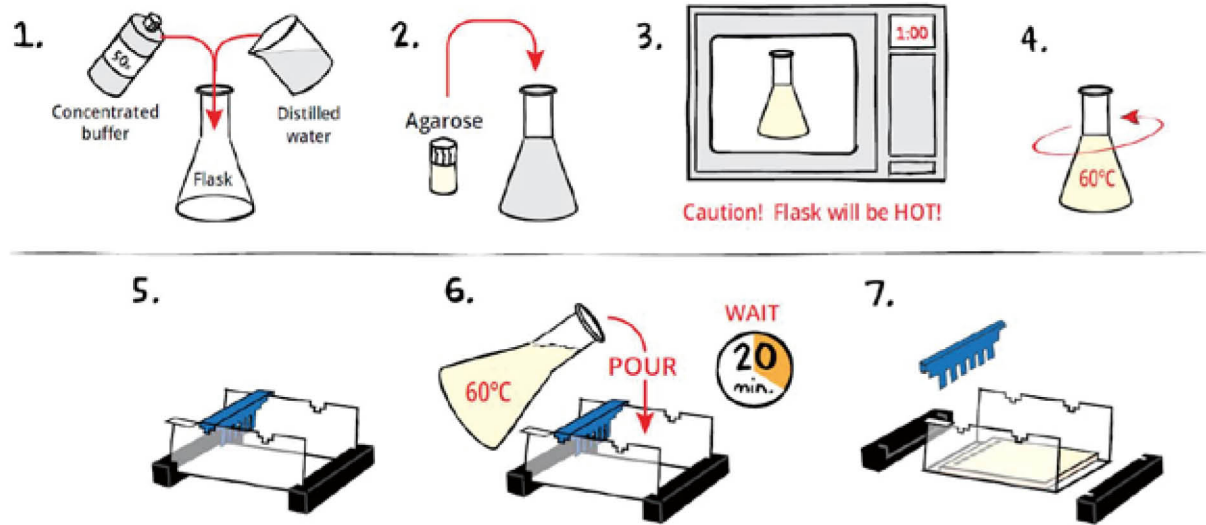


MODULE II: Staining Agarose Gels Using FlashBlue™

Time required: 30 min.



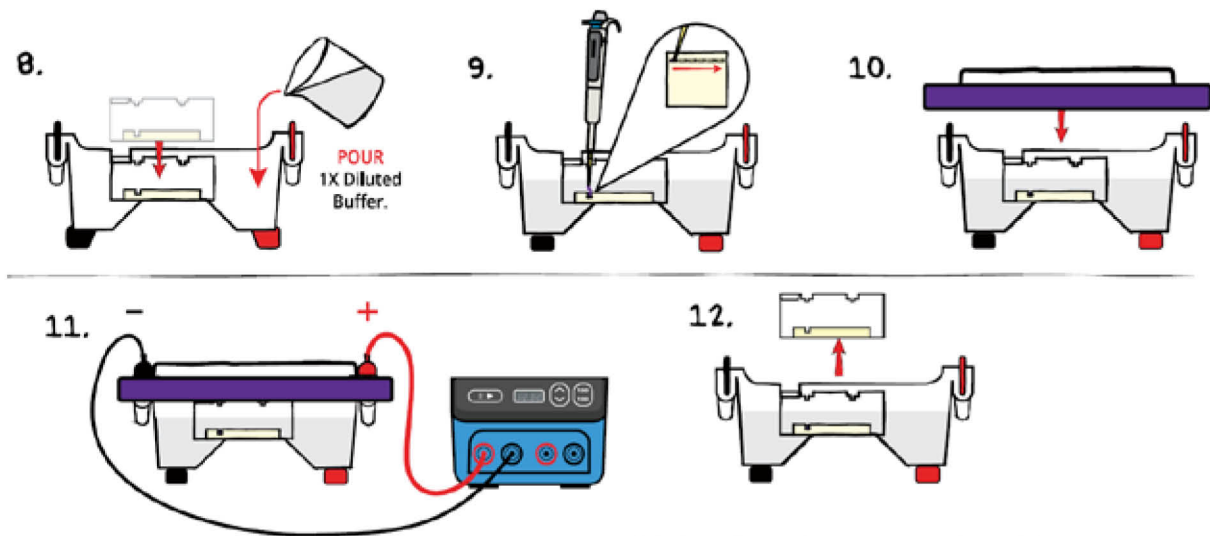
아가로스 겔 전기영동



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.

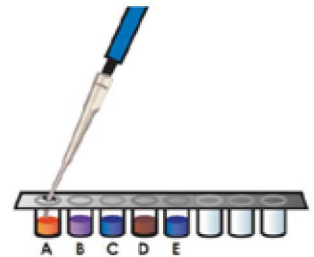


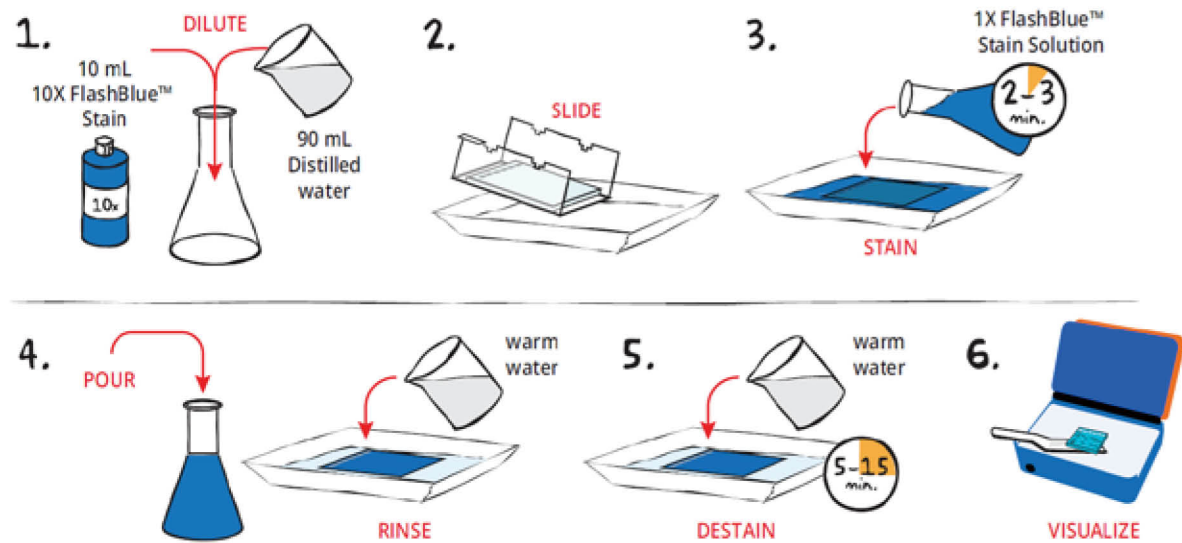
TABLE 1: Gel Loading	
Lane 1	Group 1 Concentrated Plasmid
2	Group 1 Diluted Plasmid
3	Group 2 Concentrated Plasmid
4	Group 2 Diluted Plasmid
5	Group 3 Concentrated Plasmid
6	Group 3 Diluted Plasmid

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

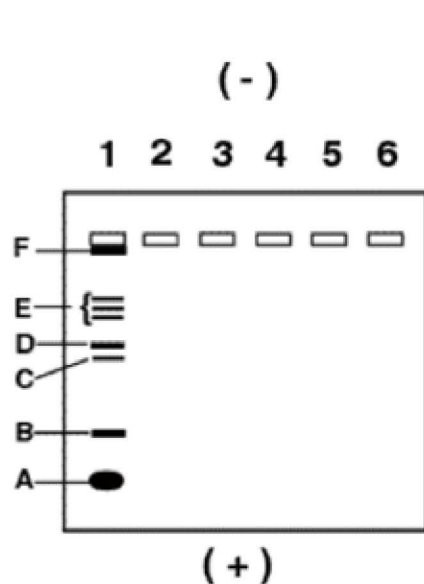


1. FlashBlue (10배 농축) 10ml와 증류수 90ml를 플라스크에 넣고 희석시킵니다.
2. 아가로스 겔과 캐스팅 트레이를 전기영동 장치에서 빼냅니다. 깨끗한 염색용 트레이 위에 겔만 미끄러뜨려 떨어뜨립니다.
3. 섞어놓은 Staining(염색)용액을 겔이 충분히 담길 정도로 붓고 2-3분간 놔둡니다. 3분을 넘어가게 되면 더 많은 destaining(탈색) 시간을 요구하게 됩니다.
4. FlashBlue를 다시 플라스크에 넣거나 겔을 다른 트레이로 옮긴 후 40~45°C 따뜻한 물로 20-30초간 부드럽게 헹군 후 물을 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.

연구질문

1. 플라스미드 DNA를 분리하는 이유는 무엇인가요?
2. 세포 용해 용액에서 sodium hydroxide와 SDS의 기능은 무엇인가요? Potassium acetate 용액의 기능은 무엇인가요?
3. 플라스미드 DNA의 어떤 구조적 특성으로 인해 염기성 세포 용해 동안 염색체 DNA로부터 분리될 수 있는가요?
4. 전기영동 및 염색 후 플라스미드 샘플에서 여러 개의 밴드가 관찰되었나요?

실험결과



Lane 1

- A Degraded RNA
- B Supercoiled plasmid
- C Nicked plasmid (may not be visible)
- D Plasmid dimer
- E Higher catenanes (may not be visible)
- F Residual chromosomal DNA (may not be visible)

왼쪽 그림은 이상적인 결과입니다. 1번 라인의 예제는 일부 추출물의 상대적인 위치를 보여줍니다. 학생들은 다른 밴드 구성물이 나올 수 있습니다.

만약 플라스미드 추출물이 제한효소 Eco RI로 잘린다면, $3,000 \pm 300$ 염기서열을 측정할 수 있는 단일 밴드가 생성됩니다. 다양한 형태의 플라스미드는 선형형태로 전환됩니다.

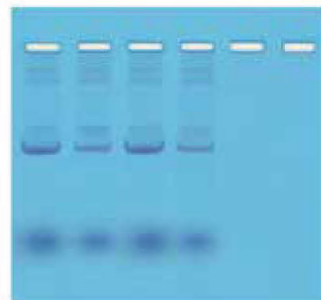
A 변화없음

B-E Eco RI에 의해 모두 잘리기에 단일 선형의 플라스미드

F 염색체 DNA에는 많은 Eco RI 부위가 있기에 젤에서 확산되거나 뭉치는 효과 때문에 덜 나타나거나 아예 안나타 날수도 있습니다.

이상적인 결과에서는 밴드의 상대적인 위치를 보여주지만 실체는 다릅니다.

Lane	Sample
1	Group 1 Concentrated Plasmid
2	Group 1 Diluted Plasmid
3	Group 2 Concentrated Plasmid
4	Group 2 Diluted Plasmid



부록 B

아가로스젤 대량 준비

실험시간을 아낄 수 있도록 선생님께서는 미리 대량의 버퍼와 아가로스젤을 만들어 놓으실 수 있습니다.

3리터 버퍼 제작

50X 버퍼 60mL + 2,940mL 증류수 = 3,000mL 1X 버퍼

0.8% 아가로스 젤

아가로스 파우더 3.0 g + 50X 버퍼 7.5mL + 증류수 367.5mL = 총 부피 375mL

1. 500mL 플라스크를 사용하여 희석된 젤 버퍼를 준비합니다.
2. 준비된 버퍼에 UltraSpec-Agarose™ 3.0 그램을 부어서 덩어리가 없도록 휘저어줍니다.
3. 마킹펜으로 용액의 부피 레벨을 플라스크 바깥면에 표시합니다.
4. 개별 젤 준비에 설명된 대로 아가로스 용액을 가열합니다. 총 용액 부피가 크기 때문에 가열 시간을 조정해야 할 수 있습니다.
5. 열이 고르게 분산되도록 휘저어가며 아가로스 용액을 60°C로 냉각합니다. 증발이 일어났다면, 단계 3에서 마킹했던 원래 용량에 도달하도록 증류수를 추가합니다.
6. 각 젤에 주어진 양의 냉각된 아가로스 용액을 따릅니다. 7 x 7 cm 트레이에는 30 mL, 10 x 7 cm 트레이에는 45 mL, 14 x 7 cm 트레이에는 60 mL를 측정합니다. 이 실험에서는 7 x 7 cm 젤을 권장합니다.
7. 젤이 완전히 굳어질 때까지 기다립니다. 약 20분 후에 딱딱해지고, 손으로 만졌을 때 차가워 집니다. 굳어진 젤은 냉장고에서 버퍼 아래에 최대 2주간 보관할 수 있습니다. 젤을 얼리지 마세요.