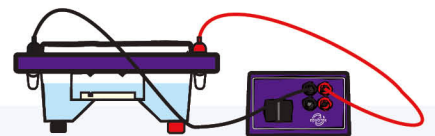


제한효소 지도 작성

Restriction Enzyme Mapping

ED206



☎ 02-929-1110 ✉ info@koreasci.com

🛒 www.koreasci.com

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

실험 목표

이 실험에서는, 여러 가지 조합으로 플라스미드 DNA가 제한효소에 의해 절단됩니다. 아가로스 젤 전기영동법을 사용하여 조각의 크기를 결정하고 제한효소 인식 부위의 상대적 위치를 매핑에 대해 탐구합니다.

제품 구성품

시약	보관방법
A Plasmid DNA for Restriction Digest	-20°C 냉동보관
B Restriction Enzyme Reaction Buffer	-20°C 냉동보관
C UltraPure Water	-20°C 냉동보관
D Restriction Enzyme Dilution Buffer	-20°C 냉동보관
E EcoRI Dryzyme	-20°C 냉동보관
F BamHI Dryzyme	-20°C 냉동보관
G DNA Standard Marker	-20°C 냉동보관

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), 250mL삼각플라스틱, 안전장갑, 증류수, 염색용 트레이, UV Transilluminator, 항온수조, 얼음

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

배경지식

분자생물학에서 가장 중요한 발견 중 하나는 제한효소라고 알려진 효소 종류입니다. 많은 종류의 박테리아가 침입하는 바이러스 DNA로부터 자신을 보호하기 위해 이러한 종류의 엔도뉴클레아제(endonuclease: 제한효소로도 알려져 있음)를 생성합니다. 제한효소는 분자가위처럼 작용하여 특정 서열에서 이중 가닥 DNA를 자릅니다. 제한효소는 분자 클로닝, DNA 매핑, 시퀀싱 및 다양한 유전체 전체 연구 등을 가능하게 하여 바이오테크놀로지 시대를 열었습니다.

1970 년대에 처음 발견된 이후로, 3,000 개 이상의 제한효소가 확인되었습니다. 각각은 처음 분리된 생물 종을 묘사하는 고유한 약어가 부여되었습니다. 약어의 첫 글자는 속의 첫 글자이고, 다음 두 글자는 해당 생물 종의 종 이름의 첫 두 글자입니다. 다른 글자와 숫자는 특정 균주와 발견 순서를 나타냅니다. 예를 들어, EcoRI 는 대장균 *Escherichia coli* 의 RY13 균주에서 처음 분리된 제한효소였습니다. (더 많은 예는 Table 1.에 표시되어 있습니다.)

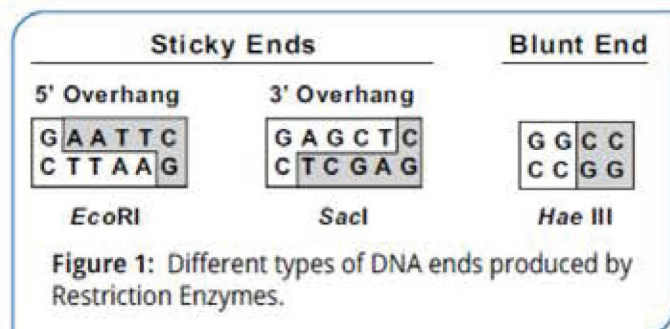
Restriction Enzyme	Genus	Species	Strain	Recognition Site
<i>Ava</i> I	<i>Anabaena</i>	<i>variabilis</i>	N/A	C [^] YCGUG
<i>Bgl</i> I	<i>Bacillus</i>	<i>globigii</i>	N/A	GCCNNNN [^] NGGC
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	RY 13	G [^] AATTC
<i>Hae</i> III	<i>Haemophilus</i>	<i>aegyptius</i>	n/a	GG [^] CC
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae</i>	R _d	A [^] AGCTT
<i>Sac</i> I	<i>Streptomyces</i>	<i>achromogenes</i>	n/a	GAGCT [^] C

많은 제한효소는 활성화를 위해 Mg²⁺가 필요하며, 일반적으로 4-8 염기쌍 길이의 회문적인 DNA 구간을 인식합니다. 특정 효소가 DNA 조각을 절단할 확률은 인식부위의 길이에 직접 비례합니다. 통계적으로, 효소는 인식부위의 길이를 나타내는 n 에 대해 4ⁿ 염기쌍마다 평균적으로 한 번 절단합니다. 예를 들어, 4 개 염기쌍 길이의 서열(예: HaeIII)을 인식하는 효소는 256(또는 2^{4^4}) 염기쌍마다 DNA를 한 번 자를 것입니다. 그러나 6 개 염기쌍 길이의 인식부위(예: EcoRI)를 가진 효소는 4096(또는 2^{4^6}) 염기쌍마다 한 번씩 자를 것입니다.

따라서 DNA 분자가 길수록 하나 이상의 제한효소 부위를 가질 확률이

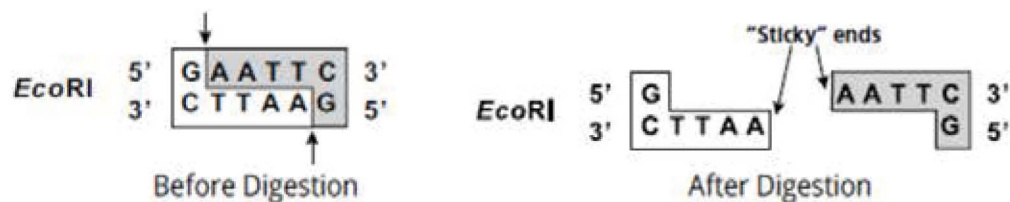
더 높습니다. 예를 들어, 인간 염색체 DNA(3 억 염기쌍)와 작은 세균 플라스미드(5,000 염기쌍)가

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



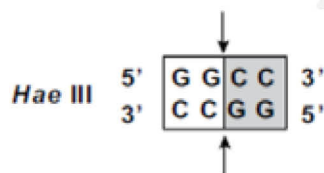
포함된 샘플을 EcoRI 로 소화한다고 가정해 봅시다. 이 효소는 염색체 DNA 를 700,000 회 이상 (3 억 염기쌍, 4096 염기쌍마다 자름) 자를 것이지만, 플라스미드는 한 번만 자를 것입니다 (5,000 염기쌍, 4096 염기쌍마다 자름).

제한효소에 의한 소화는 두 가지 유형의 DNA 끝 중 하나인 "스티키(sticky)" 또는 "끝(none)"으로 생성됩니다(Figure 1). 이를 설명하기 위해 먼저 EcoRI 의 인식부위와 절단 패턴을 살펴보겠습니다.

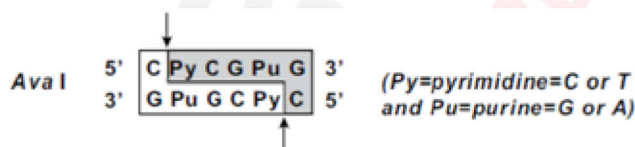


EcoRI 는 그림 왼쪽의 화살표에 표시된 대로 G 와 이웃하는 A 사이를 절단합니다. 중요한 점은 절단 위치가 교대되어 있으므로 결과적으로 단일 가닥의 상보적인 서열을 가진 짧은 돌출 부분을 만듭니다. 이러한 돌출 부분은 "스티키(sticky)" 끝이라고 불리며, 상보적인 서열을 가진 다른 돌출 부분과 상호작용하거나 "달라붙을" 수 있기 때문입니다. 같은 DNA 조각을 다른 효소로 소화하면 다른 길이와 가닥 방향(5'대 3')의 스티키 끝을 생성할 수 있습니다.

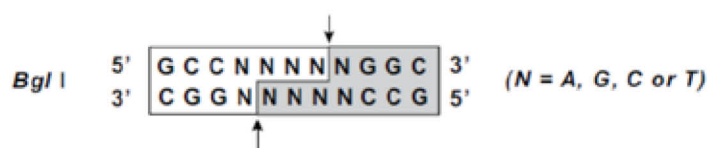
EcoRI 과는 달리, HaeIII 는 두 개의 DNA 가닥을 동일한 위치에서 절단하여 돌출 부분 없이 조각을 생성합니다. 이러한 끝을 "끝(none)"라고 하며, 서로 상보적이지 않아도 어떤 끝이든 상관없이 함께 결합시킬 수 있습니다.



AvaI 와 같은 일부 제한효소는 "변성(degenerate)" 부위를 인식하며, 이는 하나 이상의 가변 위치를 포함합니다.



따라서 AvaI 가 인식하고 절단할 수 있는 네 가지 가능한 부위는 CCCGGG, CCCGAG, CTCGGG 및 CTCGAG 입니다. BglI 와 같은 효소는 "hyphenated" 부위를 인식하는데, 이는 여러 가변적인 염기에서 분리된 회문적인 염기서열입니다.



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

BglII 가 인식하는 6 개의 G-C 염기쌍은 DNA 의 5 개 염기쌍으로 분리되어 있어야만 인식할 수 있으며, 그렇지 않으면 효소는 인산디에스터 결합을 절단할 수 없습니다. 이러한 염기쌍의 염기서열은 가변적이기 때문에, BglII 는 최대 1,024 개의 가능한 염기서열을 인식하고 절단할 수 있습니다!

지도 플라스미드에 제한효소 사용하기

제한효소 가닥부위의 위치는 분자 클로닝 실험에서 중요합니다. 이 정보는 재조합 DNA 구조물을 생성하는 것과 같은 하류 응용 분야에 매우 중요합니다. 제한효소를 이용하여 플라스미드 DNA 를 소화하면 인식 부위의 위치에 따라 길이가 다른 단편들이 생성됩니다. 이 기술은 분자의 "지도"를 작성하기 위해 생물공학 실험실에서 수행됩니다. 여러 제한효소로 플라스미드를 소화하면, 효소 부위 간의 상대적 거리를 결정할 수 있습니다.

예를 들어, A, B 및 C 세 가지 별도의 효소에 대한 단일 인식 부위를 포함하는 5000 개 베이스 페어 원형 플라스미드 DNA 가 있다고 가정해 봅시다. 효소가 플라스미드를 잘라내면 선형 DNA 분자가 생성됩니다. 이러한 효소의 다양한 조합은 다음과 같은 DNA 조각을 생성합니다(베이스 페어 단위).

A+B	A+C	B+C	A+B+C
4500	3000	3500	3000
500	2000	1500	1500
			500

이 데이터의 분석은 플라스미드 내 다양한 제한효소의 위치를 설명하는 지도를 작성합니다. 이 데이터를 분석하면, 우리는 효소 A와 B의 결합이 모든 이중 소화물 중 가장 작은 조각(500 bp)을 생성했음을 알 수 있습니다. 이는 B의 제한 부위가 A와 가장 가깝다는 것을 시사합니다. 다음으로, 나머지 두 이중 소화물을 검사해보면, 우리는 효소 A와 C의 제한 부위가 2000 베이스 페어 떨어져 있다는 것을 알 수 있습니다(Figure 2). 그리고 효소 B와 C의 제한 부위가 1500 베이스 페어 떨어져 있다는 것도 알 수 있습니다.

한 번 각 제한효소 간의 가장 짧은 상대적 거리를 결정하면, 해당 위치를 plasmid 내에서 할당할 수 있습니다. 시작점으로, 효소 A의 절단부위는 위치 0으로 지정되고, 효소 B의 절단부위는 위치 500으로 지정됩니다. 또한, 우리는 효소 C의 제한부위가 A와 B 사이에 있을 수 없음을 알고 있습니다. 왜냐하면 A+B+C로 삼중제한을 하면 500 베이스 페어의 조각이 남기 때문입니다.

다음으로, triple digest 에서의 데이터는 A+C digest 에서 발견된 2000 베이스 페어 조각이 1500 베이스 페어와 500 베이스 페어로 잘렸음을 보여줍니다. 이는 효소 B의 제한부위가 효소 A와 C의 제한부위 사이에 위치한 것으로 추정됩니다. 이러한 논리는 DNA 단편 크기를 기반으로한 맵의 작성을 가능케 합니다 (Figure 3).

A 에서 시계 방향으로 이동하면, A 와 B 사이의 거리는 500 bp 이고, B 와 C 사이의 거리는 1500 bp 이며, C 와 A 사이의 거리는 3000 bp 입니다 (Figure 3). 이 실험의 데이터는 절단 부위의 절대적인 방향을 알려주지는 않기 때문에, 그림 4 에 나와 있는 대안적인 지도가 나올 수 있습니다. 그러나 절단 부위 간의 상대적인 위치는 동일합니다(B 는 A 와 C 사이에 있음).

특정 실험 조건에서는 제한효소 소화 실험의 결과가 데이터 분석을 복잡하게 만들 수 있습니다. 충분한 양의 효소를 사용하지 않거나 반응을 짧게 중단하는 경우, 플라스미드 DNA 가 완전히 소화되지 않을 수 있습니다. 이러한 상황에서는 일부 제한효소 부위가 소화되지 않게 됩니다 (Figure 5). 일부 소화된 DNA 조각은 겔에서 추가 밴드를 생성할 수 있으며, 이는 제한효소 매핑 실험의 분석을 복잡하게 만들 수 있습니다.

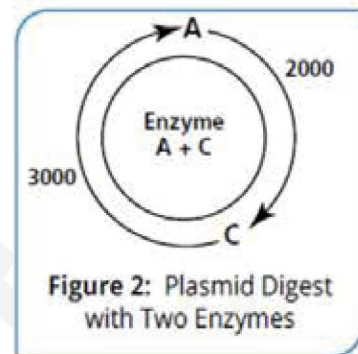


Figure 2: Plasmid Digest with Two Enzymes

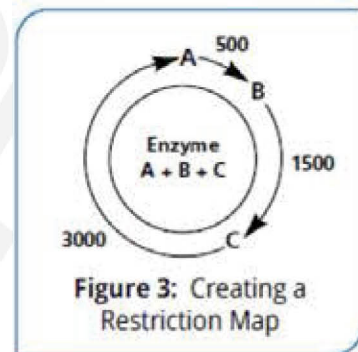


Figure 3: Creating a Restriction Map

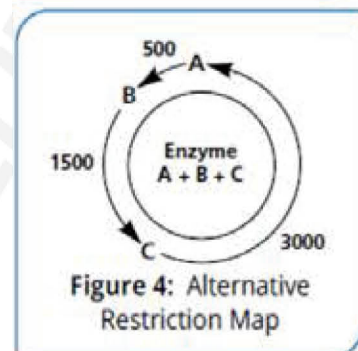


Figure 4: Alternative Restriction Map

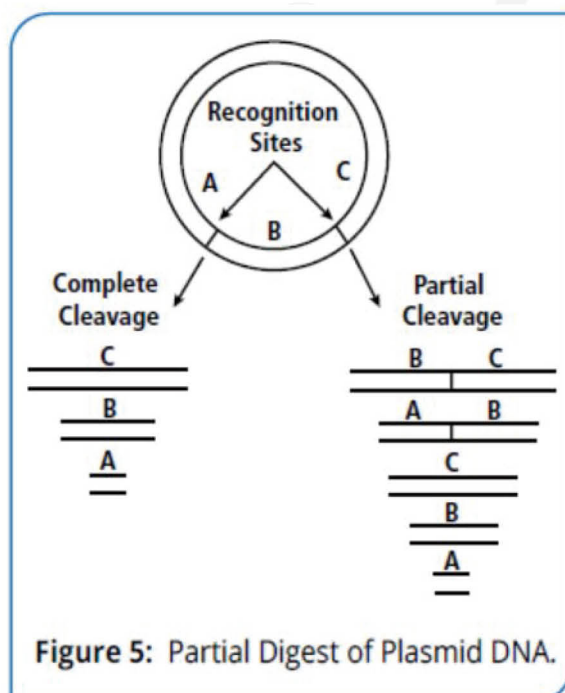
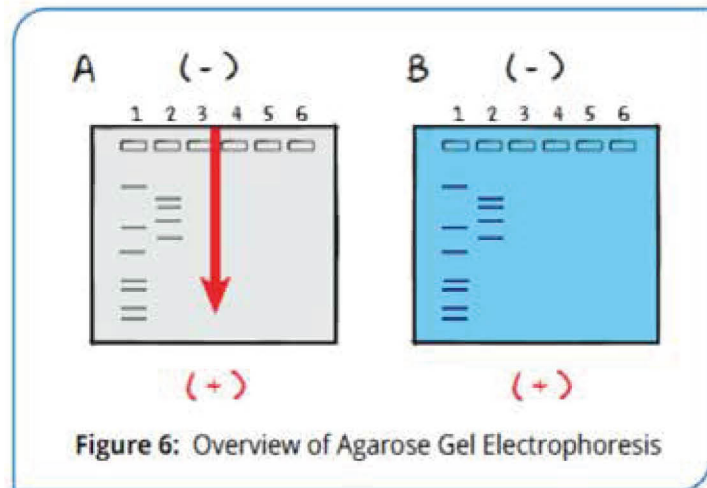


Figure 5: Partial Digest of Plasmid DNA.

제한효소 분석

과학자들은 DNA 조각 혼합물을 분석하기 위해 아가로스 젤 전기영동 기술을 사용합니다. 이 기술은 DNA 조각을 크기별로 분리합니다. 먼저, 마이크로 파이펫을 사용하여 잘려진 DNA 분자를 웰(well)에 넣습니다. 전기적인 전류가 웰을 통해 흐릅니다. DNA의 당-인산염 백본이 강한 음전하를 가지고 있기 때문에 전류는 제한 조각을 양극으로 향해 밀어냅니다 (Figure 6A).



아가로스 젤은 상온에서 단단해 보이지만, 분자 수준에서는, 젤 안에는 DNA가 통과할 수 있는 작은 채널이 존재합니다. 작은 DNA 조각은 이 작은 구멍을 쉽게 통과할 수 있지만, 큰 DNA 조각은 이 작은 터널을 통과하는 것이 더 어려워집니다. 크기가 다른 분자들이 서로 다른 속도로 이동하기 때문에, 분리되고 젤 안에서 별도의 "밴드(bands)"를 형성합니다. 전류가 중단된 후, 이 밴드는 DNA에 달라붙는 염료를 사용하여 시각화됩니다(Figure 6B). 소화되지 않은 플라스미드 DNA 샘플에 예상치 못한 밴드가 나타날 수 있습니다. 이는 플라스미드가 서로 다른 형태로 존재할 수 있기 때문입니다. 세포 내에서 플라스미드 DNA는 효율적으로 포장되도록 밀집하게 감겨 있으며, 이를 "슈퍼코일"이라고 합니다. 전기영동법으로 분석할 때 슈퍼코일 DNA는 분자량보다 작게 나타납니다. 반면 정제 과정에서 DNA 백본이 깨지면 플라스미드는 조밀한 구조를 잃고 적절한 크기로 도출됩니다. 슈퍼코일과 선형 DNA가 혼합된 플라스미드 샘플은 전기영동법으로 분석할 때 두 개의 구분된 밴드가 나타납니다.

제한효소 분해 후, 플라스미드 혼합물은 전기영동 분석 시 동일한 일련의 DNA 조각을 생성합니다. 그러나 이전에 언급했듯이, 부분 분해는 제한 맵핑 실험에서 분석을 복잡하게 할 수 있습니다. 또한 두 개의 다른 조각이 크기가 비슷하면 젤을 통해 함께 이동하여 하나의 밴드로 보일 수 있습니다. 소화물이 많은 경우, 조각들은 smear로 보일 수 있습니다. 만약 두 제한 효소 부위가 서로 가까이 위치해 있다면(30개 이하의 염기서열 차이), 그 조각은 전기영동 분석 과정에서 보이지 않을 수 있습니다. 이 실험에서 학생들은 플라스미드 DNA 상의 제한효소 절단부위의 상대적 위치를 결정할 것입니다. 각 효소는 플라스미드를 한 두 번 잘라내지만, 절단부위의 상대적 위치는 알려져 있지 않습니다. 먼저, 학생들은 서로 다른 조합의 제한효소를 사용하여 플라스미드 DNA를 제한 분해합니다. 그리고 제한효소 소화물은 아가로스 젤 전기영동을 사용하여 분석됩니다. 각 그룹은 DNA 표준 마커를 사용하여 표준곡선을 작성하고, 이를 통해 제한효소 조각의 길이를 계산할 수 있습니다. 이 데이터를 사용하여, 학생들은 서로 다른 제한효소 인식부위 간의 관계를 기술하는 제한지도를 작성합니다.

실험 전 준비 사항

시약

준비 목록	준비물	필요 시간	소요 시간
모듈 1: 제한효소 분석	시약 준비	실험 수행하기 하루에서 30 분 전	20 분
	항온 수조 온도설정	실험 1-2 시간 전	10 분
	제한 효소 준비	사용 전 30 분 이내	30 분
모듈 2: 아가로스젤 전기영동	전기영동 버퍼 희석	언제든지	10 분
	아가로스 겔 준비	실험 하루에서 30 분 전	45 분
모듈 3: 아가로스젤 염색	염색 구성물 준비	실험 전날	10 분

모듈 1: 실험 전 준비

시약은 실험 당일에 준비한다면 얼음에 보관이 가능합니다. 미리 준비한 시약은 냉동실(-20°C)에 보관하십시오. 사용하기 전 완전한 해동이 필요합니다.

1. 제한효소 소화를 위한 Plasmid DNA (튜브 A), 제한효소 반응버퍼(Restriction Enzyme Reaction Buffer – 튜브 B), UltraPure Water (튜브 C)를 해동합니다.
2. A 튜브에서 Plasmid DNA 를 25 μ L 씩 6 개의 원심분리기 튜브에 담고 뚜껑을 닫습니다.
3. B 튜브에서 Buffer 를 25 μ L 씩 6 개의 원심분리기 튜브에 담고 뚜껑을 닫습니다.
4. C 튜브에서 UltraPure Water 를 70 μ L 씩 6 개의 원심분리기 튜브에 담고 뚜껑을 닫습니다.
5. 10x Gel Loading Solution 을 25 μ L 씩 6 개의 원심분리기 튜브에 담고 뚜껑을 닫습니다.

★ 실험당일 준비

항온 수조를 37°C에 맞춥니다.

DryZyme Restriction Enzyme 준비

E 튜브, F 튜브에 들어 있는 Dryzyme 제한효소를 복원 후 30 분 이내에 restriction digest 를 수행합니다.

1. UltraPure Water (C), Restriction Enzyme Dilution Buffer (D)를 해동하여 얼음에 곱아 둡니다.

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

2. Dryzyme 튜브 E, 튜브 F 의 바닥에 고체 덩어리가 있는지 확인합니다. 그렇지 않다면 탁상에 탁탁 치거나 원심분리기를 이용해 바닥면에 모아 줍니다.
3. 모듈 1 실험 시작 후 30 분 이내로 Dryzyme 튜브 바닥에 있는 덩어리에 Restriction Enzyme Dilution Buffer 75 μ L 를 추가하여 1 분간 녹도록 합니다. 손가락으로 가볍게 튜브를 톡톡치거나 30 초간 볼텍싱을 하여 잘 섞어줍니다. 고체덩어리가 완전히 용해될 때까지 진행합니다. 이 시점에서는 효소를 더 이상 보관할 수는 없기에 가능한 빨리 사용해야 합니다. 사용할 때까지 얼음에 꽂아 둡니다.
4. 복원된 Dryzyme 의 각 튜브에 75 μ L UltraPure Water(튜브 C)를 천천히 추가합니다.
5. 20 초간 피펫팅 또는 볼텍싱을 통해 완전히 섞이도록 합니다.
6. 복원된 EcoRI 효소 15 μ L 를 6 개의 원심분리기 튜브에 옮겨 담습니다. BamHI(튜브 F)도 이과정을 반복하고 얼음에 꽂아둡니다. 그리고나서 30 분 이내에 사용해야합니다.

실험 전 각 조에 분배해야하는 것

플라스미드 DNA 튜브 1 개

Restriction enzyme reaction buffer 튜브 1 개

Ultrapure water 튜브 1 개

EcoRI (얼음에 꽂아둔) 튜브 1 개

Bamhi(얼음에 꽂아둔) 튜브 1 개

10X Gel Loading Dye 튜브 1 개

원심분리기 튜브 4 개

마이크로피펫과 피펫팁

Summary of Reagent Preparation		
Component	Number of tubes	Volume per tube
Plasmid DNA	6	25 μ L
Restriction Enzyme Reaction Buffer	6	25 μ L
UltraPure Water	6	70 μ L
Eco RI	6	15 μ L
Bam HI	6	15 μ L
10x Gel Loading Buffer	6	25 μ L

모듈 II: 실험 전 준비

이 실험에서는 학생 그룹당 0.8% 아가로스 겔이 필요합니다. 사전에 겔을 준비하거나 학생들이 직접 준비할 수 있습니다. 이 과정에는 약 30-40 분 정도 소요됩니다.

SYBR® Safe 염색액 준비하기

1. 50 배 농도의 버퍼 20 μ L 과 증류수 980 μ L 을 섞어 1 배 Electrophoresis Buffer 를 준비합니다.
2. 1X Electrophoresis Buffer 375 μ L 을 SYBR® Safe 튜브에 첨가하고 섞습니다. 이제 희석된 SYBR® Safe 염색액은 아가로스 겔 제작 중에 사용할 준비가 되었습니다.

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. 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.

DNA 샘플 & DNA 마커 준비

이 실험을 위한 DNA 샘플 및 DNA 표준 마커는 스크류 뚜껑 원심분리기 튜브에 대량으로 제공됩니다. 학생들은 샘플 튜브를 공유할 수도 있고, 개별 튜브로 분배할 수도 있습니다 (포함되지 않음).

SYBR® Safe 는 DNA 에 결합될 때 형광을 내며 샘플을 시각화할 수 있게 해주는 DNA 염색약입니다. 이 DNA 염색약은 UV 와 블루라이트 투과광 양쪽에서 모두 호환됩니다. 최상의 결과를 위해 TruBlu™ 2 Blue Light Transilluminator (Cat # ED557)를 권장합니다.

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

부록 B

전기영동을 위해 대량으로 전기영동 용매와 아가로스 겔을 준비할 수 있습니다.

전기영동 버퍼 대용량 : 3 리터의 1X 전기영동 버퍼를 만들기 위해 table D 의 비율을 참조합니다.

Table D Bulk Preparation of Electrophoresis Buffer		
50x Conc. Buffer	+	Distilled Water
60 mL		2940 mL
		Total Volume Required
		3000 mL (3 L)

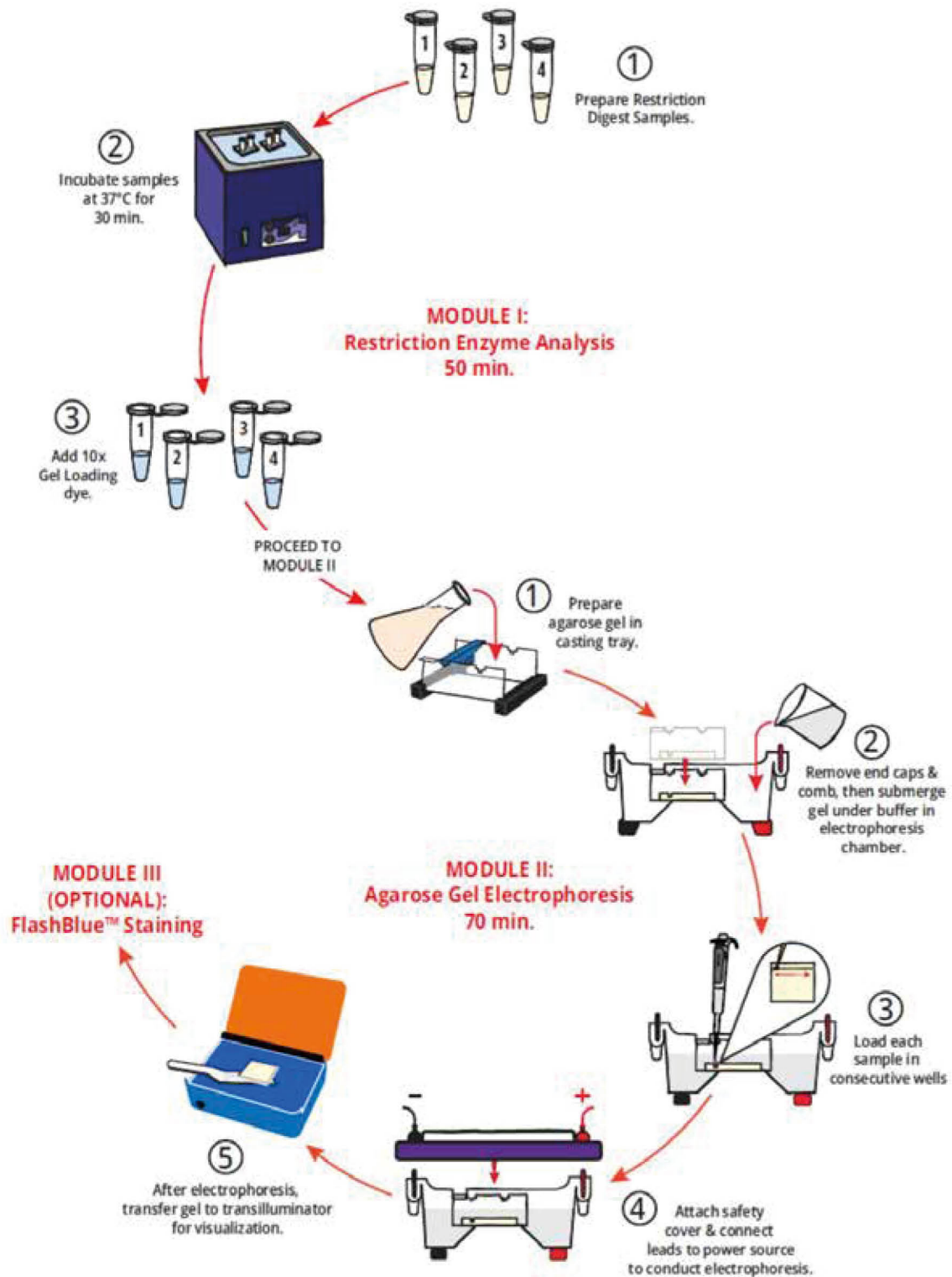
0.8% 아가로스 겔 대량 제작 : Table E 표를 참조해 0.8% 아가로스겔을 만듭니다.

Table E Batch Prep of 0.8% UltraSpec-Agarose™			
Amount of Agarose	+	Concentrated Buffer (50x)	+
3.0 g		7.5 mL	367.5 mL
			Total Volume
			375 mL

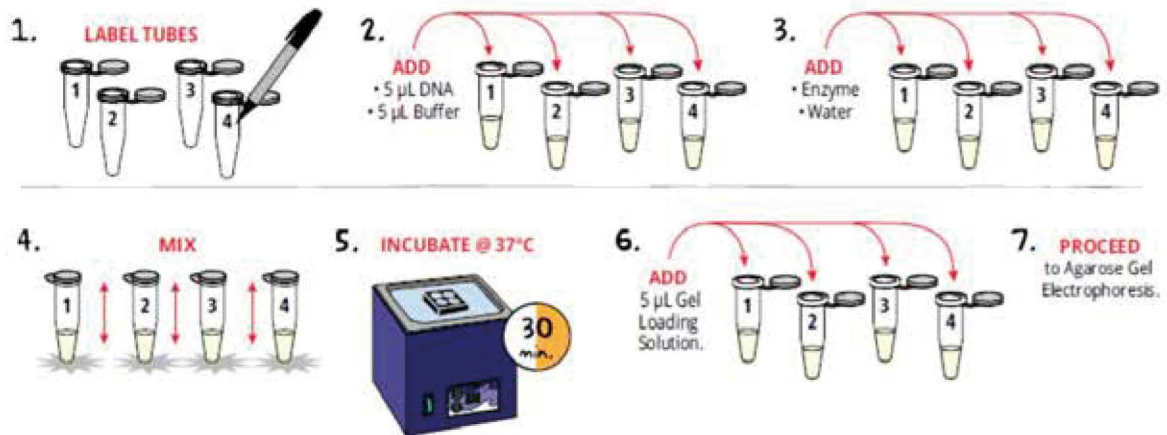
- 1 리퍼 용기를 사용하여 희석된 버퍼를 준비합니다.
- UltraSpec-Agarose™ 3g 을 준비된 버퍼에 붓습니다. 잘 섞이도록 합니다.
- 마킹 펜으로 용액의 용량을 병의 바깥면에 기록합니다.
- 모듈 II 에서 실시할 겔 준비 과정에 기술된대로 아가로스 용액을 가열합니다. 대량의 경우 용액의 총 부피가 더 크기 때문에 가열 시간을 조정해야 할 수 있습니다.
- 아가로스 용액을 60°C까지 냉각하세요. 용액이 증발된 경우 마킹 펜으로 단계 3 에서 표시한 원래의 부피까지 증류수를 첨가하세요.
- 식힌 아가로스 용액에 희석한 SYBR® Safe 염료 전체를 넣고 잘 섞으세요. (이전 페이지 참조)
- 각 겔에 부어야 할 아가로스 용액의 필요한 부피를 트레이에 붓습니다. 7 x 7 cm 트레이에는 30 mL, 10 x 7 cm 트레이에는 45 mL, 14 x 7 cm 트레이에는 60 mL 을 측정합니다. 참고: 이 실험에서는 7 x 7 cm 겔을 권장합니다.
- 겔이 완전히 굳어질 때까지 기다립니다. 대략 20 분 후 겔이 단단하고 손에 냉각감이 느껴지면 전기영동을 위해 겔을 준비하세요.

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

실험 개요



모듈II: 제한효소 분석

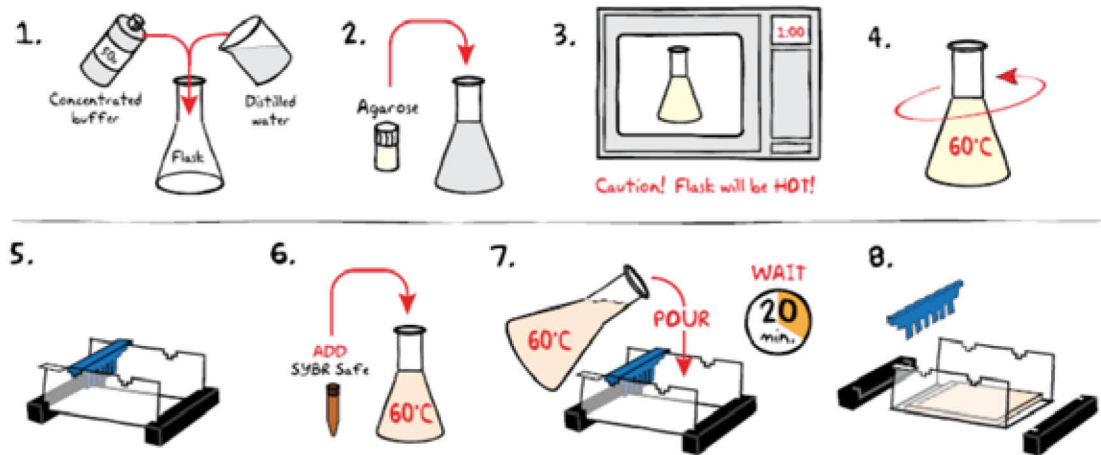


1. 1.5 mL 원심분리기 튜브 4 개에 1, 2, 3, 4 번호를 적습니다.
2. 4 개의 튜브(1-4) 각각에 5µL 의 DNA 와 5µL 의 제한효소 반응 버퍼를 넣습니다.
3. 아래 표대로 반응 튜브에 새로운 마이크로피펫 팁을 사용해 물과 효소를 넣습니다.

Reaction Tube	Plasmid DNA	Restriction Enzyme Rxn Buff	EcoRI Enzyme	BamHI Enzyme	Ultra Pure Water	Final Reaction Volume
1	5 µL	5 µL	----	----	20 µL	30 µL
2	5 µL	5 µL	5 µL	----	15 µL	30 µL
3	5 µL	5 µL	----	5 µL	15 µL	30 µL
4	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	10 µL	30 µL

4. Restriction Digest 를 피펫팅(위아래로)하거나 튜브를 가볍게 두드려 균일하게 섞습니다.
5. 튜브에 뚜껑을 덮고 37°C에서 30 분간 반응을 진행합니다.
6. 반응 후, 각 반응용 튜브에 10X gel loading 용액 5µL 을 첨가합니다. 튜브 뚜껑을 덮고 튜브를 가볍게 두드리거나 완전히 혼합되도록 볼텍싱합니다.
7. 모듈 II - 아가로스 젤 전기영동 단계로 넘어갑니다.

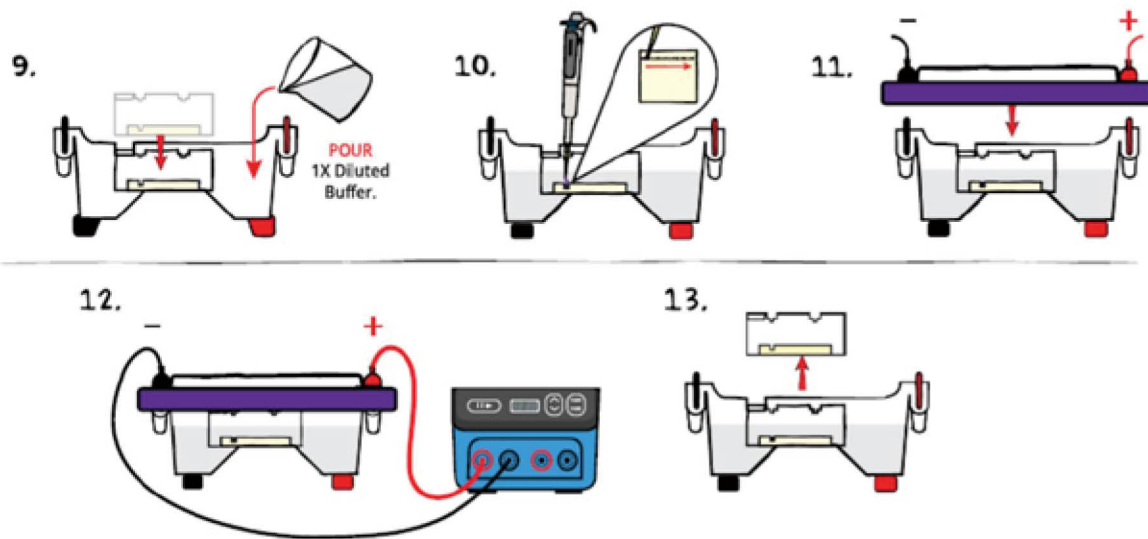
모듈II: 아가로스젤 전기영동



1. 50X 버퍼와 증류수를 Table A 참조하여 적정용량을 플라스크에 넣고 섞어 희석합니다.
2. 아가로스 분말 적정량을 1X 버퍼가 담긴 250 mL 플라스크에 넣습니다(Table A 참조).
3. 아가로스 분말을 용해시키기 위해 용액을 끓입니다. 1분 동안 전자레인지에서 강력하게 가열한 다음 조심스럽게 플라스크를 꺼내서 흔들어 섞습니다. 아가로스가 완전히 용해될 때까지 15초 간격으로 가열을 계속합니다(용액은 물과 같이 맑아집니다).
4. 플라스크를 주의해서 흔들어 열을 균일하게 퍼뜨린 후, 아가로스를 60°C까지 냉각시킵니다.
5. 아가로스가 냉각되는 동안, 젤 캐스팅트레이의 끝부분을 고무 캡으로 막습니다. 적절한 노치에 comb을 끼워 넣습니다.
6. 60도로 식힌 아가로스에 희석된 SYBR® Safe 염료를 넣고 섞습니다(Table A 참조). **중요:** SYBR® Safe를 아가로스 용액에 첨가하기 전에 반드시 본인 또는 선생님께서 희석하셨는지 확인하세요.
7. 냉각된 아가로스 용액을 젤 캐스팅트레이에 부어 굳힙니다. 완전히 굳어지는 데 20분이상 소요됩니다. 젤은 굳어질수록 더 굳고 불투명해집니다.
8. 고무 캡과 comb을 분리합니다. well에 손상을 입히지 않도록 특히 comb 제거 시 주의합니다.

Table A		Individual 0.8% UltraSpec-Agarose™ Gel with SYBR® Safe Stain				
Size of Gel Casting tray	Concentrated Buffer (50x)	+ Distilled Water	+ Amt of Agarose	= TOTAL Volume	Diluted SYBR® (Step 6)	
7 x 7 cm	0.6 mL	29.4 mL	0.24 g	30 mL	30 µL	
10 x 7 cm*	0.9 mL	44.1 mL	0.36 g	45 mL	45 µL	
14 x 7 cm	1.2 mL	58.8 mL	0.48 g	60 mL	60 µL	

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



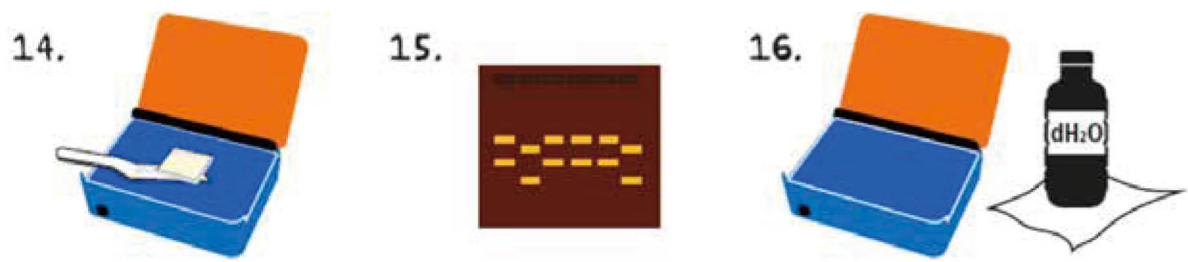
9. 젤을 전기영동 챔버에 넣고 1X전기영동 버퍼(Table B 참조)를 넣어 완전히 잠기게 합니다.
10. Table 3: Gel Loading참조, 각 샘플을 젤의 well에 마이크로 피펫으로 ~35 μ L씩 로딩합니다.
11. 덮개를 덮고 +, - 극을 잘 연결했는지 확인합니다.
12. 전원공급장치에 연결하여 실험을 시작합니다. (전압과 시간은 Table C 참조).
13. 전기영동을 마친 후 장치에서 젤이 담긴 트레이를 빼냅니다.

TABLE 3: Gel Loading	
Lane 1	DNA Standard Marker
2	Reaction Tube 1
3	Reaction Tube 2
4	Reaction Tube 3
5	Reaction Tube 4

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.



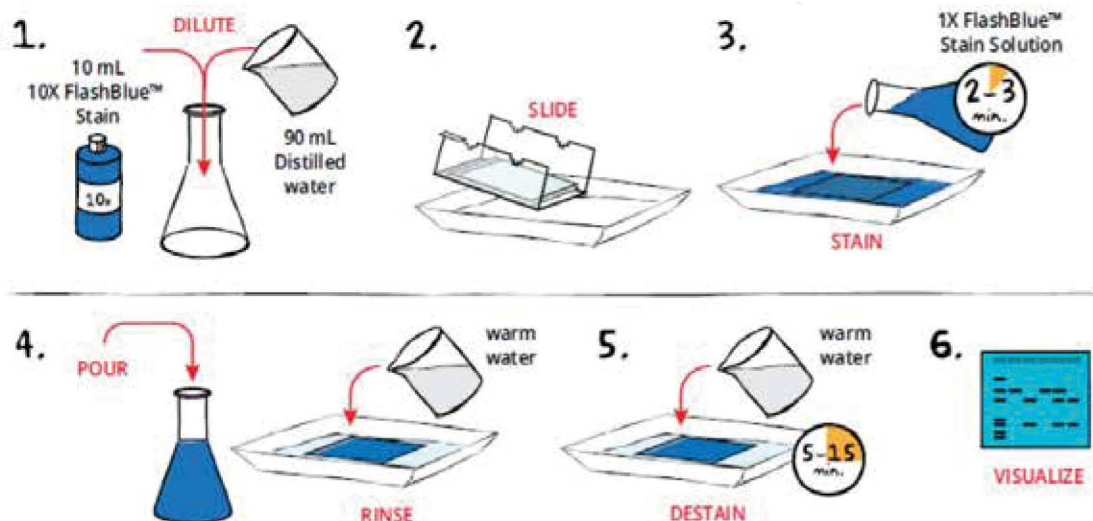
14. 젤을 조심스럽게 트랜스 일루미네이터에 올립니다.

15. 결과를 확인하고 사진을 찍습니다.

16. 사용 후에는 깨끗하게 트랜스일루미네이터를 닦습니다.

(선택사항) 모듈III: FlashBlue 염색

FlashBlue™ 염색은 SYBR® Safe와 같은 UV 반응성 DNA 염색제의 대안 또는 보조로 사용할 수 있는 간단하고 효과적인 DNA 염색제입니다. SYBR® Safe와 FlashBlue™을 함께 염색하는 경우, FlashBlue™ 염색을 시작하기 전에 SYBR® Safe 밴드를 검사하고 기록해야 합니다.



1. 10X 농도의 FlashBlue™ 10mL을 90mL의 증류수와 혼합한 후 잘 섞습니다.
2. 전기영동 챔버에서 아가로스 젤과 캐스팅 트레이를 제거한 후 젤을 깨끗한 작은 트레이에 미끄러지게하여 놓습니다.
3. 1X 농도의 FlashBlue™ 염료 용액으로 젤을 완전히 덮습니다. 2-3분 동안 염색합니다. 최상의 결과를 위해서는, 염료 용액에 젤을 가볍게 흔들어주는 오비탈 셰이커를 사용합니다. 3분 이상 염색할 경우에는 추가적인 디스테인(destaining) 시간이 필요합니다.
4. FlashBlue™ 용액을 유리 병에 따로 보관한 후 (염료는 재사용 가능합니다), 따뜻한 물(40-45 °C)로 젤을 완전히 덮습니다. 20-30초 동안 젤을 부드럽게 헹굽니다. 물을 따르고 버립니다.
5. 깨끗하고 따뜻한 물(40-45 °C)로 젤을 완전히 덮습니다. 부드럽게 흔들어 5-15분간 디스테인 합니다(더 오래 디스테인할수록 좋은 결과가 나옵니다). 5분 후부터 DNA 밴드가 보이기 시작합니다. 물을 자주 교체하면 디스테인이 가속화됩니다.
6. 디스테인 용액에서 젤을 조심스럽게 제거한 후, 흰색 빛 시각화 시스템을 사용해 결과를 확인합니다. DNA는 연한 파란색 배경에 검은색 밴드로 나타납니다.

연구 질문

1. 제한효소 *Sau3AI*는 다음 염기서열을 인식합니다: 5'-GATC-3'

이 효소는 평균적으로 어느 정도의 빈도로 DNA를 절단할까요?

반면, 제한효소 *NotI*는 다음 염기서열을 인식합니다: 5'-GCGGCCGC-3'.

이 효소는 평균적으로 어느 정도의 빈도로 DNA를 절단할까요?

*NotI*가 *Sau3AI*보다 더 자주 DNA를 절단할까요?

2. 미분류된 플라스미드 DNA가 여러 제한효소를 사용하여 각각 및 다양한 조합으로 절단되었습니다. DNA 조각 크기는 아가로스 겔 전기영동법으로 결정되었으며, 제한효소 인식부위도 매핑되었습니다. 그 후, DNA는 시퀀싱되었으며 한 효소에 대해 추가 인식부위가 발견되었습니다. 그러나 다른 매핑 데이터는 시퀀스 데이터와 일치했습니다. 이 불일치에 대한 이유가 무엇인가요? DNA 서열에 오류가 없다고 가정하세요.
3. 플라스미드는 여러 제한효소로 개별적으로 또는 조합하여 절단되었습니다. 아가로스겔 전기영동을 통해 다음 조각 크기 (염기쌍)가 측정되었습니다.

<i>Eco</i> RI	4364		
<i>Ava</i> I	2182		
<i>Pvu</i> II	4364		
<i>Pst</i> I	4364		
<i>Eco</i> RI - <i>Ava</i> I	2182	1425	757
<i>Eco</i> RI - <i>Pst</i> I	3609	755	
<i>Ava</i> I - <i>Pvu</i> II	2182	1541	641
<i>Ava</i> I - <i>Pst</i> I	2182		
<i>Pvu</i> II - <i>Pst</i> I	2821	1543	
<i>Eco</i> RI - <i>Pvu</i> II	2298	2066	

이 데이터를 기반으로 제한 지도를 작성하십시오.

참고: 총 염기쌍 수를 합산하는 데 약간의 차이가 있을 수 있습니다. 부위 간의 거리를 나타내십시오. *Ava* I-*Pst* I 에서 왜 하나의 밴드만 감지되는지 설명하십시오.

4. 제한 소화 실험 결과를 상세히 나열한 표를 작성하십시오. 이 데이터를 사용하여 플라스미드의 제한 지도를 그리십시오.

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