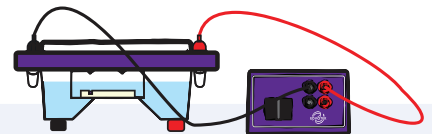

CRISPR를 이용한 농작물 개발

USING CRISPR TO IMPROVE CROPS

ED210



☎ 02-929-1110 ✉ info@koreasci.com

🛒 www.koreasci.com

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

실험 목표

이 실험에서 학생들은 gRNA(가이드RNA) 설계에 대한 이해를 높이고, 아가로스 젤 전기영동을 사용해 CRISPR 처리한 DNA를 측정합니다.

SH2 유전자를 자르기 위한 gRNA설계와 BLAST를 사용해 특이점을 찾고 gRNA가 Cas를 정확하게 찾아 SH2 유전자를 자르는지 확인합니다.

제품 구성품

구성물	보관온도
A SH2 DNA	-20 °C
B Cas9	-20 °C
C gRNA A/C (동결건조상태)	-20 °C
D gRNA B/Scramble (동결건조상태)	-20 °C
E gRNA D (동결건조상태)	-20 °C
F DNA 표준 마커	-20 °C
G 재구성 버퍼(Reconstitution Buffer)	-20 °C
H Enzyme Grade Water	-20 °C
I 젤 로딩 용액(Gel Loading Solution)	실온

시약

UltraSpec-Agarose

Electrophoresis buffer (50x)

SYBR® Safe Stain

FlashBlue DNA stain

원심분리기 튜브

필요 장비 및 준비물

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

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

배경지식

역사상 인간은 농작물을 개선하기 위해 노력해왔습니다. 과학자와 농업인들은 많은 식물의 생육 기간을 단축하고, 영양분 함량을 높이고, 더 큰 과일과 종자를 생산하며, 병충해 저항성을 부여하는 등의 성과를 거두었습니다. 지난 100년 동안 유전체 연구는 작물 개량에서 게놈의 역할에 대한 이해를 넓혔습니다. 돌연변이라고 불리는 DNA 서열의 변이는 식물이 환경과 상호작용하는 방식을 변화시킬 수 있습니다.

대부분의 돌연변이는 생물체에 부정적이거나 무시할 만한 영향을 미치지만, 가끔 돌연변이가 특정 환경에서 생존을 촉진하는 이점을 부여하기도 합니다. 농업인들은 이런 유형의 돌연변이를 확인하고 작물 개량에 활용합니다.

인간은 오랫동안 전통적인 식물 및 가축 사육 기술을 통해 유전적 변이를 인식하고 활용해 왔습니다. 수세기 동안 선발 육종과 전통적인 교잡은 작물 수확량을 높이고 가뭄 내성을 부여하며 다른 바람직한 특성 발현을 촉진했습니다. 14세기부터 수박은 단맛을 위해 선발 육종되었습니다. 수박 내부의 붉은 색은 유전적으로 단맛과 관련된 DNA 서열과 연결되어 있기 때문에, 오늘날 슈퍼마켓에서 구입할 수 있는 수박 내부는 선명한 붉은색입니다(Figure 1).



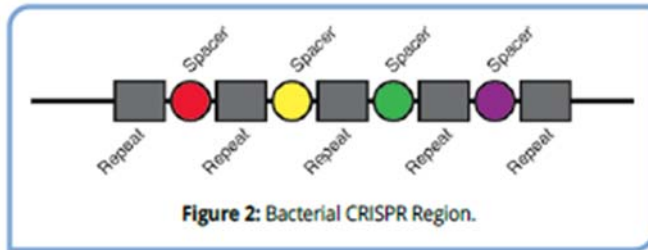
좋은 형질을 발현하기 위해 필요한 유전체 변화를 일으키려면 예전에는 수년간의 선발 육종이 필요했지만, 현대 생명공학 기술은 이 속도를 가속화했습니다. 유전자 공학을 통해 과학자들은 이제 직접 DNA 서열을 조작하여 좋은 특성을 만들어낼 수 있습니다.

유전자 변형 생물체(GMO)를 만드는 방법은 많이 있습니다. 미국 기관의 승인을 받은 최초의 GMO는 토마토, 대두, 옥수수였습니다. 이 생물체에는 재조합 DNA 기술을 사용하여 유전체에 삽입된 유전자(형질전환 유전자)가 포함되어 있습니다. 형질전환 식물을 만드는 데 사용되는 대부분의 기술은 비용이 많이 들고 정밀도가 낮으며 광범위한 선별이 필요합니다. 가장 최신 작물 유전자 공학 기술인 CRISPR-Cas9 기술은 빠르고 저렴하며 정확하여 농업인들에게 혁명적인 기술입니다.

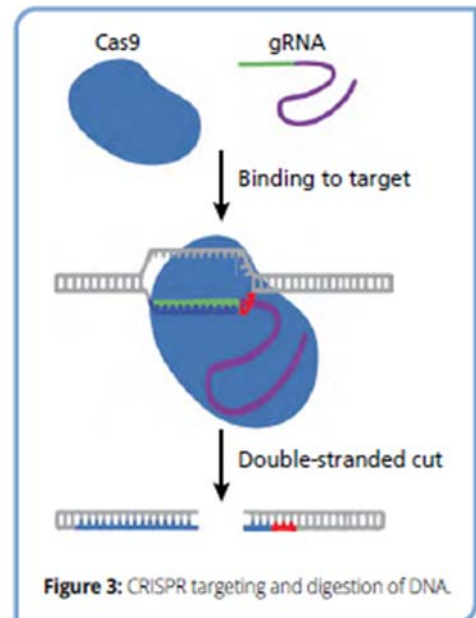
★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

CRISPR

CRISPR-Cas는 바이러스 공격에 대한 방어기작으로 박테리아에서 진화했습니다. CRISPR는 클러스터형 규칙적으로 반복되는 짧은 팔린드롬 반복 서열(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)을 의미합니다. 이 팔린드롬 반복 서열(앞뒤로 읽어도 서열이 같음)은 박테리아 DNA에서 자연적으로 발견됩니다. 각 반복 서열은 스페이서라고 불리는 DNA 블록에 의해 분리되며, 각 스페이서는 고유한 서열을 가지고 있습니다(Figure 2).



바이러스가 박테리아 세포를 침입하면 박테리아는 바이러스를 외래체로 인식하고 그 DNA 일부를 수집하여 다음에 나타날 때 인식할 수 있게 됩니다. 박테리아는 바이러스 DNA를 자신의 DNA CRISPR 영역에 있는 스페이서에 넣습니다. 스페이서가 차면 바이러스 적들의 데이터베이스가 됩니다. 스페이서(바이러스 DNA)는 CRISPR 서열 옆에 항상 있는 Cas(CRISPR 관련 효소)와 결합되어 있습니다. 스페이서 서열과 Cas 단백질이 함께 박테리아의 면역계 역할을 효과적으로 수행합니다.

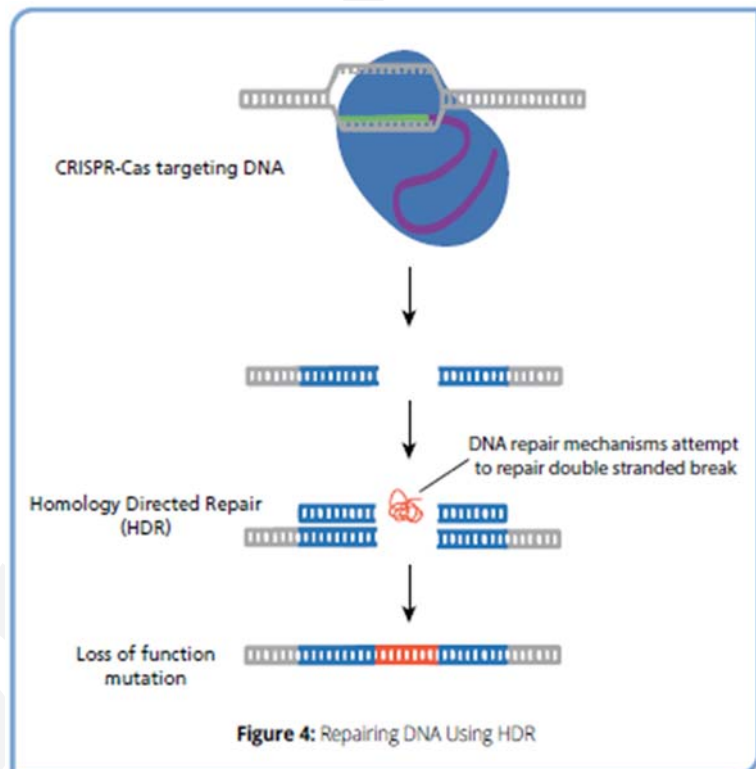


지속적인 방어 체계를 구축하기 위해 박테리아는 스페이서에 저장된 각 바이러스 DNA 조각을 꺼내 RNA 가닥으로 전사합니다. 이 RNA 가닥을 가이드 RNA(gRNA)라고 합니다. 그런 다음 Cas 효소가 gRNA에 결합하여 "로딩"됩니다. gRNA-Cas(일반적으로 CRISPR-Cas라고 함)는 세포 내를 떠돌아다닙니다. 만약 스페이서 서열과 일치하는 외래 DNA를 만나면 gRNA가 그것과 염기쌍을 이루고 Cas 효소가 침입자의 게놈을 조각내어 바이러스 복제를 막습니다(Figure 3). 이 시스템은 RNA 스페이서 서열에 특이적인 DNA만 잘라내므로, CRISPR-Cas를 통해 박테리아는 짧은 DNA 서열을 찾아 정밀하게 공격할 수 있습니다. 이 시스템으로 인해 제한 효소 등 다른 박테리아 방어 체계는 매우 원시적으로 보입니다.

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

일단 CRISPR-Cas가 대상에 결합하면 DNA를 정확하게 자르기 위해 공통 서열을 사용합니다. 이 서열을 프로토스페이서 인접 모티프 또는 PAM 서열이라고 합니다. 서로 다른 Cas 효소는 다른 PAM 서열을 인식합니다. 가장 흔히 사용되는 *Streptococcus pyogenes*에서 유래한 Cas9는 'N'이 모든 핵레오타이드 염기가 될 수 있는 5'-NGG-3' PAM 서열을 인식합니다. 이 PAM 서열은 gRNA의 일부이며 Cas 효소에 DNA를 자를 위치를 지시합니다.

CRISPR-Cas가 DNA를 정확하게 표적화하고 자를 수 있는 능력과 현대 DNA 시퀀싱 기술이 결합되면서 유전자 공학, 분자 생물학, 합성 생물학 분야에 새로운 길이 열렸습니다. 연구자들은 유전자의 서열을 결정하고, 특정 DNA를 자르도록 CRISPR 가이드 RNA(gRNA)를 설계하고, 모든 것을 세포 내에 결합하여 살아있는 상태에서 DNA를 효율적으로 변경할 수 있습니다.



CRISPR 기술의 가장 일반적인 용도 중 하나는 유전자를 분해하여 기능을 무력화하는 것입니다. 한번 자르면 DNA 복구 메커니즘이 이중가닥 절단을 수리하려 하지만, 종종 유전자 기능 상실 돌연변이로 알려진 작은 삽입, 결실 또는 기타 돌연변이가 발생하여 유전자 기능이 무력화됩니다(Figure 4).

과학자들은 이미 CRISPR를 사용하여 건강한 게놈에 새로운 유전자를 삽입하고 있습니다. 이를 통해 식물이 병에 더 잘 견딜 수 있고, 자라는 환경의 날씨에 더 잘 견딜 수 있으며, 더 높은 수확량을 얻을 수 있습니다. 이 실험에서 여러분은 CRISPR 가이드 RNA를 테스트하여 특정 유전자를 잘라내어 초고당 옥수수를 설계할 것입니다. 초고당 옥수수는 설탕이 풍부한 축소된 종자, 일반 단옥수수보다 높은 수분 함량, 그리고 긴 유통 기한을 가지고 있습니다. 옥수수를 달콤하게 만드는 데 기여할 수 있는 여러 유전자가 있지만, SHRUNKEN (SH2) 유전자의 기능 상실 돌연변이는 업계 최고의 품종인 초고당 옥수수를 만들어냈습니다. SH2는 아데노신 디인산 글루코스 피로인산 가수분해효소의 큰 소단위를 암호화하며, 이 효소는 옥수수 배유에서 설탕을 전분으로 전환하는 기능을 합니다. 이 소단위를 제거함으로써 알곡은 더 많은 설탕을 보유하게 되어 맛이 좋아집니다.

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

다.

이 실험에서 여러분은 SH2 유전자를 자를 gRNA를 설계하고, BLAST를 사용하여 gRNA의 특이성을 결정하며, 모의 시약을 사용하여 가장 특이적인 gRNA가 정확하게 Cas를 SH2 유전자에 모집하는지 확인할 것입니다.

(주)한유과학기술
KOREA SCIENTIFICS

실험 전 준비

주의: 모듈 I와 II는 모두 모의 실험이며 언제든지 수행할 수 있습니다. 아래 사전실험 준비는 모듈 III와 IV를 위한 것입니다.

생물학적 물질 및 시약 준비

1. SH2 DNA(튜브 A)를 해동합니다. 8개의 원심분리기 튜브에 "SH2"라고 표기하고 각각에 80 μ L씩 분주합니다.
2. 모의 Cas9(튜브 B)를 해동합니다. 8개의 원심분리기 튜브에 "Cas9"라고 표기하고 60 μ L씩 분주합니다.
3. 젤로딩 용액(튜브 I) 30 μ L를 8개의 튜브에 옮기고 "GLS"라고 표기합니다. 각 그룹에 1개의 튜브가 필요합니다.

gRNA(튜브 C-E) 준비

주의: 사용 약 1시간 전에 준비하고 얼음 위에 놓아둡니다.

1. 고체 물질이 튜브 바닥에 있는지 확인합니다. 그렇지 않다면 원심분리기에서 최고 속도로 20초 동안 돌리거나 실험대 위에 튜브를 가볍게 두드립니다.
2. 각 튜브 바닥의 고체 물질에 150 μ L의 재구성(reconstitution) 버퍼(튜브 G)을 넣습니다.
3. 시료가 1분 동안 수화되도록 둡니다.
4. 고체가 완전히 용해될 때까지 튜브를 손가락으로 세게 치거나 30초 동안 볼텍싱하여 시료를 잘 섞습니다.
5. 각 재수화된 gRNA 튜브에 150 μ L의 효소 등급 물enzyme grade water(튜브 H)을 넣습니다.
6. 시료를 섞거나 볼텍싱한 다음 20초 동안 원심분리하거나 튜브를 실험대 위에 가볍게 두드립니다. 재수화 후 입자가 남아있지 않은지 확인합니다. 완전히 용해되지 않았다면 볼텍싱을 반복합니다.
7. 8개의 튜브에 "gRNA sc", 8개에 "gRNA A", 8개에 "gRNA B", 8개에 "gRNA C", 8개에 "gRNA D"라고 적습니다
8. gRNA A/C(튜브 C) 20 μ L를 "gRNA A" 튜브에, 20 μ L를 "gRNA C" 튜브에 옮깁니다.
9. gRNA B/scramble(튜브 D) 20 μ L를 "gRNA B" 튜브에, 20 μ L를 "gRNA sc" 튜브에 옮깁니다.

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

10. gRNA D(튜브 E) 20 μ L를 "gRNA D" 튜브에 옮깁니다.

11. 튜브에 마개를 닫고 즉시 얼음 위에 놓습니다. 주의: 튜브는 얼음 위에서 1주일까지 보관하거나 냉동할 수 있습니다.

일반 준비사항

1. 실험 당일 수조에 45°C 또는 37°C의 물을 충분히 넣고 평형상태에 도달하도록 기다립니다.
2. 각 학생 그룹은 5개의 CRISPR 반응을 수행합니다.

각 학생 그룹은 다음 자료를 받게 됩니다:

- 아래 표에 시약 및 생물학적 물질
- 마이크로피펫과 팁
- 마개가 있는 5개의 원심분리기 튜브
- 마킹 펜

Summary of Biologicals and Reagents Required for Each of the Six Groups		
Component	Label 6 tubes each	Dispense for each tube
A SH2 DNA	"SH2"	80 μ L
B Cas9	"Cas9"	60 μ L
C gRNA A/C	"gRNA A" "gRNA C"	20 μ L
D gRNA B/Scramble	"gRNA B" "gRNA sc"	20 μ L
E gRNA D	"gRNA D"	20 μ L
F DNA Standard Marker	Marker	35 μ L
G Gel Loading Solution	GLS	30 μ L

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

모듈 1: 타겟 SH2 에 대한 gRNA 설계

이 모듈에서 여러분은 SH2 유전자의 DNA 서열 데이터를 사용하여 gRNA를 설계할 것입니다. 아래에 전사된 SH2 유전자의 일부 분절이 있습니다. gRNA를 설계하기 위해 먼저 타겟 서열에서 PAM 부위를 찾아야 합니다. 이 실험에서는 5'-NGG-3' PAM 부위를 인식하는 *Streptococcus pyogenes* 유래의 Cas9 효소를 사용한다고 가정합니다. 여기서 "N"은 임의의 뉴클레오타이드를 나타냅니다.

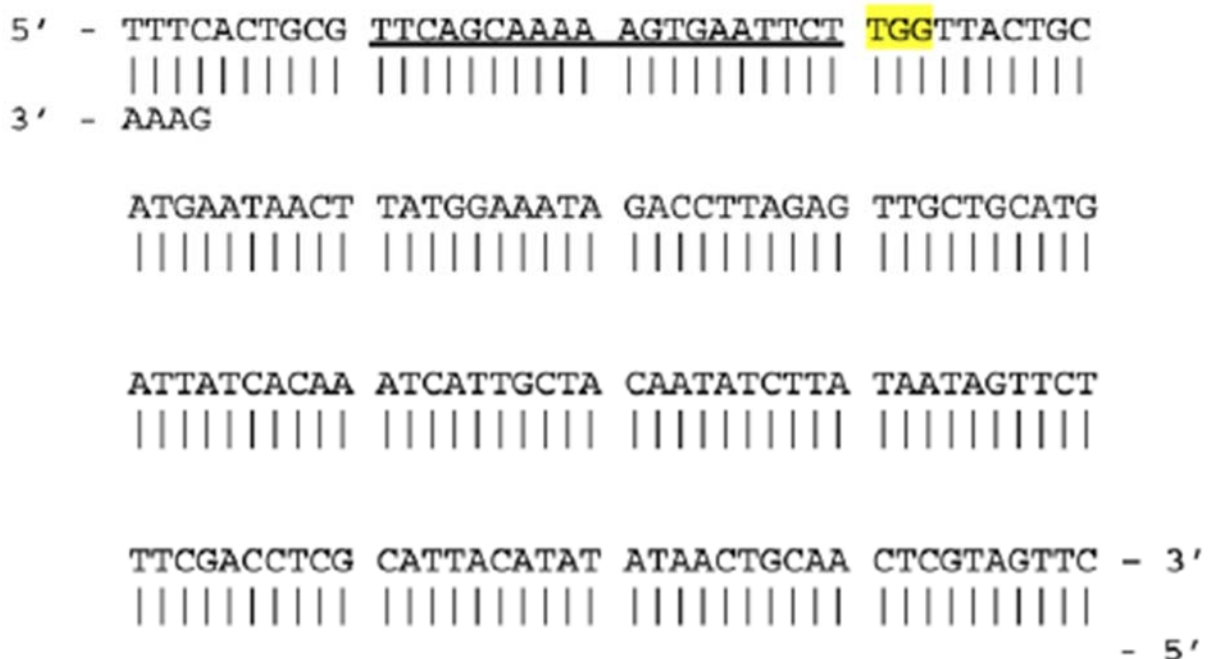
이는 Cas9가 AGG, TGG, CGG 또는 GGG 서열 바로 상류(5' 방향)의 서열에만 결합한다는 의미입니다. Cas9가 상보적인 DNA 가닥 중 어느 쪽에든 결합할 수 있으므로, 양쪽 가닥 모두에서 PAM 서열을 찾아야 합니다.

아래에 예시로 하나의 gRNA가 제시되어 있습니다. 여기서 노란색으로 강조된 PAM 서열은 TGG이며, 이는 주형 가닥에 위치합니다. 따라서 타겟 서열은 PAM 부위 상류 20 nt이며 이는 밑줄로 표시되어 있습니다.

1. 아래 SH2 서열의 상보적 뉴클레오타이드를 기록하세요. 처음 3개는 이미 채워져 있습니다.

2. *Streptococcus pyogenes* Cas9의 4개 PAM 부위를 찾아 DNA 서열에 동그라미로 표시하세요.

주의: 이 Cas9는 NGG를 PAM 서열로 인식합니다.



3. 각 PAM 부위 상류(5' 방향)에 있는 20개의 뉴클레오타이드를 찾아 밑줄을 그으세요. 이것이 타겟 서열입니다. 5'-3' 방향으로 서열을 아래 표에 기록하세요. 주의: 하단 가닥의 경우 오른쪽에서 왼쪽으로 서열을 기록해야 합니다.

Sample Name	Target Sequence	PAM Sequence
gRNA A	TTCAGCAAAAAGTGAATTCT	TGG
gRNA B		
gRNA C		
gRNA D		

(주)한진바이오
KOREA SCIENTIFIC

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

모듈 II: gRNA 특이성 측정

이 모듈에서는 Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)을 사용하여 모듈 I에서 확인한 6개의 잠재적 gRNA의 특이성을 확인할 것입니다. BLAST 도구는 사용자가 지정한 DNA 서열과 GenBank 데이터베이스의 모든 서열 간의 국소 유사성 영역을 찾습니다. 현재 GenBank는 거의 모든 서열 분석된 DNA를 포함하는 여러 데이터베이스로 구성되어 있습니다. BLAST 용어로, 사용자 입력 서열은 질의 서열(query sequence), 데이터베이스의 서열은 타겟 서열(target sequences), 그리고 입력 서열과 유사한 서열은 히트(hits)라고 합니다. 이 실습에서는 National Center for Biotechnology(NCBI)에서 제공하는 무료 서비스를 이용할 것입니다.

1. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 를 입력하여 NCBI BLAST 페이지로 이동합니다.

2. BLAST 홈페이지에서 "Nucleotide BLAST"를 클릭합니다.



3. 새 화면에서 "blastn" 탭이 선택되어 있는지 확인합니다.



4. 모듈 I에서 제공된 SH2 유전자 분절의 전체 뉴클레오타이드 서열(5' → 3' 방향)을 입력합니다:

```
TTTCACTGCGTTTCAGCAAAAAGTGAATTCCTGGTTACTGCATGAATAACTTATGGAAATAGACCTTAGAGTTGCTGCATGAT-  
TATCACAATCATTGCTACAATATCTTATAATAGTTCTTTTCGACCTCGCATTACATATATAACTGCAACTCGTAGTTC  
(IMAGE 3).
```

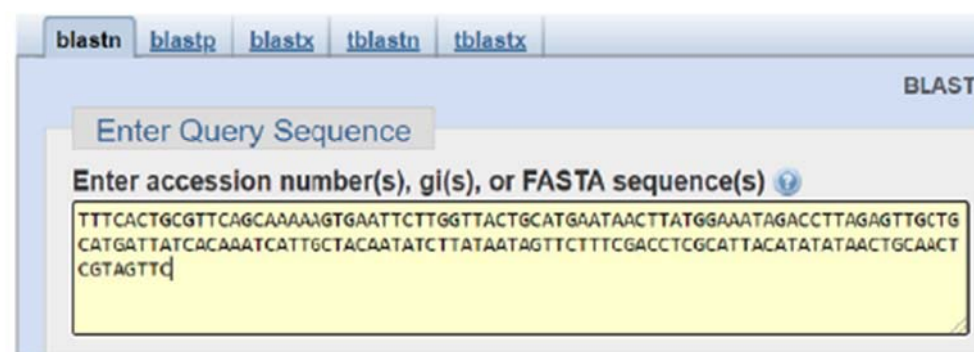


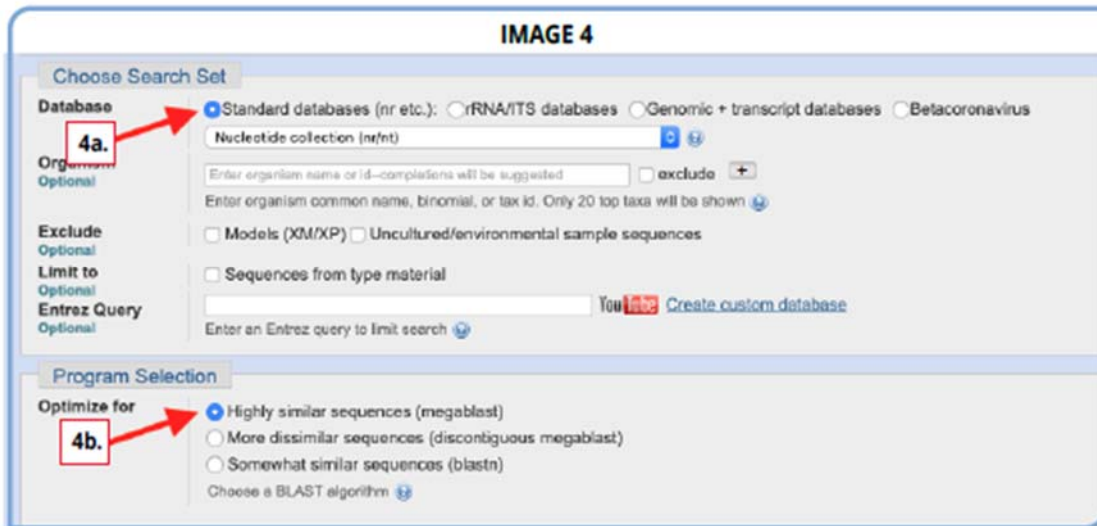
IMAGE 3

5. "Choose Search Set" 아래에서 "Standard Databases (nr etc)"가 선택되어 있고 드롭다운 메뉴

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

에서 "Nucleotide collection (nr/nt)"이 강조되어 있는지 확인합니다. 나머지 항목은 비워둡니다 (Image 4a).

6. "Program Selection" 아래에서 "Highly similar sequence (megablast)"를 선택합니다(Image 4b).



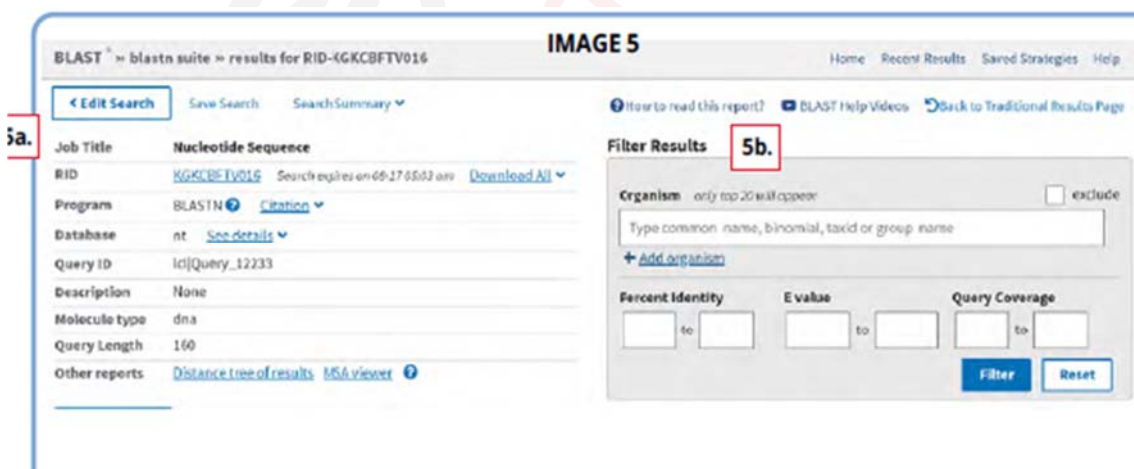
7. 파란색 "BLAST" 쿼리 상자를 클릭합니다.

8. "BLAST" 쿼리 상자를 클릭하면 ID 번호가 부여됩니다. 나중에 결과를 확인할 수 있도록 이 번호를 기록합니다.

9. BLASTN 검색 보고서를 검토합니다. 보고서에는 다음이 포함됩니다:

a. BLASTN 검색 매개변수 개요가 포함된 검색 요약 보고서(Image 5a)

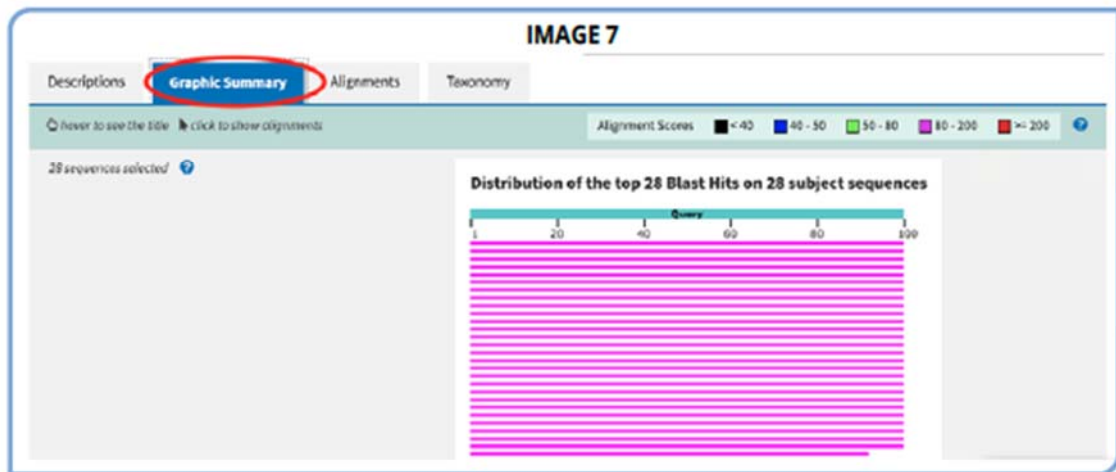
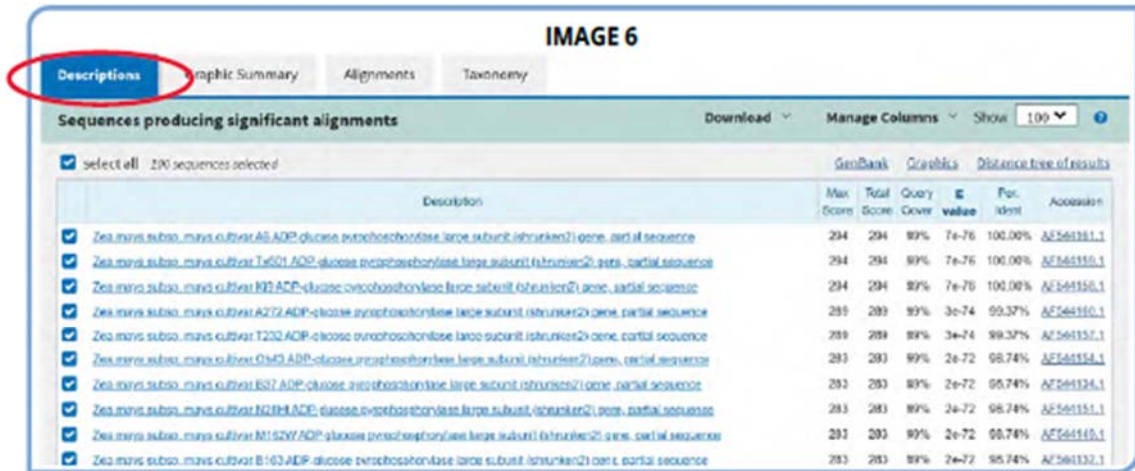
b. BLASTN에서 서열을 비교할 생물체를 지정할 수 있는 FILTER RESULTS 섹션(Image 5b)



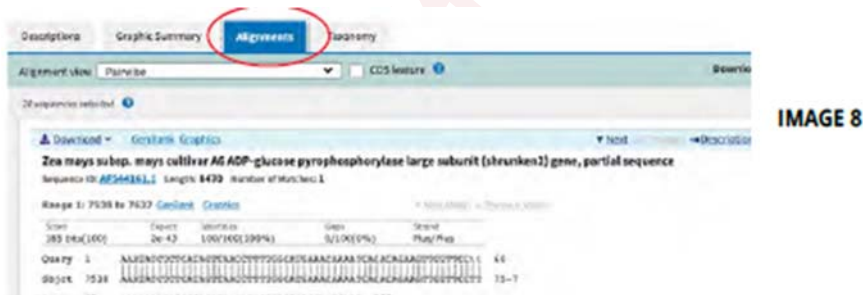
★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

c. 데이터베이스의 서열 중 질의 서열과 유의미한 서열 상동성을 가진 모든 서열이 표시되는 DESCRIPTIONS 섹션(Image 6)

d. 데이터베이스 일치 서열과 질의 서열의 정렬을 보여주는 GRAPHIC SUMMARY 섹션. 상자 색상은 정렬 점수에 따라 다르며, 빨간색은 가장 높은 정렬 점수를 나타냅니다(Image 7).

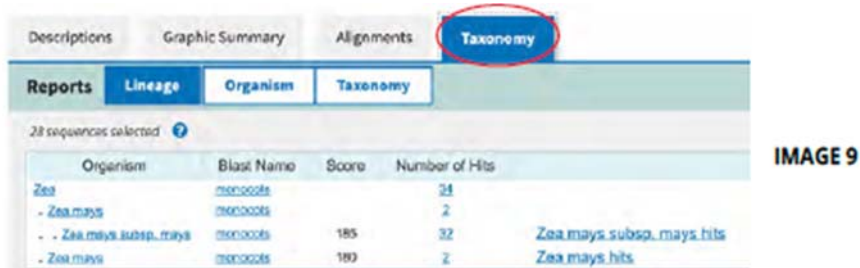


e. 각 BLAST 히트에 대한 정렬 블록을 보여주는 ALIGNMENT 섹션. 각 정렬 블록의 시작 부분에는 최대 점수, 기대값, 서열 일치도, 정렬에서의 공백 수, 질의 서열과 대상 서열 사이의 방향성 등이 요약되어 있습니다(Image 8).



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

f. 해당 서열이 확인된 생물체를 보여주는 Taxonomy 섹션(Image 9).



12. 이 검색을 수행한 후 최상위 히트는 Zea mays subsp. mays cultivar ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit (shrunkn 2) gene여야 합니다. 이 유전자의 버전이 여러 개일 수 있지만, 모두 동일한 단백질(ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit)을 코딩할 것입니다.

13. 이제 CRISPR로 자르려는 유전자에 대해 익숙해졌으므로, 4개의 잠재적 gRNA 각각을 BLAST에서 검색해 보겠습니다. 각 gRNA에 대한 최상위 히트를 아래 Table 1에 기록하십시오. gRNA를 BLAST에 입력할 때는 5'-3' 방향으로 입력해야 합니다.









TABLE 1

gRNA	Top Hit

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

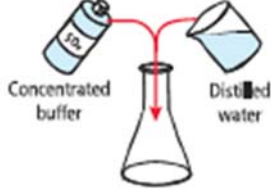


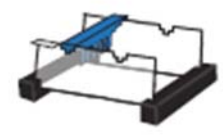
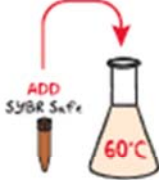
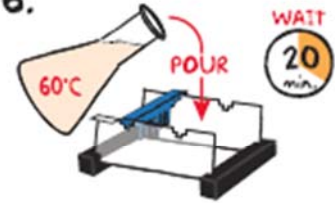
모듈 III: CRISPR 를 사용한 절단

이 모듈에서는 Cas9와 모듈 I에서 설계하고 모듈 II에서 검증한 4개의 가장 특이적인 gRNA(gRNA A, B, C, D) 및 negative control로 사용되는 무작위 서열(nonspecific) gRNA를 사용하여 SH2 유전자를 절단할 것입니다.

<p>1. </p> <p>LABEL microcentrifuge tubes A-E for the five CRISPR-Cas9 digestions. Put your initials or group number on the tube.</p>	<p>2. </p> <p>Use a micropipette to ADD 15 μL of SH2 DNA to tubes A-E.</p>	<p>3. </p> <p>ADD 10 μL of Cas9 to tubes A-E.</p>	<p>4. </p> <p>Use Table 2 below to ADD 15 μL of each gRNA to its respective tube.</p>
<p>5. </p> <p>CAP tubes A-E and TAP gently on the lab bench to mix and collect contents at the bottom of the tubes.</p>	<p>6. </p> <p>INCUBATE tubes in a 37°C water bath for 30-60 min. (Alternatively, tubes can be incubated in a 45°C water bath for 15 min.).</p>	<p>7. </p> <p>ADD 5 μL of Gel Loading Solution to tubes A-E to stop the reactions.</p>	<p>8. </p> <p>CAP tubes A-E and TAP gently on the lab bench to mix. PROCEED to Module IV: Agarose Gel Electrophoresis.</p>

1. 원심분리기 튜브를 A부터 E까지 표기합니다.
2. 마이크로 피펫을 사용해 SH2 DNA를 15 μ L 씩 위의 A-E 튜브에 각각 넣습니다.
3. Cas9 10 μ L 씩 A-E 튜브에 넣습니다.
4. 아래 Table2 표를 참고해 각 gRNA를 알맞은 튜브에 15 μ L씩 넣습니다.
5. 튜브의 뚜껑을 닫고 실험테이블 위에 살짝 쳐서 내용물이 튜브 바닥에 모이도록 합니다.
6. 37도 설정된 항온 수조에 30-60분간 담궈둡니다. (또는 45도 물에 15분 담궈둡니다)
7. 5 μ L 로딩 용액(Gel Loading Solution)을 A-E 튜브 마다 넣습니다.
8. 뚜껑을 닫고 실험테이블 위에 살짝 쳐서 내용물이 튜브 바닥에 모이도록 합니다.

모듈 IV: 아가로스 전기영동

<p>1. </p> <p>DILUTE concentrated (50X) electrophoresis buffer with distilled water to create 1X buffer (see Table A).</p>	<p>2. </p> <p>MIX agarose powder with 1X buffer in a flask (see Table A).</p>	<p>3. </p> <p>DISSOLVE agarose powder by boiling the solution. MICROWAVE the solution on high for 1 minute. Carefully REMOVE the flask and MIX by swirling. Continue to HEAT the solution in 15-second bursts until the agarose is completely dissolved (the solution should be clear like water).</p>
<p>4. </p> <p>While agarose is cooling, SEAL the ends of the gel-casting tray with the rubber end caps. PLACE the well template (comb) in the appropriate notch.</p>	<p>5. </p> <p>Before casting the gel, ADD diluted SYBR® Safe to the molten agarose (see Table A) and SWIRL to mix.</p>	<p>6. </p> <p>POUR the cooled agarose solution into the prepared gel-casting tray. The gel should thoroughly solidify within 20 minutes. The gel will stiffen and become less transparent as it solidifies.</p>

1. 50X 전기영동 버퍼를 증류수로 희석하여 1X 완충액을 만듭니다(Table A 참조).


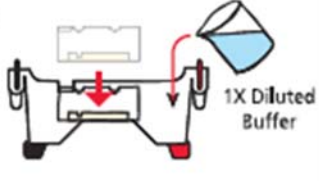

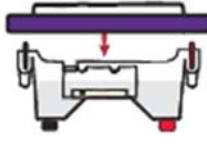
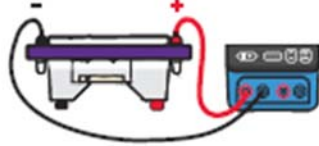
Size of Gel Casting Tray	Concentrated Buffer (50x)	+ Distilled Water	+ Amt of Agarose	= TOTAL Volume	Diluted SYBR® (Step 6)
7 x 7 cm	0.6 mL	29.4 mL	0.24 g	30 mL	30 µL
10 x 7 cm*	0.9 mL	44.1 mL	0.36 g	45 mL	45 µL
14 x 7 cm	1.2 mL	58.8 mL	0.48 g	60 mL	60 µL

2. 플라스크에 아가로스 가루와 1X 버퍼를 섞습니다(Table A 참조).

3. 녹이기 위해 용액을 가열합니다. 전자레인지에 1분간 가열합니다. 플라스크를 주의해서 꺼내고 휘저어 섞습니다. 아가로스가 완전히 녹을 때까지 15초 간격으로 계속 가열합니다(용액은 물처럼 맑아야 합니다).

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

4. 아가로스가 식는 동안 젤 casting 트레이 끝을 고무 마개로 밀봉합니다. 웰 템플릿(comb)을 적절한 홈에 끼웁니다.
5. 젤을 넣기 전에 녹인 아가로스에 희석된 SYBR® Safe를 넣고(Table A 참조) 휘저어 섞습니다.
6. 식힌 아가로스 용액을 준비된 젤 casting 트레이에 붓습니다. 젤은 20분 내에 완전히 굳어야 합니다. 굳으면서 젤은 단단해지고 불투명해집니다.

<p>8.</p>  <p>REMOVE end caps and comb. Take particular care when removing the comb to prevent damage to the wells.</p>	<p>9.</p>  <p>PLACE the gel (still on the tray) into the electrophoresis chamber. COVER the gel with 1X Electrophoresis Buffer (See Table B for recommended volumes). The gel should be completely submerged.</p>	<p>10.</p>  <p>OBTAIN your sample tubes. Make sure the gel is properly oriented in the chamber. LOAD the entire sample (35 μL) into the well in the order indicated by Table 3, below.</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th colspan="2">TABLE 3: GEL LOADING</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Lane 1</td> <td>DNA Standard Marker</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>Tube A - gRNA A</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>Tube B - gRNA B</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>Tube C - gRNA C</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>Tube D - gRNA D</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>Tube E - Scramble gRNA</td> </tr> </tbody> </table>	TABLE 3: GEL LOADING		Lane 1	DNA Standard Marker	2	Tube A - gRNA A	3	Tube B - gRNA B	4	Tube C - gRNA C	5	Tube D - gRNA D	6	Tube E - Scramble gRNA
TABLE 3: GEL LOADING																
Lane 1	DNA Standard Marker															
2	Tube A - gRNA A															
3	Tube B - gRNA B															
4	Tube C - gRNA C															
5	Tube D - gRNA D															
6	Tube E - Scramble gRNA															
<p>11.</p>  <p>PLACE safety cover on the unit. CHECK that the gel is properly oriented. Remember, the DNA samples will migrate toward the positive (red) electrode.</p>	<p>12.</p> <p>CONNECT leads to the power source and PERFORM electrophoresis (See Table C for time and voltage guidelines). Allow the tracking dye to migrate at least 3.5 cm from the wells.</p> 	<p>13.</p> <p>After electrophoresis is complete, REMOVE the gel and casting tray from the electrophoresis chamber and proceed to Step 14 for VISUALIZING the agarose gel.</p>														

8-9. comb과 고무마개 분리 후 챔버에 젤이 올려진 트레이를 넣고 1x 버퍼를 채웁니다. 버퍼 용량은 Table B표를 참고합니다.





10. Table3를 참조해 각 Lane에 샘플을 35 μ L씩 로딩합니다.

11-13. 뚜껑을 닫고 전원공급장치에 연결하고 전기영동을 실시합니다.

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

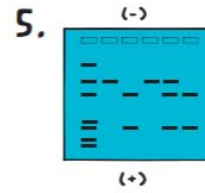
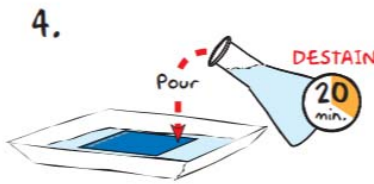
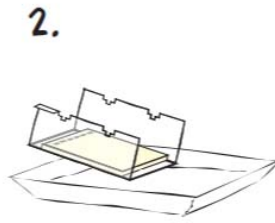
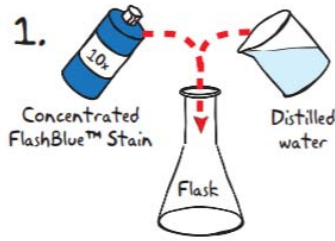
EDVOTEK Model #	Total Volume Required	Dilution 50x Conc. Buffer + Distilled Water	
EDGE™	150 mL	3 mL	147 mL
M12	400 mL	8 mL	392 mL
M36	1000 mL	20 mL	980 mL

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

<p>14.</p>  <p>SLIDE gel off the casting tray onto the viewing surface of the transilluminator. LOWER orange contrast cover.</p>  <p>Be sure to wear UV goggles if using a UV transilluminator.</p>	<p>15.</p>  <p>Turn the unit ON. DNA should appear as bright green bands on a dark background.</p> <p>PHOTOGRAPH the results.</p>	<p>16.</p>  <p>Turn the unit OFF. REMOVE and DISPOSE of the gel. CLEAN the transilluminator surfaces with distilled water.</p>
---	---	---

14. 전기영동 종료 후 뒤집개 등을 사용해 젤을 조심스럽게 일루미네이터로 이동시킵니다.
15. 결과를 관찰합니다.
16. 종료 후 증류수로 일루미네이터 표면을 닦습니다.

(선택사항 추가염색) FlashBlue 를 이용한 아가로스 겔 염색



- FlashBlue (10배 농축) 10ml와 증류수 90ml를 플라스크에 넣고 희석시킵니다.
- 아가로스 겔과 캐스팅 트레이를 전기영동 장치에서 빼냅니다. 깨끗한 염색용 트레이 위에 겔만 미끄러뜨려 떨어뜨립니다.
- 섞어놓은 Staining(염색)용액을 겔이 충분히 담길 정도로 붓고 5분간 놔둡니다. 5분을 넘어가게 되면 더 많은 destaining(탈색) 시간을 요구하게 됩니다.
- 다른 트레이로 겔을 옮긴 후 증류수를 붓습니다. destaining은 최소 20분동안 이뤄져야 합니다. 시간을 단축하려면 물을 자주 교체하십시오.
- 겔을 꺼낼 때는 손상되지 않게 조심히 꺼냅니다. 더 나은 겔 결과 관찰을 위해 transilluminator 에서 관찰합니다.

결과 분석

모듈 I

5' - TTCTACTGCG TTCAGCAAAA AGTGAATTCT TGGTTACTGC ATGAATAACT
 3' - AAAGTGACGC AAGTCGTTTT TCACTTAAGA ACCAATGACG TACTTATTGA

 TATGGAAATA GACCTTAGAG TTGCTGCATG ATTATCACAA ATCATTGCTA
 ATACCTTTAT CTGGAATCTC AACGACGTAC TAATAGTGTT TAGTAACGAT

 CAATATCTTA TAATAGTTCT TTCGACCTCG CATTACATAT ATAACTGCAA
 GTTATAGAAT ATTATCAAGA AAGCTGGAGC GTAATGTATA TATTGACGTT

 CTCGTAGTTC - 3'
 GAGCATCAAG - 5'

Sample Name	Target Sequence	PAM Sequence
gRNA A	TTCAGCAAAAAGTGAATTCT	TGG
gRNA B	GTTACTGCATGAATAACTTA	TGG
gRNA C	ATAATCATGCAGCAACTCTA	AGG
gRNA D	GCAGTTATATATGTAATGCG	AGG

모듈 II

이 결과는 2020 년 8 월 것이지만 BLAST 가 지속적으로 업데이트되어 실험 결과와 다를 수 있습니다.

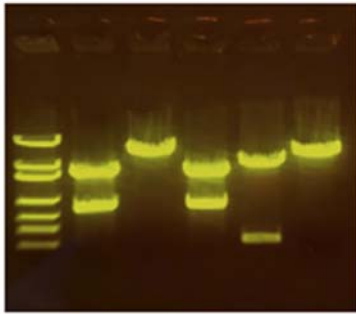
Sample Name	Top Hit from BLAST
gRNA A	<i>Zea mays</i> ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit (shrunken2) - SH2
gRNA B	<i>Zea mays</i> shrunken-2 (SH2) gene locus, partial sequence
gRNA C	<i>Zea mays</i> shrunken-2 (SH2) gene locus, partial sequence
gRNA D	<i>Saccharum hybrid</i> cultivar R570 done BAC 022D05 complete sequence

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

결과 분석

모듈 IV

MODULE IV



Lane	Sample	Result	Molecular Weights
1	Standard DNA Marker	---	6751, 3652, 2877, 1568, 1118, 825, 630
2	Tube A - gRNA A	DNA is cut	3000, 1280
3	Tube B - gRNA B	Uncut DNA	4280
4	Tube C - gRNA C	DNA is cut	3000, 1280
5	Tube D - gRNA D	DNA is cut	3650, 630
6	Tube E - Scramble gRNA	Uncut DNA	4280