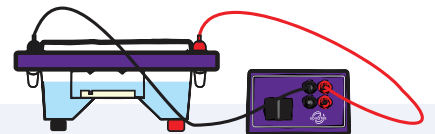

EcoRI 제한효소를 이용한 람다 DNA의 절단

Cleavage of Lambda DNA with Eco RI Restriction Enzyme

ED212



☎ 02-929-1110 ✉ info@koreasci.com

🛒 www.koreasci.com

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

실험 목표

제한효소를 이해하고 전기영동을 실행합니다.

제품 구성품

- A Lambda phage DNA
- B Concentrated Restriction Enzyme Reaction Buffer
- C Enzyme grade water
- D Eco RI Dryzymes endonuclease
- E DNA Standard Marker
- F Reconstitution Buffer F
- G Reconstitution Buffer G

시약

10X Gel Loading Solution

Practice Gel Loading Solution

UltraSpec-Agarose

Electrophoresis Buffer (50x)

FlashBlue DNA stain

InstaStain Blue cards

1ml pipet

Transfer pipet

Microtest tubes with attached caps

Semi-log graph paper template

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

필요 장비 및 준비물

전기영동 장치, 전원공급장치, 피펫과 피펫팁, 전자저울, 전자레인지(핫플레이트), 250mL삼각플라스크, 안전장갑, 증류수, 염색용 트레이, Transilluminator, 향온수조, 얼음, 마커펜, 500mL 실린더

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

모듈 1: 실험 전 준비

1. Lambda Phage DNA (A) 튜브, Restriction Enzyme Reaction (B) 튜브, Enzyme Grade Water (C) 튜브를 손가락으로 툭툭 쳐서 아래로 모이게 합니다.
2. Restriction Enzyme Reaction Buffer 준비:
 - A. 깨끗한 마이크로 피펫팁을 사용해 Enzyme Grade Water (C) 1mL 를 원심분리기 튜브에 옮깁니다.
 - B. Concentrated Restriction Enzyme Reaction buffer(B) 126 μ L 을 이 튜브에 넣습니다.
 - C. 튜브 뚜껑을 닫고 손가락으로 강하게 쳐서 섞습니다. 볼텍스가 있으면 볼텍스를 이용해 섞습니다. 30 초 동안 섞습니다.
 - D. 10 개의 원심분리기 튜브에 "1"로 표기하고 희석된 버퍼 80 μ L 씩을 넣고 뚜껑을 닫습니다.
3. Lambda Phage DNA (A) 10 μ L 를 10 개의 원심분리기 튜브에 넣고 "2"로 표기합니다.
4. Enzyme Grade Water (C) 5 μ L 를 10 개의 원심분리기 튜브에 넣고 "3"을 표기하고 뚜껑을 닫습니다.
5. 10X Gel Loading Solution 10 μ L 를 10 개의 원심분리기 튜브에 넣습니다.

★ 실험당일 준비

37 도 항온수조를 준비합니다.

DryZyme Ecoli 복원 30 분 이내에 restriction digest 준비

1. Reconstitution Buffer (F)와 Reconstitution Buffer (G)를 손가락으로 친 후 얼음에 꼽아 둡니다.
2. Dryzyme 튜브(D)의 바닥에 고체 물질이 모인 것을 확인하고 그렇지 않다면 원심분리기에 넣고 돌려 모이게 합니다.
3. 모듈 1 실험 시작 30 분 전, Reconstitution Buffer(F) 30 μ L 를 Dryzyme 튜브 바닥의 고체에 넣고 1 분동안 녹게 놔둡니다. 손가락으로 튜브를 툭툭 치거나 볼텍스를 최소 30 초간 돌려 잘 섞습니다. 고체가 완전히 용해될 때까지 잘 섞습니다. 이 때부터 enzyme 은 다시 보관될 수 없습니다. 가능한 빨리 사용해야 합니다. 사용할 때까지 얼음에 꼽아둡니다.

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

4. Reconstitution Buffer (G) 30 μ L 를 Dryzyme 튜브에 천천히 넣습니다. 이 버퍼용액은 어느 정도의 점성이 있기에 피펫팅 하기 힘들 수도 있습니다. 버퍼에 추가하기 전에 모든 용액이 피펫 팁으로 유입되었는지 확인하고 분주합니다.
5. 버퍼를 추가한 후 볼텍스를 이용하거나 피펫팅으로 20 초간 잘 섞습니다.
6. 10 개의 원심분리기에 "4" 표기하고 5 μ L EcoRI enzyme 를 넣습니다. 얼음에 꼽아두고 30 분이내로 사용합니다.

실험 전 각 조에 분배해야하는 것

희석된 Restriction Enzyme Reaction Buffer "1" 튜브 1 개

Lambda DNA "2" 튜브 1 개

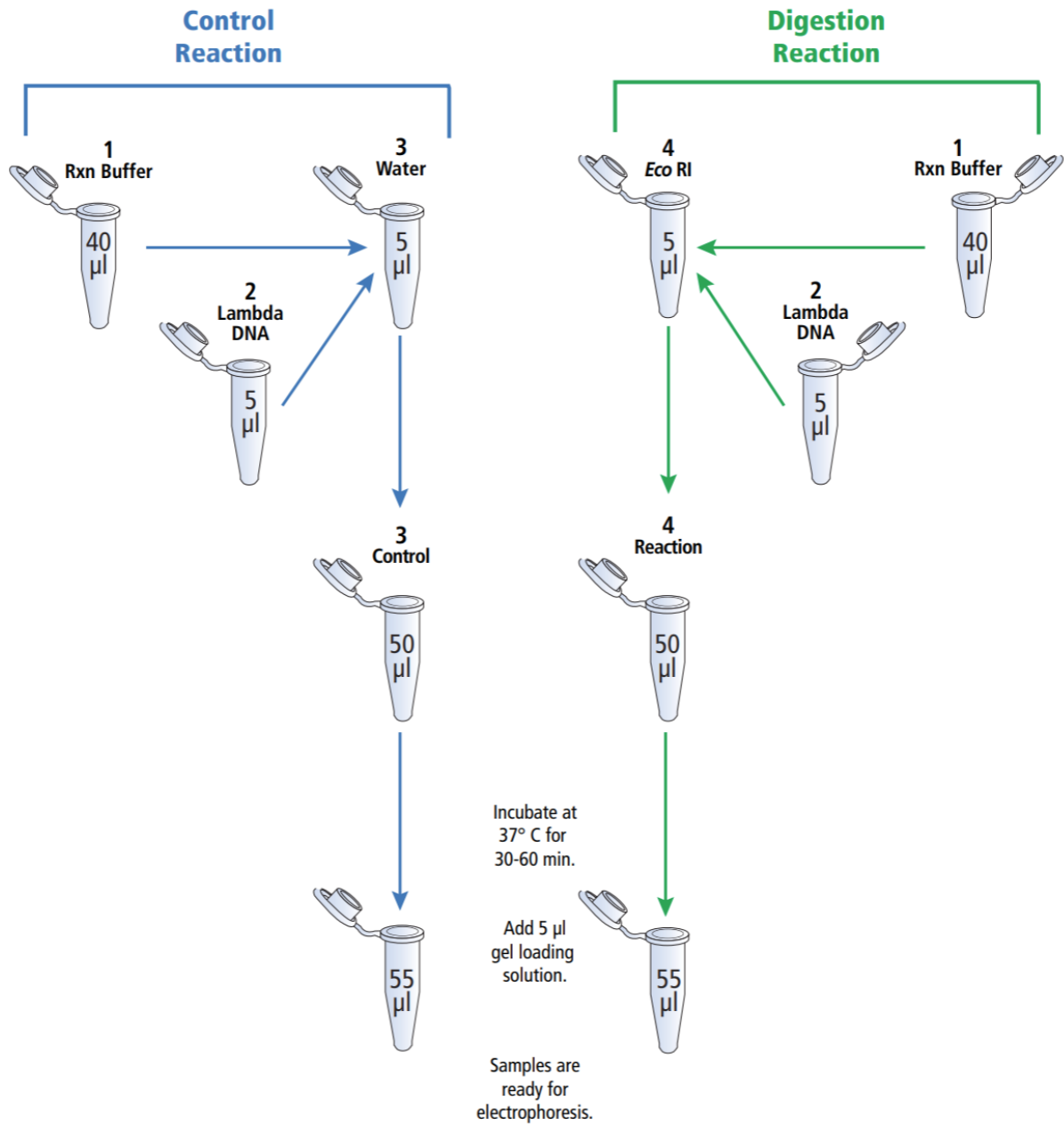
Enzyme Grade Water "3" 튜브 1 개

EcoRI (얼음에 꼽아둔) "4" 튜브 1 개

10X Gel Loading Buffer 튜브 1 개

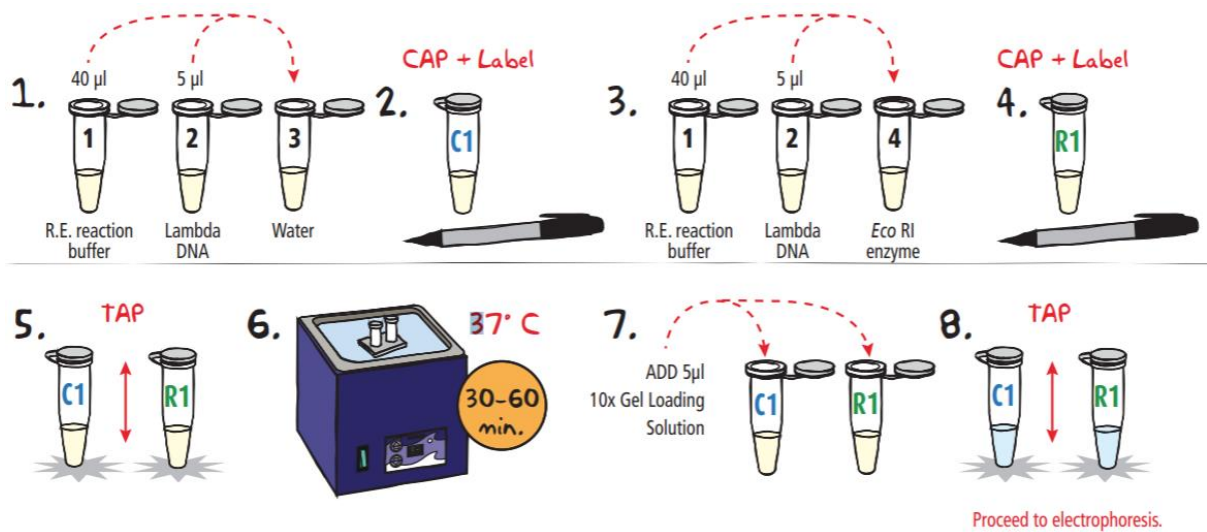
Summary of Reagent Preparation			
Component	Number of tubes	Label	Volume per tube
Diluted Reaction Buffer	20	1	80
Lambda DNA	20	2	10
Enzyme Grade water	10	3	5
Eco RI	10	4	5

모듈 1 실험 개요



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

모듈1: Lambda DNA의 제한효소

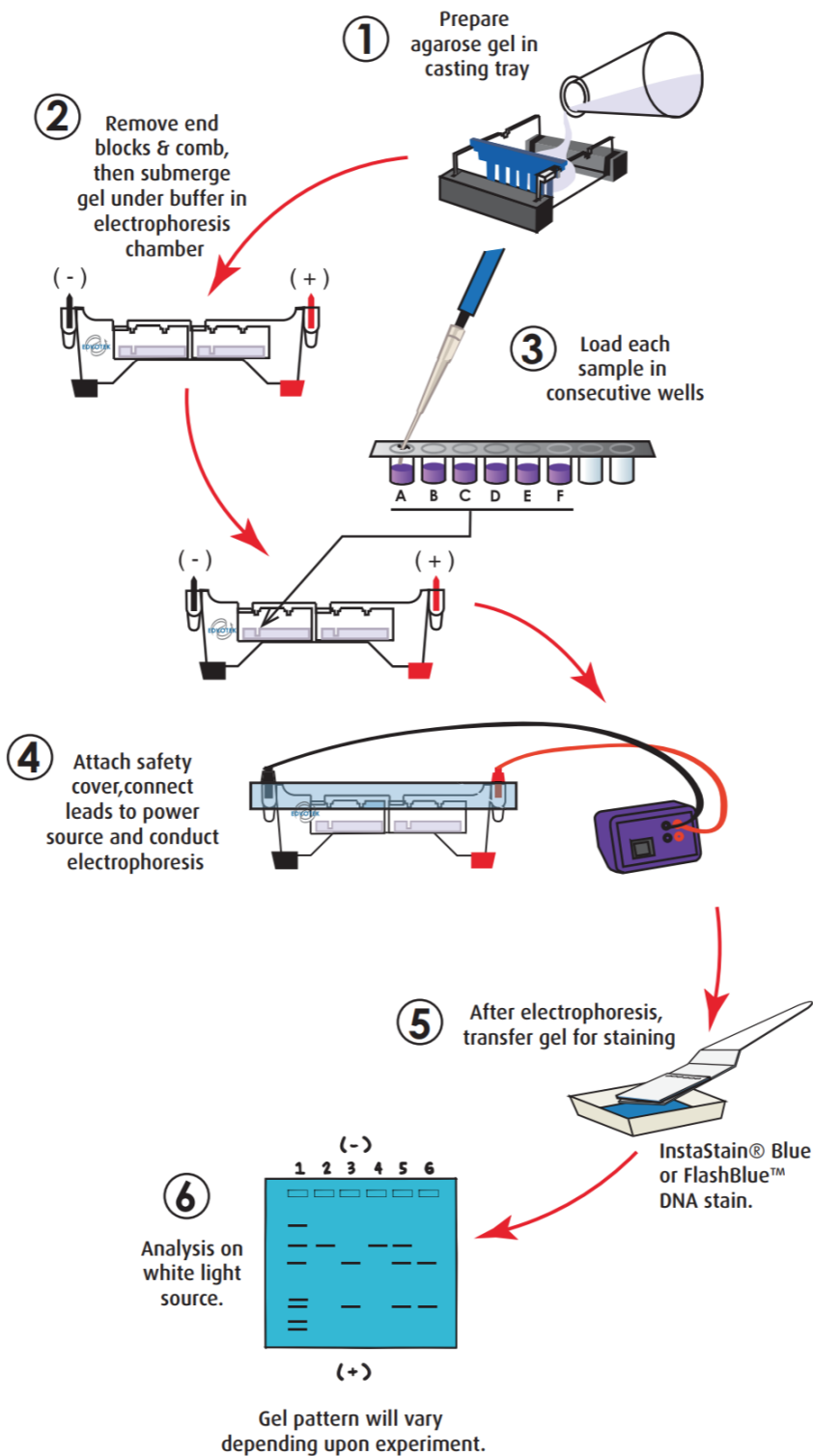


1. 튜브 1 번 Restriction Enzyme Reaction Buffer 40µL 와 튜브 2 번 Lambda DNA 5µL 를 튜브 3 번(Water)에 추가합니다.
2. 튜브 뒷개를 닫고 "C"와 그룹명을 적습니다. (Control "C")
3. 튜브 1 번 Restriction Enzyme Reaction Buffer 40µL 와 튜브 2 번 Lambda DNA 5µL 를 4 번 Eco RI enzyme 튜브에 넣습니다.
4. 뚜껑을 닫고 "R"과 그룹명을 적습니다. (Reaction "R")
5. 튜브를 살살 쳐가면서 섞습니다.
6. 37 도의 항온 수조에서 30-60 분간 배양합니다.
7. 10X gel loading solution 을 각 튜브에 5µL 씩 넣습니다.
8. 뚜껑을 닫고 튜브를 쳐가면서 섞거나 볼텍스에 넣고 돌립니다. 이 두 샘플로 전기영동을 합니다.

Summary of Restriction Enzyme Digestion Reactions					
Tube	Tube 1 Reaction Buffer	Tube 2 Lambda DNA	Tube 3 Water	Tube 4 EcoRI	Reaction Volume
REACTION	40 µl	5 µl	---	5 µl	50 µl
CONTROL	40 µl	5 µl	5 µl	---	50 µl

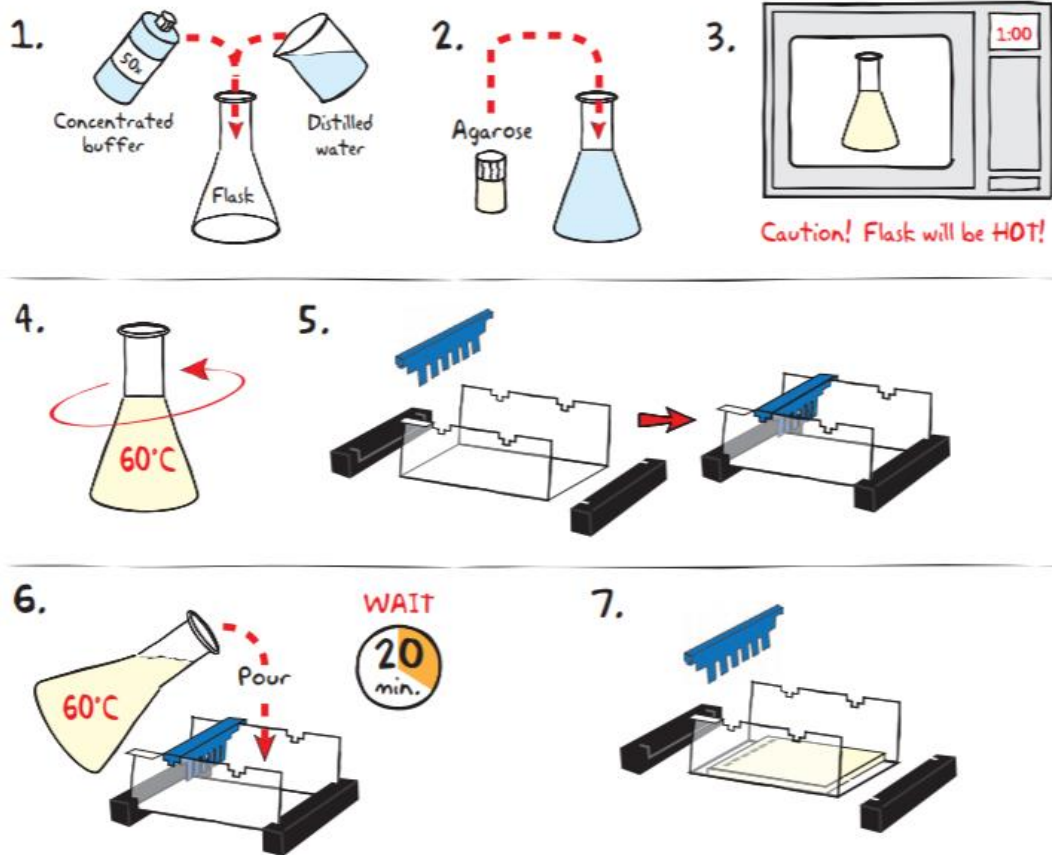
★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

모듈2: 전기영동 실험 개요



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

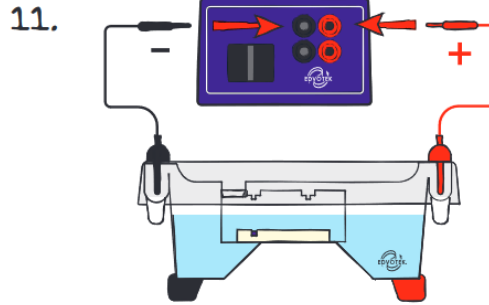
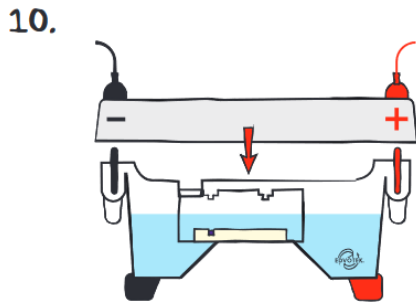
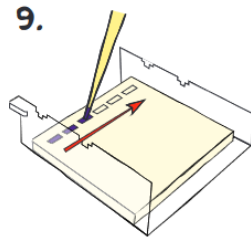
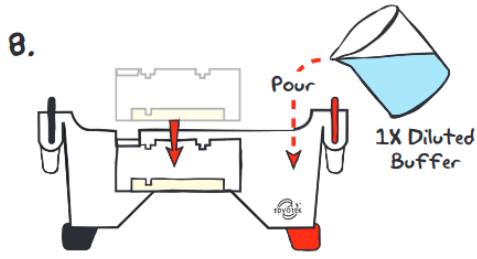
모듈 1: 아가로스겔 전기영동



1. Concentrated buffer(50X)를 1X버퍼로 만들기 위해 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°C까지 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™ Gel				
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	0.23 g	30 ml
7 x 10 cm	1.0 ml	49.0 ml	0.39 g	50 ml
7 x 14 cm	1.2 ml	58.8 ml	0.46 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. 40 μ L Standard Dye Marker를 첫 번째 well에 분주합니다. 준비한 샘플 5개를 나머지 well에 분주합니다.

Lane	Sample
1	Group 1 Standard Marker
2	Group 1 Reaction
3	Group 1 Control
4	Group 2 Standard Marker
5	Group 2 Reaction
6	Group 2 Control

10. 전기영동장치의 덮개를 덮습니다. 전극의 방향 (+, -)이 알맞게 연결되었는지 확인합니다.

11. 전원공급장치에 연결하여 전기영동을 시작합니다. (Table C. 의 공급전압과 구동 시간 참조)

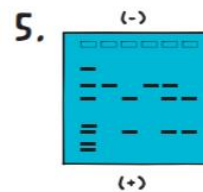
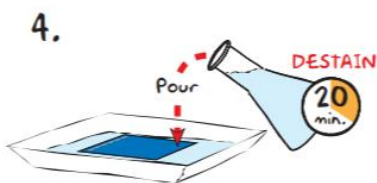
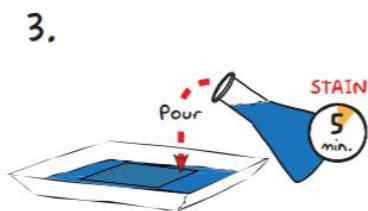
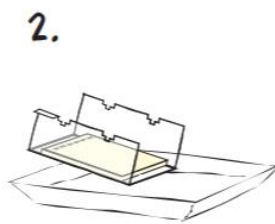
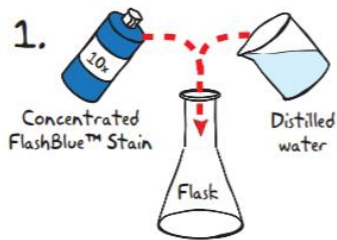
12. 모두 마치고 나면 겔과 트레이를 빼내 결과를 관찰합니다.

EDVOTEK Model #	Total Volume Required	Dilution	
		50x Conc. Buffer	+ Distilled Water
M6+ & M12 (new)	300 ml	6 ml	294 ml
M12 (classic)	400 ml	8 ml	392 ml
M36	1000 ml	20 ml	980 ml

Volts	Electrophoresis Model		
	M6+	M12 (new)	M12 (classic) & M36
	Min. / Max.	Min. / Max.	Min. / Max.
150	15/20 min.	20/30 min.	25 / 35 min.
125	20/30 min.	30/35 min.	35 / 45 min.
75	35 / 45 min.	55/70 min.	60 / 90 min.

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

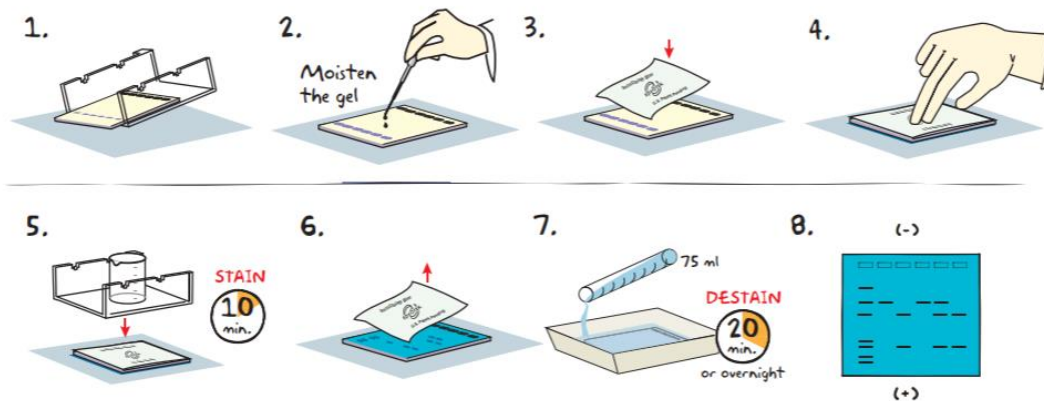
염색 선택1: FlashBlue를 이용한 아가로스 겔 염색



- 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 Transilluminator에서 관찰합니다.

염색 선택2: InstaStain Blue를 이용한 아가로스 겔 염색

가장 사용이 쉽고 편리한 DNA염색입니다. 기존의 염색량은 많은 양을 만들고 보관하고 폐기하였지만 이 카드는 소량으로 충분히 DNA 염색이 가능합니다. Staining(염색)과 destaining(탈색) 작업이 동시에 진행되어 최소한의 용액 낭비를 유지합니다.



1. 조심스럽게 아가로스겔과 트레이를 전기 영동장치에서 꺼낸 후 깨끗한 트레이 위에 겔만 올립니다.
2. 전기영동 버퍼 몇 방울을 겔에 떨어뜨려 수분을 유지합니다.
3. 장갑을 착용하고 InstaStain Blue 카드의 파란 면을 겔 위에 올립니다.
4. 장갑을 착용한 손으로 눌러가며 염색카드와 겔 사이의 공기를 없앱니다. 공기방울로 인해 염색이 안될 수 있습니다.
5. 겔과 카드에 트레이와 비커같이 가벼운 것을 올려놓아 잘 붙어있도록 합니다. 염색은 10분동안 진행합니다.
6. InstaStain Blue 카드를 제거합니다. 만약 색상이 매우 열게 되었다면 다시 염색카드를 올리고 5분간 반복합니다.
7. 카드를 제거한 겔을 깨끗한 트레이로 이동시키고 증류수를 붓고 20분간 destaining 합니다. 최상의 결과를 위해 오비탈 셰이커를 이용하셔도 됩니다. 빠른 탈색을 원하시면 37도의 증류수로 자주 교체합니다.
8. 겔을 꺼내고 Transilluminator위에 올려 관찰합니다.

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

Experiment Results and Analysis

Lane	Sample	Molecular Weight (bp)
1	DNA Standard Marker	6751, 3652, 2827, 1568, 1118, 825, 630
2	Lambda DNA cut with <i>EcoRI</i>	21226, 7421, 5804, 5643, 4878, 3530
3	Lambda DNA (uncut)	48500

NOTE: Smaller bands appear fainter in color than larger bands because they stain less efficiently. A white light visualization system (cat. #552) will aid with visualization.

