실험 가이드북

제한효소에 의한 DNA 지문분석

#ED225

DNA FINGERPRINTING USING RESTRICTION ENZYMES

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

실험 목표

가상의 범죄수사 사건 분석으로 RFLP기반의 DNA 지문분석에 적용되는 제한효소 사용을 이해합니다.

제품 구성품

A DNA Standard Marker

B 범죄현장에서 채취한 DNA 샘플 (제한효소 1번으로 미리 자름)

C 범죄현장에서 채취한 DNA 샘플 (제한효소 2번으로 미리 자름)

D 용의자 #1 DNA 샘플

E 용의자 #2 DNA 샘플

F Enzyme Reaction Buffer

G Dryzymes 제한효소~~Restriction Enzyme~~ 1 (EcoRI)

H Dryzymes 제한효소~~Restriction Enzyme~~ 2 (HindUIII)

I Reconstitution Buffer

***튜브 A~I , 냉동 보관**

시약

10x Gel Loading Solution

Practice Gel Loading Solution

UltraSpec-Agarose

Electrophoresis Buffer (50x)

FlashBlue DNA stain

SYBR Safe stain

1ml pipet & Transfer pipet

Microcentrifuge Tubes with attached caps

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

필요 장비 및 준비물

전기영동 장치, 전원공급장치, 피펫과 피펫팁, 항온수조, 전자저울, 전자레인지(핫플레이트), 250mL 삼각플라스크, 안전장갑, 증류수, 염색용 트레이, 얼음과 얼음통, DNA 트랜스일루미네이터, 마킹펜

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

실험 전 준비

이 실험은 Eco RI와 Hind III로 자른 가상의 범죄현장과 용의자에서 나온 DNA 샘플이 있는 모의 실험입니다. 용의자 DNA 지문 패턴을 분석하고 범죄현장 샘플과 비교하는 것이 목표입니다. 각 DNA 샘플은 별도의 반응에서 두 개의 제한효소로 잘라지며, 조각된 패턴들은 지문으로 사용됩니다. 조각난 DNA 패턴은 Southern blot 분석이 필요없이 염색된 아가로스 겔에서 분석됩니다.

이 실험 과정은 두 파트의 모듈이 있습니다. : 1) DNA의 제한효소 절단 2)아가로스겔 전기영동

각 그룹은 두 용의자샘플과 DNA Standard Marker를 받습니다. 용의자 DNA를 제한효소 처리하게 됩니다.

준비과정

1. 실험 당일 항온 수조를 37도로 유지하여 둡니다.
2. 각 학생 그룹은 4개의 제한 효소 반응을 실행합니다.

각 학생 그룹은 다음 시약을 받아야 합니다. (Table 3표 참고)

- 시약 : Table3. 참조
- 마이크로 피펫과 피펫팁
- 4개의 원심분리기 튜브
- 네임펜

Table 3: Summary of Biologicals & Reagents for each group

Component	Label 8 Tubes	Dispense for each tube
A - DNA Standard Marker	DNA Marker	35 µL
B - Crime Scene DNA cut with Enzyme 1	CS1	35 µL
C - Crime Scene DNA cut with Enzyme 2	CS2	35 µL
D - DNA from Suspect 1	#1	30 µL
E - DNA from Suspect 2	#3	30 µL
F - Reaction Buffer	Rxn Buffer	45 µL
G - Diluted Enzyme 1	Enzyme 1	35 µL on ice
H - Diluted Enzyme 2	Enzyme 2	35 µL on ice
10X Gel Loading Solution	Gel Load	25 µL

시약 준비

1. 모든 튜브를 손가락으로 툭툭치고 테이블에 살짝 쳐서 튜브 밑바닥에 모이도록 합니다
2. B와 C 튜브는 범죄현장에서 채취한 샘플이 들어있습니다. 이 두 샘플은 제한효소 처리가되어 전기영동에 바로 사용할 준비가 되어있습니다. 샘플B DNA는 제한효소 1번으로 잘렸고 샘플C는 제한효소 2번으로 잘렸습니다.
   A. 8개 원심분리기 튜브에 "CS 1"로 표기합니다. (Crime Scene)
   B. 8개 원심분리기 튜브에 "CS 2"로 표기합니다. (Crime Scene)
   C. 범죄현장 샘플 1번(B튜브)는 "CS 1"으로 표기한 튜브에 샘플2번(C튜브)는 "CS 2" 튜브에 각각 35µL씩 분주하고 8그룹의 실험조에 분배합니다.

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

3. F 튜브에는 Enzyme Reaction Buffer(효소 반응 버퍼)가 들어있습니다.
   A. 8개의 튜브에 "Rxn Buffer" 로 표기합니다.
   B. F튜브에서 45μL씩 8개의 튜브에 옮겨 담고 각 실험조에 분배합니다.
4. 8개의 튜브에 "Gel Load"라고 표기하고 10X Gel Loading Solution 25μL씩 넣습니다.

용의자 DNA 준비

5. 피펫을 사용해 두 명의 용의자 DNA (D, E 튜브)를 나눠야 합니다.
   A. 8그룹마다 2개의 튜브에 각각 #1과 #3을 표기합니다.
   B. 용의자 1번 DNA를 30μL씩 "#1"튜브에 각각 넣고 나눠줍니다.
   C. 용의자 2번 DNA를 30μL씩 "#3"튜브에 각각 넣고 나눠줍니다.

DryZyme 제한효소 준비

Dryzyme 복원 후 30분 이내에 제한효소 절단을 준비합니다.

참고: 필요한 경우 Dryzyme은 1주일간 다시 얼릴 수 있습니다.

1. Reconstitution Buffer(튜브 I)를 손가락으로 쳐서 모이게 한 후 얼음에 꼽아둡니다.
2. 튜브 바닥에 고체물질이 모였는지 확인하고 안되었다면 원심분리기를 20초가량 돌려 모아줍니다.
3. Reconstitution Buffer 300μL씩 DryZyme 튜브(튜브G, H) 에 넣어줍니다.
4. 1분간 녹도록 기다립니다.
5. 고체가 완전 용해 될때까지 손가락으로 치거나 볼텍스로 돌려 섞이도록 합니다.
6. 20초간 원심분리기를 통해 튜브에 모이도록합니다.
7. 녹지 않은 물질이 남아 있으면 다시 볼텍싱을 합니다.
8. 8개의 튜브에 "Enzyme 1", 8개의 다른 튜브에 "Enzyme 2"라고 표기합니다.
9. 희석된 효소1 은 "Enzyme 1"로 표기한 튜브에 35μL씩 넣고 뚜껑을 닫습니다.
10. 희석된 효소2 은 "Enzyme 2"로 표기한 튜브에 35μL씩 넣고 뚜껑을 닫습니다.

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

아가로스 전기영동

이 실험에서는 1.2% 아가로스겔이 요구되며 미리 겔을 준비해 두거나 학생들이 직접 실험도중에 만들어도 됩니다. 대략 30-40분 정도 소요됩니다.

DNA 스탠다드 마커: 튜브A 에는 DNA Standard Marker가 들어있습니다.

8개의 튜브에 "Marker"라고 표기합니다.

각 튜브에 DNA 스탠다드 마커(튜브A) 35μL씩 넣고 뚜껑을 닫습니다.

그룹당 1개씩 나눠줍니다.

SYBR 염색 준비

이 키트에서는 기본적으로 SYBR 염색을 진행 할 수 있습니다. 아래의 Table E. 를 참조하여 아가로스겔을 만듭니다. SYBR 염색이 아닌 (추가 옵션)전기영동을 마친 후 Flash Blue 염색을 하실 수 있습니다.

1. 1X 전기영동 버퍼를 만들기 위해 50X 버퍼 10μL와 증류수 490μL를 섞습니다.
2. 위에서 만든 1X 버퍼 390μL를 SYBR Safe 튜브에 넣고 잘 흔들어 섞습니다.
3. 희석된 SYBR Safe를 다음 아래 표 구성에 맞게 아가로스젤 제작시 첨가 합니다.

Table D

Diluting Electrophoresis Buffer		
Amount of 50X TAE	*Amount of Distilled Water*	*Final Volume*
20 mL	980 mL	1000 mL
40 mL	1960 mL	2000 mL
60 mL	2940 mL	3000 mL

Table E

Preparing 1.2% Agarose Gels			
# of Gels	*Amount of* Agarose Powder	*Amount of 1X* TAE Buffer	*Amount of Diluted* SYBR® Safe (if using)
1	0.6 g	50 mL	50 μL
2	1.2 g	100 mL	100 μL
3	1.8 g	150 mL	150 μL
4	2.4 g	200 mL	200 μL
8 (batch prep)	4.8 g	400 mL	400 μL

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

개인별 아가로스겔 준비: 학생들은 50X희석 버퍼와, 아가로스 분말, 증류수, 희석된 SYBR Safe를 가지고 겔을 직접 만들 수 있습니다.

교사가 직접 미리 아가로스겔 준비: 실험시간을 절약하기 위해 미리 교사가 겔을 만들어 놓수 있습니다. 지퍼백에 버퍼 1-2mL와 겔을 넣고 최대 2주간 보관이 가능합니다. 1-2mL보다 더 많은 버퍼를 넣고 보관시 SYBR Safe가 겔에서 빠져나올 수 있으니 주의하십시오.

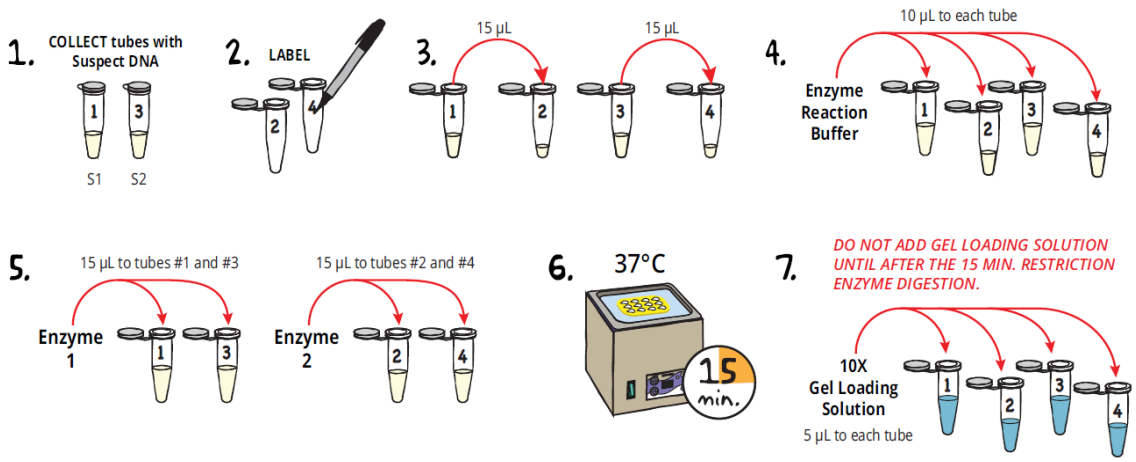
절대로 겔을 얼려서는 안됩니다.

옵션) FlashBlue로 염색

함께 제공되는 FlashBlue로 SYBR Safe대신 사용할 수 있습니다. 이 경우 겔 제작시 첨가되는 SYBR Safe는 생략됩니다. Flash Blue염색은 SYBR보다 덜 민감하기에 염색 시간이 더 걸립니다. 희석된 FlashBlue로 5분 염색 후 20동안 탈색 진행을 합니다. 최상의 결과를 얻으려면 하룻밤동안 액체에 담궈둡니다. 관찰 시 백색광원의 일루미네이터에서 관찰하면 좋습니다.

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

모듈 I: 범죄현장 탐색 – 제한 효소 절단



1. 선생님으로부터 #1, #3 원심분리기 튜브를 받습니다. 튜브 #1에는 용의자1의 DNA, 튜브#3에는 용의자2의 DNA가 들어 있습니다.

2. 2개의 빈 튜브에 #2, #4를 표기합니다.

3. 튜브 #1에서 15µL를 튜브#2로, 튜브#3에서 15µL를 튜브#4로 옮깁니다.

4. 마이크로피펫을 사용해 4개의 튜브에 10µL씩 Rxn Buffer(Enzyme Reaction Buffer)를 넣습니다.

5. 아래 Table1을 참고해 효소를 추가합니다. 다른 효소마다 다른 피펫팁을 써가면서 넣어줍니다.

주의: 이 시점에서 절대 Gel Loading Solution을 넣지 않도록 합니다.

6. 튜브를 플로팅블럭에 끼워 37도로 맞춰 놓은 항온 수조에 15분간 띄워 둡니다.

7. 15분이 지난 후 10x Gel Loading Solution을 5µL씩 각 튜브에 넣어줍니다.

8. 선생님으로부터 아래의 튜브들을 받습니다. 각 튜브에는 내용물이 35µL씩 들어있습니다.

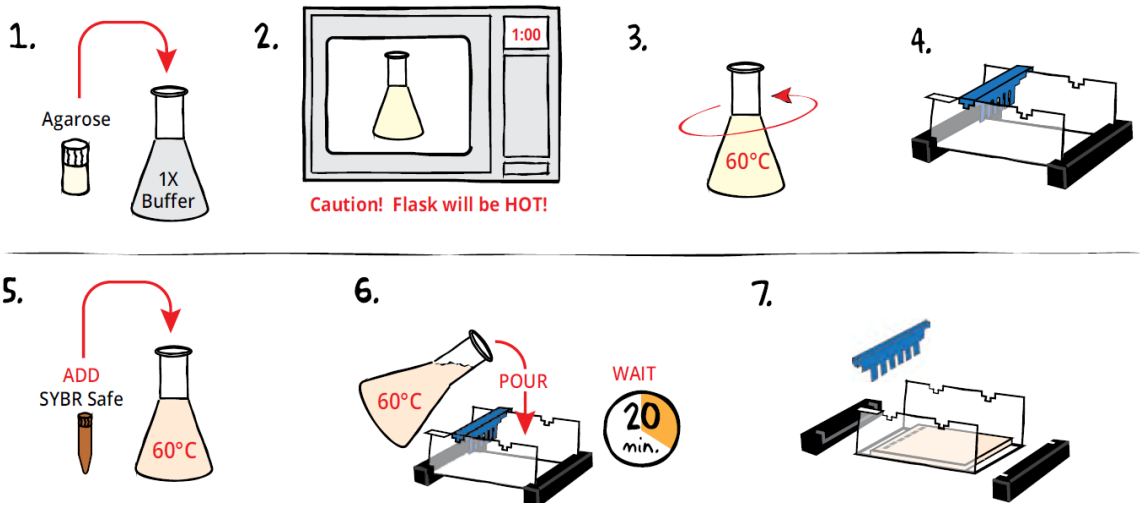
   - DNA Standard Marker
   - 범죄현장에서 발견된 Enzyme 1로 절단된 DNA (CS1 튜브)
   - 범죄현장에서 발견된 Enzyme 2로 절단된 DNA (CS2 튜브)

Table 1: Summary of Restriction Enzyme Digestion Reactions

Reaction Tube	Suspect 1 DNA	Suspect 2 DNA	Reaction Buffer	Enzyme 1	Enzyme 2	10X Gel Load
#1	15 µL	-	10 µL	15 µL	-	5 µL
#2	15 µL	-	10 µL	-	15 µL	5 µL
#3	-	15 µL	10 µL	15 µL	-	5 µL
#4	-	15 µL	10 µL	-	15 µL	5 µL

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

모듈 II: 제한효소 조각의 전기영동



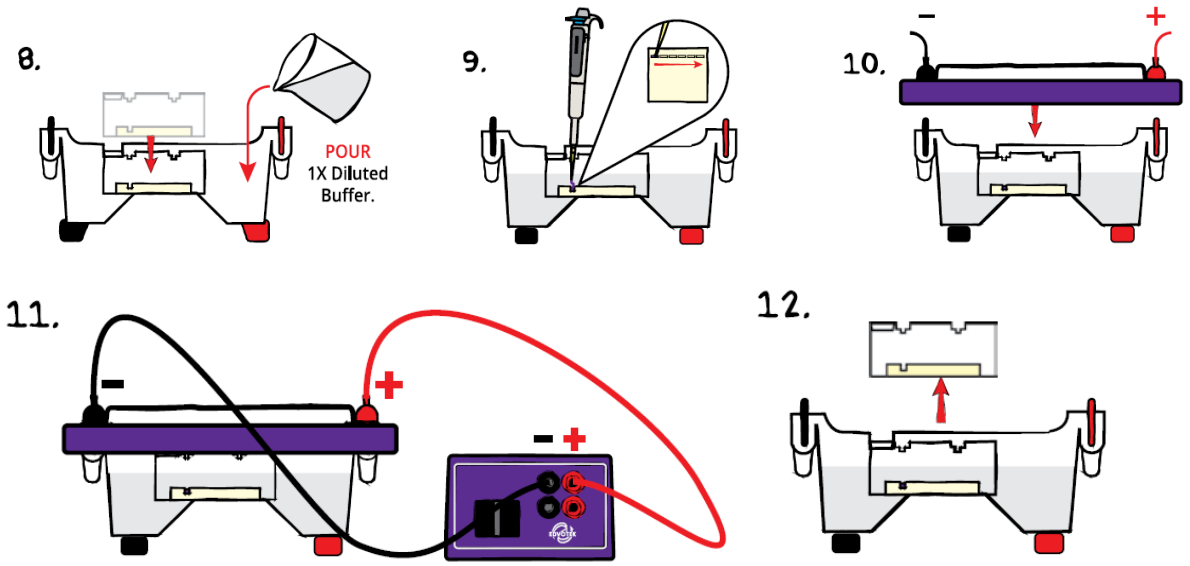
주의: 만약 실험학생이 직접 아가로스겔을 만든다면 다음 과정으로 제작합니다.

1. Table A 표를 참고해 만들려는 겔 크기에 맞는 1X 버퍼와 아가로스의 양을 250mL 플라스크에 넣습니다.
2. 전자레인지에 1분간 돌려 가열시켜 녹입니다. 알갱이가 보인다면 15초씩 더 돌려가며 완전히 맑은 물처럼 녹을 때까지 가열합니다.
3. 잘 돌려가며 열이 발산되어 60도 정도가 되게 합니다.
4. 전기영동 장치의 트레이와 고무마개, comb을 결합합니다.
5. 60도 정도로 식은 겔 용액에 TableA 표의 SYBR Safe를 첨가합니다. 만약 SYBR가 아닌 FlashBlue염색을 할 예정이라면 이 과정은 생략 합니다.
6. 틀에 붓고 20분간 기다립니다.
7. 완전히 굳었는지 확인 후 고무마개와 comb을 조심히 분리합니다. 이 때 덜 굳어졌다면 기다리고 분리시에는 겔이 손상되지 않게 주의합니다.

Table A — Individual 1.2% UltraSpec-Agarose™ Gels with SYBR® Stain

Size of Gel Casting Tray	Agarose	+ 1X Buffer	+ *DILUTED* SYBR® (if using)
7 x 7 cm	0.36 g	30 mL	30 µL
10 x 7 cm*	0.6 g	50 mL	50 µL
14 x 7 cm	0.72 g	60 mL	60 µL

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



8. 겔이 올려진 트레이를 조심스럽게 전기영동 장치에 넣습니다. 1X 전기영동용 완충액이 겔이 충분히 잠길 때까지 넣습니다. TableB를 참고해 각 기기별 버퍼를 넣습니다.

9. Table2 표를 참고해 준비된 시약들을 각 웰마다 35μL 로딩합니다.

10. 전극위치를 확인한 후 덮개를 닫습니다.

11. 전원공급장치에 연결하여 전기영동을 실행합니다. Table C 참고

12. 완료되면 겔과 트레이를 꺼냅니다.

Table 2: Gel Loading Scheme

Lane	Sample	Vol. to Load
1	DNA Standard Marker	35 μL
2	Crime scene DNA digested with Enzyme 1	35 μL
3	Crime scene DNA digested with Enzyme 2	35 μL
4	Tube 1 - Suspect 1/Enzyme 1	35 μL
5	Tube 2 - Suspect 1/Enzyme 2	35 μL
6	Tube 3 - Suspect 2/Enzyme 1	35 μL
7	Tube 4 - Suspect 2/Enzyme 2	35 μL

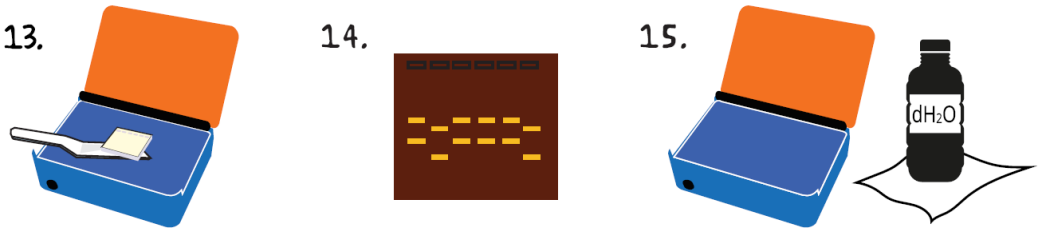
Table B — **1x Electrophoresis Buffer (Chamber Buffer)**

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 (1.2% Agarose Gel)**

	Electrophoresis Model: EDGE™	M12/M36
Volts	Min/Max (minutes)	Min/Max (minutes)
150	20/30	25/35
100	35/45	40/50
75	NA	55/65

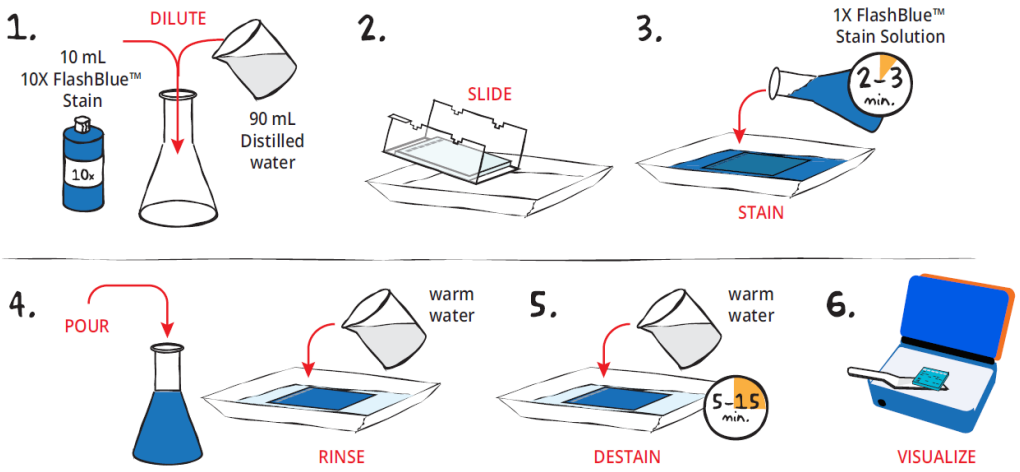
★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.



13. 겔을 부드럽게 뒤집개를 이용해 트랜스일루미네이터로 이동시킵니다.

14. 15. 결과물을 관찰한 후 일루미네이터 표면을 깨끗이 닦습니다.

(추가선택옵션)모듈 II: FlashBlue 염색



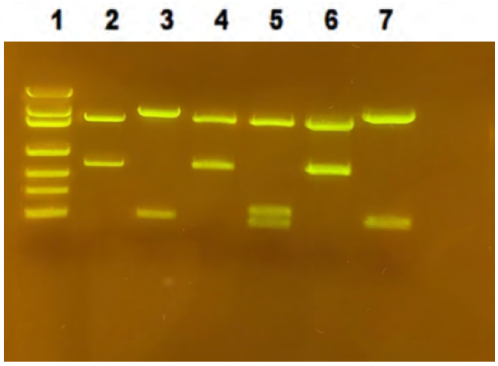
UV램프가 없다면 FlashBlue염색을 대안으로 사용할 수 있는 간단한 염색방법입니다.

1. 플라스크에 90mL증류수, 10mL 10X Flash Blue를 넣어 희석시킵니다.
2. 전기영동이 완료된 겔을 트레이에 조심스럽게 옮깁니다.
3. 희석된 염색약을 트레이에 붓고 2-3분간 기다립니다. 최상의 결과를 위해 오비탈 쉐이커를 이용해 흔들어주면 좋습니다.
4. 염색약을 재사용하려면 트레이의 염색약을 다시 플라스크에 넣어줍니다. 40-45도의 물을 트레이에 부어 20-30초간 탈색을 합니다. 물을 버립니다.
5. 새로운 깨끗한 물로 5-15분간 탈색합니다. (오래 놔두면 더 나은 결과를 얻을 수 있습니다.) DNA 밴드는 5분 후에 나타나며 물을 자주 갈아주면 탈색이 가속화 됩니다.
6. 겔을 조심스럽게 꺼내 트랜스일루미네이터에서 관찰합니다. DNA는 밝은 파란색 배경에 진한 파란색 밴드로 나타납니다.

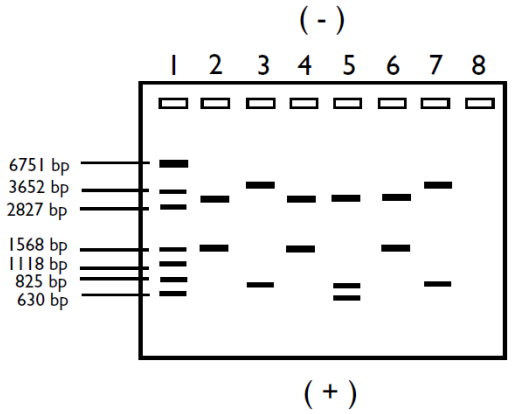
★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

Experiment Results and Analysis

EXPECTED RESULTS



The restriction digest pattern from crime scene samples matches Suspect 2. This suggests Suspect 2 was at the crime scene.



In the idealized schematic, the relative positions of DNA fragments are shown but are not depicted to scale.

Lane	Tube	Sample	Molecular Weight
1	Markers	DNA Standard Marker	6751, 3652, 2827, 1568, 1118, 825, 630
2	CS1	Crime scene DNA cut with Enzyme 1	3000, 1280
3	CS2	Crime scene DNA cut with Enzyme 2	3650, 630
4	1	DNA from Suspect 1 cut with Enzyme 1	3000,1280
5	2	DNA from Suspect 1 cut with Enzyme 2	3000, 760, 650
6	3	DNA from Suspect 2 cut with Enzyme 1	3000, 1280
7	4	DNA from Suspect 2 cut with Enzyme 2	3650, 630

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