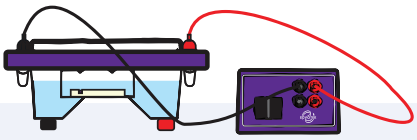
실험 가이드북

DNA 증폭

PCR Amplification of DNA

ED330



KOREA SCIENTIFICS (주)한국과학

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 Polymerase Chain Reaction (PCR)의 원리를 배우고 각 사이클 별로 샘플을 추출해 전기영동으로 그 결과물을 관찰하여 PCR을 사용하는 이유를 알게 됩니다.

제품 구성품

구성물품	보관시 온도
· PCR EdvoBeads Plus	실온
A. TE buffer	-20℃
B. Ultra-pure water	-20℃
C. LyphoPrimer Mix	-20℃
D. LyphoTemplate	-20℃
E. DNA Standard Marker	-20℃

주의: C와 D는 사용 전 재복원작업이 필요합니다. 실험 전 준비사항 페이지로 넘어가 Primer와 DNA Template 준비를 하십시오.

- PCR EdvoBeads Plus(dNTP, Taq DNA Polymerase Buffer, TaQ DNA Polymerase, MgCl2, Reaction Buffer)
- UltraSpec-Agarose
- Electrophoresis buffer (50x)
- SYBR Safe DNA stain
- FlashBlue stain
- Microcentrifuge Tubes
- PCR Tubes

필요 장비 및 준비물

Thermal Cycler(PCR기기), 전기영동 장치, 전원공급장치, 원심분리기, UV Transilluminator, Ice bucket, 얼음, 피펫과 피펫팁, 전자저울, 전자레인지(핫플레이트), 250mL삼각플라스크, 안전장갑, 증류수, 염색용 트레이

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

모듈 I 관련 실험 전 준비

LyphoTemplate 과 LyphoPrimer 가 이 키트에 들어있습니다. 시약은 정확한 PCR 반응에 오렌지색을 띄게해주도록 코딩되어 있습니다. 이 것으로 성공적인 실험이 이뤄지도록 도와줍니다.

Primer Mix 준비

1. 사용 전 TE buffer(A) 튜브를 손가락으로 툭툭 칩니다.
2. Primer Mix 준비 전 고체 물질이 LyphoPrimer Tube(C) 바닥면에 모여 있는지 확인하고 그렇지 않다면 원심분리기로 20 초가량 돌려 바닥에 모이도록 합니다.
3. LyphoPrimer 에 1mL TE 버퍼를 첨가에 희석시킵니다. 뚜껑을 닫고 잘 섞어 얼음에 꼽아 둡니다. 이 용액은 맑은 오렌지색을 띄고 완전히 용해되어야 합니다.
4. 10 개의 튜브에 25μL 씩 희석된 primer 를 각각 넣고 "Primer Mix"라고 표기하여 실험그룹마다 놔눠줍니다.

DNA Template 준비

1. 사용 전 TE buffer(A) 튜브를 손가락으로 툭툭 칩니다.
2. DNA template 준비 전에 LyphoTemplate (튜브 D)가 잘 모여있는지 확인하고 그렇지 않다면 20 초간 원심분리기를 돌려 모아줍니다.
3. LyphoTemplate 에 70μL TE 버퍼를 첨가하고 뚜껑을 닫아 얼음에 꼽아 둡니다. 이 용액은 맑고 밝은 붉은색을 띕니다.
4. 6μL 를 10 개의 튜브에 분주하고 "DNA Template"로 표기하여 각 그룹에 나눠줍니다.

각 그룹 추가 준비 시약

- 100μL Ultra-pure water
- PCR EdvoBead PLUS 1 개
- 0.2mL PCR 튜브 1 개와 4 개의 원심분리기 튜브

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

모듈 II 관련 실험 전 준비

★실험 시작 전 SYBR 염색과 FlashBlue 두 가지 중 어느 염색 방법으로 할 지 결정해야합니다.

SYBR : 형광 DNA 염색으로 안전하고 빠른 결과를 얻지만 UV 또는 BLUE light illuminator 가 구비되어야 합니다.

FlashBlue : 육안으로 바로 확인이 가능한 DNA 염색이며 염색시간이 오래걸리는 단점이 있습니다.

SYBR Safe 염색약 준비

1. 490μL 증류수와 10μL 50X 농축버퍼(Concentrated Buffer)를 섞어 희석시켜 1X 전기영동 버퍼를 만듭니다.
2. 1X 전기영동 버퍼 390μL 를 SYBR Safe 튜브에 넣고 잘 섞습니다.

겔을 미리 준비 시:

실험시간의 부족으로 미리 겔을 준비시에는 4℃ 냉장 보관을 하면 됩니다. 다만 2 일 이상 보관하여 사용하거나 냉동보관(-4℃)은 피하셔야 합니다.

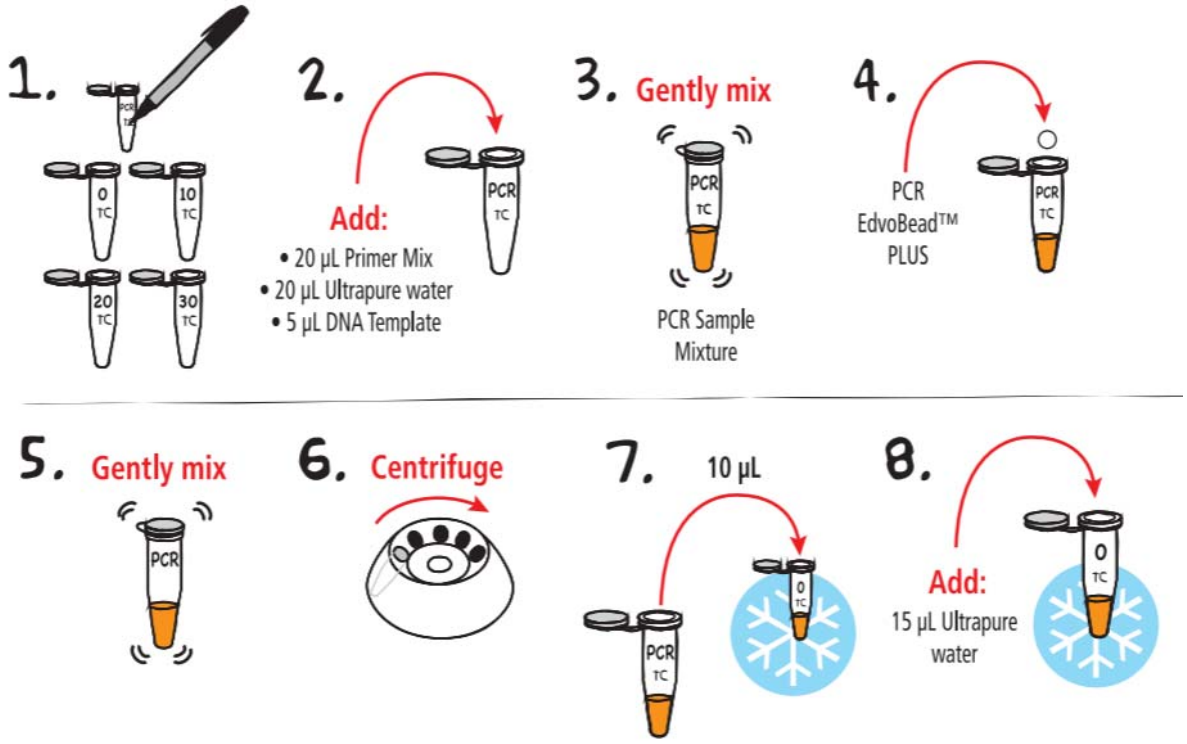
실험 전 각 그룹에 준비한 아래 시약들을 나눠줍니다.

FOR MODULE I
Each Group should receive:
- One PCR tube and PCR EdvoBead™ PLUS
- 25 μL Diluted Primer Mix
- 6 μL Diluted DNA Template
- 100 μL Ultra-pure water
- Four Microcentrifuge tubes

FOR MODULE II-A
Each Group should receive:
- 50X electrophoresis buffer
- Distilled Water
- UltraSpec-Agarose™ Powder
- Diluted SYBR® Safe
- 35 μL DNA Standard Marker

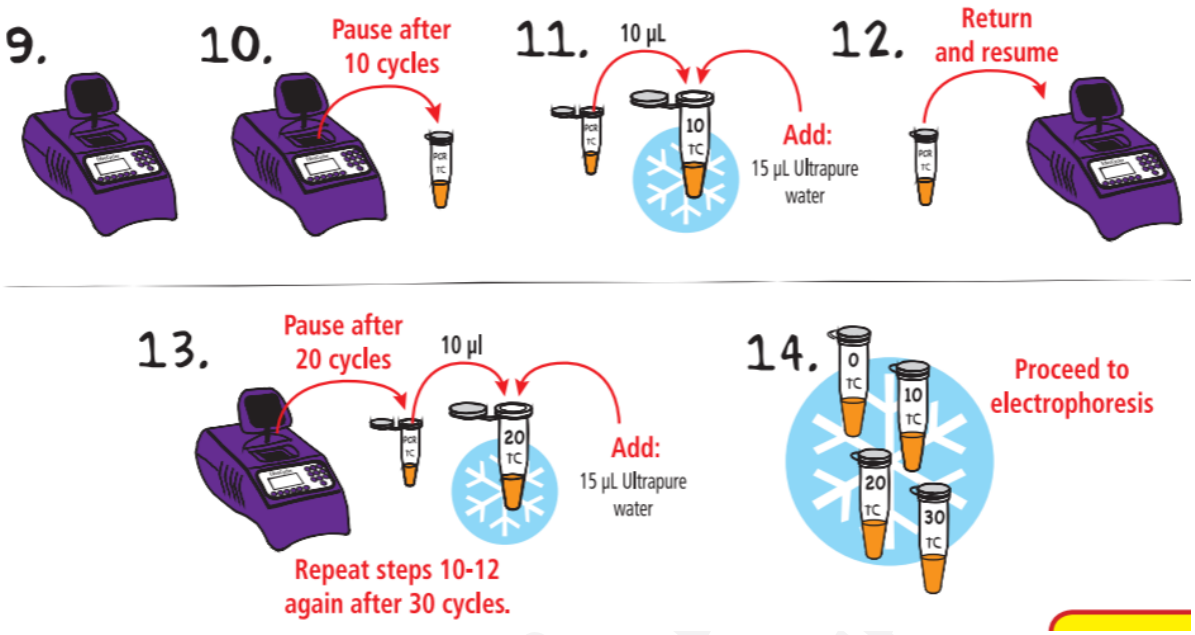
★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

모듈 1: PCR 수행



1. 0.2mL PCR 튜브 한 개에 "PCR"과 각그룹의 이니셜을 표기합니다. 4개의 0.5mL 튜브에 각각 "0", "10", "20," "30"을 표기하고 각그룹의 이니셜을 표기합니다.
2. 20µL Primer Mix(오렌지색), 20 µL Ultrapure water, 5 µL DNA template(빨간색)을 "PCR"로 표기한 0.2mL 튜브에 첨가합니다.
3. 튜브를 손가락으로 쳐가면서 잘 섞이도록합니다. 이것은 PCR sample mixture 입니다. 이 용액은 오렌지색이어야 합니다. ***주의: 만약 용액이 오렌지색을 띄지 않는다면 PCR 샘플이 정확하게 첨가되지 않은 것입니다.***
4. 한 개의 PCR EdvoBead PLUS를 "PCR"로 표기된 0.2mL 튜브에 넣고 손가락으로 톡톡 쳐서 알갱이가 용액으로 들어가도록 합니다.
5. PCR EdvoBead PLUS가 완전히 녹을 수 있도록 합니다.
6. 원심분리기를 이용해 샘플이 튜브의 바닥에 모이도록 합니다.
7. "PCR" 튜브에서 mixture 10 µL 를 "0"으로 표기한 튜브에 넣고 다시 얼음에 꼽아둡니다.
8. 15 µL Ultra-pure water 를 "0" 튜브에 첨가하고 전기영동을 위해 얼음에 꼽아둡니다.

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



9. 아래의 PCR 가이드라인을 참조해 PCR을 수행하여 각 사이클별로 샘플을 준비합니다. 주의: 이 실험을 위해 (A-C과정)10회, 20회, 30회 PCR 실행 후 일시정지가 필요합니다.

   A. 94℃에서 15초
   B. 45℃에서 15초
   C. 72℃에서 30초

   30 cycles

   D. 72℃에서 Final extension 60초

10. PCR 10번째 사이클에 일시정지를 하고 PCR 샘플을 꺼냅니다. (히팅블럭과 뚜껑에 열이 남아 있으니 주의하도록 합니다.)

11. 10 µL PCR mixture를 "PCR"튜브에서 빼내 "10"으로 표기한 튜브에 넣고 15 µL Ultra-pure water를 함께 넣고 얼음에 꼽아 둡니다.

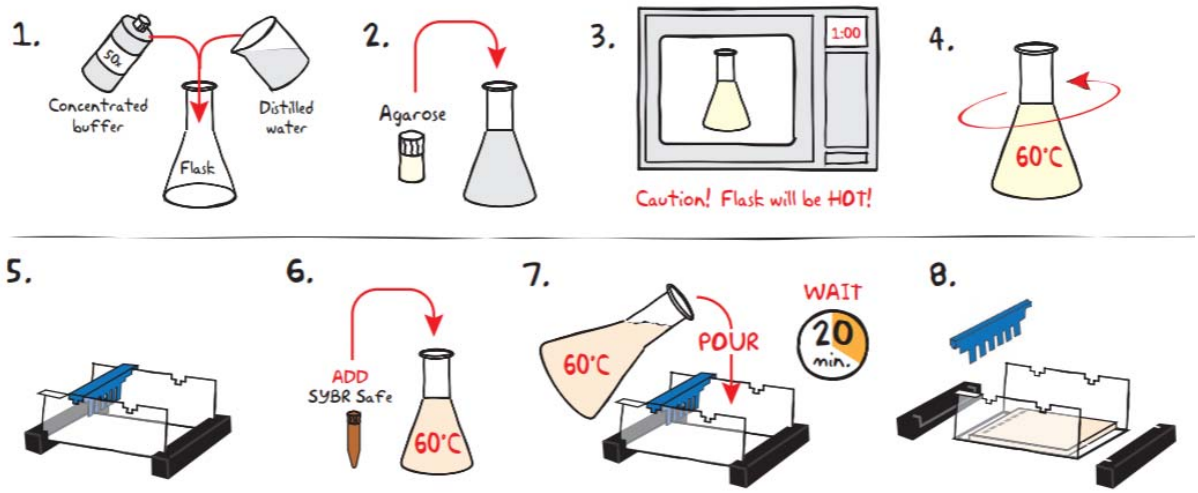
12. "PCR" 튜브를 다시 PCR에 집어넣고 다시 실행합니다.

13. 10-12번의 과정을 반복해 "20"과 "30"으로 표기한 튜브에 넣습니다.

14. 모든 PCR 작업을 마친 후 다음의 전기영동 과정으로 넘어갑니다.

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

모듈 2-A: SYBR Safe DNA 염색을 이용한 전기영동 *(추천방식)



1. 50X의 버퍼를 증류수와 섞어 1X 버퍼로 희석합니다. (Table A.1 참조)

2. 아가로스 파우더를 250mL 플라스크에 1X버퍼와 섞습니다.

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℃ 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. 겔을 캐스팅 트레이에 붓기 전 희석된 SYBR Safe를 섞습니다. (Table A.1 참조)

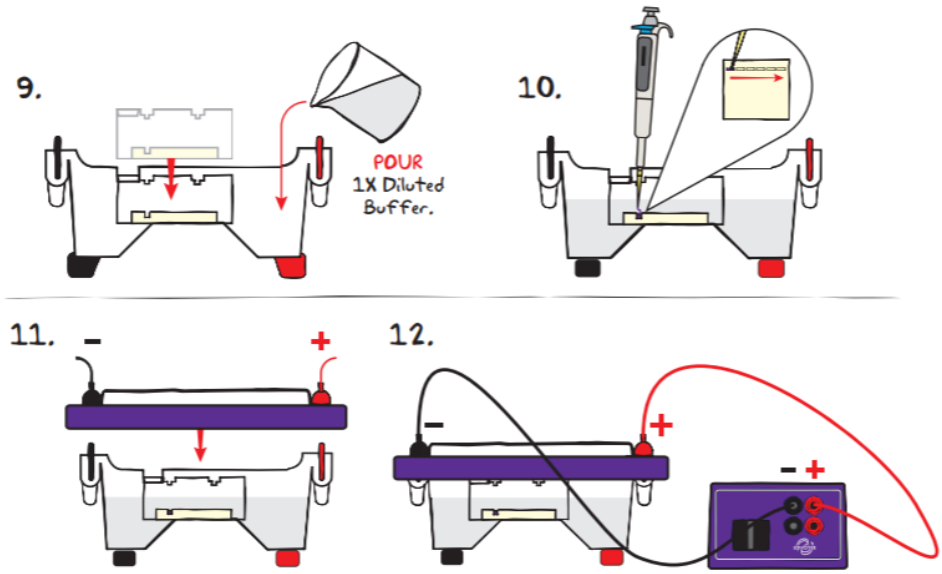
7. 어느정도 식은 아가로스 용액을 겔캐스팅 트레이에 붓습니다. 20분정도면 완전하게 굳게됩니다.

8. 다 굳으면 고무 마개와 comb을 제거합니다.

Table A.1 — 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	0.23 g	30 mL	30 µL
7 x 10 cm	1.0 mL	49.0 mL	0.39 g	50 mL	50 µL
7 x 14 cm	1.2 mL	58.8 mL	0.46 g	60 mL	60 µL

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



9. 겔을 전기영동 챔버에 넣고 1X 전기영동 버퍼(Table B.1 참조)를 넣어 완전히 잠기게 합니다.

10. Table 1에서처럼 각 샘플을 겔의 웰에 마이크로 피펫으로 25 µL씩 분주합니다.

11. 안전 덮개를 덮고 +, - 극을 잘 연결했는지 확인합니다.

12. 전원공급장치에 연결하여 실험을 시작합니다. (전압과 시간은 Table C 참조)

13. 전기영동을 마친 후 장치에서 겔을 꺼냅니다.

Table 1

Lane	Recommended	Sample Name
1	Marker	DNA Standard Marker
2	0	Reaction sample after 0 cycles
3	10	Reaction sample after 10 cycles
4	20	Reaction sample after 20 cycles
5	30	Reaction sample after 30 cycles

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

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

Table C — Time and Voltage Guidelines (0.8% Agarose Gel)

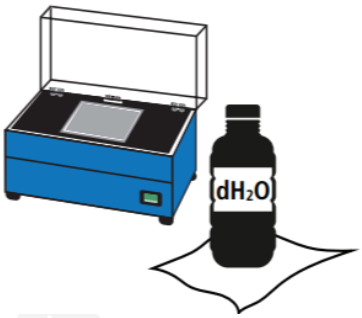
	Electrophoresis Model		
	M6+	M12 (new)	M12 (classic) & M36
Volts	Min. / Max.	Min. / Max.	Min. / Max.
150	15/20 min.	20/30 min.	25 / 35 min.
125	20/30 min.	30/35 min.	35 / 45 min.
75	35 / 45 min.	55/70 min.	60 / 90 min.

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

14.

15.

16.



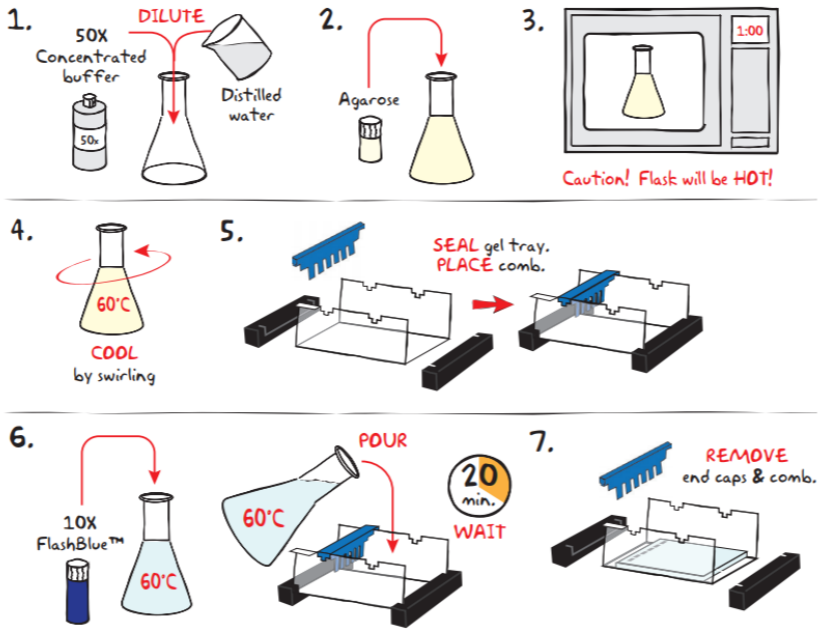
14. 겔을 조심스럽게 트랜스일루미네이터로 옮깁니다.

15. 결과를 사진 찍습니다.

16. 사용 후에는 깨끗하게 트랜스일루미네이터를 닦습니다.

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

모듈 2-B FlashBlue 염색을 이용한 전기영동



1. 50X 버퍼를 증류수와 섞어 1X 버퍼로 희석합니다. (Table A.2 참조)
2. 아가로스 파우더를 250mL 플라스크에 넣고 희석한 버퍼와 섞습니다. (Table A.2)
3. 전자레인지에 넣고 돌려 플라스크를 전자레인지에 1 분간 넣고 돌립니다. 플라스크를 돌려가며 아가로스 분말이 충분히 녹아 안보일 때까지 15 초 간격으로 전자레인지에 돌려 완전히 용해시킵니다.

Table A.2 Individual 0.8% UltraSpec-Agarose™ Gel

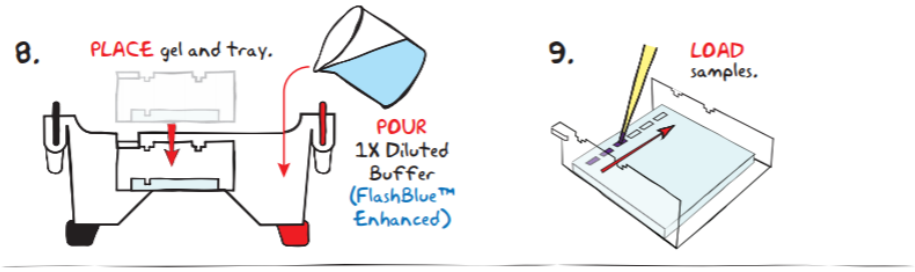
Size of Gel Casting tray	Concentrated Buffer (50x) +	Distilled Water +	Amt of Agarose =	TOTAL Volume
7 x 7 cm	0.6 mL	29.4 mL	0.23 g	30 mL
7 x 10 cm	1.0 mL	49.0 mL	0.39 g	50 mL
7 x 14 cm	1.2 mL	58.8 mL	0.46 g	60 mL

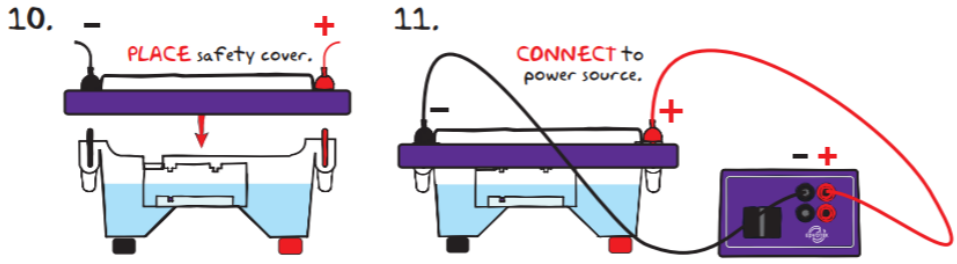
4. 완전히 용해된 후 60℃ 까지 식혀줍니다.
5. 용액이 식는 동안 겔 캐스팅 트레이에 고무 마개와 comb을 결합합니다. Comb 결합 방향을 트레이에 표시된 노치 쪽으로 잘 맞춰 끼워 샘플로딩 well의 위치가 (-)극에 위치하게 합니다.
6. 겔을 캐스팅 트레이에 붓기 10X FlashBlue를 Table A.3 을 참조해 정확한 양을 넣고 겔캐스팅 트레이에 붓습니다. 20분정도면 완전하게 굳게됩니다.
7. 다 굳은 후 고무마개와 comb을 제거합니다.

Table A.3 FlashBlue™ Enhanced Gel

Size of Gel	Amt of FlashBlue™
7 x 7 cm	10 µL
7 x 10 cm	16 µL
7 x 14 cm	20 µL

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





8. 겔을 전기영동 장치에 넣고 FlashBlue Enhanced 챔버 버퍼를 겔이 충분히 담기게 붓습니다. (Table B.2 참조)

9. 25 µL 씩 Table 1 을 참조해 각 웰마다 분주합니다.

10. +, - 극을 맞춘 후 뚜껑을 덮습니다.

11. 전원공급장치에 연결하여 전기영동실험을 시작합니다. 가장 좋은 결과물을 위해 오렌지 염료가 최소 4cm 이동이 될 때까지 진행합니다.

12. 모두 마친 후 겔을 꺼내고 다음 페이지의 FlashBlue 염색과정을 진행합니다.

Table B.2 — FlashBlue™ Enhanced 1x Diluted Chamber Buffer

EDVOTEK Model #	Total Volume Required	DILUTION 50x Conc. Buffer	+ Distilled Water	+ 10x FlashBlue Solution
M6+ & M12 (new)	300 mL	6 mL	294 mL	100 µL
M12 (classic)	400 mL	8 mL	392 mL	130 µL
M36	1000 mL	20 mL	980 mL	330 µL

Table 1

Lane	Recommended	Sample Name
1	Marker	DNA Standard Marker
2	0	Reaction sample after 0 cycles
3	10	Reaction sample after 10 cycles
4	20	Reaction sample after 20 cycles
5	30	Reaction sample after 30 cycles

Table C — Time and Voltage Guidelines (0.8% Agarose Gel)

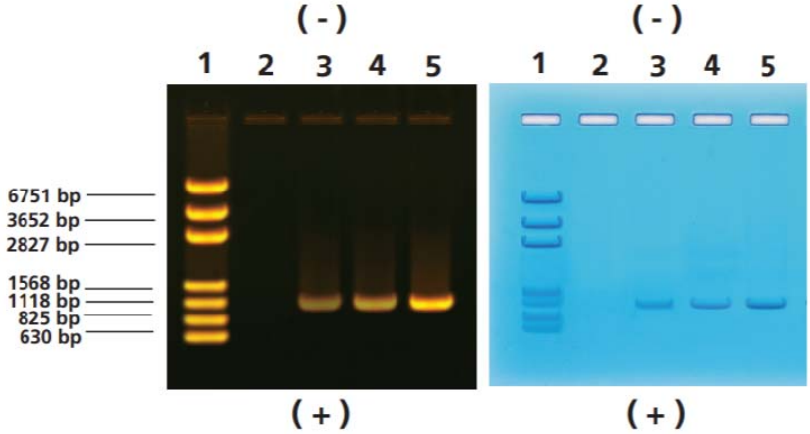
	Electrophoresis Model		
	M6+	M12 (new)	M12 (classic) & M36
Volts	Min. / Max.	Min. / Max.	Min. / Max.
150	15/20 min.	20/30 min.	25 / 35 min.
125	20/30 min.	30/35 min.	35 / 45 min.
75	35 / 45 min.	55/70 min.	60 / 90 min.

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

1. 10x FlashBLue 1mL 를 499mL 증류수와 플라스크에 넣고 섞습니다.
2. 아가로스겔을 챔버와 트레이에서 빼내서 염색용 트레이에 위치시십니다.
3. 희석시킨 FlashBlue 염색용액을 붓고 최소 3 시간 여유가 된다면 좋은 결과를 위해 하룻밤 놔둡니다.
4. 겔을 용액에서 건져낸 후 transilluminator 에 올려 관찰합니다.

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

Experiment Results and Analysis



Lane	Sample Name
1	DNA Standard Marker
2	Reaction sample after 0 cycles
3	Reaction sample after 10 cycles
4	Reaction sample after 20 cycles
5	Reaction sample after 30 cycles

The results photo shows the approximate intensity of the PCR amplified band after various cycles. Smaller fragments will stain less efficiently and will appear as fainter bands.

This PCR experiment produces a single DNA fragment of 1000 base pairs that increases in intensity as the number of cycles increases. In some experiments, a faint band above the PCR amplified DNA band may also be visible (not shown in idealized schematic), which is the DNA template. The predominant band is the PCR product. Likewise, smaller bands may be faintly visible at the bottom of the gel due to partial PCR amplification products or primer.

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