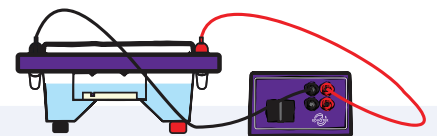


PCR을 이용한 인간 기원 탐구 (미토콘드리아 DNA 분석)

The Mother of All Experiments:

ED332



실험 목표

이 실험에서 학생들은 미토콘드리아 DNA를 분리하고, Polymerase Chain Reaction(PCR)을 사용하여 미토콘드리아 유전체의 두 가지 분리된 부분을 증폭합니다. 결과는 아가로스 젤 전기영동법을 사용하여 분석합니다.

제품 구성품

시약	보관방법
PCR EdvoBeads	실온보관
A Universal DNA Buffer	-20°C 냉동보관
B TE Buffer	-20°C 냉동보관
C Mitochondrial LyphoPrimer™ Mix	-20°C 냉동보관
D LyphoControl	-20°C 냉동보관
E EdvoQuick™ DNA ladder	-20°C 냉동보관
Proteinase K	-20°C 냉동보관

참고: 튜브 C와 튜브 D는 동결건조 상태이며 PCR 준비를 위해 복원되어야합니다.

- UltraSpec-Agarose™
- TBE Electrophoresis Buffer Powder
- SYBR® Safe Stain
- Snap-top microcentrifuge tubes
- Screw-top microcentrifuge tubes (Use for boiling)
- 0.2 mL PCR tubes
- Disposable plastic cups
- Salt packets
- 15 mL Conical tube

필요 장비 및 준비물

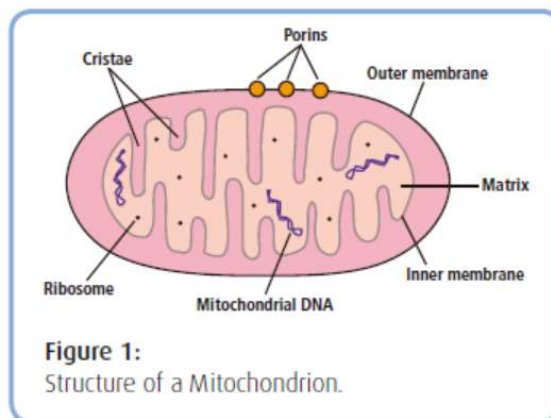
- PCR Thermal cycler
- 전기영동장치, 전원공급장치

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

- 저울
- 원심분리기
- 55°C 및 99°C 두 개의 항온수조
- UV 트랜스 일루미네이터
- UV 안전 고글
- 마이크로피펫, 피펫팁
- 전자레인지
- 피펫 펌프
- 250 mL 플라스크 또는 비커
- 핫 글러브
- 일회용 비닐 또는 라텍스 실험실 장갑
- 아이스 버킷과 얼음
- 증류수
- 생수
- 염소산용액 락스

배경 지식

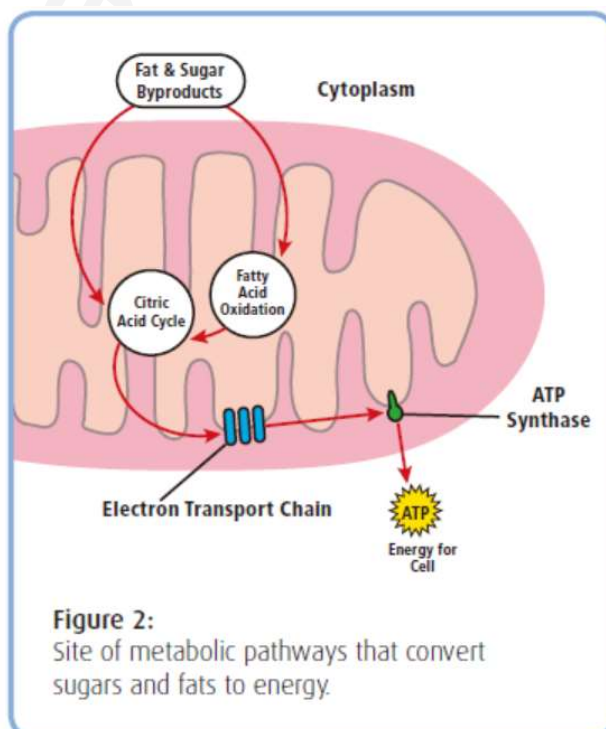
미토콘드리아는 식물과 동물의 거의 모든 세포에서 발견되는 작은 세포기관입니다. 그들은 일반적으로 세포의 "발전소"로 알려져 있으며, 생물이 생존하고 성장하는 데 필요한 많은 에너지를 생성합니다. 그러나 미토콘드리아는 또한 살아있는 역사 기록입니다. 생명공학과 수학 모델을 사용하여 유전자학자들은 인구의 미토콘드리아 유전체의 유사성과 차이를 이용하여 적외선학적 가설을 구축할 수 있습니다. 예를 들어, 외할아버지가 어디에서 왔는지, 어떻게 종이 마지막 빙하기를 생존했는지, 주요 진화 단계가 언제 일어났는지 등입니다. 이러한 조사는 나무, 균류, 새 등의 모든 진핵 생물에 대해 수행될 수 있습니다. 그러나 인간은 특히 주목받는 대상입니다. 우리 자신의 미토콘드리아 DNA(mtDNA)를 연구함으로써, 우리는 인간 사회와 문화가 어떻게 발전해 왔는지, 우리가 이동한 환경을 어떻게 형성했는지, 심지어는 왜 개인이 특정 질병에 취약한지를 더 잘 이해할 수 있습니다.



인간 미토콘드리아와 미토콘드리아DNA

미토콘드리아의 크기, 구조 및 밀도는 대단히 다양하지만, 거의 모든 인간 세포에 존재합니다. 이러한 세포 기관들은 일반적으로 타원형이며 항상 이중막을 포함하고 있습니다(Figure 1). 이중막은 각 미토콘드리아의 총 표면적을 크게 증가시키고 전자 그라디언트 형성을 가능하게 합니다. 이 그라디언트는 미토콘드리아의 주요 역할인 당과 지방산에 포함된 생화학적 에너지를 보다 사용하기 쉬운 아데노신 삼인산(ATP)이라는 통화로 변환하는 데 중요합니다(Figure 2). 호흡이라고 하는 이 과정 외에도, 미토콘드리아는 세포 주기 제어 및 세포 신호전달에도 관여합니다.

지난 20년간 많은 질병들이 미토콘드리아 기능장애와 연관이 있다는 것이 밝혀졌습니다. 이러한 질병들은 특정 조직이 미토콘드리아가 생성하는 ATP보다 더 많은 ATP를 필요로 할 때 발생합니다. 근육과 신경 세포가 많은 미토콘드리아를 포함하고 있기 때문에

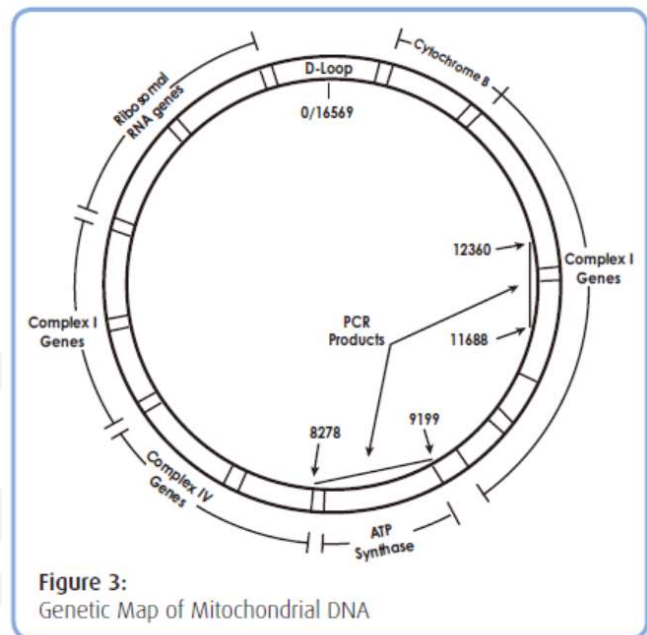


★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

이러한 기관계는 미토콘드리아 기능장애에 가장 영향을 받습니다. 예를 들어, 알츠하이머와 파킨슨 병은 둘 다 미토콘드리아 이상과 연관되어 있다고 생각됩니다.

미토콘드리아는 핵계놈과 독립적으로 복제 및 분열하는 자체 DNA를 가지고 있습니다. 이는 미토콘드리아의 일반적인 크기와 mtDNA 계놈의 모양, 박테리아 유사 유전자의 존재, 그리고 이중막 구조와 함께, 미토콘드리아가 내부 공생에 의해 발생했다는 학자들의 이론을 제시하게 만들었습니다. 내부 공생 이론은 생명의 진화 초기 어느 시점에서 단일 세포 생물체가 다른 박테리아를 포획하고, 두 생물체가 상호 유익한 관계를 발전시켰다는 것을 제안하며, 이는 모든 진핵생물에서 오늘날까지 계속되고 있습니다.

인간의 경우, mtDNA 유전체에는 37개의 유전자를 코딩하는 16,569 bp의 DNA가 포함되어 있습니다 (Figure 3). 이러한 유전자는 전자 전달 연쇄의 일부를 이루는 단백질, ATP 합성 효소, 그리고 미토콘드리아 특이적인 RNA를 생성합니다. 또한, D-loop 이라고 불리는 고도로 가변적인 지역도 존재합니다. 이 가변 지역은 mtDNA의 높은 돌연변이율을 담당하며, 핵 DNA에 비해 5-10배 빠릅니다.



인간의 mtDNA의 또 다른 중요한 특징은 어머니로부터만 상속된다는 것입니다. 세포질에는 여러 복사본의 미토콘드리아(및 미토콘드리아 DNA)가 있습니다. 예를 들어, 인간의 여성 난자는 10,000개 이상의 미토콘드리아를 가지고 있습니다. 이에 비해, 남성의 정자는 매우 적은 미토콘드리아를 가지고 있습니다. 또한, 아버지의 mtDNA는 수정 분화 후 선택적으로 파괴되는 것으로 나타났습니다. 결과적으로, 아이는 어머니와 아버지로부터 핵 DNA를 상속하지만 미토콘드리아 DNA는 어머니로부터 전적으로 상속받게 됩니다.

이 모성 상속은 유전학자들이 몇 세대에 걸쳐 조상들을 추적하고 심지어 수십만 년 전에 존재한 공통 조상까지 거슬러 올라갈 수 있도록 하는 핵심적인 역할을 합니다.

모든 유전체가 직접적으로 내려온 가장 최근 개체를 마지막 공통 조상(LCA)이라고 합니다. 시각적으로는, 분기되는 나무(tree)가 그룹의 역사를 나타낸다면 LCA는 모든 선택된 가지가 다시 분기하는 첫 번째 노드입니다 (Figure 4).

LCA는 어떤 개인들의 집합에 대해 계산될 수 있습니다. 당신과 당신의 사촌의 LCA는 당신의 조부모입니다. 모든 유핵생물(eukaryotes)의 LCA는 아마도 미토콘드리아를 가진 하나의 세포생물과 함께한 두 개의 박테리아종이었을 것입니다. 지구상의 모든 생명체들의 최근 공통 조상은

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

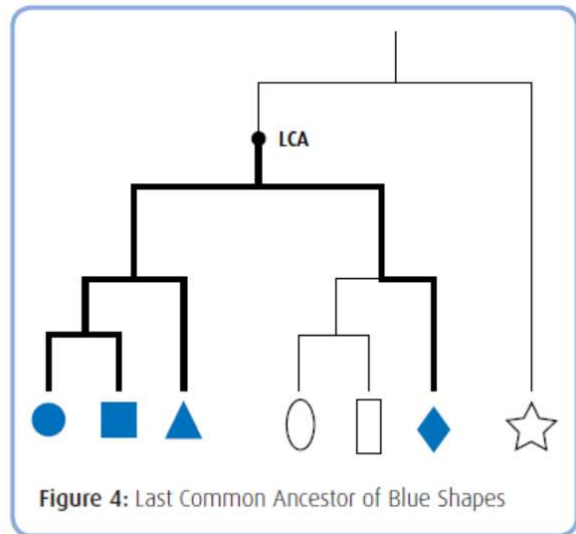
LUCA(Last Universal Common Ancestor)로 별칭하며, 35~38억 년 전에 살았을 것으로 추정됩니다.

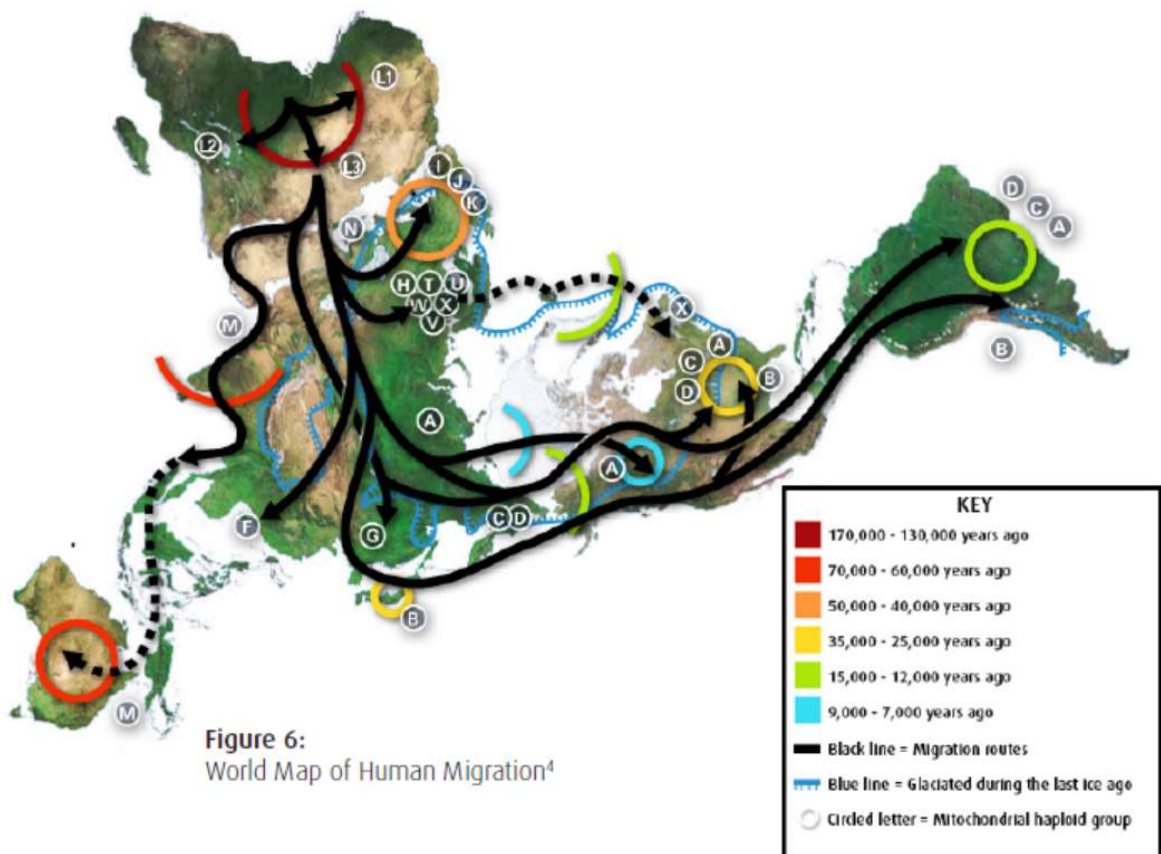
인류가 내려온 모든 LCA(Last Common Ancestor)와 그의 유전체를 식별할 수 있다면, 과학자들은 개인들 간의 유사성 패턴을 해석하는 데 도움을 받을 수 있습니다. 과학자들은 돌연변이를 또는 집단의 유전적 다양성의 지리적 분포와 같은 보조 정보를 사용하여 LCA가 언제, 어디에서 존재했는지 추정할 수도 있습니다.

관련성이 있는 개인들의 그룹과 마찬가지로 인간도 모두에서 내려온 LCA가 있습니다. 그러나 우리의 핵 DNA에서는 이 공유 조상에 대한 적은 또는 아무런 증거도 없을 수 있습니다. 이는 핵 DNA가 성적 생식 과정에서 섞이고, 염색체 교차로 더 많이 혼란스러워지기 때문입니다.

미토콘드리아 유전체가 등장합니다. 과학자들은 어머니 또는 아버지 쪽 계통으로 제한하여 더 쉽게 어머니나 아버지 쪽 LCA (최근 공통조상)까지 추적할 수 있습니다(Figure 5). 이를 위해 공선 이론이라는 수학적 모델(mathematical model)을 사용합니다. 이 모델은 유전자의 알렐(allele)을 LCA의 공통 조상 복사본까지 추적할 수 있으며 변이적인 변화는 고려하지만 재결합, 자연 선택, 인구 통계는 고려하지 않습니다. 편리하게도, 한 부모로부터 상속받은 DNA는 주로 변이를 통해 변화합니다. 또한, mtDNA 유전체의 특정 영역에서 변화 속도가 예측 가능할 정도로 일정하여 LCA가 언제 존재했는지 추정하는 분자 시계로 사용될 수 있습니다.

현재 모델과 인간 mtDNA 다양성에 대한 광범위한 샘플링을 기반으로, 과학자들은 우리의 미토콘드리아 LCA가 약 10만 ~ 20만 년 전에 아프리카에서 살았다고 추정하고 있습니다 (Figure 6). 이 개인은 "미토콘드리아 이브"라는 별명이 붙었지만, 그녀는 전혀 첫 번째 인간 여성이나 그 시기의 유일한 여성이 아닙니다. 그녀는 단지 하나의 행운을 가진 어머니에 불과했습니다. 이 발견은 현대인의 최근 아프리카 기원에 대한 인류학 이론을 형성하는 데 영향을 미쳤습니다. 또한, 재구성된 LCA 유전체는 현대 미토콘드리아 질환을 이해하기 위한 기준으로 사용됩니다.

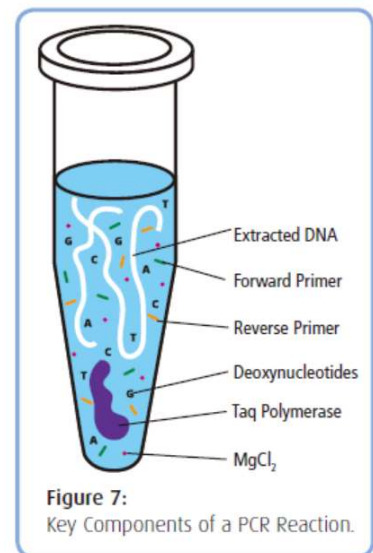




PCR

미토콘드리아 DNA를 조사하기 위해 일반적으로 Polymerase Chain Reaction (PCR)이 사용됩니다. PCR은 원하는 DNA 서열을 열기중합효소(DNA polymerase)를 사용하여 시스템적으로 증폭하는 방법으로, 열수생균인 *Thermus aquaticus*에서 추출된 열합성 DNA polymerase를 사용합니다. 이 방법은 1984년 캘리포니아 주 세투스(Cetus) 회사의 Kary Mullis 박사가 발명하였으며, 1993년 화학 분야에서 노벨 상을 수상하게 되었습니다.

PCR을 수행하기 전에는 생물학적 샘플로부터 템플릿 DNA가 추출됩니다. PCR은 매우 민감하기 때문에 몇 개의 DNA 복사본만 있으면 충분합니다. 또한, 대상 서열의 끝에 해당하는 짧은 합성 DNA 분자인 프라이머가 설계됩니다. 이 프라이머는 증폭 과정을 안내합니다. 특히, 대다수의 세포에서 수백 개에서 수천 개의 복사본을 가지고 있으므로 미토콘드리아 DNA의 경우에는 이미 많은 양이 존재합니다.



시작하기 전에, PCR에서 추출한 DNA와 프라이머는 "자유" deoxynucleotides, MgCl₂ 및 Taq DNA polymerase가 포함된 버퍼에 결합됩니다. 이 효소는 원래 온천에 서식하는 박테리아로부터 정제된 것으로, 매우 높은 온도에서 안정적입니다. 이 DNA, 프라이머 및 버퍼의 혼합물은 열/냉각 주

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

기를 거쳐 열사이클러에서 세 가지 서로 다른 온도로 처리됩니다.

- Denaturation: 혼합물이 거의 끓는 온도 (94°C - 96°C)로 가열되어 목표 DNA를 "언집" (또는 용해)합니다. 높은 온도는 두 개의 상보적인 DNA 염기서열 간의 수소 결합을 깨트리고 그들의 분리를 유발합니다.
- Annealing: 반응 혼합물이 45°C - 65°C까지 냉각되어 프라이머가 목표 DNA 서열과 염기 대 쌍을 이루도록 합니다. (정확한 온도는 프라이머와 템플릿 DNA의 특정 서열에 따라 결정됩니다.)
- Extension: 온도가 72°C로 올라갑니다. 이것은 Taq polymerase가 하이브리드화된 프라이머에 뉴클레오티드를 첨가하여 새로운 상보적인 염기서열을 합성할 수 있는 최적의 온도입니다.

이 세 단계는 하나의 PCR "cycle"를 구성합니다 (Figure 8). 각 PCR 주기는 대상 DNA 양을 5분 이내에 2배로 늘립니다. 분석에 충분한 DNA를 생성하기 위해서는 20~40 회 주기가 필요할 수 있습니다. 이 과정을 간소화하기 위해, "thermal cycler" 또는 "PCR 기계" 라고 불리는 전용 기계가 개발되어 샘플을 빠르게 가열 및 냉각할 수 있습니다. 증폭된 조각은 젤 전기영동을 사용하여 시각화 및 크기를 측정할 수 있습니다. 제한효소에 의해 소화되거나, 특정 핵산 돌연변이를 확인하기 위해 염기서열 분석도 가능합니다.

이 실험에서는, 자신의 mtDNA를 추출하고, 세포질 유전체의 두 개의 별개 지역을 PCR로 증폭하고 (Figure 3), 이 지역의 크기를 젤 전기영동으로 측정합니다. 10만 ~ 20만년 전에 존재한 최근 세포질 eve의 현재 이론에 따르면, 이러한 큰 조각의 크기는 수업 전체에서 일관성이 있어야 합니다.

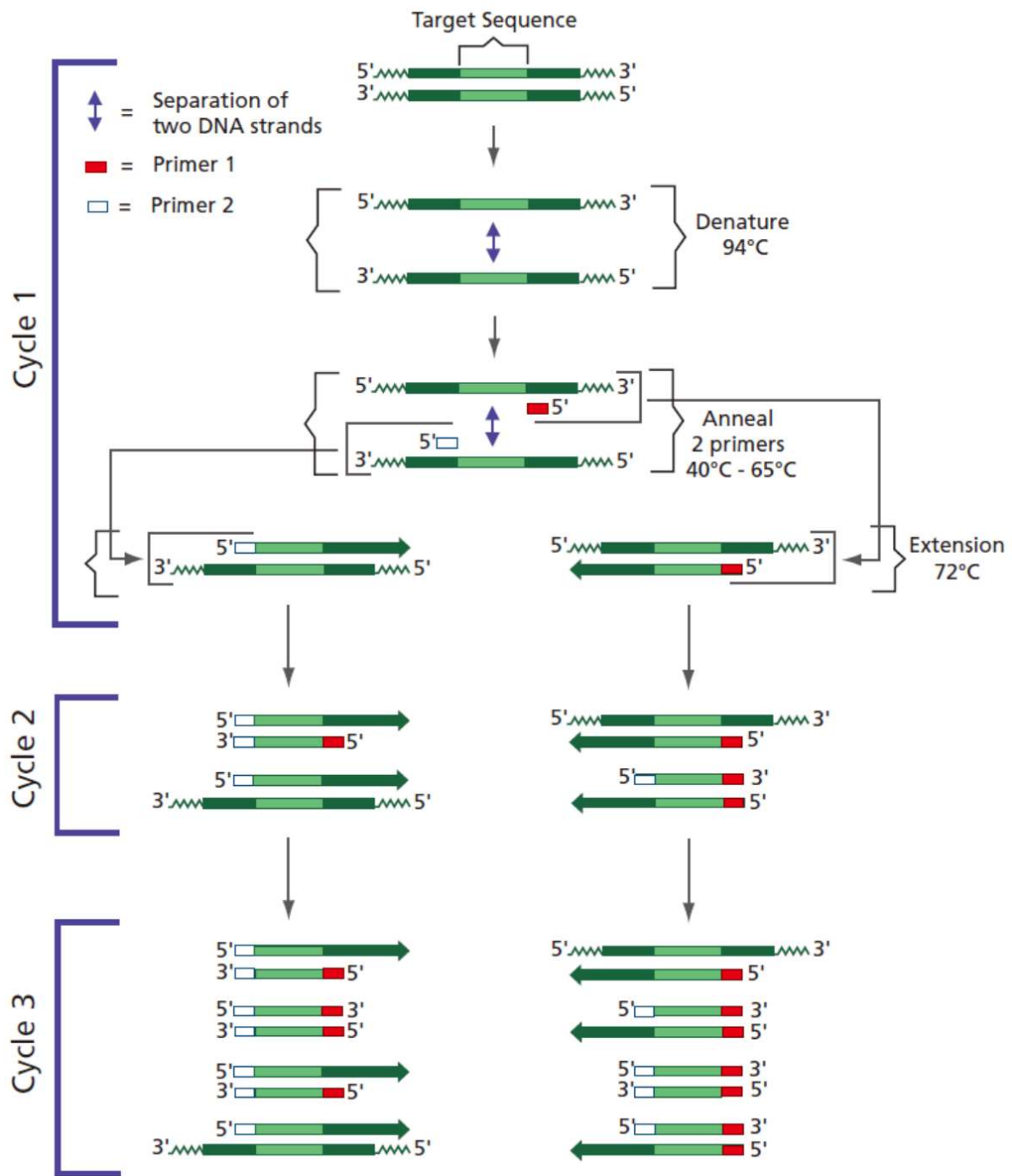


Figure 3:
Polymerase Chain Reaction

모듈 I 준비

구강 세포에서 DNA 추출

참고: 모듈 I-A에서 구강세포 세척에 반드시 Saline 용액(생리식염수)을 사용해야 합니다. 모듈II 에서 DNA 증폭을 억제 할 수 있는 스포츠음료를 사용하면 안됩니다. 만약 스포츠음료로 입안세척을 하였다면 샘플을 폐기하고 다시 생리식염수로 DNA 추출을 진행합니다.

실험실 기자재 소독: 사용 후 오염된 실험 폐기물(타액, 컵, 피펫팁 등)은 폐기 전 15% 농도의 표백제(락스)등으로 소독해야 합니다. 각 학교의 안전지침에 따라 생물학적 샘플을 적절하게 처리합니다.

Saline solution 준비 (모듈 I-A 선택시에만)

1. 생리식염수를 만들기 위해, 8 개의 소금 봉지(~4 g)를 500mL 의 생수에 녹입니다. 병을 덮고 뒤집어서 잘 섞어주세요.
2. 한 명당 10mL 의 생리식염수를 컵에 넣어주세요. 한 명당 하나의 컵을 배분합니다.

Lysis 버퍼 준비 (모듈 I-A 또는 I-B 을 위한)

참고: 실험을 수행하기 전에 Lysis 버퍼는 Prteinase K 와 혼합되어야 합니다. 한번 준비된 Lysis 는 같은 날 사용하거나 냉동 보관해야 합니다.

1. Proteinase K 튜브에 유니버설 DNA 버퍼(튜브 A) 100 μ L 을 넣고 몇 분간 샘플을 수분화하도록 합니다. 샘플이 수분화되면 몇 번의 피펫팅을 통해 재료를 잘 섞습니다.
2. 복원된 Prteinase 용액 전부를 콘니컬 튜브에 옮겨 담고 유니버설 DNA 버퍼(튜브 A) 4mL 를 추가로 넣습니다.
3. 튜브를 여러 번 뒤집어서 잘 섞어주세요. 이 튜브에 "Lysis Buffer"라고 표기합니다.

참고: Lysis 버퍼는 빨간색이며 녹지않은 덩어리가 없어야 합니다.

4. 라벨이 붙은 13 개의 원심분리기 튜브에 각각 300 μ L 의 Lysis 버퍼를 분주합니다. 이것을 학생 두 명씩 공유합니다.

참고: 이 시점에서 Lysis 버퍼는 사용 당일(최대 6 시간)에 사용하거나 냉동 보관할 수 있습니다.

5. 각 학생에게 "Lysis Buffer" 튜브를 나눠줍니다. 냉동된 경우, 37°C 의 물에 담가 빨리 해동하거나 학생들의 손으로 튜브를 따뜻하게하여 녹입니다.

실험실용품 소독: 오염된 실험실 폐기물(침, 컵, 피펫 등)은 폐기 전에 15% 표백제 용액으로 소독해야 합니다. 해당 기관의 지침에 따라 모든 생물학적 샘플을 적절하게 처리하도록 합니다.

모듈 I-A 을 위해 학생들이 받아야 할 것

- 10 mL 생리식염수 한컵
- 스크류 뚜껑이 있는 튜브 1 개
- 원심분리기 튜브 1 개

모듈 I-A 을 위해 학생 두 명이 공유하는 시약

- 300 µL Lysis buffer
- 15% 표백락스 bleach solution

모듈 I-B 을 위해 학생들이 받아야 할 것

- 스크류 뚜껑이 있는 튜브 1 개
- 원심분리기 튜브 1 개

모듈 I-B 을 위해 학생 두 명이 공유하는 시약

- 300 µL Lysis buffer

모듈 II 준비

미토콘드리아 영역 증폭

PCR 프라이머는 실험을 진행하기 전에 선생님이 복원해야하는 동결건조된 혼합물로 제공됩니다. PCR EdvoBeads™ PLUS 는 PCR 세팅 전에 나눠줄 수 있습니다. 학생이나 교사는 장갑을 착용한 채로 PCR EdvoBeads™ PLUS 를 부드럽게 전달할 수 있습니다. 또는, 포장비닐에서 조심스럽게 PCR 튜브로 옮길 수 있습니다. PCR 튜브 뚜껑을 꼭 닫아 수분이 들어가는 것을 방지합니다. 참고: PCR EdvoBeads™ PLUS 는 부서지기 쉬우므로 PCR 튜브로 옮길 때 조심해야 합니다.

이 키트는 EDVOTEK® LyphoControl™과 LyphoPrimer™를 특징으로 합니다. 또한, 시약은 색상 코드로 구분되어 정확히 제조되어 진행된 PCR 반응은 주황색을 띕니다.

프라이머 혼합물의 준비

1. TE 버퍼 (튜브 B)를 해동하고 잘 섞습니다.
2. LyphoPrimer™ (튜브 C)의 하단에 고체가 있어야합니다. 그렇지 않으면 최대 속도로 튜브를 10 초 동안 원심 분리합니다.
3. Primer Mix 튜브에 TE 버퍼 (튜브 B) 1 mL 을 첨가합니다. 튜브를 닫고 잘 섞습니다.
4. 희석된 Primer Mix 50 μ L 을 13 개의 표기된 원심분리기 튜브에 동일하게 분주합니다.
5. 희석된 Primer Mix 튜브를 학생 두 명당 한 개씩 나눠줍니다. 튜브는 필요할 때까지 얼음 위에 또는 4°C 냉장고에 보관할 수 있습니다

PCR Control Mix 준비

NOTE: 이 키트에는 6 개의 반응에 사용할 수 있는 충분한 양의 control DNA 가 포함되어 있습니다. PCR 이 성공적으로 수행되었는지 확인하려면 control 반응 6 개 모두를 실행하는 것이 권장됩니다.

1. LyphoControl™ (튜브 D)의 하단에 고체가 있어야합니다. 그렇지 않으면 최대 속도로 튜브를 10 초 동안 원심 분리합니다.
2. LyphoControl™ (튜브 D)에 TE 버퍼 (튜브 B) 160 μ L 을 첨가합니다. 피펫팅으로 섞습니다.
3. control 반응 1 개당 25 μ L 을 분주합니다. 참고: LyphoControl™은 이미 필요한 모든 PCR 구성 요소를 포함하고 있으므로 PCR Edvobead™가 필요하지 않습니다. 희석 후 LyphoControl™은

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

학생 샘플과 함께 PCR 으로 즉시 증폭할 수 있습니다 (PCR 기기에 여유 공간이 있는 경우), 또는 실험 전에 실행하고 -20°C 에 보관할 수 있습니다. PCR 이 성공적으로 수행되었는지 확인하기 위해 학생 겔마다 1 개의 25 μ L LyphoControl™ 반응을 로딩 해야합니다.

모듈 II 실험을 위해:

각 학생들은 PCR 튜브와 PCR EdvoBead 1 개씩을 받습니다.

두 명당 한 개씩의 희석된 Primer 50 μ L 를 받습니다.

모듈 III 준비

전기영동을 이용한 PCR 생성물 분리

TBE 전기영동 버퍼 준비:

실험을 위해 1X TBE 버퍼를 대량으로 준비하는 것이 좋습니다. 사용하지 않은 남은 버퍼를 나중에 사용이 가능합니다.

1. 증류수를 3.7 L 측정하여 큰 용기에 넣습니다.
2. 전체 TBE 전기영동 용액 분말을 용기에 첨가하고 잘 섞습니다.
3. 용기에 "1X TBE 전기영동 용액"이라고 표시합니다.

SYBR® Safe 염료 제조 방법:

SYBR® Safe 를 희석하려면, SYBR® Safe 튜브에 250μL 의 1X TBE 버퍼를 추가하고 몇 번 흔들어 혼합합니다. 희석된 SYBR® Safe 는 아가로스 젤 제조 중에 사용됩니다.

아가로스젤 준비

이 실험은 한 그룹당 0.8% 아가로스 젤 하나가 필요합니다. 7 x 7 cm 크기의 젤이 권장됩니다. 젤을 미리 준비할 것인지 학생들이 직접 준비할 것인지 선택할 수 있습니다. 이 과정은 30-40분 정도 필요합니다. 아래 3가지 방법 중 하나를 택하도록 합니다.

● 개별 준비

각 학생 그룹은 실험을 실험 중에 만들 수 있습니다 (모듈 III 참조). 학생들은 50X 전기영동 완충액, 증류수, 아가로스 분말 및 희석된 SYBR® Safe 염료가 필요합니다 (용량비에 대한 표 테이블 A 는 모듈 III 쪽을 참조하십시오)

● 일괄적으로 젤을 만들기

시간을 절약하기 위해, 수업 전체가 공유할 수 있는 더 큰 양의 아가로스 용액을 제조할 수 있습니다. 지침은 부록 B 를 참조하십시오.

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

- 미리 젤을 만드는 경우

젤은 미리 만들어 나중에 사용할 수 있습니다. 고체화된 젤은 밀봉 봉지에 작은 양의 버퍼를 첨가하여 냉장고에 최대 1주일 동안 저장할 수 있습니다. 우리는 봉지에 2mL의 버퍼를 추가하는 것을 권장합니다. 과다한 버퍼는 SYBR® Safe가 젤에서 확산되는 것을 방지합니다. SYBR® Safe가 들어간 젤은 빛에 노출되는 것을 피해 어둡고 서늘한 곳에서 보관해야 합니다.

-20°C에 젤을 보관하지 마세요. 열리면 파괴될 수 있습니다. 보관용기에서 뺀 젤은 트레이(접시)에 아가로스 몇 방울을 떨어뜨려 접착 고정시킵니다. 이 방법은 트레이와 챔버에서 미끄러지는 것을 방지할 수 있습니다.

추가 재료:

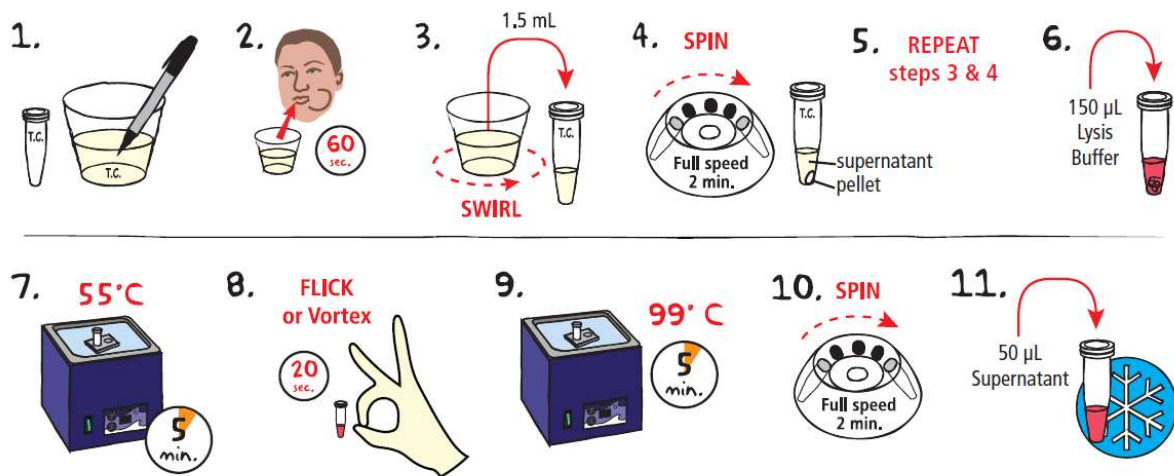
각 2.0%젤에는 EdvoQuick DNA Ladder, Control DNA 및 4명의 학생 PCR 샘플이 로딩되어야 합니다.

- EdvoQuick DNA ladder (튜브 E)를 라벨된 원심분리기 튜브에 30μL 씩 나누어 담아 하나씩 나눠줍니다.

모듈 III을 위해

각 조별로 1X TBE Buffer, UltraSpec-Agarose™ Powder, 희석된 SYBR® Safe 튜브(25 μL), EdvoQuick™ DNA Ladder (30 μL)가 주어져야 합니다.

모듈 1-A: 입안 세포에서 DNA 분리 (모듈 1-B 방식보다 추천)

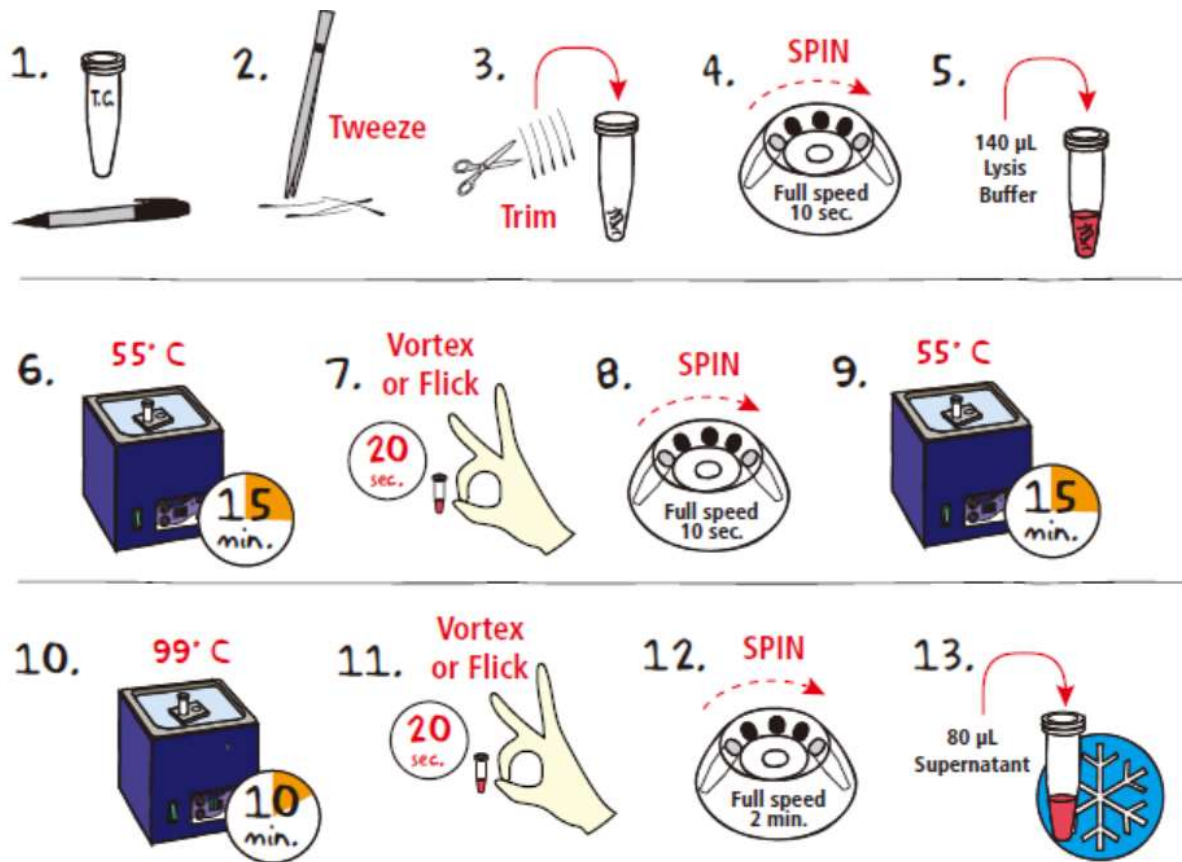


1. 비어있는 1.5mL 원심분리기 튜브 (스크류 뚜껑이 있는 튜브: 가열 시 열릴가능성이 있기
에)와 식염수 컵에 그룹명 또는 이름을 적습니다.
2. 10mL 식염수를 사용해 60초동안 세게 입안을 헹군 후 용액을 컵에 다시 뱉습니다.
3. 컵을 살살 돌린 후 1.5 mL를 튜브에 옮겨담습니다.
4. 세포를 펠렛화하기위해 원심분리기에서 2분간 최고속도로 돌려서 침전물(pellet)이 모이게
합니다. 위에 상층액을 부어버립니다.
5. 위의 3-4단계를 한 번 더 반복합니다.
6. Lysis 버퍼 150 µL를 넣고 피펫팅을 하거나 볼텍싱하여 상피세포 침전물을 다시 풀어줍니
다. **주의: 세포 펠릿이 완전히 풀어져 덩어리가 남아있지않도록 합니다.**
7. 튜브의 뚜껑을 닫고 항온수조에 띄웁니다. 55°C에서 5분간 놔둡니다.
8. 튜브를 꺼낸 뒤에 볼텍싱을 하거나 20초간 손가락으로 강하게 쳐서 잘 섞이게 합니다.
9. 튜브를 다시 항온수조에 넣고 99°C에서 5분간 놔둡니다.
10. 원심분리기에 2분간 최대속도로 돌려줍니다.
11. 상층액 50 µL를 라벨링한 깨끗한 원심분리기 튜브로 옮긴 후 얼음에 꼽아둡니다.

추출한 DNA는 이제 다음 모듈II:D1S80 Locus 증폭에 사용될 준비가 되었습니다. -20°C 냉동 보관
이 가능합니다.

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

모듈 1-B: 머리카락에서 DNA 분리 (모듈 1-A 방식을 추천)

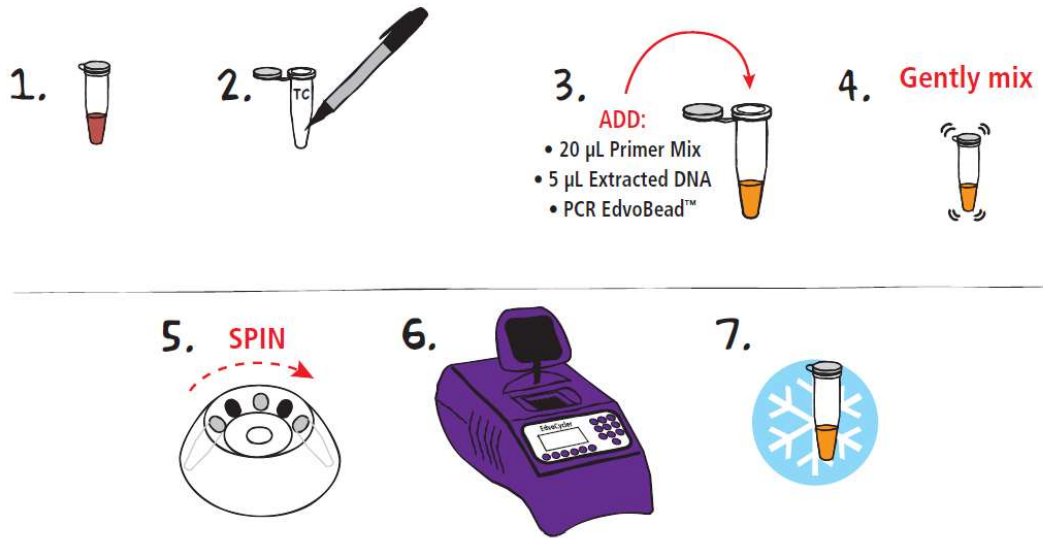


1. 1.5 mL 스크류캡 원심분리기 튜브에 자신의 이니셜을 적습니다.
2. 집게로 모발 기둥 2-3 개를 끝에서 잡고 빠르게 뽑아냅니다. 뿌리와 겹질(모발 뿌리 끝을 둘러싸는 점착성이 있는 통 모양의 세포층)이 포함된 5 개 이상의 모발을 수집합니다.
3. 깨끗한 면도칼이나 가위로 뿌리 주변의 불필요한 모발을 자릅니다(뿌리에서 약 1cm 길이를 남긴다). 힘줄로 뿌리를 집게로 잡아 라벨이 붙은 튜브로 옮깁니다.
4. 튜브에 스크류캡을 닫고, 최대속도에서 10 초간 원심분리하여 뿌리를 튜브 바닥에 모읍니다.
5. 140µL lysis 버퍼를 튜브에 첨가하고 모발 모든 부위가 버퍼 속에 잠길 수 있도록 해야 합니다.
6. 튜브에 스크류캡을 닫고 55°C 물 온도의 항온수조에서 15 분 동안 띄워둡니다.
7. 튜브를 볼텍싱하여 20 초간 섞습니다.
8. 튜브의 스크류캡을 닫고, 최대속도에서 10 초간 원심분리하여 뿌리를 튜브 바닥에 모읍니다.
9. 55°C 항온수조에서 샘플을 15 분 더 놔둡니다.
10. 99°C 항온 수조로 샘플을 옮겨 10 분 동안 놔둡니다. 가열시에는 꼭 스크류캡 튜브를 사용합니다.

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

11. 튜브를 볼텍싱하여 20 초간 섞습니다.
12. 저속도(6000 rpm)로 2 분 동안 세포 용액을 원심분리한다.
13. 상층액에서 80 μ L 을 깨끗하고 라벨링된 원심분리기 튜브로 옮깁니다. 얼음에 꽂아둡니다.
14. 모듈 II 로 넘어가 미토콘드리아 영역 증폭을 수행합니다.

모듈 II: 미토콘드리아 영역 증폭



1. 모듈 I 에서 추출한 붉은색 DNA 샘플을 준비합니다.
2. 0.2mL PCR 튜브에 실험 학생이름을 적습니다.
3. 20µL D1S80 프라이머 믹스(노란색), 5µL 추출한 DNA(붉은색), PCR EdvoBead 1개를 튜브에 넣습니다.
4. PCR EdvoBead가 완전히 용해될 때까지 살살 흔들어 섞습니다. 잘 섞었다면 용액은 밝은 오렌지색을 띕니다.
5. 튜브 바닥에 샘플이 모이도록 원심분리기를 약간 돌려줍니다.
6. 가지고 있는 PCR기기를 이용해 아래 조건으로 증폭시킵니다.

PCR 사이클 조건:

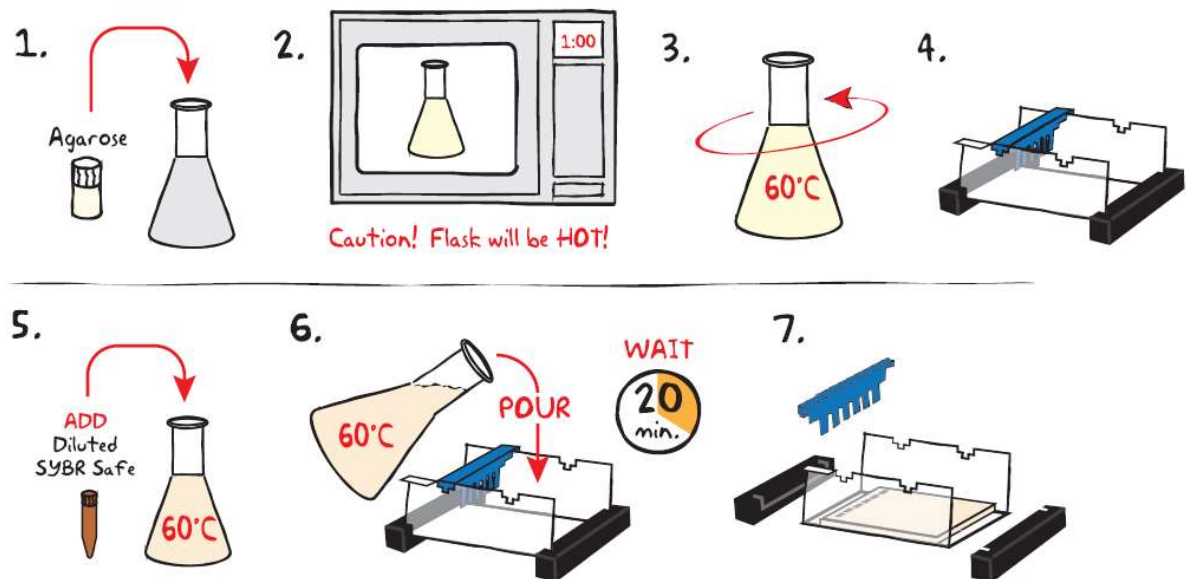
Initial denaturation 94°C 1분

94°C에서 30초	} 25 cycles
55°C에서 30초	
72°C에서 2분	

72°C에서 Final extension 1분

7. PCR완료 후 튜브는 얼음에 삽입해 놓습니다. 다음 모듈 III으로 이동해 전기영동을 진행합니다.

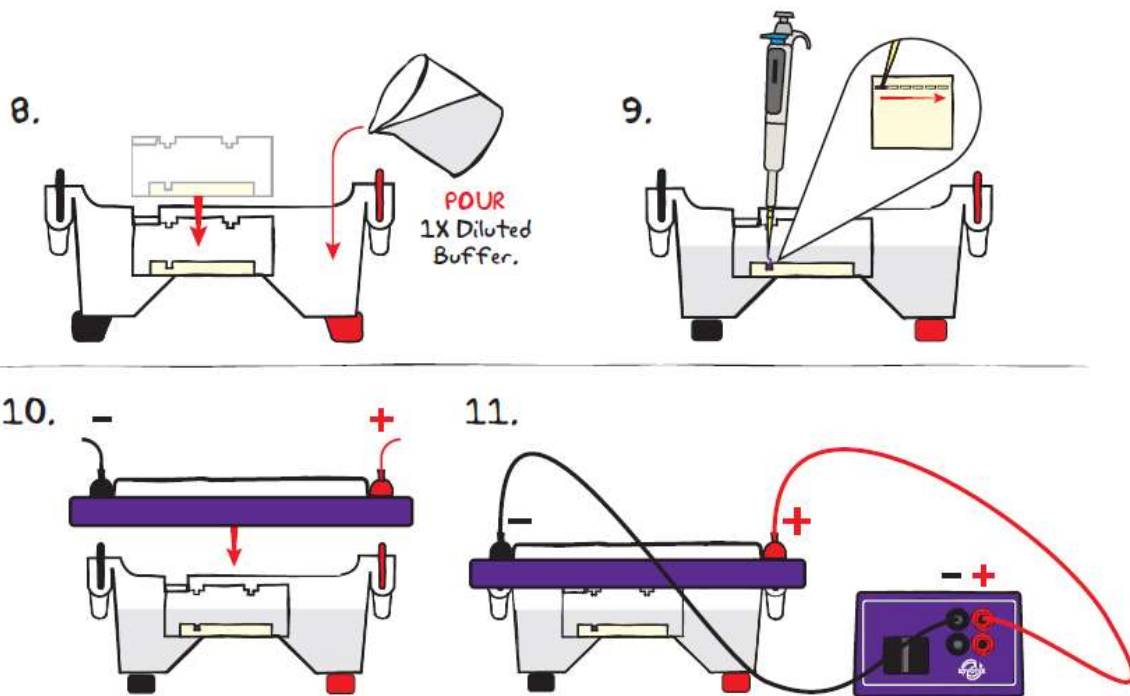
모듈 III: 전기영동을 이용한 PCR 결과물 분리



SYBR Safe 염료가 있는 아가로스 젤 준비

1. 250mL 플라스크에 Agarose 분말을 1X의 TBE버퍼와 섞습니다. (Table A.1 참조)
2. 전자레인지에 넣고 1분간 가열합니다. 플라스크를 살짝 돌려보고 10초씩 다시 전자레인지에 가열시켜 분말이 완전히 녹을 때까지 반복합니다.
3. 완전히 용해된 후 60°C까지 식혀줍니다.
4. 용액이 식는 동안 젤 캐스팅 트레이에 고무 마개와 comb을 결합합니다. Comb 결합 방향을 트레이에 표시된 노치 쪽으로 잘 맞춰 끼워 샘플로딩 well의 위치가 (-)극에 위치하게 합니다.
5. 용액을 캐스팅 트레이에 붓기 전 희석된 SYBR Safe를 섞습니다. (Table A.1 참조)
6. 어느정도 식은 아가로스 용액을 젤캐스팅 트레이에 붓습니다. 20분정도면 완전하게 굳게 됩니다.
7. 다 굳으면 고무 마개와 comb을 제거합니다.

Table A Individual 2.0% UltraSpec-Agarose™ Gel with Diluted SYBR® Safe Stain				
Size of Gel Casting tray	1X TBE Buffer +	Amt of Agarose	TOTAL Volume	ADD Diluted SYBR (Step 5)
7 x 7 cm	25 mL	0.5 g	25 mL	25 µL
7 x 14 cm	50 mL	1.0 g	50 mL	50 µL



8. 젤을 전기영동 챔버에 넣고 1X 전기영동 버퍼(Table B 참조)를 넣어 완전히 잠기게 합니다.
9. "Table 1: Sample Table" 에서처럼 각 샘플을 well웰에 마이크로 피펫으로 25 μ L씩 로딩합니다.
10. 안전 덮개를 덮고 +, - 극을 잘 연결했는지 확인합니다.
11. 전원공급장치에 연결하여 실험을 시작합니다. (전압과 시간은 Table C 참조)
12. 전기영동을 마친 후 장치에서 젤을 꺼냅니다.

Table 1: Sample Table

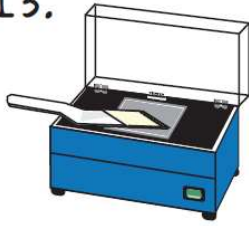
Lane	Recommended	Sample Name
1	EdvoQuick™ DNA Ladder	
2	Control DNA*	
3	Student #1	
4	Student #2	
5	Student #3	
6	Student #4	

Table B	1x TBE Electrophoresis Buffer (Chamber Buffer)	
	EDVOTEK Model #	Total Volume Required
	M6+ & M12 (new)	300 mL
	M12 (classic)	400 mL
	M36	1000 mL

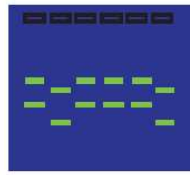
Table C	Time & Voltage Guidelines (2.0% Agarose Gels)	
	Volts	Time: 7 x 7 cm gel ~4.0 cm migration
	75	75 min.
	125	40 min.
	150	30 min.

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

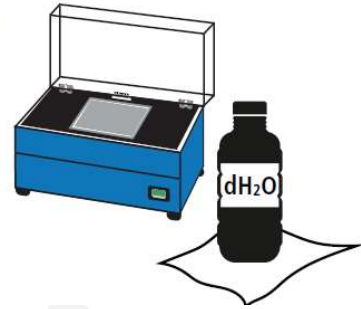
13.



14.



15.



13. 뒤집개 같은 기구를 사용해 젤을 조심스럽게 트랜스 일루미네이터에 올립니다.

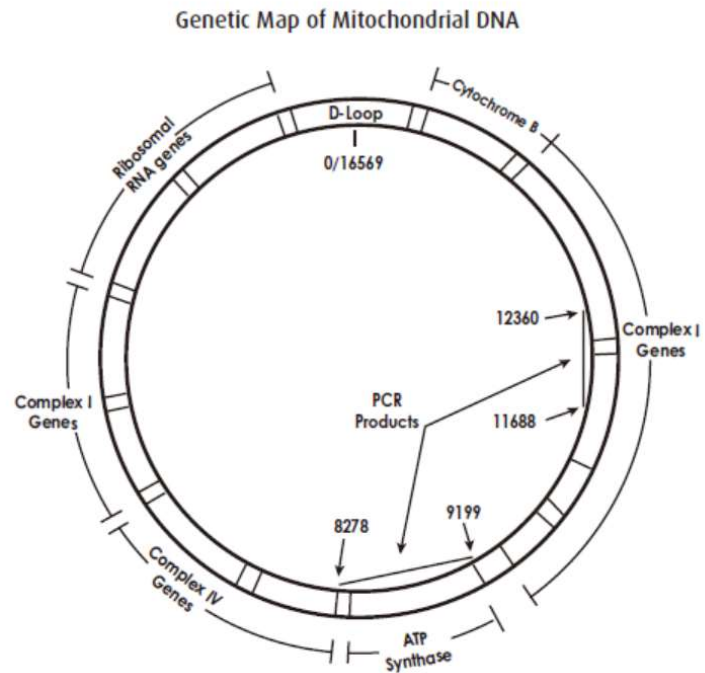
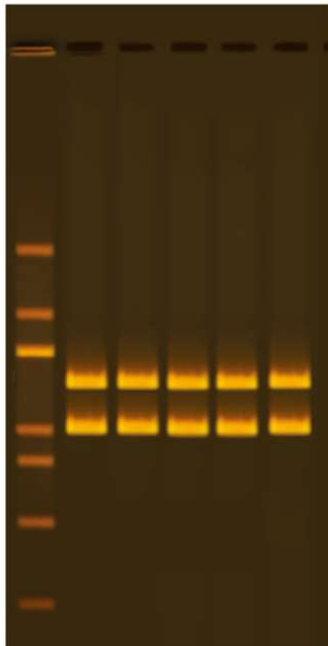
14. 결과를 확인하고 사진을 찍습니다.

15. 사용 후에는 깨끗하게 트랜스 일루미네이터를 닦습니다.

토론 주제

1. 세포 내의 다른 세포 기관들과는 어떤 점에서 미토콘드리아가 다른지 이러한 특성을 설명하는 하나의 기원론적 이론은 무엇인지 생각해봅시다.
2. 미토콘드리아 DNA가 핵 DNA보다 인류의 과거 역사를 해석하는 더 나은 도구가 될 수 있는 이유는 무엇인가요?
3. 미토콘드리아 이브(Mitochondrial Eve)는 누구인가요? 모든 종에 미토콘드리아 이브가 존재하나요? 인간에는 다른 공통 조상이 있나요?

결과 및 분석



이러한 영역의 증폭은 모든 학생에게 921 및 672 bp 의 PCR 생성물이 나올 것입니다. 이러한 대형 mtDNA 영역의 크기의 연속성은 대형 삽입 또는 삭제가 발생하지 않은 최근(현재로부터 10 만에서 20 만 년 전) 미토콘드리아 이브 이론을 지원합니다. (이 시간 범위 내에서 단일 염기의 작은 변화는 분자 시계 연대 측정에 사용되지만, 추가적인 서열 분석 또는 제한 효소 분석 단계가 필요합니다.)

참고 - 사용된 PCR 조건에 따라 "프라이머 다이머(primer dimer)"라고 하는 작은 분자량 밴드가 200 bp 마커 아래에 존재할 수 있습니다. 이것은 PCR 아티팩트이며 무시해도 됩니다. 다른 작은 밴드가 나타날 수도 있으며 이는 비특이적인 프라이머 결합 및 이에 따른 서열 증폭으로 인한 것입니다.