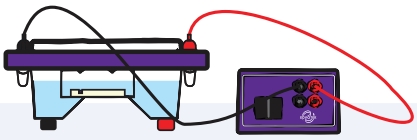
실험 가이드북

ALU 인간 DNA 분석

Alu-Human DNA Typing Using PCR

ED333



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 자신의 genomic DNA를 추출할 것입니다. PCR(Polymerase Chain Reaction)과 젤 전기영동법을 사용해 16번 염색체(PV92)의 Alu 삽입부위에서 개인 간 다형성을 분석할 것입니다.

*주의: PCR 사이클링 조건과 전기영동 버퍼 내용이 최근에 변경되었습니다. 2023년 이전에 구입하신경우 프로토콜을 확인해주세요.

제품 구성품

	시약	보관방법
	PCR EdvoBeads	실온보관
A	Universal DNA Buffer	-20℃ 냉동보관
B	TE Buffer	-20℃ 냉동보관
C	PV92 LyphoPrimer™ Mix	-20℃ 냉동보관
D	LyphoControl	-20℃ 냉동보관
E	EdvoQuick™ DNA ladder	-20℃ 냉동보관
	Proteinase K	-20℃ 냉동보관

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

- 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

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

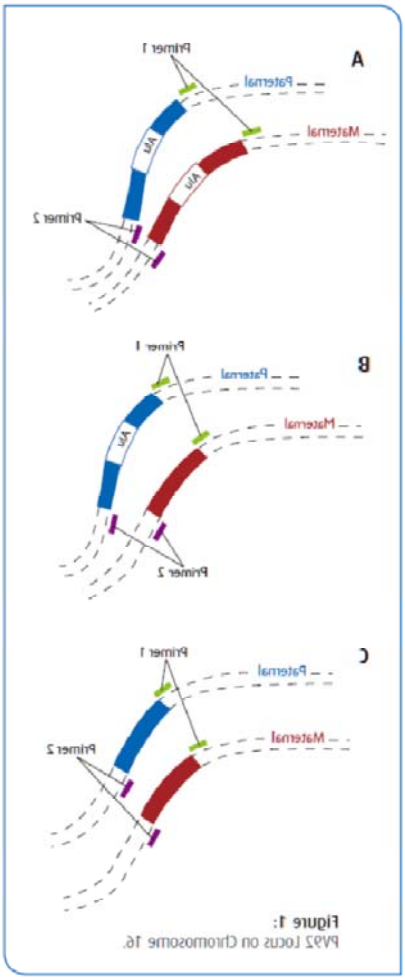
필요 장비 및 준비물

- PCR Thermal cycler
- 전기영동장치, 전원공급장치
- 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

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

배경 지식

인간의 단일 염색체 유전체는 29억 개의 염기쌍(DNA)으로 구성되며, 이 중 약 5%는 단백질을 코딩하는 유전자입니다. 인트론과 기타 비코딩 염기서열은 나머지를 차지하며, 이러한 비코딩 서열 중 일부는 유전자 프로모터, 리보솜 및 전이 RNA, 그리고 마이크로 RNA로 구성됩니다. 그러나 이러한 비코딩 서열 중 많은 것들은 자체 복제되는 것으로 보이며, 유전체 전체에서 수백 또는 수천 번 반복됩니다. 이러한 반복 서열은 종종 자신의 복제를 제외하고는 기능을 갖지 않는 것으로 보여 "이기적인" 또는 "기생적인" DNA라고 불립니다. 이러한 반복적인 요소들은 인간 유전체의 20% 이상을 차지합니다. 1979년에는 인간 유전체의 여러 다른 위치에서 특정한 300 염기서열의 DNA 요소가 식별되었습니다. 이 요소의 사본에는 제한효소 Alu I의 인식부위가 포함되어 있으며, 그 이후로 이러한 요소들은 Alu 요소라고 불리게 되었습니다. Alu 요소는 엑손에 발견되기도 하지만 대부분은 인트론과 기타 비코딩 영역에 존재합니다. 그러나 Alu 요소가 특정 유전자를 방해할 때 인간 질병이나 기타 결함을 유발할 수 있습니다. Alu 삽입 과정의 세부 사항을 이해하기는 쉽지 않습니다. Alu 서열은 RNA 중간체를 통해 복제되며, 해당 RNA은 retrotransposon이라고 불리는 이중 가닥 DNA 세그먼트로 복사됩니다. 그리고 retrotransposon은 유전체의 다른 곳에 삽입됩니다. 대부분의 Alu 서열은 복제 불가능하며, 일부 "마스터 유전자 master genes"만이 복제되어 새로운 요소를 형성한다는 이론이 있습니다. 인간(및 기타 유인원)은 그들의 유전체 전체에 수십만 개의 Alu 요소를 가지고 있습니다. 그 중 대부분은 고정되어 있으며, 두 염색체에 동일한 삽입이 있는 것을 의미합니다. 그러나 다른 Alu는 이형성을 가지며, 해당 요소가 특정 염색체 위치에 존재할 수도 있고, 존재하지 않을 수도 있습니다. 개인 간의 DNA 서열의 차이를 우리는 다형성이라고 부릅니다. 개인은 특정 Alu 유전자에 대해 이형합 또는 동형합일 수 있습니다. 이는 해당 서열이 동일한 염색체의 양쪽이나 한쪽에만 존재할 수 있다는 것을 의미합니다.



이형성 Alu 삽입의 예로는 염색체 16의 PV92 부위에서 발견되는 것이 있습니다. PCR을 사용하여 개인이 PV92 부위에 Alu 삽입을 가지고 있는지 여부를 결정할 수 있습니다. 만약 사람이 해당 삽입물을 모든 염색체에 가지고 있다면, PCR의 결과로는 700 bp 크기의 단일 밴드가 나타납니다 (Figure 1A). 만약 사람이 염색체 16의 한 염색체에 삽입물을 가지고 있지만, 다른 새로운 삽입물을 가지고 있지 않다면, PCR 이후 두 개의 밴드가 나타납니다. 하나는 700 bp이고, 다른 하나는 400 bp입니다 (Figure 1B). 만약 사람이 어느 한 새로운 삽입물도 갖고 있지 않다면, 이 사람은 null 유전형을 가지고 있으며 PCR 결과 400 bp의 하나의 밴드만 표시됩니다 (Figure 1C).

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

PV92 locus를 조사하기 위해 일반적으로 중합효소연쇄반응 (PCR)이 사용됩니다. PCR은 1984년에 캘리포니아의 Cetus Corporation에서 Kary Mullis 박사에 의해 발명되었습니다. PCR 방법의 거대한 유용성은 사용의 용이성과 작은 DNA 조각의 증폭을 허용하는 능력에 기초합니다. 이 혁신적인 기술로 Mullis는 1993년 화학 분야의 노벨상을 수상하게 되었습니다.

PCR을 수행하기 전에는 다양한 생물학적 원천에서 템플릿 DNA를 추출합니다. PCR은 매우 민감하기 때문에 유전자의 몇 개 사본만 필요합니다. 그러나 새로 분리된 DNA는 낡은 DNA 샘플보다 적합한 증폭 결과를 제공합니다. 특정 DNA 또는 타겟 서열을 증폭하기 위해, 타겟 서열의 끝과 대응하는 두 개의 프라이머(짧은 합성 DNA 분자)를 설계합니다.

PCR를 수행하기 위해, 템플릿 DNA와 프라이머(more molecules)의 molar excess가 대상 염기서열의 끝 부분에 상응하도록 디자인된 두 개의 프라이머와 네 개의 "자유free" Deoxynucleotide(dATP, dCTP, dGTP, and dTTP) 및 열안정성 DNA polymerase가 혼합됩니다. 가장 흔히 사용되는 DNA polymerase는 Taq DNA polymerase입니다. 이 효소는 온천에서 발견된 박테리아에서 정제되었으며 매우 높은 온도에서 안정적입니다. 이러한 구성 요소(템플릿 DNA, 프라이머, 네 개의 Deoxynucleotide 및 Taq DNA polymerase)는 Taq polymerase에게 필수적인 요소인 Mg^{+2}를 가진 버퍼와 혼합됩니다. PCR 반응 혼합물은 thermal cycler의 세 가지 서로 다른 온도에서 순차적인 가열/냉각 주기에 노출됩니다.

• 첫 번째 단계인 "denaturation(분리)"에서는 혼합물을 거의 끓는 온도(94℃-96℃)로 가열하여 대상 DNA를 "unzip"(녹임)합니다. 높은 온도는 두 상보적인 DNA 염기 서열 사이의 수소 결합을 붕괴시키고 그들의 분리를 일으킵니다.

• 두 번째 단계인 "annealing(결합)"에서는 반응 혼합물을 45℃-65℃까지 냉각하여 프라이머가 대상 DNA 서열과 결합할 수 있도록 합니다.

• 세 번째 단계인 "extension(확장)"에서는 온도가 72℃까지 올려집니다. 이는 Taq polymerase가 가닥이 맞물린 프라이머에 뉴클레오티드를 추가하여 새로운 상보적인 가닥을 합성하는 데 최적인 온도입니다.

이 실험에서, 각 학생은 머리카락이나 구강 세포로부터 자신의 DNA를 추출하고 PCR을 통해 PV92 염색체상의 DNA를 증폭할 것입니다. 대조군으로는 배양된 인간 세포주에서 정제한 DNA를 사용할 수 있습니다. 그리고 PCR 산물은 아가로스 젤에서 이용되어 해당 염색체상의 Alu 삽입에 대해 해당 학생이 돌연변이가 있는지 (+/+), 이형합체 (+/-) 또는 결함 (-/-)인지를 결정합니다. 이 실험의 목적은 인간 DNA의 분리 및 PCR 증폭과 젤 전기영동을 통해 각 개인 간의 DNA 다형성을 비교하는 것입니다.

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

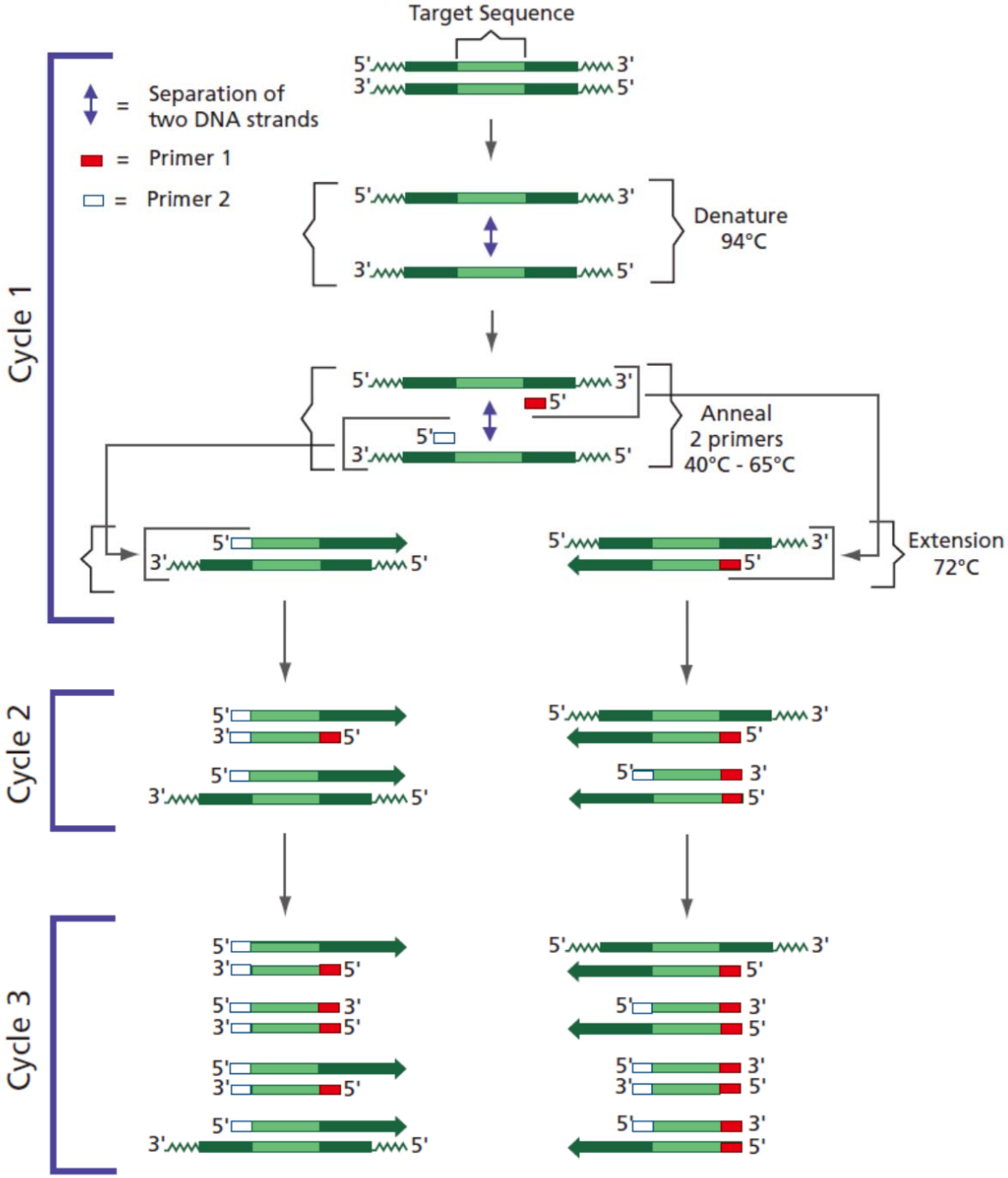


Figure 2:
Polymerase Chain Reaction

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

모듈 I 준비

구강 세포에서 DNA 추출

참고: 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

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

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 유니버셜 DNA 버퍼(튜브 A) 100μL 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 유니버셜 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 녹지 않은 덩어리가 없어야 합니다.

4. 라벨이 붙은 13 개의 원심분리기 튜브에 각각 300μL 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.

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 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 을 위해 학생들이 받아야 할 것

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

학생 두 명이 공유하는 시약

- 300 µL Lysis buffer
- 15% 표백락스 bleach solution

모듈 II 준비

PCR 프라이머는 실험을 하기 전에 선생님이 재수화해야 하는 동결건조된 혼합물로 제공됩니다. PCR EdvoBeads 는 PCR 설정 전에 나눠줄 수 있습니다. 학생이나 선생님은 장갑을 착용한 채로 PCR EdvoBeads를 집어 옮길 수 있습니다. 또는 담겨있는 비드를 개별 PCR 튜브에 부드럽게 넣을 수도 있습니다. 비드를 나눠준 후에는 습기를 흡수하고 실험 전에 다시 분산하기 어려워지지 않도록 PCR 튜브를 꼭 닫는 것이 중요합니다.

참고 : PCR EdvoBeads ™는 부서지기 쉬우므로 PCR 튜브에 이동시키는 동안 주의해야 합니다.

이 키트에는 LyphoControl™ 및 LyphoPrimer™ 샘플이 포함되어 있습니다. 시약을 올바르게 사용한 결과의 반응은 주황색으로 나타납니다.

PV92 프라이머 혼합물의 준비

1. TE 버퍼 (튜브 B)를 해동하고 잘 섞습니다.

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

2. LyphoPrimer™ (튜브 C)의 하단에 고체가 있어야합니다. 그렇지 않으면 최대 속도로 튜브를 10 초 동안 원심 분리합니다.
3. PV92 Primer Mix 튜브에 TE 버퍼 (튜브 B) 1 mL 을 첨가합니다. 튜브를 닫고 잘 섞습니다.
4. 희석된 PV92 Primer Mix 50μL 을 13 개의 표기된 원심분리기 튜브에 동일하게 분주합니다.
5. 희석된 PV92 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 μL 을 첨가합니다. 피펫팅으로 섞습니다.
3. control 반응 1 개당 25 μL 을 분주합니다. **참고: LyphoControl™은 이미 필요한 모든 PCR 구성 요소를 포함하고 있으므로 PCR Edvobead™가 필요하지 않습니다. 희석 후 LyphoControl™은 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 μL LyphoControl™ 반응을 로딩 해야합니다.**

모듈 II 실험을 위해:

각 학생들은 PCR 튜브와 PCR EdvoBead 1 개씩을 받습니다.

두 명당 한 개씩의 PV92 Primer 50μL 를 받습니다.

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

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 2mL 의 버퍼를 추가하는 것을 권장합니다. 과다한 버퍼는 SYBR® Safe 가 젤에서 확산되는 것을 방지합니다. SYBR® Safe 가 들어간 젤은 빛에 노출되는 것을 피해 어둡고 서늘한 곳에서 보관해야 합니다.

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

추가 재료:

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

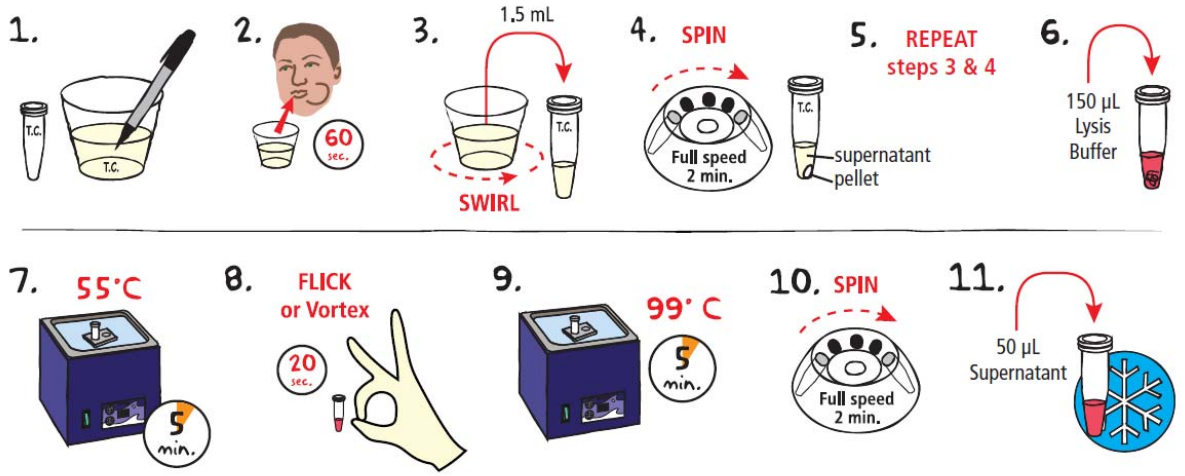
- EdvoQuick DNA ladder (튜브 E)를 라벨된 원심분리기 튜브에 30μL 씩 나누어 담아 하나씩 나눠줍니다.

모듈 III 을 위해

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

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

모듈 1: 입안 세포에서 DNA 분리

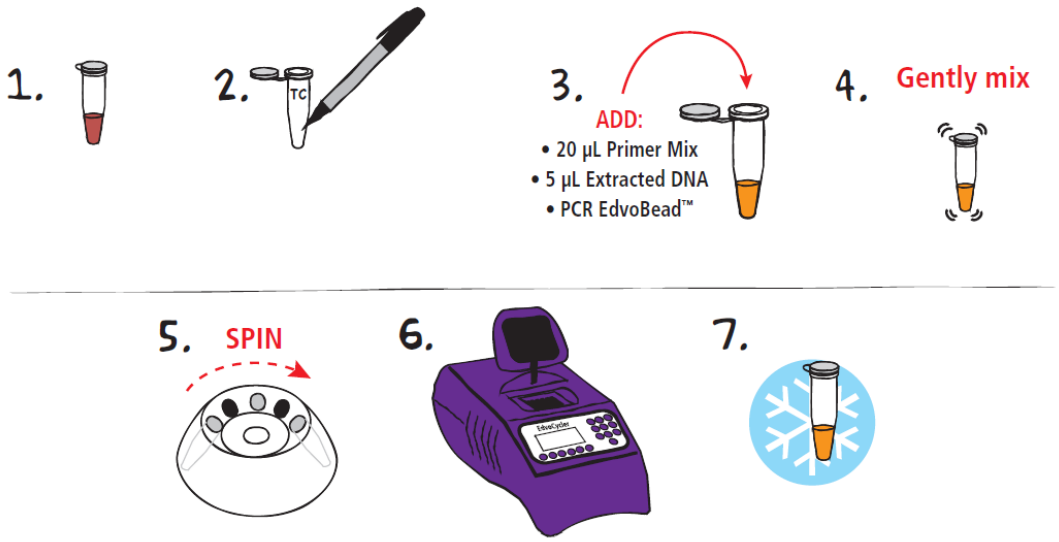


1. 비어있는 1.5mL 원심분리기 튜브 (스크류 뚜껑이 있는 튜브: 가열 시 열릴가능성이 있기에)와 식염수 컵에 그룹명 또는 이름을 적습니다.
2. 10mL 식염수를 사용해 60초동안 세게 입안을 헹군 후 용액을 컵에 다시 뱉습니다.
3. 컵을 살살 돌린 후 1.5 mL를 튜브에 옮겨담습니다.
4. 세포를 펠렛화하기위해 원심분리기에서 2분간 최고속도로 돌려서 침전물(pellet)이 모이게 합니다. 위에 상층액을 부어버립니다.
5. 위의 3-4단계를 한 번 더 반복합니다.
6. Lysis 버퍼 150 µL를 넣고 피펫팅을 하거나 볼텍싱하여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

추출한 DNA는 이제 다음 모듈II: PV92 Locus 증폭에 사용될 준비가 되었습니다. -20℃ 냉동 보관이 가능합니다.

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

모듈 II: PV92 Locus 증폭



1. 모듈I 에서 추출한 붉은색 DNA 샘플을 준비합니다.
2. 0.2mL PCR 튜브에 실험 학생이름을 적습니다.
3. 20µL PV92 프라이머 믹스(노란색), 5µL 추출한 DNA(붉은색), PCR EdvoBead 1개를 튜브에 넣습니다.
4. PCR EdvoBead가 완전히 용해될 때까지 살살 흔들어 섞습니다. 잘 섞였다면 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℃ 5분

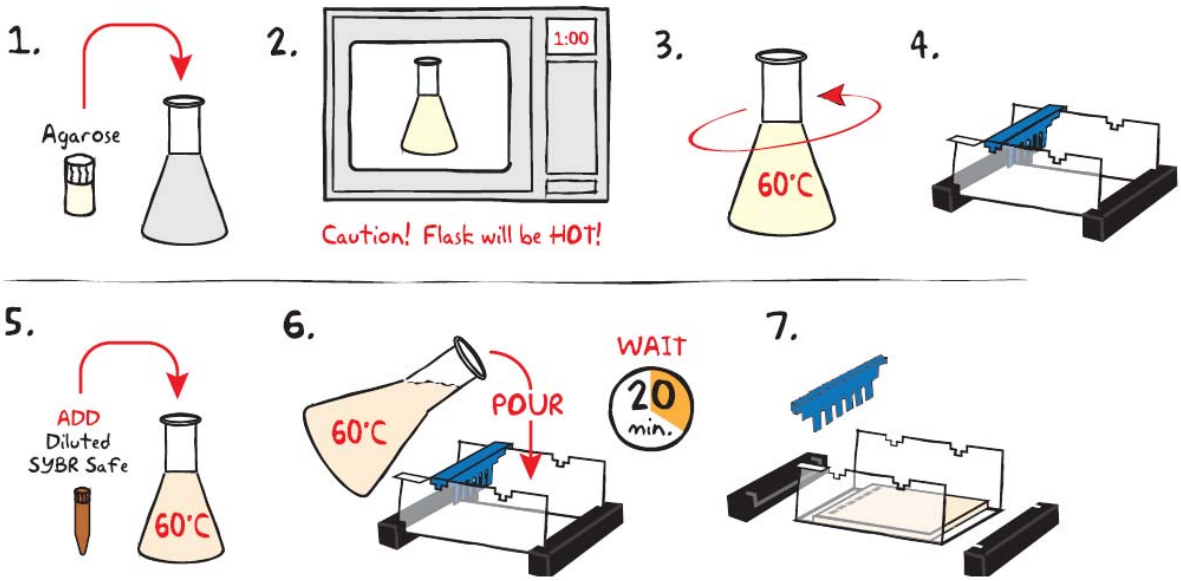
   94℃에서 30초
   65℃에서 30초 } 32 cycles
   72℃에서 30초

   72℃에서 Final extension 4분

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

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

모듈 III: 전기영동을 이용한 PCR 결과물 분리



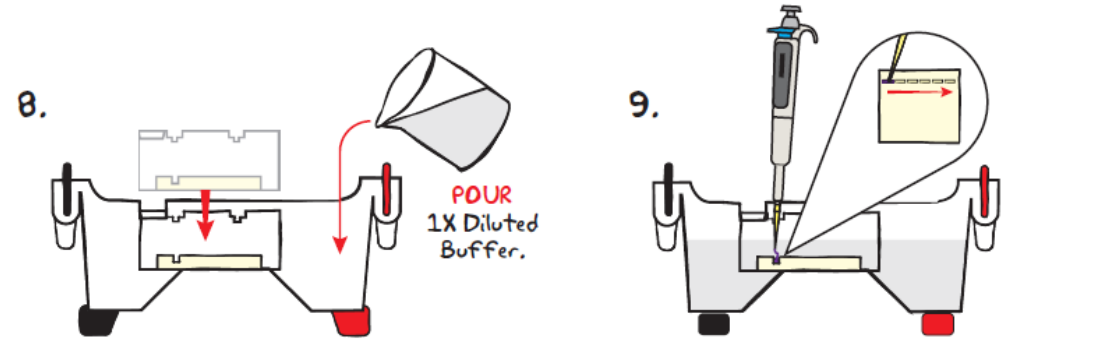
SYBR Safe 염료가 있는 아가로스 젤 준비

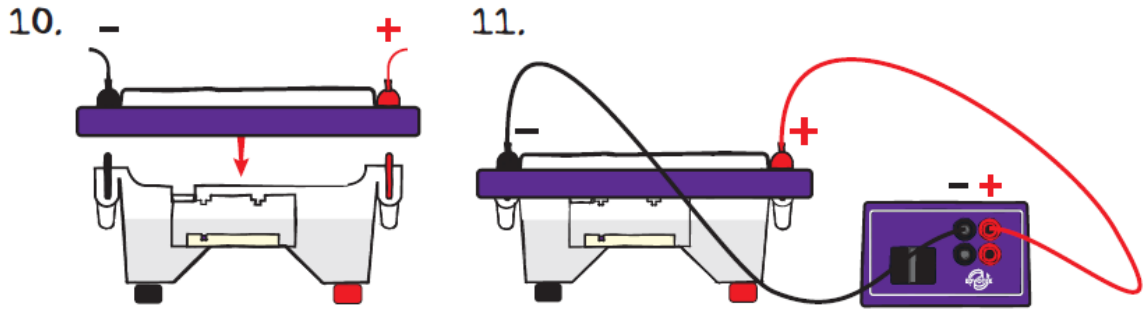
1. 250mL 플라스크에 Agarose 분말을 1X의 TBE버퍼와 섞습니다. (Table A.1 참조)
2. 전자레인지에 넣고 1분간 가열합니다. 플라스크를 살살 돌려보고 10초씩 다시 전자레인지에 가열시켜 분말이 완전히 녹을 때까지 반복합니다.
3. 완전히 용해된 후 60℃까지 식혀줍니다.
4. 용액이 식는 동안 겔 캐스팅 트레이에 고무 마개와 comb을 결합합니다. Comb 결합 방향을 트레이에 표시된 노치 쪽으로 잘 맞춰 끼워 샘플로딩 well의 위치가 (-)극에 위치하게 합니다.
5. 용액을 캐스팅 트레이에 붓기 전 희석된 SYBR Safe를 섞습니다. (Table A 참조)
6. 어느 정도 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

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





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 µL씩 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)

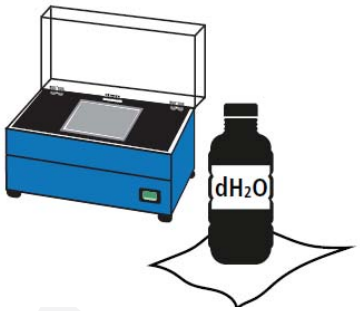
Volts	Time: 7 x 7 cm gel ~4.0 cm migration
75	75 min.
125	40 min.
150	30 min.

★ 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.

탐구 질문

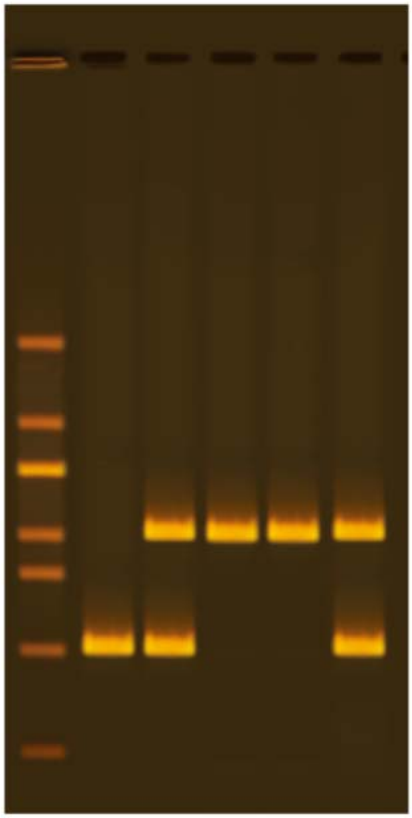
1. 여러분의 Alu 유전자형을 반 친구들의 유전자형과 비교해 보세요. 유사한 결과를 보인 사람이 있었다면, 어떤 가능성 있는 설명이 있을까요?

2. "이기적인 DNA"는 무엇인가요? Alu 요소가 어떻게 복제되는지 생각해보세요. Alu 요소의 기능은 무엇인가요?

3. 이형성 Alu 요소는 DNA 식별에 사용될 수 있을까요(예: 범죄 수사에서)? 그렇다면 그 이유는 무엇인가요? 그렇지 않다면 왜 그런가요?

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

결과 및 분석



Lane	Recommended	Molecular Weight	Result
1	EdvoQuick™ DNA Ladder	---	---
2	Control DNA*	400 bp	Null for Alu insertion (-/-)
3	Student #1	700, 400 bp	Heterozygous for Alu insertion (+/-)
4	Student #2	700 bp	Homozygous for Alu insertion (+/+)
5	Student #3	700 bp	Homozygous for Alu insertion (+/+)
6	Student #4	700, 400 bp	Heterozygous for Alu insertion (+/-)

참고: 사용한 PCR 조건에 따라, "프라이머 다이머"(primer dimer)라고 알려진 분산된, 작은 분자량의 밴드가 200 bp 마커 밑으로 나타날 수 있습니다. 이것은 PCR 유물이며 무시할 수 있습니다. 다른 적은 수의 밴드는 비특이적인 프라이머 결합과 이러한 서열의 후속 증폭으로 인해 나타날 수 있습니다

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