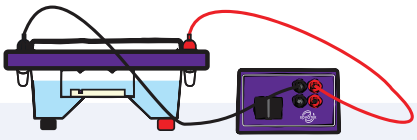
실험 가이드북

VNTR 인간 DNA 분류

VNTR Human DNA Typing Using PCR

ED334



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 입안의 구강상피세포에서 유전체 DNA를 추출할 것입니다. PCR(Polymerase Chain Reaction)과 Agarose Gel Electrophoresis는 염색체 1의 D1S80 영역에서 개인 간 다형성을 분석하는 데 사용됩니다.

제품 구성품

	시약	보관방법
	PCR EdvoBeads	실온보관
A	Universal DNA Buffer	-20℃ 냉동보관
B	TE Buffer	-20℃ 냉동보관
C	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

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

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

배경 지식

인간의 DNA는 생물학적 부모로부터 상속받은 23쌍의 염색체에 포장됩니다. 대부분의 유전자는 모든 사람에서 동일하지만, 유전체 전체에 걸쳐 "다형성"이라는 작은 차이 또는 "다형성"이 발생하여 우리 각자를 독특하게 만듭니다. 예를 들어, 가장 간단한 차이는 단일 염기 다형성(SNP)입니다. 유전체의 특정 위치에 있는 짧은 반복되는 DNA는 수의 차이로 변형되어 단조성 반복(STRs)을 생산하고, 더 긴 반복 세그먼트는 가변적인 반복 수(VNTRs)로 불립니다. 대부분의 다형성은 DNA의 비코딩 영역에서 발생하지만, 그렇지 않은 경우에는 유전자를 방해하고 질병을 유발할 수 있습니다. 의학 진단 검사는 질병과 관련된 특정 다형성을 식별하는 데 일상적으로 사용됩니다.

VNTR
15 - 70 bp repeats, repeated five to 100 times.

STR
2 - 6 bp repeats, repeated three to 100 times.

한 사람의 유전체 내에서 여러 다양한 다형성을 분석하면 고유한 DNA "지문"이 생성됩니다. DNA 지문은 우리가 서로를 구별할 수 있도록 합니다. 다형성은 상속되기 때문에 DNA 지문은 부계/모계성 및 가족 관계를 결정하는 데에도 사용될 수 있습니다. DNA 지문 기술의 가장 잘 알려진 응용 분야는 법의학입니다. 법의학적 DNA 지문 분석의 첫 번째 단계는 범죄 현장 또는 피해자에서 발견되는 생물학적 증거 (주로 얼룩으로 나타남)를 법적으로 수집하는 것입니다. 샘플은 세포막을 파괴하기 위해 detergent(계면활성제)로 처리되며, 세포 DNA는 추가적인 분석을 위해 추출됩니다(Figure 1 참조). 이러한 샘플에서 DNA가 추출된 후, 법의학 전문가는 DNA 지문을 알아냅니다. 범죄 현장에서 추출한 DNA 지문은 다른 용의자들의 DNA 지문과 비교할 수 있습니다. 일치하는 경우, 용의자가 범죄 현장에 있었을 가능성이 크게 증가합니다.

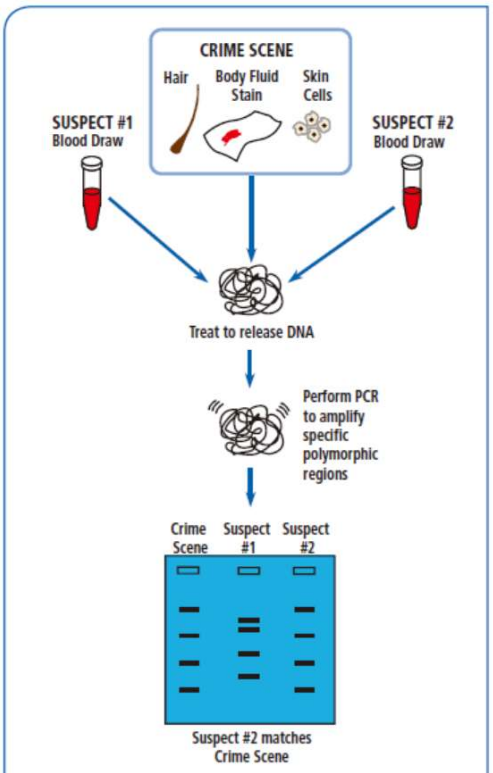


Figure 1:
Extraction and Electrophoresis of DNA Samples.

1984년 영국에서 유전자 지문(Forensic DNA fingerprinting)이 처음 사용되었습니다. 이는 Leicester 대학교의 Alex Jeffreys 박사의 연구를 바탕으로 이루어졌습니다. Jeffreys의 분석 결과, 1987년 9월 최초의 DNA 인쇄술 사례에서 범인을 검거할 수 있었습니다. DNA 증거를 사용한 최초의 유죄 판결은 1987년 11월 6일 플로리다주 오클랜드에서 이루어졌습니다. 이후, 수천 건의 사건에서 DNA 분석이 사용되었습니다. 또한, 여러 명의 사형수를 포함하여, 수백 명의 유죄 선고를 받은 죄수들이 그들의 범죄에서 무죄가 입증되었습니다. 원래의 DNA 지문 기술은 제한효소(Restriction enzymes)로 DNA를 자르고, 아가로스 젤 전기영동법으로 조각을 분리하고, DNA를 막에 이식한 다음, 다형성 영역(probe)에 대한 핵산 전달을 통해 막을 융합하는

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

방식인 제한효소길이 다형성(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) 분석을 사용했습니다. RFLP는 매우 정확하지만, 시간이 많이 소요되며 대량의 DNA가 필요합니다. 이러한 이유로 RFLP 방법은 더 이상 법의학에서는 사용되지 않지만, 특정 의료 진단 검사에서는 계속 사용되고 있습니다.

범죄 수사 과학자들은 PCR을 사용하여 고도로 다형성을 가진 DNA 지역을 분석합니다. 같은 개인에서 여러 다른 VNTR 또는 STR을 조사함으로써, 수사관은 해당 개인의 고유한 DNA 지문을 얻게 되며, 이는 쌍둥이를 제외한 다른 어떤 사람의 것과도 다릅니다. 인간 염색체 1에 존재하는 D1S80이라고 불리는 하나의 VNTR은 16-40 회 반복되는 16 뉴클레오티드 서열로 구성됩니다. D1S80 유전자형이 균형집단일 경우, 염색체 1상의 모든 동일한 위치에서 반복되는 염기서열의 반복 횟수가 같아서 (homozygous) 농도가 동일한 하나의 PCR 산물이 나타납니다. 이후 아가로스 젤 전기영동을 통해 하나의 밴드(band)로 확인됩니다. (Figure 2A). 더 일반적으로, 개인은 이 Loci에서 이형접합체를 갖고 있으며, 다른 D1S80 반복 횟수를 나타냅니다. 이형 접합체를 갖는 개인의 DNA 증폭은 두 개의 구분된 PCR 생성물을 발생시킵니다(Figure 2B). 대부분의 응용 분야에서 법 집행 기관들은 크기가 작기 때문에 쉽게 증폭이 가능하고 따라서 출발 DNA 양이 적게 필요한 STR을 분석합니다.

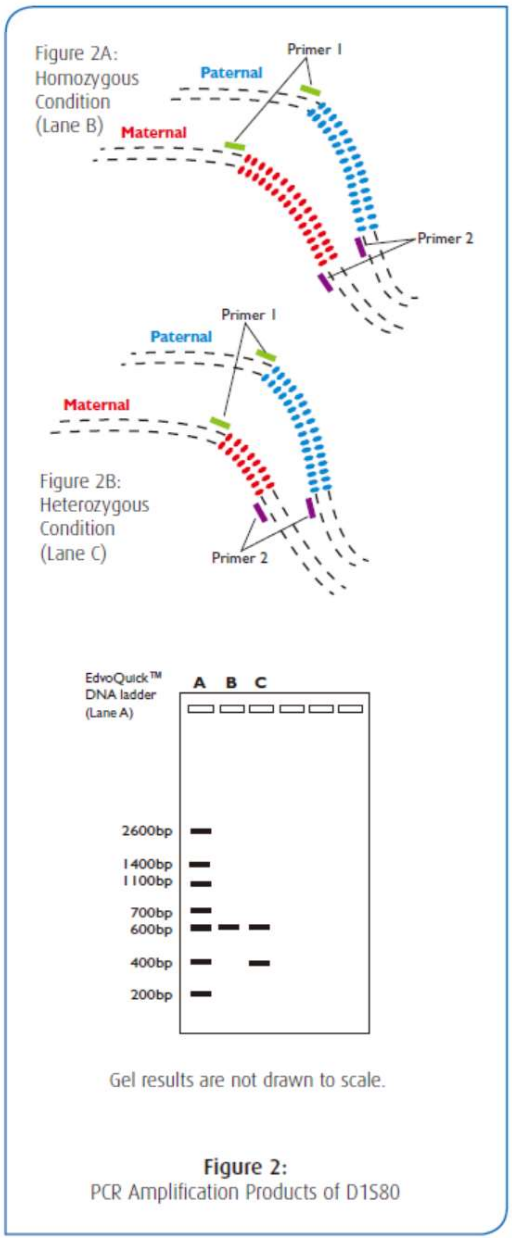


Figure 2:
PCR Amplification Products of D1S80

PCR를 수행하기 전에, 생물학적 원천에서 (법의학적 사례에서는 혈액, 조직 또는 체액) 템플릿 DNA가 추출됩니다. PCR은 매우 민감하기 때문에 유전자의 몇 개 사본만 있으면 충분합니다. 그러나 신선하게 분리된 DNA는 분해될 가능성이 있는 오래된 DNA 샘플보다 좋은 증폭 결과를 제공합니다. 특정 DNA 또는 타겟 서열을 증폭하기 위해, 두 개의 프라이머(짧은 합성 DNA 분자)가 대상 서열의 끝 부분에 대응하도록 설계됩니다.

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

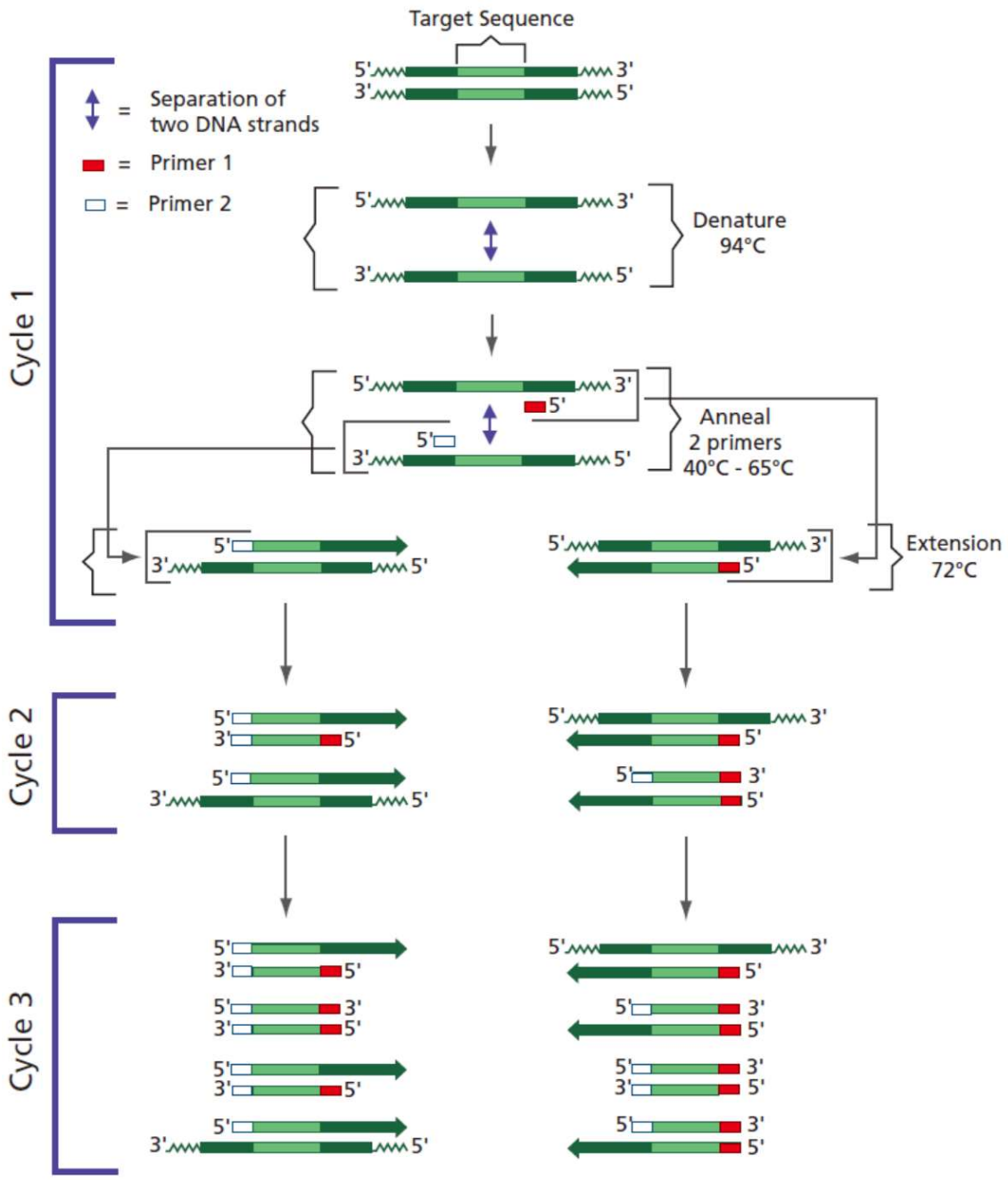


Figure 3:
Polymerase Chain Reaction

PCR을 수행하기 위해서는, 템플릿 DNA와 프라이머의 과잉분자량, 네 가지 "자유" Deoxynucleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 및 열 안정성 DNA 폴리머라아제가 혼합됩니다. 가장 흔하게 사용되는 DNA 폴리머라아제는 Taq DNA 폴리머라아제입니다. 이 효소는 원래 온천에 서식하는 세균으로부터 정제되었으며 매우 높은 온도에서 안정적입니다. 이러한 구성 요소 (템플릿 DNA, 프라이머, 네 개의 Deoxynucleotide 및 Taq DNA 폴리머라아제)는 Taq 폴리머라아제의 필수 보조인인 Mg+2를 포함하는 버퍼와 혼합됩니다. PCR 반응 혼합물은 열 싸이클러에서 세 가지 다

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

른 온도로 순차적인 가열/냉각 주기에 노출됩니다.

• 첫 번째 단계인 "denaturation"에서는 혼합물을 거의 끓는 온도(94°C-96°C)로 가열하여 대상 DNA를 "언집" (또는 용해)시킵니다. 높은 온도는 두 상보적인 DNA 염좌 사이의 수소 결합을 분리시켜 그들의 분리를 유도합니다.

• 두 번째 단계인 "annealing"에서는 반응 혼합물을 45°C에서 65°C까지 냉각하여 프라이머가 대상 DNA 서열과 결합할 수 있도록 합니다.

• 세 번째 단계인 "extension"에서는 온도를 72°C로 올리게 됩니다. 이는 Taq 폴리머라제가 하이브리드화된 프라이머에 뉴클레오티드를 추가하여 새로운 보조 염좌를 합성하기에 가장 적합한 온도입니다.

이 세 단계 - denaturation, annealing, extension -은 하나의 PCR "사이클"을 구성합니다(Figure 3). 각 PCR 사이클은 대상 DNA의 양을 5분 이내로 두 배로 늘립니다. 분석을 위해 충분한 양의 DNA를 생성하기 위해서는 20 ~ 40 사이클이 필요할 수 있습니다. 이 프로세스를 간단하게 하기 위해, "열사이클러" 또는 "PCR 기기"라고 하는 특수한 기계가 개발되었으며, 이는 샘플을 빠르게 가열 및 냉각시키는 데 사용됩니다.

범죄 현장의 DNA와 용의자의 DNA 간 단일 위치에서의 일치는 유죄를 증명하지 않으며 무죄를 배제하지도 않습니다. 따라서, 다수의 유전자 위치(loci)가 검사됩니다. 1990년, 연방수사국(FBI)은 범죄 현장 DNA와 유죄 선고자 및 범죄 현장 인덱스의 DNA 프로필 비교를 가능케하는 "Combined DNA Index System (CODIS)" 시스템을 개발했습니다. 유죄 선고자 인덱스의 프로필과 범죄 현장 DNA의 일치는 해당 범죄의 용의자를 나타내며, 범죄 현장 인덱스의 DNA와 일치할 경우, 다른 범죄의 연속 범행자를 나타냅니다. CODIS에 저장된 DNA 지문은 13개의 위치에 대한 데이터가 포함되어 있습니다(Figure 4 참조). 13개의 위치에서 일치할 확률은 1조분의 1 미만입니다. CODIS는 지금까지, 당국이 해당 범죄의 용의자를 확인하지 못한 사건을 해결하는 데에 사용되었습니다.

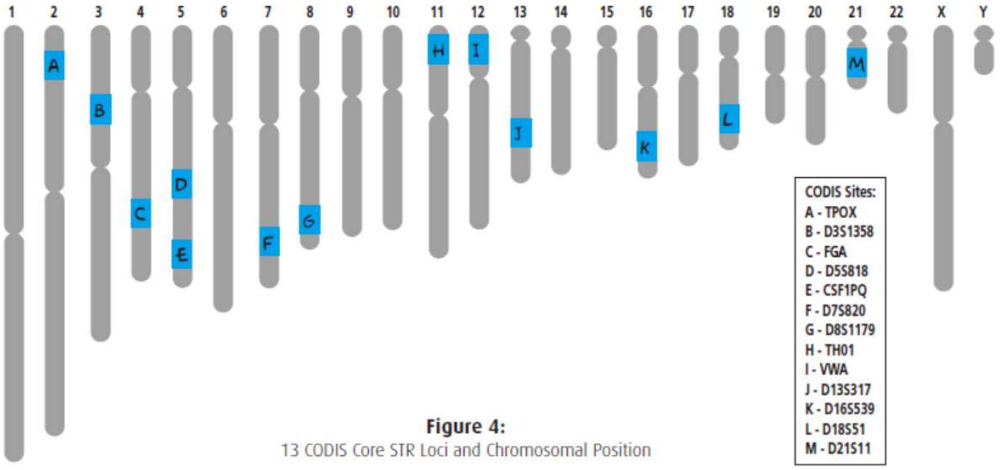


Figure 4:
13 CODIS Core STR Loci and Chromosomal Position

★ 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 녹지않은 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 EdvoBeads 를 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.

D1S80 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. D1S80 Primer Mix 튜브에 TE 버퍼 (튜브 B) 1 mL 을 첨가합니다. 튜브를 닫고 잘 섞습니다.
4. 희석된 D1S80 Primer Mix 50µL 을 13 개의 표기된 원심분리기 튜브에 동일하게 분주합니다.
5. 희석된 D1S80 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 D1S80 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.

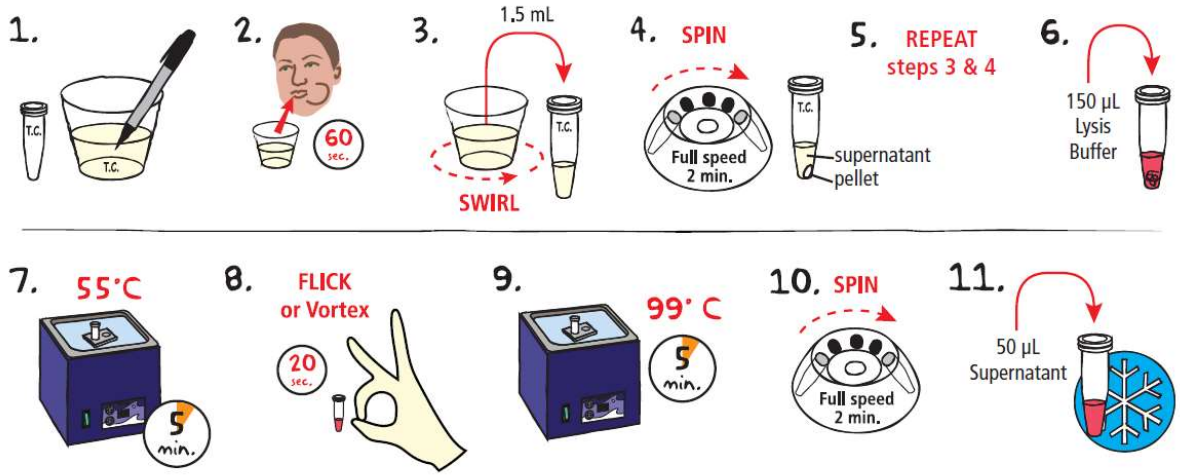
- EdvoQuick DNA ladder (튜브 E)를 라벨된 원심분리기 튜브에 30μL 씩 나누어 담아 하나씩 나눠줍니다.

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

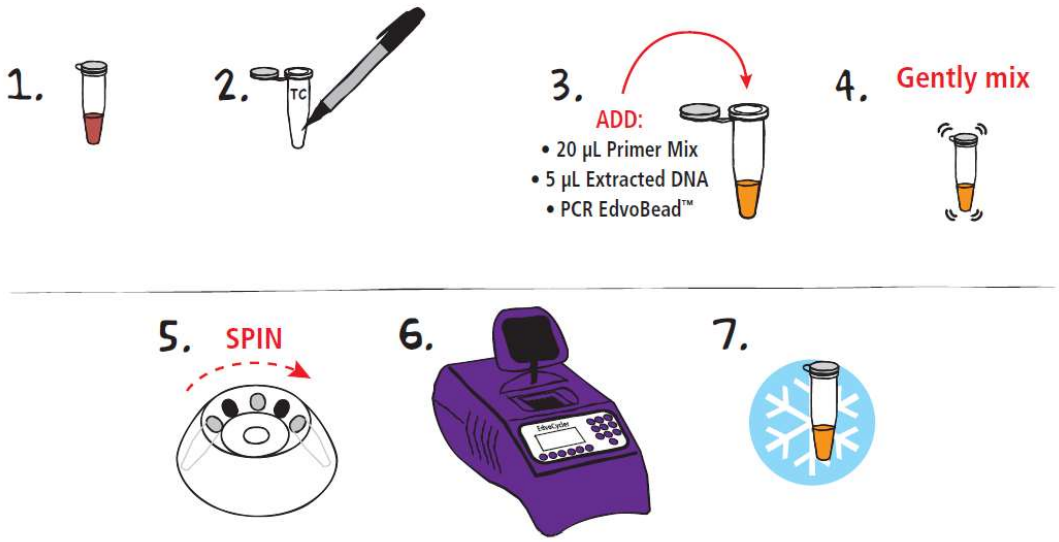


1. 비어있는 1.5mL 원심분리기 튜브 (스크류 뚜껑이 있는 튜브: 가열 시 열릴가능성이 있기에)와 식염수 컵에 그룹명 또는 이름을 적습니다.
2. 10mL 식염수를 사용해 60초동안 세게 입안을 헹군 후 용액을 컵에 다시 뱉습니다.
3. 컵을 살살 돌린 후 1.5 mL를 튜브에 옮겨담습니다.
4. 세포를 펠렛화하기위해 원심분리기에서 2분간 최고속도로 돌려서 침전물(pellet)이 모이게 합니다. 위에 상층액을 부어버립니다.
5. 위의 3-4단계를 한 번 더 반복합니다.
6. Lysis 버퍼 150 µL를 넣고 피펫팅을 하거나 볼텍싱하여 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:D1S80 Locus 증폭에 사용될 준비가 되었습니다. -20℃ 냉동 보관이 가능합니다.

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

모듈 II: D1S80 Locus 증폭



1. 모듈I 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 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℃ 4분

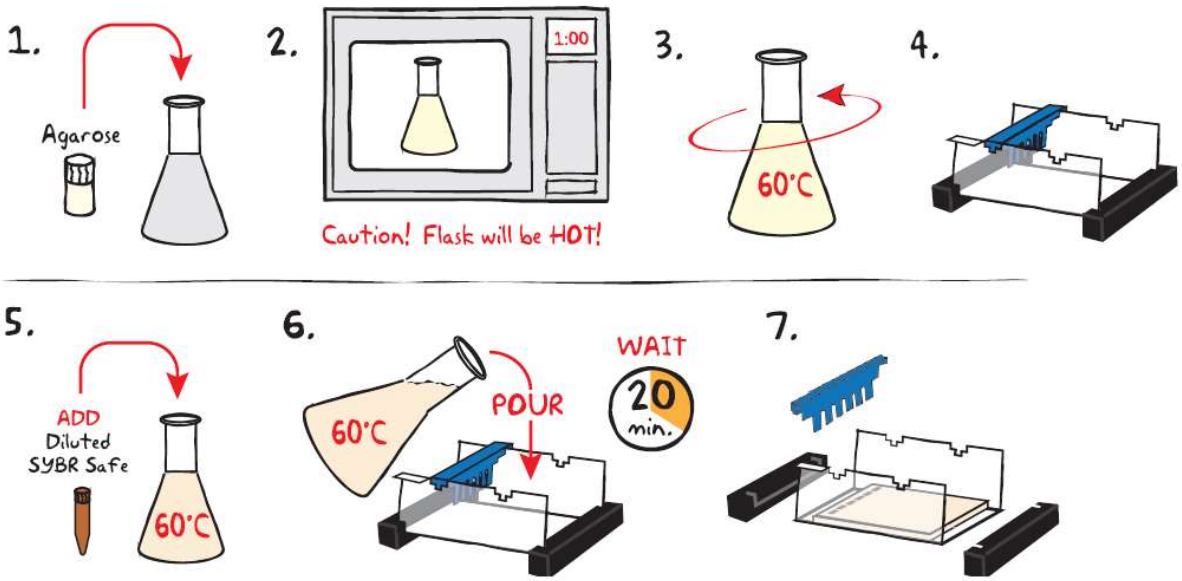
   94℃에서 30초
   65℃에서 30초 } 32 cycles
   72℃에서 30초

   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



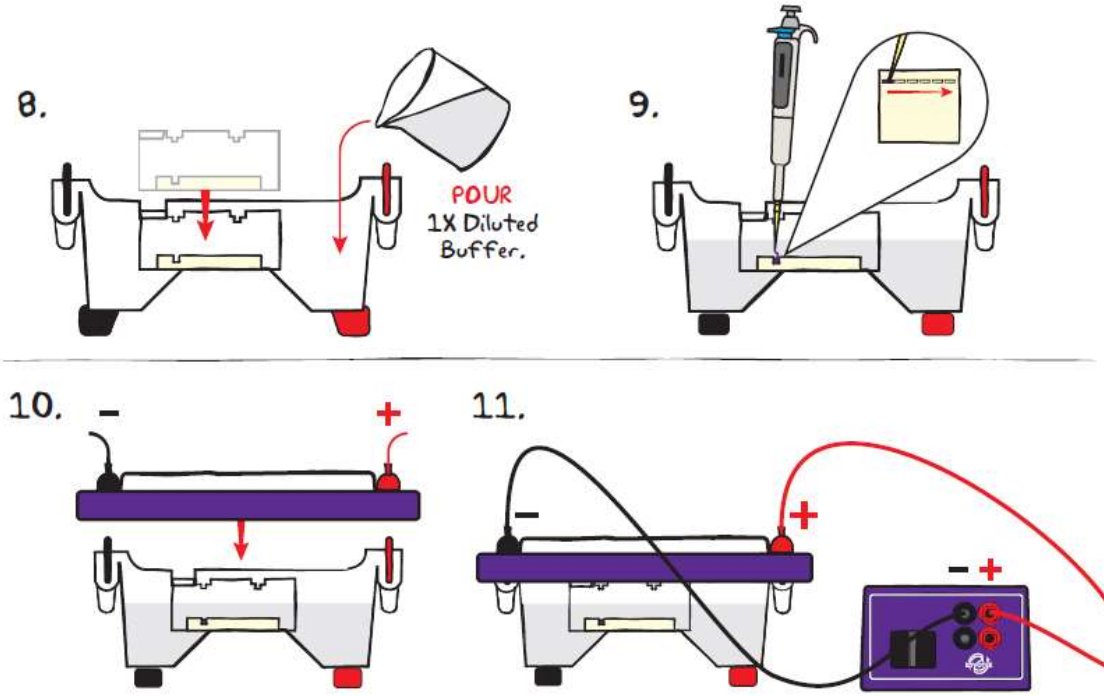
SYBR Safe 염료가 있는 아가로스 젤 준비

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.1 참조)
6. 어느정도 식은 아가로스 용액을 겔캐스팅 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)

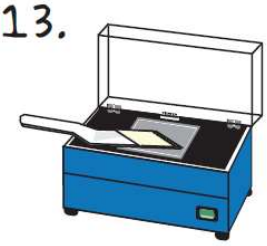
EDVOTEK Model #	Total Volume Required
M6+ & M12 (new)	300 mL
M12 (classic)	400 mL
M36	1000 mL

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.

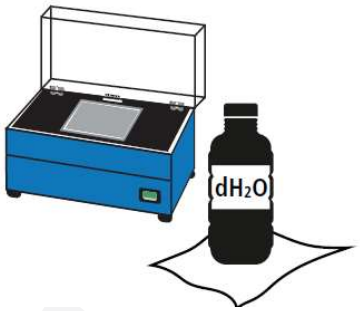
★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

13.



14.

15.



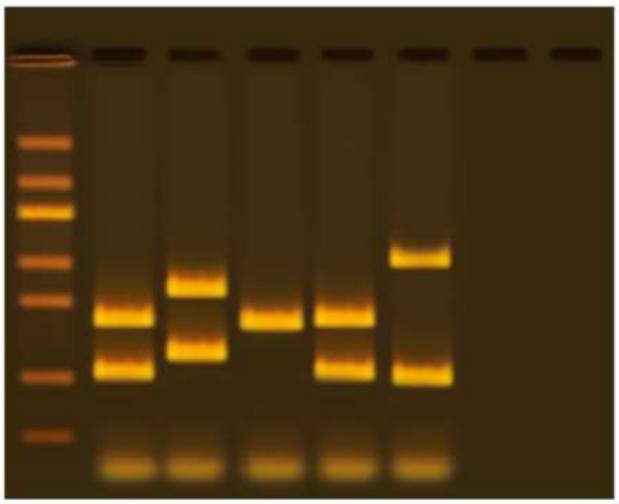
13. 뒤집개 같은 기구를 사용해 젤을 조심스럽게 트랜스 일루미네이터에 올립니다.

14. 결과를 확인하고 사진을 찍습니다.

15. 사용 후에는 깨끗하게 트랜스 일루미네이터를 닦습니다.

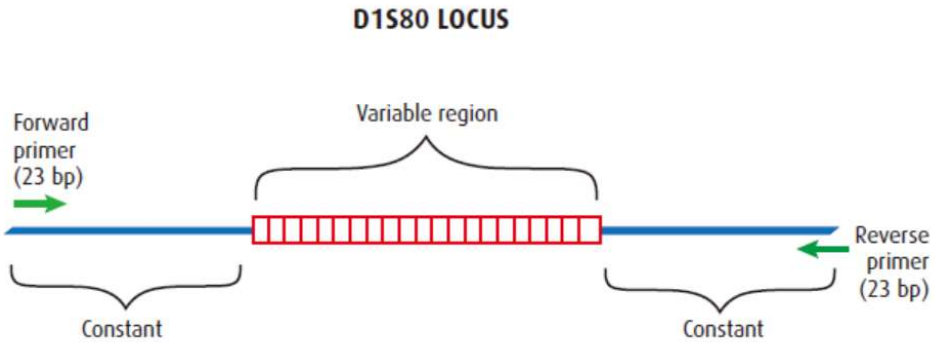
★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

결과 및 분석



사진은 서로 다른 유전형에서 나올 수 있는 PCR 생성물의 예를 보여줍니다. 학생들이 실험하여 얻은 밴드는 약 400~785bp 길이로 하나 또는 두 개의 밴드가 나올 것입니다. Control DNA 는 약 420bp 와 600bp 에서 밴드가 나옵니다.

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 실험에서 PCR 생성물은 400bp 에서 785bp 까지의 크기를 가집니다.

145bp 는 샘플간 일정합니다: 23 bp (Forward Primer), 23 bp (Reverse Primer), 99 bp (Flanks VNTR)

256bp 에서 640bp 까지는 VNTR 개수에 따라 샘플마다 가변적입니다.

:반복마다 16 bp

:가변적 구간에서 16 부터 40 개의 반복

: 16 개의 반복 X 16 bp 반복당 = 256 bp

: 40 개의 반복 X 16 bp 반복당 = 640 bp

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