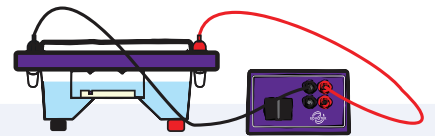

PTC 유전자의 SNP분석-미각의 유전학탐구

Exploring the Genetics of Taste: SNP Analysis of the PTC Gene Using PCR

ED345



☎ 02-929-1110 ✉ info@koreasci.com

🛒 www.koreasci.com

※ 이 문서는 교육적 목적으로만 사용되어야 하며 그 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

Experiment Components

Perishable Components	Storage	Check (✓)
• PCR EdvoBeads™ Plus Each PCR EdvoBead™ Plus contains: <ul style="list-style-type: none">• dNTP Mixture• Taq DNA Polymerase Buffer• Taq DNA Polymerase• MgCl₂• Reaction Buffer	Room Temperature	<input type="checkbox"/>
A Universal DNA Buffer	-20°C Freezer	<input type="checkbox"/>
B TE Buffer	-20°C Freezer	<input type="checkbox"/>
C LyphoPrimer™ Mix	-20°C Freezer	<input type="checkbox"/>
D LyphoControl™ (Complete PCR control)	-20°C Freezer	<input type="checkbox"/>
E Dryzymes® Restriction Enzyme <i>Hae</i> III	-20°C Freezer	<input type="checkbox"/>
F Restriction Enzyme Dilution Buffer	-20°C Freezer	<input type="checkbox"/>
G 100 bp ladder	-20°C Freezer	<input type="checkbox"/>
• Proteinase K	-20°C Freezer	<input type="checkbox"/>
• PTC Paper	Room temperature	<input type="checkbox"/>
• Control Taste Paper	Room temperature	<input type="checkbox"/>

NOTE: Components C and D are supplied in our LyphoPrimer™ and LyphoControl™ format. They will require reconstitution prior to use. Be sure to review page 21 in the Instructor's Guide for more details.

Reagents & Supplies

Store all components below at room temperature.

- UltraSpec-Agarose™
- TBE Electrophoresis Buffer Powder
- SYBR® Safe Stain
- Disposable plastic cups
- 15 mL Conical Tube
- Snap-top microcentrifuge tubes
- Microcentrifuge Tubes (1.5 mL screw-cap tube – use for boiling)
- 0.2 mL PCR tubes
- Salt packets

Requirements *(NOT included in this experiment)*

- Thermal cycler (EDVOTEK Cat. #541 highly recommended) or three water baths*
- Two Water bath for 55° C and 99° C incubations (EDVOTEK® Cat. #539 highly recommended)
- Horizontal gel electrophoresis apparatus
- D.C. power supply
- Balance
- Microcentrifuge
- UV Transilluminator or Blue Light Visualization System (EDVOTEK® Cat. #557 or #558 highly recommended)
- UV safety goggles
- Automatic micropipettes (5-50 µL) with tips
- Microwave or hot plate
- Pipet pump
- 250 mL flasks or beakers
- Hot gloves
- Disposable laboratory gloves
- Ice buckets and ice
- Distilled or deionized water - 3.7 L (**NOTE: for ease of preparation, we recommend purchasing one gallon [3.78 L] of distilled water.**)
- Drinking water
- Bleach solution

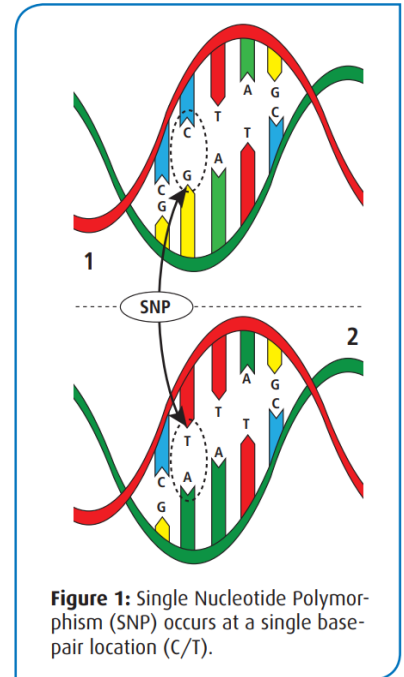
Background Information

단일염기 다형성 [single nucleotide polymorphism , SNP]

네 개의 뉴클레오티드는 A(아데닌), C(사이토신), T(티민) 및 G(구아닌)의 유전코드를 지정합니다. 점 돌연변이는 하나의 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 대체 될 때 발생합니다. 예를 들어 A가 C, T 또는 G로 대체되는 경우 (그림 1). 이러한 돌연변이가 모집단의 1 % 이상에 존재하는 경우 단일 뉴클레오티드 다형성 또는 SNP로 알려져 있습니다. SNP는 단일 염기 쌍이 삭제되거나 서열에 추가 된 경우에도 발생할 수 있습니다.

SNP는 사람들 사이에서 가장 흔한 유형의 유전 적 변이입니다. 이들은 유전자의 비 암호화 영역과 유전자 사이의 영역에서 자주 발생합니다. 이러한 SNP는 자동으로 아미노산으로 번역되지 않지만 유전자 스플라이싱, 전사 인자 결합 또는 비 코딩 RNA 시퀀싱을 통해 단백질 생산에 여전히 영향을 미칠 수 있습니다.

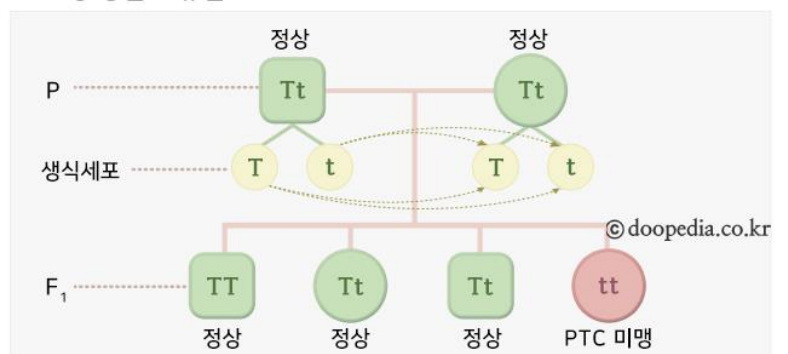
SNP는 유전자의 코딩 서열에서도 발생할 수 있으며, 해당 유전자의 단백질 산물에 영향을 미칠 수 있습니다. 예를 들어 겸상 적혈구 빈혈은 단일 뉴클레오티드 다형성으로 인해 친수성 아미노산 글루탐산이 헤모글로빈의 β - 글로빈 사슬에서 소수성 아미노산 발린으로 대체되기 때문에 발생합니다. 그러나 다른 경우에는 코돈 축퇴로 인해 단백질의 아미노산 서열이 반드시 변경되는 것은 아닙니다. 이 실험에서 우리는 Phenylthiocarbamide (PTC) Sensitivity 유전자 TAS2R38의 뉴클레오티드 위치 145에서 발생하는 SNP를 조사 할 것입니다.



단PTC 미맹 [Phenylthiocarbamide taste blindness]

보통의 쓴맛은 정상적으로 느끼지만, 페닐티오카바마이드 용액(PTC 용액)의 쓴맛을 느끼지 못하는 것을 PTC 미맹이라고 합니다. 페닐티오카바마이드 용액은 대부분의 사람들에게 강한 쓴맛을 느끼도록 하는데, PTC 미맹인 사람들은 아무런 맛을 느끼지 못하거나 쓴맛이 아닌 다른 맛으로 느낀다고 합니다.

PTC 미맹 형질의 유전



PTC 미맹은 상염색체에 있는 한 쌍의 대립유전자에 의해 결정되며, PTC 용액의 쓴맛을 느끼는 유전자가 우성형질(T)이고 쓴맛을 느끼지 못하는 미맹 유전자는 열성형질(t)입니다. PTC 미맹의 유전은 멘델의 유전법칙을 따르며, 유전자형은 TT, Tt, tt로 구성됩니다. 이중 유전자형이 TT, Tt인 사람은 PTC 용액의 쓴맛을 느낄 수 있으나, 유전자형이 tt인 사람은 PTC 용액의 쓴맛을 느낄 수 없는 PTC 미맹이 됩니다.

Background Information

TAS2R38 유전자

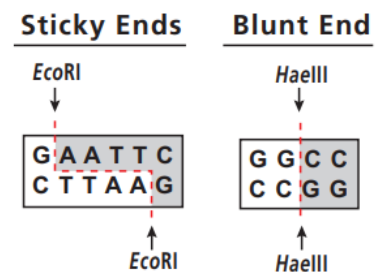
TABLE 1: Relationship of Variations at Specific locations in *TAS2R38* gene and Ability to Taste PTC

Nucleotide Position	Change in Nucleotide (Non-taster > Taster)	Change in Codon (Non-taster > Taster)	Change in Amino Acid (Non-taster > Taster)
145	G > C	GCA > CCA	Alanine > Proline
785	T > C	GTT > GCT	Valine > Alanine
886	A > G	ATC > GTC	Isoleucine > Valine

TAS2R38 유전자의 코딩영역의 시퀀스분석 결과, 3개의 구별되는 위치에서 SNP로 인해 PTC 정상과 미맹을 구분하는 아미노산의 차이가 있는 것으로 나타났습니다(TABLE 1)

전 세계적으로 5가지 버전의 유전자가 발견된다(AVI, AAV, AAI, PAV, 그리고 PVI). 가장 흔한 두 가지 형태는 각각 미맹과 정상을 나타내는 AVI와 PAV이다. 아미노산 염기서열의 변화는 수용체 단백질이 PTC에 얼마나 강하게 결합할 수 있는지를 결정하는 수용체 단백질의 모양을 변화시킨다. 모든 사람들은 모든 유전자의 두 개의 복제본을 가지고 있기때문에, 쓴맛 유전자 변형의 조합은 누군가가 PTC를 심하게 쓴다고 생각하는지, 다소 쓴맛인지, 아니면 전혀 맛이 없다고 생각하는지를 결정한다. 이는 미각 테스트로 대략 정량화할 수 있거나 위치 145, 785 및 886에서 뉴클레오타이드의 분석을 통해 보다 정확하게 특성화할 수 있습니다. 이 실험에서 우리는 Phenylthiocarbamide (PTC) Sensitivity 유전자 TAS2R38의 뉴클레오타이드 위치 145에서 발생하는 SNP를 조사 할 것입니다.

유전자 TAS2R38의 뉴클레오타이드 위치 145에서 발생하는 SNP를 검출하는 한 가지 방법은 제한효소를 사용하는 것입니다. 제한효소는 DNA의 특정한 염기서열을 식별하고 이중사슬을 절단하는 엔도뉴클레아제(핵산분해효소의 하나)로서 유전공학에서 재조합 DNA를 만들기 위해서 사용하는 특수한 효소입니다. 제한효소는 특정한 염기서열을 가진 DNA를 절단합니다. 제한효소가 DNA를 절단하면 잘린 부위를 두 종류로 분류할 수 있는데 하나는 점착성 말단(sticky end)으로 잘린 부위의 DNA는 엇갈리게 나타나고 다른 하나는 비점착성 말단(blunt end)으로 잘린 부위는 말단의 위치가 동일합니다.

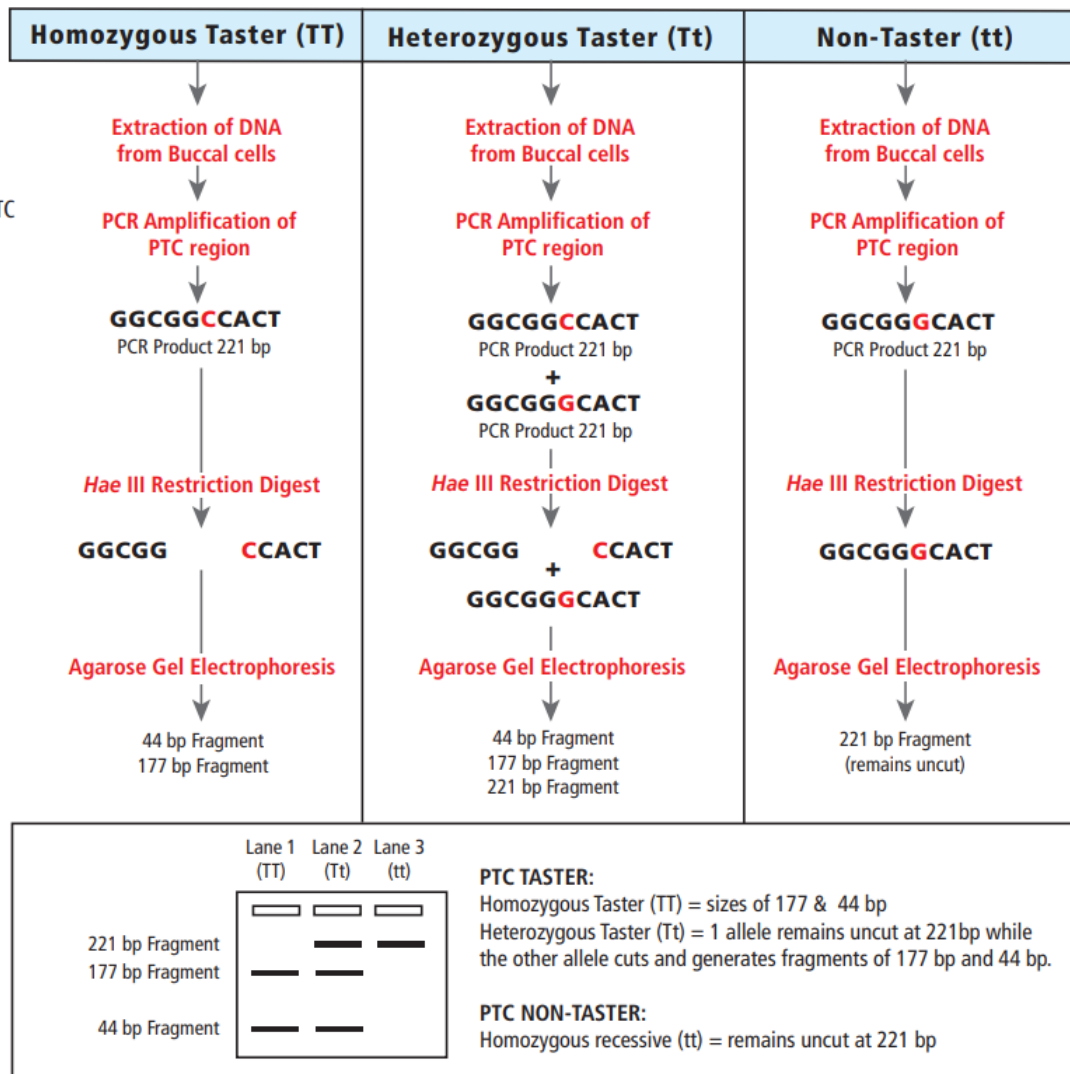


제한효소로 특정 염기서열이 절단된 후 생성되는 DNA 단편의 길이와 수는 젤 전기영동에 의해 길이에 따라 분리될 수 있습니다. 효소 분해에 이어 전기 영동하는 과정을 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 분석이라고 합니다 (Figure 3). 이 실험에서는 RFLP 분석을 사용하여 TAS2R38 유전자의 위치 145에있는 뉴클레오타이드를 검사합니다.

TAS2R38 유전자에서 Hae III는 정상 대립유전자 (5'-GGC**GGCC**ACT-3 ') 만 잘라냅니다. 미맹 대립 유전자 (5'-GGCGGGCACT-3 ')에는 Hae III의 절단 인식부위(GGCC)가 없기 때문에 Hae III는 미맹의 TAS2R38 유전자는 절단할 수 없습니다.

Background Information

Figure 3:
Determining PTC
Genotype



Experiment Overview

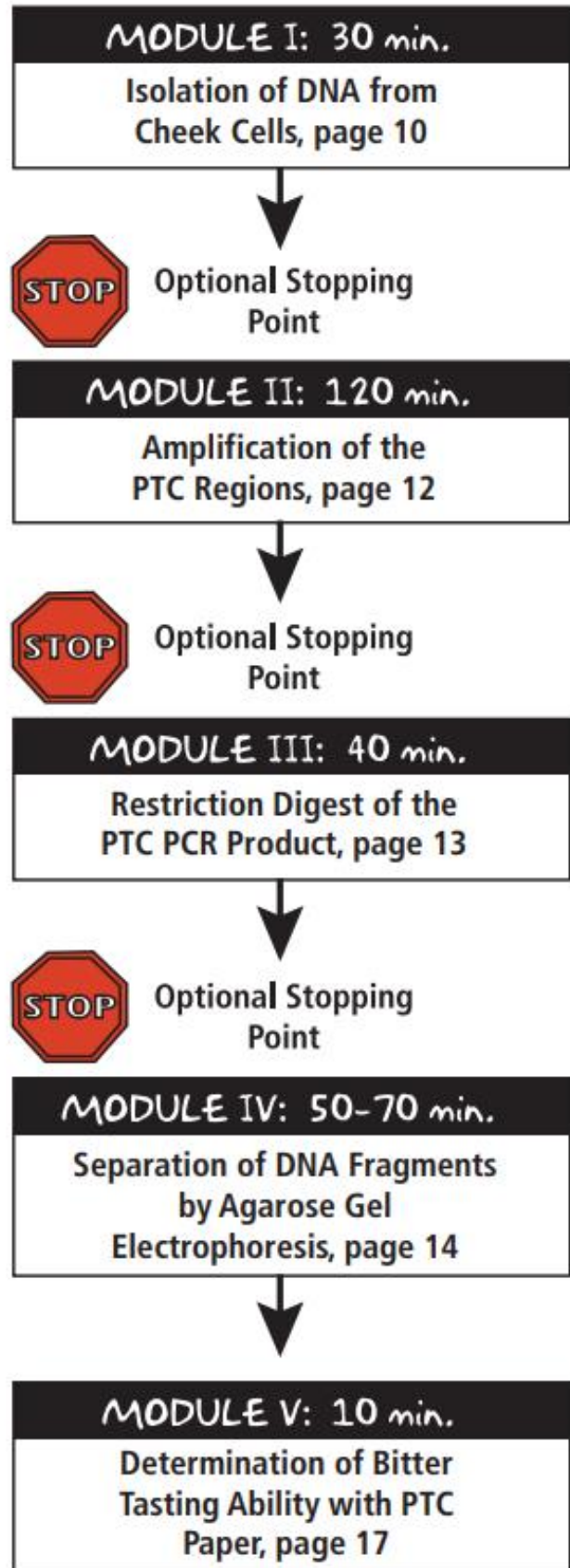
이 실험의 목적은 학생들이 인간 DNA를 분리하고 PCR을 사용하여 PTC의 쓴맛을 감지하는 TAS2R38 유전자의 일부를 증폭하여 제한 효소로 처리한 다음 아가로즈 젤 전기영동을 통해 자신의 유전자형을 확인하는 것입니다. 그리고 PTC용지를 맛 보면서 표현형과 일치여부를 확인하게 됩니다.

모듈 I에서 학생들은 자신의 볼에서 DNA를 추출하게 됩니다.

MODULE II에서 추출된 DNA는 PCR 프라이머 및 PCR EdvoBead™ PLUS와 혼합된 다음 PCR 기에 의해 TAS2R38 유전자 부위가 증폭됩니다.

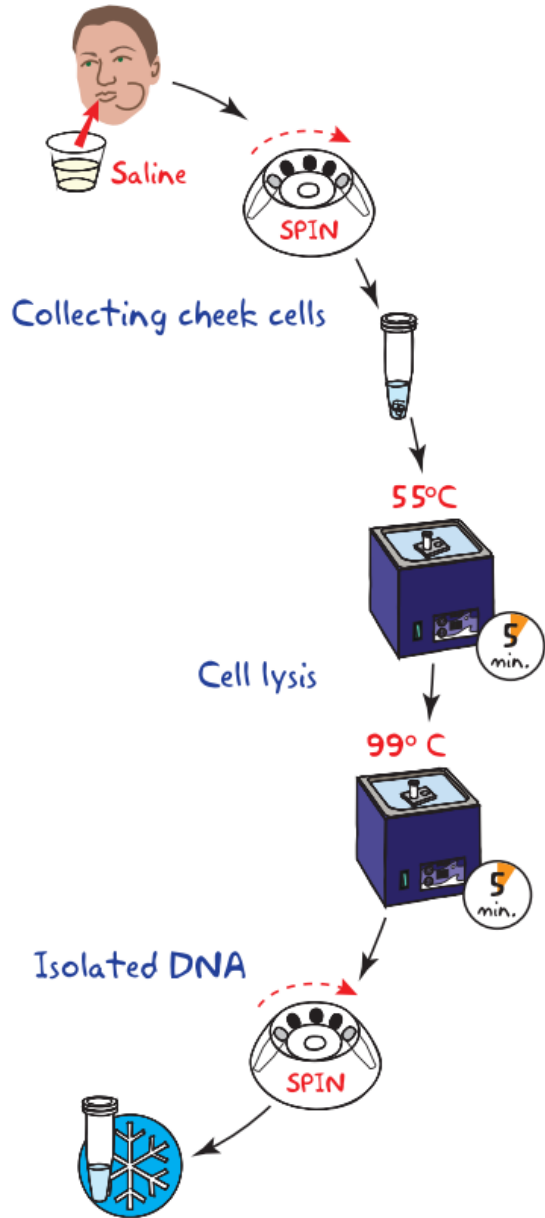
MODULE III에서 TAS2R38 유전자가 증폭된 PCR 산물을 HaeIII 제한 효소와 혼합합니다.

마지막으로 MODULES IV 및 V에서 학생들은 자신의 유전자형을 표현형(이 경우 PTC 맛볼 수 있는 능력)과 비교합니다. 제한효소를 처리한 PCR 산물dmf 아가로스 겔 전기영동으로 분석하여 학생들이 TAS2R38 유전자에서 SNP의 존재 및 자신의 유전자형을 확인합니다. 그리고 이 유전자형 결과는 PTC용지를 맛 보면서 표현형과 일치여부를 확인하게 됩니다.

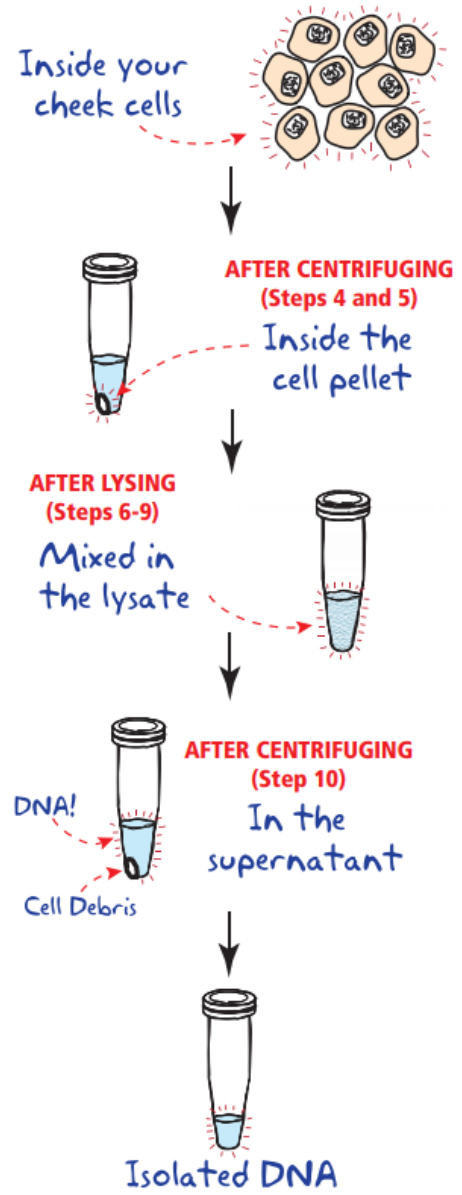


Module I Overview

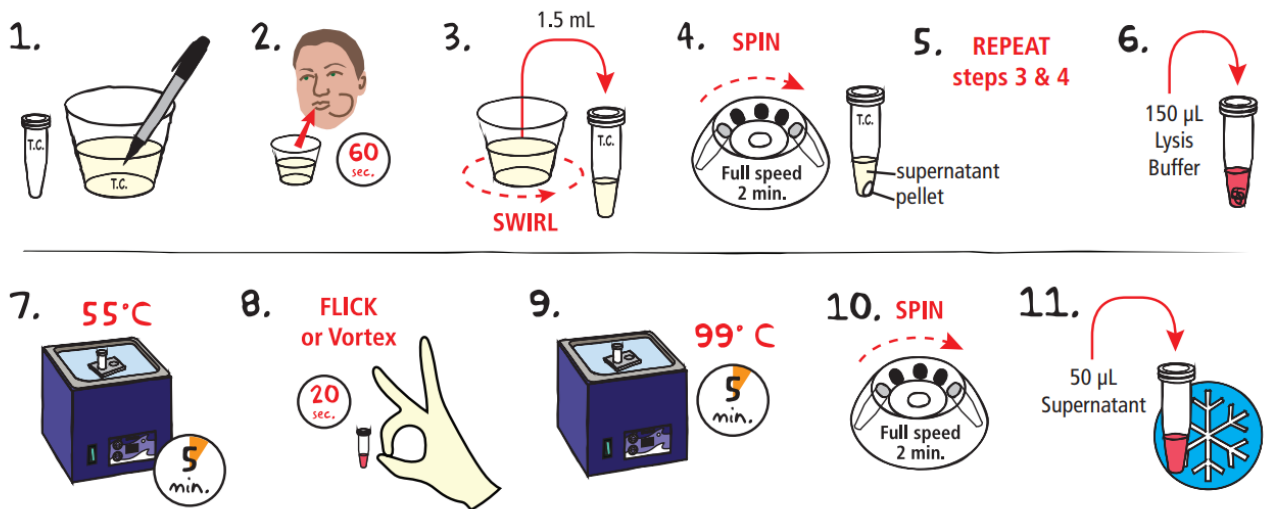
Experiment Overview



Where's my DNA



Module I: Isolation of DNA from Human Cheek Cells

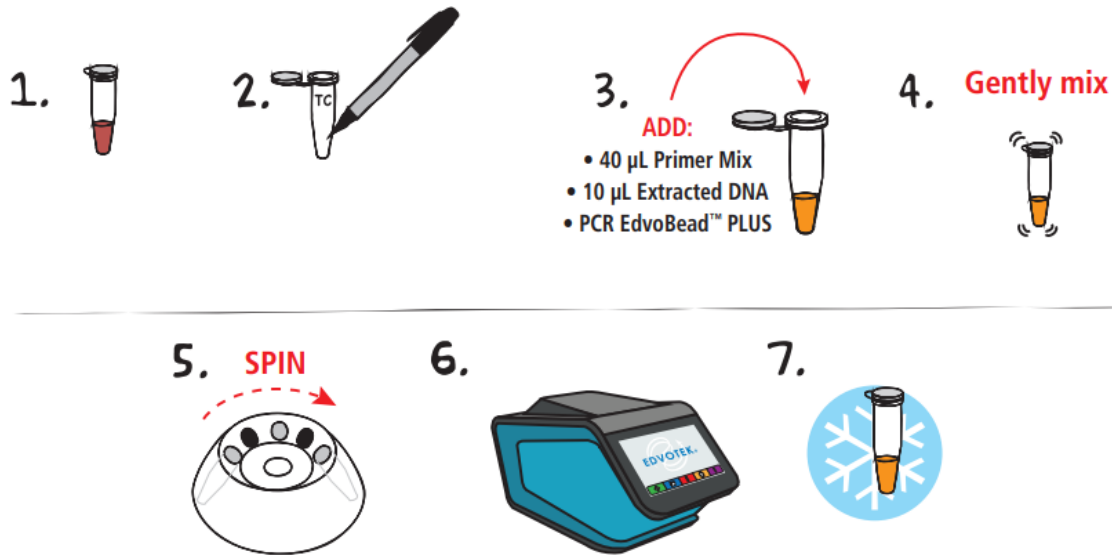


1. 1.5ml Screw-cap 튜브와 식염수컵에 자신의 이름을 표시합니다.
2. 10mL 식염수를 사용하여 60 초 동안 입을 세게 헹군 후 다시 컵에 뱉습니다.
3. 입을 헹군 식염수가 들어있는 컵을 부드럽게 회전시킨 후 식염수 1ml을 1.5ml Screw-cap 튜브에 넣습니다.
4. 최고 속도로 2분 동안 원심분리하여 세포를 펠릿 화합합니다. 상층 액(세포 펠릿 위의 액체)을 따르되 **세포 펠릿이 떨어지지 않도록 조심합니다!**
5. 3~4를 2번 더 반복합니다. 만약 펠릿이 보이지 않으면 펠릿이 보일 때 까지 반복합니다.
6. 펠릿이 들어있는 1.5ml Screw-cap 튜브에 150µL 용해 완충액(Lysis Buffer)을 넣고 위아래로 피펫팅 하거나 볼텍싱하여 펠릿을 완전히 현탁합니다.
7. 55°C 항온수조에서 5분간 배양합니다.
8. 손가락으로 튜브를 20초동안 쳐서 내용물을 충분히 혼합합니다.
9. Screw-cap 튜브의 뚜껑을 단단히 조인 후 99°C 항온수조에서 5분간 배양합니다.
10. 최고 속도로 2분 동안 원심 분리합니다.
11. 50µL의 상층액을 새로운 1.5ml 튜브로 옮긴 다음 얼음에 박아 둡니다.

※ 추출 된 DNA는 Module II 실험 시작까지 FREEZER(-20°C)에 보관할 수 있습니다.

Module II: Amplification of the PTC Region

이제 DNA를 분리 했으므로 모듈 II에서는 TAS2R38 유전자의 특정 영역을 증폭합니다. 먼저 DNA(빨간색)를 PTC 프라이머(노란색) 및 PCR EdvoBead™ PLUS와 혼합하여 PCR 샘플을 만듭니다. 이 샘플이 준비되면 PCR기를 사용하여 TAS2R38 유전자의 특정 영역을 증폭합니다.



1. Module I에서 만든 DNA 샘플을 준비합니다.
2. 0.2ml PCR 튜브에 자신의 이름을 표시합니다.
3. 40µL PTC 프라이머 믹스(노란색), 10µL DNA(빨간색) 및 PCR EdvoBead™ PLUS를 0.2ml PCR 튜브에 넣습니다.
4. 0.2ml PCR 튜브를 흔들거나 손가락으로 쳐서 내용물을 잘 혼합합니다.
5. 10초 동안 원심분리하여 튜브의 혼합물을 스피ندا운 시킵니다.
6. PCR기를 사용하여 샘플 DNA를 증폭시킵니다.

Initial denaturation 94° C for 4 minutes
94° C for 30 seconds
65° C for 30 seconds } 35 cycles
72° C for 30 seconds
Final Extension 72° C for 5 minutes

7. PCR을 마친 튜브는 얼음에 박아 둡니다.

※ 증폭 된 DNA는 Module III 실험 시작까지 FREEZER(-20°C)에 보관할 수 있습니다.

Module III: Restriction Digest of the PTC PCR Product

Module III에서는 PCR 결과물에 대해 제한효소를 처리하여 단일 뉴클레오티드 다형성 (SNP)이 뉴클레오티드 145에 존재하는지 확인합니다. HaeIII 제한효소가 PCR 결과물에 존재하는 "GGCC"서열을 식별하고 절단 할 수 있도록 37°C에서 배양합니다..

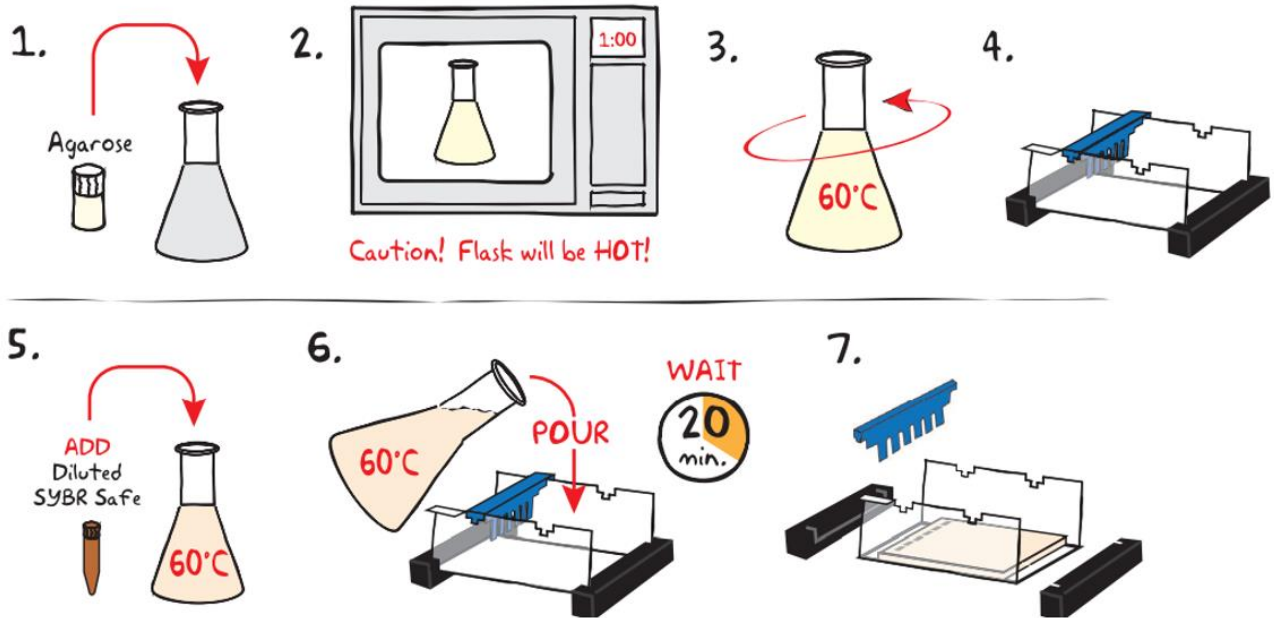


1. 5µL HaeIII 제한효소가 포함 된 튜브에 25µL PCR로 증폭된 DNA를 추가합니다. 나머지 25 µL 자르지 않은 PCR 결과물은 대조군으로 설정합니다.
2. 튜브를 흔들거나 손가락으로 쳐서 내용물을 잘 혼합합니다.
3. 10초 동안 원심분리하여 튜브의 혼합물을 스피ندا운 시킵니다.
4. 37°C 항온수조에서 30분간 배양합니다.

※ 제한효소 처리된 샘플은 Module IV 실험 시작까지 FREEZER(-20°C)에 보관할 수 있습니다.

Module IV: Separation of DNA by Electrophoresis

Module IV에서는 아가로스 젤 전기영동을 통해 DNA 밴드를 시각화하여 TAS2R38의 유전자형을 결정합니다.



1. Table A를 참고하여 아가로스 분말과 1X TBE 버퍼를 250mL 삼각플라스크에 혼합합니다

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

2. 혼합액이 든 삼각플라스크를 전자레인지에서 1분 동안 가열합니다. 삼각플라스크를 꺼내 조심스럽게 휘저어 혼합합니다. 아가로스가 **완전히 용해되어 투명**해질 때까지 20초 동안 삼각플라스크를 가열하고 꺼내 휘젓는 과정을 반복합니다.

※ 가열된 삼각플라스크는 매우 뜨거우므로 반드시 내열장갑을 착용하고 실험을 진행합니다.

3. 플라스크를 조심스럽게 휘저어 아가로스를 60°C까지 식힙니다.

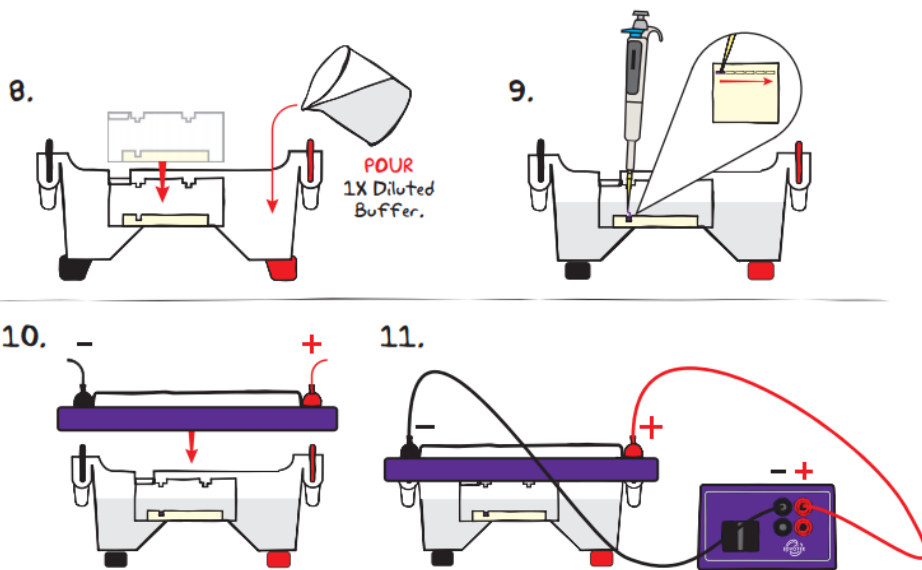
4. 아가로스가 냉각되는 동안 젤트레이를 조립합니다.

5. Table A를 참고하여 삼각플라스크에 희석시킨 SYBR® Safe를 첨가합니다.

6. 젤 트레이를 평평하고 진동이 없는 책상에 놓고 젤 트레이에 아가로스젤을 부은 다음 20분이 상 충분히 굳힙니다.

7. 아가로스 젤이 완전히 굳으면 젤 트레이에서 콤과 고무캡을 제거합니다.

Module IV: Separation of DNA by Electrophoresis



Reminder:
Before loading the samples, make sure the gel is properly oriented in the apparatus chamber.



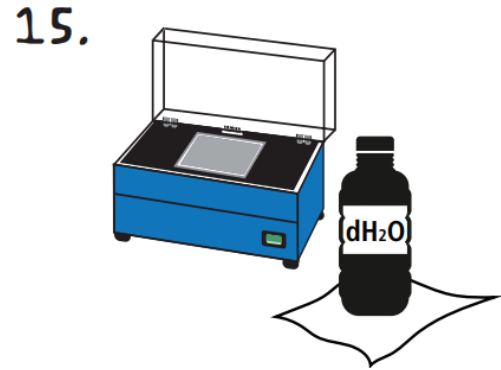
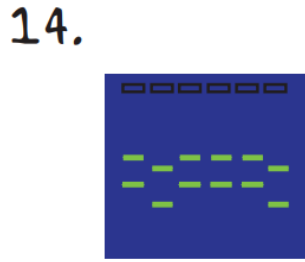
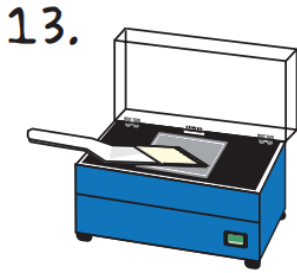
- 8. 젤 트레이를 전기영동기 챔버에 넣고 1X TBE 버퍼를 아가로스 젤이 잠기도록 부어줍니다.
- 9. Table 1을 가이드로 사용하여 25 μ L의 샘플을 순서로 웰에 로드합니다.

Lane	Recommended	Sample Name
1	DNA ladder	
2	Control DNA (undigested or digested)	
3	Student 1 undigested	
4	Student 1 digested	
5	Student 2 undigested	
6	Student 2 digested	

- 10. 전극을 잘 맞추어 전기영동기 뚜껑을 덮어줍니다.
- 11. 전원을 연결하고 Table C를 참고하여 전기영동을 실시합니다.

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

Module IV: Separation of DNA by Electrophoresis

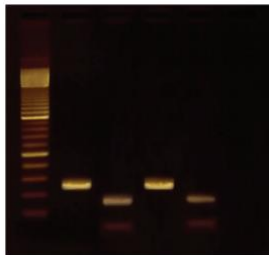


13. 전기영동을 마친 아가로스 젤을 UV 또는 Blue LED 트랜스일루미네이터 위에 올려놓습니다.

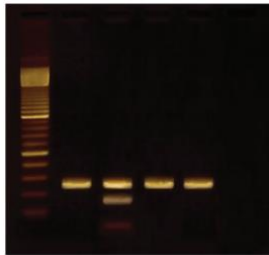
14. 트랜스일루미네이터의 전원을 켜고 DNA 밴드를 확인합니다.

※ UV 트랜스일루미네이터를 사용할 경우 반드시 보안경을 착용하고 젤을 관찰해야 합니다.

<전기영동 결과 샘플>



Lane	Sample	Size
1	100 bp ladder	Bands range in size from 100 bp – 4000 bp in 100 bp increments. High intensity reference band at 500 bp.
2	Control DNA, uncut	221 bp
3	Control DNA, cut	177, 44 bp
4	Student DNA, uncut	221 bp
5	Student DNA, cut	177, 44 bp



Lane	Sample	Size
1	100 bp ladder	Bands range in size from 100 bp – 4000 bp in 100 bp increments. High intensity reference band at 500 bp.
2	Student 1 DNA, uncut	221 bp
3	Student 1 DNA, cut	221, 177, 44 bp
4	Student 2 DNA, uncut	221 bp
5	Student 1 DNA, cut	221 bp

15. 관찰을 마치면 트랜스일루미네이터에서 젤을 제거하고 증류수로 닦아냅니다.

Module V: Determination of Bitter Tasting Ability with PTC Paper

Module V에서는 TAS2R38의 표현형을 결정하기 위해 컨트롤 용지와 PTC 용지의 맛을 측정한다.
컨트롤 용지와 PTC 용지의 맛의 차이를 주의하면서 측정합니다.

1. 먼저 컨트롤 용지의 맛을 측정하고 그 결과를 기록합니다.
2. PTC 용지의 맛을 측정하고 그 결과를 기록합니다.
3. 컨트롤 용지와 PTC 용지의 맛을 비교합니다.

	매우쓴맛	약간쓴맛	무미
컨트롤 용지			
PTC 용지			

4. 모듈 IV에서 확인한 자신의 유전자형과 PTC 용지의 맛을 관찰한 표현형은 일치하는지 확인해봅니다.

Study Questions

1. PCR을 통해 DNA가 어떻게 증폭 되는지 PCR의 세 단계를 중심으로 설명하세요.

2. 유전자형과 표현형에 대해 설명하세요.

3. TAS2R38의 유전자형과 표현형에 대해 배운 내용을 바탕으로 아래 표를 작성하세요.

유전자형	표현형	DNA 밴드의 수	DNA 밴드의 사이즈(bp)
TT (homozygous)			
Tt (heterozygous)			
tt (homozygous)			

4. 실험결과에 따르면 당신의 유전자형과 표현형은 무엇인가요? 유전자형과 표현형은 일치하나요?

5. 아래의 표에 전체 실험결과를 정리하세요.

유전자형	각 표현형을 가진 사람수		
	Strong Taster (매우쓴맛)	Weak taster (약간쓴맛)	Non-taster (무미)
TT (homozygous)			
Tt (heterozygous)			
tt (homozygous)			

6. PTC를 맛볼 수있는 모든 사람이 같은 방식으로 맛보는 것은 아니라는 점을 고려하여 실험결과를 활용하여 PTC 미맹 형질의 유전과 열성유전을 설명하세요.

PTC 유전자의

SNP분석

(미각의 유전학탐구)

Exploring the Genetics of
Taste: SNP Analysis of the
PTC Gene Using PCR #345

교사용

가이드북

Pre-Lab Preparations: Module I

모듈 I에서는 학생들은 구강세포에서 DNA를 분리합니다. 구강세포를 수집하는 가장 쉽고 권장되는 방법은 식염수로 간단히 헹구는 것입니다. 식염수 린스는 잠시 원심분리하여 구강세포를 분리한 다음 용해 완충액과 혼합하여 55°C 및 99°C에서 배양합니다. 마지막으로, 학생들은 세포 용해 물을 원심분리하고 DNA가 포함된 상등액을 수집합니다. 분리된 DNA는 모듈 II에서 PCR이 필요할 때까지 -20°C (냉동고)에서 안전하게 보관할 수 있습니다.

모듈 I을 시작하기 전에 교사는 식염수와 용해 완충액을 준비해야 합니다. 두 솔루션에 대한 준비 지침은 아래를 참조하십시오.

▶ 식염수(Saline Solution) 준비

※ 구강 세척에는 식염수를 사용해야 합니다. 스포츠 음료는 모듈 II에서 중합효소 연쇄반응에 의한 DNA 증폭을 억제합니다. 뱀 세포 세척에 스포츠 음료를 사용한 경우 샘플을 폐기하고 식염수로 DNA 추출을 반복하십시오.

1. 식수 500mL에 소금 패킷 8개 (4g)를 모두 녹입니다.
2. 컵당 10 mL의 식염수를 분주한 다음 학생당 한 컵씩 나누어줍니다.

▶ 용해 완충액(Lysis Buffer) 준비

※ Lysis Buffer는 실험을 수행하기 전에 Proteinase K와 혼합되어야 합니다. 일단 준비되면 Lysis는 같은 날 사용하거나 냉동보관 합니다.

1. 100 μ L의 Universal DNA 버퍼(A)를 Proteinase K 튜브에 추가하고 샘플이 몇 분 동안 수화되도록 합니다. 샘플이 수화되면 재료를 완전히 혼합하기 위해 위아래로 여러 번 피펫팅 합니다.
2. 재수화 된 Proteinase K 용액의 전체 양을 4mL의 범용 DNA 버퍼(A)가 들어있는 15mL 코니칼 튜브로 옮깁니다.
3. 튜브를 여러 번 뒤집어 완전히 혼합합니다. 이 튜브에 "Lysis Buffer"라고 표시하십시오.

※ Lysis Buffer는 빨간색이어야 하며 용해되지 않은 덩어리가 없어야 합니다.

4. 300 μ L의 Lysis Buffer를 13개의 라벨이 붙은 microcentrifuge 튜브에 분주하고 1개의 microcentrifuge 튜브를 한 쌍의 학생들이 공유하도록 합니다.

※ 이 시점에서 Lysis Buffer는 같은 날 (최대 6시간) 내에 사용하기 위해 얼음에 보관하거나 냉동 보관해야 합니다.

5. 각 학생 쌍에 "Lysis Buffer" 튜브 1 개를 배포합니다. 동결된 경우, Lysis Buffer는 37°C 항온수조 또는 학생들이 손으로 튜브를 데워서 빠르게 해동할 수 있도록 합니다.

※ 실험실 재료 소독 : 오염된 실험실 폐기물(타액, 컵, 피펫 등)은 폐기 전에 15% 표백용액으로 소독해야 합니다. 기관 지침에 따라 생물학적 샘플을 적절하게 폐기하십시오.

Pre-Lab Preparations: Module II

모듈 II에서 학생들은 모듈 I에서 분리 한 DNA에 대해 PCR을 수행합니다. PCR 혼합물에는 학생 DNA, TAS2R38 유전자의 221bp 영역에 결합하는 특정한 프라이머 혼합물 및 PCR EdvoBead™ PLUS가 포함됩니다

PCR 프라이머는 실험을 수행하기 전에 교사가 재수화 해야하는 동결건조 혼합물로 제공됩니다. PCR EdvoBeads™ PLUS는 PCR을 설정하기 전에 배포할 수 있습니다. 비드를 PCR 튜브에 넣어 배포한 후에는 비드가 수분을 흡수하고 실험 전에 재현탁하기 어려워지는 것을 방지하기 위해 PCR 튜브를 단단히 닫는 것이 중요합니다.

※ PCR EdvoBeads™ PLUS는 깨지기 쉬우므로 PCR 튜브로 옮기는 동안 비드를 부수지 않도록 주의하십시오.

이 키트에는 LyphoControl™ Complete PCR 대조샘플이 포함되어 있습니다. LyphoControl™ 샘플은 모든 PCR 구성 요소와 미리 혼합되어 있으며 재수화 후 즉시 PCR을 실행할 수 있습니다. 가능하다면 학생들의 샘플과 함께 PCR을 실행하는 것이 좋습니다.

▶ PTC Primer Mix 준비

1. TE 버퍼(B)를 해동하고 잘 섞습니다.
2. 동결 건조된 고체가 LyphoPrimer™ 튜브(C)의 바닥에 있는지 확인합니다. 그렇지 않은 경우 튜브를 최대속도로 10초 동안 원심분리합니다.
3. 1.2mL의 TE 버퍼(B)를 튜브(C)에 추가합니다. 뚜껑을 닫고 잘 섞은 다음 얼음 위에 놓습니다. 용액은 연한 주황색이어야 하며 고체 조각이 없어야 합니다.
4. 13개의 microcentrifuge 튜브에 "PTC Primer"라고 라벨링 합니다. 희석된 Primer Mix 90μL를 나누어 13개의 microcentrifuge 튜브에 넣습니다. 필요할 때까지 튜브를 얼음 위에 놓습니다. 사전에 프라이머를 준비하려면 분주 한 다음 필요할 때까지 냉동보관 할 수 있습니다.
5. 각 학생 쌍에 희석된 PTC 프라이머 튜브 1개를 배포합니다.

Pre-Lab Preparations: Module II

▶ LyphoControl™ 준비

※ 이 키트에는 6개의 대조샘플을 PCR 할 수 있는 충분한 시약이 포함되어 있습니다. 학생들이 PCR을 성공하였는지 확인하기 위해 각 조마다 반드시 하나 이상의 대조샘플을 PCR 실행해야 합니다.

1. 동결 건조 된 고체가 LyphoControl™ 튜브(D)의 바닥에 있는지 확인합니다. 그렇지 않은 경우 튜브를 최대속도로 10 초 동안 원심분리합니다.
2. 320 µL의 TE 버퍼(B)를 튜브(D)에 추가합니다. 뚜껑을 닫고 잘 섞은 다음 얼1음 위에 놓습니다. 용액은 연한 빨간색이어야 하며 고체 조각이 없어야 합니다.
3. 각 대조군의 PCR을 위해 희석된 LyphoControl™ 50µL를 분배합니다.

※ LyphoControl™에는 이미 필요한 모든 PCR 성분이 포함되어 있으며 PCR EdvoBead™ PLUS가 필요하지 않습니다. 희석되면 LyphoControl™은 여지가 있거나 학생 실험 전에 실행되는 경우 학생 PCR 샘플과 함께 PCR에 의해 증폭 될 준비가됩니다. PCR 후 제어 반응은 모듈 III에서 필요할 때까지 -20 ° C에서 보관할 수 있습니다.

▶ PCR기(Thermal Cycler) 준비

Thermal cycler는 모듈 II에 설명 된 대로 프로그래밍해야 합니다.

• 정확한 온도와 주기시간이 중요합니다. Thermal cycler가 제대로 프로그래밍 되었는지 확인하려면 한 사이클을 (약 3~5분 소요) 사전 실행하는 것이 좋습니다.

※ Thermal cycler에 저장되어 있는 PCR 조건이 변경되었을 수 있습니다. 실험을 실행하기 전에 아래 설정과 일치하는지 반드시 확인해야 합니다.

Initial denaturation 94° C for 4 minutes
94° C for 30 seconds
65° C for 30 seconds } 35 cycles
72° C for 30 seconds
Final Extension 72° C for 5 minutes



Pre-Lab Preparations: Module III

모듈 III에서 학생들은 HaeIII 제한효소를 사용하여 모듈 II에서 증폭한 PCR 결과물을 절단합니다. 최상의 결과를 위해 HaeIII Dryzyme® 제한효소는 사용 직전에 준비하여 얼음 위에 보관하거나 분주 후 즉시 -20°C 에 보관해야 합니다.

학생들에게 모듈 IV에서 사용하기 위해 절단하지 않은 나머지 샘플을 저장하도록 상기시킵니다. 제한효소로 절단 한 샘플과 절단하지 않은 샘플은 필요할 때까지 -20°C 에 함께 보관할 수 있습니다.

▶ HaeIII 제한효소 희석

1. 고체 물질이 Dryzyme® 제한 효소 HaeIII 튜브(E)의 바닥에 있는지 확인합니다. 그렇지 않은 경우 튜브를 최대속도로 20초 동안 원심분리합니다.
2. HaeIII Dryzyme®이 들어있는 튜브에 제한효소 희석 버퍼(F)를 $200\mu\text{L}$ 를 추가합니다.
3. 샘플이 1분 동안 수화 되도록 합니다.
4. 튜브를 30초 동안 혼합하고(튜브바닥을 부드럽게 빙빙 돌거나 두드려) 1분 동안 얼음에 둡니다.
5. 재수화 된 효소를 최대속도로 20초 동안 원심분리 합니다.
6. HaeIII 제한효소 $6\mu\text{L}$ 을 25개의 튜브에 분배합니다. 이 튜브에 "HaeIII"라고 표시합니다.

※ 재수화 된 제한효소는 얼음이나 냉장고에 최대 6시간 동안 보관하거나 최대 1주일 동안 냉동보관 할 수 있습니다. 냉장고에 밤새 보관하지 않는 것이 좋습니다.

Pre-Lab Preparations: Module IV

▶ SYBR® Safe 준비

1. SYBR® Safe의 튜브에 400 μ L의 1X TBE 버퍼를 추가하고 튜브를 여러 번 두드려 혼합하여 희석된 SYBR® Safe를 준비합니다.
2. 희석된 SYBR® Safe는 아가로스 젤 준비 중에 사용됩니다.

▶ 전기영동 버퍼 준비

이 실험을 위해 TBE 전기영동 버퍼를 대량으로 준비하여 클래스별로 공유하는 것이 좋습니다. 사용하지 않은 희석된 버퍼는 나중에 사용할 수 있습니다.

1. 3.7L의 증류수 또는 탈이온수를 큰 용기에 넣습니다.
2. TBE 전기 영동 완충 분말 전량을 용기에 넣고 잘 섞습니다.
3. 용기에 "1X 전기 영동 버퍼 (TBE)"라는 레이블을 붙입니다.
4. 준비된 버퍼는 60 일 이내에 사용하십시오.

▶ 아가로스 젤의 제조

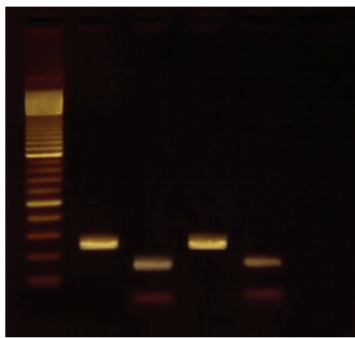
이 실험에는 두 학생 당 2.0 % 아가로스 젤 하나가 필요합니다(총 13 개의 젤). 7x7cm 젤을 권장합니다. 젤을 미리 준비할지 아니면 학생들이 직접 준비하도록 할지 선택할 수 있습니다. 이 절차에는 30-40 분 정도 소요됩니다.

1. 각 7x7cm 젤에는 1X TBE 완충액 25mL, 아가로스 분말 0.5g, 희석된 SYBR® Safe Stain 25 μ L가 필요합니다.
2. 젤은 미리 준비하여 나중에 사용하기 위해 보관할 수 있습니다. 고형화된 젤은 건조를 방지하기 위해 소량의 완충액이 있는 방수백에 냉장고에 최대 1주일 동안 보관할 수 있습니다. 방수백에 2mL의 버퍼를 추가하는 것이 좋습니다. 과도한 완충액은 SYBR® Safe가 젤 밖으로 확산될 수 있습니다.
3. -20°C에서 젤을 보관하지 마십시오. 얼면 파손될 수 있습니다.
4. 보관을 위해 트레이에서 제거된 젤은 트레이에 넣기 전에 녹은 아가로스 몇 방울과 함께 트레이에 다시 "고정"되어야 합니다. 이렇게하면 젤이 트레이와 챔버에서 미끄러지는 것을 방지할 수 있습니다.

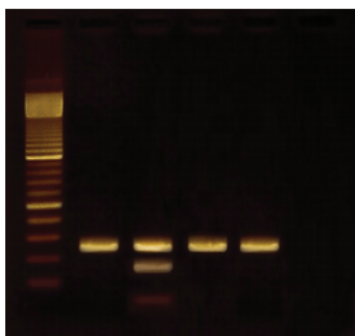
▶ DNA ladder(Size Maker) 준비

1. 100bp ladder(G)를 30 μ L씩 microcentrifuge 튜브에 분주하고 "100bp ladder"라 레이블을 붙입니다.
2. 아가로스 젤 1개당 분주한 100bp ladder를 분배합니다.
3. 각 2.0 %젤에는 100bp ladder와 두 학생의 샘플이 로드되어야 합니다.

Experiment Results and Analysis

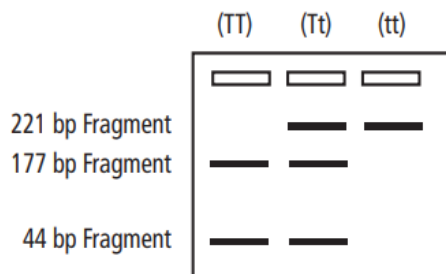


Lane	Sample	Size
1	100 bp ladder	Bands range in size from 100 bp – 4000 bp in 100 bp increments. High intensity reference band at 500 bp.
2	Control DNA, uncut	221 bp
3	Control DNA, cut	177, 44 bp
4	Student DNA, uncut	221 bp
5	Student DNA, cut	177, 44 bp



Lane	Sample	Size
1	100 bp ladder	Bands range in size from 100 bp – 4000 bp in 100 bp increments. High intensity reference band at 500 bp.
2	Student 1 DNA, uncut	221 bp
3	Student 1 DNA, cut	221, 177, 44 bp
4	Student 2 DNA, uncut	221 bp
5	Student 1 DNA, cut	221 bp

NOTE: In some samples, a diffuse, low molecular weight band known as a "primer dimer" may be present. This is a PCR artifact and can be ignored.



PTC TASTER:

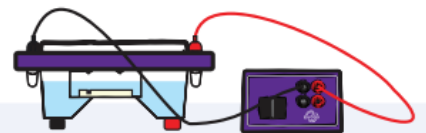
Homozygous Taster (TT) = sizes of 177 & 44 bp
 Heterozygous Taster (Tt) = 1 allele remains uncut at 221bp while the other allele cuts and generates fragments of 177 bp and 44 bp.

PTC NON-TASTER:

Homozygous recessive (tt) = remains uncut at 221 bp

- Homozygous Taster: 유전자의 두 복사본 모두 다형성을 포함하고있어 모두 HaeIII에 의해 절단.
- Heterozygous Taster: 유전자의 한 사본에는 다형성이 포함되어있어 HaeIII에 의해 절단. 유전자의 다른 사본은 절단되지 않음.
- Homozygous Non-taster: 유전자의 두 복사본 모두 다형성을 포함하지 않았기 때문에 HaeIII로 절단되지 않음.

※ 221 및 177bp 밴드는 44bp 밴드보다 더 밝게 나타납니다.



☎ 02-929-1110 ✉ info@koreasci.com

🛒 www.koreasci.com

※ 이 문서는 교육적 목적으로만 사용되어야 하며 그 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.