ED345-PTC 유전자의 SNP분석 - 미각의 유전학탐구

Created by Edvotek Inc.

👉🏾 이 실험에서 학생들은 PTC종이의 독특한 맛을 느낄 수 있는 PTC 유전자를 증폭시켜 SNP(single nucleotide polymorphism)의 그 존재 유무를 확인합니다. 학생들은 본인의 구강상피세포에서 DNA를 추출하여 PCR과 전기영동을 통해 PTC 유전자가 있는지 검사합니다.그리고 그 결과가 맞는지 PTC 용지의 맛을 봅니다.

제품 구성

	PCR EdvoBeads PLUS	-20°C 냉동보관
A	Universal DNA Buffer	-20°C 냉동보관
B	TE Buffer	-20°C 냉동보관
C	LyphoPrimer Mix	-20°C 냉동보관
D	LyphoControl (Complete PCR control)	-20°C 냉동보관
E	Dryzymes Restriction Enzyme HaeIII	-20°C 냉동보관
	Restriction Enzyme Dilution Buffer	-20°C 냉동보관
	100 bp ladder	-20°C 냉동보관
	Proteinase K	-20°C 냉동보관
	PTC Paper	
	Control Taste Paper	
	** 튜브 C와 D는 LyphoPrimer™ 및 LyphoControl™ 동결건조 상태로 제공됩니다. 사용 전에 재수화가 필요합니다. 더 자세한 내용은 실험 준비과정을 참조하시기 바랍니다.	*각 PCR EdvoBead™ PLUS에는 다음이 포함됩니다: dNTP 혼합물, Taq DNA 중합 효소 완충액, Taq DNA 중합 효소, MgCl2 및 반응 완충액.

	시약 및 소모품	
•	UltraSpec-Agarose™	
•	TBE Electrophoresis Buffer 50X	
•	SYBR Safe Stain	
•	일회용 플라스틱 컵	
•	15ml 코니칼튜브	
•	소금 팩 (Salt Packets)	
•	원심분리기 튜브	
•	0.2mL PCR 튜브	

필요 장비 및 준비물

- PCR 머신 Thermal cycler
- 55°C와 99°C 항온수조
- 전기영동장치와 전원공급장치
- 원심분리기
- UV 트랜스 일루미네이터
- 마이크로 피펫과 피펫팁
- 전자레인지
- 250 mL 플라스크 또는 비커
- 안전 장갑 및 고글
- 실험용 라텍스 장갑
- 증류수, 식수
- 락스 또는 표백제용액 - 생물학적 오염 방지용

💬 배경 지식

네 개의 뉴클레오타이드 문자가 유전자 코드를 지정합니다: A (아데닌), C (사이토신), T (티민), 그리고 G (구아닌). 점 돌연변이는 한 뉴클레오타이드가 다른 뉴클레오타이드로 대체될 때 발생합니다. 예를 들어, A가 C, T, 또는 G로 대체될 때입니다 (Figure 1). 이러한 돌연변이가 전체 인구의 1% 이상에서 존재할 경우, 이를 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP, "스닙"으로 발음됨)이라고 합니다. SNP는 또한 단일 염기 쌍이 시퀀스에서 삭제되거나 추가될 때 발생할 수 있습니다.

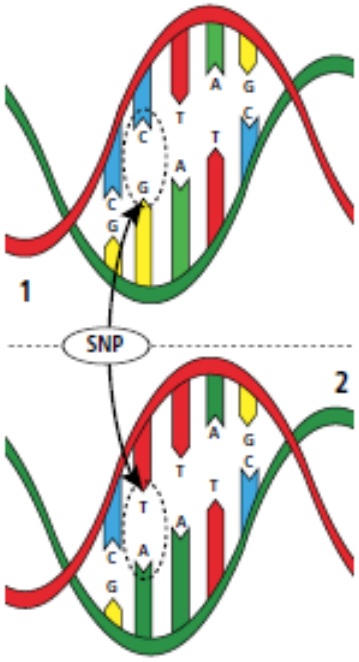


Figure 1: Single Nucleotide Polymorphism (SNP) occurs at a single base-pair location (C/T).

SNP는 사람들 사이에서 가장 일반적인 유전적 변이 형태입니다. 이들은 유전자 비부호화 영역과 유전자 사이의 영역에서 자주 발생합니다. 이러한 SNP는 자동으로 아미노산으로 변환되지 않지만, 유전자 스플라이싱, 전사 인자 결합, 또는 비부호화 RNA 서열 결정 등을 통해 단백질 생산에 영향을 미칠 수 있습니다. SNP는 또한 유전자의 코딩 서열에 발생할 수 있으며, 이곳에서는 유전자 제품인 단백질에 영향을 미칠 수 있습니다. 예를 들어, 겸상적혈구빈혈은 단일 뉴클레오타이드 다형성으로 인해 친수성 아미노산인 글루탐산이 헤모글로빈의 ß-글로빈 사슬에서 소수성 아미노산인 발린으로 대체되기 때문에 발생합니다. 그러나 다른 경우에는, 코돈의 퇴화성 때문에 단백질의 아미노산 서열이 반드시 변하지 않을 수 있습니다. 본 실험에서는 페닐티오카바마이드(PTC) 민감성 유전자 TAS2R38의 뉴클레오타이드 위치 145에서 발생하는 SNP를 살펴볼 것입니다.

사람들은 고통스럽게 쓴 PTC 화합물에 대한 민감도가 매우 다양합니다 (Figure 2). 이 사실은 1931년에 인상적인 과학적 호기심과 의문스러운 실험실 안전과 관련된 일련의 사건에서 발견되었습니다. 화학자인 아서 폭스는 분말 화학 물질을 혼합하던 중 실수로 약간의 분말이

공기 중으로 날아가는 바람에 튀었습니다. 근처의 동료는 그 분말이 얼마나 쓴맛이 나는지 외쳤지만, 폭스(화학 물질에 더 가까웠음)는 아무 맛도 느끼지 못했습니다. 두 사람은 흥미를 느끼고 번갈아 그 화학 물질을 맛보았고, 폭스는 계속해서 그 화학 물질이 무미하다고 느낀 반면 그의 동료는 쓴맛을 느꼈습니다. 이후 폭스는 많은 사람을 테스트했습니다. 다시 그는 '맛을 느끼는 사람(tasters)'과 '맛을 느끼지 않는 사람(non-tasters)'의 그의 발견을 발표했습니다. 이는 유전학자 L.H. 스나이더의 관심을 끌었고, 그는 가족들을 대상으로 그 화합물을 테스트하고 맛보는 상태가 유전적으로 결정된 것이라고 가설을 세웠습니다.

PTC 화합물을 맛볼 수 있는 능력은 현재 TAS2R38 유전자가 인코딩한 단백질인 미각 수용체 38의 존재와 연결되어 있습니다. TAS2R38 유전자는 두 개의 대립유전자를 가지고 있습니다: PTC를 맛볼 수 있는 능력을 부여하는 우성 대립유전자 (T)와 비맛 대립유전자 (t)입니다. 사람은 부모로부터 각각 하나의 유전자를 물려받습니다. 개인 내에서 이 다양한 대립유전자 조합을 유전자형(genotype)이라고 하며, 이는 다시 표현형(phenotype)을 결정합니다: 이 경우 한 개인이 '맛을 느끼는(taster)'지, '맛을 느끼지 않는(non-taster)'지 결정됩니다. PTC 맛을 느끼는 사람들은 두 가지 가능한 유전자형 중 하나를 갖습니다; 즉, 동형 접합 우성으로서 뚜렷한 맛 유전자(TT)를 두 개 가지고 있거나, 이형 접합으로 맛 유전자(T)와 비맛 대립 유전자(t) 하나를 갖습니다. '맛을 느낄수 없는' 사람들은 동형 접합 열성으로서 두 개의 비맛 대립 유전자(tt)를 가지고 있습니다. 사람들에서, 테스트를 받은 사람의 약 70%가 PTC를 맛볼 수 있으며, 나머지 30%는 맛을 느끼지 못합니다.

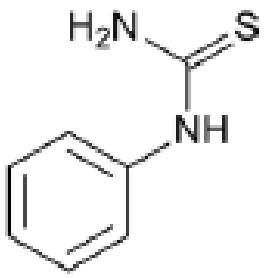


Figure 2: The structure of PTC.

TAS2R38의 코딩 영역 분석 결과 PTC 맛을 느끼는 대립유전자와 못느끼는 대립유전자가 3개의 아미노산에서 SNP로 인해 다르다는 것이 밝혀졌습니다 (Table 1). 세계적으로 발견되는 유전자의 다섯 가지 변종이 있으며, AVI, AAV, AAI, PAV, PVI로 명명되어 있으며, 이는 유전자 내에 존재하는 아미노산 조합에 의해 이름 붙여졌습니다. 두 가지 가장 일반적인 하플로타입은 AVI와 PAV로, 각각 비맛 보지 않는 사람과 맛 보는 사람을 나타냅니다. 아미노산 서열의 변화는 수용체 단백질의 모양을 변경하여 PTC에 얼마나 강하게 결합할 수 있는지를 결정합니다. 모든 사람은 각 유전자의 두 개 복사본을 가지고 있기 때문에, 쓴맛 유전자의 변종 조합은 누군가가 PTC를 강하게 쓴맛, 다소 쓴맛 또는 전혀 맛을 느끼지 않을지를 결정합니다. 이는 대략적인 맛 테스트로 정량화할 수 있으며, 더 정확하게는 위치 145, 785, 및

886의 뉴클레오타이드를 결정하여 특징짓습니다. SNP를 감지하는 한 가지 방법은 제한 효소를 사용하는 것입니다.

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

제한 효소는 DNA의 두 가닥 내의 인산 결합을 절단하는 엔도뉴클레아제입니다. 제한 효소의 특징적 기능은 매우 특정한 염기 서열에서만 절단한다는 점입니다. 이러한 인식 부위는 일반적으로 4~8 염기쌍 길이이며, 절단은 해당 위치 내 또는 근처에서 발생합니다. 인식 부위는 대칭적이며, 인식 부위 내의 두 DNA 가닥이 5'에서 3'으로 읽을 때 동일한 염기 서열을 가집니다. 이러한 서열을 팔린드롬(palindrome)이라고 합니다. 인식 팔린드롬에서 단일 염기 변화가 발생하면 제한 효소가 해당 위치에서 DNA를 절단할 수 없게 됩니다. 이는 효소 소화 후 생성된 DNA 조각의 길이와 수를 변경합니다. 이 조각들은 겔 전기영동을 통해 길이에 따라 분리될 수 있습니다. 효소 소화와 전기영동의 과정을 제한 조각 길이 다형성(RFLP) 분석이라고 부릅니다 (Figure 3). 본 실험에서는 RFLP 분석을 사용하여 TAS2R38 유전자의 위치 145에서의 뉴클레오타이드를 조사할 것입니다.

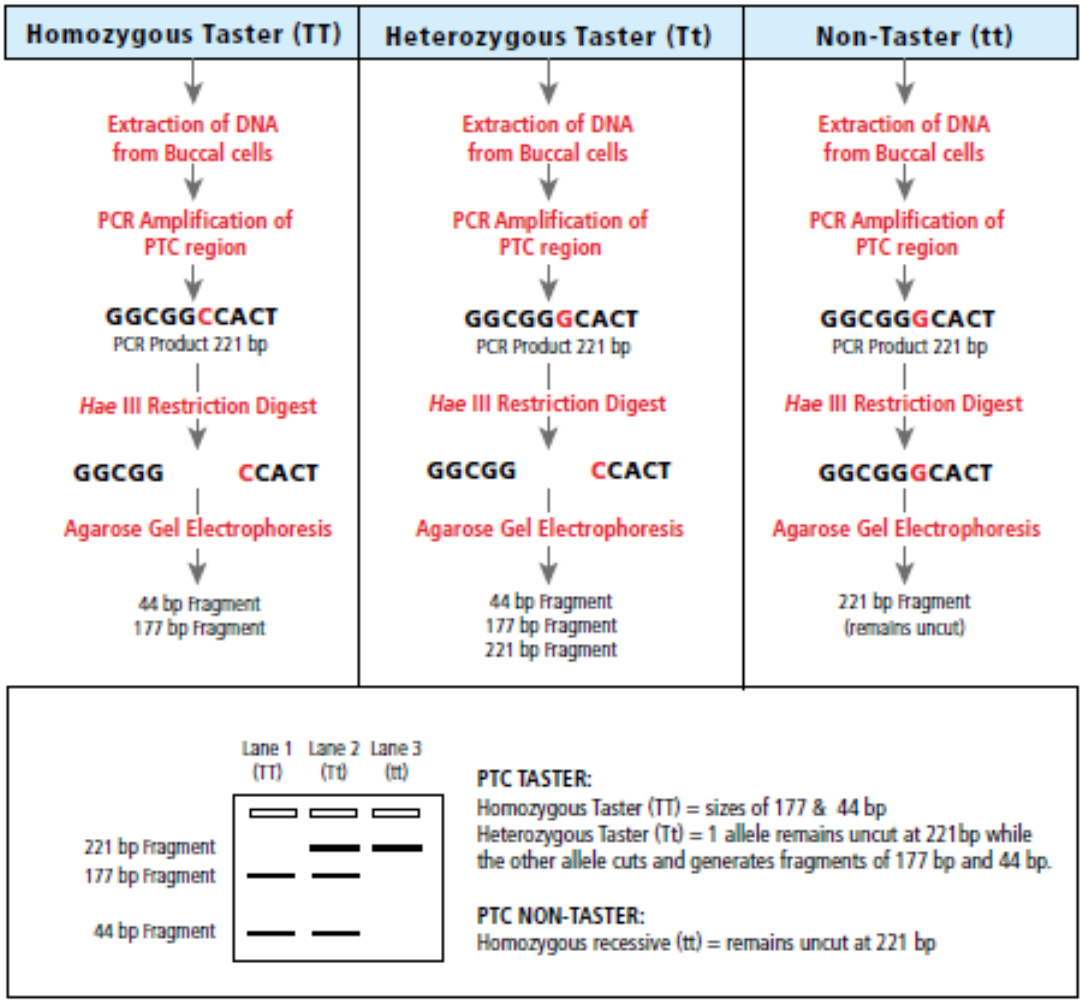
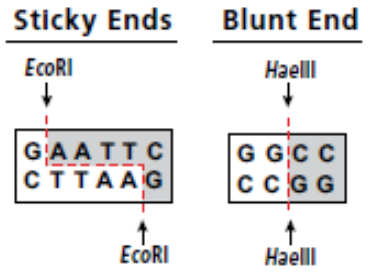


Figure 3: Determining PTC Genotype

아래 그림의 EcoRI와 HaeIII의 인식 부위 및 절단 패턴을 확인해 보십시오. 화살표는 절단 위치를 나타냅니다. EcoRI로 소화하면 비대칭 "접착 끝(sticky ends)"이 생성되고, HaeIII 제한 효소로 소화하면 평평한 끝(blunt ends)이 생성됩니다.

PTC 유전자의 예에서 HaeIII는 맛을 느끼는 대립유전자(5′-GGCGGCCACT-3′)만을 절단합니다. 맛을 못느끼는 대립유전자(5′-GGCGGGCACT-3′)에 존재하는 다형성은 제한 효소 인식 부위의 단일 염기 변화를 초래하여, HaeIII가 비맛 DNA를 절단할 수 없습니다.



중합효소 연쇄 반응 (PCR)

HaeIII가 TAS2R38의 첫 221 bp에 미치는 영향을 시각적으로 보기 위해서는 이 DNA 영역을 선택하고 증폭해야 합니다. 이는 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 사용하여 수행됩니다. PCR은 특정 DNA 서열의 수천에서 수백만 개의 복사본을 생성하는 기술입니다. 이 절차는 1984년 Cetus Corporation에서 Kary Mullis 박사에 의해 발명되었습니다. PCR은 생물학적 연구의 거의 모든 측면을 혁신했기 때문에, Mullis 박사는 1994년에 그의 작업으로 노벨상을 수상했습니다. PCR의 막대한 유용성은 절차의 단순성과 특이성에 기반하고 있습니다.

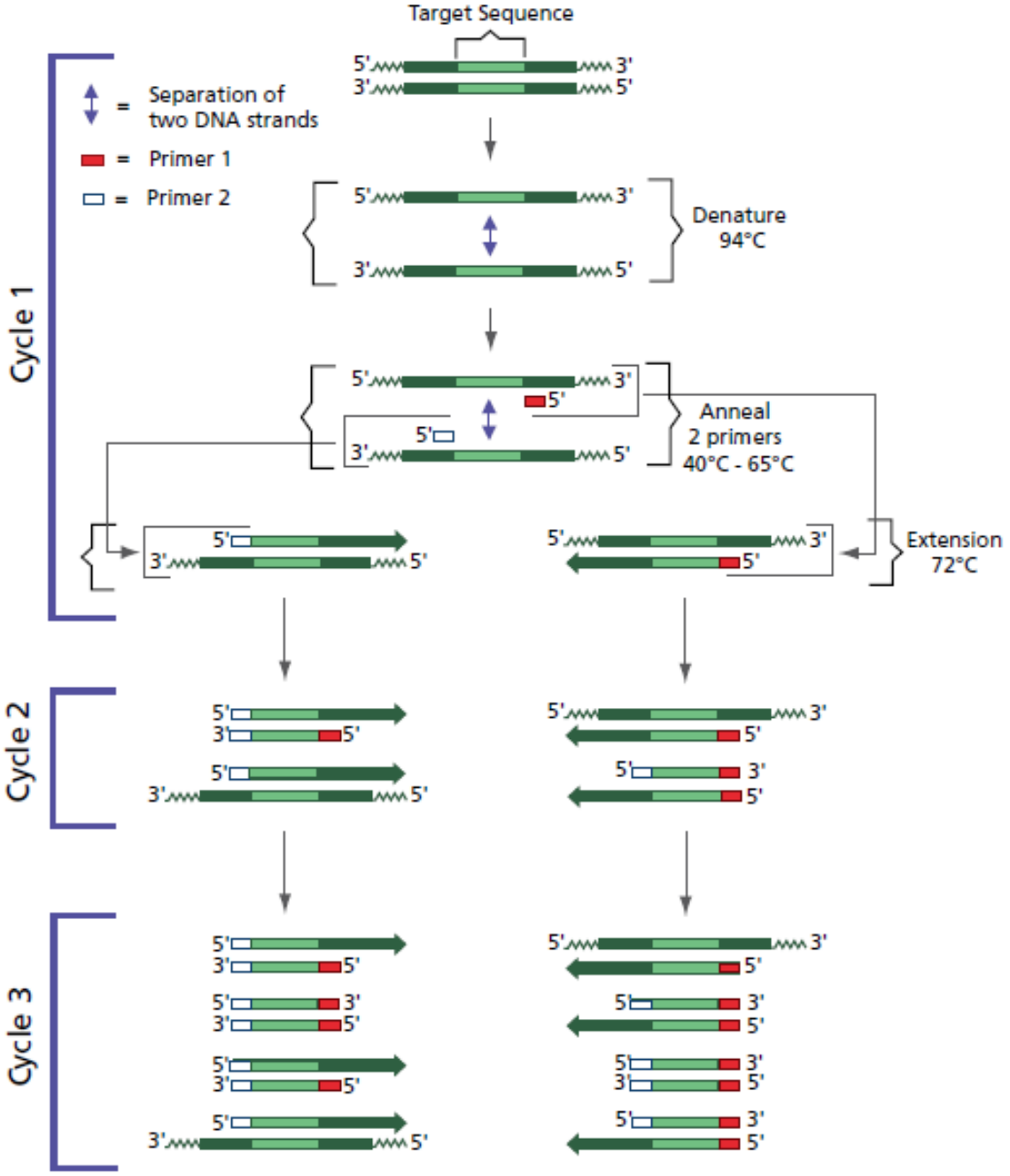
PCR 증폭을 준비하기 위해, 특정 유전자 서열을 목표로 하는 두 개의 DNA "프라이머" 세트를 설계합니다. 프라이머는 표적 DNA 영역의 시작과 끝에 해당하는 길이 15-30 염기쌍의 합성 올리고뉴클레오타이드입니다. 프라이머는 템플릿 DNA에 결합합니다 - 이 경우 PTC를 맛보는 능력에서 차이를 보이는 개인들로부터 추출한 DNA입니다. 두 개의 프라이머 외에도 네 가지 탈산소뉴클레오타이드(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)와 열 안정성이 있는 DNA 중합효소가 필요합니다. 가장 일반적으로 사용되는 DNA 중합효소는 열수성 박테리아인 Thermus aquaticus에서 정제된 Taq 중합효소입니다. 이 효소는 거의 끓는 온도에서도 안정합니다.

PCR 과정은 세 가지 다른 온도에서 혼합물을 순차적으로 가열하고 냉각해야 합니다 (Figure 4). 이 과정은 샘플을 지정된 온도에서 다양한 시간 동안 신속하게 가열하고 냉각하며 유지하도록 프로그램된 기계인 열 사이클러에서 효율적으로 수행됩니다. PCR 반응의 첫 번째 단계에서 혼합물은 거의 끓는 온도(94°C)로 가열되어 DNA 가닥 간의 수소 결합을 파괴합니다. 이 단계는 두 개의 DNA 가닥이 완전히 분리되는 결과를 초래하며, 이를 “변성(denaturing)”이라고 합니다.

두 번째 PCR 단계에서는 샘플이 45° - 65°C의 온도로 냉각됩니다. 이 단계는 “어닐링(annealing)”이라고 하며, 두 개의 프라이머가 목표 상보체에 결합합니다. 세 번째 단계는 “신장(extension)”이라고 하며(또는 DNA 합성), 온도가 중간 값(일반적으로 72°C)으로 상승합니다. 이 온도에서 Taq 폴리머제 단백질이 각 분리된 DNA 가닥과 프라이머 조합에 결합합니다. Taq는 그런 다음 네 가지 자유 탈산소뉴클레오타이드(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)를 성장하는 상보적 가닥에 추가합니다. 이 가닥에 있는 탈산소뉴클레오타이드의 순서는 원래 가닥과의 Watson-Crick 염기쌍 형성에 의해 결정됩니다.

이 세 단계 - denature, annealing, extension - 는 하나의 PCR “사이클”을 구성합니다. 각 사이클은 목표 DNA의 양을 두 배로 증가시킵니다. 수학적으로 계산하면, 사이클이 n번 반복되면 복사본의 수는 2의 n제곱만큼 기하급수적으로 증가합니다. 예를 들어, 10회의 사이클은 2^10 즉 1024개의 복사본을 생성합니다. PCR 과정은 일반적으로 20-40 사이클 반복되며, 이론적으로 목표 서열을 수백만 개의 복사본으로 증폭합니다. 실제로는 반응 성분의 고갈과 DNA 중합효소 활성의 감소로 인해 약 35회 사이클 후에 생성물의 양이 최대에 도달합니다.

이 실험에서 학생들은 PCR-RFLP 방법을 사용하여 아미노산 코딩 SNP의 존재를 확인합니다. 학생들은 TAS2R38 유전자의 다형성 영역을 증폭하기 위해 PCR을 사용할 것입니다. 증폭된 DNA는 제한 효소 HaeIII로 절단되어 145 부위에서의 유전자형을 확인하며, 이는 PTC를 맛볼 수 있는 능력과 관련이 있습니다. 제한 효소 처리한 PCR 생성물의 아가로스 겔 전기영동을 통해 TAS2R38 유전자의 두 가지 대립유전자가 나타나게 되며, 이를 통해 학생이 맛보는 형질에 대해 동형 접합(homozygous)인지 이형 접합(heterozygous)인지, 또는 맛을 못느끼는 동형 접합(homozygous non-taster)인지 알 수 있습니다. 마지막 모듈에서는 학생들이 쓴맛 PTC를 맛볼 수 있는 능력을 테스트하고, 그들의 유전자형과 표현형을 연관 지어 보게 됩니다.



실험 개요

실험 목표

이 실험의 목표는 학생들이 자신의 DNA를 분리하고 PCR을 사용하여 PTC의 쓴맛을 감지하는 TAS2R38 유전자의 일부를 증폭하는 것입니다.

모듈 I에서, 학생의 뺨에서 채취한 세포를 Lysis 완충액으로 인간 DNA를 수집합니다. **모듈 II**에서는 인간 DNA를 PCR 프라이머 및 PCR EdvoBead PLUS와 혼합한 후 열 사이클러

(PCR기기)에서 PCR을 수행합니다. TAS2R38 유전자가 증폭되면, **모듈 III**에서 PCR 생성물을 HaeIII 제한 효소와 혼합합니다.

마지막으로, **모듈 IV와 V**에서는 학생들이 자신의 유전자형과 표현형을 비교하게 됩니다. 이때, PTC를 맛볼 수 있는지 알 수 있습니다. 절단된 DNA와 절단되지 않은 DNA는 아가로스 겔 전기영동을 통해 분석되며, 이를 통해 학생들은 자신의 TAS2R38 유전자의 SNP의 존재를 감지할 수 있습니다. 이 유전자형 결과는 PTC 종이를 맛보는 것으로 표현형과 연결됩니다.

중요 사항

실험을 시작하기 전에 반드시 지침을 완전히 읽고 이해하십시오. 어떤 것이 불확실한 경우, 반드시 강사에게 질문하십시오!

- 실험실에서 작업할 때는 주의하십시오.
- 항상 장갑과 고글을 착용하십시오.
- 끓는 물 및 녹인 아가로스와 같은 뜨거운 시약을 다룰 때는 보호 장갑을 착용하십시오.
- 시약을 입으로 흡입하지 마십시오 - 피펫 펌프를 사용하십시오.
- 실험실에서 작업 후에는 항상 비누와 물로 손을 철저히 씻으십시오.
- 오염된 실험실 폐기물(타액 용액, 컵, 피펫 등)은 폐기 전에 15% 표백제 용액으로 소독해야 합니다.

실험실 준비

실험을 시작하기 전에 교사용 준비과정을 전체적으로 검토하십시오. 실험을 수행하기 전에 열 사이클러의 프로그램이 아래의 PCR 설정과 일치하는지 확인하십시오.

모듈 I: 30분 소요, 입안 세포에서의 DNA 분리

모듈 II: 120분 소요, PTC 영역의 증폭

모듈 III: 40분 소요, PTC PCR 생성물의 제한 단편화

모듈 IV: 50-70분 소요, **아가로스 겔 전기영동을 통한 DNA 조각 분리**

모듈 V: 10분 소요, **PTC 종이를 통한 쓴맛 감지 능력 확인**

🤝 실험 전 준비 - 교사용

시약 준비하기 - 모듈 I

예비 실험 준비: 모듈 I

모듈 I에서는 학생들이 자신의 입안 세포에서 DNA를 분리할 것입니다. 입안 세포를 수집하는 가장 쉽고 추천되는 방법은 saline solution(소금을 물에 녹인 생리식염수)으로 가볍게 헹구는 것입니다. 헹궈진 물은 짧은 시간 동안 원심분리되어 입안 세포를 분리하고, 이후 이 세포는 lysis buffer와 혼합되어 55°C와 99°C에서 인큐베이션됩니다. 마지막으로 학생들은 cell lysate를 원심분리하여 DNA가 포함된 supernatant를 수집하게 됩니다. 분리된 DNA는 모듈 II에서 PCR에 사용될 때까지 -20°C (냉동고)에서 안전하게 보관할 수 있습니다.

모듈 I을 시작하기 전에 강사는 saline solution과 lysis buffer를 준비해야 합니다. 아래 각각의 용액 준비 방법을 참조하십시오.

Saline Solution 준비

주의: Saline solution은 반드시 뺨 세포 세척에 사용해야 합니다. Sports drinks는 모듈 II에서 중합효소 연쇄 반응에 의한 DNA 증폭을 방해합니다. 만약 sports drinks로 뺨 세포를 세척하였다면, 샘플을 폐기하고 saline solution으로 DNA 추출을 반복하십시오.

1. Saline solution을 준비하려면, 여덟 개의 소금 패킷 (~4 g)을 500 mL의 drinking water에 녹입니다. 병을 뚜껑을 닫고 뒤집어 혼합합니다.
2. 컵당 10 mL의 saline solution을 나눕니다. 각 학생에게 하나의 컵을 나눠줍니다.

Lysis Buffer 준비

주의: Lysis buffer는 실험을 수행하기 전에 Proteinase K와 혼합해야 합니다. 준비된 날에 사용해야 하며, 나중을 위해 얼려둘 수 있습니다.

1. Proteinase K 튜브에 100 µL의 Universal DNA buffer (튜브 A)를 추가하고 샘플이 몇 분 동안 수화되도록 합니다. 샘플이 수화된 후, 피펫으로 여러 번 위아래로 섞어 재료가 잘 혼합되도록 합니다.
2. 재수화된 Proteinase K 용액 전체량과 Universal DNA buffer (A) 4 mL를 15 mL 코니칼 튜브로 옮깁니다.
3. 튜브를 여러 번 뒤집어 혼합합니다. 이 튜브에 “Lysis Buffer”라는 라벨을 붙입니다.

주요사항: Lysis buffer는 빨간색이어야 하며, 용해되지 않은 덩어리는 없어야 합니다.

1. Lysis Buffer 300 µL씩 13개의 마이크로 원심분리 튜브에 분주하고 튜브마다 표기하여 학생들끼리 공유합니다.

주요사항: 이 시점에서 Lysis Buffer는 같은 날 (최대 6시간) 사용할 수 있도록 얼음 위에 보관하거나 얼릴 수 있습니다.

1. 각 학생 쌍에게 하나의 “Lysis Buffer” 튜브를 배포합니다. 얼려진 경우, Lysis Buffer는 37°C 수조에서 빠르게 해동하거나 학생들이 손으로 튜브를 따뜻하게 하여 해동할 수 있습니다.

실험실 재료 소독

오염된 실험실 폐기물(타액 용액, 컵, 피펫 등)은 폐기 전에 15% 표백제 용액으로 소독해야 합니다. 생물학적 샘플은 반드시 기관의 지침에 따라 적절히 폐기해야 합니다.

모듈I 실험을 위해 학생당 받아야 할 것
• One cup containing 10 mL of saline solution
• One screw-cap tube
• One microcentrifuge tube

두 학생이 서로 공유할 시약
• 300 µL Lysis buffer

시약 준비하기 - 모듈 II

모듈 II에서는 학생들이 모듈 I에서 분리한 DNA에 대해 PCR을 수행합니다. PCR 혼합물에는 학생의 DNA, TAS2R38 유전자의 221 bp 영역에 특정한 프라이머 혼합물, 그리고 PCR EdvoBead™ PLUS가 포함됩니다.

PCR 프라이머는 실험 수행 전에 강사가 재수화해야 하는 동결건조상태로 제공됩니다. PCR EdvoBeads™ PLUS는 PCR 설정 전에 분배할 수 있으며, 학생들이나 강사가 장갑을 끼고 부드럽게 PCR EdvoBeads™ PLUS를 옮길 수 있습니다. 또는 비드를 병에서 개별 PCR 튜브로 부드럽게 "따르기" 할 수도 있습니다. 비드를 분배한 후에는 PCR 튜브를 빠르게 잠가서 비드가 수분을 흡수해 실험 전에 다시 분산하기 어렵게 만드는 것을 방지하는 것이 중요합니다.

이 실험에는 LyphoControl™ 완전 PCR 대조 샘플이 포함되어 있으며, 학생 PCR 샘플과 함께 준비하고 실행해야 합니다. LyphoControl™ 샘플은 모든 PCR 구성 요소가 미리 혼합되

어 있으며 재수화 후 즉시 사용할 수 있습니다. 가능하다면 학생 샘플과 함께 대조군을 실행하는 것을 강력히 권장하지만, 학생 PCR 이전 또는 이후에 실행할 수도 있습니다.

PTC Primer Mix 준비

1. TE Buffer (B)를 해동하고 잘 섞어줍니다.
2. LyphoPrimer™ 튜브 (C) 밑에 내용물이 잘 모여 있는지 확인합니다. 그렇지 않은 경우, 튜브를 최대 속도로 10초간 원심분리하여 모아줍니다.
3. 이 튜브에 TE Buffer (B) 1.2 mL를 추가합니다. 뚜껑을 닫고 잘 섞어준 다음 얼음 위에 두십시오. 용액은 연한 오렌지색이며 고형물이 없어야 합니다.
4. 13개의 마이크로 원심분리 튜브에 "PTC Primer"라는 라벨을 붙입니다. 희석된 Primer Mix를 90 µL씩 13개의 마이크로 원심분리 튜브에 분주합니다. 튜브는 필요할 때까지 얼음 위에 두십시오. 미리 프라이머를 준비하고 싶은 경우, 프라이머를 분주한 후 얼려둘 수 있습니다.
5. 희석된 PTC Primer 튜브 하나를 각 학생 쌍에게 분배합니다.

LyphoControl™ 준비

주의: 이 키트에는 6개의 대조 반응을 설정할 수 있는 만큼의 시약이 포함되어 있습니다. PCR이 성공적으로 수행되었는지 확인하기 위해 수업당 최소 하나의 대조 반응을 수행해야 합니다.

1. 리오필리제이드 고체가 LyphoControl™ 튜브 (D) 바닥에 있는지 확인합니다. 그렇지 않은 경우, 튜브를 최대 속도로 10초간 원심분리합니다.
2. 튜브에 320 µL의 TE Buffer (B)를 추가합니다. 뚜껑을 덮고 잘 섞어준 다음 얼음 위에 둡니다. 용액은 연한 빨간색이며 고형물이 없어야 합니다.
3. 각 대조 반응을 위해 희석된 대조 혼합물 50 µL를 분주합니다.

주요 사항:

- LyphoControl™은 이미 모든 필수 PCR 구성 요소가 포함되어 있으며 PCR EdvoBead™ PLUS가 필요 없습니다. 희석이 완료되면, LyphoControl™은 학생 PCR 샘플과 함께 PCR을 통해 증폭할 준비가 되어 있으며, 공간이 있으면 함께 실행하거나 학생 실험 이전에 실행할 수 있습니다. PCR 후 대조 반응은 모듈 III에서 필요할 때까지 -20°C에서 보관할 수 있습니다.
- 증류수는 리오필리제이드 구성 요소를 재수화하는 데 사용할 수 있습니다. 올바른 부피가 사용되도록 주의하십시오.

중요:

PCR EdvoBeads™는 잠시라도 열어두면 수분을 흡수합니다. 비드를 사용할 준비가 되었을 때만 병을 여십시오. 한 번에 모든 비드를 사용하지 않을 경우, 필요한 수량을 신속하게 제거한 후 즉시 회색 마개를 다시 병에 꽉 잠가주세요. 사용하지 않은 비드는 -20°C에서 필요할 때까지 보관하십시오.

PCR EdvoBeads™

주의: 비드는 진공 밀봉되어 있으며 마개를 제거하여 꺼낼 수 있습니다. 비드를 사용할 준비가 되었을 때만 병을 열고 신속하게 다시 닫아주세요.

학생들이 PCR 실험을 하기 직전에 PCR EdvoBeads™를 분배합니다. 샘플 당 1개의 비드가 필요합니다.

1. PCR EdvoBeads™ 병을 열고 (금속 크림프를 조심스럽게 제거) 회색 고무 마개를 천천히 제거합니다.
2. 장갑을 끼거나 겸자 또는 무균 루프를 사용하여 하나의 비드를 빼내PCR 튜브로 옮깁니다. 튜브를 신속하게 잠그고 학생 그룹에 분배합니다.

PCR 증폭:

PCR Thermal Cycler는 모듈 II의 학생 실험 과정에 따라 프로그래밍되어야 합니다.

- 정확한 온도와 사이클 시간은 매우 중요합니다. 기기가 제대로 프로그래밍되었는지 확인하기 위해 한 사이클에 대한 예비 실행(약 3~5분 소요)을 추천합니다.
- 보유 기기에 덮개가 가열 기능이 없는 경우, PCR 반응이 있는 마이크로 원심분리 튜브 위에 기름이나 왁스의 층을 놓아 증발을 방지해야 합니다.

모듈II 실험을 위해 학생당 받아야 할 것
• One PCR tube and PCR EdvoBead™ PLUS

두 학생이 서로 공유할 시약

• 90 µL PTC Primer mix

시약 준비하기 - 모듈 III

PTC 생성물의 제한 효소 처리

모듈 III에서는 학생들이 모듈 II에서 얻은 PCR 생성물의 일부를 HaeIII 제한 효소 처리할 것입니다. 최상의 결과를 얻기 위해서는 HaeIII Dryzyme 제한 효소를 사용 직전에 준비하고 얼음 위에 보관하거나, 분주 후 즉시 -20°C에서 저장해야 합니다. 각 학생은 실험 중 사용할 재수화된 효소의 단일 튜브를 받게 됩니다.

학생들에게 나머지 처리되지 않은 샘플은 모듈 IV에서 사용하도록 저장하도록 상기시켜 주십시오. 처리가 완료된 후, 처리된 샘플과 처리되지 않은 샘플은 필요할 때까지 -20°C(냉동고)에서 함께 보관할 수 있습니다.

HaeIII 제한 효소 희석

1. HaeIII Dryzyme 튜브 (E) 바닥에 고체 물질이 있는지 확인합니다. 그렇지 않은 경우, 튜브를 최대 속도로 20초간 원심분리합니다.
2. HaeIII Dryzyme 이 들어 있는 튜브에 200 µL의 Restriction Enzyme Dilution Buffer (튜브 F)를 추가합니다.
3. 샘플이 수화되도록 1분 동안 두십시오.
4. 튜브를 30초 동안 섞습니다(부드럽게 혼합하거나 튜브 바닥을 두드림) 후 얼음 위에 1분 동안 둡니다.
5. 재수화된 효소를 최대 속도로 20초간 원심분리합니다.
6. HaeIII 제한 효소를 25개 튜브에 각각 5 µL씩 분주합니다. 이 튜브에 "HaeIII"라고 라벨을 붙입니다.

주의: 재수화된 제한 효소는 얼음 위나 냉장고에서 최대 6시간 동안 보관할 수 있으며, 최대 일주일 동안 얼릴 수 있습니다. 냉장고에서 하룻밤 보관하는 것은 권장하지 않습니다.

모듈III 실험을 위해 두 학생당 받아야 할 것

• Two tubes of HaeIII Restriction Enzyme

시약 준비하기 - 모듈 IV

전기영동에 의한 분리

전기영동 완충액 준비:

이번 실험에서는 수업에서 공유할 수 있도록 TBE 전기영동 완충액을 대량으로 준비하는 것을 추천합니다. 사용하지 않은 희석된 완충액은 나중에 사용할 수 있습니다.

1. 증류수 3.7 L를 측정하여 큰 용기에 넣습니다.
2. TBE 전기영동 완충액 파우더 전체를 용기에 추가하고 잘 혼합합니다.
3. 용기에 "1X Electrophoresis Buffer (TBE)"라는 라벨을 붙입니다.
4. 준비한 완충액은 60일 이내에 사용합니다.

SYBR Safe Stain 준비:

SYBR Safe를 희석하기 위해 1X TBE 완충액 400 µL를 SYBR Safe 튜브에 추가하고, 여러 번 가볍게 탭하여 혼합합니다. 희석된 SYBR Safe는 아가로스 겔 준비 중에 사용됩니다.

아가로스 겔 준비:

이 실험에서 두 학생당 하나의 2.0% 아가로스 겔이 필요합니다 (총 13개 겔). 7 x 7 cm 크기의 겔을 추천합니다. 겔을 미리 준비할지 학생들이 직접 준비할지는 선택할 수 있습니다. 이 과정에는 30-40분이 소요됩니다.

개별 겔 준비:

각 학생 그룹은 실험 수행 전에 자신의 겔을 제조할 수 있습니다 (학생 실험 절차의 모듈 IV 참조). 각 7 x 7 cm 겔은 25 mL의 1X TBE 완충액, 0.5 g의 아가로스 가루, 및 25 µL의 희석된 SYBR Safe Stain이 필요합니다.

대량 겔 준비:

시간을 절약하기 위해, 수업에서 공유할 수 있도록 더 많은 양의 아가로스 용액을 준비할 수 있습니다. 배치 겔 준비에 대한 지침은 부록 B를 참조하십시오.

미리 겔 준비:

겔을 미리 준비하여 나중에 사용할 수 있도록 저장할 수 있습니다. 고체화된 겔은 물기가 없는 봉지에 소량의 완충액과 함께 냉장고에서 최대 1주일 동안 보관할 수 있습니다. 봉지에 2 mL의 완충액을 추가하는 것을 추천합니다. 과도한 완충액은 SYBR Safe가 겔에서 확산되는 원인이 될 수 있습니다.

겔을 -20° C에서 보관하지 마십시오. 동결은 겔을 파괴합니다. 보관을 위해 트레이에서 제거된 겔은 재부착하기 위해 몇 방울의 녹인 아가로스를 추가하여 트레이에 다시 "고정"한 후

트레이에 넣어야 합니다. 이는 겔이 트레이와 챔버 내에서 흘러다니는 것을 방지합니다.

추가 물질:

- 100 bp ladder (G)를 라벨이 붙은 마이크로 원심분리 튜브에 각각 30 µL씩 분주하고, 겔당 하나의 100 bp ladder 튜브를 분배합니다.

각 2.0% 겔에는 100 bp ladder와 두 학생의 샘플이 적재되어야 합니다. 대조 PCR 반응도 웰 중 하나에 적재할 수 있습니다. 원하시면 각 겔에서 대조군을 적재할 학생이나 학생 쌍을 지정할 수 있습니다.

SYBR Safe로 염색된 겔 시각화:

SYBR Safe는 이중 가닥 DNA에 결합했을 때 형광을 발산하는 DNA 염색기로, 샘플을 시각화할 수 있습니다. 이 DNA 염색제는 UV 및 블루 라이트 트랜스일루미네이터와 호환됩니다. 최상의 결과를 얻기 위해 TruBlu™ 2 Blue Light Transilluminator (제품코드: ED557)를 추천합니다.

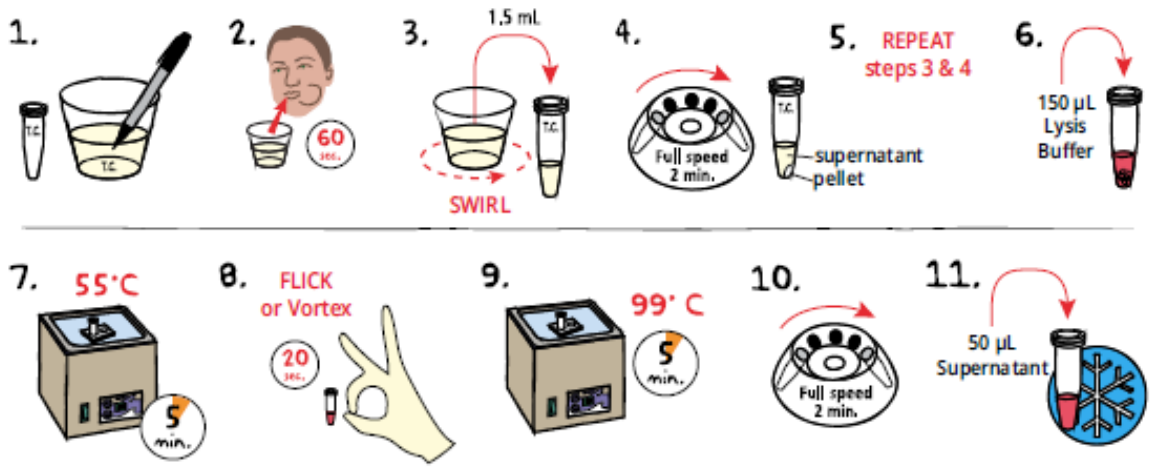
DNA의 사진 기록 (선택 사항):

겔이 염색된 후, 결과를 사진으로 기록할 수 있습니다. 다양한 사진 기록 시스템이 있으며, 컴퓨터와 직접 연결되는 디지털 시스템도 포함됩니다. 사용 중인 사진 기록 시스템의 종류에 따라 구체적인 지침은 다를 수 있습니다.

FOR MODULE IV
Each group receives:
• 1X TBE buffer
• UltraSpec-Agarose™ Powder
• Tube of diluted SYBR Safe (25 µL)
• 100 bp ladder (30 µL)

🤝 실험 하기 - 학생용

실험 모듈 I: 구강상피세포에서 DNA 추출

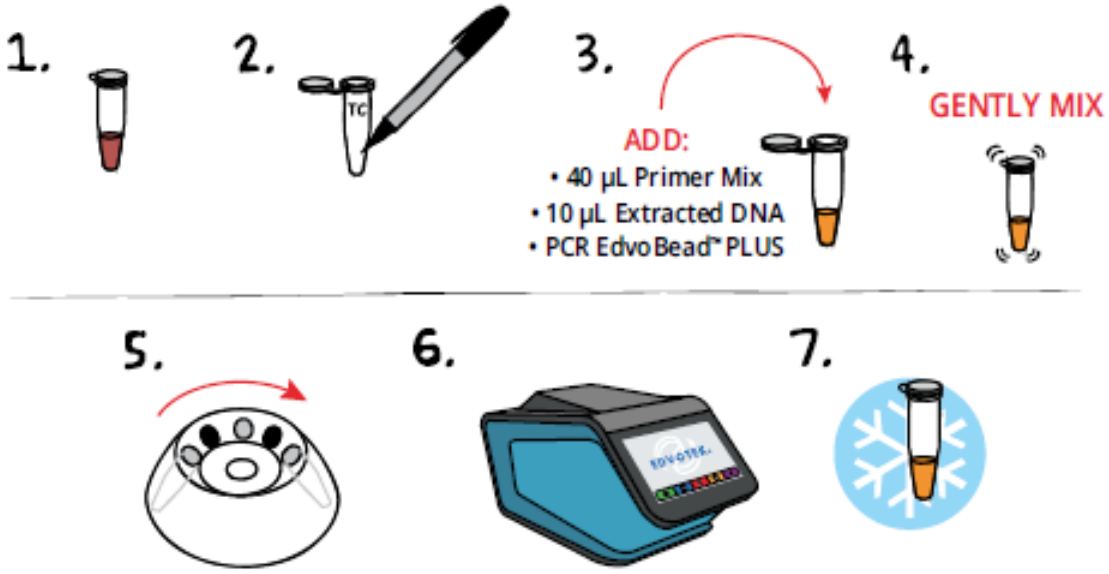


1. **표기:** 비어있는 1.5 mL 스크류캡 마이크로 원심분리 튜브와 생리식염수 컵에 실험 그룹 또는 이니셜로 표기한다. **주의:** 학생들은 샘플을 끓일 때 스크류캡 튜브를 반드시 사용해야 한다.
2. **헹구기:** 10 mL의 생리식염수로 입을 60초 동안 힘차게 헹군 후, 용액을 같은 컵에 다시 뱉는다.
3. **혼합:** 컵을 부드럽게 흔들어 세포를 재현탁한 후, 1.5 mL의 세포 용액을 자신의 이니셜이 적힌 튜브로 옮긴다.
4. **원심분리:** 세포 현탁액을 최대 속도로 2분간 원심분리하여 세포 침전물을 형성한다. 상층액(세포 침전물 위의 액체)을 붓고 **세포 침전물이 방해받지 않도록 주의**한다!
5. **반복:** 3단계와 4단계를 한 번 더 반복한다.
6. **재현탁:** 입안 세포 침전물을 150 µL의 lysis buffer에 피펫으로 위아래로 휘젓거나 강하게 vortex하여 재현탁한다. **주의:** 세포 침전물이 완전히 재현탁되고 세포의 덩어리가 남지 않도록 확인한다.
7. **뚜껑 닫기:** 튜브의 뚜껑을 닫고 bath float에 놓는다. 55°C 항온수조에서 샘플을 5분간 인큐베이션한다.
8. **혼합:** 샘플을 20초 동안 vortex하거나 튜브를 세게 흔들어 혼합한다.
9. **고온 인큐베이션:** 샘플을 99°C 항온수조에서 5분간 인큐베이션한다. **주의:** 학생들은 샘플을 끓일 때 스크류캡 튜브를 반드시 사용해야 한다.
10. **원심분리:** 세포 용해액을 최대 속도로 2분간 원심분리한다.
11. **샘플 옮기기:** 상층액 50 µL를 깨끗하고 표기된 마이크로 원심분리 튜브로 옮긴다. 그 튜브를 얼음 위에 놓는다.

*추출된 DNA는 이제 모듈 II인 PTC 영역 증폭을 위해 준비되었습니다 추출된 DNA는 필요할 때까지 냉동고(-20°C)에 보관할 수 있습니다.

실험 모듈 II: PTC 부위 증폭

이제 모듈 I에서 DNA를 분리했으므로, 다음 단계는 TAS2R38 유전자의 특정 영역을 증폭하는 것입니다. 먼저, 여러분의 DNA(빨간색)와 PTC 프라이머 혼합물(노란색), 그리고 PCR EdvoBead™ PLUS를 결합하여 PCR 샘플을 준비합니다. 이 샘플이 준비되면 PCR기기에 넣어 DNA를 PCR로 증폭할 것입니다.

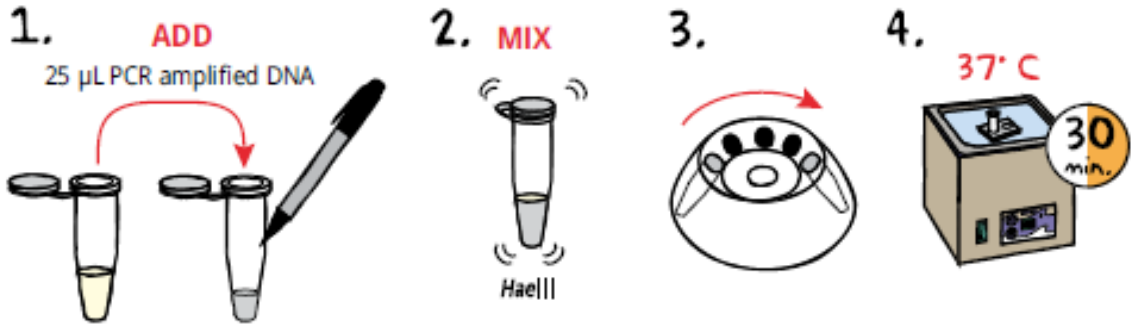


1. **확인:** 모듈 I에서 분리된 빨간색 DNA를 준비합니다.
2. **표기:** 새로운 0.2 mL PCR 튜브에 자신의 이니셜로 표기합니다.
3. **추가:** 40 µL의 PTC 프라이머 혼합물(노란색), 10 µL의 추출된 DNA(빨간색), 그리고 PCR EdvoBead PLUS를 추가합니다.
4. **혼합:** PCR 샘플을 혼합합니다. PCR EdvoBead PLUS가 완전히 녹아 있는지 확인합니다. 올바르게 혼합되면 최종 용액은 연한 오렌지색이 될 것입니다.
5. **원심분리:** 튜브를 몇 초간 원심분리하여 샘플을 튜브 바닥에 모읍니다.
6. **DNA 증폭:** 아래에 나열된 PCR 지침을 사용하여 DNA를 증폭합니다.

증폭된 DNA는 이제 모듈 III인 PTC PCR 생성물의 제한 처리에 맞게 준비되었습니다. 증폭된 DNA는 필요할 때까지 냉동고(-20°C)에 보관할 수 있습니다.

실험 모듈 III: PTC PCR 생성물의 제한효소 처리

모듈 II를 완료한 후에는 PCR 샘플에 TAS2R38 유전자 대상의 수백만 또는 수십억 개의 복사본이 포함되어 있어야 합니다. 이 모듈에서는 PCR 생성물의 절반에 대해 제한 처리를 수행하여 뉴클레오타이드 145에 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)이 존재하는지 확인합니다. 먼저 PCR 혼합물의 절반을 제거하여 HaeIII 제한 효소가 포함된 튜브에 추가합니다. 이 용액은 37°C에서 인큐베이션되어 제한 효소가 DNA 내에서 "GGCC" 서열을 식별하고 절단할 수 있도록 합니다.

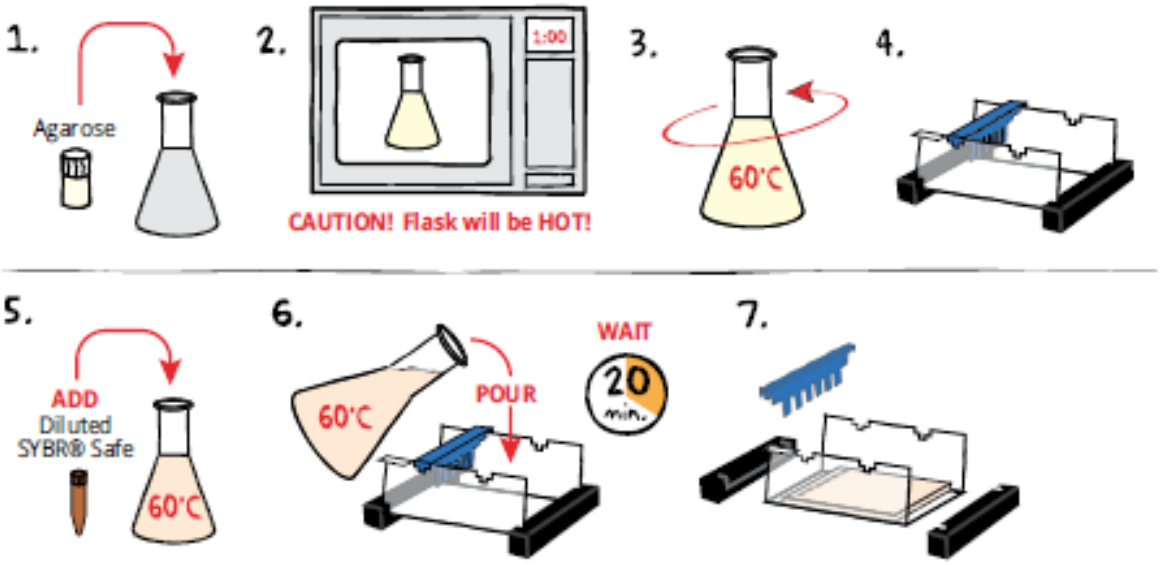


1. **추가:** PCR로 증폭된 DNA 25 µL를 5 µL HaeIII 제한 효소가 들어있는 튜브에 추가합니다. 이 튜브에 자신의 이니셜과 “HaeIII”라고 표기합니다. 나머지 25 µL의 자르지 않은 PCR 생성물은 나중에 대조군으로 설정하기 위해 남겨둡니다.
2. **혼합** 제한 처리, "HaeIII" 튜브를 부드럽게 두드려서 혼합합니다.
3. **원심분리:** 샘플을 튜브 바닥에 모으기 위해 신속하게 원심분리합니다.
4. **인큐베이션:** 제한효소 처리를 37°C에서 30분간 진행합니다.

이제 DNA 샘플은 모듈 IV인 전기영동에 의한 DNA 조각의 분리에 대한 분석을 위해 준비되었습니다.

실험 모듈 IV: 전기영동에 의한 PCR 생성물 분리

모듈 IV에서는 모듈 III에서의 제한 처리 및 비제한 PCR 생성물 두 가지 DNA 샘플에 대해 아가로스 겔 전기영동을 수행합니다. 비제한 샘플과 제한 처리 샘플을 인접한 웰에 로딩하는 것을 추천하지만, 선생님이 겔을 로딩하는 방법에 대한 안내를 할 것입니다. 전기영동이 완료되면 DNA 밴드를 시각화하여 TAS2R38 유전자형을 결정합니다.



SYBR SAFE 염색으로 아가로스 겔 준비하기

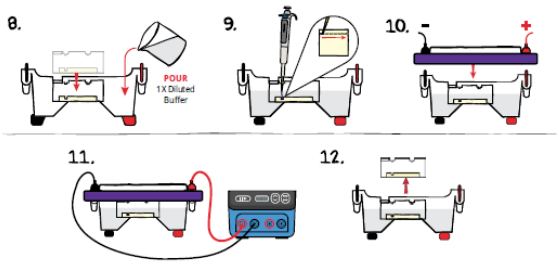
1. **혼합:** 아가로스 가루를 1X TBE 완충액과 250 mL 플라스크에서 혼합합니다 (Table A 참조).
2. **용해:** 아가로스 가루를 끓여서 용해합니다. 전자레인지에서 강한 세기로 1분 동안 용액을 가열합니다. 전자레인지에서 플라스크를 조심스럽게 꺼내고 플라스크를 흔들어 혼합합니다. 아가로스가 완전히 용해될 때까지 15초마다 가열합니다 (용액은 물처럼 맑아야 합니다).
3. **냉각:** 아가로스를 60°C로 냉각시키기 위해 플라스크를 부드럽게 흔들어 열이 고르게 퍼지도록 합니다.
4. **겔 캐스팅 트레이 준비:** 아가로스가 냉각되는 동안 겔 캐스팅 트레이의 끝을 고무 끝 캡으로 밀봉합니다. 적절한 홈에 컴브를 놓습니다.
5. **겔 캐스팅 전:** 냉각된 녹은 아가로스에 희석된 SYBR Safe를 추가하고 플라스크를 흔들어 혼합합니다 (표 A 참조).
6. **붓기:** 냉각된 아가로스 용액을 준비된 겔 캐스팅 트레이에 붓습니다. 겔은 20

Table A — Individual 2.0% UltraSpec-Agarose™ with Diluted SYBR® Stain

Size of Gel Casting tray	1X TBE Buffer	+	Amt of Agarose	=	TOTAL Volume	Diluted SYBR® (Step 5)
7 x 7 cm	25 mL		0.5 g		25 mL	25 µL
10 x 7 cm*	45 mL		0.9 g		45 mL	45 µL
14 x 7 cm	50 mL		1.0 g		50 mL	50 µL

분 이내에 완전히 고체화되어야 합니다. 겔이 고체화되면서 겔이 단단해지고 투명도가 감소합니다.

7. **끝 캡과 컴브 제거:** 끝 캡과 컴브를 제거합니다. 웰이 손상되지 않도록 컴브를 제거할 때 특히 주의하십시오.



8. **겔 배치:** 겔(트레이 위)을 전기영동 챔버에 놓습니다. 1X TBE 전기영동 완충액으로 겔을 덮습니다(추천 부피는 Table B를 참조하십시오). 겔이 완전히 잠기도록 합니다.

9. **샘플 로딩:** Table 1을 참고하여 모든 샘플(25 µL)을 웰에 순차적으로 로딩합니다.

Table 1 : Gel Loading

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. **겔 정렬 확인:** 겔의 방향이 올바른지 확인한 후, 안전 커버를 챔버에 올립니다. DNA 샘플이 양극(적색 전극) 쪽으로 이동한다는 점을 기억하십시오.

11. **전원 연결:** 리드선을 전원에 연결하고 전기영동을 수행합니다(시간 및 전압 지침은 Table C를 참조하십시오).

Table B

1x TBE Electrophoresis Buffer (Chamber Buffer)

EDVOTEK Model #	Total Volume Required
EDGE™	150 mL
M12	400 mL

Table C

Time and Voltage Guidelines (2.0% Agarose Gel)

	Electrophoresis Model	
	EDGE™ (10 x 7 cm gel)	M12 (14 x 7 cm gel)
Volts	Min/Max (minutes)	Min/Max (minutes)
150	20/30	30/40
100	35/45	45/55
75	NA	60/70

12. **겔 제거:** 전기영동이 완료된 후, 겔과 캐스팅 트레이를 전기영동 챔버에서 제거합니다.

SYBR 겔 시각화

13. **겔 이동:** 겔을 캐스팅 트레이에서 슬라이드하여 트랜스일루미네이터의 시각화 표면으로 옮깁니다.
14. **전원 켜기:** 장치를 켭니다. DNA는 어두운 배경 위에 밝은 녹색 밴드로 나타나야 합니다. 결과를 사진으로 기록합니다.
15. **전원 끄기:** 장치를 끕니다. 겔을 제거하고 폐기하며 트랜스일루미네이터의 표면을 증류수로 청소합니다.

실험 모듈 V: PTC 용지를 사용해 쓴 맛 테스트

이번 최종 모듈에서는 대조 종이와 PTC 종이를 맛보아 자신의 표현형을 결정합니다. 먼저 대조 종이를 맛보고, 그 다음에 PTC 코팅 종이를 맛보는 것이 중요합니다. 대조 종이는 약간의 맛이 있어 PTC 코팅 종이를 맛보기 전에 tasting해야 합니다. 이후 PTC 종이를 맛보며 대조 종이와의 차이에 주의합니다.

과정:

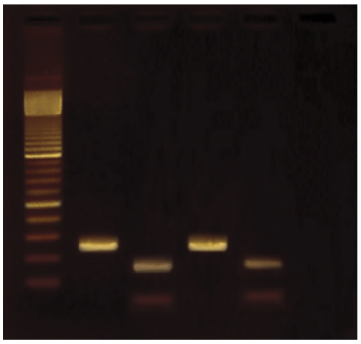
1. **대조 종이 맛보기:** 먼저 대조 종이를 맛보고 그 맛에 대해 기록합니다.

2. **PTC 종이 맛보기:** 그 다음, PTC 종이를 맛보고 그 맛에 대해 기록합니다.
3. **대조 종이와 PTC 종이의 맛 비교:**
    - PTC 종이의 맛을 대조 종이에 비해 어떻게 느끼는지 확인합니다: 강하게 쓴맛, 다소 쓴맛, 또는 무미인지.
    - 만약 당신이 맛을 느끼는 사람(taster)이라면, PTC 종이 스트립은 쓴맛이 날 것입니다. 맛을 못느끼는 사람(non-taster)은 두 종이 스트립 간의 차이를 느끼지 못할 것입니다.

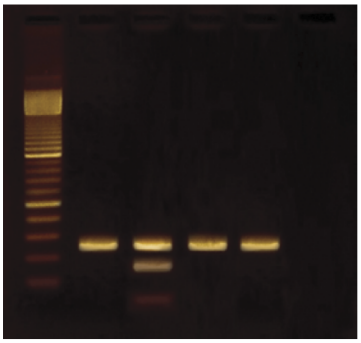
결과 분석:

1. 모듈 IV에서 결정한 유전자형을 PTC 스트립을 맛보았을 때 관찰된 표현형과 비교합니다. 결과가 일치하나요?
2. 당신은 동형 접합 쓴맛 맛보는 사람(homozygous bitter taster), 이형 접합 쓴맛 맛보는 사람(heterozygous bitter taster), 아니면 비맛 보는 사람(non-taster)인가요?

🔑 실험 결과 및 분석

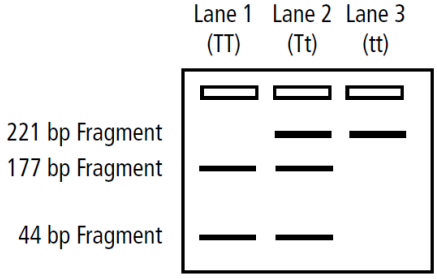


Lane	Sample	Size
1	100 bp ladder	Bands range in size from 100 bp – 4000 bp in 100 bp increments. High intensity reference band at 500 bp.
2	Control DNA, uncut	221 bp
3	Control DNA, cut	177, 44 bp
4	Student DNA, uncut	221 bp
5	Student DNA, cut	177, 44 bp



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 2 DNA, cut	221 bp

주의: 일부 샘플에서는 "프라이머 다이머(primer dimer)"라고 알려진 확산된 저분자량 밴드가 나타날 수 있습니다. 이는 PCR 부산물이며 무시할 수 있습니다.



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

- **동형접합 맛보는 사람 (Homozygous Taster):** 유전자의 두 복사본 모두 다형성을 포함하여 HaeIII에 의해 분해될 수 있습니다.
- **이형접합 맛보는 사람 (Heterozygous Taster):** 유전자의 한 복사본이 다형성을 포함하여 HaeIII로 분해될 수 있습니다. 다른 복사본은 제한 부위가 없어 분해되지 않습니다.
- **동형접합 비맛보는 사람 (Homozygous Non-taster):** 유전자의 어느 복사본에도 다형성이 포함되어 있지 않아 HaeIII가 이 DNA를 분해할 수 없습니다.

주의: 221 bp 및 177 bp 밴드는 44 bp 밴드보다 더 밝게 나타납니다.

부록 B

전기영동 완충액 및 아가로스 젤의 대량 준비

시간을 절약하기 위해, 전기영동 완충액과 아가로스 젤 용액은 전체 학급이 공유할 수 있는 더 큰 양으로 준비될 수 있습니다. 남은 희석 완충액은 나중에 사용할 수 있으며, 굳어진 아가로스 젤 용액은 다시 녹일 수 있습니다.

대량 1X TBE 전기영동 완충액

이번 실험에서는 수업에서 공유할 수 있도록 대량으로 1X TBE 전기영동 완충액을 준비하는 것을 추천합니다. 사용하지 않은 희석된 완충액은 나중에 사용할 수 있습니다.

1. **물 측정:** 증류수 또는 탈이온화된 물 3.7 L를 측정하여 큰 용기에 담습니다. (주의: 갤런 자루에서 구매한 물을 사용할 경우, 80 mL의 물을 제거하고 폐기합니다.)
2. **혼합:** TBE 전기영동 완충액 파우더 전체를 용기에 추가하고 잘 혼합합니다.
3. **표기:** 용기에 "1X TBE Electrophoresis Buffer"라는 라벨을 붙입니다.
4. **사용:** 준비한 후 60일 이내에 사용합니다.

배치 아가로스 겔 (2.0%)

2.0% 아가로스 겔의 대량 준비는 Table E에 나와 있습니다.

Table E — Batch Prep of 2.0% UltraSpec-Agarose™

Amt of Agarose	+	1x Electrophoresis Buffer
8.0 g		400 mL

1. **완충액 측정:** 1X TBE 전기영동 완충액 400 mL를 측정하여 500 mL 플라스크에 붓습니다.
2. **아가로스 추가:** 준비된 완충액에 UltraSpec-Agarose™ 8.0 g을 붓고, 덩어리를 분산시키기 위해 흔들어줍니다.
3. **솔루션 레벨 표시:** 마킹 펜으로 플라스크 외부에 용액의 레벨을 표시합니다.
4. **용해:** 아가로스 용액을 이전에 설명한 대로 개인 겔 준비를 위해 가열합니다. 전체 겔 완충액의 더 큰 부피로 인해 가열 시간이 조정되어야 할 수 있습니다.
5. **냉각:** 아가로스 용액을 60°C로 냉각시키고 고르게 열이 분산되도록 흔들어줍니다. 증발이 발생한 경우, 3단계에서 표시된 원래 부피까지 증류수를 추가합니다.

6. **염색 추가:** SYBR Safe로 염색할 경우, 희석된 SYBR Safe 전체를 냉각된 아가로스에 추가하고 잘 혼합합니다.
7. **겔 캐스팅을 위한 용액 분배:** 각 겔에 필요한 부피만큼 냉각된 아가로스 용액을 분배합니다. 7 x 7 cm 겔의 경우 25 mL, 7 × 14 cm 겔의 경우 50 mL가 필요합니다. 이번 실험에서는 7 x 7 cm 겔을 추천합니다.
8. **고체화:** 겔이 완전히 고체화될 때까지 기다립니다. 약 20분 후 겔이 단단해지고 만지면 차가워집니다. 그런 다음 전기영동을 위한 겔 준비를 진행합니다. 또는 겔을 수밀성 플라스틱 봉지에 1X 전기영동 완충액 2 mL와 함께 담아 냉장고에서 최대 1주일까지 보관할 수 있습니다.