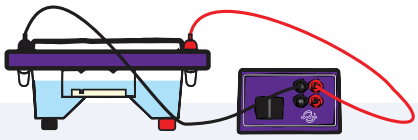
실험 가이드북

DNA 손상과 수선

DNA Damage and Repair

 # ED957



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

학생들은 UV 광선이 DNA에 미치는 영향을 직접 관찰합니다. 시간에 따른 UV에 노출된 플라스미드 샘플을 비교하여 실험을 진행하고 전기영동을 이용해 결과를 분석합니다. DNA 손상을 예방하는 선크림의 효능을 실험할 수 있습니다.

제품 구성품

	시약	보관방법
A	DNA Standard Marker	-20℃ 냉동보관
B	플라스미드 DNA 기질	-20℃ 냉동보관

UltraSpec-Agarose

Electrophoresis buffer (50x)

10x Practice Gel Loading Solution

SYBR Safe Stain

Microtest tubes

필요 장비 및 준비물

전기영동 장치, 전원공급장치, 피펫과 피펫팁, 전자저울, 전자레인지(핫플레이트), 항온수조(65℃), 250mL삼각플라스크, 안전장갑, 증류수, UV 일루미네이터, 선크림, 비닐랩, UV차단 고글

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

배경 지식

음악, 그림, 날씨예보, 사진 등에서 태양은 언급되며, 그만한 이유가 있습니다. 식물을 만들며, 지구를 따뜻하게 유지하며, 서로 볼 수 있게 해줍니다. 또한 건강을 유지해주는 이점이 있습니다. 햇볕은 비타민 D를 생산하는데 도움을 주어 수면이 잘 이루어 지도록 하고 차분하고 행복한 기분을 느끼게 해줍니다. 그러나 발암요소(carcinogen)를 가지고 있습니다. 과학자들은 태양광선과 우리 세포 간의 상호작용을 연구하여 노출이 암 발생을 유발하는 방식과 위험을 최소화하고자 연구하고 있습니다. 이 실험에서는 분자 생물학을 통해 UV파장의 빛과 DNA 손상 관계를 탐구합니다.

볼 수 없는 햇살: 자외선 UV

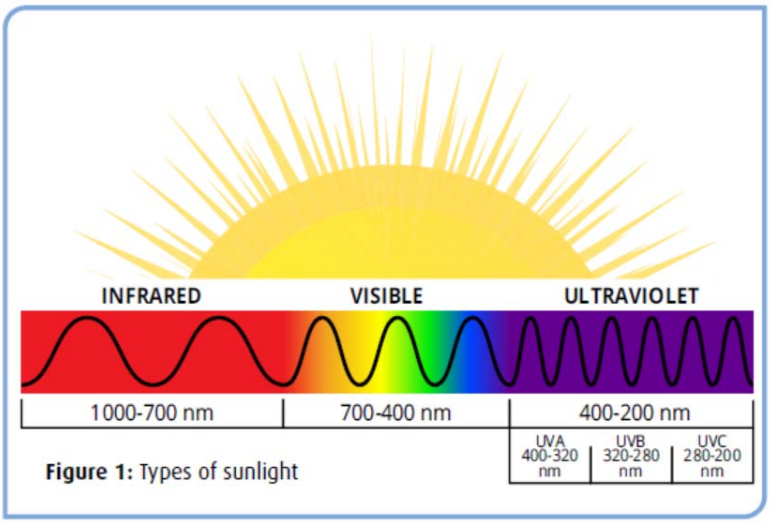


Figure 1: Types of sunlight

매시간마다 약 430 십조 (430,000,000,000,000,000,000) 주의 태양 에너지가 지구를 타격합니다. 이는 매우 많은 양의 에너지입니다. 사실, 이는 인류가 전 세계에서 사용하는 전체 에너지 양과 매우 유사합니다! 태양으로부터의 에너지 (햇살)는 다른 빛 유형의 혼합물 또는 스펙트럼입니다. 이러한 유형은 대략적으로 적외선 에너지(열로 느껴지는 것), 우리가 볼 수 있는 가시광선, 그리고 느낄 수 없고 볼 수 없지만 매우 큰 에너지를 지니는 자외선으로 대략적으로 세 가지 범주로 나눌 수 있습니다(Figure 1).

세 가지 태양광 하위 유형 중 자외선 (UV) 빛은 가장 큰 암 발생 위험을 가지고 있으며, 이는 짧은 파장이 가장 많은 에너지를 지니기 때문입니다 (Box 1). UV 빛은 1801년 독일 물리학자 요한 리터 (Johann Ritter)가 발견했는데, 보라색 이상의 불가시광선에 노출된 후 은염화 은 종이가 색상을 변화시킨 것을 관찰하였습니다. 그는 "이상 보라색" 또는 "자외선" 빛이 은염화 은 분자에 에너지를 폭발시켜 그 구성 요소들로 분해시키기 때문이라고 추론했습니다.

Box 1.
물리학에서 빛은 파동과 입자 모두인 것으로 배웠을 수 있습니다. 이것은 빛을 에너지 패킷(예: 광자)으로 또는 시간에 따라 변하는 전기 및 자기장 (예: 전자기파)으로 설명할 수 있다는 것을 의미합니다. 빛의 이 두 가지 측면은 다음과 같은 관계를 가지고 있습니다.
높은 에너지 = 짧은 파장
낮은 에너지 = 긴 파장

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

가장 많은 에너지를 지닌 자외선 빛은 전자를 원자에서 떼어내게 할 수 있습니다. 이 과정을 이온화라고하며, 이는 원자의 화학적 특성을 변화시키며 종종 기존의 화학 결합을 분해하고 새로운 결합을 형성합니다. 이온화 자외선 빛은 UVC라고합니다. 그러나 대기권이 감마선, X선 및 UVC 광선과 같은 더 높은 에너지 파장을 흡수하고 반사하기 때문에 지구 상에는 UVC가 거의 존재하지 않습니다. 대신 지구 표면에 도달하는 자외선 빛은 대부분 UVA와 UVB의 형태로 존재합니다. 이 두 종류의 자외선 빛은 파장이 약간 더 길어 에너지가 덜하기 때문에 전자를 제거할 수 없습니다. 그러나 UVA와 UVB에 있는 에너지는 세포에 영향을 미칩니다. 포유류 세포에서 두 유형의 자외선 빛은 비타민 D의 합성을 유도합니다. 하지만, 두 유형의 자외선 빛은 세포 내의 비타민 A와 콜라겐을 분해시키기도 합니다. 이로 인해 피부 세포는 탄력을 잃게 되며, 반복적인 태양 (또는 인공 태닝) 노출로 인한 조기 주름과 피부 처진 것의 주요 원인이 됩니다. 마지막으로, UVB 빛은 세포의 유전 코드를 손상시켜 심각한 건강 문제인 세포 사멸, 돌연변이, 암 등을 유발할 수 있습니다.

태양의 이면: DNA 손상

DNA는 생명의 유전적 지침을 포함하는 핵산의 스레드 모양의 자가복제 체인입니다(Figure 2). 이 분자가 UVB 광선에 포함된 고에너지에 노출되면 여러 가지 일이 발생할 수 있습니다. 대부분의 경우 99.9%는 아무 일도 일어나지 않습니다. DNA 분자의 분자 구조는 매우 안정적이며 UV 방사선을 처리하는 데 능숙합니다. 이러한 경우 DNA 분자는 UV 에너지를 흡수하고, 열로 전환한 다음, 열을 다시 환경으로 방출합니다.

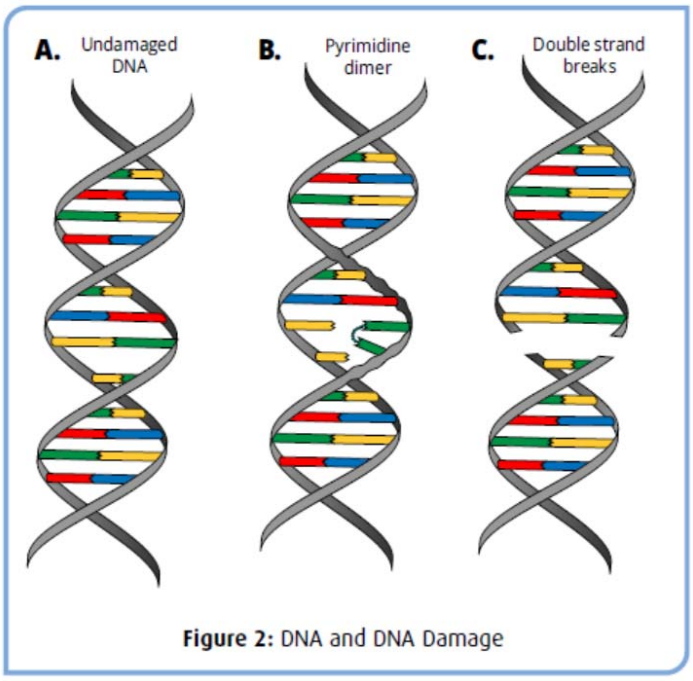


Figure 2: DNA and DNA Damage

DNA는 생명의 유전 지시사항을 담고 있는 자가 복제성이 있는 염색체인 핵산 체인입니다 (그림 2). 이 분자가 UVB 광선에 포함된 고에너지에 노출되면 여러 가지 일이 벌어질 수 있습니다. 그러나 99.9%의 경우에는 아무 일도 일어나지 않습니다. DNA 분자의 분자 구조는 UV 방사선을 처리하기에 매우 안정적이며 숙련되어 있습니다. 이러한 경우 DNA 분자는 UV 에너지를 흡수하고 열로 변환한 다음 이 열을 다시 환경으로 방출합니다.

이 포착 및 방출 과정은 빠르지만 여전히 위험합니다. 왜냐하면 일시적으로 DNA 분자를 더 높은 반응성과 더 높은 에너지 상태로 만들기 때문입니다. DNA가 반응성일 때 새로운 결합이 형성되고 주요 구조 결합이 파괴될 수 있습니다. 예를 들어 UVB 노출 후, 보통 상대적으로 반대쪽 염색체에서 수평으로 결합하는 DNA 뉴클레오타이드가 대신 상하에 있는 뉴클레오타이드와 결합할 수

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

있습니다. 이는 DNA 내의 새로운 구조인 피리미딘 이중체(pyrimidine dimer)를 만듭니다 (그림 2B). 드물게는 연결된 두 인접한 뉴클레오타이드의 인산기와 당기 구간 사이의 결합이 끊어지면서 염색체가 나눠지는 염기 서열 단절이 일어납니다. 단일 염기 단절 또는 닉(nick)은 DNA 이중 나선의 한쪽면만 손상되는 경우입니다. 특정 상황에서는 이러한 단절이 DNA 분자가 복제를 위해 스스로 풀어지도록 돕는 경우가 있으며, 이것이 세포가 때때로 의도적으로 이를 생성하는 이유이며 그러한 경우 많이 회복될 수 있습니다. 더 심각하고 회복하기 어려운 것은 이중 나선 단절 (doubl strand breaks)입니다(그림 2C). 이중 나선 단절은 서로 가까운 곳에서 DNA 나선 양쪽에서 단절이 형성되는 경우입니다.

DNA는 유전적인 생명의 지침을 포함하는 염기 쌍의 스레드 모양의 자가 복제 체인입니다 (그림 2). 이 분자가 UVB 광선에 내재된 고에너지에 노출되면 여러 가지 일이 발생할 수 있습니다. 대부분의 경우, DNA 분자의 분자 구조는 고도로 안정되어 있으며 UV 방사선을 처리하는 데 능숙합니다. 이러한 경우, DNA 분자는 UV 에너지를 흡수하여 열로 변환하고, 이후에는 열을 환경으로 방출합니다. 이 포획 및 방출 과정은 빠르지만 여전히 위험합니다. 왜냐하면 이것은 일시적으로 DNA 분자를 더 높은 반응성 에너지 상태로 놓게 만듭니다. DNA가 반응성 상태일 때 새로운 결합이 형성되고 중요한 구조 결합이 파괴될 수 있습니다. 예를 들어, UVB 노출 이후에 일반적으로 반대쪽 연속체의 다른 염기와 수평으로 결합하는 DNA 염기는 대신 그 위나 아래에 있는 염기와 결합할 수 있습니다. 이렇게하면 DNA 내에서 새로운 구조가 형성되며 이것을 피리미딘 이머 (그림 2B)이라고 합니다. 덜 빈번하게는 염기 사이의 인산기와 당기의 결합이 끊어지면서 염기쌍의 더불어 있는 한 쪽면만 손상된 단일 염기쌍의 끊기가 발생합니다. 특정 상황에서는 이러한 끊기가 실제로 DNA 분자가 복제를 위해 스스로 해제하는 데 도움이되므로 세포가 의도적으로 이러한 끊기를 만드는 경우도 있습니다. 그리고 이러한 끊기는 종종 회복됩니다. 더욱 심각하고 회복하기 어려운 것은 두 개의 끊기가 서로 가까이 위치한 DNA 나선의 양쪽면에 생기는 이중 염기쌍의 끊기 (그림 2C)입니다.

DNA를 복사하는 과정에서 발생하는 복사 오류는 DNA 염기 서열의 변화를 의미합니다. 이러한 변화가 단백질 코딩 영역에서 발생하면 비정상적인 단백질이 생성되며, 이러한 비정상적인 단백질이 세포 성장, DNA 수리 또는 종양 억제와 관련되어 있으면 결국 암으로 이어질 수 있습니다. 암 세포는 계속해서 성장과 분열을 하며 (필요 없는, 오래된 또는 손상된 경우에도), 이와 유사한 또 다른 세포들을 생성합니다. 이러한 결과로 생긴 암 종양은 주변 조직을 침입하고, 몸의 다른 부위로 번지며, 결국 치명적일 수 있습니다. UV 노출의 경우, 주요한 암 종류는 기저세포암, 편평세포암, 멜라노마 등이 있습니다.

예방과 치료

다행히, 대부분의 자외선 노출 사례는 암으로 이어지지 않습니다. 대신, 세포들은 손상된 DNA를 예방, 수리 또는 격리하는 데 진화해왔습니다. 방어 기작은 DNA의 견고한 구조와 세포 내에서의

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

조심스러운 포장으로 시작됩니다. 또한, 세포가 DNA를 위한 화학 보디가드 역할을 하는 색소를 생성할 때 추가적인 보호가 제공됩니다 (Box 2 참조). 손상, 결합 또는 복사 오류가 발생할 때,

DNA는 이러한 비정상성을 식별하고 빠르게 수리합니다. 사실, 세포들은 지속적으로 수리 작업을 실행하여 UV 에너지에 의해 생성된 화학적 변화를 되돌리거나 잠재적으로 손상되고 위험한 DNA영역을 제거하고 대체합니다.

Box 2.
지구 대기가 표면에 가장 높은 에너지의 빛 파장이 도달하는 것을 막는 것과 비슷하게, 우리의 피부는 체내의 나머지 부분을 자외선 방사선으로부터 보호합니다. 피부가 이를 수행하는 한 가지 방법은 체내에서 높은 자외선 수준에 노출될 때 멜라닌(자외선 에너지를 흡수하는 화합물)을 생성하는 것입니다. 그래서 여러분이 본 태닝은, 체내 세포가 파괴적인 태양 광선에 노출되었음을 나타내는 신호이자, 여러분의 몸의 미사일 방어 시스템으로 생각할 수 있습니다.

그러나 일부 경우에는 너무 많은 수리가 필요합니다. 이런 경우 세포는 프로그램된 세포사멸 또는 아포토시스 과정을 시작할 수 있습니다. 이것은 하나의 세포를 교체하는 것이 많은 손상된 DNA를 수리하는 것보다 덜 에너지를 소비하고 훨씬 덜 위험하기 때문에 다세포 생물에서 특히 흔합니다! 일광 화상을 경험해 보신 적이 있다면, 많은 손상된 세포들이 죽습니다. 이렇게 많은 세포들이 죽으면 염증이 발생하여 피부가 붉어지고 따끔하고 가려워지며 민감해집니다. 그러나 이러한 불쾌한 증상은 이제 주로 부담을 더하는 세포들을 제거할 수 있도록 강력한 방어 기능을 제공합니다.

당신의 피부과 의사(또는 엄마)가 말해 준 대로, 일광 화상의 위험을 최소화하는 현명한 선택을 할 수도 있습니다. 이에는 언제 얼마나 오래 태양에 노출되어 있을지, 보호용 옷과 안경을 입을 것, 그리고 선크림을 바르는 것 등이 포함됩니다.

우리는 태양에 노출될 때 일어날 수 있는 일광화상 및 DNA 손상 위험을 최소화하기 위해 현명한 선택을 할 수 있습니다. 이러한 선택에는 태양에 노출될 때 언제와 얼마나 오래 머물러야 하는지 알아내는 것, 보호용 의류와 안경을 착용하는 것, 그리고 선크림을 바르는 것이 포함됩니다.

선크림은 수천 년간 인류의 생존 병기 중 하나였습니다. 초기 필리핀과 말레이시아 선원들은 식물, 쌀, 향신료를 섞은 페이스트를 사용하여 얼굴을 보호했고, 고대 그리스인들은 올리브 오일을 사용했습니다. 최초의 현대적인 선크림 중 하나는 RVP (빨간색 수의 예방제)로 불리는 끈적거리는 붉은 물질이었습니다. 제2차 세계 대전 중 미국 군인들이 남태평양에서 사용했습니다. 그 후, 1946년에 오스트리아의 화학자인 프란츠 그라이터 박사는 알프스 산악 등반 중 특히 심한 태양 안면 색소 침착을 겪은 후 더 쾌적하고 효과적인 버전을 개발했습니다. 그라이터는 또한 SPF (Sun Protection Factor)를 기반으로 선크림을 설명한 첫 번째 사람이었으며, 그의 제품은 SPF 2 정도였습니다.

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

오늘날의 선크림은 자외선을 흡수하거나 반사하는 화학물질을 결합하여 작용합니다. 예를 들어, 일부 선크림은 산화아연과 이산화티타늄과 같은 무기 화합물을 포함하여 피부 위에 남아 자외선을 산란시킵니다. 다른 선크림은 옥시벤존과 옥티녹싸트와 같은 유기 화합물을 포함하여 피부로 스며들어 UV 광선에서의 에너지를 흡수합니다. 선크림은 많이 발전해왔지만, 과학자들은 이러한 혼합물을 보다 안전하게, 방수성과 지속성을 개선하며 환경에 더 안전하게 만들기 위해 노력하고 있습니다.

UV 빛과 DNA 손상 연구에 생명과학 기술 활용하기

붉은 태닝이나 일광 화상은 UV 빛이 누군가의 DNA에 영향을 미치고 있음을 식별하는 하나의 방법일 수 있지만, 이러한 관계를 연구하거나 새로운 보호 장치를 시험하는 데에는 이상적인 도구는 아닙니다. 대신, 과학자들은 PCR (Polymerase Chain Reaction), 전기 영동 및 형광 단백질과 같은 생물공학 기술을 사용하여 이 보이지 않는 빛이 세포와 분자에 미칠 수 있는 영향을 관찰하는 데 도움을 받습니다.

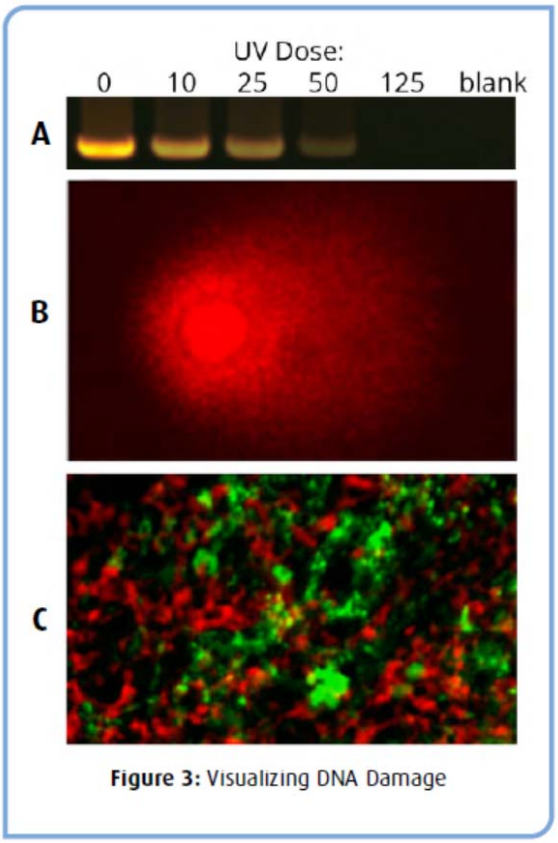


Figure 3: Visualizing DNA Damage

과학자들은 시험관에서 수행되는 인공적인 DNA 복제 유형인 Polymerase Chain Reaction(PCR)을 사용하여 다른 UV 조건에 노출된 DNA 용액을 비교할 수 있습니다(그림 3A). 손상된 DNA는 효소 폴리머라제에 의해 복사될 수 없기 때문에, 많은 손상을 입은 PCR 샘플은 잘 증폭되지 않습니다. 그 결과, 다른 샘플에서 증폭된 DNA 양을 비교함으로써 연구자는 어떤 UV 조건이 가장 강한 손상 효과를 미쳤는지를 결정할 수 있습니다.

다른 인기 있는 방법은 Comet Assay(그림 3B)입니다. 이 방법에서는 세포를 아가로스와 혼합한 다음, 용해하고(분해) 전기영동을 거친 후 염색합니다. 전기영동에 의해 파열된 세포와 핵 내의 DNA가 이동합니다. 손상되지 않은 DNA는 크기가 크고 함께 모여 있으므로 아가로스를 통해 느리게 이동하며, 손상된 작은 DNA 조각은 빠르게 이동합니다. 이는 각 세포가 중심에 손상되지 않은 DNA 덩어리와 손상된 DNA 꼬리를 가진 혜성 모양으로 나타나게 합니다. 꼬리가 길수록 세포 내부에서 더 많은 손상이 발생한 것입니다.

보다 최근의, 아직은 명명되지 않은 방법으로, 과학자들은 다양한 유형의 DNA 손상(피라미드 다

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

이며, 단일 가닥 절단 등)을 포함하는 원형의 DNA 조각과 화려한 형광 단백질 유전자를 함유한 원형의 DNA 조각들을 만듭니다. 그런 다음 이러한 DNA를 다른 생물 세포에 삽입하고 형광 현미경으로 이러한 세포를 관찰합니다(그림 3C). 삽입된 DNA를 수리할 수 있는 경우, 색상 단백질이 생성되고 해당 세포가 형광을 내게 됩니다. 이 방법을 사용하여, 과학자들은 세포들이 종종 특정 유형의 DNA 수리에 전문화된다는 것을 발견했습니다.

이 키트의 실험

이 실험실에서는 UV 노출시간대별로 DNA 샘플을 만들고, 아가로스 젤 전기영동법을 사용하여 손상을 관찰하고 비교할 것입니다. 또한 여러 종류의 선크림으로 보호된 샘플을 비교할 수도 있습니다. 통제 샘플로 노출되지 않은 DNA 샘플을 포함하는 것이 좋습니다.

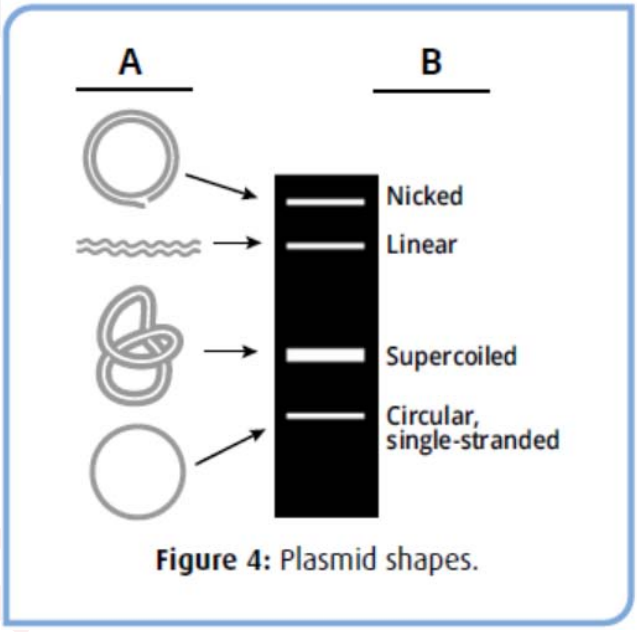


Figure 4: Plasmid shapes.

아가로스 겔 전기영동을 사용하여 DNA 손상을 확인하는 것은 플라스미드 DNA라는 특정 유형의 DNA를 사용해야합니다. 보통 원형으로 나타내지만, 대부분의 플라스미드 DNA 샘플은 다양한 형태의 분자로 이루어져 있습니다(그림 4a). 가장 일반적인 형태의 DNA는 손상되지 않은 플라스미드 샘플에서 super coil 형태입니다. 이 구성에서 DNA 염기 서열은 꼬여 있으며 자신 또는 근처의 다른 염기 서열에 감겨 매우 압축된 형태를 띠고 있습니다. 이 형태는 하나의 염기 서열이 손상되거나 "칼집"이 날 때 원형이 될 수 있습니다. 이는 이러한 유형의 단일 염기 손상이 꼬임 긴장을 해제하기 때문입니다. Super coil 플라스미드는 두 가닥이 손상될 때, 즉 이중 가닥 끊어짐이 발생할 때 선형 DNA가 될 수 있습니다. 마지막으로, 일부 실험 절차는 플라스미드의 두 가닥을 분리시킬 수 있습니다. 이는 원형 및 단일 가닥 DNA 분자를 생성합니다.

슈퍼코일된 플라스미드는 두 가닥이 손상될 때 선형 DNA 가 될 수도 있습니다. 이 경우 더 이상 supercoil 이 유지되지 않아 매우 긴 형태로 늘어납니다. 마지막으로 일부 실험실 절차는 플라스미드의 두 가닥을 분리할 수 있습니다. 이는 원형과 단일 가닥 분자를 만듭니다.

아가로스 겔에서 이러한 다른 모양들은 구분된 밴드(band)를 형성합니다(Figure 4b). 원형 단일 가닥 DNA 는 작으며 빠르게 이동합니다. 존재할 때, 하단의 밴드를 형성합니다. 밀도가 높은, 슈퍼코일된 플라스미드는 아가로스를 빠르게 통과합니다. 대부분의 샘플에서 가장 집중되어 가장

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

밝은 밴드를 형성합니다. 그 위에는 선형 및 nick (plasmid DNA 의 한 가닥이 손상된 형태) 플라스미드 분자로 만들어진 밴드가 있습니다. 이 두 밴드의 순서는 플라스미드의 크기에 따라 다릅니다. 큰 플라스미드는 선형 DNA 밴드가 위에 있고, 작은 플라스미드는 nick 플라스미드 밴드가 위에 있습니다. 때로는 더 큰 희미한 밴드나 DNA 의 스미어도 겔 상단에 나타납니다. 이러한 밴드는 서로 꼬여서 큰 플라스미드 복합체를 형성한 플라스미드로 생성됩니다.

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

전체 실험 개요

모듈 I 준비

선크림 준비

선크림을 추가하는 것은 보다 개방적인 실험을 만들고 이 발명품의 건강상 이점에 대해 논의하는 좋은 방법입니다. 우리의 실험에서는 대부분의 선크림 - 심지어 SPF가 낮은 것들도 - 이중 염기가 포함된 DNA(plasmid DNA)를 손상으로부터 보호합니다. 따라서, 우리는 몇몇 학생 그룹이 자신들의 plasmid DNA 시험관에 선크림을 사용하지 않고 실험을 진행하도록 권장합니다. 이렇게 하면 수업에서 아가로스 겔 상에서 DNA 손상을 여전히 관찰할 수 있습니다.

모듈 II 준비

UV 노출을 이용한 DNA 손상

1. 플라스미드 DNA 시약 120µL을 10개의 원심분리기 튜브에 나누어 넣어줍시다. (이는 가장 작은 튜브입니다 - 얇은 벽면으로 인해 자외선 노출을 극대화할 수 있습니다.)
2. 원심분리기 튜브 10개에 "10x Gel Load"라고 마킹하고, 각각에 10x 젤 로딩 용액 35µL을 넣어줍시다.
3. 각 그룹에게 비어있는 원심분리기 튜브 5개씩을 제공합니다.
4. 트랜스 일루미네이터가 적절한 자외선 파장을 가지고 있는지 확인해합니다. 플라스미드 DNA는 300nm 이하의 파장을 가진 자외선 빛에만 손상을 입습니다.
5. 선크림을 사용한다면, 트랜스 일루미네이터의 디스플레이 판에 비닐랩을 붙여주세요. 이렇게 하면 튜브에 도달하는 자외선 빛의 세기에는 영향을 주지 않으면서 사용 후 청소가 쉽습니다.

*각 그룹룹당 Plasmid DNA 튜브, 10x Gel Load 튜브, 5 개의 빈 튜브, 선크림이 주어져야 합니다.

모듈 III 준비

SYBR Safe Stain 염색 준비

1. 1x 전기영동 버퍼를 준비하기 위해 키트에서 제공된 50x 농축 버퍼 10µL 와 증류수 490µL 를 섞습니다.
2. SYBR Safe 용액 튜브에 위에서 만든 1x 버퍼 용액 250µL 를 넣고 튜브를 두드려 섞습니다. 이제 아가로스 젤 준비가 되었습니다.

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

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 30-40 분 정도 필요합니다. 아래 3 가지 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.

- 미리 젤을 만드는 경우

젤은 미리 만들어 나중에 사용할 수 있습니다. 고체화된 젤은 밀봉 봉지에 작은 양의 버퍼를 첨가하여 냉장고에 최대 1 주일 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:

DNA Standard 마커를 라벨링된 원심분리기튜브에 30µL 씩 나누어 담아 하나씩 나눠줍니다.

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

부록 B.

Table D — Bulk Preparation of Electrophoresis Buffer

50x Conc. Buffer	+	Distilled Water	Total Volume Required
60 mL		2,940 mL	3000 mL (3 L)

Table E — Batch Prep of 0.8% UltraSpec-Agarose™

Amt of Agarose	+	Concentrated Buffer (50X)	+	Distilled Water	=	TOTAL Volume	
2.4 g		6.0 mL		294 mL		300 mL	Cool to 60°C, ADD entire tube of diluted SYBR Safe

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

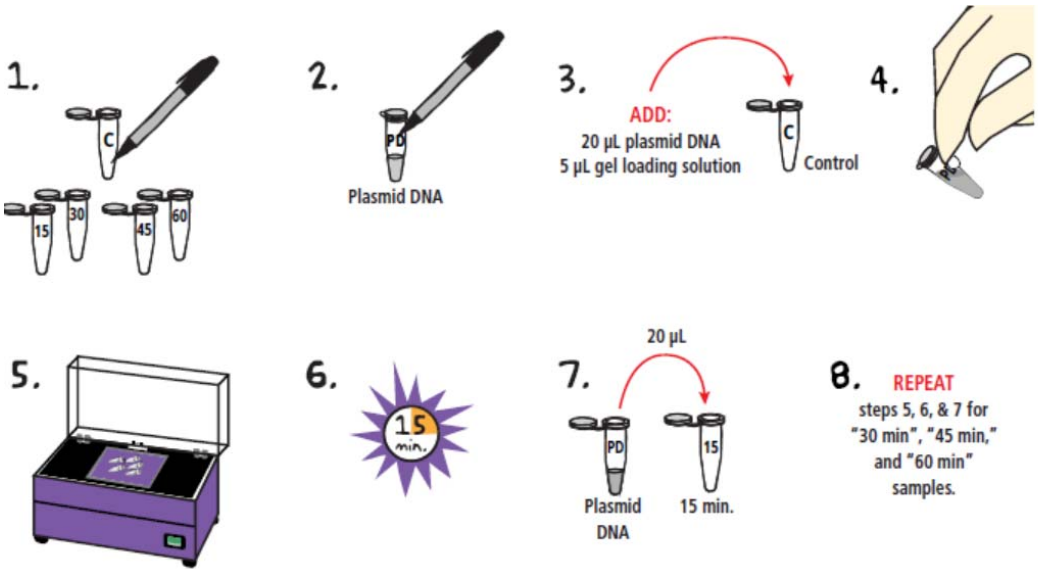
모듈 I: 선크림 실험 준비

1. 수업에서, 선크림의 다양한 종류에 대해 브레인스토밍합니다. 선크림을 실험할 조와 보호되지 않은 DNA 를 실험할 조를 결정합니다. 선크림 샘플을 가져올 사람을 결정합니다.
2. 수업에서 1-5 개의 선크림 샘플을 수집합니다. 참고: 적은 양의 선크림만 필요합니다. 각 실험에는 <1 mL 또는 완두콩 크기의 샘플이 필요합니다.
3. 만약 선크림을 실험하는 조라면, 해당 제품의 SPF 및 유효 성분을 실험 기록부 또는 아래에 기록합니다..

Sunscreen Name	SPF	Active Ingredient(s)

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

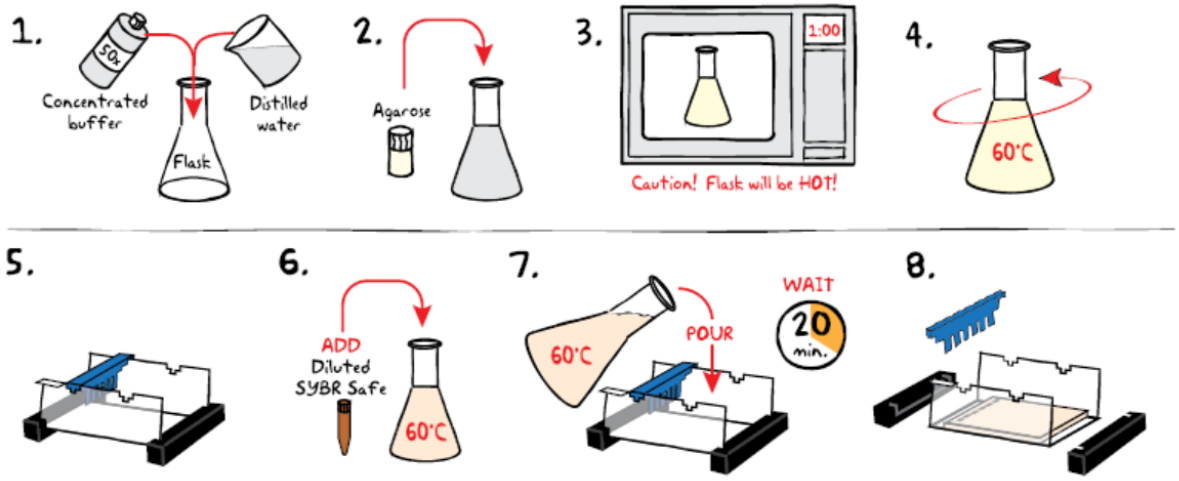
모듈 II: UV노출을 통한 DNA 손상



1. "Control", "15 min", "30 min", "45 min", "60 min"으로 다섯 개의 원심분리기튜브에 표기합니다.
2. 한 개의 튜브에 'PD'로 표기합니다. (Plasmid DNA).
3. 플라스미드 DNA 20 µL 을 "Control" 튜브로 옮기고 10x 농도의 젤 로딩용 용액 5µL 을 첨가합니다. 이 튜브는 얼음이나 냉장고에 보관합니다.
4. 선크림 실험을 진행하는 경우, PD 튜브 외부에 작은 콩알만큼의 양을 손으로 발라줍니다. **주의:** 전체 튜브가 얇은 선크림 층으로 덮여야 합니다.
5. 전체 그룹이 모든 PD 튜브를 UV 램프 위에 놓습니다. 튜브를 옆으로 뉘어놓아 노출을 극대화합니다.
6. UV 램프를 켜고 15 분동안 튜브를 노출시킵니다.
7. 플라스미드 DNA 20 µL 을 "15 min"으로 레이블된 튜브로 옮기고 10x 농도의 젤 로딩용 용액 5 µL 을 첨가합니다. 이 튜브는 얼음이나 냉장고에 보관합니다.
8. "30 min", "45 min", "60 min" 샘플에 대해서도 동일한 작업을 3 번 더 반복합니다. **중요:** UV 램프는 피부와 눈에 손상을 일으킬 수 있습니다. UV 안전 고글을 착용하고 직접적인 피부 노출을 피합니다. 안전을 위해 DNA 를 UV 램프에 노출할 때 광원 위에 상자를 덮어 놓습니다.

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

모듈 III: 전기영동을 이용한 DNA 조각의 분리

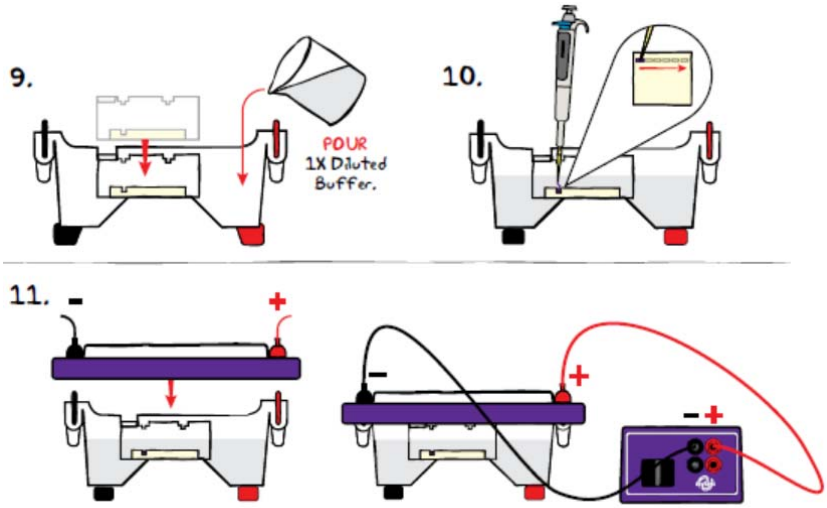


1. 농축된 50x 버퍼를 증류수로 희석하여 1x 버퍼를 만듭니다(Table A 참조).
2. 아가로스 분말을 250 mL 플라스크에 1x 버퍼와 섞습니다(Table A 참조).
3. 용액을 끓여 아가로스 분말을 용해시킵니다. 1 분간 전자레인지에 가열한 후, 조심스럽게 플라스크를 꺼내 흔들어 섞습니다. 아가로스가 완전히 용해될 때까지 15 초씩 끓이며 가열합니다(용액이 물과 같이 맑아질 때까지).
4. 플라스크를 열이 고르게 분산되도록 60℃로 냉각시킵니다.
5. 아가로스가 식는 동안, 젤 캐스팅 트레이의 끝부분을 고무 캡으로 끼워 막습니다. 적절한 홈에 comb 을 삽입해 놓습니다.
6. 젤을 캐스팅하기 전에 60℃로 냉각된 아가로스 용액에 희석된 SYBR® Safe 염료를 넣고 섞습니다(Table A 참조).
7. 아가로스 용액을 준비된 젤 캐스팅 트레이에 부어줍니다. 20 분 이내에 젤이 완전히 응고되어야 합니다. 젤은 고형화되며 불투명해집니다.
8. 고무마개와 comb 을 제거합니다. 웰 well 에 손상이 가지 않도록 제거할 때 특별한 주의가 필요합니다.

Table A — Individual 0.8% UltraSpec-Agarose™ Gel with SYBR® Safe Stain

Size of Gel Casting tray	Concentrated Buffer (50x)	+ Distilled Water	+ Amt of Agarose	= TOTAL Volume	Diluted SYBR® (Step 6)
7 x 7 cm	0.5 mL	24.5 mL	0.23g	25 mL	25 µL
7 x 14 cm	1.0 mL	49.0 mL	0.46 g	50 mL	50 µL

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



젤 러닝(Running Gel)

9. 전기영동 챔버에 트레이에 올려진 젤을 놓고 1X TBE 전기영동용 버퍼 (권장 용량은 표 B 참조)로 젤을 완전히 덮습니다. 젤이 완전히 잠길 수 있도록 해야 합니다.

10. Gel Loading Table 을 참고해 샘플 전체(25 µL)를 연속적인 순서로 well 웰에 로딩합니다.

11. 젤이 올바른 방향으로 놓였는지 확인한 후 안전 커버를 챔버에 덮습니다. DNA 샘플은 양극(빨간색) 전극 쪽으로 이동할 것입니다.

12. 리드를 파워서플라이와 연결하고 전기영동을 실행합니다. (시간과 전압 가이드는 표 C 참조). 전기영동이 완료되면, 젤과 캐스팅 트레이를 전기영동 챔버에서 제거합니다.

GEL LOADING TABLE

Lane	Tube Label	Sample Description
1	DNA Standard Marker	DNA Standard Marker
2	Control	Control Plasmid DNA
3	15 min.	Plasmid DNA exposed to UV for 15 min.
4	30 min.	Plasmid DNA exposed to UV for 30 min.
5	45 min.	Plasmid DNA exposed to UV for 45 min.
6	60 min.	Plasmid DNA exposed to UV for 60 min.

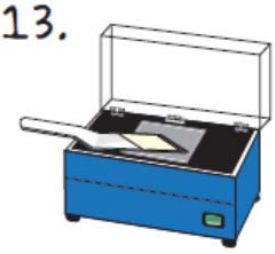
Table B — 1x Electrophoresis Buffer (Chamber Buffer)

EDVOTEK Model #	Total Volume Required	Dilution: 50x Conc. Buffer	+ Distilled Water
M6+ & M12 (new)	300 mL	6 mL	294 mL
M12 (classic)	400 mL	8 mL	392 mL
M36	1000 mL	20 mL	980 mL

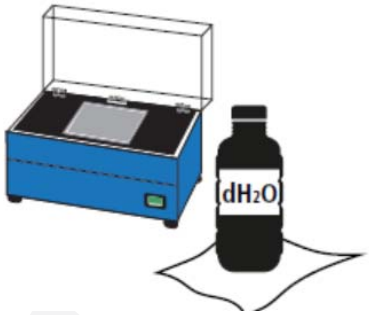
Table C — Time and Voltage Guidelines (0.8% - 7 x 7 cm Agarose Gel)

Volts	Recommended Time: Minimum	Maximum
150	10 min.	20 min.
125	20 min.	35 min.
70	35 min.	1 hour

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

13. 

14.

15. 

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

14. 광원을 켜서 밴드를 확인합니다.

15. 실험관찰을 마친 후 젤을 제거하고 기구를 닦습니다.

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

결과 분석

1. 아가로스 젤을 관찰한 후 다음 질문에 대답하십시오. 답변은 아래에 작성하거나 실험 노트에 기록하십시오.

- UV 노출 시간들 중 몇 분에서 플라스미드 샘플의 밴딩 패턴에 중요한 변화가 관찰되었습니까?
- 어떤 밴드가 바뀌었습니까? 각 밴드는 어떤 종류(모양)의 플라스미드로 이루어져 있습니까?
- 관찰한 밴드 변화로부터 DNA 손상에 대한 어떤 추론을 할 수 있습니까?

2. 선크림을 테스트했다면, 아래 질문에 대한 답을 실험 노트에 기록하십시오.

- 각 그룹에서 DNA 손상의 징후가 어떤 UV 노출 시간에서 관찰되었습니까?
- 각 그룹별 Control통제 샘플과 여러분의 통제 샘플에서의 손상된 DNA 샘플에서 어떤 밴딩 패턴의 유사성 또는 차이를 관찰했습니까?
- 선크림으로 보호된 샘플과 그렇지 않은 샘플 사이에 어떤 차이가 있었습니까?
- 서로 다른 종류의 선크림으로 보호된 샘플 사이에 어떤 차이가 있었습니까?

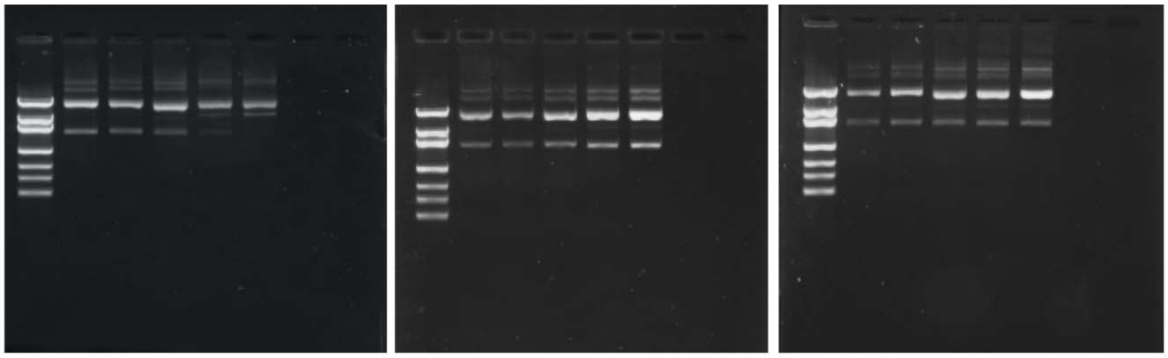
GEL LOADING TABLE

Lane	Tube Label	Sample Description
1	DNA Standard Marker	DNA Standard Marker
2	Control	Control Plasmid DNA
3	15 min.	Plasmid DNA exposed to UV for 15 min.
4	30 min.	Plasmid DNA exposed to UV for 30 min.
5	45 min.	Plasmid DNA exposed to UV for 45 min.
6	60 min.	Plasmid DNA exposed to UV for 60 min.

Time Series of Plasmid DNA Exposed to UV Radiation

Time Series of Plasmid DNA with SPF 4 Sunscreen Protection Exposed to UV Radiation

Time Series of Plasmid DNA with SPF 30 Sunscreen Protection Exposed to UV Radiation



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