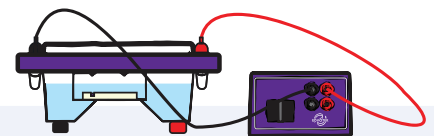

PCR의 효과 학습(기본)

What Is PCR and How Does It Work?

EDS-48



PCR의 효과 학습(기본)

[실험 목적]

이 실험의 목적은 학생들이 다음의 내용을 배우는 것이다.

- PCR(Polymerase Chain Reaction)의 원리를 실험을 통해 직접 학습
- PCR의 주기와 DNA 증폭 양 사이의 관계를 이해

[제품 구성]

전기영동을 위한 Ready-To-Load 염색 샘플

- A 표준 염료 마커
- B PCR 10 Cycle 후의 시료
- C PCR 20 Cycle 후의 시료
- D PCR 30 Cycle 후의 시료
- E PCR 40 Cycle 후의 시료

시약&기구

- 연습용 겔로딩 용액
- 아가로스 분말
- 전기영동 버퍼
- 1ml 파이펫
- 100ml 눈금 실린더
- 분주용 파이펫

[기타 실험에 필요한 장비 - 별도 구매]

- 수평형 겔 전기영동 장치
- D.C 전원 공급장치
- 마이크로 파이펫, 팁
- 저울
- 전자레인지 혹은 핫플레이트
- 250ml 플라스크 혹은 비커
- 장갑
- 백색광 조명 (White LED 트랜스 일루미네이터)
- 증류수

※ 주의

모든 제품 구성품은 교육적 연구를 목적으로 개발되었으며 인간 또는 동물의 진료용으로 사용될 수 없습니다.

[배경지식]

1. PCR이란?

중합효소 연쇄 반응은 DNA의 원하는 부분을 증폭시키는 기술이다. 이 기술은 매우 복잡하며 양이 지극히 미량인 DNA 용액에서 연구자가 원하는 특정 DNA 조각만을 선택적하여 증폭시킬 수 있다. 또한 증폭에 필요한 시간이 2시간 정도로 짧으며, 실험 과정이 단순하여 의료, 범죄 수사, 생물의 분류 등 DNA를 취급하는 작업에서 중요한 역할을 담당하고 있다. PCR에는 일련의 세 개의 단계가 있다.

1)DNA의 변성 (Denaturation)

92 °C ~ 95 °C로 가열하여 이중가닥 DNA를 단일가닥 DNA로 분리시킨다. 높은 온도일수록 단일가닥 DNA로 잘 이행되지만 Taq DNA 중합효소도 온도가 아주 높은 상태에서는 변성되어 사용하지 못하게 될 수 있으므로 보통 94 °C로 한다.

2)프라이머의 결합 (Annealing)

50 °C ~ 65 °C에서 진행된다. Primer가 자신의 염기서열과 상보적인 염기서열을 갖고 있는 DNA에 결합하는 단계이다. 염기간의 결합은 G와 C는 세 군데에서 수소결합이 일어나고, A와 T는 두 군데에서 결합이 일어나므로 G-C 결합이 A-T결합보다 강하다. 따라서 G+C 비율에 따라 결합온도에 변화를 주는 것이 좋다. 일반적으로 G-C content가 50%가 되는 primer 쌍을 이용하는 것이 바람직하다. 보통 30초가량 지속되는 이 단계에서 5'→3'방향으로 DNA의 합성이 시작된다.

3)DNA의 신장 (Elongation)

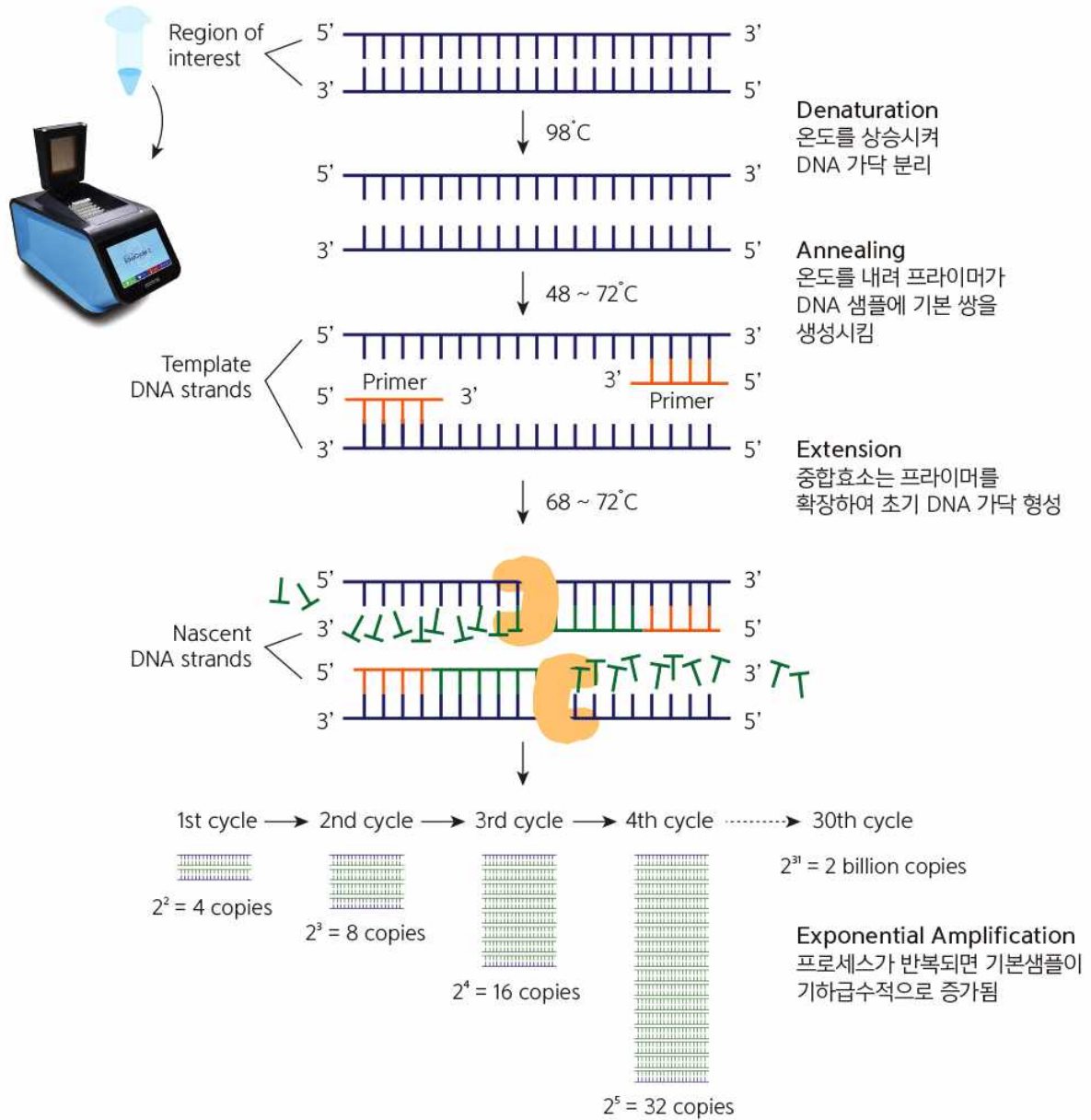
70 °C ~ 74 °C에서 시행하며 원하는 PCR산물의 크기가 크거나 반응효소의 농도가 낮을 때에는 시간을 연장시킬 수도 있다. Taq 중합효소는 보통 1분에 2,000-4,000 염기쌍을 중합할 수 있으므로 원하는 PCR산물의 크기 1kb마다 1분 정도의 시간을 배당하면 충분히 반응이 일어난다. 마지막 cycle에는 약 10분 정도 시간을 충분히 주는 것이 좋다.

이 과정이 계속 반복하여 진행되면서(보통 20~40회) DNA의 원하는 부분을 증폭시키는 것이 PCR의 원리이다.

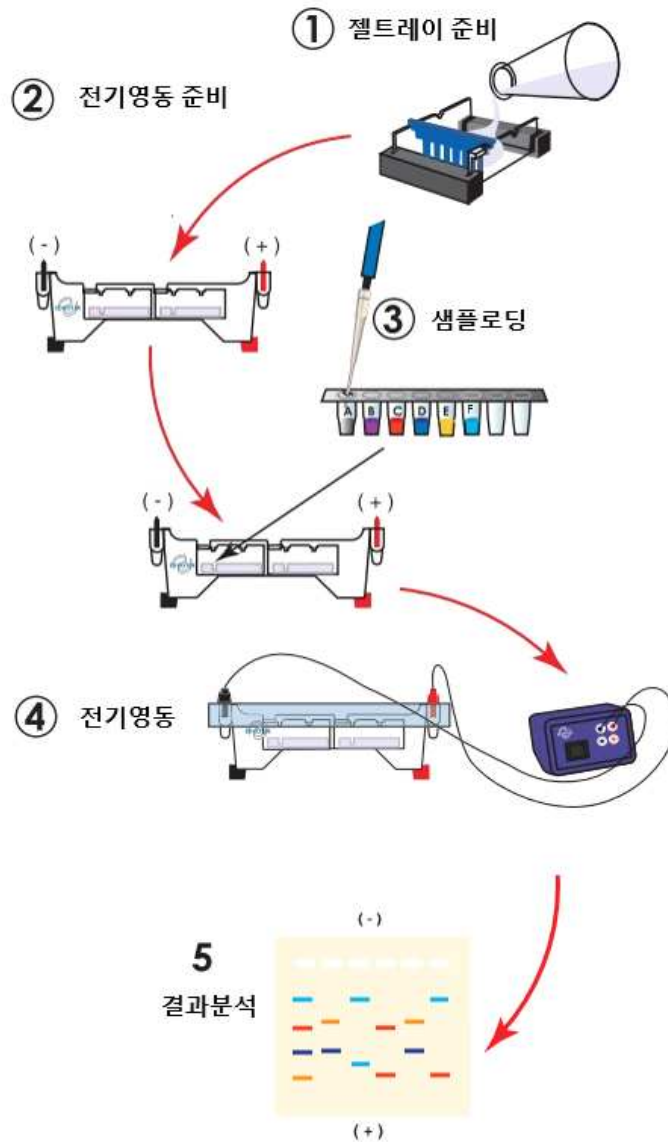
※ 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 일으키기 위해서는 다음과 같은 것들이 필요하다.

▶ 복제할 DNA, ▶ 프라이머 : DNA 복제가 시작되는 지점을 제공한다. ▶ DNA 뉴클레오타이드: DNA를 구성하는 물질이다. ▶ DNA 중합효소(Taq) : 중합효소 연쇄 반응이 일어나는 과정에서 가열과 냉각이 반복되기 때문에 열에 변성이 일어나지 않아야 한다. DNA 중합효소용 완충용액: 효소가 활성을 얻는 데 필요한 것들이 들어있다. ▶ dNTP : DNA 합성 될때 재료로 이용되는 3개의 인산이 결합된 디옥시리보뉴클레오타이드이다. 합성에 필요한 4가지 염기의 뉴클레오타이드를 모두 제공해야 되어야 함으로 dATP, dTTP, dGTP, dCTP 모두 필요로 한다

2. PCR 과정

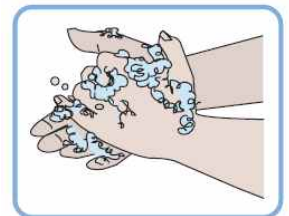


[실험과정 Overview]



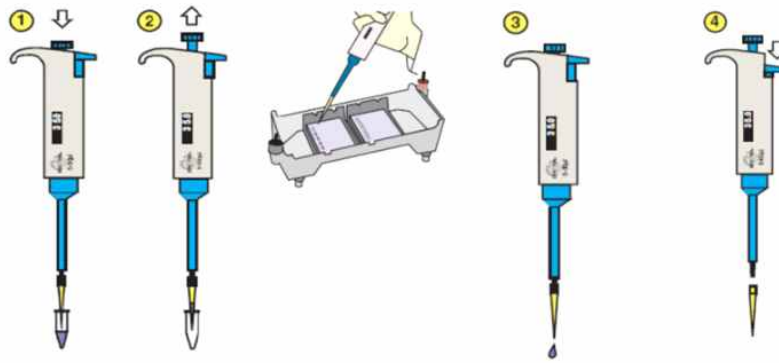
[안전 유의사항]

1. 보호장갑 및 보호안경을 반드시 착용한다.
2. 시약을 가열하거나 녹이는 장비를 다룰 때에는 특별히 주의해야 한다.
3. 입으로 피펫을 사용하지 않는다. 피펫 펌프나 벌브를 사용한다.
4. 전기 장비를 사용할 경우 특별히 조심한다.
 - 항상 파워소스의 전원을 끄고 전기영동기의 커버를 벗긴다.
 - 사용하지 않을 때는 파워를 끄고 플러그를 뽑는다.
5. EDVOTEK 전기영동 실험 장치는 전기가 켜져 있을 때 안전이 없다. 그러나 만약에 전기영동 실험 중 전기가 켜진다고 생각하면 즉시 전원을 끄고 장비를 사용하지 않는다.
6. 항상 시약이나 생물학적 물질을 다루는 실험이 끝나면 비누로 손을 깨끗이 닦는다.



[마이크로피펫으로 샘플 이동하기]

1. 마이크로피펫의 용량을 적당히 설정하고 깨끗한 팁을 마이크로피펫에 연결한다. 버튼을 1단계 까지 누르고 팁을 샘플에 담근다.
2. 팁이 샘플에 잠기면 버튼을 천천히 놓아 샘플을 팁으로 빨아들인다.
- 3-1. 피펫 팁을 들어 올려 겔의 홈에 이동시킨다. 이 때 팁이 홈을 상하지 않도록 조심한다.
- 3-2. 피펫 버튼을 2단계 까지 눌러 샘플을 분주시킨 후 내용물을 완전히 비운다.
- 3-3. 샘플을 이동시킨 후 팁이 버퍼에서 완전히 나올 때까지 피펫 버튼을 놓지 않는다.
4. 버튼을 눌러 팁을 제거한다. 다음 샘플에는 새 팁을 사용한다.



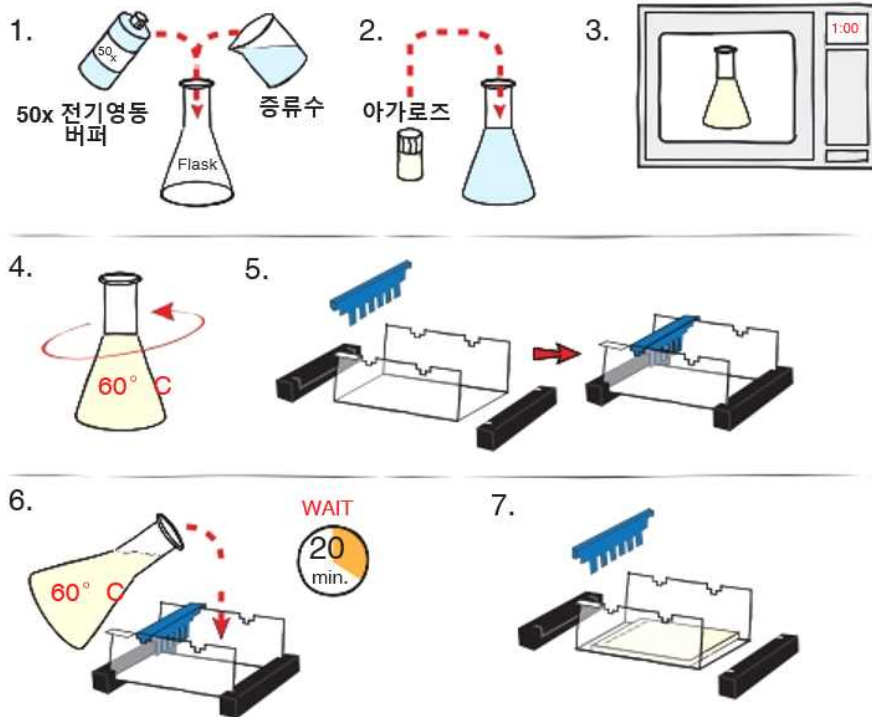
[Notice]



마이크로피펫의 버튼은 최초 Rest Position과 1단계 멈춤 단계와 , 2단계 멈춤 단계로 구분된다. 피펫의 버튼을 눌렀을 때 1단계 멈춤 단계까지가 정확한 용량이며 더 세게 눌렀을 경우 2단계 멈춤 단계까지 눌러지는 것은 용액을 옮길 때 피펫팁에 남아있는 용액을 내보낼 때 사용한다. 따라서 1단계 멈춤 단계까지만 눌러 용액을 취하고 옮길 때는 2단계 멈춤 단계까지 눌러 피펫팁 안에 남아있는 용액을 모두 내보낸다.

또한 팁에 용액이 담긴 상태에서 피펫을 거꾸로 세워서 피펫의 팁 홀더로 용액이 흘러 들어가지 않도록 조심해야 한다.

[실험과정 1 : 전기영동]



1~2. 50x 전기영동 버퍼와 증류수, 아가로스를 [표1]에 따라 혼합하여 삼각플라스크에 넣는다.

[표A] 0.8% 울트라스팩 아가로스 겔

| 겔 트레이 크기 | 50x 버퍼 | 증류수 | 아가로스 | 총 부피 |
|----------|--------|--------|-------|------|
| 7 × 7 | 0.6ml | 29.4ml | 0.23g | 30ml |
| 7 × 10 | 1.0ml | 49.0ml | 0.39g | 50ml |
| 7 × 14 | 1.2 | 58.8ml | 0.46g | 60ml |

3. 삼각플라스크를 전자렌지에 넣고 아가로스가 완전히 녹아 투명해질 때 까지 가열한다.

[주의] 한번에 가열하면 버퍼가 끓어 넘칠 수 있으니 30초씩 나눠서 가열.

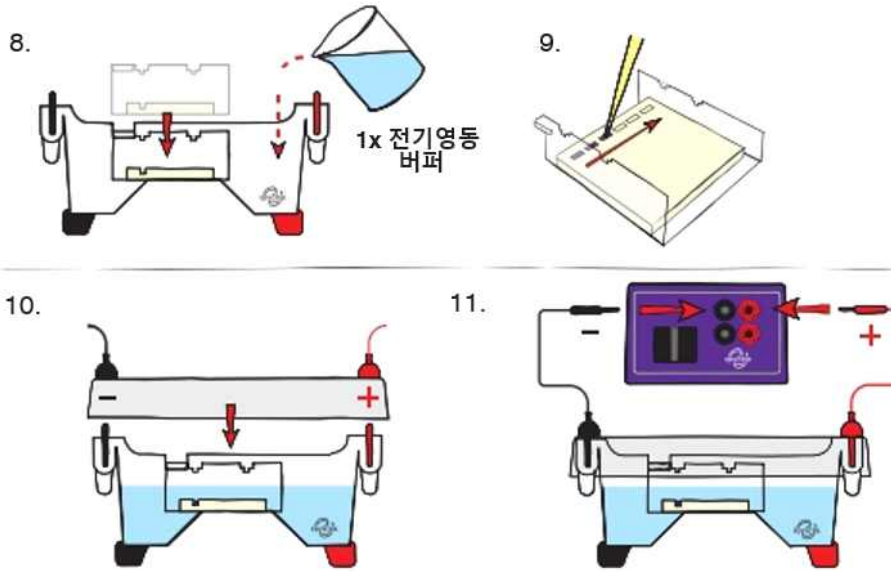
4. 아가로스가 완전히 녹은 다음 60°C까지 냉각시킨다.

5. 아가로스가 냉각되는 동안 젤트레이를 조립한다.

6. 아가로스를 젤트레이에 붓고 20분동안 굳힌다.

[주의] 아가로스를 굳히는 동안 젤 트레이는 수평을 유지해야 한다.

7. 아가로스가 완전히 굳은 다음 젤트레이에서 고무캡과 콤을 제거한다.

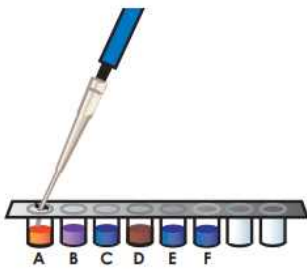


8. [표B]에 따라 1x 전기영동 버퍼를 만들어 전기영동 챔버를 채운다.

[표B] 1x 전기영동 버퍼

| 전기영동기 | 50x 버퍼 | 증류수 | 총 부피 |
|-------|--------|-------|--------|
| M12 | 8ml | 392ml | 400ml |
| M36 | 20ml | 980ml | 1000ml |

9. 아래의 순서로 35 μ l의 샘플을 각 웰에 로딩한다.



| Lane | Tube | Sample |
|------|------|--------------------|
| 1 | A | 표준 염료 마커 |
| 2 | B | PCR 10 Cycle 후의 시료 |
| 3 | C | PCR 20 Cycle 후의 시료 |
| 4 | D | PCR 30 Cycle 후의 시료 |
| 5 | E | PCR 40 Cycle 후의 시료 |

10. 전극방향을 잘 맞추어 두경을 덮는다.

11. 전원공급장치에 전극을 연결하고 전기영동을 아래와 같은 조건으로 실시한다.

[표C] 전기영동에 필요한 시간 및 전압

| 전압 | 권장 실험시간 |
|-----|---------|
| 150 | 30분 |
| 70 | 50분 |
| 50 | 90분 |

12. 전류가 잘 흐르고 있는지 확인한다. 플래티넘 전극에 공기방울이 형성되는 것이 보여야 한다.
13. 약 10분 후에 색깔 있는 염료가 분리되는 것을 확인할 수 있다.
14. 전기영동이 끝나면 전원을 끄고 플러그를 뽑고 전선을 분리한 후 커버를 연다.
15. 전기영동이 끝나면 젤을 White LED 트랜스 일루미네이터나 TruBlu™ 2 Transilluminator에 올려놓고 결과를 확인한다..

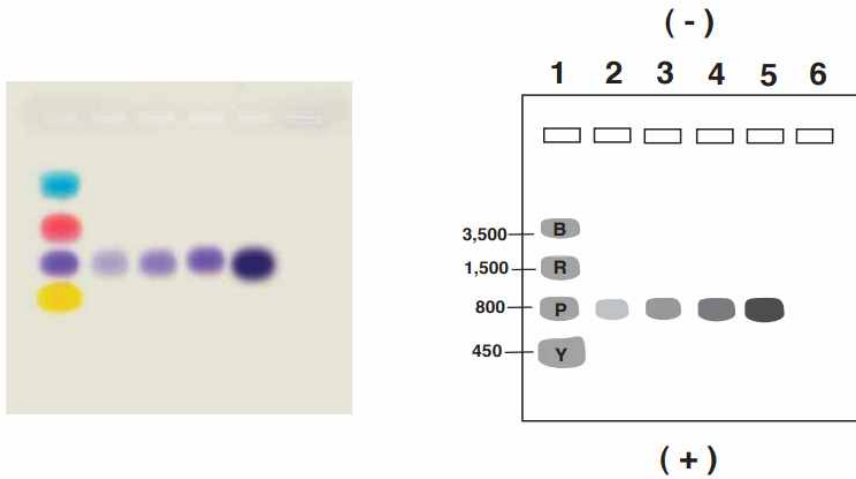


White LED 트랜스 일루미네이터



TruBlu™ 2 Transilluminator

[실험결과 분석]



| Lane | Tube | Sample |
|------|------|--------------------|
| 1 | A | 표준 염료 마커 |
| 2 | B | PCR 10 Cycle 후의 시료 |
| 3 | C | PCR 20 Cycle 후의 시료 |
| 4 | D | PCR 30 Cycle 후의 시료 |
| 5 | E | PCR 40 Cycle 후의 시료 |

[탐구 질문]

다음 학습을 위한 질문에 답한다.

1. 왜 DNA 증폭이 중요한가?
2. PCR 반응과 세포내의 복제사이의 차이점은 무엇인가?
3. dXTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)의 기능은?
4. 왜 PCR에 두 가지 다른 프라이머가 필요한가?

PCR의 효과 학습(기본)

What Is PCR and How Does It Work?

S-48

교사용 가이드북

[교사를 위한 메모]

학생 수, 실험시간의 길이, 실험장비 준비 여부 등 다양한 요소가 이 실험에 영향을 미칠 수 있다. 따라서 실험을 설계하는데 이러한 요소들을 고려해야 한다. 이 가이드라인은 특별한 상황에 맞도록 실험을 준비하는데 필요한 제안을 포함하고 있다.

[실험준비 소요시간]

1. 아가로스 겔 준비 : 스케줄에 따라 아가로스 겔을 언제 준비할 것인지를 결정합니다. 직접 아가로스 겔을 준비하든 아니면 학생들에게 준비하도록 지시하든 아가로스 겔을 준비하는데 약 30~40분이 필요합니다. 일반적으로 이 시간 중 약 20분은 겔이 응고되는데 걸리는 시간입니다.
2. 전기영동에 걸리는 시간은 약 20분에서 1시간까지 차이가 발생할 수 있습니다.

[실험 준비를 위한 제안]

아래 내용을 수업토론에 필요한 가이드라인으로 활용할 수 있다.

1. PCR은 분자생물을 기반으로한 연구와 진단에 발전을 가져왔다. 학생들이 다음의 사례 등에 사용된 과정이 어떻게 되는지 찾도록 한다.

- COVID-19 검사
- 유전질환의 진단
- 범인찾기
- 친자확인

2. PCR을 이용해 증폭할 DNA의 수집과 분석이 세심해야 할 필요성에 대해 논의한다.

3. 아래 단어 목록에서 단어를 선택하고 사용하여 문장을 만들도록 한다.

| | | |
|---------------|----------------|-------------------|
| PCR | Primer | Target DNA Region |
| Amplification | Tag polymerase | Annealing |

4. 얼마나 많은 DNA 목표분자가 5, 10, 20, 30 cycle 후에 생기게 되는지 예상하도록 한다.

5. PCR의 원리를 이해한다.

- PCR은 두 개의 다른 프라이머로 정의된 DNA의 특정 타겟 시퀀스만 증폭한다는 것을 이해한다.
- 세포내의 DNA PCR증폭과 복제가 다른 점을 이해한다.
- PCR의 한 cycle에 세 가지 온도의 중요성과 이론을 이해한다.
- 유전자 혹은 DNA의 많은 복제가 2-3시간 만에 만들어 진다는 것을 이해한다.

[실험 준비]

퀵스트립™ 튜브

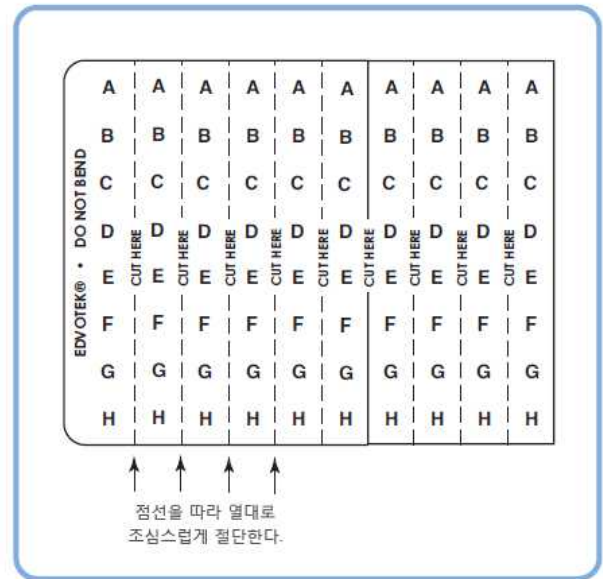
만일 퀵스트립™ 샘플이 잘 분리되지 않으면

1. 가위 등 날카로운 도구를 이용해 튜브를 하나씩 떼어냅니다.

※ 주의 : 실험키트에 따라 비어있는 튜브도 있다.

2. 각 실험그룹 당 한 개의 스트립을 사용합니다.

3. 겔 로딩을 하기 전에 튜브나 호일을 살짝 두드려 모든 샘플이 튜브 바닥에 모이도록 합니다.

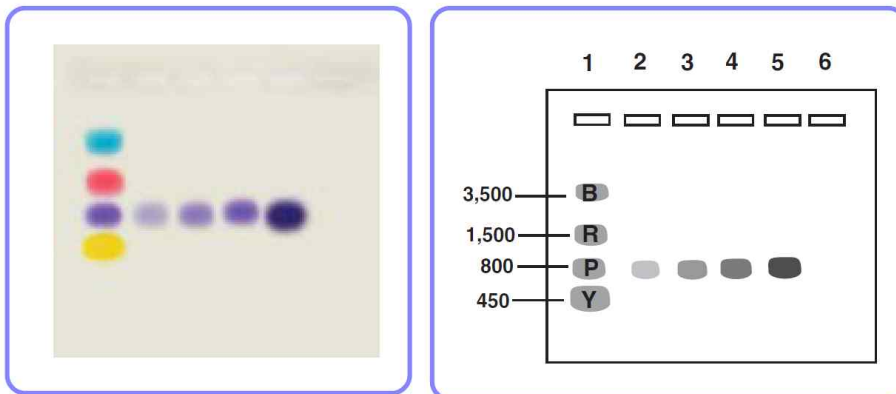


[일반적인 위험요소 회피방법]

다음과 같은 방법으로 위험요소 또는 잠재적인 문제를 피할 수 있습니다.

- 염료가 잘 용해될 수 있도록 겔의 혼합 비율을 잘 맞추고 (표 A 참조) 그리고 전기영동은 권장 시간을 기준으로 샘플의 전개 상황에 따라 시간을 조절하시면 됩니다.
- 버퍼 준비에 증류수만 사용하고 수돗물은 절대 사용하지 않도록 합니다.
- 최상의 결과를 얻기 위해서는 항상 새로운 전기영동 버퍼를 사용합니다.
- 샘플이 유실되는 것을 방지하기 위해 아가로스 겔이 적절하게 위치가 되었는지 확인합니다.

[실험결과 및 분석]



이 PCR 시뮬레이션에서 염료의 양을 통해 위 그림의 Lanes 2에서 5에 나타난 것처럼 PCR 반응 사이클수가 증가할 수록 복제된 DNA의 양도 증가하는 것을 확인할 수 있다.

[탐구질문에 대한 해답]

1. 왜 DNA 증폭이 중요한가?

분석해야할 DNA량이 매우 적을 때 PCR 과정을 통해 분석이 가능한 많은 양까지 충분히 많은 DNA를 만들 수 있다. 이를 통해 DNA지문, 친자감별, 질병 분석이 가능해 진다.

2. PCR 반응과 세포내의 복제사이의 차이점은 무엇인가?

복제(세포내의 DNA 합성)에서 많은 수의 효소들에 의해 DNA의 풀림(두 가닥으로 분리)이 이루어지고 복제가 진행된다. 세포내에서는 반응들은 몸의 온도인 37도에서 이뤄진다. 이와는 대조적으로 PCR은 DNA합성만을 다루며 물이 끓는 온도에 가까운 94도에서 변성이 시작되며 이것을 이용하게 된다.

3. dXTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)의 기능은?

네 가지의 dXTP(ddATP, dCTP, dGTP, dTTP)를 구성하는 DNA 구성 건물들이다. DNA template와 두 프라이머는 DNA합성에 필요하다. template의 맞은편 가닥은 왓슨-크릭 염기쌍 규칙이 사용되어 합성된다. 최종결과는 이중 나선 DNA가 첫 PCR 사이클에 두 복제로 증폭된다.

4. 왜 PCR에 두 가지 다른 프라이머가 필요한가?

앞과 반대쪽 프라이머로 적용되는 두 프라이머는 시퀀스내에서 다르다. 각각은 유전자 template의 시작과 끝 지점에 부착되어 다른 시퀀스를 갖는다. 두 사례에서 DNA는 5'에서 3'방향으로 PCR 반응 동안 합성된다.



TEL. 02-929-1110 FAX. 02-929-0966
info@koreasci.com www.koreasci.com

이 실험서는 (주)한국과학에 의해 작성되었으며 저작권법에 의해 보호를 받습니다.
무단복제를 금하며, 무단 복제 및 배포 시 저작권법에 의해 처벌 받을 수 있습니다.