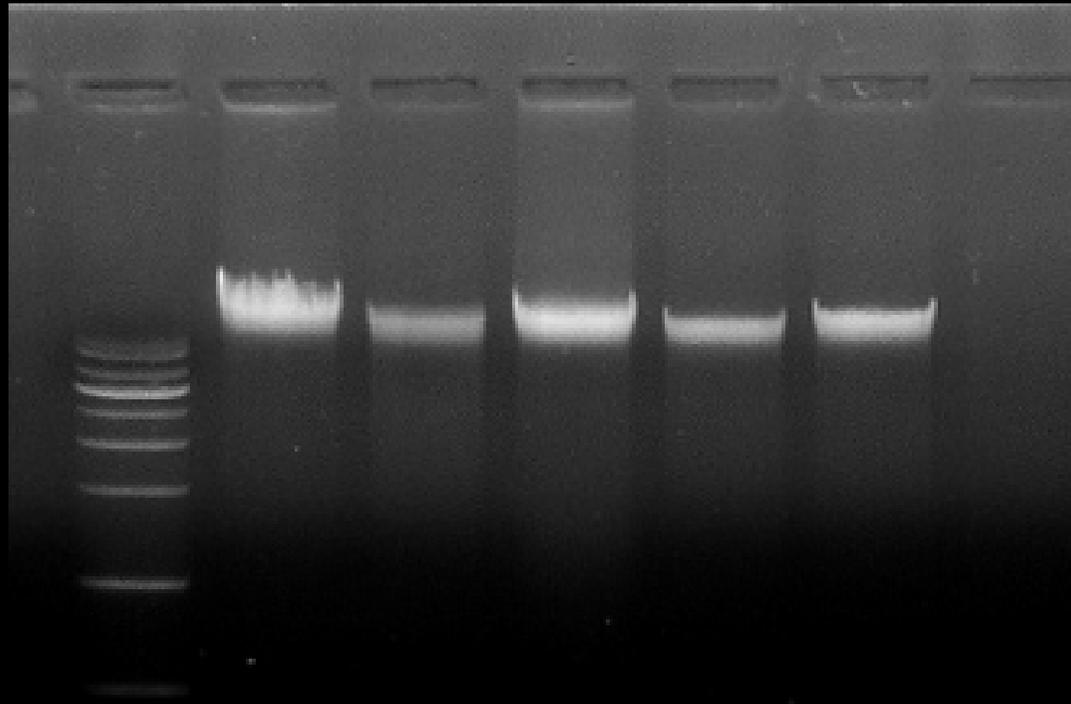


전기영동



실험 목적

- 기본적인 분자실험 장비인 피펫, 저울, 원심분리기, vortex mixer 사용법 숙지
- 전기영동 과정을 통해서 DNA 크기 비교

여러 가지 피펫 종류들



Basic type

P2 white tip

P10 white tip

P20 yellow tip

P100 yellow tip

P200 yellow tip

P1000 blue tip



Multi-channel pipette





Auto-pipettes

Electric Balance



원심분리기

- g value: gravity
- rpm: round per minutes
- Rotor: 고정식과 swing bucket
- 원심분리기 사용시 주의사항:
 - 축을 중심으로 항상 좌우가 같은 무게가 되도록 한다.
 - 시료가 하나밖에 없을 경우에는 같은 blank tube를 넣어 무게를 맞춘다.
- 고속이나 대용량의 원심분리기에서는 열이 많이 발생함으로 일반적으로 냉각장치가 부착되어 있다.



Vortex Mixer 또는 Touch Mixer

시험관 혼합기

Vortex Mixer

Model KMC-1300V

시험관 혼합기

- 시험관으로 Cup을 누르면 자동으로 동작 (Touch On)
- 스위치를 작동하면 계속 동작 (Constant On)
- 3000RPM까지 속도 조절
- 다양한 약세서리 선택 가능
- 고품질의 안전 설계
- CE 인증



Vortex Mixer, Platform Head



Vortex Mixer, Mixing Cup Head

Fume hood



공기의 흐름

이곳에 주로 부식성 또는 인화성 시약들을 보관

전기영동(electrophoresis)

- **정의:** DNA나 RNA, protein과 같은 큰 분자들을 전기적인 힘을 이용하여 gel에서 이동시켜 크기에 따라 서로 분리하는 기술이다.
- **Agarose gel:** 추출된 DNA의 확인이나, PCR product의 확인 등을 위해서는 0.005%정도의 EtBr (또는 대체 물질)을 포함한 1~1.5% 정도의 agarose gel 을 이용하여 전기영동한다.
- **완충액 (buffer):** 전기영동을 위한 buffer는 1X TAE (Tris base, Acetic acid, EDTA) 또는 1X TBE (Tris base, Boric acid, EDTA)를 사용하며, 10X로 만들어 사용 전 1X로 희석하여 사용한다.
※ "X"라 함은 농도를 뜻하고, 10X 용액이란 10배 농도의 저장용액을 말한다.
- **DNA의 이동방향:** 전기영동 시에는 시료의 이동방향에 주의한다: DNA는 "-" 전하를 띠고 있으므로 전기영동을 하면 "+" 극으로 이동한다.
- **염료와 침강제:** DW (distilled water) 또는 TE (Tris-EDTA)에 녹아있는 DNA는 무색이고, 전기영동 buffer에 들어가면 즉시 확산된다. 그러므로 DNA를 전기영동 할 때에는 loading dye와 섞어 함께 loading 한다. Loading dye에는 bromophenolblue라는 파란색의 염료가 들어있어 이것과 섞인 DNA의 위치를 눈으로 확인할 수 있게 하고, 또한 sucrose 등의 고분자물질을 넣어 DNA가 buffer 속에서 확산되지 않고 well 으로 가라앉을 수 있게 침강제의 역할을 한다.

손쉬운 DNA의 확인과 정량 방법

- DNA는 무색으로 눈으로 보이지 않는다. 그러므로 일반적으로 EtBr (Ethidium bromide)을 이용하여 간접적으로 DNA의 존재와 농도를 확인 할 수 있다.
 - EtBr은 두개의 염기가 결합한 DNA 사다리의 가로대와 비슷한 크기와 구조를 갖고 있어 DNA 염기쌍 사이로 잘 삽입된다.
 - EtBr은 자외선(ultra-violet ray)을 받으면 가시광선으로 전환시켜 발광하는 성질을 갖는 일종의 형광물질이다.
 - 추출된 DNA를 EtBr을 포함한 agarose gel 상에서 전기영동 시키면, DNA에 EtBr이 결합하게 되고 이를 자외선 하에서 관찰하면 발광하는 EtBr의 밝기로서 상대적인 DNA의 양을 측정할 수 있게 된다.
 - 일반적으로 이미 그 양을 알고 있는 DNA와 동일한 조건에서 같이 전기영동하여 그 밝기를 비교함으로써 정량한다.
- ※ EtBr은 DNA에 삽입되는 intercalating agent로서 틀변환돌연변이(frame-shift mutation)를 일으키는 **발암물질**이다. 그러므로 제한된 구역에서 조심하여 사용하여야 한다. EtBr은 수용성으로 신체가 오염되었을 시에는 즉시 물로 닦아내고, 빛에 의해 파괴됨으로 항상 어두운 곳에 보관하여야 한다.
- ※ EtBr은 발암물질이므로 최근 EtBr을 대체할 수 있는 많은 물질들이 개발되어 있음. 하지만 여전히 EtBr보다 경제적이지 못하고 DNA를 검출해 내는 감도가 떨어진다.

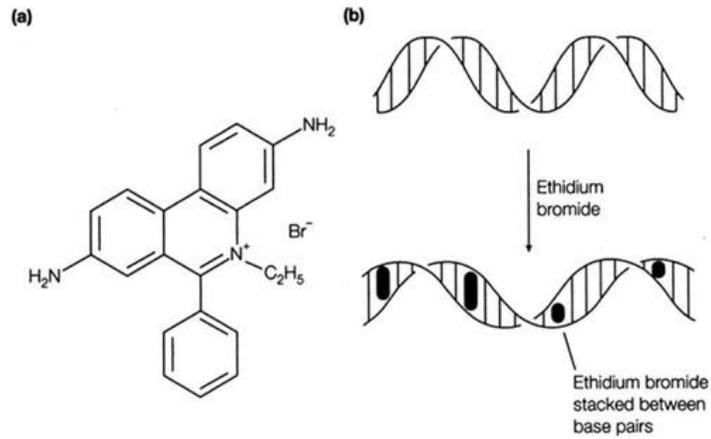
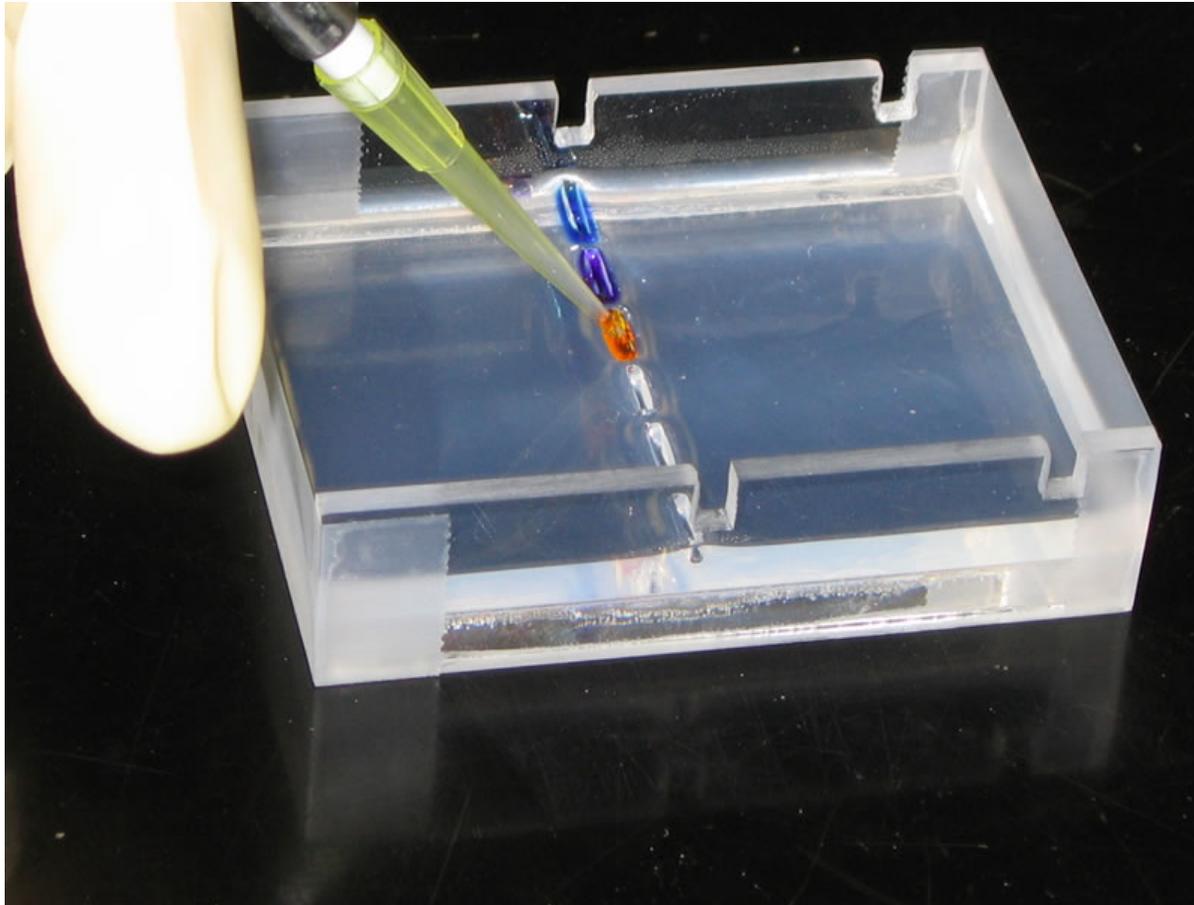


Fig. 3. (a) Ethidium bromide; (b) the process of intercalation, illustrating the lengthening and untwisting of the DNA helix.





1.2% agarose gel 만들기

- Agarose gel을 만들 수 있는 cast와 cassette를 결합하고 comb을 꽂아 놓음

- 250ml 비이커에

1) 40ml 1X TAE buffer

2) 0.48g agarose

를 넣고 잘 흔들어 준 다음 vinyl wrap 으로 덮고 구멍을 2~3개 뚫어줌

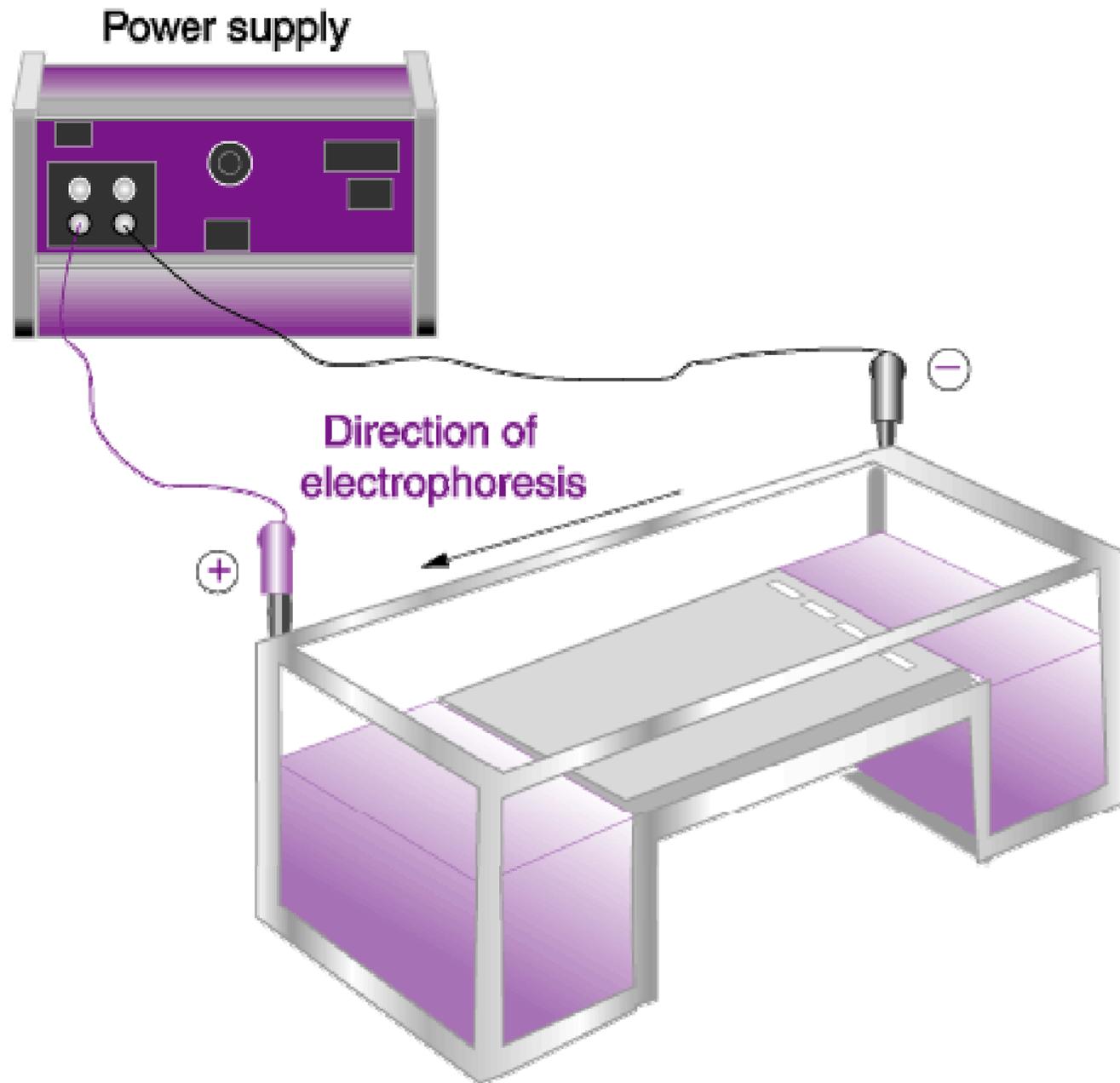
- 전자레인지에서 1분간 가열한 후 흔들어줌

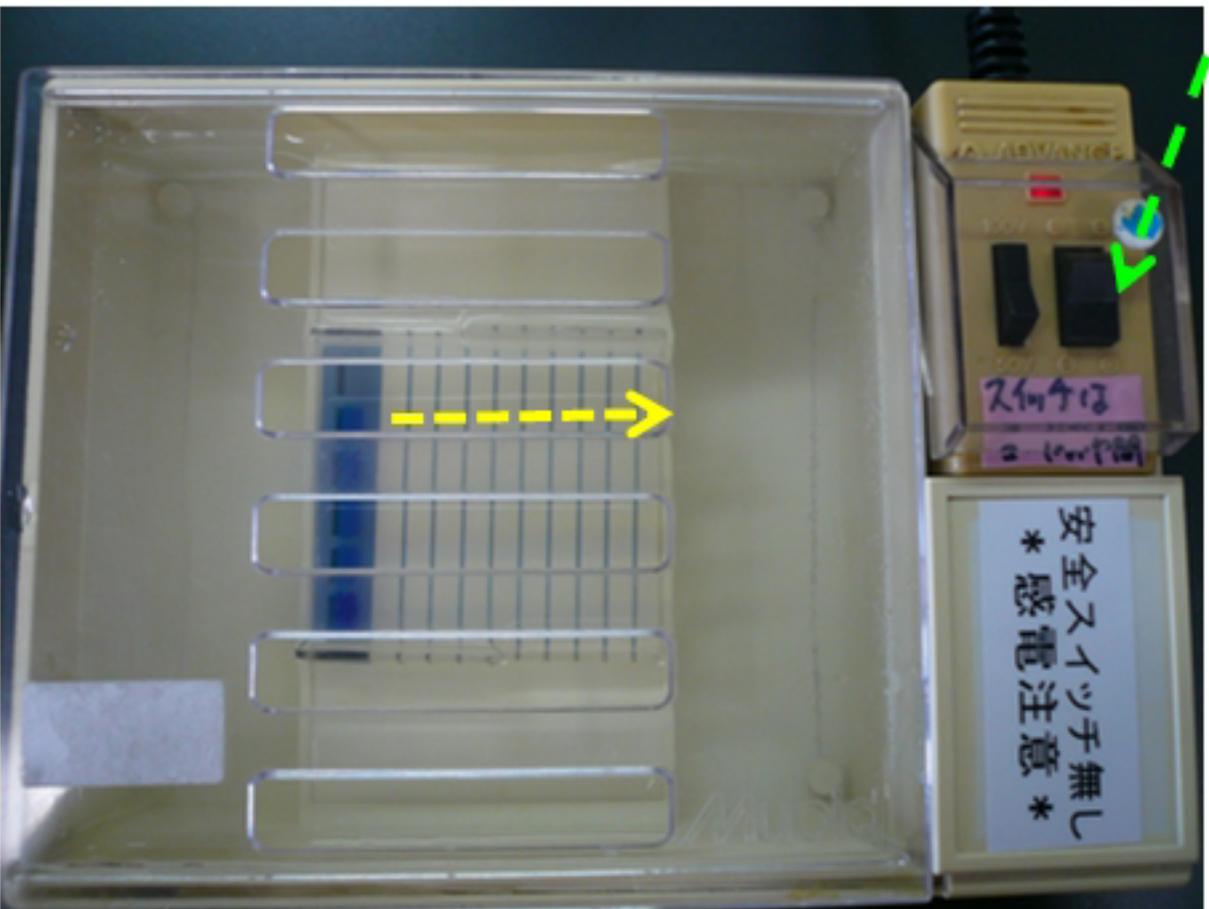
- 다시 30초간 가열하여 agarose가 완전히 녹았는지 확인함 (알갱이가 보이면 15초 정도 더 가열하여 완전히 녹임).

- Vinyl wrap을 벗겨 내고 (**뜨거운 수증기 조심**) 피펫으로 EtBr 또는 대체시약 (Goodview) 4ul를 넣고 흔들어 완전히 섞어줌. 이때 기포가 발생하면 안됨.

- 준비된 cast에 부어 넣음. Gel의 두께는 약 7mm 정도가 되도록 함. 이 때 만약 기포가 발생하였다면 pipette tip을 이용하여 기포를 제거 (제거가 어려울 시에는 적어도 cassette 벽으로 기포를 이동시킴. Comb에 기포가 붙어 있으면 절대 안되고 comb에 붙은 기포 제거가 어려울 경우 comb을 다시 빼 낸 후 기포를 제거한 후 재장착 시킴).

- 10~20분 후 gel이 완전히 굳은 후 사용함. Gel 을 만들고 장시간 (1시간 이상) 이후에 사용하려고 할 때는 vinyl wrap으로 싸거나 밀폐된 용기에 보관하여 gel의 수분증발을 막아야 함.





ス何ヶは
コ-100P

安全ス
* 感電注意 *

전기영동

준비물:

전기영동장치, agarose, 1XTAE buffer, 전자레인지, 피펫, EtBr 또는 대체물질 (Goodview TM),
침강제 및 염료, parafilm, UV gel-documentation system

실험 방법

1. 보고자 하는 DNA의 크기에 따라 agarose의 양을 조절하여 TAE/TBE buffer와 비이커에 넣고 전자레인지에 넣어 녹인다. (주의; agarose가 잘 녹았는지 확인한다)



2. 녹은 agarose가 따뜻할 정도로 식으면 EtBr또는 대체물질 (Goodview)을 넣고 잘 섞는다.

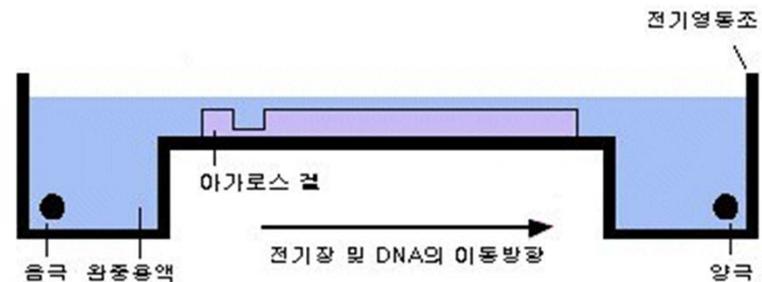
전기영동

3. 깨끗이 닦은 gel plate에 기포가 생기지 않도록 조심스럽게 분주한 다음, comb을 끼우고 gel이 굳도록 한다.



4. DNA size marker와 gel loading dye와 섞은 sample을 parafilm 상에서 피펫을 이용하여 섞은 후 well에 넣는다.

5. 50-100V로 15-30분 동안 전기영동을 한다.

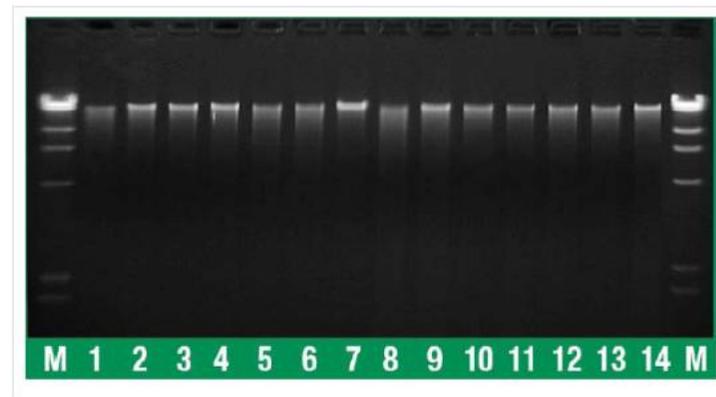
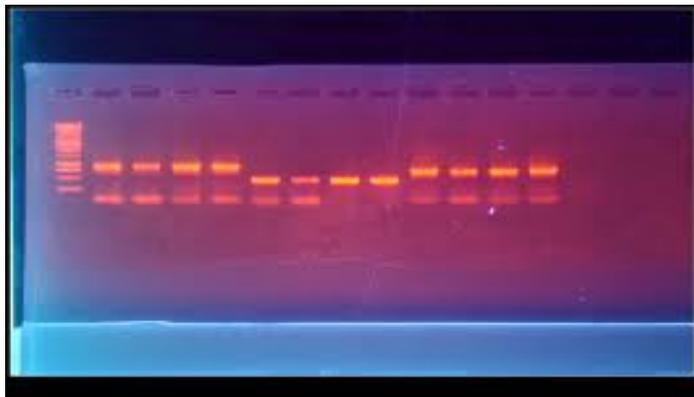


전기영동

6. UV transilluminator로 agarose gel을 관찰 및 이미지를 획득한다.

(이때, EtBr이 들러간 agarose gel은 반드시 폴리글러브를 착용하고 잡도록 한다.)

UV 광선을 맨눈으로 보는 것은 매우 위험하므로 항상 UV protector를 통하여 UV 상에서 gel을 관찰한다.



아가로오스 겔을 통한 DNA의 이동속도 : DNA분자의 크기, 아가로오스의 농도, DNA형태, 전류의 세기, 염기 조성 및 온도 등에 좌우.

Lamda phage DNA 의 전기영동

- Lamda phage를 이용하여 serial dilution 하여 다양한 농도의 DNA를 만든 후 이를 한꺼번에 전기영동하여 DNA 농도 차이를 확인한다.

- **Serial dilution**

	Lamda DNA	DW
① 1/10	3ul	27ul
② 1/50	① 3ul	12ul
③ 1/250	② 3ul	12ul

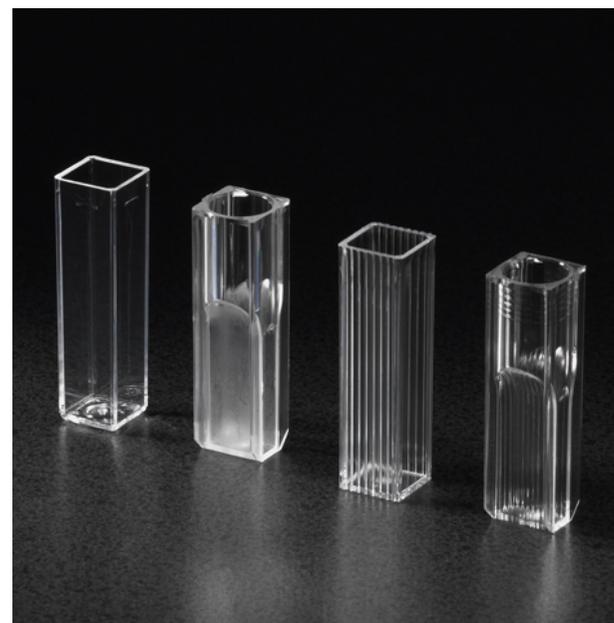
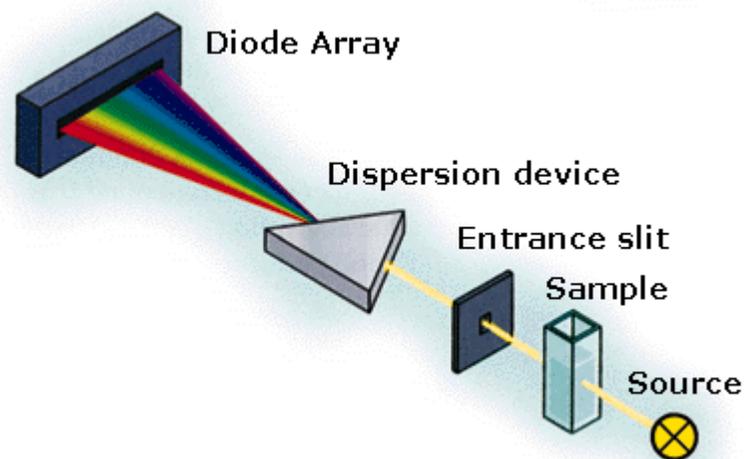
- **Loading 하는 방법**

- 1) Parafillim을 잘라 놓고 loading dye (푸른색)를 loading할 시료 수 만큼 1ul씩 분주하여 방울을 만들어 놓는다.
- 2) 1번 lane에 준비된 ladder를 3ul loading
- 3) 2~4 번 lane에 각각 시료 5ul와 준비한 1ul의 loading dye 를 pipette 으로 펌프하여 잘 섞고 (기포가 생기면 안됨) 전체 6ul를 loading

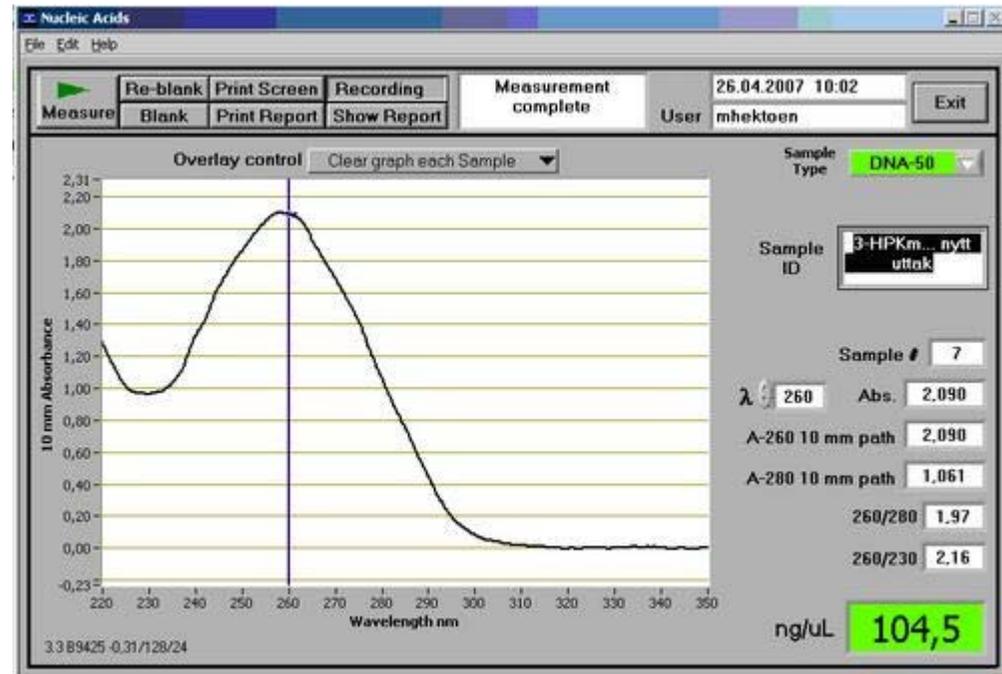
정확한 DNA 정량법

- 일반적으로 추출된 DNA를 정확히 정량하기 위해서는 spectrophotometer를 이용한다. DNA는 **260nm**의 파장을 흡수하기 때문에 그 양은 260nm에서의 **OD (optical density)값에 비례한다**. 이를 이용하여 DNA의 양을 측정한다.
- 단백질의 흡수파장은 280nm로서 OD 260/280 값은 추출된 DNA가 얼마나 순수한지를 측정하는 지표이다.
- spectrophotometer를 이용하기 위해서는 일정부피 (cuvette의 크기에 따라 약 1ml~100ul 정도)이상이 필요하며, OD 값 또한 측정을 위한 유효한 범위가 존재하기 때문에 일반적으로 추출된 DNA는 1/10~1/100정도로 희석하여 측정한다.
- spectrophotometer는 소량의 DNA의 정량에는 한계가 있다.
- 최근 개발된 특수한 형태의 spectrophotometer인 Nanodrop과 같은 측정장치는 1ul정도라도 정량이 가능하므로 소량의 DNA의 정밀한 정량이 가능해 졌다.

UV-visible Spectrophotometer



Nano drop spectrophotometer



전기영동 과정







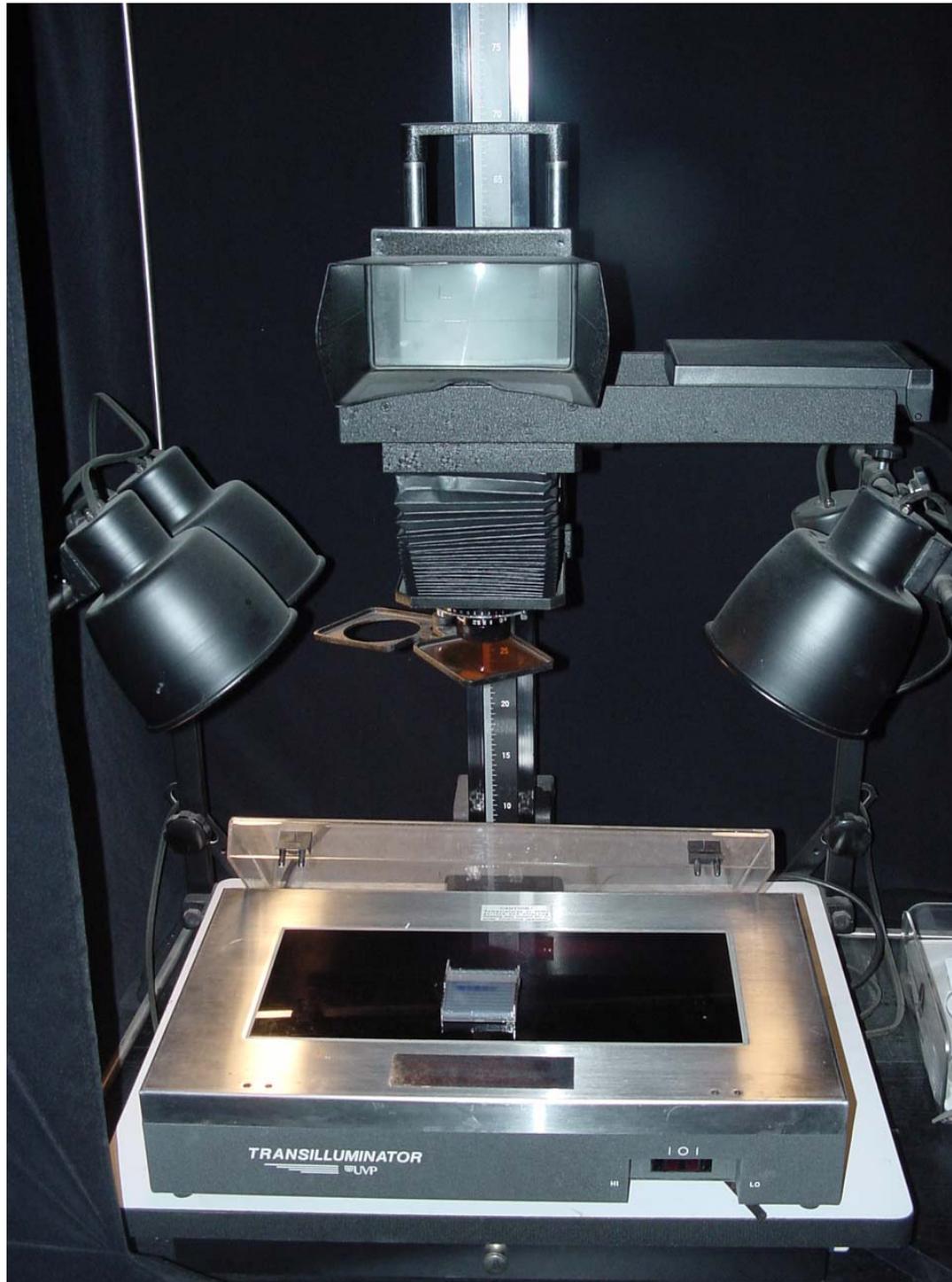


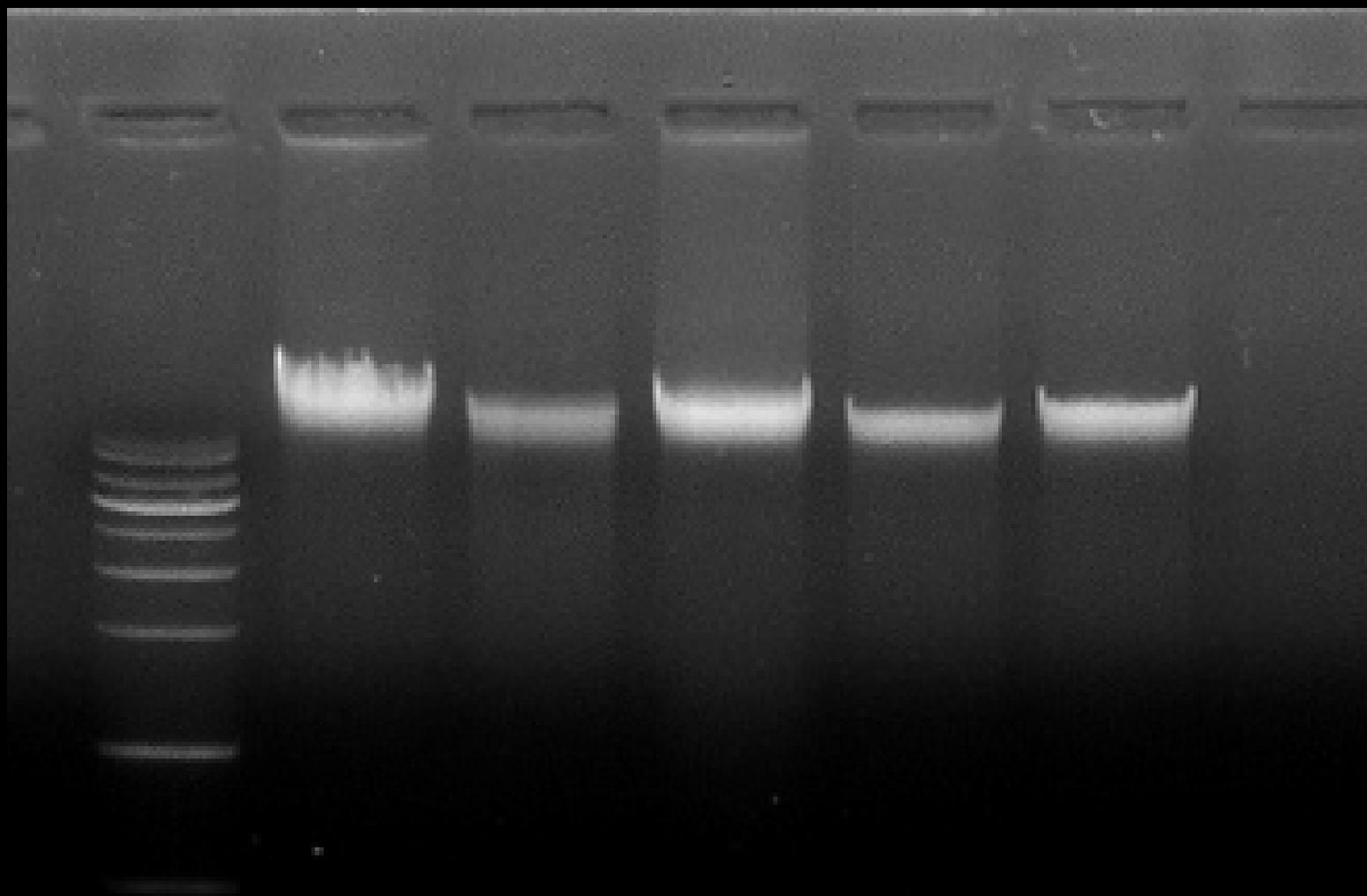
CAUTION
When polarity is set to the position, molecules which are negatively charged will migrate in the direction of arrow

Use only 0.5 x TAE or 0.5 x TBE buffer for electrophoresis

CHECK POLARITY

Turn power off before opening the lid





보고서

실험의 Background 설명을 참조하여 아래 질문에 대한 해답을 정확히 이해한 후 답을 1 페이지 정도 작성해서 제출하시오 (기말고사문제가 될 수 있음).

1. 추출된 DNA를 어떻게 정량할 수 있는지 각각의 방법과 그 원리를 설명하시오.
2. DNA를 전기영동 할 때 DNA는 어떤 방향으로 이동하는가와 그 이유에 대하여 설명하시오.