

잎으로부터 DNA 추출



실험 목적

- 식물 잎으로부터 직접 DNA를 추출해 봄으로서 DNA의 성질을 이해하고, 이를 수행함에 있어서 기본적인 분자실험 장비인 피펫, 원심분리기, 전기영동기 등의 사용법을 숙지한다.

Background

액체질소 (Liquid Nitrogen)

- 식물은 세포벽을 갖고 있어 세포벽을 파쇄하여야 세포 내 내용물이 나와 DNA 추출이 가능하다. 이를 위해 액체질소를 이용하여 막자사발로 식물조직을 분쇄할 수 있다.
- 액체상태의 질소는 **-196°C 의 극저온** 상태 임으로 **매우 조심하여 취급**하여야 한다. 특히 피부에 직접 닿을 경우 피부가 심하게 손상 됨으로 저온장갑을 착용하고, 안구에 튀는 것을 방지하고자 안전고글을 착용하고 취급한다.
- 액체질소는 극저온 상태를 유지시켜 줌으로 여러 가지 산업적으로 이용된다. 특히 생물분야에 있어서는 전기가 많이 소요되는 -80°C 의 초저온냉동고(deepfreezer)를 대신하여 장기보관 냉동생체 시료를 액체질소 속에 담그어 보관하기도 한다.

(예: 냉동정자, 냉동난자의 저장)

※ 참조: 생물학 실험실에서 일반적으로 사용하는 냉장 및 냉동고의 온도

- | | |
|------------------|--|
| - 일반 냉장고: 4 °C | - 초저온 냉동고 (deepfreezer): -80 °C |
| - 일반 냉동고: -20 °C | - 극저온 생체보존장치 (Cryo-Biological System): -196 °C |



DNA의 추출:

- 파쇄된 조직을 extraction buffer (CTAB buffer) 와 섞으면 조직으로부터 DNA가 분리된다 (버퍼속의 EDTA가 **킬레이트(chelate) 작용**을 함)

※ 킬레이트: 한 개의 리간드가 금속 이온과 두 자리 이상에서 배위결합을 하여 생긴 착이온을 뜻한다.

- 조직이 파쇄되면 DNase가 세포내에서 빠져나와서 DNA를 파괴하게 된다. 그러므로 chloroform등의 **단백질 비활성화 물질을 처리**함으로서 모든 효소작용을 정지시킨다.
- DNA는 염(salt)의 존재 하에서 70%정도의 EtOH에서 엉기는 (pellet을 형성) 성질을 갖고 있다. 이 때 원심분리를 하면 엉긴 DNA는 가라앉고 다른 이물질은 용액속에 남아있게 된다. 이러한 성질을 이용하여 순수한 DNA를 추출할 수 있다.
- DNA는 TE (Tris-EDTA) buffer에서 매우 잘 녹는다.

DNA의 추출

실험 방법

1. 실험 시작 전 중탕기를 65도에 맞추어 놓는다.
2. 약 4X7cm 정도 되는 여러가지 식물 잎을 막자사발에 넣고 저온장갑을 끼고 액체질소를 부은 후 파쇄시킨다. **액체질소가 피부에 닿으면 피부조직이 파괴됨으로 장갑을 끼고 매우 주의하여 파쇄시킨다.**
3. 파쇄한 즉시 약수저를 이용하여 50 ml tube에 약 0.5g을 넣고 즉시 준비된 추출용액 (CTAB buffer) 5ml을 넣는다.
4. Vortexing 한 후 65도 중탕기에서 10분간 중탕. 5분 경과 시 꺼내어 흔들어 준 후 중탕 계속.
5. 5ml의 chloroform/Isoamylalcohol (24: 1) 액을 넣고 뚜껑을 닫고 서너번 뒤집어 주어 잘 섞이게 한다. **Chloroform과 Isoamylalcohol은 냄새가 심한 유독성 물질이므로 fumehood내에서 다룬다.**
6. Swing-bucket centrifuge를 이용하여 3,000 rpm에서 5분간 원심분리

7. 스포이드를 이용하여 상등액만 새 tube로 옮긴다. 이때 아래로 가라앉은 식물조직, chloroform, isoamylalcohol은 나중에 폐기통에 폐기한다.
8. 옮겨진 상등액 부피에 대한 2/3 부피의 isopropanol을 피펫을 이용하여 넣고 뚜껑을 닫고 서너번 뒤집어 주어 DNA가 엉기는 것을 확인한다.
9. 3000rpm 5분간 원심분리 (4도 유지).
10. 뚜껑을 열고 상등액을 따라낸다. 이때 DNA pellet은 바닥에 붙어 떨어지지 않는다.
11. 페이퍼타월을 이용하여 tube벽의 액체를 제거한다.
12. 5ml의 TE buffer를 넣고 DNA pellet을 완전히 녹인다. (잘 녹지 않을 경우에는 65도의 중탕기로 열을 가해 녹여도 된다)
13. 7.5M ammonium acetate 2.5ml과 95% ethanol 15ml 을 넣은 후 서너번 뒤집어 DNA를 다시 침전시킨다.
14. 3000rpm 5분간 원심분리 함 (4도 유지).
15. DNA pellet을 완전히 건조시킨 후 약 1ml 의 TE로 완전히 녹인다.

전기영동

준비물:

추출된 DNA, 전기영동 장치, power supply, agarose, 1XTAE buffer, 전자레인지, 피펫, EtBr, 침강제 및 염료, parafilm, UV gel-documentation system

실험 방법

1. EtBr을 첨가하여 1.5% agarose gel을 만든 후 충분히 온도를 내려 굳힌다.
2. Agarose gel을 전기영동기에 거치시킨다.
3. 추출된 DNA 5ul와 침강/염료 1ul를 parafilm 상에서 피펫을 이용하여 섞은 후 agarose gel의 well에 넣는다.
4. 100V에서 약 15분간 전기영동 시킴.
5. UV illuminator 상에서 DNA 추출을 확인함. **UV 광선을 맨눈으로 보는 것은 매우 위험하므로 항상 UV protector를 통하여 UV 상에서 gel을 관찰한다.**

Lamda DNA를 이용한 DNA 정량

- 500ng/ul의 농도를 갖는 lamda DNA를 serial dilution 하여 1) 50ng/ul, 2) 10ng/ul, 3) 2ng/ul의 농도의 DNA를 준비한다.
- 앞으로부터 추출한 DNA를 1/10 희석하여 (10ul DNA + 90ul DW) 위에서 준비된 lamda DNA 세 시료와 같이 agarose gel에 loading 한다.

Lane 1: Lamda 1 (50ng/ul) 5ul

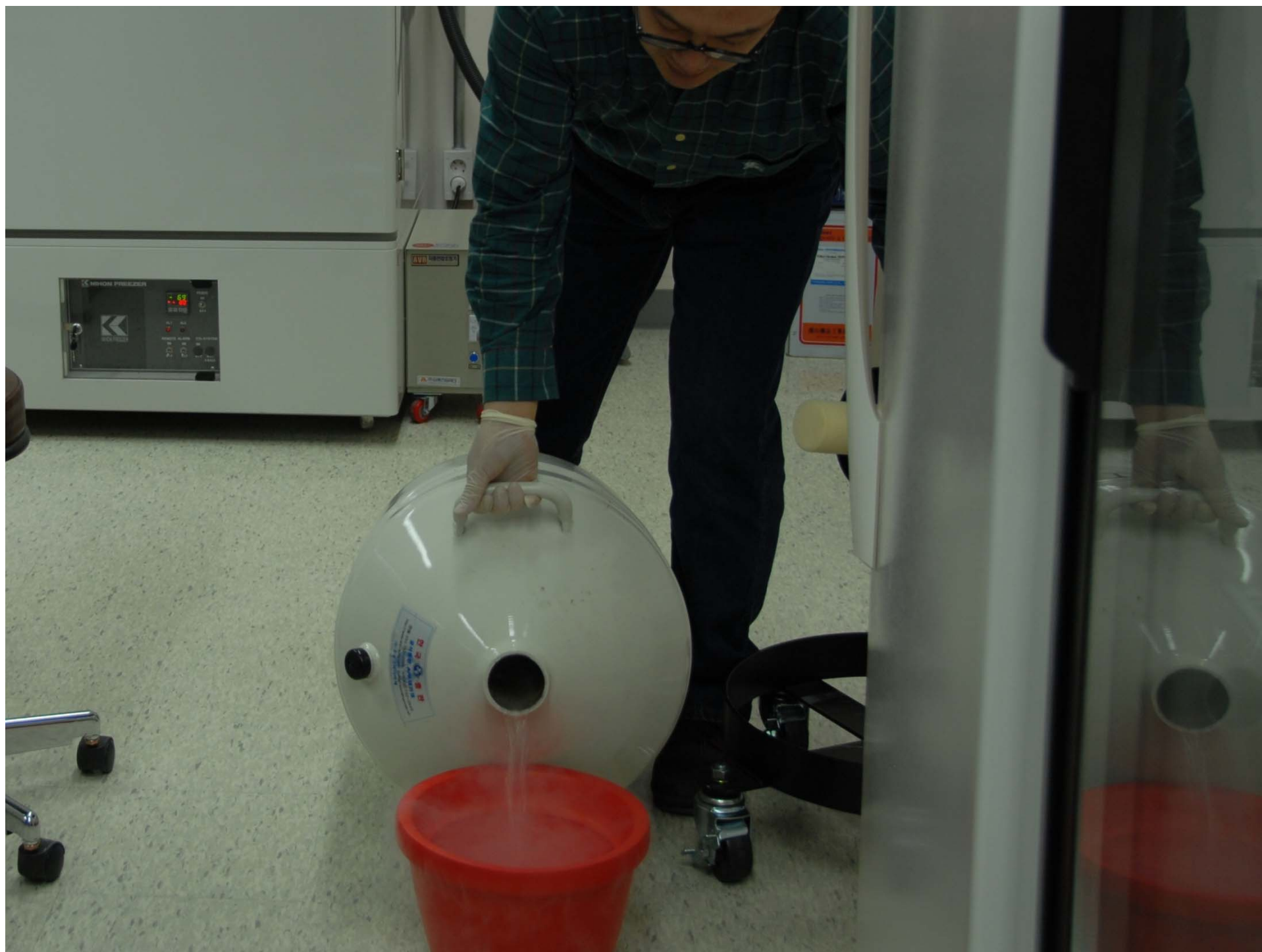
Lane 2: Lamda 1 (10ng/ul) 5ul

Lane 3: Lamda 1 (2ng/ul) 5ul

Lane 4: 1/10로 희석한 자신의 시료 5ul

전기영동을 완료한 후 자신이 추출한 DNA 시료의 농도를 계산한다.

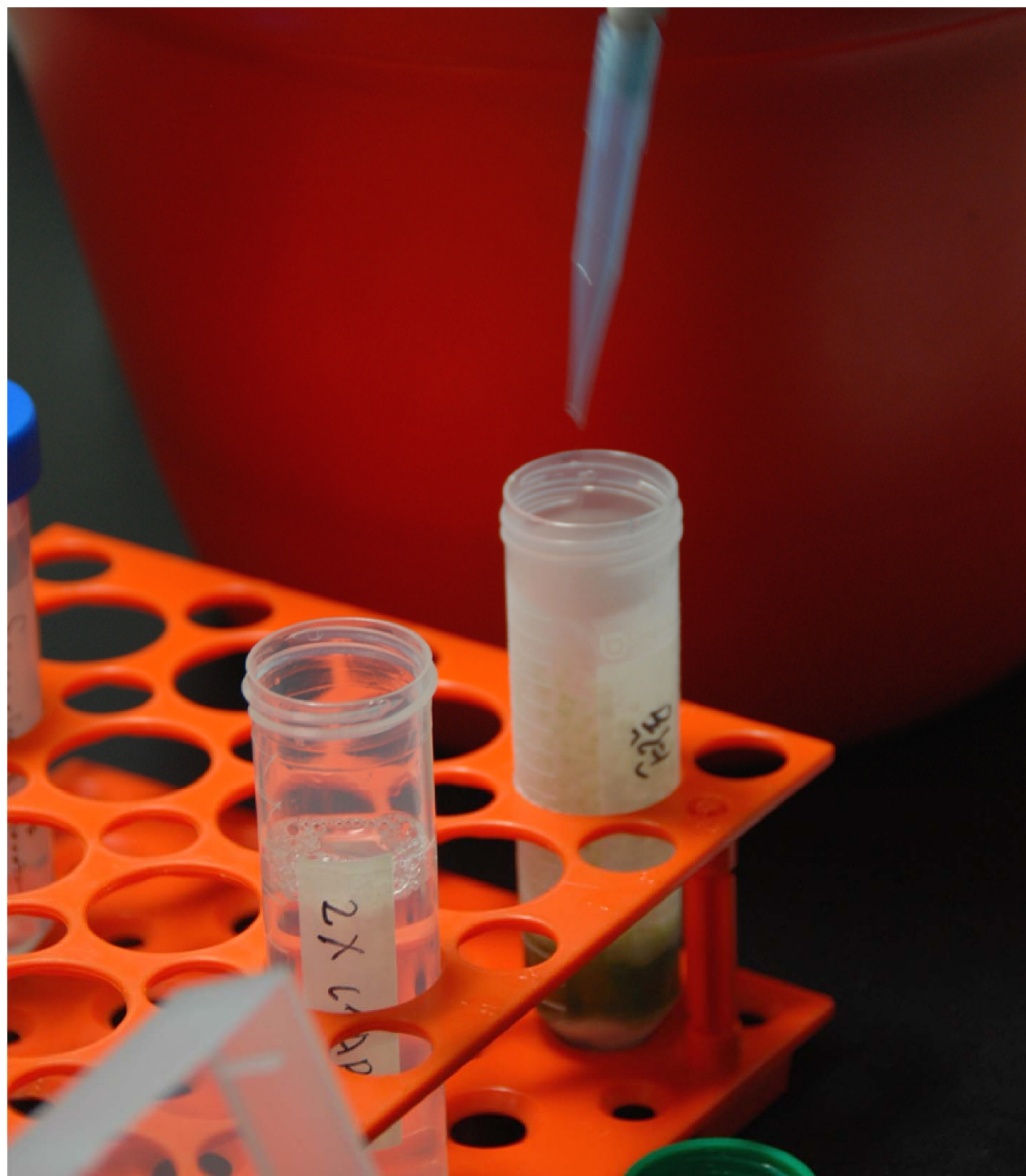
DNA 추출 과정







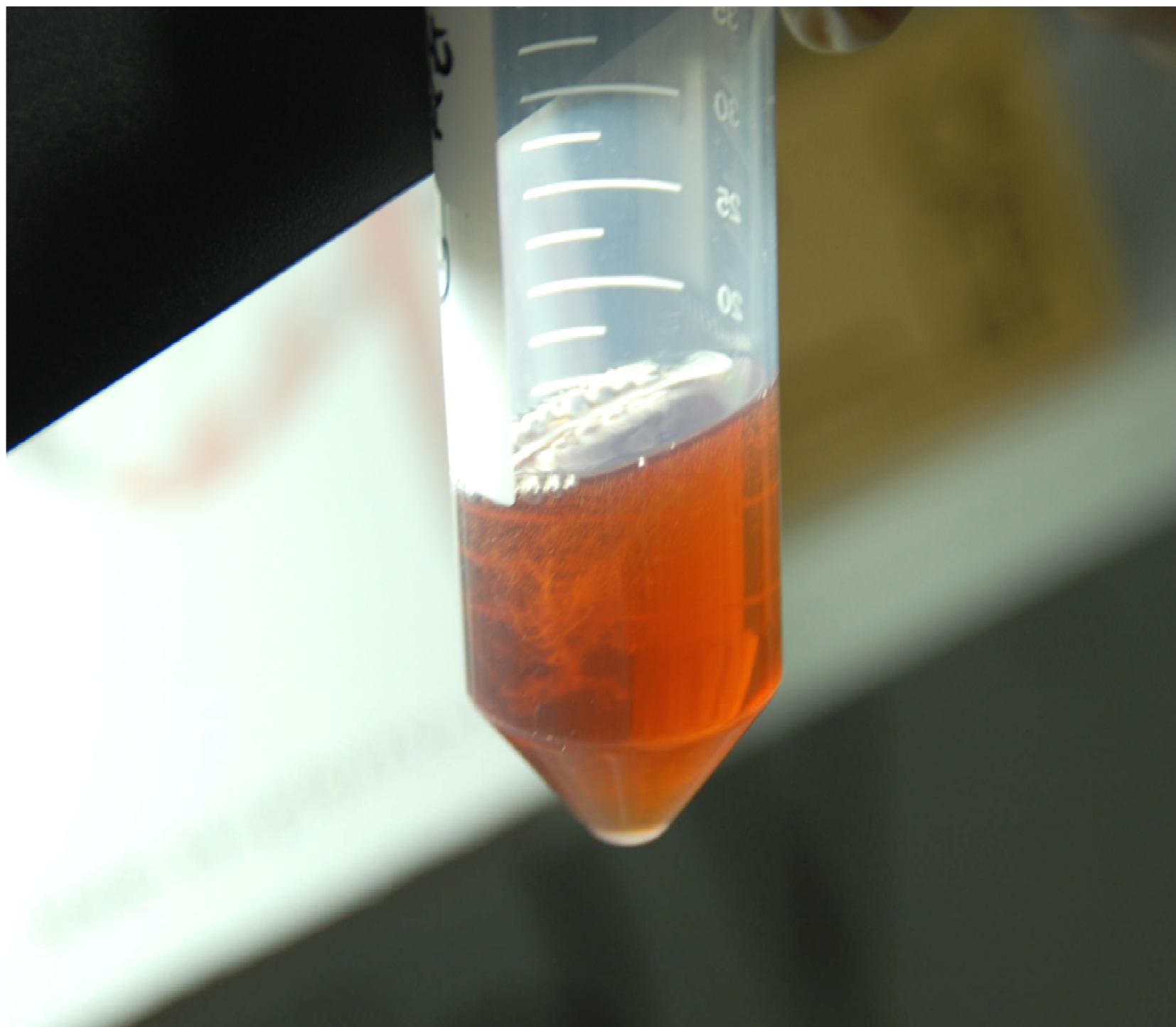




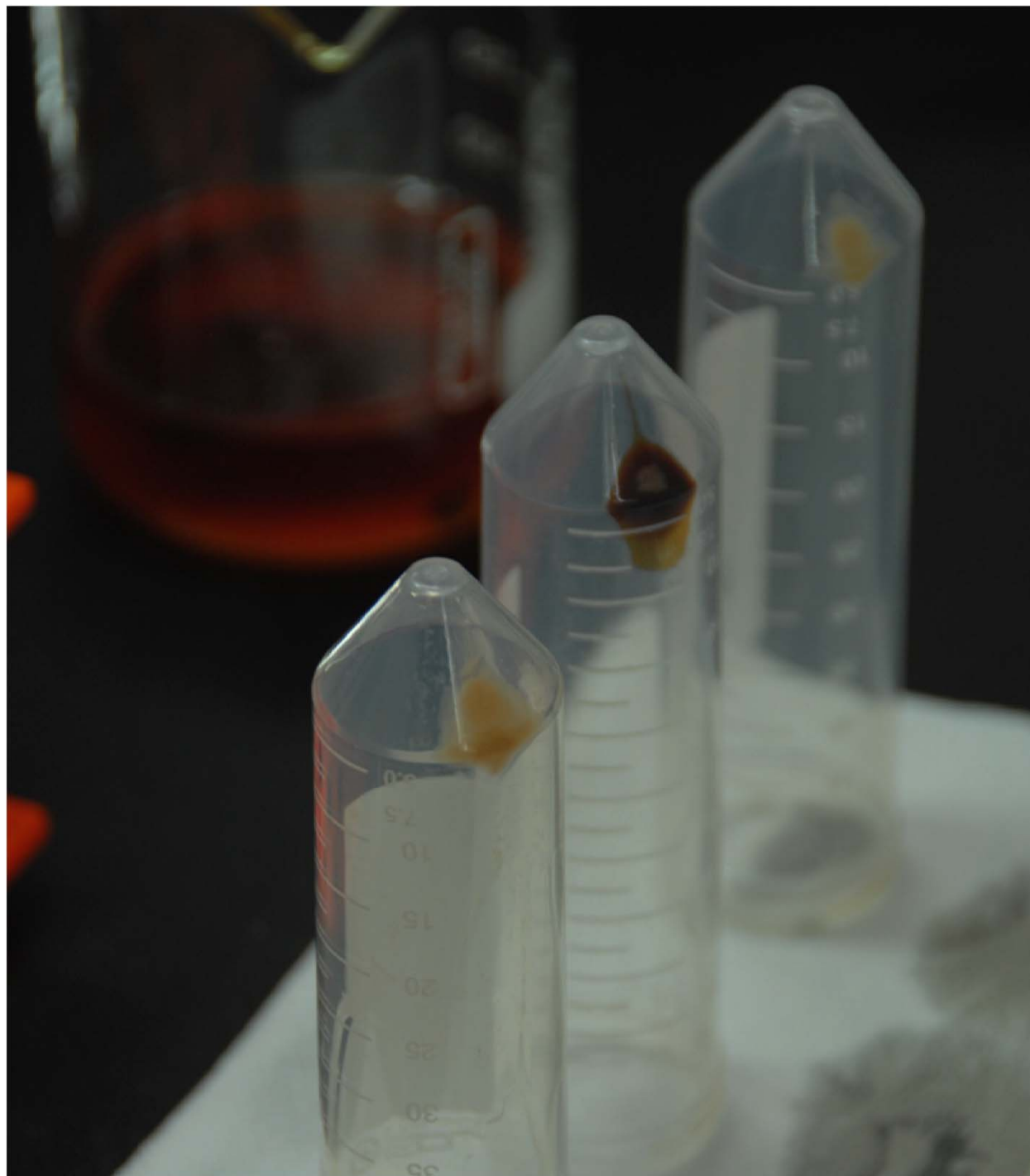


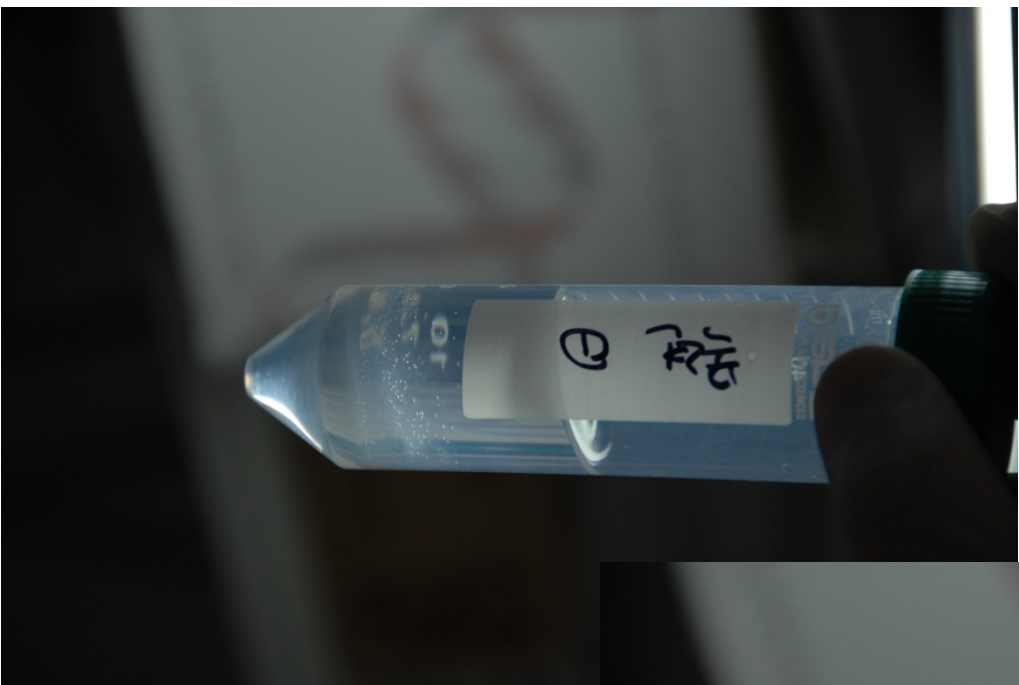




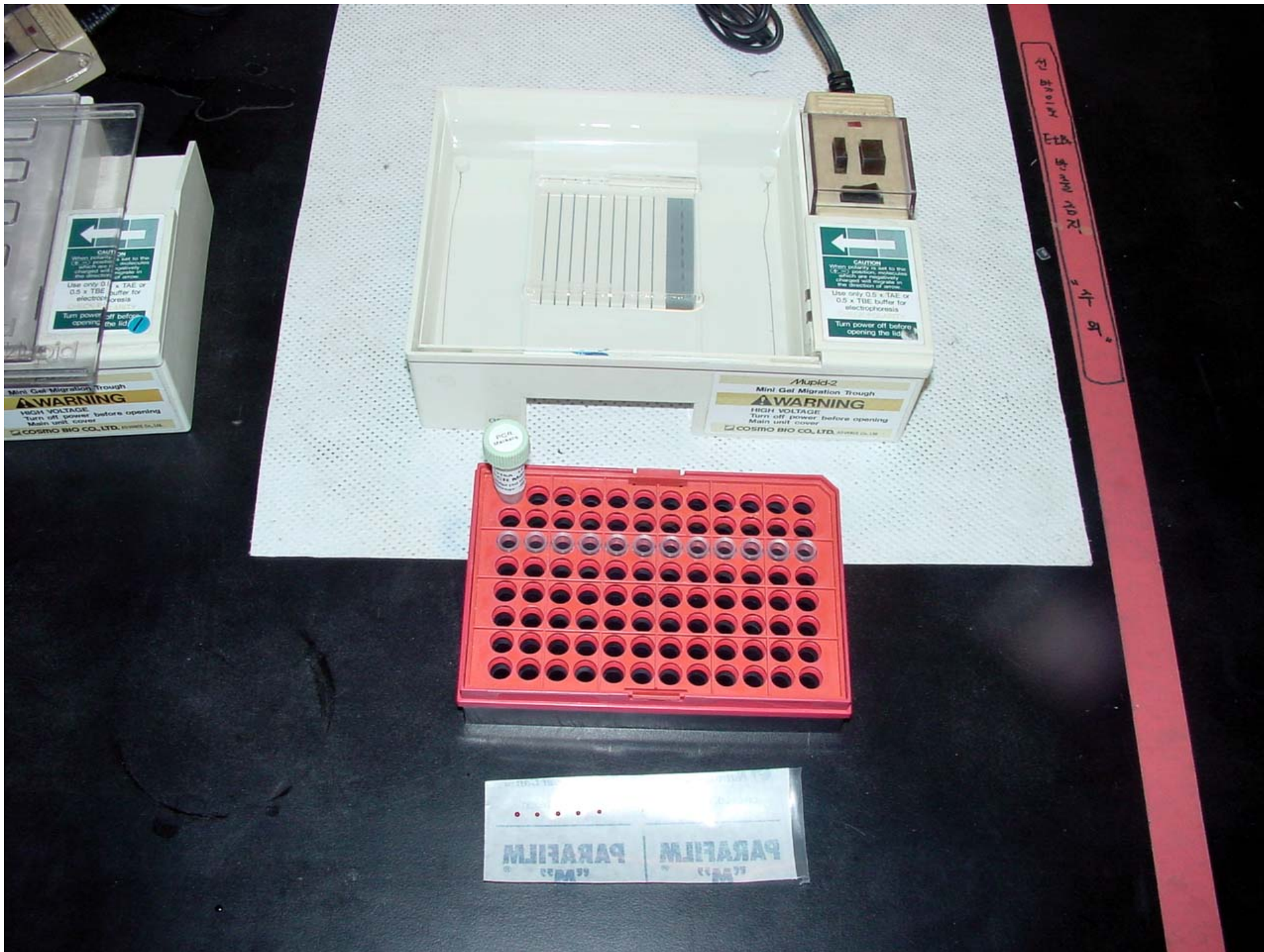


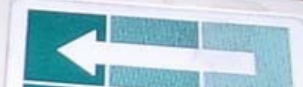
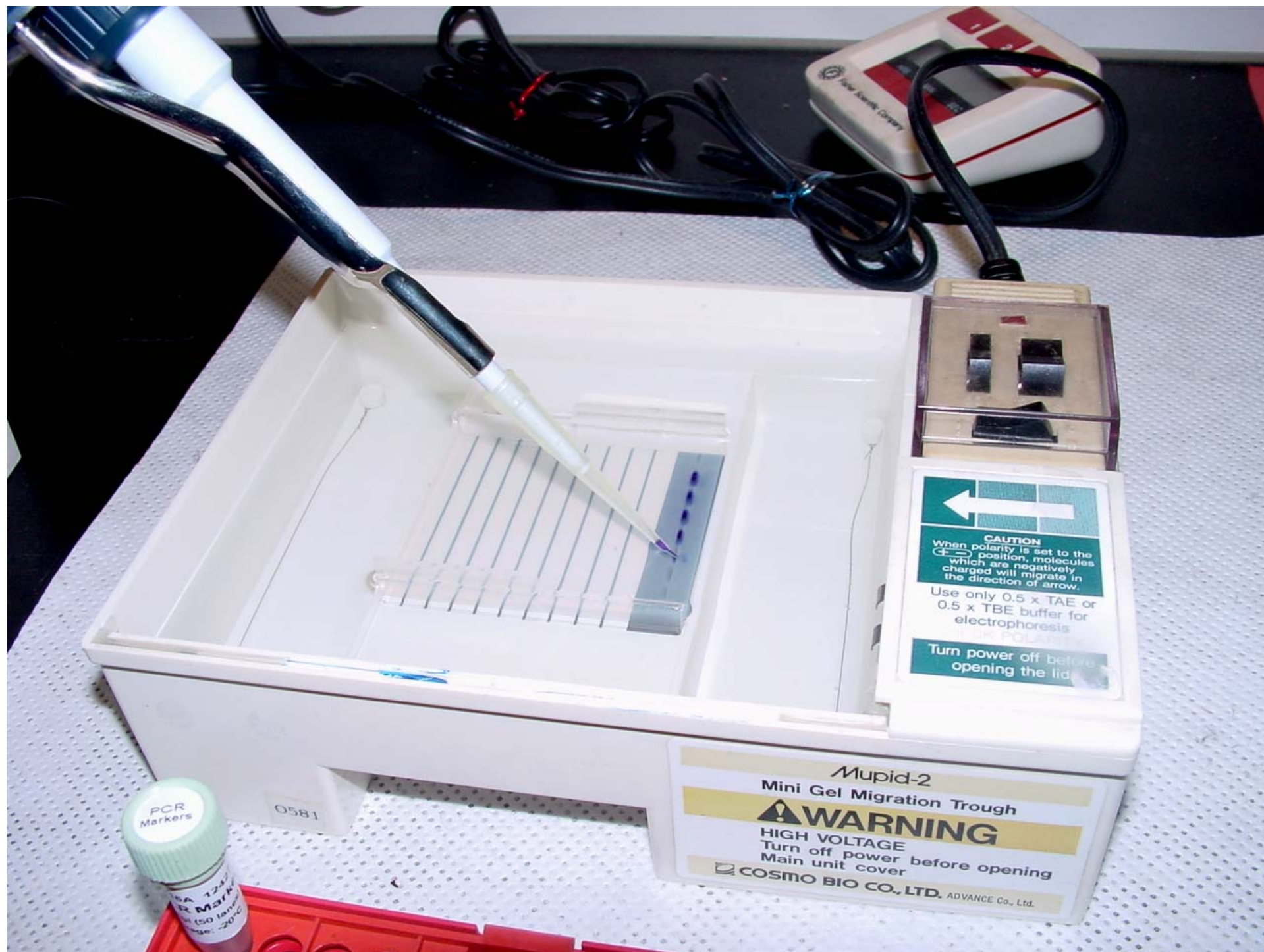






전기영동 과정





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.
DO NOT POLARIZE
Turn power off before opening the lid.

Mupid-2
Mini Gel Migration Trough

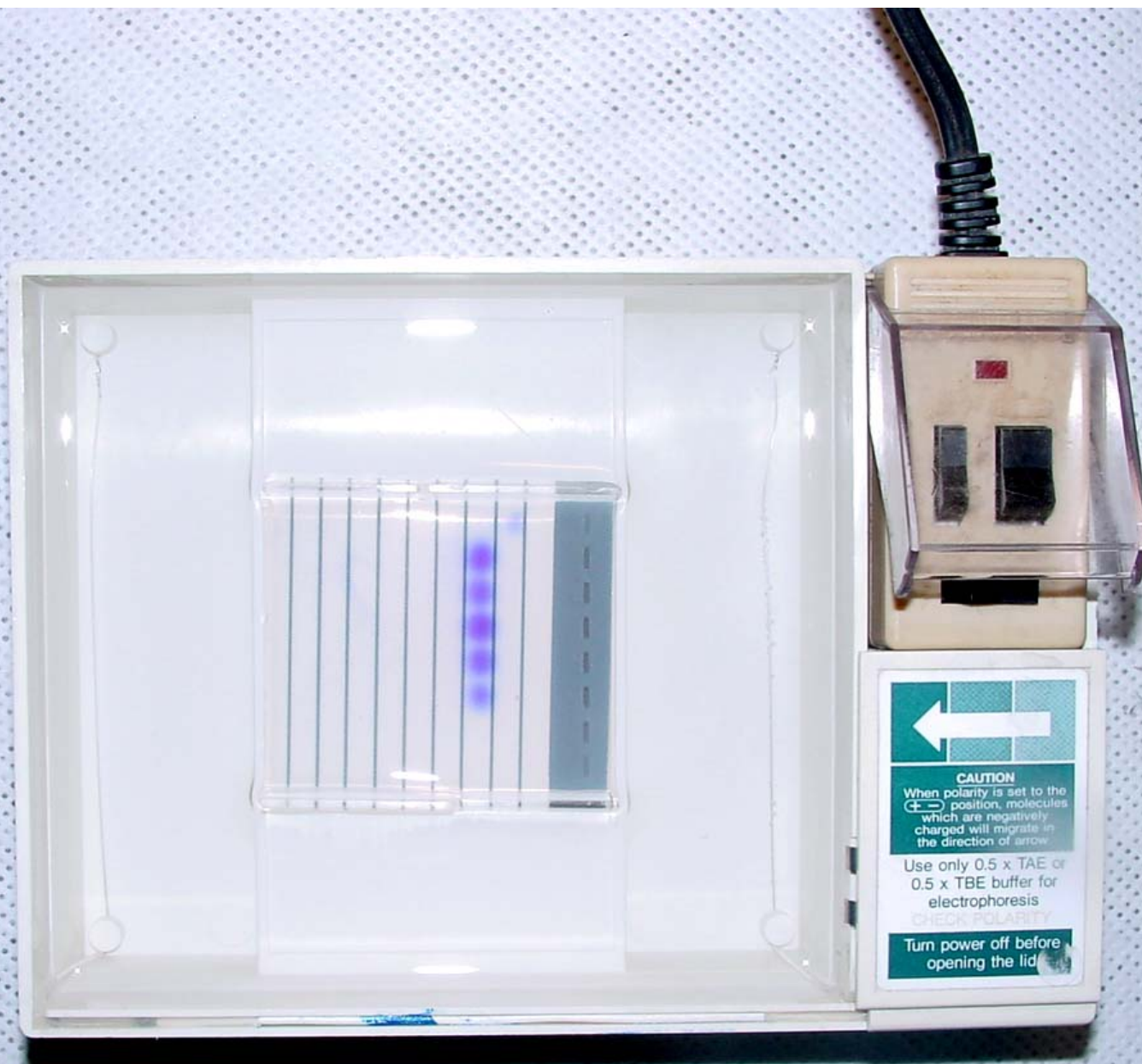
WARNING

HIGH VOLTAGE
Turn off power before opening
Main unit cover

COSMO BIO CO., LTD. ADVANCE Co., Ltd.

PCR
Markers
1245
100 (50 lanes)
-20°C

0581



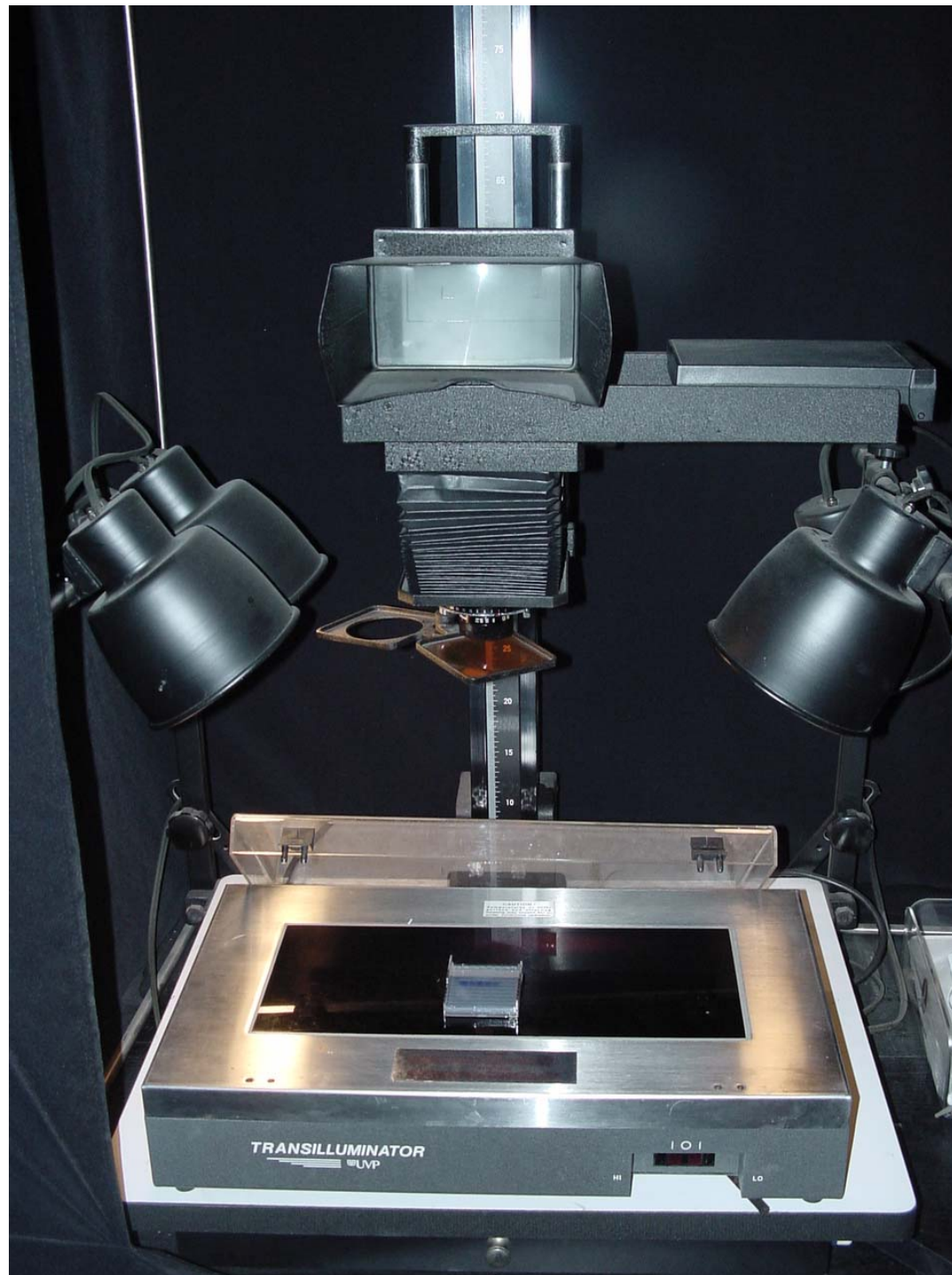
←

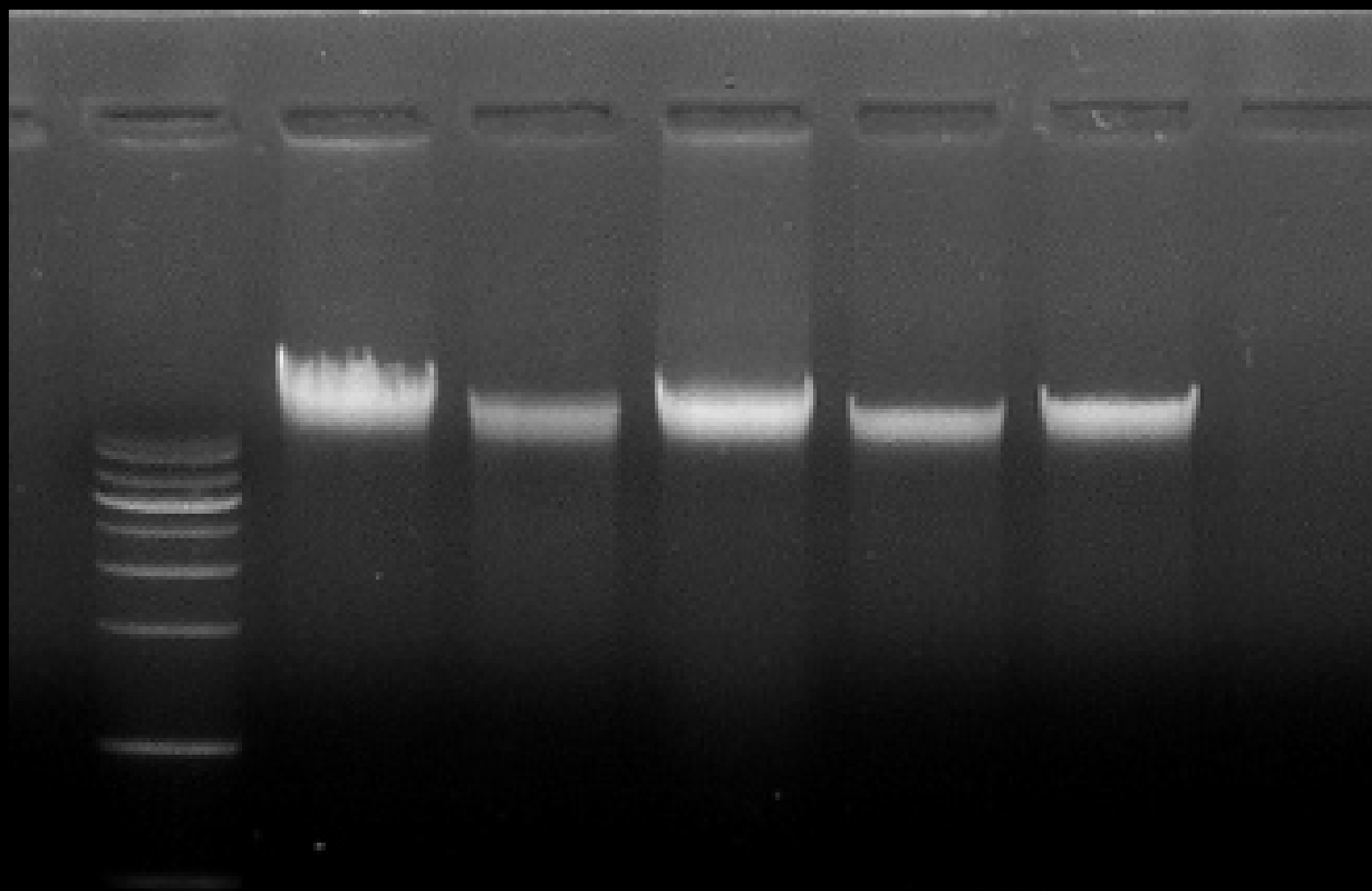
CAUTION
When polarity is set to the position, molecules which are negatively charged will migrate in the direction of arrow

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

CHECK POLARITY

Turn power off before opening the lid





보고서

1. 식물시료로부터 DNA를 추출하는 과정과 그 원리를 단계별로 정리.
2. DNA 추출 결과에 대한 정확한 데이터와 함께 추출 결과를 사진으로 기록하고, lamda DNA와 비교하여 자신이 추출한 DNA 시료의 농도를 기록.
※ 기록할 사항: 1) 시료이름, 학명, 2) agarose gel 농도,
3) 전기영동 시간과 voltage, 4) 각 lane 당 전기영동 한 시료의 양.
3. 생체시료의 초저온 장기보존을 위해 deep freezer를 이용하는 것과 액체질소 보존탱크를 이용하는 경우 각 system의 성질과 장단점을 비교설명 하시오 (1/2 page).