

실험3. 제한효소에 의한 DNA 절단과 전기영동을 이용한 크기 분석

2-9 3조

박지은, 백지혜, 변정인,
양수연, 오유리, 이수현

실험 목표

제한효소를 이용하여 플라스미드 DNA를 절단하고, 전기영동을 통해 크기를 분석할 수 있다.

실험 기구 및 재료

3차 증류수(이온 등이 전혀 없는 순수한 물), 콤, 플라스미드 DNA, EcoR I, BamH I, 10X 버퍼, 원심분리기, 마이크로 피펫, 피펫 팁, Ep tube, TBE 버퍼 용액(Tris-acetate, EDTA), 젤 트, 아가로오즈 가루, 전기영동 장치, bX loading star, 배양기, 전자레인지



실험 방법 및 절차

(1) 제한효소로 DNA 자르기

① Ep tube 에 아래와 같이 플라스미드 DNA, EcoRI, BamHI, 10X Buffer, 3차 증류수를 넣는다.

플라스미드 DNA	5 μ l
EcoRI	1 μ l
BamHI	1 μ l
10X 버퍼	3 μ l
3차 증류수	20 μ l

② 37 $^{\circ}$ C 에서 30분 반응시킨다.



<그림1. uncut, B, B.E, 증류수, DNA1,2차>

실험 방법 및 절차

(2) 아가로오즈 젤 만들기

① TBE 버퍼 용액 (100ml)에 아가로오즈 가루(0.8g)를 넣고 끓여 녹인다.

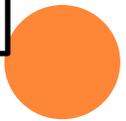
* TBE버퍼에는 Tris-acetate, EDTA가 들어있다.



<그림2. 끓이기 전 아가로오즈 용액>

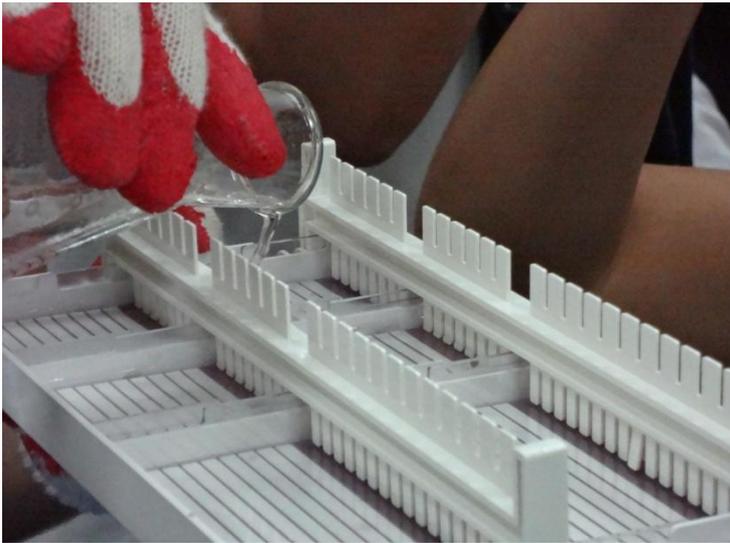


<그림3. 끓인 후 아가로오즈 용액>

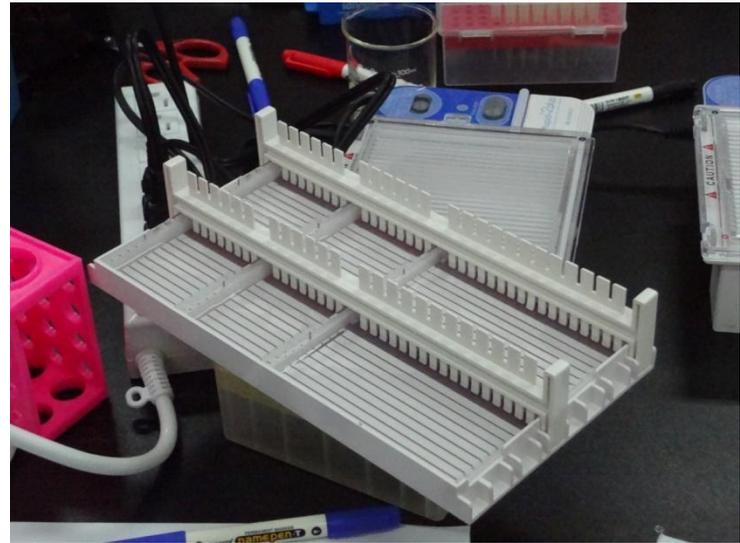


실험 방법 및 절차

② 약 65°C 정도로 식으면 아가로오즈 용액을 젤트에 넣고 식혀 굳힌다.



<그림4. 아가로오즈 용액을 젤트에 넣는 모습>



<그림5. 식히는 중>



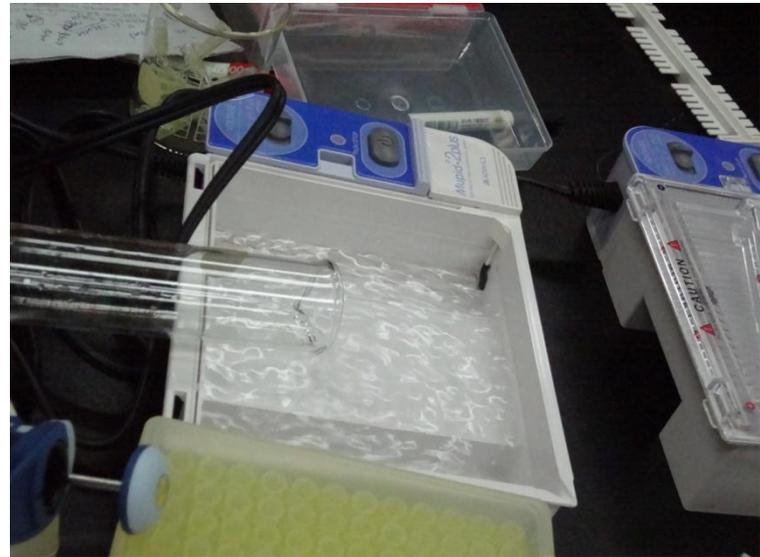
실험 방법 및 절차

(3) 전기영동 장치 설치 및 웰(well)에 DNA loading(로딩)하기

① 전기영동 장치에 아가로오즈 젤을 넣고 TBE 버퍼 용액으로 채운다.



<그림6. TBE 버퍼 용액 >



<그림7. 아가로오즈를 채우는 모습>



실험 방법 및 절차

② DNA에 loading dye(로딩 다이)를 넣는다.

*loading dye(로딩 다이)의 목적

- 웰에 쏜 것이 확산되는 것을 막아줌.
- UV를 쬐었을 때 눈으로 확인할 수 있게 해줌.

BUT! 로딩 스타가 로딩다이의 역할도 겸함. 실험에선 로딩 스타를 사용함.



<그림8. loading star>



<그림9. loading star를 넣은 모습>



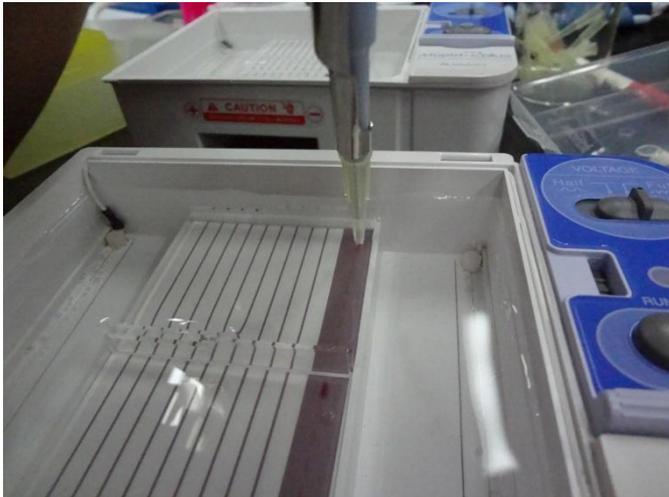
실험 방법 및 절차

③ 아가로오즈 젤의 콤(comb)을 빼고 DNA를 웰(well)에 조심스럽게 넣은 뒤 전원을 켜다.

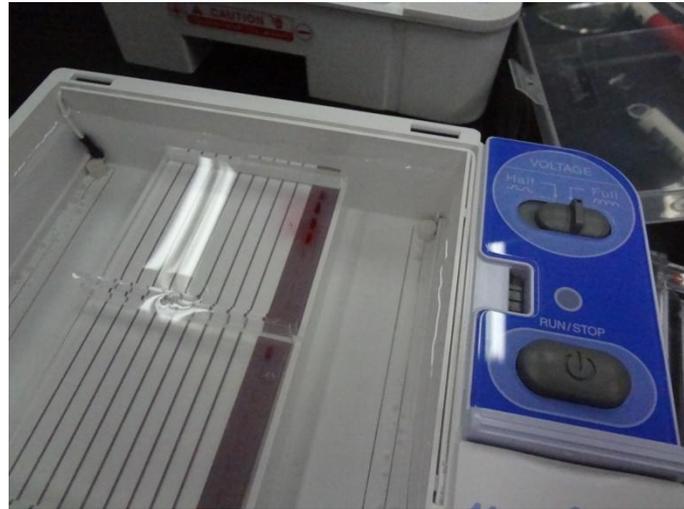
A. 마커(marker) 3 μ l

B. 제한 효소 처리하지 않은 플라스미드 DNA

플라스미드 DNA 1 μ l
6X loading star 2 μ l
3차 증류수 9 μ l



<그림10. uncut을 넣는 모습>



<그림11. 다 넣은 모습>



실험 방법 및 절차

A. 마커(marker) 3 μ l

B. 제한 효소 처리하지 않은 플라스미드 DNA

플라스미드 DNA 1 μ l
6X loading star 2 μ l
3차 증류수 9 μ l

C. 제한 효소로 처리한 플라스미드 DNA

제한 효소 처리한 플라스미드 DNA 10 μ l
6X loading star 2 μ l



실험 방법 및 절차

(4) DNA 이동

(-)를 띠는 DNA는 (+)극 방향으로 이동한다. DNA 분자 크기(길이)에 따라 아가로스 젤 사이로 이동하는 속도가 달라 크기 별로 분리된다. (DNA 조각이 작을수록 빨리, 멀리 이동한다.) **이 때, DNA를 볼 수는 없지만, loading dye(로딩 다이)를 통해 대략 파악할 수 있다.(loading star가 loading dye의 역할을 대신하게 된다.)**

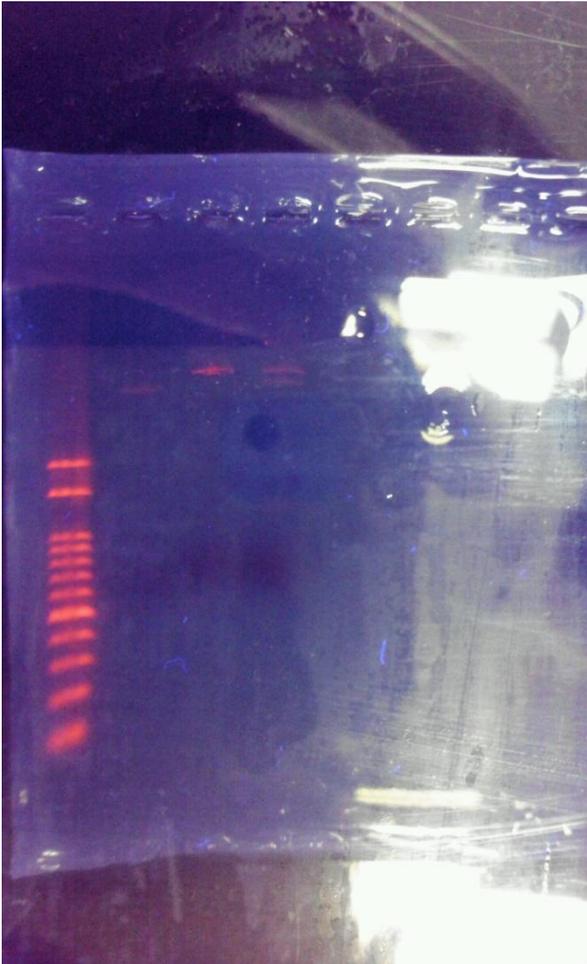
(5) DNA 확인 및 사진찍기

UV를 쬐었을 때 눈으로 확인할 수 있다.

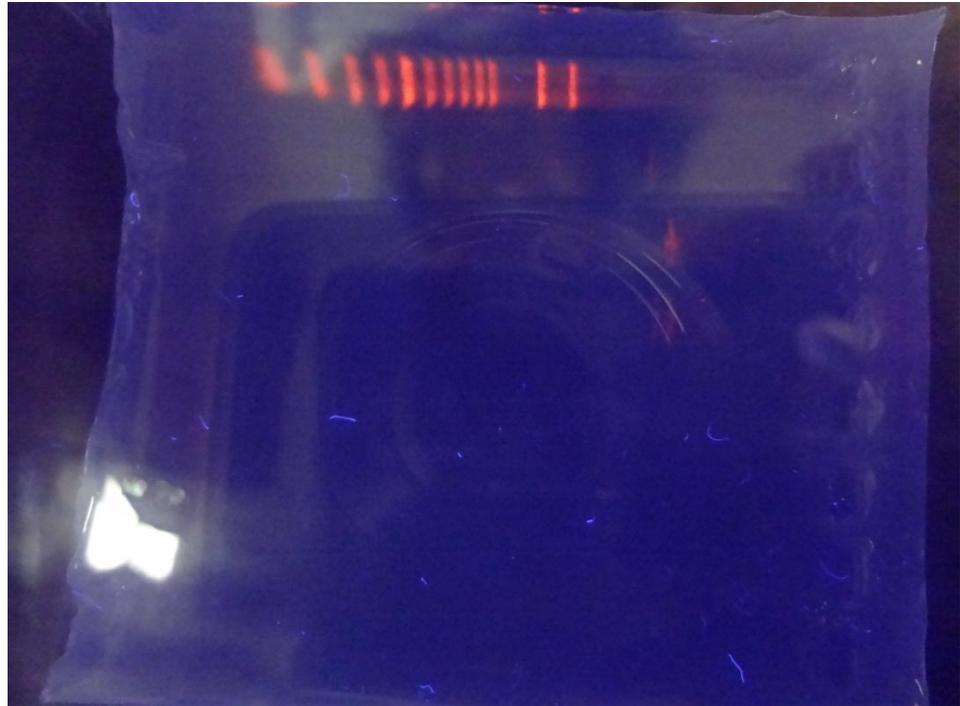
(6) 자른 DNA 크기 확인

DNA 마커와 사이즈를 비교하면서 예상되는 크기의 DNA 조각이 나왔는지 확인한다.

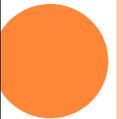
결과



<그림12. 결과 1>



<그림13. 결과 2>



- ☞ ladder
- ☞ Uncut
- ☞ BamH 1
- ☞ BamH 1 + EcoR 1

<그림14. 결과 3>



결론 및 토의

1) 결론 및 기존의 이론과 결론과의 비교 분석

제한 효소를 이용하여 플라스미드 DNA를 절단하고, 전기영동을 통해 크기를 분석할 수 있는가에 대하여 실험했다.

그 결과 <그림14>처럼 형광색으로 빛나는 밴드를 관찰할 수 있었다.

제한효소를 넣지 않은 DNA(uncut)는 한 줄, BamH 1을 넣은 DNA(B)는 한 줄, BamH 1과 EcoR 1을 넣은 DNA(B.E)는 두 줄의 밴드가 나왔다.

이론대로라면 uncut은 한 줄, BamH 1은 한 줄, EcoR 1은 두 줄의 밴드가 나와야 한다.

우리가 실험한 결과 마커(ladder)가 인식할 수 있는 범위에서 벗어났지만 uncut은 BamH I 보다 작은 밴드 하나와 두 줄이 나온 BamH I +EcoR I 은 BamH I 보다 큰 밴드 하나와 BamH I 보다 작지만 uncut보다 큰 다른 밴드 나왔다.

실험을 통해 나온 결과를 보고 정확하진 않지만 대강의 크기를 비교할 수 있었다.



결론 및 토의

2) 반성 및 고찰

마커(ladder)가 인식할 수 있는 범위를 벗어난 곳에 하나도 아니고 well에 넣은 3종류의 DNA의 밴드가 나왔다.

우리는 네 가지의 추측을 했다.

첫 번째, loading star의 양이 부족해서 형광색이 뿌옇게 나왔다.

두 번째, 실험에서 사용한 마커(ladder)보다 더 넓은 범위를 인식할 수 있는 마커를 사용했다면 우리가 사용한 마커보다 더 정확한 결과가 나오지 않았을까.

세 번째, well에 DNA를 넣는 과정에서 제대로 들어가지 못하고 빠져나왔다.

네 번째, 두 번째 실험에서 플라스미드 추출이 잘못되었다.



~
KIM

