대장균 염색체 DNA 분리 실험

**Purpose**

유전자 연구에 필요한 첫 단계인 DNA를 세포로부터 분리하는 원리와 과정을 배운다.

**Materials**

LB 고체배지, LB 액체배지, E.coli, 37 ℃ Incubator, 37 ℃ Shaking Incubator, Conical Flask, 1.5ml tube, Centrifuge, TE Buffer(10mM Tris-HCL, 1mM EDTA, pH8.0), lysozyme, 10% SDS, RNase A, Pronase E, phenol/chloroform, 3M NaCl, 70% Ethanol, 100% Ethanol, Agarose Gel, Ethidium bromide, 1X TAE buffer, 6X loading dye, 1kb DNA ladder, pipette, electrophoresis kit, UV illuminator, rack, 백금이, Alcohol lamp, 얼음, Ice Box

1. LB 고체배지에 E.coli 단일 colony를 백금이를 이용하여 streaking한다. (streaking 할 때 Alcohol lamp에 백금이를 달군 후 식히고 나서 사용한다.)

2. 37 ℃ Incubator에서 하루동안 배양한다.

3. 백금이로 단일 colony를 50ml의 LB 액체배지에 접종한다.

4. 37 ℃ Shaking Incubator에서 160rpm으로 하루동안 배양한다.

5. 배양액을 1.5ml tube에 1ml 옮긴 후 4℃, 8000rpm, 10분간 원심분리 한다.

6. 상층액을 버리고 침전된 세포를 200ul TE buffer에 녹인다.

7. lysozyme 4ul를 넣고 37℃에서 10분간 배양한다.

8. 10% SDS 2ul, RNase A 4ul를 넣고 37℃ Incubator에 30분간 배양하고, Pronase E 4ul를 넣고 섞어서 37℃에서 30분간 더 배양한다.

9. Phenol/chloroform 200ul를 tube에 넣고 10분간 천천히 섞은 다음 26℃, 12000~15000rpm에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 새 tube에 옮긴다.

10. 3M NaCl 20ul, 100% Ethanol 440ul를 넣고, 얼음에 10분간 배양하여 DNA를 침전시킨 후 4℃, 12000~15000rpm에서 10분간원심분리 한다. (침전물이 보이지 않으면 -20℃에서 30분 둔 다음 다시 원심분리 한다.)

11. 상층액을 버리고 침전물에 70% Ethanol 20ul를 넣고, 부드럽게 흔든 다음 다시 원심분리 한다.

12. 상층액을 버리고 침전물을 공기중에 10분간 말린다.

13. 20~100ul의 TE buffer에 녹이고, 1~5ul를 1% Agarose Gel에서 전기영동 한다.

14. Ethidium bromide 용액으로 염색하여 DNA를 확인한다.

동물조직(간) DNA의 분리 실험

**Materials**

간 조직, 액체질소, 막자사발, 시약 숟가락, DNA 추출 완충용액, 비커, 50ml centrifuge tube, 37℃ Incubator, Pronase E, 70% Ethanol(cold), TE buffer, 1% Agarose Gel, 1.5ml tube, pipette, Electrophoresis kit, UV illuminator, 1kb DNA ladder, 6X loading dye, 1X TAE buffer,

**Method**

1. 간 조직 1g을 액체 질소에 얼린 다음, -70℃에 보관한다.

2. 냉동된 간 조직을 -70℃에서 차갑게 식힌 막자사발에 넣고 액체 질소를 부어주면서 가루로 만든다. (액체 질소를 사용할 때에는 저온 화상을 입을 수도 있기 때문에 조심한다.)

3. 조직 가루를 시약 숟가락으로 10ml 부피의 DNA 추출 완충 용액이 들어 있는 비커에 넓게 펴서 뿌려 넣는다. (DNA 추출 완충용액: 10 mM Tris-HCl, 0.1M EDTA, pH 8.0, 20ug/ml Rnase A, 0.5%SDS,)

4. 50ml centrifuge tube에 옮기고, 37℃에서 1시간 배양한다.

5. Pronase E를 최종농도 100ug/ml를 넣고 섞는다.

6. 37℃에서 1hr 배양한다.

7. Phenol 추출 (26℃(실온), 2500rpm, 5min)

9. 200kb 이상의 DNA를 분리하기 위해 phenol extraction 후 4℃에서 50mM Tris-Cl(pH 8.0), 10mM EDTA(pH 8.0) solution 4L씩 4번 투석한다(OD270에서 0.05이하가 될 때까지 투석한다.)

또 100-150kb의 DNA를 분리하기 위해 chloroform 추출 후 새 tube로 옮기고, 0.2 volume의 10M ammonium acetate를 넣고, 2 volume Ethanol을 넣고 실온에서 섞어준다. 섞으면 DNA 침전물이 생기는데 이 DNA 침전물을 새 tube로 옮긴다.

10. 70% Ethanol(cold)로 두 번 washing하고, TE buffer 1ml를 넣고 녹인다. (take 12-24시간)

11. A260과 A280을 측정한다. (A280에 대한 A260의 비가 1.75 이상이여야 한다. 낮은 비는 많은 양의 protein을 나타낸다.

12. DNA 농도를 계산하고 1% Agarose Gel을 전기 영동하여 확인한다.

- DNA 농도 계산 : A260=1 이면 50 ug/ml

게놈 DNA 제한효소 처리 및 전기영동 실험

**Materials**

1.5ml microtube, Genome DNA, 10X 제한효소 buffer, 멸균수, 제한효소,

37℃ Incubator, 1X TAE Buffer, 1% Agarose LE, Microwave oven, Ethidium bromide, Tray, Comb, 10X loading buffer, 1kb DNA ladder, pipette, electrophoresis kit, UV illuminator, rack

**Method**

1. 다음과 같이 시약을 1.5ml microtube에 넣는다.

- 분리한 genome DNA 10ug

- 10X 제한효소 Buffer 10ul

- 멸균수

----------------------------------

Total 98ul

잘 섞은 다음 2ul(20unit)의 제한효소를 넣고 잘 섞는다.

2. 37℃에서 1시간 배양한다.

3. 배양하는 동안 1% Agarose Gel을 만든다.

- 1x TAE Buffer 100ml, Agarose LE 1g을 삼각 플라스크에 넣고 rapping 후 구멍을 내어 microwave oven에 약 1분 30초 돌린다.

- 다 녹으면 흐르는 물에 식힌 후 EtBr 8ul를 섞어주고 Gel tray에 붓는다.

- 붓고 난 후 comb를 꽂고 실온에서 30분간 굳힌다.

-사용 직전에 comb를 제거한다.

4. 제한효소 처리한 DNA 10ul에 10X loading Buffer 1.1ul를 넣고 resuspend 해준 다음 전기영동 한다. (BPB가 gel 3/4까지 도달할 때까지 전기영동 한다.)

5. UV illuminator 위에 놓고 관찰한 후 사진을 촬영한다.

제한효소 처리 후 DNA 순수 분리

**Material**

제한효소 처리한 Genome, phenol/chloroform, vortex, 1.5ml tube, 3M sodium acetate(pH 5.3), 70% Ethanol(cold), 100% Ethanol(cold), Ice, Ice box, centrifuge, TE buffer, 6X loading dye, Electrophoresis kit, UV illuminator, rack, pipette, tip, gloves

**Method**

1. 제한효소 처리한 genome DNA 90ul에 동량의 phenol/chloroform 용액을 넣고 1분간 vortexing 한다.

2. 상층액을 들어내어 새 1.5ml tube에 옮긴다.

3. 부피를 측정한다.

4. 1/10 부피의 3M sodium acetate(pH 5.3)를 넣고 섞는다.

5. 2배 부피의 100% Ethanol(cold)를 넣고 섞는다.

6. 얼음에 30분 이상 둔다

7. 4℃ 13000rpm에서 10분간 원심분리 한다.

8. 상층액을 제거한다.

9. 70% Ethanol(cold) 1ml을 넣고 다시 5분간 원심분리 한다.

10. 상층액을 제거하고 공기중에 10분간 침전물을 건조시킨다.

11. 10ul TE buffer에 녹인다.

12. 2ul를 들어내어 7ul의 TE와 1ul의 6X loading dye를 섞은 다음 전기영동으로 확인한다.