

# 100분만에 끝내는 유전자 분석 실험

백중희

(라이프사이언스에듀랩)

고등학교 교과서에 나오는 생명공학 관련 실증적 실험은 자라나는 청소년들의 미래를 향한 꿈을 키우는 과정에서 매우 소중한 경험이 될 수 있지만 어려운 준비 과정과 긴 실험 시간, 특히 50분/100분 단위로 진행 되어야하는 현실적인 문제로 학교 현장에서 실증적 실험을 한다는 것이 쉬운 일이 아니다.

본 연수에서는 이러한 문제를 해결할 수 있는 다양한 방법을 소개하고자 하며 특히 전문 실험 기구가 제대로 갖춰지지 못한 학교에서 주변의 간단한 기구를 응용하여 할 수 있는 방법, 실험의 각 단계를 50분 단위로 재편하여 진행하는 방법 등 학교 현장에서 실제 실험을 효율적으로 진행할 수 있는 방법을 소개하고자 한다.

실험 과정	내용	전문실험기구	대체가능도구	소요시간
1. DNA추출	구강세포 DNA 추출 -주방세제 버전 -Chelex Resin 버전	microcentrifuge 마이크로피펫 heating block	9V모터 주사기피펫 핫플레이트	50분
2. PCR	유전자 증폭	일반 PCR	PCR기계	2시간
		UF PCR	UF PCR	25분
		RT PCR	RT PCR	30분
3. 전기영동	PCR 결과 분석	전기영동장치 UV transilluminator	스텐레스와 소형플라스틱통 UV펜라이트	25분

## 1. 주방세제를 이용한 구강세포 DNA 추출

### 가. 실험기구 및 시약

실험기구	시약과 재료
micropipette, microcentrifuge, heating block	100% ethanol, 25% 세제액, 8% 소금물, 1.5mL tube

### 나. 실험과정

- 1) 네임펜으로 마이크로튜브(1.5mL)와 종이컵에 이름을 쓴다.
- 2) 10mL의 물을 입안에 넣고 격렬하게(구강상피를 이로 약하게 긁으며) 약 1분간 세척한 뒤 종이컵에 다시 받는다.
- 3) 구강세척액을 마이크로피펫을 사용하여 마이크로튜브에 1500uL 넣는다(750uL씩 2회).
- 4) 마이크로튜브를 microcentrifuge에 무게중심을 맞추어 넣고 30초간 최고속(13,500RPM)으로 돌린다.
- 5) 마이크로튜브 상등액을 버리고 튜브 바닥의 pellet(세포덩이)의 크기가 쌀알 크기 이상이 될 때까지 3)~4)과정을 반복하고 pellet의 크기가 충분하면 튜브 상등액을 제거한 상태에서 튜브를 다시 한번 최고속으로 10초간 돌려서 튜브벽의 가글액을 튜브 바닥으로 모아 사용하던 마이크로피펫팁을 이용하여 pellet 위의 액체를 최대한 제거한다.
- 6) pellet이 든 마이크로튜브에 8% 소금물과 25% 세제액을 각 250uL씩 넣고(미리 반반씩 섞어 500uL로 넣어도 됨) 바로 pellet이 현탁액으로 풀릴 때까지 in & out pipetting한다.

- 7) 마이크로튜브를 55°C 히팅블록에 넣어 10분간 인큐베이션한다.
- 8) 인큐베이션 후 마이크로튜브를 매우 천천히 1회 invert mix하고 1분간 식힌 후 냉동 보관된 에탄올 800uL를 마이크로튜브에 넣고 부드럽게 invert mix 10회 하고 흰 실타레 같은 구조물이나 미세한 입자가 형성되어 있는지를 확인한다.

※ 흰 실타레 또는 미세한 입자에 DNA가 포함되어 있다.

- 9) 마이크로튜브를 13,500RPM으로 1분간 원심분리한다.
- 10) 마이크로튜브 내의 상등액을 제거한 뒤 빈 튜브를 다시 한번 원심분리하여 튜브벽에 묻은 액체를 바닥으로 모으고 이를 마이크로피펫을 이용하여 제거한다.
- 11) 마이크로튜브에 멸균증류수 100uL 넣고 바닥의 흰색 물질을 약 1분간 in & out pipetting으로 잘 녹인다.  
※ 바닥에 흰 고형물이 보이지 않으면 멸균증류수 60uL만 넣고 바닥의 보이지 않는 물질을 잘 녹인다.
- 12) 다시 한번 마이크로튜브를 13,500RPM으로 원심분리하고 상등액만을 새 마이크로튜브로 옮긴다.

※ 기존의 실험 방법과의 차이점

1. 세제에 포함된 단백질분해제를 이용하여 별도의 단백질분해제를 넣지 않는다.
2. 마이크로튜브를 이용하여 DNA를 추출함으로써 DNA추출 시료의 사용량을 최소화하고 쉽게 추출할 수 있다.

#### 다. 전기영동으로 DNA 확인하기

##### 1) 1.2% 아가로스 겔(gel-red포함) 제작

실험기구	시약과 재료
전자렌지, 250mL 플라스크, 랩, 목장갑, 전자저울, 약포지, 겔 트레이	아가로스 분말, gel-red, TAE buffer액(100배 희석 사용)

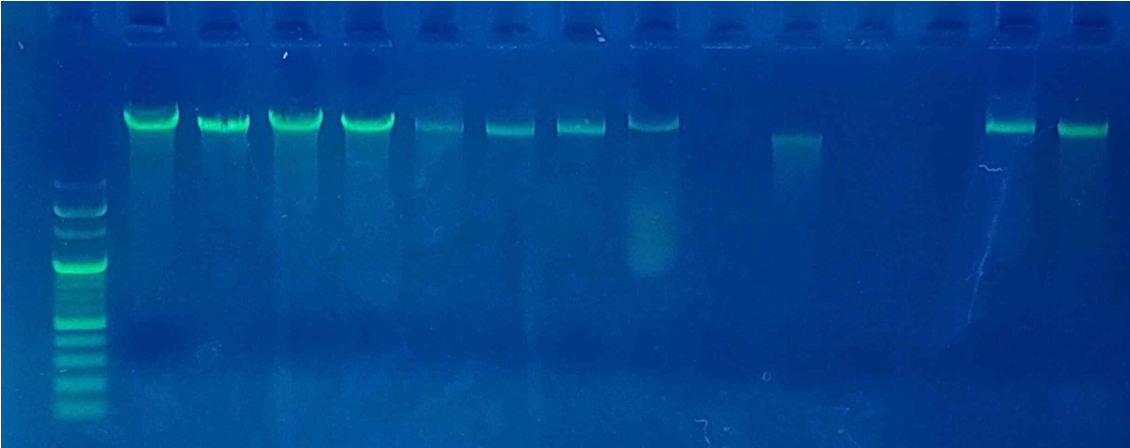
- ① 약포지에 정량된 아가로스를 250mL의 플라스크에 넣고 지시된 양의 TAE buffer를 붓고 흔들어 잘 녹인다..
- ② 플라스크의 입구를 랩으로 막고 구멍을 몇 개 뚫는다.
- ③ 플라스크를 전자렌지에 넣고 가열하다가 내용물이 단시간에 잘 녹을 수 있도록 끓기 직전에 전자렌지의 작동을 잠시 멈추고 플라스크를 꺼내어 흔드는 과정을 약 3~4회 반복하여 내용물에 미세한 알갱이가 보이지 않고 투명해지도록 한다.)
- ④ 플라스크를 약 1분 식힌 후에 gel-red를 1/20000의 비율(아가로스용액 100mL에 5uL)로 넣고 부드럽게 잘 섞는다.
- ⑤ 졸 상의 아가로스용액을 겔 트레이에 붓고 콤을 꽂아 굳힌다.

##### 2) 전기영동

실험기구	시약과 재료
전기영동장치, agarose gel, UV-transilluminator	DNA, 6×Loading dye, TAE buffer액, 파라필름

- ① 파라필름 조각을 실험대 위에 잘 붙이고 그 위에 DNA Loading dye 1.5μl 떨어뜨린 후, Loading dye에 DNA 시료 7.5μl를 넣고 잘 섞는다.
- ② 전기영동 탱크에 아가로스 겔을 넣고 아가로스 겔을 2mm 정도 덮도록 TAE buffer를 붓는다.
- ③ 아가로스 겔의 well에 DNA Loading dye와 섞인 DNA 10uL를 주입한다.
- ④ 장치의 뚜껑을 덮고 전원을 연결하여 100V에서 20분간 전기영동을 실시한다.
- ⑤ Loading dye가 겔의 중간 정도로 내려오면 전원을 끄고 UV-transilluminator 위에 겔을 올려놓고 결과를 관찰한다.

□ 실험결과



본 사진은 좌측에 100bp DNA ladder를 넣고 실험한 결과이며, DNA ladder를 넣지 않고 전기영동 실험을 하면 위의 사진과 같이 일반적으로 위쪽에 total DNA밴드가 10kbp(또는 그 이상) 위치에서 선명하게 나타나고 그 아래로 여러 크기로 조각난 DNA들이 짙은 띠가 나타납니다.

[참고]

인간의 실제 염색체 DNA는 수천만에서 수억 염기쌍(bp)에 달할 정도로 거대하지만, 전기영동 상에서 약 10kbp 부근에 하나의 밴드로 뭉쳐 나오는 데에는 다음과 같은 과학적 원리와 이유가 있다.

1. 추출 과정에서의 물리적 절단 (Shearing Effect)

인간의 세포 속 DNA는 물리적으로 매우 길고 가느다란 실과 같습니다. DNA를 세포 밖으로 추출하는 과정에서 원심분리를 돌리거나, 파이펫팅(Pipetting)을 하고, 용액을 섞는 등의 물리적 힘(Mechanical Shear Stress)이 가해진다.

거대한 Genomic DNA는 이 물리적 자극을 견디지 못하고 무작위로 뚝뚝 끊어지게 된다.

대개 일반적인 실험실 키트나 과정을 거치면 DNA가 완전히 분해되는 것이 아니라, 평균적으로 \*\*약 10kbp ~ 20kbp 정도의 크기 파편으로 일정하게 균질화(Homogenization)된다.

2. 한천당 겔(Agarose Gel)의 그물망 구조와 분리 한계

전기영동에 사용하는 한천당 겔은 일종의 입체적인 그물망 구조를 가지고 있습니다. DNA는 음(-)전하를 띠고 있어 양(+)전하 방향으로 이동하는데, 크기가 클수록 그물망을 통과하기 어려워 느리게 이동한다.

해상력의 한계: 일반적인 1% 내외의 Agarose 겔이 분리할 수 있는 분자량의 한계는 보통 10kbp ~ 20kbp 수준이다.

포화 현상: 물리적으로 끊어진 약 10kbp 이상의 거대한 DNA 조각들은 겔의 그물망 크기에 비해 너무 크기 때문에, 크기별로 촘촘히 분리되지 못하고 겔의 최상단(대략 10kbp 분리선) 근처에 함께 걸려서 거의 같은 속도로 내려오게 된다.

3. 고분자량 DNA의 무작위 분해 결과

추출된 DNA 조각들이 완전히 일정한 크기(정확히 10,000bp)로 잘린 것은 아닙니다. 예를 들어 8kbp, 12kbp, 15kbp 등 다양한 크기의 거대 분자들이 뒤섞여 있다.

하지만 앞서 말한 겔의 분리 한계 때문에 이 거대한 조각들이 서로 분리되지 않고 한곳에 뭉쳐서(Stacking) 내려오게 되며, 우리 눈에는 매우 두껍고 선명한 단일 밴드(High Molecular Weight Band)로 보이게 된다.

만약 이 밴드 아래쪽으로 길게 끌리는 꼬리(Smear)가 보인다면, 그것은 DNA가 보관 중 또는 추출 중에 효소(DNase) 등에 의해 더 작게 분해(Degradation)되었음을 의미하는 실험적 지표가 되기도 한다.

## 2. Chelex®100 resin을 이용한 구강세포 DNA 추출

실험기구	시약과 재료
micropipette, microcentrifuge, heating block	정수기물, 10%(W/V) Chelex®100 Resin, 종이컵, 1.5mL tube

- 1) 네임펜으로 마이크로튜브(1.5mL)와 종이컵에 이름을 쓴다.
- 2) 입안을 물로 가볍게 헹군 후 약 10mL의 물을 입안에 넣고 격렬하게(구강상피를 이로 약하게 긁으며) 약 40초간 세척한 뒤 종이컵에 다시 받는다.
- 3) 구강세척액을 마이크로피펫을 사용하여 마이크로튜브에 1500uL 넣는다(750uL씩 2회).
- 4) 마이크로튜브를 microcentrifuge에 무게중심을 맞추어 넣고 30초간 최고속(13,500RPM)으로 돌린다.
- 5) 마이크로튜브 상등액을 버리고 튜브 바닥의 pellet(세포덩이)의 크기가 쌀알 크기 이상이 될 때까지 3)~4)과정을 반복하고 pellet의 크기가 충분하면 튜브 상등액을 제거한 상태에서 튜브를 다시 한번 최고속으로 10초간 돌려서 튜브벽의 침액을 튜브 바닥으로 모아 사용하던 마이크로피펫팁을 이용하여 pellet 위의 액체를 최대한 제거한다.
- 6) 튜브에 Chelex®를 100uL 넣고 in&out pipetting 하여 pellet이 분쇄되도록 하여 구강세포 현탁액을 만든다.
- 7) 튜브 캡을 닫은 후 floating rack에 끼워서 boiling water bath(또는 히팅블록)에 100°C 로 10분간 끓인다.  
※ floating rack이 없으면 두께 1cm정도의 스티로폼판으로 대체 가능.
- 8) 끓인 후 튜브를 약 5초간 볼텍싱하고(없으면 손톱으로 tapping), 얼음에 1분간 정치했다가 마이크로센트리퓨지에 60초간 최고속(13,500rpm)으로 원심분리한다.
- 9) 원심분리하는 동안 튜브 상등액(DNA용액)을 옮길 새 1.5mL 마이크로튜브에 네임펜으로 이름을 쓴다.
- 10) 새 마이크로피펫팁을 사용하여 맑은 튜브 상등액 약 30~50uL 정도만 새로 준비한 마이크로튜브로 옮긴다.  
이때 바닥의 세포 파편이나 Chelex® 알갱이가 들어가지 않도록 주의한다.
- 11) DNA용액을 사용할 때 까지 아이스나 냉동실에 보관한다.

### [참고]

Chelex®100 Resin은 세포에 상존하는 DNA분해효소(DNase)의 활성을 억제하기 위해 넣는 Chelate로서 킬레이트는 DNase 활성의 보조인자로 작용하는 금속이온( $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ )을 흡착하여 제거하여 DNA가 잘 추출되도록 한다.

## 3. 중합효소 연쇄반응 (PCR, Polymerase chain reaction)

- 1) 20uL PCR primix tube(dNTP, Taq, buffer, loading dye 혼합) 멸균증류수 16uL, primer(F와 R)를 각각 1uL씩, 주형 DNA 2uL 넣는다.(total 20uL)

### 실험 Tip

- 10명이 실험한다면 PCR에 필요한 각자의 주형DNA만을 제외한 10인분의 멸균증류수와 primer(F와 R)를 한꺼번에 넣은 mastermix를 만들어 이를 나눠 사용하는 것이 좋다.
- 1명 분의 여분을 두어 멸균증류수  $16uL \times 11 = 176uL$ , F-primer 11uL, R-primer 11uL을 넣고 혼합 한 뒤 각 PCR tube에 18uL씩 분배한다.

- 2) tube 바닥의 푸른색 시료가 다 녹을 때 까지 약한 tapping으로 잘 녹인다.
- 3) 시료액을 tube바닥으로 모은 뒤 PCR 기계에 넣는다.

- 4) 각자 자신의 PCR 시료를 제작한다.
- 5) PCR 수행 (약 1시간 반 소요)

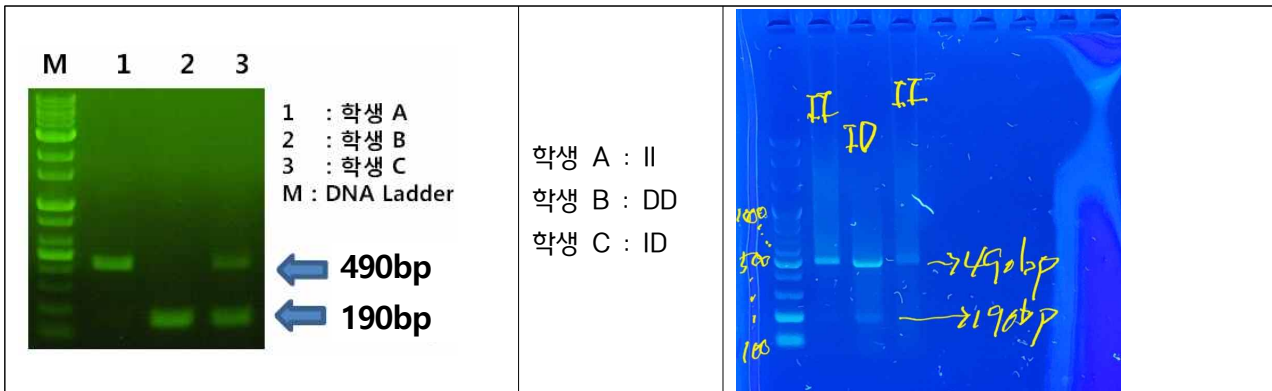
가. ACE PCR

사람의 염색체 17q 23에 위치하고 있는 ACE gene 중에서 Intron 16에 있는 287bp가 있거나 없는 Insertion/Deletion polymorphic 부위를 PCR을 이용하여 증폭한다.

<b>ACE gene primer</b>	Forward primer : 5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3' Reverse primer : 5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T-3'
------------------------	--

3) thermocycle 조건

stage	cycle	step	temperature	time		function
				일반 PCR	UF-PCR	
1	1	1	94°C	3min	60s	pre-denaturation
2	35	1	94°C	30s	4s	denaturation
		2	55°C	30s	6s	annealing
		3	72°C	30s	10s	extending
3	1	1	72°C	5min	90s	after-extending
4	2	2	4°C	∞ (hold)	∞ (hold)	DNA 냉동보관



나. 범죄과학(pMCT118) PCR

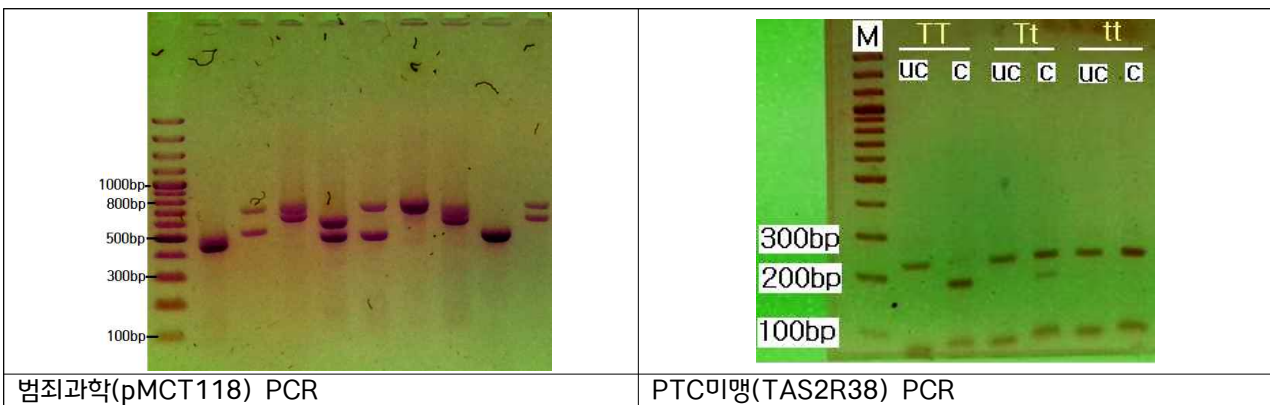
PCR primer	SEQUENCE (5' → 3')	길이
pMCT118-Fdw	gaaactggcc tccaacact gcccgccg	28 mer
pMCT118-Rev	gtcttggttg agatgcacgt gcccttgc	29 mer

stage	cycle	step	temperature	time		function
				일반 PCR	UF-PCR	
1	1	1	94°C	5min	60s	pre-denaturation
2	35	1	94°C	15s	6s	denaturation
		2	65°C	30s	8s	annealing
		3	72°C	40s	10s	extending
3	1	1	72°C	7min	90s	after-extending
4	2	2	4°C	∞ (hold)	∞ (hold)	DNA 냉동보관

다. PTC미맹(TAS2R38) PCR

PCR primer	SEQUENCE (5' → 3')	길이
TAS2R38-Fdw	ccttcgtttt cttggtgaat ttttgggatg tagtgaagag gcgg	44 mer
TAS2R38-Rev	aggttgctt gtttgaat catc	24 mer

stage	cycle	step	temperature	time		function
				일반 PCR	UF-PCR	
1	1	1	94°C	5min	90s	pre-denaturation
2	35	1	94°C	30s	4s	denaturation
		2	64°C	45s	6s	annealing
		3	72°C	45s	10s	extending
3	1	1	72°C	5min	60s	after-extending
4	2	2	4°C	∞ (hold)	∞ (hold)	DNA 냉동보관

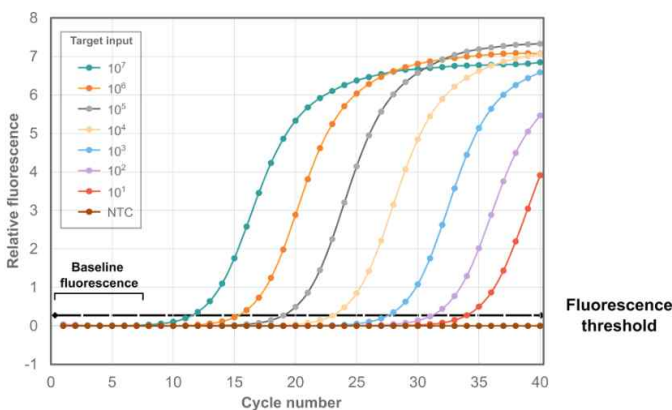


범죄과학(pMCT118) PCR

PTC미맹(TAS2R38) PCR

#### 4. Real-time PCR

Real-time PCR(실시간 중합효소 연쇄반응) 분자진단법은 DNA 증폭 과정을 실시간으로 모니터링해 해석하는 PCR 기반의 기술로 Real-time PCR은 기존 PCR과 달리 DNA 증폭 후 결과를 확인하는 전기영동의과정이 필요 없어 보다 신속하게 결과를 도출할 수 있고 정량적 평가가 가능해 질병의 중증도를 파악할 수 있다



PCR 과정에서 Cycle 수가 증가 할 수록 새로운 DNA 가닥을 합성할 때마다 형광의 양도 증가하여, 실시간으로 형광의 증가량을 확인할 수 있다.

[활용예] SMARTCHEK *E-coli* O157 detection kit (진시스템)

식중독 대장균 O157을 검사할 수 있는 실험으로 검사 대상 식품 시료를 대장균 배지에서 증균 배양하고 DNA를 추출하여 RT PCR을 할 경우 전기영동 과정 없이 30분만에 감염 여부를 확인할 수 있다.

※ 간이 실험 장비 제작법은 고급생명과학실험서(백종희) 참고