실험 제목	실험교사 서명
혈액을 이용한 DNA 추출	

학교	학년	반	번호	이름

1. 실험 목표

혈액의 특징을 이해하고 혈액으로부터 DNA를 추출하여 전기영동으로 확인할 수 있다. 또한 추출된 DNA의 활용성을 알아본다.

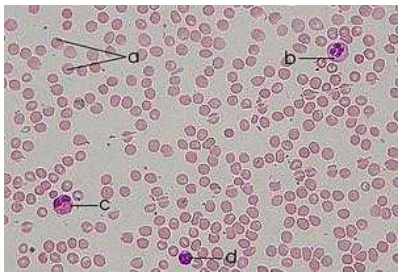
2. 배경 이론

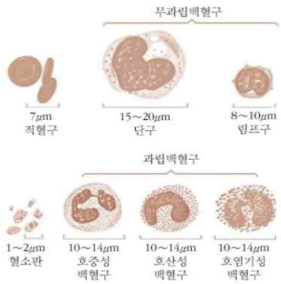
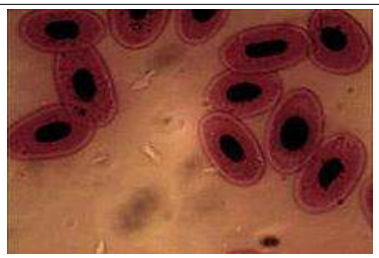
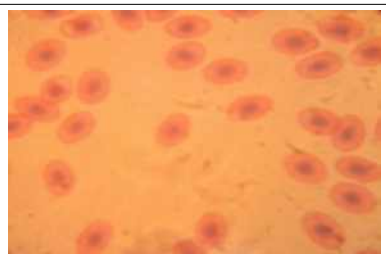
1)혈액이란?

혈액은 혈장(약 55%)과 혈구(약45%)의 구성성분으로 이루어져 있다.

혈장은 약 90%가 물이며 여러 다양한 이온들이 포함되어 있어 혈액의 pH를 유지시킨다 또한 몸 안의 세포에 호르몬, 산소 및 영양소를 공급하고 세포의 신진대사에 의해 발생하는 이산화탄소와 노폐물을 회수하여 운반한다.

혈액에 존재하는 세포 유래 구성성분은 크게 적혈구, 백혈구, 혈소판이 있다. **적혈구**는 산소운반에 관여한다. 척추동물의 피가 붉은 색인 것은 적혈구 안의 철분이 산소와 결합하여 붉은 색을 띠기 때문이며, 종의 위치에 따라 핵의 유무가 나눠진다. 사람의 경우 골수에서 혈구아세포가 분열하여 처음 만들어진 적혈구를 적아세포라고 한다. 이 적아세포에는 핵이 있다. 그러나 적아세포는 분화되면서 크기가 줄어들고 세포질이 핵에 비해 많아지다가 마침내 핵이 사라지면서 적혈구로 성숙하면서 중심부가 오목한 작은 원반 형태가 된다. **백혈구**는 단핵구, 호중성 백혈구, 호염기성백혈구, 호산성백혈구 및 림프구로 구성된다. 이들은 질병에 대항하여 신체를 방어하는 기능을 가진다. 감염된 박테리아나 죽은 세포 부스러기를 포획해 소화시킴으로서 감염에 대항하여 싸우는 데 대부분의 시간을 소모한다. **혈소판**은 대식세포의 파편들이다. 대식세포가 골수에 머물면서 막으로 싸인 세포질 덩어리를 일부 쥐어짜 혈소판을 만든다. 혈소판은 혈액응고에 관여하여 손상된 혈관을 막음으로서 과다 출혈로부터 동물을 보호한다.

<table>
<tr><td colspan="3">

사람 (4,550,000/mm^3)
a – 적혈구(erythrocyte)
b – 호중구(neutrophil)
c – 호산구(eosinophil)
d – 림프구(lymphocyte)

</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>붕어(1,590,000/mm^3)</td><td>개구리 (270,000/mm^3)</td><td>닭(3,550,000/mm^3)</td></tr>
</table>

2) DNA의 구조와 기능

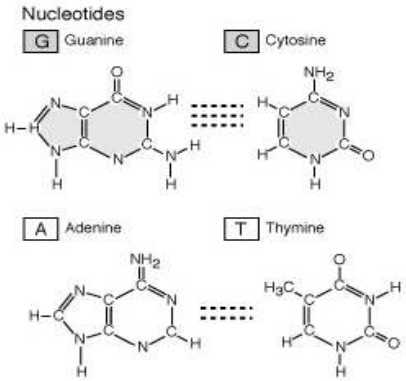
세포 내에서 생물의 유전 정보를 장기간에 걸쳐 저장하는 물질이며, 염기에 의해 구분되는 네 종류의 nucleotide가 결합하여 **이중 나선 구조**를 이룬다.

(1) Nucleotide

스위스의 생물학자 프레드릭 미셔(Frederick Miescher)에 의하여 1869년에 처음으로 발견되었다. 백혈구로부터 핵 성분을 분리 추출하였으며, 강한 산성을 나타내며 인을 함유하는 유기화합물을 발견하였다. 이 후 핵 속에 들어있는 산성 물질이라는 뜻에서 핵산이라 불리게 되었다. 핵산을 가수분해하면 그 기본단위인 nucleotide를 얻을 수 있다. Nucleotide를 더욱 강한 조건으로 가수분해하면 염기(base), 당(sugar), 인산(phosphate)을 얻을 수 있다.

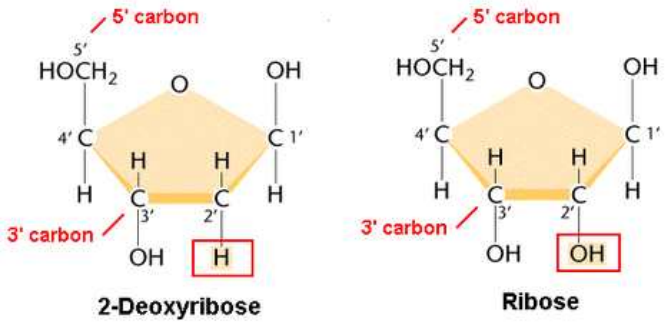
(2) 염기(base)

생명현상의 모든 정보는 핵산에 담겨 있는데 그 핵산의 구성단위인 nucleotide는 4가지 밖에 없다. 4가지의 nucleotide는 그 구성 성분 중 염기만이 서로 다르다. 4가지의 염기는 adenine, guanine, cytosine, thymine이다.



(3) 당(sugar)

Nucleotide를 구성하는 당은 두 종류가 있다. DNA를 구성하는 nucleotide의 당은 2번 탄소에 산소가 없이 수소(-H)만 결합되어 있는 5탄당인 deoxyribose이다. 반면, RNA를 구성하는 당은 2번 탄소에 hydroxyl(-OH)가 결합되어 있는 ribose이다. 이러한 이유 때문에 DNA가 RNA보다 반응성이 작고, 안정성이 높으며 다른 구조를 갖는다.

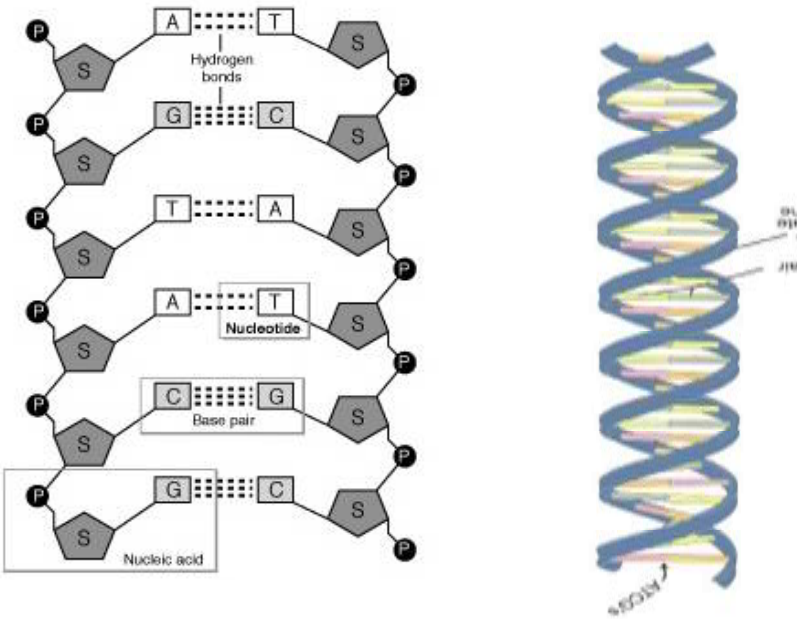


(4) 인산(phosphate)

인산은 강산으로서 생체 ph조건에서 항상 (-) charge를 띠고 있다. Phosphate가 핵산의 단위인 nucleotide마다 하나씩 있으며 (-) charge를 갖고 있어 거대한 분자량을 가진 핵산이 물에 잘 녹을 수 있다.

(5) 이중나선 구조

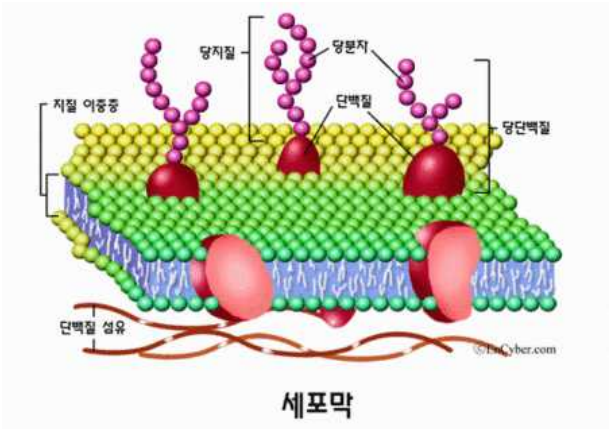
DNA는 2개의 nucleotide사슬로 이루어진 이중나선이다. 염기 A와 T, G와 C가 짝을 이루어 상보적 염기사이의 수소결합이 이중나선의 가운데에서 두 가닥 DNA를 연결한다.



3) 세포막의 구조와 기능

세포 내부를 채우고 있는 원형질의 가장 바깥쪽의 얇은 막으로 원형질막이라고도 한다. 지질 분자의 층 사이에 단백질 분자가 모자이크 모양으로 박힌 구조로, 이 막에 의해 세포 내에 들어오는 수분을 조절하거나 드나드는 물질을 제어하고 있다.

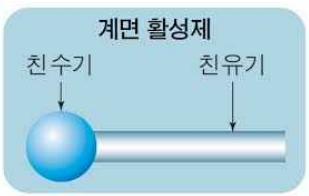
세포막의 주요 구성 성분은 양친매성을 나타내는 인지질이다. 막의 내부는 소수성이고, 외부는 친수성의 이중층을 이루고 있다. 두께는 약 5nm로, 물, 산소, 이산화탄소, 글리세롤, 지용성 분자 등은 비교적 쉽게 세포막을 통과하지만, 글루코오스, 아미노산, 이온 등은 특별한 수송체계의 도움을 필요로 한다. 세포막에는 다양한 종류의 단백질이 부착 또는 관통하여 존재하며, 세포막의 많은 분자들이 당쇄와 결합하여 당지질, 당단백질의 형태로 분포한다.



세포막

4) DNA 추출 용액의 기능

계면활성제 한 분자 안에 친수성기와 소수성기가 함께 존재, 세포막을 구성하고 있는 인지질을 분해하여 세포소기관들이 밖으로 나올 수 있게 도와준다.



염 (Salt) 히스톤 단백질과 DNA를 분리시켜주는 역할을 하며, 인산기를 가지고 있는 DNA는 반발력을 가져 서로 잘 뭉쳐지지 않지만 염분이 들어가면 반발력이 줄어 서로 잘 뭉쳐지게 한다.

Proteinase K 단백질을 분해하는 효소이다. 세포에 있는 단백질을 분해한다. 특히 DNA에 결합된 단백질을 제거하여 순순한 DNA를 얻을 수 있다.

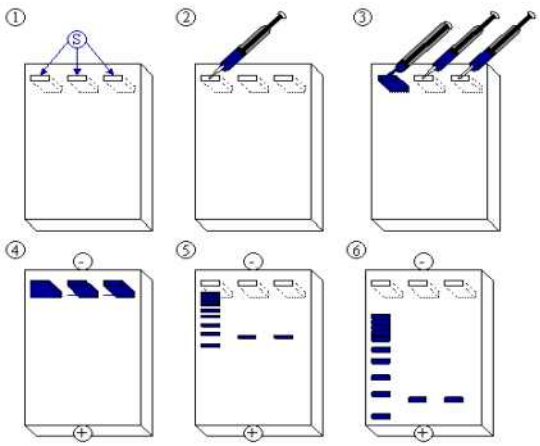
알코올 극성인 DNA는 물(극성)에 잘 녹아 있게 된다. 용해되어있던 DNA는 비극성인 알코올을 만나 용해도가 낮아지면서 DNA가 응결이 된다.

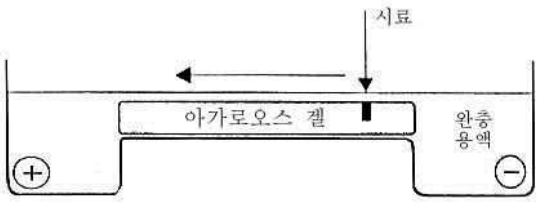
5) 전기영동

전기영동이란 핵산이나 단백질과 같은 고분자를 전기장을 띤 매질(gel)에서 이동시켜 분리하는 기술이다. 분자들의 이동 속도는 분자량의 크기, 모양 및 전하 크기에 따라 다르며 또한 그 분자가 이동하는 gel 내 전기장의 크기, 용액의 점도, 전해질의 농도 및 물질의 종류에 따라서도 다르게 나타난다.

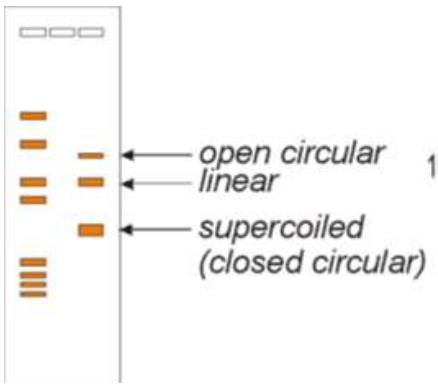
Gel의 납작한 직사각형 판의 한 끝에 홈을 만들고 이 홈에 DNA 샘플을 넣는다. 여기에 전극을 걸어 주면 DNA는 인산기로 인해 음전하를 가지므로 (+)극으로 이동한다. 그런데 길이가 긴 DNA 조각은 젤을 빠져 나가기 어려워 작은 DNA 조각보다 더 천천히 이동하므로 결국 DNA의 길이에 따라 분리된다. Gel의 각 통로(lane)에 여러 개의 띠가 나타나며, 각 띠는 일정 크기의 DNA 분자로 이루어져 있다.

Plasmid DNA는 그 모양이 선형, 둥근 고리형 그리고 끊어진 고리형 등 3가지가 있으며 이는 동일한 염기쌍을 지니고 있지만 모양이 다르므로 gel 위에서 각각 다른 이동 속도를 보이게 된다.

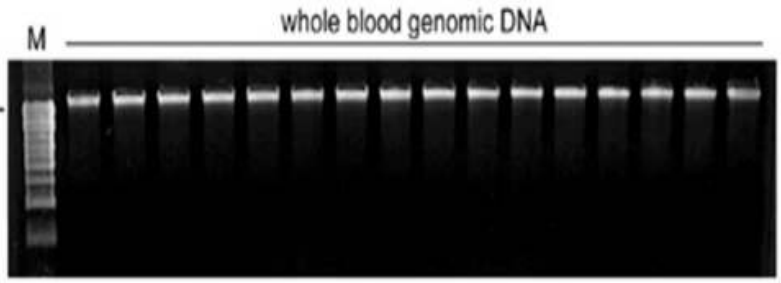




전기영동 Gel에 로딩하는 법과 전기영동장치



plasmid DNA 전기영동



genomic DNA 전기영동

3. 실험 재료 및 기구

혈액, DNA extraction kit, microtube, microtube rack, agarose, 전기영동 장치, glove, vortexer, 저울, 약수저, 유산지, 온도계, 항온수조, UV detector, 삼각플라스크, 마이크로파이펫&팁, 에탄올, DNA ladder, TAE

4. 실험 방법



실험 1) DNA 추출(분리)

① 1.5ml 튜브에 라벨을 하고 Proteinase K용액(20mg/ml) 20㎕를 넣는다.

② 혈액 200㎕를 넣는다.
(주의, 혈액의 양이 200㎕이하이면 PBS용액으로 200㎕가 되게 맞춘다)

③ Buffer BL 200㎕를 넣고 충분히 vortexing 하여 섞어준다.

④ 56℃의 항온수조에서 약 10분 동안 방치한다.

⑤ lysis (세포용해)가 완료되면 ethanol 200㎕를 tube에 넣고 간단히 vortexing하여 섞어준다.

⑥ ⑤번까지의 과정을 통해 얻은 혼합액을 Column(위 튜브)에 조심스럽게 옮기고 1분 동안 원심분리(8000rpm이상)한다.

⑦ 아래튜브에 통과된 액은 버리고 아래 튜브를 다시 끼운다.

⑧ Buffer BW 600㎕를 Column(위 튜브)에 첨가하고 1분 동안 원심분리한다. 아래 튜브의 통과액은 버리고 다시 아래튜브를 끼운다.

⑨ Buffer TW 700㎕를 Column(위 튜브)에 첨가하고 1분 동안 원심분리한다. 아래 튜브의 통과액은 버리고 다시 아래튜브를 끼운다.

⑩ Buffer가 Column(위 튜브)에 남아있지 않도록 제거하기 위하여 다시 한 번 원심분리한다.

⑪ Column(위 튜브)을 새로운 1.5ml 튜브에 끼운다.
⑫ Buffer AE 100㎕(또는 증류수)를 Column(위 튜브)에 첨가하고 실온에서 3분 동안 방치한다.

⑬ 1분 동안 원심분리한다. 아래 tube의 용액에 DNA가 존재한다.

⑭ 준비된 색소용액 4ul에 추출한 DNA 20ul를 넣고 전기영동을 하여 확인한다.

실험 2) 전기영동

① 1% agarose gel을 만든다.
: 삼각플라스크에 1%가 되게 agarose를 TAE 완충용액에 넣고 hot plate에서 녹인 후 DNA염색시약(gel red)을 넣고 흔들어 섞어준다. 콤이 꽂아진 gel 틀에 붓고 gel이 굳을 때까지 기다린다.

② 굳은 gel을 전기영동 장치에 넣고 겔의 홈이 잠길 때까지 1X TAE buffer를 붓는다.
주의) DNA는 "-"전극에서 "+"전극으로 이동하므로 홈의 방향이 "-"전극쪽으로 오도록 gel을 놓는다.

③ 새 microtube에 분리한 DNA 20ul와 6X loading Dye Solution 4ul를 넣어 전기영동 시료을 만든다.

④ ②에 준비된 홈에 전기영동시료(③ 20ul)를 조심스럽게 넣는다. (이때 size marker 5ul도 맨 앞 홈에 넣어준다)

⑤ gel을 100V로 전기영동한다. dye가 gel상에서 빠져 나기지 않도록 주의 한다.

⑥ 결과는 UV light를 쬐여 band를 확인한다.

5. 실험 결과 및 고찰

1. 실험에 사용한 proteinase K, Buffer, 에탄올, column의 역할에 대해서 생각해 보자.

2. 추출한 DNA의 전기영동 상을 확인하고, 전기영동에서 DNA 이동 속도에 영향을 주는 요인에 대해 생각해 보자.

고찰이란?

실험을 통하여 결과를 얻었을 때, 실험 과정과 결과에 대해 생각하고 연구하는 것을 의미한다. 실험 결과가 좋던 나쁘던 관계없이 실험 과정에서 발생할 수 있는 오류에 대해 생각하여 기재하고, 실험 결과에 대해 전체적인 정리를 하고, 더 나아가 실험과정과 결과를 이용하여 더 깊이 연구할 수 있는 실험에 대해 생각하고, 어떤 분야에 응용할 수 있는지에 대해 생각해보도록 하자.

6. 토론

1. 추출된 DNA의 농도와 순도를 측정할 수 있는 방법에 대해 생각해보자.

2. DNA를 이용한 생명공학이 현재 아주 빠르게 성장하고 있다. 이 기술을 이용하여 의학, 농학 및 산업의 발달에 어떤 기술로 응용될 수 있는지 추출된 DNA의 활용도에 대하여 토론해 보자.