

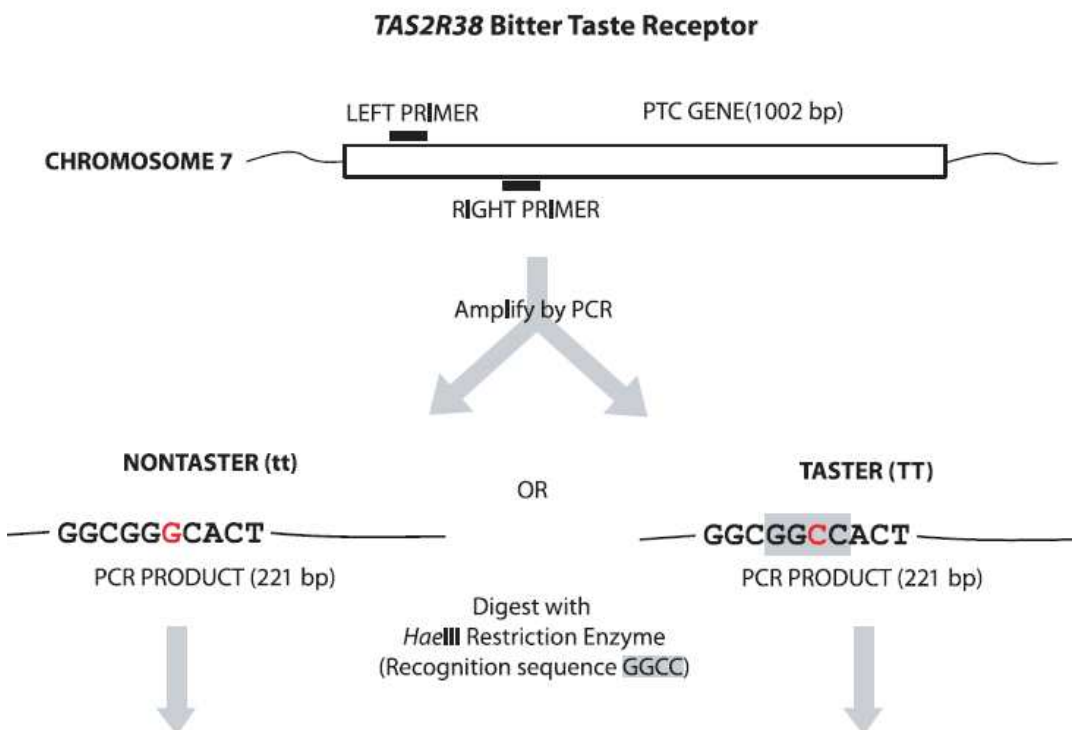
PCR기계 없이 손으로 직접 해보는 PCR

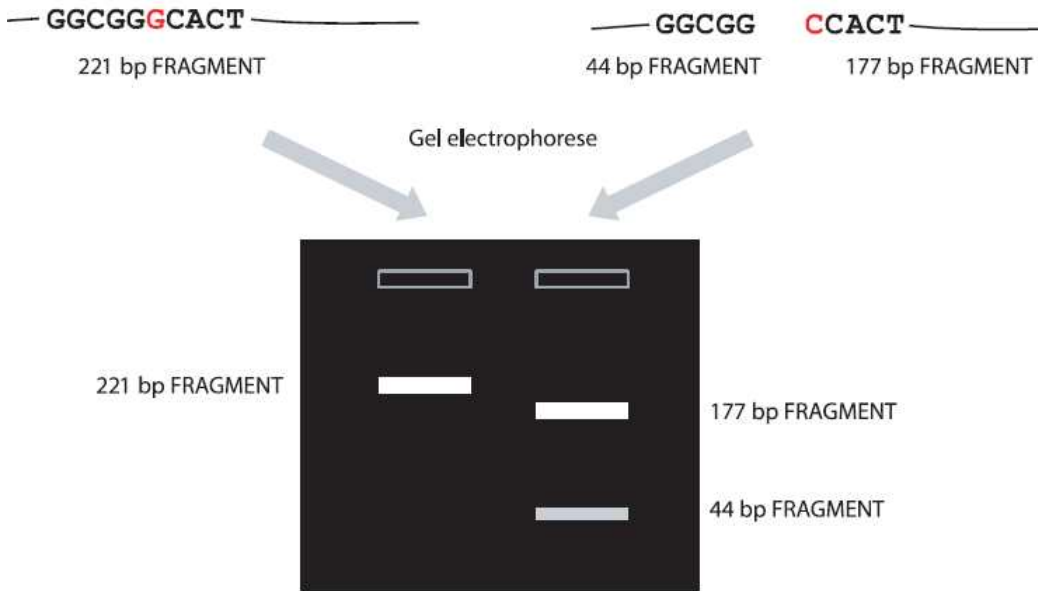
I. 개발 목적

유전자 검사를 위한 PCR 실험은 DNA복제와 유전자 발현과 관련하여 고등학교 교육과정에도 포함되어 있으나 그동안 고가의 장비가 있어야 실험 가능한 것이라는 인식이 커서 PCR 기계가 없는 학교에서는 실험 자체를 포기하는 경우가 많았는데 본 실험 연수를 통하여 항온수조 3개를 이용하여 간단히 PCR실험을 할 수 있는 방법을 소개하여 일선의 학교에서 생명 공학 관련 실험이 더욱 활성화되는 계기를 마련해보고자 한다.

II. 실험 내용

PTC 미맹 유전자 검사를 손으로 직접 해보는 PCR(이하 핸드PCR) 방법으로 설계하였으며 본 연수에서는 실험 과정 중 추출된 DNA를 이용하여 핸드PCR하고 PCR 결과물을 전기영동으로 확인해보는 것까지의 진행하려 한다.





III. 실험 준비물

실험과정	실험 기구		시료
PTC 미각테스트	·큰 비커		·정수기물 ·종이컵
DNA추출	·마이크로센트리퓨지 ·마이크로피펫(1000uL, 200uL) ·히팅블록 (또는 물 끓이는 기구와 마이크로튜브용 floating rack) ·볼텍스(없어도 가능) ·팁수거용기(비커) ·네임펜		·정수기물 ·마이크로피펫 (1000uL, 200uL) ·종이컵 ·얼음물
PCR	·항온수조 3개 ·마이크로피펫(200uL, 20uL, 2uL) ·팁수거용기(비커) ·네임펜		·마이크로피펫 (200uL, 20uL, 2uL)
전기영동	·전자렌지 ·삼각플라스크 (250mL) ·내열장갑 ·눈금실린더 (500mL)	·전기영동장치세트 ·마이크로피펫(20uL) ·팁수거용기(비커) ·UV transilluminator ·카메라	·증류수 ·마이크로피펫(20uL) ·랩

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

IV. 실험 방법

1. 구강세포 DNA 추출

- 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 곧바로 in and 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 튜브를 약 5초간 볼텍싱하고(없으면 손톱으로 tapping), 아이스에 1분간 정치했다가 마이크로센트리퓨지에 60초간 최고속(13,500rpm)으로 원심분리한다.
- 9) 원심분리하는 동안 튜브 상등액(DNA용액)을 옮길 새 1.5mL 마이크로튜브 튜브에 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.

2. 세 개의 항온수조를 이용한 고속 핸드 PCR

<https://youtu.be/W-9HIL00CtE>

1) 고속 핸드 PCR이란?

- PCR기계 없이 세 개의 항온 수조를 이용하여 사람 손으로 직접 PCR tube를 denaturation 온도 수조, annealing 온도 수조, extending 온도 수조를 차례로 짧게 30~40회 반복 이동하여 약 20분 내외의 짧은 시간에 PCR이 완료될 수 있도록 하는 것으로 빠른 PCR을 위해 PCR결과물의 크기를 200bp 정도가 되도록 primer를 설계해야 한다.



<참고동영상QR코드>

※ PCR결과물의 크기가 300bp 이상의 큰 사이즈를 hand PCR방법으로 진행하려면

PCR의 각 과정(denaturation, annealing, extending)을 일반 PCR시간으로 진행하면 가능하지만 약 1시간 30분의 집중력과 반복 작업이 요구된다.

2) 고속 핸드 PCR 준비물

- 항온수조 3개, 손잡이 달린 floating rack, 고속 핸드 pcr용 Timer (<https://youtu.be/vwZl6QJ4cj0>), UF pcr용 20uL 피펫팁 microtube 20개, PCR tube 20개, 라이터, 마이크로피펫, 200uL 튜브용 마이크로센트리퓨지, parafilm 20조각 (10*10mm), PCR시료



<참고동영상QR코드>

3) 고속 핸드 PCR용 실험 도구 제작법 <https://youtu.be/04z7AmVUX8Q>

- ① 항온수조 : 0.5°C 수준의 정교한 온도 조절이 가능한 항온수조가 3개 필요하며 적당한 것이 없으면 본 실험서 부록에 나오는 디지털온도조절기와 침수형히터를 이용한 항온수조를 직접 제작하거나 세 개의 비커에 물을 넣고 직접 가열하여 수동으로 정교하게 온도 유지를 하는 방법이 있다.
- ② 손잡이 달린 floating rack : 5mm 두께의 압축스펀지보드(floating rack)를 50*30mm 정도의 크기로 자르고 송곳으로 필요한 PCR tube의 수만큼 적당한 간격(최소 8mm 이상)으로 구멍을 뚫고 압축스펀지보드 중앙에 200uL 피펫팁을 보족한 부분으로 압축스펀지보드에 구멍을 뚫어 끼우고 피펫팁 끝을 라이터볼로 조금 녹여 눌러 피펫팁이 빠지지 않게 하여 floating rack 손잡이를 만든다.
- ③ 고속 핸드 PCR용 20uL 피펫팁 microtube : 20uL 피펫팁의 끝부분을 라이터볼로 살짝 녹여 손으로 눌러 붙이고 다시 한번 끝부분에 불을 가까이 하여 끝부분이 둥글게 막히도록 마무리한다.
- ④ 고속 핸드 PCR용 Timer (<https://youtu.be/vwZl6QJ4cj0>) : 링크된 영상을 핸드폰이나 노트북 컴퓨터에 준비



<참고동영상QR코드>

4) 실험 상세 과정 (5명 검사, 20uL PCR primix 사용)

- ① 20uL PCR primix tube 6개에 각각 멸균증류수 17uL씩 넣고 바닥의 파랑색 건조시료가 모두 녹을 수 있도록 손톱으로 톡톡쳐서 잘 녹인 후 5초 정도 원심분리하여 시료를 바닥으로 모은다.
- ② 6개의 PCR primix tube의 시료를 한 tube로 모으고(102uL) 여기에 F-primer와 R-primer를 각각 6uL씩 넣고 잘 섞는다(PCR master mix 114uL 완성).
- ③ PCR master mix를 다시 22uL씩 6개의 PCR tube에 나눠 넣고 남은 PCR master mix는 폐기한다.
※ 원래 PCR master mix의 양은 19uL이지만 시료를 옮기는 과정에서 유실되는 양을 고려하여 3uL 증량한다.
- ④ 각각의 PCR master mix 22uL에 실험자의 DNA를 1.5uL씩 넣고 손톱으로 톡톡쳐서 잘 녹인 후 5초 정도 원심분리하여 시료를 바닥으로 모은다.
- ⑤ 제한효소 처리용 PCR과 비처리용 PCR을 구분하여 UF pcr용 20uL 피펫팁 microtube(이하 피펫팁 튜브) 20개 준비하고 각 tube에 네임펜으로 개인 번호를 기재한다.
- ⑥ 실험자 5명의 번호를 각각 부여하고 피펫팁 튜브 20개에 각자 2개씩 PCR시료를 차례로 10uL씩 주입하고 입구는 파라필름 조각으로 잘 눌러 밀봉한다.
※ 시료 주입시 시료가 튜브 중간에 머물러 있는 것이 정상이며 만약 주입된 시료가 바닥 가까이까지 내려가면 해당 피펫팁 튜브는 바닥에 구멍이 있는 불량이므로 새것으로 교체해야 한다.
- ⑦ 200uL 튜브용 마이크로센트리퓨지에 시료를 주입한 피펫팁 튜브를 넣고 2~3초간 원심분리하여 PCR시료를 피펫팁 튜브의 바닥 보족한 부분으로 내린다.
- ⑧ 피펫팁 튜브를 floating rack에 깊숙이 꽂고 고속 핸드 PCR protocol에 맞춰 손으로 PCR을 진행한다.
※ 모든 준비가 완벽하면 혼자서도 PCR이 가능하지만 항온수조와 UF PCR Timer가 없으면 최소 3인(항온수조 온도 조절 담당, 타이머 담당, 플로팅랙 이동 담당)이 함께 협력하면 가능하다.
- ⑨ PCR이 완료되면 각자의 PCR이 완성된 2개의 피펫팁 튜브의 PCR 결과물을 각자의 PCR tube 2개로 다시 옮기기 위해 다음의 과정을 진행한다.
 - PCR이 완성된 피펫팁 튜브의 상단부를 가위로 5mm 정도 잘라내고 이를 PCR tube에 거꾸로 넣는다.
 - 200uL 튜브용 마이크로센트리퓨지에 PCR 피펫팁 튜브가 거꾸로 꽂힌 PCR tube를 넣고 2~3초간 원심분리한

다.

- ⑩ 2개 중 하나는 네임펜으로 “D” (digested)를 표시하고 제한효소 처리 과정으로 넘기고 나머지 하나는 “U” (undigested)로 표기하고 전기영동 할 때까지 냉동보관 한다.

※ 핫플레이트를 이용한 Hand UF(Ultra Fast) PCR 동영상 <https://youtu.be/WMAYP-qMx8w>

3. 전기영동(electrophoresis)

1) TAE buffer 용액 만들기

- 100×TAE buffer를 1×TAE buffer로 희석 : 100×TAE buffer 6mL에 증류수 594mL를 넣고 섞는다.

2) 아가로즈겔 만들기

- 1) 물약병에 든 2g의 아가로즈 분말에 TAE buffer를 눈금실린더(또는 물약병)으로 160mL를 정량하여 300mL 삼각 플라스크에 넣고 잘 섞는다.
- 2) 삼각 플라스크의 입구를 랩으로 막고 피펫팁을 이용하여 구멍을 2~3개 낸 다음 전자렌지에 넣고 용액이 살짝 끓어오를 때까지 돌려준다.
- 3) 내열장갑을 끼고 플라스크를 몇차례 흔들어주고 다시 전자렌지에 넣어 살짝 끓어오를때까지 돌려준다.
- 4) 아가로즈 분말이 모두 녹아 용액이 투명해 질 때 까지 위의 과정을 3~4번 반복하면 아가로즈 용액이 완성된다.
- 5) 완성된 아가로즈 용액에 DNA염색액(Safe Red)의 전량(10uL)을 모두 넣고 잘 섞일수 있도록 부드럽게 흔들어 준다.
- 6) 콤을 결합한 겔 메이커 트레이에 아가로즈 용액을 약 5mm두께로 붓고 약 10분간 식힌다.

3) 본 실험

- 1) 전기영동탱크에 아가로즈겔의 well이 전기영동탱크의 '-'극 쪽으로 향하도록 아가로즈 겔 트레이를 넣고 TAE buffer를 아가로즈겔 위로 1~2mm정도 덮이도록 붓는다.
- 2) 맨 좌측 well에 DNA ladder를 넣고 이 후 차례로 loading한다(1인당 2개의 well을 사용).
- 3) 전원 스위치를 올려 전기영동을 시작한다.

4) 실험 결과

