

실험2. 플라스미드 mini-prep

5조 : 임연정 정예은 정우예 정효정
주혜진 최지인 홍명지

실험2의 목표

Plasmid mini-prep Kit 을 사용하여

대장균 Plasmid 추출을 통해

mini-prep의 원리를 이해할 수 있다.

Mini-prep 란?

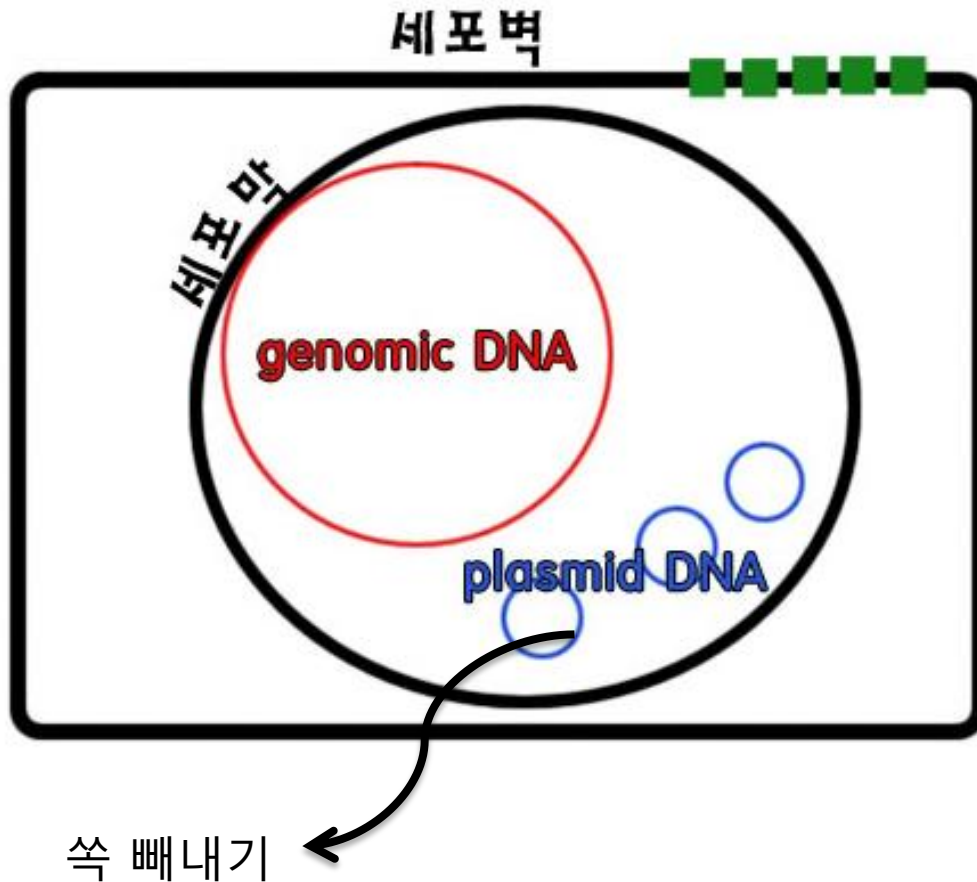
- Mini-prep는 대장균의 DNA중에서 **plasmid DNA만 소량 분리**하는 방법으로가장 보편적으로 이용하는 방법은 **Alkali lysis method**이다.

Plasmid 란?

- 원형의DNA로서 **외부의DNA를 쉽게 삽입** 할 수 있고 **자기 복제** 기능과 **운반**의 기능을 가지고 있다.

실험에 앞서

대장균의 구조



세포벽 부수기→
세포막 살살 찢기→
Plasmid와
genomic DNA 변성→
Plasmid만 복원→
Plasmid 추출

실험 기구 및 재료



원심분리기

마이크로 피펫(20P,200P,1000P), 피펫 팁

유성펜, 대장균

Ep tube

Mini-prep spin column

Collection tube

Cell resuspension solution[Sol1]

Cell lysis solution [Sol2]

Neutralization solution[Sol3]

Denaturation solution,

Column washing solution[Sol4]

Elution buffer

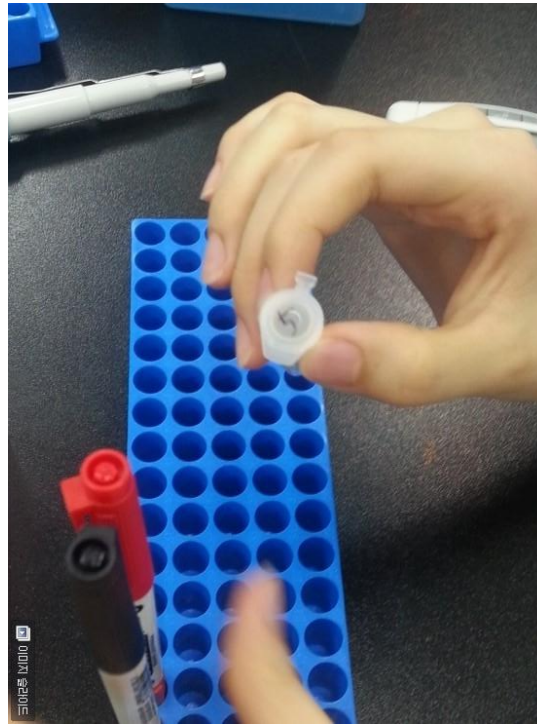
Rnase A solution

실험 방법 및 절차

1. 대장균과 배양액을 분리한다.



대장균 배양액 850 μ



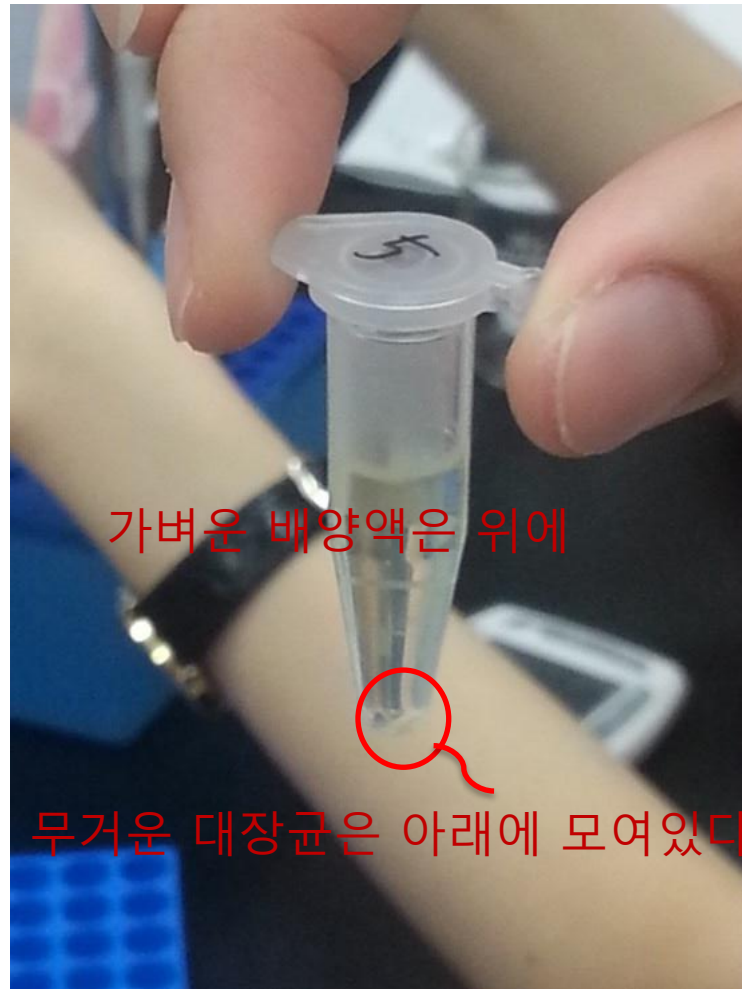
Ep tube에 넣고 이름쓰



13,000rpm에서 15초
원심분리



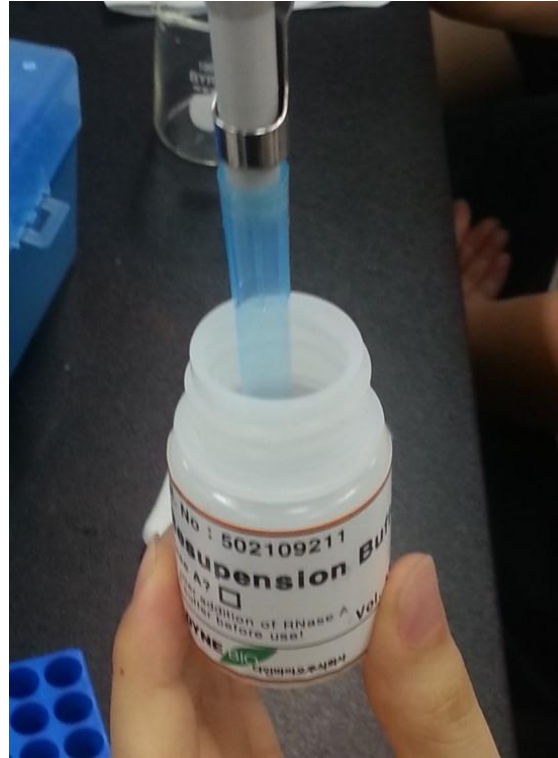
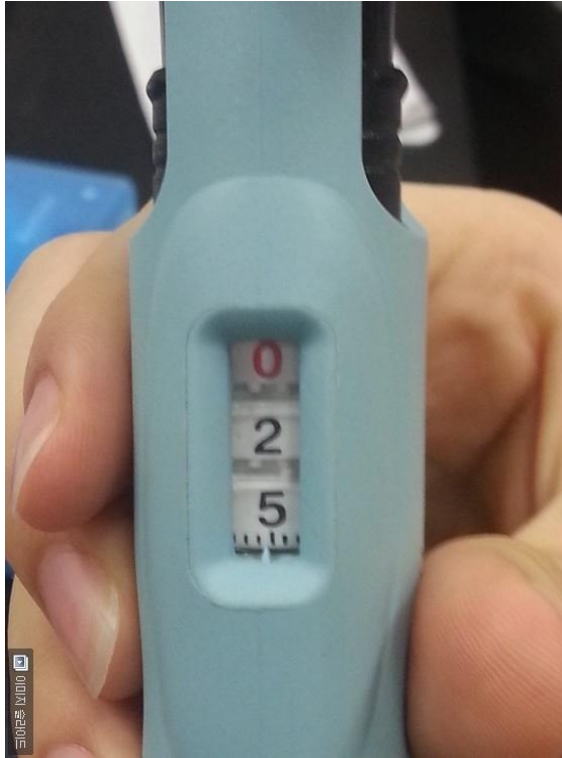
원심 분리 후



배양액만 빼낸다



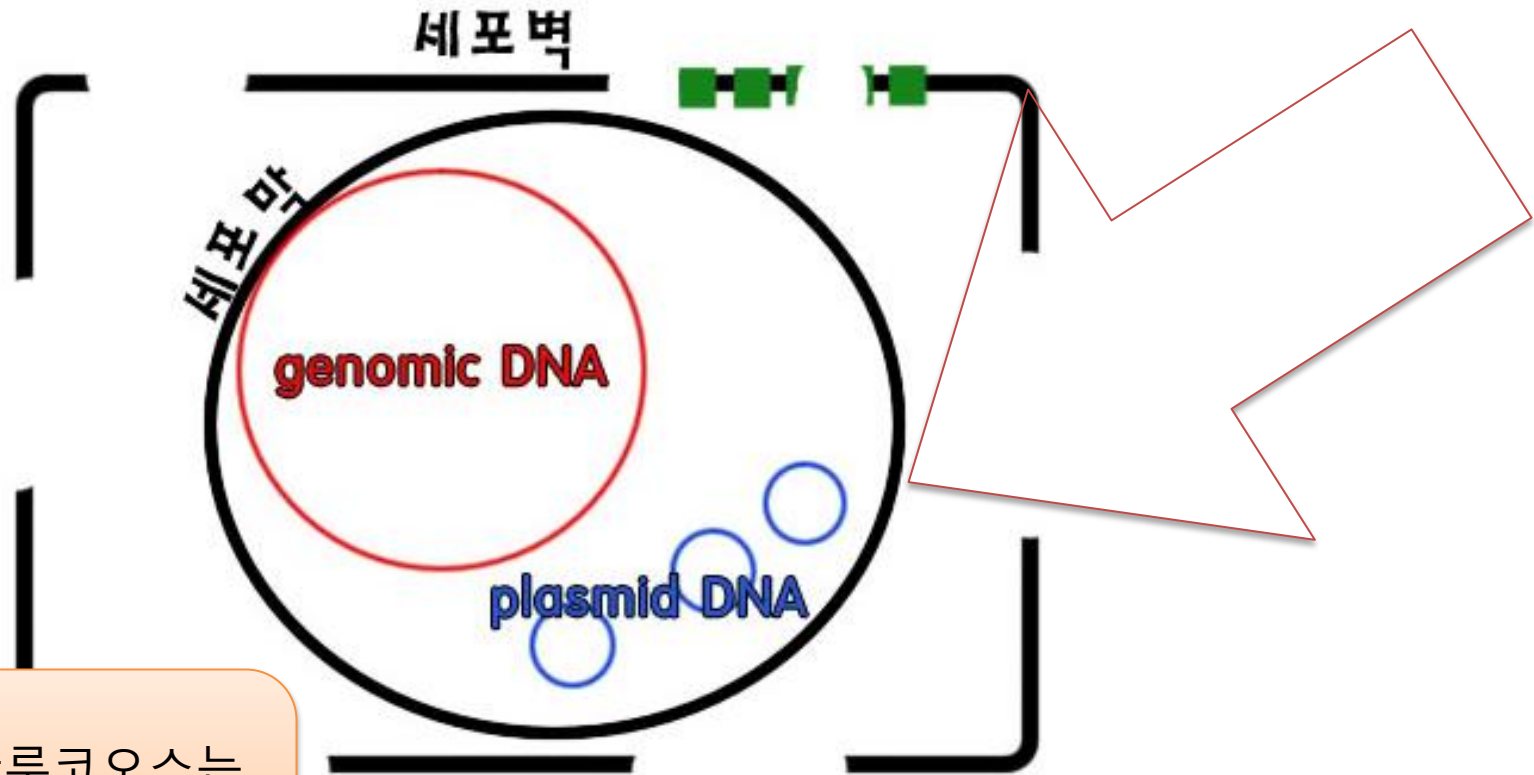
2. Cell resuspension solution [Sol 1]



Sol 1 250 λ 를 대장균이 들어있는 Ep tube에 넣고

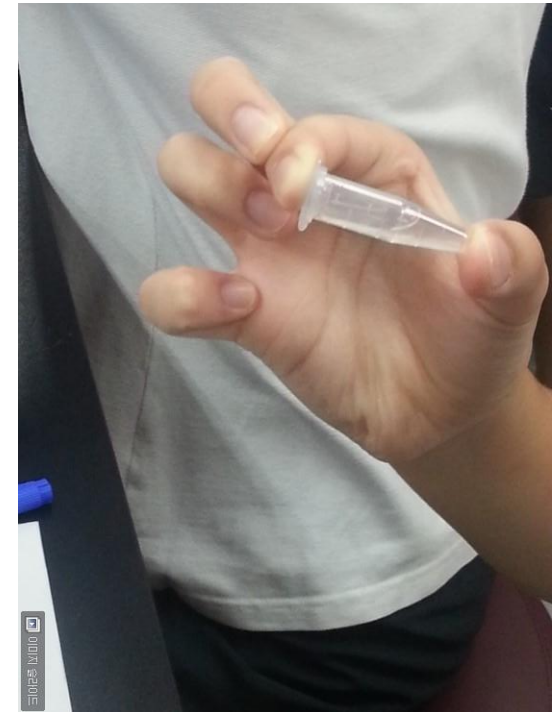
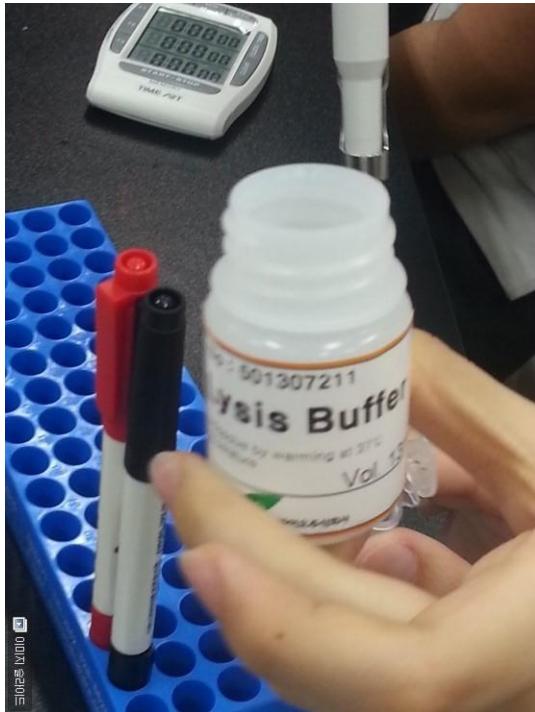
피펫팁을 이용하여
대장균과 함께 잘 섞는다

▶ Sol 1) **EDTA**
Tris-Cl
글루코오스



Tris-Cl과 글루코오스는
세포형태를 유지시키고
ph를 조절한다

3. Cell lysis solution [Sol 2]

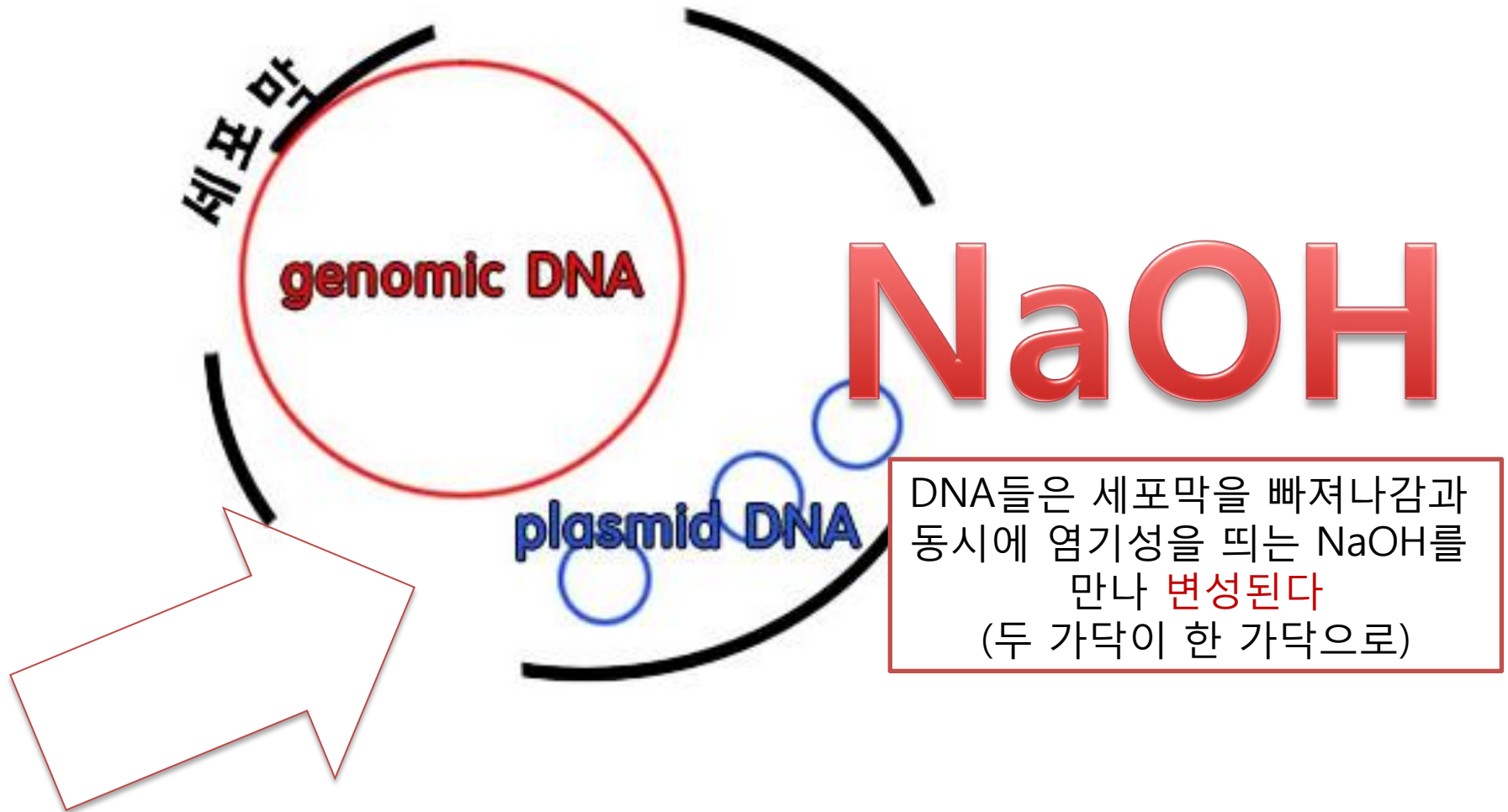


Sol 2 250 λ 를 Sol 1 과 대장균이
들어있는 Ep tube에 넣는다

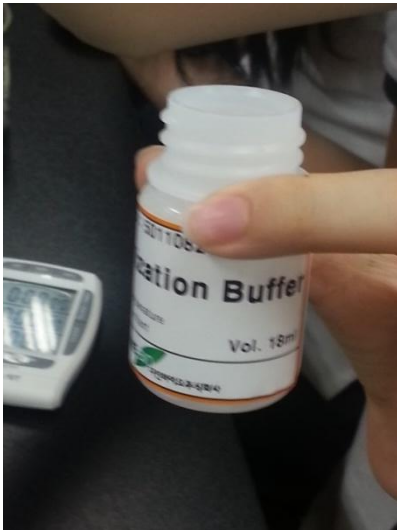
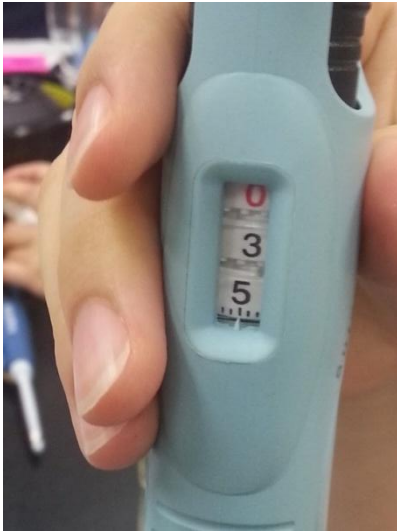
(이 때 세포가 다치지 않게 벽면으로 살살 넣는다.)
여기서 반응 시간은 절대 5분을 넘기지 않는다.

천천히 4회 뒤집어서 섞는다.

▶ Sol 2) SDS(용해제)
NaOH(염기성)



4. Neutralization solution [Sol 3]



Sol 3 350 μ l 를 튜브 벽면에 조심스럽게 넣고
튜브를 4회 뒤집으면서 섞는다
과정을 마친 후에 튜브에 **하얀색 응고물**이 생긴다.

▶ Sol 3) 아세트산 아세트산 칼슘

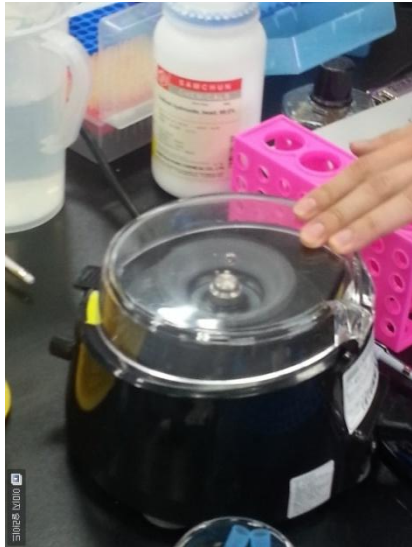
Sol 2 에서 NaOH(염기)에 의해 변성된 DNA는
한가닥으로 존재한다.

SolⅢ

아세트 산으로 인하여 중성화되게 하여 복원을 시도

긴 genomic DNA는 복원 불가
짧은 Plasmid DNA는 복원 가능

5. DNA 추출



1. 하얀 응고물이 담긴 튜브를 10분간 원심 분리한다

2. mini-prep spin column에 옮긴다

3. 마이크로 피펫으로
mini-prep spin column에
첨가한다

4. 다시 13,000 rpm으로
5분간 원심 분리한다
용액은 버린다

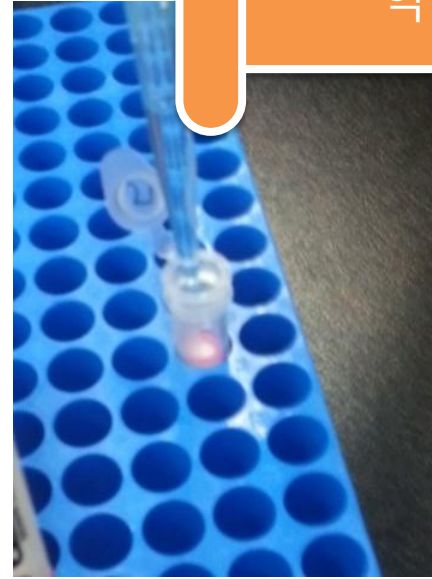
원심 분리시

한가닥인 genomic DNA는 필터 통과
두가닥인 plasmid DNA는 **필터에 잡힘**

버려진 용액은 버린다.
tube에 끼워 넣는다.

6. Column washing solution [Sol 4]

Sol 4 에 있는 에탄올은
DNA를 씻겨주는
역할을 한다.



mini-prep spin column에
Sol 4를 흘려 넣는다.

에탄올이 남으면 실험에
지장을 주므로
모두 제거한다.

13,000rpm으로 1분간 원심분리하여

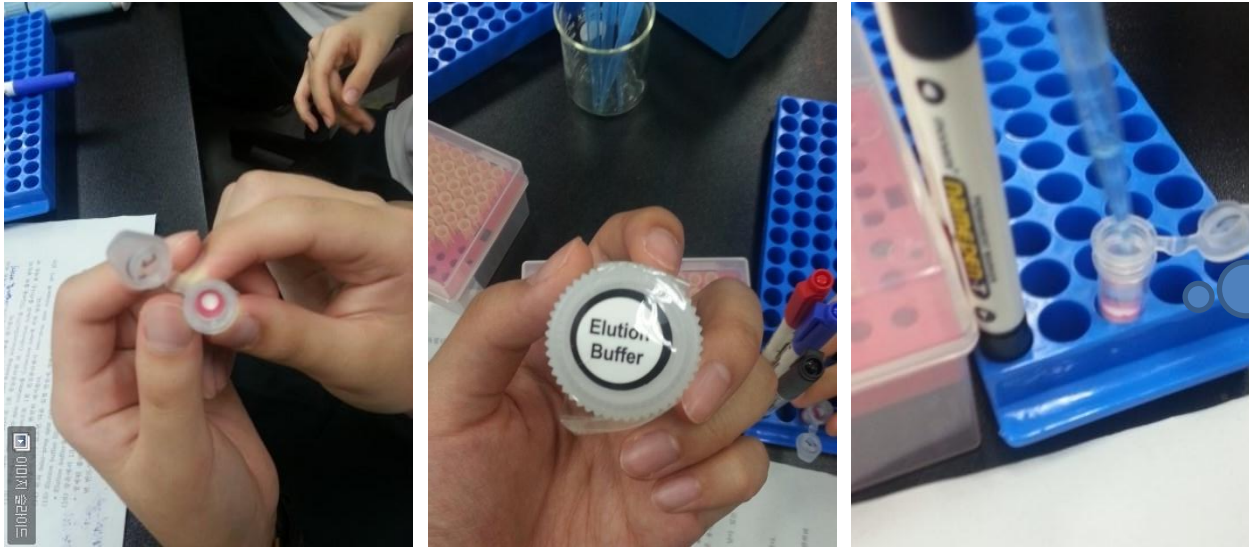
Collection tube로 흘러나온 물질을 버린 후

mini-prep spin column에 다시 Collection tube를 끼우고

13,000rpm으로 1분간 원심분리하여

Collection tube로 흘러나온 물질을 버린다.

7. Plasmid DNA 추출



mini-prep
spin column
정 중량에 정
확히 넣는다.

mini-prep spin column을 1.5ml Ep tube에 옮겨 끼운다.

Elution buffer 50 λ 를 mini-prep spin column에 넣고

1분간 상온에서 방치한다.

13,000rpm으로 원심분리한다.

**ELUTION
BUFFER**

필터에 있는것을
떨어뜨림

원심분리 후 필터위의
plasmidDNA가
Ep tube로 내려옴

원심 분리후

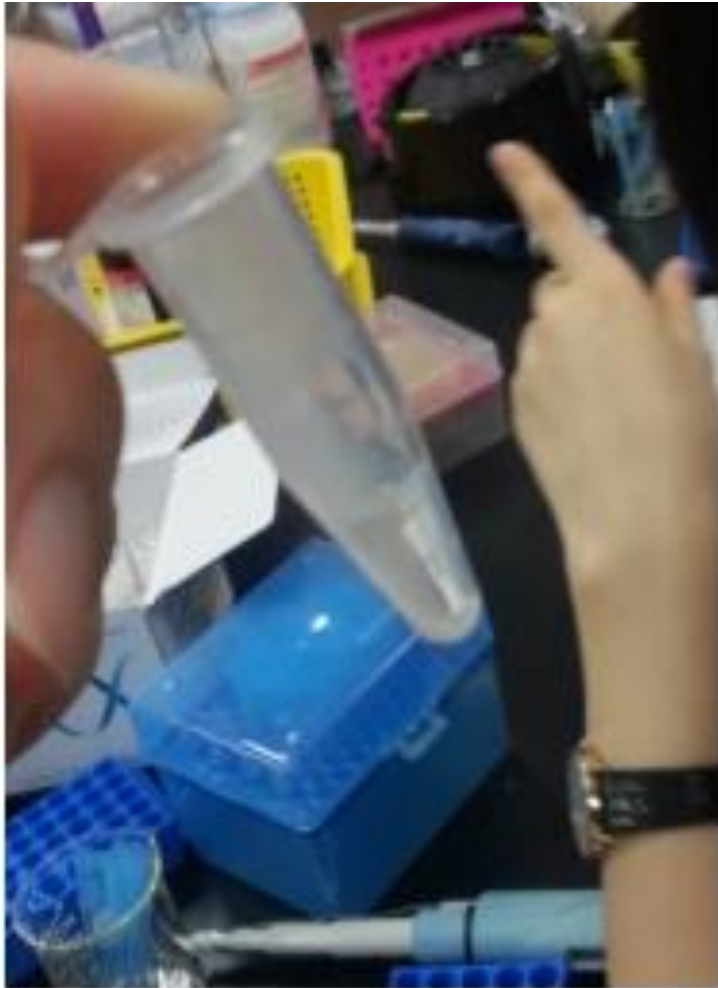
Ep tube에 있는
Plasmid DNA 추출



정제된 plasmid DNA는
 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 의 냉장상태에서
보관하는 것이 좋으며
장기간 보관 시
반드시 -20°C 의 냉장 상태에서
보관해야 한다.

실험 끝

결론



- Plasmid DNA가 추출되었다.
- 정제된 플라스미드 DNA를 얻었다. 하지만 제대로 얻었는지 확인하기 위해서는 전기영동을 해야만 한다.