

Technical Note

FlashGel® System for DNA Recovery

By Mary Riley and Hugh White, Lonza Rockland, Inc.

서론

LONZA FlashGel Recovery System을 이용하면 agarose gel 만들기 와 gel extraction 정제 과정 없이도 5~10분내 UV에 의한 손상 없이 간편하게 고효율로 DNA 회수가 가능하다.

Agarose gel 전기영동 후 DNA를 회수하는 방법은 기초적인 분자 생물학 기술로 DNA 밴드를 잘라서 스핀 컬럼으로 DNA를 정제하는 방법으로 되어 있다. 밴드를 자를 때는 DNA 손실을 최소로 하면서 샘플 내 agarose양을 최소화 하도록 주의 깊게 agarose를 제거해야 한다. 이 과정에서 DNA 밴드를 확인하기 위해 사용하는 UV에 의한 DNA 손상이 일어나지 않도록 주의해야 한다. 컬럼 정제 과정시 elution buffer를 사용할 때 DNA가 membrane에 잘 binding하고 elution이 잘 일어나는지, 그리고 wash step에서는 에탄올 잔류 등에 주의해야 한다. Agarose gel 전기영동부터 gel 절제하여 스핀 컬럼 정제하기까지 최소 한 시간 이상 소요된다.

LONZA FlashGel Recovery System은 gel을 만들어 전기영동하는 시간과 DNA 회수를 위해 밴드를 잘라내고 정제하는 과정이 모두 필요하지 않다. FlashGel system은 전기영동과 DNA 회수까지 전 과정이 10분 이내로 가능하며 80% 이상의 회수율을 보인다. 또한 회수된 DNA는 전기영동과 정제과정시 포함될 수 있는 저해물질이나 UV에 의한 돌연변이 발생 등의 영향 없이 DNA 증폭이나 클로닝, ligation 과정에 적용할 수 있으며, 컬럼으로 정제한 DNA 이상의 효율을 보였다.

제품 개요

FlashGel System은 5분내에 DNA 분리가 가능한 빠른 전기영동 속도 뿐만 아니라, DNA 밴드의 전기영동과정을 실시간으로 확인할 수 있는 광원 시스템이 결합된 혁신적인 시스템이다. 또한 FlashGel Recovery System을 이용하면 전기영동 시작 후 4 ~ 10분 정도면 gel에서 곧바로 DNA를 회수할 수 있다. 이 시스템은 밴드를 잘라내고 정제하는 과정이 필요없이 정제 과정상의 손실을 최소화하고 DNA 회수율을 최대한으로 높일 수 있다.

DNA가 extract well(두 번째 단의 well)에 도착하면 DNA는 agarose gel로부터 분리가 된 상태이기 때문에 FlashGel Recovery Buffer를 첨가한 후 파이펫으로 쉽게 추출해 낼 수 있다. 컴팩트한 FlashGel Dock의 빛은 DNA에 손상을 주거나 사람에게 해가 되지 않는다. 거의 80~100%의 높은 DNA 회수율 뿐만 아니라 정제 과정상 저해제가 포함될 가능성이 없으며 PCR이나 클로닝과 같은 다음 실험단계에 곧바로 사용할 수 있다. FlashGel Cassettes의 특허 받은 염색시료는 매우 적은 양의 DNA도 분리와 회수가 가능하도록 할 뿐만 아니라 잠재적 돌연변이 유발 환경에 연구자가 노출될 가능성을 최소화했다. 시료 추출 전 초기 분리 시간에 따라 동일한 cassette를 이용해 회수된 샘플을 검증할 수도 있다.

적용 방법

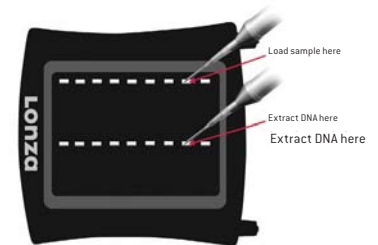
FlashGel 이용한 회수율 (그림 1)

회수율을 입증하기 위해서, 단계적으로 1/2씩 희석serial doubling dilutions (18,25~600 ng)한 1,000 bp DNA Fragments (BioVentures, Inc.)를 FlashGel Recovery Cassette (그림1A: 1 & 2)로 전기영동해서 분리한 후 회수했다. 첫 번째 단의 well에 시료를 loading 한 후 두 번째 단의 well의 위쪽 끝까지 전기영동 시킨 후 멈추고 두 번째 단의 well에 FlashGel Recovery Buffer를 20 μ l 첨가했다. DNA 단편이 두 번째 단의 well로 충분히 전기영동 되도록 한다. 파이펫으로 각 well에서 DNA를 회수한다. 회수된 시료의 5%를 1.2% FlashGel DNA Cassette (그림 1A: 3)로 분석했더니 회수 범위가 80~90% 정도 되었다.

다양한 길이의 단편도 회수 가능함을 검증하기 위해 50 bp ~ 4,000 bp의 단편을 100 ng씩 FlashGel Recovery Cassette로 전기영동 한 후 회수하였다. 회수된 시료를 3 μ l씩 1.2% FlashGel DNA Cassette에 로딩하여 분석하였다(그림 1B).

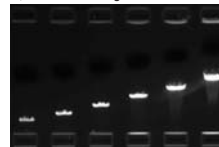
Procedure

1. Load samples in top tier of wells.
2. Run until samples reach the second tier of wells.
3. Stop the run and add FlashGel Recovery Buffer.
4. Extract DNA from wells by pipette



Panel A – DNA Concentration Range

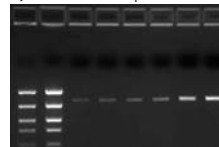
1) Pre-Recovery



2) Post-Recovery



3) Recovered Samples



Panel B – DNA Size Range

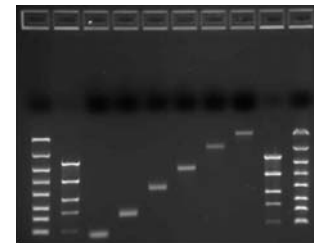


그림 1. FlashGel System recovery capabilities. A: Images 1 & 2 show the FlashGel Recovery Cassette before and after recovery of serial dilutions of a 1000 bp fragment. Image 3 shows analysis of 5% of each recovered sample using a 1.2% FlashGel DNA Cassette. B: 100 ng samples of fragments ranging in size from 50 bp to 4000 bp were recovered, and 3 μ l aliquots of the recovered DNA were separated on a 1.2% FlashGel DNA Cassette, along with the FlashGel QuantLadder and FlashGel DNA Marker (100 bp to 4 kb).

스핀컬럼 정제와 FlashGel 회수 방법 비교 (그림 2)

1,000bp Purified DNA Fragments (BioVentures, Inc.) 300ng을 FlashGel Recovery System (FG)과 스핀 컬럼 회수 방법(C1과 C2)으로 DNA를 회수했다. 스핀 컬럼으로 정제된 시료는 1% Reliant Gel (Lonza, premade agarose gel)로 전기영동한 후 밴드를 잘라내서 회수했다.

그림 2는 회수된 시료의 10%를 1.2% FlashGel DNA Cassette에 전기영동해서 비교한 결과다. Reliant Gel과 컬럼을 활용하여 전기영동부터 DNA 회수까지 약 90분 정도 시간이 걸렸던 것에 비해 FlashGel System은 전 과정을 수행하는데 8분 정도 밖에 소요되지 않았다.

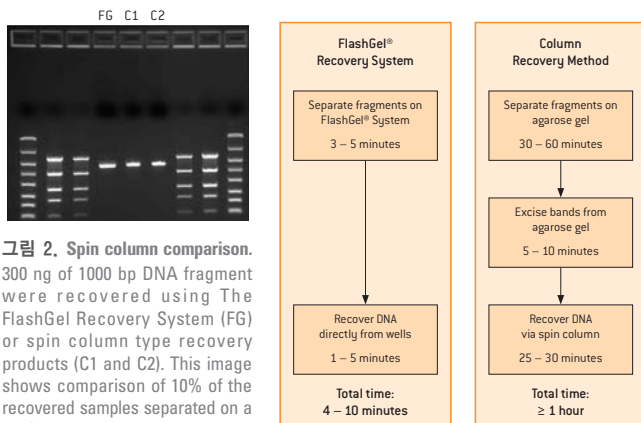


그림 2. Spin column comparison. 300 ng of 1000 bp DNA fragment were recovered using The FlashGel Recovery System (FG) or spin column type recovery products (C1 and C2). This image shows comparison of 10% of the recovered samples separated on a 1.2% FlashGel DNA Cassette, along with the FlashGel QuantLadder and FlashGel DNA Marker (100 bp to 4 kb).

Time comparison. FlashGel® System vs. Column Recovery.

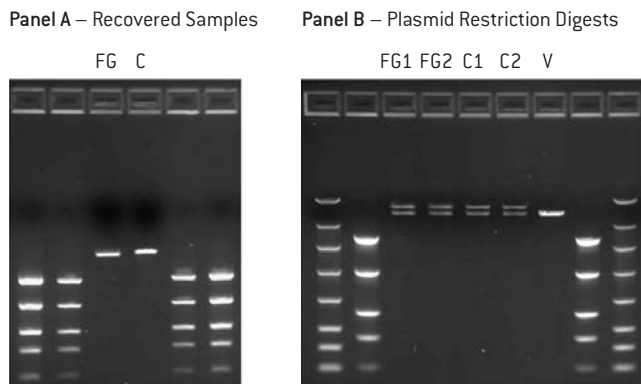


그림 3. Recovery and cloning comparison. Samples of PstI/BamHI cut pBR322 were separated and 3.2 kb DNA fragments were recovered using the FlashGel Recovery System (FG) or spin column kits (C1 and C2). A: shows the comparison between 5% of each recovered DNA sample separated on a 1.2% FlashGel DNA Cassette, along with the FlashGel QuantLadder. B: PstI/BamHI cut plasmid samples from colonies transformed with recovered DNA samples; lane "V" is digest of vector with no insert. Other lanes contain the FlashGel QuantLadder and FlashGel DNA Marker (100 bp to 4 kb).

DNA 회수와 cloning 적용 (그림 3)

플라스미드 DNA (pBR322; New England BioLabs)를 PstI/BamHI으로 이중으로 절단한 후, FlashGel Recovery System (FG)과 스핀 컬럼 정제 키트 (C)를 이용해 3.2 kb DNA 단편을 전기영동한 후 회수하였다. 각 방법으로 회수된 DNA 시료의 5%를 1.2% FlashGel DNA

Cassette (그림 3A)로 전기영동하여 분석했다. 또한 회수된 DNA를 PstI/BamHI으로 절단된 pUC19 vector에 ligation 한 후 *E. coli*에 형질전환 했다. 두 방법으로 회수된 DNA에서 나온 콜로니 수는 매우 비슷했다. 각 시료의 형질전환된 콜로니 2개씩 선택해 플라스미드를 추출한 후 PstI/BamHI으로 절단한 후 전기영동했다(그림 3B). 전기영동 결과는 모두 정확하게 vector와 insert로 절단된 것을 확인할 수 있었다.

PCR 단편의 회수 후 cloning 적용 (그림 4)

PCR로 500 bp 단편을 증폭한 후, FlashGel Recovery System으로 전기영동하여 분리한 후 회수하였다. 회수된 PCR 시료 8 μ l를 플라스미드에 ligation 한 후 *E. coli*에 형질전환했다.

그림 4에서는 형질전환된 콜로니 중 무작위로 선택하여 colony PCR 증폭했더니 예측했던 사이즈로 증폭됨을 확인할 수 있었다. 이는 FlashGel로 회수된 원래의 PCR 산물을 곧바로 클로닝 실험에 사용해도 적합함을 의미한다.

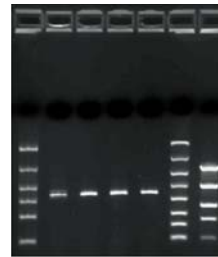


그림 4. Cloning of recovered PCR product. A 500 bp amplicon was amplified and recovered using the FlashGel Recovery System. 8 μ l of recovered PCR sample was ligated into the vector and transformed into *E. coli* Competent Cells.

회수한 DNA를 PCR 증폭의 주형으로 이용 (그림 5)

Multiplex PCR 반응으로 300 bp와 500 bp의 단편을 증폭했다. 반응이 끝난 PCR 반응액을 6 μ l씩 FlashGel Recovery System으로 전기영동하여 분리한 후 회수하였다. 회수된 PCR 단편을 4 μ l씩 로딩하여 1.2% FlashGel DNA Cassette로 분석한 (그림 5A)후, 각 단편을 새로운 PCR 반응의 주형으로 이용했다. 그림 5B에서는 회수된 DNA가 곧바로 또 다른 PCR 증폭의 주형으로 사용되는데 적합함으로 보여준다.

Panel A – Recovered PCR Products Panel B – Reamplified PCR Products

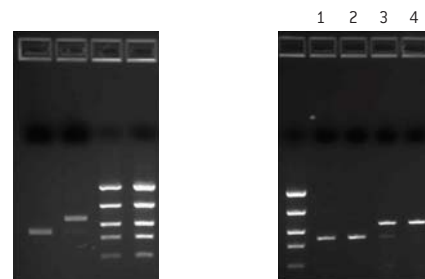


그림 5. PCR amplification of recovered DNA. Reagents from the PCR Kit were used to amplify 300 and 500 bp fragments in a multiplex PCR amplification reaction. 6 μ l of the PCR reaction was separated on the FlashGel Recovery System and the PCR product bands were recovered. A: 4 μ l of both recovered PCR fragments. The recovered fragments were used as templates for new PCR amplifications. B: 0.5 μ l aliquots of these amplification reactions. The resulting amplification products were observed for all reactions by gel analysis on a 1.2% FlashGel DNA Cassette, along with the FlashGel QuantLadder. Reactions 1 & 3 used primers for 300 and 500 bp fragments while reactions 2 & 4 used only single primer set.