

## 겔스캐너를 이용한 변성아크릴아마이드 겔의 형광 DNA 검출

구자환\*† · 정지웅\*\* · 조영찬\*

\*작물과학원, \*\*국제미작연구소 한국지소

## Rapid Detection of Fluorescent DNA on Denaturing Polyacrylamide Gel by Using Gel Scanner

Ja-Hwan Ku\*†, Ji-Ung Jeong\*\*, and Young-Chan Cho\*

\*National Institute of Crop Science, Suwon 441-857, Korea

\*\*IRRI-Korea Office, National Institute of Crop Science, Suwon 441-857, Korea

**ABSTRACT:** The denature polyacrylamide gel stain silver nitrate is used for routine nucleic acid detection. More sensitive stains, such as Vistra Green, SYBR Green are available to address a broad range of DNA applications requiring lower detection limits in polyacrylamide gel formats. Gel Scanners, laser-scanning instruments, provide sensitive fluorescence detection of DNA gel stains. We established one step fluorescent impregnation enhanced sensitivity with simple, rapid and low cost. We have applied this fluorescent staining procedure for the routine analysis of DNA profiles generated by SSR amplification.

**Keywords:** polyacrylamide gel, DNA, fluorescent, silver staining, detection

은(Silver nitrate)을 이용한 DNA와 단백질 염색은 검출 민감도의 우수성 때문에 가장 많이 사용하는 방법이다. 그러나 Bassam 등 (1991년)에 의해 개량되어 지금까지 보편적으로 이용되는 박막 겔 은염색법은 고정 (Fix), 세척 (Rinse), 염색 (Impregnate), 세척 (Rinse), 발색 (Develop), 종결 (Stop), 세척 (Rinse)의 복잡한 단계와 90분 이상의 시간이 소요되는 단점이 있다. 형광염료 (Vistra Green, SYBR Green)와 Gel Scanner (Typhoon Trio, Amersham Biosciences)를 이용하여 DNA 검출 민감도는 은염색법과 거의 동등하며 염색단계와 시간, 비용을 크게 절감할 수 있는 방법을 확립하였기에 소개하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 겔의 준비 및 전기영동

0.5X TBE buffer로 5% 변성 아크릴아마이드겔 (7 M urea)을 제조하여 0.4 mm 두께의 sequencing 전기영동 장치에 캐스

팅한 후에 2배수로 연속적으로 희석한 DNA 사이즈 마커 (100 bp DNA ladder, Bioneer Co.)와 SSR 마커 PCR 산물을 웰 당 5 µl씩 주입한 후 80와트로 90분간 전기영동 하였다.

#### 은염색 (Silver staining)

10% 초산 (Acetic acid)의 고정액이 담긴 트레이에 전기영동이 끝난 변성아크릴아마이드 겔을 담가 겔의 tracking dye가 보이지 않을 때까지 고정시킨 후 고정액을 별도의 용기에 따라내고 증류수로 5분씩 2회 세척하였다. 1.5 g 질산은이 용해된 1.5리터 증류수에 2.3 ml의 Formaldehyde (37%)를 첨가하여 완전히 혼합한 은 염색 용액에 겔을 담근 후 30분간 부드럽게 흔들어 주면서 은염색한 후 겔을 증류수에 5초 정도 담가 은염색 액을 씻어주었다. 1.5리터 증류수에 45 g의 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 녹여 10°C 이하로 냉각한 후 300 µl의 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0.4 M)와 2.3 ml Formaldehyde (37%)를 첨가하여 완전히 혼합한 발색 용액에 겔을 담그고 원하는 강도로 발색될 때 까지 부드럽게 흔들어 주면서 반응을 진행하였다. 발색이 원하는 정도로 진행된 겔을 10% 초산 고정액에 5분 이상 담가 발색을 종결 시킨 후 증류수에 5분 정도 담가 부드럽게 흔들어 주면서 여분의 고정액을 씻어주고 공기 중에 건조시켰다.

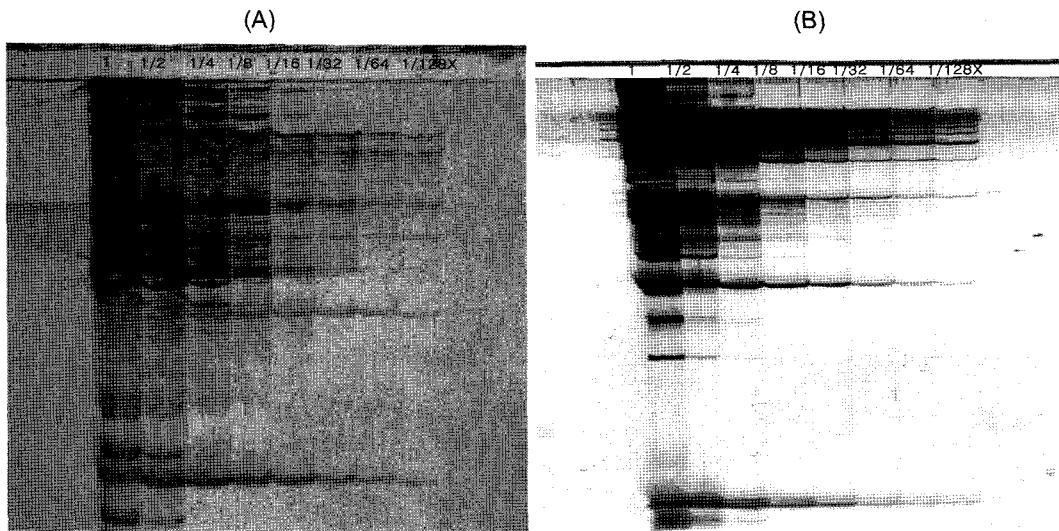
#### 형광 염료 염색 및 스캔

전기영동이 끝난 변성아크릴아마이드 겔이 부착된 유리판을 50 ml 0.5X TBE (혹은 TE) buffer (pH 8.0)가 첨가된 증류수 2리터에 Dimethyl sulfoxide로 100 X로 희석한 Vistra Green (RPN5786, Amersham Biosciences) 200 µl를 용해시킨 염색 용액 (0.01X)에 담가 20분간 부드럽게 흔들어 주어 겔을 염색한 후 겔의 표면에 맺힌 물방울이 모두 흘러 내리도록 유리판을 수직으로 2 분간 세워 놓은 다음 겔이 부착된 반대편 유리면의 물기를 보풀이 없는 티슈로 닦아낸 후 표 1과 같은 조건으로 겔스캐너(Typhoon Trio, Amersham Biosciences)로 스캔하였다.

†Corresponding author: (Phone) +82-31-290-6765 (E-mail) kooch@rda.go.kr

**Table 1.** Typhoon Scanner control settings for the detection of fluorescent DNA gel stains (Amersham Biosciences, 2002).

Laser	Emission filter	Conforcal	PMT voltage	Pixel size	Sensitivity
Blue(488 nm)	520 BP 40	+3 mm	600	200 $\mu$ m	Normal



**Fig. 1.** Two-fold serial dilutions of the DNA mass ladder imaged using Typhoon Scanner (A) or stained with silver (B). Starting DNA quantity was 377.5 ng/5  $\mu$ l. A : polyacrylamide stained with Vistra Green. B : Polyacrylamide stained with silver.

**결과 및 고찰**

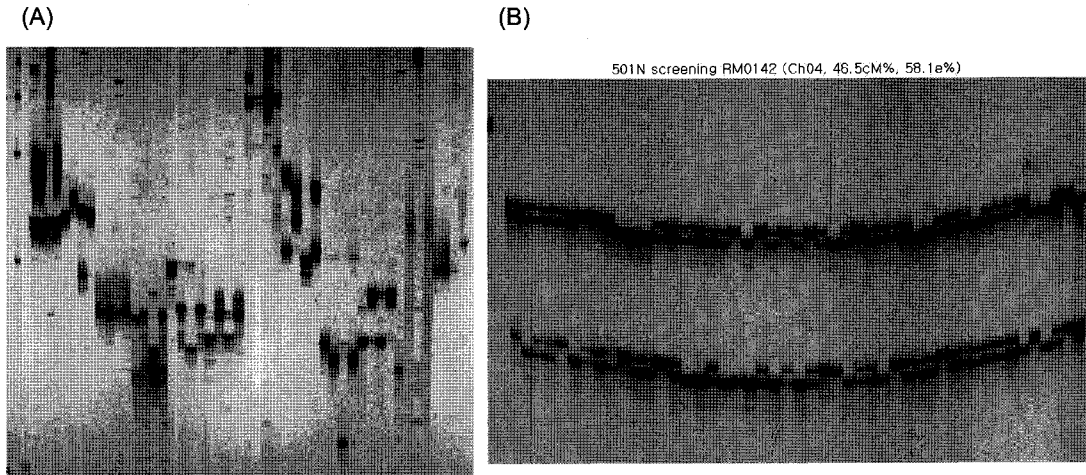
DNA 사이즈 마커를 2배씩 연속 순차적으로 희석하여 5% 변성 아크릴아마이드겔에 전기영동 한 후 은염색과 Gel Scanner로 얻은 이미지 결과는 그림 1과 같다.

Fig. 1의 왼쪽(A)의 이미지는 Vistra Green 0.01X 희석 증류수에 겔을 20분간 염색하였고 염색이 끝난 직후 488nm 레이저로 이미지를 스캔한 것이다. 오른쪽(B)의 이미지는 바이오니아(주)에서 제공하는 은염색 키트 (K1050, Bioneer Co.)의 매뉴얼에 따라 은염색을 실시한 후 광학 스캐너 (1640XL, EPSON)로 200 dpi의 해상도로 스캔하여 얻은 이미지이다. 샘플의 최초 DNA 총량은 377.5 ng 이었으며 이것을 순차적으로 2배씩 희석한 후 5  $\mu$ l 씩 주입하여 전기영동 하였다. DNA를 Gel Scanner로 스캔한 결과 은염색법에서 나타난 DNA 밴드가 Vistra Green으로 염색한 겔에서도 검출됨을 알 수 있었다. 다만 은염색법은 바탕이 비교적 밝은데 비해 형광 염료로 염색한 겔은 바탕이 어둡게 나타났다. 이는 전기영동 겔 유리판을 캐스팅할 때 유리판에 겔을 부착시키기 위해 바인딩 액을 도포하였기 때문에 나타나는 현상이다. 형광 염료 제조 회사인 Molecular Probes (2003년)의 정보에 의하면 형광염료는 유리와 바인딩 액에 흡착되는 성질이 있다고 한다. Vistra Green으로 염색된 이미지에서는 밴드와 밴드 사이에 지저분하게 깔려 있는 현상이 나타나는 반면에 은염색 이미지에서는 밴드와 밴드 사이가 비교적 깨끗하게 나타났다. 이는 은염색법은 고정, 세척, 발색의 여러 단계를 거치는 동안 오염 물질

이 씻겨 나가고 발색의 정도를 조절할 수 있는 반면에 Vistra Green으로 염색할 경우는 염색이라는 단 한 단계의 과정만 거치기 때문에 잔존해 있는 오염 물질이 상대적으로 많이 검출되기 때문인 것으로 생각된다.

Fig. 2의 왼쪽 이미지(A)는 벼 SSR 프라이머들의 품종간 다형성을 조사하기 위하여 전기영동한 것이고, 오른쪽의 이미지(B)는 진부벼와 멸구저항성을 지닌 IKO501 계통과의 교잡 후 F<sub>2</sub> 세대의 계통들을 RM142로 PCR한 후 5% 변성아크릴아마이드 겔에 전기영동한 것을 Vistra Green 0.01X로 염색한 후 겔 스캐너로 200  $\mu$ m 해상도로 이미지를 얻은 결과이다. 이 그림의 이미지 결과를 보았을 때 DNA의 profile을 판독하는데 어려움이 없음을 알 수 있었다. 최근에는 배경의 어두움을 줄이고 보다 선명한 이미지를 얻기 위하여 겔 바인딩유리판의 바인딩 액 도포량을 기준 사용량 보다 절반 이하로 줄이고, Triton X-100을 염색 용액 2리터당 0.5~1 ml를 첨가하여 사용하고 있다. Triton X-100을 전착제 종류인 Tween 20으로 대체해도 같은 효과를 얻을 수 있었다. 형광 염료에 영향을 주지 않는 전착제를 첨가해 줌으로써 겔의 염색이 보다 균일하게 되어 좀 더 선명한 이미지를 얻을 수 있는 것으로 생각된다.

이러한 결과를 고찰해 볼 때 형광염료와 겔스캐너를 이용하여 변성아크릴아마이드의 DNA를 검출할 경우 염색 단계가 한 단계로 단축됨으로 소요 시간과 노동력을 크게 절감할 수 있다. 그리고 소량의 형광 염료를 사용함으로써 은염색법을 이용하는 데 소요되는 시약 비용에 비교하여 20% 이하로 절감할 수 있을 것으로 추산되었다.



**Fig. 2.** Vistra Green staining of SSR markers PCR products resolved in a 5% denature polyacrylamide gel and imaged by Typhoon 488nm with the 520 BP 40 emission filter. A : Primer screening in rices. B : The fragments amplified by RM142 in F<sub>2</sub> lines of Jinbubyeo x IKO501.

### 적 요

형광 염료와 레이저 젤스캐너 장비를 이용하여 변성아크릴아마이드 겔에서 전기 영동된 DNA를 신속하고 간편한 방법으로 기존의 은염색법과 비슷한 감도로 검출하고자 하였다. 변성아크릴아마이드 겔을 형광 염료인 SYBR Green (Molecular Probes)이나 Vistra Green (Amersham Bioscience) 0.01 X 희석액 (pH 8)으로 염색한 후 480 nm 레이저, 520 nm filter 옵션으로 스캔하여 DNA를 검출하였으며, 검출감도는 기존의 은염색법과 비슷하면서 염색 단계를 한 단계로 줄일 수 있었다.

### 인용문헌

- Bassam B. J., Caetano-Anollés, and P. M. Gresshoff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 196 : 80-83.
- Molecular Probes. 2003. SYBR Nucleic Acid Gel Stains. Useful Tips Revised: 26-June-2003. ([www.probes.com](http://www.probes.com))
- Amersham Biosciences. 2002. Fluorescence Imaging. principles and methods. Handbook pp.47-55.