| 연구논문 |

현장과학교육 1(2) pp81~91 (2007년 11월)

식물로부터 유전물질을 추출하는 방법에 관한 연구
- 브로콜리, 키위 및 바나나를 이용하여 -

박기석, 정극일, 전상학*

서울대학교, 서울특별시 151-742

How to Extract Genetic Materials from Plants
- Using Broccoli, Kiwi and Banana -

Ki-Seok Park, Keuk Il Jung and Sang-Hak Jeon*

Department of Biology Education, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

요 약

DNA는 1897년 미셔(Miescher)에 의해서 처음으로 발견되었지만, DNA가 유전물질이라는 것은 1928년 그리피스(Griffith)의 형질전환실험, 1944년 에이베리(Avery) 등의 형질전환 물질에 대한 생화학적인 연구, 그리고 1952년 허쉬(Hershey)와 체이스(Chase)의 방사성 동위원소를 이용한 바이러스의 유전연구를 통해서 규명되었다. 1953년에 왓슨(Watson)과 크릭(Crick)에 의한 DNA 이중나선 구조의 규명은 분자생물학의 발달과 DNA 재조합 시대를 여는 계기가 되었다. DNA 기술은 사람을 포함하는 많은 생물의 유전체연구의 완성을 가져왔고, 형질전환 동식물의 생산, 사람의 질병 예방과 치료, DNA 지문을 이용한 과학적 수사, 친자 확인 등 우리 실생활과 매우 밀접한 연관성을 갖게 되었다. 따라서 DNA를 교육 현장에서 학생들이 직접 뽑아서 눈으로 확인하는 것은 매우 중요한 의미가 있다고 생각된다. 본 연구에서는 구입이 쉽고 저렴한 재료인 브로콜리, 키위 및 바나나를 이용하여 DNA를 추출하는 과정을 연구하였다. 전통적인 복잡한 방법 대신에 세제와 에탄올만으로도 눈으로 확인할 수 있을 만큼 많은 양의 DNA를 나무젓가락으로 감아올릴 수 있었다. 추출된 DNA의 양은 키위에서 실험재료의 단위 무게 당 가장 많은 양의 DNA가 추출되지만 추출액의 색깔이 DNA 덩어리와 비슷하여 관찰이 용이하지 않았으며, 반면에 상대적으로 적은 양이 추출되는 브로콜리는 색깔의 대비로 DNA가 뚜렷하게 관찰되었다. 추출된 DNA를 페놀로 처리하였을 때 단백질이 검출되었기 때문에 추출된 DNA는 단백질도 일부 포함하고 있는 것으로 생각된다. 추출된 DNA는 발암성 물질인 에씨디움 브로마이드(Ethidium Bromide, EtBr)뿐만 아니라 교육현장에서 이용되는 염색약인 메틸렌블루 용액 및 아세트올세인 용액으로도 염색되었다. 따라서 본 연구 결과는 DNA 추출 및 확인 실험이 중등교육 현장에서도 탐구활동으로 활용가능하며, 향후 새로운 교과과정 개편에서 분자생물학 실험으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

주제어: DNA 추출, 유전물질, 전기영동

서 론

유전 현상에 대한 관심은 역사 시대 이전에도 인식을 하고 있었다는 것을 벽화를 보면 알 수 있다. 기원전 9세기의 아시리안 벽화에는 식물을 인공 수분시키는 과정이 나오는데 이는 인위적인 수정 과정을 통해 좀 더 나은 자손을 수확할 수 있었다는 것을 추론해 볼 수 있게 한다(Hartwell et al., 2000). 유전 현상에 대하여 학문적인 측면에서 체계적으로 정립한 사람은 멘델(Mendel)이다. 멘델은 1865년에 9년간의 연구 결과를 '식물 잡종에 관한 연구'라는 발표를 통해 유전의 원리를 발표하였다(Mendel, 1865). 비록 멘델의 연구 결과는 1900년대에 재발견되기까지 빛을 보지 못하였지만 멘델은 자손에게 전달되는 물질을 라틴어로 원소라는 의미를 가지는 elementum이라고 명명하였으며, 유전물질의 존재를 구체적으로 명시하기에 이르

*교신저자: jeonsh@snu.ac.kr. Tel.: 02-880-1409. Fax: 02-886-2117. CP: 010-8754-1409

*이 논문은 초청논문임.

렀다.

1900년대 전반부는 유전물질의 정체를 확인하고자 하는 많은 연구들이 진행되었다. 1910년쯤에 모건은 초파리 연구를 통해 유전물질이 염색체에 있다는 유전자설을 증명하였다. 1928년에 그리피스(Griffith)는 두 종류의 폐렴쌍구균을 쥐에 감염시키는 실험을 통해 비감염성 세균이 감염성 세균으로 형질전환이 된다는 것을 보여주었다. 이러한 그리피스의 실험은 형질전환에 관여하는 물질을 생화학적으로 규명할 수 있는 길을 열어주었다. 1944년 에이버리(Avery), 마크레오드(MacLeod), 맥카티(MacCarty)는 그리피스의 실험에서 형질전환에 대한 물질이 탄수화물, 지질, 단백질, DNA 중에서 DNA 분해 효소를 처리하여 DNA를 파괴하였을 때에만 형질전환이 일어나지 않는 것을 보고 DNA가 유전물질임을 주장하였다. 이들의 주장을 믿지 못하는 사람들은 단백질이 미량으로 들어가 형질전환 과정에 관여했을 것이라는 것과 생명체의 다양성을 담당할 수 있는 물질은 단백질 밖에 없다는 주장을 굽히지 않았기 때문에 DNA가 유전물질이라는 확고한 증거를 제시하는 실험이 필요하였다. 1952년에 허쉬(Hershey)와 체이스(Chase)는 바이러스를 각각 DNA에 들어있는 인산(P)을 방사선 동위원소(^{32}P)로 치환하거나 혹은 단백질에만 들어있는 황(^{35}S)을 방사선 동위원소로 치환하여 박테리아에 감염시킨 후 다음 세대 박테리아에 인산의 방사성 동위원소가 나타나는 것을 확인함으로써 DNA가 유전물질이라는 것을 증명하여 유전물질에 대한 논란에 종지부를 찍었다(Hartwell et al., 2000). 그렇다면 실제 핵산 물질은 언제쯤 순수분리 되었을까? 핵산은 DNA가 유전물질이라는 것이 규명되기 훨씬 전인 1897년 미셔에 의해서 처음으로 순수분리되었다. 미셔는 고름에서 얻은 백혈구의 핵에 인과 질소를 포함하는 물질이 있는 것을 발견하였다. 그는 이것을 단백질과 산성을 나타내는 물질로 분리하고 산성의 물질을 핵산(nucleic acid)이라고 명명하였다.

중등교육 현장에서 DNA 추출과 같은 분자생물학 실험을 수행하는 것은 매우 어려운 것으로 생각되어 왔다. 50분이라는 짧은 시간 내에 실험을 수행하여야 하고, 기구 이용이 쉽고 비용이 저렴하게 들어야 하는데 분자생물학 실험은 그렇지 못한 경향이 크다. 현행 7차 교과서 7종을 분석해 보면 분자생물학 분야에서 실험 탐구 수업은 없다. 하지만 유전 영역은 현대 생물학의 핵심 영역이면서 미래 생명과학 산업의 근간을 이루기 때문에 실험 탐구 수업을 통해 분자생물학을 배울 수 있는 기회를 제공하는 것이 매우 중요하다고 생각된다.

다행스럽게도 최근에는 실험실에서 연구용으로 핵산을 분리하는 것뿐만 아니라 교육 현장에서도 핵산을 분리하는 실험을 수행하려는 시도들이 많이 나타났다. 서울과학전시관에서는 교사 연수 과정에 돼지 난소세포를 이용하여 DNA를 추출하는 실험이 진행되었으며(서울특별시과학전시관 실험연수 교재, 2007), 다른 교육현장에서는 사람의 구강세포나 동물의 간세포를 이용하여 DNA를 추출하는 실험도 진행되었다. 이 실험을 수행한 교사나 학생들로부터 많은 질문들이 제기되었기 때문에 본 논문에서는 DNA 추출 과정에 대한 좀 더 상세한 연구 결과를 발표하여야 할 필요성을 갖게 되었다. 본 연구에서는 브로콜리, 키위 혹은 바나나 같은 좀 더 쉬운 재료를 이용하여 DNA를 대량으로 얻는 방법을 구체적으로 연구함으로써 중등교육현장에서 분자생물학 실험이 가능하도록 하였다. 본 실험은 2007년도 생물학의 해 '국제생물공학전 및 DNA 돌연변이전' 서 사용되어 큰 반향을 불러 일으켰다. 선행 연구에서는 DNA 추출만으로 끝나는 경우가 많아서 학생들이 직접 추출한 것이 DNA가 맞는지에 대한 의문을 가지게 되었는데, 본 실험에서는 DNA가 정말 맞는지 확인하는 과정을 학생들이 직접 할 수 있게 하여 학생들이 과학적인 근거를 들어서 사고하는 능력을 키워줄 수 있도록 하였다. 본 실험을 중학교 2학년을 대상으로 적용하였을 때 큰 흥미를 불러일으킴으로써 교육 현장에서 실험 탐구 활동으로 적절하게 활용할 수 있다는 것을 확인하였다.

연구 재료 및 방법

시약, 기구 및 실험 재료

본 연구는 DNA를 추출하는 실험과 추출한 DNA를 확인하는 심화 실험까지 포함하고 있다. 따라서 재료 및 방법을 현장에서의 실험 수행을 고려하여 두 부분으로 구분하여 표시하였다.

(1) DNA 추출 과정

DNA를 뽑는데 이용한 재료로는 주변에서 구입하기 쉽고 보관이 쉬운 브로콜리, 키위 혹은 바나나를 이용하였다. 이들 재료는 가능하면 신선한 것을 이용하였으며, 키위나 브로콜리는 신선도를 유지하기 위하여 사용 전까지 냉장 보관하기도 하였다. 이들 재료를 막자사발에 넣은 다음 갈아주고 DNA 추출을 도와주는 소금-세제액을 넣어주었다. 소금-세제액은 소금 2g에 세제 7ml를 넣고 물을 150ml 부어서 만든 것이다. 이 용액은 실험 시작 전에 바로 만들어 놓고 다음 단계의 실험들을 진행하였다. 세제는 주방용으로 쓰이는 일반적인 세제면 어떤 것이

시약, 기구 및 실험 재료

〈DNA 추출〉
브로콜리(바나나, 혹은 키위), 100% 에탄올, 주방용 세제, 막자사발, 가위(혹은 칼), 나무젓가락, 100ml 비이커, 소금(NaCl), 구멍이 작은 주방용 체, 돋보기, 붓, 종이, 증류수(혹은 수돗물), 붓, 페트리 접시.

〈전기영동을 통한 DNA 확인실험〉
전기영동장치, Agarose, TAE buffer(40mM Tris-acetate, 1mM EDTA), 전원공급장치, 1% 메틸렌블루(생물나라), 1% 아세트올세인(생물나라), 염색통(작은 주방용 유리 용기), 마이크로 피펫, 거름종이.

든 상관없이 잘 작용한다. 여기서 소금-세제액의 역할은 세제의 경우 계면활성제의 역할을 함으로써 세포막의 주성분인 인지질을 녹이는데 도움을 준다. 그리고 소금의 경우는 알콜을 넣어줬을 때 DNA가 잘 뭉치게 도와주며 무색인 DNA가 Na^+ 이온과 결합하여 흰색을 띄게 된다.

(2) DNA 확인실험: 전기영동실험

DNA 확인실험을 하기 위해서는 전기영동실험이 필요하다. 0.8 ~ 1% 정도의 아가로즈 겔(agarose gel)을 TAE 완충용액(buffer)에 넣고 전자레인지에서 녹여 액체를 만든 후 겔을 만드는 판에 부어 굳게 만든다. 겔 판에는 DNA를 넣을 공간이 필요하기 때문에 겔 판에 콤(comb)을 넣고 녹은 아가로즈 용액을 붓는다. 전기영동장치에 굳은 겔을 올려놓고 완충용액을 부은 후 물에 잠긴 작은 구멍에 마이크로 피펫을 이용하여 DNA를 넣는다. 다음에 전기를 흘려주어 DNA를 이동시켜야 하므로 전원장치(파워 서플라이)가 필요하다. DNA는 “-” 이온을 띠고 있기 때문에 DNA가 “-”에서 “+” 방향으로 이동하도록 전원을 걸어준다. 전기영동이 끝나면 메틸렌블루(혹은 아세트올세인)에 넣어 염색하여 DNA를 확인한다. 전기영동 장치는 많은 회사들이 취급하고 있는 품목으로 구입이 비교적 쉽다. 교육현장에서 필요한 것은 매우 규모가 작은 것이면 충분하다.

전기영동과정은 복잡하기 때문에 교육 현장에서 아주 간단하게 확인할 수 있는 방법을 고안하였다. DNA를 거름종이에 찍고 아세트올세인으로 염색하면 비교적 DNA가 잘 보이는데, 메틸렌블루는 거름종이에 너무 흡착이 잘 되어 좋은 결과를 주지 못하였다.

실험 방법

(1) DNA 추출과정

① 브로콜리, 키위, 바나나를 각각 50g씩 막자사발 안에 넣고 칼 혹은 가위로 잘게 자른다. 키위나 바나나는 껍질을 벗긴 후 안 부분만을 이용하여 잘게 자른다. (대략적으로 50g은 키위 반개, 바나나 반개, 주먹만한 브로콜리 절반)

② 작은 조각의 샘플을 막자사발에 넣고 막자로 아주 잘게 간다.

③ 실험 전에 바로 만든 소금-세제액 100ml를 막자사발에 넣고 약 10분 동안 조심스럽게 섞으면서 갈아준다.

④ 구멍이 작은 체를 이용하여 용액을 걸러 찌꺼기를 제거한다.

⑤ 나무젓가락을 비커 벽에 대고 조심하면서 에탄올이 나무젓가락을 타고 내려가게 하면서 조심스럽게 에탄올을 비이커에 넣는다. (에탄올은 세포 추출액 부피의 2배를 넣어준다.)

⑥ 흰색의 가는 선 모양의 물질이 생기면 먼저 돋보기로 관찰한 후 나무젓가락으로 여러 번 휘감아 올린다. 흰 색깔의 물질이 DNA가 엉켜서 생긴 것이다.

⑦ 추출한 DNA를 1ml 증류수 혹은 수돗물에 녹인다. (1.5ml의 작은 튜브(e-tube)를 사용하면 편하다.)

⑧ 붓으로 이 용액의 일부를 묻힌 후 거름종이에 DNA라고 글씨를 쓰고 잘 말린 뒤 0.2% 아세트올세인 염색약(1% 원액을 5배 희석)에 15분 정도 넣어둔 후 열탕에서 5분간 여분의 아세트올세인 용액을 제거한다. 탈색후 유전물질을 색깔을 통해 확인한다.

(2) DNA 확인 과정: 전기영동장치의 이용(그림 7 참조)

① 추출한 DNA를 1.5ml 튜브에 들어 있는 증류수에 녹인다. 이 때 손으로 튜브를 잡고 흔들어 주면서 DNA가 증류수에 잘 녹도록 한다.

② 0.8%가 되게 아가로즈를 TAE 완충용액에 넣고 전자레인지에서 녹인 후 콤이 꽂아진 겔 틀에 붓고 겔이 굳을 때까지 기다린다.

③ 굳은 겔을 전기영동장치에 넣고 겔의 홈이 잠길 때까지 완충용액을 붓는다.

④ 전원을 꼽고 DNA를 “-”에서 “+” 방향으로 이동하도록 한다.

⑤ 약 30분 정도 지나면 전원을 끄고, 겔을 전기영동장치에서 빼내 염색통에 넣고 염색을 한다.

⑥ 염색약으로는 EtBr, 메틸렌블루, 아세트올세인을 이용하

여 DNA를 염색한다. EtBr은 약 5분 동안 염색을 하며, 메틸렌 블루는 약 5분 정도, 아세트올세인은 약 10분 정도 염색을 한 후 2 ~ 3시간 동안 탈색한다. DNA가 염색되어 있고 겔의 나머지 부분의 염색부분이 사라진다.

⑦ EtBr로 염색한 겔은 자외선을 쪼여주면서 관찰하며, 메틸렌블루나 아세트올세인으로 염색한 겔은 밝은 빛 위에 올려놓고 관찰한다.

실험상의 주의점

소금-세제액은 실험 전에 만들어 써야 효과가 더 좋으며, 또한 실험 재료는 반드시 신선하게 유지해야 유전물질의 파괴를 막을 수 있다. 잘게 부순 브로콜리 용액에 나무젓가락을 비스듬하게 세운 뒤 에탄올을 막대를 따라서 천천히 넣는 것이 매우 중요하다. 에탄올을 한꺼번에 붓게 되면 긴 사슬의 DNA를 보기 어렵고 약간 뿌옇게 보이는 경향이 있다. 100% 에탄올은 휘발성이면서 발화성이 있기 때문에 원액은 학생들이 접근할 수 없도록 보관한다. 만약 EtBr을 이용하는 경우에는 강력한 돌연변이 유발물질이기 때문에 특별한 관리가 필요하다. 전기영동기구를 사용할 때 높은 전압이 걸리므로 전기 안전에 유의한다.

연구 결과 및 논의

소금-세제액 및 에탄올을 이용한 DNA의 추출

교육 현장에서 DNA를 추출하는 실험을 수행하기 위해서는 실험 과정이 50분 안에 끝날 수 있어야 하기 때문에 대학 실험실에서처럼 복잡한 화학 약품을 이용한 정교한 실험을 할 수 없다. 교육 현장에서의 실험은 시간의 제약을 고려해야 할 뿐만 아니라 재료를 쉽게 구입할 수 있고, 위험한 약품을 줄이며, 비용이 저렴해야 한다.

본 연구에서 이용한 바나나, 키위, 브로콜리는 시장에서 쉽게 구입할 수 있고, 키위 및 브로콜리는 냉장보관을 통해 상당한 기간 동안 보관이 가능하여 학교 현장에 이용하기에 편리하다. 이러한 재료는 박테리아를 키워서 DNA를 추출하는 실험이라든가 입안을 헹궈 DNA를 뽑아내는 것보다 훨씬 쉽고 다량의 DNA를 추출할 수 있다. 박테리아를 이용하는 경우 배지를 만들어야 하는 불편함이 있고, 교사 연수 과정에서 종종 이용되는 입안을 헹궈 구강세포를 얻는 과정은 위생상으로 좋지 않으며 DNA 함량이 생각보다 부족하여 나무젓가락으로 걷어 올리기가 쉽지 않다.

본 연구 과정에서는 바나나, 키위, 브로콜리 모두를 이용하여 DNA를 뽑아 보았는데 어느 재료든지 쉽게 그리고 풍부한 양의 DNA를 얻을 수 있었다. 바나나 및 키위는 껍질을 제거하고 안의 내용물만으로 DNA를 추출하였다. 세 가지 재료를 이용하여 DNA를 뽑는 과정은 큰 차이가 없기 때문에 여기에서는 브로콜리를 재료로 하여 DNA를 뽑는 과정에 대한 연구 결과를 보이고자 한다. 브로콜리를 이용하여 DNA를 뽑는 일반적인 절차는 '재료 및 방법' 부분에서 이미 설명하였다 (그림 1). 실험 과정에서 몇 가지 중요한 점을 소개하면 다음과 같다. 첫째, 브로콜리는 가능하면 작은 크기로 잘라 막자 사발에 넣는 것이 좋은데, 이것은 브로콜리를 잘게 부수는데 크게 도움이 되었기 때문이다(그림 1A). 둘째, 소금-세제액을 함께 넣고 브로콜리를 부수는 것이 브로콜리만 넣고 부수는 것보다 더 많은 DNA를 추출할 수 있었다. 셋째, 브로콜리가 부수어진 용액에 나무젓가

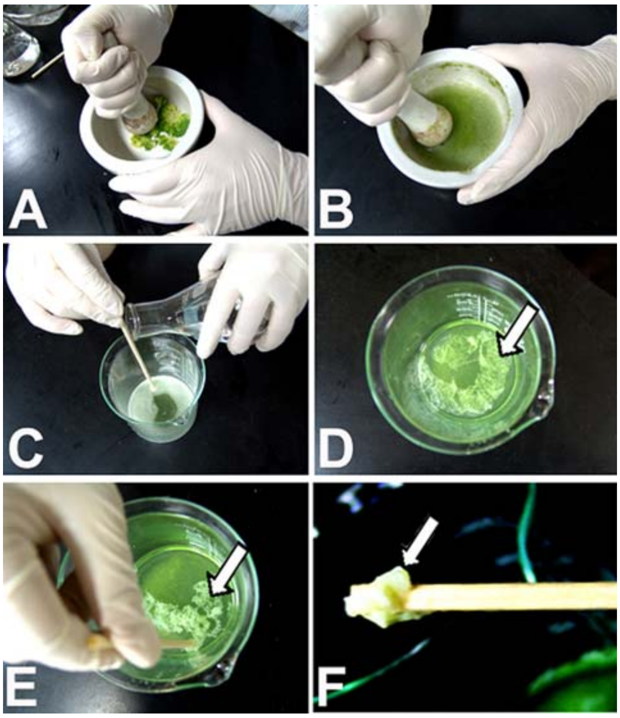

그림 1. 브로콜리를 이용한 DNA 추출 시 필요한 정보. (A) 브로콜리를 잘게 부수는 과정. 재료를 잘게 자를수록 막자사발로 가는 것이 쉽다. (B) 막자사발에서 잘게 부수는 과정. 재료만 넣어서 가는 것이 아니라 소금-세제액을 넣고 천천히 갈아 줌으로써 DNA를 얻을 수 있는 효율을 높일 수 있다. (C) 에탄올에 의한 DNA 침전. 에탄올을 첨가하면 DNA가 하얗게 침전된다. (D) 침전 중인 DNA. DNA는 에탄올에 의해 침전되면서 하얀 실타래 모양으로 엉키면서 눈으로 관찰이 가능해진다. (E~F) DNA 걷어 올리기. 침전 중인 DNA를 나무젓가락으로 여러 번 감아올린다.

락을 비스듬하게 세운 뒤 에탄올을 막대를 따라서 천천히 넣는 것이 매우 중요하다(그림 1C). 넷째, 1차적으로 풀어 논 실타래와 같은 모습으로 나타나는 DNA를 돋보기로 관찰한 후 나무젓가락으로 휘감아 올린다(그림 1E).

그림1D의 화살표는 DNA가 들어있는 액체에 에탄올을 붓게 되면 DNA가 침전을 하면서 그 과정 중에 실타래의 모습으로 얽혀 있는 것을 보여준다. 에탄올을 제거한 침전된 DNA는 증류수나 완충용액(예: TE buffer)을 넣으면 녹는다.

그림 2는 다양한 재료에서 추출한 DNA의 모습을 보여주고 있다. 모든 재료에서 DNA가 추출된 것을 알 수 있으며 그 중 브로콜리의 경우 세포추출액이 녹색이어서 흰색과 대비가 되어서 관찰이 가장 용이하였다(그림 2A). 키위의 경우는 가장 많은 양의 DNA가 생겼으나 그 구분이 용이하지 않는 단점이 있었다. 하지만 옆에서 관찰하면 모두 에탄올 층에서 흰 실타래 모양의 DNA가 뭉친 것을 관찰할 수 있다(그림 2D~F).

각 각의 재료를 50g씩 이용하여 DNA를 추출하였으며, 0.001g까지 측정할 수 있는 저울을 이용하여 DNA 양을 측정하였다. 먼저 1.5ml 튜브를 저울에 올려놓고 영점 조정을 하였으며, 이 튜브에 젓가락으로 걷어 올린 흰색의 DNA를 튜브에 넣고 질량을 측정한 후 차이 질량을 추출한 DNA 질량으로 결정하였다. 이 DNA에는 단백질이 완전히 제거된 것이 아닐 수 있기 때문에 순수하게 DNA 질량이라고 볼 수는 없지만 상대적인 질량을 비교하는데 큰 어려움이 없다고 생각된다. 이 방법을 이용하여 얻은 DNA의 양은 브로콜리는 50mg, 바나나는 350mg, 키위는 850mg이다. 따라서 질량으로만 보면 키위로부터 단위량 당 가장 많은 DNA를 얻을 수 있다. 이 수치는 재료를 곱게 갈수록 많은 양이 생기는 경향이 있기 때문에 절대적인 값이 될 수 없다. 추출한 DNA 50mg에는 증류수 50ul을, 350mg에는 350ul, 850mg에는 850ul를 넣어 최종적으로 1mg/ul의 농도를 가지는 용액을 만들어 전기영동을 할 때 이용하였다.

거름종이와 아세트올세인(aceto-orcein) 염색약을 이용한 DNA의 확인

본 실험을 학교 현장에서 할 때 여러 제약 조건을 생각하면 최종적으로 나무젓가락으로 휘감아 올리는 과정까지만 하여도 충분하다고 생각된다. 하지만 본 실험을 중학교 1학년을 대상으로 수행하였을 때 나왔던 질문 중의 하나가 나무젓가락에 붙어 있는 것이 DNA인지 어떻게 알 수 있냐는 것이었다. 따라서 심화 실험도 필요하기 때문에 DNA 확인 실험을 수행하였다.

DNA를 확인할 수 있는 가장 간단한 방법은 아세트올세인 염색약을 이용하는 것이다. DNA는 수용성이므로 나무젓가락에 붙어 있는 DNA를 증류수에 녹인 후 붓으로 이 액체를 묻혀 거름종이 위에 점을 찍고 메틸렌블루로 염색을 하였다. 이 때

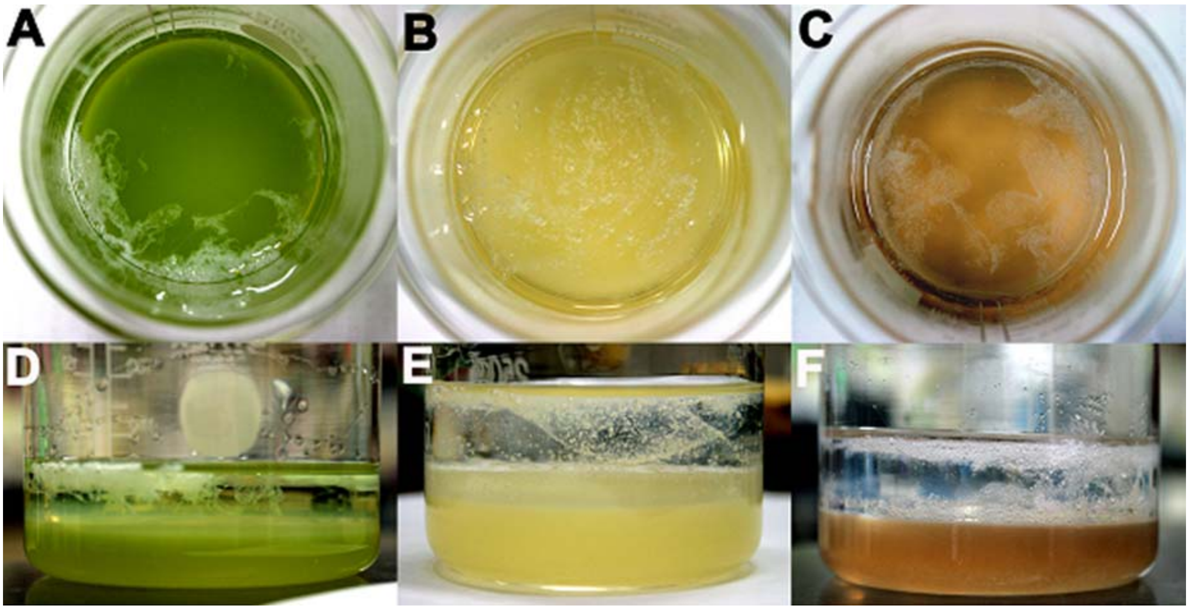

그림 2. 다양한 샘플에서 응축된 DNA의 모습. (A) 브로콜리, (B) 키위, (C) 바나나. 세포 추출액의 색깔은 재료에 따라 다르게 나타나는 것을 알 수 있으며 관찰을 할 때에는 브로콜리가 가장 선명하게 보였다.

DNA뿐만 아니라 주변의 거름종이도 염색이 되기 때문에 끓는 물 속에 거름종이를 넣어 탈색을 하였다(그림 3A). DNA 용액을 묻힌 부분에서 진하게 염색되는 것이 관찰되었다(그림 3B, C). 거름종이에 찍고 말리는 과정을 반복하면 더욱 선명한 DNA를 볼 수 있었다(그림 3D). 염색약의 농도에 따라 염색시간을 조절하여야 하며, 1% 아세트올세인 용액(생물나라)을 1/5로 증류수에 희석시켜서 사용할 경우에는 15분간 염색하고 끓는 물에서 5분간 탈색하면 쉽게 관찰할 수 있었다. 탈색하는 과정에서 DNA를 찍은 곳 이외의 지역에서 염색약이 없어지는지 중간 중간 확인하면서 관찰이 용이할 정도로 탈색이 되면 중단시킨다. 반면에 메틸렌블루 용액은 거름종이에 착색이 심하게 되어 염색된 DNA를 관찰하기 어려웠다. 그림 3B에서 보이는 것처럼 거름종이 위에 DNA 글씨를 쓰는 것은 많은 양의 DNA를 필요로 하기 때문에 어려움이 있는 반면에 점을 찍어 확인하는 것은 학생들과 쉽게 실험할 수 있었다.

그러나 가장 많은 DNA 덩어리가 나왔던 키위의 경우 같은 농도에서 브로콜리나 바나나보다 염색이 약한 것이 확인되었다. 이에 의문을 가지고 DNA 용액에 다른 물질이 섞여 있는지 확인하는 실험을 수행하였다. 단백질과 지질은 페놀과 만나면 뭉쳐져서 덩어리지는 성질을 이용하여 페놀-클로로포름 용액을 DNA 용액과 1:1로 넣고 고속으로 원심분리 시켜보았다. 그 결과는 아래 (그림 4)와 같이 DNA는 상층에 녹아 있어 보이지 않는데 비해, 단백질을 포함한 다른 물질들은 중간에 덩어리져 있다. 따라서 DNA라고 생각되었던 물질은 모두 DNA뿐만 아니라 단백질 등의 다른 물질도 포함하고 있다는 것을 알 수 있었다(그림 4D).

EtBr과 UV 조사를 통한 DNA의 확인 방법

위의 실험에서 나무젓가락을 걷어 올린 것에 DNA 이외의 물질이 있다는 것을 보여 주었는데 하지만 DNA가 있다는 것을 보여준 것이 아니다. 그렇다면 DNA도 있다는 것을 어떻게 보

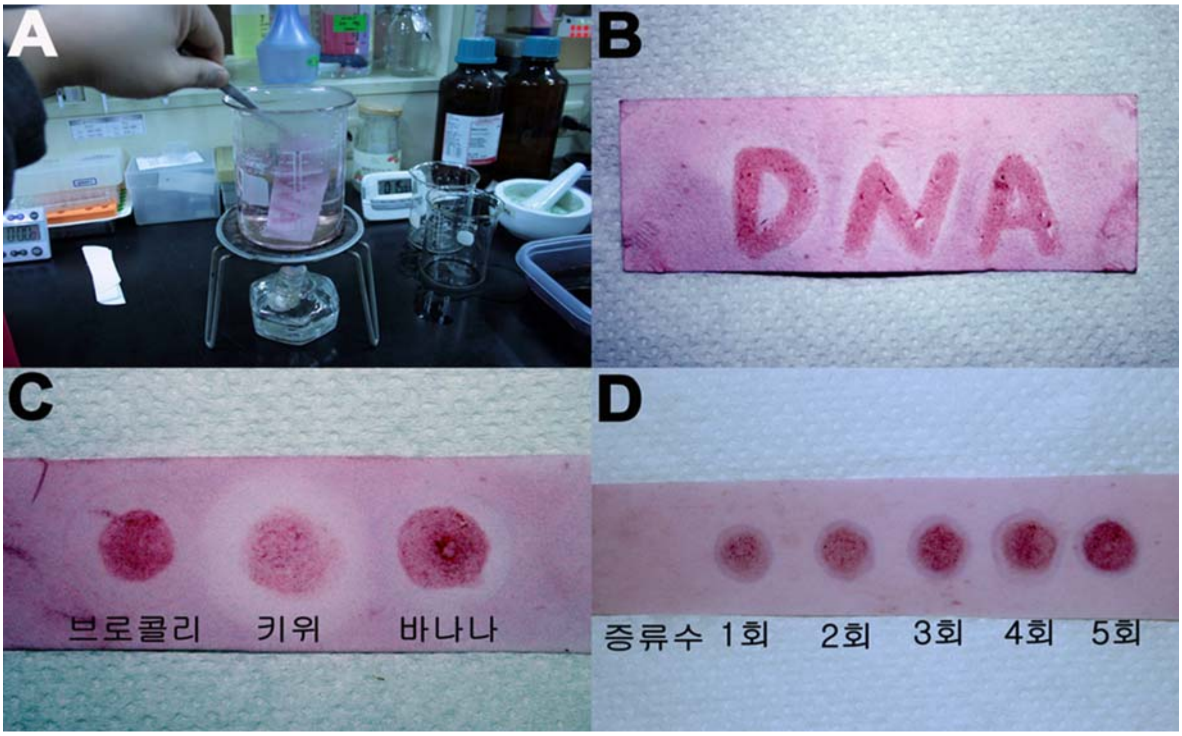

그림 3. 종이와 아세트올세인 염색약을 이용한 DNA 확인 실험. (A) 끓는 물에서 염색된 거름종이를 탈색시키는 과정. 탈색 정도는 눈으로 보면서 결정한다. (B) DNA 글자를 이용한 DNA 확인하기. DNA 용액을 이용하여 글자를 쓰면 글씨부분이 진하게 염색된다. (C) 점을 찍어 DNA 확인하기. 브로콜리, 키위 및 바나나의 DNA 용액을 이용하여 거름종이에 묻힌 후 염색하면 모두 DNA 용액을 묻힌 곳에서 진하게 염색되는 것을 볼 수 있다. 브로콜리와 바나나가 키위에 비해 더 진하게 나타나는 것을 알 수 있다. (D) 농도 차이에 의한 DNA 확인하기. DNA를 녹인 증류수와 DNA 용액을 묻히는 횟수를 달리하여 실험해본 결과 묻힌 횟수가 많을수록 염색이 더욱 진해지는 것을 알 수 있으며 3회, 4회, 5회는 크게 차이가 없는 것을 알 수 있다. 그러나 DNA를 녹인 증류수만을 묻힌 곳에서는 아무런 반응이 없었다.

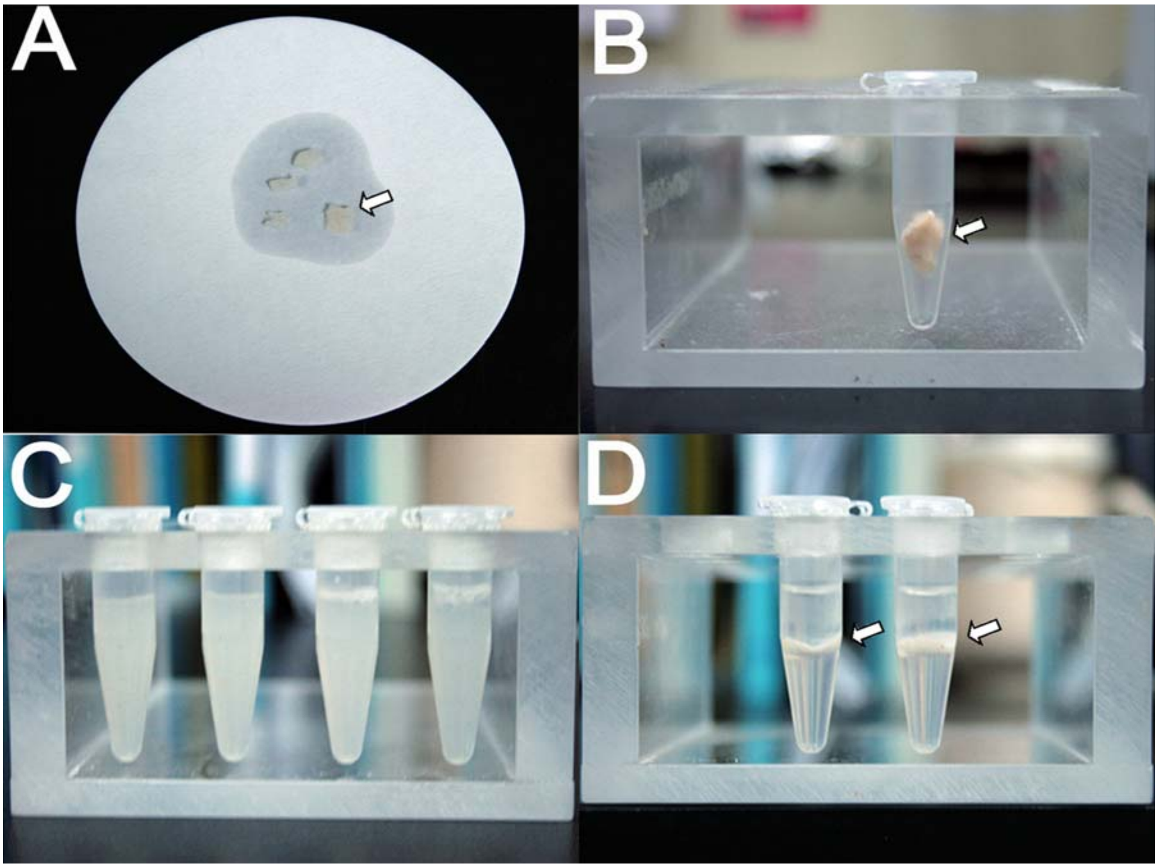

그림 4. 키위 DNA 용액에서 단백질 분리. (A) 알코올 층에서 얻은 DNA 덩어리. (B) 거름종이에서 충분히 말린 상태의 DNA 덩어리를 E-tube에 넣는다. (C) 증류수를 이용하여 DNA덩어리가 모두 녹을 때까지 E-tube를 흔들어준다. (D) 페놀을 이용한 DNA 분리. 페놀-클로로포름 용액과 DNA 용액을 1:1로 섞고 고속원심분리기에서 15분간 돌려주면 상층은 DNA 용액, 중간층의 화살표가 가리키는 곳에서는 단백질을 포함한 다른 물질이 분리되어 나타난다.

여줄 수 있을까? DNA를 확인하는 가장 좋은 방법은 아가로즈 겔 전기영동법(agarose gel electrophoresis)을 이용하여 전기영동을 하고, DNA를 EtBr 염색약으로 염색한 후 자외선(UV)을 쪼여 확인하는 것이다(Sambrook and Russell, 2001). EtBr은 DNA 이중나선에 끼여 들어가는 특징이 있기 때문에 분자생물학을 하는 실험실에서는 빈번하게 이용하는 방법이다. EtBr이 끼여 들어간 DNA는 자외선을 쪼이면 강한 빛을 낸다. 하지만 EtBr은 DNA 구조에 이상을 유발하는 강력한 돌연변이 유발물질로 알려져 있다. 따라서 교육 현장에서는 EtBr을 이용하기 어려울 것으로 생각된다.

본 연구에서는 먼저 DNA를 전기영동법에 의해 분리하고 이를 EtBr로 염색하여 우리가 얻은 것이 DNA라는 것을 확인하였다. 그림 5A는 EtBr로 염색한 겔로 UV를 조사하여 촬영한 것이다. 그림 5A의 1번 줄(Lane 1)은 표준 DNA 마커(standard DNA marker)로 가장 작은 것이 100bp(화살표머리), 가장 큰 것이 10,000bp(10kbp)(화살표)가 된다. 작은 크기의 DNA는 겔 사이를 좀 더 빨리 이동하기 때문에 아래에 놓이게 되며, 크기가 큰 것은 이동이 어려워 위쪽에 있다. 그림 4A의 2번 줄(Lane 2)은 브로콜리로부터 추출한 DNA로 화살표는 브로콜리 DNA를, 화살표 머리는 RNA를 나타낸다. DNA가 10kbp보다 더 위쪽에 있기 때문에 브로콜리 유전체 DNA는 10kbp보다 크다는 것을 알 수 있는데 이것에 해당하는 표준 값이 없으므로 실제 DNA 크기를 알 수 없을 뿐만 아니라 지금 보이는 DNA도 긴 DNA가 끊어진 조각들일 가능성도 배제할 수 없다. 그림 5A의 2번 줄은 5mg DNA를, 3번 줄(Lane 3)은 10mg DNA를 넣어 전기영동한 것으로 10mg을 넣었을 때 매우 뚜렷한 밴드를 보여준다. 본 정량 방법은 위에서 설명한 것처럼 현장에서 할 수 있도록 아주 단순한 방법을 통해서 이루어진 것이다. 그림

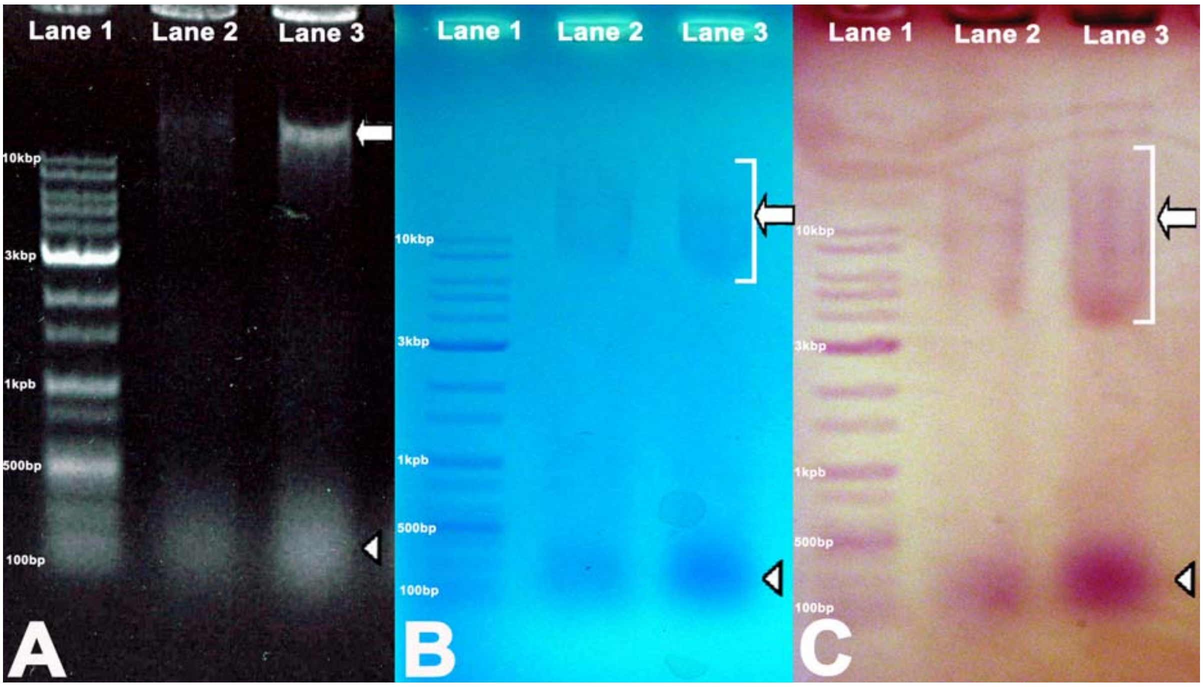

그림 5. 브로컬리 DNA 전기영동 사진. (A-C) 첫 번째 줄(Lane 1)은 DNA 크기를 측정하기 위한 표준크기 마커(size marker)이며, 2번 줄(Lane 2)에는 DNA 5mg을, 3번 줄(Lane 3)에는 10mg을 넣은 것이다. (A) EtBr 염색을 통한 DNA의 확인. DNA 농도를 달리하여 전기영동하고 EtBR에 염색 후 사진 촬영한 것이다. 브로콜리의 DNA가 위쪽에서 진하게 잘 보이는 것이 관찰된다(화살표). 아래의 밴드는 RNA로 생각된다(화살표머리). (B) 메틸렌블루 염색에 의한 DNA의 확인. 브로컬리의 DNA를 전기영동한 후 메틸렌블루 염색약으로 염색한 것이다. 전기영동 결과와 같은 결과가 나오는 것을 확인할 수 있다. (C) 아세트올세인 염색에 의한 DNA 확인. 브로컬리 DNA를 전기영동한 후 아세트올세인으로 염색한 결과이다. 마찬가지로 EtBr 염색 결과와 유사한 양상을 보여준다. B와 C에서 유전체 DNA가 더 아래로 내려온 것은 DNA가 조각으로 나누어진 것으로 생각된다.

5B는 브로콜리 DNA를 그림 5A처럼 전기영동 하였지만 메틸렌블루로, 그림 5C는 아세트올세인으로 염색한 것이다. 그림 5의 A, B, C가 매우 유사한 것으로 보아 그림 5B와 C에서 각각 메틸렌블루와 아세트올세인으로 염색한 것이 DNA임을 알 수 있다. 그림 5B와 C에서 DNA가 10kbp보다 약간 아래쪽에 있는 것으로 보아 DNA가 파괴되어 작은 크기가 된 것으로 생각된다.

전기영동을 하기 위해서는 전기영동장치(electrophoresis device), 아가로오즈(agarose), 겔을 만들기 위한 틀, 전기영동시 사용할 완충용액(TAE buffer)이 필요하다. DNA가 클수록 아가로즈 농도는 묽은 것을 이용하여 DNA의 이동을 원활하게 할 필요가 있다. DNA는 음전하를 가지고 있기 때문에 전기영동 시 (+)극에서 (-)극으로 이동한다. 겔을 메틸렌블루나 아세트올세인으로 염색한 후에는 배경 색깔을 없애는 탈색 과정을 거쳐야 한다. 염색은 약 5분 정도 하며, 염색이 끝난 후 겔을 1 ~ 2시간 정도 증류수에 넣어서 DNA 이외 지역에 있는 메틸렌블루를 탈색시켰다. 이 때 증류수를 15분에 한번 씩 갈아 주었다. 하지만 한번 탈색해 놓고 증류수에 넣어 보관을 하면 오랜 시간동안 관찰할 수 있어서 교사가 미리 만들어 놓고 학생들에게 관찰만 하도록 해도 충분히 효과가 있을 것으로 생각된다.

에탄올에 의한 DNA 침전 및 염색약의 염색 원리

DNA는 인산에 의해 '—' 이온을 띠고 있는데 물은 극성을 띠고 있어 DNA 분자와 결합할 수 있기 때문에 물에 녹는다(그림 6A). 에탄올은 핵산 주변의 수막(hydration shell)을 제거하여 음전하를 띄는 인산기를 외부로 노출시킨다. 음전하를 띠고 있는 작용기 그룹에 Na^+와 같은 양전하가 붙으면 폴리뉴클레오티드 사이의 반발력이 줄어들고 침전되기 쉬운 형태로 변하게 된다(Sambrook and Russell, 2001). 에탄올을 제거한 침전된 DNA는 증류수나 완충용액(예: TE buffer)을 넣으면 녹는다. 따라서 나무젓가락에 감겨진 DNA를 증류수가 들어 있는 곳에 넣

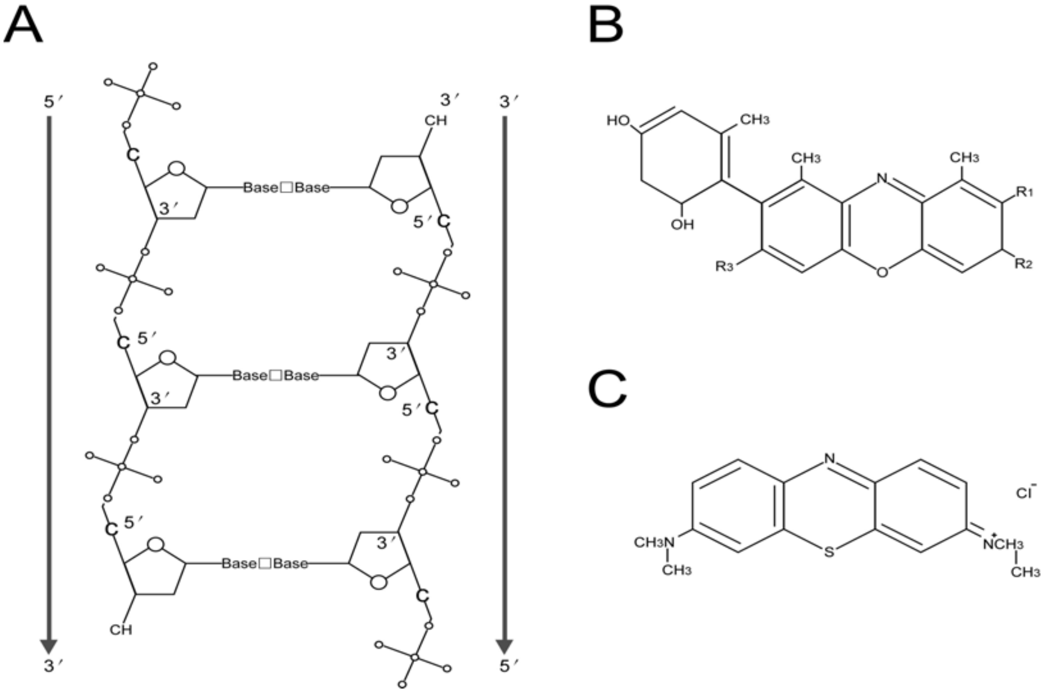

그림 6. DNA, 메틸렌블루 및 아세트올세인의 화학적 구조. (A) DNA 이중나선 구조. 편의상 나선을 풀어서 보여주고 있다. (B) 아세트올세인의 구조. (C) 메틸렌블루의 구조.

으면 증류수에 녹아 보이지 않는다.

아세트올세인이나 메틸렌블루는 염기성 염색약으로 산성 물질에 이온결합을 통해서 결합하는 것으로 알려져 있으며, 아세트올세인은 붉은색을, 메틸렌블루는 푸른색을 나타낸다(Kiernan, 1999; Ruzin, 1999). DNA 이중나선은 그림 6A에서 보이는 것처럼 인산기가 음이온을 띠고 있어 염기성 물질과 화학결합 할 수 있다. 올세인은 다양한 화학구조식을 갖는 것이 발견되는데 그림 6B는 그중의 하나를 보여준다. 올세인은 orcinol이 활성화될 때 만들어지는 산물들이며, 염색과정에 아민(amine)이나 수산화기(hydroxyl group)가 관여하는 것으로 알려져 있다. 메틸렌블루의 화학식은 $C_{16}H_{18}N_3SCl \cdot 3H_20$로, 용매에 녹으면 이온화되어 $C_{16}H_{18}N_3S^+$와 Cl^-로 분리된다(그림 6C).

중학교 2학년을 대상으로 한 실험 활동에 대한 반응

본 실험은 서울대학교 과학영재교육원 2학년 학생들을 대상으로 적용해 보았다(그림 7). 참여 학생들은 DNA가 유전물질이라는 것을 알고 있었지만, DNA를 직접 관찰한 학생은 거의 없었다. 본 실험을 적용해본 결과 중학생도 DNA 추출에서 전기영동 실험까지 가능하다는 것을 알 수 있었다. 학생들은 직접 DNA를 추출하는 것에 큰 흥미를 보여주었으며, 특히 주변에서 흔히 관찰할 수 있는 식물과 과일에서 DNA를 뽑는 것을 신기해하며 적극적으로 실험에 참여하였다.

결론 및 제언

본 연구에서는 정규 교과 과정에는 없지만 많은 교사들이 관심을 가지고 시도를 하고 있는 DNA 추출 과정을 체계적으로 정리하였고, 심화 과정을 첨부하여 현장교육에서 널리 이용될 수 있도록 하였다. 실험을 통해서 우리는 다음과 같은 결론을 얻었다. 첫째, 브로콜리, 키위, 바나나는 DNA 추출 실험에 대한 훌륭한 재료로 쓸 수 있다. 이들 재료는 우리 주변에서 구입이 쉽고, 저렴할 뿐만 아니라 풍부한 양의 DNA를 제공해 준다. 둘째, 브로콜리, 키위, 바나나 중 같은 중량에서 가장 많은 DNA를 제공해 주는 것은 키위이지만 누런 색깔의 용액 때문에 DNA 구별이 약간 어려운 점이 있는 반면에 브로콜리는 녹색 바탕에 흰 색깔의 DNA가 선명하게 나타나 구별이 쉬운 점이 있다. 하지만 추출된 DNA에는 단백질을 포함하는 다른 물질도 있어 추출된 DNA 양을 절대적으로 비교하기는 어렵다. 셋째, DNA를 추출하여 전기영동을 하였을 때 키위와 바나나는 겔 상

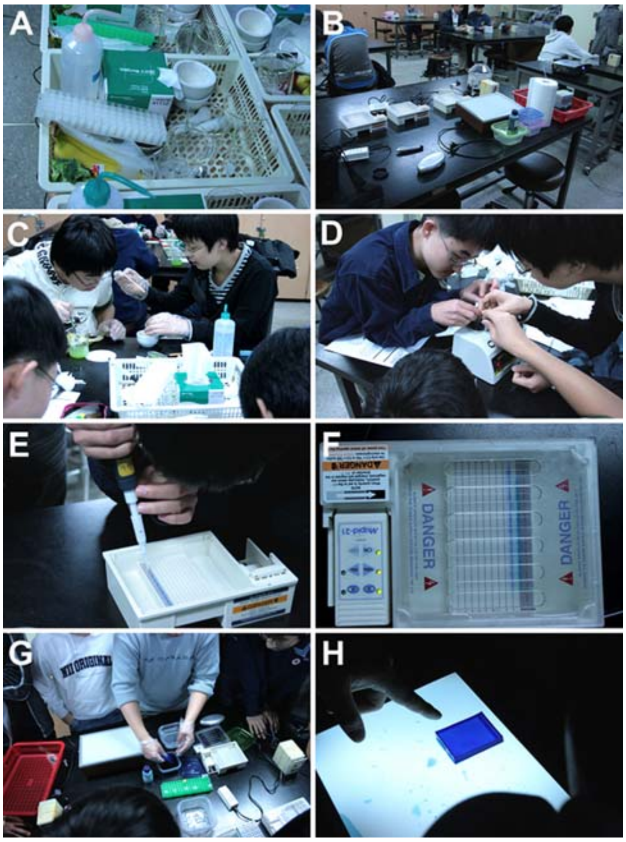

그림 7. 전기영동 실험을 수행하는 학생들의 실험 활동. (A) DNA 추출에 필요한 기구 및 재료들. (B) DNA 확인을 위한 전기영동장치 및 관련시약. (C) DNA를 추출하고 있는 학생들. (D) 추출한 DNA를 증류수에 녹임. 1.5ml 튜브에 추출한 DNA를 넣고 가볍게 섞어준다(vortexing). (E~F) DNA를 전기영동 겔의 작은 구멍(홈) 속에 넣기. (G) 메틸렌블루로 DNA 염색하기. 메틸렌블루는 DNA와 결합하기 때문에 DNA가 있는 지역은 푸른색을 나타낸다. (H) 염색된 겔 속의 DNA 확인 과정. 밝은 불빛 위에 겔을 놓으면 DNA 밴드는 강한 푸른 색깔의 띠(밴드)로 나타난다.

에서 뜨는 경향이 있는 반면에 브로콜리는 겔 상에서 정상적으로 이동하면서 밴드를 보여주어 전기영동 단계까지 고려한다면 브로콜리가 실험 재료로 가장 적합하다고 생각된다.

분자생물학에 대한 실험은 일반적으로 복잡한 기구와 비용이 많이 들어가는 것으로 생각되어 중등교육현장에서는 생각지도 못하는 실험이 되었다. 하지만 연수과정이나 과학행사 등에서 DNA 추출 실험이 수행되는 것을 보면 학교현장의 정규수업에서도 충분히 DNA 추출 실험이 가능할 수 있다는 것을 보여준다. 따라서 새로운 교과 과정의 분자생물학 부분에서는 DNA 추출 실험을 실험 탐구 수업으로 넣어도 실험이 가능할 것으로 생각된다. 그리고 본 연구에서는 DNA 추출 후 전기영동을 통해 확인하는 작업까지 보여주었지만 현장에서 1시간을 이용하여 수업을 하고자 할 때는 단지 DNA를 추출하는 실험만 수행하는 것이 적절하다고 생각된다. 생물반이나 영재 수업에서 이용하고자 한다면 DNA 추출 실험 → 전기영동을 통한 DNA 확인 실험 → DNA 이중나선 구조 모형 만들어보기와 같은 실험을 순서적으로 수행한다면 더 심도 있고, 의미 있는 실험이 될 수 있을 것이다.

ABSTRACT

DNA was first discovered by Miescher in 1897, but it was later recognized as genetic material from transformation experiment by F. Griffith in 1928, from biochemical analysis on transformation material by O. Avery in 1944, and finally from study of virus genetics using isotope by A.D. Hershey and M. Chase. J. Watson and F. Crick discovered DNA double helix structure, which opened the era of molecular biology and the DNA recombinant technology. DNA technology has been widely used in producing genetically transformed plant and animals, prevention and treatment of human disease, forensic medicine, paternity test, etc. In this study, we studied the way to extract the genetic materials from broccoli, kiwi and banana. Instead of complex and dangerous traditional way, DNA was extracted just with detergent and ethanol, and then wound up with wood chopsticks. Kiwi gave the most plenty of amount of DNA, but DNA was not able to be easily recognized due to background color. On the while, although brocoli gave the least amount of DNA, but the genetic materals were easily recognized from the green background. Phenol treatment showed that the extracted DNA actually contained protein as well. The extracted DNA was stained with ethidium bromide(EtBr) as well as methylene blue and aceto-orcein dyes. The later two dyes are not harmful. Taken together, we suggest that DNA extraction experiment can be carried out in the secondary school and included in the next version of science textbook.

Key words : DNA extraction, genetic materials, electrophoresis

참고문헌

2007년도 중 · 고등학교 과학교사 실험연수 (2007) 서울특별시 과학전시관.

Hartwell LH, Hood L, Goldberg ML, Reynolds AE, Silver LM and Veres RC (2000) GENETICS from Genes to Genomes. The McGraw Hill. p13.

Benjamin A. PIERCE (2006) GENETICS 2nd edition. FREEMAN.

Kiernan JA (1999) Histological and histochemical methods. Arnold.

Mendel G (1865) "EXPERIMENTS IN PLANT HYBRIDIZATION". Read at the February 8th, and March 8th, 1865, meetings of the Brünn Natural History Society.

Sambrook J and Russell DW (2001) Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 5.14 ~ 5.17 & A8.12.

Ruzin SE (1999) Plant microtechnique and microscopy. Oxford University Press.