

Gel documentation system 의 이해

2013. 12. 31

Il Shin Kim

UNIST Central Research Facilities (UCRF)



Gel documentation system 장비는 DNA(혹은 RNA) gel로부터 나오는 빛을 렌즈에서 모아 카메라에 그 정보를 받아들이고, 이 결과를 컴퓨터로 보여주게 됩니다. 이때 아래의 transilluminator로부터 나오는 빛에 의하여 DNA가 발광하게 됩니다. 그러므로 광원인 Transilluminator와 정보를 받아들이는 카메라가 가장 중요한 부분이라고 할 수 있습니다.

가. Transilluminator

- Transilluminator는 UV빛을 조사하여주는 장치입니다. 여기서 나오는 빛에 의하여 DNA혹은 RNA의 밴드가 발광하게 되고 이를 카메라에 담아 결과를 얻을 수 있습니다. 이때 Transilluminator에서 나오는 빛이 고르지 않을 경우 정량분석 시 정확하지 않은 결과를 얻을 수 있습니다. 이를 보완하기 위하여 나온 것이 Vilber Lourmat사의 Super-Bright기술입니다.

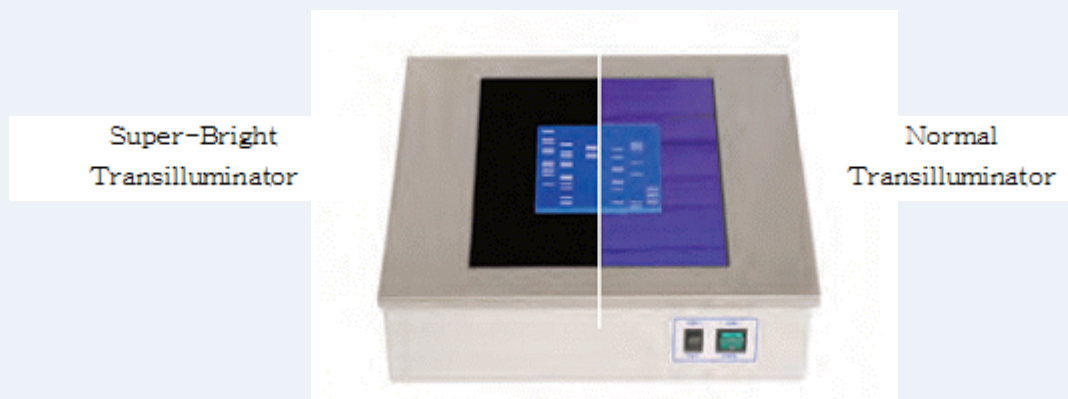


Fig.1 Super-Bright기술이 접목 된 Transilluminator와 그렇지 않은 장비에서 보이는 결과차이.

일반 transilluminator의 경우 아래 UV lamp가 비춰져 밴드간의 차이를 보일 수 있으며, 푸른색으로 빛이 나와 이미지의 contrast나 낮아집니다. 하지만 Super-Bright를 적용한 경우 UV lamp로 인한 결과차이를 볼 수 없을 뿐만 아니라 필터가 검은 색을 유지하여 더 명확하고 선명한 결과를 얻을 수 있습니다. (Fig.1) 타사에서 지원되지 않는 Super bright 필터로 업그레이드가 가능합니다.

나. 카메라

- 카메라는 렌즈로부터 들어오는 빛의 신호를 전기적 신호로 변경하여 모니터로 출력할 수 있도록 해주는 부분입니다. 카메라에서는 크게 2가지 부분으로 나누어 설명드릴 수 있습니다. 하나는 빛을 받아들이는 CCD입니다. 이 CCD는 빛신호를 직접적으로 받는 곳으로 예전 필름과 같은 역할을 한다고 보시면 됩니다. CCD는 pixel의 집합체이며, 이 pixel수에 따라서 CCD의 해상도가 달라집니다. 해상도가 높으면 좀 더 좋은 이미지를 얻을 수 있습니다. 일반적으로 5.0 mega pixels이상의 해상도가 적당하며, 그 이상의 크기는 무의미할 수 있습니다. 각 pixel은 Dynamic range라고 하는 빛 신호에 대한 포화도를 가지고 있습니다. 흔히 4.x order of magnitude라고 표기되거나 4.x OD로 표기합니다. 흔히 “saturation이 되었다”라고 하는 부분이 signal이 dynamic range값을 넘어섰음을 표현하는 말입니다. saturation이 되면 정확한 비교가 되지 않으므로 어떠한 data도 saturation된 결과를 얻는 것은 옳지 못합니다. Bio-print ST-4의 경우 4.00D입니다.

또한 카메라에서 중요한 부분은 해상도입니다. 리뷰어에게 겔 이미지를 전송할 경우 큰이미지를 요구할 때가 있습니다. 이런 경우 해상도가 크고 이미지가 깨지지 않아야 합니다. Bio-print ST-4의 경우 최대 5.5 mega pixels의 해상도로 결과를 저장할 수 있어 리뷰어가 원하는 조건의 결과를 만들 수 있습니다. 큰 이미지는 줄여 사용할 수 있지만, 작은 이미지를 늘렸을 경우 pixelization이라고 하는 이미지 깨짐 현상을 볼 수 있습니다.(Fig.2)

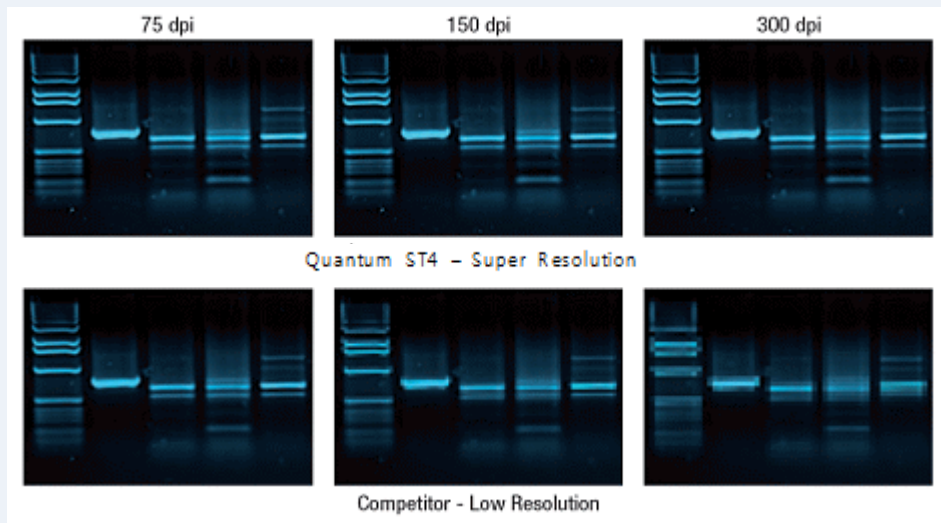
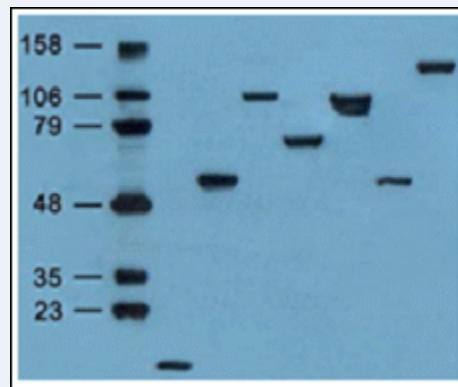
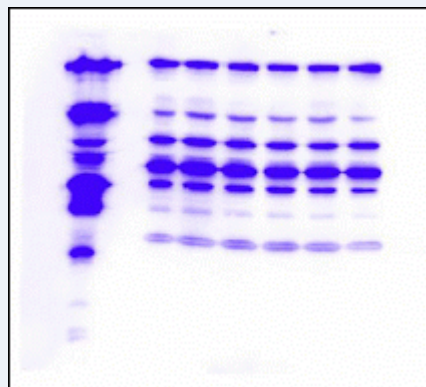


Fig.2 타사와의 해상도 차이.

다. White light convertor

White light convertor는 UV light를 형광물질이 처리된 유리판을 통과시켜 하얀 빛이 나오게 해주는 장치입니다. 이 장치를 통하여 coomassie blue로 염색된 protein gel과 western blot 실험을 통해 얻은 x-ray film을 이미지화하여 결과를 얻을 수 있으며, 이를 정량 분석이 가능합니다.



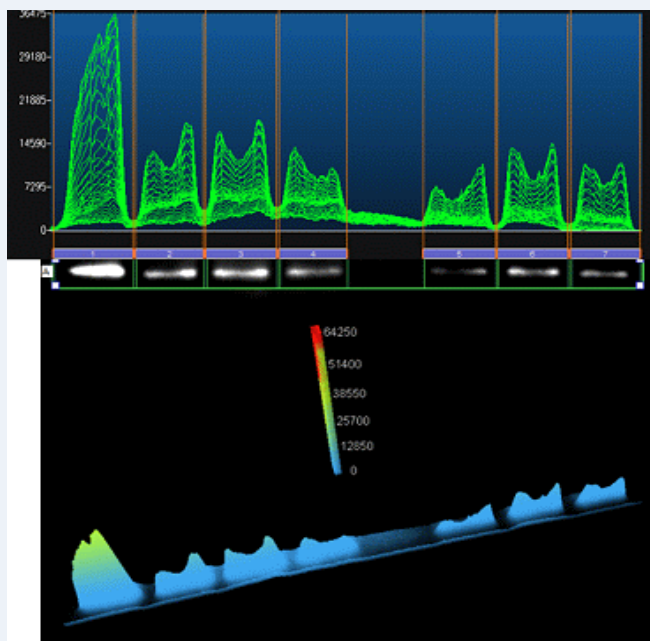
기기사용법 및 정량 분석

- 기기 컨트롤은 Quantum capt.라는 소프트웨어를 통해 조절을 합니다. 물론 인터페이스에 대한 유저 친화도는 사용을 해봐야 좋은지 알 수 있어 호불호가 많이 갈리게 됩니다. Quantum capt 소프트웨어의 경우 사용법이 간단하며, 부가적인 분석 및 수정 기능을 포함하고 있어 유저들 사이에서 호응이 좋습니다.

이미지 파일 형식은 16bit 원본 TIFF 파일을 지원하고 있습니다. 이 이미지가 24 bit로 변형이 될 경우 원본 파일에 있는 정량 정보인 grey level이 1/256배 압축이 일어나게 되며 정량결과가 정확해 질수 없기 때문입니다.

또한 소프트웨어에서 Molecular weight, colony counting, Quantification등의 분석은 물론 rotation, text, crop, pseudo-color, brightness, contrast등의 이미지 작업을 동시에 할 수 있습니다. 이 모든 작업은 microsoft office 프로그램과 연동이 되어 결과정리에도 큰 도움이 되며 본 소프트웨어는 무상으로 제공됩니다.

아래는 분석하여 얻는 데이터입니다.(Fig.4)




Number	fold	Volume
No 1	1	23,358,552
No 2	0.643	15,012,521
No 3	0.833	19,460,321
No 4	0.651	15,212,980
No 5	0.356	8,326,409
No 6	0.468	10,942,733
No 7	0.309	7,220,165

Fig. 4. Vision capt로 얻은 결과를 분석한 데이터. 각 시그널이 가지고 있는 인텐시티 그래프와 값을 얻을 수 있으며, 3D 이미지로 시그널의 양상을 확인할 수 있습니다.



Fusion Quick Guide(for Chemiluminescence)
Fusion Manual-Focus 사용자 매뉴얼

1. 켜기/끄기

- A. 기기의 전원을 켭니다.
- B. 컴퓨터의 전원을 켭니다.
- C.  Fusion Quantum 아이콘을 더블클릭하여 프로그램을 실행합니다.

2. Quantum 소프트웨어의 구성



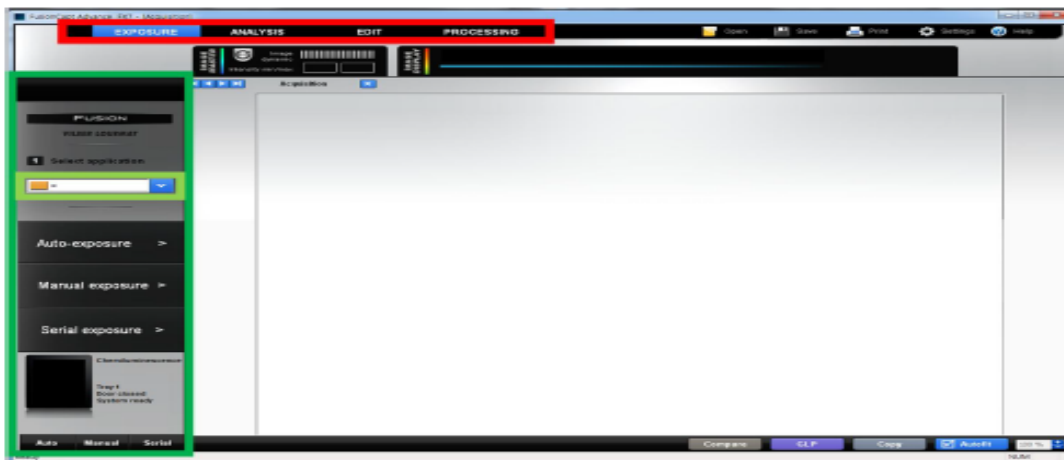
3. 사용자 설정 불러오기(Application)

실험에 맞는 설정을 불러오는 과정입니다. 자신의 샘플의 특성에 맞는 application을 불러오면 보다 좋은 이미지를 얻을 수 있습니다.

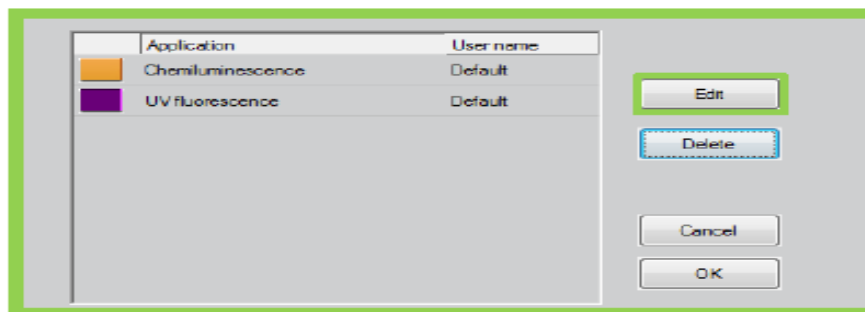
- a. EXPOSURE를 선택 후 Select application을 선택합니다.



Fusion Quick Guide(for Chemiluminescence) Fusion Manual-Focus 사용자 매뉴얼



b. Edit를 선택하여 줍니다.

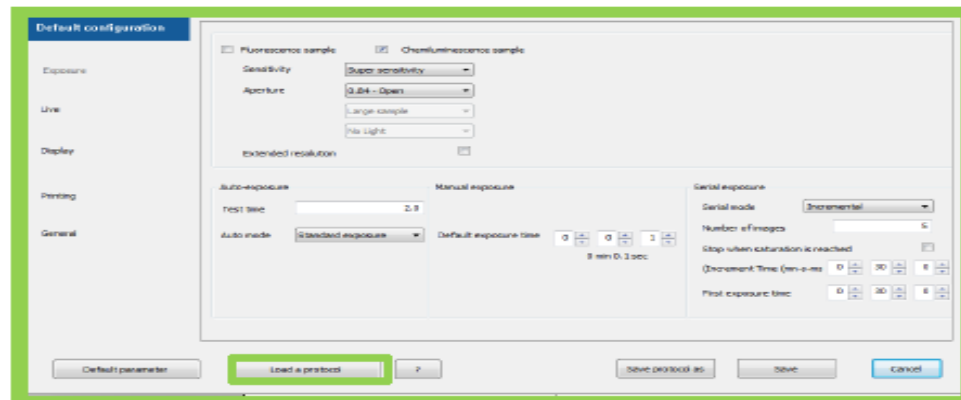


- Chemiluminescence: Western blot의 Chemiluminescence 실험을 위한 모드입니다.
- UV fluorescence: UV fluorescence 를 이용한 DNA gel image를 얻기 위한 모드입니다.

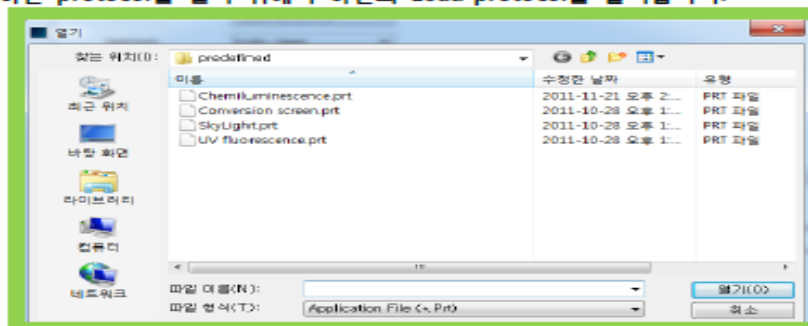
c. Configuration 메뉴는 다음과 같습니다. 원하는 세부 사항을 설정하실 수 있습니다.



Fusion Quick Guide(for Chemiluminescence) Fusion Manual-Focus 사용자 매뉴얼



d. 원하는 protocol을 열기 위해서 하단의 Load protocol을 클릭합니다.



e. 원하는 Protocol을 선택합니다.

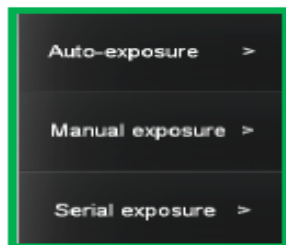
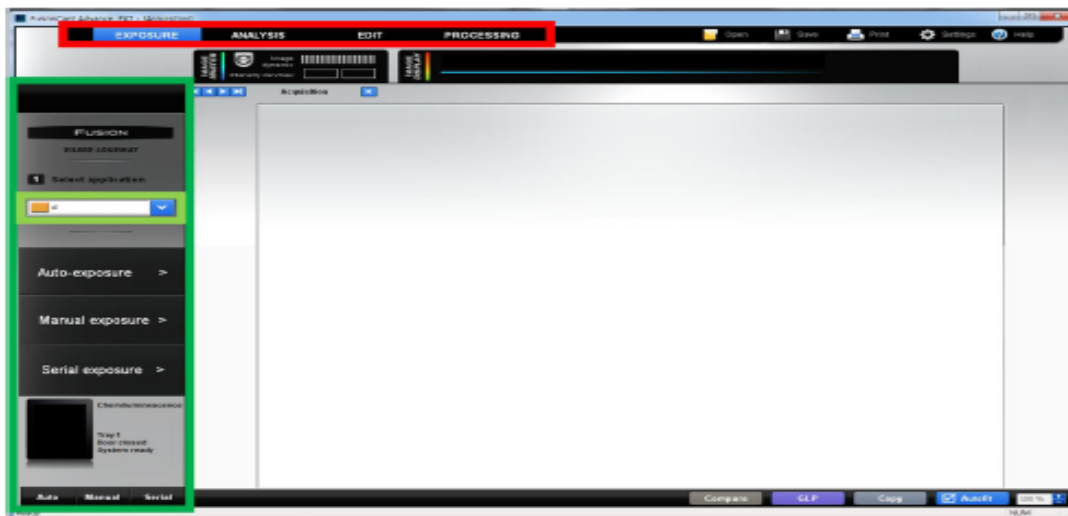
- Chemiluminescence를 이용한 경우 Chemiluminescence파일 선택
- Fluorescence를 이용한 경우 UV fluorescence 파일 선택

f. 원하는 모드로 이미지를 얻습니다.



Fusion Quick Guide(for Chemiluminescence)
Fusion Manual-Focus 사용자 매뉴얼

4. 이미지 획득



a. 최고의 이미지 한 장을 얻을 때
▶ 4-2. Auto-exposure mode

b. 발광시간을 알고있을 경우 시간을 정하여 이미지를 얻을때
▶ 4-3Manual-exposure

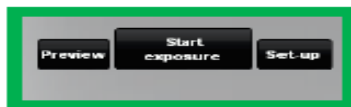
c. 샘플이 어느 시간대에 발광이 가장 좋은지 확인하고자 할 때
▶ 4-4 Serial mode

VILBER LOURMAT

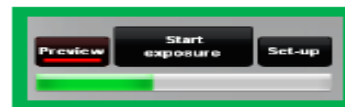
Fusion Quick Guide(for Chemiluminescence)
Fusion Manual-Focus 사용자 매뉴얼

4-1. Preview

- Preview는 membrane촬영 전 샘플의 상태 및 초점(focus)이 잘 맞는지 확인하는 단계입니다.
- a. Sample을 넣고 **WL** 버튼을 눌러 white light를 켜준 후, Preview를 눌러 카메라를 활성화 합니다. 이때 샘플이 가운데 잘 위치하는지 확인하고, 필요하다면 줌을하여 쉐의 보이는 크기를 조절합니다. 끝에는 다시 눌러 비활성화 합니다

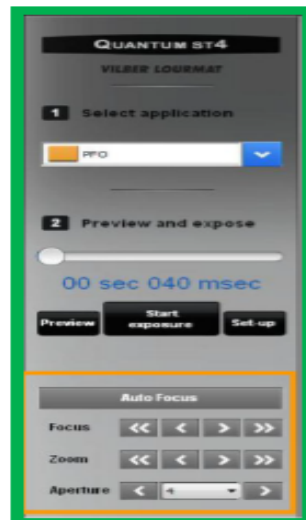


활성화 전



활성화 후

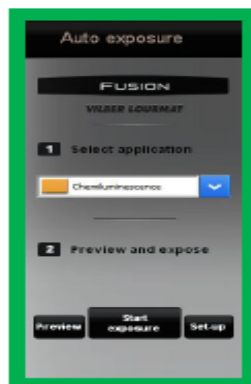
- b. Quantum autofocus의 경우, 샘플대신 focus용지(혹은 명함)를 넣은 후 auto-focus버튼을 누르게되면 자동으로 초점을 잡게 됩니다.
- c. 촬영 후 **WL** 버튼을 다시 눌러 white light를 꺼줍니다.



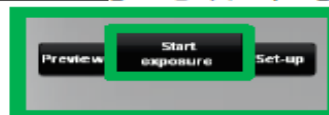


Fusion Quick Guide(for Chemiluminescence)
Fusion Manual-Focus 사용자 매뉴얼

4-2. Auto-exposure mode



- a. **UV** 버튼을 눌러줍니다.
- b. Start exposure를 누르면 최적의 이미지를 촬영하여줍니다.



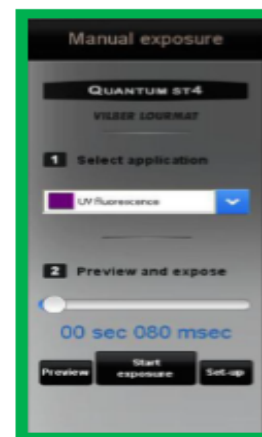
- c. continue를 누르고 이미지를 획득 후 저장(save)합니다.



- d. 다시 **UV** 버튼을 눌러 UV등을 꺼줍니다.




4-3. Manual-exposure mode

- a. **UV** 버튼을 눌러줍니다.
- b. Start exposure를 눌러 노출정도를 확인 합니다.
- c. 바를 이동하여 촬영 할 시간을 설정해줍니다.
- d. 다시 Start exposure를 눌러 촬영합니다.
- e. 이미지를 획득 후 저장(save)합니다.
- f. 다시 **UV** 버튼을 눌러 UV등을 꺼줍니다.



Gel documentation system 의 작동 방법

모 델 명	12 200008	제 조 사	Vilber Lourmat
담 당 자	연구지원본부, 생체효능검중실 김일신 5211	업 체 명	악이제이사이언스 김영진 사장 054-272-2126

작동 방법	<p>1. 켜기/끄기</p> <p>A. 기기의 전원을 켭니다. B. 컴퓨터의 전원을 켭니다. C.  Quantum 아이콘을 더블클릭하여 프로그램을 실행합니다.</p> <p>2. 이미지 획득</p> <p>2-1 Preview (미리보기)</p> <p>a. Auto-exposure 버튼을 눌러줍니다. b. Safety screen을 세우고 UV transilluminator위에 sample을 올려두고, 기기상의 WL 버튼을 눌러 white light를 켜줍니다. c. Preview를 눌러 카메라를 활성화 합니다. 이때 샘플이 가운데 잘 위치하는지 확인하고, 필요하다면 zoom 사용하여 젤의 보이는 크기를 조절합니다. 조절 후에는 버튼을 다시 눌러 비활성화 합니다. d. 기기상의 WL 버튼을 다시 눌러 white light를 켜줍니다.</p> <p>2-2 Exposure (이미지 촬영)</p> <p>a. 기기상의 UV 버튼을 눌러 줍니다. b. Start exposure를 누르면 최적의 이미지를 촬영하여 줍니다. c. Contingue 를 누르고 이미지를 획득한 후 저장(save)합니다. d. 다시 UV 버튼을 눌러 UV등을 꺼줍니다.</p> <p>3. 젤 자르기(Gel cutting)</p> <p>A. Safty screen을 세우고 UV transilluminator를 당겨 앞으로 빼신 후 위에 샘플을 올려둡니다. B. 기기상의  버튼을 눌러줍니다.(경고버튼이며, 문이 열린 상태에서 UV가 켜지도록 해줍니다.) C. 기기상의 UV 버튼을 눌러 줍니다.(UV가 켜집니다. 육안으로는 켜짐 여부가 구별되지 않으니 조심하시기 바랍니다. 확인할 때는 현종이 혹은 샘플을 올려두시면 확인할 수 있습니다.) D. UV의 경우 30초가 지나면 DNA에 영향을 줄 수 있으므로 최대한 빨리 젤을 자르는 것이 좋습니다. E. 기기상의  버튼을 눌러 UV를 꺼줍니다.</p>
주의사항	<p>1. UV가 켜져 있을때 항상 조심하도록 한다. 2. EtBr을 사용할 때에는 기기에 EtBr이 묻지 않도록 항상 장갑을끼고 깨끗이 사용한다. 3. 기기 작동 후에는 기기가 완전히 꺼졌는지 꼭 확인한다. 4. 사용 후 정리정돈을 철저히 한다. 5. 로그북을 잘 작성한다.</p>

Log book 작성

- 정확한 장비이용 방법을 습득한 후 장비이용
- 장비 옆에 비치되어 있음

순번	사용일자	시간	사용자	소속 / 연락처	비고
1	11월 26일	P.M 1:00 - 1:30	김영신	IVRC / 5211	
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					
26					
27					
28					
29					
30					

- 장비이용을 할때 반드시 log book 을 작성할것
- 사용일자, 사용시간, 사용자, 소속 및 연락처, 비고