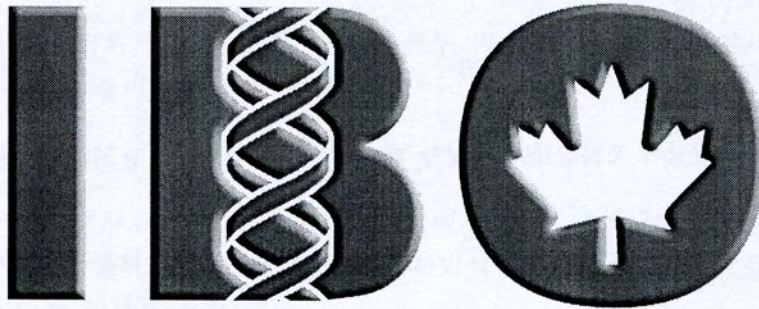


18th INTERNATIONAL BIOLOGY OLYMPIAD

JULY 15 - 22, 2007

International Biology Olympiad



Saskatoon Canada 2007

실험 평가 3

세포 생물학/생화학

- | | |
|-------------------------------------|-----|
| 과제 A: 콜리플라워의 티오시아나산(thiocyanate) 분석 | 29점 |
| 과제 B: 얼마나 많은 콜리플라워를 섭취해야 독성을 일으킬까? | 5점 |
| 과제 C: 유전자 발현 조절 | 10점 |

실험 시간 : 90분

모든 답은 이 시험지에 작성할 것

4자리로 된 자신의 학생번호를 아래 빈칸과 각 페이지 상단에 적으시오.

학생 번호	
-------	--

서론

양배추과 식물들은 glucosinolate류의 화학물을 함유한다. glucoraphanin과 같은 glucosinolate 종류는 의학적 효능이 있어서 항암제로 사용하기도 하는 반면, glucosinalbin 과 같은 glucosinolate 종류는 독성이 있다.

독성을 지닌 glucosinolate로부터 나오는 산물 중 하나가 thiocyanate(SCN^-)이다. SCN^- 는 요오드 대사를 방해하여 갑상선 호르몬 결핍을 가져온다. 콜리플라워 같은 양배추과 식물을 섭취하면 glucosinalbin 과 같은 glucosinolate류로부터 미량의 thiocyanate가 발생한다.

glucoraphanin은 대사되어 sulforaphane이 된다. Sulforaphane은 phase 2 단백질을 유도한다. Phase2 단백질이 만들어지면 세포 속의 유리기(free radical) 및 기타 산화제들을 제거할 수 있다. 산화제 양이 줄어들면 염증반응이 일어날 확률이 떨어진다. 이 현상은 NFkappaB와 같은 단백질 복합체가 활성화되어 일어난다.

과제 A. 분광광도계를 이용하여 콜리플라워에서 나오는 thiocyanate 양을 측정하기. (29점)

목표 : 콜리플라워에서 나오는 thiocyanate 양을 측정하기 위해 분광광도계를 이용한다. 이 분석의 원리는 다음과 같다. 산이 존재할 때 thiocyanate는 Fe^{3+} 와 반응하여 안정된 화합물인 Fe^{2+} -SCN(붉은색)복합체가 만들어지며 447nm 파장의 빛을 최대로 흡수한다.

재료

- ▶ 에펜도르프 피펫 : $20\mu\text{l}$ 에서 $200\mu\text{l}$ 까지 채취할 수 있으며 $100\mu\text{l}$ 로 세팅되어 있다.
- ▶ 에펜도르프 피펫팁 1 box
- ▶ 분광광도계 큐벳(튜브)에 $900\mu\text{l}$ 의 질산 철(ferric nitrate) 용액이 들어 있으며 이 용액은 강산이다.

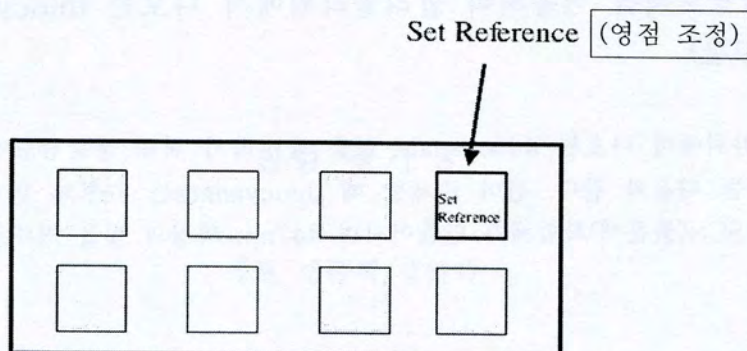
주의 : 질산철 용액은 1M의 질산에 용해되어 있으므로 반드시 장갑을 끼고 보호안경을 실험 전에 착용할 것.

- ▶ Thiocyanate 표준 용액이 다음 농도로 준비되어 있다 : 0 micromoles/mL(영점 조정 위한 용액), 0.5 micromoles/mL, 2.0 micromoles/mL, 4.0 micromoles/mL.
- ▶ 콜리플라워를 갈아 여과시킨 액이 들어 있는 시험관. 콜리플라워 1g을 간 후 물을 섞어 총 4.0mL로 맞추었음. 이 추출액(용액)이 시험할 미지의 용액으로서, 이 추출액(용액) 1mL에 thiocyanate가 몇 micromole 들어 있는지 알아내야 한다.
- ▶ 마커펜을 이용하여 큐벳의 뿌연 측면에 라벨을 표시하라.
- ▶ 비닐장갑과 보호안경
- ▶ 학생의 실험대 위에 447nm 흡광으로 세팅되어 있는 분광광도계(이하 분광계)가 있다.

주의 : 실험 시작 전에 위에 열거된 모든 재료와 준비물이 있는지 확인하라. 만약 부족한 것이 있으면 손을 들어 조교에게 알릴 것.

실험과정

1. 장갑을 끼고 보호안경을 착용하라.
2. 질산화철이 들어 있는 큐벳에 thiocyanate 표준 용액 각각을 $100\mu\text{L}$ 씩 넣어라. 표준 용액은 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 micromoles thiocyanate/mL 농도로 되어 있다. 0 micromole/mL 용액은 영점 조정(blank)로 사용되므로 색깔반응이 없을 것이며 나머지는 색깔반응이 나타나야 한다. 큐벳의 흐린 면에 반드시 라벨을 표지한다.
3. 나머지 남아 있는 3개의 큐벳에 콜리플라워 추출액 $100\mu\text{L}$ 를 넣어라.
4. 큐벳을 조심스럽게 분광계로 가져간다(분광계는 447nm 흡광도를 측정하도록 이미 세팅되어 있다). 분광계 뚜껑을 열고 0 micromole/mL 용액(영점조정용)을 제대로 잘 넣는다. 분광계 뚜껑을 열면 화살표가 보이는데 화살표는 빛이 지나가는 방향을 나타내므로 큐벳의 투명한 면이 화살표가 관통하도록 큐벳을 집어넣어라. 분광계 뚜껑을 닫고 "set reference(영점조정)"라고 적혀 있는 버튼을 누른다. 이 버튼은 분광계 패널의 상단 우측에 있다-아래 그림을 보라. 다른 버튼들은 절대 손대지 마시오.



5. 표준 용액이 들어간 큐벳들을 하나씩 넣으면서 흡광도 값을 읽는다. 그리고 나서, 콜리플라워 추출액이 들어 있는 큐벳을 넣고 값을 읽는다. 실험이 끝나면 큐벳이 분광계에 들어 있는 채로 그냥 놔둔다. 조교가 다 정리해줄 것이다.

각 표준 용액의 흡광도 값 (10점) :

0.5 micromole/mL thiocyanate(2점) : _____

1.0 micromole/mL thiocyanate(2점) : _____

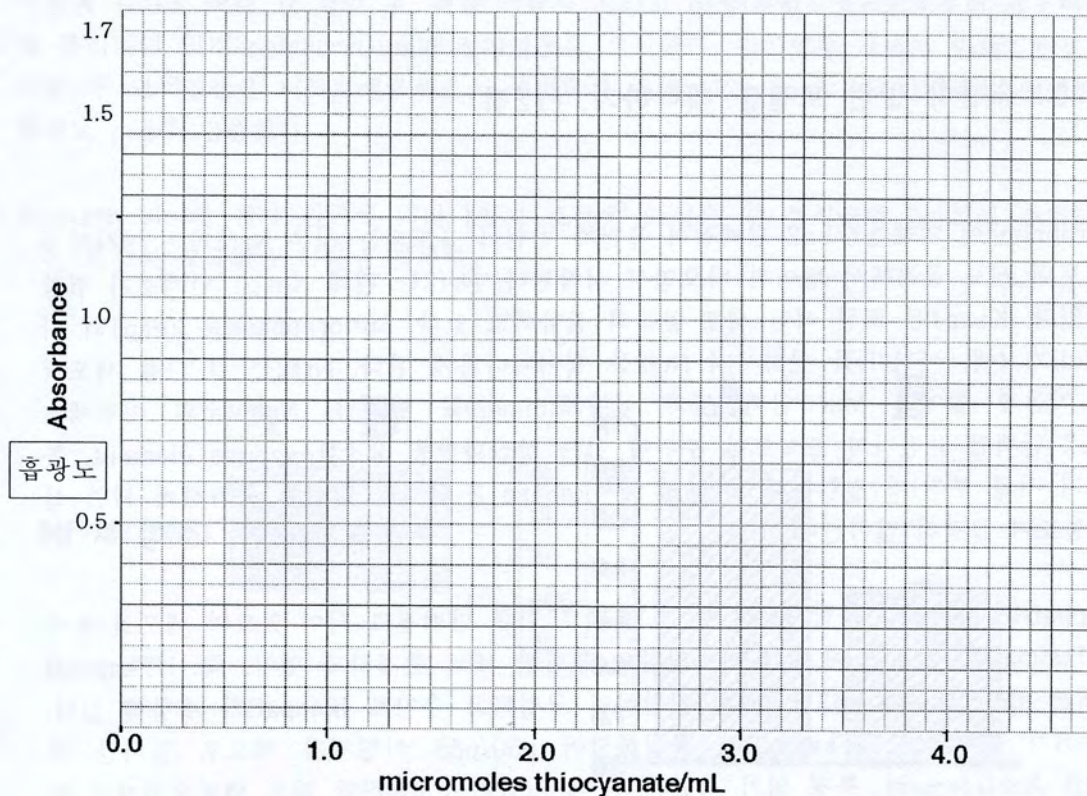
1.5 micromole/mL thiocyanate(2점) : _____

2.0 micromole/mL thiocyanate(2점) : _____

+ (2점)

콜리플라워 추출액의 흡광도 값 (3점, 각 1점씩) 시료 1.____ 시료 2.____ 시료 3.____

6. 5페이지에 있는 그래프 용지에 표준 용액의 흡광도 값들과 농도를 사용하여 그래프를 그린다. (6점)
7. 콜리플라워 용액의 흡광도 평균값을 통해, 앞서 만든 그래프에서 추출 용액에 들어 있는 thiocyanate의 농도를 알아내라. (5점) 답. _____
8. 당신이 받은 콜리플라워 자체 내의 thiocyanate 농도는 얼마인가? 단위를 반드시 적어야 한다. (3점) 답. _____
9. 추출용액의 흡광도 값에 대한 표준 편차를 구하라. (2점) 답. _____



과제 B. thiocyanate가 독성을 나타내려면 콜리플라워를 얼마나 많이 섭취해야하는지 알아보기. (5점)

서론

LD₅₀란 독성학 용어로서 동물개체들 중 50%를 죽일 수 있는 화합물의 양(동물 kg당 독소의 millimoles)을 말한다. 쥐의 경우, sodium thiocyanate의 LD₅₀는 쥐 몸무게 kg 당 9 millimoles 이다. 당신이 막 실험을 끝낸 데이터를 이용하여 다음을 계산하라.

500g 체중의 쥐가 thiocyanate의 LD₅₀에 도달하기 위해 콜리플라워를 얼마나 섭취해야 하는가?

실험 과정

당신이 계산해낸 결과가 가장 잘 맞게 포함된 범위를 나타낸 문항의 기호에 동그라미 치시오. 계산 과정을 이 페이지에 적고 더 필요한 뒷면에 써라.

- (a) 1gm to 5gm
- (b) 50gm to 250gm
- (c) 500gm to 1kg
- (d) 1.5kg to 14kg
- (e) 15kg to 25kg

과제 C. 유전자 발현 조절을 해석하기. (12점)

서론

Sulforaphane에 의해 phase2 단백질의 유전자 발현이 유도되는 것은 Nrf2라는 전사인자가 세포내 세포 골격에서 떨어져 나오면서 시작된다. Nrf2는 원래 Keap1 단백질과 결합되어 있다. Keap1은 또한 액틴 세포 골격과 결합하고 있다. Sulforaphane은 keap1의 티올(thiol)기 (예, -SH기)를 산화시켜 Nrf2를 떨어져나가게 한다. Nrf2는 그 다음 세포핵으로 이동해 들어가 Maf 단백질들과 이량체(dimer)를 만든다. Nrf/Maf의 이량체는 phase2 단백질 유전자의 프로모터 부위에 있는 항산화반응 요소(response element, 특정 염기 서열 부위)에 결합한다. 이렇게 해서 phase 2 단백질 발현이 증가하게 되면 산화제 농도가 급격히 떨어진다.

NFkappaB는 전사인자 복합체로서 두 가지 서로 다른 단백질로 되어 있으며 세포질 속에서는 IkappaB로 알려진 제 3의 단백질과도 결합한 채로 존재하고 있다. 즉, NFkappaB 복합체는 p50단백질과 p65단백질이 결합하여 구성되고 추가로 IkappaB가 결합해 있다. IkappaB가 파괴되면 NFkappaB가 활성화되어 p50/p65 이량체가 핵으로 들어간 후 kappaB 요소(element, 특정 염기 서열 부위)에 결합하여 iNOS와 같은 염증유전자의 발현을 증가시킨다. NFkappaB가 활성화된 정도는 IkappaB 단백질 당 p65 단백질의 비율로 알아낼 수 있다.

iNOS 활성이 증가하면 산화질소 유리기(NO)가 증가한다. 산화질소(NO)는 과산화물음이온(O_2^-)과 반응하여 peroxynitrous acid를 만든다. Peroxynitrous acid는 매우 강력한 산화제이다.

산화제 양이 증가하면 NFkappaB 활성이 증가하고, 산화제 양이 줄어들면 NFkappaB 활성이 감소한다. NFkappaB 활성이 감소하면 염증 유전자 발현이 감소한다.

과제 절차

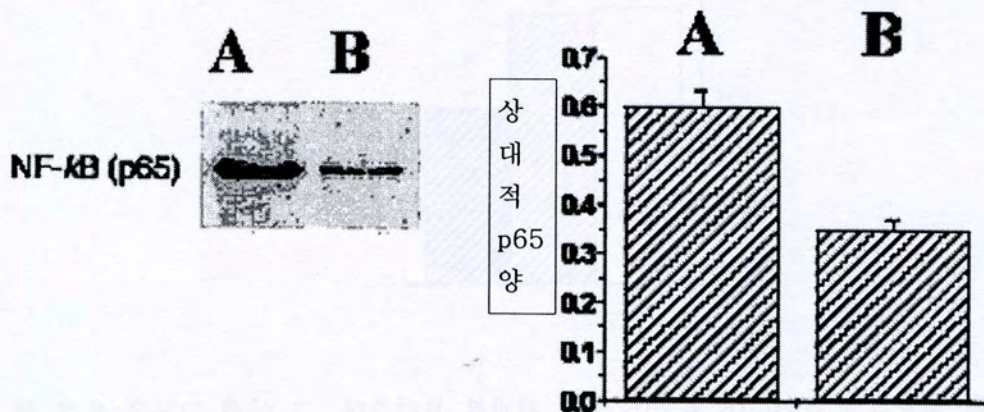
1. 다음 section들에 나오는 그림들을 잘 조사하라.
2. 제시된 데이터를 이용하여, 어떤 데이터 세트가 glucoraphanin이 많이 함유된 음식을 먹고 자란 쥐에서 나온 것인지 찾아내고 그 근거를 밝힌다.

SECTION A. (5점)

다음은 NFkappaB 활성도에 대한 그림이며, 고혈압과 뇌졸중에 잘 걸리는 특별한 종류의 수컷 쥐(SHRsp)들에게 두 종류의 음식을 먹인 결과이다. 한 실험군은 glucoraphanin이 들어있는 음식을 먹였으며, 다른 쥐들은 보통 음식을 먹인 대조군이다. 실험군에서는, 쥐 체중당 10 micromoles의 glucoraphanin을 먹였다.

이상의 음식을 여러 달 먹인 후, 쥐를 안락사 시키고 신장(콩팥) 조직으로부터 세포핵 만을 분리하여 SDS polyacrylamide 전기영동을 실시했다. 전기영동 겔에서 단백질을 분리한 후 단백질을 니트로셀룰로오스 종이막에 옮겨 NFkappaB p65단백질을 인식하는 항체로 p65를 검출했다.

Western blot의 예가 왼쪽에 나타나있고 오른쪽 그림은 각 음식군당 5마리씩 실험하여 얻은 결과의 평균값을 나타낸 것이다.



다음에 답하시오:

1. 어느 동물군이 glucoraphanin이 든 음식을 먹었는가? 동물군은 A 또는 B로 표시되어 있다. (1점)

답 : _____

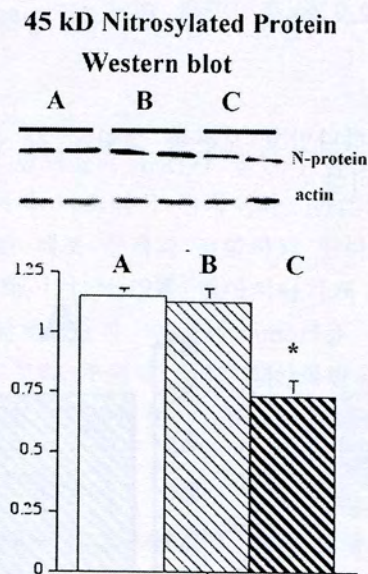
2. 위에 대한 답으로서 가장 적절한 설명은? 옳은 지문의 기호에 동그라미 치시오. (4점)

(a) 산화스트레스가 적어 NFkappaB 활성이 낮아지고 따라서 핵에 p65 양이 적다.

- (b) 산화스트레스가 적어 NFkappaB 활성이 낮아지고 따라서 핵에 p65 양이 많다.
 (c) 산화스트레스가 많아 NFkappaB 활성이 낮아지고 따라서 핵에 p65 양이 적다.
 (d) 산화스트레스가 많아 NFkappaB 활성이 낮아지고 따라서 핵에 p65 양이 많다.
 (e) 산화스트레스가 많아 NFkappaB 활성이 높아지고 따라서 핵에 p65 양이 적다.

SECTION B. (5점)

다음 그림은 수컷 SHRsp 쥐의 신장조직에 있는 단백질로서 크기는 45KD이고 니트로화된 단백질(nitrosylated protein)(N-protein)에 대한 자료이다. 이 쥐들을 세 개의 군으로 나눈 후 한 군은 glucoraphanin이 든 음식을 주고 나머지 두 군은 서로 다른 종류의 보통 음식들을 준 대조군들이다.



맨 위 그림은 대표적인 Western 블롯(bolt)의 결과를 보여주며, 그 아래 그림은 음식 군당 5마리씩 실험한 평균값을 나타낸다.

다음에 답하시오 :

1. glucoraphanin을 먹인군(그룹)은 A, B, C 중 어느 것인가? (1점)

답 : _____

2. Glucoraphanin 처리에 의해 생기는 위의 이유를 가장 잘 설명하는 지문의 기호에 동그라미 치시오. (4점)

- (a) 산화스트레스가 많아 NFkappaB 활성이 증가하고 결과적으로 iNOS 발현이 증가하고 peroxynitrous acid가 많이 생성되어 단백질의 니트로화가 증가한다.
- (b) 산화스트레스가 많아 NFkappaB 활성이 증가하고 결과적으로 iNOS 발현이 증가하고 peroxynitrous acid가 많이 생성되지만 단백질의 니트로화가 감소한다.
- (c) 산화스트레스가 적어 NFkappaB 활성이 증가하고 결과적으로 iNOS 발현이 증가하지만 peroxynitrous acid가 적게 생성되어 단백질의 니트로화가 감소한다.
- (d) 산화스트레스가 증가하여 NFkappaB 활성이 감소하지만 iNOS 발현이 감소하고 peroxynitrous acid가 적게 생성되어 단백질의 니트로화가 감소한다.
- (e) 산화스트레스가 감소하여 NFkappaB 활성이 감소하고 결과적으로 iNOS 발현이 감소하고 peroxynitrous acid가 적게 생성되어 단백질의 니트로화가 감소한다.

SECTION. 3. (5점) 삭제

학생 번호를 첫 페이지에 적었는가? 매 쪽마다 위에 학생번호를 적었는가?