

19th INTERNATIONAL BIOLOGY OLYMPIAD

13th-20th July, 2008

Mumbai, INDIA



실험 평가 3

생화학 및 세포학

총점: 43

시간: 60분

학생에게

- 이 시험에서 학생은 다음 과제를 수행합니다.

과제1: A: β -락타아제의 활성과 그것의 억제에 관한 실험
B: β -락타아제 발현과 항생제 저항성의 상관관계
C: 세균의 증식과 살충제의 K_i 값과의 상관관계

- 실험 결과와 답은 반드시 답안지에 쓰시오.
문제지에 기록된 답은 채점되지 않습니다.

- 각 실험에 필요하다고 적힌 실험재료와 기구를 모두 받았는지 반드시 확인하시오.

준비물에서 빠진 것이 있으면 노란색 카드를 드시오.

- 이 시험이 끝나면, 답안지와 문제지를 모두 봉투에 넣으시오.
감독관이 이 봉투를 회수할 것입니다.

행운을 빕니다!

국가명: _____

국가 코드 번호: _____

이름: _____

성: _____

학생 번호: _____

과제 1

Part A (35점)

β-락타아제의 활성과 그것의 억제에 관한 실험

재료 및 도구	수량
1. 색도계와 큐벳 7개	1
2. 시험관	8
3. 시험관 대	1
4. 마이크로 피펫(10~100 μ l용)	1
5. 마이크로 피펫(100~1000 μ l용)	1
6. 마이크로 피펫 팁(10~100 μ l용)	20
7. 마이크로 피펫 팁(100~1000 μ l용)	20
8. 고형 배지 사진	6
9. 유성펜	1
10. 두루마리 화장지	1
11. 증류수 병	1
12. 씻고 버리는 데 필요한 용기	1
13. 그래프 용지	1

시약

라벨	시약	용기
A	β-락타아제 효소 (1.85mg/ml)	작은 관병
B	억제제 (100mM)	작은 관병
C	페니실린 G(0.54mM)	푸른색 마개 시험관
D	인산나트륨 버퍼, pH 7.0(10mM)	푸른색 마개 시험관
E	CuSO ₄ -네오큐프로인 시약	푸른색 마개 시험관
F	HCl (2M)	흰색 마개 시험관

마이크로 피펫 사용법 :

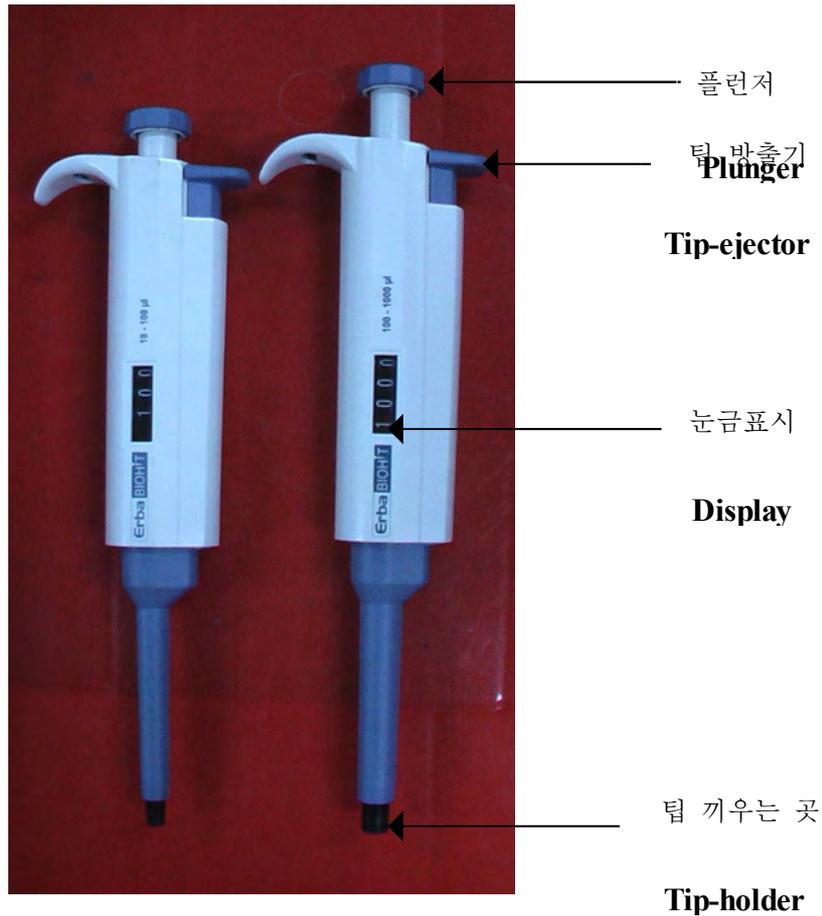


그림 1

조절 방법

필요한 양이 눈금 표시기에 표시되도록 플런저(그림1)를 돌린다.

각각의 마이크로피펫은 피펫 위에 표시된 량의 일정 범위에서만 작동함을 기억하십시오. 이 범위를 넘어서는 안된다.

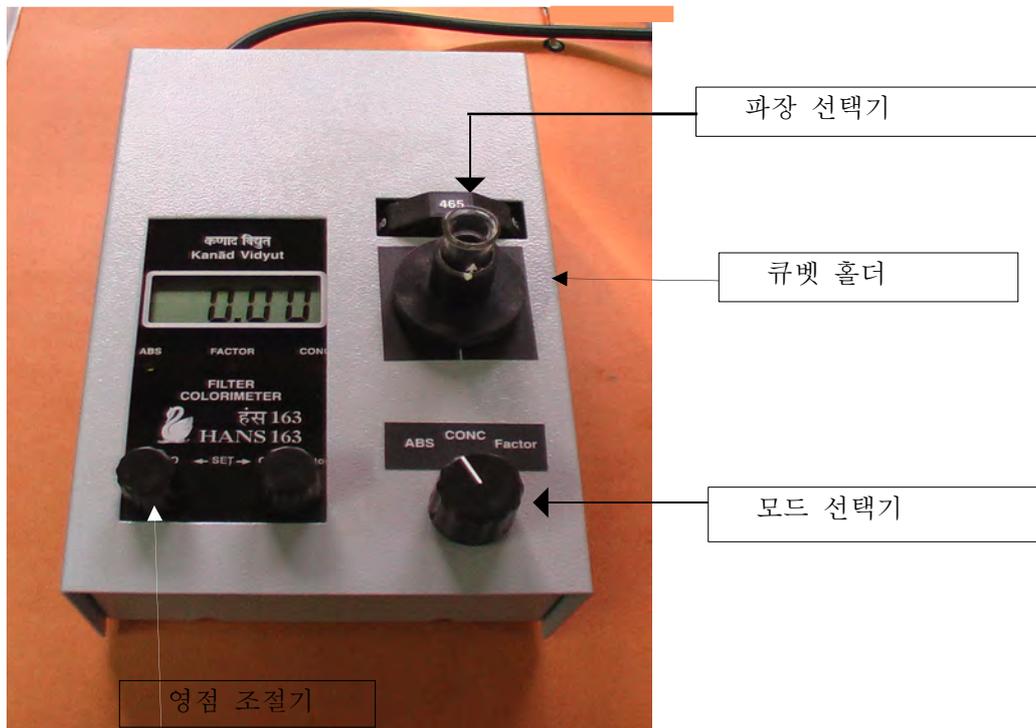
사용 방법

팁 끼우는 곳(그림1)에 피펫 팁을 단단히 끼우시오. 플런저를 서서히 처음 멈추는 곳까지 누른 후 그대로 멈춘 상태에서 팁을 2~4mm 깊이까지 용액에 수직으로 넣는다. 플런저를 천천히 놓아 처음 위치로 되돌아오게 한다. 피펫을 용액에서 꺼내어 원하는 시험관으로

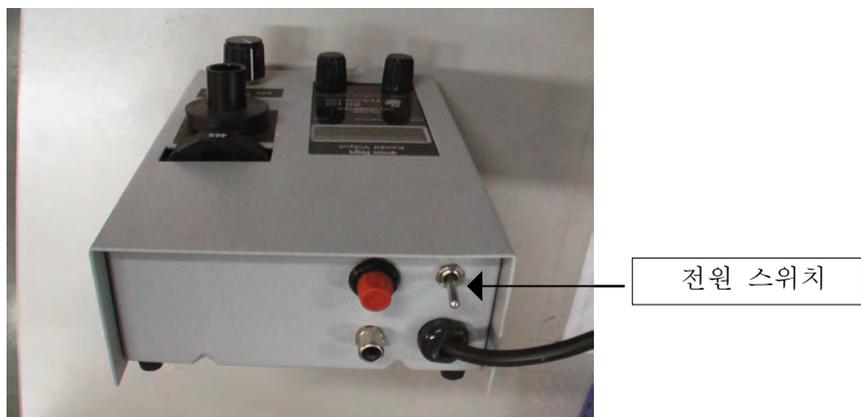
웁긴다. 팁이 시험관의 내벽에 가까이 있어야 한다. 플린저를 처음 멈추는 곳까지 누른 후 팁에서 용액이 모두 빠져 나오도록 더 누른다. 시험관에서 피펫을 꺼낸다. 사용한 팁은 팁 방출기를 눌러 버리는 용기에 버린다.

색도계 사용 방법

그림 2



위에서 내려다 본 색도계



뒷면에서 본 색도계

- 1) 색도계의 전원 스위치(그림2)를 ON으로 밀어준다.
- 2) 모드 선택기를 사용하여 흡수모드(ABS)를 선택한다.
- 3) 파장 선택기를 사용하여 파장을 465nm로 맞춘다.
- 4) 큐벳에 무처리(blank) 용액을 넣는다. 휴지로 큐벳의 바깥 면을 깨끗이 닦고 큐벳 홀더에 넣는다. 큐벳을 살살 끝까지 밀어 넣는다.
- 5) 영점 조절기를 돌려 흡광도가 0이 되게 한다. 이제 이 기계를 이용하여 시험 용액의 흡광도를 측정할 수 있다.

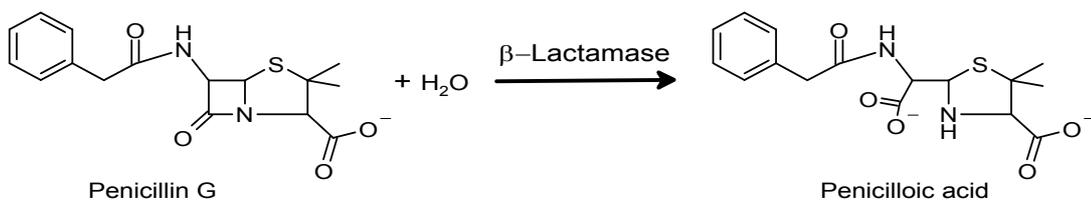
서 론

페니실린은 특징적인 β -락탐링 구조를 가지는 항생제이다. 이 항생제는 세포벽 합성을 억제하여 세균을 죽인다. 그러나 이 분자들은 β -락타아제라 불리는 효소를 합성하는 일부 세균에 의해 비활성화된다. β -락타아제를 생산하는 이 세균들은 페니실린에 저항성을 가진다. 이것 때문에 그런 저항성 세균에 감염된 환자들에게 페니실린 처리는 효과가 없다. 이 문제를 해결하기 위한 방법은 효과적인 β -락타아제 억제제를 개발하는 것이다.

β -락타아제 억제제의 효과는 억제제의 IC_{50} 과 K_i 값을 구하여 평가할 수 있다. 억제제의 IC_{50} 은 효소 활성도를 50% 억제하는데 필요한 억제제의 농도로 정의된다. 억제제의 K_i 는 효소와의 결합 친화력의 측정 도구이다.

β -락타아제 분석 원리

β -락타아제는 다음 반응을 촉매하여 페니실린을 불활성화시킨다.



만들어진 페니실로익산은 네오큐프로인이 있을 때 $CuSO_4$ 와 복합체를 이룬다. 생성된 노란색 물질은 색도계를 사용하여 465nm에서의 흡광도를 측정하여 그 양을 측정할 수 있다.

이 과제에서

- 양-반응 곡선을 그려 주어진 억제제의 IC_{50} 을 구하고,
- 억제제의 K_i 값을 구할 것이다.

억제제에 대한 양-반응 곡선은 일정 농도의 기질에서 억제제의 농도를 다양하게 하면서

β -락타아제의 활성도를 측정하여 만들 수 있다.

Q.1.A.1.(18점) 아래의 방법대로 실험을 하여 흡광도 값을 **답안지의 표 1.A.1.**에 쓰시오.

I. 다음 반응 혼합물을 준비한다.

시험관	인산나트륨 버퍼, pH 7.0	억제제 (100mM)	β -락타아제효소	증류수
1	1.48 ml	-	20 μ l	-
2	1.46 ml	20 μ l	20 μ l	-
3	1.44 ml	40 μ l	20 μ l	-
4	1.42 ml	60 μ l	20 μ l	-
5	1.40 ml	80 μ l	20 μ l	-
6	1.38 ml	100 μ l	20 μ l	-
무처리	1.43 ml	50 μ l	-	20 μ l

II. 시험관을 살짝 흔들어 섞은 후 상온에 5분간 놓아둔다.

III. 각각의 시험관에 페니실린G(0.54mM) 1ml를 넣고 살짝 섞는다. 상온에 10분간 놓아둔다.

IV. 각각의 시험관에 CuSO₄-네오큐프로인 시약 1.5ml를 넣고 살짝 섞는다.

V. 각각의 시험관에 HCl 100 μ l를 넣고 살짝 섞어 색 반응을 멈추게 한다.

VI. 색도계를 465nm 파장으로 맞춘다.

VII. 무처리 용액으로 흡광도 0을 맞춘다.

VIII. 시험관 1부터 6까지의 용액 흡광도 값을 측정하여 표에 기록한다. 모든 측정값에 감독관과 학생이 모두 서명하여야 한다. 감독관을 부르기 위해서는 노랑색 카드를 높이 들면 된다.

표 1.A.1.

시험관	흡광도
1	
2	
3	
4	
5	
6	

데이터 분석과 해석

Q. 1.A.2. (6점)

- I. 시험관 1부터 6까지 효소 반응 용액 2.5ml에 들어 있는 억제제의 농도 [I]를 mM 단위로 계산하여 답안지의 표 1.A.2.에 쓰시오.
- II. 흡광도 값을 페니실린 G의 가수 분해율이라 가정하자. 이제 V_i/V_o 를 계산하자. 이 때 V_o 는 억제제가 없을 때 β -락타아제에 의한 페니실린 G의 가수 분해율이고, V_i 는 억제제가 있을 때 페니실린 G의 가수 분해율이다.
시험관 1에서 $V_i=V_o$ 임을 주목하시오.

이 값들은 답안지의 표 1.A.2.에 소수점 아래 두 자리까지 기록하시오.

표 1.A.2.

시험관	[I] (mM)	V_i/V_o
1		
2		
3		
4		
5		
6		

Q. 1.A.3. (5점) [I]에 대한 V_i/V_o 의 그래프를 주어진 그래프용지에 그리고 답안지와 함께 제출하시오. (그래프용지에 학생 번호를 쓰시오.)

억제제의 IC_{50} 과 K_i 값의 결정

Q.A.1.4.(3점) 그래프의 데이터 점 사이의 내삽을 이용하여 IC_{50} 값을 결정하시오. 그 값을 답안지의 박스에 소수점 아래 두 자리까지 쓰시오.

$IC_{50} =$ _____ mM

Q.A.1.5.(3점) 다음 식을 사용하여 억제제의 분해 상수 K_i 를 계산하십시오.

$$IC_{50} = K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right)$$

이 때 K_m 은 페니실린G에 대한 β -락타아제의 미카엘리스-멘텐 상수이고, $[s]$ 는 효소 반응 혼합물에 존재하는 기질(페니실린G)의 초기 농도이다.

페니실린G에 대한 β -락타아제의 K_m 은 **0.05mM**로 가정하라. 답을 답안지의 박스에 소수점 아래 두 자리까지 쓰시오.

$K_i =$ _____ mM

Part B (4점)

β-락타아제 발현과 항생제 저항성의 상관관계

페니실린 저항성 세균을 액상 배양 배지에 키울 때 페니실린G 분해효소인 β-락타아제가 배지에 분비된다. 이 배지에 분비된 β-락타아제는 배지의 상등액을 취하여 그 활성을 측정할 수 있다. 4종류의 다른 항생제 내성 추정 세균(P, Q, R, S)에서 얻어진 배지의 상등액을 20μl씩 취하여 β-락타아제의 효소 활성을 측정하였다.

각 시료의 분광 광도계의 흡광도가 465nm에서 측정되어, 밑의 표에 주어졌다.

세균	흡광도
P	0.090
Q	0.450
R	0.075
S	0.220

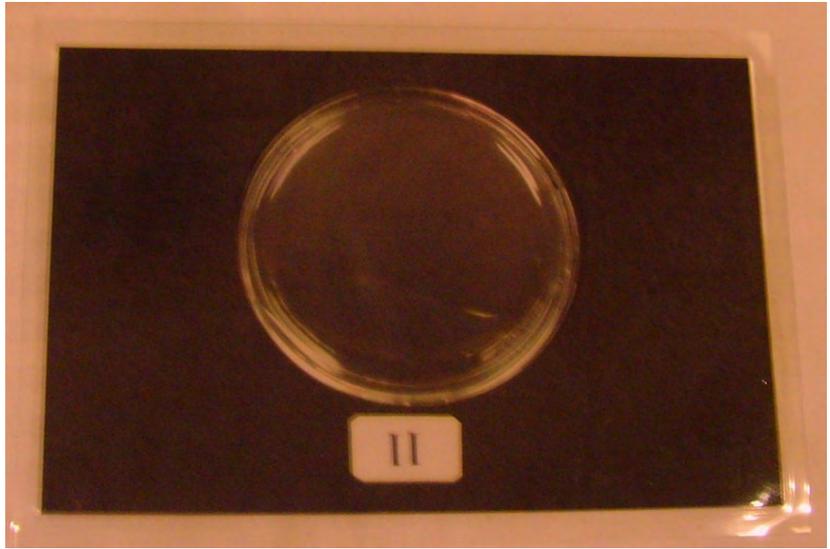
이 네 종류의 세균에 대해 디스크 확산(plate assay)법을 이용하여 페니실린G에 대한 항생제 저항성이 분석되었다.

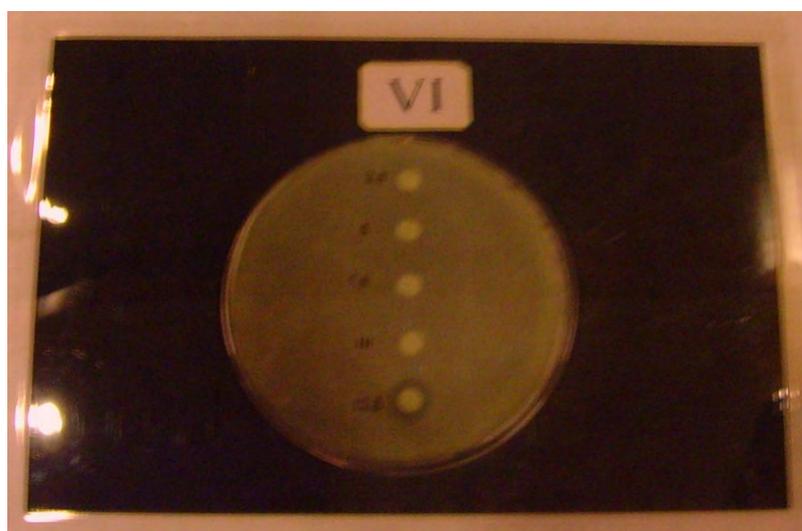
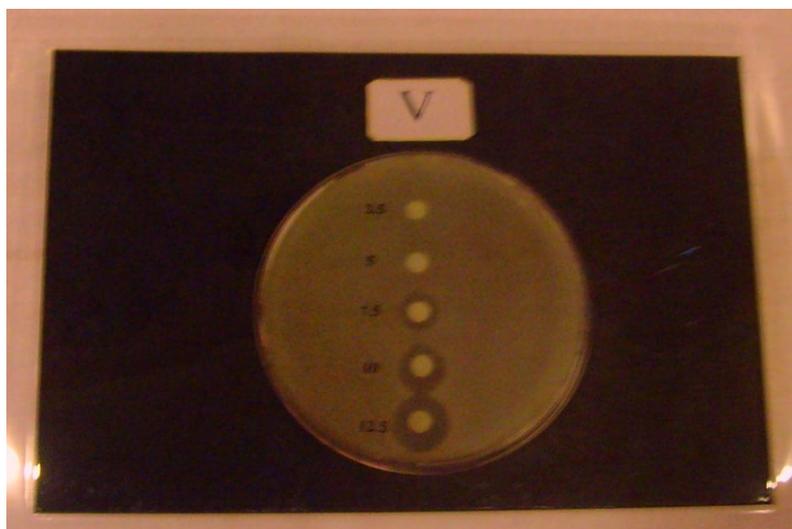
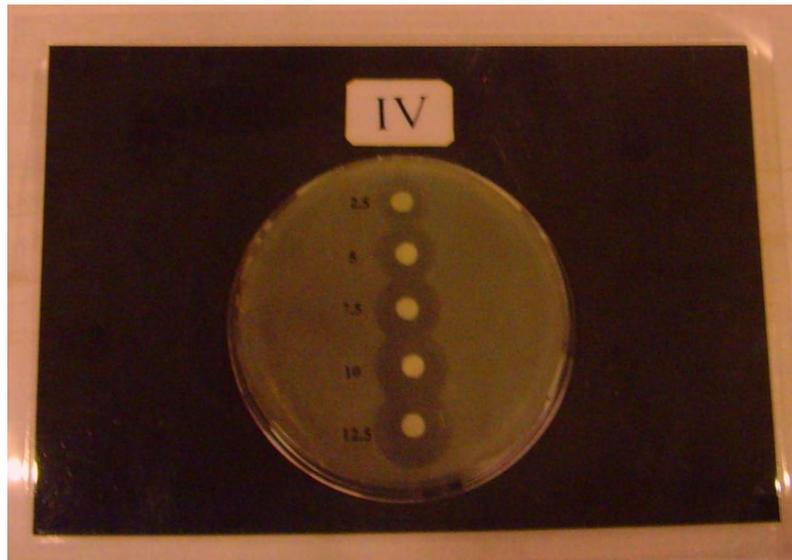
1. 각 세균이 따뜻한 배지에 따로 접종이 된 후 멸균이 된 후 고형배지(petriplate) 위에 부어졌다. 세균이 접종된 액체 배지는 온도가 떨어짐에 따라 고형 배지 위에서 굳게 된다.
2. 여러 농도의 페니실린G가 묻혀진 filter paper 디스크가 굳어진 배지 위에 놓여졌다.
3. 배지에서 세균은 배양이 되고, 디스크에 묻어있는 페니실린이 배지로 확산되며, 세균은 그 배지에서 자라게 된다.
4. 페니실린에 민감한 세균은 항생제가 묻어 있는 디스크 주위에서는 자라지 못하므로, 세균이 자라지 못하는 투명한 부위가 디스크 주위에 형성될 것이다.

I에서 IV로 표지된 6 종류의 plate의 사진이 주어졌다.

plate I은 페니실린G가 존재하지 않아 세균이 plate에 균일하게 자란 대조군 plate이다. plate II는 세균을 접종하지 않아, 세균이 자라지 않은 대조군 plate이다.

plate III에서 VI는 페니실린G의 존재하에 자란 4종류의 세균을 보여준다. 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5는 각 디스크에 존재하는 페니실린G의 양을 μg으로 표시한 숫자이다.





Q.1.B.1.(4점) plate를 관찰하고, 각 plate에서 어떠한 세균이 자라는가를 추론하시오.
답안지의 표 1.B.1.에 답을 써 넣으시오.

표 1.B.1.

배지	세균
III	
IV	
V	
VI	

Part C (4점)

세균의 증식과 살충제의 Ki 값의 상관관계

P1에서 P4는 세균 B의 성장에 필수적인 효소 E에 대해서 가역적인 억제제로 작용한다. 이들의 Ki 값이 아래 표에 주어졌다. 이들 4종류의 살충제는 지역적으로 다른 R1, R2, R3, R4 지역에서 사용되고 있다. 이들 살충제 사용 후 잔류하는 살충제 농도가 각 4 지역에서 측정되었고, 아래 표에 기록되었다.

지역	R1	R2	R3	R4
살충제	P1	P2	P3	P4
효소 E에 대한 Ki 값	1 nM	5 nM	0.45 μ M	0.55 μ M
잔류농도	60 nM	100 pM	30 nM	5.5 μ M

Q.1.C.1.(4점) 세균 B가 다른 4 지역에서 성장할지 성장하지 못할 지의 여부를 V으로 **1.C.1. 답안지** 표에 표시하시오.

표 1.C.1.

지역	R1	R2	R3	R4
세균 B가 성장함				
세균 B가 성장하지 못함				

***** 실험 평가 3의 끝입니다. *****