

Student Code: \_\_\_\_\_

# 20<sup>th</sup> INTERNATIONAL BIOLOGY OLYMPIAD

12<sup>th</sup> – 19<sup>th</sup> July, 2009

Tsukuba, JAPAN



실험 시험 2

생화학

총점 : 100

시험시간 : 90 분

## 참가 학생들에게

이 시험은 다음과 같은 2 가지 과제로 구성되어 있다.

**Task 1:** 산성 인산가수분해효소 활성화 측정 (70 점)

**Task 2:** 단백질 정량 (30 점)

1. 반드시 답안지에 결과와 답을 적으시오. 시험지에 적은 답은 평가에 반영되지 않습니다.
2. 각 과제를 위해 필요한 시약과 기구가 모두 준비되었는지 확인하고, 빠진 것이 있으면 손을 들어주세요.
3. 시험이 끝난 후 답안지와 시험지를 봉투에 넣으면, 감독관이 이 봉투를 회수합니다.

**Good Luck!!**

행운이 있기를 바랍니다.

## 분광광도계 사용법

분광광도계(쉬마츄사 자외선 미니-1240)의 창은 400nm로 맞추어져 있다(그림 1). 혹시 다르게 표시되어 있으면 손을 드시오. 흡광도 값은 0.000으로 표시되어 있지 않을 수 있습니다.

플라스틱 미니큐벳을 최소 어깨선까지 증류수로 채운다(그림 2).

큐벳을 분광광도계의 투명한 면이 좌우로 향하도록 큐벳 홀더에 삽입한다(그림 3).

덮개를 닫는다(그림 4).

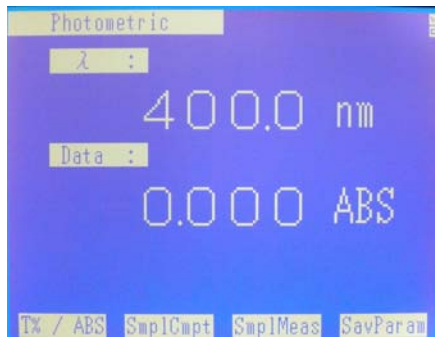
“AUTO ZERO(자동영점)” 버튼을 누른다(그림 5). 이와 같은 작동은 기기가 물을 포함한 큐벳의 흡광도를 “0”으로 인식하도록 한다. 이것은 지금부터 시행하려는 실험의 바탕값 대조군으로 이용된다.

이제, 시료의 흡광도를 측정하고자 한다.

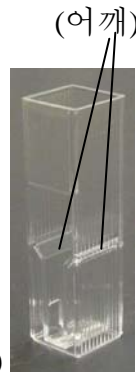
큐벳에 있는 물을 시료용액으로 교체한 후 기기의 뚜껑을 닫고 흡광도 값을 읽는다.

흡광도는 시료용액의 용질에 의해 영향을 받는다.

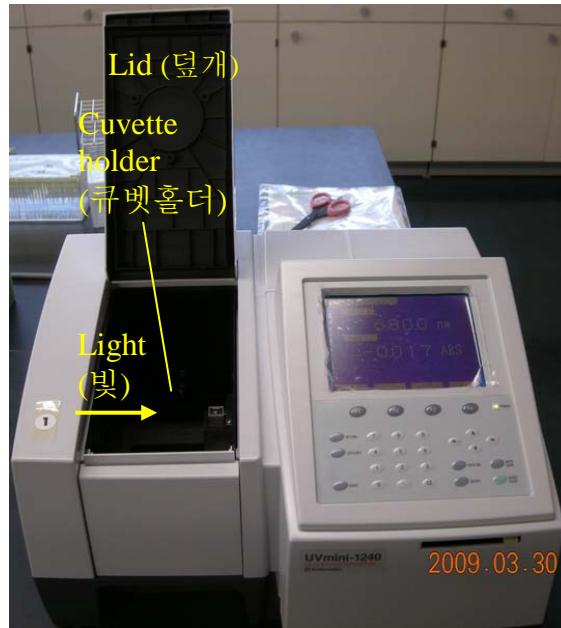
용질의 농도가 낮은 시료에서 높은 시료를 연속적으로 측정한다면 매 측정 시 큐벳을 세척할 필요가 없다.



(그림 1)



(그림 2)



(그림 3)



(그림 4)



(그림 5)

(서론)

산성 인산가수분해효소는 산성화된 조건에서 인산화된 분자에서 인산이온을 방출한다. 이 실험의 목적은 산성 인산가수분해효소의 특이활성도를 결정하는 것이다. 여러분은 과제 1에서 감자 추출물을 이용해서 산성 인산가수분해효소의 활성도를 측정하고, 과제 2에서는 그 추출물의 단백질 농도를 결정한다. 특이활성도는 단백질의 단위 무게와 단위시간당 활성도이며, 과제 1 과 과제 2 를 통해 결정된다. 특이활성도는 효소의 순도를 나타내는 하나의 지수이며, 효소의 순도가 높을수록 높다.

(주의사항)

여러분은 소량의 독성물질(*p*-nitrophenol 과 NaOH)을 취급하게 되며 원하는 경우 일회용 장갑과 보안경을 착용할 수 있다.  
이전 질문에 대한 답이 필요한 계산의 경우, 계산식이 정확하면 오답이더라도 부분 점수를 부여한다.

준비물과 장비

수량

1

분광광도계

마이크로피펫 (1000 µl 용)

마이크로피펫 (200 µl 용)

피펫팁 (1,000 µl 와 200 µl 용 각각 1 박스)

플라스틱 큐벳

6-1 에서 6-7 의 시험관들을 씻을 수 있는 시험관대

산성 인산가수분해효소 추출물 (15 ml 플라스틱튜브에 4 ml, '1x enzyme'으로 표지)

0.5 M 아세트산 나트륨 완충용액 (pH 5.6) (15 ml 플라스틱 튜브에 2 ml)

5 mM pNPP (15 ml 플라스틱 튜브에 4 ml)

0.5 M NaOH (15 ml 플라스틱 튜브에 8 ml)

3% NaCl (15 ml 플라스틱 튜브에 10 ml)

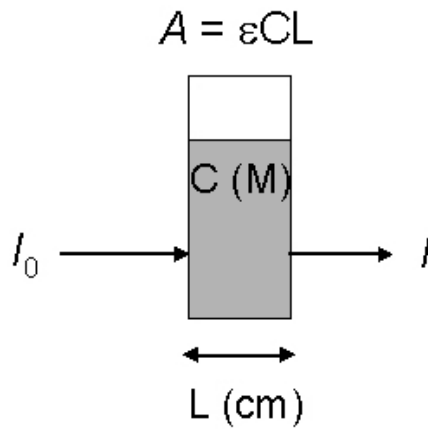
시험관 (유리관)

## 과제 1 (70 점)

### 산성 인산가수분해효소 활성화 측정

산성 인산가수분해효소의 활성화는 *p*-nitrophenylphosphate (pNPP)를 *p*-nitrophenol (pNP)로 전환시키는 효소이다. 생산물인 pNP는 400 nm에서 빛을 흡수하며, 강한 알칼리 조건에서 흡수계수( $\epsilon_{400\text{nm}}$ )는  $19,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 이다. 산성 인산가수분해효소의 반응 용액은 약한 산성이기 때문에 pNP의 측정을 위해서 알칼리화가 필요하다. 과제 1에서 여러분은 효소 추출물 1 ml에 의한 1 분당(per minute) 흡광도의 변화를 측정하게 된다. 흡광도 변화는 흡수계수( $\epsilon_{400\text{nm}}$ )를 이용해서 농도의 변화로 변환된다. 그런 다음 측정된 농도 변화를 측정된 부피에 곱해서 반응에 의해 생성된 pNP 분자의 몰 수(mol number)를 계산한다.

\* 흡수계수란 무엇인가?



A, 흡광도

$\epsilon$ , 흡수계수 ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

C, 농도 ( $M = \text{mol litre}^{-1}$ )

L, 빛의 경로길이 (cm)

$I_0$ , 입사광선의 강도

I, 투과된 빛의 강도

흡광도(A)는 특정 파장에서 빛을 흡수하는 정도를 나타내는 용액의 물리·화학적 특성이다. 흡광도는 농도(C)와 빛의 경로길이(L)에 비례한다. 수식의 상수는 흡수계수( $\epsilon$ )이며 용질의 특성을 나타낸다. 따라서  $\epsilon$ 값은 주어지고 A는 1cm 이기 때문에  $A = \epsilon C \text{ (} M = \text{mol litre}^{-1} \text{) } L \text{ (cm)}$  식을 이용하면 흡광도를 이용해 용질의 농도를 계산할 수 있다. 흡광도는 단위가 없는 수이기 때문에  $\epsilon$ 의 단위는  $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$  이다.

과제 1에서는 2 가지 농도의 효소를 분석에 이용한다. 산성 인산가수분해 효소의 추출물을 포함하고 있는 '1x enzyme'으로 표지된 튜브를 찾는다. 다음에는 3% NaCl 튜브에서 1ml 를 제거한 후 남은 9 ml 에 마이크로피펫을 이용하여 1 ml '1x' enzyme 을 추가하여 '0.1x' enzyme 용액을 만든다. 이 튜브를 '0.1x' enzyme 으로 다시 표지한 다음, 6 개의 빈 튜브에 다음과 같이 각각 효소의 농도와 반응시간을 표지한다.

'0.1x', 20 min

'1x', 20 min'

'0.1x', 10 min

'1x', 10 min

'0.1x', 1 min

'1x', 1 min



**Q.1.1. (10 점)** 첫째, 6 가지 반응을 모두 진행할 수 있도록 하고 각 반응의 시작 시간 사이가 1 분 간격이 되도록 실험계획을 세우기 위하여, 답안지의 표에 시작(○)과 정지(●)표시를 하시오. 답안지의 표에 ‘0.1x, 20 min’ 반응이 예시로 표시되어 있습니다.

**Q.1.2. (15+10 점)** 아래에 설명된 측정방법과 Q.1.1.의 실험계획에 따라 효소반응 실험을 수행한다. 용액을 피펫으로 추가할 때마다 새로운 팁을 이용한다. 용액을 추가한 후 즉시 시험관을 가볍게 쳐서 용액을 섞은 후 반응을 시키고 시료의 흡광도( $A_{400}$ )을 측정한다. 답안지의 표에 측정된 값을 적고 그 값을 그래프 용지에 표시 하시오. 물이 바탕값으로 이용되었기 때문에 그래프의 선은 Y축의 0 점(원점)을 지나지 않는다.

산성 인산가수분해효소 활성화도 측정 방법

- 1) 0.5M 아세트산 나트륨 완충용액 (0.5 M Na acetate buffer) (pH 5.6) 0.12 ml 과 5 mM pNPP 용액 0.24 ml 을 튜브에 넣어서 섞는다. 효소용액 0.24 ml 을 추가해서 반응을 시작한다.
- 2) 1, 10, 20 분간 각각 반응을 시킨 후 0.5 M NaOH 용액 0.6 ml을 추가해서 반응을 중지시킨다. 추가된 NaOH는 효소반응과 생성물인 pNP를 노란색 물질( $A_{400}$ -absorbing)로 바꾼다.
- 3) 모든 반응이 중지된 후 시료의 흡광도( $A_{400}$ )를 측정한다.

감자의 산성 인산가수분해효소의 분석

0.5 M Na acetate buffer(pH 5.6)	0.12	ml
5 mM pNPP	0.24	ml
Enzyme (효소)	0.24	ml
0.5 M NaOH	0.6	ml
Sum (계)	1.2	ml

**Q.1.3. (15 점)** 시간과 흡광도( $A_{400}$ ) 사이의 관계에서 어떤 효소농도가 직선에 더 가까운가? 답안지에 직선에 더 가까운 효소의 농도에 동그라미를 그리시오. 그리고 이 효소농도의 그래프에서 기울기를 계산식과 함께 쓰시오.

**Q.1.4. (5 점)** Q.1.3.에서 얻은 기울기를 이용해서 ‘1x’ 효소 용액의 1 ml 당, 분 당 활성도를 흡광도 변화로 계산하시오. 빛의 경로길이 (L)은 1cm 이다. 답안지에 계산식과 적당한 단위를 반드시 쓰시오.

**Q.1.5. (5 점)** Q.1.4.에서 얻은 흡광도 변화를 농도의 변화로 계산하시오(pNP의  $\epsilon_{400}$  를  $19,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  로 추정). 답은 답안지에 계산식과 ‘1x’ 효소 용액의 1 ml 당, 분 당 단위로 표시하시오.

**Q.1.6. (5 점)** Q.1.5.에서 얻은 농도의 변화를 pNP 의 몰 수(number of moles)의 변화로 표시하시오. 여러분의 답은 답안지에 계산식과 ‘1x’ 효소용액의 ml 당, 분당 몰(moles)로 표시하시오.

**Q.1.7. (5 점)** 초기에 이용되었던 ‘1x’ 효소 용액 4ml 에 있는 총 활성도(분당 몰; moles per min)를 계산하시오.

## 과제 2 (30 점)

### 단백질 정량

단백질의 농도는 소 혈청단백질(BSA)와 같은 표준 단백질을 이용해서 결정된다. 과제 2에서 여러분은 브래포드 방법(Bradford method)에 의해 '1x' 효소 용액의 단백질 농도를 결정하게 된다. 브래포드 방법은 단백질과 결합하면 595nm에서 흡광도가 증가하는 코마시 블루(Coomassie Brilliant Blue)를 이용하는 장점이 있다.

0.4 mg/ml BSA 용액을 3% NaCl 용액으로 2 배씩 연속적으로 희석해서 0.4, 0.2, 0.1, 0.05 mg/ml 용액을 준비했다. 연속적으로 희석된 BSA 용액과 과제 1에서 준비된 '0.1 x' 효소 용액을 코마시 블루 용액으로 반응시키고 595nm에서 흡광도를 측정한 후 아래의 표와 같이 기록되었다.

Table (표)

시 료	[BSA] ( $mg \cdot ml^{-1}$ )	OD <sub>595</sub>
	0.00	0.000
	0.05	0.070
	0.1	0.143
	0.2	0.261
	0.4	0.521
0.1x 효소 용액		0.180

OD 값은 물질이 빛을 투과시키는 정도 또는 용액의 흡광도를 나타냄.

**Q.2.1. (10 점)** 답안지의 그래프 용지에 BSA 농도에 따라 OD<sub>595</sub> 값을 표시하고 값에 근접한 직선을 그리시오.

**Q.2.2.(10 점)** 그래프로부터 '0.1x' 효소 용액의 단백질 농도를 산출하고, '1x' 효소 용액의 단백질 농도를 단위와 함께 쓰시오.

**Q.2.3.(10 점)** '1x' 효소 용액의 특이 활성화도(mg 단백질 당, 분당 활성화도; activity per min per mg protein)를 계산하시오. 답은 단안지에 계산식과, mg 단백질 당, 분당 단위(unit per min per mg protein)로 표시하시오.