

Student Code: _____

22nd INTERNATIONAL BIOLOGY OLYMPIAD

July 10-17, 2011

Taipei, Taiwan



PRACTICAL TEST 1

BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY

생화학 및 세포생물학

Total Points: 100

(총점: 100)

Duration: 90 minutes

(소요시간: 90 분)

Dear Participants 수험생 유의사항,

- In this test, you have been given the following 3 tasks:

Task I: Protein electrophoresis (35 points)

Task II: Protein quantification (30 points)

Task III: Protein purification (35 points)

이 시험에서는 다음 세 가지 과제가 부여됩니다.

- **과제 1:** 단백질 전기영동 (35점)
- **과제 2:** 단백질 정량 (30점)
- **과제 3:** 단백질 정제 (35점)

- Check your **Student Code** on the **Answer Sheet** before starting the test.

시작하기 전에 **답안지의 학생코드(student code)**를 확인하십시오.

- Write down your results and answers in the **Answer Sheet**. **Answers written in the Question Paper will not be evaluated.**

결과와 답은 **답안지에 적으시오. 문제지에 적은 답은 채점하지 않습니다.**

- Make sure that you have received all the materials listed for each task. If any of the listed items is missing, **raise your sign.**

각각의 과제에 제시된 재료를 모두 받았는지 확인하십시오. 하나라도 없으면 **표시판(sign)**을 들어 **알리세요.**

- Use pen only. 반드시 펜을 사용하십시오.

- You should organize your work efficiently but ensure that you complete task II early enough to obtain the spectrophotometer readings to answer the questions that follow.

실험을 효율적으로 계획하십시오. 과제 2를 충분히 일찍 끝내야 이어지는 문제에 필요한 분광광도계 측정을 하는 데 지장이 없습니다.

- Stop answering **immediately** after the end bell rings.

끝나는 벨이 울리면 **즉시** 답안 작성을 멈추시오.

- After test, enclose both the **Answer sheets, Question paper, and Data printout** in the provided envelope. Our lab assistants will collect it promptly.

시험이 끝나면 **답안지, 문제지, 결과출력물**을 모두 나누어 준 봉투에 넣으시오. 실험조교가 곧 수거해 갈 것입니다.

- No paper or materials should be taken out of the laboratory.

실험실 밖으로는 종이나 재료를 가지고 나갈 수 없습니다.

Good Luck!!

Shared instruments 공용기구:

Camera 카메라, spectrophotometer 분광광도계, printer 프린터

Equipments and Materials 기구 및 재료:

<u>Equipments 기구:</u>	<u>Quantity</u> <u>수량</u>
1 Power supply 전원공급장치	1
2 Electrophoresis tank (with gel and buffer) 전기영동장치(젤과 완충용액 포함)	1
3 Micropipettes P20 and P200 (마이크로피펫 P20, P200)	1 each
4 80-well microcentrifuge tube rack (80-홈 마이크로튜브 꽂이)	1
5 Wire test tube rack with 15-mL centrifuge tubes (×6) (yellow cap) (15-mL 원심분리튜브(노란 뚜껑) 6 개가 들어 있는 철사 시험관꽂이)	1
6 4-way test tube rack (4-방향 시험관 꽂이)	1
7 Plastic droppers in 15-mL centrifuge tubes (15mL 원심분리용 튜브에 사용할 플라스틱 스포이트)	2
8 Micropipette tips (for P20 and P200) (마이크로피펫 팁, P20 및 P200 용)	1 each
9 Timer (타이머)	1
10 96-well microplate (96-홈 마이크로플레이트)	1
11 Marker pen & paper label (마커펜 및 종이 라벨)	1 each
12 600-mL beaker for waste disposal (쓰레기 수거용 600-mL 비이커)	1
13 Scissors and ruler (가위와 자)	1
14 Double-sticker to attach the results (결과지 부착을 위한 양면테이프)	1
15 Student Code sticker (학생코드 스티커)	1

- | | | |
|----|--|---|
| 16 | Tissue paper (티슈) | 1 |
| 17 | Mini centrifuge (if you need to spin down the samples in the microcentrifuge tubes) 마이크로원심분리기 (마이크로튜브를 이용해서 시료를 원심분리할 필요가 있는 경우) | 1 |

Materials 재료:

Quantity

- | | | |
|---|---|---|
| 1 | Loading dye (microcentrifuge tube-L) (pink tube with orange label)
로딩염료(마이크로튜브-L)(오렌지색 라벨의 분홍색 튜브) | 1 |
| 2 | Pre-stained protein molecular weight marker (microcentrifuge tube-M) (pink tube with orange label)
사전염색된 단백질 분자량 마커(마이크로튜브-M)(오렌지색 라벨의 분홍색 튜브) | 1 |
| 3 | Unknown pre-stained protein samples (microcentrifuge tubes-U1 and U2) (pink tube with orange label)
사전염색된 미지의 단백질 시료 (마이크로튜브-U1, U2)
(오렌지색 라벨의 분홍색 튜브) | 1 |
| 4 | CBG reagent in 50-mL centrifuge tube
(CBG 시료가 들은 50-mL 원심분리용 튜브) | 1 |
| 5 | Bovine serum albumin (BSA) concentration standard (0.5 mg/mL) in microcentrifuge tube (green tube with yellow label)
마이크로튜브에 들어 있는 BSA 표준농도 용액(0.5 mg/mL)(노란색 라벨의 녹색 튜브) | 1 |
| 6 | Enzyme E in two microcentrifuge tubes: concentrations X and Y (green tube with yellow label)
두 개의 마이크로튜브에 들어 있는 효소 E: 농도 X 및 Y(노란색 라벨의 녹색 | 1 |

- 튜브)
- 7 Distilled water (microcentrifuge tube-ddH₂O) (green tube with yellow label) 1
증류수 (마이크로튜브- ddH₂O) (노란색 라벨의 녹색 튜브)
- 8 Protein sample (microcentrifuge tube-C) (blue tube with blue label) 1
단백질 시료 (마이크로튜브-C) (파란색 라벨의 파란색 튜브)
- 9 Anion exchange chromatography column on 15-mL centrifuge tube 1
15 mL 원심분리용 튜브에 넣을 음이온교환 크로마토그래피 컬럼
- 10 Anionic buffers A and B (5 mL each in two separated 15-mL centrifuge tubes) (green cap) 1
음이온 교환 크로마토그래피용 완충용액 A와 B (두 개의 다른 15-mL 원심분리용 튜브에 5 mL 씩 들어 있음) (녹색 뚜껑)
- 11 Coomassie brilliant blue G-250 (CBG) reagent 1 mL in each of six 15-mL centrifuge tubes (A1 to A3 & B1 to B3, red cap) 1
쿠마씨블루 G-250(CBG) 용액 1 mL 씩 들어 있는 6 개의 15-mL 원심분리용 튜브 (A1~A3 & B1~B3, 빨간색 뚜껑)

Task I (35 points) 과제 1 (35 점)

Protein electrophoresis (단백질 전기영동)

Introduction 서론:

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) is a common technique for protein study. It can be used to separate different proteins based on their charges or sizes. A type of PAGE is termed SDS-PAGE, in which the negatively charged chemical, SDS, is added before protein electrophoresis. The amount of SDS that binds to proteins is proportional to the size of the protein which confers each protein a similar charge-to-mass ratio and renders the intrinsic charge of the protein insignificant, at least for this experiment. Thus, the major factor that affects the migration of protein is the molecular weight (MW) of the protein during SDS-PAGE. The relative mobility (R_f) of the protein can be calculated as the ratio of the distance migrated by the protein to that migrated by the dye-front. The value of R_f is inversely proportional to the log of its molecular weight.

폴리아크릴아미드 젤 전기영동(PAGE)은 단백질 연구에 흔히 쓰이는 기법이다. PAGE 는 서로 다른 단백질을 전하량이나 크기 등에 따라 분리한다. PAGE 의 일종인 SDS-PAGE 에서는 단백질 전기영동을 하기 전에 음으로 하전된 화합물인 SDS 를 첨가한다. 단백질에 결합한 SDS 의 양은 단백질 크기에 비례하므로 각 단백질의 전하량 대 질량의 비는 대개 일정하고, 그래서 단백질 고유의 전하는 이 실험에서 중요하지 않다. SDS-PAGE 에서 단백질의 이동에 영향을 주는 주요인은 단백질의 분자량(MW)이다. 단백질의 상대적인 이동거리(R_f)는 염료가 이동한 거리에 대한 단백질의 이동거리 비로 계산할 수 있다. R_f 값은 분자량의 로그값에 반비례한다.

In the problem set, you will perform the following experiment:

이 문제를 풀기 위해 여러분은 다음과 같은 실험을 하게 됩니다.

1. An electrophoresis tank has been set up for SDS-PAGE, in which a polyacrylamide gel has been secured on electrode assembly and electrophoresis buffer has been filled. There are 10 wells for sample loading on the top of the gel. To load the sample, use the P20 micropipette with tip to withdraw protein sample, and carefully place the tip on the top of the well. By injecting slowly the sample will sink to the bottom of the well by gravity (**Figure 1**).

SDS-PAGE 전기영동 장치에는 폴리아크릴아미드 젤이 장착되어 있고 전기영동 완충용액이 채워져 있다. 젤의 위쪽에 시료를 로딩할 수 있는 10 개의 시료홈(well)이 있다. 시료를 로딩하기 위해서 P20 마이크로피펫과 팁을 써서 단백질 시료를 채취하고 시료홈의 맨 위에 팁을 조심스럽게 놓는다. 마이크로피펫 팁에 있는 시료를 천천히 밀어 내면 시료는 중력에 의해 시료홈의 바닥에 가라앉을 것이다(그림 1).

2. If you need to practice, use the P20 micropipette with tip to withdraw 10 μL of loading dye from microcentrifuge tube L (pink tube with orange label) on rack. Load the dye into wells 1 to 3 or 7 to 10.

연습이 필요하면 P20 마이크로피펫으로 마이크로튜브 L(오렌지색 라벨의 분홍색 튜브)에서 로딩염료 10 μL 를 덜어낸다. 염료를 1~3 또는 7~10 번 시료홈(well)에 로딩하는 연습을 해 본다.

3. Each of the microcentrifuge tubes M, U1 and U2 (pink tube with orange label) contains 15 μL of protein molecular weight marker, unknown protein U1 and unknown protein U2, respectively. Use micropipette P20 to withdraw 10 μL solution from each tube and load the samples into wells 4 to 6 as shown in **Figure 1**.

마이크로튜브 M, U1, U2(오렌지색 라벨의 분홍색 튜브)에는 각각 15 μL 단백질분자량 마커, 미지의 단백질 U1, 미지의 단백질 U2 가 들어 있다. 마이크로피펫 P20 를 이용해서 각각의 튜브에서 10 μL 용액을 덜어 내어 그림 1 에 나타난 바와 같이 시료홈 4~6 에 로딩한다.

4. As soon as you finish sample loading, **Lift the sign**, lab assistants will connect the power cord to power supply and set the voltage to 200 V for you. The gel will run for 25 minutes. The timer will be set up by an assistant to countdown.

시료 로딩을 마치면 즉시 **표시판(sign)을 드시오.** 실험조교가 전기영동장치를 전원에 연결한 다음 200V 로 전압을 맞추어줄 것이다. 25 분간 전기영동한다. 실험조교가 시간을 썰 수 있도록 타이머를 설정해 줄 것이다.

5. After finishing electrophoresis, **Lift the sign**, lab assistants will disassemble the electrophoresis set-up and give back your gel. Wipe clean the surface of gel with tissue papers and **label the gel with your Student Code** sticker. Lab assistants will take the photo of your gel. Put the photo on the answer sheet using double-sticker (5 points).

전기영동을 마치면, **표시판(sign)을 드시오.** 실험조교가 전기영동 장치를 해체하여 젤을 줄 것이다. 젤 표면을 휴지로 닦고 **젤에 학생코드(student code) 스티커를 붙인다.** 실험조교가 젤 사진을 찍어 줄 것이다. 양면테이프로 사진을 답안지에 붙인다(5 점).

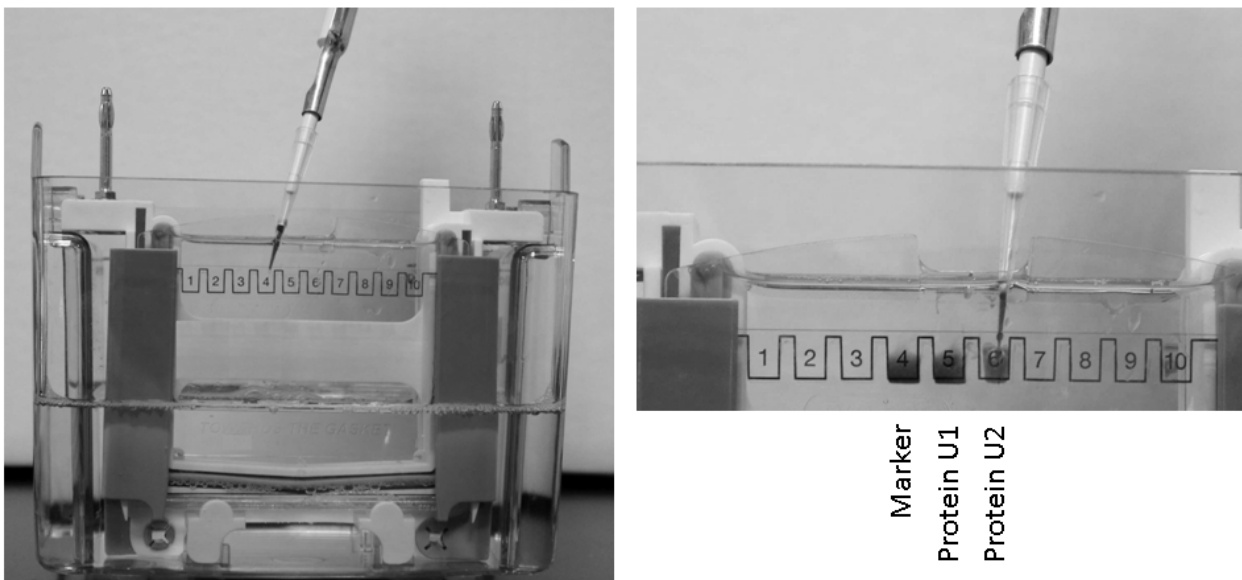


Figure 1

- Marker : 단백질 분자량 마커
- Protein U1: 미지의 단백질 U1
- Protein U2: 미지의 단백질 U2

Answer the following questions:

다음 물음에 답하십시오.

Q.1.1. (2 points) Figure 2 shows a photograph of a SDS-PAGE gel. The electrophoresis start point and dye-front are indicated. Which side of the gel should be connected to the anode (+ charge) of the power supply? Mark your answer (X) on the answer sheet.

그림 2 는 SDS-PAGE 젤 사진이다. 전기영동 시작점(Start point)과 염료 이동선(Dye-front)이 표기되어 있다. 젤의 어느 쪽에 양극(+극)을 연결해야 할까? 답안지에 X 표시를 하시오.

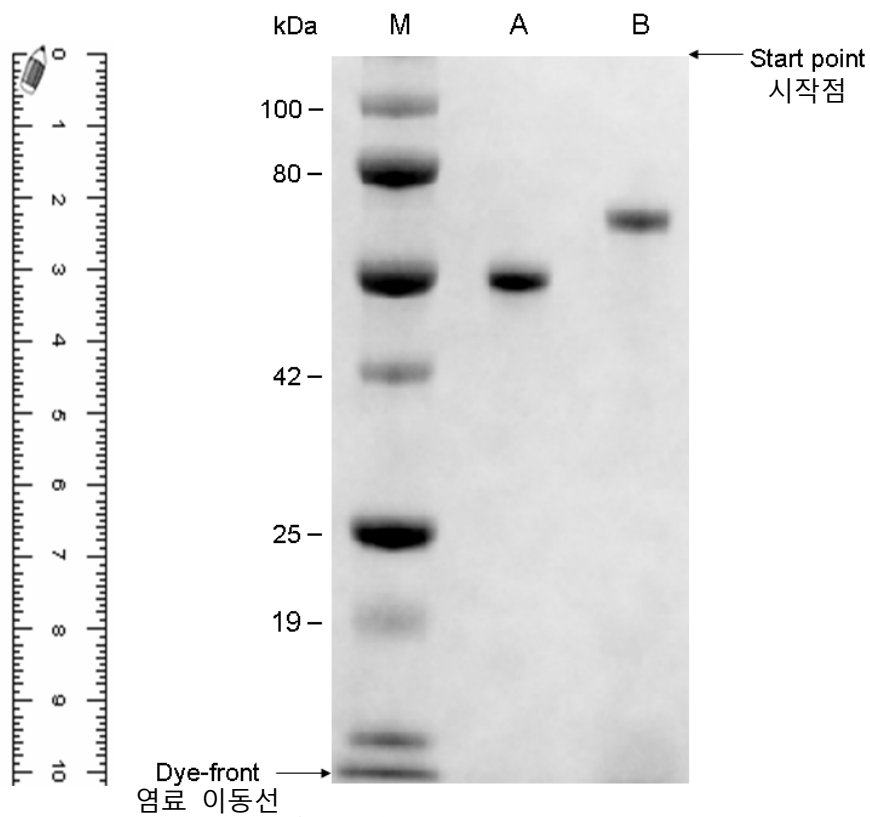


Figure 2

Q.1.2. (8 points) Based on the information provided in **Figure 2**, plot a graph of molecular weight values of the five marker proteins versus their relative migration- R_f values on the graph paper provided on the answer sheet (4 points). Use the graph to estimate the molecular weights of unknown proteins on lanes A and B (4 points). Write down your answers on the answer sheet.

그림 2 의 정보에 근거하여, 다섯 종의 마커 단백질의 상대적 이동거리인 R_f 값과 분자량의 관계를 그래프로 그리시오. 답안지에 제공된 그래프 용지를 사용한다(4 점). 그래프를 이용하여 젤의 레인 A 와 B 에 나타난 단백질의 분자량을 추정하시오(4 점). 답은 답안지에 적는다.

Q.1.3. (5 points) A protein complex of molecular weight 246 kDa is composed of multiple subunits bound by non-covalent interaction. Two protein bands of 57 and 33 kDa were identified after SDS-PAGE. How many 57-kDa and 33-kDa subunits, respectively, are included in the protein complex? Write down your answers on the answer sheet.

분자량이 246 kDa 인 어느 단백질 복합체는 여러 개의 소단위체가 비공유결합으로 결합되어 있다. SDS-PAGE 전기영동 결과, 57 kDa 과 33 kDa 의 두 종류 단백질 밴드가 확인되었다. 이 단백질 복합체에는 57 kDa 과 33 kDa 소단위가 각각 몇 개씩 포함되어 있을까? 답안지에 답을 적으시오.

Q.1.4. (5 points) The average molecular weight of amino acid residues is about 110 daltons. How many amino acids are there in the 33-kDa protein subunit? How many nucleotides of RNA are translated into the protein? Write down your answers on the answer sheet.

아미노산 잔기의 평균 분자량은 대략 110 dalton 이다. 33 kDa 단백질 소단위체에는 몇 개의 아미노산이 포함되어 있을까? 답안지에 답을 적으시오.

Q.1.5. (5 points) Suppose the average molecular weight of nucleotides is 330 daltons. Excluding intron and stop codon, what is the mass ratio of dsDNA encoding the 33-kDa protein to the 33-kDa protein? Write down your answer on the answer sheet.

뉴클레오티드의 평균 분자량이 330 dalton 이라 하자. 인트론과 종결코돈을 제외하였을 때, 33-kDa 단백질을 암호화하는 이중나선 DNA(dsDNA)와 33-kDa 단백질의 질량비는 얼마인가? 답안지에 답을 적으시오

Q.1.6. (5 points) Suppose a protein P can bind to a protein Q (MW = 1000 daltons). The binding can be revealed by gel-mobility shift assay. Now 200 pmol of protein P were mixed with various amounts (0 to 500 ng) of protein Q. These mixtures were resolved by 10% (w/v) polyacrylamide gel. Gel was stained by Coomassie blue and is shown in **Figure 3**. Calculate the binding molar ratio of proteins P and Q? Write down your answer on the answer sheet.

단백질 P 는 단백질 Q(분자량=1000 daltons)에 결합할 수 있다. 두 단백질의 결합 여부는 젤-이동변화 분석법(gel-mobility shift assay)으로 알 수 있다. 200 pmol 단백질 P 를 서로 다른 양의 단백질 Q(0~500 ng)와 혼합하였다. 이들 혼합액을 0%(w/v) 폴리아크리아미드젤에서 분리하였다. 젤을 쿠마씨블루 염료로 염색한 결과가 그림 3 에 나타나있다. 단백질 P 와 Q 분자의 결합 몰 비(molar ratio)를 계산하시오. 답은 답안지에 적으시오.

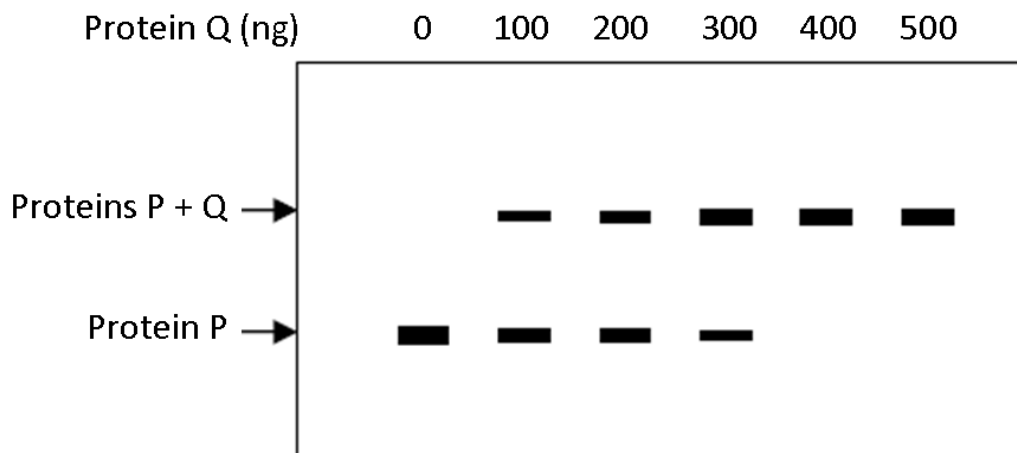


Figure 3

Protein : 단백질

Task II (30 Points) 과제 2 (30 점)

Protein quantification 단백질 정량

Introduction 서론:

Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBG) is a protein staining reagent. It appears in a different color under different pH conditions. It looks reddish brown in acidic solution, whereas it turns blue under neutral or alkaline condition. Since proteins can provide a relative neutral environment, CBG will turn blue with the maximum absorbance at a wavelength of 595 nm when binding to protein. The more protein there is in a sample, the more CBG will bind to it, and thus, the higher intensity of blue color will be. In other words, the absorbance at 595 nm is proportional to the amount of protein in a sample. Based on this, one can determine the concentration of protein by measuring the blue intensity of a sample.

쿠마씨블루 G-250(CBG)는 단백질을 염색할 수 있는 염색약이다. 쿠마씨블루의 색은 pH 에 따라 달라진다. 산성용액에서는 붉은갈색이지만, 중성이나 알칼리 조건에서는 푸른색으로 변한다. 단백질은 비교적 중성 환경을 제공하므로 CBG 가 단백질과 결합하면 595 nm 파장을 최대 흡수하여 푸른색을 나타낸다. 더 많은 양의 단백질이 시료에 포함되어 있으면, 더 많은 CBG 가 단백질에 결합할 것이다. 그렇게 되면 더 진한 푸른색이 나타나게 된다. 달리 말하면, 595 nm 에서의 흡광도는 시료에 들어있는 단백질의 양에 비례한다. 이를 바탕으로 시료가 얼마나 푸른색을 띠는가를 측정함으로써 단백질의 농도를 결정할 수 있다.

In the problem set, you will perform the following experiment:

이 문제를 풀기 위해 여러분은 다음과 같은 실험을 하게 됩니다.

1. To make BSA concentration standards (**Table 1**), add 0, 2, 4, 6, 8 and 10 μL of 0.5 mg/mL BSA (green color) in A1 to A6 wells of a microplate (**Figure 4**). Make duplicated BSA concentration standards in B1 to B6 wells. If this step is incorrect, you can repeat the procedure in wells A7 to A12 and/or B7 to B12. Adjust the total volume of each BSA solution to 10 μL by adding an appropriate volume of H_2O (**Table 1**).

BSA 표준농도를 만들기 위해(표 1), 0.5 mg/mL BSA(녹색) 0, 2, 4, 6, 8, 10 μL 씩을 마이크로플레이트 시료홈(well) A1~A6 에 각각 첨가한다(그림 4). 반복실험을 위하여 똑 같은 양의 BSA 를 시료홈 B1~B6 에 각각 첨가한다. 만일 이 단계에서 실수를 하였다면, 시료홈 A7~A12 와 B7~B12 를 사용해서 앞의 과정을 반복할 수 있다. 각 시료홈의 BSA 용액의 최종 부피가 10 μL 이 되도록 적당량의 H_2O 를 첨가한다(표 1).

2. Add 200 μL of CBG reagent per well in A1 to A6 & B1 to B6. Mix and observe the color change.

시료홈 A1~A6 및 B1~B6 에 CBG 용액 200 μL 씩을 각각 첨가한다. 조심스럽게 섞어 색 변화를 관찰한다.

3. To determine the two concentrations X and Y of enzyme E, add various amounts (2, 4, 6, 8 and 10 μL) of enzyme E (green color) in duplicate to empty wells and bring up the volume to 10 μL with H_2O .

서로 다른 농도의 효소 E 가 포함된 용액 X 와 용액 Y 의 단백질 농도를 결정하기 위해, 서로 다른 분량(2, 4, 6, 8, 10 μL)의 효소 E(녹색)가 포함된 용액 X 와 Y 를 각각 빈 시료홈에 넣는다. 용액의 최종 부피가 10 μL 이 되도록 각각의 시료홈에 적당량의 H_2O 를 첨가한다

4. Add 200 μL of CBG reagent per well to the diluted enzyme E. Mix and observe the color change.

희석된 효소 E 가 들어있는 각각의 시료홈에 CBG 용액 200 μL 를 첨가한다. 조심스럽게 섞어 색 변화를 관찰한다.

5. **Lift the sign**, lab assistants will accompany you to measure the absorbance values of your samples at 595 nm using spectrophotometer. Put your Student Code on the print-out data with marker pen.

표시판(sign)을 드시오. 실험조교의 도움을 받아 분광계를 이용, 595 nm 에서 시료 흡광도를 측정한다. 출력된 자료에 마커펜으로 학생코드(student code)를 적는다.

6. Return to your work bench, and put the result on the answer sheet using double-sticker.
 실험대로 돌아가서 양면테이프로 실험 결과를 답지에 붙인다.

Table 1

Materials (재료)	Well of a microplate (마이크로플레이트 시료함)					
	A1 & B1	A2 & B2	A3 & B3	A4 & B4	A5 & B5	A6 & B6
0.5 mg/mL BSA (μ L)	0	2	4	6	8	10
H ₂ O (μ L)	10	8	6	4	2	0
Diluted BSA concentration (mg/mL) (희석된 BSA 농도(mg/mL))	0					

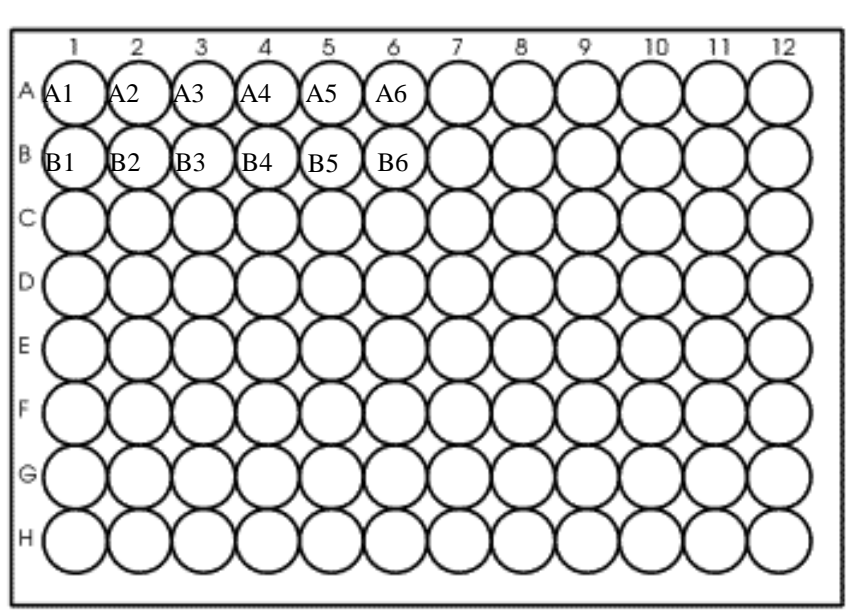


Figure 4

Answer the following questions:

다음 물음에 답하시오.

Q.2.1. (10 points) Calculate the concentrations of BSA in each sample (10 μ L) and fill in the blanks in the table on the answer sheet (Q.2.1.1. 5points). Use these values to plot a standard curve of BSA concentrations (X-axis) versus mean absorbance values of duplicated standards (Y-axis) on the answer sheet (Q.2.1.2. 5points).

각 시료(10 μ L)에 들어 있는 BSA 농도를 계산하고 답안지에 있는 표(Q.2.1.1. 5 점)의 빈칸을 채우시오. 이들 값을 이용해서 BSA 농도(X 축)에 대한 반복 실험한 BSA 흡광도의 평균값(Y 축)의 표준농도 곡선을 답안지 그래프용지(Q2.1.1.2, 5 점)에 그리시오.

Q.2.2. (12 points) Choose the best sample solution of diluted solutions X and Y within the range of BSA standard curve and fill in the table on the answer sheet.

BSA 표준농도 곡선의 범위 안에 들어가는 희석된 용액 X와 용액 Y를 선택하고, 시료와 물의 부피 및 흡광도를 답안지의 표에 적으시오.

Q.2.3. (8 points) Based on the best sample solution you chose, calculate the original concentrations (X and Y) of enzyme E from the standard curve of BSA concentration. The concentrations should be expressed in units of mg/mL. Write down your answers on the answer sheet.

앞의 문항에서 선택한 최적의 시료용액을 근거로, BSA 표준농도 곡선을 이용해서 효소 E가 들어있는 용액 X와 용액 Y의 원래 농도를 계산하시오. 농도는 mg/mL 단위로 표현한다. 답은 답안지에 작성한다.

Task III (35 points) 과제 3 (35 점)

Protein purification 단백질 정제

Introduction 서론:

Column chromatography is commonly used for purification of proteins. The column is made by packing solid porous material (stationary phase) in a column filled with buffer solution (mobile phase). The protein solution to be separated is loaded on top of the column and allowed to percolate into the solid matrix (stationary phase). A reservoir at the top supplies elution buffer constantly which flows through the matrix and passes out of the column at the bottom (the eluent). Since proteins interact with solid matrix in different degree, individual proteins migrate faster or more slowly through the column depending on their properties. Therefore, one can obtain purified proteins by collecting eluent at different times (**Figure 5**).

컬럼 크로마토그래피는 단백질 정제에 널리 사용된다. 이 컬럼은 완충용액(이동상, mobile phase)이 든 컬럼에 다공성 소재(정지상, stationary phase)를 채워 만든다. 분리하고자 하는 단백질 용액을 컬럼의 상단부에 넣은 다음 고체기질(정지상) 사이를 흘러내려 가도록 한다. 상단부에 있는 저장용기(reservoir)는 추출용 완충용액을 지속적으로 공급하여 완충용액이 정지상의 기질을 통과한 다음 컬럼의 하단부를 빠져 나가도록 한다(추출액). 단백질은 고체 기질과 서로 다른 정도로 상호작용하기 때문에, 각각의 단백질은 그들 고유한 특성에 따라 컬럼을 빠르게 혹은 더욱 느리게 통과한다. 따라서 서로 다른 시간에 추출되는 추출액을 받음으로써 정제된 단백질을 얻을 수 있다(그림 5).

Ion-exchange chromatography can be used to separate proteins with different electric charge at a given pH. In anion exchange chromatography, negatively charged proteins bind to positively charged stationary phase. Using solution containing anions to compete with proteins for the adsorption of solid matrix, the bound proteins will be eluted. In practical, proteins are eluted first with buffer containing lower concentration of anion, then with buffer containing higher concentration of anion. Since different charged proteins interact with the stationary phase in different strength, they can be separately eluted by different concentrations of anionic buffers.

이온교환 크로마토그래피는 주어진 pH 에서 서로 다른 전하량을 갖는 단백질을 분리하는 데 사용된다. 음이온교환 크로마토그래피에서 음전하를 띤 단백질은 양전하를 띤 정지상에 결합한다.

음이온이 포함된 용액을 이용해서 고체 기질에 흡착된 단백질과 경쟁하도록 하면, 결합된 단백질이 추출될 것이다. 실제로 단백질은 음이온 농도가 낮은 완충용액에 의해 추출된 다음, 점차 음이온 농도가 높은 완충용액에 의해 추출된다. 각기 달리 하전된 단백질은 정지상과 상호작용하는 힘이 서로 다르기 때문에 각 단백질은 서로 다른 음이온 농도의 완충용액에 의해서 분리되어 추출될 수 있다.

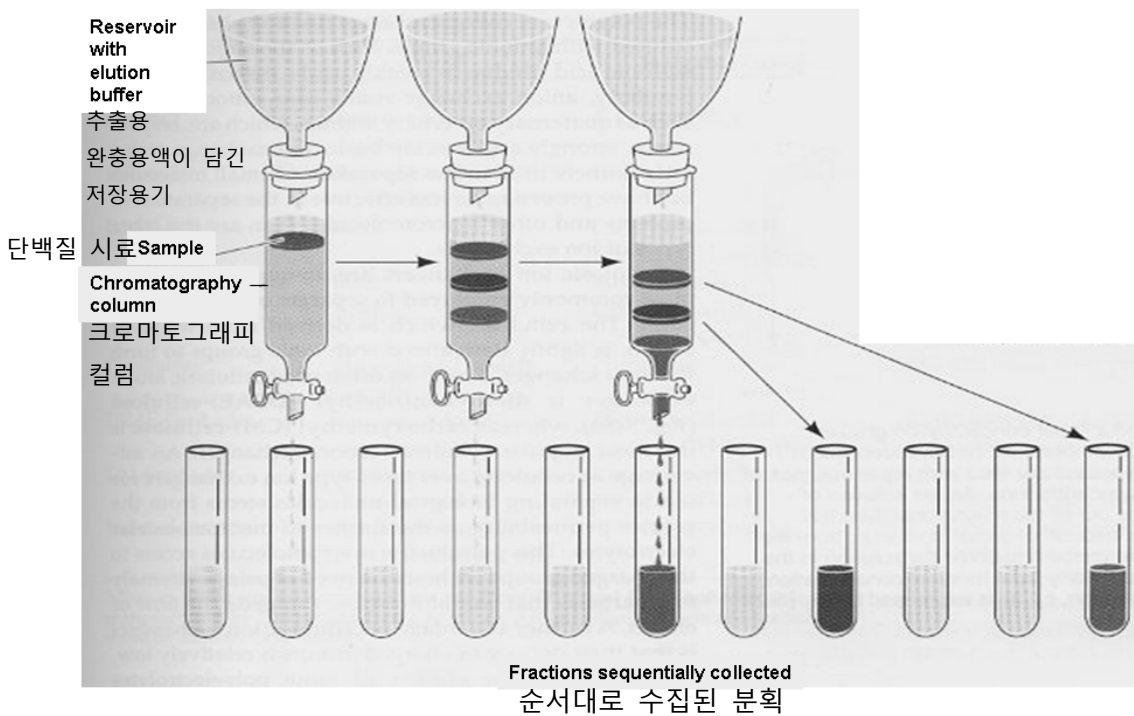


Figure 5

In the problem set, you will perform the following experiment (5 points):

이 문제를 풀기 위해 여러분은 다음과 같은 실험을 하게 됩니다(5 점).

1. Label six 15-mL centrifuge tubes (yellow cap) a1 to a3 and b1 to b3 accordingly, with a marker pen.

여섯 개의 15-mL 원심분리용 튜브(노란 뚜껑)에 마커펜으로 각각 a1~a3 및 b1~b3 라 표기한다.

2. Take the anion chromatography column (**Figure 6A**), un-plug the tube and allow the solution to be drained by gravity in the same centrifuge tube. Plug the tube intermediately when the liquid surface reaches the top of the disc (**Figure 6A**, white arrow). Do not over-dry the gel as it may affect protein purification.

음이온 교환수지 크로마토그래피 컬럼(그림 6A)을 가져와서 아래 쪽의 마개를 빼고, 중력에 의해 용액이 원심분리용 튜브 안으로 흘러내리게 한다. 용액의 수위가 디스크 위쪽에 도달하는 즉시(그림 6A, 흰색 화살표) 아래쪽 마개를 다시 막는다. 용액이 디스크 아래로 내려가 젤이 마르게 되면 단백질 분리에 영향을 줄 수 있으니 주의한다.

3. Withdraw 200 μ L of protein solution from microcentrifuge tube C (blue tube with blue label) using a P200 micropipette, apply the sample to the chromatography column slowly by touching the filled pipette tip lightly against the inside wall of the tube (**Figure 6B**).

P200 마이크로피펫으로 마이크로튜브 C(파란색 라벨의 파란색 튜브)에서 단백질 용액 200 μ L 를 덜어내서 시료가 들어 있는 마이크로피펫 팁끝을 컬럼의 안쪽 벽에 살짝 닿게 하여 조심스럽게 천천히 시료를 컬럼에 로딩한다(그림 6B).

4. Un-plug the column and allow the protein sample to drain out, then transfer the column to centrifuge tube a1 (yellow cap). Withdraw 3 mL of anion buffer A (green cap) with a plastic dropper and apply the solution to gel by touching pipette tip against the wall of the tube (**Figure 6C**).

컬럼의 아래 마개를 빼고 단백질 용액이 흘러나오게 한 다음, 컬럼을 원심분리용 튜브 a1(노란 뚜껑) 으로 옮긴다. 플라스틱 스포이트(dropper)로 음이온 완충용액 A(녹색 뚜껑) 3 mL 을 취한 다음 스포이트 끝을 컬럼 안쪽 벽에 닿게 하여 정지상 기질로 용액을 천천히 넣는다(그림 6C).

5. Collect ~1 mL eluent in centrifuge tubes a1 to a3 (yellow cap) sequentially. It takes about 2 to 3 minutes for each tube.

원심분리용 튜브 a1~a3(노란 뚜껑)에 순서대로 각각 대략 1 mL 의 추출액을 수집한다. 각 튜브에 2~3 분씩 추출액을 순서대로 받는다.

6. Allow the contents of the column to **drain entirely out** then transfer the column to centrifuge tube b1 (yellow cap). Withdraw 3 mL of anion buffer B (green cap) with a plastic dropper and apply the solution to gel by touching pipette tip against the wall of the tube (**Figure 6C**).

컬럼에서 용액이 완전히 빠져나올 때까지 기다린 후 컬럼을 원심분리용 튜브 b1(노란 뚜껑)로 옮긴다. 플라스틱 스포이트로 음이온 완충용액 B(녹색 뚜껑) 3 mL 을 덜어서 스포이트 끝을 컬럼 벽에 살짝 대고 정지상 기질 위로 용액을 천천히 넣는다(그림 6C).

7. Collect ~1 mL eluent in centrifuge tubes b1 to b3 (yellow cap) sequentially. It takes about 2 to 3 minutes for each tube.

원심분리용 튜브 b1~b3(노란색 뚜껑)에 순서대로 각각 ~1 mL 의 추출액을 수집한다. 각 튜브에 2~3 분씩 순서대로 추출액을 받는다.

8. Withdraw 50 μ L of eluent from tubes a1 to a3 & b1 to b3 (yellow cap) and transfer to centrifuge tubes A1 to A3 & B1 to B3 (red cap), respectively. Mix and observe color change. CBG (see introduction in Task II) reagent in tubes A1 to A3 & B1 to B3 will turn blue when it reacts with the eluted protein.

튜브 a1~a3 및 b1~b3(노란 뚜껑)에서 추출액을 50 μ L 씩 덜어 내어 원심분리용 튜브 A1~A3 및 B1~B3(붉은 뚜껑)으로 각각 옮긴다. 잘 섞어 준 다음 색 변화를 관찰한다. 튜브 A1~A3 및 B1~B3 에 들어있는 CBG(과제 2 의 서론 참조)가 추출된 단백질과 반응하면 푸른색으로 변할 것이다.

9. After finishing all the experiments, **Lift the sign**, lab assistants will take photo of your experiment results and put a stamp mark on your answer sheet. Without the stamp mark, you will not be evaluated for Q.3.1.1. and Q.3.1.2.

모든 실험을 마치고 나면, **표시판(sign)을 드시오.** 실험조교가 결과사진을 찍고 답안지에 도장을 찍어 줄 것이다. 도장이 찍혀있지 않으면 Q.3.1.1 과 Q.3.1.2 를 채점하지 않을 것이다.

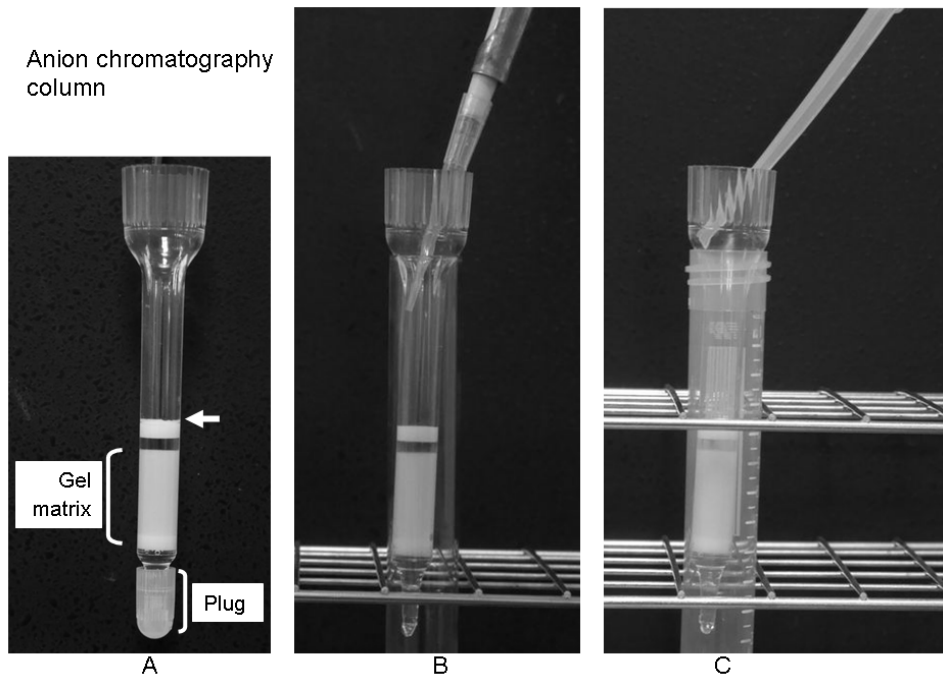


Figure 6

- Anion chromatography column : 음이온 크로마토그래피 컬럼
- Gel matrix : 젤 기질
- Plug : 마개

Q.3.1. (7 points) Mark the deepest color change (X) on the answer sheet (Q.3.1.1. 5 points).

Which of the following buffers (buffer A or buffer B) can be used to elute the protein? Mark your answer (X) on the answer sheet (Q.3.1.2. 2 points).

가장 진하게 색이 변한 튜브를 골라 답안지(Q.3.1.1. 5 점)에 X 표 하시오. 완충용액 A 또는 B 중에서 어느 용액을 이 단백질 분리에 사용할 수 있겠는가? 답안지(Q.3.1.2. 2 점)에 X 표를 하시오.

Q.3.2. (5 points) Enzyme A is a protein whose surface is evenly distributed with electric charges. If enzyme A can be eluted from anionic exchange chromatography by high concentration of anionic buffer, what is the property of enzyme A with respect to electric charge? Mark (X) the answer on the answer sheet.

효소 A 는 표면이 전체적으로 고르게 하전되어 있는 단백질이다. 효소 A 를 음이온 교환 크로마토그래피에서 음이온 농도가 높은 완충용액으로 추출할 수 있다면, 효소 A 는 어떤 방식으로 하전되어 있을까? 다음에서 골라 답안지에 X 표를 하시오.

- (A) High negative net charges 알짜 음전하가 높음
- (B) Low negative net charges 알짜 음전하가 낮음
- (C) Zero net charge 알짜 전하를 띠지 않음
- (D) Low positive net charges 알짜 양전하가 낮음
- (E) High positive net charges 알짜 양전하가 높음

Q.3.3. (4 points) Different amino acids differ in the chemical nature of the R group (side chain). **Figure 7** shows four amino acids A, B, C, and D in their prevailing ionic forms at pH 7.2, with the side chain marked in white box. Which of the following amino acids in **Figure 7** would be present more frequently on enzyme A? Write down your answer (X) on the answer sheet.

서로 다른 아미노산은 R 기능기(결사슬)의 화학적 특성이 서로 다르다. 그림 7 은 네 개의 서로 다른 아미노산 A, B, C, D 가 pH 7.2 에서 주로 나타내는 하전 상태를 보여주고 있으며, 흰색 박스 안은 결사슬을 나타낸다. 그림 7 의 아미노산 가운데 어느 것이 효소 A 에 더 많이 존재하겠는가? 답안지에 X 표기를 하시오.

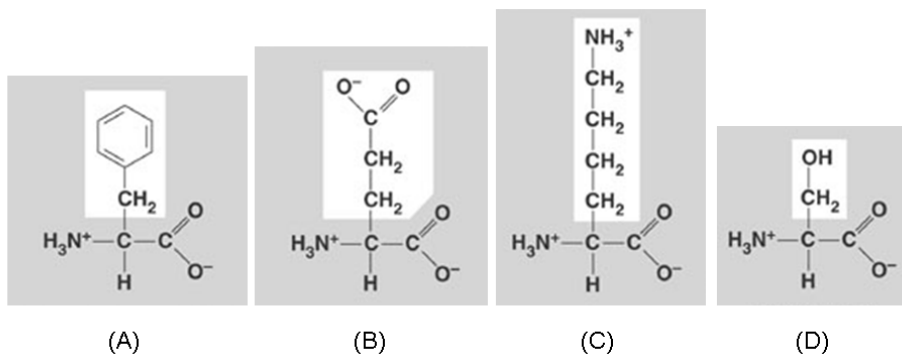


Figure 7

Q.3.4. (5 points) Hydrophobic interaction chromatography can be used to separate proteins based on their hydrophobicity. To perform the chromatography, protein samples were first treated with buffer containing high concentration of salts such as ammonium sulfate $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, which will remove water molecules from the protein surface. This causes the hydrophobic area on the surface of the protein to be exposed. When the salt-treated proteins are subjected for chromatography, they will be absorbed on the stationary phase through hydrophobic interactions. The higher the hydrophobicity of the protein, the stronger the absorption. As salt concentration can affect the hydrophobic interaction between the protein and the stationary phase, different proteins can be separately eluted by using different concentrations of salt-containing buffers. If enzyme A is highly hydrophobic, which of the following buffers should be used to separate enzyme A from other proteins by chromatography? Mark (X) the answer on the answer sheet.

소수성 상호작용 크로마토그래피를 이용하면 단백질을 소수성 정도에 따라 분리할 수 있다. 이 크로마토그래피로 단백질을 분리하기 위해서는, 단백질 시료를 먼저 황산암모늄 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 과 같은 염이 고농도로 포함된 완충용액으로 처리한다. 황산암모늄은 단백질 표면에서 물 분자를 제거하여 소수성 부위가 단백질 표면으로 노출되게 한다. 이렇게 염으로 처리한 단백질을 크로마토그래피로 분리하면, 단백질은 소수성 상호작용을 통해 정지상에 흡착될 것이다. 단백질의 소수성이 클수록 컬럼의 정지상에 더 강하게 흡착된다. 염의 농도가 단백질과 정지상 사이의 소수성 상호작용에 영향을 미치기 때문에, 서로 다른 단백질은 염의 농도가 서로 다른 완충용액에 의해 분리되어 추출될 수 있다. 만일 효소 A 가 강한 소수성을 가지고 있다면, 이 크로마토그래피를 이용하여 효소 A 를 다른 단백질로부터 분리하기 위해 어떤 완충용액을 써야 할까? 답안지에 X 표를 하시오.

- (A) Low-salt buffer 저염 완충용액
- (B) High-salt buffer 고염 완충용액
- (C) Buffer without salt 염이 포함되지 않은 완충용액
- (D) Low-salt buffer first then high-salt buffer 저염 완충용액을 먼저 쓰고 나중에 고염 완충용액 사용
- (E) High-salt buffer first then low-salt buffer 고염 완충용액을 먼저 쓰고 나중에 저염 완충용액 사용

Q.3.5. (4 points) If enzyme A is highly hydrophobic, which of the amino acids in **Figure 7** would be present more frequently on enzyme A? Mark (X) the answer on the answer sheet.

효소 A 가 강한 소수성이라면, **그림 7**의 아미노산 중 어떤 아미노산이 효소 X 에 가장 많이 존재할까? 답안지에 X 표를 하시오.

Q.3.6. (5 points) Gel filtration chromatography separates proteins based on their sizes. The gel, or stationary phase, consists of cross-linked polymer beads with engineered pores of a particular size. Small proteins enter the pores and are retarded by their more labyrinthine path. Large proteins cannot enter the pores and so take a short path through the column, around the beads. **Table 2** is a list of gels and their fractionation ranges. Suppose both enzyme A (22 kDa) and protein B (44 kDa) are single-subunit proteins. One would like to purify enzyme A from a mixture containing enzyme A and protein B using gel filtration chromatography. Which gel is best suited for the job? Mark your answer (X) on the answer sheet.

젤 여과 크로마토그래피는 단백질을 크기에 따라 분리한다. 정지상을 이루는 젤은 교차결합된 중합체 젤 구슬(bead)로 이루어져 있는데 이 젤 구슬은 특정한 크기의 좁은 통로를 안에 가지고 있다. 작은 단백질은 이 좁은 통로에 들어가기 때문에 오랫동안 젤에 머무르게 된다. 한편 분자량이 큰 단백질은 젤 안의 좁은 통로에 들어가지 않고 젤 구슬 바깥을 돌아가기 때문에 컬럼을 보다 빨리 통과한다. 표 2 는 젤의 종류와 각각의 분리 범위를 제시하고 있다. 효소 A(22KD)와 단백질 B(44KD)는 각기 단일체 단백질이라 가정하자. 효소 A 와 단백질 B 가 함께 들어 있는 혼합액으로부터 젤 여과 크로마토그래피를 이용해서 효소 A 를 분리하려 한다. 다음 중 어떤 정지상 기질인 젤을 사용하는 것이 가장 좋을까? 답안지에 X 표를 하시오.

Table 2

Types of stationary phase (정지상 기질의 종류)	Fractionation range (MW, Da) (분리 범위)
G-10	<700
G-15	<1500
G-25	1,000-6,000
G-50	1,500-30,000
G-75	3,000-70,000
G-100	4,000-150,000
G-150	5,000-400,000
G-200	5,000-800,000

Q.3.7. (5 points) Assume that the concentration of total proteins in the original solution is 1 mg/mL and the activity of enzyme A is 0.5 units in 1-mL protein sample. The concentration of total proteins after purification is 0.1 mg/mL and the activity of enzyme A is 1 unit in 1-mL protein sample. Calculate the purification factor (times of purity improvement) of enzyme A. Write down your answer on the answer sheet.

원래 용액(정제 이전)의 총 단백질 농도는 1 mg/mL 이고 효소 A의 활성은 1-mL 샘플 당 0.5 units 라고 가정하자. 단백질을 정제한 후 측정된 총 단백질 농도는 0.1 mg/mL 이고 효소 A의 활성은 1-mL 샘플 당 1 unit 포함되었다고 한다. 효소 A의 정제배율(순도가 개선된 배수)을 계산하시오. 답은 답안지에 쓰시오.