

Student Code: _____

22nd INTERNATIONAL BIOLOGY OLYMPIAD

July 10-17, 2011

Taipei, Taiwan



PRACTICAL TEST 4

(실험 4)

PLANT ANATOMY, PHYSIOLOGY, AND GENETICS

(식물 형태학, 생리학 및 유전학)

Total Points:100

총 점수: 100

Duration: 90 minutes

실험 시간: 90 분

Dear Participants, 수험생 주의 사항,

- In this test, you have been given the following 2 tasks:
Task I: Plant anatomy (**60 points**)
Task II: Plant physiology and genetics (**40 points**)
[이 실험은 2 개의 과제를 포함합니다.
- 과제 1 : 식물 형태학 (60점)
- 과제 2 : 식물 생리학 및 유전학 (40점)]
- Check your **Student Code** on the **Answer Sheet and Template paper** before starting the test.
[실험을 시작하기 전에 답안지와 Template paper(슬라이드를 올려 놓고 사진 찍는 종이)에 학생 코드(Student Code)를 확인하십시오.]
- Write down your results and answers in the **Answer Sheet**. **Answers written in the Question Paper will not be evaluated.**
(답안지에 결과와 답을 적으시오. 문제지에 적은 답은 인정하지 않습니다.)
- Make sure that you have received all the materials listed for each task. If any of the listed items is missing, **lift the sign**.
[각 과제에 나열된 모든 재료를 받았는지 확인하십시오. 만약 빠진 것이 있으면 “표시판(Sign)”을 들어 시험 감독관에게 알리시오]
- Ensure that you organize the sequence of your tasks efficiently.
[실험의 순서를 효율적으로 조절하기 바랍니다.]
- Stop answering **immediately** after the end bell rings.
[끝종이 울리면 답안 작성을 즉시 중단하기 바랍니다]
- After test, enclose the **Answer sheets, Question paper, Data printout**, and the **Template paper** without slide in the provided envelop. Our lab assistant will collect it promptly.
[실험을 마친 후 답안지, 문제지, Data 프린트지와 슬라이드를 제외한 Template paper(슬라이드를 올려 놓는 종이)를 주어진 봉투에 넣으십시오. 실험 조교가 수거할 것입니다]
- No paper or materials should be taken out of the laboratory.
[어떠한 종이나 재료라도 시험장 밖으로 가져 나가면 안됩니다.]

행운을 빕니다 Good Luck!!

Task I (60 points) – 과제 I (60 점)

Plant Anatomy (식물 형태학)

<u>Equipments: (기구)</u>	<u>Quantity</u>
1. Slides (in carrier box) (슬라이드글라스 - 박스에 들어 있음)	20
2. Cover slips (in carrier box) (커버글라스 - 박스에 들어 있음)	30
3. Compound microscope (with 4X, 10X, and 40X objective lenses) (광학 현미경: 4X, 10X, 및 40X 의 대물 렌즈)	1
4. Ocular micrometer (installed within the lens) (접안 마이크로미터 - 이미 렌즈 내에 장착되어 있음)	1
5. Single sided razor blade (in carrier box) (단면 면도날 - 박스에 들어 있음)	5
6. Petri dish (in carrier box) (페트리접시 - 박스에 들어 있음)	1
7. Forceps (in carrier box) (핀셋 - 박스에 들어 있음)	1
8. Marker pen (마커펜)	1
9. Kimwipes (휴지 or 티슈)	1
10. Paper towel (페이퍼 타올)	1
11. Waste basket (쓰레기 통)	1

<u>Materials (재료):</u>	<u>Quantity</u>
1. Double distilled water (labeled as “ddH ₂ O” in carrier box) (2 차 증류수, “ddH ₂ O”로 표시되어 있음)	20 mL/vial 20 mL/병
2. 1 N hydrochloric acid (HCl) (in carrier box) (1N 염산, HCl, - 용기에 들어 있음)	5-10 mL/vial 5-10 mL/병

- | | |
|---|----------------|
| 3. Transparent nail polish (in carrier box)
(투명한 매니큐어 - 용기에 들어 있음) | 1 vial |
| 4. Section slides X, Y, and Z of the root of plant K in slide box K
(슬라이드박스 K에 들어 있는 식물체 K의 뿌리 절편 슬라이드 X, Y 및 Z) | 1 slide each |
| 5. Four-compartment plastic petri dish
(Containing tissue samples from plants V, W, M, N, P, Q, R, S
in each compartment)
(4 개 구획으로 나뉘어진 플라스틱 페트리 접시)
(각 구획마다 식물체 V, W, M, N, P, Q, R, S의 조직 시료가 들어 있음) | 2 petri dishes |
| 6. Template paper (with student code) for placing the slides
. with sections you made and for documenting
[각자 만든 절편을 올려 놓고 기록용으로 사진 찍을 때 사용하는 Template
paper (학생 코드 스티커를 붙임)] | 1 sheet |

Part A: Structure of Plant Root (10 points total)

Part A: 식물 뿌리의 구조 (총 10 점)

Introduction : (서론)

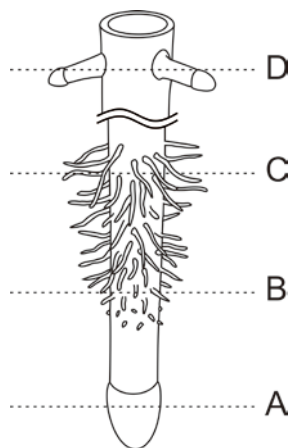


Figure 1. The structure of a typical plant root tip (그림 1. 식물의 전형적인 뿌리 정단의 구조)

There are three slides (X, Y, and Z) that are the transverse sections (located within the circular label on the slides) from different regions of the root of plant K. You need to determine whether plant K is monocot or dicot to answer questions later. Observe these sections under microscope and answer the following questions.

식물 K 뿌리의 서로 다른 부위를 (슬라이드 상에 원으로 표시된 안 쪽 부분에 위치한 부위) 횡으로 절단한 3 장의 슬라이드 X, Y 및 Z가 있다. 나중에 나오는 문제에 답할 수 있도록 식물 K가 쌍떡잎 식물인지 또는 외떡잎 식물인지를 조사하라. 이들 절편 슬라이드를 현미경으로 관찰하고 다음 물음에 답하라.

Q1.A.1. (2 point each, 6 points total) (각 2 점 총 6 점)

Section X, Y, and Z each corresponds to which part of the root depicted in Figure 1. Check [X] the correct answers on the answer sheet.

X, Y 및 Z 절단면은 각각 그림 1에서 표시된 부위의 어디에 해당하는가?
 답안지에서 옳은 답을 [X]로 표시하라.

Q.1.A.2. (single answer, 4 points) (정답이 하나임, 4 점)

What is the direction of maturation of primary xylem in the root (tissues mature earlier → tissues mature later)? Check [X] the correct answers on the answer sheet.

뿌리에서 1기물관부의 성숙 방향(초기에 성숙하는 조직 → 나중에 성숙하는 조직)은 어떻게 되는가? 답안지에서 옳은 답에 [X]로 표시하라.

Part B: Structure of Plant Stem (6 points total)

Part B : 식물 줄기의 구조 (총 6 점)

Introduction (서론):

Carefully prepare transverse sections of proper thickness from the stem segments of plants V and W and place them on separate slides. Add a drop of water onto the sections and cover with cover slips. Observe under the microscope, and answer the following questions. You need to determine whether plant V and W are monocot or dicot to answer questions later. When you finish this part, place your slides with the sections on the template paper. **Lift the sign and the lab assistant will mark with stamp in the boxes with slides.**

식물 V와 W의 줄기를 적절한 두께로 조심스럽게 횡절단(가로로 절단)하고 각기 다른 슬라이드에 올려 놓아라. 절편 위에 물 한 방울을 떨어뜨리고 커버슬라이드로 덮는다. 현미경으로 절편을 관찰한 후 다음의 물음에 답하라. 나중에 나오는 문제에 답할 수 있도록 식물 V와 W가 쌍떡잎식물인지 또는 외떡잎식물인지를 조사하라.

이 실험을 끝낸 다음 여러분이 만든 슬라이드를 Template paper(슬라이드를 올려 놓는 종이)에 올려 놓아라. 표지판을 올려 들어라. 실험 조교가 오면 슬라이드가 있는 칸에 스탬프를 찍어 줄 것이다.

Q.1.B. (3 points for each plant, points are given when all correct answers are selected; 6 points total)

Q.1.B. (각 식물 당 3 점, 모든 답이 맞아야 점수를 얻음. 합계 6 점)

What are the distribution patterns of vascular bundles in the stems of plant V and W? Check [X] the correct answers on the answer sheet.

식물 V와 W의 줄기에서 관다발의 분포 양상은 어떻게 되는가? 답안지에서 옳은 답에 [X]로 표시하라

Part C: Structure of Plant Leaf (14 points total)

Part C: 식물 잎의 구조 (총 14 점)

Introduction (서론) :

First determine the upper and lower epidermis of the leaves of plants M and N. Answer the following questions. You need to determine whether plant M and N are monocot or dicot to answer questions later. **Lift the sign and the lab assistant will mark with stamp in the boxes with slides.**

When you finish this part, place your slides with the sections on the template paper.

먼저 식물 M 과 N 잎의 위표피(upper epidermis)와 아래 표피(lower epidermis)를 조사하라. 아래의 물음에 답하라. 나중에 나오는 문제에 답할 수 있도록 식물 M 과 N 이 쌍떡잎 식물인지 또는 외떡잎 식물인지를 조사하라.

이 실험을 끝내면 절편이 포함된 슬라이드를 Template paper(슬라이드를 올려 놓는 종이)에 올려 놓아라. 표지판을 올려 들어라. 실험 조교가 오면 슬라이드가 있는 칸에 스탬프를 찍어 줄 것이다

Q.1.C.1 (8 points)

식물 M 의 기공 관찰 (Observation of stomata of plant M:

Prepare the upper and lower epidermis strips of the leaves, either by peeling them off with bare hands or by scraping off the undesired parts and leaving only the epidermis. Place these epidermal tissues on separate slides, with the epidermal side facing upward. Add a drop of water on each tissue sample and cover with cover slip. Observe under the microscope and use the ocular micrometer for measurements. One smallest unit of scale length of the micrometer is approximately 30 μm when observing under 4X objective lens. Answer the following questions in the answer sheet.

잎의 표피를 손으로 벗기거나 또는 표피만을 남겨 놓고 필요없는 부위를 면도날로 긁어 내어 잎의 위 표피와 아래 표피를 준비하라. 이 표피조직 각각을 표피면을 위로 향하게 하여 서로 다른 슬라이드 위에 올려 놓아라. 각 조직 시료에 물 한 방울을 떨어뜨리고 커버글라스를 덮어라. 현미경으로 관찰하고 길이 측정엔 접안 마이크로미터를 사용하라. 4 배(4X) 배율의 대물 렌즈로 관찰 할 때 접안 마이크로미터의 가장 작은 눈금의 한 단위는 약 30 μm (마이크로미터)이다. 다음의 질문을 답안지에 답하라.

(a) Measurement of stomatal size on upper epidermis:

- i) Under the 40X objective lens, what is the length of each smallest scale unit of the ocular micrometer? (1 point)
- ii) Measure the lengths of 3 guard cells, then average their lengths. (3 points)

(a) 위 표피 (upper epidermis)에 존재하는 기공의 크기 측정.

i) 40X의 대물 렌즈를 사용할 때 접안 마이크로미터의 가장 작은 눈금 하나의 길이는 얼마인가? (1점)

ii) 공변세포 3개의 길이를 측정한 후, 이들의 평균값을 구하라 (3 점)

(b) Measurement of stomatal density on lower epidermis:

i) Under 40X objective lens , what is the approximate area of the field of view ? (1 point)

ii) Observe 3 fields of view, and calculate the number of stomata in each. Then work out the average stomatal density. (3 points)

(b) 아래 표피(lower epidermis)에서 기공의 밀도 측정.

i) 40X의 대물 렌즈 아래에서 현미경 시야의 대략적인 면적은 얼마인가? (1점)

ii) 3 개의 서로 다른 현미경 시야를 관찰한 다음, 각각의 시야에서 볼 수 있는 기공의 수를 세어라.

그리고 기공의 평균 밀도를 계산하라 (3 점)

Q.1.C.2 (6 points, points are given when all correct answers are selected)

Q.1.C.2 (6 점. 모든 답이 맞아야 점수 획득)

Observation of leaf tissue of plant N:

Use the provided transparent nail polish to paint the upper and lower epidermis of leaves. When the nail polish has dried, carefully peel off the layers and place on separate slides, with the epidermal side facing upward. Add a drop of water on each sample, cover with cover slips. Use the appropriate objective lens to observe. Determine the stomatal distribution of the upper and lower epidermis, and deduce the habitat of plant N. Check [X] the correct answers on the answer sheet.

식물 N의 잎조직 관찰.

앞의 위 표피와 아래 표피를 투명한 매니큐어로 칠하라. 매니큐어가 마르면 조심스럽게 매니큐어를 바른 층을 벗겨 서로 다른 슬라이드 위에 표피면이 위로 향하도록 올려 놓아라. 물 한 방울을 떨어뜨리고 커버글라스를 덮고, 적절한 대물 렌즈로 관찰하라. 위 표피와 아래 표피의 기공 분포를 조사하고, 식물 N의 서식지를 추정하여라. 답안지에서 옳은 답에 [X]로 표시하라.

Part D: Monocot or Dicot of Plants (5 points)

Part D: 외떡잎식물과 쌍떡잎식물 (5 점)

Q.1.D (1 point each, 5 points total) (각 1 점, 총 5 점)

Determine whether plants K, V, W, M, and N are monocot or dicot. Check [X] the correct answers on the answer sheet.

식물 K, V, W, M 및 N 이 외떡잎 식물인지 쌍떡잎 식물인지 조사하여라. 답안지에서 옳은 답에 [X]로 표시하라.

Part E: Calcium Crystals in Plant Cells (20 points)

Part E: 식물 세포 내의 칼슘 결정(crystal) (20 점)

Introduction :

Some plants have idioblasts that can form polygonal calcium oxalate crystals or calcium carbonate crystals. Use the four plant materials (P, Q, R, S), carefully prepare transverse sections of appropriate thickness with a clean razor blade, and place the sections on separate slides. Add a drop of water on each section, and cover with cover slips. Observe under the microscope and check for the presence of crystals. If the crystals are present, locate the region of crystal distribution in the tissue (most crystals present in or absent from the cells of vascular bundles), carefully open the cover slip, remove the excess water around the sections, and add a few drops of HCl. Add cover slips again and observe the samples under the microscope and deduce the types of crystals that are present. When you finish this part, place your slides with sections on the template paper. Lift the sign and the lab assistant will mark with stamp in the boxes with slides.

일부 식물은 다면형의 옥살 산 칼슘 결정이나 탄산칼슘 결정을 형성할 수 있는 결정 세포 (idioblast) 를 가지고 있다. 4 종류의 식물 재료 (P, Q, R, S)를 사용하여 깨끗한 면도날로 적절한 두께로 조심스럽게 횡으로 절단하여 절편을 만들고 각각을 슬라이드 위에 올려 놓아라. 각 절편 위에 물을 한 방울 떨어뜨리고 커버글라스로 덮어라. 현미경으로 관찰하여 결정의 존재를 확인하라. 만약 결정이 존재하면 조직에서 결정이 분포하는 부위를 찾은 다음 (대부분의 결정은 관다발 세포에 존재하거나 또는 존재하지 않는다), 조심스럽게 커버글라스를 열고 절편에서 여분의 물을 제거한 후, 몇 방울의 염산(HCl)을 떨어뜨려라. 다시 커버글라스를 덮고 현미경으로 시료를 관찰하여 존재하는 결정의 유형을 추정하라. 이 part 를 마치면 절편이 포함된 슬라이드를 Template paper(슬라이드를 올려 놓는 종이)에 올려 놓아라. 표지판을 올려 들어라. 실험 조교가 오면 슬라이드가 있는 칸에 스탬프를 찍어 줄 것이다.

Q.1.E (6 points for each plant with the presence of crystals, points are given when all correct answers are selected ; 2 points for the plant with the absence of crystals; 20 points total)

(결정이 존재하는 식물에 대하여 각 6 점. 모든 답이 옳으면 점수 획득. 결정이 없는 식물은 2 점. 합계 20 점)

According to your observation, fill in the corresponding letters in the table in the answer sheet.

Plants: P, Q, R, S

Location of crystals: **A** (most crystals present in cells of vascular bundles)

B (crystals absent from the cells of vascular bundles)

Crystal type: **C** (polygonal calcium oxalate crystal)

D (calcium carbonate crystal)

여러분이 관찰한 바에 따라서 답안지의 표에 적절한 알파벳을 넣어라.

식물: P, Q, R, S

결정의 위치: **A** (대부분의 결정이 관다발 세포에 존재)

B (관다발 세포에 결정이 존재하지 않음)

결정의 유형: **C** (다면형 옥살산 칼슘 결정)

D (탄산칼슘 결정)

Documentation (10 points total)

증거사진을 위해 슬라이드를 종이에 올려 놓아 조교가 사진 찍음

(합계 10 점)

When you finish all the parts (A to E) of Task I, double check whether you have collected all the stamps for this Task. **lift the sign** and the lab assistant will check your template sheet (0.5 point for each slide present, 5 point total).

과제 I의 "Part A 에서 E' 까지 모든 실험을 마치고 본 실험 과제에서 받을 수 있는 모든 스탬프를 받았는지 한번 더 확인 한 다음 "표시판(Sign)"을 들어 올려라. 실험 조교가 Template paper 를 확인 할 것이다. (각 슬라이드 0.5 점, 총 5 점)

Task II (40 points) 과제 II (40 점)

Plant Physiology and Genetics (식물 생리학 및 유전학)

Shared Equipment (공용 장비)

ELISA reader (엘라이자 리더기 : 흡광도 측정기)

Equipments: (장비)

Quantity

1. Micropipettes P200 and P1000 (마이크로피펫 P200 및 P1000)	1 each
2. Micropipettes tips for P200 and P1000 (마이크로피펫 팁 P200 및 P1000)	1 each
3. 96-well microplate [96 개 웰(시료홈)이 있는 마이크로플레이트]	1
4. 1.5 mL microcentrifuge tubes (1.5 mL 마이크로 원심분리기 튜브) (for preparation of standard solutions, use those labeled 0 μ M, 25 μ M 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M) 0 μ M, 25 μ M 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M 로 표시된 튜브를 표준용액 제조에 사용하라.	12 (6 extra unlabeled) 12 개 - 6 개는 표시안된 여분
5. 80-well microcentrifuge tube rack / 4-way test tube rack (80 개 튜브 공간/4 방향 시험관 공간)	1 each
6. Vortex mixer (Vortex 믹서)	1
7. Marker pen (마커 펜)	1

Materials: (재료)

Quantity

1. Phosphate detection solution (labeled as “Solution A”) [인산 검출 용액 (Solution A 로 표시됨)]	10 mL/tube
2. 400 μ M KH_2PO_4 solution (labeled as “Solution B”) [400 μ M 인산칼륨 용액 (Solution B 로 표시됨)]	10 mL/tube
3. Double distilled water (labeled as “ddH ₂ O”) [2 차 증류수 (ddH ₂ O 로 표시됨)]	50 mL/vial
4. 6 samples to be tested (allotted in microcentrifuge tubes, labeled as sample #1, #2, #3, #4, #5, & #6)	

(검사할 시료 6 개. 모두 마이크로튜브에 나누어 담겨져 #1, #2, #3, #4, #5 및 #6 으로 표시되어 있음)

Introduction: (서론)

Phosphate is an important plant nutrient that constitutes substances such as cell membranes, nucleic acids, and energy compounds like ATP. When lacking phosphates, plants' growth and development can be dramatically affected. Plants can sense changes in phosphate concentration in the environment and accordingly regulate their gene expressions, changing the activity of phosphate transport proteins on the cell membranes to maintain the homeostasis of phosphate concentration within. Using the model plant *Arabidopsis*, scientists discovered that root cells respond to phosphate-sufficient (Pi-sufficient; e.g. 1mM) or phosphate-deficient (Pi-deficient; e.g. 10μM) condition as depicted below in Figures 2 and 3, respectively:

인산은 세포막, 핵산, 그리고 ATP 와 같은 에너지 화합물 등 여러 물질을 형성하는 중요한 식물 영양소이다. 인산이 결핍되면 식물의 성장과 발생에 심각한 영향을 받는다. 식물은 주변 환경의 인산 농도의 변화를 감지하여 유전자 발현을 조절하여 원형질 막에 존재하는 인산 수송 단백질의 활성을 변화시켜 세포 내 인산 농도의 항상성을 유지시킨다. 모델 식물인 애기장대(아라비도시스)를 이용하여 과학자들은 그림 2 와 3 에 도식화된 것과 같이 뿌리 세포가 충분한 인산 조건인지 (Pi-sufficient, 인산 충분: 예. 1mM) 또는 인산 결핍 조건(Pi-deficient, 인산 결핍: 예. 10μM)을 감지한다는 사실을 발견하였다.

Figure 2

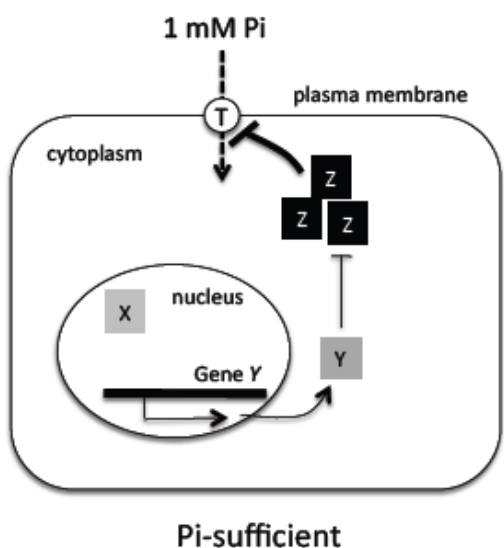
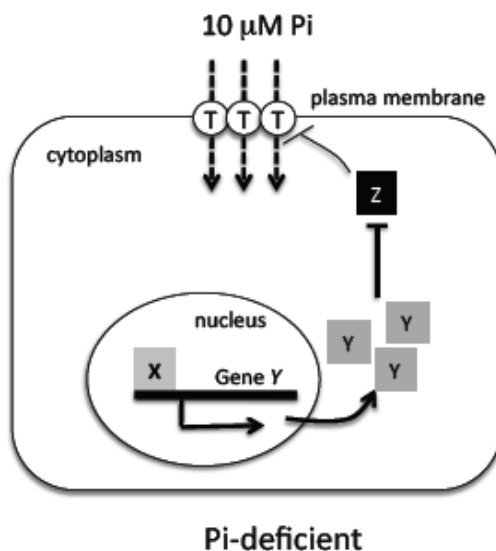


Figure 3



- ★ Plasma membrane : 원형질막; Cytoplasm : 세포질
- Nucleus : 핵;
- Gene Y : 유전자 Y
- Pi-sufficient : 인산 충분; Pi-deficient : 인산 결핍

When *Arabidopsis* is in Pi-sufficient condition (Figure 2), the protein Z negatively regulates the level of the protein T on plasma membrane, which is responsible for the transport of phosphate into the cell, to avoid excessive phosphate absorption that leads to toxicity. On the other hand, when plant is in Pi-deficient condition (Figure 3), the transcription factor X will enhance the expression of gene Y and thus increase the level of protein Y. Protein Y can promote the degradation of protein Z, leading to the increase of protein T level, and consequently a higher absorption of phosphate. In general, the phosphate level in the shoot of a plant is proportional to the uptake efficiency of phosphate in the root.

애기장대가 인산이 충분한 조건에 있을 때 (그림 2), 단백질 Z는, 인산을 세포 내로 흡수하는데 관여하는 원형질막 단백질 T의 양을 억제시켜, 과다한 인산 흡수로 인한 세포 내 독성이 생기는 것을 방지하게 한다. 반면, 식물이 인산 결핍 조건에 있을 때 (그림 3), 전사인자 X는 유전자 Y의 발현을 증가시켜 결과적으로 단백질 Y의 양을 증가시킨다. 단백질 Y는 단백질 Z의 분해를 촉진시켜 단백질 T의 양을 증가시키며, 그 결과 인산 흡수가 증대된다. 일반적으로 식물 지상부(shoot)에서의 인산의 양은 뿌리에서 인산 흡수 효율에 비례한다.

The phosphate level in plants will be considerably affected when the expression of genes encoding T, X, Y, and Z is perturbed by mutation or transgene. Therefore, plant biologists can utilize such mutant or transgenic plants to determine the role and relationship of these genes in the regulatory mechanism of phosphate homeostasis.

식물 내 인산의 양은 T, X, Y와 Z를 암호화하는 유전자의 발현이 돌연변이나 전이유전자에 의해 방해받을 때 심각하게 영향을 받는다. 그러므로 식물학자들은 인산 항상성의 조절 메커니즘에서 이들 유전자의 관련성과 기능을 결정하기 위해 이러한 돌연변이 식물체 또는 형질전환 식물체를 이용한다.

There are 6 samples in microcentrifuge tubes, which are extracts from the shoots of five *Arabidopsis* lines (A to E) grown under either Pi-sufficient (1 mM) or Pi-deficient (10 μ M) condition (as listed in Table 1). *Arabidopsis* A is wild type and B to E are either knockout (KO; null mutant with complete loss of function of the gene) mutant line or over-expression line corresponding to gene T, X, Y, or Z. You will be measuring the phosphate level in each sample and determine the identities of the samples based on the principle shown in Fig. 2 and 3. Each sample is derived from 20 seedlings of fresh weight shown in Table 1 and brought to final volume of 10 mL with ddH₂O.

인산이 충분한 조건(Pi-sufficient, 1mM) 또는 인산이 결핍된 조건(Pi-deficient, 10 μ M)에서 자란 5종의 애기장대(A 부터 E)의 지상부 (shoot)로 부터 추출한 추출액이 담겨진 시료 6 개가 마이크로튜브 안에 들어 있다(표 1에 목록이 있음). 애기장대 A는 야생형이고, B부터 E까지는 녹아웃(유전자 기능이 완전히 없어진 돌연변이 식물) 돌연변이 식물체이거나 또는 유전자 T, X, Y와 Z를 과다 발현시킨 식물체이다.

각 시료로부터 인산의 양을 측정하고 그림 2와 3에 근거하여 각 시료가 어떤 것인지를 결정할

것이다. 각 시료는 20 개의 어린식물체(seedlings)에서 추출하였으며, 이를 표 1 에 제시하였고 증류수로 최종 부피를 10mL 로 맞춘 것이다.

Table 1

Sample No. 시료 번호	Plant 식물	[Pi] in medium 생장배지 내 인산 농도	Fresh weight of seedlings (mg) 어린식물체의 생체 중량 (mg)
1	A	1 mM	40.4
2	A	10 μ M	17.3
3	B	1 mM	28.0
4	C	1 mM	39.2
5	D	1 mM	30.6
6	E	1 mM	33.8

Use the provided equipments and solutions to measure the phosphate concentration in each sample according to the experimental procedures.

제공된 기기와 용액을 사용하여 실험 방법에 따라 각 시료의 인산 농도를 측정하라.

Experimental Procedures: 실험 과정

1. Use the 400 μM KH_2PO_4 solution (Solution B), ddH₂O, and pre-labeled 1.5 mL microcentrifuge tubes to prepare the following concentrations of phosphate solutions for standard curve: 0, 25, 50, 100, 200, 400 μM . Use vortex mixer to mix solutions thoroughly. For each concentration, there should be at least 0.5 mL. Use the P200 micropipette with fresh tips to transfer 0.1 mL of each standard solution into the 96-well microplate at specified positions (as in Figure 4, make 2 replicates for each standard).

400 μM 인산칼륨(KH_2PO_4) 용액 (Solution B), 증류수(ddH₂O) 및 미리 표시된 (pre-labeled) 1.5 mL 마이크로 튜브를 사용하여 표준 곡선 (standard curve)을 측정하기 위한 다음 농도의 용액을 만들어라: 0, 25, 50, 100, 200, 400 μM . Vortex 교반기를 이용하여 용액을 완전히 섞는다. 각 농도 당 시료의 양은 최소 0.5 mL 이 되도록 한다. P200 마이크로피펫과 새 피펫 팁을 사용하여 각 표준 용액 0.1mL 을 96 개의 웰(시료 홈)을 가진 마이크로플레이트의 정해진 위치에 넣는다. [그림 4와 같이 각 표준 용액당 서로 다른 2 개의 웰(시료홈)에 각각 넣어 2 번 반복하도록 한다].

Figure 4. Positions of standards and samples in 96-well microplate

[그림 4. 96 웰(시료 홈) 마이크로플레이트에서 표준 용액과 시료 용액의 위치]

	Standards			Samples		Standards						
A			0	#1	#1		0					
B			25	#2	#2		25					
C			50	#3	#3		50					
D			100	#4	#4		100					
E			200	#5	#5		200					
F			400	#6	#6		400					
G												
H												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

2. Transfer 0.1 mL of each sample into the 96-well microplate at specified positions (as in Figure 4, make 2 replicates for each sample).
 (각 시료용액 0.1mL 을 96 웰 마이크로플레이트의 정해진 위치에 넣는다. (그림 4 와 같이 각 표준 용액당 서로 다른 2 개의 웰에 각각 넣어 2 번 반복하도록 한다).).
3. Add 0.1 mL of the phosphate detection solution (Solution A) into the wells that contain the standards and the samples. Mix by gently tapping the side of the plate.
 인산 검출 용액(Solution A) 0.1mL 을 표준 용액과 시료 용액이 담겨 있는 웰(시료홈)에 넣는다.

4. **Lift the sign** after you finish Step 3, and wait for lab assistants to guide and help you with measuring the absorbance of the reaction mixtures with ELISA reader at 820 nm.
위의 3 번 과정을 마친 후 “표지판(Sign)”을 들고 기다리면 실험 조교가 와서 820nm 에서 ELISA(엘라이자)리더기로 반응혼합액의 흡광도를 측정하는데 도와 줄 것이다.
5. The lab assistant will print out the data for you. **Put your student code on the print-out.**
실험 조교가 여러분의 data 를 프린트 해 줄 것이다. 프린트에 자신의 학생 코드(Student Code) 스티커를 붙여라.
6. Answer the following questions:
다음 질문에 답하라.

Q.2.1. (18 points total) (합계 18 점)

Calculate the mean values of the absorbance for each sample and standard. Use the graph paper on the answer sheet to plot a standard curve. **(0.5 point for each standard point correctly plotted)**

각 시료와 표준 용액의 흡광도 평균값을 계산하라. 답안지의 모눈 종이를 이용하여 표준곡선(standard curve)을 그려라. **(바르게 그려진 각 표준점은 0.5 점임)**

Determine the phosphate concentrations of the samples in μM and the nmol phosphate per mg of seedling fresh weight for sample # 1 to # 6. Fill in your results in the table of answer sheet. **(2 points for each phosphate concentration measured, 0.5 point for each nmol/mg of phosphate calculated)**

시료 # 1 에서부터 # 6 까지 각 시료의 인산 농도(μM)와 어린식물체의 생체량(mg) 당 인산량(nmol)을 결정하라. **(각 시료의 인산 농도를 측정하면 2 점, 각 시료의 생체량 당 인산량 (nmol/mg)을 결정하면 0.5 점)**

Q.2.2. (Multiple answers, 4 points. Points given when all correct answers are selected)

For each of the following statements, determine whether they are true or false explanations for those plants having higher phosphate content (nmol/mg) than the wild type. Check [X] the correct answers on the answer sheet.

Q.2.2. 복수 정답, 4 점, 모든 맞는 답에 점수를 줌

야생형보다 높은 인산 양(nmol/mg)을 가진 식물에 대한 다음의 진술이 옳은지 또는 그른지를 결정하라. 답안지에서 옳은 답을 [X]로 표시하시오

- (A) X cannot be activated in the plant, thus leading to an increase in phosphate uptake.
 - (B) Loss-of- function of Gene Y in the plant causing an increase in phosphate uptake.
 - (C) Loss-of-function of Gene Z in this plant causing an increase in phosphate uptake.
 - (D) The plant harbors a transgene that over-expressed gene Y, causing the loss of inhibition of protein T, leading to higher activity in phosphate uptake.
 - (E) Protein T of the plant has a defect, and it is unable transport phosphate efficiently.
 - (F) The transcription factor X of this plant has a mutation, and is incapable to bind the promoter of gene Y.
- (A) X는 이 식물체에서 활성화되지 못하므로 인산 흡수가 증가된다.
- (B) 이 식물체에서 유전자 Y의 기능 결손(Loss-of function) 은 인산 흡수 증가를 유발한다.
- (C) 이 식물체에서 유전자 Z의 기능 결손(Loss-of function) 은 인산 흡수 증가를 유발한다.
- (D) 이 식물체는 유전자 Y를 과다 발현 시킨 형질전환 유전자를 가지고 있어 단백질 T의 기능을 억제시키지 못해 인산 흡수의 활성을 높인다.
- (E) 이 식물체의 단백질 T는 결함이 있어 인산을 효과적으로 수송할 수 없다.
- (F) 이 식물체의 전사유전자X는 돌연변이를 가지고 있어 유전자 Y의 프로모터에 결합할 수 없다.

Q.2.3. (2.5 points each, 10 points total)

Q.2.3. (각 2.5 점, 합계 10 점)

According to the results from the experiment, assign the corresponding plant (B, C, D, or E) to the correct description on the answer sheet.

실험 결과에 근거하여 답안지에 언급한 것에 해당하는 식물 (B, C, D, 또는 E)을 고르시오.

Q.2.4. (Single answer, 4 points)

Q.2.4. (정답 하나임. 4 점)

If wild type plant (W), gene X knockout mutant (X), and gene Y knockout mutant (Y) were all grown in the same Pi-deficient condition, what would be the phosphate level in their shoots (rank from the lowest to highest)? Check [X] the correct answer on the answer sheet.

만약 야생형 식물 (W), 유전자 X 녹아웃(기능 상실) 돌연변이(X)와 유전자 Y 녹아웃(기능 상실) 돌연변이(Y) 모두를 인산이 결핍된 조건에서 기른다면 각 식물체의 지상부(shoot)의 인산 양은 어떻게 되겠는가? (낮은 것에서부터 높은 것 순서로 표시하여라). 답안지에서 옳은 답에 [X]로 표시하라.

- (A) $X < W < Y$
- (B) $Y < W < X$
- (C) $W < X < Y$
- (D) $W < Y < X$
- (E) $X < Y < W$
- (F) $Y < X < W$

Q.2.5. (Single answer, 4 points)

Q.2.5. (정답 하나임. 4 점)

Western blot is a technique to detect specific protein level with the use of antibody. Which of the following would be the most likely result of the Western blot analysis of protein Y and Z from the total protein extract of samples # 1 and # 2? Check [X] the correct answer on the answer sheet.

웨스턴 블롯 분석은 항체를 이용하여 특정한 단백질의 양을 결정하는 기법이다. 시료 #1 과 #2 의 단백질 추출물로부터 단백질 Y 와 Z 의 웨스턴 블롯 분석을 하였을 때 가장 바르게 나타날 것으로 예상되는 결과는 다음 중 어느 것인가? 답안지에서 옳은 답에 [X]로 표시하라.

