

Country: _____

Student Code: _____

23rd INTERNATIONAL BIOLOGY OLYMPIAD

8th – 15th July, 2012

SINGAPORE



PRACTICAL TEST 1

(실험 시험 1)

CELL & MOLECULAR BIOLOGY

(세포 및 분자 생물학)

Total points: 100 (총점 100 점)

Duration: 90 minutes (시간: 90 분)

Dear Participants (학생 여러분)

- In this test, you have been given the following task:
이 시험에서는 다음의 과제를 여러분에게 제공할 것입니다.
Task: Gene mapping by restriction endonuclease digestion of DNA fragments
Part A. Confirmation of insertion of human DNA in a cloning plasmid. (80 points)
Part B. Determination of orientation by which the fragment is inserted. (20 points)
과제: DNA 절편의 제한효소 절단에 의한 유전자 지도 작성
파트 A. 플라스미드 클로닝 벡터에 있는 사람 DNA의 삽입 확인
파트 B. 절편이 어떤 방향으로 삽입되었는지 방향 결정.
- Use the **Answer Sheet**, which is provided separately, to answer all the questions.
별도로 제공한 **답안지**를 이용해서 모든 문제에 답하십시오.
- The answers written in the Question Paper will **NOT** be evaluated.
문제지에 쓴 답은 **채점하지 않습니다**.
- Write your answers legibly in ink.
펜으로 읽기 쉽게 정자로 답을 쓰십시오.
- Please make sure that you have received all the materials and equipment listed for each task.
각 과제에서 목록으로 제시한 실험 재료와 기구가 실험대 위에 모두 놓여 있는지 확인하십시오.
- If any of these items are missing, please raise your hand **immediately**.
이 목록 중에서 어느 하나라도 없는 경우에는 **즉시** 손을 드십시오.
- Stop answering and put down your pen **IMMEDIATELY** when the bell rings.
종료를 알리는 종이 울리면 **즉시** 답하기를 멈추고 펜을 책상 위에 내려 놓으십시오.
- At the end of the test, place the Answer Sheet and Question paper in the envelope provided.
Our Assistants will collect the envelope from you.
시험이 끝난 후에 답안지와 문제지를 제공한 봉투 안에 넣으십시오. 조교가 봉투를 수거할 것입니다.

Have fun and Good Luck! 😊

행운을 빕니다!

Materials and equipment (재료 및 기구)

Materials and equipment (재료 및 기구)	Quantity (수량)	Unit (단위)
restriction endonuclease RE1 (<i>Nde</i> I) (kept on ice) (제한효소 RE1 (<i>Nde</i> I) (얼음에 보관되어 있음))	4 μ l	tube
restriction endonuclease RE2 (<i>Eco</i> RI) (kept on ice) (제한효소 RE2 (<i>Eco</i> RI) (얼음에 보관되어 있음))	4 μ l	tube
DNA test samples in enzyme buffer (labelled T) (on ice) (효소 완충액에 담겨 있는 DNA 실험 시료: T 로 표시된 튜브) (얼음에 보관)	10 μ l x 4	tube
miliQ water (labelled W) (증류수: W 로 표시된 튜브)	1	tube
DNA electrophoresis gel tank and power supply (DNA 전기영동 장치와 전압장치)	1	Set (세트)
micropipettes and tips in boxes (p10, p100) (마이크로 파이펫과 팁 (P10 과 P100))	2	piece
Stopwatch (스톱워치)	1	piece
DNA ladder (as internal size markers, L1 for 100 bp range and L2 for 1 kbp range) (on ice) (DNA 크기 마커 L1 은 100 bp 범위이고 L2 는 1kbp 범위임) (얼음에 보관)	2	tube
DNA loading dye (blue in colour) [DNA 지시염색액 (로딩 다이) – 튜브 안의 파란색 용액]	1	tube
pre-cast gel in holder (already placed in running buffer) (미리 만들어진 젤: 전기영동 완충액에 담겨져 있음)	1	piece
large petri dish (for placing the gel for imaging purposes)	1	piece

(큰 페트리 접시: 젤 사진을 찍기 위한 용도)		
card with your country code (in a clip holder): for signalling for assistance (국가 번호가 적힌 카드 – 클립 홀더에 있음; 조교의 도움이 필요할 때 사용)	1	piece
floating rack (labelled with your country code) (물에 띄울 수 있는 튜브 꽂이: 국가번호가 표시되어 있음)	1	piece
micro-centrifuge (마이크로 튜브용 원심분리기)	1	set
water-bath 37 °C (there is one assigned for your usage) (항온 수조 37 °C: 각자 사용할 수조는 지정되어 있음)	1	set
gel doc (there is one assigned for your usage) (젤 사진 장치: 각자 사용할 장치는 지정되어 있음)	1	set

Task (100 points)

실험 (100 점)

Gene mapping by restriction endonuclease digestion of DNA fragments (DNA 절편의 제한효소 절단에 의한 유전자 지도 작성)

Introduction

Genetic mapping is routinely used in analysing the order and the identities of DNA fragments. This technique is based on the unique profiles of DNA fragments generated after DNA digests with specific combination of restriction endonucleases (RE) and revealed by DNA gel electrophoresis. It is extremely powerful for gene cloning, studying gene function and regulation, for finding candidate genes for diseases and their diagnosis and also as a forensic tool.

서론

유전자 지도작성은 DNA 절편의 확인 및 순서를 분석하는데 흔히 사용된다. 이 기술은 DNA 를 특정 제한효소(RE)의 조합으로 절단한 다음 전기영동에 의해 나타나는 DNA 절편의 독특한 양상에 기초한다. 이 기술은 유전자 클로닝, 유전자 기능 및 조절 연구, 질병 유전자의 발견과 진단, 그리고 법의학에 사용되는 매우 강력한 기술이다.

Part A. Confirmation of insertion of human DNA in a cloning plasmid. (80 points)

플라스미드 클로닝 벡터에 있는 사람 DNA 의 삽입 확인 (80 점)

Using this technique, you are now tasked to confirm that a fragment of human DNA “X” (approximate size: 760 base pairs) has been inserted into a cloning plasmid or vector “V” (circular and approximate size: 2570 base pairs). You are required to design and carry out DNA digests by incubating DNA “T” with the restriction endonucleases (RE) by following the general protocol of incubation and electrophoresis given (details described below). After the gel electrophoresis, your results will be revealed by DNA staining (this will be performed by lab technicians), analysed and data interpreted.

이 기술을 사용하여 여러분은 클로닝 플라스미드 벡터 “V” (2570 bp 크기의 원형 벡터) 에 삽입되어 있는 사람 DNA “X” (약 760 bp 크기)를 확인하는 실험을 하게 된다. 여러분은 어떻게 제한효소(RE)로 DNA 절단하는지를 디자인한 다음, 제한효소(RE)로 DNA “T”를 절단하고 전기영동을 수행하게 된다. (자세한 사항은 아래에 기술되어 있음). 전기영동을 수행한 후 여러분이 실험한 결과는 DNA 염색에 의해 나타나고 (이것은 실험 조교에 의해 수행될 것이다), 분석되며 데이터가 해석될 것이다.

Protocol and Procedures

실험 과정

1. Design your DNA digests (you may do a maximum of 4 tubes) in a total volume of 20 μl by using the Table in **the Answer Sheet**.

제한효소를 이용한 DNA 절단 실험(최대 4 튜브)을 **답안지**에 있는 표를 이용하여 전체 부피가 20 μl 가 되도록 디자인 하시오.

Q1.1 (20 points) Record the desired amounts of reagents in your plan. One example is already given for Tube 2 in the table provided. All units are in μl .

여러분이 디자인한 실험에서 필요한 시료의 양을 기록하시오. 한 예가 답안지에 주어진 표의 튜브 2에 이미 주어졌다. 모든 단위는 μl 이다.

2. Prepare the mixtures by carefully pipetting the correct amount of the reagents and gently mix them by pipetting them up and down in each tube. Label the tubes. Do not contaminate one sample with another when preparing the mixture. Use a clean pipette tip for each operation. Note: use p10 micropipetter (white-coded) for pipetting reagents of less than 10 μl . [NOTE: there will be a penalty of 20 points if additional samples are requested. Please prepare the samples carefully.

적절한 양의 시료를 파이펫을 이용하여 조심스럽게 튜브에 넣은 다음, 파이펫을 이용하여 (pipetting up and down) 조심스럽게 섞어 혼합액을 준비하시오. 튜브를 표시하시오. 혼합액을 준비할 때 시료가 다른 시료와 섞이지 않도록 하시오. 매번 깨끗한 새 파이펫 팁을 사용하시오. 주의: 10 μl 보다 적은 양의 시료를 파이펫팅 할 경우 흰색으로 표시된 p10 파이펫을 사용하시오.

[만약 추가의 시료를 요구 할 때에는 20 점의 감점이 있을 것입니다. 조심스럽게 시료를 준비하기 바랍니다]

3. Spin down the mixture by placing all four tubes in the micro-centrifuge (please balance the spin by placing tubes opposite to each other). During preparation and after spinning, always keep the tubes on ice.

모두 4 개의 튜브를 마이크로 튜브 원심분리기에 넣고 혼합액을 간단히 스피ندا운 시킨다. (균형을 잡도록 튜브를 서로 마주 보도록 원심분리기에 놓는다). 시료를 준비할 동안 및 원심분리 이후에는 항상 튜브를 얼음에 보관하시오)

4. After all the tubes have been prepared, remove them from the ice and place them into the labelled floatation rack and incubate them for 20 minutes (stopwatch is provided) at 37 $^{\circ}\text{C}$ in the

water bath assigned to you. Make sure that you retrieve your own samples after the 20 minutes' incubation time.

모든 튜브가 준비된 다음에는 얼음에서 꺼내어 물에 뜨는 튜브 꽃이(라벨에 표시되어 있음)에 꽃아 각자에게 할당된 37 °C 항온수조에 20 분 간 둔다 (스톱워치 사용). 20 분 후에 여러분 자신의 시료인지 확인하고 꺼내도록 한다.

5. During this 20 minute incubation duration, answer the following questions **in the Answer Sheet:** 항온 수조에 20 분 두는 동안에 다음 문제를 **답안지**에 답하십시오.

Q1.2 (2 points × 5 = 10 points) Indicate true statement(s) with a tick (✓) and false statement(s) with a cross (✗).

다음 진술 중 옳은 것은 체크마크 (✓)로 표시하고 틀린 것은 x로 표시하십시오.

- Each RE cuts DNA at a specific sequence.
(각 제한효소는 DNA 를 특정 염기서열에서 절단한다)
- Each RE cuts DNA only at the 3' and 5'end..
(각 제한효소는 DNA 를 오직 3' 말단과 5' 말단에서만 절단한다)
- RE are most effective in digesting DNA at 4 °C.
(제한효소는 4 °C 에서 가장 효과적으로 DNA 를 절단한다)
- RE can be kept at room temperature for months.
(제한효소는 실온에 몇 달 동안 보관할 수 있다)
- Unlike exonucleases, RE only cut the DNA internally.
(DNA 말단 절단효소와 달리 제한효소는 오직 DNA 내부만 절단한다)

Q1.3 (2 points × 5 = 10 points) Which of the following principles is true of separating DNA by gel electrophoresis? Indicate true statement(s) with a tick (✓) and false statement(s) with a cross (✗).

젤 전기영동에 의한 DNA 분리에 관한 원리 중 옳은 것은? 옳은 것은 체크마크 (✓)로 표시하고 틀린 것은 x로 표시하십시오.

- DNA fragments are overall positively charged.
DNA 절편은 일반적으로 양전하를 띤다.
- The smaller DNA fragments move faster across the gel under the electric current.
보다 작은 DNA 절편일수록 전기장 하에서 젤 속을 보다 빠르게 이동한다.
- The smaller DNA fragments are lesser charged than the larger fragments hence they move faster across the gel.

보다 작은 DNA 절편일수록 보다 더 큰 DNA 절편에 비해 전하를 덜 띄기 때문에 젤 속에서 보다 빠르게 이동한다. .

- d. The relative density of the gel matrix affects how long the separation takes.
젤의 상대 밀도는 DNA 가 분리되는 시간에 영향을 미친다.
- e. The voltage applied to the electrophoresis is determined by how much DNA is loaded in the gel.

전기영동에 사용되는 전압은 얼마나 많은 양의 DNA 시료를 젤 시료함에 넣어야 하는지를 결정한다

- 6. When the 20 minutes of DNA digests duration is up, retrieve your own tubes from the water bath.

20 분의 DNA 절단에 끝나면 항온 수조에서 여러분 자신의 시료를 꺼내도록 한다.

- 7. Add 4 μ l of DNA loading-dye (blue colour). Mix them well by pipetting the mixture up and down and spin down any residual liquid using the micro-centrifuge.

푸른 색의 DNA 로딩다이 (지시염색액)를 4 μ l 넣는다. 파이펫으로 (pipetting up & down) 잘 섞은 다음 튜브 벽에 붙은 시료를 튜브 아래로 모으기 위해 원심분리기로 간단히 스피ندا운 시킨다.

- 8. Using the p100 micropipetter (yellow-coded), load 15 μ l of the sample mixture of DNA digests with the loading dye into the “wells” of the agarose gel provided. Make sure that you position the pipette tips carefully on top of the wells and gently deliver the mixture to the wells without spilling them. Load 15 μ l of each of the Markers, L1 and L2. Add your samples according to the following scheme of lanes, starting from the left end of the gel.

노란색으로 표시된 p100 마이크로파이펫을 사용하여, 절단된 DNA 시료와 시료염색액 (로딩다이)이 혼합된 시료 15 μ l 를 주어진 아가로오스 젤의 시료함 (well)에 넣는다. 파이펫 팁을 시료함에 잘 위치시켜 DNA 시료가 넘치지 않도록 시료함에 잘 넣는다. DNA 크기 마커 L1 과 L2 를 각 15 μ l 씩 넣는다. 여러분의 시료를 아래와 같은 순서에 따라 젤의 왼쪽 끝 시료함에서부터 시작하여 넣는다.

Marker L1 DNA 크기 마커 L1	Tube 1 튜브 1	Tube 2 튜브 2	Tube 3 튜브 3	Tube 4 튜브 4	Marker L2 DNA 크기 마커 L2
------------------------------	----------------	----------------	----------------	----------------	------------------------------

- 9. Cover a gel with a lid and connect the power supply to run at 100 volts for 20 min. Please be careful and do not touch any part of the electrodes and power supply.

전기영동 장치의 덮개를 덮고 전원을 연결시켜 100 볼트(v)에서 20 분간 전기영동한다. 전극과 전압장치에 손을 대지 않도록 주의한다.

10. Check regularly that the samples have entered the wells and are indeed running towards the positive electrode. If you need help from the technicians to ensure proper runs for the samples, please signal for assistance by clipping your signal card at the edge of right wall of your cubicle. 시료가 시료함에 잘 들어 가서 실제로 시료가 양극으로 이동하는지를 주기적으로 확인하십시오. 만약 시료가 적절히 이동하는지 확인하기 위해 조교의 도움이 필요하면 여러분 실험대 오른쪽 벽에 있는 카드(signal card)를 들어 조교를 부르도록 한다.
11. While waiting for the gel run, answer the following questions **in the Answer Sheet:** 전기영동을 하는 동안 다음 문제의 해답을 **답안지**에 적으시오.

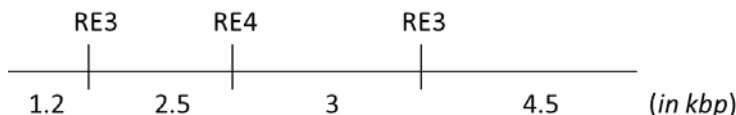
Q1.4 (20 points) Consider the following scenario: A piece of linear human DNA (1 kbp) was digested by a particular enzyme RE3, resulting in 2 fragments of 650 bp and 350 bp. The same piece of 1 kbp DNA was digested with another enzyme RE4, releasing 2 fragments of 800 bp and 200 bp. And when this 1 kbp DNA was digested with RE3 and RE4 together, 3 fragments of DNA were generated, 650 bp, 200 bp and 150 bp.

다음과 같은 상황을 생각해보자: 선형의 사람 DNA (1 kbp)를 특정 제한효소 (RE3)로 절단하여 650 bp 와 350 bp 두 종류의 절편을 얻었다. 동일한 사람 DNA (1 kbp)를 다른 제한효소 (RE4)로 절단하여 800 bp 와 200 bp 두 종류의 절편을 얻었다. 그리고 이 DNA 를 RE3 와 RE4 로 동시에 절단하여 650 bp, 200 bp 및 150 bp 의 세 가지 절편을 얻었다.

Sketch a linear map of this piece of DNA by indicating the position of RE3 and RE4 digests in the space provided. An example of such a sketch is provided below as a guide.

이 DNA 절편에 RE3와 RE4의 위치를 나타내는 선형의 제한지도를 작성하라.

아래는 제한지도를 작성하는 예를 나타낸 것이다.



12. When the 20 minutes of gel running time is up, turn off the power supply and remove the lid of the gel tank. Carefully remove the gel (still on the gel tray) and place it on the petri dish provided. Bring your gel to the gel doc that has been assigned for your usage and the technician will photograph it for you.

20 분간의 전기영동 시간이 끝나면 전압장치를 끄고 젤 탱크의 덮개를 벗기시오. 젤 트레이에 젤이 들어 있는 상태로 조심스럽게 젤을 꺼내어 제공된 페트리접시에 놓는다. 각자의 젤을 할당된 전기영동 사진 장치로 가져가도록 하시오. 실험 조교가 젤 사진 찍는 것을 도와줄 것입니다.

13. Bring your gel and the photograph back to your cubicle and use your signal card to get assistance for an invigilator to staple it in the space provided **on the Answer Sheet**. 여러분의 젤과 사진을 다시 실험대로 가져온 다음 카드를 들어 시험 감독관이 **답안지**에 사진을 스테이플러로 찍을 수 있도록 한다.

Q1.5 (10 points) Your skills in running a gel will be assessed by the quality of the gel produced.

전기영동하는 능력이 여러분의 젤 사진의 질로 평가될 것입니다.

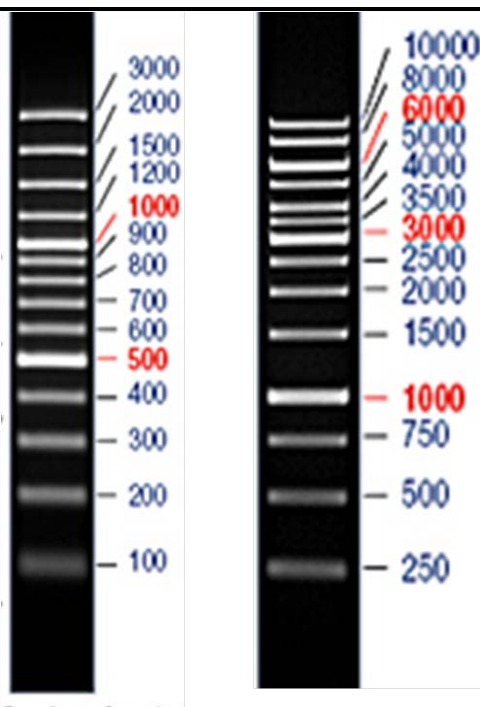
14. Based on the gel results, answer the following questions **in the Answer Sheet**: 젤 결과에 기초하여 다음 문제를 **답안지**에 답하십시오.

Q1.6 (1 point × 5 = 5 points) Using the DNA ladder markers (in basepairs) provided below as the reference, estimate the sizes of the fragments/bands. You may draw a line across the band of your query and the size marker to do the estimation. How many fragment(s) of DNA were generated by RE1 and RE2? And what is/are the estimated size(s)? Answer using numerals.

아래 주어진 DNA 크기 마커 (bp 로 주어진)를 이용하여 절편의 크기를 예측하십시오.

여러분이 알고자 하는 밴드를 해당하는 DNA 크기 마커에 줄을 그어 크기를 예측하면 된다. RE1 과 RE2 에 의해 몇 개의 DNA 절편이 생성되는가?

또 절편의 대략적인 크기는 어떻게 되는가? 숫자로 답하십시오.



L1: 100 bp DNA Ladder L2: 1 kb DNA Ladder
L1: 100 bp DNA 크기 마커 L2: 1 kb DNA 크기 마커

Q1.7 (1 point) What is the estimated size of the test DNA sample (T)? Answer using numerals.

실험한 DNA (T)의 대략적인 크기는 얼마인가? 숫자로 답하십시오.

Q1.8 (1 point) Based on your results, is the test DNA sample (T) larger, smaller or the same size as the empty vector? Indicate your answer with a tick (✓) in the correct box.

여러분이 얻은 결과에 기초하면, 실험 DNA 시료(T)는 빈 벡터 (벡터 자체 크기) 보다 크거나 혹은 작거나 아니면 같은가? 맞는 칸에 체크 마크(✓)로 답하십시오.

Q1.9 (1 point) Does the test DNA sample (T) contain any insert? Indicate yes with a tick (✓) and no with a cross (✗).

실험한 DNA 시료(T)는 삽입 DNA(insert)를 포함하고 있는가? 포함하면 체크마크 (✓)로 표시하고 그렇지 않으면 x로 표시하십시오.

Q1.10 (2 points) Uncut DNA appears to move faster than any of the samples digested with RE2. Why? Indicate your answer with a tick (✓) in the correct box.

절단되지 않은 DNA는 RE2로 절단된 어떤 시료보다도 더 빠르게 이동한다. 왜 그런가? 맞는 칸에 맞는 칸에 체크 마크(✓)로 답하십시오.

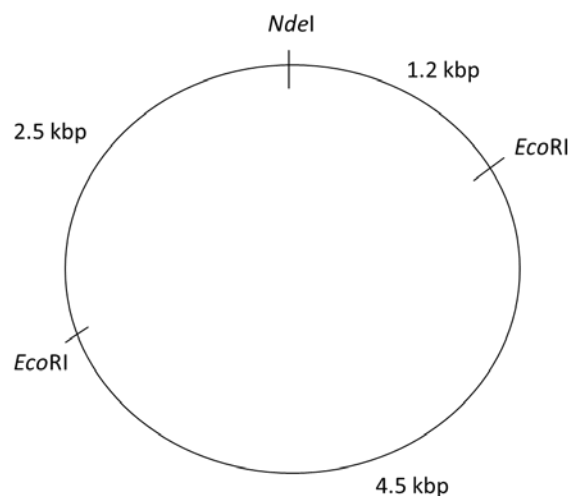
- a. The smaller fragment size of uncut DNA is due to DNA degradation.
절단되지 않은 DNA 의 작은 절편 크기는 DNA 분해 때문이다.
- b. The uncut DNA is more compact and therefore moves faster through the gel
절단되지 않은 DNA 는 보다 더 응축(compact)되어 있어 젤 속을 더 빠르게 이동한다
- c. RE2 still binds to the DNA and therefore slows down their movement through gel.
RE2 가 여전히 DNA 에 결합되어 있으므로 젤 속에서의 이동이 느려진다.

Part B. Determination of orientation by which fragment was inserted. (20 points)

절편이 어떤 방향으로 삽입되었는지 방향 결정. (20 점)

Q1.11 (20 points) Construct possible the restriction map(s) for the DNA "T" by indicating the relative position of RE1 and RE2 and the distance between them in the Answer Sheet. An example of such a map is provided below as a guide.

답안지 에 DNA "T"의 가능한 제한지도를 RE1 과 RE2 의 위치 및 이들 사이의 거리를 표시하여 작성하시오. 아래에 주어진 지도는 제한지도 작성에서 참고하기 위한 예이다.



END OF PAPER

끝