

Student Code:

# 24<sup>th</sup> International Biology Olympiad

14<sup>th</sup>-21<sup>st</sup> July, 2013

Bern, Switzerland



**BERN 2013** International Biology Olympiad

Practical Exam 1

실험시험 1

Molecular Cell Biology

분자세포생물학

Total points: **100**

총점 : **100**

Duration: **90 minutes**

시간 : **90 분**

Dear participants,

This test consists of two tasks: 이 실험은 두 과제로 구성되었음.

<b>Introduction [2 points] 서론</b>	<b>6</b>
<b>Task 1: Presence of the <math>\beta</math>-glucuronidase <math>\beta</math>-glucuronidase 의 검출 [12 points]</b>	<b>8</b>
Part 1.1: Determine the presence of the $\beta$ -glucuronidase [12 points]	
$\beta$ -glucuronidase 의 존재여부 조사	8
<b>Task 2: Presence of the procyclin protein 프로사이클린 단백질의 검출 [86 points]</b>	<b>9</b>
Part 2.1: How to use the counting chamber [1 point]	
세포계수기(counting chamber)의 사용법	9
Part 2.2: Washing the magnetic beads. 마그네틱 비드의 세척	10
Part 2.3: Density of trypanosomes not binding to magnetic beads [37.5 points]	
마그네틱 비드에 달라붙지 않은 트리파노조마의 밀도 계산	11
Part 2.4: Total trypanosome density [25.5 points]	
전체 트리파노조마의 개체 밀도	12
Part 2.5: Success of the deletion of the procyclin gene [9 points]	
프로사이클린 유전자의 성공적인 제거 확인	13
Part 2.6: Verification of binding to beads [9 points] 마그네틱 비드 부착의 확인	16
Part 2.7: Interpretation of your results [4 points] 결과 해석	17

Please write your student code into the box on the title page.

당신의 학생번호 (student code)를 표지에 있는 빈 칸 속에 써 넣으시오.

There is no separate answer sheet. Please fill in your answers into the specific answers boxes indicated with a gray background. **Only answers given inside these boxes will be evaluated.**

별도로 주어지는 답지는 없음. 모든 답을 회색으로 칠해진 빈 칸 속에 직접 써 넣으시오. 오직 이 빈 칸 안에 적힌 답만 채점됨.

The answers have to be given either with a tick (✓) or with Arabic numbers. The numbers "1" and "7" can look very similar in handwriting. To make sure that those two numbers can be well distinguished by the IBO staff, please write them as you normally would into the following box.

해답은 tick (✓) 또는 아라비아숫자로 표시합니다. 숫자 "1"과 "7"은 모양이 비슷해서 혼동 될 수 있으니 채점자가 판단기준으로 사용 할 수 있도록 당신이 평소에 이 숫자들을 적는 방식을 아래 상자 안에 써 넣으시오.

	1 = <input type="text"/>	7 = <input type="text"/>	
------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------	--------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------

Stop answering and **put down your pen IMMEDIATELY** when the bell rings at the end of the exam. Put the entire protocol with all the answers back into the exam envelope.

벨이 울리면 즉시 펜을 내려놓고 답안 작성을 중지합니다.

그리고 모든 시험지와 답지를 주어진 봉투 안에 넣습니다.

## Material and equipment 시약 및 기구

Make sure that you have received all the materials and equipment listed for each task. If any of these items are missing, please raise your hand.

아래 적힌 시약과 기구를 모두 빠짐없이 받았는지 확인하십시오. 만약 빠진 것이 있으면 손을 드시오.

### Equipment 기구

- |                                                 |                           |
|-------------------------------------------------|---------------------------|
| • Water bath at 37°C (used in common)           | 37 도에 맞춰진 수조 (공동 사용)      |
| • 1 Micropipette P1000                          | p1000 마이크로파이펫 1 개         |
| • 1 Micropipette P200                           | p200 마이크로파이펫 1 개          |
| • 1 Micropipette P20                            | p20 마이크로 파이펫 1 개          |
| • 1 Box of pipette tips for P1000               | p1000 파이펫팁 1 상자           |
| • 1 Box of pipette tips for P200 and P20        | p200 및 p20 용 파이펫팁 1 상자    |
| • 1 Eppendorf holder                            | 에펜도르프 튜브 홀더 1 개           |
| • 1 Tube holder                                 | 시험관 홀더 1 개                |
| • 1 Solid waste container                       | 고체용 쓰레기통 1 개              |
| • 1 Liquid waste tube [LW]                      | 액체시약 버리는 용기 1 개 [LW]      |
| • 1 Polystyrene (styrofoam) box filled with ice | 얼음이 채워진 스티로폼 상자 1 개       |
| • 1 Timer                                       | 타이머 1 개                   |
| • 1 Marker                                      | 마커펜 1 개                   |
| • 1 Microscope                                  | 현미경 1 대                   |
| • 3 Cell counting chambers                      | 세포계수기 3 개                 |
| • 3 Microscope slides                           | 현미경 슬라이드글라스 3 개           |
| • 3 Cover slips                                 | 커버슬립 3 개                  |
| • 21 Eppendorf tubes                            | 에펜도르프 튜브 21 개             |
| • 1 Magnetic Eppendorf holder                   | 투명 아크릴로 된 마그네틱 에펜도르프튜브 홀더 |
| • Blank paper                                   | 빈 종이                      |
| • 1 Flag to call an assistant                   | 조교호출용깃발 1 개               |
| • 1 Yellow sheet labeled with your student code | 학생번호가 적힌 노란 종이 1 장        |

### Chemicals 시약

- 1 Eppendorf tube with magnetic beads [MB]  
마그네틱 비드가 들어있는 에펜도르프튜브 1 개 [MB]
- 1 Tube with phosphate buffer [PBSB]  
인산완충용액(phosphate buffer)이 들어있는 시험관 1 개 [PBSB]
- 1 Eppendorf tube with Fixation Buffer [FB]  
고정액(Fixation buffer)이 들어있는 에펜도르프 튜브 1 개 [FB]
- 1 Eppendorf tube with Substrate Buffer [SB]  
기질완충용액(substrate buffer)이 들어있는 에펜도르프 튜브 1 개 [SB]
- 1 Eppendorf tube with Substrate(X-gluc) [S]  
기질 (X-gluc)이 들어있는 에펜도르프튜브 1 개 [S]

**Trypanosome suspensions 트리파노조마 현탁액**

- 1 Eppendorf tube with suspension of Strain 1 **[T1]**  
트리파노조마 strain 1 의 현탁액이 들어있는 에펜도르프 튜브 1 개 **[T1]**
- 1 Eppendorf tube with suspension of Strain 2 **[T2]**  
트리파노조마 strain 2 의 현탁액이 들어있는 에펜도르프 튜브 1 개 **[T2]**
- 1 Eppendorf tube with suspension of Strain 3 **[T3]**  
트리파노조마 strain 3 의 현탁액이 들어있는 에펜도르프 튜브 1 개 **[T3]**

## Introduction [2 points] 서론

*Trypanosoma brucei* is a parasite causing sleeping sickness in humans and nagana in animals. It is transmitted between individuals via the tsetse-fly and is almost exclusively found in Africa south of the Sahara. To better understand the function of different proteins implicated in the life cycle and infection pathway of *T. brucei*, it is the goal to create mutant strains that lack procyclin, but express another protein of interest instead. Procyclin is a surface protein found in *T. brucei* but not in other trypanosome species and is hypothesized to have an effect on the infection pathway. Different trypanosome species rely on different surface proteins for their infectivity. For example, *T. congolense* relies on a surface protein called GARP.

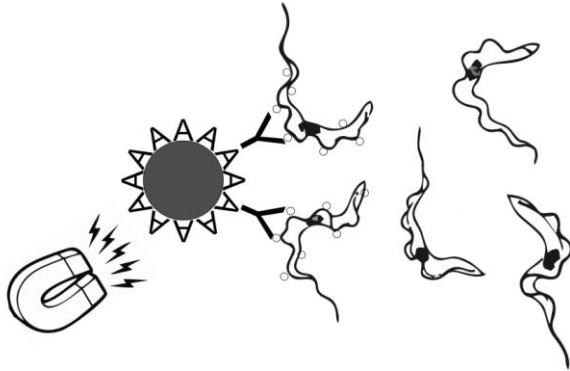
트리파노조마 브루세이(*Trypanosoma brucei*)는 사람의 수면병과 동물의 나가나병을 유발하는 기생충이다. 체체파리에 의하여 전염되며 대부분 사하라 이남 아프리카지역에서만 발생한다. 트리파노조마의 생활사와 감염경로를 좀더 잘 이해하기 위하여 프로사이클린이라는 단백질 유전자가 제거되고 대신 다른 표지유전자를 발현하는 돌연변이종 트리파노조마를 제작하려고 한다. 프로사이클린은 *T. brucei* 에서만 발현되고 다른 종류의 트리파노조마에서는 발현되지 않는 세포 표면단백질로, 감염 경로에 영향을 미친다고 알려져 있다. 각기 다른 종류의 트리파노조마들은 서로 다른 단백질을 발현하여 감염을 유발한다, 예를 들어 *T. congolense* 의 감염에는 GARP 라고 불리는 표면 단백질이 필요하다.

In this practical you will work with strains of the subspecies *T. brucei brucei*, which can infect domestic and wild animals, but is not dangerous for humans. In a first step, cells were transfected or not with a single construct coding for both GARP and  $\beta$ -glucuronidase and grown as pure strains.  $\beta$ -glucuronidase, which is absent in wild-type *T. brucei*, is a protein that can cleave X-gluc, an artificial substrate, into a blue product that can easily be observed by eye. In this setting,  $\beta$ -glucuronidase serves as a convenient reporter gene that will allow you to recognize the strains carrying a successfully introduced construct by simply incubating the strains with X-gluc (Task 1).

이 실험에서는 *T. brucei* 의 한 아종인 *T. brucei brucei* 를 사용하게 된다. 이 아종은 가축과 야생동물에 감염되지만 사람에게에는 해가 없다. 실험 첫 단계에서는 GARP 와  $\beta$ -glucuronidase 두 외래 유전자가 도입된 형질전환 트리파노조마와 이 유전자들을 도입하지 않은 대조군을 순수배양하였다.  $\beta$ -glucuronidase 는 야생종 트리파노조마에는 없는 유전자로, X-gluc 라는 기질을 분해하여 눈에 잘 보이는 푸른색 화합물로 전환시켜주는 효소이다. 이 실험에서  $\beta$ -glucuronidase 는 트리파노조마를 X-gluc 와 반응시켜 푸른색이 나타나는지 여부를 조사함으로써 외래유전자가 성공적으로 도입되었는지 여부를 편리하게 검사 할 수 있는 표지유전자의 역할을 한다 (과제 1).

The strains were then subjected to a protocol to delete the gene coding for the protein procyclin. This would allow verifying whether procyclin is indeed important for the infectivity cycle and whether GARP can compensate for the procyclin function. Since the deletion efficiency is not 100%, you will separate the cells where the procyclin gene was successfully deleted from the ones in which the deletion did not work. To achieve this, trypanosomes pre-incubated with antibodies specific against procyclin will be separated with magnetic beads coated with protein A that specifically binds to the Fc part of antibodies, as is illustrated below.

다음 단계에서는 트리파노조마의 프로사이클린 유전자를 제거하기 위한 과정들을 수행하였다. 이 실험은 프로사이클린이 실제로 감염에 필수적으로 요구되는지 여부와 GARP 가 이를 대신 할 수 있는지 여부를 조사하기 위한 것이다. 유전자를 제거하는 작업이 100% 일어나는 것은 아니므로, 프로사이클린 유전자가 제거된 트리파노조마와 그렇지 않은 트리파노조마를 분리해야 한다. 이 작업을 수행하기 위하여 아래 그림과 같이 프로사이클린 단백질에 특이적으로 달라붙는 항체와 반응시킨 트리파노조마를 항체의 Fc 부위에 달라붙는 특성을 가진 '단백질 A (protein A)'로 코팅된 마그네틱 비드를 사용하여 분리한다.



Before starting the practical work, indicate for each of the following statements if it is true or false with a tick (✓). [2 points]

실험을 시작하기 전에 아래 주어진 문장들이 참(true)인지 거짓(false)인지를 해당 칸에 tick (✓)으로 표시하십시오 [2 점]..



Q1

	true	false
<p>If the suspension of a strain incubated with X-gluc turns blue, the <math>\beta</math>-glucuronidase gene was successfully introduced.</p> <p>X-gluc 와 반응시킨 트리파노조마의 현탁액이 푸른색으로 변했다면 이는 <math>\beta</math>-glucuronidase 유전자가 성공적으로 도입되었음을 의미한다.</p>		
<p>Inferring the successful introduction of the GARP gene based on the presence of the reporter gene (<math>\beta</math>-glucuronidase) may result in false positives or negatives if only one gene of the construct was successfully inserted.</p> <p>만일 표지유전자 (즉 <math>\beta</math>-glucuronidase)의 존재여부만을 토대로 GARP 유전자의 도입여부를 판단한다면 두 유전자 중 하나만 도입된 가짜 양성 (false positive) 또는 가짜 음성(false negative)을 틀리게 판정할 수도 있다.</p>		
<p>The location in the genome where the construct is introduced affects the level of gene expression of the introduced genes.</p> <p>유전체 내 삽입 위치에 따라 삽입된 유전자의 발현 정도가 달라진다.</p>		
<p>A similar approach with magnetic beads and specific antibodies can be used to separate cells, with successful deletion of a gene coding for an intracellular protein, from cells where the deletion did not work.</p> <p>이 실험과 유사한 방법으로 마그네틱비드와 특정 단백질을 인지하는 항체를 이용해서 세포 내부 단백질의 유전자가 제거된 세포와 제거되지 않은 세포를 분리 할 수 있다.</p>		



**Task 1: Presence of  $\beta$ -glucuronidase [12 points]****과제 1:  $\beta$ -glucuronidase 의 검출****Part 1.1: Determine the presence of  $\beta$ -glucuronidase [12 points]** **$\beta$ -glucuronidase 의 존재여부 조사**

Prepare the following reaction mix for each of the three trypanosome strains T1, T2 and T3 in a separate Eppendorf tube and mix by pipetting up and down:

T1, T2 그리고 T3 세 종류의 트리파노조마 각각에 대하여 따로 에펜도르프 튜브에 아래 순서대로 반응용액을 만들어 넣고 파이펫으로 업앤다운하여 잘 섞는다.

1. 20  $\mu$ l of the trypanosome suspension. Since the trypanosomes sink to the bottom of the tube, make sure to mix the tubes by inverting prior to pipetting.  
트리파노조마 현탁액 20  $\mu$ l. 트리파노조마가 바닥에 가라앉아있으므로 시험관을 잘 흔들고 파이펫으로 업앤다운하여 잘 섞은 뒤 채취한다.
2. 100  $\mu$ l substrate buffer (SB)  
기질 완충용액 (SB) 100  $\mu$ l
3. 10  $\mu$ l substrate (S)  
기질(S) 10  $\mu$ l

Label each tube with the strain you used as well as with your three letter country code (as indicated on your badge).

각 튜브마다 그 안에 들어있는 트리파노조마의 종류와 3 자리로 된 참가자의 국가번호 (country code, 이름표에 적혀있음)를 써넣는다.

The reaction mixes must be incubated for at least 1 hour at 37°C. Place your flag into the tube on your partition wall to call an assistant who will put your tubes in a water bath. Also, use your flag to indicate to the assistant that you want to get your tubes back from the water bath.

반응 용액은 37°C 에서 적어도 한 시간 동안 반응시켜야 한다. 반응용액이 완성되면 타이머를 작동시킨 뒤 국기를 실험대 왼쪽 벽에 부착된 홀더에 꽂아놓으면 조교가 와서 튜브를 수조로 옮겨줄 것이다. 또한 수조에서 튜브를 꺼낼 시간이 되었을 때도 깃발을 사용하여 조교를 호출한다. 한 시간 기다리는 동안 다른 과제를 수행한다.

Put your tubes on the yellow sheet with your student code in the corresponding box, they will be photographed and evaluated. 학생번호가 적힌 노란색 종이 위에 수조에서 꺼내온 튜브를 올려놓는다. 이 튜브들은 조교가 나중에 사진을 찍어 채점에 사용할 것이다.

Indicate with a tick (✓) for each of the three strains if the sample turned blue or remained clear after incubation. [12 points]

3 종류의 트리파노조마가 반응 후 색깔이 변했는지 여부를 tick (✓)으로 표시하십시오 [12 점].



Q2

	Strain T1	Strain T2	Strain T3
Blue 푸른색			
Colorless 무색			





## Task 2: Presence of the procyclin protein [86 points]

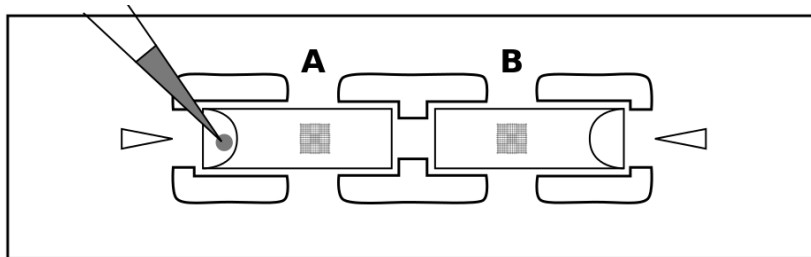
### 과제 2: 프로사이클린 단백질의 검출

#### Part 2.1: How to use the counting chamber [1 point]

##### 세포계수기(counting chamber)의 사용법

You will use counting chambers to determine the density of trypanosomes in Part 2.3 and Part 2.4. Two counting chambers that can be individually filled are organized on a single slide. **Please be aware that these chambers cannot be cleaned and that no extra counting chambers will be provided. Also, these counting chambers do not need a cover slip.**

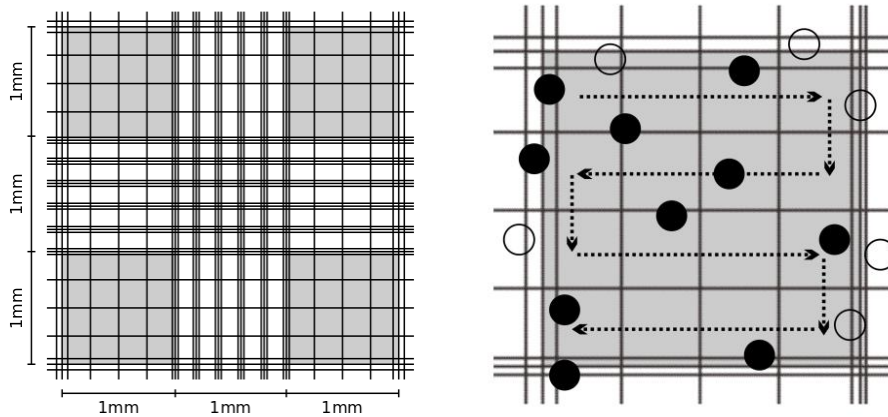
Part 2.3 와 2.4 에서는 세포계수기를 이용하여 트리파노조마의 숫자를 계산하게 될 것이다. 각기 따로 시료를 넣을 수 있는 두 개의 세포계수기가 하나의 슬라이드로 연결 되어 있다. 이 세포계수기는 씻어서 다시 사용 할 수 없으며 여분의 계수기가 제공되지 않는다는 것을 명심해야 하지만 필요하면 사용하지 않은 다른 쪽 챔버를 써도 된다. 또한 이 세포계수기는 커버슬립이 필요 없다.



The following steps should be performed when determining the density of trypanosomes in a suspension:

현탁액 속 트리파노조마의 밀도 측정은 다음과 같은 순서대로 시행한다.

1. Pipette 10  $\mu$ l of the suspension into a counting chamber.  
현탁액 10  $\mu$ l 를 계수기 챔버 두 개중 하나에 넣는다.
2. Wait at least 2 minutes for the cells to sink to the bottom.  
적어도 2 분간 기다리면서 세포들이 정착할 시간을 준다.
3. Put the slide under the microscope and count the number of trypanosomes individually in three of the four larger squares highlighted in gray.  
세포계수기를 현미경에 장착하고 그림에 회색으로 표시된 정사각형 4 개중 3 개에 들어있는 트리파노조마 숫자를 센다.



You may use either the 10x or the 40x objective, whichever you prefer. It is advised to follow a serpentine (snake-like) route to go through each of the smaller squares to avoid losing orientation. In order to prevent a potential bias, count trypanosomes within the square and those crossing the left or bottom limit (filled circles), but not those outside the square or crossing the right or top limit (open circles).

각자 선호하는 대로 10X 또는 40X 대물렌즈를 사용한다. 위 그림 오른쪽에 표시된 것처럼 작은 사각형들을 S 자 곡선을 따라 순서대로 세면 혼동이 생기는 것을 막을 수 있다. 숫자를 정확하게 세기 위해서 사각형의 왼쪽 또는 아래쪽 변에 걸쳐진 트리파노조마의 숫자는 포함시키고 (검은 동그라미) 오른쪽 또는 윗변에 걸쳐진 트리파노조마(흰 동그라미)는 세지 않는다.

To obtain the trypanosome density from the number of counted trypanosomes, first determine the volume in which the cells are counted and indicate it in the table below. Note that the height of the counting chamber is exactly 0.1 mm and each of counting cell is exactly 1 mm wide (see figure above) [1 point].

트리파노조마의 밀도를 계산하기 위해서 먼저 세포 수를 센 정사각형에 들어가는 액체의 부피를 계산하여 아래 표에 적어 넣으시오. 여기서 세포계수기 빈 칸(chamber)의 높이는 정확히 0.1 mm 이고, 위 그림에 표시된 것처럼 각 사각형의 한 변은 1mm 이다. [1 점]



Q3

Volume of 1 counting square (mm <sup>3</sup> ) 회색 정사각형 하나의 부피 (mm <sup>3</sup> )	
Volume of 1 counting square (ml) 회색 정사각형 하나의 부피 (ml)	



## Part 2.2: Washing the magnetic beads 마그네틱 비드의 세척

Wash the magnetic beads (**MB**) twice as follows:

마그네틱 비드(MB)를 다음 순서에 따라 두 번 세척한다.

1. Add 1 ml cold phosphate buffer (**PBSB**) to the tube and mix by pipetting up and down.  
냉각시킨 인산완충용액 (PBSB) 1 ml 을 튜브에 넣고 파이펫으로 업앤다운하여 잘 섞어준다.
2. Place the Eppendorf tube in the magnetic holder. Wait at least 1 minute for the magnetic beads to get pulled down.  
에펜도르프 튜브를 마그네틱 홀더에 장착시킨다. 마그네틱 비드가 침전 될 때까지 최소 1 분간 기다린다.
3. Pipette the supernatant into the liquid waste tube (**LW**).  
상층액을 떠서 액체 버리는 통(LW)에 버린다.

Finally, resuspend the magnetic beads in 35  $\mu\text{l}$  PBSB buffer and put them on ice.

마지막으로 마그네틱 비드를 35  $\mu\text{l}$  PBSB 로 다시 현탁 시킨 뒤 얼음 속에 넣어둔다.

## Part 2.3: Density of trypanosomes not binding to magnetic beads [37.5 points]

### 마그네틱 비드에 달라붙지 않은 트리파노조마의 밀도 계산

Pull down trypanosomes expressing procyclin in a sample of each of the three trypanosome strains T1, T2 and T3 as follows:

T1, T2 그리고 T3 세 종류에서 프로사이클린을 발현하는 트리파노조마를 아래 순서대로 침전시킨다.

1. Pipette 190  $\mu\text{l}$  of the trypanosome suspension in a fresh Eppendorf tube. Mix the trypanosome suspension by inverting prior to pipetting.  
파이펫으로 트리파노조마 현탁액 190  $\mu\text{l}$  를 깨끗한 에펜도르프 튜브로 옮긴다. 파이펫 하기 전에 튜브를 위아래로 여러 번 뒤집어 현탁액을 잘 섞어준다.
2. Add 10  $\mu\text{l}$  of washed magnetic beads. Make sure the beads are resuspended prior to pipetting.  
세척한 마그네틱 비드 10  $\mu\text{l}$  를 위의 튜브에 더해준다. 파이펫으로 떠내기 전에 마그네틱 비드가 잘 섞여있는지 확인한다.
3. Incubate 30 minutes on ice. Resuspend the magnetic beads very gently every 3-5 minutes by inverting and finger-flicking the tube. Consider working on other parts of Task 2 during the incubation.  
얼음 위에 30 분간 놓아둔다. 3-5 분에 한 번씩 튜브를 뒤집고 아래쪽을 손가락으로 부드럽게 튕겨서 마그네틱 비드를 다시 현탁시킨다.
4. Pull down the magnetic beads using the magnetic holder.  
튜브를 마그네틱 홀더에 장착하여 마그네틱 비드를 침전시킨다.
5. Transfer the entire supernatant, while the tube is still in the magnetic holder, into a fresh Eppendorf tube and put on ice.  
튜브를 마그네틱 홀더에 그대로 장착한 상태에서 상층액 전부를 새로운 에펜도르프 튜브로 옮겨 담아 얼음 속에 넣어둔다.
6. Immediately resuspend the magnetic beads in 50  $\mu\text{l}$  phosphate buffer (PBSB) very gently and put on ice.  
곧 이어서 마그네틱비드를 50  $\mu\text{l}$  인산완충용액(PBSB)으로 조심스럽게 재현탁시킨 뒤 역시 얼음 속에 넣어둔다.
7. Prepare 100  $\mu\text{l}$  of a 1:10 dilution of the supernatant in phosphate buffer (PBSB) in a fresh Eppendorf tube.  
새로운 에펜도르프 튜브속에 인산완충용액을 사용해서 상층액을 1:10 으로 희석한 용액 100  $\mu\text{l}$  를 만든다.
8. Pipette 36  $\mu\text{l}$  of this dilution into a separate Eppendorf tube and add 4  $\mu\text{l}$  of Fixation Buffer (FB). Mix well by pipetting up and down.  
이 희석액 36  $\mu\text{l}$  를 다른 에펜도르프 튜브에 옮긴 뒤 고정액 (FB) 4  $\mu\text{l}$  를 더해주고 파이펫으로 업앤다운하여 잘 섞어준다.
9. Count the number of trypanosomes according to the protocol in Part 2.1 and enter the values in the table below.  
위의 Part 2.1 에서 설명한대로 트리파노조마의 숫자를 센다.
10. Calculate the mean of the number of trypanosomes per square (precision: 3 positions after the decimal point). You will use these numbers in Part 2.5. [37.5 points]  
각각의 회색 정사각형에 들어있는 트리파노조마 숫자의 평균값을 계산한다. (소수점 아래 세 자리까지 계산할 것). 이 값은 Part 2.5 에서 사용될 것이다 [37.5 점].



Q4

	Strain T1	Strain T2	Strain T3
Square 1 정사각형 1			
Square 2 정사각형 2			
Square 3 정사각형 3			
Mean counts per square 정사각형 하나당 평균값			



## Part 2.4: Total trypanosome density [25.5 points]

### 전체 트리파노조마의 개체 밀도

To determine the total trypanosome density in the original suspension, perform the following steps for each of the three trypanosome strains T1, T2 and T3:

아래 순서대로 T1, T2, T3 각각에 대하여 처음 현탁액 속에 들어있던 트리파노조마의 밀도를 계산한다.

1. Prepare 100  $\mu\text{l}$  of a 1:10 dilution of the original suspension in phosphate buffer (**PBSB**) in a fresh Eppendorf tube. Mix the trypanosome suspension by inverting prior to pipetting.  
새로운 에펜도르프 튜브에 인산완충용액을 사용해서 처음 현탁액을 1:10 으로 희석한 용액 100  $\mu\text{l}$  를 만든다.
2. Pipette 36  $\mu\text{l}$  of this dilution into a fresh Eppendorf tube and add 4  $\mu\text{l}$  of Fixation Buffer (**FB**). Mix well by pipetting up and down.  
이 희석액 36  $\mu\text{l}$  를 다른 에펜도르프 튜브에 옮긴 뒤 고정액 (**FB**) 4  $\mu\text{l}$  를 더해주고 파이펫으로 업앤다운하여 잘 섞어준다.
3. Count the number of trypanosomes according to the protocol in Part 2.1 and report the values in the table below.  
위의 Part 2.1 에서 설명한대로 트리파노조마의 숫자를 세어서 다음 쪽에 있는 표에 적는다.
4. Calculate the mean and the standard deviation of the number of trypanosomes per square (precision: 3 positions after the decimal point). You will use these numbers in Part 2.5. **[25.5 points]**  
희석 정사각형 하나에 들어 있는 트리파노조마 숫자의 평균값을 계산한다. (소수점 세 자리까지 계산할 것). 이 값을 Part 2.5 에서 사용할 것이다 [25.5 점].

The formula for the standard deviation (SD) is given below with  $n$  being the number of replicates,  $x_i$  the value of the replicate and  $\bar{x}$  the mean.

표준편차(SD)를 계산하기 위한 공식이 아래에 주어져 있다. 여기서  $n$  은 실험을 반복한 숫자이고  $x_i$  는 측정값, 그리고  $\bar{x}$  는 평균값이다.

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$



Q5

	Strain T1	Strain T2	Strain T3
Square 1 정사각형 1			
Square 2 정사각형 2			
Square 3 정사각형 3			
Mean counts per square 정사각형 하나당 개체수의 평균값			
Standard deviation of counts per square 정사각형 하나당 개체수의 표준편차			



### Part 2.5: Success of the deletion of the procyclin gene [9 points]

#### 프로사이클린 유전자의 성공적인 제거 확인

The ultimate goal is to calculate and compare the density of trypanosomes not binding to magnetic beads to the total trypanosome density in the starting suspension from the average counts observed. However, you will first have to determine the standard error of the mean ( $SE_{mean}$ ) to decide on the correct number of significant digits. Under the assumption that the counts are normally distributed, the  $SE_{mean}$  is given by  $SE_{mean} = \frac{SD}{\sqrt{n}}$

실험의 최종 목표는 처음 현탁액 속 트리파노조마와 마그네틱 비드에 결합하지 않은 트리파노조마 숫자의 평균치를 계산하고 서로 비교하는 것이다. 이를 위해서는 먼저 평균에 대한 표준오차( $SE_{mean}$ )를 구해서 올바른 답이 되기 위한 유효숫자의 자리수를 결정해야 한다. 계수기속에 트리파노조마들이 고르게 분포해 있다는 가정 하에 표준오차는

$$SE_{mean} = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

라는 수식으로 나타낼 수 있다.

Calculate  $SE_{mean}$  for the strain for which you observed the largest standard deviation among the counts of trypanosomes per cell from Part 2.4 and enter your result in the table below (precision: 3 positions after the decimal point). [0.6 points]

Part 2.4 에서 관찰한 정사각형 당 개체수 중에서 표준편차(SD)가 가장 크게 나오는 종류(strain)의 표준오차( $SE_{mean}$ )를 구해서 아래 표에 써 넣으시오. (소수점 이하 세 자리까지 구할 것) [0.6 점]



Q6

$SE_{mean}$ 표준 오차	
-------------------	--



The  $SE_{mean}$  tells you the accuracy with which you estimated the mean number of trypanosomes per square. Use this estimate to decide the correct number of significant digits (all digits including the first for which you are uncertain) by comparing the estimated mean plus the  $SE_{mean}$  with the estimated mean minus  $SE_{mean}$ . For instance, if the mean is 1234.567 and the  $SE_{mean}$  98.765, you will have to compare  $1234.567 + 98.765 = 1333.332$  with  $1234.567 - 98.765 = 1135.802$ . In this case, there are two significant

digits and the mean should be reported as  $1.2 \times 10^3$ . Indicate the number of significant digits you should use with your data. **[1.5 points]**

표준오차는 당신이 계산해 낸 정사각형 하나당 트리파노조마 개체수의 평균값이 얼마나 정확한지를 말해 준다. 계산해 낸 평균값에 표준오차를 더한 값과 표준 오차를 뺀 값을 비교하는 방법으로 정확한 유효숫자의 자리수를 결정하시오 (확신 할 수 없는 맨 첫 번 자리를 포함한 모든 자리수). 예를 들어 만일 평균값이 1234.567 이고 표준오차( $SE_{\text{mean}}$ )가 98.765 라면 당신이 비교해야 할 두 숫자는  $1234.567 + 98.765 = 1333.332$  와  $1234.567 - 98.765 = 1135.802$  이다. 여기서 유효숫자의 자리수는 **2 자리**이고, 따라서 평균값은  **$1.2 \times 10^3$**  이라고 표시해야 한다.

데이터를 표시 할 때 사용할 유효숫자의 자리수를 말하시오. **[1.5 점]**



Q7

Number of significant digits  
유효숫자의 자리수



Report in the table below the mean counts per square with and without pull-down for all three strains using the number of significant digits you indicated above. **[0.6 points]**

세 종류의 트리파노조마에서 세포계수기 정사각형 하나당 마그네틱 비드에 부착하지 않은 개체의 숫자와 전체 트리파노조마의 정사각형 하나당 숫자를 위에서 결정한 유효숫자 자리수에 맞추어 써 넣으시오 **[0.6 점]**.



Q8

	Strain T1	Strain T2	Strain T3
Mean counts per square of trypanosomes not binding to magnetic beads (from Part 2.3) 마그네틱 비드에 부착하지 않은 트리파노조마의 정사각형 하나당 평균값 (Part 2.3로부터)			
Mean counts per square of total trypanosomes (from Part 2.4) 전체 트리파노조마의 정사각형 하나당 평균값 (Part 2.4로부터)			



Now use these values to estimate the density of trypanosomes in the dilutions used for counting, and report your values in the table below with the same number of significant digits. **[3.7 points]**

다음에는 위에서 얻은 값을 사용하여 세포수 계산에 사용된 트리파노조마 희석액 속의 개체 밀도를 계산하여 위와 동일한 유효숫자 자리수대로 표에 써 넣으시오 **[3.7 점]**.



Q9

	Strain T1	Strain T2	Strain T3
Trypanosomes not binding to magnetic beads /ml in dilution used for counting (from Part 2.3) 세포수 계산에 사용된 희석액 1 ml 속의 마그네틱 비드에 달라붙지 않은 트리파노조마 숫자 (Part 2.3 으로부터)			
Total trypanosomes / ml in dilution used for counting (from Part 2.4) 세포수 계산에 사용된 희석액 1 ml 속의 전체 트리파노조마 숫자 (Part 2.4 로부터)			



Finally, calculate both the density of trypanosomes not binding to magnetic beads as well as the total trypanosome density in the original suspension, and report your values in the table below with the same number of significant digits. **[1.1 points]**

마지막으로 희석하기 전 현탁액 속에 들어있던 전체 트리파노조마와 마그네틱 비드에 달라붙지 않은 트리파노조마의 개체밀도를 계산하여 앞과 동일한 유효숫자 자리수대로 표에 써 넣으시오**[1.1 점]**.



Q10

	Strain T1	Strain T2	Strain T3
Trypanosomes not binding to magnetic beads /ml in original suspension (from Part 2.3) 희석 전 원액 1 ml 속에 들어있던 마그네틱 비드에 달라붙지 않은 트리파노조마 숫자 (Part 2.3 로부터)			
Total Trypanosomes / ml in original suspension (from Part 2.4) 희석 전 원액 1 ml 속에 들어있던 전체 트리파노조마 숫자 (Part 2.4 으로부터)			



In order to assess the success rate of the gene deletion experiment, calculate the percentage of trypanosomes that did not bind to magnetic beads for each of the three strains. Use the estimates for the densities in the original suspension for your calculations and indicate your results in the table below (precision: only full percentages). **[1.5 points]**

유전자 제거실험의 성공률을 알아보기 위해서 3 종류의 트리파노조마 각각에 대하여 마그네틱 비드에 부착하지 않은 개체의 백분율을 계산하시오. 이 숫자를 이용하여 상층액에 들어있던 부착하지 않는 개체의 밀도를 계산하고 그 백분율값을 아래 표에 적어 넣으시오 (소수점 이하는 쓰지 말 것). **[1.5 점]**



Q11

	Strain T1	Strain T2	Strain T3
Percentage of trypanosomes <b>not</b> binding to beads 마그네틱 비드에 부착하지 않은 트리파노조마의 백분율(percentage)			



## Part 2.6: Verification of binding to beads [9 points]

### 마그네틱 비드 부착의 확인

You will next verify under the microscope if a reduction in trypanosomes observed after pull down is indeed due to binding of trypanosomes to the magnetic beads. To do so, perform the following steps for each of the three strains:

다음으로 마그네틱비드 침전후 일어난 트리파노조마 숫자의 감소가 실제로 마그네틱비드에 부착하는 능력으로 인한 것인지를 현미경관찰을 통해 확인해보기로 한다. 3 종류의 트리파노조마를 아래 순서대로 처리하시오.

1. Pipette **10  $\mu$ l** of the beads, you resuspended in Part 2.3, on a microscope slide.  
Part 2.3 에서 다시 현탁시킨 마그네틱 비드 **10  $\mu$ l** 를 슬라이드글라스에 올려놓는다.
2. Cover the drop with a cover slip.  
용액 방울을 커버슬립으로 덮는다.

Make a rough assessment of the fraction of trypanosomes that are attached to a magnetic bead. A good indication that a trypanosome is bound to a bead is when the bead wiggles as the trypanosome moves.

마그네틱 비드에 부착한 트리파노조마의 비율을 대략 추정해 보시오.

만일 트리파노조마가 움직일 때 마그네틱 비드도 따라서 움직이면 부착이 일어난 것으로 계산함.

In the table below, indicate with a tick ( $\checkmark$ ) for each of the three strains which description best fits your observation [9 points].

3 종류의 트리파노조마 각각에 대하여 당신이 관찰한 바를 가장 잘 표현한 문장을 tick ( $\checkmark$ )으로 표시하시오 [9 점].



Q12

	Strain T1	Strain T2	Strain T3
Practically no bound trypanosomes in the sample 거의 모든 트리파노조마가 부착하지 않았음			
<50% of the trypanosomes present in the sample are bound 절반 이하의 트리파노조마가 부착하였음			
>50% of the trypanosomes present in the sample are bound 절반 이상의 트리파노조마가 부착하였음			





**Part 2.7: Interpretation of your results [4 points]****결과 해석**

Indicate with a tick (✓) the statement best describing the reduction in trypanosomes in the supernatant after pull down for each strain. [3 points]

3 종류의 트리파노조마 각각에 대하여, 마그네틱 비드 침전 후 상층액 속 트리파노조마 숫자가 감소한 이유를 바르게 설명한 문장을 tick (✓)으로 표시하십시오 [3 점].



Q13

	Strain T1	Strain T2	Strain T3
A reduction, at least in part due to binding to beads 마그네틱 비드에 부착함으로 인한 감소			
No or only a purely stochastic change 변화 없음 또는 우연한 숫자 차이			



Indicate with a tick (✓) the strain where the deletion was most efficient. [1 point]

프로사이클린 유전자의 제거가 가장 효과적으로 일어난 strain 을 tick (✓)으로 표시하십시오 [1 점]



Q14

	Strain T1	Strain T2	Strain T3
Highest deletion efficiency 가장 높은 유전자 제거 효과			

**End of the Practical Exam**

실험시험 끝.