

25th INTERNATIONAL BIOLOGY OLYMPIAD

5 – 13 July, 2014

INDONESIA



PRACTICAL TEST 1 CELL & MOLECULAR BIOLOGY

Total points: **64.5** (총점 64.5 점)

Duration: 90 minutes (시험기간 90 분)

COUNTRY: 국가명	
STUDENT: 학생번호	

Dear Participants

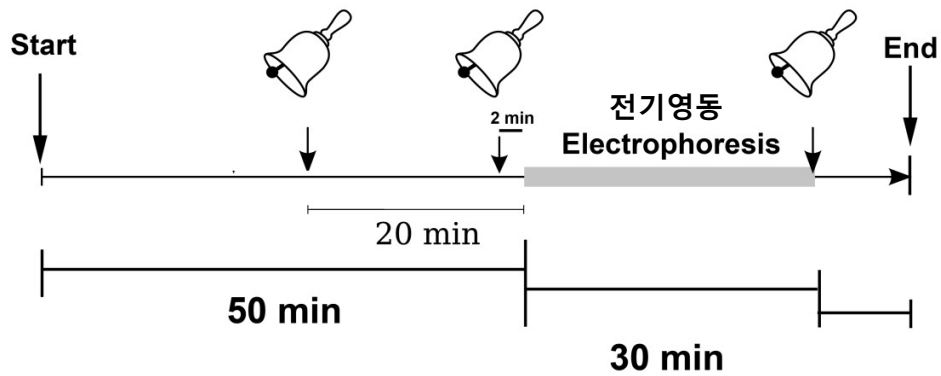
- In this test, you have been given the following tasks:
이 실험에서는 다음 두 가지 과제를 수행한다.
Part A. Confirmation of plasmid samples X, Y, and Z by restriction enzyme analysis. (40 points)
파트 A. 제한효소 절단 분석법을 통하여 플라스미드 X, Y, Z 를 확인하기 (40 점)
Part B. Cell reproduction and telomere analysis of *Paramecium*. (30 points)
파트 B. 짚신벌레의 번식과 말단소체 분석 (30 점)
- Answer all the questions in the **Answer Sheet** provided.
주어진 **답안지**에 정답을 쓰시오.
- The answers written in the **Question Paper** will **NOT** be evaluated.
문제지에 작성한 정답은 **채점되지 않습니다.**
- Write your answers legibly in ink.
잘 알아 볼 수 있는 글씨체로, 펜으로 답을 쓰시오.
- Please 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 immediately.**
각각의 task 에 필요한 시약과 기구를 모두 빠짐없이 받았는지 확인하시오.
만일 빠진 물건이 있으면 즉시 손을 드시오.
- Use the gloves provided for the experiment.
이 실험을 할 때는 장갑을 착용하시오.
- Stop answering and put down your pen **immediately** when the final bell rings.
마지막 종이 울리면 **즉시** 펜을 내려 놓으시오.
- 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 끝나면 답안지와 문제지를 모두 주어진 봉투에 넣으시오. 조교가 봉투를 수거해 갈 것입니다.

Note! All the DNA electrophoresis instruments will be turned on simultaneously by the assistants **50 minutes after the start of the test.**

주의! 실험이 시작 된 후 **50 분 후에** 조교가 모든 전기영동을 동시에 시작 할 것이다.

Make sure that you have placed your samples in the agarose gel in accordance to the instructions on the Question paper before the power supply is turned on. After this, you will **NOT** be allowed to run the gel. To remind you, the assistant will ring the bell three times. Bell 1 will remind you that the electrophoresis will be carried out in 20 minutes. Bell 2 is a warning that electrophoresis will begin in two minutes' time. Bell 3 will mark the end of electrophoresis. At that time you will be asked to remove your gel and place it into the box provided for assessment. 파워 서플라이가 켜지기 전에, 문제지에 지시된 순서대로 모든 샘플이 젤에 로딩되었는지 확인하시오. 일단 전기영동이 시작 된 후에는 다시 시작 할 수 없다. 다시 한 번 강조하는데,

조교가 종을 모두 합해서 3 번 울릴 것입니다. 첫 번째 종은 전기영동이 20 분 후에 시작되리라는 것을 예고한다. 두 번째 종은 전기영동이 2 분 후에 시작된다는 것을 알려준다. 세 번째 종은 전기영동이 끝났다는 것을 알려준다. 이 종이 울리면 젤을 꺼내서 평가를 위해 제공한 상자에 넣는다.



Materials and Equipment 재료와 도구

Materials 재료	Quantity	Unit
Restriction endonucleases FD EcoRI (kept on ice) FD EcoRI 이라고 쓰여진 제한효소 (얼음 위에 보관)	1 (8 µL)	Tube 튜브
Restriction endonucleases FD HindIII (kept on ice) FD HindIII 이라고 쓰여진 제한효소 (얼음 위에 보관)	1 (8 µL)	Tube 튜브
10X Restriction buffer solution (labeled FD Buffer) kept on ice 10X 제한효소 buffer (FD Buffer 라고 쓰여있음) 얼음위에 보관	1 (8 µL)	Tube 튜브
Plasmids 1, 2 and 3 kept on ice 플라스미드 1,2,3 얼음위에 보관	3 (5 µL)	Tubes 튜브
Sterile water (labelled Deion) in zipper bag 지퍼백에 들어 있는 멸균수(Deion 라고 쓰여있음)	1 (100 µL)	Tube 튜브
DNA staining solution, labeled Gel Red (in black tube) in zipper bag 지퍼백 속에 들어있는 (검은 튜브에 담긴) DNA 염색용액(GelRed 라고 쓰여 있음)	1 (200 µL)	Tube 튜브
DNA ladder stock solution, labeled 1 Kb Ladder , kept on ice 1 Kb Ladder 라고 쓰여진 DNA 사이즈 마커, 얼음위에 보관	1 (20 µL)	Tube 튜브
Ready-made agarose gel 미리 만들어진 아가로즈 젤	1	Piece 한 개
Running buffer (TAE)	1 (300 mL)	Bottle 한 병

Equipment 기구	Quantity	Unit
DNA electrophoresis gel tank per person 개인별 DNA 전기영동장치	1	Set 한 세트
Power supply for four persons 파워서플라이 (4 명이 함께 사용)	1	Unit 한 개
Micropipettes and tips in boxes (p10, p200) 마이크로 피펫(p10, p200)과 박스에 들어있는 일회용 tip	2	Sets 각각 한 개씩
Stopwatch 스톱워치	1	Piece 한 개
Tube rack 튜브랙	1	Piece 한 개
Sterile microtubes (in zipper bag) 멸균된 마이크로튜브들(지퍼백 안에 들어 있음)	6	Pieces 1 bag

Plastic box 플라스틱 상자	1	Piece 한 개
Floating rack styrofoam 스티로폼 플로팅 랙	1	Piece 한 개
Minicentrifuge 마이크로퓨지	1	Set 한 개
Sticker 스티커	1	Sheet 한 장
Marker pen 마커 펜	1	Piece 한 자루
Tissue paper 휴지	1	Box 한 상자
Gloves 장갑	1	Pair 한 짝

Note : Use given reagents properly! No additional reagents will be provided.

주어진 물품들을 주의해서 사용하시오, 여러분의 물품은 제공되지 않음.

Part A (40 points)

Identification of Plasmids by Restriction Enzyme Analysis

제한효소 절단 분석을 통한 플라스미드 동정

Introduction (도입)

A scientist was surprised to find unlabelled tubes in the freezer. These tubes, containing Plasmids X, Y and Z, were arbitrarily labelled Plasmid 1, Plasmid 2 and Plasmid 3. These plasmids are indistinguishable by DNA electrophoresis because they are all 3750 bp long. Since the three plasmids differ in their restriction pattern when using *EcoRI* and/or *HindIII* (Figure 1), you will conduct restriction enzyme analysis to correctly identify the three plasmids.

어떤 과학자가 냉동고를 열어보고 순간 당황했다. 플라스미드 X, Y, Z 가 단지 번호로 1, 2, 3 이라고만 적혀 있었기 때문이다. 이 플라스미드들은 모두 3750 bp 여서 크기로는 구분 할 수 없다. 하지만 제한효소 *EcoRI* 과 *HindIII* 로 절단하면 각기 다른 결과를 나타내므로(Figure 1), 이 제한효소들을 사용하여 3 개의 플라스미드를 동정하고자 한다.

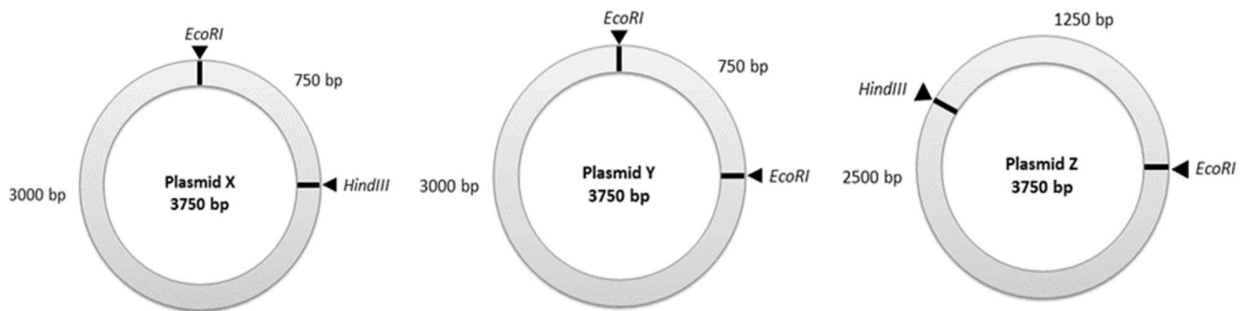


Figure 1. Restriction maps of Plasmids X, Y, Z.

플라스미드 X, Y, Z 의 제한효소 지도

Table I in the **Answer Sheet** shows the experimental design you will perform. The experiment is divided into Series 1 and Series 2, carried out simultaneously. In each series, all three plasmids should be cut with the same restriction enzyme(s). The final concentration of the restriction buffer solution should be 1X.

답안지에 있는 **Table 1** 에 당신이 수행해야 할 실험이 요약되어 있다. 이 실험은 Series 1 과 Series 2 를 동시에 진행한다. 각 series 내에서는 3 개의 플라스미드를 동일한 제한효소(또는 제한효소들)로 절단해야 한다. 제한효소 buffer 의 최종 농도는 1X 로 맞춘다.

Question 1.1 Determine how these restriction enzyme(s) can be used to differentiate between the plasmids. Complete **Table I** on the **Answer Sheet** to indicate your chosen protocol for each series! (8 points). You must choose one or two enzymes for each series that are most informative based on Figure 1. If the enzyme is used in the reaction, add 1 µL enzyme.

문제 1.1. 세 가지 플라스미드를 서로 구분하려면 어떤 제한효소(들)로 절단해야 할지를 결정한다. 그런 다음 **답안지**에 있는 **Table 1** 을 완성하여 각각의 시리즈에서 당신이 선택한 검정방법을

나타내시오 (8 점). 그림 1 에 근거하여 각 series 에 가장 유용한 정보를 줄 수 있는 제한효소를 하나 또는 2 개 선택하여야 한다. 선택한 제한효소를 사용하려면 1 μ L 를 넣는다.

Question 1.2. Complete the figure on your **Answer Sheet** to show the expected molecular weight(s) of the completely digested plasmid for Plasmids X, Y and Z that you would observe using each of your two chosen Series. Indicate the restriction enzyme(s) used for Series 1 and Series 2 of your experimental design. (12 points – 2 points each lane).

문제 1.2. Series 1 과 series 2 에서 당신이 고안한 실험방법대로 플라스미드 X, Y, Z 를 주어진 제한효소로 완전히 절단했을 때 어떤 크기의 산물이 관찰 될 것인지를 답안지에 그림을 그려 나타내시오. 여러분이 디자인한 Series 1 과 Series 2 에서 사용한 제한효소를 나타내시오. (12 점-각 Lane 당 2 점)

Plasmid restriction and DNA electrophoresis protocol

플라스미드의 제한효소 처리 및 DNA 전기영동 방법

Note: Electrophoresis will start 50 minutes after the test begins. After this, you will NOT be allowed to run the gel.

주의: 전기영동은 실험이 시작 된 후 50분이 경과한 시점에 시작 할 것임. 이 시점이 지난 후에는 전기영동을 시작 할 수 없음.

Note: Spin down all reagents in microtubes before pipetting (Be sure to balance the minicentrifuge by placing the microtubes opposite each other, even if there is only one tube to spin).

주의: 피펫 하기 전에 모든 시약을 마이크로튜브에 돌리시오. (밸런스를 맞추기 위해서 마이크로튜브 홀더의 반대편 구멍에 짝을 맞추어 튜브를 넣는 것을 잊지 마시오. 설사 튜브가 하나뿐이더라도 여분의 튜브 하나를 반대편 구멍에 넣어주어야 함)

1. Label the microtubes S1 to S6, and prepare the reaction mixtures according to Table I in the Answer Sheet. Spin down the mixture by placing the microtubes in the minicentrifuge for 10-20 seconds.

마이크로튜브에 S1 에서 S6 까지 번호를 쓰고 답안지의 Table 1 에 제시된 대로 반응액을 준비한다. 시약들을 넣은 튜브를 마이크로튜브로 10~20 초 돌린다.

2. Place the microtubes into the floating rack labelled with your bench number and incubate for at least 10 minutes at 37°C in the water bath, located at the end of your aisle in the direction of the arrow. 마이크로튜브들을 당신의 벤치 번호가 적힌 플로팅 랙에 꽂아서 37°C 로 맞춰진 수조에 띄우고 최소한 10 분동안 반응시킨다. 수조의 위치는 각자의 벤치 줄 끝에 화살표로 표시되어 있음.

3. Add **ONLY 2 μL** of DNA staining solution into microtube labelled 1 Kb Ladder. Spin down the solution for 10 seconds.

1 Kb Ladder 라고 적힌 튜브에 DNA 염색액만 **2 μL** 넣고, 마이크로퓨지로 10 초 돌린다.

4. After incubation, raise your bench number and your tubes will be returned to you. Add **ONLY 1 μL** of DNA staining solution into each of these tubes, mix well by pipetting and spin down any residual liquid.

반응 종료 후 벤치번호를 들어올리면 수조에 넣어둔 튜브를 돌려받을 수 있다. 이 튜브들 각각에 DNA 염색액을 **1 μL** 넣고 피펫으로 up and down 하여 잘 섞어준다.

5. Open the gel agarose package and place the gel with its tray in the electrophoresis chamber. Pour the entire TAE buffer from the bottle into the tank.

Note: Black plug is cathode (-) and red plug is anode (+).

포장된 아가로스 젤을 꺼내서 트레이 위에 올려진 채로 전기영동장치 탱크 속에 넣는다. TAE buffer 를 그 위에 붓는다.

주의 : 검은 플러그가 음극(-), 빨간색 플러그가 양극(+)이다.

6. Load 10 μl of samples S1 to S6 and molecular weight marker solution into the agarose gel as shown in **Figure 2**.

Figure 2.에 제시된 순서대로 튜브 S1~S6 에 들어있는 샘플과 분자크기 마커(1kb ladder)를 각각 10 μl 씩 젤에 로딩한다.



Figure 2

7. Close the lid of the gel chamber and notify the assistant by raising your hand that you are ready. The assistant will connect the cables to the power supply.

젤 박스의 뚜껑을 닫고 조교에게 손을 들어 전기영동을 시작할 준비가 되었음을 알린다. 그러면 조교가 와서 파워서플라이에 연결 해 줄 것이다.

During the electrophoresis continue with Part B.

전기영동이 진행 되는 동안 Part B 를 수행한다.

8. After the electrophoresis (indicated by Bell 3 ringing), the assistants will turn off the power supply. Carefully place the gel with the tray in the plastic box provided. **Pour the running buffer from the electrophoresis chamber into the plastic box.** Close the box, label the sticker with your **Student ID** and affix it to the side of the box. Leave the box on your bench. Later the gel will be documented and the picture will be attached onto your answer sheet by the assistants.

전기 영동이 끝나면 (세 번째 종이 울리면) 조교가 파워서플라이를 끌 것이다. 젤을 트레이 위에 놓여진 상태 그대로주어진 플라스틱 상자로 조심스럽게 옮긴다. **전기영동 탱크 속에 들어있던 running buffer 도 플라스틱 상자에 붓는다.** 상자 뚜껑을 닫고 스티커에 당신의 Student ID 를 적어서 상자 옆쪽에 붙인다. 상자는 벤치 위에 놓아둔다.

나중에 조교가 이 젤의 사진을 찍어서 당신의 답안지에 부착 할 것이다.

Part B (24.5 points)
Cell Reproduction and Telomere Analysis of *Paramecium*

짚신벌레의 번식과 말단소체 분석

Two of the phenomena displayed by *Paramecium tetraurelia* are binary fission (asexual reproduction) and conjugation (exchange of genetic materials), which are affected by the abundance of nutrients in the media. Figure 3 shows microscopic observations of two *P. tetraurelia* cultures grown in rich and poor media, respectively.

짚신벌레 *Paramecium tetraurelia* 는 배양액 속에 영양분이 얼마나 풍부한지에 따라 이분법(무성생식) 또는 접합(유전물질의 교환)으로 번식한다. Figure 3 은 영양분이 풍부한 배지와 영양분이 결핍된 배지에서 각각 따로 배양한 2 가지 짚신벌레를 보여주는 현미경 사진이다

Question 2.1. (2 points) Which of the phenomena are shown by the two cultures in Figure 3A and 3B?

문제 2.1. 이분법과 접합 중에서 그림 3A 와 3B 에서 관찰되는 현상을 있는 대로 고르시오.

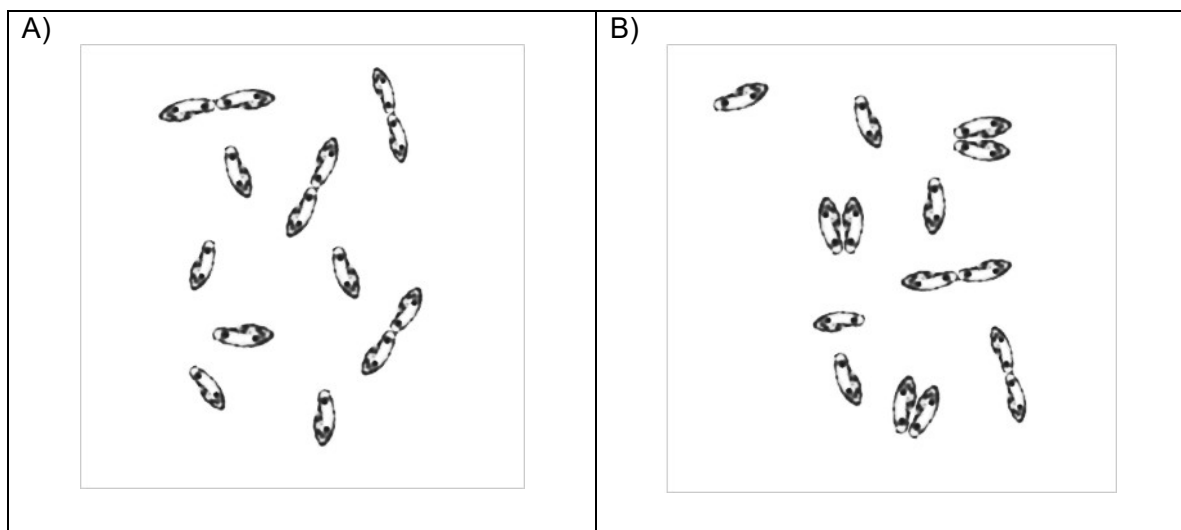


Figure 3. *P. tetraurelia* growing in rich (A) and poor (B) media.

그림 3. 영양분이 풍부한 배지(A)와 제한된 배지(B)에서 기른 짚신벌레

Paramecium, which has just undergone conjugation, continues to asexually reproduce. In this instance, telomere shortening occurs for a certain number of divisions during logarithmic growth. **Table B-1** shows data for the growth of a strain of *Paramecium* in three replicates for four days. The cultures can be grown continuously with no significant change in the fission rate.

접합이 일어난 후, 짚신벌레는 이어서 무성생식을 계속한다. 이 때 대수증식기(logalythmic growth)동안 말단소체(telomere)의 길이가 짧아지는 현상이 발생한다. **Table B-1** 은 짚신벌레의 세 실험군(triplicates)을 4 일 동안 기르면서 개체수를 측정한 데이터를 보여준다. 이 기간 동안 짚신벌레는 분열속도가 거의 감소하지 않으면서 계속 증식한다.

Table B-1. *P. tetraurelia* growth in the first four days.

표 B-1. 처음 4 일동안의 짚신벌레 증식 속도

Day	Cell Concentration (Cell/mL)		
	개체수/mL		
	A	B	C
0	1	1	1
1	8	10	16
2	80	120	128
3	640	960	1024
4	5760	7680	10240

Question 2.2. (2.5 + 8 points) Calculate the average cell concentrations and using the logarithmic value draw the growth curve of *P. tetraurelia* from Days 0 to 4 on the graph provided in your **Answer Sheet** (Precision: integer).

문제 2.2. 개체수의 평균을 계산하고 그 로그값을 취하여 답안지에 주어진 그래프에 Day 0~ Day 4 사이의 짚신벌레 성장곡선을 그리시오. (정수로 구할 것)

Figure 4 shows the result of Southern blot analysis of *P. tetraurelia* telomeres for a total of 30 synchronized generations of cultivation. DNA from *P. tetraurelia* was digested at the beginning of the telomere region, blotted onto a membrane and then hybridized with telomere probes. Telomeres were seen as smears, the midpoints of which can be matched with molecular weight markers to determine the average telomere length.

그림 4 는 30 세대까지 동시화(synchronized)배양을 한 짚신벌레의 말단소체 길이를 분석한 서던블롯 분석 결과이다. 말단소체가 시작되는 부위에서 자른 짚신벌레 DNA 를 membrane 에 블로팅 한 뒤 말단소체 특이적 탐침으로 혼성화(hybridize) 시켰다. 결과에서 말단소체는 세로로 퍼진 형태(smear)로 나타나는데, 이 smear 의 중간점을 molucelar weight 마커와 비교하여 평균 길이를 추정 할 수 있다.

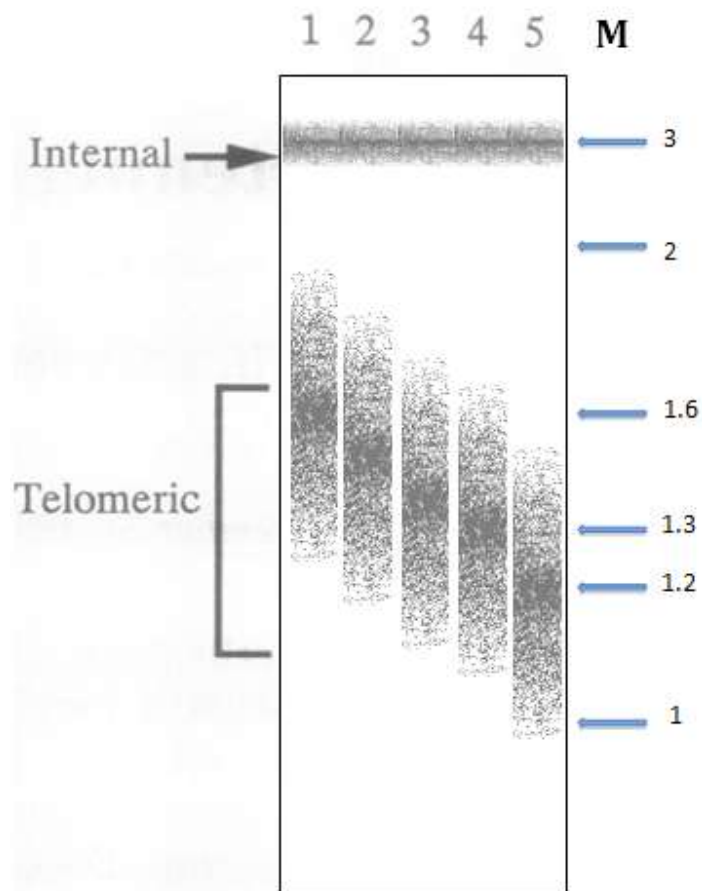


Figure 4. Southern blot of *P. tetraurelia* telomeres. Lanes 1 to 5 show telomeres after 4, 7, 17, 23, and 30 generations, respectively. DNA size markers (M) are shown next to Lane 5 (in kbp).

Internal: Internal part of the chromosomal DNA that contains telomeric sequence

그림 4. 짚신벌레 말단소체의 서던블로팅. Lane 1 에서 5 는 각각 4, 7, 17, 23, 30 세대가 지난 후의 말단소체이다. DNA size markers (M)는 lane 5 오른쪽에 kbb 로 표시하였다.(Internal : 말단소체를 포함하는 염색체 안쪽 부위)

Question 2.3. (12 points) Indicate in the answer sheet with a tick (✓) if the following statements are **true** or **false**.

문제 2.3. 다음 문장들의 참과 거짓에 따라 답안지에 체크표시(✓)하십시오. (12 점)

No.	Statement
a	The media can support the growth of <i>P. tetraurelia</i> to more than 10^4 cells/mL. 이 배지에서 짚신벌레는 10^4 cells/mL 이상까지 증식 할 수 있다.

b	<p>The Telomere probe used for Southern blot analysis is not specific for telomeric sequences.</p> <p>서던 블롯 분석에 사용한 탐침은 말단소체 염기서열에 특이적으로 부착하지 않았다.</p>
c	<p>Based on the Southern blot, telomeres of the cells from the same generation have the same length.</p> <p>서던 블로팅 결과로 미루어 볼 때 같은 세대에 속한 세포의 말단소체는 모두 길이가 동일하다.</p>
d	<p>Paramecium can grow from 10^5 to 10^7 cells in less than three days, if enough medium is provided.</p> <p>충분한 배지가 제공된다면 짚신벌레는 3 일 이내에 10^5 에서 10^7 마리로 늘어 날 수 있다.</p>
e	<p>Based on telomere data from lane 4 and 5, telomeres shorten by 20-25 base pairs per generation..</p> <p>Lane 4 와 5 에 나타난 결과로 미루어 볼 때 한 세대가 지나 갈 때마다 말단소체 길이는 20~25 bp 만큼 짧아진다.</p>
f	<p>At beginning of the experiment (parental generation), telomeres were likely between 1500 and 1700 base pairs long.</p> <p>실험이 시작되는 시점(부모세대)에서 말단소체 길이는 대략 1500~1700 bp 였을 것이다.</p>