

PRACTICAL EXAM 2 MOLECULAR BIOLOGY (실험시험 2 분자생물학)

일반 정보

총점: 100점
시험 시간: 90분
15문제

이 실험은 모두 3 파트로 구성되어 있음.

파트 1: 플라스미드의 제한효소 지도 (48점)

파트 2: PCR을 이용한 효모 돌연변이 균주의 유전자형 분석(genotyping) (37점)

파트 3: 돌연변이 효모의 아미노산 영양요구성 (15점)

실험 활동을 시작하기 전에 먼저 전체 시험 파일을 읽어볼 것. 시험을 완성하기 위하여 세 파트를 동시에 진행해야 함(아래 그림 참조).

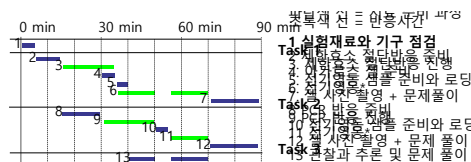


그림 0.1: 이 시험의 세 파트를 완성하기 위한 제안 시간표

1. 시료와 기구의 점검

Task 1

2. 제한효소 반응 set up
3. 제한효소 절단 반응 진행
4. 아가로스 젤 준비
5. 전기영동 샘플의 준비 및 로딩
6. 아가로스 젤 전기영동
7. 젤 사진 촬영 및 문제 풀이

Task 2

8. PCR 반응 set up
9. PCR 기계 안에서 반응 진행
10. 샘플 준비 및 젤 로딩
11. 전기영동*
12. 젤 사진 촬영 및 문제 풀이

Task 3

13. 관찰과 추론 및 문제풀이

* 동일한 젤을 사용하되 샘플을 다른 well에 로딩 할 것

서론

재료 및 기기

실험을 위해 아래에 제시된 A - V 재료 및 물질이 필요하다. 이 재료들이 다 확보되어 있는지 확인하여야 한다. 만약 빠진 물질이 있으면 시험 시작 15분 이내에 핑크카드를 들어 시험관에게 알려야 한다.

주의할 사항

1. 모든 용액은 실제 필요한 양의 2배가 제공된다. 실험 준비중의 실수로 인해 훼손된 튜브 및 아가로스 젤과 같은 물질들은 다시 제공되지 않는다.
2. 튜브 바닥으로 액체를 모으기 월요일에 보여주었던 방법을 활용하도록 한다.
3. 시험의 목적중의 하나는 각자의 실험 기술을 측정하는 것임을 명심하여야 한다.
4. 라벨에 청색 선이 있는 튜브는 실험동안 얼음 위에 보관하여야 한다.
5. 모든 용액은 얼려 보관되었다. 따라서 사용전에 녹인 후 잘 섞어야 한다.

시 료	수 량	내 용	사 용 파 트
A	1	마이크로피펫 1-10 μ L	1.2
B	1	마이크로피펫 20-200 μ L	1.2
C	1	1-10 μ L 피펫팁 1 상자	1.2
D	1	20-200 μ L 피펫팁 1 상자	1.2

E	1	PCR 튜브 랙(rack)	1.2
F	1	1.5 mL 튜브 랙	1.2
G	5	1.5 mL 튜브 (봉투에 들어있음)	2
H	2	한 줄로 붙어있는 0.2mL 튜브(봉투에 들어있음)	1.2
I	1	하얀 봉투에 들어있는 12-well 아가로스 젤 (로딩할 준비가 되기 전에는 봉투를 열지 마시오)	1.2
J	1	완충용액이 들어있는 OneRun 전기영동 장치	1.2
K	1	마커 펜	1.2
L	1	스톱워치 (타이머)	1.2
M	1	휴지	1.2
N	1	일회용 장갑 (대기실에서 나누어 준 것)	1.2
O	2	지퍼락 백 (봉투에 들어있음)	1
P	1	8가지 다른 배양조건에서 기른 효모의 사진이 들어 있는 책자	3
Q	1	다양한 아미노산의 합성경로를 보여주는 차트 (실험 공간 벽에 붙어있음)	3
R	1	1Kb Plus DNA ladder (봉투에 들어있음)	1.2
S	1	실험조교를 부르기 위한 핑크색 카드	1.2.3
T	2	작은 ID 태그	1.2
U	1	커다란 ID 태그	1
V	1	물 540 μ L	1.2

그림 0.2: 시료 H의 튜브에 *student number*와 국가 코드를 적은 ID 라벨을 붙인 모양

액체시료가 담긴 1.5mL 튜브들을 꽂아놓은 아이스 버킷

액체 시료	수 량	라벨	용량 (μ L)	내용물	사 용 파 트
1	1	dNTPs	60	dATP, dGTP, dCTP 및 dTTP	2
2	1	DNApol buffer	140	DNA 중합효소 완충용액 (5X)	2
3	1	Loading buffer	100	아가로스 젤 전기영동에 필요한 로딩 버퍼	1.2
4	1	Prime A	30	프라이머 쌍 A	2
5	1	Prime B	30	프라이머 쌍 B	2
6	1	Prime C	30	프라이머 쌍 C	2
7	1	Prime D	30	프라이머 쌍 D	2
8	1	Prime E	30	프라이머 쌍 E	2
9	1	DNApol	14	DNA 중합효소	2
10	1	1 Kb ladder	12	아가로스 젤 전기영동에 필요한 사이즈 마커	1.2
11	1	Buffer 1	8	완충용액 1 (10X)	1

12	1	Buffer 2	8	완충용액 2 (10X)	1
13	1	Buffer 3	8	완충용액 3 (10X)	1
14	1	TemplateWT	6	야생형 주형 DNA	2
15	1	Template mutant	6	돌연변이 주형 DNA	2
16	1	Plasmid tube 1	6	플라스미드 tube 1	1
17	1	Plasmid tube 2	6	플라스미드 tube 2	1
18	1	Apal	6	제한효소 Apal	1
19	1	EcoRI	6	제한효소 EcoRI	1
20	1	SmaI	6	제한효소 SmaI	1

1. 플라스미드의 제한효소 지도 (48 POINTS)

효모 *Saccharomyces cerevisiae* 에서 Alb 단백질의 세포내 위치를 알아보기 위하여 다음과 같은 실험을 하였다. 먼저 alb 유전자(999bp)를 두 종류의 각기 다른 형광단백질을 암호화하는 염기서열에 연결하였다. 이를 위하여 alb 유전자를 두 종류의 플라스미드 (pX와 pZ)에 삽입하여 pX:alb와 pZ:alb를 제작하였다.

*E. coli*를 연결효소(ligase)반응을 통해 만들어진 두 종류의 플라스미드로 형질전환시킨다. 형질전환된 *E. coli*를 배양한 뒤 이로부터 분리한 두 종류의 DNA가 각각 "Plasmid tube 1"과 "Plasmid tube 2" 라고 표지된 tube에 담겨져 있다. 여러분이 할 일은 이제까지 언급된 4가지 종류의 플라스미드 (pX, pZ, pX:alb, pZ:alb) DNA 중 어느 것이 주어진 두 개의 tube에 들어있는지 알아내는 것이다. (하나의 tube에는 한 종류의 플라스미드만 들어있음)

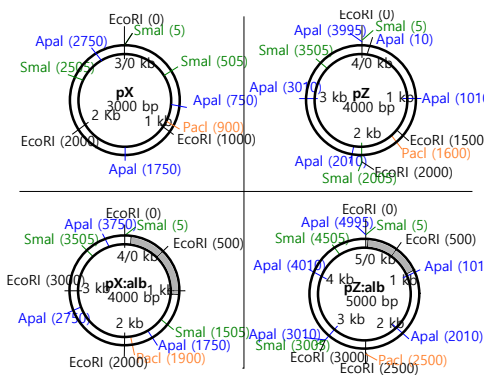


그림 1.1: 플라스미드 'pX', 'pZ', 'pX:al'b, 'pZ:abl' 의 제한효소 지도

Q. 1 DNA 절편의 크기 (2 points)

Node Id: **b494ba5c17b6eddea97b2778**

4 종류의 플라스미드가 **PacI** 제한효소로 완전히 절단되었을 때 각각 만들어 지는 **DNA** 절편의 크기를 태그하시오.

✓

=

있음

—

=

없음

	PX	PX:ALB	PZ	PZ:ALB
0.5 kb	☐	☐	☐	☐
1.0 kb	☐	☐	☐	☐
1.5 kb	☐	☐	☐	☐
2.0 kb	☐	☐	☐	☐
2.5 kb	☐	☐	☐	☐
3.0 kb	☐	☐	☐	☐
3.5 kb	☐	☐	☐	☐
4.0 kb	☐	☐	☐	☐
4.5 kb	☐	☐	☐	☐

5.0 kb



각 제한효소마다 각기 다른 반응조건이 필요하다 (표 1.1)

표 1.1 제한효소별 적정 반응조건

제한효소	Buffer 1에서의 %활성	Buffer 2에서의 %활성	Buffer 3에서의 %활성	적정 반응온도 (°C)
Apal	25	50	100	25
EcoRI	10	100	10	37
PacI	100	75	10	37
SmaI	0	0	100	25

2 가지 플라스미드의 제한효소 절단

Q. 2 제한효소 선택 (4점)

Node Id: 2a3e13184a7a07ed1aff6caf

여러분이 사용할 수 있는 제한효소는 **Apal**, **EcoRI**, 그리고 **SmaI** 이다. 이 셋 중에서 앞서 설명한 4종류의 플라스미드를 구분 할 수 있는 것을 고르시오. 단, 크기가 **100bp**보다 작은 **DNA** 절편은 겔에서 보이는 밴드가 매우 흐려서 정확하게 구분 할 수 없다는 점을 감안 할 것.

1.
2.
3.

Q. 3 절단 반응용액 (4 points)

Node Id: 6c455f6de8153f592c46f58b
2 종류 플라스미드의 제한효소 절단

실험방법

1. 한 줄로 연결된 **0.2mL tube**들을 각각 **S1, S2, S3** 그리고 **S4**로 표시하시오.
2. 어떤 한 종류의 제한효소만을 사용하여 두 종류의 각기 다른 플라스미드를 구분 할 수 있도록 실험방법을 고안하시오. 이 때 절단하지 않은 대조군 (=control)을 포함하여 모든 반응에 동일한 한 종류의 제한효소만을 사용함, 각 반응의 최종부피는 **10 µL**로 맞춘다. 참고로 일반적인 제한효소 절단 반응의 조성은 다음과 같다:
2 µL 플라스미드 **DNA**, **1 µL** 제한효소, **1 µL Buffer** 와 **water**를 포함한 최종부피**10 µL**.

정수의 숫자를 사용하여 각 반응 **tube**에 넣을시료의 양을 표 시하시오(모든 단위는 **µL**). 사용하지 않는 시료는 '**0**'으로 표시하시오.

	S1 (µL)	(S2 (µL) (Control)	S3 (µL)	S4 (µL) (control)
Plasmid tube 1				
Plasmid tube 2				
Apal				
EcoRI				
SmaI				
10x Buffer 1				
10 x Buffer 2				
10 x Buffer 3				
Water				
최종부피				



Q. 4 제한효소 절단을 위한 반응조건 (2 points)

Node Id: d753f5302f0bf03853b72487

실험방법-계속

3. 제한효소 절단에 필요한 시료들을 여러분이 **Question 2**에서 고안한대로 각각의 **tube**에 넣는다.

4. 각 튜브의 용액을 **5** 마이크로리터에 맞춘 피펫으로 **5-10회 up-and-down**하여 골고루 잘 섞는다.

거품이 생기지 않도록 플라스틱 팁의 끝부분이 항상 용액 속에 잠겨있도록 한다.

5. 한 줄로 붙은 **0.2mL** 튜브를 작은 지퍼락 봉투에 넣는다. 지퍼락을 잠그고 각자의 **ID**번호를 봉투 바깥에 붙인다.

여러분이 사용한 반응조건을 여기에 표시하시오.

1. 25°C

2. 37°C

실험방법-계속

6. 반응 튜브가 다 준비되었을 때 핑크색 카드를 들면 조교가 와서 여러분의 샘플을 인큐베이터에 넣어 줄 것임. 절단반응은 인큐베이터 안에서 15분동안 진행함.

7. 20분이 지나면 다시 핑크 카드를 들어서 조교에게 반응튜브를 인큐베이터에서 꺼내달라고 부탁한다. **말하지 않으면** 튜브를 돌려주지 않음.

8. 돌려받은 튜브가 자기것인지 확인 할 것.

9. 각 튜브에 3 μ L의 로딩버퍼를 넣는다.

10. 마이크로피펫으로 10번 up-and-down하여 잘 섞는다 (거품이 생기지 않도록 주의 할 것)

제한효소 절단반응 결과를 전기영동으로 분석하는 과정은 아가로스 젤 전기영동 실험방법을 따른다.

아가로스 젤 전기영동



전기쇼크 주의-전기영동이 시작 된 후에는 *RunOne* 전기영동 기구를 움직이거나 기구의 뒷개에 있는 구멍 사이로 물건을 집어넣지 마시오!



유독물질 주의-아가로스 젤에는 DNA에 결합하는 염색약이 들어 있으므로 만질 때에는 항상 장갑을 낀다

실험순서 제안

Part 1과 Part 2 실험은 모두 아가로스 젤 전기영동으로 샘플을 분석하며 아래와 같이 진행한다.

- Part 1의 샘플을 로딩 한 뒤 15-20분 동안 전기영동한다.
- 전기영동을 멈춘다.
- Part 2의 샘플을 로딩한다.
- 기구를 다시 켜고 15-20분 더 전기영동한다.

전기영동 방법

1. 실험용 장갑을 착용한다.

- 2. RunOne 전기영동 기구의 뚜껑을 똑바로 들어올리듯이 연다.
- 3. 흰색 봉투를 열고 아가로스 젤을 꺼낸다. 투명한 덮개를 벗기고, 젤이 담겨 있는 트레이를 조심스럽게 들어올려 꺼낸다. 젤은 쉽게 부서지므로 주의해서 다룬다. 흰색 봉투는 나중에 다시 필요하므로 잘 보관한다.
- 4. 젤에 금이 가거나 깨어진 부분이 없는지, well이 손상되거나 젤 속에 버블이 없는지 잘 살펴본다. 만일 문제가 있으면 핑크 카드를 들어서 조교에게 알린다.
- 5. 그림 1.2이 보여주는 대로 젤을 전기영동기구 안에 넣는다.

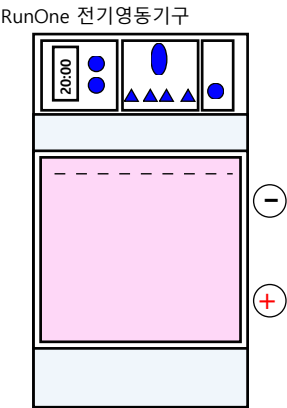


그림 1.2: RunOne 전기영동 기구와 아가로스 젤을 넣는 방향

전기영동방법-계속

- 7. 젤은 항상 running buffer속에 완전히 잠겨져야 한다. 만일 그렇지 않으면 핑크 카드를 들어서 조교에게 알려 도움을 청하시오.
- 8. 표 1.2의 순서대로 Part1에서 준비한 샘플을 젤에 로딩하고, Part2의 샘플은 표 1.3의 순서대로 로딩한다.
1Kb ladder는 3 μ L를 로딩하고, Part 1의 샘플은 13 μ L를, 그리고 Part 2의 샘플은 15 μ L를 로딩한다.

표 1.2. Part1 샘플을 well 1-5에 로딩하는 순서

well	1	2	3	4	5
샘플	1Kb ladder	S1	S2(control)	S3	S4(control)

부피(μ L)	3	13	13	13	13
--------------	---	----	----	----	----

표 1.3. Part 2의 샘플을 well 6-12에 로딩하는 순서

Well	6	7	8	9	10	11	12
샘플	1Kb ladder	PCR-1	PCR-2	PCR-3	PCR-4	PCR-5	PCR-6
부피(μ L)	3	15	15	15	15	15	15

전기영동 방법-계속

9. RunOne 전기영동 기구의 덮개를 덮는다 (튀어나온 부분이 파워 서플라이 파트에 꽂히도록 해야 함)
10. 전압이 100V에 맞추어져 있는지 확인한다. 만일 아니라면 "Voltage select" 버튼을 누른다.
11. "Run/Stop"버튼을 눌러서 전원을 켜고 15-20분 동안 전기영동한다.
- 이 때 DNA가 이동하는 것을 실시간으로 관찰 할 수는 없지만 로딩버퍼에 들어있는 파란색 염색약이 대략 300bp크기의 DNA 절편과 비슷한 속도로 움직인다고 생각하면 된다.
12. 20분 후 "Run/Stop" 버튼을 눌러서 전원을 끈다.
13. 핑크 카드를 들어올리면 조교가 DNA를 볼 수 있는 장치를 가져다 줄 것이다.
- 이 장치와 태블릿을 사용해서 아래 방법대로 DNA밴드의 사진을 찍어 기록한다. 조교가 사진을 찍는 것을 도와 줄 것이다.
14. 실험용 장갑을 착용한다.
15. 아가로스 젤을 트레이에 담긴채로 들어서 light-table위로 옮긴다.
16. 검정색 photo hood를 light-table위에 덮는다.
17. 태블릿의 사진기 렌즈가 아래쪽을 향하도록 photo hood위에 장착한다.
18. 사진을 찍는다.



Q. 5

DNA밴드 패턴의 사진 촬영

잘 나온 사진 세 장을 찍는다. 이 사진으로 여러분의 제한효소 절단 및 PCR 실험이 성공적으로 수행되었는지 여부와 더불어 결과의 타당성을 판단하게 될 것이다.

Node Id: **97456e13a3f7a0b2b66a4c29**

첫번째 젤 사진을 여기에 업로드하시오.



Node Id: **2e88ffb3af4dd5b441daefd5**

두 번째 젤 사진을 여기에 업로드하시오.



Node Id: **6398e6f6cb1240fcd6f8afa0**

세 번째 젤 사진을 여기에 업로드하시오.



20. 사진을 찍고 난 뒤에는 젤을 다시 처음에 들어있던 흰색 봉투 안에 넣는다.



Q. 6

제한효소를 이용한 플라스미드 절단

Node Id: **631ab61f0da876d8b070db01**

여러분이 사용한 제한효소로 플라스미드 **DNA**가 절단되었는지 여부를 여기에 표시하시오.

절단됨

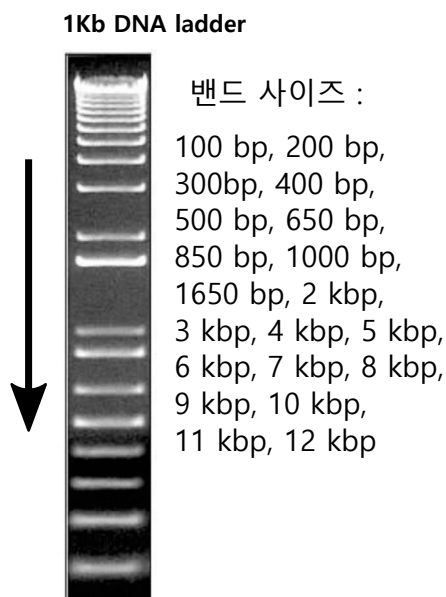
절단되지 **않음**

S1	☐	☐
S2	☐	☐
S3	☐	☐
S4	☐	☐

이번에는 여러분이 앞서 Question 3에서 선택한 제한효소를 사용했을때의 결과를 보여주는 표준 젤 사진이 주어질 것이다. 이 사진을 토대로 Question 7과 8에 답하시오.

여러분 자신의 젤 사진을 찍은 후에만 이 결과를 볼 수 있음

아래 주어진 DNA ladder를 문제의 답을 구하는데 참고하시오.



Q. 7

제한효소 절단으로 얻은 DNA 절편의 크기

Node Id: **723065e993cf22c5ad91aad4**

'여러분이 제한효소로 절단한 **DNA** 절편중에 아래의 크기에 해당하는 것이 있는지 여부를 표시하시오.


있음

=


없음

	PLASMID TUBE 1의 DNA 절편 크기	PLASMID TUBE 2의 DNA 절편 크기
0.5 Kb	☐	☐
1.0 Kb	☐	☐
1.5 Kb	☐	☐
2.0 Kb	☐	☐
2.5 Kb	☐	☐
3.0 Kb	☐	☐
3.5 Kb	☐	☐
4.0 Kb	☐	☐
4.5 Kb	☐	☐
5.0 Kb	☐	☐
5.5 Kb	☐	☐
6.0 Kb	☐	☐

Q. 8 튜브에 들어있는 플라스미드 동정

Node Id: **f182a828e66bfc5be092fde**
각각의 튜브에 어떤 플라스미드가 들어있었는지를 여기에 표시하시오. 만
일 주어진 플라스미드의 존재 여부를 판단 할 수 없다면 마지막 컬럼에
'+'를 표시하시오.



	플라 스미 드 PX	플라스 미드 PX:ALB	플라 스미 드 PZ	플라스 미드 PZ:ALB	사용한 제한효소로 는 판단 할 수 없음
Plasmid tube 1	☐	☐	☐	☐	☐
Plasmid tube 2	☐	☐	☐	☐	☐

2. PCR을 이용한 돌연변이 효모의 유전자형 판독(37 POINTS)

효모(yeast)의 돌연변이 균주를 분리하였다. 이 균주가 증식하려면 배지에 페닐알라닌과 티로신이 들어 있어야 한다. 한편 이 균주가 트립토판이 결핍된 배지에서 자랄 수 있는지 여부는 확인해 보지 않았다. 역교배실험 결과에 따르면 돌연변이가 일어난 유전자는 하나뿐이다.

여러분이 수행할 task는 관찰된 영양요구성(auxotrophy)의 유전적 근거를 밝혀내는 것이다. 이를 위하여 사용할 PCR 프라이머가 다섯쌍 준비되어 있다 (표 2.1). 이 프라이머들을 사용하면 방향성(aromatic) 아미노산의 합성 경로에 관여하는 효소들 중 돌연변이주에서 기능이 망가져 있을지도 모르는 5가지 유전자의 대립유전자형을 판단 할 수 있다 (그림 2.1)

표 2.1. 효모의 야생형과 돌연변이 균주를 구분 할 수 있는 유전자 부위의 증폭에 사용되는 프라이머 쌍

프라이머 쌍	유전자	PCR product의 크기 (bp)-야생형	PCR product의 크기 (bp)-돌연변이형
A-순방향 + A-역방향	<i>TYR1</i>	500	400
B-순방향 + B-역방향	<i>PHA2</i>	500	250
C-순방향 + C-			

역방향	<i>ARO7</i>	500	300
D-순방향 + D-역방향	<i>TRP5</i>	500	350
E-순방향 + E-역방향	<i>ARO2</i>	500	300

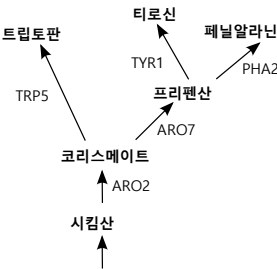


그림 2.7: 방향성 아미노산의 생합성 경로 (위 왼쪽에서부터 트립토판, 티로신, 페닐알라닌, 프리펜산, 코리스메이트, 시킵산) 및 각각의 경로에 작용하는 효소 유전자

Q. 9 프라이머 쌍 선택

위의 표 2.1에 제시된 5종류의 프라이머쌍 중에서 2 종류를 선택하여 돌연변이 효모가 나타내는 영양요구성의 유전적 근거를 판단 할 수 있다.

Node Id: **d72a621f704984960a188a6c**

실험에 사용할 프라이머 쌍 (표 2.1의 **A, B, C, D** 또는 **E**)

	A	B	C	D	E
첫번째 프라이머 쌍	☐	☐	☐	☐	☐
두번째 프라이머 쌍	☐	☐	☐	☐	☐

실험 방법

- 1. 1.5mL 튜브에 다음 시료들을 섞어서 PCR 마스터 믹스(master mix)를 준비한다.
196 μ l Water + 70 μ l DNA polymerase buffer (x5) + 35 μ l dNTP's + 7 μ l DNA polymerase.

2. 100 μ l에 맞춘 마이크로 피펫으로 5-10번 up-and-down하여 잘 섞어준다.
3. 한 줄로 연결된 0.2mL PCR 튜브에 각자의 ID번호가 쓰여진 작은 라벨을 부착한다.
4. 튜브에 1-6까지 번호를 표시한다. (한 줄로 붙은 튜브를 떼어내지 말 것-만 일 분리하면 PCR을 진행 할 수 없음)
5. 6개의 PCR 튜브에 마스터믹스를 44 μ l 씩 분주하여 담는다.
6. 튜브 1-3에는 여러분이 선택한 첫 번째 프라이머쌍을 각각 3 μ l 씩 넣는다.
7. 튜브 4-6에는 여러분이 선택한 두번째 프라이머쌍을 각각 3 μ l 씩 넣는다.
8. 튜브 1과 4에 야생형 주형 DNA를 1 μ l 씩 넣는다.
9. 튜브 2와 5에 돌연변이 주형 DNA를 1 μ l 씩 넣는다.
10. 튜브 3과 6에 증류수를 1 μ l 씩 넣는다.
11. 각각의 튜브를 45 μ l에 맞춘 마이크로피펫으로 5-10번 up-and-down하여 섞는다.
12. 튜브 뚜껑을 닫는다.

표 2.2. 세 가지 PCR 프로그램 (1-3)

프로그램 1	프로그램 2	프로그램 3
98°C 에서 1 min	98°C 에서 1 min	98°C 에서 1 min
25 번 반복: 98°C for 15 sec 55°C for 5 sec 72°C for 20 sec	25 번 반복: 72°C for 20 sec 55°C for 5 sec 98°C for 15 sec	25 번 반복: 72°C for 10 sec 98°C for 15 sec 55°C for 5 sec
72°C for 1 min	72°C for 1 min	72°C for 1 min
10°C에 저장	10°C에 저장	10°C에 저장



Q. 10 PCR 프로그램의 선택 (2 points)

Node Id: 33418d50512f939d3aeb6813

만일 프라이머의 **melting temperature (T_m)** 가 **60 °C**이고 **DNA** 중합효소가 **72 °C**에서 **25bp/sec**의 속도로 움직인다면 표 2.2의 3가지 **PCR** 프로그램 중에서 어떤 것이 가장 적절할 지 표시하십시오.

1. PCR 프로그램 1

2. PCR 프로그램 2

3. PCR 프로그램 3

매우 중요

1. Question 9와 10은 각자가 원하는 답을 제출한다는 것을 명심 할 것. 만족 할만한 답을 얻은 후에는 "LOCK ANSWERS"를 클릭하여 답을 확정지으시오. **NOTE:** 확정한 후에는 답을 더 이상 수정 할 수 없음.

2. 답을 확정한 후에 핑크 카드를 들어서 조교가 여러분의 샘플을 PCR기계로 옮겨 줄 수 있도록 한다. PCR 프로그램은 약 20분간 진행됨. (이 시간동안 서론에 제시한 바 대로 Part 1 또는 Part 3의 실험을 수행한다.)

3. 20분 후 다시 핑크 카드를 들어서 조교로부터 샘플을 돌려받도록 한다. 직접 요구하지 않으면 샘플을 돌려받을 수 없음.

4. 샘플을 돌려 받은 후에는 자기 것이 맞는지 확인한다.

5. PCR 샘플에 로딩 버퍼 10 µL를 더하고 피펫으로 5번 정도 up-and-down하여 (거품이 생기지 않도록 주의) 잘 섞어준다.

6. 샘플을 아가로스 젤의 정해진 섹션에 로딩하고 전기영동 한다.

7. 젤 사진을 찍어서 기록을 남긴다. (젤 사진에 최고 22points까지 점수가 부여됨)

이제 여러분이 선택한 프라이머 쌍을 사용한 PCR 분석에 해당되는 표준 젤 사진이 주어질 것이다.

이 사진을 사용해서 Question 11과 12에 답하십시오.

NOTE: 여러분의 젤을 돌려줄 때 조교로부터 이 사진을 받게 될 것이다.



Q. 11 DNA 밴드의 크기 (4 points)

Node Id: **2261c610758917fbc24905ed**

아래 주어진 크기의 **DNA** 밴드가 각 **PCR** 산물에 들어있는지 여부를 '+'로 표시하시오.

실험 결과는 **column**별로 보고 하시오,



	PCR-1	PCR-2	PCR-3	PCR-4	PCR-5	PCR-6
150 bp	☐	☐	☐	☐	☐	☐
200 bp	☐	☐	☐	☐	☐	☐
250 bp	☐	☐	☐	☐	☐	☐
300 bp	☐	☐	☐	☐	☐	☐
350 bp	☐	☐	☐	☐	☐	☐
400 bp	☐	☐	☐	☐	☐	☐
450 bp	☐	☐	☐	☐	☐	☐
500 bp	☐	☐	☐	☐	☐	☐
550 bp	☐	☐	☐	☐	☐	☐

| Q. 12 효소 기능에 이상이 생긴 단계 (4 points)

Node Id: **ff6dc825d5bde0184dfec782**

주어진 프라이머를 사용한 **PCR** 실험 결과를 토대로, 그림 **2.1**에 표시된 **5**가지 효소 경로 의 기능이 정상적인지 아니면 기능에 이상이 있는지, 또는 해당 프라이머로는 효소 기능의 정상 또는 비정상 여부를 판단 할 수 없는 지를 표시하시오.

	정상 기능	기능이상	판단 불가
TRP5	☐	☐	☐
TYR1	☐	☐	☐

PHA2	☐	☐	☐
ARO7	☐	☐	☐
ARO2	☐	☐	☐

3. 돌연변이 효모의 영양요구성 (15 POINTS)

오래 전부터 반수체 균류인 효모 *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast)는 진핵생물의 중심 대사경로를 규명하는 연구에서 모델 생물로 사용되어 왔다. 정상적인 효모는 단백질 합성에 필요한 20가지 아미노산을 모두 만들 수 있다. 그러나 UV를 조사하면 다양한 영양요구성(auxotrophic) 돌연변이 균주가 생겨난다. 주어진 책자에는 *S. cerevisiae*의 반수체 균주 1-5를 8가지 다른 배지(A-H)에서 배양한 사진들이 들어있다. Position 1=접종하지 않음; Position 2 = 균주 1; Position 3 = 균주 2; Position 4 = 균주 3; Position 5 = 균주 4; Position 6 = 균주 5.
배지 A-H의 조성은 표 3.1에 나와 있다.

책자에 표시를 하거나 글자를 쓰지 마시오.

배지	조성
A	완전복합배지 (yeast extract + 펩톤 + 덱스트로스)
B	아미노산이 배제된 최소배지
C	최소배지 + 호모시스테인
D	최소배지 + 이소류신
E	최소배지 + 트레오닌
F	최소배지 + 메티오닌 + 트레오닌
G	최소배지 + 리신
H	최소배지 + 프롤린



Q. 13

효모 균주의 생장 또는 생장불능 (10 points)

Node Id: **bbd24126db8bb263c5dc6452**

각각의 배지에서 여러 균주의 생장 (+) 또는 생장불능(-)을 여기에 기록하십시오.

 =
생장

 =
생장 불능

	균주 1	균주 2	균주 3	균주 4	균주 5
배지 A					
배지 B					
배지 C					
배지 D					
배지 E					
배지 F					
배지 G					
배지 H					



Q. 14

효소 기능이 상실된 대사 단계 (5 points)

Node Id: **5d4effda2f48e112ec5b7354**

돌연변이 효모의 생장 패턴을 토대로, 5종의 균주(1-5)중에서 관여하는 효소의 기능에 이상이 생겼을 가능성이 가장 높은 단계를 추리하십시오.

	균주 1	균주 2	균주 3	균주 4	균주 5
부스 벽에 부착된 생합성 지도에 나오는 효소 경로 번호					

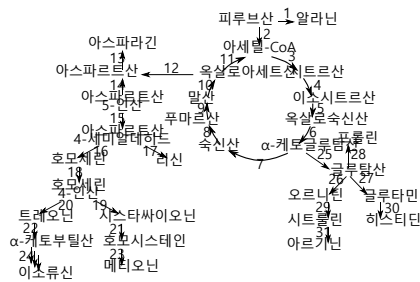


그림 3.7: 효모의 아미노산 생합성 경로를 요약한 모식도

끝