

## §4 Заключительный этап: командная часть

### 9 класс

Финальный этап олимпиады был посвящен работе с аквапонными установками. В ходе проведения финального тура участники были разделены на команды по 3-4 человека. Финальные командные задания включали как расчетные и теоретические задачи, так и практическую работу с аквапонными системами (описание систем приводится ниже).

Помимо выполнения заданий участникам проводились теоретические лекции, на которых рассматривались основные вопросы по проектированию, бюджетированию, созданию и балансированию аквапонных установок.

Работа команд и выполнение заданий оценивалась исходя из составленных критериев. Результаты команды подсчитывались как сумма баллов за выполнение заданий.

Максимальное количество баллов - **78**

В ходе практической работы оценивалось ведение журнала отслеживания основных параметров системы (Ph, электропроводность, Red/Ox потенциал, температура, концентрация растворенного кислорода, концентрация аммиака, концентрация нитратов и нитритов), интерпретация полученных результатов и принятие решения для восстановления оптимального состояния системы.

Часть параметров отслеживалась при помощи электронных датчиков (Ph, температура, растворенный кислород, электропроводность и Red/Ox потенциал)

Отдельно командам были доступны химические тесты для измерения Ph, концентрации аммиака, нитратов, нитритов, растворенного кислорода и фосфатов .

За практическую часть и ведение журнала команда могла получить до **4 балла за каждый день работы. (Всего - 20 баллов)**

При выполнении большинства заданий участникам разрешалось пользоваться доступной литературой и электронными источниками в сети Интернет.

За теоретическую часть команда могла получить максимально **58 баллов**.

### Описание аквапонных систем

Аквапонная система представляет собой трехуровневую конструкцию, состоящую из гидропонного модуля для растений (расположен сверху), аквариума для рыбы (расположен посередине) и модуля биофильтра (расположен снизу). Фотография системы приведена ниже.

Модуль биофильтра разделен на 3 отсека для отдельного размещения бактерий, водных растений и биологических фильтратов.

Для создания и поддержания постоянного водяного потока в системе в биофильтре установлены помпа, которая обеспечивает подачу воды в аквариумный блок и гидропонный модуль предварительно проходя через внешний фильтр. Соотношение потоков в аквариумный и гидропонный блок регулируется при помощи шаровых кранов.

Излишки воды в гидропонном модуле сливаются в аквариумный блок, а из аквариума вода сливается в биофильтр в отсек с бактериями.

Гидропонный модуль заполнен листовым салатом. В аквариуме размещена форель. Поскольку для нормального существования форели необходимо поддержание низкой

температуры (10-12С), к каждой системе подключена холодильная установка со встроенным насосом. Контур охлажденной воды проходит только через аквариум для повышения эффективности охлаждения и создания дополнительной циркуляции в системе.

Для отслеживания параметров в системе установлены электронные датчики для измерения:

- рН
- Редокс-потенциала
- Концентрации растворённого кислорода
- Электропроводности
- Температуры
- Скорости потока

Показания с датчиков снимаются при помощи подключенных ноутбуков.

**Каждой команде для работы в финале была предоставлена отдельная аквапонная система.**



## Теоретические задания

### Задание-1 (16 баллов)

Время на выполнение 45 минут

1.1 Опишите ключевые биологические, химические и физический процессы, которые происходят в блоках предложенных установках из-за биологической активности организмов. (8 баллов)

1.2 Приведите список параметров системы, которые можно (и нужно) отслеживать при помощи датчиков и реагентов в предложенных системах. (8 баллов)

*\* при решении этого задания пользоваться интернетом не разрешается*

#### Решение:

##### 1.1

Блок- процесс	Баллы
Аквариум - потребление O <sub>2</sub>	0.5
Аквариум- выделение NH <sub>3</sub>	0.5
Аквариум- выделение CO <sub>2</sub>	0.5
Аквариум- испарение воды	0.5
Биофильтр- потребление O <sub>2</sub>	0.5
Биофильтр- NH <sub>3</sub> -> NO <sub>2</sub> /NO <sub>3</sub>	0.5
Биофильтр- потребление CO <sub>2</sub>	0.5
Биофильтр- выработка O <sub>2</sub>	0.5
Биофильтр- Переработка органики	0.5
Гидропоника - выделение O <sub>2</sub>	0.5
Гидропоника - потребление NO <sub>3</sub>	0.5
Гидропоника- испарение H <sub>2</sub> O	0.5
Дополнительные процессы	2

##### 1.2

Показатели	Баллы
Ph	0.5
[NH <sub>3</sub> ]	0.5
[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ]	0.5
[O <sub>2</sub> ]	0.5
[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	0.5
[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]	0.5
Температура	0.5
Электропроводимость (жесткость)	0.5

Скорость потока	0.5
Red-Ох потенциал	0.5
Концентрация CO <sub>2</sub>	0.5
Уровень воды	0.5
Дополнительные	2

### Задание-2 (7 баллов)

Время на выполнение 45 минут

2.1 Обоснуйте возможные корреляции и изобразите графически (два параметра на графике) корреляции между:

- Температурой и относительной концентрацией ионизированной и не ионизированной форм аммиака;
- Температурой и растворённым кислородом;
- Температурой и эффективностью работы нитрифицирующих бактерий в биофилтре;
- Давлением на выходе из воздушного компрессора (диаметр воздуховода и диаметр пузырьков на выходе из распылителя считать постоянным) и растворённым в воде кислородом;
- Концентрацией азота в системе (во всех возможных для УЗВ биологически активных формах азота) и: численностью гидробионтов, численностью растений, суммарной площадью всасывания корневой системы растений, суммарной площадью листовой пластинки растений, биомассой бактерий-нитрификаторов;
- Плотность посадки рыб, растворимого кислорода и концентрации корма на единицу объёма в условиях аэрации и оксигенации;
- Редокс-потенциалом и: рН, растворимым кислородом, органическими веществами в воде;

#### Решение: (3 балла)

Графики должны отображать следующие корреляции:

- При повышении температуры степень диссоциации гидроксид - аммония возрастает, а растворимость Аммиака уменьшается.
  - При повышении температуры растворимость кислорода в воде снижается
  - При повышении температуры активность (и эффективность) нитрифицирующих бактерий сначала растёт до оптимального значения температуры (~33-37С), после которой бактерии больше не могут функционировать
  - При повышении давления концентрация растворенного кислорода быстрее выходит на «плато»
  - концентрации всех форм азота:
1. Зависимость между концентрацией азота и численностью гидробионтов.

Гидробионты - все живые организмы - животные, растения, бактерии, развивающиеся и существующие в водной массе и донных отложениях водоемов и водотоков. [ecology.info/term/25227/](http://ecology.info/term/25227/)

Таким образом, для ответа на вопрос гидробионов нужно разделить по типам питания на автотрофы, гетеротрофы и хемотрофы и рассмотреть влияние каждой группы на предлагаемый параметр (общий азот в УЗВ).

Гетеротрофы выделяют азот в виде органических веществ, аммиака и мочевины. Следовательно, чем больше количество гетеротрофных гидробионтов, тем выше общее содержание азота в УЗВ.

Хемотрофы, кроме азот-фиксирующих бактерий, не оказывают влияние на количество азота. От них зависит лишь общий аммонийный азот (TAN). Т.к. азот-фиксаторы – являются почвенными организмами, от хемотрофов-гидробионтов зависит не столько количество азота в системе, сколько форма в которой азот находится в УЗВ (нитрат, нитрит, аммоний ион, аммиак) и их соотношение между собой.

Общий аммонийный азот (TAN) состоит из двух фракций, неионизированного аммония ( $NH_3$ ) и ионизированного аммония ( $NH_4^+$ ) и продуктов белкового метаболизма. TAN выделяется через жабры рыб и продуцируется бактериями, которые разлагают органические частицы в воде.

Подробнее: <http://aquavitro.org/2016/07/09/model-uzv-rukovodstvo-po-proektirovaniyu-i-upravleniyu/>

Автотрофы, как потребители окисленных форм азота, уменьшают общую концентрацию азота в УЗВ.

2. Концентрацией азота в системе и численностью растений Поскольку все водные растения являются автотрофами, см. ответ на первый подвопрос.

3. Концентрацией азота и суммарной площадью всасывания корневой системы растений Чем больше суммарная площадь всасывания корневых систем растений, тем больше азота растения могут потребить из УЗВ. Однако, существует зависимость от стадии развития растений и потребности растений в азоте. Наибольшее количество азота растения потребляют в период усиленного роста листьев, побегов и плодов.

4. Концентрацией азота и суммарной площадью листовой пластинки растений Как было сказано выше, наибольшее количество азота растения потребляют в период усиленного роста листьев, побегов и плодов. Поэтому можно говорить о том, что чем больше суммарная площадь листовой пластинки растений, тем больше аккумулировано растением азота. Но потребление азота в единицу времени не имеет прямой зависимости от площади пластинки. Необходимо учитывать стадию роста и развития растения, а так же другие факторы, влияющие на потребление азота (количество фосфора и калия, потребляемого растениями)

- Плотность посадки при повышении концентрации кислорода можно увеличивать до некоторого предела. Повышение концентрации кислорода в воде и увеличение плотности посадки ведет к увеличению необходимого количества корма на единицу объема.

- Увеличение значений Red/Ox- потенциала приводит к уменьшению значений Ph и активированию окисления органических продуктов.

2.2 Предложите способ увеличения концентрации растворённого кислорода в воде, если при 15 град С его концентрация:

- меньше чем 10,1 мг/л

- равна 10,1 мг/л

(2 балла)

**Решение:**

Растворимость кислород при 15С составляет 10,1 мг/л. Таким образом, увеличение концентрации кислорода дополнительными растениями или аэраторами имеет смысл только при начальной концентрации < 10.1

При концентрации равной 10,1 при 15С концентрацию кислорода можно лишь увеличить или путем озонирования (или оксигенации), или путем снижения температуры

2.3 Предположите, какой эффект при аэрации воздухом будет получен в системе, если подавать на вход компрессора воздушную смесь, прошедшую УФ обработку.

(2 балла)

**Решение.**

В ответе необходимо сделать основной упор на озонировании. При этом растворимость и насыщение воды кислородом будет эффективнее.

Атомарный кислород является активным в химическом плане и легко вступает во взаимодействие с ионами в растворе и органическими веществами, окисляя их. Озонирование воздуха системы подачи на распылители аэраторы приведёт к смещению Red-Ox потенциала в сторону его увеличения.

С другой стороны, будет происходить уменьшение числа бактерий, попадаемых с воздухом. Однако, в подобных системах УФ- излучение для дезинфекции устанавливают на протоке воды.

### **Задание-3**

#### **Расчет параметров системы (15 баллов)**

*Время на выполнение 60 минут*

Рассчитайте количество сеголетков бестера, которое необходимо закупить для заполнения аквапонной системы, если известны следующие параметры:

1. Аквакультурный модуль имеет диаметр 2 м, высоту 1 м
2. Модуль биофильтра 0,5 м кубический.
3. Модуль гидропоники имеет размеры (Ш\*В\*Г), см: [150\*30\*90] в количестве 20 шт
4. При заполнении водой системы модули были заполнены на 70см (Аквакультура), 0,5 метра кубических по воде, без учёта сепарации органики (биофильтр) и 20см (гидропоника)
5. Масса сеголетки бестера – 80 гр.
6. Длина сеголетки бестера - 15 см
7. Плотность посадки - 30 кг/м<sup>3</sup>
8. Потребление O<sub>2</sub> для товарного бестера составляет 0,12 мг O<sub>2</sub>/ кг рыбы в сек

9. Товарный вес бестера - 2 кг
10. Время выращивания 1,5 года
11. Гибель и отклонение в развитии - не более 5% в год
12. Если в условии указывается диапазон значений, используйте среднее.

Промежуточные расчеты мер (вес, размеры, проценты, концентрации..) округляйте до тысячного знака по стандартным правилам.

Количество особей округляйте до целых значений в большую сторону.

### **Решение:**

Рассчитываем объем воды в системе в  $M^3$ :

- Гидропоника:  $0.2 * 1.5 * 0.9 * 20 = 5.4 M^3$

- Аквакультура:  $3.14 * (2/2)^2 * 0.7 = 2,198 M^3$

- Биофильтр:  $0.5 M^3$

Общий объем системы =  $8.098 M^3$

Количество рыбы через 1.5 года =  $(30 * 8.098) / 2 = 122$

Количество рыбы при посадке = X

Количество рыбы через год =  $(X - 0.05X)$

Количество рыбы через 1,5 года =  $(X - 0.05X - (X - 0.05X) * 0,05) = 122$

**X = 136**

### **Задания на автоматизацию**

Следующий блок заданий направлен на создание алгоритмов для автоматизации задач перемещения растений при помощи манипулятора, движущегося по направляющей рамке и задач добавления реагентов для оптимизации значений Ph в системе при помощи автоматической помпы.

Выполнение заданий не требует знаний языков программирования, однако, опыт в этой области является преимуществом.

Перед выполнением задания преподаватель детально разбирает все ключевые функции для управления системами автоматизации и основные подходы для составления алгоритмов управления.

Поскольку задания на автоматизацию выходят за рамки основных школьных предметов трека (химия и биология)- всего за данный блок можно было получить не более 10 баллов. Таким образом, успешность (или, не успешность) выполнения этих заданий не оказывало решающего влияния на общую оценку работы команд.

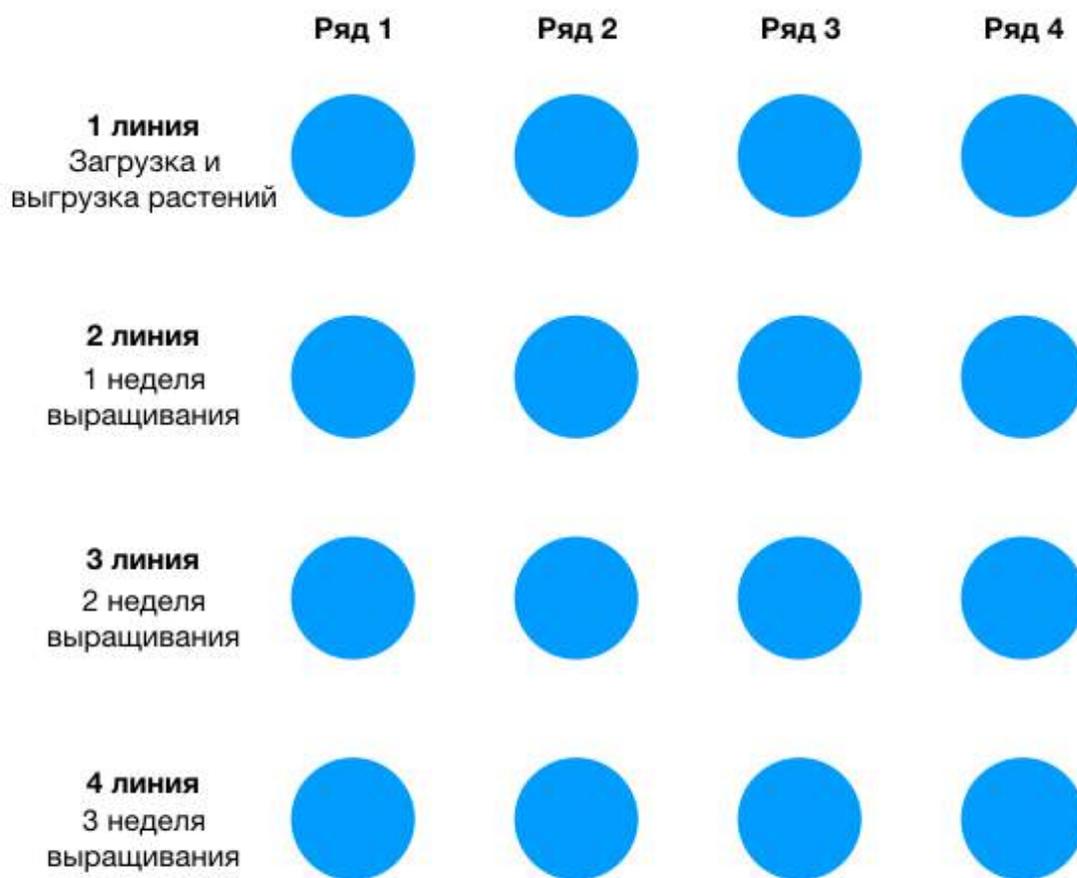
## Задание - 4

### Перемещение растений по мере их созревания. (5 баллов)

*Время на выполнение 120 минут*

Ресторан “Свинья и Бисер” заказал новейшую систему по управлению ростом растений. Заказчик сообщил, что культуры, которые требуется выращивать прямо на кухне, созревают за 3 недели, поэтому была заказана конфигурация гидропоники с посадочными местами 4x4. Схема приведена ниже.

1 линия растений занята в моменты сбора и загрузки, в остальное время должна быть всегда свободна! С помощью этой линии осуществляется сбор урожая и загрузка новых растений.



Каждой неделе выращивания соответствует своя линия, таким образом растения должны автоматически перемещаться. Сбор урожая производится регулярно- один раз в неделю.

#### Сбор урожая

Для сбора урожая с 4 линии растения должны быть перемещены с помощью манипулятора на 1 линию, где повар забирает выращенные растения, готовые к употреблению.

#### Загрузка урожая

Повар загружает на 1 линию контейнеры с ростками для выращивания, затем контейнеры перемещаются на 2 линию выращивания, что соответствует 1 недели выращивания.

Наши коллеги из ООО “Вселенские магистры кода” помогли с реализацией алгоритма загрузки урожая, поэтому ваша задача - создать программу сбора урожая используя готовые запрограммированные функции.

Задачи:

1. Составить подробную блок-схему алгоритма сбора урожая для 1 ряда, учитывая **задержку между командами!** (на выполнение каждой инструкции отводится время, которое следует учитывать перед отправкой новой инструкции).
2. Расширить алгоритм на 4 ряда. Что для этого необходимо изменить в первом алгоритме? \_\_\_\_\_
3. Перенести координаты и задержки в систему GreenPL GRED и протестировать точность и правильность выполнения составленного алгоритма.

### Решение:

Для решения задания необходимо использовать уже готовые функции для управления автоматическим блоком- манипулятором, в которые необходимо проставить координаты расположения горшочков с растениями. Схема расположения растений предоставляется в виде перенесенной схемы на бумаге.

Примеры функций:

#### 🔧 Функция

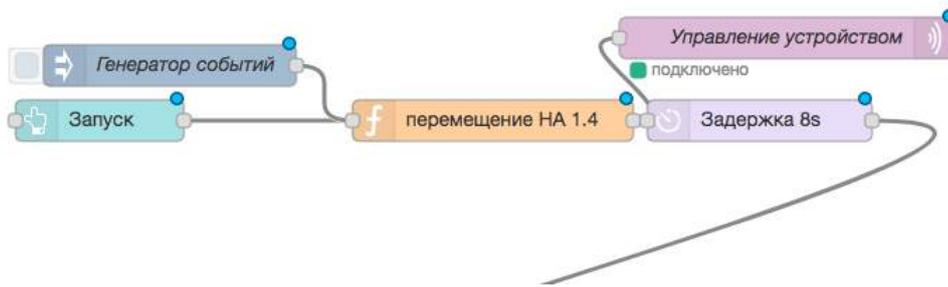
```
1
2 * msg.payload = {
3     x : 0,
4     y : 0,
5     grab: 0,
6     pump: 0
7 * };
8 return msg;
```

В данной функции прописываются координаты перемещения манипулятора по плоскости (X и Y) путем ввода значений для переменных “x” и “y”.

“Захват горшочка с растением” активируется при присвоении значения “1” переменной grab.

После этого разработанные функции с проставленными значениями переменных размещаются на Блок-Схеме, которая в дальнейшем используется для управлением системой автоматизации.

Пример рабочей блок-схемы одного перемещения приведен ниже:



Приведенная схема позволяет переместить манипулятор на клетку 1.4 с последующей задержкой.

Блок с заданными участниками параметрами на схеме называется “перемещение на 1.4”

Проверка работоспособности алгоритма осуществляется с помощью практического запуска систем.

Каждой команде на этапе отработки алгоритма и определения значений переменных в функциях предоставляется неограниченное количество подходов к оборудованию в рамках предоставленного времени.

### Задание-5

#### Регулировка pH в гидропонике. (5 баллов)

*Время на выполнение 120 минут*

Увидев автоматизированную систему сбора растений в ресторане “Свинья и Бисер”, владелец заведения “Лось и Лосось” тоже захотел поставить установку, но с усовершенствованиями. Проведя несколько тестов с датчиками, работники ресторана “Лось и Лосось” выяснили, что pH больше 8 (это значение не соответствует норме).

Для автоматической оптимизации значений Ph, был заказан перистальтический насос, который способен добавлять нейтрализующие реагенты в систему.

Известно, что для добавления 1 мл реагента время работы помпы должно составлять 6666 мс.

При проработке алгоритма необходимо учитывать инерционность системы.

Ваши задачи:

1. Рассчитать количество необходимого реагента, исходя из текущих показаний датчиков и объема жидкости в тестовой системе, заполненной на  $0,0423 \text{ м}^3$ .
2. Создать алгоритм добавления реагента для нейтрализации системы

#### РЕШЕНИЕ:

Для решения задания необходимо использовать уже готовые функции для управления автоматическим перистальтическим насосом, в которые необходимо проставить параметры времени работы помпы.

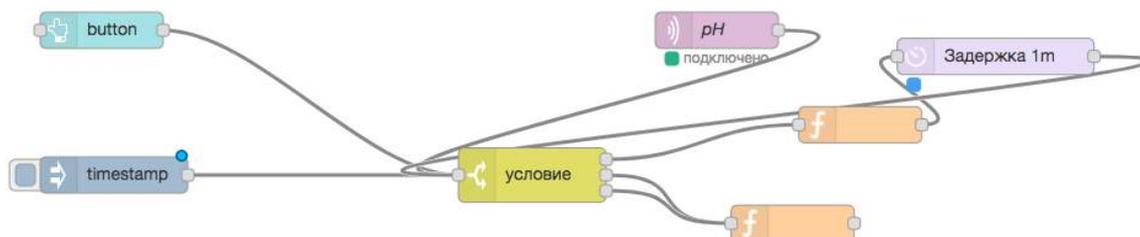
Примеры функций:

```
Функция
1
2 msg.payload = {
3   x : 0,
4   y : 0,
5   grab: 0,
6   pump: 30*6666
7 };
8 return msg;
```

В данной функции необходимо назначить переменную “pump” и указать время работы помпы. Время работы помпы рассчитывается из условия, что за 6666мс помпа прокачивает 1мл реагента. В приведенном примере помпа запрограммирована прокачивать 30мл за запуск функции.

После этого разработанные функции с проставленными значениями переменных размещаются на Блок-Схеме, которая в дальнейшем используется для управлением системой автоматизации.

Пример рабочей блок-схемы приведен ниже:



В данной блок схеме необходимо использовать минимум 2 функции, отвечающие за работу или простой помпы в зависимости от условий.

Условия задаются в подготовленном заранее блоке, приведенном ниже

Удалить      Отмена      **Готово**

▼ свойства блока

Название

Свойство

и

Данное условие позволяет запустить три разных сценария (вызвать три разные функции) управления помпой в зависимости от показаний датчиков Ph.

При показаниях  $> 8$  должен добавляться реагент для понижения значений.

При показаниях в пределах (7;8) помпа должна быть отключена (функция простоя)

И при показаниях  $< 7$  должна запускаться помпа, добавляющая реагент для повышения Ph.  
(ДАННОЕ УСЛОВИЕ НЕ ПРОВЕРЯЛОСЬ НА ФИНАЛЕ)

Каждой команде на этапе отработки алгоритма и определения значений переменных в функциях предоставляется неограниченное количество подходов к оборудованию в рамках предоставленного времени.

### Задание- 6 (10 баллов)

Поработав с аквапонными установками предложите возможные варианты их модификации и оптимизации. При этом, вам не обязательно ограничиваться тем, что есть в продаже. Попробуйте разработать что-то новое, что было бы интересно любителям аквапоники.

При разработке новых компонентов постарайтесь отнестись к этому, как к созданию потенциально прибыльного StartUp'a. Для этого вам надо рассчитать себестоимость и рыночную стоимость вашего компонента с учетом затрат.

Какие проблемы будет решать ваш инновационный компонент?

(5 баллов)

По результатам проработки проекта составьте презентацию и проведите ее защиту.

(5 баллов)

**Критерии оценки:**

- Предлагаемое решение имеет уникальность
- Предлагаемое решение теоретически может быть произведено в настоящее время
- Произведен детальный разбор необходимых компонентов при расчете себестоимости
- Произведен анализ конкурентных предложений
- Сформулированы проблемы, на решение которых направлена предлагаемая разработка
- При расчете себестоимости и стоимости конечного продукта учитывается не только стоимость компонентов, но и операционные расходы
- Презентация отражает основные моменты, указанные в списке критериев.

## Практическая работа. Ведение лабораторного журнала.

Помимо решения теоретических задач по проектированию и автоматизации закрытых биологических систем, в финале Олимпиады-НТИ команды участников осуществляли практическую работу с предложенными системами.

В ходе этой работы командам необходимо было проводить, с одной стороны, стандартные необходимые процедуры (добавление корма в систему, очистка систем), проверку основных показателей (Ph, электропроводность, Red/Ox потенциал, температура, концентрация растворенного кислорода, концентрация аммиака, концентрация нитратов и нитритов), так и принимать экстренные решения для балансировки установок при отклонении показателей.

Все проводимые операции и принимаемые решения должны ежедневно оформляться командами в лабораторный журнал.

Качество практической работы и ведение журнала оценивалось по следующим критериям:

- Командой правильно проведены все необходимые измерения
- Результаты измерений внесены в журнал
- Результаты интерпретированы (указана норма или отклонение от нормы)
- В случае отклонения значений от нормы, командой предложен вариант необходимой корректировки
- В журнал внесены все процедуры, осуществленные с системами командой
- Действия команды направлены на улучшение работы системы
- Действия приводят к реакции системы - видно динамику улучшения.
- Журнал ведется на ежедневной основе
- При невозможности проведения модификаций систем непосредственно участниками в ходе рабочего Олимпиадного дня, команды составляют список манипуляций для кураторов трека\*.

*\* К подобным манипуляциям относятся: добавление воды и внесение корма в вечернее время, удаление заболевших особей из системы, увеличение/уменьшение количества растений аквапонного блока, и др. После завершения рабочего финального дня кураторы трека производят все манипуляции для подготовки систем к следующему рабочему дню.*

### 10-11 класс

Финальные командные задания для участников 10-11 классов включали как теоретическую, так и практическую часть.

На подготовительном (теоретическом) этапе командам необходимо было найти таргетный ген используя биоинформатические базы данных NCBI(GeneBank) и ICGC. После этого, для отобранного участка гена команды должны предложить праймеры и составить протокол проведения реакции амплификации.

Ответы и решения заданий теоретической части приводятся командами в электронном виде и сдаются преподавателю.

Практическая часть включает задания по проведению полимеразной цепной реакции с дальнейшей детекцией результатов при помощи горизонтального ДНК гель-электрофореза.

Оценка практических заданий осуществляется не только по конечному результату, но и проводится оценивание работы членов команд в лаборатории по подготовленному списку ключевых этапов и правил.

Результаты команды подсчитывались как сумма баллов за выполнение заданий.

Максимальный балл за командную работу – 57

### **Теоретические командные задания (Биоинформатика) -21 балл**

Для диагностики рака поджелудочной железы используется панель для детекции мутаций в следующих генах:

**APC, ATM, BRCA1, BRCA2, CDK4, CDKN2A, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, PALB2, PMS2, STK11, VHL**

1. Определите, как часто эти гены мутированы (мутация с заменой а.о!) в образцах базы данн ICGC? (2 балла)

2. Определите, как часто эти гены мутированы (мутация со сдвигом рамки считывания!) в образцах базы данн ICGC? (2 балла)

3. Определите ген, в котором чаще всего (топ 50 случаев каждого типа мутации) встречаются и сдвиг рамки и замена а.о. (2 балла)

4. Для найденного гена определите, какие мутации случаются в образцах (замена а.о), ассоциированных с заболеванием (скорее всего патогенные и/или фактор риска). Выпишите их координаты. (2 балла)

5. Определите, в каких кодонах происходят замены. (3 балла)

6. Найдите запись гена в банке NCBI (Раздел GeneBank). Сохраните идентификатор записи в файл отчета. (1 балл)

Определите (и сохраните в ОТДЕЛЬНОМ текстовом файле, созданном при помощи блокнота) последовательность гена (формат- FASTA). Сохраните в файле отчета координаты экзонов (в генных координатах). Сохраните в файле отчета координаты экзонов (в хромосомных координатах) (3 балла)

7. Определите, в каком экзоне сконцентрировано большинство мутаций (замена а.о., без учета патогенности и риска). Запишите в файл отчета. Сколько таких мутаций на участке? (Запишите в файл отчета) (2 балла)

Подсказка: Для решения использовать аминокислотные замены

8. Подготовьте праймеры для амплификации участка длиной от 490 до 510нк. Таким образом, чтобы

а) Праймеры отжигались при  $t_0$  59-62 (opt-60)

б) Экзон с наибольшим количеством мутаций должен входить в амплифицированный продукт.

в) Если участок короче 490-510, необходимо захватить дополнительные нуклеотиды с концов последовательности соответствующего участка гена

(4 балла)

### Решение:

Для решения заданий при помощи расширенного поиска в базе ICGC необходимо найти записи об известных мутациях у пациентов с раком поджелудочной железы (pancreas cancer). Необходимо указать тип мутаций- missense (замен а.о.) (или Frameshift (сдвиг рамки считывания).

Результаты поиска генов со сдвигом рамки считывания-  
[https://dcc.icgc.org/search/g?filters=%7B%22donor%22:%7B%22primarySite%22:%7B%22is%22:%5B%22Pancreas%22%5D%7D%7D,%22mutation%22:%7B%22consequenceType%22:%7B%22is%22:%5B%22frameshift\\_variant%22%5D%7D%7D%7D&donors=%7B%22from%22:1%7D&mutations=%7B%22from%22:1%7D](https://dcc.icgc.org/search/g?filters=%7B%22donor%22:%7B%22primarySite%22:%7B%22is%22:%5B%22Pancreas%22%5D%7D%7D,%22mutation%22:%7B%22consequenceType%22:%7B%22is%22:%5B%22frameshift_variant%22%5D%7D%7D%7D&donors=%7B%22from%22:1%7D&mutations=%7B%22from%22:1%7D)

Результаты поиска генов с мутацией а.о.-

[https://dcc.icgc.org/search/g?filters=%7B%22donor%22:%7B%22primarySite%22:%7B%22is%22:%5B%22Pancreas%22%5D%7D%7D,%22mutation%22:%7B%22consequenceType%22:%7B%22is%22:%5B%22missense\\_variant%22%5D%7D%7D%7D&donors=%7B%22from%22:1%7D&mutations=%7B%22from%22:1%7D](https://dcc.icgc.org/search/g?filters=%7B%22donor%22:%7B%22primarySite%22:%7B%22is%22:%5B%22Pancreas%22%5D%7D%7D,%22mutation%22:%7B%22consequenceType%22:%7B%22is%22:%5B%22missense_variant%22%5D%7D%7D%7D&donors=%7B%22from%22:1%7D&mutations=%7B%22from%22:1%7D)

После этого для каждого перечисленного гена необходимо посмотреть, сколько известно для них мутаций каждого типа.

	missense	frameshift
PC A	10/729	4 / 545 (0.73%)
TM A	20 / 729 (2.74%)	3/545
RCA1 B	5/729	0
RCA2 B	5/729	5 / 545 (0.92%)
DK4 C	0	0
<b>DKN2A C</b>	<b>57 / 729 (7.82%)</b>	<b>57 / 545 (10.46%)</b>
CAM EP	0	1/545
LH1 M	2 / 729	0
SH2 M	2 / 729	0
SH6 M	2 / 729	0
ALB2 P	3/729	1/545
MS2 P	1/729	0
K11 ST	2/729	1/545
HL V	0	0

Таким образом, ген CDK2A наиболее часто мутирует из всех приведенных в задании.

Для найденного гена в базе ICGC необходимо найти патогенные мутации (Likely pathogenic, risk factor )

Позиция	Замен а а.о.	
chr9:g.21971120G>A	P135L, P94L	
chr9:g.21971111G>A	H83Y, A138V,	
chr9:g.21971186G>A	P72L, P113L	
chr9:g.21971028C>T	G125R, G166R	
chr9:g.21971153C>A	G83V, G124V	
chr9:g.21974677C>A	Q50H	
chr9:g.21971111G>C	H83D, H32D,	
chr9:g.21971108C>A	R98L, D84Y	
chr9:g.21971096C>A	G143V, G102V	

Для определения мутированных кодонов необходимо посмотреть, какие триплеты кодируют а.о., и оставить только те, изменение соответствующего нуклеотида в которых приведет к появлению нового остатка.

Пример:

chr9:g.21971120G>A	P135L, P94L	ССТ, ССА, ССГ, ССС
chr9:g.21971111G>A	H83Y, A138V,	САТ, САС
chr9:g.21971186G>A	P72L, P113L	ССТ, ССА, ССГ, ССС
chr9:g.21971028C>T	G125R, G166R	ГГА, ГГГ
chr9:g.21971153C>A	G83V, G124V	ГГТ, ГГА, ГГГ, ГGC

В первом случае произошла замена G на A и при этом произошла замена Pro на Leu. По таблице генетического кода необходимо найти все кодоны, кодирующие Пролин и Лейцин, и посмотреть, в каких случаях замена одного Гуанина на Аланин приводит к смене кодона.

В данном задании необходимо учесть, что исследуемый ген находится на обратной цепи ДНК (это участники должны найти в базе NCBI, выполняя соответствующее задание), а нуклеотиды в базе ICGC представлены только для прямой (т.е. комплементарной гену) цепи.

Запись в NCBI для гена- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1029>

Последовательность гена можно сохранить по ссылке [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NG\\_007485.1?report=fasta&from=5001&to=31740](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NG_007485.1?report=fasta&from=5001&to=31740)

(NCBI Reference Sequence: NG\_007485.1)

Ген расположен на обратной цепи 9 хромосомы с 21967752 по 21995043 н.к.

Ген содержит 2 экзона : 5161-5353 и 28284-28489 нк.

По соответствию координат мутированных нуклеотидов и а.о., если их отсортировать по убыванию, можно увидеть, что большая часть мутаций собрана именно во втором экзоне.

Таким образом, данный участок и должен быть использован для подбора праймеров и экспериментальной работы. По условиям задания необходимо выбрать участок длиной 500. Таким образом, должна быть выбрана последовательность:

>NG\_007485.1:28124-28649 *Homo sapiens cyclin dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A), RefSeqGene (LRG\_11) on chromosome 9*

AACTCAAGAAGGAAATTGGAAGCTGGAAGCAAATGTAGGGGTAATTAGACACCTGGGGCTTGT  
GTGGGGGTCTGCTTGGCGGTGAGGGGGCTCTACACAAGCTTCCTTTCCGTCATGCCGGCCCCACC  
CTGGCTCTGACCATTCTGTTCTCTCTGGCAGGTCATGATGATGGGCAGCGCCCGAGTGGCGGAGCTG  
CTGCTGCTCCACGGCGCGGAGCCCAACTGCGCCGACCCCGCCACTCTACCCGACCCGTGCACGAC  
GCTGCCCGGGAGGGCTTCTGGACACGCTGGTGGTGTGCACCGGGCCGGGGCGCGGCTGGACGT  
GCCGATGCCTGGGGCCGTCTGCCCGTGGACCTGGCTGAGGAGCTGGGCCATCGCGATGTGCGAC  
GGTACCTGCGCGGGCTGCGGGGGCACCAGAGGCAGTAACCATGCCCGCATAGATGCCGCGGAA  
GGTCCCTCAGGTGAGGACTGATGATCTGAGAATTTGTACCCTGAGAGCTTCAAAGCTCAGAGCATTC  
A

При помощи сервиса Primer-BLAST необходимо найти пары праймеров для ПЦР.

Длину продукта необходимо указать от 490 до 510, а температуру отжига от 59С до 62С с оптимумом 60С.

Пример правильной пары праймеров:

Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Top	M	C%	Self complementarity	Self 3' complementarity
<b>Forward primer</b>	GAAACTGGAAG CAAATGTAGGGG	10	3	9	1	9.81	47.83	2.00
<b>Reverse primer</b>	CTTTGGAAGCT CTCAGGGTACA	10	2	13	92	9.70	50.00	4.00
<b>Product length</b>	495							

### ПЦР Задача- 1 (5 баллов)

#### Расчет количеств компонентов

Рассчитайте, какое количество каждого компонента необходимо добавить в смесь для ПЦР на основе следующий данных:

Конечный объем ПЦР смеси - 50uL

Не рекомендуется добавлять объемы меньше 1uL (кроме полимеразы), соответственно, можно предварительно развести водой исходные компоненты до более низкой концентрации, если необходимо.

Исходные компоненты	Концентрация или количество в конечной смеси	V, uL на 1 реакцию	V, uL на 5 реакций
10X Taq Buffer с Mg <sup>2+</sup>		5uL	
10mM dNTPs	200uM		
100uM Прямой праймер	0,2 uM		
100uM Обратный праймер	0,2 uM		
Taq-полимераза 5units/uL	1,25 units		
ДНК-матрица 500ug/mL	0,5 ng		
Вода	до конечного объёма 50uL		

**Решение:**

Исходные компоненты	Концентрация или количество в конечной смеси	V, uL на 1 реакцию	V, uL на 5 реакций
10X Taq Buffer с Mg <sup>2+</sup>		5uL	<b>25uL</b>
10mM dNTPs	200uM	<b>1uL</b>	<b>5uL</b>

100µM Прямой праймер	0,2 µM	<b>2µL (5µL раствора)</b>	<b>10µL (5µL раствора)</b>
100µM Обратный праймер	0,2 µM	<b>2µL (5µL раствора)</b>	<b>10µL (5µL раствора)</b>
Тaq- полимераза 5units/uL	1,25 units	<b>0,25 uL</b>	<b>1,25 uL</b>
ДНК- матрица 500ug/mL	0,5 ng	<b>1uL (раствора 0,5 ng/uL)</b>	<b>5uL (раствора 0,5 ng/uL)</b>
Вода	до конечного объёма 50uL	<b>38,75 uL</b>	<b>193,75 uL</b>

### ПЦР Задача 2 - Выбор оптимальной программы (3 балла)

Используя информацию из методички и приведённую ниже, напишите оптимальную программу для вашей ПЦР.

- Для предварительной денатурации используйте максимальное время
- Для всех этапов денатурации используйте 95С
- Оптимальное время отжига праймеров - 30 секунд
- Оптимальное время для финальной элонгации - 7 минут
- 34 цикла

#### Решение:

Стадия	Количество циклов	Температуры	Длительность
Предварительная денатурация	<b>1</b>	<b>95С</b>	<b>3 мин</b>
Денатурация	<b>34</b>	<b>95С</b>	<b>30 сек</b>
Отжиг		<b>(59-61С)</b> <b>Зависит от выбранных праймеров.</b>	<b>30 сек</b>
Элонгация		<b>72С</b>	<b>30 сек</b>

Финальная элонгация	1	72С	7 мин
------------------------	---	-----	-------

### ПЦР Задача №3 (6 баллов)

Для проведения ПЦР вам дан участок геномной ДНК длиной ~ 40000нк.

Одноцепочечный такой фрагмент имеет молекулярный вес 15015346 г/моль

Молекулярный вес продукта (одноцепочечного амплифицированного кусочка) составляет

158915 г/моль

Рассчитайте концентрацию продукта ПОСЛЕ проведения ПЦР, если известно, что:

- в программе ПЦР было предусмотрено 34 шага

- Эффективность используемого подхода и реагентов (по выходу конечного продукта) составляет 75%

- объем реакционной смеси 50мкл.

#### Решение:

$n = 0,5 \cdot 10^9 / (2 \cdot 15015346) = 1,66 \cdot 10^{(-17)}$  моль

после ПЦР  $n = 1,66 \cdot 10^{(-17)} \cdot 2^{34} \cdot 0,75 = 2,14 \cdot 10^{(-7)}$  моль

$c = n/V = 2,14 \cdot 10^{(-7)} / 50 \cdot 10^{(-6)} = 0,0043 \text{ M} = 4,3 \text{ mM}$

### ПЦР - задача 4 постановка реакции (22 балла)

Соблюдая правила работы в лаборатории, условия стерильности и правила, описанные в методичке, смешайте мастер-микс без ДНК на 5 реакций в ПЦР-боксе -1. (В мастер-миксе закладывают одну лишнюю реакцию, чтобы учесть ошибки пипетирования.)

Первым в реакцию необходимо добавлять буфер

Последней Таq-полимеразу

Добавьте в мастер-микс ДНК-матрицу в ПЦР-боксе-2

В этом же ПЦР-боксе раскапайте мастер-микс на нужное количество пробирок для ПЦР (0,2mL)

Установите необходимую программу на амплификаторе и запустите реакцию

Для постановки ПЦР и проведения электрофореза участникам были выданы протоколы- методички с описанием основных процедур.

### ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ

Приготовьте плашку для заливки агарозного геля.

Приготовьте 1 литр однократного Трис-ацетатного буфера (1xТАЕ, состав 40 мМ Трис-ацетат, рН 7,8-8,0; 1 мМ ЭДТА), используя 50-кратный концентрат.

Приготовьте суспензию агарозы в 1xТАЕ буфере. Концентрацию агарозы необходимо выбрать, исходя из длины разделяемых фрагментов ДНК, руководствуясь следующей таблицей:

Длина разделяемых фрагментов ДНК	Концентрация агарозы, %
50-1500 п. о.	2,0
300-3000 п. о.	1,5
400-6000 п. о.	1,2
500-10000 п. о.	1,0
800-10000 п. о.	0,7
1000-20000 п. о.	0,5

Нагрейте суспензию в микроволновке или водяной бане, избегая вспенивания, и инкубируйте до полного растворения агарозы.

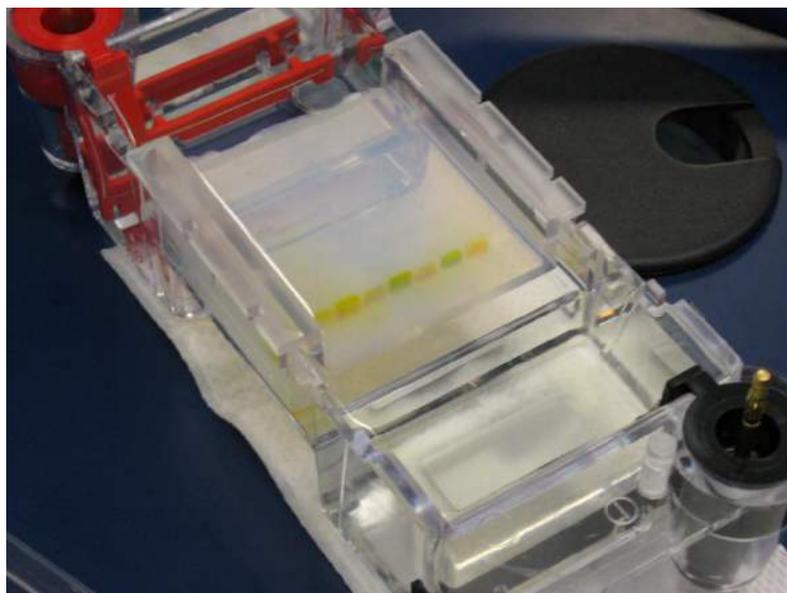
Дайте раствору немного остыть (чтобы колба стала тёплой, а не обжигающе горячей), добавьте бромистый этидий (0,3 мг/л) и аккуратно перемешайте, покачивая и вращая колбу в руке, избегайте резких движений и не используйте пипетку, это может привести к образованию пузырей.

Медленно залейте раствор расплавленной агарозы в приготовленную плашку, установите над плашкой гребёнку для заливки агарозного геля так, чтобы между зубцами гребёнки и плашкой был зазор в 1-2 мм, и дождитесь полного застывания геля (10-15 мин при комнатной температуре). При образовании пузырей во время заливки геля аккуратно отодвиньте их гребёнкой или наконечником пипетки на край геля.

Аккуратно вытащите гребёнку вертикально вверх, придерживая пальцами за плашку.

1.





Поместите в центр системы горизонтального фореа плашку с гелем и залейте в камеру свежеприготовленный 1X TAE буфер так, чтобы гель был покрыт слоем буфера на 1,0-2,0 мм

#### **Приготовление проб:**

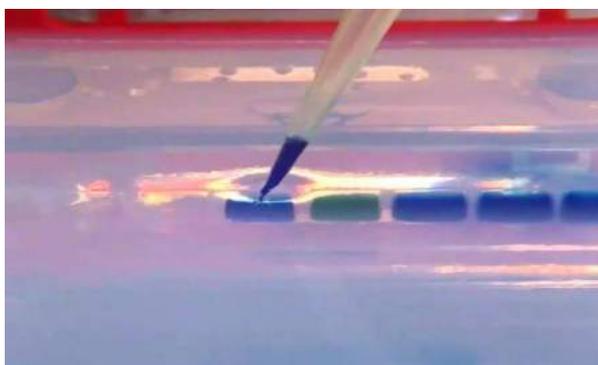
Смешайте 2-5мкл вашего ПЦР продукта с буфером для нанесения согласно его кратности.

#### **Приготовления пробы маркера длин:**

10.1. Разбавьте исходный раствор маркера длин водой до конечной концентрации 20 мкг/мл.

10.2. Приготовьте раствор маркера в 1x буфере для нанесения с концентрацией 25 нг/мкл, используя ранее приготовленный водный раствор маркера, концентрированный буфер для нанесения и воду.

Нанесите в лунки агарозного геля по 5-6 мкл приготовленных проб ПЦР продукта и маркера, наслаивание образцов проводите под буфер.



Закройте крышку камеры для горизонтального фореа, соединив контакты + к +, – к –.

Включите прибор и установите напряжение не более 10 V/см (10 V на каждый см длины между электродами).

Контролируйте прохождение фореа по продвижению красителей.

Для остановки фореа отключите ток на приборе, только после этого откройте крышку камеры, извлеките гель.

Разместите гель в камере прибора для гель-документирования и визуализируйте ДНК в УФ свете. (**ОБЯЗАТЕЛЬНО НАЛИЧИЕ ЗАЩИТНЫХ ОЧКОВ**).

## **ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР)**

Для проведения ПЦР вам понадобятся следующие реагенты:

ДНК-полимераза

Буфер с  $MgCl_2$

Дезоксинуклеозидтрифосфаты (dNTPs)

Прямой и обратный праймеры

ДНК-матрица

Вода

Все реагенты (кроме воды) хранятся при  $-20^{\circ}C$ .

### **ДНК-полимераза.**

Обычно 1-1.5u ДНК-полимеразы используется в 50чl реакционной смеси. Более высокие концентрации могут вызывать синтез неспецифических продуктов. Точное количество ДНК-полимеразы, которое необходимо добавить в реакционную смесь, зависит от конкретного типа используемого фермента и ДНК-матрицы. В комплекте к полимеразе идёт буфер, оптимизированный для работы данной полимеразы. При отсутствии в буфере  $MgCl_2$  его добавляют отдельно.

### **Дезоксинуклеозидтрифосфаты.**

Смесь всех четырёх возможных дезоксинуклеотидтрифосфатов, из которых будут синтезироваться новые цепи ДНК. Чаще всего смеси dNTP представлены в концентрациях 0.5mM, 2.5mM, и 4 mM, удобных для прямого использования в ПЦР. Рекомендовано добавлять такое количество dNTPs, чтобы их конечная концентрация в реакционной смеси была 0,2mM каждого.

### **Праймеры.**

Рекомендуется, чтобы конечная концентрация праймеров в реакционной смеси составляла 0,2-0,5мкМ.

### **ДНК-матрица**

Необходимое количество ДНК-матрицы варьируется в зависимости от её типа. Обычно рекомендуется добавлять 0,1-100нг ДНК-матрицы на 25-50мкл реакции.

## Вода

Стерильная деонизированная вода используется для доведения реакционной смеси до нужного объёма, как правило, 25мкл или 50мкл.

## Оптимизация процедуры постановки ПЦР.

Для выполнения нескольких параллельных реакций готовят «мастер-микс», содержащий одинаковые компоненты для всех реакций в одной пробирке (часто в пробирке на 1,5мл), который затем аликвотируется по индивидуальным ПЦР-пробиркам, в которые уже добавляются различные компоненты реакции. Например, если вам необходимо поставить несколько ПЦР с разными парами праймеров, то «мастер-микс» будет содержать воду, буфер с  $MgCl_2$ , дезоксинуклеозидтрифосфаты, ДНК-матрицу и ДНК-полимеразу. А праймеры необходимо будет уже добавить в индивидуальные пробирки.

Иногда пробирки ставятся в амплификатор до добавления ДНК-полимеразы. После первичной денатурации устанавливается температура 80С, при которой (не вынимая пробирки из амплификатора) добавляется Taq ДНК полимеразы из расчета 1 единица на 50(+5) мкл реакционной смеси.

Этот метод постановки реакций не только экономит время за счет уменьшения числа переноса реагентов и минимизирует возможность ошибок при пипетировании, но и повышает специфичность реакции за счет уменьшения вероятности появления побочных продуктов.

## Предотвращение упаривания реакционной смеси.

Если не используется амплификатор с нагреваемой крышкой, то поверх реакционной смеси наливается минеральное масло. Трех четвертей от общего объема реакционной смеси обычно достаточно. К амплификаторам без нагреваемой крышки относится «Герцик».



## Постановка ПЦР

**Все операции осуществляются только в**

**ЗАЩИТНЫХ ПЕРЧАТКАХ и ЗАЩИТНЫХ ОЧКАХ!**

Достаньте все реагенты, за исключением полимеразы, из морозилки и оставьте размораживаться. Лучше оставить размораживаться на льду, либо для более быстрого

оттаивания можно погреть пробирки в руках, а для буфера, праймеров и нуклеотидов использовать тёплую водяную баню.

Пробирки с оттаявшими реагентами взболтайте несколько секунд на вортексе. ДНК-матрицу необходимо перемешать, просто встряхивая и переворачивая пробирку в руках, **вортексировать ДНК-матрицу НЕЛЬЗЯ!**

Сбросьте капли на микроцентрифуге.

Пробирки с растворами необходимо держать на ледяной бане или на льду.

Смешайте в тонкостенной пробирке для ПЦР, находящейся в ледяной бане или на льду, компоненты для ПЦР:

Вода стерильная деионизованная

ДНК-матрица

dNTP смесь

Праймеры прямой и обратный

Буфер

25mM MgCl<sub>2</sub>(при необходимости)

ДНК-полимераза

Конечный объём смеси должен быть 25мкл или 50мкл. Для амплификатора «Терцик» используйте ПЦР пробирки на 0,5мл, для амплификатора Bio-Rad используйте ПЦР пробирки на 0,2мл. При необходимости сначала приготовьте «мастер-микс», описанный в разделе «**Оптимизация процедуры постановки ПЦР**» .



Мягко перемешайте образцы и коротко отцентрифугируйте для сбора всех капель со стен пробирки.



Покройте образцы минеральным маслом (три четверти объема образца), если необходимо.

Поместите образцы в амплификатор и запустите ПЦР.

После окончания реакции храните образцы на льду или в холодильнике (+4С).

### Условия термоциклирования

Параметры амплификации сильно зависят от матрицы, праймеров, полимеразы и типа используемого амплификатора.

Ниже приведена таблица с оптимальными условиями для ПЦР, которые вам необходимо адаптировать для своего эксперимента.

Стадия	Количество циклов	Температуры	Длительность
Предварительная денатурация	1	92-95С	1-3 мин
Денатурация	30-40	92-95С	5 сек-1 мин
Отжиг		Зависит от температуры плавления праймеров	5 сек-1 мин
Элонгация		72С	1 мин на 1000 п.о
Финальная элонгация	1	72С	5-15 мин

Для геномной ДНК или плазмиды рекомендуемое время предварительной денатурации - 2-3 мин.

Оптимальная продолжительность денатурации для фрагментов менее 3000-5000п.о. – 15-20 сек., более 5000п.о. – до 1 мин.

Оптимальная температура отжига определяется температурой плавления праймеров. Если праймеры имеют разную температуру отжига, то берётся наименьшая из них (или от наименьшей отнимают 2 С). Данная стадия чаще всего используется для подбора наилучших условий ПЦР с наибольшим выходом продукта, проверяют выход реакции при разных температурах отжига, подходящих для праймеров.

Длительность элонгация зависит от длины желаемого ПЦР продукта с расчётом 1 мин на каждые 1000п.о.

После последнего цикла, образцы обычно выдерживают при 72 °С в течение 5-15 мин для заполнения выступающих 5 штрих концов ПЦР продуктов комплементарной цепью.

Необходимое количество циклов ПЦР зависит от количества ДНК-матрицы в начале реакции.

### ОЦЕНКА РАБОТЫ (22 балла)

Качество проведения экспериментальной части заданий проверялось по следующим критериям (0,5 балла за каждый пункт соответствия критерию):

### **Стерильность (4,5 балла)**

- Работают в перчатках
- не трогают пробирки голыми руками
- Перед началом работы в боксе выполняют инструкцию, написанную на нём (включают на 15 мин УФ)
  - открывают пробирки только под ПЦР-боксом
  - Перед работой в ПЦР-боксе брызгают перчатки спиртом
  - Всё, что заносят под ПЦР-бокс, сбрызгивают спиртом
  - Не выносят пипетки, носики из бокса во время работы.
  - После того, как закончили работу в боксе, выполняют написанную на нём инструкцию (закрывают и включают УФ)
- Не трогают перчатками, которыми работают, телефоны и прочие посторонние предметы

### **Подготовка реагентов (2 балла)**

- Все реагенты держат на льду
- Размораживают либо на льду, либо в руках (всё, кроме полимеразы, её греть нельзя), либо в термостате
  - После разморозки мешают на вортексе буфер, нуклеотиды, воду (её можно не мешать), праймеры. ДНК и полимеразу не вортексируют. Но ДНК всё равно мешают, встряхивая пробирку. Полимеразу не должны трогать.

- После перемешивания сбрасывают капли

### **Раскапывание ПЦР (5,5 баллов)**

- Не задевают носиками ничего постороннего
- Меняют носики при смене реагентов
- Выбрасывают в жёлтые ведёрки
- Раскапывают на льду или в ледяном штативе
- При добавлении каждого компонента несколько раз пипетируют то, что добавили
  - Добавляют правильные объёмы
- Первым в мастер микс добавляют буфер, последней полимеразу в первом ПЦР-боксе
  - ДНК добавляют только в боксе в другой комнате
  - Мастер-микс мешают только пипетированием, с полимеразой вортексировать ничего нельзя!
  - Правильно раскапывают микс в ПЦР-пробирки (микс делается на нужное кол-во реакций +1, чтобы учесть ошибки пипетирования), поэтому раскапать должны на меньшее число пробирок, чем готовили микс.

- Сбрасывают капли перед тем, как поставить в амплификатор

### **Гель (10 баллов )**

- Делают всё в перчатках и халатах
- Взвесили верное количество агарозы

- Развели правильно 1X TAE
- Плавят агарозу на бане, не дают ей закипеть и ждут, чтобы она вся полностью расплавилась
- Добавляют SYBR safe в нужном количестве (он 10000X)
- Добавляют его, когда колба немного остыла, а не сразу в горячую агарозу
- Не трясут колбу, а аккуратно мешают, поворачивая кисть, чтобы избежать пузырей
- Правильно собирают столик для заливки
- Наливают нужное количество геля (чтобы он не получился во всю толщину ячейки)
- Ставят гребёнку
- На геле не должно быть заметных пузырей (пузыри должны гребёнкой отодвинуть на края или носиком)
- Вытаскивают гребёнку аккуратно, чтобы все ячейки были целы
- Устанавливают гель в ячейку для электрофореза в правильной ориентации
- Не забывают залить 1X TAE
- Смешивают образец с буфером в нужных пропорциях
- Добавляют правильное количество маркера
- Попадают образцам в ячейки (а не наносят мимо)
- Правильно надевают крышку (красное к красному, чёрно к чёрному) и подключают к прибору
- Верно идентифицируют нужные им полосы на геле