

# Командный тур

## 7.1. Геномное редактирование. 10-11 класс

### *Формулировка задания финала*

Задача вашей команды: проанализировать клеточную линию НЕК 293, геном которой был изменен с помощью технологии редактирования CRISPR/Cas. В ходе проведения исследования вашей команде необходимо будет использовать методы молекулярной биологии и биоинформатики. Вам необходимо получить образцы хромосомной ДНК из клеток НЕК 293, подвергнутых процедуре редактирования, и нативной (исходной) клеточной линии. Используя биоинформатические инструменты, требуется определить таргетируемый ген, а также провести ПЦР *in silico* для предсказания продукта реакции. Далее необходимо амплифицировать фрагмент ДНК, содержащий редактируемый участок, и визуализировать результаты в агарозном геле. В случае успешного прохождения реакции ампликон очищается и передается на процедуру секвенирования по Сэнгеру. Завершающим этапом задания станет анализ секвенограмм, в ходе которого вашей команде требуется охарактеризовать изменения в клеточном геноме, произошедшие в результате редактирования.

### *Задача 7.1.1. Выделение геномной ДНК из клеточных лизатов (17 баллов)*

#### *Необходимое оборудование и реактивы*

- Набор для выделения геномной ДНК
- Микропробирки 1,5-2 мл
- Автоматические дозаторы 20 мкл, 200 мкл и 1 мл и наконечники к ним
- Настольная центрифуга
- Спектрофотометр для определения концентрации ДНК
- Агарозный гель
- Буфер с красителем для нанесения проб на гель (4X Gel loading dye)
- ДНК-маркер
- Камера и источник питания для проведения электрофореза
- Трансиллюминатор

## Протокол процедуры

Важно! Центрифугирования проводятся в настольной центрифуге при максимальных оборотах, если не указано иное.

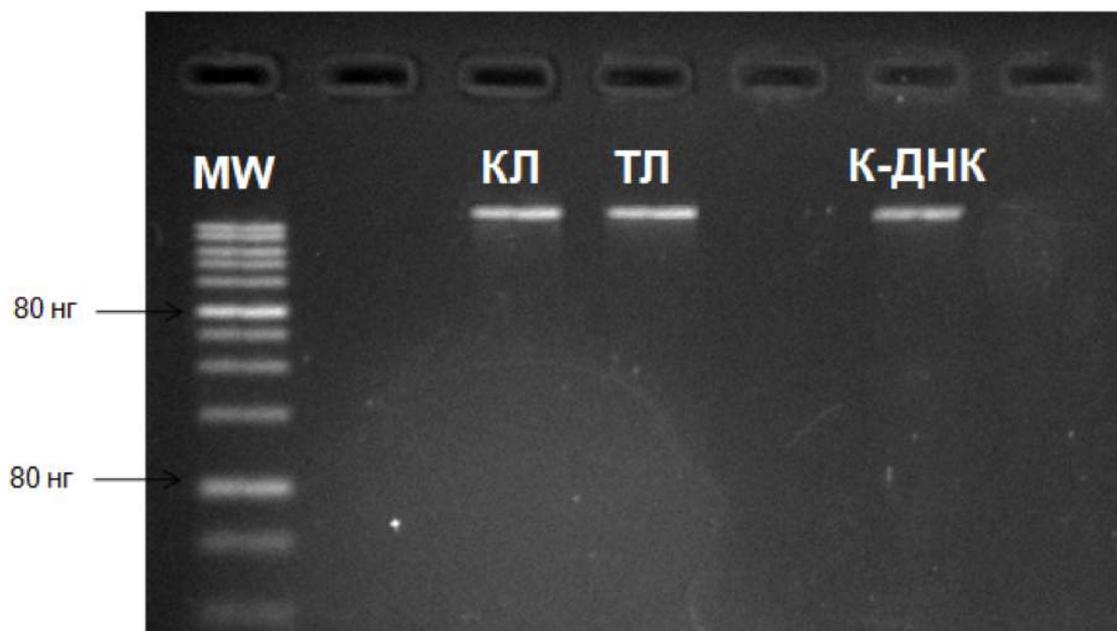
1. К 200 мкл клеточного лизата добавить 200 мкл изопропанола (i-PrOH) и перемешать с помощью пипетки.
2. Колонки для выделения ДНК пометить как «контрольная» и «тестовая».
3. Перенести в колонку образец. Центрифугировать 1 мин. Удалить фильтрат.
4. Нанести на фильтр 300 мкл WB1. Центрифугировать 1 мин.
5. Нанести на фильтр 500 мкл WB2. Центрифугировать 1 мин.
6. Вылить содержимое собирающей пробирки. Центрифугировать 1 мин для удаления остатков буфера.
7. Перенести колонку в новую 1,5 мл пробирку. Нанести на фильтр 25 мкл воды. Инкубировать 5 минут. Центрифугировать 1 мин.
8. Измерить концентрацию ДНК в полученном растворе при помощи спектрофотометра, подписать концентрацию на пробирке с образцом.

	Измерение 1	Измерение 2	Измерение 3	Среднее значение
$C_{\text{днк}}$ , контрольная линия	100 нг/мкл	101 нг/мкл	99 нг/мкл	100 нг/мкл
$C_{\text{днк}}$ , тестовая линия	52 нг/мкл	51 нг/мкл	47 нг/мкл	50 нг/мкл

9. 100 нг выделенной ДНК необходимо смешать с 4X красителем для нанесения проб на гель (4X Gel loading dye).

	$C_{\text{р-ра ДНК}}$	$V_{\text{р-ра ДНК}}$	$V_{\text{красителя 4X}}$
Контрольная линия	100 нг/мкл	1 мкл	0,33 мкл
Тестовая линия	50 нг/мкл	2 мкл	0,67 мкл

10. Нанести на гель 6 мкл маркера длин ДНК фрагментов 1kb и 100 нг ДНК образца сравнения (выполняется ассистентом на площадке).
11. Отступив одну лунку от предыдущих проб, нанести на гель в соседние лунки весь объем проб ДНК контрольной и тестовых линий.
12. Провести электрофорез в течение 20 минут.
13. Визуализировать результаты с помощью УФ-трансиллюминатора.



Результат электрофореза в агарозном геле: MW — маркер длин ДНК фрагментов, КЛ — геномная ДНК, выделенная из клеток контрольной линии, ТЛ — геномная ДНК, выделенная из тестовой линии, К-ДНК — контрольное нанесение 100 нг ДНК. Наиболее яркие полосы маркера соответствует 80 нг ДНК, остальные полосы — 40 нг ДНК. Яркость полос выделенной геномной ДНК из контрольной и тестовых линий соответствует яркости контрольного нанесения ДНК и превосходит по яркости полосы маркера по 80 нг. Таким образом, концентрация ДНК на спектрофотометре измерена верно.

### Система оценки

Примечание: в зависимости от наборов для выделения ДНК выход геномной ДНК может быть различным, поэтому критерии оценки нормировались на каждую площадку по отдельности.

Описание критерия	Балл
Наличие в конце эксперимента 2-х пробирок с объемом растворов ДНК по 25 мкл (наличие ДНК подтверждено форежом)	2
Концентрация ДНК в контрольной линии (подтверждена форежом): Площадка НГУ: >=50нг/мкл 4б, 25-50 нг/мкл – 3б, 15-25 нг/мкл – 2б, менее 15нг/мкл – 1б, менее 10нг/мкл – 0 Площадка МФТИ: >=100нг/мкл 4б, 50-100 нг/мкл – 3б, 25-50 нг/мкл – 2б, менее 25нг/мкл – 1б, менее 10нг/мкл – 0	4
Концентрация ДНК в тестовой линии (подтверждена форежом): Площадка НГУ: >=50нг/мкл 4б, 25-50 нг/мкл – 3б, 15-25 нг/мкл – 2б, менее 15нг/мкл – 1б, менее 10нг/мкл – 0 Площадка МФТИ: >=100нг/мкл 4б, 50-100 нг/мкл – 3б, 25-50 нг/мкл – 2б, менее 25нг/мкл – 1б, менее 10нг/мкл – 0	4
Расчет объема 100нг ДНК: по 1б за каждую линию	2
Расчет объема красителя: по 1б за каждую линию	2
Результаты фореза: четкая визуализация полос геномной ДНК. Интенсивность соответствует бенду контрольного нанесения 100 нг (3 б), только одна полоса соответствует контрольному нанесению, вторая слабее (2 б), обе полосы очень слабые (1 б) или отсутствуют (0 б)	3
Команде потребовалась помощь в работе с протоколом	(-2)
Команда не уложились в регламент	(-2)
Утеряны пробирки с ДНК, либо ДНК в образце или образцах по результатам фореза отсутствует. Для продолжения работы участникам были выданы пробирки с раствором ДНК.	штраф 25% за каждый образец ДНК
<b>Итого</b>	<b>17</b>

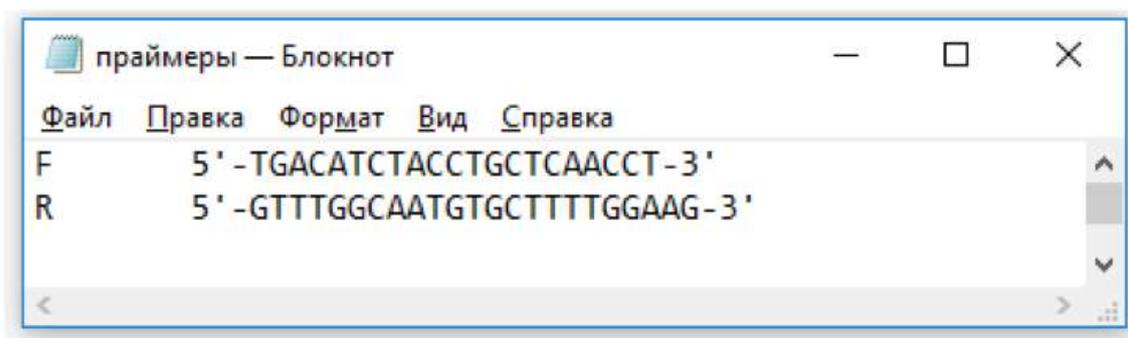
## Задача 7.1.2. Анализ данных нуклеотидных последовательностей (13 баллов)

### Формулировка задания

Для выполнения данного задания вам необходимо определить размер ПЦР-продукта, который образуется при использовании данной пары праймеров, а также предоставить информацию о гене, который соответствует данному фрагменту ДНК.

### Входные данные

1. Последовательность праймеров в файле «Праймеры.txt» на Рабочем столе в папке «ОНТИ»



2. Источник ДНК – клеточная линия НЕК 293
3. Онлайн инструменты для работы:
  - (a) [blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov) (доступен для поиска по запросу «blast»)
  - (b) [genome.ucsc.edu](http://genome.ucsc.edu), на данном ресурсе доступен инструмент для проведения ПЦР in silico (доступен для поиска по запросу «genome browser»)
  - (c) [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov) (доступен для поиска по запросу «ncbi»)

### Решение

НЕК 293 — клеточная линия, полученная из клетки надпочечника абортированного эмбриона человека. Следовательно, организм-источник ДНК - Homo sapiens. С помощью инструмента “Nucleotide blast” необходимо по последовательности праймеров установить ген, фрагмент которого будет амплифицирован.

Standard Nucleotide BLAST

blastn blastp blastx tblastn tblastx

BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide query [more...](#)

**Enter Query Sequence**

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [Clear](#) [Query subrange](#)

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)

From  To

Or, upload file

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search

Align two or more sequences

**Choose Search Set**

Database  Human genomic + transcript  Mouse genomic + transcript  Others (nr etc.);  
Nucleotide collection (nr/nt)

Organism   exclude [+](#)  
Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown

Exclude  Models (XM/XP)  Uncultured/environmental sample sequences

Limit to  Sequences from type material

Entrez Query  [You Tube](#) [Create custom database](#) [+](#)  
Enter an Entrez query to limit search

**Program Selection**

Optimize for  Highly similar sequences (megablast)  
 More dissimilar sequences (discontiguous megablast)  
 Somewhat similar sequences (blastn)  
Choose a BLAST algorithm

**BLAST** Search database Nucleotide collection (nr/nt) using Megablast (Optimize for highly similar sequences)  
 show results in a new window

[Algorithm parameters](#)

Результат выравнивания будет выглядеть следующим образом:

Download [GenBank](#) [Graphics](#)

Homo sapiens CC chemokine receptor 5B (CCR5) gene, complete sequence; and CCR5 truncated isoform (CCR5) genes, CC chemokine receptor 5 (CCR5) gene, complete cds  
Sequence ID: [AH005786.2](#) Length: 8135 Number of Matches: 1

Range 1: 5032 to 5052 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
42.1 bits(21)	0.005	21/21(100%)	0/21(0%)	Plus/Plus

Query 1 TGACATCTACCTGCTCAACCT 21  
Sbjct 5032 TGACATCTACCTGCTCAACCT 5052

Последовательность праймеров идентична фрагментам гена CCR5, кодирующего C-C-рецептор хемокина 5. В БД.ncbi в разделе "Gene" по запросу "Homo sapiens CCR5" будет доступна информация для данного гена, в том числе и положение данного гена — 3p21.31.

#### CCR5 C-C motif chemokine receptor 5 (gene/pseudogene) [ *Homo sapiens* (human) ]

Gene ID: 1234, updated on 25-Mar-2019

##### Summary

**Official Symbol** CCR5 provided by [HGNC](#)

**Official Full Name** C-C motif chemokine receptor 5 (gene/pseudogene) provided by [HGNC](#)

**Primary source** [HGNC:HGNC:1608](#)

**See related** [Ensembl:ENSG00000160791](#) [MIM:601373](#)

**Gene type** protein coding

**RefSeq status** REVIEWED

**Organism** [Homo sapiens](#)

**Lineage** Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorhini; Catarrhini; Hominoidea; Homo

**Also known as** CCR5; CCR-5; CD105; CKR-5; CCCR5; CMKBR5; IDDM22; CC-CCR-5

**Summary** This gene encodes a member of the beta chemokine receptor family, which is predicted to be a seven transmembrane protein similar to G protein-coupled receptors. This protein is expressed by T cells and macrophages, and is known to be an important co-receptor for macrophage-tropic virus, including HIV, to enter host cells. Defective alleles of this gene have been associated with the HIV infection resistance. The ligands of this receptor include monocyte chemoattractant protein 2 (MCP-2), macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP-1 alpha), macrophage inflammatory protein 1 beta (MIP-1 beta) and regulated on activation normal T expressed and secreted protein (RANTES). Expression of this gene was also detected in a promyeloblastic cell line, suggesting that this protein may play a role in granulocyte lineage proliferation and differentiation. This gene is located at the chemokine receptor gene cluster region. An allelic polymorphism in this gene results in both functional and non-functional alleles; the reference genome represents the functional allele. Two transcript variants encoding the same protein have been found for this gene. [provided by RefSeq, Jul 2015]

**Expression** Broad expression in appendix (RPKM 9.4), lymph node (RPKM 7.4) and 21 other tissues [See more](#)

**Orthologs** [all](#)

##### Genomic context

Location: 3p21.31

See CCR5 in [Genome Data Viewer](#)

Exon count: 3

Далее необходимо провести *in silico* пцр с помощью онлайн ресурса genome.ucsc.edu. Ниже приведены входные данные для *in silico* пцр и ее результат:

**UCSC In-Silico PCR**

Genome:  Assembly:  Target:  Forward Primer:  Reverse Primer:

Max Product Size:  Min Perfect Match:  Min Good Match:  Flip Reverse Primer:

Длина искомого ампликона составляет 761 п.н.

**UCSC In-Silico PCR**

```
>chr3:46373097+46373857 761bp TGACATCTACCTGCTCAACCT GTTTGGCAATGTGCTTTTGGAAAG
TGACATCTACCTGCTCAACCTggccatctctgacctgttttcccttctta
ctgtcccccttctgggctcactatgctgcccagtgaggactttggaaat
acaatgtgtcaactcttgacagggctctatattataggcttcttctctgg
aatcttcttcatcatcctcctgacaatcgataggtacctggctgtcgtcc
atgctgtgtttgctttaaagccaggacggtcacctttgggggtggtgaca
agtgtgatcacttgggtggtggctgtgtttgctctctcccaggaatcat
ctttaccagatctcaaaaagaaggcttccattacacctgcagctctcatt
ttccatacagtcagtatcaattctggaagaatttcagacattaaagata
gtcatcttggggctggtcctgcccgtgcttgtcatggtcatctgctactc
gggaatcctaaaaactctgcttcgggtgctgaaatgagaagaagaggcaca
gggctgtgaggcttatcttcacatcatgattgtttattttcttcttctgg
gctccctacaacattgctcttctcctgaacaccttcaggaattctttgg
cctgaataattgcagtagctctaacagggttgaccaggctatgcaggtga
cagagactcttgggatgacgactgctgcatcaacccatcatctatgcc
tttgtcggggagaagttcagaactacctcttagtcttCTTCCAAAAGCA
CATTGCCAAAC
```

## Результаты

Размер ампликона	761 п.н.
Организм-источник ДНК	Homo sapiens
Название гена	CCR5
Положение гена	3p21.31
Краткое описание гена (физиологическая функция его продукта)	С-С-рецептор хемокина 5 — белок человека, кодируемый геном CCR5. CCR5 является членом подкласса рецепторов бета-хемокинов класса интегральных мембранных белков. CCR5 представляет собой белок адгезии и является рецептором, сопряжённым с G-белком. Белок CCR5 синтезируется преимущественно Т-клетками, макрофагами, дендритными клетками и клетками микроглии. Видимо, CCR5 участвует в процессе воспалительной реакции. Однако роль этого белка в иммунном ответе до конца не ясна.

### Система оценки

Описание критерия	Балл
Определен размер ампликона	2
Определен организм-источник ДНК	1
Определено положение гена: с указанием точного локуса — 4б, только номер хромосомы — 2б, не указан — 0	4
Приведено описание гена или соответствующего ему белка: 6б или 0. Если описание недостаточно или путанно, допускается выставление 3б.	6
<b>Итого</b>	<b>13</b>

### *Задача 7.1.3. Полимеразная цепная реакция с геномной ДНК (16 баллов)*

#### *Необходимое оборудование и реактивы*

- ДНК-матрица
- 2 праймера (форвард и реверс)
- Мастер-микс (ПЦР буфер, дезоксинуклеозидтрифосфаты (дНТФ или dNTP), полимеразы)
- Стерильная вода
- Микропробирки 0,2 мл для амплификатора
- Амплификатор
- Агарозный гель
- Буфер с красителем для нанесения проб на гель (4X Gel loading dye)
- ДНК-маркер
- Камера и источник питания для проведения электрофореза
- Трансиллюминатор

#### *Протокол процедуры*

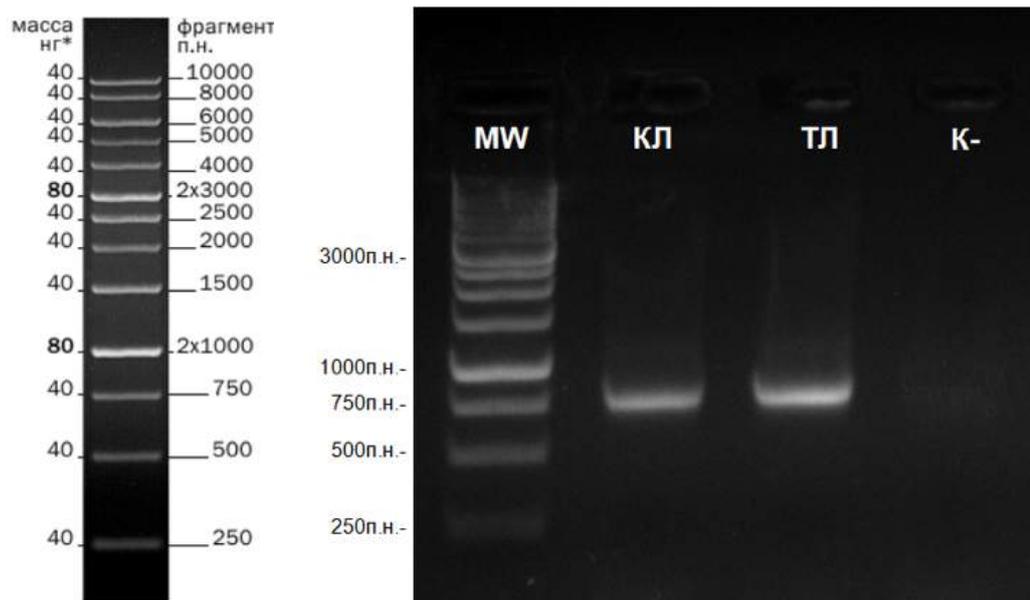
1. Подготовить реакционные смеси для постановки ПЦР согласно таблице

	Контрольная линия	Тестовая линия	Отрицательный контроль
H <sub>2</sub> O	19,5 мкл	18 мкл	21 мкл
Мастер-микс, X2 (буфер, dNTP, полимераза)	25 мкл	25 мкл	25 мкл
Праймер F, X25	2 мкл	2 мкл	2 мкл
Праймер R, X25	2 мкл	2 мкл	2 мкл
ДНК-матрица (100-150 нг)	1,5 мкл (при концентра- ции ДНК 100нг/мкл)	3 мкл (при концентра- ции ДНК 50нг/мкл)	-
Общий объем = 50 мкл	50 мкл	50 мкл	50 мкл

2. На пробирках обязательно указать номер рабочего места!
3. Перемешать реакционную смесь пипеткой.
4. Если в реакционной смеси наблюдаются пузырьки воздуха, эти образцы следует центрифугировать.
5. Настроить программу амплификатора в соответствии с заданными параметрами (выполняет ассистент на площадке):

Первичная денатурация ДНК	95°	3 мин	
Денатурация ДНК	95°	30 сек	30 циклов
Отжиг праймеров	58°	15 сек	
Элонгация	72°	45 сек	
Финальная достройка	72°	5 мин	
Хранение	12°	∞	

6. Установить пробирки в амплификатор и запустить программу (выполняет ассистент на площадке).
7. После окончания ПЦР отобрать 10 мкл каждого образца и добавить 3,3 мкл четырехкратного красителя. Перемешать реакционную смесь до равномерного распределения красителя.
8. Перенести подготовленные пробы в гель для электрофореза в следующем порядке: 6 мкл маркера длин ДНК фрагментов 1kb, отрицательный контроль, проба с контрольной линии, проба с тестовой линии.
9. Провести электрофорез в течение 30 мин.
10. После завершения электрофореза сделать фотографию геля.



Слева — расшифровка полос маркера длин ДНК фрагментов, справа — фотография электрофореза для продуктов ПЦР: КЛ — продукт, полученный при амплификации с ДНК контрольной линии, ТЛ — ампликон для тестовой линии, К- — отрицательный контроль. Размер ампликонов примерно соответствует 750 п.н.

- По результатам электрофореза оценить размер ампликона и сопоставить результат с данными, полученными в результате дизайна ПЦР *in silico*.

Длина ампликона по результатам фореа: 750 п.н.

Предсказанная длина ампликона: 761 п.н.

### Система оценки

Описание критерия	Балл
Расчет состава р.с.: 4б — все вычисления сделаны правильно, 2б — ошибка в расчете для одной из проб, 0б — состав 2 и более проб рассчитан неверно	4
Объем р.с. после приготовления для всех проб = 50 мкл: 2 или 0	2
Расчет объема 4X красителя: 2 или 0 (допускается округление до целых мкл)	2
Соблюден порядок нанесения образцов на гель (MW, K-, контр.л., тест.л.): 1 или 0	1
В K- отсутствует продукт: 1 или 0 Контрольная линия: яркость полосы продукта соответствует наиболее интенсивным полосам маркера — 2б, яркость меньше — 1б, продукт не визуализируется или не той длины — 0 2 Тестовая линия: яркость полосы продукта соответствует наиболее интенсивным полосам маркера — 2б, яркость меньше — 1б, продукт не визуализируется или не той длины — 0	1 2
Длина ампликона по фотографии фореа определена верно: 2 или 0	2
Команде потребовалась помощь в работе с протоколом	(- 2)
Команда не уложились в регламент	(- 2)
<b>Итог</b>	<b>16</b>

#### *Задача 7.1.4. Анализ секвенограмм, построение контига (10 баллов)*

##### *Формулировка задания*

В представленных секвенограммах найти и удалить из рассмотрения последовательности, соответствующие праймерам. Интерпретировать неоднозначно распознанные пики. Из полученных последовательностей перекрывающихся участков генома собрать контиг, в котором обозначить рамки трансляции. Файл сохранить в рабочей папке и назвать «N Contig», где N — номер рабочего места вашей команды.

##### *Входные данные*

1. Секвенограммы в формате .ab1
2. Инструменты для работы – программа Mega X.

##### **Система оценки**

Описание критерия	Балл
Удалены последовательности праймеров	3
Собран контиг	4
Обозначены рамки трансляции	3
<b>Итог</b>	<b>10</b>

### Задача 7.1.5. Очистка ампликона из реакционной смеси (8 баллов)

#### Необходимое оборудование и реактивы

- Набор для очистки из реакционной смеси
- Микропробирки 1,5 мл
- Автоматические дозаторы 20 мкл, 200 мкл и 1 мл и наконечники к ним
- Настольная центрифуга
- Спектрофотометр для определения концентрации ДНК

#### Протокол процедуры

Важно! Центрифугирования проводятся в настольной центрифуге при максимальных оборотах, если не указано иное.

1. Добавить 5 объемов «Связывающего раствора» (200 мкл) к 1 объему реакционной смеси, перемешать раствор.
2. Добавить 2,5 объема изопропанола (iPrOH, 100 мкл) на 1 объем реакционной смеси и перемешать раствор с помощью пипетки.
3. Поместить спин-колонку в собирательную пробирку.
4. Перенести пробу в колонку и центрифугировать 30 сек. Удалить фильтрат из собирательной пробирки.
5. Добавить 700 мкл «Промывочного раствора» в колонку, центрифугировать 30 сек. Удалить фильтрат из собирательной пробирки.
6. Центрифугировать пустую колонку 60 сек для полного удаления промывочного раствора.
7. Поместить колонку в новую пробирку 1,5 мл.
8. Нанести в центр мембраны 20 мкл воды, центрифугировать 30 сек.
9. Элюат повторно нанести на колонку, центрифугировать 30 сек.
10. Измерить концентрацию ДНК в полученном растворе при помощи спектрофотометра.

	Измерение 1	Измерение 2	Измерение 3	Среднее значение
С <sub>ампликона</sub> , контрольная линия	33 нг/мкл	37 нг/мкл	35 нг/мкл	35 нг/мкл
С <sub>ампликона</sub> , тестовая линия	41 нг/мкл	43 нг/мкл	42 нг/мкл	42 нг/мкл

#### Пояснения к ответу

Для постановки одной реакции секвенирования необходимо не менее 6 мкл раствора, содержащего очищенный целевой продукт с концентрацией 20-50

нг/мкл, в зависимости от длины фрагмента.

### Система оценки

Описание критерия	Балл
Расчет V связывающего раствора	1
Расчет V изопропанола	1
Наличие в конце эксперимента 2-х пробирок с объемом растворов ДНК по 15 мкл (после измерения концентрации)	2
Концентрация ампликона: 30нг/мкл и более — 4б, 20-30нг/мкл — 2б, 10-20нг/мкл — 1б, менее 10нг/мкл — 0	4
Команде потребовалась помощь в работе с протоколом	(- 2)
Команда не уложились в регламент	(- 2)
<b>Итог</b>	<b>8</b>

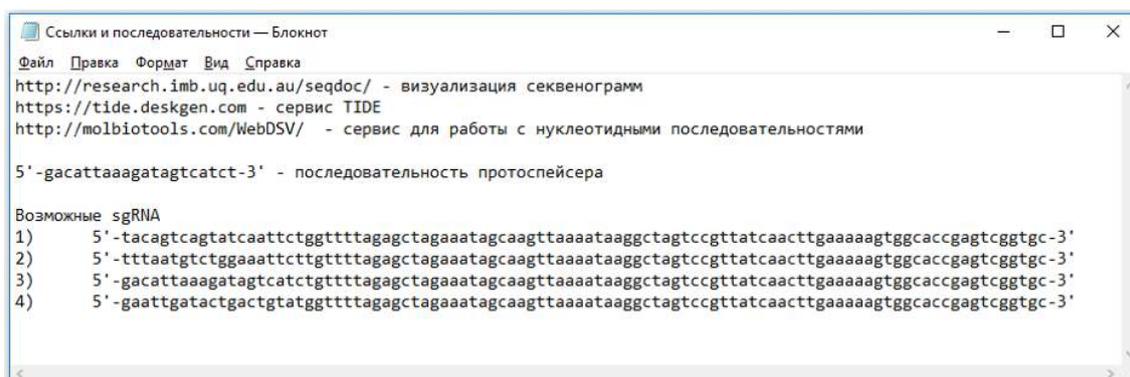
### Задача 7.1.6. Анализ результатов секвенирования целевого гена в модифицированных клеточных линиях (18 баллов)

#### Формулировка задания

Определить характер мутаций, которые произошли в геноме моноклональной модифицированной линии после воздействия системы редактирования CRISPR/Cas9 с помощью сервиса Tide.

#### Входные данные

1. На рабочем столе в папке «ОНТИ» — «Задача TIDE» находится папка с номером, соответствующим вашему рабочему месту. В данной папке размещены секвенограммы ампликонов и файл с нуклеотидными последовательностями и ссылками на онлайн-инструменты.



2. С помощью сервиса TIDE (<https://tide.deskgen.com/>) и иных инструментов необходимо проанализировать результаты вашего эксперимента и ответить на вопросы таблицы
3. При решении данной задачи вы можете пользоваться не только рекомендованными сервисами, но и любыми другими онлайн инструментами, которые сочтете нужными.

### Решение

Настройки TIDE для анализа результатов:

**Parameters**

All parameters have default settings but can be adjusted by checking the 'advance settings' box.

Advanced settings

**Alignment window (bp)**

The sequence segment used to align the control and test sample

left boundary

1 248 700

1 71 141 211 281 351 421 491 561 631 700

right boundary

automatically set at breaksite - 10bp

**Decomposition window (bp)**

The sequence segment used for decomposition.  
Default is maximum window possible

1 432 645 700

1 71 141 211 281 351 421 491 561 631 700

**Indel size range**

Maximum size of insertions and deletions modeled in decomposition

2 50

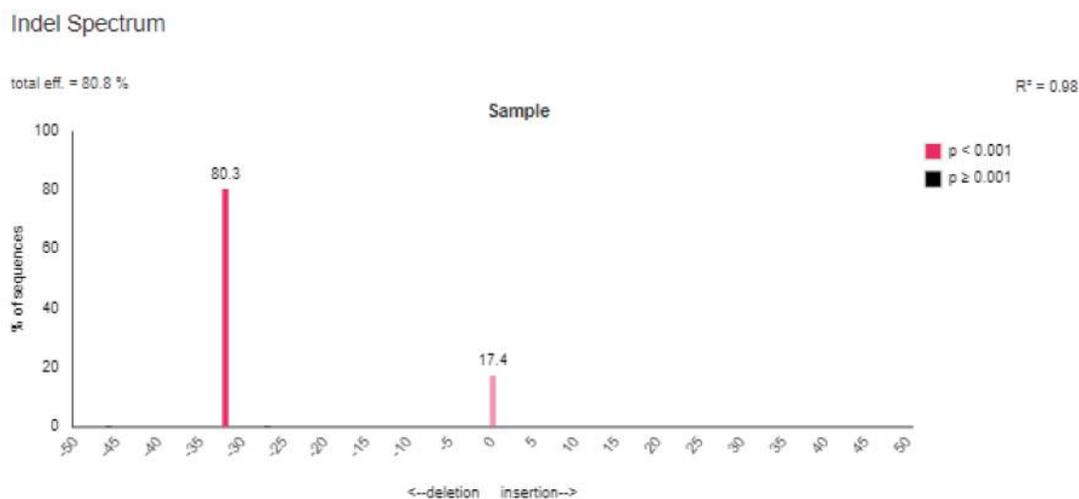
2 7 12 17 22 27 32 37 42 47 50

**P-value threshold**

Significance cutoff for decomposition

0,001

В результате анализа тестовой и контрольной секвенограмм TIDE строит спектр инделов:



Ту же информацию можно увидеть ниже в табличной форме:

	percentage	pvalue
-34	0.0	1
-33	0.0	1
-32	80.0	0
-31	0.0	1
-30	0.0	1
-29	0.0	1
-28	0.0	1
-27	0.1	0.83
-26	0.0	1
-25	0.0	1

В результате анализа становится ясно, что ген CCR5 несет делецию 32 нуклеотида. Редактирование прошло не полностью, поскольку в спектре наблюдается пик, соответствующий аллелю дикого типа. С помощью онлайн инструмента <http://molbiotools.com/WebDSV/> можно визуализировать положение протоспейсера и определить РАМ-последовательность:

protospacer

561 TCAATTCTGGAAGAATTTCCA**GACATTAAGATAGTCATCT**TGGGGCTGGTCCTGCCGCTGCTTGTTCATGGTCATCTGCT 640  
 AGTTAAGACCTTCTTAAAGGT**CTGTAATTICTATCAGTAGA**ACCCCGACCCAGGACGGCGACGAACAGTACCAGTAGACGA

В данном случае PAM будет выглядеть как 5'-TGG-3'.

## Результаты

Какие мутации несут аллели полученной клеточной линии	Делеция 32 нуклеотидов
Произошел ли полный нокаут гена-мишени? Объяснить раз-вернуто ответ.	Нет, поскольку отредактирован только один из аллелей, соответственно в клетках сохранилась работающая копия гена, полного нокаута не произошло.
Определить последовательность PAM, которая была использована для направления sgРНК	5'-TGG-3'
Выбрать направляющую РНК из списка ниже, которая была использована при редактировании (Обосновать ответ)	Для редактирования была использована sgRNA под номером 3, поскольку именно она содержит фрагмент соответствующий указанному в задании спейсеру, т.е. она сможет связаться с нужным участком ДНК, прилежащим к PAM, и запустить процесс редактирования.

Возможные sgRNA:

1. 5'-tacagtcagtatcaattctggttttagagctagaaatagcaagttaaataaggctagtcggttat caacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgc-3'
2. 5'-ttaaagtctggaaattctggttttagagctagaaatagcaagttaaataaggctagtcggttat caacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgc-3'
3. 5'-gacattaaagatagtcacatctggttttagagctagaaatagcaagttaaataaggctagtcggttat caacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgc-3'
4. 5'-gaattgatactgactgtatggttttagagctagaaatagcaagttaaataaggctagtcggttat caacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgc-3'

## Система оценки

Описание критерия	Балл
Получен ответ по характеру мутаций с указанием размера инсерций и делеций	3
Описали результат — произошел ли полный нокаут? без объяснения — 3б, с объяснением — 6б, неверный ответ — 0б	6
Правильно определен PAM в формате NGG	3
Выбрана верная направляющая РНК: без объяснения — 3б, с объяснением — 6б	6
Команде были выданы параметры настройки tide	(-3)
<b>Итог</b>	<b>18</b>

### *Задача 7.1.7. Дополнительная задача. Анализ результатов секвенирования целевого гена в модифицированных клеточных линиях (18 баллов)*

#### *Формулировка задания*

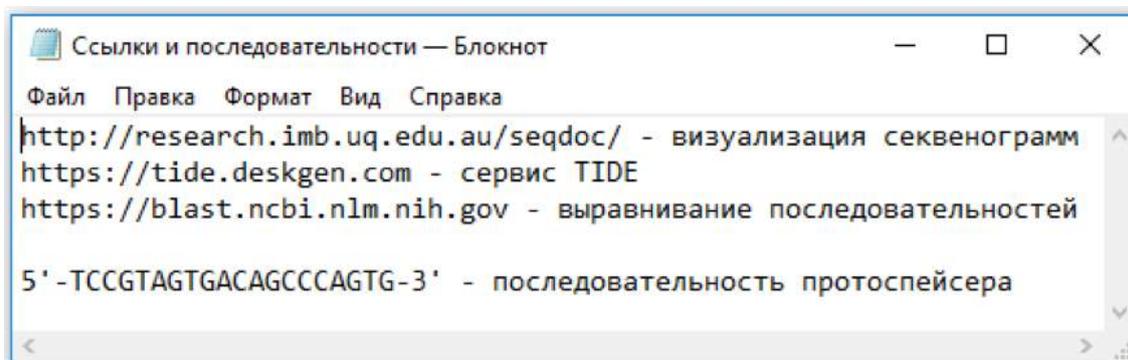
Определить характер мутаций, которые произошли в геноме моноклональной модифицированной линии НЕК 293 после воздействия системы редактирования CRISPR/Cas9 на ген METTL3 (*Homo sapiens methyltransferase like 3*).

Для данной клеточной линии была выделена геномная ДНК и получен ПЦР-продукт, соответствующий таргетированному участку. Далее ампликоны были заклонированы в плазмидный вектор. После трансформации и выделения плазмидной ДНК из одиночных колоний были получены плазмиды со вставкой, соответствующей одному либо другому аллелю. Данные плазмиды были так же проанализированы с помощью секвенирования по Сэнгеру.

Вам необходимо провести анализ секвенограмм, полученных для смеси ампликонов, с помощью сервиса TIDE. Далее проанализировать секвенограммы для каждого аллельного варианта с помощью Blast. На основании полученных результатов требуется определить характер мутации и ответить на вопросы в таблице.

#### *Входные данные*

1. В папке «ОНТИ» — «Дополнительная задача» — «Сиквенсы» размещены файлы результатов секвенирования исходной клеточной линии «Control\_f» и «Control\_r» и модифицированной линии «Clone\_2-8\_f» и «Clone\_2-8\_r».
2. В подпапке «Разделенные аллели» находятся результаты сиквенса исходной линии (НЕК 293) отдельных аллелей отредактированной линии (Clone\_allele) в формате .ab1 и .fasta.
3. Ссылка на онлайн инструменты и последовательность протоспейсера размещены в файле «Ссылки и протоспейсер». При работе с Blast необходимо выбрать «Align two or more sequences».



4. Помимо указанных инструментов вы можете использовать любые онлайн инструменты, которые сочтете нужными.

## Решение

Настройки TIDE для анализа результатов:

**Parameters**

All parameters have default settings but can be adjusted by checking the 'advance settings' box.

Advanced settings

**Alignment window (bp)**

The sequence segment used to align the control and test sample

left boundary

1 **33** 700



right boundary

automatically set at breaksite - 10bp

**Decomposition window (bp)**

The sequence segment used for decomposition.  
Default is maximum window possible

1 **287** **538** 700



**Indel size range**

Maximum size of insertions and deletions modeled in decomposition

2 **15** 50



**P-value threshold**

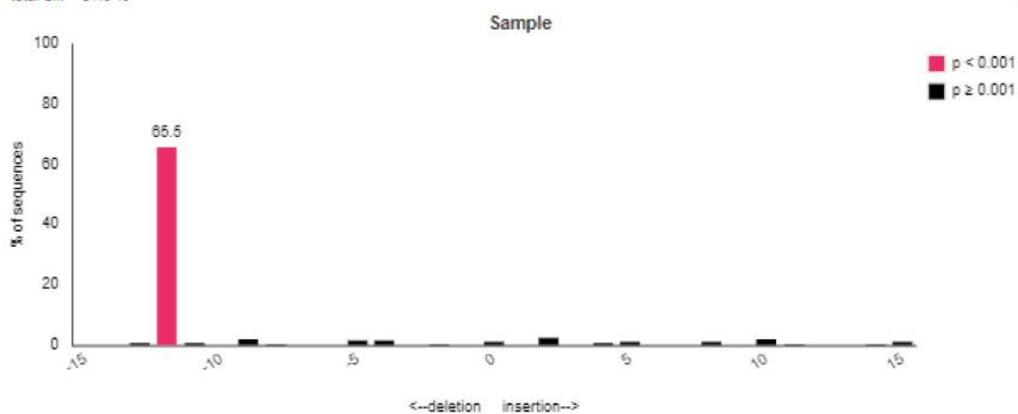
Significance cutoff for decomposition

0,001

Результаты анализа секвенограмм в сервисе TIDE:

## Indel Spectrum

total eff. = 81.9 %

R<sup>2</sup> = 0.83

Клеточная линия содержит делецию 12 нуклеотидов в одном из аллелей гена METTL3 (примерно в 65.5% проанализированных молекул ДНК). Информация по второму аллелю недоступна: сервис не отмечает иных мутаций, но и не находит аллель дикого типа (индел = 0).

Анализ секвенограмм для разделенных аллелей с помощью blast, выявляет протяженную мутацию:

Range 1: 156 to 602 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
826 bits(447)	0.0	447/447(100%)	0/447(0%)	Plus/Plus
Query 227	CAGTTCTGAATTAGCTACAGATCCTGAGTTAGAGAAGAAGTTGCTACACCACCTCTCTG			286
Sbjct 156	CAGTTCTGAATTAGCTACAGATCCTGAGTTAGAGAAGAAGTTGCTACACCACCTCTCTG			215
Query 287	ATCTGGCCTTAACATTGCCCACTGATGCTGTGTCCATCTGTCTTGCCATCTCCACGGTAA			346
Sbjct 216	ATCTGGCCTTAACATTGCCCACTGATGCTGTGTCCATCTGTCTTGCCATCTCCACGGTAA			275
Query 347	TGACCTGACAGAGTTAGGATTTACCACTTATTTTCAGTTCACGGTCAGTGTCTTATTGCC			406
Sbjct 276	TGACCTGACAGAGTTAGGATTTACCACTTATTTTCAGTTCACGGTCAGTGTCTTATTGCC			335
Query 407	CATACCTCCCCTCGTTCTCTAGCCAGATGCTCCTGCCACTCAAGATGGGGTAGAAAAGCCT			466
Sbjct 336	CATACCTCCCCTCGTTCTCTAGCCAGATGCTCCTGCCACTCAAGATGGGGTAGAAAAGCCT			395
Query 467	CCTGCAGAAGTTTGCAGCTCAGGAGTTGATTGAGGTAAAGCGAGGTCTCTACAAGATGA			526
Sbjct 396	CCTGCAGAAGTTTGCAGCTCAGGAGTTGATTGAGGTAAAGCGAGGTCTCTACAAGATGA			455
Query 527	TGCACATCCTACTCTTGTAACTATGCTGACCATTCCAAGCTCTCTGCCATGATGGGTGC			586
Sbjct 456	TGCACATCCTACTCTTGTAACTATGCTGACCATTCCAAGCTCTCTGCCATGATGGGTGC			515
Query 587	TGTGGCAGAAAAGAAGGGCCCTGGGGAGGTAGCAGGGACTGTCAATCTTTCTAGAAGATC			646
Sbjct 516	TGTGGCAGAAAAGAAGGGCCCTGGGGAGGTAGCAGGGACTGTCAATCTTTCTAGAAGATC			575
Query 647	TCCTACAATATTCTCAGCTGCCATGGA			673
Sbjct 576	TCCTACAATATTCTCAGCTGCCATGGA			602

Range 2: 10 to 155 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
248 bits(134)	6e-70	144/148(97%)	2/148(1%)	Plus/Plus
Query 12	GATGGCTCGAGTTTTTTNGCAAGATGTATGGGAATGCTAGAGAATTTGACTTCTCAGAAAT			71
Sbjct 10	GATGGCTCGAGTTTTTTNGCAAGA--TATGGGAATGCTAGAGAATTTGACTTCTCAGAAAT			67
Query 72	ATATAGACCAACAGTGGTTGNCTTTTTTCATTTTCACCTTCTTTCATTCTTAGATCTACG			131
Sbjct 68	ATATAGACCAACAGTGGTTGCCTTTTTTCATTTTCACCTTCTTTCATTCTTAGATCTACG			127
Query 132	GAATCCAGAGGCAGCATTGTCTCCAACC			159
Sbjct 128	GAATCCAGAGGCAGCATTGTCTCCAACC			155

По разнице нуклеотидов для верхней последовательности можно определить размер делеции:  $227 - 159 - 1 = 67$  п.н.

Поскольку TIDE позволяет анализировать инделы размером до 50 п.н., данная мутация оказывается “вне поля зрения” инструмента.

## Результаты

Какие мутации несут аллели полученной клеточной линии Произошел ли полный нокаут гена-мишени? Объясните развернуто ответ.	Делеция 12 п.н., делеция 67 п.н.  Нет, полный нокаут не произошел, поскольку одна из делеций (-12п.н.) кратна 3, т.е. не приводит к сдвигу рамки считывания и возникновению преждевременного стоп-кодона.
Определите последовательность РАМ, которая была использована для направления sgРНК	5'-AGG-3'
Объясните возникшую разницу в результатах анализа и укажите причину, по которой это могло получиться	Одна из делеций (-67п.н.) больше размера индела, который можно задать в параметрах сервиса TIDE, поэтому ее невозможно обнаружить с помощью данного инструмента, но можно найти при анализе секвеннограмм разделенных аллелей.

### Система оценки

Описание критерия	Балл
Получен ответ по характеру мутаций с указанием размера инсерций и делеций	3
Описали результат — произошел ли полный нокаут? без объяснения — 3б, с объяснением — 6б, неверный ответ — 0б	6
Правильно определен РАМ в формате NGG	3
Есть объяснение и указание причины расхождения результатов анализа Tide и разделенных аллелей	6
Команде были выданы параметры настройки tide	(-3)
<b>Итог</b>	<b>18</b>

## 7.2. Агробиотехнологии. 9 класс

### Задача 7.2.1. (10 баллов)

Для правильного проектирования, балансирования и работы с аквапонными установками вам необходимо учесть все организмы, которые в ней присутствуют и понять, какие процессы происходят в каждом из модулей.

1. Внимательно изучите предложенные вам аквапонные установки и определите все биокомпоненты, задействованные в ней.
2. Опишите все процессы, которые могут влиять на стабильность аквапонной установки, происходящие в ее модулях (биофилтрационный, аквакультурный и гидропонный).

Результат приведите в письменном виде. Листок с ответом подпишите (название команды) и проставьте дату.

**Задание выполняется “offline”**

### Система оценки

Определены (поименованы):

1. Салат (салат латук);
2. Карп (кои и/или серебристый – равнозначно для д. сл.), стерлядь;
3. Перловица и шаровка (до рода);
4. Баксообщество (равнозначно бактерии).
5. Сделано предположение о наличии протистов в системе.

За каждый правильный ответ по 1 баллу. – 5 баллов

Определены высшие растения, НЕ подключённого растительного фильтра (ка-бомба и элодея) – 1 балл, т.к. данный блок НЕ входит в систему (в задании сказано про аквапонные системы, а не все биокомпоненты, которые есть в комнате).

Выявлены процессы:

1. Газообмена кислород-углекислый газ
2. Нитрификации (аммоний-нитрит-нитрат)
3. Выделение аммония рыбой
4. Выделение рыбой не р-римой органики (слизь, кал)
5. Поглощение нитратов, нитритов, аммония

Плюс/либо замена на один параметров: фотосинтез растений, выделение корневой системой салата, скорость циркуляции воды в системе

Макс. значение баллов – 5 баллов

### **Задача 7.2.2. (10 баллов)**

На стабильность работы аквапонных установок влияет не только видовой состав организмов и их количество, но и ряд некоторых ключевых показателей и свойств.

Оцените критически важные рабочие и физические параметры ваших систем. Приведите их список и значения.

Результат приведите в письменном виде. Листок с ответом подпишите (название команды) и проставьте дату.

Максимальный балл - 10

**Задание выполняется “offline”**

**Ответ:**

Выявлены параметры системы:

1. аммоний-ион,

2. не растворимый аммоний,
3. нитрит-ион,
4. нитрат-ион,
5. растворённый углекислый газ,
6. рН – кислотность
7. кН – временная жёсткость
8. гН – общая жёсткость
9. редокс-потенциал (ОВП),
10. температура воды.

За каждый верный ответ 1 балл

Возможна замена или дополнение параметров (временной жёсткости, не растворимого аммония) на скорость потока, растворённый кислород, хлор-ион.

### **Задача 7.2.3. (8 баллов)**

Результат приведите в письменном виде. Листок с ответом подпишите (название команды) и проставьте дату.

**Задание выполняется “online”**

#### **Система оценки**

1. Значение параметров содержания карпа представлены верно -2 балла
2. Значение параметров содержания стерляди представлены верно – 2 балла
3. Определён диапазон значений, оптимальный для смешанной аквакультуры карпа и стерляди – 4 балла

Значение параметров представлено с ошибками – 0 баллов (по п.п. 1 и 2)

Не определён оптимальный диапазон для смешанной аквакультуры – 0 баллов (по п.3.)

### **Решение**

Таблица 7.1: Таблица значений параметров для содержания карпов Коя

Параметр	от	до	Оптимум
рН	6.5	9.5	7-8
Аммоний-ион моль/куб.м.		$2.8 \cdot 10^{-2}$	
Нитрит-ион моль/куб.м.		$4.3 \cdot 10^{-4}$	
Нитрат-ион моль/куб.м.		$1.6 \cdot 10^{-2}$	
Диоксид углерода растворенный моль/куб.м.		$2.3 \cdot 10^{-1}$	
Температура воды, град. С	+20	+24	

Таблица 7.2: Таблица значений параметров для содержания Стерляди

Параметр	от	до	Оптимум
pH	7.0	7.7	
Аммоний-ион моль/куб.м.		$1.25 \cdot 10^{-2}$	
Нитрит-ион моль/куб.м.		$2.0 \cdot 10^{-4}$	
Нитрат-ион моль/куб.м.		$0.9 \cdot 10^{-2}$	
Диоксид углерода растворенный моль/куб.м.		$1.0 \cdot 10^{-1}$	
Температура воды, град. С	+18	+22	

Таблица 7.3: Таблица параметров содержания в УЗВ смешанной культуры карп Кои и Стерлядь (оптимизируем по минимальному значению диапазона – лимитирующим факторам среды)

Параметр	от	до	Оптимум
pH	7.0	7.7	
Аммоний-ион моль/куб.м.		$1.25 \cdot 10^{-2}$	
Нитрит-ион моль/куб.м.		$2.0 \cdot 10^{-4}$	
Нитрат-ион моль/куб.м.		$0.9 \cdot 10^{-2}$	
Диоксид углерода растворенный моль/куб.м.		$1.0 \cdot 10^{-1}$	
Температура , град. С	+20	+22	

### Задача 7.2.4. (10 баллов)

Оцените важные для аквапонных установок физико - химические параметры воды и предложите методы их стабилизации без использования химических реагентов. Для работы может быть использовано все, что представлено в лаборатории.

Сделайте же это!

Но только под контролем преподавателя!

*Реализуйте идею и результат приведите в письменном виде в виде отчета. В отчете приведите расчеты, описание и схемы (если это необходимо). Листок с ответом подпишите (название команды) и проставьте дату.*

Максимальный балл - 10 баллов

**Задание выполняется “online”**

### Система оценки

Определены значения 8 возможных параметров (нитраты, нитриты, аммиак/аммоний, растворенный углекислый газ, (ОВП) – редокс-потенциал, , ,  $g$ ) – 0.625 баллов за каждый параметр; - макс. количество 5 баллов

Для каждого определённого параметра предложен свой вариант способа изменения параметра до оптимального значения (адекватного ситуации работы реальной аквапонной системы прикрепленной к команде) – 0.625 балла за каждый вариант оптимизации значения параметра; - макс. количество – 5 баллов.

Оптимизация параметров:

Нитраты – увеличение биомассы водных растений или растений гидропонного модуля; частичная замена воды;

Нитриты – увеличение аэрации бактериального фильтра; увеличение площадки бакфильтра; частичная замена воды;

Аммиак/аммоний-ион – увеличение биомассы водных растений и растений гидропонного модуля; частичная замена воды; усиление аэрации бакфильтра, увеличение площади бакфильтра;

Р-рѐный углекислый газ – увеличение количества водных растений; подключение дополнительного растительноводного фильтра;

ОВП – добавить органики (торф низовой, фрагмент топляка); увеличить аэрацию; поставить оксигенатор; обработать УФ (увеличить количество образующихся перекисей в воде);

кН – отстаивание воды; кипячение перед добавлением в систему или частичной замене;

gН – добавить осадочные породы (известняк) для увеличения gН или топляк (коряги, сфагнум, торф) для уменьшения gН, кипячение перед частичной заменой, добавление дистиллированной воды;

pН – добавить осадочные породы (известняк) для увеличения pН или топляк (коряги, сфагнум, торф) для уменьшения pН

### **Задача 7.2.5. (5 баллов)**

Для уравнивания параметров системы вам предлагается ввести в аквапонную установку дополнительный модуль с растениями.

Для этого вам необходимо продумать следующие вопросы:

1. Определите очередность подключения блока к уже существующим модулям.
2. Определите способ создания единого потока воды в расширенной системе. (при помощи чего вы будете его создавать?)
3. Оцените риски подключения дополнительного модуля. Сколько может вытечь воды, если отсоединится шланг / выключится электричество?

Результат приведите в письменном виде. Листок с ответом подпишите (название команды) и проставьте дату.

*Реализуйте идею и результат приведите в письменном виде в виде отчета. В отчете приведите расчеты, описание и схемы (если это необходимо). Листок с ответом подпишите (название команды) и проставьте дату.*

Максимальный балл - 5 баллов

### **Система оценки**

1. Очередность подключения блока вне зависимости от места подключения аргументировано – 1 балл  
Похожее задание было разобрано во втором туре Олимпиады. Правильным расположением может быть один из следующих вариантов:

- Гидропонный > Растительноводный > Аквакультурный > Бактериальный фильтрационный
- Гидропонный > Аквакультурный > Бактериальный фильтрационный > Растительноводный

Таким образом, модуль должен быть подключен или до, или после гидропонного блока.

2. Выполнена схема подключения растительного фильтра и общая схема аквапонной установки. Указаны уровни воды, переливы, положение заборных патрубков – 1 балл
3. Проведено расчётное определение скоростей работы водных помп в системе – 1 балл
  - (а) Скорость работы зависит от типа и регулировки насоса. Участники должны измерить ее при помощи секундомера и емкости известного объема
4. Скорости потоков воды уравновешены любым способом, рассчитана ошибка определения скорости потоков – 1 балл (без расчёта ошибки – 0.5 баллов)
5. Определён объём воды, способный вылиться из системы в случае откл. электричества или превышении скоростей заполнения с блоков системы – 1 балл
  - Объем воды, которая может вылиться из системы в случае поломки определяется для каждой конкретной установки (схемы подключения, модификаций, объемов воды..) отдельно.
  - При расчете должна быть нарисована схема системы с точным размещением по высоте приливных и сливных отверстий в разноуровневых ёмкостях
  - должны быть определены максимальные объёмы каждой из отдельных ёмкостей в случае остановки циркуляции и самотечного слива. При этом важно учитывать, как будет происходить осушение: управляемо с использованием ограничителей минимального уровня воды, или по закону “сообщающихся сосудов”.
  - Построена модель водообмена для каждого критического случая (отсоединился шланг/выключилось электричество);
  - Произведён расчёт первого и второго варианта по потере воды системой.

В начальных аквапонных установках (без модификаций, которые могли ввести участники) неправильное подключение дополнительного модуля, при котором скорости насосов (на вход и выход) не были сбалансированы по расчетам мог произойти перелив воды по уровню заборного фильтра в биофильтрационном модуле или модуле с высшими водными растениями (в зависимости от схемы подключения).

### **Задача 7.2.6. (10 баллов)**

Для автоматизированного сбора и анализа физико-химических показателей воды в аквапонной установке настройте и проверьте датчики:

- Осуществите онлайн-регистрацию установок на сервисе GreenPL
- Проверьте работоспособность датчиков и правильность отображение показаний

телей в личном кабинете на сервисе GreenPL

- Сравните показания датчиков с химическими тестерами

*Ход работы и результаты измерений внесите в лабораторный журнал*

Максимальный балл - 10

**Задание выполняется “online”**

### Система оценки

1. Регистрация на онлайн-платформе обработки данных осуществлена, выполняется онлайн-мониторинг за параметрами систем – 1 балл
2. Проведена проверка на соответствие регистрируемым параметрам соответствующим датчикам (правильность подключения гнезд датчиков к разъёмам соответствующих АЦП) – 1 балл
3. Сняты показатели каждого из датчиков (т-ра, рН, ОВП, проводимость, р-рѐнный кислород. Для каждого из датчиков проверена его работоспособность по стандартным р-рам – по 1 баллу за каждый датчик; макс количество баллов - 5
4. Проведена сверка показателей тест-систем с применением химических реагентов с показателями рН датчика – 1 балл
5. Проведена сверка показателей тест-систем с применением химических реагентов для определения ОВП с показателем ОВП датчика – 1 балл
6. Проведена сверка показателей тест-систем с применением химических реагентов р-рѐнного кислорода с показателями датчиков р-рѐнного кислорода – 1 балл

### **Задача 7.2.7. (10 баллов)**

1. Убедиться в правильности работы блока MQTT вход (ИС GRED). Вывести показания всех доступных датчиков в панель отладки. - 1 балл
2. Создать информационную панель с выводом исторических данных с датчиков в виде графиков, выводом последнего значения с датчиков в виде текста с разбивкой по группам. - 3 балла
3. Создать оповещение при превышении или понижении концентрации карбонатов до опасного уровня. - 2 балла
4. Создать оповещение по электронной почте при отключении измерительной системы от сети интернет. - 2 балла
5. Создать оповещение по электронной почте при поступлении неадекватных показаний с датчиков. - 2 балла

### Система оценки

Задание выполняется с использованием программирования при помощи построения блок-схем из готовых “кусков” кода на онлайн-платформе GreenPL. Успешность выполнения определяется следующими требованиями:

1. Все датчики “видятся” онлайн - платформой
2. Все необходимые оповещения срабатывают с минимальной задержкой
3. Не происходит ложных срабатываний предупреждений

### *Дополнительные задания*

#### **Критерии оценки ведения журнала (10 баллов)**

1. Дата, название команды, состав команды – 1 балл
2. Нумерация страниц – 1 балл
3. Точность фиксации задачи дня - 1 балл
4. Точность фиксации применяемого оборудования, расходных материалов, реагентов – 1 балл
5. Наличие плана реализации задачи дня – 1 балл
6. Наличие расчётов, комментариев, дополнений и/или примечаний по ходу ведения журнала – 1 балл
7. Наличие выводов или предварительных итогов дня – 1 балл
8. Заключительный итог по работе с 12 по 15 – 3 балла

Максимальное количество баллов – 10

#### **Инженерная и исследовательская культура при проведении работ с аквапонной установкой (17 баллов)**

1. Действие не подкреплённое обоснованием (гипотезой, опорой на знания физики, химии, математики, биологии) – минус 1 балл
2. Действие, противоречащее требованиям к безопасной эксплуатации установки (попытка работать с агрегатами системы (помпы, лампы) в погруженном состоянии, при включенном электропитании – 2 балла
3. Организация рабочего места 5 баллов (наличие мусора, бессистемное расположение записей, проливание р-ров на записи - минус один балл за каждый зафиксированный случай)
4. Грамотное инженерное решение задачи по предотвращению перелива из растительноводного фильтра (сифоном, самотёком после прекращения работы помпы) – 5 баллов;
5. Грамотное решение по стабилизации скоростей движения воды в двух помпах – 2 балла
6. Применение уникального, не стандартного решения в реализации инженерной задачи – 5 баллов.

## **7.3. Агробиотехнологии. 10-11 класс**

### ***Задача 7.3.1. Создание биофильтра (25 баллов)***

Приставка «био» всегда обозначает, что в процессе участвуют живые микроорганизмы - бактерии, поглощающие аммиак, от которого страдают обитатели аква-

риума, превращая его в нитриты и затем в нитраты. Это жизненно необходимая составляющая здорового аквариума, поскольку буквально все органические соединения разлагаются, образуя вредоносный аммиак. Достаточное количество полезных бактерий контролирует содержание аммиака в воде. Дело остается за малым, создать для бактерий место обитания и комфортную среду. \*\*Важно помнить, что «работать» должны бактерии, осевшие на фильтре, а не свободно плавающие!!

**Основные компоненты** (их можно конкретизировать для вашего фильтра): ёмкости, наполнители, источники микроорганизмов.

**Ожидаемый результат:** собранный биофильтр работает эффективно (определите показатели назначения – эффективность работы, проведите их мониторинг – в динамике, с шагом около 12/24 часа).

**Требования к результату:** результат должен быть оформлен в таблице, данные лучше визуализировать в виде графика. Дать критический анализ работы созданного биофильтра (почему выбраны те или иные компоненты, в чём плюсы/минусы, идеи для улучшения конструкции/ условий). Для этой задачи можно использовать оборудование: датчики pH, температуры, электропроводности.

**Расходные материалы:** тест-системы для определения аммония, нитрата, pH, наполнители (биокерамика, песок, гравий, поролон, ...), соли аммония, ..

**Ограничение:** объём фильтра ограничен ёмкостью 1 литр

### Лабораторный журнал по задаче:

Дата, время	Результаты измерений					
	$NH_4^+$ , ...	$NO_3^-$ , ...	$NO_3^-$ , ...	$O_2$ , ...	$T$ , ...	pH

### Система оценки

Правильное и своевременное измерение показателей в течение всего финального тура олимпиады. Максимум - 15 баллов.

Построение графиков - максимум 3 балла.

Эффективность работы биофильтра - 7 баллов.

Эффективность работы биофильтра проверяется по следующим параметрам: происходит снижение концентрации аммиака и ионов аммония, происходит увеличение содержания нитрат-ионов, концентрация кислорода в системе не уменьшается.

### Задача 7.3.2. Культивирование бактерий (30 баллов)

1. Перечислите необходимые компоненты для роста бактерий. (4 балла)

**Ответ:** Основными биогенными элементами являются: С, Н, N, О, Р, S, К; микроэлементы (многие ионы металлов, являясь составной частью активного

центра ферментов или участвуя в поддержании их пространственной структуры, обеспечивают обмен веществ микроорганизмов; наибольшее влияние на рост и развитие микроорганизмов оказывают ионы железа, меди, марганца, цинка, бора, молибдена, кобальта и ряда других металлов).

Таким образом, для культивирования и роста бактерий необходимы следующие компоненты:

- Источники углерода – органические/ неорганические ( $C$ ,  $O$ )
- Источники азота – аммонийные, нитратные формы, аминокислоты, белки
- Минеральная основа – соли, традиционно присутствующие в природной воде/ почвенном растворе
- Микроэлементы
- Факторы роста - витамины, пурины, пиримидины и аминокислоты, дрожжевой экстракт, дрожжевой автолизат (комплексный источник витаминов), возможны растительные экстракты

2. Из предложенного списка веществ выберите те, которые могут быть источником питания. Определите их в соответствующую колонку. **(6 баллов)**

*Количество строк в таблице приведено примерное. Можете оставлять какие-то пустыми, или добавить необходимые.*

$NO_3$ ,  $O_3$ ,  $NH_4Cl$ , лизин,  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $N_3$ , Тиомолибдат аммония,  $NaN_3$ , гистидин, гидролизат белка, пептон,  $N_2$ ,  $Na_2S$ , треонин,  $HCN$ ,  $N_2O$ ,  $C_2H_2$ , лизин, сукцинат, ацетат,  $KOH$ , декстран, полиэтиленгликоль,  $H_5OH$ , аргинин,  $NaH_2PO_4$ , холекальциферол, триптофан,  $z$ , сахароза,  $Na_2HPO_4$ ,  $H_2PO_4$ ,  $NaI$ ,  $FeSO_4$ , тиамин,  $CuSO_4$ , никотиновая кислота, пантотеновая кислота, рибофлавин,  $MoS_2$  пиридоксин, биотин, дианкобаламин,  $Fe(MoO_4)_3 \cdot nH_2O$  параамино-бензойная кислота,  $H_4O_8O_{26}$  фолиевая кислота, холин;  $CoSe_2$  аденин,  $SiO_2$ , гуанин, цитозин,  $SeSO_3$  тимин, урацил; триптофан, холин, глутаминовая кислота, метионин, валин, лейцин, фенилаланин,  $NH_2CONH_2$ , гистидин.

Источники С	Источники N	Минеральные компоненты	Микроэлементы	Факторы роста

*Верная таблица с ответами:*

Источники С	Источники N	Минеральные компоненты	Микроэлементы	Факторы роста

гидролизат белка, $C_2H_2$ , сук- цинат, ацетат, декстран, полиэти- ленгликоль, $2H_5OH$ , холекаль- циферол, сахароза, аминокис- лоты	$NH_4Cl$ , $(NH_4)_2SO_4$ , $N_3$ , Тио- молибдат аммония, $NaN_3$ , гидроли- зат белка, пептон, $N_2$ , амино- кислоты, $NH_2CONH_2$ , $N_2O$	$NO_3$ , $O_3$ , $NaH_2PO_4$ , $Na_2HPO_4$ , $H_2PO_4$ , $NaI$ , $Na_2S$ , $NaN_3$ $FeSO_4$ , $z$	$Fe(MoO_4)_3 \cdot$ $nH_2O$ , $H_4O_8O_{26}$ , $CoSe_2$ , $SiO_2$ , $SeSO_3$ , $CuSO_4$ , $MoS_2$ , Тио- молибдат аммония	треонин, тимин, урацил; триптофан, холин, глутаминовая кислота, метионин, валин, лизин, ги- стидин, лейцин, фенилаланин, ги- стидин, аденин, гуанин, цитозин, ни- котиновая кислота, пантотеновая кис- лота, рибофлавин, биотин, дианкоба- ламин, параамино- бензойная кислота, фолиевая кислота, тиамин, пиридоксин, лизин, аргинин, триптофан
---	--	--	---	---

3. Перед вами стоит задача культивировать азотфиксаторов, какую среду будете использовать? (предложите состав и укажите, для чего используется каждый компонент). (6 баллов)

**Ответ:** Необходимы источники углерода, в качестве источника азота – атмосферный  $N_2$  (т.к. в случае использования нитратов/ аммония или органического источника – азотфиксаторы предпочтут их вместо того, чтобы фиксировать молекулярный азот. При этом селекции азотфиксаторов не произойдёт). Необходимы микроэлементы (молибден, железо, ванадий), которые могут выступать в качестве активного центра нитрогеназы (фермента, ответственного за восстановление  $N_2$ ). Важно поддержание нейтральной по кислотности среды, тк при низких значения рН ингибируется нитрогеназа.

4. Вам предлагают культивировать следующую бактерию. Предложите оптимальный состав питательной среды для бактерии. Какие дополнительные условия необходимо выполнить для успешного роста (рН, ОВП – окислительно-восстановительный потенциал, температура, ...)? (14 баллов)

*Бактерия X.*

*Облигатный аэроб, температурный оптимум роста 28-30; растет в пределах рН среды от 5.2 до 8.0. В дополнительных факторах роста не нуждается (прототроф). Обладает лецитиназной активностью, желатину разжижает. Крахмал не гидролизует. В качестве источника углерода использует глюкозу, триптофан, глицерин, этиловый спирт, слабо усваивает мальтозу. Не усваивает лактозу, дульцит, рамнозу, сорбит. Использует аммиачные и нитратные соли азота в качестве единственного источника азота.*

**Ответ:** В качестве примера бактерии может быть приведена *Pseudomonas spp*

Для контроля организаторы подготовили минимальную синтетическую среду следующего состава:  $2O_4$  - 7 г/л,  $KH_4PO_4$  - 3 г/л,  $NH_4Cl$  - 1 г/л, глюкоза

- 2 г/л. Задача участников состояла подобрать на своё усмотрение минимальный достаточный состав, на котором штамм Псевдомонады мог образовать биомассу. Также, необходимо было указать физико-химические условия культивирования - температуру, кислотность, аэрация (это всё указано в описании бактерии).

Лучшим результатом становился тот, где бактерия показывала максимальный рост. В обеих командах рост был ниже контроля, и были отличия в количестве биомассы между командами. Причём отличия были зафиксированы в 3-й повторности.

### **Задача 7.3.3. Как антибиотики воздействуют на полезную микрофлору? (20 баллов)**

«Антибиотики присутствуют в большом количестве в продукции аквакультуры, что становится проблемой, к такому выводу пришли ученые из университета Аризона в США. Анализ проб из различных видов рыбы и морепродуктов, выращенных на фермах в США, продемонстрировал наличие пяти различных видов антибиотиков, которые достаточно часто встречались в чрезмерных концентрациях. Об этом сообщает foodcontrol.ru.

При этом анализ импорта продемонстрировал еще более угрожающие данные. Исследователи обнаружили следы 47 различных видов антибиотиков в креветках, лососе, соме, форели и тилапии, ввезенных из 11 стран. И опять же достаточно часто антибиотики встречались в больших концентрациях. Результаты работы были опубликованы в Journal of Hazardous Materials.

Как сообщает kombi-korona.ru, агентства по контролю за оборотом пищевой продукции в США практически не обращают внимание на эту проблему, точно также, как и общественность, которая традиционно беспокоится о наличии антибиотиков в мясе сельскохозяйственных животных. В то же время об аналогичной проблеме в продукции аквакультуры вообще мало кто говорит, отмечают специалисты».

1. Обсудите в команде, какие эффекты может иметь использование антибиотиков/ пестицидов в агропроизводстве. Укажите все заслуживающие внимание негативные последствия. (4 балла)

#### **Ответ:**

- снижение биоразнообразия микробных сообществ почв – нарушение естественного биоконтроля патогенов (супрессивности), присущего природным ландшафтам
- дисбактериоз - в животноводстве, снижение иммунитета, делающее объекты животноводства более уязвимыми инфекциям
- аккумуляция в цепях питания – потребление с/х продукции, содержащей антибиотические вещества – дисбактериозы у потребителей
- резистентность патогенных микроорганизмов (в результате горизонтального переноса генов в природной среде)  
( – балл за указание одного корректного эффекта, максимум 4)

2. В каких случаях антибиотические вещества могут попадать в водоёмы, которые являются базой для аквакультуры? (2 балла)

**Ответ:**

- с кормами (производитель стремится увеличить сроки хранения кормов)
- стоки с животноводческих ферм (экскременты содержат антибиотики в случае их использования даже при профилактике заболеваний молодняка)
- стоки с полей, обработанных пестицидами  
(балл за указание одного корректного примера, максимум 2)

3. Какие способы снижения объёмов использования таких веществ можно применять без ущерба для здоровья среды? Предложите способы, покажите, в чём их положительные стороны. **(4 балла)**

**Ответ:**

- севооборот в растениеводстве – позволяет существенно снизить численность фитопатогенов (как бактерий, так и грибов – микромицетов), увеличивает разнообразие микроорганизмов (ризосфера разных культур отличается по составу), восстановить баланс биогенных элементов
- комплексные посадки, включающие растения, которые являются источниками репеллентов нежелательных популяций
- биоконтроль патогенов, в тч использование суперпаразитов  
(за каждый корректный способ – 1 балл, за его аргументацию +1 балл, максимум – 4 балла)

4. Возьмите предложенные штаммы микроорганизмов (полезные!). Предложите дизайн эксперимента для определения минимальной действующей концентрации антибиотика/ пестицида.

Для определения активности штамма используйте методику гидролиза ди-ацетата флуоресцеина. **(6 баллов)**

**Ответ:** Для работы использовались пекарские дрожжи - *Saccharomyces cerevisiae*. В качестве антибиотика был взят нистатин. За обоснованный дизайн эксперимента (схема, логические пояснения) – 4 балла, за аккуратное исполнение методики, работу в лаборатории - + 2 балла

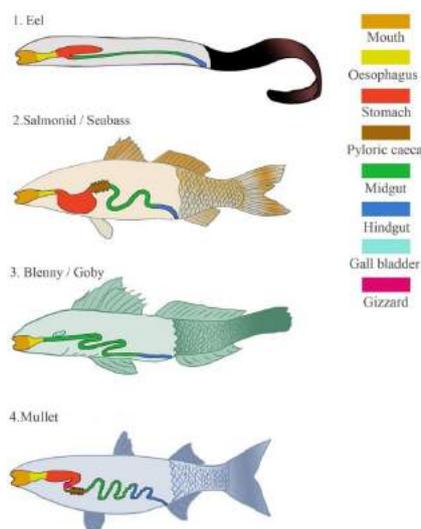
5. Проанализируйте полученные данные. Сделайте вывод. **(4 балла)**

**Ответ:**

- в случае активности дрожжей – в среду высвободился флуоресцеин, относительное содержание которого регистрировали на спектрофотометре.
- за аккуратность работы на спектрофотометре – 2 балла, корректную интерпретацию (супернатант зелёный – нет ингибирования, нет зелёной окраски – есть ингибирование) +2 балла

### Задача 7.3.4. (10 баллов)

1. Ознакомьтесь с материалами - Из источника <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5946678/>



«Gut microbial communities of fish in other trophic levels have less characteristic dominance when compared to herbivores. However, one study comparing phylogenetically similar benthivore and planktivore freshwater species showed they contained different unique intestinal bacterial communities (Uchii et al., 2006). In general, within the marine environment, Proteobacteria, rather than Firmicutes, is often the dominant phylum at the non-herbivorous trophic levels (Miyake et al., 2015). Vibrionaceae, Aeromonas and Pseudomonas are all frequently reported in carnivores, omnivores and (zoo-) planktivores.»

Какие роды бактерий являются наиболее традиционными обитателями кишечника рыб?

**Ответ:** Pseudomonas spp., Vibrio spp, относящиеся к типу протеобактерии (Proteobacteria). (участники могли выяснить это из статьи, на которую дана ссылка)

Какую бактерию вам предложили для культивирования?-(2 балла)

**Ответ:** Pseudomonas fluorescens

2. Укажите, в каких пропорциях и какие препараты вы интродуцировали в своих фильтры? (2 балла)

#### *Пояснения к ответу*

Участники должны сами определиться с пропорциями, которые приведены ниже, и которые выдавались через установленное время .

Внизу пояснения – в пробирку №1 добавили ..., №2 ..., №3 ...

3. Возьмите 3 центрифужных пробирки объемом 15 мл, подпишите их (№1, 2, 3)

В пробирки добавьте:

В №1 - 10 мл фосфатного буфера (pH 7.5). Внесите туда бактерию Pseudomonas fluorescens Встряхните.

В №2 – то, что вносили в фильтры (объёмом 10 мл, сохраняя ваши пропорции)

В №3 – 10 мл пробы из аквапонной установки

4. Используйте тест-систему Biolog-Eco для анализа ваших проб.

Ознакомиться с системой можно тут: [https://openwetware.org/wiki/M465:Biolog\\_Ecoplates](https://openwetware.org/wiki/M465:Biolog_Ecoplates)

В каждую лунку вносим 0,2 мл тестируемого образца.

Занесите все действия в лабораторный журнал.

5. Подпишите (сбоку аккуратно) вашу планшетку. Поместите в термостат = 27°C

Наблюдайте изменения окраски лунок на первые сутки, на вторые **(2 балла)**



6. Интерпретируйте полученные результаты и занесите в журнал **(4 балла)**

**Ответ:**

В качестве результата можно ожидать классификацию трёх объектов на основе разного спектра и активности потребления субстратов. Участники могли выдвинуть гипотезу, что коммерческий препарат, если представляет собой только нитрификаторов, то штаммы, входящие в состав препарата, не используют органические субстраты. Участники могли предложить разного рода визуализации полученных результатов, вплоть до кластерного анализа.

### ***Задача 7.3.5. Ведение журнала (15 баллов)***

В ходе работы команды должны были вести лабораторный журнал, в который необходимо вносить описание того, что делали, приводить расчеты, выписывать наблюдения и делать выводы.

За каждый день ведения журналы команды могли получить по 5 баллов.

При оценке журнала применялись следующие критерии:

- В журнале кратко приводится описание действий в течение дня - 2 балла
- В журнале приводятся подробные описания процедур с расчетами -3 балла
- В журнале приводятся все расчеты, подробные описания работы и делаются выводы по проделанной работе - 5 баллов.