

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**  
**БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**  
**БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

**Кафедра генетики**

**КОВАЛЕВСКИЙ**  
Антон Александрович

**РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ**  
**РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ, ОСНОВАННОЙ НА КРАВ-ДОМЕНЕ**

Аннотация  
к дипломной работе

Научный руководитель:  
кандидат биологических наук,  
доцент В.В. Гринев

Минск, 2014

## РЕФЕРАТ

Дипломная работа 47 страниц, 22 рисунка, 1 таблица, 33 источника.

ЛЕНТИВИРУСНАЯ ТРАНСДУКЦИЯ, РЕПРЕССОР ТРАНСКРИПЦИИ, ГЕННЫЙ НОКДАУН, РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ, ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ, РЕКОМБИНАНТНЫЕ ДНК.

Острый миелоидный лейкоз в 12 % случаев ассоциирован с транслокацией, при которой образуется гибридный ген *runx1/runx1t1*. В работе предложен инструмент для исследования его функций путем генного нокдауна: разработана система из двух лентивирусных векторов доставки pLVTHM-shAML1/ETO и pLVUT-mCherry-tTRKRAB, позволяющая осуществлять индуцибельную РНК-интерференцию данного гена.

Испытания векторов на клеточной линии НЕК 293Т показали работу отдельных векторов и функционирование их в системе. При трансфекции данных клеток векторами pLVTHM-shAML1/ETO и pLVUT-mCherry-tTRKRAB экспрессия репортерных генов eGFP и mCherry происходит конститутивно. При должном проценте трансдуцированных обоими векторами клеток, система векторов остается зарепрессированной в отсутствие индуктора; и, в то же время, отвечает на присутствие индуктора (доксидиклина), что приводит к экспрессии репортерных генов и, как следствие, к появлению зеленой и красной флуоресценции.

Установлено, что вирусные частицы pLVUT-mCherry-tTRKRAB образуются с низким титром. Показано, что наличие телячьей фетальной сыворотки в среде для культивирования клеток не вызывает индукцию системы.

## РЭФЕРАТ

Дыпломная работа 47 старонак, 22 рысунка, 1 табліца, 33 крыніцы.

ЛЕНЦІВІРУСНАЯ ТРАНСДУКЦЫЯ, РЭПРЭСАР ТРАНСКРЫПЦЫІ, ГЕННЫ НАКДАЎН, РНК-ІНТЭРФЕРЭНЦЫЯ, ПРАТОЧНАЯ ЦЫТАМЕТРЫЯ, РЭКАМБІНАНТНЫЯ ДНК.

Востры міелоідны лейкоз у 12 % выпадкаў асацыяваны с транслакацыяй, при якой утвараецца гібрыдны ген *runx1/runx1t1*. У работе прапанаваны інструмент для даследвання яго функцый шляхам геннага накдаўна: распрацавана сістэма з двух ленцівірусных вектараў дастаўкі pLVTHM-shAML1/ETO і pLVUT-mCherry-tTRKRAB, якая дазваляе ажыцяўляць індукцыю РНК-інтэрферэнцыю дададзенага гена.

Выпрабаванні вектараў на цэлявай лініі НЕК 293Т паказалі работу вектараў паасобна і функцыянаванне іх у сістэме. Пры трансфекцыі дадзеных цэляў вектарамі pLVTHM-shAML1/ETO і pLVUT-mCherry-tTRKRAB экспрэсія рэпарцёрных генаў eGFP і mCherry адбываецца канстытуцыйна. Пры належным працэнце трансдуцыраваных абодвума вектарамі цэляў, сістэма вектараў застаецца зарэпрэсаванай у адсутнасці індуктара; і, у той жа час адказвае на прысутнасць Індуктара (даксіцыкліна), што вядзе да экспрэсіі рэпарцёрных генаў і, як следства, да з'яўлення зялёнай і чарвонай флуарэсцэнцыі.

Вызначана, што вірусныя часціцы pLVUT-mCherry-tTRKRAB фарміруюцца з нізкім тытрам. Паказана, што наяўнасць цялячай фетальнай сывараткі ў пажыўным асяроддзі для культывавання цэляў не выклікае індукцыю сістэмы.

## ABSTRACT

Diploma work 47 pages, 22 figures, 1 table, 33 sources.

LENTIVIRAL TRANSDUCTION, TRANSCRIPTIONAL REPRESSOR, GENE KNOCKDOWN, RNA INTERFERENCE, FLOW CYTOMETRY, RECOMBINANT DNA.

Acute myeloid leukemia in 12 % of cases is associated with translocation, leading to the appearance of fused gene *runx1/runx1t1*. We developed a tool for the study of its functions by gene knockdown: a system of two lentiviral delivery vectors pLVTHM-shAML1/ETO and pLVUT-mCherry-tTRKRAB, allowing to carry out inducible RNA interference of the gene.

The functional activity of vectors was demonstrated by treating HEK 293T cell line. pLVTHM-shAML1/ETO and pLVUT-mCherry-tTRKRAB after being transfected with express reporter genes eGFP and mCherry constitutively. With the proper percentage of transduced cells by both vectors and with the absence of inducer the system remains repressed; at the same time, the system responds to the inducer (doxycycline) presence with expression of reporter genes that results in green and red fluorescence appearance.

pLVUT-mCherry-tTRKRAB viral particles were shown to generate with low titre. Addition of fetal bovine serum into the culture medium didn't cause activation of the system.