

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра генетики

ЯСЮЧЕНЯ
Елена Сергеевна

КЛОНИРОВАНИЕ ВАРИАБЕЛЬНЫХ ДОМЕНОВ ГЕНОВ
ИММУНОГЛОБУЛИНА И СБОРКА ЛИНЕЙНОЙ
КОНСТРУКЦИИ ИДИОТИПА SCFV ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ
ИДИОТИПИЧЕСКИХ ДНК-ВАКЦИН

Аннотация
к дипломной работе

Научный руководитель:
научный сотрудник,
Луцкович Дмитрий Викторович

Минск, 2020

РЕФЕРАТ

Дипломная работа включает: страниц – 65, рисунка – 26, таблиц – 18, приложений – 2, источников – 40.

Ключевые слова: неходжкинская лимфома, реаранжировка, ДНК-вакцина, иммуноглобулин, молекулярное клонирование, одноцепочечный переменный фрагмент.

Объект исследования: опухолевый идиотип, идентифицированный из выделенной РНК пациента с подтверждённой В-клеточной неходжкинской лимфомой.

Цель: собрать линейную конструкцию идиотипа (scFv) для получения идиотипической ДНК-вакцины. Подобрать и проверить аллель-специфичные олигонуклеотиды для дальнейшего наблюдения за течением заболевания методом ПЦР в режиме «реального времени».

Методы: ПЦР, гетеродуплексный анализ, секвенирование, рестрикция-лигирование, электропорация, бактериальный скрининг.

Задачи дипломной работы: выделение РНК из материала опухоли и синтез кДНК; проведение ПЦР-скрининга переменных регионов иммуноглобулинов и секвенирование их для идентификации опухолевого идиотипа и подбора АСО-праймеров; сборка scFv-конструкции; проверка правильности собранной конструкции; проведение ПЦР в режиме «реального времени» для проверки АСО-праймеров.

Актуальность работы: В-клеточная неходжкинская лимфома относится к онкологическим заболеваниям с медленной прогрессией и частыми рецидивами. Идиотипическая ДНК-вакцинация применяется как вспомогательный метод терапии при лечении данного заболевания. Основная функция вакцины – усиление способности иммунной системы контролировать оставшиеся опухолевые клетки, соответственно стабилизировать ремиссию.

Полученные результаты: сконструированная scFv клонирована в вектор pING для экспрессии вместе с геном иммуностимулятора PVXSP, электропорирована в клетки *E. coli*, плазмидная ДНК которых в последующем будет использоваться в качестве основы для персональной идиотипической ДНК-вакцины. Проведена проверка конструкции и также проверка АСО-праймеров для дальнейшей возможности отслеживания минимальной остаточной болезни.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа ўключае: старонак – 65, малюнкаў – 26, табліц – 18, прыкладанняў – 2, крыніц – 40.

Ключавыя словы: неходжкінская лимфома, рэаранжыроўка, ДНК-вакцына, імунаглабулін, малекулярнае кланаванне, адналанцуговы варыябельны фрагмент.

Аб'ект даследавання: пухінны ідыатып, ідэнтыфікаваны з выдзеленай РНК пацыента з пацверджанай В-клеткавай неходжкінскай лимфomай.

Мэта: сабраць лінейную канструкцыю ідыатыпа (scFv) для атрымання ідыатыпічнай ДНК-вакцыны. Падабраць і праверыць алель-спецыфічныя алігануклеатыды для далейшага назірання за цягам захворвання метадам ПЛР ў рэжыме «рэальнага часу».

Метады: ПЛР, гетэрадулексны аналіз, секвеніраванне, рэстрыкцыя-лігіраванне, электрапарацыя, бактэрыяльны скрынінг.

Задачы дыпломнай работы: вылучэнне РНК з матэрыялу пухліны і сінтэз кДНК; правядзенне ПЛР-скрынінга варыябельных рэгіёнаў імунаглабулінаў і секвеніраванне іх для ідэнтыфікацыі пухліннага ідыатыпу і падбору АСА-праймераў; зборка scFv-канструкцыі; праверка правільнасці сабранай канструкцыі; правядзенне ПЛР ў рэжыме «рэальнага часу» для праверкі АСА-праймераў.

Актуальнасць работы: В-клеткавая неходжкінская лимфома ставіцца да анкалагічных захворванняў з павольнай прагрэсіяй і частымі рэцыдывамі. Ідыатыпічная ДНК-вакцынацыя прымяняецца як дапаможны метада тэрапіі пры лячэнні дадзенага захворвання. Асноўная функцыя вакцыны – узмацненне здольнасці імуннай сістэмы кантраляваць пакінутыя пухлінныя клеткі, адпаведна стабілізаваць рэмісію.

Атрыманыя вынікі: сканструяваная scFv- канструкцыя кланаваная ў вектар pING для экспрэсіі разам з генам-кастымулятарам PVXSP, электропорірована ў клеткі *E. coli*, плазмідная ДНК якіх у наступным будзе выкарыстоўвацца ў якасці асновы для персанальнай ідыатыпічнай ДНК-вакцыны. Праведзена праверка канструкцыі і таксама праверка АСА-праймераў для далейшай магчымасці адсочвання мінімальнай рэшткавай хваробы.

ABSTRACT

Thesis includes: pages – 65, figures – 26, tables – 18, applications – 2, sources – 40.

Key words: non-Hodgkin lymphoma, rearrangement, DNA vaccine, immunoglobulin, molecular cloning, single-chain variable fragment.

Object of study: a tumor idiotype identified from an isolated RNA of a patient with confirmed B-cell non-Hodgkin lymphoma.

Aim of work: to assemble a linear idiotype construct (scFv) to produce an idiotypic DNA vaccine. Select and test allele-specific oligonucleotides for further monitoring the course of the disease by real time PCR.

Methods: PCR, heteroduplex analysis, sequencing, restriction ligation, electroporation, bacterial screening.

Objectives of the thesis: RNA isolation from tumor material and cDNA synthesis; PCR screening of variable regions of immunoglobulins and sequencing them to identify the tumor idiotype and the selection of ASO primers; assembly of scFv construction; validation of the assembled structure; real-time PCR for testing ASO primers.

Relevance of work: B-cell non-Hodgkin lymphoma refers to cancer with a slow progression and frequent relapses. Idiotypic DNA vaccination is used as an auxiliary method of therapy in the treatment of this disease. The main function of the vaccine is to enhance the ability of the immune system to control the remaining tumor cells, respectively, to stabilize remission.

Results: the constructed scFv cloned into a pING vector for expression together with the PVXCP immunostimulant gene, electroporated into *E. coli* cells, the plasmid DNA of which will subsequently be used as the basis for a personal idiotypic DNA vaccine. Design verification and testing of ASO primers were carried out to further monitor the minimum residual disease.