

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра генетики

ШНИТКОВСКАЯ
Анна Владимировна

РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА
ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ ЯДЕРНОЙ И
ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ РНК КЛЕТОК ЭУКАРИОТ

Аннотация к дипломной работе

Научный руководитель:
старший преподаватель
И.Н. Ильюшёнок

Минск, 2021

РЕФЕРАТ

Дипломная работа включает: страниц – 38, рисунка – 10, таблиц – 3, источников – 76.

Ключевые слова: ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ РНК, СПЛАЙСИНГ, АЛЬТЕРНАТИВНОЕ ПОЛИАДЕНИЛИРОВАНИЕ, ЯДЕРНЫЙ ТРАНСПОРТ, NMD-СИСТЕМА, РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ, РАКОВЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ.

Объект исследования: РНК клеток культуры опухоли Kasumi-1.

Цель: разработать базовый протокол выделения ядерной и цитоплазматической фракции тотальной клеточной РНК человека.

Методы: выделение РНК, ПЦР, ОТ-ПЦР, количественная ПЦР, электрофорез в агарозном геле.

Уровень и качество мРНК в клетке тонко регулируется различными системами. Так дефектно процессируемая мРНК запирается в ядре, а в цитоплазме мутантная мРНК уничтожается посредством РНК-интерференции или NMD-системы.

Баланс между качественным и количественным составом мРНК в ядре и в цитоплазме критически важен для нормального функционирования клеток и определяет их выживаемость, пролиферацию, дифференцировку. Нарушение этого баланса приводит к развитию многих заболеваний, в том числе и раковых. Разработка эффективной методики фракционирования ядерной и цитоплазматической фракций РНК создает основу для изучения патологий человека на уровне транскриптома.

В ходе настоящей работы мы модифицировали базовый протокол выделения РНК, что позволило нам получить оптимальный выход ядерной и цитоплазматической РНК. Также мы доказали, что качество и количество полученной РНК пригодно для постановки ПЦР. Анализ с помощью ПЦР в реальном времени позволяет детектировать в ядерной фракции РНК как сплайсированные, так и специфичные для неё несплайсированные молекулы РНК.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа ўключае: старонак – 38, малюнкаў – 10, табліц – 3, крыніц – 76.

Ключавыя словы: ФРАКЦЫЯНАВАННЕ РНК, СПЛАЙСІНГ, АЛЬТЭРНАТЫЎНАЕ ПОЛІАДЭНІЛАВАННЕ, ЯДЗЕРНЫ ТРАНСПАРТ, NMD-СІСТЭМА, РНК-ІНТЭРФЕРЭНЦЫЯ, РАКАВЫЯ ЗАХВОРВАННІ.

Аб'ект даследвання: РНК клетак культуры пухліны Kasumi-1.

Мэта: распрацаваць базавы пратакол выдзялення ядзернай і цытаплазматычнай фракцый татальнай клетачнай РНК чалавека.

Метады: выдзяленне РНК, ПЛР, АТ-ПЛР, колькасная ПЛР, электрофарэз ў агарозным гелі.

Узровень і якасць мРНК у клетцы тонка рэгулюецца рознымі сістэмамі. Так мРНК, якая праходзіць працэсінг з хібамаі, не выпускаецца з ядра, а ў цытаплазме мутантная мРНК знішчаецца пры дапамозе РНК-інтэрферэнцыі альбо NMD-системы.

Баланс паміж якасным і колькасным складам мРНК ў ядры і ў цытаплазме крытчна важны для нармальнага функцыянавання клеткі і вызначае іхнюю выжываемасць, праліферацыю, дыферэнцыроўку. Парушэнне гэтага балансу прыводзіць да развіцця многіх захворванняў, у тым ліку і ракавых. Распрацоўка эфектыўнай метадыкі фракцыянавання ядзернай і цытаплазматычнай фракцый РНК стварае аснову для вывучэння паталогій чалавека на ўзроўні транскрыптома.

У ходзе сапраўднай работы мы мадыфікавалі базавы пратакол выдзялення РНК, што дазволіла нам атрымаць аптымальны выход ядзернай і цытаплазматычнай РНК. Таксама мы даказалі, што якасць і колькасць атрыманай РНК прыгодна для пастаноўкі ПЛР. Аналіз з дапамогай ПЛР у рэальным часе дазваляе дэтэктаваць ў ядзернай фракцыі РНК як сплайсаваныя, так і спецыфічныя для яе нсплайсаваныя малекулы РНК.

ABSTRACT

The thesis includes: pages – 38, figures – 10, tables – 3, sources – 76.

Key words: FRACTIONATION OF RNA, SPLICING, ALTERNATIVE POLYADENYLATION, NUCLEAR TRANSPORT, NMD, RNA INTERFERENCE, CANCER.

Object of study: RNA of tumor culture cells Kasumi-1.

The aim was to develop a basic protocol for the isolation of nuclear and cytoplasmic fractions of human total cellular RNA.

Methods: isolation of RNA, PCR, RT-PCR, qPCR, agarose gel electrophoresis.

The level and quality of mRNA in the cell is tightly regulated by various systems. Thus, defectively processed mRNA is locked in the nucleus, and in the cytoplasm, the mutant mRNA is destroyed by RNA interference or the NMD system.

The balance between the qualitative and quantitative composition of mRNA in the nucleus and in the cytoplasm is critically important for the normal functioning of cells and determines their survival, proliferation, and differentiation. Disruption of this balance leads to the development of many diseases, including cancer. Devising an effective technique for fractionation of nuclear and cytoplasmic RNA fractions creates the basis for the study of human pathologies at the transcriptome level.

In this project, we modified the basic protocol for RNA isolation, which allowed us to obtain an optimal yield of nuclear and cytoplasmic RNA. We also proved that the quality and quantity of the obtained RNA is suitable for PCR. Real-time PCR analysis allows the detection of both spliced and non-spliced RNA molecules in the nuclear fraction of RNA.