

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра генетики

**ВОДНЕВА
Кира Владимировна**

**РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ 293T С
ЦЕЛЬЮ УЛУЧШЕНИЯ ЕЕ ХАРАКТЕРИСТИК ПРИ
ПРОИЗВОДСТВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЛЕНТИВИРУСНЫХ
ЧАСТИЦ**

Аннотация к дипломной работе

Научный руководитель: старший научный сотрудник лаборатории иммунологических исследований, А.А. Мигас

Минск, 2022

РЕФЕРАТ

Дипломная работа: 56 с., 15 рис., 4 табл., 58 источников.

Ключевые слова: РЕКОМБИНАНТНЫЕ ЛЕНТИВИРУСНЫЕ ЧАСТИЦЫ, ФУЗОГЕННЫЕ БЕЛКИ, РЕЦЕПТОР ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ (LDLR), ГЛИКОПРОТЕИН VSV-G, GFP, 293T(НЕК293), НОКАУТ ГЕНА.

Объекты исследования: клеточная линия 293T и ее производная 293T_LDLR.KO с нокаутом по гену LDLR.

Цель работы: изучение возможности повышения выхода VSVG-псевдотипированных вирусных частиц за счет генетической модификации пакующей линии 293T.

Методы исследования: молекулярное клонирование (конструирование экспрессионных кассет в составе плазмидных векторов, рестрикция ДНК, лигирование ДНК, бактериальная трансформация, выделение плазмидной ДНК), методы культур клеток млекопитающих и клеточной инженерии (ведение клеточной линии, криосохранение клеток, проточная цитометрия, трансфекция, лентивирусная трансдукция, нокаут гена с применением технологии CRISPR-Cas), молекулярно-генетические методы (выделение нуклеиновых кислот, ПЦР, электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в агарозном геле).

Результаты: в результате проведенной нами работы была сконструирована векторная система на основе плазмида pX333, предназначенная для нокаута гена LDLRc применением технологии CRISPR-Cas; проведен нокаут гена LDLR в клетках линии 293Tc использованием полученной векторной системы и путем сортировки флуоресцентно-активированных клеток получена чистая сублиния 293T_LDLR.KO; показано, что использование в качестве пакующей линии клеток 293T_LDLR.KO позволяет существенно (до 3 раз) увеличить, при сравнении с исходной линией 293T, выход рекомбинантных псевдотипированных белком VSVG лентивирусных частиц.

ABSTRACT

Diploma work: 56 p., 15 fig., 4 tables, 58 sources.

Key words: RECOMBINANT LENTIVIRUS PARTICLES, FUSOHOGENIC PROTEINS, LOW DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR (LDLR), GLYCOPROTEIN VSV-G, GFP, 293T (HEK293), NOKAUT GENE.

Object of research: 293T cell line and its derivative 293T_LDLR.KO with LDLR gene knockout.

Purpose of work: to investigate the possibility of increasing the yield of VSVG-pseudotyped viral particles by genetic modification of the 293T packing line.

Research methods: Molecular cloning (construction of expression cassettes within plasmid vectors, DNA restriction, DNA ligation, bacterial transformation, plasmid DNA isolation), mammalian cell culture and cell engineering techniques (cell line maintenance, cryopreservation of cells, flow cytometry, transfection, lentiviral transduction, gene knockout using CRISPR-Cas technology), molecular genetic techniques (nucleic acid isolation, PCR, electrophoretic separation of nucleic acids in agarose gel).

Results: as a result of this work was constructed vector system based on plasmid pX333, designed to knockout the LDLR gene using CRISPR-Cas technology; knockout of LDLR gene in 293T cells was performed using the obtained vector system, and by sorting the fluorescently activated cells a pure subline 293T_LDLR. KO; it was shown that using 293T_LDLR.KO cells as a packing line increased the yield of recombinant pseudotyped VSVg lentiviral particles up to 3-fold as compared with the original 293T line.

РЭФЕРАТ

Дыпломная праца: 56 с., 15 мал., 4 табл., 58 крыніц.

Ключавыя слова: РЭКАМБІНАНТНЫЯ ЛЯНТЫВІРУСНЫЯ ЧАСТКІ, ФУЗОГЕННЫЯ БЕЛКІ, РЭЦЭПТАР ЛІПАПРАТЭІНАЎ НІЗКАЙ ШЧЫЛЬНАСЦІ (LDLR), ГЛІКАПРАТЭІН VSV-G, GFP, 293T (HEK293), НАКАЎТ ГЕНА.

Аб'екты даследавання: клеткавая лінія 293T і яе вытворная 293T_LDLR.KO з накаўтам па гене LDLR.

Мэта працы: вывучэнне магчымасці павышэння выходу VSVG-псеўдатыпаваных вірусных часціц за кошт генетычнай мадыфікацыі пакуе лініі 293T.

Метады даследавання: малекулярнае кланаванне (канструяванне экспрэсійных касэт у складзе плазмідных вектараў, рэстрывцыя ДНК, лігіраванне ДНК, бактэрыяльная трансфармацыя, вылучэнне плазмідной ДНК), метады культур клетак млекакормячых і клеткавай інжынерыі (вядзенне клеткавай лініі, крываахаванне клетак, праточная цытаметрыя, трансфекцыя, накаўт гена з ужываннем тэхналогіі CRISPR-Cas), малекулярна-генетычныя метады (вылучэнне нуклеінавых кіслот, ПЦР, электрафарэтычны падзел нуклеінавых кіслот у агарозным гелі).

Вынікі: у выніку праведзенай намі працы была сканструявана вектарная сістэма на аснове плазміды pX333, прызначаная для накаўту гена LDLR з ужываннем тэхналогіі CRISPR-Cas; праведзены накаўт гена LDLR у клетках лініі 293T з выкарыстаннем атрыманай вектарнай сістэмы і шляхам сартавання флуарэсцэнтна-актываваных клетак атрымана чистая сублінія 293T_LDLR.KO; паказана, што выкарыстанне ў якасці пакавальнай лініі клетак 293T_LDLR.KO дазваляе істотна (да 3 разоў) павялічыць, пры параўнанні з зыходнай лініяй 293T, выход рэкамбінантных псеўдатыпаваных бялком VSVg лентівірусных часціц.