

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра генетики

КУНЦЕВИЧ
Татьяна Казимировна

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИНИИ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА СО СТАБИЛЬНОЙ
ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА CAS9

Аннотация
к дипломной работе

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
доцент Т.В.Романовская

Минск, 2022

РЕФЕРАТ

Дипломная работа включает: страниц – 38, рисунков – 6, таблиц – 1, источников – 26.

Ключевые слова: CRISPR/CAS9, KASUMI-1, НЕК293Т, ТРАНСФЕКЦИЯ, ЛЕНТИВИРУСНАЯ ТРАНСДУКЦИЯ.

Объекты исследования: клетки острого миелоидного лейкоза человека Kasumi-1 и клетки эмбриональной почки человека НЕК293Т.

Цель: получить клетки человека со стабильной экспрессией трансгена Cas9 посредством лентивирусной трансдукции.

Методы: выделение плазмидной ДНК из бактерий, трансфекция клеток человека плазмидной ДНК с использованием полиэтиленимина в качестве вспомогательного компонента, лентивирусная трансдукция, методы культивирования клеток человека *in vitro*, селекция клеток по признаку устойчивости к антибиотику.

Система CRISPR/Cas входит в топ инструментов для целенаправленной манипуляции поведением клеткок из-за ее эффективности, простоты в использовании и способности нацеливаться как на ДНК, так и на РНК. Она представляет собой совокупность двух компонентов: белка Cas9 и sgRNA. Целью данной работы является достижение стабильной экспрессии гена Cas9 в клеточных линиях Kasumi-1 и НЕК293Т.

В ходе проведенной работы была осуществлена котрансфекция клеток линии НЕК293Т векторами лентивирусной системы. В качестве основной плазмиды использовали плазмиду lenti-Cas9-blast, содержащую ген Cas9, а также ген устойчивости к бластицидину (BSD). С использованием полученных псевдотипированных вирусных частиц проведена лентивирусная трансдукция клеток Kasumi-1, а также клеток НЕК293Т. На этапе селекции использовался антибиотик бластицидин. Селекция не позволила получить стабильно поддерживаемую устойчивую к антибиотику линию Kasumi-1, в то время как для линии НЕК293Т селекция прошла успешно. Полученная устойчивая сублиния в последующем будет дополнительно проверена на предмет экспрессии гена Cas9 при помощи ПЦР.

РЕФЕРАТ

Дыпломная работа ўключае: старонак – 38, малюнкаў – 6, табліц – 1, крыніц – 26.

Ключавыя словы: СІСТЭМА CRISPR/CAS9, KASUMI-1, HEK293T, ТРАНСФЕКЦЫЯ, ЛЕНТЫВІРУСНАЯ ТРАНСДУКЦЫЯ.

Аб'екты даследавання: клеткі вострага міялоіднага лейкозу чалавека Kasumi-1 і клеткі эмбрыянальнай ныркі чалавека HEK293T.

Мэта: ажыццяўленне лянтывіруснай трансдукцыі клетак лініі Kasumi-1 і лініі HEK293T.

Метады: катрансфекцыя вектарамі лянтывіруснай сістэмы, лянтывірусная трансдукцыя, падрыхтоўка асяроддзя RPMI (асяроддзе для клеткавай лініі Kasumi-1), падрыхтоўка асяроддзя DMEM (асяроддзе для клеткавай лініі HEK293T), селекцыя клетак Kasumi-1, селекцыя клетак HEK293T.

Сістэма CRISPR/Cas уваходзіць у топ інструментаў для мэтанакіраванай маніпуляцыі паводзінамі клеткаў з-за яе эфектыўнасці, прастаты ў выкарыстанні і здольнасці нацэльвацца як на ДНК, так і на РНК. Яна ўяўляе сабой сукупнасць двух кампанентаў: вавёрка Cas9 і sgRNA. Мэтай дадзенай працы з'яўляецца дасягненне стабільнай экспрэсіі гена Cas9 у клеткавых лініях Kasumi-1 і HEK293T.

У ходзе праведзенай работы была ажыццёўлена катрансфекцыя клетак лініі HEK293T вектарамі лянтывіруснай сістэмы. У якасці асноўнай плазміды выкарыстоўвалі плазміды lenti-Cas9-blast, якая змяшчае ген Cas9, а таксама ген устойлівасці да бластыцыдзіну (BSD). З выкарыстаннем атрыманых псеўдатыпаваных вірусных часціц праведзена лентывірусная трансдукцыя немадыфікаваных клетак Kasumi-1, а таксама клетак HEK293T. На этапе селекцыі выкарыстоўваўся антыбіётык бластыцыдзін. Селекцыя не дазволіла атрымаць стабільна падтрымліваемую ўстойлівую да антыбіётыку лінію Kasumi-1, у той час як для лініі HEK293T селекцыя прайшла паспяхова. Атрыманая ўстойлівая сублінія ў далейшым будзе дадаткова праверана на прадмет экспрэсіі гена Cas9 пры дапамозе ПЦР.

ABSTRACT

The thesis includes: pages - 38, figures - 6, tables - 1, sources - 26.

Keywords: CRISPR/CAS9, KASUMI-1, HEK293T, ТКФТbIAFECTION, LENTIVIRAL TRANSDUTION.

Purpose:: to get human cells with stable expression of the Cas9 transgene by lentiviral transduction.

Objects of study: human acute myeloid leukemia cell line Kasumi-1 and human embryonic kidney cell line HEK293T.

Methods: isolation of plasmid DNA from bacteria, transfection of human cells with plasmid DNA using polyethyleneimine as an auxiliary component, lentiviral transduction, methods of human cells culturing in vitro, cell selection based on antibiotic resistance.

6oThe CRISPR/Cas system is among the top tools for targeted manipulation of cell behavior due to its efficiency, ease of use, and ability to target both DNA and RNA. It is composed of two components: the Cas9 protein and sgRNA. The aim of this work was to achieve stable expression of the Cas9 gene in Kasumi-1 and HEK293T cell lines.

In the course of this work, HEK293T cells were cotransfected with vectors of the lentiviral system. The lenti-Cas9-blast plasmid containing the Cas9 gene and the blasticidin resistance gene (BSD) was used as the main plasmid. Using the obtained pseudotyped viral particles, lentiviral transduction of Kasumi-1 cells, as well as HEK293T cells, was carried out. At the selection stage, the antibiotic blasticidin was used. The selection failed to produce a stably maintained antibiotic-resistant Kasumi-1 line, while the selection was successful for the HEK293T line. The resulting stable subline will subsequently be further tested for the expression of the Cas9 gene using PCR.