

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

**Кафедра генетики**

**ЛОВЦОВА**  
Полина Евгеньевна

**СОЗДАНИЕ ВЕКТОРА, НЕСУЩЕГО ГЕН ГИД-РНК ДЛЯ НОКАУТА**  
**ГЕНА RUNX1-RUNX1T1 В КЛЕТКАХ ОМЛ С ТРАНСЛОКАЦИЕЙ**  
**T(8;21)**

Аннотация к дипломной работе

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

Минск, 2022

## РЕФЕРАТ

Дипломная работа 40 с., 14 рис., 9 табл., 20 источников.

Тема: Создание вектора, несущего ген гид-РНК для нокаута гена RUNX1-RUNX1T1 в клетках ОМЛ с транслокацией t(8;21).

Объект исследования: бактерии *Escherichia coli XL1 Blue*, плазмидный вектор pU6-sgRNA-EF1Alpha-puro-T2A-BFP

Цель: Создать вектор лентивирусной системы доставки, несущий гид-РНК нокаута гена RUNX1-RUNX1T1 в клетках ОМЛ с транслокацией t(8;21).

Методы исследования: трансформация бактерий плазмидной ДНК, ПЦР-скрининг, выделение плазмидной ДНК, рестрикция, лигирование, электрофорез в агарозном геле, выделение тотальной клеточной РНК, обратная транскрипция, количественная ПЦР.

Плазмидный вектор pU6-sgRNA-EF1Alpha-puro-T2A-BFP был выбран в качестве бэк-бона, т.к. уже содержит конститутивную часть гид-РНК. Для создания целевого вектора в него необходимо было лишь вставить вариабельную часть, которая специфична по отношению к гибриднему гену RUNX1-RUNX1T1. Бактерии *Escherichia coli XL1 Blue* выступили в качестве объекта для трансформации данным плазмидным вектором.

В ходе данной дипломной работы была измерена экспрессия гибридного гена RUNX1-RUNX1T1 в клетках линии Kasumi-1 и сделан вывод о ее наличии. Также бактерии *Escherichia coli XL1 Blue* были трансформированы плазмидой pU6-sgRNA-EF1Alpha-puro-T2A-BFP, проводился высеv их на селективную среду, а затем выделялась эта же плазмида в большей концентрации по сравнению с изначальной. С выделенным вектором проводилась рестрикция и лигирование со вставкой, несущей последовательность, необходимую для связывания с нокаутируемым гибридным геном.

В результате был получен целевой вектор. Верная сборка была подтверждена ПЦР-скринингом, рестрикционным анализом и секвенированием.

## РЭФЕРАТ

Дыпломная работа 40 с., 14 мал., 9 табл., 20 крыніц.

Тэма: Стварэнне вектара, які нясе ген гід-РНК для накаўту гена RUNX1-RUNX1T1 у клетках ВМЛ з трансляцый t (8;21).

Аб'ект даследавання: бактэрыі *Escherichia coli XL1 Blue*, плазмідны вектар pU6-sgRNA-EF1Alpha-puro-T2A-BFP.

Мэта: стварыць вектар ленцівіруснай сістэмы дастаўкі, які нясе гід-РНК накаўту гена RUNX1-RUNX1T1 у клетках ВМЛ з трансляцый t (8;21).

Метады даследавання: трансфармацыя бактэрыі плазміднай ДНК, ПЛР-скрынінг, вылучэнне плазміднай ДНК, рэстрыкцыя, лігіраванне, электрофарэз у агарозным гелі, вылучэнне татальнай клеткавай РНК, зваротная транскрыпцыя, колькасная ПЛР.

Плазмідны вектар pU6-sgRNA-EF1Alpha-puro-T2A-BFP быў выбраны ў якасці бэк-бона, так як ужо змяшчае канстытутыўную частку гід-РНК. Для стварэння мэтавага вектара ў яго неабходна было толькі ўстаўіць варыябельную частку, якая спецыфічная ў адносінах да гібрыднага гену RUNX1-RUNX1T1. Бактэрыі *Escherichia coli XL1 Blue* выступілі ў якасці аб'екта для трансфармацыі дадзеным плазмідным вектарам.

У ходзе дадзенай дыпломнай работы была вымераная экспрэсія гібрыднага гена RUNX1-RUNX1T1 у клетках лініі Kasumi-1 і зроблены вывад аб яе наяўнасці. Таксама бактэрыі *Escherichia coli XL1 Blue* былі трансфармаваныя плазмідай pU6-sgRNA-EF1Alpha-puro-T2A-BFP, высейваліся на селектыўнае асяроддзе, а затым вылучалася гэтая ж плазміда ў большай канцэнтрацыі ў параўнанні з першапачатковай. З вылучаным вектарам праводзілася рэстрыкцыя і лігіраванне з устаўкай, нясучай паслядоўнасць, неабходную для звязвання з нокаутіруемым гібрыдным геном.

У выніку быў атрыманы мэтавы вектар. Правільнасць канструкцыі была пацверджана з дапамогай ПЛР, рэстрыкцыйнага аналізу і секвеніравання.

## ABSTRACT

Diploma work 40 p., 14 fig., 9 tables, 20 sources.

Thesis: creation of a vector carrying the guide RNA gene for knockout of the RUNX1-RUNX1T1 gene in AML cells with translocation t(8;21).

Object of study: *Escherichia coli XL1 Blue* bacteria, plasmid vector pU6-sgRNA-EF1Alpha-puro-T2A-BFP

Objective: to create a vector of a lentiviral delivery system carrying the RUNX1-RUNX1T1 gene knockout guide RNA in AML cells with translocation t(8;21).

Research methods: transformation of bacteria with plasmid DNA, PCR screening, plasmid DNA extraction, restriction, ligation, agarose gel electrophoresis, total RNA extraction, reverse transcription, real-time PCR.

The plasmid vector pU6-sgRNA-EF1Alpha-puro-T2A-BFP was chosen as a backbone because it had already contained the constitutive part of the guide RNA. We needed to add a variable part to it which is specific to the RUNX1-RUNX1T1 hybrid gene. *Escherichia coli XL1 Blue* bacteria was transformed by this plasmid vector.

During this diploma work the expression of the RUNX1-RUNX1T1 hybrid gene in Kasumi-1 cells was measured and confirmed. Furthermore *Escherichia coli XL1 Blue* bacteria were transformed by the pU6-sgRNA-EF1Alpha-puro-T2A-BFP vector, then were raised on a selective medium. Thus, the same plasmid was isolated in a higher concentration compared to the original one. Next step was restriction and ligation with an insert carrying the sequence necessary for binding to the knockout hybrid gene.

As a result, the target vector was obtained. The correct construction was confirmed by PCR screening, restriction analysis and sequencing.