

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

СВЕТНИК
Анна Сергеевна

**СОЗДАНИЕ ВЕКТОРА С ГЕНОМ ГИД-РНК ДЛЯ НОКАУТА ГЕНА
TGFB1 В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА**

Аннотация
к дипломной работе

Научный руководитель:
доцент каф. генетики
Романовская Т.В

Минск, 2022

РЕФЕРАТ

Дипломная работа 53 с., 9 рис., 19 табл., 51 источник.

Тема: Создание вектора с геном гидРНК для нокаута гена TGFB1 в клетках человека.

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

Цель: Сконструировать вектор с геном гид-РНК для нокаута гена TGFB1 в клетках человека.

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

Для создания целевого вектора в качестве бэк-бона была выбрана плаزمида pU6-sgRNA-EF1Alpha-puro-T2A-BFP. В ней уже имеется конститутивная часть гидРНК, к которой в дальнейшем была присоединена вариабельная часть, специфичная по отношению к гену TGFB1. Бактерии *Escherichia coli* штамма XL1 Blue выступили объектом для трансформации данным плазмидным вектором.

В ходе подготовки дипломной работы было исследовано и подтверждено наличие экспрессии гена TGFB1 в клеточной линии Kasumi-1. Также была проведена трансформация бактерий *Escherichia coli* XL1 Blue плазмидой pU6-sgRNA-EF1Alpha-puro-T2A-BFP, затем выделенная плазмидная ДНК подвергалась рестрикции и лигированию со вставкой, включающей последовательность необходимой гид-РНК.

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

Кроме того, было проведено исследование влияния кондиционной среды на выживаемость клеток ОМЛ после теплового шока. По результатам эксперимента был сделан вывод, что, вероятно, наличие кондиционной среды не оказывает значительного влияния на выживаемость клеток после теплового шока.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа 53 с., 9 мал., 19 табл., 51 крыніца.

Тэма: Стварэнне вектара з геном гідРНК для накаўту гена TGFB1 у клетках чалавека.

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

Мэта: Сканструяваць вектар з геном гід-РНК для накаўту гена TGFB1 ў клетках чалавека.

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

Для стварэння мэтавага вектара ў якасці бэк-бона была абраная плазмідна рU6-sgRNA-EF1Alpha-puro-T2A-BFP. У ёй ужо маецца канстытутыўная частка гідРНК, да якой у далейшым была далучана варыябельнасць частка, спецыфічная ў адносінах да гена TGFB1. Бактэрыі *Escherichia coli* штаму XL1 Blue выступілі аб'ектам для трансфармацыі дадзеным плазмідным вектарам.

У ходзе падрыхтоўкі дыпломнай працы было даследавана і пацверджана наяўнасць экспрэсіі гена TGFB1 у клеткавай лініі Kasumi-1. Таксама была праведзена трансфармацыя бактэрыі *Escherichia coli* XL1 Blue плазмідай рU6-sgRNA-EF1Alpha-puro-T2A-BFP, затым выдзеленая плазмідная ДНК падвяргалася стрыкцыі і лігавання са ўстаўкай, у якую ўваходзяць паслядоўнасць неабходнай гід-РНК.

У выніку быў атрыманы мэтавы вектар. Правільнасць зборкі была пацверджана ПЦР-скрынінгам, рэстрыкцыйным аналізам і секвеніраванне.

Акрамя таго, было праведзена даследаванне ўплыву кандыцыйнага асяроддзя на выжывальнасць клетак ОМЛ пасля цеплага шоку. Па выніках эксперыменту была зроблена выснова, што, верагодна, наяўнасць кандыцыйнага асяроддзя не аказвае значнага ўплыву на выжывальнасць клетак пасля цеплага шоку.

ABSTRACT

Diploma work 53 pages, 9 figures, 19 tables, 51 sources.

Topic: Creation of a vector with the guide RNA gene for knockout of the TGFB1 gene in human cells.

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

Objective: To construct a vector with a guide-RNA gene for knockout of the TGFB1 gene in human cells.

Research methods: bacterial transformation, PCR screening, plasmid DNA isolation, restriction, ligation, agarose gel electrophoresis, total cellular RNA isolation, reverse transcription, quantitative PCR, total cellular RNA isolation.

To create the target vector, the pU6-sgRNA-EF1Alpha-puro-T2A-BFP plasmid was chosen as a backbone. It already has a constitutive part of gRNA, to which a variable part specific to the TGFB1 gene was later attached. Bacteria *Escherichia coli* strain XL1 Blue acted as an object for transformation with this plasmid vector.

During the preparation of the thesis, the presence of TGFB1 gene expression in the Kasumi-1 cell line was investigated and confirmed. The bacterium *Escherichia coli* XL1 Blue was also transformed with the plasmid pU6-sgRNA-EF1Alpha-puro-T2A-BFP, then the isolated plasmid DNA was subjected to restriction and ligation with an insert containing the sequence of the required guide RNA.

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

In addition, a study was made of the influence of the conditioned environment on the survival of AML cells after heat shock. Based on the results of the experiment, it was concluded that, probably, the presence of a conditioned environment does not significantly affect the survival of cells after heat shock.