

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра генетики

БАТУХТИНА
Валерия Александровна

**НОКАУТ ГЕНА ADAR1 В КЛЕТКАХ ЛИНИИ KASUMI-1 С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9**

Аннотация
к дипломной работе

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

Минск, 2024

РЕФЕРАТ

Дипломная работа 63 с., 21 рис., 13 табл., 31 источник.

Ключевые слова: ГЕН ADAR1, KASUMI-1, CRISPR/CAS9, НОКАУТ ГЕНА.

Объекты, использованные в исследовании: клетки Kasumi-1 и HEK293T, бактерии *Escherichia coli* XL1 Gold, плазмидный вектор pU6-sgRNA-EF1Alpha-puro-T2A-BFP.

Цель работы: произвести нокаут гена ADAR1 в клетках линии Kasumi-1

Методы использованные в исследовании: выделение РНК, синтез кДНК по матрице РНК, ПЦР, ПЦР в реальном времени, трансформация бактерий, рестрикция, очистка, лигирование, выделение плазмидной ДНК, электрофорез нуклеиновых кислот, секвенирование, спектрофотометрия; заморозка и разморозка клеточных линий, трансфекция, трансдукция.

В рамках поставленных задач было произведено лигирование вставки, кодирующей вариабельную часть гидРНК к гену ADAR1 в вектор pU6-sgRNA-EF1Alpha-puro-T2A-BFP. Вектор был клонирован в бактериях *Escherichia coli* штамма XL1 Gold. После клонирования, вектор был выделен из бактерий и очищен, для получения лентивирусных частиц. Лентивирусные частицы получали при помощи котрансфекции в клеточной линии HEK293T. Собранные вирусы концентрировали и использовали для трансдукции клеточной линии Kasumi-1, являющейся модельной линией острого миелоидного лейкоза. Результатом переноса данной конструкции, является нокаут гена ADAR1.

В перспективе полученная модельная система позволит изучить функциональную роль гена ADAR1 в определении особенностей фенотипа лейкозных клеток, что может представлять интерес в контексте поиска новых подходов к терапии онкологических заболеваний.

РЭФЕРАТ

Дыпломная праца 63 с., 21 мал., 13 табл., 31 крыніца.

Тэма дыплама: Накаўт гена ADAR1 ў клетках лініі Kasumi-1 с выкарыстаннем сістэмы CRISPR/Cas9

Ключавыя словы: ГЕН ADAR1, KASUMI-1, CRISPR/CAS9, НОКАЎТ ГЕНА.

Аб'екты, выкарыстаныя ў даследаванні: клеткі Kasumi-1 і HEK293T, бактэрыі *Escherichia coli* XL1 Gold, плазмідны вектар pU6-sgRNA-EF1Alpha-puro-T2A-BFP.

Мэта дыплама: вырабіць накаўт гена ADAR1 ў клетках лініі Kasumi-1

Метады выкарыстаныя ў даследаванні: вылучэнне РНК, Сінтэз кДНК па матрыцы РНК, ПЦР, ПЦР ў рэальным часе, трансфармацыя бактэрыі, рэстрыкцыя, Ачыстка, лігаванне, вылучэнне плазмідной ДНК, электрофарэз нуклеінавых кіслот, секвенираванне, спектрафотометры; замарозка і размарозка клеткавых ліній, трансфекцыя, трансдукцыя.

У рамках пастаўленых задач было праведзена лігіраванне ўстаўкі, кадавальныя варыябельнасць гідРНК да гена ADAR1 ў вектар pU6-sgRNA-EF1Alpha-puro-T2A-BFP. Вектар быў кланаваны ў бактэрыях *Escherichia coli* штаму XL1 Gold. Пасля кланавання, вектар быў выдзелены з бактэрыі і ачышчаны, для атрымання лянтывірусных часціц. Лентывірусныя часціцы атрымлівалі пры дапамозе котрансфекцыі ў клеткавай лініі HEK293T. Сабраныя вірусы канцэнтравалі і выкарыстоўвалі для трансдукцыі клеткавай лініі Kasumi-1, якая з'яўляецца мадэльнай лініяй вострага миелоидного лейкозу. Вынікам пераносу дадзенай канструкцыі, з'яўляецца накаўт гена ADAR1.

У перспектыве атрыманая мадэльная сістэма дазволіць вывучыць функцыянальную ролю гена ADAR1 у вызначэнні асаблівасцяў фенатыпу лейкозных клетак, што можа прадстаўляць цікавасць у кантэсце пошуку новых падыходаў да тэрапіі анкалагічных захворванняў.

ABSTRACT

Thesis 63 p., 21 figures, 13 tables, 31 sources.

Thesis topic: Knockout of the ADAR1 gene in Kasumi-1 cells using the CRISPR/Cas9 system

Keywords: ADAR1, KASUMI-1, CRISPR/CAS9, GENE KNOCKOUT.

Objects used in the study: Kasumi-1 and HEK293T cells, *Escherichia coli* XL1 Gold bacteria, pU6-sgRNA-EF1Alpha-puro-T2A-BFP plasmid vector.

The purpose of the diploma: to knock out the ADAR1 gene in Kasumi-1 cells

Methods used in the study: RNA isolation, cDNA synthesis by RNA matrix, PCR, real-time PCR, bacterial transformation, restriction, purification, ligation, plasmid DNA isolation, nucleic acid electrophoresis, sequencing, spectrophotometry; freezing and defrosting of cell lines, transfection, transduction.

As part of the assigned tasks, the insert encoding the variable part of the guideRNA to the ADAR1 gene was ligated into the pU6-sgRNA-EF1Alpha-puro-T2A-BFP vector. The vector was cloned into *Escherichia coli* strain XL1 Gold. After cloning, the vector was isolated from bacteria and purified to produce lentiviral particles. Lentiviral particles were produced by cotransfection in the HEK293T cell line. The collected viruses were concentrated and used to transduce the Kasumi-1 cell line, which is a model line of acute myeloid leukemia. The result of transfer of this construct is knockout of the ADAR1 gene.

In the future, the resulting model system will enable to study the functional role of the ADAR1 gene in determining the characteristics of the phenotype of leukemia cells, which may be of interest in the search for new approaches to the treatment of oncological diseases.