

АНОТАЦІЯ

Уперше було проведено аналіз нокауту гена синтезу пуринів з використанням HPLC-MS, що дає змогу оцінити функціональну активність білка синтезованого із даного гена. Природа гена GART дещо незвична. Хребетні продукують два білка із гена GART, один - повний трифункціональний білок і один, що містить тільки N-кінцевий домен GARS. На даний момент є незрозумілим, чому після еволюційного відбору трифункціонального білка, який також каталізує реакцію GARS, зберігається механізм експресії окремої монофункціональної активності GARS. Для виконання експерименту було підібрано послідовність олігонуклеотидів для лідируючої РНК, яка була вставлена у вектор. Вектор клонували у культурі клітин *E.coli*, клонованим вектором трансфіковано культуру клітин HeLa. Відібрані клони культивувалися до 70-90% конфлюентності. Перевірка отриманих клонів на наявність індел-мутацій проводилася двома шляхами: аналіз функціональної активності білку GART, і постановка полімеразної ланцюгової реакції. Для проведення аналізу функціональної активності білку GART, клітини культивували в депуринізованому середовищі із міченим двома атомами ^{13}C гліцином. З клітин було виділено азотисті основи. За допомогою обернено-фазової хроматографії пурини розділялися та іонізувалися в мас-спектрометрі для детекції. За співвідношенням мічених ^{13}C пуринів до немічених оцінювалася ефективність нокаутування гену. Відібрали 5 клонів культури клітин та провели ПЛР клонів. Кожен клон містив звичайного розміру частину із 125 нуклеотидів, три культури клітин, також містили послідовність довжиною в 75 нуклеотидів. ПЛР підтвердила часткове нокаутування гену GART шляхом делеції. Повторне проведення експериментів показало наявність частинок розміром в 125 у нових клонів культур клітин.

Кваліфікаційна робота викладена на 43 сторінках, ілюстрована 1 таблицею та 10 рисунками. Список використаних джерел включає 43 роботи.

Ключові слова: GART, мас-спектроскопія, хроматографія, CRISPR Cas9, нокаут гена.