

VILNIAUS UNIVERSITETAS
Chemijos ir geomokslų fakultetas



Biochemijos studijų programos magistrantė
Greta STONYTĖ

Magistrinis darbas

**Pavienių ląstelių *IgG* genų padauginimas pasitelkiant mikroskysčių
technologijas**

Darbo vadovas
Dr. Linas Mažutis

Vilnius 2017

VILNIAUS UNIVERSITETAS
Chemijos ir geomokslų fakultetas

Greta STONYTĖ

**Pavienių ląstelių *IgG* genų padauginimas pasitelkiant
mikroskysčių technologijas**

Santrauka

Esminių imuninės sistemos dalyvių – antikūnų (imunoglobulinų) – nustatymas yra svarbus žingsnis siekiant suprasti įgyto imuniteto atsaką sveikuose ir sergančiuose pacientuose. Antikūnų abiejų grandinių sekoskaita pavienių ląstelių lygmenyje, kur ląstelių populiacija siekia dešimt tūkstančių ir daugiau, yra sudėtinga, kadangi juos sudarančios sunkiosios ir lengvosios grandinės koduojamos atskirų iRNR molekulių. Atsižvelgiant į šiuos išskylančius analizės sunkumus, šiame darbe yra pristatoma technologija, leidžianti greitai, patikimai ir nedidelėmis išlaidomis nustatyti antikūnų sunkiosios ir lengvosios grandinių poras iš gausios B limfocitų populiacijos. Lašeliais paremtos mikroskysčių technologijos yra naudojamos patalpinti pavienes ląsteles mikroląseliuose kartu su poliakrilamidiniais rutuliukais, paviršiuje turinčiais poli-T pradmenis, bei lizės-atvirkštinės transkripcijos reagentais. Vykstant atvirkštinei transkripcijai, kDNR molekulės per poli-T pradmenis prijungiamos ir koncentruojamos ant rutuliukų, kurie vėliau pakartotinai inkapsuliuojami persidengiančio PGR atlikimui. Šio PGR metu gaunami sunkiosios ir lengvosios grandinių sujungti produktai – VH:VL poros, kurios vienu metu gali būti analizuojamos naujos kartos sekoskaitos sistemomis.

Greta STONYTĖ

Single-cell *IgG* gene amplification using droplet-based microfluidics

Summary

Characterization of essential players in the immune system – antibodies (immunoglobulins) – is of key importance in the understanding of adaptive immune responses in healthy and diseased patients. However, sequencing analysis of both antibody chains at the single-cell level for typical samples containing more than ten thousands lymphocytes is problematic, because antibodies are comprised of two polypeptide chains that are encoded by separate mRNAs. To overcome those difficulties, here we present a technology that allows fast, reliable and low-cost determination of a paired antibody repertoire from millions of B cells. Droplet-based microfluidic is used to encapsulate single cells in emulsions containing hydrogel beads with poly-T primers and lysis-reverse transcription reagents for mRNA capture and cDNA synthesis. After reverse transcription cDNA molecules are covalently linked via poly-T primers with hydrogel beads that are re-encapsulated to perform overlap-extension PCR. VH:VL pairs obtained during overlap extension PCR are pooled together and analyzed using next generation sequencing techniques.