

Белаш А.П.*, Казловский И.С., Зинченко А.И.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

**Международный государственный экологический институт им. А.Д.Сахарова
Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь*

Бесклеточный синтез ДНК, обогащенной CpG-мотивами

CpG-динуклеотид вместе с одним или двумя нуклеотидами на его 3'- и 5'-концах образует т.н. CpG-мотив. В ДНК прокариот преобладают неметилированные CpG-мотивы. В геноме позвоночных CpG-динуклеотиды встречаются в 3–4 раза реже, чем у бактерий; более того, около 70–80 % CpG-мотивов ДНК позвоночных метилировано по пятому атому углерода остатка цитозина. CpG-мотивы распознаются иммунной системой позвоночных как «сигнал тревоги», активируя врожденный и приобретенный иммунитет и во много раз усиливая ответ организма даже на слабоиммуногенные антигены [1].

Показано, что для человека наиболее эффективной нуклеотидной последовательностью является GTCGTT, а для мышей и кроликов – GACGTT. Распознавание CpG-мотивов иммунной системой позвоночных происходит путем их взаимодействия с толл-подобным рецептором 9, ген которого у человека экспрессируют В-лимфоциты и дендритные клетки [2]. CpG-ДНК стимулирует иммунокомпетентные клетки, способствуя их пролиферации, дифференцировке, хемотаксису, секреции цитокинов, высвобождению лизосомальных компонентов и образованию молекул реактивного кислорода или нитроксидсинтазы.

Благодаря способности стимулировать иммунную систему позвоночных, а также усиливать иммунный ответ на антигены, ДНК, содержащая CpG-мотивы, может быть использована для лечения и профилактики таких

заболеваний как астма, аллергия, некоторые виды опухолей, бактериальные и вирусные инфекции и др., а также в качестве адъюванта для ряда вакцин [3, 4].

Основным биотехнологическим методом получения CpG-мотивов является получение плазмидной ДНК (пДНК), обогащенной CpG-мотивами. Этот метод включает такие этапы, как конструирование вектора при помощи генной инженерии, встраивание полученной плазмиды в бактериальные клетки, для дальнейшей репликации необходимой последовательности. Конечный этап – наработка пДНК в препаративных количествах и ее очистка (рис. 1).



Рис. 1 – Схема основных этапов препаративного получения плазмид

Однако описанный биотехнологический способ получения CpG-ДНК имеет существенные недостатки. Главным из них является проблема выделения и очистки пДНК. Для терапевтического применения пДНК не должна содержать примесей компонентов бактериальной клетки (в том числе эндотоксина), которые потенциально могут быть токсичны для организма или вызывать иммунный ответ.

Мы предполагаем, что синтез линейной формы CpG-ДНК при помощи ПЦР позволит избавиться от описанных недостатков метода получения пДНК.

В основе метода ПЦР лежит многократное удвоение определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). В результате нарабатываются количества ДНК, достаточные для визуальной детекции. При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце.

Для получения многократных повторов CpG-мотивов нами были выбраны праймеры из двух пар: CpG-F/CpG-R и M13F/M13R. Первая пара в литературе использовалась для первичного клонирования CpG-мотивов; вторая пара применялась для секвенирования генов, вставленных в многокопийный вектор pXcmkn12 [5]. Сравнение эффективности двух пар праймеров приведено на рис. 2.

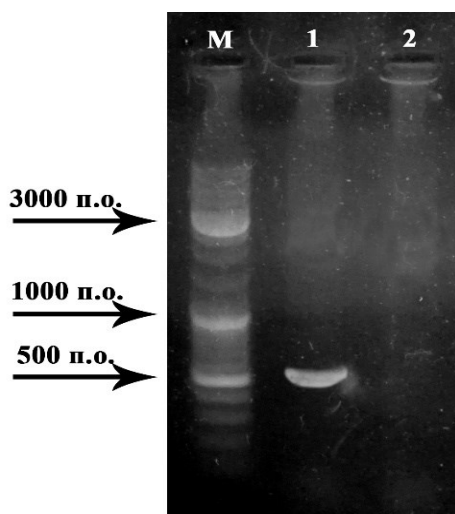


Рис. 2 – Электрофореграмма продуктов амплификации CpG-мотивов праймерами M13F/M13R (1) и CpG-F/CpG-R (2)

Из рисунка видно, пара что пара CpG-F/CpG-R не дала результатов.

На следующем этапе мы провели препаративный синтез CpG-ДНК в реакционной смеси объемом 0,5 мл, используя выбранную выше пару праймеров M13F и M13R.

После завершения синтеза ДНК-продукт выделили с использованием кремневого фильтра GF/F (Whatman, Великобритания). Потери после выделения составили около 5%. Таким образом было получено 0,02 мл раствора целевой ДНК с концентрацией 228,5 нг/мкл, что соответствует в сумме 4 мг ДНК. Наличие необходимых участков ДНК было подтверждено методом электрофореза в агарозном геле.

Заключение. Изучена возможность использования метода бесклеточного синтеза ДНК (ПЦР) для получения иммуностимулирующих CpG-мотивов. При этом показано, что метод ПЦР может быть применен для препаративного бесклеточного синтеза иммуностимулирующей CpG-ДНК.

Полученные результаты могут лечь в основу будущей разработки технологии получения иммуностимулирующего лекарственного препарата, состоящего из иммуностимулирующих CpG-мотивов.

Литература:

1. Krieg, A.M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects / A.M. Krieg // *Annu. Rev. Immunol.* – 2002. – Vol. 20. – P. 709–760.
2. Krieg, A.M. CpG still rocks! Update on an accidental drug / A.M. Krieg // *Nucleic Acid Ther.* – 2012. – Vol. 22, № 2. – P. 77–89.
3. Зинченко, А.И. CpG-олигодезоксинуклеотиды и их практическое применение / А.И. Зинченко, А.С. Щеколова // *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. біял. навук.* – 2017. – № 4. – С. 96–109.
4. Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvanticity / S. Shi [et al.] // *Vaccine.* – 2019. – Vol. 37, № 24. – P. 3167–3178.
5. Zinchenko, A.I. Construction of plasmid enriched with immunostimulatory CpG motifs / A.I. Zinchenko, S.V. Kvach, A.S. Shchokolova // *East. Eur. Sci. J.* – 2014. – № 3. – P. 10–13.