

Anatoly I. Zinchenko,  
Sc.D., professor;

Sergey V. Kvach,  
PhD;

Anastasia S. Shchokolova,  
The Institute of Microbiology of the  
National Academy of Sciences of Belarus

## Construction of Plasmid Enriched with Immunostimulatory CpG Motifs

**Key words:** CpG motifs, Toll-like receptor 9, adjuvant.

**Annotation:** The plasmid pCpG-KH11 carrying 104 copies of GTCGTT CpG motif has been constructed. The cloned motif is considered to be the most effective in stimulation of the human immune system. It is suggested that constructed plasmid may be used to improve protein and DNA vaccines and to treat cancer, infectious and allergic diseases.

**Введение.** CpG-мотив представляет собой CpG-динуклеотид вместе с одним или двумя нуклеотидами на его 3'- и 5'-концах. Неметилированные CpG-мотивы преобладают в ДНК бактерий (1). Эти участки ДНК распознаются иммунной системой позвоночных как «сигнал тревоги», активируя как врожденную, так и адаптивную ветви иммунитета и во много раз усиливая ответ организма на антигены, т.е. проявляют адьювантную активность (2).

Наиболее распространенным способом получения адьювантов, содержащих CpG-мотивы, является многостадийный химический синтез, позволяющий заменять природную фосфодиэфирную связь между нуклеозидами на нуклеазоустойчивую – фосфоротиоатную. По нашему мнению, более перспективным способом получения CpG-ДНК является метод, предложенный группой канадских и немецких ученых, заключающийся в конструировании рекомбинантного штамма-производителя плазмидной ДНК, обогащенной CpG-мотивами (3). Данный способ биотехнологического получения CpG-плазмид имеет некоторые преимущества перед химическим синтезом: процесс получения более прост и не требует использования токсичных растворителей и реагентов.

Учитывая литературные данные о том, что с увеличением числа встроенных CpG-мотивов повышается и биологическая активность CpG-плазмиды (4), целью данной работы явилось конструирование плазмидной ДНК, с максимально возможным количеством CpG-мотивов.

**Материалы и методы исследования.** Для получения двухцепочечной ДНК, содержащей CpG-мотивы, использовали химически синтезированную прямую (CpG-F) и обратную (CpG-R) цепи олигодезоксинуклеотидов (ОДН) (жирным выделен участок, содержащий 4 повтора CpG-мотива, италика – сайт узнавания рестриктазы *HindIII*).

CpG-F: 5'- AGCTTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTA-3'

CpG-R: 5'-AGCTTAACGACAAAACGACAAAACGACAAAACGACGA-3'

Для отжига ОДН реакцию смесь, содержащую CpG-R (500 пмоль), CpG-F (500 пмоль), 20 мМ Трис-НСl-буфер (рН 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub> и 50 мМ NaCl, прогревали при 95°C 5 мин, а затем медленно охлаждали до 4°C.

Фосфорилирование 5'-концов полученного дуплекса осуществляли с помощью Т4-полинуклеотидкиназы (Sileks, Россия).

Самолигирование фосфорилированного дуплекса проводили по «липким концам», соответствующим сайтам узнавания рестриктазы *Hind*III, с помощью Т4-лигазы (Fermentas, Литва). Продукт лигирования (двухцепочечный полидезоксинуклеотид; dsCpG-полинуклеотид) разделяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле. Вырезали участок геля, содержащий продукт наибольшего размера (900–1300 п.н.) и очищали с использованием набора реагентов «MinElute Gel Extraction Kit» (Qiagen, Германия) согласно методике фирмы-изготовителя. Далее, 100 мкл реакционной смеси, содержащей 2 мкг очищенных dsCpG-полинуклеотидов, ПЦР-буфер (67 мМ Трис-НСl (рН 8,3), 17 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,02% Твин-20), каждый из четырех природных дезоксинуклеозидтрифосфатов в концентрации 0,2 мМ и 1 ед активности *Taq*-ДНК-полимеразы, инкубировали 20 мин при 72°C.

Полученные dsCpG-полинуклеотиды с дополнительными остатками дАМФ на 3'-концах лигировали с Т-вектором, приготовленным на основе плазмиды рХcmkn12 (Cloning Vector Collection, Япония) путем ее обработки рестриктазой *Xcm*I (New England Biolabs, США) в течение 12 ч при 37°C. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *Escherichia coli* DH5α.

Полученные колонии бактериальных клеток подвергали ПЦР-анализу для подтверждения наличия в них CpG-плазмид. Для этого использовали праймеры, комплементарные нуклеотидным вектора рХcmkn12, находящимся по обеим сторонам клонированной последовательности.

Для дальнейшей работы выбрали колонию, содержащую плазмиду (обозначенную рCpG-КН11) с наибольшим размером встроенного фрагмента. Клетки выращивали на питательной среде LB (1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl) с добавлением ампициллина до 100 мкг/мл. Из полученной биомассы клеток выделяли плазмидную ДНК стандартным методом щелочного лизиса (5).

Молекулярно-генетическую характеристику плазмиды рCpG-КН11 проводили с помощью рестрикционного анализа. Для этого целевую плазмиду обрабатывали смесью эндонуклеаз рестрикции *Nde*I и *Eco*RI с последующим инкубированием продуктов реакции с рестриктазой *Hind*III.

**Результаты и их обсуждение.** В результате выполнения данной работы сконструирован плазмидный вектор рCpG-КН11, обогащенный мотивом GTCGTT, который, по литературным данным, наиболее эффективно стимулирует иммунную систему человека (2). Схематическое изображение плазмиды рCpG-КН11 представлено на рисунке 1.

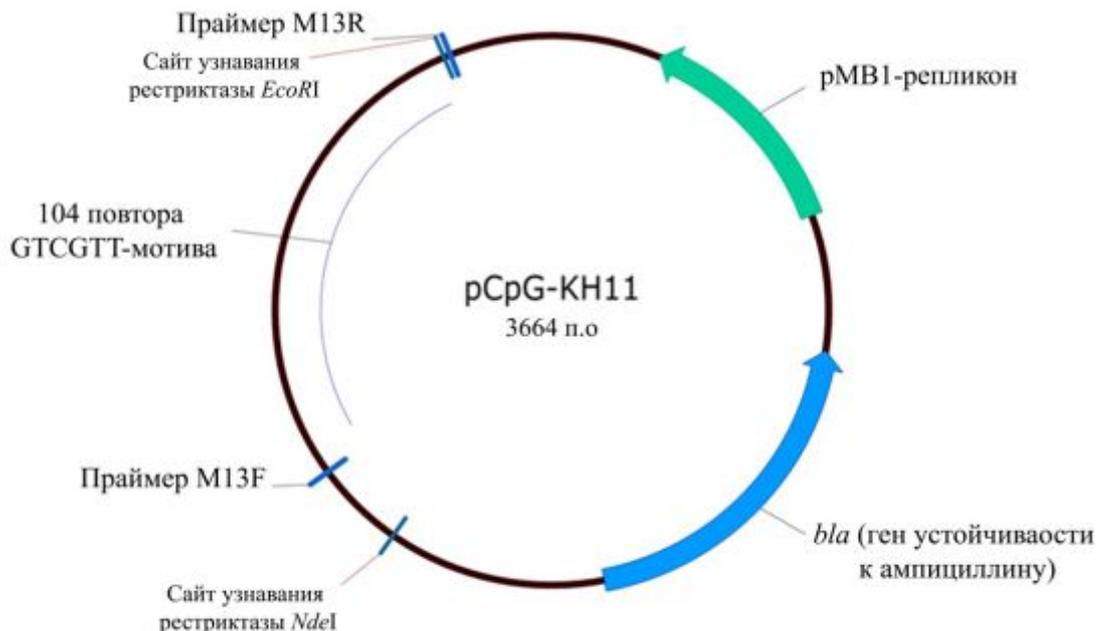
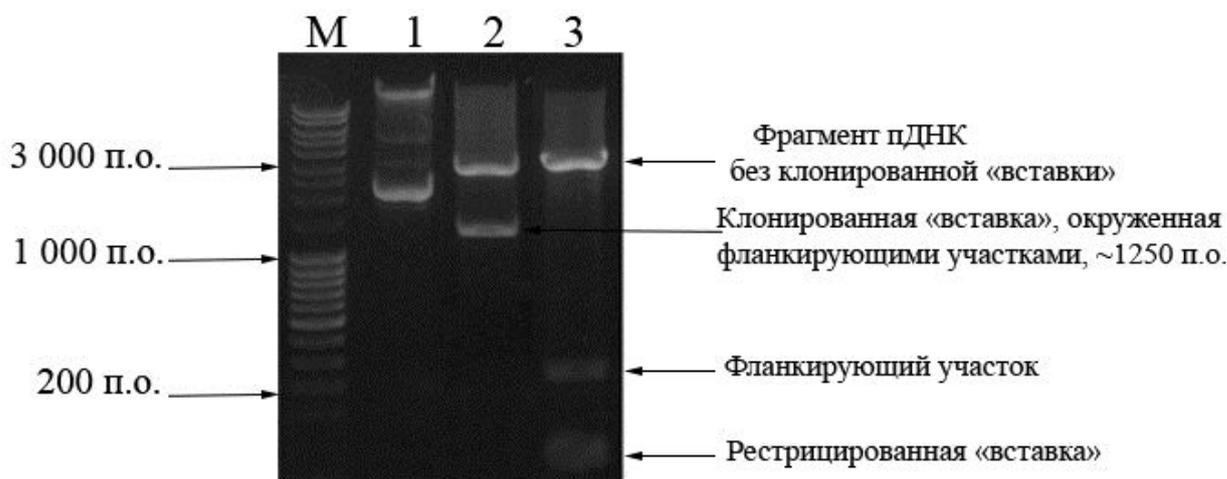


Рисунок 1 – Схематическое изображение плазмиды pCrG-KH11

Наличие в плазмиде встроенных тандемных повторов CrG-мотивов подтверждено методом рестрикционного анализа. С этой целью плазмидную ДНК инкубировали со смесью рестриктаз *NdeI* и *EcoRI*. Полученные в результате рестрикции фрагменты затем обработали рестриктазой *HindIII*, сайты рестрикции которой находятся внутри клонированного участка. Анализ продуктов рестрикции проводили путем электрофореза в 1% геле (рисунок 2).

Рисунок 2 – Электрофореграмма рестрикетов плазмиды pCrG-KH11

М – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК; 1 – очищенная плаزمида pCrG-



KH11; 2 – фрагменты ДНК, полученные после обработки pCrG-KH11 смесью рестриктаз *NdeI* и *EcoRI*; 3 – фрагменты ДНК, полученные после обработки pCrG-KH11 смесью рестриктаз *NdeI*, *EcoRI* и *HindIII*

Число клонированных в плазмиде pCrG-KH11 CrG-мотивов определяли по формуле:

$$X = \frac{D - 286}{37} \cdot 4, \text{ где:}$$

$D$  – размер фрагмента, полученного в результате обработки рCpG-КН11 смесью рестриктаз *NdeI* и *EcoRI* и состоящего из клонированной вставки, окруженной фланкирующими участками (1250 п.н.);

286 – суммарный размер фланкирующих участков (п.н.);

37 – размер 1 тандемного повтора CpG-мотивов (п.н.);

4 – количество CpG-мотивов в 1 тандемном повторе.

Таким образом, содержание CpG-мотивов в плазмиде рCpG-КН11 составило 104 повтора, что превосходит аналогичный показатель известных в настоящее время плазмид-аналогов (6).

**Заключение.** В результате выполнения настоящей работы сконструирован вектор рCpG-КН11, содержащий 104 повтора иммуностимулирующего CpG-мотива GTCGTT, проявляющего высокую активность в отношении иммунной системы человека. Полученная плазида может быть использована в качестве адьюванта для вакцин против инфекционных, аллергических и онкологических заболеваний.

#### **References:**

1. Fletcher BS. Development and validation of an approach to produce large-scale quantities of CpG-methylated plasmid DNA: *Microbial Biol.*; 2008; Vol. 1; 62–67.
2. Krieg AM. CpG still rocks! Update on an accidental drug: *Nucleic Acid Ther.*; 2012; Vol. 22, N 2; 77–89.
3. Pontarollo RA, Babiuk LA, Hecke R, van Drunen Littel-van den Hurk S. Augmentation of cellular immune responses to bovine herpesvirus-1 glycoprotein D by vaccination with CpG-enhanced plasmid vectors: *J. Gen. Virol.*; 2002; Vol. 83; 2973–2981.
4. Martinez-Alonso S, Martinez-Lopez A, Estepa A, Cuesta A, Tafalla C. The introduction of multi-copy CpG motifs into an antiviral DNA vaccine strongly up-regulates its immunogenicity in fish: *Vaccine*; 2011; Vol. 29; 1289–1296.
5. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*; 2-nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989; 2222.
6. Chen Y, Xiang LX, Shao, J.Z. Construction of a recombinant plasmid containing multi-copy CpG motifs and its effects on the innate immune responses of aquatic animals: *Fish Shellfish Immunol*; 2007; Vol. 23, N 3; 589–600.