

Студ. М.И. Рудович,
аспирант А.Б. Саченко
(Институт биоорганической химии НАН Беларуси)
Науч. рук. зав. кафедрой В.Н. Леонтьев
(кафедра биотехнологии БГТУ),
директор А.В. Янцевич
(Институт биоорганической химии НАН Беларуси)

МЕЖФАЗНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ТОПОЛОГИЧЕСКИХ ФОРМ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК В СИСТЕМЕ ВОДА-ФЕНОЛ-ХЛОРОФОРМ

Одним из применений плазмидной ДНК (пДНК) в генной терапии является ДНК-вакцина. ДНК-вакцина, обычно называемая вакциной третьего поколения, представляет собой специфическую последовательность нуклеотидов, которая может вызывать иммунный ответ на патогены и раковые клетки (опухолевые антигены).

пДНК обнаруживается в пяти конформациях, которые эффективно разделяются электрофорезом в агарозном геле: разомкнуто-кольцевая, релаксированная кольцевая, линейная, суперспирализованная и суперспирализованная денатурированная. Принято считать, что суперспирализованная изоформа обладает терапевтическим эффектом, но этот факт не подтвержден в ряде работ. Однако один из аргументов очевиден из нашего опыта: суперскрученная пДНК более устойчива к физическим, биологическим и химическим факторам.

Несмотря на токсичность и неудобство, фенольная экстракция до сих пор широко используется для получения некоторых биомолекул, таких как ДНК, РНК. Экстракция фенолом является очень эффективным подходом при выделении РНК [2, 3].

В настоящей работе мы тщательно исследовали рН-зависимое распределение различных форм пДНК при фенольной (фенол-хлороформенной) экстракции и выявили условия, позволяющие просто изолировать фармакологически активную суперскрученную пДНК от других форм, рассматриваемых нами как ферментативно или физически поврежденные.

В нашем исследовании мы использовали рсDNA3.1 в качестве модельной плазмиды. Плазмиду трансформировали в компетентные NEB-DH5a клетки *E. coli*. Выделение неочищенной плазмиды осуществляли путем щелочного лизиса с последующим осаждением *iPrOH* и растворением в воде до конечной концентрации 300 мкг/мл. Фенол и фенол-хлороформ (1:1) уравнивали 0,2 М натрий-ацетатным буфером заданного рН. 300 мкл раствора плазмиды встряхивали с 300 мкл соответствующей органической фазы в течение 30 мин. Фазы разделяли центрифугированием, 100 мкл верхней фазы осаждали *iPrOH*, промывали 70% *EtOH* и растворяли в деионизированной воде. 3 мкл полученного раствора наносили на агарозный гель

На основании нашего исследования в текущей работе мы продемонстрировали, что можно отделить суперспирализованную пДНК от других форм. Более того, эта стратегия имеет полезный дополнительный эффект: устранение геномной ДНК хозяина. Полученные данные позволяют предложить эффективный, недорогой и простой маломасштабный (до 10 г) метод выделения пДНК фармацевтического качества для исследовательских целей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Impact of plasmid supercoiling on the efficacy of a rabies DNA vaccine to protect cats / L. Cupillard, V. Juillard, S. Latour, G. Colombet, N. Cachet, S. Richard, S. Blanchard, L. Fischer // *Vaccine* – 2005. – V. 23. – P. 1910-6.
2. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // *Analytical biochemistry* – 1987. – V. 162. – P. 156-9.
3. Modified acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform RNA extraction method which greatly reduces DNA contamination / P.D. Siebert, A. Chenchik // *Nucleic acids research* – 1993. – V. 21. – P. 2019-20.