



Пархомчук О.Ю.¹✉, Фомина Е.Г.¹, Григорьева Е.Е.¹, Счесленок Е.П.¹, Антоненко В.В.¹, Бурдейко Е.Ю.¹, Доценко Э.А.², Новикова Т.П.²

¹ Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

² Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Получение рекомбинантного полипептида Bet v 1 – главного аллергена пыльцы березы – и создание на его основе экспериментальной тест-системы для выявления специфических IgE-антител

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Пархомчук О.Ю. – сбор материала, проведение исследований, написание текста, литературный обзор; Фомина Е.Г. – концепция, дизайн исследования, редактирование; Григорьева Е.Е. – дизайн исследования, проведение исследований, редактирование; Счесленок Е.П. – проведение исследований, редактирование; Антоненко В.В., Бурдейко Е.Ю. – проведение исследований; Доценко Э.А. – дизайн исследования, редактирование; Новикова Т.П. – сбор материала, проведение исследований.

Подана: 04.07.2023

Принята: 12.02.2024

Контакты: olgaparhom4uk@mail.ru

Резюме

Введение. Во всем мире наблюдается рост числа аллергических заболеваний. Внедрение рекомбинантных технологий в аллергологию позволило определить белковые компоненты, отвечающие за формирование аллергической реакции. Синтез рекомбинантных аллергенов дает возможность целенаправленно получать пептиды с заданными свойствами.

Цель. Получить рекомбинантный полипептид Bet v 1.0101 в прокариотических клетках *Escherichia coli*, штамм BL21 (DE3).

Материалы и методы. В качестве матрицы использована тотальная РНК пыльцы березы повислой, собранная на территории Республики Беларусь. Для получения целевого полипептида использована прокариотическая система *Escherichia coli*, штамм BL21(DE3), и экспрессирующий вектор pJC40. Очистка проведена методом металл-хелатной хроматографии в денатурирующих условиях. Для подтверждения специфичности белка применен разработанный иммуоферментный лиа-тест, который основан на реакции агглютинации («антиген – антитело»), где в качестве антигена выступает сорбированный на нитроцеллюлозной мембране полипептид Bet v 1.0101.

Результаты. Получен высокоочищенный рекомбинантный полипептид Bet v 1 (изоформа Bet v 1.0101), не содержащий примесей бактериальных белков, обладающий антигенными свойствами. Показана возможность использования белка для выявления специфических антител в иммуоферментном лиа-тесте с референс-сыворотками.

Заключение. Открывается возможность использования полученного рекомбинантного полипептида для диагностики аллергических заболеваний и в аллерген-специфической иммунотерапии.

Ключевые слова: Bet v 1, аллерген, рекомбинантный белок, прокариотическая система Escherichia coli, синтез белка

Parkhomchuk O.¹✉, Fomina E.¹, Grigorieva E.¹, Scheslenok E.¹, Antonenko V.¹, Burdeiko E.¹, Dotsenko E.², Novikova T.²

¹ Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus

² Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Obtaining Recombinant Polypeptide Bet v 1, the Main Allergen of Birch Pollen, and Creation of an Experimental Test System for Specific IgE Antibodies Identifying on Its Basis

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Parkhomchuk O. – material collecting, research conducting, text writing, literature review; Fomina E. – concept, research design, editing; Grigorieva E. – research design, research conducting, editing; Scheslenok E. – research conducting, editing; Antonenko V., Burdeiko E. – research conducting; Dotsenko E. – research design, editing; Novikova T. – material collecting, research conducting.

Submitted: 04.07.2023

Accepted: 12.02.2024

Contacts: olgaparhom4uk@mail.ru

Abstract

Introduction. Allergic diseases are on the rise worldwide. The introduction of recombinant technologies in allergology has allowed identifying protein components responsible for allergic reaction formation. Recombinant allergens synthesis makes it possible to purposefully obtain peptides with targeted properties.

Purpose. To obtain recombinant polypeptide Bet v 1.0101 in prokaryotic cells of Escherichia coli, strain BL21 (DE3).

Materials and methods. The total RNA of birch pollen collected on the territory of the Republic of Belarus was used as a matrix. To obtain the target polypeptide, the prokaryotic Escherichia coli system, strain BL21(DE3), and the expression vector pJC40 were used. The purification was carried out by metal-chelate chromatography under denaturing conditions. To confirm the protein specificity, an elaborated enzyme immunoassay was used based on agglutination reaction ("antigen – antibody"), where the polypeptide Bet v 1.0101 sorbed on a nitrocellulose membrane acted as antigen.

Results. A highly purified recombinant polypeptide Bet v 1 (isoform Bet v 1.0101), not containing bacterial protein impurities and possessing antigenic properties, was obtained. The feasibility of using the protein for specific antibodies detecting by enzyme immunoassay with reference sera has been shown.

Conclusion. The opportunity of using the obtained recombinant polypeptide in allergic conditions diagnostics and in allergen-specific immunotherapy has been discovered.

Keywords: Bet v 1, allergen, recombinant protein, Escherichia coli prokaryotic system, protein synthesis

■ ВВЕДЕНИЕ

Глобальный рост числа аллергических заболеваний, который наблюдается в последнее время, значительно снижает качество жизни людей. Мировая статистика свидетельствует о том, что около 20% населения земного шара страдает от той или иной аллергопатологии [1]. Значительный вклад вносит и пыльцевая аллергия. Поллиноз является социально-экономической проблемой, оказывая негативное влияние на все стороны жизни пациентов, и чаще всего характеризуется рецидивирующим течением у лиц трудоспособного возраста. За последние десятилетия современная наука достигла существенных успехов в понимании факторов возникновения пыльцевой аллергии. Важную роль в этом сыграло применение молекулярного клонирования и рекомбинантных технологий. Исследования с использованием этих методов позволили получить новые знания о структуре и свойствах аллергенов, классифицировать их и установить белковые молекулы, являющиеся первопричиной аллергических состояний [2, 3].

Рекомбинантные продукты стали важными инструментами для диагностики и терапевтических целей в современной медицине. В первую очередь это связано с тем, что применение в аллергодиагностике препаратов аллергенов, имеющих естественное происхождение (экстракты) и характеризующихся сложной природой, препятствует идентификации индивидуального спектра IgE-чувствительности. Поэтому диагностика с применением экстрактов позволяет определить только источники аллергенов, но не отдельные молекулы. В аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ) следствием невозможности прогнозирования способности таких аллергенов индуцировать иммунологическую толерантность становится большая вариативность результатов терапии и недостаточная приверженность лечению [4–6].

На основании строения и биологической функции молекулы аллергенов относят к различным белковым семействам. Одним из таких семейств является PR-10 (pathogenesis-related proteins), представителем которого является достаточно хорошо изученный аллерген Bet v 1, обуславливающий развитие специфической сенсибилизации у значительной части пациентов с поллинозом. Структура этого полипептида сходна со структурой белков пыльцы некоторых других деревьев, овощей и фруктов, что и объясняет наличие перекрестной реактивности. В связи с тем что применение натуральных экстрактов может приводить к некорректным результатам диагностики из-за присутствия компонентов с высокой кросс-реактивностью или загрязнения аллергенами из других источников, все чаще в современной медицине используются рекомбинантные формы полипептида Bet v 1 [4, 7–10].

При планировании экспериментов по синтезу белка первоочередной задачей становится подбор подходящей системы экспрессии и оптимальных условий. Для получения синтетических форм аллергенов используются как эукариотические, так и прокариотические системы экспрессии [11]. Что касается белка Bet v 1, то для синтеза этого полипептида применяются и те и другие системы, у каждой из которых есть свои преимущества и недостатки. Основным преимуществом эукариотических экспрессионных систем перед бактериальными является способность осуществлять многие посттрансляционные модификации, включая обработку сигнальных последовательностей, правильную укладку белка, образование дисульфидных связей.

Наиболее часто в качестве систем экспрессии этой группы используются клетки насекомых, млекопитающих и растения [12]. В частности, известны исследования, согласно которым для экспрессии белка Bet v 1 были использованы растительные организмы. Одним из таких растений является представитель семейства пасленовых *Nicotiana benthamiana*. Для внедрения чужеродных генов в это растение применяются различные методики. Одна из них была основана на использовании хорошо охарактеризованного одноцепочечного РНК-вируса табачной мозаики, который был применен в качестве вектора, содержащего нуклеотидную последовательность гена, кодирующего Bet v 1 [13]. Другой метод заключался в использовании гемини-вирусного вектора рBYR2HS, содержащего соответствующую вставку, с дальнейшей его трансформацией в *Agrobacterium tumefaciens*. Листья *Nicotiana benthamiana* погружали в суспензию, содержащую трансформированные агробактерии, и подвергали вакуумной инфльтрации [14]. Также известны и такие платформы для производства рекомбинантного аналога главного аллергена пыльцы березы, как зеленая водоросль *Chlamydomonas reinhardtii* и трансгенный рис [15]. Результаты всех этих исследований доказывают возможность достаточно успешного использования растительных организмов для получения синтетических форм аллергенов. Однако наряду с большим количеством преимуществ применения таких систем экспрессии существует и ряд недостатков. Основная проблема заключается в сложных методах экстракции полученных таким способом белков, что в результате может негативно отразиться на конечном количестве целевого продукта [12].

Что касается прокариотических систем экспрессии, то наиболее изученной и часто применяемой при получении аллергена Bet v 1 является система *Escherichia coli* [16–19]. Обусловлено это относительной простотой в использовании, экономичностью и возможностью получения большого количества рекомбинантного полипептида. Однако получение чужеродных белков в цитоплазме *Escherichia coli* часто сопровождается их неправильной укладкой и сегрегацией в виде нерастворимых телец включения, что может привести к образованию биологически неактивных форм. Причиной малоэффективной экспрессии клонированных генов в прокариотической системе может стать и наличие редко встречающихся кодонов [12]. На предыдущем этапе исследования было установлено, что содержание таких триплетов и значение индекса адаптации кодонов свидетельствуют о возможной достаточно эффективной экспрессии гена, кодирующего аллерген Bet v 1 [20]. Этот факт, а также доступность использования данной системы экспрессии стали аргументом в пользу применения в дальнейшей работе прокариотической системы *Escherichia coli*. Привлекательность этой системы также связана с тем, что, по данным спектрофотометрии, природный белок Bet v 1 не гликозилирован [21].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получить рекомбинантный полипептид Bet v 1.0101 в прокариотических клетках *E. coli*, штамм BL21(DE3).

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Используемые бактериальные штаммы: *Escherichia coli* XLBlue (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIq ΔM15 Tn10 (Tetr)]), *E. coli* BL21(DE3) (F–ompT hsdS(rB– mB–) gal dcm λ(DE3)).

В качестве исходного материала была использована пыльца березы повислой, собранная на территории Республики Беларусь. Получение нуклеотидной последовательности гена, кодирующего белок Bet v 1.0101, его клонирование в экспрессирующий вектор проводили согласно методике, описанной ранее [20].

Трансформацию *E. coli*, штамм BL21(DE3), рекомбинантной плазмидой pJC40-Bet v 1 осуществляли методом теплового шока. Культивирование трансформированных бактериальных клеток проводили на жидкой питательной среде Lysogeny broth (LB), содержащей в качестве селектирующего агента ампициллин в концентрации 50 мкг/мл (Carl Roth, Германия), при постоянном встряхивании на шейкере при +37 °С до момента достижения клеточной культурой оптической плотности OD 600 = 0,3. Биосинтез целевого белка индуцировался внесением в питательную среду изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (IPTG, Sigma, США) в конечной концентрации 0,4 мМ с дальнейшей инкубацией в течение 3 часов при тех же условиях. Осажденные центрифугированием (3000 об/мин, 10 мин.) бактериальные клетки ресуспендировали в буферном растворе (0,5 М NaCl, 20 мМ трис-НСl, pH 8,0).

Очистку рекомбинантного полипептида от клеточных белков осуществляли с использованием метода высокоаффинной металл-хелатной хроматографии на автоматическом жидкостном хроматографе среднего давления FPLC ÄKTAexplorer 100 (GE Healthcare) с применением колонки HisTrap Chelating HP (GE Healthcare) объемом 1 мл в денатурирующих условиях.

Анализ полученного рекомбинантного белка осуществляли в полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Laemmli [22].

Оценку специфичности рекомбинантного аллергена проводили с использованием разработанного иммуноферментного лия-теста, в основе которого лежит реакция «антиген – антитело». В качестве антигена был использован полученный рекомбинантный белок в нескольких концентрациях (от 0,15 до 15 мкг/мл). Антиген наносили в виде дискретных линий на мембраны из нитроцеллюлозы с диаметром пор 0,1 мкм (Millipore Corporation, США), 0,22 мкм (GSV, США) и 0,45 мкм (ADVANTEC, Япония). Для иммунодетекции образовавшегося комплекса аллерген – IgE использованы биотинилированные анти-человеческие IgE (козьи) и конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена (R-Biopharm AG RIDA qLine® Allergy, Германия). Интерпретацию полученных результатов проводили в соответствии с наличием/отсутствием специфически окрашенных полос преципитации в области нанесения белка Bet v 1.0101.

В качестве источника специфических антител к рекомбинантному полипептиду Bet v 1.0101 был использован пул сывороток пациентов, страдающих поллинозом (n=23). Аллергологическое обследование проводилось на базе аллергологического кабинета УЗ «б-я городская клиническая больница» (г. Минск) и включало кожные тесты с пыльцевыми аллергенами, выявление общих IgE в сыворотке крови (набор «ИФА-общий IgE» производства СП ООО «Фармлэнд», Республика Беларусь) и определение специфических IgE к аллергену березы (Bet v 1) с использованием тест-системы R-Biopharm AG RIDA qLine® Allergy, Германия. После получения информированного согласия пациентов собирали пул сывороток положительного контроля с высоким содержанием антител к Bet v 1 (5-й класс реактивности, содержание аллерген-специфических IgE-антител более 50 МЕ/мл) (n=8) и отрицательного контроля (0 класс реактивности, содержание аллерген-специфических IgE-антител менее 0,35 МЕ/мл) (n=9). Исследования проводили в соответствии с инструкцией производителя тест-системы.

Контролем, подтверждающим работу компонентов теста и специфичность конъюгата, служила сыворотка крови респондента с высоким содержанием общих IgE (288 МЕ/мл), нанесенная на нитроцеллюлозную мембрану.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Трансформацию компетентных клеток *Escherichia coli*, штамм BL21(DE3), осуществляли рекомбинантной плазмидой рJC40-Bet v 1, содержащей нуклеотидную последовательность гена, кодирующего белок Bet v 1.0101, наиболее распространенную изоформу главного аллергена пыльцы березы [23, 24]. Этапы получения экспрессирующего вектора рJC40-Bet v 1 изложены ранее [20]. Применение плазмиды рJC40 в исследовании обусловлено наличием индуцибельного промотора T7 РНК-полимеразы и участка, кодирующего так называемый гистиридиновый «хвост». В результате в используемой экспрессирующей системе при трансляции на N-конце белковой молекулы дополнительно синтезируются 10 остатков гистидина, благодаря чему появляется возможность очистить рекомбинантный белок с помощью металл-хелатной хроматографии.

В результате индукции синтеза рекомбинантного белка Bet v 1.0101 в составе полученного экспрессирующего плазмидного вектора был получен бактериальный лизат. Электрофоретический анализ лизата бактериальных клеток представлен на рис. 1.

Величина клонированного в экспрессирующий вектор фрагмента составляет 480 п. н., или 160 аминокислотных остатков, с расчетной массой полипептида

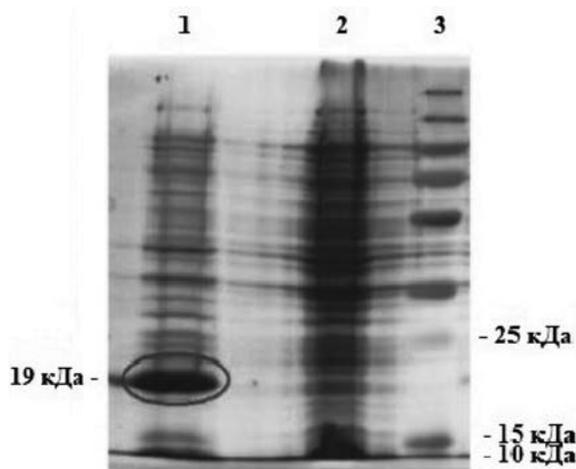


Рис. 1. Электрофоретический анализ лизата бактериальных клеток, содержащего рекомбинантный полипептид Bet v 1.0101, методом ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле

Примечания: дорожка 1 – лизат бактериальных клеток после индукции ИПТГ; дорожка 2 – лизат бактериальных клеток без индукции ИПТГ; дорожка 3 – маркер молекулярных масс.

Fig. 1. Electrophoretic analysis of bacterial cell lysate containing recombinant polypeptide Bet v 1.0101 by DSN electrophoresis in polyacrylamide gel

19,6 кДа (с учетом положения сайтов рестрикции и гистидинового «хвоста»). На гелеэлектрофорезе в области 19 кДа видна мажорная полоса на фоне значительного подавления синтеза бактериальных белков.

Получение рекомбинантного полипептида, максимально очищенного от клеточных белков, осуществляли с использованием аффинной металл-хелатной хроматографии в денатурирующих условиях. Очистка целевого белка при использовании данного метода происходит за счет взаимодействия N-концевых гистидиновых остатков рекомбинантного полипептида с иммобилизованными на сорбенте ионами металлов (Ni^{2+}). На рис. 2 представлены результаты очистки рекомбинантного аллергена Bet v 1.0101 от бактериальных белков.

Фракции элюции (дорожки 7, 8) содержат белок с молекулярной массой, соответствующей теоретически рассчитанной (~19 кДа). Наблюдался достаточно высокий уровень экспрессии целевого продукта (~15–20 мкг/мл) со следовым количеством бактериальных белков.

Для оценки специфичности полученного рекомбинантного полипептида был использован разработанный иммуоферментный лиа-тест. В качестве твердой фазы для нанесения рекомбинантного белка использованы нитроцеллюлозные мембраны с различным диаметром пор. Экспериментальным путем было установлено, что белок наиболее прочно фиксируется на нитроцеллюлозной мембране с диаметром пор 0,45 мкм. Для определения оптимального количества рекомбинантного аллергена, необходимого и достаточного для выявления специфических комплексов белок – антитело, на мембрану наносили белок в различных концентрациях (от 0,15 до 15 мкг/мл). Иммобилизованный на мембране полипептид Bet v 1.0101 обрабатывали сыворотками крови респондентов, содержащими и не содержащими специфические IgE. На рис. 3 представлены репрезентативные результаты оценки

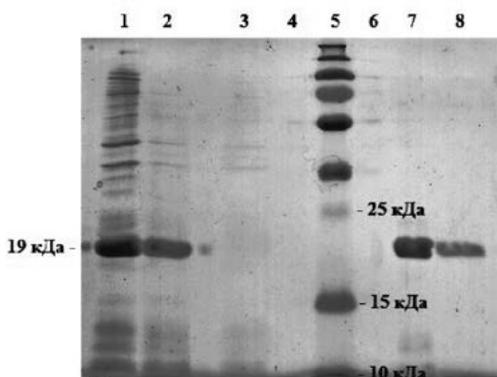


Рис. 2. Электрофоретический анализ фракций металл-хелатной хроматографии рекомбинантного полипептида Bet v 1.0101

Примечания: дорожка 1 – лизат бактериальных клеток после индукции ИПТГ; дорожка 2 – лизат бактериальных клеток после обработки ультразвуком и центрифугирования; дорожка 3 – бактериальный лизат после нанесения на колонку; дорожки 4, 6 – фракции отмывки; дорожка 5 – маркер молекулярных масс; дорожки 7, 8 – фракции элюции.

Fig. 2. Electrophoretic analysis of metal chelate chromatography fractions of recombinant polypeptide Bet v 1.0101

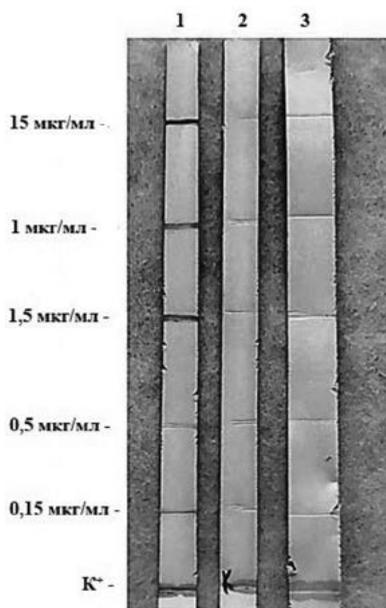


Рис. 3. Оценка количества белка, необходимого для корректной визуальной оценки специфического связывания «аллерген – антитело»

Примечания: стрипы с нанесенным рекомбинантным полипептидом в различных концентрациях: № 1 – обработанный сывороткой, содержащей специфические антитела; № 2, № 3 – обработанные сыворотками, не содержащими специфических антител; K* – сыворотка крови респондента с высоким содержанием общих IgE.

Fig. 3. Estimation of the amount of protein required for correct visual assessment of specific allergen – antibody binding

количества белка, которое необходимо нанести на мембрану для корректной визуальной оценки специфического связывания «аллерген – антитело». Стрип № 1 инкубировали с сывороткой респондента с высоким содержанием специфических IgE к исследуемому аллергену, а стрипы № 2 и № 3 – с сыворотками, не содержащими специфических IgE.

Оценивали результаты визуально. При наличии в образцах пациентов IgE-антител, специфичных к нанесенному на мембрану полипептиду Bet v 1.0101, происходит образование комплекса «аллерген – антитело», что обеспечивает прикрепление анти-человеческих IgE, конъюгированных с биотином (проявляющие антитела). Обработка мембран стрептавидином, конъюгированным со щелочной фосфатазой (конъюгат), приводит к ферментативному окрашиванию в сине-фиолетовый цвет бесцветного субстрата. Таким образом, в областях нанесения рекомбинантного полипептида Bet v 1.0101 наблюдали окрашенные полосы связывания при наличии в сыворотке крови специфических антител и отсутствие этих полос при обработке мембран сывороткой крови, не содержащей соответствующие антитела, что свидетельствовало о специфичности нанесенного полипептида. Ярко окрашенные специфические полосы преципитации выявлялись в случае, когда концентрация наносимого белка составляла не менее 1,0 мг/л.

Получение рекомбинантного полипептида Bet v 1 – главного аллергена пыльцы березы – и создание на его основе экспериментальной тест-системы для выявления специфических IgE-антител

Характеристика пациентов по содержанию в сыворотке аллерген-специфических IgE к аллергену березы Bet v 1 и определяемым классам реактивности
Characteristics of patients according to allergen-specific IgE to birch allergen Bet v 1 serum levels and determined reactivity classes

Количество пациентов	МЕ/мл	Класс	Содержание аллерген-специфических IgE
9	0,00–0,34	0 (0,0–0,9)	Не выявляются или отсутствуют
0	0,35–0,69	1 (1,0–1,9)	Низкое
1	0,70–3,49	2 (2,0–2,9)	Повышенное
3	3,50–17,49	3 (3,0–3,9)	Значительно повышенное
2	17,50–49,99	4 (4,0–4,9)	Высокое
8	50,00–99,99	5 (5,0–5,9)	Очень высокое
0	≥100,00	6	Запредельно высокое

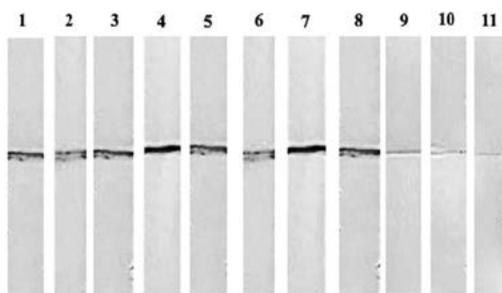


Рис. 4. Оценка антигенной специфичности рекомбинантного полипептида Bet v 1.0101

Примечания: № 1–8 – стрипы, обработанные сыворотками с высоким содержанием антител к Bet v 1; № 9–11 – стрипы, обработанные сыворотками, не содержащими специфических антител.

Fig. 4. Evaluation of the recombinant polypeptide Bet v 1.0101 antigenic specificity

Уровень содержания специфических IgE к аллергену березы Bet v 1 был определен в 23 образцах сыворотки пациентов с поллинозом (см. таблицу).

Для оценки антигенной специфичности рекомбинантного полипептида Bet v 1.0101 были использованы сыворотки с высоким содержанием антител к Bet v 1 (5-й класс реактивности, содержание аллерген-специфических IgE-антител более 50 МЕ/мл).

На рис. 4 представлены результаты оценки специфичности полученного полипептида Bet v 1.0101.

Наличие характерного окрашивания в области нанесения белка на всех стрипах, обработанных сыворотками с высоким содержанием антител к Bet v 1, свидетельствовало об образовании комплекса «аллерген – антитело» и было доказательством специфичности полученного рекомбинантного аллергена.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лабораторная диагностика аллергических заболеваний с применением натуральных экстрактов аллергенов характеризуется не всегда достаточной специфичностью в связи со сложностями стандартизации и особенностями получения

нативных белков. Поэтому целесообразным становится применение рекомбинантных технологий для решения этих и других задач в аллергологии.

Для получения рекомбинантного белка использовался экспрессирующий вектор рJC 40. Этот вектор направляет биосинтез полипептида под контролем T7 промотора. В описанных в литературе экспрессирующих прокариотических системах выход рекомбинантного белка значительно варьировал и составлял от 0,1–0,3 мг/л бактериальной культуры для плазмиды рКК 233 до 30–60 мг/л – для вектора рMW 172 [18, 19, 21].

Использованная нами экспрессирующая система (плазида рJC 40 и *E. coli*, штамм BL21(DE3)) позволила получить рекомбинантный полипептид Bet v 1.0101 с концентрацией целевого продукта 15–20 мг/л бактериальной культуры. Белок находится в растворимой форме. Преимуществом данной системы является также тот факт, что в процессе синтеза белка к его N-концу присоединяются 10 остатков гистидина, что дает возможность использовать высокоаффинную металл-хелатную хроматографию для его очистки от белков бактериальных клеток.

Для фракционирования белков бактериального лизата использовались колонки с иммобилизованными ионами никеля (Ni^{2+}), имеющими сродство к гистидину. Получена высокоочищенная рекомбинантная изоформа Bet v 1.0101 главного аллергена пыльцы березы.

Антигенная специфичность полипептида подтверждена в разработанном иммуноферментном лия-тесте, основой которого является полученный аллерген, нанесенный на нитроцеллюлозную мембрану. Инкубирование мембраны с сыворотками, содержащими специфические IgE, приводит к появлению полос преципитации в области нанесения рекомбинантного аллергена и отсутствию таковых при использовании сывороток, не содержащих антител к главному аллергену пыльцы березы. Показано, что для четкой визуализации полос преципитации концентрация аллергена в наносимой пробе должна быть не менее 1 мкг/мл.

Дальнейшие эксперименты будут направлены на изучение возможности использования полученной рекомбинантной формы главного аллергена пыльцы березы (изоформа Bet v 1.0101) в аллергодиагностике и в АСИТ. Подобные исследования в Республике Беларусь не проводились.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Yang L, Fu J, Zhou Y. Research Progress in Atopic March. *Front Immunol*. 2020;11:1907. doi: 10.3389/fimmu.2020.01907
2. Valenta R, Karaulov A, Niederberger V, Gattinger P, van Hage M, Flicker S, Linhart B, Campana R, Focke-Tejkl M, Curin M, Eckl-Dorna J, Lupinek C, Resch-Marat Y, Vrtala S, Mittermann I, Garib V, Khaitov M, Valent P, Pickl W.F. Molecular aspects of allergens and allergy. *Advances in Immunology*. 2018;138:195–256. doi: /10.1016/bs.ai.2018.03.002
3. Biedermann T. Birch pollen allergy in Europe. *Allergy*. 2019;74(7):1237–1248. doi: 10.1111/all.13758
4. Valenta R, Campana R, Niederberger V. Recombinant allergy vaccines based on allergen-derived B cell epitopes. *Immunology Letters*. 2017;189:19–26. doi: 10.1016/j.imlet.2017.04.015
5. Gutermuth J, Grosber M, Pfaar O, Bergmann K.C., Ring J. 111 years of allergen-immunotherapy: A long and successful history of the only available disease-modifier in allergic diseases. *Allergologie Select*. 2022;6:248–258. doi: 10.5414/ALX02330E
6. Khokha R.N. Diagnostics of allergies: realities and prospects. Part 2. *Journal of the Grodno State Medical University*. 2020;18(4):481–486. doi: 10.25298/2221-8785-2020-18-4-481-486. (in Russian)
7. Nony E, Bouley J, Le Mignon M. Development and evaluation of a sublingual tablet based on recombinant Bet v 1 in birch pollen-allergic patients. *Allergy*. 2015;70(7):795–804. doi: 10.1111/all.12622
8. Sinha M., Singh R.P., Kushwaha G.S. Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families. *Scientific World Journal*. 2014;2014:543195. doi: 10.1155/2014/543195
9. Zhernov Y, Curin M., Khaitov M., Karaulov A., Valenta R. Recombinant allergens for immunotherapy: state of the art. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2019;19(4):402–414. doi: 10.1097/ACI.0000000000000536

10. Nevskaya L.V., Lavrenchik E.I., Zhdanova M.Yu. Allergens based on recombinant proteins. *Immunology*. 2018;39(4):239–242. doi: 10.18821/0206-4952-2018-39-4-239-242. (in Russian)
11. Singh M.B., Bhalla P.L. Recombinant expression systems for allergen vaccines. *Inflammation & allergy drug targets*. 2006;5(1):53–59. doi: 10.2174/187152806775269312
12. Schmidt M., Hoffman D.R. Expression systems for production of recombinant allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;128(4):264–270. doi: 10.1159/000063865
13. Krebitz M., Wiedermann U., Essl D. Rapid production of the major birch pollen allergen Bet v 1 in *Nicotiana benthamiana* plants and its immunological in vitro and in vivo characterization. *FASEB J*. 2000;14(10):1279–1288. doi: 10.1096/fj.14.10.1279
14. Yamada Y., Kidoguchi M., Yata A. High-Yield Production of the Major Birch Pollen Allergen Bet v 1 With Allergen Immunogenicity in *Nicotiana benthamiana*. *Front Plant Sci*. 2020;11:344. doi: 10.3389/fpls.2020.00344
15. Hirschl S., Ralsler C., Asam C. Expression and Characterization of Functional Recombinant Bet v 1.0101 in the Chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int Arch Allergy Immunol*. 2017;173(1):44–50. doi: 10.1159/000471852
16. Weiss C., Kramer B., Ebner C. High-level expression of tree pollen isoallergens in *Escherichia coli*. *Int Arch Allergy Immunol*. 1996;110(3):282–287. doi: 10.1159/000237300
17. Wallner M., Himly M., Neubauer A. The influence of recombinant production on the immunologic behavior of birch pollen isoallergens. *PLoS One*. 2009;4(12):e8457. doi: 10.1371/journal.pone.0008457
18. Hoffmann-Sommergruber K., Susani M., Ferreira F. High-level expression and purification of the major birch pollen allergen, Bet v 1. *Protein Expr Purif*. 1997;9(1):33–39. doi: 10.1006/prep.1996.0671
19. Pavlov A.E., Seylieva N.A., Mukhortykh O.Yu., Stefanov V.E. Preparation and properties evaluation of the recombinant analogue of birch pollen allergen Bet v 1. *Russian Journal of Allergy*. 2012;9(3):7–13. (in Russian)
20. Parkhomchuk O.Yu., Fomina E.G., Grigorjeva E.E. Obtaining an expression vector containing the nucleotide sequence of the gene encoding Bet v 1 – the major allergen of birch pollen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Biological Series*. 2023;68(2):104–113. doi: 10.29235/1029-8940-2023-68-2-104-113. (in Russian)
21. Swoboda I., Jilek A., Ferreira F., Engel E. Isoforms of Bet v 1, the major birch pollen allergen, analyzed by liquid chromatography, mass spectrometry and cDNA cloning. *J. Biol. Chem*. 1995;270(6):2607–2613. doi: 10.1074/jbc.270.6.2607
22. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680–685. doi: 10.1038/227680a0
23. Erler A., Hawranek T., Krückemeier L. Proteomic profiling of birch (*Betula verrucosa*) pollen extracts from different origins. *Proteomics*. 2011;11(8):1486–1498. doi: 10.1002/pmic.201000624
24. Cabrera A., Foo A.C.Y., Fitzgerald M.C., Mueller G.A. Bet v 1 and other birch allergens are more resistant to proteolysis and more abundant than other birch pollen proteins. *Allergy*. 2022;77(4):1307–1309. doi: 10.1111/all.15209