

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК, СОДЕРЖАЩЕЙ ГЕН, КОДИРУЮЩИЙ МИНОРНЫЙ АЛЛЕРГЕН ПЫЛЬЦЫ БЕРЕЗЫ BETV2

Зверко В.В., Пархомчук О.Ю., Григорьева Е.Е., Фомина Е.Г.
*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь,
zverko-v88@bk.ru*

В настоящее время во всем мире отмечается быстрый рост аллергической заболеваемости. В Европе сенсibilизация к пыльце березы является одной из ведущих среди пыльцевой аллергии. Идентификация причинного аллергена имеет решающее значение для установления точного диагноза и организации лечебно-профилактических мероприятий [1].

Рекомбинантные технологии в получении аллергенных компонентов представляют собой современное прогрессивное направление в клинической аллергологии, позволяющее решить ряд задач в диагностике и лечении аллергических заболеваний. Препараты аллергенов, получаемые из природных источников, неоднородны. Они содержат одновременно аллергенные и неаллергенные компоненты, что затрудняет их стандартизацию. Применение современных биотехнологий для создания рекомбинантных белков позволяет получить хорошо охарактеризованные в иммунохимическом плане препараты, пригодные для использования в диагностических целях, а также для проведения аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ) [3, 5].

Betv2 представляет собой минорный аллерген пыльцы берёзы, принадлежит к семейству профилинов, группе актинсвязывающих белков. Профилины, являющиеся перекрёстно-реактивными аллергенами, содержатся не только в пыльце неродственных растений (деревья, травы, сорняки), но и в других продуктах растительного происхождения (фруктах, овощах, орехах, специях). Betv2 распознается IgE-антителами примерно у 10% пациентов с аллергией на берёзу. Betv2 может служить маркером синдромов, включающих перекрёстные реакции с неродственными растениями и растительными продуктами [4, 6].

Целью данного исследования явилось получение рекомбинантной плазмидной ДНК, содержащей в качестве вставки ген, кодирующий аллерген пыльцы березы Betv2.

Материалы и методы. Для получения растительного генетического материала были использованы листья березы повислой (*Betula pendula* Roth.). Выделение РНК проводили двумя методами: с использованием коммерческого реагента TRIzol согласно прилагаемой инструкции и методики, описанной в работе К. Vijli и соавторов [2].

Постановку реакции обратной транскрипции осуществляли со специфическим обратным праймером с применением набора реагентов

RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) согласно инструкции производителя.

Для постановки полимеразной цепной реакции применяли специфические олигонуклеотидные праймеры (синтезированы ОДО «Праймтех», Республика Беларусь) Betv2dH и Betv2rX, подобранные для амплификации гена Betv2 и содержащие дополнительно сайты рестрикции для последующего клонирования в экспрессирующий вектор.

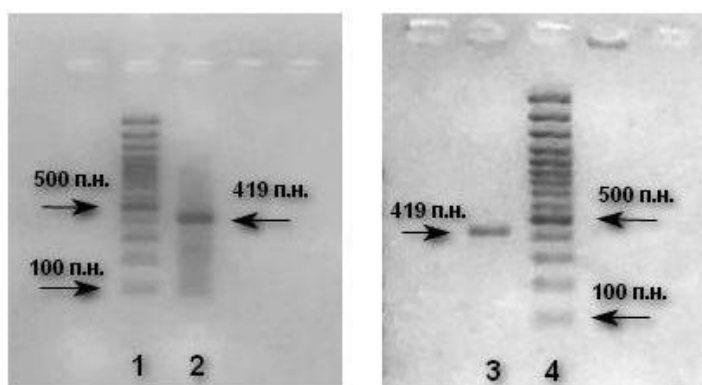
Анализ продуктов амплификации проводили в 1,5 % агарозном геле с использованием в качестве электродного буфера однократного TBE-буфера. Для визуализации анализируемой ДНК гели окрашивали раствором бромистого этидия с последующим просмотром в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе.

Для создания гибридных векторов использовали набор реагентов PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, США).

Трансформацию компетентной культуры клеток *E. coli* (штамм XL1-Blue) плазмидной ДНК проводили методом теплового шока.

Выделение плазмидной ДНК осуществляли методом кипячения с использованием STET-буфера [8].

Результаты исследований. Наибольшую эффективность для выделения РНК из природного растительного материала показал метод, предложенный в работе К. Vijli и соавторов [2] и основанный на применении LiCl. Полученная РНК была использована для постановки реакции обратной транскрипции. С применением специфических праймеров Betv2dH и Betv2rX методом ПЦР на матрице кДНК был получен амплификат гена Betv2 размером 419 п.н. (рис. 1).



- 1, 4 – маркер молекулярных масс 100 bp DNA ladder, Thermo Scientific;
2 – исходный амплификат гена, кодирующего аллерген пыльцы березы Betv2;
3 – очищенный амплификат гена, кодирующего аллерген пыльцы березы Betv2

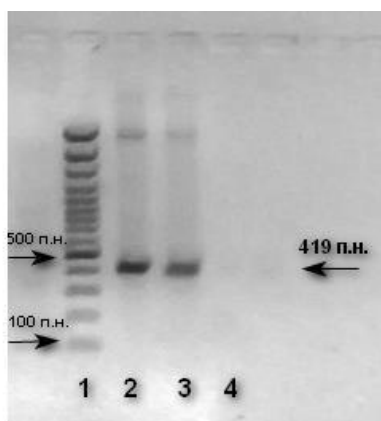
Рисунок 1 – Электрофоретический анализ продуктов амплификации

В качестве вектора для клонирования полученного фрагмента ДНК была использована плаزمида pJET 1.2/blunt. Особенностью данного вектора является

наличие в его составе «суицидного гена», который не транслируется при встраивании в него чужеродного генетического фрагмента. Таким образом, после трансформации лигазной смесью вырастают только те бактериальные клоны, которые содержат плазмидную ДНК с клонированной последовательностью.

Аmplицированный ДНК-фрагмент вырезали из агарозного геля и проводили его очистку (рис. 1). Клонирование осуществляли по «тупым» концам в полилинкер исходного вектора последовательно в две стадии, предполагающие подготовку фрагмента и его лигирование в вектор. Полученную лигазную смесь использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli*, штамм XL1-Blue. Клетки выращивали на твердой селективной питательной среде, содержащей ампициллин (50 мкг/мл). После инкубирования в течение ночи при 37°C отдельные колонии клеток рассеивали штрихом и выращивали при тех же условиях, из бактериальных клеток *E. coli* выделяли плазмидную ДНК.

Наличие клонированного фрагмента в составе рекомбинантных плазмид определяли методом ПЦР со специфической парой праймеров. Присутствие ампликона заданного размера при отсутствии такового для отрицательного образца свидетельствовало об амплификации на матрице гибридной плазмидной ДНК специфической нуклеотидной последовательности гена, кодирующего аллерген пыльцы березы Betv2 (рис. 2).



- 1 – маркер молекулярных масс 100 bp DNA ladder, Thermo Scientific;
2, 3 – амплификат, полученный на матрице плазмидной ДНК, выделенной из двух клонов, 4 – отрицательный контроль

Рисунок 2 – Электрофоретический анализ продуктов амплификации гена Betv2 на матрице рекомбинантных плазмидных ДНК

Таким образом, с использованием методов генетической инженерии получена рекомбинантная плазмидная ДНК, содержащая в своем составе ген, кодирующий минорный аллерген березы Betv2. Гибридная ДНК в дальнейшем

будет использована для получения в прокариотической экспрессирующей системе рекомбинантного белка Betv2 с последующей оценкой его биологических и иммунологических свойств.

Литература

1. Biedermann T., Winther L., Till S., Panzner P., Knulst A., Valovirta E. Birch pollen allergy in Europe // *Allergy*. 2019. V. 74. N 7. P. 1237–1248.
2. Bijli K., Singh B., Sridhara S., Arora N. Isolation of total RNA from pollens // *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2001. V. 31. P. 155–162.
3. Curin M., Garib V., Valenta R. Single recombinant and purified major allergens and peptides. How they are made and how they change allergy diagnosis and treatment // *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2017. V. 119, N. 3. P. 201–209.
4. De Amici M., Mosca M., Vignini M., Quaglini S., Moratti R. Recombinant birch allergens (Bet v 1 and Bet v 2) and the oral allergy syndrome in patients allergic to birch pollen // *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2003. V. 91. N 5. P. 490–492.
5. Jutel M., Solarewicz-Madejek K., Smolinska S. Recombinant allergens: the present and the future // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2012. V. 8. N10. P. 1534–1543.
6. Rossi R., Monasterolo G., Monasterolo S. Detection of specific IgE antibodies in the sera of patients allergic to birch pollen using recombinant allergens Bet v 1, Bet v 2, Bet v 4: evaluation of different IgE reactivity profiles // *Allergy*. 2003. V. 58. N. 9. P. 929–932.
7. Sambrook J., Russell D. W. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: in 3 vol. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. V. 1. 749 p.