

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 575.117.2.053.4.083.32:616-022.854:582.878.43

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-2-104-113>

Поступила в редакцию 15.11.2022

Received 15.11.2022

О. Ю. Пархомчук, Е. Г. Фомина, Е. Е. Григорьева

*Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
Минск, Республика Беларусь*

ПОЛУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО ВЕКТОРА, СОДЕРЖАЩЕГО НУКЛЕОТИДНУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО БЕЛОК BET v 1 – ОСНОВНОЙ АЛЛЕРГЕН ПЫЛЬЦЫ БЕРЕЗЫ

Аннотация. Создана экспрессирующая векторная конструкция, содержащая ген, кодирующий наиболее распространенную изоформу Bet v 1.0101 белка Bet v 1 – главного аллергена пыльцы березы, для последующей экспрессии белка в прокариотической системе *Escherichia coli*. В качестве матрицы использована тотальная РНК пыльцы березы повислой, собранной на территории Республики Беларусь. Получение экспрессирующего вектора pJC40-Bet v 1 осуществлялось при помощи молекулярно-генетических методов: клонирования, лигирования, трансформации. Специфичность клонированного фрагмента подтверждалась методом секвенирования. В ходе исследования в кодирующей части клонированного гена установлено 14 редких для *Escherichia coli* кодонов. Триплеты расположены в нуклеотидной последовательности равномерно, кластеризация кодонов наблюдалась только в двух случаях. Общее процентное содержание редких триплетов (8,75 %) и рассчитанное значение уровня адаптации кодонов (0,57) позволяет прогнозировать достаточно эффективную экспрессию исследуемого гена.

Ключевые слова: pJC40, Bet v 1, аллерген, экспрессирующий вектор, рекомбинантный белок

Для цитирования: Получение экспрессирующего вектора, содержащего нуклеотидную последовательность гена, кодирующего белок Bet v 1 – основной аллерген пыльцы березы / О. Ю. Пархомчук, Е. Г. Фомина, Е. Е. Григорьева // Вестн. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2023. – Т. 68, № 2. – С. 104–113. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-2-104-113>

Olga Yu. Parkhomchuk, Elena G. Fomina, Elena E. Grigorieva

Republican Scientific and Practical Center of Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

OBTAINING AN EXPRESSION VECTOR CONTAINING THE NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE GENE ENCODING BET v 1 – THE MAJOR ALLERGEN OF BIRCH POLLEN

Abstract. An expression vector containing the gene encoding the most common isoform Bet v 1.0101 of the Bet v 1 protein, the major birch pollen allergen, was created for a subsequent expression in the prokaryotic system of *Escherichia coli*. Total RNA from birch pollen collected in Belarus was used as a matrix. The expression vector pJC40-Bet v 1 was obtained using molecular-genetic methods: cloning, ligation, transformation. The specificity of the cloned fragment was confirmed by sequencing. During the study, 14 rare *Escherichia coli* codons were identified in the coding part of the cloned gene. The triplets were evenly arranged in the nucleotide sequence; codon clustering was observed only in two cases. The total percentage of rare triplets (8.75 %) and the calculated value of the codon adaptation level (0.57) allow us to predict a sufficiently efficient expression of the studied gene. The data obtained will be used in the synthesis of the recombinant polypeptide Bet v 1.0101.

Keywords: pJC40, Bet v 1, allergen, expressing vector, recombinant protein

For citation: Parkhomchuk O. Yu., Fomina E. G., Grigorieva E. E. Obtaining an expression vector containing the nucleotide sequence of the gene encoding Bet v 1 – the major allergen of birch pollen. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2023, vol. 68, no. 2, pp. 104–113 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-2-104-113>

Введение. Пыльцевая аллергия (поллиноз) занимает одно из ведущих мест среди аллергических заболеваний. В Европейском регионе значимой является сенсibilизация к пыльце березы. Основная масса пациентов (более 95 %), у которых наблюдается аллергическая реакция на пыльцу березы, реагирует на белок Bet v 1. Этот белок, представляющий собой мажорный аллерген пыльцы березы, имеет молекулярную массу 17 кДа и состоит из 160 аминокислот. Bet v 1 относится к семейству PR-10 (pathogenesis-related class 10) [1–4].

Известно, что белки PR-10 кодируются небольшим числом генов, которые экспрессируются в основном в корнях и индуцируются во всех частях растения в ответ на различные стрессы и повреждение тканей [5]. Гены, кодирующие белки PR-10 березы повислой (*Betula pendula*), сгруппированы в пять подсемейств. В пыльце экспрессируются семь генов первых двух подсемейств, которые кодируют различные варианты (изоформы) Bet v 1. Транскрипция этих генов происходит на поздних стадиях развития пыльников, но факторы, вызывающие транскрипцию, до конца не изучены [6, 7].

В настоящее время номенклатура изоформ Bet v 1 включает в себя 32 последовательности из NCBI (National Center for Biotechnology Information), которые соответствуют 27 вариантам трех изоаллергенов Bet v 1 [8]. На способность связываться с IgE значительное влияние могут оказывать даже несколько аминокислот, которыми изоформы отличаются между собой [9, 10]. Выявлены значительные различия в составе и количестве вариантов аллергена Bet v 1 при исследовании экстрактов пыльцы березы различных видов. По данным литературы установлено, что в пыльце одного дерева экспрессируется от 4 до 6 изоформ белка Bet v 1 [7].

При диагностике аллергической реакции на пыльцу березы в основном используются водные экстракты. Такие экстракты представляют собой смесь как аллергенного, так и неаллергенного материала и характеризуются высокой вариативностью концентрации и биологической активности аллергенов. Преодолеть данные проблемы очень сложно ввиду индивидуальных свойств источника получения экстракта и необходимости применения различных методов, которые для этого используются [11].

Для решения ряда задач в диагностике и аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ) аллергических заболеваний, в частности для синтеза рекомбинантных аллергенов, широко применяются рекомбинантные технологии. Известно, что при проведении АСИТ с применением натуральных экстрактов аллергенов, для которых возможна вариативность композиции и концентрации аллергенов, возрастает риск нежелательных реакций. С целью совершенствования АСИТ предлагается использовать аллергенные компоненты с установленной биологической активностью, которые хорошо охарактеризованы и свободны от посторонних примесей [12–16].

Несмотря на то что подходы к производству рекомбинантных аллергенов предлагаются достаточно давно (с конца 1980-х годов), получение каждого целевого полипептида требует индивидуального подхода и экспериментальной реализации. Производство таких аллергенов не зависит от нативного источника и дает возможность получить аллергенный компонент с заранее известными свойствами, что очень важно для диагностики и лечения аллергических заболеваний [17].

Цель исследования – получение векторной конструкции для последующей экспрессии рекомбинантного Bet v 1 в прокариотической системе.

Подобные исследования на территории Республики Беларусь не проводились.

Объекты и методы исследования. Исходным материалом являлась пыльца березы повислой, собранная на территории Республики Беларусь.

Для выделения РНК был использован метод, основанный на применении LiCl [18].

Синтез кДНК на матрице РНК осуществляли с помощью реакции обратной транскрипции с применением набора реагентов RevertAid First cDNA Synthesis Kit производства Thermo Scientific, США, согласно прилагаемой инструкции.

Амплификаты гена, кодирующего белок Bet v 1, получали методом ПЦР с использованием специфических олигонуклеотидных последовательностей, синтезированных ООО «АртБиоТех», Республика Беларусь. Праймеры содержали дополнительные сайты рестрикции для последующего клонирования в экспрессирующий вектор pJC40 [19]:

BetvldH 5' – CGCGAAGCTTATGGGTGTTTCAATTACGA – 3' (прямой),

Betv1rX 5' – GCGCCTCGAGGTTGTAGGCATCGGAGTG – 3' (обратный).

Состав реакционной смеси: по 15 пмоль праймеров (ООО «АртБиоТех»), 2,5 мкл 10× буфера, 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ дНТФ, 1 мкл кДНК, 1,25 ед. ArtStart-полимеразы (ООО «АртБиоТех»), деионизованная вода до конечного объема 25 мкл. Режим амплификации: 95 °С – 2 мин; 95 °С – 45 с, 55 °С – 45 с, 72 °С – 45 с (количество циклов – 35); 72 °С – 10 мин.

Для анализа фрагментов ДНК, полученных в результате проведения ПЦР, использовали метод электрофореза в 1,5 %-ном агарозном геле. Электрофорез проводили в трис-боратном буфере, pH 8,0, в течение 45 мин. Визуализацию ДНК осуществляли с помощью окрашивания геля бромистым этидием с последующим просмотром в УФ.

Для клонирования очищенного ПЦР-фрагмента в полилинкер вектора pJET1.2/blunt (Thermo Scientific) по тупым концам использовали набор CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific) в соответствии с инструкцией производителя. Переклонирование фрагмента в экспрессирующую плазмиду pJC40 осуществляли по липким концам. Для рестрикции вектора pJC40 и амплифицированного фрагмента в течение 1 ч при + 37 °C использовали по 5 U ферментов HindIII (Fermentas, Литва) и XhoI (Thermo Scientific), конечный объем смеси составил 20 мкл. После инкубации ферменты рестрикции инактивировали в течение 20 мин при + 80 °C. При дальнейшем рестрикционном анализе полученного экспрессирующего вектора дополнительно использовали эндонуклеазу SmaI (Thermo Scientific). Инкубацию плазмиды с рестриктазой осуществляли при + 30 °C в течение 1 ч.

Лигирование проводили в объеме 20 мкл. В качестве лигирующего фермента использовали T4 DNA Ligase (Thermo Scientific) согласно инструкции производителя.

Трансформацию бактериальных клеток *Escherichia coli* XLBlue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [*F'* *proAB lacI qZAM15 Tn10 (Tet r)*]) лигазной смесью осуществляли методом теплового шока. Селекцию трансформированных бактериальных клеток проводили на среде LB (Titan Biotech, India), содержащей 50 мкг/мл ампициллина.

Выделение плазмидной ДНК осуществляли колоночным методом с использованием набора реагентов GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) в соответствии с инструкцией производителя.

Специфичность клонированного фрагмента подтверждали с помощью секвенирования по методу Сэнгера [20]. При постановке секвенирующей реакции использовали набор Brilliant Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Scientific) в соответствии с инструкцией производителя; для разделения фрагментов ДНК, полученных в результате секвенирующей реакции, – метод капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе 3500 xL Applied Biosystems; для последующей обработки полученных данных – программу Bioedit Sequence Alignment Editor, version 7.2.5.

Результаты и их обсуждение. Получение любого рекомбинантного белка в гетерологичной системе (в нашем случае это биосинтез белка растительной клетки в бактериальном хозяине) предполагает целый ряд последовательных этапов, каждый из которых требует решения определенных задач: от выделения генетического материала до получения целевого продукта [21]. Общая схема проведенных экспериментов представлена на рис. 1. Они включали получение амплифицированного фрагмента гена, кодирующего главный аллерген пыльцы березы, подтверждение его специфичности в составе плазмиды как уникальной матрицы изоформы Bet v 1.0101 и получение экспрессирующего вектора для доставки копии гена в бактериальную клетку с последующей трансляцией белка под контролем индуцибельного промотора.

Известно, что растительная клетка представляет собой сложный биологический источник для выделения генетического материала. Особенно это касается молекул РНК. В первую очередь это связано с наличием жесткой полисахаридной стенки, разрушение которой занимает значительное количество времени исследователя. Негативное влияние на процесс выделения оказывают также пигменты и накопленные в растениях вторичные метаболиты, такие как терпены, алкалоиды, полифенолы. Эти соединения не только усложняют сам процесс получения РНК, но и отрицательно влияют на качество генетического материала. В качестве источника получения РНК могут быть использованы различные части растения (листья, корни, пыльца, семена), для которых характерны свои особенности, влияющие на качество и количество выделенных нуклеиновых кислот. В частности, для пыльцы характерны не только избыточная пигментация, но и наличие плотных стенок, которые необходимы для выживания в неблагоприятных природных условиях [22, 23]. Все это необходимо учитывать перед проведением и выбором метода исследования. С целью определения наиболее эффективной методики ранее нами был проведен

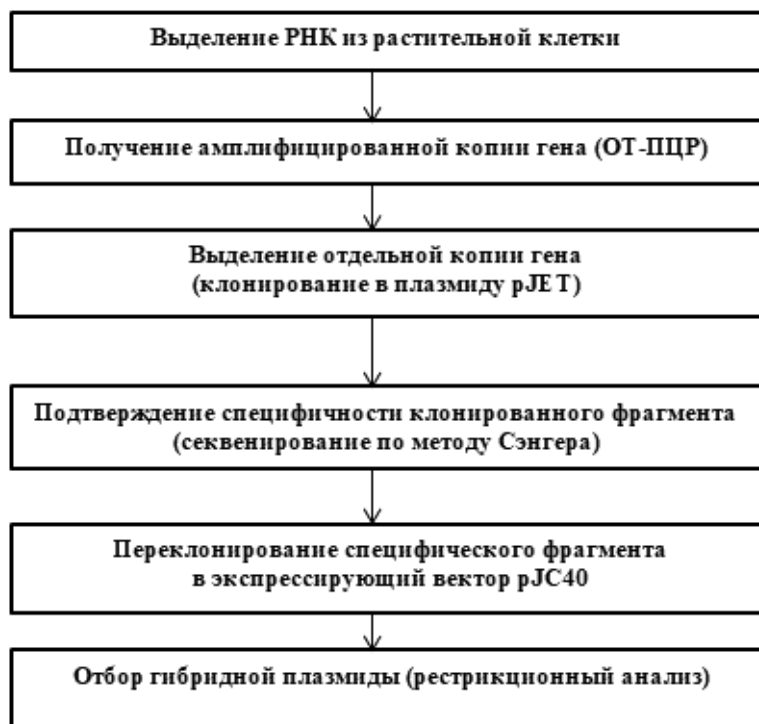


Рис. 1. Схема, отражающая этапы получения вектора экспрессии

Fig. 1. Scheme reflecting the stages of obtaining an expression vector

сравнительный анализ двух способов выделения РНК из растительного материала [24]. Установлено, что метод, основанный на применении LiCl, более эффективен, чем метод с использованием коммерческого реагента Trizol (рис. 2).

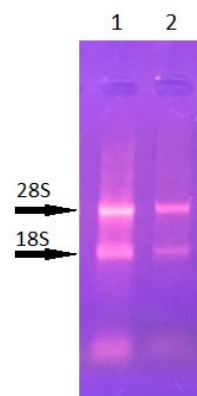
На рис. 2 видно наличие двух дискретных 28S и 18S фракций рибосомальной РНК, отсутствие деградированной нуклеиновой кислоты. Таким образом, применение анионного детергента (10 % SDS) и большого количества LiCl (4 M) способствует более полной экстракции и осаждению РНК из растительного сырья [18].

Выделенная РНК была использована в качестве матрицы для амплификации гена, кодирующего главный аллерген пыльцы березы в реакции ОТ-ПЦР с искусственно синтезированной парой праймеров, в структуру которых дополнительно вводили сайты узнавания для специфических рестриктаз HindIII и XhoI. Эти сайты входят в состав полилинкера экспрессирующего вектора рJС40 и отсутствуют в клонированной последовательности. Теоретически рассчитанная масса ампликона составляет 500 пар нуклеотидных оснований (п. о.) с учетом сайтов рестрикции.

В результате постановки обратной транскрипции на РНК-матрице и дальнейшей ПЦР был получен фрагмент ДНК соответствующего размера (рис. 3).

Рис. 2. Электрофоретический анализ РНК, выделенной двумя методами:
1 – с применением LiCl; 2 – с применением реагента TRIzol

Fig. 2. Electrophoretic analysis of RNA isolated by two methods: 1 – based on using LiCl; 2 – based on using TRIzol reagent



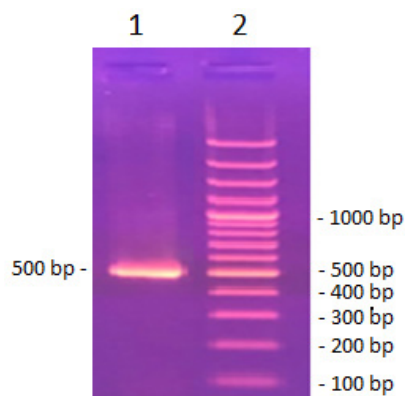


Рис. 3. Электрофоретический анализ амплифицированного фрагмента в 1,5 %-ном агарозном геле: 1 – амплификат, полученный с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров BetvldH и BetvIrX; 2 – ДНК-маркер O'RangeRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, США)

Fig. 3. Electrophoretic analysis of the amplified fragment in 1.5 % agarose gel: 1 – amplified fragment obtained using specific oligonucleotide primers BetvldH and BetvIrX; 2 – O'RangeRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, USA)

В связи с тем что в пыльце одного дерева экспрессируется несколько изоформ белка Bet v 1, необходимо было среди смеси разнообразных ампликонов выбрать последовательность, соответствующую изоформе Bet v 1.0101, и именно ее использовать в качестве специфического фрагмента, который будет клонирован в экспрессирующий вектор. По литературным данным, Bet v 1.0101 является преобладающей изоформой в пыльцевых экстрактах [1]. С этой целью полученный ПЦР-продукт был очищен и лигирован в полилинкер вектора pJET1.2/blunt как удобной модели, позволяющей клонировать вставку по тупым концам и отбирать клоны исключительно с гибридной плазмидой, так как наличие суицидного гена в исходной плазмиде приводит к элиминации бактериальных клеток с плазмидной ДНК без вставки. Таким образом, преимущество данного вектора заключается в упрощении процессов клонирования (исключается этап рестрикции и очистки фрагментов) и отбора клеточных клонов с гибридной плазмидой. Достоинством

Birch mRNA for pollen allergen Betv1

Sequence ID: **X15877.1** Length: **691** Number of Matches: **1**

Range 1: 49 to 528 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
887 bits(480)	0.0	480/480(100%)	0/480(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGGGTGTTTTCAATTACGAAACTGAGACCACCTCTGTTATCCCAGCAGCTCGACTGTTC	60		
Sbjct 49	ATGGGTGTTTTCAATTACGAAACTGAGACCACCTCTGTTATCCCAGCAGCTCGACTGTTC	108		
Query 61	AAGGCCCTTATCCTTGATGGCGATAATCTCTTCCAAAGGTTGCACCCCAAGCCATTAGC	120		
Sbjct 109	AAGGCCCTTATCCTTGATGGCGATAATCTCTTCCAAAGGTTGCACCCCAAGCCATTAGC	168		
Query 121	AGTGTGAAAACATTGAAGGAAATGGAGGGCCTGGAACCATTAAGAAGATCAGCTTTCCC	180		
Sbjct 169	AGTGTGAAAACATTGAAGGAAATGGAGGGCCTGGAACCATTAAGAAGATCAGCTTTCCC	228		
Query 181	GAAGGCTTCCCTTTCAAGTACGTGAAGGACAGAGTTGATGAGGTGGACCACACAACTTC	240		
Sbjct 229	GAAGGCTTCCCTTTCAAGTACGTGAAGGACAGAGTTGATGAGGTGGACCACACAACTTC	288		
Query 241	AAATACAATTACAGCGTGATCGAGGGCGGTCCCATAGGCGACACATTGGAGAAGATCTCC	300		
Sbjct 289	AAATACAATTACAGCGTGATCGAGGGCGGTCCCATAGGCGACACATTGGAGAAGATCTCC	348		
Query 301	AACGAGATAAAGATAGTGGCAACCCCTGATGGAGGATCCATCTTGAAGATCAGCAACAAG	360		
Sbjct 349	AACGAGATAAAGATAGTGGCAACCCCTGATGGAGGATCCATCTTGAAGATCAGCAACAAG	408		
Query 361	TACCACACCAAGGTGACCATGAGGTGAAGGCAGAGCAGGTTAAGGCAAGTAAAGAAATG	420		
Sbjct 409	TACCACACCAAGGTGACCATGAGGTGAAGGCAGAGCAGGTTAAGGCAAGTAAAGAAATG	468		
Query 421	GGCGAGACACTTTTGAGGGCCGTTGAGAGCTACCTCTTGGCACACTCCGATGCCTACAAC	480		
Sbjct 469	GGCGAGACACTTTTGAGGGCCGTTGAGAGCTACCTCTTGGCACACTCCGATGCCTACAAC	528		

Рис. 4. Результаты поиска идентичных нуклеотидных последовательностей в NCBI

Fig. 4. Search results of identical nucleotide sequences in NCBI

коммерческого набора для клонирования, включающего плазмиду pJET1.2/blunt, является наличие праймеров для секвенирования, комплементарных плазмидной ДНК, и описание условий постановки секвенирующей реакции. С использованием секвенирования определяли изоформы гена Bet v 1, содержащиеся в полученных рекомбинантных плазмидах pJET1.2/blunt (рис. 4). Среди гибридных плазмид была отобрана плазида, которая в качестве вставки содержала изоформу Bet v 1.0101 главного аллергена пыльцы березы.

Результаты секвенирования доказывают, что полученная нуклеотидная последовательность идентична последовательности изоформы Bet v 1.0101 (идентификационный номер в GenBank X15877.1).

К настоящему времени известно достаточно большое количество причин, приводящих к отсутствию или малоэффективной экспрессии клонированных гетерологичных генов в прокариотической системе [21]. Одной из них может быть наличие в клонированной последовательности растительной клетки редко встречающихся у *Escherichia coli* кодонов. Наличие таких триплетов может привести к преждевременной терминации трансляции и/или к снижению ее эффективности.

На следующем этапе был проведен анализ частоты встречаемости редких для *Escherichia coli* аминокислотных кодонов в составе фрагмента гена, кодирующего данную изоформу белка. Известно, что различия в частоте встречаемости синонимичных кодонов в прокариотических и эукариотических клетках также могут значительно влиять на уровень экспрессии клонированных генов [25]. Наиболее редко встречающимися кодонами в *Escherichia coli* являются AGG/CGA/AGA (Arg, аргинин), CTA (Leu, лейцин), CCC (Pro, пролин), ATA (Ile, изолейцин) и GGA (Gly, глутамин). Частота редких для *Escherichia coli* кодонов была проанализирована при помощи интерактивной формы на сайте molbiol.ru и базы данных Codon Usage Database [26, 27]. Установлено, что структурная часть гена, кодирующего Bet v 1.0101, содержит 14 редко встречающихся в *Escherichia coli* изоакцепторных кодонов: три триплета, кодирующих аргинин (AGG/CGA/AGA, частота встречаемости 2,6; 4,1; 4,5 на 1000 соответственно), три триплета, кодирующих пролин (CCC, частота встречаемости 5,6 на 1000), три триплета, кодирующих изолейцин (ATA, частота встречаемости 8,3 на 1000) и пять триплетов, кодирующих глицин (GGA, частота встречаемости 10,7 на 1000) (рис. 5).

Анализ показал, что редкие для *Escherichia coli* кодоны в клонированной последовательности распределены равномерно. На рис. 5 видно, что среди 160 триплетов белка 14 составляют редкие кодоны, причем в двух случаях наблюдается tandemное расположение некоторых кодонов. Доля редких триплетов составляет 8,75 %. Для оценки уровня экспрессии гена в гетерологичной системе часто используется такой параметр, как индекс адаптации кодонов (CAI – codon adaptation index – CAI). Значение CAI, рассчитанное на основе кодового состава у *E. coli* с помощью online ресурса www.biologicscorp.com, для клонированной последовательности в данном случае составляет 0,57, что характерно для белков со средним уровнем экспрессии.

На следующем этапе полученный на матрице гибридной плазмидной ДНК pJET-Bet v 1 фрагмент гена, кодирующий аллерген Bet v 1.0101, был очищен, обработан рестриктазами HindIII

```

1 atgggtgttt tcaattacga aactgagacc acctctgtta tcccagcagc
51 tcgactgttc aaggccttta tccttgatgg cgataatctc ttccaaagg
101 ttgcacccca agccattagc agtgttgaaa acattgaaag aaatggaggg
151 cctgggaacca ttaagaagat cagctttccc gaaggttcc ctttcaagta
201 cgtgaaggac agagtgtgat aggtggacca cacaaacttc aaatacaatt
251 acagcgtgat cgagggcggt cccataggcg acacattgga gaagatctcc
301 aacgagataa agatagtggc aaccctgat ggaggatcca tcttgaagat
351 cagcaacaag taccacacca aaggtgacca tgaggtgaag gcagagcagg
401 ttaaggcaag taaagaaatg ggcgagacac ttttgagggc cgttgagagc
451 tacctcttgg cacactccga tgctacaac

```

Рис. 5. Нуклеотидная последовательность структурной части гена, кодирующего Bet v 1.0101 (цветом выделены редко встречающиеся в *Escherichia coli* кодоны)

Fig. 5. Nucleotide sequence of the structural part of the gene encoding Bet v 1.0101 (codons rarely found in *Escherichia coli* are highlighted in color)

и XhoI и лигирован в полилинкер экспрессирующего вектора pJC40. Использование именно этой плазмиды объясняется рядом преимуществ. Одним из них является небольшой размер вектора (2402 п. о.), что способствует субклонированию больших вставок. Важную роль играет присутствие в клетках в большом количестве копий плазмиды, что оказывает значительное влияние на результативность эксперимента. Экспрессия белка в pJC40 осуществляется под контролем промотора РНК-полимеразы Т7, который широко используется для эффективной и специфичной экспрессии клонированных генов в прокариотической системе. Кроме того, данный вектор содержит участок, кодирующий гистиридиновый «хвост», который при добавлении к целевому полипептиду позволяет значительно облегчить его выделение и очистку. Для очистки таких белков чаще всего используется металл-хелатная хроматография [19].

Трансформированные лигазной смесью клетки *E. coli*, штамм XLBlue, выращивали при +37 °С на твердой питательной среде, содержащей ампициллин в концентрации 50 мкг/мл.

После выделения плазмидной ДНК проведен последовательный рестрикционный анализ по сайтам рестрикции, узнаваемым эндонуклеазами HindIII и XhoI, HindIII и SmaI с целью подтверждения наличия вставки специфической нуклеотидной последовательности. Использование фермента SmaI обусловлено наличием соответствующего сайта рестрикции в экспрессирующем векторе pJC40 и его отсутствием в плазмиде pJET1.2/blunt. На рис. 6 показаны результаты рестрикции гибридной плазмиды pJC40-Bet v 1.

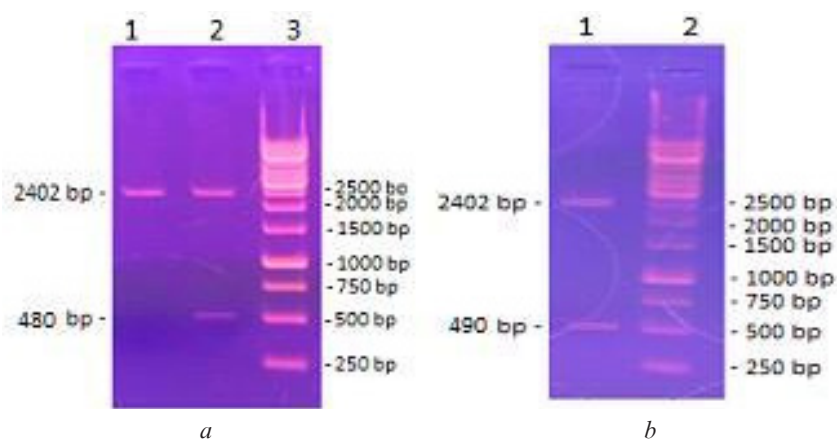


Рис. 6. Электрофоретический анализ в 1 %-ном агарозном геле продуктов рестрикции рекомбинантной плазмиды pJC40-Bet v 1 рестриктазами HindIII и XhoI (a), HindIII и SmaI (b) (a: 1 – линейная форма исходной плазмиды pJC40; 2 – продукты рестрикции гибридной плазмиды pJC40-Bet v 1; 3 – ДНК-маркер GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, США); b: 1 – продукты рестрикции гибридной плазмиды pJC40-Bet v 1; 2 – ДНК-маркер GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, США))

Fig. 6. Electrophoretic analysis in 1 % agarose gel of restriction products of recombinant plasmid pJC40-Bet v 1 by HindIII and XhoI (a), HindIII and SmaI (b) restrictases (a: 1 – linear form of the original plasmid pJC40; 2 – restriction products of hybrid plasmid pJC40-Bet v 1; 3 – DNA-marker GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, USA); b: 1 – restriction products of hybrid plasmid pJC40-Bet v 1; 2 – GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, USA))

Рестрикционный анализ показал наличие специфической вставки клонированного фрагмента ДНК в составе полученной рекомбинантной плазмиды. Размеры полученных фрагментов с учетом положения сайтов рестрикции, узнаваемых эндонуклеазами HindIII и XhoI, HindIII и SmaI в векторе, составили 480 и 490 п. о. соответственно. Таким образом, получена экспрессирующая векторная конструкция pJC40-Bet v 1, которая в качестве вставки содержит последовательность, кодирующую наиболее распространенную изоформу главного аллергена пыльцы березы Bet v 1.0101.

Заключение. В настоящее время во всем мире отмечается интенсивный рост аллергических заболеваний. Использование рекомбинантных технологий и методов молекулярного клонирования в аллергологии позволило определить белковые компоненты, отвечающие за формирование аллергической реакции. В частности, установлено, что мажорный белок пыльцы березы Bet v 1

является одной из основных причин весеннего поллиноза. Единственным лечением данной патологии на сегодняшний день является АСИТ. Для предотвращения побочных эффектов и повышения эффективности АСИТ при производстве аллергенных компонентов, необходимых для данного вида терапии, применяются рекомбинантные технологии. С помощью синтеза рекомбинантных аллергенов стало возможным получение охарактеризованного пептида с известными аллергенными, иммуногенными и толерогенными свойствами. При этом его производство не зависит от нативного источника аллергена. Для наработки такого рекомбинантного аллергенного компонента необходимо использовать экспрессирующие векторные системы. Кроме того, при синтезе белка немаловажно учитывать влияние различных факторов на уровень экспрессии целевого пептида. К таким факторам относится наличие редких для используемой системы экспрессии кодонов. В ходе исследования был проведен анализ частоты встречаемости редких для *Escherichia coli* кодонов в структурной части клонированного гена с целью дальнейшей оценки корреляции с уровнем экспрессии кодируемого белка. В результате проведенной работы была получена векторная конструкция рJC40- Bet v 1, которая содержит ген, кодирующий изоформу белка Bet v 1 – Bet v 1.0101.

Результаты исследования планируется использовать в процессе получения рекомбинантного полипептида Bet v 1.0101, изучения его свойств и возможности применения в диагностике аллергических заболеваний и в АСИТ.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Республики Беларусь (распоряжение Президента Республики Беларусь от 1 марта 2022 г. № 45рп «О предоставлении грантов Президента Республики Беларусь на 2022 год»).

Acknowledgements. This research was supported by the grant of the President of the Republic of Belarus (Order of the President of the Republic of Belarus of March 1, 2022 № 45rp «On granting grants of the President of the Republic of Belarus for the year 2022»).

Список использованных источников

1. Proteomic profiling of birch (*Betula verrucosa*) pollen extracts from different origins / A. Erler [et al.] // *Proteomics*. – 2011. – Vol. 11, N 8. – P. 1486–1498. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000624>
2. Comparative proteomics of common allergenic tree pollens of birch, alder, and hazel / B. Darnhofer [et al.] // *Allergy*. – 2021. – Vol. 76, N 6. – P. 1743–1753. <https://doi.org/10.1111/all.14694>
3. Ligand binding of PR-10 proteins with a particular focus on the Bet v 1 allergen family / L. Aglas [et al.] // *Curr. Allergy Asthma Rep.* – 2020. – Vol. 20, N 7. – P. 25. <https://doi.org/10.1007/s11882-020-00918-4>
4. Molecular aspects of allergens and allergy / R. Valenta [et al.] // *Adv. Immunol.* – 2018. – Vol. 138. – P. 195–256. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2018.03.002>
5. PR-белки с рибонуклеазной активностью и устойчивостью растений к патогенным грибам / Е. А. Филипенко [и др.] // *Вавилов. журн. генетики и селекции*. – 2013. – Т. 17, № 2. – С. 326–334.
6. Conformational flexibility differentiates naturally occurring Bet v 1 isoforms / S. Grutsch [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 18, N 6. – Art. 1192. <https://doi.org/10.3390/ijms18061192>
7. Proteomic analysis of the major birch allergen Bet v 1 predicts allergenicity for 15 birch species / M. F. Schenk [et al.] // *J. Proteomics*. – 2011. – Vol. 74, N 8. – P. 1290–1300. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.03.021>
8. Allergen Nomenclature [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.allergen.org/index.php>. – Date of access: 30.09.2022.
9. Tree pollen allergens-an update from a molecular perspective / C. Asam [et al.] // *Allergy*. – 2015. – Vol. 70, N 10. – P. 1201–1211. <https://doi.org/10.1111/all.12696>
10. Ligand recognition of the major birch pollen allergen Bet v 1 is isoform dependent / C. Seutter von Loetzen [et al.] // *PLoS ONE*. – 2015. – Vol. 10, N 6. – P. e0128677. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128677>
11. Valenta, R. Recombinant allergy vaccines based on allergen-derived B cell epitopes / R. Valenta, R. Campana, V. Niederberger // *Immunol. Lett.* – 2017. – Vol. 189. – P. 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.04.015>
12. Мировые стандарты аллерген-специфической иммунотерапии. Научный обзор [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.allergen.ru/images/staloral_10.pdf. – Дата доступа: 30.09.2022.
13. 111 years of allergen-immunotherapy: A long and successful history of the only available disease-modifier in allergic diseases / J. Gutermuth [et al.] // *Allerg. Select.* – 2022. – Vol. 6, N 1. – P. 248–258. <https://doi.org/10.5414/ALX02330E>
14. Birch pollen allergy in Europe / T. Biedermann [et al.] // *Allergy*. – 2019. – Vol. 74, N 7. – P. 1237–1248. <https://doi.org/10.1111/all.13758>
15. Recombinant allergens for immunotherapy: state of the art / Y. Zhernov [et al.] // *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* – 2019. – Vol. 19, N 4. – P. 402–414. <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000536>
16. Epitope specificity determines cross-protection of a AIT-induced IgG4 antibody / E. Gadermaier [et al.] // *Allergy*. – 2016. – Vol. 71, N 1. – P. 36–46. <https://doi.org/10.1111/all.12710>
17. Tscheppe, A. Recombinant allergens in structural biology, diagnosis, and immunotherapy / A. Tscheppe, H. Breiteneder // *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 2017. – Vol. 172, N 4. – P. 187–202. <https://doi.org/10.1159/000464104>

18. Isolation of total RNA from pollens / K. Bijli [et al.] // *Preparat. Biochem. Biotechnol.* – 2001. – Vol. 31, N 2. – P. 155–162. <https://doi.org/10.1081/PB-100103381>
19. Clos, J. pJC20 and pJC40 – two high-copy-number vectors for T7 RNA polymerase-dependent expression of recombinant genes in *Escherichia coli* / J. Clos, S. Brandau // *Protein Expr. Purif.* – 1994. – Vol. 5, N 2. – P. 133–137. <https://doi.org/10.1006/prep.1994.1020>
20. Sanger, F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1977. – Vol. 74, N 12. – P. 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
21. Tripathi, N. K. Recent developments in bioprocessing of recombinant proteins: expression hosts and process development / N. K. Tripathi, A. Shrivastava // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2019. – Vol. 7. – Art. 420. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00420>
22. Varma, A. Plant genomic DNA isolation: an art or a science / A. Varma, H. Padh, N. Shrivastava // *Biotechnol. J.* – 2007. – Vol. 2, N 3. – P. 386–392. <https://doi.org/10.1002/biot.200600195>
23. Рябушкина, Н. А. Специфика выделения ДНК из растительных объектов / Н. А. Рябушкина, М. Е. Омашева, Н. Н. Галиакбаров // *Биотехнология. Теория и практика.* – 2012. – № 2. – С. 9–26.
24. Сравнительный анализ двух методов выделения РНК из растительного сырья / О. Ю. Пархомчук [и др.] // *Современные проблемы инфекционной патологии человека : сб. науч. тр. / под ред. В. А. Горбунова.* – Минск, 2019. – Вып. 12. – С. 237–238.
25. Brule, C. Synonymous codons: choose wisely for expression / C. Brule, E. J. Grayhack // *Trends Genet.* – 2017. – Vol. 33, N 4. – P. 283–297. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.02.001>
26. MolBiol.ru [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.molbiol.ru/scripts/01_11.html. – Дата доступа: 30.09.2022.
27. Codon Usage Database [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.kazusa.or.jp/codon/>. – Date of access: 30.09.2022.

References

1. Erler A., Hawranek T., Krückemeier L., Asam C., Egger M., Ferreira F., Briza P. Proteomic profiling of birch (*Betula verrucosa*) pollen extracts from different origins. *Proteomics*, 2011, vol. 11, no. 8, pp. 1486–1498. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000624>
2. Darnhofer B., Tomin T., Liesinger L., Schittmayer M., Tomazic P. V., Birner-Gruenberger R. Comparative proteomics of common allergenic tree pollens of birch, alder, and hazel. *Allergy*, 2021, vol. 76, no. 6, pp. 1743–1753. <https://doi.org/10.1111/all.14694>
3. Aglas L., Soh W. T., Kraiem A., Wenger M., Brandstetter H., Ferreira F. Ligand binding of PR-10 proteins with a particular focus on the Bet v 1 allergen family. *Current Allergy and Asthma Reports*, 2020, vol. 20, no. 7, p. 25. <https://doi.org/10.1007/s11882-020-00918-4>
4. Valenta R., Karaulov A., Niederberger V., Gattlinger P., van Hage M., Flicker S. [et al.]. Molecular aspects of allergens and allergy. *Advances in Immunology*, 2018, vol. 138, pp. 195–256. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2018.03.002>
5. Filipenko E. A., Kochetov A. V., Kanayama Y., Malinovskii V. I., Shumnyi V. K. Association between PR proteins with ribonuclease activity and plant resistance against pathogenic fungi. *Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii* [Vavilov journal of genetics and breeding], 2013, vol. 17, no. 2, pp. 326–334 (in Russian).
6. Grutsch S., Fuchs J. E., Ahammer L., Kamenik A. S., Liedl K. R., Tollinger M. Conformational flexibility differentiates naturally occurring Bet v 1 isoforms. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, vol. 18, no. 6, art. 1192. <https://doi.org/10.3390/ijms18061192>
7. Schenk M. F., Cordewener J. H., America A. H., Peters J., Smulders M. J., Gilissen L. J. Proteomic analysis of the major birch allergen Bet v 1 predicts allergenicity for 15 birch species. *Journal of Proteomics*, 2011, vol. 74, no. 8, pp. 1290–1300. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.03.0218>
8. *Allergen Nomenclature*. Available at: <http://www.allergen.org/index.php> (accessed 30.09.2022).
9. Asam C., Hofer H., Wolf M., Aglas L., Wallner M. Tree pollen allergens—an update from a molecular perspective. *Allergy*, 2015, vol. 70, no. 10, pp. 1201–1211. <https://doi.org/10.1111/all.12696>
10. Seutter von Loetzen C., Jacob T., Hartl-Spiegelhauer O., Vogel L., Schiller D., Spörlein-Güttler C., Schobert R., Vieths S., Hartl M. J., Rösch P. Ligand recognition of the major birch pollen allergen Bet v 1 is isoform dependent. *PLoS ONE*, 2015, vol. 10, no. 6, p. e0128677. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128677>
11. Valenta R., Campana R., Niederberger V. Recombinant allergy vaccines based on allergen-derived B cell epitopes. *Immunology Letters*, 2017, vol. 189, pp. 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.04.015>
12. *World standards of allergen-specific immunotherapy. Scientific review*. Available at: http://www.allergen.ru/images/staloral_10.pdf (accessed 30.09.2022) (in Russian).
13. Guterma 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, vol. 6, no. 1, pp. 248–258. <https://doi.org/10.5414/ALX02330E>
14. Biedermann T., Winther L., Till S. J., Panzner P., Knulst A., Valovirta E. Birch pollen allergy in Europe. *Allergy*, 2019, vol. 74, no. 7, pp. 1237–1248. <https://doi.org/10.1111/all.13758>
15. 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, vol. 19, no. 4, pp. 402–414. <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000536>

16. Gadermaier E., James L. K., Shamji M. H., Blatt K., Fauland K., Zieglmayer P. [et al.]. Epitope specificity determines cross-protection of a SIT-induced IgG4 antibody. *Allergy*, 2016, vol. 71, no. 1, pp. 36–46. <https://doi.org/10.1111/all.12710>
17. Tscheppe A., Breiteneder H. Recombinant allergens in structural biology, diagnosis, and immunotherapy. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2017, vol. 172, no. 4, pp. 187–202. <https://doi.org/10.1159/000464104>
18. Bijli K. M., Singh B. P., Sridhara S., Arora N. Isolation of total RNA from pollens. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2001, vol. 31, no. 2, pp. 155–162. <https://doi.org/10.1081/PB-100103381>
19. Clos J., Brandau S. pJC20 and pJC40 – two high-copy-number vectors for T7 RNA polymerase-dependent expression of recombinant genes in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 1994, vol. 5, no. 2, pp. 133–137. <https://doi.org/10.1006/prep.1994.1020>
20. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977, vol. 74, no. 12, pp. 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
21. Tripathi N. K., Shrivastava A. Recent developments in bioprocessing of recombinant proteins: expression hosts and process development. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2019, vol. 7, art. 420. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00420>
22. Varma A., Padh H., Shrivastava N. Plant genomic DNA isolation: an art or a science. *Biotechnology Journal*, 2007, vol. 2, no. 3, pp. 386–392. <https://doi.org/10.1002/biot.200600195>
23. Ryabushkina N. A., Omasheva M. E., Galiakparov N. N. Specifics of DNA extraction from plant objects. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*, 2012, no. 2, pp. 9–26 (in Russian).
24. Parkhomchuk O. Yu., Zverko V. V., Grigor'eva E. E., Fomina E. G. Comparative analysis of two methods for RNA isolation from plant raw materials. *Sovremennye problemy infektsionnoi patologii cheloveka: sbornik nauchnykh trudov. Vypusk 12* [Modern problems of infectious morbidity in humans: a collection of scientific papers. Iss. 12]. Minsk, 2019, pp. 237–238 (in Russian).
25. Brule C. E., Grayhack E. J. Synonymous codons: choose wisely for expression. *Trends in Genetics*, 2017, vol. 33, no. 4, pp. 283–297. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.02.001>
26. *MolBiol.ru*. Available at: http://www.molbiol.ru/scripts/01_11.html (accessed 30.09.2022) (in Russian).
27. *Codon Usage Database*. Available at: <http://www.kazusa.or.jp/codon/> (accessed 30.09.2022).

Информация об авторах

Пархомчук Ольга Юрьевна – аспирант, мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: olgaparhom4uk@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0003-3984-393X>

Фомина Елена Георгиевна – д-р биол. наук, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: feg1@tut.by. <https://orcid.org/0000-0003-3028-1176>

Григорьева Елена Евгеньевна – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: grigus@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0003-3919-0625>

Information about the authors

Olga Yu. Parkhomchuk – Postgraduate student, Junior Researcher. Republican Scientific and Practical Center of Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: olgaparhom4uk@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0003-3984-393X>

Elena G. Fomina – D. Sc. (Biol.), Head of the Laboratory. Republican Scientific and Practical Center of Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: feg1@tut.by. <https://orcid.org/0000-0003-3028-1176>

Elena E. Grigorieva – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Leading Researcher. Republican Scientific and Practical Center of Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: grigus@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0003-3919-0625>