

ПОЛУЧЕНИЕ И ОЦЕНКА СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОГО АНАЛОГА МАЖОРНОГО АЛЛЕРГЕНА ПЫЛЬЦЫ БЕРЕЗЫ Bet v 1

А.Е. Павлов^{1,2}, Н.А. Сейлиева¹, О.Ю. Мухортых¹, В.Е. Стефанов²

¹ ООО «Вега» Группа компаний «Алкор био», г. Санкт-Петербург

² Санкт-Петербургский Государственный университет

Ключевые слова: аллергодиагностика, пыльца березы, рекомбинантный аллерген, Bet v 1

Цель работы. Для внедрения покомпонентной аллергодиагностики в лабораторную практику необходимо создать протоколы получения, очистки и верификации свойств синтетических аллергенов. Мажорный белок пыльцы березы Bet v 1, являющийся представителем суперсемейства PR-10, представляет значительный интерес благодаря высокой частоте случаев сенсибилизации и проявлению кросс-реактивных свойств.

Материалы и методы. Для получения синтетического белка были применены методы клонирования ДНК с последующей экспрессией в культуре клеток *E. coli*. Очистка выполнена методом металл-аффинной хроматографии. Оценка иммунохимических свойств проведена в аллергосорбентном тесте, ИФА-анализе и лайн-блоте.

Результаты. В ходе работы нами получен высокопродуктивный бактериальный штамм *E. coli*, содержащий экспрессионную конструкцию мажорного аллергена пыльцы березы — белок Bet v 1. Произведена оценка его физико-химических и иммунологических свойств в различных тест-системах с использованием референсных препаратов и панели сывороток.

Заключение. Показано, что полученный синтетический аналог белка Bet v 1 может быть использован для тестирования наличия аллерген-специфических иммуноглобулинов класса E в образцах сыворотки крови. Данный аллергенный компонент может быть применен для покомпонентной оценки профиля сенсибилизации пациента.

Введение

Специалисты в области аллергологии во всем мире отмечают быстрый рост аллергической заболеваемости. Особенно ярко эта динамика наблюдается в развитых странах [1].

Первым шагом к облегчению аллергических состояний и активной профилактики заболевания является выявление агента, вызывающего реакцию гиперчувствительности. Правильная постановка диагноза требует проведения комплекса мероприятий, который включает в себя последовательное исключение контактов с потенциальными аллергенами, кожные тесты и диагностика *in vitro* [2]. Данная клиническая практика сформировалась по причине комплексной природы аллергического ответа и невысокой специфичности каждого подхода в отдельности. Лабораторная диагностика *in vitro* аллерген-специфической сенсибилизации состоит, как правило, в измерении уровней иммуноглобули-

нов класса E (IgE) к специфическим антигенам по принципу иммунохимического анализа.

Несмотря на уже почти полувековую историю аллергодиагностики *in vitro*, ее результаты до сих пор носят для врачей-аллергологов скорее рекомендательный характер. Причиной тому невысокая специфичность анализа и наличие расхождений с результатами кожных проб [3]. Одним из источников этой проблемы является применение в диагностических тест-системах компонентов, полученных из натуральных, природных источников. Экстракты аллергенов плохо поддаются стандартизации из-за их естественной вариабельности в природных источниках и многостадийного процесса получения. Белки, вызывающие аллергические реакции, могут быть выделены различным способом и из разнообразного материала (пыльца, фрукты, шерсть животных и т. п.), но иметь сходную структуру, обусловленную эволюционной консервативностью их функций [4].

С развитием техники молекулярного клонирования и рекомбинантных технологий была начата интенсивная работа по поиску белковых компонентов, обуславливающих аллергенность различных веществ, для получения синтетических

Адрес для корреспонденции

Павлов А.Е.

E-mail: apavlov@alkorbio.ru

аналогов. Данные белки могут быть использованы для детальной оценки профиля чувствительности пациента к конкретному аллергену, а также проведения аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ). Замещение натуральных экстрактов на панели рекомбинантных аллергенных компонентов приведет к улучшению аналитических параметров тест-систем и может вывести алергодиагностику *in vitro* на качественно новый уровень [7, 8].

За два последних десятилетия описано несколько белковых суперсемейств, представителей которых можно обнаружить в целом спектре природных источников.

Так, большой интерес представляет мажорный аллерген пыльцы березы – Bet v 1, который относится к суперсемейству PR-10 (pathogenesis related protein). Данный белок обуславливает развитие специфической сенсибилизации более чем у 95% пациентов, страдающих от аллергии на пыльцу березы [5], которая, в свою очередь, является одной из самых распространенных причин развития ингаляционных форм аллергии. Белки суперсемейства PR-10 можно обнаружить в таких природных источниках, как пыльца березы, пыльца лещины, яблоко, персик, морковь, арахис, соя, киви, сельдерей. Высокая гомологичность белков обуславливает их значительное иммуногенное сходство, что является причиной проявления иммунологической кросс-реактивности аллергенов различной природы [6].

Таким образом, существует необходимость разработки технологии получения и очистки синтетической формы мажорного аллергена пыльцы березы Bet v 1 и валидации ее иммунологических свойств для применения в диагностических тест-системах.

К настоящему моменту было идентифицировано более 30 изоформ белка Bet v 1 [9], имеющих высокую степень гомологии. Масс-спектрометрическая оценка нативного варианта белка не выявила наличия пост-трансляционных модификаций, таких как гликозилирование и дезамидирование [10].

В рамках данного исследования создана высокоэффективная экспрессионная конструкция, оптимизированы протоколы очистки белка, изучены условия перевода белка в растворимую форму, подобраны условия биотинилирования и лиофилизации, проведена серия экспериментов по оценке физико-химических и иммунологических свойств белка в различных системах.

Материалы и методы

1. Клонирование, экспрессия и очистка

Клонирование

Генетическая конструкция, содержащая оптимизированную последовательность для гетероло-

гичной экспрессии белка Bet v 1A (P15494, Uniprot) в бактериальной системе, рестрикционные сайты и His-tag, была синтезирована компанией GenScript. Полученная ДНК была переклонирована в экспрессионный вектор pQE-30 (Qiagen), содержащий T5 промотер, под регуляцией *lac*-оперонов, и имеющий ген устойчивости к ампициллину. Правильность ориентации конструкции в векторе была подтверждена проведением полимеразной цепной реакции с внутренним праймером.

Экспрессия

Трансформация экспрессионной конструкции была выполнена в подготовленные электрокомпетентные клетки *E. coli* штамма M15[pREP4] (Qiagen). Отбор клонов был произведен на селективной среде с ампициллином.

Клетки M15 pQE30[Bet v 1] растили в среде Luria Broth (LB) на 37 °C, содержащей 100 мкг/мл ампициллина. Экспрессия белка была индуцирована добавлением изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ) (AppliChem) до концентрации 0,5 mM после достижения оптической плотности культуры 0,8 при длине волны 600 нм.

Появление и накопление рекомбинантного белка в лизате клеток контролировалось электрофоретически в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (ПААГ) [11].

После 4-часовой индукции клетки были сконцентрированы центрифугированием и подвергнуты ультразвуковой обработке на холоде (Bandelin Sonopuls 3100).

Полученный лизат отцентрифугирован при 10 000×g в течение 10 мин для разделения растворенного и нерастворенного компонентов. Обе фракции были проанализированы в ПААГ.

Осадок лизата, содержащий синтезированный белок, был растворен в Трис-буфере (50 mM Трис-HCl, 500 mM NaCl, 500 mM имидазол, pH=8,0) с присутствием 8 M мочевины.

Очистка

Очистка белка производилась методом жидкостной хроматографии (FPLC, АКТА Explorer, Pharmacia) на аффинной колонке с Ni-NTA сефарозой (His-trap, GE Health Care) в денатурирующих условиях. Элюция проводилась 500 mM имидазолом и контролировалась спектрофотометрически при длине волны 280 нм.

2. Гель-электрофорез

Анализ состава фракций, а также степень очистки белка были произведены электрофоретически в 15% ПААГ и с окраской Coomassie R-250. Фракции, содержащие наибольшие количества чистого препарата, были объединены.

3. Иммуноблот

Для оценки иммунологических свойств полученного препарата осадок клеточного лизата и очищенные фракции белка были перенесены на нитроцеллюлозную мембрану при помощи прибора для полусухого переноса (Semi-dry, Хеликон). Параметры тока установлены из расчета 2 мА на 1 см² мембраны, перенос проводили в течение 45 мин. После переноса полоски нитроцеллюлозной мембраны были прогибридизованы по схеме антиген-специфические антитела – *in vitro* конъюгат антивидового anti-IgE антитела с пероксидазой хрена. В качестве антисыворотки использованы положительные пулированные образцы с уровнем антител к пыльце березы не ниже 3-го класса. Образцы в разведении 1:50 инкубировали при +4 °С в течение 16 ч. Пероксидазная активность выявлялась с использованием преципитирующего субстрата ТМВ-М (Sigma-Aldrich).

4. Аллергосорбентный тест

Сыворотки

Изучение иммунологических свойств синтетического белка выполнено на индивидуальных сыворотках крови 18 пациентов (в возрасте от 2 до 17 лет). Диагноз аллергии на пыльцу березы был поставлен на основе данных анамнеза, положительных результатов кожных проб с использованием экстракта пыльцы березы (ФГУП НПО «Микроген», Ставрополь) и повышенным уровнем аллерген-специфического IgE к пыльце березы, оцененным при помощи анализатора ImmunoCAP 250 (препарат t3, Phadia).

Контрольные сыворотки были получены от 5 здоровых пациентов с низким уровнем общего IgE (тест система «ИФА-общий IgE», Алкор Био) и не имеющих аллерген-специфических IgE к пыльце березы (ImmunoCAP 250, препарат t3, Phadia).

Рекомбинантный белок Bet v 1 в концентрациях 80, 8, 0,8 мкг/мл (50 мМ Трис-НСl с 0,5 М мочевиной) и аллерген экстракта пыльцы березы (Алкор Био) в концентрации 50 мкг/мл (50 мМ Трис-НСl) были сорбированы на фазу микропланшета (Nunc Maxisorb) при +4 °С в течение 16 ч. После ночной сорбции и последующей отмывки проводили инкубацию лунок микропланшета с положительными сыворотками и контрольными образцами в разведении 1:10. Наличие специфического сигнала выявляли после инкубации с конъюгатом анти-IgE-пероксидаза хрена (anti IgE-HRP, Hitachi) и растворимым субстратом ТМБ (Алкор Био). Реакцию останавливали добавлением 0,1 М НСl. Оптическую плотность измеряли на планшетном фотометре Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific) при длине волны 450 нм.

5. Перевод в растворимую форму

Для перевода белка в растворимую форму и последующего биотинилирования было использовано несколько вариантов диализа:

1) Последовательный ступенчатый перевод из 8 М мочевины в буфер, содержащий 50 мМ Трис-НСl, 1 мМ ЭДТА, 150 мМ NaCl, 0,3 М аргинин, рН=8,0, через аналогичные буферы, содержащие 4 М, 2 М и 0,5 М мочевины. Диализ проводили при 100-кратном избытке буфера над образцом в течение 3 ч для каждой ступени.

2) Диализ из 8 М мочевины напрямую в 20 мМ раствор бикарбоната натрия рН=11,2. Диализ проводили при 100-кратном избытке буфера над образцом в течение 16 ч при +4 °С.

Эффективность перевода белка в безмочевинные буферы контролировалась визуально и с последующей оценкой концентрации в ПААГ.

6. Биотинилирование

Для проверки возможности замены биотинилированной формы аллергена березы в «capture» варианте теста *in vitro* на синтетический аллергенный компонент было проведено биотинилирование рекомбинантного белка Bet v 1. Для модификации использован гидроксисукцинимидный эфир биотина (Sigma) в десятикратном молярном избытке. Очистку биотинилированного аллергена от избытка свободного реагента производили на хроматографической колонке HiTrap G-25 (FPLC, АКТА Explorer, Pharmacia). Измерение уровня включения биотина в белок выполнено с использованием комплекта реагентов Pierce Biotin Quantitation Kit (Pierce Biotechnology, Inc.).

7. Иммуноферментный анализ

Биотинилированный рекомбинантный аллерген Bet v 1А тестировали в наборе «АллергоИФА-специфический IgE» (Алкор Био) в концентрации 5 мг/мл. Всего проанализировано 24 сыворотки и проведено сравнение с препаратом биотинилированного экстракта березы (t3 – береза бородавчатая, Алкор Био).

8. Лайн-блот

Оценка иммунологической активности синтетического аллергена по сравнению с референсными препаратами проведена в лайн-блот анализе.

Белковые препараты экстракта пыльцы березы (0,5 мг/мл в фосфатно-солевом буфере, Алкор Био), референсного рекомбинантного аллергена Bet v 1 (Biomay, 20 мкг/мл в воде) и исследуемого синтетического аллергена Bet v 1А (0,2 мг/мл в 20 мМ Na₂CO₃) были нанесены в линиях на нитроцеллюлозную мембрану (0,2 мкм, BioRad) с исполь-

зованием диспенсера IsoFlow™ Dispenser (Image Technology, Inc.). После высушивания мембрану блокировали 3% раствором бычьего сывороточного альбумина и нарезали на полоски для последующей инкубации в индивидуальных ванночках. Образцы инкубировали со специфическими и контрольными сыворотками (27 сывороток в разведении 1:50), а также с буфером без сыворотки при +4 °С в течение 16 ч.

Наличие специфического сигнала выявляли после инкубации с конъюгатом анти-IgE-пероксидаза хрена (anti-IgE-HRP, Hitachi) преципитирующим субстратом ТМВ-М (Sigma-Aldrich). Оценку уровня интенсивности сигнала определяли визуально по 5-балльной шкале.

9. Лиофилизация

Проведено изучение стабильности препарата после лиофилизации. Раствор белка Bet v 1 (2 мг/мл) в 20 мМ бикарбонатном буфере рН=11,2 делили на аликвоты, замораживали в жидком азоте и высушивали в лиофильной сушилке (Alpha Martin Ghrist) в течение 18 ч.

Сухой препарат восстанавливали деионизованной водой, концентрация измерена электрофоретически, проведена оценка сохранения антигенных свойств в лайн-блот анализе.

Результаты и обсуждение

1. Экспрессия и очистка

Синтетическая генная конструкция Bet v 1A была клонирована в вектор pQE-30 и экспрессирована в трансформированном штамме *E. coli* M15[pREP4]. Спустя 4 ч после индукции ИПТГ клетки были сконцентрированы и лизированы. Электрофорез в денатурирующих условиях показал высокую продуктивность клона и накопление рекомбинантного белка в нерастворимой форме. Средняя продуктивность культуры составила около 80 мкг белка на 1 мл культуры.

После растворения белка в буфере с хаотропным агентом была проведена очистка на металл-аффинной колонке. Элюция имидазолом и последующий электрофоретический анализ фракций показали наличие чистого препарата в высокой концентрации и с ожидаемой молекулярной массой ≈16 кДа (см. рисунок, № 1–5).

2. Иммуноблот

Первичная оценка иммунологических свойств синтетического аллергена выполнена методом иммунного блоттинга. В качестве положительного контроля использован препарат экстракта пыльцы березы (Алкор Био) и рекомбинантный аллерген Bet v 1 (BioMay). Показано, что положительная

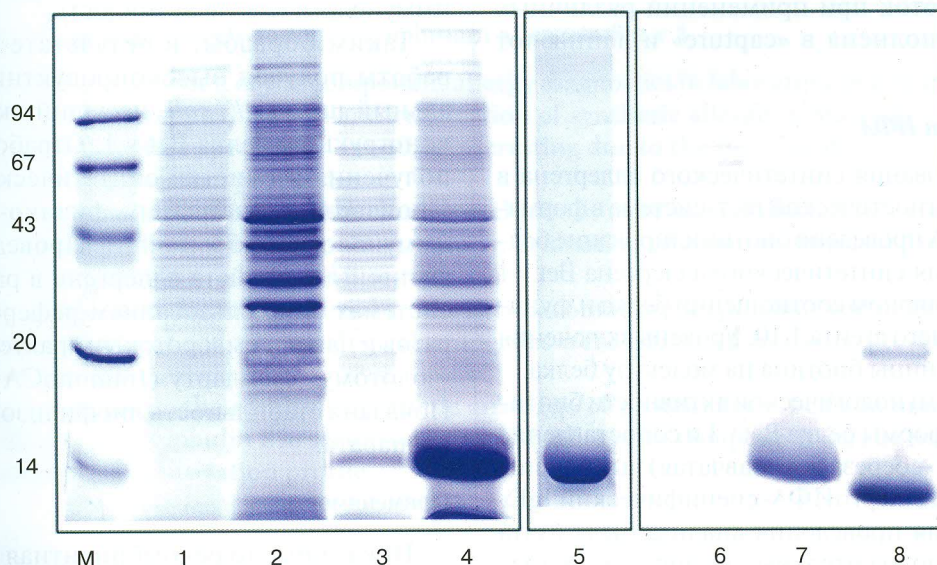


Рисунок. ПААГ 12%. Окраска Coomassie

М – маркер молекулярной массы LMW.

Культуры клеток *E. coli* M15[pREP4]:

1 – супернатант до индукции;

2 – нерастворимый осадок до индукции;

3 – супернатант после индукции;

4 – нерастворимый осадок после индукции;

5 – экспрессированный белок после хроматографической очистки;

6 – иммуноблот нерастворимого осадка культуры до индукции;

7 – иммуноблот нерастворимого осадка культуры после индукции;

8 – иммуноблот препарата экстракт березы (13, Алкор Био).

пулированная сыворотка пациентов с чувствительностью к пыльце березы специфически реагирует как с природным экстрактом, так и рекомбинантным белком (см. рисунок, № 6–8). Инкубация с отрицательным пулом не приводит к развитию специфической окраски.

3. Растворимость

Для перевода белка в растворимую форму использовано 2 подхода — ступенчатый диализ в растворах с понижением хаотропного агента в присутствии аргинина и резкий перевод раствора белка в буфер с высоким значением рН.

Оба подхода показали одинаковую эффективность. Доля растворенного белка в буферах без хаотропного агента в обоих случаях идентична (оценка произведена электрофоретически). При меньших трудозатратах второй способ был признан предпочтительным.

4. Оценка иммунохимических свойств

Аллергосорбентный тест

В ходе проведенного анализа в формате аллергосорбентного теста была показана 100% специфичность результатов при параллельной постановке экстракта и синтетического белка на выборке индивидуальных пациентов. Более точная оценка корреляции классов сенсibilизации для положительных сывороток при применении различных препаратов выполнена в «capture» и лайн-блот вариантах теста.

«Capture» формат ИФА

Для использования синтетического аллергена в стандартной диагностической тест-системе в формате «capture» ИФА проведено биотинилирование белка. Модификация синтетического аллергена Bet v 1 выполнена в молярном соотношении белка и функционализирующего агента 1:10. Уровень включения составил 2,1 единицы биотина на молекулу белка.

Изучение иммунологической активности биотинилированной формы белка Bet v 1 и сопоставление с экстрактом (t3 — береза бородавчатая) выполнены в тест-системе «АллергоИФА-специфический IgE» (Алкор Био). Для проведения анализа была взята выборка из 17 положительных сывороток, в диапазоне классов чувствительности от 2- до 5-го и 16 отрицательных образцов.

Проведенный анализ показал полное совпадение результатов по отрицательным образцам и незначительные расхождения среди положительных, но не более одного класса в 20% сывороток.

Лайн-блот

Для проведения исследований иммунохимических свойств Bet v 1 на объемной выборке индиви-

дуальных сывороток пациентов использован метод лайн-блот.

Проведены параллельные исследования 27 образцов, охарактеризованных в тест-системе ImmunoCAP 250 (препарат экстракта пыльцы березы t3 и аллергенного компонента Bet v 1 t215, Phadia), определены их классы. При сопоставлении с результатами анализа сывороток в лайн-блоте на препаратах — экстракт пыльцы березы (Алкор Био), синтетическом белке Bet v 1 (Bioma) и исследуемого рекомбинантного аллергена, — выявлена высокая корреляция результатов анализа на всех препаратах для высоких классов сенсibilизации (выше четвертого). При уровнях аллерген-специфических иммуноглобулинов, соответствующих 1–3-му классам, наблюдались незначительные расхождения (в пределах одного класса) при сопоставлении результатов референсного метода (t215, Phadia) и исследуемого белка. Синтетический белок Bet v 1 от производителя Bioma показал значительно более низкую чувствительность во всем диапазоне измерений.

5. Лиофилизация

Лиофилированная форма препарата полностью восстанавливалась после добавления воды и сохраняла свою изначальную концентрацию и иммунологическую активность.

Таким образом, в результате выполненной работы получен высокопродуктивный бактериальный штамм *E. coli*, несущий экспрессионную конструкцию белка Bet v 1. Отработана методика получения и очистки синтетического аллергена. Произведена оценка его физико-химических и иммунологических свойств. Проведено сравнение антигенных свойств аллергена в различных тест-системах с использованием референсных препаратов и панели сывороток, охарактеризованных по «золотому» стандарту (ImmunoCAP 250, Phadia). Показана стабильность лиофилизованной формы препарата.

Применимость

Показано, что рекомбинантная форма мажорного аллергенного белка пыльцы березы Bet v 1 может быть использована для определения аллерген-специфических иммуноглобулинов класса E в образцах сыворотки крови, как в аллергосорбентном тесте, так и в распространенном «capture» варианте анализа.

Внедрение определения аллергенных компонентов в лабораторную алергодиагностику *in vitro* будет способствовать повышению специфичности и воспроизводимости результатов анализов.

ЛИТЕРАТУРА

- Madsen C. Prevalence of food allergy: an overview. Proc. Nutr. Soc. 2005, v. 64, p. 413-417.
- Ebo D.G., Hagendorens M.M., Bridts C.H., Stevens W.J. In vitro diagnosis of IgE-mediated allergy: breakthroughs in the last decade. Expert. Rev. Clin. Immunol. 2012, v. 8, p. 9-11.
- Eriksson N.E., Ahlstedt S. Diagnosis of reaginic allergy with house dust, animal dander and pollen allergens in adult patients. V. A comparison between the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), provocation tests, skin tests and RAST. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 1977, v. 54, p. 88-95.
- Dolen W.K. Allergen extract standartization: reality, myth, or dream? Ann. Allergy Asthma Immunol. 1995, v. 75, p. 81-82.
- Ipsen H., Löwenstein H. Isolation and immunochemical characterization of the major allergen of birch pollen (*Betula verrucosa*). J. Allergy Clin. Immunol. 1983, v. 72, p. 150-159.
- Павлов А.Е., Сейлиева Н.А., Стефанов В.Е. Перспективы развития молекулярной диагностики аллергии в формате микрочипа. Клини. лаб. диагн. 2011, № 12, с. 3-7.
- Asturias J.A., Ibarrola I., Amat P. et al. Purified allergens vs. complete extract in the diagnosis of plane tree pollen allergy. Clin. Exp. Allergy. 2006, v. 36, p. 1505-1512.
- Midoro-Horiuti T., Brooks E.G., Goldblum R.M. Pathogenesis-related proteins of plants as allergens. Ann. Allergy Asthma Immunol. 2001, v. 87, p. 261-271.
- WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-committee: [www.allergen.org]. URL: <http://www.allergen.org/>.
- Swoboda I., Jilek A., Ferreira F. et al. Isoforms of Bet v 1, the major birch pollen allergen, analyzed by liquid chromatography, mass spectrometry and cDNA cloning. J. Biol. Chem. 1995, v. 270, p. 2607-2613.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970, Aug 15, v. 227 (5259), p. 680-685.

Статья поступила 03.02.2012 г., принята к печати 09.02.2012 г.
Рекомендована к публикации Пампурой А.Н.

PREPARATION AND PROPERTIES EVALUATION OF THE RECOMBINANT ANALOGUE OF BIRCH POLLEN ALLERGEN BET V 1

Pavlov A.E.^{1,2}, Seylieva N.A.¹, Mukhortykh O.Yu.¹, Stefanov V.E.²

¹ Vega Ltd. Group of Companies «Alkor Bio», Saint-Petersburg, Russia

² Saint-Petersburg State University, Russia

Key words: allergy diagnostics, birch pollen, recombinant allergen, Bet v 1

Background. For wide introduction of the component allergy diagnostics in laboratory practice it is necessary to create methods of production, purification and verification of synthetic allergens. Major birch pollen protein Bet v 1, a representative of the superfamily PR-10, is interesting due to the high incidence of sensitization and the manifestation of cross-reactive properties.

Methods. To receive a synthetic protein DNA cloning techniques were used, followed by expression in *E. coli*. Purification was made by metal-affinity chromatography. Evaluation of immunochemical properties was held in several tests including ELISA analysis and line-blot.

Results. We have obtained high-yield bacterial strain *E. coli*, containing expression vector for protein Bet v 1 production. Physico-chemical and immunological properties were estimated in various test systems with the reference panel of serum.

Conclusion. It was shown that the resulting synthetic analogue of protein Bet v 1 can be used to measure the presence of specific immunoglobulin E in serum samples. This allergenic component may be used for estimation of each component of the sensitization profile.