

Протеомная характеристика аллергенов яблок сортов белорусской селекции

Ольга Чижик, Владимир Решетников, Ирина Кондрацкая

Центральный ботанический сад НАН Беларуси

Авторами впервые исследованы основные белки-аллергены, содержащиеся в мякоти яблок сортов белорусской селекции. Проведенный протеомный анализ показал, что у сорта Дьямент наблюдается выраженная экспрессия белков-аллергенов всех 4-х типов (Mal d 1, Mal d 2, Mal d 3, Mal d 4). Меньше всего белков - аллергенов содержится в плодах сорта Надзейны. Сорт Весялина занимает промежуточное положение. После хранения плодов в холодильнике в течение 3-х месяцев значительных изменений в содержании белков-аллергенов не обнаружено. После термической обработки (сушки) аллергенная нагрузка всех исследуемых сортов.

Белки-аллергены, протеомный анализ, белорусские сорта яблок

Введение

Яблоко – один из любимых фруктов населения всего мира. Однако некоторые сорта яблок являются высокоаллергенными, другие — гипоаллергенными из-за разного содержания аллергенов в кожуре и мякоти.

Потребление яблок может вызывать аллергические реакции из-за присутствия в плодах целого ряда аллергенных белков (основные аллергены Mal d 1, Mal d 2, Mal d 3, и Mal d 4) и их кросс-реактивности с другими сенсибилизирующими аллергенами (например, из пыльцы березы — Bet v 1 и Bet v 2). К настоящему времени установлено, что в яблоке присутствует целый ряд аллергенных белков с молекулярными массами (Мм) от 9 до 60 кДа. Аллергенный потенциал яблок определяется генотипом и зависит от ряда внешних факторов: агротехники выращивания, сроков и способов хранения и переработки. Подобные исследования были проведены в Евросоюзе в рамках проектов «SAFE» (2001–2003 гг.) и «EuroPrevall» (2005–2009 гг.), где оценивалась аллергенность нидерландских, итальянских и немецких сортов яблок. Для Беларуси подобные исследования были проведены впервые. Следует отметить, что молекулярно-биологические исследования аллергенов яблока проводилось главным образом, с использованием двух методов — ELISA и ПЦР в реальном времени. Протеомный анализ для детекции аллергенов яблока до сих пор не был применен. Проведенные нами исследования направлены на решение фундаментальной проблемы определения генотипов яблони (*Malus domestica*) с наименьшей аллергенной нагрузкой. Актуальность и новизна работы состоит в том, что впервые для Беларуси исследован аллергенный потенциал яблок отечественных сортов. Впервые для анализа аллергенности яблок был применен комплексный подход, сочетающий методы геномики и протеомики.

Полученные новые знания о действии эндогенных и экзогенных факторов на аллергенный потенциал отечественных сортов яблок предоставят важную информацию селекционерам-плодоводам, технологам пищевой промышленности, врачам-аллергологам и диетологам, а также при составлении сертификатов качества для экспорта яблок и продажи на внутренних рынках в отделах/магазинах здорового питания.

Объектом исследований служили плоды представителя семейства Rosaceae – *Malus domestica* (яблоня домашняя) сортов белорусской селекции (Весялина, Надзейны, Поспех, Дьямент), предоставленные РУП «Институт плодоводства» НАН Беларуси.

Цель работы – исследовать изменения в характеристиках основных аллергенов яблока в зависимости от генотипа, срока и способа хранения плодов.

Методика исследования

Для выделения фракции белков из мякоти яблок, мы провели значительную модификацию методики, разработанной [Bjorksten et al., 1980] и описанной [Fido et al., 2004] для анализа содержания белков-аллергенов методом ELISA, что позволило адаптировать ее для анализа содержания аллергенов яблок методами 1D- и 2D- электрофореза. На основе данных, представленных в [Fido et al., 2004] и [Pierpoint, 2004], мы доработали состав экстракционного буфера и модифицировали методику [Beunon, Oliver, 2004]. Образцы гомогенизировали на льду, гомогенат центрифугировали, надосадочную жидкость сливали. Все последующие манипуляции являются нашей модификацией методики на основе [Beunon, Oliver, 2004]. Содержание белка в пробе определяли спектрофотометрически, используя набор реагентов Bio-Rad Laboratories, США. Вертикальный электрофорез белков проводили в денатурирующих условиях в щелочной системе по [Laemmli, 1970]. Для изоэлектрофокусирования (1-ое направление 2D-электрофореза) общей фракции клеточных белков использовали иммобилизованные сухие стрипы ReadyStrip™ IPG Strips pH 3-10 NL, длиной 11 см (производство Bio-Rad, США). После изоэлектрофокусирования, ПААГ-стрипы уравнивали с буферными системами для вертикального электрофореза белков в денатурирующих условиях в щелочной [Laemmli, 1970]. Компьютерный анализ 1D-протеомных карт легкорастворимых белков (в т.ч. белков-аллергенов) мякоти яблок проводили с использованием программ Adobe Photoshop и Quantity One (Bio-Rad Laboratories, США).

Результаты и обсуждение

Из литературных источников известно, что при хранении и после термической обработки количество белков-аллергенов изменяется. Проведен сравнительный анализ содержания основных экспрессирующихся белков-аллергенов яблок белорусских сортов Весялина, Надзейны, Поспех, Дыямент после хранения в течение 3-х месяцев в холодильнике при +4°C, с содержанием аллергенов в свежесобранных плодах.

В связи с тем, что, согласно полученных нами данных, применение удобрений не оказывает существенного влияния на содержание аллергенов, далее мы проводили исследование в образцах, выращенных без применения удобрений.

Полученные 1D-протеомные карты легкорастворимых белков (в т.ч. белков-аллергенов), содержащихся в мякоти яблок сортов Весялина, Надзейны, Поспех, Дыямент, представлены на рисунке 1.

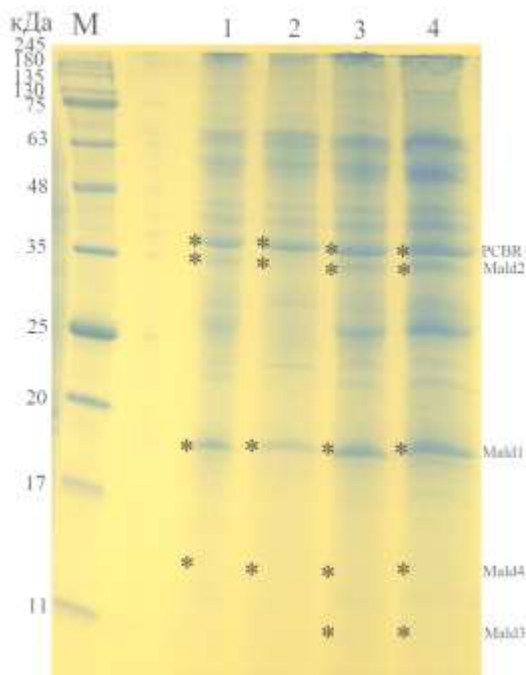


Рис. 1. 1D-протеомные карты легкорастворимых белков мякоти яблок сортов белорусской селекции Весялина (1), Надзейны (2), Поспех (3), Дыямент (4)

Fig.1. 1D-proteomic maps of the apple pulp allergens in Belarusian cultivars Vesyalina (1), Nadzeyny (2), Pospheh (3), Dyament (4)

Проведенный протеомный анализ показал, что в мякоти яблок сорта Дыямент наблюдается более сильная экспрессия белков-аллергенов всех 4-х типов (Mal d 1, Mal d 2, Mal d 3, Mal d 4), а также экспрессируется белок PCBR. В мякоти яблок сортов Дыямент и Поспех содержится больше аллергенных белков, чем у сортов Весялина и Надзейны. Определено, что меньше всего аллергенов содержится в плодах сорта Надзейны. У данного сорта также отсутствовала изоформа Mal d 2 с Мм 32 кДа. Уровень экспрессии белка Mal d 1 с Мм 18,3 кДа у сорта Надзейны был значительно ниже, чем у яблок сортов Дыямент, Поспех и Весялина. Сорт Весялина занимал

промежуточное положение. Белки-аллергены Mal d 3 (9,4 кДа) и Mal d 4 (15,3 кДа) у всех сортов обнаружены в следовых количествах.

Таким образом, по аллергенной нагрузке (в порядке убывания) сорта расположились в следующем порядке: Дыямент > Поспех > Весялина > Надзейны.

После хранения плодов в холодильнике в течение 3-х месяцев значительных изменений в содержании белков-аллергенов не обнаружено.

После термической обработки (сушки) показано снижение аллергенной нагрузки плодов (Таблица 1).

Таблица 1. Содержание основных белков-аллергенов в мякоти яблок 4-х сортов белорусской селекции после сушки
Table 1. The main allergens content in the pulp of 4 Belarusian apple varieties after drying

Сорт	Аллерген	Мм, кДа	Экспрессия, %
Дыямент	Mal d 1	–	–
	Mal d 2	22,4 30,9	92 67
Весялина	Mal d 1	–	–
	Mal d 2	30,9	84
Поспех	Mal d 2	22,4 30,9	83 66
	Надзейны	Mal d 1	19,3
	Mal d 2	22,4 30,9	79 90

Так, у сорта Дыямент после сушки экспрессия аллергена Mal d 2 (Мм 30,9 кДа) снизилась от 100 до 67 %, а белок-аллерген Mal d 1 уже не детектировался. Сходная картина наблюдалась и у сорта Весялина – белок Mal d 1 отсутствовал, а экспрессия аллергена Mal d 2 (Мм 30,9 kDa) снизилась от 90 до 84 %. Экспрессия основных аллергенов у сортов Поспех и Надзейны также уменьшилась.

После термической обработки (сушки) показано снижение аллергенной нагрузки плодов. Так, у сорта Дыямент после сушки экспрессия аллергена Mal d 2 (Мм 30,9 кДа) снизилась от 100 до 67 %, а белок-аллерген Mal d 1 уже не детектировался. Сходная картина наблюдалась и у сорта Весялина – белок Mal d 1 отсутствовал, а экспрессия аллергена Mal d 2 (Мм 30,9 kDa) снизилась от 90 до 84 %. Экспрессия основных аллергенов у сортов Поспех и Надзейны также уменьшилась.

На рисунке 2 (А, Б) представлены фрагменты 2D-протеомных карт легкорастворимых белков (в т.ч. белков-аллергенов) сорта Надзейны до и после термической обработки (сушки).

На рисунке 2 видно, что до сушки в образце экспрессировалось 5 изоформ белков-аллегиенов (Mal d 1, Mal d 2, Mal d 3 и Mal d 4). После термической обработки на протеомной карте можно выделить в следовых количествах только 2 изоформы аллергена – Mal d 2 и Mal d 4.

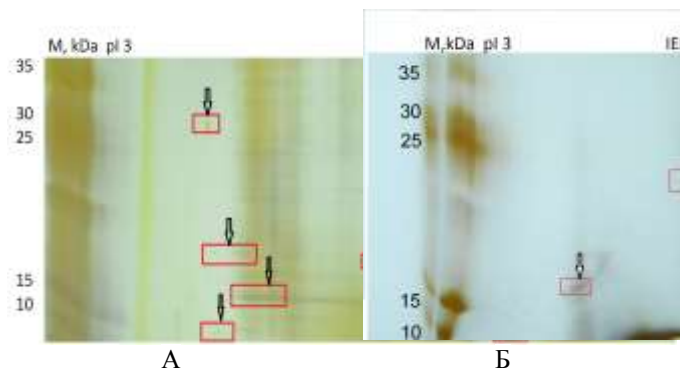


Рис. 2. 2D- протеомные карты основных белков-аллергенов, содержащиеся в мякоти яблок сорта Надзейны до (А) и после (Б) термической обработки (сушки)

Fig.2. - 2D-proteomic maps of the apple pulp allergens in Belarusian cultivar Nadzeyny before (A) and after (B) heat treatment (drying)

Полученные данные о снижении аллергенной нагрузки яблок после термической обработки можно использовать при производстве продуктов питания для детей и населения, страдающего перекрестной пищевой аллергией.

Выводы

Проведена значительная модификация методики выделения белков-аллергенов из мякоти яблок и доработан состав экстракционного буфера для протеомного анализа аллергенной нагрузки плодов.

Впервые исследованы основные белки-аллергены, содержащиеся в мякоти яблок сортов белорусской селекции. Проведенный протеомный анализ показал, что плоды сорта Дыямент характеризуются наибольшей аллергенной нагрузкой – в образцах как после хранения, так и после сушки наблюдается наибольшая экспрессия аллергенов Mal d 1 и Mal d 2. Белок Mal d 3 обнаружен в следовых

количествах, аллерген Mal d 4 при 1-Д электрофорезе не детектировался. Сорт Надзейны характеризуется наименьшим количеством аллергенов в мякоти. Яблоки сортов Всеялина и Пospех занимают промежуточное положение.

Применение удобрений и кратковременное хранение при +4°C не оказывает существенного влияния на содержание аллергенов в мякоти исследованных образцов яблок, что может быть обусловлено специфичностью анализируемых сортов и их фенотипом.

После термической обработки (сушки) количество аллергенов снижается.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Белорусского фонда фундаментальных исследований (проект № Б15МЛД-019).

Авторы выражают благодарность Кузовковой А.А. и Ковзуновой О.В. за помощь в работе.

Литература

1. BJORKSTEN, F., HALMEPURO, L., HANNUKSELA, M., LAHTI, A. Extraction and properties of apple allergens. *Allergy*, 1980, Vol. 35, p. 671–677.
2. FIDO R.J., MILLS E.N.C., RIGBY N.M., SHEWRY P.R. Protein Extraction from Plant Tissues. *Protein Purification Protocols (Methods in Molecular Biology): Second Edition* (Edited by P. Cutler), 2004, Vol. 244, p. 21–27.
3. PIERPOINT, W.S. The Extraction of Enzymes from Plant Tissues Rich in Phenolic Compounds. *Protein Purification Protocols (Methods in Molecular Biology): Second Edition* (Edited by P. Cutler), 2004, Vol. 244., p. 65–74.
4. BEYNON, R.J., OLIVER, S. Avoidance of proteolysis in Extracts. *Protein Purification Protocols (Methods in Molecular Biology): Second Edition* (Edited by P. Cutler., 2004. Vol 244, p.75–84.
5. LAEMMLI, U. K. (). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, Vol. 227(5259), p. 680-685.

Olga Chizhik, Vladimir Reshetnikov, Irina Kondratskaya

Proteomic characteristic of allergens in Belarusian apple cultivars

Summary

This work is the first investigation of the main allergenic proteins content in fruits of Belarusian apple cultivars (Dyament, Pospekh, Vesyalina, Nadzeyny) by means of proteomic analysis. The analysis showed that the Dyament cultivar contains a considerable amount of allergens of all 4 types (Mal d 1, Mal d 2, Mal d 3, Mal d 4). The least quantity of allergenic proteins is contained in the fruits of the Nadzeyny cultivar. The Vesyalina and Pospekh cultivars hold their positions in the middle of the list. After being stored in the refrigerator for 3 months, the fruits displayed no significant changes in their allergen content. After the thermal treatment (drying), the allergen content in fruits of all the examined apple cultivars decreased.

Allergenic proteins proteomic analyses Belarusian apple cultivars

Получено в марте 2018 г., подписано в печать в апреле 2018 г.

Ольга ЧИЖИК. Кандидат биологических наук, Центральный ботанический сад НАН Беларуси. Адрес: ул. Сурганова 2в, Республика Беларусь - 220012, г. Минск, адрес эл. почты: chizhikolga17@gmail.com.

Olga CHIZHIK. PhD (biology), Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus. Address; 2V, Surganov Str., Republic of Belarus - 220012, Minsk. Tel. (+375)29-684-84-73, e-mail: chizhikolga17@gmail.com.

Владимир РЕШЕТНИКОВ. Академик, доктор биологических наук, профессор, Центральный ботанический сад НАН Беларуси. Адрес: ул. Сурганова 2в, Республика Беларусь - 220012, г. Минск. Тел. (+375)29-684-14-61, адрес эл. почты: V.Reshetnikov@cbg.org.by.

Vladimir RESHETNIKOV. Academician, doctor of biological sciences, prof., Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus Address; 2V, Surganov Str., Republic of Belarus - 220012, Minsk. Tel. (+375)29-684-84-73, e-mail: V.Reshetnikov@cbg.org.by.

Ирина КОНДРАЦКАЯ. Центральный ботанический сад НАН Беларуси

Адрес: ул. Сурганова 2в, Республика Беларусь - 220012, г. Минск. Тел. (+375)29-529-12-94, адрес эл. почты: ikondratskaya@mail.ru

Irina KONDRATSKAYA. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus Address; 2V, Surganov Str., Republic of Belarus - 220012, Minsk. Tel. (+375)29-529-12-94, e-mail: ikondratskaya@mail.ru