

屋尘螨 8 类变应原(Der p 8)克隆表达、纯化及免疫原性鉴定

刘慧婷,袁如意,陈献雄,刘晓宇

摘要:目的 对屋尘螨(*Dermatophagoides pteronyssinus*) 8 类变应原 Der p 8 进行克隆表达、纯化及免疫原性分析,并用生物信息学方法分析其同源性。方法 根据已知 Der p 8 基因序列,设计 PCR 引物;提取屋尘螨总 RNA,逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)扩增得到 Der p 8 的 cDNA 片段,以 cDNA 和设计的引物进行 PCR 扩增;扩增产物连接至 T 载体并转化入大肠埃希菌(*E. coli* Top10)中,培养后挑选阳性单克隆菌落测序。测序正确后,转入表达载体 pET-32a,经酶切鉴定、测序后转入表达菌 BL21,大量表达重组蛋白 Der p 8。用亲和层析法纯化后进行免疫印迹分析(Western blotting)。利用生物信息学方法分析 Der p 8 基因的同源性。结果 酶切鉴定显示 Der p 8 表达载体构建成功,目的基因分子量约为 700 bp;SDS-PAGE 电泳显示 Der p 8 重组蛋白成功表达,分子量约为 38 kD,且主要以包涵体形式存在。Western blotting 结果显示 Der p 8 重组蛋白具有免疫原性。同源性分析结果显示本实验克隆 Der p 8 基因与 NCBI 基因库的 Der p 8 基因同源性为 76.97%。结论 本实验成功克隆表达并纯化出具有免疫原性的 Der p 8 重组蛋白,为临床上应用重组蛋白于诊断和治疗提供理论基础。

关键词:屋尘螨;Der p 8;表达纯化;免疫学鉴定

中图分类号:R384.4,S855.2

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2022)03-0236-07

Cloning, expression, purification and immunogenicity of the Der p 8 gene from *Dermatophagoides pteronyssinus*

LIU Hui-ting, YUAN Ru-yi, CHEN Xian-xiong, LIU Xiao-yu

(Allergy and Immunology Institute, School of Medicine, Shenzhen University, Shenzhen 518073, China)

Abstract: With the development of the social economy, people are increasingly experiencing allergic diseases. *Dermatophagoides pteronyssinus*, the house dust mite, is an important allergen causing many allergic diseases. The aim of this study was to clone, express, purify and analyze the immunogenicity of Der p 8 from *Dermatophagoides pteronyssinus*, and to analyze its genetic homology by bioinformatics. According to the known Der p 8 gene sequences, primers were designed. The total RNA of house dust mites was extracted. After amplification of cDNA fragments of Der p 8 by RT-PCR, the amplified products were connected to T carriers and transformed into *E. coli* Top10 cells. Properly sequenced genes were ligated into the expression vector pET-32a, digested by restriction enzymes and used to transform the expression strain BL21. After amplification, a large number of recombinant proteins was expressed. The expressed products were purified by affinity chromatography, and their immunological activity was assessed with Western blotting. Der p 8 was successfully connected to the expression carrier, and SDS-PAGE electrophoresis indicated successful expression. The purified Der p 8 recombinant protein's molecular weight was approximately 38 kD, and Western blotting results indicated its immunogenicity. Bioinformatic analysis revealed that the cloned

Der p 8 gene had 76.97% sequence identity to the Der p 8 gene in the NCBI database. The recombinant Der p 8 protein with immunogenicity was successfully cloned, expressed and purified. It may be used in the specific diagnosis of dust mite allergic diseases or in specific immunotherapy for dust mite allergies, thus laying a foundation for the production of a recombinant allergen vaccine.

Keywords: *Dermatophagoides pteronyssinus*; Der p 8; expression and purification; immunological identification

国家自然科学基金资助项目(No. 31729002, No. U1801286, No. 81971514)、广州市科学研究计划重点项目(No. 201804020043)、深圳市孔雀计划团队项目(No. KQTD20170331145453160)、深圳市科技计划国际科技合作项目(No. GJHZ2018041819053)、南山区“领航团队”支持计划项目(No. LH20180007)和呼吸疾病国家重点实验室开放课题资助项目(No. SKLRD-OP-201909)联合资助
通讯作者:刘晓宇, Email: lxy@szu.edu.cn;

ORCID: 0000-0003-3320-9890

作者单位:深圳大学医学院过敏反应与免疫学研究所,深圳 518073

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31729002, No.U1801286, No.81971514), Key Projects of Guangzhou Scientific Research Plan (No. 201804020043), Shenzhen Peacock Project Team Project (No. KQTD20170311453160), Shenzhen Science and Technology Plan International Science and Technology Cooperation Project (No.GJHZ2018041819053), Nanshan District "Navigation Team" Support Plan Project (No.LHTD 20180007) and the Open Project Funding Project of the State Key Laboratory of Respiratory Diseases (No.SKLRD-OP -201909)

Corresponding author: Liu Xiao-yu, Email: lxy@szu.edu.cn

随着社会经济的发展,人们生活水平的提高,越来越多的人遭受过敏性疾病的困扰。过敏性疾病发病率在全球呈上升趋势,是世界卫生问题。而尘螨是引起许多过敏性疾病的重要过敏原之一,现研究证明与尘螨过敏原相关的过敏性疾病有许多,如过敏性哮喘、过敏性鼻炎和过敏性皮炎等^[1-3]。居室内的优势螨类主要有屋尘螨(*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Der p*)和粉尘螨(*Dermatophagoides farina*, *Der f*),研究表明屋尘螨在温带以及热带的沿海、湿润地区有较多的分布,是室内尘螨过敏原中多种过敏原的主要来源^[4]。目前临床上治疗过敏主要应用过敏原特异性免疫治疗(Allergen-specific immunotherapy, ASIT),以改变疾病的进程,然而 ASIT 制剂多是过敏原、非过敏原和其他蛋白质的混合物,且大部分过敏患者对于不同尘螨过敏原呈现交叉反应,难以完全标准化,可能引起严重的副作用^[5-6]。目前研究者致力于开发重组过敏原,重组或纯化的天然变应原代替天然提取物,能有效还原原有的免疫原性,使得过敏治疗更加安全有效^[7-8]。

谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione S-transferases, GSTs)是一类生物广泛存在的解毒酶家族,其作用是催化谷胱甘肽(GSH)与多种亲电化合物的结合,保护生物大分子免受亲电试剂的氧化破坏攻击^[9]。因其可能与宿主的免疫反应以及寄生虫对药物的耐药性有关,已在许多寄生虫中进行了研究^[10-12]。此前已有研究克隆表达了与 GSTs 具有很大同源序列的过敏原 *Der p 8*,并鉴定了它的过敏原性^[10],但国内未见对 GSTs 基因及其蛋白特征的相关报道。考虑到不同地域的过敏原之间可能存在差异性,有必要对其变化性和差异性进行研究。因此,本实验希望通过屋尘螨 *Der p 8* 蛋白的克隆、表达及纯化,并鉴定重组蛋白的免疫原性,分析其同源性,为临床上尘螨过敏性疾病的特异性诊断和治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 螨、载体和菌株 屋尘螨为本实验室纯培

养,表达载体为 pET-32a,表达菌株为大肠埃希菌 BL21(DE3)。

1.1.2 主要试剂和实验材料 RNA 提取试剂盒和核酸胶回收试剂盒(QIAGEN,奥格生物技术有限公司),反转录试剂盒(生工生物工程股份有限公司),质粒 DNA 提取试剂盒和 DNA 胶纯化试剂盒(美国 OMEGA 公司);T 载体、T4DNA 连接酶、限制性内切酶 *Bam*H I 及 *Xho* I (Takara,宝日生物技术有限公司);镍离子亲和层析柱,Mouse anti human IgE-HRP(美国 Southern Biotech 公司),其余试剂为国产、进口分析纯试剂。

1.1.3 血清 Western blotting 所用血清取自广州医学院第二附属医院变态反应科 *Der p* IgE 阳性患者。

1.2 方法

1.2.1 尘螨饲养 收集室内尘样本,根据屋尘螨形态学特征,显微镜下挑取雌雄各半的屋尘螨,放在装有尘螨饲料的培养瓶中湿度(70±2)%、温度(25±2)℃条件下进行培养 3 个月,再进行收集纯屋尘螨。

1.2.2 尘螨鉴定 称取 1 g 尘螨用液氮研磨,研磨好的粉末 PBS 溶解冰上摇 2 h,8 000 r/min 离心 30 min。上清取样进行 SDS-PAGE 鉴定。

1.2.3 设计引物 根据 GenBank 数据库中 *Der p 8* 的核酸序列信息,利用 GeneTool 软件设计合适引物,引物交由生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.4 提取屋尘螨总 RNA 和 RT-PCR 扩增 按照说明书,将冻存的屋尘螨于液氮中研磨至粉状后按 RNA 提取试剂盒(QIAGEN 公司)说明书提取屋尘螨总 RNA。根据逆转录引物,以提取出的总 RNA 为模板,按反转录试剂盒说明书进行 RT-PCR 扩增(反应条件:42℃ 60 min、70℃ 5 min),得到屋尘螨的 cDNA。

1.2.5 PCR 扩增及其克隆产物的鉴定 以合成的 cDNA 为模板,根据设计的特异性引物,进行 PCR 扩增。反应条件为:94℃ 变性 1 min,52℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 90 s,共 31 个循环,再以 72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物凝胶电泳鉴定,胶回收并连接至 T 载体,转化入大肠埃希菌(*E.coli* Top10),

涂板培养 15 h,挑选合适的菌落 37 °C 摇菌过夜培养,取样送至公司测序。

1.2.6 构建重组表达质粒和重组表达菌 将测序正确的菌液于 37 °C 摇菌过夜培养(LB 培养液),提取质粒用 *Bam* H I 及 *Xho* I 双酶切,核酸电泳后胶回收。连接产物与表达载体 pET-32a 得到重组质粒,并转化入大肠埃希菌(*E.coli* Top 10)中,培养后取样重复测序一次,测序正确后提取质粒进行双酶切鉴定。

1.2.7 诱导表达重组蛋白 Der p 8 鉴定正确后的序列转入表达菌大肠埃希菌 BL21(DE3)中,涂板培养,挑选合适的菌落接种于 LB50 mL+AMP50 μL (LB:AMP=1 000:1)液体培养基中,37 °C 振摇(150 r/min)过夜培养。第 2 d 于新鲜液体培养基中扩大培养,当细菌处于对数生长期时($OD_{600}=0.6\sim 0.8$),应用 1 mmol/L 的诱导剂异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导目的蛋白的表达。4~5 h 后离心弃上清,菌体用平衡液重悬。菌液冰上超声破碎、4 °C 离心后,收集上清及沉淀,取部分进行 SDS-PAGE 电泳,以检测 Der p 8 的表达情况。

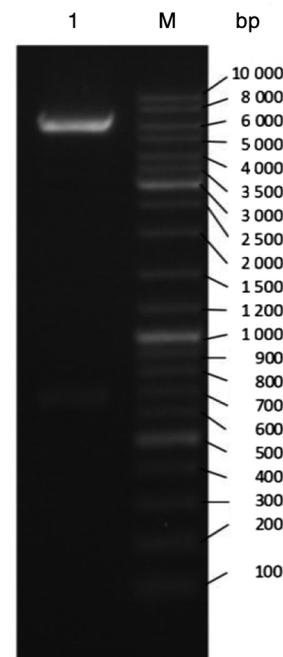
1.2.8 亲和层析法纯化重组蛋白 Der p 8 将收集到的沉淀于 6 mol/L 盐酸胍中混匀,超声破碎 15 min,于 4 °C 放置过夜,离心(10 000 r/min)20 min 后弃沉淀取上清。将上清上样至用平衡缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl,200 mmol/L NaCl)预平衡好的镍-氨三乙酸亲和层析柱(Ni-NTA)上,上样速度为 2 mL/min。上样后,用平衡缓冲液平衡 10 倍柱体积,然后分别用低浓度咪唑(40 mmol/L)和高浓度咪唑(300 mmol/L)的平衡缓冲液洗脱杂质蛋白和目的蛋白 Der p 8,取部分高浓度咪唑的洗脱液用于 SDS-PAGE 电泳。纯化后的重组蛋白保存于 -20 °C 冰箱。

1.2.9 Western blotting 鉴定重组蛋白 Der p 8 免疫原性 SDS-PAGE 电泳将纯化后的 Der p 8 重组蛋白分离,转移蛋白至硝酸纤维素膜(PVDF 膜)上,室温下将膜于 5% BSA+TBS 中孵育 2 h,以 Der p IgE 阳性患者的血清作为一抗,以辣根过氧化物酶标记的鼠抗人 IgE(Mouse anti human IgE-HRP)作为二抗孵育,TBST 将膜清洗 5 次后,加入化学发光试剂(ECL)显色,根据显色结果鉴定 Der p 8 重组蛋白的免疫原性。

1.2.10 生物信息学分析 Der p 8 基因 将本实验得到的 *Der p 8* 基因(图 5)与 NCBI 中公布的 *Der p 8* 序列进行比对,比较两者的同源性。

2 结果

2.1 Der p 8 重组表达载体的鉴定 将测序正确的 Der p 8 重组质粒用 *Bam* H I 及 *Xho* I 双酶切,进行核酸电泳。结果显示目的基因的分子量约为 700 bp,与 Der p 8 的 cDNA 片段大体一致,证明 Der p 8 重组表达载体成功构建(图 1)。



注:M 为 DNA marker;1 为 PET-32a-Der p 8 重组质粒的双酶切结果。

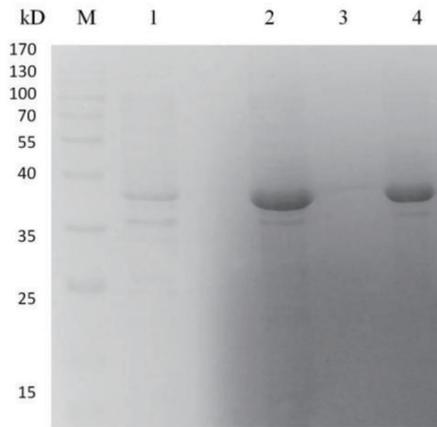
图 1 重组 Der p 8 质粒酶切后琼脂糖电泳结果

Fig.1 Identification of Der p 8 cDNA

2.2 Der p 8 的大量表达 用 1 mmol/L 的 IPTG 诱导重组蛋白 Der p 8 的表达,诱导前后 Der p 8 重组蛋白产物经 SDS-PAGE 电泳(图 2)。结果显示诱导后的菌液中,在分子量约 38 kDa 处可见明显的条带,与 Der p 8 预期分子量相近。根据诱导后的上清液和沉淀电泳结果,诱导后沉淀有较明显条带而上清未见明显条带,且样品未做盐酸胍溶解处理,因此可知 Der p 8 重组蛋白为包涵体。

2.3 Der p 8 重组蛋白的纯化鉴定 用 1 mmol/L 的 IPTG 诱导重组蛋白 Der p 8 的表达,经亲和层析法纯化后,取部分进行 SDS-PAGE 电泳。结果显示分子量约 38 kD 处可见一清晰蛋白条带,而其余分子量处未见条带,纯化纯度较高。该蛋白条带的分子量与 Der p 8 重组蛋白预计分子量相符(图 3)。

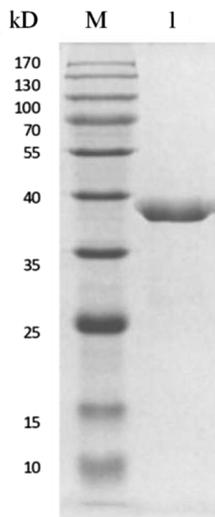
2.4 Der p 8 重组蛋白的免疫原性鉴定 以 Der p IgE 阳性患者血清为一抗,以 Mouse anti human IgE-HRP 为二抗进行 Western blotting。结果显示



注:M为蛋白 marker;1为诱导前菌液;2为诱导后菌液;3为诱导后上清液;4为诱导后沉淀。

图2 不同诱导时间 *Der p 8* 基因产物的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.2 SDS-PAGE electrophoresis of *Der p 8* gene products



注:M为蛋白 marker;1为纯化后的 *Der p 8* 蛋白。

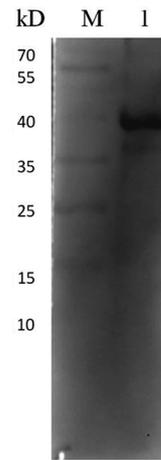
图3 纯化的 *Der p 8* 蛋白 SDS-PAGE 电泳图

Fig.3 SDS-PAGE electrophoresis of purified *Der p 8* protein

在 38 kD 处可见一明显条带,提示 *Der p 8* 重组蛋白能与 *Der p* IgE 阳性患者血清中 IgE 特异性结合,证明其具有免疫原性(图 4)。

2.5 *Der p 8* 基因的同源性分析 将酶切鉴定阳性的重组质粒测序,得到的基因序列如图 5 所示。将序列与 NCBI 基因库中的尘螨 *Der p 8* 基因序列 (GenBank: S75286.1) 进行比对,两者相似性为 76.97%(图 6)。

2.6 *Der p 8* 的系统进化树分析 将得到的 *Der p 8* 基因序列与 NCBI 基因库中的序列进行比对分析,将相似序列以 Fasta 格式输出,用 MEGA



注:M为蛋白 marker;1为纯化后的 *Der p 8* 蛋白。

图4 Western blotting 检测 *Der p 8* 蛋白的表达

Fig.4 Western blotting detection of the expression of *Der p 8* protein

7.0 构建分子进化树;分析可知,其基因序列与屋尘螨的谷胱甘肽 S-转移酶基因序列最相近 (*Dermatophagoides pteronyssinus*, GenBank: S75286.1),推测其功能相似;此外,通过分子进化树可知,屋尘螨与粉尘螨 (*Dermatophagoides farinae*, KC305499.1)、绵羊痒螨 (*Psoroptes ovis*, GenBank: AF078684.2) 的亲缘关系较近(图 7)。

3 讨论

尘螨是引起多种过敏性疾病的重要过敏原之一,而屋尘螨在亚热带和热带国家具有重要临床意义,哮喘或其他过敏患者对屋尘螨过敏原的致敏率可高达 80%~90%^[4]。因而对其重要变应原成分的免疫学、分子生物学特性进行深入研究,有助于临床诊疗。目前临床采用 ASIT 疗法,通过反复给过敏患者注射特定的过敏原,形成对过敏原的免疫耐受,从而减少过敏原暴露后的症状^[13]。随着重组技术的发展,重组过敏原替代粗提取物进行脱敏治疗成为可能,如治疗白杨花粉和草花粉过敏的重组低过敏原以及野生型重组过敏原^[14-15]。此外,重组过敏原还广泛应用于基于分子的过敏诊断,如蛋白质微阵列或悬浮阵列^[16]。

尘螨过敏原重组疫苗的研究也取得了新的进展。Chen 等设计的 *Der p 1-Der p 2* 融合蛋白在动物体内能有效降低过敏原性,并诱导产生特异性 IgG 抗体,抑制 1 组和 2 组过敏原过敏患者的 IgE 活性^[17]。Hesse 等的研究显示在小鼠体内应用纯化的屋尘螨过敏原 *Der p 1* 和 *Der p 2* 进行皮下免疫治疗,在抑制 Th2 细胞和尘螨诱导的肺结构细胞

```

1   ATGTCTCAGC CAATCCTGGG TTAGTGGGAT ATCCGTGGTT ACGCACAACC AATCCGCTCG
61  CTGCTGACTT ATTCTGGTGT TGATTTCTGTG GATAAACGCT ACCAGATCGG TCCTGCACCG
121 GATTTTGATC GTTCTGAGTG GCTGAATGAG AAATTCAACC TGGGTCTGGA TTTCCCGAAC
181 CTGCCGTAT ACATCGACGG TGACATGAAG ATGACCCAGA CTTTCGCAAT CCTGCGTTAC
241 CTGGGCCGTA AATACAAACT GAACGGCTCT AACGACCATG AAGAAATCCG TATCTCCATG
301 GCTGAACAGC AGACCGAAGA CATGATGGCT GCTATGATTG GTGTCTGTTA CGACGCTAAC
361 TGCACAAAC TGA AACCGGA CTACCTGAAA TCCCTGCCGG ACTGTCTGAA ACTGATGAGC
421 AAATTCGTGG GCGAACACGC GTTTATTCGG GCGGCCAACA TTTCCCTATGT AGATTTC AAT
481 CTGTACGAAT ACCTGTGCCA CGTCAAAGTG ATGGTTCCGG AAGTTTTCGG CCAGTTCGAG
541 AACCTGAAAC GCTATGTTGA ACGCATGGAA AGCCTGCCGC GCGTATCTGA CTATATTAAG
601 AAACAACAGC CGAAGACGTT TAACGCGCCG ACCTCCAAAT GGAACGCCAG CTATGCGTAA

```

图5 Der p 8 的 cDNA 序列
Fig.5 cDNA sequence of Der p 8

```

Der_p_8 ATGTCT G G T C C 40
Der_p_8 ..... A A A T T 34
Consensus ca ccaatcct gg ta tgggatat cgtggtt

Der_p_8 C CC TC C GC T T 80
Der_p_8 T TA GT T AT C G 74
Consensus a gcacaaccaat g tg t tgac tattc ggtgt

Der_p_8 C G C C G C T T A G 120
Der_p_8 T T T T A T A G C A 114
Consensus tgattt gt gataaacg ta ca at gg cc gc cc

Der_p_8 T T T G G CC 160
Der_p_8 C C G A A TT 154
Consensus ga tt gatcgttc ga tggctgaatga aaattcaa

Der_p_8 G C G C G C G C 200
Der_p_8 A T A A T A T A C 194
Consensus t ggt t gattt cc aa ctgcc tattacatcga gg

Der_p_8 T C C G T C A C C 240
Der_p_8 C T A A A T C A T 234
Consensus ga atgaagatgac ac tt gc at ctgcgtta

Der_p_8 C C C CTC C C 280
Der_p_8 T A T AAG T T 274
Consensus tggg cgtaaatacaaaactgaa gg taa ga catg

Der_p_8 A C C G G 320
Der_p_8 G T T A A 314
Consensus aaga at cgtat tccatggctgaaca ca accgaaga

Der_p_8 C T T C C C T C 360
Der_p_8 T A A T T T C T 354
Consensus atgatggc gc atgattcgtgt tgтта ga gc aa

Der_p_8 C G A G C C G CC G 400
Der_p_8 T C G T T T C AT C 394
Consensus tg gacaaact aa cc ga ta ct aaatc tgcc g

Der_p_8 TC C AG A C G C C 440
Der_p_8 CT T TC G T T T T 434
Consensus actg tgaaa tgatg caa tt gt gg gaaca gc

Der_p_8 G G C C A C 480
Der_p_8 A C T T T T T 474
Consensus tttattg c gg gccaa atttcctatgt gattt aat

Der_p_8 G C CC C A T G 520
Der_p_8 T T TT T G G C 514
Consensus ct ta gaata tgtgcc g tcaa gtgatggt cc g

Der_p_8 T C G C G C C C T 560
Der_p_8 G T A T A T A A A 554
Consensus aagt ttcgg ca tt ga aa ctgaaa g tatgt ga

Der_p_8 A C AGCC G G C T G 600
Der_p_8 G T TCGT A A T G A 594
Consensus cg atggaa t cc cg gtatc gactatattaa

Der_p_8 G G G T C G G C 640
Der_p_8 A A A C T A A T 634
Consensus aaacaacagcc aa ac tt aa gc cc acctc aaat

Der_p_8 C CAGCTATGCGTA 659
Der_p_8 T ..... 641
Consensus ggaa gc

```

图6 Der p 8 基因的同源性分析
Fig.6 Homology analysis of the Der p 8 gene

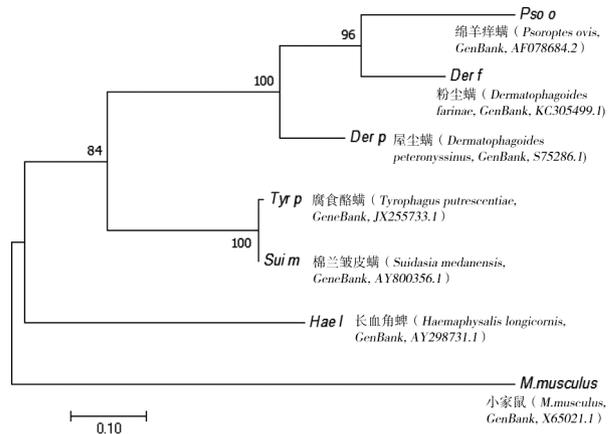


图7 Der p 8 的系统进化树分析
Fig.7 Phylogenetic tree analysis of Der p 8

激活相较粗尘螨提取物具有明显的优越性。这显示纯化后的尘螨过敏原有可能提高皮下免疫治疗的临床疗效^[18]。

O'Neill 等的研究发现尘螨表达的与 GSTs 具有很大同源序列的过敏原 Der p 8 能与 40% 的尘螨过敏患者血清中特异性 IgE 结合, 40% 中有一半以上的反应是正常对照组的 10 倍^[19]。本实验克隆的 Der p 8 序列与 GenBank 上的基因序列进行比对, 具有 76.97% 的同源性, 表明国外所报道的屋尘螨过敏原 Der p 8 基因序列与中国地区屋尘螨过敏原 Der p 8 基因序列存在一定的地区差异性。基于不同地区变应原的基因多样性, 建立高效表达重组过敏原 Der p 8 的表达载体, 并对其进行大量表达和纯化, 对研制纯度较高的重组变应原疫苗以及分子免疫诊断仍有一定意义。

本研究提取了屋尘螨总 RNA, 通过 RT-PCR 扩增后将其连接至表达载体 PET-32a, 经双酶切鉴定和测序后, 显示所克隆序列为目的基因片段, 导入

到表达菌大肠杆菌 BL21(DE3)。经过 IPTG 诱导剂的诱导表达及镍柱亲和层析法的纯化,结果显示诱导的重组蛋白 Der p 8 成功地大量表达,Western blotting 分析显示重组蛋白 Der p 8 具有良好的免疫原性。随着过敏性疾病发病率的上升,人们对其诊断和治疗的需要程度也越来越高,因此过敏性疾病的特异性诊断和治疗需要作出更多改变和突破。本实验所克隆的 Der p 8 重组蛋白经检验具有较强的免疫原性,一方面可应用于尘螨过敏性疾病的特异性诊断,另一方面应用于尘螨过敏的特异性免疫治疗,为制作重组的过敏原疫苗奠定基础。

利益冲突:无

引用本文格式:刘慧婷,袁如意,陈献雄,等.屋尘螨 8 类变应原(Der p 8)克隆表达、纯化及免疫原性鉴定[J]. 中国人兽共患病学报,2022,38(3):236-241. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2022.00.009

参考文献:

- [1] Platts-Mills TA, Erwin EA, Heymann PW, et al. Pro: The evidence for a causal role of dust mites in asthma[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 180(2):109-113. DOI:10.1164/rccm.200811-1756PR
- [2] Hales BJ, Martin AC, Pearce LJ, et al. IgE and IgG anti-house dust mite specificities in allergic disease[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 118(2):361-367. DOI:10.1016/j.jaci.2006.04.001
- [3] Pawankar R, Baena-Cagnani CE, Bousquet J, et al. State of world allergy report 2008: allergy and chronic respiratory diseases[J]. *World Allergy Organ J*, 2008, 1(6 Suppl):S4-S17. DOI:10.1097/WOX.0b013e31817ff995
- [4] Arlian LG, Morgan MS, Neal JS. Dust mite allergens: ecology and distribution[J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2002, 2(5):401-411. DOI:10.1007/s11882-002-0074-2
- [5] Curin M, Reininger R, Swoboda I, et al. Skin pricktest extracts for dog allergy diagnosis show considerable variations regarding the content of major and minor dog allergens[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2011, 154(3):258-263. DOI:10.1159/000321113
- [6] Casset A, Mari A, Purohit A, et al. Varying allergen composition and content affects the *in vivo* allergenic activity of commercial *Dermatophagoides pteronyssinus* extracts[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2012, 159(3):253-262. DOI:10.1159/000337654
- [7] Bordas-Le Floch V, Bussi eres L, Airouche S, et al. Expression and characterization of natural-like recombinant *Der p 2* for sublingual immunotherapy[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2012, 158(2):157-167. DOI:10.1159/000331143
- [8] Vrtala S, Huber H, Thomas WR. Recombinant house dust mite allergens[J]. *Methods*, 2014, 66(1):67-74. DOI:10.1016/j.ymeth.2013.07.034
- [9] Ketterman AJ, Saisawang C, Wongsantichon J. Insect glutathione transferases[J]. *Drug Metab Rev*, 2011, 43(2):253-265. DOI:10.3109/03602532.2011.552911
- [10] O' Neill GM, Donovan GR, Baldo BA. Cloning and characterization of a major allergen of the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*, homologous with glutathione S-transferase[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1219(2):521-528. DOI:10.1016/0167-4781(94)90080-9
- [11] Rosa de Lima MF, Sanchez Ferreira CA, Joaquim de Freitas DR, et al. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione S-transferase[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2002, 32(7):747-754. DOI:10.1016/s0965-1748(01)00157-6
- [12] Sommer A, Rickert R, Fischer P, et al. A dominant role for extracellular glutathione S-transferase from *Onchocerca volvulus* is the production of prostaglandin D2[J]. *Infect Immun*, 2003, 71(6):3603-3606. DOI:10.1128/IAI.71.6.3603-3606.2003
- [13] Tscheppe A, Breiteneder H. Recombinant allergens in structural biology, diagnosis, and immunotherapy[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2017, 172(4):187-202. DOI:10.1159/000464104
- [14] Jutel M, Jaeger L, Suck R, et al. Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 116(3):608-613. DOI:10.1016/j.jaci.2005.06.004
- [15] Pauli G, Larsen TH, Rak S, et al. Efficacy of recombinant birch pollen vaccine for the treatment of birch-allergic rhinoconjunctivitis[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, 122(5):951-960. DOI:10.1016/j.jaci.2008.09.017
- [16] Calderon MA, Linneberg A, Kleine-Tebbe J, et al. Respiratory allergy caused by house dust mites: what do we really know[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 136(1):38-48. DOI:10.1016/j.jaci.2014.10.012
- [17] Chen KW, Blatt K, Thomas WR, et al. Hypoallergenic *Der p 1*/*Der p 2* combination vaccines for immunotherapy of house dust mite allergy[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 130(2):435-443. DOI:10.1016/j.jaci.2012.05.035
- [18] Hesse L, van Ieperen N, Habraken C, et al. Subcutaneous immunotherapy with purified *Der p 1* and 2 suppresses type 2 immunity in a murine asthma model[J]. *Allergy*, 2018, 73(4):862-874. DOI:10.1111/all.13382
- [19] O' Neill GM, Donovan GR, Baldo BA. Glutathione S-transferase a major allergen of the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus* [J]. *Immunol Lett*, 1995, 48(2):103-107. DOI:10.1016/0165-2478(95)02452-2

收稿日期:2021-07-06 编辑:张智芳