【生物工程 / Bioengineering】

粉尘螨过敏原 *Der f 35* 的克隆表达及免疫学鉴定

陈 扬, 陈献雄, 欧阳春艳, 钟永浩, 刘晓宇

深圳大学过敏反应与免疫学研究所, 深圳大学医学部, 广东深圳 518060

摘 要: 粉尘螨是诱导过敏性疾病的重要变应原, 可诱发 I 型变态反应, 对其免疫原性的鉴定是研究过敏性鼻炎等过敏性疾病的基础. 首次对粉尘螨过敏原基因 *Der f 35* 进行克隆表达、纯化及免疫原性鉴定, 提取粉尘螨总核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA), 根据已知基因序列 (GenBank: LC175222.1) 设计引物进行反转录聚合酶链式反应扩增, 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 连接构建 pET-32a-*Der f 35* 载体, 并克隆至大肠杆菌 TOP 10 菌株, 取 1 mL 克隆菌液进行测序. 使用试剂盒提取高纯度质粒转至感受态细胞 Rosetta (DE3) 中进行诱导、表达纯化及免疫学鉴定, 并进行同源性比对分析、进化树构建及二级结构预测. 克隆和表达结果显示, *Der f 35* 基因的片段长约 436 个碱基对 (base pair, bp); 重组蛋白 *Der f 35* 相对分子质量约为 30 ku (1 u = 1 D), 与预期结果相符. 蛋白质印迹法结果证明, *Der f 35* 与尘螨过敏性疾病患者的血清结合有明显的反应原性. 生物信息学进化树结果显示, 粉尘螨与屋尘螨、热带无爪螨、害嗜鳞螨、绵羊痒螨和兔耳痒螨亲缘关系较近, 二级结构预测显示 *Der f 35* 的氨基酸序列由 2 个 α 螺旋、6 个 β 折叠、2 个 β 转角和 10 个无规则卷曲片段组成. 研究结果可为尘螨过敏性疾病的诊断与治疗提供理论依据.

关键词: 生物信息学; 免疫学; 粉尘螨; 过敏原 *Der f 35*; 克隆表达; 过敏原性鉴定

中图分类号: R384.4

文献标志码: A

doi: 10.3724/SP.J.1249.2021.03301

Cloning, expression and immunological identification of *Der f 35* allergen from *Dermatophagoides farinae*

CHEN Yang, CHEN Xianxiong, OUYANG Chunyan,
ZHONG Yonghao, and LIU Xiaoyu

Institute of Allergy and Immunology, Department of Medicine, Shenzhen University,
Shenzhen 518060, Guangdong Province, P. R. China

Abstract: *Dermatophagoides farinae* is an important allergen that induces allergic diseases and type I allergic reaction. The identification of its immunogenicity is the basis for the study of allergic rhinitis and other allergic diseases. First, primers were designed according to the *Der f 35* gene sequence (GenBank: LC175222.1), and the total RNA was extracted from dust mite, use it as a template for *Der f 35* reverse transcription polymerase chain reaction amplification. Then, the pET-32a vector was ligated with the *Der f 35* gene and transfer it into *Escherichia*

Received: 2020-07-20; **Accepted:** 2020-12-09

Foundation: National Natural Science Foundation of China (31729002, U1801286, 81971514); Key Project of Guangzhou Scientific Research Plan (201804020043); Shenzhen Peacock Project Team Project (KQTD20170331145453160); Shenzhen Science and Technology Plan International Science and Technology Cooperation Project (GJHZ2018041819053); Nanshan District "Pilot Team" Support Project (LHTD20180007); Open Project of State Key Laboratory of Respiratory Diseases (SKLRD-OP-201909)

Corresponding author: Assistant professor LIU Xiaoyu. E-mail: lxy0901@szu.edu.cn

Citation: CHEN Yang, CHEN Xianxiong, OUYANG Chunyan, et al. Cloning, expression and immunological identification of *Der f 35* allergen from *Dermatophagoides farinae* [J]. Journal of Shenzhen University Science and Engineering, 2021, 38(3): 301-306. (in Chinese)

coli (*E. coli*) TOP 10 cloned bacteria, and 1 mL of the cloning bacteria liquid was aspirated for sequencing. The high purity plasmid was extracted and transferred to Rosetta (DE3) cells. Expression of the objective protein Der f 35 was induced, purified and immunologically identified. Homology comparison analysis, phylogenetic tree construction and secondary structure prediction was then performed. Results showed that the fragment of the *Der f 35* gene was about 436 base pair (bp). The molecular weight of the recombinant protein Der f 35 was 30 ku ($1 \text{ u} = 1 \text{ D}$), which was consistent with the expected results. The results of bioinformatics evolutionary tree showed that the dust mite was close to house dust mite, *blomia tropicalis*, scaly mite, sheep itchy mite and ear free mite. Secondary structure prediction indicated that Der f 35 amino acid sequence consists of two α helices, six β folds, two β turns and ten random coil fragments. *Der f 35* gene was successfully cloned, and the coded protein was expressed and purified in *E. coli* with good reactivity. It lays a foundation for the study of allergic diseases of dust mites.

Key words: bioinformatics; immunology; *Dermatophagoides farinae*; allergen Der f 35; cloning and expression; allergen identification

尘螨是最强烈的室内过敏原之一, 主要包括屋尘螨、粉尘螨 (*Dermatophagoides farinae*) 及埋内欧螨等, 其螨体和排泄物均能引起 I 型超敏反应, 如过敏性鼻炎、过敏性哮喘及过敏性皮炎等多种变态反应性疾病^[1-4]. 研究表明, 全球约有 10% ~ 20% 的人对尘螨过敏, 且 50% 以上的 I 型超敏反应由尘螨引起, 严重影响了人们的生活质量^[5]. 文献[6]研究显示, 在过敏性患者中粉尘螨过敏原 Der f 35 与免疫球蛋白 E 的结合率高达 77.5%. 而中国尚未见 *Der f 35* 基因克隆、表达、纯化及过敏原性鉴定的报道. 本研究通过克隆、表达 *Der f 35* 基因, 并对得到的 Der f 35 重组蛋白进行纯化和反应原性鉴定, 为过敏性疾病患者的特异性诊断及治疗提供基础, 具有重要的临床意义.

1 实验材料及方法

1.1 实验材料

实验所用的粉尘螨由深圳大学医学院过敏与免疫研究所纯培养. 感受态细胞为 Rosetta (DE3), 表达载体为 pET-32a. 尘螨过敏原血清取自深圳大学第三附属医院.

1.2 主要仪器设备与试剂

核酸电泳仪 (Mini-PROTEAN Tetra)、纯化仪 (NGC Quest 10)、聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增仪 (CFX96 Touch)、电泳槽 (Mini-PROTEAN)、高压电泳仪 (Power pack) 和紫外凝胶成像仪 (Gel Doc XR+) 均购自美国伯乐公司; 全波长酶标仪 (Multiskan GO) 购自美国 Thermo 公司; 恒温恒湿箱 ZXMP-A1151 购自上海智城分析仪器制造有限公司; 尘螨核糖核酸 (ribonucleic

acid, RNA) 提取试剂盒 Trizol 购自美国 Invitrogen 公司; 质粒提取试剂盒 Omega 购自北京索莱宝科技有限公司; 反转录试剂盒及 PCR 试剂盒均购自上海生工生物工程股份有限公司; Taq 酶、T4 脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 酶和胶回收试剂盒均购自日本 Takara 公司; Ni 柱购自美国 GE 公司.

2 实验方法

2.1 粉尘螨总 RNA 的提取

取纯培养的粉尘螨用液氮浸泡, 研磨后用 RNA 提取试剂盒 Trizol 提取粉尘螨总 RNA.

2.2 粉尘螨重组过敏原 *Der f 35* 基因的扩增

以获得的总 RNA 为模板, 根据反转录试剂盒合成 DNA. 依据已知的 *Der f 35* 序列设计上游引物为 5'-GGATCC ATGATCAAATTTTGTGCAT-3', 下游引物为 5'-CTCGAGTTAATCGGCCGATTTCACCA-3'. 然后进行 PCR 扩增.

2.3 构建粉尘螨重组蛋白表达质粒

将 *Der f 35* 基因 PCR 扩增产物回收纯化, 连接构建 pET-32a-*Der f 35* 载体, 并转化至大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 克隆菌 TOP10 菌株中, 涂布至含 50 $\mu\text{g/mL}$ 的氨苄霉素平板上, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养过夜. 次日挑选阳性菌落进行培养, 取 1 mL 菌液送往上海生工生物工程股份有限公司测序. 将测序正确的质粒与原核表达载体 pET-32a 用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切后, 将得到的 *Der f 35* 基因片段与 pET-32a 酶切产物连接, 构建 pET-32a(+)-*Der f 35* 重组质粒. 将重组质粒转入感受态细胞 Rosetta (DE3) 中用于诱导表达.

2.4 诱导表达粉尘螨重组蛋白

少量表达粉尘螨重组蛋白的具体操作为: ① 取 20 μL 含有 *Der f 35* 的克隆菌菌液加入到 20 mL 的 Luria-Bertani (LB) 培养液 (含 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素) 中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 的摇床中震荡培养过夜; ② 取培养后的菌液 1 mL 加入到 20 mL 新灭菌的 LB 培养液中, 再加入 20 μL 氨苄青霉素, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 的摇床中震荡培养 4 h; ③ 待细菌生长至对数生长期即光密度值 $D(600)$ 为 0.6 ~ 0.9 时, 加入 20 μL 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG), 分别于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 条件下培养 4 h, 16 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 条件下培养 20 h, 进行诱导表达; ④ 收集沉淀超声破碎, 取样进行聚丙烯酰胺凝胶 (polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 电泳鉴定表达情况。

大量表达粉尘螨重组蛋白的具体操作为: 取 50 μL 含 *Der f 35* 的克隆菌菌液加入到 50 mL 的 LB 培养液 (含 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素) 中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 的摇床中培养过夜, 取 50 mL 菌液加入到 1 L 的 LB 培养液 (含 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素) 中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 的摇床中培养 4 h 后, 加入 IPTG 高温 (37 $^{\circ}\text{C}$) 诱导 4 h, 离心收集沉淀。

2.5 粉尘螨重组蛋白 pET-32a-*Der f 35* 的纯化

粉尘螨重组蛋白 pET-32a-*Der f 35* 的纯化步骤为: ① 将离心收集的含 *Der f 35* 基因的克隆菌菌体用 6 mol 的盐酸胍重悬超声破碎, 离心取上清液; ② 用 5 倍体积柱平衡缓冲液 (由 50 mmol/L Tris、200 mmol/L NaCl 和 4 mol/L 尿素配制) 预平衡 Ni-NTA 柱, 取上清液清上样; ③ 上样完毕后, 用 10 倍体积柱体积的平衡缓冲液 (由 50 mmol/L Tris、200 mmol/L NaCl 和 4 mol/L 尿素配制) 洗涤; ④ 再用 10 倍体积柱体积的洗涤液 (由 50 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl、4 mol/L 尿素和 40 mmol/L 咪唑配制) 洗涤; ⑤ 用洗脱液 (由 50 mmol/L Tris、200 mmol/L NaCl、4 mol/L 尿素和 300 mmol/L 咪唑配制) 将目的蛋白洗脱、收集; ⑥ 将纯化后的目的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析。

2.6 免疫印迹及免疫原性分析

对纯化后的 pET-32a-*Der f 35* 重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 电转至聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 上, 进行免疫印迹 (western blot) 分析。使用含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST (tris buffered saline with Tween-20) 缓冲液室温封闭 2 h

后, 再用含 25 g/L 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液对尘螨过敏患者的阳性血清进行稀释 (体积比为 10:1), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。回收血清后, 用 TBST 缓冲液洗涤 3 次, 稀释偶联辣根过氧化物酶鼠抗人 IgE 作为二抗孵育 1.5 h 后, 用 TBST 缓冲液洗涤 3 次。多功能化学发光成像仪检测粉尘螨重组蛋白 pET-32a (+)-*Der f 35* 免疫原性。

3 结果与分析

3.1 粉尘螨过敏原 *Der f 35* 基因的构建

使用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 对 pET-32a-*Der f 35* 重组质粒进行双酶切鉴定, 经质量浓度为 20 g/L 的琼脂糖凝胶电泳, 结果如图 1, 在 500 碱基对 (base pair, bp) 处附近可见目的基因片段, 该基因与 *Der f 35* 基因片段大小相符。

1 为 *Der f 35* 基因片段; M 为 D10000 bp DNA 分子标记

图 1 pET-32a-*Der f 35* 重组质粒 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定

Fig. 1 Identification of pET-32a-*Der f 35* through double enzyme digestion by *Bam*H I and *Xho* I

3.2 粉尘螨重组蛋白的表达及纯化

将含有 pET-32a-*Der f 35* 重组质粒的 Rosetta 感受态细胞置于 LB 培养基中培养, 分别在 16 $^{\circ}\text{C}$ 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 两种条件下诱导其表达目的蛋白, 结果如图 2。由图 2 (a) 可见, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 时 *Der f 35* 重组蛋白诱导量较多, 且为包涵体。由图 2 (b) 可见, 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导条件下 *Der f 35* 大量表达, 纯化后可得到纯度较高的 pET-32a-*Der f 35* 重组蛋白。

3.3 粉尘螨重组蛋白免疫原性的鉴定

将重组蛋白 pET-32a-*Der f 35* 转移至 PVDF 膜上, 取 10 份尘螨阳性患者血清进行一抗实验, 结果如图 3, 表明重组蛋白 *Der f 35* 具有免疫原性。

M 为 DBI70-10 蛋白分子量标记; 1 为诱导前克隆菌液; 2 为 16 °C 诱导后的上清液; 3 为 16 °C 诱导后的沉淀; 4 为 37 °C 诱导后的上清液; 5 为 37 °C 诱导后的沉淀; 7 为 Der f 35 重组蛋白

图 2 重组蛋白 Der f 35 的表达和纯化

Fig. 2 Expression and purification of recombinant protein Der f 35

3.4 粉尘螨过敏原 Der f 35 的系统进化树分析

将 Der f 35 氨基酸序列输入美国国家生物信息中心 (National Coalition Building Institute, NCBI) 进行 Blast 比对分析, 并将同源序列以 Fasta 格式保存. 使用 MEGA7 软件分析并构建进化树, 结果如图

图 4 Der f 35 的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of Der f 35

图 5 Der f 35 蛋白的二级结构预测

Fig. 5 Secondary structure prediction of Der f 35 protein

图 3 Der f 35 蛋白与过敏性疾病患者的血清结合

Fig. 3 Binding of Der f 35 to serum from patients with allergic diseases

4. 由图 4 可见, 粉尘螨与屋尘螨、热带无爪螨、害嗜鳞螨、绵羊痒螨和兔耳痒螨的亲缘关系比较近.

3.5 粉尘螨 Der f 35 蛋白的二级结构预测

将 Der f 35 的氨基酸序列输入 Protean 网站进行二级结构预测, 结果如图 5. 图 5 显示, Der f 35 基因编码的氨基酸序列由 2 个 α 螺旋、6 个 β 折叠、2 个 β 转角和 10 个无规则卷曲片段组成, 还含有 1 个潜在的 T 细胞抗原表位.

4 讨论

目前, 尘螨过敏疾病的临床诊断主要依赖免疫学检测, 而针对尘螨过敏疾病最常用且最有效的方法是特异性免疫治疗 (specific immunity, SIT)^[7-9]. 将微量尘螨过敏原通过舌下或口服给药途径进行脱敏治疗^[10-11], 可减少过敏性休克的发生概率, 再逐步增加尘螨过敏原的含量, 从而达到提升尘螨过敏患者对特异性过敏原的免疫耐受能力, 减轻或控制其过敏症状的治疗目的. 其中, 舌下给药脱敏是目前依从性最好的剂型.

但传统尘螨过敏原为天然尘螨疫苗, 即尘螨粗提取液, 其成分复杂, 含有多种过敏原, 非过敏性或毒性蛋白及杂质, 且含量不稳定, 组分无法标准化, 导致安全性低且重复性差^[12]. 运用尘螨粗提取液作为尘螨疫苗不仅治疗周期长, 且副作用大, 长期使用易导致肿胀、红晕、坏死或硬结等局部反应, 以及喉头水肿、血管性水肿、全身红斑、荨麻疹、支气管痉挛、哮喘甚至休克等全身反应^[13-14]. 随着尘螨相关的变态反应疾病患病率逐渐上升, 临床对尘螨过敏的诊断和治疗也提出了更高的要求. 因此, 新型尘螨疫苗 (包括 DNA 疫苗、重组活菌疫苗、细菌性疫苗和重组蛋白疫苗) 作为替代尘螨粗提取物的脱敏治疗新方案, 具有很好的应用前景, 其成分清晰且作用机理明确, 有利于临床进行标准化的治疗. 重组蛋白疫苗是将目的抗原基因构建于表达载体上再转化至细菌、酵母、昆虫或动物细胞中, 通过诱导表达大量抗原蛋白再进行纯化所制备的疫苗, 具有纯度高、产量高、稳定性好, 且安全性高的优点^[15].

本研究提取了粉尘螨总 RNA, 通过 RT-PCR 扩增得到 *Der f 35* 基因, 并将其连接至 pET-32a 表达载体上, 然后转化到 Rosetta 感受态细胞中; 在一定条件下诱导该基因大量表达, 纯化得到大量目的蛋白, 通过 Western blot 鉴定其免疫原性, 得到尘螨 *Der f 35* 单一过敏原. 有助于完善临床上过敏性疾病的特异性诊断及尘螨疫苗的制备^[16], 降低尘螨粗提取液带来的风险, 为临床治疗提供了基础材料, 也为实现精准医疗打下基础^[17]. 通过构建系统进化树, 可以预测对人类具有同样过敏原性的尘螨, 找到亲缘关系较近的尘螨并对其蛋白质序列分析, 进而找到相对保守的氨基酸序列, 辅助相对广谱性的靶向药物的开发和研究. 通过生物信息学方

法进行分析, 可预测重组蛋白 *Der f 35* 的蛋白质二级结构主要含有 β 折叠及无规则卷曲片段和潜在的 T 淋巴细胞抗原决定簇片段, 为尘螨过敏性疾病的诊断提供理论依据.

结 语

通过基因工程技术成功克隆、表达和纯化出粉尘螨 *Der f 35* 基因和蛋白 *Der f 35*, 且 Western blot 结果发现, *Der f 35* 具有较强过敏原性, 是一种新过敏原. 研究结果可为尘螨过敏性疾病诊断及新型过敏原疫苗研制提供理论依据.

致谢: 衷心感谢深圳大学刘志刚教授的悉心指导!

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31729002, U1801286, 81971514); 广州市科学研究计划重点资助项目 (201804020043); 深圳市孔雀计划团队资助项目 (KQTD20170331145453160); 深圳市科技计划国际科技合作资助项目 (GJHZ2018041819053); 南山区“领航团队”支持计划资助项目 (LHTD20180007); 呼吸疾病国家重点实验室开放课题资助项目 (SKLRD-OP-201909)

作者简介: 陈 扬 (2000—), 深圳大学本科生. 研究方向: 过敏性疾病及过敏原的研究. E-mail: 2018221037 @ email.szu.edu.cn

引 文: 陈 扬, 陈献雄, 欧阳春艳, 等. 粉尘螨过敏原 *Der f 35* 的克隆表达及免疫学鉴定 [J]. 深圳大学学报理工版, 2021, 38(3): 301-306.

参考文献 / References:

- [1] 朱永峰, 刘志刚, 高 波, 等. 粉尘螨 *Der f18* 变应原的克隆表达, 纯化及免疫学特性鉴定 [J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2008, 15(3): 162-166.
ZHU Yongfeng, LIU Zhigang, GAO Bo, et al. Cloning, expression, purification and immunological identification of the *Der f18* allergen of mites dust mites [J]. Journal of Parasites and Medical Insects, 2008, 15(3): 162-166. (in Chinese)
- [2] 朱健琦, 刘志刚, 高 波, 等. 粉尘螨 I 类变应原 (*Der f I*) 的克隆表达、纯化及免疫学特性 [J]. 昆虫学报, 2006, 49(2): 213-218.
ZHU Jianqi, LIU Zhigang, GAO Bo, et al. Cloning, expression, purification and immunological characteristics of *Der f I* from *Dermatophagoides farinae* [J]. Acta Entomologica Sinica, 2006, 49(2): 213-218. (in Chinese)
- [3] 李 平, 黄娜娜, 常可欣, 等. 屋尘螨变应原 *Der p9* 基因的克隆表达, 纯化及反应原性鉴定 [J]. 南昌大学学报医学版, 2018, 58(6): 1-4.
LI Ping, HUANG Nana, CHANG Kexin, et al. Cloning,

- expression, purification and identification of allergen Der P9 gene of house dust mite [J]. Journal of Nanchang University Medical Edition, 2018, 58(6): 1-4. (in Chinese)
- [4] 孙金霞, 滕飞翔, 崔玉宝. 尘螨变应原单克隆抗体的制备及应用研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2017, 12(3): 1-4.
- SUN Jinxia, TENG Feixiang, CUI Yubao. The preparation and application of single clone antibody of dust mite allergen [J]. Chinese Journal of Pathogenic Biology, 2017, 12(3): 2-4. (in Chinese)
- [5] 古霞, 欧阳春艳, 袁如意, 等. 屋尘螨 3 类变应原基因的克隆, 表达及免疫原性分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2018, 36(6): 627-631.
- GU Xia, OUYANG Chunyan, YUAN Ruyi, et al. Cloning, expression and immunogenicity analysis of three allergen genes of house dust mite [J]. Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases, 2018, 36(6): 627-631. (in Chinese)
- [6] FUJIMURA T, AKI T, ISOBE T, et al. Der f 35: an MD-2-like house dust mite allergen that cross-reacts with Der f 2 and Pso o 2 [J]. Allergy, 2017, 72(11): 1728-1736.
- [7] 陈德盛, 胡天城, 关丽, 等. 屋尘螨第 21 类过敏原核表达和过敏原性鉴定[J]. 中国热带医学, 2019, 19(2): 7-10.
- CHEN Desheng, HU Tiancheng, GUAN Li, et al. Prokaryotic expression and allergen identification of 21 allergens of house dust mites [J]. Tropical Medicine, 2019, 19(2): 7-10. (in Chinese)
- [8] 江贝, 肖小军, 欧阳春艳, 等. 粉尘螨过敏原 Der f 32 的克隆, 表达, 免疫学鉴定及其对树突状细胞的调节作用研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2019(3): 279-285.
- JIANG Bei, XIAO Xiaojun, OUYANG Chunyan, et al. Cloning, expression, immunological identification of Der f 32 from *Dermatophagoides farinae* and its regulation on dendritic cells [J]. Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases, 2019(3): 279-285. (in Chinese)
- [9] COMPALATI E, BRAIDO F, WALTER C G. Sublingual immunotherapy: recent advances [J]. Allergology International, 2013, 62(4): 415-423.
- [10] 胡传翠, 李朝品. 尘螨与变应性疾病的研究进展[J]. 医学综述, 2009, 15(7): 1054-1056.
- HU Chuancui, LI Chaopin. Research progress of dust mites and allergic diseases [J]. Medical Review, 2009, 15(7): 1054-1056. (in Chinese)
- [11] LIPWORTH B. Clinical relevance of house dust mite immuno-therapy [J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2015, 135(1): 288.
- [12] 王媛媛, 林建立, 黄娜娜, 等. 粉尘螨过敏原 Der f 13 基因克隆表达与免疫原性鉴定[J]. 南昌大学学报医学版, 2016(1): 21-25.
- WANG Yuanyuan, LIN Jianshe, HUANG Nana, et al. Cloning, expression and immunogenicity identification of dust mite allergen Der f 13 gene [J]. Journal of Nanchang University Medical Edition, 2016(1): 21-25. (in Chinese)
- [13] 李喆, 张影, 徐颖华, 等. 新型尘螨过敏原疫苗的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2016, 29(3): 312-314.
- LI Zhe, ZHANG Ying, XU Yinghua, et al. Research progress of novel dust mite allergen vaccine [J]. Chinese Journal of Biological Products, 2016, 29(3): 312-314. (in Chinese)
- [14] BARNES P J. New therapies for asthma: is there any progress [J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2010, 31(7): 335-343.
- [15] 郑蔓茵, 邬玉兰, 闫浩, 等. 粉尘螨第 7 类变应原 (Der f 7) 基因的克隆表达及免疫学特性鉴定[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2013, 31(5): 363-366.
- ZHENG Manyin, WU Yulan, YAN Hao, et al. Cloning, expression and immunological characterization of Der f 7 gene of *Dermatophagoides farinae* [J]. Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases, 2013, 31(5): 363-366. (in Chinese)
- [16] 黄娜娜, 陈德盛, 常可欣, 等. 屋尘螨 Der p7 基因的克隆表达、纯化及过敏原性鉴定[J]. 南昌大学学报医学版, 2018, 58(6): 13-18.
- HUANG Nana, CHEN Desheng, CHANG Kexin, et al. Cloning, expression, purification and identification of allergen of Der p7 gene of house dust mite [J]. Journal of Nanchang University Medical Edition, 2018, 58(6): 13-18. (in Chinese)
- [17] CALDER N M A, LINNEBERG A, KLEINE-TEBBE J, et al. Respiratory allergy caused by house dust mites: what do we really know [J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2015, 136(1): 38-48.

【中文责编: 晨 兮; 英文责编: 艾 琳】