

【实验研究】

文章编号:1000-7423(2007)-06-0081-06

屋尘螨和粉尘螨主要变应原的序列多态性分析

张纯青^{1,3}, Peter B. Thorsted², Kaare Lund²,
Michael D. Spangfort², 徐军³, 钟南山³, 姜勇¹

【摘要】 目的 探讨不同地域间屋尘螨和粉尘螨主要变应原变异体的差异。**方法** 分别提取中国华南地区培养的粉尘螨和欧洲商业化培养的屋尘螨和粉尘螨的螨体、螨卵和全螨培养物总 RNA, 采用 RT-PCR 技术扩增第 1 组变应原的包含前导肽段、酶原肽段和成熟肽段以及第 2 组变应原的包含前导肽段和成熟肽段在内的目的片段, 根据国际标准参照物进行序列比较。**结果** 欧洲商业化的屋尘螨 Der p 1 主要变异体是 Der p 1.0105, 除了第 124V、50 Y 和 19M 位氨基酸有频繁的置换外, 其余为散在的置换, 出现 8 种新的变异体; Der p 2 主要变异体是 Der p 2.0104, 置换集中在第 40V、4T7、111M 和 114D 位, 出现 6 种新的变异体。中国华南地区的粉尘螨 Der f 1 变异体很少, 出现 3 种新的变异体; 与欧洲商业化的粉尘螨相比, 中国华南地区有不同的 Der f 2 变异体, 出现 6 种新的变异体。来自螨体、螨卵和全螨培养物的各主要变应原变异体无明显差异。**结论** 不同地域间尘螨的主要变异体不同。

【关键词】 屋尘螨; 粉尘螨; 变应原; 多态性

中图分类号: R384.42, R392.1 文献标识
码: A

Sequence Polymorphism of Major House Dust Mite Allergens

ZHANG Chun-qing^{1,3}, Peter B. Thorsted², Kaare Lund², Michael D. Spangfort²,
XU Jun³, ZHONG Nan-shan³, JIANG Yong¹

(1 Department of Pathophysiology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2 ALK-Abelló A/S, Research Department, Hørsholm, Denmark; 3 Guangzhou Institute of Respiratory Diseases, Guangzhou 510120, China)

【Abstract】 Objective To determine the sequence variation of the groups 1 and 2 allergens from *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* in different geographical regions. **Methods** RNAs were isolated from the whole bodies, eggs and entire culture of mites (*D. farinae*) from South China and European commercialized *D. pteronyssinus* and *D. farinae*. Sequences of prepeptide, propeptide and mature peptide fragments in group 1, and prepeptide and mature peptide fragments in group 2 were determined from cDNA produced by PCR. All the sequences were compared with the corresponding standards in GenBank. **Results** Der p 1.0105 was the major variant found in European commercialized Der p 1 clones, where amino acid variations appeared sporadic, except for frequent substitutions shown in residues 124, 50 and 19, and eight novel homologous variants were identified. Der p 2.0104 was mostly detected in clones from European commercialized Der p 2, where amino acid substitutions were predominant in residues 40, 47, 111 and 114, and six novel homologous variants were identified. Very few amino acid sequence substitutions were found among South China based Der f 1 clones, where three novel homologous variants were identified. As compared with European commercialized ones, a number of homologous variants were recognized unique to South China based Der f 2 clones where six novel homologous variants were identified. There was no significant differences in major allergens among variants from the whole mite bodies, eggs or the entire culture. **Conclusion** There is a difference among the predominant variants of major house dust mite allergens in different geographical regions.

【Key words】 *Dermatophagoides pteronyssinus*; *Dermatophagoides farinae*; Allergen; Polymorphism

尘螨是世界范围内引起变应性哮喘、变应性鼻炎和变应性皮炎最常见的室内变应原之一, 国内许多变应原流行病学调查显示, 无论是用体内还是体外的检

测手段, 屋尘螨(*Dermatophagoides pteronyssinus*, Der p)和粉尘螨(*Dermatophagoides farinae*, Der f)均是引起中国变应性疾病最重要的变应原^[1]。尘螨变应原的同源异构现象比较常见, 国外对来自屋尘和商业化培养的尘螨进行了基因组和 cDNA 的序列分析, 发现屋尘螨和粉尘螨的第 1 组和第 2 组变应原的序列具有高

作者单位: 1 南方医科大学病理生理学教研室, 广州 510515;
2 丹麦 ALK-Abelló 公司研究部;
3 广州呼吸疾病研究所, 广州 510120

度多态性,不同地域或商品化和实际环境暴露的尘螨主要变应原的分布存在一定差异^[2],而且部分差异是位于 T 或 B 细胞表位,这对其免疫原性和变应原性都有重要的影响,例如不同的 Der p 2 变异体与 IgE 的反应活性有 25~50% 的差别^[3,4],还能使 T 细胞应答产生不同的细胞因子^[5],这些均有可能对变应性疾病的特异性诊断和治疗带来影响。近年来全国各大医院应用国外的尘螨变应原制剂进行体内外检测和特异性免疫治疗的比例不断增多,这些诊断和治疗制剂是否完全适用于我国患者,以及是否可以忽略地域间的遗传差异并不清楚。因此,有必要探讨不同地域间尘螨主要变应原变异体的差别,为进一步选择和开发更有针对性的诊断和免疫治疗制剂奠定基础。

材料与方法

1 屋尘螨和粉尘螨

屋尘螨由丹麦 ALK-Abell6 公司提供(在丹麦收集并鉴定后人工培养);两种粉尘螨分别由深圳大学生命科学学院刘志刚教授惠赠(在华南地区收集并鉴定后人工培养)和丹麦 ALK-Abell6 公司(在丹麦收集并鉴定后人工培养)提供。

2 试剂

RNA 提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒和质粒提取试剂盒均购自德国 QIAGEN 公司;RNA 鉴定试剂盒购自美国 Agilent 公司;cDNA 合成试剂盒购自美国 Applied Biosystems 公司;PCR 反应试剂盒购自美国 Promega 公司;质粒的连接和转化试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。

3 屋尘螨和粉尘螨的螨体、螨卵及全螨培养物总 RNA 的提取

在显微镜下用细针分别挑取干净的爬壁活螨约 100 只和螨卵约 100 个,称取约 2 mg 全螨培养物,根据 RNA 提取试剂盒说明,用异硫氰酸胍一步法提取总 RNA。

4 屋尘螨和粉尘螨第 1 组和第 2 组变应原引物的设计

根据 GenBank 上公布的屋尘螨和粉尘螨第 1 组和第 2 组变应原的 cDNA 序列,设计特异性引物,引物包含第 1 组变应原的前导肽段(prepeptide)、酶原肽段(propeptide)和成熟肽段(mature peptide)以及第 2 组变应原的前导肽段和成熟肽段,各引物由 DNA technologies 公司合成,序列如下:

preproDer p 1 上游: 5'-GTATCTCTCGAGAAAAGAATGAAAATTG-

TTTTGGCCATCG-3', 下游 5'-CCTCTAGATTAGAGAATGACA-ACATATGGATATTC-3'

preproDer f 1 上游: 5'-GTATCTCTCGAGAAAAGAATGAAATTC-GTTTTGGCCATTG-3', 下游: 5'-CCTCTAGATCAGATGATTACA-ACATA-TGGATATTG-3'

preDer p 2 上游: 5'-GTATCTCTCGAGAAAAGAATGTACAAAAT-TTGTGTCTTTTCATTGTTGG-3', 下游: 5'-CCTCTAGATTAATCG-CGGATTTTAGCA-TGAGTAGCAATAGC-3'

Der p 2 上游: 5'-GTATCTCTCGAGAAAAGAGATCAAGTCGATG-TCAAAGATTGTG-3', 下游: 5'-CCTCTAGATTAATCGCGGATT-TTAGCATGAGTAGCAATAGC-3'

preDer f 2 上游: 5'-GTATCTCTCGAGAAAAGAATGATTTCCAAA-ATCTTGTGCCTTTTCATTGTTGG-3', 下游: 5'-CCTCTAGATTAA-TCGAGGATTTTAACT-TGGGTAGCAATAGC-3'

Der f 2 上游: 5'-GTATCTCTCGAGAAAAGAGATCAAGTCGATG-TTAAAGATTGTG-3', 下游: 5'-CCTCTAGATTAATCGAGGATT-TTAACTTGGGTAGCAATAGC-3'

5 RT-PCR 扩增屋尘螨和粉尘螨第 1 组和第 2 组变应原的 cDNA 片段

分别以随机六聚核苷酸引物或特异的下游引物作为反转录引物合成 cDNA,PCR 扩增各目的片段。

6 质粒的构建

DNA 纯化试剂盒回收纯化各扩增产物,并连接到 TOPO TA 载体,转化大肠埃希菌(*E.coli*),涂布于氨苄抗性显色 LB 平板。挑取单个分离良好、白色的菌落放入 LB 培养液培养,提取质粒,经 *EcoR* I 酶切与 PCR 鉴定后,取阳性质粒标本送测序。

7 DNA 序列测定和分析

克隆所得基因由德国 MWG Biotech 公司测序,根据国际标准参照物进行序列比较,分别对应于 GenBank 中的 Der p 1.0101 (DPU11695)、Der f 1.0101 (AB034946)、Der p 2.0101 (AF276239)和 Der f 2.0101 (D10447),用 Vector NTI-AlignX 软件进行序列分析。

结 果

1 不同尘螨源性变应原的 RT-PCR 扩增及其产物的克隆与鉴定

从屋尘螨和粉尘螨的螨体、螨卵及全螨培养物中特异扩增的各 cDNA 片段,2% 琼脂糖凝胶电泳结果显示 PCR 产物电泳条带清晰,preproDer p 1 为约 989 bp 的片段,preproDer f 1 为约 992 bp 的片段;preDer p 2 为约 464 bp 的片段,Der p 2 为约 416 bp 的片段;preDer f 2 为约 464 bp 的片段,Der f 2 为约 416 bp 的

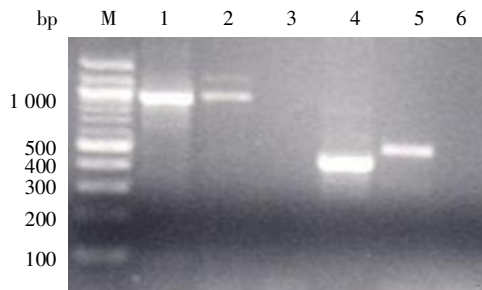
片段,大部分与预期相符。但是在丹麦全螨培养物 preproDer p 1 和 Der f 2, 分别较预期多出 1 条约 1 500 bp 和 500 bp 的片段;中国全螨培养物 Der f 2 较预期片段为大,约 500 bp (图 1);在丹麦螨卵 preproDer p 1 和 preDer p 2, 分别较预期多出 1 条约 1 200 bp 和约 550 bp 片段,继续进行上述产物的纯化和连接。质粒的酶切和 PCR 证实所扩增的片段已克隆入 TOPO TA 载体,获得包含以上片段的各种质粒,酶切鉴定可切下大小相符的片段(图2)。

2 不同尘螨源性变应原的序列分析

Der p 1 的变异体:在 26 个丹麦 Der p 1 的 cDNA 克隆中,主要变异体是 Der p 1.0105(13/26),以第 124 位由 V 置换为 A(V124A)为特征,一共出现 8 种新的变异体。成熟肽段有 8 个氨基酸位点被置换,其中 3 个位点置换频繁,最常见的是 V124A(25/26),其次是 Y50H(4/26)和 M19I 或 L(3/26)。其余位点的置换 H72Y 或 N、R95Q、A180 E、T194I 和 I213V 均为本研究所新发现,大多为单次置换。内含子序列同时出现在来自全螨培养物和螨卵 cDNA 克隆的 4 个位点(第 69~68 位,第 29~28 位,第 99~100 位和第 153~154 位之间)(表 1)。

Der p 2 的变异体:在 16 个丹麦 Der p 2 的 cDNA 克隆中,主要变异体是 Der p 2.0104(9/16),以 LSLN 在第 40、47、111 和 114 位取代 VTMD 为特征。成熟肽段有 10 个氨基酸位点被置换,绝大多数位于上述 4 个位点(14/16)。一共出现 6 种新的变异体。其中 5 种是在 2.0104 基础上多出 1 个位点的置换。来自螨卵的第 8~9 位氨基酸之间出现了内含子序列(表 2)。

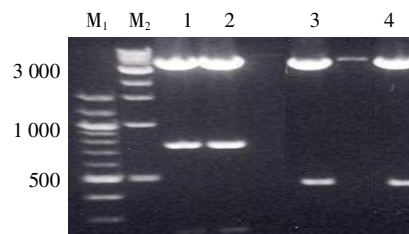
Der f 1 的变异体:在 16 个中国 Der f 1 的 cDNA 克隆中,13 个都是 Der f 1.0101,成熟肽段只有 3 个



M: DNA 标志物 (100 bp), 1: RT-PCR 扩增丹麦螨体 proDer p 1, 2: RT-PCR 扩增丹麦全螨培养物 proDer p 1, 3: 阴性对照, 4: RT-PCR 扩增中国螨体 Der f 2, 5: RT-PCR 扩增中国全螨培养物 Der f 2, 6: 阴性对照。

M: DNA marker (100 bp), 1: RT-PCR product of Danish proDer p 1 from whole mite body mRNA, 2: RT-PCR product of Danish proDer p 1 from whole mite culture mRNA, 3: Negative control, 4: RT-PCR product of Chinese Der f 2 from whole mite body mRNA, 5: RT-PCR product of Chinese Der f 2 from whole mite culture mRNA, 6: Negative control.

图 1 Der p 1 和 Der f 2 的 RT-PCR 产物电泳图
Fig. 1 RT-PCR amplification of Der p 1 and Der f 2



M₁: DNA 标志物 (100 bp), M₂: DNA 标志物准 (1 000 bp), 1,2: 丹麦螨体 TOPO-TA-preproDer p 1 质粒的 *Eco* R I 酶切后, 3,4: 中国螨体 TOPO-TA-preDer f 2 质粒的 *Eco* R I 酶切后。

M₁: DNA marker (100 bp), M₂: DNA marker (1 000 bp), 1,2: Danish whole mite body TOPO-TA-preproDer p 1 digested with *Eco* R I, 3,4: Chinese whole mite body TOPO-TA-preDer f 2 digested with *Eco* R I.

图 2 TOPO-TA-preproDer p 1 质粒和 TOPO-TA-preDer f 2 质粒的 *Eco* R I 酶切鉴定

Fig.2 The restriction analysis of TOPO-TA-preproDer p 1 and TOPO-TA-preDer f 2

氨基酸位点被置换,相应出现 3 种新的变异体,没有发现内含子序列(表 3)。

表 1 欧洲商业化培养的屋尘螨 Der p 1 变异体
Table 1 Polymorphisms of European commercialized Der p 1 variants

克隆 Clone	AA								个数(16)Frequency
	19	50	72	95	124	180	194	213	
1.0101 (DPU11695)	M	Y	H	R	V	A	T	I	1
1.0105	.	.	.	.	A	.	.	.	13
Dp 1-1	.	.	.	.	A	E	I	.	1
Dp 1-2	.	H	.	.	A	.	.	.	4
Dp 1-3	.	.	.	.	A	E	.	.	1
Dp 1-4	.	.	.	Q	.	.	.	.	1
Dp 1-5	.	.	Y	.	A	.	.	.	1
Dp 1-6	I	.	.	.	A	.	.	.	1
Dp 1-7	L	.	.	.	A	.	.	.	2
Dp 1-8	.	.	N	.	A	.	.	V	1

注:“.”氨基酸与标准参照物一致;Dp 1-1~1-8 为新的 Der p 1 变异体。

Note:“.” Same amino acid as the standard; Dp 1-1~1-8 New variants found in this study.

表 2 欧洲商业化培养的屋尘螨 Der p 2 变异体
Table 2 Polymorphisms of European commercialized Der p 2 variants

克隆 Clone	AA										个数(16)Frequency
	6	13	15	40	47	97	106	110	111	114	
2.0101 (AF276239)	K	I	K	V	T	I	V	V	M	D	1
2.0104	.	.	.	L	S	.	.	.	L	N	9
Dp 2-1	.	.	.	L	S	T	.	.	L	S	1
Dp 2-2	.	.	.	L	S	.	.	F	L	N	1
Dp 2-3	.	T	.	L	S	.	.	.	L	N	1
Dp 2-4	.	.	.	L	S	.	I	.	L	N	1
Dp 2-5	.	.	T	L	S	.	.	.	L	N	1
Dp 2-6	E	.	.	L	S	.	.	.	L	.	1

注：“.”氨基酸与标准参照物一致；Dp 2-1~2-6 为新的 Der p 2 变异体。

Note: “.” Same amino acid as the standard; Dp 2-1~2-6 New variants found in this study.

表 3 中国华南地区培养的粉尘螨 Der f 1 变异体
Table 3 Polymorphisms of South China based Der f 1 variants

克隆 Clone	AA			个数(16)Frequency
	64	78	85	
1.0101 (AB034946)	V	P	Q	13
Df 1-1	A	.	.	1
Df 1-2	.	S	.	1
Df 1-3	.	.	R	1

注：“.”氨基酸与标准参照物一致；Dp 2-1~2-6 为新的 Der p 2 变异体。

Note: “.” Same amino acid as the standard; Dp 2-1~2-6 New variants found in this study.

Der f 2 的变异体：33 个两种来源的 Der f 2

表 4 中国华南地区和欧洲商业化的粉尘螨 Der f 2 变异体
Table 4 Polymorphisms of South China based Der f 2 variants

克隆 Clone	AA															个数(33)Frequency	地区 Region
	29	32	57	58	59	63	75	76	85	88	92	104	111	125			
2.0101(D10447)	I	G	S	L	D	I	F	V	Q	I	W	V	I	G	7	a,b	
2.0103	.	.	.	.	.	.	.	M	.	A	.	.	V	A	3	b	
2.0111	.	.	N	I	N	V	Y	I	.	A	.	.	.	A	3	a	
2.0112	.	.	.	.	.	.	.	M	.	A	.	.	V	.	9	a,b	
2.0116	.	.	N	I	N	V	Y	I	.	A	.	.	.	.	4	a	
Df 2-1	.	.	N	I	N	V	Y	I	.	A	.	.	V	.	2	a	
Df 2-2	.	.	N	I	N	.	.	.	.	.	R	.	.	.	1	a	
Df 2-3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	1	a	
Df 2-4	.	C	N	I	N	V	Y	I	.	A	.	.	V	.	1	a	
Df 2-5	T	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	b	
Df 2-6	.	.	.	.	.	.	.	M	R	A	.	.	V	.	1	b	

注：“.”氨基酸与标准参照物一致；Df 2-1~2-6 为新的 Der f 2 变异体；“a”为中国华南地区，“b”为欧洲。

Note: “.” Same amino acid as the standard; Df 2-1~2-6 New variants found in this study; “a” South China, “b” Europe.

讨 论

本研究首次对欧洲尘螨生产商培养的屋尘螨和粉尘螨以及中国华南地区培养的粉尘螨主要变应原进行多态性分析，并与其他地区的结果进行比较。所克隆的丹麦屋尘螨主要变异体 Der p 1.0105 和 Der p 2.0104 与 Piboonpocanun 等研究曼谷地区屋尘中的屋尘

cDNA 克隆中有较多的变异体出现，可见 Der f 2.0112 (9/33)、Der f 2.0101 (7/33)、Der f 2.0116 (4/33)、Der f 2.0103 (3/33) 和 Der f 2.0110 (3/33)。成熟肽段有 14 个氨基酸位点被置换，与 Der p 2 相似，置换位于某些固定的位点并且同时出现，常见在 S57N、L58I、D59N、I63V、F75Y、V76M 或 I、I88A 和 I111V。只有中国 Der f 2 出现第 57~59、63 和 75 位上述氨基酸的置换，导致 2.0103 只出现在丹麦 Der f 2，2.0111 和 2.0116 只出现在中国 Der f 2。一共出现 6 种新的变异体。在第 8~9 位氨基酸之间出现了内含子序列，只发现在全螨培养物中 (表 4)。

螨结果相同^[6]。国外对 Der p 1 和 Der p 2 中突变频繁的位点进行了研究，发现 Der p 1 的第 124 位氨基酸位于与免疫原性相关的环结构，由 V 置换为 A 使 T 细胞更易产生免疫应答^[7]。另一研究发现 T 细胞对 Der p 1 第 45~60 位肽段的应答受第 50 位氨基酸的影响，当它是 Y 而不是 H 时，三分之一的 T 细胞能识别此肽段并引起增殖反应^[8]。提示 Der p 1.0105 可

能具有较强的免疫原性。关于 Der p 2, Park 等研究发现 IgE 与 Der p 2.0104 的结合能力是与 Der p 2.0101 的两倍^[3]; Hales 等进一步研究发现具有 T47S 置换的变异体较没有置换的能结合更多的 IgE^[5], 提示 Der p 2.0104 可能具有较强的变应原性。

目前国内使用的尘螨变应原诊断和免疫治疗制剂主要有国产的粉尘螨制剂以及欧洲标准化的屋尘螨和粉尘螨制剂, 欧洲标准化的屋尘螨免疫治疗制剂在我国的应用越来越广泛, 它的主要变应原组分是 Der p 1, Der p 2 的浓度较它低五倍^[9]。虽然我们没有克隆华南地区的屋尘螨, 但是根据 Piboonpocanun 等^[6] 的研究结果, 曼谷地处热带地区, 地理气候方面与我国华南地区接近; 而且人种也相近似, 对变应原的免疫反应可能相同。因此, 这些包含了以具有较强免疫原性的 Der p 1.0105 为主要变异体的屋尘螨所制成欧洲标准化变应原制剂有可能适用于我国华南地区的部分患者。

与国外的研究结果相似, 中国 Der f 1 很少出现变异体。而两地的 Der f 2 都存在复杂的多态性, 我们发现中国 Der f 2 在第 57~59 位、第 63 和 75 位都有频繁的 NINVV 置换, 而丹麦没有出现, 使 Der f 2.0111 和 2.0116 为我国华南地区和曼谷地区所特有。尘螨第 2 组变应原的生物学功能至今仍未清楚, Der f 2 的 X 射线晶体结构分析显示整个分子由一个具有两个反向 β 折叠的结构域组成, 内部有一个由疏水和芳香族氨基酸构成的疏水腔, 具有结合脂质的作用, 提示可能是其生物学功能。F57、L58、D59 和 I63 位于其中一个 β 折叠的末端, 同时 L58 和 I63 又位于疏水腔的开口部分, L58、F75 和 I88 排列在腔内^[10,11]。中国这部分特有的变异体可能导致 Der f 2 与脂质的结合发生改变, 是否影响其免疫原性和变应原性, 有待进一步的研究。

用于提取尘螨变应原的原材料是纯的螨体或者整个全螨培养物, 全螨培养物含有螨过敏患者自然条件下接触的所有物质, 包括螨体、幼虫、螨卵、粪粒、螨分解物和饲料等, 而纯的螨体只含有螨卵和粪粒, 粪粒含有绝大多数变应原。我们扩增了来自螨体、螨卵和全螨培养物的 4 个主要变应原 cDNA, 没有发现其变异体在三种提取对象有任何差异。RT-PCR 结果

中的较预期片段增多的 PCR 产物被证实包含有内含子序列, 但是只出现在全螨培养物和螨卵, 并不在螨体。全螨培养物含有螨卵, 推测内含子序列可能是在尘螨的发育过程中出现, 在成熟过程中被剪切掉。综上所述, 不同区域间尘螨的主要变异体不同, 本研究通过比较中国华南地区与丹麦 Der f 2 变异体的异同, 发现了仅在我国华南地区出现而在丹麦没有的变异体。因此, 调查与鉴定当地主要变异体, 研究不同变异体结构对功能的影响, 对发展适合当地患者的特异性诊断制剂、发展更有效和更安全的重组免疫治疗制剂有重要的临床现实意义。

参 考 文 献

- [1] Yu L, Lai NK. *In vivo* and *in vitro* detection and clinical correlative analysis of bronchitic asthma (300 cases)[J]. Chin J Microbiol Immunol, 2001, 21(suppl): 87-90. (in Chinese)
(于陆, 赖乃揆. 支气管哮喘的体内、体外检测和免疫治疗的相关分析(300 例)[J]. 中华微生物和免疫学杂志, 2001, 21(增刊): 87-90.)
- [2] Smith WA, Hales BJ, Jarnicki AG, *et al.* Allergens of wild house dust mites: Environmental Der p 1 and Der p 2 sequence polymorphisms[J]. J Allergy Clin Immunol, 2001, 107: 985-92.
- [3] Park JW, Kim KS, Jin HS, *et al.* Der p 2 isoallergens have different allergenicity, and quantification with 2-site ELISA using monoclonal antibodies is influenced by the isoallergens[J]. Clin Exp Allergy, 2002, 32: 1042-1047.
- [4] van Ree R. Isoallergen: a clinically relevant phenomenon or just a product of cloning [J]. Clin Exp Allergy, 2002, 32: 975-978.
- [5] Hales BJ, Hazell LA, Smith W, *et al.* Genetic variation of Der p 2 allergens: effect on T cell responses and immunoglobulin E binding [J]. Clin Exp Allergy, 2002, 32: 1461-1467.
- [6] Piboonpocanun S, Malainual N, Jirapongsananuruk O, *et al.* Genetic polymorphisms of major house dust mite allergens[J]. Clin Exp Allergy, 2006, 36: 510-516.
- [7] Jarnicki AG, Thomas WR. Stimulatory and inhibitory epitopes in T-cell responses of mice to Der p 1[J]. Clin Exp Allergy, 2002, 32: 942-950.
- [8] Hales BJ, Thomas WR. T-cell sensitization to epitopes from the house dust mites *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Euroglyphus maynei*[J]. Clin Exp Allergy, 1997, 27: 868-875.
- [9] Heymann PW, Chapman MD, Aalberse RC, *et al.* Antigenic and structural analysis of group 2 allergen(Der f 2 and Der p 2) from house dust mites (*Dermatophagoides* spp)[J]. J Allergy Clin Immunol, 1989, 83: 1055-1067.
- [10] Derewenda U, Li J, Derewenda Z, *et al.* The crystal structure of a major house dust mite allergen Der p 2, and its biological implication[J]. J Mol Biol, 2002, 318: 189-197.
- [11] Johannessen BR, Skov LK, Kastrup JS, *et al.* Structure of the house dust mite allergen Der f 2: implications for function and molecular basis of IgE cross-reactivity[J]. FEBS Lett, 2005, 579: 1208-1212.

(收稿日期: 2007-04-24 编辑: 盛慧锋)