

文章编号: 1674-7054(2017)03-0371-06

重组热带螨 Blo t 21 变应原诱导小鼠 变态反应气道炎症模型的建立

肖正泮¹, 刘金莹¹, 韦双双², 王大勇², 裴业春¹

(1. 海南大学 热带农林学院 动物科技学院/海南省热带动物繁育与疫病研究重点实验室, 海口 570228;

2. 海南大学 热带农林学院 生物学院, 海口 570228;)

摘 要: 为了建立热带螨重组变应原 Blo t 21(rBlo t 21) 诱导小鼠变态反应气道炎症模型, 笔者利用从 NCBI GenBank 库里获得的热带螨 Blo t 21 基因序列, 进行了序列优化与全基因合成, 构建了原核表达载体 PQE80L-rBlo t 21, 在大肠杆菌内诱导表达 rBlo t 21, 利用镍柱亲和层析纯化 rBlo t 21 蛋白。12 只 BALB/c 小鼠随机分为对照组(PBS 组)与诱导组(rBlo t 21 组), 每组 6 只, 通过腹腔注射致敏与气道诱导后, 分别通过酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清总 IgE 水平; 鼠尾静脉注射变应原诱发迟发性过敏反应; HE 染色观察小鼠肺部炎症严重程度。本试验成功表达与纯化了重组热带螨变应原 Blo t 21。利用纯化的 rBlo t 21 诱导小鼠变态反应气道炎症模型, 与 PBS 组相比, rBlo t 21 组的小鼠血清总 IgE 水平显著升高, 肺部组织细胞浸润明显增加($P < 0.05$)。原核表达纯化的重组 Blo t 21 变应原能够诱导小鼠产生变态反应气道炎症。

关键词: 热带螨; 重组 Blo t 21 蛋白; 气道炎症

中图分类号: Q 819

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2017.03.020

热带无爪螨, 简称为热带螨, 是尘螨中非常重要的一种, 也是室内致敏原的重要来源之一。在热带地区, 热带螨过敏发生率极高, 是哮喘和其他过敏性疾病的室内过敏原的重要来源^[1-2]。王灵等对海南 324 例哮喘患儿进行过敏史问卷调查及皮肤点刺试验和血清过敏原特异性 IgE (SIgE) 抗体检测, 结果显示, 对热带螨的皮肤点刺阳性率为 85.5%^[3]。热带螨有多种 IgE 结合蛋白存在, 目前至少有 12 种被列入致敏原库, 分别是 Blo t 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 19 和 21^[4-7]。Blo t 21 是 2007 年发现的一种重要的热带螨致敏原^[8], 与热带螨第 5 组致敏原 Blo t 5 是旁系同源蛋白, 但两者之间有较低的交叉反应性^[9]。Blo t 21 与其他尘螨第 21 组致敏原的序列相似度较高。屋尘螨(*Dermatophagoides pteronyssinus*, Der p) 的第 21 组致敏原 Der p 21 与 Blo t 21 的氨基酸序列同源性为 38.1%, 粉尘螨(*Dermatophagoides farinae*, Der f) 第 21 组致敏原 Der f 21 与 Blo t 21 的氨基酸序列同源性为 38.9%^[8-9]。研究结果表明, 热带螨的主要致敏原分别是 Blo t 21, Blo t 5, Blo t 7^[6], 这与屋尘螨的主要致敏原是第 1 组和第 2 组致敏原(Der p 1, Der p 2) 不同。目前, 关于热带螨变应原的研究甚少, 临床上使用热带螨的总变应原提取物作为诊断或特异性治疗的变应原, 但热带螨粗提液成分复杂, 含有不同比例的各种过敏原或者非变应原, 容易引起过敏反应。笔者从 GenBank 库获得 Blo t 21 基因序列, 进行优化后在大肠杆菌中进行表达, 纯化出具有致敏性的重组变应原 Blo t 21, 并利用重组 Blo t 21 变应原(rBlo t 21) 诱导小鼠变态反应气道炎症模型, 为热带螨过敏的特异性诊断与免疫治疗奠定了基础。

收稿日期: 2017-05-07

修回日期: 2017-07-12

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(31402257); 海南省科技项目资助(ZDYF2017110)

作者简介: 肖正泮(1993-), 男, 海南大学热带农林学院动物科技学院 2016 级硕士研究生。

通信作者: 裴业春(1985-), 男, 博士, 讲师, 硕士生导师。研究方向: 生物技术与分子药理学。E-mail: yypei@hainu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 基因序列 热带螨 Blo t 21 基因序列来自 NCBI Genbank 库 (GenBank: DQ788677.1)。基因序列经海南大学热带农林学院生物技术与分子药理实验室优化后,由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 菌株、载体和试剂 大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α 感受态细胞、BL21 (DE3) 感受态细胞均购自海南青峰生物科技有限公司;PQE-80L 原核表达载体由海南大学热带农林学院生物技术与分子药理实验室保存;胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒均购自 TaKaRa 公司;T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司;BamH I 和 Sal I 限制性内切酶均购自 New England Biolabs 公司;Ni-NTA Agarose 购自 Qiagen 公司(货号:30210);氢氧化铝凝胶为本实验室自制,其他试剂均为国产分析纯。

1.3 BALB/c 小鼠 BALB/c 小鼠 雌性 6~8 周龄,体质量约为 20 g,购自广东省医学实验动物中心。

1.4 载体构建 热带螨 Blo t 21 基因序列优化后 5'端添加 BamH I 酶切位点 3'端添加 Sal I 酶切位点,进行全基因合成,然后利用 BamH I 和 Sal I 双酶切回收,连接至经 BamH I 和 Sal I 双酶切回收的 PQE-80L 载体上,构建 PQE80L-rBlo t 21 原核表达质粒。

1.5 rBlo t 21 蛋白的原核表达 将原核表达质粒 PQE80L-rBlo t 21 转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中,挑取单菌落至 10 mL 含有卡那霉素的 LB 培养基中,37℃ 200 r·min⁻¹ 振荡过夜。次日按 1:100 转接培养至 OD₆₀₀ ≈ 0.6。取出部分菌液作为非诱导对照,然后加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol·L⁻¹,37℃ 诱导 4 h 收样,进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.6 IPTG 浓度梯度诱导 rBlo t 21 蛋白的表达 设置不同 IPTG 浓度诱导实验,IPTG 的浓度设置为 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0 mmol·L⁻¹,37℃ 诱导 4 h,收集等量菌体,SDS-PAGE 蛋白电泳检测。

1.7 rBlo t 21 蛋白的纯化 利用 IPTG 0.1 mmol·L⁻¹,37℃ 诱导 6 h 扩大诱导的菌液量,收集菌体,超声破碎菌体,离心取上清,利用镍柱进行重组蛋白的纯化。先用 1 倍柱体积的 10 mmol·L⁻¹ 咪唑缓冲液 (50 mmol·L⁻¹ NaH₂PO₄, 300 mmol·L⁻¹ NaCl, 10 mmol·L⁻¹ 咪唑) 平衡镍柱,将超声破碎离心后的上清液加入镍柱里,重复上样 1 次;利用 5 倍柱体积的 50 mmol·L⁻¹ 咪唑缓冲液 (50 mmol·L⁻¹ NaH₂PO₄, 300 mmol·L⁻¹ NaCl, 50 mmol·L⁻¹ 咪唑) 漂洗镍柱,洗脱杂蛋白;利用高浓度咪唑缓冲液 (50 mmol·L⁻¹ NaH₂PO₄, 300 mmol·L⁻¹ NaCl, 250 mmol·L⁻¹ 咪唑) 洗脱目的蛋白。

1.8 rBlo t 21 蛋白诱导小鼠变态反应气道炎症模型 将购买的 BALB/c 小鼠随机分笼饲养,每笼 3 只小鼠,每 2 笼小鼠为 1 组;PBS 组作为对照组,注射 PBS 溶液;诱导组为 rBlo t 21 组,注射 rBlo t 21 蛋白。将 100 μg rBlo t 21 蛋白 (1 g·L⁻¹ 溶于 PBS) 作为过敏抗原与 5 mg 氢氧化铝凝胶佐剂混合,室温条件下震荡混合 2 h。第 0/7 天时,每只小鼠腹腔注射 100 μg rBlo t 21/氢氧化铝的复合物,第 14,16,18,20 d 利用 100 μg rBlo t 21 (溶于 PBS,浓度为 1 g·L⁻¹) 经过气管注入小鼠的肺组织,进行过敏模型的诱导。于第 21 天,眼眶静脉采血。第 22 天,分离小鼠肺部组织,4% 多聚甲醛固定,石蜡切片进行 H&E 染色。

1.9 ELISA 法检测小鼠血清总 IgE 水平 设置标准品孔和样本孔,标准品孔各加不同浓度的标准品 50 μL;待测样本孔先加待测样本 10 μL,再加样本稀释液 40 μL;随后标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的检测抗体 100 μL,用封板膜封住反应孔,37℃ 水浴锅或恒温箱温育 60 min。弃去液体,在吸水纸上拍干,每孔加满洗涤液,静置 1 min,甩去洗涤液,在吸水纸上拍干,如此重复洗板 5 次 (也可用洗板机洗板)。每孔加入底物 A、B 各 50 μL,37℃ 避光孵育 15 min。每孔加入终止液 50 μL,15 min 内,在 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值。

1.10 小鼠肺部组织切片 H&E 染色 小鼠被麻醉处死。取小鼠的肺部组织进行固定、包埋和切片。进行 H&E (hematoxylin for evaluation) 染色。肺部组织切片 H&E 染色的炎症打分标准:以 0~3 分标准来评价支气管周围炎症的程度^[10-11]。0 分是指没有炎症细胞的浸润;1 分是指支气管周围偶尔出现炎症细胞;2 分则说明大多数支气管包围着 1~5 层炎症细胞薄层;3 分则代表了大多数支气管周围环绕着一厚层 (超过 5 层细胞厚度) 的炎症细胞。

2 结果与分析

2.1 载体构建 表达质粒 PQE80L-rBlo t 21 经 BamH I 和 Sal I 双酶切,电泳结果表明,目标条带位于

250 bp 和 500 bp 之间,与 *Blo t 21* 基因片段(336 bp)大小一致(图 1 泳道 1 所示)。

2.2 rBlo t 21 蛋白的原核表达 重组质粒 pET80L-rBlo t 21 转化入大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞, 37 °C 条件下,用 1 mmol · L⁻¹ IPTG 诱导 4 h, SDS-PAGE 结果显示: 与非诱导对照(图 2 泳道 1) 相比, 经 IPTG 诱导后, 重组 Blo t 21 蛋白(约 14 kDa) 呈较好表达(图 2), 10 ku 与 15 ku 之间。且不同单菌落均呈现较高的表达量(图 2 泳道 2 ~ 4)。

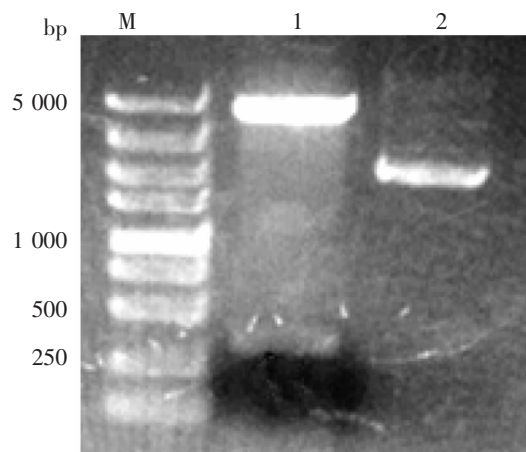


图 1 PQE80L-rBlo t 21 重组质粒双酶切鉴定
M: DNA 分子质量标准(DL5000); 1: PQE80L-rBlo t 21 质粒经 *Bam*H I 与 *Sal* I 双酶切产物; 2: PQE80L-rBlo t 21 质粒对照

Fig.1 Identification of recombinant plasmid PQE80L-rBlo t 21 digested with *Bam*H I and *Sal* I.
M: 5000bp ladder DNA marker; 1: PQE80L-rBlo t 21 digested with *Bam*H I and *Sal* I; 2: Recombinant plasmid PQE80L-rBlo t 21, CK

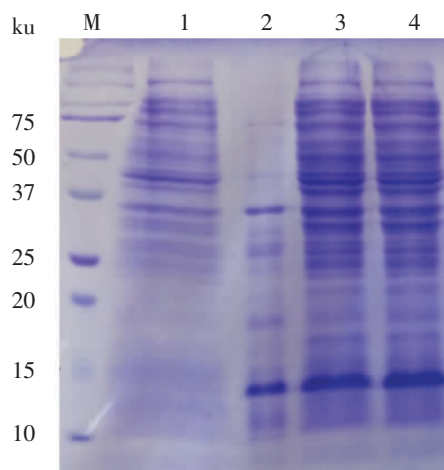


图 2 重组 Blo t 21 蛋白的原核表达

M: 预染蛋白相对分子质量标准 (Bio-rad 161-0375); 1: PQE80L-rBlo t 21 未诱导菌体表达产物; 2~4: PQE80L-rBlo t 21 诱导菌体表达产物, 不同单菌落

Fig.2 Prokaryotic expression of the recombinant Blo t 21 protein
M: Pre-stained protein marker (Bio-rad 161-0375); 1: Bacterial lysate containing rBlo t 21 protein without IPTG induction; 2~4: Bacterial lysate containing rBlo t 21 protein with IPTG induction, having different single colonies

2.3 IPTG 浓度梯度诱导 rBlo t 21 蛋白的表达 设置 IPTG 浓度梯度诱导实验, 结果如图 3 所示, 从 IPTG 0.1 mmol · L⁻¹ 到 1.0 mmol · L⁻¹, rBlo t 21 均呈现较好的表达, 且表达量差异不大。这为后续大量诱导表达纯化 rBlo t 21 蛋白提供了 IPTG 浓度的参考依据。

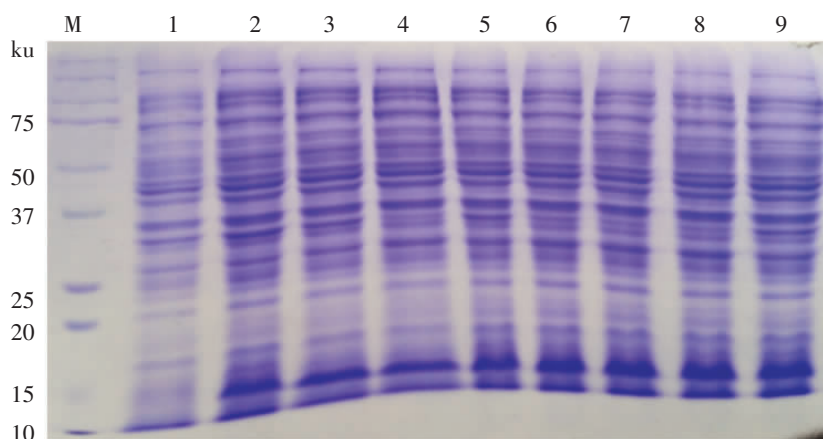


图 3 IPTG 浓度梯度诱导 rBlo t 21 蛋白的表达

M: 预染蛋白相对分子质量标准 (Bio-rad 161-0375); 1: PQE80L-rBlo t 21 未诱导菌体表达产物; 2~9: PQE80L-rBlo t 21 诱导菌体表达产物, 不同 IPTG 浓度梯度, 依次为 IPTG 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0 mmol · L⁻¹

Fig.3 Prokaryotic expression of the recombinant Blo t 21 protein induced with IPTG at concentration gradients
M: Pre-stained protein marker (Bio-rad 161-0375); 1: Bacterial lysate containing rBlo t 21 protein without IPTG induction; 2~9: Bacterial lysate containing rBlo t 21 protein induced with IPTG at different concentration gradients: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0 mmol · L⁻¹

2.4 镍柱亲和层析纯化 rBlo t 21 蛋白 利用 IPTG 诱导后收集菌体,超声破碎后利用镍柱纯化。结果如图 4 所示 rBlo t 21 蛋白几乎全部在上清中存在(图 4 泳道 3),表明了 rBlo t 21 蛋白在大肠杆菌内呈现很好的可溶性表达。经过镍柱亲和层析纯化后,得到了较纯的 rBlo t 21 蛋白(如图 4 泳道 4 所示)。

2.5 rBlo t 21 蛋白诱导小鼠变态反应气道炎症模型 利用纯化的 rBlo t 21 蛋白进行诱导小鼠变态反应气道炎症模型的结果(图 5 - A) 显示,与 PBS 组相比,rBlo t 5 诱导组小鼠血清总 IgE 水平显著上升($P < 0.05$)。

小鼠的肺部组织经 H&E 染色,发现相较于 PBS 对照组小鼠,rBlo t 21 诱导组小鼠的肺部组织细胞浸润明显增加(图 5 - B)。对小鼠肺部组织切片 H&E 染色的炎症严重程度进行打分统计的结果显示,与 PBS 组相比,rBlo t 21 诱导组小鼠的肺部细胞浸润显著增多,呈显著差异(图 5 - C, $P < 0.05$)。

由上述结果可见 rBlo t 21 诱导后的小鼠呈现出典型变态反应的症状,血清总 IgE 上升,肺部组织细胞浸润增加等,这表明了原核表达纯化的 rBlo t 21 具有很强的致敏性,能够诱导小鼠呈现变态反应气道炎症的症状。

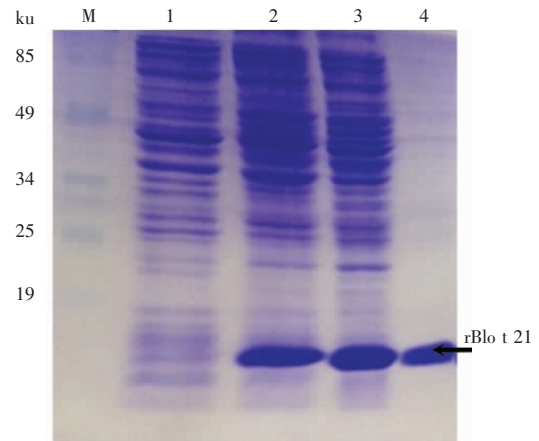


图 4 rBlo t 21 蛋白的纯化

M: 预染蛋白相对分子质量标准, (Fermentas SM0441); 1: 不加 IPTG 诱导对照; 2: 加入 IPTG 诱导后的全菌; 3: 诱导菌超声破碎后的上清溶液; 4: 镍柱亲和纯化的目的蛋白 rBlo t 21

Fig.4 Purification of recombinant Blo t 21 protein
M: Pre-stained protein marker, Fermentas SM0441;
1: Bacterial lysate without IPTG induction, the control (CK); 2: Bacterial lysate with IPTG induction; 3: Supernatant of bacterial lysate with IPTG induction; 4: The rBlo t 21 purified by nickel column, with detailed description

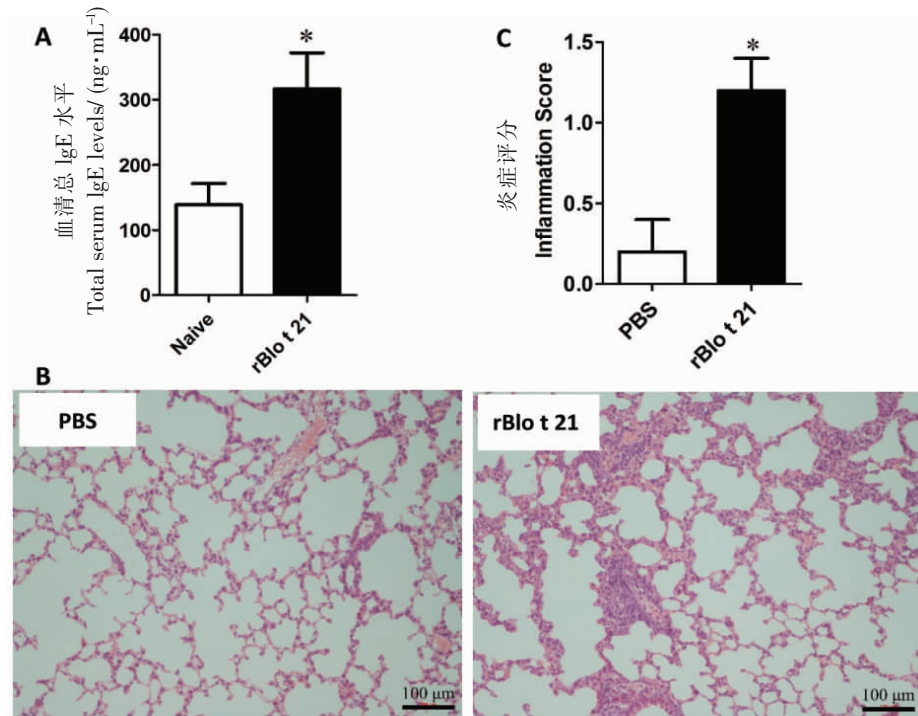


图 5 rBlo t 21 变应原诱导小鼠变态反应气道炎症模型

A: 小鼠血清总 IgE 水平的检测 ($n=5$)。B: 第 22 天,小鼠肺部组织经 4%多聚甲醛固定后,石蜡切片进行 H&E 染色。左: PBS 对照组,右: rBlo t 21 诱导组; C: 对小鼠 H&E 染色切片的细胞浸润严重程度进行打分统计。($n=5$) 打分数值表示为平均值 $\pm$ 标准差,* 号表示与 PBS 组相比,差异显著, $P < 0.05$

Fig.5 Airway inflammation model induced by rBlo t 21

A: Serum of individual mice was collected after allergic model induction. Mean total serum IgE titers $\pm$ SD ($n=5$). B: At 22 d, histological examination of lung tissues by hematoxylin and eosin (H&E) staining. Left: The PBS group; Right: The rBlo t 21 group. C: Lung inflammation was defined as the peribronchial inflammation score ($n=5$). Values are expressed as mean $\pm$ S.E.M. * indicated significant difference from the PBS group at the level of $P < 0.05$

3 讨 论

螨类是在众多的变应原中最主要的变应原之一,而螨变应原是引起变态反应性疾病的重要病因之一,也是引起儿童变应性哮喘的重要的危险因子。尘螨主要有屋尘螨、粉尘螨和热带螨。其中,热带螨是热带和亚热带地区占优势地位的螨种,其作为一种重要过敏原在其孳生地区,致敏性可能比屋尘螨还强,可诱发过敏性皮炎、过敏性鼻炎、哮喘等,甚至可能引起湿疹^[2,7,12-13]。海南岛由于其特殊的地理位置,年平均温度为 22~26℃,相对湿度为 76%~86%,是我国最适宜热带螨的孳生地之一^[3,14-15]。因此,对于热带地区,尤其是海南岛,研究热带螨的致敏模型动物对防治热带螨诱发的过敏性疾病具有重要的意义。

特异性免疫治疗是用逐渐增加剂量的变应原提取物对过敏患者进行反复接触,提高患者对此类变应原的耐受性,从而控制或减轻过敏症的一种治疗方法。天然萃取的抗原用来诊断和免疫治疗过敏性疾病存在许多缺点,例如有大量非抗原性的蛋白;会被其他潜在的免疫刺激物污染,如内毒素。Garcia 等通过结膜和支气管激发试验证实热带无爪螨抗原提取物可引起患者的过敏症状,并建议应将热带无爪螨作为一种重要过敏原在其孳生地区用于临床诊断和治疗^[16]。

热带螨的致敏原很多,最主要的变应原是 Blo t 5、Blo t 21 和 Blo t 7^[6]。Blo t 21 是 Blo t 5 的旁系同源蛋白,2 种序列同源性为 40.7%,但 Blo t 21 与 Blo t 5 之间只有中度的交叉反应性^[6,9],这表明了 Blo t 21 是热带螨的新的一组变应原。Blo t 21 由 3 个反平行 α -螺旋组成,分别由残基 Thr-19 至 Thr-44、Glu-49 至 Glu-74 和 Leu-82 至 Asp-111 分别形成的 3 个 α -螺旋。在氨基酸的组成上,类似于大多数其他吸入性过敏原, Blo t 21 含有高百分比的碱性氨基酸残基(15.0%)和酸性氨基酸残基(20.4%)^[9],高水平的易溶性残基和抗体结合更稳定,是致敏原性的基础结构。

本试验对热带螨主要变应原 Blo t 21 的基因序列进行了密码子优化,构建了相应的原核表达质粒 PQE80L-rBlo t 21,原核表达并利用镍柱亲和层析方法纯化出 rBlo t 21 蛋白。进一步利用 rBlo t 21 蛋白对 BALB/c 小鼠进行变态反应气道炎症模型的诱导,与 PBS 对照组相比,rBlo t 21 诱导组小鼠的血清总 IgE 显著上升,肺部组织切片 H&E 染色则明显看到,细胞侵染增多,尤其是血管与气管周围。这些症状都与过敏性哮喘的症状相似。过敏性哮喘在世界各国广泛存在,是一种以气道炎症、气道高反应性为主要特征的疾病,其主要表现为血清 IgE 水平上升,气道黏膜上皮组织以 T 淋巴细胞、嗜酸性粒细胞和中性粒细胞浸润增加,气道高反应与慢性气道重塑等^[17-18]。这表明重组 Blo t 21 蛋白具有较强的致敏性,能够诱导小鼠变态反应气道炎症模型。本试验成功表达与纯化了重组热带螨变应原 Blo t 21,并利用纯化的 rBlo t 21 诱导了小鼠变态反应气道炎症模型,为热带螨过敏的诊断与治疗打下基础,尤其为研究热带螨过敏的预防与治疗性疫苗或者药物提供了动物模型,也为热带螨与其他过敏原的交叉致敏反应的研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Milián E, Díaz A M. Allergy to house dust mites and asthma [J]. Puerto Rico Health Sciences Journal, 2004, 23(23): 47-57.
- [2] Pires M C, Calux M J F, Mori J C, et al. Reactivity of anti-Blomia tropicalis IgG and IgE in patients with atopic dermatitis [J]. Clinical & Experimental Dermatology, 2002, 27(4): 309-313.
- [3] 王灵,陈实,廖锋,等. 海口市儿童哮喘变应原流行病学调查研究 [J]. 海南医学, 2016, 27(4): 665-667.
- [4] Meno K H, Kastrup J S, Kuo I C, et al. The structure of the mite allergen Blo t 1 explains the limited antibody cross-reactivity to Der p 1 [J]. Allergy, 2017, 72(4): 665-670.
- [5] Chua Y L, Liong K H, Huang C H, et al. Blomia tropicalis-Specific TCR Transgenic Th2 Cells Induce Inducible BALB and Severe Asthma in Mice by an IL-4/IL-13-Dependent Mechanism [J]. Journal of Immunology, 2016, 197(10): 3771-3781.
- [6] Carvalho K D A, Melo-Neto O P D, Magalhães F B, et al. Blomia tropicalis Blo t 5 and Blo t 21 recombinant allergens might confer higher specificity to serodiagnostic assays than whole mite extract [J]. BMC Immunology, 2013, 14(3): 11.
- [7] Chua K Y, Cheong N, Kuo I C, et al. The Blomia tropicalis Allergens [J]. Protein & Peptide Letters, 2007, 14(4): 325-333.
- [8] Gao Y F, Wang D Y, Ong T C, et al. Identification and characterization of a novel allergen from Blomia tropicalis: Blo t 21 [J]. Journal of Allergy & Clinical Immunology, 2007, 120(1): 105.
- [9] Tan K W, Ong T C, Gao Y F, et al. NMR structure and IgE epitopes of Blo t 21, a major dust mite allergen from Blomia tropicalis [J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(41): 34776-34785.

- [10] Kwak Y G , Song C H , Yi H K , et al. Involvement of PTEN in airway hyperresponsiveness and inflammation in bronchial asthma [J]. Journal of Clinical Investigation , 2003 , 111(7) : 1083 – 1092.
- [11] Tournoy , Kips , Schou , et al. Airway eosinophilia is not a requirement for allergen-induced airway hyperresponsiveness [J]. Clinical & Experimental Allergy , 2000 , 30(1) : 79 – 85.
- [12] Caraballo L. Mite allergens [J]. Expert Review of Clinical Immunology , 2017 , 13(4) : 297 – 299.
- [13] Ofmite A , Tropicalis. B. Allergenicity of the mite , *Blomia tropicalis* [J]. Journal of Allergy & Clinical Immunology , 1993 , 91(5) : 1042 – 1050.
- [14] 陈实 , 王灵 , 陈冰 , 等. 海南儿童哮喘常见吸入性变应原的调查 [J]. 临床儿科杂志 , 2011 , 29(6) : 552 – 555.
- [15] 饶朗毓 , 林英姿 , 王永存 , 等. 海口市大学生宿舍尘螨孳生情况的调查 [J]. 海南医学院学报 , 2006 , 12(2) : 124 – 127.
- [16] Robaina J C G , Machín I S , Fernándezcaldas E , et al. Skin tests and conjunctival and bronchial challenges with extracts of *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus* in patients with allergic asthma and/or rhinoconjunctivitis [J]. International Archives of Allergy & Immunology , 2003 , 131(3) : 182.
- [17] Collins R A , Sly P D , Turner D J , et al. Site of inflammation influences site of hyperresponsiveness in experimental asthma [J]. Respiratory Physiology & Neurobiology , 2003 , 139(1) : 51.
- [18] Underwood S , Foster M , Raeburn D , et al. Time-course of antigen-induced airway inflammation in the guinea-pig and its relationship to airway hyperresponsiveness [J]. European Respiratory Journal , 1995 , 8(12) : 2104 – 2113.

The Development of Airway Inflammation Murine Model Induced by Recombinant *Blomia tropicalis* Group 21 Allergen

XIAO Zhengpan¹ , LIU Jinying¹ , WEI Shuangshuang² , WANG Dayong² , PEI Yechun¹

(1. Hainan Key Lab of Tropical Animal Reproduction & Breeding and Epidemic Disease Research , College of Animal Science and Technology , Institute of Tropical Agriculture and Forestry , Hainan University , Haikou , Hainan 570228 , China;

2. College of Biological Science , Institute of Tropical Agriculture and Forestry , Hainan University , Haikou , Hainan 570228 , China)

Abstract: An attempt was made to develop airway inflammation murine model induced by the recombinant Blo t 21 allergen. The Blo t 21 gene sequences were obtained from NCBI GenBank , then optimized , synthesized and inserted into the prokaryotic expression vector PQE80L. The recombinant Blo t 21 was expressed in *E. coli* bacteria , and purified by NI-NTA agarose. Twelve BALB/c mice were divided randomly into control group (PBS group , n = 6) and rBlo t 21-induced group (rBlo t 21 group , n = 6) . After sensitization by intraperitoneal injection (i. p) and challenged by intratracheal instillation of rBlo t 21 , the total serum IgE levels were measured by ELISA; the lungs were fixed and stained with haematoxylin and eosin (H&E) . The recombinant Blo t 21 allergen was expressed successfully in *E. coli* and purified by Ni-NTA affinity chromatography. Furthermore , the airway inflammation murine model were induced by the recombinant Blo t 21 allergen. Compared with the control group (PBS group) , the total serum IgE levels rose obviously in the rBlo t 21 group ($p < 0.005$) . Mice in the rBlo t 21 group showed inflammatory cell infiltration in airway by haematoxylin and eosin (H&E) . The airway inflammation murine model was induced successfully by the recombinant Blo t 21 allergen.

Keywords: *Blomia tropicalis*; recombinant Blo t 21; airway inflammation