

# 科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

真菌免疫調節蛋白調控Th細胞分化與干擾素 $\gamma$ 產生的機制作為  
減緩家塵璜誘發氣喘的健康食品之應用(第2年)

計畫類別：個別型計畫  
計畫編號：NSC 102-2320-B-040-012-MY2  
執行期間：103年08月01日至104年07月31日  
執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系(所)

計畫主持人：劉玉凡  
共同主持人：柯俊良  
計畫參與人員：碩士級-專任助理人員：康嘉真  
碩士級-專任助理人員：呂權蓁  
碩士級-專任助理人員：林欣穎  
大專生-兼任助理人員：邱于安  
大專生-兼任助理人員：李庭瑀

處理方式：

1. 公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢
2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否
3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考：是，衛福部

中華民國 104 年 10 月 24 日

中文摘要：2006年中山醫學大學的呂克桓院長研究團隊，對於台灣中部地區的462位特異反應性(atopy)過敏幼童(2-16歲)，利用免疫實驗法的測試，證實有高達80%以上病患對於各類型的塵蟎都具有致敏的作用(sensitization)，而相較於一些其他常見的過敏原，如蟑螂、貓、狗的毛屑(dander)及食物過敏原，則相對而言，並沒有相對比例的致敏性(約僅有1-20%左右的陽性反應)。同時，在這份報告中所提的台灣中部地區的特有品種微角家塵蟎(*Dermatophagoides microceras*, Der m)的分析，在調查台灣中部地區的幼童過敏病患中，卻有高達80%以上的比例具有致敏性。身處於高溫潮濕亞熱帶氣候的台灣，環境更有利於家塵蟎的滋生，本次計劃如何透過次世代基因定序(Next Generation Sequencing)的方法及生物資訊學的分析，來選殖本土性家塵蟎的致敏基因，並建立並選殖本土性微角家塵蟎的致敏基因，利用表現大量蛋白質來作為建立病人血清之專一性抗體檢測標準、也可作為建立細胞及動物的致敏原模式，是本計畫兩年所要解決的重點，以下的報告內容，就是針對這方面的研究成果作一份完整的進度報告。

中文關鍵詞：微角家塵蟎、免疫調節蛋白、次世代基因定序技術、基因選殖、致敏原基因

英文摘要：House dust mites are complex species which produce thousands of different proteins and other macromolecules. The examination of mixture extractions from whole mites, nymphs, faecal pellets and eggs have indicated that over 30 different proteins induce IgE antibody in patients allergic to the house dust mite. In this plan, from a practical point of view using the bioinformatics, next generation sequencing new technologies to analysis and cloning the important allergens from local breeding mite, *Dermatophagoides microceras* (Der m). Then, based on the engineering recombination technology and protein expression system to generate specific antibodies not only better explained and molecular epidemiology have allowed excellent choice of allergen molecules useful for diagnosis, but also developing allergen of house dust mite Der m-sensitized cell-based and animal models to screen lead active compounds and healthy foods for therapeutic approaches. Next generation sequencing (NGS) technologies enable the quick and comprehensive approach of complex nucleic acid populations and have opened fascinating opportunities for the analysis of organism without a sequenced genome on a genomic scale. Plan Goal: Focus on the not determined and unknown allergies from local glycyphagid mites in subtropical region of Taiwan. Based on the bioinformatics tools, molecular biology and next generation sequencing to analysis and cloning the specific mite-allergic subjects.

The opportunity to produce more recombinant allergens to generate specific antibodies not only to molecular epidemiology allergen molecules for diagnosis, but to developing allergen of house dust mite Der m-sensitized cell-based and animal platforms to lead active compounds and healthy foods screening for therapeutic approaches.

英文關鍵詞：Der m, FIP, NGS, Gene clone and Allergene genes

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

期中進度報告  
期末報告

真菌免疫調節蛋白調控 Th 細胞分化與干擾素  $\gamma$  產生的機制作為減緩家塵蟎所誘發氣喘的健康食品之應用

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 102-2320-B-040-012-MY2

執行期間：102年8月1日至104年7月31日

執行機構及系所：中山醫學大學 生物醫學科學學系

計畫主持人：劉玉凡 副教授

共同主持人：柯俊良 教授

計畫參與人員：林欣穎、康嘉真、呂權蓁（碩士級專任助理）、  
邱于安、李庭瑤（大學部兼任助理）

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 0 份：

- 移地研究心得報告
- 出席國際學術會議心得報告
- 國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年 二年後可公開查詢

中 華 民 國 104 年 10 月 24 日

## (二) 中文摘要

2006 年中山醫學大學的呂克桓院長研究團隊，對於台灣中部地區的 462 位特異反應性(atopy) 過敏幼童 (2-16 歲)，利用免疫實驗法的測試，證實有高達 80% 以上病患對於各類型的塵蟎都具有致敏的作用(sensitization)，而相較於一些其他常見的過敏原，如蟑螂、貓、狗的毛屑(dander)及食物過敏原，則相對而言，並沒有相對比例的致敏性 (約僅有 1-20% 左右的陽性反應)。同時，在這份報告中所提的台灣中部地區的特有品種微角家塵蟎(*Dermatophagoides microceras*, *Der m*) 的分析，在調查台灣中部地區的幼童過敏病患中，卻有高達 80% 以上的比例具有致敏性。身處於高溫潮濕亞熱帶氣候的台灣，環境更有利於家塵蟎的滋生，本次計劃如何透過次世代基因定序(Next Generation Sequencing)的方法及生物資訊學的分析，來選殖本土性家塵蟎的致敏基因，並建立並選殖本土性微角家塵蟎的致敏基因，利用表現大量蛋白質來作為建立病人血清之專一性抗體檢測標準、也可作為建立細胞及動物的致敏原模式，是本計畫兩年所要解決的重點，以下的報告內容，就是針對這方面的研究成果作一份完整的進度報告。

## (二) 英文摘要

House dust mites are complex species which produce thousands of different proteins and other macromolecules. The examination of mixture extractions from whole mites, nymphs, faecal pellets and eggs have indicated that over 30 different proteins induce IgE antibody in patients allergic to the house dust mite.

In this plan, from a practical point of view using the bioinformatics, next generation sequencing new technologies to analysis and cloning the important allergens from local breeding mite, *Dermatophagoides microceras* (*Der m*). Then, based on the engineering recombination technology and protein expression system to generate specific antibodies not only better explained and molecular epidemiology have allowed excellent choice of allergen molecules useful for diagnosis, but also developing allergen of house dust mite *Der m*-sensitized cell-based and animal models to screen lead active compounds and healthy foods for therapeutic approaches.

Next generation sequencing (NGS) technologies enable the quick and comprehensive approach of complex nucleic acid populations and have opened fascinating opportunities for the analysis of organism without a sequenced genome on a genomic scale.

**Plan Goal:** Focus on the not determined and unknown allergies from local glycyphagid mites in subtropical region of Taiwan. Based on the bioinformatics tools, molecular biology and next generation sequencing to analysis and cloning the specific mite-allergic subjects. The opportunity to produce more recombinant allergens to generate specific antibodies not only to molecular epidemiology allergen molecules for diagnosis, but to developing allergen of house dust mite *Der m*-sensitized cell-based and animal platforms to lead active compounds and healthy foods screening for therapeutic approaches.

## (二) 關鍵詞

微角家塵蟎、免疫調節蛋白、次世代基因定序技術、基因選殖、致敏原基因。

### (三)報告內容：

#### I、前言

家塵蟎(house dust mites, HDMs) 屬於一種品種複雜的節肢動物門(Arthropoda)的生物，本身可產生成千上萬種的不同的蛋白質或是混和的巨分子物質，然而從其蟲體、蛹及排洩物的萃取物之中，以及氣喘病人檢體的分析，目前已經有超過 30 多種不同的蛋白質，被鑑定具有在誘發氣喘病人身上產生 IgE 抗體，引發對於 HDMs 產生過敏性的物質。(Thomas, Smith et al. 2002) 在這些已發現的過敏原中，又以 Group 1 (Cysteine protease, MW 25,000) 與 2 (HE1 homologue, MW 14,000) 類型的過敏原對於誘發人類產生氣喘，具有較顯著的專一性與重要性。對於這些家塵蟎過敏原的研究，利用 IgE binding 以及 T-cell response 的實驗都指出對於過敏的發展與調控，因此能夠選殖家塵蟎的致敏原基因，對於這方面的研究工作具有重要的關聯性與意義。

#### II、研究目的

因為家塵蟎的樣本取得不易，同時樣本的 DNA 品質不易控制，本子計畫的研究重點藉由生物資訊學與次代基因定序(Next Generation Sequencing)的方法，一方面可以有系統選殖本土性微角塵蟎的致敏基因，並且做為大量表現蛋白質來作為建立專一性抗體、同時也可作為建立細胞及動物的致敏原模式之應用，並且對於進一步對於家塵蟎致敏原的致敏機制研究、建立專一性 IgE 抗體作為臨床病因診斷之用，以及對於相關地抗過敏藥物及健康食品的篩選，作為研究的平台與對於相關領域提出貢獻。

#### III、研究方法

次世代定序技術(Next Generation Sequencing, NGS) 是一項快速且完整的分析複雜核酸序列的技術。(Metzker 2010) 開啟了全新分析物種基因的方法，能夠對於該物種的基因體序列還處於未知的狀況下，該分析技術仍能以全基因體的模式，本計畫用來發現物種的新穎同源基因的選殖、探討基因的多型性(polymorphism)，以及預估特定基因不同時期的表現量等等生物問題。

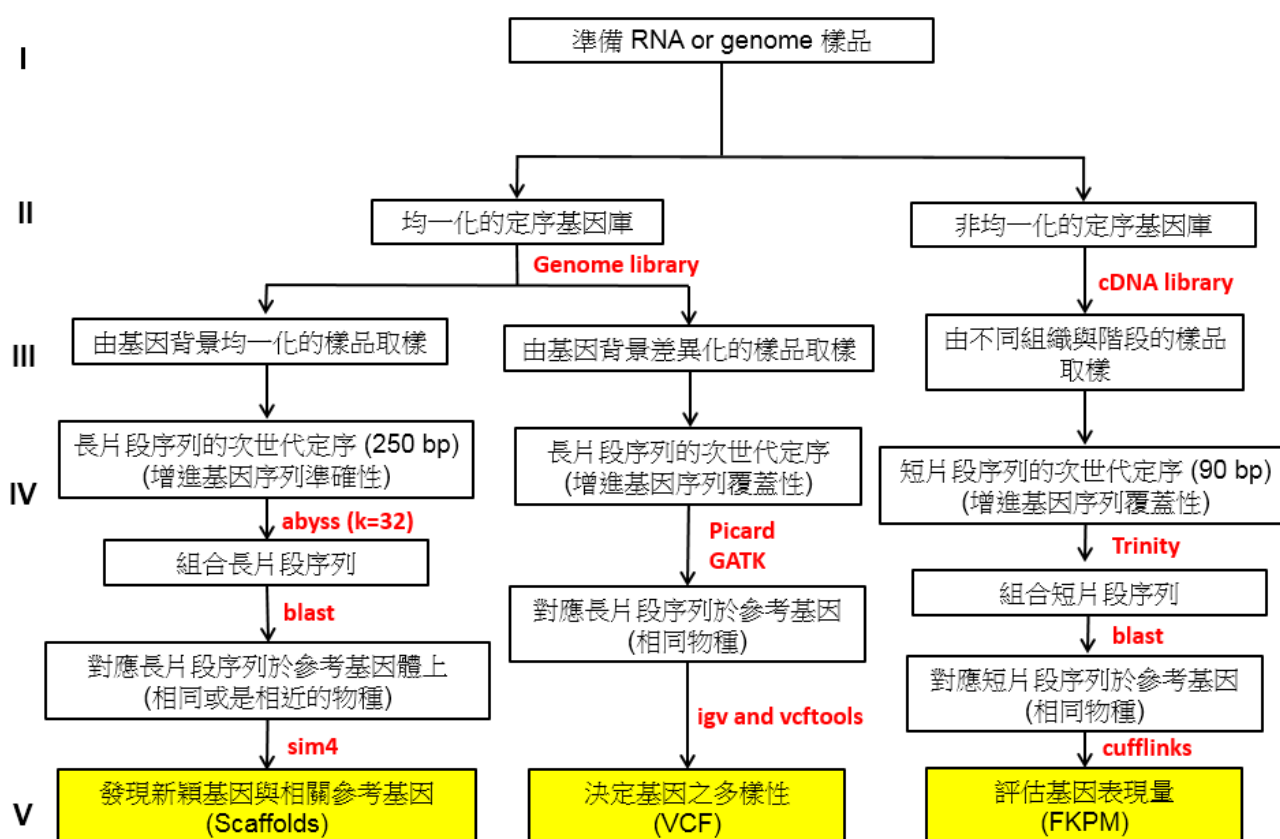
#### IV、結果與討論

**本研究計畫目標:** 針對 *Der m* 家塵蟎品種中目前還沒有研究的過敏原的研究，以及對於單一品種的家塵蟎做有系統的報導。因此，本計畫希望藉由生物資訊學及次代基因定序(Next Generation Sequencing)的方法，來選殖本土性微角家塵蟎的致敏基因，並且大量表現來作為建立專一性抗體、同時也可作為建立細胞及動物的致敏原模式，對於進一步對於家塵蟎致敏原的致敏機制研究、建立專一性 IgE 抗體作為臨床病因診斷之用，以及對於相關地抗過敏藥物及健康食品的篩選，作為重要的研究工具與該領域的貢獻。

## [家塵蟎的背景介紹]

根據前人的研究中，家塵蟎(house dust mites, HDMs) 屬於一種複雜的節肢動物(Arthropoda)，本身可產生成千上萬種的不同的蛋白質或是巨分子的物質，然而從其蟲體、蛹及排洩物的萃取物之中，目前已經有超過 30 多種不同的蛋白質，被鑑定具有在誘發氣喘病人身上產生 IgE 抗體，引發對於 HDMs 產生過敏性的物質。(Thomas, Smith et al. 2002) 在這些已發現的過敏原中，又以 **group 1 (Cysteine protease, MW 25,000)** 與 **2 (HE1 homologue, MW 14,000)** 類型的過敏原對於誘發人類產生氣喘，具有較顯著的專一性與重要性。(Chapman and Platts-Mills 1980; Lind and Lowenstein 1983) 同時根據公衛相關的調查統計，在每個糞便球(dung ball) 中約含有 0.15 ng 的 group 1 過敏原，而對於臨床症狀的影響，以平均每隻家塵蟎每天可產生 20 個糞便球來估計，約估 100 隻的家塵蟎在一週就可產生 2 μg 的過敏原，這個過敏原量已可達到誘發過敏的劑量。(Platts-Mills, Thomas et al. 1992) 同時在臨床病人血清的研究中，也證明這兩類的家塵蟎過敏原，直接以 Skin prick test, histamine release 及 IgE binding 等免疫學的測試方法，也證實對於 80%-100% 的病人血清具有陽性反應。(van der Zee, van Swieten et al. 1988; Meyer, Bond et al. 1994)

首先利用 Next Generation Sequencing (NGS)的分析流程，分析了 Der m 的基因體(Genome)與轉錄體(Transcriptome)，建立並選殖本土性微角家塵蟎的致敏基因庫。分析流程如下：



**Figure 1** | 在沒有基因陣列與基因體資訊的情況下，利用次世代定序技術進行基因表現量的預測與新穎基因發現的流程。

**[次世代定序技術的優點與預計要解決的問題]**

針對上述所遇到的困難，本計畫提出利用次代基因定序的方法，來選殖微角家塵蟎致敏基因的方式，不但可以克服利用生物資訊學方法的盲點，同時可以有系統的選殖到所有基因，甚至可以找到一些相關性的致敏基因，同時再配合不同的定序策略(“Long” reads 與 “Short” reads 的方式)，還可進一步找出這些基因間的多型性與表現量與致敏的關係。

根據先前的研究報導，序列的多樣性(Diversity)在 HMD 致敏原中是一個常見的現象，同時多樣性的致敏原序列，所誘發的 T-cell 反應也有所不同 (Smith, Hales et al. 2001)，因此利用次代基因定序的方法(Figure 1)，不但可以幫助有系統的選殖到這些致敏原的同源基因外，同時也利用次代基因定序快速且高產量的特性( $7.5 \times 10^9$  bp/run)，對於粗估全序列長度僅有  $200 \times 10^6$  bp 的家塵蟎基因體，至少擁有 35 倍的序列覆蓋率(Coverage)，簡言之以這樣的策略工具，足以偵測致敏基因間的多型性與表現量的問題，這樣的資訊對於後續利用分子生物學的方法，來表現大量蛋白質來作為建立專一性抗體，區別致敏原的多型性問題的探討、作為後續建立有別於傳統利用 OVA 致敏原模式，直接利用家塵蟎致敏重組基因的方式，所建立的細胞及動物的致敏原模式，也為將來進一步篩選活性物質，以及相關的治療方式提供很大的幫助。(Figure 2)

(A) Table 1.Result statistics

	R1.clean.fastq	R2.clean.fastq
Read length (bp)	250	250
Total number of clean reads	7,343,792	7,343,792
Total bases of clean reads (bp)	1,835,948,000	1,835,948,000
Total number of Q20 bases (bp)	1,743,770,754	1,619,700,209
Percentage of Q20 bases	94.98%	88.22%

(B)

Method	Statistics
Contig N50	1,836
median Contig length	483
average Contig length	1,029.92
Total assembled bases	104,362,787
min Contig length	201
Max Contig length	303,949
total Contigs	101,331
n:N50 <sup>a</sup>	9,961

**Figure 2 |** Sequence data obtained from NGS platform for *Dermatophagoides microceras* strain.



## [家塵蟎致敏原的分類與資訊]

家塵首度被報導與氣喘有關是在 1920 年代左右，直到 1964 年 Voorhorst R 等人發現在這些造成氣喘的過敏原中，有 90% 氣喘病患的皮膚試驗呈現對家塵具有陽性反應，而三年後 Voorhorst R 等人才發現，原來家塵中的塵蟎才是造成過敏的主要原因。1987 年 Platts-Mill TAE 等人指出，屋塵蟎與粉塵蟎會導致 90% 以上的氣喘患者，引發細胞性與體液性的過敏反應。根據 Chilmonczyk BA 等人的研究工作，孩童在一歲時曝露於塵蟎的刺激，與將來發展成為氣喘呈現正相關情形。

塵蟎的過敏原主要存於其軀體、蛹、蛋、分泌物以及排泄物中。對於 HDMs 中萃取的 30 多種不同的蛋白質分析的結果，目前 15 種重要的造成過敏原，在兩種主要的家塵蟎-歐洲屋塵蟎(Der p)與美洲粉塵蟎(Der f)，已被選殖以及研究測試。整合如 Table I 所示，其中 Group 1 and 2 兩種過敏原是主要誘發 IgE-binding 的蛋白質，根據估計約佔整個 HDM 成分中的 40%-60% 左右，而 Group 1, 2, 5, 7 and 10 等五種主要的過敏原，就已涵蓋約八成以上的過敏病患血清中，IgE binding 測試的陽性反應。(Thomas, Smith et al. 2002) 從過敏原的生化功能分類來分析，大部分由家塵蟎中所分離的過敏原，是屬於蛋白質水解酵素 (如: Group 1, 3, 6 and 9)、醣類與脂肪類的代謝水解酵素 (如: Group 2, 4, 13 and 14) 以及肌肉纖維收縮相關的蛋白質(如: Group 10 and 11)。(Thomas, Smith et al. 2002; Bessot and Pauli 2011)

**Table 1 | Gene structures of putative *D. microceus* allergens confirmed by Next Generation Sequencing analysis.**

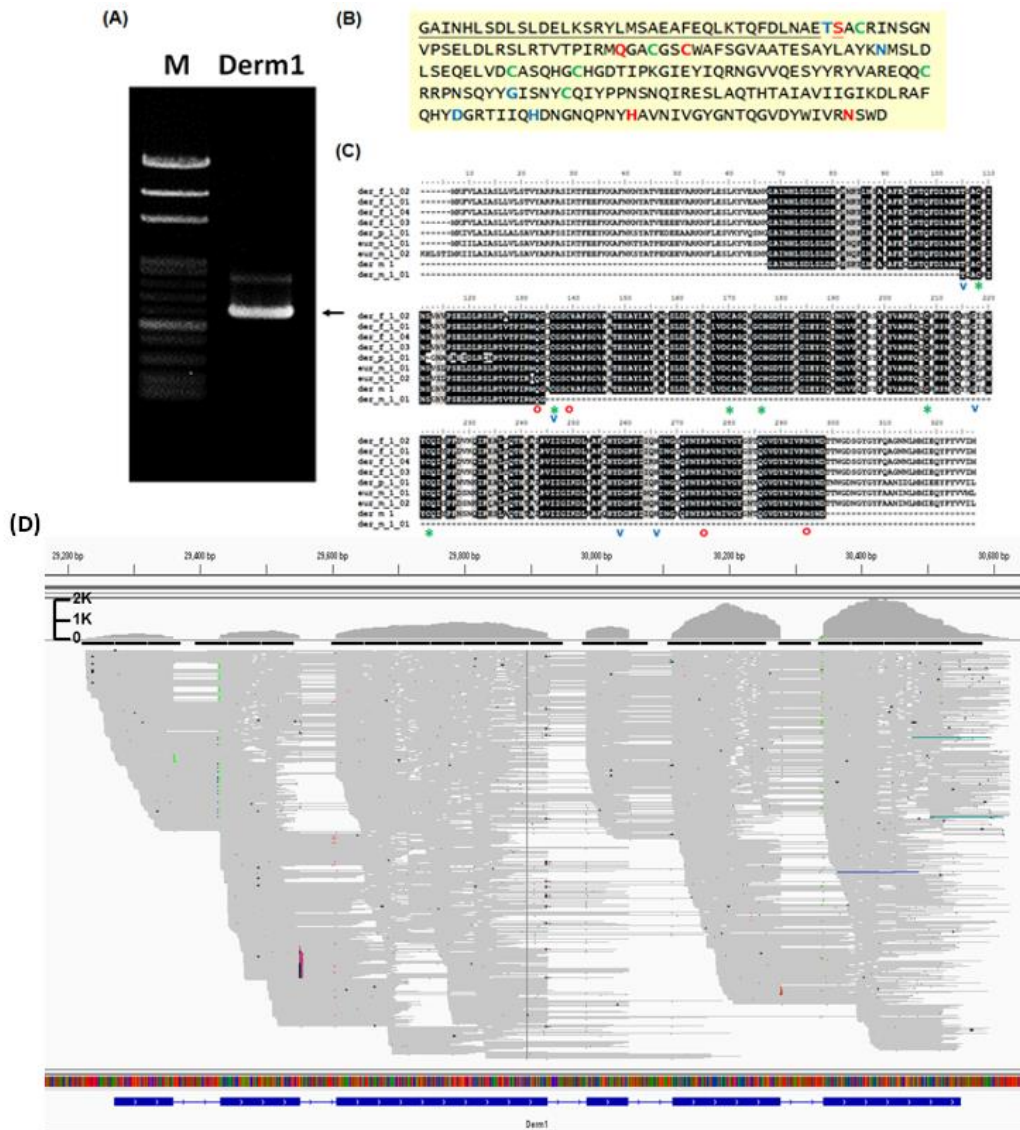
Gene <sup>a</sup>	Locus tag <sup>b</sup>	Biochemical function <sup>c</sup>	Molecular Basis <sup>d</sup>	Length (a.a.)	No. of exons	FPKM <sup>e</sup>	Der f (American) <sup>f</sup>	Der p (European)	IgE binding <sup>g</sup>
Der m 1	996414	Cysteine peptidase	proteolytic activity	321	6	140.2	ABU49605 (92%)	P08176.2 (84%)	80-100
Der m 2	1001166	MD2-like lipid binding protein	lipid binding	146	2	93.7	ABL84753.1 (95%)	AAF86462.1 (84%)	80-100
Der m 3	1003695	Trypsin-like serine protease	proteolytic activity	259	2		ACK76293.1 (94%)	AAA19973 (78%)	16-100
Der m 4	1006825	$\alpha$ -amylase	others	525	3	3.53	AIP86946.1 (99%)	AAD38942 (88%)	40-46
Der m 5	999417	Structural protein	chitin binding	132	2	90.9	BAE45865 (87%)	AAB32842 (75%)	50-70
Der m 6	1002640	Trypsin-like serine protease	proteolytic activity	279	3	159.0	ABW82654 (92%)	-	40
Der m 7	1005778	Unknown	Others	213	2	1.1	ACK76299 (85%)	AAA80264 (81%)	50
Der m 8	1003214	Glutathione-S-transferase	Others	221	2	0.9	AIO08867 (96%)	P46419 (70%)	40
Der m 9	994782	Trypsin-like serine protease	proteolytic activity	235	3	124.2	AAP35067.1 (96%)	AIO08869.1 (92%)	90
Der m 10		Tropomyosin	Muscle related	284	5		ABU97468 (99%)	ACI32128 (98%)	50-95
Der m 11	997204	Paramyosin	Muscle related	875	11	1.1	AIO08864.1 (98%)	-	80
Der m 13		Lipocalin	lipid binding	131	2		AAP35078.1 (99%)	ADK92390 (95%)	10-23
Der m 14	995453	Apolipoprotein-like	lipid binding	1666	2	10.0	AAM21322.1 (88%)	AAM21322 (88%)	90
Der m 15		GH18_Chitinase-like	chitin binding	451	3		AIO08863.1 (99%)	AAY84564 (93%)	70
Der m 16	1000414	Gelsolin-like	Others	480	7	12.3	AIO08859.1 (97%)	-	50
Der m 18	998970	GH18_Chitinase-like	chitin binding	462	3		AAM19082.1 (98%)	AAY84563.1 (89%)	55
Der m 20		Arginine kinase like	Others	350	5	1.0	AAP57094 (98%)	ACD50950.1 (96%)	25
Der m 21	999417	Structural protein	chitin binding	136	2		AHC94806.1 (92%)	ABC73706.1 (69%)	<95
Der m 22	994603	MD2-like lipid binding protein	lipid binding	156	2		ABG76195.1 (97%)	-	
Der m 23	995003	Chitin-binding	chitin binding	120	1		ACB46292.1 (55%)	ACB46292.1 (55%)	
Der m 24	984203	Ubiquinol-cytochrome C reductase binding protein-like	Others	118	1		AGI78542.1 (97%)		50-100
Der m 25	994899	Triosephosphate isomerase	Others	247	4		AIO08860.1 (99%)		76
Der m 26	1004878	Myosin alkali light chain protein	Others	160	4		AIO08852.1 (99%)		70-85
Der m 27	994836	Serpin	Others	408	2		AIO08851.1 (98%)		35-100
Der m 28	995095	Heat shock protein	Others	654	1		AIO08848.1 (88%)		68-70
Der m 29	994909	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase		164	3		AIO08856.1 (99%)		
Der m 30		Ferritin	Muscle	166	3		AGC56219.1 (90%)		29-100
Der m 31	997785	Cofilin	Muscle related	148	3		AIO08870.1 (99%)		31-100
Der m 32	989339	Secreted inorganic pyrophosphatase	Others	293	2		AIO08849.1 (96%)		15-100
Der m 33		Alpha-tubulin	Others	461	3		AIO08861.1 (83%)		25-100
		alpha-actinin	Muscle	975	10		AGC56214.1 (78%)		80-85
		Profilin	Muscle related	130	3		AIO08866.1 (99%)		60-63

- a. The allergen candidate genes of *Der m* determined by preliminary verification of transcriptomic analysis and annotation results. Retrieved complete gene sequences and structures with amino acid sequence homology (approximately 55% to 99%) to validated allergens in the *Der f* and *Der p* species of house dust mite.
- b. Locus tags are revealed scaffold ID in the assembled *D. microceaus* draft genomic sequences.
- c. Thirty-three groups of mite proteins have been officially listed as allergens by the allergen nomenclature subcommittee in the source of Animalia Arthropoda (available web site from [www.allergen.org](http://www.allergen.org)).
- d. The dust mite allergens can be classified according to the presence of inherent adjuvant-like activities or their affinity to adjuvant substances in mite extract.
- e. FPKM, Fragment per kilo-base of transcript per million mapped reads.
- f. The relative homologous genes in *Der f* and *Der p* species of house dust mite analyzed in the NCBI database (by BLAST2 algorithm); GenBank accession number are listed (% similarity).

NGS 分析的結果整理如 Table 1，利用 *Der f* and *Der p* 已知的過敏源的分類方法（請參考過敏源網站 [www.allergen.org](http://www.allergen.org)），將本土性微角家塵蟎的致敏基因分析的結果整理如 Table 1。目前利用序列同源的分析結果，總共找到 30 個可能的過敏源，目前暫定為 *Der m*1 - *Der m* 33。其中跟據序列比對的結果與 *Der f* (American) 的過敏源較為相似（達 78%-99%），另一方面各個過敏源的表現量評估，可利用 NGS 的資料來進行估算，方法是利用 FPKM (Fragments Per Kilobase of Exon Per Million Fragments) 的方式估算，根據分析的結果顯是表現最多的前五名分別為 *Der m* 6, 1, 9, 2, and 5，其中對於臨床檢體誘發 IgE 的估算，則是由過敏源網站中利用 *Der f* 做 Skin test 臨床資料分析的結果，\* 80-100 代表 80%-100% 具陽性反應，結果以 *Der f* 1 and 2 最為顯著。(Table 1)

### [*Der m* 1 致敏基因的選殖]

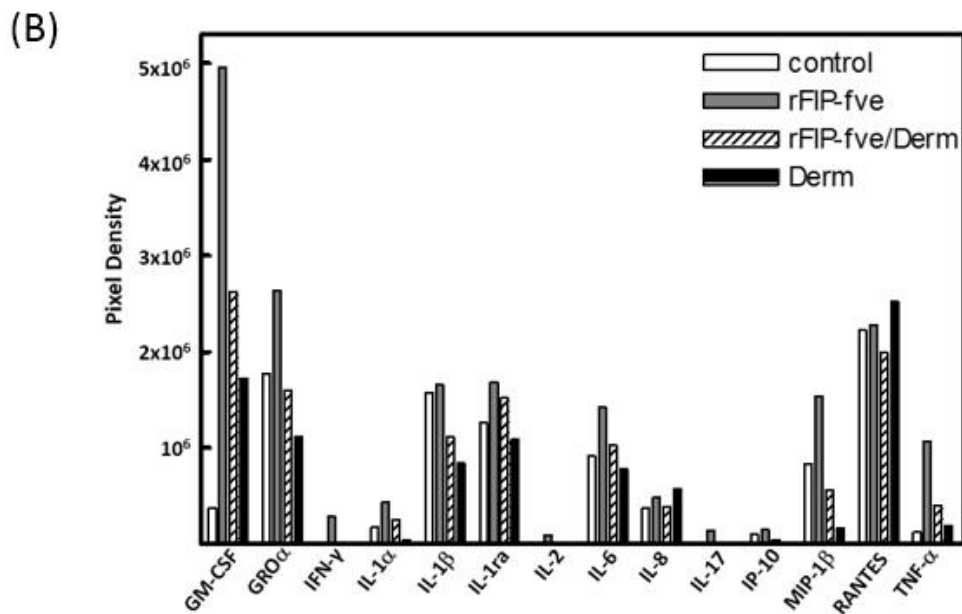
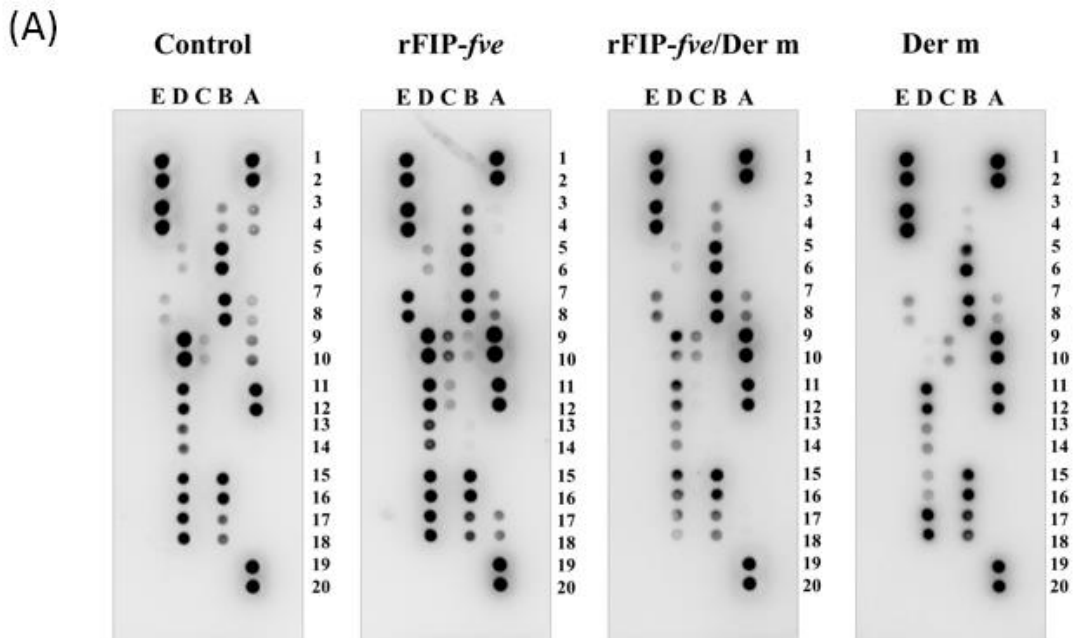
Figure 2 所示，是利用專一性引子所選殖的微角家塵蟎基因，其中圖(Figure 2A)是 PCR 膠圖顯示在 692 bp (箭頭所示)，有實驗所預測的產物，將 PCR 物送去定序的結果，共可得到 695 個核苷酸，可轉譯為 231 個完整氨基酸的開放式框架 (如 Figure 2B)，其中 Thr38 氨基酸是預測的 protease 水解位點，成熟的 *Der m* 1 蛋白質會在後轉譯修飾過程中，切除前面的 38 個氨基酸；由六個綠色星型符號(40, 69, 103, 109, 141 and 155) 顯示為 Cys 的位置，藉由 *Der p* 1 與 *Der f* 1 的結構來預測，顯示為蛋白質雙硫鍵形成的位置，分別為 40-155, 69-109, 103-141 兩兩的相互配對，而紅色圓型符號 (Glu69, Cys72, His208 and Asn228)所顯示的四個氨基酸位置分別是構成 *Der m* 1 蛋白酶酵素的活性中心；而藍色字的部分 (Thr38, Cys69, Gly150, Asp192 and His199)等 5 個氨基酸的部份，分別構成蛋白酶酵素的金屬離子結合位，其中 Ser39 為定序結果與在資料庫中(ID: P16312)所記載的 *Der m* 1 部分序列有差異之處(Gln -> Ser)。如 Figure 2C 所示則是利用多序列分析的結果，其中顯示大部分的活性中心、金屬離子結合位與雙硫鍵的位置，具有高度的保留性，除了 His199 的位置與 *Der f* 1 相同外而與 *Der p* 1 (Arg) 有差異。如 Figure 2D 所顯示 NGS reads 組裝 *Der m* 1 基因的情形，將利用 Genome library 所組裝的基因體片段，與 RNA library 所建立起的基因表達片段，進行序列的比對(alignment)，顯示該基因由 6 個外顯子 (Exons)所組成，同時也可利用 FPKM(Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads)來預估該基因表現的多寡。(Figure 2)



**Figure 2 | Novel gene discovery of Der m 1 HDM allergy and view of aligned NGS reads.** **A.** 692 bp PCR product revealed the Der m 1 from crude Der m cDNA library. **B.** Deduced 231 amino acids sequence of potential Der m 1 protein, the underline indicated the signal peptide was processed by protease during posttranscriptional modification, the six conserved residues (positions 40, 69, 103, 141 and 155) of Cysteines shown in color green revealed the forming the consensus disulfide bonds based on the crystal structure of Der f 1. The residues of Glu69, Cys72, His208 and Asn228 shown in color red circles indicates the putative active site of Cysteine protease. The color blue “v” symbols Thr38, Cys69, Gly150, Asp192 and His199 indicated the consensus residues of metal ion binding site. **C.** The multiple sequence alignment of Der f 1, Der p 1 and Der m 1. **D.** Alignment are represented as gray lines with sorted reads mismatching the genome reference indicated by color with alpha transparency proportional to quality. Refuses genes track of HDM Der m1 gene, strain oriented by arrow in additional to the bar and line indicated the exon and intron region, respectively.

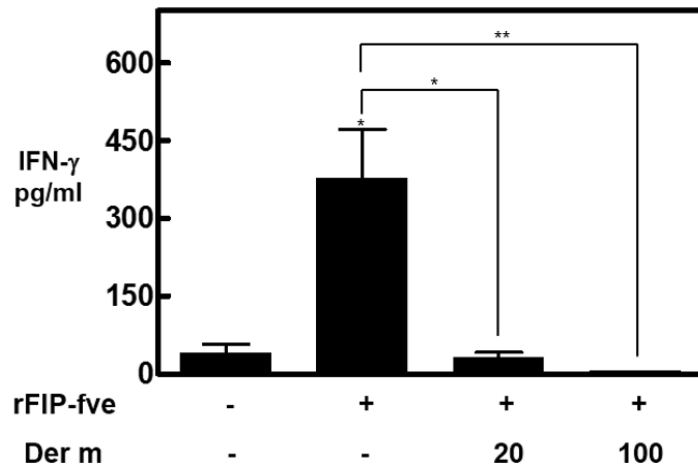
**[Der m 粗萃取與免疫反應測試]**

目前我們已完成粗 Der m 萃取、金針菇免疫調節蛋白(FIP-fve)及合併處理正常人類 hPBMC 利用人類 cytokine array panel A 分析 36 種不同的人類 cytokines 結果。(Figure 3A) 將實驗結果量化,如 Figure 3B 所示,其中  $INF-\gamma$  的表現是有差異。其他幾個 Cytokines 有顯著差異的分別為 GM-CSF,  $GRD\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $IL-8$ ,  $MIP-1\beta$ , RANTES and  $TNF-\alpha$ 。(Figure 3)



**Figure 3 | Cytokine analysis of hPBMCs by cytokine array.** The supernatant were collected from hPBMCs which were treated with control (GST), rFIP-fve, DerM and rFIP-fve/DerM for 48 hours and manipulated followed by array manual. (A) membrane image; (B) mean pixel density of human cytokine array.

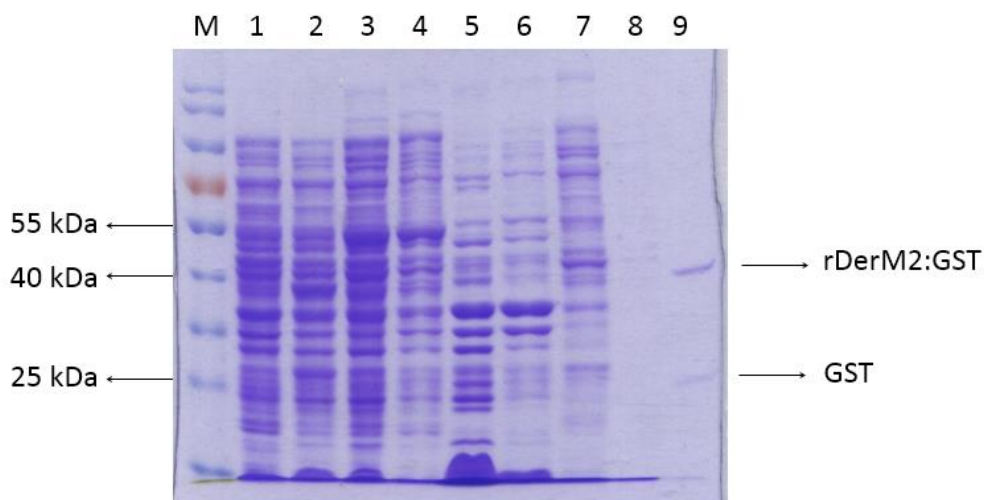
針對  $\text{INF-}\gamma$  作進一步的分析，如 Figure 4 顯示發現對於正常的 hPBMCs 細胞處理 FIP-fve 的蛋白質，確實可以誘發細胞分泌  $\text{INF-}\gamma$ ，而對於 Der m 的粗萃取物，也確實對於  $\text{INF-}\gamma$  的分泌具有平衡的效果。(Figure 4)



**Figure 4 | Cytokines effects of FIP-fve treatment on hPBMCs combined with crude Der m-challenged.** The IFN- $\gamma$  expression levels of hPBMCs was measured by ELISA. The supernatant were collected from hPBMCs which were treated with control (GST 200  $\mu$ g/ml), rFIP-fve (100  $\mu$ g/ml) and rFIP-fve/DerM for 48 hours and operated followed by ELISA manual. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.005$

### [Der m 2 的蛋白質表達與純化]

根據本土性微角家塵蟎的致敏基因 NGS 分析的結果，設計專一性的引子(primers)，首先進行 Der m 2 基因的選殖，並與 GST-tagged (Glutathione S-transferase) 系統進行蛋白質的表達，並利用 Ecoli 系統表達，來產生大量的 rDer m 2:GST 蛋白質，以利後續之分析。(Figure 5)

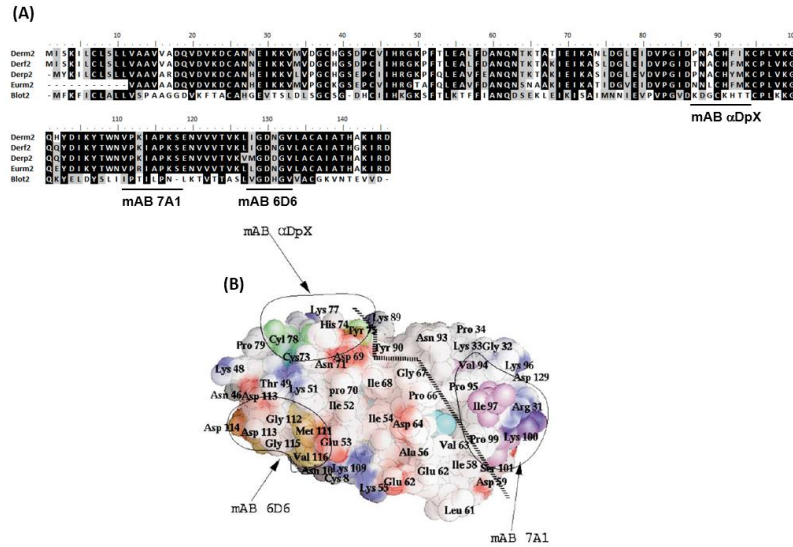


**Figure 5 | SDS-PAGE analysis of rDerm2 purification process.** The rDerm2 protein was purified by GST column. The fractions were collected during the experiment and analyzed by SDS-PAGE. M, marker. 1, non-induction E.coli. 2, induction E.coli. 3, cell lysate (supernatant). 4, whole bacteria. 5, cell lysate (pellet). 6, cell lysate (supernatant) 7, flow through. 8, washed 9, elution. The lane 1~3 were generated from E.coli which incubated at 37 $^{\circ}$ C and the lane 4~9 were incubated at 20  $^{\circ}$ C.

### [Der m 2 抗原決定位的分析]

根據多序列比對的分析結果(Figure 6A)，顯示蛋白質序列的比對 Der m 2 與 Der f 2 (95%) 具有和 Der p 2 (84%) 據有高度的相似度；但以蛋白質立體結構來顯示(Figure 6B)，在抗原辨識區域中的抗原

決定位(mAB 6D6 and mAB  $\alpha$ DpX)則有明顯差異，而另一個區域 (mAB 7A1)，是否三種常見的家塵蟎是否有彼此之間據有交互反應(cross-reactions)的情形？則需要利用臨床檢體來做進一步分析。(Figure 6)

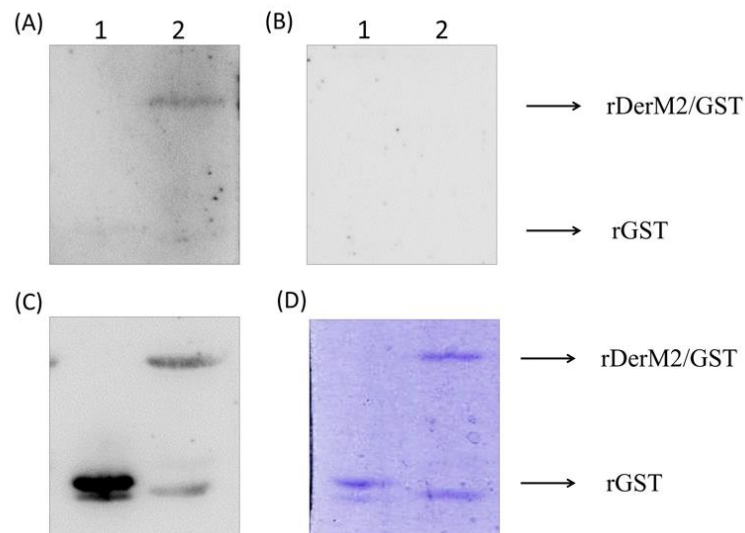


**Figure 6 | Comparison the sequences of antibody epitopes between the three difference major dust mite allergen.**

(A) Multiple sequences alignment of Der m 2, Der p 2 (P49278), Der f 2 (Q00855), Eur m 2 (Q9TZZ2) and Blo t 2 (Q1M2P1) using the ClustalW. Identical amino acids are indicated by black shading and similar amino acids by gray shading. Numbers indicate the positions of the amino acid residues of each protein. The underlines revealed the known immunogenic epitopes sequences in the Der p 2 protein. (B) GRASP representation of the Der p 2 crystal structure (PDB ID: 1KTJ). Cycled are three known immunogenic epitopes on the surface of the molecule, based on amide exchange measurements. The broken lone marks the groove between two beta-sheets.

**[對於本土塵蟎的病人的血清檢測]**

將純化後的 rDer m 2:GST 進行臨床檢體的檢測，其中 Figure 7A 與 B 分別代表利用成年病人與正常人的血清，來進行 IgE 抗體免疫墨點法(immune-blotting) 分析，顯示病人血清中具有專一性針對 Der m 2 的 IgE 抗體(Figure 7A, line2)，這個偵測的結果在正常人並沒有(Figure 7B)，同時利用 anti-GST 的抗體及蛋白 Coomassie Blue 染色法來驗證所表達的 rDer m 2:GST 與內生性的 GST 的蛋白質。(Figure 7C and D)



## Figure 7 | Binding of recombinant Der m 2 protein by IgE in the sera from adult patient with HDM allergy.

Recombinant DerM2 protein analysis by SDS-PAGE and western. The Lane1 (rGST) and Lane2 (rDerM2/GST) were purified by GSTrap™ FF column. (A) corresponding IgE-immunoblot image from patient serum (B) non-allergic serum (C) corresponding GST-immunoblot image (D) Coomassie blue staining demonstrate recombinant GST fusion Der M 2 protein.

### [已完成之工作項目]

1. 家塵蟎致敏原的分類與資訊
2. 次世代定序樣品的準備與分類
3. 探討次世代定序的策略
4. 建立次世代定序的生物資訊分析方法
5. 設計適當專一性引子進行 Der m 1 and Der m 2 致敏基因的選殖
6. 探討 Der m 1 and Der m 2 致敏基因與同源基因的比較
7. 探討 Der m 2 致敏基因的高度保留區序列分析與抗原決定位
8. 對於本土塵蟎的病人的血清檢測

### 研究計劃貢獻

1. 因此藉由分子生物學及次代基因定序(Next Generation Sequencing)的方法，來選殖本土性家塵蟎的致敏基因，並且大量表現來作為建立專一性抗體、同時也可作為建立細胞及動物的致敏原模式，對於進一步對於家塵蟎致敏原的致敏機制研究、建立專一性 IgE 抗體作為臨床病因診斷之用，以及對於相關地抗過敏藥物及健康食品的篩選，作為重要的研究工具與該領域的貢獻。

## V、文獻探討

- Alagna, F., N. D'Agostino, et al. (2009). "Comparative 454 pyrosequencing of transcripts from two olive genotypes during fruit development." *BMC Genomics* **10**: 399.
- Bessot, J. C. and G. Pauli (2011). "[House dust mites allergens]." *Rev Mal Respir* **28**(4): 475-495.
- Brautigam, A. and U. Gowik (2010). "What can next generation sequencing do for you? Next generation sequencing as a valuable tool in plant research." *Plant Biol (Stuttg)* **12**(6): 831-841.
- Chapman, M. D. and T. A. Platts-Mills (1980). "Purification and characterization of the major allergen from Dermatophagoides pteronyssinus-antigen P1." *J Immunol* **125**(2): 587-592.
- Gordon, D., C. Abajian, et al. (1998). "Consed: a graphical tool for sequence finishing." *Genome Res* **8**(3): 195-202.
- Hewitt, C. R., S. Foster, et al. (1998). "Mite allergens: significance of enzymatic activity." *Allergy* **53**(48 Suppl): 60-63.

- Holt, R. A. and S. J. Jones (2008). "The new paradigm of flow cell sequencing." Genome Res **18**(6): 839-846.
- Huang, H. W., K. H. Lue, et al. (2006). "Distribution of allergens in children with different atopic disorders in central Taiwan." Acta Paediatr Taiwan **47**(3): 127-134.
- Imelfort, M., C. Duran, et al. (2009). "Discovering genetic polymorphisms in next-generation sequencing data." Plant Biotechnol J **7**(4): 312-317.
- Kuo, C. J., V. C. Chen, et al. (2010). "Asthma and suicide mortality in young people: a 12-year follow-up study." Am J Psychiatry **167**(9): 1092-1099.
- Lee, C. S., R. B. Tang, et al. (2000). "The evaluation of allergens and allergic diseases in children." J Microbiol Immunol Infect **33**(4): 227-232.
- Lind, P., O. C. Hansen, et al. (1988). "The binding of mouse hybridoma and human IgE antibodies to the major fecal allergen, Der p I, of *Dermatophagoides pteronyssinus*. Relative binding site location and species specificity studied by solid-phase inhibition assays with radiolabeled antigen." J Immunol **140**(12): 4256-4262.
- Lind, P. and H. Lowenstein (1983). "Identification of allergens in *Dermatophagoides pteronyssinus* mite body extract by crossed radioimmuno-electrophoresis with two different rabbit antibody pools." Scand J Immunol **17**(3): 263-273.
- Metzker, M. L. (2010). "Sequencing technologies - the next generation." Nat Rev Genet **11**(1): 31-46.
- Meyer, C. H., J. F. Bond, et al. (1994). "Comparison of the levels of the major allergens Der p I and Der p II in standardized extracts of the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*." Clin Exp Allergy **24**(11): 1041-1048.
- Platts-Mills, T. A., W. R. Thomas, et al. (1992). "Dust mite allergens and asthma: report of a second international workshop." J Allergy Clin Immunol **89**(5): 1046-1060.
- Shendure, J. and H. Ji (2008). "Next-generation DNA sequencing." Nat Biotechnol **26**(10): 1135-1145.
- Smith, W. A., B. J. Hales, et al. (2001). "Allergens of wild house dust mites: environmental Der p 1 and Der p 2 sequence polymorphisms." J Allergy Clin Immunol **107**(6): 985-992.
- Sun, H. L. and K. H. Lue (2000). "Household distribution of house dust mite in central Taiwan." J Microbiol Immunol Infect **33**(4): 233-236.
- Thomas, W. R., W. A. Smith, et al. (2004). "The allergenic specificities of the house dust mite." Chang Gung Med J **27**(8): 563-569.
- Thomas, W. R., W. A. Smith, et al. (2002). "Characterization and immunobiology of house dust mite allergens." Int Arch Allergy Immunol **129**(1): 1-18.
- van der Zee, J. S., P. van Swieten, et al. (1988). "Skin tests and histamine release with P1-depleted *Dermatophagoides pteronyssinus* body extracts and purified P1." J Allergy Clin Immunol **81**(5 Pt 1): 884-896.
- Wall, P. K., J. Leebens-Mack, et al. (2009). "Comparison of next generation sequencing technologies for transcriptome characterization." BMC Genomics **10**: 347.
- Warner, A., S. Bostrom, et al. (1998). "Environmental assessment of *Dermatophagoides* mite-allergen levels in Sweden should include Der m 1." Allergy **53**(7): 698-704.



## 國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

### 1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

### 2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文：已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利：已獲得 申請中 無

技轉：已技轉 洽談中 無

其他：(以 100 字為限)

針對 *Der m* 家塵蟎品種中目前還沒有研究的過敏原的研究，以及對於單一品種的家塵蟎做有系統的報導，因此，本計畫希望藉由生物資訊學以及次代基因定序(**Next Generation Sequencing**)的方法，來選殖本土性微角家塵蟎的致敏基因，並且大量表現來作為建立專一性抗體、同時也可作為建立細胞及動物的致敏原模式，對於進一步對於家塵蟎致敏原的致敏機制研究、建立專一性 IgE 抗體作為臨床病因診斷之用，以及對於相關地抗過敏藥物及健康食品的篩選，作為重要的研究工具與該領域的貢獻。

# 科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2015/10/24

科技部補助計畫	計畫名稱: 真菌免疫調節蛋白調控Th細胞分化與干擾素 $\gamma$ 產生的機制作為減緩家塵瑞誘發氣喘的健康食品之應用
	計畫主持人: 劉玉凡
	計畫編號: 102-2320-B-040-012-MY2      學門領域: 保健營養
無研發成果推廣資料	

102年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：劉玉凡		計畫編號：102-2320-B-040-012-MY2				計畫名稱：真菌免疫調節蛋白調控Th細胞分化與干擾素 $\gamma$ 產生的機制作為減緩家塵璠誘發氣喘的健康食品之應用	
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	2	2	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	3	3	100%		林欣穎、康嘉真、呂權蒸
國外	論文著作	期刊論文	1	1	100%	篇	Peptide Selection and Design for Epitope-base Vaccine Development against FMDV
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
其他成果	無						

(無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

# 科技部補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無

專利： 已獲得  申請中  無

技轉： 已技轉  洽談中  無

其他：（以100字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以500字為限）

針對Der m家塵蟎品種中目前還沒有研究的過敏原的研究，以及對於單一品種的家塵蟎做有系統的報導。因此，本計畫希望藉由生物資訊學及次代基因定序(Next Generation Sequencing)的方法，來選殖本土性微角家塵蟎的致敏基因，並且大量表現來作為建立專一性抗體、同時也可作為建立細胞及動物的致敏原模式，對於進一步對於家塵蟎致敏原的致敏機制研究、建立專一性IgE抗體作為臨床病因診斷之用，以及對於相關地抗過敏藥物及健康食品的篩選，作為重要的研究工具與該領域的貢獻。