

# 科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

## 探討次世代測序技術與重組過敏原應用於檢測微角家塵蟎致敏 性氣喘

計畫類別：個別型計畫  
計畫編號：MOST 106-2320-B-040-026-  
執行期間：106年08月01日至107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：林翰佳  
計畫參與人員：碩士級-專任助理：胡瑞興

報告附件：出席國際學術會議心得報告

中華民國 107 年 10 月 29 日

中文摘要：家塵蟎屬於一種節肢動物(Arthropoda)，整個塵蟎的形成由成千上萬種不同的塵蟎自身的蛋白質基因、亦包含環境中許多巨分子物質混雜而成。目前由其蟲體、蛹及排洩物的萃取物的分析，已經有超過30多種不同的蛋白質過敏原；在臨床上被檢查為誘發氣喘病人，體內會產生專一性的IgE抗體。在這些已發現的過敏原中，又以Group 1與Group 2類型的過敏原，對於誘發病人產生氣喘，在臨床上已被證實，具有顯著的專一性。因此在家塵蟎過敏原的治療研究中，利用IgE binding以及T-cell response的檢測方法，都能夠證明過敏症狀的發展與誘發，是具有重要的關聯性與臨床意義的存在。

本期計畫研究的成果，是藉由生物資訊學、次代基因定序(Next Generation Sequencing)、蛋白質體學(Proteomics)等新穎性「體學」(OMICs)的分析方法，來建立本土性微角塵蟎(Dermatophagoides microceus, Der m)的致敏基因組草圖(draft sequencing map)，並且分子生物學的方法，來量產致敏蛋白質(Der m 2)，並藉此來製備專一性抗體作為進行臨床檢測的工具。致敏蛋白質、以及具專一性的抗體，可作為建立細胞及動物的致敏原模式所需材料。對於進一步對於不同種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助益良多，更可應用開發相關的抗過敏藥物及健康食品，對於抗過敏的研究平台的建立具有指標性的意義。

次世代定序技術是一項快速、高通量的核酸測序技術。利用此測序技術建立未知物種的基因體序列的分析(Metzker 2010)，嘗試從物種的基因體序列，尚處於未知的情況下，本分析技術就能以建立全基因體草圖的模式，用以發現物種的新穎同源基因(homologous genes)、探討基因的多型性(polymorphism)，以及評估特定基因在不同時期表現量等等的應用。

本計畫的成果：針對家塵蟎品種中本性的微角塵蟎(Der m)，此特有本土家塵蟎，目前僅存有限的過敏原研究資料，亦沒有相關的研究做有系統的分析報導。因此，本計畫希望藉由生物資訊學，次代基因定序、蛋白質體為基礎方法，來建構微角家塵蟎的致敏原基因庫，並且透過分子生物學的工具來量產致敏原蛋白質，並製備具可分辨不同品系家塵蟎的專一性抗體，進一步建立細胞及動物的致敏原之測試模式。對於微角家塵蟎致敏原與其他常見的家塵蟎，臨床上是否具有交互反應(cross reaction)的致敏機制，並可建立專一性IgE抗體作為臨床診斷之用，以及抗過敏藥物及健康食品的篩選開發，為家塵蟎所誘發的過敏症狀建立預防、診斷及治療完整的模式。

中文關鍵詞：微角家塵蟎、免疫調節蛋白、次世代基因測序技術、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 in the environment. 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. Among

these discovered allergens, Group 1 and group 2 allergens are used to induce asthma in child patients. Clinically significant. In the study of the treatment of house dust mite allergens, the tests using IgE binding and T-cell response all pointed out that the development and regulation of allergic symptoms are relevant and important. The research achievement of this project are based on the novel genomics analysis methods such as bioinformatics and Next Generation Sequencing to establish the local house dust mite (*Dermatophagoides microceaus*, Der m). The methods of genome annotation, and molecular biology massively produced sensitizing proteins, and thereby use to prepare specific antibodies for detection. This sensitizing protein and specific antibodies can be used as materials for establishing sensitizing patterns in cells and animals. Further research on the sensitization mechanism of different species of dust mite allergens, establishment of specific IgE antibodies as a clinical cause for diagnosis, and 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 technology enable the quick, high-throughput nucleic acid sequencing technology. Based on this sequencing technology to establish the analysis of the sequence of the novel genome of targeted species, the attempt to discover the genome sequence of the species is still unknown, and the analysis technique can be used to create a genome-wide annotation process for discovery. Novel homologous genes of species, exploration of polymorphism of relative-genes, and applications for assessing the amount of expression of a particular gene at different times in genome scale.

The achievement of this project: For Der m of the unique local house dust mites, there are only limited allergen research data available, and there is no comprehensive research to approach a systematic analysis. Therefore, the project constructed a putative sensitizing genes pools of Der m using bioinformatics and next generation sequencing, and mass-produce the allergen protein through molecular biology tools. Prepare a specific antibody that can be divided into different strains of house dust mites, and further establish a test model for sensitizers of cells and animals. For the allergens of house dust mite Der m and

other well-known house dust mite (for example as Der f and Der p), whether there is a clinical cross-reaction in sensitization mechanism, and can establish a specific IgE antibodies for clinical diagnosis, as well as anti-allergic drugs screening and development of healthy foods establishes a complete model for prevention, diagnosis and treatment of children asthma induced by house dust mites.

英文關鍵詞：Dermatophagoides microceaus, ImmunoModulator protein, Next Generation Sequencing technology, Gene cloning, allergen gene

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

探討次世代測序技術與重組過敏原應用於檢測微角家塵蟎致敏性氣喘

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 106 - 2320 - B - 040 - 026 -

執行期間：106年8月1日至107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 教授

共同主持人：林翰佳 教授

計畫參與人員：吳葶萱、胡瑞興（碩士級專任助理）、  
施尚宏、許皓瑞、宋承憶、林昀萱、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 1 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 107 年 10 月 24 日

## (二) 中文摘要

家塵蟎屬於一種節肢動物(Arthropoda)，整個塵蟎的形成由成千上萬種不同的塵蟎自身的蛋白質基因、亦包含環境中許多巨分子物質混雜而成。目前由其蟲體、蛹及排洩物的萃取物的分析，已經有超過 30 多種不同的蛋白質過敏原；在臨床上被檢查為誘發氣喘病人，體內會產生專一性的 IgE 抗體。在這些已發現的過敏原中(Thomas, Smith et al. 2002)，又以 **Group 1** (Cysteine protease, MW 25,000) 與 **Group 2** (HE1 homologue, MW 14,000) 類型的過敏原，對於誘發病人產生氣喘，在臨床上已被證實，具有顯著的專一性。因此在家塵蟎過敏原的治療研究中，利用 IgE binding 以及 T-cell response 的檢測方法，都能夠證明過敏症狀的發展與誘發，是具有重要的關聯性與臨床意義的存在。

本期計畫研究的成果，是藉由生物資訊學、次代基因定序 (Next Generation Sequencing)、蛋白質體學(Proteomics) 等新穎性「體學」(OMICs) 的分析方法，來建立本土性微角塵蟎 (*Dermatophagoides microceaus, Der m*) 的致敏基因組草圖(draft sequencing map)，並且分子生物學的方法，來量產致敏蛋白質(*Der m 2*)，並藉此來製備專一性抗體作為進行臨床檢測的工具。致敏蛋白質、以及具專一性的抗體，可作為建立細胞及動物的致敏原模式所需材料。對於進一步對於不同種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助益良多，更可應用開發相關的抗過敏藥物及健康食品，對於抗過敏的研究平台的建立具有指標性的意義。

次世代定序技術是一項快速、高通量的核酸測序技術。利用此測序技術建立未知物種的基因體序列的分析 (Metzker 2010)，嘗試從物種的基因體序列，尚處於未知的情況下，本分析技術就能以建立全基因體草圖的模式，用以發現物種的新穎同源基因(homologous genes)、探討基因的多型性(polymorphism)，以及評估特定基因在不同時期表現量等等的應用。

本計畫的成果: 針對家塵蟎品種中本性的微角塵蟎 (*Der m*)，此特有本土家塵蟎，目前僅存有限的過敏原研究資料，亦沒有相關的研究做有系統的分析報導。因此，本計畫希望藉由生物資訊學，次代基因定序、蛋白質體為基礎方法，來建構微角家塵蟎的致敏原基因庫，並且透過分子生物學的工具來量產致敏原蛋白質，並製備具可分辨不同品系家塵蟎的專一性抗體，進一步建立細胞及動物的致敏原之測試模式。對於微角家塵蟎致敏原與其他常見的家塵蟎，臨床上是否具有交互反應(cross reaction)的致敏機制，並可建立專一性 IgE 抗體作為臨床診斷之用，以及抗過敏藥物及健康食品的篩選開發，為家塵蟎所誘發的過敏症狀建立預防、診斷及治療完整的模式。

## (二) 英文摘要

House dust mites are complex species which produce thousands of different proteins and other macromolecules in the environment. 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. Among these discovered allergens (Thomas, Smith et al. 2002), Group 1 (Cysteine protease, MW 25,000) and group 2 (HE1 homologous, MW 14,000) allergens are used to induce asthma in child patients. Clinically significant. In the study of the treatment of house dust mite allergens, the tests using IgE binding and T-cell response all pointed

out that the development and regulation of allergic symptoms are relevant and important.

The research achievement of this project are based on the novel genomics analysis methods such as bioinformatics and Next Generation Sequencing to establish the local house dust mite (*Dermatophagoides microceaus*, *Der m*). The methods of genome annotation, and molecular biology massively produced sensitizing proteins, and thereby use to prepare specific antibodies for detection. This sensitizing protein and specific antibodies can be used as materials for establishing sensitizing patterns in cells and animals. Further research on the sensitization mechanism of different species of dust mite allergens, establishment of specific IgE antibodies as a clinical cause for diagnosis, and 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 technology enable the quick, high-throughput nucleic acid sequencing technology. Based on this sequencing technology to establish the analysis of the sequence of the novel genome of targeted species (Metzker 2010), the attempt to discover the genome sequence of the species is still unknown, and the analysis technique can be used to create a genome-wide annotation process for discovery. Novel homologous genes of species, exploration of polymorphism of relative-genes, and applications for assessing the amount of expression of a particular gene at different times in genome scale.

**The achievement of this project:** For *Der m* of the unique local house dust mites, there are only limited allergen research data available, and there is no comprehensive research to approach a systematic analysis. Therefore, the project constructed a putative sensitizing genes pools of *Der m* using bioinformatics and next generation sequencing, and mass-produce the allergen protein through molecular biology tools. Prepare a specific antibody that can be divided into different strains of house dust mites, and further establish a test model for sensitizers of cells and animals. For the allergens of house dust mite *Der m* and other well-known house dust mite (for example as *Der f* and *Der p*), whether there is a clinical cross-reaction in sensitization mechanism, and can establish a specific IgE antibodies for clinical diagnosis, as well as anti-allergic drugs screening and development of healthy foods establishes a complete model for prevention, diagnosis and treatment of children asthma induced by house dust mites.

## (二) 關鍵詞

微角家塵蟎、免疫調節蛋白、次世代基因測序技術、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基因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) 及蛋白質體學(Proteomics)的體學(OMICs)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

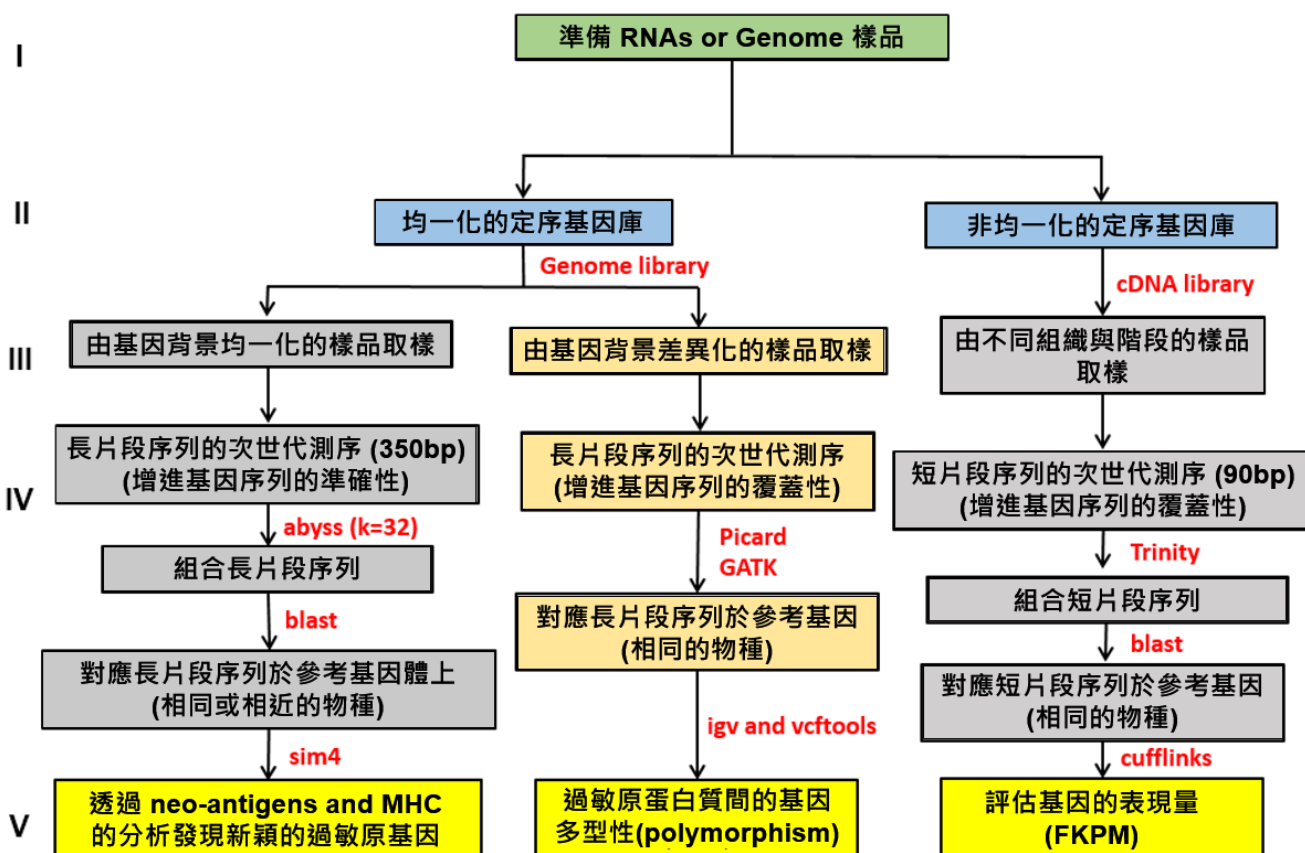
本研究計畫目標: 針對 *Der m* 家塵蟎品種中目前還沒有研究的過敏原的研究，以及對於單一品種的家塵蟎做有系統的報導。因此，本計畫希望藉由生物資訊學及次代基因定序(Next Generation Sequencing) 蛋白質體學(Proteomics)的體學(OMICs)的方法，來選殖本土性微角家塵蟎的致敏基因，並且大量表現來作為建立專一性抗體、同時也可作為建立細胞及動物的致敏原模式，對於進一步對於家塵蟎致敏原的致敏機制研究、建立專一性 IgE 抗體作為臨床病因診斷之用，以及對於相關地抗過敏藥物及健康食品的篩選，作為重要的研究工具與該領域的貢獻。



## [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)

依據 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，紅字的部分為使用的分析工具。

## [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，本計畫提出採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，不但可以克服生物資訊學方法的弱點（利用 degenerate primers），同時還可以有系統的選殖(clone)到所有基因，甚至可以推測一些相關性的致敏基因（putative allergen genes）；同時再配合不同的定序策略（“Long” reads 與 “Short” reads 的方式，如：圖 1 所示），還可進一步，分析出這些致敏基因間的多型性以及表現量與致敏的關係。

目前還沒有家塵蟎完整的參考基因體(reference genome)資料，下表所顯示的是應用 ABySS 程式來重頭組合(*de novo assemble*) 的方式進行基因體的組裝。使用代基因定序的資料，使用 pair-ends 的測序方式長度為 250 bp，分別進行測序共得 7,343,792 條 reads，符合 Q20 品質的測序總長 1,743,770,754 bp。程式組裝時所用的參數如下，其中選擇 **k=41** 來進行基因體的組裝，共可組成 268,372 條組合片段 (contigs)，平均長度大於 500 bp 的組合片段共有 30,903 條，而其中最長組合片段的長度為 164,097 bp。這樣品質的基因體組合結果，所得的組合長度，足可以讓我進行下一步驟：利用 *Der f* and *Der p* 已知過敏原進行 *Der m 1 - Der m 33* 同源序列分析。(Table II)

**Table I** | The parameter of abyss that a parallel assembler for short reads in the *Der m* genomic sequences

k	n	n:500	L50	min	N80	N50	N20	E-size	max	sum
26	1,034,509	40,804	8,803	500	807	1,569	3,785	3,332	54,290	54.37e6
31	506,674	43,966	7,729	500	929	2,046	6,342	4,790	61,780	70.05e6
<b>41</b>	<b>268,372</b>	<b>30,903</b>	<b>3,052</b>	<b>500</b>	<b>1,484</b>	<b>5,270</b>	<b>19,533</b>	<b>13,213</b>	<b>164,097</b>	<b>80.71e6</b>
51	169,243	28,489	2,115	500	1,560	7,542	28,418	18,721	180,835	80.92e6
61	121,575	27,962	1,968	500	1,589	8,072	31,433	19,844	180,861	81.61e6

k: size of k-mer (bp); n: number of contigs; n:500: number of configs > 500 bp; min: minimum of config size; N80, N50, N20: length of a contig from a set of longer contigs whose combined length represent 80%, 50% 20% of assembly, respectively; E-size: The sum of the square of the sequence sizes divided by the assembly size; max: maximum contig size; sum: total assembly size.

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，是否會產生在免疫學上的交互作用反應 (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。(Table I)

### [家塵蟎致敏原的分類與資訊]

在 1920 年代左右家塵蟎 (household dust) 首度被報導與氣喘有關，直到 1964 年由 Voorhorst R. 等人發現，在這些造成氣喘的過敏原成份中，有 90% 氣喘病患的皮膚試驗 (skin testing)，呈現對家塵具有陽性反應；而三年之後 Voorhorst R. 等人才發現，原來家塵中的家塵蟎 (house dust mite)，過免原蛋白質才是真正造成過敏的主要原因。1987 年 Platts-Mill T.A.E. 等人指出，屋塵蟎 (*Der p*) 與粉塵蟎 (*Der f*) 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 B.A. 等人的研究工作，孩童在一歲時曝露於家塵蟎的刺激，與將來發展成為氣喘呈現正相關情形。同時根據最新的環保署，對學齡前幼童氣喘體質的臨床統計資料，其中佔有 90% 以上的氣喘體質，從分析誘發過敏的肇因中，主要以「家塵蟎」為主要的過敏原為最多。

**Table 1 | Gene structures of putative *D. microceaus* 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>	<i>Der f</i> (American) <sup>f</sup>	<i>Der p</i> (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

- 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.
- Locus tags are revealed scaffold ID in the assembled *D. microceus* draft genomic sequences.
- 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)).
- 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.
- FPKM, Fragment per kilo-base of transcript per million mapped reads.
- 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).

家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*)，已完成選殖以及研究測試。整合：如 Table I 所示，其中又以 Group 1 (蛋白酶酵素, cysteine protease, MW 25,000)、與 Group 2 (作為佐劑的角色, auto-adjuvant, HE1 homologue, MW 14,000) 類型為臨床上檢測的主要家塵蟎過敏原。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性質 (如: Group 1, 3, 6 and 9)、具有醣類與脂肪類的代謝水解酵素性質 (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)

NGS 生物資訊學分析的結果，整理如: Table 1，利用 *Der f* and *Der p* 已知過敏原的分類方法 (請參考過敏源網站, ALLERGEN NOMENCLATURE, [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 II。目前利用序列同源的分析結果，總共找到 33 個可能(putative)的過敏原 (allergens)，目前暫定為 *Der m 1 - Der m 33* (Table II)。整體性的序列比對結果，與 *Der f* (American) 的過敏原較為相似 (蛋白質序列的相似程度達 78% - 99%)；另一方面各個過敏原的表現量評估，可利用 NGS 的資料來進行估算，評估的方法是採用 FPKM (Fragments Per Kilo-base of Exon Per Million Fragments) 的方式進行估算；根據分析的結果，顯示表現量最多的前五名，依序分別為 *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(primers)，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(signal peptide)；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 兩兩之間的相互配對情形，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* 蛋白酶活性中心；而藍色字的部份 (Thr38, Cys69, Gly150, Asp192 and His199) 等 5 個氨基酸的部份，分別構成蛋白酶的金屬離子結合位，其中 Ser39 為定序結果，與在蛋白質資料庫中 (UniProt ID: P16312) 所記載的 *Der m 1* 部分序列有差異之處(Gln -> Ser)。



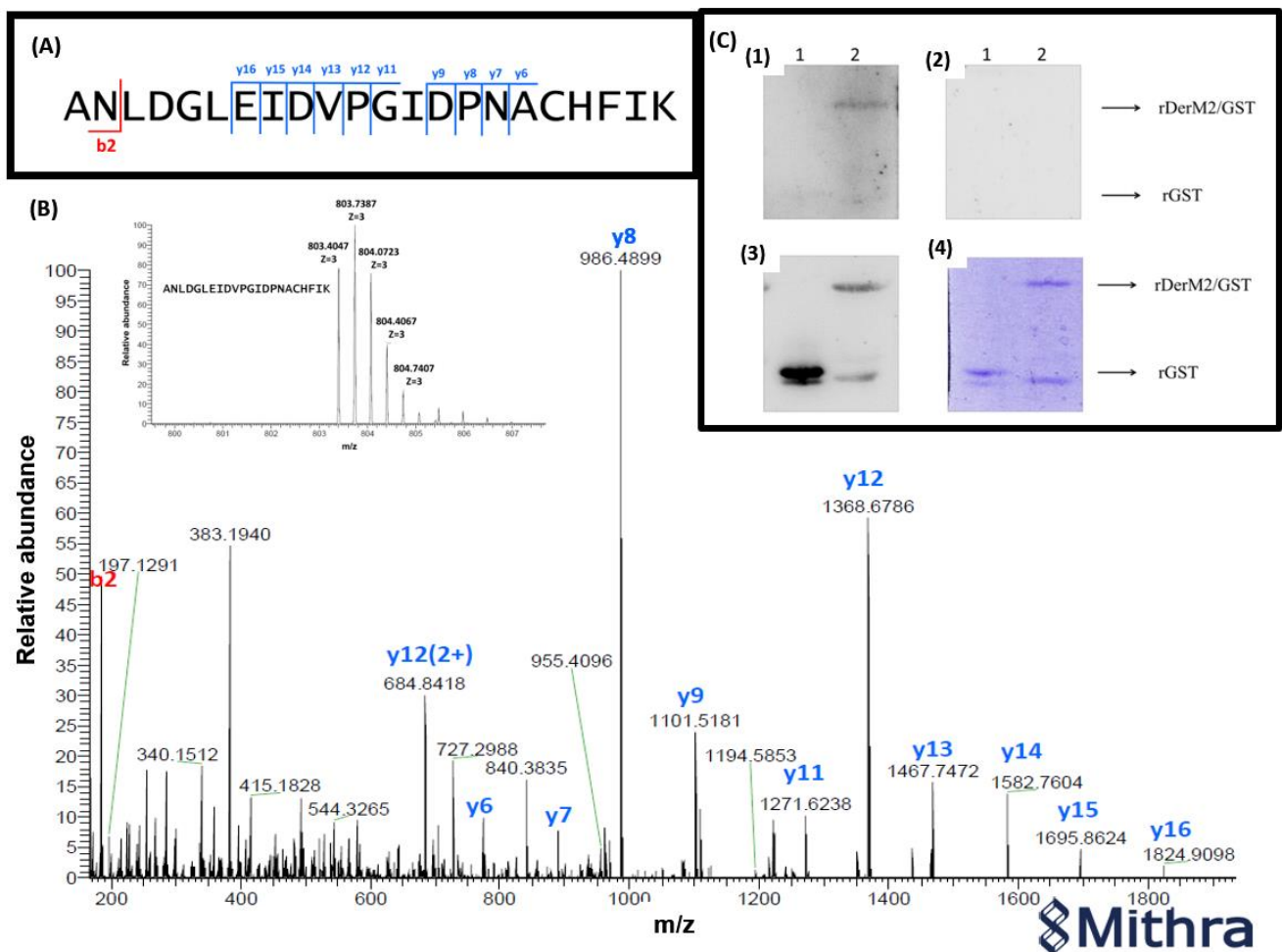
**Figure 2 | Novel gene discovery of *Der m 1* HDM allergy and view of aligned NGS reads. (A).** 692 bp PCR product revealed the *Der m 1* from crude *Der m* cDNA library. **(B).** Deduced 231 amino acids sequence of potential *Der m 1* protein, the underline indicated the signal peptide was processed 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 m 1* gene, strain oriented by arrow in additional to the bar and line indicated the exon and intron region, respectively.



如 Figure 2C 所顯示，則是利用多序列分析 (Multiple Sequences Alignment) 的結果，其中顯示大部分的活性中心 (active center)、金屬離子結合位 (metal ion binding site) 與雙硫鍵 (disulfide bonds) 的位置，具有高度的保留性 (conservation)，除了 His199 的位置與 *Der f1* 相同外，而與 *Der p1* (Arg) 有差異。如: Figure 2D 所顯示 NGS reads 組裝(assembly) *Der m1* 基因(的情形，將利用 Genome library 所組裝的基因體片段，與 mRNA 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。初步進行次世代測序的組裝過程，顯示對於未知 *Der m1* 基因組裝 (genome assembly) 的情形，目前已經利用 **abyss** 工具將次世代測序片段，所組裝成為大段的基因體片段(contigs)；同時的利用 RNA library 所建立起的基因表達片段組裝(gene assembly)的結果，透過 sim4 程式進行基因體序列與 cDNA 序列的比對 (alignment)的結果，顯示 *Der m1* 基因是由 6 個外顯子 (exons) 所組成，同時也可利用 **cufflink** 工具以 FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads) 的方法，來估算該 *Der m1* 基因在微角家塵蟎樣品中的表現量。(Figure 2)

### [微角家塵蟎患者的蛋白質體分析與血清檢測]

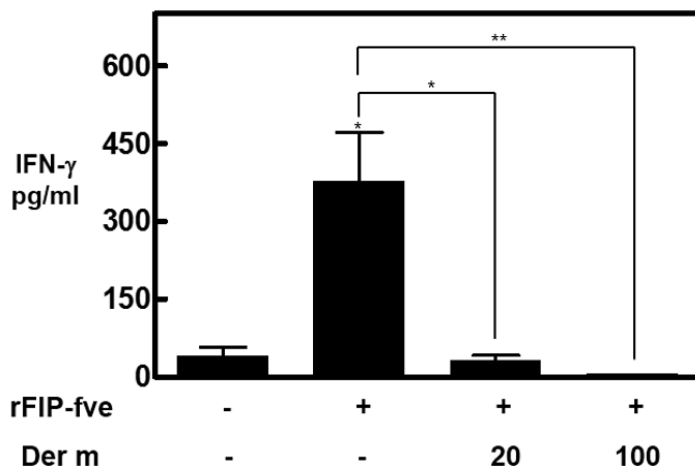
利用蛋白質體學 (LC-MS/MS) 的分析流程，如: Fig.3A 所示，首先採用 LC-MS 分離出的專一性的胜肽鏈 (MS=803.4047, Z=3)，接著利用 tandem MS/MS 的資料(Fig.3A)，確定 *Der m2* 專一性的胜肽 (“ANLDGLEIDVPGIDPNACHFIK”)，再次證實次世代測序 *Der m2* 結果正確性。(Fig.3A and 3B)



**Figure 3 | Proteomics data and recombinant *Der m 2* protein by IgE in the sera from adult patient with HDM allergy. (A) and (B)** The unique peptides was performed using the ThermoFisher Scientific™ Orbitrap Elite Hybrid Liquid chromatographic–Tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) quipped with a Waters nan-Acquity UPLC system. Raw LC-MS/MS data were searched through Mascot search engine (version 2.2.0, Matrix Science) against *Der m* allergen proteins primary sequence from NGS analysis. **(C)** Recombinant *Der m 2* protein analysis by SDS-PAGE and western. The Lane 1 (rGST) and Lane 2 (rDerM2/GST) were purified by GSTrap™ FF column. (1) corresponding IgE-immunoblot image from patient serum (2) non-allergic serum (3) corresponding GST-immunoblot image (4) Coomassie blue staining demonstrate recombinant GST fusion *Der m 2* protein.

在蛋白質體學方面的分析，利用質譜儀分析的方法，首先利用 ThermoFisher 科技公司所發展的 LC-MS/MS 系統，將未經純化的 *Der m* 粗過敏蛋白質樣品，首先利用液相色譜設備 (liquid chromatography equipment)，增強未化合物的分離 (separation)，其中 Fig.3B 分別代表分離出的專一性的胜肽鏈 (MS=803.4047, Z=3)，確定 *Der m 2* 專一性的胜肽 (“ANLDGLEIDVPGIDPNACHFIK”)。圖中顯示患者血清中具有專一性針對 *Der m 2*。偵測的結果在正常人並沒有發現 (Fig.3 C1 and C2)，分別是利利用 anti-GST 的抗體及蛋白質染色法，透過考馬斯藍染色法，來驗證所表達的 *rDer m 2*:GST 重組蛋白與內生性的 GST (Fig.3 C3 and C4)。說明利用基因重組的方式，由大腸桿菌所生產的重組蛋白質患者血清，具有針對 *Der m 2* 專一性的 IgE 抗體所辨識。

針對 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，確實可以誘發細胞來分泌 INF- $\gamma$ ，而對於 *Der m* 致敏原蛋白質的粗萃取物，也確實對於干擾素 INF- $\gamma$  的分泌具有平衡的效果。(Figure 4)

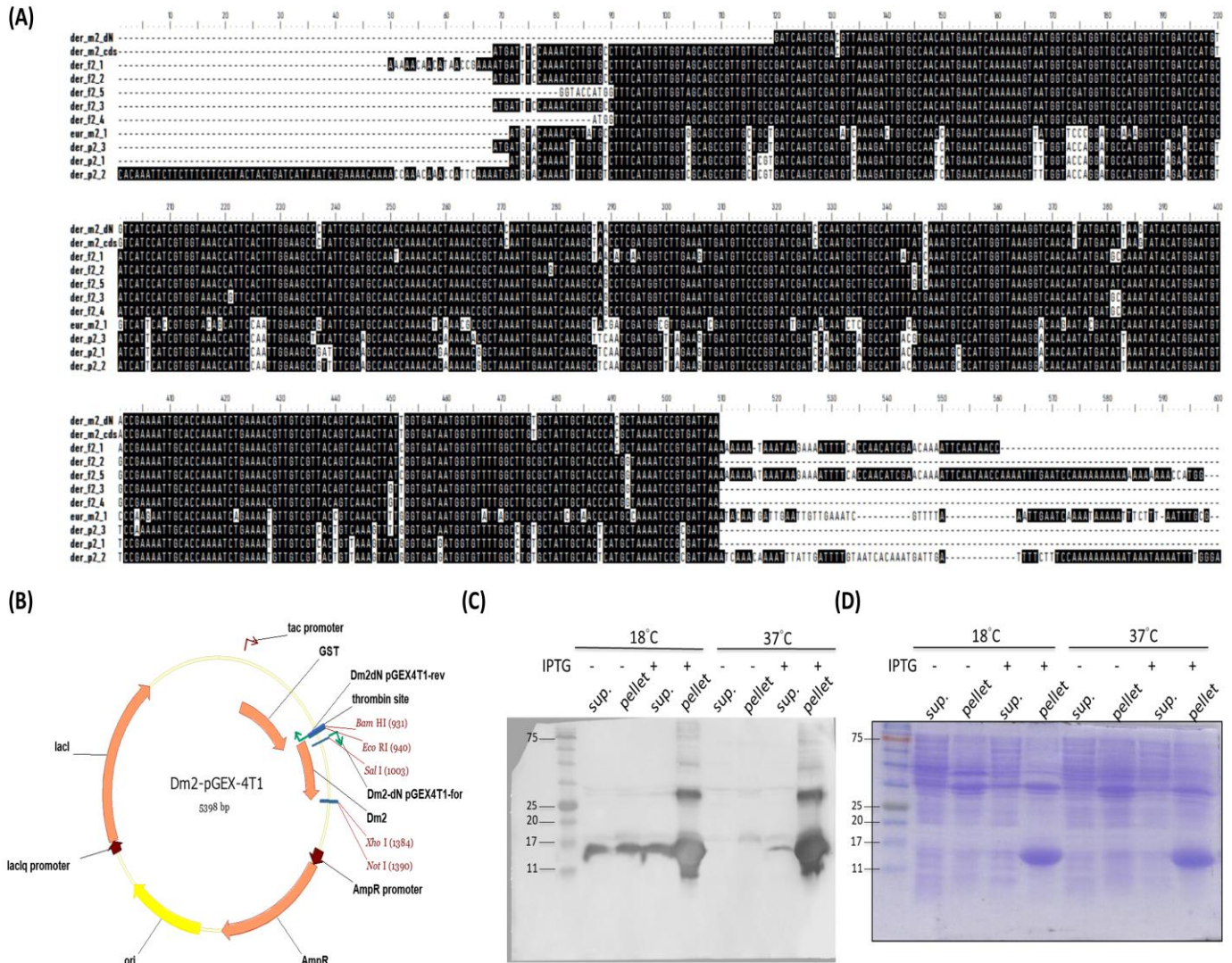


**Figure 4 | Cytokines effects of *FIP-fve* treatment on hPBMCs combined with crude *Der m*-challenged.** The IFN- $\gamma$  expression levels of hPBMCs was measured by ELISA. The supernatant were collected from hPBMCs which were treated with control (GST 200  $\mu$ g/ml), *rFIP-fve* (100  $\mu$ g/ml)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

### [*rDer m 2* 的蛋白質選殖、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 (Fig.5B)，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，來量產的 *rDer m 2*:GST 蛋白質，並利用專一性的 *Der m 2* IgE 抗體所辨識。(Fig. 5C and 5D)

將純化後的 *rDer m 2:(His)<sub>6</sub>* 在進行臨床檢體的檢測，其中 Figure 3C 與 D 分別代表利用不同蛋白質表達的條件下，來進行抗體免疫墨點法(immune-blotting) 與考馬斯藍染色法 (Coomassie Blue) 蛋白質分析，顯示蛋白質分子量 15.4K Da 的位置，具有鎳離子的親和性管柱層析法進行蛋白質的純化。根據這個測試的結果，顯示在 18°C 培養並有 IPTG 促進表達的條件下 (Figure 5C line 3)，可以在溶液中得到具有活性的 *rDer m 2:(His)<sub>6</sub>*，同時利用針對 *Der m 2* 的專一性抗體、及考馬斯藍染色法，來驗證所表達的 *rDer m 2:(His)<sub>6</sub>* 的蛋白質分子量及專一性。(Figure 5C and D)



**Figure 5 | *rDer m 2* construction and SDS-PAGE analysis of *rDerm2* purification process. (A)** The multiple sequence alignment of *rDer m 2 dN* (truncated signal peptide at N-terminal of recombinant *Der m 2*), *Der m 2 cds* (putative coding sequence by NGS assembled config (1001166), *Der f 2* (1: AJ862837, 2: EF139431, 3: AB195580, 4: AY283288, 5: S70378), *Der p 2* (1: EU346693, 2: AF276239, 3: AM263560) and *Eur m 2* (AF047613). **(B)** The gene construction of *Der m 2 dN* using the pET29a vector and *E.coli* strain BL21 (DE3). **(C)** and **(D)** The *rDerm2* protein was purified by GST column. The fractions were collected during the experiment and analyzed by SDS-PAGE. sup. - suspension, IPTG - Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside The lane 1~4 were generated from *E.coli* which incubated at 18°C and the lane 5~8 were incubated at 37°C .



[Der m 2 抗原定位的分析]

根據多序列比對的分析結果(Figure 5A)，顯示核酸序列的比對 *Der m 2* 與 *Der f 2* (95%) 具有和 *Der p 2* (84%) 據有高度的相似度；但以蛋白質立體的結構來顯示(Figure 6B)，在抗原辨識區域中的抗原決定位(mAB 6D6 and mAB 7A1) 則無明顯的差異 (僅有 *Der m 2* 與 *Der p 2* - 2/6; 其他與 *Der f 2*, and *Eur m 2* - 0/6)，並且從結構的分析，皆位於蛋白質的表面區域；而另一個區域 (mAB αDpX)，則有可區分的差異 (其中 *Der m 2* 與 *Der p 2* - 2/8; 與 *Der f 2* - 2/8)，是否三種常見的家塵蟎 (*Der p*, *Der f* and *Der m*)，是否有彼此之間據有交互反應(cross-reactions)的情形？目前我們已利用合成胜肽的方法，產生可區別不同家塵蟎的抗體，下一步驟需要在臨床病人的血清中，來做進一步分析。(Figure 6B)

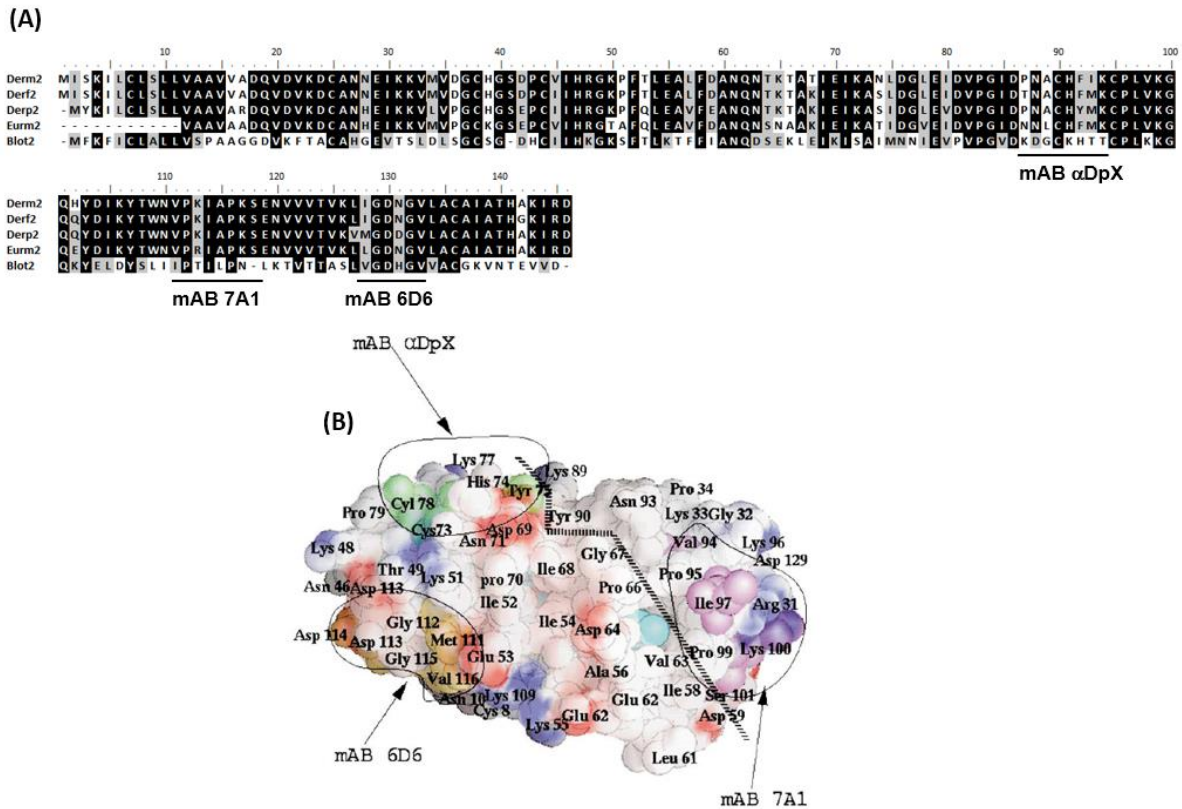


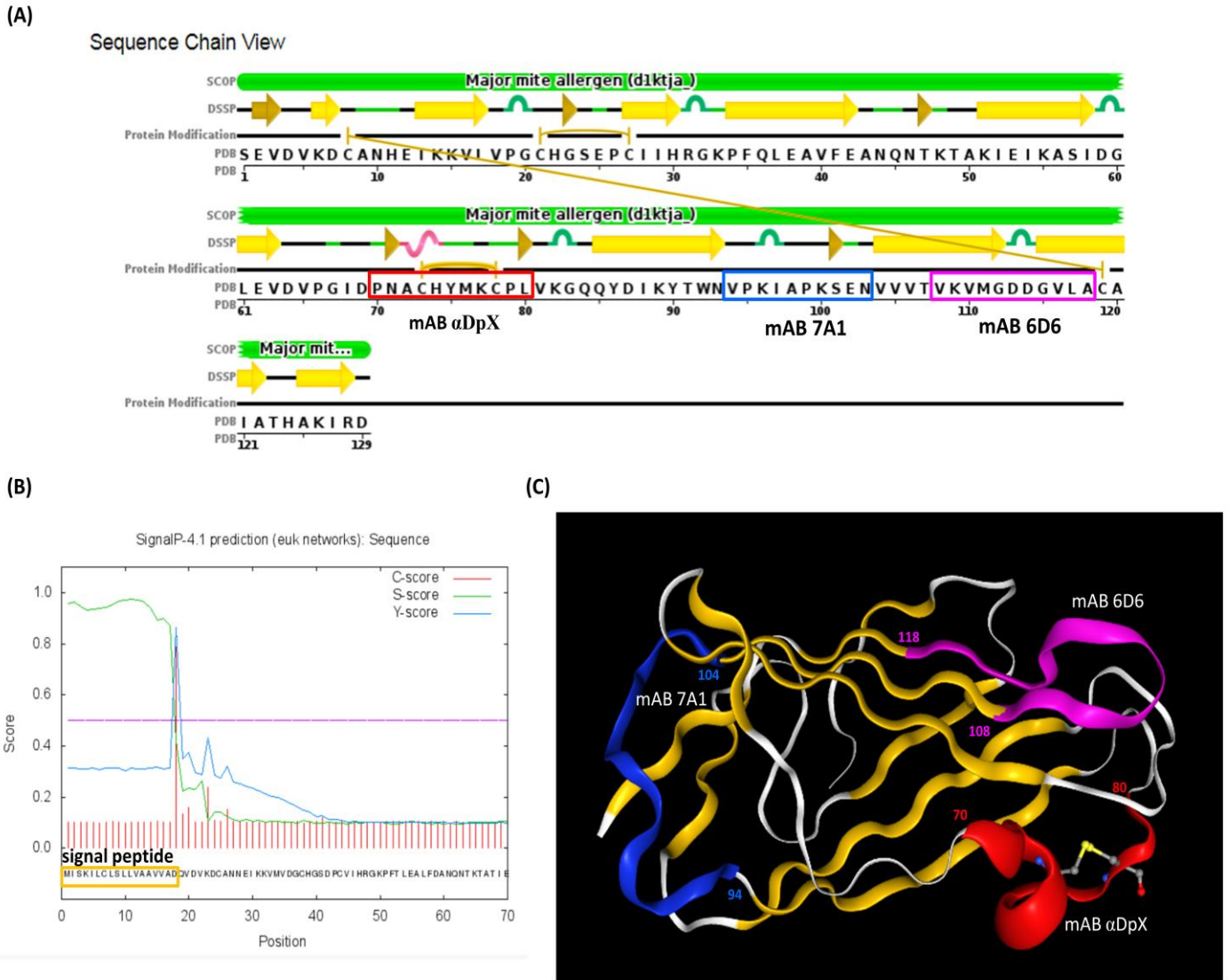
Figure 6 | Comparison the sequences of antibody epitopes between the three difference major dust mite allergen.

(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.

[對於本土塵蟎結構與抗原定位的檢測分析]

從蛋白質序列的二級結構分析的結果顯示(Figure 7A)，*Der p 2* 的蛋白質由兩個雙硫鍵 (disulfide bonds) 所組成，並且以 beta 平板(beta-sheet) 的結構為主，其與脂多糖 (Lipopolysaccharides, LPS) 結合形成的功能有關。而三個抗原結合位(mAB αDpX and mAB 7A1 and αDpX) 皆是位於蛋白質的環狀(loop)區域，有助於下一步驟胜肽抗原疫苗的設計。(Figure 7C)

另一方面，在之前生產 *rDer m 2* 蛋白質的過程中，很容易形成包涵體 (inclusion bodies)，而無法摺疊成適當的蛋白質結構；因此根據 SignalP 4.1 server 分析的結果，顯示 *Der m 2* 蛋白質的 N-端 18 個胺基酸序列 “MISKILCLSLVAAVVAD” 為 signal peptide 的功能 (Figure 7B)，在大腸桿菌的表現系統中，會妨礙蛋白質的正常摺疊；因此，在建構 *rDer m 2* 蛋白質基因質體時，並將這 18 個胺基酸給去除掉，並為了純化蛋白質方便，在蛋白質 C-端加上 6 個 Polyhistidine-tag，以方便進行鎳離子的親和性管柱層析法進行純化。(Figure 5C and 5D)



**Figure 7 | Epitopes-based analysis of recombinant *Der m 2* protein by bioinformatics tools and protein modelling.**

(A) The Sequence Chain View of major house dust mite allergen from *Der p 2* (PDB ID: 1KTJ). The brown and yellow arrows indicate the beta bridge and beta strain, respectively. The deep and light green line revealed the turn and bend structures, respectively. The purple line indicated the 3/10-helix structure. (B) The signal peptide prediction of *Der p 2* sequence using eukaryote network of the SignalP 4.1 server. The corresponding N-terminal 18 amino acids of “MISKILCLSLVAAVVAD” of *Der m 2* reveals the yellow box. (C) The homologous modelling structure of *Der m 2* based on the *Der p 2* revealed in (A) as the template by the SWISS-MODEL server. The red, blue and purple ribbons represent the monoclonal antibodies (mAB) of  $\alpha$ DpX, 7A1 and 6D6 recognized epitopes at the corresponding positions of amino acids to *Der m 2* sequence, respectively. The protein secondary structure modelling drawn by NGL Viewer server (<http://proteininformatics.charite.de/ngl-tools/ngl/html/ngl.html>).

## [已完成之工作項目]

1. 微角家塵蟎 (*Der m*) 致敏原的分類與資訊
2. 微角家塵蟎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 *Der m 2* 致敏基因的蛋白質體的分析
9. *Der m 2* 致敏基因的選殖、表達與純化
10. 專一性抗原決定位的分析、建立專一性的抗原胜肽，產生可區別的專一性抗體

## 研究計劃貢獻

1. 因此藉由分子生物學、次代基因定序(Next Generation Sequencing)、及蛋白質體學(Proteomics)的體學方法(OMIC methods)，來預測及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。

# 國科會補助專題研究計畫項下出席國際學術會議心得報告

日期：102年10月28日

計畫編號	MOST 106-2320-B-040-026 -		
計畫名稱	探討次世代測序技術與重組過敏原應用於檢測微角家塵蟎致敏性氣喘		
出國人員姓名	劉玉凡	服務機構及職稱	中山醫學大學生物醫學科學學系 教授
會議時間	107年7月1日至 107年7月6日	會議地點	日本京都
會議名稱	(中文) 第18屆世界基礎和臨床藥理學大會 (英文) 2018 WCP Kyoto		
發表論文題目	(中文) 整合人類全外顯子測序技術，用以偵測人類體細胞的突變，作為對於肝癌治療的標靶治療與免疫細胞療法之評估依據。 (英文) <b>Integrated technologies of whole exome sequencing and somatic mutations detections for targeted and adjuvant therapies assessment in Hepatocellular Carcinoma</b>		

## 一、參加會議經過

經過 WCP2018 會議報名的前置作業，及學校相關請假與調課的過程，終於 7 月 1 日踏上遠赴日本京都的旅程，在開會當天的早上時刻到達日本關西機場，因為在行前有做一些功課，所以直接搭乘南海電車經大阪直達京都、捷運系統及步行到達開會地點附近的 Grand Prince Hotel Kyoto 旅館，因為是一個行前往也沒有安排特別的拜會活動，就直接去會場辦理報到，並且聽了的一天的 Opening Lecture，也是 2018 年諾貝爾生醫獎的獲獎人之一的東京大學教授 Tasuku Honjo 先生介紹「Future of cancer immunotherapy by PD-1 blockade」，本次參加會議主要報告的

題目「Integrated technologies of whole exome sequencing and somatic mutations detections for targeted and adjuvant therapies assessment in Hepatocellular Carcinoma」，與探討次世代測序技術的相關應用有關，晚上利用時間去東京市區用餐及參觀日本古都的市區文化。第二天會議開始，首先完成會議報到的手續及領取會議的資料，會議約有數百人參加，有來自於世界各地的學者，其中又以東亞地區的學者與相關的公司研究單外居多，正好可以利用這個時機，來觀察亞洲國家在次世代測序技術的領域發展情形。與會報告的人員以日本本地的學者、韓國、中國與台灣的科學家居多，印象特別深刻的是日本藥廠是以「EA Pharma Co.」一家公司的研究成果，就包下一整個子會議的內容，從他們所發表的議題內容 - 「cancer immunotherapy」的企圖心就看得出來，幾乎是國家層級的資源與力量來全力的發展這個領域，也是目前國內大學的實驗室，多以進行個體戶的單打獨鬥的規模，研究領域發展所難與項望其背。在與會的第一天、第二天的會議中，也利用一些時間去參觀以及發表 Posters，近距離的了解目前這個領域各個研究室最新的發展，在會議中也遇到到日本來參展的國內廠商，因為地緣以及領域相同的關係，和他們聊聊最新國內的發展及商業領域契機，我們都同意在技術與規模上，與國外大型公司相較起來，真有點兒「大巫見小巫」的感覺，如何發展小而美且具有本土特色的研究領域，是共同認可的發展方向；最後一天的下午有一場與生技廠商的會談，因為計畫執行的需要，與會取得一些分析的軟體及硬體內容的資料，並把我們在研究的需求與廠商交換一下了意見，並遇到同樣從台中中國醫藥大學來的同學，他們很熱心的提供我們將來可以發展的寶貴建議，與內容使我能夠獲益良多，並且對於我有很多的啟發作用回來台灣之後，期待有機會多請教貴實驗室的指導老師張偉嶠教授，學



習在 Immune Cell Repertoire analysis 方面的寶貴經驗與實驗室間交流的可能性。在得到這些寶貴的資料與資訊後，次日欲同樣搭乘捷運趕到關西國際機場，因為遇到百年難得一遇的大雨，使得從京都到大阪及機場的電車幾乎停駛，最後還是輾轉抵達大阪後直接搭乘計程車去機場，也見識到異常極端氣候，就連防災意識很先進的日本也無法承受，還好最後平安的回到桃園中正機場。

## 二、與會心得

可能是該項會議是在亞洲地區來舉辦的關係，因此，所討論的議題內容與亞洲國家的民情會比較接近，例如：癌症免疫療法或是亞洲常見的傳統治療方法、中草藥相關的議題，說真的不論是多高深的研究工作，對於開發中的國家來說不如歐美國家，「治療以調養身體為主」是這個地區的醫療人員們，最重要並且迫切需要解決的問題還是在於癌症的根本問題，參與這次會議之後，個人強烈建議利用「世代測序的技術」來調整癌症治療的過程與癒後的保健與調理，除了可以大幅提供精確性與預測性之外，也可以對於本土性的癌症發生，做更有效的管理與治療，例如：在第一天的會議中聽到關於「Future of cancer immunotherapy by PD-1 blockade」的議題，包括先進國家日本與韓國也開始已經利用自身的免疫系統方式，作為對於各式的癌症醫療，正向基因的篩選標準，同時也可利用 NGS 的方式作為育種的依據，同時也有討論利用癌症病人組織相容性基因(MHCs)的多樣性分析，來增加對於癌症治療的疾病抵抗的人力，當然在目前環境共通致癌物質汙染的年代，顯示這項生物科技在癌症基因體分析的快速發展，更凸顯得這項技術的重要性。另一方面，利用新發展的次世代定序技術，除了大量降低基因體分析的成本外，也加快這方面研究工作的進展，不過在會議的過程中，也感覺到每個實驗對於所發展的成果，因為國家因



素或是商業利益的考量，多半只要涉及到核心的資料內容時，就會採取合作保留的態度；因此，如何快速的建立本土的研究動能，加速趕上國際的水準外，沒有辦法透過管道的迅速達成的方法，相對的，建立本土世代測序技術的分析流程，也是保護國內生技產業發展的一項重要的策略。

三、考察參觀活動(無是項活動者略)

無。

四、建議

五、攜回資料名稱及內容

WCP2018 KYOTO 會議手冊，參展廠商的產品介紹等。

六、其他

106年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：劉玉凡			計畫編號：106-2320-B-040-026-			
計畫名稱：探討次世代測序技術與重組過敏原應用於檢測微角家塵蟎致敏性氣喘						
成果項目		量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)		
國內	學術性論文	期刊論文	1	篇	Liu, Y.F., Hsieh, C.W., Chang, Y.S., and Wung, B.S. (2017). "Effect of acetic acid on ethanol production by Zymomonas mobilis mutant strains through continuous adaptation." BMC biotechnology 17, 63	
		研討會論文	0			
		專書	0	本		
		專書論文	0	章		
		技術報告	0	篇		
		其他	0	篇		
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	
				已獲得	0	
				新型/設計專利	0	
		商標權	0			
		營業秘密	0	件		
		積體電路電路布局權	0			
		著作權	0			
		品種權	0			
		其他	0			
	技術移轉	件數	0	件		
		收入	0	千元		
	國外	學術性論文	期刊論文	0	篇	
			研討會論文	0		
專書			0	本		
專書論文			0	章		
技術報告			0	篇		
其他			0	篇		
智慧財產權及成果		專利權	發明專利	申請中	0	
				已獲得	0	
				新型/設計專利	0	件
		商標權	0			

		營業秘密	0		
		積體電路電路布局權	0		
		著作權	0		
		品種權	0		
		其他	0		
	技術移轉	件數	0	件	
		收入	0	千元	
參與計畫人力	本國籍	大專生	5	人次	施尚宏、許皓瑞、宋承憶、林昀萱、李庭瑤
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士後研究員	1		吳葶萱
		專任助理	1		胡瑞興
	非本國籍	大專生	0		
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
其他成果 (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。)					

## 科技部補助專題研究計畫成果自評表

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（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）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（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

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200字為限）

已順利申請到科技部 2018-2021 的三年期計畫，目前已在撰寫論文期刊中。

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）

因此藉由分子生物學、次代基因定序(Next Generation Sequencing)、及蛋白質體學 (Proteomics) 的體學方法 (OMIC methods)，來預測及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。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值： 否  是，建議提供機關科技部, 衛生福利部, 行政院農業委員會,

（勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關）

本研究具影響公共利益之重大發現： 否  是

說明：（以150字為限）

以微角家塵蟎誘發的致敏性氣喘為主題，利用次世代測序、蛋白質體學等組學方法，及生物大數據的分析流程，建立本土性家塵蟎的致敏基因庫。以矽藻為致敏蛋白質的生產平台，開發專一性過敏原檢測晶片，建立分子過敏原診斷技術。採用單一致敏原小鼠致敏模式，探討菇類免疫調節蛋白在免疫調節功能上的機制，開發精準食療。