

R
008.8
8042

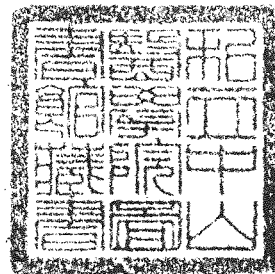
私立中山醫學院醫學研究所

碩士論文

指導教授：林克亮 博士

家塵蟎低分子量過敏原 Der p V
於昆蟲細胞表達之研究

The Study of House Dust Mite Allergen Der p V
Expressed In Insect Cell System



研究生：曾博修 撰

中華民國八十四年六月

中山醫學院圖書館



C032782

本論文為中山醫學院授予理學碩士學位之
必備條件之一，經中山醫學院醫學研究所碩
士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

台灣大學醫學院免疫研究所

蔡考圓 博士

蔡考圓

私立中山醫學院醫學研究所

蔡嘉哲 博士

蔡嘉哲

私立中山醫學院醫技系
(論文指導教授)

林克亮 博士

林克亮

中華民國八十四年六月

誌謝

求學的過程，就如同探勘未開發的大陸，之中雖有著無數美麗的寶藏等你搜尋、無窮盡的知識待你吸收；但卻也時時佈滿著陷阱，必須小心翼翼，才能真正有所收穫。

能夠順利完成論文，首先要感謝指導教授林克亮博士，兩年來不單單於研究上給與最大的幫助，在知識的傳授、困惑的解答也是不餘遺力，尤其人格的啓發，更是獲益良多。在研究期間，台大蔡考圓博士及中山蔡嘉哲博士對於學生的指導及教誨，頃囊相授尤為盡心，最是令學生感激！謹此表達內心之敬意。

此外，張大貞老師給與相當多實驗上寶貴的經驗，而實驗室的夥伴-威志學長，瑞玲、珍容、梅林學姐，李瑤玲老師，黃建寧醫師，重進，姿妙及學弟柏年、健隆，學妹靜玉及醫技系各位老師，也都給與不少幫助，在此謝謝你們。而李輝老師、張德卿老師及電腦室的黃老師和王老師，對於器材上的幫助，相當感激！

最後要感謝的是我的父親、母親、家人及再靜，謝謝你們無限的關心、容忍及鼓勵，才能完成學業，謝謝！！

曾博修 謹誌於

中山醫學院醫學研究所

中華民國八十四年六月二十二日

目 錄

口試及格書	
致謝	
中文摘要.....	1
前言.....	2
第一部分 家塵蟎過敏原Der pV於昆蟲細胞表達.....	4
第一章 研究背景.....	5
第一節 過敏反應.....	5
第二節 過敏原及家塵蟎的過敏原.....	6
第三節 桿狀病毒/昆蟲細胞表達系統.....	14
第二章 材料及方法.....	17
第一節 Der pV之於昆蟲細胞表達.....	17
(A) 桿狀病毒載體.....	17
(B) 將Der pV基因構築至pVL1393載體.....	17
(C) 昆蟲細胞培養液配製.....	19
(D) SF-9細胞培養.....	20
(E) 感染昆蟲細胞.....	21
(F) 病毒的增殖.....	22
(G) 終點稀釋.....	22
(H) 時間行程.....	22
(I) 西方點墨法.....	23
第三章 結果.....	25
第一節 構築Der pV基因至桿狀病毒載體.....	25
第二節 感染昆蟲細胞.....	25
第三節 西方點墨法之確認.....	26
第四章 討論.....	36
第二部分 Der f 基因庫過敏原基因選殖.....	39
第一章 研究背景.....	40
第一節 過敏原基因之選殖.....	40

第二章 材料及方法.....	42
第一節 多聚合酶鍊反應.....	42
(A)Der f cDNA基因庫之構築.....	42
(B)Der f λ噬菌體的增殖.....	42
(C)Der f λ cDNA 的純化.....	43
(D)PCR.....	44
(E)PCR的結果及構築.....	45
(F)Transformation.....	46
(G)成功株落的篩選.....	47
(H)pBlueScript SKII(+/-)載體.....	48
(I)核苷酸序列分析.....	49
(J)核苷酸序列分析所用之引子.....	51
第二節 利用DNA探針之搜尋.....	53
(A)核酸缺口移動技術.....	53
(B)原位DNA雜交法.....	54
第三節 菌斑放射免疫分析.....	55
(A)兔子血清.....	55
(B)兔血清價數之偵測.....	55
(C)菌殘渣之製備.....	56
(D)Der f λ cDNA基因庫搜尋.....	57
第三章 結果.....	58
第一節 Der f基因庫搜尋.....	58
第四章 討論.....	68
參考文獻.....	71
英文摘要.....	82
授權書	

摘要

目前對於家塵蟎 *Dermatophagoides pteronyssi-nus* (*Der p*) 第五組過敏原的研究，已進行到相當的階段，並且發現 *Der pV* 過敏原在臨床上確有其重要的意義。本論文的第一部分，則是針對於以往 *Der pV* 過敏原的研究，皆取自於大腸菌表達系統。而此類蛋白質在和自然的 *Der pV* 比較下，因來自不同的系統，自然差異便很大。於是我們便利用桿狀病毒載體/昆蟲細胞表達系統 (Baculovirus / insect cell system)，將 *Der pV* 的兩株異構體，WL及WM株落的cDNA構築到桿狀病毒載體 pVL1393，並感染昆蟲細胞SF-9，使其表達 *Der pV* 過敏原，而能夠再進行往後更深入的研究。

本論文之第二部分，便是利用目前可用來選殖cDNA的方法；如多聚合酶鍊反應(PCR)、原位DNA雜交(in situ DNA hybridization)、及菌斑放射免疫分析(plaque radioimmunoassay)，再以 *Der pV* 為其基礎模版，於另一同屬之蟎類 *Dermatophagoides farinae* (*Der f*) 的互補DNA基因庫(cDNA library)中搜尋，再經由PCR的方式，我們得到4段DNA片斷，並將這些片斷構築至pBluescript載體中做DNA序列分析。再經由學術網路(internet)進入中研院的基因庫做相似性比對，發現其中一段DNA片斷的C端序列和噬菌體及老鼠的ferritin的基因有很高的相似性。至於此結果是否有意義仍須更進一步的探討。

前言

蟎的生命週期並不長(Clinical and Experimental Allergy., 1994)；從孵化至死亡只耗時十週左右。在這短短兩個半月之間，雌性蟎體可以產生40-80個卵，而每隻蟎體終其一生又可產生1000個排泄物；平均每個排泄物中含有100pg的主要過敏原*Der pI*。蟎的生存環境和人類所須差異不大；在溫度25-30度之間，相對溼度(RH)在75-80%；也就是最適宜的生存條件下，蟎體可於一週內有八倍以上的增殖。

目前愈來愈多臨床報告證實，家塵蟎和一些過敏性疾病如支氣管氣喘、過敏性鼻炎、異位性皮膚炎有絕對關係存在；且日後發展為氣喘的比例為正常人之19倍。在台灣，塵蟎的分布以 *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Der p*) 為主。而另一種主要的蟎種 *Dermatophagoides farinae* (*Der f*) 則分布在歐洲、美國、日本。到目前為止，已有七組的家塵蟎過敏原經由分子生物學或基因選殖的方法選殖出來，並對其進行研究。其中以 *Der pI* (Chapman MD., 1980) 和 *Der pII* (Chua KY., 1990) 過敏原對氣喘病人血清的反應率高達80%以上，被視為主要的過敏原。但是近年來也發現一些低分子量的過敏原如 *Der pV*, 14Kd (K-L Lin., 1993), *Der pVII*, 22kD (H-D Shen., 1993) 對氣喘病人血清的反應率也分別高達55%及37%。此外，也發現 *Der pV* 不同cDNA株落間有多樣性 (polymorphysim) 的存在，並已將之構築成數段重疊

片斷進行抗原性分析。

*Der p*和*Der f*雖然為同屬之蟎種，外形也很類似，但是其過敏原間的生化特性及抗原性，卻不相同。目前*Der pV*的研究，已有相當結果；至於*Der fV*，也希望能選殖出其cDNA，並與*Der pV*做一比較。此外，*Der pV*過敏原的純化，都是來自於大腸菌表達系統。這和在昆蟲真核細胞中所表達的過敏原有什麼差異，則是另一項深具意義的研究。

第一部分

家塵蟎過敏原Der pV於昆蟲細胞表達

第一章 研究背景

第一節 過敏反應

當適應性免疫(adaptive immune)的反應發生在一種過度劇烈或不適當的情況下，而引發組織的受損，便可稱作過敏反應(hypersensitivity)。

過敏反應的發生，在個體和抗原初次接觸時，並不十分明顯；而是在往後的接觸，才會發生。Cooms和Gell把過敏反應分為四型(Type I、II、III、IV)。這四種過敏反應的發生經常是混合性，而非獨立不相關。

過敏(allergy)這個名詞，首先是由Van Pirquet於1906所創，但是當時的定義並不清楚，直到近年來，過敏一詞才變為第一型過敏反應的同義詞。而異位性(atopy)，最早是由Coca和Cooke (1923)用以描述第一型過敏反應的臨床特徵，包括氣喘(asthma)、溼疹(eczema)、乾草熱(hay fever)、蕁麻疹。

第一型過敏反應又稱為立即型過敏反應，是指某些特定的抗原，激活已被IgE抗體刺激過的肥胖細胞(mast cell)或嗜鹼性白血球(basophil)，而導致許多藥理性質的釋放，如組織氨(histamine)、前列腺素(postaglandin)等，而引

起的發炎反應所稱之。

第二節 過敏原及家塵蟎的過敏原

家塵、花粉、黴菌、動物皮屑、昆蟲所衍生的過敏原，都可以懸浮於空氣中，成為所謂的吸入性過敏原是造成氣喘 (asthma)，及過敏性鼻炎 (atopic rhinitis) 的主因；其中又以家塵為最重要，因其可刺激90%以上的氣喘病人皮膚測試呈陽性反應 (Voor-host R et al., 1964)。

在家塵中有許多過敏原物質 (1920)，包含甚廣；以家塵蟎為最主要過敏原來源。而家塵蟎的種類主要有四類：*Dermatophagoides pteronysinus* (*Der p*)，*Dermatophagoides farinae* (*Der f*)，*Dermatophagoides microcera* (*Der m*)，及 *Euroglyphus maynei* (*E m*)。其中以 *Der p*，*Der f* 為最重要。*Der p* 分布於台灣、澳洲、西澳 (Chang YC, Hsieh KH., 1989)，而美國、歐陸、日本則以 *Der f* 為主要分布的蟎種 (van Bronswijk TEMH and Sinha RN., 1971)。

目前已經知道蟎體有許多的過敏原會引發人類即發型過敏反應，但在如此多的粗蟎萃取物中，那些才是重要過敏原，

便相當值得深究。(Voorhorst et al., 1964 Manusell et al., 1968 Van Bronswijk and Sinha., 1971 Platts-Mills and Chapman., 1987)。在利用交叉放射免疫電泳法(cross radioimmunoelectrophoresis, CRIE) (Krills S et al., 1984)發現蟎體中有一些成分會和氣喘病人血清反應。但鑑於敏感度、解析度的考量及材料來源，便有學者利用免疫轉印分析法(immunoblotting assay) (Towbin et al 1979)(Sutton et al., 1982)對蟎粗萃取物進行IgE的結合反應。結果發現有14種蟎粗萃取物會和IgE有反應。而在*Dermatophagoides*此屬蟎中，至少有八種過敏原(Iang RB et al., 1988 Nakanishik et al., 1990 KL-Lin et al., 1991)其分子量分別為10kD, 60kD, 55kD, 43kD, 31kD, 27kD, 16kD, 15kD。

目前已有七組過敏原被發現，其相關資料分別敘述如下：

第一組過敏原

此組過敏原在三種不同蟎間 *Dermatophagoides pteronysinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides microcera*, 都被發現，且分別命名為

Der pI (Thomas WR et al., 1988) (KY Chua et al., 1988), *Der fI* (RJ Dilworth et al., 1991), *Der mI* (Kent NA et al., 1991), 經由核苷酸排序及生化特性分析得知此組過敏原為27kD的熱不穩定糖化蛋白質(heatunstable glycoprotein), 且具有胱氨酸蛋白酶(cysteine protease)的活性。由於此類過敏原是在蟎的排瀉物中發現, 於是推論可能是蟎消化道中所釋放的消化酶。

至於此組過敏原的抗原性探討, 首先是利用超音波將 *Der pI* 的cDNA打成隨機的片斷, 並構築至 λ gt11基因庫, 再利用兔子抗*Der pI*血清進行反應(WK Greece et al., 1990), 發現在60-80氨基酸殘基最具抗原性。為了更進一步確認*Der pI*的抗原性區域, 便將重疊的*Der pI*片斷構築入pGex-1載體, 經由點漬免疫分析(Dot blot immunoassay)發現五個反應較強區域, 分別位於34-47, 60-72, 82-99, 112-140, 166-194殘基。而相同方式在*Der f*上只得到34-47, 60-72, 82-99, 有抗原性反應(Le Mao T et al., 1992)這也顯示了*Der pI*和*Der fI*抗原性的不同。

由於大腸菌系統所表達的*Der pI*和IgE反應性並不高, 便將之選殖至酵母菌系統pYELC5-13T中表達(Chua KY et al., 1992), 結果此系統中得到的*Der pI*和IgE有較佳的

反應性。另外在數個不同 *Der pI* cDNA 株落中間，發現有1-2個氨基酸殘基的不同(Chua KY et al., 1993)，此結果亦說明了 *Der pI* 變異性的存在(polymorphysim)。這些變異區多為於50、82、124、136、215的氨基酸殘基；這些位置稍後證實和T細胞的結合有直接關係。

第二組過敏原

Der pII 是利用氣喘病人血清IgE在 *Der p λgt11* cDNA 基因庫中以菌斑免疫分析(plaque immunoassay)所選殖出來的16kD蛋白質過敏原(KY Chua et al., 1990)。其與 *Der pI* 的DNA序列有81%的相似性，且和氣喘病人血清有很高的反應率，被視為是主要的過敏原。而利用PCR在 *Der f* cDNA 基因庫選殖到 *Der fIII* 過敏原，和 *Der pII* 的DNA序列有88%的相似性(M Trudinger et al., 1991)這包含了N端的糖化位置(glycosylation site)和胱氨酸殘基保留區(conserved cysteine residue)的缺失，再經由生化分析，發現其具有溶解酶(lysozyme)的功能。

在台灣，利用氣喘病童的血清，亦選殖到了不同株落的 *Der pII* cDNA，發現有4個氨基酸殘基不同(KL Lin et al., 1993)。這亦顯示 *Der pII* 的多樣性；再經由IgE反應測

試得知 isoform 間反應亦具有差異。至於抗原決定點的研究上，經所得到的資料推論，*Der pII* 的抗原性須完整分子才可表現 (Chua KY et al., 1991) 此現象似乎和蛋白質三級結構有關。

第三組過敏原

本組過敏原最先被發現的是 *Der fIII* (Hey-man et al., 1989)。是直接由 *Der f* 蟎體純化出來。經生化特性分析，證實其具有胰蛋白酶的功能，分子量約為 29kD，其 N 端氨基酸序列已被分析出來，而 cDNA 也已經選殖出來。在 *Der p* 方面也純化到了類似的過敏原，命名為 *Der pIII* (Stewart GA et al., 1992)，但其分子量卻是呈現雙重性 (duplicate)，有 34kD 及 28kD 兩種形式；而也有其它報告指出，*Der pIII* 至少有 12 種異構體 (isoform) 存在 (MacDonald et al., 1982)。但一般相信 28kD 的形式是由 34kD 的形式降解而來；且經稍後的證實，具有胰蛋白酶活性的是 28kD 的形式。此外，*Der pIII* 的 cDNA 也已選殖出 (WA Smith et al., 1994)。

本組過敏原和其它胰蛋白酶有 50% 左右的相似性，以和鮭魚胰蛋白酶有 47% 相似最高。而 Ando 的株落 (Ando T et



al., 1993) 和 Stewart 的株落間 (Stewart GA et al., 1992) 在 11 (Gln/Glu)、12 (Ser/Cys)、25 (Ser/Cys) 殘基上有相異處，此是否代表不同株落間抗原性差異，仍須進一步探討。

第四組過敏原

早在 1979 年便知道黴菌中的澱粉酶 (amylase) 會引發職業性的過敏性疾病，並可刺激 IgE 的產生 (Baur et al., 1986)。此組過敏原具澱粉酶 (amylase) 的活性，為一 60 kD 的過敏原，和氣喘病人血清有 40% 反應率 (Lake FR et al., 1991)。目前由 *Der p* 及 *Der f* 中都已存化出此組過敏原，並已定出 N 端序列。而 cDNA 的選殖仍在進行中。

第五組過敏原

Tovey 等人於 1989 年利用過敏病人血清進行 IgE 菌斑放射免疫分析法 (IgE plaque radioimmunoassay)，得到一 14 kD 的低分子量過敏原，命名為 *Der pV*。但此時對於此株落的 cDNA 並不能肯定為 *Der pV* 基因全長。同樣利用台灣氣喘病童血清進行 IgE 菌斑放射免疫分析法，得到一短片斷 *Der pV* DNA，再用此為探針 (probe)，進行原位 DNA 雜交試驗 (in

situ DNA hybridization), 於 λ gt11基因庫找到4個*Der pV*株落, 分別命名為24(WM)、25、26(WL)、27; 經DNA序列分析和Tovey的株落進行比對; 證實為*Der pV*全長基因。24株落有613bp, 26株落有737bp; 此二株落間最大不同在於24株落尾端沒有多腺嘌呤尾(poly A tail)及殘基295(A/C), 438(A/C), 439(A/C), 503(A/C)的不同。(KL Lin et al., 1993)

本組過敏原和氣喘病人血清反應率約為55%。而25株落和27株落和氣喘病人血清反應率只有41%。再將之構築成數段片段, 進行抗原性研究, 反應性卻又下降。這似乎和抗原的三級結構有關。

第六組過敏原

本組過敏原最早稱為DP4及DF4(Yasueda H et al., 1991), 是由*Der p*及*Der f*培養基中分離而得。其後被稱為DP5及DF5(Yasueda H et al., 1993)。目前則正式命名為*Der pVI*及*Der fVI*(Thomas WR., 1993)。其分子量約為25kD; 且具有chemotrypsin的活性。運用放射免疫分析法的偵測, 得知與氣喘病人血清反應比率為40%。目前僅有N端氨基酸次序被定出來。

第七組過敏原

Der pVII cDNA的發現是利用氣喘病人血清中IgE為探針，以菌斑放射免疫分析法於 λ gt11基因庫所篩得(HD Shen et al., 1993)。其cDNA長度為812bp，可轉譯為一215殘基的蛋白質，包含一段17個殘基的前導肽鍊，分子量約為22kD。*Der fVII* cDNA目前已被選殖出(尚未發表)，而相關研究工作仍在進行中。

以下是各組塵蟎過敏原一覽表：

Group	Name	MW(kD)	Function	IgE reactivity	Sequence
I	Der pI	25	cysteine protease	80-90%	cDNA
	Der fI	25	cysteine protease	80-90%	cDNA
II	Der pII	16	lysozyme	80-90%	cDNA
	Der fII	16	?	92%	cDNA
III	Der pIII	28,30	trypsin	70%	-cDNA
	Der fIII	29	trypsin	80%	N-terminal
IV	Der pIV	60	amylase	40%	N-terminal
V	Der pV	14	?	55%	cDNA
VI	Der pVI	25	chymotrypsin	41%	N-terminal
VII	Der pVII	22	?	37%	cDNA
	Der fVII	?	?	?	cDNA

第三節 桿狀病毒/昆蟲細胞表現系統

目前,塵蟎過敏原的抗原性研究,絕大部分是利用大腸菌表達系統所表現的重組蛋白質;而此類重組過敏原和自然的過敏原蛋白質,似乎有著某種程度上的差異;以*Der p1*為例,構築後的過敏原抗原性,以在酵母菌系統所表達的較高。為了更進一步了解*Der p1*,便利用真核細胞的表現系統—桿狀病毒/昆蟲細胞表現系統,進行我們的研究。

桿狀病毒(Baculovirus)具有多樣的族群,幾乎在所有昆蟲身上都可以找到,而且此類病毒不會寄生在非節肢動物宿主。Baculo 這個字所指的意思是病毒粒子的外觀呈現長桿狀外觀,其外殼直徑寬通常約為 40-50um 而長為 200-400um (Harrap et al.,1972)。也就是因為桿狀病毒有這麼大的空間,所以可以攜帶很大的內插DNA(Fraser et al.,1986),最大可以攜帶15kbp的內插基因。另外,病毒外殼圓桿的一端,通常具結構上的差異,可給與桿狀病毒一個極性端(Fraser et al.,1986)。桿狀病毒的宿主範圍,非常的狹隘(Groner et al.,1986)。每一種桿狀病毒都只能感染極少數相關的昆蟲細胞。重組過的桿狀病毒載體對於哺乳類沒有不利的影響,也就是實驗者的安全無慮。

爲了取得具有生理功能的蛋白質，使用一個真核細胞的表達系統是很重要的。而桿狀病毒/昆蟲細胞表達系統提供了這樣的一個環境，使得蛋白質在合成時，能有較適合的摺疊(folding)、雙硫鍵的形成、寡體聚合(oligomerization)、及轉譯後修飾(posttranslational modification)。桿狀病毒正常於27°C下增殖，這個溫度恰巧也適於多數原本生長於37°C的突變生物。在適宜的溫溼度下，桿狀病毒/昆蟲細胞表達系統能大量表現殖入的基因產物(Reynisdattir et al., 1990)，此外這個系統並不須要輔助病毒(helper phage)的幫助，而是直接利用重組病毒體的方式；不但較快，而且比構築一個高產量的真核細胞株來的容易。在感染後4-5天，溶菌斑(plaque)便形成，而再純化或放大(Amplification)需5-7天。

在我們的實驗中，所採用的細胞株是 *S. frugiperda* (Sf9, Sf21) 此細胞株是蠶的腸細胞，其表達能力極好，不單如此，其生長速率快、對於病毒的複製穩定(18-24hr可複製一次)、培養容易(可懸浮培養或貼附培養)、對重組蛋白合成容易，都是我們選此細胞株的原因。而桿狀病毒的選擇，則有兩種基本選擇，*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV) 或 *Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus* (BmNPV)，我們則是選擇了AcMNPV

。目前雖然有超過500種以上的桿狀病毒被報告，但在基因複製及表達上，仍以AcNPV的使用為最好。

第二章 材料及方法

第一節 *Der pV*之於昆蟲細胞表達

(A) 桿狀病毒載體

我們採用的是 pVL1393\1392 載體，是以 pVL941 為基礎所設計改造出的 (Lucknow and Summers., 1989)，它主要是把 AcMNPV/pUC8 接合處，也就是 polyhedrin promoter (*polh*) 下游處切除，並且把 polyhedrin promoter 之 ATG 突變成 ATt，而使得其下游 (down stream) 之 ATG 能啓動更好的 promoter 活性。

此載體之殖選限制位置有 BqI II, Pst I, Not I, Ega I, EcoR I, Xba I, Sma I, Kpn I, 及 BamH I。基於基因方向之考量，我們採用了 BamH I 和 EcoR I 兩個位置。

pVL1393 和 pVL1392 唯一不同處在於二個載體的 polylinker 排列方向相反。其基因圖如圖一。

(B) 將 *Der pV* 基因構築至 pVL1393 載體

我們所要構築的是兩株 *Der pV* cDNA, WM 及 WL，但此

二段cDNA其結構基因(structure gene)前有大於100個鹼基對的非轉譯區(untranslation region)，若直接構築至pVL1393載體，會使得Der pV蛋白質表現的不好，甚致於不會表現。於是我們便設計了一段具BamH I構築位的引子WMWL(見圖二)，其序列如下：

5'GCGGATCCCCGTTTAAAAAATATCAATC 3'

並進行PCR反應，其條件如下：

WM或WL SKII(-)	0.01ug
WMWL primer	20 pmole
ks primer	20 pmole
dNTPS	40 mM
10X pfu buffer	10 ul
pfu enzyme	2 unit

加水至100ul

95 °C 5min 55 °C 1min 72 °C 2min 1cycle
 95 °C 1min 55 °C 1min 72 °C 2min 38cycle
 95 °C 2min 55 °C 1min 72 °C 5min 1cycle

待反應完成，把產物於2%低融點洋菜膠上以電泳分離

後(圖三)，切下含放大帶的膠，置入微量離心管中，於65°C水浴15分鐘，加入等體積的酚(phenol)，以第一節(C)所提之phenol/chloroform方式純化出DNA；再以第二節(E)所提之方法，把純化出的DNA及pVL1393載體分別以BamH I，EcoR I處理後，再以T4 Ligase接合。圖四為接合後所檢視的結果。

(C) 昆蟲細胞培養液配製

昆蟲細胞培養液的種類很多，而最常使用的有三種基質，分別為Grace's medium (Grace 1962), IPL-41 (Weiss et al, 1981., Weiss and Vaughn, 1986) 及 TC-100 (Gardner and Stockdale, 1975)。目前使用最廣泛的是TNM-FH medium (Hink, 1970)，其成份以 Grace's basal medium 為主，再加上二種補充物 (supplement)，lactalbumin hydrolysate 及 yeasolate。

我們是採用 Grace's Insect Cell Culture Medium powder / 1 pack (GIBCO BRL)。首先把0.35g的 sodium bicarbonate (NaHCO₃)，加入950ml的純水中，置入滅菌鍋滅菌後，加入 Grace's Medium powder, 3g TC yeasolate 及 3g lactalbumin hydrolysate，於室溫下

攪拌2小時，使各成份確實溶解後，用10N NaOH調pH值至6.2，置入通風櫥內，以丟棄式的0.22 μ m濾膜(Gelman mini capsule)過濾至乾淨瓶中後，加入50ml胎牛血清。

此時，把配製好的medium置於27°C中培育3-5天，確定無細菌污染後，可置4°C保存但須於3個月內使用完。

(D) SF9細胞培養

我們實驗採用的是SF9細胞，是蠶的腸細胞。值得注意的是這類細胞和一般細胞不同處，在於其沒有接觸性抑制(contact inhibition)。當細胞密度太高時，會因為擠壓而變形，只有在合宜的情況下，細胞會呈現均勻圓球狀，而非聚集成大顆粒狀(granular)，這亦為判別的重要依據。(圖五)在準備好37°C水浴後，把液態氮中保存的細胞取出，於水浴中快速攪動30-60秒使之解凍，容器外壁再以70%酒精消毒後，置入通風櫥內，把細胞置入T-25培養瓶中，加入10ml TNM-FH medium，於27°C培育4小時，待細胞附著(attach)，再置換5ml新鮮TNM-FH medium。於27°C培育3-4天後，再繼代培養(passage)及可。此時每個T-25培養瓶中約加入30萬個細胞即可。

(E) 感染昆蟲細胞

我們所使用的是 Liposome-mediated Transfection 的方法，其成份為 lipofectin (DOTMa 和 phospholipid dioleoyl phosphatidylethanolamine 1:1 混合)，是一種合成的脂質— N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N1N1N1-triethylammonium chloride (DOPA)，可形成帶正電價之脂小體 (positive charged liposome)，會和 DNA 或 RNA 成自動形成分子內鍵結 (Felgner et al., 1987)。

進行感染之前，要先準備好健康的細胞。換 2ml 不含胎牛血清的 medium 後，將細胞刮下並置入無菌的離心管中，取 45ul 至微量離心管中，並加入 5ul trypan blue 混合，於血球計算盤計算一大格的細胞數再乘上一萬便是每 ml 的細胞數。之後取 10^6 的細胞至 3.5mm 的培養盤中，靜置 30—60 分鐘，此時把 40ul lipofectin (Phramacia) 稀釋在 1ml 不含胎牛血清的 medium 中，另外把病毒 DNA 1ug 和接有 *Der pV* 之 pVL1393 3ug 混合，置室溫下 5 分鐘後，將之滴到培養盤並部分封上，置 27°C 中培育 4 小時後，再以不含胎牛血清的 medium 置換 2 次後，於 27°C 中培育 4-5 天。之後，把 medium 移至離心管離心 3000rpm 5 分鐘，取上清液至無菌容

器中，並置4。C 保存。

(F) 病毒的增殖 (Amplification)

如(E)所示，計算細胞數後，取 7×10^6 個細胞至14.5 cm的培養盤，待細胞附著後，置換新的medium，並加入初次感染後回收的medium 1ml，於27。C 中 培育3-5天。如此重覆數次，直到病毒價數變高。

(G) 終點稀釋 (End point dilution)

此為偵測病毒價數的方法。先種 2×10^4 個細胞至12槽平板上的每個槽中，待細胞附著後，以2ml新鮮TMN-FH\10% FCS置換。加入所收集的病毒懸浮液100uI, 10uI, 1uI, 0uI分別到不同的槽內，於27°C培育72hr後，觀察細胞是否有明顯受感染的現象；若是有CPE的現象，則收集此槽內的細胞，將細胞溶破後，可進行更進一步的確認。

(H) 時間行程 (Time course)

本實驗的目的為觀察SF9細胞在被病毒感染後，不同時間內Der pV 過敏原蛋白質表現的情況。

首先種入 10^6 的SF9細胞到35mm培養盤中，靜置30分鐘，待其附著後，以2ml新鮮TMN-FH\10% FCS置換，並加入適量MOI(20pfu/cell)的病毒懸浮液，於 27°C 中培育12hr, 24hr, 36hr, 48hr後，收集細胞，加入適量 SDS sample buffer，以沸水煮5分鐘後，置 -20°C 中儲存。(圖六)

(I) 西方點墨法(Western Blot)

a. SDS PAGE

把不同時間搜集的SF9細胞樣本取10 μ l 到15% SDS PAGE的槽中，以120V(Bio Rad)進行電泳反應，當反應結束後，將之浸泡在 transfer buffer(25mM Tris 20% methanol 192mM pH8.3)中半小時，以備transfer之用。

b. Transfer

裁與SDS PAGE相同大小的NC paper及3M濾紙，浸泡在 transfer buffer中，由負極到正極分別擺上棉塊、濾紙、膠、NC paper、濾紙、棉塊，於100伏特下 transfer 1小時後，取下NC paper，以ponsou S 染 30秒，再以清水沖洗，則可見轉印過去之 band，以鉛筆迅速將 marker 標示

後，便將之以5%的脫脂奶粉block整夜。

c. Western blot

把抗體稀釋於適量5%牛奶中，和block好的NC paper於室溫做用2小時後，以PBS-tween清洗5次/每次10分鐘，再以接合有鹼性磷酸酵素之二次抗體，室溫下做用1小時，再以PBS-tween清洗6次/每次10分鐘，之後於 substrate buffer (0.15M Tris-Cl, 4mM MgCl₂)呈色，待呈色後以清水終止反應。(圖七.八)

第三章 結果

欲構築至桿狀病毒載體的 *Der pV* 基因, WM、WL 以由經林克亮教授選殖並分析完成, 且於大腸菌系統表達。本部分便是將其構築於昆蟲病毒載體, 以期於此真核系統中表現。

第一節 構築 *Der pV* 基因至桿狀病毒載體

首先, 我們將 *Der pV* 基因, WM、WL 株落選取適當位置, 使其含有自己結構基因上游的啓始密碼 - ATG, 且和結構基因小於 100 bp 的距離。基於這些條件, 於是設計一段引子(圖二), 利用 PCR 把要構築的部分放大出來(圖三)再將其構築至昆蟲病毒載體 pVL1393(圖四)。且基於轉錄上方向的考量, 便將之以 Bam HI, EcoRI 限制酶位構築。

第二節 感染昆蟲細胞

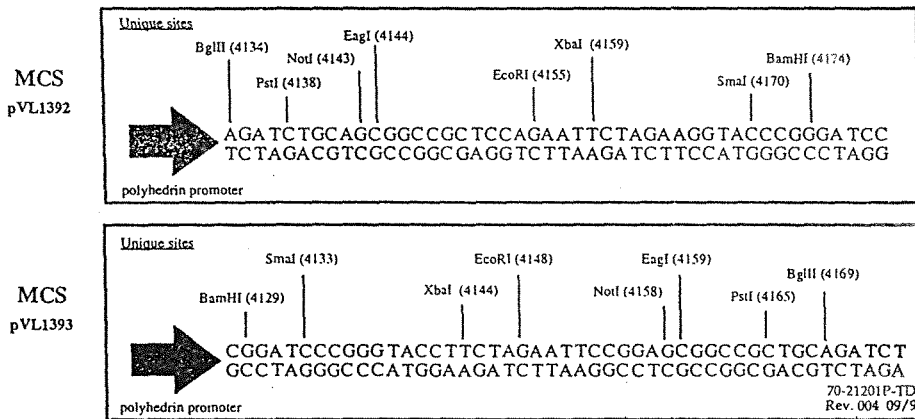
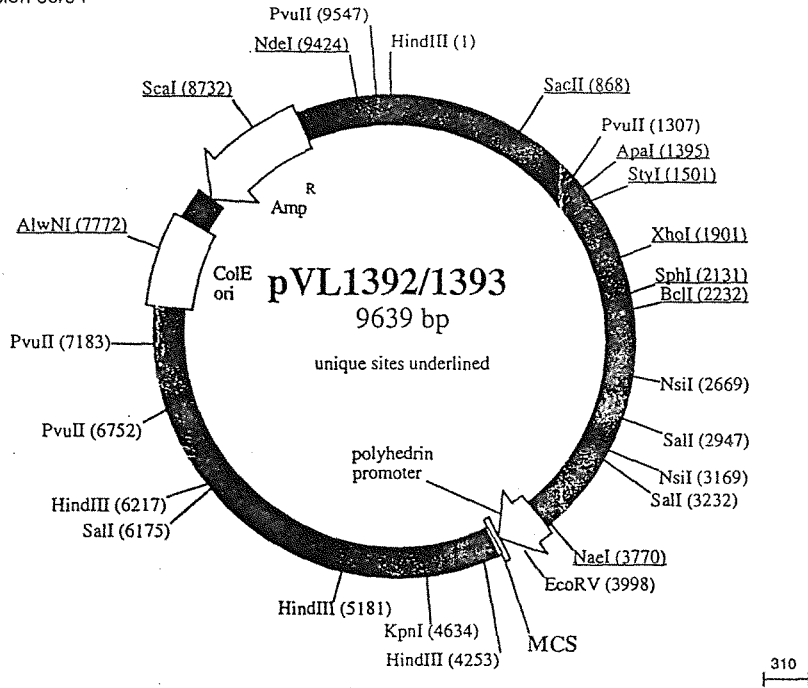
此時把構築好之兩株落 *Der pV* cDNA, WM 及 WL 藉由病毒 DNA 及 lipofectin 的幫助, 共同感染(cotransfection)至昆蟲細胞 SF-9 後(圖五 a、b), 收集不同時間之被感染細胞, 觀察是否有預期大小之蛋白質產生, 結果發現在 14Kd 處有一蛋白質帶出現(圖六), 隨感染時間之不同而變化, 且於感染 48 小時後最多。

第三節 西方點墨法之確認

之後，便以兔子抗*Der pV*多株抗體進行西方點墨法確認(圖七、八)，發現分別會與WM, WL time course之14Kd處蛋白質帶反應，但WM較強。再由time course及wild type之比較中發現，wild type不含14Kd處蛋白質帶反應。且又知wild type是不含*Der pV*基因之病毒。故推知*Der pV*確實表達於SF-9之中。

pVL1392/1393 Baculovirus Transfer Vector Set

Revision 09/94



圖一. 桿狀病毒載體 pVL1393/1392 的基因圖


```

WL TTTTTTTGCTTGTGGATGTATTGTCCAATAGATTAATGAACTGTAACITTTTTTCAAG 60
WM

WL TGTATCTTTGTAATTGGTAATTTTAAATCGATCAAAATGTAAACAACAACAAAAAAGAG 120
WM

WL ATAGAAATACAATTTGATCGATATAAAAAATAAAGAACTGGAAGTTATAATTTTTGAAAA 180
WM

WL GATTGATCGACAAAAGTGTGCATTTATATAATTTTTTCTAGAAAAAATCCAAACGGT 240
WM          T*T*TTT**T*T*TT**C*CGA*A*T**G***** 45
                               GCGGATCC

WL TAAAAAATATCAATCATGAAATTCATCATTGCTTCTTTGTTGCCACTTTGGCCGTTAT 300
WM *****A***** 105

WL GACTGTTTCAGGTGAAGATAAAAAACATGATTATCAAAATGAATTTGATTTCCTATGAT 360
WM ***** 165

WL GGAACGTATTTCATGAACAAATTA AAAAAGGTGAACITGCATTGTTCTATCTTCAAGAACA 420
WM ***** 225

WL GATTAATCATTTTGAAGCCAAACCAACAAAAGAAATGAAAGATAAAATTTGTAGCCGAAAT 480
WM *****AA***** 285
                               Glu

WL GGATACCATTATTGCTATGATTGATGGTGTACGTGGPACTTGATCGTCTTATGCAACG 540
WM ***** 345

WL TAAAGATTTAGATATTTTTGAACAATATAATCTTGAAATGGCTAAAAAATCTGGTGATAT 600
WM ***** 405

WL TTTGGAACGTGATTTGAAAAAGAAGAAGCACGTGTTAAAAAGATTGAAGTTAATTTAA 660
WM ***** 465

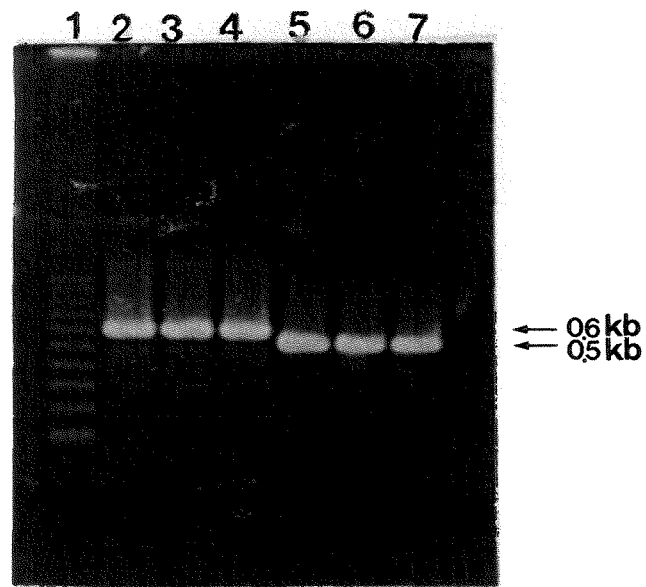
WL TTGAATTA AAAATTTCTTGATTTTTTCTTGTTCCTCATCAATTGACAATAAAAATG 720
WM *****G***** 525

WL AATAAAGAATTTGG 736
WM *****AAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 585

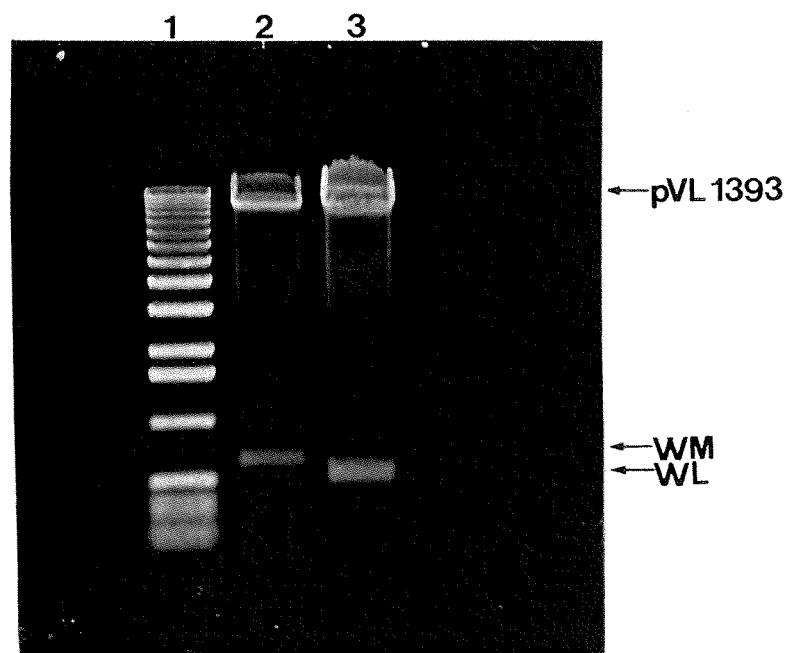
WL
WM AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 613

```

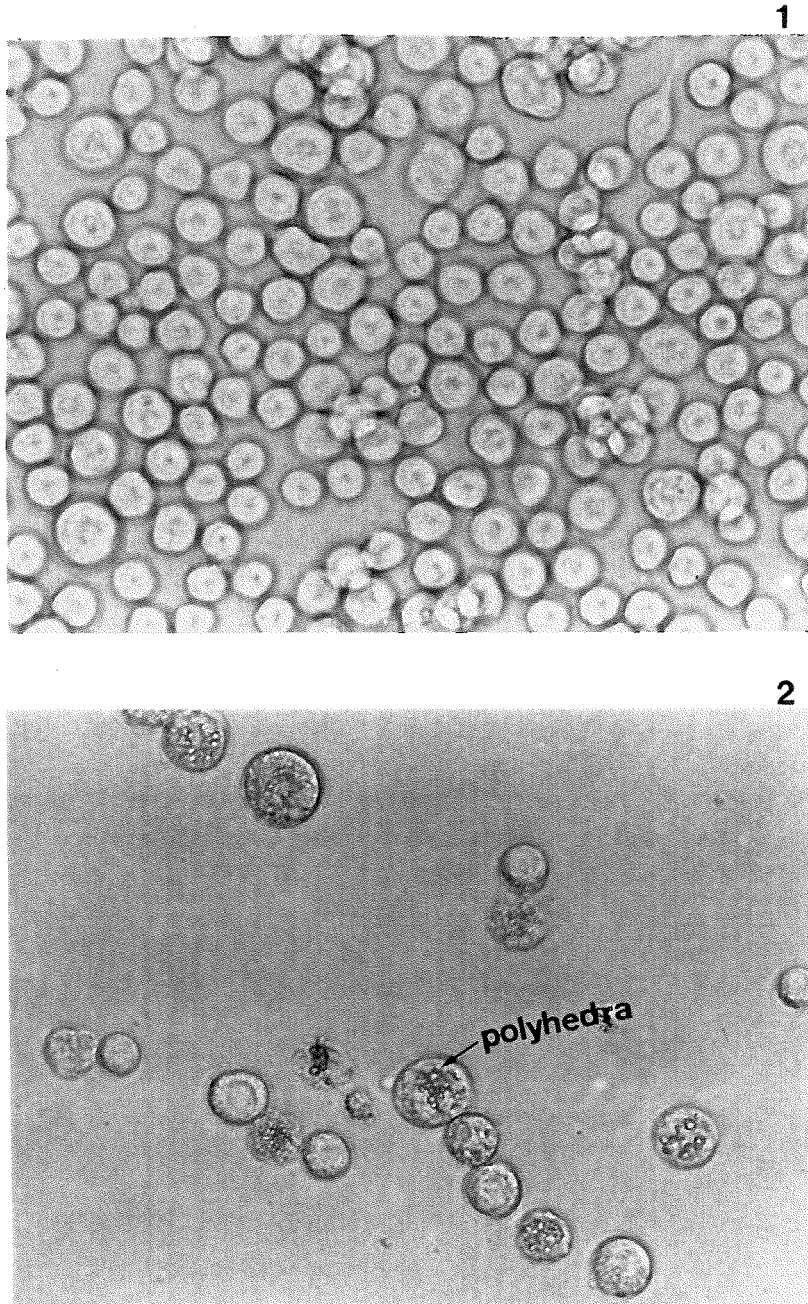
圖二. WMWL 引子的設計位置, 包含了 *Der pV* 基因自身的啓始密碼, 且結構基因前之非轉譯區小於 100 bp



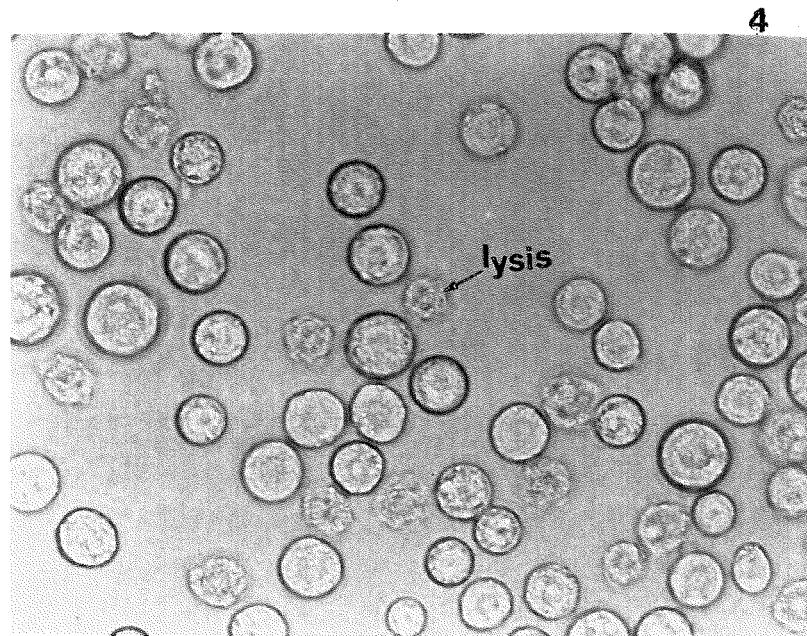
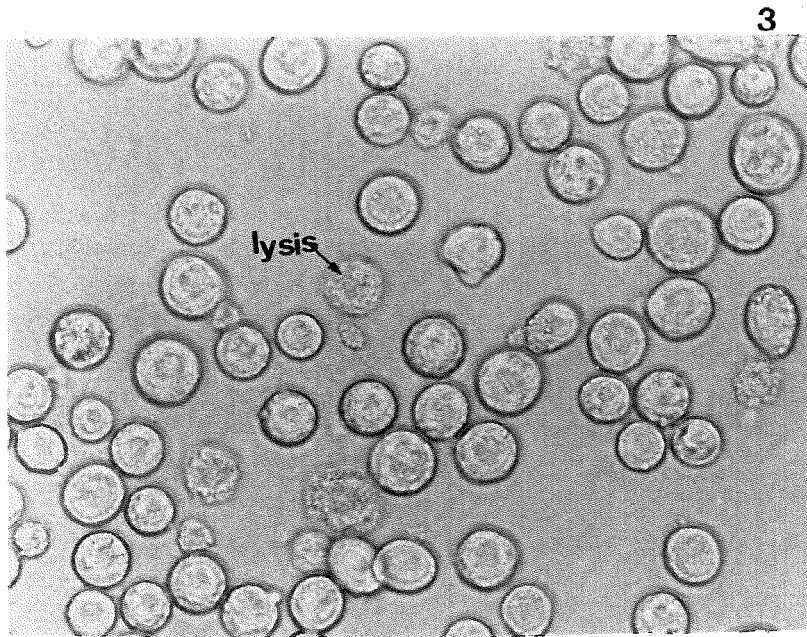
圖三. 利用設計之引子所得到 WM, WL PCR之產物於1%洋菜膠分布的結果。



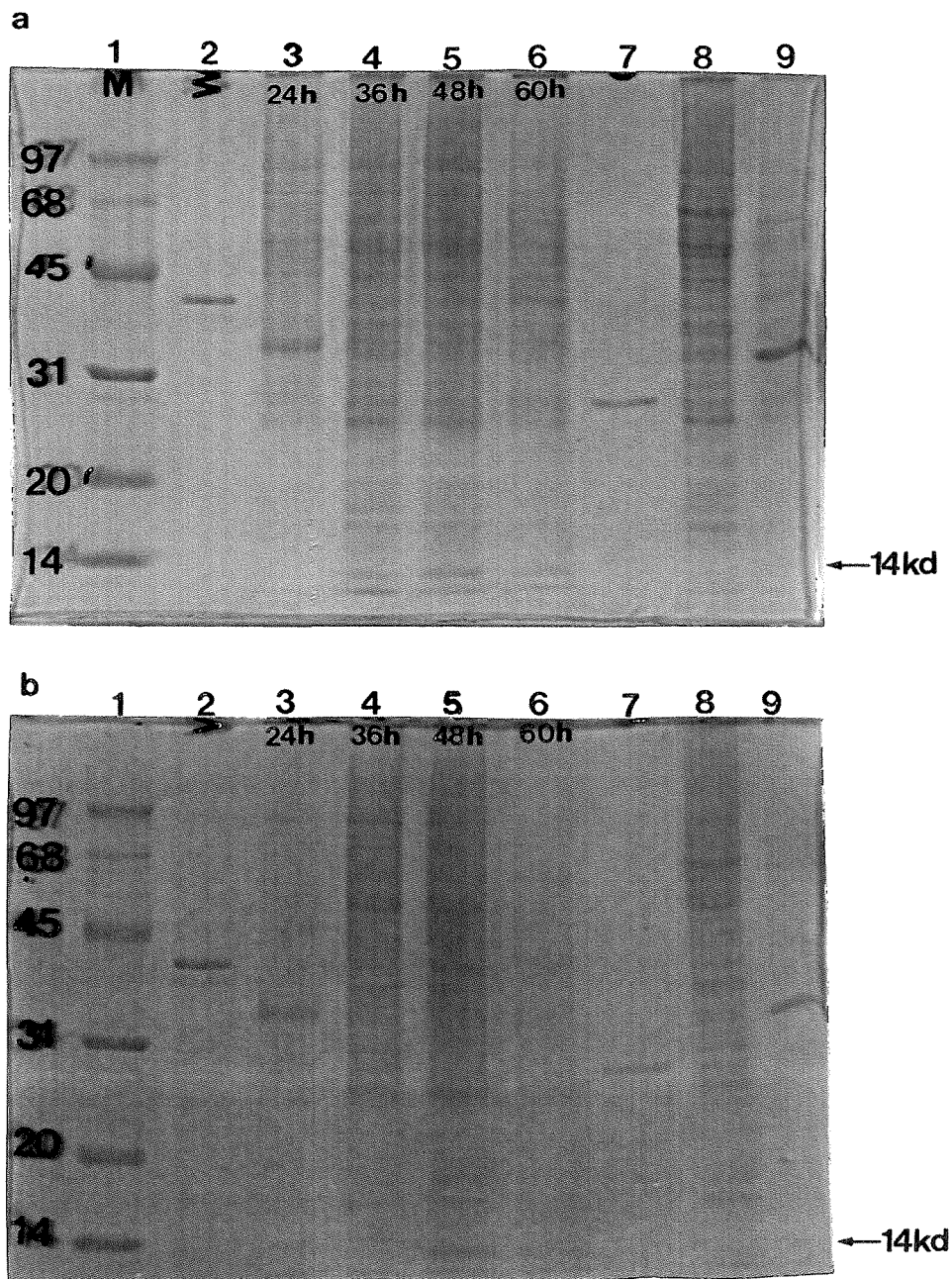
圖四. 此為 WM, WL, 構築至 pVL1393 桿狀病毒載體後, 以限制酶切出在 1% agarose 上檢視. lane 1 為 1 Kb ladder, lane 2 為 WM, lane 3 為 WL



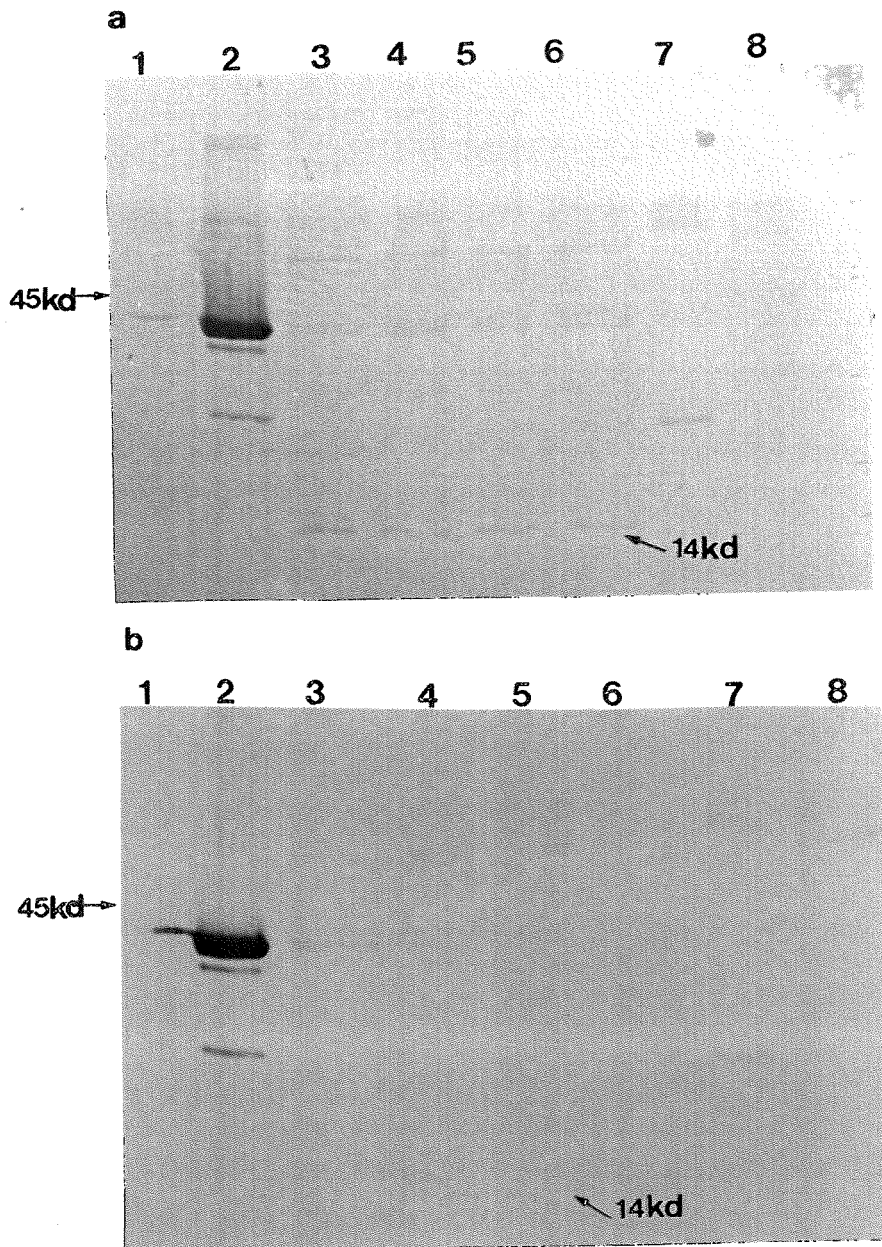
圖五.(1)為正常細胞,胞質均勻且外觀呈圓球狀。(2)為 wild type-AcNPV 感染的細胞,出現明顯CPE。(200X)



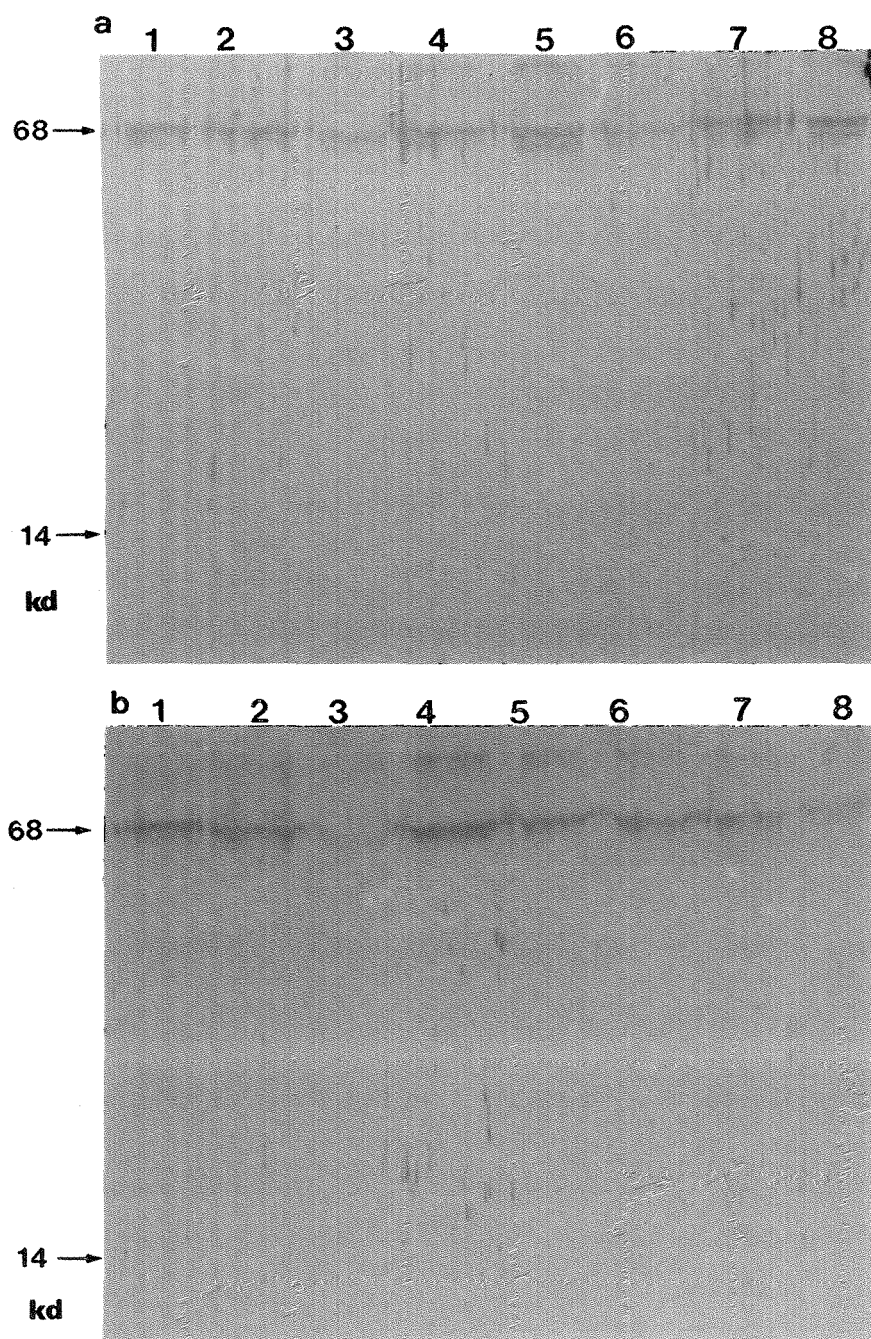
(3)(4)分別為帶WM, WL基因的病毒感染的結果, 細胞有明顯皺縮或溶破的現象。(200X)



圖六. SDS PAGE 的結果 (a) (b) 分別為 WM, WL 的時間行程
 Lane 1 為 marker Lane 2 為 Der pV-Gst 融合蛋白 Lane 3-6
 為時間行程 Lane 7 為 Gst Lane 8 為正常細胞 Lane 9 為
 AcNPV 感染的細胞



圖七. 西方點墨法結果(a)(b)分別是WM WL與多株抗體反應的結果, 在time course處(lane3-6)可見一反應帶



圖八. a, b 分別為WM WL以正常兔血清反應之結果. 14Kd處並沒反應帶出現。

第四章 討論

本論文的第一部分，便是希望能把 *Der pV* 過敏原於昆蟲真核細胞表達系統中表現。由於以往 *Der pV* 過敏原的研究，並無法取得自然 (native) 蛋白質，都是由大腸菌表達系統所取得大小為 15Kd 的重組蛋白質 (recombinant protein)，而這些由大腸菌表達系統所取得的蛋白質，抗原性並不很高，於是我們希望能把 *Der pV* 過敏原於昆蟲真核細胞表達系統中表現。因為在真核細胞表達系統中，不會有融合蛋白的產生，應更接近 *Der pV* 過敏原於蠅體所表現的自然 (native) 蛋白質。另一方面，目前台大蔡考圓老師亦發現 *Der pV* 會直接刺激 B 細胞的增殖及產生抗體，似乎有 mitogen 的功能。但我們知道，脂多醣 (lipopolysaccharide-LPS) 也是 B 細胞的 mitogen，而細菌的細胞壁，正是富含 LPS 的區域，這對證明 *Der pV* 是 B 細胞的 mitogen，似乎有不利的影響。但若能由昆蟲真核細胞表達系統中取得 *Der pV* 過敏原，對 B 細胞進行 mitogen 實驗，相信是相當具有意義。

在考量 *Der pV* cDNA (WL, WM) 之後，我們分別選擇了最適宜的部分，包含距結構基因小於 100 鹼基對的起始密碼 (ATG) 及前導基因序列 (leader sequence)，構築至桿狀病毒昆蟲載體，以期於昆蟲細胞有最好表現。在感染昆蟲細胞後，我們取感染 0hr、24hr、36hr、48hr 及 60hr 的細胞，於 SDS PAGE 檢視，發現 14Kd 附近，有一蛋白質帶隨感染時間增

加。但由SDS PAGE的檢視，不易確定是否真有*Der pV*的產生。於是再由西方點墨法，我們發現以單株抗體作用的結果，除了positive control有反應外，並沒有其它反應出現。事實上，這種現象是可以解釋的。由於我們使用的單株抗體只有一株，而一般單株抗體在產生後會有很多種株落，可能會認知抗原上不同抗原點(epitope)或部分構形。所以並不一定那株單株抗體會有反應。加上目前欲偵測之抗原是由另一系統所表達，單株抗體的認知，則又更為可議。而在以多株抗體(兔子抗*Der pV*)做用的結果中發現，在先前SDS PAGE 15Kd處，有一反應帶出現，但因為是多株抗體，所以有些非特異性的反應帶。而再以正常兔血清進行比照，15Kd處並沒有反應帶，只在60Kd處有一非特異性的反應帶。於是我們相信，*Der pV*確實於昆蟲細胞表達。此外，再深究其竟，知道*Der pV*單株及多株抗體皆是由WM株落刺激所產生，而多株抗體其西方點墨的結果中也發現對於WM的認識較強，這是否又是*Der pV*異構體產物抗原性相異的例子，仍須更深入證實。至於單株抗體並沒有反應帶產生，有可能是因製造單株抗體的*Der pV*過敏原是由原核系統表達所致。

雖然由我們的結果推論*Der pV*確實於昆蟲細胞表達，但是其表達的量似乎太少。由昆蟲細胞表達系統的文獻得知，插入基因的蛋白質表達量，可能佔細胞蛋白質產量的0.1%-

50%不等。以B型肝炎病毒抗原(HBsAg)來說，便是一相當成功的例子。而表達量和載體的選擇、及感染的病毒數又有絕對的關係。且基於此類過敏原基因於昆蟲細胞表達的例子，仍數先驅，相信還有許多須要改進的地方。目前實驗室中，*Der p I*及*Der p II*於昆蟲細胞表達的實驗也正順利進行，希望能將此系統建立，相信對過敏原的研究會有很大助益。

第二部分

Der f基因庫過敏原基因選殖

第一章 研究背景

第一節 過敏原基因之選殖

由目前所發表之關於蟎過敏原選殖的文章中，所採用的方法在最早期是以氣喘病人血清和蟎粗萃取物進行反應，發現17種蟎粗萃取物會和IgE有反應，而其中14種萃取物有較強的反應。在*Dermatophagoides*此屬蟎中，推測至少有八種過敏原(Iang RB et al., 1988 Nakanishik et al., 1990 KL Lin et al., 1991)其分子量分別為10kD, 60kD, 55kD, 43kD, 31kD, 27kD, 16kD, 15kD。

至目前已於同屬之兩類家塵蟎中找出七組的過敏原，分別命名為*Der pI-VII*, *Der fI-VII*。且由於分子生物技術的日趨成熟，大多數蟎過敏原基因已被選殖出來，尚未被選殖出來的只賸*Der fIII, IV, V, VI*, *Der pIV, VI*。但是*Der pIV, VI*, *Der fIII*的N端序列也已被找出，其cDNA全長的選殖也正在進行中。

目前用以選殖家塵蟎過敏原的常用技術有DNA探針雜交法(DNA probe hybridization)，是以一段DNA標示放射物質後為探針，於基因庫中搜尋相似基因。*Der fIcDNA*便是用此法找到。另外有多聚合酶鍊反應法(PCR)，此法是以設計好且具特异性之小片段DNA引子(primer)於基因庫中，利用PCR方法

放大出相似基因，而達到選殖的目的。*Der fII*, *Der fVII*, *Der fIII*等，便是以此法找出其cDNA。

此外，還有一種相當常用的方式便是菌斑放射免疫法 (plaque radioimmunoassay)。它亦為一種利用探針選殖的技術，只是所利用的探針為具有特異性或專一性的多株或單株抗體或是氣喘病人的血清。用此法尚有一個好處，便是可以肯定所表現出來的蛋白質，具有抗原性。目前多數過敏原皆是以此法選殖出，如*Der pI*, *Der pII*, *Der pV*, *Der pVII*, 及其許多異構體 (Isoform)。

除了以上的方式外，*Der fIII*因具胰蛋白酶的特性，也可以用親合管柱將之純化。而第六組過敏原皆由培養基分離而得。大體言之，過敏原的純化或選殖，並無一定的方式，而是須多方的測試。

第二章 材料及方法

第一節 多聚合酶鍊反應法

(A) *Der f* cDNA 基因庫之構築

首先以修飾過的guanidiumHCl/CsCl方法(Stewart GA et al., 1987; Thomas WR et al., 1988), 抽取 *Der f* 塵蟎的 mRNA, 再以反轉錄多聚合酶反應(RTPCR)的方法, 以廠商提供試劑(Amersham International Inc., Bucks) 將之合成 cDNA(Gubler U et al., 1983). 再以磷酸化的 EcoRI 連接子(Linker)接合, 並構築至 λ gt11 及 λ ZAP 載體中。包裝成噬菌體後, 可感染至宿主 Y1090 或 XL-1 blue 大腸菌中, (Huynah et al., 1986), 將之增殖後可加入 7% di-methyl sulfoxide(DMSO) 並置於 -70 °C 保存。

(B) *Der f* λ 噬菌體的增殖

把由(A)所得的 λ 噬菌體由 1/10 依序做 100 倍稀釋於 PSB(phage sorbent buffer), 並加入一滴氯仿置於 4 °C 保存。將宿主大腸菌培養於 L-肉汁, 於 37 °C 震盪培養過夜, 次晨將之做 100 倍稀釋至新鮮 L-肉汁, 於 37 °C 震盪培養 2—3 小時, 直到 OD₆₀₀ = 0.5 後, 把菌液於 4 °C, 5000 rpm 離心 5 分鐘, 去除上清液, 加入 30 ml PSB 清洗一次後, 將之懸浮於

5 ml PSB中。取300 μ l的宿主懸浮液，加入適量的噬菌體保存液中，於37°C孵育30分鐘，加入9 ml 45°C的液態L+G洋菜膠混合均勻，迅速倒至L+G培養基上，凝固後置於37°C孵育整夜。次日溶菌斑形成後，加入15 ml PSB，再置於4°C隔夜後，吸出PSB，於4°C 10000 rpm 離心10分鐘，去除沉澱物，加數滴氯仿置於4°C保存，或7%DMSO於-70°C保存。

(C) λ cDNA的純化

把由(B)取得之PSB溶液(每盤培養基約可回收10 ml)加入100 μ l Lambdasorb phage adsorbent (promaga, Madison, WI)混合均勻後於室溫下震盪30分鐘，使試劑中 *Staphylococcus aureus* 及兔子抗 λ 噬菌體多株抗體的複合物，和噬菌體結合，再以10000 rpm，5分鐘離下來，去除上清液後用1 ml PSB打散沉澱物，並移至微量離心管，以PSB清洗三次，再加入噬菌體釋放溶液(release buffer, 10 mM Tris-Cl pH7.8 10 mM EDTA)打散沉澱物，置入70°C水浴10分鐘後，待噬菌體DNA 釋放出後，以10000 rpm，5分鐘離心去除沉澱物，再以酚/氯仿(phenol/chloroform)法純化DNA:本方法的目的是利用酚及氯仿把溶液中蛋白質變性後去除。首先加入等量體積的leader phenol(phenol:chloroform:isoamyl alc=25:24:1)，震盪1分鐘，施以12000

rpm, 3分鐘離心, 如此重複2-3次, 再以chloroform(chloroform:isoamyl alc=24:1)萃取一次, 之後加入1/10體積之3Msodium acetate及2.5倍體積之純酒精置, -70°C沉澱30min再以14000rpm離心15min, 去除上清液後再以70%酒精清洗一次, 以去除鹽類。待乾燥後加入適量TE溶解保存。
圖九. 萃取物之檢視。

(D) PCR

本方法的目的是利用 *Der pV* 5' 端的一段DNA (KL-2) 為一個引子 (primer), λ gt11 的 reverse 或 forward 為另一個引子, 以 *Der f* cDNA 基因庫為模板, 依照 pfu 聚合酶的特性進行不同溫度重複循環的反應。以下為其反應條件及所使用的引子:

KL-2:	5' GAAGATAAAAAACATGAT 3'
λ gt11 F:	5' GGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCG .3'
λ gt11 R:	5' TTGACACCAGACCAACTGGTAATG 3'
template	0.001ug
10X pfu buffer	5ul (MgCl 1.5mM)
dNTP	40uM
primer	20pM/each
pfu enzyme	2 unit

加水至50ul，並覆上一層mineral oil，於Thermal cycle machine進行如下溫度及時間反應：

95 °C 5min 55 °C 1min 72 °C 1min 1cycle
95 °C 45sec 55 °C 1min 72 °C 1min 38cycle
95 °C 2min 55 °C 1min 72 °C 5min 1cycle

待反應結束後，取2ul產物於1%洋菜膠上以電泳分佈，再染以EtBr(30ug/ml)檢視，結果如圖十。

(E) PCR結果的純化及構築

取PCR反應完成之產物於2%的低融點洋菜膠(low melting agarose)上進行電泳分布後，切下含放大帶(amplification band)的膠，置於微量離心管中，65 °C水浴15min後，加入等量酚，震盪1min，以12000rpm離心5min。再以(C)中所提的phenol/chloroform方式純化。

純化後的DNA，爲了構築至載體上，首先以限制酶切割，使之成爲cohesive end，其反應如下：

DNA	2 ug
multi core buffer	5 ul
Bam H I	2 unit
Eco R I	2 unit

加水至50ul，於37°C下水浴2-4小時後，利用Wizard DNA clean up system(promega)Kit回收，此種利用resin回收的方式，可直接去除50mer以下的DNA小片段。而載體也同樣利用此法處理後備用。

當載體及DNA處理好後，便可進行構築的工作。其成分如下：

DNA	3 pM
pBlueScript	1 pM
ATP	10 mM
10X Buffer	1 ul
T4 Ligase	2 unit

加水至10ul，於16°C作用12-18小時。

(F) Transformation

a. competent cell 準備

把宿主大腸菌 *E. coli* XL-1 blue (12.5ug tetracycline resistance) 於前夜於 37°C 震盪培養一夜後，於次晨做 1:100 稀釋，於 37°C 震盪培養 2—4 小時，直到 OD₆₀₀ = 0.5 後，把菌液於 4°C 下，以 3500 rpm 離心下來，以 25ml 0.1M MgCl₂ 清洗一次後，加入 12ml 0.1M CaCl₂，冰浴 50min 後，將之再懸浮於 5ml 0.1M CaCl₂ 中，此時可置於 4°C 中 2-3 天備用。

b. Transformation

取 200ul 製備好的 competent cell 懸浮液，加入 5ul 接合完的混合物，冰浴 60min 後，及刻 42°C 水浴 2min，再冰浴 5min 後於已塗上 4mg X-gal 的 A+T 培養基 (ampicillin 100ug/ml, tetracycline 12.5ug/ml) 上塗開，於 37°C 培育整夜，待株落長出。

(G) 成功株落的篩選

把隔夜培養的菌盤取出，挑出白色株落至新的培養盤次培養；這是由於連接成功的載體會打斷 Lac Z (β -galacto

-sidase)的轉譯，使得塗在培養基上之X-gal不會被分解，而不產生藍色株落(圖十一)。次日再挑出次培養之株落至5ml L-broth (ampicillin 100ug/ml, tetracycline 12.5ug/ml)於37°C隔夜培育，次日取1ml菌液至微量離心管，於4°C離心10000rpm 5分鐘，去除上清液後加入100ul 溶液I(50mM glucose, Tris-Cl pH8.0 10mM EDTA)懸浮菌塊，再加入200ul 溶液II(0.2N NaOH, 1%SDS)於冰浴作用10分鐘，之後加入150ul 溶液III(5M potassium acetate)，冰浴5分鐘，強烈振盪1分鐘，再10000rpm離心5分鐘，把上清液移至新的管子，加入5ul RNase (10mg/ml), 2ul proteinase K(20mg/ml)，於37°C作用15分鐘後，以(C)所提之 Phenol/ chloroform方法純化。

取5ul之純化溶液，加1ul的緩衝液及各1ul的BamHI, EcoRI, 於37°C水浴1小時後，於1%洋菜膠上電泳檢視(如圖十二)。

(H) pBluescript II SK(+/-)載體

此載體是利用pUC19為藍本所設計改造而得之一雙股DNA載體。其大小為2961bp，具有抗生素抗性(ampicillin resistance)及LacZ基因，可供作篩選之用，如(F)所提。

此外其具有一多樣性選殖位(multiple cloning site)-MCS。包含許多限制酶切割位，(Short JM et al., 1988) (Alting-Mees MA et al., 1989)。我們基於方向上的考量，而採用BamH I及EcoR I。其基因圖如圖十三。

(I) 核苷酸序列分析

我們把構築好的pBluescript質體，自轉移成功的株落中抽出，以供作核苷酸序列分析之用。本實驗室是採用雙去氧核糖核酸錄終止法(Sanger F et al., 1977)為原理的試劑 Sequenase Version 2.0(USB, Ohio)。其操做流程如下：

a. 模板(template)準備

首先取約4ug的SKII(-)雙股質體DNA，體積約為18ul再加入2ul鹼性溶液(2M NaOH, 2mMEDTA)靜置10分鐘，使雙股DNA降解成單股，再加入2ul的中合鹽類溶液(3M Ammonium acetate)，使解離之單股DNA能穩定。再加入3—4倍體積的絕對酒精，置於-70°C沉澱15分鐘後，14000rpm離心30分鐘，再以真空乾燥後，加入7ul ddH₂O溶解後備用。

b. 黏結作用(annealing)

把所需之引子配製成 2 pmole 的濃度，並準備 65°C 的水浴槽，把(a)中製備之 7 ul 單股質體加入 2 ul 5X 之反應緩衝液(reaction buffer)及 1 ul 配製好的引子，混合後置於 65°C 水浴中2分鐘，使其自然降溫至 35°C 以下，再將其插入冰上備用。此段時間內，可把標示好的微量離心管中，分別加入四種不同之中止混合物(termination mixture)，並置於室溫中；再以 $1:5$ 稀釋標示混合物(labeling mixture)及 $1:8$ 稀釋sequenase後，插於碎冰上待用。

c. 標示反應(labeling reaction)

把冰浴中已黏上引子的DNA混合物溶液，加上 1 ul 0.1 M DTT， 2 ul 稀釋過的標示混合物， 0.5 ul 的 $[^{35}\text{S}]$ dATP，及 2 ul 稀釋過的sequenase。混合均勻後，置室溫下作用2-5分鐘。

d. 終止反應(termination reaction)

把標示好裝有終止混合物的管子置入 37°C 中預溫2分鐘後，取 3.5 ul 於室溫下作用完之標示混合物至每個裝有終止混合物的管子中，於 37°C 培育5分鐘，加入 4 ul 之反應終止液至每個管中，此時做好的反應可於 -20°C 下保存1-2個月。

本實驗是以雙去氧核糖核酸(ddNTP)中止DNA聚合酶的反應，而使DNA能停在不同長度上，於8% polyacrylamide 7M urea的序列分析膠上能被讀出。我們是採用1600伏特電壓進行電泳反應，之後以真空乾熱乾膠後，於-70°C下感光60-72小時。圖十五為所做之X光片感光圖。

(J) 核甘酸序列分析中所用的引子

生產pBlueScript的廠商提供了幾條在SKII(+/-)上常用的引子：

reverse: 5' GGAAACAGCTATGACCATC 3'

-40: 5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'

SK: 5' CGCTCTAGA AACTAGTGGATC 3'

KS: 5' TCGAGGTCGACGGTATC 3'

此外，基於我們分析的是雙股DNA，所能解析的長度有限，於是另外設計了幾條引子，供作序列分析之用：

TB-1: 5' TGCGTCCAGAAGTATCTTCGTAG 3'

TB-2: 5' GTACTGTCAGCGGCAGGAC 3'

TB-3: 5' ATCGGGTGGCATTTCATG 3'

TB-4: 5' GTGTTACAGAGGTTCGTC 3'

圖十五為分析完1.1Kb PCR產物之DNA序列。

第二節 利用DNA探針之搜尋

利用數段 Dp V DNA片斷做爲搜尋的探針(Rigby PWJ et al., 1977)。我們所選用的探針是 5B2(182bp)及 BH7(296bp)(KL Lin et al., 1993)，分別位於 Dp V 的 5'端及3'端。

(A) 核酸缺口移動技術(Nick translation)

採用Promega出產的Nick translation Kit，把標示過放射性物質之核苷酸鹼基補入選用的探針之中，使其帶有放射性。首先取1ug的選定之探針，加入10ul的核苷酸混合物、5ul的 nick translation緩衝液、 $[\alpha^{32}\text{-P}]\text{dNTP}$ (10mCi/ml)、及 DNA polymerase/DNase I 混合物，並加水至50ul，於15°C下培育1小時後，加入5ul終止溶液終止反應，並插入冰中保存。

再以glass wool及Sephadex G50(Pharmacia)做成之管柱，加入已中止反應之混合液，並於4°C下離心3000 rpm 15分鐘，此時未標示上探針之放射線物質便會滯留於管柱中，而離下之收集物便利用閃爍計數器(scintillation counter)估算放射強度。

(B) 原位DNA雜交法 (in situ DNA hybridization)

把 *Der f* λ gt11 cDNA 基因庫，用第一節中(B)的方式，使之產生20000個溶菌斑，並用鑷子取一張硝基纖維紙 (Nitrocellulose paper) 輕覆培養基上，室溫下靜待2分鐘後，噬菌體便附著於硝基纖維紙上，此時把沾有噬菌體的一面朝上，覆蓋已浸濕過變性溶液 (0.5M NaOH, 0.5M NaCl) 的3MM濾紙 (Whatman)，室溫下作用5分鐘，使噬菌體DNA變性為單股後把濾紙移去，再把浸濕過中和溶液 (0.5M NaOH, 1.5M Tris—Cl pH7.5) 的3MM濾紙覆蓋上去5分鐘，之後以1X SSC溶液浸潤清洗一次後，置入80°C烘箱中烘烤2小時後，使變性的單股DNA固定於硝基纖維紙上。此時，把處理好的硝基纖維紙和預溫過42°C的前雜交溶液 (prehybridization solution 50% formamide, 5X SSC, 1X Denhard's reagent, salmon sperm DNA 100ug/ml)，於42°C烘箱中以50rpm培育2小時後，把前雜交溶液置換為含 6×10^6 cpm/ml 探針的雜交溶液，於42°C作用隔夜後，次日以2X SSC溶液於42°C清洗3分鐘後，分別再以 2X SSC/0.1%SDS 0.5X SSC/0.1%SDS, 0.1X SSC/0.1%SDS 於65°C清洗15分鐘後，最後再以0.1X SSC/0.1%SDS於50°C清洗30分鐘後，於室溫下風乾後，於-70°C曝光4-12小時。

第三節 菌斑放射免疫分析

(Plaque radioimmunoassay)

本方法為參照 *Der pI* (WR Thomas et al., 1988) 及 *Der pII* (Chua KY et al., 1991) 的方式，利用兔子血清中抗 *Der pV* 的 IgG 免疫球蛋白為探針，於 *Derf* $\lambda_{ZAPgt11}$ cDNA 基因庫中進行搜索的工作。

(A) 兔子血清

血清的取得，為利用構築在 pGex 2T 載體中的 *Der pV* (KL Lin et al., 1993) 基因，於大腸菌 TG-1 中表達為蛋白質，再經由 glutathione bead 純化後，注射兔子所得。

首先，利用蛋白質分析試劑 (BioRad)，做出標準曲線定出蛋白質的量，再分別取 30ug、40ug、50ug，的 *Der pV* 蛋白質，混合適量之 complete 佐劑 (第一劑) 或 incomplete 佐劑 (第二、三劑)，隔週注射兔子之肩部皮下一劑 (第一劑) 及腹腔兩劑 (第二、三劑)。之後抽取兔血，去除血球後，-20°C 保存。

(B) 兔血清價數之偵測

各取100ul *Der pV*抗原(1ug/ml)至ELISA平底盤上之每個凹槽內，於37°C培育2小時，以蒸餾水清洗三次後，每個凹槽內再加入10% BSA200ul，於37°C培育1小時，再以蒸餾水清洗三次，之後加入連續稀釋過的兔子血清，於37°C培育1小時，以蒸餾水清洗五次後，每個凹槽內再加入100ul的¹²⁵I protein A(5x10⁵cpm/ml)，室溫下作用1小時後，以蒸餾水清洗6次，再加入6N HCl 100ul 於37°C培育1小時後，移至閃爍計數瓶中，利用閃爍計數器(scintillation counter)估算放射強度。

(C) 菌殘渣之製備(Lysate Preparation)

由於我們所使用之抗體探針是屬於多株抗體(polyclonal antibody)，會有非特異性的反應，為了減低此效應，便利用噬菌體之宿主菌殘渣和抗體進行吸附做用。

培育大腸菌 XL-1 blue(tetracycline resistant)於含0.5% maltose(可促菌體產生 pili—性毛)的1000ml L Broth 中隔夜，次晨把菌液於10000rpm離心下來後，加入20ml PBS溶液再懸浮，並加入1M MgCl₂ 50ul、DNase I 10ul (20ug/ml)、aprotinin 100ul(1mg/ml) PMSF(0.0174g/ml)、及200ul Triton X100後，置入均

質器中打碎，此時可置入-20°C保存。

(D) *Der f* λ ZAP cDNA 基因庫搜尋

首先，在37°C下培育XL-1 blue於100ml LB(0.5% maltose)中，直到OD=0.4後，於3000g離下菌體，以PSB清洗一次後，再懸浮於2mlPSB中。此時可置於4°C中備用。再把製備好之菌殘渣(B)和血清以100:1混合後，於4°C中旋轉，以進行吸附做用(adsorbation)。

把LSA(top agar)溶解後，置於50°C水浴中。此時取適量噬菌體溶液，加入400ul XL-1 blue菌液，並於37°C 孵育30分鐘後，和LSA混合後，倒於L洋菜膠平板上，置於42°C培育3.5小時。此時菌斑已形成如針孔狀；再覆蓋上已用8mM IPTG浸過並已風乾之硝基纖維紙，再置於37°C中培育6小時後，取出培養盤，以針沾印第墨汁(india ink)作記號。取下硝基纖維紙以TTBS(8gNaCl, 0.2g KCl, 3gTris, 0.5% Tween 80 for 1L)清洗10分鐘3次。此時把菌殘渣和血清的混合液加入5%的脫脂奶粉，於室溫下和硝基纖維紙作用2小時，再以TTBS清洗6次(每次10分鐘)後，加入100ul的 ^{125}I A protein (1×10^7 cpm/ml)，室溫下作用2小時，以TTBS清洗6次(每次10分鐘)後，將之風乾並曝光12小時。圖十六。

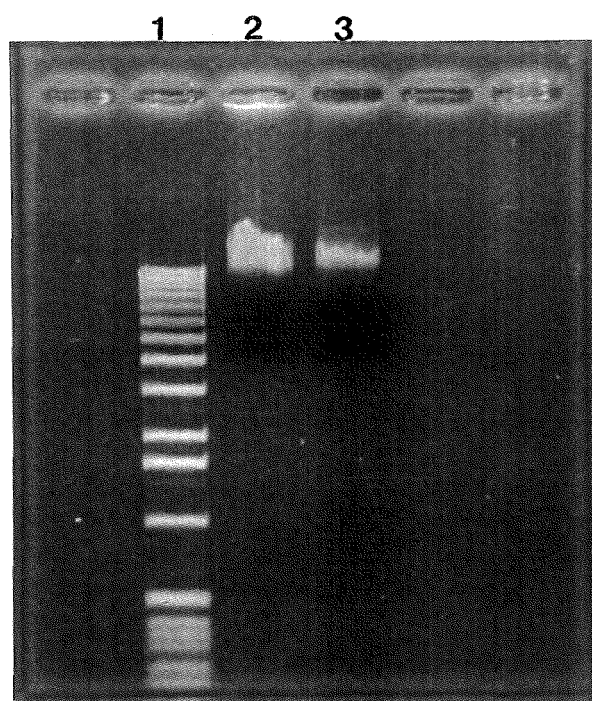
第三章 結果

第一節 *Der f* 基因庫之選殖

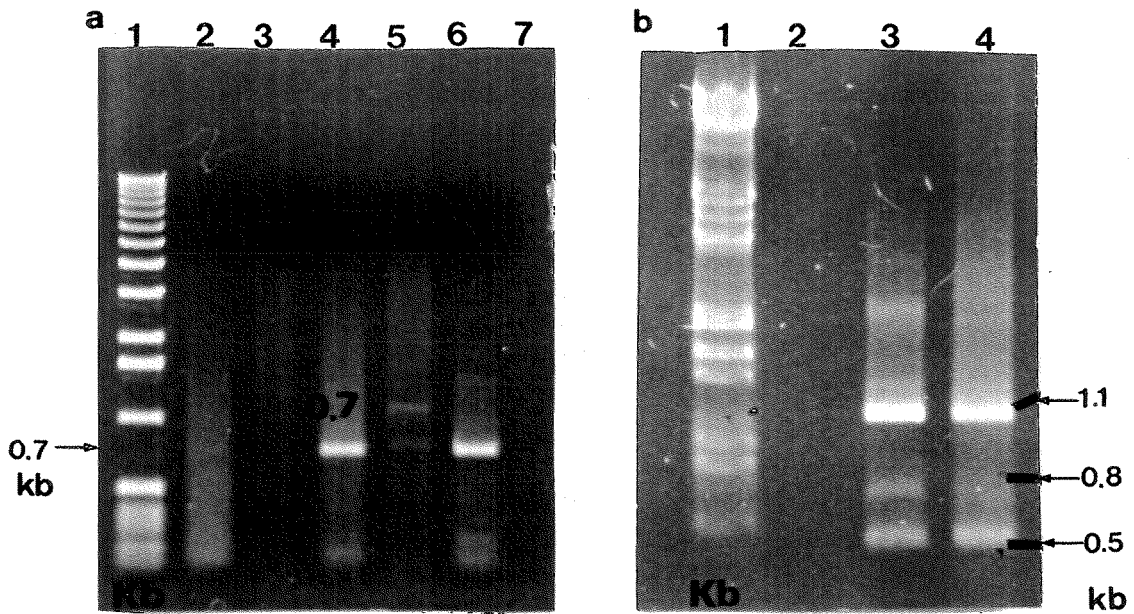
本部分為利用已知的 *Der pV* 為基礎，於 *Der f* 基因庫搜尋相關或相似的基因。因限於 *Der pV* 單株抗體材料缺乏，而採用 PCR、In Situ Hybridization、及 plaque radio-immunoassay。

我們以 *Der pV* 為背景，選取一段 *Der pV* 基因為引子，並純化出 *Der f* cDNA 基因庫做為模板(圖九)，以 PCR 方式於兩個 *Der f* 基因庫(λ)及(λ ZAP)進行選殖，而得到四段產物，大小分別是 0.7Kb(λ)，1.1Kb，0.8Kb，0.5Kb(λ ZAP)(圖十)。再將之構築至 SKII(-)後，讀出四段產物部分基因序列。經分析後，選擇 1.1Kb 的產物將其基因序列分析完。此時經由基因庫相似性的搜尋，發現此段基因產物和 λ genome 或老鼠鐵紅蛋白(ferritin)相似(圖十五)。

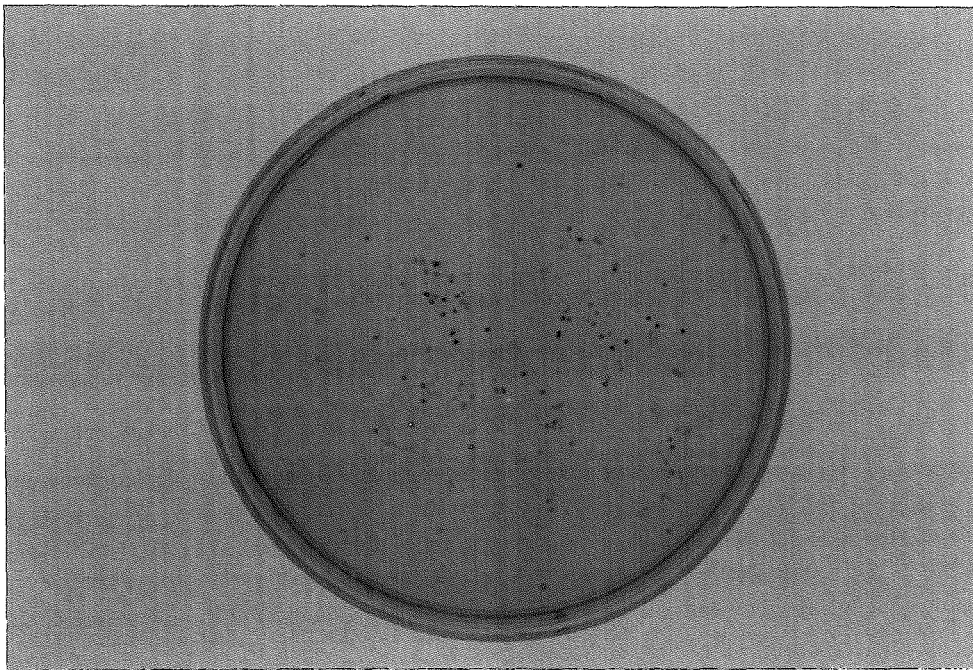
而利用菌斑放射免疫分析法，我們得到了數株呈陽性的初級株落(圖十六 *Der pV*)，仍待進一步實驗。



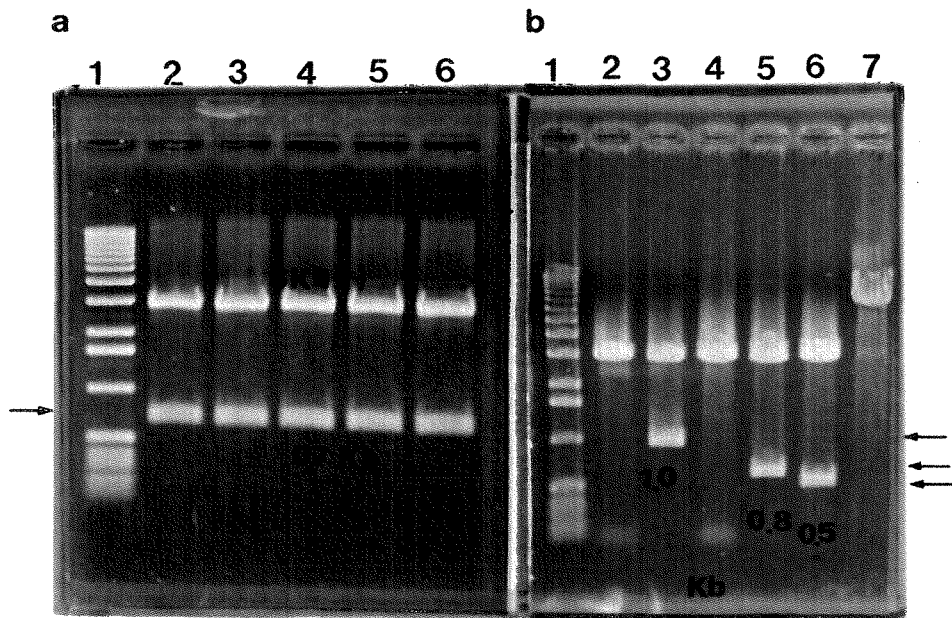
圖九. 利用 phenol/chloroform 方式所純化出之 *Derf* λ cDNA library DNA 於 1% agarose 電泳分佈後的結果, lane1 為 1Kb ladder, lane2(λ) 及 lane3(λ zap) 為兩個不同 *Derf* λ cDNA Library 的基因



圖十. 利用PCR的方式, 以 *Derf* λ cDNA Library (λ) 及 (λ zap) 為模板, 所得到的結果. (a) lane 1 為 1Kb ladder lane 2, 3 為完整 phage 加熱後配上 λ gt11 R 及 F 和 KL-2 引子所得之結果. lane 4 及 5 則是以純化之 DNA 和 λ gt11 R 及 F 配上 KL-2 引子所得之結果, 可發現在 0.7Kb 處有一放大帶. lane 6, 7 是 positive 及 negative control. (b) lane 1 為 λ EcoRI/Hind III lane 2 及 3 是以 λ gt11 F 及 KL-2 為引子所得的結果. 可見在約 1.1Kb, 0.8Kb, 0.5Kb 處有放大帶.



圖十一. 接合(Ligation)成功之株落在塗有X-gal 的培養盤上會呈現白色株落, 而未接合成功之菌株則呈藍色株落



圖十二.把構築至 pBluescript SKII(-) 的 PCR 產物以限制酶切出後,於 1% agarose 上檢視結果.(a) lane 1 為 1 Kb ladder, lane 2-5 為不同株落 (b) lane 1 為 1 Kb ladder lane 3, lane 5, lane 6 分別具有接入之 1.1 kb, 0.8 Kb, 0.5 Kb 的 PCR 產物

pBLUESCRIPT™ II SK (+/-) PHAGEMID

The pBluescript™ II SK (+/-) phagemid is a 2961 basepair phagemid derived from pUC19. The SK designation indicates the polylinker is oriented such that *lacZ* transcription proceeds from Sac I to Kpn I.

f1 (+) origin: f1 filamentous phage origin of replication allowing recovery of the sense strand of the *lacZ* gene when a host strain containing the pBluescript II phagemid is co-infected with helper phage.

f1 (-) origin: f1 filamentous phage origin of replication allowing recovery of the antisense strand of the *lacZ* gene when a host strain containing the pBluescript II phagemid is co-infected with helper phage.

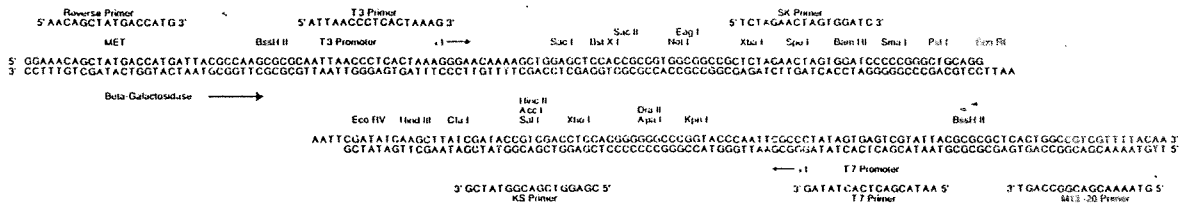
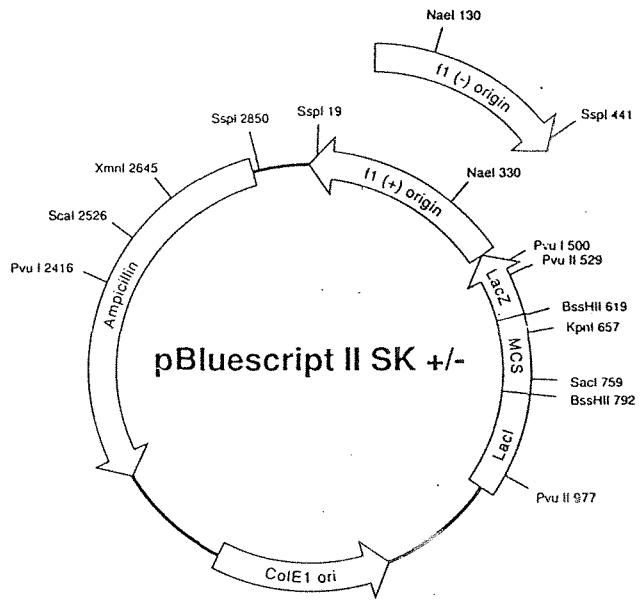
ColE1 origin: Plasmid origin of replication used in the absence of helper phage.

LacZ: This portion of the *lacZ* gene provides α -complementation for blue/white color selection of recombinant phagemids. An inducible lac promoter upstream from the *lacZ* gene permits fusion protein expression with the β -galactosidase gene product.

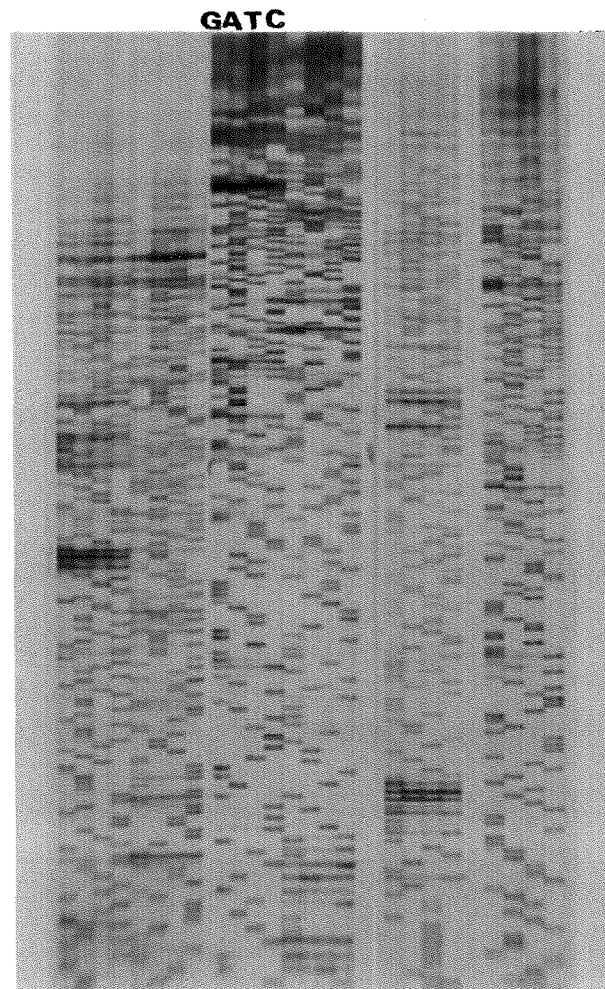
MCS: Multiple cloning site flanked by T3 and T7 promoters; please see sequence below.

Ampicillin: Ampicillin resistance gene for antibiotic selection of the phagemid vector.

Please Note: The upper strand is designated the (+) strand and the lower strand is designated the (-) strand.



圖十三. 為 pBluescript II SK (+/-) 載體之基因圖



圖十四. 以Sequence Version 2.0 Kit 作的DNA序列

```

1.1 GCCACTTTGGCAGTGTGAATGCGAACTCCGGGACGCTCAGTAATGTGACGATAGCTGAAA 60
geno *****
fer

61 ACTGTACGATAAACGGTACGCTGAGGGCGGAAAAATCCGTCGGGGACATTGTAAAGGTG 120
*****

121 GCGAGCGCGGCTTTTCCGAGCGTGAAAGCAGTGTGGAAGTGGCCGTCAGTACCCGACTGT 180
*****

181 CACCGTGACCGATGACCATCCTTTTGCATCGCCAGATAGTGGTGCTTCCGTGACGTTTGC 240
*****

241 GGAAGTAAGCGTACTGTCAGCGGCAGGACAACGTATTCGATGTGTTATTGAAAGTACTGA 300
*****

301 TGAACGGTGCGGTGATTTTATATCGGCGCGGCGAACGAGGCGGTACAGGTGTTCTCCCGT 360
*****

361 ATTGTTGACATGCCAGCGGGTCCGGGAAACGTGATCCTGACGTTACGCTTACGTCCACA 420
*****
1230 ***** 1289

421 CGGCATTCGGCAGATATCCAGCCGTATACGTTTCCAGCGATGTGCAGGTTATGGTGAT 480
*****
1290 *****_***** 1349

481 TAAGAAACAGGCGCTGGGCATCAGCTGGTCTGAGTGTGTTACAGAGGTTTCGTCGGGAA-CG 540
*****
1350 *****_C****** 1409

541 GCGTTTTATTATAAAACAGTGAGAGGTGAACGATGCGTAATGTGTGTATTGCCGTTGCTG 600
*****
1410 *-****** 1469

601 TCTTTCCGCACTTGCTG-CACAGTCACTCCAGGCCCGTCCGGAAGGTGGACATGGTACGT 660
*****
1470 *****_***** 1529

```

```

661 AATGCCACCCGATAAAAAGTTCACCTTGGCCCATGTAACGGCAGCAACAGCCCGCCCTAT 720
*****
1530 ***** 1589

721 CC-GACACTCAGTAGACTTTCCCTAATTGCACTTCATGGCAATACTCGACTGCCTGTCACA 780
*****
1590 ***** 1649

781 CCCCCACTAGCCAAGGACCCAAGCGGCGCAGCTTTTTCTCGGTCACTACTGGCCTCTATC 840
*****
1650 *****CAG*****TCC***** 1709

841 CGAAGTGATACTCTCGGACGCACACTGCAATACACTCGCACTACCGGCTGGCCAAAATGTTT 900
*****
1710 *****CC***** 1769

961 AGTCATTCGTCCAGTCACGCATGCGGTACCGGCCTCACCGAGTGTGAGCCACCAGGCCGA 1020
*****
1770 ***** 1829

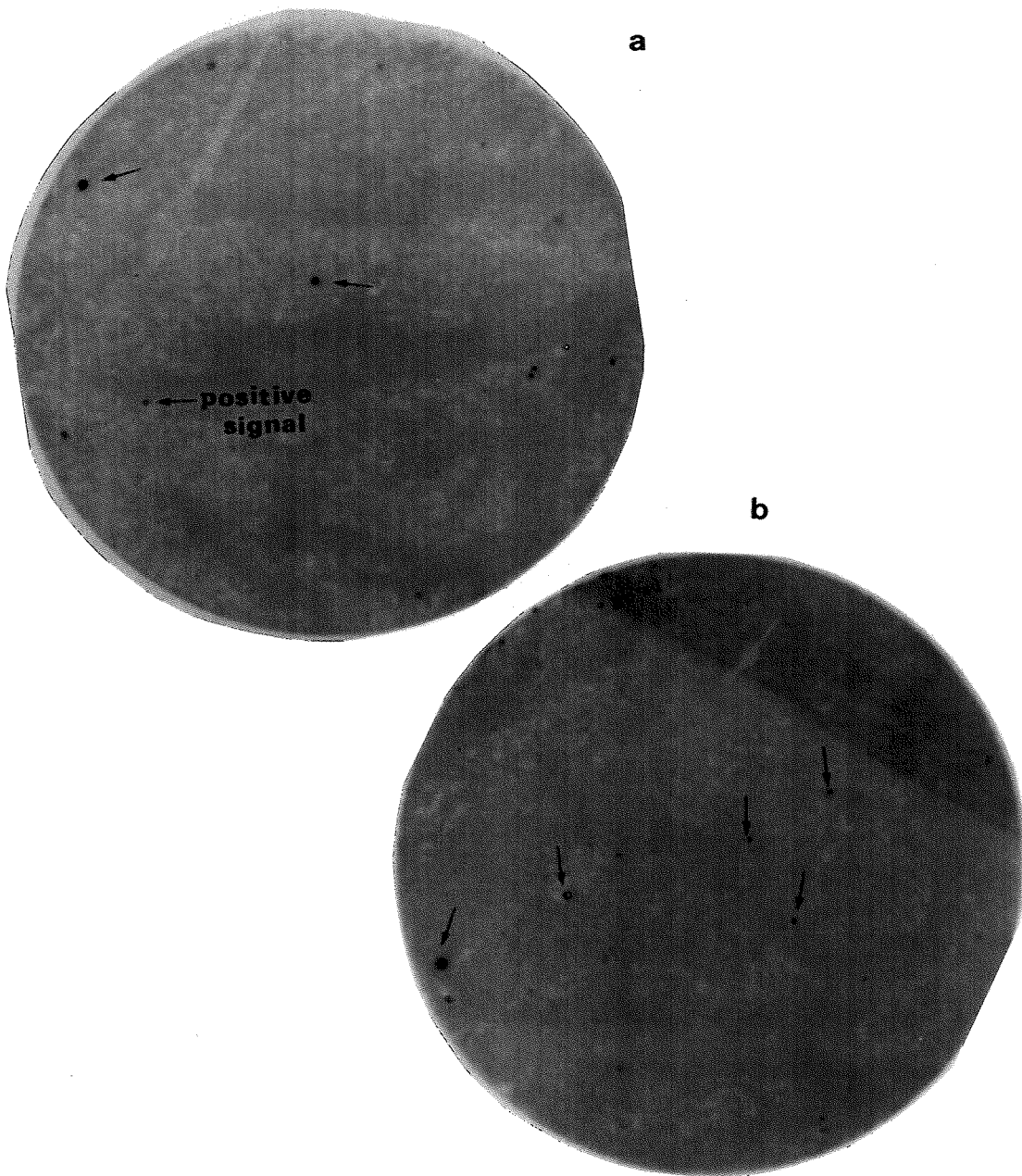
1021 CATGTTTCCTAAAGGAATGCGGGTCCGGCAGTACAATGGATTTCCCTTACGCGAAATAGCG 1080
*****

1081 CAGACATGGCCTGCCCGGTTATTATTATTTTGGACACCAGACCAACTGGTAATGGTAGCG 1140
*****

1141 AGCCGGCGCTCAGCTG 1156

```

圖十五. 分析完基因序列之1.1Kb PCR產物和與其相似之λ噬菌體及老鼠鐵紅蛋白基因之比較



圖十六. 在 λ cDNA Library 形成菌斑後, 以兔子抗 *Der pV* 之多株抗體為探針的 plaque radioimmunoassay 之結果:
(a), (b), 分別是不同的盤所得到之結果

第四章 討論

家塵蟎第五組過敏原 (*Der p V*) 自1989年由Tovey等人選殖到之後，曾懷疑並非全長，但至今已證實是 *Der p V* 全長。本實驗室也於1993年利用台灣氣喘病童的血清做為探針，於 *Der p* 基因庫中，選殖到了六個相異的 *Der p V* 株落，WM、WL、25、27-1、27-2、27-3，且已由林克亮博士將此六株落的核苷酸序列分析完成。經由核苷酸序列的比較，又可分為二組。一組為和WM相似，包括27-2、27-3，另一組和WL相似，包括25、27-1。這結果是否意味著Dp V是由不只一種基因所轉譯，抑或只是單一基因的多樣性，都是極欲求知的問題。而同屬中同樣具有相當重要臨床意義的另一蟎種，*Dermatophagoides farinae* (*Der f*)，在第二組過敏原中，同樣具有多樣性的結果。而其第五組過敏原，至今仍未被發現，這也是本論文第二部分的目的。

我們利用 *Der p V* 核苷酸序列的片段為引子或多株抗體為探針於 *Der f* 基因庫搜尋，由IgG菌斑放射免疫分析法，得到了11個呈陽性的初級株落，我們便選擇其中六個株落進行次選殖，但其中四個株落進行次選殖後，便失去訊號。再經過二次次殖選後，所有的訊號便都消失。如此結果，很難斷定這些株落是否真的是陽性株落，而造成這現象可能的原因，除了使用的是IgG多株抗體，對抗原的辨認會有變異性，而造成非特異的偽陽性外，*Der p V* 本身的抗原性亦是重要考量因素。我們

由研究中知道，*Der pV*過敏原和*Der pII*一樣，具有基因的多樣性，且不同株落的抗原性亦不相同。另外，*Der pV*和氣喘病人血清的反應率只有40%左右，這和其它組過敏原比較起來是低了一點。或許這些都是造成*Der pV*抗體多變性的原因。我們也利用了氣喘病人血清中的抗體為探針，於*Der f*基因庫進行搜尋，亦得到數個陽性反應株落。而這些株落目前仍更待進一步的確認。

在利用*Der pV* cDNA片段為引子所做的PCR結果中，我們在兩個*Der f*基因庫(λ)及(λ ZAP)中，得到四段被放大的DNA產物，大小分別為0.7Kb(λ)、1.1Kb(λ ZAP)、0.8Kb(λ ZAP)、及0.5Kb(λ ZAP)。得到此四段PCR產物後，我們將其構築入至SKII(-)後，分析四段DNA兩端序列，發現 λ ZAP基因庫的三段DNA產物的3'端幾乎完全相似，但5'端卻不相同，而0.7Kb和其它三段並不相似。再將這些分析出的序列經由網路上中研院，於GCG進行基因庫相似性搜尋，發現 λ ZAP的產物和綿羊毛角質基因相似，於是選擇了1.1Kb的產物，將其DNA序列分析完。在分析完1.1Kb產物(1156bp)的DNA序列後，再由網路上中研院，於GCG進行基因庫相似性搜尋，卻發現997bp和 λ 基因相似，且95.8%相同。還有另一相似基因是老鼠鐵紅蛋白(*ferritin*)，在1156bp中有604bp和和鐵紅蛋白有95.9%相似。

若我們推論1.1Kb產物是 λ 基因，則其意義可能不大，且極有可能是所設計的引子的問題。因由*Der p V*的基因序列來看，5'端的A、T鹼基對太多，和 λ 基因有很高相似性，所以非專一的情形極有可能。而一般基因的3'端，大多有很多保留片段(*conserved region*)，專一性不高，並不適合用於基因選殖。

若此1.1Kb產物和老鼠鐵紅蛋白(*ferritin*)相似。則目前知道，鐵紅蛋白存在且合成於紅血球中，和發炎反應有關，並可由多種生化方法測得，可做為惡性淋巴瘤及慢性腎衰竭的指標。而這是否是所預期的過敏原，仍須更完整的分析比較。

家塵蟎過敏性疾病在此工業化生活形態的社會下，越來越受到重視，對其研究也就越來越深入。以*Der p V*來說，對*Der p V*過敏的氣喘病人的血清，其血清抗體會特別高，對*Der p V*的反應特別強，且具有專一性，也就是對其它組過敏原的反應性低。相對的，和其它組過敏原反應性很高的氣喘病人血清，未必會和*Der p V*反應。這說明了*Der p V*亦可能有臨床上重要的表徵，值得我們不斷的努力下去，畢竟這是和5億人息息相關的問題。

參考文獻

Ball T, Valenta R, Kraft D, Scheiner O. Characterization of IgE epitopes of birch pollen protein. *J Allergy* 1992., 12:p50

Baur X, Fruhman G, Hug B, Reither W, Weiss W. Role of *Aspergillus* amylase in baker's asthma. *Lancet* 1986;1:43

Chanf YC, Hsieh KH: The study of house dust mite in Taiwan. *Ann. Allergy* 1989;62:101-6

Chapman MD, Platts-Mills TAE. Purification and characterization of the major allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus*. *J Allergy Clin Immunol* 1980b;125:587-92

Chua KY, Doyle CR, Simpson RJ, Turner KJ, Stewart GA, Thomas WR. Isolation of cDNA coding for the major mite allergen *Der p II* by IgE plaque immunoassay. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990a;91:118-23

Chua KY, Stewart GA, Thomas WR, Simpson RJ, Plozza TM and Turner KJ. Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, *Der p I* homology with cysteine protease. *J Exp Med* 1988;67:175-82

Chua KY, Dilworth RJ, Thomas WR. Expression of *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen, *Der p II*, in *Escherichia coli* and the binding studies with human IgE. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990b;91:124-29

Chua KY, Greene WK, Kehal P, Thomas WR. IgE binding studies with large peptides expressed from *Der pII* cDNA constructs. *Clin Exp Allergy* 1991;21:161-6.

Chua KY, Kehal PK, Thomas WR, Vaughan PR, Macreadie IG. High frequency binding of IgE to the *Der pI* allergen expressed in yeast. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89:95-102

Chua KY, Kehal PK, Thomas WR. Sequence polymorphism of cDNA clone encoding the mite allergen *Der pI*. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1993

Colloff MJ, Spiekma FThM. Pictorial keys for the identification of domestic mites. *Clin Exp Allergy* 1992;22:823-30

Dilworth RJ, Chua KY, Thomas WR. Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust allergen, *Der fI*. *Clin Exp Allergy* 1991;21:25-32

R M O'brien, WR Thomas. Immune reactivity to *Der pI* and *Der pII* in house dust mite sensitive patients attending paediatric and adult allergy clinics. 1994;24:737-24

A P Verhoeff, R T Van Strien, J H Van Wijnen B Brunekreef, House dust mite allergen (*Der pI*) and respiratory symptoms in children in children: a case control study. 1994;24:1061-69

Demotz S, Grey HM, Appella E, Sette A. Characterization of a naturally processed MHC class II-restricted T-cell determinant of hen egg lysozyme. *Nature* 1989;342:682-4

Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Gunther J, Rammensee HG. Allelespecific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 1991; 351:290-6

Fletcher TS, Ayala FJ, Thatcher DR, Chambers GK. Structure analysis of the ADH^S electro-morph of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:5609-12

Flindt MLH. Allergy to alpha-amylase and papain *Lancet* 1979;1:1407-8

Ford SA, Tovey ER, Baldo BA. The pectrum of low molecular weight house dust mite (*Der p*) allergens with emphasis on *Der pII*. *Clin Exp Allergy* 1989;20:27-31

Greene WK, Chua KY, Stewart GA, Thomas WR. Antigenic analysis of group I house dust mite allergens using random fragments of *Der pI* expressed by recombinant DNA libraries. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990;92:30-8

Greene WK, Custer JG, Chua KY, O'brin RM, Thomas WR. IgE and IgG binding of peptides expressed from fragments of cDNA encoding the major house dust mite allergen *Der pI*. *J Immunol* 1991;147:768-73

Greene WK, Thomas WR. IgE binding structures of the major house dust mite allergen *Der pI*. *Mol Immunol* 1992;29:257-62

Heymann PW, Chapman MD, Aalberse RC, Fox JW, Platts-Mills TAE. Antigenic and structure analysis of group II allergen (*Der fI* and *Der f II*) from house dust mite. *J Allergy Clin Immunol* 1989;83:1055-67

Kent NA, Hill MR, Keen JN, Holland PWH, Hart BJ. Molecular characterization of group I allergen *Eur mI* from house dust mite *Euroglyphus maynei*. *Int Arch Allergy Immunol* 1991;99:150-2

Krills S, Baldo BA, Basten A. Antigen and allergens from the common house mite - *Dermatophagoides pteronyssinus*. part II Identification of the major IgE-binding antigens by crossed radioimmuno-electrophoresis. *J Allergy Clin Immunol* 1984;74:142-6

Lake FR, Kay AB, O'Hehir RE. HLA class II restriction specificity of *Dermatophagoides spp.* reactive T lymphocyte clone that support IgE synthesis. *Clin Exp Allergy* 1989;19:389-93

Lake FR, Ward LD, Simpson RJ, Thopsin PJ, Stewart GA. House dust mite-derived amylase: Allergenicity and physicochemical characterization. *J Allergy Clin Immunol* 1991;87:1035-42

Lin KL, Chua KY, Thomas WR, Ching BL, Hsuidh KH. Characterization of *Der pV* allergen. cDNA analysis and IgE mediated reactivity to the recombinant protein. *J Allergy Clin Immunol* 1993

Nakanishi K, Shimokata K. Immunoblot analysis of *Dermatophagoides farinae* antigen. Ann Allergy 1990;64:219-23

Rigby PWJ, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P. Labeling deoxyribonucleic acid to high Specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J Mol Biol 1977;113:237-51

Rocklin RE. Immune mechanism in allergen-specific immunotherapy Clin Immunol Immunopathol 1989;53:S119-31

Romagnani S. Induction of TH1 and TH2 response: a key role for the 'natural' immune response? Immunol Today 1992;13:379-81

Le Mao J, Weyer A, Mazie JC, Rouyre S, Marchand F, Le Gall A, David B. Identification of allergic epitopes on Der fI, a major allergen of *Dermatophagoides farinae*, using monoclonal antibodies. Mol Immunol 1992;29:205-11

Blainley AD, Philips MJ, Ollier S, Davies RJ. Hyposensitization with a tyrosine-adsorbed extract of *Dermatophgoides pteronyssinus* in adults with perennial rhinitis: a controlled clinical trial. Allergy 1984;39:521-28

Yuuki T, Okamura Y, Ando T, Yamakawa H, Suko M, Haida M, Okudaira H. Cloning and sequencing of cDNA coding for the major house dust mite allergen. Der fII in *Escherichia coli*. Agric -cult Biol Chem 1991;55:1233-8

Shen HD, Chua KY, Lin KL, Hsieh KH, Thomas WR. Molecular cloning of a house dust mite allergen with common antibody binding specificities with multiple components in mite extracts. *Clin Exp Allergy* 1993;23:934-940

C H Meyer, J F Bond, M S Chen, M T Kasaian. Comparison of the levels of the major allergens *Der pI* and *Der pII* in standardized extracts of the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*. 1994;24:1041-48

Stewart GA, Lake FR, Thompson TJ. Faecally derived hydrolytic enzyme from *Dermatophagoides pteronyssinus*: physiocochemical characterization of potential allergens. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991;95:248-56

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463-7

Jahn R, Schiebler W, Greengard P. A quantitative dot-immunobinding assay for proteins using nitrocellulose membrane filters. *Proc Natl Acad Sci* 1984;81:1648-7

Kemeny DM, Urbanek R, Ewan P, Mchugh S, Richards D, Patel C, Lessof MH: The subclass of antibodies produced following natural exposure to dust mite and grass pollen in atopic and non-atopic individuals. *Clin Exp Allergy* 1989;19:545-9

Kent KJ, Valetine MD, Sobotka AK. A controlled trial of immunotherapy in insect hypersensitivity. *N Engl J Med* 1978;299:157-61

Huynh TV, Young RA, Davis RW. Constructing and screening cDNA libraries in λ gt10 and λ gt11; 1: A practical Approach. Oxford, IRL press, 1986, :48-78

International Workshop Report. Dust mite allergens and asthma: A worldwide problem. *WHO Bulletin* 1988;66(6):769-80

Ishizaka K; Regulation of IgE synthesis. *Annu Rev Immunol* 1984;2:159-62

Bousquet J, Hejjaoui A, Clauzel AM, Guerin B, Dhivert H, Skassabrocié W, Michel FB. Specific immunotherapy with a standardized *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. Purification of efficacy of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1988;82:971-977

Bousquet J, Hejjaoui A, Michel FB. Specific immunotherapy in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1990;86:292-305

Burnette WN. Western blotting: Electrophoretic transfer of proteins from Sodium dodecylsulfate gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981;112:195-203

- Geysin HM, Tainer JA, Rodda SJ, Mason TJ, Alexander H, Getzoff ED, Lerner RA. Chemistry of antibody binding to a protein. *Science* 1987;102:1184-90
- Ghosh B, Perry MP, Marsh DG. Cloning the cDNA encoding the Amb t V allergen from giant ragweed pollen. *Gene* 1991;101:231-8
- Greene WK, Chua KY, Wtewart GA, Thomas WR. Antigenic analysis of group I house dust mite allergens using random fragments of Der p I synthetic peptides. *Mol Immunol* 1991;28:1225-32
- H Yasueda, A Saito, K Akiyama, Y Maeda, T Shida, M Sakaguchi S Inouye. Estimation of *Der p* and *Der fl* quantities in the reference preparations of *Dermatophagoides* mite extracts 1994;19: 1030-35
- WA Smith, KY Chua, MC Kuo, BL Rogers and WR Thomas. Cloning and sequencing of the *Dermatophagoides pteronyssinus* group III allergen, Der pIII. 1994;24:220-28
- Creating optional house conditions for the house dust mite. *Clin and Exp Allergy*; 1994;24:207-9
- Yasueda H, Mita H, Yui Y, Shida T. Isolation and characterization of two allergens from *Dermatophagoides farinae*. *Int Archs Allergy Appl Immunol* 1986;81:214-23

Yasueda H, Mita H, Shida T, Ando T, Sugiyama S, Yamakawa H. Allergens from *Dermatophagoidea* with chymotryptic activity. Clin Exp Allergy 1993;

Snyder M, Elledge S, Sweetser D, Young RA, Davis RW. λ gt11. Gene isolation with antibody probes and other applications. Methods in Enzymology 1987;154:107-110

Stewart GA, Thomas WR. In vitro translation of messenger RNA from the house dust mite *Dermatophagoidea pteronyssinus*. Int Arch Allergy Appl Immunol 1987b;83:384-9

Stewart GA, Thomas WR, Chua KY, Geysen HM. An allergen and antigenic mapping of a major mite allergen, *Der pI*. Advanced in the Biosciences 1989;74:297-331

Stewart GA, Ward LD, Simpson RJ, Thompson TJ. The group III allergen from the house dust mite *Dermatophagoidea pteronyssinus* is a trypsin-like enzyme. Immunology 1992;5:29-35

Thomas WR, Baldo BA. Comparison by electroblotting of IgE-binding components in extracts of house dust mite bodies and spent mite culture. J Allergy Clin Immunol 1987;79:93-102

Thomas WR. Mite allergen group I-VII. A catalogue of enzyme. Clin Exp Allergy 1993

Tovey ER, Johnson MC, Roche AL, Cobon GS, Baldo BA. Cloning and sequencing of a cDNA expressing a recombinant house dust mite protein that binds human IgE and corresponds to an important low molecular weight allergen. J Exp Med 1989;170:1457-62

Yoo K, Parker MD, Babiuk LA. The S2 subunit of the spike glycoprotein of bovine coronavirus mediates membrane fusion in insect cells. 1991; *Virology* 180:395-399

Yoden S, Kikuchi T, Siddell SG, Taguchi F. Expression of the peplomer glycoprotein of murine coronavirus JHM using a baculovirus vector. 1989; *Virology* 173:615-623

Wilson ME, Mainprize TH, Friesin PD, Miller LK. Location transcription and swquence of a bacu-
-lovirus gene encoding a small arginine-rich polypeptide. *J Virol.* 61:661-666

Wu JG, Miller LK. Sequence transcriptional and translation of a late gene of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus encoding a 34.8k polypeptide. 1989 70:2449-2459

Weiss SA, Vaughn JL. Cell culture method for large-scale propagational baculovirus. In the biology of *Baculovirus*. 2eds. RR Franados and BA Fdedrici. pp.63-87

Miller DW, Safer P, Miller LK. An insect baculovirus host vector for high level expression of foreign genes. In Genetic engineering eds. JK Stelow, and A. Hollaender, pp227-298

Parkin C, Ooi BG, and Miller LK. 1988
Eightbase pairs encompassing the transcriptional start point are the major determinant for baculovirus polyhydrin gene expression. *Gene* 70:39-50

Vasudevan S Reilander G Maul G and Michel H1991, Expression and cell membrane localization of rat M3 muscarinic acetylcholine receptor produced in SF9 insect cells using the baculovirus. System FEBS Lett 283:52-6

Tomalski MD, Miller LK. 1991 Insect paralysis by mediated expression of a mite neurotoxin gene. Nature 352:82-85

Stewart LMD, Hirst M, Fevber ML, Merry Weather AT, Cayley PJ, Possee RD. 1911 Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene. Nature 352:85-88

Summer M, Anderson D. 1972 Granulosis virus deoxyribonucleic acid: a closed double-stranded molecule J Virol 9:710-3

Summers MD, Smith GE. 1987 A manual of methods for baculovirus. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin no.1555

Choudary P, Kamitor S, 1992 Expression of foreign genes in insect larve using baculovirus vectors In Methods in Molecular Biology:protocol for Baculovirus expression.

Abstract

Recent studies have documented the importance of responses to the group V allergen (Der pV) in house dust mite allergy. It has been shown to bind IgE from human allergic sera with high affinity and frequency.

This paper can be divided into two parts. Part one focus on the expression of Der pV allergen in the Baculovirus Expression Vector System. There have had a thought to choose and eukaryotic system for the expression of an eukaryotic gene can be particularly important in obtaining biologically active recombinant protein. And we wish to get Der pV allergen expressed in Baculovirus Expression Vector System for further studies.

The second part of this paper is like to clone the Der pV homologus allergen in Der f cDNA library. With the method of PCR, we got 4 DNA products with the sizes of 0.7、1.1、0.8、0.5 Kb. After constructed the PCR products to pBluescript, we analyzed the sequence of 1.1Kb PCR product. By similitiy comparision in Gene-bank, we found the similitiy with mouse ferritin large subunit and λ phage genome, and it needs further studies.

授 權 書

本人所撰(著)

83

學年度第 2 學期

大學

私立中山醫學院 學院

醫學

研究所 碩 士學位論文(論文明稱)

家塵蟎低分子過敏原
量
昆蟲細胞表達之研究
Derp IV 於

之提要

同意
 不同意

開放供學術利用。

姓名:

曾博修

立書人: 地址:

新竹市德高街12號

身分證統一編號: J170528843

聯絡電話: 035 232059

中華民國

84

年

6 月

30

日