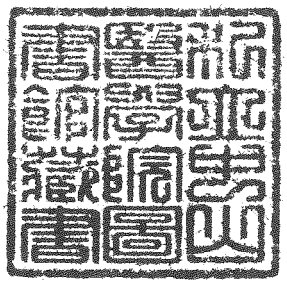
R
008.8
2613-1

私立中山醫學院生物化學研究所　　碩士論文

指導老師:林克亮博士

過敏病童居家家塵蟎第五群(Der p5)過敏原分佈之研究,及對家塵蟎過敏原特異性抗體的比較

The distribution of house dust mite allergens Der p5 in houses, and the comparison of Der p 5 allergens specific antibodies in asthmatic children



研究生:吳珍容

中華民國八十五年六月

中山醫學院圖書館
C036189

授權書
(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院　生物化學研究所
_____ 組 84 學年度第 2 學期所撰 碩士 學位論文 。

論文名稱: 過敏病童居家家塵瑞過敏原分佈之研究,及對家塵瑞過敏原特異性抗體的比較

☑同意 ☐不同意

本人具有著作財產權之論文提要,授予國家圖書館、本人畢業學校及行政院國家科學委員會科學技術資料中心,得重製成電子資料檔後收錄於該單位之網路,並與台灣學術網路及科技網路連線,得不限地域時間與次數,以光碟或紙本重製發行。

☑同意 ☐不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料,授予行政院國家科學委員科學技術資料中心,得不限地域時間與次數以微縮、光碟重製後發行,並得享該中心微縮小組製作之研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔資料等值新台幣伍佰元之服務。本論文因涉及專利等智慧財產權之申請,請將本論文全文延後至民國 __ 年 __ 月後再公開。

☑同意 ☐不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料,授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館,為學術研究之目的以各種方法重製,或為上述目的再授權他人以各種方法重製,不限時間與地域,惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。

指導教授姓名: 林克亮

研究生簽名: 呂許名　　學號: R8202113

(親筆正楷)

日期: 民國 85 年 7 月 20 日

備註: 1. 上述同意與不同意之欄立若未鉤選,本人同意視同授權。
2. 授權第二項者,請再交論文一本予承辦人員。
3. 本授權書已於民國 85 年 4 月 10 日送請著委會修正定稿。

簽署人須知

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內鉤選並填妥各項資料。

2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書。

3. 授權人的權利與義務:

在美國授權博碩士論文予ＵＭＩ公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發行，須交付美金 45 元的出版費，銷售年逾七件以上時得享收入 10%的權利金約美金 20 元；在國內本計畫之經費全數由政府支應，收入亦應歸國庫，為答謝您的支持，科資中心特為您提供新台幣 500 元的等值資料服務(以研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔為限)，請逕洽本案聯絡人，地址電話詳如第 5 項。

義務方面唯一要注意是，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可以授權其他自然人或法人上述的行為。

4. 全國博碩士論文全文資料微縮片整合計畫的宏觀效益:

在個人方面，您的論文將可永久保存（微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年），也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。

5. 本案聯絡電話: (02)7377746 江守田、王淑貞

地址: 台北市和平東路二段 106 號 17 樓 1702 室

研究生姓名: 吳玲玉　聯絡電話: 2129331

地址: 台中市精武路177之

本論文爲中山醫學院授予理學碩士學位之必備條件之一,經中山醫學院生物化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

私立中山醫學院公衛系　　李鴻森　博士

李鴻森

私立中山醫學院醫技系　　林克亮　博士
(論文指導教授)

林克亮

中華民國八十五年六月

學生吳珍容論文題目為過敏病童居家家塵蟎過敏原分佈之研究，及對家塵蟎過敏原特異性抗體的比較，其論文已經中山醫學院生物化學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：林克亮博士　　簽名：林克亮

中華民國 85 年 7 月 18 日

目 錄

頁數

授權書

口試及格書

指導教授簽名單

致謝

中文摘要..... 5

英文摘要..... 7

第一章 背景介紹

第一節 過敏性疾病免疫機轉.....8

第二節 家塵蟎與過敏症之間關係..... 11

第三節 家塵蟎過敏原..... 14

第四節 經減敏治療後血清變化.....20

第一部份

第二章 台中地區家塵蟎過敏原(Der p5)分佈研究

第一節 前言..... ..23

第二節 實驗材料與方法..... ..26

第三節 結果..... 34

第四節 討論.....37

圖表..... 41

第二部份

第三章台灣地區過敏病童血清中對家塵蟎過敏原特異性效價之比較

第一節 前言 58
第二節 實驗材料方法 59
第三節 結果 64
第四節 討論 66
圖表 69
參考文獻 82

致 謝

在這三年研究所的訓練過程中是自我知識的探索與自我能力的培養，更是自我專業的成長。因此能夠順利地完成學業，真的滿懷無限的感激與感恩。

本篇論文得以完成，首先感謝的是我的指導教授林克亮老師，他不遺餘力的悉心指導，除了學業外，對日常生活及做人處事都能夠適時的給予扶持與激勵。同時也要感謝台大醫學院免疫所蔡考圓老師在我實驗期間所提供的技術及及學識上指導，也要感謝本院公共衛生學系李鴻森老師，在論文初稿及口試時提出指正及寶貴的意見；感謝實驗室的工作伙伴在實驗上的幫忙及對我的關懷和支持；另外，感謝我的服務機關--省婦研所，使我有機會可一面工作一面進修，黃春雄所長及曾德運主任全力支持，及同事於工作上之協助，在此一併致上由衷的謝意。

最後，感謝家人和親友從旁的協助與支持，由於他們的關懷與鼓勵，使我的更能專心於學業。

中文摘要

近年來過敏性氣喘之病童有日益增加之驅勢，在這十年當中學齡兒童也由1974年之1.3%增加至1994年10.8%，而家塵蟎被發現是最重要之過敏原，其中最主要之種類為*Dermatophagoides Pteronyssinus*(DP)，目前被確認過敏原共有七組，其中Der p 5過敏原基因是由我們實驗室所選殖並加以大量表達。

本論文分為二部份，第一部份利用遺傳工程表達之Der p5作成吸附性管柱用以純化過敏病人血清特異性Anti Der p5抗體，並將純化的抗體和家塵蟎萃取物進行免疫轉印法分析，結果可以證明Der p5是一自然型過敏原。進一步我們調查台中市12位氣喘病童之住家，進行塵蟎抗原Der p5特性之評估。本研究於1994年10月至1995年九月以每月採集方式進行長達一年之連續偵測，使用吸塵器收集居家表面的灰塵，再以酵素免疫分析方法定量一克灰塵中Der p5抗原之濃度，結果顯示濃度由6-8000ng/g fine dust，而居家環境中的不同地點，發現床墊上的抗原量最多，其次為客廳地板，而臥室地板則含量最少。在台中地區年平均溫度為23.2℃，以六月28.4℃最高，而以二月的15.5℃最低。年平均相對濕度為75.3％，以六月的79％最高，而以十月的70％最低。而本實驗結果得知家塵中之Der p5過敏原含量全年各月份並無明顯差異。總結，本實驗證明了Der p5過敏原為一自然型蛋白質並建立了偵測家塵中Der p5過敏原含量的技術。

第二部份 以RIA方法測過敏病童經治療後之血清對多種蟎過敏原所形成特異性IgG 、IgE 反應,再分析與各組過敏原間之反應率, 結果發現應用台灣氣喘病童所篩選出來的Der p2 (II-8)其反應率高於另一組由澳洲血清所篩選之Der p2 Isoform(S2R)。而 Der p 5在臨床上也確有其重要性,即對Der p5過敏之氣喘病童,其血清抗體會特別高,即其如有反應,則其反應特別強,因此也說明Der p5可能有其臨床重要之表徵,值得進一步探討。

ABSTRACT

The prevalence of asthma in school-age children in Taipei increased from 1.3% to 10.8% during the past twenty years. It is found that HDM (House Dust Mite) is the most impotant allergens in Taiwan ， especially for asthmatic children .

This study is divided into two parts.In the first part the author used the affinity purification of human sera that attaches specific Der p 5 antibodies with the Der p5 recom -binant fusion protein .The result will elute antibody in mite extraction and rDer p5 fusion protein to corresponding to components of Mr 14 kd and 42 kd that can identify the natural allergen -Der p5 .

The samples are drawn from the 12 families in Taichung. Inclusion criteria: the family must has a child attacked asthma.The dust samples were collected from the mattreses and the floors of the bedroom and living room of the children 'home enviroment from OCT 1994 to SEP 1995.In the research finding ,the highest concentration of dust samples ranges from 6-8000 ng/g fine dust , The highest concentration samples were observed the mattress . The lowest concentra -tion in the floors of the bedroom.

In the second part,the study is focused on the reaction frequency and relationship between antibodies (IgG and IgE) and purified mite allergen (Der p5) in different groups , According to the result ,theDer p5 has the significance in the clinical finding .The antiboddy (IgE) in the serum has the high affinity and frequency in the children of asthma .

第一章 背景介紹：

第一節 過敏性疾病免疫機轉：

呼吸性過敏疾病包括氣喘 (asthma)及過敏鼻炎，在最近幾年似乎有逐年增加的趨勢。 而造成的原因相當廣泛。 在整個過敏疾病的致病機轉中， 雖然過敏原特異性 IgE 及肥胖細胞(mast cell)是直接的因素，但是過敏原特異性的 T 細胞仍是扮演著一個重要角色。

當後天性免疫反應(Adaptive immune) 發生得過於強烈或者是很不恰當的時候，引起組織傷害， 則稱為過敏反應(Hypersensitivity)。 其是一種異位性(ATOPY)，而且是當個體第二次或者是說再次接觸到 (特定) 過敏原時所產生的反應。

第一型過敏反應(立即型過敏反應)的免疫機轉如下： IgE 與無害的抗原作用時，被 IgE 致敏感的肥大細胞(mast cell)或嗜鹼性細胞 (basophilic cell) 一旦再次遇到過敏原，即會引起 Fc ε RI 受體的交叉聯結 (cross-linking) 而被活化，釋放出具有藥理活性的媒介物，包括 histamines, prostaglandins 及 leucotrienes 等，而這些介質會造成血管通透性增加及氣管收縮，造成氣喘等臨床症狀；接下來的反應是由被趨化因子吸引嗜酸性球 (eosinophiles)，嗜中性球 (neutrophiles)，單核球 (monocytes) 至作用區域，而這些細胞會造成更進一步的發炎反應 (inflammation)，但若加入類固醇 (steroid) 則可以壓抑輔助性

T 細胞 (helper T-cells.) 分泌淋巴激素 (lymphokines), 則可阻止發炎反應的發生。(Janeway)

今已知道 T 輔助細胞依其分泌之淋巴激素的不同而分成二類(Romagnani S et al.,1992)：第一型 T 輔助細胞(Th1) 及第二 型 T 輔助細胞(Th2); Th1 細胞或 NK 細胞分泌 IL-2 及 IFN-α 和 IFN-γ 其中以 IFNγ 會促進 Th1 的分化(Manetti R et al., 1993), 幫助 B 細胞製造 Ig G 及 Ig M 抗體及活化巨噬細胞 (macrophage), 且抑制 Th2 對抗原所產生的反應. 已知在細菌感染時 macrophage 及 B cell 分泌的 IFNα,IL-12,IFNβ 會促使 Th1 expansion(Romagnani S et al.,1992)。

過敏反應的形成,主要是與外界的過敏原接觸時,由 mast cell 呈現抗原予 CD4+ $\alpha\beta$+ Th2 cell 並活化,而 Th2 cell 會釋放出 IL-4(interleukin-4),IL-5,IL-10,Il-13 等激素(cytokine).同時 Th2 cell 透過 CD40 ligand 與 B cell 上 CD40 交互作用,此作用與大量 IgE mRNA 形成有關 (Gauchat JF et al 1992) ,Th2 細胞似乎更易被抗原呈獻細胞 (antigen presenting cells) 刺激, 造成 IL-4, IL-13 的釋放而促使促使 gernline ε 表現(Spriggs MK et al.,1992).透過這兩個訊息活化 B cell 的同型機轉轉換且會製造 IgE , 因而 IgE 結合至肥大細胞和嗜鹼性細胞表面上 Fc ε RI 受體,當抗原再次進入時, 便可直接呈現抗原與 Th2 cell(Madde GC et al.,1990)。 同時當 Langerhans´cell 或 Mast cell 表面上的 IgE 接上抗

原後,會促使其釋放 TNFα(tumor necrosis factor α),IL-1 及 IL-4.IL-4 會促使 eosinophile 游移至發炎處,並會釋放出 major basic protein,peroxidase,cationic protein(ECP),neurotoxin(EDN) 等毒性蛋白,而造成細胞損害.CD4+ Th2 cell 在過敏反應中扮演重要角色,而造成 Th2 cell 發展的機制與 microenviromental cytokine 有關. macrophage 及 B cell 分泌的 cytokine 與 Th2 的發展較無關,對人類及鼠類 Th2 development 有關的 cytokine 是 IL-10(Hseih CS et al., 1992),在某些鼠類 IL-1 是 Th2 cell 生長 cofactor(Williams ME et al 1991)。另一最重要的 cytokine 是 IL-4(Seder RA et al 1992).在缺乏 IL-4 基因的老鼠無法產生成熟的 Th2, 也不能製造 IgE(Kopf M et al., 1993).在早期 IL-4 的分泌推測與 CD4-CD8-αβ T cell 有關(Zlotnik A et al 1993)。之外 mast cell 也會分泌 IL-4,而在 mast cell 缺乏的老鼠仍有正常的 Th2 cell 發展出來(Wershil BK et al., 1994),所以 mast cell 所產生的 IL-4 可能與 secondary response 較有關,而與 primary response 中 Th2 cell 發展較無關。

另外影響 Th2 cell 發展有關的重要因素是抗原呈現細胞(antigen presenting cell,APC)及 T cell repertoire.在氣喘或異位性皮膚炎病人與過敏原接觸的第一點就是呼吸道黏膜的 dendritic cell 或皮膚的 Langerhans´ cell,有證據指出氣喘病人呼吸道上皮的 dendritic cell 較正常人多,且

此 dendritic cell 可誘導 T cell 活化並分泌 IL-4,IL-5(Schon-Hegrad MA et al., 1991)。另一受爭議的是 T cell rpertoire,在被 Leishmania major 感染的老鼠所發展出相同 TCR 的 Th1,Th2 cell(Reiner SL et al., 1993)。但另有證據指出對 ragweed allergen 過敏病人其 IgE 的產生及臨床症狀與特定的 Vβ express T cell 有關(Renz H et al., 1993),由此推測 T cell receptor 過敏原的認識,提供了一個訊息,或一連串的訊息促使 T cell 發展成 Th1 或 Th2。

因此這兩型 T 輔助細胞彼此間有著非常密切的交互調節作用，不僅在過敏疾病扮演著重要角色，同時也有調節感染或自體免疫疾病等反應。

第二節 家塵蟎與過敏症之間關係

過敏原的總類相當多，包括花粉,黴菌,動物皮屑,家塵蟎，蟑螂等，其可存在空氣中，成為吸入性過敏原.而家塵於 1920 年就已被研究與家塵蟎過敏症(house dust allergy)之間是否有關聯，直至 1964 年由 Voorhost 證明其之間有相關。

蟎類與人類之生活息息相關，常造成人類之疾病發生，例如恙蟎(Leptotrombidium spp.) 引起恙蟲病等，至於家中灰塵亦有蟎類存在，除了造成食物污染以外，亦會引發疾病. 其與脊椎動物相伴發生,且均可在室塵內生存,所以逐漸成為世界性分佈,在臨床醫學上， Voorhost (1964) 利用家塵蟎之萃取物在皮膚測試，產生強烈皮膚過敏反應以證實與室塵過敏症(House dust allergy)有關; 再經美國昆蟲學會鑑定確定其屬於塵蟎科 (Pyroglyphidae)(Wharton GW,1967).與家塵蟎有關之室內蟎分三群: 家塵蟎(house dust mite) 約佔家塵蟎中 80%, storage mite(倉庫蟎) 則佔 5-8%, glistening mite 佔 10%,而以家塵蟎這個 family 與人之住家最有密切關係。(Hallas TE et al.,1991)

家塵蟎為家塵過敏原之主要來源,家塵蟎為節肢動物門中之塵蟎科(pyroglyphidae)屬於此類相當多,有關其分類,主要乃根據型態學;已知 pyroglyphidae 這個 family 中以 *Dermatophagoides pteronyssinus*(*Der p*), *Der. farinae* (*Der f*),*Der. microcera* (*Der m*)及 *Euroglyphus. maynei*(*Eur m*)四種為最重要過敏原,而又以 *Der p* 和 *Der f* 造起過敏性疾病中最主要來源(Yasueda H et al., 1989)(Platts-MillsTAE,l 1989).*Der p* 盛行於英國、澳洲、及多數亞熱帶國家(如台灣), *Der f* 則普遍於北美及日本。

倉庫蟎不僅出現在住家,也會出現在農場中,通常與職業性之過敏症有關,所以也顯得其重要,在許多國家之住家中灰塵也會出現,特別是在濕氣較重之房子,屬於此類有:*Acarus,Tyrophagus ,Lepidoglyphus,Blomia*,其分類屬於 non-pyroglyphide 這個 family,而以 *Blomia tropicalis* 常出現在熱帶與亞熱帶地區住家之灰塵(香港、日本、台灣、巴西、委內瑞

拉)(Tee Rd et al.,1994) ,由巴西聖保羅家塵蟎中分離出 Blomia tropicalis ,所產生之過敏原會促成 IgE 形成,造成氣喘之重要因子。(Arruda Lk et al.,1991)

蟎之發育期分為卵期、幼蟎、第一若蟎 ，第三若蟎，成蟎五期,雌蟎生育期間與雄蟎接近,經接尾後,每天可產卵 1-3 枚,在適宜環境下可生存兩個月,在此期間,每一雌蟎一生可產生 200-300 粒卵，而每隻蟎每天可排洩 20 粒排泄物; 平均每個排泄物中含有 100 pg 的主要過敏原 Der p 1(Tovey ERet al ., 1981)，溫度和濕度為家塵蟎生長之二大有利因素,其靠其皮膚取得水份及氣體.如相對濕度低於 45%則幾乎無法生長，因此溫度 17-32°C 以及 55-80% 的相對濕度，為其最佳的生長環境 (Korsgaard et al.,1991).但隨著不同的地點，季節月份及距離，海平面的高度,家塵蟎產量也會有所改變. (Vervloet D et al ., 1982)

臺灣位於亞熱帶,屬於高溫多濕之海島型氣候，整年平均溫度為 18-29 ℃，相對濕度 82-94 %,因此適合塵蟎之生長.曾調查臺灣塵蟎與氣喘病童家中環境,發現其種類共有五科十種,而以塵蟎科之 (*Der p*)含量最多 (Chang YC et al., 1989).因此為造成氣喘、 鼻炎 及異位性皮膚炎 (atopic dermatitis) 等過敏性疾病中之最重要過敏原(Hsieh KH et al.,1988).氣喘在小孩中是最常見之慢性疾病,目前在遠東地區國家有日漸增加,而死亡率也相對增加。(Lai ckw et al., 1996)

因此如避開與過敏原間接觸,尤其是在幼兒期,更可減少其發作次數(Colloff MJ et al., 1992). 家塵蟎的數目,具有季節週期的變化,而於秋季達到最高，(Korsggard J et al.,1983),1 克家塵中如出現 2ug 以上之 Der p1(即 100 隻蟎

體)會成為引起氣喘之危險因子,而大於10ug以上Der p1(約500隻),會使病情加重.因此如何逃避蟎,而減少氣喘之發作及減敏療法之功效也是受到特別之重視。

家塵蟎量與人類生活作息有關,而以人出入最頻繁之起居室更是重要,尤以起居室中床墊的家塵蟎含量更是多,因為此處富含人類之皮屑，正為蟎的主食，家塵蟎過敏原可能是造成過敏的製造者,其經腸消化後,由糞便排泄，因此主要的家塵蟎過敏原存在於蟎便中，即使蟎已死亡，其屍體、糞便仍引起過敏症狀.因此即家塵蟎繁殖量可因季節而異，對塵蟎的過敏卻是終年性的。

家塵蟎之採集通常以吸塵法為最主要之方法,即利用吸塵器吸取灰塵,再至實驗室分離,所得樣本可在室溫或25℃及75%RH，存放三個月,利用篩浮法取得蟎體計數之,但此法耗時;不適合大量調查流行病學，今可應用單株抗體技術測定家塵蟎之過敏原。(Lind P et al., 1986)(Platts-Millis TAE et al.,1986) (Chapman MDet al.,1987)

第三節 家塵蟎過敏原

有關家塵蟎過敏原之研究,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份會和氣喘病人血清反應,再利用免疫轉印分析法(imunoblotting assay)(Lin KL et al., 1991),發現在 Dermatophagoides 此屬中,至少有八種過敏原.目前已有七組過敏原被研究出, 其相關資料分別敘述如下:

第一組過敏原

Der p1 Der f1, Der m 1 目前經 DNA 定序 (DNA sequencing) 及生化特性分析得知(Thomas WR et al.,1988) (Chua KY et al., 1988),(Dilworth RJ et al.,1991), 此組過敏原為分子量 25 KD, 對熱不穩定, 易溶解之蛋白質, 具有半胱氨酸蛋白水解酶 (cysteine protease) 的活性, 是在蟎的排泄物中發現的, 推論可能是蟎消化道中所釋放的消化酶。.

其抗原結構已在人類及老鼠被調查, Der p 1 基因在大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 所表現出之融合蛋白質與病人血清 Ig E 反應性比天然型(Native protein) Der p 1 反應性低(Thomas WR et al.,1989),因此將其選殖至酵母菌系統中(pYELC5-13T)表達,結果得到一與 Ig E 有較強之反應性(Chua KY et al.,1992). Der p1 與 Der f1 有 81% 的相似性 (homology),將純化 Der p 1 以皮膚試驗和放射性免疫分析法 (radioimmunoassay, RIA) 測試對蟎過敏病人之血清,對 IgE 反應陽性者有 90%(Lind P et al .,1986)(O'brien RM et al., 1994)。

第二組過敏原

Der p 2 之 cDNA 利用澳洲血清以 Ig E 菌斑免疫篩選法

(IgE plaque immunoassay) 而選殖出 16 kD 蛋白質過敏原 (Chua KY et al.,1990), 有 90%對家塵蟎過敏原之病人血清中 IgE 可以辨識 Der p2 (Tovey ER et al., 1987),所以被視為是主要過敏原. Der p2 可能具有同功酶(isozyme) 之性質 (Stewart GAet al.,1990), 其主要存在於蟎體消化道和排泄物, 利用遺傳工程技術在大腸桿菌中以 Glutathione-S-Transferase(GST) 融合蛋白表現 (Recombinant Der p 2), 在皮膚試驗中與天然型 Der p2 (native Der p2)比較, 其引起陽性反應強度差不多(Chua KY et al., 1990b) (Lynch NR et al.,1994),所以可作為過敏材料.稍後, 在台灣氣喘病童血清篩選到另一株 Der p2 的同質異體型(Isoforms). 為利比較, 由澳洲血清篩選到之 Der p 2 稱 S2R 型, 由台灣血清篩選到之 Der p2 稱 Ⅱ-8 型.兩者差別在 26,47,114 胺基酸殘基的改變.以 GST 融合蛋白質型式,檢測 Ig E 反應強度,發現反應情形改變,顯示 Der p 2 的 Ig E 抗原決定點似乎是由蛋白質三級結構決定的 (Chua KY et al.,1991)。

第三組過敏原

Der f 3 是最早被發現的(Heymann PW et al.,1989), 為一 29 KD 蛋白, N-端胺基酸已被定序, 經生化特性分析, 證實其具胰蛋白酶(Trypsin)的功能.Der p3 為一 32 KD 之蛋白質 (Stewart GA.,1992), 但偶而也以 34 KD 和 28 KD 這兩種型式存在,Der p 3 至少有 12 種同質異型體存在 (MacDonald RJ et al., 1982), 28KD 型式是由 34KD 之型式降解 (degradation); 且經稍後的證實,具有胰蛋白酶活性的是 28 KD 之型式. 而自然狀態的 Der p3 是由 Gel filtration 分離得到的. Der p3 之 cDNA 也已選殖 (Smith WA et al.,1994). 有關其 IgE 反應的研究, 利用放射線過敏原吸附分析法 (radioallergosorbent test, RAST), 其反應性為 100% (Stewart GA et

al.,1992). 但也有一些報告指出 IgE 反應性為 60-83%.

第四組過敏原

黴菌中的澱粉酶(Amylase)在 1979 年便知會引發職業性過敏性氣喘，且可刺激 Ig E 的產生 (Baur X et al.,1986)，此組過敏原具有澱粉酶之活性，其生化特性為一 60 KD 之蛋白質，和氣喘病人血清反應有 46%(Fiona R et al .,1991)，目前由 *Der p* 及 *Der f* 中都可純化出此組過敏原，並已定出 N-端序列，而 cDNA 之選殖仍在進行中。

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 p5，為一製造 14 KD 蛋白質的過敏原，但是無法肯定此一選殖之 cDNA 是否為 Der p5 之全長基因. 於 1993 年利用台灣氣喘病童血清進行 Ig E 菌斑放射線免疫分析法，得到一個短片段 Der p5 DNA，再以此為探針 (probe)，進行原位 DNA 雜交反應 (*in situ* DNA hybridization)，經 DNA 序列分析及和 Tovey 等人的株落進行比對，證實為 Der p5 全長基因。 (Lin KL et al.,1994)

本組過敏原和氣喘病人血清反應率約為 55%,再將之構築 (construstion) 成數片段,檢測其和 IgE 之反應強度,結果發現反應性卻又下降,顯示似乎和蛋白質的三級結構有關.

第六組過敏原

最早的名稱為 Dp 4, Df 4，其發現是由 *Der p* 及 *Der f* 此兩種蟎的培養中分離而得，其目前正式名稱為 Der p6 及 Der f6

(Thomas WR et al.,1993), 分子量為 25kD, 具有 Chymotrypsin 的活性, 以放射線免疫分析法偵測, 與氣喘病人血清反應率約為 40%, 目前僅有 N-端胺基酸次序被定出來.

第七組過敏原

同樣利用 IgE 菌斑放射線免疫分析法,於 λ gt11 基因庫篩到一個與 IgE 抗體呈陽性反應之互補 DNA 株,稱為 Der p7(HD6)(Shen HD et al ., 1993),可轉譯為 215 殘基蛋白質 ,分子量約為 22kD,沒有半胱銨酸,以及有一個 N-glycosylattion site, 與蜱過敏病人之血清反應性約為 37%.目前已應用其單株抗體證明其性質(Shen H D et al ., 1995),Der f7 cDNA 目前已被選殖出,胺基酸序列有 86%與 Der p7 homology 。(Shen H D et al .,1995)

近年來,社會進步、文明發達,然而對家塵 蜱過敏性疾病不但沒有減少,反而有增加的驅勢,因此被認為是人類文明進步的結果,因此越來越受到重視,對其研究也就越重視, 也因此基因工程合成之純化過敏原也易受重視,其將有助於探討過敏性疾病的致病機轉及其預防與治療的方法。

Dermatophagoides 過敏原之相關資料

Group	Name	MW(kD)	Function	IgE reactivity	sequence
I	Der p1	25	cysteine protease	80-90%	cDNA
	Der f 1	25	cysteine protease	80-90%	cDNA
	Der m1	25	cysteine protease		cDNA
II	Der p2	16	Lsozyme (unknown)	80-90%	cDNA
	Der p2 isoform	16		92%	cDNA
	Der f2	16			cDNA
	Der f2 isoform				
III	Der p3	28-30	Trypsin	80%	N-terminal
	Der f3	29	Trypsin	70%	N-terminal
IV	Der p4	60	Amylase	40%	N-terminal
V	Der p5	14	unknown	55%	cDNA
VI	Der p6	25	Chymotrysin	41%	N-terminal
VII	Der p7	22	unknown	36%	cDNA
	Der f7				cDNA

第四節 經減敏治療後血清學變化

引起氣喘之主要因素有:(1)家塵蟎、花粉、黴菌、動物皮屑等，(2)遺傳因子,通常小孩有氣喘,其家屬約有一半以上,也有此症狀,因此具有家族性；(3)空氣污染；(4)藥物(如 Aspirin)；(5)感染如病毒;(6)運動,由流行病學調查證明吸入性過敏原而引起氣喘在小孩較大人常見。(Onorato J et al.,1986)

塵蟎中之 Dermatophagoides 造成氣喘之主要過敏原，特別在小孩 (Platts-Mill TAE, 1989),台灣也是如此(Chang YC et al.,1989).其傳統治療方法主要有三方面: (1)避免暴露於致過敏物即避免療法,(2)以藥物減輕或消除症狀;(3)改變對過敏原的免疫反應(減敏療法 Hyposensitization).但病患如藥物治療出現副作用及長期使用類固醇改善而有不良效果或環境改變不具顯著感受性,則減敏療法便成為治療的選擇。

過敏原特異的免疫治療其形成的減敏反應,最早是由 Noon 提出 (Noon, 1911),以花粉萃取物有效治療氣喘(Pollart SM et al.,1989).其機轉使對塵蟎過敏原有反應性之 T 淋巴細胞之功能去活化,做法就是長期地注射此種過敏原,讓體內產生免疫球蛋白(主要是 IgG),下次再接觸過敏原時,則體內抗體便可將之中和,因為此治療並不是每個人都有效,所以目前對減敏療法效力仍是爭論的.今最常應用在對吸入性過敏原所造成的過敏病人,且得到良好的療效(O'hman JL et al.,1989) (Nuchel PB et al., 1988). 但有些學者並不認為減敏療法 有任何效果。(Grant IWB , 1986)(Warner JO et

al., 1986)

為達到減敏之良好良效,需注意選擇病人,確知其為吸入性過敏原引起及使用適合劑量,而免疫治療期間目前仍未有明確之界定,但至少 3 年的治療(Bousquet J et al.,1990),目前減敏治療法已被廣泛使用多年,但對減敏治療法作用機轉仍不明確,綜合最近的研究顯示與下列機轉可能有關:1、接受治療的病人血清中有阻斷抗體的出現,此阻斷抗體是屬於 Ig G 而且對注射的抗原有特異性,因此視抗原種類不同,其 IgG subclass 抗體之種類變化亦不同(Philip B et al.,1987) (Nakagawa T et al., 1991),其可與肥胖細胞及嗜鹼性細胞上的 IgE 抗體競爭抗原(過敏原)。 2、血清中 Ig E 和特異性 IgE 抗體的含量在治療初期會有上升之現象,但經長期治療後,會有下降趨勢 (Nakagawa T et al, 1987)。 3、對於淋巴球的功能方面,接受治療的病人不單祇對過敏原刺激所引起的增生反應降低,同時可產生過敏原特異性壓制性 T 細胞,也會影響病人淋巴球製造淋巴激素(lymphokine)的機能 (Hsieh KH et al., 1987)。 4、可穩定肥胖細胞和嗜鹼性細胞,使受到過敏原刺激時釋出的組織胺及其它介質(mediator) 的反應降低。(Liao TN et al., 1990)

減敏療法通常以一年四季不斷為過敏性病人注射過敏原,起初以最低劑量開使始注射,每週一次,約需六個月便可達到最大耐受量,當達到耐受量後則可將注射時間延長,一般減敏療法所需時間約三到五年。但造成過敏之因素是多因子的,其癒後也受到許多因素的影響。

第一 部份

台中地區家塵蟎過敏原(Der p5)分佈研究

第二章 台中地區家塵蟎過敏原(Der p5)分佈研究

第一節 前 言

過敏性氣喘在學齡兒童中,有日漸增加之趨勢。根據國內報告由1974年的1.3%增加到1985年的1.3% (Hsieh KH et al., 1984), 至1994年增加到10.8%(Hsieh KH et al.,1992), 可見其成長速度較其他疾病快很多。其發生因素可分為兩大類, 一類是過敏性或外因性(extrinsic),另一類是非過敏性或內因性(instrinsic),步, 外因性的過敏原中,在台灣最重要就是家塵蟎 (Chang YC 1989., et al),過敏性疾病之傳統療法,是先經由病史及診斷性實驗,找出誘發症狀之物質或狀況。然後再以此為根據擬出治療計劃,長久以來對氣喘治療基本原則,即在儘量減少過敏兒童與家塵、家塵蟎接觸之機會。

1920年便知家塵蟎為過敏原, 到1967年確知家塵為家塵蟎中之主要過敏原。利用免疫轉印法分析台灣氣喘病童血清之家塵蟎特異性 Ig E, Ig G4 及 Ig G 之變化,約有8種可在多數氣喘病童刺激產生 Ig E 及 Ig G4 抗體 (Lin KL et al., 1991), 而已有7組家塵蟎過敏原經由分子生物學或基因選殖的方法而選殖到(Editorial , 1993) 並進行研究。其中在台灣 Der p1 和 Der p2 過敏原對氣喘病童血清的反應率高達 80%以上, 因此被視為主要過敏原, 但也發現一些低分子量的過敏原如 Der p 5, 對氣喘病童血清的反應也有高達近 60% 。(Lin KL et al., 1994)

Der p5 在1989年已被 Tovey 等人選殖到 cDNA, 且證實是

一 14 kD 的低分子量過敏原，但不能肯定其為全長的 Der p5 基因，Lin KL 等(1994)利用台灣氣喘病童血清當做探針，篩選 Der p5 之基因庫 (library)，得到一段短的 cDNA，再次以此段 DNA 作為探針，進行原位 DNA 雜交試驗 (*in situ* hybridization)，找到了四個相異的 Der p5 株落. 再經 DNA 序列分析，並與 Tovey 所發現的序列進行比對，證實為 Der p5 之全長基因。利用大腸桿菌大量表現，且加以純化並證實可與 Ig E 抗體有很好的反應。

環境中之灰塵如減至最低程度是非常重要,而且此一簡單的處理並不影響病人或家人之日常生活而對病情之改善卻大有幫助。台灣是一海島國家，溫度可高達 18-29 ℃，相對濕度則在 82-94%之間，因此非常適合塵蟎之生存,Chang YC 等(1989),利用 RAST 和皮膚試驗證明台灣地區的塵蟎以 *Der p* 為主 (10 個樣本中佔 78.7%)，其次為 *Der* f (僅有 6.2%).台灣地區對家塵蟎過敏之氣喘病童住家會依環境之不同，Der p5 抗原濃度之分佈亦有所差異 。(Li CS et al.,1996)

通常家塵蟎與人類之生活作息習習相關,最常出現居家中起居室，臥室中更以床墊為佳環境,若在床墊上覆蓋毛毯,蟎含量會增加,且與床的年齡成正相關(Van Strien RT et al .,1994)即老舊的床墊蟎數量增加；因為當床上有人睡覺時,床表溫度會增加至 25-29 ℃,而此溫度適合家塵蟎生長,因此床墊上之蟎含量佔所有寢具中最多(Lang et al .,1978),如使用纖維物品也有利家塵蟎生長情況(Georgesgridel et al .,1987),此外,建築物年齡也與家塵蟎含量成正相關。(Mulla et al., 1975)

本實驗目地想要了解 Der p5 此過敏原是否存在自然界中，

進一步想了解台中地區在氣喘病童在不同季節中其居家室內環境灰塵中的 Der p 5 抗原含量及其分佈情形,則將可在 Der p5 抗原量升高前, 採取適當的預防措施, 有助於降低氣喘的發生率。 因此本實驗利用抗 Der p5 多株抗體、單株抗體及由對 Der p 5 抗原有特異性抗體之病人血清(利用免疫性親和力色層分析法 (immunoaffinity chromatography) 將血清 IgE 引流 (elution) 下來與使用吸附法證明之，即利用 Der p5 過敏原(大腸桿菌表現)將氣喘病童血清中之 Der p 5 抗體吸附之; 將此以免疫轉印法測試對粗製蟎萃取液,rDer p5-GST 融合蛋白之反應性. 證明 Der p5 是一自然界過敏原。進一步調查台中市十二位對家塵蟎過敏之氣喘病童家中,想瞭解灰塵中 Der p 5 之濃度是否與溫度及濕度有關，另外，想瞭解環境中分佈之情形.因此收集個案家中表面灰塵之 Der p 5 的含量及由病患家長填寫基本問卷以做為環境參考， 採集方式是每個月收集住家不同地點之灰塵(床墊,臥室地板,客廳地板);每次用吸塵器吸取 1 平方公尺區域面積的灰塵, 每次之吸取時間是 2 分鐘,將收集的灰塵經過濾、萃取、加入緩衝液再以酵素免疫分析法分析一克灰塵中 Der p5 含量，收集時間 由 83 年 10 月到 84 年 9 月止。

第二節 實驗材料與方法

實驗材料

Dermatophagoides pteronyssinus 粗製蟎萃取液(Crude mite extract).

以 1 克的蟎體,加上 100 ml 乙醚振盪 24 小時去脂,均質化後不斷地與 100 ml 之 PBS 緩衝液攪拌 36 小時,經離心後,將上清液存放於-70 ℃。

含有蟎抗原之培養液(Spent mite medium).

秤取 100 克 spent mite medium 溶於 100 ml PBS 中,於 4 ℃中攪拌,隔日以 9000 rpm 離心 30 分鐘,取出上清液,加入 NaN3(sodium azide) 至 0.01%,置於 4 ℃保存 。

Der p 5 去 Glutathione-S-Transferase (GST)置備

取 Der p5 大腸桿菌萃取液,通入 Glutathione agarose 再加入 CaC2 10 ul ,及 80 ul 凝血酶(thromin)(20 ul thromin /1mg protein) ,4 ℃隔夜反應, 則可引流出 14 kd Der p5 。

抗 Der p5 單株抗體 (Anti-Der p 5 monoclonal antibody)

Fusion:

取已經經 rDer p 5(去 GST)免疫小白鼠 BALB/C 之脾臟細胞，取出脾臟泡在 RPMI-1640 media ，離心取沉澱細胞再將其與 myeloma cell 以4:1的比例混合，離心沉澱；取沉澱細胞，在 37 ℃作用一分鐘，加入 polyethylene glycol(4000)1g/ml ,分置於 well

中，利用 ELISA 篩檢 hybrid cell。

Cloning

利用 limiting dilution(限數吸釋法)，殺老鼠取其脾臟當為 Fedder cell ，與欲選殖的細胞混合均勻混合，選出只有單一細胞長出來之株落,以 ELISA 挑選出具分泌抗體能力之細胞株。

抗 Der p 5 多株抗體 (Anti-Der p 5 mouse polyclonal antibody)

將 rDer p5-GST 免疫小白鼠(BALB/C)以 50 ug 溶於 0.5 ml PBS 中,再與 0.5 ml Complete Freund's Adjuvant ,以二支針筒連接方式均勻混合後,以皮下注射至小白鼠至腹腔,兩週後將 rDer p5-GST 50 ug 溶於 0.5 ml PBS 中,再與 0.5 ml imcomplete Freund's Adjuvant, 以二支針筒連接方式均勻混合後,再以皮下注射至小白鼠至腹腔, 為第一次追加.兩週後，再將 rDer p5-GST 50 ug 溶於 0.5 ml PBS 中,再與 0.5 ml imcomplete Freund's Adjuvant,以二支針筒連接方式均勻混合後,再以皮下注射至小白鼠至腹腔, 為第二次追加,兩週後以 ELISA 測其血清效價,如果達到 1:100 倍稀釋濃度,就可將純之 rDer p 5-GST50 ug 溶於 0.5 ml PBS 中,從尾靜脈注射。

抗 Der p 5 多株抗體(Anti Der p5 Rabbit polyclonal antibody)置備及純化:

將純化的 rDer p5-GST 融合蛋白質免疫兔子,於免疫兔子前先取兔子血液, 再將純化出的 rDer p5-GST 融合蛋白 100ug／ml 與 1ml Complete Freund's Adjuvant 以二支針筒連接方式均勻混合後, 全部注入兔子皮下,10 天後追加注射(booster), 第一次所追加注射的量是 100ug／ml 融合蛋白與 1ml Incomplete Freund's Adjuvant 同樣以二支針筒連接方式混合, 然後注入兔子皮下, 再隔 10 天後追加注射第二次, 追加的量是 以 180ug／ml 融合蛋白與 1ml

Incomplete Freund's Adjuvant,抽且兔子血液以酵素連結免疫吸附法 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay); 初步鑑定兔子對 Der p5 所產生之特異性免疫反應, 假如抗體力價達到 1:100x, 即達到了免疫效果, 則此時再追加注射 260ug／ml 融合蛋白質與 1ml Incomplete Freund's Adjuvant, 相隔 10 天後則可抽取耳朵靜脈血(如為了大量血液可採取心臟血),以 3000 rpm 離心 10 分取得血清。

多株抗體(anti-Der p5 polyclonal)純化測試

以 G 蛋白 (G protein)層析柱(chromatography column) 純化含有 Anti Der p5 之兔子血清,其步驟如下:先將 protein G column 利用緩衝液沖洗,之後加入兔子血清,待一段時間即加入緩衝液,將血清中非 IgG 部份的免疫球蛋白欲已去除,再以 pH 2.5 Glycine 將附著 column 中之 IgG 洗出,此時立即以 1M Tris 中和洗出之含 IgG 溶液,最後利用分光光度計(波長 280 nm)定量血清中蛋白質濃度。之後取抗體 20μl, 以 15% SDS-PAGE 分析, 同時以西方墨點法測試抗體之活性及專一性。

Der p5 之單株抗體與多株抗體在 ELISA 反應的飽和濃度測定

為瞭解 ELISA 反應中適當的 Der p5 抗體濃度的使用,以便應用未來臨床血清學測定,首先先分別 coating 1:1000 倍、1:100 倍、1:50 倍、1:40 倍稀釋之單株抗體血清與多株抗體血清(多株抗體則至 1:20 倍及 1:15 倍)在 96 well 的 microtiterplate, 然後加入 100ul rDerp 5-GST 融合蛋白質，濃度分別為 0.1 ng 、0.3ng、1ng、3ng、10ng、30ng、100ng、300ng、1ug、3ug,以 ELISA 方法偵測,結果發現單株抗體血清效價 1 :40 倍與多株抗體血清效價 1:15 倍已達飽和。

對家塵蟎抗原 Der p 5-GST 融合蛋白質有特異性抗體反應之血清

利用 RIA 方法找出對 Der p5-GST 融合蛋白質有特異性抗體之血清.

灰塵檢體

利用吸塵器吸取 12 位氣喘病童家中臥室地板, 客廳地板及床墊之表面灰塵, 收集時間從 83 年 10 月至 84 年 9 月, 共收集 283 個檢體, 分別是 83 年 10 月的 32 個檢體, 83 年 11 月有 36 個檢體, 83 年 12 月有 39 個檢體, 84 年 1 月有 33 個檢體, 84 年 2 月有 16 個檢體, 84 年 3 月有 40 個檢體, 84 年 4 月有 17 個檢體, 84 年 5 月有 21 個檢體, 84 年 6 月有 12 個檢體, 84 年 7 月有 11 個檢體, 84 年 8 月有 12 個檢體, 84 年 9 月有 14 個檢體。

抗原萃取

將採得的灰塵檢體以 300 微米孔徑之篩網 (300μm) 過濾, 將其中較大的灰塵顆粒去除,加入 (1:20wt/vol) 碳酸氫銨緩衝溶液 0.125M (NH_4HCO_3), 0.05% 胎牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA), 0.05% Sodium Azide, 於 4℃的冰箱中緩慢均勻攪拌 6 個小時, 再離心 3000 rpm 10 分鐘, 吸取上清液, 最後置於-20℃冰箱冷凍。

實驗方法

以 Der p5 單株抗體與多株抗體測其 IgG 反應

吸附人血清中含有特異性 Der p5 之抗體測其 IgG 與 IgE，證明 Der p5 是天然型過敏原

將隔夜培養的大腸桿菌,以 10 倍 L-broth 稀釋(含 100 ug/ml ampicillin)，置於 37℃ 培養 2 小時後,加入 IPTG,再培養 2 小時, 9000 rpm 10 分離心,再以 TBS 清洗沉澱物,以 TBS 調整至原來培養液 1/100 的體積,置於 Braun 瓶內並含其體積一半量的 0.1mm 玻璃珠,加入 lysozyme (10 mg Lysozyme/40mlTBS)置室溫 30 分,再加入 MgCl2 1M);DNaseI(10mg/ml) ;Apotinin200ul,PMSF(Phenylmethyl sulfonyl fluoride 100 mM)則在每一次進行振破菌體前立即加入。置於均質振盪機(B.Braum Hamburger)振盪三次,每次 1 分鐘,中間並以冰浴將之降溫,將均質化後之產物,以離心(Hettich Zetrifugen)15000 rpm 10 分鐘。取上清液加入 0.5 M EDTA,通 millipore(1.2 uM), 將含 Der p 5 抗體之人血清與大腸桿菌 lysate 以 1:2 倍稀釋,置於 4℃ 24 小時緩慢均勻反應,再將未與菌液吸附血清與吸附後血清,進行西方墨點法測試 IgG 與 IgE 反應.

測試含有特異性 Der p 5 之 IgE 抗體血清通過親和力色層分析柱及抗體引流出證明其屬於天然型過敏原

取 CNBr-activated Sepharose 4B (pharmacia USA)粉末 0.5 克, 以 1mM HCl 將其漲大,可至體積 1.75ml(15 分鐘) ,並以 100ml 1mM HCl 分數次將保存劑洗去.將 3 mg/1ml Der p 5-GST 融合蛋白質溶

於 2.5 ml coupling buffer (0.1 M NaHCO3, 0.5M NaCl pH 8.3) 和上述處理過之 Sepharose 4B 混合,並置於先前已用 5% non-fat milk 阻斷過之管子內,於 4 ℃緩慢旋轉。隔日先將引流出來溶液測其 OD 值,再以 5 倍量 coupling buffer 洗去未結合之蛋白質,再加入 1M ethanolamine 於室溫作用 4 小時(怕光)。

病人血清以 3000rpm 離心 10 分鐘,去除大塊殘渣以 1:5 倍稀釋 (pH7.5 10 mM Tris)再將之通入已置備好之 column(至少三次),再以 20 倍量之 10 mM Tris (pH7.5) 和 500mM NaCl 10 mM Tris (pH7.5) 沖洗, 再以 10 倍量之 100mM Glycine (pH2.5) 引流出抗體, 而以 1M Tris(pH8.0)中和之。置於 PBS 中 4 ℃,24 小時透析。

利用西方墨點法(Western Blot) 偵測含抗 Der p 5 多株抗體、單株抗體及吸附前、後人血清之 IgG 、 IgE 與通過親和力色層分析柱引流出來的 IgE 反應

a.SDS-PAGE

將如前述方法所純化 rDer p5-GST 融合蛋白質 10 ul (3 ug)及前述方法所得之粗製蟎萃取液取 20ul(80ug)以 15%SDS PAGE 分離之

b.Transfer

將 rDer p5-GST 融合蛋白質與粗製蟎萃取液轉至 N.C paper, 裁與 SDS PAGE 相同大小的 nitrocellulose paper(NC)及 3M 濾紙, 浸泡在 transfer buffer 中(anode 與 cathode buffer),利用 H oriblot (ATTO)由負極到正極分別擺上四張濾紙、膠、 N.C paper, 二張濾紙,以面積換算其伏特, 40 分鐘條件下轉印至 N.C paper 上,取下 N.C 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,將之以 20 ml 5%的脫脂奶粉,於室溫中均勻搖動反應 30 分,進行阻斷(blocking)作用。

c.利用西方墨點法(Western blot)偵測含抗 Der p5 多株抗體、單株抗體及吸附前、後人血清之 IgG

將抗體稀釋於適量 5%脫脂奶中, 和 block 好的 NC paper 於室溫作用 1 小時後, 以 PBS-tween 清洗 5 次／每次 10 分鐘,加入以鹼性磷酸酶標定之 antihuman IgG 或 Antimouse IgG 二次抗體(依第一次抗體而決定),於室溫作用 1 小時, 再以 PBS-tween 清洗-5 次／每次 10 分鐘,之後以 nitroblue tetrazolium (NBT) 及 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) 為鹼性磷酸酶之受質 (substrate), 於 0.05M sodium carbonate, 1mM $MgCl_2$,pH 9.5 之水溶液中呈色。

a.利用西方墨點法(western blotting)偵測氣喘病童血清吸附含 Der p5-GST 之大腸桿菌萃取液前及後及病童血清通過已吸附 Der p5 過敏原管柱再利用 pH2.5 Glycine 將抗体引流下

加入與含有 Der p5-GST 之大腸桿菌萃取液吸附前與吸附後之血清與未通過與通過吸附性管柱之稀釋的血清(10 mM Tris ph 7.5)親和力色層分析之血清，再以 pH 2.5 Glycine 將 IgE 抗體引流下來. 和 block 好的 NC paper 於室溫作用 1 小時後,再以 TBS-tween 清洗 5 次／每次 10 分鐘,之後加入 biotin labeled antihuman IgE (Vectastain ABC kit) 於室溫反應 30 分鐘,再以 TBS-tween 清洗 5 次／每次 10 分鐘,然後加入 ABC reagent (avidin DH,biotinylated horseadish peroxidase H)30 ml ,於室溫反應 30 分鐘,再以 TBS-tween 清洗 5 次／每次 10 分鐘,最後加入 Diaminobenidine solution (final cocentration 0.01%)及 H2O2 (final concetration 0.012%)呈色分析。

三明治酵素連結免疫吸附法 (sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)定量灰塵中之塵蟎抗原 Der p5 濃度

在 96 孔微量平板 (96 well microplate) 的每一孔中加入 100 ul (1:40 倍)稀釋之單株抗體(anti Der p5 monoclonal Ab) 於 37℃ 培養 2 小時, 以 PBS-tween 沖洗三次; 加入 100μl 之 5% 脫脂牛奶於每一孔中, 培養 1 小時, PBS-tween 清洗三次;分別加入 100μl 之灰塵檢體(而標準定量曲線以定量純化 rDer p5-GST 融合蛋白質為材料,以不同濃度 0.1ng.0.3ng.1ng.3ng.10ng.30ng.100ng.300ng.1ug.3ug 求出標準曲線), 37℃培養 1 小時, PBS-tween 清洗三次; 加入 100μl 1:15 倍稀釋 多株抗體(anti Der p5 rabbit polyclonal Ab), 37℃ 培養 1 小時, PBS-tween 清洗三次; 加入 1:1000 倍稀釋之鹼性磷酸酶標定之羊抗兔 Ig G 抗體 100μl, 37℃ 培養 1 小時, PBS -tween 清洗三次; 最後加入酵素基質 p-nitropyrophosphate (PNPP),30 分後產生顏色變化, 於自動比色儀 (DYNATECH, U.S.A.)波長.495nm 測其 O.D 值。

統計方法

利用 wilcoxon signed-rank test 分析樣本之統計檢定。

第三節　結 果

本實驗採用之 Der p 5 為我們實驗室所選殖且已分析完成,於大腸桿菌系統表達,本部份目的想瞭解 Der p5 是否存在蟎体中,進一調查台中地區氣喘病童家中灰塵之家塵蟎抗原(Der p 5)在不同季節其含量及分佈情形。

西方墨點法測定抗 Der p 5 多株抗體及單株抗體

將 rDer p 5-GST 融合蛋白質免疫小白鼠(balbc) strain,使其產生抗 Der p 5 多株抗體,粗製蟎萃取液、含有蟎抗原之培養液、 r Der p 5 -GST 融合蛋白質與去 GST 之 Der p 5 首先先以 15% SDS PAGE 進行(Fig.1.),再與抗 Der p5 之多株抗體與單株抗體進行西方墨點法確認 IgG 反應,結果發現多株抗體在粗製蟎萃取液及 去 GST 之 Der p5 在 14 kD 有一反應帶, rDer p 5-GST 融合蛋白質在 42 kD 有反應(Fig 2 .a),而單株抗體則只出現在去 GST 之 Der p 5(14 kD)與 rDer p5-GST 融合蛋白質(42 kD)有反應帶.(Fig 2.b)

人的血清 Der p 5 抗體吸附前及吸附後之 IgG 與 IgE 反應

將大腸桿菌 Lysate 與人之血清(1:2 倍稀釋)置於 4 ℃ 24 小時緩慢均勻反應,取未吸附與吸附後之血清進行西方墨點法,測其與粗製蟎萃取液與 rDer p5-GST 融合蛋白質之 Ig G(Fig 3.a,b)及 Ig E 反應,結果其在吸附前皆有反應帶出現,而吸附後則皆沒有反應.(Fig 4a .b)

將未通與通過親和力管柱之人的血清及再經酸將抗體引流下來之

溶液進行西方墨點法測試 IgE 抗體

將人的血清先經稀釋,而後通過親和力管柱,再以 (pH2.5) Glycine 將抗體引流下來,以 pH 8.0 1M Tris 中和之,進行西方墨點法測試其對粗製蟎萃取液 與 rDer p 5-GST 融合蛋白質是否有產生反應,結果發現 (Fig.5a)為未通 column 前之血清,其呈現反應帶皆有反應, 而經通過後之血清皆未有反應,表示血清中抗 Der p5 其都與管柱中 Der p5 抗原結合,(Fig 5b.),但經酸引流下來之抗體則在粗製蟎萃取液(14kD)與 rDer p 5-GST 融合蛋白質(42kD)皆有反應。(Fig 5.c)

進一步想瞭解台中地區灰塵中塵蟎抗原(Der p 5)之濃度分佈是否與溫度及濕度有關,從一九九四年十月至一九九五年九月,我們在台中地區收集十二位氣喘患者之住家灰塵量,收集當中也測個案家中室內室外之濕度與溫度,再根據中央氣象局所發佈之年相對濕度及平均溫度之報告;全年的相對濕度約在 70%-79%之間,年平均相對濕度為 75%,其中以二月份之相對濕度為 70%略低,大抵本省之月平均相對濕度間並無顯著差異。而攝氏平均溫度全年約在 17.2 ℃至 28.3 ℃間,年平均溫度為 23.5 ℃,其中以七月份之攝氏平均為 28.3 ℃,一月份之攝氏平均為 17.2 ℃,全年平均溫度為 23.5 ℃。(Fig .6)

Der p5 的重量濃度從最低 6ng/g fine dust 至最高 8000 ng/g fine dust ,其中濃度最高的月份是在 3 月(10-5400 ng/g fine dust,幾何平均值為 195.1ng/gfine dust,標準誤差為 5ng/g fine dus,中位數為 1047.2ng/g fine dust 與五月(20 -7600ng/g fine dust ,幾何平均值為 188.4ng/g fine dust,標準誤差為 6.2 ng/g fine dus,中位數為 152.5 ng/g fine dust),而濃度最低則出現在 11 月(6-8000ng/g fine dust, 幾

何平均值為 86.3ng/g fine dust,標準誤差為 2.1 ng/g fine dust ,中位數為 50ng/g fine dus)(Fig 7.)

塵蟎抗原 Der p5 在居家環境中不同地點,其濃度也有所不同.對床墊而言,整年塵蟎抗原 Der p5 (7-8000 ng/g fine dust, 幾何平均值為 145.9ng/d fine dust, 中位數為 95ng/g fine dust)將其中最高的月份是在六月(60 -5600 ng/g fine dust,幾何平均值為 1055.2 ng/g fine dust,標準誤差為 263.8 ng/g fine dust ,中位數為 2500 ng/g fine dust),與五月(20-7600 ng/g fine dust,幾何平均值為 226.0 ng/g fine dust,標準誤差為 22.6 ng/g fine dust ,中位數為 157.5 ng/g fine dust) ,而濃度最低的月份為四月(12-1600 ng/g fine dust,幾何平均值為 62.2 ng/g fine dust,標準誤差為 7.8 ng/g fine dust ,中位數為 30 ng/g fine dust) (Fig 8.) , 臥室地板整年塵蟎抗原 Der p5(6-5400 ng/g fine dust,幾何平均值為 100.1ng/g fine dust ,中位數為 90 ng/g fine dust),濃度出現最高的月份是在七月(80-1200 ng/g fine dust, 幾何平均值為 363.4 ng/g fine dust, 標準誤差為 121 ng/g fine dust,中位數為 183.5 ng/g fine dust),而以六月最低(10 -210 ng/g fine dust,幾何平均值為 22.9 ng/g fine dust, 標準誤差為 5.8ng/g fine dust ,中位數為 11.5 ng/g fine dust)(Fig 9.),對客廳地板而言, 整年塵蟎抗原 Der p 5(6-6200 ng/g fine dust,幾何平均值為 130.6ng/g fine dust, ,中位數為 100 ng/g fine dust),其以四月最高(30-2500 ng/g fine dust ,幾何平均值為 472.7 ng/g fine dust,標準誤差為 59.2 ng/g fine dust,中位數為 600 ng/g fine dust),而濃度最低的月份為六月(10-150 ng/g fine dust,幾何平均值為 30.8 ng/g fine dust, 標準誤差為 7.8 ng/g fine dust ,中位數為 25 ng/g fine dust(Fig 10 .)

同時,本實驗室亦測主要過敏原 Der p 2 其分佈情形,因此我們也

想了解Der p2與Der p5 之間分佈是否有關係,Der p2重量濃度(1ng/g -360,000 ng/g fine dust),以八月最高(46-16400 ng/g fine dust,幾何平均值為 8550 ng/g fine dust),最低則在六月(26-1600 ng/g fine dust,幾何平均值為 97ng/g fine dust),而將其與 Der p5 比較: 發現與床墊相關係數(r=-0.07, P>0.1)(Fig 10.),臥室地板其間相關係數 (r=-0.05, P>0.1)(Fig 12.),客廳地板相關係數 (r=-0.04, P>0.1)(Fig 13.)

除外，將所有灰塵之數據以三個月為一單位區分為四季,計算其間結果(Fig 14,15,16,17 由結果顯示與月份計算似乎並沒有明顯改變

。

第四節 討 論

Tovey 等人於 1989 年選殖到一 Der p5 基因,且證實其所反應之 IgE 抗體是與粗製蟎萃取液中 14KD 蛋白質反應。而 Lin KL 等 1994 也選殖到一 Der p5 基因,即為本實驗所用之材料,較適合大量純化。

本實驗想證明 Der p5 基因是否為自然界之過敏原，因此將含有 Der p5 基因之大腸桿菌菌液,與含有特異性 Anti -Der p5 之人類

血清而將此吸附後之血清與粗製蟎萃取液及 Der p5 融合蛋白質反應,測其 IgG 及 IgE 反應,結果顯示吸附後之血清,其 14KD 與 42KD 之反應帶皆被吸附,同時將 Der p5 融合蛋白質置備於親合力色層分析(Affinity hromatography),再通含有特異性 Anti -Der p5 之人類血清,以 pH2.5Glycine ,將抗體引流下來,以免疫轉印分析法測其蟎萃取液與 Der p5 融合蛋白質之 IgE 反應,結果發現有一 14KD 與 42KD 之反應帶引流下之抗體,因此由以上實驗與 Tovey 等 (1989), 證明 Der p5 是屬於自然界之過敏原.通常研究過敏性病的致病機轉及其預防與治療的方法,其困難之一係無法大量取得純化過敏原蟎萃取液過敏原中成分之含量不一又少,因此由基因工程合成之純化過敏原將有助於探討過敏性疾病的基礎及臨床之研究。

台灣地區位居亞熱帶,一年四季溫度介於攝氏 17.2 ℃至 28 ℃ (平均溫度為 23.5 ℃),全年相對溫度約在 70-79 %(年平均濕度為 75%),此溫度及濕度條件下為家塵蟎生長之最佳環境,因此一年四季沒有影響蟎之生長.而本研究調查主要針對台中地區過敏病童之居家環境，首先先瞭解台中自然環境，因此根據中央氣象局台中站之報告,台中地區年平均溫度為 23.2 ℃(最高為六月 28.4 ℃, 最低為二月 15.5 ℃) 年平均濕度為 75.3%,(最高為六月 79%,最低為十月的 70%),也涵蓋於適合家塵蟎生長之環境,所以台中市一年四季皆適合其生長。

Der p5 整年含量由 6-8000ng/g fine dust,以三月最高(幾何平均值 195.1 ng/g),十一月最低(幾何平均值 86.3 ng/g),而 Li CS (1995) 調查台北地區 Der p5 含量由 4-4630 ng/g fine dust ,以一月最高,而以七、九月最低,此間差距 Der p5 可能是因個體差異及家庭作息不同,及清潔習慣不同,而突顯其數量不同。因為根據問卷,知道家長

對環境之清潔並沒刻意注意。至於居家環境中不同地點,如客廳地板、臥室地板與床墊，其抗原量的分佈亦有所不同。以床墊佔所有地點中濃度最高(7-8000 ng/g fine dust 幾何平均值為 145.9),最高之月份是在六月(幾何平均值 1055.2 ng/g fine dust), 台北地區也以床墊含量最高。Lang 等(1978)測試臥室內寢具與蟎之相關,發現以床墊上蟎數最高,因為當床上有人睡時,溫度增加至 25-29℃,而此溫度適合家塵生長,而人們身上皮屑脫落下來,多集中在此成為其之主要食物,也是生長之最佳物理環境,尤其是舊的床墊更是多量(LT Van Strien et al ., 1994).因此預防方法需經常刷掃及洗淨床墊,則可減少 90%之死與活蟎量,Funan R 等(1992)建議定期清潔床墊,使用床墊套之拉鍊要拉緊,最好再用膠布貼上,避免滲漏,枕頭套材質最好用合成聚酯,一個月清洗一次,洗時水溫宜大於 55℃,有效殺死蟎,而冷水洗滌則無法有此目地(McDonald et al.,1992),但由問卷得之病童家中皆沒有採用此方法。

客廳地板含量次之(6-6200 ng/g fine dust,幾何平均值為 130.6 ng/g fine dust)以四月最高,經由問卷得知四月學校放春假,且為春雨季節,小孩無法外出；因此都在客廳玩耍,而環境清掃,則為簡單的清掃,通常以一星期小範圍之清掃,半年為較大規模之清潔工作,使用清潔工具為掃帚,而根據 Platts-Mills TAE 認為掃帚會助長灰塵中塵蟎抗原之飛揚,至一定時間便會降落下來,因此無法減少塵蟎抗原,而根據問卷得知每個家庭都裝有冷氣機,使用濾網則每半年清洗一次,冷氣機具有過濾大粒子及具有除濕功能,但部份家庭仍維持風扇與冷氣機交替使用,而風扇會增加室內過敏原之流動(Fuan R et al., 1992)。但有一好現象,病童家中皆未使用地毯,因地毯可能含有大量之塵蟎抗原,即使反覆使用吸塵器清理,也無法完全移除(Dybendal T et al., 1991).

臥室地板 Der p5 含量為三者之間最低(6-5400 ng/ g fine dust, 幾何平均值為 100.1 ng/g fine dust),以七月最高,而與床墊間有明顯之差異(P<0.05),但與客廳地板沒有明顯之不同(P>0.1),因為病童待在臥室時間只有睡覺才會進入,因此含量也較少.而與 Der p2 間相關性沒有達到統計水準(P>0.1).其量之差異,因 Der p5 存在蟎體上,而排泄物無法偵測到,只能少量由蟎體萃取物測到。總之,本調查針對 12 位氣喘病童住家,進行長達一年的研究，而為了配合個案的意願，故僅能選取十二個家戶做為此研究的對象。

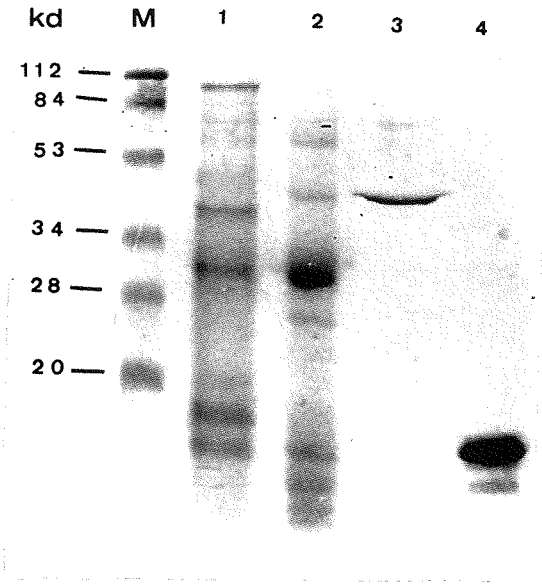


Fig.1 SDS PAGE analysis of purified mite allergens ,Lane M Molecular weight markers; Lane 1,crude mite extract ;Lane 2, spent mite medium ; Lane 3, r Der p5 GST;Lane 4 rDer p5 analysis on a 15% acrylamide gel.

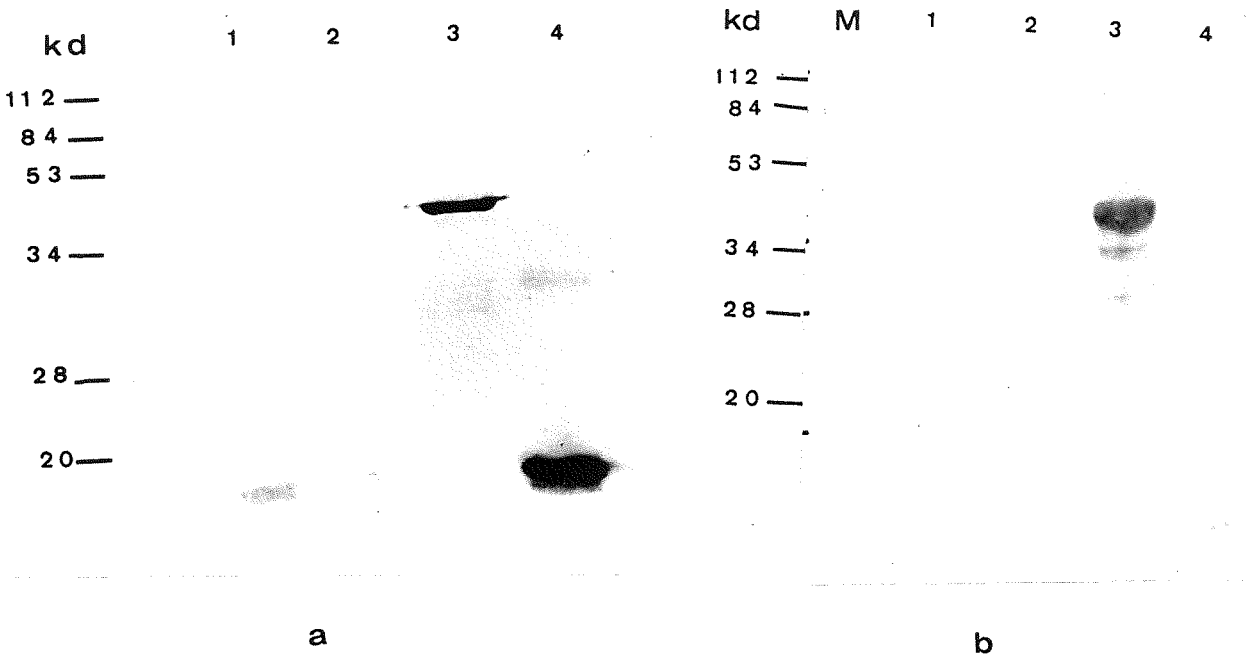


Fig.2 The Western blotting analysis of IgG binding pattern of crude mite extract, spent mite medium ,r Der p5 GST,and rDer p5 were transfered to N.C paper ; (a) then reacted with anti -Der p5 polyclonal antibodies the result developed by antimouse IgG (conjugated ALK-P) ,(b) and reacted with anti Der p5 MonAb ,the result developed by anti -Der p5 polyclonal show reactivity to crude mite extract ,rDer p5 -GST and rDer p5 ,but anti Der p5 Moab showed reactivity to rDer p5 -GST and Der p5 .

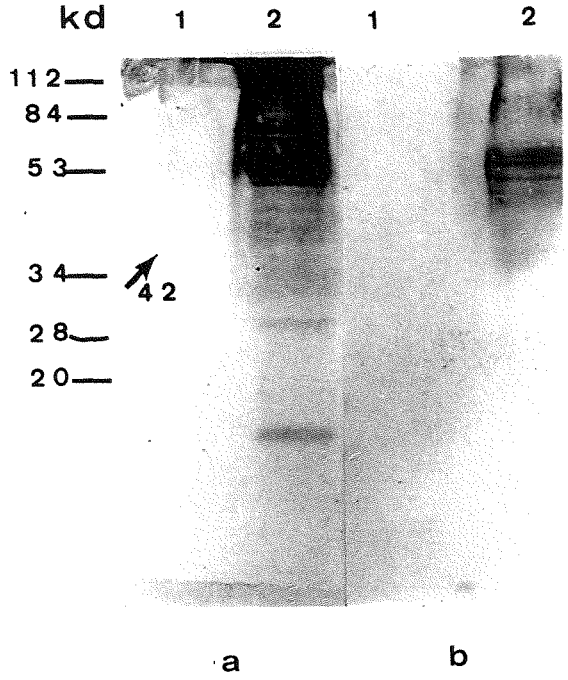


Fig3 The Western blotting analysis of IgG binding pattern of alergic serim and allergic serum absorbed with *E.coli* lysate (Der p5),Lane 1 and Lane 3, rDer p5 -GST ; ,Lane 2 and Lane 4,crude mite extract were electrophorsed on a 15% SDS PAGE ,and transfered to N.C paper ,then reacted with (a) before absorbed house dust mite allergic serum and (b) house dust mite allergic serum absorbed with lysate from *E.coli* (Der p5) ,the result developed by anti human IgG (conjugated ALK-P) showed the *E.coli l*ysate removed reactivity to Mr 42 kD and 14 kD bands

Fig.4 The Western blotting analysis of IgE binding pattern of alergic serim and allergic serum absorbed with *E.coli* lysate (Der p5),Lane 1 and Lane 3, rDer p5 -GST ; ,Lane 2 and Lane 4,crude mite extract were electrophorsed on a 15% SDS PAGE ,and transfered to N.C paper ,then reacted with (a) before absorbed house dust mite allergic serum and (b) house dust mite allergic serum absorbed with lysate from *E.coli* (Der p5) ,the result developed by anti human IgG (conjugated ALK-P) showed the *E.coli l*ysate removed reactivity to Mr 42 kD and 14 kD bands

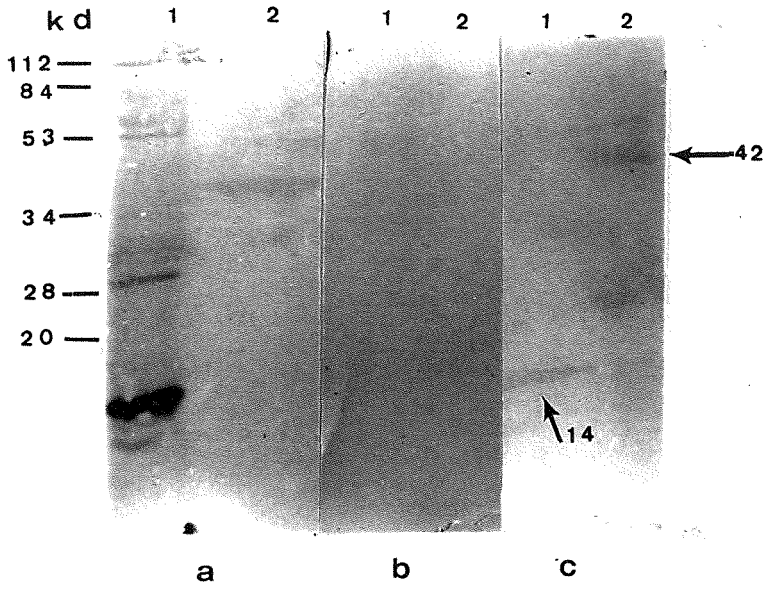


Fig.5 The Western blotting analysis of IgE binding pattern of alergic serim and allergic serum were affinity purified , Lane 1 ,3 and Lane 5 crude mite extract , Lane 2 ,4 and Lane 6 rDer p5 -GST , were electrophorsed on a 15% SDS PAGE ,and transfered to N.C paper ,then reacted with .(a) before affinity purified house dust mite allergic serum and (b)after affinity purified house dust mite allergic serum.(c) IgE antibodies eluted from affinity purified house dust mite allergic serum,the result developed by anti human IgE (conjugated peroxidase) showed(a),(c)reactivity to Mr 42 kD and 14 kD bands

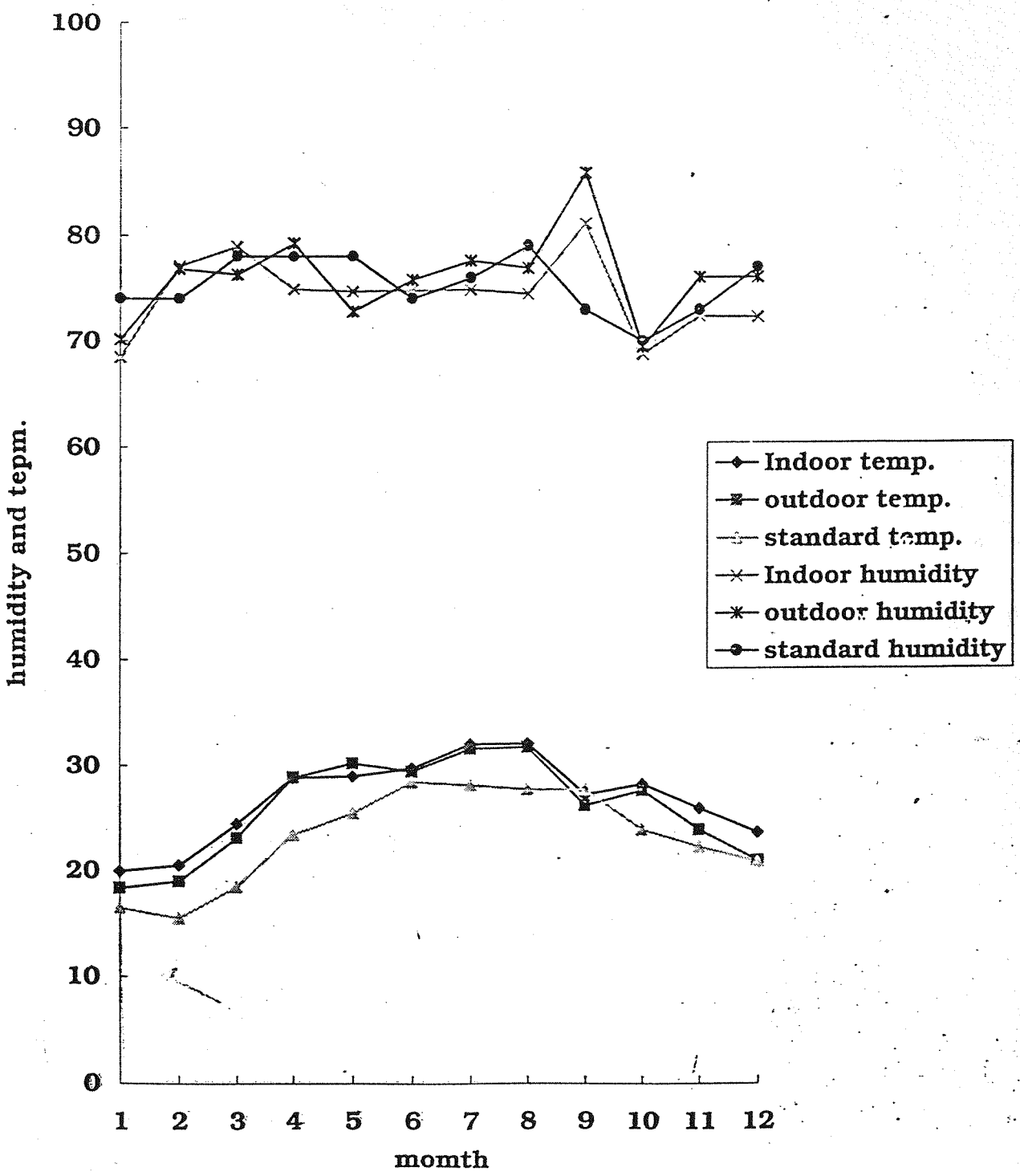
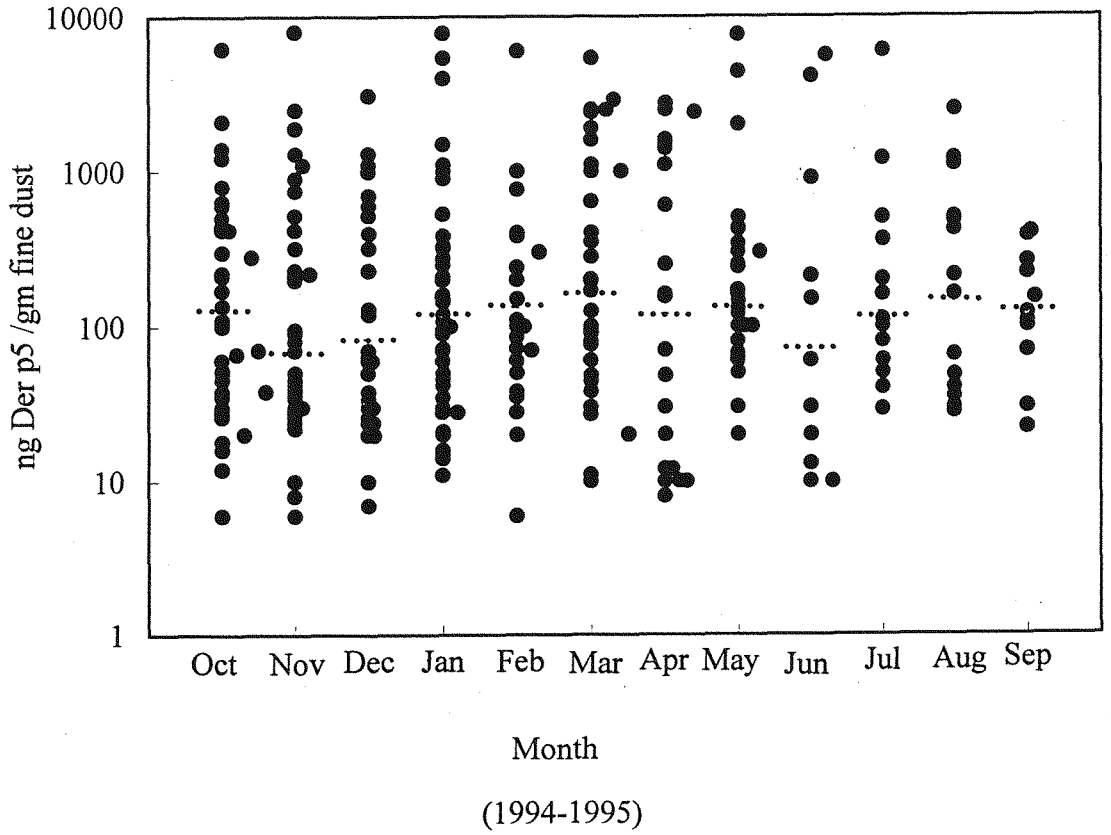
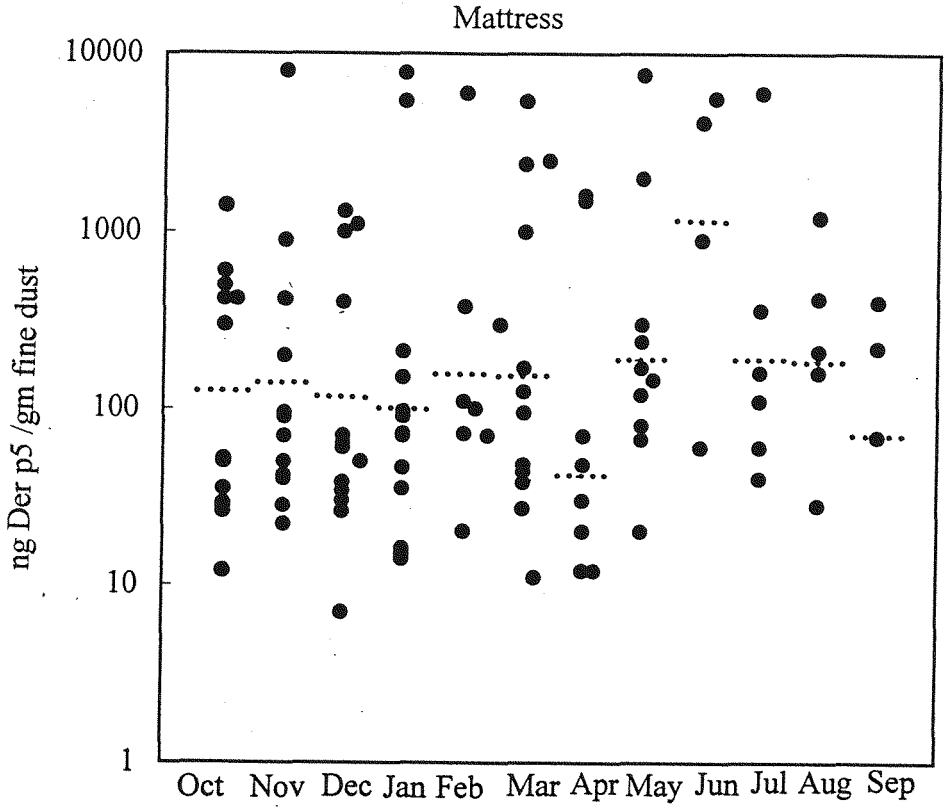


Fig 6. 台中地區室內外環境的溫度濕度分佈圖



GM	115	86	97	115	126	195	122	188	91	148	181	120
S.E	2.3	2.1	2.4	2.2	2.4	5	4.7	6.2	7.5	9.3	12.9	10.9

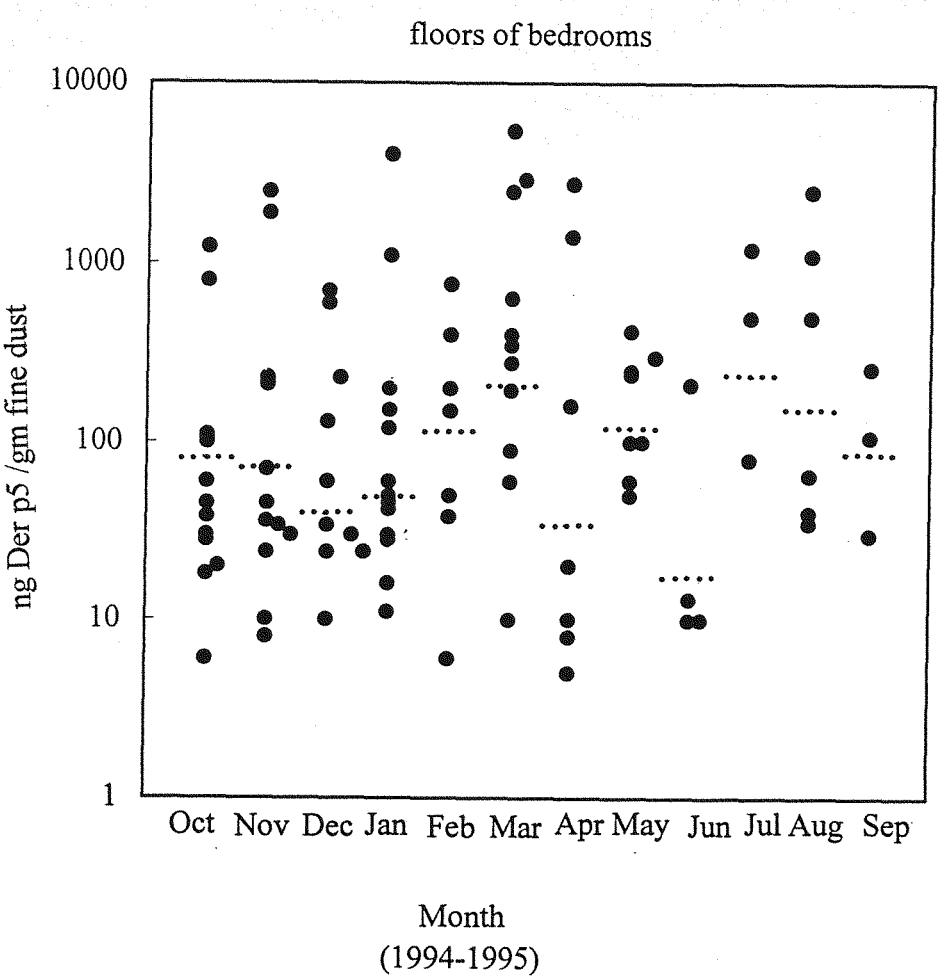
Fig.7 Seasonal variation in distribution of Der p5 concentrations in house mite allergic patients



(1994-1995)

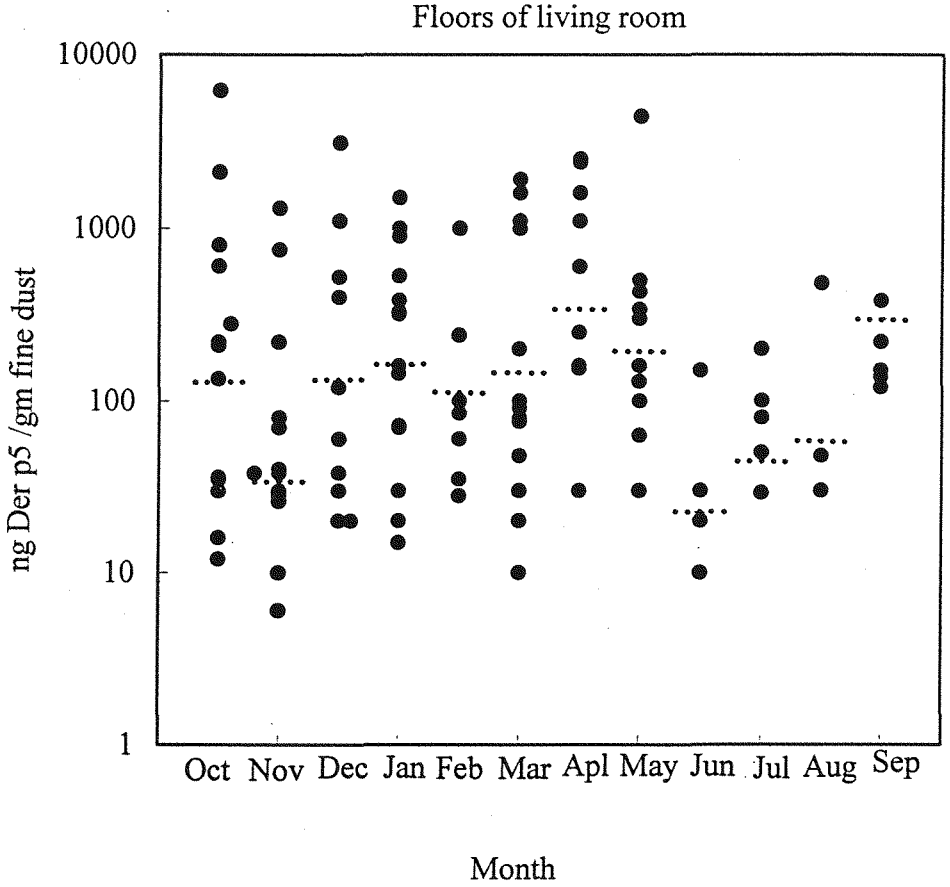
GM	128	151	114	108	172	173	62	226	1055	212	216	85
S.E	12.8	13.7	9.5	9	21.5	144.4	7.75	22.6	263.8	35.3	43.2	28.3

Fig.8 Seasonal variation in distribution of Der p5 concentrations in house mite allergic patients from mattress



GM	88	85	61	80	110	315	56	130	23	363	224	94
S.E	7.3.	7.1	5.1	6.7	15.7	28.6	8	18.5	5.8	121	37.3	31.3

Fig.9 Seasonal variation in distribution of Der p5 concentrations in house mite allergic patients from floor of bedroom .



GM	135	51	135	181	103	143	473	228	31	74	88	380
S.E	12.2	4.6	13.5	15.8	14.7	11.9	59.2	22.8	7.75	14.8	29.3	37.6

Fig.10 Seasonal variation in distribution of Der p5 concentrations in house mite allergic patients from floor of living room

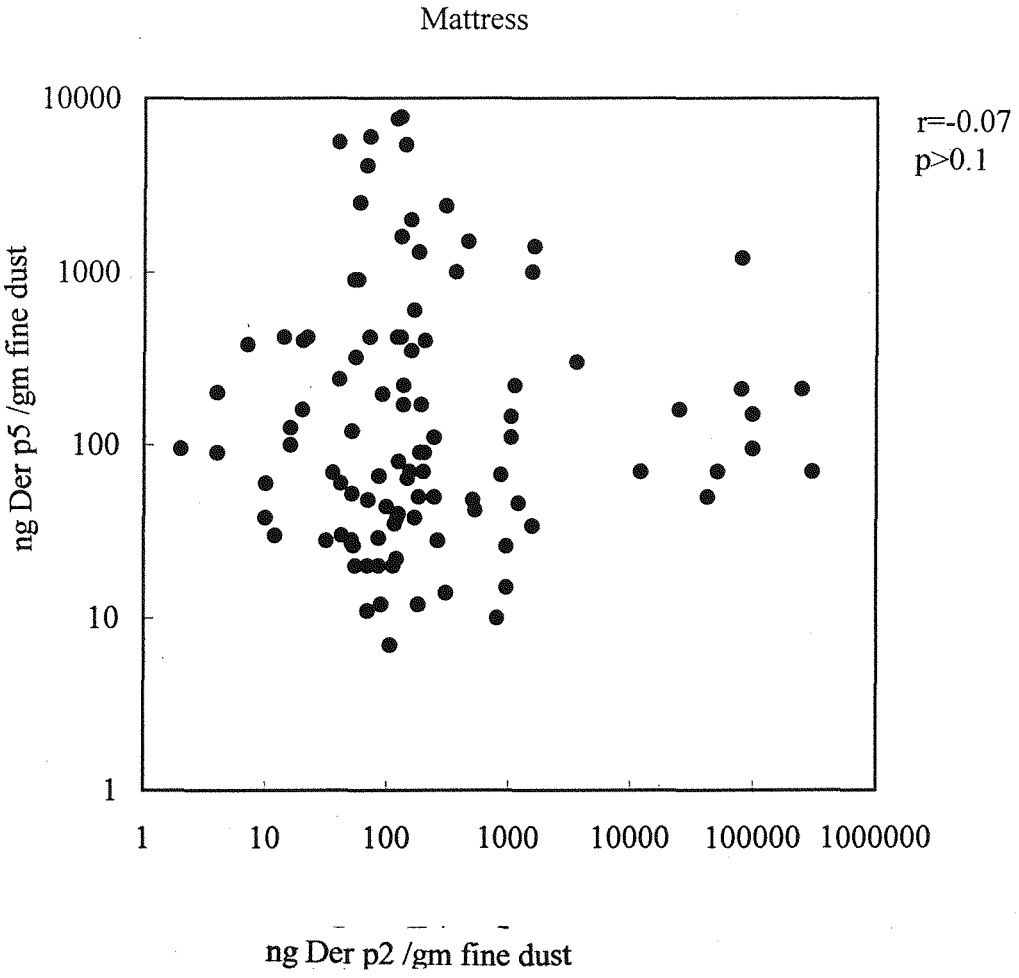


Fig. 11 Correlation between nDer p2 and r Der p5 allergens expressed in ng/gm of fine dust in house dust mite allergic patients from mattress.

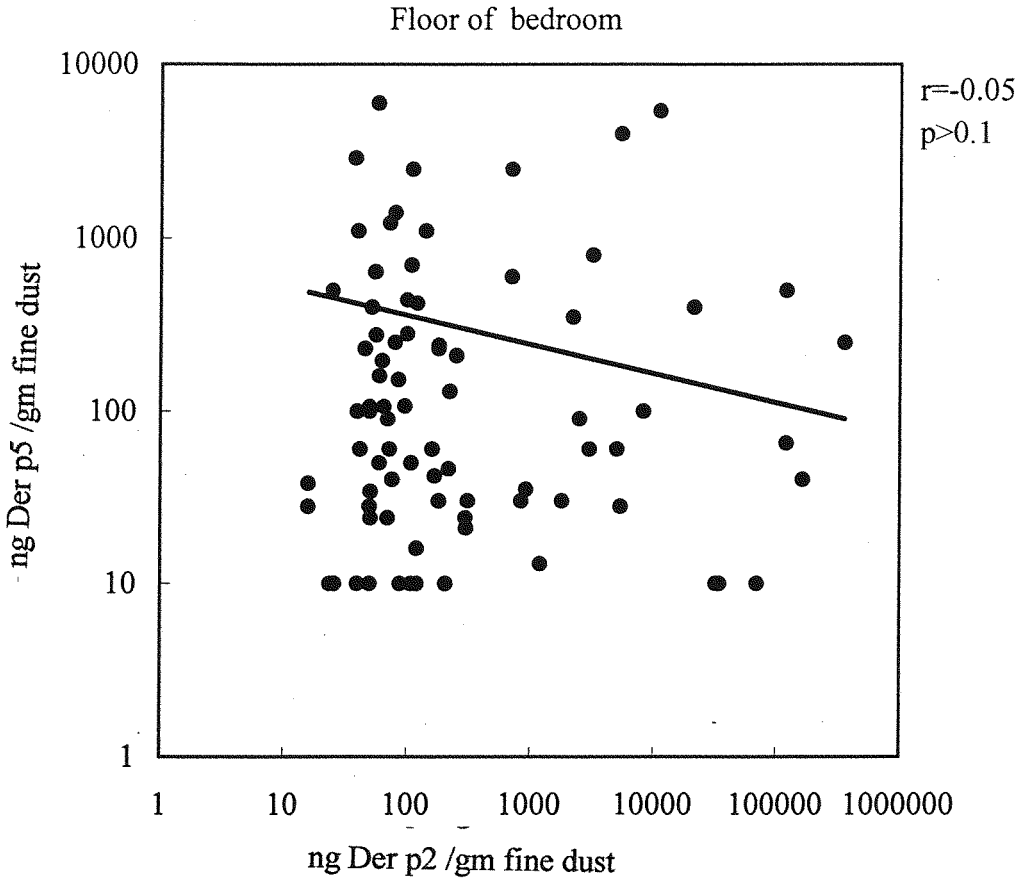


Fig.12 Correlation between nDer p2 and r Der p5 allergens expressed in ng/gm of fine dust in house dust mite allergic patients from floor of bedrooms .

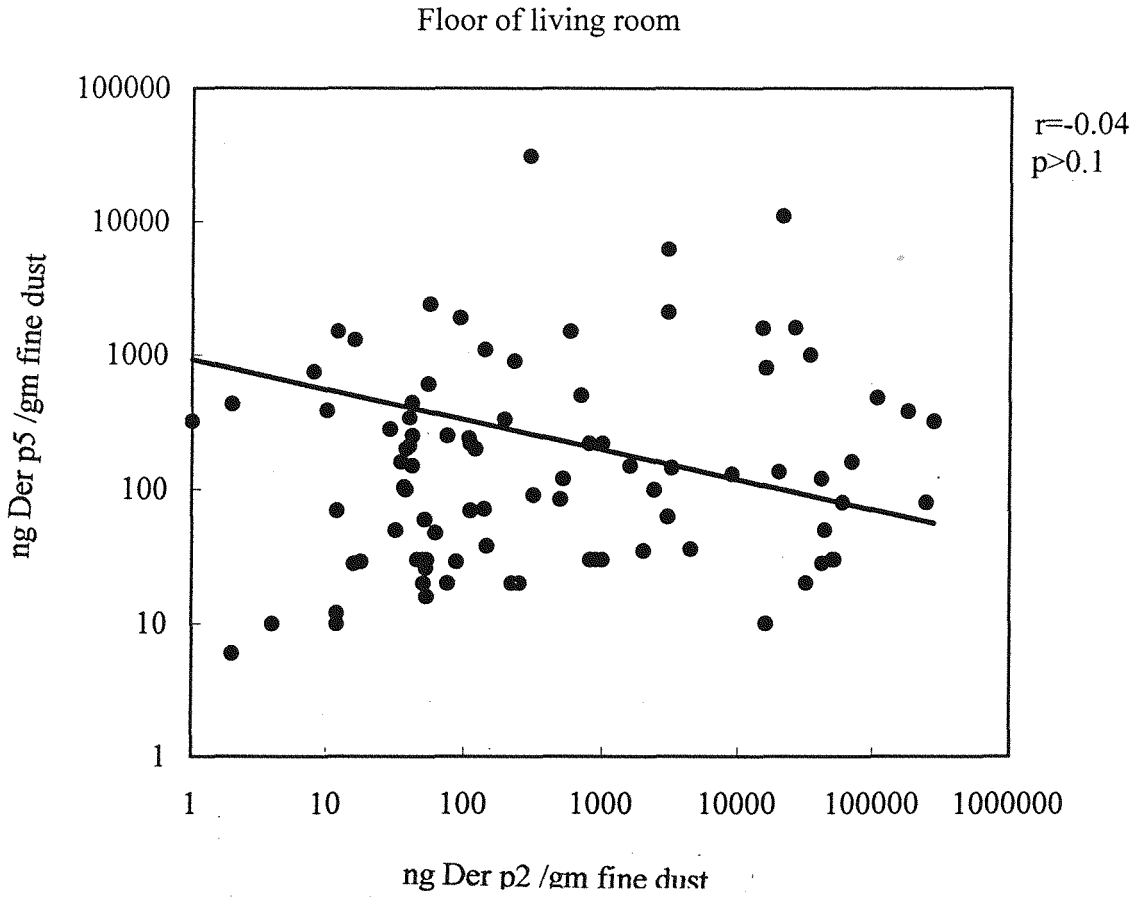
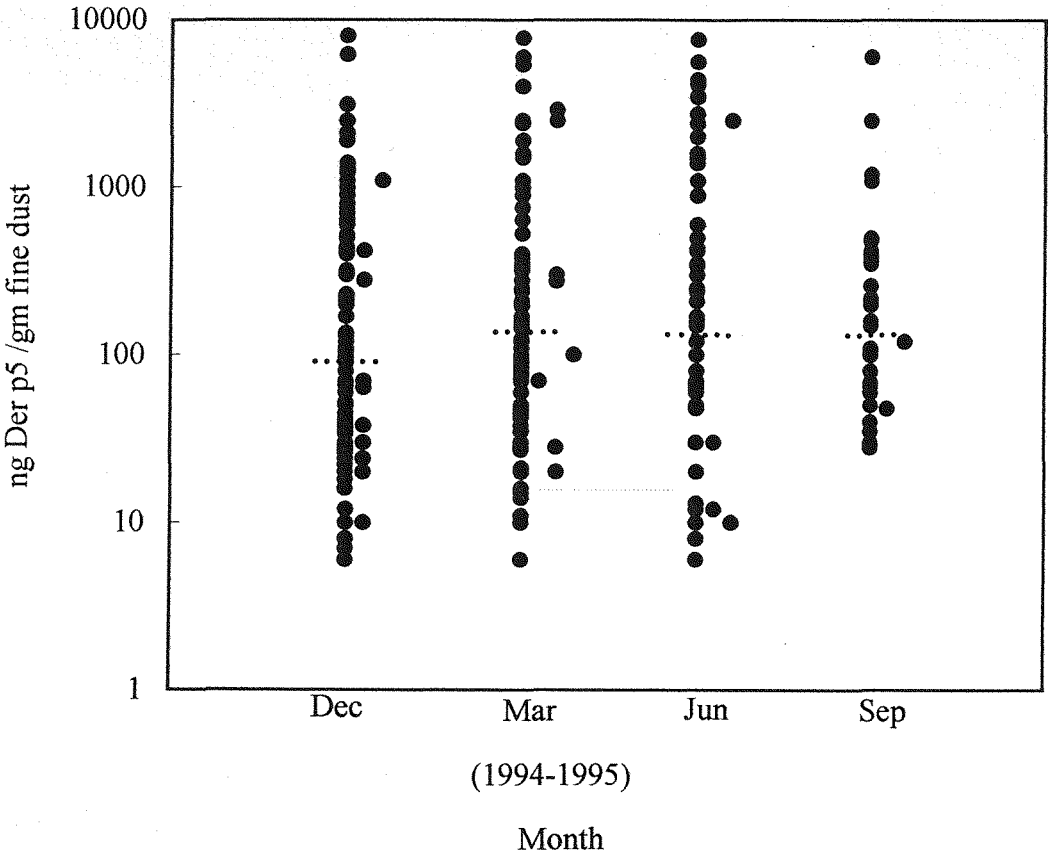
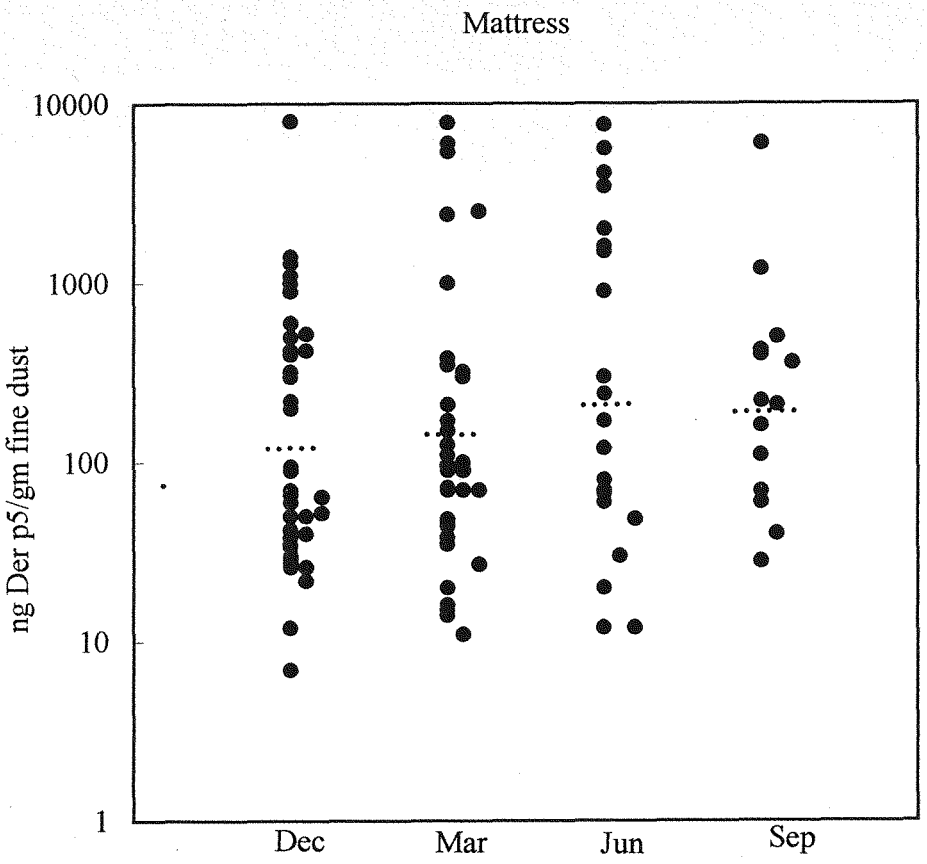


Fig.13 Correlation between nDer p2 and r Der p5 allergens expressed in ng/gm of fine dust in house dust mite allergic patients from living room.



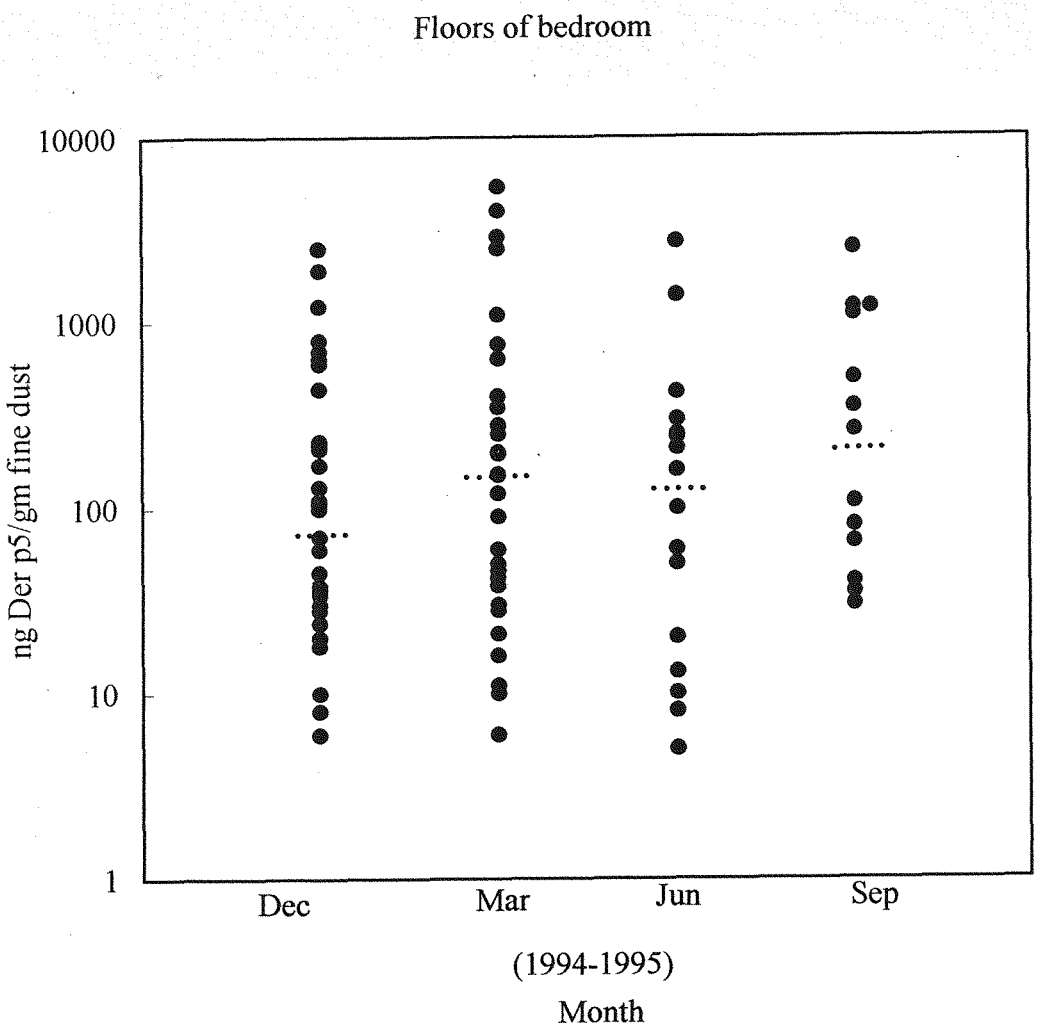
	Oct	Jan	Apr	Jul
GM	99.7	146	145.3	137.1
S.E	0.77	1.27	2.14	3.36

Fig.14 Seasonal variation in distribution of Der p5 concentrations in house dust allergic patients



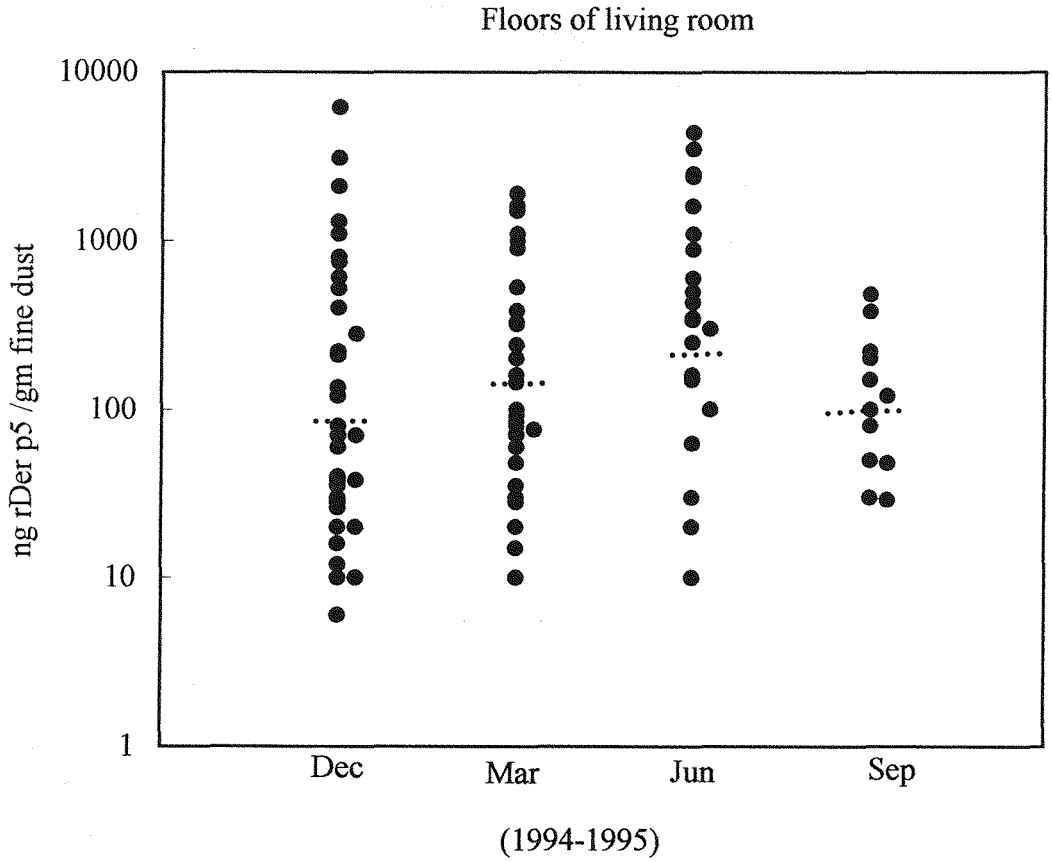
	Oct	Jan	Apr	Jul
GM	129.5	139.8	222.6	206.9
S.E	2.8	3.5	4.6	15.9

Fig.15 Seasonal variation in distribution of Der p5 concentrations in house dust allergic patients from mattress



	Oct	Jan	Apr	Jul
GM	77.6	131.5	116.1	213
S.E	1.8	3.6	3.1	19.4

Fig.16 Seasonal variation in distributionof Der p5 concentrations in house dust allergic patients from floor of bedrooms



	Oct	Jan	Apr	Jul
GM	96.7	149.1	216.1	95.9
S.E	2.4	4.14	5.7	7.9

Fig.17 Seasonal variation in distribution of Der p5 concentrations in house dust allergic patients from floor of living room

第 二 部 份

台灣地區過敏病童血清中對家塵蟎過敏原特異性 IgE 和 IgG 效價之比較

第 二 章 台灣地區過敏病童血清中對家塵蟎過敏原特異性 IgE 和 IgG 效價之比較

第一節 前 言

臺灣家塵蟎是造成氣喘的重要過敏原,當然並非所有氣喘都是由塵蟎蟎誘發,其他過敏原亦有可能引發氣喘,諸如花粉,蟑螂等過敏原。在臨床上,常用皮膚反應性(skin test)來判定是否對家塵蟎過敏,然而這些方法只能知道病人是否對塵蟎過敏反應, 蟎有七種過敏原,那一種過敏原才是真正觸發過敏反應,抑或七種都參與過敏反應?只從皮膚反應性的結果是無從得知的。

我們知道,在第一型過敏反應中,過敏原特異性 IgE 在致病機轉中扮演者重要角色.過敏病人血清中的 IgE 力價會上昇(Philip B., et al 1987).除 Total IgE 力價上昇外, 過敏原特異性 IgE 也會明顯上昇(Lin KL et al., 1991),因此,我們若能比較病人血清中七種過敏原效價之差異,應可歸納出那一種過敏原在疾病扮演著較重要角色。

初步想了解台灣地區氣喘病童,其不同過敏原特異性 IgE 之間關係,以了解台灣地區氣喘病童,究竟是那一種過敏原較重要,此結果不但對致病機轉的研究有所助益, 且可提高減敏治療上的一些訊息,此外,本實驗室有 Der p2 兩種 isoform ,S2R 來自澳洲,II-8 來自台灣, 我們也想了解此二者之間的 IgE 陽性反應百分比是否有

所差異。

研究目的有二:

1.對蟎過敏之氣喘病童,我們將以 RIA 之方法分析對 Der p1 、 2 、 5 、 7 特異性 IgE 與 IgG 之效價.

2.兩種來自不同地理位置之 Der p2 isoform ,本土型 II-8 之特異性 IgE 效價是否高於澳洲型 S2R?

第二節 實驗材料與方法

血 清

病人分別來自台大醫院小兒科門診經治療氣喘病童,年齡 10 -15 歲, 及另一組未經治療氣喘病童,均經 RAST 測試對家塵蟎抗原(Dermatophagoides pteronyssinus) 呈陽性反應,取得全血後,經 3000 rpm 離心將血清取出,存放於 -20 ℃冰櫃中, 以測試血清中 IgE 、 IgG , 4 位健康孩童當對照組及 20 位嬰兒臍帶血。

Der p2 之 S2R 與 II-8 二個 clone 、 Der p5 、 Der p7GST 重組融合蛋白質製備及純化:

Der p2 之 S2R 及 II-8 二個 clone,Der p(W2T2),Der p7 clone 已接於 pGEX-2T 載體中, pGEX-2T operon 含有一 lac,可於化學物 IPTG 誘導後大量表現出融合蛋白及 lac Z 及 AMP 25 selection

marker 。先將含有 Der p2 、 Der p5 、 Der p7 clone 的大腸桿菌 37℃ 隔夜培養,以 10 倍稀釋於含有 100ug/ml Ampicillin 的培養液(L -broth) 中，於 37℃振盪培養 2 小時至 O.D 600 值於 0.4-0.6 時,加入 IPTG(isopropyl beta D-thiogalactoside)(sigma)至 0.1 mM ,繼續培養 2 小時後將菌液離心(Backma) 9000 rpm ,10 分鐘,沉澱物經 TBS(Tris buffer saline)洗過三次 最後用 TBS 調至原培養液之 1/100 體積;置於 Braun 瓶內並含其體積一半量的 0.1 mm 玻璃珠, 之後加入 lysozyme (10 mg Lysozyme /40 ml TBS)置室溫 30 分, 再加入 gCl2(1M);DNaseI(10mg/ml) ;Apotinin200ul,PMSF(Phenyl methyl sulfonyl fluoride 100 mM),則在每一次進行振破菌體前立即加入。置於均質振盪機(B.Braum Hamburger)振盪三次,每次 1 分鐘,中間並以冰浴將之降溫,將均質化後之產物,以離心(Hettich ZETRIFUGEN)15000 rpm 10 分鐘.取上清液加入 0.5 M EDTA,通 millipore(1.2 uM),再利用 Glutathion 吸附性管柱(Sigma)進行 GST 融合蛋白純化,使用前需加入蒸餾水使之吸水復原,欲純化一升的菌液約需 50mg 的乾燥過的 bead, 當 bead 吸水膨脹後,將之充填入色層分析用管柱(Chromatography column, Bio-Rad), 將之靜置一段時間使 bead 沉澱至管柱底端, 接著利用約 200ml 的 TBS 溶液沖洗 bead,之後便將 sample 通過管柱, 完成後利用 TBS 溶液加以清洗, 直到 OD 值小於 0.003 , 即表示一些非特異性的結合已經去除後, 再以 elution buffer (5mM reduced glutathion,50mM Tris, pH8.0)將 GST 融合型蛋白置換出來而加以收集,經 4℃隔夜於 PBS 溶液中透析。

重組融合蛋白質定量分析

測定蛋白質濃度所使用的廠牌為 (Bio-Rad Protein Assay), 其原理是利用一可與蛋白質結合的染料與蛋白質

作用後在 595 nm 的波長下比色，依據吸光度來計算蛋白質的濃度,測定之初先用一已知濃度的 BSA (Bovine Serum Albumin)溶液定出標準曲線，sample 中的蛋白質與試劑反應後，可在標準曲線中依據 O.D 值算出蛋白質的濃度。

天然型 Der p1 抗原蛋白質(native Der p1 nDer p 1)：

事先準備 coupling monoclonal antibodies(利用親和力色層分析柱)，準備 spent mite medium 再利用 1M NH4OH (pH11)將 nDer p1 引流下。

Dermatophagoides pteronyssinus 粗製蟎萃取液(Crude mite extract).

以 1 克的蟎體,加上 100 ml 乙醚振盪 24 小時去脂,均質化後不斷地與 100 ml 之 PBS 緩衝液攪拌 36 小時,經離心後,將上清液存放於-70 ℃ 。

含有蟎抗原之培養液(Spent mite medium).

秤取 100 克 spent mite medium 溶於 100 ml PBS 中,於 4 ℃ 中攪拌,隔日以 9000 rpm 離心 30 分鐘,取出上清液,加入 NaN3(sodium azide) 至 0.01%,置於 4 ℃ 保存 。

Mouse anti human IgE mAb (2.1.5)

來自台灣大學醫學院免疫研究所蔡考圓博士贈與。

同位素化之單株抗體:

利用 Sephadex-G25 分離游離之 $^{125-}$I 及 $^{125-}$I labeled anti -human IgE mAb, 這是利用分子量不同來分離大、小物質。大分子(如 antihuman IgE mAb)較早收集到，小分子 (如游離 $^{125-}$I) 較

晚被收集到。一般第一次放射性強的物質約在 7-9 管出現,此即所要的 $^{125-}$I labeled antihuman IgE mAb; 另一個尖峰則出現較晚,為未標幟上的游離 $^{125-}$I . chloramine T 可將 $^{125-}$I 標幟到抗體上,主要是利用氧化劑 chloramine T 將 Na $^{125-}$I 氧化成活化狀態 ,使 $^{125-}$I 主要附著於 Tyrosine 或少部分的 Histidine 上; 所以成功與否, 氧化劑佔有很重要的地位; 最好在進行氧化作用前, 才新鮮配製好 chloramine T.

天然型 Der p 1(native Der p1)、含有蟎抗原之培養液； Der p 粗製蟎萃取液與 Der p2 之 S2R 和 II-8 、 Der p5 、 Der p7 所得融合蛋白質及 GST 以 15% sodium sulfate polyacrylamide(SDS PAGE)分析評估分子量。

測血清中對蟎抗原之特異性 IgE 、 IgG 在 RIA(radioimmuno assay)反應的飽和濃度測定

為了瞭解在 RIA 反應中適當血清的抗體濃度稀釋的使用,以便未來在臨床血清學測定,分別 coating 1ug/100ul,spent mite medium 、 nDer p 1 、 r Der p2-GST 、 rDer p 5-GST 、 rDer p7-GST 、在 96 well 的 microtiterplate 然後加入 100ul 以 10 、 100 倍血清稀釋 IgG 及 5 倍血清稀釋 IgE 以 RIA 方法偵測,結果發現血清 IgE 稀釋 5 倍與血清 IgG 稀釋 100 倍已達飽和濃度。

放射免疫分析法(Radioimmunoassay;RIA)

將含有 spent mite medium,Der p 2-GST 融合蛋白質 (S2R, Ⅱ-8)Der p5-GST 融合蛋白質,rDer p7 融合蛋白質,及 nDer p1 與 GST 之蛋白質的量吸附於 microwell plate (NUNC polysorp)，每一個 well 中加入 100ul(1ug)並置於 4 ℃ 培養隔夜之後, 用 TNT(TBS

-Tween0.05%)清洗 well 三次，然後於每個 well 內加入 200ul 5% non-fatty milk 於每一個 well 中於 37℃ Incubator 中反應 1 小時，然後用 TNT 清洗 4 次，在面紙上吸乾 well 上殘餘的 Buffer，然後再加入病童稀釋血清檢體 100 ul(測試 IgE 的血清是稀釋 5 倍,IgG 為 100 倍)及嬰兒臍帶血和正常小孩血清(IgE 值正常,也以相同稀釋倍數),並於 37℃ 中反應 1 小時,再用 TNT 清洗 8 次,加入以 TNT 稀釋標幟 $^{125-}$I 的 Anti-human IgE 或 $^{125-}$I Protein A 100ul (2x 100000 cpm/ 1ml),並於室溫中反應 2 小時,以 TNT 清洗 well 10 次，置於 γ - Counter 中計數其 cpm 。

統計方法:

將其分成 10 組再依據 cross match process 做比較分析.

Group I-nDer p1 與 rDer p2-GST 之(S2R)

Group II- nDer p1 與 rDer p2-GST 之(II-8)

Group III- nDer p1 與 rDer p5-GST

Group IV- nDer p1 與 rDer p7-GST

Group V- rDer p2-GST 之(S2R) 與 rDer p2-GST 之(II-8)

Group VI- rDer p2-GST 之(S2R)與 rDer p5-GST

Group VII- rDer p2-GST 之(S2R)與 rDer p7-GST

Group VIII- rDer p2-GST 之(II-8)與 rDer p5-GST

Group IX- rDer p2-GST 之(II-8)與 rDer p7-GST

Group X- rDer p5-GST 與 rDer p7-GST

第三節 結果

Mite allergy 分子量呈現:

crude mite extract 呈現一低分子量 14 kD, nDer p 1 分子量為 25kD,rDer p2 -GST(S2R),(II-8)分子量為 43kD(本身為 16 kD 及 27 kD GST)、 rDer p5 -GST 為 42kD(本身為 15 kD),rDer p 7- GST 分子量為 49 kD(本身為 22kD)這些融合型蛋白質和自然型蛋白質的表現及純化則由(Fig.1)的 SDS-PAGE 加以分析並確定之。

IgG 對 mite allergy 反應性之比較:

選取 40 位經診斷為對蟎抗原過敏之病童血清,取至實驗室庫存 (-20 ℃ 保存),利用放射免疫分析法測試血清對 Spent mite medium, nDer p 1,及含 rDer p 2-GST (S2R, Ⅱ-8) 及 rDer p 5-GST 與 rDer p 7-GST,結果顯示病童血清對以上所有過敏原形成之 IgG 反應都有一致性的反應,且彼此間並沒有顯著的差異 (P>0.1)。(Table .1)

IgE 對 nDer p 1, rDer p2-GST (S2R, Ⅱ-8), rDer p5-GST,及 rDer p7 -GST 反應性之比較:

病童之血清對含有蟎抗原之培養液之反應結果顯示;最小值為 0.77 最大值為 17.5 中間值為 1.5(Table.2.),根據初步評估可能是含有蟎抗原之培養液中蟎抗原成分較少,所以測出值較低。

IgE 對 mite allergy 反應性之比較:

反應結果顯示 40 位病童血清對 nDer p 1 IgE 之反應性佔 10 位 (25%) ,rDer p2-GST(S2R) IgE 之反應性佔 9 位 (23%), rDer p 2-GST(Ⅱ-8) IgE 之反應性佔 16 位(40%), rDer p5 -GST IgE 之反

應性佔 17 位(43%), rDer p7 -GST IgE 之反應性佔 10 位(25%) (Table.3.),測另一組未治療之 24 位病童血清對 mite allergy 反應性均有偏高之現象(Table .4)

IgE 對 nDer p1 與 rDer p2-GST(S2R), (Ⅱ-8), rDer p5 -GST, rDer p7 間相關性:

病童之血清對 nDer p 1 與 rDer p2-GST(S2R) IgE 間之相關係數 r=0.133(p>0.1) (Fig.2.).與 rDer p2-GST(Ⅱ-8) IgE 反應性之比較,相關係數 r=0.043(p>0.1)(Fig.3.).與 rDer p5-GST IgE 反應性之比較,相關係數 r=-0.05(p>0.1) (Fig.4.).與 rDer p 7 -GST IgE 反應性之比較,相關係數 r=0.03(p>0.1) (Fig.5.), 相關係數沒有達到統計顯示水準。

IgE 對 rDer p 2 二個 isoform; S2R 與Ⅱ-8,其間反應性之比較:

反應結果顯示 S2R 與 II-8 兩個 isoform,相關係數 r=0.194(p>0.1) ,相關係數沒有達到統計顯示水準(Fig.6.).

IgE 對 rDer p 2-GST (S2R) 與 rDer p5-GST. rDer p 7-GST 反應性之比較:

rDer p2-GST (S2R)與 rDer p5-GST 二者之間 IgE 反應性間之相關係數 r=-0.102 (p>0.1) (Fig.7.).與 rDer p7 IgE 反應性其相關係數 r=-0.08 (p>0.1),相關係數沒有達到統計顯示水準(Fig.8.)

IgE 對 rDer p 2-GST (Ⅱ-8)與 rDer p 5-GST, rDer p 7-GST 反應性之比較:

Ⅱ-8 與 rDer p 5-GST 間相關係數 r=0.733,(p<0.05)(Fig.9.).與 rDer p 7GST 之間相關係數 r=0.58,(p<0.05)(Fig.10.).與 rDer p 7-

GST 間相關係數 r=0.468,p<0.05(Fig.11.)其皆呈正相關,達到統計水準.

第四節 討論

以往研究過敏疾病之最大困難則是過敏原取得,但目前可由重組融合蛋白質發展而改善,因以往皆由蜱粗製萃取液中取得,且是商品化,其抗原成份含量不一又少,因此難以標準化,也比較不易取得(Meyer CH et al ., 1994),而本實驗所用之材料為重組融合蛋白質,其利用 IgE 菌斑放射免疫分析法選殖過敏基因,再將此殖入大腸桿菌中表現,得重組融合蛋白質,優點:可得大量純化過敏原,因此更方便應用過敏疾病機轉之研究,以往利用 Western blotting 方法,缺點是無法量化,而本實驗設計採用 RIA 方法,優點可量化,其間差異不大,更可看出抗體間之變化, 但 GST 為來自日本血吸蟲(*schitoma japonicum*),(Smith DB et al ., 1988),由於寄生蟲在免疫反應上常會引起 IgE 反應,所以在試驗中會造成結果判讀之困擾,因此本實驗在操作中有加做 GST 當對照,因此可減少干擾之發生。我們在 Table .3 中發現四十位病童血清對各組過敏原之 IgE 反應似乎與文獻上不同, 因此經查證這些氣喘病童病史發現這些病童都已經過治療,而結果又符合 Hsieh KH 等(1987)及 Bousquet J

等(1990),Lin KL 等(1987), 且在另一組未經治療之氣喘病童血清(Table. 4)與各組過敏原特異 IgE 反應,結果顯示其陽性率均偏高,因此病童經治療後 ,對過敏原特異 IgE 會有降低之趨勢.因此便可解釋 nDer p1 反應率只有 25%與 nDer p 2(S2R)反應率有 23%,減敏治療所用之藥物為粗製蟎萃取液,成份中主要含 Der p 1 、 Der p2(S2R),因此會以 Der p1 、 Der p2(S2R)治療為主,而造成反應率下降. 由 Table .3 顯示 Der p2 之兩個 isoform (S2R)(II-8)之反應率,II-8 反應率為 40 位有 16 位反應(40%),而 S2R 反應率為 40 位有 9 位反應(23%),II-8 是利用台灣氣喘病童血清中 IgE 篩選出來,S2R 是利用澳洲病童血清篩出來,而這兩 isoform 分別差在 26 、 47 、 114 胺基酸的改變(Fig.12),第 47 胺基酸的改變:S2R(Thr)-II-8(Ser), 第 114 胺基酸的改變: S2R(Asp)-II-8(Asn), 第 26 胺基酸的改變:S2R(Pror)-II-(Ser),除了從非極性胺基酸變成極性胺基酸外,最重要的是可能會影響蛋白質之立體結構.本實驗室先前利用 Dot blot證實II-8反應強度高於S2R,與我們結果相符合,顯示Der p2 的過敏原在地域性的分佈可能有差異,有可能 II -8 型在台灣地區較具有抗原性.而台大醫學院免疫研究所,為了探討這種 S2R 與 II-8 IgE 結合強度之差異,是否因多變性胺基酸所造成,因此將 S2R,II-8 設計成小片段升肽,分別 包含 S2R 、 II-8 之多變性胺基酸 ,觀察是否可被 IgE 所認識,結果發現位置 26 及 47 之多變性胺基酸會影響 IgE 之反應強度.因此日後如要實施減敏療法則須考慮 isoform, 因其間不同也會影響治療之效果.

Der p5 與 nDer p1 、 rDer p2 、 rDer p7 比較,發現其反應率都較其他過敏原高,即為 40 位病童中佔 17 位(43%),可能治療中所用之治療成份中所含 Der p5 成份較少,也可能對 Der p5 過敏之氣喘病人血清,其血清抗體會特別高,所以對 Der p5 反應特別強而 Lin KL 等(1994)對氣喘病童以皮膚試驗測試 Der p5,其有 58%反應率,

以 Dlot blot 可看出只要有反應,其強度都較強.因此可說明 Der p5 可能在臨床上伴演著重要性.

由 Fig 9,Fig 10,Fig 11,II-8,Der p 5,Der p7 之間相關性發現其係數呈正相關且達統計上意義,因此有部份病人對以上三種過敏原有同時敏感之現象.

展望:

RIA 方法因標識放射線物質,雖其敏感度較高,但其廢棄物須保存一定時間才可拋棄,而且對人也較危險,目前酵素免疫分析法敏感度也不輸 RIA,而如再能善加利用過敏原重組融合蛋白質,則對過敏研究一定有較大供獻,且有更周密思慮,則會有更好之成果.

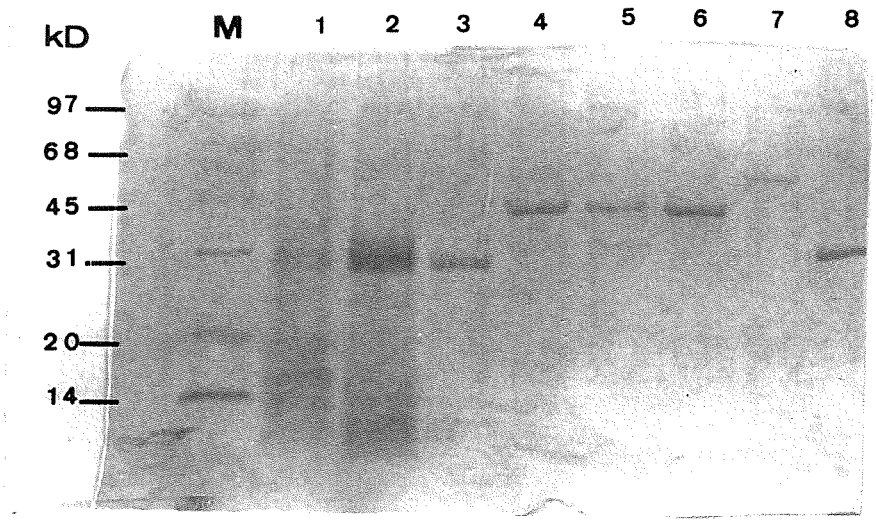


Fig .1 SDS PAGE analysis of purified mite allergens
Lane 1. Molecular weight markers ; Lane 2, crude mite extrat ;Lane 3 , spent mite medium ,Lane 4, nDer p1;Lane 5,rDer p2 -GST(II-8) ;Lane 6, rDer p2 -GST(S2R),Lane 7,rDer p5-GST;Lane8,rDer p7-GST ;Lane 9,GST,samples were analysed on a 15% acrylamide gel.

Table.1.Specific IgG reactivity to mite allergy in allergic patients

	mite	n*Der p* I	S2R	II-8	r*Der p* V	r*Der p* VII
median	1755.6	1262.4	1859.8	906.3	1800.0	1916.0
max	4052.1	3932.2	4565.5	2547.4	3982.7	4793.2
min	794.3	689.6	1046.3	388.6	517.3	669.1

$p>0.1$

Table.2.Specific IgE reactivity to mite allergy in allergic patients

	mite	n*Der p* I	S2R	II-8	r*Der p* V	r*Der p* VII
median	1.5	1.4	0.7	0.9	0.8	0.5
max	17.5	11.8	29.9	126.6	166.5	174.1
min	0.77	0.5	0.7	0.9	0.8	0.5

Table.3.RIA reactivity to mite allergens in allergic patients

Allergens	Reactivity	%
nDer p1	10/40	25
rDer p2(S2R)	9/40	23
rDer p2(II-8)	16/40	40
rDer p5	17/40	43
rDer p7	10/40	25

Table.4 RIA reactivity to mite allergens in lergic patients (untreated)

Allergens	Reactivity	%
nDer p1	24/24	100
rDer p2(S2R)	24/24	100
rDer p2(II-8)	24/24	100
rDer p5	23/24	96
rDer p7	24/24	92

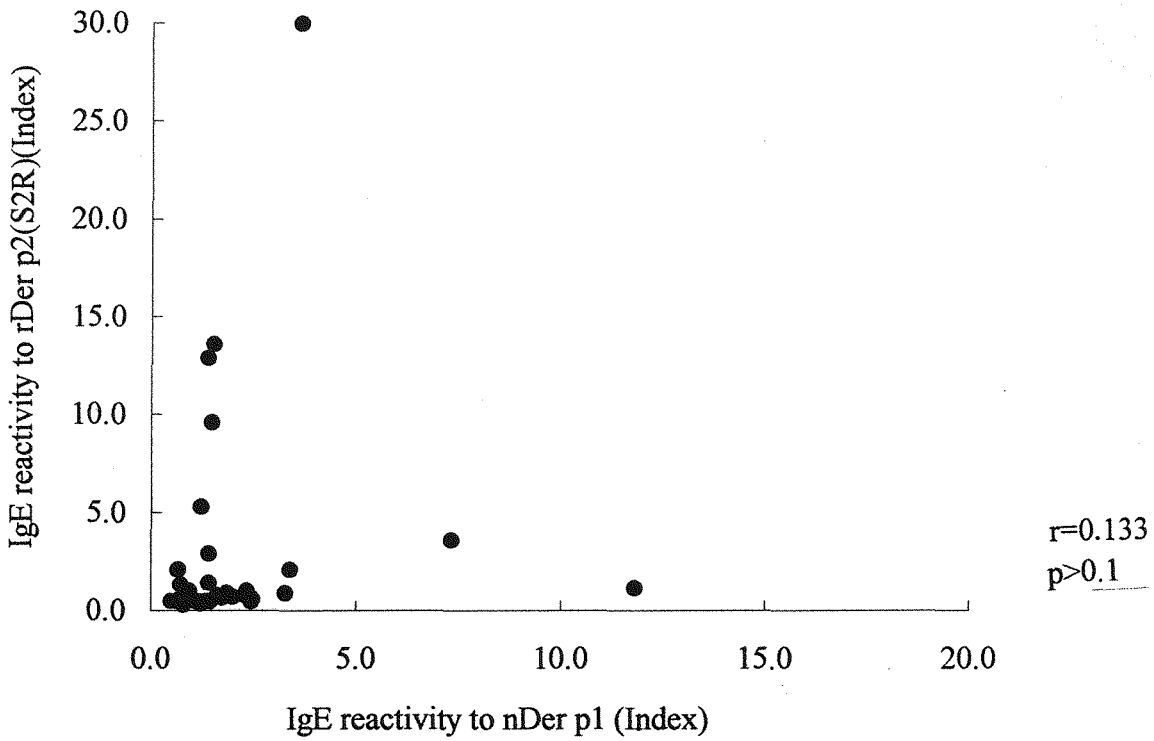


Fig.2.Specific IgE antibodies reactivity to nDer p 1 ,
rDer p2-GST (S2R),in house dust mite allergic patients.

patient serum/cord serum=Index

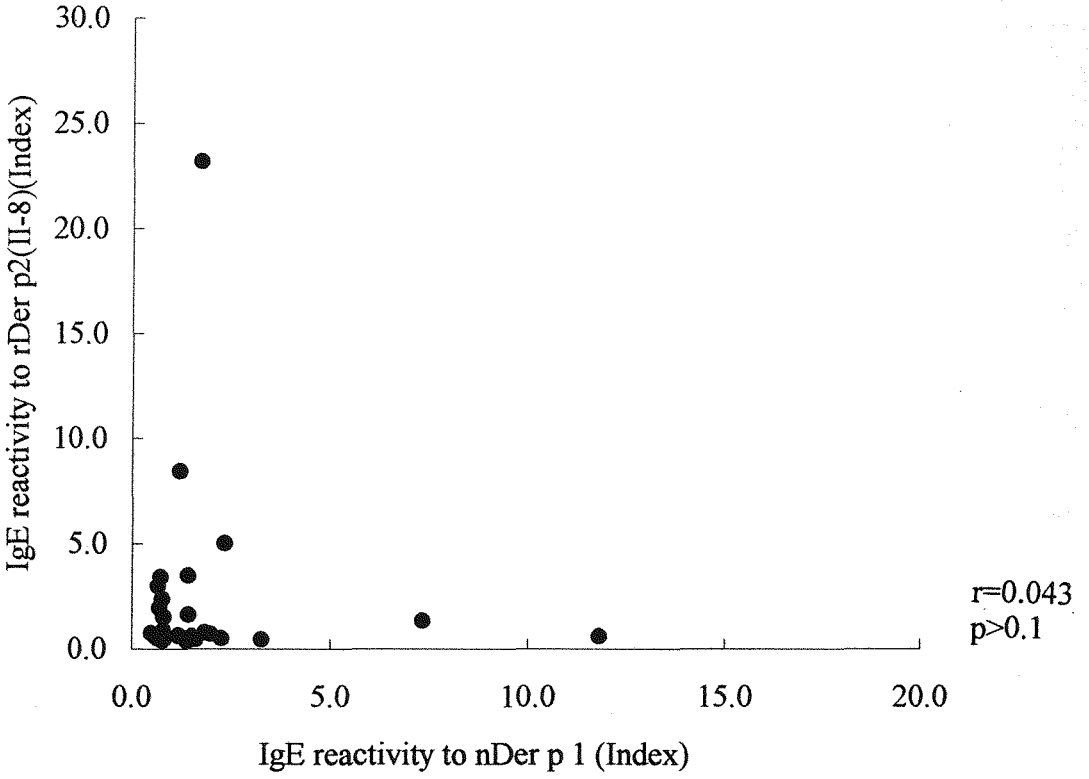


Fig.3 . Specific IgE antibodies reactivity to nDer p1 ,rDer p2-GST(II-8), in house dust mite allergic patients

patient serum/cord serum=Index

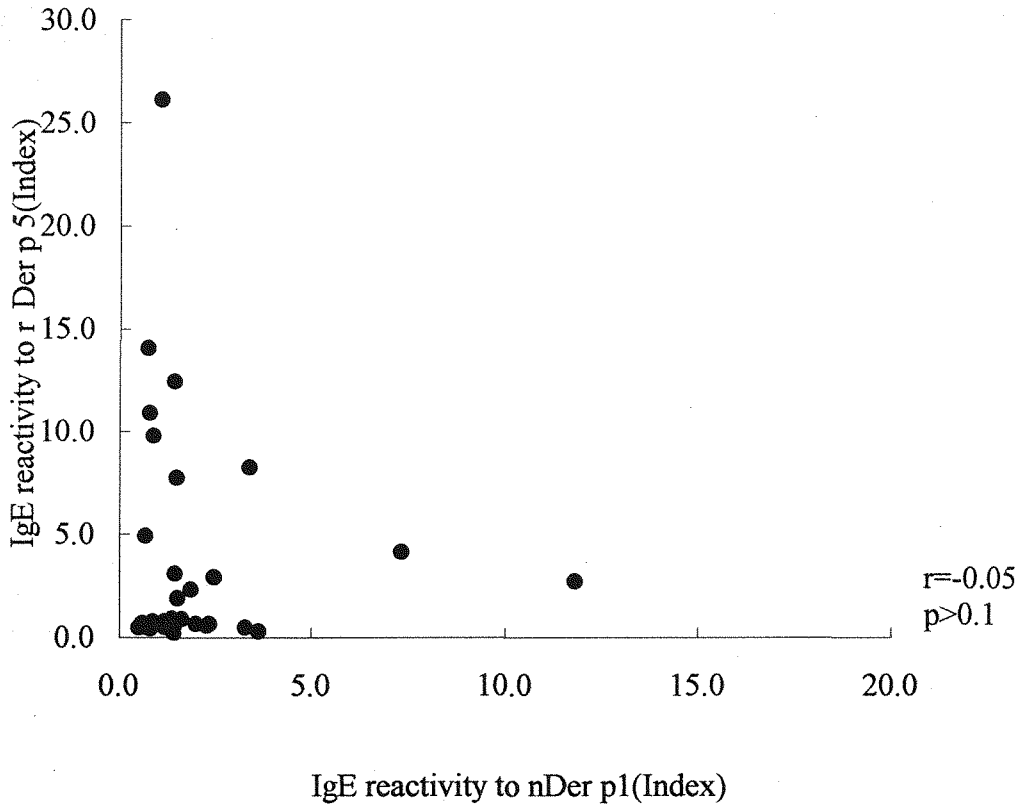


Fig.4 . Specific IgE antibodies reactivity to nDer p1 , rDer p5-GST in house dust mite allergic patients.

patient serum/cord serum=Index

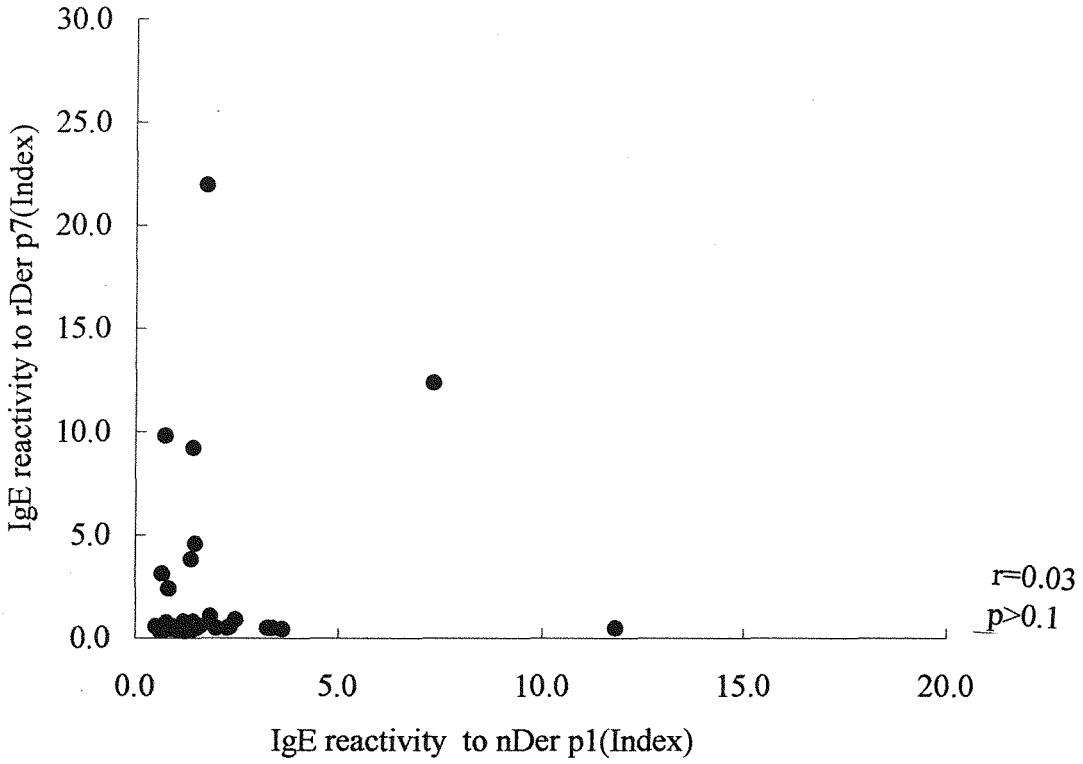


Fig.5 .Specific IgE antibodies reactivity to nDer p 1 ,rDer p7-GST in house dust mite allergic patients.

patient serum /cord serum =Index

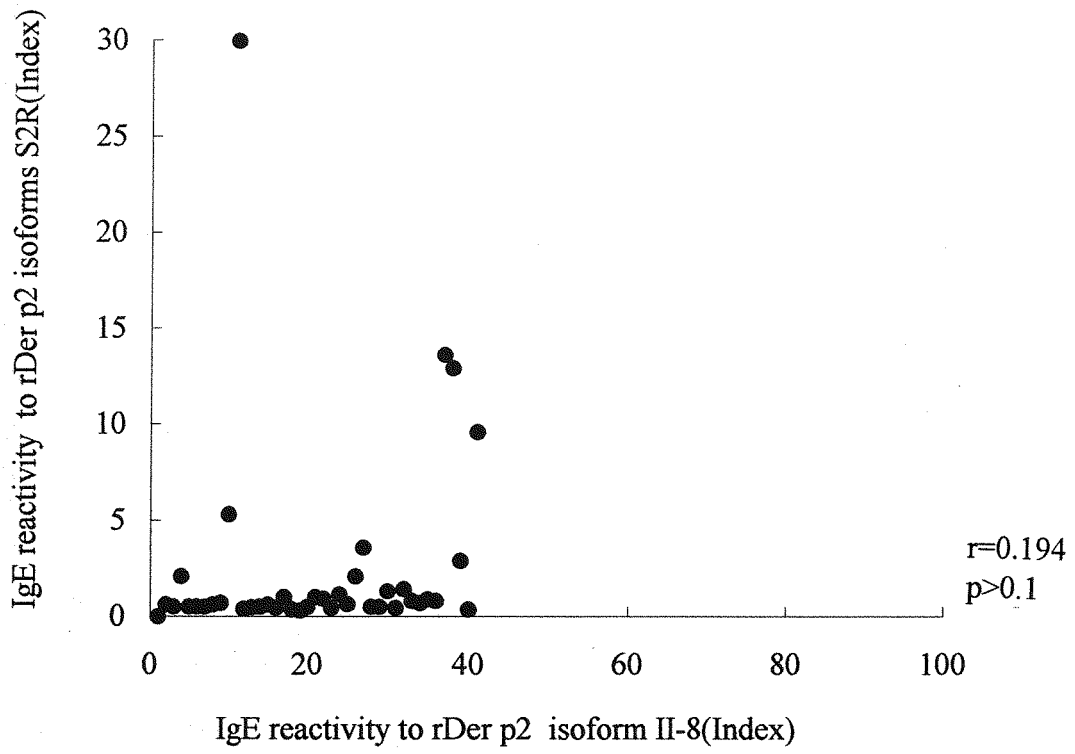


Fig 6.Specific IgE antibodies reactivity to rDer p2-GST (S2R),rDer p2-GST (II-8) in house dust mite allergic patients

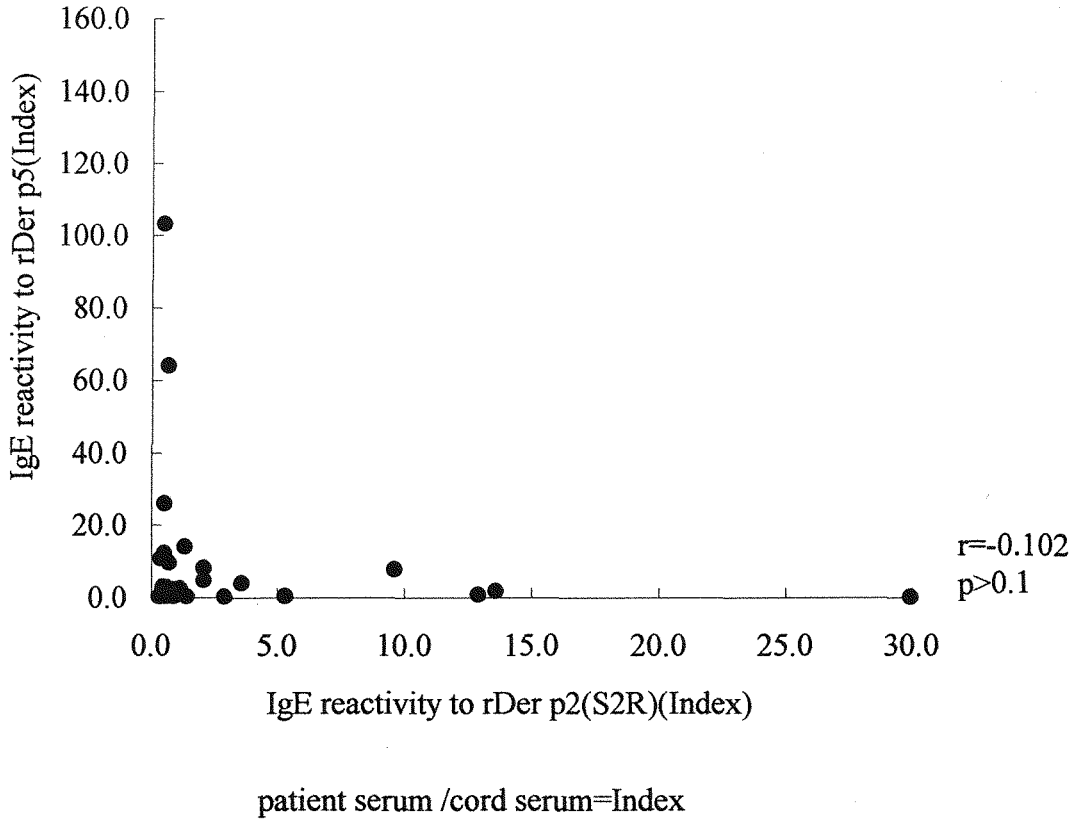


Fig 7.Specific IgE antibodies reactivity to rDer p2 -GST (S2R),rDer p5-GST in house dust mite allergic patients.

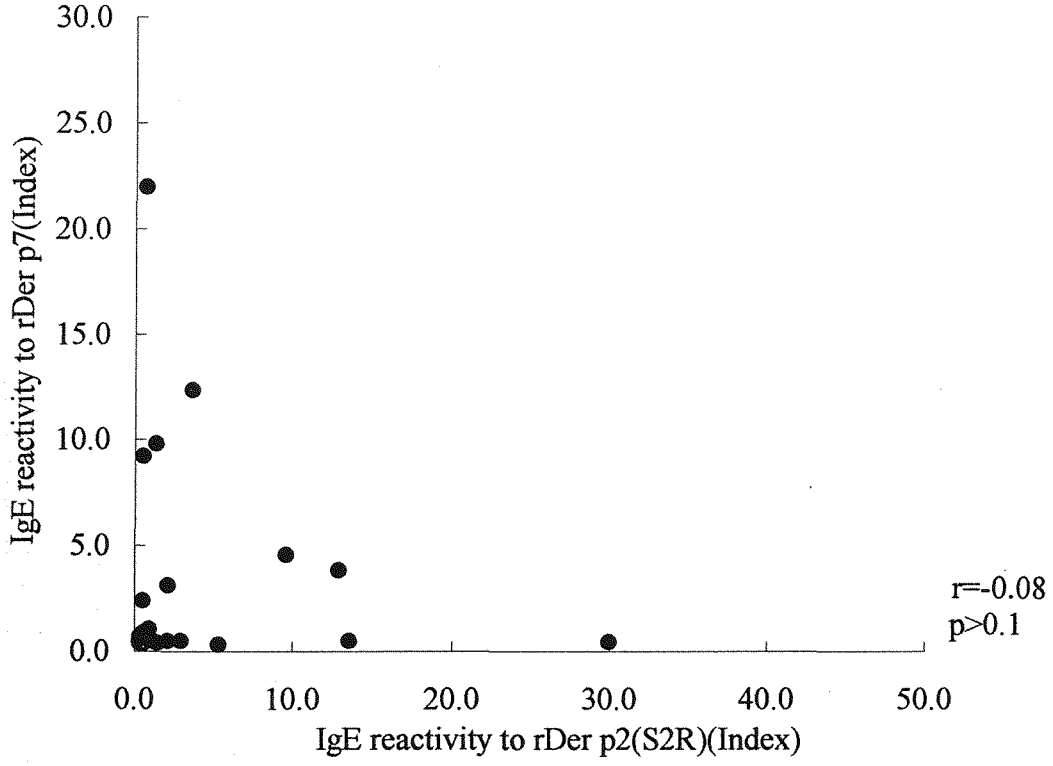


Fig.8 .Specific IgE antibodies reactivity to rDer p2-GST (S2R),rDer p 7-GST in house dust mite allergic patients. patient serum /cord serum=Index

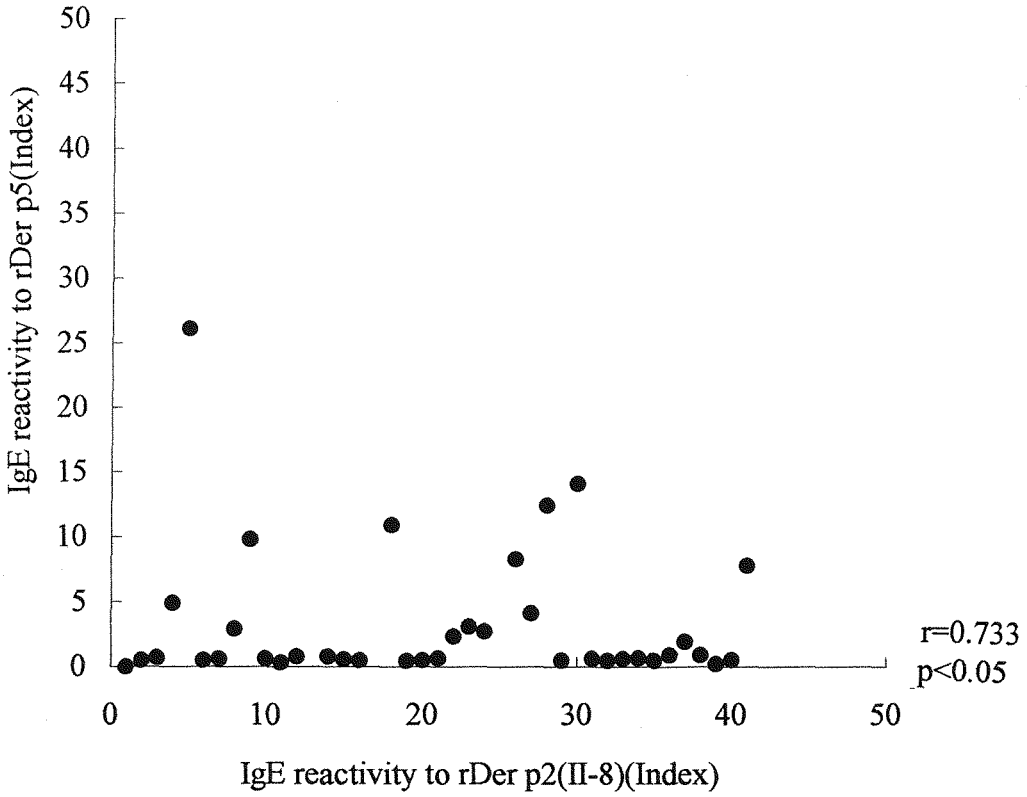


Fig.9.Specific IgE antibodies reactivity to rDer p2-GST (II-8),rDer p5-GST in house dust mite allergic patients.

patient serum /cord serum=Index

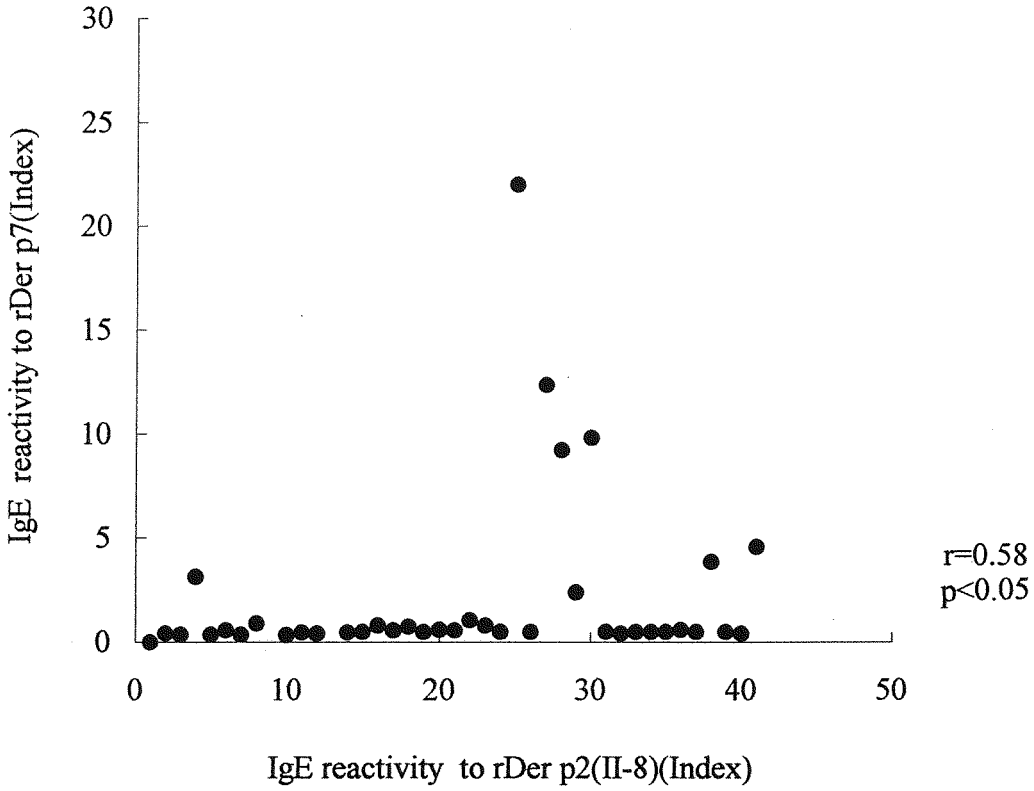


Fig.10 .Specific IgE antibodies reactivity to rDer p2-GST (II- 8),rDerp 7-GST in house dust mite allergic patients.

patient serum/cord serum=Index

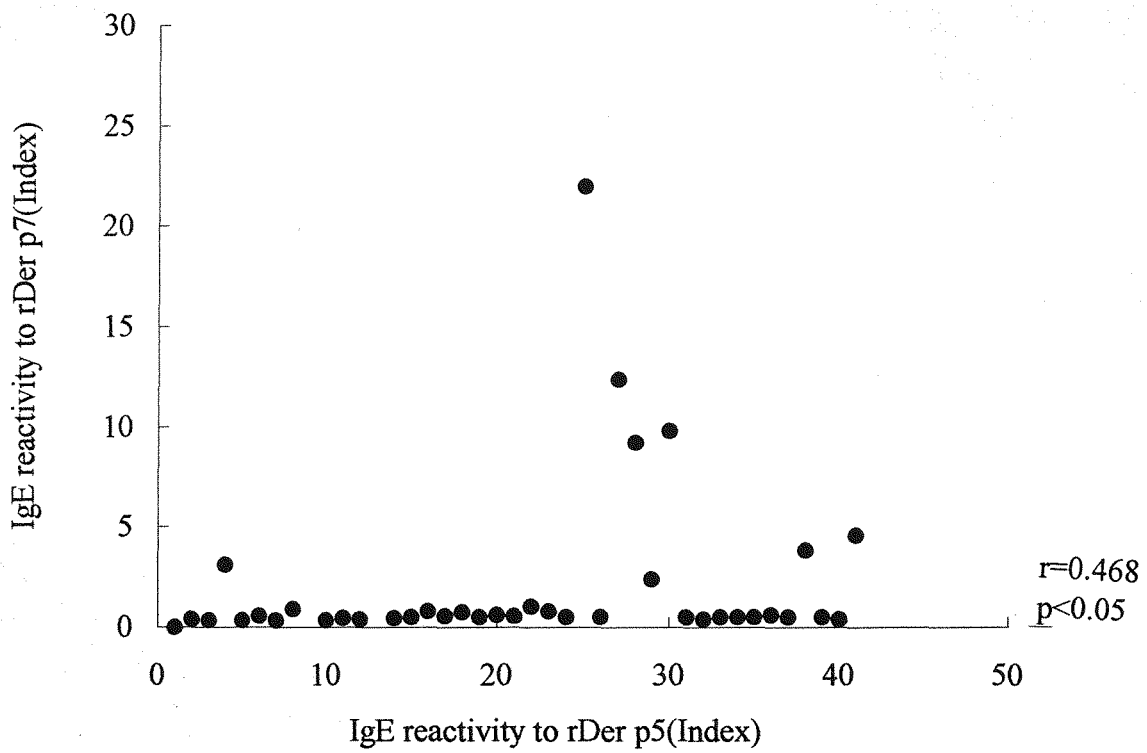
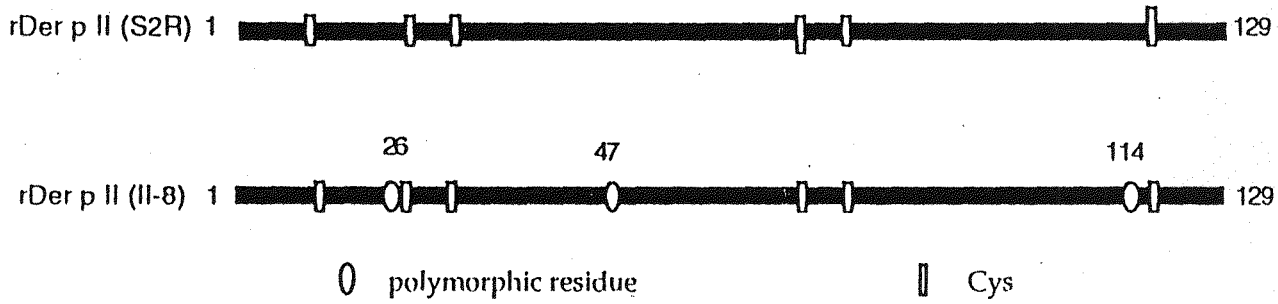


Fig.11.Specific IgE antibodies reactivity to r Der p5-GST , rDer p7 -GST in house dust mite allergic patients

patient serum/cord serum=Index

Fig 12. 圖示二種*Der p* II同質異型體(isoforms)-S2R, II-8之多變性胺基酸位置極多變性胺基酸改變所造成的影響



residue no.	amino acid conversions		remarks
	S2R	II-8	
26	P	S	non-polar to polar
47	T	S	polar & uncharged
114	D	N	#uncharged to charged(-)

D to N resulted in : (1) change of pI value from 6.6 (S2R) to 7.3 (II-8)

(2) make Der p II more Der f II-like

proline : (1). usually cause a significant bend in an α helix .

(2). flexible regions of protein --- high proportion of Pro . (hinge regions of Ig)

參考文獻

Arruda LK ,Rizzo MC,Chapman .Exposure and sensitizatiop to dust mite allergens among asthmatic children in Sao Paulo Brazil Clin & Exp Allergy 1991; 21:443-439

Baur X, Frahman G, Hug B.,et al Aspergillus amylase in baker's asthma. Lancet 1986; 1:43.

Bousequet Jhejjaoui Adnan and B-Fancois .Specific immuno therapy in asthma. J Allergy Clin Immunol 1990,292-305

Chang YC, Hsieh KH. The study of house dust mite in Taiwan. Ann Allergy 1989; 62:101-106.

Chapman MD, Platts-Mills TAE. Purification and charact -erization of the major allergen from Dermatophagoides pteronyssinus Antigen p1. J Allergy Immunol 1980; 125 :587-592

Chapman MD,Rowntree S, Mitchell EB.,et al. Quantitative assessments of IgG and IgE antibodies to inhalent allergens in patients with atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol 1983; 72:27-33.

Chapman MD,Heymann PW ,Wilkins SR.,et al .Monoclonal immunoassayas for the major dust mite (Dermatophagoides) allergens Der pI and Der fI and quantitative analysis of the allergens content of mite and house dust extract J Allergy Clin Immunol 1987; 80:184-194.

Chapman MD. Mite allergens and asthma. cunn Opin Immunol 1990; 2:525-530.

Cheng SW.The Influence of sequence polymorphism on the T

and B Epitopes of HDM Major allergen, Der pII 台大醫學院免疫研究學研究所,1994.

Chua KY, Stewart GA, Thomas WR.,et al.Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p I homology with cysteine protease.J Exp Med 1988; 167:175-182.

Chua KY, Doyle CR, Simpson RJ., et al. Isolation of cDNA coding for the major mite allergen Der p II by IgE plaque immunoassay. Int Arch Allergy Appl Immunol 1990; 91: 118-123.

Chua KY, Dilworth RJ, Thomas WR. Expression of Dermato phagoides pteronyssinus allergen, Der p II , in Escherichia coli and the binding studies with humanI IgE. Int Arch Allergey Appl Immunol 1990b; 91:124-129.

Chua KY, Greene WK, Kehal P.,et al . IgE binding studies with large peptides expressed from Der p II cDNA constructs.Clin & Exp Allergy 1991; 21:161-166

Chua KY, Kehal PK, Thomas WR.,et .High frequincy binding of IgE to the Der p I allergen expressed in Yeast. J Allergy Clin Immunol
1992; 89:95-102.

Colloff MJ, Ayres,Carswell F., et al. The control of allergens of dust mites and domestic pets: a position papaer. Allergy 1992; 22(52):1-28.

Dilworth RJ ,Chua KY ,Thomas WR .sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen ,Der f I .Clin & Exp Allergy 1991;21:25-32.

Editorial .Mite allergens group I-VII .a catalogue of enzymes

Clin Exp Allergy 1993.23:350-353.

Eiki Oshika, Yosshio Kuroki, Yukio Sakiymaa.,et al A study of
the binding of IgG and IgE fromchildren with bronchia asthma to peptides derived from group Ⅱ Ag of Der p. Pediatric Research 1993; 2:209-213

Fiona R ,Lake FR ACP.House dust mitedivived amylase : allergenicity and physicohemical charactrization.J Allergy Clin Immunol.1991,87:1035-42.

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

Gauchat JF,Gascan H,de Waal Malefyt R et al.Regulation of germine -line e transcription and induction of e switching in cloned EBV -transformed and malignant human Bcell lines by cytokines and CD+T cells, J Immunol.1992; 148:2291-2299.

Grant IWB .Dose immunotherapy have a role in the treatment of asthma ? Clin Allergy ,1986 ;16:7-16

International Workshop Report. Dust mite allergens and asthma A worldwide problem. J Allergy Clin Immunol 1989;83:416-27.

Hallas TE .The biology of mites Allergy 1991,46(s)11,6-9

Halken S. Environmental causes of asthma in children. Pediatric Allergy & Immunology 1994; 5:(6):57-60.

Heyman PW, Chapman MD, Aulberse RC, Fox JW, Platts-Mill TAE. Antigenic and structural analysis of group Ⅱ allergens (Der f Ⅱ and Der p Ⅱ), from house dust mites

(Dermato
phagoides spp.) J Allergy Clin Immunol 1989; 83:1055-1067

Hill Dj ,Hosking cs .Shetton MJ ,Turner MW ,Failure of hyposensitization in treatment of children with grass pollen asthma. Br Med J 1982;284:360-9

Hsieh KH:A study of intracutaneous skin tests and radio-allerogosorbent tests on 1000 asthmatic children in Taiwan .Asian Pacific J Allergy Imminol 1984;2:56-60

Hsieh KH ,Lue KH ,Chiang CF .Immunological changes after hyposensitization in house dust senstive asthmatic children .J asthma 1987 ;41:19-27

Janeway CA,Travers P.Immuno bioloy, The immunesystem in health and disease(Testbook)

John A .Filng MAJ ,USAF.Suppresion of the late cuataneous response immunotherapy. J Allergy Clin Imminol.1989,83: 101-9

King TP ,Holfman D ,Lowenstein H ,Marsh DG ,Thomas W :Allergen nomenclature .Int Arch Allergy Immunol 1994: 224-33.

Kopf M,Le Gros G,Bachmann M et al.,Distruption of the murine IL-4gene blocks Th2 cytokine responses.Nature. 1993; 362:245-248.

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 radioimmunoelectrophoresis.J Allergy Clin Immunol1984; 74:142-146.

Korsggaard J .Dahl R.Sensitivity to house dust mite an grass pollen in house dust mite and grass pollen in adult influence of the month of birth .Clin Allergy 1983;13:529-36.

Korsggard J .Iversen M .Epidmiology of house dust mite allergy .1991;46(s)11:14-18.

Lai CKW,Douglass ,Ho SS, Chan J .Asthma epidemiology in the Fast East Clin Exp Allergy ,1996;26:5-12

Lake FR, Thompson PJ, Stewart GA.HDM derived amylase: Allergenicity and physicochemical characterization. J Allergy Clin Immunol 1991; 87:1035-1042.

Lau S, Falkenhorst G, Weber A .High mite allergen exposure increase the risk of sensitisation in atopic children and young adults.J Allergy Clin Immunol 1989; 84:718-725.

Li CS ,Wan GH ,Hsieh KH ,Chua Ky Lin RH:Seassonal variation of house dust mite allergen (Der pI)in a subtropical climate .J Allergy Clin Immunol 1994; 94 :131-4 .

Li CS ,Hsu CW, Chua KY ,Hsieh KH , Lin RH:Environmental distribution of house dust mite allergen (Der p V) .J Allergy Clin Immunol 1996.

Lind P, Hansan OC, Horn N. The binding of mouse hybridoma and human IgE antibodies to the major faecal allergen Der p I of Dermatophagoides pteronyssinus, relative binding site location and species specificity studies by solid-phase inhibition assays with radiolabelled antigen. J Immunol 1986;140:4256-4262.

Lin KL, Wang SY, Hsieh KH. Analysis of house dust mite specific IgE, IgG4 and IgG antibodies during immunotherapy in asthmatic children. Ann Allergy 1991; 67:63-69.

Lin KL, Chua KY, Thomas WR, Ching BL, Hsieh KH. Characterization of Der p V allergen cDNA analysis and IgE mediated reactivity to the recombinent protein. J Allergy Clin Immunol1994;94:989-96

Liou RL Cloning and Expression of Der pII isoforms:1993 Master Thesis Institute of Medicine Chung Shan Medical and Dental College.

Luczynska CM, Arruda LK, Platts-Mill TAE.A two site monoclonal antibody ELISA for the quantitation of the major Dermatophagoides spp. allergens Der p I and Der f I . J Immunol methods 1989; 118:227-235.

Lynch NR, Thomas WR, Chua KY, Gancia N, Diprisio MC, LopezR: In vivo biology activity of recombinant Der p II allergesof house dust mite. Int Arch of Allergy & Immunology 1994;105:70-74.

Madde GC,Van Reijsen FC,Boland GJ,DeGast GC, and Bruijnzeel PLB. Immunology. 1990; 690:335-341

Manetti R,Parrronchi P,Giudizi MG.Nature killer stimulatory factor (Interleukin 12)induces T helper 1(Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4 producing Th cells J Exp Med 1993; 177:1199-1204.

Marsh DGL, Thomas AE, Platts-Mills. Allergen nomenclature.Clin Exp Allergy 1995; 25:27-37.

Nakagawa T ,Kozejkih H, Katarir J ,et al .changes of house dust mite specific IgE ,IgG subclass antibodies during immunotherapy in patients with perennial rhinitis .Int Arch Allergy Appl Immune 1987;82:95-9.

Nakagawa T .The role of,IgG subclass antibodies in the

clinical response to immunotherapy in allergic disease .Clin and Exp Allergy1991;21:289-296.

Noon L ,prophylactic inoculation against hay fever. Lancet 1911; I :1572-3.

Nuchel PB ,Janniche H,Munch EP ,Wihl JA, Bowadt H. Immunotherapy with partially purified and standardized tree pollen extracts .Allergy 1988;43:353-62

O'brien RM, Thomas WR .Immune reactivity to Der pI and Der pII in house dust mite sensitive patients attending paediatric and adult allergy clinics.Clinic and Exp Alergy.1994.24
:737-742.

O'hehir RE and Lamb JR.Strategisis for modulating immunoglobulin E synthesis.Clin Exp Allergy 1992;22:7-10

O'hman JL .Allergen immunotherapy in asthma :evidence for efficacy .J Allergy Clin Immunol 1989;84:133-40.

Philip B ,Wilson ,Janet E et al.Detection of IgG subclass-specific anti-IgE antibodies in normal and atopical individuals .Int arch Alergy appl Iimmun 1987;84:198-204

Platts-Mills TAE,Heymen PW ,Cjapman MD.Cross reacting and species specific determinent on a major allergeen fro D.p and D.f:development of a radioimmunoassay for Ang-p1 Equivalent in house dust and dust mite extract J Allergy Clin Immunol 1986 ;78:398-407

Platts-Mills TAE, de Weck AL. Dust mite allargens and asthma : A world wide problem. J Allergy Clin Immunol 1989; 2: 525-530.

Platts -Mills TAE ,Pollart SM ,Luczynska CM .,et al :The role of indoors allergens in asthma .In :Pichler WJ ,et al ,eds . progress in allergy and clinical immunology Toronto: Hogrefe &Huber , 1989 :279-86 .

Reiner SL,Wang ZE,Hatam F,Scott P.Th1 and Th2 cell antigen receptors in experimental leishmaniasis. Science. 1993; 259:1457-1460.

Renz H,Saloga J,Bradley KL.Specific V β Tcell subsets mediate the immediate hypersensitivity response to ragweed allergen. J Immunol. 1993; 151:1907-1917.

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

RM O'brien, WR Thomas. Immune reactivity to Der p I and Der p II in house dust mite sensitive patients attending paediatricand adult allergy clinics. 1994; 24:724-737.

Seder RA,paul WE,Davis Mm et al.,The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphocyte producing potential of CD4+Tcells from Tcell receptor transgenic mice. J Exp Med. 1992; 176:1091-1098.

Schon-Hegrad MA,Oliver J,McMenamin PG.Studies on the density ,distribution and surfave phenotype of intraepithelial class II MHC (Ia) antigen -bearing dendritic cells in the conductive airways J Exp Med. 1991; 173:1345-1356.

Shen HD, Chua KY, Lin KY , Hsieh KH, Thomas ER .molecular cloning of a house dust mite allergen with common antibody binding specificities with multiple components in mite extracts.Clin and Exp A llergy 1993;23:575

Shen HD, Chua KY, Hsieh KH, Thomas ER. Chacterization of the hose dust mite allergen Der p Ⅶ by monoclonal antibodies
.Clin Exp Allergy 1995; 25:416-422.

Shen HD, Chua KY,Lin WL Hsieh KH and Thomas ER. Molecular cloning and Immunogenical chacterization of the hose dust mite allergen DfVII.Clin Exp Allergy 1995;25 :1000-1006

Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of poly -peptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione-S-transferase. Gene 1988; 67:31-40.

Smith WA, Chua KY, Kuo MC, Rogers BL, Thomas WR. Cloning and sequencing of the Dermatophagoides pteronyssinus group Ⅲ allergen, Der p Ⅲ, Clin & Exp Allergy 1994; 24:220-228.

Sporik R, ,Platts-Millss TAE.Epidemiology of dust mite related disease.Exp & Applie Acarology. 1992 16:141-151

Spriggs MK,Armitage RJ,Strockbine L et al .Recominant human CD40 ligand stimulates B cell proliferation and Immunoglobuline E secretion J Exp Med.1992; 176:1543-1550.

Stewart GA, Bird CH, Thompson PJ. Do the group Ⅱ dust mite allergens to lysozyme? J Allergy Clin Immunol 1990 ;141-142

Stewart GA, Bird CH, Thompson PJ. Do the group Ⅱ dustmite allergens to Isozyme?. J Allergy Clin Imunol 1990 :141-142.

Tee RD. Allergy to storage mites. Clin Exp Allergy 1994;24

:636-640.

Thomas WR,Mite allergen group I-VII .A catalogue of enzyme Clin Exp Allergy 1993;23:350-3.

Thomas WR, Chua KY, Smith WA. Molecular polymorphisms of house dust mite allergens. Exp Appl Acarol 1992; 16:153-164.

Tovey ER, Chapman MD, Platts-Mills TAE. Mite faecal are a major source of house dust mite allergens. Nature 1981; 289 :592-593.

Tovey ER, 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.

Tovey ER, Johnson MC, Roche AL, Cobon GS, Baldo BA. Cloning and sequencing of a cDNA expression a recombinant house dust protein that binds human IgE and corresponds to an important low molecular weight allergen. J Exp Med 1989; 170:1457-1462.

Trang RB, Tsai LC, Hwang HM, Hwang B, Wa KG, Hung MW. The prevalence of Allergic disease and IgE antibodies to house dust mite in school-children in Taiwan. Clin Exp Allergy 1990; 20:33-38.

Trudeau WL 3rd, Fernandez-Caldas E. Identifying and measuring Indoor biologic agents. J Allergy Clin Immunol 1994; 94 (2 pt 2):393-400.

Van Strien RT ,Verhoeff AP,Brunekreff .Mite antigen in fouse dust :relationship with different housing characteristics in
the Netherlends Clin Exp allergy 1994; 24:843-853.

Vervloet D ,A Penaud H ,Razzouk M et al.,Altitude and house dust mites , J Allergy Clin Immunol.1982(3):290-296

Voorhorst R, Spikesma-Boezeman MIA, Spieksma FTHM. Is a mite (Dermatophagoides spp.) the producer of the house dust allergen ? Allergy Asthma 1964; 10:329-334.

Warner JO ,Price JF ,Soothill JF et al., Controlled trail of Hyposensitization to D.p in children with asthma .Lancet 1978;2:912-5

Wershil BK ,Theodos CM ,GALLI SJ , Master cells augment lesion size and persistence during expermential leishmania major infection in the mouse J Immunol 1994 ,152:4563-4571

Wharton GW. House dust mites. J med Entomology 1976; 12:577-621.

Williams ME,Chang TL,Burke Sket al,Activation of functionally distinct subsets of CD4+Tlymphocytes.Res Immunol. 1991; 142:23-27.

Yasueda H, Mita H, Yui Y, Shida T. Comparative analysis of physicochemical and immunochemical properties of the two major allergens from Dermatophagoides pteronyssinus and the corresponding allergens from Dermatophagoides farinae. Int Arch Allergy Appl Immunol 1989; 88:402-407.

Zlotnik A, and Bean AGD.Production of IL-4 by non Th2 cell subsets:possible role of CD4-CD8-α β TCR +and CD4 subset T cell in T helper subset regulation. Res Immunol. 1993; 144:608-609.

＊ 基本資料 戴廷勳 12 男 國一 664748

1. 個案姓名：戴杏儒 10 女 四年級 849823　6.電話：
2. 性別：男　7. 地理區域：
3. 年齡：　8. 病歷號碼：
4. 教育程度：　9.填寫者：謝垣玉
5. 住址：

請描述您的居家環境

個案姓名：戴廷勳、戴杏儒

填 寫 者：_____

填寫日期：_____

1. 住屋型式：□公寓 ☑透天厝
2. 樓　　層：□1 □2 ☑3 □4 □5 □6 □7 □8 □9 □10
3. 採樣樓層：□1 ☑2 □3 □4 □5 □6 □7 □8 □9 □10
4. 家中是否裝設冷暖氣機？

□否

☑是

(1)裝設地點是客廳、 6:00-11:00

夏天平均每日開_____小時　濾網的清除平均__1__日清除一次

清除方法是水洗

冬天平均每日開__0__小時　濾網的清除平均_____日清除一次

清除方法是_____

(2)裝設地點是書房、 6:30-7:00

夏天平均每日開_____小時　濾網的清除平均__1__日清除一次

清除方法是水洗

冬天平均每日開__0__小時　濾網的清除平均_____日清除一次

清除方法是_____

(3)裝設地點是臥室

夏天平均每日開~~3~~ 3.4 小時　濾網的清除平均_____日清除一次

清除方法是水洗

冬天平均每日開__0__小時　濾網的清除平均_____日清除一次

清除方法是_____

(4)裝設地點是_____

夏天平均每日開_____小時　濾網的清除平均_____日清除一次

清除方法是_____

冬天平均每日開_____小時　濾網的清除平均_____日清除一次

清除方法是_____

5. 家中是否使用除溼機？

□否

☑是

(1)裝設地點是走廊、

夏天平均每日開__0__小時　濾網的清除平均_____日清除一次

清除方法是_____

冬天平均每日開__24__小時　濾網的清除平均_____日清除一次

清除方法是_____

(2)裝設地點是客廳、

夏天平均每日開_____小時　濾網的清除平均_____日清除一次

清除方法是_____

冬天平均每日開_____小時　濾網的清除平均_____日清除一次

清除方法是_____

6. 家中是否使用地毯？

☑否

☐是

(1)使用地點：_____

購買的時間是_____　　使用時間共_____月

地毯的質料是_____　　清洗的方法是_____

地毯面積佔其面積的幾分之幾？_____　(使用地點是_____坪)

(2)使用地點：_____

購買的時間是_____　　使用時間共_____月

地毯的質料是_____　　清洗的方法是_____

地毯面積佔其面積的幾分之幾？_____　(使用地點是_____坪)

(3)使用地點：_____

購買的時間是_____　　使用時間共_____月

地毯的質料是_____　　清洗的方法是_____

地毯面積佔其面積的幾分之幾？_____　(使用地點是_____坪)

(4)使用地點：_____

購買的時間是_____　　使用時間共_____月

地毯的質料是_____　　清洗的方法是_____

地毯面積佔其面積的幾分之幾？_____　(使用地點是_____坪)

7. 家中是否養寵物？

☑否

☐是

(1)種類：_____

養寵物時間達_____月　平均_____日清洗一次

清洗方法是_____飼養地點是_____

(2)種類：_____

養寵物時間達_____月　平均_____日清洗一次

清洗方法是_____飼養地點是_____

(3)種類：_____

養寵物時間達_____月　平均_____日清洗一次

清洗方法是_____飼養地點是_____

8. 家中是否使用吸塵器？

☑否

☐是

(1)使用地點：_____

平均_____日清除一次　　清除方法是_____

(2)使用地點：_____

平均_____日清除一次　　清除方法是_____

(3)使用地點：_____

平均_____日清除一次　　清除方法是_____

(4)使用地點：_____

平均_____日清除一次　　清除方法是_____

9. 家中平均多久清除地板一次？

(1)清除地點：全家

平均__ __日清除一次　　清除方法是掃地

(2)清除地點：全家

平均__7__日清除一次　　清除方法是拖地

(3)清除地點：_____

平均_____日清除一次　　清除方法是_____

10. 家中平均多久大掃除一次？__1年__

11. 二手煙的暴露

家中成員是否有抽煙習慣　　☐是　　☑否

家中的抽煙者共有____人，與個案之關係_____。

與個案同住在一室者且有抽煙情況，每天大約是_____小時。

這樣的狀況有多少年？_____年。