

R
008-8
7211

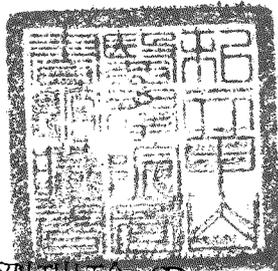
中山醫學院醫學研究所碩士論文

Master Thesis, Institute of Medicine,
Chung Shan Medical and Dental College

指導教授：林克亮 博士

家塵蟎 *Der p II* 相關基因之選殖及表現

Cloning and Expression of *Der p II* Isoforms



研究生：劉瑞玲 (Ruey - Ling Liou) 撰

中華民國八十三年七月

中山醫學院圖書館



C028101

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

台大醫學院免疫所

蔡考圓 博士

蔡考圓

中山醫學院醫學系

蔡嘉哲 博士

蔡嘉哲

中山醫學院醫技系
(論文指導教授)

林克亮 博士

林克亮

中華民國八十三年七月

謝 誌

兩年實在是不算長的時間，但是若能在兩年的時光中留下些什麼或是學得了些什麼，在人生的記憶中也是珍貴難忘的寶貝了。

回憶這兩年來，林克亮老師台北台中兩頭跑，一方面要顧及台大的實驗室，一方面要顧及台中的課程及兩位學生—威志和我，實在是勞心勞力，其中的付出與關懷皆是令我畢生感激與難忘的恩情。平時，老師在做人處事以及做科學實驗應持有的態度上的諄諄教誨，皆令我獲益良多。心中感激萬分，所幸能在此表達對恩師的感謝與尊敬，老師，您將是我永遠敬愛的老師。

在研究期間，感謝台大醫學院免疫所蔡考圓老師多方面的指導，尤其是接近口試期間的幫忙與鼓勵，學生由衷的感謝。在學期間，感謝中山醫學院醫研所蔡嘉哲老師每週討論會所給予的指導與鼓勵，獲益良多，在此致謝。

文稿初成，復蒙蔡考圓老師、蔡嘉哲老師，對本論文細心審查並詳加指正，謹此敬表謝意。

在實驗室的一切是最令人難忘的，首先謝謝微生物科簡宏堅主任所給予的一切幫忙與方便，此外，在第一年林老師

不在的期間，錢佑老師、陳志豪老師、張大貞老師多方面的指導與幫忙，在此謝謝您們。第二年歸國服務的張德卿老師，您在實驗上與做人處事的態度上的指導，讓我獲益許多，能認識您這樣的良師益友，實在是莫大的收穫。

此外，還要感謝實驗室的伙伴給予的幫忙與關心，威志、博修、珍容學姊、姿妙、重進、再靜、梅林、玉珍，謝謝你們。也感謝遠在台大的書緯辛苦的幫忙，謝謝你！

最後，謹以此論文獻給我的雙親、弟妹及名貴，感謝爸爸的支持、媽媽的鼓勵、弟妹的打氣以及名貴的凡事包容及幫忙與鼓勵，感謝你們所付出的愛，成為我研究期間的最大支柱。

劉瑞玲 謹誌於

中山醫學院醫學研究所

中華民國八十三年七月二十八日

目錄

壹、摘要-----	1
Part I：家塵蟎 Der p II 相關基因之選殖及表現	
(Cloning and Expression of Der p II related allergen)-----	5
貳、研究背景-----	6
參、材料與方法-----	16
肆、結果-----	37
伍、討論-----	48
Part II：Der p II 單株抗體的建立	
(Production of Monoclonal Antibodies Against Der p II	
allergen)-----	52
壹、研究背景-----	53
貳、材料與方法-----	60
參、結果-----	72
肆、討論-----	82

伍、參考文獻	85
--------	----

圖表：

表一	45
表二	46
表三	73
圖一	37
圖二	38
圖三	39
圖四	40
圖五	41
圖六	42
圖七	43
圖八	44
圖九	72
圖十	74
圖十一	75
圖十二	76

圖十三	77
圖十四	78
圖十五	79
圖十六	80
圖十七	81

壹、摘要

家塵蟎已被研究認為是引起過敏性疾患的重要致病因子之一，如支氣管氣喘，過敏性鼻炎及異位性皮膚炎等。在台灣主要的蟎種為 *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp)。

Der p II 為重要的過敏原，分子量為 16 KD，與患過敏性疾病的病童的血清中 IgE 的反應率為 80-90%。

首先我們以台灣過敏病童的血清利用放射性菌斑免疫分析法以 DNA 原位雜交的技術，來篩選陽性的菌株。利用載體 (Bluescript) 來做 DNA 的序列分析，發現到一段基因，其氨基酸序列與 *Der p II* 所表現出來的氨基酸序列僅僅只有三個氨基酸不同。

藉由表現載體 pGEX-2T 在大腸桿菌系統中將此段蛋白質表現出來，為一分子量 44 KD 的融合蛋白質 (II-8)。利用台灣過敏病童的血清做 Western blot 結果呈陽性反應。

更進一步我們以台灣過敏病童的血清利用 Dot blot 技術來比較 *Der p II* (S2R) 與 II-8 過敏原。結果發現有三組情形產生：(1) II-8、S2R 皆呈陽性反應。(2) II-8、S2R 皆呈陽性反應，II-8 反應較 S2R 為強。(3) S2R 呈陽性反應，II-8 呈陰性反應。II-8 與台灣過敏病童的血清中的 IgE 反應

較 S₂R 為強，此兩者之間的差異是否會因為當初 II-8 是由臺灣本地的病童血清中的 IgE 所篩選出來的差異而具有意義呢？皆需進一步的探討。並利用 RIA 更精準的比較兩者之間與 IgE 的結合能力的量是否有意義的差異，都是我們所要努力的方向。

Part I

家塵蟎 *Der p* II 相關基因之選殖及表現 (Cloning and Expression of *Der p* II Isoforms)

貳、研究背景

一、即發型 (immediate) 過敏反應就是無防禦性 (anaphylactic) 或反應素依賴性 (reagin, 即IgE, dependent) 過敏反應。其臨床症狀可以分為全身性和局部性兩種，全身性的即發型過敏反應包括下列幾種器官系統：

- (1) 呼吸道，
- (2) 胃腸道，
- (3) 心臟血管系統，
- (4) 皮膚。

抗原：

各種抗原 (過敏原) 都可以引起。包括了家塵 (house dust)、花粉 (pollen)、黴菌 (mold)、動物皮屑 (animal dander)、一些昆蟲如蟑螂 (cockroach) 等所衍生的過敏原 (insect-derived allergen)、食物 (food)、藥物 (drug)、以及膜翅類昆蟲毒素 (hymenoptera venom) 等。

抗體：

主要為IgE。

補體：

不參與作用。

典型的即發型過敏反應在動物實驗中是先注射抗原，

過幾天後抗原已經誘發抗體形成，並且抗體附著在肥大細胞上，也就是說該動物已經被致敏化了，這時候再從靜脈注射抗原立刻就會引起即發型的過敏反應 (Gell and Coombs, 1963)。

二、每個抗體只與抗原的某一特別部位結合，這個部位稱為抗原決定位置，某一特定抗原可以具有數種不同或相同的抗原決定位置。

三、Dr.Chua 於 1993年提出：DNA 序列的 polymorphisms 深深地影響過敏原敏感度及 T 細胞的 Cross-reaction (交叉作用) (Chua KY et al., 1993)。決定 Allergen polymorphism 的重要性並不是只為了未來相關技術重組 (recombinant) 的應用，而是為了讓我們更進一步的了解 Mite allergen。

在 1993 年 Dr.Chua 研究五個 *Der p I* 株落 (Clones)，發現共有六處氨基酸產生變化，每一個 *Der p I* 株落 (Clones) 只有 1-3 個氨基酸的變化 (Chua KY et al., 1993)。例如：His 由 Tyr 所置換；Glu 由 Lys 所置換，這些並不被認為會造成蛋白質三級結構的改變，但是氨基酸的任何改變亦可能會深深地影響 T 細胞抗原決定點的改變，包括

決定 T 細胞所對應的抗原決定點的靠外側的氨基酸的變化。
(Liu ZR et al., 1991 ; Evavold BD et al., 1991 ; Brown LE et al., 1991)。

Evavold and Allen 於 1991 年也曾提出
antihemoglobin T cell clone 會因為 Thr 由 Ser 所取代；
Gln 由 Asn 所取代的變化而失去了它 epitopic 的活性。此
Der p I 株落 (Clones) polymorphism 的機率遠遠大於
cDNA replication 所產生的錯誤 (error) 機率 1/10000，並
且證明確實 4/5 的株落有氨基酸代替。

因為所有全部的 polymorphisms 並不可能完全被找到，所以在測量過敏原間的 T 細胞 cross-reactivity 或免疫反應上基因的研究，皆會造成混淆。有趣的是
polymorphisms 的區域都是在 *Der p I* 與 *Der f I* 高度保留區域，而不是在 N 端或 C 端或是種與種之間的變異處 (interspecies variation)。

四、家塵是引起氣喘病及異位性皮膚炎的重要過敏原之一。雖然家塵中，包含了許多過敏原，如：蟎、動物皮屑、黴菌孢子等，蟎還是引起許多過敏性疾病的重要過敏原之一 (Toshifumi Yuuki and Yasushi Okumura 19)。

第一組蟎過敏原 (group I)

塵蟎過敏原為過敏性疾病的主要過敏原，而且是氣喘的危險因子之一。*Der p I*，為一 27 KD 的醣蛋白 (glycoprotein)，是在蟎的糞便中發現的 (Thomas WR et al.,1988)。*Der p I*，*Der f I* 及 *Eur m I* (Thomas WR et al.,1988) (Chua KY et al.,1988 ; Dilworth RJ et al.,1991) (Kent NA et al.,1991) 的 cDNA 已被選殖。*Der p I* 被證明為一 Cysteine protease，*Der p I* 的第 52-71 個氨基酸和第 117-133 個氨基酸與病人血清中的 IgE 反應性最高 (Pascale Jeannin et al., 1992)。但是 *Der p I* 過敏原經過 *Ecoli* 系統所表現出來的融合蛋白質與病人血清中的 IgE 反應性比自然型的 *Der p I* 差很多 (Dilworth RJ et al., 1990)。*Der p I* 與 *Der f I* 有 81% 的 homologous，1993 年 Dr.Chua KY 比較五個 *Der p I* 不同的 cDNA，發現在每個 cDNA 之間有 1-3 個氨基酸的不同，其最常見的氨基酸改變位置為 50，82，124，136 及 215 等，而這些位置恰為細胞重要的抗原決定點。現今已在酵母菌系統表現出 *Der p I* 的蛋白質 (Chua KY et al.,1992) 其對 IgE 的抗原性，較大腸桿菌系統表現出來的好，為今後研究的重要材料之一。

第二組蟎過敏原 (group II)

Der p I 為一分子量 14 KD 的蛋白質。*Der p I* 和 *Der p II* 與病人血清中 IgE 的反應率大於 80% (Lind P et al., 1983 ; Krilis S et al., 1984 ; Tovey ER et al., 1987 ; Heymann PW et al., 1989) , *Der p II* 與 *Der f II* 有 88% 的 Homology (Trudinger M et al., 1991) 。 1990 年 , Dr. Chua 以 IgE plaque immuno screening 的方法從 λ gt11 基因庫中分離出 *Der p II* 過敏原。將 *Der p II* 基因接入 pGEX-2T 株落中 , 為一分子量 42 KD 大小的 GST 融合蛋白質 , 此 GST 融合蛋白質與氣喘病人和氣喘病童血清的反應率和自然型的 *Der p II* 差異並不大。

Dr. Chua 於 1991 年研究分析指出 *Der p II* 在 1-69 的氨基酸片段與 69-129 的氨基酸片段與病人血清中的 IgE 反應率皆為 38% , 但是比 69-129 的氨基酸片段少了 12 個氨基酸的 69-117 的氨基酸片段 , 其反應率即降到 15% 。 1993 年 Joost RJ 等人提出 : 有許多 T 細胞的 epitope 零散地分佈在 *Der p II* 分子上。有人推測蹠重要過敏原為消化過程的一重要物質 , 1992 年 Dr. Stewart 比較生化及生理化學的研究後 , 指出此蹠體糞便中及蹠體萃取物中所找到的蛋白質 *Der p II* 推測可能為 lysozyme 。



蟎第二組過敏原與溶菌酵素 (lysozyme) 間的比較 (Stewart GA et al., 1992) :

Parameter	Group II allergen	Mite lysozyme
Molecular weight	15,000	16,000
Isoelectric point	5>8	5>8
Precipitation by ammonium sulfate (percent saturation)	50%-80%	50%-80%
Acid stable	Yes	Yes
Heat stable	Yes	Yes
Present in Both body and fecal extracts	Yes	Yes

我們利用臺灣氣喘病童血清中的 IgE 選殖到一個 *Der p II* 的 cDNA。關於 *Der p II* 的抗原決定位置的存在是否依賴完整的蛋白質三級構造，目前正被探討中。

第三組蟎過敏原 (group III)

Der p III、*Der f III* 其氨基酸的排列序列應是胰蛋白酶 (trypsin)，為消化到的重要物質之一 (Stewart GA et al., 1991)。*Der f III* 為一 29KD 的蛋白質 (Heymann PW et al., 1989)。自然狀態的 *Der f III* 是藉由 5A12 單株抗體

分離得到的。*Der p III* 為一 32KD 的蛋白質，但常常有 34 及 28KD 變化的形式出現(Stewart GA et al., 1992)。其自然狀態的 *Der p III* 是由 Gel filtration 分離得到的。藉由 DNA 探針已從 Dp 的 cDNA 基因庫中調到 *Der p III* 的 cDNA (Smith WA et al., 1994)，其具有 232 個氨基酸，推測的分子量為 24985D，與 Trypsin 蛋白質有 50% 的相似性 (homo-logous)。這些存在不同分子量的 *Der p III* 及 *Der f III* 可能是自己分解的產物或變異型 (isoform) 的蛋白質 (Stewart GA et al., 1992)。

1989 年 Dr. Heymann 等利用 IgE 菌斑放射線免疫分析法 (plaque radioimmunoassay) 分析其反應比率為 16%。

第四組蟻過敏原 (group IV)

在 1979 年 Flind 發現黴菌中的澱粉酵素 (Amylase) 會引起過敏病，1986 年 Baur 等人發現澱粉酵素 (Amylase) 可刺激 IgE 產生，並產生呼吸道的症狀。在 1991 年，Dr. Stewart 等人發現蟻的排泄物中有澱粉酵素 (Amylase) 的活性。故懷疑蟻的排泄物中的澱粉酵素為一過敏原。之後純化到一 60KD 的蛋白質 *Der P IV*，亦可與 IgE 反應，其與蟻

的過敏病童反應率是 25%，與蟎的過敏病成年人的血清中 IgE 的反應率為 46%。目前其基因的選殖工作正在進行中。

第五組蟎過敏原 (group V)

1989 年 Dr. Tovey 利用混合的過敏病人血清所進行的 IgE 菌斑放射線免疫分析法 (plaque radioimmunoassay) 第一個選殖到的 *Der p V*。*Der p V* 為一可製造 14KD 蛋白質的過敏原，可能與果蠅的乙醇去氫酵素 (alcohol dehydrogenase) 相似 (Fletcher TS et al., 1978)。1993 年 Dr. Lin 利用一位臺灣病童的血清進行 IgE 菌斑放射線免疫分析法 (plaque radioimmunoassay) 得到一個截短型的 *Der p V*，並利用此截短型的 *Der p V* 基因當探針，進行 DNA 雜交反應 (hybridization)，得到預測成熟蛋白質為 15KD 全長的 cDNA。純化自然型的 *Der p V*，並決定其 N-端氨基酸排列序列乃是未來所要努力的方向。

第六組蟎過敏原 (group VI)

Der p VI 及 *Der f VI* 在還原態的 SDS-PAGE 分析，分子量為 25KD，以 Sephadex G-75 的過濾色層分析，分子量為 27KD。早期利用生化學方法從 Dp 及 Df 的培養

基純化得到的，稱之為 DP4 及 DF4 (Yasueda H et al.,1991)。之後稱之為 DP5 及 DF5 (Yasueda H et al.,1993)。最後正式稱之為 *Der p VI* 及 *Der f VI* (Thomas WR., 1993)。*Der p VI* 及 *Der f VI* 具有水解蛋白質活性，為類似乳糜蛋白酶 (chymotrypin)，其放射性免疫分析結果，血清 IgE 反應比為 41%。

第七組蟎過敏原 (groupVII)

Der p VII 乃是以菌斑放射性免疫分析法，利用一位臺灣氣喘病童的血清中的 IgE 抗體從 Dp 之 λ gt11 基因庫所找到的 (Shen HD et al.,1993)，分子量為 22,177 D，為一可製造 215 個氨基酸的 cDNA，包含了 17 個氨基酸的領導序列，目前沒有 Homologous 發現。這位臺灣氣喘病童的血清中的 IgE 抗體與蟎 60KD 與 25KD 成分皆有反應。*Der p VII* 沒有 cystein 及 tryptophan，含一個醣化位置，其基因已在大腸桿菌系統表現，對臺灣氣喘病童的血清做點狀免疫分析法 (Dot blot) 及皮膚試驗 (skin test) 發現有 37% 及 53% 的陽性率，以兔子抗蟎抽取物的抗體 (rabbit anti-mite extract antibody) 經 *Der p VII* 的蛋白質吸附，發現可吸附蟎提取物 (mite extrac) 中 29, 27, 24KD 的抗體，其真正意義正在研

究中。

家塵蟎 (*D. pteronyssinus*) 過敏原 (Thomas WR, 1993) :

	MW	Function	IgE binding	sequence
	(KD or Mr)		Frequency (%sera)	
<i>Der p I</i>	25	Cysteine protease	80-100	cDNA
<i>Der p II</i>	14	Probably lysozyme	80-100	cDNA
<i>Der p III</i>	28/30	Trypsin	70-100	N-term
<i>Der p IV</i>	56-60	Amylase	40	N-term
<i>Der p V</i>	15	?	40	cDNA
<i>Der p VI</i>	25	Chymotrypsin	40	N-term
<i>Der p VII</i>	22,26,28	?	40	cDNA

參、材料與方法

家塵蟎-Dermatophagoides pteronyssinus 的 cDNA 基因庫

Poly A⁺ RNA是由活的蟎體分離出來的 (Commonwealth Serum Laboratories, Melbourne, Australia) (Stewart GA et al., 1987)。cDNA 的備製是使用 Huynh et al. 所描述的 S₁ nuclease 方法製作 (Huynh TV et al., 1985)。接上 E coRI 連接子 (linker)，產生接合端，再接到 λ gt11 中，之後再劃在 *Escherichia coli* Y1090 平板培養基上。

家塵蟎-*Dermatophagoides pteronyssinus* cDNA 基因庫的篩

選

將 *Escherichia coli* Y1090 50ml 培養至 Log phase 後，4°C 離心 4000 rpm, 15分鐘，沈澱物加 400 μ l PBS，加入適量的噬菌體培養 37°C 30 分鐘後一起倒入未凝固 50°C 的培養液，混合後再倒在平板培養皿上，37°C 作用隔夜。使每個平板培養皿上產生 20000個噬菌體形成單位 (PFU)，將硝基纖維素濾紙 (Nitrocellulose filter)，先以 2mg/ml IPTG (isopropyl beta-D-thiogalactoside) 飽和後乾燥。然後平放在平板培養皿上，37°C 作用隔夜，取出濾紙以 TNT 洗三次，再以 5% 脫脂奶粉阻斷 (blocking) 一小時，再加入欲測試的台灣病童血清 (1:5 倍稀釋) 4°C 隔夜作用，洗三次，再加入 ¹²⁵碘標識的抗人類血清 IgE 的第二級抗體 (secondary antibody) 作用一小時，TNT 輕洗徹底 (約 10 分鐘 6 次)。於 X-光底片下感光，-70 °C 24小時。

Der p II 相關基因的 DNA 序列分析

用廠商的 Lambdasorb Phage Adsorbent (Promega, Madison, WI) 分離 λ gt10 和 λ gt11 的 cDNA，將其 DNA 用 EcoR I 切割。插入的 DNA 用標準步驟次選殖到 Bluescript phagemide (Stratagene, California)。為了決定 DNA 的次序，4 μ g 的雙股質體 DNA，利用鹼性溶液 (2M NaOH, 2mM EDTA)，在室溫作用 5 分，使 DNA 變性成單股 DNA；再用 2 μ l 2M 醋酸銨 pH4.6 中和反應，此時變性的單股 DNA 用酒精沈澱，再以 7 μ l 的蒸餾水溶解。cDNA 次序的決定是用廠商的 Sequencing Version 2.0 kit (USB, Ohio) 以雙去氧核酸鏈中止的方法完成 (Sanger F et al., 1977)。

以 PCR 技術放大 *Der p* II 相關基因 (N5B10)

Bluescript phagemide (Stratagene, California) 上接有 *Der p* II 相關基因 (以下稱 N5B10)，以 PCR 技術放大之。利用含 BamH I 位置 (site) 序列的引子，以 PCR 技術將 *Der p* II 相關基因 (N5B10) 3' 端放大成具 BamH I 位置 (site) 的序列。如此一來此 *Der p* II 相關基因 (N5B10) 則一端具有 EcoR I site，一端則具有 BamH I site。其引子 (primer) 分別是：

SK- I (5' -TCTAGA ACTAGTGGATC-3');

II -5 (5' -TTAGAAGTTGATG TTCCC-3')。

使用的酵素是 pfu。

其步驟為 95°C 5分鐘，55°C 2分鐘，72°C 2分鐘，各一次；95°C 30秒鐘，55°C 1分鐘，72°C 2分鐘，各 38 次；95°C 30秒鐘，55°C 1分鐘，72°C 10分鐘，各 一次。

純化 PCR 結果的 *Der p* II 相關基因 (N5B10)

PCR 產物跑 1.5% 低沸點洋菜膠 (Low melting gel)，之後在紫外燈下切下預期大小的洋菜膠 (約 0.4ml)，加入 200 μ l 1 \times TE (pH8.0)/40 μ l 1M NaCl，加熱 65 $^{\circ}$ C 20分鐘，趁熱時加入 phenol (1:1)，趁熱攪拌混合 (stir) 2分鐘，離心 20 $^{\circ}$ C，12000rpm，5分鐘。取上清液，下層液加入 100 μ l TE，攪拌混合 (stir) 2分鐘，離心 20 $^{\circ}$ C，12000rpm，5分鐘。取上清液與第一次的上清液混合，加入 phenol (1:1)，攪拌混合 (stir) 2分鐘，離心 20 $^{\circ}$ C，12000rpm，5分鐘。取上清液，加入 phenol (1:1)，攪拌混合 (stir) 2分鐘，離心 20 $^{\circ}$ C，12000rpm，5分鐘。取上清液，加入 leader phenol (1:1)，攪拌混合 (stir) 2分鐘，離心 20 $^{\circ}$ C，12000rpm，5分鐘。取上清液，加入 leader phenol (1:1)，攪拌混合 (stir) 2分鐘，離心 20 $^{\circ}$ C，12000rpm，5分鐘。取上清液，加入 leader phenol (1:1)，攪拌混合 (stir) 2分鐘，離心 20 $^{\circ}$ C，12000rpm，5分鐘。取上清液，加入 Chloroform : Isoamylalcohol 24 : 1 溶液，攪拌混合 (stir) 2分鐘，離心 20 $^{\circ}$ C，12000rpm，5分鐘。取上清液，置於事先已加入 1 μ l

10mg/ml Dextran 或 glycogen ; (1:10) 3N Sodium
Acetate ; (2.5×) 100% 冰的絕對酒精的容器中，稍稍混合一
下，置於 -70°C 2小時。迅速離心於 4°C，15000rpm，15分
鐘，去上清液，乾燥 5 分鐘，加入 50 μl 的 H₂O，稍稍混合
一下，微微離心，置於 65°C 15分鐘，置放在 4°C 隔夜。

Factor X

Pro Lys Ser Asp Leu Ile Glu Gly Arg Gly Ile Pro Gly Asn
CCA AAA TCG GAT CTG ATC GAA GGT CGT GGG ATC CCC GGG AAT
BamI SmaI EcoRI

Ser Ser ***
TCA TCG TGA CTG ACT GAC

GAT CTG

b. 步驟：

將載體 (Plasmid) DNA (GEX-2T) 和 *Der p II* -R
insert DNA 皆以 EcoR I , BamH I restriction enzyme 作用
37°C 4 小時切斷。

接合 (Ligation)

將已被 EcoR I ， BamH I restriction enzyme 作用過的載體 (Plasmid) DNA (GEX-2T) 和 *Der p II* -R insert DNA 跑 1.5% 低沸點洋菜膠 (Low melting gel) ，之後在紫外燈下切下預期大小的洋菜膠 ，並純化之，加入接合緩衝液 (ligation buffer) ，及 T4 DNA ligase (接合酵素) ，作用 4°C 隔夜。

Agarose-Gel Electrophoresis

以 TAE 緩衝液泡 0.8% 的 agarose gel，待冷卻凝固後將 DNA 與 loading dye (6:1) 混合之後，置於 agarose gel 的凹槽中，以 100V 的電壓由陰極往陽極跑，之後以 Ethidium Bromide 染色，在紫外燈下觀看。

轉型 (Transformation) 及篩選 (Selection)

隔夜培養 *E.coli* TG-1，然後取 1/50 體積接種在含有安匹西林 (100 μ g/ml) 的 L 肉湯，放在 37°C 200 rpm 搖動，一直到吸光度在 OD_{650} 為 0.6，此時約須二小時。取 50ml 的菌液以 3000rpm，5 分鐘，4°C 離心。去上清液。加入無菌冰的 0.1M $MgCl_2$ 25ml，快速震盪混合，之後立刻以 3000rpm，5 分鐘，4°C 離心。去上清液，加入無菌冰的 0.1M $CaCl_2$ 12.5ml，置冰中，小心溫和地以玻璃吸管一吸一放地混合之。置冰中至少 1 小時。以 3000rpm，5 分鐘，4°C 離心，去上清液，加入無菌冰的 0.1M $CaCl_2$ 5ml，小心溫和地混合之。取 300 μ l 加入接合好的 DNA 25 μ l，另各取 300 μ l 加入 10 倍 100 倍稀釋的 DNA 25 μ l，置冰中 40 分鐘至 1 小時，之後放置在 42°C 1 分鐘 (或 37°C 5 分鐘)。塗抹在含有安匹西林 (100 μ g/ml) 的平板培養基上，37°C 隔夜培養。隔天從此含有安匹西林 (100 μ g/ml) 的平板培養基上，挑選長出來的菌株 8 株再劃在另一個含有安匹西林 (100 μ g/ml) 的平板培養基上，37°C 隔夜培養，使我們能得到更純的

單一菌株。隔天從此含有安匹西林 (100 μ g/ml) 的平板培養基上，各挑選長出來的菌株 1 株，種於含有安匹西林 (100 μ g/ml) 的 L 肉湯中，37°C 隔夜培養。隔天從此含有安匹西林 (100 μ g/ml) 的 L 肉湯中，吸取 0.2ml 放於 1.8ml 的含安匹西林 (100 μ g/ml) 的 L 肉湯中，放在 37°C 200 rpm 搖動，2 小時。取 300 μ l 離心 10000 rpm 4°C 5分鐘，凍於 -70°C。剩下的 1.7ml 菌液加上 IPTG (isopropyl beta-D-thiogalactoside) 使其最終濃度為 0.1mM。放在 37°C 200 rpm 搖動，2 小時，取 200 μ l 離心 10000 rpm 4°C 5分鐘，再將此 200 μ l 菌液離心後的沈澱物與前面凍在 -70°C 的菌液離心後的沈澱物一起以 SDS-PAGE sample buffer 100 μ l 混合後煮沸 5 分鐘。跑 SDS-PAGE 來篩選轉型 (transformatrion) 成功的菌株。

**SDS-PAGE Gel (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
of Proteins)**

Mini-resolving gel : (12.5%)

試藥 : (1:36) 30% Acrylamide : 3.75ml

1.5M Tris pH 8.6 : 2.25ml

H₂O : 3ml

20% SDS (Sodium dodecyl sulfate) : 45 μl

10.0% A.P. (Ammonium persulfate) : 35 μl

TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)
: 5 μl

方法 : 靜置作用 60 分鐘，以 20% 酒精壓平，為下層膠
(Lower gel)。

Stacking gel :

試藥 : (1:36) 30% Acrylamide : 1.0ml

0.5M Tris pH 6.8 : 1.9ml

H₂O : 4.5ml

20% SDS (Sodium dodecyl sulfate) : 35 μl

10.0% A.P. (Ammonium persulfate) : 40 μl

TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)

: 10 μ l

方法： 靜置作用 15分鐘，並加上齒槽做蛋白質欲放置的凹槽的模型，為上層膠 (Upper gel)。

樣品： 將欲測的樣品與樣品緩衝液，一起混合完全後煮沸 5 分鐘，待冷卻後，將處理過的樣品置入凹槽中，以 100 伏特的電壓在 Tank buffer (Tris 3g / Glycine 14.4g / SDS 1g / 每公升) 中使樣品由陰極跑向陽極，當第一個染料跑掉時，即可關掉電源。取下 SDS-PAGE Gel 置放於 Staining buffer (0.1% Coomassie blue / 10% Acetic acid / 50% methanol) 中染色 2 小時，之後以脫色液 (10%Acetic acid / 45% methanol) 脫色至背景色為透明無色為止。

GST 融合型蛋白質的表現 (Expression) 和純化

a. GST 基因融合系統的介紹：

Insertion of foreign gene into GST expression vector.



Growth and induction of bacteria transformed with recombinant vector.



Harvesting and lysis of bacteria. Clarification of homogenate.



Adsorption of fusion protein onto gel.



Elution of fusion protein. Proteolytic cleavage of fusion protein immobilized on gel.



Proteolytic cleavage in solution of eluted fusion protein.



Further purification of foreign (poly)peptide

b.步驟：

將轉型成功的 *E.coli* 菌株先隔夜培養，然後取 1/50 體積接種在含有安匹西林 (100 μ g/ml) 3000ml 的 L 肉湯中，放在 37°C 200 rpm 搖動，一直到吸光度在 OD₆₀₀ 為 0.5，此時約須二小時。在 3000ml 的 L 肉湯中加入 IPTG (Isopropylthiogalactosidase) 使最終濃度為 0.1mM，繼續放在 37°C 200 rpm 搖動二小時，3000g 離心15分鐘，去上清液。以 TBS (Tris Buffer saline) 洗塵澱物 1-2 次，離心後加入 1:100 體積比的 TBS (Tris Buffer saline)，約 30ml。之後加入 lysozyme 7.5mg (10mg lysozyme / 40ml TBS)，置室溫30 分鐘，再加入 MgCl₂ (1M) 150 μ l；DNase I (10mg / ml) 60 μ l；Aprotinin 200 μ l；PMSF (Phenylmethyl- sulfonyl fluoride 100mM) 150 μ l；Tween-20 150 μ l。將此溶液置放在液態氮 N(l) 中，並旋轉容器，使之能夠快速結冰，再迅速解凍於 45°C 中，加 PMSF 150 μ l。如此結凍、解凍 3 次，再以超音波處理樣品由膠液態變成液態，以 15000 rpm 4°C 離心 10 分鐘，取上清液。上清液約 30ml 加上 15 μ l 之 EDTA (0.5M)混合。過 millipore (1.2 μ M) 2 次，通 column (新的粉狀 Glutathion

bead 100mg 泡在 50ml 的 TBS 中，洗 3 次，填塞在 column 中，以含有 0.25mM EDTA 的 TBS 100ml 沖洗之) 3 次，再以 TBS 洗至 OD_{280} 小於 0.003，利用洗出緩衝液 (Glutathion elution buffer; Tris 0.605g / Reduced Glutathione 0.154g / 每 100ml / pH8.0) 將 OD_{280} 值最高者收下來，並以 TBS 清洗 column。(column 可重複使用。) 收集下來的樣品須以透析模 / PBS 透析之。

蛋白質的測定

採用 BIO-RAD PROTEIN ASSAY 的方法。以 0、2、4、6、8、10 μ g BSA / ml 當 standard，standard 與預測定的樣品皆溶於 0.8ml 的 H₂O 中，待混合完全後，各加入 0.2ml 的 Bio-Rad reagent，混合完全後，靜置 5 分鐘，再各取 150 μ l 至 ELISA plate 上，以 ELISA reader 判讀結果。

轉印 (Transfer)

採用 ATTO corporation 的 AE-6675

HORIZBLOT。SDS-PAGE Gel 和硝基纖維素紙 (Nitro-cellulose paper) 大小為 $9 \times 6.5 \text{ cm}^2$ ，毫安培數為 146.0，伏特數為 100 Volts，由負極往正極跑。轉印時間為 40分鐘至 60 分鐘，轉印 (Transfer) 完成後以 2% Ponceau-S 染色看看蛋白質是否有轉印成功，並用鉛筆標示分子量的大小於硝基纖維素紙上 (Nitro-cellulose paper)。

蛋白質免疫轉印法 (Western Blot)

轉印成功的硝基纖維素紙 (N-C paper)，先以 5% 的脫脂奶做阻斷的工作，置放於室溫至少 30 分鐘。將病童的血清，以 1：5 倍稀釋，與硝基纖維素紙 (N-C paper) 一起於 4 °C 中作用隔夜，之後以 TBS-Tween 洗 3 次每次 10 分鐘。然後加入第二級抗體 (已接上放射性¹²⁵碘的老鼠抗人類血清中的免疫球蛋白 IgE 的抗體)，於室溫中一起作用 3 小時，之後以 TBS-Tween 洗 6 次每次 10 分鐘，最後待硝基纖維素紙 (N-C paper) 乾了之後，以 X-光片壓片、洗片即可。

點狀免疫吸附分析法 (Dot-blot immunobinding assay)

將欲測試的抗原蛋白質直接點在硝基纖維素紙 (N-C paper) 上，待乾燥後，以 5% 的脫脂奶做阻斷的工作，置放於室溫至少 30 分鐘。將病童的血清，分別以 1：5 倍稀釋，與硝基纖維素紙 (N-C paper) 一起於 4°C 中作用隔夜，之後以 TBS-Tween 洗 3 次每次 10 分鐘。然後加入接上放射性¹²⁵碘的老鼠抗人類血清中的免疫球蛋白 IgE 的抗體，於室溫中一起作用 3 小時，之後以 TBS-Tween 洗 6 次或更多，每次 10 分鐘，最後待硝基纖維素紙 (N-C paper) 乾了之後，以 X-光片壓片、洗片即可。

肆、結果

1. *Der p* II 相關基因 II-8 的 cDNA 次序的決定是用廠商的 Sequencing Version 2.0 kit(USB, Ohio) 以雙去氧核

酸鏈中止的方法完成的。

a. *Der p* II 相關基因的cDNA 次序 (圖一)

```

CACAAATTCCTTCCTTCCTTACTGATCATTAATCTGAAAACAAAACCAACAA
-17                               -10                               -1
ACCAATCAAA ATG ATG TAC AAA ATT TTG TGT CTT TCA TTG TTG GTC GCA GCC GTT GCT GCT
Met Met Tyr Lys Ile Leu Cys Leu Ser Leu Leu Val Ala Ala Val Ala Ala
                               10                               20
GAT CAA GTC GAT GTC AAA GAT TGT GCC AAT CAT GAA ATC AAA AAA GTT TTG GTA CCA GGA
Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Lys Val Leu Val Pro Gly
                               30                               40
TGC CAT GGT TCA GAA TCA TGT ATC ATT CAT CGT GGT AAA OCA TTC CAA TTG GAA GCC GTT
Cys His Gly Ser Glu Ser Cys Ile Ile His Arg Gly Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Val
                               50                               60
TTC GAA GCC AAC CAA AAC TCA AAA ACC GCT AAA ATT GAA ATC AAA GCT TCA ATC GAT GGT
Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Lys Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly
                               70                               80
TTA GAA GTT GAT GTT CCC GGT ATC GAT CCA AAT GCA TGC CAT TAT ATG AAA TGT CCA TTG
Leu Glu Val Asp Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Lys Cys Pro Leu
                               90                               100
GTT AAA GGA CAA CAA TAT GAT ATT AAA TAT ACA TGG AAT GTT CCG AAA ATT GCA CCA AAA
Val Lys Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys Ile Ala Pro Lys
                               110                               120
TCT GAA AAT GTT GTC GTC ACT GTT AAA GTT ATG GGT AAT GAT GGT GTT TTG GCC TGT GCT
Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Met Gly Asn Asp Gly Val Leu Ala Cys Ala
                               129
ATT GCT ACT CAT GCT AAA ATC CGC GAT TAAATTCAGCAAACAAACAAAATTTATTGATTTTGTAAATCAA
Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Arg Asp
ATCAATTGATTTTCTTTCCAAAAAATAAAAAATAAGGGAATTC

```


c. II-8 與 S2R 蛋白質其氨基酸的變化而影響電荷的變化情形：

NO. -1 Arg \rightarrow Pro(postively charged \rightarrow nonpolar)

NO. 26 Pro \rightarrow Ser(nonpolar \rightarrow polar but uncharged)

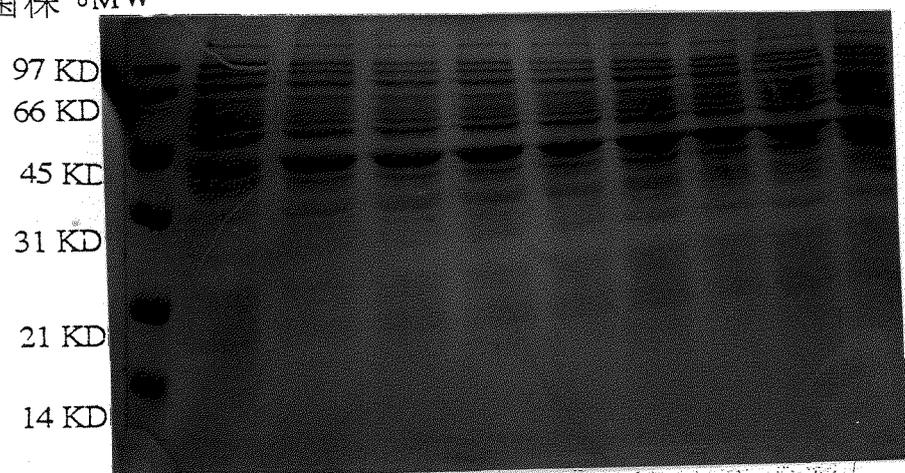
NO. 47 Thr \rightarrow Ser(polar but uncharged)

NO.113 Asp \rightarrow Asn(negatively charged \rightarrow polar but uncharged)

2. *Der p II* 相關基因 (N5B10) 與表現載體 pGEX-2T

接合成功後，轉型 (transformation) 送入寄主細胞 TG-1，以一倍、十倍、一百倍稀釋培養在平板培養皿中，挑選出 8 個菌落，再經 IPTG 的誘導 (induced)，以 SDS-PAGE 篩選出

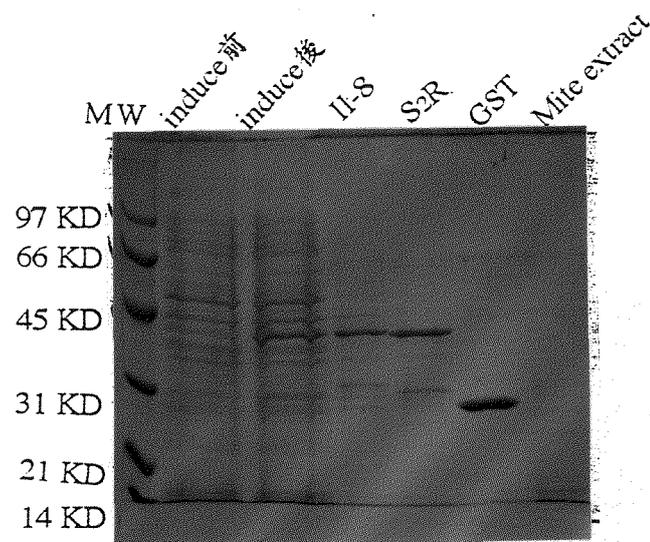
接合成功的菌株。MW
(圖三)



圖三： lane 1 : molecule weight. lane 2. non-induced.

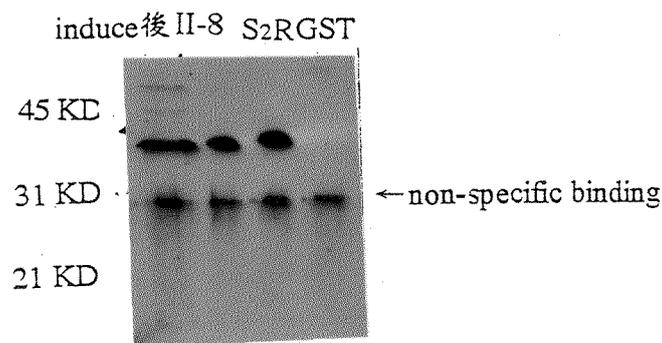
lane 3-8 : transformation 經 Ampicillin 篩選後分別挑選出六株菌落，再以 IPTG induced，觀察 pGEX-2T-*Der p II* cDNA 的表現情形。

3. 將轉型成功的 *E.coli* 菌株加入 IPTG 誘導 (induced) 後，將菌液打破，通 column，再以 TBS 洗至 OD_{280} 小於 0.003，利用洗出緩衝液 (Glutathion elution buffer: Tris 0.605g / Reduced Glutathione 0.154g / 每 100ml / pH8.0) 將 OD_{280} 值最高者收下來。收集下來的樣品以透析模 / PBS 透析之。(圖四)



圖四：lane 1：molecule weight. lane 2：non-induced. lane 3：IPTG induced. lane 4：*Der p* II related allergen (II-8) lane 5：GST. lane 6：mite extract.

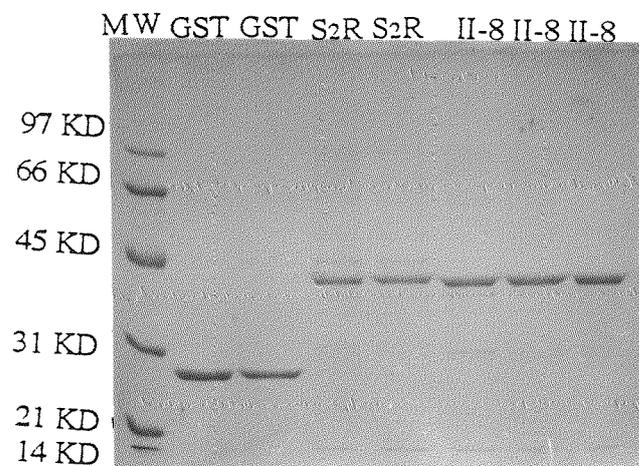
4. 將跑好的 SDS-PAGE 利用 ATTO corporation 的 AE-6675 HORIZBLOT 轉印 (Transfer) 到硝基纖維素紙 (Nitro-cellulose paper) 上，做 Western blot。以 5% 的脫脂奶做好阻斷的工作，將病童的血清與硝基纖維素紙 (N-C paper) 一起作用。第二級抗體為已接上放射性¹²⁵碘的老鼠抗人類血清中的免疫球蛋白 IgE 的抗體，以 X-光片壓片、洗片即可。(圖五)



圖五：lane 1 : non-induced. lane 2 : IPTG induced.
lane 3 : *Der p* II related allergen (II-8)
lane 4 : GST. lane 5 : mite extract.

5.將欲測試的抗原蛋白質直接點在硝基纖維素紙 (N-C paper)上以便做 Dot blot。待乾燥後，以 5% 的脫脂奶做阻斷的工作，將病童的血清與硝基纖維素紙 (N-C paper) 一起作用，第二級抗體是已接上放射性¹²⁵碘的老鼠抗人類血清中的免疫球蛋白 IgE 的抗體。結果：

a. 將欲點在 N-C paper 上的蛋白質先以 BIO-RAD PROTEIN ASSAY 的方法測定。下圖為定量後的蛋白質的 SDS-PAGE。(圖六)



圖六：lane 1：molecule weight. lane 2.3：GST.

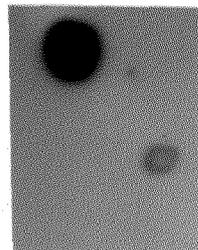
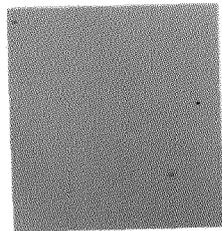
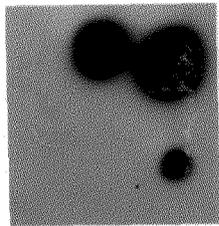
Lane 4.5：S2R. lane 6.7.8：II-8.

Each lane was loaded 2 μ g sample.

b. 將 II -8、S2R 融合蛋白質以及 Mite extract、GST直接點在硝基纖維素紙 (Nitro-cellulose paper)上，觀察其與病童血清中的 IgE 反應發現有三種情形：(圖七)

- a. II -8、S2R 及 Mite extract 皆有反應。
- b. II -8、S2R、GST 及 Mite extract 皆沒有反應。
- c. S2R 及 Mite extract 皆有反應，II -8、GST沒有反應。(Repeated)

S2R	II-8
GST	Mite

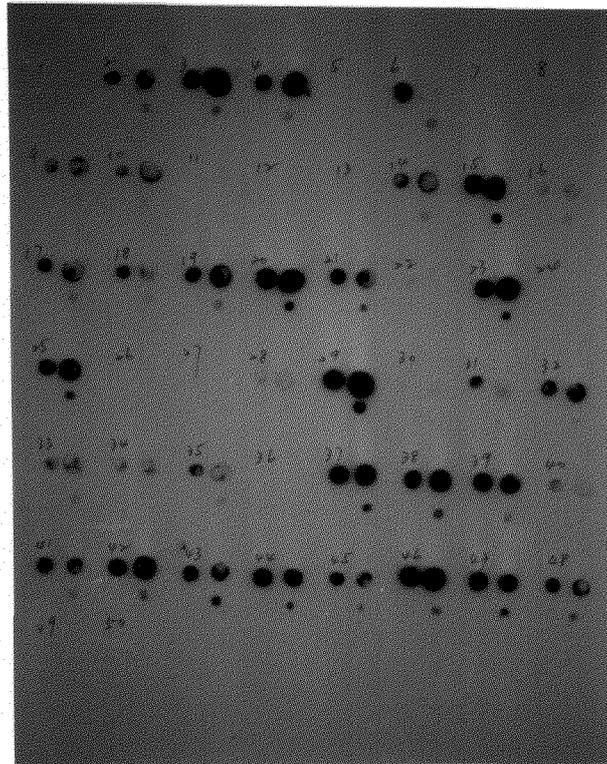


圖七：

- a. II -8、S2R 及 Mite extract 皆有反應。
- b. II -8、S2R、GST 及 Mite extract 皆沒有反應。
- c. S2R 及 Mite extract 皆有反應，II -8、GST沒有反應。(Repeated)

c. 下圖為 50 位病童血清中的 IgE 與 II-8、S2R 融合蛋白質以及 Mite extract、GST 做 Dot blot 的結果。(圖八)

S2R	II-8
GST	Mite



d. 50 位病童血清中的 IgE 與 II-8、S2R 融合蛋白質以及 Mite extract、GST 做 Dot blot 的結果。(表一)

Patient	mite	S2R	II-8	GST
1	-	-	-	-
2	+	++	++	-
3	+	++	+++	-
4	+	++	+++	-
5	-	-	-	-
6	+	++	-	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
9	+	+	+	-
10	+	+	+	-
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
14	+	+	+	-
15	++	++	++	-
16	+	+	+	-
17	+	++	+	-
18	+	++	-	-
19	+	++	++	-
20	++	+++	+++	-
21	+	++	+	-
22	-	-	-	-
23	++	++	+++	-
24	-	-	-	-
25	+	++	++	-
26	-	-	-	-
27	-	-	-	-
28	+	+	+	-
29	++	++	+++	-
30	-	-	-	-
31	+	+	-	-
32	+	++	++	-
33	+	+	+	-
34	+	+	+	-
35	+	+	+	-
36	-	-	-	-
37	++	++	++	-
38	+	++	++	-
39	+	++	++	-
40	+	+	+	-
41	+	++	++	-
42	+	++	++	-
43	++	++	+	-
44	+	++	++	-
45	+	++	+	-
46	+	+++	+++	-
47	++	++	++	-
48	+	++	+	-
49	-	-	-	-
50	-	-	-	-

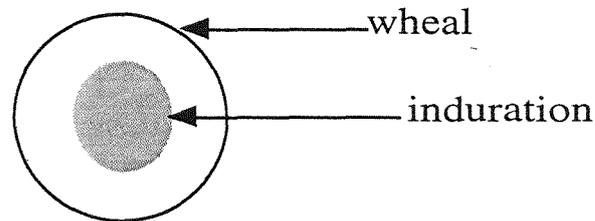
肆、結果

8.以 HDM (House dust mite)、GST、II-8、S2R、
1-129、22-129、DpVII、DfVII等蛋白質作皮膚試驗，結果
如下：(表二)

Patient NO.	Induration/Wheal (in mm)				
	1	2	3	4	5
HDM	11x12/25x25	7x7/34x30	(-)	11x11/35x27	10x11/20x18
GST	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
II-8	15x15/30x25	11x8/29x30	(-)	12x12/36x37	11x10/25x18
S2R	5x7/15x17	7x7/18x17	(-)	8x7/30x27	(-)
1-129	10x8/25x22	(-)	(-)	7x7/23x22	(-)
22-129	5x5/5x5	8x8/26x8	(-)	(-)	(-)
Dp VII	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Df VII	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Patient NO.	Induration/Wheal (in mm)			
	6	7	8	9
HDM	(-)/7x7	7x7/9x11	(-)	9x8/33x30
GST	(-)	(-)	(-)	(-)
II-8	9x8/12x12	9x9/12x12	11x9/28x18	13x10/30x25
S2R	(-)/7x7	(-)	8x7/17x14	8x8/27x26
1-129	(-)	(-)	7x6/13x12	11x10/23x22
22-129	(-)	(-)	(-)	(-)
Dp VII	(-)	(-)	(-)	(-)
Df VII	(-)	(-)	(-)	(-)

上表中分母代表 wheal (疙瘩、紅暈) 的大小，分母代表 induration (硬結)，單位為 mm。



從實驗結果得知 9 位接受皮膚試驗的病童中有 3 位只對利用臺灣氣喘病童血清中的 IgE 調出來的過敏原 II-8 有反應，而對 S2R 過敏原並沒有反應。從這樣的結果我們可以得知，利用臺灣氣喘病童血清中的 IgE 從 mite library 調出來的過敏原 II-8 在與 IgE 的結合方面的確與 S2R 有差異的存在，也就是說其 IgE 所認識的抗原決定位置 (epitope) 是有所不同的。Dp II 過敏原中的 isoform 在澳洲主要為 S2R，而這 3 位臺灣氣喘病童除了會與 II-8 反應之外，並不會與 S2R 反應。可見 mite allergen 具有地區性的差異，並且不同的 species 彼此間亦有所差異。

伍、討論

從 II-8 與 S2R DNA 序列的比較圖中發現由於 3' 端的許多變化，可以得知 II-8 與 S2R DNA 是由兩個不同的 mRNA 所轉譯出來的，也就是說，house dust mite 的 genomic sequence 中有一個以上的基因來製造 *Der p* II 蛋白質。(more than one gene coding for *Der p* II protein)

Der p II 相關基因 (N5B10) 藉由表現載體 pGEX-2T 所產生的 GST 融合蛋白質，我們稱之為 II-8。經由 Western blot 的結果可以看出血清中 IgE 並不會與 GST 反應，所以並不用擔心 GST 融合蛋白質會呈偽陽性反應。

II-8 蛋白質有三個氨基酸與 *Der p* II 過敏原不同，其中 NO. 26 與 NO. 113 造成極性的變化。NO. 26 是由 Pro→Ser，Proline 為 Helix breaker，且具有使 helix 結構彎曲的能力，因此，Proline 由 Serine 取代的結果就可能會引起局部結構改變的結果。而在 1991 年 Dr. Evavold 和 Allen 曾提出 antihemoglobin T 細胞株落會因為 Thr 由 Ser 替代，以及 Gln 由 Asn 替代而完全失去了它 Epitopic activity。恰巧 NO. 47 正是 Thr 由 Ser 替代的情形。這三個氨基酸的變化是否會使整個抗原決定位置的結構發生改變呢？還是線狀的抗原決定位置單點發生改變，而影響 IgE

與其他的結合情形呢？皆是需要繼續努力的方向。

1990 年 Dr. Chua 曾經研究家塵蟎自然型的過敏原 *Der p II* 與藉由表現載體 pGEX 所產生的融合蛋白質 (fusion protein) *gst-pII* 對成年病人與病童血清中 IgE 的結合情形是否有差異。

	Native <i>Der p II</i>	<i>gst-pII</i> (S2R) ^a
Adult (n=12)	12	12
Children (n=12)	12	10 ^b

a. Recombinant *Der p II* glutathione-S-transferase fusion.

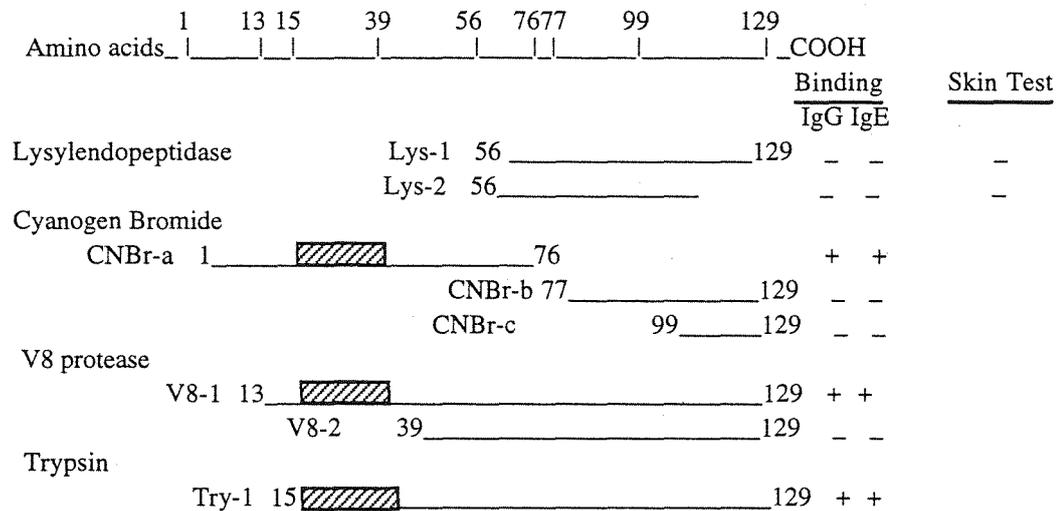
b. The children showing no reactivity with recombinant *Der p II* gave weak reactions with native *Der p II*.

由上圖得知家塵蟎自然型的過敏原 *Der p II* 與藉由表現載體 pGEX 所產生的融合蛋白質 (fusion protein) *gst-pII* 對成年病人血清中的 IgE 做 Dot blot 其結合情形相同。而 12 位血清中的 IgE 與自然型的過敏原 *Der p II* 有反應的病童中，有 2 位血清中的 IgE 不會與融合蛋白質 (fusion protein) *gst-pII* 反應，這兩位病童血清中的 IgE 與自然型的過敏原 *Der p II* 的反應很微弱。

由此可知利用表現載體 pGEX 所產生的融合蛋白質

(fusion protein) gst-pII 來進行過敏原 *Der p II* 與人類血清中的 IgE 結合能力是可以替代的一個有利的工具。

1993 年 EIKI OSHIKA 等人研究 *Der p II* 過敏原的各個片段與 IgE 和 IgG 的結合情形。如下圖：



結果 EIKI OSHIKA 認為第 15 到 39 個氨基酸是很重要的片段，在三段與 IgG、IgE 有反應的氨基酸片段中第 15 到 39 個氨基酸為其交集。而 II-8 蛋白質與 *Der p II* 過敏原不同的三個氨基酸中恰有一個氨基酸 NO. 26 座落於此。是否會造成 抗原決定位 (epitope) 有意義的影響，仍待進一步的研究。

我們從 Dot blot 的結果發現單位體積內相同的濃度的蛋白質 S2R 與 II-8 其與病童血清中 IgE 的結合情形有所差異。部份 II-8 與病童血清中 IgE 的結合情形較 S2R 與病童血清中 IgE 的結合情形為強，臺大免疫所蔡考圓老師所指導的鄭書緯同學做

Dot blot 的結果發現 40 位病童血清中的 IgE 有 3 位只與 II-8 蛋白質有反應，而完全不與 S2R 反應。其他大多數的結果皆是 II-8 反應較 S2R 為強。此外，有三位病童血清 (NO.6. 18. 31.) 只與 S2R 反應，而不會與 II-8 蛋白質反應，已重做確定結果。此兩者之間的差異是否會因為當初 II-8 是由臺灣本地的病童血清中的 IgE 所篩選出來的差異而具有意義呢？皆需進一步的探討。

經由台灣大學醫學院附設醫院所作的皮膚試驗顯示出 9 位病童中有三位的皮膚試驗只對 II-8 蛋白質有反應而不與 S2R 有反應。由此充分的指出 S2R 與 II-8 各有不同的 epitope，並且其間的差異恰能檢查出對 DpII 過敏的病童其皮膚試驗不會與 S2R 反應的漏網之魚。總之，II-8 的發現對臺灣的部份氣喘病童是件重要的事，或許 II-8 才是引起他們過敏性疾病的元凶。

Part II :

Der p II 單株抗體的建立

Production of Monoclonal Antibodies Against *Der p*
II allergen

壹、研究背景

一、單株抗體的發展及原理

對於 B 淋巴球接受抗原刺激後，產生抗體專一性的了解，首先來自 Burnet 於 1950 年提出的 clonal selection hypothesis，認為一個 B 淋巴球或由此 B 淋巴球所分化而來得漿細胞 (plasma cell) 所產生的抗體只對抗一種抗原決定位 (Antigenic determinant)，因而建立起單一來源 (monoclonality) 的觀念。

由於大多數的抗原分子在生物體內引起的反應為多源的 (polyclonal)，故傳統的抗血清都是異質的 (heterogeneous)，早期欲獲得均質抗體有二類方法：(1) 將某些品系的老鼠，例 Balb/c、NZB 等小白鼠，以腹腔多次注射礦油 (mineral oil)，刺激產生骨髓瘤，可以體外培養均質抗體，因為無法得知其抗原專一性，故只能用於抗體結構、抗體基因方面的研究。(Furth ME., 1982 ; Galfre G., 1977)

(2)Steinitz 用 Epstein-Barr Virus，Strosberg 用 Simian Virus 40 (SV40)將經高度免疫的兔脾臟細胞變形

(transform) 後來獲得特異性抗體，也因變形細胞生長不穩定而無法推廣。(Steintz M., 1977 ; Strosberg AD., 1971)

直到 1975 年 Kohler 及 Milstein 以對 8-azaguanine 具抵抗性的老鼠骨髓瘤細胞株與經以綿羊紅血球免疫的 Balb/c 老鼠脾臟細胞，加入 Sendai 病毒促使細胞融合，得到 10 個融合細胞，其中兩個可以大量產生抗綿羊紅血球的抗體，從此建立了利用融合瘤來產生大量均質抗體的方法。(Kohler G. and Milstein C., 1975 ; Kohler G. et al.,1978)

融合瘤技術的發展成功，須歸功於可生長於篩選培養基之骨髓瘤細胞突變株的發展成功，利用某些骨髓瘤細胞對某些藥物具有抵抗性，則可加入此藥物而抑制其他細胞的生長：如 Kohler 等曾以抗 8-azaguanine 的簇群進行實驗，找出 Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT-) 有缺陷的細胞 (Casbey CT and Kruh GD., 1979 ; Kohler G. and Milstein C., 1975)，Cotten 篩選出對 5, -bromodeoxy-Uridine 具抵抗性而 thymidine kinase 有缺陷 (TK-) 的骨髓瘤突變株。此兩種細胞都無法在 HAT (hypoxanthine aminopterin , thymidine) 培養液中存活，因

TK- 或HGPRT- 都無法利用培養液中的 thymidine 或 hypoxanthine 來合成細胞分裂時所須的 DNA，而 aminopterin 與葉酸結構相似而與葉酸還原酵素 (folic acid reductase) 緊密結合，更抑制了細胞內源性 (De Novo) 合成 purines 及 pyrimidines 的輔酵素活性 (Casbey CT and Kruh GD., 1979)。

目前常被使用的骨髓瘤細胞株，NS1-Ag 4/1 仍具有分泌 κ 鏈的能力，而 SP2/0-Ag14 及 F0 則不具分泌抗體特性 (Antczak DF., 1982 ; Kearney JF et al.,1979 ; Kohler GH., 1978)。

脾臟細胞的取得最好是與骨髓瘤細胞同源品系之動物，因為兩者 MHC (major histocompatibility antigen) 愈相似，所形成之融合細胞愈穩定，目前常用來供做免疫的小白鼠以 Balb/c 品系為主，此外如 AKR/J. 及 Balb/c×Balb/k 等品系亦常被使用 (Antczak DF., 1982 ; Kasamatsu H., 1982 ; Kearney JF et al.,1979 ; Kohler GH., 1978 ; Orvell G and Grandien M., 1982 ; Kar SK et al., 1981)。

最早使用 Sendai 病毒做融合促進劑，因不易控制融合情況，差異大，又具危險性，故現今已不採用，目前廣被使

用的融合劑為 polyethylene glycol (PEG)，主要作用是幫助細胞凝集，而形成融合細胞，但 PEG 對細胞有毒性，毒性大小與分子量成正比，因此選擇分子量介於 500 - 6,000，使用濃度 30 - 50% (John GRH., 1982)。

欲早期且正確地檢出分泌特異性抗體的融合瘤，常用的方法有放射性免疫分析法 (radio-immune assay ; RIA) (Gosting LH et al., 1984 ; Kamisango KI., 1985 ; Strand BC et al., 1982)，酵素結合免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay)，螢光抗體法 (fluorescence antibody ; FA) (Epstein AL., 1984 ; Roumillat LF et al., 1984 ; Walsh EE et al., 1984)。自 Engvall 和 Perlman 發表了酵素免疫測定 (enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA) 的原理與應用後，因其安全性高、試劑價錢合理，物性穩定，靈敏度已接近 RIA，且操作簡單，可經自動化設計等優點，被廣泛應用在微生物學 (Anderson LJ et al., 1983 ; Weil GJ et al., 1985)。最近，更發展出免疫轉印技術 (immuno blotting technique)，是應用蛋白質轉印 (western blotting) 方法將已電泳完畢之聚醯胺膠上的蛋白質垂直電泳至硝化纖維紙上，此經電泳至硝化纖維紙上的蛋白質可以用免

疫學方法證明，而結

合 ELISA 成為酵素連接免疫轉印技術 (enzyme-linked immuno blotting technique) 可證明單源抗體所作用之抗原決定區是位於哪一個蛋白質上 (Gershoni JM and Palade GE., 1983 ; Roumillat LF et al., 1984)。

二、單株抗體的應用

利用融合瘤製造出來有專一性的單株抗體有下列優點：(Anderson LJ et al., 1983 ; Cotton RGH and Milstein C., 1973 ; EMBO, SKMB course. 1980 ; Goding JW., 1980 ; Gold p and Freedman SO., 1965 ; Kozber DP et al., 1984 ; McMichael AJ and Fabre JW., 1982 ; ST. Groth SF and Scheidegger D., 1980)

- (1) 以獲得性質完全一致的抗體。
- (2) 融合瘤可以注射至同質動物腹腔以獲得大量抗體。
- (3) 抗體純化簡單，且純化後抗體純度高。
- (4) 利用單源抗體，可以自粗萃取液將抗原純化。

(5) 融合瘤細胞可以冷凍保存，抗體來源不成問題。

(6) 單源抗體可以對抗細胞抗原，而將不同的細胞分開。

(7) 挑選高親合力 (affinity) 的抗體，可以提高測定血清中微量物質如 CEA (carcino embryonic antigen)、hormone 等的敏感度。

由於單株抗體的許多優點，不論在植物、動物之病原體的診斷上或動物疾病的治療上都可做更迅速正確的診斷或治療，而在免疫學、分子生物學及生物醫學上拓展領域，可做更深入的基礎研究 (Gold P and Freedman SO., 1965 ; Herlyn M et al., 1979 ; Yelton DE and Scharff MD., 1981)。

(1) 在生物化學方面，以單株抗體做成 affinity column 可純化各種蛋白質，且可做為探子 (probe)，探索分子上各不同決定基構造上的異同，或結合 DNA 重組技術可決定特定基因的位置做基因定位 (gene mapping) 方面的研究如 Mettenleiter 等利用對抗假性狂犬病毒酵素蛋白 A 之單源抗體，篩選出能表現產生酵素蛋白 A 的重組基因片斷，進而決定出酵素蛋白 A 的構造基因是位在基因圖 (gene map) 上

0.86 - 0.89 之位置 (Mettenleiter TC., 1985)。

(2) 在微生物學方面，應用於細菌、病毒和微生物毒物的分子研究，以單源抗體做試劑，可提高敏感度，減少 cross-reaction。例如以梅毒螺旋體 (*Treponema pallidum*) 的單源抗體可靈敏地檢驗出檢體液中只含少量約 10^3 個螺旋體 (NorGard MV et al., 1984)，又如在流行性感冒病毒 (Phillips DJ et al., 1982)、B 型肝炎病毒 (Walsh EE et al., 1984) 等病毒感染之診斷上廣泛地應用。

(3) 在免疫學上，應用於淋巴球分類分化的研究及免疫調節、組織抗原的了解 (Marshak-Rothstein AP et al., 1979 ; Zarling JM and Kung PC., 1980)。

(4) 在腫瘤免疫上，可以尋找腫瘤抗原，研究其特性，以利對腫瘤分化的了解，並為提供腫瘤治療、腫瘤定位、血清檢查的最好方法。如 Blythman 等用單源抗體加上一段具毒物的物質而形成 immunotoxins，能對特定的腫瘤細胞具毒殺作用 (Blythman HE et al., 1981)。

貳、材料與方法

免疫 B6 小白鼠 (Immunization)

從台大醫學院購買 5 至 7 週的 B6 小白鼠。將自然型的 *Derp II* 抗原蛋白質 50 μ g 溶於 0.5ml PBS (phosphate-buffer Saline) 中，再與 0.5ml complete adjuvant 以超音波充分混合後，以皮下注射至小白鼠 B6 的腹腔，兩週後將自然型的 *Derp II* 抗原蛋白質 50 μ g 溶於 0.5ml PBS 中，再與 0.5ml incomplete adjuvant 以超音波充分混合後，再一次以皮下注射至小白鼠 B6 的腹腔，為第一次追加。兩週後，再將自然型的 *Derp II* 抗原蛋白質 50 μ g 溶於 0.5ml PBS 中，再與 0.5ml incomplete adjuvant 以超音波充分混合後，再一次以皮下注射至小白鼠 B6 的腹腔，為第二次追加。兩週後，以酵素結合免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA) 測定小白鼠 B6 血清中抗體對 *Derp II* 抗原蛋白質的效價為多少？如果不及 1 : 100 倍稀釋濃度，就再繼續追加第三劑，如果達到 1 : 100 倍

稀釋濃度以上就可以將純的 *Derp II* 抗原蛋白質 $50\mu\text{g}$ 溶於 0.5ml PBS 中從尾靜脈注射進去。約 3-4 天後從心臟採血並取其脾臟供作融合用。

融合 (Fusion)

自小白鼠 B6 的心臟取血，迅速拉斷頸椎，待血液凝固後以 2500 rpm 10 分鐘離心。斷頸後將小白鼠 B6 泡於 75% Alcohol 中。固定後剪開皮膚及腹肌，撐開，脾臟 (spleen) 於左下方。(脾臟在肝臟的下方，切勿將腸道剪破，以防腸內物污染脾臟。) 取出脾臟，泡在 RPMI-1640 內，更新 RPMI-1640，去除脾臟上的脂肪。以 RPMI-1640 浸洗三次，以無菌平板物緩緩壓碎脾臟，直到只剩下脾臟的外包膜為止。將上述溶液放置於試管內，待大組織沈澱後再取上層只含細胞之 RPMI-1640 培養液。(假設每個脾臟含 1×10^8 個細胞)。上層只含細胞之 RPMI-1640 培養液以 400G 5 分鐘離心，再以 RPMI-serum free medium 洗兩次。離心，取沈澱的細胞。

將 X-63 myeloma cell 計數後，以 400G 5 分鐘離心，取沈澱的細胞。

將 RPMI-serum free medium 10ml 和 40ml 以及滅

過菌的 PEG (4000) 1g /ml。預先溫熱於 37°C 中。

將脾臟細胞與 X-63 骨隨瘤細胞以 4 : 1 的比例用 RPMI-serum free medium 混合在一起。以 400G 5 分鐘離心，取沈澱的細胞。

將沈澱的細胞輕輕地打散，在 37°C 作用一分鐘。加入 1ml 的 PEG，於 45 秒中緩慢地加入並攪拌。之後立刻於 30 秒內緩慢地加入 37°C 的 RPMI-serum free medium 10ml，馬上於一分鐘內繼續緩慢地加入 37°C 的 RPMI-serum free medium 40ml。

放置 8 分鐘後，在 37°C 作用兩分鐘。以 400G 5 分鐘離心，取沈澱的細胞，加入 10% 的 HAT-RPMI medium 200ml，分別加 200 μ l 至每一個 well 中。

酵素結合免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent
assay ; ELISA)

Coating Antigen : 每一公撮的 PBS 含 $1 \mu\text{g}$ 的 *Derp* II 。 ($1 \mu\text{g} / \text{ml}$) 。 每一個 ELISA PLATE 的 well 放置 $100 \mu\text{l}$ 已稀釋好的抗原蛋白質。於 37°C 1小時，或者是 4°C 放隔夜。以蒸餾水或 PBS 洗 3 次，甩乾。

Blocking : 1% BSA $200 \mu\text{l}$ 當 blocking agent 。
(10% BSA 50ml / 5% Thimensol 5ml or 0.1% gelatin 5ml /
PBS 445ml) 。 37°C 1小時，封好，可存於 4°C 中。以蒸餾水
或 PBS 洗 3 次，甩乾。

First Antibody : 加 $25 \mu\text{l}$ 的 antibody diluent
(10% BSA 50ml / 5% Tween-20 / PBS 450ml) ; 加 $25 \mu\text{l}$
欲測試的樣品 (被致敏的小白鼠 B6 的血清) 。 Negative
control : (一) diluent of antibody 。

Positive control : (+) anti-*Derp* II serum $5 \mu\text{l} / 0.5\text{ml}$
diluent 。 於 37°C 1-2 小時，以蒸餾水或 PBS 洗 5 次，甩
乾。

Secondary antibody : 加 50 μ l Secondary antibody
(1 μ l GAM / ml diluent) [Alkaline phosphatase
conjugated affini pure Goat Anti-mouse IgG+ IgM(H+
L)(minimal cross-reaction to Human Bovine and Horse
Serum protein)] 於 37°C 1 小時，以蒸餾水或 PBS 洗 5 次，
甩乾。

呈色：以 pNPP 呈色，50 μ l。

單殖 (Cloning)

採用限數稀釋法 (Limiting dilution method)。

a). Feeder cell：殺一隻老鼠，取其脾臟，磨碎後加 10% HAT-RPMI-1640 medium 至 100ml，每一個 well 中置入 100 μ l。

b). 欲選殖 (cloning) 的細胞混合均勻 (resuspension) 後，計算細胞數量，並調細胞數至每一公撮 50 個細胞，即每 100 μ l 有 5 個細胞的量，加 100 μ l 至第一區的每一個 well。再 3 倍 3 倍的稀釋至第二區、第三區、第四區。

c). 從以上四區挑選出只有從單一細胞長出來的株落，以酵素結合免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA) 測定，挑選出具分泌抗體能力的細胞株。之後逐漸地將 HAT-RPMI-1640 medium 換成 HT-RPMI-1640 medium，最後換成 10% FCS RPMI-1640 medium 大量培養。

單株抗體亞型的測定 (Isotyping)

採用 MonoAb-ID™ EIA Kit 進行測定。

Coating Antigen：每一公撮的 PBS 含 $1\ \mu\text{g}$ 的 *Derp* II 抗原蛋白質。 $(1\ \mu\text{g}/\text{ml})$ 。每一個 ELISA PLATE 的 well 放置 $100\ \mu\text{l}$ 已稀釋好的抗原蛋白質。於 37°C 1小時，或者是 4°C 放隔夜。以蒸餾水或 PBS 洗 3 次，甩乾。

Blocking：1% BSA $200\ \mu\text{l}$ 當 blocking agent。
(10% BSA 50ml / 5% Thimensol 5ml or 0.1% gelatin 5ml / PBS 445ml)。 37°C 1小時，封好，可存於 4°C 中。以蒸餾水或 PBS 洗 3 次，甩乾。

First Antibody：加 $25\ \mu\text{l}$ 的 antibody diluent (10% BSA 50ml / 5% Tween-20 / PBS 450ml)；加 $25\ \mu\text{l}$ 欲測試的樣品 (被致敏的小白鼠 B6 的血清)。 Negative control：(-) diluent of antibody。

Positive control：(+) anti-*Derp* II serum $5\ \mu\text{l}$ / 0.5ml diluent。於 37°C 1-2 小時，以蒸餾水或 PBS 洗 5 次，甩

乾。

Secondary antibody：RAM，完全採用 MonoAb-ID™ ELA Kit 進行測定。各加一滴 (約 50 μl)，37°C 1 小時，以蒸餾水或 PBS 洗 5 次，甩乾。加 GAR (Goat-anti-Rabbit) 50 μl，37°C 1 小時，以蒸餾水或 PBS 洗 5 次，甩乾。加入呈色劑，判讀。

Secondary antibody：

- (1) NRS:Normal Rabbit Serum:control
- (2) μ：Rabbit antimouse IgM (IgM)
- (3) γ 1：Rabbit antimouse IgG1 (IgG1)
- (4) γ 2a：Rabbit antimouse IgG2a (IgG2)
- (5) γ 2b：Rabbit antimouse IgG2b (IgG3)
- (6) γ 3：Rabbit antimouse IgG3 (IgG4)
- (7) κ：Rabbit antimouse Kappa light chain
- (8) λ：Rabbit antimouse Lambda light chain

單株抗體的大量生產

單株抗體的大量生產的方法有二：

(1) 組織培養法：

將快速生長的融合瘤細胞 20ml (10^6 cells/ml) 移入 500ml 攪拌培養瓶 (spinner) 中，加入 100ml 只含 2.5% 血清之骨髓瘤培養液，在含 CO_2 ， 37°C 恆溫培養中攪拌培養 1-2 天，再加入 400ml 含 1% 血清的 RPMI，繼續攪拌培養 2-3 天後，收集細胞培養液即可。

(2) 腹水法：

於 SCID 小白鼠之腹腔中注射 0.5ml 的 pristane，經 1-2 週後，取純化的融合瘤細胞，經 RPMI 洗滌 2 次後，離心去上清液，再懸浮在 0.5ml RPMI 中，每隻注射 10^6 - 10^7 細胞，約在 1-2 週後，待老鼠腹腔脹大，可插入無菌的 19 號注射針引流腹水而收集之，每 2 天引流一次，直到老鼠死亡。經離心除去細胞和脂肪，其顏色呈淡黃到淡紅不一，然後保存在 -20°C 冰箱中，供定性。

純化單株抗體 (Purification of Monoclonal Antibody of *Der pII*)

採用 Promega 的產品 Protein G。剛購買來泡好的 protein G 因含有保護劑，故需先以蒸餾水 (Distilled water) 洗三次。首先以 coating protein G 之圓珠 (bead) 填充於 column 內，以 PBS 沖洗之。

收集好的 Balb/c 小白鼠之腹水需先以 PBS 稀釋一倍，在 4°C 2500rpm 離心 5 分鐘，取上清液過 8 μ m 的 millipore。

以大約 100ml PBS 沖洗過的 column，最後當 PBS 快要流盡時，加入先前過濾過的腹水 (注意不可讓 bead 乾掉或者有氣泡存在，流速也不可太快，預防 bead 來不及抓 Antibody。column 總共要通三次，以增加 bead binding antibody 的能力。之後再以 PBS 沖洗 column 直至 base-line (OD280 小於 0.003)。

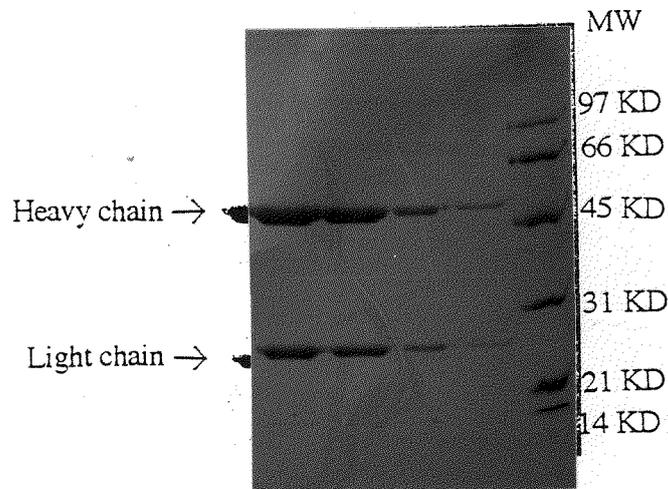
當 PBS 沖洗 column 直至 base-line 時，以 Glycine buffer 當 elution buffer (pH 2.6 ; 0.1M Glycine ; 0.5M

NaCl)。為避免 antibody 被酸破壞掉，在接 Glycine buffer 洗出之 antibody 的 ependof tube 中先加 200 μ l 之 Tris-HCl (1M, pH 8.0)，可與 Glycine buffer 中和之。通過 column 洗出的 antibody 要以 PBS 在 4°C 中透析。使用過的 column 以 column 的 10 倍體積的 Glycine buffer 沖洗，再以 PBS 沖洗，此 column 即可再使用了。可加 0.01% NaN₃ 於 PBS 中將 column 保存於 4°C 中。

參、結果

1. 以ELISA篩選出具分泌*Der p* II 抗體的細胞株兩株
II-64、II-6 其， Isotype 測定的結果為 IgG1 κ chain。

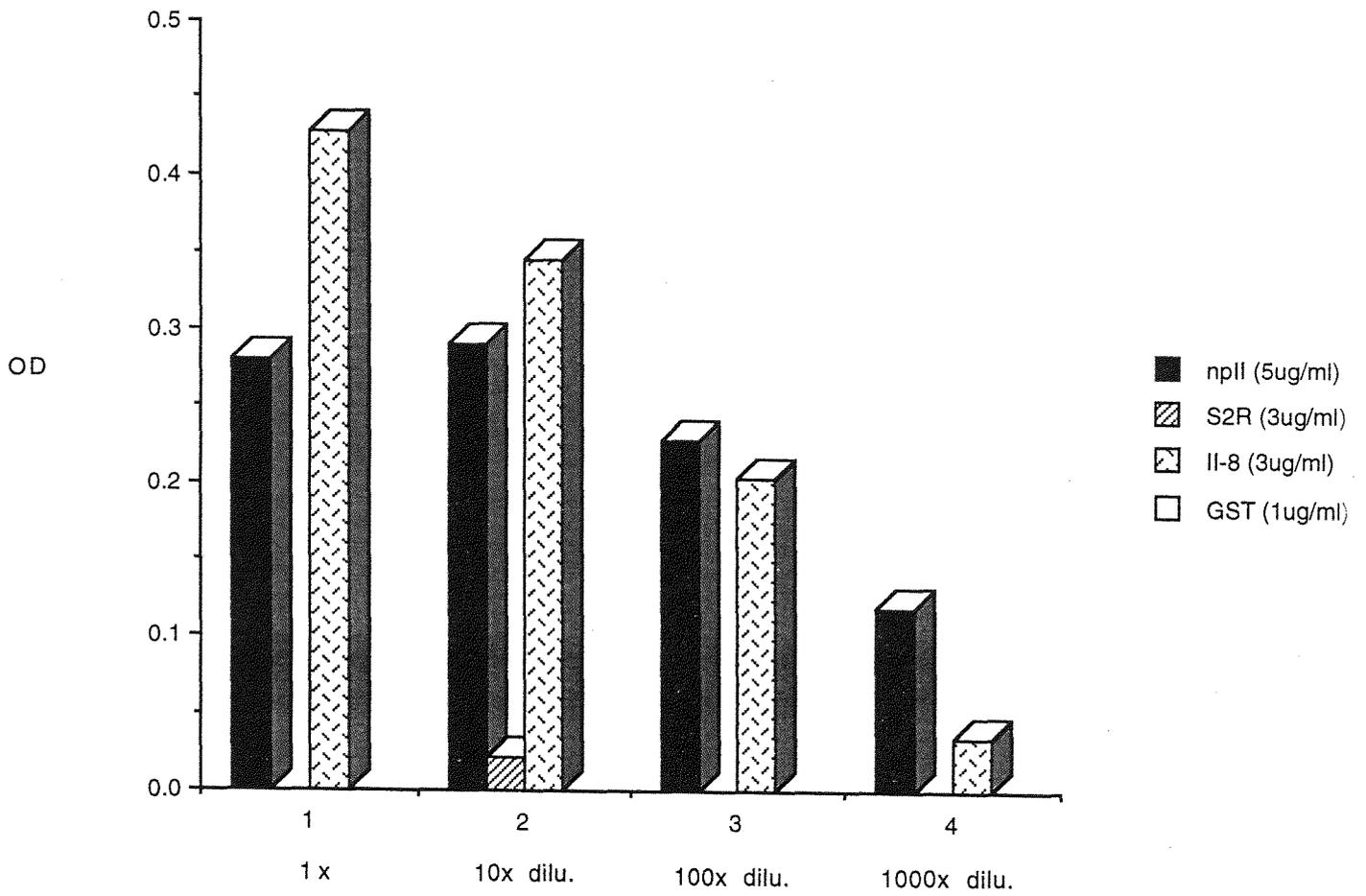
2. 將老鼠腹水以 Protein G 純化過後跑一片 SDS-PAGE 看看所純化的抗體純不純。結果發現 SDS-PAGE 上只有很純的 Heavy Chain 及 Light Chain。(圖九)



3. 將此 *Der p* II 的單株抗體 II-64、II-6 分別與 mite extract、S2R 及 II-8 抗原、GST 以及 *Der p* V 等 融合蛋白質做 ELISA 觀看其結果。(表三)

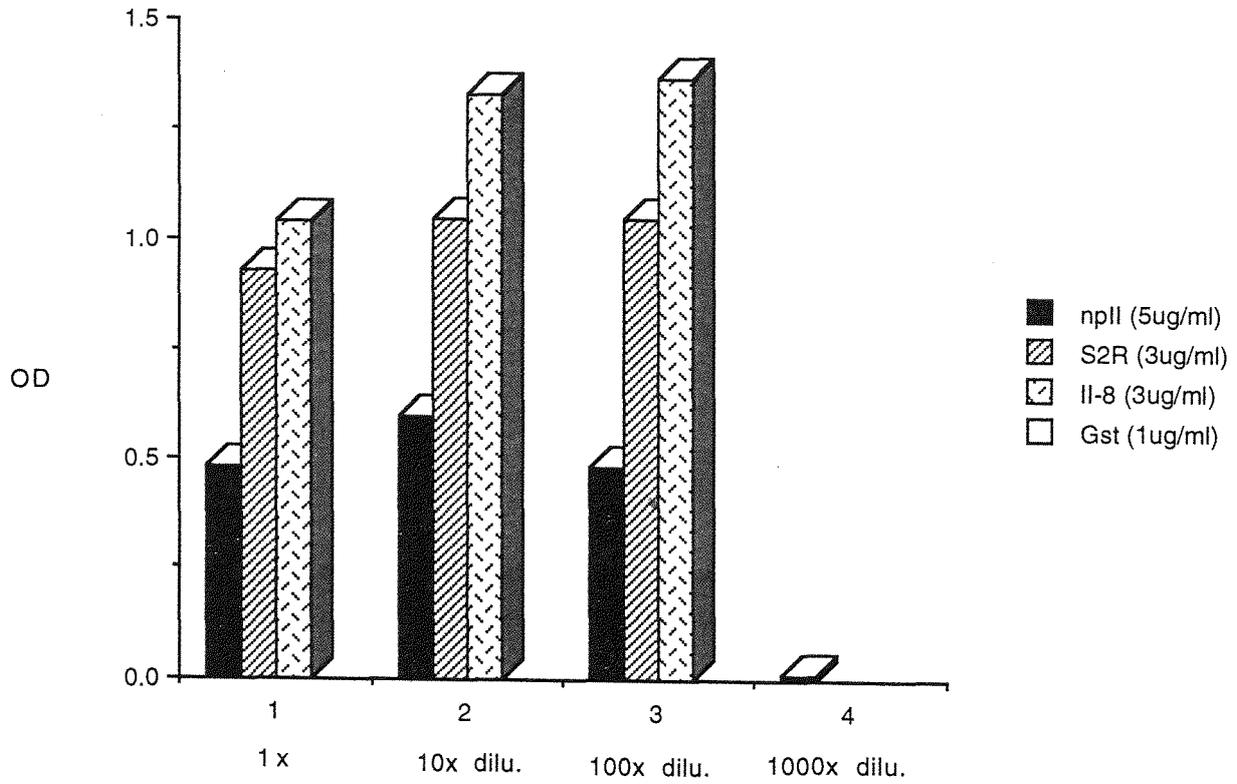
		nPII(5ug/ml)	nPII(5ug/ml)	S2R(3ug/ml)	S2R(3ug/ml)	II-8(3ug/ml)	II-8(3ug/ml)	GST(1ug/ml)	GST(1ug/ml)
II-64(S)	1x	0.28	0.154	0	0	0.427	0.244	0	0
	10x	0.29	0.162	0.022	0.015	0.345	0.2	0	0
	100x	0.227	0.122	0	0	0.203	0.112	0	0
	1000x	0.118	0.067	0	0	0.034	0.019	0	0
II-6(S)	1x	0.484	0.272	0.925	0.543	1.042	0.661	0	0
	10x	0.596	0.322	1.048	0.628	1.334	0.864	0	0
	100x	0.481	0.274	1.046	0.646	1.365	0.912	0	0
	1000x	0.015	0.012	0	0	0	0	0	0
II-6(A)	100x	0.813	0.462	0.81	0.514	0.982	0.594	0	0
	1000x	0.838	484	0.678	0.411	0.992	0.582	0	0
	10000x	0.533	0.301	0.999	0.608	1.551	0.941	0	0
	100000x	0.385	0.217	0.744	0.446	1.389	0.823	0	0
7A1	1ug/ml	0.829	0.474	1.168	0.693	1.477	0.876	0	0
	0.1ug/ml	0.37	0.21	0.646	0.366	1.066	0.62	0	0
	0.01ug/ml	0.154	0.089	0.099	0.055	0.152	0.096	0	0
	0.001ug/ml	0.03	0.018	0	0.001	0	0	0	0
DPI	1ug/ml	0.109	0.06	0	0	0	0.001	0	0
	0.1ug/ml	0.116	0.064	0	0	0	0	0	0
	0.01ug/ml	0.116	0.062	0	0	0.002	0	0	0
	0.001ug/ml	0.115	0.058	0	0	0	0	0	0
DPII(poly)	100x	1.75	1.076	1.433	0.916	1.542	1.001	0	0
	1000x	1.588	0.978	1.537	0.955	1.73	1.085	0	0
	10000x	0.523	0.293	0.754	0.435	0.832	0.479	0	0

a. Titration-II-64 supernatant (圖十)



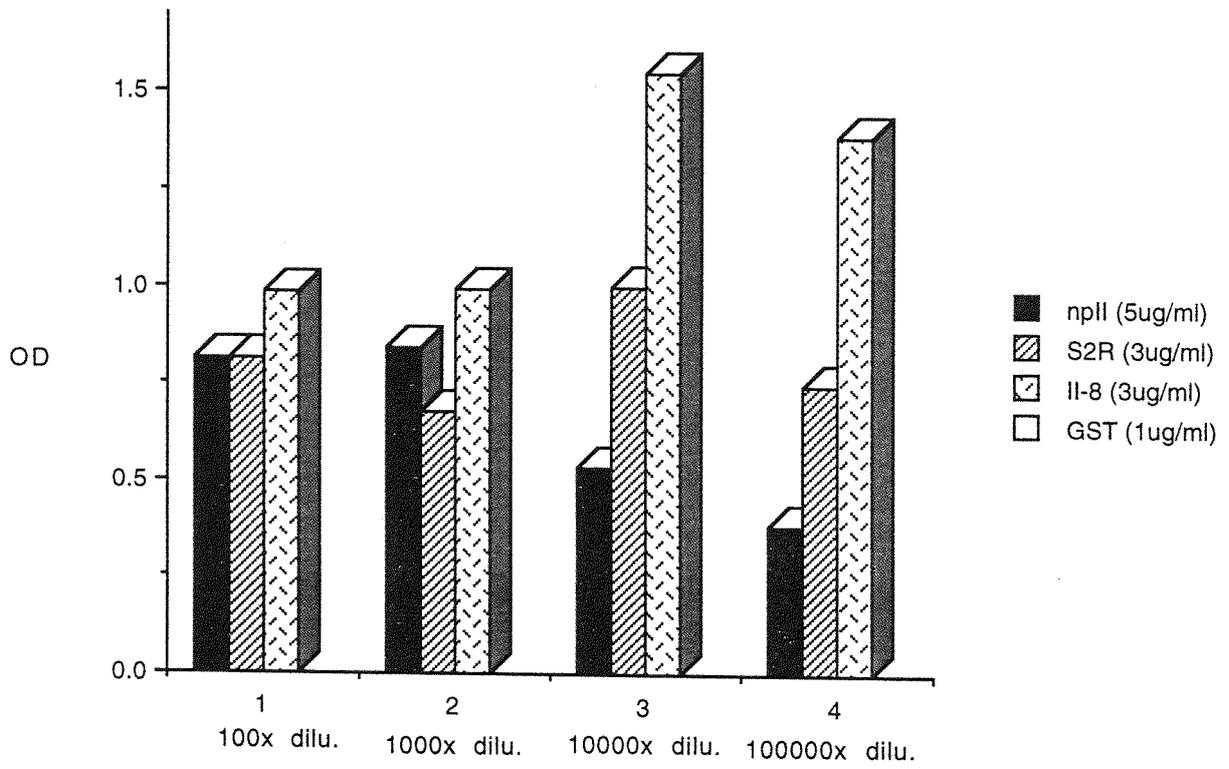
圖十：II-64 supernatant 對 S2R 的反應幾乎接近於零。

b.Titration-II-6 supernatant (圖十一)

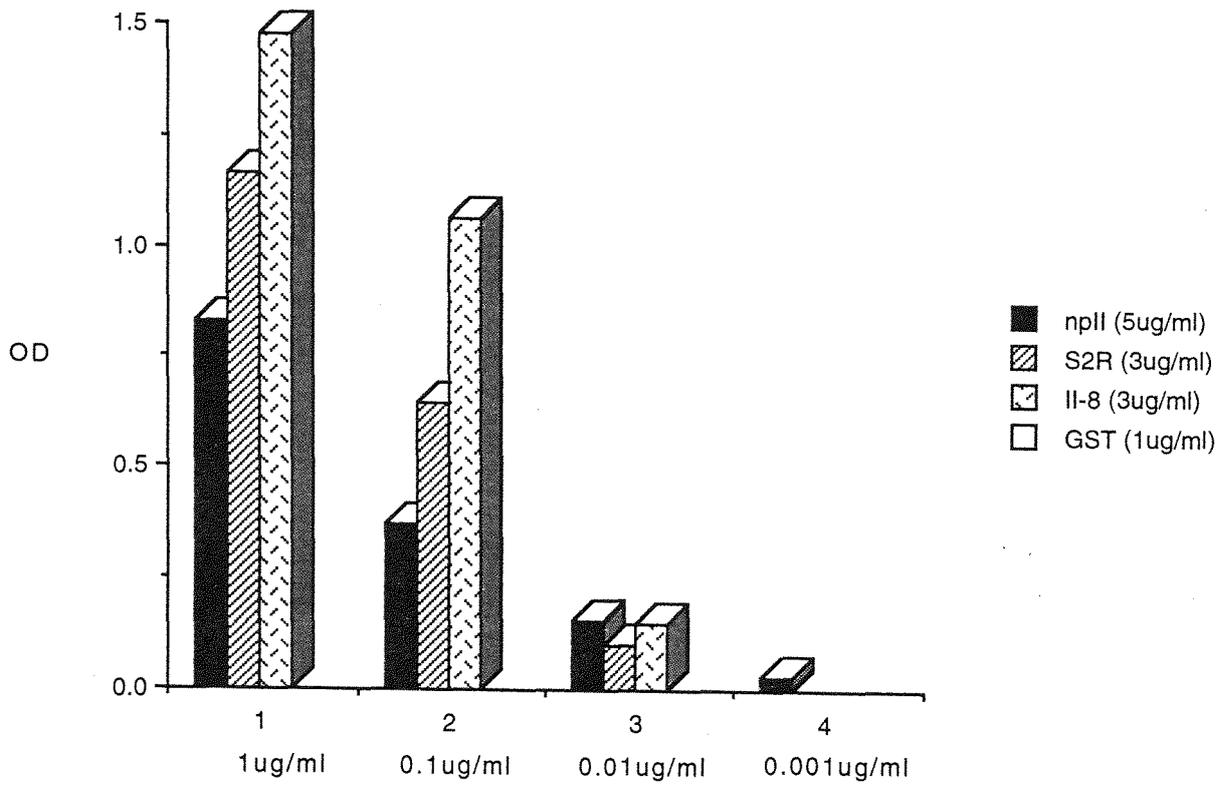


圖十一：II-6 supernatant 對 S2R 及 II-8 的反應接近。

c. Titration-II-6 Acities (圖十二)

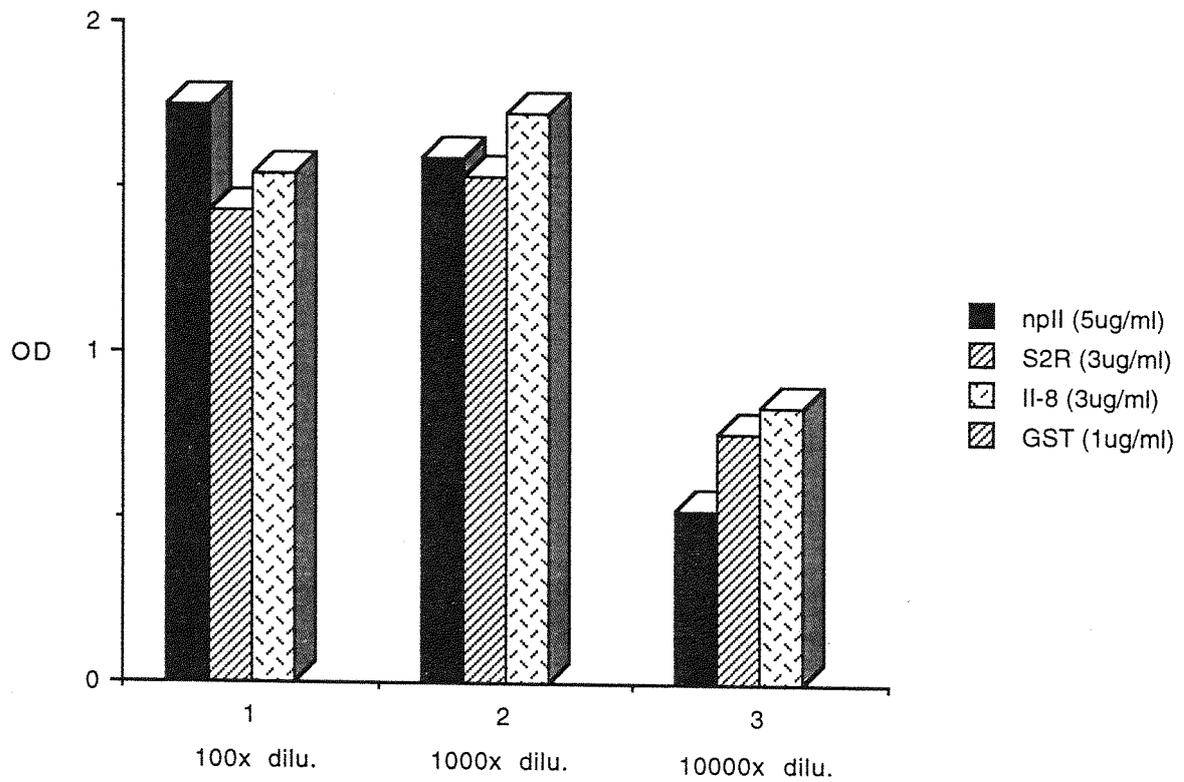


d.Titration-7A1 Acities (圖十三)



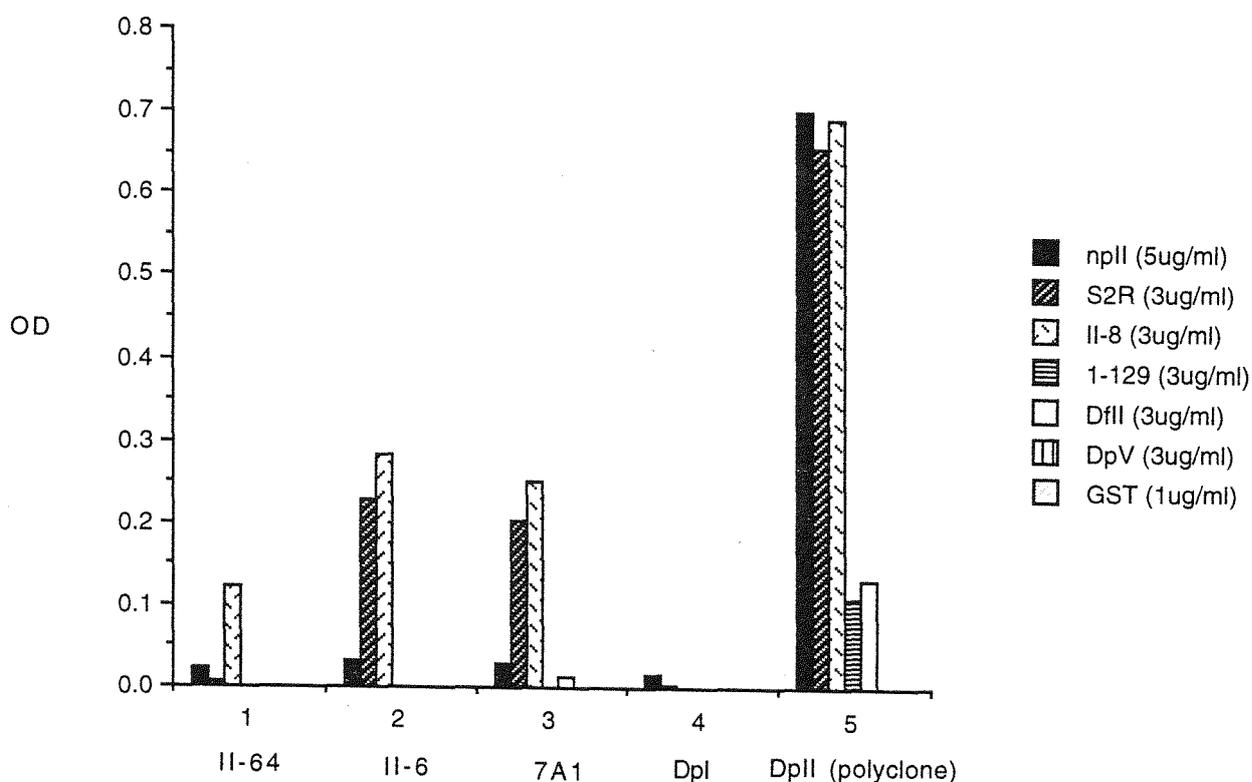
圖十三：7A1 Acities 對 S2R 及 II-8 的反應接近

e. Titration-Dp II Polyclonal Antibody (圖十四)



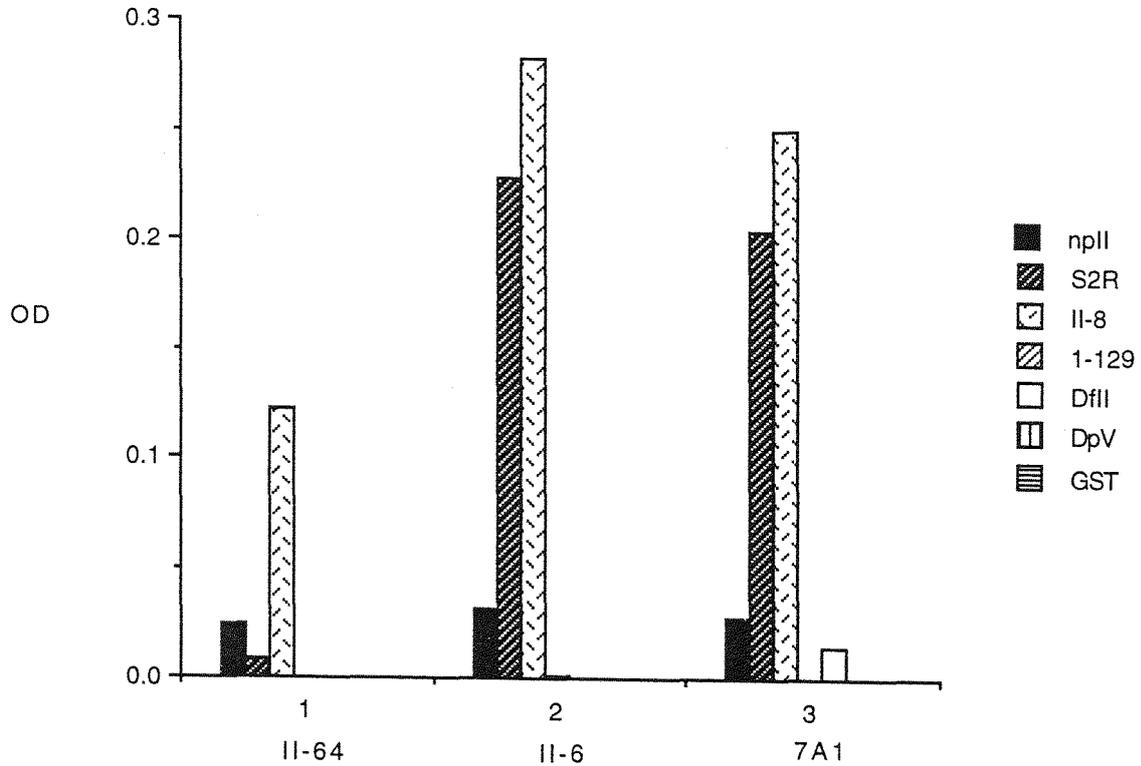
圖十四：DpII polyclonal Ab 不只對 npII、S2R 及 II-8 有反應，且 npII 的反應大大提高。

f.從上挑選出濃度適當者來作比較。(圖十五)



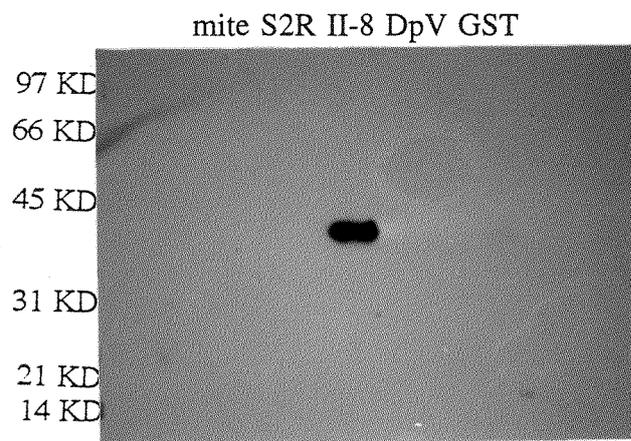
圖十五：由 DpII polyclonal Ab 當 control 得知，S2R 與 npII Ag 本身並沒有問題，並非 Ag 的問題而使得 II-64 對 S2R 不反應。1-129 peptide 在 DpII polyclonal Ab 會被認識，而不會被 II-64、II-6 以及 7A1 認識，表示 DpII polyclonal Ab 中仍有許多會認識 1-129 peptide 上的 linear epitopes，但 II-64、II-6 及 7A1 等均因 1-129 peptide 末端多 5 個氨基酸而產生結構的改變，進而改變了其 epitope 與抗體的 recognize。

g. Comparison among II-64, II-6 and 7A1 (圖十六)



圖十六：1. II-64 supernatant 對 S2R 的反應幾乎接近於零，但是對 II-8 的反應卻很強，顯示 II-64 為一對 II-8 specific 的 MAb，可見 II-64 所認識的 epitope 恰巧與 II-8 及 S2R 的不同處有關。2. II-6 supernatant 與 7A1 Acities 同時與 S2R 及 II-8 的反應都很強，顯示 II-64 與 II-6 為不同的單株抗體。

4. 將此 *Der p* II 的單株抗體當作第一級抗體 (first antibody) ，再以兔子抗老鼠抗體 (Rabbit-antimouse-IgG labeled peroxidase) 當作第二級抗體 (secondary antibody) 。分別作用於 Mite extract、GST、S2R及 II -8 抗原上做 Western blot 。(圖十七)



圖十七：*Der p* II 的單株抗體 (II-64) 與 Mite extract、GST、S2R及 II -8 做 Western blot 的比較，DpV antigen 作為 negative control 。結果顯示單株抗體 II-64 只與 II -8 antigen 有反應。

肆、討論

1.由 ELISA 的結果得知 II-64 與 II-6 兩個株落彼此間有差異，II-6 與 7A1 兩個單株抗體與 S2R 和 II-8 的反應相差不多，也可以說 II-6 與 7A1 兩個單株抗體同時認識 S2R 和 II-8 蛋白質。但是，II-64 單株抗體對 S2R 的反應非常微弱幾乎接近零，而對 II-8 的反應就比較高，也可以說 II-64 單株抗體只認識 II-8 而不認識 S2R。S2R 和 II-8 其間的不同只在於三個氨基酸的差異，而幸運地我們得到的這個單株抗體 II-64 只認識 II-8 而不認識 S2R，這樣的結果強烈地暗示我們三個氨基酸的差異恰會影響到 II-64 對 II-8 epitope 的認識，或許是線狀的 epitope，其單點的氨基酸的變化而影響了其結合能力。也可能是因為單點的氨基酸的變化進而影響了整個結構 (conformation) 的改變，進而影響了 epitope 的結合能力。從前面的 ELISA 結果得知 1-129 這段氨基酸與 II-6 和 7A1 的反應幾乎接近於零，1-129 這段氨基酸其 DNA 的序列與 S2R 完全相同，只是 1-129 是利用表現載體 pGEX-2T 的終止密碼，因此，此段氨基酸比 S2R 多了五個氨基酸，在多了五個氨基酸的情況下，就有如此大的差異，可見 Dp

II 過敏原的 N 端或 C 端 是非常重要的 epitope 所在地，可能只是 C 端多了五個氨基酸而產生 C 端本身的三級結構 (conformation) 改變，也可能因為 C 端多了五個氨基酸而產生 C 端與 N 端間原本就有的相互間互相結合所產生的三級結構 (conformation) 發生變化，才使得與 II-6 和 7A1 的反應幾乎接近於零。而 Dp II polyclonal Ab 與 1-129 的反應強是因為 Dp II polyclonal Ab 並不像 II-6 和 7A1 為單株抗體，Dp II polyclonal Ab 同時有許多的抗體對應 1-129 所以才會有這麼強的結果產生。而 II-8 與 S2R 恰有一處不同點在靠 C 端的第 113 個氨基酸處，是否因為這個因素而造成 II-64 單株抗體對 II-8 和 S2R 的反應如此差異，都是我們今後所要繼續努力的方向。

2. 純化出來的 native *Der p* II 的單株抗體 (II-64)，與 *rDer p* II (II-8) 抗原、*rDer p* II (S2R) 抗原以及 GST 蛋白質，進行 Western Blot。結果顯示此 *Der p* II 的單株抗體 (II-64) 只與 *rDer p* II (II-8) 抗原有反應且對於 GST 蛋白質沒有反應，結果與 ELISA 的反應結果相符。由此得知經由 SDS-PAGE denature 過後的蛋白質依然只對 II-8

抗原有反應，是否單株抗體 II-64 認識 II-8 抗原的決定位不是因為 S2R 整個蛋白質三級結構的改變而有所差異，而是取決於 S2R no.26，no.47 以及 no.113 的單點氨基酸的變化而有如此大的不同？這些問題皆是未來所要繼續研究的方向。以後可以利用此單株抗體做成 *affinity column* 來獲得自然型的 *Der p II isoform* 抗原 (II-8)，以及其相關的研究。總之，我們找到了一個特異性 (Specific) 很高的單株抗體。

伍、參考文獻

Anderson, L. J., Godfrey, E. McIntosh., K. and Hierholzer, J. C. (1983) Comparison of a monoclonal antibody with a polyclonal serum in an enzyme linked immunosorbent assay for detecting adenovirus. *J. Clin. Microbiol.* 18, 463-471.

Antczak, D. F. (1982) Monoclonal antibodies: Technology and potential use. *JAVMA.* 181, 1005-1010.

Blythman, H. E., Casellas, P., Gros, D. Gros, P. F., Paolucci, K. F., Pan, B and Vidal, H. 1981.

Immunotoxins: hybrid molecules of monoclonal antibodies and a toxin subunit specifically kill tumor cells. *Nature* 290, 145-146.

Brown, L. E., Jackson, D. C., Tribbick, G., White, D. O., Geysen, H. M. Extension of a minimal T cell determinant

allows relaxation of the requirement for particular residues within the determinant. *Int. Immunol.* 3, 1307-1313.

Calkhoven, P. G., Aalbers, M., Schilte, P. P. M., Yntema, B-J. L., Griffione, R. W., Nierop, Jan C. , Oranje, A. P. and Aalberse, R. C. Newly generated IgE antibodies to *Dermatophagoides Pteronyssinus*. in children are directed against components distinct from *Der p I* and *Der p II*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 265-271.

Casbey, C. T. and Kruh, G. D. (1979) The HPRT Locus. *Cell* 16, 1-9.

Chua, K. Y., Kehal, P. K. and Thomas, W. R. (1993) Sequence polymorphisms of cDNA clones encoding the mite allergen *Der p II*. *Arch. Allergen Immunol.*, 101, 364-368.

Chua, K. Y., Stewart, G. A., Thomas, W. R., Simpson, R. J., Dilowrth, R. J., Plozza, T. M. and Turner, K. J. (1988) Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, *Der p* I homology with cysteine proteases. *J. Exp. Med.*, 167, 175-182.

Chua, K. Y., Greene, W. K., Kehal, P. and Thomas, W. R. (1991) IgE binding studies with large peptides expressed from *Der p* II cDNA constructs. *Clinical and Experimental Allergy*, 21, 161-166.

Chua, K. Y., Doyle, C. R., Simpson, R. J., Turner, K. J., Stewart, G. A. and Thomas, W. R. (1990) Isolation of cDNA coding for the major mite allergen *Der p* II by IgE plaque immunoassay. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 91, 118-123.

Chua, K. Y., Dilworth, W. R. and Thomas, W. R.

Expression of *Dermatophagoides Pteronyssinus*. allergen, *Der p* II, in *E. coli* and the binding studies with human IgE. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 91, 124-129.

Cotton, R. G. H., and Milstein, C. (1973) Fusion of two immunoglobulin producing myeloma cells. *Nature*. 244.

EMBO, SKMB course. (1980) Basel, Hybridoma technique. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 11, 724.

Epstein, A. L. (1984) Immunobiochemical characterization with monoclonal antibodies of Epstein-Barr virus-associated early antigens in chemically induced cells. *J. Virol.* 50, 372-379.

Evavold, B. D., Allen, P. M. (1991) Separation of IL-4 production from Th cell proliferation by an altered T cell receptor ligand. *Science*, 252, 1308-1310.

Furth, M. E., Davis, J. Fleurdelys, B. and Scolnick, E. W. (1982) Monoclonal antibodies to the p.21 products of the transforming gene of Harvey Murine Sarcoma Virus and of the cellular ras gene family. *J. Virol.* 43, 294-304.

Galfre, G., Howe, S. C., Milstein, C., Butcher, G. W. and Howard, J. C. (1977) Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature* 266, 550-552.

Gershoni, J. M., and Palade, G. E. (1983) Protein blotting: Principles and application. *Anal. Biochem.* 131, 1-5.

Greene, W. K., Chua, K. Y., Stewart, G. A. and Thomas, W. R. (1990) Antigenic analysis of group I house dust mite allergens using random fragments of *Der p* I expressed by recombinant DNA libraries. *Int. Arch. Allergen Immunol.*, 92, 30-38.

Goding, J. W. (1980) Antibody production by hybridomas.
J. immunol. Method. 39, 285-308.

Gold, P., and Freedman, S. O. (1965) Demonstration of
tumorspecific antigens in human colonic carcinoma by
immunological tolerance and absorption technique. *J. Exp.*
Med. 121, 439.

Gosting, L. H., Cabrian, K. Sturge, J. C. and Goldstein,
L. C. (1984) Identification of a monoclonal antibody. *J.*
Clin. Microbiol. 20, 1031-1035.

Herlyn, M., Steplewski, Z., Herlyn, D. and Koprowski, H.
(1979) Colorectal carcinoma-specific antigen: Detection by
means of monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.*
S. A. 76, 1438.

Heymann, P. W. Chapman, M. D., Aalberse, Fox, R. C.

Jay W. and Platts-Mills, T. A. E. (1989) Antigenic and structural analysis of group II allergens (*Der f* II and *Der p* II) from house dust mite (*Dermatophagoides spp*) . *J. Allergy Clin. Immunol.* 83, 1055-67.

Hoyne, G. F., Callow, M. G., Kuo, M-C. and Thomas, W. R. Characterization of T-cell responses to the house dust mite allergen *Der p* II in mite. Evidence for major and cryptic epitopes. *Immunology*, 78, 65-73.

John, G. R. H. (1982) Monoclonal hybridoma antibodies: Techniques and applications, CRC Press Inc. Florida, 1-52.

Joost van Neerven, R. J., Win van Hof, Ringrose, J. H., Jansen, H. M., Aalberse, R. C., Wierenga, E. A. and Kapsenberg, M. K. (1993) T cell epitopes of house dust mite major allergen *Der p* II. *The Journal of immunology*, 151, 2326-2335.

- Kamisango, K. I, Nagaoka, M. Fujii, H. and Azuma, I.
(1985) Enzyme immunoassay of Teichoic acids from
Listeria monocytogenes. *J. Clin. Microbiol* 21, 135-137.
- Kasamatsu, H. (1982) Isolation of monoclonal antibody
against viral polypeptide VP2 of Simian Virus 40. *J.*
Virology 44, 413-418.
- Kearney, J. F., Radbruch, A. Liesegang, B. and
Rajewsky, K. (1979) A new Mouse Myeloma cell line that
has lost immunoglobulin expression but permits the
construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J.*
Immunology 123, 1548-1550.
- Kohler, G. and Milstein, C. (1975) Continuous cultures of
fused cells secreting antibody of prededined specificity.
Nature 256, 495.
- Kohler, G., Hengartner, H. and Shulman, M. J. (1978)

Immunoglobulin production by lymphocyte hybridomas.

Eur. J. Immunol. 8, 82-88.

Kozber, D., P. Tripputi. J. C. Roder and Croce, C. M.

(1984) A human hybrid myeloma for production of human monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 133, 3001-3005.

Liu, ZR., Williams, K. p., Chang, Y.H., Smith, J. A.

(1991) Single amino acid substitution alters T cell determinant selection during antigen processing of *Staphylococcus aureus* nuclease. *The Journal of Immunology*, 146, 438-443.

Lombardero, M., Heymann, P. W., Platts-mills, T. A. E.,

Fox, J. W. and Chapman, M. D. (1990) Conformational stability of B cell epitops on group I and group II *Dermatophagoides spp.* allergens. *The Journal of Immunology*, 144, 1353-1360.

Marshak-Rothstein, Fink, A. P., Gridley, T., Raulet, D. H.

, Beavan, M. J. and Geffer, M. L. (1979) Properties and applications of monoclonal antibodies directed against determinants of the THY-1 locus. *J. Immunol.* 122, 2491-2497.

McMichael, A. J., and Fabre, J. W. (1982) Monoclonal antibodies in clinical medicine. p: 503-517. In J. M.

Bastin., Kirkley, J. and McMichael, A. J. eds. production of monoclonal antibodies: a practical guide. Academic press. Oxford. U. S. A.

Mettenleiter, T. C., Lukacs, N. and Rziha, H. J. (1985)

Mapping of the structural gene of Pseudorabies Virus glycoprotein A and identification of two non-glycosylated precursor polypeptides. *J. Virol.* 53: 52-57.

Norgard, M. V., Selland, C. K., Kellman, J. R. and

Miller, J. N. (1984) Sensitivity and Specificity of

monoclonal antibodies against autigenic determinants of *Treponema pallidum* nichols in the diagnosis of syphilis. *J. clin. Microbiol.* 20, 711-717.

Microbiol. 20, 711-717.

Orvell, G. and Grandien, M. (1982) The effects of monoclonal antibodies on biologic activities of structural protein of sendai virus. *J. Immunol.* 129, 2739-2787.

Oshika, E., Kuroki, Y., Sakiyama, Y., Matsumoto, S. and Akino, T. (1993) A study of the binding of immunoglobulin G and immunoglobulin E from children with bronchial asthma to peptides derived from group II antigen of *Dermatophagoides Pteronyssinus*. *Pediatric Research*, 33, 209-213.

Pascale, J., Alain, D. L., Helene, G-M., Abdel, A. Z., Yves, D., Eric, C., Michel, J. Ander, T., Gerard, V. and Joel, P. (1992) Specific histamine release capacity of

peptides selected from the modeled *Der p* I protein, a major allergen of *Dermatophagoides Pteronyssinus*. *Molecular Immunology*, 29, 739-749.

Person, T. W., Kar, S. K., McGuire, T. C. and Lundin, L. B. (1981) Trypanosome Variable surface antigens: Studies using two-dimensional gel electrophoresis and monoclonal gel electrophoresis and monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 126, 823-828.

Phillips, D. J., Galland, G. G., Reimer, C. B, and Kendal, A. P. (1982) Evaluation of a Solid-Phase immunoassay with fluorescein Isothiocyanate-conjugated heterogeneous or monoclonal antibodies for identification of virus isolates, with influenza virus as a model. *J. Clin. Microbiol.* 15, 931-937.

Roumillat, L. F., Patton and Davis, M. L. (1984) monoclonal antibodies to a monkeypox virus polypeptide

determinant. *J. Virol.* 52(1): 290-292.

Shen, H-D., Chua, K. Y., Lin, K. L., Hsieh, K. H. and Thomas, W. R. (1993) Molecular cloning of a house dust mite allergen with common antibody binding specificities with multiple components in mite extracts. *Clinical and Experimental Allergy*, 23, 934-940.

Smith, W. A., Chua, K. Y., Kuo, M. C., Rogers, B. L., and Thomas, W. R. (1994) Cloning and sequencing of the *Dermatophagoides pteronyssinus* group III allergen, *Der p* III. *Clinical and Experimental Allergy*, 24, 220-228.

St. Groth, S. F., and Scheidegger, D. (1980) Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics. *J. Immunol. Methods*. 35, 1-21.

Steintz, M. (1977) EB virus-induced B lymphocyte cell lines producing specific antibodies. *Nature*. 269: 420.

Stewart, G. A., Thomas, W. R., Chua, K. Y., Turner, K. J. and Geysen, H. M. (1988) An allergen and antigenic mapping analysis of a major mite allergen, *Der p I*.

Stewart, G. A., Bird, C. H. and Thompson, P. J. Do the group II dust mite allergens correspond to lysozyme? *J. Allerg and Clinical Immunol.*, 90, 141-142

Strand, B. C., Schuster, T. Klein, R., Hopkins III, R. F., Witmer, T., Neubauer, R. H. and Rabin, H. (1982) Production and characterization of monoclonal antibodies against the Epstein-Barr virus membrane antigen. *J. Virol.* 41, 258-264.

Strosberg A. D. (1971) Transformation by SV 40 of spleen cells from a hyperimmune rabbit: Demonstration of production of specific antibody to the immunizing antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 263.

Sweart G. A., Ward, L. D., Simpson, R. J. and Thompson, P. J. (1992) The group III allergen from the house dust mite *Dermatophagoides Pteronyssinus*. is a trypsin- like enzyme. *Immunology*, 75, 29-35.

Thomas, W. R., Stewart, G. A., Simpson, R. J., Chua, K. Y., Pla, T. M., Dilworth, R. J., Nisbet, A. and Turner, K. J. (1988) Cloning and expressing of DNA coding for the major housw dust mite allergen *Der p I* in *E. coli*. *Int. Archs Allerg. Immun.* 85, 127-129.

Thomas, W. R. (1993) Mite allergen group I-VII. A catalogue of enzyme. *Clin Exp Allergy*. 23, 350-3.

Trudinger, M. Chua, K.Y. and Thomas, W. R. (1991) cDNA encoding the major mite allergen *Der f II*. *Clinical and Experimental Allergy*, 21, 33-37.

- Walsh, E. E., Schlesinger, J. I. and Brandriss, M. W.
(1984) Protection from respiratory syncytial virus
infection in cotton rats by passive transfer of monoclonal
antibodies. *Inf. & Imm.* 43, 756-758.
- Wands, J. R., R. I. Carlson, Schoemaker, H. Isselbacher, K.
J. r and Zurawski, V. R. (1981) Immunodiagnosis of
hepatitis B with high affinity IgM monoclonal antibodies.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 1214.
- Weil, G. J., Malane, M. S., Powers, K. G. and Blair, L. S.
(1985) Monoclonal antibodies to parasite antigens found in
the serum of *Dirofilaria immitis*-infected dogs. *J. Imm.*
134, 1185-1191.
- Yelton, D. E. and Scharff, M. D. (1981) Monoclonal
antibodies: a powerful new tool in biology and medicine.
Ann. Rev. Biochem. 50, 657.

伍、參考文獻

Yuuki, T and Okumura, Y. Cloning and sequencing of cDNA corresponding to mite major allergen *Der f* II. *Jpn. J. Allergol.*, 39, 557-561.

Zarling, J. M. and Kung, P. C.(1980) Monoclonal antibodies which distinguish between human NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *Nature*. 288, 394-396.