

## 目錄

目錄.....	1
中文摘要.....	7
英文摘要.....	9
圖目錄.....	11
表目錄.....	13
縮寫對照(Abbreviations).....	14
第一章 研究背景.....	16
第一節 過敏疾病簡介.....	16
第二節 過敏疾病之診斷.....	19
1. 皮膚穿刺測試(Skin Prick Test).....	19
2. 血清測試.....	20
第三節 過敏疾病之治療.....	21
第四節 美國蟑螂過敏症的研究.....	22
1. Group 1.....	23
2. Group 2.....	24
3. Group 3.....	24
4. Group 4.....	25
5. Group 5.....	25
6. Group 6.....	25
7. Group 7.....	26

8. Group 9.....	26
第五節 重組過敏原之應用 .....	26
第六節 呼吸道上皮細胞株研究平台 .....	27
1. MAPK 訊息傳遞路徑 .....	28
2. MIP-3 $\alpha$ .....	29
3. IL-8 .....	30
4. MCP-1 .....	30
第二章 研究目的 .....	32
第三章 實驗材料與方法 .....	34
第一節 研究材料及病人血清 .....	34
1. 美國蟑螂粗萃物 .....	34
2. 蟑螂過敏病人篩選方法及血清來源 .....	34
3. 人類肺癌呼吸道上皮細胞株A549 .....	35
第二節 化學藥品與器材 .....	35
1. 一般化學試劑 .....	35
2. 限制酶及核酸修飾酵素 .....	35
3. DNA 電泳相關藥品 .....	35
4. 蛋白質電泳相關藥品 .....	35
5. 引子 .....	36
第三節 重要器材及儀器 .....	36

1. 桌上型離心機 .....	36
2. 電泳設備 .....	36
3. 其他器材 .....	36
第四節 實驗方法 .....	37
1. 美國蟑螂過敏原之分子選殖 .....	37
1.1 以聚合酶鏈鎖反應(PCR)增幅美國蟑螂過敏原 .....	37
1.2 DNA 之電泳 .....	38
1.3 洋菜膠體回收 DNA(DNA extraction from agarose gel) .	38
1.4 接合作用(ligation).....	39
1.5 勝任細胞之製備 .....	39
1.6 細菌之轉型作用(Transformation).....	40
1.7 微量質體DNA的萃取(Miniprep) .....	40
1.8 基因定序及分析 .....	41
1.9 構築表現載體 .....	42
2. 重組蛋白質之表現及純化 .....	42
2.1 IPTG 誘導重組蛋白表現之劑量測定 .....	42
2.2 重組蛋白質之表現時間測定 .....	43
2.3 重組蛋白質之純化：(1) denature condition .....	43
(2) native condition .....	45

2.4 蛋白質濃度測量.....	47
3. 蛋白質電泳分析 .....	47
3.1 聚丙烯醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE).....	47
3.2 CBR 染色法 (Coomassie brilliant blue stain) .....	49
3.3 西方墨漬法 (Western blotting) .....	50
4. IgE ELISA.....	51
5. 細胞培養.....	52
5.1 移除重組蛋白質中 LPS 汙染 .....	52
5.2 A549 細胞株之培養 .....	52
5.3 繼代培養 .....	53
5.4 細胞計數 .....	53
6. 細胞趨化激素基因表現分析.....	54
6.1 A549 細胞之 RNA 萃取 (RNA extraction).....	54
6.2 RNA 濃度之測定 .....	54
6.3 1 <sup>st</sup> -strand cDNA synthesis .....	55
6.4 細胞趨化激素之聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase Chain eaction ; PCR).....	55
7. IL-8濃度之測定.....	56
8. CCL20濃度之測定 .....	57
9. MCP-1濃度之測定 .....	58

10. 抑制 MAPK 訊息傳遞對 rPer a 2 誘發 A549 分泌 IL-8 作用 之影響 .....	59
11. 以西方點墨法分析 MAPK 磷酸化 .....	59
12. 統計分析 .....	60
第四章 結果 .....	61
第一節 六種蟑螂過敏原基因選殖與序列比對分析 .....	61
第二節 以 SDS-PAGE 與免疫轉漬法分析重組過敏原 .....	62
第三節 八種過敏原與臨床患者 IgE 反應圖譜 .....	62
第四節 臨床患者血清中細胞趨化激素濃度之差異 .....	64
第五節 不同濃度 rPer a 2 刺激 A549 對細胞趨化激素 mRNA 之 影響 .....	64
第六節 rPer a 2 刺激 A549 在不同時間點之細胞趨化激素 mRNA 與蛋白質之變化 .....	65
第七節 rPer a 2 刺激 A549 偵測 MAPK 訊息傳遞路徑之磷酸化 ...	66
第八節 rPer a 2 刺激 A549 釋放 IL-8 受到 ERK1/2 和 JNK 抑制 劑影響 .....	66
第五章 討論 .....	68
第六章 結論與展望 .....	74
第一節 重組過敏原之應用 .....	74

1. 重組過敏原之臨床診斷.....	74
2. 專一性免疫治療.....	74
第二節 Per a 2 對肺上皮細胞之發炎機轉.....	75
第七章 參考文獻.....	76
圖.....	86-103
表.....	104-107
附錄.....	108-114

## 中文摘要

蟑螂為遍及全世界的室內主要過敏原，藉由異常調控 IgE 而導致呼吸道疾病。先前的研究顯示，台灣氣喘病人中有 57% 對蟑螂過敏。目前為止，已有八種美國蟑螂(*P. americana*)過敏原被選殖出來，命名為 Per a 1~7 和 Per a 9。現今用在蟑螂過敏症的檢驗和治療用疫苗，基本上使用未經標準化程序的粗萃物，包含許多過敏或非過敏的蛋白質成分，導致其靈敏度和特異度仍有許多改善的空間。我們第一部份研究的目標是，探討八個重組過敏原與台灣蟑螂過敏病人之 IgE 反應圖譜。藉由反轉錄聚合酶連鎖反應產生 Per a 1~7 和 Per a 9 的 cDNA，在 *E. coli* 系統中進行選殖及表現重組蛋白質。利用免疫轉漬法和 ELISA 分析純化之重組過敏原，對蟑螂過敏病人的血清反應。將臨床上收集之 64 位受試者，依疾病嚴重度分成三組：A 過敏性鼻炎和氣喘，B 過敏性鼻炎，C 健康受試者。在免疫轉漬法的結果顯示，實驗室製備的重組蛋白質，可專一地和蟑螂過敏病患血清的 IgE 抗體結合，A 和 B 二組病人對八種重組蟑螂過敏原盛行率分別如下：rPer a 1=43, 45%; rPer a 2=81, 45%; rPer a 3=52, 55%; rPer a 4=48, 35%; rPer a 5=67, 55%; rPer a 6=48, 55%; rPer a 7=52, 50%; rPer a 9=29, 80%，我們觀察到在不同病人中，個別 IgE 反應圖譜差異甚大。進一步分析，我們認為將 rPer a 2、rPer a 6 和 rPer a 9 三種重組過敏原混合可診斷出

95% 蟑螂過敏病人。此外，我們推論 rPer a 2 是與疾病嚴重度相關之重要主過敏原，因此需要更深入探討。我們第二部份的目標，是探討 rPer a 2 刺激人類肺癌上皮細胞株 A549 細胞株之致敏機轉。利用 RT-PCR 和 ELISA，分別來分析 A549 細胞經 rPer a 2 刺激後，引發細胞趨化激素的基因和蛋白質之表現。我們的結果顯示，rPer a 2 刺激 A549 細胞株，IL-8、MCP-1 和 CCL20 的 mRNA 表現會隨處理時間及濃度的成正相關，利用西方點墨法的結果顯示，在 Per a 2 短時間處理會增加 ERK1/2 磷酸化。前處理 ERK1/2 抑制劑 U0126 和 JNK 抑制劑 SP600125 顯著減少 rPer a 2 所誘導的 IL-8 釋放，然而 P38 抑制劑 SB203580 不會影響 IL-8 釋放。因此得到的結論是，rPer a 2 刺激肺上皮細胞株誘導 IL-8 釋放，是透過 ERK1/2 和 JNK 訊息傳遞的路徑。此外 CCL20 和 MCP-1 的生成是否為相同途徑，則待進一步的研究。探討過敏原對呼吸上皮釋放細胞激素之致敏機轉，將可以幫助研發新的蟑螂過敏疾病之治療方法。



## 英文摘要

Cockroach is one of the major indoor allergens for IgE-mediated respiratory illness throughout the world. Previous studies showed that 57% of the asthmatic patients in Taiwan are allergic to cockroach. So far, eight *P. americana* allergens, named Per a 1~7 and Per a 9, have been cloned. Current diagnostic tools and therapeutic vaccines for cockroach allergy are based on unstandardized crude extracts containing wide variety of undesirable proteins, which leave rooms for improvability regarding the test sensitivity and specificity. In the first part of the study, we aimed to determine the IgE reactivity profiles to the eight recombinant allergens in Taiwanese. The cDNAs encoding for Per a 1~7 and Per a 9 were generated by RT-PCR and cloned into the *E. coli* expression system. The purified recombinant allergens were examined by immunoblotting and ELISA with sera from clinical cockroach allergy test with a positive ImmunoCAP. We recruited 64 subjects and divided into three groups: A) allergic rhinitis and asthma, B) allergic rhinitis only, and C) normal control. Immunoblotting results revealed that lab-prepared recombinant proteins specifically bind IgE antibodies in the sera of patients allergic to cockroach. The frequency of sensitization was as follows: rPer a 1=43, 45%; rPer a 2=81, 45%; rPer a 3=52, 55%; rPer a 4=48, 35%; rPer a 5=67, 55%; rPer a 6=48, 55%; rPer a 7=52, 50%; rPer a 9=29, 80%; for group A and B, respectively. We observed that highly variable individual sensitization patterns in patient groups. Furthermore, we suggested that a cocktail of rPer a 2, rPer a 6 and rPer a 9 would diagnose 95% of patients with cockroach allergy by serologic analysis in Taiwan. In

addition, we concluded that rPer a 2 is an important major allergen correlated with disease severity and need to be further studied. The purpose of the second part was to investigate the sensitization mechanism of recombinant rPer a 2 in human pulmonary epithelial cell line A549. The gene and protein expression of chemokines from rPer a 2-stimulated A549 cells were assessed by RT-PCR and ELISA, respectively. In our data displayed that rPer a 2 stimulates the mRNA expression of IL-8, MCP-1 and CCL20 in a dose- and time-dependent manner. Western blotting data showed that rPer a 2 increase significantly ERK1/2 phosphorylation. In addition, the ERK1/2 inhibitor U0126 and the JNK inhibitor SP6001125 significantly decreased rPer a 2-induced IL-8 release. However, p38 inhibitor SB203580 had no effect. We found that rPer a 2-induced IL-8 release in lung epithelial cells maybe through the ERK1/2 and JNK signaling pathways. We need further studies to prove this finding. In the future, the precise mechanism underlying cytokine release from the respiratory epithelium will help design novel therapeutic approaches for treating cockroach allergy.

## 圖目錄

圖一、	洋菜膠體電泳分析六種重組過敏原之 cDNA 片段。 .....	86
圖二、	洋菜膠體電泳分析六種過敏原 cDNA 嵌入表現載體。 .....	87
圖三、	六種重組過敏原 Per a 2(A)、Per a 4(B)、Per a 5(C)、 Per a 6(D)、Per a 7(E)和 Per a 9(F)蛋白質與核苷酸序列。 .....	88
圖四、	純化後八種重組過敏原以 SDS-PAGE 電泳分析(A)和免疫轉 漬法(B)。 .....	95
圖五、	臨床檢驗過敏之 immunoCAP 值與實驗室所檢測過敏之 ELISA OD 值之線性迴歸分析。 .....	96
圖六、	以卡方統計分析八種過敏原在氣喘患者與過敏性鼻炎患者之 盛行率。 .....	97
圖七、	三群受試者血清細胞趨化激素之濃度。 .....	98
圖八、	在 A549 細胞株上，IL-8、CCL20、MCP-1 的 mRNA 表現， 會隨著 rPer a 2 的濃度增加而有倍率上升的趨勢。 .....	99
圖九、	在 A549 細胞株上，IL-8、CCL20、MCP-1 的 mRNA 表現， 會隨著 rPer a 2 的處理的時間增加而有倍率上升的趨勢。 .....	100
圖十、	IL-8 釋放會隨著 rPer a 2 處理 A549 細胞時間增加而增加。 .	101
圖十一、	rPer a 2 刺激 A549 以西方點墨法偵測 MAPK 訊息傳遞 路徑。 .....	102

圖十二、MAPK 訊息傳遞路徑抑制劑對於 rPer a 2 刺激 A549 釋放 IL-8

之影響。 ..... 103

## 表目錄

表一、八種重組株之培養特性.....	104
表二、21 位氣喘患者個別對八種過敏原 IgE 反應圖譜.....	105
表三、20 位過敏性鼻炎患者個別對八種過敏原 IgE 反應圖譜.....	106
表四、過敏原交叉混合對 41 位蟑螂過敏患者之盛行率.....	107

## 縮寫對照(Abbreviations)

AP	agonist peptide
APS	Ammonium Persulfate
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
Cra A	American cockroach allergens
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EtBr	3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium bromide
ERK	extracellular-signal-regulated kinases
GTP	Guanosine triphosphate
HRP	Horseradish peroxidase
Ig	Immunoglobulin
IL	interleukin
IPTG	Isopropyl beta-D-1-thiogalactopyranoside
JNK	c-Jun N-terminal kinases
LB	Luria-Bertani
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCP	monocyte chemotactic protein
MHC	Major histocompatibility complex
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
NBT	Nitro blue tetrazolium chloride
NCBI	National Center for Biotechnology Information

PAR Protease-activated receptors  
PBS Phosphate buffered saline  
PCR polymerase chain reaction  
PMSF phenylmethanesulfonyl fluoride  
RT Reverse transcription  
SIT Specific immunotherapy  
SDS-PAGE Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis  
SPSS Self-Propelled Semi-Submersible  
TEMED *N,N,N',N'*-tetramethyl-ethane-1,2-diamine  
Th Helper T-cell  
TMB Tetramethylbenzidine  
X-Gal 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

## 第一章 研究背景

### 第一節 過敏疾病簡介

最初關於過敏(allergy)的概念，是在於 1906 年，由維也納小兒科醫生 Clemens von Pirquet 所提出。Pirquet 在猩紅熱病房觀察施打抗毒素血清治療的病患，反而產生不良的反應，把此現象稱為 allergy，Allergy 源自希臘文“allos”和“ergon”，涵義為不正常的反應。

1963 年，Gell 和 Coombs 依不同的免疫病理機轉，將免疫系統的過敏反應(hypersensitivity)分為四型：(1)第 I 型過敏反應，由 IgE 為媒介，又稱為立即型過敏反應；(2)第 II 型過敏反應，由 IgG 或 IgM 為媒介，又稱為細胞毒殺過敏反應；(3)第 III 型過敏反應，由免疫複合物為媒介，又稱為免疫複合物疾病；(4)第 IV 型過敏反應，由細胞為媒介，又稱為延遲型過敏反應(Thomas et al., 2004)。

Kay 於 1997 和 2008 年主編的書中，提出 Modified Coombs and Gell 分類，將 Gell 和 Coombs 對過敏反應分類予以修正，進而將過敏反應細分為七類型態(附錄一)(Kay, 2008)：

(1)第 I 型過敏反應(Type I)：立即型過敏反應，IgE 調控或全身性過敏反應(IgE-dependent or anaphylactic hypersensitivity)，由於過敏原與致敏之肥大細胞或嗜鹼性球上過敏原專一性免疫蛋白 E (allergen-specific IgE)產生交互作用，引發細胞釋出發炎介質，導致



過敏性鼻炎或過敏性氣喘之急性症狀

(2) 第 IIa 型過敏反應(Type IIa)：細胞毒殺反應( cytolytic or cytotoxic reactions)，IgG 抗體與細胞表面之抗原交互作用，加上補體系統之作用，造成細胞之崩解死亡。例如自體免疫溶血性貧血。

(3) 第 IIb 型過敏反應(Type IIb)：細胞刺激反應(cell-stimulating reactions )，細胞受刺激產生 IgG 抗體，並且與細胞表面之受體作用後，影響細胞之訊息傳導與功能。例如慢性自體免疫蕁麻疹

(4)第 III 型過敏反應(Type III)：抗原-抗體免疫複合體媒介。抗原-抗體免疫複合體，活化補體系統後，大量嗜中性球的浸潤，引起發炎反應。例如血清病 (serum sickness)

(5)第 IV 型 Th1 過敏反應(Type IV Th1)：典型之延遲型過敏反應，此型之過敏反應的特徵，抗原呈現細胞(Antigen presentation cell)經 MHC class II，將抗原呈現而活化 CD4<sup>+</sup> 第一型輔助型淋巴細胞 (T helper type 1 cells，Th1 cells) 與巨嗜細胞 (macrophage)浸潤於病灶處。這些第一型輔助型淋巴細胞的主要特性，為受到抗原刺激後，會分泌丙型干擾素 (interferon-gamma，IFN- $\gamma$ ) 及第二介白質 (interleukin-2，IL-2)。如過敏性接觸性皮膚炎、類風濕性關節炎，結核菌素反應等皆屬此類。

(6)第 IV 型 Th2 過敏反應(Type IV Th2 )：抗原呈現細胞(Antigen

presentation cell)經 MHC class II, 將抗原呈現而活化 CD4<sup>+</sup>第二型輔助型 T 巴細胞 (T helper type 2 cells, Th2 cells)。這些第二型輔助型淋巴細胞的主要特性, 為受到抗原刺激後, 會分泌第四介白質 (interleukin-4, IL4)、第五介白質 (interleukin-5, IL-5)、第九介白質 (interleukin-9, IL-9)與第十三介白質 (interleukin-13, IL-13)。第 IV 型 Th2 過敏反應發炎病灶會有嗜酸性白血球與嗜鹼性白血球 (eosinophil- and basophil-rich inflammatory response) 之浸潤。如慢性氣喘、慢性過敏性鼻炎、異位性皮膚炎等。

(7) 第 IV 型細胞毒殺過敏反應 (Type IV cytotoxic): 組織因毒殺型 T 淋巴細胞之作用而受損。毒殺型 CD8<sup>+</sup>T 淋巴細胞辨認出標靶細胞表面抗原之片段並進而攻擊之。如早發型胰島素依賴型糖尿病、移植器官之排斥等。

過敏疾病是已開發中國家常見的疾病包括: 氣喘、鼻炎、風疹和濕疹, 全世界受影響的人口超過 30% (Mari et al., 2006; Taussig et al., 2003)。大部份臨床醫師或病患所稱之過敏病, 多半指的是由 IgE 媒介所造成立即型過敏反應, 而能誘發 IgE 產生的抗原稱為過敏原。立即型過敏反應其特點通常在三十分鐘內迅速引發症狀, 當個體第一次接觸過敏原, 抗原呈現細胞吞噬外來抗原, 將其分解成片段, 抗原片段藉由表面 MHC CLASS II 分子辨識, 呈現 Th 細胞上的接受體 TCR (T

cell receptor)，促使分化成 Th2 細胞，Th2 細胞會分泌細胞激素 IL-4 和 IL-13，促使 B 細胞分化成漿細胞產生專一性 IgE 抗體(Corry and Kheradmand, 1999)，過敏原專一性 IgE 抗體與肥大細胞和嗜鹼性白血球表面的 high-affinity(FcεRI)受體結合(Dreborg, 1989)。當個體再次接觸相同或交叉性過敏原，會以交叉性連結的方式與肥大細胞結合，促使肥大細胞脫顆粒化(degranulation)釋出如組織胺、白三烯類、前列腺素、細胞激素和多種蛋白質水解酶等發炎介質，而影響周遭組織(Sutherland et al., 2002)。對過敏原研究，最近四十年以指數成長，已經超過 1 千 3 百個過敏原結構被鑑定，發表的文獻超過 7 千篇(Mari, 2005)。

## 第二節 過敏疾病之診斷

過敏疾病的診斷，依據症狀，例如：流鼻水，鼻塞、皮膚起疹、腹瀉、呼吸困難、結膜紅腫等(Bousquet et al., 1992; Hogan et al., 1994)，並且查閱患者過敏病史，給予患者皮膚穿刺測試或檢驗血液中過敏原專一性免疫球蛋白 E (Allergen-specific IgE)，證實對何種物質過敏(Scolozzi et al., 1989)。

### 1. 皮膚穿刺測試(Skin Prick Test)

表皮上皮膚試驗包括數種，是臨床上常規用來檢試 IgE-mediated

立即型過敏反應的 gold-standard 作法。檢測方法是以細針沾過敏原之後，輕戳皮膚約 2mm 深，20 分鐘內局部會有明顯的發炎反應，測量皮膚紅腫(wheal)和紅斑(flare)的直徑大小與陰性對照組(PBS)比對，相同或小於陰性對照組視為無反應；大於陰性對照組為有反應(+)。嚴重程度以紅腫和紅斑情形分級，紅斑直徑小於陽性對照組(histamine)1/2 視為 1+；紅斑與陽性對照組相當視為 2<sup>+</sup>；紅斑大於陽性對照視為 3<sup>+</sup>；紅斑大於陽性對照組並出現皮膚腫視為 4<sup>+</sup>(Dreborg, 1989)。皮膚試驗依然具有潛在危險，嚴重過敏患者不適宜使用，可能導致過敏性休克等情況，並且皮膚試驗非唯一檢驗過敏之方法。

## 2. 血清測試

過敏體質的病人血液中 IgE 含量比非過敏的人高，利用偵測血清 IgE 含量來檢測過敏疾病。目前血清測試方法有許多種，臨床檢驗較普遍及準確的方法為 Pharmacia immunoCAP system。Pharmacia 特異性免疫球蛋白試劑，特別的專利設計 immunoCAP。一般實驗室 ELISA well 將過敏原結合在管壁上，過敏原接觸面積不大；ImmunoCAP 將過敏原結合在纖維質構成的海綿結構中，增加過敏原接觸表面積，大幅增加過敏原與抗體的結合，提高敏感度與反應時間，並且纖維質可擠壓有效地進行清洗的步驟，提高準確性。固態 CAP 系統與液相的

系統相比，CAP 則較便利的包裝、較簡單的處理過程(不需稀釋直接上機)以及較佳的穩定性(Costongs and Bas, 1997)。ImmunoCAP 能為血清中特異性 IgE 定量，濃度單位以 KU/L 表示，此檢驗低於 0.35 KU/L，則為陰性；大於或等於 0.35 KU/L，則為陽性。ImmunoCAP 專一性與敏感性均在 89%以上，可以取代傳統測量 IgE 檢測及皮膚穿刺試驗，作為過敏診斷第一線的過敏篩檢試劑。

### 第三節 過敏疾病之治療

目前臨床對於過敏疾病，以藥物治療為主，例如：抗組織胺、皮質類固醇和氣管擴張劑，主要是針對中和執行分子(effector molecules)及發炎介質 (inflammation mediators)，可快速的減輕臨床症狀及降低過敏發炎反應過敏症狀，非常有效，但停止使用，再次遇到過敏原，會再度復發 (Barnes, 1999)。使用專一性免疫治療 (specific immunotherapy；SIT) 能根治過敏病，傳統的方式以過敏原粗萃物作為減敏治療試劑，經由每週皮下注射，並逐漸提高過敏原的劑量，使患者逐漸產生耐受力(Durham, 2006; Pons et al., 2005)。此外，減敏治療需要長時間的治療約2~5年(Nelson, 2007)，注射期間可能產生許多安全性問題：(1)過敏原的粗萃物很難標準化、(2)治療時可能有嚴重的副作用，甚至全身性的過敏性休克與(3)由於未能標準化或擔心副作

用，所以無法達到有效劑量。患者的安全為SIT首要之考量，因此許多研究利用基因工程方式，製造更具有安全性與有效性的過敏疾病之疫苗，例如：修飾過敏原(Modified allergens)、胜肽免疫治療(Peptide immunotherapy)和DNA疫苗(DNA vaccination)(Bhalla and Singh, 2008)。

#### 第四節 美國蟑螂過敏症之研究

蟑螂的化石發現於 3.4 億年前，至今蟑螂物種已經超過 3500 種 (Appel and Smith, 2002)，僅有 5 種蟑螂在居家環境中經常出現，分別是美國蟑螂、德國蟑螂、東方蟑螂、褐斑蟑螂和煙褐蟑螂，成為可能的室內過敏原之一(Baumholtz et al., 1997)。蟑螂的唾液、排泄物、分泌物、皮屑、碎片和屍體等，夾雜在室內空氣中，能引發 IgE 媒介的呼吸道過敏疾病，例如：過敏性鼻炎和氣喘等(Arruda and Chapman, 2001; Arruda et al., 2001; Matsui et al., 2003)。Bernton 和 Brown 在 1964 年首先記錄蟑螂過敏原的皮膚反應試驗(Bernton and Brown, 1964)，在 1979 年 Kang 等人證明氣喘病患與吸入蟑螂過敏原之間的關係(Kang et al., 1979)。隨後的文獻指出，在巴西、奈及利亞、馬來西亞、中國、台灣、新加坡和泰國對蟑螂過敏原的盛行率有 38%~80% (Pomes et al., 2007)。

美國蟑螂為台灣一般住家內最多且最常出現的蟑螂品種，為中台

灣主要的蟑螂過敏原。美國蟑螂身體為紅棕色、大型、體長約 30~45 公釐。前胸背皮近於扁平，其周緣部具黃白色輪紋；觸角長度超過體長；雌雄成蟲之翅甚發達，超過腹部末端。性喜溫暖潮濕，常棲息於廚房、餐廳、潮濕之地窖或牆腳之縫隙(Eggleston and Arruda, 2001)。

關於蟑螂過敏原的研究，早期由吳啟輝博士等利用美國蟑螂的粗萃取液，分離並且部分純化出兩群過敏原 Cr-PI(Per a 3)和 Cr-PII(Per a 1)(Wu and Lan, 1988)。過敏原的命名是根據物種來源的屬名前三個字和種名第一個字與發現順序用阿拉伯數字指出 (King et al., 1994)，目前德國蟑螂有六種過敏原(Bla g 1、Bla g 2、Bla g 4、Bla g 5、Bla g 6 和 Bla g 7)序列和特性已被鑑定出來，美國蟑螂有八種過敏原(Per a 1、Per a 2、Per a 3、Per a 4、Per a 5、Per a 6、Per a 7 和 Per a 9)序列和特性已被鑑定出來，如附錄二(Gore and Schal, 2007)。分別說明如下：

### **1. Group 1**

Per a 1 包含許多的 isoallergen(Per a 1.0101、Per a 1.0102、Per a 1.0104、Per a 1.02 and Per a 1.03)其序列中都有很高的同源性(52-71%)，Per a 1 與德國蟑螂過敏原 Bla g 1 具有交叉性過敏原之特性、70-72% 蛋白質序列相似及共同的特徵，包括分子內部重覆序列、磷酸化位點、粒線體能量轉移蛋白及沒有 cysteine 和 N-glycosylation

site(Wu et al., 1996a; Wu et al., 1998)。Pera 1 跟非洲蚊之母蚊吸血時所誘發的一種前驅蛋白有27-32% 序列相似，蟑螂過敏病患者有54-77% 對Per a 1呈陽性IgE反應，2002年文獻指出Per a 1.0104具有3段linear IgE-binding epitopes(Wu et al., 2002)。

## 2. Group 2

Bla g 2 和 Per a 2 已鑑定為不具活性天冬氨酸蛋白酶(inactive aspartic proteinase)，Per a 2 與 Bla g 2 有 44%蛋白質序列的相似(Botos et al., 2005)，德國蟑螂過敏原 Bla g 2 和多種天冬氨酸蛋白酶如 pepsin、cathepsin、和 chymosin 有同源性(Arruda et al., 1995b)，天冬氨酸蛋白酶催化序列 32–34 為 DTG 和 215–217 DTG，Per a 2 與德國蟑螂 Bla g 2 過敏原重要的催化序列被替代，缺乏蛋白質水解的活性，蟑螂過敏病患者有 60-80%對 Bla g 2 呈陽性 IgE 反應(Pomes et al., 2002)。

## 3. Group 3

Per a 3 已鑑定為芳基/血藍蛋白(Arylphorin/hemocyanin)，group 3 只有美國蟑螂才有的過敏原，Per a 3 與 arylphorins 或 insect storage proteins (20-34%)、insect juvenile hormonesuppressible proteins (31-36%) 和 arthropod hemocyanins (30-35%)的同源性(Wu et al., 1996b)，Per a 3 的二個 isoallergen(Per a 3.01 和 3.0201)有 82.6%的盛行率以及 19 位蟑



螂過敏的氣喘患者對 Per a 3.01 有 47.4%皮膚試驗呈陽性 IgE 反應，2003 年文獻指出 Per a 3.01 有 4 段 linear IgE-binding epitopes(Wu et al., 2003)。

#### **4. Group 4**

Bla g 4 和 Per a 4 已鑑定為 Lipocalins，雖然胺基酸序列同源相似性只有 20%，晶体結構顯示與 lipocalin 有相同摺疊。Bla g 4 只表現在成年雄性生殖系統，特別在 utricles 和 conglobate gland，在交配時期運送至雌性蟑螂(Fan et al., 2005)，德國蟑螂過敏患者有 40-60%對 Bla g 4 呈陽性 IgE 反應(Arruda et al., 1995a)。

#### **5. Group 5**

Bla g 5 和 Per a 5 已鑑定為 glutathione S-transferase(GST)，有 42-45%GST 的同源性，具有基本結合 glutathione 的能力，蟑螂過敏對 Bla g 5 有 70%的盛行率(Arruda et al., 1997)。GST 參與解毒內生和生體異物的毒化合物，殺蟲劑抵抗昆蟲會提高 GST 的產生，因此，企圖消滅家中蟑螂會導致環境中暴露 Bla g 5 過敏原增加(Arruda et al., 1997)。

#### **6. Group 6**

Bla g 6 和 Per a 6 已鑑定為 troponin C，次單位有一個鈣分子結合

troponin 形成複合物，調節橫紋肌收縮，蟑螂過敏病患約有 14%對 Bla g 6 皮膚試驗呈陽性 IgE 反應(Hindley et al., 2006)。

## 7. Group 7

Bla g 7 和 Per a 7 已鑑定為原肌蛋白(tropomyosin)，Bla g 7 和 Per a 7 胺基酸序列 99%的相似度，並且與無脊椎的原肌蛋白有很高的同源性，在許多不同物種之間會有交叉性反應，因此原肌蛋白也被認定為 pan-allergen。Bla g 7 和 Per a 7 之間 IgE 個體反應有極大的不同，蟑螂過敏病患僅有 16%對 Bla g 7 皮膚試驗呈陽性反應(Jeong et al., 2003)，蟑螂過敏病患 50%對 Per a 7 呈陽性 IgE 反應(Santos et al., 1999)。

## 8. Group 9

Per a 9 已鑑定為精胺酸激酶(Arginine kinase)，在泰國對 25 位蟑螂過敏病人以血清試驗 80%呈呈陽性 IgE 反應(Sookrung et al., 2006)。精胺酸激酶首先在草蝦(Penaeus monodon)被描述為過敏原，在六位蝦過敏的病人皮膚試驗呈陽性反應(Yu et al., 2003)，Arginine kinase 也被認定為無脊椎動物的 pan-allergen(Binder et al., 2001)。

## 第五節 重組過敏原之應用

臨床上使用天然來源的過敏原粗萃物，經由過敏原皮膚試驗與檢

驗患者血液中的過敏原特異型IgE，作為診斷IgE媒介過敏疾病之試劑。而治療過敏病之減敏治療，也是使用粗萃取物作為減敏疫苗。但天然來源之過敏原粗萃取物，遭遇許多問題：無法對粗萃物標準化、萃取的過程中具有蛋白質水解酵素可分解粗萃物之組成、過敏原只屬於粗萃物之小部份和無法確認患者對於粗萃物中那些分子之過敏，導致敏感度和特異性不足(Bhalla and Singh, 2008)。然而，近年來許多主要及次要過敏原基因，都已陸續被選殖和定序(Chapman et al., 2000)。經由分子選殖之技術，利用細菌、酵母菌、昆蟲病毒與植物中表現出重組蛋白質，短時間獲得高濃度之蛋白質，易品質管制，絕大部分的重組過敏原具有與天然性過敏原相等之IgE結合能力(Mueller et al., 1998; Smith et al., 2001)，可改善過敏原粗萃物之問題。

## 第六節 呼吸道上皮細胞株研究平台

呼吸道上皮細胞在接觸與發炎反應相關的環境外來物中，為首要的黏膜分泌細胞，藉由物理屏障(physical barriers)，如緊密接合(tight junctions)、醣化合物(glycoconjugates)和酵素組成防禦的環境，防止過敏原和微生物的侵襲，以分泌細胞激素、發炎介質與生長因子等來活化發炎反應，使發炎細胞增生及聚集在發炎的區域(Mullol et al., 1995; Roca-Ferrer et al., 1997)。進一步探討環境過敏原，如蟑螂、塵蟎、花粉和黴菌過敏原等，經由吸入性的途徑，引發呼吸道過敏疾病的作用

機轉(Rudeschko et al., 2004)，但確切過敏原在人類呼吸道中，形成過敏反應的作用機轉仍然不明瞭。因此，許多研究，利用呼吸道細胞株作為研究之平台，進行 *in vitro* 模擬上皮細胞接觸過敏原刺激的發炎反應，來探討過敏原的作用機轉(Kauffman et al., 2006; Wang et al., 2007)。以下分別介紹文獻中，提到之訊號傳遞相關分子和細胞趨化激素。

### 1. MAPK 訊息傳遞路徑

Mitogen-activated protein kinases (MAPK) 屬於 serine/threonine protein kinases 家族之一，演化上廣泛被保留(conserved)在真核生物中，顯示對細胞的重要性。許多研究發現MAPK訊息傳遞路徑與細胞生長、發育及細胞的死亡有關(Pearson et al., 2001)。MAPK訊號傳遞會經由small GTPases磷酸化下游之訊息傳遞分子，而活化不同之受體所引發的下游分子也不同(Porter and Vaillancourt, 1998)。

基因體、分子與動物研究中，ERK1/2、p38和ERK5與許多疾病相關，像類風濕性關節炎、慢性阻塞性肺部疾病和氣喘(Duan and Wong, 2006)。最近幾年許多環境過敏原的分子結構和特性都有詳細研究，但確切過敏原與人類呼吸道上皮形成過敏反應的作用機轉仍然不明瞭，陸續數種具有半胱氨酸和絲氨酸蛋白水解酶的過敏原已經被

鑑定。目前文獻指出，塵蟎(*Dermatophagoides pteronyssinus*)過敏原Der p 3和Der p 9個別為絲胺酸與半胱胺酸蛋白酶，都具有活化Protease-activated receptors 2(PAR2)刺激人類呼吸道細胞株釋放細胞激素(King et al., 1998; Sun et al., 2001)，並且霉菌過敏原Pen c 13為鹼性絲氨酸蛋白酶(alkaline serine protease)，此過敏原刺激人類呼吸道細胞株會活化PAR2，經MAPK訊息傳遞路徑導致IL-8釋放(Chiu et al., 2007)。然而，許多過敏原為不具有酵素活性，目前文獻指出，塵蟎過敏原Der p 2不具酵素活性，在人類呼吸道細胞株的體外實驗中，發現會經由活化MAPK訊息傳遞路徑導致細胞激素之釋放(Osterlund et al., 2009)。另外，貓尾草花粉過敏原Phl p 1同樣不具酵素活性，也會經由活化MAPK訊息傳遞路徑導致細胞激素之釋放(Roschmann et al., 2009)。

## 2. MIP-3 $\alpha$

MIP-3 $\alpha$ 又稱CCL20，其屬於C-C趨化因子之一，具有趨化淋巴球至發炎區域和調節淋巴球穿越淋巴組織(Hieshima et al., 1997; Hromas et al., 1997; Yoshie et al., 2001)。MIP-3 $\alpha$ 表現於巨噬細胞、嗜酸性球、樹突細胞和淋巴球(Rossi et al., 1997)。MIP-3的受體為CCR6屬於G-protein coupled receptors (Baba et al., 1997; Liao et al., 1997; Power et al., 1997)。文獻指出，過敏疾病(ex:氣喘)在呼吸道中，導致免疫反應的開始與持續是藉由具有專一性活化氣管周圍的樹突細胞(Lambrecht,

2001; Lanzavecchia and Sallusto, 2001)。另外塵蟎過敏原Der p 1刺激人類呼吸道上皮細胞株會引起釋放CCL20，可趨化樹突細胞(Pichavant et al., 2005)。

### **3. IL-8**

IL-8是一種C-X-C的趨化因子之一，主要藉由單核球、嗜中性球、內皮細胞和上皮細胞受到刺激而分泌，會活化及趨化嗜中性球和嗜鹼球(Luscinskas et al., 2000)。當組織受到破壞及感染時時，IL-8會導致嗜中性球遷移穿越內皮細胞至發炎區域(Mulayim et al., 2003)。嚴重的氣喘患者中，可經由呼吸道細胞與周邊血液單核球細胞分泌IL-8 (Gagliardo et al., 2000; Shannon et al., 2008)。目前文獻指出，過敏原刺激呼吸道上皮細胞會釋放IL-8(Page et al., 2005)。

### **4. MCP-1**

過敏原刺激人類呼吸道上皮細胞也具有導致MCP-1之釋放。MCP-1 是一種C-C chemokine(Carr et al., 1994; Xu et al., 1996)，在免疫反應中，經由淋巴球與抗原之間的作用，淋巴球會釋放MCP-1，導致單核球之聚集。(Snyderman et al., 1972)；MCP-1在宿主受到突發性損傷時，可經組織中纖維母細胞釋放，使單核球趨化至損傷區域，對抗外來物的侵害。MCP-1可經由淋巴球、單核球、巨噬細胞、纖維母細胞、平滑肌細胞和人類內皮細胞釋放，並且具有趨化單核球之能

力，其受體為CCR2，而CCR2會表現於淋巴球、單核球、嗜鹼性球等細胞上(Leonard and Yoshimura, 1990)。

## 第二章 研究目的

蟑螂過敏原是台灣重要的室內過敏原之一，會引起過敏性鼻炎與氣喘等呼吸道過敏症。根據文獻報導，美國蟑螂過敏症在台灣的盛行率為 54.9%(Lan et al., 1988)，目前已經鑑定出有八種美國蟑螂過敏原。對於美國蟑螂過敏原之盛行率調查，只有 Per a 1、Per a 2、Per a 3 與 Per a 7，都被認定是主要過敏原。對於 Per a 4、Per a 5、Per a 6 與 Per a 9 之盛行率仍然不清楚(附錄二)(Gore and Schal, 2007)。目前臨床對於蟑螂過敏疾病的檢測，都以天然來源之粗萃物做為檢測之試劑，仍有許多改善的空間，例如：無法對粗萃物標準化、萃取的過程中具有蛋白質水解酵素可分解粗萃物之組成、過敏原只屬於粗萃物之小部份和無法確認患者對於粗萃物中那些分子之過敏等等，導致敏感度和特異性不足(Bhalla and Singh, 2008)。經由重組過敏原可改善檢測上之問題，並可用來探討八種美國蟑螂過敏原之間是否與呼吸道疾病嚴重度相關？

本研究選殖及製備八種美國蟑螂過敏原，建立臨床患者 IgE 反應圖譜，探討八種過敏原與臨床反應之關聯性。我們發現重組過敏原 rPer a 2 與疾病嚴重度相關，利用人類肺癌上皮細胞株更進一步釐清 rPer a 2 的致病機轉。本研究欲達成之目標包括：



1. 分子選殖六種美國蟑螂過敏原基因
2. 純化八種美國蟑螂重組過敏原
3. 分析八種美國蟑螂重組過敏原與臨床患者的 IgE 圖譜
4. 受試者血清中細胞趨化激素濃度之差異
5. rPer a 2 對 A549 細胞株發炎反應之探討
6. rPer a 2 與 MAPK 訊號傳遞路徑之關聯性

希望本研究純化之美國蟑螂重組過敏原，將來可以用來作為診斷美國蟑螂的檢驗試劑。rPer a 2 致敏機轉的研究，希望能應用於開發治療過敏病疾之藥物。

### 第三章 實驗材料和方法

#### 第一節 研究材料及病人血清

##### 1. 美國蟑螂粗萃物

本實驗所使用的美國蟑螂粗萃物 (Cra A)，是由先前實驗室的吳啟輝博士所製備。他收集台中地區一般住家內常見的美國蟑螂，之後根據 Bernton and Brown 所敘述的方法。將這些美國蟑螂萃取物溶在 CoCA's solution 中 (Bernton and Brown, 1964)，以  $18,000\times g$  離心，將萃取液以 PBS 透析，之後過  $0.45\ \mu m$  過濾膜，使用於 ELISA，再經由  $0.22\ \mu m$  過濾膜使用於細胞培養。

##### 2. 蟑螂過敏病人篩選方法及血清來源

本實驗共收集 64 位受試者血清，由台中榮民總醫院過敏免疫風濕科陳怡行大夫所提供，台中榮總人體試驗委員會許可書編號：TCVGHC08017。依據臨床診斷將病人分成 3 群，A 群：I6 immunoCAP 為陽性反應並患有過敏性鼻炎及氣喘之 21 位病人；B 群：I6 immunoCAP 為陽性反應，臨床只有過敏性鼻炎之 20 位病人；C 群：I6 immunoCAP 為陰性反應並無過敏疾病之 23 位受試者。收集的新鮮全血在室溫靜置一小時，使凝血後，經  $420\times g$  離心 20 分鐘後，取上層血清分裝於微量離心管，保存於  $-70^{\circ}C$ 。

### 3. 人類肺癌呼吸道上皮細胞株A549

由新竹市台灣生物資源保存及研究中心(BCRC, Bioresource Collection and Research Center, Taiwan) 所購得。

## 第二節 化學藥品與器材

1. 一般化學試劑：藥品大部分購自 Sigma 公司與 Merck 公司。

2. 限制酶及核酸修飾酵素

i. 內切限制酶購自美國 Promega 公司。

ii. RNaseH 購自 Invitrogen。

3. DNA 電泳相關藥品

i. Plasmid DNA Purification kit 購自 QIAGEN。

ii. Agarose 購自 Merck 公司。

iii. UltraPure™ agarose 購自 invitrogen。

iv. 100 bp 和 1,000 bp DNA marker 購自 Fermentas。

v. 2x PCR master mixture 購自於伯昂公司。

4. 蛋白質電泳相關藥品

i. pre-staining protein markers 購自於 Fermentas。

ii. CBR、TEMED、 $\beta$ -mercaptoethanol、SDS、APS、  
N-N-methylenediacrylamide (Bis)均購自 Bio-Rad 公司。

- iii. 培養基：LB Broth 購自台灣季勗公司。
  - iv. 西方墨漬分析二次抗體：Anti-human IgE 購自 BD Pharmingen 公司。
  - v. 轉漬膜：0.45um NC membrane 購自於 Millipore (USA)。
  - vi. IL-8 ELISA kit：購自於 Bender MedSystems (Austria)。
5. 引子：蟑螂過敏原特異性引子(附錄三)和細胞趨化激素引子(附錄四)。

### 第三節 重要器材及儀器

1. 桌上型離心機：Eppendorf 5417、Stratagene-ProFuge-10K。
2. 電泳設備
  - i. 蛋白質電泳：採用 Hoefer 蛋白質電泳系統。
  - ii. 核酸迷你電泳：Cosmo Bio Company 出品之 Mupid II 電泳槽及鑄膠槽。
  - iii. 電泳轉印槽：採用 Bio-Rad semi-dry。
3. 其他器材
  - i. 恆溫培養箱 Orbital shaking incubator OSI500R (KS)。
  - ii. 酵素免疫分析儀：Sunrise。
  - iii. 電源供應器 Bio-Rad 300。
  - iv. pH meter：JENCO electronic。

- v. 溫度循環反應器(thermocycler)：Perkin elmer 480, 2400。
- vi. 超音波震碎機(sonicator)：Branson sonifier 250，用於破碎細胞。
- vii. 洗片機器：Kodak Medical X-Ray 101 Processor

## 第四節 實驗方法

### 1. 美國蟑螂過敏原之分子選殖

#### 1.1 以聚合酶鏈鎖反應(PCR)選殖美國蟑螂過敏原基因

本論文預計選殖已知的八種美國蟑螂過敏原基因，其中Per a 1和Per a 3之前已在吳博士實驗室完成，其餘六種依NCBI基因資料庫中蟑螂過敏原Per a 2、Per a 4、Per a 5、Per a 6、Per a 7和Per a 9之基因序列(附錄五)，設計primers(附錄三)，利用Taq DNA polymerase以美國蟑螂cDNA為模板，進行目標基因的增幅。將1  $\mu$ l 的蟑螂1<sup>st</sup>-strand cDNA，1  $\mu$ l 的sense-primer (10  $\mu$ M)，1  $\mu$ l的antisense-primer (10  $\mu$ M)，25  $\mu$ l的2x PCR master mix，22  $\mu$ l的去離子水加入0.5 ml PCR tube中，並以手拍均勻混合，再以桌上型離心機離心3~5秒，之後加入少許礦物油，置於PCR機器進行反應。反應條件：94°C×1分鐘，55°C×1分鐘，72°C×1分鐘，重覆此三步驟共35循環，作用完畢，即降溫至4°C，取5  $\mu$ l產物進行瓊脂凝膠電泳分析並回收增幅之cDNA。

## 1.2 DNA 之電泳

以洋菜膠體 (agarose gel) 作為電泳支持介質，膠體之濃度視需要配製，通常在 0.5%~2%之間。將 DNA 樣品與 6 倍 loading buffer 以 5:1 混勻，然後注入洋菜膠體之樣品凹槽中，以 50 伏特或 100 伏特之電壓進行電泳，電泳完成後以溴化乙醯 (EtBr; 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 染色，於紫外光燈下觀察結果。

## 1.3 洋菜膠體回收DNA (DNA elution from agarose gel)

DNA樣品先以1~1.5%洋菜膠體電泳分析後，經EtBr 進行染色10分鐘，於紫外燈下以小刀切下目標DNA片段的位置，然後將其置入微量離心管中，加入以每400  $\mu\text{l}$  /100 mg 比例的Buffer A1，放置於55°C水浴槽中搖晃混合均勻約5分鐘，待其膠體完全溶解後放置於室溫回溫。將套組中所附BandPrep suspension搖晃均勻後，取10  $\mu\text{l}$ 的suspension 加入已完全溶解的膠體液中，進行DNA吸附(放置室溫十分鐘，每隔1~2 分鐘以手指輕彈管壁以保持suspension 的狀態)；然後以13,000 $\times$ g離心30秒鐘之後，移除上清液，加入1 ml Wash Buffer A3，以13,000 $\times$ g離心1分鐘之後，移除上清液。加入120  $\mu\text{l}$  Buffer A2於離心管中將沉澱物完全打散，並於55°C 水浴1分鐘，以13,000 $\times$ g離心1分鐘之後，將上清液移至新的離心管中。加入120  $\mu\text{l}$  isopropanol 並

用力震盪5秒後，靜置室溫下1分鐘，以 $13,000\times g$ 離心5分鐘之後，完全去除上清液，加入1 ml ethanol (75%)，以 $13,500\times g$ 離心2分鐘之後，移除上清液，留下沉澱物，加入10  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 回溶，此時回收之DNA 片段可儲存於-20°C 備用。

#### 1.4 接合作用(ligation)

PCR 產物經膠體回收後，即和載體 (pET30a、pQE30 和 pCR2.1(TA cloning kit))，以insert : vector 比例為3 : 1 的量，在微量離心管內加入1  $\mu$ l的10 $\times$  ligation buffer、0.5  $\mu$ l的T4 DNA ligase (1U/ $\mu$ l)、5  $\mu$ l的ddH<sub>2</sub>O、3  $\mu$ l insert、0.5  $\mu$ l vector (20 ng/ $\mu$ l)，於16°C 反應隔夜，所得之反應物即可進行轉型作用。

#### 1.5 勝任細胞之製備(Competent cell)

由-70°C 冰箱取*Escherichia coli* 菌種，使用白金環接菌，劃線培養於含適當抗生素的固態培養基，37°C 培養17小時，隔日挑取固態培養基(plate)上單一菌落，培養於2 ml LB中，以37°C 震盪培養12至16 小時；經隔夜培養後取300  $\mu$ l菌液至含有30 ml LB培養液的錐型瓶中，將大腸桿菌次培養至對數期的初期(early log phase)，以光譜儀測定OD<sub>600</sub> 值為0.2~0.3 時停止培養，移至15 ml離心管中，在4°C 離心 $5,000\times g$ 離心5分鐘，移除上清液，加入15 ml無菌的100 mM CaCl<sub>2</sub> 15

ml，以手拍方式使菌體與CaCl<sub>2</sub> 均勻混合，靜置在冰上20 分鐘，在4°C 離心5,000×g離心5分鐘後移除上清液，此時菌體呈現中空狀，加入85% 的100 mM CaCl<sub>2</sub> 與15% glycerol 共3 ml 與菌體混合均勻，放置在冰上1小時即可使用。完成的勝任細胞以200 μl/tube分裝，儲存於-70°C，可保存2至3個月。

### 1.6 細菌之轉型作用(Transformation)

保存的勝任細胞從-70°C取出，放置冰上約十分鐘，待其溶解立即加入10 μl接合反應(Ligation)的DNA混合均勻，靜置冰上作用30 分鐘，放置於42°C水浴，熱休克作用(Heat shock transformation)45 秒，冰上作用2分鐘，之後加入1 ml的LB培養液，放置於37°C培養箱中培養1小時，然後加入100 mM的IPTG及40 μg/ml的X-Gal各40 μl，菌液離心5,000×g離心1分鐘，移除上清液800~900 μl，將剩餘菌液均勻塗抹於含抗生素的固態培養基上，於37°C培養12至16 小時。

### 1.7 微量質體DNA的萃取(Miniprep)

轉型完成pCR2.1- Per a 2、pCR2.1- Per a 4、pCR2.1- Per a 5、pCR2.1- Per a 6、pCR2.1- Per a 7與 pCR2.1-Per a 9菌株，培養在2 ml 的LB/kanamycin 25 μg/ml液態培養基中，在37°C培養16至18小時，然後將培養後的菌液取1 ml到微量離心管中，以10,600×g離心1分鐘，去



除上清液，加入250  $\mu$ l之Buffer P1 (contains ribonuclease and optional LyseBlue reagent)，打散菌體，再加入250  $\mu$ l之Buffer P2 (contains sodium hydroxide)混合均勻，之後加入350  $\mu$ l之Buffer N3 (contains guanidine hydrochloride and acetic acid)，均勻混合以19,400 $\times$ g離心10分鐘。吸取上清液，組合離心管與QIAprep spin column，將上清液加入column中以10,600 $\times$ g離心1分鐘，再加入500  $\mu$ l Buffer PB (contains guanidine hydrochloride and isopropanol)以10,600  $\times$ g離心1分鐘，移除廢液，加入750  $\mu$ l PE buffer/ethanol以10,600 $\times$ g離心1分鐘，移除廢液，以10,600 $\times$ g離心1分鐘除去多餘ethanol，換新的離心管，加入50  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O，靜置1分鐘後以10,600 $\times$ g離心1分鐘，此時eppendorf中即為抽取之質體DNA，可存於4 $^{\circ}$ C備用。將純化之質體以限制性酵素 *Bam*HI-*Hind*III 切割，並且以DNA電泳確認載體大小以及Per a 1-7和Per a 9 基因大小是否正確，經確認無誤後則進行其DNA定序。

## 1.8 基因定序及分析

轉型完成pCR2.1- Per a 2、pCR2.1- Per a 4、pCR2.1- Per a 5、pCR2.1- Per a 6、pCR2.1- Per a 7與 pCR2.1-Per a 9菌株送往波仕特國際生物科技協助定序，獲得DNA序列，然後經NCBI BLAST確認Per a Per a 2、Per a 4、Per a 5、Per a 6、Per a 7和Per a 9的正確序列。

## 1.9 構築表現載體

pCR2.1- Per a 2、pCR2.1- Per a 4、pCR2.1- Per a 5、pCR2.1- Per a 6、pCR2.1- Per a 7與 pCR2.1-Per a 9以限制性酵素*Bam*HI-*Hind*III 切割與pQE30或pET30a 載體進行黏合反應；由於pQE和pET30a載體上有 6×His tag，可以利用 nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) metal-affinity chromatography matrix 和6xHis tag 結合的原理來純化重組蛋白質；轉型至表現宿主大腸桿菌M15或BL21(DE3)。

## 2 重組蛋白質之表現及純化

### 2.1 IPTG 誘導重組蛋白表現之劑量測定

將選殖成功之 pET30a- Per a 2、pET30a- Per a 4、pET30a- Per a 5、pQE30- Per a 6、pET30a- Per a 7 與 pQE30-Per a 9 菌落，接種於含有 Ampicillin (100 µg/ml)或 kanamycin (25 µg/ml)抗生素之 LB 培養基中，在 37°C 隔夜培養。次日取 1/100 隔夜培養菌液至新鮮 LB 培養基含抗生素中，在 37°C 震盪培養至 OD<sub>600</sub> 為 0.5~0.8 時，之後加入不同濃度之 IPTG，分別為 0.1、0.2、0.5、1 mM，在 37°C 誘導蛋白質表現後，再以 10,600×g 離心 1 分鐘，移除上清液以保留菌體，以 SDS-PAGE 分析重組蛋白質的產量，挑選最佳 IPTG 濃度。

## 2.2 重組蛋白質之表現時間測定

將選殖成功之 pET30a- Per a 2、pET30a- Per a 4、pET30a- Per a 5、pQE30- Per a 6、pET30a- Per a 7 與 pQE30-Per a 9 菌落，接種於含有 Ampicillin(100  $\mu\text{g/ml}$ )或 kanamycin(25  $\mu\text{g/ml}$ )抗生素之 LB 培養基中，在 37°C 震盪培養 12~16 小時。次日取 1/100 隔夜培養菌液至含抗生素之新鮮 LB 培養基中，在 37°C 震盪培養至  $\text{OD}_{600} \doteq 0.6 \sim 0.8$  時，加入 IPTG，其最佳 IPTG 濃度 0.2 mM 為 pET30a- Per a 2、pET30a- Per a 4 和 pQE30-Per a 9。其最佳 IPTG 濃度 0.5 mM 為 pET30a- Per a 5、pQE30- Per a 6 和 pET30a- Per a 7；然後 37 °C 條件下誘導 1、2、3、4、5 小時以及隔夜，誘導蛋白質表現後，以 10,600 $\times$ g 離心 1 分鐘，去除上清液以保留菌體，以 SDS-PAGE 分析以決定最佳重組蛋白質產量的時間點。

## 2.3 重組蛋白質之純化：(1) denature condition

利用大腸桿菌所產生的重組蛋白質 pET30a- Per a 2、pET30a- Per a 4 與 pQE30-Per a 9，會形成不可溶的 inclusion bodies 蛋白質，需透過變性劑溶解，所以使用去活化方式 (denature condition) 純化蛋白質。

### ● Resin 之製備 (denature condition)

取 300  $\mu\text{l}$  slurry resin (Novagen) 置於 15 ml 離心管中，加入 2 ml

ddH<sub>2</sub>O 在 4°C 的條件下以 960×g 離心 1 分鐘並將上清液去除，重複三次。再加入 3 ml 1X charge buffer (50 mM NiSO<sub>4</sub>) 與 resin 均勻混合，以 960×g 離心 1 分鐘，去除上清液，重複三次，最後以 2 ml 1X binding buffer (5 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH7.9) plus 6M urea，與 resin 均勻混合，以 960×g 離心 1 分鐘，去除上清液，重複三次，即完成 resin 的準備工作。

- Cell lysate 的準備 (denature condition)

200 ml overnight 菌液以 2,700×g 離心 10 分鐘，pET30a- Per a 2、pET30a- Per a 4 與 pQE30-Per a 9 之 cell lysate 分別以 6 ml binding buffer 回溶，之後經超音波震碎，每 10 秒鐘後放置冰上十秒鐘，反覆重覆此步驟六 60 分鐘之後，以 19,400×g 離心 25 分鐘，去除上清液。接著將 pET30a- Per a 2、pET30a- Per a 4 與 pQE30-Per a 9 pellet 以 6 ml 1X binding buffer plus 6M urea 回溶，並且慢慢的翻轉 overnight，促使形成 inclusion bodies 的蛋白質溶解，全程需要在 4°C 進行。次日，以 19,400×g 離心 25 分鐘以去除不溶的沉澱物，並將上清液，加入準備好的 resin 中。

- His-tag Binding (denature condition)

pET30a- Per a 2、pET30a- Per a 4 與 pQE30-Per a 9 之上清液分別與先前已準備好的 Ni<sup>2+</sup>-resin 均勻混合，同樣輕輕的旋轉混合一小時，使攜帶 His-tag 之重組蛋白質和 Ni<sup>2+</sup>-resin 結合，然後 4°C 下以

960×g 離心 1 分鐘，去除上清液。連續以 6 ml 1X binding buffer (5 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH7.9) plus 6M urea 洗 resin 三次；之後換以 1X wash buffer (60 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH,7.9) plus 6M urea 與 resin 混合，洗去非專一性結合的蛋白，重複三次；最後，以 2 ml 含有 elution buffer (1 M imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH7.9) plus 6M urea 將專一性蛋白質洗出，並且收集定量。

### 2.3 重組蛋白質之純化：(2) native condition

利用大腸桿菌所產生的重組蛋白質 pET30a- Per a 5、pQE30- Per a 6 與 pET30a- Per a 7 為可溶的蛋白質，所以使用 native condition 進行純化。

#### ● Resin 之製備 (native condition)

取 300  $\mu$ l slurry resin (Novagen) 置於 15 ml 離心管中，加入 2 ml ddH<sub>2</sub>O 在 4°C 的條件下以 960×g 離心 1 分鐘並將上清液去除，重複三次。再加入 3 ml 1X charge buffer (50 mM NiSO<sub>4</sub>) 與 resin 均勻混合，以 960×g 離心 1 分鐘，去除上清液，重複三次，最後以 2 ml 1X binding buffer (5 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH7.9) 與 resin 均勻混合，以 960×g 離心 1 分鐘，去除上清液，重複三次，即完成 resin

的準備工作。

- Cell lysate 的準備 (native condition)

200 ml overnight 菌液以  $2,700\times g$  離心 10 分鐘，pET30a- Per a 5、pQE30- Per a 6 與 pET30a- Per a 7 之 cell lysate 分別以 6 ml binding buffer 含有 0.1% NP-40 回溶，之後經超音波震碎，每十秒鐘後放置冰上 10 秒鐘，反覆重覆此步驟 60 分鐘，之後  $19,400\times g$  離心 25 分鐘，吸出上清液，加入準備好的 resin 中。

- His-tag Binding (native condition)

pET30a- Per a 5、pQE30- Per a 6 與 pET30a- Per a 7 上清液與先前已準備好的  $Ni^{2+}$ -resin 均勻混合，同樣輕輕的旋轉混合一小時，使攜帶 His-tag 之重組蛋白質和  $Ni^{2+}$ -resin 結合，然後  $4^{\circ}C$  下以  $960\times g$  離心 1 分鐘，去除上清液。分別連續以 6 ml 1X Binding buffer (5 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH7.9) 洗 resin 三次；之後換以 1X wash buffer (60 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH,7.9) 混合，洗去非專一性結合的蛋白，重複三次；最後，以 2 ml 含有 1M imidazole 的 elution buffer (1 M imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH7.9) 將專一性蛋白質洗出，並且收集定量。

## 2.4 蛋白質濃度測定

以 Bradford method 測定純化之重組蛋白質的濃度，利用染料 Coomassie Blue 與蛋白質結合後，會由褐色變為藍色；由反應前後藍色吸光度的改變，與已知蛋白質的標準曲線比較，即可推知樣本中蛋白質的濃度，顏色越呈現藍色，表示蛋白質含量越高。將樣品連續稀釋 2 倍、4 倍、8 倍，吸取每組稀釋液 20  $\mu\text{l}$  加上 500  $\mu\text{l}$  的 protein dye (Bio-Rad, Laboratories, Inc.) 充分混合，靜置五分鐘，吸取 300  $\mu\text{l}$  於 96 well ELISA plate 中，利用 ELISA reader (TECAN, Austria) 測定其 595 nm 之吸光值。取牛血清蛋白(BSA, Sigma)濃度為 50、125、250、500、1,000  $\mu\text{g/ml}$  作為蛋白質定量標準品，經由 ELISA reader (Tecan, Austria) 測得的吸光值可得標準曲線 (standard curve)，得到其直線公式，再將符合於直線內待測蛋白質數據帶回公式內，可得萃取液蛋白質濃度。

## 3 蛋白質電泳分析

### 3.1 聚丙烯醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)

- 配製分離膠體 (Separating gel)

3.35 ml ddH<sub>2</sub>O、30% acrylamide/bis (29:1) 4 ml、1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 2.5 ml、10 % SDS 50  $\mu\text{l}$ 、10 % Ammonium Persulfate (APS) 100

$\mu\text{l}$ 、TEMED 10  $\mu\text{l}$ ，混合上述溶液再加入butanol於凝膠上方，約40分鐘後凝膠介面即可形成，倒掉 butanol 再繼續製備焦集膠體。

### Separating gel-12 %

ddH <sub>2</sub> O	3.35 ml
30% acrylamide/bis (29:1)	4 ml
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 ml
10 % SDS	50 $\mu\text{l}$
10 % APS	100 $\mu\text{l}$
TEMED	10 $\mu\text{l}$

### ● 配製焦集膠體 (Stacking gel)

取3 ml ddH<sub>2</sub>O、30% acrylamide/bis (29:1) 0.65 ml及0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 取1.25 ml，加入10 % SDS 50  $\mu\text{l}$ 、10 % APS 50  $\mu\text{l}$ 、TEMED 10  $\mu\text{l}$ ，混合上述溶液加入已凝固的separating gel上，放入梳狀模板於凝膠上方，待膠凝固後取下模版，即成為可容納蛋白樣品的凹槽。

### Stacking gel-4 %

ddH <sub>2</sub> O	3 ml
30% acrylamide/bis (29:1)	0.65 ml
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	1.25 ml
10 % SDS	50 $\mu\text{l}$
10 % APS	50 $\mu\text{l}$
TEMED	10 $\mu\text{l}$



- **電泳緩衝液的製備 (Running buffer)**

取3.05 g的Tris/base、甘胺酸 (glycine) 14.4 g以及1g SDS再加ddH<sub>2</sub>O至總體積1公升，配成25 mM Tris-HCl，192 mM glycine，0.1 % SDS的電泳緩衝液。

- **電泳的操作**

將配置好的4-12%電泳膠片安掛於直立式電泳槽，利用低溫循環水浴槽(Firstek<sup>TM</sup>) 控制溫度恆定在12°C，上膠以15mA之電流進行電泳約40分鐘，然後改以30 mA之電流進行下膠之電泳30分鐘。之後，待指示劑移至膠片底部，完成電泳停止通電，取出膠片進行染色，或膠片直接進行西方墨漬法分析。

### **3.2 CBR 染色法 (Coomassie brilliant blue stain)**

利用 CBR 上的芳香基團與蛋白質的非極性區結合，以及所帶負電與蛋白質的正電基團結合，取出蛋白質電泳膠片後，將膠片置於染色液 (0.1% Coomassie Blue R-250、10% acetic acid、40% methanol) 中染色 45 分鐘，再取出以褪色液 (10% acetic acid、40% methanol) 進行褪色至背景接近透明。是最常用的染色法，快速而方便。

### 3.3 西方墨漬法 (Western blotting)

將欲檢測之蛋白質以 4-12% SDS-PAGE 電泳分離，在蛋白質電泳結束後，準備一張 8×5.5 公分的 0.45 um nitrocellulose membrane (NC membrane)，同時與六片濾紙（四小張、兩大張）一起浸在 Transfer buffer 中；另一方面此時卸下蛋白質電泳膠，浸在 Towbin buffer 中十五分鐘。依序疊上濾紙，順序是：兩大張濾紙，兩小張濾紙然後是轉漬膜、蛋白質膠片、兩小張濾紙，小心將氣泡趕走，放入半乾式轉漬器(Bio-Rad)，外接電源控制器設定 20 伏特電壓進行蛋白轉漬約 33 分鐘。完畢後取出電泳膠片以 CBR 染色法進行染色。NC membrane 以 PBST 洗 10 分鐘三次，再浸漬於 blocking solution (5% 脫脂牛奶) 於室溫振盪兩小時以去除非專一性結合，然後用 PBST 洗三次每次 10 分鐘；加入一級抗體（病人血清稀釋比例為 serum：PBST=1:10），先在 4°C 作用 16 至 18 小時；之後以 PBST 洗三次每次 10 分鐘，再加入以 PBST 稀釋 2,000 倍的 AKP anti-human IgE (BD PharmingenTW) 在室溫下反應二小時，之後以 PBST 清洗三次每次 10 分鐘，最後用 BCIP/NBT/AP 避光進行呈色反應約 10 分鐘，去除呈色溶液，以 ddH<sub>2</sub>O 清洗二次，注意避光，使呈色更完全。

### **Transfer buffer (for Sermidry transferring)**

Tris-base	5.82 g
Glycine	2.93 g
10 % SDS	3.75 ml
Methanol	200 ml

加 ddH<sub>2</sub>O 使體積至 1,000 ml

### **Towbin buffer (for gel soaking)**

Tris-base	3.03 g
Glycine	14.4 g
Methanol	200 ml

加 ddH<sub>2</sub>O 使體積至 1,000 ml

## **4 IgE ELISA**

原理是利用抗體可專一性的與抗原結合，抗原與抗體之結合是藉抗原與結合部位間所形成的許多非共價鍵來完成，ELISA 辨識利用已知量的抗原來測定未知量的抗體。在進行 ELISA 時，先經 checkerboard titration 選擇適當的抗原抗體的濃度。首先，將 100  $\mu$ l 抗原加至 96 孔盤，在 37°C 培養 2 小時後，用 1% BSA 於室溫下培養兩小時以去除非專一性結合；再與 10 倍稀釋後的病人血清在 4°C 下培養隔夜後，加入二級抗體 (alkaline phosphatase-labeled mouse anti-human IgE 1:2,000)，經室溫反應 2 小時，呈色劑以  $\rho$ -nitrophenol phosphate 作用 90 分鐘後，由 ELISA 分析儀 (Tecan, Austria) 在波長

405 nm 處測吸光，並以 595 nm 波長作為參考背景值。

## 5 細胞培養

### 5.1 移除重組蛋白質中 LPS 汙染

取 100  $\mu$ l Detoxi-Gel Resin (Thermo, USA) 置 1.5 離心管中，在 25°C 的條件下，以 960 $\times$ g 離心 1 分鐘，移除上清液。再加入 500  $\mu$ l 1% sodium deoxycholate (Pierce) 與 resin 均勻混合，以 960 $\times$ g 離心 1 分鐘，移除上清液。最後加入 500  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 與 resin 均勻混合，以 960 $\times$ g 離心 1 分鐘，即完成 resin 的準備工作。將重組過敏原與先前已準備好的 Detoxi-Gel Resin，在 25°C 的條件下，反應 1 小時，以 960 $\times$ g 離心 1 分鐘，收取上清液，最後以 Bradford method 測定其重組蛋白質之濃度。

### 5.2 A549 細胞株之培養

人類肺癌呼吸道上皮細胞株 A549 於含有 10%FBS (fetal bovine serum) 以及 100 U/mL penicillin and streptomycin (GibcoBRL, Grand Island, MD, USA) 的 RPMI 1640 medium 中，置於 37°C 含 5% CO<sub>2</sub> 的培養箱生長，每 2-3 天需繼代一次。

### 5.3 繼代培養

當細胞於T75 flask 內生長至高密度時(約七八成滿),即須收集細胞,分殖至新的T75 flask中繼續培養。首先,吸掉舊培養液,用無菌的DPBS洗滌一次。之後加入Cell dissociation buffer (GibcoBRL, Grand Island, MD, USA),於 37°C作用數分鐘後,使用顯微鏡觀察,當細胞將要分離而呈現圓粒狀時,輕拍培養瓶使細胞自瓶壁脫落,將溶液吸出置於15 ml離心管,經110×g離心5分鐘,去除上清液。再加入3 ml DPBS,離心110×g離心5分鐘,去除上清液。最後加入適當的含血清之新鮮培養液,混合均勻後,依稀釋比例轉移至新的T75 flask中。

### 5.4 細胞計數

細胞數目可用血球計數盤 (chamber),每個 chamber 中細刻 9 個  $1\text{mm}^2$  大正方形,其中 4 個角落之正方形再細刻 16 個小格,深度均為 0.1mm。當 chamber 上方蓋上蓋玻片後,每個大正方形之體積為  $1\text{mm}^2 \times 0.1\text{mm} = 1.0 \times 10^{-4}\text{ml}$ 。使用時之前,先將細胞以 Cell dissociation buffer (GibcoBRL, Grand Island, MD, USA) 處理後離心,加入 6 ml 細胞培養液,充分將細胞打散,取 10  $\mu\text{l}$  細胞懸浮液與 10  $\mu\text{l}$  trypan blue 充份混合,計數四個大正方形內之細胞數目/4,乘以稀釋倍數,再乘以  $10^4$ ,即為每 ml 中之細胞數目。

## 6. 細胞趨化激素基因表現分析

### 6.1 A549 細胞之 RNA 萃取 (RNA extraction)

先將種  $3 \times 10^5$  A549 cells 的六孔盤 (BD Falcon; catalog no. 353046) 從 37°C 培養箱取出，吸掉 medium，用 1x DPBS wash 1 次，之後每個 well 加入 0.5 ml TRIzol reagent (Invitrogen)，斜置六孔盤並用 cell scraper 以畫圈方式刮下細胞，靜置五分鐘之後收集至 1.5 ml eppendorf。加入 200  $\mu$ l chloroform，用手劇烈搖晃混合，此時呈現粉紅色，之後放在室溫下反應 5 分鐘，在 4°C 下以  $19,400 \times g$  離心 15 分鐘，將上層液取出到新的 1.5 ml eppendorf 內，再加入等量 isopropanol 混合均勻，然後在室溫下反應作用 10 分鐘，在 4°C 下以  $15,300 \times g$  離心 10 分鐘，倒掉上清液，加入 1 ml 75% 酒精，洗乾淨沉澱物，在 4°C 下以  $10,600 \times g$  離心 5 分鐘，倒掉上清液，放置桌上等待管內酒精揮發完後，加入 15  $\mu$ l nuclease-free water 溶解，之後存放於 -70°C 中。

### 6.2 RNA 濃度之測定

取 1  $\mu$ l 的 RNA 萃取液，利用 NanoDrop 分析儀，依  $OD_{260}$  估算 RNA( $\mu$ g/ml) 的濃度(公式： $RNA = OD_{260} \times 40$ )，並依  $OD_{260}/OD_{280}$  之間的比值，觀察 RNA 之純度。

### 6.3 1<sup>st</sup>-strand cDNA synthesis

取 0.5  $\mu\text{g}$  的 total RNA 加 ddH<sub>2</sub>O 至 4  $\mu\text{l}$ 、分別加入 5  $\mu\text{l}$  2X RT Reaction mix 和 1  $\mu\text{l}$  10X RT Enzyme Mix 至 0.5 ml PCR tube，手拍均勻混合，再以桌上型離心機離心 3~5 秒，放置 PCR 機器(PerkinElmer Life Sciences 480) 進行反應。反應條件為：25°C×10 分鐘(Annealing)，50°C×60 分鐘進行反轉錄作用，85°C×5 分鐘進行去活化作用，所得之 1<sup>st</sup>-strand cDNA 儲存於-20°C 備用。

### 6.4 細胞趨化激素之聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase Chain Reaction ; PCR)

將 1  $\mu\text{l}$  之 10 倍稀釋的 1<sup>st</sup>-strand cDNA、1  $\mu\text{l}$  的 10  $\mu\text{M}$  或 2.5  $\mu\text{M}$  sense-primer、1  $\mu\text{l}$  的 10  $\mu\text{M}$  或 2.5  $\mu\text{M}$  antisense-primer、25  $\mu\text{l}$  的 2x PCR master mixture 以及 22  $\mu\text{l}$  的 ddH<sub>2</sub>O 加入 0.5 ml PCR tube 中，並以手拍均勻混合，再以桌上型離心機離心 3~5 秒，之後加入少許礦物油，置於 PCR 機器 (PerkinElmer Life Sciences 480) 進行反應。反應條件為：94°C×1 分鐘，55°C、60°C 和 62°C×1 分鐘依 primer 調整，72°C×1 分鐘，重覆此三步驟共 22 至 40 循環依不同基因表現量調整(附錄四)，作用完畢，即降溫至 4°C，取 7.5  $\mu\text{l}$  產物進行瓊脂凝膠電泳分析。

## 7. IL-8濃度之測定

基本操作流程是根據 IL-8 ELISA kits(Bender MedSystems, Vienna, Austria)內所附之操作手冊操作。準備一個96孔盤，coating human  $\alpha$ IL-8抗體(5  $\mu$ g/ml)於well底部，置於4°C overnight。隔天早上先將96孔盤從4°C取出並且回溫十分鐘，之後用PBST 洗一次。接著加入200  $\mu$ l的Assay Buffer (0.5%BSA in PBST)作blocking，於室溫反應兩小時以去除非專一性結合。之後去除blocking buffer再以PBST 洗三次。加入IL-8 標準品，從最高濃度為1,000 pg/ml，2倍序列稀釋至16.125 pg/ml；同時其餘的wells加入100  $\mu$ l之2倍稀釋血清或culture supernatant(1：1稀釋於sample dilution buffer)。接著每個well再個別加入50  $\mu$ l Biotin-Conjugate(1:1,000 稀釋於Assay Buffer)，於室溫下反應兩小時。之後去除多餘抗體再以PBST 洗三次。接著加入100  $\mu$ l strepavidin-HRP(1:10,000 稀釋於 Assay Buffer)，於室溫下培養搖盪一小時。之後再以PBST wash 三次。接著加入100  $\mu$ l TMB (Tetamethylbenzidine)溶劑來呈色，必須避光，約十分鐘呈色後，加入停止劑 (stop solution)1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 終止反應，讀取波長450 nm之吸光度，並以620 nm當參考波長 (reference wave length)。再根據畫成之標準曲線(standard curve)，求得各個檢體 IL-8 的濃度。



## 8. CCL20濃度之測定

基本操作流程是根據 CCL20 ELISA kits(Research and Development ; Cat. NO. DY360)內所附之操作手冊操作。準備一個96孔盤，coating mouse anti-human CCL20抗體(2  $\mu\text{g/ml}$ )於well底部，置於室溫overnight。隔天早上使用PBST 洗一次。接著加入300  $\mu\text{l}$  的 Reagent Dilueuent (Research and Development ; Cat. NO. DY995)作 blocking，於室溫反應兩小時以去除非專一性結合。之後去除blocking buffer再以PBST 洗三次。加入MCP-1標準品，從最高濃度為500  $\text{pg/ml}$ ，2倍序列稀釋至7.8125  $\text{pg/ml}$ ；同時其餘的wells加入100  $\mu\text{l}$ 之2倍稀釋血清或culture supernatant(1：1稀釋於Reagent Dilueuent)，放置於室溫下反應兩小時，之後去除多餘抗體再以PBST洗三次。接著每個well再個別加入100  $\mu\text{l}$  Detection antibody (1:180稀釋於Reagent Dilueuent)，放置於室溫下反應兩小時，之後去除多餘抗體再以PBST洗三次。接著加入100  $\mu\text{l}$  strepavidin-HRP(1:200稀釋於Reagent Dilueuent)，於室溫下培養搖盪20分鐘。之後再以PBST wash三次。接著加入100  $\mu\text{l}$  TMB(Tetamethylbenzidine)溶劑來呈色，必須避光，約十分鐘呈色後，加入停止劑(stop solution)1M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  終止反應，讀取波長450 nm之吸光度，並以540 nm當參考波長(reference wave length)。再根據畫成之標準曲線(standard curve)，求得各個檢體CCL20的濃度。

## 9. MCP-1濃度之測定

基本操作流程是根據 MCP-1 ELISA kits(Research and Development ; Cat. NO. DY279) 內所附之操作手冊操作。準備一個 96孔盤，coating mouse anti-human MCP-1抗體(1  $\mu\text{g/ml}$ )於well底部，置於室溫overnight。隔天早上使用PBST 洗一次。接著加入300  $\mu\text{l}$  的 Reagent Dilueuent(Research and Development ; Cat. NO. DY995)作 blocking，於室溫反應兩小時以去除非專一性結合。之後去除blocking buffer再以PBST洗三次。加入MCP-1標準品，從最高濃度為1,000  $\text{pg/ml}$ ，2倍序列稀釋至16.125  $\text{pg/ml}$ ；同時其餘的wells加入100  $\mu\text{l}$ 之2倍稀釋血清(1：1稀釋於Reagent Dilueuent)，放置於室溫下反應兩小時，之後去除多餘抗體再以PBST 洗三次。接著每個well再個別加入100  $\mu\text{l}$  Detection antibody(1:180 稀釋於Reagent Dilueuent)，放置於室溫下反應兩小時，之後去除多餘抗體再以PBST洗三次。接著加入100  $\mu\text{l}$  strepavidin-HRP(1:200 稀釋於Reagent Dilueuent)，於室溫下培養搖盪20分鐘。之後再以PBST wash三次。接著加入100  $\mu\text{l}$  TMB (Tetamethylbenzidine) 溶劑來呈色，必須避光，約十分鐘呈色後，加入停止劑 (stop solution)1M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  終止反應，讀取波長450 nm之吸光度，並以540 nm當參考波長(reference wave length)。再根據畫成之標準曲線(standard curve)，求得各個檢體 MCP-1 的濃度。

## 10. 抑制 MAPK 訊息傳遞對 rPer a 2 誘發 A549 分泌 IL-8 作用之影響

將 A549 以  $2 \times 10^5$  cells/well 培養於 24 孔盤(BD Falcon ; cat. No.353047)，經 24 小時細胞密度達 80%融合度，換至不含血清之培養液，放置於培養箱 24 小時之後，分別加入 MAPK 抑制劑：5  $\mu$ M U0126 (ERK1/2 inhibitor)、25  $\mu$ M SP600125(JNK inhibitor)以及 25  $\mu$ M SB203580(P38 inhibitor)，前處理 2 小時，再各別加入 rPer a 2(10  $\mu$ g/ml)、Cra A (10  $\mu$ g/ml)以及 AP(10  $\mu$ M)並置於培養箱 16 小時，取出上清液並以 420xg 離心 5 分鐘，上清液保存於-70°C 備用。

## 11. 以西方點墨法分析MAPK磷酸化

將 A549 cells 以  $5 \times 10^5$  cells/dish 的濃度種於 3.5 cm 組織培養盤 (tissue culture dish 35×35mm, BD Falcon)，經過 24 小時的飢餓之後，再以 10  $\mu$ g/ml rPer a 2 分別處理 5、10、15 和 20 分鐘以及 10  $\mu$ g/ml Cra A 和 10  $\mu$ M PAR-2 AP(agonist peptide) 處理 10 分鐘，加入 100  $\mu$ l PRO-PREP™ protein extraction solution，將細胞膜打破以便蛋白質之萃取，放置冰上 20 分鐘，收集上清液至 1.5 ml 離心管中，在 4°C 下以 19,400×g 離心 15 分鐘，將上清液移至新的 1.5 ml 離心管中，再以 Bradford method 測定其萃取蛋白質之濃度。

取20  $\mu\text{g}/\text{lane}$ 細胞蛋白質萃取物經4-12%蛋白質電泳分析後，轉漬至PVDF膜上，再用5% 脫脂牛奶反應2小時，去除非專一性結合，然後用PBST洗3次，每次分別10分鐘。接著加入抗體：rabbit anti-human phospho-44/42 MAPK antibody(1:2,000, R&D; cat. No. MAB1018)； GAPDH (1:10,000, R&D; cat. No. 2275-PC-1)，置於4°C作用16~18小時。PBST洗三次每次10分鐘，再加入抗體(1:10,000 goat anti-rabbit IgG-HRP)，在室溫反應1小時，之後以PBST清洗3次每次10分鐘。以ECL呈色，Oxidizing reagent與Enhanced luminal reagent(PerkinElmer Life Science, Boston, Ma, USA)以1:1之比例加至PVDF膜上，室溫作用5分鐘，暗房內壓片及沖片。

## 12. 統計分析

實驗結果的數據的皆以平均值 $\pm$ 標準偏差平均值 (Mean $\pm$ standard error of mean; SEM) 的方式來表示。不同濃度rPer a 2刺激A549的實驗數據，利用統計分析系統 (excel, Microsoft 2008)以T-Test分析統計，以及受試者血清細胞趨化激素之濃度與MAPK訊息傳遞路徑之抑制劑的實驗數據，利用SPSS 10.0軟體 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA)比較平均數法中的單因子變異數分析統計。

## 第四章 結果

### 第一節 六種蟑螂過敏原基因選殖與序列比對分析

萃取蟑螂 total RNA 進行反轉錄反應，合成蟑螂 1st-strand cDNA，分別根據 Per a 2、Per a 4、Per a 5、Per a 6、Per a 7 和 Per a 9 之序列設計特異性引子 (附錄三)，進行 PCR 增幅目標基因，以洋菜膠體電泳分析之蟑螂過敏原基因片段 (圖一)。將蟑螂過敏原 cDNA 片段與 TA cloning 載體(pCR2.1, Invitrogen)進行接合作用(ligation)並轉殖(transform)至 TOP 10F'，萃取轉殖後菌株之質體，以限制酶酵素 *Bam*HI/*Hin*dIII(Per a 2、Per a 4、Per a 5、Per a 6 和 Per a 9)或 *Eco*RI/*Not*I(Per a 7)進行切割。確認之菌株送至波仕特國際生物科技公司定序。將確認之目標基因片段與表現載體(pQE 30 和 pET30 a)進行接合作用，並嵌入至 BL21(DE3)或 M15 菌株中，挑選重組株，純化之質體以限制酶酵素 *Bam*HI/*Hin* III(Per a 2、Per a 4、Per a 5、Per a 6 和 Per a 9)或 *Eco*RI/*Not*I(Per a 7)進行切割(圖二)，將確認之菌株送至波仕特國際生物科技公司定序，六種過敏原核苷酸序列和衍譯之胺基酸序列，分別列於圖三 A-F。利用 NCBI BLAST 軟體與已發表之序列比對，發現 Per a 2：8 個核苷酸與 6 個胺基酸和 AY792947 不同；Per a 4：3 個核苷酸與 2 個胺基酸和 AY792948 不同；Per a 5：2 個核苷酸與 5 個胺基酸和 AY792949 不同；Per a 6：2 個核苷酸與 1 個胺基

酸和 AY792950 不同；Per a 7:3 個核苷酸與 2 個胺基酸和 Y14854 不同；Per a 9:8 個核苷酸與 1 個胺基酸和 AY563004 不同。

## 第二節 以 SDS-PAGE 與免疫轉漬法分析重組過敏原

將八種含重組過敏原基因之菌株放入培養基中，加入不同濃度 (0.2mM、0.4 mM、0.6 mM、0.8 mM 和 1 mM)IPTG，培養 16 hr，利用 SDS-PAGE 分析蛋白質最佳表現濃度，結果列於表一。另以最佳濃度 IPTG 去誘導過敏原之菌株，收取不同時間點(1、2、3、4、5 和 16 Hr)菌液以 10,600×g 離心 1 分鐘，取沉澱之菌落，利用 SDS-PAGE 分析最佳表現之時間(表一)。依最佳 IPTG 濃度和最佳時間點培養八種重組過敏原菌株，利用超音波將震碎細菌，以具有 Ni<sup>2+</sup> 的 Resin 加以純化，重組蛋白質可分成可溶性和非可溶性，其產量如表一。取 2 μg 進行 SDS-PAGE 分析蛋白質純度(圖四-A)與免疫轉漬法，以 5 位蟑螂過敏症病患血清做為探針，確認八種重組過敏原都具有與 IgE 結合之能力(圖四-B)。

## 第三節 八種過敏原與臨床患者 IgE 反應圖譜

將 64 位受試者(附錄六)之血清，其中 41 位美國蟑螂過敏患者依臨床症狀分成 A 群 (過敏性鼻炎與氣喘)與 B 群(過敏性鼻炎)，23 位無過敏為 C 群做為 ELISA 之對照組。首先欲比較 IgE ELISA 和

immunoCAP 之相關性，故以實驗室所製備的蟑螂過敏原粗萃物與 41 位美國蟑螂之血清反應，依據蟑螂過敏患者 immunoCAP 所得到 IgE(kU/L)值與 ELISA 之 OD<sub>405</sub> 值，經由統計分析之線性迴歸其 P 值為 0.0001，發現二者成正相關。觀察 A 群和 B 群患者與八種重組過敏原之 IgE 反應，發現 A 群有 9 名病患(43%)之血清與 rPer a 1 反應；17 名病患(81%)之血清與 rPer a 2 反應；11 名病患(52%)之血清與 rPer a 3 反應；10 名病患(48%)之血清與 rPer a 4 反應；14 名病患(67%)之血清與 rPer a 5 反應；10 名病患(48%)之血清與 rPer a 6 反應；11 名病患(52%)之血清與 rPer a 7 反應；6 名病患(29%)之血清與 rPer a 9 反應(表二)。發現 B 群有 9 名病患(45%)之血清與 rPer a 1 反應；9 名病患(45%)之血清與 rPer a 2 反應；11 名病患(55%)之血清與 rPer a 3 反應；7 名病患(35%)之血清與 rPer a 4 反應；11 名病患(55%)之血清與 rPer a 5 反應；11 名病患(55%)之血清與 rPer a 6 反應；10 名病患(50%)之血清與 rPer a 7 反應；16 名病患(80%)之血清與 rPer a 9 反應(表三)。八種過敏原在 41 位蟑螂過敏患者個別盛行率為 43%~64%，兩兩交叉混合發現，有 36 名病患(88%)血清會與 rPer a 2 和 rPer a 9 反應，在加上 Per a 6 可觀察有 39 名病患(95%)血清會與 rPer a 2、rPer a 6 和 rPer a 9 反應 (表四)。將 A 和 B 群之患者個別對八種過敏原以 SPSS 軟體以卡方統計分析二組之盛行率，發現 rPer a

2 與 rPer a 9 具有顯著性的差異，rPer a 9 在過敏性鼻炎患者中盛行率高於氣喘患者，推測 rPer a 9 與呼吸道鼻炎相關；然而 rPer a 2 在氣喘患者盛行率高於過敏性鼻炎患者，推測 rPer a 2 與氣喘相關 (圖六)。以上 ELISA 之結果，是以 23 位正常受試者之 OD 值 Mean+2 個標準差(standard deviation) 定義各別過敏原，界定陽性與陰性之反應(cut-off value=mean+2SD)。

#### 第四節 臨床患者血清中細胞趨化激素濃度之差異

將三群受試者之血清，利用 ELISA 測量 IL-8、CCL20 和 MCP-1 之濃度，測量之結果：A 群患者 IL-8 中位數濃度為 661 pg/ml，CCL20 中位數濃度為 209 pg/ml，MCP-1 中位數濃度為 435 pg/ml；B 群患者 IL-8 中位數濃度為 8 pg/ml，CCL20 中位數濃度為 63 pg/ml，MCP-1 中位數濃度為 186 pg/ml；C 群患者 IL-8 中位數濃度為 65 pg/ml，CCL20 中位數濃度為 23 pg/ml，MCP-1 中位數濃度為 68 pg/ml(圖七-A~C)。最後以 SPSS'統計分析三群患者細胞趨化激素之差異，A 群受試者不論是 B 或 C 二群受試者血清中，IL-8、CCL20 和 MCP-1 都具有顯著之差異。

#### 第五節 不同濃度 rPer a 2 刺激 A549 對細胞趨化激素 mRNA 之影響

以 His-tag resin 之純化 rPer a 2，再利用 2 M urea/PBS 透析，接著



進行 Detoxi-gel column 將 Endotoxin 移除，最後經由 0.22um 膜過濾，應用於細胞實驗。分別利用不同濃度(1、2.5、5、10、20 和 40 µg/ml) 處理 A549 細胞 2 小時之後，萃取 total RNA，進行 RT-PCR，依細胞趨化激素(IL-8、CCL20 和 MCP-1)基因表現量不同，分別收取不同之 cycle(附錄四)，再以洋菜膠體電泳分析(圖八-A)，將膠圖利用 gel-pro 軟體加以量化(圖八-B~D)，IL-8 表現量增加 1.5 倍至 5.1 倍；CCL20 表現量增加 2.6 倍至 19.5 倍；MCP-1 表現量增加 1.4 倍至 4.2 倍。

#### **第六節 rPer a 2 以時間點方式刺激 A549 表現細胞趨化激素 mRNA 與釋放 IL-8 蛋白質**

以 10 µg/ml rPer a 2 處理 A549 細胞，收取 1、2、3、4、5、8、16 和 24 小時之細胞用於萃取 total RNA，以及上清液用於蛋白質測量。依基因表現量不同，分別收取不同之 cycle(附錄四)，再以洋菜膠體電泳分析(圖九-A)，將膠圖利用 gel-pro 軟體加以量化，rPer a 2 依不同時間刺激 A549 細胞 IL-8 mRNA 表現，在 1 小時至 8 小時都有二倍以上增加，並且在 2 小時 mRNA 達最大量；MCP-1 mRNA 表現，在 2 小時至 5 小時都有二倍以上增加，並且在 4 小時 mRNA 達最大量；CCL20 mRNA 表現，並且在 2 小時 mRNA 達最大量(圖九-B)。收取之上清液，利用 ELISA 偵測 IL-8 蛋白質釋放量，發現 IL-8 在 2 小時

開始可以測到 11 pg/ml，隨著處理的時間增長在 16 小時達 592 pg/ml (圖十)，最後經由統計分析，發現 16 小時的實驗組與對照組具有顯具之差異。

### **第七節 rPer a 2 刺激 A549 偵測 MAPK 訊息傳遞路徑之磷酸化**

分別以 10 µg/ml rPer a 2、10 µg/ml Cra A 與 100 uM AP (PAR2 agonist peptide)刺激 A549，萃取細胞蛋白質(rPer a 2: 0、5、10 和 20 分鐘; Cra A 和 AP:10 分鐘)，利用西方點墨法分析，偵測 MAPK 訊息傳遞路徑之磷酸化。依 20 µg/lane 萃取之細胞蛋白質進行 SDS-PAGE 並轉漬至 PVDF 膜上，將膜與 P-ERK(1/2)和 GAPDH 抗體進行雜交反應，加入 ECL-1 和 ECL-2 激發冷光，進入暗房壓片。底片經 gel-pro 軟體分析，依據 GAPDH 做為基準值，發現 ERK1/2 磷酸化由 5 分鐘持續到 15 分鐘，ERK1/2 磷酸化倍率從 2.81 倍至 3.77 倍，並於 20 分鐘後結束 ERK1/2 磷酸化(圖十一)。

### **第八節 rPer a 2 刺激 A549 釋放 IL-8 受到 ERK1/2 和 JNK 抑制劑影響**

為了進一步探討，rPer a 2 刺激 A549 時，IL-8 的產生是否經由 MAPK 訊號傳遞路徑，分別利用 ERK1/2 的抑制劑 U0126、JNK 的抑制劑 SB203580 和 p38 的抑制劑 SP6001125 前處理細胞 2 小時後，再

加入 rPer a 2(10 µg/ml)刺激細胞，培養 16 小時後，吸取上清液，利用 ELISA 測量 IL-8 含量。結果發現處理 5 uM U0126 和 25 uM SB203580 能抑制 IL-8 釋放，利用 SPSS 軟體中單因子變異分析，結果發現當 A549 細胞前處理 ERK1/2 和 JNK 抑制劑，導致 rPer a 2 誘發之 IL-8 的產量顯著降低。(圖十二)。

## 第五章 討論

根據文獻報導，美國蟑螂文獻中已經被選殖出八種過敏原，我們將八種美國蟑螂過敏原之 cDNA 嵌入表現載體中，經由 *E.coli* 大量表現重組過敏原，其中 rPer a 1、rPer a 5、rPer a 6 和 rPer a 7 以 native form 生產出來，因此具有類似的天然構形與生化活性，但 rPer a 2、rPer a 3、rPer a 4 和 rPer a 9 經由 *E.coli* 大量表現會形成包涵體(inclusion bodies)，雖然蛋白質表現產量高卻也造成純化與應用上之困難。包涵體是指細菌表現蛋白質在細胞內凝集，形成無活性的固體顆粒、錯誤摺疊的多肽(Middelberg, 2002)。目前文獻有利用低溫環境降低生產速率有助於 soluble protein 形成，超過 40% 的包涵體蛋白能再折疊回具有生化活性的構形；使用變性劑、低濃度的尿素和鹽類可以做到純化包涵體(Singh and Panda, 2005)。

我們將純化之八種美國蟑螂重組過敏原，利用 IgE 免疫轉漬法分析與病人血清 IgE 結合能力，圖四的結果顯示我們純化出來的重組過敏原可以被患者血清中 IgE 所辨識，因此八種過敏原都具備免疫活性。多種重組過敏原已經運用於診斷上，例如：貓毛過敏原 Fel d 1、花生 Ara h 1 及花粉 Bet v 1 等(Chapman et al., 2000)。

八種美國蟑螂過敏原分別利用 ELISA 與 64 位受試者血清反應，分析結果發現：(1)重組過敏原分別與 23 位健康的受試者反應，rPer a

1、rPer a 5 和 rPer a 9 都為陰性偽陽性為 0，rPer a 2、rPer a 3、rPer a 4 和 rPer a 4 之偽陽性為 5%，rPer a 6 之偽陽性為 9%。(2)重組蟑螂過敏原與 41 位蟑螂過敏患者血清之 IgE 反應，rPer a 1 之盛行率為 45%，rPer a 2 之盛行率為 64%，rPer a 3 之盛行率為 55%，rPer a 4 之盛行率為 43%，rPer a 5 之盛行率為 62%，rPer a 6 之盛行率為 52%，rPer a 7 之盛行率為 52%，rPer a 9 之盛行率為 55%，過敏原若能與 50%以上之病患的血清 IgE 反應，則稱為主要過敏原(major allergen)；若僅能與少於 50%之病患的血清 IgE 反應，則稱為次要過敏原(minor allergen)(Te Piao King, 1995)，因此除 Per a 1 與 Per a 4 為次要的過敏原，然而先前文獻指出 Per a 1、Per a 2、Per a 3 和 Per a 7 都為主要過敏原(Gore and Schal, 2007)，推測我們所使用與先前文獻中 Per a 1，為不同之 isoform，因此對其盛行率有所差異。

臨床上診斷 IgE 媒介之過敏疾病，主要是經由皮膚試驗或檢驗病患血液中過敏原特異性 IgE，經由天然之過敏原粗萃物做為診斷或減敏治療之試劑(Niederberger and Valenta, 2004)，但粗萃物具有許多缺點例如：無法對粗萃物標準化、萃取的過程中具有蛋白質水解酵素可分解粗萃物之組成、過敏原只屬於粗萃物之小部份和無法確認患者對於粗萃物中那些分子之過敏，導致敏感度和特異性不足(Bhalla and Singh, 2008)。分子生物的演進，利用重組蛋白質解決其困擾，經細菌、

酵母菌、昆蟲病毒與植物中表現出重組蛋白質。研究與診斷上重組過敏原的優點，短時間獲得高濃度之蛋白質，易品質管制，絕大部分的重組過敏原具有天然性過敏原之 IgE 結合能力(Mueller et al., 1998; Smith et al., 2001)。八種美國蟑螂重組過敏原在 ELISA 的結果中，顯示同時使用 rPer a 2、rPer a 6 和 rPer a 9 存在時，在 41 位美國蟑螂過敏患者敏感性可達 95%，專一性可達 97%，我們的結果突顯出，運用重組過敏原來檢測蟑螂過敏病，具有應用價值。

傳統對過敏原治療以減敏治療為主要，至今已經長達超過八十年，其方法是利用皮下注射過敏原之粗萃物，隨著施打次數，逐漸提高過敏原之劑量(Bousquet et al., 1998; Creticos, 1992)。然而，減敏治療還是有需改善之問題，過敏原粗萃物難標準化，治療時可能產生副作用，因此難以達到有效之劑量(Ferreira et al., 2002)，近年為了開始更安全，並且更有效的免疫治療方法，利用不同基因工程方法，試圖改變重組過敏原之結構，應用於免疫治療過敏疾病(Akdis and Blaser, 2000)，例如：修飾過敏原(modified allergens)、胜肽免疫治療(peptide immunotherapy)和 DNA 疫苗等方式(Jeong et al., 2006)。我們分析 41 位美國蟑螂過敏患者與八種過敏原的 IgE 圖譜中，顯示在每位患者對過敏原之 IgE 反應差異甚大，建議針對患者進行過敏原專一性免疫治療，必須先偵測患者之 IgE 圖譜，使用重組過敏原的 cocktail，將有

效提昇 SIT 療效。

我們依據 41 位患者的臨床表現，區分別有氣喘的 A 群和只有過敏性鼻炎的 B 群，利用卡方統計比對二群患者之盛行率，發現在 rPer a 2 和 rPer a 9 具有顯著之差異，rPer a 2 在氣喘之患者具有較高之盛行率，推測 rPer a 2 在八種過敏原中與疾病嚴重度較為相關。德國蟑螂 Bla g 2 為主要過敏原之一，研究指出 Bla g 2 與許多天冬氨酸蛋白酶都具有同源性，但在天冬氨酸蛋白酶催化位(catalytic site)中 55-57 與 239-241 胺基酸被置換(Pomes et al., 2002)，因此 Bla g 2 失去天冬氨酸蛋白酶之活性(Wunschmann et al., 2005)，然而，rPer a 2 也具有同樣之情形(圖三-A)。近年來陸續開始針對過敏原的致病機轉探討，目前文獻指出，蟑螂過敏原之粗萃物具有蛋白質酶之活性，在德國蟑螂之研究中，發現會經由呼吸道上皮細胞 PAR2 活化釋放細胞趨素(Hong et al., 2004)。

有文獻指出，利用親合性管柱(His-tag)純化細菌中重組蛋白質，但細菌中 lipopolysaccharide(LPS)同時具有 histidine 的親合性，在純化之過程經常會有 LPS 的殘存(Matsumae et al., 1990)，然而 LPS 會影響細胞釋放前發炎因子，影響細胞實驗之結果(Simon et al., 2007)。目前已經有商品化的 Detoxi-Gel™ EndotoxinRemoving Gel，利用 Polymyxin B 具有結合 LPS 中 lipid A，經由此方式移除純化過程中

LPS 殘存(Morrison and Jacobs, 1976; Zhang et al., 2008)，並且文獻中有使用相同之方法(Zhang et al., 2008)。我們經由親合性管柱(His-tag)純化大量之重組蛋白質，以透析的方式置換溶液，利用具有 polymyosin B 之 resin 去移除殘存的 endotoxin，用於處理上皮細胞株 A549，以避免 LPS 對細胞平台的影響，干擾實驗結果。

目前在德國蟑螂粗萃物的文獻指出，蟑螂粗萃物刺激人類呼吸道上皮細胞株會導致 IL-8 和 IL-6(Page et al., 2005)。此外，在許多單獨利用重組過敏原刺激上皮細胞株，同樣會導致前發炎因子之 IL-8 釋放(Chiu et al., 2007)。我們在三群受試者血清中，發現 IL-8、CCL20 和 MCP-1 在 A 群患者中，以 SPSS 統計的結果都具有顯著之差異，因此使用重組過敏原 rPer a 2 刺激 A549 細胞株，觀察 IL-8、CCL20 和 MCP-1 的 mRNA 表現量，發現會隨著時間和濃度有上升的趨勢，而且 IL-8 分泌也會隨著時間增加而釋放。

針對 IL-8 釋放機轉探討，發現許多過敏原刺激後 IL-8 釋放與 MAPK 訊息傳遞路徑有關，美國蟑螂粗萃物具有蛋白質水解酶活性，刺激人類肺癌上皮細胞株，透過 ERK1/2 和 JNK 磷酸化，導致 IL-8 釋放(劉思偉, 2009)。而塵蟎過敏原 Der p 2 不具蛋白質水解活性，也顯示經由活化 MAPK 訊息傳遞路徑，導致細胞釋放細胞激素與細胞趨化激素(Osterlund et al., 2009)。在我們的實驗中，利用西方點墨法，



當 rPer a 2 刺激 A549 發現 ERK1/2 確實會被磷酸化。接著利用 MAPK 抑制劑，更一步確認，發現前處理 ERK1/2 抑制劑，會影響 rPer a 2 刺激 A549 之 IL-8 釋放，並且前處理 JNK 抑制劑也同樣情況，必須更進一步確認 rPer a 2 刺激 A549 時，JNK 是否會被磷酸化。目前文獻中對於 rPer a 2 刺激肺上皮細胞株引起的過敏發炎機轉還不明瞭，值得更深入探討。

## 第六章結論與未來展望

本論文的研究成果，探討八種美國蟑螂重組過敏原與臨床蟑螂過敏患者 IgE 反應圖譜，以及 Per a 2 在肺上皮細胞株的致病機轉，預期對蟑螂過敏症的檢驗和治療可能之應用。

### 第一節 重組過敏原之應用

#### 1. 重組過敏原之臨床診斷

ELISA 的結果顯示 Per a 2、Per a 6 和 Per a 9 在 41 位蟑螂過敏患者中，檢驗到 39 位病患(95%)血清呈陽性反應，具有很高的敏感度及專一性，相較於 immunoCAP 檢驗過敏疾病之試劑中粗萃物無法標準化，未來可能依 Per a 2、Per a 6 和 Per a 9 添加至 immunoCAP 中，提高 immunoCAP 的敏感度與專一性。

#### 2. 專一性免疫治療

觀察八種過敏原與臨床蟑螂過敏患者 IgE 反應圖譜中，發現在不同病人中，個別 IgE 反應圖譜差異甚大，未來要針對個別患者過敏原專一性免疫治療，應當先建構個別患者 IgE 反應圖譜，再依據個別需求進行過敏原之雞尾酒療法。

## 第二節 Per a 2 刺激上皮細胞之發炎機轉

三群患者血清中 IL-8、CCL20 和 MCP-1 的濃度中，發現氣喘患者與過敏性鼻炎或健康受試者之間具有顯著之差異，之後利用 rPer a 2 刺激 A549，發現 IL-8、CCL20 和 MCP-1 的 mRNA 含量，會受到濃度與時間增加有上升的趨勢，並且釋放 IL-8 蛋白質會隨著時間，使得表現量增加。利用西方點墨法確認 Per a 2 刺激 A549 會使 ERK1/2 被磷酸化，接著更進一步用 MAPK 訊息傳遞路徑的抑制劑，發現 rPer a 2 刺激 A549 釋放 IL-8，會受到 U0126 和 SP6001125 影響，證實 rPer a 2 刺激 A549，經由 ERK1/2 和 JNK 磷酸化，導致表現 IL-8，未來可能應用在過敏之治療與新藥開發。

## 第七章 參考文獻

劉思偉，(2009)，探討美國蟑螂的致敏機轉及美國蟑螂重組過敏原應用於檢測蟑螂過敏病。碩士論文，生物技術研究所，彰化師範大學，彰化。

Te Piao King, Donald Hoffman, Henning Lowenstein, David G. Marsh, Thomas A.E., Platts-Mills and Wayne Thomas (1995). Allergen nomenclature. WHO/IUS Allergen Nomenclature Subcommittee World Health Organization, Geneva, Switzerland. *Clin Exp Allergy* 25, 27-37.

Akdis, C. A., and Blaser, K. (2000). Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy* 55, 522-530.

Appel, A. G., and Smith, L. M., 2nd (2002). Biology and management of the smokybrown cockroach. *Annu Rev Entomol* 47, 33-55.

Arruda, L. K., and Chapman, M. D. (2001). The role of cockroach allergens in asthma. *Curr Opin Pulm Med* 7, 14-19.

Arruda, L. K., Vailes, L. D., Ferriani, V. P., Santos, A. B., Pomes, A., and Chapman, M. D. (2001). Cockroach allergens and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 107, 419-428.

Arruda, L. K., Vailes, L. D., Hayden, M. L., Benjamin, D. C., and Chapman, M. D. (1995a). Cloning of cockroach allergen, Bla g 4, identifies ligand binding proteins (or calycins) as a cause of IgE antibody responses. *J Biol Chem* 270, 31196-31201.

Arruda, L. K., Vailes, L. D., Mann, B. J., Shannon, J., Fox, J. W., Vedvick, T. S., Hayden, M. L., and Chapman, M. D. (1995b). Molecular cloning of a major cockroach (*Blattella germanica*) allergen, Bla g 2. Sequence homology to the aspartic proteases. *J Biol Chem* 270, 19563-19568.

Arruda, L. K., Vailes, L. D., Platts-Mills, T. A., Hayden, M. L., and Chapman, M. D. (1997). Induction of IgE antibody responses by glutathione S-transferase from the German cockroach (*Blattella germanica*). *J Biol Chem* 272, 20907-20912.

Baba, M., Imai, T., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S., Hieshima, K.,

Nomiyama, H., and Yoshie, O. (1997). Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC. *J Biol Chem* 272, 14893-14898.

Barnes, P. J. (1999). Therapeutic strategies for allergic diseases. *Nature* 402, B31-38.

Baumholtz, M. A., Parish, L. C., Witkowski, J. A., and Nutting, W. B. (1997). The medical importance of cockroaches. *Int J Dermatol* 36, 90-96.

Bernton, H. S., and Brown, H. (1964). Insect Allergy--Preliminary Studies of the Cockroach. *J Allergy Clin Immunol* 35, 506-513.

Bhalla, P. L., and Singh, M. B. (2008). Biotechnology-based allergy diagnosis and vaccination. *Trends Biotechnol* 26, 153-161.

Binder, M., Mahler, V., Hayek, B., Sperr, W. R., Scholler, M., Prozell, S., Wiedermann, G., Valent, P., Valenta, R., and Duchene, M. (2001). Molecular and immunological characterization of arginine kinase from the Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*, a novel cross-reactive invertebrate pan-allergen. *J Immunol* 167, 5470-5477.

Botos, I., Melnikov, E. E., Cherry, S., Kozlov, S., Makhovskaya, O. V., Tropea, J. E., Gustchina, A., Rotanova, T. V., and Wlodawer, A. (2005). Atomic-resolution crystal structure of the proteolytic domain of *Archaeoglobus fulgidus* Ion reveals the conformational variability in the active sites of Ion proteases. *J Mol Biol* 351, 144-157.

Bousquet, J., Chanez, P., Lacoste, J. Y., White, R., Vic, P., Godard, P., and Michel, F. B. (1992). Asthma: a disease remodeling the airways. *Allergy* 47, 3-11.

Bousquet, J., Lockey, R., Malling, H. J., Alvarez-Cuesta, E., Canonica, G. W., Chapman, M. D., Creticos, P. J., Dayer, J. M., Durham, S. R., Demoly, P. (1998). Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. World Health Organization. American academy of Allergy, Asthma and Immunology. *Ann Allergy Asthma Immunol* 81, 401-405.

Carr, M. W., Roth, S. J., Luther, E., Rose, S. S., and Springer, T. A. (1994). Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3652-3656.

Chapman, M. D., Smith, A. M., Vailes, L. D., Arruda, L. K., Dhanaraj, V., and Pomes, A. (2000). Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* *106*, 409-418.

Chiu, L. L., Perng, D. W., Yu, C. H., Su, S. N., and Chow, L. P. (2007). Mold allergen, pen C 13, induces IL-8 expression in human airway epithelial cells by activating protease-activated receptor 1 and 2. *J Immunol* *178*, 5237-5244.

Corry, D. B., and Kheradmand, F. (1999). Induction and regulation of the IgE response. *Nature* *402*, B18-23.

Costongs, G. M., and Bas, B. M. (1997). The first fully automated allergy analyser UniCAP: comparison with IMMULITE for allergy panel testing. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* *35*, 885-888.

Creticos, P. S. (1992). Immunotherapy with allergens. *JAMA* *268*, 2834-2839.

Dreborg, S. (1989). The skin prick test in the diagnosis of atopic allergy. *J Am Acad Dermatol* *21*, 820-821.

Duan, W., and Wong, W. S. (2006). Targeting mitogen-activated protein kinases for asthma. *Curr Drug Targets* *7*, 691-698.

Durham, S. R. (2006). Allergen immunotherapy (desensitisation) for allergic diseases. *Clin Med* *6*, 348-351.

Eggleston, P. A., and Arruda, L. K. (2001). Ecology and elimination of cockroaches and allergens in the home. *J Allergy Clin Immunol* *107*, S422-429.

Fan, Y., Gore, J. C., Redding, K. O., Vailes, L. D., Chapman, M. D., and Schal, C. (2005). Tissue localization and regulation by juvenile hormone of human allergen Bla g 4 from the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Insect Mol Biol* *14*, 45-53.

Ferreira, F., Wallner, M., Breiteneder, H., Hartl, A., Thalhamer, J., and Ebner, C. (2002). Genetic engineering of allergens: future therapeutic products. *Int Arch Allergy Immunol* *128*, 171-178.

Gagliardo, R., Chanez, P., Vignola, A. M., Bousquet, J., Vachier, I., Godard, P., Bonsignore, G., Demoly, P., and Mathieu, M. (2000). Glucocorticoid receptor alpha and beta in glucocorticoid dependent asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 162, 7-13.

Gore, J. C., and Schal, C. (2007). Cockroach allergen biology and mitigation in the indoor environment. *Annu Rev Entomol* 52, 439-463.

Hieshima, K., Imai, T., Opendakker, G., Van Damme, J., Kusuda, J., Tei, H., Sakaki, Y., Takatsuki, K., Miura, R., Yoshie, O., and Nomiyama, H. (1997). Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2. *J Biol Chem* 272, 5846-5853.

Hindley, J., Wunschmann, S., Satinover, S. M., Woodfolk, J. A., Chew, F. T., Chapman, M. D., and Pomes, A. (2006). Bla g 6: a troponin C allergen from *Blattella germanica* with IgE binding calcium dependence. *J Allergy Clin Immunol* 117, 1389-1395.

Hogan, M. B., Grammer, L. C., and Patterson, R. (1994). Rhinitis. *Ann Allergy* 72, 293-300; quiz 301-292.

Hong, J. H., Lee, S. I., Kim, K. E., Yong, T. S., Seo, J. T., Sohn, M. H., and Shin, D. M. (2004). German cockroach extract activates protease-activated receptor 2 in human airway epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 113, 315-319.

Hromas, R., Gray, P. W., Chantry, D., Godiska, R., Krathwohl, M., Fife, K., Bell, G. I., Takeda, J., Aronica, S., Gordon, M., *et al.* (1997). Cloning and characterization of exodus, a novel beta-chemokine. *Blood* 89, 3315-3322.

Jeong, K. Y., Hongb, C. S., and Yong, T. S. (2006). Recombinant allergens for diagnosis and immunotherapy of allergic disorders, with emphasis on cockroach allergy. *Curr Protein Pept Sci* 7, 57-71.

Jeong, K. Y., Lee, J., Lee, I. Y., Ree, H. I., Hong, C. S., and Yong, T. S. (2003). Allergenicity of recombinant Bla g 7, German cockroach tropomyosin. *Allergy* 58, 1059-1063.

Kang, B., Vellody, D., Homburger, H., and Yunginger, J. W. (1979). Cockroach cause of allergic asthma. Its specificity and immunologic profile. *J Allergy Clin Immunol* *63*, 80-86.

Kauffman, H. F., Tamm, M., Timmerman, J. A., and Borger, P. (2006). House dust mite major allergens Der p 1 and Der p 5 activate human airway-derived epithelial cells by protease-dependent and protease-independent mechanisms. *Clin Mol Allergy* *4*, 5.

Kay, A. B. (2008). *Allergy and allergic diseases*, 2nd edn (Malden, Mass.: Blackwell).

King, C., Brennan, S., Thompson, P. J., and Stewart, G. A. (1998). Dust mite proteolytic allergens induce cytokine release from cultured airway epithelium. *J Immunol* *161*, 3645-3651.

King, T. P., Hoffman, D., Lowenstein, H., Marsh, D. G., Platts-Mills, T. A., and Thomas, W. (1994). Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. *Int Arch Allergy Immunol* *105*, 224-233.

Lambrecht, B. N. (2001). Allergen uptake and presentation by dendritic cells. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* *1*, 51-59.

Lan, J. L., Lee, D. T., Wu, C. H., Chang, C. P., and Yeh, C. L. (1988). Cockroach hypersensitivity: preliminary study of allergic cockroach asthma in Taiwan. *J Allergy Clin Immunol* *82*, 736-740.

Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2001). Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* *106*, 263-266.

Leonard, E. J., and Yoshimura, T. (1990). Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol Today* *11*, 97-101.

Liao, F., Alderson, R., Su, J., Ullrich, S. J., Kreider, B. L., and Farber, J. M. (1997). STRL22 is a receptor for the CC chemokine MIP-3alpha. *Biochem Biophys Res Commun* *236*, 212-217.

Luscinskas, F. W., Gerszten, R. E., Garcia-Zepeda, E. A., Lim, Y. C., Yoshida, M., Ding, H. A., Gimbrone, M. A., Jr., Luster, A. D., and Rosenzweig, A. (2000). C-C and



C-X-C chemokines trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Ann N Y Acad Sci* 902, 288-293.

Mari, A. (2005). Importance of databases in experimental and clinical allergology. *Int Arch Allergy Immunol* 138, 88-96.

Mari, A., Scala, E., Palazzo, P., Ridolfi, S., Zennaro, D., and Carabella, G. (2006). Bioinformatics applied to allergy: allergen databases, from collecting sequence information to data integration. The Allergome platform as a model. *Cell Immunol* 244, 97-100.

Matsui, E. C., Wood, R. A., Rand, C., Kanchanaraksa, S., Swartz, L., Curtin-Brosnan, J., and Eggleston, P. A. (2003). Cockroach allergen exposure and sensitization in suburban middle-class children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 112, 87-92.

Matsumae, H., Minobe, S., Kindan, K., Watanabe, T., Sato, T., and Tosa, T. (1990). Specific removal of endotoxin from protein solutions by immobilized histidine. *Biotechnol Appl Biochem* 12, 129-140.

Middelberg, A. P. (2002). Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol* 20, 437-443.

Morrison, D. C., and Jacobs, D. M. (1976). Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. *Immunochemistry* 13, 813-818.

Mueller, G. A., Benjamin, D. C., and Rule, G. S. (1998). Tertiary structure of the major house dust mite allergen Der p 2: sequential and structural homologies. *Biochemistry* 37, 12707-12714.

Mulayim, N., Palter, S. F., Kayisli, U. A., Senturk, L., and Arici, A. (2003). Chemokine receptor expression in human endometrium. *Biol Reprod* 68, 1491-1495.

Mullol, J., Xaubet, A., Lopez, E., Roca-Ferrer, J., and Picado, C. (1995). Comparative study of the effects of different glucocorticosteroids on eosinophil survival primed by cultured epithelial cell supernatants obtained from nasal mucosa and nasal polyps. *Thorax* 50, 270-274.

Nelson, H. S. (2007). Allergen immunotherapy: where is it now? *J Allergy Clin Immunol* 119, 769-779.

Niederberger, V., and Valenta, R. (2004). Recombinant allergens for immunotherapy. Where do we stand? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 4, 549-554.

Osterlund, C., Gronlund, H., Polovic, N., Sundstrom, S., Gafvelin, G., and Bucht, A. (2009). The non-proteolytic house dust mite allergen Der p 2 induce NF-kappaB and MAPK dependent activation of bronchial epithelial cells. *Clin Exp Allergy* 39, 1199-1208.

Page, K., Hughes, V. S., Odoms, K. K., Dunsmore, K. E., and Hershenson, M. B. (2005). German cockroach proteases regulate interleukin-8 expression via nuclear factor for interleukin-6 in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32, 225-231.

Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22, 153-183.

Pichavant, M., Charbonnier, A. S., Taront, S., Bricchet, A., Wallaert, B., Pestel, J., Tonnel, A. B., and Gosset, P. (2005). Asthmatic bronchial epithelium activated by the proteolytic allergen Der p 1 increases selective dendritic cell recruitment. *J Allergy Clin Immunol* 115, 771-778.

Pomes, A., Chapman, M. D., Vailes, L. D., Blundell, T. L., and Dhanaraj, V. (2002). Cockroach allergen Bla g 2: structure, function, and implications for allergic sensitization. *Am J Respir Crit Care Med* 165, 391-397.

Pomes, A., Wunschmann, S., Hindley, J., Vailes, L. D., and Chapman, M. D. (2007). Cockroach allergens: function, structure and allergenicity. *Protein Pept Lett* 14, 960-969.

Pons, L., Palmer, K., and Burks, W. (2005). Towards immunotherapy for peanut allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 5, 558-562.

Porter, A. C., and Vaillancourt, R. R. (1998). Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis. *Oncogene* 17, 1343-1352.

Power, C. A., Church, D. J., Meyer, A., Alouani, S., Proudfoot, A. E., Clark-Lewis, I., Sozzani, S., Mantovani, A., and Wells, T. N. (1997). Cloning and characterization of a specific receptor for the novel CC chemokine MIP-3alpha from lung dendritic cells. *J Exp Med* *186*, 825-835.

Roca-Ferrer, J., Mullol, J., Lopez, E., Xaubet, A., Pujols, L., Fernandez, J. C., and

Roschmann, K., Farhat, K., Konig, P., Suck, R., Ulmer, A. J., and Petersen, A. (2009). Timothy grass pollen major allergen Phl p 1 activates respiratory epithelial cells by a non-protease mechanism. *Clin Exp Allergy* *39*, 1358-1369.

Rossi, D. L., Vicari, A. P., Franz-Bacon, K., McClanahan, T. K., and Zlotnik, A. (1997). Identification through bioinformatics of two new macrophage proinflammatory human chemokines: MIP-3alpha and MIP-3beta. *J Immunol* *158*, 1033-1036.

Rudeschko, O., Machnik, A., Dorfelt, H., Kaatz, H. H., Schlott, B., and Kinne, R. W. (2004). A novel inhalation allergen present in the working environment of beekeepers. *Allergy* *59*, 332-337.

Santos, A. B., Chapman, M. D., Aalberse, R. C., Vailes, L. D., Ferriani, V. P., Oliver, C., Rizzo, M. C., Naspitz, C. K., and Arruda, L. K. (1999). Cockroach allergens and asthma in Brazil: identification of tropomyosin as a major allergen with potential cross-reactivity with mite and shrimp allergens. *J Allergy Clin Immunol* *104*, 329-337.

Scolozzi, R., Boccafogli, A., Vicentini, L., Baraldi, A., and Bagni, B. (1989). Correlation of MAST chemiluminescent assay (CLA) with RAST and skin prick tests for diagnosis of inhalant allergic disease. *Ann Allergy* *62*, 193a-193b.

Shannon, J., Ernst, P., Yamauchi, Y., Olivenstein, R., Lemiere, C., Foley, S., Cicora, L., Ludwig, M., Hamid, Q., and Martin, J. G. (2008). Differences in airway cytokine profile in severe asthma compared to moderate asthma. *Chest* *133*, 420-426.

Simon, D., Braathen, L. R., and Simon, H. U. (2007). Increased lipopolysaccharide-induced tumour necrosis factor-alpha, interferon-gamma and interleukin-10 production in atopic dermatitis. *Br J Dermatol* *157*, 583-586.

Singh, S. M., and Panda, A. K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng* 99, 303-310.

Smith, A. M., Benjamin, D. C., Derewenda, U., Smith, W. A., Thomas, W. R., and Chapman, M. D. (2001). Sequence polymorphisms and antibody binding to the group 2 dust mite allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 124, 61-63.

Snyderman, R., Altman, L. C., Hausman, M. S., and Mergenhagen, S. E. (1972). Human mononuclear leukocyte chemotaxis: a quantitative assay for humoral and cellular chemotactic factors. *J Immunol* 108, 857-860.

Sookrung, N., Chaicumpa, W., Tungtrongchitr, A., Vichyanond, P., Bunnag, C., Ramasoota, P., Tongtawe, P., Sakolvaree, Y., and Tapchaisri, P. (2006). *Periplaneta americana* arginine kinase as a major cockroach allergen among Thai patients with major cockroach allergies. *Environ Health Perspect* 114, 875-880.

Sun, G., Stacey, M. A., Schmidt, M., Mori, L., and Mattoli, S. (2001). Interaction of mite allergens Der p3 and Der p9 with protease-activated receptor-2 expressed by lung epithelial cells. *J Immunol* 167, 1014-1021.

Sutherland, M. F., Suphioglu, C., Rolland, J. M., and O'Hehir, R. E. (2002). Latex allergy: towards immunotherapy for health care workers. *Clin Exp Allergy* 32, 667-673.

Taussig, L. M., Wright, A. L., Holberg, C. J., Halonen, M., Morgan, W. J., and Martinez, F. D. (2003). Tucson Children's Respiratory Study: 1980 to present. *J Allergy Clin Immunol* 111, 661-675; quiz 676.

Thomas, W. R., Hales, B. J., and Smith, W. A. (2004). Recombinant allergens for analysing T-cell responses. *Methods* 32, 255-264.

Wang, H., Yi, T., Zheng, Y., and He, S. (2007). Induction of monocyte chemoattractant protein-1 release from A549 cells by agonists of protease-activated receptor-1 and -2. *Eur J Cell Biol* 86, 233-242.

Wu, C. H., Hsieh, M. J., Huang, J. H., and Luo, S. F. (1996a). Identification of low molecular weight allergens of American cockroach and production of monoclonal antibodies. *Ann Allergy Asthma Immunol* 76, 195-203.

Wu, C. H., and Lan, J. L. (1988). Cockroach hypersensitivity: isolation and partial characterization of major allergens. *J Allergy Clin Immunol* *82*, 727-735.

Wu, C. H., Lee, M. F., Liao, S. C., and Luo, S. F. (1996b). Sequencing analysis of cDNA clones encoding the American cockroach Cr-PI allergens. Homology with insect hemolymph proteins. *J Biol Chem* *271*, 17937-17943.

Wu, C. H., Lee, M. F., and Tseng, C. Y. (2003). IgE-binding epitopes of the American cockroach Per a 3 allergen. *Allergy* *58*, 986-992.

Wu, C. H., Lee, M. F., Yang, J. S., and Tseng, C. Y. (2002). IgE-binding epitopes of the American cockroach Per a 1 allergen. *Mol Immunol* *39*, 459-464.

Wu, C. H., Wang, N. M., Lee, M. F., Kao, C. Y., and Luo, S. F. (1998). Cloning of the American cockroach Cr-P11 allergens: evidence for the existence of cross-reactive allergens between species. *J Allergy Clin Immunol* *101*, 832-840.

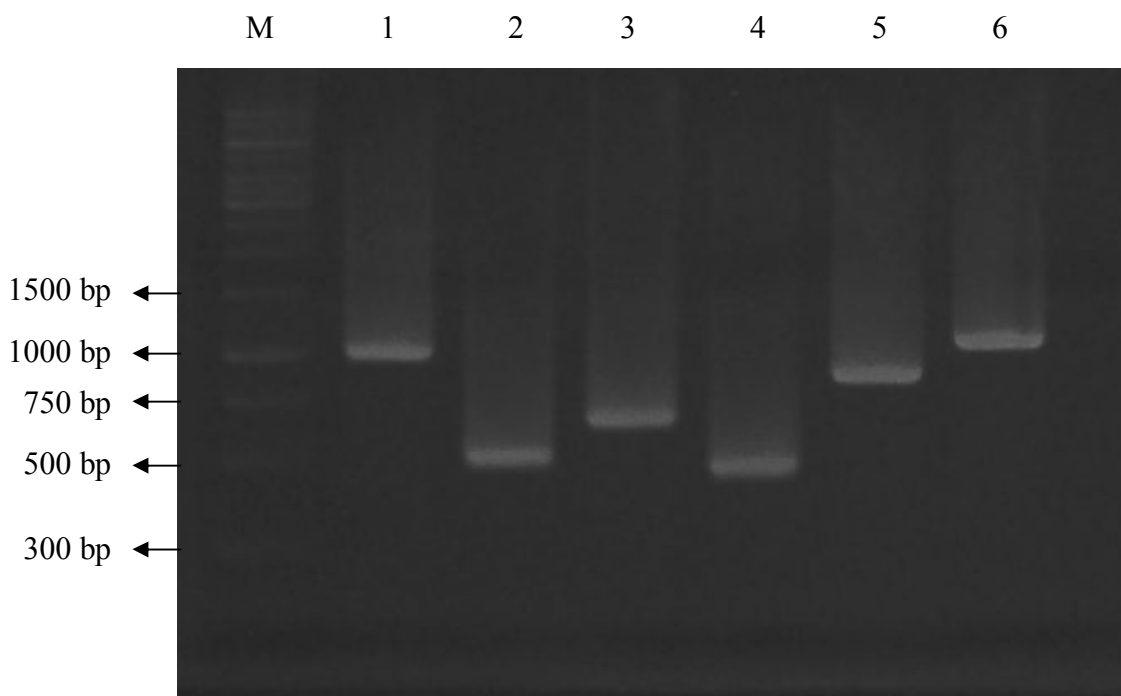
Wunschmann, S., Gustchina, A., Chapman, M. D., and Pomes, A. (2005). Cockroach allergen Bla g 2: an unusual aspartic proteinase. *J Allergy Clin Immunol* *116*, 140-145.

Xu, L. L., Warren, M. K., Rose, W. L., Gong, W., and Wang, J. M. (1996). Human recombinant monocyte chemotactic protein and other C-C chemokines bind and induce directional migration of dendritic cells in vitro. *J Leukoc Biol* *60*, 365-371.

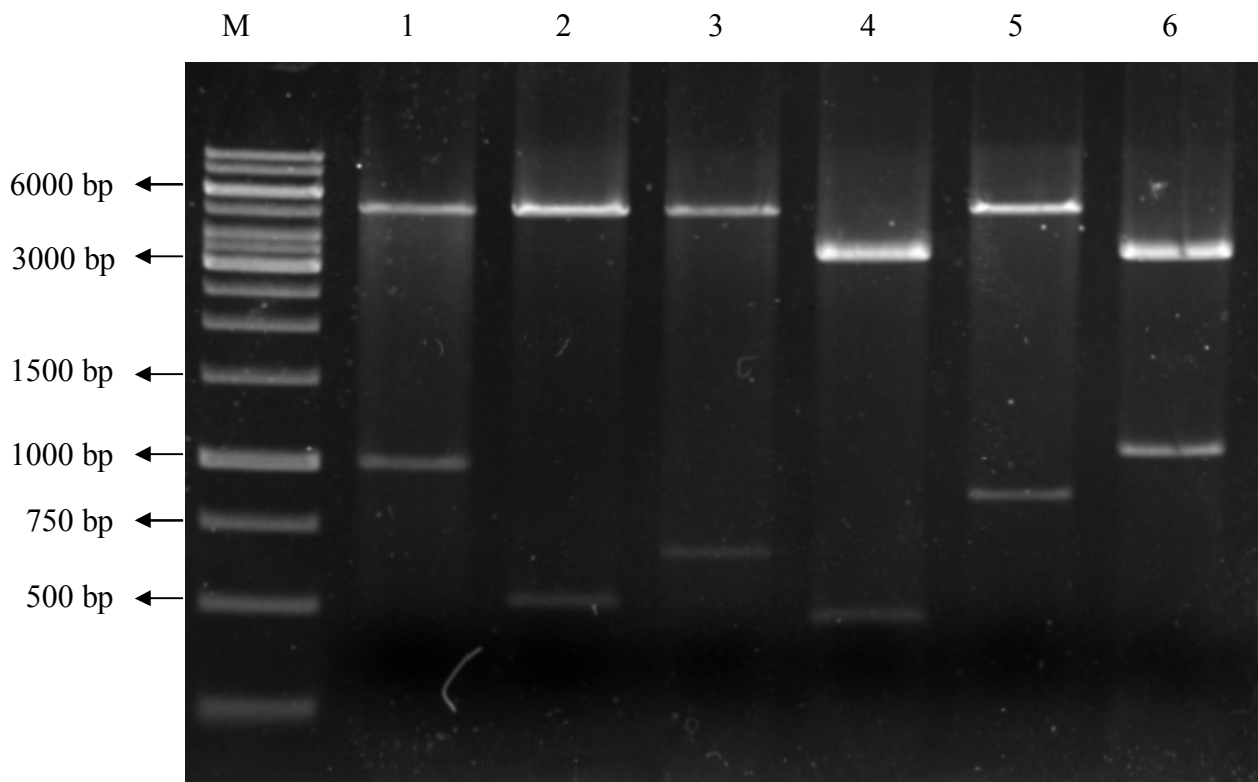
Yoshie, O., Imai, T., and Nomiyama, H. (2001). Chemokines in immunity. *Adv Immunol* *78*, 57-110.

Yu, C. J., Lin, Y. F., Chiang, B. L., and Chow, L. P. (2003). Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m 2. *J Immunol* *170*, 445-453.

Zhang, Z., Zhang, H., Yang, H., Zhang, L., Chen, X., Zheng, X., and He, S. (2008). Induction of T-helper type 2 cytokine release and up-regulated expression of protease-activated receptors on mast cells by recombinant American cockroach allergen Per a 7. *Clin Exp Allergy* *38*, 1160-1167.



圖一 洋菜膠體電泳分析六種重組過敏原之 cDNA 片段。Lane M : 1 Kb DNA marker ; Lane 1 : Per a 2 長度為 996 bp ; Lane 2 : Per a 4 長度為 501 bp ; Lane 3 : Per a 5 為 651 bp ; Lane 4 : Per a 6 長度為 456 bp ; Lane 5 : Per a 7 長度為 855 bp ; Lane 6 : Per a 9 長度為 1068 bp 。



圖二 洋菜膠體電泳分析六種過敏原 cDNA 嵌入表現載體。Lane M : 1 Kb DNA marker ; Lane 1 : Per a 2/pET30a 以 *Bam*HI/*Hind*III 切割 , Per a 2 cDNA 長度為 996 bp ; Lane 2 : Per a 4/pET30a 以 *Bam*HI/*Hind*III 切割 , Per a 4 cDNA 長度為 501 bp ; Lane 3 : Per a 5/pET30a 以 *Bam*HI/*Hind*III 切割 , Per a 5 cDNA 長度為 651 bp ; Lane 4 : Per a 6/pQE30 以 *Bam*HI/*Hind*III 切割 , Per a 6 cDNA 長度為 456 bp ; Lane 5 : Per a 7/pET30a 以 *Eco*RI/*Not*I 切割 , Per a 7 cDNA 長度為 855 bp ; Lane 6 : Per a 9/pQE30 以 *Bam*HI/*Hind*III 切割 , Per a 9 cDNA 長度為 1068 bp 。 pQE30 質體長度為 3.4 Kbp , pET30a 質體長度為 5.4 Kbp 。

(A) Per a 2

1 D P V V V P L Q K R A P V E E Y I N T Q  
1 GATCCAGTCGTCGTTCCCTCTGCAGAAACGCGCGCCGGTAGAAGAATACATCAATACACAA

21 Y V G P V Q L G N Q Y F L C V F D T S S  
61 TACGTTGGACCGGTACAACCTGGCAACCAGTATTTTCTATGTGTCTTCGATACGTCAATCA

41 Y T T V I P S A S C V S G G C N C A N V  
121 TACACAACGGTTATTCCCTCGGCATCCTGTGTAAGCGGGCGGCTGCAATTGTGCGAACGTA

61 H K Y Y S N K P V S N N V A S V R I L G  
181 CACAAATATTACTCCAATAAGCCTGTATCAAATAACGTGGCATCCGTACGAATTCTCGGC

81 S G Y A N G S E A H D Y I A V S T L N A  
241 AGTGGCTATGCCAACGGATCTGAAGCCCACGACTACATCGCAGTAAGCACTCTGAATGCT

101 T N Q G F L L A D D I S N D I C S L G A  
301 ACGAATCAAGGCTTCTTGCTAGCAGATGACATATCAAATGATATATGTTCCCTGGGCGCT

121 D C V I G L G R P K S G R A A F N L P T  
361 GATTGTGTAATTGGATTGGGACGCCCCAAATCTGGAAGGGCTGCCTTTAATCTGCCGACT

141 V M E N F V N Q D N I A N S F S F H H G  
421 GTTATGGAAAATTTTCGTCAACCAAGACAATATCGCCAACCTCGTTCTCATTCCATCACGGA

161 R Y P D G Q H R G V L V L G G T I P A Y  
481 AGATATCCCAGCGGACAGCACCGCGGAGTTCTGGTGCTCGGAGGCACAATACCTGCCTAC

181 Y R G D F T Y V P L V D K D T W N F K V  
541 TATAGGGGCGACTTCACTTACGTACCTCTCGTAGATAAAGATACCTGGAACCTCAAGGTG

201 D S I S V G N E V V A T D Q L A F V D S  
601 GACAGCATCAGTGTTCGGAAATGAAGTGGTAGCAACAGACCAATTGGCGTTTTGTTGATTCA

221 S K Y V I T G P A E E I K K I N D R L G  
661 AGCAAGTACGTCATAACTGGTCCAGCCGAAGAGATTAAGAAAATTAATGATCGTCTGGGG

241 C T N K V I G S R T L C V F D C D K L D



721 TGCACCAACAAAGTTATAGGTTCCAGGACTCTATGTGTGTT**CGATTGCGATAAACTCGAC**  
261 N V P S V T F T I G G V A F N I S S T Y  
781 AATGTGCCATCAGTCACATTCACCATTGGAGGTGTTGCCTTTAACATCAGCTCAACATAC  
281 H I Q Q N G D L C Y S G F Q Y S A G K C  
841 CACATTCAGCAAAACGGAGATTTGTGCTACTCGGGTTTCCAATACTCAGCTGGAAAATGT  
301 F H F G D F F M D N Y Y **A K** F D G Q N K  
901 TTCCAATTCCGGAGATTTCTTCATGGACAACACTATTATG**CAAAATTCGATGGCCAAAATAAA**  
321 R M G F A K S V E E L -  
961 CGCATGGGATTTGCAAAATCCGTAGAAGAACTGTAG

**(B) Per a 4**

1 G D D S C Q I G T S F T G L D M T K Y V  
1 GGAGATGATTCATGTCAAATCGGCACTTCGTTTACTGGTCTTGACATGACCAAGTACGTG  
21 G T W Y E L F R T P N S D E E D F T N C  
61 GGCACCTGGTATGAGCTGTTCCGCACACCGAACTCCGACGAGGAAGATTTACAAAACCTGC  
41 E Y D K Y T L D E N G V I Q V T S V A Y  
121 GAATATGACAAGTACACCTTGGATGAAAATGGTGTTCATCCAAGTCACGAGTGTGGCCTAC  
61 T N S T R G F I T S T G T V P S W T E N  
181 ACTAACAGTACTCGTGGTTTCATAACCTCTACTGGAACCTGTGCCGTCTTGGACTGAAAAAC  
81 T F D I A Y G D **D** E T W S S T Y F M **V** G  
241 ACCTTCGATATTGCCTATGGCGAT**G**ACGAAACCTGGTCGAGCACATA**T**TTTCATG**G**TTGGA  
101 T D Y Q T Y S I V A G C L D N D Y S R H  
301 ACCGACTACCAGACATACTCAATAGTAGCTGGTTGTCTCGACAACGACTACTCACGCCAT  
121 L Y W I A S H G T S F D D A T K A K V N  
361 CTCTACTGGATCGCGAGTCACGGAACCTTCGTTTGGACGACGCTACTAAGGCGAAAGTAAAC  
141 E V L A P Y N L S L D D M E P V D Q S Y  
421 GAGGTTCTAGCTCCCTACAACCTCAGCCTGGACGATATGGAGCCAGTGGACCAATCTTAT

161 C V Q Y K S -  
481 TCGGTTTCAGTACAAGTCTTGA

(C) Per a 5

1 M T I D F Y Y L P G S A P C R S V L L A  
1 ATGACCATCGACTTCTACTACCTGCCCGGCAGCGCACCATGCCGTTTCAGTTCTCCTGGCT  
  
21 A K A I G V D L N L K V T N L M A G E H  
61 GCCAAGGCCATCGGCGTGGATCTGAACCTCAAAGTGACGAACCTCATGGCTGGCGAACAT  
  
41 L T P E F L K M N P Q H T I P T L N D N  
121 CTCACGCCTGAATTTCTTAAGATGAATCCTCAACATACGATCCCAACCCTCAACGACAAC  
  
61 G F C L W E S R A I L S Y L A D Q Y G K  
181 GGTTCCTGTTTGTGGGAGAGCCGAGCCATTCTCAGTTACCTGGCTGACCAGTATGGCAAG  
  
81 D D S L Y P K D A K K R A L V D Q R L Y  
241 GACGACTCGCTGTACCCCAAGGACGCCAAGAAGCGAGCTCTTGTGGACCAGAGACTGTAC  
  
101 F D I G T L Y H R F G E Y Y Y P I Y F A  
301 TTCGATATTGGAACCCTGTACCACAGATTCGGAGAATACTATTATCCAATCTATTTTCGCA  
  
121 K Q A A D P E K M K K L E E A F E F L N  
361 AAACAAGCTGCAGATCCTGAAAAGATGAAGAAACTGGAGGAGGCCTTCGAGTTCTTGAAT  
  
141 K F L E S Q E F V A G N K L T I A D L A  
421 AAGTTCCTGGAATCGCAAGAGTTTGTGGCAGGAAATAAGCTCACCATTGCGGACCTGGCA  
  
161 I V S S V S T A D I M G F D V S K Y S N  
481 ATTGTCTCCTCTGTCTCCACTGCTGACATCATGGGCTTTGATGTAAGCAAATACTCAAAC  
  
181 V A K W F E K C K K I V P G Y E E L N H  
541 GTCGCCAAATGGTTCGAGAAATGCAAGAAGATTGTTCCAGGCTATGAGGAACTGAATCAC  
  
201 S G C L K F K E M C D N L A K K -  
601 TCCGGATGCTTGAAGTTCAAGGAGATGTGCGATAACCTCGCCAAGAAGTGA

(D) Per a 6

1 M D E L P D E Q I Q L L K K A F D A F D  
1 ATGGATGAACTGCCAGATGAACAAATCCAGCTGTTGAAGAAGGCTTTTGATGCCTTCGAT

21 R E K N G F I S T D M V G T I L E M L G  
61 CGTGAGAAGAATGGATTTATCTCTACTGACATGGTGGGCACCATTCTAGAGATGTTGGGC

41 H P L D D D M L E E I I S E V D A D G S  
121 CATCCCCTAGATGACGACATGCTGGAGGAGATCATCTCGGAAGTGGATGCTGACGGTTCT

61 G E L E F Q E F V T L A A R F L V E E D  
181 GGCGAACTGGAGTTTCAGGAATTCGTA ACTCTGGCTGCCAGGTTCCCTGGTTGAAGAGGAT

81 A E A M Q Q E L K E A F R L Y D K E G N  
241 GCTGAAGCCATGCAGCAGGAGCTCAAAGAGGCCCTCCGGTTGTACGACAAAGAGGGCAAC

101 G Y I T T T V L R E I L K E L D D K L T  
301 GGTTACATCACCACAACAGTTCTGCGTGAAATTCCTGAAGGAGTTGGATGACAACTTACA

121 N E D L D A M I E E I D S D G S G T V D  
361 AATGAAGATCTGGACGCCATGATTGAAGAAATCGATTCTGACGGTTCCGGCACCGTTGAC

141 F D E F M E V M T G E -  
421 TTTGATGAGTTCATGGAAGTCATGACCGGAGAATAA

(E) Per a 7

1 M D D I K K K M Q A M K L E K D N A M D  
1 ATGGATGATATCAAGAAGAAGATGCAGGCGATGAAGCTGGAGAAGGACAACGCGATGGAC

21 R A L L C E Q Q A R D A N L R A E K A E  
61 CGCGCCCTTCTCTGCGAGCAGCAGGCCCGCGACGCCAACCTTAGGGCCGAGAAGGCTGAG

41 E E A R S L Q K K I Q Q I E N D L D Q T  
121 GAGGAGGCGCGCTCCCTGCAGAAGAAGATCCAGCAGATTGAGAACGATCTGGATCAGACC

61 M E Q L M Q V N A K L D E K D K A L Q N  
181 ATGGAGCAGCTGATGCAGGTCAACGCCAAGCTGGACGAGAAGGACAAGGCCCTCCAGAAC

81 A E S E V A A L N R R I Q L L E E D L E  
 241 GCTGAGAGTGAAGTTGCTGCCCTGAACCGCCGTATCCAGCTGCTAGAGGAGGACCTCGAG  
  
 101 R S E E R L A T A T A K L A E A S Q A A  
 301 AGGTCTGAGGAACGATTGGCCACTGCCACTGCCAAACTGGCCGAGGCTTCACAGGCTGCC  
  
 121 D E S E R A R K I L E S K G L A D E E R  
 361 GATGAATCCGAGCGAGCCCCGTAAGATTCTTGAATCCAAGGGCCTGGCAAGATGAAGAACGC  
  
 141 M D A L E N Q L K E A R F M A E E A D K  
 421 ATGGACGCACTGGAGAACCAGCTGAAGGAGGCCAGGTTTCATGGCTGAAGAAGCAGACAAA  
  
 161 K Y D E V A R K L A M V E A D L E R A E  
 481 AAATATGATGAGGTTGCACGTAAGTTGGCCATGGTTGAGGCCGACTTGGAGAGAGCAGAG  
  
 181 E R A E S G E S K I V E L E E E L R V V  
 541 GAACGTGCCGAGAGTGGTGAATCCAAAATTGTAGAGCTTGAGGAGGAGCTCCGTGTTGTC  
  
 201 G N N L K S L E V S E E K A N L R E E E  
 601 GGCAACAACCTGAAGTCCCTTGAGGTGTCTGAGGAGAAGGCCAACCTGCCGTGAAGAAGAG  
  
 221 Y K Q Q I K T L T T R L K E A E A R A E  
 661 TACAAGCAGCAGATTAAGACCTTGACTACCAGGCTAAAGGAGGCTGAGGCCCGTGCTGAG  
  
 241 F A E R S V Q K L Q K E V D R L E D E L  
 721 TTCGCTGAGAGGTCCGTGCAGAAGCTGCAGAAGGAGGTTGACAGGCTTGAGGATGAATTG  
  
 261 V H E K E K Y K F I C D D L D M T F T E  
 781 GTACACGAGAAGGAGAAGTACAAGTTCATTTGTGATGATCTTGATATGACTTTCACCGAA  
  
 281 L A G Y -  
 841 CTTGCTGGTTACTAA

**(F) Per a 9**

1 M V D A A V L E K L E A G F A K L A A S  
 1 ATGGTGGACGCGCAGATTCTGGAGAAGCTGGAGGCCGGCTTCGCCAAATTGGCCGCCTCC  
  
 21 D S K S L L K K Y L T K E V F D N L K T

61 GACAGCAAGTCCCTGCTCAAGAAGTATCTGACCAAGGAAGTGTTTCGACAATCTCAAGACC  
41 K K T P S F G S T L L D V I Q S G L E N  
121 AAGAAGACTCCTTCATTTGGCTCTACACTTCTTGATGTAATCCAGTCTGGTCTCGAGAAC  
61 H D S G V G I Y A P D A E A Y A V F A D  
181 CACGACTCCGGCGTGGGCATCTACGC<sup>C</sup>CCAGATGCAGAGGCTTATGCCGTGTTTCGCTGAC  
81 L F D P I I E D Y H G G F K K T D K H P  
241 CTGTTTCGACCCCATCATTGAGGACTACCATGGTGGCTTCAAGAAGACCGACAAGCACCCCT  
101 P K D W G D V D T L G N L D P A G E Y I  
301 CCCAAGGACTGGGGTGATGTGGACACCCTGGGCAACCTGGACCCTGCTGGCGAGTACATC  
121 I S T R V R C G R S M Q G Y P F N P C L  
361 ATCTCCACACGAGTGAGGTGCGGTCGCTCCATGCAGGGCTACCCCTTCAACCCCTGCTTG  
141 T E A Q Y K E M E D K V S S T L S G L E  
421 ACTGA<sup>A</sup>AG<sup>C</sup>CAGTACAAGGAGATGGAGGACAAGGTGTCCAGCACGCTGTCCGG<sup>C</sup>CTGGAG  
161 <sup>G</sup> E L K G Q F Y P L T G M T K E V Q Q K  
481 <sup>G</sup>CGAGCTGAAGGGCCAGTTCTACCCCTCACCGGCATGACCAAGGAGGTCCAGCAGAAG  
181 L I D D H F L F K E G D R F L Q A A N A  
541 CTCATTGAT<sup>T</sup>GACCACTTCTCTTCAAGGAGGGCGATCGCTTCTTGCAGGCTGCCAACGCA  
201 C R F W P T G R G I Y H N D A K T F L V  
601 TGCCGCTTCTGGCCCACTGGACGAGGCATCTACCACAACGACGCCAAGACGTTCTCCTGGTC  
221 W C N E E D H L R I I S M Q M G G D L G  
661 TGGTGCAATGAGGAGGATCACTTGCGAATCATCTCTATGCAGATGGGCGGGCAGCTGGGA  
241 Q V Y R R L V T A V N D I E K R I P F S  
721 CAGGTGTACCGCGTCTGGTGACGGCTGTGAATGACATCGAGAAGCGCATCCCCTTCTCG  
261 H D D R L G F L T F C P T N L G T T V R  
781 CACGACGACCGTCTGGGCTTCTCACCTTCTGCCCCACCAACCTGGGCACCACCGTTCGT

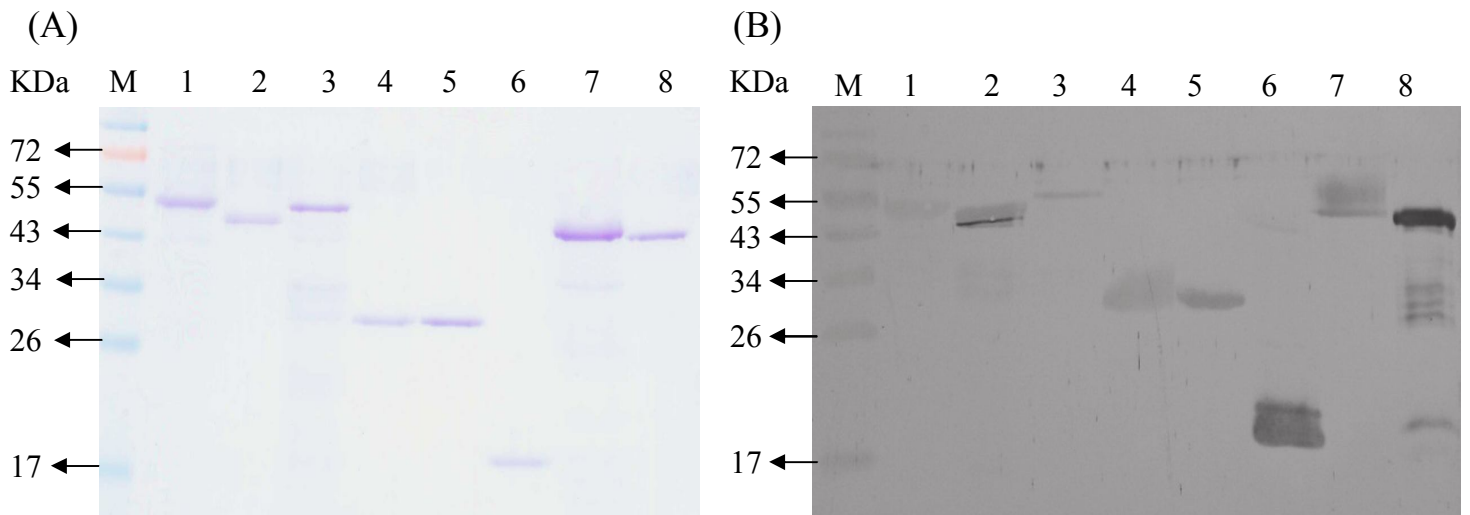
281 A S V H I K V P K L A A D K A K L E E A  
 841 GCGTCTGTGCACATCAAGGTGCCCAAGCTGGCTGCCGACAAGGCCAAGCTGGAGGAGGCT  
  
 301 A G K Y N L Q V R G T R G E H T E A E G  
 901 GCTGGCAAGTACAACCTGCAGGTCCGTGGCACCCGTGGCGAGCACACAGAGGCCGAGGGC  
  
 321 G V Y D I S N K R R M G L T E Y D A V K  
 961 GGTGTGTACGACATCTCCAACAAGCGGCGCATGGGCCTGACAGAGTACGACGCCGTCAAG  
  
 341 E M N D G I A E L I K L E S S L -  
 1021 GAGATGAACGACGGCATCGCCGAGCTGATCAAGCTGGAGAGCTCGCTCTAA

**圖三 六種重組過敏原 Per a 2 (A)、Per a 4 (B)、Per a 5 (C)、**

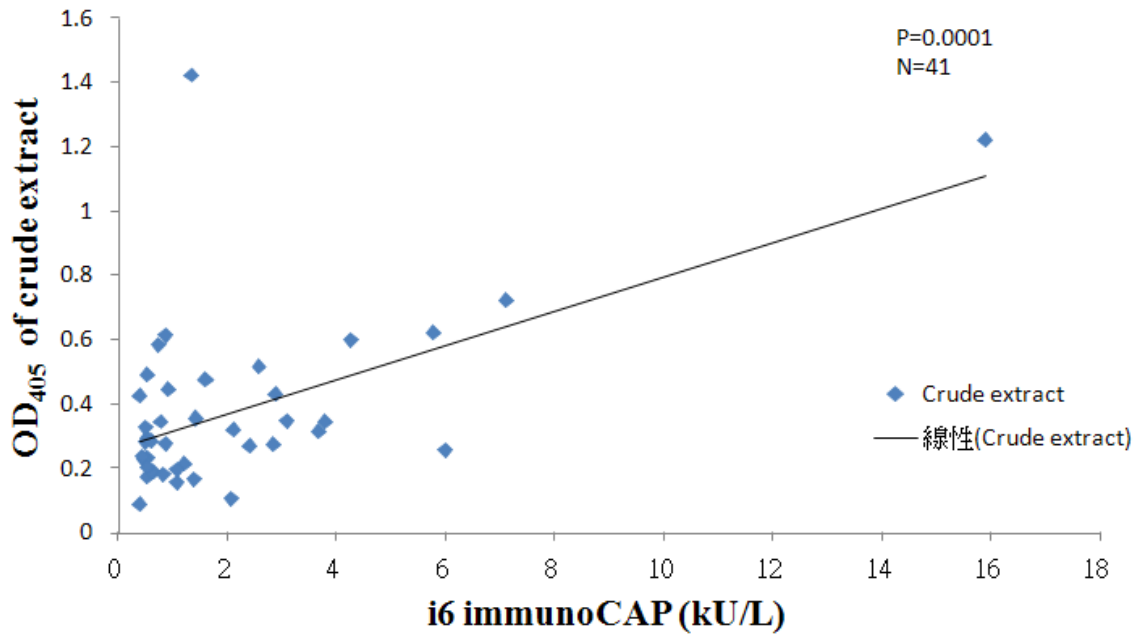
**Per a 6 (D)、Per a 7 (E)和 Per a 9 (F)蛋白質與核苷酸序列。藍色的字**

**母為天門冬胺酸酶被置換之催化區域(2-A)，紅色的字母為重組過敏**

**原序列與 NCBI 基因庫比對被置換之序列。**



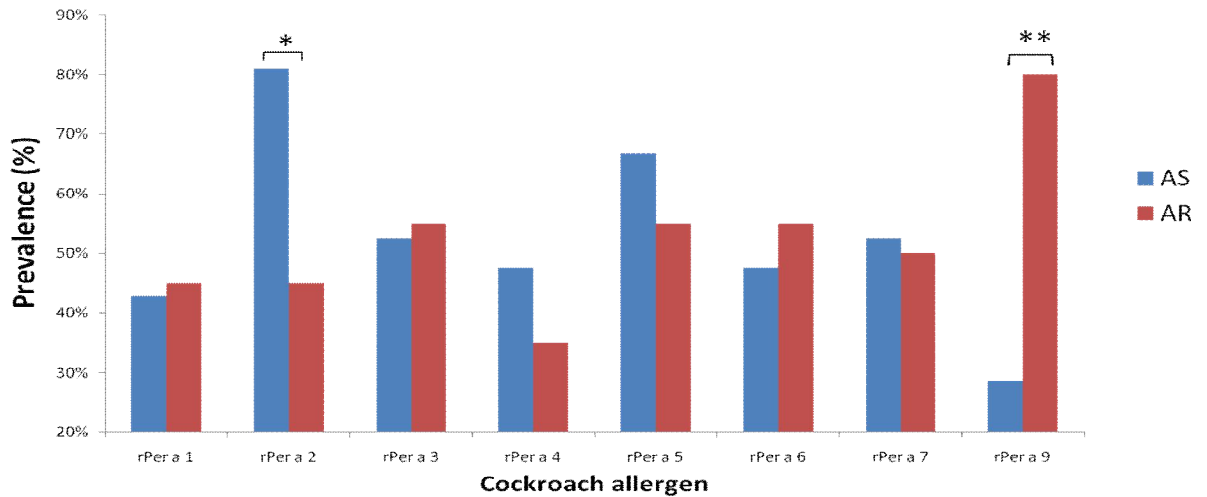
圖四 純化後八種重組過敏原以 SDS-PAGE 電泳分析(A)和免疫轉漬法(B)。 Lane M : Pre-stain marker ; Lane 1 : rPer a 1 分子量為 52 KDa ; Lane 2 : rPer a 2 分子量為 43.6 KDa ; Lane 3 : rPer a 3 分子量為 51.1 KDa ; Lane 4 : rPer a 4 分子量為 30 KDa ; Lane 5 : rPer a 5 分子量為 29.6 KDa ; Lane 6 : rPer a 6 分子量為 17.1 KDa ; Lane 7 : rPer a 7 分子量為 46 KDa ; Lane 9 : rPer a 9 分子量為 41.4 KDa 。



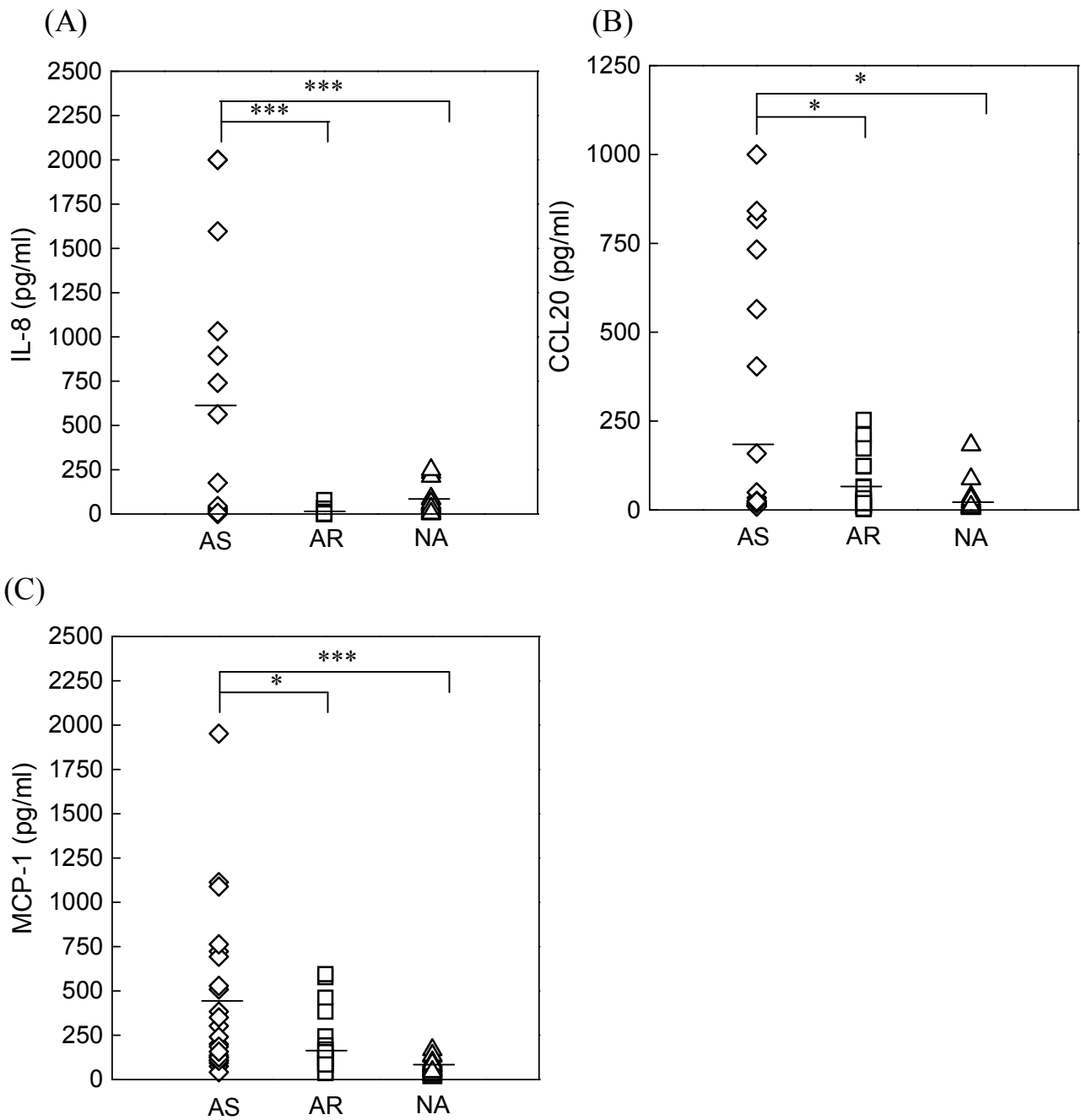
圖五 臨床檢驗過敏之 immunoCAP 值與實驗室所檢測過敏之 ELISA

OD 值之線性迴歸分析。



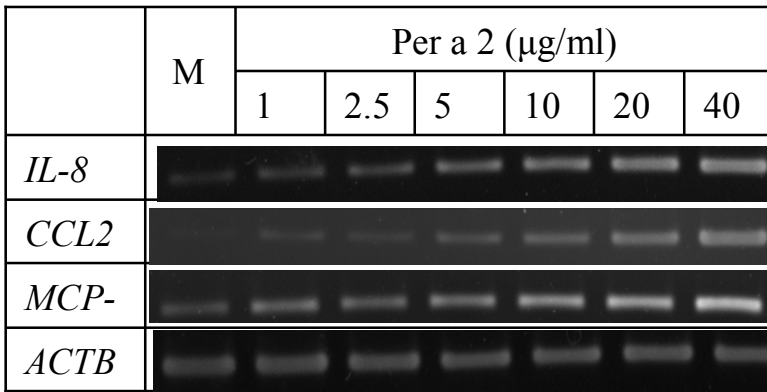


圖六 以卡方統計分析八種過敏原在氣喘患者與過敏性鼻炎患者之盛行率。rPer a 2 和 rPer a 9 在氣喘患者與過敏性鼻炎之間具有顯著，推測 rPer a 2 與疾病嚴重度相關；rPer a 9 與疾病嚴重度不相關。P 值<0.05 以\*表示和 P 值<0.01 以\*\*表示。

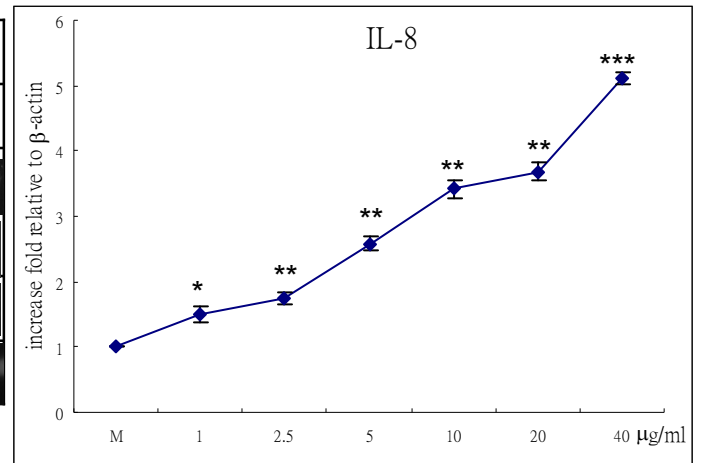


圖七 三群受試者血清細胞趨化激素之濃度。氣喘患者(AS)與過敏性鼻炎(AR)或健康受試者(NA)血清中，IL-8、CCL20 和 MCP-1 具有顯著之差異，推測 IL-8、CCL20 和 MCP-1 與氣喘的發生有關。AS:氣喘患者，AR:過敏性鼻炎，NA:健康受試者。P 值<0.05 以\*表示、P 值<0.01 以\*\*表示和 P 值 $\leq$ 0.001 以\*\*\*表示。

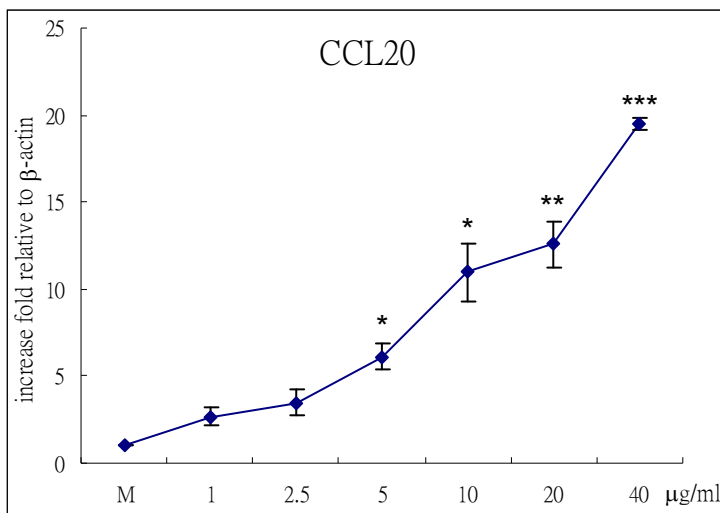
(A)



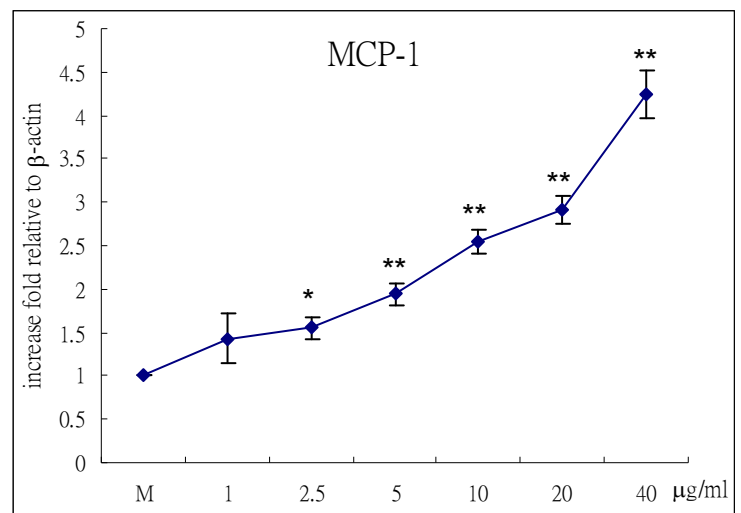
(B)



(C)



(D)

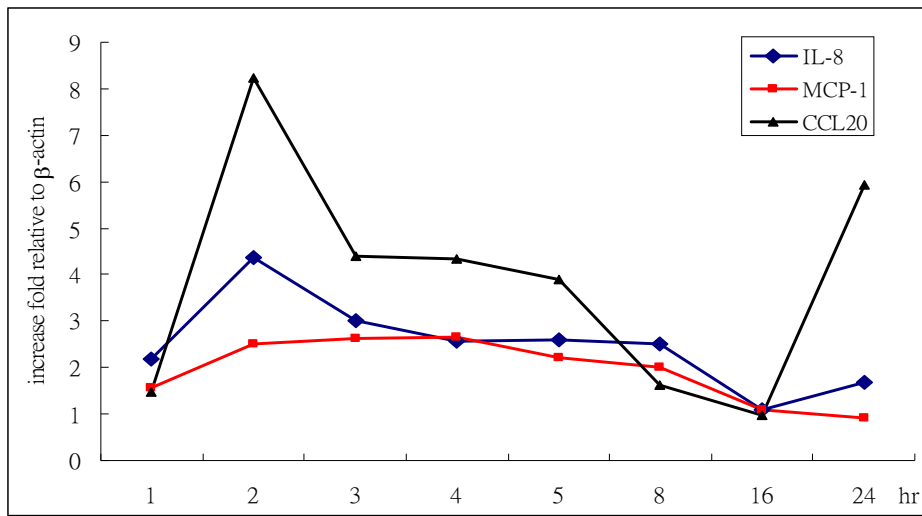


圖八 在 A549 細胞株上，IL-8、CCL20、MCP-1 的 mRNA 表現，會隨著 rPer a 2 的濃度增加而有倍率上升的趨勢。使用 1、2.5、5、10、20 和 40 μg/ml 之 rPer a 2 處理 A549 細胞株 2 小時，再經由 RT-PCR 確認 IL-8、CCL20、MCP-1 的 mRNA 之表現，接著進行洋菜膠體電泳分析(A)，最後利用 gel-pro 軟體進行量化分析，依據 β-actin mRNA 校正並計算 IL-8(B)、CCL20(C)和 MCP-1(D)之倍率。\*表示與實驗組之對照組相比其 P 值<0.05、P 值<0.01 以\*\*表示和 P 值≤0.001 以\*\*\*表示。

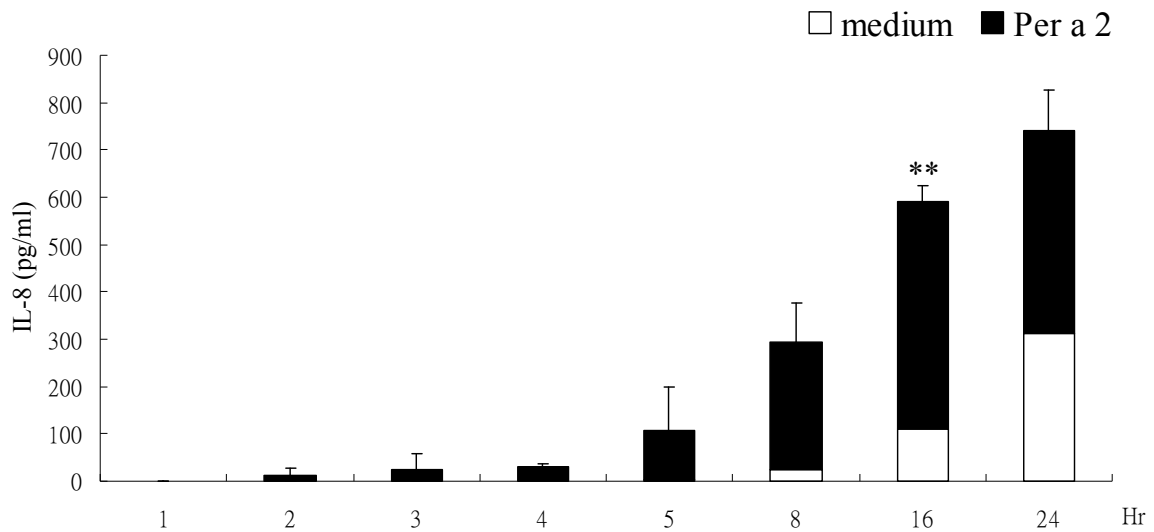
(A)

	1 hr		2 hr		3 hr		4 hr		5 hr		8 hr		16 hr		24 hr	
	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T
<i>IL-8</i>	[Gel electrophoresis image showing IL-8 mRNA bands]															
<i>MCP-1</i>	[Gel electrophoresis image showing MCP-1 mRNA bands]															
<i>CCL20</i>	[Gel electrophoresis image showing CCL20 mRNA bands]															
<i>ACTB</i>	[Gel electrophoresis image showing ACTB mRNA bands]															

(B)



圖九 在 A549 細胞株上，IL-8、CCL20、MCP-1 的 mRNA 表現，會隨著 rPer a 2 的處理的時間增加而有倍率上升的趨勢。rPer a 2 以 10  $\mu\text{g/ml}$  處理 A549 不同時間，再經由 RT-PCR 確認 IL-8、CCL20、MCP-1 的 mRNA 之表現，接著進行洋菜膠體電泳分析(A)，最後利用 gel-pro 軟體進行量化分析，依據  $\beta$ -actin mRNA 校正並計算 IL-8、CCL20 和 MCP-1(B)之倍率。

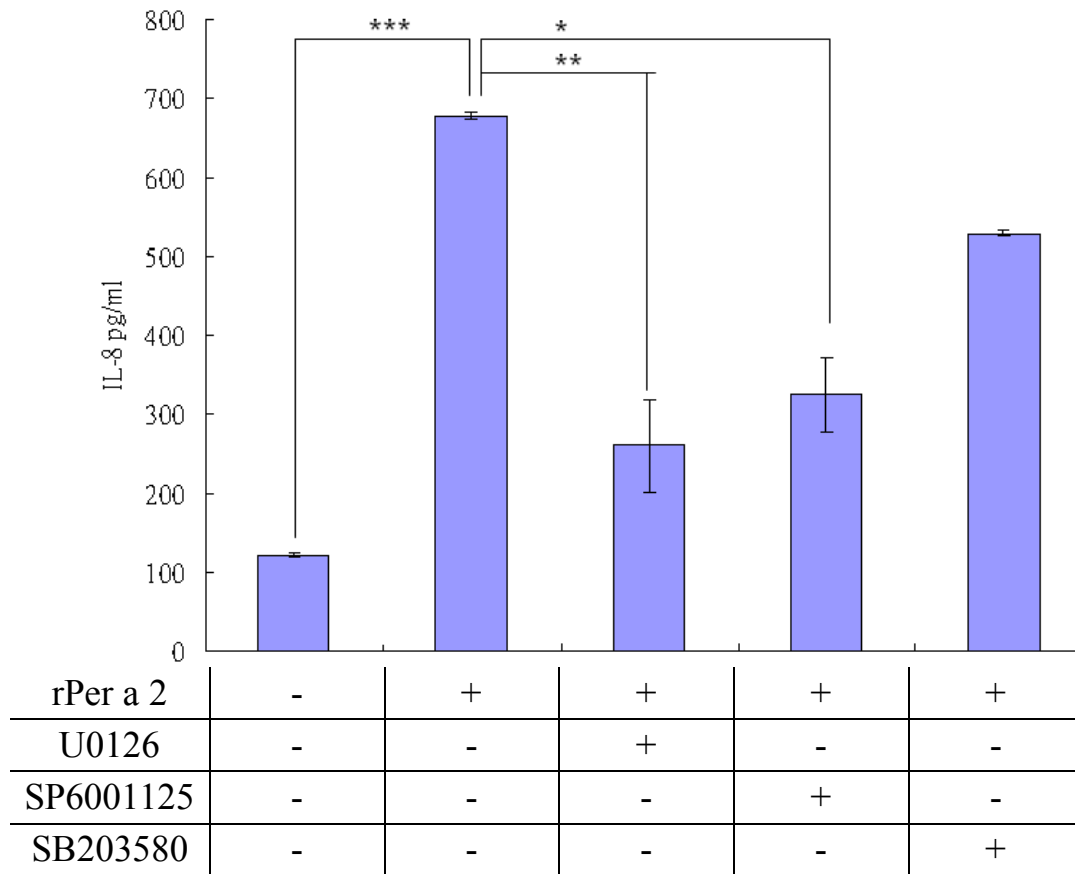


圖十 IL-8 釋放會隨著 rPer a 2 處理 A549 細胞時間增加而增加。rPer a 2 以 10  $\mu\text{g/ml}$  處理 A549 不同時間，再經 ELISA 偵測 IL-8 濃度。

\*表示與實驗組之對照組相比其 P 值 $<0.05$  和 P 值 $<0.01$  以\*\*表示

	rPer a 2 10 $\mu$ g/ml					Cra A	AP
Time	0	5	10	15	20	10	10
ERK1/2-P							
Fold	1.0	2.81	3.51	3.77	1.94	7.16	13.3
GAPDH							

**圖十一 rPer a 2 刺激 A549 以西方點墨法分析偵測 MAPK 訊息傳遞路徑。** rPer a 2(10  $\mu$ g/ml)、Cra A(10  $\mu$ g/ml)和 AP(10  $\mu$ M)刺激 A549 收取細胞之蛋白質，20  $\mu$ g/lane 進行西方點墨法分析，最後利用 gel-pro 軟體進行量化分析，依據 GAPDH 校正並計算磷酸化 ERK 1/2 之倍率。



圖十二 MAPK 訊息傳遞路徑抑制劑對於 rPer a 2 刺激 A549 釋放

IL-8 之影響。前處理 U0126 (5 uM)、SP6001125 (25 uM)和 SB203580 (25 uM) 2 小時，再以 rPer a 2(10 µg/ml)刺激 A549，16 小時後收集上清液，經 ELISA 測量 IL-8 濃度。\*表示與實驗組之對照組相比其 P 值<0.05 和\*\*P 值<0.005

表一 八種重組株之培養特性

	<b>IPTG</b>	<b>Time</b>	<b>Solubility</b>	<b>Yield</b>
<b>rPer a 1</b>	0.1 mM	16 hr	insoluble	20 mg/L
<b>rPer a 2</b>	0.2 mM	5 hr	insoluble	30 mg/L
<b>rPer a 3</b>	1 mM	16 hr	soluble	32 mg/L
<b>rPer a 4</b>	0.2 mM	5 hr	insoluble	4 mg/L
<b>rPer a 5</b>	0.5 mM	5 hr	soluble	32 mg/L
<b>rPer a 6</b>	0.5 mM	5 hr	soluble	4 mg/L
<b>rPer a 7</b>	0.5 mM	24 hr	soluble	3 mg/L
<b>rPer a 9</b>	0.2 mM	2 hr	insoluble	25 mg/L



表二 21 位氣喘患者個別對八種過敏原 IgE 反應圖譜

NO.	rPer a 1	rPer a 2	rPer a 3	rPer a 4	rPer a 5	rPer a 6	rPer a 7	rPer a 9
A-1	+	+	+	-	+	-	-	-
A-2	+	+	+	+	+	+	+	-
A-3	-	+	+	-	+	-	+	-
A-4	-	-	-	-	-	+	-	-
A-5	+	+	-	-	+	+	+	+
A-6	-	+	+	+	+	-	+	-
A-7	+	+	-	+	+	-	+	-
A-8	-	-	-	-	+	-	-	-
A-9	-	+	-	-	-	-	-	-
A-10	-	+	-	+	-	-	-	-
A-11	+	+	-	-	-	-	-	-
A-12	+	+	+	+	+	+	+	+
A-13	+	+	+	+	+	-	-	-
A-14	-	+	+	+	+	+	+	+
A-15	-	-	-	-	-	+	-	-
A-16	-	+	+	-	+	-	+	+
A-17	-	-	-	+	+	+	+	+
A-18	-	+	+	+	+	+	+	-
A-19	+	+	-	-	-	-	-	-
A-20	-	+	+	-	-	+	-	-
A-21	+	+	+	+	+	+	+	+
	9/21	17/21	11/21	10/21	14/21	10/21	11/21	6/21
	43%	81%	52%	48%	67%	48%	52%	29%

表三 20 位過敏性鼻炎患者個別對八種過敏原 IgE 反應圖譜

NO.	rPer a 1	rPer a 2	rPer a 3	rPer a 4	rPer a 5	rPer a 6	rPer a 7	rPer a 9
B-1	-	+	+	-	-	+	-	-
B-2	+	+	+	-	+	+	+	+
B-3	+	+	+	+	-	-	-	-
B-4	+	-	+	+	+	-	-	+
B-5	-	+	+	-	+	+	-	+
B-6	-	-	-	-	-	+	-	-
B-7	-	-	-	-	-	-	+	-
B-8	-	-	-	-	-	-	-	+
B-9	+	+	+	+	+	+	+	+
B-10	-	-	-	-	-	-	-	+
B-11	-	-	+	-	+	-	+	+
B-12	+	-	-	+	-	-	-	+
B-13	+	+	+	-	+	+	+	+
B-14	+	+	+	+	+	+	+	+
B-15	-	-	-	-	+	-	-	+
B-16	-	-	-	-	-	+	+	+
B-17	+	+	+	+	+	+	+	+
B-18	+	-	-	-	+	+	+	+
B-19	-	+	+	+	+	+	+	+
B-20	-	-	-	-	-	-	-	+
	9/20	9/20	11/20	7/20	11/20	11/20	10/20	16/20
	45%	45%	55%	35%	55%	55%	50%	80%

表四 過敏原交叉混合對 41 位蟑螂過敏患者之盛行率

	Cra A	rPer a 1	rPer a 2	rPer a 3	rPer a 4	rPer a 5	rPer a 6	rPer a 7	rPer a 9
<b>Cra A</b>	57%								
<b>rPer a 1</b>	67%	45%							
<b>rPer a 2</b>	79%	71%	64%						
<b>rPer a 3</b>	79%	69%	69%	55%					
<b>rPer a 4</b>	62%	60%	71%	64%	43%				
<b>rPer a 5</b>	76%	71%	79%	69%	69%	62%			
<b>rPer a 6</b>	71%	71%	79%	71%	69%	76%	52%		
<b>rPer a 7</b>	71%	69%	76%	69%	64%	67%	67%	52%	
<b>rPer a 9</b>	74%	71%	88%	76%	71%	74%	71%	69%	55%
<b>rPer a 2+ rPer a 9</b>	88%	88%	88%	88%	88%	90%	<b>95%</b>	90%	88%

# 附錄一

## Hypersensitivity 七種型態

	Type I	Type II		Type III	Type IV	Type IV	Type IV
		a	b		Th1	Th2	cytotoxic
Descriptive term	Immediate-type (IgE-dependent, or anaphylactic) hypersensitivity	Cytolytic, or cytotoxic, reactions	Cell-stimulating reactions involving altered cell function (or signaling)	Arthus type (or antigen-antibody complex) – often called ‘immune complex’ – hypersensitivity reaction	Classical delayed-type hypersensitivity	Cell-mediated eosinophilic hypersensitivity or chronic allergic inflammation	Tissue injury by cytotoxic T lymphocytes
Initiating event	Antigen (allergen) interacting with mast cells or basophils passively sensitized by IgE	IgG antibody interacting with cell surface antigen	IgG cell-stimulating antibody interacting with cell surface receptors involved in cell signaling	Antigen-antibody complexes, in and around the microvasculature, which activate complement	Antigen presentation to sensitized CD4 <sup>+</sup> type 1 T lymphocytes (also called T helper (Th) type 1 cells)	Antigen presentation to sensitized CD4 <sup>+</sup> type 2 T lymphocytes. <i>Sensitized CD8<sup>+</sup> type 2 T lymphocytes (also called T cytotoxic (Tc) type 2 cells) may also participate</i>	Cytotoxic CD8 <sup>+</sup> T lymphocytes recognize fragments of antigen on the surface of target cells
Antigen	Soluble	Cell-associated	Cell-associated	Soluble	Soluble	Soluble	Cell-associated
Simplified scheme of the proposed mechanism	<p>Release of granule-associated mediators (e.g. histamine) and membrane-derived lipid mediators of hypersensitivity</p>	<p>+/- complement Complement lysis or removal by the RE system</p>	<p>Agonist      Antagonist</p>	<p>Neutrophil-rich inflammatory response</p>	<p>Macrophage-rich inflammatory response</p>	<p>Eosinophil- and basophil-rich inflammatory response</p>	<p>Cytotoxicity (apoptosis)</p>
Examples in humans	<ul style="list-style-type: none"> <li>Acute symptoms of allergic rhinitis</li> <li>General and local anaphylaxis</li> <li>Early-phase allergic reactions (in experimental models of atopic allergic disease)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Certain allergic drug reactions (e.g. penicillin)</li> <li>Incompatible transfusion reactions</li> <li>Autoallergic (“autoimmune”) hemolytic anemia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Chronic urticaria (Anti-FcεR1α antibody – agonist)</li> <li>Graves disease (Thyroid stimulating antibody – agonist)</li> <li>Myasthenia gravis (Anti-acetylcholine receptor antibody – antagonist)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Serum sickness</li> <li>Extrinsic allergic alveolitis</li> <li>Antigen-antibody complex (“immune complex”) glomerulonephritis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tuberculin reaction</li> <li>Contact dermatitis</li> <li>Rheumatoid arthritis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Chronic asthma</li> <li>Chronic allergic rhinitis</li> <li>Atopic eczema</li> <li>Late-phase allergic reactions (in experimental models of atopic allergic disease)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Early-onset, insulin-dependent diabetes</li> <li>Graft rejection</li> </ul>

(Kay, 2008)

## 附錄二

### 蟑螂過敏原基本特性

Allergen	MW (kDa)	cDNA size (bp)	Amino acids	IgE prevalence (%)	Protein family or deduced function	Accession no.	References
<i>Blattella germanica</i>							
Bla g 1	33–37	—	—	30–50	Digestion	—	12, 101, 127
Bla g 1.0101	46	1429	412	—	—	AF072219	105
Bla g 1.0102 <sup>a</sup>	90	4058	192	77	—	L47595	57
Bla g 1.0103	21	715	188	—	—	AF072221	105
Bla g 1.02	56	1791	492	—	—	AF072220	105
Bla g 2	36	1056	328	60	Inactive aspartic protease; digestion	U28863	12
Bla g 4	21	546	182	40–60	Lipocalin; reproduction	U40767	11
Bla g 5	23	1140	203	70	Glutathione S-transferase; detoxification	U92412	13
Bla g 6	25	580	38	14	Troponin C; muscle	—	8
Bla g 6.0101	—	—	—	—	—	DQ279092	59
Bla g 6.0201	—	—	—	—	—	DQ279093	59
Bla g 6.0301	—	—	—	—	—	DQ279094	59
Bla g 7	33	1115	284	16	Tropomyosin; muscle	AF260897	66
<i>Periplaneta americana</i>							
Per a 1	33–37	—	—	30–50	—	—	101, 127
Per a 1.0101	26	870	231	—	—	AF072222	89
Per a 1.0102	26	890	228	—	—	U78970	149
Per a 1.0103	45	1432	395	—	—	U69957	89
Per a 1.0104	31	1024	274	—	—	U69261	149
Per a 1.0105	13.8	579	124	—	—	AY259514	35a
Per a 1.02	51	1630	446	—	—	U69260	142
Per a 2 <sup>b</sup>	38	1056	351	53	Inactive aspartic protease; digestion	AY792947	97a
Per a 3	72	—	—	73–83	Arylphorin-like protein; storage	—	150, 151, 155
Per a 3.01	79	2418	685	—	—	L40818	151
Per a 3.0201	76	2274	631	—	—	L40820	151
Per a 3.0202	56	1410	470	—	—	L40819	153
Per a 3.0203	47	1179	393	—	—	L40821	153
Per a 4 <sup>b</sup>	—	552	183	—	—	AY792948	—
Per a 5 <sup>b</sup>	—	651	216	—	—	AY792949	—
Per a 6	17	456	151	—	Troponin C; muscle	AY792950	59
Per a 7	37	—	—	50	Tropomyosin; muscle	Y14854	15, 116
Per a 7.0101	33	855	284	—	—	Y14854	15
Per a 7.0102	33	1325	284	—	—	AF106961	116

(Gore and Schal, 2007)

附錄三 六種過敏原特異性引子序列與限制酶切位

引子名稱	引子序列	限制酶切位
Per a 2 sense	5' <u>GGA TCC</u> GAT CCA GTC GTC GTT CCT 3'	<i>Bam</i> HI
Per a 2 anti-sense	5' <u>AAG CTT</u> CTA CAG TTC TTC TAC GGA 3'	<i>Hind</i> III
Per a 4 sense	5' <u>GGA TCC</u> GGA GAT GAT TCA 3'	<i>Bam</i> HI
Per a 4 anti-sense	5' <u>AAG CTT</u> TCA AGA CTT GTA CT 3'	<i>Hind</i> III
Per a 5 sense	5' <u>GGA TCC</u> ATG ACC ATC GAC TTC TAC 3'	<i>Bam</i> HI
Per a 5 anti-sense	5' <u>AAG CTT</u> TCA CTT CTT GGC GAG GTT 3'	<i>Hind</i> III
Per a 6 sense	5' <u>GGA TCC</u> ATG GAT GAA CTG CCA GAT 3'	<i>Bam</i> HI
Per a 6 anti-sense	5' <u>AAG CTT</u> TTA TTC TCC GGT CAT GAC 3'	<i>Hind</i> III
Per a 7 sense	5' <u>GAATTC</u> ATG GAT GCT ATC AAG AAG AAG 3'	<i>Eco</i> RI
Per a 7 anti-sense	5' <u>GCGGCCGC</u> TTA GTA ACC AGC AAG TTC GGT 3'	<i>Not</i> I
Per a 9 sense	5' <u>GGA TCC</u> ATG GTG GAC GCC GCA GTT 3'	<i>Bam</i> HI
Per a 9 anti-sense	5' <u>AAG CTT</u> AGA GCG AGC TCT CCA GCT T 3'	<i>Hind</i> III

附錄四 細胞趨化激素引子之序列、產物與 PCR cycle

引子名稱	引子序列	產物大小	PCR Cycle
ACTB sense	5' AAA GAC CTG TAC GCC AAC ACA GTG C 3'	227 bp	22
ACTB anti-sense	5' CCG GAC TCG TCA TAC TCC TGC TTG C 3'		
IL-8 sense	5' TTG GCA GCC TTC CTG ATT 3'	248 bp	30
IL-8 anti-sense	5' AAC TTC TCC ACA ACC CTC TG 3'		
CCL20 sense	5' TAC TCC ACC TCT GCG GCG AAT CAG AA 3'	318 bp	35
CCL20 anti-sense	5' GTG AAA CCT CCA ACC CCA GCA AGG TT 3'		
MCP-1 sense	5' CCC CAG ACA CCC TGT TTT A 3'	199 bp	31
MCP-1 antisense	5' TCA AAA CAT CCC AGG GGT AGA 3'		

附錄五 實驗中八種美國蟑螂過敏原基本資料

Allergen	Base pair	Amino acid	Accession no.	Signal peptide
Per a 1	1432	395	U69957	No
Per a 2	1056	351	AY792947	1-20
Per a 3	1179	393	L40821	No
Per a 4	552	183	AY792948	1-17
Per a 5	651	217	AY792949	No
Per a 6	456	152	AY792950	No
Per a 7	855	284	Y14854	No
Per a 9	1068	356	AY563004	No



附錄六 64 位受試者臨床資料

NO.	性別	年齡	臨床症狀	i6(KU/L)
A-1	F	45	AS	0.44
A-2	M	24	AS	0.49
A-3	F	41	AS	1.07
A-4	M	25	AS	1.4
A-5	M	30	AS	15.9
A-6	M	54	AS	0.62
A-7	M	18	AS, AD,AR	2.1
A-8	F	62	AS	2.07
A-9	M	47	AS, AR	7.11
A-10	M	35	AS, AR	2.56
A-11	F	36	AS, AR, urticaria	3.8
A-12	M	8	AS:AR	2.87
A-13	M	19	AS	0.78
A-14	F	28	AS	1.34
A-15	M	25	AS	0.38
A-16	F	58	AS, AR, AC	0.83
A-17	M	16	AS,CR	2.4
A-18	M	19	AS,CR	1.41
A-19	M	13	AS, AR	0.54
A-20	F	30	AS,AR	0.74
A-21	F	26	AS, AD, AR	0.85
B-1	M	23	AR	0.53
B-2	F	24	AR, urticaria	4.27
B-3	M	28	AR	2.83
B-4	F	30	AR, urticaria	1.59
B-5	M	38	AR	0.53
B-6	M	25	AR	1.22
B-7	F	25	AR, urticaria	0.66
B-8	F	47	AR, urticaria	0.86
B-9	F	11	AR, SLE	0.91
B-10	M	18	AR	0.464
B-11	F	15	AR, urticaria	5.99

<b>B-12</b>	M	86	AR, CR	0.53 (I)
<b>B-13</b>	F	15	AR, CR, AT	0.49
<b>B-14</b>	F	19	AR, CU	0.54
<b>B-15</b>	M	29	AR, AC	0.6
<b>B-16</b>	F	15	AR, AD	5.79
<b>B-17</b>	M	15	AR	3.09
<b>B-18</b>	M	30	AR, CU	3.68
<b>B-19</b>	M	33	AR	0.38
<b>B-20</b>	M	30	AR, AC, CU	1.07
<b>C-1</b>	F	24	None	<0.35
<b>C-2</b>	F	21	None	<0.35
<b>C-3</b>	F	21	None	<0.35
<b>C-4</b>	M	30	None	<0.35
<b>C-5</b>	F	53	None	<0.35
<b>C-6</b>	F	55	None	<0.35
<b>C-7</b>	F	21	None	<0.35
<b>C-8</b>	F	22	None	<0.35
<b>C-9</b>	F	21	None	<0.35
<b>C-10</b>	F	27	None	<0.35
<b>C-11</b>	F	38	None	<0.35
<b>C-12</b>	F	33	None	<0.35
<b>C-13</b>	M	60	None	<0.35
<b>C-14</b>	F	25	None	<0.35
<b>C-15</b>	F	51	None	<0.35
<b>C-16</b>	F	49	None	<0.35
<b>C-17</b>	F	21	None	<0.35
<b>C-18</b>	M	28	None	<0.35
<b>C-19</b>	M	27	None	<0.35
<b>C-20</b>	F	42	None	<0.35
<b>C-21</b>	M	75	None	<0.35
<b>C-22</b>	F	60	None	<0.35
<b>C-23</b>	F	47	None	<0.35

AR：過敏性鼻炎，AS：氣喘，CU：慢性蕁麻疹，AC：過敏性結膜

炎，AD：異位性皮膚炎，CR：慢性全鼻竇炎