

東海大學生命科學系  
博士論文

指導教授：黃光裕 博士

Guang-Yuh Hwang Ph.D

吳啟輝 博士

Chii-Huei Wu Ph.D

乳膠-水果症候群之印度棗交叉性過敏原  
分子特性的研究

Molecular characterization of Indian jujube  
(*Zizyphus mauritiana*) cross-reacting allergens  
in latex-fruit syndrome

研究生：李美芳

Mey-Fann Lee

中華民國九十四年十二月

## 致謝

工作十幾年後能有機會重回校園進修，真是莫大的福氣，這一切首先要感謝我的指導教授也是我的直屬長官吳啟輝博士。在他的全力支持下，使我獲得台中榮總在職進修的機會。在吳博士研究室，學習很多研究過敏原的實驗技巧和觀念，方能促使我的博士論文順利完成。吳博士即將退休赴美，對我而言萬般不捨，離情依依，祝福他身體健康一切順利。

我要特別感謝的是指導教授黃光裕老師，在求學的過程中，不時提醒我該注意的地方，給予我鼓勵和信心，這一切我都銘記在心。每次一走進東海大學，校園的美景總是令我好感動，這裡真是一個很好的學習環境。感謝生科系的鄭葳老師、謝明麗老師、范聖興老師、劉蕙雯老師和胡承波老師在專題討論時，給予許多寶貴的意見，使我獲益良多。

感謝我的研究好搭檔陳怡行醫師，提供寶貴的檢體和臨床的試驗。感謝實驗室的夥伴小胖、志學、慧青、惠琳在這段時間裡工作上的協助。上學最快樂的一件事，是認識我的同窗鄭元凱醫師和林維文醫師，還有智翔、月嬌、展延、婉玲、瓊姬、靜琪和滕傑林醫師，感謝他們陪我度過這一段求學的美好時光。

最後更要感謝的是寵我的爸媽、老公和婆婆，因為您們的付出和支持，讓我無後顧之憂，朝著自己的目標努力前進。我也要謝謝兩個貼心懂事的寶貝佳慧和長胤，你們的笑容讓媽媽忘記一切壓力，更有信心接受挑戰。僅以這本論文獻給所有關心我的家人和朋友。

## 目錄

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| 目錄                                  | 1  |
| Abbreviations                       | 6  |
| 中文摘要                                | 7  |
| 英文摘要                                | 9  |
| 第一章 緒論                              | 11 |
| 1-1 前言                              | 11 |
| 1-2 文獻回顧                            | 14 |
| 1-2-1 第I型過敏反應(IgE-mediated allergy) | 14 |
| 1-2-2 乳膠過敏                          | 16 |
| 1-2-3 乳膠-水果症候群                      | 20 |
| 1-2-4 過敏原之 IgE 交叉性反應研究              | 22 |
| 1-3 重組過敏原                           | 24 |
| 1-3-1 製造重組過敏原的方法                    | 24 |
| 1-3-2 重組過敏原在研究的用途                   | 26 |
| 1-3-3 重組過敏原在臨床檢驗的應用                 | 27 |
| 1-3-4 重組過敏原在治療過敏性疾病的應用              | 28 |
| 1-4 蛋白質體學 (Proteomics)              | 31 |

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| 第二章 印度棗和乳膠交叉性過敏原的鑑定 .....      | 34 |
| 2-1 前言 .....                   | 34 |
| 2-2 材料與方法 .....                | 36 |
| 2-2-1 檢體來源 .....               | 36 |
| 2-2-2 製備乳膠和印度棗粗萃物 .....        | 36 |
| 2-2-3 皮膚試驗 .....               | 37 |
| 2-2-4 血清專一性 IgE 抗體的測定 .....    | 37 |
| 2-2-5 蛋白質電泳分析和免疫轉漬法 .....      | 38 |
| 2-2-6 過敏原之交叉性反應分析 .....        | 38 |
| 2-2-7 製備抗印度棗多株抗體 .....         | 39 |
| 2-2-8 蛋白質二維電泳分析 .....          | 39 |
| 2-2-9 質譜儀分析和胜肽質量指紋鑑定 .....     | 40 |
| 2-3 結果 .....                   | 42 |
| 2-3-1 皮膚試驗和 IgE 抗體的測定 .....    | 42 |
| 2-3-2 印度棗和乳膠的交叉性反應 .....       | 43 |
| 2-3-3 印度棗和鹼化乳膠蛋白質的二維電泳分析 ..... | 44 |
| 2-3-4 蛋白質體學的分析 .....           | 44 |
| 2-4 討論 .....                   | 46 |

|  |    |
|--|----|
| 第三章 印度棗主要過敏原 Ziz m 1 分子特性之研究.....                  | 48 |
| 3-1 前言.....  | 48 |
| 3-2 材料與方法.....                                     | 50 |
| 3-2-1 印度棗 mRNA 之製備.....                            | 50 |
| 3-2-2 生體外轉譯作用.....                                 | 50 |
| 3-2-3 構築和篩選 cDNA 基因庫.....                          | 50 |
| 3-2-4 過敏原基因定序和同源性序列分析.....                         | 51 |
| 3-2-5 構築和產生重組過敏原於 <i>Pichia pastoris</i> 表現系統..... | 52 |
| 3-2-6 陰離子交換色層分析法.....                              | 53 |
| 3-2-7 幾丁質酶活性分析.....                                | 53 |
| 3-2-8 重組過敏原對 IgE 抗體的活性分析.....                      | 54 |
| 3-2-9 製備 rZiz m 1 抗體和進行 ELISA .....                | 54 |
| 3-3 結果.....  | 55 |
| 3-3-1 印度棗過敏原 cDNA 的選殖.....                         | 55 |
| 3-3-2 過敏原 Ziz m 1 的核苷酸和胺基酸序列 .....                 | 55 |
| 3-3-3 Ziz m 1 天然和重組蛋白質的比較 .....                    | 56 |
| 3-3-4 免疫抑制反應.....                                  | 57 |
| 3-3-5 rZiz m 1 的過敏試驗.....                          | 58 |
| 3-4 討論.....  | 59 |

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| 第四章 鑑定台灣醫護人員乳膠手套的主要過敏原                | 63 |
| 4-1 前言                                | 63 |
| 4-2 材料和方法                             | 65 |
| 4-2-1 製備乳膠手套粗萃物                       | 65 |
| 4-2-2 皮膚試驗和乳膠專一性 IgE 抗體               | 65 |
| 4-2-3 蛋白質電泳和免疫轉漬分析                    | 66 |
| 4-2-4 二維電泳和質譜儀分析                      | 66 |
| 4-3 結果                                | 67 |
| 4-3-1 病歷資料和 IgE 抗體                    | 67 |
| 4-3-2 乳膠手套蛋白質和過敏原分析                   | 67 |
| 4-3-3 二維電泳和過敏原蛋白質身分鑑定                 | 68 |
| 4-4 討論                                | 69 |
| 第五章 結論與展望                             | 72 |
| 5-1 前言                                | 72 |
| 5-2 Ziz m 1 之 B 細胞抗原表位的研究             | 74 |
| 5-2-1 構築 Ziz m 1 突變株                  | 74 |
| 5-2-2 製造和純化融合蛋白質於 <i>E. coli</i> 表現系統 | 74 |
| 5-2-3 Ziz m 1 突變株對 IgE 抗體的活性分析        | 75 |
| 5-3 未來的研究方向                           | 76 |

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| 5-3-1 過敏原之 B 細胞抗原表位..... | 76      |
| 5-3-2 過敏原的臨床檢驗方法.....    | 77      |
| 5-3-3 過敏原專一性免疫治療.....    | 79      |
| 5-4 結論.....              | 80      |
| 參考文獻.....                | 82-92   |
| 圖.....                   | 93-112  |
| 表.....                   | 113-117 |
| 附錄.....                  | 118-122 |
| 個人資料.....                | 123-126 |

## Abbreviations

|           |  |
|-----------|--|
| BLAST     | Basic local alignment search tool  |
| BSA       | Bovine serum albumin   |
| CD        | Cluster of differentiation   |
| cDNA      | Complementary deoxyribonucleic acid  |
| CHAPS     | (3-[3-(cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulphonate; C <sub>32</sub> H <sub>58</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S) |
| ELISA     | Enzyme-linked immunosorbent assay  |
| ESI-MS/MS | Electrospray ionization tandem mass spectrometry   |
| FDA       | Food and drug administration   |
| HLA       | Human leukocyte antigen  |
| HRP       | Horseradish peroxidase   |
| IL        | Interleukin  |
| INF       | Interferon   |
| IPTG      | Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside   |
| MALDI-TOF | Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry   |
| NCBI      | National center for biotechnology information  |
| NRL       | Natural rubber latex   |
| NMR       | Nuclear magnetic resonance   |
| PBS       | Phosphate buffered saline  |
| pI        | Isoelectric point  |
| PR        | Pathogenesis-related   |
| RT-PCR    | Reverse transcription-polymerase chain reaction  |
| PVDF      | Polyvinylidene difluoride  |
| RAST      | Radioallergosorbent test   |
| SDS-PAGE  | Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis  |
| SIT       | Specific immunotherapy   |
| SPT       | Skin prick test  |
| TBE       | Tris-borate-EDTA   |
| TBST      | Tris-buffered saline and Tween 20  |
| Th        | helper T-cell  |



## 中文摘要

天然乳膠是巴西橡膠樹(*Hevea brasiliensis*)樹幹流出的乳汁，多年來被廣泛地用來製造各種醫療器材。乳膠過敏症第一個病例報告在 1979 年由 Nutter 發表，近年來已經成為一個重要的國際性健康問題。已知乳膠過敏原是多種分子量分佈於 10~100 kDa 的蛋白質，目前至少有 13 種乳膠過敏原被選殖並命名為 Hev b 1~Hev b 13。許多研究發現，有超過一半的乳膠過敏病人，對植物性食物尤其是水果，有專一性的 IgE 抗體。這種交叉性過敏反應，在 1994 年訂名為乳膠-水果症候群。目前參與此類交叉作用的共同抗原表位尚未被鑑定出來。

不論引起過敏反應的重要性如何，在台灣還沒有關於乳膠過敏症和乳膠-水果症候群的深入研究。印度棗是一種美味的水果，普遍種植在南台灣。本研究有三個目的依序進行。第一是從印度棗和鹼化乳膠原料製備粗萃物，利用二位乳膠-印度棗過敏病人之血清，進行過敏原專一性的 IgE 抗體測定、免疫轉漬法、免疫轉漬抑制法和 ELISA 抑制法等實驗。我們鑑識一種 42 kDa 的乳膠過敏原和兩種分子量分別為 30 和 42 kDa 的印度棗過敏原，並且證實印度棗和乳膠過敏原之間，存在交叉性的抗原決定因子。胜肽質量指紋鑑定的結果顯示，印度棗 30 kDa 過敏原和稻米(*Oryza sativa*)的 Class III chitinase 有同源性，而乳膠 42 kDa 過敏原則是 Hev b 7。

第二是從印度棗 mRNA 構築一個 ZAP II cDNA 基因庫，利用 IgE 抗體進行免疫篩選，共獲得 10 株呈陽性反應的溶菌斑。cDNA 的長度在 0.15~1.39 kb，並且進行核苷酸定序。轉譯 30 kDa 過敏原的重組株訂名為 Ziz m 1，利用酵母菌 *Pichia pastoris* 表現重組過敏原(rZiz m 1)。rZiz m 1 擁有 chitinase 的活性，對 8 位乳膠-印度棗過敏病人，有 87.5%的陽性皮膚反應。另外，由電腦的比對搜尋發現，Ziz m 1 序列和 hevamine (乳膠的 class III chitinase)有 45%的相似性。

第三是從 8 種不同批號的乳膠手套製備乳膠粗萃物，共有 20 位對乳膠過敏的醫護人員參與研究。由免疫轉漬法發現 3 種 IgE 結合蛋白質，分子量分別為 45、30 和 14 kDa。胜肽質量指紋鑑定的結果，證明均為已知乳膠過敏原，依序是 Hev b 13、hevamine 和 Hev b 1。

我們的研究證明 hevamine 是一種重要的交叉性過敏原，和台灣醫護人員的乳膠-水果症候群有關，這個結果和西方國家的報導並不相同。將來我們將致力於 Ziz m 1 分子之 IgE 結合抗原表位的分析。對於過敏原的特性有充分瞭解，可以促進發展有效用的免疫治療，也可能解答乳膠-水果症候群的致病機轉。

## Abstract

Natural rubber latex is the milky sap obtained by tapping the bark of *Hevea brasiliensis* trees, and it is a common component in various medical equipments. Latex allergy was first described by Nutter in 1979 and has been recognized as a very important international health problem in the last few years. It has been demonstrated that latex allergens are various proteins with molecular weights ranging from 10 to 100 kilodaltons (kDa), and at least 13 latex allergens (Hev b 1~b 13) have been cloned and named. Several studies have shown that more than half of latex-sensitized people had specific IgE antibodies to proteins from many plant foods, especially fruits. This type of cross-reactivity is designated as the latex-fruit syndrome in 1994. However, the common epitopes responsible for these associations have not been well elucidated.

Despite the importance in the elicitation of hypersensitivity reactions, the latex allergy and latex-fruit syndrome have not been closely studied in Taiwan. Indian jujube (*Zizyphus mauritiana*) is a sweet fruit that is abundantly cultivated in southern Taiwan. There were three aims of the present study and carried out sequentially. Firstly, the crude extracts were prepared from Indian jujube and ammoniated latex. Sera from two latex-Indian jujube allergic subjects were used for allergen-specific IgE, immunoblotting, immunoblot inhibition and ELISA inhibition studies. We identified a 42 kDa latex allergen and two allergens, 30 and 42 kDa, from Indian jujube and proved that the cross-reactive determinants exist between Indian jujube and latex allergens. Peptide mass fingerprinting revealed that

the 30 kDa-Indian jujube allergen was homologous with class III chitinase of *Oryza sativa* and the 42-kDa latex protein was identified as a known allergen, Hev b 7.

Secondly, a ZAP II cDNA library was constructed from *Z. mauritiana* mRNA and screened with IgE antibodies. Ten immunoreactive clones containing inserts ranging from 0.15 to 1.39 kb were identified and sequenced. The Ziz m 1 encoding 30 kDa allergen was expressed in *Pichia pastoris*. The recombinant Ziz m 1 (rZiz m 1) showed chitinase activity and possessed 87.5% skin response on eight latex-Indian jujube sensitive subjects. Moreover, the computer-assisted homology search revealed that Ziz m 1 with 45% sequence similarity to hevamine (class III chitinase of *H. brasiliensis*).

Thirdly, crude extracts from eight different lots of latex gloves were prepared and 20 medical workers with latex allergy were included in the study. Immunoblotting revealed that three IgE-binding proteins, at molecular mass of 45, 30 and 14 kDa, were identified. Peptide mass fingerprinting demonstrated that they were known latex allergens Hev b 13, hevamine and Hev b 1, respectively.

Our results indicated that hevamine is an important cross-reactive allergen associated with latex-fruit syndrome among medical workers in Taiwan, which is different from the reports in Western countries. Future works will focus on the analysis of immunodominant IgE-binding epitopes of the Ziz m 1 molecule. The well characterized allergen will aid in developing effective immunotherapy and may help to elucidate the mechanism of latex-fruit syndrome.

## 第一章 緒論

### 1-1 前言

根據許多西方國家的研究指出，有超過 25% 的人，由於接觸到環境或食物中的過敏原，導致罹患第 I 型的過敏疾病。常見的過敏原包括塵蟎、蟑螂、黴菌、貓或狗的毛屑和各種植物的花粉等等(Casolaro *et al.*, 1996; Valenta *et al.*, 1998)。第 I 型過敏反應的特徵是血清中含有高濃度的過敏原專一性 IgE 抗體，以及組織有大量的嗜酸性白血球(eosinophils)浸潤。當過敏原交叉連結在肥胖細胞表面的 IgE 抗體，導致肥胖細胞的活化，因而釋放 histamine 和 leukotriene 等等發炎反應介質，造成過敏性鼻炎、眼結合膜炎、皮膚炎、過敏性氣喘等典型的立即性過敏症狀(Wurtzen, 2001)。

對於第 I 型過敏病的臨床診斷，主要依據病人所述之病歷、過敏原專一性 IgE 抗體的偵測和皮膚試驗。臨床的治療，通常使用 anti-histamine、anti-leukotriene 或是局部類固醇等藥物，讓過敏的症狀得到緩解；但是唯有針對專一性過敏原的免疫治療，才是根治過敏病的最佳方法(Bousquet *et al.*, 1998)。目前臨床的檢驗試劑和免疫治療，主要使用天然過敏原的粗萃物。由於組成份複雜，很難標準化，因而降低診斷的準確性和治療的效果。近 15 年來，將分子生物的技術，應用在過敏原的研究，選殖出許多主要過敏原的 cDNA；並且利

用各種表現載體系統，製造重組過敏原，跟天然過敏原比較，具有相似的結構、功能和免疫反應的特性(Valenta & Kraft, 2004)。雖然已經有許多成功的過敏原研究成果，改善過敏病的醫療品質，但是對於日益增加的過敏原種類，仍有更多的過敏原特性需要深入探討和研發。

乳膠過敏症是一種全球性重要的職業病。在歐美國家，醫療工作人員約有 2-17% 對乳膠有第 I 型過敏反應(Turjanmaa *et al.*, 1996; Poley & Slater, 2000)。台灣地區醫療工作人員，對乳膠過敏症的盛行率也有 6.8-8.6%，但是卻沒有獲得應有的重視(Lai *et al.*, 1997; Chen & Lan, 2002)。在臨床上發現，有 30~50% 的乳膠過敏病人，對許多水果有專一性的 IgE 抗體反應，在 1994 年將這種交叉性反應所引起的過敏症，訂名為「乳膠-水果症候群」(Blanco *et al.*, 1994)。許多研究顯示酪梨、香蕉、栗子和奇異果等是主要產生交叉性過敏反應的水果，而木瓜、馬鈴薯、番茄及其他食物，也是可能產生乳膠-水果症候群的交叉性過敏原。雖然已有這些發現，目前對乳膠-水果症候群的交叉性過敏原之分子特性並不清楚。

我的論文以印度棗和乳膠的交叉性過敏原為研究題材，共分五章。第一章為「緒論」，針對過敏病的一般觀念介紹；其次是乳膠過敏症和乳膠-水果症候群研究背景的文獻回顧；最後是重組過敏原以及蛋白質體學的方法和應用。第二章為「印度棗和乳膠交叉性過敏原

的鑑定」，主要內容發表在 *International Archives of Allergy and Immunology* 2004; 133:211-216。篇名是：Allergenic components of Indian jujube (*Zizyphus mauritiana*) show IgE cross-reactivity with latex allergen。第三章為「印度棗主要過敏原 Ziz m 1 分子特性的研究」，主要內容發表在 *Molecular Immunology* 2006; in press。篇名是：Molecular cloning of Indian jujube (*Zizyphus mauritiana*) allergen Ziz m 1 with sequence similarity to plant class III chitinases。第四章為「利用蛋白質體學的方法，鑑定台灣醫護人員對乳膠手套的主要過敏原」，主要內容發表在 *International Archives of Allergy and Immunology* 2006; 139:38-44。篇名是：Identification of hevimine and Hev b 1 as major latex allergens in Taiwan。第五章為「結論和展望」，綜合討論第二~四章的研究成果，並對於印度棗過敏原 Ziz m 1 的 B 細胞抗原表位，提出初步結果和將來的研究方針。

希望本文的研究成果，有助於乳膠和水果交叉性過敏反應之分子機轉的了解，將來更可以應用在臨床的檢驗以協助診斷，並發展過敏原專一性的免疫治療。

## 1-2 文獻回顧

### 1-2-1 第 I 型過敏反應 (IgE-mediated Allergy)

因為不當的免疫反應所造成的疾病，總稱為「hypersensitivity diseases」。根據免疫病理機轉，臨床免疫學家將其分為四種類型(附錄一)(Coombs & Gell, 1963; Janeway Jr *et al.*, 2001)。由 IgE 媒介所造成的立即性過敏反應，屬於第 I 型。能誘發 IgE 產生的抗原稱為過敏原，通常是一些蛋白質或化學物質。

過敏原的命名是根據其分類的學名，以屬名的前三個字母，加上種名的第一個字母和一個阿拉伯數字所組成。例如巴西橡膠樹(學名為 *Hevea brasiliensis*)樹液的過敏原，依發現的順序命名為 Hev b 1, Hev b 2, Hev b 3... 等等。目前已知的過敏原都登記在世界衛生組織的過敏原資料庫(World Health Organization (WHO)/IUIS'allergen list: <http://www.allergen.org>)。在 2005 年 6 月之前，已註冊的過敏原初級構造有 487 種，共分為 9 類：Weeds 27 種，Grasses 30 種，Trees 47 種，Mites 46 種，Animal 27 種，Fungi 88 種，Insects 71 種，Foods 124 種，其他類 27 種。在食物類中，屬於植物性的有 102 種，印度棗過敏原(Ziz m 1)為其中之一。乳膠過敏原歸類在其他類，共有 13 種。

在 1921 年，Prausnitz 和 Kustner 首先證明在過敏病人血清中，有一種因子直接參與過敏反應。又經過了幾乎 50 年，Ishizaka K 和



Ishizaka T 以及 Johansson 和 Bennich，2 組團隊在 1967 年同時發表，引起過敏反應的因子，是一種新的免疫球蛋白。在 1968 年由 WHO/IUIS 正式訂名為 IgE (Flicker & Valenta, 2003)。IgE 是 5 種免疫球蛋白(IgA, IgD, IgE, IgG, IgM)成員之一，由 2 條相同的輕鏈( $\kappa$  或  $\lambda$ )和 2 條相同的  $\epsilon$  重鏈組合摺疊成 Y 型(所有免疫球蛋白共同的形狀)，並構成固定區(crystallizable fragment, Fc)和變異區(antigen-binding fragment, Fab)。IgE 受器的結合位在固定區，而專一性的過敏原結合位在變異區。IgE 的分子量約為 190 kDa，在正常人血清中的濃度只有 50~150 ng/ml (IgG 約 10 mg/ml)，在周邊血中的 half-life 僅 1~5 天 (IgG 約 20 天)；對於熱相當不安定，在 56°C 數小時即失去活性(Prussin & Metcalfe, 2003)。

過敏原專一性的 IgE 抗體濃度和臨床症狀有密切關係 (Smurthwaite & Durham, 2002)。一般而言，IgE 的合成過程如下：當抗原呈現細胞(antigen presenting cells)將過敏原處理後，抗原片段經表面的 MHC class II 分子辨識後，呈現給 Th2 細胞，接著細胞激素 IL-4 和 IL-13 的釋放，導致 B 細胞增殖並分化成產生 IgE 的漿細胞，最後製造了過敏原專一性的 IgE 抗體(Corry & Kheradmand, 1999)。過敏的個體接觸到非常少量的過敏原，就可能在數分鐘至數小時內引發立即性的反應。立即性的過敏反應，是由於過敏原專一性的 IgE 抗體結合

到組織中的肥胖細胞或血液中的嗜鹼性細胞所引起的。當 IgE 結合在作用細胞表面的 high-affinity (FcεRI) 受器時，如果再次遇到相同或交叉性過敏原，產生交叉性連結於 IgE 的 Fab 區，將導致作用細胞的活化，引起釋放細胞質顆粒中的 histamine、tumor necrosis factor-α 和多種 proteases，或是新合成 leukotrienes、prostaglandins 和 cytokines 等等發炎介質(inflammatory mediators)，造成臨床上的過敏疾病(Sutton & Gould, 1993; Corry & Kheradmand, 1999; Prussin & Metcalfe, 2003)。

### 1-2-2 乳膠過敏

根據考古學家的研究，最早出現的乳膠製品，約在公元前 1600 年，在墨西哥發現的 12 粒橡膠球。在西元 400~800 年發現的馬雅文化遺跡中，也發現專門比賽橡膠球的競技場(Ownby, 2002)。由於硬化處理的發明，使乳膠的應用更加廣泛，目前有超過 40,000 種產品，包括醫療器材、玩具、家庭用品、保險套等(Meade *et al.*, 2002)。雖然大概有 2,000 種植物(分佈在 300 屬)可以產生乳膠，但是由於種植環境和產能等經濟效益的考量，目前 99 % 以上的商業製品，都來自一種學名為 *Hevea brasiliensis* 巴西橡膠樹，主要種植的國家包括馬來西亞、泰國和印尼(Ownby, 2002)。天然乳膠是橡膠樹一種特化細胞 laticifers 的細胞質，主要成份包括 65% 水份、33% rubber (cis-1,4-polyisoprene)、2% resin 和 1~1.8% 蛋白質。乳膠在植物體主

要的功能是傷口的黏合(Nettis *et al.*, 2002)。

Halstead 在 1896 年首先在外科手術時使用乳膠手套。在 1979 年，由 Nutter 第一次發表由於使用乳膠手套，導致接觸性皮膚炎的病例。直到 1986 年，Frosch 等人証明對乳膠產物的反應，是由 IgE 所引起的，而過敏原則是殘留在乳膠產物的蛋白質(Nutter, 1979; Frosch *et al.*, 1986; Meade *et al.*, 2002)。由於愛滋病和肝炎的流行，醫護人員開始全面使用乳膠手套，作為避免感染的防護；從 1980 年代晚期起，醫學文獻中對於乳膠過敏症的報告也快速增加。根據美國食品及藥物管理局(FDA)的統計，在 1989 和 1992 間就有高達 1100 個乳膠過敏的病例，其中有 15 位死於乳膠蛋白質引起的過敏性休克(Slater, 1994)。現在乳膠過敏症已經被認為是一種重要的國際性健康問題。對一般人的發生率約 4~7 % (Merrett *et al.*, 1999)，高危險群包括醫護人員(5~15 %)、乳膠工人、以及先天畸型在嬰兒期就接受多次手術的脊柱裂患者(spina bifida, 24~60 %; Poley *et al.*, 2000)。

經過二十年來的研究發表，對於乳膠過敏症已經有比較清楚的了解。根據美國職業安全衛生研究所的報告(NIOSH, 1997)，乳膠製品可能引發的人體反應有三種類型，第一種為刺激性接觸皮膚炎(irritant contact dermatitis)，可能源自製造過程殘留的化學添加物，例如 thiazoles、thiurams 和 carbamate。這類反應不需要事先接觸過，也沒

有免疫記憶，只要避免直接接觸乳膠手套，症狀就可以解除。第二種為遲發型之過敏性接觸皮膚炎(allergic contact dermatitis)，約於接觸後24~48小時發作起疹，臨床上將遲發性過敏歸類為第IV型反應(見附錄一)，肇因於T細胞的作用。第三種則為急發性乳膠過敏(latex allergy, immediate hypersensitivity)，發作時間在數分鐘至數小時內，臨床的症狀包括蕁麻疹、鼻眼結膜炎、血管性水腫和氣喘，甚至有致命危險的過敏性休克。臨床上將立即性過敏歸類為第I型反應，肇因於血清中的IgE抗體與乳膠過敏原結合後，誘發histamine等中間物質的釋放所導致。這種免疫反應是有記憶的，如果不能避免過敏原的暴露，症狀將隨著接觸次數的增加而愈來愈嚴重。

研究乳膠的成分，以蛋白質二維電泳的方法，分析天然乳膠的粗萃物，發現含有超過250種蛋白質(Kurup *et al.*, 1996)。利用乳膠病人血清的IgE抗體，進行免疫轉漬法，證明各種乳膠過敏原的分子量，主要分布在10至100 kilodaltons (kDa)之間(Blanco *et al.*, 1994; Turjanmaa *et al.*, 1996)。目前有超過30種乳膠過敏原被鑑識出來(Wagner *et al.*, 2002)，其中只有13種經WHO/IUIS註冊為乳膠過敏原Hev b 1~b 13(附錄二)(Sussman *et al.*, 2002; Beezhold *et al.*, 2003; Yeang, 2004)。現在關於乳膠過敏原的研究，主要集中在這13種已命名的過敏原。目前Hev b 2、Hev b 4和Hev b 13尚無有效的重組過敏

原提供檢驗和治療用。根據已知乳膠過敏原的生化特性，大致可以分為四類：(1) 與 polyisoprene 的合成或凝固功能有關/Hev b 1, 3, 6。(2) 防禦相關蛋白質/Hev b 2, 6, 7, 11, 12, 13。(3) 構造蛋白質/Hev b 4, 5, 8。(4) 日常酵素/Hev b 9, 10 (Meade *et al.*, 2002; Yeang, 2004)。值得注意的是，其中有 6 種乳膠過敏原，屬於防禦相關蛋白質(defense-related proteins)。這一類蛋白質主要因為植物受病原菌感染時誘發產生，所以又稱為 Pathogenesis-related proteins，簡稱為 PR 蛋白質。已知許多 PR 蛋白質都被證明是過敏原(Midoro-Horiuti *et al.*, 2001)。

高等植物自我保護對抗各種壓力的方式，包括生理改變或誘發防禦反應，而防禦反應所產生的植物蛋白質，通稱為 PR 蛋白質。目前分為 14 類(附錄三)，已知第 2, 3, 4, 5, 8, 10 和 14 與過敏有關(Hoffmann-Sommergruber, 2000; Midoro-Horiuti *et al.*, 2001)。植物的防禦相關蛋白質擁有許多共同特性，例如低分子量(5~70 kDa)、抗酸性和抗蛋白質酶。橡膠樹由於經濟效益的考量，被不斷重複割傷，以利乳膠的收集；並且使用大量的植物荷爾蒙，刺激植株的快速生長，故誘發大量 PR 蛋白質的產生，因而造成提高過敏反應的發生率。PR 蛋白質在演化上有相當的保存性，故在過敏原的交叉性反應，可能扮演重要角色，將在下一部分深入討論。

### 1-2-3 乳膠-水果症候群

根據臨床的觀察，乳膠過敏和許多食物過敏，尤其是水果過敏有相當的關聯性，在 1994 年將這種交叉性反應所引起的過敏症，訂名為「乳膠-水果症候群」(Blanco *et al.*, 1994)。已被報導的相關水果包括：香蕉、酪梨、百香果、鳳梨、奇異果、木瓜、桃子、葡萄、蕃茄、西瓜等等。雖然乳膠和以上這些水果，並無植物分類的親緣關係（屬於不同科），但是乳膠-水果症候群的存在，已經由許多不同的研究報告所確認(Beezhold *et al.*, 1996; Delbourg *et al.*, 1996; Brehier *et al.*, 1997)。目前關於乳膠-水果交叉性反應的分子基礎並不清楚，最廣為接受的假說，認為過敏原的交叉性反應，是由於 IgE 抗體可以辨認在不同蛋白質之間，具有構造相似的抗原表位(antigen determinants, epitopes)。所以不論是物種相近與否，或代表演化的保留構造等，都有可能發生 IgE 的交叉性反應(Wagner & Breiteneder, 2002)。

根據臨床的特徵，有二種型式的食物過敏必須先加以區分。一般傳統的食物過敏，屬於第一類，致敏的過程發生在胃腸道。經由食用而致敏後，臨床症狀因再次食入同種蛋白質而發生過敏反應，這類食物過敏原，稱為「完全過敏原」，同時扮演致敏的 sensitizer 和引起過敏症狀的 eliciter。乳膠-水果症候群屬於第二類食物過敏，致敏的過程，發生在直接接觸乳膠製品，或是吸入含乳膠過敏原的粉塵；過敏

症狀可能肇因於第二次暴露到相同過敏原，或者由於吃到含交叉性過敏原成分的食物所引起，這類食物過敏原稱為「不完全過敏原」(Yagami, 2002)。由於臨床的症狀來自 IgE 的交叉反應，一般會誤認為後者才是主要過敏原。IgE 的交叉性反應可能發生在相關或不相關的蛋白質，前提是具備相似的抗原表位序列。因為目前相關的資訊十分缺乏，很難預估過敏原發生交叉性反應的可能性。所以對於乳膠過敏症的患者，隨時都有可能遭受不明交叉性反應發生的風險。交叉性反應的分子機轉，有必要更多的深入了解。

為了證明乳膠和水果的過敏原之間，是否具有共同的 IgE 抗原結合表位？許多研究利用乳膠和水果的粗萃物進行 radioallergosorbent test (RAST) 和免疫轉漬抑制法(immunoblot inhibition)。發現許多植物性食物和乳膠的過敏原之間，具有很高的同源性(附錄四)(Breiteneder & Ebner, 2000; Salcedo *et al.*, 2001)。例如從酪梨、栗子和香蕉所鑑識的 class I chitinases (分子量在 24~35 kDa 之間)，位於 N 端的 hevein-like domain (40~43 個胺基酸)和乳膠主要過敏原 Hev b 6 (含有 prohevein/hevein domain) 有很高的同源性(65~70%, Breiteneder & Ebner, 2000)。許多文獻指出 class I chitinases (在 2002 年訂名為 Hev b 11)，尤其是 N 端 hevein-like domain，對乳膠和水果交叉性過敏反應，扮演重要角色(Diaz-Perales *et al.*, 1998; Sanchez-Monge *et al.*, 1999;

Breiteneder & Ebner, 2000)。Hev b 5 能與 50%以上受測乳膠過敏病人血清的 IgE 反應，與奇異果的酸性蛋白質有 46 % 同源性(Slater *et al.*, 1996; Akasawa *et al.*, 1996)。Hev b 7 和馬鈴薯過敏原 patatin 有 39~42% 同源性(Seppala *et al.*, 1999)。其他可能的交叉性過敏原還有  $\beta$ -1,3-glucanase (Hev b 2) 和缺少 hevein-like domain 的 class III chitinase (hevamine)。這些被報導的過敏原，都屬於植物的防禦相關酵素家族的成員(Breiteneder & Ebner, 2000)。比較這些來自不同植物的蛋白質序列，出現有意義的同源性(40-70%)，這些特徵建議它們參與乳膠和水果交叉性反應的可能性。無論如何，以上這些過敏原之間，是如何產生交叉反應的真正機轉，仍然不清楚。

#### 1-2-4 過敏原之 IgE 交叉性反應研究

探討 IgE 抗體交叉性反應的意義，分別從基礎研究、臨床醫學和預防發生等三方面來討論。首先由免疫的觀點來看，為什麼 IgE 抗體對過敏原的交叉性反應，發生的機率高於 IgG 抗體對抗原的交叉性反應？以貓過敏原 Fel d 1 為例，在相同血清的實驗中，IgE 或 IgG4 的平均交叉性反應的發生率分別是 66% 和 37% (van Milligen *et al.*, 1994)。希望經由比較各種交叉性過敏原的構造和生化特性，來瞭解其作用機轉。其次由臨床的觀點而言，瞭解交叉性反應的類型(pattern)是很重要的，因為他們通常反應臨床致敏的類型；整合純化或重組



DNA 產生的交叉性過敏原，將可以簡化檢驗的步驟和增加過敏疾病的治療效果。第三點就實際的應用方面，俗話說「預防勝於治療」，如果能預知 IgE 的交叉性反應，也許就能預防‘新’食物的過敏反應，降低 IgE 交叉性反應造成的風險。根據許多文獻對過敏原間交叉性反應的說明，通常是指生物體間之物種關係，因為親緣關係造成蛋白質初級構造有很高的同源性，而初級構造的高同源性，則導致三級構造的同源性，也因而容易造成交叉性反應。例如脊椎動物中，血清的白蛋白質(albumin)常有交叉性反應的存在(Spitzauer, 1999)。而對花生(peanut)過敏原反應的 IgE 抗體，通常和黃豆(soybean)或其他豆科植物(legumes)的同源蛋白質，也會有交叉性反應(Aalberse *et al.*, 2001)。但是如果在物種分類上，相關性很遠的生物體間，發生的交叉性反應，又是如何？例如乳膠和水果間的交叉性反應，是由那些分子構造所導致？在此討論的交叉性反應，是個體的抗體對個別的過敏原特性。所以要研究過敏病人的 IgE 交叉性反應，需要使用專一性的過敏原，而不是組成份複雜的粗萃物。由於基因工程技術的發展，許多問題都可以用高純度重組過敏原作為研究的工具，來尋求解答。

## 1-3 重組過敏原

### 1-3-1 製造重組過敏原的方法

主要過敏原蛋白質成份的鑑定，對於過敏機制的了解相當重要。雖然過去二十年來，天然過敏原粗萃物的品質已經有許多改善，例如少數利用單株抗體將過敏原標準化。但是天然來源的產物，含有許多非過敏原的蛋白質和酵素，所以很不穩定，以及不同批次的商品化過敏原成份不能恆定等問題，都影響臨床檢驗的準確性和減敏治療的效果。而這些天然過敏原所遭遇的問題，都可由分子選殖的技術，產生重組過敏原獲得改善。過去幾年來，許多植物、真菌、塵蟎、蟑螂等的主要及次要過敏原基因，都已陸續被選殖和定序 (Chapman *et al.*, 2000)。產生重組過敏原的第一步，是純化過敏來源的 mRNA，構築 cDNA 基因庫，利用過敏病人血清含高量 IgE 抗體的特性，進行免疫篩選。或是由純化的天然過敏原，經 Edman 胺基酸定序法，獲得 N 端序列後，設計 degenerated primers 進行 RT-PCR，選殖過敏原基因。重組過敏原基因的表現，可以利用原核生物的表現載體系統 (例如 *E. coli*)，或是真核生物的表現載體系統 (例如酵母菌、昆蟲細胞株、哺乳類細胞株)。兩種表現系統各有其優缺點，分別說明如下：

目前最普遍使用的原核生物表現載體系統是 *E. coli*。許多載體都可向生技公司購得，十分方便。而且有各種不同 tag、fusion 或

non-fusion protein，可依實驗的需要做最佳的選擇。*E. coli* 重組蛋白質表現系統的優點，包括容易操作、效率高(每 20 分鐘即複製一次)、產量高(*E. coli* promoters 有許多調節和誘導的因子，例如 IPTG)、容易純化(搭配 Flag、GST 或 His-6 peptides affinity column)。而 *E. coli* 重組蛋白質表現系統的缺點，主要包括(1) 由於過度表現外來蛋白質，易導致 misfolding，形成不溶性的 inclusion body，喪失生物活性。(2) 原核生物沒有後轉譯修飾(post-translational modifications)，導致有些含 glycosylation sites 或 phosphorylated groups 的蛋白質，減低活性。目前的研究報告中，尚無法推論過敏原蛋白質的生化活性，對 allergenicity 是否有一定的關係。在美國蟑螂主要過敏原 Per a 1 和 Per a 3 的研究中，利用 *E. coli* 蛋白質表現系統，成功地產生具有 IgE 結合能力的重組過敏原，並完成 B 細胞抗原表位的標定(IgE epitopes mapping)(Wu *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003)。

真核生物的表現載體系統，最主要的優點是擁有 *E. coli* 所缺乏的後轉譯修飾作用，包括 signal sequences、folding、disulfide bond formation。酵母菌 *Pichia pastoris* 是目前最常使用的真核生物表現系統。相對於 *E. coli* 系統可將基因接在質體而獨立表現的構築方法，酵母菌構築後的載體則必須殖入 *P. pastoris* 的基因體，因而操作較為複雜。但目前有 *E. coli* / *P. pastoris* shuttle vectors，可以在兩種生物體轉

換生長，更方便研究的應用。德國蟑螂主要過敏原 Bla g 4，同時被選殖在 *E. coli* 和 *P. pastoris* 表現其重組過敏原，產量在 *E. coli* 為 0.25 mg/l，而在 *P. pastoris* 則高達 50 mg/l (Vailes *et al.*, 1998)。我們發表的印度棗主要過敏原 Ziz m 1 在 *P. pastoris* 的產量為 15 mg/l，而且具有很好的 IgE 結合能力和生化活性(Lee *et al.*, 2006b)。Baculovirus system (感染昆蟲細胞株)應用於蛋白質的表現，始於 1980 年末期。這個系統的優點包括安全性高、昆蟲細胞的培養容易。缺點是培養的成本高、時間長、產量少。目前利用這個系統產生的重組過敏原，都具有很好的 IgE 結合能力和生化活性(Soldatova *et al.*, 1998; Ichikawa *et al.*, 1999)。最早直接產生真核生物酵素和蛋白質的是哺乳類細胞株表現系統，但是很少應用在重組過敏原。因為哺乳類細胞株的培養，需要複雜的設備和操作者的技巧。美國蟑螂過敏原 Per a 1 利用 cos-1 細胞 (monkey, African green, kidney)表現重組過敏原，但是卻無法克服純化的問題，因而限制應用的價值(Wu *et al.*, 2000)。

### 1-3-2 重組過敏原在研究的用途

從 1990 年代基因工程快速發展，許多過敏原初級構造(胺基酸序列)，利用成功的基因選殖而了解，重組過敏原也成為研究過敏病的最佳工具。目前的應用包括(1) B 細胞和 T 細胞抗原表位訊息的偵測。經由合成 overlapping peptides 或設計特定重組株，許多主要過敏原的

IgE 結合表位或 T 細胞的認知表位都被確認。(2) 研究專一性 IgE 的調節機轉。已知細胞激素 IL-4、IL-13 和 INF- $\gamma$  可以有效地調節 IgE 的產生。使用重組過敏原，可以在生體外偵測過敏病人周邊血液淋巴細胞專一性 IgE 抗體的產生，而不受 IL-4、IL-13 或細胞激素抑制劑 (cytokine antagonists) 的影響。(3) 各種過敏原交叉性構造的探討。在 1980 年代，利用天然過敏原的粗萃物，以免疫轉漬抑制法，證明交叉性反應的存在。直到 1990 年代，利用純化的重組過敏原，才鑑定出許多參與交叉性反應的過敏原分子 (Valenta *et al.*, 1998)。(4) 過敏原的三級結構。使用 NMR (nuclear magnetic resonance) 和 X-ray crystallography，可以決定過敏原的三級結構，但先決條件蛋白質必須達 99.9% 以上的純度，對於天然過敏原的粗萃物很難做到，而現在已有許多純化的重組過敏原，成功決定三級結構。但是目前為止，從已知的立體構造並未發現可能與抗體結合的 conserved structural motifs，畢竟這方面的資料還很有限，需要更多的研究成果，以建立過敏原立體構造相關資料庫 (Aalberse, 2000)。

### 1-3-3 重組過敏原在臨床檢驗的應用

目前在臨床上對第 I 型過敏病，不論是生體外的血清檢驗或生體內的皮膚試驗，仍然以天然過敏原的粗萃物為主。但是一則因為粗萃物中除了含有過敏原外，還有大量的蛋白質、醣類、核酸等其他成

份。已知 IgE 抗體與醣類的  $\beta$  (1,2)-xylose 和  $\alpha$  (1,3)-fucose 有結合位，易造成偽陽性(van Ree *et al.*, 2000)。二則因為粗萃物很難標準化內容物。因此重組過敏原應用在協助正確診斷之檢驗，有其必要性。只要選擇適當的蛋白質表現系統，建立純化的流程，即可無限量製造品質恆定，價格合理的檢驗試劑。但是目前已知的重組過敏原數量仍十分有限，只有少數已被利用。有些重組過敏原和臨床症狀並無一致性，需要更多的研究改進。將來希望利用重組過敏原雞尾酒的檢驗分析，可以建立個人專一性的過敏原 IgE 圖譜。也許將來對過敏病的診斷，不只告知病人對花粉或塵蟎過敏，而是精確的告知是對花粉的 Bet v 1 或是塵蟎的 Der p 1 過敏。只有正確的診斷，才能更有效的治療。

#### 1-3-4 重組過敏原在治療過敏性疾病的應用

研究過敏原分子的特性，了解過敏的致病機轉，最後的目的是希望能應用在過敏病的治療，不僅是減輕症狀而是根治。基本上過敏疾病是由於過敏原的刺激，導致免疫系統失調，使 T 細胞產生過敏發炎的細胞激素(尤其是 IL-4、IL-5 和 IL-13)，將免疫反應導向 Th2 pathway。過敏的症狀可由藥物的使用得到改善，但是過敏原專一性的免疫治療(specific immunotherapy; SIT)才能根治第 I 型的過敏病(Ferreira *et al.*, 2002; Niederberger *et al.*, 2004)。過去幾年來，SIT 的發展遭遇許多問題，包括(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。(3) 由於未能標準化或擔心副作用，所以無法達到有效劑量(Ferreira *et al.*, 2002)。理論上，這些問題都可因重組過敏原的使用而克服。許多研究利用不同的基因工程方法，企圖改變重組過敏原的結構，應用於免疫治療過敏性疾病(Akdis & Blaser, 2000)。此外，除了注射式的治療方法，將重組過敏原另以口服、舌下或是鼻子噴劑等不同路徑給予治療，也在實驗動物的模式進行評估中(Westritschnig & Valenta, 2003)。

目前已開發許多降低過敏原活性的疫苗，並且進入臨床試驗階段，基本上包括三種理論基礎：(1) 使用 T cell epitope peptide：可以誘發 T cell tolerance，而不會引起發炎中間介質的釋放，因為缺少 IgE 的結合表位。這個方法應用在貓和蜂毒素的過敏病，但是仍有一些爭論(Pene *et al.*, 1998; Muller *et al.*, 1998)。可能由於 T cell peptides 可以活化 MHC-dependent T 細胞，導致全身性反應的副作用。後來的研究發現，如果將蜂毒素主要過敏原 phospholipase A<sub>2</sub> (PLA) 的兩個 T cell epitopes 位置，以 alanine 取代後，可以改變對 MHC class II 的親合力，因而抑制 IL-4 的分泌，對於 INF- $\gamma$  的分泌並不影響，增加 T cell peptides 在臨床應用的可行性(Faith *et al.*, 1999)。(2) 使用過敏原之 B cell epitope peptide：可以誘發 blocking IgG 抗體的產生，拮抗 IgE 抗體可能引發的一系列發炎反應，並抑制過敏原誘發的記憶細胞之 IgE 增生

(Focke *et al.*, 2001; Flicker & Valenta, 2003)。必須經由困難的 epitope mapping 實驗，獲得過敏原 IgE 結合位的資料方能進行，可是多數過敏原並無 B cell epitopes 的資料。(3) 使用減低過敏活性之重組過敏原衍生物：是目前最多研究發展的方法，例如改變專一性的 base pairs (mutated gene)、插入一小段 DNA 分子(hybrid gene)、刪去或是 site-directed mutagenesis 過敏原的 IgE epitopes 等等(Ferreira *et al.*, 2002; Westritschnig & Valenta, 2003)。製造這類'新'過敏原的目的，原則是希望能降低其 allergenicity (使用 hypoallergens)，但是保留對 T 細胞的 immunogenicity，因而將免疫反應導向 Th1 細胞激素的產生。另外一種構築低過敏原衍生物的方法，是以樺樹花粉主要過敏原 Bet v 1 之 cDNA 為模板，利用限制酶裁剪再以 DNA ligase 接合成 dimer 和 trimer，構成的 oligomers，可能因為 microaggregation 的作用，造成表面 epitopes 的改變，降低 IgE 的辨識，但不影響對 T 細胞的刺激能力，是一個安全的減敏試劑(Vrtala *et al.*, 1999)。



#### 1-4 蛋白質體學(Proteomics)

”Proteome”是指由基因體轉譯之所有蛋白質總合，而”Proteomics”則是指這些蛋白質的表現、功能和構造等研究的科學，在 1995 年由澳洲學者 Wasinger 第一次提出這個名詞(Figeys, 2002)。蛋白質體學的方法，需要有分離個別蛋白質的技術和如何去鑑定蛋白質身份(質譜儀分析和生物資訊)。在 1969 就有以二維電泳膠(2D-PAGE)分離蛋白質的技術，但是在 1975 年經 Klose 和 O’Farrelle 改進後才更完備(Arthur, 2003)。二維電泳利用等電點聚焦(isoelectric focusing, IEF)和 SDS-PAGE 兩種原理，將來自組織或細胞的蛋白質混合物作高解析度的分離，隨後切出標的蛋白質，並使用蛋白酶水解成胜肽片段，再利用質譜儀分析後進行身分鑑定。早期希望把胜肽片段離子化，以利質譜儀的分析，一直無法克服，直到 2002 年諾貝爾化學獎得主 John Fenn 和 Koichi Tanaka，才解決這個難題(Cho & Normille, 2002)。因為分析技術的改進和基因庫資料日益增加，使得蛋白質體學快速發展，並且廣泛地應用在許多領域，包括疾病相關蛋白質的鑑定、新藥研發、細胞內 protein-ligand interactions 和 structural proteomics 等等(Figeys, 2002)。

目前主要有兩種質譜儀應用於蛋白質體學，一種是 MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry)，另一種是 ESI-MS/MS (electrospray ionization-tandem

mass spectrometry)(Arthur, 2003)。質譜儀本身包括三個主要部分，(1) 來源(source)：由樣品產生離子。(2) 質析(mass analyzer)：依離子質量/價數(mass/charge,  $m/z$ )的比例分離肽片段。(3) 偵測(detector)：分析結果。簡單的說，質譜儀就是將一群混合物轉為離子，再依照  $m/z$  分析後，得到的結果由儀器自動記錄下來，交由電腦分析。MALDI-TOF MS 和 ESI-MS/MS 基本的差別在樣品離子化的部分，前者將待測物和一些化學物質(matrix)混合，置於玻片上，用雷射光激發電子，釋放的能量將樣品離子化，每一個肽分子都會帶一個正電  $[M+H]^+$ 。而 ESI-MS/MS 的樣品是放在溶液中，溶液 pH 值的高低，控制樣品的官能基離子化的狀態，ESI-MS 一般都在酸性的環境下分析帶正電的肽離子。一個蛋白質分子因為酵素(trypsin)切點的位置，使肽裸露出 lysine 或 arginine 部分，加上低 pH 值的環境，這些肽會變成帶有多個正電的狀態(Liebler, 2002)。

至於哪一種質譜儀較佳？有三個重點：(1) 敏感度(sensitivity)：多數蛋白質能得到的量都有限，儀器最好能偵測到  $10^{-15}$  莫耳的 peptide。(2) 解析能力(resolution)：能從極小的  $m/z$  值分辨不同離子，目前的儀器通常在 1 dalton (Da)左右。(3) 精密度(mass accuracy)：測得的 peptide ion，愈接近真實狀況愈好。本研究所有質譜儀分析的實驗，都是委託國立成功大學國科會貴儀中心，使用的儀器是四極棒-

飛行時間串聯式質譜儀系統(Applied Biosystems QSTAR Pulsars I)，屬於 ESI-MS/MS。分析後的胜肽質量指紋圖譜，利用 Mascot <http://www.matrixscience.com> 軟體，比對 NCBI 蛋白質資料庫，尋找已知同源蛋白質序列，鑑定出待測蛋白質的身分。

## 第二章 印度棗和乳膠交叉性過敏原的鑑定

### 2-1 前言

天然乳膠 (Natural rubber latex, NRL) 是一種屬於大戟科 (Euphorbiaceae) 橡膠樹 (*Hevea brasiliensis*) 樹液的天然衍生物。它是許多醫療用品的組成份，例如拋棄式手套、針筒、聽診器、各種侵入性導管和彈性繃帶等等。由於配戴乳膠手套是醫護人員避免感染的必要防護，最近 20 年來，乳膠過敏症成為最重要的職業病之一。臨床症狀是由於直接接觸乳膠製品，或是吸入工作環境中的乳膠過敏原微粒所導致。乳膠過敏症最引起注意的特徵之一，是有 30~50% 的乳膠過敏病人，對多種水果會產生專一性的 IgE 過敏反應，這種交叉性反應稱為「乳膠-水果症候群」。但是目前對於引起這類交叉反應的分子並不十分清楚。

在台灣尚無關於乳膠-水果症候群的嚴重性、類型和發生率等之研究。關於乳膠過敏症在台灣的研究，在 1997 年由臺大醫院賴建丞等發表於台灣醫誌，報導院內醫護人員對乳膠過敏症的盛行率約 6.8 % (70/1021) (Lai *et al.*, 1997)。在 2002 年，由台中榮總陳怡行和藍忠亮兩人針對中部地區醫護人員的調查，發現乳膠過敏症的盛行率是 8.6 % (26/302)，而 26 位乳膠過敏症的患者中，罹患乳膠-水果症候群的發生率是 26.9 % (7/26) (Chen & Lan, 2002)。在這 7 (7/26) 個病例

中，有 4 位對鳳梨過敏，有 2 位對印度棗過敏，1 位對木瓜過敏。鳳梨和木瓜含有許多酵素成分，已知會引起食物過敏，同時也有和乳膠交叉性反應的報導。印度棗(*Zizyphus mauritiana*)俗稱棗子，屬於鼠李科(Rhamnaceae)棗(*Zizyphus*)屬之經濟作物，原產於印度及中國雲南一帶；台灣於 1944 年開始引進栽培，目前是南部重要農特產品之一，果實的盛產期在秋末，有「台灣蘋果」美譽，目前尚無引起過敏反應的文獻記錄。本實驗以高雄縣高朗地區生產的印度棗和鹼化乳膠原料為材料。由於台灣地區並非天然乳膠的生產地，乳膠手套製造工廠主要從印尼和馬來西亞進口鹼化的乳膠原料。當新鮮的天然乳膠，由橡膠樹幹流出，收集於容器中，必須添加高達 20% ammonium hydroxide，以及 formaldehyde、tetramethylthiuram disulfide 和 zinc oxide 等等化學藥劑，作為抗凝劑和抑菌作用(Meade *et al.*, 2002)。比較天然乳膠和鹼化乳膠粗萃物，在 SDS-PAGE 和 IgE 免疫轉漬的圖譜，具有一致的結果(Grutta *et al.*, 2003)。本章研究目的有三點：

- 一、製備印度棗和乳膠粗萃物，以免疫轉漬法鑑識過敏原成份。
- 二、以免疫轉漬抑制法和 ELISA 抑制法，分析印度棗和乳膠過敏原的交叉性反應。
- 三、以蛋白質體學的方法，進行印度棗和乳膠過敏原的蛋白質身份鑑定。

## 2-2 材料與方法

### 2-2-1 檢體來源

本研究所使用之乳膠-印度棗過敏症病人血清，是由台中榮總免疫風濕科陳怡行醫師提供。所收集的新鮮血液，經 1,000 g 離心 15 分鐘後，將上層血清分裝於微量離心管，保存在-70 。

### 2-2-2 製備乳膠和印度棗粗萃物

由乳膠手套工廠取得鹼化之乳膠原料，在 4 經 10,000 g 離心 30 分鐘後，懸浮液再重複離心至少 4 次，直到不再有凝固物存在為止。乳膠懸浮液經 0.45  $\mu\text{m}$  針筒過濾膜(Millipore, Bedford, MA, USA) 過濾後，裝入 cut-off 6~8 kDa 之透析膜(Spectrum, Terminal Annex, LA, USA)，以 PBS 緩衝液(pH 7.4)在 4 透析隔夜後，分裝於微量離心管，保存在-70 備用(Delbourg *et al.*, 1996)。參考萃取蘋果使用的低溫法(Rudeschko *et al.*, 1995)，做部分修改，用以製備印度棗粗萃物。新鮮的棗子 100 克，加入 200 ml 預冰(-20 )的丙酮(acetone; Sigma, St. Louis, MO, USA)，以果汁機均質化(homogenization)後，放置於-20 隔夜；經抽氣過濾去除丙酮，並以 1:1 的丙酮/乙醚混合液清洗二次後抽乾。印度棗組織以低溫冷凍乾燥機完全乾燥後，保存在-70°C 備用。每 10 克印度棗乾燥組織，加 200 ml PBS 緩衝液(pH 7.4)，並另外添加 2 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA; Merck,

Darmstadt, Germany)、5 mM diethyldithiocarbamic acid (Merck)、0.5 mM benzanidine hydrochloride (Merck) 和 0.2 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF; Sigma)等化學藥品，用以抑制蛋白質酵素的活性。在 4°C 攪拌 1 小時後，經 10,000 g 離心 30 分鐘。上澄液利用 Amicon PL-10 centricon (Millipore)濃縮至約 1 mg/ml，保存在-70 °C。蛋白質濃度的測定，引用 Bradford (1976)的方法，當 Coomassie brilliant G250 染劑(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)和待測物混合 5 分鐘後，利用光譜儀測量波長 595 nm 的吸光值，以 BSA(Bio-Rad)作為定量標準濃度曲線，換算待測物蛋白質濃度。

### 2-2-3 皮膚試驗

印度棗和乳膠粗萃物經 0.22 $\mu$ m 針筒過濾膜(Millipore)無菌處理後，配製皮膚試驗試劑(100 $\mu$ g/ml in PBS 含 50% glycerol)；分別以 PBS 和 1 mg/ml histamine 作為陰性和陽性對照組。皮膚試驗在過敏門診依照標準的方法進行，反應 15 分鐘後測量結果(Wu *et al.*, 1997)。

### 2-2-4 血清專一性 IgE 抗體的測定

臨床上用 CAP-FEIA (Pharmacia Diagnosis, Sweden)的方法，測量病人血清中 IgE 總量和過敏原專一性 IgE 的濃度。實驗室製備的乳膠和印度棗粗萃物，利用 fluoroallergosorbent test (FAST, Wu *et al.*,

1996)的方法，測試對病人血清 IgE 的反應。

### 2-2-5 蛋白質電泳分析和免疫轉漬法

以 SDS-PAGE (上層膠為 4%，下層膠為 12%; Laemmli, 1970) 分析乳膠和印度棗粗萃物蛋白質成份。過敏原的偵測，利用半乾式轉漬槽，將膠片上的蛋白質轉移至硝化纖維膜(Towbin *et al.*, 1979)，用 5%脫脂奶粉去除非專一性結合，經與 10 倍稀釋之病人血清在 4 培養隔夜後，用鹼性磷酸酶冷光偵測試劑(Applied Biosystem, Bedford, MA, USA)，在 X 光底片(Kodak, Rochester, NY, USA)顯現結果。

### 2-2-6 過敏原之交叉性反應分析

利用免疫轉漬抑制法和 ELISA 抑制法，分析乳膠和印度棗過敏原的交叉性反應。在進行免疫轉漬抑制法時，病人血清先與 5 種不同濃度(10、20、40、80、160  $\mu\text{g/ml}$ )的乳膠或印度棗粗萃物混合，在 4°C 培養隔夜後再使用，其他步驟如同免疫轉漬法。在進行 ELISA 抑制法時，先經 checkerboard titration 選擇適當的抗原和抗體濃度。首先將乳膠或印度棗粗萃物以三個重複(triplicate)加在 96 孔盤上，在 37°C 培養 2 小時後，用 1% 正常山羊血清於室溫培養 2 小時去除非專一性結合。病人血清的前處理同免疫轉漬抑制法，二級抗體使用 alkaline phosphatase – labeled mouse anti-human IgE (1:500, BD



PharMingen, San Diego, CA, USA), 經室溫反應 2 小時, 呈色劑以  $\rho$ -nitrophenol phosphate (Sigma; 1:1,000 w/v in diethanolamine buffer, pH 9.8) 作用 2 小時後, 由光譜分析儀 (SLT Labinstruments, Salzburg, Austria) 測量波長 405 nm 處之吸光值, 用 [ % inhibition =  $(OD_0 - OD) \div OD_0 \times 100$ 。OD<sub>0</sub> 代表未加 inhibitor 時, 血清與抗原反應的吸光值; OD 代表血清加入 inhibitor 後, 與抗原反應的吸光值。] 公式計算抑制的百分比。

### 2-2-7 製備抗印度棗多株抗體

兩隻 2.5 公斤重的紐西蘭白兔, 分 20 處於背部皮下注射 1 mg/ml 印度棗粗萃物和等體積 complete Freund 佐劑 (Sigma) 混合液。在第一次免疫注射後, 每隔三週, 再追加注射 0.5 mg/ml 印度棗粗萃物和等體積 incomplete Freund 佐劑混合液。每周採耳血 5 ml, 用 ELISA 測試效價, 直到免疫反應符合要求才停止注射, 共追加注射三次。採集的兔子血清, 先經 18 % sodium sulfate 沉澱後, 再經 14 % sodium sulfate 沉澱。純化的抗印度棗 IgG 抗體, 以 cut-off 6-8 透析膜 (Spectrum) 在 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液中, 在 4 透析 48 小時, 隨後分裝並保存在 -70 。

### 2-2-8 蛋白質二維電泳分析

在進行蛋白質二維電泳前, 印度棗粗萃物先以 Microcon centrifugal filter devices (Millipore) 作脫鹽 (desalting) 處理。第一維管

柱膠，長度為 14 公分，內徑 1.5 毫米(Bio-Rad protean II xi 2-D cell system)，內含 1.5 % CHAPS、0.5 % NP-40、9.2 M urea、4.5 % acrylamide/bis (29.2:0.8) 和 5% pH 3~10 carrier ampholytes (Bio-Rad)。負極和正極的緩衝液分別是 20 mM NaOH 和 10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>。第一維管柱膠電泳先以 200 伏特 2 小時，其次 500 伏特 2 小時，然後 800 伏特 16 小時，達總量 14200 伏特-小時。將第一維管柱膠以針筒擠出，浸泡在含 2.8 % SDS, 72 mM Tris-HCl (pH 6.8), 以及微量的 bromophenol blue (BPB) 染劑的緩衝液中 15 分鐘後，置入第二維片狀膠上層。第二維蛋白質電泳的進行同 Laemmli (1970) 的方法。印度棗和乳膠粗萃物經二維電泳膠分析後，一方面進行銀染，以呈現全蛋白質的圖譜；另一方面進行免疫轉漬法，以確認 IgE 結合過敏原之正確位置。

### **2-2-9 質譜儀分析和胜肽質量指紋鑑定**

由銀染的二維電泳膠片，精確切下標的蛋白質，經胰蛋白酶進行 in-gel digestion (Montage In-Gel Digest Kit, Millipore)。過敏原的蛋白質身分鑑定，委託國立成功大學國科會貴儀中心；利用高效能液相層析儀分離 tryptic 胜肽群，並經由電噴灑離子源(electrospray ionization)連接上串聯式質譜(ESI-MS/MS) (electrospray ionization tandem mass spectrometry; Finnigan MAT, San Jose, CA, USA)。分析

每個胜肽片段的離子質量與部分序列訊息，然後與 NCBI nr (National Center for Biotechnology Information, nonredundant) 蛋白質序列資料庫 (<http://www.matrixscience.com>, Matrix Science) 數據比對，搜尋符合的可能蛋白質。比對的參數除了一致的  $m/z$  值外，同時必須考量待測物的 pI 值和分子量。

## 2-3 結果

### 2-3-1 皮膚試驗和 IgE 抗體的測定

病人的病歷和皮膚測試的結果列於表一。病例一是一位 26 歲的男性，患有異位性皮膚炎，兒時就有過敏氣喘的病史。其皮膚試驗呈陽性反應的過敏原，包括商品化的皮膚試劑：乳膠(3+)、小麥(2+)、芒果(3+)、橘子(2+)、香蕉(2+)，以及實驗室所製備的鹼化乳膠粗萃物(4+)和印度棗(4+)。病例二是一位 38 歲女性，她在醫院實驗室擔任醫檢師之前，並無過敏的病史。由於每天戴乳膠手套，經 8 年後逐漸出現臨床症狀。對於乳膠手套過敏 2 年後，因為食用印度棗而造成 angioedema 立即性過敏反應，她是一位典型的「乳膠-水果症候群」。經皮膚試驗，僅對於乳膠和印度棗的過敏原呈 3+和 4+陽性反應，對其他臨床經常使用的其他過敏原皆無反應。

IgE 抗體的測定結果：病例一的 IgE 總量高達 12,500 kU/l，FAST 的測量值，對於乳膠和印度棗分別屬於 class III 和 IV。病例二的 IgE 總量為 352 kU/l；FAST 的結果對於乳膠和印度棗分別屬於 class II 和 class I。一般而言，過敏的臨床症狀愈嚴重，IgE 的測量值將愈高。病例一對於以上皮膚試驗呈陽性的食物，由 CAP 所測量的 IgE 抗體結果和病人臨床症狀有一致性(表一)。

### 2-3-2 印度棗和乳膠的交叉性反應

實驗室製備的印度棗和乳膠粗萃物，經 SDS-PAGE 分析後，以銀染所呈現的蛋白質圖譜，如圖一所示。病例一對於乳膠萃取物的 IgE 結合反應，結果如圖二所示。Lane 1 可以發現單一條 42 kDa 的 IgE 結合蛋白質。當病人血清先與 inhibitors 在 4°C 經隔夜反應後，進行免疫偵測，所得結果如圖二的 lane 2 (乳膠)、3 (印度棗)、4 (手套)。可以發現乳膠粗萃物的 42 kDa IgE 結合蛋白質被完全抑制了。Lane 5 是以 BSA 當 inhibitor，作為對照組，結果並沒有抑制反應。Lane 6 是以正常未曾過敏的血清，做為 IgE 背景之對照組。病例二對於乳膠萃取物的 IgE 結合反應結果和病例一相同(未列)。

病人血清對印度棗蛋白質的結合和免疫抑制反應，結果如圖三所示。在病例一，對印度棗有二個 IgE 結合蛋白質，分子量分別為 30 kDa 和 42 kDa。當進行免疫抑制反應，圖三(左)分別以印度棗(lane 2)、乳膠(lane 3)、手套(lane 4)為 inhibitors 時，發現 42 kDa 的 IgE 結合蛋白質，被完全抑制，但是 30 kDa 的 IgE 結合蛋白質，則只是顯著減弱，並未完全抑制。在病例二的結果(圖三右)，則只有存在 42 kDa 一種 IgE 結合蛋白質，經免疫抑制反應後，可被印度棗(lane 2)、乳膠(lane 3)、手套(lane 4)完全抑制。在圖中出現的 25 kDa band 是非專一性結合，在正常血清的反應亦可發現(lane 6)。

為確認免疫轉漬抑制法的結果，利用 ELISA 抑制法進一步加以分析，結果列於圖四(印度棗)和圖五(乳膠)。病人血清分別和一系列二倍稀釋的乳膠或印度棗粗萃物，經隔夜反應後，再依標準的 ELISA 步驟，將所測得的 OD 值，依公式轉換成抑制百分比。結果顯示，inhibitors 濃度依序為 10、20、40、80、160  $\mu\text{g/ml}$  二倍增加，抑制的百分比，呈正向線性關係；以正常血清做為對照組，則無反應(曲線 e)。

為評估乳膠萃取物的反應活性，利用自製的兔子抗印度棗 IgG 抗體，進行 ELISA 分析，結果列於圖六。印度棗抗體對印度棗、臨床使用的乳膠皮膚試劑、實驗室製備的鹼化乳膠蛋白質和未免疫的兔子血清，在  $\text{OD}_{415\text{nm}}$  的反應值，分別是 1.462、1.244、0.432 和 0.018。

### 2-3-3 印度棗蛋白質的二維電泳分析

印度棗粗萃物利用二維電泳膠分析後，以銀染所呈現的蛋白質圖譜，以及對乳膠-水果症候群病人血清反應的結果，列於圖七。由圖七 A 發現大部分印度棗蛋白質，分布於 pI 值 4~8 之間；圖七 B 顯示有二個分子量約 30 和 42 kDa 的 IgE 結合蛋白質，這個結果和圖三相吻合。

### 2-3-4 蛋白質體學的分析

將印度棗 30 和 42 kDa 蛋白質，從銀染的二維電泳膠挖出，經

in-gel 胰白質酶水解後，進行質譜儀分析。另一方面，二維電泳膠以半乾式法轉漬蛋白質到 PVDF 膜，經 coomassie brilliant blue 染色後，剪下 30 和 42 kDa 標的蛋白質，進行 Edman 胺基酸定序。由於二種過敏原之 N 端都被保護而無結果。

ESI-MS/MS 對於 30 kDa 過敏原的胜肽質量指紋分析，經由 Mascot 程式(Matrix Science)比對已知蛋白質資料庫(NCBI nr)，質譜訊號 1054.3 和 1054.4 m/z 鑑定為 *Oryza sativa* (GenBank gi: [50936023](#)) 的 class III chitinase (31.6 kDa, pI 4.8)之 <sup>273</sup>YGGIMLWSK<sup>282</sup> 序列。ESI-MS/MS 對於 42 kDa 過敏原的分析結果，並未比對到已知的同源蛋白質。

鹼化乳膠 42 kDa 過敏原，利用相同的蛋白質身份鑑定方法，得到 10 種胜肽片段的訊號，發現和已知乳膠過敏原 Hev b 7 (42.8 kDa, pI 5.0; GenBank gi: [6707018](#))，有高達 33%的一致性胺基酸序列，結果列於表二。

## 2-4 討論

目前有 13 種乳膠過敏原(Hev b 1~ b 13)登記在 WHO/IUIS 過敏原資料庫(附錄二)。Hev b 2、Hev b 5、Hev b 6.02、Hev b 7、Hev b 8 和 Hev b 11 等被報導和乳膠-水果症候群有關(Wagner & Breiteneder, 2002)。其中 Hev b 2 ( $\beta$ -1,3-glucanase)、Hev b 6 (prohevein)、Hev b 7 和 Hev b 11 (class I chitinase)都屬於 PR 蛋白質，具有在酸性環境很穩定，能夠抵抗內生和外來蛋白質酵素等特性。Hev b 6.01 是一個 20 kDa 的前驅分子，成熟的蛋白質裂解為 4.7 kDa 的 hevein (Hev b 6.02)和 14 kDa 的 C 端片段 (Hev b 6.03)。Class I chitinases (25-35 kDa)也具有 N 端 hevein-like domain，在酪梨、栗子和香蕉都被證實是主要過敏原，而且和乳膠有交叉性反應(Diaz-Perales *et al.*, 1998; Mikkola *et al.*, 1998; Sanchez-Monge *et al.*, 1999; Diaz-Perales *et al.*, 1999)。

最近有一個因為食用 azufaifa fruit (*Ziziphus jujuba*) 而發生過敏性休克的病例報告(Alvarado *et al.*, 2002)，這種熱帶水果在植物分類上，和印度棗屬於同屬不同種。其過敏原是一個 30 kDa 的蛋白質，在免疫轉漬抑制法中，可以被乳膠粗萃物抑制，但是以栗子的 recombinant class I chitinase 作為 inhibitor，卻只有很弱的抑制作用。印度棗 30 kDa 過敏原，胜肽質量指紋鑑定結果，發現和稻米的 class III chitinase 有同源性。許多研究報告證明 class I chitinase 的 hevein-like



domain，在乳膠-水果症候群扮演重要的角色(Diaz-Perales *et al.*, 1998; Breiteneter & Ebner, 2000)。但是對於印度棗 30 kDa 過敏原身份鑑定的結果，顯然和已知的研究報告不同，除了 hevein-like domain 外，推論應該還有未知的交叉性抗原表位存在。

這是第一篇有關於印度棗過敏原的學術報告。歸納本章內容，由免疫轉漬法、免疫轉漬抑制法和 ELISA 抑制法等實驗，發現 2 個印度棗過敏原(30 和 42 kDa)和 1 個乳膠過敏原(42 kDa)。利用抗印度棗抗體進行 ELISA 分析，可以偵測到乳膠粗萃物和乳膠皮膚試劑的反應。所有的結果都清楚的說明：印度棗過敏原和乳膠過敏原之間，存在共同的交叉性抗原表位，應該將印度棗加入乳膠-水果症候群的一員。利用蛋白質體學的方法，成功比對印度棗 30 kDa 過敏原屬於 class III chitinase；而鹼化乳膠之 42 kDa 過敏原，證實為 Hev b 7。已知馬鈴薯過敏原 patatin (Sol t 1) 和 Hev b 7 有交叉性反應。Sol t 1 是一種儲藏蛋白質，具有 phospholipase A<sub>2</sub> 的活性和扮演防禦的功能(Seppala *et al.*, 2000)。印度棗 42 kDa 過敏原，雖然經陰離子層析法純化，但是不論利用 N 端定序或質譜儀的分析方法，都沒有身分鑑定的結果。由於本文使用的蛋白質都是乳膠和印度棗的粗萃物，無法說明單一過敏原間的交互作用，所以下一章將進行印度棗 cDNA 基因庫的篩選和表現重組過敏原。

### 第三章 印度棗主要過敏原 Ziz m 1 分子特性之研究

#### 3-1 前言

乳膠過敏症是一種重要的國際性健康問題。約莫 50% 的乳膠過敏病人會伴隨產生食物過敏，這一類交叉性過敏反應稱為乳膠-水果症候群。有愈來愈多的植物被報導和這種過敏症有關，例如酪梨、奇異果、香蕉、番茄、水蜜桃、馬鈴薯、木瓜、鳳梨和印度棗等等。可以確定的是，乳膠過敏原蛋白質本身，或者是其抗原表位(epitopes)，應該廣泛地存在各種植物性食物中，而非局限於少數種類。印度棗 (*Zizyphus mauritiana*) 是一種鮮美多汁的水果，普遍種植在台灣南部。在第二章的內容中，從印度棗的粗萃物，鑑定 42 和 30 kDa 兩種過敏原，並且和乳膠蛋白質產生 IgE 的交叉性反應。本章的研究目的是選殖印度棗過敏原的 cDNA 和製造重組過敏原。

利用兩種不同的方法進行 cDNA 選殖，第一種方法是根據 30 kDa 過敏原的胜肽質量指紋分析，所得到的胺基酸序列，設計 degenerated primers，進行 RT-PCR。將 PCR 產物轉接在 TA cloning 載體(pCR2.1, Invitrogen)，並進行序列分析。核苷酸序列經 NCBI BLAST 軟體做同源性比對，結果發現和 class III chitinase 並無同源性，可能只是非專一性的 PCR 產物。因此改用傳統方式，由印度棗 mRNA 合成雙股 cDNA，以 *EcoRI* 和 *XhoI* 切位黏合在  $\lambda$  ZAP II 載體，構築基因庫。 $\lambda$

嗜菌體根據標準方法培養後，以乳膠-印度棗過敏病人之 IgE 抗體進行免疫篩選。第一次呈陽性反應之溶菌斑被分離，並再次篩選確認。cDNA 的片段大小，由兩條  $\lambda$  專一性的引子，進行 PCR 增幅而得知。選殖結果共鑑定 10 株溶菌斑，對於 IgE 抗體呈陽性反應。其 cDNA 的長度在 0.15 到 1.39 kb 之間。核苷酸定序的結果，發現 1.39 kb cDNA 株為 class III chitinase，和 ESI-MS/MS 的結果一致。根據 WHO/IUIS 過敏原的命名原則，將印度棗 1.39 kb cDNA 株註冊為 Ziz m 1，GenBank 序號為 AY839230。

本章的第二個目的是將選殖的 Ziz m 1 cDNA 轉接於 pPIC 9K (*E.coli*/Yeast shuttle) 載體，以嗜甲基酵母菌 *Pichia pastoris* KM71 製造重組 Ziz m 1 蛋白質 (rZiz m 1)。rZiz m 1 和其序列的資料，可以提供皮膚試驗和乳膠-水果交叉反應作用機轉的探討，對於臨床檢驗和將來發展免疫治療是有價值的。

## 3-2 材料與方法

### 3-2-1 印度棗 mRNA 之製備

新鮮摘下的印度棗樹嫩芽，以植物 RNA 試劑(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)萃取 total RNA，再利用 oligo-dT cellulose chromatography (Invitrogen)純化 poly A<sup>+</sup> RNA。

### 3-2-2 生體外轉譯作用(*In vitro* translation)

印度棗 mRNA 以兔子紅血球細胞液系統 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)，進行生體外轉譯作用。這個方法使用 biotin 標定在 lysine-tRNA，轉譯作用合成有 biotin 標定的蛋白質，經 SDS-PAGE 分離後，轉移在 PVDF 膜上。利用 streptavidin-peroxidase 抗體來偵測合成的蛋白質，用 luminol/iodophenol (Roche)作受質，冷光訊號壓片後，呈現在 X 光底片(Kodak)上。

### 3-2-3 構築和篩選 cDNA 基因庫

根據 Strategene 套組(Stratagene, La Jolla, CA, USA)標準步驟，以 5 µg 的印度棗 mRNA 為模板，合成雙股 cDNA。利用外加之 *Eco*RI 和 *Xho*I 切位，黏合在 λZAPII 載體，構築基因庫。根據 λ SCREEN Vector 標準方法(Novagen, Madison, WI, USA)培養 λ 嗜菌體。首先在 42 培養 4 小時後，以浸泡過 10 mM IPTG 的硝化纖維膜覆蓋，轉於 37 繼續培養 4 小時，完成誘發 λ 嗜菌體重組株之融合蛋白質的表現。在培

養皿和硝化纖維膜做 3 點標記後，小心取出，先以 TBST 緩衝液清洗 30 分鐘後，利用乳膠-印度棗過敏病人 IgE 抗體，進行免疫篩選(步驟如同前述免疫轉漬法)。呈 IgE 陽性反應之溶菌斑被分離，並再次培養及篩選確認。cDNA 的片段大小由兩條  $\lambda$  專一性的引子(T3: AATTAACCCTCACTAAAGGG 和 T7: GTAATACGACTCACTATAGG GC)，進行 PCR 增幅而得知。將單一溶菌斑，加入 25  $\mu$ l SM 緩衝液(0.1 M NaCl; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 0.01 % gelatin)，經 99 煮 5 分鐘後，取 5  $\mu$ l 進行 PCR 反應。條件如下: 94 , 1 分鐘; 55 , 1 分鐘; 72 , 2 分鐘，共 35 次循環。接著進行 72 , 6 分鐘，最後保存在 4 。以 2 % 洋菜膠/TBE 緩衝液進行產物之電泳分析。

### 3-2-4 過敏原基因定序和同源性序列分析

純化 PCR 增幅的陽性  $\lambda$  重組株 cDNA 片段，一方面利用 TA 選殖套組，黏接於 pCR2.1 載體(Invitrogen)，並以 M13 forward 和 reverse 引子進行螢光標定(ABI PRISM Dye Terminator Kit)和自動化定序(ABI 377 sequencer, Perkin-Elmer Biosystem, Warrington, UK, USA)。核苷酸序列則經 NCBI BLASTP2.2.10 程式，作同源性比對；signal peptide 和可能的 N-glycosylation sites，分別使用 SignalP3.0(Bendtsen *et al.*, 2004)和 ExPASy Proteomics 伺服器之 NetNGlyc 1.0 程式進行分析。另外利用 EMBI-EBI 伺服器之 ClustalW (1.82)程式，進行同源性

序列的線性排列。

### 3-2-5 構築和產生重組過敏原於 *Pichia pastoris* 表現系統

命名為 Ziz m 1 的  $\lambda$  重組株 cDNA coding 區域，利用已知序列設計一對引子，進行 PCR 增幅之產物，作為次轉殖之用途。引子的序列分別為：sense, 5'-AGAGAATTCATGGTTCCACAAGCCAAAC-3'; antisense, 5'-GCGGCCGCTTATGCATTCTGATACATA-3' (畫底線為引子黏合序列，外加之 *EcoRI* 和 *NotI* 接合子序列以斜體表示)。將 PCR 增幅之 DNA 片段，以限制酶 *EcoRI* 和 *NotI* 切割後，黏接於質體 pPIC9K (Invitrogen) 相對應切位。將構築的 pPIC9K/Ziz m 1 重組株質體，轉形至 *E.coli* TOP10F' 菌株，並且再次進行 DNA 序列分析，確認 Ziz m 1 分子之序列正確無誤，以及 in-frame 銜接在  $\alpha$ -factor signal sequence。以限制酶 *SaII* 將 pPIC9K/Ziz m 1 線性化後，轉形至 *P. pastoris* KM71 酵母菌株。篩選 Histidine<sup>+</sup>，同時對 G418 具有抗藥性的重組株。依據使用手冊 (Invitrogen, 25-0170) 之培養方法，以 0.5% 甲醇進行誘發重組蛋白質的胞外表現。製造 rZiz m 1 的酵母菌培養液，經 4,000g 離心 10 分鐘後，上澄液再以 0.22  $\mu$ m 過濾膜過濾。細胞分泌的蛋白質以 Amicon Ultra 離心過濾管柱 (Millipore) 濃縮，最後置換於 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 緩衝液，以 RESOURCE Q (Pharmacia, Heidelberg, Germany) 陰離子交換色層分析法純化。

### 3-2-6 陰離子交換色層分析法

根據二維電泳分析和免疫轉漬的結果，印度棗 30 和 42 kDa 過敏原都屬於酸性蛋白質。印度棗粗萃物和 Ziz m 1 重組蛋白質進一步以陰離子交換色層分析法純化，希望得到高純度的過敏原。使用 RESOURCE Q 管柱，以 FPLC 自動化系統(Pharmacia)在冷房進行。動態的緩衝液是 20 mM Tris-HCl, pH 8.0，記錄器設定的吸光值在 280 nm，收集器的流速是每分鐘 1 ml。以 0~0.5 M NaCl 在 30 分鐘完成線性梯度分離蛋白質，收集的蛋白質經 SDS-PAGE 和免疫轉漬法確認過敏原的成份。

### 3-2-7 幾丁質酶活性分析

幾丁質酶活性分析，參考 Sheng 等人的方法(Sheng *et al.*, 2002)，做部分修改。分析的原理是當幾丁質酶將膠態幾丁質完全水解後，產生 N-乙醯葡萄糖胺 (N-acetyl-D-glucosamine)，然後用呈色法測定被分解的幾丁質量，而推算出待測物之幾丁質酶活性。首先將 1 克蟹殼幾丁質粉末(Sigma)，慢慢加入 18 ml 的濃鹽酸(37%)，在 4°C 激烈攪拌隔夜後，加入預冷的 95%酒精至總體積 100 ml，完成 10 g/l 之膠態幾丁質的製備。混合 50  $\mu$ l 的待測物、50  $\mu$ l 的 10 g/l 膠態幾丁質和 350  $\mu$ l 的 100 mM Tris-HCl (pH8.0)，在 65°C 反應 15 分鐘後，經煮沸 15 分鐘以終止反應。加入 2 ml 的 1.5 mM potassium ferricyanide (Wako,

Osaka, Japan), 再次煮沸 15 分鐘, 冷卻後以光譜儀測量波長 420 nm 的吸光值。以已知濃度的 N-乙醯葡萄糖胺(Wako)所測得的標準曲線加以換算酵素的活性。每單位幾丁質酶活性的定義: 在 pH 8.0 和 60 °C 下, 每分鐘產生 1  $\mu$ mol N-乙醯葡萄糖胺。

### 3-2-8 重組過敏原對 IgE 抗體的活性分析

在生體外的實驗部分, 利用免疫轉漬抑制法和 ELISA 抑制法(Lee *et al.*, 2004), 分析並比較天然和 rZiz m 1 對乳膠-水果症候群病人血清 IgE 抗體的反應。在生體內的實驗部分, 則是進行臨床的皮膚試驗(方法見 2-2-3)

### 3-2-9 製備 rZiz m 1 抗體和進行 ELISA

多株抗體的製備同 2-2-7 所述, 除了血清中之 IgG 抗體, 再以 Protein A-agarose 進一步純化。依照標準步驟用 Anti-rZiz m 1 抗體進行 ELISA, 依序 coating 1  $\mu$ g/well 之 rZiz m 1、乳膠皮膚試劑、實驗室製備的乳膠和印度棗粗萃物。1<sup>st</sup> 抗體 Anti-rZiz m 1 使用的濃度為 1  $\mu$ g /ml, 2<sup>nd</sup> 抗體為 goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate(Sigma, 1:4000)。



### 3-3 結果

#### 3-3-1 印度棗過敏原 cDNA 的選殖

在進行印度棗和乳膠交叉性過敏原基因選殖前，先利用生體外轉譯系統，確認印度棗 mRNA 純化的品質。轉譯作用的產物經 SDS-PAGE 分析，以冷光試劑反應後，在 X 光底片所呈現的結果如圖八。經生體外轉譯合成的印度棗蛋白質，分子量主要分布在 20~50 kDa。

由 5  $\mu$ g 的印度棗 mRNA 合成雙股 cDNA，以 *Eco*RI 和 *Xho*I 切位黏合在  $\lambda$  ZAP II 載體構築基因庫。 $\lambda$  嗜菌體根據標準方法培養後，以印度棗過敏病人 IgE 抗體進行免疫篩選，呈陽性反應之溶菌斑被分離並再次篩選確認(圖九)。選殖結果共獲得 10 株溶菌斑，對 IgE 抗體呈陽性反應。由 PCR 增幅得知，cDNA 的長度在分布於 0.15 到 1.39 kb 之間(圖十)。對 10 株選殖的重組株進行核苷酸序列分析，並利用 NCBI BLASTP2.2.10 程式作同源性比對。

#### 3-3-2 過敏原 Ziz m 1 的核苷酸和胺基酸序列

由核苷酸定序的結果，發現 1.39 kb 的 cDNA clone 和許多植物的 class III chitinase 有同源性，對照 30 kDa 過敏原之蛋白質身分鑑定結果有一致性。根據 WHO 對過敏原的命名準則，訂名為 Ziz m 1。圖十一是 Ziz m 1 的核苷酸和胺基酸序列。Ziz m 1 cDNA 全長有 1223

個核苷酸，轉譯一段 open reading frame 為 330 個胺基酸的蛋白質，並且包括一段 25 個胺基酸的 leader peptide。Ziz m 1 演譯的胺基酸序列，包括 5 個可能的 N-glycosylation sites。扣除 leader peptide 後，換算成熟蛋白質的分子量為 33.86 kDa，等電點為 4.36。預估的分子量和觀察所得的分子量之間的差異，應是由於 glycosylation 的關係所致。

經由電腦進行同源性搜尋的結果，顯示 Ziz m 1 的序列和橡膠樹 *H. brasiliensis* 的 hevamine 有 45.2% 的一致性，和許多其他植物的 class III chitinases 的同源性則分別為 *Vigna angularis* (bean), 45.3%; *Capsicum annuum* (pepper), 44.7%; *Oryza sativa* (rice), 41.2%。上述的胺基酸線性排列結果如圖十二。根據 NCBI, RPS-BLAST 2.2.9 程式，關於 conserved domain 的比對，發現 Ziz m 1 和以上 4 種 class III chitinases，都屬於醣基水解酵素(glycosyl hydrolases)第 18 家族的成員。

### 3-3-3 Ziz m 1 天然和重組蛋白質的比較

將 Ziz m 1 cDNA 次轉殖於酵母菌 *P. pastoris* 的胞外表現載體系統。以 0.5% 的甲醇誘發重組蛋白質的產生。最高的蛋白質產量，出現在培養的第 6 天。培養液經過 Amicon Ultra 離心過濾管柱(Millipore)濃縮後，以陰離子交換管柱層析法純化，每 1 公升的培養液，可以得到 15 mg 的 Ziz m 1 重組蛋白質。

另一方面，也用陰離子交換管柱層析法，由印度棗粗萃物進一步純化天然的 30 kDa 過敏原(圖十三)。根據記錄器在 OD<sub>280nm</sub> 所顯示的吸光值圖譜(圖十三 A)，選擇收集管編號第 13~25 管，進行 SDS-PAGE，分析蛋白質純度和相對應的分子量(圖十三 B)。免疫偵測的結果，發現 30 kDa 過敏原出現在第 14 和 15 管，而 42 kDa 過敏原集中在第 22~25 管。

利用 SDS-PAGE 和免疫轉漬法，比較天然和 rZiz m 1 的分子特性(圖十四)。兩者在蛋白質膠片上的移動位置非常接近(圖十四 A)，同時都具備 IgE 的結合能力(圖十四 B)。

以呈色法分析純化的 rZiz m 1 專一性的幾丁質酶活性，實驗的平均值為  $1.185 \pm 0.145$  U/mg protein，這個值遠高於天然 Ziz m 1 蛋白質的 0.16 U/mg protein。

### 3-3-4 免疫抑制反應

利用免疫轉漬抑制法，以純化的 rZiz m 1 當作 inhibitor 時，對於乳膠 42 kDa 過敏原的 IgE 結合，未觀察到抑制反應(結果未列)。但是對於天然 Ziz m 1(30 kDa)，則有顯著的抑制作用(圖十五, lane b)。lane d 以 BSA 為對照組，未發生抑制反應；lane e 是非乳膠過敏病人血清，對於天然 Ziz m 1 並沒有結合作用發生。為進一步確認免疫轉漬抑制法的結果，進行 ELISA 抑制法。圖十六 A、B 和 C 分別為病例 2、6

和 7 (如表三)的結果。當病人血清事先與 2.5、5.0、10.0 和 20  $\mu$ g 等濃度的 inhibitors (曲線 a: 純化的天然 Ziz m 1, b: 印度棗粗萃物, c: 乳膠粗萃物)作用後，對於 rZiz m 1 都有顯著的抑制反應。

### 3-3-5 rZiz m 1 的過敏試驗

本研究共收集 8 位乳膠-印度棗過敏病人，分別進行生體外的血清 IgE 偵測，以及生體內的皮膚試驗，結果整理在表三。用 CAP-FEIA 或 in-house EIA 的方法，偵測病人血清分別對於乳膠、印度棗粗萃物和 rZiz m 1 的 IgE 效價。所有的病人都有增高的乳膠和印度棗專一性 IgE 值，數據分別為 0.66~27.4 和 0.60~25.0 kU/l。對於 rZiz m 1，有 1 位低於 0.35 kU/l (故定義為陰性反應)；其他 7 位的數據為 0.87~25.3 kU/l。以 rZiz m 1 進行皮膚試驗，呈陽性反應率為 87.5% (7/8)。對照組為 10 位非乳膠過敏受檢者，對於 rZiz m 1 均呈陰性皮膚反應。病例 1 對乳膠和印度棗粗萃物，都有專一性的 IgE 抗體和陽性皮膚反應，但對於 rZiz m 1 則不反應。

### 3-4 討論

由印度棗 mRNA 構築 cDNA 基因庫，選殖出的 Ziz m 1 cDNA，全長為 1223 個核苷酸，轉譯的蛋白質有 330 個胺基酸，其中前 25 個為 signal peptide。成熟的 Ziz m 1 蛋白質分子量為 33.86 kDa，等電點為 4.36。雖然未發現 Ziz m 1 和其他已知過敏原有相似的序列，但是和許多植物的 class III chitinases 有 39~45.3 % 的同源性，例如橡膠樹的 hevamine (45.2%)，和豆類、辣椒、稻米的 class III chitinase 分別有 45.3 %、44.7 % 和 41.2% 的一致性胺基酸序列。

根據 NCBI conserved domain 搜索的結果，發現 Ziz m 1 屬於第 18 類糖苷分解酵素。此家族的 class III chitinases，都具有一個 chitinases – family - 2 motif: [LIMFY]-[DN]-G-[LIVMF]-[DN]-x-E (Henrissat, 1991)。Ziz m 1 也有相對應的 motif: <sup>146</sup>LDGIDLDIQ<sup>154</sup>，唯一的不同是在第 154 胺基酸為 glutamine (Q) 而不是 glutamic acid (E)。乳膠過敏原 hevamine 也是一種 class III chitinase，但是有一篇文獻，報告純化的天然 hevamine 成分，對於乳膠病人 IgE 的反應只有 1/29，因之歸類為非主要過敏原 (Alenius *et al.*, 1995)。

幾丁質(chitin)是由 1000~3000 個 *N*-acetyl-D-glucosamine 的單元體，以  $\beta$ -1,4 鍵結所構成的高分子醣類，在自然界的含量僅次於纖維素(cellulose)，是真菌細胞壁和節肢動物外骨骼的主要成分(Robertus & Monzingo, 1999)。幾丁質酶(Chitinases, poly- $\beta$ -1,4-(2-acetamido-

2-deoxy)-D-glucoside glycanohydrolases)普遍存在許多生物體，扮演許多重要的功能(Collinge *et al.*, 1993; Hamel *et al.*, 1997)。例如細菌體內的 chitinases，能夠分解 chitin 作為生長的能量來源；真菌的 chitinases 和細胞分裂有關，同時參與一些致病過程。許多研究指出，當植物遭受到病毒、病原菌或機械傷害時，都會刺激植物大量生產 chitinases，具有防禦的功能。在植物的 chitinases，依據初級構造分為 5 種(class I~V, 附錄五)；參考酵素的作用特徵，又分屬於第 18 和 19 兩種糖苷分解酵素家族(Hamel *et al.*, 1997)。Class III 和 V 屬於 family 18，class I、II 和 IV 屬於 family 19。5 種 chitinases 都具有 signal peptide，class I, II 和 IV 有同源性的 catalytic domain。Class I 和 IV 有一個 hevein domain (chitin-binding domain)，class V 有二個 hevein domain，而 class II 和 III 則沒有 hevein domain。Class III 同時具有 lysozyme 和 chitinase 兩種酵素活性，但是和其他幾種 chitinases 並無序列的同源性(Jekel *et al.*, 1991; Hamel *et al.*, 1997)。

利用 *Pichia pastoris* 表現系統，製造 Ziz m 1 重組蛋白質(rZiz m 1)。實驗結果證明 rZiz m 1 和純化的 30 kDa 蛋白質都具有 chitinase 的活性、擁有和 IgE 的結合能力、以及對乳膠粗萃物有交叉性反應。植物的 class III chitinases 和 hevamine 都具有防禦病原菌的功能，被分類為 PR-8。已知許多植物的過敏原都是 PR 蛋白質(Ebner *et al.*,

2001)，而 PR 蛋白質在乳膠-水果交叉性過敏反應，被認為扮演重要角色 (附錄四) (Yagami, 2002)。但是 class III chitinases 和 hevamine 從未被報導和乳膠-水果症候群有關。將來還需要更多的研究來證明 class III chitinases-related 過敏原，在這類交叉性反應的作用機轉。許多農業生物學家嘗試將 chitinases 基因表現在各種農作物，提高其抗病防禦能力 (Schickler & Chet, 1997)。目前對於許多 chitinases 的過敏致病機轉並不清楚，這種基因轉殖植物對於過敏症患者很不安全，值得注意。

這是第一個選殖印度棗全長 cDNA 的報告。利用 rZiz m 1 製成皮膚試劑，對 10 位非乳膠過敏研究室人員的測試結果，都呈現陰性反應，證明重組過敏原的安全性。對於 8 位乳膠-印度棗過敏的病人，陽性率則高達 87.5% (7/8)，只有一位對 rZiz m 1 沒有專一性 IgE 反應。根據 WHO/IUIS 的定義，只要受試者有高於 50% 的陽性反應，就是主要過敏原 (King *et al.*, 1995)。所以 Ziz m 1 應該是 *Z. mauritiana* 的主要過敏原之一。

由本章的結果，不免產生新的疑問：為什麼台灣醫護人員對 hevamine 特別敏感呢？某種蛋白質之所以會成為過敏原，包括許多因素：過敏原的分子特性、暴露的劑量和頻率、環境的因素、個人免疫的背景和遺傳的控制等等 (Huby *et al.*, 2000)。最近有報告指出，在西

班牙乳膠-水果症候群病人，其 HLA class II 的特定區域，相較於只有乳膠過敏者，有顯著的表現差異(Blanco *et al.*, 2004)。目前我們正在收集病人和正常人的 genomic DNA，將來希望進行 HLA class II typing，尋找台灣人是否有特定的表現型態。某些過敏原特別重要與否，必須根據”致敏的源頭(origin of sensitization)”而定(Chardin *et al.*, 2002)。下一章將探討醫護人員最主要暴露的乳膠過敏來源：乳膠手套的過敏原種類。



## 第四章 鑑定台灣醫護人員乳膠手套的主要過敏原

### 4-1 前言

在第三章的研究中，選殖和表現印度棗 30 kDa 過敏原 Ziz m 1。經由電腦資料庫比對，發現和乳膠過敏原 hevamine 具有約 45% 同源性。已知的研究報告認為 hevamine 並非西方國家主要乳膠過敏原 (Alenius *et al.*, 1995)；但是我們的研究發現，Ziz m 1 在台灣受試病人的盛行率高達 87.5% (Lee *et al.*, 2006b)。由於醫護人員的乳膠過敏症，導因於重複接觸或吸入殘留在乳膠手套的蛋白質。但是目前關於各種乳膠製品的過敏原成分，並不清楚 (Yip & Cacioli, 2002)，在台灣更沒有關於乳膠手套中過敏原種類的研究。雖然有超過 30 種天然乳膠過敏原曾被報導 (Wagner *et al.*, 2002)，但是在複雜的製造過程中，是否可能都被保留在成品中，是值得懷疑的。

乳膠過敏症在歐美醫護人員的盛行率約為 2~17%，在台灣報告是 6.8 和 8.6% (Lai *et al.*, 1997; Chen & Lan, 2002)，並不亞於西方國家。相對於自 1990 年以來，其每年平均 130-160 篇文章的發表 (Ownby, 2002)，台灣對於這種職業病的重要性實在被忽略了。本章的研究目的是分析乳膠手套的過敏原成分，並利用蛋白質體學的方法，進行過敏原蛋白質的身分鑑定。

蛋白質體學 (Proteomics) 的方法，已經被有效地運用在花粉和乳膠

過敏原的研究(Raftery *et al.*,2003; Yagami *et al.*, 2004)。傳統蛋白質的研究方法，需要純化單一過敏原才能鑑識特性，整個過程十分複雜、繁瑣和耗時。運用蛋白質體學的技术，將複雜的蛋白質混合物，以高解析度的二維電泳分離後，經免疫轉漬用病人 IgE 抗體偵測過敏原的位置，就可以很容易將標的物切出，以專一性酵素(例如 trypsin)分解後，由質譜儀分析胜肽片段，最後進入資料庫找尋相關蛋白質(Yagami *et al.*, 2004)。因為蛋白質資料庫的資料快速增加，使蛋白質身分鑑定的成功率愈來愈高。

## 4-2 材料和方法

### 4-2-1 製備乳膠手套粗萃物

本實驗收集台中榮總經常使用的 3 種乳膠手套廠牌(PROTOS, Indonesia; DE CROWN, Malaysia; ENCHS, Indonesia)，共萃取 8 個不同批號的乳膠手套蛋白質。首先將 100 克的手套，剪成 0.5 平方公分的小碎片，混合 500 ml PBS, pH 7.4，在 37°C 攪拌 1 小時後，置於 4 °C 攪拌隔夜。經 4,000g 離心 30 分鐘，去除手套碎片。上澄液以 0.45  $\mu\text{m}$  過濾膜過濾(Millipore)後，利用 Amicon Ultra 離心過濾管(cut-off 10 kDa)濃縮 150 倍。以 Bio-Rad Bradford assay 套組，測量蛋白質濃度，用 BSA 做定量標準曲線。

### 4-2-2 皮膚試驗和乳膠專一性 IgE 抗體

分別以臨床使用的乳膠粗萃物(100 IR/ml, Stallergenes SA, France)和實驗室製備乳膠手套粗萃物(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in 50% PBS-glycerol)進行皮膚試驗。本實驗經台中榮總人體試驗委員會核可的序號為 IRB TCVGH No 930902/384。共有 20 位對乳膠過敏的醫護人員和 10 位正常未過敏的本院員工參與研究。臨床上用 CAP-FEIA (Pharmacia Diagnosis, Sweden)的方法，測量病人血清中乳膠過敏原專一性 IgE 抗體的濃度。實驗室製備的乳膠手套粗萃物，對病人血清專一性的 IgE 濃度，則利用 EAST 套組(Allergopharma, Reinbek, Germany)來分析。

病人血清儲存在-70°C備用。

#### 4-2-3 蛋白質電泳和免疫轉漬分析

8種手套粗萃物，以標準的 SDS-PAGE 方法(Laemmli, 1970)，分析蛋白質組成分。選擇 5 位乳膠過敏病人血清混合，進行免疫轉漬，偵測 IgE 結合蛋白質。對於手套粗萃物過敏原的盛行率分析，實驗組是 20 位病人個別血清，另以 10 位非乳膠過敏症的血清混合液，作為陰性對照組，進行免疫轉漬法。將等量的手套蛋白質(30 µg/lane)，以半乾式轉漬法，轉移在 21 條 0.5 公分寬的 PVDF 膜，以 5%的脫脂奶粉反應 1 小時後，分別加入 2 ml 經 10 倍稀釋的 20 位病人個別血清，或對照組血清，置於 4°C 隔夜。二級抗體為標定鹼性磷酸酶的 mouse anti-human IgE 單株抗體(1:2000, PharMingen, San Diego, CA, USA)。鹼性磷酸酶的呈色反應液，是 100 mM Tris-HCl, pH 9.5 含 165 µg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP, Sigma) 和 330 µg/ml nitroblue tetrazolium (NBT, Sigma)。

#### 4-2-4 二維電泳和質譜儀分析

手套粗萃物的二維電泳分析方法同 2-2-8。免疫偵測用鹼性磷酸酶冷光偵測試劑(Applied Biosystem, Bedford, MA, USA)，在 X 光底片顯現結果。質譜儀分析和胜肽質量指紋鑑定方法和 2-2-9 相同。

## 4-3 結果

### 4-3-1 病歷資料和 IgE 抗體

20 位病人的病歷資料、皮膚試驗和乳膠專一性 IgE 抗體的偵測結果，列於表四。由於工作性質的因素，這些病例需要經常使用乳膠手套，導致對乳膠過敏原產生立即性過敏反應。最常見的臨床症狀是過敏性鼻炎和氣喘，只有一位牙醫師曾經發生幾乎致命的過敏性休克。所有病人對臨床的乳膠試劑和手套粗萃物的皮膚試驗都呈陽性反應。利用 CAP-FEIA 或 EAST 套組都可以偵測到增高的乳膠專一性 IgE 抗體。10 位非乳膠過敏症的對照組，乳膠皮膚試驗都呈陰性反應，乳膠專一性 IgE 抗體也都低於標準值( $<0.35\text{kU/l}$ )。

### 4-3-2 乳膠手套蛋白質和過敏原分析

本實驗所製備的 8 種乳膠手套粗萃物，經 SDS-PAGE 分析後，用銀染所呈現的蛋白質圖譜，如圖十七 A 所示，分子量分布在 13~71 kDa 之間。8 種乳膠手套粗萃物的蛋白質圖譜相當一致，每克乳膠手套的蛋白質總量在 25~145  $\mu\text{g}$ 。免疫轉漬的結果，有 3 個專一性的 IgE 結合蛋白質(圖十七 B)，在 8 種乳膠手套粗萃物的分布，出現顯著的差異性。14、30 和 45 kDa 過敏原在 8 種手套粗萃物的發生率，分別是 100% (8/8)、50% (4/8)和 50% (4/8)。選擇反應最顯著的一種乳膠手套粗萃物(圖十七, lane 5)進行個別血清的 IgE 免疫轉漬實驗。圖十八的

lane 1-20 為表四的 20 位病例，14、30 和 45 kDa 過敏原分別和 85% (17/20)、55% (11/20)和 10% (2/20)的病人血清 IgE 反應。10 位非乳膠過敏對照組的血清混合液，並沒有出現任何乳膠蛋白質和 IgE 的結合反應。

#### 4-3-3 二維電泳和過敏原蛋白質身分鑑定

乳膠手套粗萃物(圖十七, lane 5)，經二維電泳分析後，3 種過敏原的等電點分別是：14 kDa, pI 6.1-6.8；30 kDa, pI 5.4-8.7；45 kDa, pI 5.2 (圖十九)。選擇 5 位代表的病人血清，所呈現的二維電泳 IgE 圖譜如圖十九(Patient no. 1, 3, 6, 8, 20)所示。將相對應的 14、30 和 45 kDa 蛋白質由銀染的二維電泳膠切下，經胰蛋白酶分解產生的胜肽片段，由 ESI-MS/MS 分析後，胜肽圖譜指紋比對的結果列於表四。乳膠手套 14 kDa 蛋白質，得到二段胜肽的質譜訊號 810.9 和 580.0 m/z，被鑑定為 *H. brasiliensis* 之 rubber elongation factor (Hev b 1, GenBank gi:132270)，胜肽序列  $^2$ AEDNQQGQGEGLK<sup>16</sup> 和  $^{100}$ DASIQVVSAIR<sup>110</sup>。利用同樣的技術，30 kDa 蛋白質得到 6 段胜肽的質譜訊號 666.5, 680.5, 806.09, 818.25, 905.55, 1255.8 m/z；45 kDa 蛋白質得到 5 段胜肽的質譜訊號 550.1, 606.53, 909.28, 952.4, 1061.2 m/z；分別鑑定為已知乳膠過敏原 hevamine (29.5 kDa, pI 8.4; GenBank gi:234388)和 Hev b 13 (43.3 kDa, pI 5.0; GenBank gi:30909057)。以上結果見表五。

#### 4-4 討論

這是第一個針對台灣醫護人員乳膠過敏原圖譜的研究。由台中榮民醫院經常使用的 3 種不同品牌，共 8 個不同批號的乳膠手套，以相同方法製備的粗萃物，在銀染之 SDS-PAGE 上所呈現的蛋白質圖像，相當一致。十分訝異的是，經由免疫轉漬後，IgE 結合蛋白質的類型，卻有很大差異性。這個結果顯示每批手套的過敏原濃度並不相同，如果只由蛋白質濃度或種類評論手套過敏原含量，並不能反映真實情況。已發表的乳膠手套每克蛋白質含量，變化很大，有些少於  $75 \mu\text{g}$ ，有些甚至高達  $7500 \mu\text{g}$  (Yunginger *et al.*, 1994)。在手套的製造過程，會導致乳膠原料中蛋白質的變性，所以成品中的過敏原圖譜可能和原料中的不同(Tomazic *et al.*, 1995; Muguerza *et al.*, 1996)。目前的研究資料中，無法設定一個所謂的「安全標準」去規範乳膠蛋白質的含量，除非直接測定真正的過敏原(Yunginger *et al.*, 1994; Baur *et al.*, 1997; Palosuo *et al.*, 1998)。

乳膠過敏症已經是一個公認的重要職業病。許多對於乳膠過敏原的發表，認為主要過敏原為 Hev b 2、Hev b 5、Hev b 6.01、Hev b 6.02 和 Hev b 13(Yeang, 2004)。Hev b 13 是一種 43 kDa 的醣蛋白，生化活性為 lipolytic esterase，是 2004 年才被選殖出的最新乳膠過敏原(Arif *et al.*, 2004)；在早期的研究中，因為分子量和 Hev b 7 (42.9 kDa)十分接

近，被訂名 Hev 7b (Yeang *et al.*, 2000)。Bernstein 等人報告 Hev b 13 對於 63%的受試者有陽性皮膚反應，應該是醫護人員的主要過敏原 (Bernstein *et al.*, 2003)。我們的實驗結果發現，Hev b 1 (14 kDa)和 hevamine (30 kDa)才是主要乳膠手套過敏原。對於 45 kDa (Hev b 13)過敏原只和 10%受試者血清有反應，應該屬於非主要過敏原(Lee *et al.*, 2006a)。

14 kDa 過敏原蛋白質身分鑑定的結果是 rubber elongation factor (REF, Hev b 1)，是最早被命名的乳膠過敏原(Czuppon *et al.*, 1993)。當 1993 年發表 Hev b 1 時，許多科學家認為乳膠過敏症一定可以很快被控制，事實上陸續又發現了更多乳膠過敏原(2004 年為止，已經有 Hev b 13)，而且應該還有更多未被證實，這種過敏病的致病來源似乎比預期中複雜許多。已發表的 Hev b 1 分子量為 14.6 kDa，pI 值為 4~5 (Posch *et al.*, 1997)。在我們的 2D-PAGE，其 pI 值估計為 6.1~6.8。Chardin 等從乳膠床墊萃取的 Hev b 1 之 pI 值，分布在 5.7~大於 8.3，並認為它是乳膠製品最後被遺留的蛋白質(Chardin *et al.*, 2000)。我們的結果也發現乳膠手套粗萃物中，Hev b 1 的確是最多的水溶性蛋白質之一，同時也是台灣醫護人員的主要過敏原。

Hevamine 是一個來自巴西橡膠樹管狀乳膠細胞(lactifers)的特殊胞器 luteoids 中的 30 kDa 蛋白質，同時擁有 lysozyme 和 chitinase 兩種



酵素的活性(Jekel *et al.*, 1991)，它一直被認定是一個非主要乳膠過敏原(Alenius *et al.*, 1995)。本章的研究結果發現，hevamine 顯著存在乳膠手套的粗萃物中，而且對於受試者血清有 55%的反應率。根據 WHO/IUIS 的定義，hevamine 應該是乳膠主要過敏原(King *et al.*, 1995)。

總結本章內容，以免疫轉漬法鑑識出 3 種乳膠手套過敏原，結果證明 hevamine (30 kDa)和 Hev b 1 (14 kDa)是台灣乳膠手套重要過敏原，和西方國家顯然不同。東西方乳膠過敏原圖譜的差異，有許多因素值得探討，例如環境和遺傳等等。現在對於乳膠過敏症並沒有根治的方法，「避免(prevention)」是最好的治療，但是這幾乎是不可能達成的，因為乳膠製品充斥在我們的工作環境和居家環境中。退而求其次，降低暴露於過敏原的機率是非常重要的。欲達成這個目標，首先必須有效的評估乳膠製品之”allergenicity”。對於乳膠手套過敏原的了解，將可以幫助乳膠製品的生產業者，發展低過敏原的製品。另一方面，也希望主管單位可以對乳膠製品專一性的過敏原，訂定適當的限制和規範。

## 第五章 結論與展望

### 5-1 前言

過去 20 年來，在歐洲和北美洲對乳膠過敏症已經有詳細的研究，許多專業的指導方針，成功的降低醫護人員的致病風險(Wagner & Breiteneder, 2005)。反觀其他發展中的國家，由於高度發展經濟的企圖心和技術的標準化，大量增加乳膠產品的使用，可能在醫護人員之外，發生第二波乳膠過敏症的流行高潮，例如人口密集的中國大陸、台灣、東京和波蘭(Rolland *et al.*, 2005)。因此對於乳膠過敏原的基礎研究、開發新的檢驗方法和專一性的免疫治療，是十分重要的。

目前有 5 篇使用天然乳膠粗萃物治療乳膠過敏症的報導，雖然證明有臨床的效用，但是仍然存在局部或全身性過敏反應的風險，需要審慎的評估(Rolland *et al.*, 2005)。為了製備安全有效的乳膠專一性免疫治療試劑，首先必須充分了解天然乳膠過敏原成分。已經登錄的乳膠過敏原只有 13 種([www.allergen.org](http://www.allergen.org))，而不同的受試病人族群，不同的分析方法，以及使用天然或重組過敏原等等因素，造成乳膠過敏原對於 IgE 結合的盛行率有很大的差異性(Wagner & Breiteneder, 2005)。對於 spina bifida 病人而言，Hev b 1 和 Hev b 3 是臨床重要的乳膠過敏原(Yeang *et al.*, 1996)；而 Hev b 5、Hev b 6.02 (即 Hev b 6 之 hevein domain)和 Hev b 13 則是醫護人員主要過敏原(Yeang *et al.*,

2004)。不同族群間呈現不同的乳膠過敏原反應圖譜，可能導因於不同乳膠製品的過敏原成分差異、暴露的路徑和許多 cofactors。此外，有超過 20 種植物性食物，可能和乳膠產生交叉性反應；如果乳膠過敏病人只是避免天然乳膠的接觸，仍然無法排除交叉性食物過敏的可能性。目前對於乳膠和水果發生交叉性反應的分子基礎了解十分有限，已知的 IgE 交叉性反應成份例如：Hev b 13 的 carbohydrate moiety 和馬鈴薯的 patatin 有相似的構造(Arif *et al.*, 2004)；Hev b 2 是一種  $\beta$ -1,3-glucanase，和來自番茄、馬鈴薯、香蕉等水果，以及許多植物的花粉，都發生同源性蛋白質的交叉反應(Palomares *et al.*, 2005)；Hev b 6 和 Hev b 11 都具有 N 端 hevein-like domain，是目前已經確認參與乳膠-水果症候群的交叉性反應構造(Karisola *et al.*, 2005)。

根據第二~四章一系列的實驗，我們選殖和表現一種主要的印度棗過敏原 Ziz m 1，它擁有和 IgE 結合的能力，具有 chitinase 的活性，屬於第 18 類糖苷分解酵素家族成員之一；胺基酸序列的比對和乳膠過敏原 hevamine 有 45%的一致性(Lee *et al.*, 2006b)。在乳膠手套過敏原的分析中，證實 hevamine 是台灣醫護人員主要過敏原之一，和西方國家顯然不同(Lee *et al.*, 2006a)。究竟是哪些分子構造會引起這兩種過敏原的交叉性反應？接下來我們先將研究的焦點集中在 Ziz m 1 分子之 B 細胞抗原表位的分析。

## 5-2 Ziz m 1 之 B 細胞抗原表位的研究

### 5-2-1 構築 Ziz m 1 突變株

為了快速達到構築 Ziz m 1 突變株的目的，選擇使用 pET-30 表現載體系統(Novagen, Madison, WI, USA)。首先設計三組引子依序是突變 1：sense, 5'AGAGAATTC<sup>140</sup>GGTGGCATAGCAACCTAC<sup>157</sup>3'; antisense, 5'*GCG GCCGC*<sup>661</sup>TGTCCAAAGATAAGCGTC<sup>642</sup>3'。突變 2：sense, 5'AGA *GAATTC*<sup>419</sup>GTTGCAGAGCAACTGTGG<sup>436</sup>3'；antisense, 5'*GCGGCCG C*<sup>904</sup>CACCGAAACAATTTGATC<sup>887</sup>3'。突變 3：sense, 5'AGAGAATTC<sup>776</sup>GATTGGACTGTGTCGCTT<sup>793</sup>3'; antisense, 5'*GCGGCCGC*<sup>1057</sup>TTAT GCATTCTGATACATA<sup>1039</sup>3' (畫底線為引子黏合序列，外加之 *EcoRI* 和 *NotI* 接合子序列以斜體表示)。以 PCR 增幅，產生三段相互重疊的片段，相對於 Ziz m 1 的位置依序是 26~199 胺基酸 (突變 1)、119~280 胺基酸 (突變 2) 和 238~330 胺基酸 (突變 3)。用 *EcoRI* 和 *NotI* 限制酶切位黏合於 pET-30a 載體，並轉形至 *E. coli* BL21(DE3) 菌株中。

### 5-2-2 製造和純化融合蛋白質於 *E. coli* 表現系統

利用 pET-30 在融合蛋白質的 N 端和 C 端都帶有 6 個 histidine residues (稱為 His-tag sequences) 的特殊設計，可以結合到 Ni<sup>2+</sup> metal chelation resin，純化重組過敏原。重組株接種在含 25 µg/ml kanamycin

的 LB 培養基，在 37°C 生長至 OD<sub>600</sub> 達 0.6~1.0 時，加入 0.4~1.0 mM IPTG 誘導融合蛋白質的表現。經 8 小時產生的融合蛋白質達最佳效率，但是形成不可溶的 inclusion bodies，根據 Novagen 套組之建議方法進行純化。以 8,000 g 離心 10 分鐘，倒去培養基，將細胞懸浮於 binding buffer (5 mM imidazole; 0.5 M NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 7.9; 0.1% NP-40)。利用超音波振碎細胞，經 14,000 g 離心 15 分鐘後，將 inclusion bodies 懸浮於含 6 M urea 的 binding buffer，放在冰上 3 小時使蛋白質完全溶解後，進行親合性層析法純化重組過敏原。

### 5-2-3 Ziz m 1 突變株對 IgE 抗體的活性分析

純化的重組過敏原利用免疫轉漬法分析對乳膠-水果症候群病人血清 IgE 抗體的反應，結果列於圖二十。Lane 1 是去除 leader peptide 的 Ziz m 1 融合蛋白質，lane 2、3 和 4 則分別是突變株 1、2 和 3。免疫轉漬的結果證明：突變株 2 喪失與 IgE 結合的能力，而突變株 1 和 3 仍具有 IgE 的結合反應。初步的結果預測 Ziz m 1 分子的 B 細胞抗原表位可能有兩個區段，N 端位於第 26~119 胺基酸，而 C 端位於 280~330 胺基酸之間。雖然已經縮短了 Ziz m 1 抗原表位的範圍，但一般而言，IgE 的結合位應該只有 8~15 個胺基酸，我們正設計一系列的實驗，希望找出正確的 B 細胞抗原表位。

## 5-3 未來的研究方向

### 5-3-1 過敏原之 B 細胞抗原表位

由 IgE 抗體所媒介的立即型過敏病代表第 I 型的過敏症，影響全球超過 25% 的人口 (Deinhofer *et al.*, 2004; Valenta & Kraft, 2004)。過敏病人由於過敏原的重複刺激，造成專一性 IgE 抗體的激增，導致嚴重的臨床症狀。立即性反應的發生，主要是由於 IgE 抗體黏合在作用細胞表面的  $Fc \epsilon RI$  受器，等待過敏原的結合。必須有二個過敏原的抗原表位交叉連結在 IgE 的結合位，方能活化作用細胞，釋放生物性中間介質(例如 histamine 和 leukotrienes)，引起發炎反應。基本上 IgE 抗體是血清中最少量的免疫球蛋白，如果不經過 IgE 和過敏原之間的交互作用，產生細胞性增幅機轉，很難造成過敏反應的影響。利用重組 DNA 的技術，可以了解過敏原的分子特性。許多研究發現，各種不同的過敏原可能具有相似的抗原表位，如果可以使用少數具代表性的 cross-reactive model allergens，對於臨床的檢驗和治療將有重要的改進 (Valenta *et al.*, 1998)。如果可以避免過敏原和 cell-bound IgE 抗體間的交互作用，也是專一性免疫治療可以嘗試的方向。

基本上，過敏原的 IgE epitopes 有兩種類型：continuous epitopes, 為一小段連續的胺基酸序列(8-15 個)；discontinuous epitopes, 至少由二個不同區域的分子因折疊而構成的三級構造。對於 continuous

epitopes 的研究，可以經由分析相互重疊的胜肽片段對於 IgE 的結合能力而決定(見 5-2 的內容)。對於 discontinuous epitopes 的分析方法比較困難，目前只有極少數的過敏原經由 X-ray crystallography 和 NMR 決定三級結構(Aalberse, 2000)。蛋白質的三級穩定構造主要依賴雙硫鍵，最近有一篇報告，將乳膠過敏原 Hev b 6.02 (hevein domain)之 4 個 cysteine residues，以 alanine 替換，破壞 IgE-reactive 區域的雙硫鍵橋，成功產生 hypoallergen (Drew *et al.*, 2004)。由 Ziz m 1 分子的胺基酸序列得知共含有 6 個 cysteine residues (見圖十一)，其中 4 個位於突變株 1，有 2 個位於突變株 2。由 *E. coli* 的表現系統發現，在突變株 1 具 continuous epitopes，是否還有 discontinuous epitopes 呢？未來將重新構築突變株 1，採用 Drew 等人的方法，以 alanine 取代 cysteine，並利用 *P. pastoris* 表現系統，產生正確摺疊和醣化的重組過敏原，分析 IgE 的結合能力。根據實驗所推估之 IgE 抗原表位(8~15 胺基酸)，將以自動化合成方法，產生胜肽片段(Applied Biosystems 432A peptide synthesizer)；將以 basophil 的活化分析，進一步確認是否以 alanine 取代 cysteine 之後的 B cell epitope，可以改變對 IgE 的反應力，並保留對 T 細胞的免疫刺激能力，將來可以開發成為安全的減敏試劑。

### 5-3-2 過敏原的臨床檢驗方法

第 I 型的過敏病是由各種不同的過敏原所導致，常見的來源包括

花粉、塵蟎、乳膠、食物、蟑螂、黴菌、貓或狗的毛屑和昆蟲毒素等等。現在最常見的過敏原成分，大都可以由重組 DNA 的技術生產，提供多種過敏原的測試使用。但是目前最常用的臨床過敏原試驗系統(例如 Pharmacia CAP-FEIA)，每次只能提供單一種或有限的過敏原檢查，除了消耗大量的血清外(每種過敏原測試需要 50  $\mu$ l)，十分繁瑣又費時。最近的報導利用微矩陣的技術，可以在一個 7×7 mm 的玻璃片上，點 400 種不同的重組過敏原(1  $\mu$ l/spot, 2  $\mu$ g)，只需使用 20  $\mu$ l 的血清(Deinhofer *et al.*, 2004)。推廣 Chip-based allergy diagnosis，可能只需要一次檢驗，就可以建立個人的過敏原 IgE 反應圖譜，對於過敏病的診斷將有很大的幫助。當前發展過敏原微矩陣試驗最大的困難是各種重組過敏原的整合，收集完整的過敏原種類，才能真正發揮最大效益。當然本文所選殖的 Ziz m 1 分子也將是其中重要的成員之一。

醫護人員是乳膠過敏症和乳膠-水果症候群的高危險群。由第四章的研究發現：Hev b 1 和 hevamine 是台灣醫護人員主要乳膠過敏原；而印度棗過敏原 Ziz m 1 分子則含有主要乳膠和水果的交叉性過敏原成分。建議將 Hev b 1 和 Ziz m 1 加入醫護人員每年的健康檢查之常規篩檢項目，希望可以早期診斷乳膠過敏症和乳膠-水果症候群的發生，以便及時治療；同時必須避免持續重覆刺激，以免病情惡化影響工作。



### 5-3-3 過敏原專一性免疫治療

發展以過敏原為主的專一性免疫治療(SIT)已經行之有年(從1967年至今)，包括早期以 chemical modification 天然過敏原，例如 alum 或 mineral oil precipitation、urea denaturation、PEG conjugation 等等(Akdis & Blaser, 2000)。SIT 通常需要持續進行追加劑量 3~5 年，雖然許多研究肯定對於第 I 型過敏病的療效，但是根據過敏原的種類不同而有很大的差異，最大的危險因子是造成過敏性休克。從 1990 年之後，由於分子生物技術的進步，許多研究分別以 structural modification 之重組過敏原進行有效又安全的免疫治療試驗(見 1-3-4)。目前將 hypoallergens 應用在乳膠過敏症的 SIT，只集中在少數的乳膠過敏原，包括 Hev b 1、Hev b 3、Hev b 5、Hev b 6.01、Hev b 6.02 和 Hev b 13 (Rolland *et al.*, 2005)。另外，以 DNA-based 的免疫治療，在疫苗中添加 immunostimulatory DNA 序列(CpG motifs, 屬於微生物常見的序列，但很少發生在哺乳類的基因體中)，模擬自然感染的路徑(hygiene hypothesis)，可以提高 Th1 免疫反應，因此增加治療的效用，目前尚未應用在乳膠過敏症的治療(Homer *et al.*, 2001)。

Hevamine 在歐美國家的研究中，被列為非主要過敏原，故未曾深入探討。針對台灣醫護人員的乳膠過敏症治療，Hev b 1 和 hevamine 的 T 和 B 細胞抗原表位，則有必要進一步研究和開發專一性的疫苗。

## 5-4 結論

這是一篇關於印度棗和乳膠產生交叉性過敏反應的研究。在第二章的實驗中，利用免疫轉漬抑制法，鑑識分子量為 30 和 42 kDa 的印度棗-乳膠交叉性過敏原。在第三章，利用 8 位乳膠-水果症候群病人血清，篩選印度棗 cDNA 基因庫，成功選殖分子量 30 kDa 的交叉性過敏原，命名為 Ziz m 1 (GenBank 序號：AY839230)。利用 *Pichia pastoris* 表現系統，製造 Ziz m 1 重組蛋白質。實驗結果證明 rZiz m 1 和純化的 30 kDa 蛋白質都具有 chitinase 的活性、擁有和 IgE 的結合能力、以及對乳膠粗萃物有交叉性反應，對病人皮膚試驗的陽性率為 87.5%。第四章，鑑定台灣醫護人員乳膠手套的主要過敏原為 Hev b 1 和 hevamine。Ziz m 1 和 hevamine 有 45% 的同源性，可能具有引起交叉性反應的構造，需要更深入的研究。第五章，以 *E. coli* 表現系統重新構築 Ziz m 1 的突變株。在免疫轉漬法實驗中，雖然具有 IgE 的結合能力，但是對病人的皮膚試驗反應差，也喪失 chitinase 的活性(實驗結果未列)。比較真核和原核生物表現系統，主要差異在後轉譯修飾作用。已知 Ziz m 1 屬於 glycoprotein，目前醣化作用對於 allergenicity 的影響並無定論。例如牧草花粉主要過敏原 Phl p 13，醣化和非醣化的形式，對於 IgE 的結合率分別是 50% 和 21%。對於塵蟎主要過敏原 Der f 1 則似乎並不影響(Cromwell *et al.*, 2004)。我認為重組過敏原

作為檢驗試劑時，愈接近天然過敏原的形式(包括醣化和三級構造)，愈能夠做正確的過敏原診斷，所以真核表現系統是較佳的選擇。當重組過敏原作為減敏疫苗時，減少醣化和改變 conformation，反而可以減少過敏性休克的風險，此時原核的表現系統反而更具優勢。將來我們將審慎評估 Ziz m 1 重組過敏原在檢驗和治療的應用。

## 參考文獻

- Aalberse RC. Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:228-238.
- Aalberse RC., Akkerdaas JH., van Ree R. Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. *Allergy* 2001; 56:478-490.
- Akasawa A., Hsieh LS., Martin BM. A novel acidic allergen, Hev b 5, in latex. Purification, cloning and characterization. *J Biol Chem* 1996; 271:25389-25393.
- Akdis CA., Blaser K. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy* 2000; 55:522-530.
- Alenius H., Kalkkinen N., Lukka M., Reunala T., Turjanmaa K., Makinen-Kiljunen S., Yip E., Palosuo T. Prohevein from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is a major latex allergen. *Clin Exp Allergy* 1995; 25:659-665.
- Alvarado M., Moneo I., Gonzalo I., Alvarez-Eire M., Diaz-Perales A. Allergy to azufaifa fruit and latex. *Allergy* 2002; 57:460-461.
- Arif SAM., Hamilton RG., Yusof F., Chew NP., Loke YH., Nimkar S., Beintema JJ., Yeang HY. Isolation and characterization of the early nodule-specific protein homologue (Hev b 13), an allergenic lipolytic esterase from *Hevea brasiliensis* latex. *J Biol Chem* 2004; 279:23933-23941.
- Arthur JM. Proteomics. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12:423-430.
- Baur X., Chen Z., Raulf-Heimsoth M., Degens P. Protein and allergen content of various natural latex articles. *Allergy* 1997; 52:661-664.
- Beezhold DH., Hickey VL., Kostyal DA., Puhl H., Zuidmeer L., van-Ree R., Sussman GL. Lipid transfer protein from *Hevea brasiliensis* (Hev b 12), a cross-reactive latex protein. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003 Apr; 90(4):439-445.
- Beezhold DH., Sussman GL., Liss GM., Chang NS. Latex allergy can induce clinical reactions to specific foods. *Clin Exp Allergy* 1996; 26:416-422.
- Bendtsen JD., Nielsen H., von Heijne G., Brunak S. Improved prediction

of signal peptides: SignalP 3.0. J Mol Biol 2004; 340:783-795.

Bernstein DI., Biagini RE., Karnani R., Hamilton R., Murphy K., Bernstein C., Arif SA., Berendts B., Yeang HY. In vivo sensitization to purified *Hevea brasiliensis* proteins in health care workers sensitized to natural rubber latex. J Allergy Clin Immunol 2003; 111(3):610-616.

Blanco C., Carrillo T., Castillo R., Quiralte J., Cuevas M. Latex allergy: clinical features and cross-reactivity with fruits. Ann Allergy 1994; 73:309-314.

Blanco C., Sanchez-Garcia F., Torres-Galvan MJ., Dumpierrez AG., Almeida L., Fligueroa J., Ortega N., Castillo R., Gallego MD., Carrillo T. Genetic basis of the latex-fruit syndrome: Association with HLA class II alleles in a Spanish population. J Allergy Clin Immunol 2004; 114:1070-1076.

Bousquet J., Lockey R., Malling HJ., WHO panel members. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. J Allergy Clin Immunol 1998; 102:558-562.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72:248-254.

Brehier R., Theissen U., Mohr C., Luger T. "Latex-fruit syndrome": frequency of cross-reacting IgE antibodies. Allergy 1997; 52:404-410.

Breiteneter H., Ebner C. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. J Allergy Clin Immunol 2000; 106:27-36.

Casolaro S., Georas SN., Song Z., Ono SJ. Biology and genetics of atopic disease. Curr Opin Immunol 1996; 8:796-803.

Chapman MD., Smith AM., Vailes LD., Arruda LK., Dhanaraj V., Pomes A. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. J Allergy Clin Immunol 2000; 106:409-418.

Chardin H., Chen Z., Raulf-Heimsoth M., Mayer C., Senechal H., Desvaux FX., Peltre G. Identification of Hev b 1 in natural latex mattresses. Int Arch Allergy Immunol 2000; 121:211-214.

Chen YH., Lan JL. Latex allergy and latex-fruit syndrome among medical workers in Taiwan. J Formos Med Assoc 2002; 101:622-626.

Cho A., Normille D. Mastering macromolecules. Science 2002;

298:527-528.

Collinge DB., Kargh KM., Mikkelsen JD., Nielsen KK., Rasmussen U., Vad K. Plant chitinases. *The Plant J* 1993; 3: 31-40.

Coombs RRA., Gell PGH. The classification of allergic reactions underlying disease. (eds) *Clinical aspects of immunology*. Blackwell Scientific Publications: Oxford, 317-337. 1963.

Corry DB., Kheradmand F. Induction and regulation of the IgE response. *Nature* 1999; S402:B18-23.

Cromwell O., Suck R., Kahler H., Nancy A., Weber B., Fiebig H. Transition of recombinant allergens from bench to clinical application. *Methods* 2004; 32:300-312.

Czuppon AB., Chen Z., Rennert S., Engelke T., Meyer HE., Heber M., Baur X. The rubber elongation factor of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) is the major allergen in latex. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92:690-697.

Deinhofer K., Sevcik H., Balic N., Harwanegg C., Hiller R., Rumpold H., Mueller MW., Spitzauer S. Microarrayed allergens for IgE profiling. *Methods* 2004; 32(3):249-254.

Delbourg MF., Guilloux L., Moneret-Vautrin DA., Ville G. Hypersensitivity to banana in latex-allergic patients. Identification of two major banana allergens of 33 and 37 kDa. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996; 76:321-326.

Diaz-Perales A., Collada C., Blanco C., Sanchez-Monge R., Carrillo T., Aragoncillo C. Class I chitinases with hevein-like domains, but not class II enzymes, are relevant chestnut and avocado allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102:127-133.

Diaz-Perales A., Collada C., Blanco C., Sanchez-Monge R., Carrillo T., Aragoncillo C., Salcedo G. Cross-reactions in the latex-fruit syndrome: A relevant role of chitinases, but not of complex asparagines-linked glycans. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:681-687.

Drew AC., Eusebius NP., Kenins L., de Silva HD., Suphioglu C., Rolland JM., O'Hehir RE. Hypoallergenic variants of the major latex allergen Hev b 6.01 retaining human T lymphocyte reactivity. *J Immunol* 2004; 173:5872-5879.

Ebner C., Hoffmann-Sommergruber K., Breiteneder H. Plant food allergens homologous to pathogenesis-related proteins. *Allergy* 2001; 56 (S67)43-44.

Faith A., Akdis CA., Akdis M., Joss A., Whmann D., Blaser K. An altered peptide ligand specifically inhibits Th2 cytokine synthesis by abrogating TCR signaling. *J Immunol* 1999; 162:1836-1842.

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

Figeys D. Proteomics in 2002: A year of technical development and wide-ranging applications. *Anal Chem* 2002; PAGE EST:14.3.

Flicker S., Valenta R. Renaissance of the blocking antibody concept in type I allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 132:13-24.

Focke M., Mahler V., Ball T., Sperr WR., Majlesi Y., Valent P., Kraft D., Valenta R. Nonanaphylactic synthetic peptides derived from B cell epitopes of the major grass pollen allergen, Phl p 1, for allergy vaccination. *FASEB J* 2001; 15(11):2042-2044.

Frosch PJ., Wahl R., Bahmer FA., Maasch HJ. Contact urticaria to rubber gloves is IgE-mediated. *Contact Dermatitis* 1986; 14(4):241-245.

Grutta SL., Mistrello G., Varin E., Pajno GB., Passalacqua G. Comparison of ammoniated and nonammoniated extracts in children with latex allergy. *Allergy* 2003; 58:814-818.

Hamel F., Boivin R., Tremblay C., Bellemare G. Structural and evolutionary relationship among chitinases of flowering plant. *J Mol Evol* 1997; 44:614-624.

Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 1991; 280:309-316.

Hoffmann-Sommergruber K. Plant allergens and pathogenesis-related proteins. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 122:155-166.

Homer AA., Van-Uden JH., Zubeldia JM., Broide D., Raz E. DNA-based immunotherapeutics for the treatment of allergic disease. *Immunol Rev.* 2001; 179:102-118.

Huby RDJ., Dearman RJ., Kimber I. Why are some proteins allergens? *Toxicol Sci* 2000; 55:235-246.

Jameson BA., Wolf H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *CABIOS* 1988; 4:181-186.

Janeway Jr CA., Travers P., Walport M., Shlomchik MJ. *Immunobiology* 5<sup>th</sup>. Garland publishing, New York, 2001.

Jekel PA., Hartmann BH., Beintema JJ. The primary structure of hevamine, an enzyme with lysozyme/chitinase activity from *Hevea brasiliensis* latex. *Eur J Biochem* 1991; 200:123-130.

Ichikawa K., Wen W., Wu Z., Vailes LD., Guyre P., Chapman MD. Full immunoreactive recombinant cat allergen, Fel d 1, expression in baculovirus. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:S184.

Karisola P., Kotovuori A., Poikonen S., Niskanen E., Kalkkinen N., Turjanmaa K., Palosuo T., Reunala T., Alenius H., Kulomaa MS. Isolated hevein-like domains, but not 31-kd endochitinases, are responsible for IgE-mediated in vitro and in vivo reactions in latex-fruit syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115(3):598-605.

King TP., Hoffman D., Lowenstein H., Marsh DG., Platts-Mills TA., Thomas W. Allergen nomenclature. *Allergy* 1995; 50:765-774.

Kurup VP., Alenius H., Kelly KJ., Fink JN. A two-dimensional electrophoretic analysis of latex peptides reacting with IgE and IgG antibodies from patients with latex allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 109(1):58-67.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.

Lai CC., Yan DC., Yu J., Chou CC., Chiang BL., Hsieh KH. Latex allergy in hospital employees. *J Formos Med Assoc* 1997; 96:266-271.

Lee MF., Chen YH., Lan JL., Tseng CY., Wu CH. Allergenic components of Indian jujube (*Zizyphus mauritiana*) show IgE cross-reactivity with latex allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 133:211-216.

Lee MF., Chen YH., Lin HC., Wang HL., Hwang GY., Wu CH. Identification of hevamine and Hev b 1 as major latex allergens in Taiwan. *Int Arch Allergy Immunol* 2006a; 139:38-44.



Lee MF., Hwang GY., Chen YH., Lin HC., Wu CH. Molecular cloning of Indian jujube (*Zizyphus mauritiana*) allergen Ziz m 1 with sequence similarity to plant class III chitinases. Mol Immunol 2006b; (In press)

Liebler DC. Introduction to proteomics-tools for the new biology. New Jersey, USA, Humana Press, 2002.

Meade BJ., Weissman DN., Beezhold DH. Latex allergy: past and present. Int Immunopharm 2002; 2:225-238.

Merrett TG, Merrett J., Kekwick R. The prevalence of immunoglobulin E antibodies to the proteins of rubber (*Hevea brasiliensis*) latex and grass (*Phleum pratense*) pollen in sera of British blood donors. Clin Exp Allergy 1999; 29:1572-1578.

Midoro-Horiuti T., Brooks EG., Goldblum RM. Pathogenesis-related proteins of plants as allergens. Ann Allergy Asthma Immunol 2001; 87:261-271.

Mikkola JH., Alenius H., Kalkkinen N., Yurjanmaa K., Palosuo T., Reunala T. Hevein-like protein domain as a possible cause for allergen cross-reactivity between latex and banana. J Allergy Clin Immunol 1998; 102:1005-1012.

Muguerza J., Capo C., Porri F., Jacob JL., Mege JL., Vervloet D. Latex allergy: allergen identification in *Hevea brasiliensis* fractions by immunoblotting. Clin Exp Allergy 1996; 26(10):1177-1181.

Muller U., Akdis CA., Fricker M., Akdis M., Blesken T., Bettens F., Blaser K. Successful immunotherapy with T-cell epitope peptides of bee venom phospholipase A2 induces specific T-cell anergy in patients allergic to bee venom. J Allergy Clin Immunol 1998; 101:747-754.

Nettis E., Colanardi MC., Ferrannini A., Tursi A. Latex hypersensitivity: personal data and review of the literature. Immunopharmacol Immunotoxicol 2002; 24(2):315-334.

Niederberger V., Horak F., Vrtala S., Spitzarier MT., Krauth P., Valent J. Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101 (S2):14677-14682.

NIOSH ALERT: Preventing allergic reactions to natural rubber latex in the workplace. DHHS (NIOSH) Publication 1997; 97-135.

- Nutter AF. Contact urticaria to rubber. *Br J Dermatol* 1979; 101:597-598.
- Ownby DR. A history of latex allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:S27-32.
- Palomares O., Villalba M., Quiralte J., Polo F., Rodriguez R. 1,3-beta-glucanases as candidates in latex-pollen-vegetable food cross-reactivity. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:345-351.
- Palosuo T., Mäkinen-Kiljunen S., Alenius H., Reunala T., Yip E., Turjanmaa K. Measurement of natural rubber latex allergen levels in medical gloves by allergen-specific IgE-ELISA inhibition, RAST inhibition, and skin prick test. *Allergy* 1998; 53(1):59-67.
- Pene J., Desroches A., Paradis L., Lebel B., Farce M., Nicodemus CF., Yssel H., Bousquet J. Immunotherapy with Fel d 1 peptides decreases IL-4 release by peripheral blood T cells of patients allergic to cats. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102:751-758.
- Poley GE., Slater JE. Latex allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105:1054-1062.
- Posch A., Chen Z., Wheeler C., Dunn MJ., Raulf-Heimsoth M., Baur X. Characterization and identification of latex allergens by two-dimensional electrophoresis and protein microsequencing. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99(3):385-395.
- Prussin C., Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:S486-494.
- Raftery MJ., Saldanha RG., Geczy CL., Kumar RK. Mass spectrometric analysis of electrophoretically separated allergens and proteases in grass pollen diffusates. *Respir Res* 2003; 4:10.
- Robertus JD., Monzingo AF. The structure and action of chitinases. *EXS* 1999; 87:125-135.
- Rolland JM., Drew AC., O'Hehir RE. Advances in development of hypoallergenic latex immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5:544-551.
- Rudeschko O., Fahlbusch B., Henzgen M., Schlenvoigt G., Herrmann D., Jäger L. Optimization of apple allergen preparation for in vivo and in vitro diagnostics. *Allergy* 1995; 50:262-268.

Salcedo G., Diaz-Perales A., Sanchez-Monge R. The role of plant panallergens in sensitization to natural rubber latex. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001 Apr; 1(2):177-183.

Sanchez-Monge R., Blanco C., Diaz-Perales A., Collada C., Carrillo T., Aragoncillo C. Isolation and characterization of major banana allergens: identification as fruit class I chitinases. *Clin Exp Allergy* 1999; 29:673-680.

Schickler H., Chet I. Heterologous chitinases gene expression to improve plant defense against phytopathogenic fungi. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1997; 19:196-201.

Seppala U., Alenius H., Turjanmaa K. Identification of patatin as a novel allergen for children with positive skin prick test response to raw potato. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:165-171.

Seppala U., Ylitalo L., Reunala T., Turjanmaa K., Kalkkinen N., Palosuo T. IgE reactivity to patatin-like allergen, Hev b 7, and to patatin of potato tuber, Sol t 1, in adults and children allergic to natural rubber latex. *Allergy* 2000; 55:266-273.

Sheng LI., Zhao ZA., Ming LI., Zhen-Rong GU., Chen BAI., Huang WD., Purification and characterization of a novel chitinase from *Bacillus brevis*. *Acta. Biochemica. et Biophysica. Sinica. Shanghai* 2002; 34: 690-696.

Slater JE. Latex allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94:139-149.

Slater JE., Vedvick T., Arthur-Smith A. Identification, cloning, and sequences of a major allergen (Hev b 5) from natural rubber latex (*Hevea brasiliensis*). *J Biol Chem* 1996; 271:25394-25399.

Smurthwaite L., Durham SR. Local IgE production in allergic rhinitis and asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2002; 2:231-238.

Soldatova LN., Cramer R., Gmachl M., Kemeny DM., Schmidt M., Weber M., Mueller UR. Superior biological activity of the recombinant bee venom allergen hyaluronidase expressed in baculovirus-infected insect cells as compared with *Escherichia coli*. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101:691-698.

Spitzauer S. Allergy to mammalian proteins: at the borderline between

- foreign and self? Int Arch Allergy Immunol 1999; 120:259-269.
- Sussman GL., Beezhold DH., Kurup VP. Allergens and natural rubber proteins. J Allergy Clin Immunol 2002; 110:S33-39.
- Sutton BJ., Gould HJ. The human IgE network. Nature 1993; 366:421-428.
- Tomazic VJ., Withrow TJ., Hamilton RG. Characterization of the allergens in latex protein extracts. J Allergy Clin Immunol 1995; 96:635-642.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoresis transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76:4350-4354.
- Turjanmaa K., Alenius H., Makinen-Kiljunen S., Reunala T., Palosuo T. Natural rubber latex allergy. Allergy 1996; 51:593-602.
- Vailes LD., Kinter MT., Arruda LK., Chapman MD. High-level expression of cockroach allergen, Bla g4, in *Pichia pastoris*. J Allergy Clin Immunol 1998; 101:274-280.
- Valenta R., Kraft D. Recombinant allergens. Methods 2004; 32:207-345.
- Valenta R., Vrtala S., Laffer S., Spitzauer S., Kraft D. Recombinant allergens. Allergy 1998; 53:552-561.
- van Milligen FJ., van Swieten P., Aalberse RC. IgE and IgG4 binding to the ocelot variant of the cat (*Felis domesticus*) major allergen Fel d 1. Allergy 1994; 49:393-394.
- van Ree R., Cabanese-Macheteau M., Akkerdaas J., Milazzo JP., Loutelier-Bourhis C., Rayon C., Villalba M., Koppelman S., Aalberse R., Rodriguez R., Faye L., Lerouge P. (1,2)-xylose and  $\alpha(1,3)$ -fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens. J Biol Chem 2000; 275:11451-11458.
- Vrtala S., Hirtenlehner K., Susani M., Hufnagl P., Binder BR., Vangelista L., Pastore A., Sperr WR., Valent P., Ebner C., Kraft D., Valenta R. Genetic engineering of recombinant hypoallergenic oligomers of the major birch pollen allergen, Bet v 1: Candidates for specific immunotherapy. Int Arch Allergy Immunol 1999; 118:218-219.
- Wagner S., Breiteneder H. The latex-fruit syndrome. Biochem Soc Trans 2002 Nov; 30(Pt 6):935-940.

- Wagner S., Breiteneder H. *Hevea brasiliensis* latex allergens: Current panel and clinical relevance. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 136:90-97.
- Wagner S., Pusch F., Radauer C., Scheiner O., Breiteneder H. Natural rubber latex contains more than 30 significant allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 107:S117.
- Westritschnig K., Valenta R. Can we genetically engineer safer and more effective immunotherapy reagents? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003; 3:495-500.
- Wu CH., Lee MF., Liao SC., Luo SF. Sequencing analysis of cDNA clones encoding the American cockroach Cr-PI allergens: homology with insect hemolymph proteins. *J Biol Chem* 1996; 271:17937-17943.
- Wu CH., Lee MF., Tseng CY. IgE-binding epitopes of the American cockroach Per a 3 allergen. *Allergy* 2003; 58:986-992.
- Wu CH., Lee MF., Wang NM. Expression of the American cockroach Per a 1 allergen in mammalian cells. *Allergy* 2000;55:1179-1183.
- Wu CH., Lee MF., Wang NM., Luo SF. Sequencing and immunochemical characterization of the American cockroach Per a 3 (Cr-PI) isoallergenic variants. *Mol Immunol* 1997; 34(1):1-8.
- Wu CH., Lee MF., Yang JS., Tseng CY. IgE-binding epitopes of the American cockroach Per a 1 allergen. *Mol Immunol.* 2002; 39:459-464.
- Wurtzen PA. Grass allergen-specific T-cells of atopic patients. *APMIS* 2001; 109:561-571.
- Yagami Y. Allergies to cross-reactive plant proteins. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 128:271-279.
- Yagami T., Haishima Y., Tsuchiya T., Tomitaka-Yagami A., Kano H., Matsunaga K. Proteomic analysis of putative latex allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 135:3-11.
- Yeang HY. Natural rubber latex allergens: new developments. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4(2):99-104.
- Yeang HY., Arif SA., Raulf-Hemsoth M., Loke YH., Sander I., Sulong SH., Lau CH., Hamilton RG. Hev b 5 and Hev b 13 as allergen markers to estimate the allergenic potency of latex gloves. *J Allergy Clin Immunol*

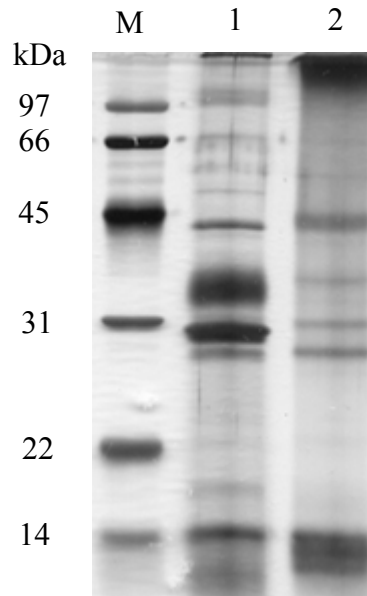
2004; 114:593-598.

Yeang HY., Cheong KF., Sunderasan E., Hamzah S., Chew NP., Hamid S., Hamilton RG., Cardoso MJ. The 14.6 kd rubber elongation factor (Hev b 1) and 24 kd (Hev b 3) rubber particle proteins are recognized by IgE from patients with spina bifida and latex allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98:628-639.

Yeang HY., Chow KS., Yusof F., Arif SA., Chew NP., Loke YH. Appraisal of latex glove proteins in the induction of sensitivity to multiple latex allergens. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2000; 10(4):215-222.

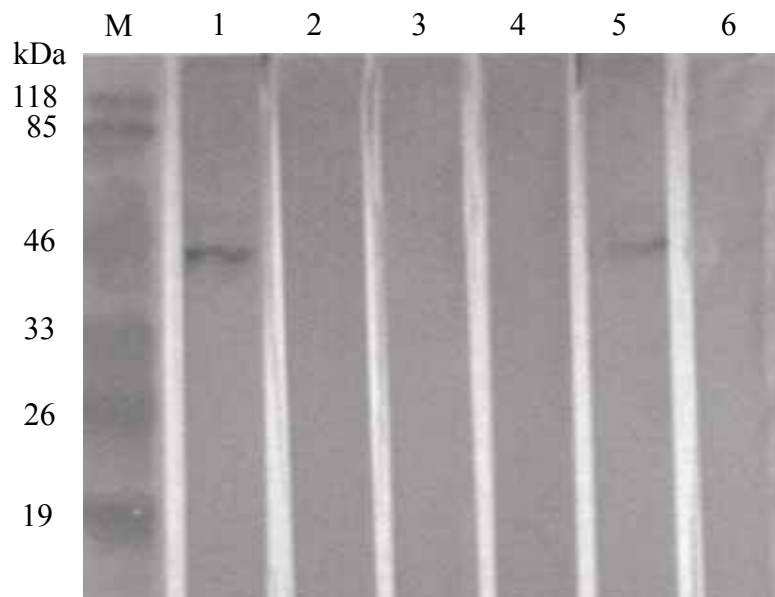
Yip E., Cacioli P. The manufacture of gloves from natural rubber latex. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:S3-S14.

Yunginger JW., Jones RT., Fransway AF., Kelso JM., Warner MA., Hunt LW. Extractable latex allergens and proteins in disposable medical gloves and other rubber products. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93:836-842.



圖一、印度棗和鹼化乳膠粗萃物之 SDS-PAGE 分析。

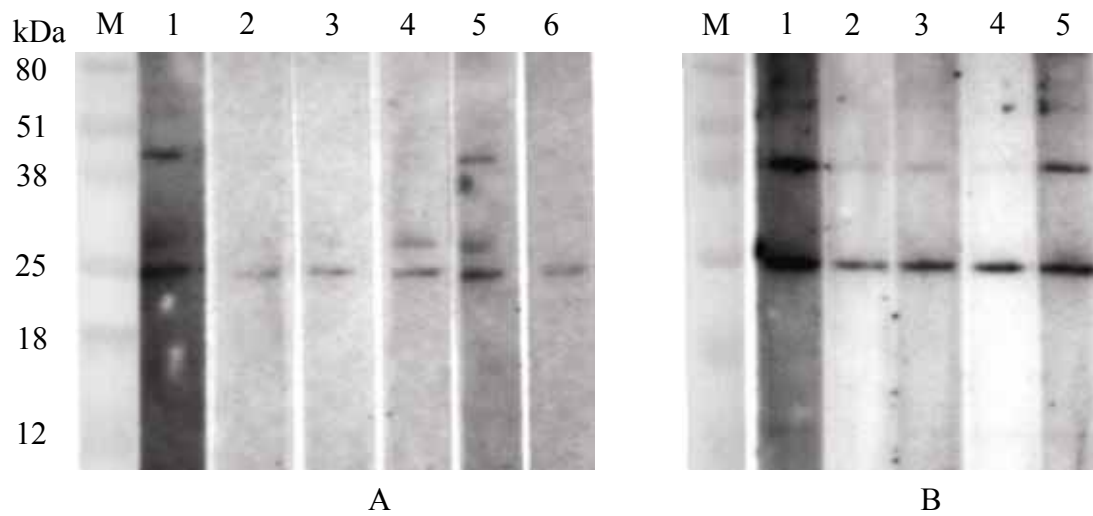
Fig. 1 Silver-stained SDS-PAGE profile of Indian jujube and latex proteins. Lane M: protein markers, lane 1: Indian jujube, lane 2: latex. The silver stained profile of Indian jujube and latex extracts show predominant components of apparent molecular weight located at 42, 35, 30, 28 and 14 kDa, and 42, 35, 31, 28 and 14 kDa, respectively.



圖二、免疫轉漬抑制法分析交叉性反應。

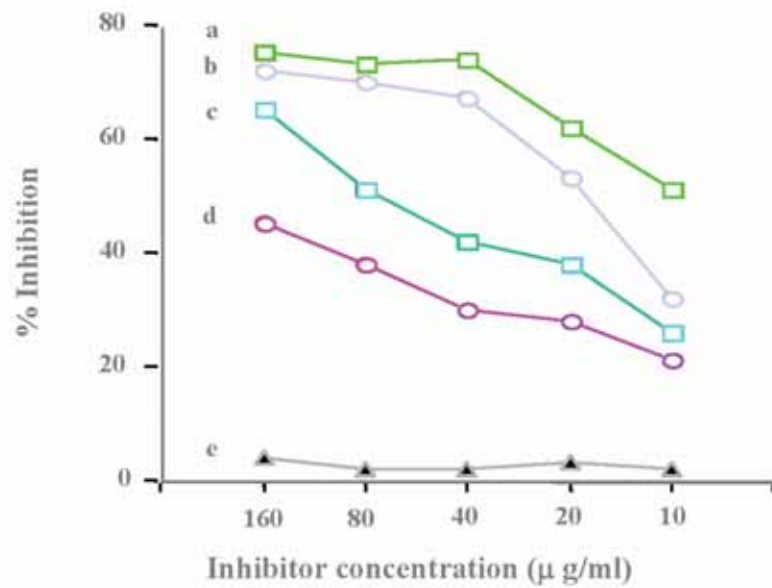
Fig. 2 Cross-reactivity by immunoblot inhibition. Binding of IgE from patient 1 to latex allergens, inhibited by 150  $\mu\text{g/ml}$  of proteins from latex (lane 2), Indian jujube (lane 3), latex gloves (lane 4) or BSA (lane 5). Lane 1: no inhibitor, lane 6: nonatopic serum, lane M: protein markers. Immunoblotting revealed human IgE binding to a 42 kDa latex protein. Preincubation of atopic sera with latex or Indian jujube extract demonstrated absent inhibition of IgE-binding.





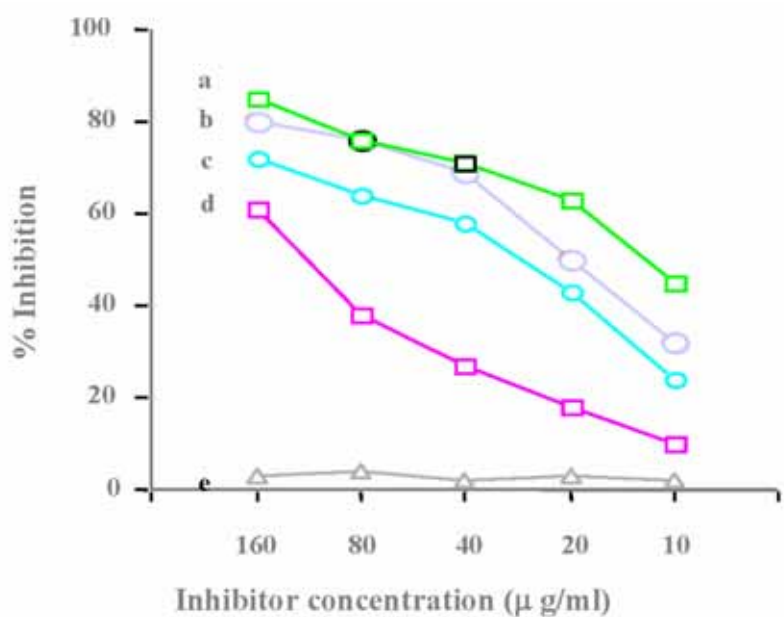
圖三、免疫轉漬抑制法分析交叉性反應。

Fig. 3 Cross-reaction by immunoblot inhibition. Binding of IgE from patient 1 (A) and patient 2 (B) to Indian jujube allergens, inhibited by 150  $\mu\text{g/ml}$  of proteins from Indian jujube (lane 2), latex (lane 3), latex gloves (lane 4) or BSA (lane 5). Lane 1: no inhibitor; lane 6: non-atopic serum; lane M: protein markers.



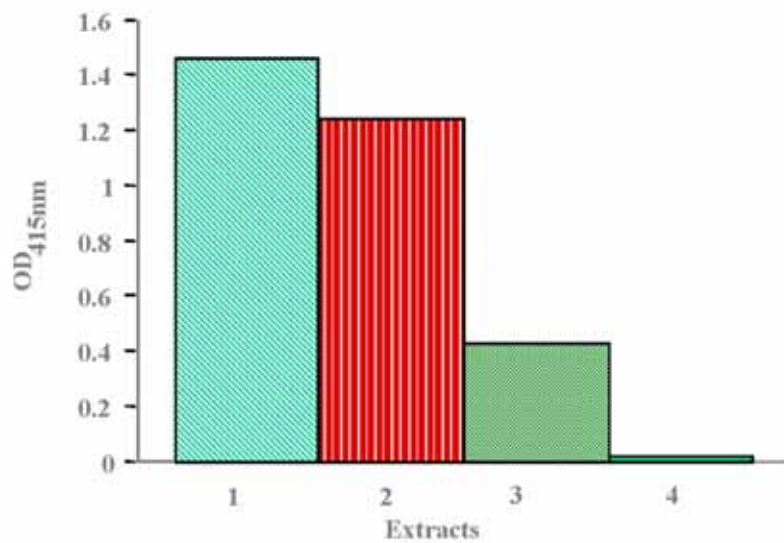
圖四、ELISA 抑制法分析交叉性反應。

Fig. 4 Binding inhibition of IgE from patients 1 (a and d) and 2 (b and c) to Indian jujube by ELISA. Inhibitors: a and b, Indian jujube; c and d, latex; e, non-atopic serum. Microtiter plates were coated with 3 µg/well Indian jujube extract, and results are the average of experiments performed in triplicate. Preincubation of Indian jujube or latex with both atopic sera resulted in marked inhibition of the IgE binding to Indian jujube.



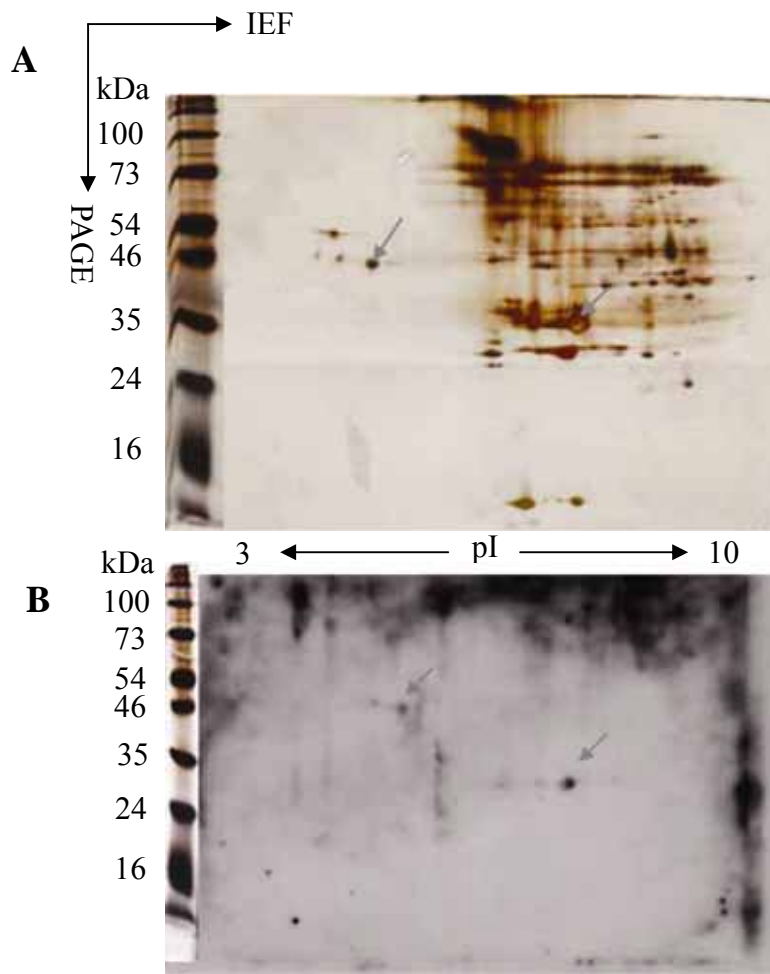
圖五、ELISA 抑制法分析交叉性反應。

Fig. 5 Binding inhibition of IgE from patients 1 (a and d) and 2 (b and c) to latex by ELISA. Inhibitors: a and b, Indian jujube; c and d, latex; e, non-atopic serum. Microtiter plates were coated with 3 µg/well latex extract, and results are average of experiment performed in triplicate. Preincubation of Indian jujube or latex with both atopic sera resulted in marked inhibition of the IgE binding to latex.



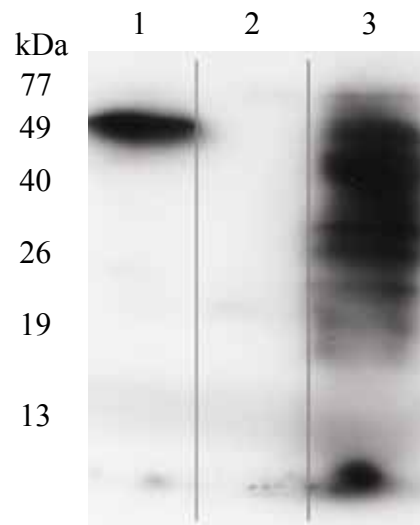
圖六、兔子抗印度棗抗體進行 ELISA 的結果。

Fig. 6 ELISA binding profiles of rabbit anti-Indian jujube antibodies. Microtiter plates were coated either with 100  $\mu$ l of Indian jujube (50  $\mu$ g/ml, extract 1), a commercial skin testing latex (extract 2), ammoniated latex (50  $\mu$ g/ml, extract 3) extracts or unimmunized rabbit IgG (50  $\mu$ g/ml, extract 4), and results are average of experiment performed in triplicate.



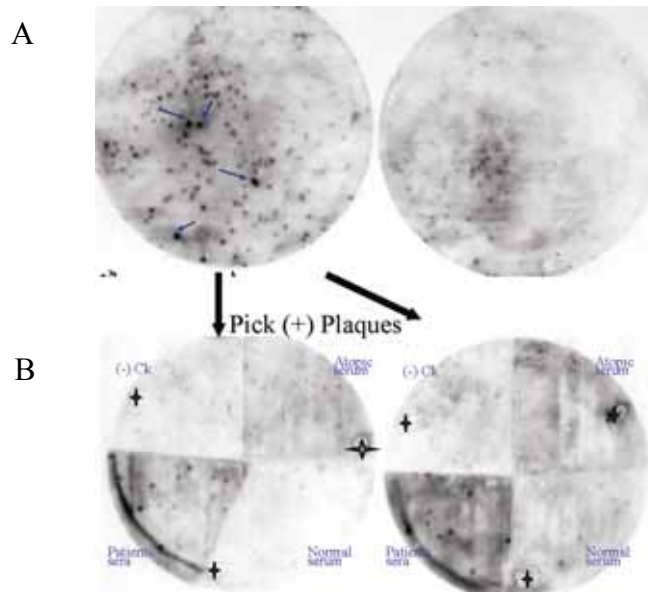
圖七、印度棗粗萃物之二維電泳膠分析結果。

Fig. 7 Staining profiles (A) and immunoblot (B, probed with human IgE) of two-dimensional gel electrophoresis of crude Indian jujube extract. Predominant components of crude Indian jujube extract with apparent pI values between pH 4.0 to 8.0 were revealed by panel A. Two proteins with apparent molecular weights of 30 and 42 kDa were recognized by human IgE shown in panel B.



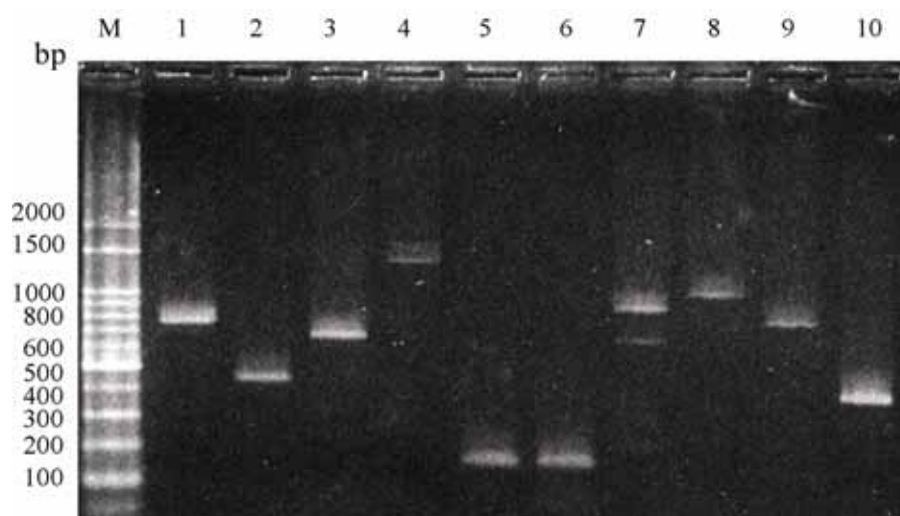
圖八、印度棗 mRNA 體外轉譯作用之產物以 SDS-PAGE 分析之結果。

Fig. 8 Chemiluminescent patterns of SDS-PAGE analysis of *in vitro* translated proteins. Lane 1: mRNA of  $\gamma$ -globulin, lane 2: negative control, lane 3: mRNA of Indian jujube. Many Indian jujube proteins, ranging from 20 to 50 kDa, were revealed in lane 3, and positive control mRNA of  $\gamma$ -globulin (lane 1) showed the respective 50 kDa translation product.



圖九、印度棗  $\lambda$  cNDA 基因庫以病人血清 IgE 篩選的結果。

Fig. 9 Immunodetection of  $\lambda$  ZAP II clones on *E.coli* XL1 blue probed with human IgE (A). Plaques producing positive signals were selected and re-screened (B) by cut into 4 sections and probed with washing buffer (-Ck), Indian jujube-negative atopic serum, normal serum and latex-Indian jujube patients' sera, respectively.



圖十、乳膠-印度棗 IgE(+)噬菌斑經 PCR 增幅之 DNA 電泳分析。

Fig. 10 Agarose gel electrophoresis of amplified DNA of latex-Indian jujube IgE-positive plaques. Lane M: 100 bp ladder DNA, lanes 1-10: clones 1-10. Clones 5 and 6 have identical 0.15 kb. The remaining clones 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 and 10, have inserts of 0.76, 0.43, 0.67, 1.39, 0.82, 1.0, 0.7 and 0.33 kb, respectively.



```

ggcagcaggcctcgtgccggacgaggtaaaaaccgcagatagtattaaaaaggggqaaaaaatggtcca 73
                                                    M V P 3
caagccaaacttggtgtggcttctctgatcctcacctcagccttaatccaaacctctgaggctgtaggtggcata 148
Q A K L V V A S L I L T S A L I Q T S E A V G G I 28
Gcaacctactgggtcaatatactgagaccgaagaaggagctctagccgaagcctgtgctagtaatttgtattct 223
A T Y W G Q Y T E T E E G S L A E A C A S N L Y S 53
Tacataaacatagcctatcttaacattttcggcgaagccggtaacctgagtttaacatctctggctcactgcagt 298
Y I N I A Y L N I F G E G R Y L S L N I S G H C S 78
Cattgcacctttctcggcgaagagataaaaggcttgtcagagccagggcgtaagatcttcctctctcttggagga 373
D C T F L G E E I K A C Q S Q G V K I F L S L G G 103
Ccttatggagattatcatcctaacaaccgatgggatggcgatagggttgagagcaactgtggagttcctttctc 448
P Y G D Y H L T T D G D A D R V A E Q L W S S F L 128
ggaggttctaaaagtactggagtttatcaaccatttctcggagacgttgaaactcgatggcatagatttggacata 52
G G S K S T G V Y Q P L L G D V E L D G I D L D I 153
caaattggtccccagaagagtatgacgttctggcagtaactgaaggacttaaccaaagatcgaacaagacct 598
Q I G P P E E Y D V L A R N L K D L T K D R T R P 178
Ttctatttctgcagctcccaagtgttctgcttataatgatagcagccttatcttggacagccgttgagacg 673
F Y L S A A P K C S A Y N D S D A Y L W T A V E T 203
Gggcttttcgacttctgttgggttaagttctataatgatacttcatgccagtacaataatgacacagctgctggt 748
G L F D F V W V K F Y N D T S C Q Y N N D T A A G 228
Cttgacgcttttaccgttctgtgtatgatggactgtgtcgttgcggaaggaataagttgctcatagggata 823
L D A F Y R S W Y D W T V S L A E G N K L L I G I 253
ccggcttccaatgaaactgataattccccactcggcggctacatcccgctctgatgtgctgaacgatcaaattggt 898
P A S N E T D N S P L G G Y I P S D V L N D Q I V 278
tcggtgataatgacgtcgtccaagtttgaggtgtaaactgtaggaataggtattatgatccttaagacgaattac 973
S V I M T S S K F G G V N V W N R Y Y D L K T N Y 303
tcttctccattattctcgagtatgtaattcgggaaccaagtatttaccattacggactaaatttatgtatcag 1048
S S S I I L E Y V N S G T K Y L P L R T K F M Y Q 328
aatgcataatccataacgcaccattaccaactatgtatgagtgatttgtatccttgaatatatatatatat 1123
N A * 330
atatatgtatccactgctacataaatgggtaccactatgtatcactcttgtttaataaacaatggtgtgaaat 1198
gtctaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1223

```

圖十一、Ziz m 1 核苷酸和胺基酸序列。

Fig. 11 The nucleotide and deduced amino acid sequence of Ziz m 1. The putative TATA-box, the initiation methionine codon and the potential N-glycosylation sites are underlined. The putative cap signal, the putative signal peptide, the stop codon and polyadenylation site are indicated by bold print. The nucleotide sequence reported in this paper has been deposited in GenBank database with accession number AY839230.

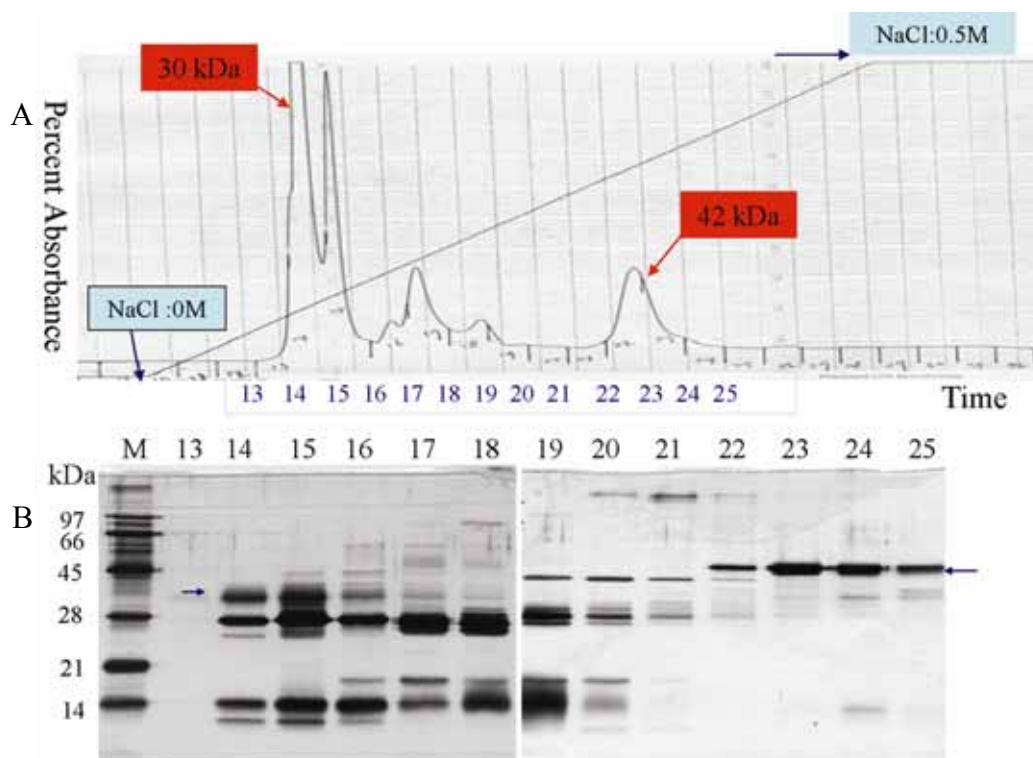
```

Ziz m 1 -MVPQAKLVVASLILTSALIQTS--EAVGGIATYWGQYTETEESLAEACASNLYSYINI 57
Hev b --MAKRTQAILLLLLLAISSHHVDGGGIAIYWGQ--NGNEGTLTQTCSTRKYSYVNI 56
Cap a ----MTINLLPSILFLALIQTS--IARSGIAIYWGQ--NGNEATLNDTCASGNAYVNL 52
Vig a MACLKQVSALLLPLLFISFFKPS---HAGGISVYWGQ--NGNEGLADACNTGNKYVNI 55
Ory s MANKSSLLQLLLIAAVASQFVSS---QAGSIAIYWGQ--NNEGTLADTCATGNKYFVNI 55
      : : : * ..* : ** : * : * : * : * :
Ziz m 1 AYLNIFGEGRYLSLNISGHCS----DCTFLGEEIKACQSQGVKIFLSLGGPPYGDYHLTTD 113
Hev b AFLNKFGNGQTPQINLAGHCNPAAGGCTIVSNGIRSCQIQGIKVMLSLGGGIGSYTLASQ 116
Cap a SFLNKFGNGQTPQINLAGHCNPAVNGCTILGPQIKFCQKLGVKVMSMGGGVGNYSLASK 112
Vig a AFLFTFGGGQTPQINLAGHCNPSINNCNVFSDQIKECQSKDIKVLSSLGGASGSYSLTS 115
Ory s AFLAAFGNGQPPVFNLAGHCDPTNGGCASQSSDIKSCQSRGVKIMLSIGGGAGSYLSS 115
      : * ** * : : * : * * . * . * : ** . : * : * : * * * * * * * * * *
Ziz m 1 GDADRVAEQLWSSFLGGSKSTGVYQPLLDGVDLGDIDLDIQIGPPEEYDVLARNLKD LTK 173
Hev b ADAKNVADYLWNNFLGGKSSS----RPLGDAVLDGIDFDIEEHGSTLYWDDLARYLSAYS 172
Cap a KDAKDVARYLYNNFLGGRSSF----RPLGNARLDGIDFDIELGSSLYEDLAQYLKRYSK 168
Vig a DDATQVANYIWNFLGGQSSS----RPLGDAILDGVDFDIESGTGHEHDDLARALKGFNS 171
Ory s EDAKNVATYLWNNFLGGQSSS----RPLGDAVLDGIDFDIEEGGTNQHWDDLARYLKGYSN 171
      ** ** : : . * * * * . * * * : * : * : * : * : * : * : * : * :
Ziz m 1 DRTRPFYLSAAPKCSAYNDSDAYLWTAJETGLFDFVWVKFYNDTSCQYNNDTAAGLDAFY 233
Hev b Q-GKKVYLTAAPQC PFP---DRYLGTAALNTGLFDYVWVQFYNNPPCQYS---SGNINNI 225
Cap a L-GRKMYLTAAPQC PFP---DRLLGTALNTGLFDNVWIQFYNNPSCQYT---TNNVDDLK 221
Vig a ----QLLLTAAPQC PIP---DAHLDTAIKTGLFDIVWVQFYNNPPCQYS---SGNTNDLI 221
Ory s S-GRRVYLTAAPQC PFP---DACIGDALNTGLFDYVWVQFYNNPPCQYS---SGSTSNLA 224
      . * : * * : * . * : * : * * * * * * * * : * : * : * : * :
Ziz m 1 RSWYDWTVSLAEGNKLLIGIPASNETDNSPLGGYIPSDVLNDQIVSVIMTSSKFGGVNVW 293
Hev b NSWNRWTTS-INAGKIFLGLPAAPEAAGS---GYVPPDVLISRILPEIKKSPKYGGVMLW 281
Cap a NSWTRWTTS-VNARRIFLGLPAAPQAAGS---GFIPAEVLTGGILPVIKKSRKYGGVMLW 277
Vig a SSWNQWTS--SQAKQLFLGV PASTAAAGS---GFIPADVLTSQVLPVTKGSSKYGGVMLW 276
Ory s DAWKQWLS--VPAKQIFLGLPASPQAAGS---GFIPADDLKSQVLPVIKSSGKYGGIMLW 279
      : * * . : : * : * * : * : * * * * * * * * : * : * : * : * :
Ziz m 1 NRYDDLRTNYSSSIILEYVNSGTKYLPLRTKEMYQNA 330
Hev b SKFYDDKNGYSSSILDSVFLHSEECMTVL----- 311
Cap a SKFWDEQTGYSASIVKSV----- 295
Vig a DRFNDGQSGYSGAIGSV----- 294
Ory s SKYYDDQDDYSSSVKSDV----- 297
      . : : * : * * : * : .

```

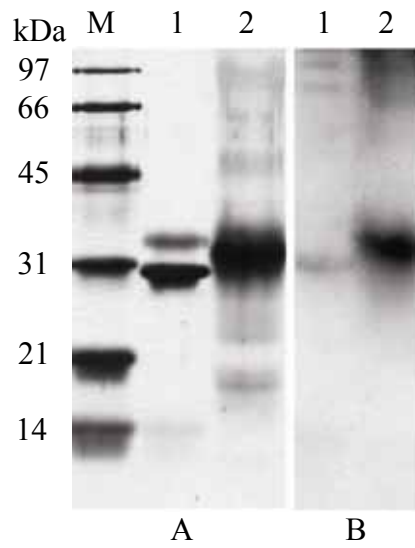
圖十二、Ziz m 1 和 4 種植物之 class III chitinases 胺基酸序列之線性排列比較圖。

Fig. 12 Comparison of Ziz m 1 with the sequences of class III chitinases from *Hevea brasiliensis* (Hev b), *Capsicum annuum* (Cap a), *Vigna angularis* (Vig a) and *Oryza sativa* (Ory s). The motifs of family 18 glycosyl hydrolase are indicated by bold print. \*, : and ., indicate that a position in alignment is perfectly, conserved and semi-conserved, respectively.



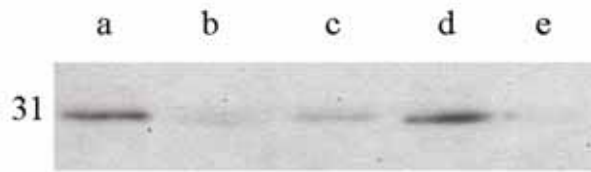
圖十三、印度棗粗萃物經陰離子交換層析法之管柱分離結果(A)和第13~25管之 SDS-PAGE 分析(B)。

Fig. 13 Chromatogram of anion-exchange of crude Indian jujube extracts (A) and staining patterns of SDS-PAGE of the selected 13 to 25 fractions (B).



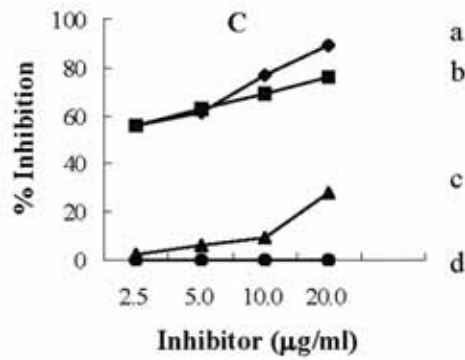
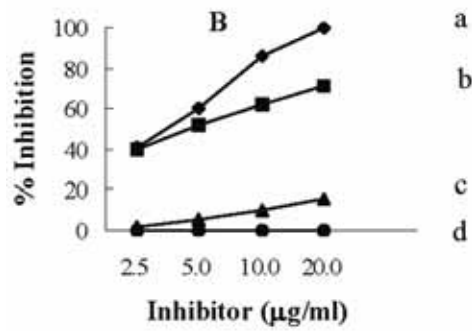
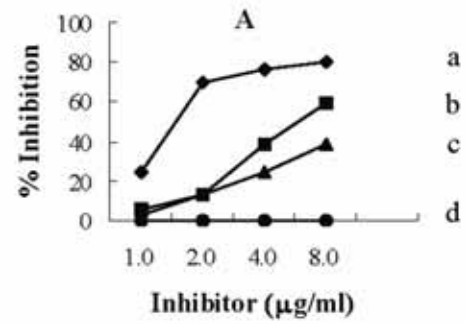
圖十四、天然和重組 Ziz m 1 蛋白質之 SDS-PAGE (A) 和免疫轉漬法 (B) 的結果。

Fig. 14 Silver-stained SDS-PAGE (A) and immunoblotting (B) of partially purified natural Ziz m 1 (lane 1) and recombinant Ziz m 1 (lane 2). Numbers at left indicate size of standard proteins in kDa (lane M).



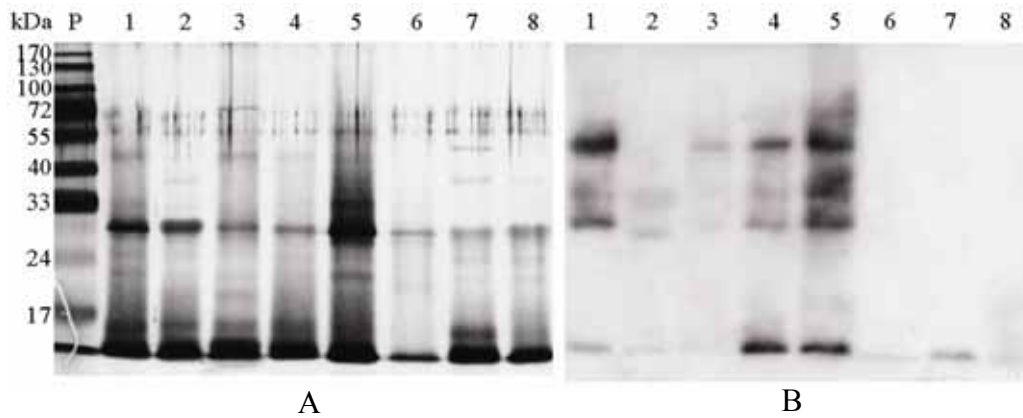
圖十五、免疫轉漬抑制法。

Fig. 15 Immunoblot inhibition. Binding of IgE from latex and Indian jujube-sensitive subjects to partially purified natural Ziz m 1, inhibited by 150  $\mu$ g/ml proteins from rZiz m 1 (lane b) or latex extract (lane c) or rBSA (lane d). Lane a: no inhibitor, lane e: non-allergic serum. Number at left indicates size of standard protein in kDa.



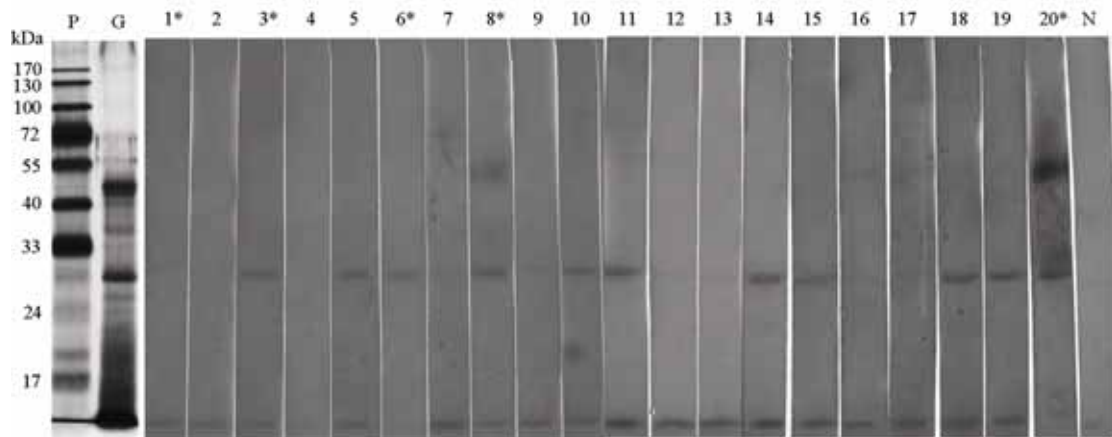
圖十六、病人 2(A)、6(B)和 7(C)對於 rZiz m 1 的 ELISA 抑制反應。

Fig. 16 Binding inhibition of IgE from patients 2 (A), 6 (B) and 7 (C) to rZiz m 1 by ELISA. Inhibitors, a: partial purified natural Ziz m 1; b: Indian jujube extract; c: latex extract; d: rBSA. Preincubation of natural Ziz m 1 or latex extract with all of the atopic sera resulted in marked inhibition of IgE binding to rZiz m 1. No significant inhibition was observed when rBSA was used as inhibitor.



圖十七、SDS-PAGE 分析 8 種乳膠手套粗萃物，A 為銀染的蛋白質圖譜，B 為 IgE 結合蛋白質的結果。

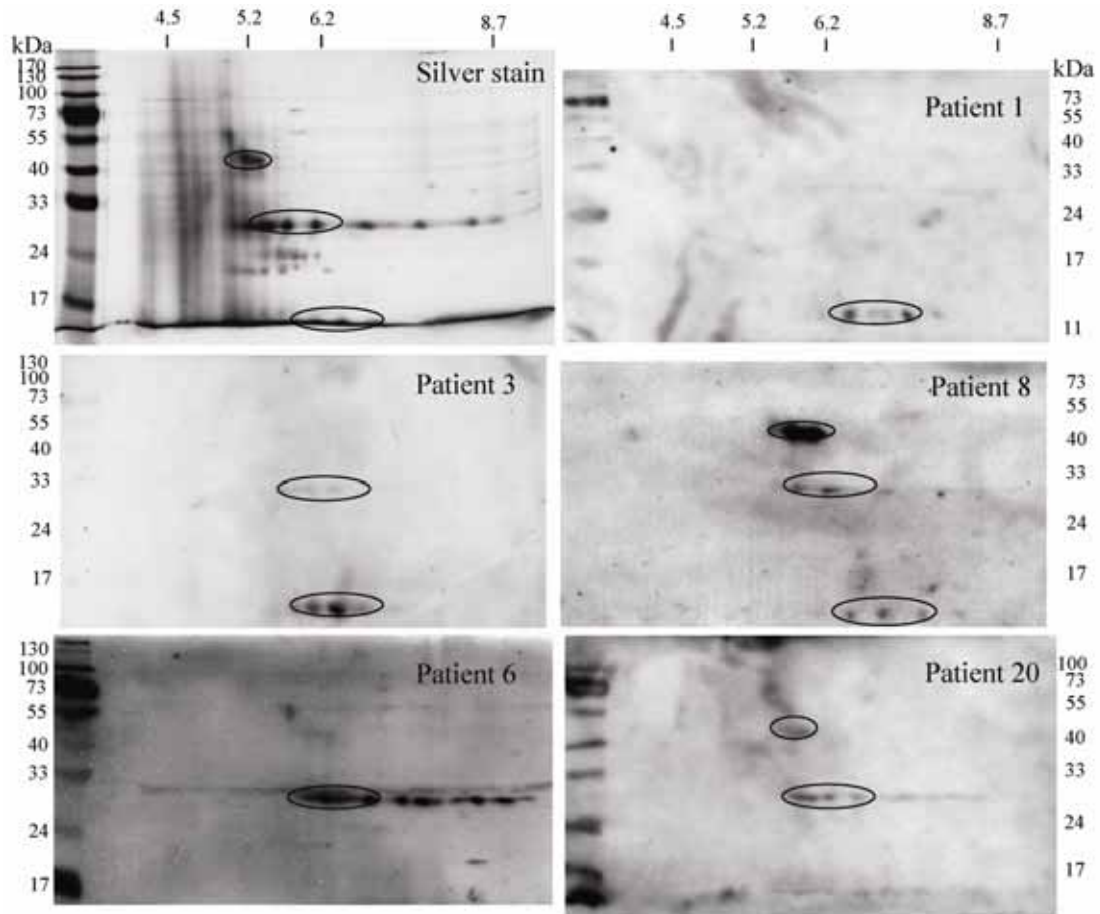
Fig. 17 Protein patterns by silver-stained SDS-PAGE (A) and IgE-binding allergenic proteins by immunoblotting (B) of crude latex glove extracts from eight lots of three different manufacturers. Lanes 1-2: PROTOS, lane 3: DE CROWN, lanes 4-8: ENCHS, lane P: protein markers.



圖十八、乳膠手套粗萃物免疫轉漬的圖譜。

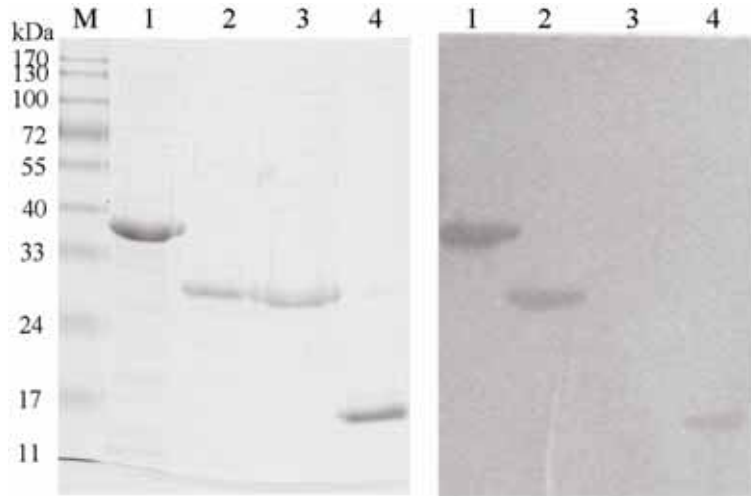
Fig. 18 Immunoblot patterns of a latex glove extract. Lanes 1-20: patients 1-20 (Table 4), lane N: a pool sera of non-atopic subjects, lane P: protein markers, lane G: latex glove extract by silver staining. Five representative sera used in 2D-PAGE analysis are denoted by an asterisk (\*).





圖十九、乳膠粗萃物二維電泳分析的圖譜。

Fig. 19 Two-dimensional proteomics map of latex glove extract by silver nitrate staining and immunoblotting of 5 representative sera. Molecular weight standards are shown at left and right and isoelectric points are on the top. Black circles indicate proteins recognized at 45, 30 and 14 kDa, for which ESI-MS/MS was performed.



圖二十、Ziz m 1 突變株之融合蛋白質以 SDS-PAGE 分析(A)和免疫轉漬法(B)的結果。

Fig. 20 SDS-PAGE (A) and immunoblotting (B) of proteins expressed from mutant Ziz m 1 cDNA. Proteins were stained with Coomassie brilliant blue (A), or probed with patients' sera (B). Lane 1: origin clone of Ziz m 1(residues 26-330); lane 2: deletion mutant 1 (residues 26-199); lane 3: deletion mutant 2 (residues 119-280); lane 4: deletion mutant 3 (residues 238-330), lane M: protein markers.

表一、病歷和皮膚試驗的結果

| Parameter                      | Patient No. 1 (26-year-old male)  | Patient No. 2 (38-year-old female)   |
|--------------------------------|---|--|
| Indian jujube allergy symptoms | atopic dermatitis   | angioedema   |
| Latex allergy symptoms         | dermatitis  | rhinoconjunctivitis  |
| Concomitant allergic diseases  | atopic dermatitis, asthma   | none   |
| Positive skin test results     | hd (4+), as (2+), ps (3+), gr (1+)<br>we (3+), latex (3+), wheat (2+)<br>mango (3+), orange (2+), banana (2+)<br>latex <sup>1</sup> (4+), Indian jujube <sup>1</sup> (2+) | latex (2+), latex <sup>1</sup> (3+)<br>Indian jujube <sup>1</sup> (4+)     |
| Total IgE, kU/l                | 12500   | 352  |
| FAST <sup>2</sup> , kU/l       | latex: 3.8 (3); Indian jujube <sup>1</sup> : 14 (4)   | latex: 1.2 (2); Indian jujube <sup>1</sup> : 0.65 (1)                      |
| CAP <sup>2</sup> , kU/l        | latex: 25.5 (4); wheat: 30 (4);<br>mango: 71.2 (5); orange: 45.1 (4);<br>melon: 33.1 (4); apple: 63.1 (5)   | latex: 1.48 (2); wheat: ND; mango: ND;<br>orange: ND; melon: ND; apple: ND |

hd = house dust; as = *Aspergillus* species; ps = *Penicillium* species; gr = grass pollen; we = weed pollen; ND = not determined.

1. Laboratory prepared extracts.
2. FAST and CAP classes are shown in parentheses.

表二、鹼化乳膠之43 kDa 過敏原胜肽質量指紋鑑定結果

| Allergen*  | Matching identity   | GenBank access No. | MW/pI (GenBank) | Matching residue sequence   | Sequence coverage |
|------------|---|--------------------|-----------------|---|-------------------|
| 43 kDa/5.2 | Hev b 7 of <i>Hevea brasiliensis</i> , Patatin-like phospholipase | gi: 6707018        | 42.8/5.0        | <sup>14</sup> ITVLSIDGGGIR <sup>25</sup><br><sup>26</sup> GIIPGILASLESK <sup>39</sup><br><sup>104</sup> DNYDPIHSIGPIYDGEYLR <sup>122</sup><br><sup>136</sup> DTLTDVIPTFDIK <sup>149</sup><br><sup>150</sup> LLLPVIFSSDDAK <sup>162</sup><br><sup>313</sup> IQDDTLTGEESSGHIA TEENCLQR <sup>335</sup><br><sup>336</sup> LVEIGTELLEK <sup>346</sup><br><sup>351</sup> INLDTGRLESIPGAPTNEAAIAK <sup>373</sup> | 33%               |

\*Experimental molecular weight (MW) and pI.

表三、病歷和皮膚試驗的結果

| Patient | Age/sex | Diagnosis <sup>a</sup> | SPT/kU/l           |                                    |                       |  |
|---------|---------|------------------------|--------------------|------------------------------------|-----------------------|--|
|         |         |                        | Latex <sup>b</sup> | Indian jujube extract <sup>c</sup> | rZiz m l <sup>c</sup> |  |
| 1       | 42/F    | AE,OAS                 | +++/1.48           | ++++/2.50                          | -/<0.35               |  |
| 2       | 31/F    | A,OAS                  | +++ /27.4          | +++ /16.6                          | +++ /6.65             |  |
| 3       | 22/F    | U                      | ++ /2.30           | ++ /25.0                           | +++ /25.3             |  |
| 4       | 27/F    | OAS                    | ++ /0.66           | ++ /0.60                           | ++ /0.87              |  |
| 5       | 32/F    | OAS                    | +++ /20.2          | ++ /5.62                           | +++ /9.32             |  |
| 6       | 26/M    | A,AD                   | +++ /25.5          | ++ /15.2                           | +++ /10.3             |  |
| 7       | 76/M    | AD                     | + /0.68            | ++ /3.28                           | +++ /14.3             |  |
| 8       | 42/M    | OAS                    | +++ /12.9          | +++ /10.3                          | ++ /3.61              |  |

<sup>a</sup>U, urticaria; AE, angioedema; A, asthma; AS, oral allergy syndrome; AD, atopic dermatitis.

<sup>b</sup>CAP-FEIA system; <sup>c</sup>ELISA.

表四、病歷和皮膚試驗的結果

| Patients | Age/Sex | Occupation    | Latex-specific IgE<br>CAP/EAST (kU/l) | Latex SPT<br>Crude/Glove | Clinical<br>symptoms* |
|----------|---------|---------------|---------------------------------------|--------------------------|-----------------------|
| 1        | 42/F    | Technician    | 1.5/1.09                              | 3+/3+                    | AR, AC                |
| 2        | 31/F    | Nurse         | 27.4/38.4                             | 4+/4+                    | A                     |
| 3        | 36/F    | Dentist       | 99/49.2                               | 4+/4+                    | Anaphylaxis, A        |
| 4        | 37/F    | Technician    | 0.9/0.5                               | 3+/2+                    | AR, AC                |
| 5        | 42/M    | Physician     | 12.9/25.7                             | 3+/4+                    | AR, AC                |
| 6        | 36/F    | Dentist       | 4.7/0.8                               | 4+/2+                    | A, AR                 |
| 7        | 31/F    | Nurse         | 14.4/12.4                             | 3+/4+                    | A, AR                 |
| 8        | 26/F    | Lab assistant | 23.1/13.7                             | 3+/2+                    | A, AR, AD             |
| 9        | 45/F    | Technician    | 1.9/3.8                               | 3+/2+                    | A, AR                 |
| 10       | 32/F    | Nurse         | 20.2/0.7                              | 2+/4+                    | AR, AC                |
| 11       | 35/F    | Technician    | 11.3/2.5                              | 4+/4+                    | A                     |
| 12       | 32/M    | Surgeon       | 0.35/0.8                              | 2+/4+                    | AD                    |
| 13       | 46/F    | Technician    | 1.9/0.4                               | 4+/4+                    | A, AR                 |
| 14       | 33/M    | Technician    | 16.2/56                               | 2+/4+                    | AD                    |
| 15       | 26/F    | Lab assistant | 25/26.2                               | 2+/3+                    | AR/AC                 |
| 16       | 32/F    | Nurse         | 0.35/3.3                              | 4+/3+                    | AR                    |
| 17       | 31/M    | Physician     | 10.8/5.7                              | 4+/2+                    | AC                    |
| 18       | 24/F    | Lab assistant | 0.9/20.9                              | +/3+                     | AR, AC                |
| 19       | 34/F    | Nurse         | 2.2/3.5                               | 2+/2+                    | AR                    |
| 20       | 54/M    | Surgeon       | 0.61/0.38                             | 4+/4+                    | AR, AD                |

\*A, asthma; AR, allergic rhinitis; AC, allergic conjunctivitis; AD, atopic dermatitis.

表五、乳膠手套過敏原胜肽質量指紋鑑定結果

| Allergen*             | Matching identity                   | GenBank access No. | MW/pI (GenBank) | Matching residue sequence  | Sequence coverage |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------|-----------------|--|-------------------|
| 45 kDa/5.2            | Hev b 13, lipolytic esterase        | gi:30909057        | 43.3/5.0        | 49 <sup>AAAFYPLNPPYGETFFHR</sup> <sup>66</sup><br>116 <sup>LPTTIIPAHGGFSPFYLDVQYSQFR</sup> <sup>140</sup><br>151 <sup>ETGGIFAELVPEEYFEK</sup> <sup>168</sup><br>271 <sup>DLPLATFVHVDIYSVK</sup> <sup>286</sup><br>287 <sup>YSLFSEPEK</sup> <sup>295</sup>  | 21.0%             |
| 30 kDa/5.2, 5.4, 6.0  | Hevamine, <i>Hevea brasiliensis</i> | gi:234388          | 29.5/8.4        | 25 <sup>YSYVNI AFLNK</sup> <sup>35</sup><br>74 <sup>VMLSLGGGIGSYTLASQADAK</sup> <sup>94</sup><br>95 <sup>NVADYLWNNFLGGK</sup> <sup>108</sup><br>151 <sup>VVYLTAAPQCFFPDR</sup> <sup>164</sup><br>214 <sup>IFLGLPAAPEAAGSGYVPPDVLISR</sup> <sup>238</sup><br>256 <sup>FYDDKNGYSSSILDSV</sup> <sup>273</sup> | 40%               |
| 14 kDa/ 6.1, 6.4, 6.8 | Hev b 1, rubber elongation factor   | gi:132270          | 14.6/4.9        | 2 <sup>AEDDNQQGQGEGLK</sup> <sup>16</sup><br>100 <sup>DASIQWWSAIR</sup> <sup>110</sup>   | 18.8%             |

\*Experimental molecular weight (MW) and pI.

一、 Four types of hypersensitivity reactions

|   | Type I  | Type II                                       | Type III                             | Type IV  |
|---|---|---|--------------------------------------|--|
| <b>Immune reactant</b>                      | IgE   | IgG   | IgG                                  | T <sub>H</sub> 2 cells<br>CTL  |
| <b>Antigen</b>                              | Soluble antigen                                 | Cell- or matrix-associated antigen            | Soluble antigen                      | Soluble antigen<br>Cell-associated antigen   |
| <b>Effector mechanism</b>                   | Mast-cell activation                            | FcR <sup>+</sup> cells (phagocytes, NK cells) | FcR <sup>+</sup> cells<br>Complement | Eosinophil activation<br>Macrophage activation<br>Cytotoxicity   |
| <b>Example of hypersensitivity reaction</b> | Allergic rhinitis, asthma, systemic anaphylaxis | Some drug allergies (e.g., penicillin)        | Serum sickness, Arthus reaction      | Chronic asthma, chronic allergic rhinitis<br>Contact dermatitis, tuberculin reaction<br>Contact dermatitis |

From Immunobiology 5<sup>th</sup>, Janeway Jr et al., 2001.



## 二、Registered latex allergens

Modified from Sussman *et al.*, 2002; Beezhold *et al.*, 2003; Arif *et al.*, 2004.

| <i>Allergen</i> | <i>kDa</i> | <i>PI</i> | <i>Biologic function</i>   |
|-----------------|------------|-----------|--|
| Hev b 1         | 14.6       | 4.9       | Large rubber particles (biosynthesis of polyisoprene)            |
| Hev b 2         | 35.1       | 9.5       | $\beta$ -1,3-glucanase (defense against fungal pathogens, PR-2)  |
| Hev b 3         | 22.3       | 4.8       | Small rubber particles (biosynthesis of polyisoprene)            |
| Hev b 4         | 50-57      | 4.5       | Microhelix component (not determined)                            |
| Hev b 5         | 16         | 3.5       | Structural protein   |
| Hev b 6         | 20         | 5.6       | Coagulation of latex (PR-3,4)                                    |
| Hev b 7         | 42.9       | 4.8       | Esterase (inhibitor of polyisoprene biosynthesis, PR)            |
| Hev b 8         | 13.9       | 4.9       | Profilin (cytoskeletal actin-binding protein)                    |
| Hev b 9         | 47.7       | 5.6       | Enolase (key enzyme of glycolysis and gluconeogenesis)           |
| Hev b 10        | 22.9       | 6.3       | MnSOD (protection from reactive oxygen species)                  |
| Hev b 11        | 33         | 5.1       | Class I chitinase (involved in plant-pathogen interaction, PR-3) |
| Hev b 12        | 9.3        | 10.8      | Lipid transfer protein (PR-14)                                   |
| Hev b 13        | 43         | 5         | Lipolytic esterase (plant defense, PR)                           |

### 三、 Families of PR-proteins and examples of their function

| Family | MW (kDa) | Properties   |
|--------|----------|--|
| PR-1   | 15-17    | Antifungal   |
| PR-2   | 25-35    | Antifungal/class I, II chitinases, $\beta$ -1,3-glucanases |
| PR-3   | 25-35    | Antifungal/class I, II, IV chitinases                      |
| PR-4   | 13-19    | Antifungal/class I, II chitinases                          |
| PR-5   | 22-24    | Antifungal/thaumatin-like proteins                         |
| PR-6   | 6        | Proteinase inhibitors                                      |
| PR-7   | 69       | Endoproteinases  |
| PR-8   | 28       | Class III chitinases/lysozymes                             |
| PR-9   | 39-40    | Peroxidase isoenzymes                                      |
| PR-10  | 17-18    | Ribonucleases, Bet v 1-homologues                          |
| PR-11  | 41-43    | Class V chitinases   |
| PR-12  | 5        | Defensins  |
| PR-13  | 14       | Thionins   |
| PR-14  | 7-12     | Lipid transfer proteins                                    |

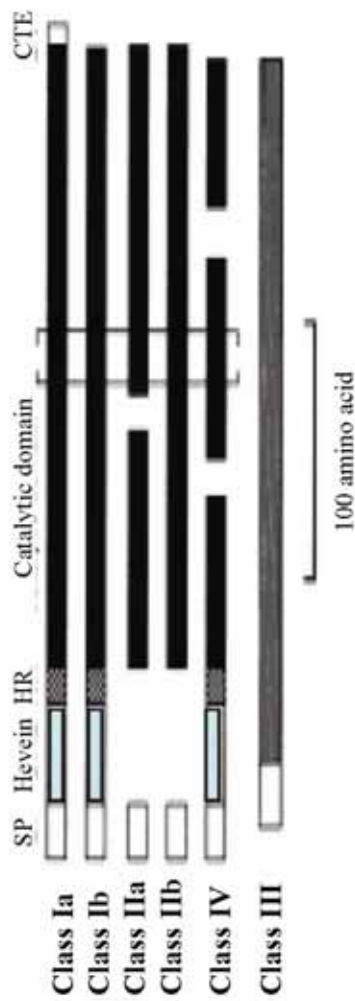
Hoffmann-Sommergruber, 2000; Midoro-Horiuti *et al.*, 2001.

#### 四、Potential cross-reactive allergens from plant food and latex

| Plant food proteins  | Latex allergens                                | PR-type proteins |
|--|--|------------------|
| Class I chitinases<br>(chestnut, avocado,<br>banana, green bean) | Prohevein (Hev b 6.01)/<br>Hevein (Hev b 6.02) | PR-4/<br>PR-3    |
| Proheveins (turnip)  |  | PR-4             |
| Profilin (Bet v2, etc.)  | Profilin (Hev b 8)                             |                  |
| Acidic protein (kiwi)  | Acid protein (Hev b 5)                         |                  |
| Patatin-homologous<br>(potato, tomato)                           | Patatin-like (Hev b 7)                         | PR               |
| $\beta$ -1,3-glucanases<br>(plant food glucanases)               | $\beta$ -1,3-glucanases (Hev b 2)              | PR-2             |
| Chitinases/lysozyme<br>(plant food class III chitinases?)        | Hevamine                                       | PR-8             |
| Lipid transfer protein (LTP)                                     | LTP (Hev b 12)                                 | PR-14            |

Breiteneder et al., 2000. Salcedo et al., 2001.

## 五、The structures of chitinase proteins



Schematic representation of the structural differences between chitinase classes in angiosperms. Gaps found in most class II and in class IV chitinases, when compared to class I, are indicated as such. The signal peptide (SP) and the carboxy-terminal extension (CTE) are represented by open boxes, while the chitin-binding domain (Hevein) and the hinge region (HR) are identified by shadowed and hatched boxes, respectively. Filled boxes represent the catalytic domain, used in this work for phylogenetic analysis of classes I, II, and IV, while gray box identifies the divergent class III catalytic domain. In one region of the catalytic domain, brackets delineate a previously identified catalytic site.

Hamel *et al.*, 1997.

# 個人資料表

---

---

中文姓名：李美芳

英文姓名：Mey-Fann Lee

出生日期：1966年1月15日

通訊地址：台中市港路三段160號教研部

電話：(O) 04-23592525 分機 4035

E-mail: mflee@vghtc.gov.tw

學歷：私立東海大學生命科學系博士 (2002-2005)

國立中興大學植物所碩士 (1988-1990)

國立成功大學生物系學士 (1984-1988)

現職：台中榮民總醫院教學研究部助理研究員

論文發表 (2000~2006):

1. **Lee MF.**, Hwang GY., Chen YH., Lin HC., Wu CH. Molecular cloning of Indian jujube (*Zizyphus mauritiana*) allergen Ziz m 1 with sequence similarity to plant class III chitinases. Mol Immunol 2006; (In press) (SCI)
2. **Lee MF.**, Chen YH., Lin HC., Wang HL., Hwang GY., Wu CH. Identification of hevamine and Hev b 1 as major latex allergens in Taiwan. Int Arch Allergy Immunol 2006; 139:38-44. (SCI)
3. Chen YH., **Lee MF.**, Lan JL., Chen CS., Wang HL., Hwang GY., Wu CH. Hypersensitivity to *Forcipomyia taiwana* (biting midge): Clinical analysis and identification of major For t 1, For t 2 and For t 3 allergens. Allergy 2005; 60:1518-1523. (SCI)
4. Wu CH., **Lee MF.** Molecular characteristics of cockroach allergens. Cell Mol Immunol 2005; 2(3):177-180. (Review)

5. **Lee MF.**, Chen YH., Lan JL., Tseng CY., Wu CH. Allergenic components of Indian jujube (*Zizyphus mauritiana*) show IgE cross-reactivity with latex allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 133:211-216. (SCI)
6. Wu CH., **Lee MF.**, Tseng CY. IgE-binding epitopes of the American cockroach Per a 3 allergen. *Allergy* 2003; 58:986-992. (SCI)
7. Wu CH., **Lee MF.**, Yang JS., Tseng CY. IgE-binding epitopes of the American cockroach Per a 1 allergen. *Mol Immunol* 2002; 39:459-464. (SCI)
8. Wu CH., **Lee MF.**, Wang NM. Expression of the American cockroach Per a 1 allergen in mammalian cells. *Allergy* 2000; 55:1179-1183. (SCI)

# Curriculum Vitae

**Name** : Mey-Fann Lee

**Birth** (Date/month/Year) : 15/01/1966

**Address** : Department of Education and Research

Taichung Veterans General Hospital

160 Chang Kang Road, Section 3, Taichung 407,

Taiwan

**Phone** : 886-4-2359-2525 EXT.4035

**E-mail** : mflee@vghtc.gov.tw

## **Education Background:**

Ph.D. of Dept. of Life Science, Tunghai University, Taiwan (2002-2005)

Master of Research institute of Botany, National Chung Hsing University, Taiwan (1988-1990)

Bachelor of Dept. of biology, National Cheng-Kung University, Taiwan (1984-1988)

## **Career :**

Assistant researcher of Dept. of Education and Research

Taichung Veterans General Hospital, Taiwan

## **Publication** (2000~2006)

1. **Lee MF.**, Hwang GY., Chen YH., Lin HC., Wu CH. Molecular cloning of Indian jujube (*Zizyphus mauritiana*) allergen Ziz m 1 with sequence similarity to plant class III chitinases. Mol Immunol 2006; (In press) (SCI)
2. **Lee MF.**, Chen YH., Lin HC., Wang HL., Hwang GY., Wu CH. Identification of hevamine and Hev b 1 as major latex allergens in Taiwan. Int Arch Allergy Immunol 2006; 139:38-44. (SCI)

3. Chen YH., **Lee MF.**, Lan JL., Chen CS., Wang HL., Hwang GY., Wu CH. Hypersensitivity to *Forcipomyia taiwana* (biting midge): Clinical analysis and identification of major For t 1, For t 2 and For t 3 allergens. *Allergy* 2005; 60:1518-1523. (SCI)
4. Wu CH., **Lee MF.** Molecular characteristics of cockroach allergens. *Cell Mol Immunol* 2005; 2(3):177-180. (Review)
5. **Lee MF.**, Chen YH., Lan JL., Tseng CY., Wu CH. Allergenic components of Indian jujube (*Zizyphus mauritiana*) show IgE cross-reactivity with latex allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 133:211-216. (SCI)
6. Wu CH., **Lee MF.**, Tseng CY. IgE-binding epitopes of the American cockroach Per a 3 allergen. *Allergy* 2003; 58:986-992. (SCI)
7. Wu CH., **Lee MF.**, Yang JS., Tseng CY. IgE-binding epitopes of the American cockroach Per a 1 allergen. *Mol Immunol* 2002; 39:459-464. (SCI)
8. Wu CH., **Lee MF.**, Wang NM. Expression of the American cockroach Per a 1 allergen in mammalian cells. *Allergy* 2000; 55:1179-1183. (SCI)