



國立臺灣大學生物資源學系暨農學院

園藝暨景觀學系暨研究所

碩士論文

Graduate Institute of Horticulture and Landscape Architecture

College of Bio-Resources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

建立番茄過敏原 Sola l 1 分析平台及

評估數種番茄品種中 Sola l 1 含量

Analytical Platform Construction for Tomato Allergen

Sola l 1 and Evaluation of Sola l 1 Level in Selected

Tomato Cultivars

蔡季霖

Chi-Lin Tsai

指導教授：許 輔 博士

Advisor: Fuu Sheu, Ph.D.

中華民國 103 年 7 月

July, 2014



# 國立臺灣大學碩士學位論文 口試委員會審定書

建立番茄過敏原 Sola 1 1 分析平台

及評估數種番茄品種中 Sola 1 1 含量

Analytical Platform Construction for Tomato Allergen Sola 1  
1 and Evaluation of Sola 1 1 Level in Selected Tomato Cultivars

本論文係蔡季霖（R01628207）在國立臺灣大學園藝暨景觀學系、所完成之碩士學位論文，於民國一百零三年七月十一日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

許 輔

許 輔 博士

國立臺灣大學園藝暨景觀學系 教授  
本論文指導教授

周志輝

周志輝 博士

國立中興大學食品暨應用生物科技學系 特聘教授

潘敏雄

潘敏雄 博士

國立臺灣大學食品科技研究所 教授

繆希椿

繆希椿 博士

國立臺灣大學醫學院免疫學研究所 副教授



## 誌謝

暨此論文完成之際，謹向恩師 許輔 博士獻上最高敬意與感謝。一路上感謝老師的提攜與教誨，提供充足、完善的資源予我們利用及學習，讓我們在實驗之餘，不必擔心設備的不足；謝謝老師總在難關處適時的推我們一把，教導我們人生態度及學術精神，應用於人生的道路上，我將受用無窮，再次感謝老師。

文稿初成，承蒙口試委員們撥冗審閱及斧正，感謝各位老師於口試時給予學生肯定以及提供不同面向的思考方式和評論，於此再次向各位老師表達感謝。

感謝淑幸姊和璨哥，實驗室裡裡外外的大小事情總有你們的幫助和關懷照料，這兩年來的團體生活和奮鬥，有你們在旁，真的很幸福。感謝我的學長姐們，志良學長、立於學長和小白學姐。謝謝志良學長在我各種實驗上給予極大的幫助，研究室裡各樣的實驗操作及大小事物學長都不吝指導。謝謝小白學姐總在前方帶領著我前進，無私的提攜後輩，在我迷惘的時候給予我方向和勇氣，真的非常感謝你。謝謝立於學長總是在我需要時伸出援手。感謝我的同學們，柏羽、雅玲和瑜珊。謝謝柏羽這兩年來一直和我在一起努力，不論是開心的、傷心的或生氣的事情都能和你分享，你總是用微笑迎接我，給我滿滿的能量和歡笑；雅玲真的很可愛，偶爾做出天兵的行為舉止真的好傻，你總是能帶來歡笑；瑜珊做事認真負責，為實驗室分擔不少事情。謝謝可愛的學弟妹們，佳琳、映柔、偉齊和暉翰，有你們在，總是能一起努力，一起品嚐各種酸甜苦辣。

感謝我的父母，總是以開明的態度，讓我自主發展並在我迷失方向時給予肯定與意見；感謝父母辛苦提拔我長大和念書，供給我生活所需，讓我能專心一致的完成學業，謝謝你們對我的疼愛，你們是我最大的依靠。感謝哲蓁、穎華、韋汶、子君、郁琚、凱傑，有你們的陪伴和幫助，我的生活更加地精彩。

感謝為我的實驗所犧牲的小鼠們。衷心的感謝所有人事物。

蔡季霖 謹誌於

國立台灣大學園藝暨景觀學研究所



## 摘要

番茄 (*Solanum lycopersicum*)，又名為西紅柿，為茄科茄屬番茄亞屬的多年生草本植物。在台灣，番茄是易誘發過敏的蔬果之一。番茄中的主要過敏原 Sola l 1 為一種肌動蛋白結合蛋白 (profilin)。這類的蛋白在高等植物物種中序列保守且結構相近，因此時常造成蔬果與花粉之間的交叉反應，誘導過敏發生。本研究的目的即是希望能藉由研究番茄中的過敏原，建立蔬果食品過敏原的分析平台和技術。研究分成四部份，第一部份試驗欲取得番茄過敏原之基因並生產重組蛋白，自牛番茄‘紅慧’中選殖 Sola l 1 基因，片段大小約 396 bp，將此片段進行構築並轉形至 *E.coli* 系統中生產 Sola l 1 重組蛋白，利用快速蛋白質液相層析系統 (fast protein liquid chromatography, FPLC) 純化含 His-tag 的重組蛋白 rHis-Sola l 1，分子量約 34 kDa。第二部份以此蛋白作為抗原生產抗體，建立過敏原蛋白質的分析平台。特異性分析發現 rSola l 1 之單株抗體專一性表現不佳，仍須進一步針對單株抗體的特異性予以篩選。第三部份以即時聚合酶鏈鎖反應 (real-time quantitative PCR, qPCR) 作為分析方法，建立核酸定量的分析平台。依番茄 profilin 過敏原 Sola l 1 序列上與其他番茄中 profilin 蛋白具有特異性的位置設計引子，最終選擇 real 5 引子作為 Sola l 1 特異性引子；看家基因引子則選擇 Actin 3 和 18 S 1 作為相對定量的引子。第四部份以建立之分析平台分析不同品種與成熟度的番茄中 Sola l 1 含量。以核酸平台分析，結果顯示番茄品種間 Sola l 1 mRNA 表現量有顯著差異；而以蛋白分析平台搭配生物影像處理分析軟體分析，結果顯示 Sola l 1 蛋白含量於不同品種間有所差異，但與核酸定量結果之趨勢不完全相同。另外，以 Tanya 番茄探討成熟度與過敏原含量相關性，分析番茄五個生長階段 Sola l 1 過敏原含量，結果顯示 Sola l 1 核酸表現量隨番茄果實成熟而逐漸下降，在果實過熟階段則大幅增加；蛋白分析則無此變化趨勢。以蛋白分析平台作為番茄過敏原 Sola l 1 的定量分析平台仍需再進行特異性評估。本研究建立之番茄過



敏原核酸分析平台可定量 Sola l 1 表現，並證實不同番茄品種以及不同成熟度皆會影響過敏原表現。

關鍵字：*Solanum lycopersicum*、番茄過敏、肌動蛋白結合蛋白、Sola l 1、基因選殖、定量分析。



## Abstract

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is a perennial plant belonging to the nightshade family (*Solanaceae*). In Taiwan, tomato is one of the most frequent causes of allergy among vegetables. Sola l 1, a profiling is a major allergen in Tomato. Due to the high identity in amino acid sequence among plant profilins, cross reaction usually happens among tomato, other allergenic foods, and pollens. The aim of this study was to construct analytical platforms by using both immunochemical and molecular biological methods for tomato allergen Sola l 1. First of all, we cloned a 396 bp cDNA of Sola l 1 from tomato '紅慧' and produced recombinant protein with *E. coli* expression system. The recombinant protein was named rHis-Sola l 1, and its molecular weight was 34 kDa. Second, this protein was used as an antigen for mouse immunization and monoclonal antibodies production. However, the specificity of the monoclonal antibody against rHis-Sola l 1 protein was not as well as expected. The hybridoma for monoclonal antibody production had to be further selected. In the determination of Sola l 1 mRNA expression, the primer pairs of real 5, Actin3, and 18S1 yielded the optimal results in PCR efficiency and PCR quantitation slope for relative quantification. After the analytical platforms were constructed, we selected twenty tomato cultivars for determining the mRNA expression of Sola l 1. Furthermore, five growth stages of tomato 'Tanya' were selected for discussing the relationship between growth stages and mRNA expression of Sola l 1. The results indicated that the mRNA expression of Sola l 1 over cultivars would be different, but the variation trend of the protein expression of Sola l 1 was not the same as mRNA expression. The mRNA expression of Sola l 1 would decrease along with early growth stages, but increased in the overipen stage of tomato 'Tanya'; however, the variation trend in protein level was not significant. The quantitative analysis platform of Sola l 1 protein has to be further evaluated. Finally, we



have constructed analytical platforms for evaluating tomato Sola 1 1 allergens in gene level.

Key words: *Solanum lycopersicum*, tomato allergy, profilin, Sola 1 1, gene cloning, quantitative analysis.



## 總目錄

|                                              |     |
|----------------------------------------------|-----|
| 口試委員會審定書.....                                | I   |
| 誌謝.....                                      | II  |
| 摘要.....                                      | III |
| Abstract.....                                | V   |
| 表目錄.....                                     | X   |
| 圖目錄.....                                     | XI  |
| 壹、緒論.....                                    | 1   |
| 一、食品過敏.....                                  | 1   |
| 1.1. 過敏簡介.....                               | 1   |
| 1.2. 食品過敏反應類型.....                           | 1   |
| 1.3. 食品過敏與食品安全.....                          | 3   |
| 1.4. 交叉反應與食品過敏.....                          | 3   |
| 1.5. 常見的食品過敏.....                            | 4   |
| 1.6. 食品過敏分析方法.....                           | 4   |
| 二、蔬果過敏.....                                  | 5   |
| 2.1. 蔬果中的主要過敏原.....                          | 5   |
| 2.2. 植物 profilin 與 profilin-pollen 交叉反應..... | 7   |
| 三、番茄之生理活性.....                               | 8   |
| 3.1. 番茄簡介.....                               | 8   |
| 3.2. 番茄之成分組成.....                            | 9   |
| 3.3. 台灣主要栽培番茄品種.....                         | 9   |
| 四、番茄過敏.....                                  | 11  |
| 4.1. 番茄致敏地區及症狀.....                          | 11  |
| 4.2. 番茄 profilin 過敏原-Sol a l 1.....          | 11  |
| 4.3. 園藝生理與番茄過敏原關係.....                       | 12  |





|                                |    |
|--------------------------------|----|
| 五、研究目的及架構.....                 | 13 |
| 貳、材料與方法.....                   | 15 |
| 一、番茄 Sola11 基因選殖.....          | 15 |
| 二、重組 Sola11 蛋白質之表現與純化.....     | 19 |
| 三、抗體製備.....                    | 23 |
| 四、細胞融合與培養.....                 | 24 |
| 五、酵素免疫連結分析.....                | 27 |
| 六、即時聚合酶鏈鎖反應 Real-time PCR..... | 28 |
| 七、質譜序列分析.....                  | 29 |
| 八、番茄糖酸度測定.....                 | 31 |
| 九、番茄患者血清.....                  | 31 |
| 十、實驗動物.....                    | 31 |
| 十一、統計分析.....                   | 31 |
| 參、研究結果.....                    | 33 |
| 一、番茄重組蛋白 rSola11 基因之選殖及表現..... | 33 |
| 1.1. 番茄過敏原 Sola11 基因選殖.....    | 33 |
| 1.2. 重組蛋白之構築與表現.....           | 33 |
| 二、建立 Sola11 蛋白分析工具.....        | 35 |
| 2.1. 製備抗體.....                 | 35 |
| 2.2. 抗體篩選.....                 | 36 |
| 三、建立 Sola11 核酸分析工具.....        | 37 |
| 3.1. 專一性引子的設計與選擇.....          | 37 |
| 四、數種番茄品種果實中 Sola11 含量分析.....   | 39 |
| 4.1. 番茄樣品取得.....               | 39 |
| 4.2. 相對定量計算方式.....             | 39 |
| 4.3. 不同番茄品種過敏原定量結果.....        | 39 |
| 4.4. 不同番茄成熟度過敏原定量結果.....       | 40 |



|                                                 |    |
|-------------------------------------------------|----|
| 肆、 討論.....                                      | 42 |
| 一、番茄過敏原基因選殖之討論.....                             | 42 |
| 二、番茄過敏原蛋白質分析平台之討論.....                          | 43 |
| 2.1. 以 rHis-Sola l 1 作為抗體生產之抗原.....             | 43 |
| 2.2. 抗體篩選之合成胜肽設計條件與原因.....                      | 43 |
| 2.3. 抗體特異性不佳.....                               | 44 |
| 三、番茄過敏原核酸分析平台之討論.....                           | 44 |
| 3.1. 開發即時聚合酶連鎖反應 (Real-time PCR) 分析過敏原含量原因..... | 44 |
| 3.2. 專一性引子選擇及條件設計依據.....                        | 45 |
| 四、數種番茄品種中過敏原含量變化趨勢討論.....                       | 46 |
| 4.1. 不同品種間過敏原 Sola l 1 含量差異探討.....              | 46 |
| 4.2. 不同成熟度過敏原 Sola l 1 含量差異探討.....              | 47 |
| 五、結論與未來展望.....                                  | 48 |
| 伍、參考文獻.....                                     | 50 |



## 表目錄

Table 1. The Sola l 1-specific primer sets used in real-time PCR.

Table 2. The housekeeping gene primer sets used in real-time PCR.

Table 3. Real-time PCR efficiency and slope of Sola l 1 specific primer.

Table 4. Real-time PCR efficiency and slope of housekeeping gene Actin primer.

Table 5. Real-time PCR efficiency and slope of housekeeping gene 18S rRNA primer.

Table 6. The information of cultivar names, origins, and comments for twenty tomato cultivars used in this study.

Table 7. The cDNA and protein concentration, sugar degrees, and pH levels of different tomato cultivars.

Table 8. The cDNA and protein concentration, sugar degrees and pH levels of tomato 'Tanya' in five growth stages.



## 圖目錄

- Fig. 1. Cloning of tomato allergen Sola l 1.
- Fig. 2. The alignment result of recombinant tomato profilin rHis-Sola l 1 and Sola l 1 from NCBI gene bank.
- Fig. 3. The elution profile of the of recombinant tomato protein rHis-Sola l 1 attaching to FPLC system.
- Fig. 4. SDS-PAGE analysis and western blot of rHis-Sola l 1 and purified rHis-Sola l 1.
- Fig. 5. SDS-PAGE analysis of rSola l 1 after removing His-tag residue.
- Fig. 6. The elution profile of the secondary purification of tomato rSola l 1 using HiTrap Chelating column attaching to FPLC system.
- Fig. 7. SDS-PAGE analysis of secondarily purified rSola l 1.
- Fig. 8. SDS-PAGE and western blot analysis of secondarily purified rSola l 1.
- Fig. 9. The analysis result of the amino acid sequence of recombinant protein rSola l 1 using mass spectrometry.
- Fig. 10. The protocol of monoclonal antibody production.
- Fig. 11. The titer of rHis-Sola l 1 monoclonal antibody.
- Fig. 12. The specificity of rHis-Sola l 1 monoclonal antibody no.21 using dot blotting.
- Fig. 13. SDS-PAGE and western blot analysis of the specificity of rHis-Sola l 1 monoclonal antibody no. 21 against proteins from different tomato cultivars.
- Fig. 14. Real-time PCR melting curves and PCR standard curves of Sola l 1 specific primer.
- Fig. 15. Real-time PCR products with Sola l 1 specific primer sets of (A) real 1 primer, (B) real 2 primer, (C) real 3 primer, (D) real 4 primer, and (E) real 5 primer.
- Fig. 16. Real-time PCR melting curves and PCR standard curves of housekeeping gene actin primer.



Fig. 17. Real-time PCR melting curves and PCR standard curves of housekeeping gene 18S rRNA primer.

Fig. 18. The appearances of leaves and flowers for eighteen tomato cultivars used in this study.

Fig. 19. The fruit appearances of twenty tomato cultivars used in this study.

Fig. 20. Real-time PCR quantification of Sola l 1 expression from twenty tomato cultivars.

Fig. 21. SDS-PAGE analysis of crude proteins from 20 tomato cultivars.

Fig. 22. Quantification of tomato allergen Sola l 1 among twenty tomato cultivars with monoclonal antibody.

Fig. 23. Immunological activity analysis of tomato allergen Sola l 1 among twenty tomato cultivars with patient serum.

Fig. 24. The fruit appearance of tomato 'Tanya' in five growth stages.

Fig. 25. Real-time PCR quantification of Sola l 1 expression from tomato cultivar 'Tanya' in five different growth stages.

Fig. 26. SDS-PAGE analysis of crude proteins from tomato cultivar 'Tanya' in five different growth stages.

Fig. 27. Quantification of Sola l 1 in tomato 'Tanya' in five growth stages with monoclonal antibody.

Fig. 28. Immunological activity analysis of Sola l 1 in tomato 'Tanya' in five growth stages with patient serum.



## 壹、緒論

### 一、食品過敏

#### 1.1. 過敏簡介

免疫反應可分為「先天性免疫反應」和「後天性免疫反應」兩大類，前者不具有抗原特異性，只要有異物存在就能引發；後者則具有抗原特異性，針對不同的異物產生不同的反應，需要淋巴球的參與，例如不同的 B 淋巴球株，可分別受特定結構的抗原活化，分化為抗原特異性的記憶性 B 淋巴球與漿細胞 (plasma cells)。

過敏反應是指人體免疫系統將不具致病性異物識別為威脅而引起嚴重反應。人體的免疫機制會為保護人體免於遭受外界物質的傷害而產生排斥反應，當異物質第一次入侵人體，體內的漿細胞會進行吞噬作用，將過敏原上的抗原呈現給記憶性 B 淋巴球，並誘發相關免疫反應，包括肥大細胞增生、組織胺釋出等，因而造成呼吸道及皮膚等器官和組織的發炎反應。而後，當再次接觸到抗原，因著 B 淋巴球對此抗原具有特異性，體內的屏障會快速啟動，接著引發後續一連串的免疫反應，常見的症狀包括呼吸急促、腹瀉、噁心、皮膚紅腫、吞嚥困難、過敏性蕁麻疹和急性休克等。

#### 1.2. 食品過敏反應類型

食品過敏的發生，通常因為人體的免疫系統錯將食品中某些蛋白質誤認為是對人體有害的外來成份，特別是當某些可耐消化的食品蛋白質片段，受到 IgE 抗體所辨識之時，就可能引發後續的免疫反應，特別是區域性的發炎反應，因而引起食品過敏。食品過敏可就 IgE 的參與與否分為二類，有時此兩類反應可能同時發生 (Curotto de Lafaille *et al.*, 2009; Luccioli 2012; Ruiter and Shreffler, 2012)。

A. IgE 參與之食品過敏 (IgE-mediated food allergy)，這是傳統認為最典型的食品過敏反應，通常在攝食過敏原後兩小時內發生。當人體首次接觸外來過敏原



時，B 淋巴球受過敏原活化而分化後，製造結構相對應此外來抗原的 IgE 抗體；當人體再次接觸過敏原時，可辨識此過敏原之特異性 IgE 會與過敏原結合，並進一步與顆粒性球細胞（肥大細胞、嗜酸性與嗜鹼性白血球）結合，導致顆粒性球反應並釋放大量例如組織胺之免疫趨化物質，引起食道、胃、腸道甚至是其他組織例如皮膚與呼吸道的發炎反應 (Cianferoni and Spergel, 2009)。

B. 非 IgE 參與之食品過敏 (non-IgE-mediated food allergy)，又稱為細胞參與之食品過敏 (cell-mediated food allergy)，此類食品過敏反應的發生機轉尚不完全清楚，目前已知可能有 T 細胞或是嗜酸性球的參與 (Lee and Burks, 2006)，也可能與新生嬰兒腸道淋巴組織發育時，飲食所引起的免疫反應與耐受反應 (tolerance)，兩者間的平衡有關。非 IgE 參與之食品過敏，因為涉及 T 細胞及其他細胞的活化，通常發生較慢，於飲食後 4-48 小時後才發生，例如嬰兒餵食數小時後的出血性腹瀉、腹脹、血便；或是例如成人攝食海鮮後造成暈眩、噁心、抽續、嘔吐反應。另一方面，食品不耐受性 (food intolerance) 症狀與非 IgE 參與之食品過敏類似，但是食品不耐受性，例如乳糖不耐受性及藥物反應，因未涉及免疫反應，因此並不屬於食品過敏之範疇。乳糖不耐受性發生的原因可能是由於腸道內缺乏所需的乳糖酶，或者由於乳糖酶的活性已減弱而造成；而藥物反應則可能起因於機體對作用藥物的感受性有所差異，而造成的副作用或毒性反應。(Bulks *et al.*, 2012)。

由於腸道同時肩負接觸外物、吸收養分、抵禦病原的複雜功能，腸道免疫系統應對外來無害之食品成份具口服耐受性 (oral tolerance)，可能與後天調節性 T 細胞 (Adaptive Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells, iTreg) 相關，目前推測可能原因為後天調節性 T 細胞可抑制腸道免疫細胞對食品的免疫反應，因而產生耐受性 (reviewed by Curotto de Lafaille *et al.*, 2009)，避免食物過敏。然而，食品過敏患者失去口服耐受性而導致發生食品過敏反應的原因，至今仍未完全清楚。





### 1.3. 食品過敏與食品安全

食品過敏 (food allergy) 是重要的食因性疾病 (foodborne illness) 之一，也是現代非常重要的食品安全議題。在流行病學上，約 33% 的過敏反應主要是由食物誘發，且與遺傳、地域、食物種類、飲食習慣等多種因素有關 (Hughes and Mills, 2001)。調查發現人類總人口數中約有 2.5% 會產生食品過敏反應 (Costa *et al.*, 2012)。經由病史及實驗上確認食品過敏的比例，在嬰幼兒大約是 2-8%，在成人則大約是 2% (Cianferoni and Spergel, 2009)。

由於防止過敏反應發生最有效的方法是避免患者接觸過敏原，因此美國國會在 2004 年通過「食物過敏原與消費者保護法案」(Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act of 2004, FALCPA 2004)，後續 FDA 規定自 2006 年開始，所有包裝食品中，若含有主要過敏原 (major food allergen) 之原料，及部份可能引起過敏的食品添加物，均應予以標示 (Gendel, 2013)。除美國之外，在聯合國食品法典委員會 (CAC Food Standards 4.2.1.4)、歐盟 (2000/13/EC, 2003/89/EC)、英國 (Directive 2006/142/EC)、日本 (食品安全法, 食品衛生執行條例)、澳洲、紐西蘭、中國 (預包裝食品標籤通則) 等國，均對食品過敏成份的標示，有不等的法令規範 (Gendel, 2013; Luccioli 2012)。我國鑒於現今國人食品過敏發生率屢屢攀升，消費者對於食品中致過敏性成分漸重視。暨此，台灣食品藥物管理署於 2014 年訂定「食品過敏原標示規定」，明定市售有容器或包裝之食品中，含有特殊過敏體質者致生過敏之內容物，應於其容器或外包裝上，顯著標示含有致過敏性內容物名稱之醒語資訊。在其列表包括：蝦及其製品、蟹及其製品、芒果及其製品、花生及其製品、牛奶及其製品、蛋及其製品。

### 1.4. 交叉反應與食品過敏

當抗體無法鑑別兩種抗原，同時對兩種結構類似的不同抗原均發生反應，稱為交叉反應 (cross reaction) (Fedorov *et al.*, 1997)。當食品中的蛋白與其他致敏的抗





原結構相似時，就可能引起交叉免疫反應，造成食品過敏。

臨床上食品過敏的首例於 1942 年被提出，當時發現受花粉過敏原致敏的個體，有可能對部份的新鮮水果產生過敏症狀 (Tuft and Blumenstein, 1942)。後續的研究發現，此一過敏的機制與 IgE 抗體有關，個體第一次接觸花粉過敏原時，可能活化 B 淋巴球產生可辨識花粉過敏原的特異性 IgE；當人體第二次接觸結構近似的過敏原例如番茄 Sol a l l 蛋白之時，因為花粉過敏原與番茄 Sol a l l 蛋白的結構類似，因此個體內特異性的 IgE 便會與番茄 Sol a l l 蛋白結合，並進一步與顆粒性球細胞（肥大細胞、嗜酸性與嗜鹼性白血球）結合，導致顆粒性球反應並釋放大量例如組織胺之免疫趨化物質，於是番茄便可能因為交叉反應，造成個體過敏引起發炎反應。

### 1.5. 常見的食品過敏

食物過敏主要由食物中的蛋白過敏原所引起，無論動物性或植物性食物都可能含有過敏原。文獻上，常引發兒童過敏之食物主要有牛奶、蛋、花生、大豆、小麥；而引起成年人花粉相關食物過敏之食物則有水果、蔬菜、堅果、種子及魚貝類等 (Sampson, 2008; Rancé *et al.*, 2005; Harrop *et al.*, 2007; Ventura *et al.*, 2010)。榮民總醫院吳子聰教授曾針對台灣常見的食物過敏進行研究，結果顯示蝦、蟹、牛奶、蛋、花生是台灣地區最易引起過敏反應的第一級食物，第二級致敏食物為芒果、其他海鮮，第三級致敏食物則是花枝、蛤蠣、魷魚、墨魚、螺、鱈魚、大豆、小麥、奇異果等 (Wu *et al.*, 2012)。

### 1.6. 食品過敏分析方法

食品過敏對食品安全以及人體健康非常重要，食品科學上對食品過敏的研究方向，除了針對食品中的過敏原予以標示管理，讓消費者避免接觸攝入過敏原之外，亦應建立食品中過敏原的基礎資料及分析工具，以瞭解在地不同食品種類中，



過敏原的存在與高低情形。同時建立適當之過敏原分析平台，分析不同種類、不同品種、不同加工程序後食品中過敏原的含量。

常見用於食品過敏原的分析方法為免疫分析方法，是以純化之食品過敏原作為抗原，將此抗原免疫動物後，進一步製作單株抗體；在大量生產單株抗體後，再以酵素連結免疫分析法分析樣品中的過敏原含量。然而，此免疫分析方法受限於必須取得優異特異性的抗體，否則很容易受到交叉反應的干擾。另一方面，一般免疫方法每個反應只能使用一種抗體偵測一種抗原，因此倘若必須同時分析樣品中是否含有多種過敏原，就必須進行多次反應而提高成本 (Heick *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2012)。

市場上少數以核酸定量方式，藉由製備特異性核酸探針以分析不同種類、不同品種、不同加工程序後食品中過敏原的含量。目前已有商品化套組可方便食品業者或是管理單位分析食品過敏原，然而商品化套組所包含的食品過敏原種類仍十分有限，也缺乏地方性食品所含的過敏原，此外，世界各國對食品過敏原亦尚未建立公訂分析方法。

## 二、蔬果過敏

### 2.1. 蔬果中的主要過敏原

文獻上蔬果過敏原主要有六類，茲根據已被鑑定出之過敏原數目多寡，依重要性序列如下 (reviewed by Ballmer-Weber and Hoffmann-Sommergruber, 2011):

A. 脂質運輸蛋白質 (lipid transfer proteins, LTP)，又稱為 Prolamin supersamily 家族。蔬果中已獲鑑定的 LTPs 家族過敏原已有 26 種，分子量約 7-9 kDa，此類過敏原廣泛存在各種植物中，包含重要作物的花生 Ara h 9、小麥 Tri a 14 過敏原皆為 LTPs 家族，國外均已廣泛之研究，可能具有植物防禦與脂質運輸的生理功能。已知 LTPs 過敏原對胃蛋白酶具有耐受性，蔬果中含有之 LTPs 家族過敏原包含番茄 Sola 13，洋蔥 All c 3，胡蘿蔔 Dau c 3，桃子 Pru p 3 等。



B. 肌動蛋白結合蛋白 (profilin)。植物中已獲鑑定的 profilin 過敏原已有 24 種，重要性僅次於 LTP 家族過敏原，亦廣泛存在各種植物中，因主要糧食作物中 profilin 致敏的情形不嚴重，故文獻上 profilin 的研究也較 LTP 家族過敏原為少。已知蔬果中含有之 profilin 過敏原包含番茄 Sola l 1, 芹菜 Api g 4, 西瓜 Cit la 2, 芒果 Man i 3 等。另外值得注意的是，1942 年 Tuft 與 Blumenstein 首次報告食品過敏之病例，後來證實是樺樹花粉的 Bet v 2 過敏原，此 Bet v 2 過敏原亦屬於 profilin 家族。

C. 樺樹花粉主要過敏原 (major white birch pollen allergen, Bet v 1-related protein)。蔬果中已獲鑑定的樺樹花粉 Bet v 1 過敏原已有 17 種，分子量約 17 kDa, 亦廣泛存在各種植物中，經發現與 latex 乳膠過敏原因結構相似會發生交叉反應，而樺樹花粉 Bet v 1 蛋白可能具有植物保護與傳遞固醇成份功能。已知蔬果中含有之樺樹花粉 Bet v 1 過敏原包含番茄 Sola l 4, 芹菜 Api g 1, 胡蘿蔔 Dau c 1, 蘋果 Mal d 1 等。

D. 類索馬甜蛋白 (Thaumatococcus-like proteins)。蔬果中已獲鑑定的 Thaumatococcus-like 過敏原已知有 7 種，以果樹為主，分子量約 20-25 kDa, 生理角色可能與植物保護有關。已知蔬果中含有之 Thaumatococcus-like 過敏原包含奇異果 Act d 2, 蘋果 Mal d 2, 葡萄 Vit v Thaumatococcus 等。

E. 內幾丁質酶 (endochitinases)。蔬果中已獲鑑定的 endochitinase 過敏原已知有 6 種，分子量約 25-35 kDa, 生理角色可能與植物保護分解真菌細胞壁的幾丁質有關。已知蔬果中含有之 endochitinases 過敏原包含香蕉 Mus xp Chitinase, 酪梨 Pers a 1 等。

F. 葡萄聚糖水解酶 ( $\beta$ -1,3-glucanases)。蔬果中已獲鑑定的 glucanase 過敏原已知有 5 種，分子量約 25-35 kDa, 生理角色可能與植物保護分解真菌細胞壁的  $\beta$ -1,3-葡聚糖有關。已知蔬果中含有之 glucanase 過敏原包含番茄 Sola l Glucanase, 香蕉 Mus a Glucanase 等。



G. 其他植物過敏原。由於分類上植物與人類的親緣較一般動物為遠，因此許多蔬果蛋白都可能被人體視為外來蛋白而引起免疫反應，但因上述之外其他蔬果蛋白種類眾多且病例較少，尚未受系統性研究。例如蔬果的過氧化酶 peroxidase, 果膠酶，都曾被報導可能引起過敏反應。

蔬果種類眾多且含有的過敏原種類十分複雜，蔬果造成食品過敏的比例佔所有食品過敏的 5.7 - 11.5% 左右 (Zuidmeer *et al.*, 2008)，但是文獻上對蔬果過敏原的瞭解較少，且對享有「水果王國」美譽的台灣而言，研究蔬果中的過敏原，更具意義、優勢及應用價值。

## 2.2. 植物 profilin 與 profilin-pollen 交叉反應

植物 profilin 是肌動蛋白 (actin) 的結合與調控蛋白 (binding and regulatory protein)，生理功能與生物體的生長、形態發育、細胞質架構、細胞質流、細胞器運動、細胞分裂、極性建立和尖端生長皆有相關 (Staiger, 2000; Wasteney, 2000; McKinney *et al.*, 2001)，也是植物生長必要的蛋白質，廣泛存在於各種植物之中。植物 profilin 為一種球狀蛋白，分子量大小約為 14-16 kDa，廣泛分布於各種生物體中 (Gibbon and Staiger, 2000; Ramachandran *et al.*, 2000; McKinney *et al.*, 2001)，1991 年首次自樺樹花粉中發現 profilin 類之 Bet v 2 過敏原 (Valenta *et al.*, 1991)，而後研究顯示大部份的花粉、草、花生、甜瓜和其他蔬菜水果的過敏原也皆是 profilin 蛋白 (Valenta *et al.*, 1992; Vieths *et al.*, 2002; López-Torrejón *et al.*, 2007)。

Profilin 蛋白在高等植物物種中序列保守且結構相近，即便是種源較遠的植物，其 profilin 仍具有 75% 以上之序列相似性 (Radauer *et al.*, 2006)；Hauser 等人的研究指出至少有 39 個致敏的 profilins 已被發現，且這些致敏 Profilin 的胺基酸序列相似度達 90% (Hauser *et al.*, 2010)，因此，profilin 蛋白容易在植物花粉和食物過敏之間引起高度交叉反應性 (Bulks *et al.*, 2001)。文獻指出有 20% 對樺



樹花粉及食物過敏的患者其 IgE 會辨認到 profilins 過敏原 (Willerroider *et al.*, 2003); 另一研究發現, 二十位對樺樹花粉過敏的患者, 皆至少對兩種蔬果表現出嚴重過敏反應, 血清檢測發現所有樺樹花粉過敏患者血清中, 皆產生對植物食品具特異性的 IgE 抗體 (Ebner *et al.*, 1995); 由於植物 profilin 與花粉及植物性食物的具複雜的交叉反應, 使得過敏患者的致敏原複雜化, 同時難以界定。

### 三、番茄之生理活性

#### 3.1. 番茄簡介

番茄 (*Solanum lycopersicum*), 又名為西紅柿, 為茄科茄屬番茄亞屬的一年生草本植物, 原產於南美洲西岸安地斯山區和峽谷地帶, 栽種歸化則在墨西哥。起初番茄僅作觀賞之用途, 直至十九世紀才在歐洲被作為生食及加工用之栽培作物。中國則是在十七世紀時, 由葡萄牙人引入, 直到二次世界大戰後才普遍栽培。台灣在 1895 年自日本引進栽培品種, 而後經各試驗場所進行試種、推廣, 番茄才在台灣成為經濟栽培作物 (楊, 1992)。

番茄喜好冷涼及高光照氣候, 於熱帶及亞熱帶地區的台灣, 番茄多於秋冬季種植。葉為互生羽狀複葉, 葉片缺刻不深, 光滑或有毛絨; 完全花著生於節間, 每一花序有五到六朵花, 花色為黃色。番茄為一漿果, 胎座肉質而皮薄, 果實的形狀及顏色經改良已呈現多種形色, 最常見的為紅色、黃色等 (楊, 1992)。

番茄學名之辨也多為人所討論, 1753 年 Linnaeus 將番茄分類在茄屬 (genus: *Solanum*), 學名為 *Solanum lycopersicum*; 然而 1768 年 Philip Miller 則有不同見解, 他將番茄獨立為番茄屬 (genus: *Lycopersicon*), 學名改為 *Lycopersicon esculentum*。此學名延用至 2000 年, 在 2000 年經遺傳分析後認為番茄應該屬於茄屬, 因此學名再次更改為 *Solanum lycopersicum*, 至今對於番茄學名仍有各種不同意見, 因此 2000 年之後文獻, 此二學名皆多有出現。根據美國植物科學家 Charles Rick 的分類方法, 番茄屬可以分為九個種: 普通番茄 (*Lycopersicon esculentum*)、醋栗番茄 (*L. pimpinellifolium*)、契斯曼尼番茄 (*L. cheesmanii*)、小花





番茄 (*L. parviflorum*)、克梅留斯基番茄 (*L. chmeilewskii*)、多毛番茄 (*L. hirsutum*)、智利番茄 (*L. chilense*)、秘魯番茄 (*L. peruvianum*) 和潘那利番茄 (*L. pennellii*) (Gould, 1983; Hancock, 1992)。而農業栽培主要是以普通番茄為主，可依用途及果實大小分為大果番茄、小果番茄和加工用番茄。

番茄的品種極多，其果形和顏色多樣化且用途十分廣泛，為全球產量第二名的蔬菜，世界年產量億噸以上 (Primavesi *et al.*, 2011)，除鮮食外，番茄加工品種眾多，是一具有高經濟價值的蔬果兩用園藝作物。

### 3.2. 番茄之成分組成

番茄中含醣類、有機酸、維生素、類胡蘿蔔素等營養成分，每一百克中約含糖 2.6 克、蛋白質 0.9 克、脂肪 0.2 克、澱粉 0.1 克、維生素 C 14 毫克和維生素 E 0.54 毫克。醣類以葡萄糖和果糖為主，酸類則是檸檬酸和蘋果酸。另外，番茄中所含之抗氧化物質茄紅素，近年來為多數人所注意，其功效的研究範疇包括預防前列腺癌、降低高血壓性心臟血管疾病發生機率、減低發炎反應等 (Petr *et al.*, 2005)。

### 3.3. 台灣主要栽培番茄品種

依據 2010 年農業統計年報，台灣番茄的栽培面積約 4700 公頃。主要番茄產地大多集中在嘉義、雲林、南投及彰化等地區。在台灣，市場上常見的大果番茄包括傳統的黑柿、全紅色系的牛番茄、粉紅品種桃太郎番茄等。其中，因著全紅色系的牛番茄顏色鮮紅且具有光澤，果實耐貯運，櫥架壽命又長，目前在台灣市場上的流通率最高，為最常出現於菜餚中的大果品種。(戴，2009；陳，2013；郭，2014)

鮮食小果番茄則多以紅色品種為主，包括玉女番茄、種苗亞蔬 22 號、紅津、甜愛和台南亞蔬 11 號等。近年來，黃桔色小果番茄因著其鮮豔渾圓的外表也漸



為多數人喜愛，逐漸勢起。常見品種包括有錦珠、金瑩、麗金和花蓮亞蔬 21 號等。紅色主要栽培小果品種玉女番茄其植株及結果習性為半停心型，具有抗萎凋病的特性，因果色鮮紅亮麗，果實糖度高，廣受人們喜愛，為目前台灣市場上重要的小果番茄品種。(戴，2009；陳，2013；郭，2014)



## 四、番茄過敏

### 4.1. 番茄致敏地區及症狀

根據歐盟 ECRHS 機構的調查，番茄、胡蘿蔔及芹菜是為最常見造成過敏的蔬菜 (Burney *et al.*, 2010)；調查顯示，對新鮮番茄過敏的族群具有區域性，主要分布在亞洲國家和地中海地區 (Primavesi *et al.*, 2011)，這些地區對番茄過敏的患病率佔總食物過敏人口的 1.5% 至 16%。在台灣，前五名易誘發過敏的常見蔬果分別為：芒果 (18%)、番茄 (16%)、香瓜 (11%)、草莓 (9%) 和橘子 (7%)，其中番茄名列第二 (蔡, 2004)，顯示番茄是一重要的食品過敏來源。而番茄引起的過敏反應多為 IgE 參與之食品過敏，症狀可能有蕁麻疹、皮膚炎、口周皮炎、口腔過敏症候群、氣喘、過敏性鼻炎，以及腹痛等 (Kondo 2001; Kondo *et al.*, 2001)。

### 4.2. 番茄 profilin 過敏原- Sola l 1

文獻上曾被報導的番茄過敏原共有 Sola l 1 (profilin, MW 14-16 kDa), Sola l 2 ( $\beta$ -fructofuranosidase, MW 50 kDa), Sola l 3 (LTP, 6 kDa), Sola l 4 (intracellular pathogenesis-related protein TSI-1 of the Bet v 1 family), Sola l Chitinase (MW 31 kDa), Sola l Glucanase (MW 55 kDa), Sola l Peroxidase (MW 45 kDa), Sola l PME (pectin methylesterase inhibitor) 等八種，其中 Sola l 1 被指出為番茄中最主要之過敏原。

在番茄過敏患者中，有 22% 到 26% 的患者對 Sola l 1 具有專一性 IgE 辨認，且這些對患者在總番茄萃取物的 IgE 反應活性有 42% 的專一性 IgE 是來自於 Sola l 1 (Willeroider *et al.*, 2003；Westphal *et al.*, 2004)。

Sola l 1 屬於一 profilin 蛋白家族，這類蛋白家族廣泛分布於各種生物體中，具有高度變異性。在植物中，profilin 蛋白家族為常見過敏原，例如大部份的花粉、草、花生、甜瓜和其他蔬菜水果的過敏原皆是 profilin (Vieths *et al.*, 2002)。這類廣泛的蛋白質在植物物種中具有高度交叉反應性，而此高度交叉性反應的原因可能





來自於 profilin 專一性的 IgE 抗體，因著 profilin 蛋白家族的序列及結構相似性，致使 profilin 專一性抗體辨認錯誤。因此，profilin 這類的蛋白又被稱為 panallergens，容易在植物花粉和食物之間引起交叉反應，誘導過敏的發生 (Foetisch *et al.*, 2001)。

Sola l 1 這個番茄中最重要的 profilin 過敏原於 2002 年被純化發現 (Vieths *et al.*, 2002)，於 2003 年完成基因選殖，其基因含 396 個鹼基，蛋白分子量為 14,257 kDa，等電點為 4.46，重組之 Sola l 1 蛋白同樣可被過敏患者血清的 IgE 辨識而得確認 (Willeroider *et al.*, 2003)。

過去文獻中對番茄中 Sola l 1 過敏原的研究，多是偏向醫學及生化研究，以重組過敏原分析番茄過敏患者血清對 Sola l 1 重組蛋白的辨識能力，以及探討血清對番茄 Sola l 1 過敏原與其他蔬果 profilin 過敏原的交叉反應。Westphal 等人 (Westphal *et al.*, 2004) 曾探討番茄 Sola l 1 與其他蔬果的交叉反應活性，發現在番茄、芹菜、櫻桃、鳳梨和胡蘿蔔中，番茄 Sola l 1 具有最高的抑制能力，可抑制血清 IgE 與樺樹花粉過敏原 Bet v 2 結合，且番茄過敏原 rSola l 1 對香蕉過敏原 rMus xp 1 和樺樹花粉蛋白 rBet v 2 分別有 80% 和 78% 的胺基酸序列相似度 (Westphal *et al.*, 2004)。另一方面，Asero 等人指出，番茄造成的過敏反應，臨床症狀有 33% 的敏感度、93% 專一性、68% 的陽性預測值、75% 的陰性預測值可證明，引起番茄口腔過敏症候群的過敏原為番茄 Sola l 1 蛋白 (Asero *et al.*, 2003)。此外，番茄 Sola l 1 蛋白曾被發現具有直接刺激人類嗜鹼性球釋放發炎性介質的能力 (Westphal *et al.*, 2004)。

#### 4.3. 園藝生理與番茄過敏原關係

文獻曾指出，番茄過敏原的致敏力可能會隨著番茄的成熟及後熟有所改變 (Armentia *et al.*, 2003)。Armentia 等人發現，對番茄果實施加乙烯及水楊酸處理，影響番茄的採後生理之後，其引起患者蕁麻疹的嚴重程度增加、過敏性反應的症



狀也變得更加嚴重 (Armentia *et al.*, 2003)。以皮膚點刺法 (Prick by prick test) 和免疫分析方法測試八名 12 至 27 歲番茄過敏患者分別食用未處理之番茄、乙烯處理之番茄和水楊酸處理之番茄之後，其皮膚紅腫區塊大小以及血清中特異性 IgE 之辨認情形，結果發現賀爾蒙處理過的番茄果實，致使患者皮膚的蕁麻疹腫脹區塊顯著提高 ( $p < 0.0001$ )，其產生的過敏反應也較嚴重。免疫分析的部份也同樣可以看到一致的現象。

前人研究也曾以皮膚點次法測試不同成熟度番茄之致敏能力，結果發現未成熟之番茄果實其致敏性會較成熟的番茄果實來的低 (Bleumink *et al.*, 1967)。而 Kondo 等人以免疫墨漬法分析 (immunoblotting) 綠熟期 (green)、變色期 (breaker)、粉紅期 (pink) 以及紅熟期 (red ripening) 等四個成熟階段番茄中過敏原含量，結果顯示番茄中過敏原蛋白含量會隨著成熟度變動 (Kondo *et al.*, 2001)。因此推測番茄果實的營養、生理、成熟狀態以及賀爾蒙的影響，可能會影響番茄中 Sola 1 1 的含量，進而影響番茄的致敏性。

## 五、研究目的及架構

本研究目的希望藉由建立番茄中 profilin 過敏原 Sola 1 1 於蛋白質及核酸的分析平台，達到準確分析食品中過敏原以及建立研究過敏原之平台，以利後續研究探討。試驗分成四部份，第一部份自牛番茄中選殖 Sola 1 1 基因，以重組之基因表現和生產 Sola 1 1 重組蛋白，並以此重組蛋白作為抗原製作抗體；第二部份建立抗體技術之過敏原分析平台；第三部份為建立核酸定量的分析平台；第四部份以建立出的分析平台分析不同品種與成熟度的番茄中 Sola 1 1 含量差異。研究架構如下：

第一部份：以重組 Sola 1 1 過敏原作為抗原製作抗體

1. 以市面流通之的牛番茄作為材料，萃取 total RNA 後，反轉錄成為 cDNA，根據 GeneBank 中 Sola 1 1 之核酸序列設計引子選殖 Sola 1 1 基因，以



pGM-T 商業載體進行基因重組，經藍白篩選及抗生素篩選後轉形於大腸桿菌中。

2. 將 Sola 11 基因構築至 pET32a(+) 中，以 *E.coli* BL21 cell 進行重組蛋白生產，以 IPTG 誘導表現重組蛋白後利用快速蛋白質液相層析系統 (FPLC) 搭配 HiTrap Chelating HP 管柱純化出含 His-tag 的重組蛋白 rHis-Sola 11。

#### 第二部份：建立抗體技術之過敏原分析平台

1. 純化重組蛋白 rHis-Sola 11 作為抗原免疫小鼠，取其 B 淋巴細胞與骨髓瘤細胞製作融合瘤細胞，進行特異性篩選後得到分泌 anti-Sola 11 抗體之細胞株，並製備單株抗體。
2. 利用前項敘述製備之 anti-Sola 11 mAb 抗體進行西方墨點分析，以影像系統及軟體分析其訊號強度以定量。

#### 第三部份：建立核酸技術之過敏原分析平台

1. 以即時聚合酶鏈鎖反應 (Real-time quantitative PCR, qPCR) 作為主要的分析方法，設計番茄 profilin 過敏原 Sola 11 特異性引子及看家基因引子，藉由試驗檢測，選取 PCR 反應最適之引子及條件。
2. 在評估番茄中 Sola 11 mRNA 表現量方面，可分析 Sola 11 與 Actin 或 18S RNA (house keeping gene) mRNA 之相對表現量，利用即時定量 PCR 方法，決定不同樣品中 Sola 11 的相對表現量。

#### 第四部份：以建立出的分析平台分析不同品種與成熟度的番茄中 Sola 11 含量

1. 在相同成熟度之下分別抽取各品種番茄蛋白質及 mRNA，以前述建立之蛋白質與核酸定量分析平台，分析不同番茄品種中 Sola 11 過敏原的含量差



異。

2. 自世界蔬菜中心提供種子所栽種之番茄中，擇一鮮食品種之番茄進行成熟度與 Sola l 1 過敏原含量相關性探討。

## 貳、材料與方法

### 一、番茄 Sola l 1 基因選殖

#### 【實驗材料與藥品】

#### 1. 藥品

- a. Trizol 購自 Thermo Fisher Scientific Inc., USA
- b. Sodium tetraborate decahydrate、IGEPAL CA-630、Polyvinylpyrrolidone、Sodium deoxycholate、DTT、Ethanol、2-Propanol、DEPC、NaCl、SDS 購自 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- c. EDTA、Chloroform 購自 J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA
- d. IPTG、X-GAL、Bio 100 DNA marker 購自 Protech Technology, Taipei, Taiwan
- e. Bacto-trypton、Bacto-yeast extract 購自 Difco, Detroit, MI, USA
- f. Agar 購自 Viognene, Taipei, Taiwan
- g. Ampicillin、TBE buffer 購自 amresco, Ohio, USA
- h. Taq DNA Polymerase 2X Master Mix 購自 Ampliqon, Copenhagen, Denmark
- i. T4 lagase 購自 New England Biolabs, Inc., MA, USA

#### 2. 勝任細胞 (competent cell)

- a. *E. coli* DH5alpha competent cell 購自 Real Biotech Corporation, Taipei, Taiwan

#### 3. 套組

- a. Clontech RNA to cDNA EcoDry™ premix 購自 Clontech Laboratories, Inc. USA
- b. Plasmid Miniprep Purification Kit 購自 GMbiolab Co, Ltd., Taiwan
- c. DNA Clean/Extraction Kit 購自 GMbiolab Co, Ltd., Taiwan
- d. QIAquick Gel Extraction Kit 購自 Qiagen, CA. USA



- e. pGM-T vector systems 購自 Genomics, Taiwan

#### 4. 設備與儀器

- a. NanoDrop Spectrophotometer 購自 Thermo Fisher Scientific Inc., USA
- b. 乾式加熱器 購自 Eppendorf Inc., Hamburg, Germany
- c. ABI GeneAmp PCR System 2700 購自 Applied Biosystem, USA
- d. Mupid-2 Plus Mini-gel system 購自 Cosmo Bio co., Ltd., Tokyo, Japan
- e. 細胞分子照相分析系統 購自 Syngene Gene Genius, Europe
- f. 恆溫水浴槽 購自 KANSIN Instruments co., Ltd Taipei, Taiwan

Extraction buffer: 0.2 M Borax, 30 mM EDTA, 1% SDS, 1% Sodium deoxycholate, 10 mM DTT, 1% IGEPAL CA-630, 2% Polyvinylpyrrolidone

### 【方法】

#### 1. 番茄樣品

以台灣牛番茄‘紅慧’為材料，取得自世界蔬菜中心蔡文錫博士提供種子，培育於台大生農學院附設農場園藝分場。

#### 2. 番茄 RNA 抽取

將樣品利用液態氮冷凍磨成粉末，取約 0.5 g 番茄果實粉末，移入 1.5 mL eppendorf 中，並加入 500  $\mu$ L extraction buffer 於 65°C 下反應 3 分鐘。離心取上清液移置新 eppendorf 後，加入 500  $\mu$ L Trizol 混勻，靜置 3 至 5 分鐘。11,200 rpm 離心 10 分鐘後，取上清液加入 200  $\mu$ L 氯仿，充分混勻後於室溫靜置 3 分鐘使其作用。離心 15 分鐘後小心取出上層透明的水層液移至乾淨的 RNase free eppendorf 中，加入 500  $\mu$ L 異丙醇並靜置 10 分鐘。離心後去除上清液，加入 1 mL 的 75% alcohol/DEPC 清洗沉澱物，以 8,800 rpm 離心 5 分鐘後去除上清液，重複此步驟二至三次，最後一次盡量將液體移除，自然風乾 20 分鐘至 1 小時。風乾後以 dH<sub>2</sub>O/DEPC 回溶沉澱物，即得 RNA。



## 2. 反轉錄 PCR (RT-PCR)

利用 RNA to cDNA EcoDry™ Premix (Oligo dT) Kit 進行 RT-PCR。於 tube 中加入 5 µg total RNA 混合均勻，短暫離心後，置於自動控溫 PCR 系統中，在 42°C 反應 60 min，接著 70°C 反應 10 min 完成反轉錄。Nanodrop 測其核酸濃度，保存於 -20°C。

## 3. 切膠純化

取 1.5 g agarose 與 0.5X TBE buffer，加熱均勻溶解配製成 1.5% agarose gel。注入 PCR 產物與 DNA Marker，以 Mupid-2 Plus Mini-gel system 進行電泳分析。電泳分析後利用細胞分子照相分析系統分析膠片，切下目標條帶，以 QIAquick Gel Extraction Kit 純化目標核酸產物。先秤取切下條帶的重量，以 100 mg gel 加入 300 µL QG buffer 比例，加入適當的 QG buffer，於 50°C 加熱 10 分鐘，使膠體完全溶解。確認膠體溶解後，將液體移入 QIAquick column 中，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，倒去 column 下方流出液，再加入 500 µL QG buffer，重複離心動作，確保無未溶解膠體殘留。倒去流出液，加入 750 µL PE buffer，靜置 3 分鐘後進行離心，以去除殘留液，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，確認無 PE buffer 殘留於上方管柱內後，移管柱至新的 eppendorf 中。於管柱中加入 30 µL 的滅菌去離子水，靜置 1 分鐘後，13,000 rpm 離心 1 分鐘，eppendorf 內容物即為純化出之目標核酸產物。利用 Nanodrop 機器檢測 DNA 的濃度與純度，接續進行 TA cloning。

## 4. TA cloning

將純化得到的目標 DNA，利用 pGM-T vector systems 進行核酸片段與載體的接合。混合 2.5 µL 2X Rapid Ligation buffer、0.5 µL pGM-T vector、1.5 µL PCR





product 與 0.5  $\mu$ L T4 DNA Ligase，總體積為 5  $\mu$ L。於 4 $^{\circ}$ C 下放置 14~16 小時使其接合完全，之後可移到 -20 $^{\circ}$ C 暫存，接續轉形至大腸桿菌之試驗。

## 5. 大腸桿菌之轉形與藍白篩選

將構築好之 5  $\mu$ L 載體與 50  $\mu$ L 商業菌株液 (DH-5alpha) 混合，置冰 10 分鐘後，放入 42 $^{\circ}$ C 水浴槽 heat shock 1 分鐘，再置冰 10 分鐘。置冰後將菌液塗佈於含 20  $\mu$ L IPTG (0.5 M)、20  $\mu$ L X-GAL (50 mg/mL) 的培養基上 (10 g/L Bacto-trypton、5 g/L Bacto-yeast extract、10 g/L NaCl、15 g/L agar 含 100  $\mu$ g/L ampicillin)，37 $^{\circ}$ C 培養 18 小時以上。自菌盤上以 tip 挑取白色菌落，溶解菌落於 30  $\mu$ L 滅菌去離子水之 eppendorf 中，取此菌液 1  $\mu$ L、M13 primer Forward 0.5  $\mu$ L、M13 primer Reverse 0.5  $\mu$ L、Taq DNA Polymerase 2X Master Mix 5  $\mu$ L 與 滅菌去離子水 3 $\mu$ L 混勻後進行 PCR 反應，PCR 條件為 94 $^{\circ}$ C 5 min 進行一循環，94 $^{\circ}$ C 30s、56 $^{\circ}$ C 30s、72 $^{\circ}$ C 40s 進行 25 循環，72 $^{\circ}$ C 10 min、4 $^{\circ}$ C 10 min 進行二循環。反應完成後，利用 1.5% agarose gel electrophoresis 檢視擴增片段，選取含有正確核酸片段之菌落液，培養於含抗生素之 LB 培養液中，於 37 $^{\circ}$ C 下震盪培養 12 小時後收取菌液，送至基龍米克斯定序公司進行核酸定序。

## 6. pET-32a(+) 載體構築及轉形

### (1) 取得 pET-32a(+) 質體

首先以 LB 培養液培養已轉殖進 pET-32a(+) vector 的 DH-5 alpha 菌株，待菌液 OD<sub>600 nm</sub> 達 0.6~0.8 時，利用 Plasmid Miniprep Purification Kit 抽取 plasmid。取 1 mL 菌液至 eppendorf 以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，倒去上清液。加入 200  $\mu$ L PD1 buffer 懸浮沉澱物，再加入 200  $\mu$ L PD2 buffer 靜置 2 分鐘將菌打破，接著加入 300  $\mu$ L PD3 buffer 混勻離心 3 分鐘。吸取上清液轉移至 PD column，13,000 rpm 離心 30s 後倒去下方流出液。加入 400  $\mu$ L W1 buffer 至 PD





column, 13,000 rpm 離心 30s 之後倒去下方液。再加入 600  $\mu$ L Wash buffer, 13,000 rpm 離心 30s 後, 去除下方液, 重複離心動作, 13,000 rpm 3 分鐘, 徹底移除管柱內殘留液。將 PD column 移至新的 eppendorf 中, 加入 25  $\mu$ L Elution buffer 靜置 2 分鐘, 接著 13,000 rpm 離心 2 分鐘, eppendorf 內即為抽得之 pET-32a(+) 質體。

## (2) 載體之轉形

依據 NCBI 資料庫 Sola l 1 基因之核酸全長序列, 設計增幅 Sola l 1 核酸全長序列且包含 *Nco* I 和 *Xho* I 酵素切位之引子, 以此引子與自番茄萃取之 mRNA 進行反轉錄所得之 cDNA 作為模板, 進行聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 增幅帶有限制酶切位的 Sola l 1 核酸序列。PCR 條件為 94°C 下 2 min 一循環, 使 DNA 雙股模板分離, 於 94°C 反應 30 秒、56°C 反應 30 秒、72°C 增幅 2 分鐘, 進行 35 循環, 最後於 72°C, 10 min、4°C, 10 min 進行一循環, 完成擴增聚合反應。利用 *Nco* I 和 *Xho* I 酵素使 Sola l 1 核酸片段嵌入 pET32a(+) 商業性載體中, 以 T4 DNA ligase 進行接合反應, cDNA 與 vector 以 3:1 的比例接合。將構築好之重組質體轉形 (transform) 至 *E. coli* DH5 alpha 菌株中, 進行培養篩選, 並且進行核酸定序分析確認序列。挑選出成功構築且正確轉形之菌株, 將其再次轉形至 *E. coli* BL21 中進行蛋白表現, 於適當環境下培養並以 IPTG 誘導大量生產重組蛋白。

## 二、重組 Sola l 1 蛋白質之表現與純化

### 【實驗材料與藥品】

#### 1. 藥品

- a. Cellu Sep 3,500 MWCO 透析膜 購自 Membrane Filtration Products, Inc., Seguin, TX, USA
- b. NaCl、SDS、Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、IPTG、Imidazole 購自 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA



- c. Tris-base、Tween-20 購自 J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA
- d. APS、TEMED、polyacrylamide 購自 Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
- e. Coomassie Brilliant Blue、methonal、Tris-base 購自 Mallinckredt Baker, Kentucky, USA
- f. NBT/BCIP 1-Step Solution 購自 Thermo Fisher Scientific Inc., IL, USA
- g. HRP-goat anti mouse IgG 購自 KPL (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc. USA)

## 2. 設備與儀器

- a. Vivaspin20 3 kDa MWCO、HiTrap Chelating HP 5mL、HiTrap Q HP 5mL 管柱 購自 GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA
- b. Äkta Purifier 快速蛋白質液相層析儀 (fast protein liquid chromatography, FPLC) 購自 Amersha Bioscience, Uppsala, Sweden
- c. Nanodrop 購自 Thermo Fisher Scientific Inc., USA
- d. Mini-protein III 蛋白質電泳系統 購自 Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
- e. 濕式轉印槽 TRANS-BLOT CELL 購自 Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
- f. 細胞分子照相分析系統 Syngene PXi4 購自 J&H Technology Co., Ltd.
- g. 0.22  $\mu$ m PVDF membrane 購自 Millipore Corporation, Billerica Massachusetts, USA

Transfer buffer : 500 mL 甲醇, 4.426 g CAPS, pH 11, 加入去離子水至 2500 mL

TBS buffer : 50 mM Tris base, 150 mM NaCl, pH 7.5

TTBS buffer : TBS buffer 含 0.1% Tween-20

Block buffer : TTBS buffer 含 1% BSA

Bindong buffer: 0.02 M sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazole, pH 7.4



Elution buffer: 0.02 M sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 0.5 M imidazole, pH 7.4

## 【方法】

### 1. 誘導重組蛋白表現

培養含重組質體之 BL21 菌株，選取成功轉形之菌落以 1 mL LB 培養液培養 12 小時。以此作為 stock 10  $\mu$ L 加至 5 mL LB 培養液，37°C 搖晃培養 12 小時後，移入至 1 L LB 培養液中培養 16-18 小時。接續加入 400  $\mu$ L IPTG (1.0 M) 誘導重組蛋白表現。待誘導條件完成，離心去除培養液收以取菌塊，菌塊加入少許緩衝液以反覆冷凍解凍法打破菌壁，使胞內蛋白質釋出。菌塊破碎後以 9,400 rpm 離心去除菌塊沉澱物，收取含有蛋白質之上清液，以 0.2  $\mu$ m 膜過濾後進行蛋白純化，利用快速蛋白質液相層析系統 (FPLC) 進行後續純化步驟。

### 2. 重組蛋白質之純化

利用 Äkta Purifier 快速蛋白質液相層析系統和 HiTrap Chelating HP 5 mL 管柱進行純化。預先將 binding buffer (0.02 M sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazole, pH 7.4) 與 elution buffer (0.02 M sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 0.5 M imidazole, pH 7.4) 經 0.2  $\mu$ m 膜過濾後，置於 4°C 預冷。以去離子水平衡管柱，灌入 0.1 M NiSO<sub>4</sub> 使 Ni 鍵結 resin。接著以 binding buffer 平衡管柱，完成注入樣品之前置作業。注入蛋白樣品後，使用起始緩衝液洗去未吸附於管柱之蛋白質，接著進行鹽類梯度的沖提，沖下帶有 His-tag 的蛋白，收集並進行 SDS-PAGE 分析。以 13.5% SDS-PAGE 膠體電泳確認不同鹽濃度下沖提出之蛋白，收取含有目標蛋白之管數，接著後續分析。

重新將樣品透析至起始緩衝液，再以 Äkta Purifier 快速蛋白質液相層析系統以及 HiTrap Chelating HP 1 mL 管柱進行第二次純化。同樣經過流洗及沖提步驟，以 13.5% SDS-PAGE 膠體電泳確認沖提出之蛋白，收集純度最高的分割，合併後



以 3 kDa 之 Vivaspin 20 置換至 Tris 緩衝液中並將濃度濃縮至 1 mg/mL 以上，存放於 4 °C，或長期保存於 -20 °C。

### 3. SDS 膠體電泳法 (SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis, SDS-PAGE)

利用 SDS 膠體電泳法確認所純化之重組蛋白，首先製備 13.5 % polyacrylamide gel，將鑄膠玻片以酒精和拭鏡紙擦拭乾淨，設置於鑄膠裝置上。配置 13.5 % polyacrylamide running gel (2.55 mL polyacrylamide、1.5 M Tris-base (pH 8.8) 1.875 mL、10% SDS 溶液 75  $\mu$ L、10% APS 溶液 50  $\mu$ L、去離子水 3 mL 及 TEMED 5.5  $\mu$ L)，搖晃混合均勻後注入鑄膠裝置中，預留 stacking gel 空間，於上方覆蓋一層甲醇，壓平膠面水平。待 running gel 層凝膠完畢後倒去上方殘留的甲醇，注入 4% stacking gel (400  $\mu$ L polyacrylamide、1.5 M Tris-base, pH 6.8、1 mL、10% SDS 溶液 40  $\mu$ L、10% APS 溶液 30  $\mu$ L、去離子水 2.56 mL 及 TEMED 3.4  $\mu$ L)。小心加入 stacking gel 溶液，勿使之產生氣泡，將齒梳輕輕插入，靜置 20 至 40 分鐘待膠體完全凝固即可進行電泳分析。

膠片凝膠完全後，卸除鑄膠裝置與齒梳，架設於電泳槽中。於電泳槽中注入新鮮的 Tank buffer (3 g Tris-base、14.4 g glycine 及 10 mL 10% SDS，添加去離子水至 1 L) 後即可預備上樣，注入 20  $\mu$ L 加熱處理完畢含 dye 之樣品，與 4  $\mu$ L 蛋白質標準品。固定電壓以 60 伏特跑約一小時，再以 110 伏特跑至染劑置底，中止通電並取出膠片，切除 stacking gel 後以 Coomassie Blue 溶液染色約 15 至 30 分鐘，倒除多餘染劑以去離子水進行褪色。褪去膠片背景色後以細胞分子照相分析系統 (Syngene Genegenins) 分析。

### 4. 西方墨點分析法 (Western blotting)

將重組蛋白經 SDS-PAGE 電泳分析後的膠片，與經甲醇潤洗過的 PVDF 轉印膜浸泡於 transfer buffer 平衡，由正極到負極依序疊加海棉墊片、濾紙、PVDF 轉



印膜、膠片、濾紙、海棉墊片，將其夾緊後利用濕式轉印槽以 400 mA 於 4°C 下轉印 1.5 小時。轉印完成後，將轉印膜浸泡於 blocking buffer 中，於 4°C 下放置過夜 blocking。翌日以 TTBS buffer 沖洗轉印膜 3 次，每次 10 分鐘。加入 anti-Histag 抗體作為一抗，於室溫下反應一小時，反應後以 TTBS buffer 沖洗膜 3 次，每次 10 分鐘。接著以稀釋 500 倍之二次抗體 (HRP-goat anti mouse IgG) 反應一小時，以 TTBS buffer 沖洗轉印膜 3 次，每次 10 分鐘。以 TMB membrane Solution 進行呈色，待看到訊號出現，以清水清洗終止反應。

### 三、抗體製備

#### 【實驗材料與藥品】

##### 1. 實驗動物

- a. BALB/c, Female 購自 台大醫學院動物中心

##### 2. 藥品

- a. Imject Alum 購自 Thermo Fisher Scientific Inc., IL, USA

##### 2. 設備與儀器

- a. 5 mL 針筒、26G 針頭 購自 Terumo, Tokyo, Japan
- b. 0.22  $\mu$ m Minisart 針頭濾器 購自 Sartorius, Goettingen, Germany

抗原注射液：將蛋白抗原配置於 10% Imject Alum 佐劑中，使蛋白最終濃度為 500  $\mu$ g protein/mL

#### 【方法】

以配置好的抗原注射液經腹腔注射免疫 BALB/c 小鼠，每隻小鼠的所需注射



的劑量約 50  $\mu\text{g}$ ，同時免疫三至四隻小鼠為佳。每間隔兩週免疫一次，共免疫三次。最後一次免疫後隔週進行臉部採血，以 ELISA 分析確認血清中抗體對抗原之特異性。確認效價後，選擇效價最高者進行 boost，以不含佐劑的抗原腹腔注射，抗原劑量為 50  $\mu\text{g}$ 。隔週以二氧化碳窒息犧牲，取其脾臟，預備做細胞融合。

#### 四、細胞融合與培養

##### 【實驗材料與藥品】

##### 1. 實驗動物與細胞

- a. BALB/c, Female 購自 台大醫學院動物中心
- b. Mouse X63Ag8.653 myeloma cell 購自 American Type Culture Collection, Manassas, VA

##### 2. 藥品

- a. RPMI-1640 medium 購自 Hyclone, Logan, UT, USA
- b. FBS、100X PSN 購自 GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
- c. Gentamycin、Kenamycin 購自 Amresco, Solon, OH, USA
- d. LPS-EK Ultrapure、Pam3CSK4 購自 InvivoGen, San Diego, CA, USA
- e. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF 購自 PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA
- f. KCl、NaCl、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、EDTA、trypan blue 購自 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- g.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  購自 Riedel-de Haën, Seelze, Germany
- h.  $\text{KHCO}_3$  購自 J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA
- i. 95% ethanol 購自 友和貿易股份有限公司, New Taipei City, Taiwan
- j. Polyethylene Glycol 1500 (PEG 1500) 購自 Roche, USA





- k. HAT 50X media supplement、HT 50X media supplement 購自 GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

### 3. 設備與儀器

- c. 細胞培養盤、50 mL 與 15 mL 離心管、25 mL 與 10 mL stripette、6 cm dish、40  $\mu$ m Cell Strainer 無菌濾網 購自 Corning Life Science, Tewksbury, MA, USA
- d. 載玻片 76  $\times$  20 mm 購自 KIMBLE, Gerresheimer group, USA
- e. 0.1 mm deep 細胞計數器 購自 Reichert Inc, NY, USA
- f. 細胞培養箱 Hera、離心機 Labofuge 400 購自 Heraeus, Hanau, Germany

70% 酒精：取 740 mL 之 95% 酒精以去離子水定量至 1 L。

PBS：稱取 0.2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、8.01 g NaCl、0.2 g KCl、1.15 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  以去離子水溶解並混和均勻，將 pH 值調整至 7.2 後定量至 1 L，高壓滅菌後保存於 4  $^{\circ}\text{C}$ 。

RBC lysis buffer：155 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、10 mM  $\text{KHCO}_3$ 、0.1 mM EDTA 以去離子水溶解混合後，於無菌操作台內使用 0.22  $\mu$ m Minisart 針頭濾器過濾，保存於 4  $^{\circ}\text{C}$ 。

細胞培養液：RPMI-1640 medium 加入 10% FBS、1% 100X PSN、0.1% 10 mg/mL Gentamycin、0.1% 10 mg/mL Kenamycin。

0.4% (w/v) trypan blue 染劑：稱取 2 g trypan blue 粉末，以 50 mL 去離子水溶解混勻作為 10 倍濃之母液，取適量母液稀釋至 1 倍，即為 0.4% 之 trypan blue 染劑。

### 【方法】

#### 1. 小鼠脾臟細胞取得



取 4-6 週大的 BALB/c 小鼠以二氧化碳使其窒息死亡，移入無菌操作台內。使用高壓滅菌過的剪刀及鑷子於小鼠側腹部處外皮剪開一缺口並剪開腹膜，取出脾臟置於 PBS 緩衝溶液中，以磨砂玻璃反覆擠壓，直至脾臟細胞全部取出。以塑膠吸管初次沉澱殘渣，1,500 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液後將細胞團塊拍散，加入 1 mL RBC lysis buffer。搖晃 1 分鐘後靜置反應 2 分鐘，加入 PBS 至總體積為 10 mL 以停止反應，1,500 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液拍散細胞團塊以培養液重新懸浮細胞，即得小鼠脾臟細胞。

## 2. 細胞融合

無菌操作台中準備好 PEG、RPMI、37°C 水浴裝置，收集骨髓瘤細胞 X63，離心計數後以 1:5-1:10 的比例和脾細胞混合。1,500 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液後將細胞團塊拍散加入 RPMI 25 mL 置換緩衝液。再次 1,500 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液後將細胞團塊拍散，於融合期間離心管需置於 37°C 水浴裝置。於 1 分鐘內以 1 mL PEG 邊加邊轉離心管混合均勻，混合 1 分鐘後再加入 1 mL RPMI，混合一分鐘。最後分兩次 3 分鐘加入 RPMI，在 37°C 下靜置 5 分鐘。1,500 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液拍散細胞後以 1 mL RPMI-FBS-HAT 重新懸浮細胞，再加入 45 mL 培養液後分盤至 24 孔盤中，置於 37°C 培養箱中培養。培養條件為 37°C、5% CO<sub>2</sub>。

## 3. 融合瘤細胞培養

每日觀察細胞生長情形，依情況進行繼代。繼代方式為於培養皿中輕輕沖散細胞，去除一半體積的培養液並添加新的培養液至原始體積。一個月後可收取細胞培養上清液以進行 ELISA 效價篩選。



## 五、酵素免疫連結分析

### 【實驗材料與藥品】

#### 1. 藥品

- a. NaCl、KCl、 $K_2HPO_4$ 、BSA 購自 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- b.  $Na_2HPO_4$ 、 $NaN_3$  購自 Riedel-deHaën, Seelze, Germany
- c. Polysorbate 20 (Tween 20)、 $H_2SO_4$  購自 J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA

#### 2. 設備與儀器

- a. 半體積 96 孔平底盤 購自 Corning Life Science, Tewksbury, MA, USA
- b. ELISA reader EnSpire 2300 Multilabel Reader 購自 Perkin Elmer Inc., USA

ELISA wash buffer：50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 1% BSA, 0.05% tween 20, pH 8.0。

反應停止液：2 M  $H_2SO_4$  溶液

### 【方法】

使用三明治酵素連結分析法，首先將抗原固著於孔穴中，每一孔穴中加入 50  $\mu$ L，於室溫靜置 1 小時後以清洗液清洗三次。再依原廠說明書以固著緩衝液 (blocking buffer) 每孔穴加入 50  $\mu$ L，靜置 30 分鐘，避免樣品中的目標細胞素或此後所加入的抗體、酵素直接附著於孔穴，影響結果之準確度。以清洗液清洗三次後加入 50  $\mu$ L 細胞上清液，置溫下靜置 1 小時後以清洗液清洗五次，於每孔穴中加入 50  $\mu$ L 帶有辣根過氧化酶 (horseradish peroxidase) 之二次抗體，室溫下反應 20-30 分鐘。利用兩者的親和作用能使酵素結合於辨識到目標抗原之偵測抗體上。進行 4 次之清洗，每孔穴加入 50  $\mu$ L 反應基質 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)，受酵素之作用，無色基質會轉變成為藍色且隨著反應時間增長會不斷加深，直至酵素失活或所有基質皆反應完成。因此，視情況待呈色至適當深度加入  $H_2SO_4$



反應終止液以停止酵素作用，並使用酵素免疫反應測讀儀偵測每孔穴於光源為波長 450 nm 下之吸光值。

## 六、即時聚合酶鏈鎖反應 Real-time PCR

### 【實驗材料與藥品】

#### 1. 套組

- a. iQ™ SYBR Green Supermix 購自 Bio-Rad Laboratories, Inc., USA

#### 2. 設備與儀器

- a. MyiQ™ Single Color Real-Time PCR Detection System 購自 Bio-Rad Laboratories, Inc., USA

### 【方法】

#### 1. Sola11 專一性引子之設計

於 NCBI 基因庫中查詢 Sola11 核酸序列，依其序列設計 Sola11 專一性引子，長度約 18-25 bp 之間。為求引子擴增產物的專一性及避免引子黏合等問題造成 PCR 反應結果不佳，共設計五組目標基因引子（表一）和六組看家基因引子（表二）。

測試專一性引子的適用與否，將樣品稀釋至初始濃度的  $10^{-1}$  至  $10^{-4}$  倍，依序加入套組試劑，加入試劑時需注意避免唾液污染，於避光條件下加入反應物。加畢以專用封膜密封孔盤，離心去氣泡後即可上機。即時聚合酶鏈鎖反應器預先暖機 10-15 分鐘，即可開始運作。預先設計盤子與反應程式，盡量使中間沒有空格，並將擴增溫度設計自  $55^{\circ}\text{C}$  至  $71^{\circ}\text{C}$  共八個溫度梯度，濃度與溫度梯度的設計設定完成後，即可上機。運作過程中隨時監測結果。PCR 反應完成後依各引子增幅結果決定引子適用與否，篩選 melting curve 的波峰單一且尖銳者；PCR



efficiency 最好介於 90%~110%；Slope 則是在 -3.6~3.1。

## 2. 數種番茄品種中過敏原 Sola11 之定量分析

將欲進行擴增之模板，以前述萃取 RNA 的方法將各品種番茄中的 total RNA 萃取出來，RT-PCR 反轉錄為 cDNA 後，將各樣品之 cDNA 稀釋至適當濃度，三重複添加。選擇 Actin 和 18S rRNA 作為看家基因 (housekeeping gene)。將待測樣品與看家基因 (housekeeping gene) 相比作半定量。即時聚合酶鏈鎖反應器預先暖機 10-15 分鐘後，設計盤子與反應程式。擴增溫度固定為 61°C，34 循環。

以台灣市面上流通率最廣泛之牛番茄‘紅慧’品種作為控制組，其餘品種與其相比，以相對倍率表現作圖。

## 七、質譜序列分析

### 【實驗材料與藥品】

#### 1. 藥品

- a. ACN、DTT、Formic acid、Trypsin、IAM 購自 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- b.  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  購自 Riedel-deHaën, Seelze, Germany

#### 2. 設備與儀器

- a. Savant SpeedVac SC110 Vacuum Concentrator 購自 Thermo Fisher Scientific Inc., IL, USA

### 【方法】

#### 1. In gel digestion

- a. Reduction and alkylation:



以 SDS-PAGE 進行電泳分析，將目標產物以刀片切下膠帶，並切碎成 2~3 mm<sup>3</sup> 大小置於 1.5 mL eppendorf 中。加入 1 mL 40% ACN in 0.1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 震盪 10 分鐘，離心後取出上清液，重複此步驟直至膠帶退為無色。加入 1 mL 二次去離子水，震盪三分鐘，共清洗兩次，盡量將液體取出後加入 100% ACN 震盪脫水至膠粒變白，反應完成後吸去上清液體，真空乾燥 5 分鐘。乾燥後加入 50 μL 之 10 mM DTT in 0.1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 蓋過膠塊，震盪混勻後置於乾浴機 56°C 1 小時。直至膠塊泡脹透明。去除上清液，加入 1 mL 二次去離子水震盪三分鐘，共震盪兩次。去除上清液體後以真空乾燥 30 分鐘去除溶劑。接續快速加入 50 μL 55 mM IAM in 0.1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 蓋過膠塊，快速振盪混勻，於暗處放置 45 分鐘。反應完成後去除上清液，最後加入 1 mL 40% ACN in 0.1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 清洗兩次去除液體，加入 1 mL 二次去離子水震盪三分鐘，清洗兩次，去除液體後再以真空乾燥 30 分鐘乾燥之。

#### b. Digestion

配製 1.5 mg/mL trypsin 酶反應液，並以 0.1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 稀釋酶反應液，使酶反應液與蛋白的含量比約在 1/20~1/100 之間。加入酶液的體積以淹沒泡脹後的膠體積為宜。稍離心，使膠塊與酶液充分接觸，加入 0.1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 淹沒膠塊，於 37°C 消化過夜。

#### c. Extraction

將消化後的反應液振盪混勻，離心後吸出液相轉至新的 eppendorf 管中。膠塊以 50% ACN in 0.1% formic acid 萃取 3 次，每次 30 分鐘，吸出液相並合併抽提的溶液。最後以 80% ACN in 0.1% formic acid 萃取 10 分鐘 1 次，吸出液相並合併抽提的溶液。將抽提液以真空乾燥離心至完全乾燥。最後以 10 μL 0.1% formic acid 溶液溶解肽段，並於 -20°C 保存待後續質譜分析。

## 2. 質譜分析





將消化後樣品送至美商沃特斯國際股份有限公司台灣分公司進行質譜分析。

## 八、番茄糖酸度測定

### 【實驗材料與藥品】

#### 1. 設備與儀器

- a. Master-M 糖度計 購自 Atago Co. Ltd., Japan
- b. pH 酸檢測試伸縮筆 購自 Lutron Electronics, Inc., Taiwan

### 【方法】

#### 1. 糖度測定

番茄果實以絹印網擠壓過濾後取其過濾液置於燒杯容器中，取 100  $\mu$ L 滴於經二次水校正後之糖度計，平放之，以肉眼觀察其糖度數值並記錄。

#### 2. 酸度測定

番茄果實以絹印網擠壓過濾後取其過濾液置於燒杯容器中，將 pH 酸檢測試伸縮筆以緩衝液校正歸零後，以二次水清洗，置於燒杯中測定番茄之 pH 值並記錄。

## 九、番茄患者血清

番茄患者血清 受贈自 台中榮民總醫院，台中，台灣

## 十、實驗動物

BABL/c 小鼠 購自 國家實驗動物中心，台北市，台灣

## 十一、統計分析

試驗之各處理組皆進行三重複測定 (triplicate, n=3)，且所有試驗皆進行兩次



或兩次以上的重複 (repeated at least twice)，以求實驗結果之再現性。以 SAS 作為統計分析軟體。以  $p < 0.05$  表示顯著差異情形。



## 參、研究結果

### 一、番茄重組蛋白 rSola l 1 基因之選殖及表現

#### 1.1. 番茄過敏原 Sola l 1 基因選殖

番茄過敏原 Sola l 1 蛋白質及其抗體於市場上並沒有商業化的產品，因此欲進行番茄蛋白分析及製備抗體須自番茄直接萃取。然而，番茄中的蛋白質含量不如魚蛋貝等食品中來的豐富，前人研究指出番茄果實中的蛋白質僅佔整顆果實重量 0.9% 左右，如要萃取足夠進行試驗的番茄過敏原蛋白所需要的樣品非常大量，且純化後仍需輔以多方檢測確認蛋白。另外，番茄中所含有的肌動蛋白結合蛋白 (profilin) 種類眾多，甚至於序列也不盡相同。因此本研究於番茄過敏原 Sola l 1 蛋白的取得選擇以基因選殖方式進行基因重組、表現及純化過敏原蛋白，以利後續分析和抗體製備。

Sola l 1 基因選殖的部份，自牛番茄果實以 Trizol-modified method 萃取其 total mRNA，並依其序列設計含有限制酶切位的專一性引子 (圖一 A) 進行 PCR 增幅目標基因，agarose gel 電泳分析確認目標基因擴增結果。經 PCR 後擴增出一 cDNA 片段，電泳分析結果顯示此片段大小約 396 bp (圖一 B)。將此片段切下純化並進行 TA cloning，將目標基因構築於 pGM-T vector 並轉形至 *E.coli* DH5 $\alpha$  菌株中後送樣進行核酸定序分析。定序結果利用 NCBI 資料庫進行 nucleotide blast 比對基因庫中 Sola l 1 基因序列全長，比對結果為 100% identity，確認 Sola l 1 基因選殖成功。

#### 1.2. 重組蛋白之構築與表現

將確認序列之 Sola l 1 基因再次進行載體的構築，選用 pET32a(+) vector 為構築載體。載體 pET32a(+) 於 N 端 multiple cloning site 前面具有由六個 Histidine 所組成的 His-Tag 的區域，後續試驗即可利用與 His-tag 具有親和性的層析管柱進行重組蛋白的分離與純化。自 *E.coli* DH5 $\alpha$  菌株抽取 pET32a(+) 質體後，利用酵



素使質體上限制酶切位 *Nco* I 和 *Xho* I 裸露，並將 *Sola* 1 1 核酸片段嵌入 pET32a(+) 商業性載體中 (附圖一)，以 NCBI nucleotide blast 進行核酸序列比對 pET32a(+) 載體上一段含有 His-tag 的 *Sola* 1 1 基因序列全長，自 His-tag 前端序列比對至 *Sola* 1 1 之終止碼，其 Identities 為 572/572 (100%) (圖二)，暨此，確認 *Sola* 1 1 序列成功構築至 pET32a(+) 載體中。再將此質體轉形至 *E. coli* DH5 alpha 菌株中，進行抗生素篩選，並送核酸定序分析確認重組序列，挑出成功構築且正確轉形之菌株培養保存。於此，完成重組番茄過敏原之基因選殖。

再次將前述轉形成功之 plasmid 轉形至表現蛋白用的商業用大腸桿菌株 BL21 中，進行蛋白表現。以 LB 培養基培養菌株，於 37°C 培養箱中隔夜震盪培養。翌日以 1 mM IPTG 誘導大腸桿菌株大量表現重組蛋白，37°C 培養箱中震盪 2 小時。誘導表現出的重組蛋白以 SDS 電泳分析可看見 34 kDa 附近有一條帶表現量顯著。而後，將培養液以最高轉速 9,500 rpm 離心，取得菌塊。將菌塊凍於 -80 °C 待分析，或直接於菌塊中加入適量的 binding buffer 回溶，以反覆冷凍解凍法打破菌體，離心後取得粗萃蛋白液。利用 FPLC 搭配親和性管柱 HiTrap Chelating HP 5 mL column 進行初步純化重組蛋白，結果於 60% elution buffer 時可將重組蛋白流洗下來 (圖三)。將純化出的蛋白液進行膠體電泳和西方墨點法分析確認，結果顯示於 SDS-PAGE 電泳分析以及 western blot 以 anti-His 抗體作為一抗確認，皆可辨識到一條 34 kDa 明顯的條帶 (圖四 A、B)。

前人研究顯示未經基因構築的 pET32a(+) 質體轉形至 *E. coli* BL21 菌株中以 IPTG 誘導表現蛋白，其表現之蛋白大小約 20 kDa，而 *Sola* 1 1 大小約 14 kDa，兩者重組之後所得之重組蛋白分子量大小理論值為 34 kDa 左右，大小與電泳分析結果相符，故推測此 34 kDa 大小的蛋白即為構築成功且轉形表現出的番茄過敏原重組蛋白，將其命名為 rHis-*Sola* 1 1。

為去除重組蛋白 rHis-*Sola* 1 1 前端帶有 pET32a(+) 質體的一段 His-tag 序列，將 rHis-*Sola* 1 1 以 enterokinase 酵素於室溫隔夜反應切開序列，並以 FPLC 進行



二次純化。將 enterokinase 酵素隔夜反應後的蛋白液進行 SDS-PAGE 電泳分析，可看見蛋白分子量上的變化。Enterokinase 酵素反應組的蛋白分子量由原先 34 kDa 變成 14 kDa 左右 (圖五)，Sola l 1 蛋白分子量的理論值為 14 kDa，與電泳結果相符。接續以 FPLC 搭配 HiTrap chelating HP column 進行二次純化，因 HiTrap Chelating HP column 會接上帶有 His-tag 之片段，所以 Sola l 1 會在 unbind 的分劃裡 (圖六)。經 FPLC 二次純化後，以 SDS-PAGE 和 western blot 分析出現波峰的分劃，結果由 SDS-PAGE 經 Coomassie Blue 溶液染色後可看見 unbind 的分劃有一分子量約 14 kDa 的單一條帶 (圖七)，推測可能即為 rSola l 1。理論上，經酵素切開之條帶，儘可能是 rSola l 1 或帶有 His 之 pET32a(+) 載體片段，經西方墨點法以 Anti-His 抗體作為一抗辨認結果顯示，anti-His 抗體不會辨認到此條帶 (圖八 A、B)；為再次確認純化出的重組蛋白胺基酸序列，將此條帶進行 in gel digestion 並進行質譜分析，確認蛋白胺基酸序列。結果顯示，本篇試驗所純化出的重組蛋白經質譜分析確認為番茄 profilin 過敏原 Sola l 1 蛋白，其定序出來的胺基酸片段與 NCBI 基因庫中番茄 profilin 過敏原 Sola l 1 蛋白序列相對應，其 sequence coverage 為 45% (圖九)。暨此，確認本研究所純化之重組蛋白為目標產物，番茄主要過敏原 rSola l 1。

## 二、建立 Sola l 1 蛋白分析工具

### 2.1. 製備抗體

抗體的製備主要目的為輔以西方墨點法 (Western blot) 以影像系統及軟體分析其訊號位置和強度確認蛋白以及定量；並利用抗體開發三明治酵素免疫連結分析法 (sandwich ELISA) 由單株抗體的配對進行確效試驗，並建立蛋白質的定量平台。



本研究製備之抗體所使用的抗原為帶有 His-tag 之重組蛋白 rHis-Sola l 1。因為經過二次純化得到之 rSola l 1 回收率低，蛋白含量較少，因此於 rHis-Sola l 1 重組蛋白純化完成後，即以此蛋白作為抗原，進行腹腔免疫法 (Intraperitoneal Injection, I.P.) 免疫八周大小鼠 (BABL/c)，每間隔兩週免疫一次，共免疫三次。最後一次免疫後隔週進行臉頰採血測定其效價，選擇效價表現最高者進行 boost，五天後犧牲。取其脾臟中 B 淋巴細胞與小鼠骨髓瘤細胞 (X63 cell) 進行細胞融合製作融合瘤細胞以生產 rHis-Sola l 1 專一性抗體 (圖十)。將融合成功之融合瘤細胞進行培養，三週後取其上清液佐以商業合成之胜肽和重組蛋白進行特異性篩選，篩選分泌 anti-Sola l 1 抗體之細胞株，並製備單株抗體。試驗所使用篩選之合成胜肽包括預測番茄過敏原 Sola l 1 抗原表現位 (Sola l 1 epitope) (附圖二) 和 pET32a(+) 質體前段帶有 His-tag 之短鏈胜肽 (His-tag peptide) (附圖三)。

## 2.2. 抗體篩選

細胞融合後培養三週之融合瘤細胞經酵素免疫連結分析法進行抗體效價篩選，以重組蛋白和前述二者商業合成之胜肽進行篩選，取效價最高者進行分選單株細胞的試驗。將細胞稀釋、分散至每一格間僅有一顆細胞，分散完成之單株細胞培養一週後取其上清液測效價，結果顯示 21 號單株抗體表現的效價最高 (圖十一)。

為進一步測試 21 號單株抗體之專一性，以點墨跡法 (Dot blot) 和西方墨點法 (Western blot) 進行測試。點墨跡法結果發現，21 號單株抗體除了辨認到重組蛋白 rHis-Sola l 1、Sola l 1 epitope 和 His-tag peptide 之外，還會辨識到 Fve 金針菇蛋白、LZ8 靈芝蛋白、HMP 鴻喜菇蛋白等不相關蛋白 (圖十二)。並且，在西方墨點法試驗中，以此株抗體辨認多個番茄品種之粗萃取蛋白，結果該抗體會辨識粗萃取蛋白中多個的蛋白條帶 (圖十三)。顯示此株抗體專一性表現不佳，後續還需繼續進行新的單株抗體篩選。





於此，抗體的製備未真正完成，因抗體的專一性不佳而影響酵素免疫連結法的準確度，因此無法建立蛋白質 sandwich ELISA 定量分析平台，僅能暫以 SDS-PAGE 電泳染色以及西方墨點法的膠片看其分子量與條帶的有無做初步的蛋白確認，為定性之效。

### 三、建立 Sola11 核酸分析工具

#### 3.1. 專一性引子的設計與選擇

即時聚合酶連鎖反應 (Real-time quantitative PCR) 又稱 qPCR (Quantitative real-time PCR)。藉 PCR 擴增的原理使微量的 DNA 放大，再經由光學系統即時偵測，將每一次 PCR 擴增後將其生成反應產物進行數據記錄。Real-time PCR 反應時間較傳統 PCR 縮短許多，其準確度與敏感度也較高。再者，傳統 PCR 反應僅能待反應結束後以洋菜膠 (agarose gel) 進行 DNA 電泳分析，達到定性和半定量效果，並沒有辦法進行準確定量；且以洋菜膠分析方式，可能會多了其他干擾因子影響分析果。

於建立核酸定量的分析平台上，專一性引子的設計與選擇非常重要。引子擴增之目標基因的設計長度不需太長，介於 100 bp 至 200 bp 即可；重要的是需具有良好專一性和特異性，因此設計引子增幅目標基因上一段具有特異性的序列最佳。篩選條件為擴增後 melting curve、PCR efficiency 和 Slope 表現。雙股 DNA 在 melting 分裂成兩股時的溫度稱為半解離溫度 ( $T_m$  value)。通常一樣品 (DNA) 僅會有一 melting curve，因此可用來檢視 PCR 產物是否為單一產物。而影響 PCR efficiency 和 Slope 的條件則包含引子的設計、引子濃度、Master mix 成分及樣品純度等等。

將樣品做 4 logs 的序列稀釋，使樣品稀釋倍率為初始濃度的  $10^{-1}$  至  $10^{-4}$  倍。求此濃度對 Ct value 之方程式，此方程式的斜率即可進行 PCR efficiency 之換算。所得之 PCR efficiency 最好介於 90%~110%；Slope 則是在 -3.6~-3.1，若



是超出此範圍，則實驗配方或條件則需要重新檢視、設計。同時，考慮之後欲進行相對定量分析，看家基因也同樣需要進行檢視。並且，樣品專一性引子之 melting curve、PCR efficiency 和 Slope 條件範圍與看家基因引子相近者為佳。

此次目標基因引子的設計是依番茄 profilin 過敏原 Sola 1 1 序列上具有特異性的位置設計出五組目標基因引子 (表一)。看家基因則選擇 actin 和 18S rRNA 個設計三組看家基因引子 (表二)。

自番茄果實萃取 total mRNA，加入 RNA to cDNA EcoDry™ Premix 套組反轉錄成 cDNA。計算 real-time PCR 反應所需之體積，將 cDNA 依上述方法進行序列稀釋，以此稀釋完成之 cDNA 作為模板，依序加入番茄 cDNA、欲測樣品引子、去離子水、SYBR Green supermix 等反應試劑，加完後以專用封膜密封孔盤，離心去氣泡後即可預備上機。將擴增溫度設計 55°C 至 71°C 共八個溫度梯度，此舉可同時偵測引子增幅的最佳溫度。樣品濃度與溫度梯度的設定完成後，開始運作，運作過程中隨時監測結果。

將五組目標基因引子和六組看家基因引子分別進行專一性引子的條件測試，結果發現 real 1 引子的 melting curve 有多個波峰，代表其產物不專一 (圖十四)，此結果自洋菜膠電泳分析圖中也可看出，結果顯示 real 1 引子 PCR 反應完後擴增產物有三個產物 (圖十五)；而在 real 2、real 3 和 real 4 引子，其 melting curve 雖僅有一波峰，但其 PCR efficiency 和 slope 表現較不佳。因此，最終選擇 real 5 引子作為定量番茄過敏原 Sola 1 1 的特異性引子，其 PCR efficiency 為 104%；slope 為 -3.23。看家基因方面，最終選擇 Actin 3 (圖十六) 和 18S 1 (圖十七) 兩組引子，其 PCR efficiency 和 slope 分別為 99% 和 102%；Slope 為 -3.3 和 -3.23 (表四、表五)，皆在符合條件內。



#### 四、數種番茄品種果實中 Sola l 1 含量分析

##### 4.1. 番茄樣品取得

以前述建立之分析平台進行多種番茄品種果實中 Sola l 1 含量分析。本試驗共選用二十個番茄品種作為樣本，其中十八個番茄品種為世界蔬菜中心蔡文錫博士所提供之種子栽種而得（表六），番茄種子經育苗後於台大園藝試驗分場的溫室以藍耕方式定植栽種，固定生長條件減少試驗誤差（圖十八）。此外，因不同品種之番茄生長期略有不同，因此無法以固定開花後天數當作採摘標準，改以於採收時固定各品種番茄果實的成熟度。番茄樣品以過熟期（over ripen）作為最終分析的成熟階段（圖十九）。取樣當天進行拍照記錄，並將果實冷凍於  $-80^{\circ}\text{C}$ ，盡快進行核酸與蛋白之萃取。另外二個品種則購自台灣超市選擇台灣市面上廣為流通的番茄品種，牛番茄‘紅慧’和玉女番茄。

##### 4.2. 相對定量計算方式

核酸分析之相對定量的計算方式是以 Ct value 作為依據進行計算。Ct value 的定義是當 PCR 反應樣本擴增之生成量達到一定的數值，而此數值之相對應 cycle number，即為 Ct value。其原理是將目標基因和穩定表現的相對基因相比看其 Ct value 的差值，通常以看家基因作為相對基因，目標產物所得之 Ct value 與看家基因相減做計算。再將所得數值與控制組相比作圖。反應器內建軟體可將 PCR 反應所得曲線圖形轉換為數學方程式，再利用二次函數計算而得：

$$dCt = Ct(\text{test}) - Ct(\text{Reference})$$

$$ddCt = - (dCt(\text{test}) - dCt(\text{control}))$$

最終結果以 ddCt 作圖，視為相對定量結果。

##### 4.3. 不同番茄品種過敏原定量結果



萃取二十個品種番茄果實中之 mRNA 並反轉錄為 cDNA，同時萃取番茄果實中蛋白質以 NanoDrop 測其濃度以利後續分析時固定樣本濃度；另外記錄各番茄品種果實之糖度和酸度 (表七)。本試驗所建立之核酸定量平台 Real-time PCR 所使用增幅目標基因之引子為 real 5，看家基因引子為 Actin 1 和 18S 1。以牛番茄‘紅慧’品種作為控制組，其餘品種定量結果與之相比作圖。結果顯示，不同番茄品種間的過敏原 Sola 1 1 基因表現量的確存有差異，其中以品種編號 4 號的番茄品種 Sola 1 1 含量最高，與控制組相比可達 5 倍相對量 (圖二十)。

另外，將二十品種的番茄粗萃取蛋白進行 SDS-PAGE 電泳分析，固定蛋白質濃度後跑膠，結果可看到分子量約在 14 kDa 的位置上有一條帶 (圖二十一)，且以前述生產之抗體進行西方墨點法會辨認此條帶 (圖二十二 A)，因此確認此 14 kDa 蛋白應為 Sola 1 1 過敏原。抗體進行辨認後，輔以生物影像軟體 Image J 進行定量分析，結果顯示不同品種間過敏原 Sola 1 1 蛋白含量有差異，但其變化趨勢與核酸定量結果不盡相同 (圖二十二 B)。

同時將電泳後的膠片以病人血清作為抗體進行免疫墨漬法，探討過敏原含量與免疫活性相關性，結果顯示該名患者血清與數種品種之番茄中過敏原 Sola 1 1 無顯著 IgE 結合 (圖二十三)。

#### 4.4. 不同番茄成熟度過敏原定量結果

而以鮮食番茄品種 Tanya 做成熟度與過敏原含量相關性探討 (圖二十四)，同時記錄其核酸、蛋白質濃度與糖酸度 (表八)。本試驗所採摘之番茄成熟度分別為綠熟期 (mature green): 果實外皮淡綠具光澤，心室內已有膠質，果頂略變白；轉色期 (turning): 果實轉色為粉紅或紅色，約佔全果的 10-30%；粉紅期 (pink): 果實約 30-60% 變為粉紅和紅色；紅熟期 (red): 果實已全部紅熟超過 90%；過熟期 (over ripen): 果色暗紅，果肉開始變軟，共五個成熟階段。以過熟期當作控制組，



定其相對定量為 1.0。結果發現番茄 Sola l 1 過敏原含量會隨著番茄成熟階段上升而逐漸下降，然至過熟期時過敏原含量則大幅增加 (圖二十五)。

將五個不同成熟階段的番茄粗萃取蛋白進行 SDS-PAGE 電泳分析，固定蛋白質濃度後跑膠 (圖二十六)，同時將電泳後的膠片以單株抗體進行西方墨點法，輔以生物影像軟體 Image J 進行定量分析 (圖二十七)，結果顯示不同成熟階段的番茄過敏原 Sola l 1 蛋白含量無顯著差異，與核酸定量結果相左。而以病人血清作免疫活性分析，也同樣得到該患者血清與不同成熟階段之番瓜果實中過敏原 Sola l 1 無顯著 IgE 結合 (圖二十八)。





## 肆、討論

### 一、番茄過敏原基因選殖之討論

#### 1.1. 研究番茄過敏原 Sola l 1 之應用價值

番茄為一全球性的園藝作物，在全球年產量可達億噸以上。其果色、果形多樣化，栽培品種豐富，且用途十分廣泛，是一具有高經濟價值的蔬果兩用園藝作物。然而，番茄被指出為最常見的蔬果過敏原之一，在亞洲和地中海地區更是番茄過敏的高發生率地區。在地處於亞洲並同時具水國王國之美譽的台灣，番茄為名列第二位容易誘發過敏的蔬果。

番茄果實中，過敏原 Sola l 1 是最主要的過敏原，此過敏原蛋白隸屬於肌動蛋白結合蛋白 (profilin) 家族，因著蛋白家族的序列和結構的相似性，肌動蛋白結合蛋白經常在花粉和食品之間引起交叉反應，誘導過敏反應的發生。因此，本研究欲建立之番茄過敏原 Sola l 1 的分析平台更具意義且有其應用價值。

#### 1.2. 以基因選殖方式建立過敏原分析平台探討

常見用於分析及定量食品過敏原方法為免疫分析方法，將蛋白進行分離或未分離的狀態，以抗體進行蛋白辨認 (Poms *et al.*, 2004)。Moreno-Grau 等人以 ELISA 進行分析油橄欖和歐著草花粉 (Moreno-Grau *et al.*, 2006)；Koppelman 等人則藉病人血清偵測花生過敏原比例 (Koppelman *et al.*, 2001)。

過去研究以免疫分析方法評估過敏原，在過敏原的尋找及建立已有不少成就；然而以一般的免疫分析方法卻無法精確地描述過敏原的含量評估，例如於過敏原疫苗製作時，需要評估過敏原的含量與其活性 (Ree *et al.*, 2008)。因此在 2008 年，Ree 等人建立以重組過敏原作為參考材料，藉由基因選殖的方式建立標準品，再輔以 ELISA 分析樺樹花粉、貓尾草花粉、塵蟎等過敏原含量 (Ree *et al.*, 2008)。以基因選殖的方式生產重組蛋白，除了可準確地建立蛋白標準品，以此重組蛋白





當作基準，開發過敏原於分析平台為近十年之食品過敏原研究目標。本研究即是藉番茄過敏原基因選殖方式，希望能建立研究番茄過敏原之分析平台。

## 二、番茄過敏原蛋白質分析平台之討論

### 2.1. 以 rHis-Sola l 1 作為抗體生產之抗原

免疫球蛋白 E (Immunoglobulin E, IgE) 運用在過敏原的分析與測定時，可利用過敏患者的特異性 IgE 藉由結合或競爭方法偵測過敏原含量 (Williams, 2003)。然而這類的免疫分析方法，受限於 IgE 的來源與取得，有限過敏患者個數以及患者之間的個體差異都會影響抗體的特異性和親和力 (Gould *et al.*, 2003)。因此本研究以重組蛋白免疫小鼠生產單株抗體取代患者 IgE，以得到可專一性辨認蛋白的抗體。

為取得不帶有質體序列的過敏原重組蛋白，試驗以 enterokinase 酵素和重組蛋白 rHis-Sola l 1 進行反應，以切除 rHis-Sola l 1 上帶有的一段含有 His-tag 的載體序列。反應完畢後再以 FPLC 純化，接續透析。經多次純化步驟，使得蛋白回收率大幅減低，所得之不含 His-tag 的 Sola l 1 蛋白含量不足以用作生產抗體，因此最終選擇 rHis-Sola l 1 作為生產抗體之蛋白。

### 2.2. 抗體篩選之合成胜肽設計條件與原因

試驗使用預測番茄過敏原 Sola l 1 抗原表現位 (Sola l 1 epitope) 和合成之 pET32a(+) 質體前段帶有 His 的短鏈胜肽 (His-tag peptide) 進行效價篩選。所選擇之商業合成之預測番茄過敏原 Sola l 1 抗原表現位 (Sola l 1 epitope) 為預測分數第三高者 (附圖二)，此原因為篩選條件除了預測表現分數之外，同時排除番茄中其他 profilin 蛋白序列相似區，避免交叉反應致使試驗結果偏差。試驗以純化之重組蛋白進行抗體製備，建立過敏原之蛋白分析平台。



### 2.3. 抗體特異性不佳

進行抗體特異性篩選時，發現抗體除了會辨認 rHis-Sola l 1 重組蛋白、Sola l 1 epitope，還會辨認 His-tag peptide。原先希望篩選時能一併將會辨認 His-tag peptide 的抗體去除，但是所有的抗體進行特異性辨認時皆會同時辨認三者。然而因自然界中的生物體並不會自然存在連續 6 個 His 胺基酸片段，抗體辨認過敏原時並不會影響結果，因此還是將其保留下來作為番茄過敏原抗體之用。

以對 Sola l 1 具有特異性之抗體做為番茄過敏原蛋白質辨認的分析平台，以點墨跡法 (Dot blot) 和西方墨點法 (Western blot) 進行抗體特異性測試的結果發現所製備之抗體專一性表現不佳。前人研究發現，即使取得純化之 IgE 或 IgG 抗體，當蛋白質結構相似時，抗體對蛋白的專一性仍然欠佳 (Poms *et al.*, 2004)。而大部份的種子或蔬果過敏原皆是常見之蛋白家族的一員，蛋白結構的相似性高，因此影響了抗體的專一性辨認 (L'Hocine and Boye, 2007)。因此抗體專一性表現不佳之原因，推測可能除了抗體自身特異性不佳外，有可能也是因為交叉反應造成抗體的辨認錯誤。

後人欲繼續進行抗體製備，可考慮以本研究建立之方法大量純化重組蛋白，以 enterokinase 酵素反應後之不含 His-tag 的 rSola l 1 蛋白作為抗原免疫小鼠以製備抗體，可省去對 His-tag 之副篩選，得到特異性專一之抗體。同時也可考慮以製備多株抗體作為定量分析平台之用抗體，此舉除可省去抗體製備時間，在製備操作上也較容易。

## 三、番茄過敏原核酸分析平台之討論

### 3.1. 開發即時聚合酶連鎖反應 (Real-time PCR) 分析過敏原含量原因

前述提到，蛋白質於過敏原定量分析平台上仍受限於必須取得優異特異性的抗體，多個抗原所需製備多株抗體而提高的成本 (Costa *et al.*, 2012)。加上番茄過



敏原 Sola l 1 為常見的 profilin 蛋白家族，蛋白結構的相似性高，影響了抗體的專一性辨認 (L'Hocine and Boye, 2007 ; Poms *et al.*, 2004)。而且食品中的過敏原含量其實相當低，低量的過敏原即會誘發過敏反應，如花生過敏原僅需約 200  $\mu\text{g}$  即可誘發過敏反應的發生，因此需要更敏感的分析方式來偵測過敏原含量(Stephan and Stefan, 2004)。綜合上述原因，本研究希望能夠同時建立過敏原核酸定量平台，與蛋白分析平台相輔相佐。

即時聚合酶連鎖反應之反應時間較傳統 PCR 縮短許多，其準確度與敏感度也較高，依光學偵測達到準確的定量分析。於食品中的過敏原含量偵測極限可低於 10 ppm (Stephan and Stefan, 2004)，因此十分適合用於開發過敏原的分析平台。

### 3.2. 專一性引子選擇及條件設計依據

目標基因引子的設計是依番茄 profilin 過敏原 Sola l 1 序列上與其他番茄中 profilin 蛋白具有特異性的位置設計出五組目標基因引子。目的為得到番茄過敏原 Sola l 1 專一引子，避免因 profilin 序列相似而選殖到番茄中其他 profilin 蛋白。

Real-time PCR 反應將擴增溫度設計自 55°C 至 71°C 共八個梯度，此舉為同時偵測引子增幅的最佳溫度。將五組目標基因引子和六組看家基因引子分別進行專一性引子的條件測試之後，最終選擇 real 5 引子作為定量番茄過敏原 Sola l 1 的特異性引子，原因一是因其 melting curve、PCR efficiency 和 slope 皆在適用範圍之內；另一方面，real 5 引子於擴增溫度自 55°C 至 68°C 皆有良好的線性關係 (data not shown) 使用範圍廣且均具有產物專一之特性；看家基因方面，選擇 Actin 3 和 18S 1 兩組引子。此二引子在 61°C 時其 PCR efficiency 和 slope 與 real 5 引子最相符，為最適用之引子與條件。



#### 四、數種番茄品種中過敏原含量變化趨勢討論

##### 4.1. 不同品種間過敏原 Sola l 1 含量差異探討

以核酸平台分析不同番茄品種間的過敏原 Sola l 1 含量，結果顯示不同番茄品種間 Sola l 1 含量存有差異。其中品種編號 4 號的番茄品種 Sola l 1 含量最高，與控制組相比可達 4-5 倍相對量。與其特性做連結，發現該品種具有耐旱的特性，因此推測過敏原含量的結果表現或許與其耐旱機制有關。

植物 profilin 蛋白是肌動蛋白 (actin) 的結合與調控蛋白，參與生物體的生長、形態發育、細胞質架構、細胞質流、細胞器運動、細胞分裂、極性建立和尖端生長等生理功能 (Staiger, 2000 ; Wasteneys, 2000 ; Meagher *et al.*, 2000 )。前人研究曾顯示，當植物體受到外界刺激如光度的改變、缺水逆境以及二氧化碳濃度改變等，profilin 會促使 actin 聚合並移動葉綠體的位置、調節氣孔開合等細胞形狀的改變以及細胞質流的運輸 (Radauer and Hoffmann-Sommergruber, 2004)。因此推測耐旱品種之植株為預防缺水逆境所造成植株損傷發生，其 profilin 含量可能較一般植株高，以便快速參與細胞器運動等生理功能。但此原因與機制目前尚未釐清，可待後人繼續研究。

而蛋白定量分析部份，以本研究製備出之抗體定量過敏原含量，結果發現定量結果雖然顯示品種間的過敏原含量具有差異，但其變化趨勢與核酸定量不完全相同。此原因可能為抗體專一性表現不佳，或者因交叉反應使得抗體對過敏原的辨識親和力下降，也可能因核酸轉譯蛋白的表現量不與基因表現量成比例。

比較前人曾以 SDS-PAGE 電泳分析蛋白條帶的方式，偵測花生過敏原 Ara h 1 和 Ara h 2 占總蛋白質的比例，可得出 12-16% 以及 5.9-9.3% 的比例，且此比例於不同花生品種之間並無顯著差異 (Koppelman *et al.*, 2001)；同時過敏患者之 IgE 抗體對 Ara h 1 和 Ara h 2 進行競爭型 ELISA 定量，結果同樣發現於不同花生品種間之過敏原 Ara h 1 和 Ara h 2 含量並無顯著差異 (Koppelman *et al.*, 2001)。番茄不同品種間的過敏原含量差異則相對顯著，推測原因可能因番茄的品



種相對於花生較多，其基因與特性的變異較大，因此在過敏原的含量變異也較顯著。

而本研究欲以番茄過敏患者血清探討過敏原 Sola l 1 之免疫活性，結果該名番茄患者血清無法辨認到 Sola l 1，推測可能原因為導致該名患者番茄過敏之過敏原為番茄中其他過敏原，例如 Sola l 2、Sola l 3 等過敏原。因此關於 Sola l 1 免疫活性與過敏原含量相關等研究，還待後續得到對 Sola l 1 具有特異性之患者血清再進行探討。

#### 4.2. 不同成熟度過敏原 Sola l 1 含量差異探討

本研究以鮮食番茄品種 Tanya 做成熟度與過敏原含量相關性探討，其原因之一為希望研究鮮食品種的番茄過敏原表現差異，另外則是因該品種樣本數夠多而作為最終選擇。一般番茄依成熟階段可分成五至八個階段，本試驗擇其中五個成熟階段做為過敏原含量與成熟度之探討，所採摘的番茄成熟度分別為綠熟期 (green)、轉色期 (turning)、粉紅期 (pink)、紅熟期 (red) 和過熟期 (over ripen)。研究以過熟期當作控制組，訂其相對定量為 1。結果發現番茄 Sola l 1 過敏原含量會隨著番茄成熟階段上升而逐漸下降，然至過熟期時過敏原含量則大幅增加。此原因目前尚不清楚，但文獻曾指出，番茄過敏原的致敏力可能會隨著番茄的成熟及後熟有所改變 (Armentia *et al.*, 2003)。Armentia 等人發現，對番茄果實施加乙烯處理，其引起患者蕁麻疹的嚴重程度增加、過敏性反應的症狀也變得更加嚴重 (Armentia *et al.*, 2003)。當番茄果實進入後熟階段時，其乙烯生合成大幅增加，於過熟期時果實開始軟化，同時會釋出大量的乙烯賀爾蒙。此內生性乙烯是否也會使得過敏原含量增加，引起同樣的過敏反應加劇情形目前尚不清楚，此機制與原因還待後人探究。

前人研究也曾以皮膚點刺法測試不同成熟度番茄之致敏能力，結果發現未成熟之番茄果實其致敏性會較成熟的番茄果實來的低 (Bleumink *et al.*, 1967)。而





Kondo 等人以免疫墨跡法分析綠熟期 (green)、變色期 (breaker)、粉紅期 (pink) 以及紅熟期 (red ripening) 等四個成熟階段番茄中過敏原含量，結果顯示番茄中過敏原蛋白隨著成熟度增加而含量增加 (Kondo *et al.*, 2001)。

此二研究結果恰好相反，而本研究結果與 Bleumink 等人相符。以本研究結果推測 Bleumink 等人偵測階段選用之成熟果為過熟期階段之果實，因此其偵測結果為過敏原含量較高致使致敏力提高；而 Kondo 等人以免疫墨跡法分析過敏原蛋白含量隨成熟度增加而提升，此原因或許與病人血清之特異性有關，該研究所使用的血清或許對番茄中其他過敏原有較高的親和力，其辨識結果便與本研究所探討的 Sola l 1 有所差異。Bleumink 等人研究雖然沒有細分多個成熟階段的過敏原含量變化，也未明確指出造成過敏反應之過敏原為何者，但 Bleumink 等人指出未成熟果之致敏力較成熟果低的結果，與本研究結果未熟果之過敏原含量較成熟果者低相符，推測 Bleumink 等人偵測到致敏之過敏原可能為 Sola l 1。

## 五、結論與未來展望

本研究自番茄中選殖之基因經序列比對證實為番茄中主要過敏原 Sola l 1；後續表現之重組蛋白經 SDS-PAGE 電泳分析、西方墨點法和質譜分析確認試驗所純化之蛋白為 rSola l 1。本試驗所建立之番茄過敏原 Sola l 1 分析平台，於蛋白分析平台的部份，因抗體專一性表現不佳，酵素免疫連結分析 (ELISA) 時影響其準確度；且於電泳跑膠的條帶沒有辦法達到準確的定量，目前僅能以抗體辨認做到定性分析。核酸分析平台的部份，以專一性引子測定番茄過敏原 Sola l 1 含量，經試驗證實的確可定量番茄過敏原 Sola l 1，並顯現不同番茄品種及成熟度階段皆會影響過敏原含量。然而，過敏原含量於不同品種之間的差異表現以及其在過熟期階段大幅上升的機制目前仍不清楚。





番茄過敏原 profilin 於基因庫比對時，因為其蛋白家族序列相似的緣故，可與多數物種中 profilin 比對到高相似性。在同為茄科之作物例如辣椒 (*Capsicum annuum*) 的 profilin 相似度高達 92%；馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*) 更高達 95% 的胺基酸序列相似度，與他者例如鳳梨科的鳳梨和繖形科的芹菜序列相似性則較低 (附圖四)。因此推測 profilin 這個蛋白或許於科學分類相近的作物上具有較相似的序列，可能可以作為植物之中的分子標記。未來或許可就 profilin 蛋白的差異延伸至種原的分類探討，更或者進行番茄品種及親本之討論。

未來可以本研究所建立之分析平台，繼續進行園藝相關後熟處理、採後處理、加工處理、腸道消化等試驗研究。



## 伍、參考文獻

- 陳正次. 2013. 番茄品種特性簡介. 小果番茄產銷技術與經驗分享研討會專輯. 台南區農業改良場.
- 郭孚耀. 2014. 番茄栽培. 第三十八期台中區農業專訊。彰化台中改良場.
- 楊偉正. 1992. 茄科篇. 台灣地區現有作物栽培品種名錄. 台中農業試驗所、中國種苗改進協會.
- 蔡肇基. 2004. 水果過敏與花粉過敏. 春暉健康樂活家. <<http://www.healthcare.com.tw>> (accessed 2012/12/12)
- 戴振洋. 2009. 設施番茄介質耕栽培技術. 台中區農業技術專刊. 彰化台中區農業改良場.
- Armentia A., A. Callejo, A. Diaz-Perales, F.J. Martin-Gil, and G. Salcedo. 2003. Enhancement of tomato allergenicity after treatment with plant hormones. *Allergol. Immunopathol.* 31:44-6.
- Asero R., G. Mistrello, D. Roncarolo, S. Amato, D. Zanoni, F. Barocci, and G. Caldironi. 2003. Detection of clinical markers of sensitization to profilin in patients allergic to plant-derived foods. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112:427-32.
- Bleumink E., L. Berrens, and E. Young. 1967. Studies on the atopic allergen in ripe tomato fruits. II. Further chemical characterization of the purified allergen. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 31:25-37.
- Ballmer-Weber BK, and Hoffmann-Sommergruber K. 2011. Molecular diagnosis of fruit and vegetable allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 11:229-35.
- Burney P., C. Summers, S. Chinn, R. Hooper, R. van Ree, J. Lidholm. 2010. Prevalence and distribution of sensitization to foods in the European Community Respiratory Health Survey: a EuroPrevall analysis. *Allergy.* 65:1182-1188.



- Burks A, Tang M, Sicherer S, Muraro A, Eigenmann PA, Ebisawa M, Fiocchi A, Chiang W, Beyer K, Wood R, Hourihane J, Jones SM, Lack G, and Sampson HA. 2012. ICON: Food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129:906-920.
- Curotto de Lafaille M.A., and Lafaille J.J. 2009. Natural and adaptive foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity.* 30:626-35.
- Cianferoni A, and Spergel J.M. 2009. Food allergy: review, classification and diagnosis. *Allergol. Int.* 58:457-66.
- Costa J, Mafra I, Carrapatoso I, and Oliveira M.B. 2012. Almond allergens: molecular characterization, detection, and clinical relevance. *J. Agric. Food Chem.* 60:1337-49.
- Ebner C., R. Hirschwehr, L. Bauer, H. Breiteneder, R. Valenta, H. Ebner, D. Kraft , and O. Scheiner. 1995. Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). *J. allergy clin. Immunol.* 95:962-969.
- Fedorov A.A., T. Ball, N.M. Mahoney, R. Valenta and S.C. Almo. 1997. The molecular basis for allergen cross-reactivity: crystal structure and IgE-epitope mapping of birch pollen profilin. *Structure.* 5:33–45.
- Foetisch K., D. Son, F. Altmann, H. Aulepp, A. Conti, D. Haustein, and S. Vieths. 2001. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) allergens in pollen-allergic patients. *Eur. Food Res. Technol.* 213:259-266.
- Gould W.A. 1983. *Tomato Production, Processing and Quality Evaluation*, 2ed. p. 3-50. AVI Publishing Company, Inc. Westport, C.T.
- Gendel S.M. 2013. The Regulatory Challenge of Food Allergens. *J. Agric. Food Chem.* 61: 5634-5637.



- Gibbon B.C., and C.J. Staiger. 2000. Profilin. p 45-65. In: Staiger C.J., Baluška F., Volkmann D., Barlow P. (eds.) *Actin: a dynamic framework for multiple plant cell functions*. Amsterdam: Kluwer.
- Hancock J.F. 1992. *Plant Evolution and the Origin of Crop Species*. p. 275-276. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J.
- Hughes DA, and Mills C. 2001. Food allergy: a problem on the increase. *Biologist* (London). 48:201-4.
- Hauser M., A. Roulias, F. Ferreira, and M. Egger. 2010. Panallergens and their impact on the allergic patient. *Allergy Asth. Clin. Immunol.* 6:1-14.
- Harrop J., Chinn S., Verlato G., Olivieri M., Norbäck D., Wjst M., Janson C., Zock J.P., Leynaert B., Gislason D., Ponzio M., Villani S., Carosso A., Svanes C., Heinrich J., and Jarvis D. 2007. Eczema, atopy and allergen exposure in adults: a population-based study. *Clin. Exp. Allergy*. 37:526-35.
- IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee. 2010. Allergen Nomenclature. December 2012. <<http://www.allergen.org>>
- Kondo Y., A. Urisu, and R. Tokuda. 2001. Identification and characterization of the allergens in the tomato fruit by immunoblotting. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 126:294-9.
- Koppelman S.J., R.A.A. Vlooswijk, L.M. J. Knippels<sup>1</sup>, M. Hessing, E.F. Knol, F.C. van Reijssen, C.A.F.M. Bruijnzeel-Koomen. 2001. Quantification of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2 in the peanut varieties Runner, Spanish, Virginia, and Valencia, bred in different parts of the world. *Allergy*. 56:132-137.
- Luccioli S. 2012. Food allergy guidelines and assessing allergic reaction risks: a regulatory perspective. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 12:323-30.



- Lee L.A., and Burks A.W. 2006. Food allergies: prevalence, molecular characterization, and treatment/prevention strategies. *Annu. Rev. Nutr.* 2006:26:539-65.
- L'Hocine L. and J.I. Boye 2007. Allergenicity of soybean: new developments in identification of allergenic proteins, cross-reactivities and hypoallergenization technologies. *Food Sci. Nutri.* 47:127-143.
- Le L.Q., V. Mahler, Y. Lorenz, S. Scheurer, S. Biemelt, S. Vieths, and U. Sonnewald. 2006. Reduced allergenicity of tomato fruits harvested from Sola 1 1–silenced transgenic tomato plants. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118:1176-83.
- Lemon-Mule H., Sampson H.A., Sicherer S.H., Shreffler W.G., Noone S., and Nowak-Wegrzyn A. 2008. Immunologic changes in children with egg allergy ingesting extensively heated egg. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 122:977–983.
- López-Torrejón G., A. Díaz-Perales, J. Rodríguez, R. Sánchez-Monge, J.F. Crespo, G. Salcedo, and L. F. Pacios. 2007. An experimental and modeling-based approach to locate IgE epitopes of plant profilin allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119:1481-8.
- McKinney E.C., M.K. Kandasamy, and R.B. Meagher. 2001. Small changes in the regulation of one Arabidopsis profilin isovariant, PRF1, alter seedling development. *Plant Cell.* 13:1179-1191.
- Moreno-Grau S., B. Elvira-Rendueles, J. Moreno, A. García-Sánchez, N.Vergara, J. A. Asturias, M. C. Arilla, I. Ibarrola, J. A. Seoane-Camba, and M. Suárez-Cervera. 2006. Correlation between *Olea europaea* and *Parietaria judaica* pollen counts and quantification of their major allergens Ole e 1 and Par j 1-Par j 2. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 96:858–864.



- Nowak-Wegrzyn A, Bloom KA, Sicherer SH, Shreffler WG, Noone S, Wanich N, and Sampson HA. 2008. Tolerance to extensively heated milk in children with cow's milk allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122:342–347.
- Petr, L. and J.W. Erdman. 2005. Lycopene and risk of cardiovascular disease. p. 204–217. In: *Carotenoids and Retinoids: Biological Actions and Human Health*. pAOCS Press, Champaign, I.L.
- Poms R.E., C.L. Klein, and E. Anklaam. 2004. Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Addit. Contam.* 21:1-31
- Primavesi L., V. Pravettoni , O.V. Brenna , L. Farioli, E.A. Pastorello, and C. Pompei. 2011. Influence of technological processing on the allergenicity of tomato products. *Eur. Food Res. Technol.* 232:631-636.
- Radauer C. and K. Hoffmann-Sommergruber. 2004. Profilins. *Plant Food Allergens.* 95:105-124
- Ruiter B., and W.G. Shreffler. 2012. The role of dendritic cells in food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129:921-8.
- Rancé F., X. Grandmottet, and H. Grandjean. 2005. Prevalence and main characteristics of schoolchildren diagnosed with food allergies in France. *Clin. Exp. Allergy.* 35: 167-72.
- Ramachandran S., E.M. Christensen, Y. Ishimaru, C.H. Dong, W. Chio-Ming, A.L. Cleary, and N.H. Chau. 2000. Profilin plays a role in cell elongation, cell shape maintenance, and flowering in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 124:1637-1647.
- Radauer C., M. Willeroider, H. Fuchs, K. Hoffmann-Sommergruber, J. Thalhamer, F. Ferreira, and O. Scheiner. and Breiteneder, H. 2006. Cross-reactive and species-specific immunoglobulin E epitopes of plant profilins: an experimental and structure-based analysis. *Clin. Exp. Allergy.* 36:920-929.





- Ree R. van, M. D. Chapman, F.Ferreira, S. Vieths, D. Bryan,O. Cromwell, M. Villalba,S.  
R. Durham, W. M. Becker, M. Aalbers, C. André, D. Barber, A. Cistero Bahima,  
A. Custovic, A. Didierlaurent, C. Dolman, J. W. Dorpema, G. Di Felice, F.  
Eberhardt, E. Fernandez Caldas, M. Fernandez Rivas, H. Fiebig, M.Focke, K.  
Fçtisch, G. Gadermaier, R. G. Das, E. Gonzalez Mancebo, M. Himly, T.  
Kinaciyan, A. C. Knulst, A. M. Kroon, U. Lepp, F. M. Marco, A. Mari, P.  
Moingeon, R. Monsalve, A.Neubauer, S. Notten, P. OoievaardeHeer, G. Pauli, C.  
Pini, A. Purohit, J. Quiralte, S. Rak, M.Raulf-Heimsoth, M.M.SanMiguelMoncin,  
B. Simpson, A. Tsay, L. Vailes, M.Wallner, B.Weber. 2008. The CREATE  
Project: development of certified reference materials for allergenic products and  
validation of methods for their quantification. *Allergy*: 63: 310-326
- Staiger C.J. 2000. Signaling to the actin cytoskeleton in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*  
*Plant Mo.l Biol.* 51:257-288.
- Sampson H.A. 2003. Food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111:S540-7.
- Stephan O. and S. Vieths. 2004. Development of a Real-Time PCR and a Sandwich  
ELISA for Detection of Potentially Allergenic Trace Amounts of Peanut (*Arachis*  
*hypogaea*) in Processed Foods. *J. Agric. Food Chem.* 52: 3754-3760
- Schnell, S. and R.A..Herman. 2009. Should digestion assays be used to estimate  
persistence of potential allergens in tests for safety of novel food proteins? *Clin.*  
*Mol. Allergy.* 7:1.
- Sicherer S.H., and H.A. Sampson. 2010. Food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*  
125.:S116–S125.
- Tuft L, Blumenstein GI. 1942. Studies in food allergy. *J Allergy.* 13:574-581.



- Vieths S., S. Scheurer, and B. Ballmer-Weber. 2002. Current Understanding of Cross-Reactivity of Food Allergens and Pollen. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 964:47-68.
- Ventura M.T, A. D'Amato, A. Giannini, A. Carretta, R.A. Tummolo, and R. Buquicchio. 2010. Incidence of allergic diseases in an elderly population. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 32:165-70.
- Valenta R., Duchene M., K. Pettenburger, C. Sillaber, P. Valent, P. Bettelheim, M. Breitenbach, H. Rumpold, D. Kraft, and O. Scheiner. 1991. Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Sci.* 253:557-560.
- Valenta R., M. Duchene, C. Ebner, P. Valent, C. Sillaber, P. Deviller, F. Ferreira, M. Tejkl, H. Edelmann, D. Kraft, and O. Scheiner. 1992. Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *J. Exp. Med.* 175:377-385.
- Wasteneys G.O. 2000. The cytoskeleton and growth polarity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:503-511.
- Westphal S., W. Kempf, K. Foetisch, M. Retzek, S. Vieths, and S. Scheurer. 2004. Tomato profilin Sola l 1: IgE cross-reactivity and allergenic Potency *Allergy.* 59: 526-532
- Willeroider M., H. Fuchs, B.K. Ballmer-Weber, M. Focke, M. Susani, J. Thalhamer, F. Ferreira, B. Wüthrich, O. Scheiner, H. Breiteneder, and K. Hoffmann-Sommergruber. 2003. Cloning and molecular and immunological characterisation of two new food allergens, Cap a 2 and Lyc e 1, profilins from bell pepper (*Capsicum annuum*) and Tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Int. Arch. Allergy Immunol.* 131:245-55.



Wu T.C., T.C. Tsai, C.F. Huang, F.Y. Chang, C.C. Lin, I.F. Huang, C.H. Chu, B.H. Lau,

L. Wu, H.J. Peng, and R.B. Tang. 2012. Prevalence of food allergy in Taiwan: a questionnaire-based survey. *Intern. Med. J.* 42:1310-5.

Zuidmeer L., K. Goldhahn, R.J. Rona, D. Gislason, C. Madsen, C. Summers, E. Sodergren, J. Dahlstrom, T. Lindner, S.T. Sigurdardottir, D. McBride, and T. Keil. 2008. The prevalence of plant food allergies: A systematic review. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121:1210-1218.



表一、 Real-time PCR 使用之 Sola l 1 特異性引子設計列表

Table 1. The Sola l 1-specific primer sets used in real-time PCR.

| Name   | Forward primer          | Reverse primer             | Product Length |
|--------|-------------------------|----------------------------|----------------|
| real 1 | ATGTCGTGGCAAACATATGTC   | ATTCTTCGGGCTTGAACTGA       | 140            |
| real 2 | ACTTCTGCGGCTATTATTGGC   | CTCCTTGAATCACCATGTATTTTG   | 172            |
| real 3 | TTAAGAAGACCAATCAGGCTT   | CTAGAGACTCTGTTCTATAAGATAGT | 116            |
| real 4 | TTGTGTATTACTGTCATCCTTAC | CCAACCAAGTGCTCAATG         | 157            |
| real 5 | TCATCTCACTTCTGCGGCTAT   | CTTCTGGCTCTCCTTGAATCAC     | 188            |



表二、 Real-time PCR 使用之看家基因引子設計列表

Table 2. The housekeeping gene primer sets used in real-time PCR.

| Name    | Forward primer          | Reverse primer           | Product Length |
|---------|-------------------------|--------------------------|----------------|
| Actin 1 | AGTTGGTCGTCCTCGTTAC     | GGTTAAGTGGTGCCTCAGT      | 233            |
| Actin 2 | ATTGCTCTTGACTATGAACAGG  | CTTGCTCATCCTATCAGCAATACC | 291            |
| Actin 3 | TATGCCAGTGGTCGTACAAC    | TCAGCAGTGGTGGTGAACAT     | 188            |
| 18S 1   | GGTGGTGACGGGTGACGGAGAAT | CGCCGACAGAAGGGACGAGACGA  | 354            |
| 18S 2   | GTCCTACCGATTGAATGA      | TACGACTTCTCCTTCCTCTA     | 120            |
| 18S 3   | GTCAGAGGTGTAATTCTTGGA   | GTTGAGACTAGGACGGTATC     | 128            |



表三、Sola l 1 特異性引子之 Real-time PCR 表現效率和標準曲線斜率

Table 3. Real-time PCR efficiency and slope of Sola l 1 specific primer.

| Primer name | PCR efficiency and slope                 |
|-------------|------------------------------------------|
| real 1      | Not available                            |
| real 2      | PCR efficiency : 95.3%<br>Slope: -3.440  |
| real 3      | PCR efficiency : 90.1%<br>Slope: -3.586  |
| real 4      | PCR efficiency : 83.3%<br>Slope: -3.801  |
| real 5      | PCR efficiency : 104.0%<br>Slope: -3.230 |





表四、看家基因 Actin 引子之 Real-time PCR 表現效率和標準曲線斜率

Table 4. Real-time PCR efficiency and slope of housekeeping gene Actin primer.

| Primer name | PCR efficiency and slope               |
|-------------|----------------------------------------|
| Actin 1     | PCR efficiency: 76.1%<br>Slope: -4.070 |
| Actin 2     | PCR efficiency: 82.9%<br>Slope: -3.813 |
| Actin 3     | PCR efficiency: 98.5%<br>Slope: -3.359 |



表五、看家基因 18S rRNA 引子之 Real-time PCR 表現效率和標準曲線斜率

Table 5. Real-time PCR efficiency and slope of housekeeping gene 18S rRNA primer.

| Primer name | PCR efficiency and slope                |
|-------------|-----------------------------------------|
| 18S 1       | PCR efficiency: 102.0%<br>Slope: -3.275 |
| 18S 2       | PCR efficiency: 244.0%<br>Slope: -1.864 |
| 18S 3       | PCR efficiency: 89.8%<br>Slope: -1.010  |



表六、二十番茄品種名稱、來源及備註

Table 6. The information of cultivar names, origins, and comments for twenty tomato cultivars used in this study.

| 編號 | 品種名             | 來源    | 備註                                               |
|----|-----------------|-------|--------------------------------------------------|
| 1  | UC204A          | US    | Processing tomato                                |
| 2  | Tanya           | AVRDC | Popular in Tanzania/East Africa                  |
| 3  | Tengeru 97      | AVRDC | Popular in Tanzania/East Africa                  |
| 4  | Arka Maghali    | India | Reported to be drought tolerant                  |
| 5  | NCEBR-6         | US    | fresh market line                                |
| 6  | CLN3339FA       | AVRDC | High anthocyanin                                 |
| 7  | T5020           | USDA  | high carotenoids (crimson and high pigment genes |
| 8  | CLN3070J        | AVRDC | high lycopene                                    |
| 9  | BMZ51F2-67-1-30 | AVRDC | high rutin (flavonoid)                           |
| 10 | CLN2070A        | AVRDC | high beta-carotene                               |

接下頁



續上表

表六 (續)、二十番茄品種名稱、來源及備註

Table 6 (continued). The information of cultivar names, origins, and comments for twenty tomato cultivars used in this study.

| 編號 | 品種名                      | 來源     | 備註                                                             |
|----|--------------------------|--------|----------------------------------------------------------------|
| 11 | ASVEG#20                 | AVRDC  | dark green shoulder                                            |
| 12 | CLN3125P                 | AVRDC  | TYLCD resistance, fresh market/processing                      |
| 13 | 00-Q-78                  | China  | Fresh market pink fruit                                        |
| 14 | LA1320                   | TGRC   | <i>S. lycopersicum</i> var <i>cerasiforme</i>                  |
| 15 | LA1310                   | TGRC   | <i>S. lycopersicum</i> var <i>cerasiforme</i>                  |
| 16 | PTC1-96-2<br>Okhaldhunga | Nepal  | High acid                                                      |
| 17 | Pusa Ruby                | Nepal  | High acid                                                      |
| 18 | Siberia                  | Russia | early maturity                                                 |
| 19 | 牛番茄                      | Taiwan | Popular in Taiwan, and it was bought from the<br>Taiwan market |
| 20 | 玉女番茄                     | Taiwan | Popular in Taiwan, and it was bought from the<br>Taiwan market |



表七、不同番茄品種之核酸濃度、蛋白濃度及糖酸度

Table 7. The cDNA and protein concentration, sugar degrees, and pH levels of different tomato cultivars.

| Cultivar number | cDNA concentration (ng/ $\mu$ L) | Protein concentration (mg/mL) | Sugar contents ( $^{\circ}$ Brix) | pH levels (pH) |
|-----------------|----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|----------------|
| 1               | 1732.2                           | 2.72                          | 5.8                               | 4.02           |
| 2               | 1307.5                           | 1.26                          | 6.8                               | 3.93           |
| 3               | 1773.7                           | 2.36                          | 5.0                               | 4.16           |
| 4               | 1655.8                           | 3.69                          | 5.0                               | 4.10           |
| 5               | 1659.1                           | 1.98                          | 6.8                               | 4.06           |
| 6               | 1850.0                           | 1.00                          | 4.0                               | 4.18           |
| 7               | 2136.8                           | 0.99                          | 8.0                               | 4.28           |
| 8               | 2010.9                           | 1.03                          | 4.8                               | 4.29           |
| 9               | 1678.0                           | 1.68                          | 3.0                               | 4.14           |
| 10              | 1461.7                           | 4.22                          | 5.0                               | 4.22           |
| 11              | 2042.6                           | 2.10                          | 4.2                               | 4.24           |
| 12              | 1907.7                           | 2.22                          | 5.2                               | 4.32           |
| 13              | 2033.8                           | 1.17                          | 5.0                               | 4.19           |
| 14              | 1318.4                           | 1.11                          | 5.4                               | 4.30           |
| 15              | 1725.6                           | 2.75                          | 5.2                               | 4.25           |
| 16              | 1743.3                           | 2.26                          | 5.0                               | 4.01           |
| 17              | 1532.6                           | 3.47                          | 5.0                               | 3.92           |
| 18              | 2283.2                           | 1.88                          | 5.2                               | 4.33           |
| 19              | 1538.4                           | 3.8                           | 5.0                               | 4.10           |
| 20              | 2504.8                           | 6.5                           | 9.2                               | 3.92           |



表八、Tanya 番茄不同成熟度之核酸濃度、蛋白濃度和糖酸度

Table 8. The cDNA and protein concentration, sugar degrees and pH levels of tomato 'Tanya' in five growth stages.

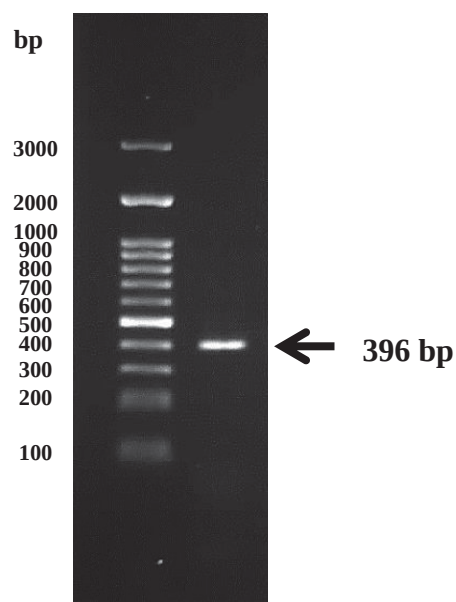
| Growth stage | cDNA<br>concentration<br>(ng/μL) | Protein<br>concentration<br>(mg/mL) | Sugar<br>contents<br>(°Brix) | pH levels<br>(pH) |
|--------------|----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|-------------------|
| 2-1          | 3342.4                           | 1.26                                | 6.2                          | 4.35              |
| 2-2          | 1940.8                           | 2.09                                | 6.4                          | 4.0               |
| 2-3          | 3010.0                           | 1.01                                | 6.4                          | 4.0               |
| 2-4          | 2053.8                           | 2.11                                | 6.6                          | 4.05              |
| 2-5          | 2216.5                           | 1.00                                | 6.8                          | 3.93              |



(A)

| Forward primer                 | Reverse Primer                  |
|--------------------------------|---------------------------------|
| CCCATGGAAATGTCGTGGCAAACATATGTC | CCCCCTCGAGCTAGAGACTCTGTTCTATAAG |

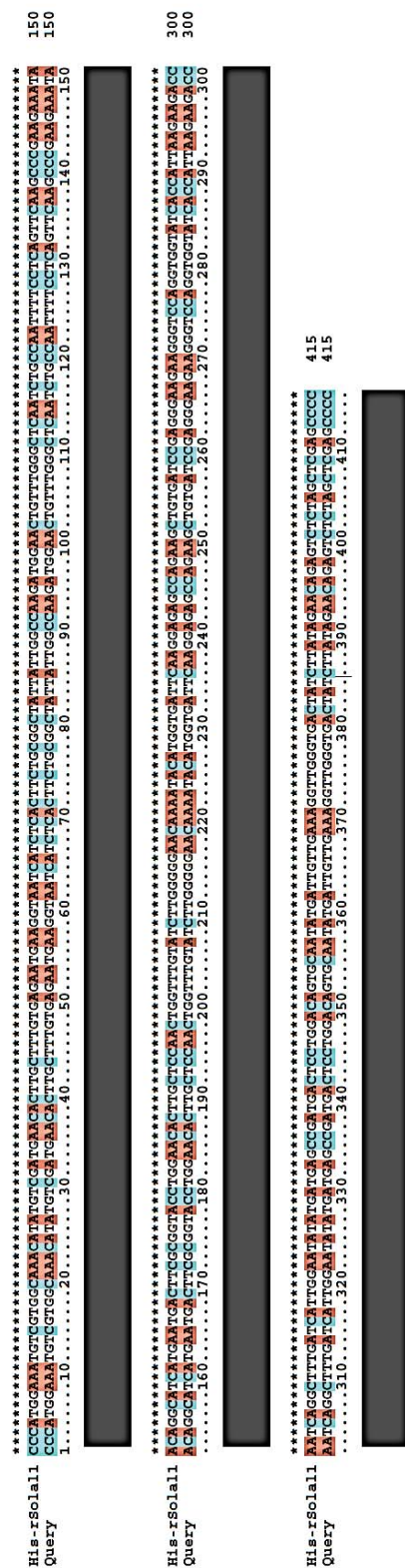
(B)



圖一、番茄過敏原 Sola l 1 基因選殖

**Fig. 1. Cloning of tomato allergen Sola l 1.**

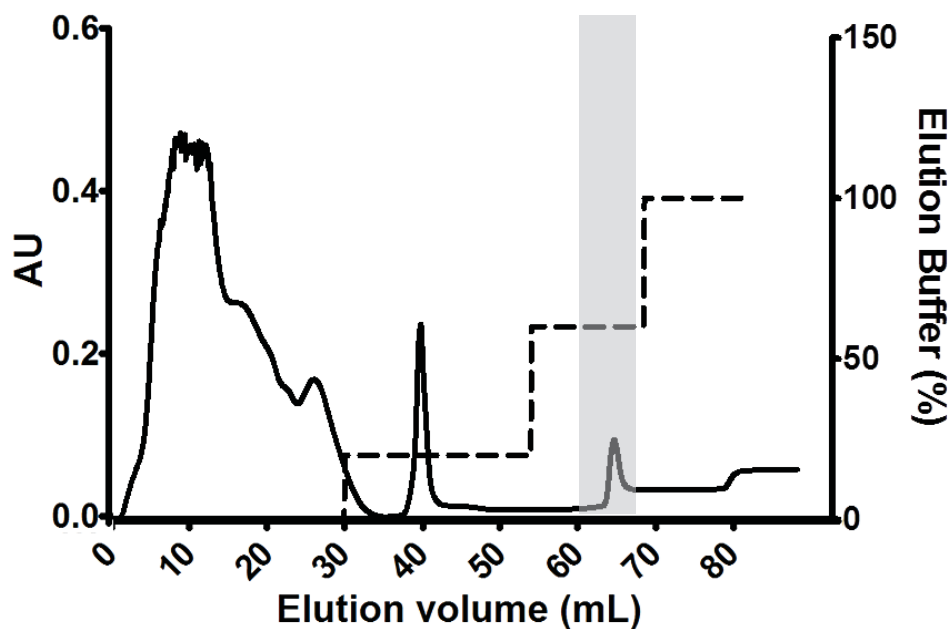
(A) Cloning of tomato allergen Sola l 1 primer design. Primers were designed based on nucleotide sequence from NCBI gene bank. (B) The product was 396 bp and amplified at 56°C.



**Score: 1057 bites**  
**Expect: 0.0**  
**Identities: 572/572 (100%)**  
**Gaps: 0/572 (0%)**

圖二、重組番茄 profilin 過敏原 rHis-Sola1 1 核酸序列與 NCBI 基因庫序列比對結果

**Fig. 2. The alignment result of recombinant tomato profilin rHis-Sola 1 1 and Sola 1 1 from NCBI gene bank. rHis-Sola 1 1 ; sequence of Sola 1 1 in pET 32a(+) vector. Query: tomato allergen Sola 1 1 sequence from NCBI gene bank. The alignment result indicated 100% identity. The alignment result was shown by Cluster X 2.1 tools.**

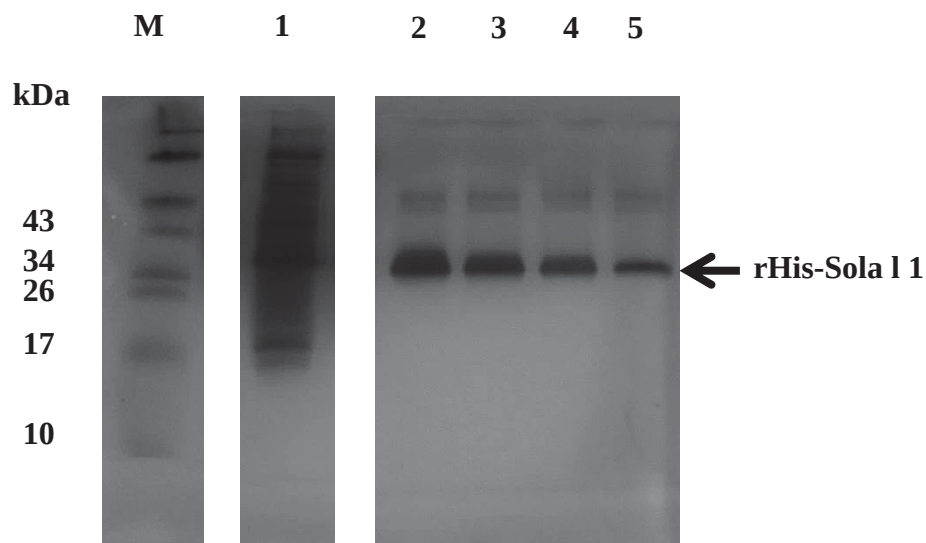


圖三、以快速液態層析親和性管柱純化番茄重組蛋白 rHis-Sola 1 1

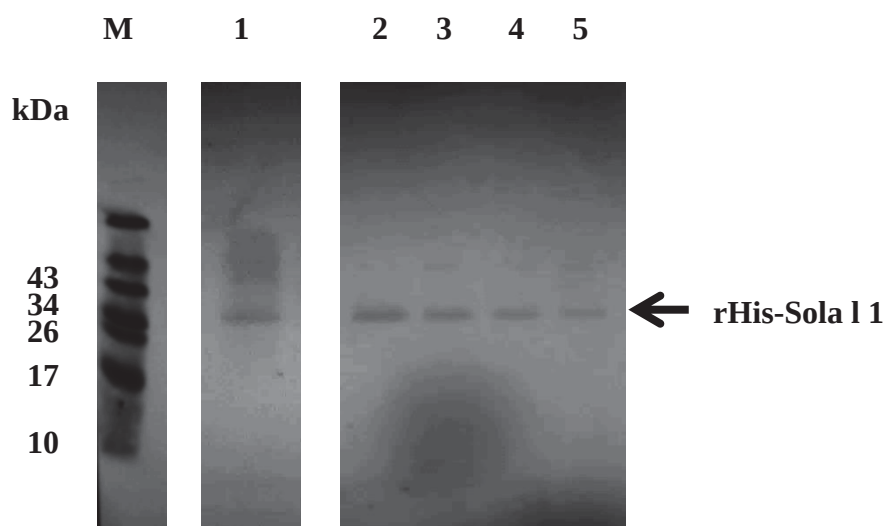
**Fig. 3. FPLC elution profile of the of recombinant tomato protein rHis-Sola 1 1 using affinity exchange with HiTrap chelating column.**

His-Sola 1 1 was eluted by 60% elution buffer (marked in gray lane). The total collection volumn of target protein was about 4 mL.

(A)



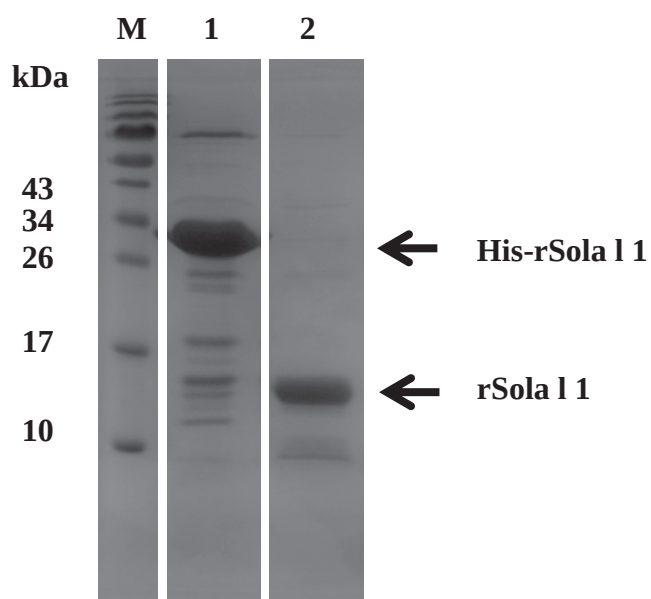
(B)



圖四、以 SDS-PAGE 和西方墨點法分析 rHis-Sola l 1 粗萃取蛋白與純化蛋白

**Fig. 4. SDS-PAGE analysis and western blot of rHis-Sola l 1 and purified rHis-Sola l 1.**

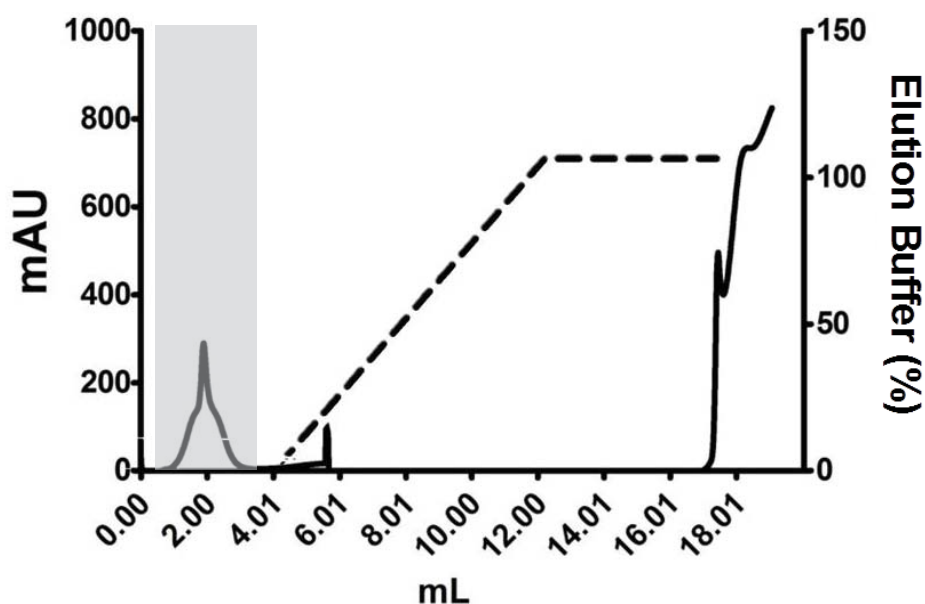
(A) SDS-PAGE analysis of rHis-Sola l 1. (B) Western blot of rHis-Sola l 1. Lane 1: the crude protein extracts of rSola l 1. Lane 2-5: purified rSola l 1. A 34 kDa fusion protein was detected by anti-His antibody.



圖五、以 SDS-PAGE 電泳分析番茄重組蛋白 rSola l 1 移除 His-tag 結果

**Fig. 5. SDS-PAGE analysis of rSola l 1 after removing His-tag residue.**

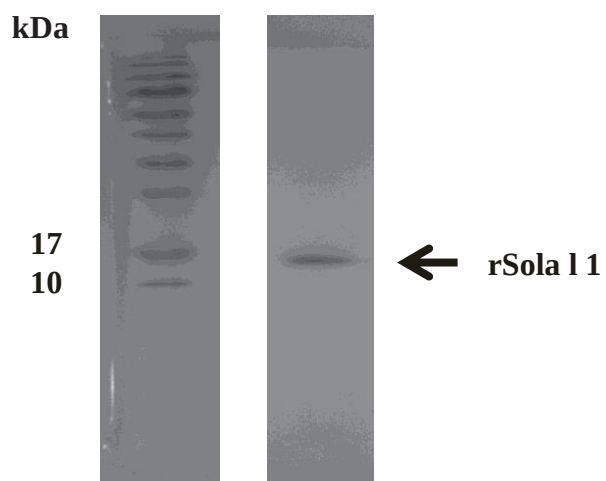
Lane 1: Fusion protein rHis-Sola l 1, lane 2: His-tag-removed rSola l 1. The His-tag was removed by enterkinase enzyme.



圖六、以快速液態層析親和性管柱二次純化番茄重組蛋白 rSola l 1

**Fig. 6. The elution profile of the secondary purification of tomato rSola l 1 using HiTrap Chelating column attaching to FPLC system.**

Tomato allergen rSola l 1 was eluted in the unbind fraction (marked in gray lane).



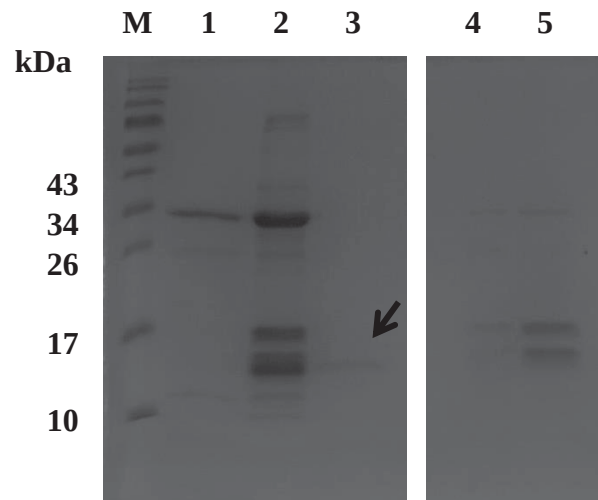
圖七、以 SDS-PAGE 電泳分析番茄重組蛋白 rSola l 1 二次純化結果

**Fig. 7. SDS-PAGE analysis of secondarily purified rSola l 1.**

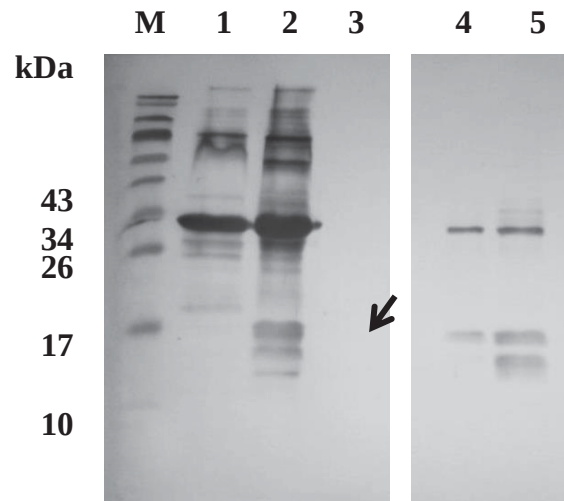
Lane: rSola l 1 after removing His-tag residue. The molecular weight of His-tag-removed rSola l 1 was about 14 kDa.



(A)



(B)



圖八、以 SDS-PAGE 和西方墨點法分析 rSola l 1 二次純化蛋白

**Fig. 8. SDS-PAGE and western blot analysis of secondarily purified rSola l 1.**

(A) SDS-PAGE analysis of rSola l 1. (B) Western blot analysis of rSola l 1 using Anti-His antibody. Lane 1: rHis-Sola l 1, lane 2: EK treated rHis-Sola l 1, lane 3: secondary purified rSola l 1, lane 4-5: FPLC binding elute. The secondarily purified rSola l 1 protein was shown on SDS-PAGE with coomassie blue stain, but it was not detected by anti-His antibody (indicated by arrow). The purified fusion protein rSola l 1 was about 14 kDa.



1 MSWQTYVDEH LLCENEGNHL TSAAIIGQDG TVWAQSANFP QFKPEEITGI  
51 MNDEAVPGTL APTGLYLGGT KYMVIQGEPE AVIRGKKGPG GITIKKTNQA  
101 LIIGIYDEPM TPGQCNMIVE RLGDYLIEQS L

Taxonomy: Solanum lycopersicum

Match to: PROF2\_SOLLC

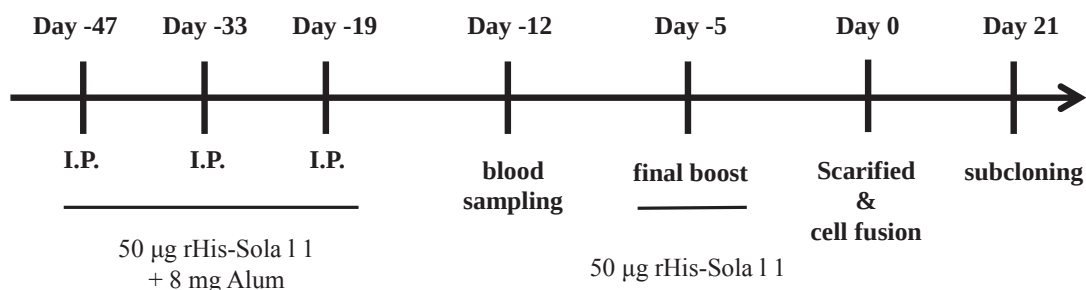
Score: 175

Sequence Coverage: 45%

Matched peptides shown in **Bold under line**

圖九、以質譜分析重組蛋白 rSola l 1 胺基酸序列

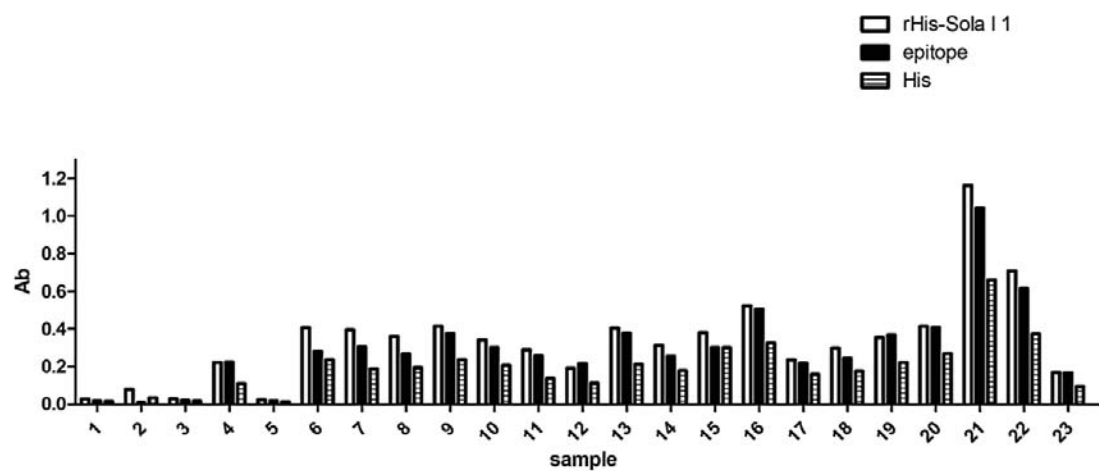
Fig. 9. The analysis result of the amino acid sequence of recombinant protein rSola l 1 using mass spectrometry.



圖十、製備單株抗體之流程

**Fig. 10. The protocol of monoclonal antibody production.**

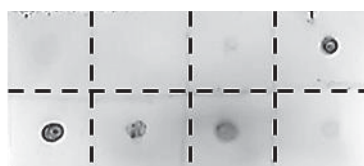
Mice were sensitized three times in a span of 14 days by intraperitoneal injection of 50 µg of rHis-Sola l 1 emulsified in aluminum hydroxide. After 35 days, blood sampling was carried out with lancet in mice facial vein. Serum was used for the titer determination. After 7 additional days, mice were boosted with 50 µg of rHis-Sola l 1 soluble antigen without emulsifying aluminum hydroxide. After 5 days of last rHis-Sola l 1 boost, mice were sacrificed for spleen preparation. After the preparation of spleen, cell fusion was carried out in the same day. The hybridomas were incubated in 37°C for 3 weeks preparing for the subcloning. n = 3.



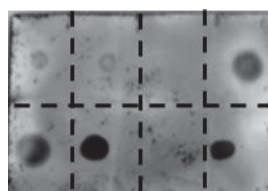
圖十一、His-rSola l 1 單株抗體效價

**Fig. 11. The titer of rHis-Sola l 1 monoclonal antibody.**

In the selection of hybridomas for the desired cell line, fusion protein rHis-Sola l 1, commercial Sola l 1 epitope, and commercial His-tag peptide were used as ELISA antigen. The culture supernatant was collected for titer measurement.



| FBS                  | BSA                          | PCP               | Fve             |
|----------------------|------------------------------|-------------------|-----------------|
| Tomato crude extract | rHis-Sola l 1 fusion protein | rSola l 1 epitope | His-tag peptide |



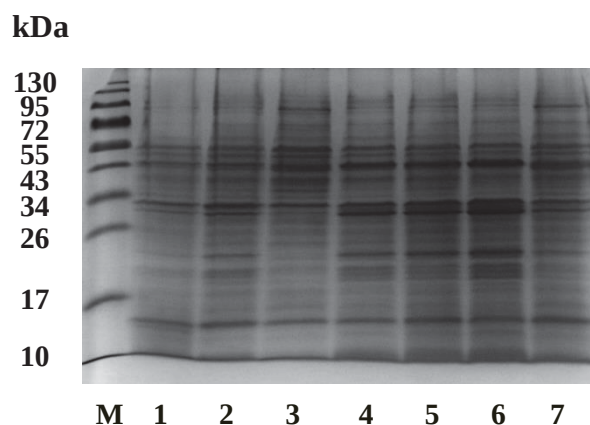
| rHis-Sola l 1 fusion protein | rSola l 1 epitope | His-tag peptide | Tomato crude extract |
|------------------------------|-------------------|-----------------|----------------------|
| LZ8                          | Fve               | PCP             | HMP                  |

圖十二、點墨跡分析 His-rSola l 1 單株抗體編號 21 特異性

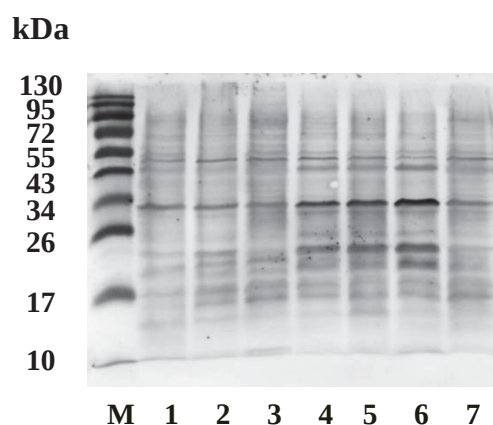
**Fig. 12. The specificity of rHis-Sola l 1 monoclonal antibody no.21 using dot blotting.**

The culture supernant was collected for specificity measurement. In determining the specificity of monoclonal antibody no.21, Fve, FBS, BSA, PCP, LZ8, HMP, tomato crude extract, rHis-Sola l 1 fusion protein, commercial Sola l 1 epitope, and commercial His-tag peptide were used as immunoblot antigen.

(A)



(B)



圖十三、以 SDS-PAGE 電泳及西方墨點法分析單株抗體編號 21 對數種品種番茄蛋白的特異性

**Fig. 13. SDS-PAGE and western blot analysis of the specificity of rHis-Sola l 1 monoclonal antibody no. 21 against proteins from different tomato cultivars.**

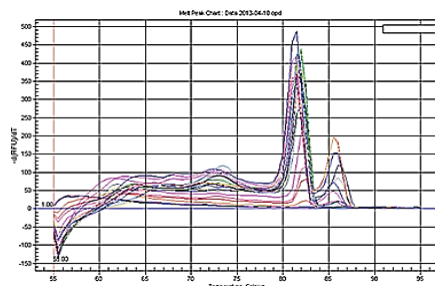
(A) SDS-PAGE analysis of tomato crude extract. (B) Western blot analysis of tomato crude extract using monoclonal antibody no. 21. Lane 1- 7: tomato cultivar no. 1-7 crude extract.



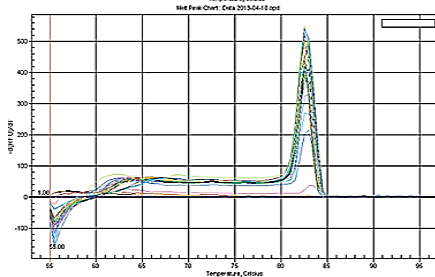
## Melting curve

## PCR standard curve

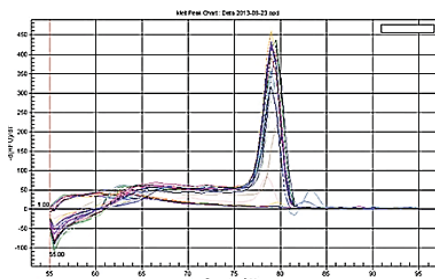
(A)



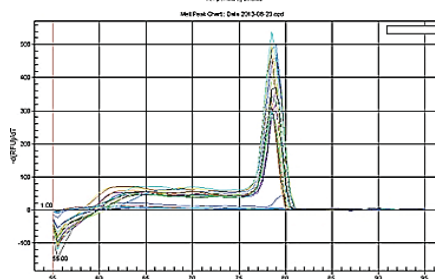
(B)



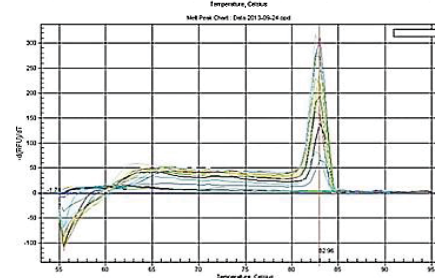
(C)



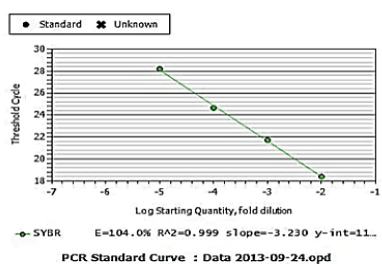
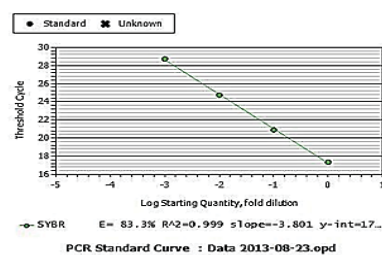
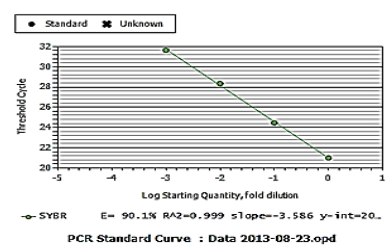
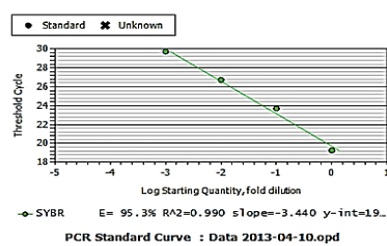
(D)



(E)



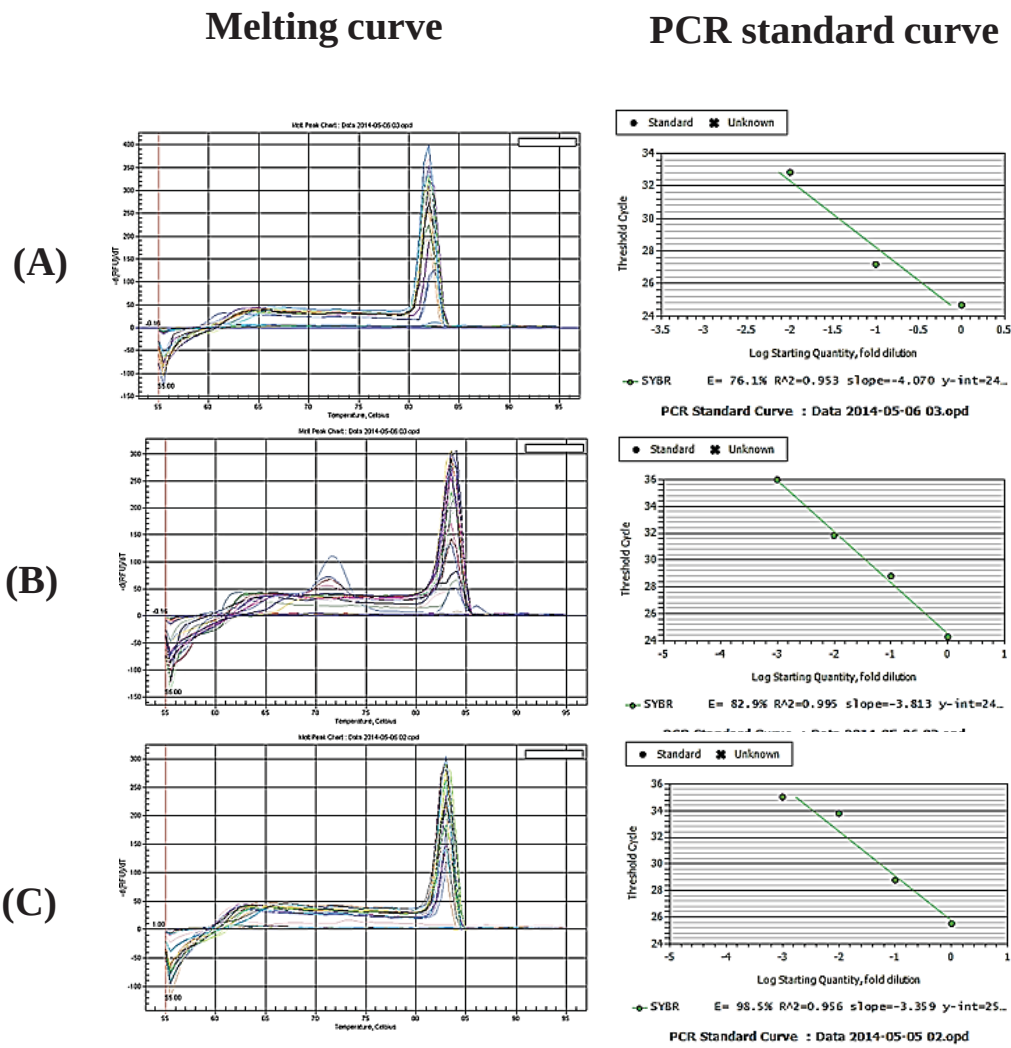
Not available



圖十四、Sola l 1 特異性引子之 Real-time PCR 溶解溫度和定量標準曲線

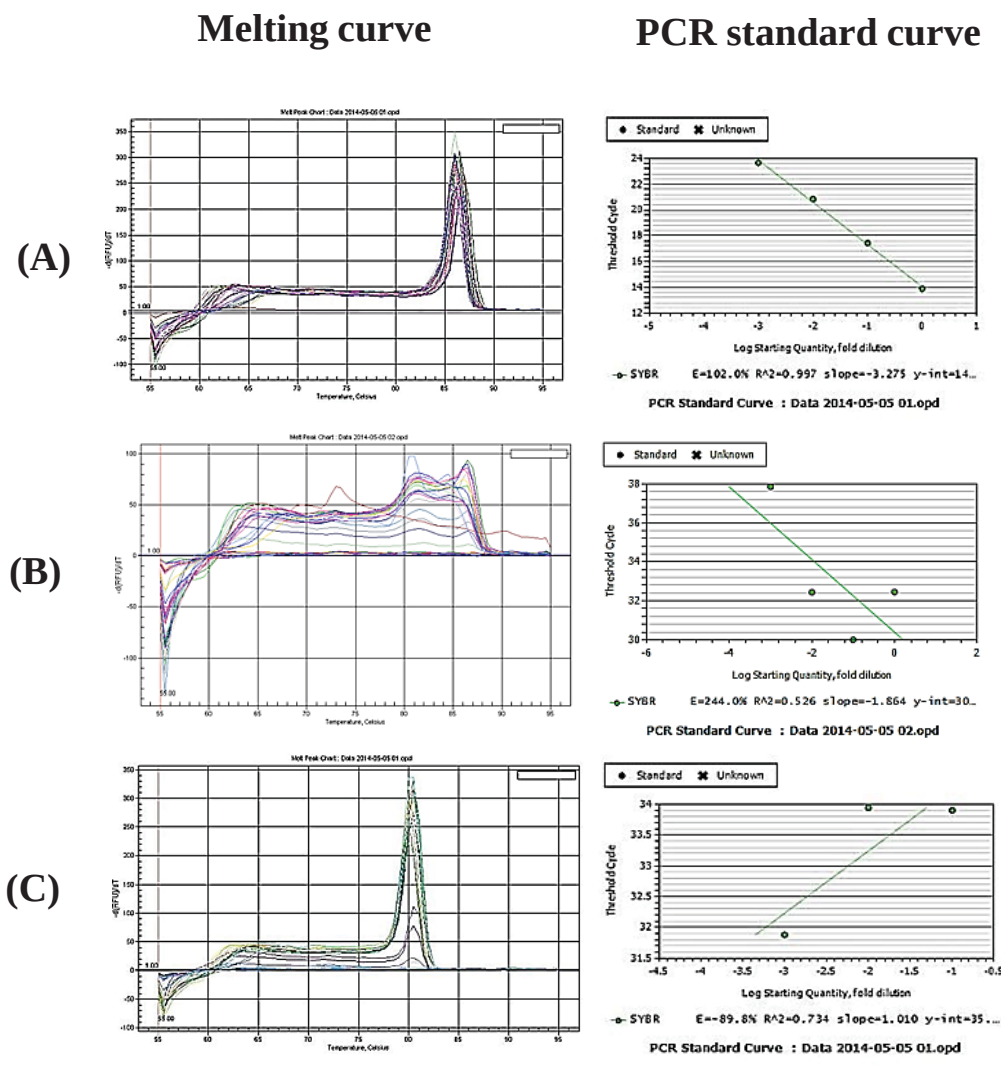
Fig. 14. Real-time PCR melting curves and PCR standard curves of Sola l 1 specific primer. The PCR standard curves was shown at 61°C



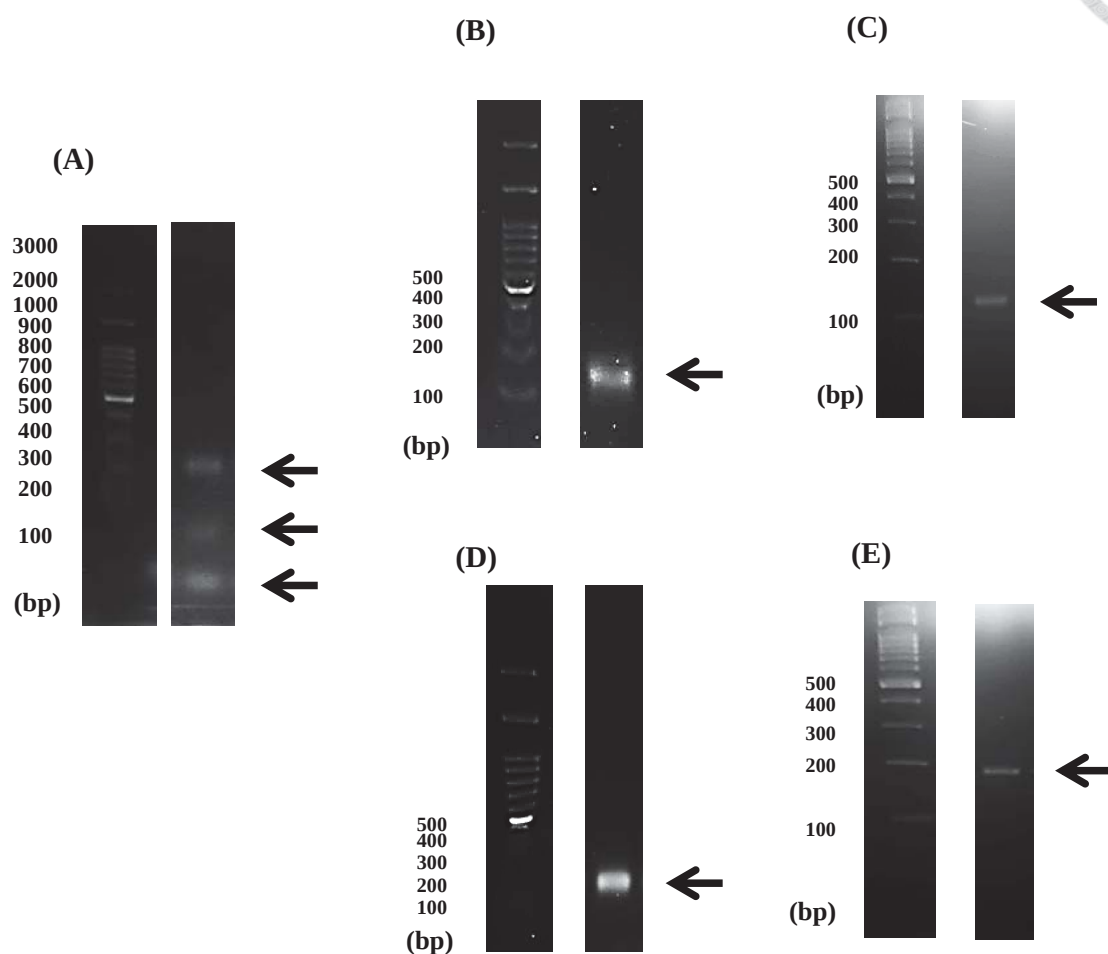


圖十五、看家基因 Actin 引子之 Real-time PCR 溶解溫度和定量標準曲線

Fig. 15. Real-time PCR melting curves and PCR standard curves of housekeeping gene actin primer. The PCR standard curves was shown at 61°C.



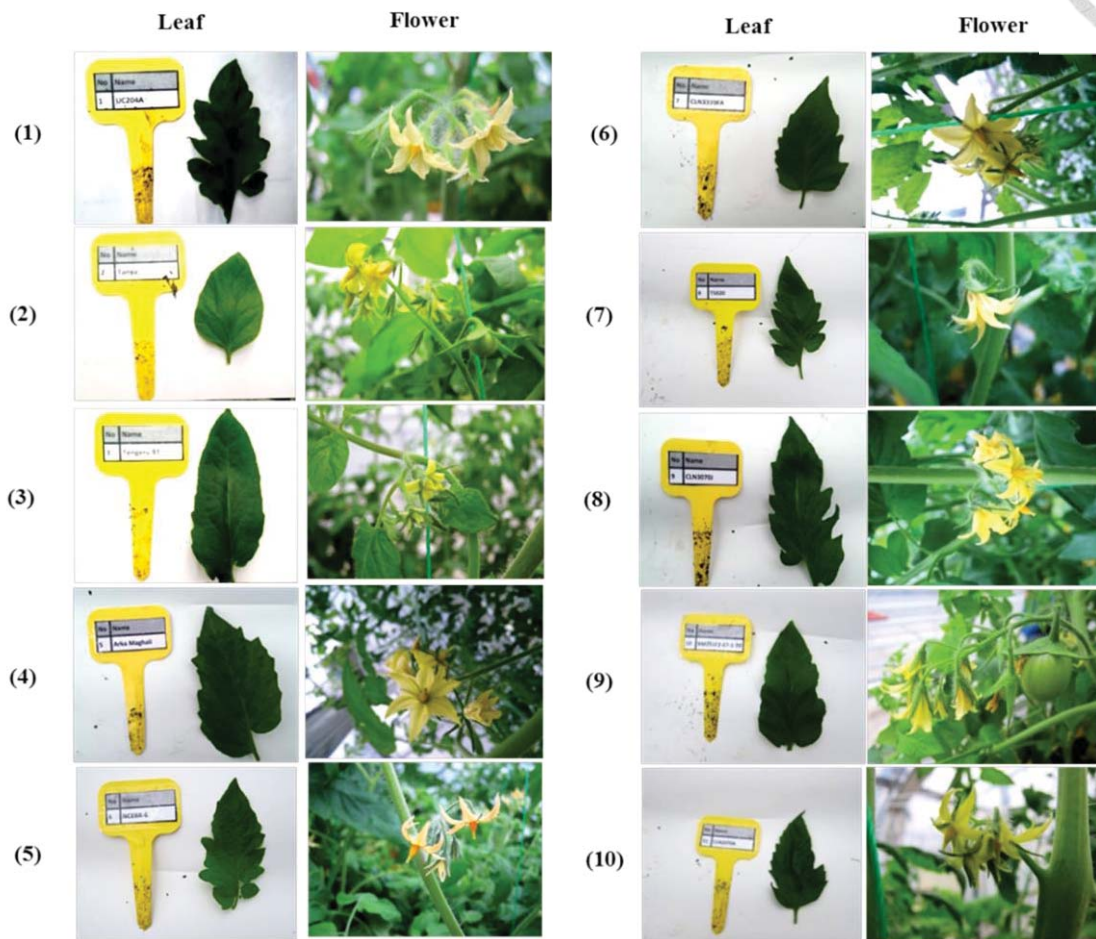
圖十六、看家基因 18S rRNA 引子之 Real-time PCR 溶解溫度和定量標準曲線  
 Fig. 16. Real-time PCR melting curves and PCR standard curves of housekeeping gene 18S rRNA primer. The PCR standard curves was shown at 61°C.



圖十七、Sola l 1 專一性引子即時聚合鏈鎖反應產物 real 1 primer (A), real 2 primer (B), real 3 primer (C), real 4 primer (D), and real 5 primer (E).

**Fig. 17. Real-time PCR products with Sola l 1 specific primer sets of (A) real 1 primer, (B) real 2 primer, (C) real 3 primer, (D) real 4 primer, and (E) real 5 primer.**

Primers were designed based on the Sola l 1 sequence from NCBI. Except for the products from real 1 primer, products from other primer sets were equal to the estimated length. Products of real-time PCR excised by real 2 primer, real 3 primer, real 4 primer and real 5 primer were about 172 bp, 116 bp, 157 bp, and 188 bp.

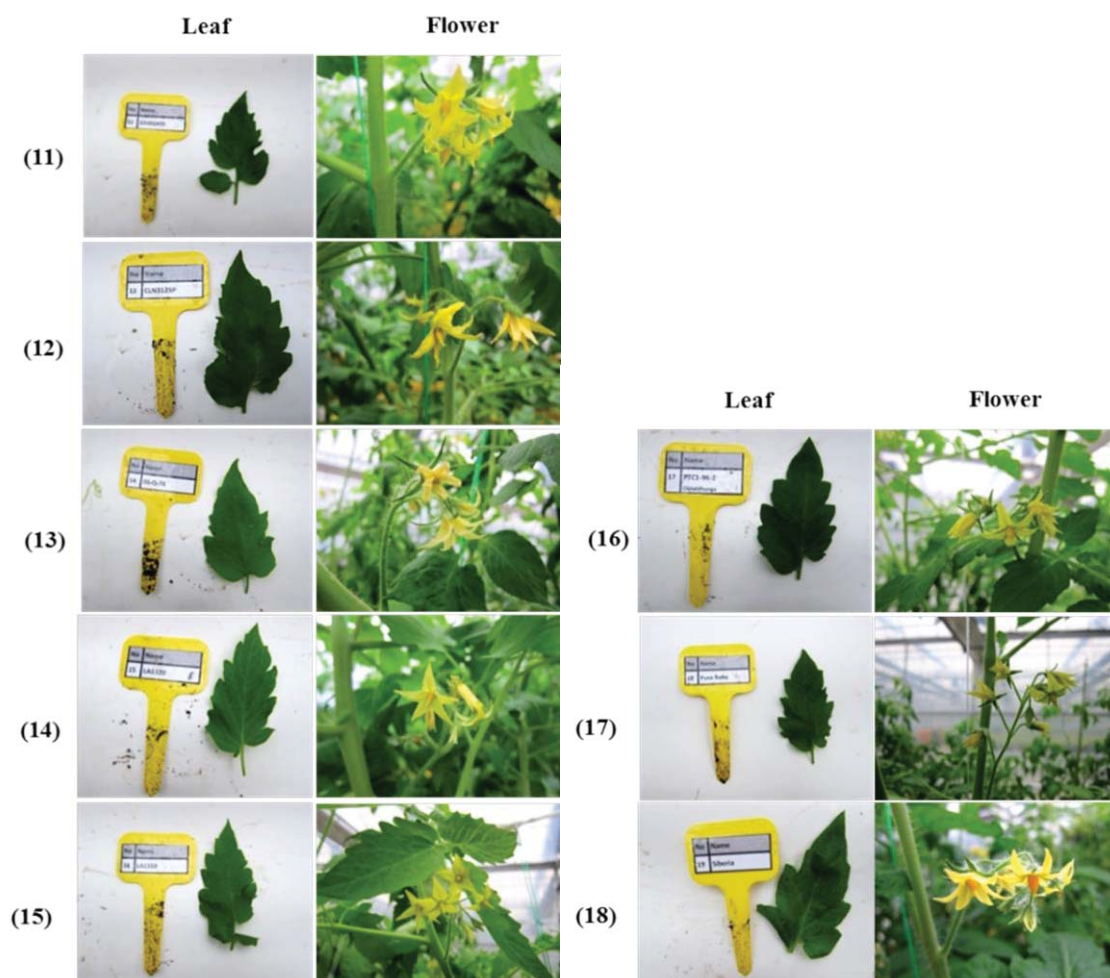


圖十八、十八個番茄品種葉及花外觀

**Fig. 18.** The appearances of leaves and flowers for eighteen tomato cultivars used in this study. (1)-(10) were the appearances of leaf and flowers corresponding to tomato cultivar no. 1 to 10.

接下頁

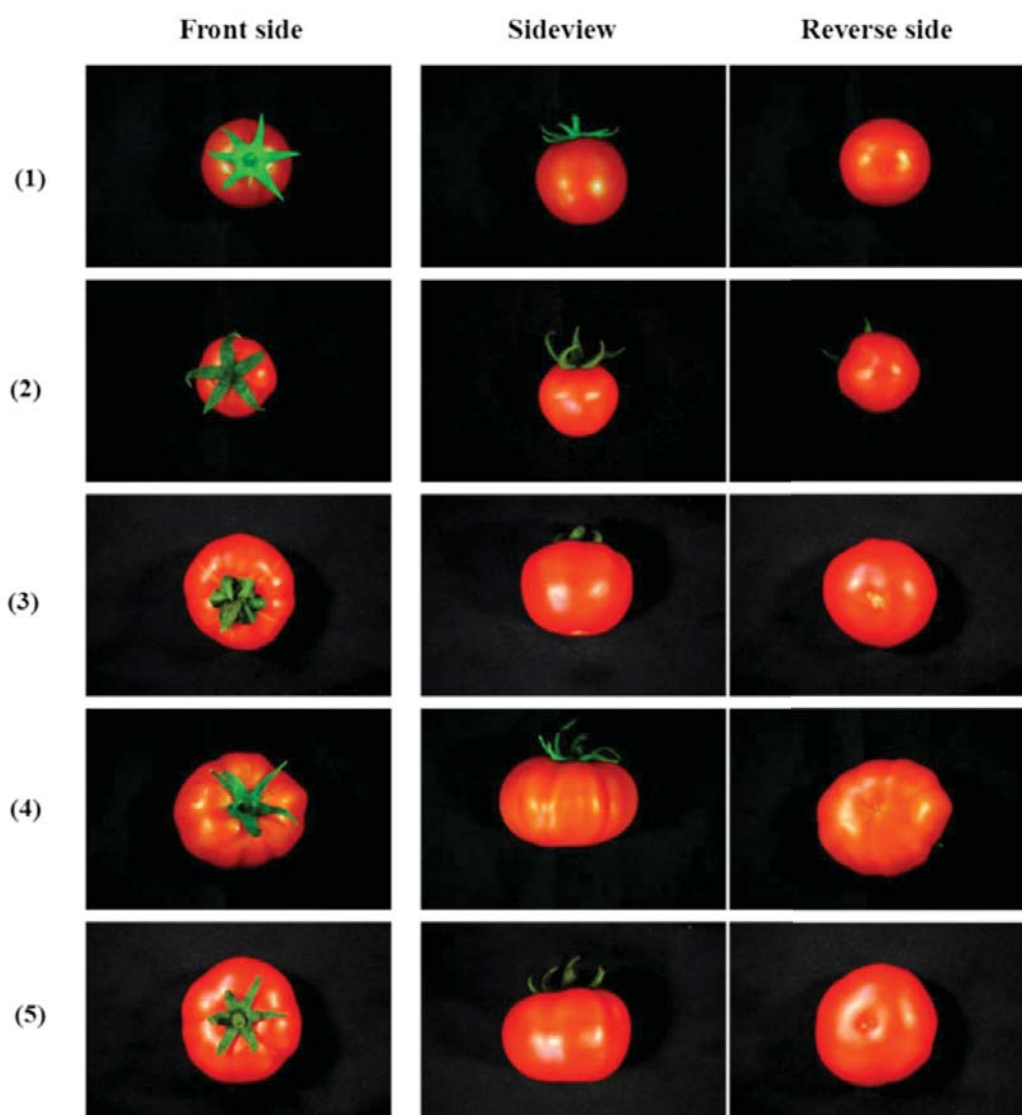
續上圖



圖十八、十八個番茄品種葉及花外觀

**Fig. 18.** The appearances of leaves and flowers for eighteen tomato cultivars used in this study. (11)-(18) were the appearances of leaf and flowers corresponding to tomato cultivar no. 11 to 18.





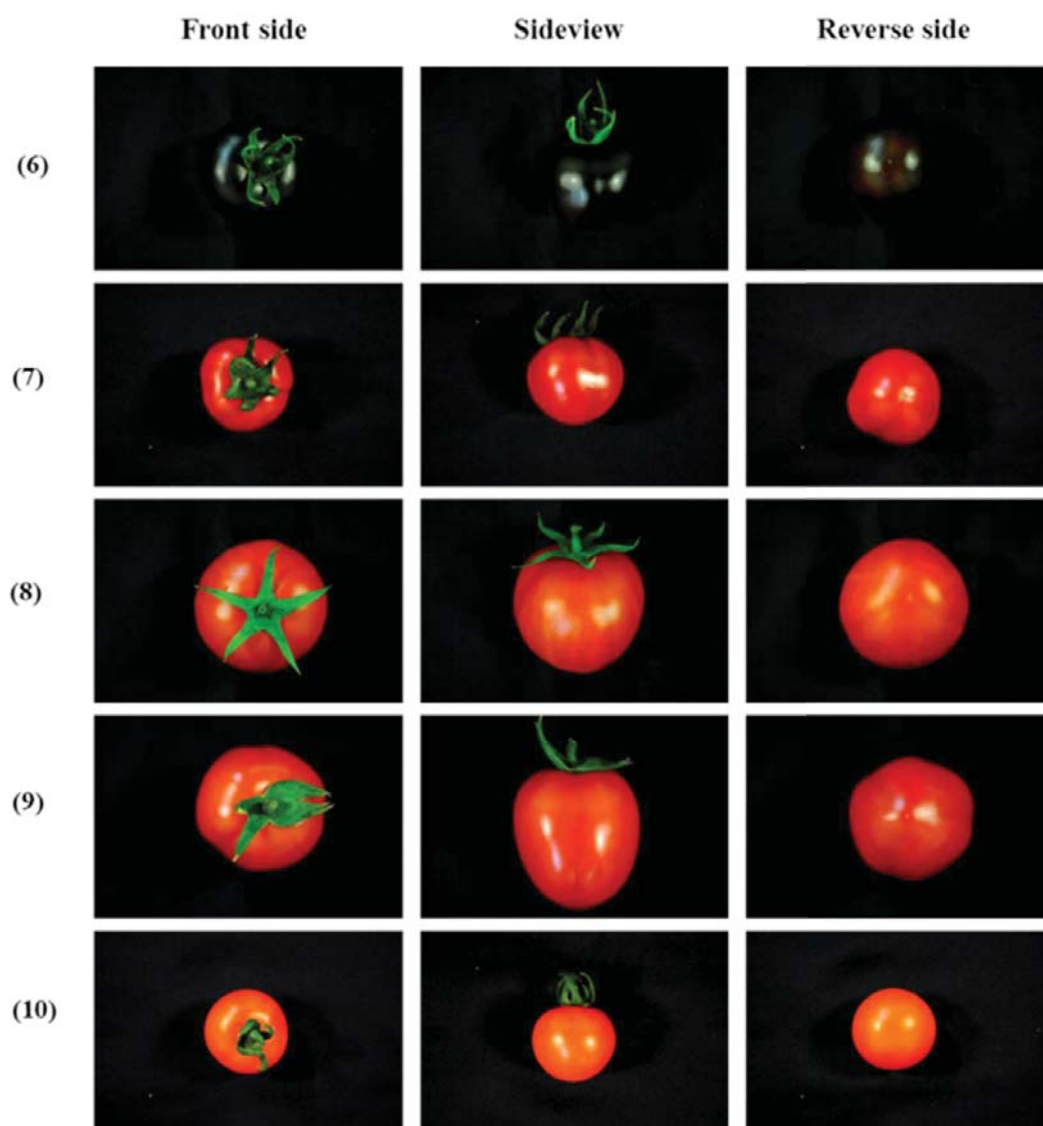
圖十九、二十個番茄品種果實外觀

**Fig. 19. The fruit appearances of twenty tomato cultivars used in this study.**

(1)-(5) were the appearances of fruit corresponding to tomato cultivar no. 1 to 5.

接下頁

續上圖



圖十九 (續)、二十個番茄品種果實外觀

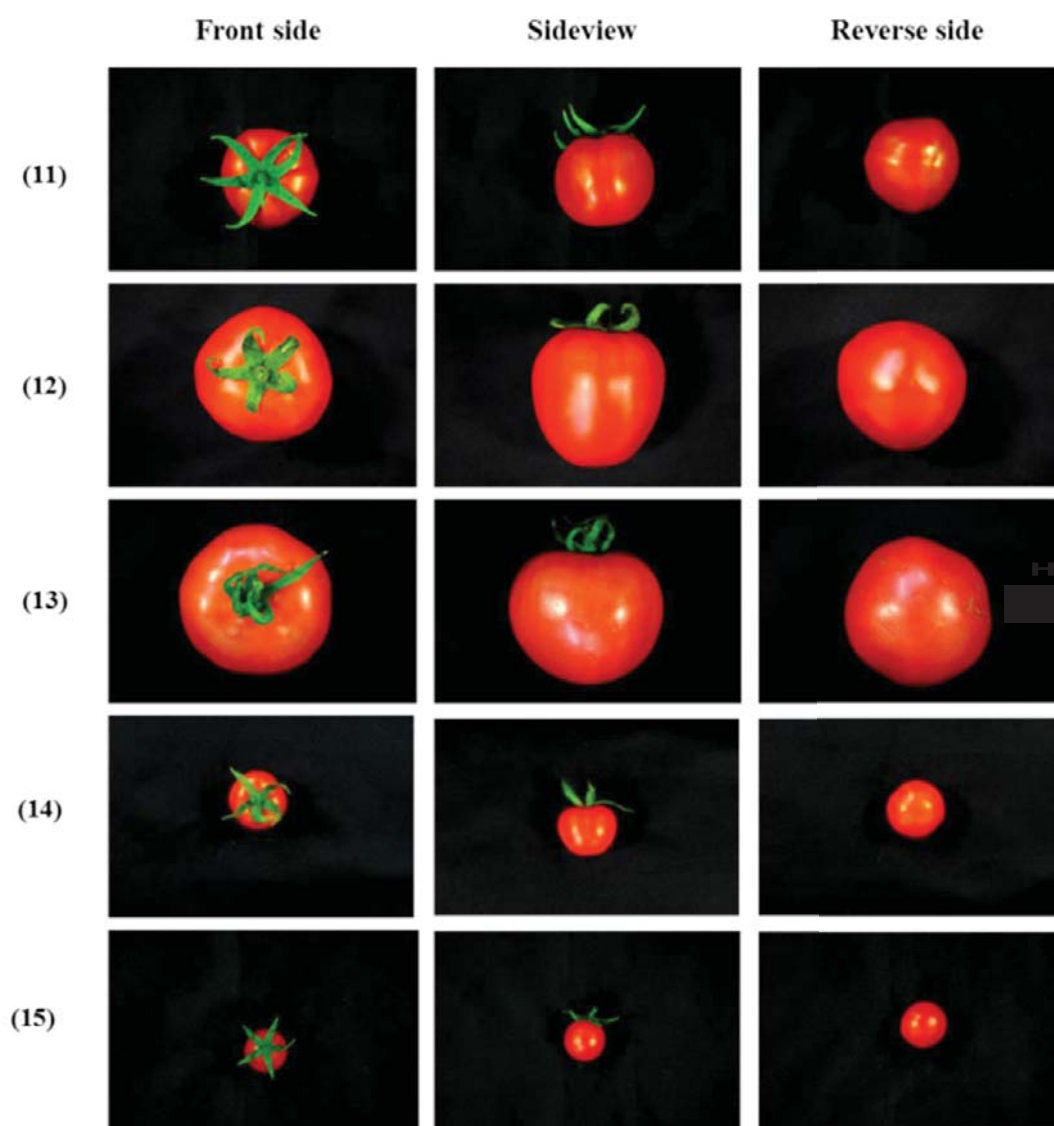
Fig. 19 (continued). The fruit appearances of twenty tomato cultivars used in this study.

(6)-(10) were the appearances of fruit corresponding to tomato cultivar no. 6 to 10.

接下頁



續上圖



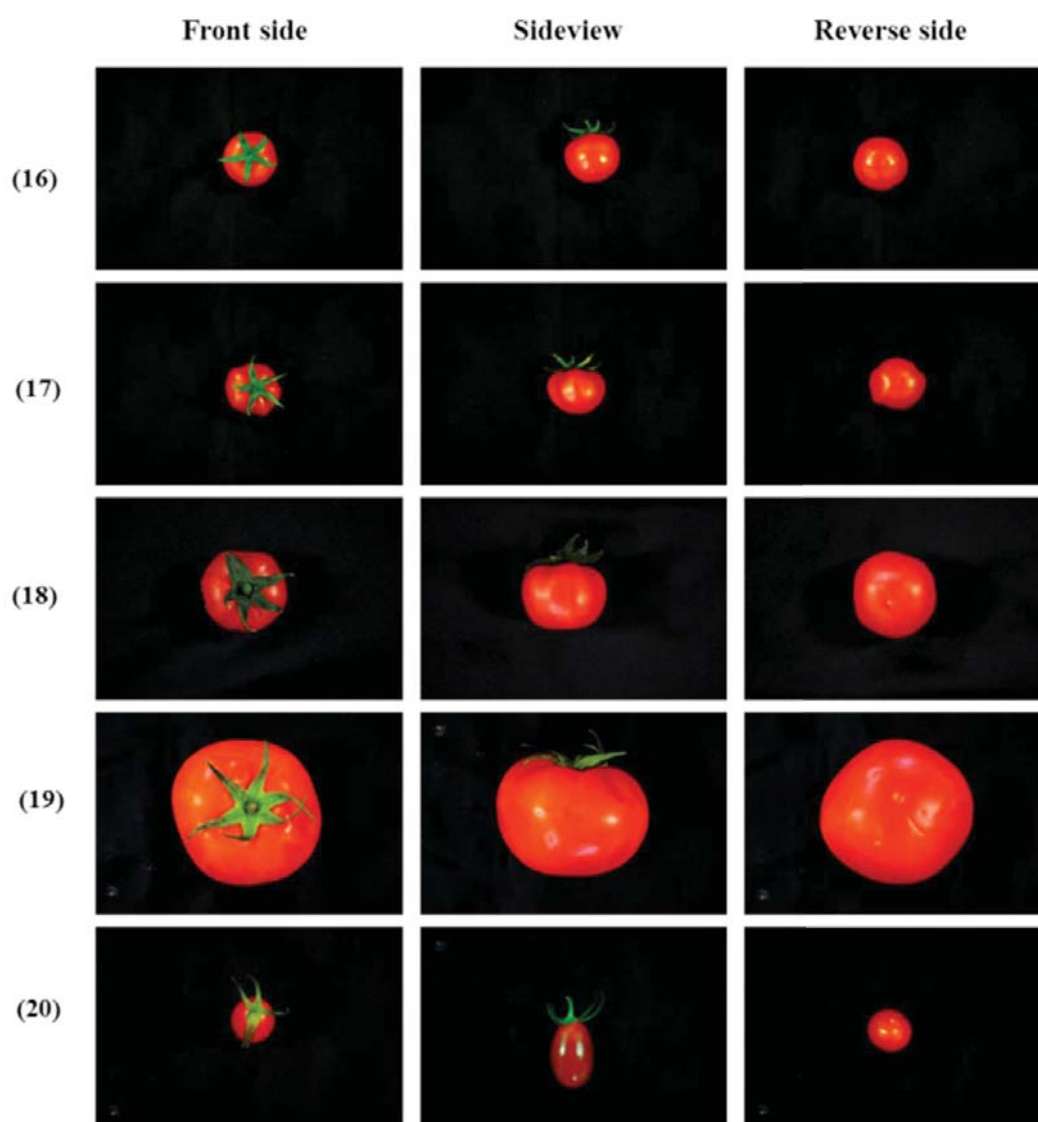
圖十九 (續)、二十個番茄品種果實外觀

Fig. 19 (continued). The fruit appearances of twenty tomato cultivars used in this study.

(7)-(15) were the appearances of fruit corresponding to tomato cultivar no. 7 to 15.

接下頁

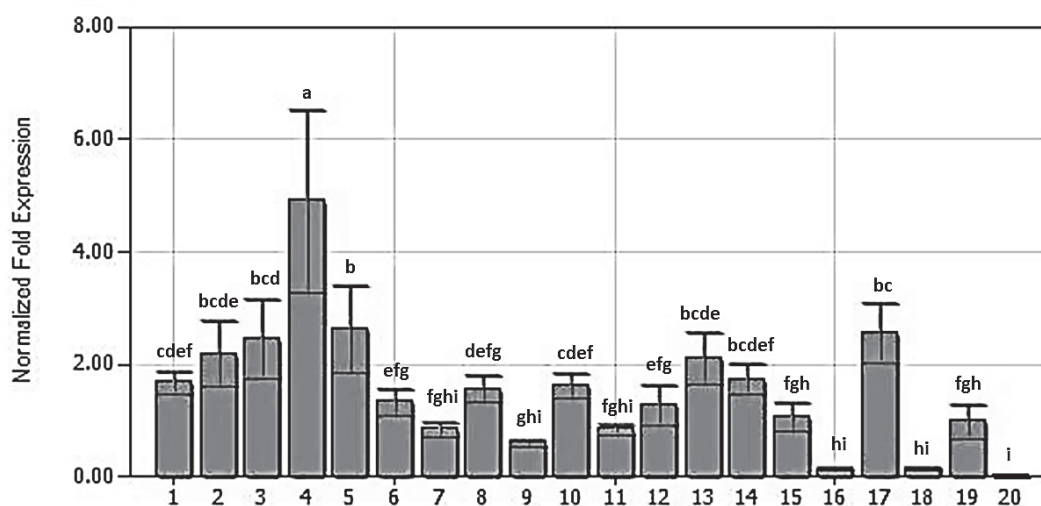
續上圖



圖十九 (續)、二十個番茄品種果實外觀

Fig. 19 (continued). The fruit appearances of twenty tomato cultivars used in this study.

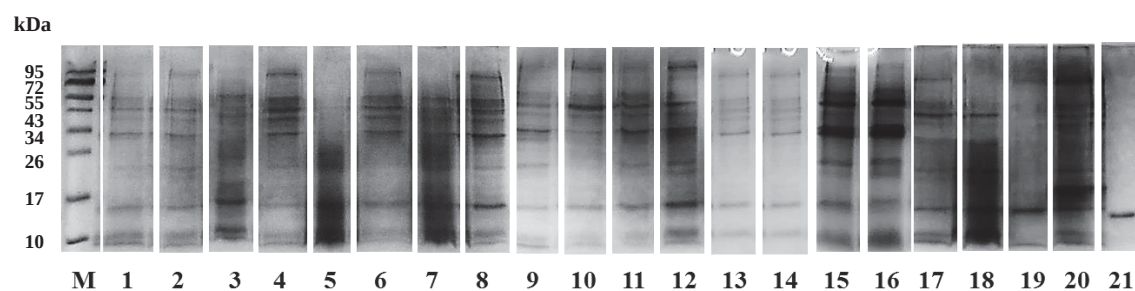
(16)-(20) were the appearances of fruit corresponding to tomato cultivar no. 16 to 20.



圖二十、Real-time PCR 分析二十品種番茄 Sola l 1 基因表現量結果

**Fig. 20. Real-time PCR quantification of Sola l 1 expression from twenty tomato cultivars.**

The quantitative analysis was carried out with two housekeeping genes, Actin 3 and 18S 1. No. 19 tomato cultivar was used as control. The statistical analysis denoted significant difference among groups. ( $p < 0.01$ ,  $n = 3$ )

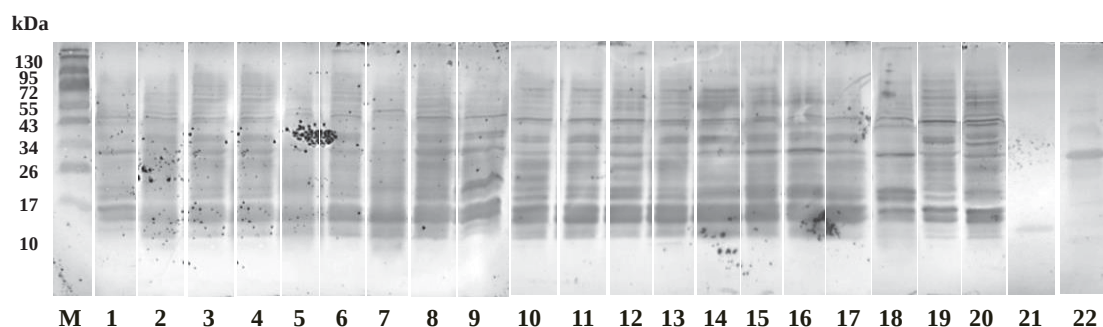


圖二十一、SDS-PAGE 分析二十品種番茄粗萃取蛋白結果

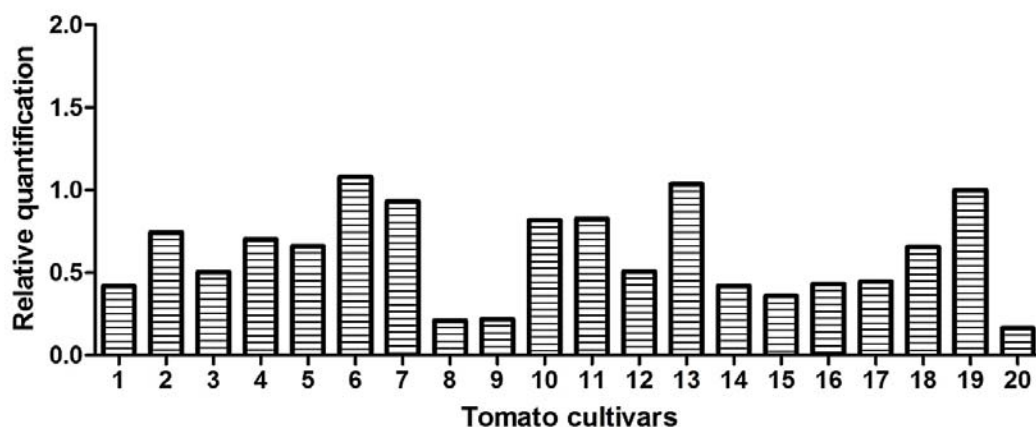
**Fig. 21. SDS-PAGE analysis of crude proteins from 20 tomato cultivars.**

The concentration of tomato crude extracts was 1 mg/mL. Lane 1 to lane 20: tomato cultivar no. 1 to 20. Lane 21: rSola l 1.

(A)



(B)

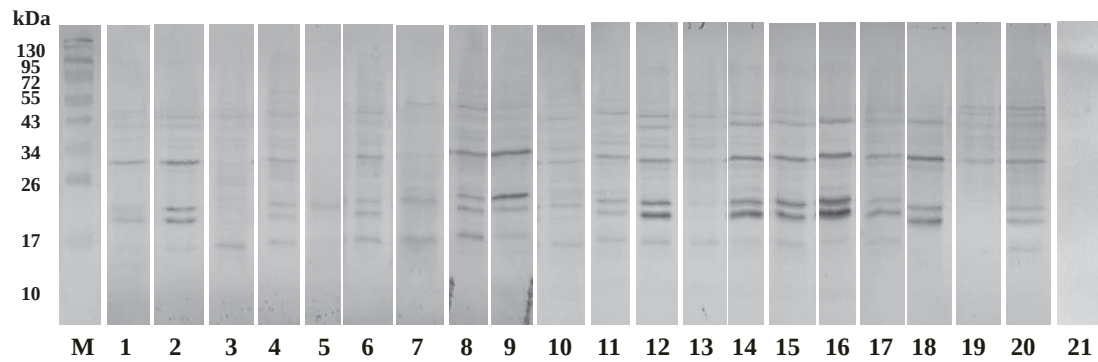


圖二十二、單株抗體分析二十個番茄品種中 Sola l 1 過敏原蛋白含量結果

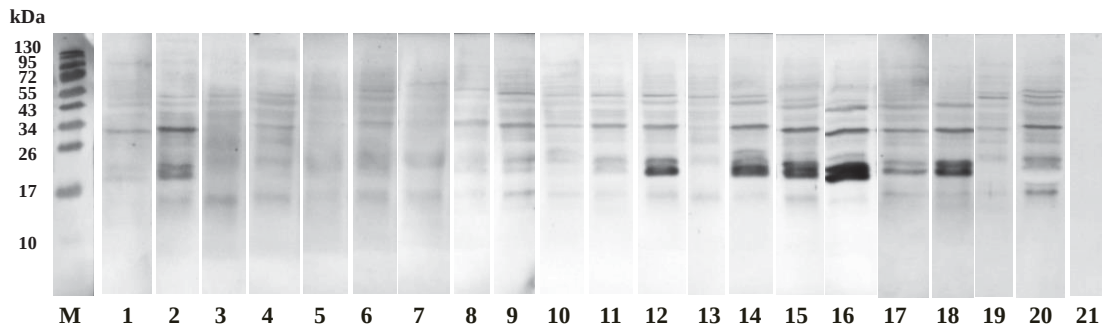
**Fig. 22. Quantification of tomato allergen Sola l 1 among twenty tomato cultivars with monoclonal antibody.**

(A) Western blot of twenty tomato cultivars with monoclonal antibody no. 21. (B) Relative quantification of Sola l 1 with image analysis program. The concentration of tomato crude extracts was 1 mg/mL. Lane 1 to lane 20: tomato cultivar no. 1 to 20. Lane 21: rSola l 1. Lane 22: rHis-Sola l 1. Image J was used as the image analysis program.

(A)

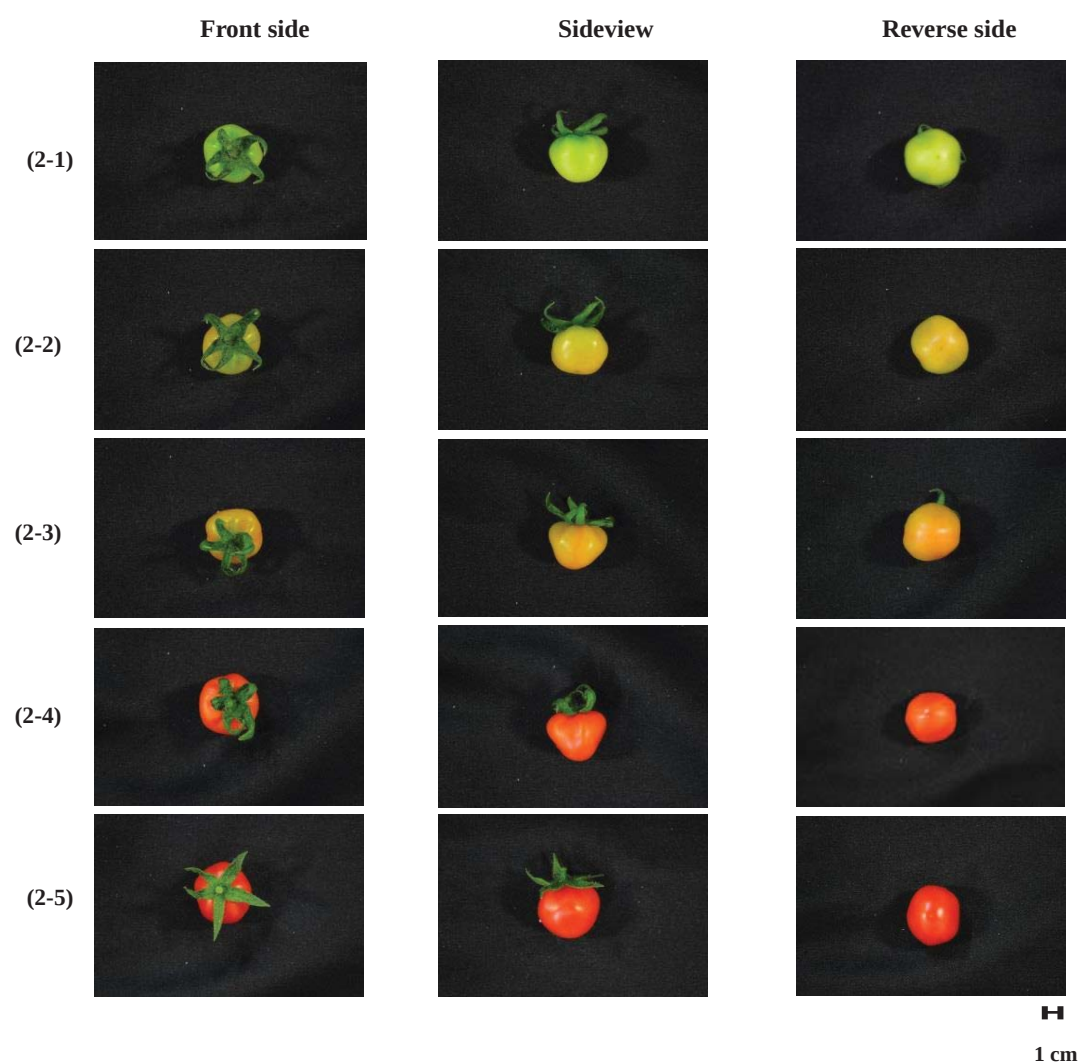


(B)



圖二十三、病人血清分析二十個番茄品種中 Sola l 1 過敏原免疫活性結果

**Fig. 23. Immunological activity analysis of tomato allergen Sola l 1 among twenty tomato cultivars with patient serum.** (A) Immunoblot of twenty tomato cultivars using patient serum. (B) Immunoblot of twenty tomato cultivars using non-patient serum.

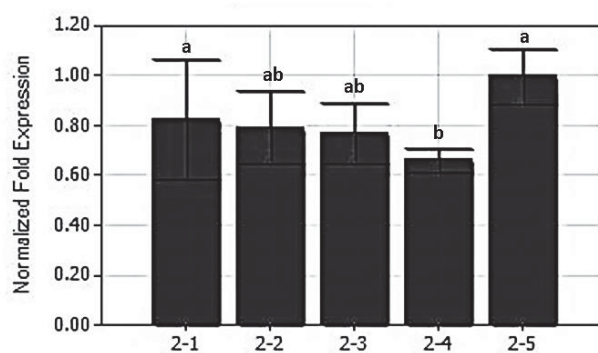


圖二十四、Tanya 番茄五個成熟階段果實外觀

**Fig. 24. The fruit appearance of tomato 'Tanya' in five growth stages.**

(2-1)-(2-5) were the appearance of fruit corresponding to mature green, turning, pink, red, and over ripen stage of tomato 'Tanya'

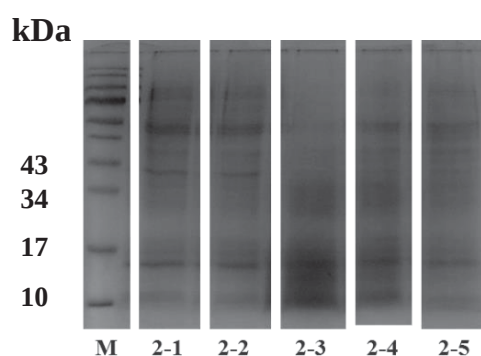




圖二十五、Real-time PCR 分析五個成熟階段的番茄品種 ‘Tanya’ 中 Sola l 1 過敏原相對定量結果

**Fig. 25. Real-time PCR quantification of Sola l 1 expression from tomato cultivar ‘Tanya’ in five different growth stages.**

The quantitative analysis was carried out with two housekeeping genes, Actin 3, and 18S 1. Lane 2-1 to 2-5: tomato crude extract of mature green, turning, pink, red, and over ripen stage of ‘Tanya’. The fifth growth stage was used as control.

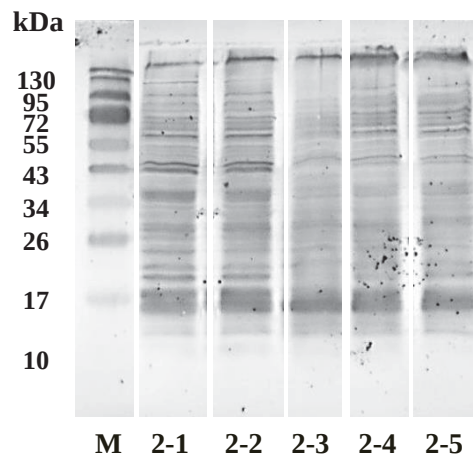


圖二十六、SDS-PAGE 分析不同成熟度的番茄品種 'Tanya' 粗萃取蛋白結果

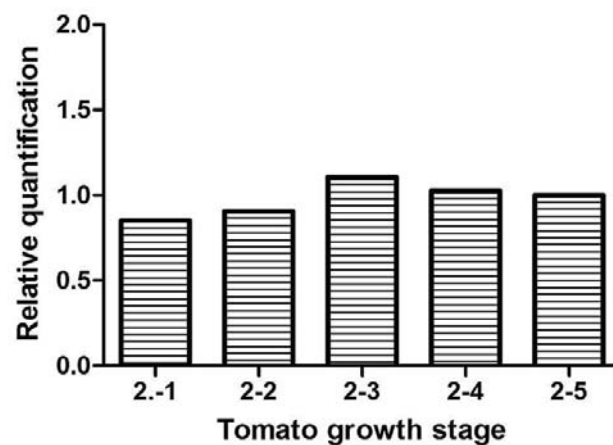
**Fig. 26. SDS-PAGE analysis of crude proteins from tomato cultivar 'Tanya' in five different growth stages.**

The concentration of tomato crude extracts was 1 mg/mL. Lane 2-1 to lane 2-5: tomato crude extract of mature green, turning, pink, red, and over ripen stage of 'Tanya'.

(A)



(B)

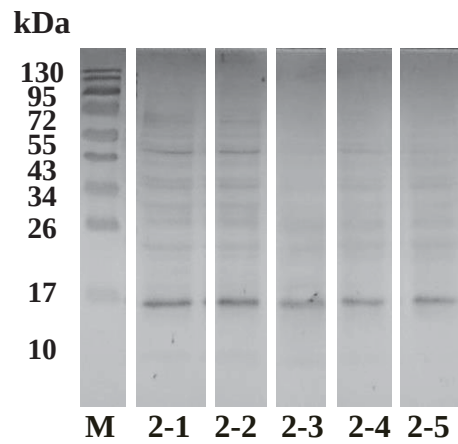


圖二十七、單株抗體分析番茄品種 ‘Tanya’ 五個成熟階段 Sola l 1 過敏原蛋白含量結果

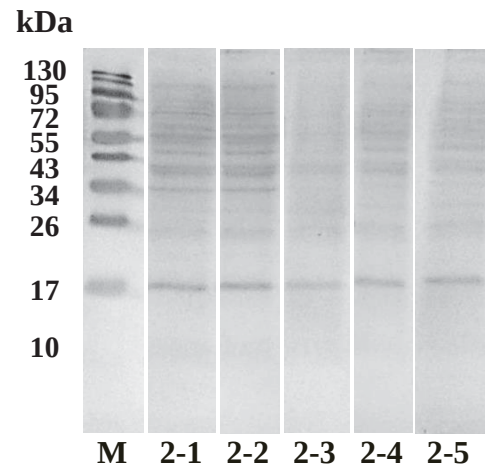
**Fig. 27. Quantification of Sola l 1 in tomato ‘Tanya’ in five growth stages with monoclonal antibody.**

(A) Western blot of five growth stages in tomato ‘Tanya’ using monoclonal antibody. (B) Relative quantification of Sola l 1 with image analysis program. The concentration of tomato crude extracts was 1 mg/mL. Lane 2-1 to lane 2-5: tomato crude extract of mature green, turning, pink, red, and over ripen stage of ‘Tanya’.

(A)



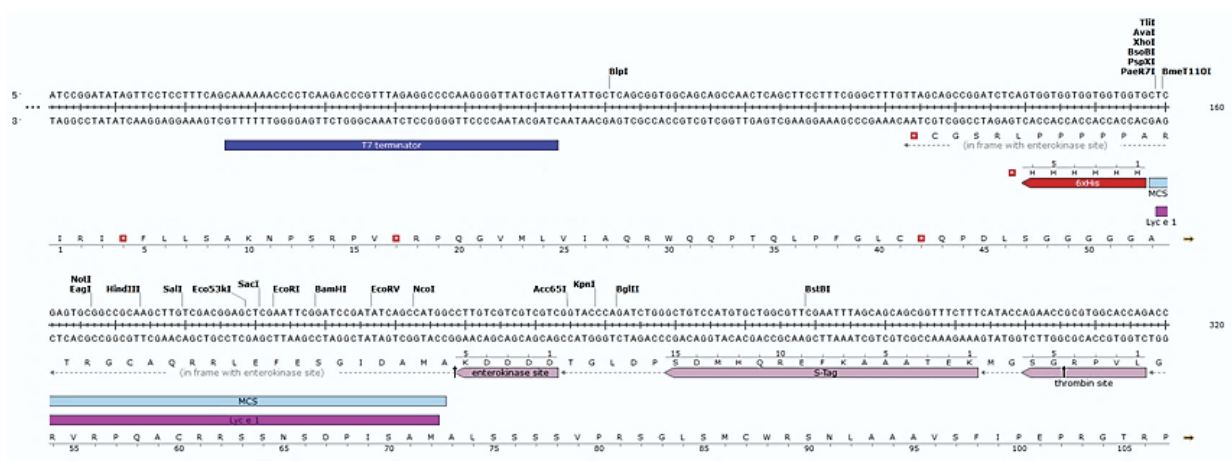
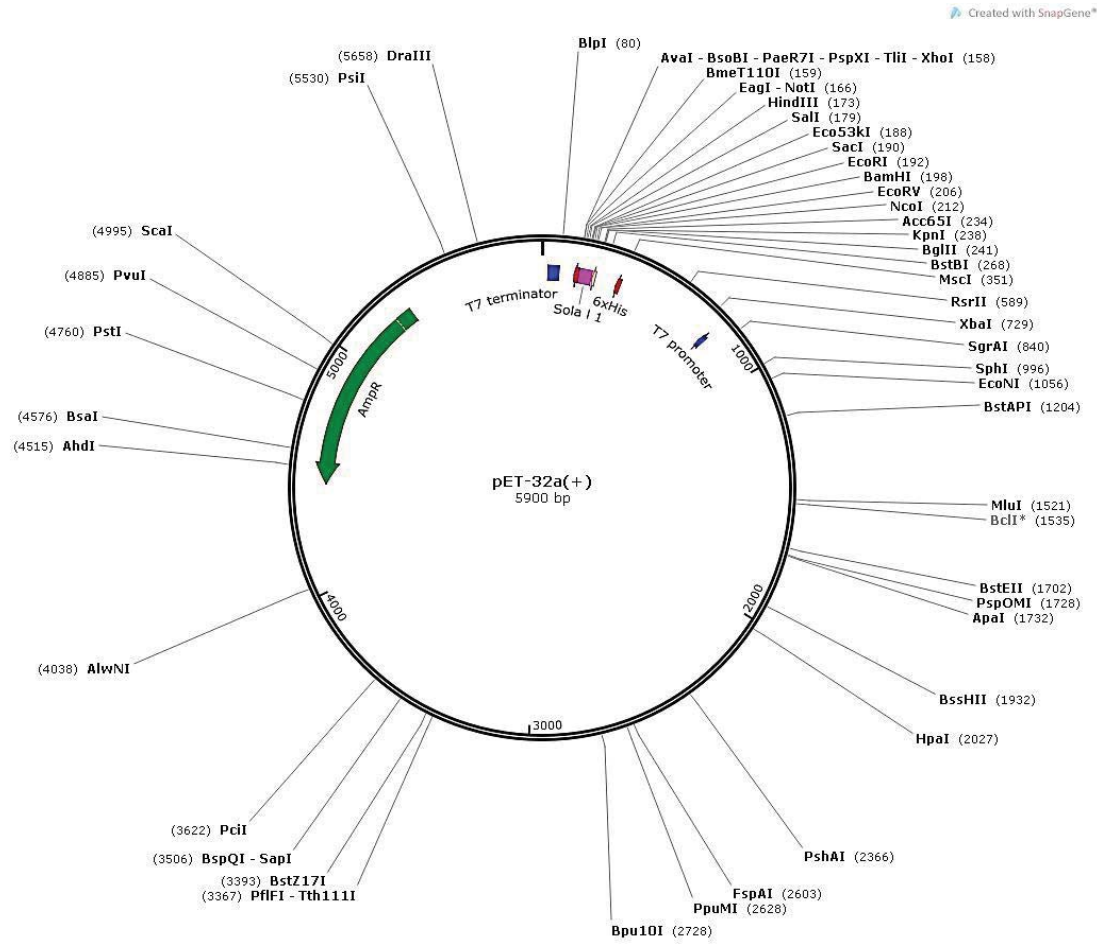
(B)



圖二十八、病人血清分析番茄品種 Tanya 五個成熟階段 Sola l 1 過敏原免疫活性結果

**Fig. 28. Immunological activity analysis of Sola l 1 in tomato ‘Tanya’ in five growth stages with patient serum.** (A) Immunoblot of five growth stages in tomato ‘Tanya’ with patient serum. (B) Immunoblot of five growth stages in tomato ‘Tanya’ with non-patient serum.

附錄



附圖一、 pET32a(+)-Sola I 1 載體建構圖

Supplementary figure S1 . The map of pET32a(+)-Sola I 1 vector.

Nco I and Xho I were selected as the digestion sites.

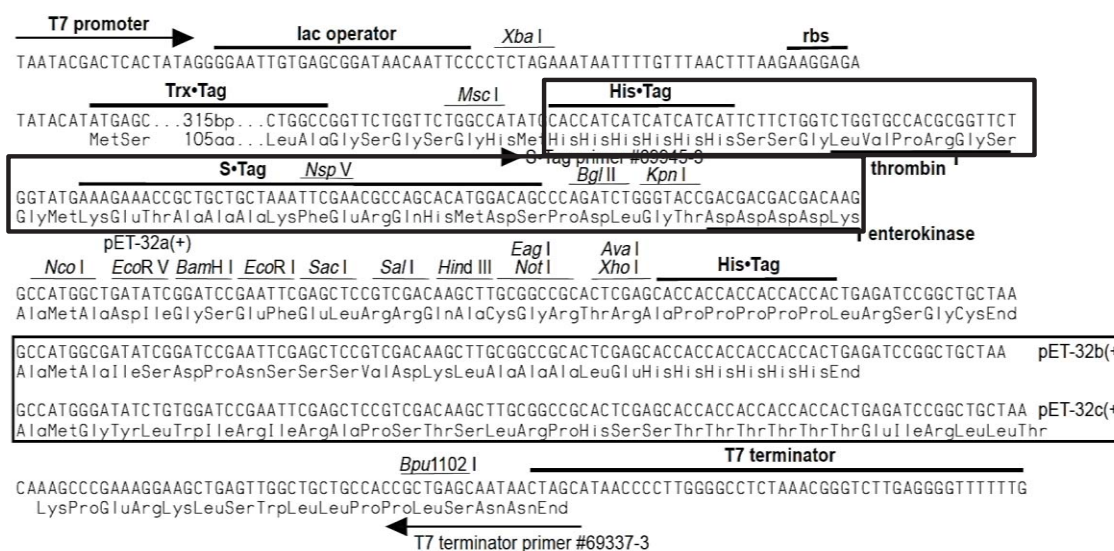






## Amino sequence of His-tag peptide

His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly Met Lys Glu  
Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser Pro Asp Leu Gly Thr  
Asp Asp Asp Asp Lys



附圖三、商業合成 pET32a(+) 載體含 His-tag 片段之胜肽

Supplementary figure S3. The mapping of commercial His-tag peptide in pET32a(+).





| Common name  | Scientific name          | Profilin allergen | Identity | NCBI accession |
|--------------|--------------------------|-------------------|----------|----------------|
| pineapple    | <i>Ananas comosus</i>    | Ana c 1           | 79%      | AAK54835.1     |
| celery       | <i>Apium graveolens</i>  | Api g 4           | 77%      | AAD29409.1     |
| carrot       | <i>Daucus carota</i>     | Dau c 4           | 78%      | AAL76933.1     |
| sweet orange | <i>Citrus sinensis</i>   | Cit s 2           | 78%      | CAI23765.1     |
| bell pepper  | <i>Capsicum annuum</i>   | Cap a 2           | 92%      | CAD10376.1     |
| Soybean      | <i>Glycine max</i>       | Gly m 3           | 84%      | CAA11756.1     |
| potato       | <i>Solanum tuberosum</i> | -                 | 95%      | NP_001275370.1 |

附圖四、常見蔬果中 profilin 蛋白與番茄過敏原 Sola l 1 胺基酸序列比對結果

Supplementary figure S4. Amino acid sequence alignment of tomato profilin allergen Sola l 1 with plant profilins from pineapple, celery, carrot, sweet orange, and soy bean. Alinment was conducted using NCBI protein blast tool.

