

노랑털갈따구(*Chironomus flaviplumus*) 성충의 알레르기 항원단백 분석

이한일^{1)*}, 이상화¹⁾, 김유경¹⁾, 전승민¹⁾, 장재경¹⁾, 김윤석²⁾

연세대학교 의과대학 기생충학교실¹⁾, 보건의료대학 임상병리학과²⁾

초록: 국내 우점종인 노랑털갈따구(*Chironomus flaviplumus*) 성충의 조항원을 제조하여 IgE 항체에 관여하는 주 항원 단백질을 찾아내고자 본 연구를 수행하였다. 노랑털갈따구 성충의 조항원을 마우스에 1 µg과 10 µg으로 각각 3회씩 면역시킨 결과 ELISA와 PCA 반응시험에서 모두 1 µg 면역군 중 9주째 얻은 혈청에서 가장 높은 갈따구-특이-IgE 항체를 얻을 수 있었다. 노랑털갈따구 성충의 조항원을 SDS-PAGE로 전기영동하여 16-18개의 단백질 구획을 얻었고, 이를 chemiluminescent substrate를 이용하여 면역이적법을 시행한 결과, 65 kDa에서 강한 단백질 구획이 52, 35 및 25 kDa에서 약한 단백질 구획이 관찰되었다. 갈따구 조항원을 전기영동한 겔을 30개 절편으로 절단하여 추출한 각각의 단백질 분획을 P-K 피부반응검사한 결과, 65, 52 및 35 kDa 부위에서 강한 양성반응을 보여 항원성이 확인되었고, 25 kDa 부위에서는 약한 반응을 보였다. 면역이적법에서 관찰하지 못한 15 kDa 부위의 단백질에서도 높은 P-K titer 값을 보여 15 kDa 단백질도 항원성이 있음을 알 수 있었다. 이상의 결과에서 국내 우점종인 노랑털갈따구 성충이 알레르기 질환의 원인 항원으로 작용하며 주항원 단백질은 15, 35, 52 및 65 kDa의 4개이고 이중 65 kDa 단백질이 가장 강한 allergen으로 관찰되었다.

서 론

기관지천식, 비염, 아토피성피부염 등 알레르기성 질환을 야기하는 원인항원에는 여러가지 물질이 있으며, 그 중 절지동물인 집먼지진드기가 가장 주요한 항원으로 잘 알려져 있고 많은 연구가 수행되어왔다. 이에 반하여 같은 절지동물이며 곤충류에 속하는 갈따구의 항원성에 관한 조사는 많지 않다. 갈따구는 분류학적으로 곤충강(Insecta), 파리목(Diptera), 갈따구과(Chironomidae)에 속하는 날벌레로 강, 개울, 호수, 못, 논, 저수지, 하수구, 물웅덩이, 늪, 인공용기 등 모든 수질에서 대량 발생하고, 강한 추광성이 있어 불빛에 모여들기 때문에 주민의 생활에 여러면으로 불편을 주거나 건강을 해치는 곤충이다. 특히 성충은 수명이 짧아 2-4 일 밖에 생존하지 못하며 몸체가 연약하여 죽은 갈

따구가 말라 부서져 먼지나 공기 중에 섞여 있으면서 사람이 호흡시 비강이나 기관지에 들어와 알레르기 증상을 일으키는 것으로 알려져 있다. Kimura et al.(1990)은 호수 부근의 대기와 흙 또는 실내먼지에 갈따구 항원이 널리 분포되어 있음을 보고하였고, Matsuno et al.(1991)도 대기중에 장소에 따라 0.3-6.8 ng/m²의 갈따구 항원을 측정 보고한 바 있다.

갈따구가 알레르기성 질환의 원인 항원으로 주목 받게 된 것은 1970년대 후반에 들어서이다. 아프리카의 수단국이 나일강에 거대한 댐을 건설한 후 인근주민 가운데 알레르기성 기관지천식환자가 다수 발생하였는데, 그 원인으로 댐에서 집단발생한 갈따구를 의심하게 되었고, *Cladotanytarsus lewisii*라는 갈따구가 주 항원으로 작용한다는 사실이 확인되었다(Kay et al., 1978). Baur(1980)는 독일에서 어류사료가 되는 *Chironomus thummi* 유충을 취급하는 수족관 및 사료공장 종사자 중에서 알레르기성 질환이 다수 발생하였음을 보고하였다. Igarashi et al.(1987)은 일본의 Toyama 지방의 기관지천식아동 119명을 대상으로 조사한 결과 *Polypedilum kyotoensis*, *Chironomus yoshimatsui*와

• 논문접수 1995년 12월 22일, 게재확정 1996년 1월 13일

• 이 연구는 1993년도 연세대학교 의과대학 일반과제(교수) 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

* 책임저자

*Tokunagayusurika akamushi*에 대하여 각각 23.5%, 17.6% 및 7.6%의 양성반응을 보고하였고, Toshiya et al.(1987)은 Kyoto 지방의 천식환자 56명 중 32명(57.1%)이 *Chironomus yoshimatsui* 조항원에 양성반응을 나타냈다고 하였다. Murakami et al.(1988)은 일본의 10개 도시의 천식아동 697명의 27.4%가 *Chironomus plumosus* 추출물에 피부시험 양성반응을 나타냈다고 보고하였고, Ishii et al.(1988)도 소아천식 환자의 16.3%가 *Chironomus yoshimatsui*에 양성반응을 보였다 고 하였다.

한국에서는 아직 갈따구류가 알레르기성 질환을 야기하는데 어느 정도 관여하고 있는지 조사된 바가 거의 없다. Park et al.(1991)은 *Chironomus plumosus*와 *Tokunagayusurika akamushi*에 대해 양성반응을 보인 2명의 기관지 천식 환자를 보고한 바 있고, Kim and Park(1994)은 475명의 호흡기계 알레르기 환자의 20.4%와 20.6%가 상기 2종에 각각 양성반응을 보여 우리 나라에서도 갈따구가 중요한 알레르기 유발 항원임을 보고하였다. 그러나 위의 두 조사에서 사용한 2종의 갈따구 항원은 일본산으로 일본에서는 가장 흔한 우점종이지만 우리 나라에서는 극히 제한된 지역에서 소수 발생하는 것으로 알려져 있고(Ree and Kim, 1981), 우리 나라에서 가장 흔한 우점종은 노랑털갈따구와 안개무늬 날개갈따구(*Chironomus kiensis*) 2종인 것으로 보고되었다(Ree, 1993). 따라서 상기 두 조사결과는 갈따구 유사종간의 교차반응의 결과라 생각된다.

알레르기성 환자에 대한 갈따구류의 항원성에 대한 연구실적이 국내는 물론 전 세계적으로 극히 미약한 실정이고, 특히 갈따구 성충의 항원성에 관해서는 연구된 바가 거의 없다. 따라서 본 연구에서는 우리 나라에서 발생하는 갈따구 중 알레르기성 질환의 가장 중요한 종이라 생각되는 노랑털갈따구의 조항원을 제작하여 IgE 항체에 주로 관여하는 주항원 단백질을 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 갈따구의 채집과 조항원 제조

1993년 8월에 경기도 포천읍에 위치한 하수천에서 갈따구 유충을 다수 채집하여 곤충사육실에서 사육하였다. 크기 40 × 20 × 20 cm의 수조에 모래를 3-4 cm 깔고 3-4령기 유충을 수조당 10,000마리 정도 넣고 25°C에서 사육하였다. 수조를 망사로 만든 대형 사육상자에 넣고 우화하는 갈따구 성충을 매일 채집하였다. 채집한 성충을 해부현미경하에서 종을 확인하여 노랑털갈따구만을 골라 -20°C에 냉동보관하였다. 냉동 보관된 성충은 해동 후 potassium phosphate 완충액(pH 7.4)을 첨가한 다음 homogenizer를 이용하여 수용성 균질액을 만들었

다. 이것을 5시간 천천히 저어준 후 15,000 × g로 4°C에서 15분 동안 원심분리하였다. 상청액을 다시 원심분리하여 조항원으로 하였고 사용하기 전까지 -70°C에 보관하였다. 단백질 농도는 Lowry (1951)의 방법으로 측정하였다.

2. 마우스 항혈청

4-5주 되는 BALB/c 수컷쥐를 50마리씩 두군으로 나누어 조항원 1 µg 면역군과 10 µg 면역군으로 하였다. 조항원 1 µg과 10 µg을 각각 4 mg의 alum adjuvant와 혼합하여 복강내에 주사하였고, 4주와 8주 후에 각각 동량의 조항원을 다시 주사하였다. 첫 면역후 3, 5, 7, 9, 10주 후에 각각 7-11마리의 마우스를 임의로 선택하여 심장으로부터 채취한 혈액을 원심분리하여 혈청을 얻었다.

3. 효소면역측정법(Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)

가. 총 IgE 항체의 측정

혈청내 총 IgE 항체를 Hirano et al.(1989)의 방법을 약간 수정하여 측정하였다. Anti-mouse IgE monoclonal antibody(Parmingen, San Diego, CA, U.S.A.)를 도포완충액(pH 9.6)으로 희석(1 µg/ml)하여 100 µl씩 microplate(Costar Co., Cambridge, MA, U.S.A.)에 넣고 4°C에서 16시간 방치한 후, 10분간 3회 세척하였다. Bovine serum albumin(Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, U.S.A.)을 도포완충액에 1% 용액으로 만들어 200 µl씩 넣고 37°C에서 1시간 차단하였다. 10분간 3회 세척한 후, 마우스 항 혈청을 희석완충액(1% BSA/PBS-Tween, pH 7.4)에 1:50의 농도로 희석하여 100 µl씩 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 다시 10분 동안 3회 세척하였다. Biotin이 부착된 anti-mouse IgE polyclonal antibody(Bio design, Kennebunk, ME, U.S.A.)를 희석완충액으로 1 µg/ml의 농도로 희석한 후 37°C에서 1시간 반응시키고 10분씩 3회 세척하였다. 여기에 1 µg/ml 농도로 희석한 peroxidase conjugate anti-biotin antibody(Vector Lab. Inc., Burlingame, CA, U.S.A.)를 가하여 37°C에서 1시간 반응시키고 10분씩 3번 세척하였다. 기질용액(Phosphate-citrate buffer, pH 5.0 100 ml, O-phenylene-diamine 40 mg, 30% H₂O₂ 40 µl)을 100 µl씩 넣고 30분 발색시켰다. 2.5 M H₂SO₄ 용액 25 µg씩 넣어 반응을 정지시킨 후, 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. IgE 농도를 측정하기 위하여 시험혈청 대신 mouse IgE(Parmingen, San Diego, CA, U.S.A.)를 0.015625, 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 µg/ml 농도로 넣어 흡광도를 측정하고, 표준곡선을 그려 시험혈청내의 IgE 양을 계산하였다.

나. 특이 IgE 항체가 측정

총 IgE 항체가를 측정한 방법과 동일하게 시행하였고, 단지 anti-mouse IgE monoclonal antibody 대신 노랑털갈따구의 조항원을 1:1,000으로 희석하여 사용하였다. 마우스 혈청은 1:200의 농도로 희석하였다.

4. Passive cutaneous anaphylaxis(PCA) 반응시험

마우스 IgE 항체가를 랫트 피부상에서의 PCA 반응을 Mota and Wong(1969)의 방법에 따라 측정하였다. 수컷 랫트(Wistar, 7-9주)의 등털을 깨끗하게 깎은 후 면역시킨 마우스 혈청을 단계적으로 희석하여(1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320), 각각 0.05 ml씩 일정한 간격으로 피하 주사하였다. 4시간 후에 조항원 0.5 ml과 2%의 Evans blue 용액 0.5 ml을 혼합한 용액을 정맥내에 주사하였다. 30분 후에 쥐를 죽인후, 등가죽을 벗겨 안쪽 반응부위의 크기가 5 × 5 mm 이상일때 양성으로 하였다. 마우스 혈청은 3, 5, 7, 9, 10주에 채혈한 혈청을 각각 그룹별로 혼합하여 사용하였다.

5. 이온교환 크로마토그래피

완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 6.0, 100 mM sodium acetate, 35 mM MgCl₂) 으로 미리 평형에 이르게 한 QAE-sephadex A-50(ionic capacity: 2.6-3.4 mMol/g; Pharmacia LKB Biotech., Uppsala, Sweden) column(1 × 7 cm)에 조항원 용액을 적하시키고 18 ml/hr의 속도로 용출하여 각 분획당 3 ml 씩 모은 후 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 한편 동일한 column에 0-0.5 N NaCl의 일정한 농도구배를 주어 25.2 ml/hr의 속도로 용출하여 각 분획당 3 ml씩 모아 농도구배의 유무에 따른 분획양상의 차이를 비교하였다.

6. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

갈따구의 조항원과 이온교환 크로마토그래피로 얻은 비농도구배 용출액(3-5) 및 NaCl 농도구배 용출액(6-8)을 각각 Laemmli(1970)의 방법을 응용하여 전기영동하였다. 0.1% SDS가 함유된 10% polyacrylamide 함유 separating gel과 4% polyacrylamide 함유 stacking gel을 Mini-Protean II(0.1 × 8 × 10 cm, vertical, Bio-Rad Lab. Inc., Hercules, CA, U.S.A.)를 이용하여 12 mA로 1시간 전기영동하였다. 이때 각 항원과 시료완충액(0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol)을 3:1의 비율로 혼합한 후, 95°C에서 5분간 가열하여 사용하였다. 전기영동한 겔은 Coomassie brilliant blue R250(Sigma Chem. Co.)으로 염색하거나 면역이적법(immu-

noblotting)을 시행하였다.

7. Western blotting

가. Colorimetric substrate를 이용한 방법

전기영동한 겔은 Friesel *et al.*(1989)의 방법을 변형시켜 면역이적법을 시행하였다. 즉, 전기영동한 겔의 단백질을 blotting kit(18 × 7.5 × 10.5 cm, Bio-Rad Lab. Inc., Hercules, CA, U.S.A.)를 이용하여 전이완충액(20 mM Tris, 150 mM glycine, 20%, methanol, pH 8.0) 내에서 70 V로 1시간 30분 동안 0.45 μm nitrocellulose paper(Bio-Rad Lab. Inc., Hercules, CA, U.S.A.)에 옮겼다. 전이된 nitrocellulose paper는 1% BSA가 첨가된 PBS 용액으로 37°C에서 30분간 차단한 다음 PBS 용액으로 5분씩 3회 세척하였다. 갈따구 조항원으로 면역시킨 마우스 혈청(1 μg, 9주)을 TBST 용액(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)에 1:400으로 희석하여 37°C에서 30분 동안 천천히 흔들어 주면서 반응시켰다. 다시 PBS 용액으로 3회 세척하고 biotin이 부착된 rat monoclonal anti-mouse IgE(Southern Biotech. Inc., Birmingham, AL, U.S.A.)를 TBST 용액으로 1:5,000으로 희석하여 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. Alkaline phosphatase가 부착된 streptavidin(Southern Biotech. Inc., Birmingham, AL, U.S.A.)을 1:10,000으로 희석한 용액을 가하고 37°C에서 20분간 반응시켰다. 발색을 위한 기질용액(100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) 10 ml에 BCIP(Promega Co., Madison, WI, U.S.A.) 33 μl와 NBT(Promega Co., Madison, WI, U.S.A.) 44 μl를 혼합하여 사용하였고, 빛을 차단한 상태에서 10-15분 동안 반응시켰다. 한편, 표준단백질을 옮긴 nitrocellulose paper는 amido black 염색용액(0.1% amido black, 20% ethanol, 2% acetic acid)을 이용하여 염색한 후 증류수로 세척하였다.

나. Chemiluminescent substrate를 이용한 방법

Colorimetric substrate를 이용한 것보다 민감도가 높은 chemiluminescent substrate를 이용하여 Gillespie and Hudspeth(1991)의 방법에 따라 면역이적법을 시행하였다. 즉, 전기영동한 겔의 단백질을 colorimetric substrate를 이용한 앞의 방법과 동일하게 0.45 μm nitrocellulose paper에 옮긴 후, PBS 용액으로 5분 동안 세척하였다. Nitrocellulose paper를 차단용액(PBS, 0.2% casein, 0.1% tween 20)으로 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이것을 세척용액(PBS, 0.1% tween 20)으로 5분씩 2회 세척한 후, 여기에 마우스 항 혈청을 1:400으로 희석하여 가하고 37°C에서 30분간 반응시켰다. Biotin이 부착된 rat monoclonal anti-mouse IgE를 1:5,000으로 차단용액에 희석하여 37°C에서 30분

간 반응시킨 후 세척용액으로 5분씩 2회 세척하였다. 여기에 alkaline phosphatase가 부착된 streptavidin conjugate를 1:10,000으로 차단용액에 희석하여 37°C에서 30분 반응시키고 세척용액으로 5분씩 2회 세척한 후, assay 용액(0.1 M diethanolamine, 1 mM MgCl₂)에 5분씩 2회 세척하였다. Chemiluminescent substrate의 반응을 증가시키는 물질인 nitro-block(Tropix Inc., Bedford, MA, U.S.A.)과 chemiluminescent substrate인 CSPD(Tropix Inc., Bedford, MA, U.S.A.)를 각각 1:20과 1:100의 농도로 혼합하여 첨가한 후 암실에서 5분 동안 반응시켰다. 반응후 nitrocellulose paper 위에 남아있는 용액을 말리고 비닐로 싸서 casset(Kodak Co., New Haven, CT, U.S.A.)내에 X-ray 필름(Fuji Co., Odawara, Japan)을 장착하여 10분 동안 암실에서 감광시켰다.

8. 단백질 추출

갈따구 조항원을 SDS-PAGE로 전기영동하여 얻은 겔을 0.5 cm 간격으로 절단하여 30개 절편을 얻었다. 각 겔 절편은 Electro-Elution kit(Model 422, Bio-Rad Lab. Inc., Hercules, CA, U.S.A.)를 이용하여 추출용액(25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS, pH 8.0)에서 cut off 값이 분자량 12,000 dalton인 filter를 통해 10-15 mA로 8시간 통전하여 각 200 µl의 단백질을 용출시켰다.

9. Praüsnitz-Kustner(P-K) 피부반응검사

Abe and Ishii(1982)의 방법으로 시행하였다. 1 µg의 조항원으로 3회 면역시켜 9주 후에 얻은 마우스 항혈청을 1:160으로 희석하여 6-8주된 수컷 랫트 등의 여섯군데에 각각 0.05 ml씩 피하주사하였다. 4시간 후 1% Evans blue 용액 0.5 ml를 정맥

주사하고, 5-10분 후 조항원, 비농도구배 용출액, 농도구배 용출액과 조항원을 전기영동한 겔의 30개 절편 각각의 추출용액을 4배수로 희석하여 0.05 ml씩 항혈청을 주사한 장소에 피하주사하였다. 30분 후 쥐를 죽이고 등가죽을 벗겨 안쪽 반응부위가 8 × 8 mm 이상일때 양성으로 하였다.

결 과

1. 갈따구의 채집 및 항원 생산

유기물에 심하게 오염된 하수천에서 채집한 노랑털갈따구 유충을 사육하여 얻은 성충은 모두 42,000여 마리였으며 이로부터 생산한 조항원은 290 ml(단백질 농도 11 mg/ml)이었다.

2. 마우스 혈청내 IgE 양의 측정

가. ELISA

Anti-mouse IgE monoclonal antibody를 사용하여 마우스 혈청내의 총 IgE 함량을 ELISA로 측정한 결과는 Table 1과 같다. 조항원 1 µg으로 3회에 걸쳐 면역시킨 마우스 혈청의 경우, 첫 면역후 3, 5, 7, 9 및 10주에 흡광도 값이 각각 0.289 ± 0.127, 0.517 ± 0.195, 0.601 ± 0.086, 1.310 ± 0.248 및 1.228 ± 0.238을 나타내어 2차 면역후(5주)와 3차 면역후(9주)에 모두 급격히 증가하였고 10주에는 약간 감소하였다. 10 µg의 조항원으로 3회 면역시킨 마우스에서는 첫 면역후 3, 5, 7, 9, 10주에 각각 흡광도 값이 0.319 ± 0.148, 0.536 ± 0.074, 0.517 ± 0.093, 0.973 ± 0.248 및 0.908 ± 0.141을 나타내었다. 1 µg으로 면역시켰을 때의 값에 비하여 7, 9, 10주의 항체량이 적었으나, 전체적으로 매우 유사한 양상을

Table 1. Total IgE values of the mouse sera immunized with 1 µg or 10 µg crude extracts of *Chironomus flavipilumus*

Weeks ^{a)}	Total IgE values (O.D. at 490 nm) ^{b)}		
	1 µg	10 µg	Control
3	0.289 ± 0.127 (n = 10) ^{c)}	0.319 ± 0.148 (n = 9)	0.119 ± 0.014 (n = 4)
5	0.517 ± 0.195 (n = 7)	0.536 ± 0.074 (n = 8)	—
7	0.601 ± 0.086 (n = 7)	0.517 ± 0.093 (n = 7)	—
9	1.310 ± 0.248 (n = 10)	0.973 ± 0.248 (n = 9)	—
10	1.228 ± 0.238 (n = 11)	0.908 ± 0.141 (n = 12)	0.114 ± 0.041 (n = 4)

^{a)}Weeks after primary immunization. The booster was injected at weeks 4 and 8. ^{b)}Mean ± S.D. ^{c)}n = Number of mice.

보였다. 1 µg 면역군과 10 µg 면역군 모두 9주만에 가장 높은 흡광도 값을 보였는데 1 µg 면역군이 10 µg 면역군에 비해 현저하게 높았다(P < 0.05). 대조군의 흡광도 값은 3주와 10주에 각각 0.119 ± 0.014와 0.114 ± 0.041이었다.

노랑털갈따구 조항원을 사용하여 갈따구-특이-IgE 항체가를 조사한 ELISA 결과는 Table 2 및 Fig. 1과 같다. 1 µg의 조항원으로 면역시킨 마우스에서는 1차 면역후 3, 5, 7, 9, 10주의 흡광도 값이 각각 0.279 ± 0.084, 0.462 ± 0.139, 0.519 ± 0.055, 0.688 ± 0.041 및 0.609 ± 0.090을 나타냈고, 10 µg의 조항원으로 면역시킨 마우스에서는 같은 기간의 흡광도 값이 각각 0.280 ± 0.088, 0.518 ± 0.079, 0.536 ± 0.051, 0.598 ± 0.040 및 0.551 ± 0.067이었다. 대조군에서는 3주와 10주에 각각 0.041 ± 0.014와 0.034 ± 0.025이었다. 1 µg과 10 µg의 조항원을 각각 면역시킨 두 군의 특이-IgE의 생성양상이 매우 유사하였다. 두군이 모두 9주에 가장 높은 IgE 항체가를 보였는데, 1 µg 면역군이 10 µg 면역군에 비해 현저하게 높았다(P < 0.05).

나. PCA 반응시험

마우스 혈청내의 갈따구-특이-IgE 양을 측정하기 위하여 2회 실시한 PCA 반응 시험결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. 1 µg의 조항원으로 면역시킨 마우스는 2차 면역(4주)후인 5주에 PCA titer가 40-80으로 증가하여 7주까지 지속하였다. 3차 면역(8주)후인 9주에 다시 160-320으로 증가하였고 10주까지 높은 항체가가 지속하였다. 10 µg의 조항원으로 1차 면역시킨 후 3주에는 항체가 역시 관찰되지 않았고, 2차 면역후인 5주에 PCA titer가 80-160까지 증가하였으나 7주만에 20-40으로 감소하

였고, 3차 면역후인 9주에 다시 80-160으로 증가하였다가 10주에 다시 감소하였다.

3. 이온교환 크로마토그래피

QAE sephadex A-50 겔을 이용하여 음이온교환 크로마토그래피를 수행한 후 280 nm에서 각 분획의 흡광도를 측정한 결과, NaCl 농도 구배를 주지 않은 용출액은 단일한 분획이 2-9번까지 넓게 나타나는 것을 볼 수있는데(Fig. 2, A), 이중 최고 흡광도 값(1.266)의 2/3인 0.84를 cut-off 값으로 하여 그 이상을 나타내는 3-5번 분획을 모아 SDS-PAGE와 면역이적법을 수행하였다. 한편, NaCl 농도 구배가 주어진 용출액은 비교적 높은 흡광도(0.538)를 나타내는 1개의 대분획과 낮은 흡광도를 나타내는 2개의 소분획(0.054와 0.065)으로 분리되었는데(Fig. 2, B), 이 중 0.1 이하의 낮은 흡광도를 나타내는 소분획들은 단백질양이 적고, 분획의 범위가 좁아 실험조작의 오차에 의해 유발되었을 가능성이 크기때문에 배제하였고, 대분획중 최고 흡광도 값의 2/3인 0.35를 cut-off 값으로 하여 그 이상을 나타내는 6-8번 분획을 모아 실험에 사용하였다.

4. SDS-PAGE

갈따구 조항원을 10% 겔 상에서 전기영동한 결과 16-18개의 단백질 구획이 나타났는데, 분자량이 97 kDa 이상되는 4개의 진한 단백질 구획과 45-97 kDa의 단백질 범위에서 6-8개의 구획이 나타났으며, 45 kDa 이하에서 6개의 작은 분자량을 가진 단백질 구획이 관찰되었다(Fig. 3, Lane 2). 한편, 갈따구 용해물의 이온교환 크로마토그래피 용출액을 NaCl 농도 구배의 유무에 따라 분리한 후 위와 동일한 겔 상에서 전기영동한 결과, 농도 구배를 주

Table 2. Specific IgE values of the mouse sera immunized with 1 µg or 10 µg crude extracts of *Chironomus flaviplumus*

Weeks ^{a)}	Specific IgE values (O.D. at 490 nm) ^{b)}		
	1 µg	10 µg	Control
3	0.279 ± 0.084 (n = 10) ^{c)}	0.280 ± 0.088 (n = 9)	0.014 ± 0.014 (n = 5)
5	0.462 ± 0.139 (n = 7)	0.518 ± 0.079 (n = 8)	—
7	0.519 ± 0.055 (n = 7)	0.536 ± 0.051 (n = 7)	—
9	0.688 ± 0.041 (n = 11)	0.598 ± 0.040 (n = 9)	—
10	0.609 ± 0.090 (n = 10)	0.551 ± 0.067 (n = 13)	0.034 ± 0.025 (n = 4)

^{a)}Weeks after primary immunization. The booster was injected at weeks 4 and 8. ^{b)}Mean ± S.D. ^{c)}n = Number of mice.

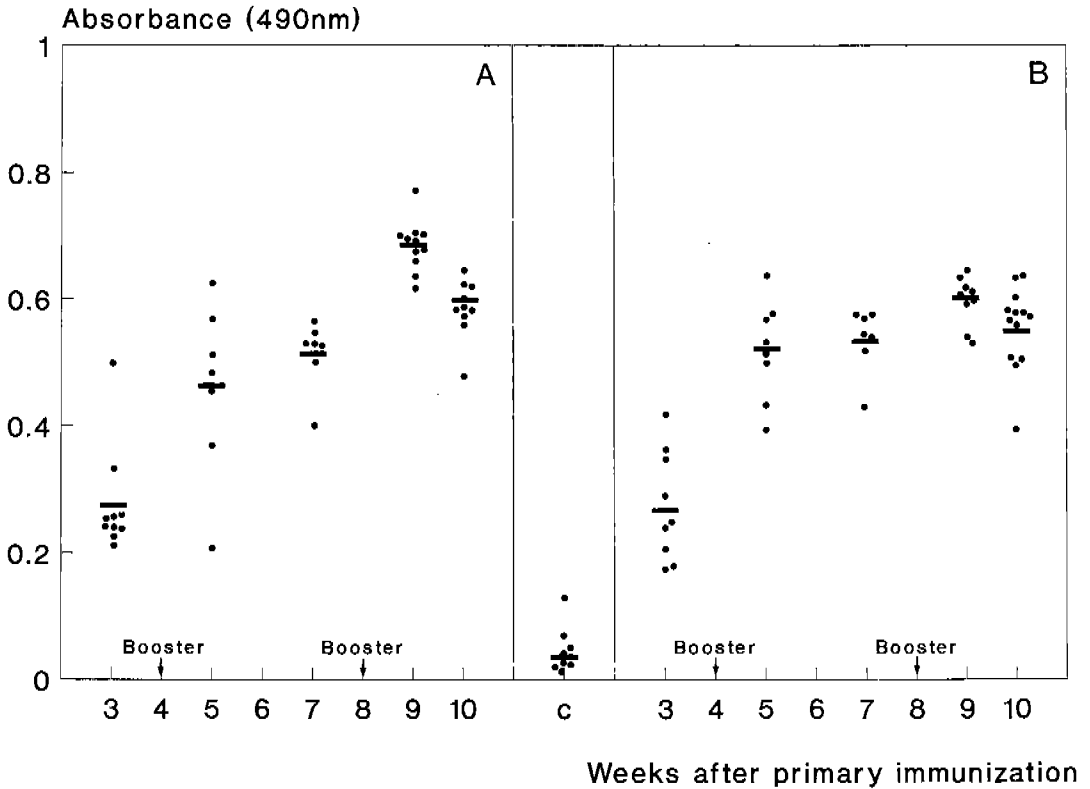


Fig. 1. Specific IgE values of the mouse sera immunized with 1 µg (A) or 10 µg (B) crude extracts of *Chironomus flaviplumus*. The bar represents the average.

Table 3. Reciprocal PCA titer of the mouse sera immunized with 1 µg or 10 µg crude extracts of *Chironomus flaviplumus*

Weeks ^{a)}	Reciprocal PCA titer			
	1 µg ^{b)}		10 µg ^{c)}	
	1st test	2nd test	1st test	2nd test
3	0	0	0	0
5	80	40	160	80
7	80	40	20	40
9	160	320	80	160
10	320	320	20	80

^{a)}Weeks after primary immunization. The booster was injected at weeks 4 and 8. ^{b)}Pooled sera from 7 mice immunized with 1 µg antigen. ^{c)}Pooled sera from 7 mice immunized with 10 µg antigen.

지 않고 용출한 단백질 구획 양상을 보면 분자량이 97 kDa 이상에서 관찰되던 4개의 단백질 중 150-160 kDa의 단백질 구획만 관찰될 뿐 3개 구획이 분리되지 않았으며, 45-97 kDa 범위에서 나타났던 6-8개의 구획들 중에서도 2개의 구획만 65 kDa과

80 kDa 부근에서 관찰되었다. 그리고, 45 kDa 이하에서는 3개의 구획만이 25, 35, 40 kDa 부근에서 관찰되었다(Fig. 3, Lane 3). 또한, NaCl 농도 구배를 0-0.5 N로 일정하게 주고 용출한 단백질의 구획들을 보면 큰 분자량을 가진 단백질은 분리되지

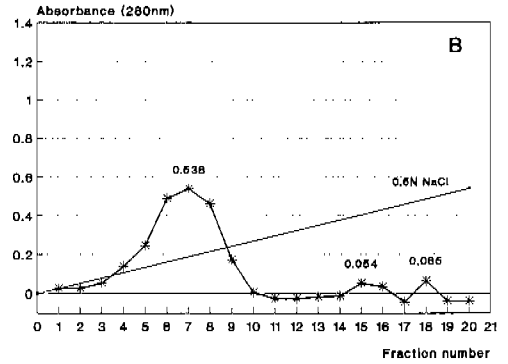
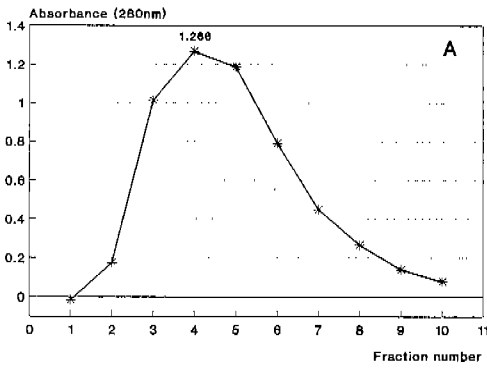


Fig. 2. Ion exchange chromatography of *Chironomus flaviplumus* crude lysate on QAE sephadex A-50 column. **A**, Fractions eluted by non-salt elution buffer; **B**, Fractions eluted by an elution buffer with 0-0.5 N gradient salt.

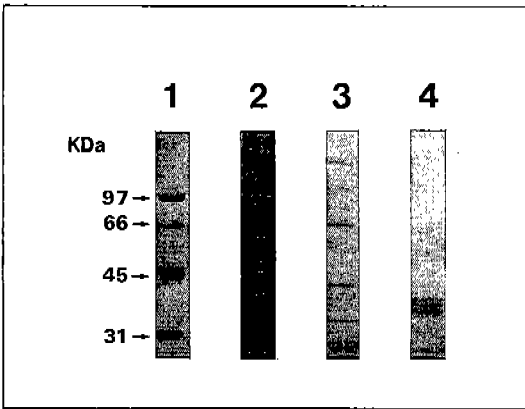


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of *Chironomus flaviplumus* crude extract and fractions from QAE sephadex A-50 column chromatography. The proteins were run on 10% SDS-PAGE. Lane 1, Molecular weight standard; lane 2, *Chironomus flaviplumus* crude extract; lane 3, a fraction eluted by non-salt elution buffer from QAE sephadex A-50 column chromatography; lane 4, a fraction eluted by elution buffer with 0-0.5 N gradient salt.

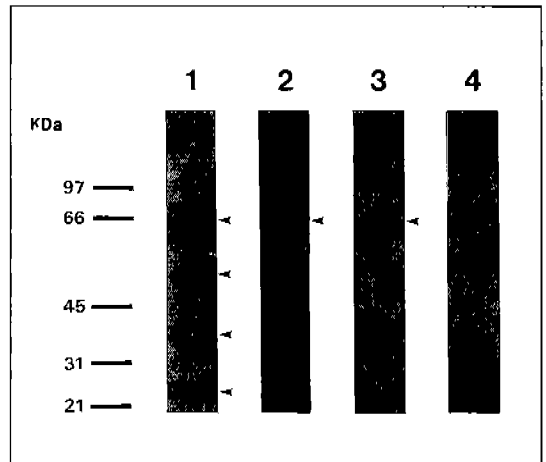


Fig. 4. Immunoblotting analysis of *Chironomus flaviplumus* crude extract and fractions from QAE sephadex A-50 column chromatography. The proteins were run on 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. The membrane was visualized by chemiluminescent substrate in lane 1 and by colorimetric substrate in lane 2, 3 and 4. Lane 1 and 2, *Chironomus flaviplumus* crude extract; lane 3, a fraction eluted by non-salt elution buffer from QAE sephadex A-50 column chromatography; lane 4, a fraction eluted by elution buffer with 0-0.5 N gradient salt.

않았고, 30 kDa과 35-40 kDa 부근에서만 구획이 나타나 농도구배를 주지않은 용출액의 단백질 구획 양상과는 큰 차이를 보였다(Fig. 3, Lane 4).

5. Western blotting

깔따구 조항원의 단백질 구획을 chemiluminescent substrate인 CSPD를 이용하여 발색시킨 경우 65 kDa 부위에서 1개의 진한 구획과 25, 35 및 52 kDa에서 약한 3개의 구획을 관찰할 수 있었다(Fig. 4, Lane 1). 깔따구 조항원을 CSPD보

다 민감도가 낮은 colorimetric substrate를 이용하여 발색시켰을 때는 65 kDa 부위의 구획만이 관찰되었는데(Fig. 4, Lane 2). 이온교환 크로마토그래피 용출물 중 농도구배 없이 용출한 단백질 구획에서도 동일하게 65 kDa 부위의 구획만 나타나는 것을 볼 수 있었다(Fig. 4, Lane 3). 한편, 농도구배

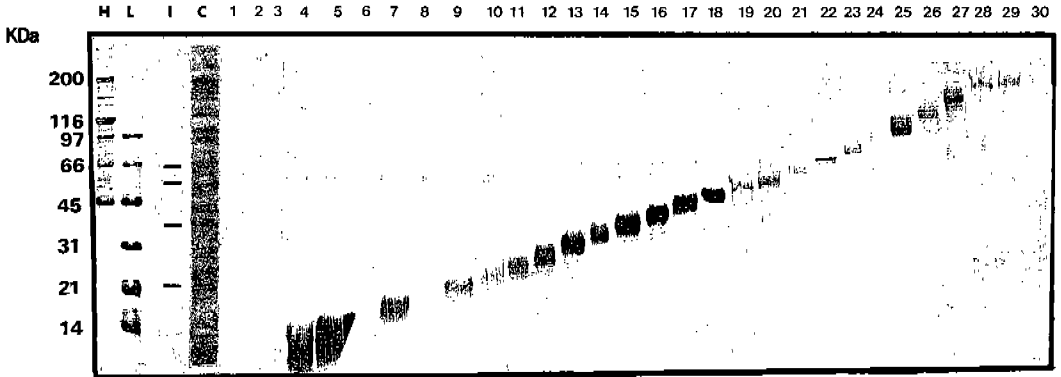


Fig. 5. SDS-PAGE analysis of proteins eluted from *Chironomus flaviplumus* crude extract on 10% SDS-polyacrylamide gel. The gel was cut into 30 pieces and each eluate was re-run on 5-20% gradient SDS-polyacrylamide gel. H, high molecular weight protein standard; L, low molecular weight protein standard; I, immunoblotting analysis of crude lysate; C: *Chironomus flaviplumus* crude extract.

Table 4. Reciprocal P-K titers of *Chironomus flaviplumus* crude extract and the proteins fractionated by ion exchange chromatography

Antigen ^{a)}	Reciprocal P-K titers ^{c)}				
	× 2	× 8	× 32	× 128	× 512
Crude extract	+	—	—	—	—
Ion exchange chromatography ^{b)}					
— Non-gradient elution	++	++	+	—	—
— Gradient elution	—	—	—	—	—

^{a)}Antigens of the crude extract, the non-gradient eluate and the gradient eluate were 11 mg/ml, 1.77 mg/ml and 0.145 mg/ml, respectively. ^{b)}The proteins were eluted from QAE sephadex A-50 column by non-salt elution buffer and the elution buffer with 0-0.5 N NaCl. ^{c)}Wheel size more than 8 × 8 mm was regarded as positive.

를 주고 용출한 단백질에서는 면역이적법 결과 관찰되는 구획이 없었다(Fig. 4, Lane 4). 즉, 65 kDa 단백질이 음이온교환 크로마토그래피의 농도구배를 주지않은 용출액 중에서 비교적 초기 용출액인 3-5번(10 min/3 ml/fraction) 분획에서는 관찰되는 반면, 0-0.5 N NaCl 농도구배를 주었을 때는 초기 용출액인 6-8번(10 min/3 ml/fraction) 분획에서 나타나지 않은 것으로 보아 65 kDa 단백질이 약한 음전하를 띠고 있음을 알 수 있었다.

6. 단백질 추출

노랑털갈따구 성충의 조항원을 SDS-PAGE로 전기영동한 겔을 단백질 분자량 별로 분획하기 위하여 30개 절편으로 절단하여 이들을 각각 다시 전기영동하여 얻은 단백질 분획은 Fig. 5에서 보는 바와 같다. 분획 번호 1, 2, 3, 6, 8, 24와 30에서는 단백질 분획이 전혀 관찰되지 않았거나 극히 미량으로 검출되었다. 면역이적법 결과로 얻은 갈따구-

특이-IgE 항원이라 생각되는 4개의 단백질 분획을 보면 65 kDa에 해당하는 분획은 22번으로 가늘고 뚜렷한 단백질 분획이, 52 kDa에 해당하는 19번은 약한 분획이, 35 kDa에 해당하는 14번은 굵고 뚜렷한 분획이, 25 kDa에 해당하는 분획은 10번으로 굵지만 약한 분획이 관찰되었다.

7. P-K 피부반응검사

갈따구 조항원과 음이온교환 크로마토그래피로 얻은 비농도구배 용출액 및 농도구배 용출액을 P-K 피부반응검사를 실시한 결과 Table 4에서 보는 바와 같이 조항원은 P-K titer 값이 2이었고, 비농도구배 용출액의 titer 값은 32로 조항원 값의 16배였으며 농도구배 용출액에서는 항체를 관찰할 수 없었다. 시험에 사용한 조항원, 비농도구배 용출액 및 농도구배 용출액의 단백질 농도는 각각 11 mg/ml, 1.77 mg/ml 및 0.145 mg/ml로 P-K 시험 양성값은 단백질 함량과 관계가 없었으며, 농도구배 용출

Reactivity*

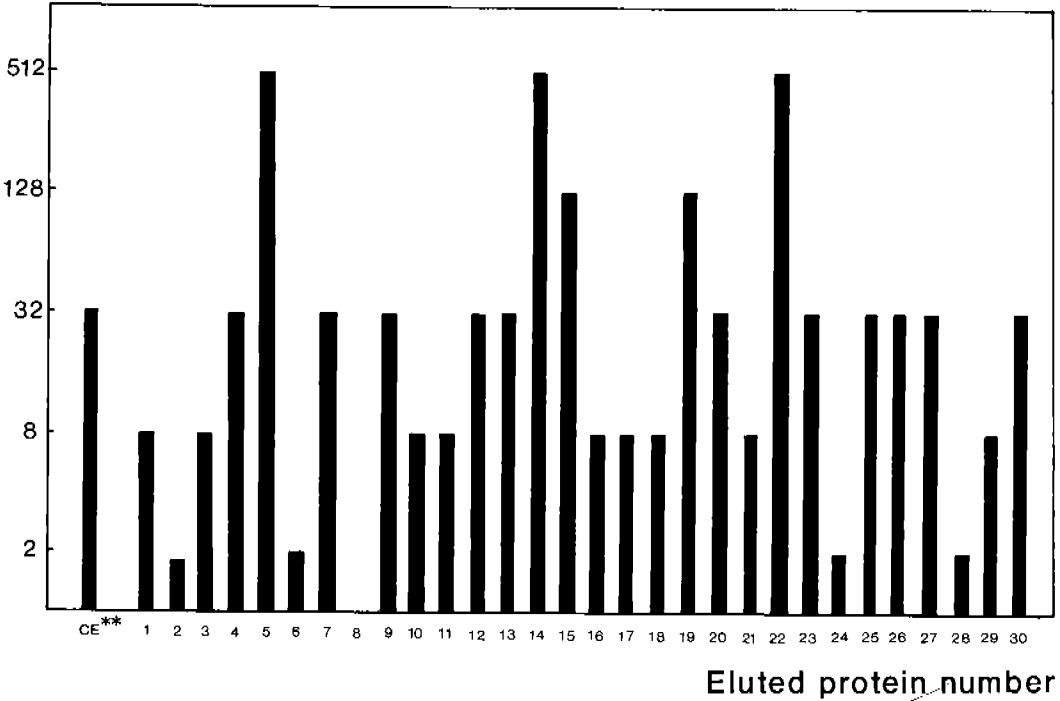


Fig. 6. Reactivities of the elutions of *Chironomus flaviplumus* antigen by P-K type skin test. *Reactivity was represented as reciprocal P-K titers. **CE, crude extract.

액의 단백질은 항원성이 없는 것으로 나타나 면역이적법 결과와 동일한 결과를 보였다.

갈따구 조항원을 SDS-PAGE로 전기영동하여 얻은 겔의 30개 절편을 용출하여 얻은 용출액을 각각 랫트에 P-K 피부반응검사를 실시한 결과 Fig. 6과 같은 결과를 얻었다. Fig. 7은 30개 용출액 중 분획번호 4번(P-K titer ×32)과 분획번호 8번(P-K titer negative)의 P-K 피부반응 양상을 보여준다. 조항원의 P-K titer 값은 32이었다. 면역이적법 결과에서 갈따구-특이-IgE 항체와 반응한 4개의 단백질 분획(65, 52, 35 및 25 kDa)에 해당하는 분획번호 22, 19, 14 및 10번을 보면, 65 kDa에 해당하는 22번과 35 kDa에 해당하는 14번 단백질에서는 P-K titer 값이 ×512로서 조항원에 비해 16배 높게 나타났고, 52 kDa에 해당한 19번은 ×128로 조항원의 4배 강하게 나타났다. 25 kDa에 해당하는 10번은 조항원보다 낮은 ×8로서 항원성이 없는 것으로 보였다. 한편 단백질 분자량이 15-17 kDa에 해당하는 분획 5번에서도 ×512의 높은 P-K titer 값을 보여 강한 항원성이 있는 것으로 나타났는데, 갈따구 유충의 단량체 헤모글로빈(monomeric hemoglobin)에 해당하는 저분자량의 이 단백질은 면역이적법에서는 관찰하지 못하였다.

고 찰

우리 나라에서는 아직 갈따구류에 감염된 알레르기성 환자에 관한 조사가 거의 없어서 충분한 수의 환자 혈청을 얻기가 매우 어려운 실정이어서 인위적으로 면역시켜 얻은 마우스 혈청으로 본 실험을 수행하였다. Kawai and Konishi(1988)는 여러 종류의 갈따구 유충에 대한 IgE 혈청을 얻기 위하여 마우스에 조항원 1, 10, 100 μg을 각각 3회에 걸쳐 면역시켰는데 종에 따라 9주 또는 10주만에 1 μg 면역마우스에서 가장 높은 IgE 항체가를 얻었다고 보고하였는데, 본 실험에서는 노랑털갈따구 성충의 조항원 1 μg과 10 μg을 각각 마우스에 면역시킨 결과 1 μg 주입 혈청에서 9주에 가장 높은 IgE 항체가를 보여 동일한 결과를 얻었다. 노랑털갈따구-특이-IgE 항체가는 ELISA와 PCA 반응의 두 방법으로 측정하였는데 모두 유사한 결과를 얻었다.

알레르기성 질환을 일으키는 갈따구 항원성에 관한 연구는 극히 저조한 형편이며 그나마 대부분은 갈따구의 헤모글로빈에 관한 것들이다. Baur et al (1982)은 *Chironomus thummi thummi* 유충의 주항원(allergen)이 cell-free hemoglobin이라 하였고, Goodman et al.(1983)은 *Chironomus thummi*

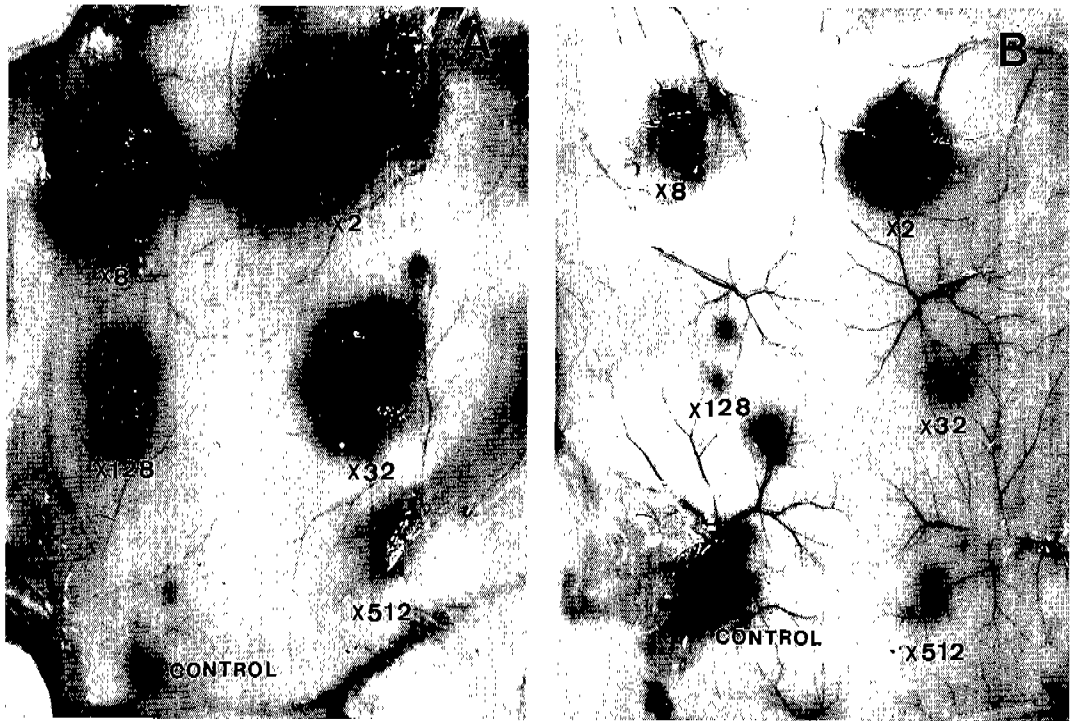


Fig. 7. P-K skin tests. A, P-K titer ($\times 32$) of elution No. 4; B, Negative P-K titer elution No. 8.

thummi 헤모글로빈에는 단량체(monomeric) 인것과 이량체(dimeric)인 것이 있다고 하였으며, Baur *et al.*(1983)은 이들 헤모글로빈에는 면역학적으로 중간 교차반응을 일으키는 공통항원 결정기(common antigenic determinant)를 가진다고 보고하였다. Mazur *et al.*(1987)은 *Chironomus thummi thummi*(CTT)가 최소한 12개의 단량체 또는 이량체의 헤모글로빈을 가지고 있음을 발견하였고, CTT II, III, IV 등 주항원의 아미노산 서열을 밝혔으며, 단량체는 15-16 kDa, 이량체는 17-32 kDa의 분자량을 가진다고 보고하였다. 갈따구 성충의 알레르기 항원성에 관한 연구결과는 더욱 빈약하다. Kawai and Konishi(1988)는 여러 종의 갈따구 성충항원의 용출물을 P-K 피부반응검사를 실시하여 15-18 kDa의 항원 단백질이 가장 강하게 알레르기를 유발시키는데, 이것은 유충 헤모글로빈에 해당한다고 하였다. 갈따구의 헤모글로빈은 유충시기에 생성되고 생리적 기능을 가지지만 성충으로 우화한 후에는 소량의 헤모글로빈이 잔존하여 있고 점차 분해되어 완전히 소실하는 것으로 알려져 있다(Schin *et al.*, 1974). Prelicz *et al.*(1986)은 *Camptochironomus tentans* 성충의 항원이 유충 헤모글로빈과 면역학적으로 동일한 특성을 보인다고 하였고, Mazur *et al.*(1987)은 갈따구 성충의 주항원도 성체내에 잔존하는 헤모글로빈이라고 주장

하였다. 그러나, Matsuoka *et al.*(1988)은 갈따구 성충과 유충 항원을 각각 기관지천식 아동의 혈청과 반응시켜 본 바, 성충에는 강한 양성반응을 보인데 반해 유충항원에 대해서는 매우 낮은 반응을 보였다고 하였다. Matsuoka *et al.*(1990)도 *Chironomus yoshimatsui* 유충이나 갓 부화한 성충에 비하여 완전히 성숙한 성충의 항원이 10배나 강하게 기관지천식아동의 혈청과 반응한다고 하였으며 암컷 체내에 존재하는 500 kDa 이상의 거대한 단백질인 vitellogenin이 주항원일 것이라고 추측하였다. Kawai and Konishi(1988)는 여러 종의 갈따구 조항원을 크로마토그래피로 분획한 단백질을 P-K 피부반응검사로 알레르기 발현성(allergenicity)을 관찰하여 헤모글로빈도 아니고 고분자 단백질도 아닌 항원단백질의 존재를 보고하였다. Kampen *et al.*(1994)은 일본인(229명), 대만인(17명)과 스웨덴인(92명)의 기관지천식 환자를 대상으로 조사한 결과 40%의 환자가 *Crictopus sylvestris* 조항원에 양성반응을 보였는데, 이 갈따구는 헤모글로빈이 존재하지 않는다. 따라서 헤모글로빈이 아닌 항원단백질이 관여한다는 사실을 알 수 있었다. 특히 스웨덴인의 경우 *Chi t I*에 10.9%, *Crictopus sylvestris* 조항원에 29.4%의 양성률을 보였는데 스웨덴에는 이 종이 서식하지 않으며 *Chi t I*은 *Chironomus thummi* 조항원을 용출하여 얻은 단백질인데 98%

가 헤모글로빈이다. 이와 같은 사실은 *Chi t I*에 함유하는 미량의 다른 단백질과 *Cricotopus sylvestris* 항원의 일부가 공통항원일 가능성을 시사하고 있다.

본 연구결과에서는 노랑털갈따구 성충의 조항원을 10% 겔 상에서 전기영동한 결과 16-18개의 단백질 구획이 관찰되었고, 이온교환 크로마토그래피 용출물을 면역이적법한 결과 colorimetric substrate를 이용했을때는 65 kDa 부위의 한 구획만이 관찰되었으나, 민감도가 보다 예민한 chemiluminescent substrate인 CSPD를 이용한 결과 65 kDa에서 1개의 진한 구획과 25, 35, 52 kDa 부위에서 약한 3개의 노랑털갈따구 특이-IgE 항원으로 여겨지는 단백질이 관찰되었는데, 이것들은 모두 갈따구 헤모글로빈과는 다른 것들이어서 성충만이 가지고 있는 특이-항원이라 사료된다. 면역이적법으로 얻은 4개의 분획, 65, 52, 35 및 25 kDa 단백질의 항원성을 확인하기 위하여 조항원을 전기영동한 겔의 30개 절편을 각각 용출하여 얻은 용출액으로 P-K 피부반응검사를 실시한 결과 65, 52 및 35 kDa 부위에 해당하는 단백질에서 높은 항원성이 확인되었으며, 25 kDa 부위의 단백질에서는 비교적 낮은 P-K titer 값을 보였다. 또한 15 kDa의 저분자 단백질부위에 해당하는 분획 5번에서도 높은 P-K titer 값을 보여 항원성이 있다는 것을 알 수 있었는데, 이 저단백질 분획은 면역이적법에서는 검출되지 않았다. 갈따구 유충의 헤모글로빈 중 단량체 단백질의 분자량이 15 kDa이라는 것이 알려져 있어서 P-K 피부반응검사에서 높은 항원성이 확인된 15 kDa 단백질도 갈따구 성충의 체내에서 분해되지 않고 남아 있던 헤모글로빈 단백질이 아닌가 사료된다. 이상을 종합하면 노랑털갈따구 성충에서 특이-IgE 생성을 유발하는 항원단백질은 65, 52, 35 및 15 kDa이라는 것을 알 수 있었다.

본 연구는 마우스를 면역시켜 얻은 특이-IgE 항체로 시험한 결과이기 때문에 갈따구에 감작된 환자의 혈청을 사용한 실험에서도 동일한 항원 단백질이 검출될지는 알 수 없다. Abe and Ishii(1982)는 집먼지진드기의 1종인 *Dermatophagoides pteronyssinus* anti-IgE 항원 성분이 사람과 마우스에서 서로 다르게 나타났다고 보고하였고, Kawai and Sakamoto(1992)는 갈따구 유충 헤모글로빈 항원이 사람과 마우스에서 유사한 반응을 보여 어느 정도의 유사성을 가지는 것 같다고 하였다. 이와같이 알레르기 항원이 사람과 동물체내에서 동일한 것인지 혹은 다른 항원 단백질을 가지고 있는지 아직 확실하게 연구된 바가 없다. 앞으로 갈따구에 감작된 알레르기 환자의 혈청이 모아지는데로 연구를 시행하여 본 연구결과와 비교검토해야 할 것이다.

REFERENCES

- Abe T, Ishii A (1982) Purification of a murine IgE-inducing antigen extracted from the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Mol Immunol* **19**: 339-346.
- Baur X (1980) Hemoglobine von chironomiden (Zuckmuiken): Bisher unbekannte aggressive Inhalations-Antigene für den Menschen. *Klin Wochenschr* **58**: 1163-1164.
- Baur X, Dewair M, Fruhmahn G, Aschauer H, Pfletschinger J, Braunitzer G (1982) Hypersensitivity to chironomids: localization of the antigenic determinants within certain polypeptide sequences of hemoglobins of *Chironomus thummi*. *J Allergy Clin Immunol* **69**: 66-76.
- Baur X, Dewair M, Haegle K, Prelicz H, Scholl A, Tichy H (1983) Common antigenic determinants of haemoglobin as bases of immunological cross reactivity between chironomid species (Diptera, Chironomidae): Studies with human and animal sera. *Clin Exp Immunol* **54**: 599-607.
- Friesel R, Burgess WH, Macing J (1989) Heparin-binding growth factor 1 stimulates tyrosine phosphorylation in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* **9**: 1857-1861.
- Gillespie PG, Hudspeth AJ (1991) Chemiluminescence detection of protein from single cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 2563-2567.
- Goodman M, Braunitzer G, Kieinschmidt T, Aschauer H (1983) The analysis of a protein polymorphism, evolution of monomeric and homodimeric hemoglobins of *Chironomus thummi thummi*. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **364**: 205-217.
- Hirano K, Yamakawa N, Miyajaki H, Maeda K, Takai S, Ueda A, Taniguchi O, Hashimoto H, Hirose S, Okumura K, Ovary Z (1989) An improved method for the detection of IgE antibody of defined specificity by ELISA using rat monoclonal anti-rat IgE antibody. *J Immunol Methods* **119**: 145-150.
- Igarashi T, Murakami G, Adachi Y, Matsuno M, Saeki Y, Okada T, Kawai K, Kumagai A, Sasa M (1987) Common occurrence in Toyama of Bronchial asthma induced by chironomid midges. *Jpn J Exp Med* **57**: 1-9.
- Ishii A, Miyamoto T, Shibuya T, Igarashi (1988) Chironomid midges in the recent environment: A possible role as a causative agent

- in allergic disease. *Res Rep Nitsan Kagaku Sinkou Jaidan* **11**: 79-88.
- Kampen van V, Liebers V, Czuppon A, Baur X (1994) Chironomidae hemoglobin allergy in Japanese, Swedish, and German populations. *Allergy* **49**: 9-12.
- Kawai K, Konishi K (1988) Fundamental studies on chironomid allergy III. Allergen analyses of some adult Japanese chironomid midges (Chironomidae, Diptera). *Jpn J Allergol* **37**: 944-951.
- Kawai K, Sakamoto K (1992) Cross-reactivities of murine IgE-inducing larval hemoglobins among various chironomid species. *Jpn J Sanit Zool* **43**: 95-103.
- Kay AB, Gad EL, Rab MO, Stewart J, Erwa HH (1978) Widespread IgE-mediated hypersensitivity in Northern Sudan to the chironomid *Cladotanytarsus lewisi*. *Clin Exp Immunol* **34**: 106-110.
- Kim YJ, Park HS (1994) Skin reactivity and specific IgE antibody to two non-biting midges in Korean respiratory allergy patients. *J Korean Med Sci* **9**: 21-28.
- Kimura JY, Matsuoka H, Ishii A (1990) ELISA inhibition method in detection of mite and chironomid antigens in environmental samples of dust, soil and air. *Allergy* **45**: 167-173.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**: 680-685.
- Lowry OH, Rosenbrugh J, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.
- Matsuno M, Murakami G, Adachi YI, Adachi YK, Kayahara M, Okada T, Arakawa R, Kawai K, Igarashi T (1991) Immunological quantification of the airborne chironomid allergens. *Jpn J Allergol* **40**: 51-59.
- Matsuoka H, Ishii A, Kimura Y, Noono S (1990) Developmental change of chironomid allergen during metamorphosis. *Allergy* **45**: 115-120.
- Matsuoka H, Ishii A, Noono S (1988) Detection of IgE antibodies to larvae and adults of chironomids by enzyme-linked immunosorbent assay. *Allergy* **43**: 425-429.
- Mazur G, Becker WM, Baur X (1987) Epitope mapping of major insect allergens (chironomid hemoglobins) with monoclonal antibodies. *J Allergy Clin Immunol* **80**: 867-883.
- Mota I, Wong D (1969) Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. *Life Sci* **8**: 813-820.
- Murakami G, Igarashi T, Adachi YS, Matsuno M, Adachi A, Sawai M, Okada T, Kawai K, Kumagai A, Sasa M (1988) Common occurrence in Toyama of bronchial asthma induced by chironomid midges. International Symposium on mite and midge allergy. Tokyo, Univ of Tokyo Press, pp 32-33.
- Park HS, Rhu NS, Cho DI, Kim JW (1991) Two cases of bronchial asthma induced by *Chironomus plumosus* and *Tokunagayusurika akamusi*. *J Korean Soc Allergol* **11**: 362-367.
- Prelicz H, Baur X, Dewair M, Tichy H, Kay AB, Tee R, Cranston PS (1986) Persistence of hemoglobin allergenicity and antigenicity during metamorphosis of Chironomidae (Insecta: Diptera). *Int Arch Allergy Appl Immunol* **79**: 72-76.
- Ree HI (1993) Breeding places of non-biting midges (Chironomidae, Diptera) in Korea. *Korean J Entomol* **23**: 169-176.
- Ree HI, Kim HS (1981) Studies on Chironomidae (Diptera) in Korea I. Taxonomical study on adults of Chironominae. *Proc Coll Nat Sci SNU* **6**: 1-126.
- Schin K, Poluhowich JJ, Gamo T, Laufer H (1974) Degradation of haemoglobin in *Chironomus* during metamorphosis. *J Insect Physiol* **20**: 561-571.
- Toshiya K, Chihara J, Fukuda K, Sasaki Y, Shogaki Y, Oshima S (1987) Allergy to insects in Japan. III. High frequency of IgE antibody responses to insects (moth, butterfly, caddis fly, and chironomid) in patients with bronchial asthma and immunochemical quantitation of the insect-related airborne particles smaller than 10 μ m in diameter. *J Allergy Clin Immunol* **79**: 857-866.

=Abstract=

Identification and characterization of allergens of *Chironomus flaviplumus* adults
(Chironomidae, Diptera) in mice

Han-II REE^{1)*}, Sang-Hwa LEE¹⁾, Yu-Kyoung KIM¹⁾, Soungmin JEON¹⁾,
Jae-Kyung CHANG¹⁾, and Yoon-Suk KIM²⁾

Department of Parasitology¹⁾, College of Medicine, Yonsei University, Seoul 120-752 and Department of
Clinical Pathology²⁾, College of Health Science, Yonsei University, Wonju 220-701, Korea

Non-biting midges (Chironomidae, Diptera) are one of the largest insect families, which are distributed worldwide and are found in nearly all types of inland waters. They are known to be aggressive inhalant allergens which cause allergic diseases. In this study, the crude antigens of *Chironomus flaviplumus* adults which are most widely distributed in Korea were extracted, and their allergens were analyzed with the sera from experimentally sensitized mice. The mice were immunized with 1 μg or 10 μg of the crude antigens, respectively, and the specific serum IgE levels were measured by both ELISA and passive cutaneous anaphylaxis (PCA) techniques. The highest levels of both total IgE and chironomid-specific IgE were found in the mouse sera obtained after 9 weeks of the first injection with 1 μg crude antigen. The crude antigen was separated into 16-18 protein bands on gel by SDS-PAGE. The crude extract was assessed by SDS-PAGE/immunoblot analysis. One IgE-binding band (65 kDa) was detected by developing with colorimetric substrate, and 4 IgE-binding bands (65, 52, 35 and 25 kDa) by developing with CSPD chemiluminescent substrate. The SDS-PAGE gel of the crude extract of chironomid adults was equally cut into 30 pieces and each of them was eluted to isolate proteins by molecular weight, and the allergenicity of each eluate was assessed by applying P-K test on rats. Proteins of 65, 35 and 15 kDa showed the highest P-K titer ($\times 512$) which was 16 times higher than that of the crude extract ($\times 32$). The P-K titer of 52 kDa protein was also 4 times higher ($\times 128$) than that of the crude extract, whereas the 25 kDa protein poorly responded, which seemed not antigenic. In conclusion, the present result in mice demonstrated that adults of *Chironomus flaviplumus*, a predominant species in Korea, cause allergic diseases and the main allergens are 65, 52, 35 and 15 kDa proteins, of which 65 kDa protein seems to be a main allergen.

Key words: allergen, *Chironomus flaviplumus* adult, Korea

[Korean J. Parasitol., 34(1): 35-47, March 1996]

*Corresponding author