

## 감마선 조사에 의한 갈색 새우(*Penaeus aztecus*) 주요알러젠(Pen a 1)의 알러지성 및 항원성의 변화

이주운 · 김재훈 · 성장근\* · 강근옥\*\* · 신명곤\*\*\* · 변명우  
한국원자력연구소 방사선식품 · 생명공학기술개발팀, \*충남대학교 식품공학과,  
\*\*한경대학교 생활관리학과, \*\*\*우송대학교 식품생명공학과

### The Changes of Allergenic and Antigenic Properties of Major Allergen(Pen a 1) of Brown Shrimp(*Penaeus aztecus*) by Gamma Irradiation

Ju-Woon Lee, Jae-Hun Kim, Chang-Keun Sung\*, Kun-Ok Kang\*\*,  
Myung-Gon Shin\*\*\* and Myung-Woo Byun

Team for Radiation Food Science and Biotechnology, Korea Atomic Energy Research Institute

\*Department of Food Science and Technology, Chung Nam National University

\*\*Department of Home Economics, Hankyong National University

\*\*\*School of Food Biotechnology, Woosong University

#### Abstract

Gamma irradiation was applied to reduce shrimp allergy. Shrimp heat-stable protein(HSP) and shrimp protein extract were gamma-irradiated at 1, 3, 5, 7 or 10 kGy in an aqueous state (1.0 mg/mL). The changes in allergenic and antigenic properties of protein extract and HSP resulted from gamma irradiation were monitored by ELISA with mouse mAb or human patients sera and immunoblotting. Conformational changes in irradiated HSP were measured by both GPC-HPLC and SDS-PAGE. The binding ability of shrimp allergic patients IgE to irradiated protein extract or irradiated heat-stable protein was dose-dependently reduced. When measured by gel permeation chromatography and sandwich ELISA, the amount of intact heat-stable protein in the irradiated solution was reduced by gamma irradiation depending upon the applied dose. SDS-PAGE showed that the main band disappeared and new bands appeared in a higher molecular weight zone. The results provide a new possibility to use irradiation process for reducing the allergenicity of shrimp.

Key words : Gamma irradiation, shrimp allergy, heat-stable protein, allergenicity, antigenic properties.

#### 서 론

식품으로부터 유발되는 알러지는 IgE를 매개로 하는 전신적인 과민반응을 유도하여 식량자원의 효율적인 이용에 장애가 될 뿐 만 아니라 환자에게는 고통과 대상식품의 기피를 야기하여 궁극적으로 바람직하지 않은 결과를 나타낸다<sup>(1,2)</sup>. 식품알러지를 억제하기 위해 효소적 가수분해법<sup>(3,4)</sup>이나 유전자 변형기법을 이

용한 방법<sup>(5)</sup>이 소개되어 이용되고 있으나 그 이용성에 한계가 있다. 새우 등과 같은 식품은 위에서 소개한 기술을 이용하기는 거의 불가능하다. 새우는 식품알러지를 잘 일으키는 주요 식품군<sup>(6)</sup>에 해당되며, 주요 알러젠은 tropomyosin으로 열에 매우 안정하여 가열 후에도 그 항원성을 그대로 유지하는 열안정성 단백질(heat-stable protein, HSP)로 보고되었다<sup>(7-10)</sup>.

한편, 방사선에 의해 식품내 단백질들의 구조가 변화된다는 보고<sup>(11-13)</sup>가 발표된 이래로 방사선 조사기술이 식품 알러지를 억제하거나 제거할 수 있는 가능성에 대한 연구가 보고되었다<sup>(14-16)</sup>.

본 연구에서는 방사선 조사기술을 이용하여 새우의 알러지성 감소를 위한 기초연구로서, 갈색새우(*Penaeus aztecus*)의 주요 allergen(Pen a 1, 36 KD)인 tropo-

Corresponding author : Dr. Myung-Woo Byun is now in Team for Radiation Food Science and Biotechnology, Korea Atomic Energy Research Institute, P.O. Box 105, Yusong, Taejeon, 305-600, Korea.  
Tel : 82-42-868-8065  
Fax : 82-42-868-8043  
E-mail : mwbyun@nanum.kaeri.re.kr

myosin에 대하여 감마선 조사에 의해 야기될 수 있는 구조변화와 항원성 및 알러지성의 변화를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 환자혈청 및 동물 항체의 준비

새우 알러지 병력이 있고 새우 allergen 추출물과 주요 새우 allergen인 Pen a 1에 대한 prick skin test에 양성인 20명의 환자에게 삶은 새우를 급여하여 과민 반응을 유도한 후, 즉시 혈액을 채취하고 혈청을 분리하여 실험에 사용하였다. 또한 비교구는 새우 알러지가 없는 5명으로부터 혈액을 채취하여 그 혈청을 사용하였다. 항원성 변화는 Jeoung 등<sup>(17)</sup>의 연구에서 사용된 mouse 단클론항체(mAb 4.9.5)를 분양 받아 사용하였고, 열안정성 단백질(HSP)에 대한 다클론항체는 Lee 등<sup>(18)</sup>의 방법을 사용하여 생산하였다.

### 새우 추출물과 주요 HSP(36 KD)의 조제

지역 수산시장으로부터 냉장 갈색새우(*Penaeus aztecus*)를 구입하여 본 실험에 사용하였다. 새우 단백질을 추출액은 Lee 등<sup>(18)</sup>의 방법을 변형하여 준비하였다. 새우의 껍질과 머리를 제거하고 새우살 20 g에 0.3 M NaCl을 함유한 PBS 완충액(0.01 M phosphate buffer, pH 7.2)을 200 mL 넣고 균질기(Diax 900, Heidolph, Germany)로 균질화하였다. 균질물을 4°C에서 하룻밤동안 교반하고 원심분리(10,000 rpm, 30 min)한 후 상등액을 여과하여 그 여액의 단백질을 bicinchoninic acid(BCA) protein assay kit(Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)을 사용하여 1.0 mg/mL로 보정한 후, 유리시험관(10 mL)에 넣고 감마선 조사를 실시하였다.

한편, 새우에서 HSP를 분리하기 위해 Nagpal 등<sup>(8)</sup>의 방법을 이용하여 새우의 주요 HSP를 분리하였다. 새우를 증류수에서 15분간 삶은 후 껍질과 머리를 제거하고 새우살 100 g에 PBS 완충액(0.01 M phosphate buffer, 0.15 M NaCl, pH 7.2) 1,000 mL을 가하고 균질하고 4°C에서 하룻밤 교반하였다. 원심분리(10,000 rpm, 30 min)하여 상등액을 분리한 후 여과하였다. 그 여액에  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 30% 포화농도가 되게 첨가한 후 원심분리(6,000 rpm, 20 min)하고, 상등액을 취하여  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 60% 포화농도가 되게 첨가하고 원심분리하였다. 원심분리 후 침전된 부분을 PBS 완충액으로 녹인 후 같은 완충액으로 투석하였다. 투석된 용액을 0.1 N HCl 용액을 사용하여 pH 4.5로 보정하고 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 isoelectric precipitation

방법으로 단백질을 침전시켰다. 침전물을 PBS 완충액으로 녹인 후 같은 방법으로 3회 isoelectric precipitation을 하였으며, 침전물을 다시 PBS 완충액으로 녹인 후 같은 용액에서 투석시켰다. 투석된 용액을 0.45  $\mu\text{m}$  여과지를 사용하여 여과한 후 BCA protein assay kit를 사용하여 단백질 농도를 측정하고 농도를 1.0 mg/mL로 보정하였다. HSP 용액을 유리시험관(10 mL)에 넣고 감마선 조사를 실시하였다. 남은 HSP 용액은 동량의 glycerol과 섞은 후 -20°C에 보관하며 실험에 사용하였다. 분리한 HSP의 순도는 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, 12.5% acrylamide)에서 측정하였다.

### 감마선 조사

감마선 조사는 Co-60을 선원으로 하여 시간당 10 kGy의 선량율로 시료가 1, 3, 5, 7, 10 kGy의 흡수선량을 받도록 감마선을 조사하였으며, 흡수선량의 확인은 ceric/cerous dosimeter를 사용하였고, 흡수선량의 오차는  $\pm 0.1$  kGy였다. 이때 조사실의 온도는 10°C였다. 감마선 조사된 HSP용액과 새우 단백질 추출액을 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 새우추출물과 HSP에 대한 환자 IgE의 항체반응성 평가

Human IgE와 감마선 조사된 새우 단백질 추출액 및 감마선 조사된 HSP와의 반응을 조사하기 위해 Competitive Indirect ELISA(Ci-ELISA)법을 사용하였다<sup>(18)</sup>. HSP에 대한 Ci-ELISA의 시험과정은 다음과 같다. Polystyrene flat-bottom microtiter plates(Maxisorp, Nunc, Kamstrup, Denmark)에 HSP를 basic coating buffer(0.1 M sodium carbonate, pH 9.6)를 사용하여 1.0  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 희석한 후 100  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 4°C에서 하룻밤 동안 well에 고정시켰고, 1%의 gelatine 용액 120  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 blocking하였고, 일정하게 희석한 감마선 조사된 HSP 용액과 표준 HSP용액과 10%로 희석한 환자 혈청을 각각의 well에 50  $\mu\text{L}$  첨가하고 반응시켰다. Mouse anti-human IgE에 horseradish peroxidase(HRP, Southern Biotechnology Associates, Inc. Birmingham, AL, USA)를 공액결합한 2차 항체를 PBS 완충액을 사용하여 0.1  $\mu\text{g/mL}$ 로 희석하여 well에 100  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 반응시킨 후, 0.04% o-phenylenediamine(OPD, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) 기질용액을 사용하여 발색을 유도하고, 세척없이 그 well에 2.0 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  용액으로 반응을 종결시킨 후 492 nm로 고정된 ELISA Reader(CERES UV-

900C, BIO-TEK instruments Inc., MI. USA)에서 흡광도를 측정하여 HSP와 항체의 반응을 구하였다. 각 단계별 반응 후 well을 0.05%(v/v) Tween 20을 함유한 PBS 완충액으로 3회 세척하였고, coating을 제외한 모든 반응은 37°C에서 90분간 반응시켰다.

새우 단백질 추출액에 대한 환자 IgE와의 반응은 환자의 혈청을 PBS 완충액을 이용하여  $\log_{10}$ 의 희석비로 일정하게 희석하여 각각의 선량에서 조사된 단백질용액을 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 준비하여 coating한 microwell에 첨가하여 환자의 IgE와 단백질 추출액내 알러젠과의 반응성을 indirect ELISA법으로 조사하였다. 이때 사용된 2차 항체와 기질용액은 Ci-ELISA에서 사용된 것과 같은 것을 사용하였다.

#### Gel permeation chromatography(GPC)-HPLC

감마선 조사된 HSP용액에 존재하는 HSP의 양을 정량하기 위해 Vijayalakshmi 등<sup>(19)</sup>의 방법을 변형한 GPC-HPLC를 사용하였다. HPLC system은 Waters Alliance HPLC system(Mo. 2690, MA, USA)에 Protein KW-803 column(Shoko Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하였으며, 0.01 M sodium phosphate buffer(pH 7.2)를 이동상으로 하여, 0.75 mL/min의 유속으로 이동시켰으며, 260 nm와 280 nm의 파장에서 각각의 흡광도를 측정하였다.

#### Sandwich ELISA

감마선 조사된 HSP용액에 존재하는 HSP의 양을 면역분석법으로 정량하기 위해 Jeoung 등<sup>(17)</sup>의 방법으로 sandwich ELISA를 실시하였다. mAb 4.9.5를 basic coating buffer(0.1 M sodium carbonate, pH 9.6)를 사용하여 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 희석한 후 100  $\mu\text{L}$ 를 microwell에 첨가하여 4°C에서 하룻밤 동안 well에 고정시켰고, 1%의 gelatine 120  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 blocking 하였고, 감마선 조사된 HSP 용액과 표준 HSP용액을 각각의 well에 100  $\mu\text{L}$  첨가하고 반응시켰다. 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 희석한 rabbit anti-HSP IgG 용액 100  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 mAb 4.9.5와 결합된 HSP와 반응시켰고, goat anti-rabbit IgG(Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)에 horseradish peroxidase를 공액결합한 2차 항체를 사용하였다. 위와 같은 방법으로 발색을 유도하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였고, 이때 얻은 흡광도를 표준곡선에 대입하여 HSP의 농도를 구하였다. 각 단계별 반응 후 well을 0.05%(v/v) Tween 20을 함유한 PBS 완충액(PBST)으로 3회 세척하였고, coating을 제외한 모든 반응은 37°C에서 90분간 반응시켰다.

#### 전기영동과 환자 IgE를 이용한 immunoblotting

Laemmli<sup>(20)</sup>의 방법을 사용하여 감마선 조사된 HSP와 시료내 단백질의 변화를 측정하기 위해 SDS-PAGE(15% acrylamide)를 실시하였다. 표준분자량 marker는 Pharmacia Biotech(Uppsala, Sweden)로부터 구입하여 사용하였고, marker는 phosphorylase b(94 KD), albumin(67 KD), ovalbumin(43 KD), carbonic anhydrase(30 KD) trypsin inhibitor(20.1 KD) and  $\alpha$ -lactalbumin(14.4 KD)이었다. 전기영동이 끝난 후 Towbin 등<sup>(21)</sup> 방법을 사용하여 gel을 nitrocellulose paper(0.45  $\mu\text{m}$ , Pharmacia Biotech.)에 transfer 시킨 후 PBS 완충액으로 10%로 희석된 환자의 혈액을 사용하여 면역반응을 시키고, mouse anti-human IgE/IgG-HRP를 2차 항체로 사용하여 반응시킨 후 4-chloro-1-naphthol(Sigma, Chemical Co., St Louis, MO, USA) 용액을 기질로 하여 항원-항체 반응을 검사하였다.

## 결과 및 고찰

#### 환자 IgE의 항체반응성 평가

감마선 조사된 새우 단백질 추출액에 대한 IgE의 반응성은 조사선량이 증가할수록 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 1). 환자의 혈청을 10%로 희석하여 희석액내 IgE와의 반응을 비교하였을 때 5 kGy에서 알러젠과 IgE의 반응성이 50% 이하로 나타났으며, 10 kGy에서는 10% 이하의 반응성을 나타내었다( $p < 0.05$ ). 이 결과는 감마선 조사에 의해 단백질 추출물내에 존재하는 알러젠들의 알러지성이 감소된다는 것을 의미한다.

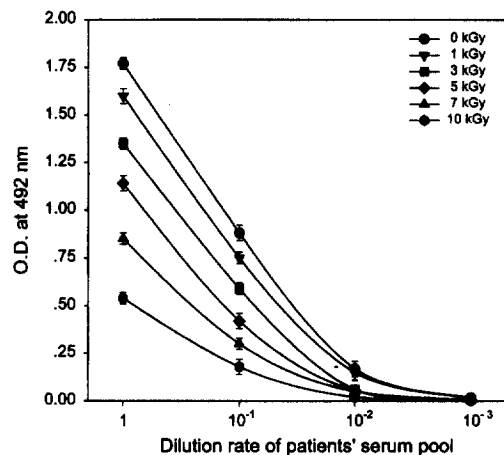
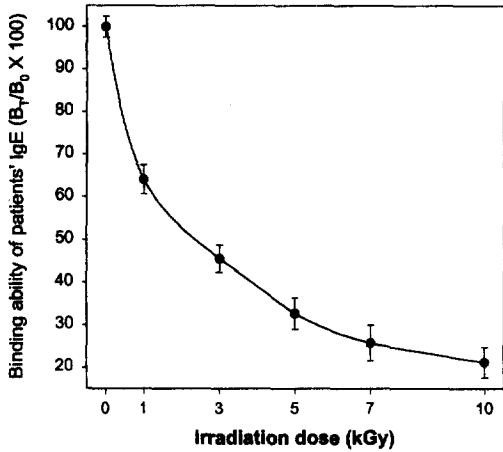


Fig. 1. Optical density at 492 nm resulted from immunoreaction of patients' IgE to allergens in gamma-irradiated shrimp protein extracts.

The reactivity was measured by indirect ELISA.

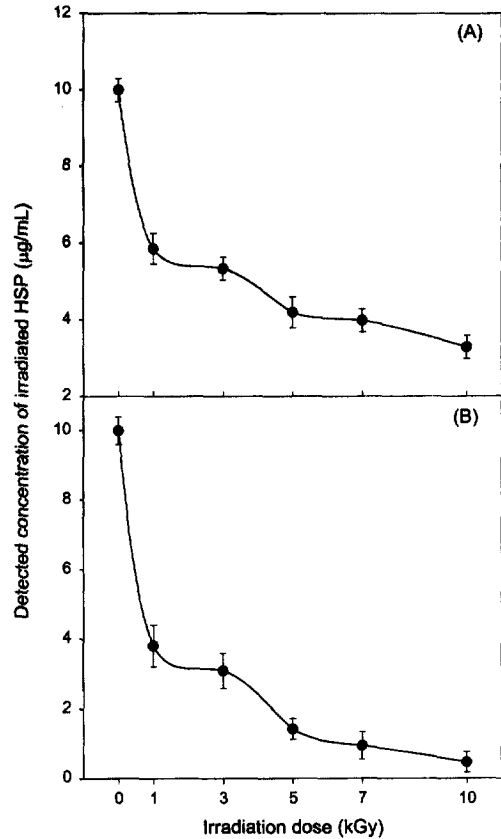


**Fig. 2. Binding ability of patients' IgE to gamma-irradiated shrimp heat-stable protein.** The binding ability was measured by competitive indirect ELISA.  $B_t$  and  $B_0$  indicate binding ability of irradiated HSP and that of non-irradiated HSP, respectively.

다. 이 결과를 근거로 새우의 주요 알러젠인 tropomyosin을 열처리한 HSP의 감마선 감수성을 측정하였다. 새우 알러지 환자의 IgE와 감마선 조사된 HSP를 Ci-ELISA법을 이용하여 반응시켰을 때 환자의 IgE는 감마선 조사선량에 의존하여 HSP를 잘 인식하지 못하였다(Fig. 2). 환자의 IgE와 3kGy 조사된 HSP와의 반응성은 대조구에 비해 50% 이하의 반응성을 나타냈고 10kGy 조사된 HSP와의 반응은 18.5% 정도로 나타났다( $p < 0.05$ ). 이 결과는 식품조사에서 국제적으로 허용된 10kGy 선량에서도 충분히 HSP의 알러지성을 80% 이상 감소시킬 수 있음을 나타내었다. 마우스 단클론항체(mAb 4.9.5)(Fig. 3-B)와 환자 IgE로부터 얻어진 항체 반응성을 비교하였을 때, 상관계수가 0.9650 ( $p < 0.05$ )으로 나타나 감마선 조사에 의한 mAb 4.9.5와 환자 IgE의 epitope의 변화가 거의 유사하게 일어난다고 사료된다. 이 결과들은 적절한 선량으로 감마선을 조사하여 새우로부터 야기되는 IgE-mediated hypersensitivity를 감소시킬 수 있음을 시사하고 있다.

**GPC-HPLC와 sandwich ELISA를 이용한 감마선 조사된 HSP의 정량**

감마선 조사된 HSP의 GPC-HPLC 결과에서 감마선 조사에 의해 HSP가 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 3-A). HSP의 retention time은 20분이었다. HSP를 정량하였을 때 HSP의 양은 감마선 선량이 증가함에 따라서 감소되었으나 1kGy의 저선량 조사로서도 크게 영향을 받는 것을 알 수 있었다. Sandwich ELISA를 이



**Fig. 3. Detected concentrations of gamma-irradiated HSP by gel permeation chromatography(A) and sandwich ELISA based with mAb 4.9.5(B).**

용하여 감마선 조사된 HSP의 농도를 검사한 결과에서도 감마선 조사에 의해 HSP의 농도가 감소됨을 알 수 있었으며, HSP 감소경향은 GPC-HPLC의 결과와 매우 유사한 경향을 나타냈다(Fig. 3-B). 이 결과는 HSP가 감마선 조사에 의해 구조적으로 변성되며, B cell epitope의 파괴에 의해 mAb 4.9.5가 인식하는 항원의 농도가 감소된다는 것을 시사한다<sup>(12,14,18)</sup>. 두 결과에서 얻어진 HSP의 감소경향을 비교하였을 때 0.9971의 상관계수( $p < 0.05$ )를 나타내었고, 감마선 조사에 의한 HSP의 항원성의 감소는 HSP의 구조 파괴에 의해 발생된다고 할 수 있었다.

**전기영동 및 immunoblotting 결과**

감마선 조사된 HSP의 전기영동 결과, 새우의 주요 HSP(36 KD) 부분이 감마선 조사에 의해 감소되었고 5 kGy 이상의 선량에서는 HSP 부분이 사라짐을 관찰할 수 있었다. 한편 3kGy와 5kGy 조사구는 더 높은 분

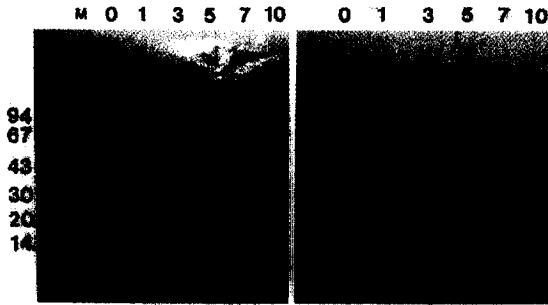


Fig. 4. Results of SDS-PAGE(left, 15% acrylamide) and immunoblotting(right) of the irradiated shrimp heat-stable protein(HSP, 1 mg/mL).

M and numerals indicate molecular weight standard and the irradiation doses(kGy), respectively. Arrow indicates main band(36 KD) and arrow heads indicate reaction of patients' IgE and traces of the denatured HSP on the paper.

자량대에서 새로운 부분들이 생성되었는데, 단일 부분을 형성하지 않고 응집에 의한 고분자화로 gel lane에 끌린 흔적(trace)들을 나타내었으며, 7 kGy 이상에서는 trace의 흔적 또한 사라졌다(Fig. 4). Immunoblotting의 결과에서 환자의 IgE는 5 kGy 이상의 선량으로 조사된 HSP와 반응하지 않았다. 1, 3, 5 kGy의 HSP lane에서 높은 분자량대에서 인식되는 부분이 나타났으며, 이 결과는 SDS-PAGE에서 나타난 것과 같이 5 kGy 이하의 선량에서는 응집된 HSP에 IgE와 반응하는 epitope이 있음을 나타내었다(Fig. 4).

감마선 조사에 의해 단백질들은 일반적으로 붕괴되어 더 작은 분자량대의 polypeptide 등으로 분해되거나, 분자간 응집으로 인하여 더 큰 분자량의 새로운 구조를 갖는다<sup>(12,22)</sup>. 감마선 조사에 의해 HSP는 응집되는 것으로 판단되었으며, 이 결과는 감마선 조사된 myosin의 변화 양상<sup>(18)</sup>과 같은 것으로 일반적으로 산소의 존재 하에서 감마선 조사에 의해 HSP는 응집되는 경향을 나타내는 것으로 판단된다<sup>(14)</sup>.

전술한 바와 같이 새우의 HSP는 tropomyosin으로 myosin의 꼬리부분과 같은 막대모양의 단백질로서 helical 구조를 갖고 있다<sup>(23)</sup>. Lee 등<sup>(18)</sup>의 보고에서와 같이 단백질의 coiled coil 구조는 3 kGy의 선량에서 풀어져 단백질 내부에 존재하는 내부 구성아미노산의 소수성 작용기가 외부로 노출되는 것으로 이러한 분자변화가 항체의 반응성을 변화시키는 것이다.

결론적으로, 감마선 조사에 의해 새우의 주요 열안정성 단백질인 tropomyosin의 구조를 변화시켜 알러지성을 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다.

## 요 약

새우 알러지를 감소시키기 위한 방법으로써 감마선 조사기술의 이용 가능성을 평가하였다. 새우로부터 분리한 열안정성 단백질(HSP)과 병원에서 임상진단용으로 사용하는 새우 단백질 추출액을 1, 3, 5, 7, 10 kGy의 선량으로 감마선을 조사하였다. 단백질 추출액 및 HSP의 알러지성과 항원성의 변화를 mAb와 환자의 IgE를 사용한 ELISA법과 immunoblotting법으로 측정하였고, 단백질의 구조변화는 gel permeation chromatography와 SDS-PAGE로 관찰하였다. 환자의 IgE는 감마선 조사된 단백질 추출액과 HSP용액 모두에서 감마선 조사선량이 증가함에 따라 감소하였다. GPC-HPLC와 sandwich ELISA법으로 HSP를 정량하였을 때도 역시 감마선 조사선량이 증가함에 따라 감소하였다. SDS-PAGE pattern 변화에서 HSP는 감마선 조사에 의해 변화되어 더 큰 분자량으로 전환되었다. 이러한 결과는 감마선 조사가 새우 알러지 억제에 적용할 수 있다는 가능성을 시사하였다.

## 감사의 글

본 연구는 과학기술부 원자력 증장기 연구개발과제의 지원으로 수행되었으며, 그 지원에 감사드립니다. 본 저자들은 본 연구에 자문과 환자 혈액 확보 및 mAb 4.9.5를 공급해 주신故연세대 의과대학 정병주 선생께 감사드리며, 고인의 명복을 기원합니다.

## 문 헌

1. Yunginger, J.W. Food antigens, pp. 50-53. In: Food allergy: adverse reactions to food and food additives. Blackwell Scientific Publications. Boston. USA (1997)
2. David, T.J. Food and food additive intolerance in childhood. pp. 157-159. Blackwell Scientific Publications. Oxford. UK (1993)
3. Maruyama, N., Sugiura, F., Kishimoto, T., Ichise, K., Takeuchi, Y., Sawada, T., Tsuda, A. and Utsumi, S. Decrease IgE-binding with wheat gluten by deamination. Biosci. Biotech. Biochem. 63: 567-569 (1999)
4. Asselin, A., Hebert, J. and Amiot, J. Effects of In Vitro Proteolysis on the Allergenicity of Major Whey Proteins. J. Food Sci. 4: 1037-1039 (1989)
5. Astwood, J.D., Fuchs, R.L. and Lavrik, P.B. Food biotechnology and genetic engineering, pp. 65-92. In: Food allergy: adverse reactions to food and food additives. Blackwell Scientific Publications. Boston. USA (1997)

6. Daul, C.B., Morgan, J.E. and Mc Cants, M.L. Crustacea allergy: immunologic evaluation shrimp-allergic individuals. *J. Allergy Clin. Immunol.* 80: 716-721 (1987)
7. Shanti, K.L., Martin, B.M., Nagpal, S.L., Metcalfe, D.D. and Subba Rao, P.V. Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding Epitopes 1. *J. Immunol.* 151: 5354-5363 (1993)
8. Nagpal, S.L., Rajappa, S.L., Metcalfe, D.D. and Subba Rao, P.V. Isolation and characterization of heat stable allergens from shrimp(*Penaeus indicus*). *J. Allergy Clin. Immunol.* 83: 26-32 (1989)
9. Daul, C.B., Slattey, M., Reese, G. and Lehrer, S.B. Identification of the major brown shrimp(*Penaeus aztecus*) allergen as the muscle protein tropomyosin. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 105: 49-55 (1994)
10. Reese, G., Daul, C.B. and Lehrer, S.B. Antigenic analysis(IgE and mABs) of the major shrimp allergen Pen a 1(tropomyosin) from *Penaeus aztecus*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107: 245-247 (1995)
11. Al-kahtani, H.A., Abu-tarbouch, H.M., Atia, M., Bajaber, A.S., Ahmed, M.A. and El-mojaddidi, M.A. Amino acid and protein changes in tilapia and spanish mackerel after irradiation and storage. *Radiat. Phys. Chem.* 51: 107-114 (1998)
12. Filali-mouhim, A., Audette, M., St-louis, M., Thauvette, L., Denoroy, L., Penin, F., Chen, X., Rouleau, N., Le Caer, J.P., Rossier, J., Potier, M. and Le Maire, M. Lysozyme fragmentation induced by  $\gamma$ -radiolysis. *Int. J. Radiat. Biol.* 72: 63-70 (1997)
13. Horowitz, R., Kempner, E.S., Bisher, M.E. and Podolsky, R.J. A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle. *Nature* 323: 160-164 (1986)
14. Kume, T., Ishii, T. and Matsuda, T. Immunochemical identification of irradiated chicken eggs. *J. Sci. Food Agric.* 65: 1-4 (1994)
15. Kume, T. and Matsuda, T. Changes in structural and antigenic properties of proteins by radiation. *Radiat. Phys. Chem.* 46: 225-231 (1995)
16. Lee, Y.K., Matsuhashi, S. and Kume, T. Change in carbohydrates of chicken and quail ovomucoids by gamma radiation. *Radiat. Phys. Chem.* 54: 285-290 (1999)
17. Jeoung, B.J., Reese, G., Hauck, P., Oliver, J.B., Daul, C.B. and Lehrer, S.B. Quantification of the major brown shrimp allergen Pen a 1(tropomyosin) by a monoclonal antibody-based sandwich ELISA. *J. Allergy Clin. Immunol.* 100: 229-234 (1997)
18. Lee, J.W., Yook, H.S., Lee, K.H., Kim, J.H. Kim, J.O. and Byun, M.W. Conformational changes of myosin by gamma irradiation. *Radiat. Phys. Chem.* 58: 271-277 (2000)
19. Vijayalakshmi, M.A., Lemeux, L. and Aniat, J. High performance size exclusion liquid chromatography of small molecular weight peptides from protein hydrolysates using methanol as a mobile phase additive. *J. Liquid Chromatogr.* 9: 3559-3562 (1986)
20. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 (1970)
21. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350-4354 (1979)
22. Tzaphlidou, M., Kounadi, E., Leontiou, I., Matthopoulos, P. and Glaros, D. Influence of low doses of  $\gamma$ -irradiation on mouse skin collagen fibrils. *Int. J. Radiat. Biol.* 71: 109-115 (1997)
23. Phillips, G.N., Fillers, J.P. and Cohen, C. Tropomyosin crystal structure and muscle regulation. *J. Mol. Biol.* 192: 111-131 (1986)

---

(2000년 3월 9일 접수)