

한국산 *Vespa*속 벌독 알레르겐의  
동정과 *Vespula*속 벌독과의  
교차항원성 규명

연세대학교 대학원  
의 과학과  
최수영

한국산 *Vespa*속 벌독 알레르겐의  
동정과 *Vespula*속 벌독과의  
교차항원성 규명

지도교수 홍 천 수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2005년 12월 일

연세대학교 대학원  
의 과 학 과  
최 수 영

# 최수영의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2005년 12월 일

## 감사의 글

면역학에 대하여 공부하고자 입문한지 벌써 여러 해가 지났습니다. 지금에 이르기까지 아무것도 모르는 저에게 많은 인내와 지침으로 지켜봐 주신 지도 교수님 되시는 홍천수 선생님께 진심으로 감사의 말씀을 드립니다. 그리고 자세한 실험에서부터 여러 가지로 꼼꼼히 신경 써주시고 살펴봐 주신 박중원 선생님께도 또한 정말 깊은 감사의 말씀을 전해 드리고 싶습니다. 또 부족한 저의 연구에 충고해 주시고 심사해 주신 용태순 선생님께도 감사를 드립니다.

무엇보다도 이 연구를 진행하면서 가장 힘들고 기억에 남는 것이라면 작년 가을 험한 산속에서 사나운 장수말벌을 잡았던 일 같습니다. 뜨거운 9월의 땀별에 무장까지 해가며 위험을 무릅쓰고 벌을 잡아주셨던 분, 충북 보은의 김홍갑님께 정말 깊은 감사의 말씀을 드립니다. 그리고 벌에 대한 저의 갑작스런 문의에도 불구하고 친절하게 동정해 주시고 여러 가지 특성에 대하여 말씀을 아끼지 않으셨던 고려 대학교의 김정규 박사님께도 정말 감사를 드립니다. 그리고 벌을 채집하러 가기까지 저를 위해 차량과 힘든 일을 대신해 주었던 후배 최원재군과 박남수군에게도 또한 고마운 마음을 전하고 싶습니다.

알레르기 연구소는 그동안 저에게 여러 가지 일과 함께 많은 것을 배우고 성장할 수 있도록 해 준 곳이었습니다. 마지막으로 이 연구를 마치고 논문을 쓰는데 여러 가지로 도움을 주었던 아끼는 저의 실험실 식구들인 이경은, 양혜선 선생님과 저와 파트너였던 이은경 선생님, 그리고 언제나 고마울 따름인 사랑하는 나의 가족에게 감사의 마음을 함께 나누고 싶습니다.

2005년 12월

저자 씀

# 목 차

국문요약 .....	1
I. 서 론 .....	3
II. 재료 및 방법 .....	7
1. 벌독 항원 .....	7
2. 환자 혈청 .....	7
3. 벌독 항원의 SDS-PAGE .....	7
4. IgE ELISA .....	8
5. <i>Vespa</i> 벌독 특이 IgE immunoblotting .....	8
6. ELISA 억제 실험 .....	9
7. 2-dimensional SDS-PAGE 및 immunoblotting .....	9
8. N-말단 아미노산 서열 및 gel 상의 ESI MS/MS 분석 .....	10
9. 상동성 검색 .....	10
III. 결 과 .....	11
1. <i>Vespa</i> 벌독 특이 IgE ELISA .....	11
2. <i>Vespa</i> 벌독 조항원의 SDS-PAGE 및 특이 IgE immunoblotting .....	11
3. <i>Vespa</i> 벌독에 대한 특이 IgE ELISA 억제 실험 .....	11
4. <i>Vespa</i> 벌독 항원의 2-dimensional SDS-PAGE 및 immunoblotting .....	15
5. N-말단 아미노산 서열 결정 .....	15
6. 주알레르겐의 ESI MS/MS 분석에 의한 동정 .....	18
IV. 고 찰 .....	24
V. 결 론 .....	28
참고문헌 .....	29
영문요약 .....	33

## 표 목 차

표 1. 한국산 <i>Vespa</i> 벌독 anaphylaxis 환자와 <i>Vespa</i> 특이 IgE ELISA .....	11
표 2. <i>Vespa</i> 벌독 주알레르겐 N-말단 아미노산 서열과 데이터베이스 검색 .....	17
표 3. Protparam program을 이용한 상동성 검색과 pI값 .....	17
표 4. ESI MS/MS와 <i>de-novo</i> sequencing을 이용한 <i>Vespa mandarinia</i> 주알레르겐 분석 .....	19

## 그림 목 차

그림 1. 벌목(Hymenoptera)의 분류와 <i>Vespa mandarinia</i> .....	6
그림 2. ELISA 억제실험을 통한 <i>Vespa</i> 에 대한 <i>Vespula</i> 와의 개인별 교차항원성 .....	13
그림 3. 각 벌독 항원의 SDS-PAGE와 <i>Vespa</i> 특이 IgE immunoblotting .....	14
그림 4. <i>Vespa</i> 벌독에 대한 2-dimensional SDS-PAGE 및 immunoblotting .....	16
그림 5. ESI MS/MS 를 통한 각 주알레르겐의 MS spectrum 결과	
A. (1),(2) 52 kD/pI 7.5 알레르겐의 MS spectrum .....	20
B. 50 kD/pI 9.31 의 hyaluronidase 알레르겐의 MS spectrum .....	21
C. (1),(2) 36 kD/pI 9.5 의 phospholipase A1의 MS spectrum .....	22
D. (1),(2) 25 kD/pI 9.02의 antigen 5 알레르겐의 MS spectrum .....	23

## 국문 요약

### 한국산 *Vespa*속 벌독 알레르겐의 동정과 *Vespula*속 벌독과의 교차항원성 규명

곤충알레르기를 일으키는 대표적인 곤충인 벌은 그 벌독간의 교차 항원성에 따라 5가지(*Apis*, *Vespa*, *Dolichovespula arenaria*, *Dolichovespula maculata*, *Polistes*)로 나누어 면역치료를 시행하고 있다. 그러나 한국에서 많이 서식하는 *Vespa*와의 교차항원성은 잘 밝혀지지 않아 면역치료의 효용성을 판단하는데 문제가 있다. 따라서 우리 나라에서 서식하고 있는 *Vespa*속에 포함되는 *Vespa mandarinia*를 중심으로 수입 시판되고 있는 *Vespula*벌독과의 교차항원성을 조사하고 그 항원성을 규명하였다.

속리산에서 채집한 *V. mandarinia*에서 독낭을 뽑아 조항원을 만들었다. 총 10예의 벌독 아나필락시스 환자의 혈청으로 *V. mandarinia* 특이 IgE 항체를 ELISA법으로 측정하였고 *Vespa*와 *Vespula*속간의 교차항원성은 ELISA억제실험으로 조사하였다. 그리고 2 dimensional SDS-PAGE 및 immunoblotting에 의한 N-말단 아미노산 염기 서열과 ESI MS/MS 분석으로 알레르겐의 특성을 조사하여 다른 알레르겐과의 상동성을 평가하였다. 그 결과 총 10예중 7명에서 *V. mandarinia*독 특이 IgE가 검출되었으며, 꿀벌과 *Vespula*에 대해서는 각각 10명, 6명에서 검출이 되었다. *Vespa*와 *Vespula*독간의 교차항원성을 개인별로 조사한 결과 *Vespa*독 항원이 *Vespula* 항원에 의하여 33%~80%가 억제되었다. *Vespa* 항원에 대한 immunoblotting 실험에서는 *V. mandarinia*에서 양성반응이 나오는 환자의 혈청에서 각각 50, 36, 25 KDa의 단백질에 공통적으로 특이 IgE가 결합하는 것을 관찰할 수 있었으며, 2 dimensional SDS-PAGE immunoblotting에서도 50, 36, 25 KDa의 단백분획에 특이 IgE가 결합하는 것을 알 수 있었다. 그리고 이들은 각각 hyaluronidase(pI 9.31), phospholipase A1(pI 9), antigen 5(pI 8.82~9.28)인 것으로 나타났으며, 52 kDa 의 pI 7.5인 부분의 단백분획은



NCBI에서 상동성을 찾을 수가 없었다.

이와 같이 *Vespa* 벌은 우리 나라에서 벌독 알레르기의 중요한 원인으로 확인되었으며 이들은 각각 hyaluronidase, phospholipase A1, antigen 5로 밝혀졌다. 그리고 *Vespa*와 *Vespula* 독간의 대한 교차항원성은 개인별로 많은 차이가 있었다.

-----  
핵심 되는 말 : 곤충 알레르기, 벌독 알레르기, *Vespa mandarinia*,  
Hymenoptera, 교차항원성

한국산 *Vespa*속 벌독 알레르겐의 동정과 *Vespula*속 벌독과의  
교차항원성 규명

<지도교수 홍 천 수 >

연세대학교 대학원 의과학과

최 수 영

I. 서 론

벌에 쏘인 후 쇼크반응을 보이는 것은 이미 고대의 기록에도 남아 있다<sup>1</sup>. 미국에서는 매년 40명 정도가 아나필락시스에 의하여 사망을 하며 우리나라에도 농촌 지역에서 성인, 소아 모두에서 2.5%–5%가 벌에 의한 알레르기 반응을 경험한 적이 있고 아나필락시스 반응을 보이는 것은 전체 인구의 약 0.4%가 넘는 것으로 알려져 있다<sup>2,3,4,12</sup>. 벌은 전세계적으로 약 12만종이 존재하는 것으로 밝혀졌으며 우리나라에서는 약 46과에 1000여종이 서식하고 있다<sup>5</sup>. 곤충 알레르기를 일으키는 벌목(Hymenoptera)은 꿀벌과(Apidae; honeybee, bumblebee)와 말벌과(Vespidae; wasp, paper wasp, yellow jacket, hornet), 그리고 개미과(Formicidae)로 크게 나눌 수 있다(그림 1)<sup>6,7,8</sup>. 말벌과(Vespidae)는 아과인 Vespinae와 Polistinae로 나뉘며, Vespinae는 다시 *Vespula*와 *Vespa*의 속으로 나뉘는데 yellow jacket과 hornet이 각각 전자와 후자에 속한다. 또한 Polistinae는 *Polistes*속을 들 수 있으며 여기에는 paper wasp가 속하고, Apinae속에는 꿀벌이 있다<sup>7</sup>.

지역에 따라 서식하는 말벌의 속에는 많은 차이가 있는데 미국에는 *Vespa* 보다는 *Vespula*가 주로 서식하고 유럽 및 아시아 지역은 *Vespa*가 주로 서식하며, 이 중 *Vespa*의 일부는 온대지역에서 우세하게 발견된다는 보고도 있다

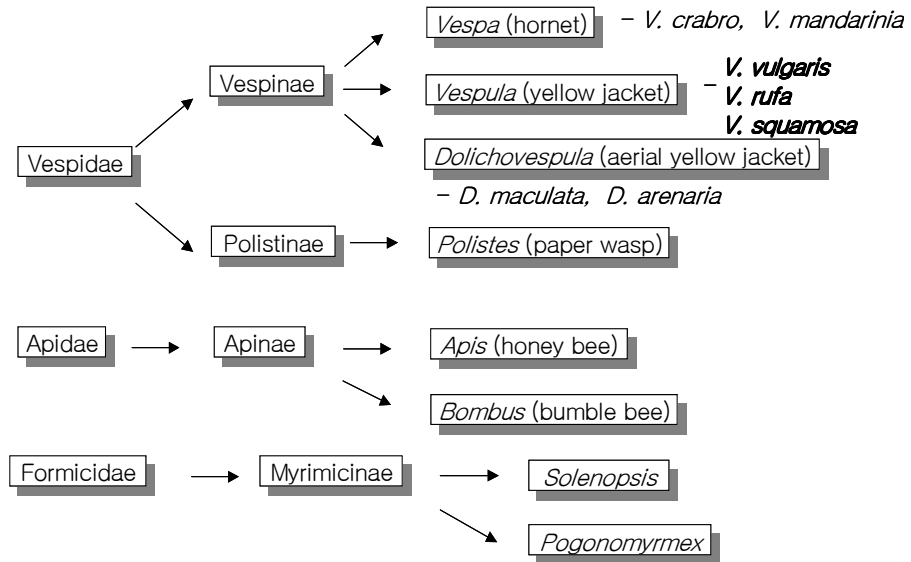
7,9,10. 특히 말벌 중에서 말벌아과인 *Vespa simillima simillima* 는 한국에서 흔한 종으로 일본에서도 아나필락시스 현상이 빈번히 일어나는 것으로 알려져 있고, *Vespa mandarinia* 는 말벌 중 가장 대형으로 매우 치명적인 독을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(고려대학교, 김정규). 또한 우리 나라 대전 근처의 양봉장에 출현하는 벌의 종류와 횡수를 관찰한 연구에 따르면 조사기간 중 포획된 말벌의 종류로는 *Vespa mandarinia*가 가장 많았고 *Vespa crabro*, *Vespula vulgaris*, *Vespa simillima*의 순으로 출현 빈도가 높았다<sup>10</sup>. 이외에도 7종의 한국산 *Vespa* 말벌이 알려져 있고, 종종 피해사례가 보고되고 있는 땅벌류(*Vespula*속)는 미국에서 흔한 것으로 국내에도 상당수 분포하고 있다<sup>10,11</sup>. 또한 같은 말벌과의 다른 아과인 쌍살벌류(Polistinae)의 종들도 아나필락시스 현상을 일으킨다.

벌독에 의한 이런 여러 가지 증상은 IgE 또는 IgG에 의해 매개되는 면역 반응으로 주로 IgE에 의한 제 1형 과민반응이 관여한다고 알려져 있으며 anaphylaxis 및 전신증상 등 대부분이 이에 속한다<sup>1,13</sup>. 벌에 쏘인 후 발생하는 전신적인 증상은 벌의 독성이 아닌 알레르기 반응이라는 것이 밝혀지면서<sup>14</sup>, 벌의 독액에서 추출한 항원을 이용한 피부시험과 면역치료가 임상에서 널리 시행되고 있다. 또한 이들 벌독간에는 상당한 교차항원성이 관찰되며 임상적으로 크게 *Apis*, *Vespula*, *Dolichovespula arenaria*, *Dolichovespula maculata*, *Polistes*의 5가지로 구분하여 진단과 치료에 활용하고 있다. 벌독액은 여러 효소, 펩타이드와 아민으로 구성되어 있으며 이 중 펩타이드와 아민은 독액의 흡수를 용이하게 하는 기능을 가지고 있고, 주로 효소가 항원으로 작용하여 알레르기 반응을 일으킨다<sup>8,15</sup>. 꿀벌(Apidae)독의 중요한 알레르겐으로써는 phospholipase A2, hyaluronidase, acid phosphatase, mellitin 등이 있으며 말벌(Vespidae)독에서는 phospholipase A1, hyaluronidase, antigen 5 가 있고, 이 중 antigen 5는 *Vespa*, *Vespula*, *Polistes* 모두에 있어 벌독간의 교차항원성을 일으키는데 관여하는 것으로 알려져 있다. 그러나 antigen 5 에 대한 생물학 기능은 아직 정확히 밝혀져 있지 않은 상태이다<sup>7,8</sup>.

우리 나라에는 야생벌 중 *Vespa*가 많이 서식하고 있으며 이에 의한 벌독

알레르기는 상당한 문제를 일으키고 있으나 현재로서는 *Vespa* 벌독을 이용한 피부시험과 면역치료 항원이 시판되지 않고 있어 *Vespula* 벌독을 진단과 치료에 활용하고 있다. 이런 문제점들을 해결하기 위하여 우리 나라에 흔하게 서식하는 *Vespa* 벌의 독액을 분리하여 항원을 만듦으로써 알레르겐의 특성을 규명하고 *Vespula* 벌독간의 교차항원성을 밝혀 진단의 정확성과 치료의 효용성을 높이려 하였다. 특히 *Vespa mandarinia* 는 가장 대형이며 치명적인 벌독 알레르기 반응으로 우리 나라에서도 피해사례가 보고되고 있으나 이제까지 연구가 미진하므로 이 특성 규명을 위한 연구는 꼭 필요하다. 이에 우리나라에 서식하는 *Vespa* 벌독 알레르겐의 특성을 밝히고 *Vespula* 벌독간의 교차항원성에 대하여 연구하였다.

A.



B.



그림 1. A. 벌목(Hymenoptera)의 분류 B. *Vespa mandarinia*; 몸길이는 수컷이 27~39 mm, 암컷은 37~44 mm. 주로 나무 속의 빈 공간이나 땅 속, 인가의 벽이나 추녀 밑에 둥근 벌집을 만든다. 성충은 4월부터 출현, 9월 중순부터 10월 초순까지 출현빈도가 가장 높다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 벌독 항원

*Vespa mandarinia*는 충북 보은의 속리산에서 채집하였다. 약 100여 마리의 벌에서 독낭만을 뽑아 모은 후, 이를 그 무게의 10배인 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) 용액에 넣고 초음파로 분쇄하여 독액을 추출해내었다. 그리고 원심분리로 상층액을 깨끗이 모은 다음 이를 동결건조 하여 벌독 항원을 얻었다. 벌독액은 그 성분의 특성상 효소의 작용으로 시간이 지남에 따라 변성이 되는 우려가 있어 별도의 추출과정이나 투석과정은 거치지 않았다. *Vespula* 속의 벌독 항원은 시판되고 있는 면역치료용 항원 (Hollister-Stier, Spoken, USA)을 이용하였다.

### 2. 환자 혈청

벌에 anaphylaxis 반응을 보여 내원한 환자 10명의 혈청과 대조군으로 역시 10명의 정상인 사람의 혈청을 이용하였다.

### 3. 벌독 항원의 SDS-PAGE

SDS-PAGE는 Laemmli(1970)의 방법에 따라 시행하였다. 벌독 항원 (*Vespa*, *Vespula*)은 SDS sample buffer에 섞은 후 100°C의 물에 5분간 끓인 다음 사용하였다. 그리고 13.5%의 SDS-polyacryl amide gel을 만들어 먼저 50 V에서 10분간 전기영동을 하여 불순물을 제거 시킨 다음, 각 항원을 15  $\mu$ l씩 주입하였다. 이를 stacking gel(5% acryl amide gel)에 50 V에서 30분, separation gel(13.5%)에서는 180 V로 약 2시간동안 전기영동을 한 후, 이를 Coomassie brilliant blue (0.1% Coomassie brilliant blue R 250, 10% glacial acetic acid, 45% methanol)로 염색하고 다시 탈염색(10% glacial acetic acid, 45% methanol)하여 확인하였다.

#### 4. 벌독 특이 IgE ELISA

벌독 항원(*Vespa*, *Vespula*)에 대한 환자별 특이 IgE를 측정하기 위한 ELISA 방법으로 먼저 96 well-plate(Costar, Cambridge, MA, USA)에 벌독 항원을 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 0.1 M carbonate buffer(pH 9.6)에 희석하여 well 당 50  $\mu\text{l}$ 씩 넣어준 후 4°C에서 18 시간 반응시켰다. 그리고 단백질의 비특이적 결합을 막기 위하여 1% BSA-PBST(1% bovine serum albumin, 137 mM NaCl, 1.8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 27 mM KCl, 0.1% Tween 20, pH 7.4)를 200  $\mu\text{l}$  넣어 1 시간 동안 반응시켰다. 그리고 희석하지 않은 환자의 혈청과 대조군인 정상 혈청을 각각 50  $\mu\text{l}$ 씩 넣고 1 시간 동안 반응시킨 후, PBS-T로 3회 세척하고 biotinylated goat anti-human IgE(Vector, CA, USA)를 1:1,000 (v/v)으로 희석하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 그리고 다시 3회 세척 후 streptavidin-peroxidase (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 1:1,000으로 희석하여 30분 동안 반응시킨 후, 4회 세척하여 ABTS solution (1 mM ABTS, 70 mM citrate phosphate buffer, pH 4.2, 1:1,000 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ )을 100  $\mu\text{l}$  넣어 5분간 발색하였다. 그리고 2 mM  $\text{NaN}_3$  100  $\mu\text{l}$ 로 발색 반응을 정지시킨 후 microplate reader 600 (Dynatec lab. Alexandria, Virginia, USA)로 405 nm에서 측정하였다.

#### 5. *Vespa* 벌독 특이 IgE immunoblotting

*Vespa mandarinia*에 대하여 환자별 ELISA 측정 후 양성 반응이 나오는 환자들의 혈청으로 immunoblotting을 하였다. 먼저 13.5% gel에서 SDS-PAGE를 한 후, gel에 있는 단백질을 전이 buffer를 이용하여 nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia, USA)에 옮겼다. 이를 5% skim milk-PBST로 1 시간 동안 반응시켜 주어 단백질의 비특이적 결합을 억제시킨 후, 1:5로 희석된 환자 혈청을 상온에서 18 시간동안 반응시켰다. 그리고 alkaline phosphatase가 결합되어 있는 1:1,000(v/v)으로 희석된 anti-human IgE (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 1 시간 동안 반응 시

킨 후 BCIP/NBT system (Promega, Madison, WI, USA)으로 발색하였다.

실험은 *V. mandarinia*에 대하여 ELISA의 OD값 0.74~0.035까지의 양성 반응을 보인 5 명의 환자 혈청을 이용하였다.

## 6. ELISA 억제실험

*Vespa*에 대한 *Vespula*와의 교차 항원성을 측정하기 위하여 환자 개인별로 ELISA 억제 실험을 실시하였다. 앞서 기술한 벌독 특이 IgE ELISA 법에 따라 *Vespa* 벌독 항원을 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 0.1 M carbonate buffer에 희석하여 96-well plate에 넣고 4°C에서 18 시간 동안 반응시킨 후, 1% BSA-PBST로 200  $\mu\text{l}$ 씩 넣고 1 시간 동안 반응 시켰다. 측정할 환자 혈청은 각 개인별로 1% BSA-PBST 와 1:6으로 희석하고 *Vespula* 항원을 넣어 미리 상온에서 두 시간 동안 반응시킨 후 4°C 에서 12 시간 동안 방치한 것을 사용하였다. *Vespula* 항원의 억제 농도는 20  $\mu\text{g/ml}$ 부터 4배씩 희석하여 0.019  $\mu\text{g/ml}$  까지로 하였다. 이후의 실험방법은 벌독 특이 IgE ELISA와 동일한 방법으로 실시하였고, 발색은 TMB (KPL, Gaithersburg, MD, USA)로 5 분간 반응시킨 후 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 정지시켜 450 nm에서 흡광도 측정을 하였다.

## 7. 2-dimensional SDS-PAGE 및 immunoblotting

*Vespa* 벌독 항원을 분석하기 위해서 2D SDS-PAGE를 하여 항원을 분자량 및 pI 값에 따라 분리시켰다. 먼저 벌독 항원을 lysis buffer (8 M urea, 2 M thiourea, CHAPS 4%, 65 mM DTT, 40 mM Tris, 0.2% biolyte)로 1 시간 동안 lysis 시킨 후, pH 3-10의 7 cm IPG strip을 이용하여 항원을 pI 값에 따라 IEF(isoelectric focusing)를 하였다(Bio-rad, rehydration 50 V, 12 hrs; 100 V, 30 min; 250 V, 30 min; 500 V, 30 min; 1000 V, 1 hr; end voltage 4000 V, 8000 V-hr)<sup>16,17,18,28</sup>. 이를 equilibration buffer (6 M urea, 20% SDS, 50 mM Tris/HCl pH 8.8, 20% glycerol)에 2% DTT와 2.5% iodoacetamide를 각각 녹여 20분씩 반응시켰다. 그리고 12%



PAGE gel을 만들어 60 mA로 약 2시간 동안 전기영동하여 분자량에 따라 다시 분리시킨 후, silver stain (Amersham Pharmacia)으로 확인하였다. 특이적인 spot을 가려내기 위하여 이 gel에 있는 단백질을 nitrocellulose membrane에 전이시킨 후, 양성 반응이 나온 환자의 혼합 혈청을 1:5로 희석하여 반응시켰다. 나머지 실험방법은 *Vespa* 별독 특이 IgE immunoblotting과 동일하다.

#### 8. N-말단 아미노산 서열 및 gel상의 ESI MS/MS 분석

2-dimensional SDS-PAGE 후 gel에 있는 단백질을 PVDF membrane에 전이(130 mA, 1 hr)시켜 Coomassie brilliant blue 로 염색하였다. 이를 다시 탈염색(50% methanol) 하고 목적하는 단백분획을 잘라낸 후 아미노산 배열결정기(Procise 491 Protein Sequencing System, Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany)를 이용하여 N-말단 아미노산 서열을 분석하였다. 그리고 gel 에서도 단백분획을 잘라내어 ESI MS/MS 분석으로 *Vespa* 별독 항원에 대한 동정을 실시 하였다.

#### 9. 상동성 검색

분석한 N-말단 아미노산 서열 결과와 ESI MS/MS 결과는 National Center for Biological Information와 SWISS-PROT의 데이터베이스를 이용하여 다른 알레르겐과의 상동성을 검색하였다

### III. 결 과

#### 1. *Vespa* 벌독 특이 IgE ELISA 측정

*Vespa mandarinia*와 *Vespula*, honeybee에 대하여 벌독 아나필락시스 환자 혈청내 특이 IgE를 개인별로 측정하였다. 그 결과, 10명 중 7명의 환자 혈청이 *Vespa mandarinia*에 대하여 양성반응을 보였고 *Vespula*에는 6명, 꿀벌에는 10명이 각각 양성반응을 보였다 (표 1). 그리고 *Vespa* 벌독에 특이 IgE가 검출된 7명중 5명에서만 *Vespula* 벌독 특이 IgE가 검출되었다. 대조군 (n=10)은 음성반응만을 보이는 정상 혈청을 이용하였으며 양성반응의 범위는 이 대조군의 평균 OD값+2 표준편차보다 높은 값으로 하였다.

#### 2. *Vespa* 벌독 조항원의 SDS-PAGE 및 특이 IgE Immunoblotting

*Vespa mandarinia*는 111 kD 에서부터 9 kD 까지의 다양한 단백질들을 보였고, *Vespula*는 약 50 kD, 36 kD, 25 kD 의 부분에 주로 나타났다(그림 2A). 그리고 *V. mandarinia*의 항원의 IgE immunoblotting에서는 *Vespula*의 단백질들과 비슷한 50 kD, 36 kD, 25 kD 의 부분에 IgE가 특이적으로 결합하는 것을 알 수 있었다(그림 2B).

#### 3. *Vespa*에 대한 특이 IgE ELISA 억제 실험

*Vespa* 와 *Vespula* 의 교차 항원성을 알아보기 위하여 ELISA 억제 실험을 실시하였다(그림 3). 대상은 벌독 특이 IgE ELISA에서 약한 양성 반응이 나온 환자들까지 총 네 명의 환자 혈청을 각각 이용하였다. ELISA의 억제 실험상 환자별로 *Vespa* 벌독 특이 IgE가 *Vespula*에 의해 억제되는 정도는 많은 차이가 있었다. 최대 억제 농도인 *Vespula* 벌독 20  $\mu$ g/ml의 농도에서 *Vespa* 특이 IgE가 개인별로 33%~80% 억제되었다.

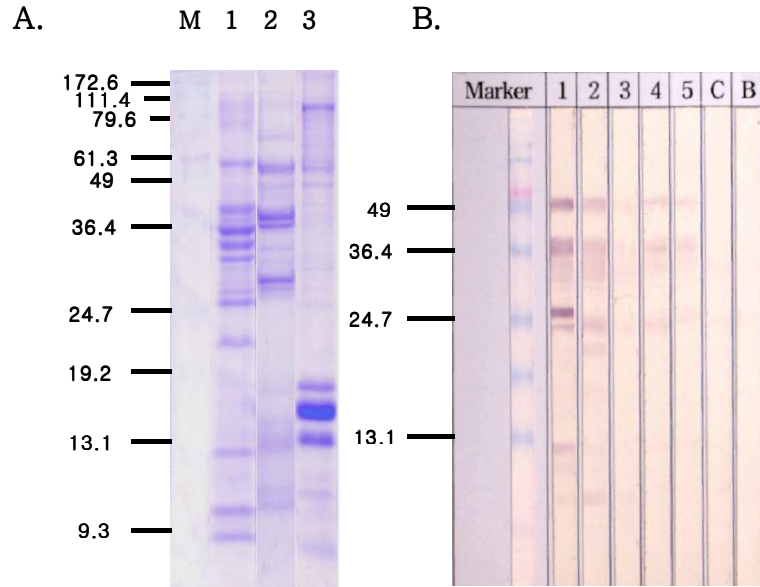
#### 4. *Vespa* 벌독 항원의 2-dimensional SDS-PAGE 및 Immunoblotting

*Vespa mandarinia* 항원을 Bio-rad system에 맞추어 시행한 결과 약

**표 1.** 한국산 *Vespa* 벌독 Anaphylaxis 환자에서 벌독 특이 IgE ELISA

Pts	Reaction to bee sting	Honeybee	<i>V. mandarinia</i>	<i>Vespula</i>
1	Local erythema	0.137	0.139	0.054
2	Anaphylaxis	0.125	-	-
3	Urticaria	0.020	0.025	-
4	Urticaria	0.114	-	-
5	Anaphylaxis	0.261	0.226	0.114
6	Anaphylaxis	0.460	0.740	0.279
7	Anaphylaxis, Angioedema	0.021	-	0.020
8	Urticaria	0.186	0.126	0.045
9	Bronchial spasm	0.582	0.423	0.213
10	Angioedema, Local erythema	0.690	0.035	-

'-' : 음성 반응 (cut-off : 10명의 정상 혈청 OD 평균값 + 2 표준편차)



**그림 2.** 각 벌독 항원의 SDS-PAGE와 *Vespa* 특이 IgE immunoblotting

**A.** 벌독 항원의 SDS-PAGE

M. molecular weight 1. *Vespa mandarinia* 2. *Vespula* 속  
3. *Apis mellifera* (honeybee)

**B.** *Vespa* 특이 IgE immunoblotting

*Vespa* 특이 IgE ELISA에서 양성반응이 나온 다섯 명의 환자 이용.  
각 환자의 OD값은 다음과 같다. Lane 1~5. 0.74, 0.423, 0.139,  
0.126, 0.035. C; 대조군(정상 혈청) D; buffer control

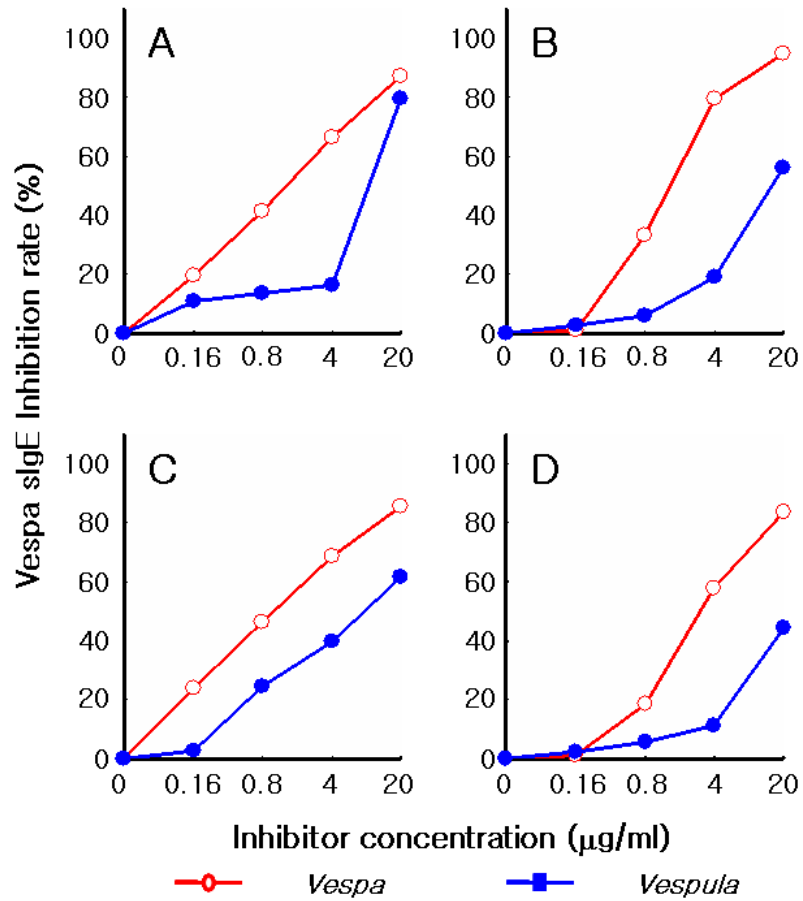


그림 3. ELISA 억제실험을 통한 *Vespa*에 대한 *Vespula*와의 개인별 교차 항원성. 특히 IgE ELISA에서 나온 환자별 OD값은 다음과 같다.  
A; 0.423, B; 0.74, C; 0.139, D; 0.126

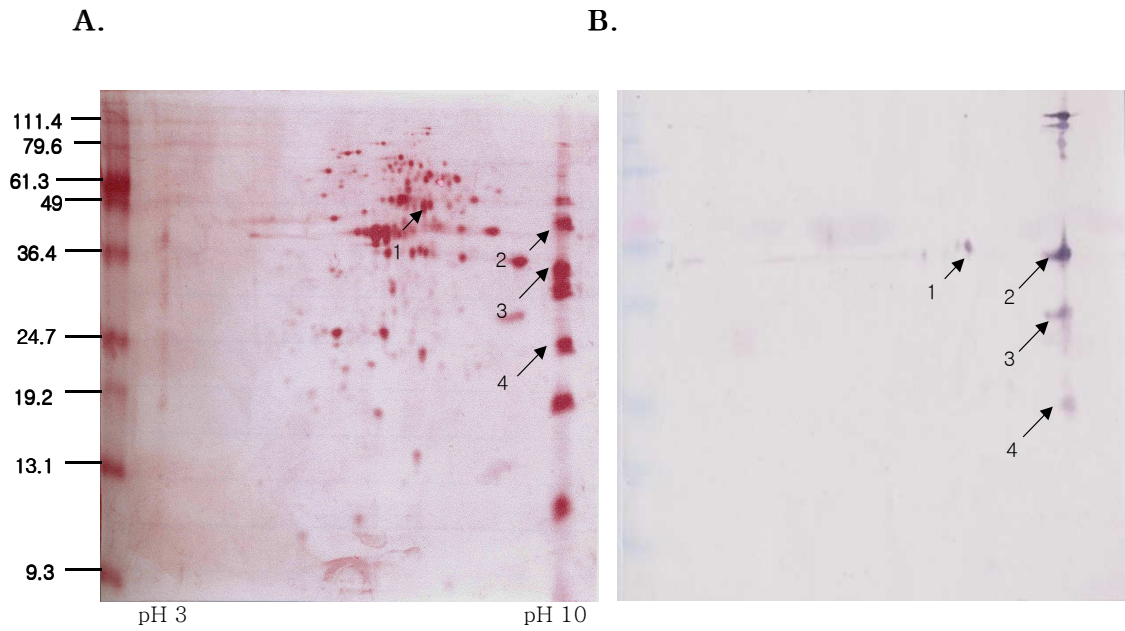
pH 4에서 pH 10 까지 단백분획의 점들이 다양하게 분포하는 가운데 주로 높은 분자량과 pH 10 이상의 강한 염기성의 성질을 많이 나타내는 것을 알 수 있었다. 여기에 IgE가 특이적으로 결합하는 점을 선별하기 위해 2-dimensional SDS-PAGE한 것을 nitrocellulose membrane에 전이시켜 양성반응이 나오는 환자의 혈청(ELISA OD값: 0.74, 0.423, 0.139, 0.126)을 모아 상온에서 18 시간 동안 반응시켰다. 그 결과, 약 pH 7.5 와 pH 10 인 염기성을 나타내는 부분에 IgE가 결합하는 것을 알 수 있었으며 분자량은 두 가지 모두 50 kD 전후와 특히 pH 10 부분은 약 36 kD, 25 kD 에서 각각 추가로 더 IgE가 결합하는 것을 알 수 있었다(그림 4).

#### 5. N-말단 아미노산 서열 결정

*Vespa* 벌독을 2-dimensional SDS-PAGE를 한 후 PVDF membrane에 옮겨 염색을 하여 IgE와 반응하는 부분을 잘라 N-말단 아미노산 서열을 분석하였다(표 2). 주알레르겐으로 확인된 네 개의 단백분획의 점들에 대해서 각각 15~18개의 아미노산 서열을 구하여 비교하였다. 이것을 바탕으로 NCBI의 데이터베이스를 이용하여 상동성 검색을 한 결과, 약 50 kD 부분의 단백분획의 점에서 *Vespula vulgaris*의 hyaluronidase major isoform인 Ves v 2b와 유사한 것으로 나타났다(표 2). 그리고 25 kD의 부분의 점에서는 말벌과에 공통으로 들어있는 antigen 5와 많은 상동성을 보이는 것으로 관찰되었고, 이 단백질들은 'http://www.expasy.org'의 ProtParam의 프로그램을 이용하여 정량적인 분자량과 pI 값을 구하였다(표 3). 그러나 첫 번째와 세 번째의 단백분획의 점들에 대해서는 N-말단 아미노산 서열로는 유의한 검색결과를 찾을 수 없었다.

#### 6. 주알레르겐의 ESI MS/MS 분석에 의한 동정

*Vespa* 벌독을 2-dimensional SDS-PAGE한 gel에서 주알레르겐 부분을 잘라내어 각 알레르겐에 대한 동정을 하였다(표 4). 곤충의 벌독에 대한 데이터베이스의 구축상황에 따라 ESI MS/MS (Electrospray Ionization



**그림 4.** *Vespa* 벌독에 대한 2-dimensional SDS-PAGE 및 immunoblotting  
 A. *Vespa* 벌독 2-dimensional SDS-PAGE  
 B. *Vespa* 벌독 특이 IgE Immunoblotting

**표 2.** *Vespa* 벌독 주알레르겐 N-말단 아미노산 서열과 데이터베이스 검색

Spot. No.	MW	Homology (%)	Protein	N-terminal amino acid sequence
1	52 kD	-	-	GCPTQMDLTPGDTEV
2	50 kD	75%	Ves v 2b	NLPRTNWPKKIFNIY
3	36 kD	-	-	GLIPKNTLVPEQISF
4	25 kD	100 %	Vesp m 5	ENYCKIKCRSGIHTLCKF

'-' : 유의한 상동성 검색 이루어지지 않음

**표 3.** Protparam program을 이용한 상동성 검색과 pI값

Spot No.	Database Accession	Specie	Protein Name	No. amino acid	MW (kD) /pI
#2	Swissprot: CAI77218	<i>Vespula vulgaris</i>	hyaluronidase b	340	40.072 / 9.31
#4	Swissprot: P81657	<i>Vespa mandarinia</i>	Allergen Vesp m 5	202	22.546 / 9.28
	Swissprot: H44583	<i>Vespa crabro</i> (European hornet)	antigen Vesp c 5.02	202	22.780 / 8.82
	Swissprot: AAA28302	<i>Dolichovespula maculata</i> (bald-faced hornet)	antigen 5 precursor	212	23.857 / 9.02

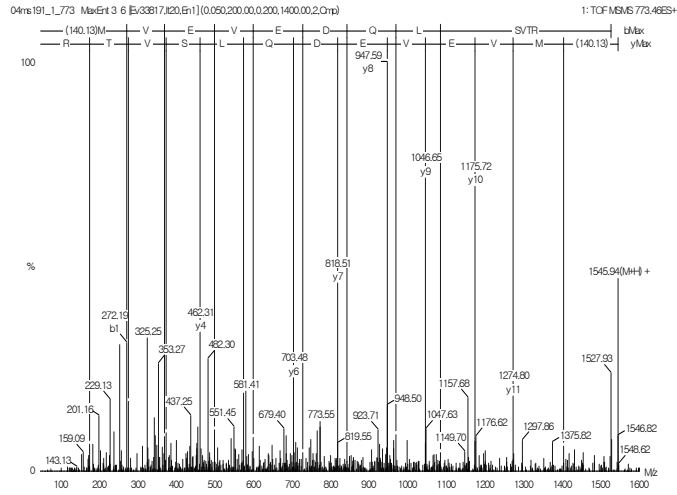


spectrometry)와 *de-novo* sequencing에 의한 분석을 이용하여 동정을 하였다(Q TOF). Coomassie brilliant blue 을 이용한 염색으로 단백질을 선별해내어 분석을 한 결과 각 한 개의 주알레르겐당 높은 signal로 여러 개의 peptide를 얻을 수 있었으며, 그 중 강하게 나타난 peak를 이용하여 NCBI(National Center for Biologic Information)의 SWISS-PROT을 이용한 데이터베이스 검색을 하였다. 그 결과 50 kD 알레르겐은 phospholipase A1, 36 kD 알레르겐은 hyaluronidase, 그리고 25 kD 의 알레르겐은 antigen 5 와 상동성이 있는 것으로 각각 검색이 되었다. 그러나 52 kD의 pH 약 7.5 부분인 알레르겐은 이 데이터베이스에서 상동성을 찾는 데 어려움이 있었고 insect proteome에서 검색해본 결과, Mycoplasma의 lipoprotein과 노랑 초파리(*Drosophila melanogaster*)의 단백질의 종류와 유사한 것으로 나타났다.

표 4. ESI MS/MS와 *de-novo* sequencing을 이용한 *V. mandarinia*의 주알레르겐 분석

Spot No.	Peptide No.	Peptide Sequence	Homologous Proteins	Identity
#1	720(+ 2)	VYSWENNLFLR	<i>Mycoplasma pulmonis</i> lipoprotein	6/9 (66%)
	773(+ 2)	MVEVEDQLSVTR	<i>D. melanogaster</i> CG11034-PA	9/10 (90%)
#2	811(+ 2)	VLSYWWYAYFPK	<i>Vespula vulgaris</i> (Yellow jacket)	8/9(88%)
			Hyaluronidase (Allergen Ves v 2)	
			<i>Dolichovespula maculata</i> (Bald-faced hornet)	8/9 (88%)
			Hyaluronidase (Allergen Dol m 2)	
			<i>Polistes annularis</i> (Paper wasp)	7/9 (77%)
			Hyaluronidase (Allergen Pol a 2)	
#3	815(+ 2)	YPELLGLDPKPLFK	<i>Dolichovespula maculata</i> (Bald-faced hornet)	7/9 (77%)
			Phospholipase A1 2 (Allergen Dol m 1.02)	
	867(+ 2)	RSNVPEKLSFVLSTR	<i>Dolichovespula maculata</i> (Bald-faced hornet)	7/9 (77%)
			Phospholipase A1 2 (Allergen Dol m 1.02)	
#4	559(+ 3)	LLEVGHYTQM VWAK	<i>Vespa mandarinia</i> (Hornet)	13/14 (92%)
			Venom allergen 5 (Allergen Vesp m 5)	
			<i>Vespa crabro</i> (European hornet)	11/11 (100%)
			Venom allergen 5.01 (Allergen Vesp c 5.01)	
			<i>Polistes fuscatus</i> (Paper wasp)	10/11 (90%)
			Venom allergen 5 (Allergen Pol f 5)	
	1145(+ 3)	VAFGCAATTAVK	<i>Vespula germanica</i> (Yellow jacket)	8/9 (88%)
		MWADEVK	Venom allergen 5 (Allergen Ves g 5)	
			<i>Vespula pensylvanica</i> (Western yellow jacket)	8/9 (88%)
			Venom allergen 5 (Allergen Ves p 5)	
			<i>Vespa crabro</i> (European hornet)	8/9 (88%)
			Venom allergen 5.01 (Allergen Vesp c 5.01)	

A. (1) 773(+2) - ~MVEVEDQLSVTR



(2) 720(+2) - VYSWENLFLR

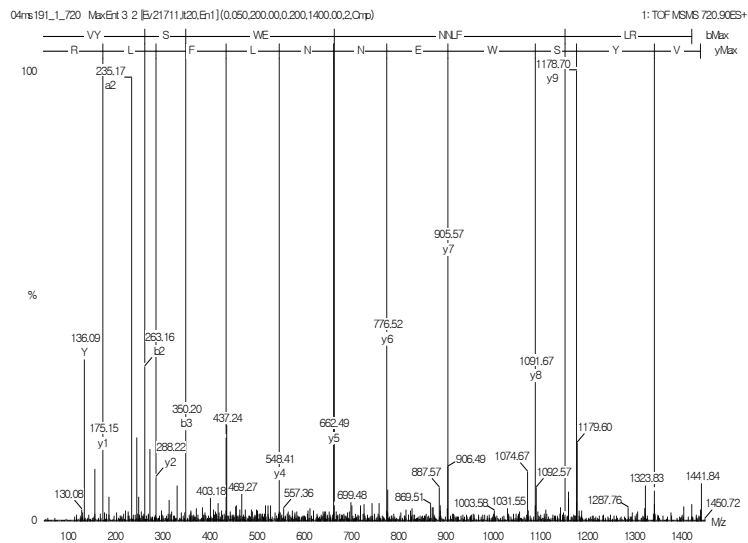
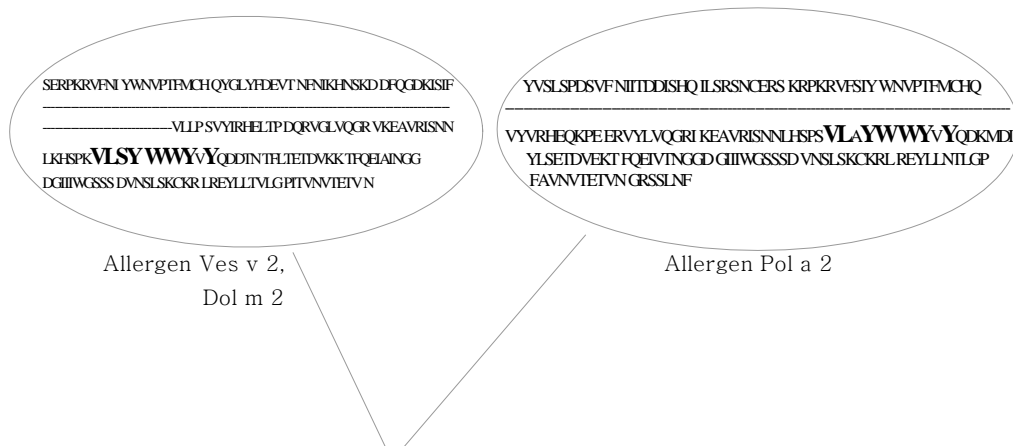


그림 5. ESI MS/MS 를 통한 각 주알레르겐의 MS spectrum 결과  
A.(1),(2) 52 kD/pI 7.5 알레르겐의 MS spectrum



**B. 811(+2) - VLSYWWYAYFPK**

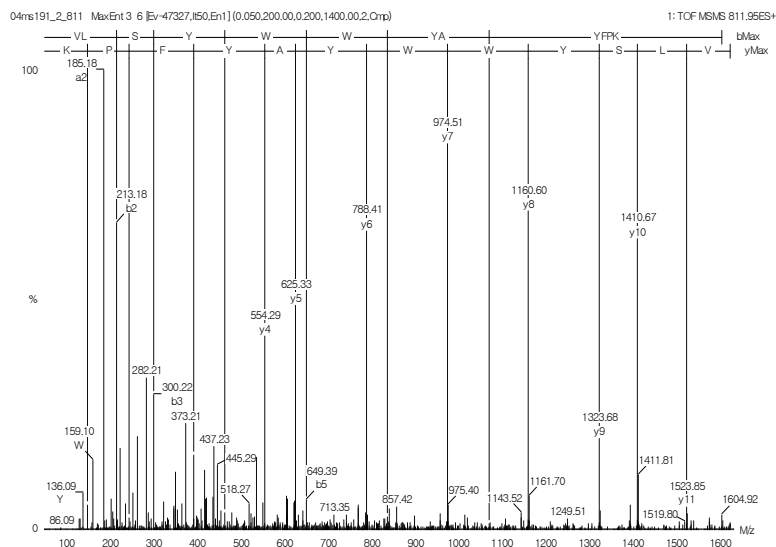
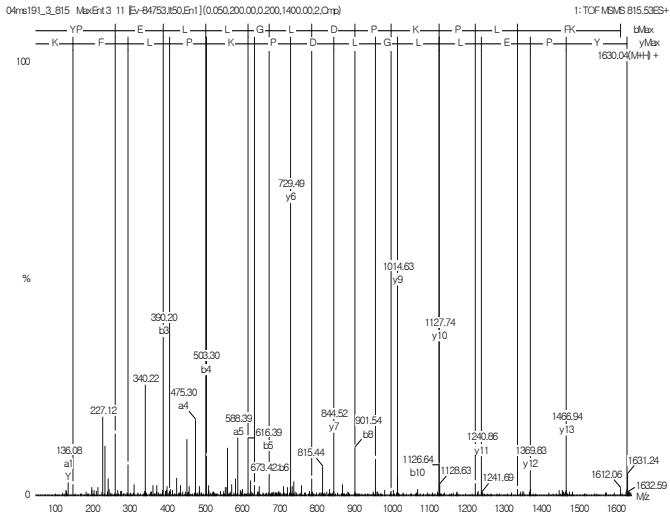


그림 5. ESI MS/MS 를 통한 각 주알레르겐의 MS spectrum 결과  
 B. 50 kD/pI 9.31 의 hyaluronidase 알레르겐의 MS spectrum

C. (1) 815 (+2) - YPELLGLDPKPLFK



GILPECKL**VP EEISFVLSTR**ENRDGVYLTL  
 FAG KEFQRFKLGK **YPEIIGLDPK** GPSFKKDCP  
 SFYVPVE AKAPFCNNG KII

(2) 867 (+2) - RSNVPEKLSFVLSTR

Allergen Dol m 1.02

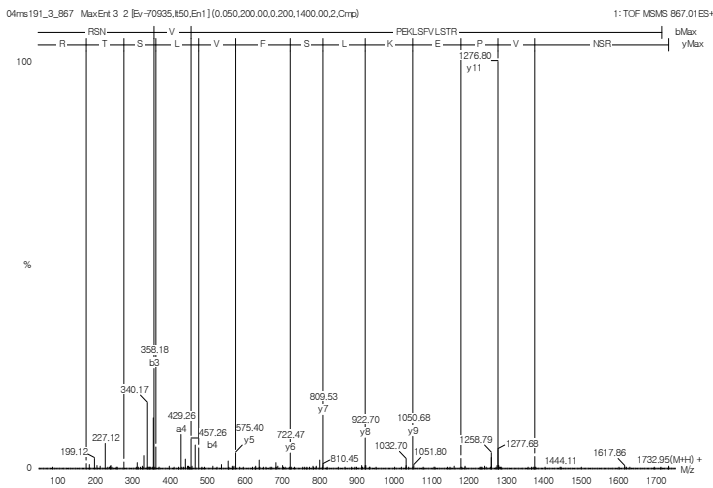
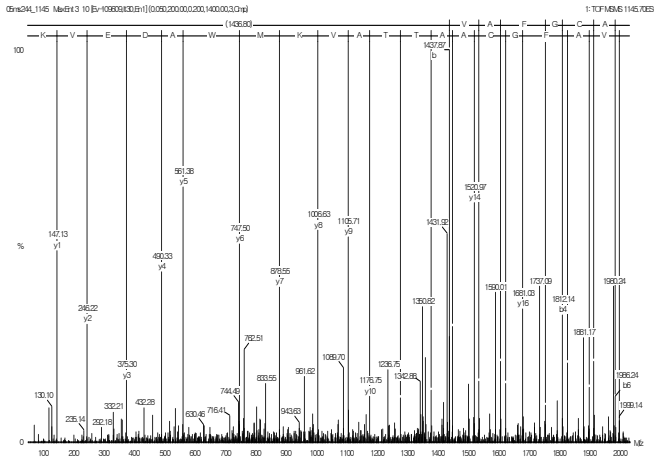


그림 5. ESI MS/MS 를 통한 각 주알레르겐의 MS spectrum 결과  
 C. (1),(2) 36 kD/pI 9.5 의 phospholopase A1의 MS spectrum

D. (1) 1145(+3):~~~VAFGCAATTAVKMWAEVVK



NNYCKIKCLK GGVHTACKYE SLKPNCANKK  
 AKYDNPVKLV **KMWEDEVK**DY NPKKKFSENN  
 FLKI**GHY**TQM **VW**ANTKEVGC GSIKYIQDKW  
 HKHYLCVNYG PSGNFGNEEL YQTK

(2) 559(+3):LLEVGHYTMVWAK

Allergen Vesp m 2

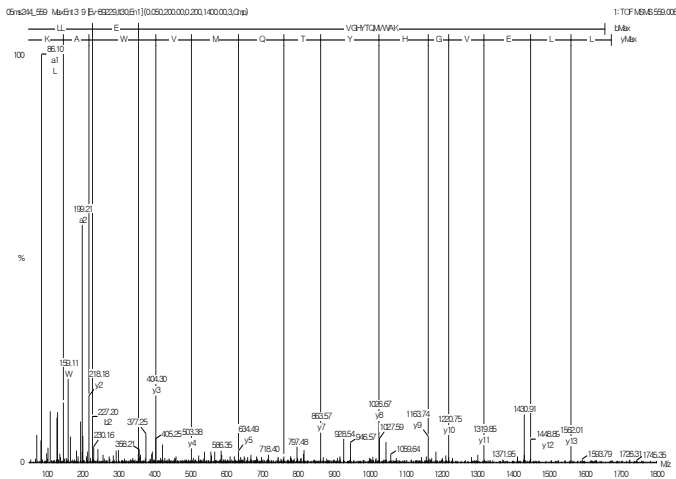


그림 5. ESI MS/MS 를 통한 각 주알레르겐의 MS spectrum 결과  
 D. (1),(2) 25 kD/pI 9.02의 antigen 5 알레르겐의 MS spectrum

#### IV. 고찰

*Vespa mandarinia*는 가장 큰 말벌과의 곤충으로 동아시아와 남아시아에 걸쳐 넓게 분포하는 것으로 알려져 있다<sup>9,10,19</sup>. 이 중 어떤 것들은 특히 온대지역에 서식하기 좋아하는 것으로 나타나 있는데, 우리 나라에도 많은 개체수가 서식하고 있고 그 피해사례도 종종 보고 되고 있으며 매우 치명적인 것으로 알려져 있다. 특히 9월 중순에서 10월 초순까지 출현 빈도가 가장 높은 것으로 나타나는데, 이는 우리 나라의 고유명절인 추석에 맞이하여 성묘를 하는 기간과 비슷한 시기로 피해 사례가 생기게 될 수 있는 때이다. 또한 몸집이 큰 만큼 독액의 양도 20~50 mg으로 매우 많다. 꿀벌의 경우, 벌의 자상에 의한 전신적인 반응이라도 약 70%는 생명에는 지장이 없는 경미한 전신성 두드러기나 혈관부종이라고 하나<sup>15</sup>, *V. mandarinia*의 경우 한번의 쏘임이라도 곧 사망할 수 있어 매우 위험하다. 그러나 그 치료나 진단에 있어서는 *Vespula*와 별다른 구분을 두지 않고 있으며 현재까지 벌독액에 대한 많은 연구가 되어 왔지만 불충분하여 이 연구를 수행하게 되었다. 저자는 9월 초 추석이 되기 직전 산 속에 서식하고 있는 *V. mandarinia*를 직접 채집하여 독낭을 추출하였다. 벌독은 여러 가지 효소로 되어 있어 항원 추출과 투석을 거치는 과정에서 그 성분이 많이 깨지는 것을 볼 수 있었다. 따라서 독액을 싸고 있는 독낭을 초음파 분쇄로 파괴시켜 그 안의 물질을 추출해 낸 후 바로 동결건조를 시켰다. 이 방법은 별도의 정제과정을 거치지 않고도 벌독 항원을 깨끗하게 만들어 낼 수 있는 좋은 방법이라 생각이 된다. 이 조항원에서 말벌과 (Vespidae) 벌독의 주알레르겐이라고 보고된 바 있는 38~44 kD의 hyaluronidase, 32~34 kD의 phospholipase A1, 23~24 kD의 antigen 5 부분<sup>7,8,20,27,28</sup>의 위치 외에도 많은 단백질의 밴드가 관찰되었는데, 이는 독액의 성분뿐만이 아니라 충체로부터 일부가 독액내로 흘러 들어올 수 있는 것이라고도 보고 있다<sup>15</sup>. 그러나 immunoblotting에서 이 주알레르겐 부분 외의 다른 단백질획에는 IgE가 반응하지 않았다. 따라서 첫번째로 이러한 결과는 벌독내 주알레르겐에 의한 알레르기 반응으로써 벌독액의 중요성이 일차적

로 입증된 것이라 생각된다. 그러나 이 벌독액은 벌의 종내에서 교차항원성이 크기 때문에 진단과 치료에 있어서 다소 차별성이 적다. 또한 같은 과에 있는 것들끼리는 독액의 주알레르겐 성분도 그 서열에서 일치하는 것이 많은 것으로 되어 있기 때문에 교차항원성이 크다<sup>7,9</sup>. 그러나 hornet과 yellow jacket 벌독의 anti-rabbit serum에서 hornet은 yellow jacket에 일부 반응하는 단백질도 있지만 yellow jacket은 전혀 반응을 보이지 않으며<sup>21</sup>, 아미노산의 염기서열의 상동성이 60% 미만이면 교차항원성이 미미하게 존재한다고 보고된 것도 있다. 따라서 *Vespula*와의 교차항원성 문제는 연구자마다 조금씩 차이가 있고 논쟁의 여지가 있다<sup>22,23,24</sup>. 특히 antigen 5는 말벌과 (Vespidae)에만 존재하는 것으로 *Vespa mandarinia*에서 antigen 5는 신경근육에서 neurotoxin으로 작용한다는 연구 보고도 있으나 이 물질에 대한 자세한 생물학적 규명은 되어 있지 않다<sup>7,19</sup>. 본 연구에서도 *V. mandarinia*에 대하여 *Vespula* 항원으로 억제실험을 한 결과, 거기에는 개인별로 많은 차이가 있는 것을 알 수가 있었는데 이것은 사람마다 교차반응을 보이는 정도도 다르지만, 각각 다른 벌에 감각이 되었을 가능성도 있는 것이라 본다. 그리고 벌에 쏘여 전신적 증상을 보이더라도 모두 혈청내 IgE가 반드시 높아져 있는 것은 아닐 수 있으며 반대로 IgE가 존재하더라도 증상은 도리어 없을 수도 있다<sup>15,26</sup>. 실제로 벌독 시약에 의한 피부 단자시험에서도 반응이 나타나더라도 알레르기 증상은 없을 수 있으며 IgE와도 관계가 없다는 보고도 있다<sup>15</sup>. 그리고 각 벌들간에 나타나는 특이 IgE는 꿀벌과 *Vespula*, *Vespa*에 대하여 공통으로 IgE가 나타나는 것이 대부분을 차지하였고, *Vespula*와 *Vespa*가 서로 독립적으로 반응이 나타나는 것은 별로 없었다. 이는 이미 언급이 되어지고 있는 교차항원성의 존재도 있지만 아토피의 병력이 있는 사람인 경우 벌에 의한 알레르기 반응이 그렇지 않은 사람들보다 더 많이 일어날 수 있고 다수의 벌에도 민감할 수 있다는 것에 중점을 둘 수가 있다고 본다. 따라서 이러한 아토피 환자에게 대한 벌독 알레르기는 유의한 상관성이 있다고 보고 있으며 IgE의 측정은 알레르기에서 중요한 것이라 할 수 있다<sup>8,30</sup>. 또 그 외 IgE와 IgG의 상관성이나 IgE가 존재하면서 실제 알레르기는 느끼지 않는 무증상을 보이는



경우도 있다<sup>15,29</sup>.

*V. mandarinia*에 대해서 2-dimensional SDS-PAGE로 분리를 하여 immunoblotting을 했을 때에도 총 4 부분이 주알레르겐과 비슷한 분자량에 반응이 나타나는 것을 알 수 있었다. 각각의 N-말단 아미노산 서열을 구하여 NCBI에서 상동성 검색과 pI값을 구하여 본 결과 50 kD 부분은 hyaluronidase로 *Vespula vulgaris*의 hyaluronidase b와 같은 것으로 나타났고 분자량은 40.072, pI값은 9.032로, 그리고 25 kD 부분은 antigen 5로 *V. mandarinia*의 Vesp m 5, *V. crabro*의 antigen Vesp c 5.02, *Dolichovespula maculata*의 antigen 5 precursor 의 일부로 다양한 종에서 상동성이 존재하는 것으로 나타났으며 분자량은 22.546~23.857, pI값은 8.82~9.28인 것으로 각각 나타났다. 그러나 나머지 두 단백질(52 kD/pI 7.5, 36 kD/pI 9.5)의 N-말단 아미노산 서열로는 유의성 있는 동정과 pI값을 추정해 볼 수 없었다. 이를 gel에서 ESI MS/MS 에 의한 분석법으로 동정을 하여 본 결과, 36 kD 부분은 phospholipase A1 2 로 *Dolichovespula maculata*의 Dol m 1.02와 상동성이 있는 것으로 나타났다. 그리고 그 외 표에서 보는 바와 동정결과에서 각 단백질들은 여러 다양한 종들에서 상동성이 많이 존재하는 것을 볼 수가 있었다. 따라서 각 종들간의 알레르겐 서열 일치하는 많이 존재할 수 있는 것이라 생각되어지고, 또 교차반응에도 연결이 될 수 있는 것이라 본다. 그러나 기존의 주알레르겐 외에 환자혈청과의 IgE 반응에서 분자량은 hyaluronidase와 비슷하나 조금 다른 pI값을 보이는 단백질이 있어 *V. mandarinia*만의 의미있는 알레르겐으로 보여지기도 하였으나, 이것에 대해서는 단백질의 동정이 이루어지지 않아 명확하게 정의를 내릴 수가 없었다. 특히 이것은 다른 단백질의 동정이 이루어졌던 데이터베이스에서는 검색이 어려워 insect proteom에서 검색을 하여 본 결과, *Mycoplasma pulmonis* lipoprotein과 *D. melanogaster*(노랑 초파리) CG11034-PA 의 일종인 것으로 나타났으나 유의성 여부에서 동정의 기준을 확신하기는 어려운 것으로 보인다. 이 외 다른 단백질도 전반적으로 곤충에 대한, 특히 독액에 대한 데이터베이스는 많이 구축되어 있지 않기 때문에 동정을 하는데 어려

움이 있었고 경우에 따라서는 더 자세한 분석도구가 필요하기도 하였다. 그러나 단백질분획 중 antigen 5 는 무척 다양한 벌독액에서 검색 결과가 나타나는 것을 볼 수가 있었는데 이는 교차반응에 관계하여서나 또는 다른 생물학적 기능의 중요성을 인식하여 생긴 연구결과가 아닌가 사료된다. 그 외 다른 단백질분획들은 *de-novo* sequencing에 의한 분석으로 동정이 가능하였으며, 따라서 이러한 동정법은 단백질의 분석과 동정을 하는데 유용한 도구라 생각되어진다.

벌독간의 교차항원성은 매우 중요하다. 본 연구에서 한국에서 서식하고 있는 *V. mandarinia*를 중심으로 *Vespula*와의 교차항원성을 다시 한번 검정하고자 한 결과, 교차항원성이 존재하는 것을 알 수 있었다. 그러나 각 개인별로는 차이가 많아 환자의 배경과 IgE, IgG의 특성을 함께 살펴보아야 더 효과적인 진단이 되어야 될 것으로 보인다. 또한 단백질들의 분석과 특성에 대한 proteomics 데이터베이스도 더 많이 구축이 되어야 알레르기의 진단과 치료의 효용성을 높이는데 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

## V. 결론

한국산 *Vespa mandarinia*에 대한 주알레르겐의 동정과 *Vespula*와의 교차항원성 연구에서 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. ELISA 억제 실험에 의한 *Vespa*에 대한 *Vespula*속과의 교차항원성은 환자 각 개인별로 많은 차이가 있었다.
2. *Vespa mandarinia*의 항원으로 2-dimensional SDS-PAGE를 한 결과 단백질들은 주로 강한 염기성의 성향을 띠는 것을 알 수 있었다.
3. 2-dimensional SDS-PAGE의 immunoblotting으로 환자 혈청내 IgE와 반응하는 주알레르겐은 52, 50, 36, 25 kD의 4 가지였으며, 각각의 N-말단 아미노산 서열과 상동성 검색을 통해 50 kD은 Ves v 2b로, 25 kD은 Vesp m 5와 상동성이 있는 것으로 나타났다. 그러나 나머지 두 알레르겐에 대해서는 N-말단 아미노산 서열로 상동성은 나타나지 않았다.
4. ESI MS/MS 와 *de-novo* sequencing 에 의한 주알레르겐의 동정 결과 50, 36, 25 kD 부분의 단백질은 각각 hyaluronidase, phospholipase A1, antigen 5 인 것으로 나타났다. 이 중 hyaluronidase와 antigen 5는 단백질 검색 결과 분자량이 전자가 40.071/ pI 9.31 로, 그리고 후자는 *Vespa mandarinia*에서 분자량이 22.546, *Vespa crabro* 22.78, *Dolichovespula maculate* 23.857로 나타났으며 pI값은 9.28, 8.82, 9.02 로 각각 나타났다. 그러나 36 kD의 phospholipase A1은 정량적인 pI값은 이루어지지 않았고, 실험상에서 약 pI 9.5 였다. 그리고 52 kD 부분의 단백질은 insect proteome 검색시 *Mycoplasma pulmonis* lipoprotein과 *D. melanogaster*(노랑 초파리) CG11034-PA의 일종인 것으로 나타났다.

## 참고문헌

1. 민경업, 문희범, 최병휘, 기만덕. 농촌아동 및 청년들의 벌독 알레르기에 관한 역학적, 임상적 조사. 알레르기. 1987;7(1):1-7.
2. Settipane GA, Newstead GJ, Boyd DK. Frequency of Hymenoptera allergy in an atopic and normal population, *J Allergy Clin Immunol* 1972;50:146-150.
3. Golden DBK, Marsh DG, Kagey-Sobotka A, Freidhoff L, Sztkio M, Valentine MD, Lichtenstein LM. Epidemiology of insect venom sensitivity. *JAMA*. 1989;262:240-244.
4. 문희범, 강석영. 농촌 아동들의 벌독 알레르기에 관한 역학적, 임상적 조사. 서울대 학술지. 1981;22:385-291.
5. 신유향. 막시 곤충류의 생태학. 대한 알레르기학회 제 8회 심포지움 “곤충” 알레르기 초록. 1977:9-10.
6. Valentine MD. Insect venom allergy : diagnosis and treatment. *J Allergy Clin Immunol*. 1984;73:299-305.
7. King TP, Spangfort MD. Structure and biology of sting insect venom allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;123:99-108.
8. Annala I. Bee venom allergy. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1682-1687.
9. Blanca M, Garcia F, Miranda A, Carmona MJ, Garcia J, Fernandez J, et al. Determination of IgE antibodies to *Polistes dominulus*, *Vespula germanica* and *Vespa crabro* in sera of patients allergic to Vespids. *Allergy*. 1991;46:109-114.
10. 장영덕, 이만영, 임용현, 윤영남. 양봉장에 출현하는 말벌류 (Hymenoptera : Vespoidea)의 종류와 비래상황. *Korean J Apiculture*. 1993;8:22-28.
11. 남상호. 한국의 곤충. 1996. pp268. 교학사.
12. Golden DBK, Valentine MD, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM.

- Prevalence of Hymenoptera venom allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1982;9:124.
13. Hoffman DR. Honeybee venom allergy: Immunological studies of systemic and large local reactions. *Ann Allergy*. 1978;41:278.
  14. Hunt KJ, Valentine MD, Sobotka AK, Lichtenstein LM. Diagnosis of allergy to stinging insects by skin testing with Hymenoptera venoms. *Ann Intern Med*. 1976;85:56-9.
  15. 박중원, 남동호, 홍천수. 꿀벌독 알레르기 환자에서의 꿀벌독에 대한 특이 IgE와 IgG<sub>4</sub> 검출. *알레르기*. 1998;13:312-325.
  16. Songping L, Xiaolan L, Menglin C, Jinyun X, Ping C, Renhuai H. Identification of venom proteins of spider *S. huwena* on two-dimensional electrophoresis gel by N-terminal microsequencing and mass spectrometric peptide mapping. *J Protein Chemistry*. 2000; 19:225-229.
  17. Paula J, Libia S, Juan JC. Snake venomomics: characterization of protein families in *Sistrurus barbouri* venom by cysteine mapping, N-terminal sequencing, and tandem mass spectrometry analysis. *Proteomics*. 2004;4:327-338.
  18. Nawarak J, Sinchaikul S, Wu CY, Liau MY, Phutrakul S, Chen ST. Proteomics of snake venoms from *Elapidae* and *Viperidae* families by multidimensional chromatographic methods. *Electrophoresis*. 2003;24:2838-2854.
  19. Abe T, Kawai N, Niwa A. Purification and properties of a presynaptically acting neurotoxin, mandaratoxin, from hornet (*Vespa mandarinia*). *Biochemistry*. 1982;21:1693-1697.
  20. Zollner TM, Spengler K, Podda M, Ergezinger K, Kaufmann R, Boehncke WH. The western blot is a highly sensitive and efficient technique in diagnosing allergy to wasp venom. *Clin Exp Allergy*.

- 2001;31:1754-1761.
21. Reisman RE, Mueller U, Wypych J, Elliott W, Arbesman CE. Comparison of the *allergenicity and antigenicity of yellow jacket and hornet venoms*. *J Allergy Clin Immunol*. 1982;69:268-274.
  22. Hoffman DR, McDonald CA. *Allergens in hymenoptera venom*. VIII. Immunologic comparison of venoms from six species of vespids (yellow jackets). *Ann Allergy*. 1982;48:78-81.
  23. Hoffman DR. *Allergens in hymenoptera venom* XV. the immunologic basis of vespid venom cross-reactivity. *J Allergy Clin Immunol*. 1985;75:611-613.
  24. Hoffman DR, Jacobsen R, Blanca M. *Allergy to venom of Polistes dominulus*. A paper wasp introduced from Europe. *J Allergy Clin Immunol*. 1990;85:211.
  25. Kagey-Sobotka A, Adkinson NF, Valentine MD, Lichtenstein LM. *Allergy to insect stings* IV. Diagnosis by radioallergosorbent test (RAST). *J Immunol*. 1978;121:2477-2484.
  26. Karen MW, Christina DF, Margit Schmidt, Hoffman DR. *Hymenoptera venom protease allergens*. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114:928-933.
  27. Hoffman DR. *Hymenoptera venoms: composition, standardization, stability*. In: Levine MI, Lockey RF, editors. *Monograph on insect allergy*. 4th ed. Milwaukee, WI: American Academy of Allergy Asthma and Immunology. 2003:37-53.
  28. Wood CL, Timmons BE, Hoffman DR. *Allergens in Hymenoptera venoms*. X. *Vespid venoms versus venom sac extractions: comparison by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*. *Ann Allergy*. 1983;51:441-445.
  29. Charpin D, Birnbaum J, Lanteaume A, Vervloet D. *Prevalence of*

- allergy to Hymenoptera stings in different samples of the general population. J Allergy Clin Immunol. 1992;90:331-334.*
30. Yunginger JW, Jones RT, Leiferman KM. *Immunological and biochemical studies in bee-keepers and their family members. J Allergy Clin Immunol. 1978;61:93.*

## Abstract

### Identification of Korean *Vespa* venom allergen and evaluation of its cross-allergenicity with *Vespula* venom

Soo Young Choi

*Department of Medical Science  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Chein-Soo Hong)

*Vespa* is the most important bee for sting anaphylaxis in Korea. However, their cross allergenicities between *Vespa* and *Vespula* subfamilies are not well characterized. In this study we identified the major allergens of Korean *Vespa mandarinia* and evaluated the cross allergenicities between *Vespa mandarinia* and commercial *Vespula* venom.

Crude extract from *V. mandarinia* was prepared and cross-allergenicities between *Vespa* and *Vespula* venom was evaluated by ELISA inhibition test. Major allergens of *V. mandarinia* was identified by IgE immunoblotting using 2-dimensional SDS-PAGE, N-terminal amino acid sequencing, and ESI MS/MS.

Among the 10 bee sting anaphylaxis patients, 7 patients has specific IgE antibody to *V. mandarinia*. Wide range of cross-allergenicities were found between *Vespa* and *Vespula* venoms in Korean bee sting anaphylaxis patients. Five from 7 *Vespa* specific IgE positive patients also had sIgE to *Vespula*, but 2 patient did not.

25 (pI 9.02), 36 (pI 9.5), and two 50 kD (pI 9.31) proteins of *V.*



*mandarinia* were identified as main allergens. N-terminal amino acid sequencing and ESI MS/MS analysis revealed the 25 kD protein as antigen 5, 36 kD protein as phospholipase A1, and 50 kD as hyaluronidase. However, the protein with 52 kD(pI 7.5) is not matched to the reported bee venom allergens.

In conclusion, individual variation in cross allergenicity between *Vespa* and *Vespula* venom was found in Korean bee sting anaphylaxis patients. We identified the 25, 36, and two 50 kD proteins as the main allergens of *Vespa mandarinia* venom.

-----  
Key Words: insect allergy, bee venom allergy, *Vespa mandarinia*,  
Hymenoptera, cross-allergenicity