

긴털가루진드기(*Tyrophagus
putrescentiae*)의 Expressed
Sequence Tags 분석 및 Tyr p
13의 알레르겐 항원성 규명

연세대학교 대학원

의학과

김 우 경

긴털가루진드기(*Tyrophagus
putrescentiae*)의 Expressed
Sequence Tags 분석 및 Tyr p 13의
알레르겐 항원성 규명

지도 김 규 언 교수

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2004년 12월 일

연세대학교 대학원

의학과

김 우 경

김우경의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2004년 12월 일

감사의 글

본 연구를 시작하게 해 주시고 끊임없는 관심과 학문적인 지도로 이끌어 주신 은사 김규언 교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 또한 연구를 진행하고 논문을 작성하는데 있어 많은 조언을 주신 기생충학교실의 용태순 교수님, 내과학교실의 홍천수 교수님, 소아과학교실의 김동수 교수님, 미생물학교실의 이봉기 교수님께 감사를 드립니다. 그리고 연구진행에 많은 도움을 주시고 어려운 실험과정에 직접 참여하여 주신 기생충학교실의 정경용 박사님께도 깊은 감사를 드립니다.

하늘에서 늘 지켜봐주시는 아버님과 언제나 한결같은 마음으로 기도와 격려를 아끼지 않으시는 어머님 및 가족에게 감사드리며, 이 논문을 바칩니다. 마지막으로 언제나 겸손을 가르쳐주신 하느님께 감사를 돌립니다.

저자 씀

차 례

국문요약.....	1
I. 서론.....	4
II. 재료 및 방법.....	7
1. 재료.....	7
가. 킨털가루진드기 조항원 제조	7
나. 킨털가루진드기 피부시험 시약 제조	7
2. cDNA expression library의 제조.....	7
가. 전체 RNA 및 mRNA의 분리.....	7
나. cDNA library 제작.....	8
다. In vivo excision.....	9
3. DNA sequencing.....	9
4. 재조합 항원의 발현 및 분리	10
가. Fatty acid binding protein 유전자의 발현벡터로의 subcloning.....	10
나. 재조합 알레르겐의 발현 및 분리.....	10
5. 킨털가루진드기 알레르겐의 특성 규명.....	11
가. 대상환자.....	11
나. 알레르기 항원성의 재검정.....	11
(1) ELISA 시험.....	11
(2) ELISA 억제시험.....	12

다. 통계분석.....	12
III. 결과	13
1. Expressed sequence tags의 데이터베이스의 분석.....	13
2. 긴털가루진드기의 fatty acid binding protein의 상동성.....	15
3. 대상 환자의 특성.....	19
4. 소아 환자의 피부시험	19
5. 긴털가루진드기 양성 환자의 총 IgE와 호산구.....	19
6. 긴털가루진드기 피부시험 양성결과와 혈액검사의 상관성.....	19
7. 재조합 Tyr p 13의 IgE binding과 발현.....	20
8. 재조합 Tyr p 13의 억제 시험.....	22
IV. 고찰.....	23
V. 결론.....	27
참고문헌.....	28
영문요약.....	34

그림 차례

- Fig. 1. A photo of *Tyrophagus putrescentiae*.
(100x).....6
- Fig. 2. Nucleotide and deduced amino acid
sequences of *T. putrescentiae* fatty acid
binding protein.....16
- Fig. 3. A three dimensional structural model of
Tyr p 13.....17
- Fig. 4. Amino acid sequence alignment of four
arthropod fatty acid binding proteins.....18
- Fig. 5 Purification of the recombinant Tyr p 13.
.....20

Fig. 6. IgE reactivity of human sera against *T. putrescentiae*.21

Fig. 7. IgE reactivity of human sera against recombinant Tyr p 13.21

Fig. 8. Inhibition ELISA of *T. putrescentiae* crude extract and recombinant Tyr p 13.22

Fig. 9. The taxonomic position of *T. putrescentiae*.26

표 차례

Table 1. ESTs of the <i>T. putrescentiae</i> cDNA library.....	13
Table 2. Significant matches of <i>T. putrescentiae</i> ESTs with sequences present in DNA and protein databases.....	13~14
Table 3. Expressed sequence tags(ESTs) match with allergenic clones	15

긴털가루진드기(*Tyrophagus putrescentiae*)의 Expressed Sequence Tags 분석 및 Tyr p 13의 알레르겐 항원성 규명

호흡기 알레르기에 있어 가장 중요한 흡입성 알레르겐으로 집먼지 진드기(*Dermatophagoides* 속)로 밝혀져 있으나, 최근 긴털가루진드기도 흡입성 알레르겐으로 관심을 끌고 있다. 본 연구는 긴털가루진드기의 알레르겐을 확인하고, 특성을 규명하고자 하였다. 또한 본 연구를 통해 알레르겐의 구조와 항원성(allergenicity)을 연구하는데 이용하고자 하였다.

긴털가루진드기의 전체 RNA 및 mRNA를 분리하여 cDNA library를 제작하였고 이를 이용하여 Expressed sequence tags(ESTs)를 분석하였다. 이중 fatty acid binding protein과 상동성이 있는 Tyr p 13의 재조합 항원을 발현 및 분리하였다. 긴털가루진드기의 조항원을 만들고 이것으로 대상 환자에게 피부시험을 시행하여 긴털가루진드기 항원에 양성률 보인 혈청으로 알레르기 항원성의 재검정을 위한 ELISA 시험과 ELISA 억제시험을 시행하였다.

총 대상 소아 환자 432명중 남녀비는 1.07:1의 비율이었으며 연령은 8 ± 3 세이었다. 이들 중에서 긴털가루진드기 피부시험에 양성인 소아 환자 54명의 남녀비는 26:28였으며 연령은 7 ± 1 세였다. 또한 긴털가루진드기에 양성인 성인 24명의 남녀비는 17:7였으며, 연령은 27 ± 10 세였다.

소아 환자 432명에서 12개 항원에 대한 피부시험의 양성률은 *D. pteronyssinus*(69.5%), *D. farinae*(57.8%), *B. germanica*(34.2%), *P. americana*(22.3%), cat(16.3%), *Alternaria*(15.7%), dog(12.8%), *T. putrescentiae*(12.7%), *Penicillium*(6.0%), oak(5.3%), ragweed(4.4%), alder(4.2%) 순으로 나타났다. 긴털가루진드기 피부시

혈에 양성인 소아와 성인 환자(n=78)의 피부시험 결과는 1+가 10례(12.8%), 2+가 24례(30.7%), 3+가 38례(48.7%), 4+가 6례(7.7%)였다. 피부시험 결과에서 긴털가루진드기에 양성을 보인 소아환자 54명의 총 IgE의 평균은 789.18 ± 777.56 IU/mL, 호산구는 $503.37 \pm 276.12/\text{mm}^3$ 였으며, 성인환자 24명의 총 IgE의 평균은 860.73 ± 1241.21 IU/mL, 호산구는 $512.06 \pm 310.26/\text{mm}^3$ 였다. 그러나 긴털가루진드기 양성 환자의 피부시험의 판독 결과와 총 IgE, 호산구 간에는 통계학적으로 의미 있는 연관 관계가 없었다.

긴털가루진드기의 전체 446 클론 중에 22개 클론이 fatty acid binding protein과 상동성을 이루었으며, 이 중 8개 클론이 진드기 group 13 allergen과 유사하였다. 전체 nucleotide sequence의 길이는 643으로 (Genbank accession number AY710432) open reading frame은 132개의 아미노산 단백질로 구성되었다. 단백질의 pI값은 7.22였으며 분자량은 14.57 kDa이었다. 아미노산 배열은 Aca s 13(*A. siro*)에 85.3%, Lep d 13(*B. torpicalis*)에 62.3%, Lep d 13(*L. destructor*)에 61.1%의 상동성이 관찰되었다.

재조합 Tyr p 13(recombinant Tyr p 13, rTyr p 13)은 분리에 용이하도록 짧은 N-terminal fusion protein과 함께 *E. coli*에 발현시켰다. 재조합단백질의 분자량은 18.71 kDa이다. Bradford assay에 의해서 측정된 rTyr p 13의 발현량은 5.43 mg/mL이었다. 재조합 알레르겐인 rTyr p 13은 *T. putrescentiae* 피부시험에 양성인 78명의 환자혈청 중에서 5명이 양성반응을 보였다(6.4%). *T. putrescentiae* 조항원은 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 억제 농도에서 93.6%의 최대 억제를 보였으며, rTyr p 13은 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 억제 농도에서 40.9%의 최대 억제를 보였다.

이상의 결과로 그 동안 알려진 mite group 2 알레르겐 외에 긴털가루진드기에서 Tyr p 13을 새로이 규명하였으며 그 결과 주알레르겐 연구에 도움을 줄 것으로 사료된다. 또한 rTyr p 13이 다른 진드기와 교차 항원성을 더 규명하여, 향후 긴털가루진드기 유전자 클로닝을

통한 rTyr p 13의 생산으로 진단용 시약 및 치료용 약제를 개발하는 데 기초 자료를 제공할 수 있을 것으로 판단된다.



핵심되는 말 : Allergen, ESTs, *Tyrophagus putrescentiae*, rTyr p 13

긴털가루진드기(*Tyrophagus putrescentiae*)의 Expressed Sequence Tags 분석 및 Tyr p 13의 알레르겐 항원성 규명

<지도교수 김규언>

연세대학교 대학원 의학과

김 우 경

I. 서론

알레르기 질환은 유전적 요인과 환경적 요인의 상호 작용으로 생긴다. 즉 유전적 소인이 있는 사람이 주위 환경에 여러 알레르겐에 노출되어 감작이 되고, 그 결과로 면역학적 과민반응에 의해서 알레르기 질환이 발생한다¹. 알레르겐에 대한 감작은 유전적 소인, 나이, 노출 시점, 알레르겐 노출량 등 다양한 요인에 의해 영향을 받는다². 알레르겐은 실내·외 환경에 널리 분포되어 있고 생활환경의 변화로 인하여 알레르겐으로서의 중요도도 시대에 따라 변할 수 있다³. 알레르기 질환은 생활양식의 변화, 인구의 증가, 산업발달 및 대기오염의 심화와 함께 동·서양 모두에서 증가추세에 있다^{4,5}. 즉 생활환경 중에서도 주거 환경 문화가 변화하면서 통풍의 제한으로 환기의 감소, 외부 환경과의 차단 등과 이러한 밀폐된 생활환경을 개선하기 위한 시설물 개설 등이 알레르겐의 노출 증가를 초래하여 알레르기 발생에 영향이 가중된 것으로 추정된다⁶. 알레르겐에 대한 노출의 증가는 기존에 존재하던 알레르겐의 단순한 수적인 증가뿐만 아니라 생활환경의 변화로 인하여 이전에는 문제되지 않았던 물질이 새롭게 항원성을 나타내어 감작을 일으켜 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다⁷. 기존에 그 중요성이 확인되지 않은 새로운 알레르겐이 최근에 다수 밝혀지고 있

으며 그들의 특성에 대한 연구가 많이 진행되고 있다^{8,9}.

면역학 및 분자생물학 연구를 통하여 새로운 알레르겐을 찾아내는 것은 재조합 알레르겐 및 단클론 항체의 대량생산을 가능하게 하여 새로운 진단용 시약 및 치료용 약제를 개발하는데 이용될 수 있으며, 특히 대증요법만 시행 받고 있는 환자에게 보다 나은 치료방침을 제공할 수 있기 때문에 알레르기를 전공하는 연구자에게 중요한 분야이다.

국내 가옥에서 큰다리먼지진드기(*Dermatophagoides farinae*), 세로무늬먼지진드기(*Dermatophagoides pteronyssinus*), 긴털가루진드기(*Tyrophagus putrescentiae*)의 순으로 채집되었다^{10,11}. 이 중에서 큰다리먼지진드기와 세로무늬먼지진드기는 알레르기 질환의 주요 항원으로 알려져 있다^{12,13}. 먼지진드기의 약 5~8%를 차지하는 *Acarus siro*(*A. siro*), *Glycyphagus domesticus* (*G. domesticus*), *Lepidoglyphus destructor*(*L. destructor*), *Tyrophagus putrescentiae*(*T. putrescentiae*) 등의 진드기에 대한 감각을 및 감각된 환자에서의 연구는 아직 미비한 실정이다¹⁴. 최근 긴털가루진드기(Fig. 1)도 흡입성 알레르겐으로 관심을 끌고 있다¹⁵. 긴털가루진드기를 살펴보면 저장진드기(storage mite)로써 1781년 Schrank에 의해 처음 분류되어 보고되었다¹⁶. 몸체는 긴달걀 모양이고 흰색 혹은 누런색이며 수컷의 경우 체장은 280~350 μm 이고, 암컷은 320~415 μm 이다. 가로간 홈에 의하여 몸은 앞 몸체와 뒷 몸체로 뚜렷하게 구별된다. 앞 몸체 이웃면에는 1쌍의 작은 앞 머리센털과 2쌍의 긴 등센털이 있고 뒷 몸체의 윗면에는 2쌍의 등센털과 3쌍의 매우 긴 기슴센털이 있다. 아래면 뒤 기슴에 5쌍의 크고 작은 센털이 있는데 긴 것은 몸체 길이 보다 훨씬 길다. 4쌍의 다리 가운데서 앞 몸체에 있는 2쌍의 다리는 뒤의 것보다 훨씬 크고 발등마디에 굵은 빨털이 1개씩 있다. 이들은 주로 식품 저장소나 헛간, 곡물 저장소, 건초 및 곡물 가루 내에 다량 분포하고 있는 것으로 알려져 있다¹⁸.

국내에는 긴털가루진드기에 대한 알레르기 천식환자에서 피부시험 및 RAST로 확인한 보고 외에는 항원에 대한 연구가 미비한 실정이다¹³. 구체적으로 항원을 분석하고 클로닝을 시도한 연구가 별로 없었다. 긴털가루진드기의 알레르겐을 클로닝하고 분자생물학적 특성을 규명하는 것은 항원성(allergenicity)과 감작되는 기전을 연구하는데 필수적이다.

이 연구는 긴털가루진드기의 알레르겐을 확인하고, 특성을 규명하는데 있다. 이를 위해 첫째, cDNA library를 제조하고 둘째, 긴털가루진드기의 DNA sequencing하여 재조합 항원 발현 및 분리하였다. 셋째, 호흡기 알레르기 환자를 대상으로 피부시험을 시행하고, 이들 양성인 환자에서 IgE ELISA 및 억제 ELISA 실험을 시행하여 긴털가루진드기의 항원성 및 특이성을 확인함으로써, 본 연구는 알레르겐의 구조와 항원성을 연구하는데 이용하고자 하였다.

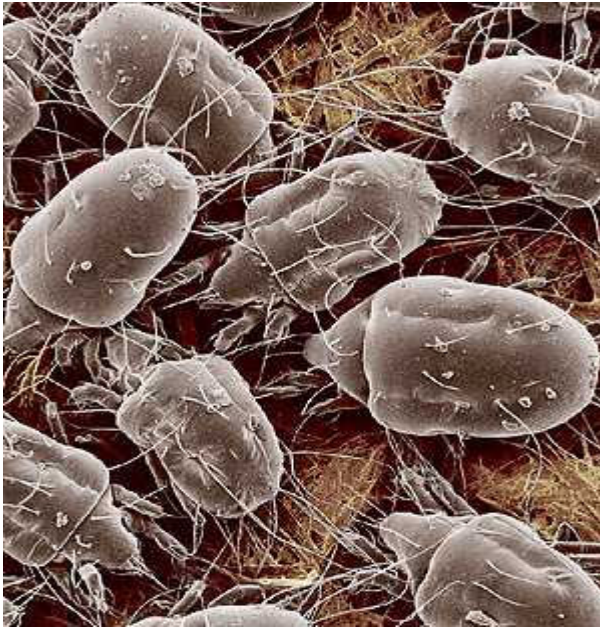


Fig. 1. A photo of *Tyrophagus putrescentiae*(100x).

II. 재료 및 방법

1. 재료

가. 긴털가루진드기 조 항원 제조

실험실에서 사육한 30 g의 긴털가루진드기를 액체질소를 이용하여 막자사발에서 분쇄하였다. 지질을 제거하기 위하여 1:1의 비율로 섞은 ethyl ether와 ethyl acetate 200 mL를 붓고 18시간 증발시켰다. 탈지한 시료를 6 mM 2-mercaptoethanol, 1/1000로 희석한 protease inhibitor set III (Calbiochem, San Diego, CA, USA)와 1 mg/mL의 1-phenyl-3-(2-thiazolyl)-2-thiourea (Sigma, St. Louis, MO, USA)가 섞인 phosphate-buffered saline, pH 7.4를 붓고 4°C에서 18시간 천천히 stirring하여 단백질을 추출하였다. 추출물을 4°C에서 10000 g으로 30분간 원심분리한 후, 상청액을 0.22 μ m filter (Millipore, Bedford, MA, USA)로 거른 후 사용할 때까지 -70°C에 보관하였다.

나. 긴털가루진드기 피부시험 시약 제조

재료 및 방법 1-가) 항의 방법으로 제조한 동결건조 조항원을 Coca 용액(0.9% NaCl, 0.25% NaHCO₃, 0.4% phenol)에 희석한 후 동량의 멸균 소독된 glycerin과 혼합하여 피부시험용 시약을 제조하여 알레르기 피부시험에 사용하였다. 피부시험에는 1:100(w/v)로 희석하여 사용하여 최종 농도는 200 μ g/mL이었다.

2. cDNA expression library의 제조

가. 전체 RNA 및 mRNA의 분리

긴털가루진드기 총체에 denaturing 용액(5 M guanidium thiocyanate, 10 mM EDTA, 2% SDS, 25 mM Tris-HCl, pH 7.6)

을 넣어 용해시킨 후, phenol/chloroform을 이용하여 단백질을 제거하였다. Isopropyl alcohol을 첨가한 후 Resin Tack을 이용하여 RNA를 침전시키고, 이를 건조하여 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 처리한 증류수에 녹여 1분간 원심 침전하여 상청액을 분리하였다. 전체 RNA 용액을 oligo-dT가 부착된 Dynabead의 Magnetic particle collection kit를 이용하여 bead와 결합한 mRNA를 모아 DEPC를 처리한 증류수에 녹여 -70℃에 보관하였다.

나. cDNA library 제작

ZAP-cDNA Synthesis kit (Stratagene, La Jolla, USA)를 이용하여 directional cloning하였으며, 방법은 제공되는 설명서를 따랐다. 위에서 기술한 바에 따라 재취 보관한 진드기의 5 μ g mRNA를 사용하여 먼저 first strand를 합성하였다. dithiothreitol(DTT), first strand methyl nucleotide mixture, linker-primer, RNase inhibitor들을 적정 농도가 되도록 넣고, poly A mRNA 5 μ g을 넣어 잘 섞은 후에, 여기에 M-MLV reverse transcriptase를 넣고 37℃에서 반응시켰다. 반응 후 first strand에 DTT, second strand nucleotide mixture, dNTP, RNase H, DNA polymerase를 넣고 16℃에서 2.5시간 반응시켜 second strand를 합성하였다. Phenol:chloroform를 첨가하고 상청액을 분리한 후 얻어진 double stranded DNA를 alcohol precipitate시켰다. Klenow fragment 및 dNTP mix를 사용하여, cDNA termini를 blunting시키고, *Eco*RI adaptors를 ligation시켰다. T4 polynucleotide kinase 및 rATP들을 섞어 *Eco*RI ends를 kination 시키고, *Xho* I으로 소화시켰다. 이렇게 준비한 cDNA를 Uni-ZAP XR vector에 T4 DNA ligase 등을 사용하여 ligation시켰다. Gigapack II Gold packaging extract를 사용하여 *in vitro* packaging시켰다. XL 1-Blue MRF' bacteria를 숙주 세포로 길러 plating과 titering에 사용하였다.

다. In vivo excision

ZAP Express vector에 있는 phagemid를 분리하기 위하여 숙주 세포 SOLR과 ExAssist helper phage를 이용하여 *in vivo* excision을 수행하였다. 3차 screening을 통하여 최종적으로 분리된 phage (1×10^5 pfu/mL) 250 μ L를 XL1-Blue MRF' (O.D. $_{600}$ = 1.0) 200 μ L와 1 μ L의 ExAssist helper phage (1×10^6 pfu/mL)에 섞어서 15분간 37°C에서 반응시켰다. 3 mL의 NZY broth를 첨가한 뒤 3시간 동안 배양하여 excision이 일어나도록 하였다. 그 다음 70°C에서 20분간 열처리한 후 원심분리 (1,000 g, 15분)를 하여 상청액 100 μ L를 취한 다음 100 μ L의 SOLR (O.D. $_{600}$ = 1.0)과 섞어 15분간 37°C에 배양하여 형질전환시켰다. 300 μ L의 NZY broth를 첨가한 후 37°C에서 45분간 더 배양하여 그 중 50 μ L를 LB/ampicillin (50 μ L/mL) agar plate에 고르게 폈다. 16시간 배양하여 생성된 colony에서 다시 plasmid를 추출하여 재조합 DNA의 크기를 확인한 후 *E. coli*에 다시 형질전환하여 이후의 실험에 사용하였다.

3. DNA sequencing

형질전환된 *E. coli*에서 plasmid를 QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)를 이용하여 얻은 후 제한효소 *EcoR* I 과 *Xho* I 으로 37°C에서 1시간 절단 후 cDNA insert 크기를 1% agarose gel에 전기 영동하여 확인하였다. 염기서열 결정은 dideoxy chain termination 방법을 기초로 한 ThermoSequenase kit (Amersham Life Science, Cleveland, OH, USA)와 Long ReadIR 4200 DNA sequencer (LI-COR, Lincoln, NE, USA)를 사용하였으며, insert에 대해 5'과 3'양쪽으로 동시에 시행하였다¹⁸. Sequencing primer로는 T3 (5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3')와 T7

(3'-CGGGATACCACTCAGCATAATG-5')을 사용하였다. 5 µg의 plasmid DNA를 ssDNA로 변성시킨 후 각각의 primer를 상보적인 DNA에 결합시켰다. 이를 상온에서 약 5분간 [³⁵S]dATP로 표지화시키고 각각의 dideoxy NTP가 들어있는 tube에 옮겨 37°C에서 5분간 반응시켰다. 각각의 반응산물을 6% polyacrylamide gel에 전기 영동한 후 X-ray film에 감광시켜 판독하였다. 판독한 DNA 염기서열 자료는 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)를 사용하여 GenBank, EMBL의 database들과 비교하여 유전자의 유사성과 특성을 분석하였다.

4. 재조합 항원의 발현 및 분리

가. Fatty acid binding protein 유전자의 발현벡터로의 subcloning

RT-PCR을 수행하여 pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA)에 클로닝한 후, *Eco*RI 제한 효소를 처리하여 expression vector인 pET 28b (Novagen, Madison, WI, USA)에 삽입하였다.

나. 재조합 알레르겐의 발현 및 분리

Subcloning한 plasmid를 *E. coli* BL21에 형질 전환하여 과발현을 유도하였다. 50 µg/mL의 kanamycin을 포함한 LB broth에 37°C에서 배양하다가 OD₆₀₀ 값이 0.5일 때 1 mM isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 첨가하고 5시간 더 배양한 후 bacteria를 모았다. 2 L 배양하여 sonicator로 1분씩 5회 sonication 한 다음 10,000 g에서 1시간 원심 분리하여 상청액을 모았다. 6 M urea 용액으로 insoluble fraction을 추출하고, 이후에도 6 M urea를 포함하는 용액을 이용하여 단백질을 분리하였다. 20 mM imidazole 용액으로 평형시킨 4 mL의 Ni-nitrilotriacetic agarose resin (Qiagen)과 20분 동안 상온에서 shaking하며 결합시

킨 후, 60 mM imidazole 용액으로 세척하고 250 mM imidazole 용액 3 mL로 elution하였다. 이렇게 얻은 용액을 phosphate buffer, pH 7.4로 투석하고 정량하여 사용하였다.

5. 긴털가루진드기 알레르겐의 특성 규명

가. 대상 환자

2003년 12월부터 2004년 7월 31일까지 연세대학교 세브란스병원 알레르기 클리닉 또는 인제대학교 서울 백병원 소아과에 내원하여 천식, 알레르기 비염, 아토피피부염 등 알레르기 질환으로 진단된 환자는 소아환자 432명과 성인 24 명을 대상으로 긴털가루진드기 제조항원(재료 및 방법 1-나)과 *D. pteronyssinus*, *D. farinae*, *Alternaria tenuis*, *Penicillium*, *Blattella germanica*, *Periplaneta americana*, cat, dog, alder, oak, ragweed 총 12가지 항원(Torii. Co, Ltd, Tokyo, Japan)을 사용하여 알레르기 피부시험을 실시하였다. 판정은 Vanselow의 기준에 의하여 팽진이 5 mm 이상인 경우는 4+, 3~5 mm인 경우는 3+, 2~3 mm이고 홍반이 21 mm이하인 경우는 2+, 2 mm이하이고 홍반이 21 mm이하인 경우는 음성으로 분류하였다¹⁹. 대조군으로는 histamine과 생리식염수를 사용하였다.

피부시험 결과에서 긴털가루진드기에 양성인 환자의 혈청 3 mL을 -70°C에 보관하였다.

나. 알레르기 항원성의 재검정

1) ELISA 시험

재조합 알레르겐을 microtiter plate well에 200 ng씩 coating 하고, 1:4로 희석한 환자혈청은 50 μ L/well과 1시간 반응, 1% bovine serum albumin과 0.05% Tween 20을 포함한 PBS에 1: 1000으로 희석한 biotinylated goat anti-human IgE (1:1000, Vector)와 1시간 반응시킨 후, 1:1000으로 희석한 streptavidin-peroxidase

(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 차례로 30분 반응한 후, 3, 3', 5, 5'-tetramethyl-benzidine(TMB; Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA)을 기질로 이용하여 발색반응을 수행하였다. 두 번의 반복 실험하였으며, 정상인 혈청의 평균 + 2SD(표준편차)를 기준으로 이용하였다.

2) ELISA 억제시험

20 µg/mL의 농도의 조항원을 100 µL씩 microtiter plates에 coating하였다. 다양한 농도로 희석한 재조합 항원과 재조합 양성혈청을 상온에서 2시간, 4°C에서 overnight반응시킨 후 ELISA 반응을 시행하였다. 1:1000으로 희석한 biotinylated goat anti-human IgE(Vector)에 1시간, 1:1000으로 희석한 streptoavidin-peroxidase(Sigma)를 차례로 30분 반응한 후, TMB(Kirkegaard & Perry Laboratories)을 기질로 이용하여 발색반응을 수행하였다.

다. 통계분석

환자의 혈액 검사, 피부시험, 환자의 특이 IgE 검사간에 통계학적 처리를 SPSS 10.0 프로그램을 이용하여 *t*-test를 실시하였으며, *p*값이 0.05이하인 경우 의미 있는 것으로 해석하였다.

III. 결과

1. Expressed sequence tags(ESTs)의 데이터베이스의 분석

전체 446 클론 중에 56개는 기존에 알려진 클론이 없었고, 8개는 sequencing 되지 않았다(Table 1). 반면에 382개는 기존에 알려진 아미노산 encoding sequence와 상동성을 보였으며, 이러한 상동성을 보인 22개 클론의 분석은 Table 2와 같다.

Table 1. ESTs of the *T. putrescentiae* cDNA library

EST match category	Clones
Match	382
No match	56
Not correct	8
Total	446

Table 2. Significant matches of *T. putrescentiae* ESTs with sequences present in DNA and protein databases *

No.	EST	Species	Putative identificaiton	e-value
21	Fatty acid-binding protein	<i>Blomia tropicalis</i>	Allergen Blo t 13,	2.00E-58
22	Troponin C	<i>Anopheles gambiae</i>	troponin I isoform a2 [<i>Drosophila pseudoobscura</i>]	7.00E-24
28	Hypothetical protein CBG01480	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	cysteine proteinase [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	1.00E-13
41	Fatty acid-binding protein	<i>Drosophila melanogaster</i>	adipocyte fatty acid-binding protein [Sus scrofa]	2.00E-08
58	Fatty acid-binding protein	<i>Blomia tropicalis</i>	Allergen Blo t 13,	1.00E-58
89	Troponin C	<i>Tachypleus tridentatus</i>	Cockroach group 6	3.00E-47
115	Putative cysteine proteinase CG12163 precursor	<i>Drosophila melanogaster</i>	cysteine proteinase [<i>Dermatophagoides farinae</i>] Group 1	2.00E-62

No.	EST	Species	Putative identificaiton	e-value
161	protein for MGC:75969	<i>Silurana</i>	cathepsin B precursor	2.00E-42
174	tropomyosin	<i>tropicalis</i> <i>Dermatophagoid</i> <i>-es farinae</i>	[<i>Araneus ventricosus</i>] mite group 10	2.00E-75
186	Serine protease	<i>Anopheles</i>	Delta tyrpsin [<i>Drosophila</i>	0.002
188	glutathione S	<i>gambiae</i>	<i>erecta</i>], mite group 3	4.00E-33
242	transferase-1 thiol protease	<i>Culicoides</i> <i>variipennis</i> <i>Phaedon</i>	group 8 cysteine protease	1.00E-26
259	α -tubulin	<i>cochleariae</i> <i>Lepidoglyphus</i>	[<i>Arabidopsis thaliana</i>] allergen Lep d 21,	1.00E-83
360	arginine kinase	<i>destructor</i> <i>Callinectes</i> <i>sapidus</i>	Possible allergen; Pen m 2 [<i>Panaeus monodon</i>], Plo i 1	1.00E-12
366	lysosomal thiol reductase IP30 precursor	<i>Mus musculus</i>	Immunity	0.14
433	CG31305-PJ	<i>Drosophila</i>	Fatty acid-binding protein	3.00E-08
445	Fatty acid-binding protein (Allergen Lep d 13)	<i>melanogaster</i> <i>Lepidoglyphus</i> <i>destructor</i>	(Allergen Lep d 13) Fatty acid-binding protein (Allergen Lep d 13)	4.00E-40
472	Fatty acid-binding protein (Allergen Blo t 13)	<i>Blomia tropicalis</i>	Fatty acid-binding protein (Allergen Blo t 13)	2.00E-58
479	(Allergen Blo t 13)	<i>Blomia tropicalis</i>	Fatty acid-binding protein (Allergen Blo t 13)	2.00E-58
485	Serine protease	<i>Drosophila</i>	CUB-serine protease	6.00E-11
513	glutathione S-transferase	<i>melanogaster</i> <i>Mus musculus</i>	[<i>Panulirus argus</i>] Group 8	3.00E-20
606	Troponin C	<i>Anopheles</i> <i>gambiae</i>	troponin I isoform a2 [<i>Drosophila</i> <i>pseudoobscura</i>]	2.00E-18

* Matches were sorted into functional categories, and only representative match is given.

2. 긴털가루진드기의 fatty acid binding protein의 상동성

전체 클론 중에서 22개 클론이 다른 기준에 알려진 알레르겐과 상동성을 이루었으며, 이 중 8개 클론이 mite group 13 allergen과 유사하였고, 그 중에서 6개가 open reading frame이 확인되는 full-length의 clone이었다(Table 3).

Table 3. Expressed sequence tags(EST) match with allergenic clones

Allergen	Biochemical identity	Clone	
		s(n=2 2)	EST numbers
Tyr p 13	Fatty acid binding protein	8	21*, 41, 58*, 366*, 433 [†] , 445*, 472*, 479*
Tyr p 1	Cysteine protease	4	28, 115*, 161, 242
Tyr p 3	Serine protease	2	186*, 485
Tyr p 8	Glutathione-S-transferase	2	188, 513
Tyr p 10	Tropomyosin	1	174
Tyr p 20	Arginine kinase	1	360
-	α -tubulin	1	259*
-	Troponin C	3	89, 22, 606

* Full-length, [†]Partial-length

전체 nucleotide sequence의 길이는 643이다(Genbank accession number AY710432). 이것은 59 bp, 184 bp의 5' noncoding region과 396 bp의 3'-untranslated region 및 open reading frame이 포함되었다. 이 open reading frame은 132개의 아미노산 단백질로 구성되며, 단백질은 농전점 (isoelectrical point, pI) 값이 7.22인 14.57 kDa이었다 (Fig. 2).

```

-59  GGCCAAATC GATCTCGACT TTTTCGGTCT TTCACCACCC CCTCAAAC TA AACCCCTCACC
   1  ATGGTTC AAC TGAACGGCTC CTACAAGCTC GAGAAGAGCG ACAACTTTGA TGCCTTCCTC
      M V Q L N G S Y K L E K S D N F D A F L      20
   61  AAGGAACTCG GCGTCAACTT TGTGACCCGA AACCTCGCCA AGTCGGCCAG CCCACCGTG
      K E L G V N F V T R N L A K S A S P T V      40
  121  GAGGTGATCG TCGACGGCGA CAGCTACACC ATCAAGACCA GCTCCACGCT GAAGAACAGC
      E V I V D G D S Y T I K T S S T L K N S      60
  181  GAGATCAAGT TCAAGCTGGG CGAGGAGTTC GAGGAGGACC GCGCCGACGG CAAGAAGGTG
      E I K F K L G E E F E E D R A D G K K V      80
  241  CAGACTCGG TCACCAAGGA GGGCGACAAC AAGCTGGTGC AGGTGCAGAA GGGCGACAAG
      Q T S V T K E G D N K L V Q V Q K G D K      100
  301  CCGGTGACCA TTGTGCGGGA GTTCAGCGAG GAGGGCCTCA CCGTCACCGC CACCGTCAAC
      P V T I V R E F S E E G L T V T A T V N      120
  361  GCGGTACCT CGGTGCGATT CTACAAGCGC CAGTAAACAG AATGAACAGA ACAAAAAATT
      G V T S V R F Y K R Q ***      131
  421  CTCCTCACAT TCCGGTAGAT TACTGTTC A CTGITTACCA TAAAAACAAC CCCACACCA
  481  CCAAGATCTT CTGAAAATCC AATTTTTCAT CTATCTATCA ATCAGTTAAT TTTGATTGGC
  541  TAATAAATAA TTTATTGCAC TTCAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA

```

Fig. 2. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *T. putrescentiae* fatty acid binding protein. The estimated molecular weight is 14.57 kDa, and the estimated isoelectrical point was 7.22.

PROSITE program에 의하여 5-22 위치에서 cytosolic fatty acid binding protein이 존재하고, 5-7 위치에 potential N-glycosylation site가 있다. Nucleotide residues 542 와 548 사이에 putative polyadenylation signal를 찾을 수 있다(Fig. 3).

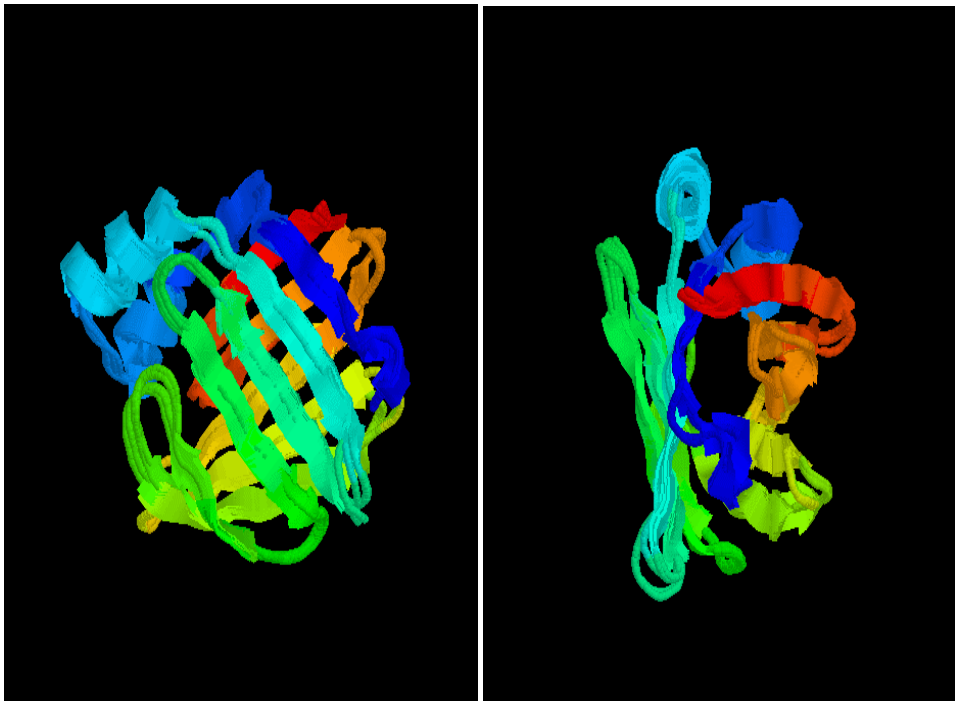


Fig. 3. A three dimensional structural model of Tyr p 13. Clustal W multiple sequence alignment program was used to select and align the sequence before modeling. Structural prediction was done using the software ExPASy (<http://www.expasy.org/swissmod/>)

아미노산 배열은 Aca s 13(*A. siro*)과 85.3%, Blo t d 13(*B. torpicalis*)과 62.3%, Lep d 13(*L. destructor*)과 61.1%의 상동성이 관찰되었다(Fig. 4). 이런 상동성을 보인 아미노산 배열이 group 13 mite 항원과의 높은 연관성으로 때문에 항원 명명법에 의하여 Tyr p 13로 명명하였다²⁰.

```
Tyr p 13  MVQLNGSYKLEKSDNFDAFLKELGVNFVIRNLAKSASPTVEVIVDGDSTYTIKTSSTILKNS 60
Aca s 13  —.I.....L.....T.....S.N.....A....T 58
Lep d 13  .ANIA.Q...D..E...Q..DK...G.LVKTA..TVK..L..A...T.IFRSL..F..T 60
Blo t 13  .P-IE.K.....K..D...G.MVKTA..TLK..L..D.Q..T.VFRSL..F..T 59
```

```
Tyr p 13  EIKFKLGEEFEEDRADGKIKVQTSVIKEGDNKLVQVQKGDKPVTIVREFSEEGTLVTATVN 120
Aca s 13  ..S.....A....T.K.V.N..S.T.F...Q...E.....D..... 118
Lep d 13  .....R.K.VIV.D...F..T.Y...E.KV...KGDEVE...S.D 120
Blo t 13  .....R.K.V.N.....FI.T.Y...E.K...D.QGDDVV...S.G 119
```

```
Tyr p 13  GVTSVRFYKRQ 131 <100.0%>
Aca s 13  ..... 129 <85.3%>
Lep d 13  .....P...A 131 <61.1%>
Blo t 13  D....T...I 130 <62.3%>
```

Fig. 4. Amino acid sequence alignment of four arthropod fatty acid binding proteins: Aca s 13 (*Acarus siro*, accession number AJ006774), Lep d 13 (*Lepidoglyphus destructor*, accession number Q9U5P1), Blo t 13 (*Blomia tropicalis*, accession number Q17284). A dot indicates amino acid identity with *T. putrescentiae* and the percentage of each sequence identity is given in parentheses.

3. 대상 환자의 특성

총 대상 소아 환자 432명중 친식은 358명, 알레르기비염은 325명, 아토피피부염은 17명, 두드러기는 6명이었고, 두 가지 이상의 질환이 동반된 경우가 318명이었다. 이들 소아환자의 남녀비는 223:209였으며 연령은 8.4 ± 3.2 세(3세 3개월 ~ 15세 8개월)이었다. 대상자 중에서 긴털가루진드기 피부시험에 양성인 소아 환자 54명은 남녀비는 26:28였으며 연령은 7.3 ± 1.5 세(3세 3개월 ~ 11세)였다. 또한 긴털가루진드기에 양성인 성인은 24명의 남녀비는 17:7였으며, 연령은 27.4 ± 10.5 세 (18 ~ 60세)였다.

4. 소아 환자의 피부시험

소아 환자 432명에서 12개 항원에 대한 피부시험의 양성률은 *D. pteronyssinus*(69.5%), *D. farinae*(57.8%), *B. germanica*(34.2%), *P. americana*(22.3%), cat(16.3%), *Alternaria*(15.7%), dog(12.8%), *T. putrescentiae*(12.7%), *Penicillium*(6.0%), oak(5.3%), ragweed(4.4%), alder(4.2%) 순으로 나타났다.

소아 및 성인의 피부시험 결과 중에서 긴털가루진드기 항원만 살펴보면 1+가 10례(12.8%), 2+가 24례(30.7%), 3+가 38례(48.7%), 4+가 6례(7.7%)였다.

5. 긴털가루진드기 양성 환자의 총 IgE와 호산구

소아환자 54명의 총 IgE의 평균은 789.18 ± 777.56 IU/mL, 호산구는 $503.37 \pm 276.12/\text{mm}^3$ 였으며, 성인환자 24명의 총 IgE의 평균은 860.73 ± 1241.21 IU/mL, 호산구는 $512.06 \pm 310.26/\text{mm}^3$ 였다.

6. 긴털가루진드기 피부시험 양성결과와 혈액검사의 상관성

긴털가루진드기 양성 환자의 피부시험 판독 결과와 총 IgE, 호산구 간에는 통계학적 의의가 없었다(자료 제시하지 않음).

7. 재조합 Tyr p 13의 IgE binding과 발현

재조합 Tyr p 13(recombinant Tyr p 13, rTyr p 13)은 분리에 용이하도록 short N-terminal fusion protein (MGSSHHHHHHSSGLV-HSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRDPNSL)과 함께 *E. coli*에 발현시켰다. 그 결과 재조합단백질의 분자량은 18.71 kDa이다(Fig. 5).

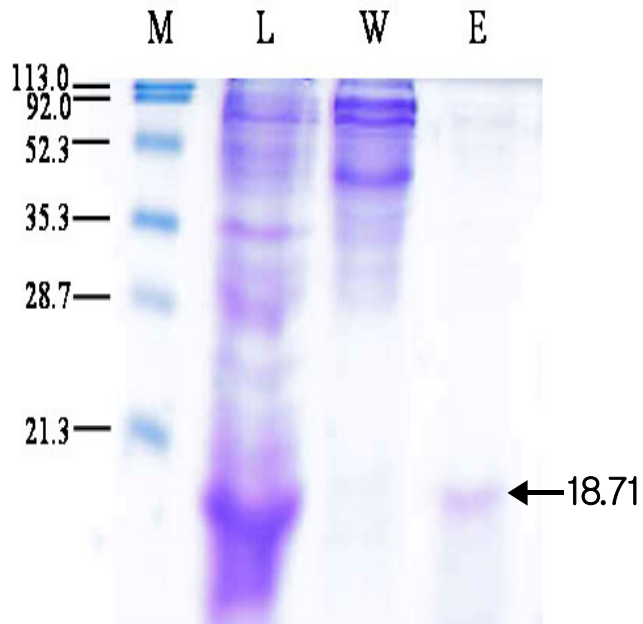


Fig. 5. Purification of the recombinant Tyr p 13. Proteins were separated under reducing conditions on 15% acrylamide gels and stained with Coomassie brilliant blue. Lanes: M, MW markers in kDa ; L, total cell lysate of *E. coli* BL21 cells bearing rTyr p 13 after IPTG induction ; W, fraction washed from the column; E, fraction eluted

Bradford assay에 의해서 재조합 Tyr p 13의 발현량은 5.432 mg/mL으로 측정되었다. 조항원에 대한 환자 혈청의 IgE 반응을 확인하였다 (Fig 6).

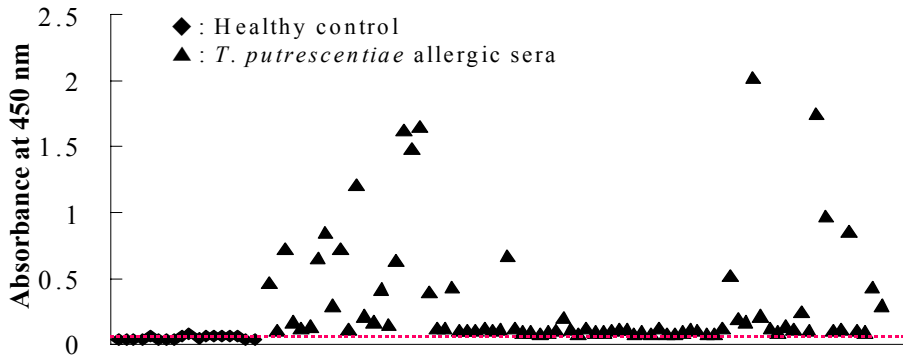


Fig. 6. IgE reactivity of human sera against *T. putrescentiae* crude extract. The dotted line indicates a cut-off value.

재조합 알레르겐인 rTyr p 13은 *T. putrescentiae* 피부시험 양성인 78명의 환자혈청 중에서 5명이 양성반응을 보였다(6.41%)(Fig. 7).

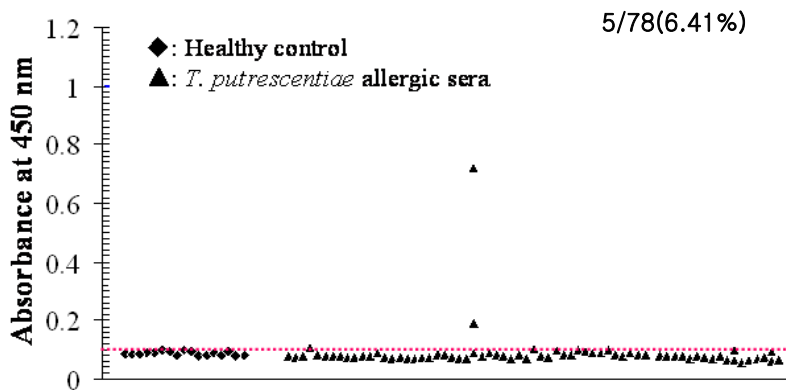


Fig. 7. IgE reactivity of human sera against recombinant Tyr p 13. The dotted line indicates a cut-off value.

8. 재조합 Tyr p 13의 억제 시험

5명의 환자 혈청 중에서 제일 높게 측정된 환자 혈청 1명에서 *T. putrescentiae* 조항원은 10 $\mu\text{g/mL}$ 억제 농도에서 93.6%의 최대 억제를 보였으며, 재조합 Tyr p 13은 10 $\mu\text{g/mL}$ 억제 농도에서 40.9%의 최대 억제를 보였다(Fig. 8).

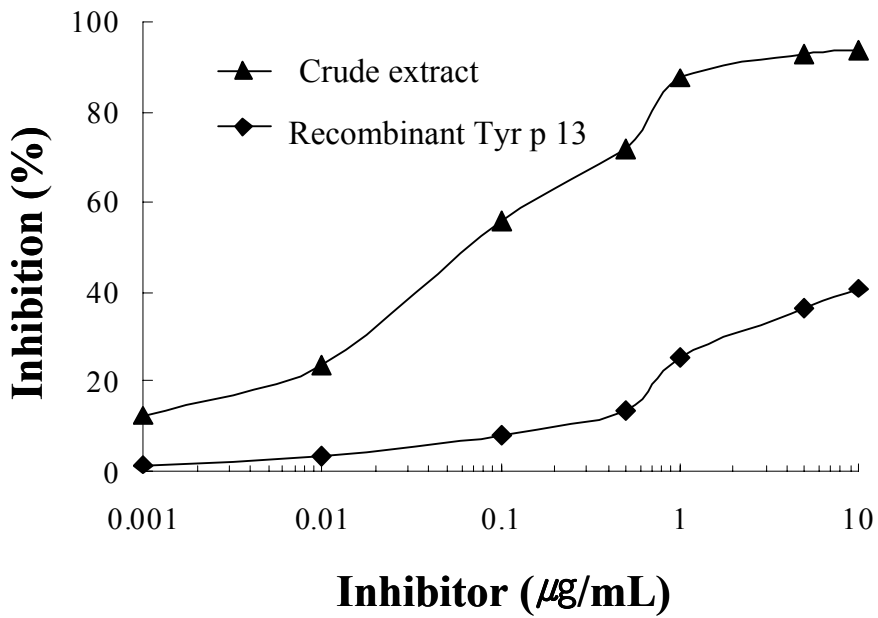


Fig. 8. Inhibition ELISA of *T. putrescentiae* crude extract and recombinant Tyr p 13.

IV. 고찰

진드기는 그 종류가 다양할 뿐만 아니라 기후나 지역에 따라서 그 분포 양상도 매우 다양하다. 세계적으로 가옥 내 우점종은 주로 pyroglyphid 진드기인 *D. pteronyssinus*와 *D. farinae* 이며²¹, 남반구나 열대 지방에서는 non-pyroglyphidae인 *Blomia* spp. 등이 보다 많은 것으로 알려져 있다^{22,23}. 또한 도시지역은 pyroglyphid 진드기가 농촌지역에 비해 많다²⁴. 국내 보고에서도 가옥 내 먼지에서 *D. farinae*(60.7%), *D. pteronyssinus*(21.4%)에 이어서 *T. putrecentiae*(7.1%) 순으로 조사되었다¹¹. 이들은 주로 건조 곡물, 사료 등의 저장 창고나 가축우리, 밀가루 등에서 주로 발견된다^{25,26}. 국내에서는 서울 지역 저장 식품 및 그 주위 환경에서 *T. putrecentiae*와 *A. siro*를 포함한 12종의 진드기류가 채취되었으며, 긴털가루진드기는 습기가 많은 지역의 가옥이나 식료품 상점 등에서도 높게 분포하였다²⁷.

저장진드기의 알레르겐에 대한 사례가 보고 되었는데, 그 중에서 기관지 천식이 있는 환자에서 곡물 가루로 시행한 기관지 유발시험에 양성인 환자의 곡물 가루 속에서 *Glycophagus destructor*를 발견하므로 인해, 저장진드기가 원인 알레르겐의 가능성을 보고하였다²⁸. 또한 농촌지역에서 건조와 곡물에 다량 노출된 기관지 천식 환자에서 *Tyroglyphus longior* 추출액을 이용한 기관지 유발시험에서 양성인 예가 보고 되었고, 이로 인하여 농촌지역의 곡물 취급자들에 있어서의 기관지 천식의 원인 알레르겐으로 저장진드기의 중요성이 강조되고 있다²⁹.

본 연구에서 소아 환자에게 시행한 피부시험에서 *D. pteronyssinus*, *D. farinae*, *B. germanica*, *P. americana*, cat, *Alternaria*, dog, *T. putrescentiae*, *Penicillium*, oak, ragweed, alder의 순으로 양성반응을 나타내었으며, 이들 중 *T. putrescentiae*는 12.7%의 감작율을 보였다. Warren 등은 저장진드기에 대한 피부시험에서 기관지 천식 환자의

4~12%의 낮은 감작율을 보고하고 있으나³⁰, 다른 보고자에 의하면 72례의 호흡기 알레르기 환자들에서 피부시험 결과 *L. destructor*(79.2%), *G. domesticus*(76.4%), *A. siro*(72.2%), *T. putrescentiae*(70.8%)에 대한 높은 양성률을 보고하면서, 습기 찬 주택에 거주하거나 정미소에서 일하는 경우, 농부들에 있어서 감작율이 높았다고 하였다³¹. 국내 농촌지역에서는 *D. farinae*(31.2%), *T. putrescentiae*(30.8%), *D. pteronyssinus*(29.9%), cockroach(25.0%) 등의 감작율이 높았다는 보고도 있다³². 지금까지 보고에서는 주로 농촌 거주자 및 성인에서 실시되어 왔다. 그러나 본 연구에서는 대상 환자가 소아가 주를 이루어 곡물 가루 등에 노출이 적었을 것으로 보이며, 또한 대부분 곡물 가루 등에 노출이 적은 도시거주자 이어서 다른 보고에 비해 감작률이 낮았을 것으로 추정된다.

저장진드기의 성분 분석에서 사용한 fatty acid binding protein은 *Fasciola hepatica*, *Schistosoma japonica*, *Schistosoma mansoni* 등의 기생충에서 처음 밝혀졌다³³⁻³⁵. 그리고 처음 알레르기와 연관된 fatty acid binding protein은 *Ascaris suum* size의 ABA-1에서 기술되었다³⁶. 본 연구에서 긴털가루진드기의 전체 클론 중에서 22개 클론이 다른 기준에 알려진 알레르겐과 상동성을 이루었으며, 이들로는 8개 클론이 먼지진드기 group 13 allergen(Tyr p 13), Tyr p 1, Tyr p 3, Tyr p 8, Tyr p 10, Tyr p 20 등에서 상동성을 보였다. ABA-1와는 상동성이 높지 않았으나, 먼지진드기 group 13인 fatty acid binding protein과 상동성을 보였다³⁷. 따라서 본 연구에서는 현재까지 보고가 적었던 Tyr p 13으로 연구를 시행하였다.

지금까지는 먼지진드기 알레르겐에 대한 보고에서는 주로 집먼지진드기의 group 1과 2를 주 알레르겐으로 보고 되었다. 기존 연구에서는 긴털가루진드기와의 교차반응을 보기 위해서 Tyr p 2의 연구가 주를 이루었다³⁸. 그러나 *D. farinae*와 *D. pteronyssinus*는 먼지진드기 group 13의 특성이 아직 규명되지 않아서 본 연구에서 Tyr p 13과 *D. farinae*와

*D. pteronyssinus*간의 교차반응은 조사할 수 없었다. 반면, *L. destructor*(Lep d 2), *T. putrescentiae*(Tyr p 2), *D. pteronyssinus*(Der p 2) 등 이들은 아미노산 서열이 잘 보존되어 있고 서로 교차 반응을 일으키는 것으로 알려져 있어서, 이들과 비교하여 보면 Lep d 2(*L. destructor*)와 Tyr p 2(*T. putrescentiae*)는 43%, Lep d 2와 Der p 2는 37%, Tyr p 2와 Der p 2는 40%에서 상동성이 있다고 보고되어 있다⁸. 이렇게 상동성을 보이는 이유로는 긴털가루진드기는 저장진드기로써 주형강(class Arachnida)중에서 가장 인간 생활과 관계 깊은 목(order)의 Acari, 아목(suborder)의 Astigmata, 과(family)의 Acaridae에 속하기 때문으로 생각할 수 있다³⁹. 다른 보고에서는 긴털가루 진드기의 체부(body)와 배지(주로 분변)내에 각각 20개와 18개의 항원, 그리고 5개의 알레르겐을 밝혀낸 바 있으며, 이들 저장진드기 사이의 교차반응은 주로 동일한 과(family) 사이에는 강하나 다른 과(family) 사이에는 미약하다는 보고도 있다⁴⁰.

SDS-PAGE와 immunoblotting으로 밝혀진 긴털가루진드기 추출물의 전체 분자량 범위는 16~33 kDa이다. 이중에서 16 kDa이 주요 알레르겐으로 80% 다른 진드기와 RAST에서 교차반응을 일으키는 것으로 보고되고 있다⁴¹. 본 연구에서는 전체 분자량이 14.57 kDa이었으며, 재조합 Tyr p 13은 18.71 kDa으로 측정되었으며, 긴털가루진드기 알레르겐의 교차항원성을 확인한 결과에서 Aca s 13(*A. siro*)에 85.3%, Blo t 13(*B. torpicalis*)에 62.3%, Lep d 13(*L. destructor*)에 61.1%의 상동성을 보였다. 이러한 상동성은 진드기의 계통유연관계와 일치한다(Fig. 9).

알레르겐은 수십개의 항원성분을 가진 단백질 복합체로 구성되어 있다. 단백질 구성 성분 중 IgE 항체 반응을 일으키는 부분이 알레르겐이며, 이를 증명하기 위해서 억제 시험을 실시하는데 이 때 50% 이상 되어야 한다⁴². 그러나 본 연구에서 억제시험에서 강한 IgE 항체 반

응을 보인 환자 1명에서만 40.9%를 보였는데, 이는 환자군이 농촌이 아닌 도시거주자로 인하여 IgE 항체 반응이 낮았을 것으로 추정된다.

이상의 결과로 그 동안 알려진 먼지진드기 group 2외에 새롭게 긴털가루진드기에서 주알레르겐 연구에 도움을 줄 것이며, 하지만 본 연구에서 대상 환자군이 긴털가루진드기에 대한 양성률이 높은 농촌 거주자가 아닌 도시거주자들이며 성인보다 소아에서 시행하므로 인하여 양성률이 낮았을 것으로 추정할 수 있다. 향후 농촌거주자에서의 긴털가루진드기의 양성률 및 이들에게 특이 IgE을 규명하는 것이 필요할 것으로 사료되며, 본 연구가 향후 긴털가루진드기 유전자 클로닝을 통한 재조합 알레르겐의 생산으로 진단용 시약 및 치료용 약제를 개발하는데 기초 자료를 제공할 수 있을 것으로 판단된다.

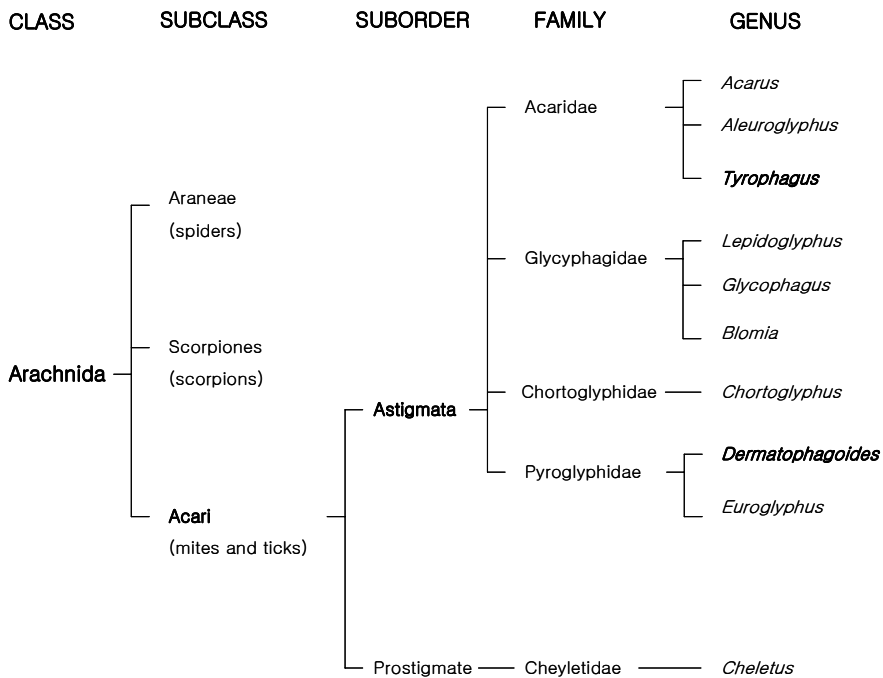


Fig. 9. The taxonomic position of *Tyrophagus putrescentiae*.

V. 결론

알레르기질환에서 알레르겐의 노출시기, 노출량 등은 매우 중요하며, 이전 국내 보고에서 가옥 내 먼지에서 *Tyrophagus putrescentiae*가 3번째로 많이 분포하며 알레르기 질환을 유발시킬 수 있는 알레르겐으로 이들의 특성을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 알레르기 피부시험에서 *T. putrescentiae*는 12.7%의 감작율을 보였다.
2. *T. putrescentiae* 양성 환자의 피부시험의 판독 결과와 총 IgE, 호산구 간에는 통계학적 의의가 없었다.
3. 전체 446 클론(clones) 중에 22개 클론이 다른 기준에 알려진 알레르겐과 상동성을 이루었으며, 이 중 8개 클론이 먼지진드기 group 13 allergen과 유사하였다.
4. *T. putrescentiae* 알레르겐의 교차항원성을 확인한 결과 Aca s 13(*A. siro*)에 85.3%, Blo t 13(*B. torpicalis*)에 62.3%, Lep d 13(*L. destructor*)에 61.1%의 상동성을 보였다.
5. *Tyrophagus putrescentiae*의 단백질은 농전점 값이 7.22이었으며, 분자량은 14.57 kDa이었다. 재조합 Tyr p 13의 분자량은 18.71 kDa으로 측정되었다.
6. *T. putrescentiae* 조항원은 10 µg/mL 억제 농도에서 93.6%의 최대 억제를 보였으며, 재조합 Tyr p 13은 10 µg/mL 억제 농도에서 40.9%의 최대 억제를 보였다

이상의 결과로 그 동안 알려진 먼지진드기 group 2외에 새롭게 긴털가루진드기에서 Tyr p 13이 주알레르겐 연구에 도움을 줄 것으로 사료된다. 또한 재조합 Tyr p 13이 다른 진드기와 교차 항원성을 더 규명하여, 향후 *T. putrescentiae* 유전자 클로닝을 통한 재조합 Tyr p 13의 생산으로 진단용 시약 및 치료용 약제를 개발하는데 기초 자료를 제공할 수 있을 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Boulet LP, Turcotte H, Laprise C, Lavertu C, Bedard PM, Lavoie A, *et al.* Comparative degree and type of sensitization to common indoor and outdoor allergens in subjects with allergic rhinitis and/or asthma. *Clin Exp Allergy* 1997;27:52-59.
2. Gergen PJ, Turkeltaub PC, Kovar MG. The prevalence of allergic skin test reactivity to eight common aeroallergens in the U.S. population: results from the second National Health and Nutrition Examination Survey. *J Allergy Clin Immunol* 1987;80:669-679.
3. Brown CW, Hawkins L. Allergy prevalence and causal factors in the domestic environment: results of a random population survey in the United Kingdom. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999;83:240-244.
4. Polosa R. Prevalence of atopy and urban air pollution: dirty business. *Clin Exp Allergy* 1999;29:1439-1441.
5. 강영모, 허영구, 최귀애, 김향재, 김능수. 알레르기 병력이 없는 한국인에 있어서의 피부단자시험 성적. *알레르기* 1989;9:378-384.
6. Ledford DK. Indoor allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1994;94:327-334.
7. Platts-Mills TA. How environment affects patients with allergic disease: indoor allergens and asthma. *Ann Allergy* 1994;72:381-384.
8. Gafvelin G, Johansson E, Lundin A, Smith AM, Chapman MD, Benjamin DC, *et al.* Cross-reactivity studies of a new group 2 allergen from the dust mite *Glycyphagus domesticus*, Gly

- d 2, and group 2 allergens from *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Lepidoglyphus destructor*, and *Tyrophagus putrescentiae* with recombinant allergens. J Allergy Clin Immunol 2001;107:511-518.
9. Curtis L, Lee BS, Cai D, Morozova I, Fan JL, Scheff P, *et al.* Pigeon allergens in indoor environments: a preliminary study. Allergy 2002;57:627-631.
 10. Jeong KY, Lee IY, Lee HI, Ree HI, Hong CS, Yong TS. Effectiveness of health education for the control of house dust mites and cockroaches in Seoul, Korea. Med Vet Entomol in press.
 11. Ree HI, Jeon SH, Lee IY, Hong CS, Lee DK. Fauna and geographical distribution of house dust mites in Korea. Korean J Parasitol 1997;35:9-17.
 12. Verhoeff AP, Van Strien RT, Van Wijnen JH, Brunekreef B. House dust mite allergen (Der p I) and respiratory symptoms in children: a case-control study. Clin Exp Allergy 1994;24:1061-1069.
 13. 박해심, 강신욱, 홍천수. *Tyrophagus putrescentiae*에 대한 피부반응도 및 RAST에 관한 연구. 알레르기 1988;8:118-124.
 14. Pollart SM, Platts-Mills TA. Mites and mite allergy as risk factors for asthma. Ann Allergy 1989;63:364-365.
 15. Cuthbert OD, Brostoff J, Wraith DG, Brighton WD. 'Barn allergy': asthma and rhinitis due to storage mites. Clin Allergy 1979;9:229-236.
 16. 조백기. 한국의 집먼지진드기에 관한 연구. 가톨릭대학 의학 논문집 1980;33:407-421.
 17. Olsen AR. Regulatory action criteria for filth and other

- extraneous materials. II. Allergenic mites: an emerging food safety issue. Regul Toxicol Pharmacol 1998;28:190-198.
18. Tabor S, Huber HE, Richardson CC. *Escherichia coli* thioredoxin confers processivity on the DNA polymerase activity of the gene 5 protein of bacteriophage T7. J Biol Chem 1987;262:16212-16223.
 19. Vanselow NA. Skin testing and other diagnostic procedures. In Sheldon JM, Lovell RG, Pathew KP eds. A manual of Clinical Allergy 2nd ED., Philadelphia and London, W.B. Saunders Co. 1967:55-77.
 20. King TP, Hoffman D, Lowenstein H, Marsh DG, Platts-Mills TAE, Thomas W. Allergen nomenclature. Int Arch Allergy Immunol 1994;105:224-223.
 21. Platts-Mills TA, Thomas WR, Aalberse RC, Vervloet D, Chapman MD. Dust mite allergens and asthma: report of a second international workshop. J Allergy Clin Immunol 1992;89:1046-1060.
 22. Hurtado I, Parini M. House dust mites in Caracas, Venezuela. Ann Allergy 1987;59:128-130.
 23. Fernandez-Caldas E, Fox RW, Bucholtz GA, Trudeau WL, Ledford DK, Lockey RF. House dust mite allergy in Florida. Mite survey in households of mite-sensitive individuals in Tampa, Florida. Allergy Proc 1990;11:263-267.
 24. 이완구, 조백기. 집먼지진드기류의 생태학적 연구. 대한피부과학회지 1984;22:286-294.
 25. Terho EO, Leskinen L, Husman K, Karenlampi L. Occurrence of storage mites in Finnish farming environments. Allergy 1982;37:15-19.

26. van Hage-Hamsten M, Johansson E, Wiren A, Johansson SGO. Storage mites dominate the fauna in Swedish barn dust. *Allergy* 1991;46:142-146.
27. 이원구, 최원영. 한국산 진드기류의 분류학적 연구. *기생충학잡지* 1980;18:119.
28. Davies RJ, Green M, Schofield NM. Recurrent nocturnal asthma after exposure to grain dust. *Am Rev Respir Dis* 1976;114:1011-1019.
29. Ingram CG, Jeffrey IG, Symington IS, Cuthbert OD. Bronchial provocation studies in farmers allergic to storage mites. *Lancet* 1979;2:1330-1332.
30. Warren CP, Holford-Strevens V, Sinha RN. Sensitization in a grain handler to the storage mite *Lepidoglyphus destructor*. *Ann Allergy* 1983;50:30-33.
31. Wraith DG, Cunnington AM, Seymour WM. The role and allergenic importance of storage mites in house dust and other environments. *Clin Allergy* 1979;9:545-561.
32. 이재영. 대전지역의 알레르기 클리닉을 방문한 환자에서 긴털가루진드기의 감염률. *천식 및 알레르기* 2002;22:703-710.
33. Rodriguez-Perez J, Rodriguez-Medina JR, Garcia-Blanco MA, Hillyer GV. *Fasciola hepatica*: Molecular cloning nucleotide sequence and expression of a gene encoding a polypeptide homologous to *Schistosoma mansoni* fatty acid binding protein. *Exp Parasitol* 1992;74:400-407.
34. Becker MM, Kalinna BH, Waine GJ, McManus DP. Gene cloning, overproduction and purification of a functionally active cytoplasmic fatty acid-binding protein (Sj-FABPC) from the human blood fluke *Schistosoma*. *Gene* 1994;148:321-325.

35. Tendler M, Brito CA, Vilar MM, Serra-Freire N, Diogo C, Almeida MS, *et al.* A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:269-273.
36. Spence HJ, Moore J, Brass A, Kennedy MW. A cDNA encoding repeating units of the ABA-1 allergen of *Ascaris*. Mol Biochem Parasitol 1993;57:339-344.
37. Madsen P, Rasmussen H, Leffers H, Honore B, Celis J. Molecular cloning and expression of a novel keratinocyte protein (psoriasis-associated fatty acid-binding protein [PA-FAB]) that is highly up-regulated in psoriatic skin and that shares similarity to fatty acid-binding proteins. J Invest Dermatol 1992; 99: 299-305.
38. Eriksson TL, Johansson E, Whitley P, Schmidt M, Elsayed S, van Hage-Hamsten M. Cloning and characterisation of a group II allergen from the dust mite *Tyrophagus putrescentiae*. Eur J Biochem 1998;251:443-7.
39. Olsson S, van Hage-Hamsten M. Allergens from house dust and storage mites: similarities and differences, with emphasis on the storage mite *Lepidoglyphus destructor*. Clin Exp Allergy 2000;30:912-919.
40. Arlian LG, Geis DP, Vyszynski-Moher DL, Bernstein IL, Gallagher JS. Cross antigenic and allergenic properties of the house dust mite *Dermatophagoides farinae* and the storage mite *Tyrophagus putrescentiae*. J Allergy Clin Immunol 1984;74:172-179.
41. Johansson E, Johansson SG, Van Hage-Hamsten M. Allergenic

- characterization of *Acarus siro* and *Tyrophagus putrescentiae* and their crossreactivity with *Lepidoglyphus destructor* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. Clin Exp Allergy 1994;24:743-751.
42. Sehon AH. Heterogeneity of allergenic extracts and of the antibody response in allergic patients. Dev Biol Stand 1975;29:1-25.

Abstract

Analysis of Expressed sequence tags from *Tyrophagus putrescentiae* and allergenic characterization of Tyr p 13

Woo Kyung Kim

Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Kyu-Earn Kim)

Storage mite is one of the important causes of allergic disorders. Fifteen allergenic components were demonstrated by SDS-PAGE and immunoblotting. so far only group 2 allergen, Tyr p 2, has been cloned and characterized from *Tyrophagus putrescentiae*. In this study, we tried to identify and characterize new allergens from *T. putrescentiae*, which is a dominant species of storage mites in Korea.

Expressed sequence tags (ESTs) were analyzed to investigate the allergens of the storage mites. A clone with cDNA sequence encoding a protein homologous to fatty acid binding protein, mite group 13 allergen, was identified, which was named Tyr p 13. The deduced amino acid sequence shows 61.1-85.3% identity with other mite group 13 allergens.

The recombinant protein was expressed in *Escherichia coli* using pET 28b vector system and its allergenicity was investigated by ELISA. The recombinant allergen was reacted with 5/78 (6.41%) by *T. putrescentiae*-positive sera. It inhibited 40.9% of IgE binding to crude extract at an inhibitor concentration of 10 g/mL by inhibition ELISA using serum from a patient who showed the strongest reaction by ELISA

In this study, Tyr p 13 was found to be minor allergens, however, it may be different in farmers, who were reported to have a high prevalence of storage mite sensitization. A novel allergen from *T. putrescentiae* has been identified and it may be used help more precise diagnosis. It could be helpful for more detailed characterization of storage mite allergy.



Key Words : Allergen, ESTs, *Tyrophagus putrescenti*, rTyr p 13