

## Immunoblot technique을 이용한 폐흡충의 발육단계별 항원 특이성 분석

고려대학교 의과대학 기생충학교실 및 열대풍토병연구소

주경환 · 홍성철 · 정명숙 · 임한중

**요 약** : 폐흡충증의 진단은 객담검사법이 가장 확실한 진단 방법이지만 폐흡충이 폐에 기생한 경우에도 총란 검출이 어려울 때가 있으므로 혈청학적 진단법이 이용되고 있다. 혈청학적 진단법에 사용되는 항원인 기생충 추출물, 즉 조항원은 분류학적으로 유사한 기생충과 서로 공유하고 있는 공통 항원 때문에 교차 반응을 일으키는 경우가 있다. 이 연구는 발육단계별 폐흡충에서 만든 조항원을 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)로 전기영동한 다음 EITB(enzyme-linked immunoelectrotransfer blot)를 이용하여 항원대별 항원성 및 특이성을 관찰하여 시기별로 채취한 고양이 혈청에 대한 특이 반응을 관찰해 보고자 시행하였다. 실험에 사용한 항원은 실험적으로 고양이에 감염시켜 3, 5, 8 및 12주 만에 얻은 폐흡충의 식염수 추출액(SEP<sub>n</sub>; n=감염된 시기)이며 3~20% linear gradient gel에서 SDS-PAGE하였다.

Silver stain 결과 폐흡충 조항원은 최소한 30개 이상의 band들로 구성되어 있었는데 각 발육단계에 공통된 항원대로 203, 63, 35, 21, 19, 13 kDa band들이 관찰되었고, 단계별로 차이점도 관찰되었다. SEP<sub>12</sub>에서는 새로운 229 kDa band가 관찰되었다. 주요 항원대에 대하여 EITB를 한 결과 각 항원과 감염 후 5주 이상 된 혈청과 공통적으로 반응한 항원대는 203, 115, 91, 85, 67, 63, 48, 39, 35 및 25 kDa band들이었고, 8주 이상 된 혈청과의 반응에서는 19, 13 및 10 kDa 항원대와 공통적으로 일관성 있게 반응하였다. SEP<sub>12</sub>는 12주 된 혈청과 229 kDa에서 특이하게 반응하였다.

**Key words:** *Paragonimus westermani*, SDS-PAGE, EITB, antigenic protein, cat

### 서 론

폐흡충증의 진단은 환자의 객담에서 총란을 검출하는 방법이 확실한 진단법으로 간주되고 있으나 이소기생의 경우 객담검사 만으로는 진단이 불가능하므로 혈청학적 진단 방법으로 이 문제를 보완할 수 있다. 즉 객담검사법이 가장 확실한 진단 방법이지만 폐흡충이 폐에 기생한 정상 기생의 경우에도 객담검사의 민감도 자체가 그다지 높은 것이 아니므로 이 경우에도 혈청학적 진단법은 방사선학적 검사와 더불어 현증 진단에 도움이 되는 경우가 많다.

Yokogawa *et al.* (1962)은 보체결합반응을 이용하여 폐흡충증 환자의 치료 후 항체가를 측정한 바 5개월에서 12개월 사이에 음성으로 전환한다는 사실을 밝혀 내어 현증 진단 및 치유 판정에 유용하게 사용할 수 있다고 하였다. 이 후 한천이중확산법(Yogore *et al.*, 1965; 李 등, 1970; 崔 및 李, 1981), 간접형광항체법(崔 등, 1975; Cho and Soh, 1976), 효소면역측정법(Cho *et al.*, 1981; 金 등, 1982; 崔 등, 1985; Soh *et al.*, 1985; 李 및 張, 1986) 등의 혈청학적 진단법이

개발되어 집단검사에 있어서 screening test로 쓰이는 피내반응과 더불어 널리 이용되고 있다.

그런데 항원으로 사용하는 기생충의 추출물, 즉 粗抗原은 분류학적으로 유사한 기생충과 서로 공유하고 있는 공통 항원 때문에 교차 반응을 일으키는 경우가 많다(Hunter *et al.*, 1958; Sadun *et al.*, 1959; 朱 및 金, 1965; Hillyer *et al.*, 1983). 그 결과 혈청학적 검사법의 특이도가 낮아지고 위양성 반응의 빈도가 많아져 검사의 신뢰도를 낮추는 원인이 되어 왔다.

이를 개선하기 위하여 항원을 정제하여 감수성과 특이성이 모두 높은 폐흡충 항원을 분리해 내려는 연구가 여러 학자들에 의해 시도되었으나(Sadun *et al.*, 1959; 朱 및 金, 1965; 金 등, 1983; 崔 등, 1986), 총체를 구성하고 있는 단백질의 조성이 매우 복잡하여 특이 항원만을 완벽하게 분리한다는 것이 불가능하였다. 대체로 부분정제된 항원의 가장 큰 문제점은 항원성 자체는 비교적 높으나 복잡한 정제 과정을 거치는 동안 항원가는 점차 저하되고 다량의 粗抗原을 사용하여 극히 미량의 항원만 남기 때문에 실용성도 없다는 데에 있다.

이와 같은 항원 정제상의 문제점을 보완할 수 있는

방법으로서 Towbin *et al.* (1979)이 처음 사용하기 시작한 electrotransfer blot에 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 결합시킨 enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB, western blot)은 SDS-PAGE의 강한 분해력과 ELISA의 민감성을 동시에 이용한 기법으로서 조항원의 각 분획에 대한 각종 혈청의 반응을 육안적으로 확인할 수 있어 특히 항원대 및 공통 항원대, 교차 반응 등을 구별할 수 있다 (Tsang *et al.*, 1983; 朱 등, 1987).

본 연구에서는 발육단계별 폐흡충 조항원을 SDS-PAGE로 전기영동한 다음 EITB를 이용하여 항원대별 항원성 및 특이성을 관찰하여 시기별로 채취한 고양이 혈청에 대한 특이 반응대를 관찰해 보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 항 원

전남 고흥에서 잡은 가재 (*Cambaroides similis*)에서 폐흡충 피낭유충을 분리하여 고양이에 경구 투여하고 3주, 5주, 8주 및 12주 후에 부검하여 발육단계별 폐흡충을 회수하였다. 이들 각각의 충체를 생리식염수와 증류수로 여러 차례 세척하여 냉동 건조시켰다. 냉동 건조된 충체 0.3g을 인산완충액 (pH 7.2) 10 ml당 SBTI (soybean trypsin inhibitor) 10 mg이 함유된 인산완충액 5 ml에 녹여 glass homogenizer에 넣은 다음 마쇄하였다. 마쇄된 액을 10,000 rpm에서 60분간 원심 분리한 후 상청액을 얻어 항원 (SEP: saline extract of *P. westermani*)으로 사용하였다.

단백질 함량은 3주 (SEP<sub>3</sub>), 5주 (SEP<sub>5</sub>), 8주 (SEP<sub>8</sub>) 및 12주 (SEP<sub>12</sub>) 된 항원에 있어서 각각 0.45 mg/ml, 0.96 mg/ml, 0.91 mg/ml 및 2.43 mg/ml이었다.

### 2. 혈 청

본 실험에 사용된 혈청은 감염 후 3주, 5주, 8주, 12주 및 16주 된 고양이 혈청과 감염되지 않은 고양이 혈청이었다.

### 3. ELISA

Voller *et al.* (1979)과 McLaren *et al.* (1978)의 방법을 약간 수정한 梁 등 (1983)의 방법을 사용하였다. 혈청 희석 배율은 1:200, 항원의 단백질 함량은 5.0 µg/ml이 되게 하여 사용하였다. Conjugate는 peroxidase-conjugated IgG fraction goat anti-cat IgG (Cappel)를 1:2,000으로 희석하여 사용하였고 Dynatech Lab.의 micro-ELISA reader로 흡수 광량을 측정하였다.

### 4. SDS-PAGE

SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)는 Tsang *et al.* (1983)과 같은 방법으로 실시하였다. Gel은 Pharmacia Fine Chemicals의 160×220×0.8 mm의 vertical system을 사용하였다.

항원 재료는 pH 8.0의 urea를 넣은 Tris 완충 용액으로 희석하여 SDS의 최종 농도를 2.5%가 되게 한 다음 여기에 각 항원 재료를 0.4 µg/µl 되게 하여 사용하였고 sample application 직전에 65°C 항온 수조에서 30분간 denature시켰다. Tracking dye로는 bromophenol blue를 재료 200 µl당 10 µl가 되게 하였다. 재료는 3.0~20.0%의 linear gradient gel (40% T, 1% C)과 3% stacking gel을 이용하여 stacking gel에서는 10 mA, resolving gel에서는 20 mA로 하여 tracking dye가 모두 resolving gel의 맨 밑에 올 때까지 약 2.5~3시간 전기영동하였다. Sample application의 양은 10 µl/lane이 되게 하였으며 염색은 Merrill *et al.* (1981)의 silver stain법으로 하였다. 전 과정에서 molecular weight marker는 Bio-Rad Lab.의 high and low molecular weight SDS-PAGE marker와 Bethesda Research Lab.의 pre-stained marker를 사용하였다.

### 5. EITB

SDS-PAGE로 분리된 단백질 분획을 Tsang *et al.* (1983)의 방법에 따라 nitrocellulose paper (NC paper)에 blot 시켰다. 이를 요약하면 다음과 같다.

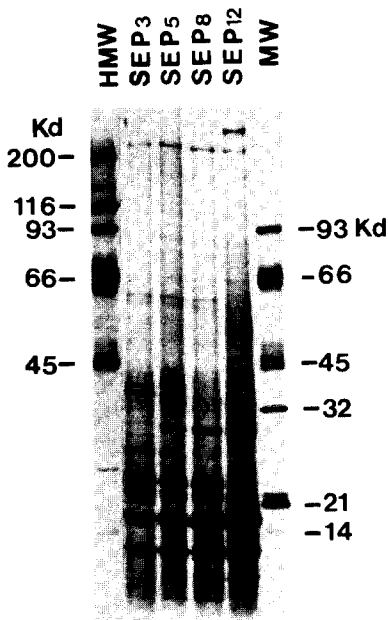
SDS-PAGE로 분해된 단백질 분획의 EITB (enzyme-linked immunoelectrotransfer blot)는 Bio-Rad Lab.의 transblot cell을 이용하여 250 Vdc constant (current = 0.5~2.0A)로 1시간 동안 실시하였다. NC paper는 0.5 cm 간격으로 잘라서 Bio-Rad Lab.의 slotted incubation tray에 넣고 PBS-3% Tween 20액으로 1:200 희석한 고양이 실험 혈청을 넣어 rotary shaker에서 overnight시켰다. 항원대와 부착한 항체는 ELISA법으로 확인하였으며 이 과정 중 conjugate는 peroxidase-conjugated IgG fraction goat anti-cat IgG (Cappel)를 1:2,000으로 희석하여 사용하였고 부착된 peroxidase는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 넣은 침전성 chromogenic substrate인 3-3'-diaminobenzidine (Sigma)으로 발색시켰다.

## 실 험 성 적

### 1. 발육단계별 폐흡충 조항원의 단백질 분획

Fig. 1에 SDS-PAGE와 silver stain으로 얻은 발육단계별 폐흡충 조항원의 단백질 분획 구성을 제시하였다. 이들 각 항원은 최소한 30개 이상의 band를 나타내는 복잡한 구성을 갖고 있었다. 진하게 염색되는 공통된 항원대는 6개로서 203, 63, 35, 21, 19, 13 kDa의 분자량을 갖는 분획이었으며, 그 밖에 미세한 작은 band들도 있었다.

각 항원은 서로 약간의 차이를 나타내는데 SEP<sub>3</sub>에서는 분자량이 31 kDa인 분획을 갖는 band는 나타나지 않았으며, 분자량이 10 kDa인 분획은 SEP<sub>3</sub>과 SEP<sub>5</sub>에서 약하게 염색되었다. 분자량이 39 kDa인 분획은 SEP<sub>8</sub>과 SEP<sub>12</sub>에서 미약하게 염색되었으며, 분자량이 28 kDa인 분획은 SEP<sub>8</sub>과 SEP<sub>12</sub>에서는 나타나지 않았



**Fig. 1.** Silver-stained SDS-PAGE of saline extract antigen(SEP) of *P. westermani*. (SEP<sub>3</sub>: antigen prepared from *P. westermani* worms collected from the cat at 3 weeks after infection, SEP<sub>5</sub>: at 5 weeks of infection, SEP<sub>8</sub>: at 8 weeks of infection, SEP<sub>12</sub>: at 12 weeks of infection, HMW: high molecular weight marker, LMW: low molecular weight marker, Kd, kDa: kilodaltons)

다. SEP<sub>12</sub>에서는 25 kDa의 분자량을 갖는 분획이 약하게 염색되었고, 다른 항원에서는 볼 수 없는 229 kDa 분자량 분획이 염색되었다.

**2. ELISA 성적**

발육단계별 폐흡충 항원에 대하여 감염 3주, 5주, 8주, 12주 및 16주 된 고양이 혈청과의 반응을 ELISA로 살펴보면 Table 1과 같다. 즉, 각 항원에 대한 같은 감염 시기인 혈청과의 반응은 차이가 없었으며(감염 12주 된 혈청과의 반응에서 보면 각 조항원에 대하여 1.274, 1.270, 1.272, 1.242의 absorbance value를 나타냄), 감염 시기별로 보면 항체가 증가하는 현상을 나타내었다(SEP에 대해서 0.229에서 1.211로 증가).

**3. EITB 성적**

발육단계별 항원의 항원대(major protein band)를 편의상 본 논문에서는 A~T까지로 나누었다(Table 2). SEP<sub>3</sub> 항원에 감염 3주, 5주, 8주 및 12주 된 고양이 혈청을 반응시킨 결과 17개 band에서 양성 반응을 나타내었는데, 3주에서는 B, D, E, I, P, Q band에서 양성 반응을 나타내었고, 5주에서는 R, S, T band에서만 양성을 나타내었으며 8주 및 12주에서는 같은 항원대에서 양성 반응을 보였다. SEP<sub>5</sub> 항원에 대해서도 17개

**Table 1.** Chronological change of absorbance value of ELISA using crude antigen of *P. westermani* collected from cats at 3, 5, 8 and 12 weeks after infection

Cat serum collected at	Absorbance values for			
	SEP <sub>3</sub> *	SEP <sub>5</sub>	SEP <sub>8</sub>	SEP <sub>12</sub>
uninfected	0.254	0.213	0.218	0.229
3 weeks	0.786	0.698	0.723	0.630
5 weeks	1.247	1.217	1.219	1.004
8 weeks	1.244	1.265	1.250	1.159
12 weeks	1.274	1.270	1.272	1.242
16 weeks	1.237	1.257	1.260	1.211

\* SEP: saline extract antigen of *P. westermani*

band에서 양성 반응을 나타내었는데 SEP<sub>3</sub>에서의 반응 양상과 거의 비슷하나 J band가 모두 음성 반응을 한 것이 차이점이었다.

SEP<sub>8</sub> 항원에 대해서는 16개 band에서 양성 반응을 나타내었는데 3주 된 혈청에서는 6개의 band(D, E, G, H, P 및 Q)에서, 5주 된 혈청에서는 11개의 band에서, 8주에서 B band가 음성인 것을 제외하고는 12주 된 혈청과 같은 항원대에서 양성 반응을 보였다.

SEP<sub>12</sub> 항원에 대해서는 19개 band에서 양성 반응을 나타내었는데 3주 된 혈청에서는 50 kDa 이하 band에서는 반응을 하지 않았으며 5주 된 혈청에서도 21 kDa 이하 band에서 음성을 나타내었다. 또 8주와 12주 된 혈청은 거의 비슷한 양상을 나타내었으나 12주 된 혈청에서만 229 kDa는 특이하게 반응하였다(Fig. 2).

이상의 결과에서 보면 발육단계별 항원에 대해서 감염 3주 된 혈청은 약한 반응이 나타났으며 8주부터는 거의 같은 양상을 나타내었다. SEP<sub>12</sub>에 대하여 12주 혈청과의 반응은 229 kDa에서 특이하게 반응하고 있음을 알 수 있었다.

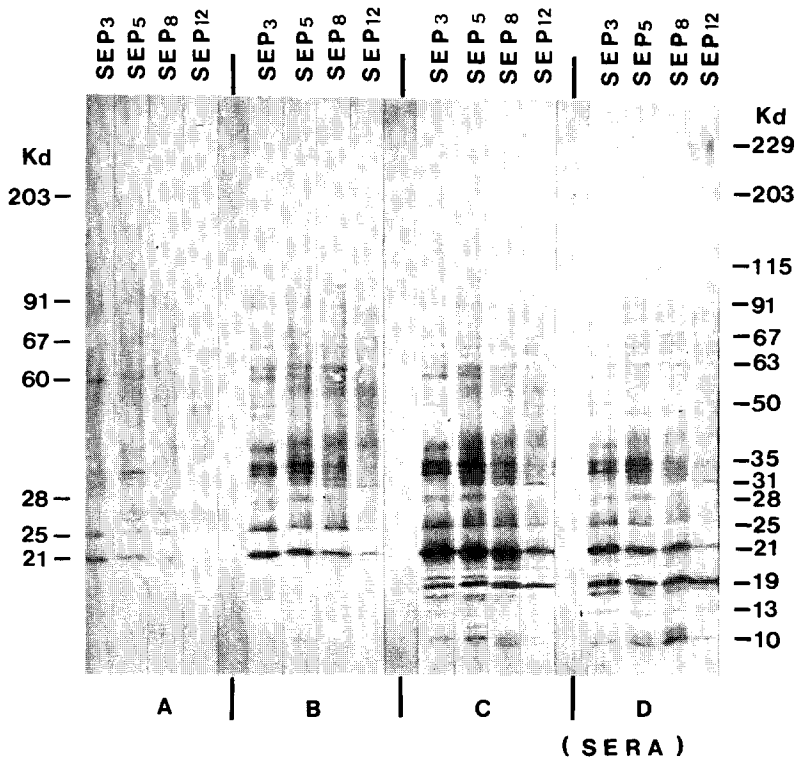
**고 찰**

폐흡충증은 아직도 우리나라에서 흔히 볼 수 있는 기생충 질환 중의 하나로서 객담이나 대변에서 총란 발견이 쉽게 되지 않으므로 혈청학적 진단법의 적용이 매우 필요한 질환이라고 할 수 있다. 최근에 폐흡충증의 진단에 많이 이용되고 있는 ELISA는 민감도와 재현성에 있어서 탁월한 장점들을 지니고 있으나 다른 기생충 질환 감염자의 혈청과 교차 반응 또는 비특이성 반응에 따라 민감도 및 특이도에 영향을 받고 있다(金 등, 1982; 崔 등, 1984). Towbin *et al.* (1979)이 처음 사용하기 시작하여 각종 질환의 진단에도 이용되기 시작한 EITB(enzyme-linked immunoelectrotransfer blot, western blot)는 탁월한 SDS-PAGE의 분해력과 blotting, 그리고 ELISA의 민감성을 결합시

**Table 2.** Antigen-antibody reactions against major antigen bands in chronologically prepared *P. westermani* antigen (SDS-PAGE and EITB)

Antigen	Cat serum (week)	Antigen bands in kDa																			
		A 229	B 203	C 130	D 115	E 91	F 85	G 67	H 63	I 60	J 50	K 48	L 39	M 35	N 31	O 28	P 25	Q 21	R 19	S 13	T 10
SEP <sub>3</sub> **	3	N*	+	N	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	
	5	N	+	N	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	
	8	N	+	N	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	
	12	N	+	N	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
SEP <sub>5</sub>	3	N	+	N	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	
	5	N	+	N	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
	8	N	+	N	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	12	N	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
SEP <sub>8</sub>	3	N	-	N	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	N	+	+	-	-	-	
	5	N	-	N	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	N	+	+	-	-	-	
	8	N	-	N	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	N	+	+	+	+	+	
	12	N	+	N	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	N	+	+	+	+	+	
SEP <sub>12</sub>	3	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	N	-	-	-	-	-	
	5	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	N	+	+	-	-	-	
	8	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	N	+	+	+	+	+	
	12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	N	+	+	+	+	+	

\* N: No antigen bands found



**Fig. 2.** Antigen-antibody binding patterns of sera from experimental cats against chronologically prepared *P. westermani* antigen. (Sera were collected at A: 3 weeks after infection, B: 5 weeks after infection, C: 8 weeks after infection, D: 12 weeks after infection)

킨 방법으로서 교차 반응의 유무와 특이 항원 및 공동 항원대를 일견해서 볼 수 있는 검사법이다(Tsang et al., 1983).

본 실험에서는 발육단계별 폐흡충 조항원의 항원성을 알아보고자 SDS-PAGE 및 EITB를 실시하였다. SDS-PAGE의 결과를 보면 각 항원 거의 비슷하나 SEP<sub>3</sub>에서는 31 kDa band가 나타나지 않았으나 SEP<sub>5</sub>, SEP<sub>8</sub> 및 SEP<sub>12</sub>에서는 나타났으며, SEP<sub>8</sub>과 SEP<sub>12</sub>에서는 28 kDa band가 나타나지 않았고, SEP<sub>12</sub>에서는 229 kDa band가 생성되는 등 시기별 항원이 약간의 차이가 있음을 보였다.

Huer et al. (1985)은 disc-PAGE를 실시하여 총체의 발육 시기에 따라 항원의 성상이 다르다는 것을 밝힌 바 있다. Payares et al. (1985)은 *S. mansoni* surface antigen의 단백질 성상이 성숙 단계별로 변한다고 하였으며 Choi et al. (1981)도 *C. sinensis*의 발육 단계에 있어서 band들이 사라지는 경우가 있다고 하였다. 李(1986)와 李 및 張(1986)의 실험에서 나타난 성적을 보면 총 22개의 확인된 band들 중 육안으로 density가 높은 주 분획은 27,600, 17,400~14,800, 11,500 dalton 등의 분획이었으며 대부분 30,000 dalton 이하의 분자량을 갖고 있다고 하였다. Joo et al. (1989)의 실험에서도 10 kDa에서 245 kDa 사이에 26개 이상의 확인된 band들 중 229, 112, 91, 85, 67, 65, 60 kDa를 비롯하여 50~45 kDa 사이에 6개의 섬세한 band들, 41 kDa, 36~18 kDa 사이에 8개의 band들, 17, 15, 11 및 10 kDa의 분자량을 갖는 band들 등이었다고 하였다.

본 실험의 SEP<sub>12</sub> 항원에서 10 kDa부터 229 kDa 사이에 약 30개의 band를 확인할 수 있었던 것과 약간의 차이는 있으나 대체로 결과가 서로 일치하는 것으로 생각된다. 崔 등(1986)의 SDS-PAGE 성적과도 방법상의 차이에 따라 약간의 상이점은 있으나 일부 같은 결과를 보이고 있다. 본 실험에서 ELISA의 결과를 보면 감염 시기에 따라 혈청의 항체가가 상승하였는데 발육단계별 항원에 대한 같은 감염 시기 혈청의 항체가가 거의 변화가 없었다.

EITB 결과를 보면 ELISA의 결과와 마찬가지로 각 항원에 대해서 같은 감염 시기의 혈청과 반응을 시켰을 때 거의 일치하였다. SEP<sub>3</sub> 항원에 대하여 감염 시기별 혈청을 반응시키면 감염 3주 혈청에서 반응하는 특이 항원대는 6개의 band들(B, D, E, I, P 및 Q)인데, 5주, 8주 및 12주로 가면서 특이 항원대 band의 수가 늘어난다. 이것은 ELISA에서 감염 시기가 경과함에 따라 혈청의 항체가가 증가하는 것과 같은 양상이라 하겠다.

SEP<sub>5</sub> 및 SEP<sub>8</sub> 항원에 대하여도 거의 같은 결과이었다. SEP<sub>12</sub>에서는 감염 3주, 5주 및 8주된 혈청과 반응하는 항원대와는 달리 12주 된 혈청에서 229 kDa band가 특이하게 반응하였다. Joo et al. (1989)의 실험

에서는 폐흡충증 환자 혈청과 반응하는 229, 91, 60, 50, 35~31, 27, 25, 21, 17, 11 및 10 kDa의 항원대가 일관성이 있다고 하였다.

이상의 결과로 보아 각 발육단계별 폐흡충 조항원은 ELISA를 실시함에 있어서는 같은 항원성이 나타났음을 알 수 있었고, SEP<sub>12</sub> 항원은 감염 후 12주된 혈청과 229 kDa에서 특이하게 반응하므로 12주 이전의 초기 감염 진단에 유용하다고 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Cho, K.M. and Soh, C.T. (1976) Indirect fluorescent antibody techniques for the serodiagnosis of paragonimiasis and clonorchiasis. *Yonsei Rep. Trop. Med.*, 7:26-37.
- Cho, S.Y., Hong, S.T., Rho, Y.H., Choi, S. and Han, Y.C. (1981) Application of micro-ELISA in serodiagnosis of human paragonimiasis. *Korean J. Parasit.*, 19(2):151-156.
- 崔鉉吉·李駿商·林漢鍾(1984) 肺吸蟲症 診斷에 있어서 ELISA법의 應用에 關한 研究. 高麗醫大論文集, 21(1):33-40.
- 崔源永·劉載乙·南皓祐·崔亨洛(1986) 肺디스토마 (*Paragonimus westermani*) 感染 고양이 血清에 對한 ELISA 抗體價의 意義. 기생충학잡지, 24(2):177-186.
- 崔源永·李玉蘭(1981) 實驗的 肺吸蟲症의 寒天沈降反應. 기생충학잡지, 19(2):101-108.
- 崔源永·李元求·李玉蘭(1975) 間接螢光抗體法에 의한 肺디스토마症의 診斷法 研究. 기생충학잡지, 13(2):152-158.
- Choi, W.Y., Jin, Y.K., Lee, O.R. and Kim, W.G. (1981) Analysis of protein components at various stages of *Clonorchis sinensis*. *Korean J. Parasit.*, 19:8-17.
- 朱 一·金基昇(1965) 디스토마 抗原의 精製에 關한 研究 第1報. 肺디스토마 抗原의 精製. 가톨릭大學 醫學部論文集, 9:153-158.
- Hillyer, G.V. and Serrano, A.E. (1983) The antigens of *Paragonimus westermani*, *Schistosoma mansoni* and *Fasciola hepatica* adult worms; Evidence for the presence of cross reactive antigens of *Paragonimus westermani*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 32(2):350-358.
- Huer, B., Kim, S.I., Kang, S.Y. and Cho, S.Y. (1985) Electrophoretic patterns of proteins from *P. westermani* in early developmental stages. *Korean J. Parasit.*, 23(2):189-196.
- Hunter, G.W.III., Ritchie, L.S. and Pan, C. (1958) Immunological studies II. Intradermal tests and

- their application in the field for the detection of schistosomiasis japonica, paragonimiasis, and clonorchiasis. *Military Medicine*, 122(2):85-96.
- 朱炘煥·姜星鎭·李駿商·林漢鍾(1987) 有鉤囊尾蟲症 診斷에 있어서 特異 抗原帶의 證明에 관한 研究. 高麗醫大論文集, 24(3):139-150.
- Joo, K.H., Ahn, H., Chung, M.S. and Rim, H.J. (1989) Demonstration of species-specific and cross reactive components of *Paragonimus westermani* crude worm antigen by EITB. *Korean J. Parasit.*, 27(1): 9-14.
- 金東燦·李溫永·李鍾秀·安順愛(1982) 페디스토마症의 管理에 關한 研究 Ⅱ. 肺吸蟲症의 免疫診斷: 分泌 排泄 抗原에 의한 ELISA 試驗. 國立保健研究院報, 19:109-114.
- 김석일·강신영·조승열(1983) 부분정제 폐흡충 항원의 유용성 검토. 기생충학잡지, 21(2):257-264.
- 梁正成·李駿商·林漢鍾(1983) 肝吸蟲症 診斷에 있어서 ELISA법의 應用에 관한 研究. 高麗醫大論文集, 20(1):201-210.
- 李玉蘭(1986) 數種의 웨스테르만 肺吸蟲 抗原의 血清 免疫沈降反應과 抗原의 電氣泳動像. 순천향대 학내문집, 9(2):239-246.
- 李玉蘭·張在景(1986) 肺吸蟲의 粗抗原과 精製抗原에 의한 肺吸蟲 감염 고양이 혈청의 免疫酵素 反應. 기생충학잡지, 24(2):187-193.
- 李溫永·橫川宗雄·辻守康(1970) 數種의 血清學的 術式에 의한 肺吸蟲 感染 血清의 抗體 測定에 관한 研究. 國立保健研究院報, 7:307-321.
- McLaren, M., Draper, C.C., Roberts, J.M., Minter-Goedbloed, E., Lightart, G.S., Teesdale, C.H., Amin, M.A., Omer, A.H.S., Bartlett, A. and Voller, A. (1978) Studies on the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test for *Schistosoma mansoni* infections. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 72: 243-253.
- Merril, C.R., Goldman, D., Sedman, S.A. and Ebert, M.H. (1981) Ultrasensitive stain for protein in polyacrylamide gel shows regional variations in cerebrospinal fluid proteins. *Science*, 211:1437-1438.
- Payares, G., McLaren, D.J., Evans, W.H. and Smithers, S.R. (1985) Changes in surface antigen profile of *Schistosoma mansoni* during maturation from cercaria to adult worm. *Parasitology*, 91: 83-99.
- Sadun, E.H., Buck, A.A. and Walton, B.C. (1959) The diagnosis of paragonimiasis westermani using purified antigens in intradermal and complement fixation tests. *Military Medicine*, 124:187-195.
- Soh, C.T., Min, D.Y., Ryu, J.S. and Yong, T.S. (1985) Study on the reproducibility of ELISA technique for the diagnosis of clonorchiasis and paragonimiasis. *Yonsei Rep. Trop. Med.*, 16(1): 1-10.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76:4350-4354.
- Tsang, V.C.W., Peralta, J.M. and Simons, A.R. (1983) Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by electrophoresis. *Methods in Enzymol.*, 92:377-391.
- Voller, A., Bidwell, D.E. and Bartlett, A. (1979) The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications. Dynatech Europe (ed.).
- Yogore, M.G., Lewert, R.M. and Marraso, E.D. (1965) Immunodiffusion studies in paragonimiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 14:586-591.
- Yokogawa, M., Tsuji, M. and Okura, T. (1962) Studies on the complement fixation test for paragonimiasis as the method of criterion of cure. *Jap. J. Parasitol.*, 11(2):117-122.

**=Abstract=**

**Analysis of antigenic specificities of *Paragonimus westermani*  
developmental stages using immunoblot technique**

Kyoung-Hwan Joo, Sung-Chul Hong, Myung-Sook Chung and Han-Jong Rim

*Department of Parasitology and Institute for Tropical Endemic Diseases,*

*College of Medicine, Korea University, Seoul 110-702, Korea*

Serodiagnosis of parasitic infections is widely used, since parasites or their eggs are not always detected by ordinary methods. The sensitive tests such as ELISA are highly dependent on the purity of antigens used. To solve this problem, many workers have tried to find species-specific components of antigens. The present study was performed to determine the antigenic profile of crude saline extracts of 3, 5, 8 and 12-week old *P. westermani* worms, which were collected from experimentally infected cats, based on SDS-PAGE and immunoblot technique.

The results were as follows:

1. The SDS-PAGE showed at least 30 protein bands ranging from 229 kDa to 10 kDa molecular weight. The protein components of *P. westermani* changed chronologically during its developmental period. The 229 kDa band was recognized only in 12-week old worms (SEP<sub>12</sub>).

2. Analysis by ELISA showed a significant increase in antibody levels at 3 weeks in infected cats using crude saline extract antigens (SEP<sub>3</sub>, SEP<sub>5</sub>, SEP<sub>8</sub>, SEP<sub>12</sub>).

3. By EITB using SEP<sub>3</sub> and SEP<sub>5</sub>, infected cats recognized major protein bands with molecular weight of 60, 35, 28, 25 or 21 kDa at 3~12 weeks of infection, and 3 additional antigens, 19, 13 and 10 kDa, were detected at 8~12 weeks of infections.

4. Using SEP<sub>8</sub>, 5 antigens, 91, 85, 31, 25 and 21 kDa, were consistently detected by all infected sera tested. In addition, 3 antigens of 19, 13 and 10 kDa were detected at 8~12 weeks of infection. Using SEP<sub>12</sub>, similar results were obtained with that by using SEP<sub>8</sub> and 1 additional antigen of 229 kDa, specifically reacting with the sera from 12 weeks of infection, was recognized.