

단클론 항체법을 이용한 바퀴의 특이항원 분리

옥미선[†] · 김광혁* · 유태현**

고신대학 의학부 기생충학교실, 미생물학교실*, 이비인후과학교실**

Detection of cockroach(*Blattella germanica* L.) specific allergens by monoclonal antibodies

Mee-Sun Ock[†], Kwang-Hyuk Kim* and Tai-Hyun Yu**

Dept. of Parasitology, Microbiology*, Otolaryngology**
Kosin Medical College, Pusan 602-702, Korea

Abstract

Cockroach antigen have been known as a cause of allergic disease. German ockroach(*Blattella germanica* L.) was chosen because it has the highest distribution range and poulation density. To identify the common and specific anti-gens of adult and larval stage of german cockraoch, we made monoclonal antibodies which were confirmen by SDS-PAGE and EITB. Anti-*B. germanica* antibody producing hybridomas were 24 among the total 96Owells. Only 4 hybri-domas did not have cross reaction to other species of cockroach and house dust mites(*Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssiis*). SDS-PAGE revealed about 20 bands from 90Kd to 15Kd. EITB showed specific antigens at 60, 72 and 82Kd which were experimented by the culture supernatant of 4 selected hybridomas. Especially 60Kd coincided with a band of immunized mouse sera.

Key words : cockroach, *Blattella germanica*, monoclonal antibodies, SDS-PAGE, EITB

서 론

최근 계절의 변화나 환경오염등으로 알레르기환자가 급증함으로써 이러한 알레르기를 유발하는 알러젠에 대한 체계적인 분석이 요망되고 있다^{1, 2, 3, 4)}.

옥내 알러젠으로 중요하게 취급되는 종류로는 집먼지(housedust), 집먼지 진드기(*Dermatophagoides* species), 바퀴류(cockroaches), cat dander등으로 알려져있다^{5, 6, 7)}.

⁸⁾. kang 등⁹⁾은 3종의 바퀴류(*Blattella germanica* L., *Peri-*

planeta americana, *Blatta orientalis*) 조항원(crude cockroach extract)으로 부터 바퀴류 특이항원을 분석한 결과, 주항원대에서는 어느것도 집먼지나 집먼지 진드기에 교차 반응을 보이지 않았으며 집먼지에는 바퀴류항원이 상당량 포함되어 있었다고 보고하였고, Tandon 등¹⁰⁾은 집먼지에 알레르기반응을 보인 200명의 환자를 집먼지, 집먼지 진드기, 바퀴 항원등에 각기 노출시킨 결과, 35%가 바퀴류에, 59%는 집먼지에, 84.7%는 *D. farinae*에 양성반응을 보이므로써 바퀴류를 진드기나 집먼지와는 다른 특이항원을

[†] Corresponding author

가진 알러젠으로 분류하였다.

바퀴벌레는 많은 종이 세계적으로 널리 분포하고 있으나 우리나라에서는 2과 8속 9종이 분포하고 있으며¹¹⁾, 그중 바퀴(*B. germanica* L.), 이질바퀴(*P. americana*), 집바퀴(*B. orientalis*) 등이 흔히 옥내에서 발견되며 기관지 천식, 알레르기성 비염 등의 알러젠으로 주목되고 있다. 이중 *B. germanica*는 분포범위가 가장 넓은 종으로 세계 도처에 서식하고 있으며, 유충에서 성충으로 성장하는데 소요되는 시간은 약 50-120일 정도이며 성충의 평균수명은 5-6개월, 난협(ootheca) 출현횟수는 3-7회, 난협당 출현유충수는 20-50개 정도이다. 성충이되면 5-10일후에는 곧 교미하여 산란하므로¹²⁾ 한마리의 바퀴가 일년에 산란하는 유충의 수는 수천에 달한다. 또 병원성 미생물이나 기생충의 매개체가 될 뿐만아니라 인체기생 유충류의 중간숙주가 되기도 하며, 여러가지 살충제에 대하여 저항력이 매우 크고 계절적인 변화나 생활정도, 위생상태 등에 무관하게 일반주택이나 병원, 아파트 등 거의 모든 주거 형태에 고루 분포함으로써 이들이 실내환경을 오염시키는 정도는 심각한 것으로 알려져 있다. 뿐만 아니라, 유충시기가 매우 길어 이시기에도 인체에 알러지원으로 작용할 가능성은 매우 높다. Chaudhry 등¹³⁾은 이질바퀴를 암수 구분하여 항원분석을 시도한 결과 공통 항원대와 동시에 각 성에 특이한 특이항원도 존재한다고 보고하였다. 그러므로 장기간의 유충시기를 거치는 바퀴벌레의 유충이 성충과 구별되는 특이항원을 나타낼 가능성은 매우 높다 하겠으나 성충시기와는 달리 유충 단계에서 알러젠으로서의 역할에 대해서는 알려진 바 없으므로 바퀴벌레 분포범위와 서식밀도가 가장 높은 *B. germanica*의 유충시기에 특이하게 나타나는 항원을 단클론항체(Monoclonal Antibody)법을 이용하여 규명하고 동시에 성충시기에 보이는 항원대와의 동일성 여부도 비교해 보고자 하였다.

재료 및 방법

항원의 준비

Cockroach extract

B. germanica, *P. americana*, *B. orientalis* 3종을 petroleum ether Soxhlet 추출장치에 걸어 수시간 둔 다음 vacuum drying oven에서 건조시켰다. 건조된 바퀴벌레의 무게를 측정한

후 막자사발에 갈아 PBS-extraction(1gm 10ml, 4°C, overnight stirring)하여 18,000rpm으로 1시간 원심한 후 extract로 사용하였다. 단백질량은 Lowry방법¹⁴⁾으로 측정하였다.

Commercial cockroach extract

위 3종의 바퀴벌레항원 및 집먼지 진드기항원을 Allergy Laboratories Inc. (Oklahoma City, Oklahoma) 및 Phadebas Allergen (Pharmacia, Sweden)에서 구입하여 사용하였다.

Production and Selection of Monoclonal Antibodies Immunization

생후 6-8주 된 암컷 Balb/c mice에 *B. germanica* 성충 및 유충항원 50µg을 10일 간격으로 3회 복강에 주사하였다. 3번째 주사로 부터 2주후 mice를 tail bleeding하여 ELISA로 screening하였다. 선택된 mice에는 조항원 100µg을 i. v.로 주사한 다음 3일후에 spleen을 분리하였다.

Fusion

선택된 mice로부터 분리한 spleen cell (1×10^8)과 mice myeloma cell (SP₂O-Agl4, 2×10^7)을 Kohler 와 Milstein¹⁵⁾ 및 Yong¹⁶⁾방법으로 hybridization을 시행하였다. 즉 10^8 spleen cell과 2×10^7 myeloma cell을 serum free RPMI 1640으로 3번 세척한 후 혼합하여 37°C, 50% polyethyleneglycol 4,000(Gibco) 1ml을 천천히 떨어뜨린다. HAT medium(RPMI 1640 containing hypoxanthine 13.6µg/ml, aminopterin 0.174µg/ml, thymidine 3.87µg/ml and FCS 20%) 20ml를 가한 다음 96well에 100µl씩 떨어뜨린다. 2일 간격으로 HAT media를 교환하면서 inverted microscope으로 hybridoma를 검색하였다.

Hybridoma Selection

확인된 hybridoma를 RPMI 1640(1% FCS)에 배양하여 supernatant를 CNBr-activated paper disk(100µl supernatant/disk)에 떨어 뜨린다음 4°C에서 overnight하였다. disk를 PBS/T로 세척하고 1% BSA PBS/T로 실온에서 1시간 배양한 다음 건조 시킨 후, *B. germanica* 유충항원 100µl(1µg/ml with undiluted horse serum)을 paper disk에 첨가하고 실온에서 6시간 incubation 한 다음 PBS/T로 다시 세척하고 horse serum으로 희석한(1:1) 100µl의 cockroach allergic patient serum을 가하여 overni-

ght시킨다. 다시 PBS/T로 5번 세척한 후 ^{125}I -labeled anti-human IgE 100 μl (horse serum)로 4시간 incubation한 후 PBS/T로 다시 5번 세척하고 disk는 gamma counter로 counting한다. 이렇게 하여 선택된 hybridoma의 supernatant는 -20°C 에서 사용시까지 보관하였다.

Immunological Specificity of Anti-german cockroach Monoclonal Antibodies in ELISA

선택된 단크론항체의 specificity를 알아보기 위하여 *P. americana*, *B. orientalis*, house dust, *Dermatophagoides* species항원으로 hybridoma specificity를 확인하였다. 즉, 100 μl (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 각종 항원으로 well을 coating하였다(4°C , overnight). PBS/T로 3번 세척한 다음 PBS/T BSA로 희석한 supernatant 100 μl 를 가한후 실온에서 1시간 방치하였다. PBS/T로 여러번 세척한 후 1:500으로 희석한 conjugate(peroxidase conjugated anti-mouse Ig) 100 μl 를 가하여 15-30분 실온에 방치한 다음 충분히 발색하면 8N H_2SO_4 를 가하여 반응을 중단시키고 microplate photometer (Bio-Rad Lab.) 450nm에서 측정하였다.

Mass Production of Monoclonal Antibodies(M_{Ab})

0.5ml pristane을 주사한 암컷 Balb/c mice의 복강내에 선택된 M_{Ab} 을 생성하는 세포($5 \times 10^6 - 10 \times 10^6$)를 주사하여 5-10일후에 ascitic fluid를 회수한 다음 cell은 원침분리로 제거하고 supernatant는 -20°C 에서 사용때까지 보관하였다.

Characterization of *germanica* larva antigen SDS-PAGE

단크론항체와 결합하는 바퀴 항원대를 알아보기 위하여 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. Vertical electrophoresis kits(Mighty small II, Hoefer)를 사용하여 5%-20%의 polyacrylamide slab gel과 3-4.5%의 separation gradient gel을 만들어 40mA, 1시간 running 시킨후, Coomassie brilliant Blue(Sigma)와 silver staining(Sigma)으로 염색하였다.

EITB

전기영동 gel상의 단백질분획은 Towbin 등¹⁷⁾과 Tasang 등¹⁸⁾의 EITB(enzyme-linked immunoelectrotransfer blot)방법으로 nitrocellulose (NC) paper(Bio-Rad Lab.)에 transfer시켰다. 즉 transfer buffer (0.02M Tris, 0.15M glycine, 20%

methanol)로 EITB kit를 채운후, 50 volts 16시간 transfer시킨다음 NC paper를 3번 세척하고 3% skim milk-PBS/T로 37°C , 1시간 blocking시키고, PBS/T로 다시 3번 세척후 단크론항체를 가하여 실온에서 1시간 둔다. NC paper를 10분간 3번 씻은후 희석한(1:500) peroxidase-conjugated anti-mouse IgG로 실온에서 1시간 반응시킨 다음 다시 3번 세척하고 substrate (50mg of DAB, 10 μg of 30% H_2O_2 , 100ml of D.W)와 반응시켜 충분히 발색되도록한 후 (10-15분) 증류수를 가하여 반응을 중단시킨다.

결과 및 고찰

천식이나 통년성 알레르기성 비염 환자의 바퀴류 항원에 의한 hypersensitivity에 관한 연구는 Bernton과 Brown¹⁹⁾이 바퀴류의 여러부위 즉, saliva, feces, body tissue등을 여러가지 방법(contactant, inhalant, ingestant, injectant)으로 인체에 접촉시킴으로써 강력한 allergic potential을 지닌다고 보고한 이후로 임상적 증상을 유발할 수 있는 새로운 allergen으로 주목받아 왔다. 우리나라에 서식하는 바퀴류중 분포범위나 서식밀도가 가장 높은 *Blattella germanica*의 유충의 조항원을 이용하여 단크론 항체를 제조하여 유충시기에 특이하게 나타나는 항원에 대하여 알아보고자 하였다.

Cell Fusion

감작된 Balb/c 마우스의 비장세포를 SP_2O 세포와 혼합하여 96 well plate에 100 μl 씩 떨어뜨렸다. 총 960 well에 혼합시킨 세포를 떨어뜨려 그중에서 311개의 well에서 hybridoma를 발견하였으며, 형성된 hybridoma중 anti-german cockroach antibodies를 분비하는 hybridoma는 24개였다(Table 1). 감작시킨 마우스에서 분리한 혈청을 사용한 ELISA의 absorbance는 모두 control이상이었다.

Table 1. Efficiency of making hybridoma secreting anti-*Blattella germanica*

wells	Numbers
1) having hybridoma secreting anti-B. germanica	21
2) having hybridomas	311
3) dispensed total cells	960

Characteristics of monoclonal antibodies

선택된 hybridoma를 24 well culture plate에 옮겨 cell의 숫자를 늘린 다음, 특이성을 알아보기 위하여 *Dermatophagoides farinae*, *D. pteronyssius*, *Periplaneta americana* 및 *Blatta orientalis*의 항원과 hybridoma culture supernatant (1 : 500 희석)를 ELISA로 시험하여 보았다(Table 2). 선

Table 2. Specificity of anti-*Plattella germanica* antibodies secreted by 24 hybridoma clones by ELISA

clones	Reactivities to antigens of				
	B.g	D.f	D.p	P.a	B.o
1)	6	0	0	0	0
2)	6	0	0	0	0
3)	6	0	0	0	0
4)	6	0	0	0	0
5)	6	3	2	0	0
6)	6	1	0	2	0
7)	6	7	4	3	2
8)	6	4	0	0	0
9)	6	0	3	0	0
10)	6	0	0	0	1
11)	6	1	0	2	2
12)	6	1	0	0	0
13)	6	2	1	1	3
14)	6	5	0	0	2
15)	6	0	0	0	2
16)	6	0	4	2	1
17)	6	0	1	1	3
18)	6	4	2	0	2
19)	6	3	1	1	1
20)	6	0	0	0	3
21)	6	0	1	3	2
22)	6	1	7	1	3
23)	6	0	2	2	1
24)	6	1	0	2	4

absorbance

score 0 : 0.00-0.20 B.g : *Blattella germanica*
 1 : 0.21-0.40 D.f : *Dermatophagoides farinae*
 2 : 0.41-0.70 D.p : *Dermatophagoides pteronyssius*
 3 : 0.71-1.00 P.a : *Periplaneta americana*
 4 : 1.01-1.20 B.o : *Blatta orientalis*
 5 : 1.21-1.30
 6 : 1.31-1.40
 7 : 1.41-1.70

택된 24개의 hybridoma중 4개 만이 집먼지 진드기 및 타종의 바퀴벌레와 교차반응을 보이지 않았다.

Cell cloning and Isotyping of Monoclonal Antibodies

선택된 4개의 hybridoma를 cloning하여 B2E11F10, A10C2H4, D12C2G5 및 B11E6B2로 명명하였다. 만들어진 4종의 단클론 항체의 isotype(Sigma isotyping kit)은 모두 IgG1으로 나타났다(Table 2).

Table 3. Isotype of selected hybridoma

hybridoma	isotype
B2E11F10	IgG1
A10C2H4	IgG1
D12C2G5	IgG1
B11E6B2	IgG1

Characteristics of the antigens

B. germanica 항원의 단백분해를 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 시행하였다(Fig. 1). 이를 NC paper에 electrotransfer시킨 후(Fig. 2) 감작시킨 마우스 혈청과 선택된 4개의 단클론 항체와 반응시켰다. B2E11F10(1)은 72Kd, D12C2G5(3)은 60Kd로써 감작된 마우스 항혈청으로 시험한 band중에서 가장 강한 반응을 나타내는 밴드와 일치하였으며, B11E6B2(4)는 86Kd로 나타났다. 그러나 A10C2H4는 EITB상에는 나타나지 않았다.

바퀴벌레 allergen에 대한 연구는 바퀴벌레의 공통항원 및 각 종의 특이항원을 연구하는 방향으로 진행되고 있다^{20, 21, 22, 23}. Helm 등²⁴은 Asian cockroach(*Blattella asahina*)와 German cockroach(*B. germanica*), American cockroach(*P. americana*), Oriental cockroach(*B. orientalis*)종의 공통항원과 특이항원에 관한 연구에서 German cockroach는 SDS-PAGE의 결과 8개(92, 80, 67, 48, 36, 27, 25, 18 Kd)의 band를 확인하였으며, Asian cockroach는 5개(92, 67, 48, 40, 32 kd)의 band를 나타내어 몇개의 band를 공유하는 것으로 보았으며, American cockroach나 Oriental cockroach와는 공통항원대가 없는 것으로 추정하였다. 본 실험에서도 SDS-PAGE상에서는 14Kd-90Kd까지 여러 band 확인할 수 있었다.

단크론 항체법을 이용한 바퀴의 특이항원 분리

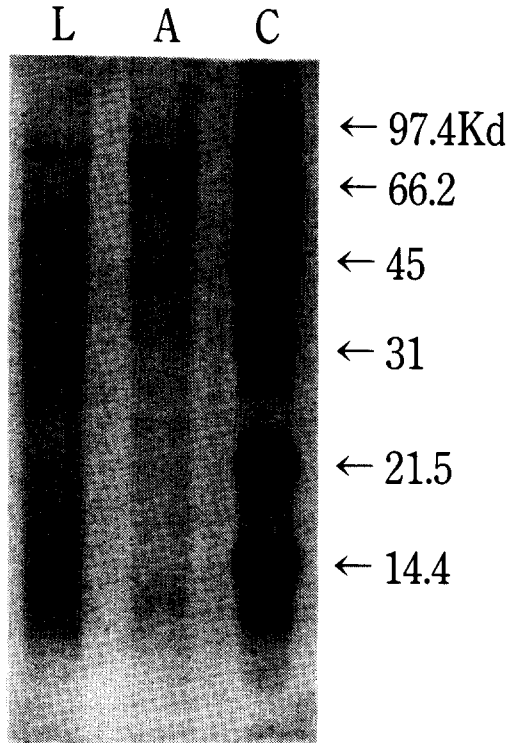


Fig. 1. SDS-PAGE finding of *B. germanica* adult and larva crude antigens A : adult worm L : larva C : standard

그러나 Schou 등²⁵⁾은 American cockroach와 German cockroach를 여러방법으로 비교하여 Per a I과 Bla g I이라는 각종에 대한 특이항원을 분리하였는데 SDS-PAGE의 결과에서는 6Kd과 25Kd로 나타났고 Sephadex G-75에서는 33-37Kd로 나타났으며, 아미노산 분석결과도 비슷한 것으로 보고하였으나 사용한 실험방법에 따른 편차가 심하여 보다 순수한 상태로의 분리가 요망되고 있다. Pollart 등²⁶⁾은 monoclonal antibodies를 이용하여 German cockroach의 항원을 분리하는 작업을 시도하여 Bla g I (*Blattella germanica* I)과 Bla g II를 분리하였는데, Bla g I은 25-35Kd, Bla g II는 36Kd로써 Bla g I은 Schou 등²⁵⁾의 33-37Kd와 유사한 항원대로 추정하였다. 그러나 저자

등이 바퀴의 유충항원으로 감작한 마우스에서 얻은 단크론 항체는 성충의 항원으로 제조한 단크론 항체들(Per a I, Bla g I and Bla g II)과는 상당한 차이가 있었다(Table 1, 2). 이러한 유충 시기의 특이항원은 알레르기 환자의 항혈청 EITB 양상과 비교해 보지는 못했지만 감작된 마우스 항혈청의 반응대와 잘 일치하였다(Table 2).

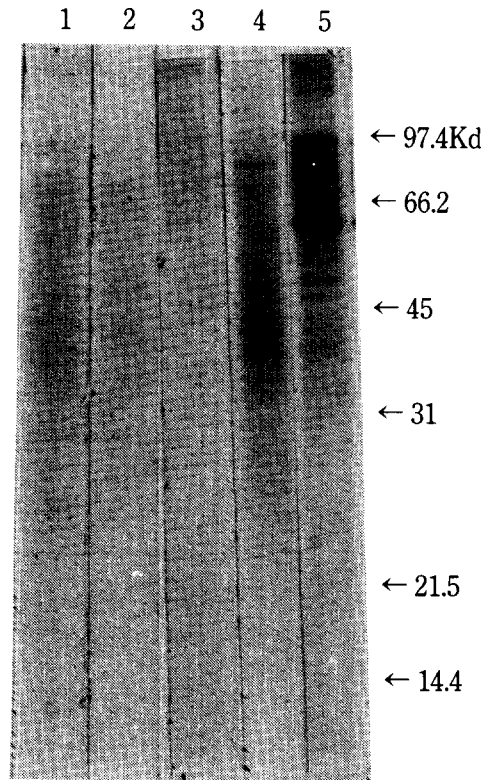


Fig. 2. EITB pattern of *B. germanica* antigen fractions against monoclonal antibodies : 1) B2E11F10, 2) A10C2H4, 3) D12C2G5, 4) B11E6B2, 5) Immunized mouse sera

바퀴류의 단크론 항체의 제조는 환자의 진단 뿐만아니라, 이를 이용한 정제 항원을 사용하면 바퀴류에 노출된 정도를 쉽게 측정할 수 있어 실내환경이 바퀴류로 오염되는 것을 막는 적절한 대책을 마련하는데 기여할 수 있을 것으로 시료된다²¹⁾.

요 약

알레르기 질환을 유발하는 중요한 기인 항원으로 작용하는 여러 바퀴벌레 중에서 분포범위나 서식 밀도가 가장 높은 *Blattella germanica* L.의 유충시기에 반응하는 특이항원을 찾기위하여 단크론 항체를 제조하고 SDS-PAGE 및 EITB로 확인하였다. 총 960 well 가운데 anti-*B. germanica* antibodies를 생산하는 hybridoma는 24개였으나, 다종의 바퀴나 집먼지 진드기종류(*Dermatophagoides farinae* 및 *D. pteronyssius*)에 교차 반응을 나타내지 않는 것은 4개로 나타났다. *B. germanica* 조항원의 SDS-PAGE에서는 14Kd-90Kd까지 20여개의 band가 확인 되었고, 선택된 4개의 단크론 항체로 실험한 EITB에서는 60, 72, 86Kd가 특이항원으로 나타났다. 특히 60Kd는 감작된 마우스 항혈청의 항원대와 일치하였다.

감사의 글

이 논문은 1993년도 고신대학 기초임상 공동연구비의 일부 지원에 의해 이루어졌으며 이를 감사드립니다.

참고문헌

- Baur, X., Dewair, M., Fruhmann, G., Aschauer, H., Pfletschinger, J. and Brsunitzer, G. : Hypersensitivity to chironomids(non-biting midges) : Localization of the antigenic determinants within certain ployperptide sequences of hemoglobins(erythrocrorins) of *Chironomus thummi thummi* (Diptera). *J. Allergy Clin. Immunol.*, 69, 66(1982)
- Bernton, H.S., McMahon, T.F. and Brown, H. : Cockroach asthma. *Brit. J. Dis. Chest.*, 66, 61(1972)
- Kimura, J. Y., Matsuoka, H. and Ishi, A. : ELISA inhibition method in detection of mite and chironomid antigens in environmental samples of dust, soil and air. *Allergy*, 45, 167(1990)
- Pollart, S.M., Chapman, M.D., Fiocco, G.P., Rose, G. and Platts-Mills, T.A.E. : Epidemiology of acute asthma : IgE antibodies to common inhalant allergens as a risk factor for emergency room visits. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 83 : 875(1989)
- Helm, R.M., Bandele, E.O., Swanson, M.C., Campbell, A.R. and Wynn, S.R. : Identification of a German cockroach-specific allergen by human IgE and rabbit IgG. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 87, 230(1988)
- Kang, B. : Study on cockroach antigen as a probable causative agent in bronchial asthma. *J. Allergy Clin. Imm.*, 58, 357(1976)
- Kang, B. and Sulit N. : A comparative study of prevalence of skin hypersensitivity to cockroach and house dust antigens. *Ann. Allergy*, 41, 333(1978)
- Kawakami, T., Suto, C., Yagura, T. and Kumada, N. : Studies on cockroach allergy 1. Allergenicity of common domestic cockroaches of Japan. *衛生動物*, 33, 233(1982)
- Kang, B.C., Chang, J-L. and Johnson, J. : Characterization and partial purification of the cockroach antigen in relation to housedust and housedust mite(D. f.) antigens. *Ann. Allergy*, 63, 207(1989)
- Tandon, N., Maitra, S.B., Saha, G.K., Modak, A. and Hati A.K. : Role of cockroaches in allergy to house dust in Calcutta, India. *Ann. Allergy*, 64, 155(1990)
- Lee, C.E. : Tentative list of Korean cockroaches(Blattaria). *Kyungpook Univ. Theses Coll.*, 11, 179(1967)
- 옥미선, 이창연 : 한국산 바퀴벌레의 형태학적 및 계통학적 연구, 자연과 생물, 20, 9(1990)
- Chaudhry, S., Jhamb, S., Chauhan, U.P.S., Gaur, S. N., Agarwal, H.C. and Agarwal, M.K. : Shared and specific allergic and antigenic components in the two sexes of American cockroach-*Periplaneta americana*. *Clin. Exp. Allergy*, 20, 59(1990)
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Far, A.F. and Randall, R.J. : Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265(1951)
- Kohler, G. and Milstein, c. : Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 256, 495(1975)
- Yong, T.S., Im, K.I. and Chung, P.R. : Analysis of *Clonorchis sinensis* antigens and diagnosis of clonorchiasis using monoclonal antibodies. *Korean J. Parasitol.*, 29(3), 293(1991)
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheet : Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76, 4350(1979)
- Tsang, V.C.W., Peralta, J.M. and Simons, A.R. : Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Methods*

- Enzymol.*, 92, 377(1983)
19. Bernton, H.S. and Brown, H. : Insect allergy-preliminary studies of the cockroach. *J. Allergy*, 35 : 506 (1964)
 20. Pollart, S.M., Smith, T.F., Morris, E.C., Gelber, L.G., Platts-Mills, T.A.E. and Chapman, M.D. : Environmental exposure to cockroach allergens : Analysis with monoclonal antibody-based enzyme immunoassay. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 87, 505(1991b)
 21. Richman, P.G., Khan, H.A., Tuskeltaub P.C., Malveaux, F.J. and Baer, H. : The important sources of german cockroach allergens as determined by RAST analyses. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 73, 590(1984)
 22. Schou, C., Lind, P., Fernandez-Caldas, E., Lockey, R. F. and Lowenstein, H. : Identification and purification of an important cross-reactive allergen from American(*Periplaneta americana*) and German (*Blattella germanica*) cockroach. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 86, 935(1990)
 23. Twarog, F.J., Picone, F.J., Strunk, R.S., So, J. and Colten, H.R. : Immediate hypersensitivity to cockroach-isolation and purification of the major antigens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 59, 154(1977)
 24. Helm, R.K., Squillace, D.L., Jones, R.T, and Brenner, R.J. : Shared allergenic activity in asian(*Blattella asahihai*), german(*Blattella germanica*), american (*Periplaneta americana*), and oriental (*Blatta orientalis*) cockroach species. *Int. Arch. Appl. Immunol.*, 92, 154(1990)
 25. Schou, C., Fernandez-Caldas, E., Lockey, R.F. and Lowenstein, H. : Environmental assay for cockroach allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 87, 828(1991)
 26. Pollart. S.M., Mullins, D.E., vailes, L.D., Hayden, M. L., Platts-Mills, T.A.E., Sutherland, W.M., Chapman, M.D. : Identification, quantitation, and purification of cockroach allergens using monoclonal antibodies. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 87, 511(1991a)