

홍모기 (*Culex pipiens pallens*) 지방체와 난소에서 난황단백질합성에 관한 연구

이승훈 · 박영민 · 성기창

성균관대학교 생물학과

홍모기 (*Culex pipiens pallens*) 난소에서 일어나는 난황단백질 (YP2)의 합성을 조사하였다. 지방체의 난황단백질 합성양과 난소에 축적되는 난황단백질의 양을 rocket immunoelectrophoresis 방법과 *in vitro* organ culture 방법으로 조사한 결과 지방체에서의 난황단백질 합성은 흡혈 후 6시간째 부터 시작되어 24시간에 최대의 합성량을 나타낸 후 48시간 이내에 완료되었으며, 난소내로의 축적은 6시간부터 시작되어 60시간까지 계속되었다. 흡혈 후 0, 24, 48, 72시간된 난소추출물을 전기영동 및 Western blotting 한 결과 24시간된 난소에서는 한종류의 난황단백질 (YP1)이 존재한 반면, 48, 72시간된 난소에서는 두종류의 난황단백질이 나타났다. 흡혈 후 48시간된 난소와 지방체를 ³H-leucine이 함유된 배지에서 배양하였을 때 지방체에서는 단백질의 합성이 거의 일어나지 않았으나 난소에서는 난황단백질 (YP2)를 포함한 다량의 단백질 합성이 일어났다. Crossed immunoelectrophoreses의 결과 YP1과 YP2는 분자량에서는 차이를 보이나 면역성은 동일한 것으로 나타났다. 이상의 결과 홍모기에서는 난소에서도 난황단백질 (YP2)의 합성이 일어나는 것으로 나타났다.

KEY WORDS: Yolk protein (YP1, 2), Vitellogenin, Vitellin, Ovary, fat body

모기 (Diptera: Culicidae)에는 흡혈을 하지 않아도 첫배의 알을 낳을 수 있는 모기 (autogenous mosquito)도 있으나 대부분은 흡혈을 하여야만 알을 만들수 있는 모기 (anautogenous mosquito)이다. 암모기의 난성숙은 척추동물의 피를 흡혈하는 순간 부터 시작되는 일련의 호르몬들의 작용에 의하여 조절되고 약 72시간 후에 완료된다 (Hagedorn *et al.*, 1979). 현재까지 모기의 난성숙 과정은 중추신경 분비세포 (Medial neurosecretory cell, MNC)에서 합성되어 측심체 (Corpus cardiacum, CC)에 저장되어 있던 Egg development neurosecretory hormone (EDNH)이 흡혈 후 방출되며 (Lea, 1967, 1970), 이 EDNH가 난소를 자극하여 α -엑디손의 합성과 분비를 유발시키고, 이 α -엑디손은 ecdysone monooxygenase에 의하여 β -엑디손

으로 전환된다 (Hagedorn *et al.*, 1979; Shapiro and Hagedorn, 1982). 이 β -엑디손이 지방체를 자극하여 난황단백질 전구물질 (vitellogenin)의 합성을 유발시키며 (Beckemeyer and Lea, 1980; Borovsky *et al.*, 1985), 이 vitellogenin이 혈림프를 통하여 난소내에 축적됨으로써 난성숙이 완료된다 (Fuchs and Kang, 1982). 그리고 *A. aegypti*의 경우 난황단백질의 분자량이 5개의 소단위로 이루어지며 664,000 dalton 이라는 보고 (Hagedorn, 1985)와 6개의 소단위이며 분자량이 393,000 dalton이라는 보고 (Borovsky, 1986)가 있으며, *Culex pipiens fatigans*의 경우는 분자량이 380,000 dalton 이라는 보고 (Atlas *et al.*, 1986)도 있다. 또한 지방체의 lysosome이 지방체에서의 vitellogenin의 분비를 조절하며, 난소의 막에 특이수용체가 존재하

여 vitellogenin의 흡수를 조절한다는 보고 (Dhadialla and Raikhel, 1991)가 있다.

모기뿐만 아니라 대부분의 곤충에서 난황단백질의 합성은 지방체에서만 일어난다고 보고되어 있으나 *D. melanogaster*, *B. mori*, *L. migratoria*에서는 난소에서도 난황단백질 합성이 일어난다는 보고 (Postlethwait and Kaschitz, 1978; Chen, 1980; Chinzei et al., 1982; Isaac and Bownes, 1982)가 있다. 본 실험에서는 한국산 홍모기 (*Culex pipiens pallens*)에 있어서 난황단백질 합성양상을 조사하였으며, 특히 난소에서의 난황단백질 합성 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험재료는 1985년 한국 국립보건원에서 분양 받아 현재까지 본 연구실의 항온항습실(온도: $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 습도: $70\% \pm 5\%$)에서 사육한 *Culex pipiens pallens*모기를 사용하였다.

난황단백질의 분리 및 항체의 제조

난황단백질은 Atlas et al. (1986)의 방법에 따라 흡혈 후 72시간된 암모기의 난소를 해부, 수집하여 그 추출물을 1차로 DEAE-cellulose chromatography방법을 실시하여 난황단백질을 분리한 후 2차로 Sephadex G-200으로 재분리하였다. 이렇게 하여 얻은 모기의 난황단백질은 토끼에 주사하여 항체를 제조하는데 사용하였다. 주사액은 단백질을 2mg/ml로 조절된 용액 1ml과 Freund's complete adjuvant (Difco) 1ml을 주사침으로 연결된 2개의 주사기로 1시간 정도 혼합한 후 체중 2.5kg 정도의 New-zealand white rabbit에 주사하였다. 주사는 등쪽에 피하주사를 실시하였고 1주일 후에 1ml의 vitellin용액과 Freund's incomplete adjuvant 1ml을 섞어서 1주일간격으로 3회 반복 주사하였다. 채혈은 최종주사 후 1주일뒤에 cardiac puncture방법으로 하였으며 채혈한 혈

액은 상온에서 2시간 방치한 후 4°C 에서 하룻밤 동안 응고시켰다. 그 혈액을 $3000 \times g$ 로 원심분리하여 상층액을 분리하여 항혈청을 얻어내었다. 이 항혈청은 사용시까지 -40°C 에 보관하였다.

Immuno-double diffusion test (Ouchterlony test)

직경 3.6cm의 petri dish에 증탕하여 녹인 1% agarose용액을 두께 2mm되게 부어 실온에서 굳힌 후 gel punch를 이용하여 well을 뚫고 중앙 well에 antiserum을 넣고 그 주위의 well에 항원이 되는 용액들을 넣고 petri dish를 sealing film으로 완전히 밀봉한 후 25°C 에서 48시간 동안 incubation하였다. Incubation이 끝난 gel은 saline용액에 최소한 48시간 동안 넣어두어 antigen-antibody complex가 형성되지 않은 단백질을 완전히 제거한 후 coomassie brilliant blue G-250로 염색하였으며 7% acetic acid로 destaining하여 band를 확인하였다.

Rocket immunoelectrophoresis

흡혈 후 난성숙 과정 동안 합성되는 vitellogenin의 정량은 rocket immunoelectrophoresis방법 (Laurell, 1966)으로 실시하였으며, 암모기의 지방체를 1mM EDTA가 함유된 0.05M tris citrate buffer, pH 8.5 내에서 glass homogenizer로 마쇄한 후 $15,000 \times g$ 에서 10분간 원심분리하여 취한 상층액을 사용하였다. 전기영동이 끝난 gel은 0.85% saline solution내에서 48시간동안 deproteinization시킨 후 coomassie brilliant blue R-250로 염색하고 7% acetic acid로 탈색하여 염색된 침전선의 높이를 측정하여 정량하였다.

Immunoelectrophoresis

Agarose gel은 0.05M tris-citrate buffer, pH 8.5로 두께 1mm, 1%로 만든 후 gel punch를 이용하여 폭 2mm, 길이 6cm되는 홈을 1cm간격을 두고 만든 후 -극쪽으로 부터 1.5cm되는 홈과 홈사이의 중앙에 지름 1mm

well들을 뚫었다. 이 well에 항원성의 sample을 넣고 $100V \times 1.5hr$ 간 전기영동한 후 길이 6cm홀에 실험시료를 넣고 antigen-antibody complex가 형성된 line이 뚜렷이 나타날 때 까지 $25^{\circ}C$ 에서 incubation하였다. 염색과정은 rocket immunoelectrophoresis방법과 동일하게 실시하였다.

지방체와 난소의 배양

In vitro 에서의 지방체 및 난소의 배양은 Hagedorn and Fallon(1973)의 방법을 수정하여 실시하였다. 흡혈한 암모기의 복부를 떼어내고 복부의 한쪽 측선을 절개하여 지방체만이 붙어있는 복부의 cuticle을 *in vitro* incubation에 사용하였다. 배양액 $50\mu l$ 에 4마리분의 난소와 지방체를 이용하였으며 모든 실험은 3회씩 반복하였다. 난소는 배양액속에 담구었으며 지방체는 배양액위에 띄워 $25^{\circ}C$ 의 유동하는 water bath위에서 3시간동안 배양하였다. 지방체와 난소의 배양에 사용한 배양액의 무기염류와 glucose 혼합액은 Varma and Pudney(1969)의 방법을 수정하여 사용하였고, 아미노산의 혼합액은 Reddy and Wyatt(1967)의 방법을 수정하여 사용하였다.

TCA and antigen-antibody precipitation assay

조직배양액에 대한 TCA precipitation assay는 다음과 같이 실시하였다. $10\mu l$ 의 3H -medium과 $10\mu l$ 의 0.3% bovine serum albumine(BSA), $180\mu l$ 의 5% TCA를 차례로 혼합한 후 ice cold water에서 1시간동안 incubation하였다. Eppendorf microcentrifuge를 이용하여 $15,000rpm \times 10min$ 동안 원심분리하여 0.4ml의 TCA로 침전물을 녹여내었으며 $90^{\circ}C$ 에서 15분간 heating후 $0^{\circ}C$ 에서 30분간 cooling하고 $15,000rpm \times 5min$ 동안 원심분리하였다. 이와 같은 TCA washing과정을 3회 반복한 후 radioactivity를 counting하기 위하여 최종침전물에 $10\mu l$ 의 1N NaOH를 가하여 완전히 녹였으며 이에 5ml의 scintillation

cocktail(Aqua Luma plus)과 섞고 1분간 touch mixer로 완전히 혼합한 후 liquid scintillation counter(LKB Rack Beta 1211)로 cpm값을 측정하였다.

Ag-Ab precipitation assay는 다음과 같이 실시하였다. $25\mu l$ 의 3H -medium과 $15\mu l$ 의 rabbit vitellin antiserum, $5\mu l$ 의 4% triton X-100, $55\mu l$ 의 PBS를 차례로 혼합하여 $37^{\circ}C$ 에서 1시간동안 incubation한 후 다시 $4^{\circ}C$ 에서 16시간동안 incubation하였다. Assay mixture를 $15,000rpm \times 10min$ 동안 원심분리한 후 침전물을 0.5ml PBS로 3회 washing 하였다. 최종 침전물은 $10\mu l$ 의 1N NaOH에 완전히 녹인 후 TCA precipitation방법에서와 동일하게 cpm값을 측정하였다.

Crossed immunoelectrophoresis

Tris-citrate buffer, 0.05M, pH 8.5 에 1% agarose를 넣고 중탕하여 gel bond film 위에 두께 1mm, 1% agarose gel을 만들고 하단 1.5cm부위에 well을 뚫고 $100V \times 3hr$ 간 1차 전기영동을 실시하였다. 단백질이 diffuse되는것을 방지하기 위하여 빠른 시간내에 sample이 전개되지않은 gel 부위를 제거하고 그 곳에 1% antiserum이 포함된 1% agarose gel을 만든후 gel을 90° 회전하여 $120V \times 12hr$ 간 2차 전기영동을 실시한후 Rocket immunoelectrophoresis와 동일한 방법으로 염색을 실시하였다.

전기영동

Non-dissociating discontinuous system을 이용한 polyacrylamide gel electrophoresis는 Davis(1964)의 방법에 따라 7.5%로 실시하였다. 염색은 Coomassie brilliant blue R-250으로 실시하였다.

Gel fractionation and counting

Gel fractionation의 경우 염색이 끝난 gel을 wrapping film으로 sealing하여 $-70^{\circ}C$ 에서 1시간동안 냉동시킨 후 1mm간격으로 잘라

내었다. 1mm 간격으로 절단된 gel은 빈 counting vial에 넣고 50°C에서 2시간 incubation하여 말린후 30% (w/v) H₂O₂를 0.25ml 넣고 뚜껑을 막은 후 50°C에서 2시간 incubation하여 완전히 녹였다. 실온에서 식힌 후 10ml의 scintillation cocktail을 넣고 혼합한 후 scintillation counter로 방사능을 측정하였다.

Western blots

전기영동이 끝난 gel상의 단백질을 nitrocellulose membrane에 옮긴 후, membrane을 BLOTTO/TTBS(50mM Tris-HCl, pH 7.4, contained 200mM NaCl + Tween 20 + 5% SKIM MILK POWDER) 용액에 넣고 30분간 room temperature에서 shaking하였다. 난황단백질에 대한 항체인 anti-rabbit serum(1차 항체)을 1:200되게 BLOTTO/TTBS로 희석한 용액에 membrane을 넣고 37°C에서 2시간 incubation하였다. 1차항체의 결합이 끝난 후 BLOTTO/TTBS용액에서 10분간 4회의 washing을 실시하여 결합하지 않은 항체를 씻어내었다. Alkaline phosphatase conjugated Goat anti-rabbit IgG(2차 항체)를 BLOTTO/TTBS로 1:2000으로 희석한 용액에 membrane을 넣고 37°C에서

2시간 incubation한 후 BLOTTO/TTBS로 10분씩 4회 씻어내고 즉시 발색용액(NBT:BCIP:Carbonate buffer = 1:1:100)에 넣고 흔들며 주면서 발색시켰다. 발색이 완전히 끝난 후 증류수에 membrane을 넣어 발색을 중지시켰다.

결과 및 고찰

분리된 난황단백질을 토끼에 주사하여 cardiac puncture의 방법으로 얻어낸 항혈청을 Ouchterlony double diffusion test와 immunoelectrophoresis method로 분석하였다. Ouchterlony test 결과 숫모기의 whole body, 혈림프와 흡혈치 않은 암모기의 혈림프, 난소 추출물에 대해서는 항원-항체 반응이 각각 나타나지 않았고, 흡혈한 후 24시간된 암모기의 혈림프와 분리된 vitellin에 대해서만 항원-항체 반응의 결과를 나타내는 침전선이 보였다(Fig. 1a). 이결과로 흡혈한 암모기의 체내에만 특이하게 존재하는 난황단백질에 대한 항체가 만들어졌음이 확인되었다. Immunoelectrophoresis 결과 숫모기의 whole body에 대해서는 침전선이 나타나지 않았고 흡혈 후 24시간된 암모기의 혈림프, 분리된 vitellin, 그리고 흡혈 후 72시간된 난소추출물의 경우에 있어서는 이동거리가

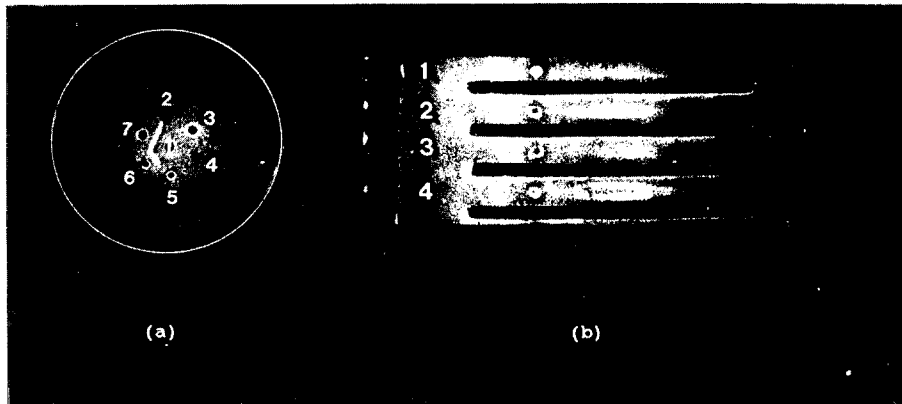


Fig. 1. Ouchterlony test (a) and immunoelectrophoresis (b) for vitellin rabbit antiserum. (a: 1. Antiserum, 2. Male whole body extract, 3. Male hemolymph, 4. Female hemolymph of non-blood fed, 5. Ovary extract of non-blood fed, 6. Female hemolymph at 24hr after blood meal, 7. Purified vitellin, b: 1. Male whole body extract, 2. Female hemolymph at 24hr after blood meal, 3. Purified vitellin, 4. Female ovary extract at 72hr after blood meal.)

유사하며 단일한 하나의 침전선이 나타났다 (Fig. 1b). 이결과에서도 흡혈한 암모기의 체내에만 존재하는 난황단백질에 대한 항체가 만들어졌음을 알 수 있다.

흡혈후의 난황단백질 합성 양상을 *in vitro*에서 관찰하기 위하여 지방체를 ^3H -leucine이 함유된 조직배양액에서 배양한 후 그 배양액을 추출하여 Ag Ab 침전방법과 TCA 침전방법으로 정량분석하였다. 그 결과 *Culex pipiens*에서는 흡혈 후 24시간에 ^3H protein 및 ^3H -vitellogenin이 가장 많이 합성되었고 36시간이후 급격히 합성이 감소되어 48시간 이전에 합성이 종료되었다 (Fig. 2 및 3). 이 결과는 *A. aegypti*에 있어서 난황단백질합성이 흡혈 후 21-32시간에 최대의 합성량을 나타낸 후 감소하여 48시간 이내에 그 합성이 완료된다는 보고 (Hagedorn *et al.*, 1975; Fallon *et al.*, 1974; Bohm *et al.*, 1978, Borovsky, 1982)와 일치한다.

*Culex pipiens*에 있어서 흡혈 후 난소에 축적되는 vitellin의 양을 rocket immunoelectrophoresis 방법으로 정량하였다. 난황단백질이 흡혈 6시간 이후부터 축적되기 시작하여 48시간 이후에도 계속 증가하여 60시간까지 계속되었다 (Fig. 4). 이 결과는 흡혈 후 42-48시

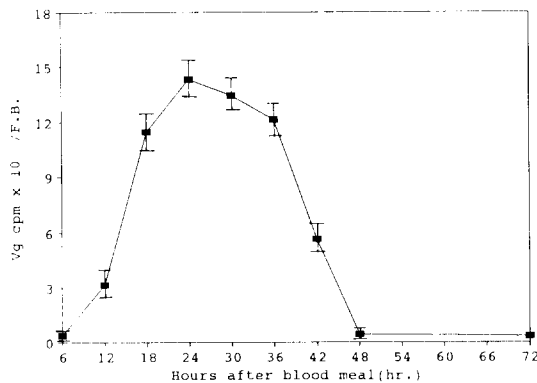


Fig. 2. ^3H -protein synthesis by *in vitro* cultured fat body of the blood fed *Culex pipiens*. At various times, fat bodies were cultured in ^3H -leucine contained medium, and the amount of incorporated ^3H -leucine was determined by TCA precipitation method. Each point represents the mean \pm SD.

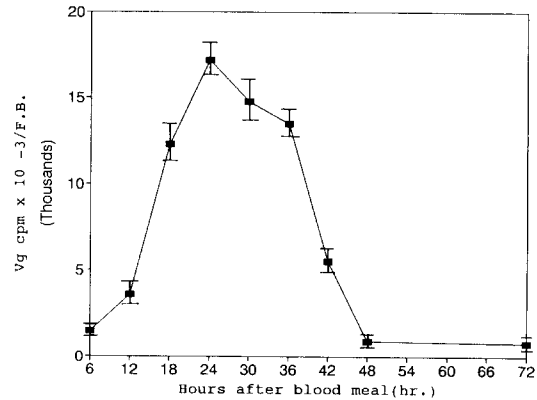


Fig. 3. ^3H -vitellogenin synthesis by *in vitro* cultured fat body of the blood fed *Culex pipiens*. At various times, fat bodies were cultured in ^3H -leucine contained medium, and the amount of ^3H -vitellogenin was determined by Ag-Ab precipitation method. Each point represents the mean \pm SD.

간에 난소내로의 난황단백질 축적이 완료된다는 보고 (Yonge and Hagedorn, 1977; Greenplate *et al.*, 1985)와는 큰 차이를 보이며, 지방체 이외의 다른 기관에서 난황단백질 합성이 일어날 수 있는 가능성을 제시한다.

흡혈 한 *C. pipiens* 암모기의 난소내에 축적되는 난황단백질의 종류를 알아보기 위하여 각 시간별 난소 추출물로 7.5% polyacrylamide gel electrophoresis를 실시한 결과 흡혈 후 24시간된 난소 추출물의 경우 흡혈하지 않은 암모기의 난소에서는 존재하지 않는 하나의 난황단백질 밴드가 나타났고 48시간 이후의 난소에서는 24시간된 난소에서 나타난 난황단백질 바로 아래 난황 단백질 밴드로 보이는 새로운 밴드가 나타났다 (Fig. 5a)

새로 생긴 단백질 밴드가 난황단백질을 확인하기 위하여 상기의 실험과 동일하게 전기영동을 실시하고 단백질 염색을 하지 않은 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane에 옮긴 후 western blotting을 실시하였다. 그 결과 흡혈을 하지 않은 암모기의 난소 추출물을 전기영동한 lane에서는 아무런 밴드도 나타나지 않았으며, 흡혈 후 24시간된 난소의 경우는 난황단백질의 항체에 반응한 하나의 밴드가 나타났으며 48시간된 난소에서 나타난 2개의 단백질도 난황단

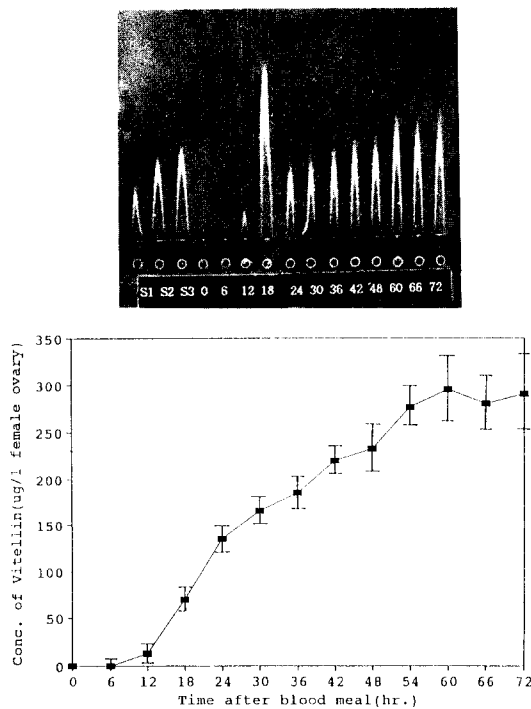


Fig. 4. Vitellin levels in female *Culex pipiens* after blood meal. At various times, ovaries were homogenized, and the amount of vitellin was determined by rocket immunoelectrophoresis (a). Each point represents the mean±SD (b). (S represents standard vitellin, S1-1ug, S2-1.5ug, S3-2ug, 0~18; undiluted, 24~72; ×10 diluted)

백질에 대한 항체와 반응하였다(Fig. 5b). 그러므로 이 두종류의 단백질이 모두 난황단백질을 알 수 있다.

흡혈 후 24시간과 48시간 지난 난소로부터 추출물을 두께 1mm, 1% agarose gel로 1차 전기영동한 후 난황단백질에 대한 항체가 1% 첨가된 1% agarose gel 내에서 Crossed immunoelectrophoresis하여 난황단백질의 항체와 반응하는 단백질이 몇개나 존재하는지 조사하였다. 그 결과 흡혈 후 24시간된 난소 추출물의 경우는 침전선이 하나의 정점을 나타내어 (Fig. 6a) 1종류의 난황단백질이 존재하는 것으로 나타났으나 48시간된 난소 추출물의 경우는 24시간된 난소 추출물의 경우 나타나는 침전선의 정점과 동일한 위치에서 낮은 침전선이 형성

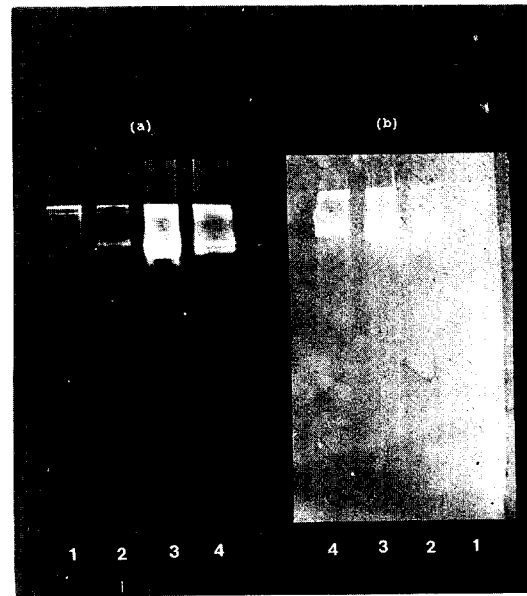


Fig. 5. Electrophoresis(a) and western blot analysis(b) for vitellin from various time *Culex pipiens* ovary extract after blood meal. (1. non blood fed, 2. 24hr after blood meal, 3. 48hr after blood meal, 4. 72hr after blood meal)

되었고, 그와 연결되어 뒤에 또다른 침전선의 정점이 나타나는 것으로 보아 48시간된 난소에는 난황단백질에 대한 항체와의 반응에서 동일한 면역성을 나타내며 전기영동상에서 서로 다른 두개의 정점을 나타내는 것으로 보아 이동거리에서 차이를 보이는 서로 다른 2개의 난황단백질이 존재하는 것을 알게되었다(Fig. 6b). 전기영동 및 Western blotting의 결과(Fig. 5a 및 5b), 흡혈 후 24시간된 난소에서는 하나의 난황단백질 밴드가 나타났고, 48시간 이후의 난소에서는 YP1보다 분자량이 작은 또다른 난황단백질을 포함하고 있었다. 그리고 Crossed immunoelectrophoresis 결과 흡혈 후 24시간된 난소에서 나타난 침전선의 정점과 48시간된 난소에서 나타난 두개의 정점중 앞쪽의 낮은 침전선이 서로 이동거리가 같으므로 분자량이 큰 앞쪽의 정점이 지방체에서 합성되는 난황단백질이며, 지방체에서의 난황단백질 합성이 완전히 정지된 흡혈 후 48시간 이후의 난소에서만 나타나는 분자량

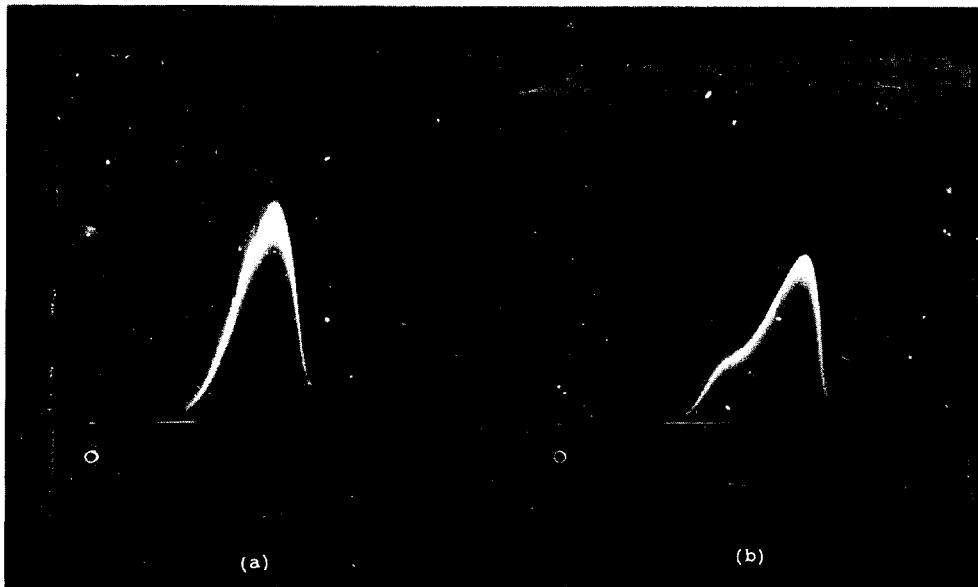


Fig. 6. Crossed immunoelectrophoresis for *Culex pipiens* vitellin. (a. 24hr ovary extract after blood meal, b. 48hr ovary extract after blood meal)

이 작은 정점이 난소에서 합성되는 난황단백질인 것으로 추측된다.

흡혈 후 48시간이 지난 이후에 *C. pipiens* 암모기의 지방체와 난소를 ^3H -leucine이 함유된 배양액속에서 배양하였을 때 ^3H leucine이 단백질 속으로 incorporation되는지를 조사하였다. 흡혈 후 48시간 된 난소와 지방체를 ^3H -leucine이 함유된 배양액에서 10분 간격으로 2시간동안 배양하여 지방체에서 합성된 ^3H -protein과 난소에서 합성된 ^3H -protein의 양을 TCA 침전방법으로 조사하였다. 그 결과 48시간된 지방체의 경우는 배양시간에 따른 ^3H -protein의 양에서 변화를 나타내지 않았으나 48시간된 난소의 경우는 배양시간이 80분동안 계속될수록 ^3H -protein의 합성량이 점진적으로 증가하는 양상을 보여 흡혈 후 48시간된 지방체에서는 단백질의 합성이 거의 일어나지 않으나 흡혈 후 48시간이 지난 난소에서는 단백질의 합성이 왕성하게 일어나는 것을 알 수 있다(Fig. 7).

흡혈 후 48시간된 난소를 떼어내어 ^3H -leucine이 들어있는 배양액에서 2시간 배양한 후 그 난소의 추출물을 전기영동하고 단백질 염

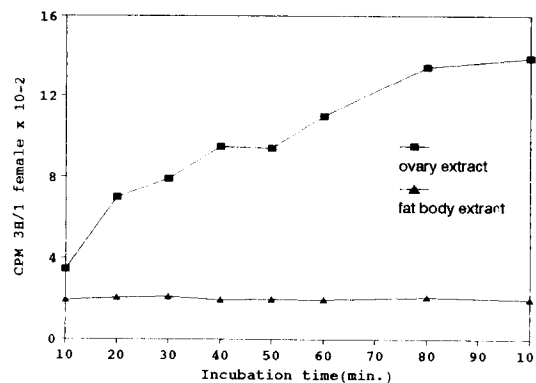


Fig. 7. ^3H -leucine incorporation rate into soluble protein of fat body and ovary *in vitro*. 48hr ovaries and fat bodies after blood meal were incubated and the amount of incorporated ^3H -leucine was determined by TCA precipitation method.

색하였다. 그 결과 2개의 밴드가 나타났으며, 아래쪽의 난황단백질인 YP2에서 높은 방사능이 나타났다. (Fig 8). 그러므로 흡혈 후 48시간 이후의 난소에서 YP2가 합성됨을 알 수 있다.

이상의 결과들에 따라서 홍모기 (*C. pipiens*)

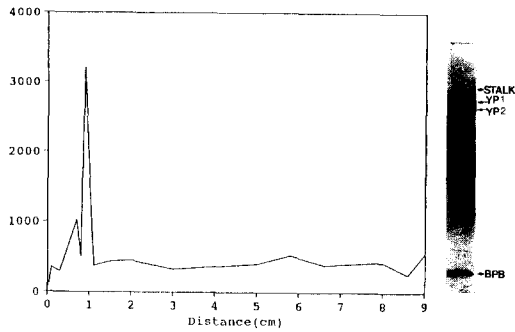


Fig. 8. Electrophoresis and gel fractionation and counting for 48hr *Culex pipiens* vitellin after blood meal. PBM 48hr ovaries were incubated in ^3H -leucine contained medium and the ovary extract were electrophoresed by 7.5% non-dissociating discontinuous PAGE. The gel were stained and sliced in 1mm. And the slices were counted by scintillation counter.

의 경우는 지금 까지 연구된 다른 모기들과는 달리 지방체에서 뿐만 아니라 난소에서 난황단백질의 합성이 일어난다는 것을 확인하였다.

인용문헌

- Atlas, S.J., T.F. Roth and A.J. Falcone, 1978. Purification and partial characterization of *Culex pipiens fatigans* yolk protein. *Insect Biochem.* **8**: 111-115.
- Beckemeyer, E.F. and A.O. Lea, 1980. Induction of follicle separation in the mosquito by physiological amounts of ecdysone. *Science.* **209**: 819-820.
- Bohm, M.K., M. Behan and H. H. Hagedorn, 1978. Termination of vitellogenin synthesis by mosquito fat body, a programmed response to ecdysterone. *Physiol. Entomol.* **3**: 17-25.
- Borovsky, D., 1982. Release of egg development neurosecretory hormone in *Aedes aegypti* and *Aedes taeniorhynchus* induced by an ovarian factor. *J. Insect Physiol.* **28**: 311-316.
- Borovsky, D., 1986. Synthesis processing and transport of mosquito vitellogenin. In Host regulated development mechanisms in vector arthropods. pp. 32-36. University of Florida.
- Borovsky, D., B.R. Thomas, D.A. Carlson, L.R. Whisenton and M.S. Fuchs, 1985. Juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone as primary and second stimuli of vitellogenesis in *Aedes aegypti*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **2**: 75-79.
- Chen, T.T., 1980. Vitellogenin in Locusts(*Locusta migratoria*): Translation of vitellogenin mRNA in *Xenopus* oocytes and analysis of the polypeptide products. *Arch. Biochem. Biophys.* **201(1)**: 266-276.
- Chinzei, Y., B.N. White and G.R. Wyatt, 1982. Vitellogenin mRNA in locust fat body: identification, isolation, and quantitative changes induced by juvenile hormone. *Can. J. Biochem.*, **60**: 243-251.
- Fallon, A.M., H.H. Hagedorn, G.R. Wyatt and H. Lauter, 1974. Activation of vitellogenin synthesis in the mosquito *Aedes aegypti* by ecdysone. *J. Insect Physiol.* **20**: 1815-1823.
- Fuchs, M.S. and S.H. Kang, 1982. Ecdysone and mosquito vitellogenesis: A critical appraisal. *Insect Biochem.* **11**: 627-633.
- Greenplate, J.T., G.L. Glaser and H.H. Hagedorn, 1985. The role of factors from the head in the regulation of egg development in the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* **31**: 323-329.
- Hagedorn, H.H. 1985. The role of ecdysteroids in reproduction. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology.* **8**: 205-262.
- Hagedorn, H.H. and A.M. Fallon, 1973. Ovarian control of vitellogenin synthesis by the fat body in *Aedes aegypti*. *Nature.* **244**: 103-105.
- Hagedorn, H.H., J.D. O'Connor, M.S. Fuchs, B. Sage, D.A. Schlaeger and M.K. Bohm, 1975. The ovary as a source of α -ecdysone in an adult mosquito. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **72**: 3255-3259.
- Hagedorn, H.H., J.P. Shapiro and K. Hanaoka, 1979. Ovarian ecdysone secretion is controlled by a brain hormone in an adult mosquito. *Nature*, **282**: 92-94.
- Isaac, P.G. and M. Bownes, 1982. Ovarian and fat body vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Eur. J. Biochem.* **123**: 527-534.
- Laurell, C.B., 1966. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. Biochem.* **15**: 45-52.
- Lea, A.O. 1967. The medial neurosecretory cells and egg maturation in mosquitos. *J. Insect Physiol.* **13**: 419-429.
- Lea, A.O. 1970. Endocrinology of egg maturation in autogenous *Aedes taeniorhynchus*. *J. Insect Physiol.* **16**: 1689-1696.
- Postlethwait, J.H. and R. Kaschnitz, 1978. The synthesis of *Drosophila melanogaster* vitellogenins in vivo, in culture, and in a cell-free translation system. *FEBS Letters.* **95(2)**: 247-251.
- Reddy, S.R.R. and G.R. Wyatt, 1967. Incorporation of uridine in vitro by *Cecropia silkworm* wing epidermis

- during diapause and development. *J. Insect Physiol.* **13**: 981-994.
- Shapiro, J.P. and H.H. Hagedorn, 1982. Juvenile hormone and the development of ovarian responsiveness to a brain hormone in the mosquito, *Aedes aegypti*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **46**: 176-183.
- Varma, M.G.R. and M. Pudney, 1969. The growth and serial passage of cell lines from *Aedes aegypti*(L.) larvae in different media. *J. Med. Ent.* **6**: 432-439.
- Yonge, C. and H.H. Hagedorn, 1977. Dynamics of vitellogenin uptake in *Aedes aegypti* as demonstrated by trypan blue. *J. Insect Physiol.*, **23**: 1199-1203.

(Accepted July 1, 1993)

Ovarian and Fat Body Yolk Protein Synthesis in *Culex pipiens pallens*

Seung-Hoon Lee, Young-Min Park, and Ki-Chang Sung (Department of biology, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea)

Ovarian Yolk protein (YP2) synthesis has been investigated in mosquito, *Culex pipiens pallens*. Yolk protein amount which was synthesized in fat body, accumulated into ovary were analyzed by Rocket immunoelectrophoresis and *in vitro* organ culture. The result was that yolk protein synthesis began to occur at 6hrs after blood meal, reached at maximum level by 24hrs, and was completed within 48hrs. Yolk protein accumulation into the ovary began to start at 6hrs and continued for up to 60hrs after blood meal. Extract from 0, 24, 48, 72hrs ovaries after blood meal were analyzed by electrophoresis and Western blotting. The result was that 24hrs ovary contain one yolk protein(YP1), and 48, 72hrs ovaries contain two kinds of yolk proteins(YP1 and YP2). When 48hr ovaries and fat bodies were incubated in ³H-leucine contained medium, protein synthesis was not occurred in fat body, but ovary synthesized much protein contained yolk protein (YP2). The result of crossed immunoelectrophoresis represented the same immunity between YP1 and YP2.

The present data suggest that ovary synthesize yolk protein(YP2) in mosquito, *Culex pipiens pallens*.