

배추흰나비(*Pieris rapae*) 발생 특이 큐티클단백질의 질적 분포에 관하여

서울원

안동대학교 자연과학대학 생물학과

배추흰나비의 조직과 발생시기에 따른 발생 특이 큐티클단백질의 질적 분포를 조사하기 위해 전기영동법, western blotting 및 autoradiography 법을 사용하였다.

SDS-PAGE에서 유충기에는 4개, 용기에는 3개의 단백질이 발생 특이 큐티클단백질로 확인되었다. 전기영동적 이동도로 보아 유충기의 62 Kd 큐티클단백질은 지방체, 표피, 혈림프에 모두 분포하며, 22 Kd, 16 Kd 단백질은 지방체와 표피, 그리고 19 Kd 단백질은 지방체에서 확인되고 있으며, 용기의 37 Kd 단백질은 표피에서, 28 Kd, 27 Kd 단백질은 표피와 지방체에 분포하는 양상을 보이고 있다. 면역학적 방법으로 발생 특이 큐티클단백질의 동질성을 조사한 결과 용기의 27 Kd 단백질은 표피와 지방체에서 반응을 나타내며, 유충기의 22 Kd 단백질은 단지 표피에서만 미약하게 이의 동질성을 보여주고 있다. 즉, 27 Kd 단백질은 지방체, 22 Kd 단백질은 표피에서 기원하고 있어 발생 특이 큐티클단백질의 합성부위는 한 조직에서 기원하는 것이 아니라 각기 상이한 조직으로 부터 생성되는 것으로 사료된다.

KEY WORDS: *Pieris rapae*, Stage Specific Cuticle Protein, Qualitative Distribution

곤충의 큐티클은 외부 구조물로서 키틴과 단백질의 고분자 화합물로 구성되어 있으며 이의 기계적인 특성은 단백질성분과 경화의 정도에 따라 매우 특이하게 나타난다(Andersen, 1974; Shawky and Vincent, 1978; Willis, *et al.*, 1981). 최근 들어 큐티클단백질에 대한 관심이 고조되면서 몇몇 연구진에서는 큐티클이 매우 복잡적으로 구성되어 있으며, 발생과정을 거치면서 발생 특이 큐티클단백질이 출현한다고 보고하고 있다(Roberts and Willis, 1980; Chihara *et al.*, 1982; Sridhara, 1983; Lemoine and Delachambre, 1986; Andersen *et al.*, 1986; Skelly and Howells, 1988; Stiles and Leopold, 1990; Seo, 1990, 1993). 이에 따라 여러 종류의 곤충류에서 발생 특이 큐티클단백질이 정제되어 이의 생화학적 특성이 밝혀 졌고(Fristrom *et al.*, 1978; Andersen and Hojrup, 1987;

Willis, 1987; Souliotis *et al.*, 1988), 부분적으로 이러한 단백질의 아미노산 서열도 확인되었다(Willis, 1989; Klarskov *et al.*, 1989; Nohr *et al.*, 1992).

이러한 큐티클단백질은 발생시기에 따라 발현되어 특이한 생리적 기능을 갖게되며 이에 따라 큐티클은 다양한 형태와 기능을 갖게된다. 그러나, 발생 특이 큐티클단백질의 발현이 완전히 독립적인 것은 아니어서 polyclonal antibody를 사용한 실험결과를 보면 동일한 곤충의 발생시기에 따라서도 큐티클단백질 사이에는 구조적 유사성이 있다고 보고되고 있다(Sridhara, 1983; Silvert *et al.*, 1984; Cox, 1987; Souliotis *et al.*, 1988; Stiles and Leopold, 1990). Chihara 등(1982)은 *Drosophila melanogaster*의 1, 2령충의 큐티클단백질을 전기영동해 보면 이의 전기영동상은 거의 동일하지만 3령에 들어서면서 급격히 변한다고 했으며, Skelly와

Howells(1988)은 *Lucilia cuprina*의 3령충에서 9개의 큐티클단백질을 확인하였는데 이중 3개는 1령, 4개는 2령충에서도 공유되고 있으며, 면역학적으로 이들은 표피에서만 확인되었고, 혈림프를 통해 큐티클로 이동되는 것 같지는 않다고 한 바 있다. 즉, 발생시기에 따라 발생 특이 큐티클단백질이 여러 곤충에서 확인되고 있는데, Cox와 Willis(1985, 1987)은 2차원 전기영동을 통해 큐티클단백질의 합성은 큐티클의 기능과 특성에 따라 달라진다고도 하였다. 이와같이 큐티클단백질은 발생특이적으로 나타나고 있으나, 이러한 큐티클단백질의 조직과 발생시기에 따른 분포에 대해서는 거의 연구되어 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 큐티클단백질을 추출하여, 전기영동법, 면역학적 방법 및 autoradiography법을 통해 발생 특이 큐티클단백질의 질적 분포를 조사하고자 한다.

재료 및 방법

실험곤충

경상북도 안동시 안동댐 주위에 서식하는 배추흰나비를 채집, 동정한 후 안동대학교내 비닐하우스에 재배중인 케일밭에서 배추흰나비를 대량 사육하였다. 5령이 되었을 때 유충을 실내 실험실로 옮겨 실험재료로 사용하였다.

단백질의 추출

배추흰나비 유충 및 용기의 발생단계를 종령말, 전용초, 전용말, 용화직후, 용화 1일, 용화 3일, 용화 5일의 간격으로 구분하였다. 혈림프는 복부를 날카로운 침으로 찌른 후 소량의 phenylthiourea가 함유된 micro-centrifuge tube에 채취한 후 12,000 rpm에서 2분간 원심 분리 시켜 상등액을 단백질 시료로 사용하였다. 혈림프를 채취한 후 곤충을 차가운 링거용액에서 해부하여 큐티클, 표피, 지방체를 적출하였다. 적출된 조직들은 링거용액으로 3-4회 세척하여 혈림프 및 기타 조직 절편을 제거하였다. 이들 조직에서 단백질을 추출하기 위하여 homogen-

tion buffer(50 mM Tris, 0.25 mM NaCl, pH 8.2)에서 완전히 균질화 시킨 후 12,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 상등액을 각 조직에 대한 단백질 시료로 이용하였다.

전기영동

상기에서 추출된 단백질 시료에서 발생 특이 큐티클단백질의 존재를 확인하기 위하여 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) 법을 사용하였다. SDS-PAGE를 하기 위하여 큐티클단백질 시료를 freeze dryer에서 농축시킨 후 SDS-sample buffer(60 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% Glycerol, 3% β -mercaptoethanol)를 부가한 후 70°C에서 10분간 처리하였다. 이러한 단백질시료와 함께 이의 분자량을 측정하기 위하여 Bio-Rad사의 SDS-PAGE low molecular weight standards(phosphorylase B, MW 97,400; bovine serum albumin, MW 66,200; ovalbumin, MW 42,699; carbonic anhydrase, MW 31,000; soybean trypsin inhibitor, MW 21,500; lysozyme, MW 14,400)을 0.1% SDS가 포함된 3% stacking gel과 9-14% gradient separation gel에서 전기영동한 후(Laemmli, 1970), 0.1% Coomassie brilliant blue R 250에서 염색하여 큐티클단백질 시료로 부터 발생 특이 큐티클단백질을 확인하였다.

항체제조

상기의 SDS-PAGE상에서 발생 특이 큐티클단백질을 확인한 후 발생 특이 큐티클단백질이 포함된 밴드를 면도칼로 잘라내었다. 이 밴드를 Bio-Rad사의 electro-eluter에 넣고 밴드 속에 들어있는 단백질을 농축 추출하였다. 이와 같이 부분적으로 정제된 발생 특이 큐티클단백질에 Freund's complete adjuvant를 각기 동량(0.5 ml씩) 혼합하여 토끼에 일주일에 한번씩 3주간 피하 주사하고, 마지막 주사 10일 후에 다시 한번 booster injection하여 10일 경과후 cardiac puncture를 통해 혈액을 채취하여 혈

장만을 취하였다. 이 혈장에서 IgG만을 정제하기 위해 혈장을 ammonium sulfate로 40%되게 포화시킨 후 이의 침전물을 모아 증류수에 녹인 후 dialysis시켜 이를 발생 특이 큐티클단백질에 대한 항체로 사용하였다.

면역확산

면역확산은 Ouchterlony(1949) 방법을 이용하였다. phosphate buffer(pH 7.0)에 녹인 1% agarose로 gel plate(5 cm×5 cm)를 만든 후 항원(큐티클, 지방체, 표피, 혈림프)과 항체를 가하여 3일간 moisture chamber에서 반응시킨 후 생성된 precipitin line를 조사하였다.

Western-blotting

각 조직에서 추출된 단백질 시료를 9-14% gradient SDS-PAGE 상에서 분리한 후 이들을 다시 Nitrocellulose membrane에 부착시키기 위해 trans-blotting buffer(25 mM Tris, 2 mM glycine, 20% methanol, pH 8.3)에서 2차적으로 분리하였다. 이 membrane을 1차적으로 발생 특이 큐티클단백질의 항체로 처리한 후 Bio-Rad사의 immuno-blot assay kit를 사용하여 Hawkes 등(1982)의 방법에 따라 Goat anti-rabbit IgG(H+L)로 처리한 후 발색하였다.

Autoradiography

배추흰나비의 발생시기에 따라 큐티클단백질의 분포를 살펴보기 위해 종령 중기의 유충에 5 μ Ci의 [4.5- 3 H(N)]-leucine을 혈강에 주사하여 종령말, 전용초, 전용말, 용1일, 용3일의 간격으로 혈림프, 지방체, 표피, 큐티클을 적출한 후 단백질을 추출하였다. 상기의 추출된 단백질을 9-14% gradient SDS-PAGE 상에서 전개한 후 coomassie blue로 염색한 후 사진촬영을 하였다. 이후 이 gel을 EnhanceTM(NEN)에 30분간 처리하여 표지된 단백질들을 활성화시켰고, 이 gel을 건조시킨 후 Kodak X-Omat X-ray film과 함께 -70°C에서 40일간 노출시킨 후 X-ray film을 현상시켜 이의

fluorography를 조사하였다.

결과

배추흰나비의 종령기 및 용기동안 발생 특이 큐티클단백질을 확인하기 위하여 9-14% gradient SDS-PAGE법을 이용하였다(Fig. 1). 큐티클단백질의 단백질 패턴은 종령기에서 용기로 발생이 진행되 감에 따라 두드러지게 질적변화가 나타나고 있으며, 부분적으로 양적변화도 수반되고 있다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 종령기에서는 62 Kd, 22 Kd, 19 Kd 및 16 Kd의 네개의 단백질이 종령기 특이 큐티클단백질로 확인되었다. 이 단백질들은 종령기에서 용기로 진행되 감에 따라 완전히 사라지는데, 이것은 변태과정을 통해 조직의 분해에 따라 소멸되는 것으로 이 단백질들은 소화와 재흡수 과정을 통해 용기의 새로운 단백질로 이용될 것으로 추측되고 있다. 이와 더불어 용기에서도 37 Kd,

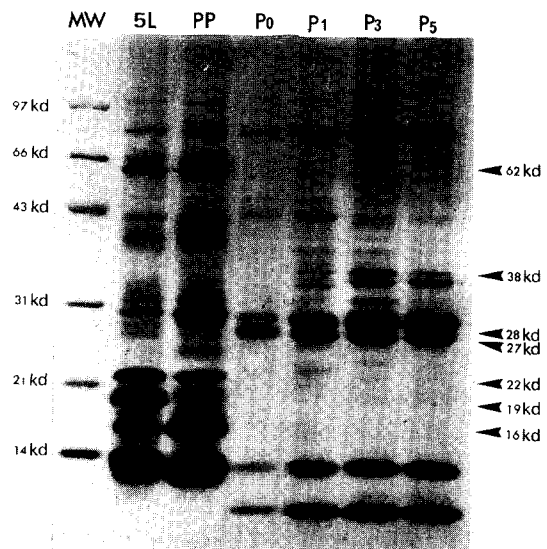


Fig. 1. 9-14% gradient SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of cuticle proteins during metamorphosis of *Pieris rapae*. Arrows show larval and pupal specific cuticle proteins by their molecular weight. Letter symbols indicate: MW, molecular weight markers; 5L, 5th larva; PP, prepupa; P₀, just ecdysed pupa; P₁, 1 day old pupa; P₃, 3 day old pupa; P₅, 5 day old pupa

28 Kd, 27 Kd의 단백질들이 용기 특이 큐티클 단백질로 확인되고 있다. 이중 37 Kd 단백질은 28, 27 Kd 단백질 보다 양적으로 적은 양상을 나타내고 있으며, 28, 27 Kd 단백질은 비교적 높은 농도로 용시기 동안 지속적인 농도를 유지하고 있다. 용기동안 큐티클단백질의 양상은 거의 동일하게 나타나고 있으며, 약간의 질적인 차이만을 보여주고 있으나, 우화직전으로 가면 양 및 질적인 면에서 상당히 변하는 양상을 나타내고 있다. 종령기 및 용기 특이 큐티클단백질의 분포를 살펴보기 위하여 지방체, 표피 및 혈림프에서 채취한 단백질들을 SDS-PAGE 상에 전개하였다(Figs. 2, 3, 4). 종령기의 62 Kd, 22 Kd, 19 Kd 및 16 Kd의 네개의 단백질과 용기의 37 Kd, 28 Kd, 27 Kd 단백질들의 전기영동적 이동도와 지방체, 표피 및 혈림프 단백질의 이동도를 비교하여 종령기 및 용기의 발생특이 큐티클단백질을 조사해 보면 종령기의 62 Kd 단백질은 지방체, 표피 및 혈림프에 모두 분포하고 있으며 22 Kd 단백질은 지방체에서는 종령기 및 전용기 시기에 비교적 높은 농도를 보이

용화후 부터 비교적 농도가 감소하고 있으며, 표피에서는 종령말기 부터 용초기까지 비교적 높은 농도로 유지되고 있다. 또한 혈림프에서는 전시기에 걸쳐 높은 농도를 유지하고 있다. 그러나,

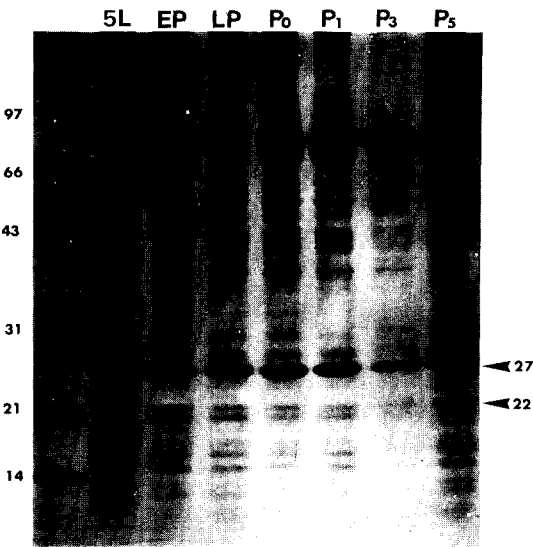


Fig. 2. 9-14% SDS-PAGE pattern of fat body proteins during metamorphosis of *Pieris rapae*. Arrows show 27 Kd pupal specific protein and 22 Kd larval specific protein. EP, early prepupal stage; LP, late prepupal stage

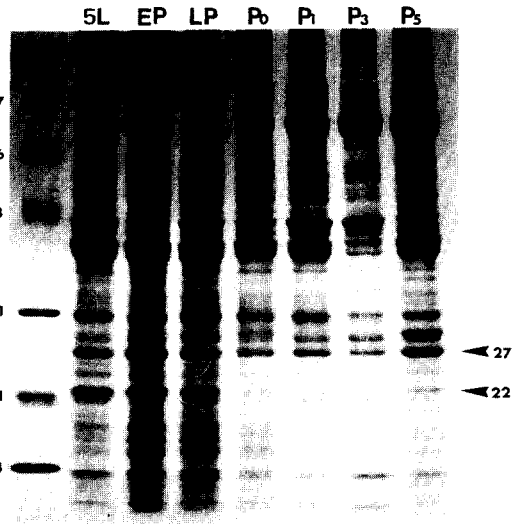


Fig. 3. 9-14% SDS-PAGE pattern of epidermal proteins during metamorphosis of *Pieris rapae*.

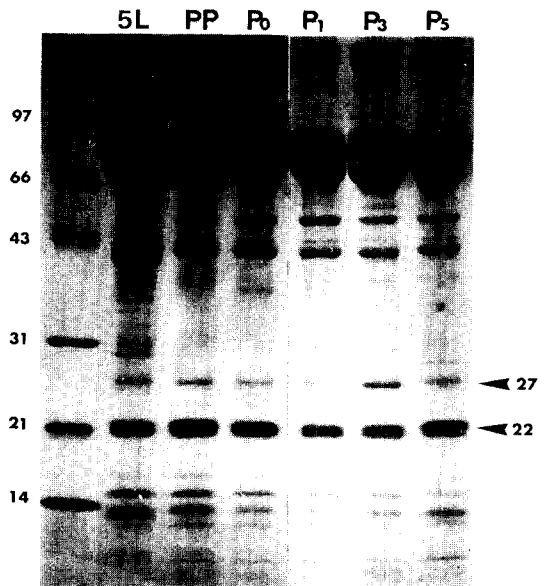


Fig. 4. 9-14% SDS-PAGE pattern of haemolymph proteins during metamorphosis of *Pieris rapae*.

19 Kd 단백질은 단지 지방체에서만 일정한 농도를 유지하고 있으며, 16 Kd 단백질은 지방체와 표피에서 전 발생시기를 걸쳐 일정하게 유지되고 있다. 이에 반해 용기의 37 Kd 단백질은 표피에서만 확인되고 있으나 기타 조직에서는 확인되지 않고 있으며, 28 Kd 단백질은 지방체나 표피에서 비교적 약한 농도로 확인되며, 27 Kd 단백질은 높은 농도로 전 발생시기에 걸쳐 유지되고 있다. 즉, 종령 및 용기 특이 큐티클단백질은 조직 및 발생시기에 따라 각기 상이하게 발현되고 있는 현상을 보여주고 있다. 이런 발생 특이 큐티클단백질의 *in vivo* 생합성을 통한 분포를 살펴보기 위해 (³H)-leucine을 종령중기에 주사한 후 종령말, 전용, 용기에 따라 조직을 적출하여 9-14% SDS-PAGE 상에 전개한 후 이 gel을 Enhance(NEN)에 처리하여 fluorography를 조사하였다(Fig. 5). 큐티클에서는 27 Kd 용기 특이 큐티클단백질이 용기 부터 큐티클 속으로 축적되고 있으며, 지방체에서도 27 Kd 용기 특이 큐티클단백질이 종령기 부터 높은 농도로 합

성되어 용기 말까지 유지되는 양상을 보여주고 있다. 그러나, 표피와 혈림프에서는 용기 특이 큐티클단백질이 분포되어 있지 않으며, 대신에 종령기 특이 큐티클단백질인 22 Kd 단백질이 분포하는 양상을 나타내고 있다.

발생 특이 큐티클단백질의 분포를 면역학적인 방법으로 조사하기 위해 종령기 큐티클단백질과 용기의 27 Kd 단백질 및 종령기의 22 Kd 단백질을 부분 정제하여 항체를 제조하여 이를 면역확산(Fig. 6)과 western-blotting(Figs. 7, 8)을 통해 큐티클단백질의 질적 분포를 살펴보았다. 우선 면역확산에서 종령기 큐티클단백질에 대해 큐티클단백질은 종령기 및 전용기에 동일한 precipitin line을 형성하고 있으며(Fig. 6), 표피에서도 종령기와 전용기에 걸쳐 큐티클단백질에 대해 precipitin line을 형성하고 있으나 그 이후에는 precipitin line이 형성되지 않고 있다. 또한, 지방체와는 거의 반응을 나타내지 않고 있으며 혈림프와는 전용직후에만 precipitin line을 형성하며 그 이후에는 아무런 반응도 나타내지 않고 있다. 면역확산법을 통한 큐티클단백질의 질적 분포를 보다 자세히 살펴보기 위해 각 조직의 단백질을 nitrocellulose

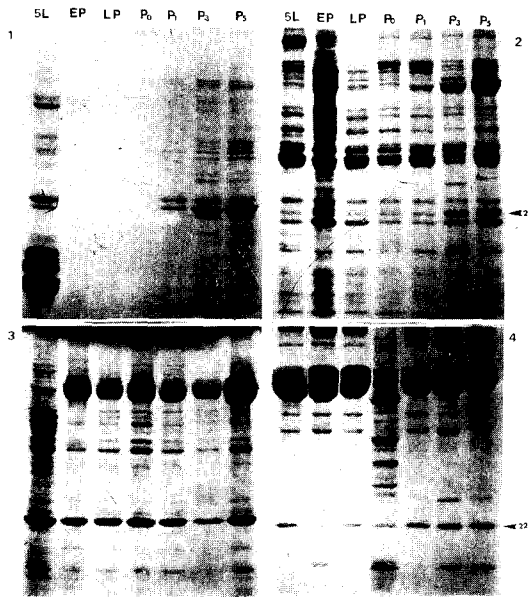


Fig. 5. Fluorography of cuticle (1), fat body (2), epidermis (3) and haemolymph (4) proteins during metamorphosis. ³H-leucine was injected into the haemocoel in mid 5th larval stage and the tissues were collected at every proper developmental stage.

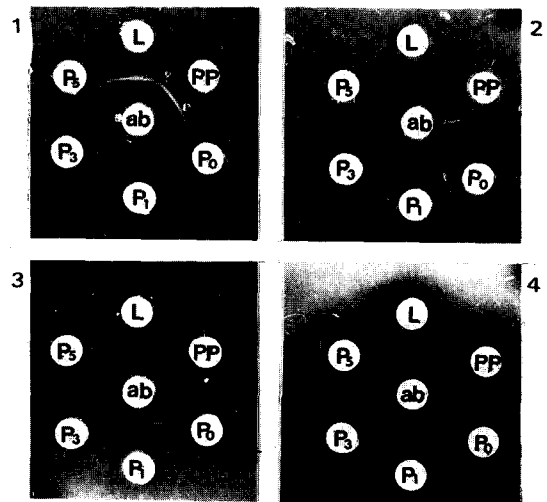


Fig. 6. Ouchterlony's double diffusion test. 1, cuticle; 2, fat body; 3, epidermis; 4, haemolymph; ab, antibody against the last larval cuticle proteins

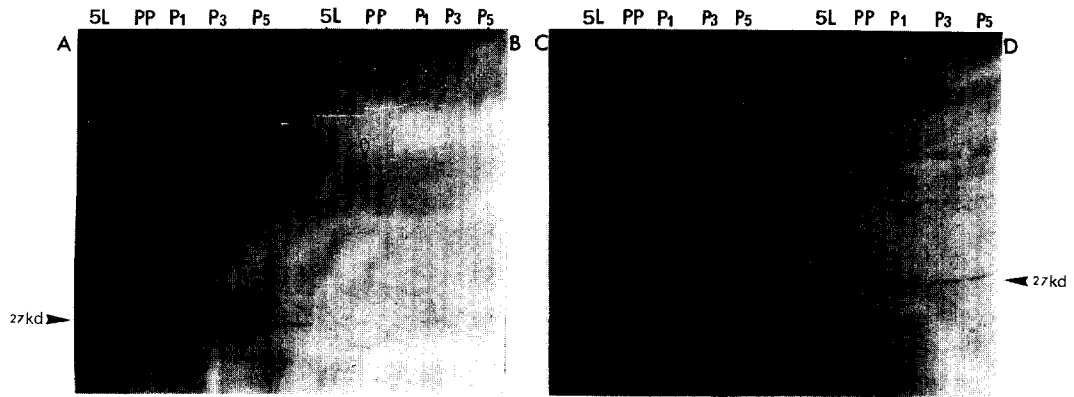


Fig. 7. Western blotting patterns of cuticle (A), haemolymph (B), epidermis (C) and fat body (D) proteins against pupal 27 Kd protein during metamorphosis of *Pieris rapae*.

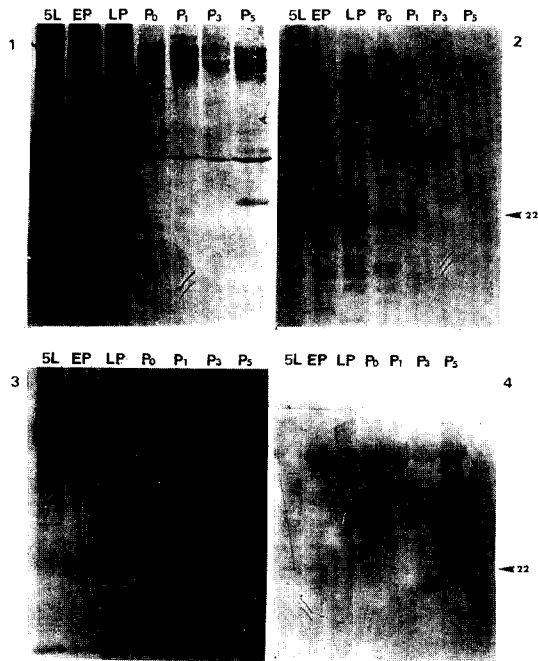


Fig. 8. Western blotting patterns of cuticle (1), epidermis (2), fat body (3) and haemolymph (4) proteins against the last larval 22 Kd protein.

membrane에 trans-blotting하였다. 이를 용기의 27 Kd 단백질과 종령기의 22 Kd 단백질의 항체로 반응시킨 후 발색반응을 거쳐 발생 특이 큐티클단백질의 분포를 조사해 보면 trans-blotting 된 nitrocellulose membrane에는

여러 단백질들과 부분적으로 cross-reactivity를 보이고 있다. 이중 용기의 27 Kd 단백질을 (Fig. 7)은 면역학적으로도 전용말기부터 확인되고 용화후부터는 일정한 농도로 큐티클에서 확인되고 있으나, 혈림프에서는 확인되지 않으며, 표피와 지방체에서는 종령기부터 비교적 일정한 농도를 유지하고 있다. 반면에 종령기의 22 Kd 단백질(Fig. 8)은 종령기 및 전용기에서만 확인되고 용기에 들어서면 전혀 반응을 나타내지 않는 양상을 보이고 있다. 그러나, 이 단백질은 나머지 조직에서는 확인되지 않는 양상을 보여 종령기의 큐티클단백질은 종령이전의 시기에 합성되어 큐티클에 축적될 뿐 그 이후 기타의 조직에서는 합성되지 않는 것으로 보인다.

고찰

곤충의 큐티클 형태는 곤충에 따라 다르며 같은 곤충이라도 발생시기에 따라 달라지게 되는데 이러한 형태의 변화는 큐티클의 질반을 차지하는 큐티클단백질 성분의 변화에 따라 일어나게 된다. *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor*, *Drosophila melanogaster*, *Manduca sexta*, *Anthraea polyphemus*(Srivastava, 1970; Roberts and Willis, 1980; Chihara et al., 1982; Riddiford, 1981; Sridhara, 1983; Kiely and Riddiford, 1985)의 발생시

기에 따라 큐티클단백질은 매우 독특한 전기영동상을 나타내고 있다. Roberts와 Willis(1980)은 *Tenebrio molitor*에서 Tris-glycine buffer로 추출한 유충기 및 용기의 수용성 큐티클단백질은 발생특이적 밴드패턴을 나타내며, 각 발생단계에서도 exocuticle의 몇몇 주요 단백질은 발생이 진행됨에 따라 점차 양적으로 감소되는 반면 기타의 밴드는 endocuticle의 형성이 시작될 때에도 계속 유지된다고 하였고, Anderson(1975)은 18 K dalton의 수용성 단백질이 발생특이적으로 나타난다고 보고한 바 있다. Hackman(1980)은 *Lucilia cuprina*의 주요 발생특이적 큐티클단백질은 주로 30 Kd 이하로 분자량이 작으며, 이들의 등전점도 3-6사이에 주로 분포한다고 하였으며 Skelly와 Howells(1988)도 *L. cuprina*의 큐티클에서 유충기에 9개, 용기에 7개, 성충기에 9개의 단백질 밴드를 확인하였다.

본 연구의 SDS-PAGE에서 유충기에는 62 Kd, 22 Kd, 19 Kd 및 16 Kd 단백질이, 용기에는 38 Kd, 28 Kd 및 27 Kd 단백질이 각각 발생 특이 큐티클단백질로 확인되고 있다. 이러한 단백질중 유충기의 62 Kd는 지방체, 표피, 혈림프에서도 확인되고 있으나, 22 Kd, 16 Kd 단백질은 종령기와 전용기에 걸쳐 지방체와 표피에서 확인되고, 19 Kd 단백질은 단지 지방체에서만 일정한 농도로 유지되고 있다. 또한 용기의 37 Kd 단백질은 표피에서만 확인될 뿐 다른 조직에서는 확인되지 않고 있으며, 28 Kd 단백질은 표피와 지방체에서 비교적 낮은 농도로, 반면 27 Kd 단백질은 높은 농도로 전 발생시기에 걸쳐 유지되는 양상을 보여주고 있어서 이러한 발생 특이 큐티클단백질은 모두 한 조직에서만 합성되는 것이 아니라 지방체와 표피 모두에서 합성되어 큐티클로 이동되는 것 같으며, 특히 표피에서 합성된 큐티클단백질은 혈림프로 방출되지 않고 직접 큐티클 속으로 이동되는 것 같으며, 지방체에서 합성된 큐티클단백질은 혈림프에 거의 머물지 않고 합성되자마자 큐티클 속으로 이동되는 것 같다. 이러한 큐티클단백질의 분포를 방사능으로 표지된 아미노산 즉 (^3H)-leucine을

5령 중기에 혈강내에 주입하여 발생시기에 따른 변화를 살펴보면, 용기 특이 큐티클단백질중 27 Kd 단백질은 용화직후 부터 큐티클단백질로 축적되는 것을 살펴볼 수 있으며, 지방체에서도 종령기부터 합성되어 용기말까지 축적되나, 표피나 혈림프에서는 확인되지 않으며, 37 Kd, 28 Kd 단백질은 큐티클을 비롯해 어느 조직에서도 확인되지 않고 있다. 또한 종령기 특이 큐티클단백질중에는 22 Kd 단백질만이 표피와 혈림프에서 확인되고 있고 나머지 단백질들은 확인되지 않고 있는데, 이러한 사실은 전기영동적 이동도에 따른 발생 특이 큐티클단백질의 분포와 일치되는 결과를 보여주고 있어 큐티클단백질의 합성이 별도의 유전자에 의해 발생시기와 조직에 따라 발현되는 양상을 나타내고 있다. 일반적으로 큐티클단백질은 지방체에서 합성되어 혈림프를 통해 큐티클 속으로 들어가는 것으로 생각해 왔으며 (Fox *et al.*, 1972; Koeppe and Gilbert, 1973; Philips and Loughton, 1976) 최근에는 *Tenebrio molitor* 및 *Manduca sexta*를 사용한 실험에서 큐티클단백질은 지방체에서 합성이 되는 것이 아니라 표피에서 합성된 후 직접 큐티클 속으로 이동해 간다고 보고하고 있으나 (Roter *et al.*, 1985; Lemoin and Delachambre, 1986; Kiely and Riddiford, 1985) 본 연구의 결과를 보면 발생 특이 큐티클단백질은 지방체와 표피에서 모두 합성되는 경향을 보여주고 있다.

이러한 단백질의 조직에 따른 동질성을 조사하기 위해 용기의 27 Kd 단백질과 유충기의 22 Kd 단백질을 부분적으로 정제한 후 항체를 제조하였으며, 이를 가지고 western-blotting을 실시하였다(Figs. 7, 8). 정제된 큐티클단백질에 대해 각 조직의 단백질은 상당 부분 cross-reactivity를 보여주고 있으며, 용기의 27 Kd 단백질은 표피와 지방체에서 면역 반응을 나타내나 혈림프에서는 살펴볼 수 없으며, 유충기의 22 Kd 단백질은 표피에서만 미약하게 반응을 나타내었으나 지방체나 혈림프에서는 거의 반응을 나타내지 않았다. Stiles와 Leopold(1990)도 *Anthonomus grandis*에서 SDS-PAGE상에서

분리된 큐티클단백질을 정제하여 항체를 제조한 후 western blotting을 해보면 큐티클단백질에 대해 상당부분 다른 단백질과 cross-reactivity를 나타낸다고 하였다. 이는 항원의 오염에 의한 것인지 아니면, 큐티클단백질의 기본적인 구조나 탄수화물 잔기가 다른 단백질과 상당부분 동일한 구조를 갖고 있기 때문이 아닌가 생각하고 있다. 본 연구에서도 이와 같은 경향을 나타내고 있으며, 본질적으로 용기의 27 Kd 단백질은 지방체와 표피의 단백질과 동일하며, 종령기의 22 Kd 단백질은 표피단백질과 일치된 결과를 나타내고 있어 큐티클단백질은 지방체와 표피에서 합성되는 것 같다.

결론적으로 배추흰나비의 발생 특이 큐티클단백질의 분포 및 동질성으로 보아 용기의 27 Kd 단백질은 지방체에서 기원하는 것 같으며, 유충기의 22 Kd 단백질은 표피에서 합성되어 큐티클로 축적되어 가는 것 같다.

감사

이 연구는 1992년도 한국과학재단 연구비지원에 의한 결과임(921-0400-034-1).

인용문헌

- Andersen, S.O., 1974. Cuticular sclerotization in larval and adult locusts, *Schistocerca gregaria*. *J. Insect Physiol.* **20**: 1537-1552.
- Anderson, S.O., 1975. Cuticular sclerotization in the beetles *Pachynoda epphiata* and *Tenebrio molitor*. *J. Insect Physiol.*, **21**: 1225-1232
- Anderson, S.O. and P. Hojrub, 1987. Extractable proteins from abdominal cuticle of sexually mature locusts, *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* **17**: 45-51
- Andersen, S.O., P. Hojrub and P. Roepstorff, 1986. Characterization of cuticular proteins from the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* **16**: 441-447
- Chihara, C.T., D.J. Silvert and J.W. Fristrom, 1982. The cuticle proteins of *Drosophila melanogaster*: Stage specificity. *Dev. Biol.* **89**: 327-388
- Cox, D.L., 1987. Analysis of the cuticular proteins of *Hyalophara cecropia* with polyclonal antibodies. *Insect Biochem.* **17**: 485-492
- Cox, D.L. and J.H. Willis, 1985. The cuticular proteins of *Hyalophara cecropia* from different anatomical regions and metamorphic stages. *Insect Biochem.* **15**: 349-362
- Cox, D.L. and J.H. Willis, 1987. Analysis of the cuticular proteins of *Hyalophara cecropia* with two dimensional electrophoresis. *Insect Biochem.* **17**: 457-468
- Fox, F.D., J.R. Seed and R.R. Mills, 1972. Cuticle sclerotization by the American cockroach: Immunological evidence for the incorporation of blood proteins into the cuticle. *J. Insect Physiol.* **18**: 2065-2070
- Fristrom, J.W., R.J. Hill and F. Watt, 1978. The procuticle of *Drosophila*: heterogeneity of urea-soluble proteins. *Biochemistry* **17**: 3917-3924
- Hackman, R.H., 1980. Biochemical methods (proteins). In *Cuticular Techniques in Arthropods* (Edited by Miller, T.A.) Chap. 4, 151 Springer, New York
- Hawkes, R., E. Niday and J. Gordon, 1982. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Analyt. Biochem.* **119**: 142-147
- Kiely, M.L. and L.M. Riddiford, 1985. Temporal patterns of protein synthesis during the change of epidermal cell commitment in *Manduca sexta* in vitro: the modulation by hormones. *Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol.* **194**: 336-343
- Klarskov, K., P. Hojrub, S.O. Andersen and P. Roepstorff, 1989. Plasma-desorption mass spectrometry as an aid in protein sequence determination. Application of the method on a cuticular protein from the migratory locust (*Locusta migratoria*). *Biochem. J.* **262**: 923-930.
- Koeppel, J.K. and L.I. Gilbert, 1973. Immunochemical evidence for the transport of haemolymph proteins into the cuticle of *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.* **29**: 615-624
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**: 680-685
- Lemoine, A and J. Delachambre, 1986. A water soluble protein specific to the adult cuticle in *Tenebrio*. Its use as a marker of a new programme expressed by epidermal cells. *Insect Biochem.* **16**: 483-489.
- Nohr, C., P. Hojrub and S.O. Andersen, 1992. Primary structure of two low molecular weight proteins isolated from cuticle of fifth instar nymphs of the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **22**: 19-24.

- Ouchterlony, O., 1949. Antigene-antibody reactions in gel. *Acta. Path. Microbiol. Scand.*, **26**: 507-575.
- Philips, D.R. and B.G. Loughton, 1976. Cuticle proteins in *Locusta migratoria*. *Comp. Biochem. physiol.* **55**: 129-135.
- Riddiford, L.M., 1981. Hormonal control of epidermal cell development. *Am. Zool.* **21**: 751-762.
- Roberts, P.E. and J.H. Willis, 1980. The cuticular proteins of *Tenebrio molitor*. I. Electrophoretic banding patterns during postembryonic development. *Devl. Biol.* **75**: 59-69.
- Roter, A.H., J.B. Spofford and H. Swift, 1985. Synthesis of the major adult cuticle proteins of *Drosophila melanogaster* during hypoderm differentiation. *Devl. Biol.* **107**: 420-431.
- Seo, E.W., 1990. Biochemical properties of water- and urea-soluble cuticle proteins of *Pieris rapae* during metamorphosis. *Kor. J. Entomol.* **20(2)**: 103-111.
- Seo, E.W., 1993. Distribution and synthesis of pupal specific cuticle proteins in tissues of *Pieris rapae*. *Kor. J. Entomol.* **23(2)**: 83-90.
- Shawky, N.A.F. and J.F.V. Vincent, 1978. The proteins of the urea-soluble fraction of locust intersegmental membrane. *Insect Biochem.* **8**: 255-261.
- Silvert, D.J., J. Doctor, L. Quesada and J.W. Fristrom, 1984. Pupal and larval cuticle proteins of *Drosophila melanogaster*. *Biochemistry* **23**: 5767-5774.
- Skelly, P.J. and A.J. Howells, 1988. The cuticle proteins of *Lucilia cuprina*: Stage specificity and immunological relatedness. *Insect Biochem.* **18**: 237-247.
- Souliotis, V.L., M. Patrino-Georgoula, V. Zongza and G.T. Dimitriadis, 1988. Isolation and Characterization of mRNAs coding for the third instar larval cuticle proteins of *Dacus oleae*. *Insect Biochem.* **18**: 829-837.
- Sridhara, S., 1983. Cuticular proteins of the silkworm *Antheraea polyphemus*. *Insect Biochem.* **13**: 665-676.
- Srivastava, R.P., 1970. Electrophoretic behavior of cuticular proteins of different stage of *Galleria mellonella*. *J. Insect Physiol.* **16**: 2345-2351.
- Stiles, B. and R.A. Leopold, 1990. Cuticle proteins from the *Anthonomus grandis* abdomen: Stage specificity and immunological relatedness. *Insect Biochem.* **20**: 113-125.
- Willis, J.H., 1987. Cuticular proteins: the neglected component. *Archs Insect Biochem. Physiol.* **6**: 203-215.
- Willis, J.H., 1989. Partial amino acid sequences of cuticular proteins from *Hyalophora cecropia*. *Insect Biochem.* **19**: 41-46.
- Willis, J.H., J.C. Regier and B.A. Debrunner, 1981. The metamorphosis of arthropodin. In *Current Topics in Insect Endocrinology and Nutrition* (Edited by Bhaskaran G., S. Friedman and J.G. Rodriguez), pp. 27-46. Plenum Press, New York.

(Accepted November 15, 1994)

Qualitative Distribution of Stage-Specific Cuticle Proteins of *Pieris rapae*

Eul Won Seo (Dept. of Biology, An Dong Nat'l University, An-dong 760-749, Korea)

Proteins extracted from various tissues of cabbage worm, *Pieris rapae* during metamorphosis have been studied to investigate the distribution of stage-specific cuticle proteins by electrophoresis, western blotting and autoradiography.

Four bands in larval stage and 3 bands in pupal stage have been identified as stage specific cuticle proteins in SDS-PAGE. 62 Kd cuticle protein in larval stage is distributed in fat body, epidermis and haemolymph. However, 22 Kd and 16 Kd cuticle proteins are present in fat body and epidermis and 19 Kd cuticle protein only in fat body. And in pupal stage, 37 Kd cuticle protein appears in epidermis and 28 Kd and 27 Kd cuticle proteins in epidermis and fat body according to their electrophoretic mobilities.

By immunological evidence, 27 Kd protein in pupal stage is specific to epidermis and fat body and 22 Kd protein in larval stage is specific to epidermal protein, suggesting that 27 Kd protein originated from fat body and 22 Kd protein from epidermis. Therefore, cuticle proteins are synthesized from at least two different tissues, epidermis and fat body.