

## 담배나방 저장단백질 SP-2의 정제 및 생화학적 특성

정성은\*, 채순용<sup>1</sup>, 김선봉, 이형철  
한남대학교 생물학과; 한국인삼연초연구원<sup>1</sup>  
(1996년 3월 15일 접수)

### Purification and Biochemical Properties of Storage Protein SP-2 in Tobacco Budworm (*Helicoverpa assulta* Guenee)

Seong Eun Jeong\*, Soon Yong Chae<sup>1</sup>, Son Bong Kim and Hyung Chul Lee  
(Dept. of Biology, Han Nam Univ., Korea Ginseng & Tobacco Research Institute<sup>1</sup>)

(Received March 15, 1996)

**ABSTRACT :** A storage protein(SP-2) was confirmed in haemolymph during larval-pupal-adult development of tobacco budworm(*Helicoverpa assulta* Guenee), and its biochemical characteristics were investigated. The titer of SP-2 showed a peak at mature larva, decreased gradually through the late pupal stage, and became undetectable at adult period. As the results from electrophoretic analysis, SP-2 was confirmed to be glycolipoprotein(M.W. 332kDa) relatively stable to heat( $\leq 68^{\circ}\text{C}$ ). This storage protein was determined to be a tetramer composed of a single subunit with MW of 83kDa, and the isoelectric point was 5.7. The amino acid composition of the SP-2 was characterized. It has relatively high content of methionine and histidine, whereas the contents of tyrosine and phenylalanine were relatively low.

**Key words :** *Helicoverpa assulta*, storage protein, glycolipoprotein

\* 연락처자 : 300-791, 대전시 대덕구 오정동 133번지, 한남대학교 생물학과

\* Corresponding author : Dept. of Biology, Han Nam University, 133 Ojung Dong, Taejon Korea, 300-791

곤충의 혈림프내 각종 생체분자들의 저장체로서의 역할을 하는 저장단백질(storage protein)은 지방체에서 합성되며 유충의 성장에 따라 그 함량이 증가하는데, 특히 왕성하게 취식하는 중령 유충기에 크게 증가하여 혈림프 단백질의 80~90%에 이르게 된다. 이들 단백질 가운데 일부는 용화 후 지방체에 재흡수되어 축적됨에 따라 혈림프내에서 감소되며 취식하지 않는 성충기에 이르러 감소되거나 소실된다(Wyatt and Pan 1978; Ogawa and Tojo, 1981; Levenbook, 1985; Palli and Locke, 1987; Haunerland *et al.*, 1990; Faria *et al.*, 1994).

저장단백질의 공통적인 특징은 70~80kDa 내외의 하나 혹은 두 종류의 subunit로 구성된 hexamer로서 400~500kDa 내외의 분자량을 갖으며(Roberts and Brock, 1981; Levenbook, 1985; Lenz *et al.*, 1987; Yokoyama *et al.*, 1993), phospholipid, diglyceride 및 cholesterol 등의 지질과 N-acetylglucosamine이나 mannose 등의 당을 포함하는 복합 단백질(Wyatt and Pan, 1978; Kim *et al.*, 1989-a; Rehn and Rolim, 1990)로서, tyrosine과 phenylalanine 등의 aromatic amino acid를 다량 함유하고 있다(Telfer *et al.*, 1983; Levenbook, 1985; Telfer and Kunkel, 1991; Silhacek *et al.*, 1994).

한편 저장단백질은 생합성에 이용될 때까지 지방체 조직에서 0.5~2 $\mu$ m 크기의 protein granule로서 저장되며(Tojo *et al.*, 1980; Roberts and Brock, 1981; Wang and Haunerland, 1991), 변태시 생합성에 필요한 아미노산들의 공급원으로서(Levenbook, 1985; Telfer and Kunkel, 1991), 또는 탈피시 새로운 cuticle 형성에 필요한 아미노산이나 당의 저장분자(Konig *et al.*, 1986; Palli and Locke, 1987)로서의 역할을 하며, 또한 ecdysteroid나 insecticide의 운반(Haunerland and Bowers, 1986; Chrysanthis *et al.*, 1994)등의 기능도 수행함이 보고되고 있다.

본 연구에서는 담배나방(*Helicoverpa assulta*)의 발생동안 혈림프내에 높은 함량으로 존재하는 저장단백질(storage protein, SP-2)를 확인하고, 이를 분리 정제하여 그 생화학적 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

담배나방(*Helicoverpa assulta*)은 인공사료(옥수수가루, 콩가루, 고추기름, skim milk, yeast extract, vitamin mixture, agar)를 먹이로 온도 27 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C, 상대습도 65 $\pm$ 5%, 및 광주기 16L:8D로 누대사육하면서 실험재료로 사용하였다.

저온실(4 $^{\circ}$ C)에서 유충의 경우에는 흙지 끝을 절단하여, 용의 경우에는 두정부를 puncture하여 그리고 성충의 경우에는 다리의 기부를 절단하여 이곳으로부터 흘러나오는 혈림프를 소량의 phenylthiourea(PTU)가 첨가된 microfuge tube에 모아 채취하였으며, 채취 직후 10분간 10,000rpm으로 원심분리하여 혈구 및 조직 절편을 제거하였다.

### 2. 방 법

**단백질의 분리 및 정제 :** 채취한 중령 유충 혈림프 단백질을 0~35%, 35~40%, 40~55%, 55~70%, 70~85%의 ammonium sulfate((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)에서 단계별로 침전시킨 후, 침전물을 50mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 투석시킨 다음 동결건조하였다. 건조된 시료를 동일 buffer에 용해시킨 후 이를 전기영동을 통해 분석하였다. 저장단백질(SP-2)은 40~55% ammonium sulfate에서 다량 침전되었으며, 이를 정제하기 위해 50mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 평형시킨 DEAE Sepharose CL-6B column(2.5 $\times$ 20cm)에 loading한 후 유출속도 0.4ml/min로 tube 당 3ml 씩 분획하였고, bound protein은 0~1.0M NaCl의 linear gradient 상에서 50mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 용출시켰다. 이후 용출된 각 분획을 50mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)에 투석한 후 동결건조시켰으며, 분리된 분획 중 저장단백질이 포함된 시료를 50mM Tris-HCl(pH 8.0)에 용해한 다음 동일 buffer로 평형된 Ultrogel AcA-22 column(2.5 $\times$ 50cm)상에서 gel filtration하였다. 유출속도 0.35ml/min으로 tube 당 2ml 씩 취하였고, 분획 중 저장단백질이 포함된 시료를 동일

buffer에서 투석한 후 동결건조하였으며, 이를 62mM Tris-HCl buffer(pH 6.8)에 용해하여 5.5% gel 상에서 전기영동하여 분리한 다음 SP-2가 분리된 부분의 gel을 slice하여 electroelution하였다.

**Native-PAGE** : 7%의 polyacrylamide gel에 각 단계 별 시료 20 $\mu$ l 씩을 loading하여 처음 1시간은 15mA로 그 이후는 25mA로 4°C에서 Tris-glycine buffer(pH 8.6)를 running buffer로 하여 전기영동을 실시하였다. 전기영동된 gel은 12% trichloroacetic acid (TCA) 용액에서 4시간 동안 고정시킨 후 0.2% Coomassie brilliant blue R-250 염색액으로 4시간 동안 염색시킨 다음 EtOH:acetic acid:DW(25:10:65, V/V/V) 혼합액에서 탈색시킴으로써 단백질 band를 확인하였다.

분자량은 Hedrick과 Smith(1968)의 방법을 일부 변형하여 실시하였는데, 5.5~7.0% polyacrylamide gel을 이용하여 분리하였고 standard protein은 Pharmacia high molecular weight determination kit(thyroglobulin, M.W. 669,000; ferritin, M.W. 440,000; catalase, M.W. 232,000; lactate dehydrogenase, M.W. 140,000; albumin, M.W. 67,000)를 사용하였다.

**열 안정성 조사** : 정제된 저장단백질(SP-2)의 열 안정성을 조사하기 위해, 정제된 단백질을 20~80°C에서 60분간 처리한 후 native-PAGE를 실시하였다.

**복합단백질의 검출** : Native-PAGE를 실시한 후 당단백질 여부의 확인을 위해 gel을 Caldwell과 Pigman(1965)의 방법으로 염색하였는데, 실온에서 7.5% acetic acid에 1시간 동안 처리하여 단백질을 고정시킨 후 4°C에서 0.2% periodic acid-Schiff's reagent에서 1시간 동안 염색한 다음 15% acetic acid로 탈색시켰으며 다시 7.5% acetic acid에서 gel의 크기를 회복시켜 확인하였다.

지단백질의 검출은 Chippendale과 Beck(1966)의 방법을 따라 실시하였다. 즉 전기영동을 실시한

후 gel을 Suddan black B로 염색하고 70% ethanol로 탈색한 다음 7.5% acetic acid에서 확인하였다.

**SDS-PAGE** : Laemmli(1970)의 방법을 일부 변형하여 실시하였다. 2%의 SDS가 첨가된 sample buffer와 시료를 혼합하여 100°C의 항온수조에서 5분 동안 가열한 후 13% polyacrylamide gel 상에 50 $\mu$ l 씩 loading하였다. 실온에서 처음 2시간 동안은 10mA로 그 이후는 20mA로 총 20시간 동안 전기영동시킨 후 gel을 12% trichloroacetic acid 용액에서 4시간 동안 고정하고 0.2% Coomassie brilliant blue R-250으로 염색시킨 다음 EtOH:acetic acid:DW(25:10:65, V/V/V) 혼합액으로 탈색시켰다.

분자량은 Weber와 Osborn(1969)의 방법으로 측정하였으며 standard protein은 Pharmacia low molecular weight determination kit(phosphorylase b, M.W. 94,000; ovalbumin, M.W. 43,000; carbonic anhydrase, M.W. 30,000; trypsin inhibitor, M.W. 20,000;  $\alpha$ -lactalbumin, M.W. 14,400)를 사용하였다.

**Isoelectric focusing(IEF)** : 1차원 전기영동은 O'Farrell(1975)의 방법을 일부 변형하여 실시하였다. 내경 3mm, 길이 12cm인 gel tube를 이용하여 3% ampholyte(pH 3~10.5, 0.6%; pH 6~8, 1.0%; pH 8~10, 1.4%)와  $\beta$ -mercaptoethanol이 첨가된 5.5% polyacrylamide gel에 1 gel 당 0.33mA의 통전량으로 4°C에서 12시간 동안 실시하였다. top tank에는 0.02M NaOH 용액을, bottom tank에는 0.01M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 용액을 넣어 사용하였다. 한편 IEF gel의 pH 측정은 O'Farrell(1975)의 방법에 준하여 실시하였으며, IEF 전기영동이 끝난 gel은 equilibration buffer(5%  $\beta$ -mercaptoethanal, 10% glycerol, 62mM Tris-HCl buffer, pH 8.0)에 30분간 평형시킨 후 2차원 전기영동에 사용하였다.

**구성아미노산 조성분석** : 순수분리된 단백질(SP-2)을 6N HCl로 110°C에서 16시간 동안 가수분해시키고 이를 0.01N HCl에 용해한 다음 OPA(o-phthalaldehyde) 유도체를 만들어 HPLC

(TOSOH 8010 Series)를 이용하여 분석하였다. TSK gel Aminopack column(4.6mm×12cm) 상에서 0.2N TSCD(pH 3.29), 0.2N TSCD(pH 4.30) 그리고 0.8N TSCD(pH 9.40)을 전개액으로하여 유출속도 0.5ml/min, 온도 60°C에서 들뜸과장 340nm와 방출과장 460nm로 측정하였다.

### 결과 및 고찰

혈림프내에 높은 농도로 존재하는 저장단백질은 지방체에 의해 합성되어 혈림프내로 유리되며 유충 초기의 혈림프에 미약하게 존재하다가 취식이 왕성한 종령유충기에 급증하며 용화 후 감소된 후성충기에 감소되거나 소실되는 것으로 보고되고

있는데(Wyatt and Pan, 1978; Kramer *et al.*, 1980; Ogawa and Tojo, 1981; Kim *et al.*, 1989-b), 본 연구에서도 담배나방의 storage protein-2(SP-2)는 3령 유충과 4령유충에서 미약하게 확인되었고 종령유충시기 이후에서 그 염색강도가 강하게 출현하기 시작하였으나 성충우화 직후 소실되어 전형적인 저장단백질의 발생학적 변동상을 보여주었다(Fig. 1, 2).

저장단백질의 특성을 알아보기 위해 정제한 후 native-PAGE를 통해 분리한 결과(Fig. 3), 40~55%에서 저장단백질인 SP-2가 다수 확인되었다. 이들 침전단백질들을 투석, 동결건조한 후 DEAE Sepharose CL-6B column으로 분리하여 얻어진 fraction중 No. 72~84(DE-4 peak)에서 SP-2가 다량 확인되었으며(Fig. 4, 5), 다시 이들 fraction을 모아

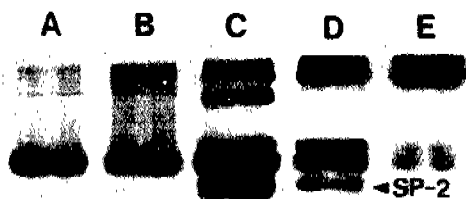


Fig. 1. Native-PAGE of haemolymph proteins during larval-pupal development in *Helicoverpa assulta*.

- A, 2-days old third instar larva;
- B, 2-days old fourth instar larva;
- C, 2-days old last instar larva;
- D, wandering larva;
- E, 1-day old pupa;
- F, 3-days old pupa;
- G, 5-days old pupa;
- H, 7-days old pupa; SP-2, storage protein-2



Fig. 2. Native-PAGE of haemolymph proteins during adult development in *Helicoverpa assulta*. A, 1-day old adult; B, 3-days old adult; C, 5-days old adult



투석, 동결건조한 후 Ultrogel AcA-22 column으로 분리한 결과(Fig. 6), fraction No. 78~88(UA-2 peak)에서 다량의 SP-2가 확인되어(Fig. 7), 이를 5.5% gel상에서 분리한 후 electroelution을 실시하여 정제하였다.

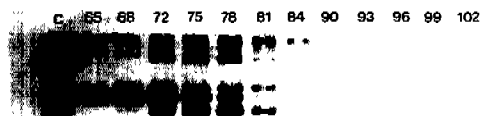
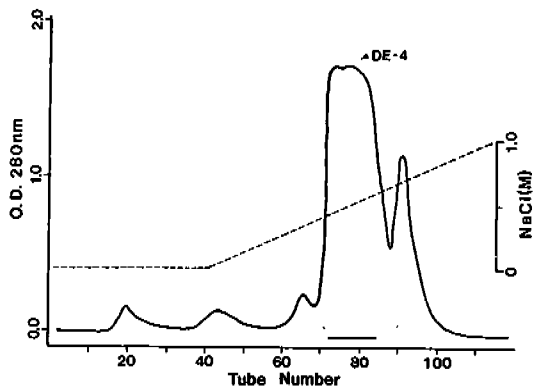


Fig. 3. Native-PAGE of haemolymph proteins precipitated into five ammonium sulphate ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) fractions. The haemolymph was prepared from the last instar larvae of *Helicoverpa assulta*. The haemolymph proteins were A, 0~25% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; B, 25~40% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; C, 40~55% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; D, 55~70% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; E, 70~85% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Fig. 5. Native-PAGE of proteins collected by ion exchange chromatography. The numbers represent the collected fractions in Fig. 4.



저장단백질류의 물리화학적 특성은 곤충의 종에 따라 다양하게 나타나는데, 주로 400~500kDa 내외의 큰 분자량을 갖으며 저장기능 혹은 운반기능을 수행하므로 복합단백질로서 존재한다. 또한 70~80kDa 내외의 하나 혹은 두 종류의 subunit로 구성된 hexamer로서 pI는 5.3~5.9의 범위에 존재하는 것으로 알려져 있다(Levenbook, 1985; Lenz et al., 1987; Kim et al., 1989-a; Tojo and Yoshiga, 1994).

Fig. 4. Ion exchange chromatography of haemolymph proteins(precipitated in 40~55% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) in *Helicoverpa assulta*. The precipitant was loaded on DEAE Sepharose CL-6B column(2.5×20cm), and then eluted at a flow rate 0.4ml/min with a linear gradient of 0~1.0M sodium chloride in 50mM Tris-HCl buffer(pH 8.0).

이에 비해 담배나방에서의 SP-2를 native-PAGE로 분리한 결과(Fig. 8) 단일 band임을 확인하였고, 분자량을 측정된 결과 약 332kDa의 단백질임이 확인되었다(Fig. 9). SP-2는 20℃에서 68℃까지 1시간씩 처리시키까지는 열에 대해 비교적 안정성을 나타냈으나(Fig. 10), 70℃이상에서 처리한 단백질은 변성되었다(Fig. 11).

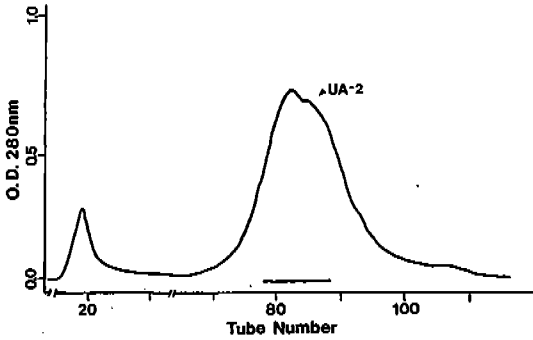


Fig. 6. Gel filtration chromatography of DE-4 fraction collected by ion exchange chromatography. The fraction(DE-4) contained SP-2 was applied to Ultrogel AcA-22 column(2.5 × 50cm), and then eluted at a flow rate 0.35ml/min with 50mM Tris-HCl buffer(pH 8.0).

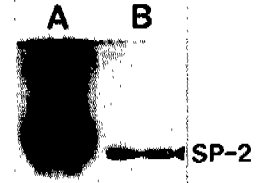


Fig. 8. Native-PAGE of haemolymph proteins and the purified storage protein(SP-2) from the last instar larva. A, precipitated haemolymph proteins in 40~55%(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; B, purified SP-2

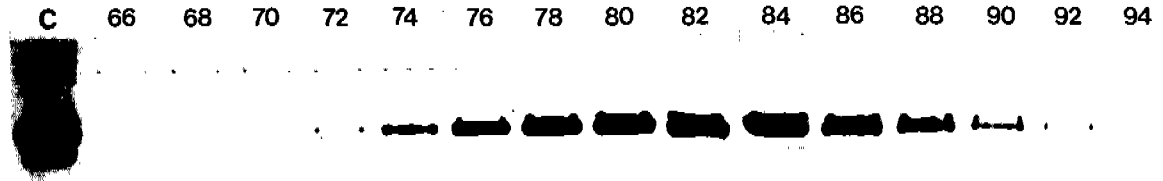


Fig. 7. Native-PAGE of protein collected by gel filtration chromatography. The numbers represent the collected fractions in Fig 6.

정제한 SP-2를 Schiff's reagent와 Sudan black B로 염색한 결과(Fig. 12) 모두에 염색되어 glycolipoprotein인 것으로 확인되었다. SP-2의 구성 소단위를 확인하기 위해 정제된 SP-2의 SDS-PAGE를 실시한 결과, 약 83kDa의 단일 band만이 나타나 SP-2는 한 종류의 polypeptide가 tetramer를 이룬 332kDa의 단백질임이 확인되었으며(Fig. 8, 9, 13, 14), ioselectic focusing한 후 2차원

전기영동을 실시한 결과 약 pI 5.7에서 단일 spot로 나타났다(Fig. 15).

저장단백질의 구성아미노산은 일반적으로 변태시 새로운 cuticle의 형성에 사용되는 tyrosine과 phenylalanine등의 aromatic amino acid를 다량 함유하고 있다고 보고되고 있으며(Kramer *et al.*, 1980; Levenbook, 1985; Rehn and Rolim, 1990; Koopmanschap *et al.*, 1992), 인시목 곤충의 일부

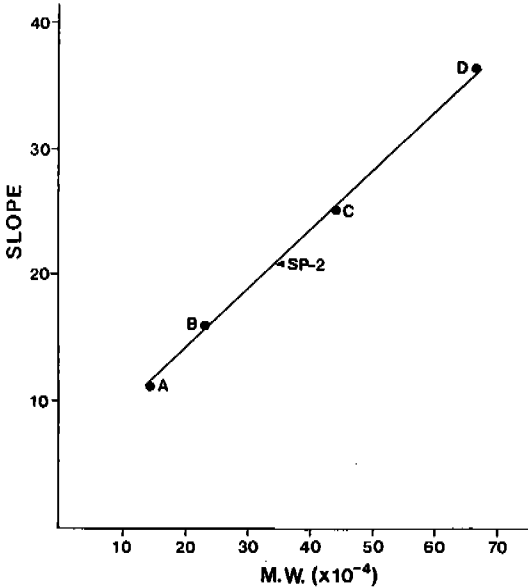


Fig. 9. Determination of native molecular weight for SP-2 according to the method of Hedrick and Smith(1968). Standard proteins are as follows: A, lactate dehydrogenase (M.W. 140,000); B, catalase(M.W. 232,000); C, ferritin(M.W. 440,000); D, thyroglobulin (M.W. 669,000)

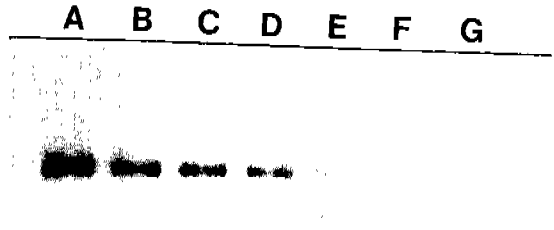


Fig. 11. Native-PAGE of haemolymph storage protein(SP-2) treated with heat(60~70 °C) for 1hr. A, storage protein-2; B, 60 °C; C, 62°C; D, 64°C; E, 66°C; F, 68 °C; G, 70°C



Fig. 12. Native-PAGE of haemolymph proteins and the purified storage protein(SP-2) from the last instar larva of *Helicoverpa assulta*. Left, stained with periodic acid-Schiff's reagent; Right, stained with Sudan black B The abbreviations are the same as in Fig. 8.

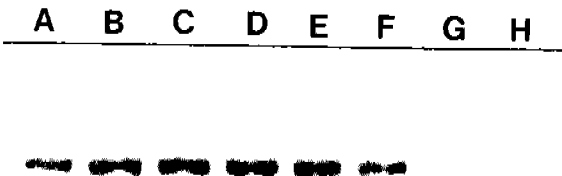


Fig. 10. Native-PAGE of haemolymph storage protein(SP-2) treated with heat(20~80°C) for 1hr. A, storage protein-2; B, 20°C; C, 30 °C; D, 40°C; E, 50°C; F, 60°C; G, 70°C; H, 80°C

중(*Bombyx mori*, *Galleria mellonella*, *Hyalophora cecropia*)의 저장단백질에서는 methionine의 함유율이 높은 반면 aromatic amino acid들의 함량이 비교적 낮다고 보고되었는데(Telfer and Kunkel, 1991), 본 연구에서 HPLC를 이용하여 구성 아미노산을 분석한 결과, 담배나방의 SP-2는 methionine의 함유율이 15.9mole%로 가장 높았고 histidine은 12.9mole%로 비교적 높은 편이었으나 tyrosine(0.46mole%)과 phenylalanine(2.3mole%)은

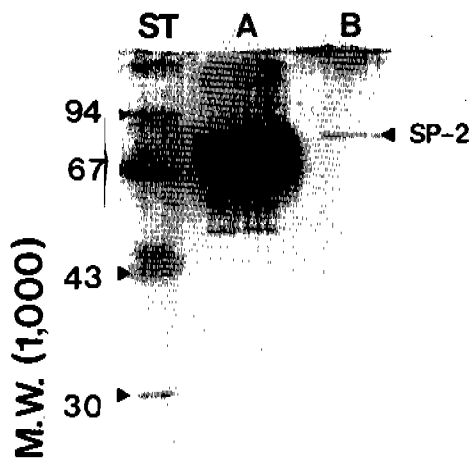


Fig. 13. SDS-PAGE(13%) of haemolymph proteins and the purified storage protein(SP-2) from the last instar larva of *Helicoverpa assulta*. The abbreviations are the same as in Fig. 8.

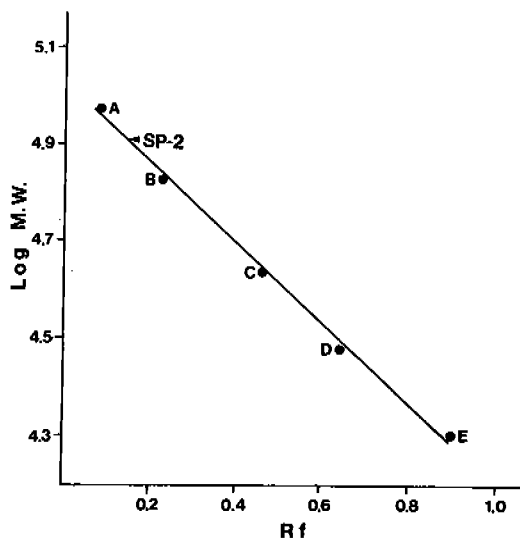


Fig. 14. Molecular weight determination of the subunits composing SP-2 by SDS-PAGE according to the method of Weber and Osborn(1969). Standard proteins are as follows:

- A, phosphorylase(M.W. 94,000);
- B, albumin(M.W. 67,000);
- C, ovalbumin(M.W. 43,000);
- D, carbonic anhydrase(M.W. 30,000);
- E, trypsin inhibitor(M.W. 20,000)

Table 1. Amino acid composition of the purified storage protein(SP-2) in *Helicoverpa assulta*

Amino acids	Mole percent
Aspartic acid	9.5
Threonine	3.3
Serine	5.5
Glutamic acid	8.4
Proline	4.3
Glycine	7.3
Alanine	4.2
Cysteine	0.3
Valine	4.2
Methionine	15.9
Isoleucine	4.0
Leucine	6.2
Tyrosine	0.5
Phenylalanine	2.3
Histidine	12.9
Lysine	7.0
Arginine	4.2
Total	100.0

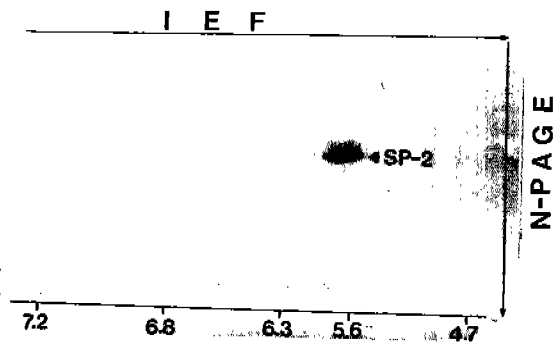


Fig. 15. Two-dimensional native-PAGE(7%) of the purified storage protein(SP-2) in *Helicoverpa assulta*.



낮은 함유율을 나타내(Table 1), 이러한 아미노산의 조성은 인시목 곤충류에서 전형적인 것으로 생각된다.

## 결 론

담배나방(*Helicoverpa assulta*)의 유충-용-성충 발생 동안 혈림프에 존재하는 저장단백질(SP-2)을 확인하고, 그 생화학적 특성을 조사하였다.

SP-2의 함량은 종령유충에서 가장 높았으며 용말기에 다소 감소하여 성충기에 이르러 소실되었다. 전기영동적 분석을 통해 분자량 약 332kDa의 glycolipoprotein으로서 68℃의 온도에 이르기까지 열에 대해 비교적 안정한 단백질인 것으로 확인되었으며, 분자량 약 83kDa의 단일 subunit로 구성된 tetramer로서 pI값은 약 5.7인 것으로 측정되었다. SP-2의 아미노산 조성은 methionine과 histidine의 함유율이 높았으며 tyrosine과 phenylalanine은 낮은 특성을 나타내었다.

## 참고문헌

1. Caldwell, R. C. and W. Pigman (1965) Disc electrophoresis of human saliva in polyacrylamide gels. *Archs. Biochem. Biophys.* 110:91-96.
2. Chippendale, G. N. and S. D. Beck (1966) Haemolymph proteins of *Ostrinia nubilalis* during diapause and prepupal differentiation. *J. Insect Physiol.* 12:1629-1638.
3. Chrysanthis, G., A. D. Kaliafas and A. C. Mintzas (1994) Biosynthesis and tissue distribution of four major larval serum proteins during development of *Ceratitis capitata*(Diptera). *Insect Biochem. Molec. Biol.* 24:811-818.
4. Faria, F. S., E. S. Garcia and S. Goldenberg (1994) Synthesis of a haemolymph hexamerin by the fat body and testis of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 24:59-67.
5. Haunerland, N. H. and W. W. Bowers (1986) Binding of insecticides to lipophorin and arylphorin, two haemolymph proteins of *Heliothis zea*. *Archs. Insect Biochem. Physiol.* 3:87-96.
6. Haunerland, N. H., K. K. Nair and W. S. Bowers (1990) Fat body heterogeneity during development of *Heliothis zea*. *Insect Biochem.* 20:829-835.
7. Hedrick, J. L. and A. J. Smith (1968) Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of protein by disc gel electrophoresis. *Archs. Biochem. Biophys.* 126:155-164.
8. Kim, H. R., C. S. Kang and R. T. Mayer (1989a) Storage proteins of the fall webworm, *Hyphantria cunea* Drury. *Archs. Insect Biochem. Physiol.* 10:115-130.
9. Kim, H. R., S. J. Seo and R. T. Mayer (1989b) Properties, synthesis and accumulation of storage proteins in *Pieris rapae* L. *Archs. Insect Biochem. Physiol.* 10:215-228.
10. König, M., O. P. Agrawal, H. Shenkel and K. Scheller (1986) Incorporation of calliphorin into the cuticle of the developing blowfly *Calliphora vicina*. *Roux's Archs. Dev. Biol.* 195:296-301.
11. Koopmanschap, B., H. Lammers and S. de Kort (1992) Storage proteins are present in hemolymph from larvae and adults of the colorado potato beetle. *Archs. Insect Biochem. Physiol.* 20:119-133.
12. Kramer, S. J., E. C. Mundall and J. H. Law (1980) Purification and properties of manducin, an amino acid storage protein of the haemolymph of larval and pupal *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* 10:279-288.
13. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 227:680-685.
14. Lenz, C. J., K. Ventatesh and G. M.

- Chippendale (1987) Major plasma proteins of larvae of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*. *Archs. Insect Biochem. Physiol.* 5:271-284.
15. Levenbook, L. (1985) Insect storage proteins. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. 10:307-346. Eds. Kerkut G. A. and L. I. Gilbert, Pergamon Press, Oxford.
  16. O'Farrell, P. H. (1975) High resolution of two dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250:4007-4021.
  17. Ogawa, K. and S. Tojo (1981) Quantitative changes of storage proteins and vitellogenin during the pupal-adults development in the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera; Bombycidae). *Appl. Ent. Zool.* 16:288-296.
  18. Palli, S. R. and M. Locke (1987) Purification and characterization of three major haemolymph proteins of an insect, *Calpodes ethlius* (Lepidoptera, Hesperidiidae). *Archs. Insect Biochem. Physiol.* 5:233-244.
  19. Rehn, K. G. and A. L. R. Rolim (1990) Purification and properties of a storage protein from the hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem.* 20:195-201.
  20. Roberts, D. B. and H. W. Brock (1981) The major serum proteins of Dipteran larvae. *Experimentia* 37:103-110.
  21. Silhacek, D. L., S. G. Miller and C. L. Murphy (1994) Purification and characterization of a flavin-binding storage protein from the hemolymph of *Galleria mellonella*. *Archs. Insect Biochem. Physiol.* 25:55-72.
  22. Telfer, H. W., P. S. Kein and J. H. Law (1983) Arylphorin, a new protein from *Hyalophora cecropia*; comparisons with calliphorin and manducin. *Insect Biochem.* 13:601-613.
  23. Telfer, W. H. and J. G. Kunkel (1991) The function and evolution of insect storage hexamers. *Ann. Rev. Entomol.* 36:205-228.
  24. Tojo, S. and T. Yoshiga (1994) Purification and characterization of three storage proteins in the common cutworm, *Spodoptera litura*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 24:729-738.
  25. Tojo, S., M. Nagata and M. Kobayashi (1980) Storage proteins in the silkworm. *Insect Biochem.* 10:289-303.
  26. Wang, Z. and N. H. Haunerland (1991) Ultrastructural study of storage protein granules in fat body of the corn earworm, *Heliothis zea*. *J. Insect Physiol.* 37:353-363.
  27. Weber, K. and M. Osborn (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Bio. Chem.* 244:4406-4412.
  28. Wyatt, G. R. and M. L. Pan (1978) Insect plasma proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 47:799-817.
  29. Yokoyama, M. N., Z. Kajiura, M. Nakagaki, R. Takei, M. Kobayashi and K. Tanaka (1993) Storage proteins, vitellogenin and vitellin of wild silkworms, *Antheraea yamamai*, *Antheraea pernyi* and their hybrids. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B:163-172.