

*Saccharomyces cerevisiae*에서 발현한 곤충 항균펩티드, defensin의 정제 및 특성 조사

강대욱 · 이준원 · 김보연 · 안종석*

한국생명공학연구원

Purification and Characterization of an Insect Antibacterial Peptide, Defensin, Expressed in *Saccharomyces cerevisiae*

Dae Ook Kang, Joon Won Lee, Bo Yeon Kim and Jong Seog Ahn*

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology P.O. Box 115,
Yuseong Daejeon 305-600, Korea

Abstract

We investigated the biochemical properties of insect defensin expressed and secreted from *Saccharomyces cerevisiae*. The defensin showed extremely high resistance to boiling for up to 30 min and to pH values tested from 2.0 to 12.0. The treatment of defensin with various proteases abolished antibacterial activity. However, amylases, cellulase, lipase and catalase had no effect on the activity. The defensin was purified to homogeneity through ammonium sulfate concentration of culture supernatant, SP-Sepharose column chromatography and RP-HPLC. Tricin-SDS-PAGE analysis revealed that the molecular weight of the defensin was about 4.0 kDa. The antibacterial activity of the purified defensin was verified by renaturation of stained gel and gel pouring assay using *Micrococcus luteus* as a test organism.

Key words – Defensin, *Saccharomyces cerevisiae*, purification, SP-Sepharose chromatography, HPLC, heat resistance, pH resistance

서 론

미생물의 감염이나 상처 등에 반응하여 합성되는 곤충 유래의 항균펩티드는 insect defensin (4 kDa), cecropin (4 kDa), attacin-like protein (10-30 kDa) 및 proline-rich protein (2~4 kDa) 등의 네 군으로 분류된다. Apidaecin, lebocin, pyrrholicin, abaecin 및 drosocin을 포함하는 proline-rich peptide 군은 분자량이 작고 염기성이며 주로

Gram (-) 세균에 작용한다. 이중 lebocin, pyrrholicin, drosocin은 O-glycosylation되는 부위인 threonine을 함유하고 있다[2,3,4,7,13,19]. 다른 군에 비해 분자량이 큰 attacin-like protein 군은 아미노산 glycine이 특징적으로 많고 주로 Gram (-) 세균을 사멸 또는 성장을 정지시키는 작용을 하며 attacin, sarcotoxin II, dipterin 및 coleopterin등이 포함된다[22]. Cecropin은 31~39개의 아미노산으로 구성된 항균펩티드군으로서 Gram (+)와 (-)세균의 세포막에 channel을 형성함으로써 활성을 나타낸다. 그러나, *Staphylococcus*와 *Bacillus*같은 세균에는 항균활성이 없다. 곤충의 defensin과 달리 분자 내에 cysteine이 없으며

* To whom correspondence should be addressed.
Tel : 042-860-4312, Fax : 042-860-4595
E-mail : jsahn@kribb.re.kr

항균활성에 필수적인 C-말단의 glycine이 amidation된 특성이 있다[18,21].

그리고 Gram (+)와 (-) 세균에 걸쳐 강력한 항균활성을 나타내는 새로운 종류의 항균펩티드인 moricin이 누에로부터 발견되었다. 이것은 42개의 아미노산으로 구성된 강염기성이며 곤충의 다른 항균펩티드와는 구조적인 유사성이 전혀 없다. Moricin에는 cecropin에서 일어나는 C-말단의 α -amidation과 lysine의 hydroxylation 그리고 proline-rich 항균펩티드에서 일어나는 threonine의 O-glycosylation과 같은 post-translational modification이 전혀 일어나지 않는다[15].

또한, 21개의 아미노산으로 구성된 thanatin이 다른 곤충에서 발견되었는데 이것은 Gram (+)과 (-)세균뿐만 아니라 곰팡이에도 항균활성이 있는 곤충유래의 유일한 항균펩티드이다. 이것은 개구리 표피유래의 brevinin과 50%의 아미노산 상동성을 나타내었으나 곤충유래의 다른 항균펩티드와는 상이한 새로운 종류이다[11].

포유동물의 defensin과 아미노산 서열이 유사한 항균펩티드인 곤충 defensin은 그람 양성세균의 막에 voltage-gated channel을 형성하여 투과성을 변화시킴으로써 항균활성을 나타낸다[9]. 포유동물의 defensin과 2-3차 구조는 완전히 다르며 포유동물의 defensin처럼 분자 내에 6개의 cysteine이 존재하여 3개의 disulfide linkage가 서로 존재하지만 disulfide bond의 위치는 상이하고 곤충의 defensin은 β -sheet만으로 구성된 포유동물의 defensin과 달리 N-말단 고리, α -helix 및 C-말단 β -sheet등의 이차구조들로 구성되어 있다[6,10,16]. 대장균이나 다른 세균으로 면역화한 여러 곤충으로부터 defensin의 정제에 관한 연구가 보고되었다[5,8,17,23].

본 논문에서는 *S. cerevisiae*에서 발현, 분비된 곤충 항균펩티드 defensin의 여러 생화학적 특성을 조사하고 아울러 재조합 효모균주의 배양액에서 순수한 형태로 defensin을 정제할 수 있었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 시약류

완충용액의 제조에 사용된 무기염류는 Sigma[St. Louis, MO, U.S.A.]제품을, 효모세포의 배양에 사용한 배지류는 Difco[Detroit, MI, U.S.A.]제품을 사용하였다. 양이온교환

수지인 SP-Sepharose는 Amersham Biosciences[Uppsala, Sweden]에서, HPLC 용매는 Merck사[Whitehouse Station, NJ, U.S.A.]에서 구입하였다. 정제된 defensin의 전기영동 분석을 위해 미리 만들어진 6-20% gradient polyacrylamide gel을 Bio-Rad[Hercules, CA, U.S.A.]에서 구매하여 사용하였다.

효모세포의 배양

*S. cerevisiae*에서 분비되는 defensin을 정제하기 위해 형질 전환체를 YPD 배지[2% Bacto-peptone, 1% Bacto-yeast extract, 2% dextrose] 1 l 에서 30°C에서 72시간 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 세포 pellet과 배양 상등액을 분리한 후 상등액을 회수하였다.

항균활성의 정량적 분석

정량적으로 항균활성을 측정하기 위해 2% agar plate에 1%의 시험균[*M. luteus* IAM 1056] 배양액을 함유한 top agar[1.25% Bacto-heart infusion, 0.5% Bacto-nutrient broth, 0.25% Bacto-yeast extract, 0.8% agar] 용액 10 ml을 붓고 굳혔다. 이 plate에 구멍을 만들고 1/2 배씩 연속 희석한 배양액 50 μ l을 넣고 37°C에서 15시간 배양한 후 구멍주위에 투명환이 생기게 하는 최대 희석배수의 역수를 취하여 arbitrary unit (AU)로 나타내었으며 원래 시료액 1 ml로 환산하여 AU/ml로 표시하였다[1].

Defensin의 열 안정성 조사

황산암모늄으로 농축한 *S. cerevisiae* 2805 (pSMF11)의 배양 상등액을 30분간 끓이면서 5분 간격으로 시료를 취하여 남아 있는 항균활성을 열처리하지 않은 시료의 항균활성에 대한 백분율로 나타내었다.

Defensin의 pH 안정성조사

황산암모늄으로 농축한 defensin 배양 상등액을 증류수에서 24시간 투석을 하고 항균활성이 400 AU/ml에 해당되는 defensin 투석액을 Speed Vac (SC-100, Savant, USA)을 이용하여 건조하고 pH가 2.0~12.0인 완충액에 각각 녹여서 상온에 2시간 방치한 후 항균활성을 정량적인 AU/ml로 측정하였다.

가수분해효소의 처리

단백질분해효소, 전분질분해효소, 지질분해효소 등을 최종 농도가 1 mg/ml의 농도로 처리하고 각 효소의 최적 온도에서 5시간 반응시키고 효소를 불활성화시키기 위해 10분간 끓이고 잔류 항균활성을 측정하여 효소를 처리하지 않은 시료의 활성에 대한 백분율로 나타내었다.

SP-Sepharose column chromatography

투석한 황산암모늄 침전액을 0.1 M sodium phosphate/citrate 완충액[pH 5.2]으로 평형이 된 SP-Sepharose column [5×30 cm]에 loading하고 세척한 후 같은 완충액을 사용하여 NaCl 0~1.0 M 농도구배로 용출한 후 분획의 흡광도 (OD₂₈₀)와 50 μl를 취하여 항균활성을 조사하고 항균활성을 보유한 각 분획의 항균활성을 재 정량하여 AU/ml로 나타내었다. 항균활성을 보유한 모든 분획을 합치고 증류수에서 투석을 하고 동결 건조하였다.

HPLC를 이용한 defensin의 정제

SP-Sepharose column chromatography를 통해 얻은 투석한 활성분획을 YMC J sphere (ODS-H80) RP HPLC column을 통해 추가로 분리하였다. 시료 300 μl를 loading하고 20%의 solvent A[80% acetonitrile/0.1% TFA]와 80%의 solvent B[0.1% TFA in H₂O]로 10분간 세척한 후 30분간 solvent A 20%~100%의 농도 구배로 용출하였다. 각 분획의 항균활성을 조사하고 활성을 보유한 분획을 모으고 동결건조하고 증류수에 녹인 후 같은 조건에서 RP-HPLC를 재 실시하였다.

정제한 defensin의 전기영동분석

효모에서 분비된 defensin의 분자량을 추정하고 정제한 defensin이 항균활성을 나타내는지 조사하기 위해 정제한 defensin을 6%-20% gradient Tricine-SDS-PAGE에서 두 쌍으로 전기영동을 하고[24] Coomassie로 염색하고 젤을 반으로 나눈 후 하나는 전기영동한 defensin을 refolding하기 위해 100 ml 증류수에서 30분간 5번 세척하고 시험균인 *M. luteus* 배양액 1%를 함유한 0.8% top agar를 붓고 37℃에서 하룻밤 배양하여 항균활성을 조사하였다.

결과 및 고찰

Defensin의 열 안정성

Defensin을 100℃에서 30분간 가열하면서 5분 간격으로 시료를 채취하여 항균활성을 측정하여 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. Defensin은 열 안정성이 아주 높아서 30분까지 끓여도 항균활성을 그대로 유지하였다. 이러한 높은 열 안정성은 항균펩티드의 일반적인 특성 중의 하나이다.

Defensin의 pH 안정성

Fig. 2는 defensin의 pH에 대한 안정성을 시험한 결과로서 defensin은 시험한 전 범위의 pH[2.0-12.0]에서 항균활성이 전혀 영향을 받지 않고 안정하게 활성을 유지하였다.

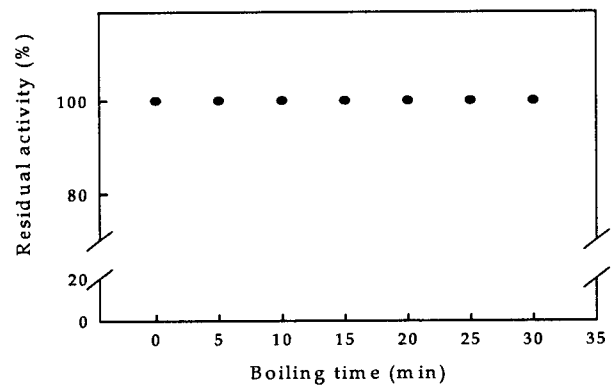


Fig. 1. Effect of heat treatments on the antibacterial activity of partially purified defensin from recombinant *S. cerevisiae*.

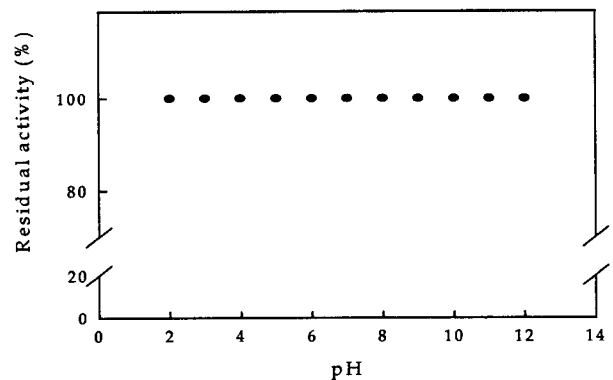


Fig. 2. Effect of pH on the antibacterial activity of partially purified defensin from recombinant *S. cerevisiae*.

Table 1. Effect of hydrolyzing enzymes on the antimicrobial activity of defensin

Enzymes	Residual activity (%)
No-Treatment	100
α -amylase	100
Glucoamylase	100
Endo-glucanase	100
Catalase	100
Lipase	100
Protease IX	0
Protease K	0
Pronase	0
Subtilisin	0
Trypsin	0
Carboxypeptidase	100
Protease XIV	0
Protease IV	0

가수분해효소의 영향

Table 1은 defensin의 다양한 종류의 가수분해효소에 대한 안정성을 시험한 결과로서 defensin을 여러 가지 가수분해효소를 처리하고 항균활성을 측정된 결과 시험한 모든 단백질분해효소에 의해 항균활성이 완전히 사라졌으나 amylase, cellulase 및 lipase 등은 전혀 영향이 없었다. 이것으로부터 항균활성을 나타내는 주요한 부분은 peptide성 물질이 중요함을 알 수 있었으며 당이나 지질은 항균활성과 무관함을 나타낸다.

황산암모늄침전

재조합 plasmid pSMF11을 함유하고 있는 *S. cerevisiae* 2805가 분비하는 defensin을 정제하기 위한 첫 단계로 YPD배지에서 배양한 상등액 1 l를 황산암모늄 0~70%의 농도로 포화시킨 후 원심분리하여 침전물을 30 ml의 0.1 M sodium phosphate/citrate 완충액(pH 5.2)에 녹이고 동일한 완충액에서 24 시간 투석을 하였다. 투석이 완료된 defensin 용액을 10분간 끓이고 원심분리하여 상등액 65 ml을 회수하였다.

SP-Sepharose column chromatography

Defensin이 PI값이 높은 양이온성 펩티드이므로 황산암모늄으로 농축하고 투석한 defensin 용액을 강한 양이온수

지인 SP-Sepharose를 사용하여 일차 분리하였다. 0.1 M sodium phosphate/citrate 완충액[pH 5.2]에서 NaCl 농도 구배[0-1.0 M]로 용출한 각 분획의 단백질농도와 항균활성을 측정된 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 많은 양의 단백질이 세척 시에 제거되었으며 항균활성을 보이는 분획을 포함하는 peak도 보였다. 항균활성이 있는 분획을 합치고 증류수에서 투석을 하고 동결건조하여 증류수 3.5 ml에 최종적으로 녹인 후 항균활성을 측정된 결과 11340 AU/ml의 활성을 나타내었다.

HPLC를 통한 defensin의 정제

SP-Sepharose로 일차 분리한 defensin을 RP-HPLC를 통해 추가로 정제하였다. 20-80%의 농도 구배에서 Buffer A로 용출한 각 peak에 해당되는 분획에 대한 항균활성을 측정된 결과 RT 23.13 min의 peak에서 활성을 나타내었다 [Fig. 4]. Fig. 4에 나타난 chromatogram은 SP-Sepharose chromatography를 통해 정제한 defensin은 아주 많은 불순물이 존재함을 보여준다. RT 23.13 min의 peak 부위를 모으고 같은 조건으로 HPLC를 재 실시하여 최종적으로 RT 24.059 min인 단일 peak를 얻었다[Fig. 5]. 이 peak 부위만 항균활성을 나타내었으며 다른 peak에서는 항균활성이 전혀 없었다. Defensin 정제 시 각 단계에서 단위 부피

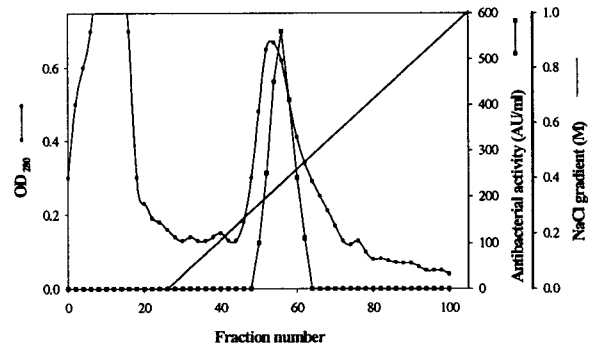


Fig. 3. Elution profile of SP-Sepharose column chromatography.

Ammonium sulfate concentrate was subjected to SP-Sepharose chromatography in 100 mM phosphate/citrate buffer, pH 5.2. Protein was eluted with the same buffer at the gradient 0 -1.0 M NaCl. Protein concentration of each fraction was determined by measuring absorbance at 280 nm and antibacterial activity against *M. luteus* was also measured.

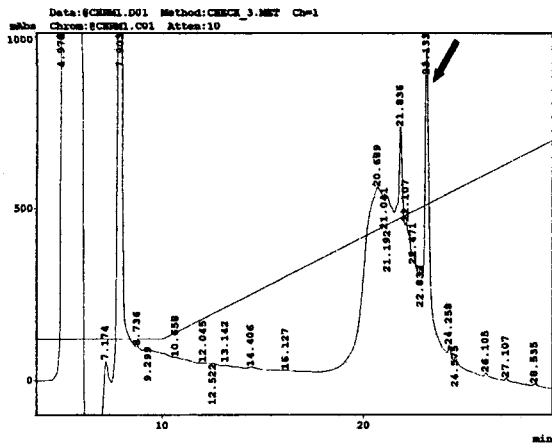


Fig. 4. HPLC chromatogram of active fractions of defensin from SP-Sepharose chromatography.

Active fractions from SP-Sepharose column chromatography were further purified through YMC J sphere (ODS-H80) RP HPLC column. After washing with 20% solvent A[80% acetonitrile/0.1% TFA] and 80% solvent B[0.1% TFA in methanol] for 10 min, the column was eluted at gradient of solvent A from 20% to 100% 30 min. The peak at 23.133 min proved to be main active one.

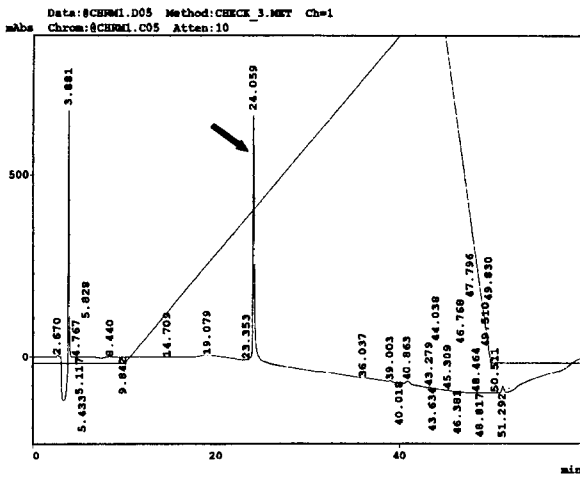


Fig. 5. HPLC profile of active fraction of the 1st HPLC. Active fraction (RT 23.133) from the first HPLC was purified by HPLC again on the same condition.

당 항균활성, 총 항균활성 및 yield를 나타낸 정제표를 Table 2에 나타내었다. 최종적으로 정제된 defensin의 yield는 15% 이었으며 최종 단계에서 활성이 SP-Sepharose chromatography에 비해 낮은 것은 농축하지 않은 활성 분획이기 때문이다.

Table 2. Purification table of defensin purified from *S. cerevisiae* 2805 (pSMF11)

Purification step	Total volume (ml)	Activity (AU/ml)	Total AU	Yield (%)
Supernatant	1000	200	200000	100
Ammonium sulfate precipitation	30	3940	118200	59.1
Dialysis	65	1800	117000	58.5
SP-Sepharose	3.5	11340	39690	19.8
HPLC	5.5	5400	28700	14.9

정제한 defensin의 분자량 확인

HPLC로 정제한 defensin의 순도를 확인하고 분자량을 조사하기 위해 6%~20% gradient Tricine-SDS-PAGE에서 두 쌍식 전기영동을 한 후 염색하고 겔을 반으로 나눈 후 하나는 증류수에서 30분간 5번 세척하고 시험균인 *M. luteus*를 함유한 0.8% NB top agar를 붓고 37°C에서 하룻밤 배양하여 항균활성을 조사한 결과 약 4.0 kDa에 해당되는 진한 밴드에서 항균활성이 나타났다[Fig. 6A]. 또한 염색한 겔에는 defensin 단일 밴드 이외의 불순물 밴드가 관찰되지 않아 defensin이 순수한 형태로 정제된 것을 확인할 수 있었다. 일반적으로 대부분의 곤충유래 defensin은 아미노산 40개 내외로 구성되었고 분자량은 약 4.0 kDa인 염기성 펩티드로 확인되었다.

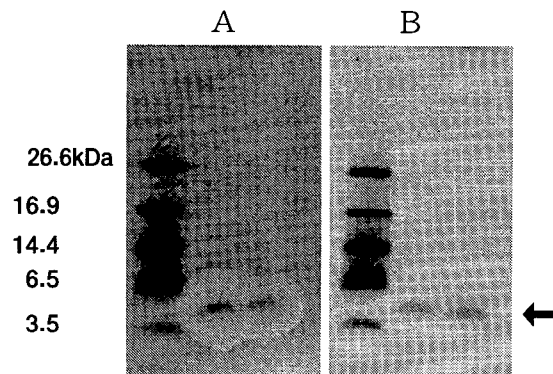


Fig. 6. Tricine-SDS-PAGE analysis and activity staining. Purified defensin through HPLC was analyzed by electrophoresis in a gradient gel[6-20%] in duplicate. After staining with Coomassie Brilliant R-250, the one gel was tested for antibacterial activity[A].

현재 광범위하게 사용되고 있는 항생제에 대한 내성균의 출현은 새로운 유형의 항생물질에 대한 개발의 필요성이 대두되며 항생제의 체내 축적과 같은 부작용으로 항생제의 사용을 점점 규제하는 추세이다. 따라서 무공해성이고 항균 spectrum이 광범위할 뿐만 아니라 내성균이 없는 항균펩티드가 항생제를 대체할 가능성이 높은 항생물질로서 활발한 연구가 진행 중이다[12,14,20]. 그러므로, 본 연구에서는 *S. cerevisiae*에서 활성적인 형태로 분비되는 곤충 *Phormia terranova* 유래 defensin의 여러 생화학적 특성을 조사하였으며 아울러 순수한 형태로 분리, 정제하였다. 이러한 연구 결과는 향후 강력한 항균펩티드의 탐색 및 재조합 미생물을 이용한 경제적인 대량 생산체계의 확립을 위한 기초연구로서 의의가 있다.

요 약

*S. cerevisiae*에서 glucoamylase 유전자의 promoter와 signal sequence 그리고 MF α 1의 prosequence를 이용하여 합성 곤충 defensin을 발현하고 항균활성을 보유한 형태로 분비하는데 성공하였다. Defensin의 여러 생화학적 특성을 조사한 결과 열 안정성이 높아 100℃에서 30분간 가열하여도 항균활성을 온전히 유지하였으며 조사한 pH 영역, 2.0-12.0에서 항균활성의 변화가 없었다. 또한 여러 단백질 분해효소를 처리하면 항균활성이 완전히 사라졌으나 전분질 분해효소, 섬유소분해효소 및 지질분해효소의 처리는 항균활성에 전혀 영향이 없었다. 황산암모늄침전, SP-Sepharose column chromatography, RP-HPLC 등의 조작을 통해 defensin을 순수한 형태로 정제하였으며 Tricine-SDS-PAGE를 통해 분자량이 약 4.0 kDa임을 확인하였고 정제한 defensin은 항균활성을 보유하였다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 연구비로 수행되었음을 밝히며 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Barefoot, S. F. and T. R. Klaenhammer. 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin

produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1808-1815.

2. Boman H. G. 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 61-92.

3. Casteels, P. 1990. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Eur. J. Biochem.* **187**, 381-386.

4. Casteels, P., C. Ampe, F. Jacobs, M. Vaeck and P. Tempst. 1989. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO Journal* **8**, 2387-2391.

5. Chalk, R, H. Townson, S. Natori, H. Desmond and P. J. Ham. 1994. Purification of an insect defensin from the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol. Biol.* **24**(4), 403-10.

6. Chalk, R., H. Townson, S. Natori, H. Desmond and P. J. Ham. 1994. Purification of an insect defensin from the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **24**, 403-410.

7. Chowdhury, S. 1995. cDNA cloning and gene expression of lebecin, a novel member of antibacterial peptides from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **214**, 271-278.

8. Cociancich, S, M. Goyffon, F. Bontems, P. Bulet, F. Bouet, A. Menez and J. Hoffmann. 1993. Purification and characterization of a scorpion defensin, a 4 kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensins and scorpion toxins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194**(1), 17-22.

9. Cociancich, S., A. Ghazi., C. Hetru., J. A. Hoffmann, and L. Letellier. 1993. Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J. Biol. Chem.* **268**, 19239-19245.

10. Cornet, B., J.-M., Bonmatin, C. Hetru, J. A. Hoffman, M. Ptak and F. Vovelle. 2001. Refined three-dimensional solution structure of insect defensin A. *Structure* **3**, 435-448.

11. Fehlbauer, P., P. Bulet, S. Chernysh, J. P. Briand, J. P. Roussel, L. Letellier, C. Hetru and J. A. Hoffmann. 1996. Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, **93**, 1221-1225.

12. Hancock, R. E. W. 1997. Peptide antibiotics. *The Lancet* **349**, 418-422.

13. Hancock, R. E. W. and G. Diamond. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defenses. *Trends in Microbiol.* **8**, 402-410.
14. Hancock, R. E. W. and R. I. Lehrer. 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnol.* **16**, 82-88.
15. Hara, S. and M. Yamakawa. 1995. Moricin, a novel type of antibacterial peptide isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* **270**, 29923-29927.
16. Hoffmann, J. A. and C. Hetru. 1992. Insect defensins : inducible antibacterial peptides. *Immunology Today* **13**, 411-415.
17. Ishibashi, J., H. Saido-Sakanaka, J. Yang, A. Sagisaka and M. Yamakawa. 1999. Purification, cDNA cloning and modification of a defensin from the coconut rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros*. *Eur. J. Biochem.* **266**, 616-623.
18. Kato, Y., K. Taniai, H. Hirochika and M. Yamakawa. 1993. Expression and characterization of cDNAs for Cecropin B, an antibacterial protein of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **23**, 285-290.
19. Lambert, J., E. Keppi, J.-L. Demarq, C. Wicker, J.-M. Reichhart, B. Dunbar, P. Lepage, A. V. Dorselaer, J. Hoffmann, J. Fothergill and D. Hoffmann. 1989. Insect immunity: Isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 262-266.
20. Latham, P. W. 1999. Therapeutic peptides revisited. *Nature Biotechnology* **17**, 755-757.
21. Lowenberger C., M. Charlet, J. Vizioli, S. Kamal, A. Richman, B. M. Christensen and P. Bulet. 1999. Antimicrobial activity spectrum, cDNA cloning, and mRNA expression of a newly isolated member of the cecropin family from the mosquito vector *Aedes aegypti*. *J. Biol. Chem.* **274**, 20092-20097.
22. Ourth, D. D., T. D. Lockety and H. E. Renis. 1994. Induction of cecropin-like and attacin-like antibacterial but not antiviral activity in *Heliothis virescens* larvae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**, 35-44.
23. Richman, A. M., P. Bulet, C. Hetru, C. Barillas-Mury, J. A. Hoffmann and F. C. Kafalos. 1996. Inducible immune factors of the vector mosquito *Anopheles gambiae*: biochemical purification of a defensin antibacterial peptide and molecular cloning of preprodefensin cDNA. *Insect Mol. Biol.* **5**, 203-10.
24. Schagger, H. and G., von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range of proteins from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.

(Received July 4, 2002; Accepted August 21, 2002)