

배추흰나비 용기 특이 큐티클 단백질의 시공간적 역할

신명자 · 박정남 · 서울원*

안동대학교 자연과학대학 생명과학과

Received October 10, 2006 / Accepted November 1, 2006

Temporal and Spatial Role of Pupal Stage Specific Cuticle Protein in *Artogeia rapae*. Myung Ja Shin, Jeong Nam Park and Eul Won Seo*. Dept. of Biological Science, Andong National University, Andong 760-749, Korea – Present study aims to investigate the topical distribution of pupal stage specific cuticle protein and its temporal and spatial role during the wing formation of *Artogeia rapae*. ArCP27 (27 kd cuticle protein) was identified as pupal stage specific cuticle protein in cuticle tissues and has not shown any qualitative differences by local portions of body. ArCP27 maintained constant concentration just after pupal ecdysis to 5-day old pupal stage but thereafter decreased. In fat body, ArCP27 was found in both thoracic and abdominal fat body from the last larval to pupal stage. In wing cuticle, ArCP27 began to find from 5-day old pupal stage. Immunologically ArCP27 in thoracic and abdominal cuticle has the response against the ArCP27 at 5-day old pupa but since then has no response. But the antibody against ArCP27 has reacted to 5- and 7-day old pupal and adult wing protein. ³H-leucine was not incorporated into ArCP27 in 5- and 7-day old thoracic and abdominal cuticle but was incorporated into ArCP27 in 7-day old wing cuticle and adult wing, suggesting that ArCP27 partly participates the wing cuticle formation by the process of digestion and reabsorption of old cuticle.

Key words – cuticle, wing, ArCP27, stage specific cuticle protein

서 론

곤충의 외골격에 해당하는 큐티클은 단백질과 키틴으로 이루어져 내부 조직을 보호하며 또한 몸을 지지하여 힘을 발휘할 수 있게 한다. 이러한 기계적 특성은 큐티클을 구성하는 단백질 성분과 경화의 정도에 따라 매우 독특한 성질을 갖게 된다[2,26].

큐티클은 비활성적인 조직이 아니라 발생 특이적으로 발현되는 큐티클 단백질에 의해 발생 시기에 따라 매우 역동적으로 변하는 조직이다[6,16,7]. *Drosophila*의 큐티클에서는 유충, 용 및 성충기에 따라 상이한 단백질이 출현하며[6], *Tenebrio molitor*의 유충 및 용기의 수용성 큐티클 단백질 중에도 발생 특이적으로 나타나는 단백질이 있다. 또한 exocuticle의 몇몇 주요 단백질은 발생이 진행됨에 따라 점차 양적으로 감소하는 반면 기타의 단백질은 endocuticle이 형성될 때에도 계속 유지되고 있다[19]. 본 연구에 사용된 배추흰나비(*Artogeia rapae*)에서도 발생 특이 큐티클 단백질이 확인되었으며[21], 이들의 분자량은 10-50 kd 범주에 포함되고 있으며 유충기에는 62 kd, 22 kd, 19 kd 및 16 kd, 용기에는 38 kd, 27 kd 단백질이 확인되어 이를 각기 유충기 및 용기 특이 큐티클 단백질이라고 하였다. 최근 *Manduca sexta*의 전용 큐티클에서는 약 100개 정도의 단백질이 확인되었으며, 전기

영동 이동도에 따라 MsCP20, MsCP27과 MsCP36이라 칭하는 3개의 주요 단백질 등에 대한 N-말단 아미노산 서열과 조성의 특징도 부분적으로 조사되었다. 아미노산 서열상으로는 아미노산 서열이 이미 알려진 단백질과 어떠한 동질성도 나타내고 있지 않지만 서로 다른 큐티클 단백질들과는 유사성을 나타내고 있으며[11], Suderman 등[24]은 이들 단백질의 특성과 cDNA cloning을 실시하여 이 중 MsCP36 단백질을 성충 조직에서도 확인하여 발생 특이 단백질이 조직의 신생에 재사용될 수 있음을 암시하였다. 각기 상이한 시기에 합성된 큐티클 단백질이 차후 발생기의 새로운 조직의 신생 과정에도 관여할 수 있다는 가설은 큐티클의 구성 성분이 차후 발생에 어떻게 관여하는가를 해결해야 할 문제점으로 제기되고 있다.

따라서 본 연구에서는 새로운 조직의 신생합성에 관여하는 배추흰나비 용기 특이 큐티클 단백질의 국소적인 분포와 신생조직합성에 있어 이의 시공간적 역할에 관해 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

실험곤충

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

*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5462, Fax : +82-54-823-1627

E-mail : ewseo@andong.ac.kr

단백질 시료 추출

배추흰나비 유충, 용 및 성충기의 발생단계에 따라 공시충으로 부터 우선 혈림프를 추출하였으며 암화를 방지하기 위하여 소량의 phenylthiourea를 첨가하였다. 혈림프를 추출한 후 Ringer 용액하에서 날개 큐티클, 복부 큐티클 및 인접조직인 지방체 및 epidermis를 적출하였으며 적출된 조직은 Ringer 용액으로 3-4회 세척하여 혈림프 및 기타 조직질편을 제거하였다. 이 후 이 조직들을 homogenation buffer (5 mM Tris, 38 mM Glycine, pH 8.4)에서 완전히 균질화 시킨 후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 각 조직에 대한 단백질 시료로 사용하였다.

SDS-전기영동 및 electro-elution

상기에서 추출된 단백질 시료는 0.1% SDS가 포함된 3% stacking gel과 9-14% gel에서 SDS-전기영동을 하였으며[15], 단백질시료와 함께 SDS-PAGE low molecular weight standards (phosphorylase B, MW 97,400; bovine serum albumin, MW 66,200; ovalbumin, MW 44,699; carbonic anhydrase, MW 31,000; soybean trypsin inhibitor, MW 21,500; lysozyme, MW 14,400, Bio-Rad)을 병행 사용하였다. 전기영동을 통해 확인된 27 kd 용기 특이 큐티클 단백질은 electro-eluter(Bio-Rad)에서 단백질을 추출하였으며, SDS-PAGE 상에서 단일 band로 확인한 후 freeze-dryer에서 lyophilize 시킨 후 항체 제조용으로 사용하였다.

2차원 전기영동

2차원 전기영동은 O'Farrell[18])의 방법을 이용하여 실시하였다. 우선 isoelectric focusing은 Biolyte (Bio-Rad) pH 4-8 과 pH 3-10을 4 : 1로 혼합한 후 4% urea gel에서 등전점에 따라 단백질을 분리하였으며 상기의 SDS-PAGE법에 따라 2차원적으로 분리하여 나타난 spot를 분석하였다.

항체제조

상기에서 부분적으로 정제된 27 kd 용기 특이 큐티클 단백질에 Freund adjuvant를 각기 동량(0.5 ml) 혼합하여 토끼에 일주일마다 한번씩 3주간 피부하 주사를 하였다. 마지막 주사 후 10일 후에 다시 한번 booster injection하여 10일 경과 후에 토끼의 marginal ear vein 혹은 심장에서 혈액을 채취하여 혈장만을 취하였다. 이 혈장을 ammonium sulfate로 40%되게 포화시켜 이의 침전물을 2일간 dialysis를 하여 큐티클 단백질에 대한 항체로 이용하였다.

Western blot

각 조직에서 추출된 단백질 시료를 9-14% gradient SDS-PAGE상에서 전개시킨 후 이를 다시 2차적으로 PVDF paper에 transblot하였다. 이 membrane을 1차적으로 27 kd

용기 특이 큐티클 단백질의 항체로 처리한 후 Bio-Rad사의 Immune-blot assay kit를 사용하여 Hawkes 등[9]의 방법이나 Bio-Rad사의 protocol에 따라 goat anti-rabbit IgG(h+L)로 처리한 후 발색하였다.

Autoradiography

종령 말기에 5 μ Ci의 [4,5- 3 H(N)]-leucine (NEN)을 혈강에 주사하여 종령말, 용기 및 성충기의 발생시기에 따라 큐티클, 지방체 및 epidermis 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 9-14% SDS-PAGE를 실시하였으며 PPO-DMSO 혼합액 혹은 EnhanceTM (NEN)로 처리한 후 autoradiography를 실시하였다[5].

결 과

배추흰나비를 발생단계에 따라 5령말기(5L), 전용(P_0), 용화직후(P_0), 용1일(P_1), 용3일(P_3), 용5일(P_5), 용7일(P_7) 및 성충(AD)으로 구분한 후 두부, 흉부 및 복부로 나누어 27 kd 발생 특이 큐티클 단백질의 국소 부위에 따른 질적, 양적 변화를 조사하였다.

큐티클에서 용기 특이 큐티클 단백질로 확인된 바 있는 27 kd 단백질은[21] 용화직후부터 우화직전까지 두부, 흉부 및 복부 큐티클에서 모두 확인되고 있어 부위에 따른 질적 변화는 거의 없는 경향을 나타내고 있다. 그러나 용 초기에 비교적 높은 농도를 보이다가 성충기로 감에 따라 서서히 농도가 낮아지는 양적인 변화를 나타내고 있다(Fig. 1). 물질대사 및 단백질 합성의 중추적인 역할을 하는 지방체에서 27 kd 단백질은 용화 후 3일까지는 흉부와 복부에서 전시기에 걸쳐 확인되고 있지만 그 이후부터는 농도가 급격히 감소하는 경향을 나타내고 있다(Fig. 2).

큐티클 단백질의 발생시기 및 부위에 따른 27 kd 용기 특이 큐티클 단백질의 분포를 조사하기 위하여 27 kd 큐티클 단백질의 항체를 사용한 western blot을 실시하였다. 흉부에서는 27 kd 단백질에 대한 반응이 매우 미약하게 확인되었으며(Fig. 3A), 복부에서는 용3일에 높은 농도를 보이나 그 이후 성충기로 감에 따라 감소하는 경향을 보이고 있다(Fig. 3B).

큐티클 단백질과 용기중 신생합성되는 날개 큐티클 단백질과의 관계를 국소 부위별로 살펴보기 위해 날개가 형성되는 용화5일, 용화7일 및 성충기까지 날개 원기가 위치한 흉부 큐티클과 복부 큐티클 및 날개 큐티클 단백질의 전기영동상과 western blot을 실시하였다(Fig. 4). 흉부와 복부 큐티클의 단백질 패턴은 거의 유사하였으며 27 kd 용기 특이 큐티클 단백질은 용화7일부터 사라지고 있으나 날개에서는 용화5일의 발생중인 날개에서 확인되기 시작하여 성충의 날개에서는 높은 농도를 나타내고 있다(Fig. 4A). 또한 27 kd 단백질에 대한 western blot 반응에 있어서도 흉부와 복부 큐티클에서

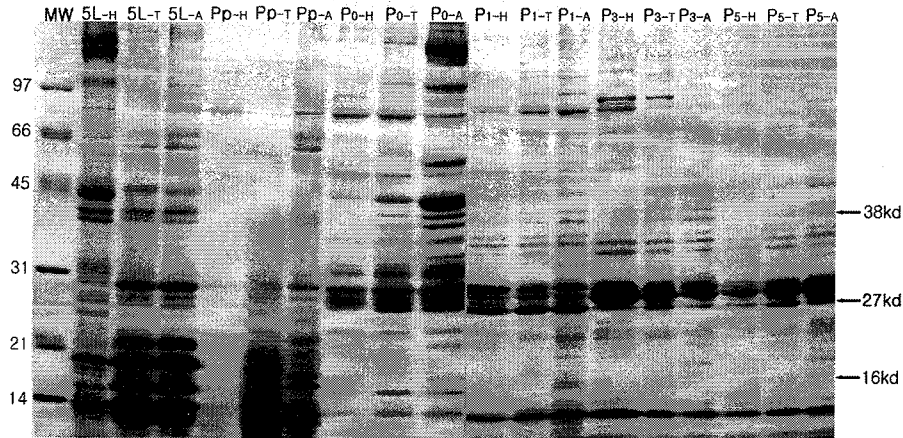


Fig. 1. SDS-PAGE patterns of cuticle proteins of *Artogeia rapae* from the last larval to pupal stage. (5L, 5th instar larva; Pp, prepupa; P₀, newly ecdysed pupa; P₁, 1-day old pupa; P₃, 3-day old pupa; P₅, 5-day old pupa; -H, Head part; -T, Thorax part; -A, Abdomen part)

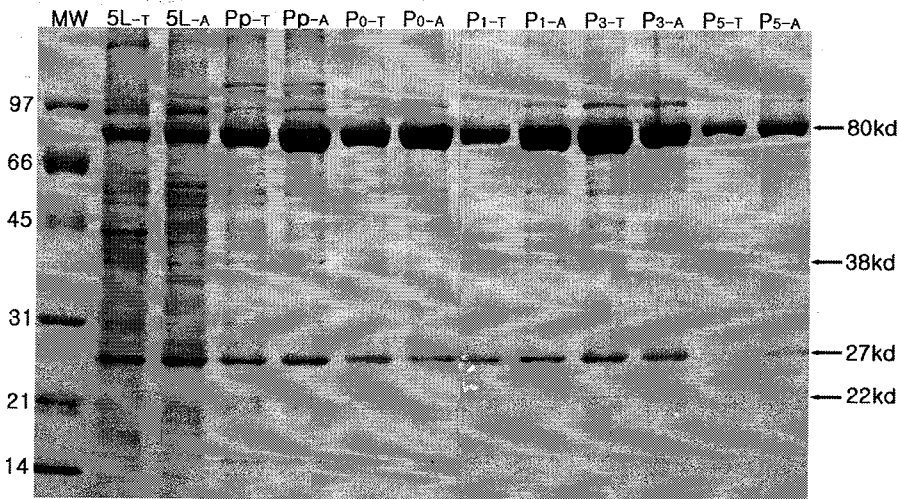


Fig. 2. SDS-PAGE patterns of fat body proteins of *Artogeia rapae* from the last larval to pupal stage.

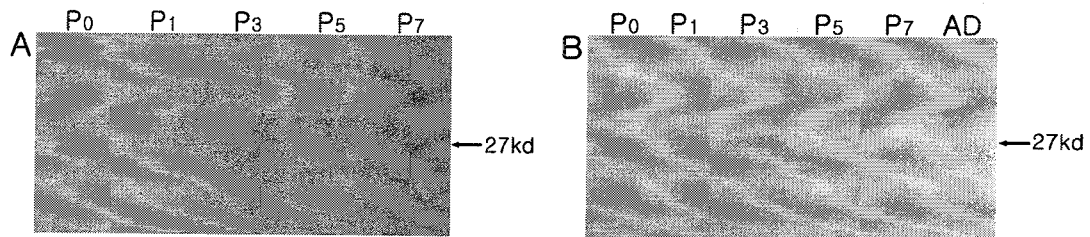


Fig. 3. Western blot of thoracic (A) and abdominal (B) cuticle proteins of *Artogeia rapae* against ArCP27 (27 kd pupal specific cuticle protein). (5L, 5th instar larva; Pp, prepupa; P₀, newly ecdysed pupa; P₁, 1-day old pupa; P₃, 3-day old pupa; P₅, 5-day old pupa; P₇, 7-day old pupa; AD, adult).

는 용화5일에는 미약하게 반응을 하고 있으나 그 이후에는 거의 나타나지 않고 있는 반면 용화5일, 용화7일 및 성충 날개 큐티클에서는 동질성을 보여주고 있다(Fig. 4B). 흉부 큐티클과 날개 큐티클의 단백질 패턴을 2차원 전기영동으로 분석해 보면 27 kd 단백질은 용화5일 이후의 흉부 큐티클 및 날개 큐티클에서 모두 하나의 spot으로 관찰되었다(Fig. 5).

용기에서 성충으로의 변태에 따른 큐티클 단백질이 날개 큐티클 단백질로 통합되는 과정을 조사하기 위해 종령 말기에 ³H-leucine을 혈강에 주사하여 발생시기에 따른 용기 특이 큐티클 단백질의 이동경로를 조사하였다. 용 초기에 주입된 ³H-leucine은 흉부 큐티클에서는 용화1일부터 27 kd 단백질에 통합되고 있으며 이는 용3일까지 유지되고 있으나 용화

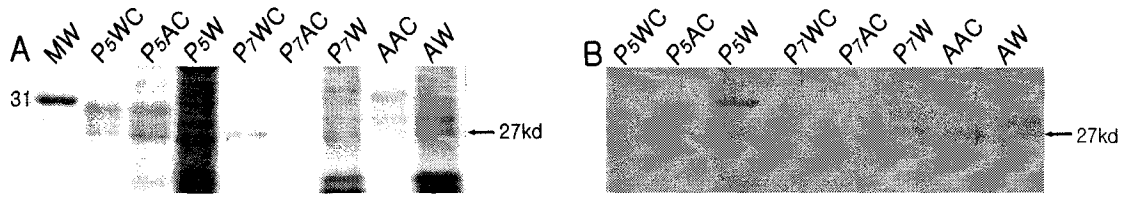


Fig. 4. SDS-PAGE pattern (A) and western blot (B) of thoracic, abdominal and wing cuticle proteins of *Artogetia rapae* from the 5th day old pupal to adult stage. (P₅WC, 5-day old pupal thoracic cuticle; P₅AC, 5-day old pupal abdominal cuticle; P₅W, 5-day old pupal wing cuticle; P₇WC, 7-day old pupal thoracic cuticle; P₇AC, 7-day old pupal abdominal cuticle; P₇W, 7-day old pupal wing cuticle; AAC, adult abdominal cuticle; AW, adult wing cuticle)

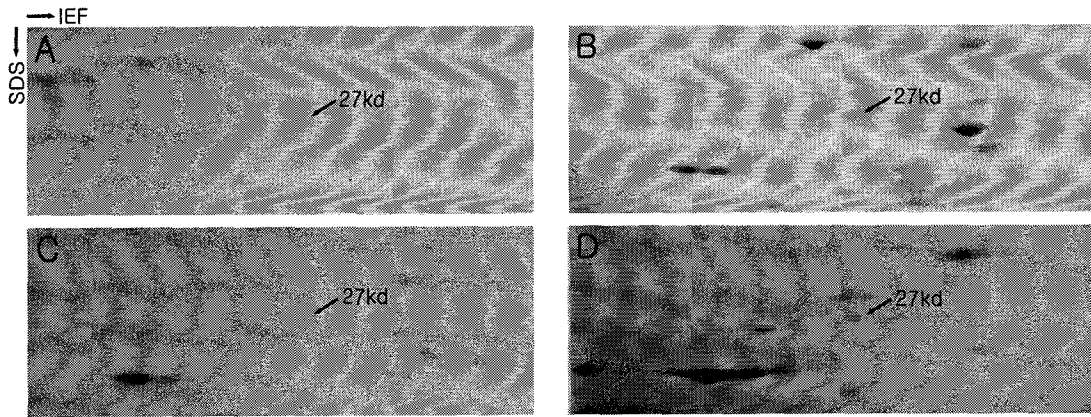


Fig. 5. Two dimensional electrophoresis of thoracic and wing cuticle proteins of *Artogetia rapae* from 5-day old pupal to adult stage. A) 5-day old pupal thoracic cuticle, B) 5-day old pupal wing cuticle, C) 7-day old pupal wing cuticle, D) adult wing cuticle

5일부터는 이의 농도가 감소하고 있으나 우화직전까지 확인되고 있다(Fig. 6A). 복부 큐티클에서는 용화1일에 27 kd 단백질에 통합되는 양상을 보여주고 있지만 이의 농도는 매우 미약하며 오히려 우화직전에 이의 농도가 증가하는 패턴을 보여주고 있다 (Fig. 6B). 지방체에서 27 kd 단백질은 종령 말기에 27 kd 단백질과의 통합이 높게 생성되었지만 전용기 및 용화직후에는 다소 감소하는 양상을 보이고 있다. 그러나 용

화1일에 다시 높은 통합성을 보이다가 용말기로 가면서 꾸준히 감소하는 경향을 보이고 있다(Fig. 7A). Epidermis에서도 많은 단백질에 주입된 아미노산이 통합되고 있으며 27 kd 단백질에 대한 통합도 두드러지게 나타나고 있다(Fig. 7B). 특히 전용기와 용화직후에는 ³H-leucine의 통합이 두드러졌으며 27 kd 단백질과의 통합도 매우 높은 수준을 유지했지만 용말기로 갈수록 이의 통합 정도는 매우 낮은 수준으로 떨어

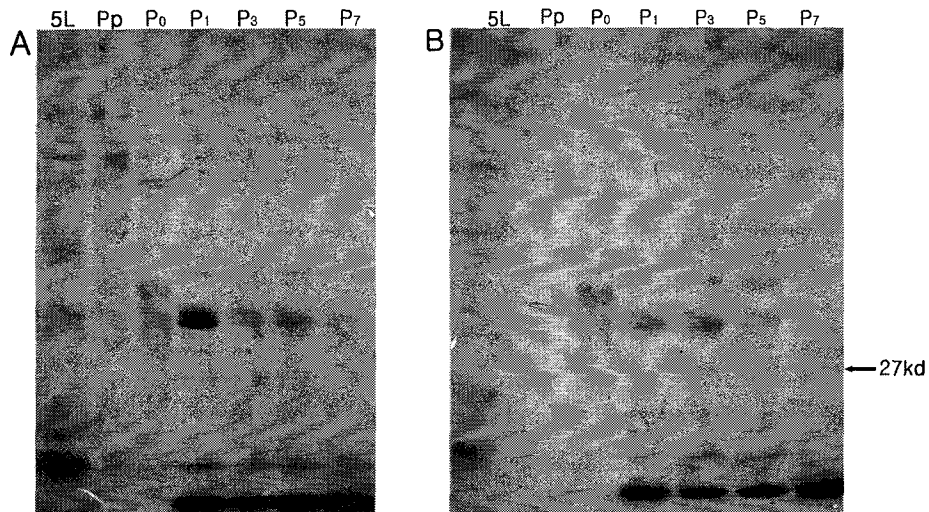


Fig. 6. Autoradiographic pattern of thoracic (A) and abdominal (B) cuticle of *Artogetia rapae* from the last larval to pupal stage.

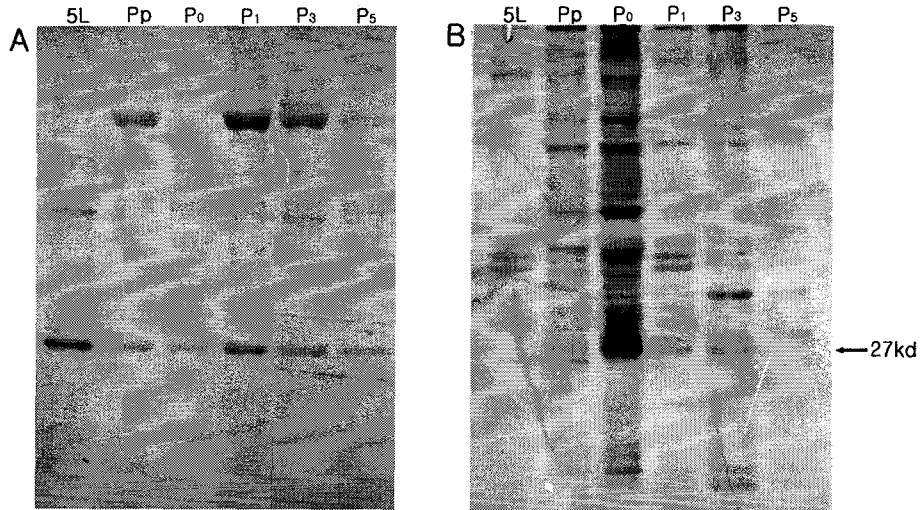


Fig. 7. Autoradiographic pattern of fat body (A) and epidermis (B) of *Artogeia rapae* from the last larval to pupal stage.

지고 있다. 용말기 및 우화직후 동안 흉부와 복부 큐티클과 날개 큐티클내 27 kd 단백질에 ^3H -leucine이 통합되는 과정을 조사해 보면(Fig. 8) ^3H -leucine은 용말기와 우화직전 흉부 큐티클과 복부 큐티클의 27 kd 단백질에서는 확인되지 않았다. 그러나 우화직전과 직후의 날개 큐티클에 통합되는 패턴을 보여주고 있다.

고찰

곤충 표면을 덮고 있는 모든 큐티클은 모두 동일한 큐티클 단백질로부터 생성되는지 아니면 부위에 따라 각기 상이한 단백질에 의해 형성되는지에 대해서는 여러 의견이 제시

되고 있다. 그러나 여러 실험적 근거에 의해 큐티클은 부위에 따라 각기 다른 종류의 단백질에 의해 이루어져 있을 것으로 추정하고 있다. *in situ* hybridization 실험을 통해서 특정 발생시기에 특이 큐티클 단백질에 대한 mRNA가 확인되지 않기 때문에 큐티클 단백질은 시간적 차이를 두고 합성되는 것으로 생각되어 왔다[19]. 또한 경화과정이 진행중인 아성충에서 분리된 큐티클 단백질에서는 부위 특이적인 차이를 보이고 있다[8]. *Hyalophora cecropia*의 여러 부위에서 추출된 mRNA의 *in vitro* translation 결과를 보면 translation 생성물에서 부위 특이성을 보이는 것으로 나타났다[4]. 그러나 큐티클에서 추출된 주요 단백질이 *in vitro* 생성물의 주요 생성물은 아니기 때문에 특정 단백질이 약간의 변형을 거쳐 큐티클의 불용성 부분으로 통합되어 가는 것으로 생각되고 있다. 외부 골격계로서의 큐티클은 곤충의 생활사를 통해 각기 다른 모양이나 크기를 갖게 되는데 이는 발생 시기 및 부위에 따라 발현되는 발생 특이 큐티클 단백질이 관여하고 있다[23]. 또한 큐티클의 상이한 물리화학적 특성은 이의 구조를 결정짓는 단백질의 종류나 양 뿐만 아니라 키틴이나 카테콜의 퀴는 유도체와 같은 기타 다른 큐티클성 성분과의 상호작용과도 밀접한 관계를 갖고 있다[10,3,13]. 배추흰나비 (*Artogeia rapae*) 큐티클에서도 용기에는 38 kd, 27 kd의 발생 특이 큐티클 단백질이 확인되었고, 이 단백질은 지방체와 epidermis에서 기원하고 있다[20,21]. 이러한 용기 특이 단백질의 시공간적 분포에서 27 kd 단백질은 두부, 흉부, 복부 등 부위에 따른 변화가 거의 없는 경향을 나타내고 있다. 즉 용기에서만 확인되는 27 kd 단백질은 부위에 따른 정성적 차이 보다는 주로 정량적인 차이를 보여주고 있으며(Fig. 1), 지방체에서도 흉부와 복부에서 전시기에 걸쳐 확인되는 양상을 보여주고 있으며 부위에 따른 양적, 질적 차이는 거의 없는 것으로 나타났다(Fig. 2). 배추흰나비의 경우 SDS-PAGE상에 나타난 여러 큐티클 단백질은 국소적인 부위와 발생 시기에

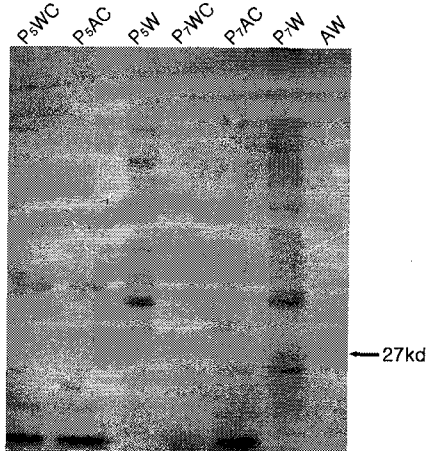


Fig. 8. Autoradiographic pattern of thoracic, abdominal cuticle, and wing cuticle of *Artogeia rapae* from the last pupal to adult stage. (P₅WC, 5-day old pupal thoracic cuticle; P₅AC, 5-day old pupal abdominal cuticle; P₅W, 5-day old pupal wing cuticle; P₇WC, 7-day old pupal thoracic cuticle; P₇AC, 7-day old pupal abdominal cuticle; P₇W, 7-day old pupal wing cuticle; AW, adult wing cuticle)

따라 양적, 질적 차이를 나타내고 있으며, 용초기에 비해서 경화가 완전히 진행된 용 후기에는 많은 단백질의 존재가 사라지는데 이러한 것은 일단의 단백질이 불용성 단백질로 전환되어 추출이 되지 않거나, 성충을 위한 조직의 신생과정에 재사용될 가능성이 있다. 그러나 용기에만 확인되는 27 kd 단백질은 부위에 따른 분포에 있어서는 차이가 없고 시기에 따른 양적 변화만 나타내는데 이 단백질은 큐티클의 완전한 경화에도 불용성으로 전환되지 않고 추출되고 있으며, 실제 신생조직의 형성에 연관성이 있을 것으로 생각된다.

성충 분화기 동안 새로운 조직의 형성과 같은 조직신생과 발생 특이 큐티클 단백질과의 연관성을 밝히기 위해 발생 특이 큐티클 단백질을 정제하여 이의 생화학적 특성과 부분적으로 이러한 단백질의 아미노산 서열이 확인되고 있다 [25,12,17,22]. *Locusta migratoria*의 날개 큐티클 단백질은 integument 단백질과 매우 비슷한 아미노산 조성을 하고 있으며 [1], genomic library에서 몇 종류의 clone을 분리하여 용기 큐티클 단백질 유전자의 특성을 밝혀낸 바 있으나 [14], 성충 분화 시 발생 특이 큐티클 단백질과 새로이 형성되는 날개 큐티클과 같은 신생 합성되는 조직과의 직접적인 관계는 밝히지 못하고 있다. 배추흰나비는 용시기에 성충이 되기 위해 날개 등 새로운 조직을 형성하게 된다. 날개가 형성되는 용말기 동안 국소 부위인 흉부와 복부 큐티클의 단백질 패턴은 거의 유사하였으며 27 kd 큐티클 단백질은 용화7일부터 사라지고 있으나 날개에서는 용화5일의 발생중인 날개에서 확인되기 시작하여 성충의 날개에서는 높은 농도를 나타내고 있으며 이러한 결과는 2차원 전기영동상과도 일치하고 있다. 이 단백질은 날개 큐티클에서 두드러지게 나타나기 때문에 날개 큐티클 형성에만 관여하는 날개 특이 큐티클 단백질인 것으로 생각되며, 이 단백질은 epidermis 및 흉부 지방체에서도 확인되기 때문에 날개 특이 큐티클 단백질은 지방체나 epidermis에서 기원하는 것으로 사료된다. 또한 western blot을 통해서도 27 kd 단백질은 흉부와 복부 큐티클에서는 용화 5일에는 미약하게 반응을 하고 있으나 그 이후에는 거의 동질성을 보이지 않고 있는 반면 용화5일, 용화7일 및 성충 날개 큐티클에서 동질성을 보여주고 있다. 방사능 전구물질을 사용한 단백질의 통합과정을 살펴보면 27 kd 단백질은 용5일과 용7일의 흉부 큐티클과 복부 큐티클에서는 확인되지 않고 있으나 용7일과 성충 날개 큐티클에는 통합되어 가는 패턴을 보여주고 있어 날개형성을 위한 조직 분해와 신생 과정 중 27 kd 단백질이 포함된 endocuticle이 성충으로 우화시 소화, 재흡수의 과정을 통해 성충 날개 큐티클의 형성에 직접적으로 관여할 것으로 사료된다.

적 요

배추흰나비 날개 형성기 동안 용기 특이 큐티클 단백질의

국소부위에 따른 분포와 신생조직합성에 있어 이의 시공간적 역할을 조사하였다.

큐티클에서 27 kd 단백질은 국소 부위에 따른 질적 변화는 거의 없으나 용 초기에 비교적 높은 농도를 보이다가 성충기로 감에 따라 서서히 농도가 낮아지는 양적인 변화를 나타내고 있다. 지방체에서 27 kd 단백질은 용화 후 3일까지는 흉부와 복부에서 전시기에 걸쳐 확인되고 있지만 그 이후부터는 농도가 감소하는 경향을 나타내고 있다. Western blot 상에서도 27 kd 큐티클 단백질의 흉부와 복부의 국소적인 분포에는 거의 차이가 없으나 용말기와 성충 날개큐티클에서는 동질성을 보여주고 있다.

³H-leucine은 흉부와 복부 큐티클의 27 kd 단백질에 시공간적인 차이를 두고 통합되고 있으며, 용말기와 우화직전 흉부 큐티클과 복부 큐티클의 27 kd 단백질에서는 확인되지 않았으나 우화직전과 직후의 날개 큐티클에 통합되는 패턴을 보여주고 있다. 지방체와 표피에서도 27 kd 단백질에 대한 통합이 두드러지게 나타나고 있다. 27 kd 용기 특이 큐티클 단백질은 국소 부위에 따른 질적, 양적 차이는 나타나지 않았으나 날개 형성기 동안 부분적으로 27 kd 단백질이 포함된 endocuticle이 소화, 재흡수 과정을 통해 성충 날개 큐티클의 형성에 관여할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Andersen, S. O. 1988. Characterization of proteins from pharate adult wing of the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* **18**(5), 415-421.
- Andersen, S. O., P. Hojrub and P. Roepstorff. 1995. Insect cuticular proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2**, 153-176.
- Andersen, S. O., M. G. Peter and P. Roepstorff. 1996. Cuticular sclerotization in insects. *Comp. Biochem. Physiol.* **113**, 689-705.
- Binger, L. C. and J. H. Willis. 1990. *In vitro* translation of epidermal RNAs from different anatomical regions and metamorphic stages of *Hyalophora cecropia*. *Insect Biochem.* **20**, 573-583.
- Bonner, W. M. and M. Laskey. 1974. A film detection method for tritium proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* **46**, 83-88.
- Chihara, C. J., D. J. Silvert and J. W. Fristrom. 1982. The cuticle proteins of *Drosophila melanogaster*: Stage specificity. *Dev. Biol.* **89**, 379-388.
- Csikos, G., K. Molnar, N. H. Borhegyi, G. C. Talian and M. Saaa. 1999. Insect cuticle, an *in vivo* model of protein trafficking. *J. Cell Science.* **112**, 2113-2124.
- Cox, D. L. and J. H. Willis. 1985. The cuticular proteins of *Hyalophora cecropia* from different anatomical regions and metamorphic stages. *Insect Biochem.* **15**, 349-352.
- Hawkes, R., E. Niday and J. Gordon. 1982. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Analyt. Biochem.* **119**, 142-147.

10. Hopkins, T. L and K. J. Kramer. 1992. Insect cuticle sclerotization. *Annual Review of Entomol.* **37**, 273-302.
11. Hopkins, T. L., L. J. Krchma, S. A. Ahmad and K. J. Kramer. 2000. Pupal cuticle protein of *Manduca sexta*: characterization and profiles during sclerotization. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**, 19-27.
12. Klarskov, K., P. Hojrub, S. O. Andersen and P. Roepstorff. 1989. Mass spectrometry as an aid in protein sequence determination. Application of the method on a cuticular protein from the migratory (*Locusta migratoria*). *Biochem. J.* **262**, 923-930.
13. Kramer, K. J., M. R. Kanost, T. L. Hopkins, H. Jiang, Y. C. Zhu and R. Xu. 2001. Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems. *Tetrahedron* **57**, 385-392.
14. Kumar, M. N. and S. Sridhara. 1994. Characterization of four pupal wing protein genes of the silkworm *Antheraea polyphemus*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **24(3)**, 291-299.
15. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T₄. *Nature* **227**, 680-685.
16. Marcu, O. and M. Locke. 1998. A cuticular protein from the moulting stages of an insect. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **28**, 659-669.
17. Nohr, C., P. Hojrub and S. O. Andersen. 1992. Primary structure of two low weight proteins isolated from cuticle of fifth instar nymphs of the locust, *Locusta migratoria*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **22**, 19-24.
18. O'Farrell, P. H. 1975. High resolution two dimensional electrophoresis of protein. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021.
19. Roberts, P. E. and J. H. Willis. 1980. The cuticular proteins of *Tenebrio*. I. Electrophoretic banding patterns during postembryonic development. *Devl. Biol.* **75**, 59-69.
20. Seo, E. W. 1993. Distribution and synthesis of pupal specific cuticle in tissues of *Pieris rapae*. *Kor. J. Entomol.* **23(2)**, 83-90.
21. Seo, E. W. 1995. Qualitative distribution of stage-specific cuticle proteins of *Pieris rapae*. *Kor. J. Zool.* **38(1)**, 88-101.
22. Souliotis, V. L., M. Patrino-Georgoula, V. Zongza and G. T. Dimitriadis. 1988. Isolation and characterization of mRNA coding for the third instar larval proteins of *Dacus oleae*. *Insect Biochem.* **18**, 829-837.
23. Stiles, B. and R. A. Leopold. 1990. Cuticle proteins from the *Anthonomus* abdomen: Stage specificity and immunological relatedness. *Insect Biochem.* **20**, 113-125.
24. Suderman, R. J., S. O. Andersen, T. L. Hopkins, M. R. Kanost and K. J. Kramer. 2003. Characterization and cDNA cloning of three major proteins from pharate pupal cuticle of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **33**, 331-343.
25. Willis, J. H. 1987. Cuticular proteins: the neglected component. *Archs. Biochem. Physiol.* **6**, 203-215.
26. Willis, J. H. 1999. Cuticular proteins in insects and crustaceans. *Amer. Zool.* **39**, 600-609.