

빨간집모기(*Culex pipiens pallens*) 난소에서 RNA 및 난황단백질 합성

이승훈 · 성기창

성균관대학교 생물학과

빨간집모기가 흡혈한 후 체내에서 일어나는 total RNA 변화를 조사한 결과 흡혈 후 6시간 이후에 RNA양이 증가하기 시작하여 18시간에서 peak를 보인 후 감소하다가 30시간째부터 증가하기 시작하여 48시간 후에 최대의 RNA 양을 보인 후 급격히 감소하였다. 난소에서의 RNA 합성을 정량한 결과 흡혈 후 24시간 이전에는 흡혈 전에 비하여 전혀 증가하지 않았고 30시간 이후부터 증가하기 시작하여 48시간에 가장 많은 양의 RNA가 난소내에 존재하였고, 그 후 급격히 감소하였다. 흡혈 후 6시간 간격으로 난소로부터 total RNA를 추출하여 *in vitro* translation을 실시하고 TCA 침전법과 면역침전법으로 합성된 ^3H -protein과 ^3H -vitellogenin을 정량하였다. 그 결과 흡혈 후 36시간 이후의 난소로부터 ^3H -protein과 ^3H -vitellogenin의 합성이 일어나기 시작하여 48시간된 난소에서 가장 많은 양의 ^3H -protein과 ^3H -vitellogenin이 합성되었으며, 이때 합성된 단백질의 약 45% 정도가 난황단백질인 ^3H -vitellogenin으로 나타났다. 이상의 결과로 빨간집모기에서는 지방체에서 뿐만 아니라 난소에서도 난황단백질의 합성이 일어남을 알 수 있다.

KEY WORDS: *Culex pipiens pallens*, RNA, ovary, vitellin, *in vitro* translation

Aedes 속 모기는 흡혈 후 난황단백질 합성을 자극하는 Egg development neurosecretory hormone(EDNH)의 분비가 6시간 이후에 최초로 일어나는 것으로 보고(Hagedorn and Fallon, 1973; Masler *et al.*, 1980; Greenplate *et al.*, 1985)되어 있으나 본 실험에 사용한 *Culex pipiens pallens* 모기는 흡혈 후 30분 이내에 EDNH의 방출이 일어나며(Kang and Lee, 1986), 유충호르몬이 흡혈 후의 난성숙에도 관여(Readio and Meola, 1985) 하는등 *Aedes*속 모기와는 여러 점에서 차이가 있다.

또한 모기에서는 지방체에서만 난황단백질 합성이 일어나는 것으로 보고(Hagedorn and Judson, 1972; Hagedorn and Kunkel, 1979; Kunkel and Nordin, 1985)되어 있으나 몇 곤충에서는 난소가 자신의 mRNA를 합성한다(Allen and Cave, 1969; Saito *et al.*,

1985)는 보고가 있다. *D. melanogaster*의 경우는 난소에서도 난황단백질 합성이 일어난다(Mintzas and Kambysellis, 1982)는 사실 이외에 그 난소에서 난황단백질에 대한 mRNA를 분리해내고 그 합성산물인 난황단백질을 분석(Isaac and Bownes, 1982)하기도 하였으며, 모기에서도 난소가 난황단백질 합성 부위라는 보고가 있다(Lee *et al.*, 1993a).

상기의 *Aedes* 속 모기와 *Culex* 속 모기간의 생리적인 차이는 조직적, 분자적 수준에서 작용기작의 차이로 발생한다고 추정되어 주요과제연구로 생각된다.

본 연구는 *C. pipiens pallens*모기를 재료로 흡혈 후에 일어나는 몸전체와 난소에서의 RNA의 합성양상을 정량하고 난소에서 합성된 total RNA를 각 시간별로 분리하여 *in vitro* translation을 실시함으로써 난소에서의 난황단백질 합성 유무를 조사하였다.

재료 및 방법

실험모기의 사육

본 실험에서 사용한 모기는 한국 국립보건원으로 부터 분양받은 *Culex pipiens pallens* Coquillett 이고 온도 $27 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $70 \pm 5\%$, 명암의 비율은 16시간 : 8시간으로 유지되는 항온항습실에서 사육하였다.

RNA의 분리 및 정량

RNA추출은 Preparation of cytoplasmic RNA from tissue culture cells의 방법 (Wiley J. and Sons, 1987. Current protocols in molecular biology, unit 4.1. 2-4.1.6)을 수정하여 실시하였다. 모든 용액에 사용한 증류수는 ribonucleases의 활성을 저해하기 위하여 0.2% diethylpyrocarbonate (DEPC)를 첨가 후 touch mixer를 사용하여 용액내에서 완전히 섞이게 한 후 남아있는 DEPC를 불활성화시키기 위하여 고온, 고압멸균한 후 사용하였다. 실험에 사용한 모든 유리제품 및 플라스틱 제품은 300°C 하에서 4시간 동안 autoclave한 후 사용함으로써 RNase의 작용을 불활성화시켰다.

RNA의 정량은 spectrophotometric determination 방법과 orcinol 방법을 사용하였다. Spectrophotometric determination 방법은 각 시간별 RNA 시료에서 100 μl 씩을 취하여 cuvette에 넣고 1.9 ml의 증류수에 희석하여 최종 부피가 2 ml 되게 하여 260 nm에서 그 흡광도를 측정하여 실시하였다. RNA농도는 다음식에 의하여 구하였다.

$\text{RNA농도}(\text{mg/ml}) = \text{absorbance at } 260 \text{ nm}/20$

정량과 함께 순수도를 측정하여 본 결과 모든 시료에 대한 A_{260}/A_{230} , A_{260}/A_{280} 의 값이 1.8 이상을 나타내어 정량에는 아무런 문제가 없었다.

Orcinol method에 의한 RNA의 정량은

Standard RNA(from calf liver, Sigma, Type IV)를 사용하여 670 nm에서의 흡광도를 측정하여 정량하였으며 분리한 RNA는 실험전까지 -70°C 에 보관하였다.

RNA의 *In vitro* translation

In vitro translation과정은 translation of RNA in reticulocyte lysates 방법 (Sambrook *et al.*, 1989)에 따라 실시하였다. Autoclave한 eppendorf microcentrifuge tube에 translation cocktail(Table 1) 2 μl , 0.5 M KCl 2 μl , 16.5 mM magnesium acetate 1 μl , 50 μCi (Specific activity: 42Ci/mmmole)의 ^3H -leucine 8 μl , micrococcal nuclease treated reticulocyte lysate(Sigma, R378) 10 μl , RNA(2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 2 μl 를 차례로 첨가한 후 30°C 에서 1시간 동안 방치하였으며 냉수조에 넣어 반응을 정지시켰다. 합성된 단백질에 대한 정량은 TCA 침전방법과 Ag-Ab 침전방법을 사용하였다.

TCA and Immunoprecipitation

TCA 침전법에 의한 측정은 다음과 같이 실시하였다. 반응이 끝난 translation용액을 5 μl 씩 glass filter에 부은 후 실온에서 6시간 방치하여 완전히 말렸으며, 10% TCA용액 내에서 10분간 침전시켰다. 5% TCA용액에서 중탕한 후 다시 냉각된 5% TCA용액에 넣고 10분간 방치하였고 이후 10 ml의 95%(v/v) ethanol, 50%(v/v) ethanol-50%(v/v) acetone, 100%(v/v) acetone으로 각각 여과 시킨 후 80°C 에서 30분간 완전히 말렸으며, 이를 5 ml의 scintillation cocktail에 넣고 liquid

Table 1. Composition of translation cocktail.

Solution	Vol.
100 mM spermidine	200 μl
800 mM creatine phosphate	400 μl
5 mM amino acids (lacking leucine)	200 μl
1 M dithiothreitol	80 μl
500mM HEPES (pH 7.4)	1,600 μl
H ₂ O	720 μl

scintillation counter(LKB, Rack Beta 1211)로 방사능을 측정하였다. Immunoprecipitation은 translation 용액에 5 μg 의 vitellin과 1 μl 의 항체를 넣고 37°C에서 1시간 방치후 4°C에서 18시간 동안 방치하였다. 이를 15000 \times g로 10분간 원심분리한 침전물을 PBS로 3회 씻어낸 후 30 μl , 1N NaOH에 녹여 10 μl 씩을 취하여 5 ml의 scintillation cocktail에 넣고 완전히 혼합한 후 방사능을 측정하였다.

결과 및 고찰

RNA의 정량

*Culex pipiens*의 난성숙 과정동안 지방체와 난소에서 일어나는 RNA의 합성양상을 조사하였다.

실험에 사용한 RNA 추출법이 적합한가를 측정하기 위하여 흡혈 후 18시간된 모기를 20,

40, 60, 80, 100마리씩 사용하여 total RNA를 추출한 후 orcinol method를 이용하여 RNA가 마리수에 비례적으로 검출되는지를 정량하였다. 그 결과 마리수 증가에 대한 추출된 RNA양이 비례적이었으며 40마리 이상을 실험에 사용하였을 때 추출되는 RNA양의 편차가 마리당 0.5 μg 이내였다(Fig. 1).

위의 결과에 따라 RNA정량에 사용된 모기는 각 시간별로 50마리씩을 사용하여 RNA를 추출하였다.

Total RNA의 정량

*Culex pipiens*에 있어 흡혈 후 total RNA의 변화를 spectrophotometric method로 정량한 결과 6시간 이후 부터 증가하기 시작하여 흡혈 후 18시간에 10 μg 정도의 양을 나타낸 후 24시간까지 감소하다가 30시간 이후 부터 다시 증가하기 시작하여 흡혈 후 48시간에 1 μg 정도의 가장 많은 양의 RNA가 존재 하였고 그 이후 다시 감소하였다(Fig. 2).

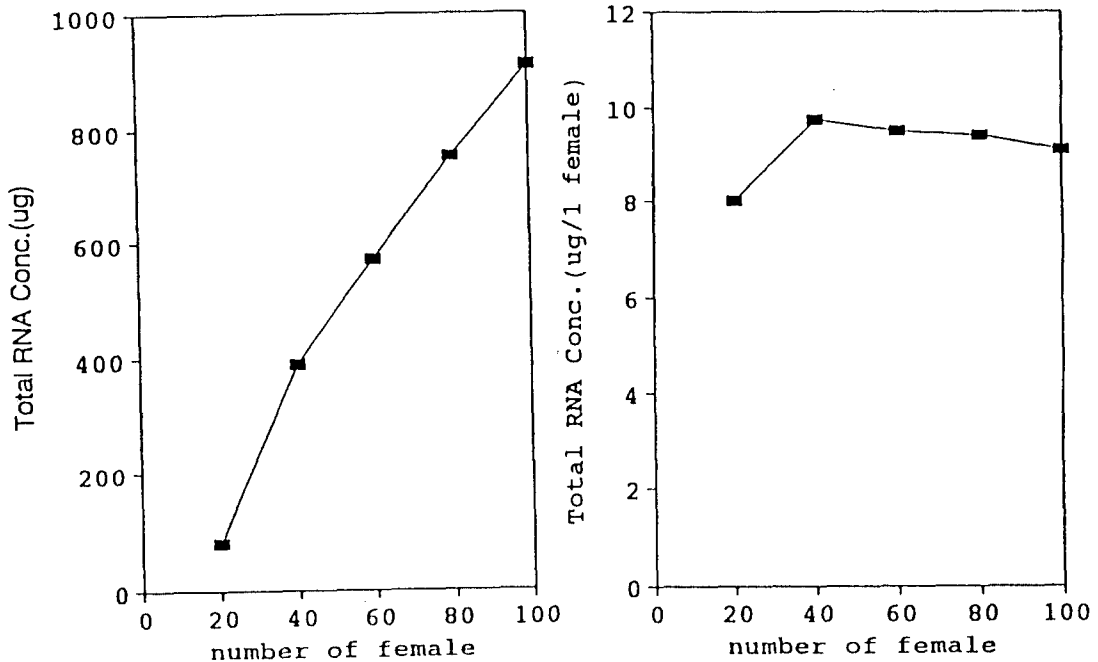


Fig. 1. Changes in total RNA content with number of *Culex pipiens* female whole body. 18hr females after blood meal were assayed. Each point represents the mean of 3 separate experiments. (a. total RNA for all number, b. total RNA for 1 female)

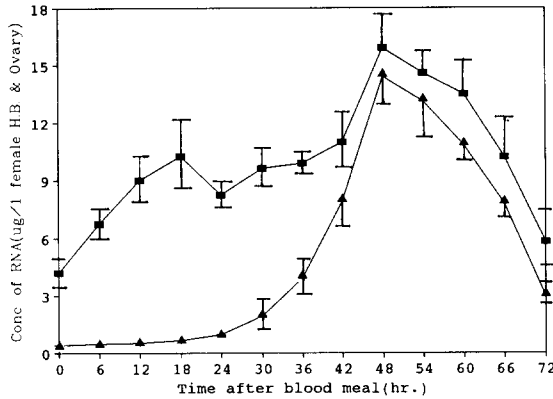


Fig. 2. Total RNA levels in female *Culex pipiens* after blood meal. At various times female whole body and ovaries were homogenized and the amount of total RNA was determined by spectrophotometric method. Each point represents the mean \pm SD obtained from 3 separate experiments. (■--■: whole body, ▲--▲: ovary)

이 사실은 흡혈 후 지방체에서의 난황단백질 합성은 6시간 이후 부터 증가하기 시작하여 24시간경에 가장 왕성한 합성율을 보이며 42시간 이내에 난황단백질의 합성이 종료된다는 보고 (Hagedorn *et al.*, 1975; Borovsky, 1982; Lee *et al.*, 1993a)와 비교할 때 단백질의 합성이 일어나려면 그 이전에 그 단백질에 대한 mRNA의 합성이 일어나므로 흡혈 후 24시간 이전인 18시간에 가장 많은 mRNA의 합성이 일어났고, mRNA의 half-life는 상당히 짧으므로 18시간 이후에 감소하는 것으로 추정된다. 그리고 지방체에서의 난황단백질의 합성이 완료된 이후에 난황단백질을 포함한 왕성한 단백질의 합성이 난소에서 일어난다는 보고 (Lee *et al.*, 1993a)와 비교할 때 30시간 이후 부터 RNA의 양이 다시 증가하고 48시간에 가장 많은 양의 RNA의 증가를 보였다는 사실에서 이는 난소에서의 RNA의 증가이며, 흡혈 후 30시간 이후 부터, 난소에서의 단백질 합성이 시작되며, 48시간 이후에 가장 많은 양의 단백질 합성이 일어나는 것으로 추정할 수 있다. 이를 증명하기 위하여 흡혈한 모기의 난소를 시간별로 분리하여 RNA의 정량을 실시한 결과 흡혈 후 30시간 이후부터 증가하기 시작하여 48시간에 15 μ g 정도

의 가장 높은 RNA 합성율을 보인 이후 급격히 감소하였다 (Fig. 2).

흡혈 후 30시간 이후에 합성된 RNA내에 난황단백질에 대한 mRNA가 포함된 사실을 증명하고 그 양을 알아내기 위하여 *in vitro* translation을 실시하였다.

In vitro translation

난소내에서 분리된 RNA를 이용하여 *in vitro* translation을 실시하기 전에 이 실험에 사용되는 magnesium acetate와 potassium chloride의 적정농도, 그리고 항체의 농도를 조절하였다.

그 결과 magnesium acetate의 경우 *in vitro* translation을 실시한 결과 15 mM에서 가장 많은 양의 3 H-leucine이 incorporation 되었으며 그 양은 magnesium acetate를 첨가하지 않았을 경우에 비하여 약 2배 정도 증가되었다 (Fig. 3). Potassium chloride의 경우는 translation 반응에서 반드시 요구되며 그 적정농도는 mRNA의 종류에 따라 다양하게 변하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 0.5 M에서 가장 높은 활성을 나타내었다 (Fig. 4). Immunoprecipitation 방법에 사용되는 항체의 적정 농도를 조사한 결과 1 μ i 정도에서 가장 높은

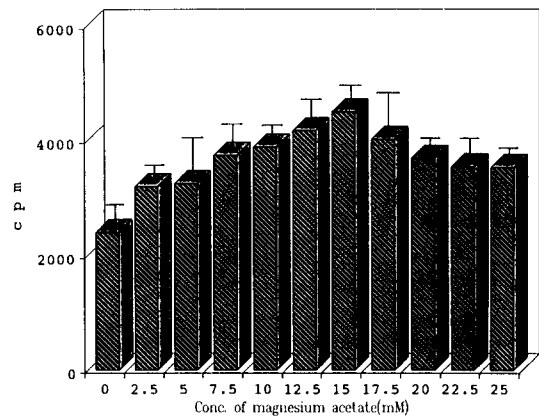


Fig. 3. Effect of various concentration of magnesium acetate on the cpm value *in vitro* translation. The cpm was determined by TCA precipitation method. Each point represents the mean \pm SD obtained from 3 separate experiments.

항원-항체 반응이 많이 일어났으며 그 이상으로 농도를 증가하여도 차이가 없는 것으로 나타났다 (Fig. 5).

흡혈 후 6시간 간격으로 난소로부터 추출한 RNA를 이용하여 *in vitro* translation을 실시하였으며 합성된 단백질에 대한 정량은 TCA 침전방법과 면역 침전방법으로 실시하였다. 그 결과 흡혈 후 30시간 까지는 단백질의 합성이 거

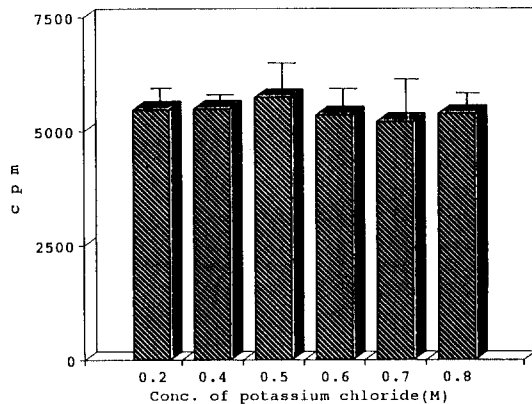


Fig. 4. Effect of various concentration of potassium chloride on the cpm value *in vitro* translation. The cpm was determined by TCA precipitation method. Each point represents the mean \pm SD obtained from 3 separate experiments.

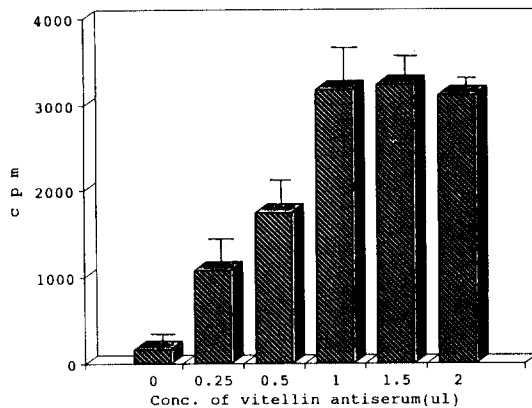


Fig. 5. Effect of various concentration of the vitellogenin antiserum on the cpm value in immunoprecipitation method. Each point represents the mean \pm SD obtained from 3 separate experiments.

의 일어나지 않았으나, 36시간 이후부터 급격히 ^3H -vitellogenin을 포함한 ^3H -protein의 합성이 증가하기 시작하여, 48시간된 난소의 경우는 합성된 total protein에 대한 난황단백질인 ^3H -vitellogenin의 양이 45% 정도인 것으로 나타났다 (Fig. 6).

흡혈 후 30시간 이후의 난소내에서 ^3H -protein의 합성이 일어난다는 *in vitro* translation의 결과는 흡혈 후 약 54시간된 난소에서 단백질 합성이 왕성하게 일어난다는 보고 (Park and Kang, 1989)와, 흡혈 후 48시간된 난소에서의 alkaline phosphatase (ALP)의 합성이 최대를 나타낸다는 보고 (Lee *et al.*, 1993b), malate dehydrgenase의 활성이 증가한다는 보고 (Kim, 1984) 등에서 자명한 것으로 사료된다. 또한 난소내 total RNA에서 합성된 단백질의 45% 정도가 난황단백질인 ^3H -vitellogenin으로 나타난 결과는 지방체에서 합성되는 난황단백질 (YP1)과 다른 난황단백질 (YP2)이 난소에서 합성된다는 보고 (Lee *et al.*, 1993a)와 일치하며, 난소에서도 난황단백질의 합성이 일어난다는 *D. melanogaster* (Bownes and Hames, 1978; Isaac and Bownes, 1982), *Sarcophaga bullata* (Huybrechts *et al.*, 1983), *Coccinella*

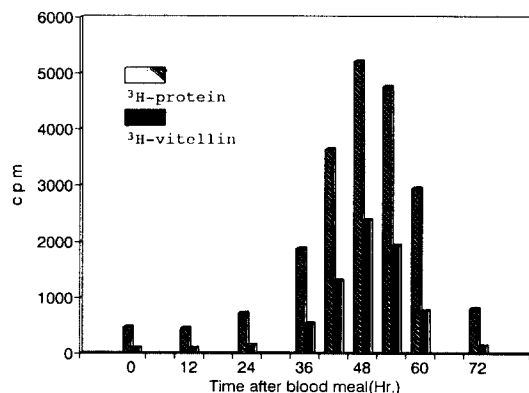


Fig. 6. *In vitro* translation of ^3H -vitellogenin and ^3H -protein by various times ovarian RNA after blood meal in *Culex pipiens*. The amount of ^3H -vitellogenin and ^3H -protein were determined by immunoprecipitation and TCA precipitation method.

sempunctata(Zhai *et al.*, 1984) 등에서의 보고가 이를 뒷받침한다. 그리고 흡혈 후 48 시간된 난소에서 ALP의 증가(Lee *et al.*, 1993b)는 난황단백질에 대한 인산의 제공에 작용하는 것으로 추측된다. 결론적으로 *Culex pipiens pallens* 에 있어서는 지방체와 더불어 난소가 난황단백질의 합성부위임을 알 수 있다.

인용문헌

- Allen, E.R. and M.D. Cave, 1969. Cytochemical and ultrastructural studies of ribonucleoprotein containing structures in oocytes of *Acbeta domesticus*. *Z. Zellforsch.* **101**: 63-71.
- 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.
- Bownes, M. and B.D. Hames, 1978. Analysis of the yolk proteins in *Drosophila melanogaster*. Translation in a cell free system and peptide analysis. *FEBS Lett.*, **96**: 327-330.
- 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. and A.M. Fallon, 1973. Ovarian control of vitellogenin synthesis by the fat body in *Aedes aegypti*. *Nature.* **244**: 103-105.
- Hagedorn, H.H. and C.L. Judson, 1972. Purification and site of synthesis of *Aedes aegypti* yolk proteins. *J. Exp. Zool.* **182**: 367-378.
- Hagedorn, H.H. and J.G. Kunkel, 1979. Vitellogenin and vitellin in insect. *Ann. Rev. Entomol.* **24**: 475-505.
- 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.
- Huybrechts, R., J. Cardoen and A. De Loof, 1983. In vitro secretion of yolk polypeptides by fat body and ovaries of *Sarcophaga bullata*(Diptera, Calliphoridae). *Annls Soc. r. Zool. Belg.*, **113**: 309-317.
- Isaac, P.G. and M. Bownes, 1982. Ovarian and fat body vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Eur. J. Biochem.* **123**: 527-534.
- Kang, S.H. and S.H. Lee, 1986. Ovarian development in the mosquito, *Culex pipiens pallens*. *Sung Kyun Kwan Univ. J. natural Sciences.* **37**: 171-180.
- Kim, I.G., 1984. *Aedes aegypti*에 있어서 흡혈 후 생성되는 ovarian mitochondrial MDH에 관한 연구. M.S. Thesis, 성균관대학교.
- Kunkel, J.G. and J.H. Nordin, 1985. Yolk proteins. *In comp. insect Physiol. Biochem. Pharmacol.* **1**: 83-111.
- Lee, S.H., Y.M. Park and K.C. Sung, 1993a. Ovarian and fat body yolk protein synthesis in *Culex pipiens pallens*. *Korean J. Zool.* **36**: 416-424.
- Lee, Y.S., S.H. Lee, Y.M. Park and K.C. Sung, 1993b. Activity of alkaline phosphatase from the Mosquito, *Culex pipiens pallens*. *Korean J. Zool.* **36**: 425-432.
- Masler, E.P., M.S. Fuchs, B. Sage and J.D. O'Connor, 1980. Endocrine regulation of ovarian development in the autogenous mosquito, *Aedes atropalpus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **41**: 250-259.
- Mintzas, A.C. and M.P. Kambysellis, 1982. The yolk proteins of *Drosophila melanogaster*: Isolation and characterization. *Insect Biochem.* **12(1)**: 25-33.
- Park, Y.M. and S.H. Kang, 1989. Incorporation of ³H-leucine into proteins in vitro by the mosquito, *Culex pipiens pallens*. *Sung Kyun Kwan Univ. J. natural Sciences.* **40**: 1-9.
- Readio, J. and R. Meola, 1985. Two stages of juvenile hormone mediated growth of secondary follicles in *Culex pipiens*. *J. Insect Physiol.*, **31**: 559-562.
- Saito, A., Y. Sugimoto, K. Kora and B. Sakaguchō, 1985. In vitro translation of RNA from unfertilized and fertilized eggs of *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **82B**: 51-53.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis, 1989. Molecular cloning. A Laboratory manual. 2nd Ed. **3**: 18. 76-80.
- Wiley, J. and Sons, 1987. Current protocols in molecular biology. Unit 4.1.2-4.1.6.
- Zhai, Q.H., J.H. Postlethwait and J. W. Bodley, 1984. Vitellogenin synthesis in the lady beetle *Coccinella septempunctata*. *Insect Biochem.*, **14**: 299-305.

(Accepted February 26, 1994)

RNA and Vitellogenin Synthesis in the Ovary of *Culex pipiens pallens*.

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

The change of total RNA amount was estimated in *C. pipiens* whole body. Total RNA amount began to increase at 6 hours after blood meal, showed first peak at 18 hours and decreased. At 30 hours, RNA began to increase again, reached at maximum level by 48 hours and decreased. Ovarian total RNA amount showed no change until 24 hours after blood meal and began to increase at 30 hours and reached at maximum level at 48 hours and decreased. The ovarian total RNA were isolated from various time and *in vitro* translations were carried out for estimating the amount of total protein and vitellogenin. ^3H -protein and ^3H -vitellogenin synthesis was started from 36 hour ovary and reached at maximum level at 48 hours. ^3H -Vitellogenin amount synthesized by 48 hour ovaries after blood meal reached at 45% compared to total protein. These results suggest that ovary itself is a site of vitellogenin synthesis in addition to fat body in the mosquito, *Culex pipiens pallens*.