실용형질이 우수한 녹색 형광실크 형질전환 누에 개발

박옥란¹ · 김성완¹ · 김성렬¹ · 김기영¹ · 강석우¹ · 구태원² · 최광호^{1*}

¹농촌진흥청 국립농업과학원 잠사양봉소재과, ²동국대학교 의과대학

Development of the transgenic silkworm producing a improved green fluorescence cocoon

Yulan Piao¹, Sung-Wan Kim¹, Seong-Ryul Kim¹, Kee-Young Kim¹, Seok-Woo Kang¹, Tae-Won Goo² and Kwang-Ho Choi^{1*}

¹Sericultural & Apicultural Materials Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, 166, Nongsangmyeong-ro, Iseo-myeon, Wanju-gun, Jeollabuk-do 565-851, Korea

²Department of Biochemistry, School of Medicine, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea

(Received September 29, 2014, Accepted October 19, 2014)

ABSTRACT

On previous studies, we constructed a transgenic silkworm which produces the chimeric silk fused green fluorescent protein (EGFP), but the transgenic silkworm has decreased commercial feasible traits such as convenience of breeding and productivity of silk. In this study, we performed cross fertilization between green fluorescent silk transgenic silkworm and colored cocoon silkworm descents to make the transgenic the transgenic silkworm producing improved fluorescence cocoon. In the result, we found out a bit valuable cross fertilization manners (female × male) in respect of silk productivity such as *T59B* × *Jam126*, *Jam329* × *T59W*, *T59W* × *Jam329*, and *T59W* × *Jam178*. The color-difference of offspring cocoons were measured according to different cross manners using by CIE Lab-based formulae with a X-rite VS450. In the result, the depth of green color of cocoons was a little high at cross manners as *Jam329* × *T59W*, *T59W* × *Jam178*. Meanwhile, the depth of yellow color of cocoons was remarkable at cross manners as *Jam178* × *T59W*, *T59W* × *Jam178*, respectively.

Key words : Transgenic silkworm, Breeding, Cocoons, CIE Lab

서 론

누에(*Bombyx mori*)는 산업곤충으로써 오랜 기간 동안 생리생태적 기초연구와 실크단백질을 활용한 신소재 개발 등 다양한 연구가 진행되어 왔으며, 최근에는 형질전환 누에 개발을 통한 기능성 융합단백질 생산을 위한 연구가 활발하다. 최초의 형질전환 누에 연구는 *Trichopusia ni*에서 개발된 전이인자(piggyBac)를 사용하여 제작된 벡터를 누에알에 주입하여 하이브리드 실크를 생산하는 형질전환 누에 개발로 시작되어, collagen 단백질이 재조합된 하이브리드 실크를 개발하는 단계에까지 이르렀다(Imamura et al. 2003, Rika et al. 2006, Satoshi et al. 2007, Tamura et al. 2000).

국내에서의 형질전환 누에 연구는 양잠농가에 장려품종으로 보급되고 있는 휴면계통인 백옥잠(잠123 × 잠124)의 월년란을 불월년란화 할 수 있는 기술을 개발함으로써 실용품종을 대상으로 한 형질전환 누에 제작 원천기술이 개발된 후 녹색, 청색, 적색의 형광단백질이 융합된 하이브리드 실크를 생산하는 형질전환 누에가 지속적으로 개발되고 있다(Kim et al. 2012, Kim et al. 2013a, Kim et al. 2013b, Kim et al. 2014). 지금까지의 하이브리드 실크 생산을 목적으로 하는 형질전환 누에 연구는 실용품종에 비해 실크의 형질이 훨씬 열악하고 사육 안전성과 관련한 강건성은 떨어지지만 휴면각성을 위해 불가피한 염산처리 과정이 없는 다화성 누에 품종에 제한적으로 이루어졌다(Tamura et al. 2000, Tatematsu et al. 2010). 또한, 하이브

*Corresponding author. E-mail: ckh@korea.kr

리드 누에 품종인 백옥잠 등 실용품종을 사용하여 개발된 형질전환 누에도 최초 형질전환체 선발 후 여러 세대 동안 자가교배(sib-mating)를 통해 원종화 함에 따라 원종화 된 형질전환 누에의 강건성과 생산된 실크의 실용형질이 매우 열악하여 농가보급 장려품종으로서는 적합하지 못하였다(Kim et al. 2012).

따라서, 본 연구는 선행연구에서 개발된 녹색 형광실크 형질전환 누에를 사용하여 국립농업과학원이 보유하고 있는 연록색의 유색견(絹) 누에 유전자원을 활용하여, 녹색 형광실크 형질전환 누에와 유색견 누에 간 교차교배를 통한 잡종강세에 의해 기존 녹색 형광실크 형질전환 누에보다 고치 생산량 및 고치 색채 등 실용형질이 향상된 1대 잡종(F1)을 선발하여 향후 형질전환 누에의 농가보급 계통을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 공시 형질전환 누에 계통

선행연구를 통해 개발된 녹색 형광실크 형질전환 누에를 11세대 이상 자가교배(sib-mating)하여 계통이 수립된 T59B(잠123계통)와 T59W(잠124계통)를 교배조합을 위한 형광실크 형질전환 누에 모본으로 사용하였다(Kim et al. 2003b). 공시한 녹색 형광실크 형질전환 누에 계통은 유색견 누에 계통과의 교배시험 때까지 농촌진흥청 농업생물부의 표준사육기준(온도 24~27°C, 상대습도 70~90%)에 준하여 격리시설에서 사육하였다.

2. 유색견 유전자원 누에 계통

국립농업과학원 잠사양봉소재과 잠상육종연구실에서 보유하고 있는 연록색의 고치를 생산하는 유색견 누에 유전자원 중 원산지별로 잠126(중국종), 잠329(일본종), 잠178(유럽종), 삼면잠(한국재래종)을 분양받아 형광실크 형질전환 누에와 교배시험에 사용할 유색견 누에 계통으로 사용하였다. 유색견 누에 계통은 형질전환 누에와의 교배시험을 위하여 농촌진흥청 표준사육기준(온도 24~27°C, 상대습도 70~90%)에 준하여 관리하였다.

3. 교배조합 우수 실용형질 계통 선발

실용형질이 우수한 농가 보급형 녹색 형광실크 형질전환 누에 1대 잡종(F1)을 선발하기 위하여 형질전환 누에와 유색견 누에 계통의 암수 성충을 사용하여 교배조합을 실시하였다. 교배조합에 따라 생산된 누에알은 농촌진흥청 표준사육기준(온도 24~27°C, 상대습도 70~90%)에 준하여 관리하며, 산란율, 부화율, 형질전환율, 화용비율, 수견량의 실용형질을 조사하였다. 실험 대조구로서 기존

의 녹색 형광실크 형질전환 누에(대조1) 및 백옥잠(대조2)을 동일한 조건에서 사육하며 조사하였다.

- 1) 평균 산란수: 암수 한쌍이 교미 후 12시간 이내 산란한 알의 평균 수
 - 2) 평균 부화율: 산란한 전체 알의 수에서 부화한 유충수의 비율
 - 3) 형질전환율: Leica (USA)사의 LEICA MZ16FA 현미경과 LEICA (USA) 사의 GFP filter를 사용하여 알과 유충에서 형광단백질의 발현이 확인된 비율
 - 4) 화용비율: 각 시험구 별 무작위 선발한 100개의 누에고치에서 절각한 고치 속에 살아있는 번데기의 비율
 - 5) 수견량: 각 시험구 별 무작위 선발한 100개의 누에고치를 절각하여 번데기를 제거한 후 측정된 순수 고치의 무게
- 모든 교배조합 실험은 시험구별 최소 3회 이상 반복하였으며, 각 실용형질 항목은 평균값으로 표시하였다. 실험구 간 항목별 조사결과는 0.05% 유의수준에서 Duncan 검증을 실시하여 실험구 간 조사항목의 유의성 검증을 실시하였다. 교배조합 별 실용형질 조사 후 실험구별 생산된 누에고치(F1)의 색채 분광반사 값 측정을 위해 번데기를 제거한 누에고치를 실험 때까지 실온에 보관하였다.

4. 녹색 형광누에고치 CIE Lab 색채분석

우수한 색채를 갖는 녹색 형광실크 형질전환 누에 1대 잡종(F1)을 생산하기 위해 적합한 교배조합 방식을 개발하기 위해, 녹색 형광실크 형질전환 누에와 유색견 누에 계통 간 교배조합에 의해 생산된 1대 잡종(F1) 누에고치를 사용하여 Lab 색채분석법을 사용하여 색 차이를 측정하였다.

본 연구에서는 녹색 형광고치(F1)의 색채 분광반사 값을 계측기로 실험구별 고치 10개를 무작위 선발하여 10회 반복하여 정밀측정한 후 평균값으로 나타내었다. 실험에 사용된 측정기기는 X-rite(Germany, Model VS450), 측정파장은 400~700 nm, 광원조건은 dual illumination(45°/0°)으로하여 분광반사 값을 측정하였다. 계측기를 사용하여 측정된 분광반사율은 수치로서 L, a, b로 각각 나타내었는데, L은 반사율로서 인간의 시각과 같은 명도(+, 밝음; -, 어두움)를, a는 빨강(+)과 초록(-)의 색도방향을, b는 노랑(+)과 파랑(-)의 색도를 나타낸다(Kim 2004, Kim et al. 2005).

결과 및 고찰

1. 실용형질이 우수한 녹색 형광실크 누에 품종 선발

일반적으로 누에의 농가 보급은 「누에 장려품종 지정 및 공급요령」(농림축산식품부훈령 제12호, 2013.4.17.) 제

Table 1. Characterization of cross-breed between green fluorescence transgenic silkworms and colored cocoon silkworm descents

No. of test	Cross-manner		No. of repeat test	No. of oviposition (average)	Hatching rate (%)	Transgenesis rate (%)	Pupating rate (%)	Weight of cocoon (g/100)
	♀	♂						
1	Jam126	T59B	3	342 ^{bc*}	69.5 ^b	100.0 ^a	100 ^a	30 ^b
2	T59B	Jam126	6	481 ^a	86.1 ^{ab}	99.7 ^a	97 ^a	31 ^b
3	Jam329	T59W	3	352 ^{bc}	85.3 ^{ab}	99.9 ^a	97 ^a	30 ^b
4	T59W	Jam329	4	391 ^{ab}	87.9 ^{ab}	99.2 ^a	98 ^a	32 ^b
5	Jam178	T59W	3	266 ^c	26.8 ^c	99.9 ^a	98 ^a	30 ^b
6	T59W	Jam178	6	435 ^{ab}	92.5 ^a	99.9 ^a	94 ^a	30 ^b
7	Sammyumjam	T59W	3	335 ^{bc}	81.6 ^{ab}	96.1 ^a	78 ^b	20 ^c
8	T59B	Sammyumjam	3	493 ^a	97.3 ^a	95.2 ^b	74 ^b	20 ^c
Control 1	T59B	T59W	3	490 ^a	90.6 ^{ab}	100.0 ^a	98 ^a	20 ^c
Control 2	Jam123	Jam124	4	381 ^{ab}	75.7 ^{ab}	0.0 ^c	100 ^a	50 ^a

*Duncan test ($p < 0.05\%$).

4조에 근거하여 일본종과 중국종의 교배 등 서로 다른 원산지의 누에품종의 교배조합을 통해 잡종강세에 의한 실용형질이 우수한 1대 잡종(F1) 계통을 선정한 후 장려품종으로 지정하여 보급하고 있는데, 국내 잠업농가에 보급되고 있는 대표적인 장려품종과 교배조합 방식(♀ × ♂)은 백옥잠(잠123 × 잠124), 대성잠(잠125 × 잠126), 금옥잠(잠125 × 잠140) 등이 있다.

기 개발된 녹색 형광실크 형질전환 누에는 백옥잠의 알에 녹색 형광단백질의 유전자(EGFP)가 도입된 누에 형질전환용 운반체를 주입한 후 형질전환이 유도된 개체를 선발한 것이다(Kim et al. 2013a, Kim et al. 2013b). 이후 녹색 형광실크 형질전환 누에는 10세대 이상 순계교배(sib-mating)를 계속하여 잠123 및 잠124 누에 계통의 표현형을 갖는 계통으로 각각 분리하여 순종화가 이루어진 것이다. 장려품종에 비하여 순종화된 형질전환 누에는 사육시 강건성 및 고치 생산량 등 실용형질이 열악하여 농가 보급을 위한 장려품종으로서 부적합하다. 따라서 순종화된 형질전환 누에의 강건성 증진과 고치 생산량 증대 등 실용형질을 개선하기 위해서는 유전적으로 거리가 먼 품종간의 교잡을 통해 실용형질이 개선된 녹색 형광실크 형질전환 누에의 새로운 1대 잡종(F1)의 개발이 필요하다(Kim 1982).

표 1은 녹색 형광실크 형질전환 누에(T59B계통, T59W계통)와 원산지가 서로 다른 연록잠 누에 계통(잠126, 잠329, 잠178, 삼면잠)간 교배조합에 의한 산란율, 부화율, 형질전환율, 화용비율 및 수견량을 조사한 결과이다. 각 교배조합별 평균 산란수는 백옥잠(대조 2)과 비교할 때, 시험구 2번(T59B × 잠126), 4번(T59W × 잠329), 6번(T59W × 잠178), 8번(T59B × 삼면잠)의 산란수가 0.05% 유의수준에서

백옥잠의 산란수와 유의적 차이가 없었다. 평균 부화율에서는 백옥잠(대조 2)과 비교 시 시험구 6번(T59W × 잠178)과 8번(T59B × 삼면잠)이 각각 92.5%, 97.3%로 가장 높은 부화율을 나타내었으며, 시험구 2번(T59B × 잠126), 3번(잠329 × T59W), 4번(T59W × 잠329)은 0.05% 유의수준에서 백옥잠(대조 2)과 유의적 차이가 없었다. 교배조합에 따른 1대 잡종(F1)의 형질전환율은 시험구 8번(T59B × 삼면잠)을 제외한 모든 시험구의 1대 잡종에서 100%에 근접한 형질전환율이 조사되었다. 화용비율에서는 한국재래종을 교배한 시험구 7번(삼면잠 × T59W), 8번(T59B × 삼면잠)에서 화용비율이 저조하였으나, 백옥잠(대조 2)과 형질전환 누에(대조 1)를 포함한 8개 나머지 시험구에서 모두 유의적 차이가 없이 94% 이상의 화용비율이 조사되었다.

형질전환 누에의 안정적 사육에 중요 지표인 산란수, 부화율, 용화율 조사 결과를 종합할 때, 시험구 2번(T59B × 잠126), 3번(잠329 × T59W), 4번(T59W × 잠329), 6번(T59W × 잠178)의 교배조합 방식 및 이로부터 생산된 1대 잡종(F1)이 백옥잠과 유사한 강건성이 있는 것으로 사료되나, 실크 생산량의 지표인 수견량에서는 비록 형질전환 누에(대조 1)의 수견량보다는 평균 50%이상 증가하였으나, 백옥잠(대조 2)에 비해서는 평균 40% 가량 저조하다는 것을 확인할 수 있었다(표 1). 따라서 육종학적 측면에서 추가적 연구를 통해 1대 잡종(F1) 농가 보급형 누에 품종으로서, 형질전환 누에의 수견량 증대에 대한 추가적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

2. 1대 잡종 누에고치 CIE Lab 색채 분석

형광실크 형질전환 누에의 고치는 일반 누에고치나 골든실크, 칼라고치와는 달리 피브로인 heavy-chain 유전자

Fig. 1. Observation of color-difference of offspring cocoons on light (upper part) and UV(down part) irradiation according to cross manners between green fluorescence transgenic silkworms and colored cocoon silkworm descents. Numbers indicate offspring cocoons of different cross manners in Table 1.

에 녹색 형광유전자가 융합되어 있어, 형질전환누에가 생산하는 세리신 단백질에는 녹색 형광단백질이 포함되어 있지 않다(Kim et al. 2013). 따라서, 형광실크 누에의 고치는 세리신을 제거하는 정련과정 후 소재로 사용할 수 있는 등 그 용도에 제한성이 있다. 따라서 본 연구에서의 교배조합 시 사용한 유색전 누에의 교배를 통해 피브로인에서는 녹색 형광이, 세리신에서는 유색전 누에의 연록색이 함께 표현됨으로써 다양한 용도의 소재로 활용할 수 있는 녹색 형광실크를 개발하고자 하였다. 시험결과, 제작한 모든 교배조합의 1대 잡종(F1) 형광고치에서 형질전환 누에의 녹색형광과 유색전 누에의 연록색이 함께 발현되었음을 확인할 수 있었으나 교배조합 형광고치 간 관능검사에 의한 색도 차이는 구분할 수 없었다(그림 1).

Lab 색채분석법은 인간이 색채를 감지하는 노랑-파랑, 초록-빨강의 반대색설에 기초하여 국제조명위원회(CIE)에서 정의한 색 공간을 말하며, 색채의 방향을 쉽게 표시하는 세계적으로 가장 널리 통용되는 기술로 알려져 있다(Kim 2004). 색의 표시(color specification) 방법으로 색광에 의한 색차를 비교하는데, 이는 국제조명위원회(CIE)가 규정한 표준광원의 색광 혼합에 기초를 둔 혼색계 표색법이다. 표색을 위한 색의 표시방법으로서는 색의 3속성(색상, 명도, 채도)을 계측기를 사용하여 색을 정밀 측정하여 표시하는 방법으로서 계측기로 분광반사율을 측정하여 색차를 수치로 표시하는 방법을 사용하고 있다(Kim

2004). 색차의 수치 표시 방법은 L, a, b의 세 가지로서 하며, L은 반사율로서 인간의 시각과 같은 명도(+, 밝음; -, 어두움)를, a는 빨강(+)과 초록(-)의 색도방향을, b는 노랑(+)과 파랑(-)의 색도방향을 나타내는데, 각각의 수치 차이를 나타냄으로써 두 색의 차이를 표현할 수 있다(Kim 2004, Kim et al. 2005).

교배조합별 1대 잡종(F1)이 생산한 고치의 CIE Lab 색채 분석 결과, 모든 고치의 명도(L)가 백옥잠보다 낮은 것으로 확인되었다(표 2). 이러한 결과는 명도(L)의 수준은 혼합된 색의 농도에 반비례한다는 보고와 같은 결과로 해석할 수 있다(Kim et al. 2005).

1대 잡종(F1) 고치별 색의 차이는 Lab 채도 측정 결과에서 의미있는 결과를 확인할 수 있었다. Lab 채도(a, 빨강색 ~ 초록색) 측정 결과, 교배조합 3번(잠329 × T59W)과 6번(T59W × 잠178)의 누에고치에서 초록색의 채도가 가장 높았다. 특히, 백옥잠 고치에서는 빨강색과 초록색이 없는, “-0.07” 값을 보인 반면, 모든 교배조합의 1대 잡종(F1) 고치에서는 최소 55배에서 최대 110배 이상 높은 초록색 색차가 확인되었다. Lab 채도(b, 노랑색 ~ 파랑색) 측정 결과에서는 백옥잠 고치에 비해 모든 1대 잡종(F1) 고치에서 최소 2배 이상 높은 노랑색 색차가 확인되었고 특히, 시험구 5번(잠178 × T59W), 6번(T59W × 잠178)의 고치에서는 백옥잠 대비 약 4배의 높은 노랑색 색차가 확인되었다(표 2).

Table 2. CIE Lab color-difference of offspring cocoons according to cross manners between green fluorescence transgenic silkworms and colored cocoon silkworm descents

No. of test	Cross-manner		L*	a**	b***
	♀	♂			
1	Jam126	T59B	88.49	-6.11	41.28
2	T59B	Jam126	89.58	-6.11	42.62
3	Jam329	T59W	90.64	-8.83	39.59
4	T59W	Jam329	91.90	-6.21	35.39
5	Jam178	T59W	89.82	-7.87	51.75
6	T59W	Jam178	89.68	-8.56	51.08
7	Sammyumjam	T59W	91.80	-3.87	25.86
8	T59B	Sammyumjam	90.98	-4.47	29.75
Control 1	T59B	T59W	90.42	-5.03	26.63
Control 2	Jam123	Jam124	92.33	-0.07	12.88

*Brightness (+light ↔ -blindness).

**Chroma (+red ↔ -green).

***Chroma (+yellow ↔ -blue).

본 연구를 통해 선발된 강건성 및 색채가 우수한 농가 보급형 녹색 형광실크 형질전환 1대 잡종 누에(F1) 계통은 기존 형질전환 누에의 녹색 형광단백질 뿐 아니라 유색견 누에 특유의 천연 연록색도 함께 갖고 있어 별도의 염색이 필요없는 차별화된 고급 패션의류나 벽지 등의 고품질 소재로 활용이 가능할 것으로 기대된다. 또한, 기 개발된 녹색 형광실크 누에와 비교하여 실크 생산량 등의 실용형질이 우수하여 잡종농가 소득향상 및 농가 보급형 GM 누에의 국가차원의 관리보급 안전체계 마련에도 기여할 것으로 사료된다.

적 요

선행연구를 통하여, 형질전환 누에를 제작하는 원천기술을 개발하고 이를 통해 녹색 형광실크를 생산하는 형질전환 누에를 제작한 바 있다. 본 연구에서는 선행연구에서 개발된 녹색 형광실크 형질전환 누에와 국립농업과학원이 보유하고 있는 누에 유전자원 중 유색견(絹) 누에 품종을 이용하여 형질전환 누에와 유색견 누에품종 간 교차교배를 통한 잡종강세를 이용하여 고치 생산량 및 고치의 색채 등이 향상된 녹색 형광실크 형질전환 누에 1대 잡종(F1) 계통을 개발하였다.

본 연구를 통해 선발된 실용형질이 우수한 농가보급형 녹색 형광실크 형질전환 누에 1대 잡종(F1) 계통은 기존 형질전환 누에의 녹색 형광단백질 뿐 아니라 유색견 누에 특유의 천연 연록색도 함께 갖고 있어 별도의 염색이 필요 없는 차별화된 고급 패션의류나 벽지 등의 고품질 소재로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ0090258012014)의 지원에 의해 이루어진 것임

References

- Imamura M, Nakai J, Inoue S, Guo XQ, Kanda T, Tamura T (2003) Target gene expression using the GAL4/UAS system in the silkworm *Bombyx mori*. *Genetics* **165**, 1329-1340.
- Kim JR, Lee SJ, Kim SS (2005) Color differences of standard samples according to the their lightness levels. *J of Korean Soc of Dyers and Finishers* **17**(2), 19-25.
- Kim NH (2004) A study on the color analysis of character by colour difference, *Cartoon & Animation studies* **8**, 77-100.
- Kim SW, Kang MU, Kang SW, Yun EY, Choi KH, Kim SR, Park SW, Nho SK, Goo TW (2013a) Modification of the commercial silkworm eggs adequate for silkworm transgenesis. *J Seri Entomol Sci* **51**(1), 73-77.
- Kim SW, Yun EY, Choi KH, Kim SR, Park SW, Kang SW, Goo TW (2013b) Production of fluorescent green silk using fibroin H-chain expression system. *J Seri Entomol Sci* **51**(2), 1-6.
- Kim SW, Yun EY, Choi KH, Kim SR, Park SW, Kang SW, Goo TW (2014) Expression of the blue fluorescent protein in fibroin H-chain of transgenic silkworm. *J Seri Entomol Sci* **52**(1), 1-8.
- Kim SW, Yun EY, Choi KH, Kim SR, Park SW, Kang SW, Kwon OY, Goo TW (2012) Construction of fluorescent red silk using fibroin H-chain expression system. *J Seri Entomol Sci* **50**(2), 87-92.
- Kim YC (1982) *Breeding*, pp14~16, Hakmun Press, Seoul.
- Rika H, Tomita M, Yoshizato K (2006) *The generation of*

- germline transgenic silkworms for the production of biologically active recombinant fusion proteins of fibroin and human basic fibroblast growth factor. *Biomaterials* **27**, 57155724.
- Satoshi Y, Zhu Z, Iaso K, Uchino K, Tamada Y, Tamura T, Asakura T (2007) Improving cell-adhesive properties of recombinant *Bombyx mori* silk by incorporation of collagen or fibronectin derived peptides produced by transgenic silkworms. *Biomacromolecules* **8**, 34873492.
- Tamura T, Thibert T, Royer C, Kanda T, Eappen A, Kamba M, Komoto N, Thomas JL, Mauchamp B, Chavancy G, Shirk P, Fraser M, Prudhomme JC, Couble P (2000) A *piggyBac* element-derived vector efficiently promotes germ-line transformation in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Nat Biotechnol* **18**, 8184.
- Tatematsu K, Kobayash I, Uchino K, Sezutsu H, Lizuka T, Yonemura N, Tamira T (2010) Construction of a binary transgenic gene expression system for recombinant protein production in the middle silk gland of the silkworm *Bombyx mori*. *Transgenic Res* **19**, 473~487.