

누에 수정란 초기발현유전자 데이터베이스 구축

최광호^{11*} · 구태원¹ · 김성렬¹ · 김성완¹ · 전재범¹ · 박승원² · 강석우¹
¹농촌진흥청 국립농업과학원 잠사양봉소재과, ²대구가톨릭대학교 의료생명산업대학 생명공학과

Gene expression profile of the early embryonic gene of the silkworm, *Bombyx mori*

Kwang-Ho Choi^{1*}, Tae-Won Goo¹, Seong-Ryul Kim¹, Sung-Wan Kim¹, Jae-Buhm Chun¹,
Seoung-Won Park² and Seok-Woo Kang¹

¹Sericultural & Apicultural Materials Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-100, Republic of Korea

²Dep. of Biotechnology, Catholic Univ. of DAEGU, Gyeongsan-si 712-702, Republic of Korea

(Received September 28, 2013, Accepted October 15, 2013)

ABSTRACT

This study was aimed for development of a useful genes that has a transcript expressional specificity in the early embryonic stage of the silkworm, *Bombyx mori*. We constructed and analyzed a full-length cDNA library from silkworm's eggs which after a lapse of 2 ~ 6 hours post oviposit. A total 960 clones were randomly selected, and the 5' ends of the inserts were sequenced to generate 652 expressed sequence tags(EST). 334 unique ESTs were generated after the assembly of 652 ESTs. The annotation of 334 unique ESTs by BLAST search revealed that 156(47%) of the sequences represented known genes, whereas 178(53%) of the sequences has no matches in the database. Of the 156 known genes, the most abundant genes were heat shock protein hsp20.8 gene(12 times) and ubiquitin-like protein gene(11 times). The functional groups of these ESTs with matches in the database were constructed according to their putative molecular functions. Among thirteen functional categories, the largest groups were protein synthesis(9.6%) and cellular organization(8.1%). Further defined studies on molecular functions and biological roles of their promoters will give us well-fined information and its application.

Key words : Silkworm, Embryo, cDNA library, EST

서 론

발현유전자단편(EST, expressed sequence tag) 분석기술은 다양한 생물종의 특정시기 및 조직으로부터 새로운 유전자를 발굴하기 위한 가장 일반적 방법으로 널리 이용되고 있으며, EST 대량분석을 통한 데이터베이스 구축은 생물체 계층 연구를 완성하기 위한 정보 제공 뿐 아니라 유전체 기능 연구를 위한 기초정보로도 활용가치가 매우 크다(Goldsmith et al. 2005, Olsen et al. 1989). 누에 유전체 연구분야에서는, 이미 일본에서 2004년에 약 500 Mb 정도의 누에 게놈이 해독되었고(Mita et al. 2004), 11,000 개가 넘는 EST 분석이 완료된 바 있다(Mita et al. 2003, Ote et al. 2004).

누에 형질전환 연구는 *Trichopusia ni*에서 개발된 전이

인자(piggyBac)를 이용하여 전이백터를 제작한 후 수정란 발생 초기에 누에알에 주입함으로써 가능성이 확인되었다(Tamura et al. 2000, Imamura et al. 2003). 최근에는 형질 전환누에로부터 콜라겐과 같은 인간에게 유용한 재조합 단백질을 생산하는 기술(Rika et al. 2006, Satoshi et al. 2007) 뿐 아니라, 실용형질이 우수한 농가 보급품종 누에로부터 다양한 천연 형광단백질이 융합된 형광고치를 연중 대량 생산할 수 있는 기술력에까지 도달하였다(Kim et al. 2012, Kim et al. 2013).

형질전환누에 제작을 위해서는 전이인자를 근간으로 한 형질전환용 운반체의 역할이 무엇보다 중요하데, 높은 수준의 형질전환율과 쉬운 형질전환체 선별 방법 뿐 아니라, 선별된 형질전환체의 차세대 유전형질의 안정성 등 해결해야 할 과제가 많이 남아 있다(Handler 2001, Satoshi

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

et al. 2007). 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 다양한 기능의 누에 유래 전이인자 및 마커의 개발과 함께 transposase 발현을 효율적으로 조절할 수 있는 프로모터의 개발이 필수적이다.

본 연구에서는 누에 초기 수정란으로부터 배자 발생 초기에 발현되는 유전자를 대량 선별하고 유전정보를 분석하여 누에 수정란 초기발현유전자 데이터베이스(eegEST)를 구축하고자 하였다. 누에 수정란 초기발현유전자 데이터베이스(eegEST)는 형질전환누에 제작 시스템의 효율 향상을 위한 프로모터 개발 연구에 기초자료로서 활용될 것이다.

재료 및 방법

1. 공시 재료 및 total RNA 분리

국립농업과학기술원 잠사양봉소재과에서 인공사료로 사육된 누에 잠124(*Bombyx mori*)를 공시재료로 사용하였다. 누에 배자 발육초기 발현 유전자의 대량 선별을 위한 cDNA 유전자은행을 제작하기 위해 산란 후 2~16시간 경과한 누에알 약 500립으로부터 차가운 PBS(0.1 M phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.0) 용액이 담긴 소형 homogenizer에서 마쇄한 후 RNA isolation kit(Qiagen, CA, USA)를 사용하여 제조사 매뉴얼에 따라 total RNA를 순수 분리하고 분광광도계로 정량한 후 실험 때까지 -80°C에 보관하였다.

2. cDNA 유전자은행 제작

순수 분리한 total RNA 100 µg으로부터 Micro-FastTrack 2.0™ mRNA Isolation Kit(Invitrogen, CA, USA)를 사용하여 제조사 매뉴얼에 따라 poly(A)⁺ RNA(mRNA)를 순수 분리한 후 분광광도계로 정제효율을 검정하였다. 이후 순수 분리한 mRNA는 ZAP-cDNA synthesis kit(Stratagene, La Jolla, CA)을 사용하여 *Xho* I linker primer와 역전사 효소를 처리하여 2nd strand cDNA를 합성하였다. 계속해서 2nd strand cDNA는 DNA 중합효소로 2nd strand cDNA의 말단을 평활말단화한 후 *EcoR* I adapter를 부착시켰다. 여기에 제한효소 *Xho* I을 처리한 후 5 ml 플라스틱 피펫을 이용하여 cDNA를 크기별로 분획하여 500 bp 이상의 cDNA 분획만을 혼합하여 Uni-ZAP XR vector에 삽입, ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit(Stratagene, CA, USA)의 매뉴얼에 따라 완전한 bacteriophage 상태가 되도록 coat protein으로 packaging 함으로써 누에 수정란 초기에 발현하는 cDNA 유전자은행을 제작하였다. 제작된 cDNA 유전자은행은 숙주세포 (XL1-Blue MRF⁺ strain)를 사용하여 phage 밀도를 조사하였다.

3. 염기서열 및 정보 분석

제작된 cDNA 유전자은행으로부터 *in vivo* excision에 의해 무작위 약 960개의 콜로니를 선별하였다. 선별된 콜로니는 ampicillin이 첨가된 LB 액상배지(1 ml)에서 37°C, 12시간 진탕배양한 후 Plasmid miniprep kit(DyneBio, Korea)을 사용하여 각 클론의 plasmid DNA를 순수 분리하였다. 순수 분리한 클론의 염기서열은 자동염기서열 분석 장치 CEQ 8000 Genetic Analysis System(Beckman coulter, CA, USA)를 사용하여 제조사 방법에 따라 분석을 진행하였다. 분석된 염기서열 정보의 Base-calling 및 quality assessment 과정은 SeqMan II program을 이용하여 벡터 sequences를 제거한 후, 200 base 이하의 짧은 클론과 low-quality 클론을 제거한 ESTs를 ‘High-quality ESTs’로 구분하였다. High-quality ESTs는 염기서열 상동성을 바탕으로 대표 EST인 독립유전자(unigene)를 선별하고 BLASTn/x 검색을 통한 독립유전자의 정보를 분석하였다(Choi et al. 2007).

4. 선별 유전자의 기능 분류

각각의 독립유전자의 기능별 분류는 AmiGo database(<http://www.godaabase.org>)를 통해 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)의 functional classification catalogue와 비교하여 수행하였다(Ashburner et al. 2000). 본 연구에서는 선별된 334개 독립유전자를 protein synthesis category 등 13개 기능으로 분류하였다.

결과 및 고찰

1. 누에 수정란 초기발현 유전자은행 제작

누에 초기 수정란에서 발현되는 유전자를 대량 선별하고 유용 유전자 EST 데이터베이스를 작성하기 위해, 산란 후 2~16시간 경과한 누에알을 사용하여 cDNA 유전자은행을 제작하였다. 제작된 cDNA 유전자은행은 *In vivo* excision을 통해 6.5×10^4 pfu/ml 이상의 역가를 갖는 것으로 확인되었고 각 클론에 삽입된 cDNA 크기는 평균 500 bp 이상으로 확인되어, 본 연구에서 제작된 cDNA 유전자은행은 누에 수정란 초기 발현유전자 분석을 위한 목적에 합당한 것으로 판단되었다(Choi et al. 2007).

제작된 cDNA 유전자은행으로부터 무작위로 960개 클론을 순수 분리하여 각 클론에 삽입된 cDNA의 5' 말단의 부분 염기서열 정보를 해독하여 EST를 제작하였다. 각 클론으로부터 해독된 염기서열 길이가 200 bp이하인 ‘Low-quality ESTs’를 제외한 652개 ‘High-quality ESTs’를 확보하였다. 652개 High-quality ESTs는 분석한 총 클론의 68%를 차지하였다. 선별된 652개 High-quality ESTs는 염

기서열 alignment 분석을 통해 최종 334점의 독립유전자 (unigenes)를 선별할 수 있었다(Table 1).

본 연구에서 선별된 334개 독립유전자는 누에 수정란 발생 초기에 발현되는 유전자들로서 기존 국제유전자은행 (GenBank)에 유전자 서열 정보가 등록되어 있거나 또는 미지의 새로운 유전자 정보를 대표한다(Choi et al. 2007).

각각의 독립유전자는 NCBI Blastn/x 검색엔진을 통해 기존 국제유전자은행에 등록된 유전자 염기서열 정보와의 상동성 여부를 유의수준 E-value $\leq 10^{-3}$ 으로 분석하였다(Lee

et al. 2002). 분석 결과, 기존 데이터베이스에 등록되어 있는 유전자 염기서열과 높은 상동성이 인정되는 156개의 known genes, 아직까지 기능이 밝혀지지 않았거나 또는 미지의 새로운 유전자일 것으로 추정할 수 있는 178개의 unknown genes으로 분류할 수 있었다(Table 1).

2. 주요 유전자 특성분석

본 연구에서 제작된 누에 수정란 초기 발현유전자 데이터베이스를 ‘eegEST’ 로 명명하였고, eegEST 독립유전자의 유전자 정보는 국제유전자은행 EST online database (GenBank accession No. FK250520 ~ K250853)에 등록하였다(Table 2).

Fig. 1은 eegEST 독립유전자의 중복발현 빈도를 나타낸 것으로서 334개 독립유전자 중 2회 이상 출현한 유전자는 143개로 전체의 34%를 차지하였다. 반면, 단일 출현한 유전자는 191개(43%)로 확인되었다. eegEST 독립유전자 중 가장 높은 발현빈도를 보인 유전자는 열충격단백질의 일종인 *Bombyx mori* heat shock protein 20.8(hsp20.8) 유전자로서 출현빈도는 12회로서 분석된 전체 EST의 약 2%를 차지하였고 다음으로는 ubiquitin-like protein 유전

Table 1. Summary of eegEST analysis generated from early embryo of the silkworm

EST category	Number of ESTs	% of ESTs
Total sequenced clones	960	100
High-quality ESTs	652	68
Unigenes	334	35
Known gene ^{a)}	156	47 ^{b)}
Unknown or novel gene	178	53 ^{c)}

^{a)} ESTs without significant matches ($E > 10^{-3}$).

^{b), c)} Percentages in the unigenes.

Table 2. The most highly occurred (> 5 times) genes in the eegEST database

Clone ID	Occurrences	bp	Putative identification	Origin	Score ^{a)}	E-value ^{b)}
EEG704	12	700	> gi 148298693 ref NP_001091794.1 heat shock protein hsp20.8	Bombyx mori	347	5.00E-94
EEG004	11	789	> gi 112983974 ref NP_001037410.1 ubiquitin-like protein SMT3	Bombyx mori	186	2.00E-45
EEG785	8	657	> gi 9626262 ref NP_040598.1 tailcomponent	Enterobacteria	291	3.00E-77
EEG121	8	652	> gi 157111023 ref XP_001651356.1 cleavage stimulation factor	Aedes aegypti	120	8.00E-26
EEG496	8	650	> gi 4521269 dbj BAA76304.1 endonuclease and reverse transcriptase-like protein	Bombyx mori	47	0.001
EEG071	8	484	> gi 145572858 gb AY639596.2 Salicornia herbacea tonoplast intrinsic protein gamma mRNA, complete cds	Salicorniaherbacea	71.9	3.00E-09
EEG860	8	773	> gi 110641351 ref YP_669081.1 minor capsid protein B	Escherichia coli	415	1.00E-114
EEG578	5	758	> gi 112982946 ref NP_001037094.1 kiser	Bombyx mori	404	1.00E-111
EEG011	5	600	> gi 71032745 ref XP_766014.1 hypothetical protein TP01_0494	Theileria parva strain Muguga	35	3
EEG170	5	458	> gi 112983924 ref NP_001037279.1 ribosomal protein S29	Bombyx mori	129	8.00E-29
EEG197	5	561	> gi 185049997 dbj AP008998.1 B. mori genomic DNA	Bombyx mori	75.8	2.00E-10
EEG456	5	788	> gi 148298831 ref NP_001091840.1 tuftelin interacting protein 11	Bombyx mori	44	0.009
EEG532	5	531	> gi 112983420 ref NP_001036984.1 heat shock protein hsp 19.9	Bombyx mori	300	4.00E-80
EEG623	5	557	> gi 12657702 gb AF178882.1 AF178882 Drepana lacertinaria 28S rRNA,	Drepana lacertinaria	472	9.00E-130
EEG630	5	518	> gi 114052751 ref NP_001040274.1 GTP-binding nuclear protein Ran	Bombyx mori	191	1.00E-47

^{a)} ESTs BLASTx/n stringency score.

^{b)} BLASTx/n expected value obtained from homology analysis between the ESTs and nr database.

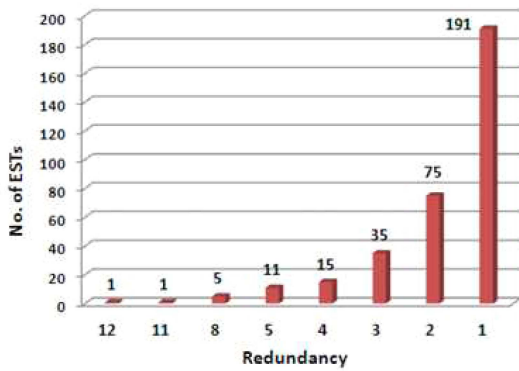


Fig. 1. Histogram showing the number of ESTs at each level of redundancy in the eegEST database. Among the 652 high-quality ESTs, 191 appeared as singleton ESTs, whereas 143 appeared more than once. The most frequently represented gene in the eegEST database was Hsp20.8 protein gene, which appeared 12 times.

자가 11회의 높은 출현빈도를 나타내었다(Table 2).

Hsp20.8 단백질은 열충격단백질(Hsp, heat shock protein) 종류 중 작은 크기에 속하는 단백질로서 이들 단백질에 대한 생화학적 기능에 관한 많은 연구가 진행되고 있으며, 세포의 발생 시기와 환경에 따라 그 발현 수준이 조절되는 특징이 있다(Velu et al. 2008, Hwang et al. 2007). 최근 곤충의 배발생(embryogenesis)과 관련하여 휴면기 앞 및 산란 후 48시간 이내에 다화성(multivoltine)을 유도한 비휴면기 앞에서 대사와 관련한 효소 및 열충격단백질 발현량에 차이가 있음을 보고한 바 있으며(Ponnuvel et al. 2010), Park 등 (2011)은 누에 배자 발육기간 중 산란 후 약 9 시간이 경과할 때까지 Hsp20.8 단백질 발현량이 최대치를 이뤘다가 20시간 이후에는 발현량이 급격히 감소하는 특성을 보고한 바 있다. 이는 누에 배자 발육기간 중 특정 시기에 열충격을 가함으로써 단백질 발현량의 조절이 가능하다는 것을 의미한다. 따라서 누에 배자발생 시기에 특이적으로 발현하는 Hsp20.8 유전자의 프로모터를 활용하여 누에 형질전환용 전이벡터를 개발하여 형질전환체를 제작한다면 목적 단백질의 발현시기와 발현량을 인위적으로 조절할 수 있을 것으로 사료된다.

3. 수정란 초기 유전자 기능 분류

eegEST 독립유전자의 BLASTx 상동성(score > 100) 분석결과를 바탕으로 독립유전자의 세포 내 기능을 유추하여 분류표로 작성하였다(Table 3). 본 연구에서는 AmiGo 데이터베이스를 활용하여 protein synthesis category를 포함한 13개 기능별 카테고리 분류하였다. 334개 eegEST 독립유전자 중 32개(9.6%) 독립유전자가 세포 내 단백질 합성(protein synthesis) 기능과 연관되어 있는 것으로 확인되었으며, 세포구성(cellular organization)과 관련한 기능

Table 3. Functional categorization of early embryonic genes of the silkworm(AmiGo)¹⁾

Category	No. of unigene	% of 334 unigene
Protein synthesis	32	9.6
Cellular organization	27	8.1
Protein destination	21	6.3
Metabolism	18	5.4
Cell growth, cell division, and DNA synthesis	12	3.6
Transcription	11	3.3
Energy	10	3.0
Protein facilitation	9	2.7
Cell biogenesis	6	1.8
Cellular transport and transport mechanism	6	1.8
Cell rescue, defense, cell death, and aging	4	1.2
Classification not yet clear-cut	12	3.6
Unclassified protein	166	49.6

¹⁾Functional classification of 334 non-redundant unigenes according to their biological process.

과 연관된 독립유전자가 27개(8.1%)인 것으로 조사되었다. 그러나 334개 독립유전자 중 166개(49.6%) 독립유전자에 대해서는 아직까지 기능이 명확히 밝혀지지 않았거나 분류학적으로 정립이 되지 못한 것으로 확인되었다.

본 연구에서 구축된 eegEST 독립유전자의 추정 기능에 의한 분류 결과, 단백질 합성 과 이동 등 곤충 수정란 발생 초기에 확인할 수 있는 기본적인 기관형성에 관련된 유전자(protein synthesis, cellular organization, protein destination) 비율이 전체 24%를 차지하는데, 이는 미 분류 독립유전자를 제외하면 eegEST 독립유전자의 약 50%를 차지하는 것으로 확인되었다(Table 1). 이러한 현상은 완전변태하는 곤충 배자의 발생 초기 유전자 발현의 일반적인 현상으로서, 수정 후 계속된 핵분열을 통해 이들이 주변세포질로 이동하여 난황물질을 둘러싸는 한 층의 세포군이 형성되면서 배자발생이 시작하게 되고, 계속해서 유충의 몸마디, 부속지와 내부기관들의 형성을 위한 기본적인 발육기작으로 알려져 있다(Boo et al. 2005).

지금까지의 형질전환누에 기술은 일본과 한국을 중심으로 진행되고 있으나, 누에 형질전환 효율 향상과 외래 기능성 단백질의 대량 생산 조절을 위한 누에 형질전환 시스템 개선 및 향상에 관한 연구는 매우 제한적이다(Kim et

al. 2012, White et al. 1996, Guo et al. 2005, Tomita 2011). 효율적인 형질전환누에 제작을 위한 시스템 개선을 위해서는 효율성이 높은 전이인자의 개발과 손쉬운 형질전환체 선발을 위한 표지 유전자의 개발 뿐 아니라 형질전환체 개발 목적에 부합하는 다양한 프로모터의 개발도 반드시 필요하다.

본 연구를 통해 구축된 누에 수정란 발생 초기 발현유전자 데이터베이스(eegEST)는 곤충발생학 연구의 기초자료 제공 뿐 아니라, 형질전환누에의 제작 및 선발 과정의 효율성 향상과 목적 외래 단백질의 발현량 증대 등 형질전환누에 개발 시스템의 개선을 위한 연구에 많은 정보를 제공할 수 있을 것으로 기대한다.

적 요

본 연구는 누에 수정란 초기에 발현하는 유전자를 대량 선별하고, 유용 유전자의 프로모터를 개발하기 위한 연구의 일환으로 추진하였다. 산란 후 2~16시간이 경과한 누에알로부터 cDNA 유전자은행을 제작하였다. 제작된 cDNA 유전자은행으로 전체 960개 클론을 무작위 추출하여 부분 염기서열 분석을 통해 EST를 제작하였다. 분석된 652개 ESTs 중 염기서열 상동성 분석을 통해 156개의 기존 알려진 유전자와 178개의 미지의 유전자로 구성된 334개 독립유전자를 최종 선별하여 ‘eegEST’ 로 명명하였다. eegEST 분석 결과, 기존 염기서열 정보가 알려진 156개 독립유전자 중 2회 이상 출현한 유전자 수는 143개로 전체의 34%를 차지하였으며, Hsp20.8 유전자(12회)와 ubiquitin-like 유전자(11회)가 가장 높은 출현 빈도를 나타내었다. 또한 eegEST 독립유전자의 추정 기능에 따른 분류에서 곤충 수정란 발생초기에 확인할 수 있는 기관형성과 관련한 유전자가 전체 24%를 차지하고 있었다. 본 연구에서 작성된 누에 수정란 초기 발현유전자 데이터베이스(eegEST)는 곤충 발생학 연구를 위한 정보제공 뿐 아니라 형질전환누에 제작을 위한 프로모터 개발 연구에 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 농업공동연구사업(No. PJ009044042013)의 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA,

Hill DP, Lsseltarver L, Lasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richadson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G (2000) Gene ontology; tool for the unification of biology. *Nat Genet* **25**, 2529.

Boo KS, Kim YG, Park GC, Choi MY (2005) Embryogenesis; in *Insect hormone and physiology*, pp.645651, Seoul national university Press, Seoul.(in Korea).

Choi KH, Goo TW, Yun EY, Hwang JS, Kang SW (2007) Gene expression profile of the posterior silk glands of the silkworm, *Bombyx mori* L., *Korean J Genetics* **29**(2), 2~9.

Goldsmith MR, Shimada T, Abe H (2005) The genetics and genomics of the silkworm, *Bombyx mori*. *Annu Rev Entomol* **50**, 71~100.

Guo TQ, Wang JY, Guo XT, Wang SP, Lu CD (2005) Transient in vivo gene delivery to the silkworm *Bombyx mori* by EGT-null recombinant AcNPV using EGFP as a reporter. *Arch Virol* **150**, 93~105.

Handler AM (2001) A current perspective on insect gene transformation. *Insect Biochem Mol Biol* **31**, 111~128.

Hwang JS, Go HJ, Goo TW, Seong SI, Yun EY, Ahn MY, Kim SR, Park KH, Kim IS, Jeon JP, Kang SW (2007) Molecular characterization of small heat shock protein(hsp20.8A) from the silkworm, *Bombyx mori*. *Int J Indust Entomol* **15**(1), 75~78.

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 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 Seric Entomol Sci* **50**(2), 87~92.

Kim SW, Yun EY, Choi KH, Kim SR, Kang SW, Goo TW (2013) Utilization of the *Bombyx mori* heat shock protein 70 promoter for screening transgenic silkworm. *Entomological Research* **43**(5), 282~287.

Lee SH, Kim BG, Kim KJ, Lee JS, Yun DW, Hahn JH, Kim GH, Lee KH, Suh DS, Kwon ST, Lee CS, Yoo YB (2002) Comparative analysis of sequences expressed during the liquid-cultured mycelia and fruit body stage of *Pleurotus ostreatus*. *Fungal Genetics and Biology* **35**, 115135.

Mita K, Kasahara M, Sasaki S, Nagayasu Y, Yamada T, Kanamori H, Namiki N, Kitagawa M, Yamashita H, Yasukochi Y, Okuda KK, Yamamoto K, Ajimura M, Ravikumar G, Shimomura M, Nagamura Y, Shin-I T, Abe H, Shimada T, Morishita S, Sasaki T (2004) The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Res* **29**, 27~35.

Mita K, Morimyo M, Okano K, Koike Y, Nohata J, Kawasaki H, Kuda KK, Yamamoto K, Suzuki MG, Shimada T, Goldsmith MR, Maeda S (2003) The construction of an EST database for *Bombyx mori* and its application. *Proc Natl Acad Sci* **100**, 14121~14126.

Olsen M, Hood L, Cantor C, Botstein D (1989) A common language for physical mapping of the human genome. *Science* **245**, 1434~1435.

Ote M, Mita K, Kawasaki H, Seki M, Nohata J, Kobayashi M, Shimada T (2004) Microarray analysis of gene expression profiles in wing discs of *Bombyx mori* during pupal ecdysis. *Insect Biochem Mol Biol* **34**, 775~784.

- Park SW, Choi KW, Goo TW, Kim SR, Kang SW (2011) Characterization of the promoter controlling the stage-specific gene expression of *Bombyx mori*. *Journal of Life Science* **21**(10), 14661472.
- Ponnuvel KM, Murthy GN, Awasthi AK, Rao G, Vijayaprakash NB (2010) Differential gene expression during early embryonic development in diapause and non-diapause eggs of multivoltine silkworm *Bombyx mori*. *Indian J Exp Biol* **48**, 11431151.
- Rika H, Tomita M, Yoshzato 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**, 5715~5724.
- 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**, 3487~3492.
- 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**, 81~84.
- Tomita M (2011) Transgenic silkworms that weave recombinant proteins into silk cocoons. *Biotechnol Lett* **33**, 645~654.
- Velu D, Ponnuvel KM, Syed MHQ (2008) Expression of the heat shock protein genes in response to thermal stress in the silkworm *Bombyx mori*. *Int J Indust Entomol* **16**(1), 2127.
- White LD, Coares CJ, Atkinson PW, O'Brochta DA (1996) An eye color gene for the detection of transgenic non-drosophilid insects. *Insect Biochem Mol Biol* **26**, 641~644.