

멜리틴 항균펩타이드를 생산하는 형질전환누에

김성완¹ · 구태원² · 김성렬¹ · 박승원³ · 최광호^{1*}
농촌진흥청 국립농업과학원, ²동국대학교, ³대구가톨릭대학교

Production of the melittin antimicrobial peptide in transgenic silkworm

Seong Wan Kim¹, Tae Won Goo², Seong Ryul Kim¹, Seung Won Park³, and Kwang-Ho Choi^{1*}

¹National Academy of Agricultural Science, RDA, Wanju 565-851, Korea

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

³Department of Biotechnology, Catholic University of Daegu, Daegu 712-702, Korea

(Received April 27, 2015, Received April 29, 2015, Accepted April 30, 2015)

ABSTRACT

Melittin is the main component of Bee Venom and has antibacterial activity against several bacteria. To produce the melittin antimicrobial peptide, we constructed transgenic silkworm that expressed melittin gene under the control BmA3 promoter using *piggyBac* vector. The use of the 3xP3-driven EGFP cDNA as a marker allowed us to rapidly distinguish transgenic silkworm. Mixtures of the donor vector and helper vector were micro-injected into 300 eggs of bivoltin silkworms, Baegokjam. In total, 131 larvae (G0) were hatched and allowed to develop into moths. The resulting G1 generation consisted of 36 broods, and we selected 4 broods containing at least 1 EGFP-positive embryo. The rate of successful transgenesis for the G1 broods was 11%. We identified 12 EGFP-positive G1 moths and these were backcrossed with wild-type moths. With the aim of identifying a melittin as antimicrobial peptide, we investigated the Radial diffusion Assay (RDA) and then demonstrated that melittin possesses high antibacterial activities against gram-negative bacteria.

Key words : *Bombyx mori*, Transgenic silkworm, Melittin, Antimicrobial peptide, Bee venome

서 론

멜리틴은 유럽 벌꿀인 *Apis mellifera*의 주요 독성성분으로 양이온의 용혈성 펩타이드이다. 이 펩타이드는 26개의 아미노산으로 이루어진 선형의 염기성 펩타이드로서 분자량은 2847.5이고, Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-ProAla-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln의 아미노산 서열로 이루어져 있다 (Terwilliger et al. 1982). 이 펩타이드는 특이한 아미노산 배열을 가지고 있는데, 비극성인 친수성 및 염기성 아미노산은 C-말단(아미노산 21-26) 근처에서 존재하는 반면, 소수성 및 중성 아미노산은 N 말단(아미노산 1-20)에 존재한다. 이러한 특성은 다양한 세포 유형에서 항균, 항바이러스, 항염증 등 다양한 효과를 가지고 있음이 보고되어 있다(Raghuraman and Chattopadhyay 2007, Terra et al.

2007). 멜리틴은 높은 표면 및 막장력을 가진 천연 세계로서 수용성의 단량체 또는 4 단량체의 구조를 가지고 있다. 이 폴리펩타이드는 천연 및 합성 막에서 이온모공으로 4단량체를 형성시켜서 막을 형태학적으로 변화시키는데, 이는 호르몬 분비유도, 막 단백질의 집합, 막 장력을 변화시킨다. 게다가 멜리틴은 G 단백질, 단백질 키나제 C, 아데닐레이트 시클라제, 포스포리파제 C와 D를 포함하는 다양한 효소를 자극한다(Carrasquer et al. 1998, Haase et al. 1996, Hui et al. 1990). 그리고, 멜리틴은 강력한 항균활성을 나타낸다. 예들 들면 라임병의 원인균인 *Borrelia burgdorferi*에 대해 높은 억제 효과를 나타내었으며, 효모인 *Candida albicans*를 죽이고, *Mycoplasma hominis* 와 *Chlamydia trachomatis*의 감염을 억제시켰다 (Klotz et al. 2004, Lazarev et al. 2005, Lazarev et al. 2004). 최근에는 나노입자만큼 작은 nanobee라는 장치를

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

이용하여 동물의 종양세포로 멜리틴을 운반하거나, HIV를 파괴하는 데 효과가 있다고 보고되었다(Hood et al. 2013).

최초의 누에 형질전환은 1971년 일본의 Nawa에 의해 이루어진 실험으로 흑란계통의 계놈을 백란계통의 알에 주입하여 흑란계통의 누에를 얻는 실험이었다. 이후 오랜 기간 동안 누에 형질전환을 위한 많은 시도가 있었지만, 뚜렷한 성과는 없었다. 그러나, 일본의 Tamura 등이 piggyBac 유전자를 이용하여 누에 형질전환에 성공하였다(Tamura et al. 2000). 이후 이 방법을 사용하여 basic fibroblast growth factor(bFGF), human serum albumin(HSA), feline interferon(FelFN), insulin like growth factor-I(hIGF-I) 등이 성공적으로 발현된다고 보고되어 있다(Hino et al. 2006, Kurihara et al. 2007, Ogawa et al. 2007, Tomita et al. 2003, Zhao et al. 2009). 최근에는 항균펩타이드인 세크로핀을 발현시키는 실크가 제작되었다고 보고되었다(Li et al. 2015).

가축에서 항생제는 질병 치료뿐만 아니라 질병을 예방하고 성장을 촉진하기 위한 목적으로도 사용된다. 그러나 무분별한 항생제 오·남용으로 가축에서 항생제 내성이 발생하고 있다. 따라서 이러한 항생제 사용을 억제하기 위한 다양한 대책이 다음과 같이 추진되고 있다. 배합사료 첨가용 항생제 종류는 2004년 53종에서 2009년 18종으로 줄이고, 동물용 항생제 잔류 기준은 2007년 58종에서 2009년 72종으로 확대 강화하여, 2007년 3월 무항생제 축산물 인증제를 도입하는 것이다. 그러나 국내에는 항생제 대체제에 대한 관심과 활용은 증대되고 있으나, 대체 물질에 대한 정보와 연구가 미흡한 실정이다. 따라서 본 실험에서는 천연 항생펩타이드인 꿀벌 봉독 유래의 멜리틴 펩타이드를 생산하는 누에를 개발하기 위하여 형질전환 누에를 이용하여 실험을 진행하였다.

재료 및 방법

1. 실험곤충 및 전이벡터

형질전환에 사용된 누에(*Bombyx mori*)는 백옥잠(123x124)을 사용하였고, 농촌진흥청 농업생물부의 표준 사육 기준(온도: 24°C ~ 27°C, 상대습도: 70% ~ 90%)에 준하여 사육하였다. 누에 형질전환에 사용된 전이벡터는 체코의 Jindra 박사로부터 pBac-3xP3-EGFP 벡터와 helper 벡터인 pHA3PIG를 분양 받아서 사용하였다.

2. 누에형질전환용 전이벡터 제작

누에에서 melittin 유전자가 발현되는 형질전환 누에를 만들기 위해 누에 액틴3프로모터와 melittin 유전자를 pBac-3xP3-EGFP 벡터에 도입하여 제작하였다. 먼저 누에 액틴

3 프로모터를 얻기 위해서, 다음의 primer를 이용하여 PCR 증폭을 통해 확보하였다. Sense primer는 Asc I 제한효소 인식서열을 포함하여 5'-GGCGCGCCGCGCGTTACCATA TATGGTG-3'를 사용하였고 antisense primer는 Nhe I 제한효소가 포함된 5'-GCTAGCCTTGAA TTAGTCTGCAAGAAA-3'를 사용하여 누에 gDNA를 주형으로 PCR을 이용하여 증폭하였고, pGEM-T Easy Vector System (Promega, Madison WI)에 클로닝하였다. 완성된 플라스미드는 pGEMT-BmA3로 명명하였다. 그리고, pGEMT-BmA3는 Asc I과 Nhe I으로, 제한효소 처리함으로써 단편들을 준비하였다. 이들 단편들은 Asc I과 Nhe I으로 제한효소 처리된 piggyBac 전이벡터인 pBac-3xP3-EGFP vector에 클로닝하였고, pG3xP3EGFPBmA3로 명명하였다. Melittin 유전자는 유전자합성(Bioneer Co.)에 의해서 확보하였고, Nhe I/Afl II 제한효소를 사용하여 melittin 유전자를 piggyBac 벡터의 Nhe I/Afl II 위치에 재클로닝하여 형질전환 전이벡터인 pG3xP3EGFPBmA3Melittin를 제작하였다.

3. 누에 초기배에 전이벡터 microinjection

형질전환에 사용된 누에알은 산란 후 4시간 이내의 것만 사용하였다. 전이벡터와 helper 벡터의 농도비는 1:1의 비율로 사용하였고, microinjection용 완충용액(5 mM KCl, 0.5 mM Phosphate buffer, pH 7.0)에 0.2 µg/µL의 농도로 희석하였다. 누에 초기배로의 microinjection은 배아의 주공과 후부 사이의 가운데 배면 부분에 주사하였으며, 그 과정은 다음과 같다. 먼저 텅스텐 침으로 누에알의 난각에 작은 구멍을 뚫고, 이 구멍에 DNA 용액이 들어있는 microcapillary의 끝을 삽입 후, microinjector의 공기압을 이용하여 DNA 용액을 알 속으로 주입하였다. 이때 각 배아에 주입된 DNA 용액의 양은 10~15 nl가 사용되었고, 난각에 생긴 구멍은 cyanoacrylate 접착제를 사용하여 막았다. 미세주사 후 누에알은 보습한 패트리디쉬에 넣어서 25°C에서 부화할 때까지 보호하였다.

4. 누에형질전환체 선발

형광현미경을 사용한 형질전환체 선발은 Leica(USA)사의 LEICA MZ16FA 현미경과 Leica(USA)사의 Microscope MZ FLIII Fluorescence Filter GFP 형광필터를 사용하여 세대별, 시기별로 관찰하여 선발하였다.

5. Inverse PCR

형질전환누에로부터 각각 genomic DNA를 분리한 다음, 제한효소 Sau3AI으로 처리하였다. 제한효소 Sau3AI로 절단된 genomic DNA는 T4 DNA ligase를 사용하여 self-ligation을 유도하고, 이를 주형으로 하여 5' 접합부위를

증폭하기 위해서 sense primer는 5'-ATCAGTGACACT TACCGCATTGACA-3'(25 mer) 와 antisense primer는 5'-TGACGAGCTTGGTTGGTGAGGATTCT-3'(25 mer)을 사용하였고, 3' 접합부위를 증폭하기 위해서 sense primer는 5'-TACGCATGATTATCTTTAACGTA-3'(23 mer)와 antisense primer는 5'-GGGGTCCGTCAAAACAAAACAT C-3'(23 mer)를 사용하여 Inverse PCR를 수행하였다. Inverse PCR 결과로 증폭된 PCR product는 pGEM-T easy 벡터에 클로닝한 다음, 삽입 단편에 대하여 염기서열을 결정하였다. 확보된 염기서열에서 전이벡터(piggyBac) 서열을 제외한 염기서열만으로 silkworm genome research program(<http://sgp.dna.affrc.go.jp/>)을 이용하여 누에 염색체 내 삽입 위치를 결정하였다

6. 항균활성 분석

항균활성분석을 위한 누에형질전환체의 채액은 다음과 같은 과정으로 전처리 하였다. 5령5일 누에 유충에서 채액을 채취하여 90 °C에서 10분간 배양한 후 얼음에서 10분간 처리하였다. 이렇게 처리된 시료는 13,000 rpm에서 4 °C, 10분간 원심분리 후 상층액을 분리하여 항균활성 분석을 위한 시료로 사용하였다. 항균활성 분석은 다음의 과정으로 진행하였다. Citrate phosphate buffer(9mM sodium phosphate, 1mM sodium citrate, pH 7.4)와 1%(w/v) type(low electroendosmosis) agarose, 0.03% TSB로 구성된 멸균된 underlay gel에 배양된 세균(4x10⁶ colony forming units/ml)을 넣고 혼합해준 뒤 배양접시에 균한 후 지름 3 mm의 구멍을 내어 1 mg/ml의 농도의 peptide를 5 µL 씩 넣는다. Peptide가 확산되도록 37 °C에서 3시간 배양한 후, overlay gel(6% TSB, 1% agarose)을 붓고 37 °C에서 다시 배양한다. 각각의 peptide의 항균 활성력은 18시간 후부터 나타나는데, 세균이 번식하지 않는 clear zone의 크기로 확인하였다.

결과 및 고찰

1. 누에형질전환체 제작

유용한 재조합단백질을 생산하는 것은 매우 중요한 연구분야 중 하나이다. 현재까지 박테리아, 효모, 곤충세포, 동물세포 등을 이용한 다양한 생산시스템이 개발되어 있다. 그 중에서 누에형질전환체를 이용한 생산시스템은 고효율, 저비용으로 재조합단백질을 생산할 수 있는 장점을 가지고 있다. 이 시스템은 2000년 일본의 Tamura 연구실에서 piggyBac transposon 유래 전이벡터를 사용하여 형질전환누에를 성공한 이후, 기술의 지속적인 발전으로 유전자 기능분석, 새로운 품종의 개발, 누에 전자선의 기능분석

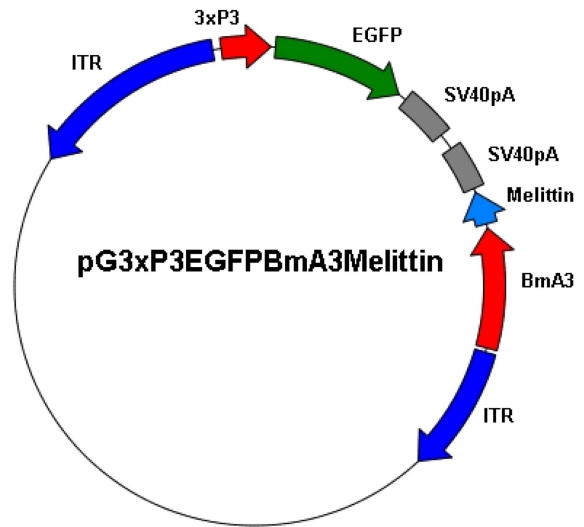


Fig. 1. Construction of pG3xP3EGFPBmA3Mellittin vector. Schematic of the pG3xP3EGFPBmA3Mellittin vector. The mellittin gene was inserted into the piggyback plasmid between the BmA3 promoter and SV40 poly A. The EGFP gene was used as a transformation marker.

등의 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 중에서 누에 실크의 품질개선 및 재조합 단백질 생산을 위한 bioreactor로 사용하기 위한 연구가 많이 진행되고 있다. 특히, 유용 재조합단백질인 basic fibroblast growth factor(bFGF), human serum albumin(HSA), feline interferon(FelFN), insulin like growth factor-I(hIGF-I) 단백질을 형질전환누에에서 성공적으로 발현시켰다고 보고됨으로써 이 시스템을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다(Hino et al. 2006, Kurihara et al. 2007, Ogawa et al. 2007, Zhao et al. 2009).

본 실험에서는 누에형질전환 시스템을 이용하여 봉독 유래의 멜리틴 항균펩타이드를 생산하는 형질전환누에를 제작하였다. 누에에서 melittin 항균펩타이드가 발현되는 형질전환누에를 제작하기 위해 piggyBac 벡터를 이용하여 전이벡터를 구축하였다. 형질전환체를 선별하기 위한 마커 유전자로는 EGFP 유전자를 사용하였고, 이 유전자의 조절 프로모터로는 3xP3 promoter를 사용하였다. 누에의 액틴3 프로모터를 얻기 위해서, 누에 계놈으로부터 PCR을 이용하여 증폭하였고, melittin 유전자는 누에 액틴3 프로모터와 SV40poly A사이에 클로닝하였다. 이렇게 제작된 벡터는 pG3xP3-EGFPBmA3Mellittin 로 명명하였다(그림 1).

2. 누에형질전환체 선별

실험에 사용한 누에품종은 농가보급 장려품종인 백옥잠(잠123×잠124)을 사용하였고, 백옥잠 누에알 300개를 대상으로 미세주입법에 의한 형질전환을 유도하였다. 전이백

Table 1. Result of injection of the construct DNAs to the bivoltin silkworms, Baegokjam embryos.

Vector	Number		Percent (%)		
	Eggs injected ¹	Hatched embryos ²	G1 broods ³	Broods with EGFP positive larvae ⁴	G1 broods with positive larvae
pG3xP3EGFP BmA3Mellittin	300	131	36	4	11

¹The Baegokjam strain was used as a host strain. The vector plasmids, pG3xP3EGFPBmA3-Mellittin (200 ng/ul) and the helper plasmid (200 ng/ul) were used for injection.

²Hatched larvae were allowed to develop to moths (G0).

³The moths were crossed and the resulting G1 broods were counted.

⁴G1 broods of embryos screened for EGFP fluorescence.

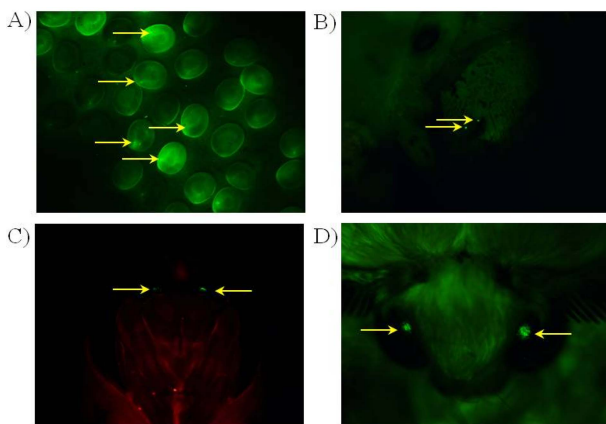


Fig. 2. Fluorescence expression of EGFP in transgenic silkworms. A) Eggs were expressed in the eyes and the abdominal nervous system of seven days old F1 embryo. Arrows point to eyes and nervous system in panel. B) Larva was expressed in the eyes of a F1 1th instar larva. C) and D) fluorescent images of pupa and moth. Arrows point to eyes in panel B, C and D.

터 pG3xP3EGFPBmA3melittin와 helper plasmid pHA3PIG를 1 : 1의 농도 비율로 혼합한 다음, 이를 microinjector를 이용하여 제조한 백옥잠 누에알 300개에 미량주입 하였다(그림 1). 형질전환을 유도한 총 300개의 누에알로부터 131마리의 G0 세대의 부화유충을 확보할 수 있었고, 최종적으로 성충(누에나방) 80마리를 확보하였다. 확보한 G0 세대의 성충은 상호교배를 통하여 G1 세대의 잠종 36아구를 확보하였다(표 1). 누에 형질전환체 선발 결과, 총 36아구로부터 표지유전자인 EGFP가 누에 배아의 5개의 홑눈(stemmata) 과 신경시스템에서 뚜렷하게 발현되는 4개의 아구를 선발할 수 있었다. 누에형질전환체를 포함하고 있는 4개의 아구는 누에사육용 잠막에 개별로 분리하여 사육하였고, 비형질전환체와 형질전환체가 혼재되어 있으므로 형질전환체 선발을 위하여 1령 2일까지 사육한 후, 전체 사육 누에를 대상으로 형광현미경 검경에 의해서 선발하였다. 형질전환체 선발은 누에 홑눈 내 표지유전자인

EGFP 발현 유무로 확인하였다. 4개 아구 내의 형질전환체 발생개체 수는 각 아구별로 차이가 있었는데 적게는 8개체부터 많게는 40여 개체 이상을 확인할 수 있었다. 이후 각 아구별로 선발한 누에 형질전환체는 아구 별로 분리사육하여 번데기를 확보한 다음 번데기를 이용하여 형질전환 유무를 재차 확인하였다. 번데기의 형질전환 유무는 향후 성충의 눈으로 형성될 부분에 표지유전자인 EGFP 발현 유무를 형광현미경으로 검경하였다. 형광현미경 검경에 의해서 형질전환이 확인된 번데기는 성충(누에나방)까지 발생시킨 다음, 같은 아구 내 성충을 sib-mating하여 제 2세대(G2) 잠종을 확보하였다(그림 2).

3. Inverse PCR

누에 게놈 내 melitin 유전자 도입 확인 및 염색체 내에 도입 위치를 분석하였다. 분리사육 된 제2세대(G2) 누에 형질전환체 4개 아구의 강건성, 생존율, 우화율, 산란율 등을 고려하여 최종적 2개 아구만을 선정하여 분석하였다. 선정된 2개의 형질전환체 아구는 Mel-1과 Mel-2로 명명하였다. 선정된 두 아구 내 누에 개체를 대상으로 melitin 유전자 도입을 확인하기 위하여 Inverse PCR을 수행하였다. 그 결과, 형질전환 라인 Mel-1과 Mel-2는 각각 1 copy로 존재하고 있었으며, 형질전환 라인 Mel-1는 전이벡터가 9번 염색체 상에 삽입되어 있었고 형질전환 라인 Mel-2는 전이벡터가 21번 염색체 상에 삽입되어 있는 것을 확인할 수 있었다(표 2).

4. 항균활성 분석

G2 세대 형질전환누에를 서로 교배하여 5령 5일까지 사육한 후 형질전환누에에서 생산된 melittin 항균펩타이드에 대한 항균활성을 분석하였다. 분석방법은 방사상 확산 분석(RDA, Radial Diffusion Assay)방법을 이용하였고, 그람 음성 세균인 E. coli(KACC 1039)에 대하여 항균활성을 검정하였다. 먼저 G2 세대의 5령 5일 유충 중 180마리에서 각각 체액을 채취한 후 전처리 하였다. RDA 분석 결

Table 2. Identification of the genomic insertion site of the pG3xP3EGFPBmA3Mellittin vector in the G2 transgenic silkworm genome by inverse PCR.

G1 lines	5'junction-piggyBac-3'junction	No. of chromosome position
Mel-1	TCAATGIAAAAAATTCTTCTTCTTGTGCGCTTCTTCATTGCTGAAGGTCGTGTCCTGAA ACTTGACCGTGGCCTGTCTCGTGAGCTGTTACCACCTCGTCCGGTCTCAGCTTCTCGAA AAAATATTGAAATATATTATATAAT-piggyBac-TATGGAATTCATTCCTGT ATTATGTGATG TATATGAAAACAAACATCTTGTGCAAAGGGGTATCGTAGCTG	9
Mel-2	CGGTGAGAAACTCAGTGGGCTGTGTCTATGGG-piggyBac-TTACTCGTCGAGCCCTT CGT CACAAGCGACGGGTAGGCGGAGGACGGTGACCGGTGCTTGAGGCACCTAAAAGAACCG TTAGTG	21

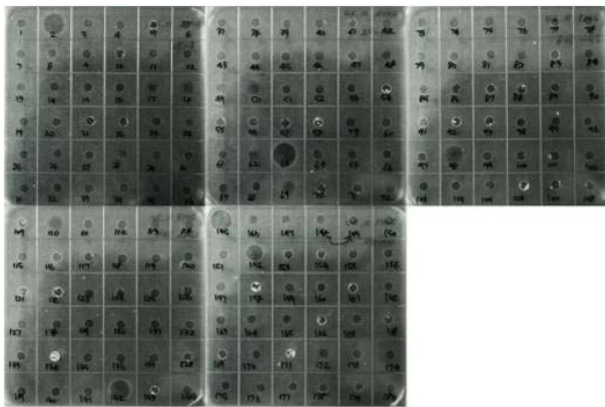


Fig. 3. Antimicrobial activity of melittin induced transgenic silkworms against *Escherichia coli*. Shortly after inoculation, 20 μ l of concentrated samples were added to the wells. The compounds diffuse out and kill the bacteria, creating a clear zone after 24 hours.

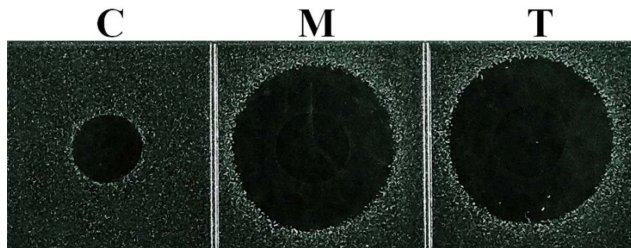


Fig. 4. Antimicrobial activity of melittin against *Escherichia coli*. Shortly after inoculation, 20 μ l of concentrated samples were added to the wells. The compounds diffuse out and kill the bacteria, creating a clear zone after 24 hours. C, a fifth instar five-days old larva of Baegokjam; M, Positive control (Melittin antimicrobial peptide from Sigma 0.016 mg/ml); T, melittin of a fifth instar five-days old larva produced in transgenic silkworms.

과에서 항균활성이 높은 5마리의 누에와 비교적 항균활성이 있는 5마리 누에를 선발하였고, 사육 후 서로 교배하여 계대사육을 진행하였다(그림 3). 앞의 과정으로 선발된 G3 세대 5령5일 누에에서 체액을 채취한 후 전처리하여 RDA 검정을 하였다. 대조군으로는 백옥잠 5령5일 누에의 체액과 시그마에서 구입한 melittin(0.016 mg/ml)을

사용하였다. 그 결과 melittin 누에 형질전환체에서 채취한 체액의 항균활성이 시그마에서 구입한 melittin과 거의 동일한 활성을 나타내었다(그림 4). 따라서 누에에서 melittin 항균펩타이드를 생산하는 누에형질전환체가 제작되었음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 누에를 재조합단백질의 대량생산 연구에 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

적 요

본 연구의 목적은 누에형질전환 기술을 이용하여 누에 체액에서 melittin 항균펩타이드를 생산하는 것으로서, 본 실험에서는 누에유래의 액틴3 프로모터를 이용하여 melittin 항균펩타이드를 발현시켰다. 누에형질전환체 선발을 위해서는 3xP3 promoter와 EGFP 유전자를 이용하여 선발하였고, 300개의 누에알에 microinjection 하여 F1 세대에서 11 bloods의 누에형질전환체를 선발하였다. 선발된 누에형질전환체는 초기배 단계의 눈과 신경조직, 유충과 번데기 그리고 성충의 눈에서 EGFP 형광단백질이 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 G2 세대 누에형질전환체를 5령 5일 유충까지 사육 후, 체액을 채취한 후 전처리 하였다. 이 시료를 항균활성검정을 하였고, 총 10마리의 누에를 선발할 수 있었다. 이렇게 선발된 누에는 서로 교배를 통해서 계대사육을 하였다. 이러한 과정으로 선발된 G3세대 누에형질전환체를 이용하여 앞의 과정과 동일한 방법으로 항균활성을 검정하였다. 그 결과 대조군으로 사용된 시그마사의 melittin(0.016 mg/ml)과 거의 동일한 항균활성을 나타내었다. 이상의 결과에서 melittin 항균펩타이드를 생산하는 누에형질전환체가 성공적으로 제작되었음을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 논문은 농림수산식품부 생명산업기술개발사업(과제 번호: 311059-4)과 농촌진흥청 어젠다사업(PJ010061012015)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Carrasquer G, Li M, Yang S, Schwartz M (1998) Effect of melittin on PD, resistance and short-circuit current in the frog gastric mucosa. *Biochimica et biophysica acta* **1369**, 346~354.
- Haase I, Czarnetzki BM, Rosenbach T (1996) Thrombin and melittin activate phospholipase C in human HaCaT keratinocytes. *Experimental dermatology* **5**, 84~88.
- Hino R, 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**, 5715~5724.
- Hood JL, Jallouk AP, Campbell N, Ratner L, Wickline SA (2013) Cytolytic nanoparticles attenuate HIV-1 infectivity. *Antiviral therapy* **18**, 95~103.
- Hui SW, Stewart CM, Cherry RJ (1990) Electron microscopic observation of the aggregation of membrane proteins in human erythrocyte by melittin. *Biochimica et biophysica acta* **1023**, 335~340.
- Klotz SA, Gaur NK, Rauceo J, Lake DF, Park Y, Hahm KS, Lipke PN (2004) Inhibition of adherence and killing of *Candida albicans* with a 23-Mer peptide (Fn/23) with dual antifungal properties. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **48**, 4337~4341.
- Kurihara H, Sezutsu H, Tamura T, Yamada K (2007) Production of an active feline interferon in the cocoon of transgenic silkworms using the fibroin H-chain expression system. *Biochemical and biophysical research communications* **355**, 976~980.
- Lazarev VN, Shkarupeta MM, Titova GA, Kostjukova ES, Akopian TA, Govorun VM (2005) Effect of induced expression of an antimicrobial peptide melittin on *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma hominis* infections in vivo. *Biochemical and biophysical research communications* **338**, 946~950.
- Lazarev VN, Stipkovits L, Biro J, Miklodi D, Shkarupeta MM, Titova GA, Akopian TA, Govorun VM (2004) Induced expression of the antimicrobial peptide melittin inhibits experimental infection by *Mycoplasma gallisepticum* in chickens. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **6**, 536~541.
- Li Z, Jiang Y, Cao G, Li J, Xue R, Gong C (2015) Construction of transgenic silkworm spinning antibacterial silk with fluorescence. *Molecular biology reports* **42**, 19~25.
- Ogawa S, Tomita M, Shimizu K, Yoshizato K (2007) Generation of a transgenic silkworm that secretes recombinant proteins in the sericin layer of cocoon: production of recombinant human serum albumin. *Journal of biotechnology* **128**, 531~544.
- Raghuraman H, Chattopadhyay A (2007) Melittin: a membrane-active peptide with diverse functions. *Bioscience reports* **27**, 189~223.
- Tamura T, Thibert C, Royer C, Kanda T, Abraham E, Kamba M, Komoto N, Thomas JL, Mauchamp B, Chavancy G (2000) Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. *Nature biotechnology* **18**, 81~84.
- Terra RM, Guimaraes JA, Verli H (2007) Structural and functional behavior of biologically active monomeric melittin. *Journal of molecular graphics & modelling* **25**, 767~772.
- Terwilliger TC, Weissman L, Eisenberg D (1982) The structure of melittin in the form I crystals and its implication for melittin's lytic and surface activities. *Biophysical journal* **37**, 353~361.
- Tomita M, Munetsuna H, Sato T, Adachi T, Hino R, Hayashi M, Shimizu K, Nakamura N, Tamura T, Yoshizato K (2003) Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nature biotechnology* **21**, 52~56.
- Zhao Y, Li X, Cao G, Xue R, Gong C (2009) Expression of hIGF-I in the silk glands of transgenic silkworms and in transformed silkworm cells. *Sci China C Life Sci* **52**, 1131~1139.