

家蚕丝素重链启动子驱动 *DsRed* 的瞬时分泌表达

潘兴亮, 曹广力, 薛仁宇, 贡成良

苏州大学医学部基础医学与生物科学学院, 苏州 215123

摘要: 根据家蚕丝蛋白基因的启动子活性高、丝蛋白具有高效分泌的特性, 克隆了家蚕丝素重链基因(*Fib-H*)启动子及其下游的信号肽序列(*FibHS*), 将 *DsRed* 基因与信号肽序列融合构建了分泌型瞬时表达载体; 转染细胞实验显示, 该载体能在家蚕 BmN 细胞中瞬时表达 *DsRed*; 家蚕注射载体后, 可在丝腺腔中检测到红色荧光, 表明瞬时表达的 *DsRed* 分泌到丝腺腔, 推测所克隆的序列具有信号肽的功能。此外, 本研究为家蚕丝腺生物反应器分泌表达外源基因的研究奠定了基础。

关键词: 丝素重链启动子, 信号肽, *DsRed*, 家蚕, BmN 细胞, 丝腺

Transiently secretory expression of *DsRed* driven by fibroin heavy chain promoter of *Bombyx mori*

Xingliang Pan, Guangli Cao, Renyu Xue, and Chengliang Gong

School of Pre-clinical Medicine and Biological Science, Medical College, Soochow University, Suzhou 215123, China

Abstract: Based on the character of strong promoter of the fibroin gene and high level secretion of fibroin of *Bombyx mori*, we amplified the promoter of heavy chain gene (*Fib-H*) and its downstream signal peptide sequence (*FibHS*) by PCR. After that, we cloned the PCR product in pBluescriptII SK (+) to form the vector pSK-FibHS and analyzed its sequence. The sequence identity was 99% comparable to that of the reported sequence by Blast on line. Then we digested pSk-Ser-DsRed-PolyA with *Sal I/Kpn I* to get *DsRed*-PolyA DNA fragment and subcloned it into vector pSK-FibHS to generate a transitorily secretory expression vector pSK-FibHS-DsRed-PolyA. After identified the recombinant plasmid by restriction enzyme digestion, we transfected pSK-FibHS-DsRed-PolyA into BmN cells by liposome. From the cells transfected with the recombinant vector, what the red fluorescence could be detected verified that the recombinant vector could express *DsRed* in BmN cells transiently. Furthermore, when silkworm had been injected with the recombinant vector pSK-FibHS-DsRed-PolyA, red fluorescence could be observed in the lumen of silk gland of silkworm. The result indicated that *DsRed* expressed transiently and was secreted into lumen of the silk gland. Therefore, we supposed that the cloned sequence (*FibHS*) possessed signal peptide bio-function. Moreover, this study would lay a foundation for the research on secretory expression of exogenous gene by silk gland bioreactor.

Keywords: fibroin heavy chain promoter, signal peptide, *DsRed*, *Bombyx mori*, BmN cell, silk gland

家蚕(*Bombyx mori*)是一种具有强大泌丝能力的昆虫。蚕丝蛋白由丝素(Fibroin, Fib)和丝胶(Sericin, Ser)组成。丝素由重链(Heavy chain, Fib-H)、轻链(Light chain, Fib-L)和 Fhx/P25 (Fibrohexamerin)以摩

Received: December 3, 2008; **Accepted:** February 23, 2009

Supported by: National Key Basic Research and Development Program of China(973 Program)(No. 2005CB121000).

Corresponding author: Chengliang Gong. Tel: +86-512-65880183; Fax: +86-512-65880183; E-mail: gongcl@suda.edu.cn

国家重点基础研究发展规划项目(973 项目)(No. 2005CB121000)资助。

尔比 6:6:1 组成^[1]。其中,丝素蛋白在后部丝腺中合成。在短短的 4~5 d 内,后部丝腺每个细胞合成丝素约 300 μg ,亦即 2 条后部丝腺(大约 1000 多个细胞)每小时合成丝素 2 mg 左右,平均每秒钟合成 6×10^8 丝素分子,比肝细胞合成血清白蛋白快 60 倍以上^[2]。如此高的蛋白合成强度,在其他动物细胞内是罕见的,因此,可以认为丝素蛋白启动子是自然界中最强的启动子之一^[3]。它作为家蚕丝腺生物反应器候选启动子已引起了广泛的关注。

有关丝心蛋白 H 链基因(*fib-H*)的结构^[4-6]、表达调控^[7,8]都已有了较为详细的研究。家蚕丝素基因的表达具有组织特异性,通常在 5 龄家蚕的后部丝腺大量表达,但汪生鹏等^[9]研究发现 *fib-H* 在家蚕丝腺的中部丝腺以及脂肪体组织存在渗漏表达。

为了利用丝素重链基因 *fib-H* 启动子实现外源基因的分泌表达,人们对家蚕丝素重链信号肽序列(*Fib-HS*)进行了研究,尝试控制引导外源蛋白质分泌表达的 N 端信号肽的氨基酸数目,研究重组蛋白的分泌与信号肽的切割^[10,11]。有研究表明,当 *Fib-HS* 长度缩短到 16 个氨基酸残基的时候,仍具有引导重组蛋白分泌的功能,且信号肽的切割位点位于 S_{16} 的羧基端^[10]。

为了进一步探讨 *fib-H* 启动子的功能及其信号肽的性能,本实验利用 *fib-H* 的启动子及其下游的信号肽序列,构建了带有 *DsRed* 报告基因的分泌型瞬时表达载体 pSK-FibHS-DsRed-PolyA,初步探讨了重组蛋白在培养细胞和丝腺组织的分泌表达,为利用 *fib-H* 启动子实现外源基因在家蚕丝腺组织的分泌表达奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 质粒和菌株

质粒 pBluescriptII SK (+)、含有 *DsRed*-PolyA 元件的质粒 pSk-Ser-DsRed-PolyA (带有 *DsRed* 基因和家蚕丝素轻链基因的 polyA 加尾信号序列)^[12]、受体菌为 *Escherichia coli* TG1、家蚕 Bm 细胞株为苏州大学医学部分子生物实验室保存、家蚕高白品种为广东蚕业研究所吴福泉研究员馈赠;限制性内切酶 *Sal* I、*Hind* III、*Eco*R I、*Xba* I、*Taq* DNA 聚合酶为 Gibico BRL 公司产品;T4 DNA 连接酶、TC-100 培养基、胎牛血清(FBS)为 Gibico BRL 公司产品;脂

质体转染试剂(RNAi-Mate)为 GenePharma 公司产品。

1.2 引物设计与合成

参照 GenBank 中已公开的家蚕丝素重链基因(Accession No. AF226688)的启动子及其下游序列设计引物 TS-Fib-H-1: (GCTCTAGAGAATTCGAGAATGTC TGGACAG (下划线表示 *Xba* I/*Eco*R I 位点,斜体部分示 AF226688 序列的 61950 位至 61965 位的核苷酸)和 Fib-HS-2:CGAAGCTTGGATCCGACATACTGCAGAGCGCAGCACAAAGATCAC(下划线表示 *Hind* III/*Bam*H I 位点,黑体部分表示 *fib-H* 基因的第二外显子 5'端起始核苷酸的互补序列,斜体部分为 AF226688 序列的 62456 至 62479 位的核苷酸的互补序列),引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 pSK-FibHS-DsRed-PolyA 瞬时表达载体的构建

按照 Kadono-Okuda 等^[13]的方法并参照萨姆布鲁克 J 等《分子克隆实验指南》(第三版)^[14]提取家蚕皓月丝腺组织基因组 DNA,并以此为模板,以 TS-Fib-H-1 和 Fib-HS-2 为引物 PCR 扩增出带有部分信号肽序列的启动子 *Fib-HS*(0.55 kb),将扩增的 *Fib-HS* 用 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切后定向克隆进用同样的双酶切的 pBluescriptII SK (+) 载体,获得重组质粒 pSK-FibHS,测序结果证实所克隆的序列为丝重链基因启动子及其下游序列;用 *Sal* I 和 *Kpn* I 双酶切质粒 pSk-Ser-DsRed-PolyA,并回收纯化 *DsRed*-PolyA (约 1.0 kb)片段,定向克隆进用同样的酶切的 pSK-FibHS,获得 pSK-FibHS-DsRed-PolyA 载体(图 1)。

1.4 脂质体介导法细胞转染

按常规方法^[15]培养 BmN 细胞,以脂质体介导法进行细胞转染^[16]。以 5×10^6 cells/mL 密度将 BmN 细胞铺于 12 cm^2 的细胞瓶中,26°C 培养过夜。分别取 2 个 eppendorf 管, A 管加入瞬时表达质粒 pSK-FibHS-DsRed-PolyA(5 μg),以 TC-100 培养基(FBS Free)将总体积补至 50 μL ,混匀备用。B 管加入脂质体转染试剂(Lipofection)8 μL ,以 TC-100 培养基(FBS Free)将总体积补至 50 μL ,将 A、B 二管混匀,室温静置 30 min 备用。取已贴壁的细胞,弃旧培养基,用 TC-100 培养基(FBS Free)洗细胞 2 次,每次用 1 mL,逐滴加入 100 μL 混合转染液,再加 0.9 mL

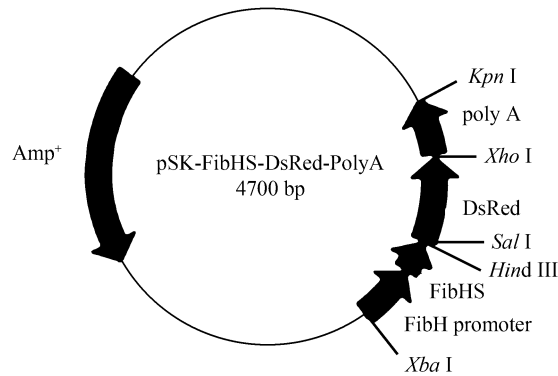


图 1 瞬时表达载体图谱

Fig. 1 Map of transient expression vector pSK-FibHS-DsRed-PolyA.

FibH-ATGAGAGTCAAACCTTTGTGATCTGTGCTGCGCTCTGCAGTATGTCGGATCCAAGCTTATCGATACCGTCGACGCCACCATG-DsRed
 M R V K T F V I L C C A L Q Y V G S K L I D T V D A T M-DsRed

Fib-HS signal peptide nucleotide sequence and its corresponding amino acid sequence was shaded; vector MCS and its corresponding amino acid sequence was denoted with wave line; underline shows *DsRed* sequence.

TC-100 培养基(FBS Free)。4 h 后, 弃掉旧培养基, 加入 2 mL 含有 10% FBS TC-100 培养基^[17], 24 h 后用荧光显微镜观察细胞荧光情况。同时设空载体 pSK-FibHS 为对照。经预实验鉴定表明, 家蚕 BmN 细胞未经处理不显示红色荧光。

1.5 蚕幼虫的注射

脂质体与 pSK-FibHS-DsRed-PolyA 混合, 以 5 μg/头注射进 4 龄幼虫的体腔。1 d 后解剖取后部丝腺, 同时设空载体 pSK-FibHS 为对照。用荧光显微镜(Nikon; TE2000-U)观察拍照。

2 结果与分析

2.1 pSK-FibHS-DsRed-PolyA 的构建与鉴定

重组载体 pSK-FibHS 用 *Xba* I/*Hind* III 酶切, 电泳检测可见一分子为 0.55 kb 的特异性条带, 序列测定结果显示, 该片段为所克隆的丝重链基因启动子及其按设计要求的下游序列(图 1), 表示 *fib-H* 启动子及下游的信号肽序列已按要求克隆进 pBluescriptIISK(+)载体; *Sal* I 和 *Kpn* I 双酶切质粒 pSk-Ser-DsRed-PolyA, 并回收纯化 DsRed-PolyA (约 1.0 kb)片段, 克隆进用同样的酶切的 pSK-FibHS, 获得 pSK-FibHS-DsRed-PolyA 载体。该载体用 *Hind* III、*Xba* I 酶切可检测到一条大小约为 0.55 kb 的条带。*Kpn* I、*Sal* I 酶切可显示 1.0 kb 同样大小的条带, 与预测值相符, 表明 DsRed-PolyA 已按设计要求插入到信号肽的下游(图 2)。

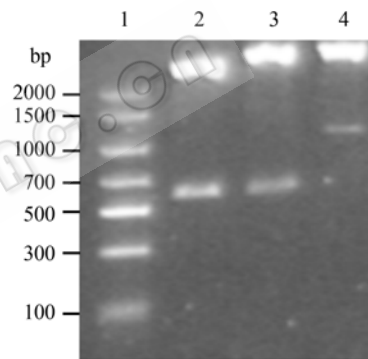


图 2 瞬时表达载体 pSK-FibHS-DsRed-PolyA 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of transient expression vector pSK-FibHS-DsRed-PolyA by enzyme digestion. 1: marker(PCR DNA Ladder, M106R); 2: pSK-FibHS(*Xba* I/*Hind* III), 3: pSK-FibHS-DsRed-PolyA(*Xba* I/*Hind* III); 4: pSK-FibHS-DsRed-PolyA(*Sal* I/*Kpn* I).

2.2 带有信号肽序列的 *Fib-H* 启动子在家蚕 BmN 细胞中的活性检测

按照 1.2.2 方法, 用脂质体介导 pSK-FibHS-DsRed-PolyA 转染 BmN 细胞, 同设空载体 pSK-FibHS 对照。转染 12 h 后, 未见转染细胞呈现明显红色荧光; 24 h 后, 转染 pSK-FibHS-DsRed-PolyA 区约有 25% 的细胞表现出红色荧光(图 3A), 而在转染空载体 pSK-FibHS 区(图 3B)未观察到荧光细胞。表明 *DsRed* 基因已按要求正确克隆在信号肽序列的下游, 与信号肽序列在同一读码框下融合, 并在细胞中正确瞬时表达, *fib-H* 启动子在家蚕卵巢细胞中具

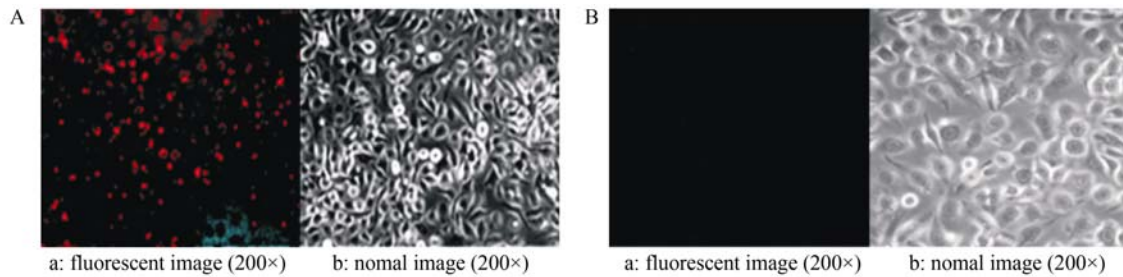


图3 DsRed在BmN细胞中瞬时表达的荧光检测

Fig. 3 Detection of transient expression of DsRed in BmN cells under fluorescent microscope. (A) BmN cells transfected with pSK-FibHS-DsRed-PolyA. (B) BmN cells transfected with pSK-FibHS.

有启动子活性。在转染 36 h、48 h，仍可观察到荧光，而 72 h 后荧光细胞明显减少，荧光强度显著减弱，到 96 h 几乎观察不到荧光细胞。

2.3 带有信号肽序列的 *Fib-H* 启动子在丝腺组织中的活性检测

家蚕品种“高白”饲养至 4 龄，按 1.5 方法注射载体 24 h 后，解剖取后部丝腺，用镊子轻轻地扯拉丝腺管壁，暴露出丝腺细胞层断面和丝腺腔内容物，荧光显微镜下观察。结果显示，在注射载体 pSK-FibHS-DsRed-PolyA 的家蚕的后部丝腺细胞中可见明显的红色荧光，从丝腺管腔流出的内容物也有明显的红色荧光(图 4A)；未注射载体家蚕的丝腺组织(图 4B)及注射空载体 pSK-FibHS 的家蚕的后部丝腺均未观察到红色荧光。周文林等^[18]报道，用不含信号肽的丝素重链启动子驱动 *DsRed* 瞬时表达时，仅观察到丝腺细胞呈红色荧光，但丝腺腔中的内容物不显示红色荧光；而本实验用带有信号肽的丝素重链启动子驱动 *DsRed* 的瞬时表达时，从丝腺腔中溢出的内容物呈现红色荧光，因此可以认为在丝腺细胞中瞬时表达的 DsRed 在信号肽的引导下分泌至丝腺腔内。汪生鹏等^[9]研究发现 *fib-H* 在家蚕中部

丝腺以及脂肪体存在渗漏表达，但本研究在注射载体 pSK-FibHS-DsRed-PolyA 的家蚕的前部、中部丝腺细胞中并没有观察到荧光，推测与丝素重链启动子在前部、中部丝腺细胞中的活性低、DsRed 的表达量少有关。尽管在前、中部丝腺的细胞中未检测到荧光，但其丝腺腔的内容物呈现红色荧光，说明分泌进后部丝腺腔的 DsRed 可与丝素蛋白一起向前部丝腺腔转运。

3 讨论

以瞬时表达分析启动子元件的活性，是一种很有效的方法。Takahiro 等^[19]以果蝇热休克蛋白基因 (Heat shock protein, *hsp*) 启动子控制的荧光素酶报告基因 (*luc*) 构建质粒载体 pHspLuc，以基因枪法体外导入家蚕 5 龄幼虫丝腺，并移植至蚕体，3 d 后检测到报告基因的表达。陆长德等利用含有启动子控制报告基因表达元件的重组苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒 (*Autographa californica* nucleopolyhedrovirus, AcNPV) 感染敏感家蚕，研究了家蚕丝蛋白基因的启动子组织特异性和丝蛋白的分泌机制^[10,11,20,21]，本

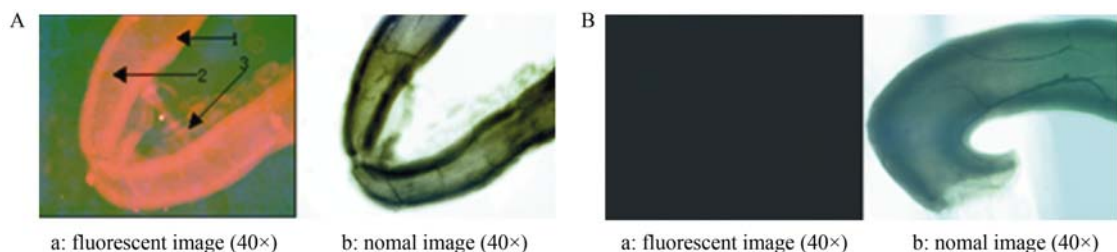


图4 DsRed在家蚕后部丝腺中的瞬时表达的荧光检测

Fig. 4 Detection of transient expression of DsRed in posterior silk gland under fluorescent microscope. (A) Posterior silk gland injected with pSK-FibHS-DsRed-PolyA. 1: wall of posterior silk gland tube (cellar layer of silk gland); 2: lumen of posterior silk gland; 3: overflowed fibrin. (B) Posterior silk gland injected without the vector.

研究曾用家蚕丝蛋白启动子控制 *DsRed* 基因构建瞬时表达载体, 在脂质体的介导下, 通过转染家蚕细胞或注射家蚕血液, 研究了丝素重链基因启动子^[18]、轻链基因启动子^[17]、丝胶基因启动子^[12]、P25 基因启动子的组织特异性^[22]; 本研究用带有信号肽序列的家蚕丝素重链启动子控制 *DsRed* 基因, 实现了 *DsRed* 基因在家蚕后部丝腺瞬时分泌表达, 可以认为这一策略是鉴定信号肽分泌能力的一种快速有效方法。

已有研究发现, 丝素轻链基因启动子中 41 bp 的一段序列与其在后部丝腺中专一表达有关^[23]; 也已经鉴定出了丝胶基因启动子转录起点上游 -500 bp 到 -475 bp 一段与其表达的丝腺专一性有关^[20]; 刘春等^[24]曾通过对大规模的家蚕 EST 序列分析发现, 丝素蛋白基因 *Fhx/P25* 不仅在家蚕后部丝腺高效转录, 而且在卵巢组织及其他组织中也有转录, 并且还发现 *Fhx/P25* 基因在卵巢中的转录起始位点比在丝腺中的至少要提前 115 bp。因此可以认为丝蛋白基因的表达并不完全表现出组织的特异性。汪生鹏等研究发现 *fib-H* 在家蚕中部丝腺以及脂肪体存在渗漏表达^[9], 本实验结果显示转染表达载体 pSK-FibHS-DsRed-PolyA 的家蚕细胞也有一定水平的 *DsRed* 表达, 表明丝素重链基因的启动子的组织特异性也不是绝对的。启动子的组织特异性与启动子的结构有关, 对 *fib-H* 启动子结构分析表明, 在 *fib-H* 启动子序列中具有泛在因子 (Ubiquitous factor) FBF-A1、SGF-3、SGF-4 因子的结合位点^[18], 因此 *fib-H* 启动子在卵巢细胞中具有一定的活性, 可能与泛在因子的调控有关, 当然也不能排除其他未知的调控机制引发的可能。

丝腺组织合成的丝蛋白具有强大的分泌性能, 有研究报道 N-末端的 151 个氨基酸残基被认为是丝素重链蛋白的信号肽^[25], 但是, 在丝素重链蛋白前体的氨基酸序列 (Accession No. P05790) 中指出, *Fib-H* 的 SP 可能是起初的 21 个氨基酸残基。汪生鹏等实验证明信号肽的切割位置在 21 与 22 氨基酸残基之间, 但当 *Fib-HS* 长度缩短到 16 个氨基酸残基时候, 仍具有引导重组蛋白分泌的功能, 且信号肽的切割位点位于 S_{16} 的羧基端^[10], 且此切割与丝素重链蛋白 N 端的二个 α 螺旋、C 端肽段无关^[11]。本研究结果显示, 分泌型瞬时表达载体 pSK-FibHS-

DsRed-PolyA 注射家蚕后, 可在丝腺腔中检测到红色荧光, 表明瞬时表达的 *DsRed* 分泌到丝腺腔, 证明具有 16 个氨基酸残基的 *Fib-HS* 信号肽就具有引导重组蛋白分泌到细胞外的功能, 可以利用这一策略进行家蚕丝腺生物反应器分泌表达外源基因研究。

REFERENCES

- [1] Inoue S, Tanaka K, Arisaka F, *et al.* Silk fibroin of *Bombyx mori* is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 mol a ratio. *J Biol Chem*, 2000, **275**(51): 40517–40528.
- [2] Lu HS. Sericulture Study in China. 1st Ed. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1990: 184. 吕鸿声. 中国养蚕学. 第一版. 上海: 上海科学技术出版社, 1990: 184.
- [3] Zhu CG, Jin YF, Shi F, *et al.* Construction of transgenic silkworm gene targeting vectors based on fibroin light chain. *Agri Biotechnol*, 2002, **10**(2): 171–175. 朱成钢, 金勇丰, 史峰, 等. 用心丝蛋白轻链基因构建转基因家蚕基因打靶载体. 农业生物技术, 2002, **10**(2): 171–175.
- [4] Manning RF, Gage LP. Physical map of the *Bombyx mori* DNA containing the gene for silk fibroin. *J Biol Chem*, 1978, **253**(6): 2044–2052.
- [5] Tsujimoto Y, Suzuki Y. Structural analysis of the fibroin gene at the 5' end its surrounding regions. *Cell*, 1979, **16**(2): 425–436.
- [6] Mita K, Ichimura S, James TC. Highly repetitive structure and its organization of the silk fibroin gene. *J Mol Evol*, 1994, **38**(6): 581–592.
- [7] Tsuda M, Suzuki Y. Translation modulation *in vitro* of the fibroin gene exerted by a 200-base-pair region upstream from the TATA box. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, **80**(24): 7442–7446.
- [8] Hui CC, Matsuno K, Suzuki Y. Fibroin gene promoter contains a cluster of homeodomain binding sites that interact with three silk gland factors. *J Mol Biol*, 1990, **213**(4): 651–670.
- [9] Wang SP, Lu CD. Leaked expression of cloned fibroin heavy chain promoter sequence in silkworm, *Bombyx mori*, and insect cultured cells. *Acta Sericol Sin*, 2006, **4**: 491–493. 汪生鹏, 陆长德. 家蚕丝素重链启动子克隆片段在家蚕体内和昆虫培养细胞内的渗漏表达. 蚕业科学, 2006, **4**: 491–493.
- [10] Wang SP, Guo TQ, Guo XY, *et al.* Structural analysis of fibroin heavy chain signal peptide of silkworm

- Bombyx mori*. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2006, **38**(7): 507–513.
- [11] Wang SP, Guo TQ, Guo XY, *et al*. In vivo analysis of fibroin heavy chain signal peptide of silkworm *Bombyx mori* using recombinant baculovirus as vector. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **341**(4): 1203–1210.
- [12] Zhu XX, Cao GL, Xue RY, *et al*. Cloning and activity analysis of promoters of sericin-1 gene from *Bombyx mori*. *Bull Sci Technol*, 2007, **23**(6): 830.
诸戌娟, 曹广力, 薛仁宇, 等. 家蚕丝胶蛋白基因 1 (ser-1) 启动子的克隆及其活性分析. *科技通报*, 2007, **23**(6): 830.
- [13] Kadono-Okuda K, Kosegawa E, Mase K, *et al*. Linkage analysis of maternal EST cDNA clones covering all twenty-eight chromosomes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol Biol*, 2002, **11**(5): 443–451.
- [14] Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. 3rd Ed. Beijing: Scientific and Technical Publishers, 2002.
J 萨姆布鲁克, DW 拉塞尔. *分子克隆实验指南*. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [15] Summers MD, Smith GE, *et al*. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. *Texas Agri Exp Station Bull*. 1987, **1555**: 10–18.
- [16] Tang SM, Yi YZ, Shen XJ, *et al*. Functional analysis of the larval serum protein gene promoter from silkworm, *Bombyx mori*. *Chin Sci Bull*, 2003, **48**(23): 2611–2615.
- [17] Zhou WL, Cao GL, Xue RY, *et al*. Cloning and activity analysis of the promoter of fibroin-L silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomol Sin*, 2007, **50**(6): 547–554.
周文林, 曹广力, 薛仁宇, 等. 家蚕丝素蛋白轻链基因 (fib-L) 启动子序列的克隆及其活性分析. *昆虫学报*, 2007, **50**(6): 547–554.
- [18] Zhou WL, Cao JR, Ye AH, *et al*. Cloning and activity analysis of fibroin heavy-chain gene promoter of silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Sericol Sin*, 2008, **34**(1): 72–77.
周文林, 曹锦如, 叶爱红, 等. 家蚕丝素蛋白 H 链基因启动子区域的克隆及活性分析. *蚕业科学*, 2008, **34**(1): 72–77.
- [19] Adachi T, Tomita M, Shimizu K, *et al*. Generation of hybrid transgenic silkworms that express *Bombyx mori* prolyl-hydroxylase alpha-subunits and human collagens in posterior silk glands: Production of cocoons that contained collagens with hydroxylated proline residues. *Biotechnol*, 2006, **126**(2): 205–219.
- [20] Liu Y, Yu L, Guo X, *et al*. Analysis of tissue-specific region in sericin 1 gene promoter of *Bombyx mori*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **342**(1): 273–279.
- [21] Guo XY, Guo TQ, Wang SP, *et al*. Silk gland specific secretory expression of egfp gene in silkworm *Bombyx mori* with rAcMNPV system. *Arch Virol*, 2005, **150**(6): 1151–1160.
- [22] Liu WB, Gong CL, Xue RY, *et al*. Cloning and analysis of Fhx/P25 gene promoter of *Bombyx mori* fibroin protein. *Zoological Res*, 2007, **28**(1): 20–22.
刘炜彬, 贡成良, 薛仁宇, 等. 家蚕丝蛋白 Fhx/P25 基因启动子区域的克隆及序列分析. *动物学研究*, 2007, **28**(1): 20–22.
- [23] Guo TQ, Wang JY, Wang SP, *et al*. Loss of posterior silk gland transcription specificity of fibroin light chain promoter due to absence of 41 bp sequence containing possible inhibitor binding sites. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2005, **37**(12): 819–825.
- [24] Liu C, Zhao P, Cheng TC, *et al*. Analysis of a novel transcription mode of Fhx/P25 gene in *Bombyx mori*. *Prog Biochem Biophys*, 2005, **32**(8): 740–746.
刘春, 赵萍, 程廷才, 等. 家蚕 Fhx/P25 基因的一种新的转录模式分析研究. *生物化学与生物物理进展*, 2005, **32**(8): 740–746.
- [25] Zhou CZ, Confalonieri F, Medina N, *et al*. Fine organization of *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**(12): 2413–2419.