

非转座子载体介导的转基因家蚕表达 hIL-28A*

崔琳琳^{1)**} 薛仁宇^{1)**} 陆叶²⁾ 曹广力¹⁾ 贡成良^{1)***}

(¹⁾ 苏州大学基础医学与生物科学学院, 苏州 215123; (²⁾ 苏州大学药学院, 苏州 215123)

摘要 为了探讨非转座子载体介导转基因家蚕表达外源基因的可能性, 将 hIL-28A 克隆进昆虫细胞表达载体 pIZT/V5-His, 构建了重组载体 pIZT/V5-His-hIL-28A. 利用精子介导法将该重组载体导入家蚕卵, 通过绿色荧光筛选并结合 PCR、DNA 杂交等分子鉴定, 证实成功获得了转基因家蚕. Western blotting 结果显示, 转基因家蚕表达重组 hIL-28A 的分子质量为 25 ku, ELISA 检测结果显示, hIL-28A 在 G3 代转基因蚕、后部丝腺、脂肪组织冻干粉中的含量分别为 0.198、0.320 和 0.238 ng/g. 表明通过非转座子载体介导可以将外源基因导入家蚕基因组并实现外源基因的表达.

关键词 非转座子载体 pIZT/V5-His, 转基因家蚕, hIL-28A, 精子介导法

学科分类号 Q756

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00690

家蚕转基因研究经过 20 多年的发展, 在技术和方法上已经取得很大进步. 制备转基因蚕常用的载体主要有两类: 一类是基于转座子的转基因, 如 *piggyBac*、*minos* 等. 应用较为成熟的是 *piggyBac* 转座子, 自从 2000 年 *piggyBac* 转座子成功用于转基因家蚕以来^[1], 已通过家蚕转基因成功表达了血清白蛋白^[2]、人粒细胞-集落细胞刺激因子^[3]、成纤维细胞生长因子^[4]、hIGF-I^[5] 等多种外源蛋白. 另一类是基于基因打靶系统的转基因, 也称基因定点同源重组, 是 20 世纪 80 代发展起来的一项重要、新兴的分子生物学技术. 1999 年张峰等^[6]利用转基因打靶载体(pG350)获得了 3 条带有绿色荧光斑块的转基因家蚕, 转基因家蚕能生长到五龄, 但不能正常吐丝. 同年, Yamao 等^[7]利用带有丝素轻链-GFP 嵌合基因的重组苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcMNPV)将丝素轻链-GFP 嵌合基因打靶到家蚕基因组丝素轻链区域, 获得了吐绿色荧光丝的基因打靶家蚕. 2001 年, 赵昀等^[8]将 *gfp* 基因和人工合成丝心蛋白样基因克隆到打靶载体上, 利用电穿孔方法导入家蚕卵中, 获得了预期的同源重组转基因蚕. 2003 年, Wu 等^[9]利用丝素轻链基因组序列作为同源臂构建打靶载体, 通过打靶获得了表达 aFGF 的转基因家蚕. pIZT/V5-His 是由 Invitrogen 公司开发的一种能在昆虫 Sf-9 细胞中稳定表达外

源基因的载体, 该载体属非转座子、非打靶类载体, 同时该载体含有 5 个组氨酸标签, 通过 His 柱, 可以相对方便地将融合表达的外源蛋白分离纯化. 李曦、陈慧梅等分别利用该载体获得了稳定表达人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的家蚕 BmN 细胞系^[10-11], 但至今还没有使用 pIZT/V5 载体进行包括家蚕在内的昆虫转基因研究报道, 因此使用该载体进行转基因家蚕的研究值得尝试.

IL-28A 是 2003 年美国科学家 Kotenko 和 Sheppard 等共同发现的一种新型白介素^[12-13], 可发挥类似 I 型干扰素的抗病毒、抗肿瘤及免疫调节功能. 陆叶等曾通过家蚕转化细胞^[14]及重组家蚕杆状病毒^[15]成功表达了 IL-28A, 但是该系统是一种瞬时表达系统, 家蚕因重组病毒的感染而死亡, 外源基因不能连续传代表达, 利用 pIZT/V5-His 载体探索通过转基因家蚕进行持续、稳定表达 IL-28A 具有

* 国家自然科学基金(31072085), 国家重点基础研究发展计划(973)(2005CB121005)和苏州大学重大应用研究培育(Q3134991)资助项目.

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 0512-65880183, E-mail: gongcl@suda.edu.cn

收稿日期: 2011-02-16, 接受日期: 2011-03-14

重要价值。

为此, 我们将人白介素 28A(hIL-28A)基因克隆到 pIZT/V5-His 载体中, 构建了转基因载体 pIZT/V5-His- hIL-28A, 利用精子介导法将该重组载体导入家蚕, 通过筛选并结合分子鉴定, 成功获得转基因家蚕。表达产物检测的结果显示重组 hIL-28A 的分子质量为 25 ku。在 G3 代转基因蚕、后部丝腺、脂肪组织冻干粉中的含量分别为 0.198、0.320 和 0.238 ng/g。研究结果显示通过非转座子载体介导可以获得外源基因正确表达的转基因家蚕。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

实验所用限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、*Eco*R V、*Xho* I 为 Fermentas 公司产品; T4 DNA Ligase 为 TaKaRa 公司产品; 高保真 Taq DNA 聚合酶、dNTP 为上海生工生物工程有限公司产品; DNA 凝胶回收试剂盒、质粒 DNA 小量制备试剂盒与 PCR 产物纯化试剂盒购自 V-GENE 生物公司; 脂质体为 Invitrogen life technologies 公司产品; 核酸 DIG 标记试剂盒及核酸杂交检测试剂盒为 Roche 公司产品。实验中所用一抗为羊抗 hIL-28A, 二抗为兔抗羊 IgG, 分别为 Santa Cruz Biotechnology 和 IMMUNECHEM 公司产品。hIL-28A ELISA 试剂盒购自 Uscn and Life Technology 公司。

转基因研究所用的家蚕皓月品种、pUC57-hIL-28A 质粒、pIZT/V5-His 及 *E. coli* TG1 由苏州大学基础医学与生物科学学院分子生物学实验室保存。

1.2 引物

用 Primer 5.0 软件设计引物 hIL-28A-1(5' TAG AAT TCA TGA AAC TAG ACA TGA C 3', 划线部分为 *Eco*R I 酶切位点)和 hIL-28A-2(5' TTG ATA TCG ACA CAC AGG TCC CCA CTG 3', 划线部分为 *Eco*R V 酶切位点), FGFP-1(5' GCG TCTA GAG GAT GGC TAG CAA AGG AGA AG 3')和 FGFP-2(5' ACG CCC GGG CAT CCA TGC CAT GTG TAA TCC 3'), 并由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 重组质粒 pIZT/V5-His- hIL-28A 的构建。以 pUC57-hIL-28A 质粒为模板, 用引物 hIL-28A-1/hIL-28A-2 通过 PCR 扩增 hIL-28A 片段(约 600 bp)。回

收 hIL-28A 片段, 用 *Eco*R I 和 *Eco*R V 双酶切后克隆进经同样酶切的 pIZT/V5-His 载体中获得 pIZT/V5-His-hIL-28A 重组载体。在该载体中, hIL-28A 基因由黄杉毒蛾核型多角体病毒(*Orgyia pseudotsugata* nucleopolyhedrovirus, OpNPV)的极早期基因启动子 *ie-2* 控制。

1.3.2 用精子介导法将重组载体导入家蚕卵。利用精子介导, 可以将外源 DNA 带进卵子^[6], 采用先交配后注射载体的方法^[7]进行。雌蛾交配 2 h 后, 拆对, 将转基因载体与脂质体按 1:1 混合后按每头 4~5 μ l (1 g/L)分别注入 3 头的雌蛾交配囊中, 在蚕蛾产卵后即时浸酸, 进行正常催青。

1.3.3 转基因蚕的筛选及分子鉴定。

利用体视荧光显微镜检测精子介导处理雌蛾所产蚕卵, 根据蚕卵的荧光情况判别外源 DNA 是否导入蚕卵。蚕卵催青孵化后、正常饲养, 并在不同阶段观察蚕的荧光情况。G0 代荧光蚕蛾与正常蚕蛾交配继代, G1 代起荧光蚕蛾之间交配继代。

抽提每一代(G0~G3)产卵后的蚕蛾基因组 DNA^[8], 以此为模板, 分别用引物 FGFP-1/FGFP-2 和 hIL-28A-1/hIL-28A-2 进行 PCR 检测。

取 G3 代蚕蛾基因组 DNA, 煮沸变性后直接在 PVDF 膜上, 进行预杂交, 与 DIG 标记的 *gfp* 探针杂交、洗膜及显色检测。*gfp* 杂交探针标记及杂交的具体操作按试剂盒说明书进行, 实验中同时设立正常家蚕基因组 DNA 为阴性对照、构建的 pIZT/V5-His- hIL-28A 载体为阳性对照。

1.3.4 SDS-PAGE 和 Western blotting。取 G3 代转基因蚕冻干粉, 加 PBS 研磨离心取上清, 按 1:1 加组织裂解液(8 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS, 20 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷(Tris base), 30 mmol/L DTT), 4℃裂解过夜。12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 与上样缓冲液混合, 100℃水浴 5 min 后上样, 进行 SDS-PAGE(浓缩胶为 5%, 分离胶 12%)。随后进行 Western blotting 分析。

1.3.5 hIL-28A 表达量的检测。取 G3 代转基因蚕全蚕、后部丝腺、脂肪组织冻干粉各 0.05 g, 充分研磨后, 加 500 μ l 组织裂解液(8 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS, 20 mmol/L Tris base, 30 mmol/L DTT), 4℃裂解过夜, 经 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清后, 按 hIL-28A ELISA 试剂盒说明书进行 ELISA 检测。

2 结果与分析

2.1 转基因载体 pIZT/V5-His-hIL-28A 的鉴定

将 hIL-28A 克隆进 pIZT/V5-His 获得重组载体 pIZT/V5-His-hIL-28A. 在新构建的载体中, hIL-28A 由 OpNPV *ie-2* 启动子控制, *Zeo-GFP* 盒由 OpNPV *ie-1* 启动子控制. 分别用 hIL-28A-1/ hIL-28A-2、FGFP-2/FGFP-2 引物进行 PCR 检测, 可分别扩增出 600、720 bp 的特异性条带(结果未显示), 各 PCR 产物的分子质量与理论值一致, 对该载体进行测序, 最终的测序结果显示载体 pIZT/V5-His-hIL-28A 已按设计要求正确构建.

2.2 转基因家蚕的筛选与鉴定

将转基因载体 pIZT/V5-His-hIL-28A 与脂质体混合后, 注射进交配 2 h 的雌蛾交配囊中, 交配后产下卵即时浸酸, 正常催青, 并用荧光显微镜观察蚕卵的荧光情况, 发现有部分蚕卵发出绿色荧光, 表明通过精子介导确能将外源 DNA 导入蚕卵. 经精子介导处理的 3 头雌蛾共产下 1 478 粒卵, 其中约 70% 的蚕卵孵化. 孵化出的蚕蛹正常, 最终从中筛选得到 3 头雄性荧光蛹(G0 代), 荧光蚕的比例约占收蚁蚕的 0.3%. 将荧光蛹化蛾后与正常雌蛾交配产卵, 以后各代均为同蛾圈荧光蚕之间交配、育种, 并在不同发育阶段观察蚕的荧光(图 1a~b).

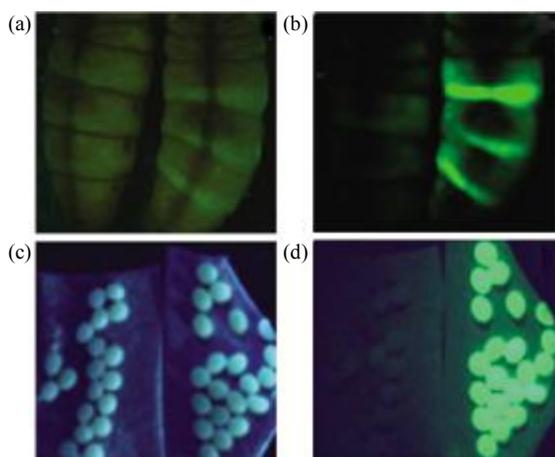


Fig. 1 The transgenic silkworm and eggs positive for GFP

(a, b) The transgenic pupa of the G2 generation and normal pupa in the normal field and fluorescent field, respectively. (c, d) The eggs of the G3 generation transgenic silkworm and normal eggs in the normal field and fluorescent field, respectively, left part and right part in each picture presents normal sample and transgenic sample.

蚕蛾交配产卵后, 提取其基因组 DNA, 分别用引物 FGFP-1/FGFP-2 和 hIL-28A-1/ hIL-28A-2 进行 PCR 检测, 结果显示, 从荧光蛾的基因组中可分别扩增出特异性 *gfp* 和 hIL-28A 片段(图 2a, b). 杂交鉴定结果显示, *gfp* 基因探针能与荧光蚕蛾的基因组杂交(图 2c), 表明筛选获得的荧光蚕确实为转基因蚕.

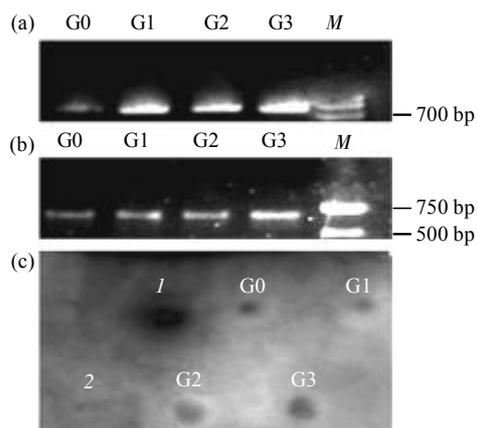


Fig. 2 Identification of the transgenic silkworms

(a, b) PCR results amplified from the genomes of the G0 ~ G3 generations fluorescent moths with the primers of FGFP-1/FGFP-2 or hIL-28A-1/hIL-28A-2, respectively, M: DNA ladder, G0 ~ G3: The G0 ~ G3 generation fluorescent moths. (c) Identification of fluorescent silkworms by dot hybridization with a dig-labeled *gfp* probe. 1: pIZT/V5-His-hIL-28A vector; 2: Genomic DNA of the normal silkworm; G0 ~ G3: Genomic DNAs of the G0 ~ G3 generation fluorescent silkworms.

2.3 hIL-28A 在转基因家蚕中的表达

取 G3 代转基因家蚕后部丝腺组织进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析, 结果如图 3 所示, 大约在 25 ku 处有一特异性条带, 表明 hIL-28A 在家蚕体内成功表达.

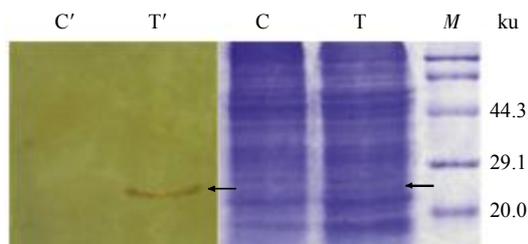


Fig. 3 hIL-28A expressed in the posterior silk glands of the transgenic silkworm

M: Protein marker; T and T': The tissue of posterior silk gland from the transgenic silkworm; C and C': The tissue of posterior silk gland from normal silkworm.

将 G3 代整体转基因蚕、后部丝腺和脂肪组织分别制成冻干粉, 再经研磨、组织裂解液处理后, 按 ELISA 试剂盒说明书检测 hIL-28A 的表达水平, 结果显示 G3 代转基因蚕整体、后部丝腺、脂肪组织中 hIL-28A 的含量分别为: 0.198、0.320 和 0.238 ng/g.

3 讨 论

家蚕是一种泌丝昆虫, 长期以来, 人们利用家蚕吐丝结茧这一生物机能, 大量生产生丝. 传统的蚕丝业经济效益相对较低. 为了充分挖掘家蚕的利用价值, 许多研究人员一直致力于通过家蚕表达外源基因的研究, 以拓展家蚕的应用领域, 提高养蚕业的经济效益.

利用重组杆状病毒在家蚕中表达外源基因已是一种非常成熟的技术, 具有表达水平高、表达产物天然性好等优点^[8], 但该系统是一种瞬时表达系统, 家蚕因重组病毒的感染而死亡, 外源基因不能连续传代表达. 因此, 人们希望通过将外源基因导入家蚕基因组实现外源基因的稳定、持续表达.

目前, 主要通过转座子介导^[9]和体内同源重组^[20-21]二种策略将外源基因导入家蚕基因组. *piggyBac* 属 II 类可移动元件^[2], 由 *piggyBac* 转座子介导的家蚕转基因已有较多的研究报道^[2-5]. 在转座酶的存在下, *piggyBac* 转座子通过剪贴的方式, 将外源基因整合进基因组, 尽管转座偏爱发生在基因组的 TTAA 位点, 但外源基因整合在基因组的位置仍具有不确定性. 通过体内同源重组可以将外源 DNA 精确导入基因组, 尽管已有通过体内同源重组获得基因打靶家蚕的报道^[6-9], 但总体来看, 该技术在家蚕中的运用仍不成熟. pIZT-V5-His 是一种非转座子、非基因打靶昆虫细胞转化载体, 该载体利用黄山毒蛾核型多角体病毒 (*Orgyia pseudotsugata* nucleopolyhedrovirus, OpNPV) *ie-1* 启动子和 *ie-2* 启动子分别控制融合报告基因 *zeo-gfp* 和外源基因, 重组载体转染昆虫细胞后, 通过博来霉素 (zeocin) 抗性标记筛选可获得持续表达外源基因的转化细胞. 本研究利用精子介导法将带有 hIL-28A 基因的 pIZT-V5-His 重组载体导入家蚕卵, 通过绿色荧光筛选并结合 PCR、DNA 杂交等分子鉴定, 证实成功获得了转基因家蚕, 表明 pIZT-V5-His 载体也可以用于家蚕的转基因研究. pIZT-V5-His 可以随机插入宿主基因组, 将

pIZT-V5-His 质粒转染 BmN 细胞后, 用 zeocin 连续筛选 1 个月, 荧光细胞的比例达到 70%~80%, 继续筛选 1 个月转化细胞中荧光细胞的比例基本保持不变, 且不同的转化细胞的荧光强度存在明显差异, 推测 *gfp* 表达元件在不同细胞中的拷贝数不同或由于整合在细胞基因组的位置不同从而表达水平不同^[10-11, 14], 但迄今为止, 对于载体 pIZT/V5-His 插入方式及特点仍不明了, 从已有的研究结果推测, 用 pIZT/V5-His 类载体介导进行家蚕转基因时, 有可能存在将不完整的基因表达元件插入基因组的现象, 外源基因表达盒可以多拷贝整合进家蚕基因组, 或是插入到基因组的不同区域. 通过对大量外源 DNA 插入区域的基因序列分析, 有可能会获得家蚕新的增强子或者沉默子.

在 pIZT/V5-His-hIL-28A 载体中, *zeo-gfp* 融合基因由 OpNPV 的 *ie-1* 启动子控制, 由 pIZT/V5-His-hIL-28A 介导获得的转基因家蚕表现出明显的绿色荧光, 表明 OpNPV 的 *ie-1* 启动子在家蚕体内也具有启动子活性; hIL-28A 基因由 OpNPV 的 *ie-2* 启动子控制, Western blotting 检测结果显示, hIL-28A 能在转基因家蚕中表达, 同样表明 OpNPV 的 *ie-2* 启动子在家蚕体内也具有活性. 说明利用该类非转座子载体介导的转基因可以研究外源启动子在家蚕中的活性. ELISA 检测结果显示, hIL-28A 在 G3 代每克转基因蚕、后部丝腺、脂肪组织冻干粉中的含量分别为 0.198、0.320 和 0.238 ng, 推测 OpNPV 的 *ie-2* 启动子在家蚕不同组织中的活性存在差异.

总体而言, 本研究中 hIL-28A 在转基因家蚕中的表达水平很低, 推测与 OpNPV 的 *ie-2* 启动子活性、外源基因插入基因组的位置等多种因素有关. 与杆状病毒表达系统相比, 本研究中 hIL-28A 在转基因家蚕中的表达水平远远低于重组杆状病毒介导的表达水平^[15]. 除上述原因外, 我们推测可能也与转基因家蚕中外源基因在基因组中的拷贝数远远低于重组病毒感染细胞中外源基因的拷贝数有关. 从转基因家蚕外源基因的表达策略来看, 目前多数学者均采用丝蛋白基因与外源基因的融合实现外源基因在家蚕丝腺组织分泌表达^[2, 4, 23-25], 但这一策略有可能导致表达产物的生物学活性不高^[4, 25], 转基因家蚕整体表达外源基因有其自身特色, 但表达水平相对较低, 因此要使转基因家蚕生物反应器真正进入实用性阶段, 提高转基因家蚕整体表达外源基因

的水平仍是一个亟待解决的关键问题,也是我们下一步研究的重点。

Western blotting 分析结果显示,在转基因家蚕中表达的重组 hIL-28A 为 25 ku,比理论分子质量(22 ku)稍大,与在哺乳类细胞中表达的分子质量(25 ku)相近^[26],因此,推测重组 hIL-28A 在转基因家蚕表达中进行了加工修饰。

外源基因能在转基因家蚕中稳定遗传和持续表达是利用转基因家蚕表达外源基因的优势,本研究中,从 G0 至 G3 代,均可观察到荧光蚕,并且可从分子水平检测到 *gfp* 和 *hIL-28A* 基因,但通过 pIZT-V5-His 介导整合进家蚕基因组的外源基因到底能否持续稳定遗传还有待于更多的传代观察。

参 考 文 献

- [1] Tamura T, Thibert C, Royer C, *et al.* Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L using a piggybac transposon derived vector. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**(1): 81-84
- [2] Ogawa S, Tomita M, Shimizu K, *et al.* Generation of a transgenic silkworm that secretes recombinant proteins in the sericin layer of cocoon: Production of recombinant human serum albumin. *Biotechnol*, 2007, **128**(3): 531-544
- [3] 曹广力,薛仁宇,何泽,等.基于 *piggybac* 转座子转 hGM-CSF 基因家蚕的研究. *蚕业科学*, 2006, **32**(3): 324-327
Cao G L, Xue R Y, He Z, *et al.* *Acta Sericologica Sin*, 2006, **32**(3): 324-327
- [4] Hino R, Tomita M, Yoshizato K, *et al.* The generation of germline transgenic silkworms for the production of biologically active recombinant fusion proteins of fibroin and human basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*, 2006, **27**(33): 5715-5724
- [5] Zhao Y, Li X, Cao G L, *et al.* Expression of *hIGF- I* in the silk glands of transgenic silkworms and in transformed silkworm cells. *Sci China Ser C: Life Sci*, 2009, **52**(12): 1131-1139
- [6] 张峰,赵响,陆长德,等.能发荧光的转基因蚕. *生物化学与生物物理学报*, 1999, **31**(2): 119-123
Zhang F, Zhao Y, Lu C D, *et al.* *Acta Biochim Biophys Sin*, 1999, **31**(2): 119-123
- [7] Yamao M, Katayama N, Nakazawa H, *et al.* Gene targeting in the silkworm by use of a baculovirus. *Commun Res*, 1999, **13**: 511-516
- [8] 赵响,陈秀,彭卫平,等.利用同源重组改变家蚕丝心蛋白重链基因. *生物化学与生物物理学报*, 2001, **33**(1): 112-116
Zhao Y, Chen X, Peng W P, *et al.* *Acta Biochim Biophys Sin*, 2001, **33**(1): 112-116
- [9] Wu X F, Cao C P. Targeting of human an aFGF gene into silkworm *Bombyx mori* L. through homologous recombination. *Zhejiang Univ Sci*, 2004, **5**(6): 644-650
- [10] 李曦,赵越,周文林,等.稳定转化家蚕 BmN 细胞表达人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子. *蚕业科学*, 2009, **35**(2): 302-307
Li X, Zhao Y, Zhou W L, *et al.* *Acta Sericologica Sin*, 2009, **35**(2): 302-307
- [11] 陈慧梅,曹广力,薛仁宇,等.非转座子载体介导的稳定转化家蚕 BmN 细胞表达人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子. *生物工程学报*, 2010, **26**(6): 830-836
Chen H M, Cao G L, Xue R Y, *et al.* *Chin J Biotech*, 2010, **26**(6): 830-836
- [12] Kotenko S V, Gallagber G, Baurin W, *et al.* IFN- λ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immun*, 2003, **4**(1): 69-77
- [13] Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, *et al.* IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immun*, 2003, **4**(1): 63-68
- [14] 陆叶,郑晓坚,薛仁宇,等.构建稳定转化 BmN 细胞表达人的 *hIL-28A* 及其表达产物的体外抗肿瘤活性. *蚕业科学*, 2010, **36**(3): 0452-0457
Lu Y, Zheng X J, Xue R Y, *et al.* *Acta Sericologica Sin*, 2010, **36**(3): 0452-0457
- [15] 陆叶,张孝林,郑晓坚,等. *IL-28A* 在家蚕 BmN 细胞及蛹中的表达. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2010, **30**(1): 244
Lu Y, Zhang X L, Zheng X J, *et al.* *Chin J Micro Immun*, 2010, **30**(1): 244
- [16] 郭秀洋,周泽扬,冯丽春,等.利用精子介导向蚕卵导入外源基因的研究. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28**(3): 423-425
Guo X Y, Zhou Z Y, Feng L C, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28**(3): 423-425
- [17] Xue R Y, Li X, Zhao Y, *et al.* Elementary research into the transformation BmN cells mediated by the *piggyBac* transposon vector. *Biotechnol*, 2009, **144**(4): 272-278
- [18] Ailor E, Betenbaugh M J. Modifying secretion and post-translation processing in insect cells. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, **10**(2): 142-145
- [19] Rubin G M, Spradling A C. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science*, 1982, **218** (4570): 348-353
- [20] Thomas K R, Capecchi M R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cell. *Cell*, 1987, **51** (3): 503-512
- [21] Koller B H, Smithies O. Inactivating the beta2-microglobulin locus in mouse embryo-derived stem cells by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**(22): 8932-8935
- [22] Horn C, Wimmer E A. A versatile vector set for animal transgenesis. *Dev Genes Evol*, 2000, **210**(12): 630-637
- [23] Tomita M, Munetsuna H, Sato T, *et al.* Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**(1): 52-56
- [24] Takahiro A, Tomita M, Shimizu K, *et al.* Generation of hybrid transgenic silkworms that express *Bombyx mori* prolyl-hydroxylase α -subunits and human collagens in posterior silk glands: production of cocoons that contained collagens with hydroxylated proline residues. *Biotech*, 2006, **126**(2): 205-219
- [25] Kurihara H, Sezutsu H, Tamura T, *et al.* Production of an active feline interferon in the cocoon of transgenic silkworms using the

fibroin H-chain expression system. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **355**(4): 976-980
[26] Li M C, Wang H Y, Wang H Y. Liposome-mediated *IL-28* and

IL-29 expression in A549 cells and antiviral effect of *IL-28* and *IL-29* on WISH cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2006, **27**(4): 453-459

Expression of *hIL-28A* in Transgenic Silkworm Mediated by Non-transposon Vector*

CUI Lin-Lin^{1)**}, XUE Ren-Yu^{1)**}, LU Ye²⁾, CAO Guang-Li¹⁾, GONG Cheng-Liang^{1)***}

¹⁾ College of Pre-clinical Medical and Biological Science, Soochow University, Suzhou 215123, China;

²⁾ Pharmaceutical College, Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract To explore the possibility of foreign gene expression in transgenic silkworm mediated by non-transposon vector, a *hIL-28A* gene was inserted into the insect cells expression vector pIZT-V5-His to generate recombinant vector pIZT/V5-His-hIL-28A, the vector was transferred into silkworm eggs by sperm mediated gene transfer, screening for *gfp* gene and verified by PCR and Dot blot hybridization. Transgenic silkworms were obtained after a specific band with the molecular mass of 25 ku could be detected in transgenic silkworm by Western blotting using an goat anti-hIL-28A antibody, and the content of hIL-28A in the G3 generation transgenic silkworms estimated by ELISA was approximately 0.198, 0.32, 0.238 ng/g in freeze-dried whole bodies, posterior silk glands and fat bodies, respectively. These results suggested that a heterologous gene could be integrated into silkworm genome by non-transposon vector and expressed successfully.

Key words non-transposon vector, transgenic silkworm, *hIL-28A*, expression

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00690

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31072085), National Basic Research Program of China (2005CB121005) and Key Fostering Project for the Application of Research of Soochow University(Q3134991).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-512-65880183, E-mail: gongcl@suda.edu.cn

Received: February 16, 2011 Accepted: March 14, 2011