

БИОТЕХНОЛОГИИ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА КАК БАЗИС БИОИНДУСТРИАЛЬНОЙ ПЛАТФОРМЫ. УЛУЧШЕНИЯ НА ЭТАПЕ ВОСХОДЯЩЕГО ПРОЦЕССА (USP)

✉ Юматов Е.Н.¹, Евлагина Е.Г.¹, Деев И.Е.², Евлагин В.Г.¹, Лейнвебер Е.Ф.¹

¹Научно-исследовательская станция шелководства –
филиал Северо-Кавказского федерального научного аграрного центра
Ставропольский край, г. Железноводск, Россия

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук
Москва, Россия

✉ e-mail: trast1207@mail.ru

Молекулярная инженерия – это метод инженерии «снизу вверх» для создания функциональных материалов и устройств с использованием молекул и атомов в качестве строительных блоков. В 2000 г. Япония стала первой страной в мире, которая генетически модифицировала тутового шелкопряда (*Bombyx mori*, далее *B. mori*). Последующее за этим развитие исследований в области разработки новых материалов расширили возможности использования продукции шелководства, характеризуя эту ситуацию как «революция в шелководстве». В Российской Федерации молекулярная инженерия в науках о жизни направлена на решение задач по разработке технологических платформ мирового уровня с целью создания инструментов для получения новых молекул (биополимеров, белков, ферментов), биопродуктов, клеток и организмов. Изучены основные подходы «снизу вверх», применяемые на этапе восходящего процесса (USP) в шелководстве для улучшения производственно-экономических показателей и качественных характеристик сырья. Разнообразие способов улучшения включает: использование искусственной питательной среды; молекулярную инженерию, основанную на методах транзientной экспрессии или стабильной трансформации зародышевой линии; генетические методы селекции; управление размножением и др. Преимущества тутового шелкопряда (*B. mori*): низкая стоимость разведения, значительно более высокий выход продукции по сравнению с другими системами экспрессии белка – способствуют его использованию в качестве эффективного продуцента рекомбинантных белков, антимикробных пептидов и биологически активных веществ. Биотехнологии этапа USP позволяют получать новые виды сырья для последующего преобразования в нисходящем процессе (DSP) для получения широкого спектра продуктов, способствующих улучшению качества жизни людей. Комплекс биотехнологических решений составляет современный базис биоиндустриальной платформы тутового шелкопряда.

Ключевые слова: тутовый шелкопряд, искусственная питательная среда, молекулярная инженерия, рекомбинантные белки, антимикробные пептиды

MULBERRY SILKWORM BIOTECHNOLOGY AS THE BASIS OF A BIOINDUSTRIAL PLATFORM. IMPROVEMENTS ON THE UPSTREAM PROCESSING STAGE (USP)

✉ Yumatov E.N.¹, Evlagina E.G.¹, Deyev I.E.², Evlagin V.G.¹, Leinweber E.F.¹

¹Scientific and Research Station of Silkworm Breeding –
Branch of the North Caucasian Federal Scientific Agrarian Center
Zheleznovodsk, Stavropol Territory, Russia

²Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences
Moscow, Russia

✉ e-mail: trast1207@mail.ru

Molecular engineering is an upstream engineering method for creating functional materials and devices using molecules, and atoms as building blocks. In 2000, Japan became the first country to genetically modify silkworms (*Bombyx mori*, hereinafter referred to as *B. mori*). The subsequent research in the development of new materials expanded the possibilities of using sericulture products,

characterizing this situation as a "sericulture revolution". In the Russian Federation, molecular engineering in life sciences is aimed at solving the tasks of developing world-class technological platforms to create tools to produce new molecules (biopolymers, proteins, enzymes), bioproducts, cells and organisms. The main "bottom-up" approaches applied in the upstream process (USP) stage of silk production to improve the production and economic performance and quality characteristics of raw materials have been studied. The variety of improvement methods includes: the possibility of using artificial nutrient medium, molecular engineering based on transient expression techniques or stable germline transformation, genetic selection methods, breeding management, etc. The advantages of the mulberry silkworm (*B. mori*) such as low breeding costs, significantly higher production yield compared to other protein expression systems, favor its use as an effective producer of recombinant proteins, antimicrobial peptides and biologically active substances. USP stage biotechnologies enable the production of new raw materials for downstream processing (DSP) to produce a wide range of products that contribute to improving the quality of human life. A set of biotechnological solutions forms the modern basis of the mulberry silkworm bioindustrial platform.

Keywords: mulberry silkworm, artificial nutrient medium, molecular engineering, recombinant proteins, antimicrobial peptides

Для цитирования: Юматов Е.Н., Евлагина Е.Г., Деев И.Е., Евлагин В.Г., Лейнвебер Е.Ф. Биотехнологии тутового шелкопряда как базис биоиндустриальной платформы. Улучшения на этапе восходящего процесса (USP) // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2023. Т. 53. № 11. С. 71–85. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2023-11-8>

For citation: Yumatov E.N., Evlagina E.G., Deyev I.E., Evlagin V.G., Leinweber E.F. Mulberry silkworm biotechnology as the basis of a bioindustrial platform. Improvements on the upstream processing stage (USP). *Sibirskii vestnik sel'skokhozyaistvennoi nauki* = *Siberian Herald of Agricultural Science*, 2023, vol. 53, no. 11, pp. 71–85. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2023-11-8>

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Благодарность

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00247, <https://rscf.ru/project/23-26-00247/>.

Acknowledgments

The research was carried out at the expense of the grant from the Russian Science Foundation № 23-26-00247, <https://rscf.ru/project/23-26-00247/>.

ВВЕДЕНИЕ

Будучи единственным полностью одомашненным видом беспозвоночных, *B. mori* потенциально помогает понять сходство и различие многочисленных процессов, в том числе одомашнивания у позвоночных и растений. Одомашнивание тутового шелкопряда повлияло на различные характеристики, например, на массу оболочки кокона: у *B. mori* – 0,5 г, что в 10 раз больше, чем у *B. mandarina* (дикий тутовый шелкопряд) – 0,04–0,07 г¹[1].

В 2004 г. было представлено сообщение о предварительной последовательности генома одомашненного тутового шелкопряда².

Анализ проекта генома тутового шелкопряда впервые систематически продемонстрировал ключевые гены хозяйственных признаков, роста и развития, регуляции пола и устойчивости к болезням тутового шелкопряда. Международная исследовательская группа тутового шелкопряда, возглавляемая Юго-Западным университетом (Государственная ключевая лаборатория биологии генома тутового шелкопряда, Чунцинский центр технологий инженерии новых материалов из шелкового волокна, Чунцин 400716), завершила точную карту генома в 2008 г.³ и карту генетической информации изменчивости 40 геномов шел-

¹Ômura S. Research on the behavior and ecological characteristics of the wild silkworm, *Bombyx mandarina* // Bull. Seric. Exp. Sta. Jpn. 1950. Vol. 13. P. 7–130.

²Xia Q. et al. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*) // Science. 2004. DOI: 10.1126/science.1102210.

³International Silkworm Genome Consortium et al. The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori* // Insect biochemistry and molecular biology. 2008. Vol. 38. N 12. C. 1036–1045. DOI: 10.1016/j.ibmb.2008.11.004.

копряда в 2009 г.⁴ в рамках транснационального сотрудничества соответственно, реализовав «Трехэтапный проект генома тутового шелкопряда».

Трансгенная технология широко использовалась в фундаментальных теоретических исследованиях тутового шелкопряда и в создании промышленных материалов, особенно в улучшении производства и качества шелка, улучшении антивирусных генетических характеристик, а также в исследованиях и разработках биореакторов, которые ускорили внедрение генетически модифицированных материалов [2].

Дизайн материалов «снизу вверх» открывает большие возможности для создания предсказуемых функциональных результатов. Технология рекомбинантной ДНК обеспечивает систематический подход к повторению, изменению и оценке пептидных комбинаций сердцевинной структуры шелка, а затем к биосинтезу полимеров на основе шелка по заданному дизайну. Обработка после биосинтеза позволяет использовать другое измерение дизайна материала путем контролируемой или вспомогательной сборки. Интеграция биосинтеза, обработки, многомасштабного моделирования и экспериментальной проверки обеспечивает путь к созданию *de novo* материалов на основе шелка с индивидуальными свойствами [3].

Цель исследования – систематизация актуальной информации по совокупности улучшений, применяемых на этапе восходящего процесса (Upstream Processing – USP), для получения новых вариантов сырья и продуктов шелководства.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Производными продуктами *B. mori* (личинки (гусеницы), оболочек кокона, куколок) являются антимикробные пептиды (AMP); хитин и хитозан; различные варианты шелка: с улучшенными характеристиками (комбинация надежных механических свойств и высокой биосовместимости), рекомбинантный

шелк (рекомбинантный спидроин), искусственный сверхпрочный шелк (превосходящий натуральный паучий шелк). Сам тутовый шелкопряд служит платформой для быстрого и экономически эффективного процесса получения рекомбинантных белков, в том числе моноклональных антител и вакцин. Эти продукты найдут широкое применение в России в качестве функционального биоматериала для доставки лекарств и генов, доставки лекарств при химиотерапии, как средства лечения и заживления ран, в качестве материала в тканевой инженерии, гибкой электронике, биочернилах для 3D-биопечати, в косметике и нутрициологии, создании катализаторов и др.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Способы улучшения

Базисное улучшение – искусственная питательная среда

Развитие биотехнологий *B. mori* в настоящее время невозможно без использования искусственной питательной среды (ИПС или искусственной диеты), позволяющей нивелировать фактор сезонности при выращивании тутового шелкопряда с использованием листьев шелковицы. Для стран с умеренным климатом, к которым относится и Российская Федерация (РФ), данное улучшение критически важно, так как традиционный способ выкармливания позволяет осуществлять только 2-кратную выкармливание шелкопряда в летне-осенний период. Плотность выращивания шелкопряда на ИПС практически в 2–3 раза больше, чем при выращивании на листе шелковицы, что значительным образом сокращает общую требуемую производственную площадь для выращивания. Существенное снижение трудозатрат на выращивание кардинальным образом улучшает показатели производственного процесса, дальнейшее увеличение масштабов производства позволяет достигнуть эффекта экономии масштаба. В научной сфере ИПС позволяет интенсифицировать проведение исследовательских работ с последующим выходом на коммерциализацию их результатов.

⁴Xia Q., Guo Y., Zhang Z., Li D., Xuan Z., Li Z., Wang J. Complete resequencing of 40 genomes reveals domestication events and genes in silkworm (*Bombyx*) // Science. 2009. Vol. 326. N 5951. C. 433–436. DOI: 10.1126/science.1176620.

В 2023 г. Научно-исследовательская станция шелководства ведет работу по разработке собственного состава искусственного рациона, который включает в себя порошок из листа шелковицы, а также другие компоненты из растительного сырья. Идентификацию восприимчивости к искусственному рациону проводили на более 40 породах девяти географических групп живой коллекции Станции шелководства отечественной и зарубежной коллекции. Тестовые выкормки гусениц, первоначально планируемые в качестве скрининга на восприимчивость к ИПС пород шелкопряда и для последующей работы с отобранными породами, показали, что у большинства пород наблюдается ярко выраженный отклик на данный вариант питательной среды. Высокие показатели жизнеспособности при выращивании на ИПС показали 60% пород биоколлекции.

Решение одной из базовых ключевых задач по разработке и созданию рабочей ИПС, позволяющей уже на данном этапе круглогодично проводить научно-исследовательскую работу с тутовым шелкопрядом, а при последующей оптимизации процесса выращивания и масштабировать данный процесс, существенным образом сокращает разрыв РФ с ведущими странами в сфере биотехнологий тутового шелкопряда: Японией, Китаем и США.

Молекулярная инженерия. Трансгенез *B. mori* Транзиентная (вирусная) экспрессия

Одомашненный шелкопряд *B. mori* представляет собой модель насекомых, имеющую большое научное и экономическое значение. Помимо установления стабильной трансформации зародышевой линии с использованием вектора PiggyBac, были разработаны технически осуществимые способы доставки генов *in vivo* и транзитной экспрессии генов с использованием векторов на основе

вирусов, особенно вирусов Синдбис и бакуловирусов. Рекомбинантный бакуловирус, множественный нуклеополиэдровирус *Autographa californica* (AcMNPV), обычно используемый для крупномасштабной продукции белка в пермиссивных клеточных линиях или насекомых, использовался для переноса чужеродного гена в специфические пептидергические клетки *B. mori in vivo*⁵. Но недостатком применения *in vivo* AcMNPV являются его патогенные эффекты для тутового шелкопряда. Личинки или куколки чувствительных штаммов обычно погибают через 1–2 нед после инъекции AcMNPV. Эти изменения в развитии личинок были предотвращены путем разрушения не-существенного раннего гена, кодирующего ETG^{6, 7}. Поскольку направленная экспрессия генов необходима для функционального анализа генов нейропептидов и их рецепторов, бакуловирус-опосредованный перенос генов может служить надежным подходом в обратных генетических исследованиях тутового шелкопряда. Методы переноса генов и другие методы обратной генетики предоставляют мощные инструменты для функционального анализа генов и их продуктов, а также для выяснения молекулярных механизмов, лежащих в основе широкого спектра биологических процессов. Успешный трансгенез дополнительного вида насекомых, *B. mori* открывает новые перспективы в фундаментальных и прикладных исследованиях. Одним из перспективных подходов к изучению функций генов является транзиентная экспрессия чужеродных генов с использованием вирусных векторов. В этих случаях соматической трансформации трансгены не интегрируются стабильно в геном хозяина и успешный перенос гена зависит от способности вируса инфицировать ткани-мишени пермиссивного хозяина. Простая инъекция вирусной кон-

⁵Daubnerová I., Roller L., Žitňan D. Transgenesis approaches for functional analysis of peptidergic cells in the silkworm *Bombyx mori* // General and comparative endocrinology. 2009. Vol. 162. N 1. P. 36–42. DOI: 10.1016/j.ygcen.2008.11.028.

⁶Shikata M., Shibata H., Sakurai M., Sano Y., Hashimoto Y., Matsumoto T. The ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus alters the moulting and metamorphosis of a non-target insect, the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae) // Journal of general virology. 1998. Vol. 79. N 6. P. 1547–1551. DOI: 10.1099/0022-1317-79-6-1547.

⁷Guo T.Q., Wang J.Y., Guo X.Y., Wang S.P., Lu C.D. Transient *in vivo* gene delivery to the silkworm *Bombyx mori* by EGT-null recombinant AcNPV using EGFP as a reporter // Archives of virology. 2005. Vol. 150. P. 93–105. DOI: 10.1007/s00705-004-0383-y.

струкции хозяину на любой стадии развития дает прекрасные возможности для введения различных генов или молекулярных маркеров в клетки-мишени или ткани и изучения функциональных результатов их экспрессии. Таким образом, вирусные системы являются относительно простыми и эффективными инструментами для репортерных анализов или физиологических и поведенческих анализов (см. сноску 5).

Альфовирус Синдбис (SINV) в настоящее время используется в качестве высокоэффективного трансдуцирующего агента в биологии насекомых. Однако опосредованная вирусом Синдбис экспрессия эктопических генов/молчание РНК может быть ограничена ограниченным тканевым тропизмом вирусной инфекции. Например, некоторые органы *B. mori*, такие как гонады, мальпигиевы каналы и личиночный эпидермис, устойчивы к инфекции SINV⁸. К недостаткам векторов на основе SINV также относится нестабильность рекомбинантных клонов после многократных пассажей в культивируемых клетках⁹. Наконец, вирус инфицирует клетки млекопитающих, и, таким образом, инфекция SINV может быть опасной для человека.

Первое успешное введение гена в *B. mori* было выполнено с помощью рекомбинантного BmSNPV-опосредованного *in vivo*, экспрессия генов (BmSNPV – вирус ядерного полиэдрома *B. mori*) хориона контролируется их собственными регуляторными элементами. Заражение куколок тутового шелкопряда рекомбинантным вирусом вызывало транзентную и тканеспецифическую экспрессию хориона¹⁰. I. Daubnerová et al. (2009) исполь-

зовали удобную бакуловирусную экспрессионную систему Bac-to-Bac® (Invitrogen) для введения генов и транзентных генетических манипуляций с перmissive штаммами тутового шелкопряда, чтобы прояснить вопросы, касающиеся передачи сигналов нейрорепептидов, необходимых для нормального развития и поведения (см. сноску 5).

Личинки *B. mori* десятилетиями использовались в качестве биореактора для производства рекомбинантных белков. S. Maeda et al. в 1985 г. впервые сообщили о продукции интерферона альфа человека (IFN- α) в гемолимфе личинок тутового шелкопряда с использованием BmNPV (нуклеополиэдровирус *Bombyx mori*), содержащего ген, кодирующий альфа-интерферон человека, управляемый полиэдриновым промотором¹¹. Многие белки эукариот были экспрессированы в личинках *B. mori* и очищены. В целом уровень экспрессии рекомбинантных белков в личинках тутового шелкопряда выше, чем в культурах клеток насекомых и животных.

Бакмидная система BmNPV, сконструированная Motohashi et al. (2005)¹², требует только инъекции ДНК бакмиды BmNPV в личинки и куколки тутового шелкопряда, что обеспечивает быструю экспрессию рекомбинантных белков, поскольку исключает приготовление бакуловирусного раствора путем трансфекции по сравнению с бакуловирусной системой экспрессии с использованием культивируемых клеток. Кроме того, эта бакмидная система BmNPV резко сократила время, необходимое для продукции рекомбинантного белка путем экспрессии в тутовом шелкопряде. Для улучшения экспрессии бел-

⁸Uhlirova M., Foy B.D., Beaty B.J., Olson K.E., Riddiford L.M., Jindra M. Use of Sindbis virus-mediated RNA interference to demonstrate a conserved role of Broad-Complex in insect metamorphosis // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003. Vol. 100. N 26. C. 15607–15612. DOI: 10.1073/pnas.2136837100.

⁹Foy B.D., Myles K.M., Pierro D.J., Sanchez-Vargas I., Uhliřová M., Jindra M., Olson K.E. Development of a new Sindbis virus transducing system and its characterization in three Culicine mosquitoes and two Lepidopteran species // Insect molecular biology. 2004. Vol. 13. N 1. C. 89–100. DOI: 10.1111/j.1365-2583.2004.00464.x.

¹⁰Iatrou K., Meidinger R.G. Tissue-specific expression of silkworm chorion genes *in vivo* using *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus as a transducing vector // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1990. T. 87. N 10. C. 3650–3654. DOI: 10.1073/pnas.87.10.3650.

¹¹Maeda S., Kawai T., Obinata M., Fujiwara H., Horiuchi T., Saeki, Y., Furusawa M. Production of human α -interferon in silkworm using a baculovirus vector // Nature. 1985. Vol. 315. N 6020. C. 592–594.

¹²Motohashi T., Shimojima T., Fukagawa T., Maenaka K., Park E.Y. Efficient large-scale protein production of larvae and pupae of silkworm by *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus bacmid system // Biochemical and biophysical research communications. 2005. Vol. 326. N 3. C. 564–569. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.11.060.

ка были сконструированы модифицированные бакмиды BmNPV: BmNPV-CP бакмида, бакмида гибридного нуклеополиэдровируса (HyNPV)¹³.

Среди доступных систем экспрессии отмечены: система экспрессии *Escherichia coli* (*E. coli*), эукариотические клетки, включая клетки млекопитающих (т.е. человека 293, СНО хомяка и т.д.) и дрожжей (т.е. *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* и т.д.); бакуловирусная векторная система экспрессии (BEVS), имеющая много преимуществ для экспрессии этих белков, включая высокий уровень экспрессии с помощью сильных промоторов (полиэдрин и P10); посттрансляционные модификации, подобные тем, которые генерируются в системах экспрессии на основе клеток млекопитающих, и более низкая стоимость в сравнении с ними.

Система экспрессии *B. mori* представляет собой BEVS, в котором шелкопряд вместо клеточных линий используется в качестве биореактора для производства рекомбинантных белков. Однако конструирование, амплификация и очистка рекомбинантного вируса BmNPV с использованием клеточной линии тутового шелкопряда требуют много времени и специальных методов, а также системы AcNPV (нуклеополиэдровирус *Autographa californica*, гибридный вирус AcMNPV). В качестве решения этой проблемы доступна технология трансгенного шелкопряда без обработки вирусом для стабильной экспрессии рекомбинантных белков¹⁴.

А. Usami et al. (2011), используя гибридную бакуловирусную систему, сравнили экспрессию 45 рекомбинантных белков из шести категорий, используя две модели: тутовый шелкопряд (личинки и куколки) и клеточную линию Sf9. Всего было успешно экспрессировано 45 белков; получение гибридного ба-

куловируса оказалось неудачным для одного белка, два белка не экспрессировались. Сходный паттерн экспрессии наблюдался как в клетках тутового шелкопряда, так и в клетках Sf9, с двойными и множественными полосами, обнаруженными при иммуноблоттинге преципитата обоих хозяев. Деградированные белки были обнаружены только в системе тутового шелкопряда (особенно у личинок). Получение личинок (гусениц) тутового шелкопряда являлось более эффективным, один шелкопряд продуцировал примерно в 70 раз больше белка, чем 106 клеток Sf9 в 2 мл питательной среды¹⁵.

Развитие и совершенствование систем экспрессии на основе бакуловируса продолжается в настоящее время. Так, Н. Yagi et al. (2020) представили данные по развитию ранее разработанного метода изотопной маркировки гликопротеинов для исследований ядерного магнитного резонанса (NMR) использованием личинок тутового шелкопряда, выращенных на искусственной диете [4]. J. Wei et al. (2022) представили результаты создания новой системы экспрессии бакуловирус – тутовый шелкопряд, в которой была предложена инокуляции очищенных окклюзионных тел непосредственным распылением их на листья тутового дерева, с целью крупномасштабного промышленного производства [5].

Стабильная трансформация зародышевой линии (трансгенез)

Вектор на основе транспозона PiggyBac был успешно использован для трансформации *B. mori*. Трансген стабильно передавался следующему поколению посредством нормального менделевского наследования¹⁶. Популярным методом получения трансгенного тутового шелкопряда является инъекция, полученная из PiggyBac-транспозона плазмиды с конструкцией-мишенью в яйца шелкопря-

¹³Kato T., Kajikawa M., Maenaka K., Park E.Y. Silkworm expression system as a platform technology in life science //Applied microbiology and biotechnology. 2010. Vol. 85. P. 459–470. DOI: 10.1007 / s00253-009-2267-2.

¹⁴Kajikawa M. Silkworm Baculovirus expression system for molecular medicine //Journal of Biotechnology & Biomaterials. 2012. Vol. 9. N 01. P. 1. DOI: 10.4172/2155-952X.S9-005.

¹⁵Usami A., Ishiyama S., Enomoto C., Okazaki H., Higuchi K., Ikeda M., Nagaya H. Comparison of recombinant protein expression in a baculovirus system in insect cells (Sf9) and silkworm // The journal of biochemistry. 2011. Vol. 149. N 2. P. 219–227. DOI: 10.1093/jb/mvq138.

¹⁶Tamura T., Thibert C., Royer C., Kanda T., Eappen A., Kamba M., Couble P. Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a PiggyBac transposon-derived vector // Nature biotechnology. 2000. Vol. 18. N 1. P. 81–84. DOI: 10.1038/71978.

да. У трансгенного тутового шелкопряда несколько рекомбинантных белков экспрессируются в шелковой железе и продуцируются в коконах на уровне от одного до нескольких сотен миллиграмм/микрограмм массы кокона. Технология трансгенного шелкопряда может быть использована для модификации штаммов-хозяев для бакуловирусной системы экспрессии. Существует два различных метода использования трансгенного тутового шелкопряда. Одним из них является экспрессия полезных генов для производства рекомбинантных белков, таких как молекулярные шапероны и ферменты, модифицирующие белок, независимо от их происхождения. Другой способ – подавление или нокаутирование вредных генов с помощью РНК-интерференции или нацеливания на гены (см. сноску 13).

Тутовый шелкопряд обладает способностью синтезировать большое количество белков шелка в своей шелковой железе. Механизм синтеза белков шелка широко изучен на молекулярном уровне^{17, 18}. Шелк состоит из двух белков, называемых фиброином и серицином. Фиброин является основным компонентом шелковых волокон, серицин представляет собой своего рода клейкий белок, покрывающий поверхность волокон. Фиброин составляет около 75% всех белков шелка и вырабатывается в задней шелковой железе (PSG). Остальные 25% составляют серицин, который синтезируется в средней шелковой железе (MSG). Фиброин содержит три разных белка, называемых тяжелой (H) и легкой (L) цепями фиброина, а также фиброгексамарин (FHX), которые производятся в молярном соотношении 6 : 6 : 1 соответственно¹⁹. Характер шелка как волокна определяется крупной H-цепью фиброина, молекулярная масса которой составляет 350–400 кДа. L-цепь фиброина и FHX представляют со-

бой небольшие белки с молекулярной массой около 25 кДа.

Система для получения рекомбинантных белков у трансгенного тутового шелкопряда использует систему синтеза шелка в шелковой железе и гены шелка, которые сильно экспрессируются в шелковой железе. До сих пор для производства PSG использовались системы продукции, использующие L- и H-цепи фиброина и гены FHX. В MSG были разработаны две разные системы, использующие ген серицина 1. Каждый из них имеет преимущества и недостатки в зависимости от цели производства белка. Для надлежащего использования трансгенных тутовых шелкопрядов требуется тщательный выбор производственной системы продукции рекомбинантного белка. Системы подразделяются: система продукции рекомбинантного белка с использованием гена L-цепи фиброина, система экспрессии бинарных трансгенов GAL4/UAS, система экспрессии гена FHX, система продукции с использованием гена H-цепи фиброина, система экспрессии, включающая промотор гена серицина 1, ген BmNPV ie1 и последовательность энхансера hr3²⁰.

Трансгенных тутовых шелкопрядов можно использовать в качестве биореакторов для производства рекомбинантных белков. Их можно легко получить, используя ДНК-транспозон PiggyBac в качестве вектора путем инъекции хелперной и векторной плазмидной ДНК в яйца сразу после откладывания яиц. Системы производства рекомбинантного белка были сконструированы с использованием генов шелка, экспрессированных в шелковой железе. Система экспрессии в PSG пригодна для производства генетически модифицированного шелка. Шелк, полученный трансгенными шелкопрядами, можно использовать для производства тка-

¹⁷Mizuno S. Regulation of fibroin gene expression and secretion of fibroin in the silk gland //Seikagaku. The Journal of Japanese Biochemical Society. 1987. Vol. 59. N 12. P. 1308–1320.

¹⁸Julien E. Silk gland development and regulation of silk protein genes //Comprehensive molecular insect science. 2005. Vol. 2. P. 369–384.

¹⁹Inoue S., Tanaka K., Arisaka F., Kimura S., Ohtomo K., Mizuno S. 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 molar ratio //Journal of Biological Chemistry. 2000. Vol. 275. N 51. P. 40517–40528. DOI: 10.1074/jbc.M006897200.

²⁰Tatemastu K., Sezutsu H., Tamura T. Utilization of transgenic silkworms for recombinant protein production //J Biotechnol Biomaterial S. 2012. Vol. 9. P. 1–8. DOI: 10.4172/2155-952X.S9-004.

ней и биоматериалов для медицинских целей. Система в MSG подходит для производства рекомбинантных белков, которые можно использовать в фармацевтических целях. Последняя система может давать до 4 мг рекомбинантного белка на одного шелкопряда. Трансгенные шелкопряды обладают несколькими важными свойствами, что делает их хорошими кандидатами для использования в качестве биореактора. Шелковые железы представляют собой высокоэффективную систему для производства большого количества белков с производительностью более 500 мг белков шелка на одну личинку. Кроме того, жировое тело личинки способно синтезировать около 100 мг белка гемолимфы/личинка. Другие преимущества включают низкую стоимость выращивания тутового шелкопряда в короткое время, необходимое для получения трансгенных тутовых шелкопрядов (60 дней) [6].

К технологиям генетического манипулирования *B. mori* относятся технологии на основе транспозонов – технологии интеграции трансгенов (транспозоны ДНК-типа от насекомых и рекомбинация, специфичная для сайта); технологии экспрессии трансгенов (индуцируемая нагреванием система экспрессии); система экспрессии Gal4/вышележащих активирующих последовательностей; система экспрессии тетрациклин-включение/тетрациклин-выключение; технология сайленсинга генов на основе трансгенной РНК-интерференции; технологии ловушек генов и энхансеров. Существуют технологии редактирования генома: нуклеазы цинковых пальцев (ZFN); эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN); короткие палиндромные повторы с регулярно расположенными кластерами / CRISPR-ассоциированные 9 (CRISPR/Cas9) [7].

Y. Wang et al. (2015) успешно сконструировали MGES (мультигенная экспрессионная система), позволяющую генерировать шелк с двумя или более дополнительными ценными функциями, такими как ранозаживляющая

и антибактериальная активность, биосовместимость и способность к регенерации тканей, или высокая прочность и выносливость за счет опосредованной MGES коэкспрессии нескольких функциональных генов [8]. Z. Li et al. (2022) представили данные по созданию целевой системы экспрессии, используя целевую вставку, опосредованную активатором транскрипции, эффекторной нуклеазой (TALEN), которая позволяет продуцировать до 3,1% (масса / масса) белка EGFP в оболочке кокона. С помощью этой стратегии дополнительно экспрессировали важный с медицинской точки зрения человеческий эпидермальный фактор роста (hEGF), выход белка как в средних шелковых железах, так и в оболочке коконов достиг более чем в 15 раз более высокого уровня, чем канонический трансгенез на основе PiggyBac [9].

Ген, который необходимо внедрить в тутового шелкопряда, вводят в яйцо сразу после откладки яиц бабочкой. При инъекции он встраивается в хромосомную ДНК тутового шелкопряда. Личинки, вылупившиеся из яиц, размножаются во взрослых особей, наследственность появляется в следующем поколении после спаривания и откладки яиц, инъектированных шелкопрядов. Отобранные трансгенные шелкопряды используются для воспроизводства новых линий трансгенных животных, способных передавать наследственную информацию. Потомство рекомбинантных тутовых шелкопрядов возможно получать неограниченно. По этой причине достаточно первой инъекции в яйца (грону) шелкопряда²¹. N. Yamada et. al (2023) разработали метод инъекции генной инженерии яиц диапазирующих пород тутового шелкопряда с использованием диметилсульфоксида (DMSO). Метод прост в исполнении и надежен, что позволяет применять его к различным диапазирующим породам тутовых шелкопрядов, в том числе к гибридным комбинациям японского, китайского, европейского происхождения и мутантным бивольтинным и поливольтинным штаммам [10].

²¹Nobuo Kuwabara. Breeding of Genetically Modified Silkworms by Sericulture Farmers //Bulletin of the "SEKAITO"-Silk Powered Innovation Incubator of the Gunma Prefectural World Heritage Center / Gunma Prefectural World Heritage Center "The power of raw silk to change the world" Institute. 2022. N 2. P. 25–34. https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9306/9306_tokushu_2.pdf.

Генетические методы селекции и регуляции пола

Управление размножением *B. mori*

Используя партеногенетические клоны как материнские и скрещивая их с породами, меченными по полу, можно получить клоново-породные гибриды со 100%-й чистотой. В Узбекистане гибриды пород АПК × С-5, 9ПК × С-5, 9ПК × С-10, партеногенетических клонов и детерминированных по полу цветом яиц пород тутового шелкопряда, созданные искусственно как средство управления размножением шелкопряда, по репродуктивным показателям и жизнеспособности превышали показатели контрольных гибридов [11].

Абляция

Для генной инженерии тутового шелкопряда требуется микроинъекция генетического материала в яйца без диапаузы. Помимо того, что диапауза может быть полезна для поддержания трансгенных линий, недостатком этой технологии является то, что большинство стандартных штаммов тутового шелкопряда и представляющие интерес экспериментальные линии производят диапаузирующие яйца. N. Yamada et al. (2022) исследовали абляцию (удаление биологической структуры или функциональности, генетическая абляция – это еще один термин, обозначающий подавление экспрессии генов, при котором экспрессия генов отменяется посредством изменения или удаления информации о генетической последовательности) подпещеводного ганглия (SG) у куколок самок, который является источником гормона, необходимого для запуска диапаузы яйца как средство отмены диапаузы²². Показано, что абляция SG является надежным методом получения яйцеклеток без диапаузы. Кроме того, проблема, связанная с более низкой плодовитостью самок с абляцией SG, была решена путем инъекции пилокарпина спариваемой самке. Также исследовали пригодность яиц без диапаузы, отложенных самками с абляцией SG, для трансгенеза, направленного мутагенеза

и индукции партеногенетического развития. Результаты продемонстрировали, что SG-абляция является полезным и простым методом для расширения возможностей, связанных с генной инженерией шелкопряда [12].

Генетическая гибридизация трансгенных шелкопряда

D. Long et al. (2021) предложили стратегию, называемую «легкой одеждой», основанную на обрезке избыточных аддитивных структурных доменов, для генетической гибридизации высокоактивного функционального слияния POI с материалами на основе шелка с использованием трансгенных платформ биосинтеза на основе тутового шелкопряда. Процесс генетической гибридизации от трансформации зародышевой линии *B. mori*, генерации, обратного скрещивания, скрининга и молекулярной идентификации трансгенных тутовых шелкопряда позволил по сравнению с обычными системами экспрессии значительно повысить активность слитых POI без ущерба для процесса генетической гибридизации. Эта повышенная активность слитых POI может быть связана с удалением лишних посттрансляционных модификаций и увеличением структурного сходства с нативными POI. По сравнению с прямым включением коммерчески доступных POI в материалы на основе шелка эти генетически гибридизованные материалы на основе шелка не только обладают сопоставимой активностью POI, но также обеспечивают дополнительные преимущества, в частности в логистике и при отсутствии необходимости хранения холодовой цепи [13].

Заражение патогенами и трансгенез для получения антимикробных пептидов (AMP)

Некоторые авторы описали более 30 AMP у тутового шелкопряда, классифицированных в такие группы, как цекропины, аттацины, морицины, гловерины, лебоцины, энбоцины и дефенсины; большинство этих AMP эффективны как против грамположительных, так и против грамотрицательных бактерий, а

²²Heritage Center "The power of raw silk to change the world" Institute. 2022. N 2. P. 25–34. https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9306/9306_tokushu_2.pdf.

также против других микроорганизмов^{23, 24} [14]. АМР являются наиболее востребованными терапевтическими соединениями благодаря своим характеристикам, включающим низкую токсичность для человека и животных; высокую специфичность и улучшенную эффективность против микробов-мишеней по сравнению с обычными антибиотиками; и, самое главное, тот факт, что большинство микробов не могут выработать резистентность к АМР. М. Mastore et al. (2021) использовали *B. mori* в качестве модельного организма для проверки пригодности гемолимфы в качестве источника АМР. После простых этапов очистки плазму анализировали и тестировали на различных штаммах грамположительных и грамотрицательных бактерий. Результаты показали, что частично очищенная плазма тутового шелкопряда может быть многообещающим источником АМР, которые можно использовать в препаратах для местного применения без дополнительных и дорогостоящих стадий очистки. Кроме того, проведены предварительные тесты на возможное хранение этих молекул в неохлажденных условиях. Результаты, полученные при хранении препаратов при температуре выше комнатной (25 °C), не показали существенной потери эффективности в отношении *E. coli* [15].

Тутовых шелкопрядов заражают патогенами, чтобы изолировать АМР во время их пятого возраста, продолжительностью 6–8 дней, что дает достаточно времени для развития инфекции. АМР тутового шелкопряда представляют собой низкомолекулярные белки (< 50 аминокислотных остатков; < 10 кДа, за редким исключением), среди которых большинство из них проявляют активность широкого спектра в отношении различных микроорганизмов. Кроме того, содержание жира в организме тутового шелкопряда достигает

своего пика в этот возраст, который является основным источником АМР²⁵ [16]. После заражения иммунокомпетентные ткани лизируют в подходящем буфере для извлечения белков и подвергают различным хроматографическим методам, таким как ионообменная хроматография, гель-фильтрационная хроматография и ОФ (обращенно-фазовая) – ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) для очистки [17].

Трансгенез для получения антимикробных пептидов (АМР)

Трансгенез тутового шелкопряда был расширен за счет включения противомикробных пептидов в белки шелка. Трансгенный шелк, слитый с противомикробным средством СЕС В или MOR пептиды, ингибировал рост *E. coli*. Кроме того, и шелковая пряжа сохраняла антибактериальные свойства в отношении кишечной палочки. Шелковые волокна сохраняют активность и противомикробные молекулы MOR после процесса рафинирования [18].

Прямое введение искусственных добавок. Метод прямого кормления

Производство флуоресцентного шелка является примером использования как метода трансгенеза, так и метода прямого кормления. Шелковый фиброин, трансгенно-гибридизованный с флуоресцентными белками, может быть обработан и регенерирован в различные формы с нано- и микроструктурами для применения в оптике, электронике, оптоэлектронике и медицине, так как он прозрачен, механически стабилен, съедобен, биосовместим и имплантируем в организм человека. Другой способ производства флуоресцентного шелка – использование методов прямой подачи, основанных на поглощении молекул флуоресцентного красителя в естественных условиях шелковыми железами.

²³Tanaka H., Ishibashi J., Fujita K., Nakajima Y., Sagisaka A., Tomimoto K., Yamakawa M. A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of Bombyx mori // Insect biochemistry and molecular biology. 2008. Vol. 38. N 12. P. 1087–1110. DOI: 10.1016/j.ibmb.2008.09.001.

²⁴Tanaka H., Yamakawa M. Regulation of the innate immune responses in the silkworm, Bombyx mori // Invertebrate Survival Journal. 2011. Vol. 8. N 1. P. 59–69.

²⁵Kajiwaru H., Ito Y., Imamaki A., Nakamura M., Mita K., Ishizaka M. Proteomic analysis of silkworm fat body // Journal of Insect Biotechnology and Sericology. 2006. Vol. 75. N 2. P. 47–56. DOI: 10.11416/jibs.75.47.

Как правило, шелк флуоресцентного цвета можно получить, используя модифицированную диету из листьев шелковицы, содержащую молекулы распространенных в текстильной промышленности красителей: роданиновые красители (например, сульфородамин) и азокрасители (например, бриллиантовый желтый, конголезский)²⁶. Молекулярная масса – фактор, влияющий на поглощение молекул красителя биохимическими путями тутового шелкопряда. Молекулярная масса ниже 400 г/моль необходима для эффективного транспорта красителей в биохимические пути организма тутового шелкопряда и для производства естественно окрашенных шелковых волокон [19].

Н. Xu et al. (2019) продемонстрировали улучшение механических характеристик новых шелковых волокон, полученных путем скормливания тутовому шелкопряду очищенных и биосовместимых одно- и многостенных углеродных нанотрубок (CNTs). Повышенное содержание CNTs не только способствовало самосборке шелковых волокон в буферные узлы, но также повышало проводимость графитизированного шелка. В целом показано, что данные стратегии покрытия и очистки обеспечивают потенциально простой способ получения натуральных шелковых волокон с высокими механическими характеристиками [20].

Непосредственное кормление шелколичных червей или пауков искусственными добавками может быть практичным способом производства усиленных шелковых волокон, что позволяет легко производить шелк, содержащий функционально-аддитивные наноматериалы. Это возможно отчасти потому, что шелкопряды имеют открытую сердечно-сосудистую систему. Все их органы плавают в гемолимфе, представляющей собой смесь лимфы и клеток крови, окружающие все ткани. Таким образом, уникальная анатомия тутового шелкопряда очень полезна

для производства функционального шелка методами прямого кормления (пероральное воздействие и потребление) наноматериалов. Наноразмерные добавки могут диффундировать из пищевого канала в гемолимфу, а затем в железы и другие ткани. В частности, если наноматериалы вводятся перорально, они всасываются в пищеварительном тракте, проходят через пищеварительный тракт, мембранный барьер и циркулируют в гемолимфе и клетках [21].

Комбинация методов трансгенеза, прямого кормления и обратного скрещивания

Фиброин шелка, содержащий неприродные аминокислоты, получен путем скормливания трансгенным *B. mori* *n*-хлор-, *n*-бром- и *n*-азидозамещенных аналогов L -фенилаланина (Phe) *in vivo*, который экспрессировал мутант фенилаланил-тРНК-синтетазы с расширенными возможностями распознавания субстрата в шелковых железах. Азидные группы, включенные в фиброин, были активны в качестве химических маркеров для клик-химии как в солюбилизованном, так и в твердом (волокнистом) состоянии. Азиды выдержали дегумирование в кипящем щелочном растворе, необходимое для полного удаления слоя серицина. Это демонстрирует, что фиброин шелка, содержащий AzPhe (синтетическая аминокислота), может быть универсальной платформой для производства «кликабельных» шелковых материалов в различных формах²⁷. Практическое применение AzidoSilk было затруднено низкой продуктивностью. Позднее Y. Tian et al. (2022) представили данные по выведению новой трансгенной линии *B. mori* для массового производства AzidoSilk с использованием обычного метода обратного скрещивания. Полученная новая линия *B. mori*, созданная после пятикратного обратного скрещивания, дала в 2,6 раза больше AzidoSilk на личинку с увеличением продуктивности на 25% [22].

²⁶Tansil N.C., Li Y., Teng C.P., Zhang S., Win K.Y., Chen X., Han M.Y. Intrinsically colored and luminescent silk //Advanced Materials. 2011. Vol. 23. N 12. P. 1463–1466. DOI: 10.1002/adma.201003860.

²⁷Teramoto H., Kojima K. Production of Bombyx mori silk fibroin incorporated with unnatural amino acids // Biomacromolecules. 2014. Vol. 15. N 7. P. 2682–2690. DOI: 10.1021/bm5005349.

Совокупность биотехнологических улучшений *B. mori*

Жизненный цикл *B. mori* включает пять основных стадий развития: яйцо (грена) (период инкубации от 10 до 14 дней); гусеница (личинка) – период развития – 20–25 дней (для 3-линочных пород) и 24–39 дней (для 4-линочных пород); кокон (завивки 3–5 дней); куколка (продолжительность стадии – от 10 до 15 дней); бабочка (процесс спаривания (папильонаж) проходит в течение нескольких часов). Основные улучшения, осуществляемые на различных этапах жизненного цикла, и целевые продукты для последующей переработки представлены на рисунке.

Улучшения

Стадия яйца

(1) Трансгенез – для получения рекомбинантных белков, включение неприродных аминокислот (UAA), для последующей генетической гибридизации, метод инъекции генной инженерии яиц диапазирующих пород.

(2) Трансгенез для получения антимикробных пептидов (AMP).

(3) Искусственное размножение: амейотический и мейотический партеногенез, гиногенез, андрогенез, полиплоидия; методы: физические и химическое воздействие: нагревание, ионизирующее излучение, специальные

яды и др.; микрохирургия, встряхивание и др.; клонирование.

Стадия гусеницы

(1) Базисное улучшение – использование искусственной питательной среды (ИПС).

(2) Транзиентная система – инъекции ДНК бакмиды BmNPV и другие в личинки, экспрессия и продуцирование рекомбинантных белков в гемолимфе шелкопряда.

(3) Трансгенез – рекомбинантные белки экспрессируются в шелковой железе.

(4) Транзиентная и стабильные системы экспрессии – инокуляция очищенных окклюзионных тел непосредственным распылением их на ИПС или пероральное заражение.

(5) Заражение патогенами для получения антимикробных пептидов (AMP).

(6) Прямое введение искусственных добавок (метод прямого кормления).

Стадия кокона

(1) Трансгенез – продуцирование целевых рекомбинантных белков в оболочку кокона: слой фиброина и серицина.

(2) Трансгенез – получение рекомбинантных шелковых нитей.

(3) Прямое кормление – получение шелковых нитей с улучшенными механическими характеристиками.

Стадия куколки

(1) Транзиентная система – инъекции ДНК бакмиды BmNPV и другие в куколки, экспрессия и продуцирование рекомбинантных белков.

(2) Абляция – для отмены диапаузы.

Стадия бабочки

(1) Генетическая гибридизация – для получения новых линий (пород) с улучшенными свойствами.

(2) Генетическая гибридизация трансгенных шелкопрядов – обратное скрещивание.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разнообразие биотехнологических решений, используемых на различных этапах жизненного цикла тутового шелкопряда, направлено на качественные и количественные улучшения в содержании и размножении, получении новых видов сырья и на последу-



Жизненный цикл и улучшения *B. mori*
Life cycle and improvements of *B. mori*

ющем нисходящем этапе – новых продуктов. И личинка, и оболочка кокона, и куколка *B. mori* могут использоваться для продуцирования рекомбинантных белков. Возможность комбинирования методов трансгенеза, прямого кормления и обратного скрещивания еще более расширяют вариативность и эффективность в получении новых целевых продуктов. Комплекс улучшений обеспечивает базис биотехнологической платформы на основе *B. mori*, масштабирование которой превращает ее в биоиндустриальную платформу для современной фармацевтической индустрии, состоящей из функциональных биоматериалов для доставки лекарств и генов, средств лечения и заживления ран, биоматериалов для тканевой инженерии, гибкой электроники, биочернил для 3D-биопечати, косметики и нутрициологии; для индустрии новых улучшенных текстильных материалов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Xiang H., Liu X., Li M., Zhu Y. N., Wang, L., Cui Y., Zhan S. The evolutionary road from wild moth to domestic silkworm // Nature ecology & evolution. 2018. Vol. 2. N 8. C. 1268–1279. DOI: 10.1038/s41559-018-0593-4.
2. Ma S.Y., Xia Q.Y. Genetic breeding of silkworms: from traditional hybridization to molecular design // Yi Chuan = Hereditas. 2017. Vol. 39. N 11. P. 1025–1032. DOI: 10.16288/j.ycz.17-103.
3. Huang W., Ebrahimi D., Dinjaski N., Tarakanova A., Buehler M.J., Wong J.Y., Kaplan D.L. Synergistic integration of experimental and simulation approaches for the de novo design of silk-based materials // Accounts of chemical research. 2017. Vol. 50. N 4. P. 866–876. DOI: 10.1021/acs.accounts.6b00616.
4. Yagi H., Yanaka S., Yogo R., Ikeda A., Onitsuka M., Yamazaki T., Kato K. Silkworm pupae function as efficient producers of recombinant glycoproteins with stable-isotope labeling // Biomolecules. 2020. Vol. 10. N 11. P. 1482. DOI: 10.3390/biom10111482.
5. Wei J., Fan Y., Jing X., Fei Z., Li C., Pan G., Zhou Z. Establishment of a Novel Baculovirus–Silkworm Expression System // Microorganisms. 2022. Vol. 10. N 5. P. 1013. DOI: 10.3390/microorganisms10051013.
6. Tatematsu K.I., Uchino K., Sezutsu H., Tamura T. Effect of ATG initiation codon context motifs on the efficiency of translation of mRNA derived from exogenous genes in the transgenic silkworm, *Bombyx mori* // SpringerPlus. 2014. Vol. 3. N 1. P. 1–12. DOI: 10.1186/2193-1801-3-136.
7. Xu H., O'Brochta D. A. Advanced technologies for genetically manipulating the silkworm *Bombyx mori*, a model Lepidopteran insect // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 2015. Vol. 282. N 1810. P. 20150487. DOI: 10.1098/rspb.2015.0487.
8. Wang Y., Wang F., Wang R., Zhao P., Xia Q. 2A self-cleaving peptide-based multi-gene expression system in the silkworm *Bombyx mori* // Scientific reports. 2015. Vol. 5. N 1. P. 16273. DOI: 10.1038/srep16273.
9. Li Z., You L., Zhang Q., Yu Y., Tan A. A targeted in-fusion expression system for recombinant protein production in *Bombyx mori* // Frontiers in Genetics. 2022. Vol. 12. P. 816075. DOI: 10.3389/fgene.2021.816075.
10. Yamada N., Mise Y., Yonemura N., Sakai H., Uchino K., Sezutsu H., Iizuka, T. Development of an Injection Method for the Genetic Engineering of Diapause Silkworm Egg Using Dimethyl Sulfoxide // Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ. 2023. Vol. 57. N 1. P. 63–72. DOI: 10.6090/jarq.57.63.
11. Ларькина Е.А., Акилов У.Х., Туйчиев Ж.Ш., Асронов Э.К., Солиева М.Б., Абдикаюмова Н.К. Использование способов управления размножением тутового шелкопряда (*Bombyx mori* L.) в практическом шелководстве // Аграрная наука. 2022. Т. 1. № 7–8. С. 114–120. DOI: 10.32634/0869-8155-2022-361-7-8-114-120.
12. Yamada N., Mise Y., Yonemura N., Uchino K., Zabelina V., Sezutsu H., Tamura T. Abolition of egg diapause by ablation of suboesophageal ganglion in parental females is compatible with genetic engineering methods // Journal of Insect Physiology. 2022. Vol. 142. P. 104438. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2022.104438.
13. Long D., Cheng X., Hao Z., Sun J., Umuhzoza D., Liu Y., Zhao A. Genetic hybridization of highly active exogenous functional proteins into silk-based materials using “light-clothing” strategy // Matter. 2021. Vol. 4. N 6. P. 2039–2058. DOI: 10.1016/j.matt.2021.03.020.
14. Li G., Xia X., Long Y., Li, J., Wu J., Zhu Y. Research progresses and applications of antimicro-

- bial peptides // Chinese Journal of Animal Nutrition. 2014. Vol. 26. N 1. P. 17–25.
15. Mastore M., Quadroni S., Caramella S., Brivio M.F. The silkworm as a source of natural antimicrobial preparations: efficacy on various bacterial strains // *Antibiotics*. 2021. Vol. 10. N 11. P. 1339. DOI: 10.3390/antibiotics10111339.
 16. Rahul K., Moamongba K.S., Rabha M., Sivaprasad V. Identification and characterization of bacteria causing flacherie in mulberry silkworm, *Bombyx mori* L // *Journal of Crop and Weed*. 2019. Vol. 15. N 3. P. 178–181. DOI: 10.22271/09746315.2019.v15.i3.1257.
 17. Makwana P., Rahul K., Ito K., Subhadra B. Diversity of Antimicrobial Peptides in Silkworm // *Life*. 2023. Vol. 13. N 5. P. 1161. DOI: 10.3390/life13051161.
 18. Teramoto H., Amano Y., Iraha F., Kojima K., Ito T., Sakamoto K. Genetic code expansion of the silkworm *Bombyx mori* to functionalize silk fiber // *ACS Synthetic Biology*. 2018. Vol. 7. N 3. P. 801–806. DOI: 10.1021/acssynbio.7b00437.
 19. Nisal A., Trivedy K., Mohammad H., Panneri S., Sen Gupta S., Lele A., Laxman R.S. Uptake of azo dyes into silk glands for production of colored silk cocoons using a green feeding approach // *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2014. Vol. 2. N 2. P. 312–317. DOI: 10.1021/sc400355k.
 20. Xu H., Yi W., Li D., Zhang P., Yoo S., Bai L., Hou X. Obtaining high mechanical performance silk fibers by feeding purified carbon nanotube/lignosulfonate composite to silkworms // *RSC advances*. 2019. Vol. 9. N 7. P. 3558–3569. DOI: 10.1039/C8RA09934K.
 21. Leem J.W., Fraser M.J., Kim Y.L. Transgenic and diet-enhanced silk production for reinforced biomaterials: a metamaterial perspective // *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2020. Vol. 22. P. 79–102. DOI: 10.1146/annurev-bioeng-082719-032747.
 22. Tian Y., Iga M., Tsuboi H., Teramoto, H.A. Novel Transgenic Silkworm Line for Mass Production of Azido-Incorporated Silk Fiber // *The Journal of Silk Science and Technology of Japan*. 2022. Vol. 30. P. 75–85. DOI: 10.11417/silk.30.75.
 1. Xiang H., Liu X., Li M., Zhu Y.N., Wang L., Cui Y., Zhan S. The evolutionary road from wild moth to domestic silkworm. *Nature ecology & evolution*, 2018, vol. 2, no. 8, pp. 1268–1279. DOI: 10.1038/s41559-018-0593-4.
 2. Ma S.Y., Xia Q.Y. Genetic breeding of silkworms: from traditional hybridization to molecular design. *Yi Chuan = Hereditas*, 2017, vol. 39, no. 11, pp. 1025–1032. DOI: 10.16288/j.yczs.17-103.
 3. Huang W., Ebrahimi D., Dinjaski N., Tarakanova A., Buehler M.J., Wong J.Y., Kaplan D.L. Synergistic integration of experimental and simulation approaches for the de novo design of silk-based materials. *Accounts of chemical research*, 2017, vol. 50, no. 4, pp. 866–876. DOI: 10.1021/acs.accounts.6b00616.
 4. Yagi H., Yanaka S., Yogo R., Ikeda A., Onitsuka M., Yamazaki T., Kato K. Silkworm pupae function as efficient producers of recombinant glycoproteins with stable-isotope labeling. *Biomolecules*, 2020, vol. 10, no. 11, p. 1482. DOI: 10.3390/biom10111482.
 5. Wei J., Fan Y., Jing X., Fei Z., Li C., Pan G., Zhou Z. Establishment of a Novel Baculovirus–Silkworm Expression System. *Microorganisms*, 2022, vol. 10, no. 5, p. 1013. DOI: 10.3390/microorganisms10051013.
 6. Tatematsu K.I., Uchino K., Sezutsu H., Tamura T. Effect of ATG initiation codon context motifs on the efficiency of translation of mRNA derived from exogenous genes in the transgenic silkworm, *Bombyx mori*. *SpringerPlus*, 2014, vol. 3, no. 1, pp. 1–12. DOI: 10.1186/2193-1801-3-136.
 7. Xu H., O’Brochta D. A. Advanced technologies for genetically manipulating the silkworm *Bombyx mori*, a model Lepidopteran insect. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2015, vol. 282, no. 1810, p. 20150487. DOI: 10.1098/rspb.2015.0487.
 8. Wang Y., Wang F., Wang R., Zhao P., Xia, Q. 2A self-cleaving peptide-based multi-gene expression system in the silkworm *Bombyx mori*. *Scientific reports*, 2015, vol. 5, no. 1, p. 16273. DOI: 10.1038/srep16273.
 9. Li Z., You L., Zhang Q., Yu Y., Tan A. A targeted in-fusion expression system for recombinant protein production in *Bombyx mori*. *Frontiers in Genetics*, 2022, vol. 12, p. 816075. DOI: 10.3389/fgene.2021.816075.
 10. Yamada N., Mise Y., Yonemura N., Sakai H., Uchino K., Sezutsu H., Iizuka T. Development of an Injection Method for the Genetic Engineering of Diapause Silkworm Egg Using Dimethyl Sulfoxide. *Japan Agricultural Research Quar-*

REFERENCES

- terly: *JARQ*, 2023, vol. 57, no. 1, pp. 63–72. DOI: 10.6090/jarq.57.63.
11. Larkina E.A., Akilov U.H., Tychiev J.Sh., Asronov E.K., Solieva M.B., Abdikayumova N.K. The use of methods for controlling the reproduction of the silkworm (*Bombyx mori* L.) in practical sericulture. *Agrarnaya nauka = Agrarian Science*, 2022, vol. 1, no. 7–8, pp. 114–120. (In Russian). DOI: 10.32634/0869-8155-2022-361-7-8-114-120.
 12. Yamada N., Mise Y., Yonemura N., Uchino K., Zabelina V., Sezutsu H., Tamura T. Abolition of egg diapause by ablation of suboesophageal ganglion in parental females is compatible with genetic engineering methods. *Journal of Insect Physiology*, 2022, vol. 142, p. 104438. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2022.104438.
 13. Long D., Cheng X., Hao Z., Sun J., Umuhiza D., Liu Y., Zhao A. Genetic hybridization of highly active exogenous functional proteins into silk-based materials using “light-clothing” strategy. *Matter*, 2021, vol. 4, no. 6, pp. 2039–2058. DOI: 10.1016/j.matt.2021.03.020.
 14. Li G., Xia X., Long Y., Li J., Wu J., Zhu Y. Research progresses and applications of antimicrobial peptides. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, vol. 26, no. 1, pp. 17–25.
 15. Mastore M., Quadroni S., Caramella S., Brivio M.F. The silkworm as a source of natural antimicrobial preparations: efficacy on various bacterial strains. *Antibiotics*, 2021, vol. 10, no. 11, p. 1339. DOI: 10.3390/antibiotics10111339.
 16. Rahul K., Moamongba K.S., Rabha M., Sivaprasad V. Identification and characterization of bacteria causing flacherie in mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. *Journal of Crop and Weed*, 2019, vol. 15, no. 3, pp. 178–181. DOI: 10.22271/09746315.2019.v15.i3.1257.
 17. Makwana P., Rahul K., Ito K., Subhadra, B. Diversity of Antimicrobial Peptides in Silkworm. *Life*, 2023, vol. 13, no. 5, p. 1161. DOI: 10.3390/life13051161.
 18. Teramoto H., Amano Y., Iraha F., Kojima K., Ito T., Sakamoto K. Genetic code expansion of the silkworm *Bombyx mori* to functionalize silk fiber. *ACS Synthetic Biology*, 2018, vol. 7, no. 3, pp. 801–806. DOI: 10.1021/acssynbio.7b00437.
 19. Nisal A., Trivedy K., Mohammad H., Panneri S., Sen Gupta S., Lele A., Laxman, R.S. Uptake of azo dyes into silk glands for production of colored silk cocoons using a green feeding approach. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2014, vol. 2, no. 2, pp. 312–317. DOI: 10.1021/sc400355k.
 20. Xu H., Yi W., Li D., Zhang P., Yoo S., Bai L., Hou, X. Obtaining high mechanical performance silk fibers by feeding purified carbon nanotube/lignosulfonate composite to silkworms. *RSC advances*, 2019, vol. 9, no. 7, pp. 3558–3569. DOI: 10.1039/C8RA09934K.
 21. Leem J. W., Fraser M. J., Kim Y. L. Transgenic and diet-enhanced silk production for reinforced biomaterials: a metamaterial perspective. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2020, vol. 22, pp. 79–102. DOI: 10.1146/annurev-bioeng-082719-032747.
 22. Tian Y., Iga M., Tsuboi H., Teramoto H. A. Novel Transgenic Silkworm Line for Mass Production of Azido-Incorporated Silk Fiber. *The Journal of Silk Science and Technology of Japan*, 2022, vol. 30, pp. 75–85. DOI: 10.11417/silk.30.75.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

✉ Юматов Е.Н., индивидуальный предприниматель, научный сотрудник; **адрес для переписки:** Россия, 357432, Ставропольский край, г. Железноводск, ул. Пушкина, 13; e-mail: trast1207@mail.ru

Евлагина Е.Г., директор

Деев И.Е., доктор биологических наук, старший научный сотрудник

Евлагин В.Г., научный сотрудник

Лейнвебер Е.Ф., кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник

AUTHOR INFORMATION

✉ **Evgeniy N. Yumatov**, Individual entrepreneur, Researcher; **address:** 13, Pushkina St., Zheleznovodsk, Stavropol Territory, 357432, Russia; e-mail: trast1207@mail.ru

Elena G. Evlagina, Director

Igor E. Deyev, Doctor of Science in Biology, Senior Researcher

Victor G. Evlagin, Researcher

Evdokia F. Leinweber, Candidate of Science in Agriculture, Senior Researcher

Дата поступления статьи / Received by the editors 29.08.2023
Дата принятия к публикации / Accepted for publication 19.10.2023
Дата публикации / Published 15.12.2023