

利用家蠶生產外源蛋白之研究

廖久薰^{1*} 詹雲貞¹ 吳登楨¹ 盧美君¹ 吳宗遠² 趙裕展³

¹行政院農委會苗栗區農業改良場 ²中原大學 ³中央研究院

摘要

利用桿狀病毒表現載體(Baculovirus Expression Vectors, BEVs)感染家蠶, 可用以生產高經濟價值的蛋白產物。以珊瑚紅螢光為外源基因, 選取家蠶 OJ03×OJ04 等 8 種品系。於 5 齡起蠶日, 分別注射感染含紅螢光基因之重組病毒。結果顯示, 最大發病日約為感染後 4 日, 品系間以 OC05×FJ01、OJ03×OJ04、OC05×瀛富表現較佳, 體液中紅螢光濃度分別為 52.2、49.8 及 37.8 單位。以家蠶桿狀病毒表現載體也可成功地生產出抗菌蛋白, 平均每隻蠶表現量為 4 mg。

前言

家蠶(*Bombyx mori* L.)是有價值的經濟昆蟲之一, 傳統養蠶主要作為蠶絲衣料之用途, 為一勞力密集之產業, 在台灣已不具競爭優勢, 為了尋求蠶業的第二春, 必需朝生物技術的方向發展。建立以家蠶為生物工廠, 利用桿狀病毒表現載體(Baculovirus Expression Vectors, BEVs)生產高經濟價值的蛋白產物。

桿狀病毒(Baculovirus)大量存在於無脊椎動物體中, 主要會危害鱗翅目昆蟲。桿狀病毒包括核多角體病毒(nuclear polyhedrosis virus, NPV)及顆粒體病毒(granulosis virus, GV)。其中, 家蠶核多

角體病毒(*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, BmNPV)感染家蠶幼蟲後約 5~6 天, NPV 在蠶體內大量形成多面體的蛋白結晶, 穿透蟲體細胞而使蟲體死亡, 此即為膿病(jaundice), 對蠶農造成莫大損失。由此病毒生活史可知, 在病毒複製過程中, 多角體蛋白基因(polyhedrin, *polh*)及 *p10* 兩個基因於感染末期時大量表現, 此兩基因非病毒感染時之必要基因, 且可以在很短的時間內, 大量生產蛋白產物。因此, Maeda *et al.*(1985)首先以 BmNPV 銜接外來基因, 生產人類 α -干擾素(α -interferon), 並可以得到 5×10^7 units (~50 μ g)的高生產量。往後有許多學者以此基因的起動子

*論文聯繫人

e-mail: jsliaw@mdais.gov.tw

銜接外源基因，生產多種有價值的蛋白產物，如 B 型肝炎表面抗原 (hepatitis B virus surface antigen, HBsAg) (洪，1989；Higashihashi *et al.*, 1991)、草魚生長激素 (Ho *et al.*, 1998) 及口蹄疫次單位疫苗 (Li *et al.*, 2008) 等。

家蠶是屬於高等動物，利用它來生產人類或動物所需的疫苗、營養物質或是生長激素，不需考慮蛋白生成時醱化修飾的問題，此等優勢乃是利用大腸桿菌或是酵母菌生產體系所欠缺的 (Miller, 1988)。外，因為 NPV 的寄主範圍很窄，尤其 BmNPV 的寄主只限於家蠶蟲體 (Maeda, 1989；Li *et al.*, 2008)；即使釋放至田間，也不會寄生於其它的昆蟲或物種中，造成環境或生態上的污染。更甚者，直接以家蠶幼蟲或蛹作為生產工具，外源蛋白表現量達超過以家蠶細胞生產之效益達 100-1000 倍 (Kato *et al.*, 2009；Li *et al.*, 2008；Maeda, 1989)。

行政院農業委員會苗栗區農業改良場 (原蠶蜂業改良場，1988 年改制為區改良場，以下簡稱本場) 保存蠶種原為 136 種，為台灣唯一蠶種原保存與利用的單位。本場自日據時代以降，多方搜集及選育多種蠶種，包括日本、中國、歐洲及熱帶蠶種等，種類多元且極具經濟性，包括高絲量及抗病等特性。建立家蠶生物工廠技術，首先要瞭解家蠶種原中品系表現外源蛋白差異性。

紅螢光蛋白 (red fluorescence protein, RFP) 是由紅珊瑚 (*Discosoma genus*) 所選殖出的蛋白基因所控制，已成功地被當作有效的報導基因 (Baird *et al.*, 2000)。因為國內尚無完善家蠶生產外源蛋白的技術及家蠶品種 (系)，因此初步以 *rfp* 當

作標的基因，利用家蠶桿狀病毒作為表現載體，本場保存蠶種 136 種作為宿主，以注射感染方式，由家蠶發病情形及 RFP 外源蛋白表現量，篩選出具有感病性高及適合生成外源蛋白的家蠶品種，供將來大量生產外源蛋白之生產工具。

抗菌蛋白廣泛的存在於自然界許多生物體中，如植物、無脊椎和脊椎動物，是一道天然的防禦系統。蜜蜂受到微生物感染時也會產生抗菌蛋白來抵抗細菌的威脅，Royalisin 為其中一種抗菌蛋白，主要發現於蜂王漿中，是由 51 胺基酸所組成，架構上含 3 組雙硫鍵，使其架構更加穩定。Royalisin 主要能抗真菌、格蘭氏陽性及少數陰性菌 (彭，2006；Fujiwara *et al.*, 1990)。Bachanová *et al.* (2002) 表示 Royalisin 具抗美洲幼蟲病原菌 *P. l. larvae*。蜂王漿主要蛋白中發現一種多肽 Apisimin (Bíliková *et al.*, 2002)，此多肽由 54 胺基酸組成，富含纈氨酸及絲氨酸，在內勤及外勤蜂頭部有很高的表達量。因此 Apisimin 可能與幼蟲發育有關，而且與成蜂行為密切關聯。在自然情況下，此多肽與主要蛋白 (MRJP1) 以二聚體的形式存在，分子量約 350 kDa。杜等人 (2007) 認為該多肽功能未知，因此選殖並利用大腸桿菌表達中國蜂 Apisimin，期望針對其營養保健功能做深入研究。藉由家蠶作為生物反應器，生產抗菌蛋白 Royalisin 及 Apisimin，未來可供畜禽業飼料添加，增加畜禽動物抵禦病菌能力，減少飼養過程中抗生素之使用，同時也可增加家蠶的附加價值。

材料與方法

一、篩選適合生產紅螢光蛋白 (red fluorescence protein, RFP) 之家蠶品系

本試驗自 97 年秋蠶期至 98 年秋蠶期進行，依照慣行法飼育本場保護的二化性蠶 131 品種(系)至 4 齡眠。5 齡起蠶日，分別以微量注射器注射氣門方式，感染含 *rfp* 基因之重組病毒(中原大學生物技術系提供)，每隻家蠶注射 $5\ \mu\text{l}$ 之 1×10^6 pfu/ml 重組病毒。感染後將家蠶飼養於 $25\ 2^\circ\text{C}$ 、高濕度蠶室(85% R. H.)，一日給桑 3 次，每日除沙、給食及觀察家蠶發病情形。待最大發病日，分別將病蠶置於冰上，剪尾角方式採集家蠶體液，儲存於 -80°C 冷凍櫃，備後續 RFP 蛋白定量及定性分析。

RFP 表現佳的品系於當期立即雜交，依照慣行方式入冷藏庫保種。於次年春蠶期，將雜交 F_1 及其親本同時出庫，依慣行方式飼育至 齡期眠。5 齡起蠶當日，同上 感染及飼育方法操作，記錄及篩選表現佳的 F_1 組合，供作生產高價外源蛋白之適合蠶種。

二、家蠶當作生物反應器表現抗菌蛋白

利用家蠶核多角體病毒 (*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, BmNPV) 構築含 Royalisin 及 Apisimin 基因於表現載體，供家蠶感染及表現。上 兩者重組病毒是中研院分生所趙裕展博士提供。本試驗使用的家蠶品種是 OJ03×OJ04，依慣行法飼育至 4 齡眠。5 齡起蠶日，以微量注射器注射氣門的接種方式感染家蠶活體，每隻接種 $5\ \mu\text{l}$ 之 1×10^6 pfu/ml

。感染後將之飼養於 $25\ 2^\circ\text{C}$ ，高濕度 (>85% R. H.) 養蠶室。接種後逐日觀察並於感染後第 4 日採集體液，進行重組蛋白定量及定性分析。

三、家蠶體液內RFP蛋白定性及定量分析

RFP 係來自紅珊瑚的一種螢光物質，因此本試驗之家蠶體液中的 RFP 分別收集後，以多功能微盤分析儀 (Anthos Zenyth 3100, Bio-RAD Co.) 設定 535/595 nm (激發光/散射光) 波長進行紅螢光定量。

四、聚丙醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE) 及西方墨漬法分析

本試驗依據 Sambrook and Russell (2001) 撰寫的 *Molecular Cloning* 專書中所敘 之聚丙醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE) 及西方墨漬法 (Western Blot)，分別配置 12% 及 20% 的 SDS PAGE 進行 RFP、Royalisin 和 Apisimin 抗菌肽分析用。60 及 120 伏特電流進行電泳程序 (Bio-Rad Co.) 分開蛋白質。將已分開的蛋白質的膠片轉漬至 PVDF 膜 (Bio-Rad Co.)，1:5000 之抗 RFP 及抗 Royalisin 及 Apisimin 血清進行免疫反應，加入適量基質後壓 X 光片呈色。

結 果

一、適合生產外源蛋白之蠶種選育

感染後每日結果：每個家蠶品系感染後 1-2 天，其生長、活動及食慾均正常，沒有病態發生。自 72 小時有些品系開始出現病徵，但仍維持正常食慾及活

動力，且尾部及後腳部位已開始零星出現紅色徵狀。感染後 80 小時蟲體表面始發現明顯紅色及節間膜稍腫脹(圖一)，而且品系間呈色情形有強弱之別，此時

依舊有進食及活動。感染後 96 小時，發病嚴重的蠶隻開始焦躁不安且急速死亡，此為最大發病日，記錄及採集體液進行定性及定量分析。

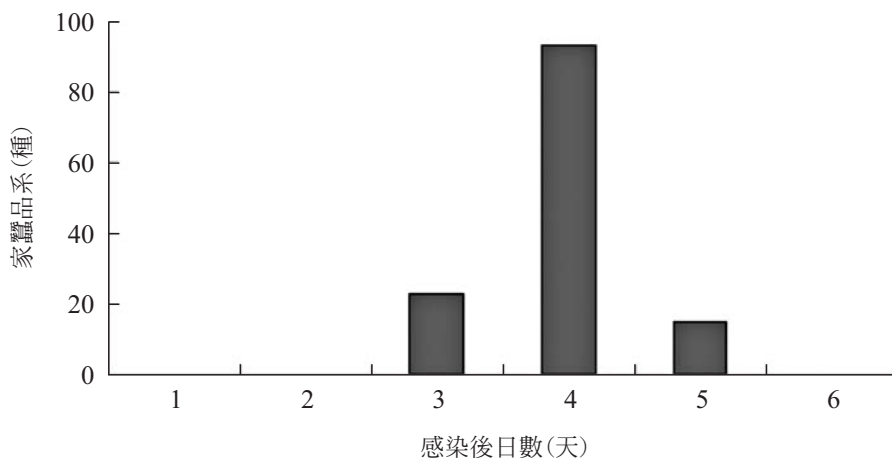


圖一 供試家蠶感染含 rfp 重組病毒之發病情形。

Fig. 1. The symptoms of silkworm infected with recombinant BmNPV harboring rfp .

供試的家蠶品種(系)之最大發病日調查顯示：所有品種系之最大發病日自感染後第 3 日即被發現，以感染後第 4

日(即感染後 96 小時)發病率最大，佔 71%。然而，感染後第 5 日即全數死亡，無法存活至感染後第 6 日(圖二)。

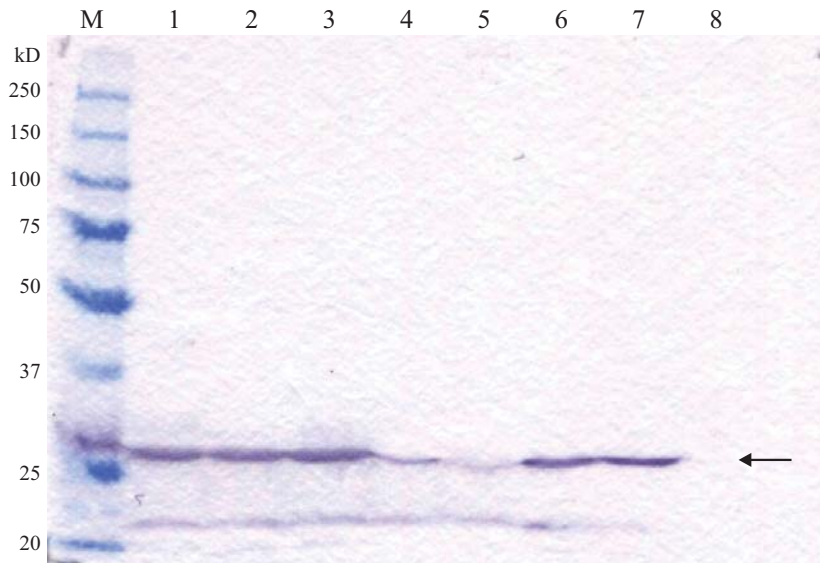


圖二 家蠶品系感染後最大發病日調查。

Fig. 2. Investigation of days after infection in various silkworm varieties.

本試驗以西方墨漬法進行紅螢光蛋白 (red fluorescence protein, RFP) 定性分析，結果顯示所有供試家蠶均可表現 RFP 重組蛋白，其分子量大小為 29 KDa (圖三箭頭指示)，與預測大小符合

(Baird *et al.*, 2000)。由條帶之濃淡可明顯說明 OC05×FJ01、OJ03×OJ04、OC05×瀛富可表現多量 RFP (圖三之第 1-3 行)。



圖三 各品系家蠶體液之 RFP 表現情形。第 M 行，蛋白質分子量標準品，第 1-7 行，被感染之家蠶體液，第 8 行，未被感染之家蠶體液 (負對照組)，箭頭指 RFP。

Fig. 3. Expression of recombinant RFP with BmNPV in silkworm hybrids. Lane M, molecular weight marker. Lane 1-7, haemolymphs from the silkworm hybrids infected with BmNPV harboring *rfp*. Lane 8, haemolymphs from the silkworm uninfected with BmNPV. Arrow shows RFP with 29 KDa.

由調查及分析結果，本試驗以 RFP 當作標的產物時，注射感染家蠶後，並非所有供試品系均具有相同的發病率，OC05×HJ04 可達 100 %；瀛富×OC05 卻僅 60 %。最大發病日亦不同，

OJ03×OJ04 於感染後 3.5-4 日即大量發病且死亡，其餘則為感染後 4-5 日才發病。RFP 生產量因品系而異，平均每隻蠶產量 12.3-32.2 μg (表一)。

表一 各雜交組合家蠶感染率及 RFP 表現情形

Table 1. Infected rate and production of RFP in silkworm hybrids

hybrids	Infected rate (%)	RFP ($\mu\text{g}/\text{larvae}$)
OJ03×OJ04	88.3 ± 2	12.30
OC05×瀛富	95 ± 1	28.50
OC05×FJ01	96 ± 4	32.20
OC05×OJ05	85 ± 2	17.85
OC05×HJ04	100 ± 0	22.46
瀛富×OC05	60 ± 23	27.24

外，中原大學生物技術系提供 ELISA 定量結果(圖)，顯示：各品系之 RFP 於特定波長所測的螢光值，換算的相對紅螢光蛋白單位，以 OC05×FJ01

、OJ03×OJ04、OC05×瀛富表現較佳，分別為 52.15、49.78 及 37.80 相對單位值。所得結果和西方墨漬法之蛋白質條帶強弱吻合。

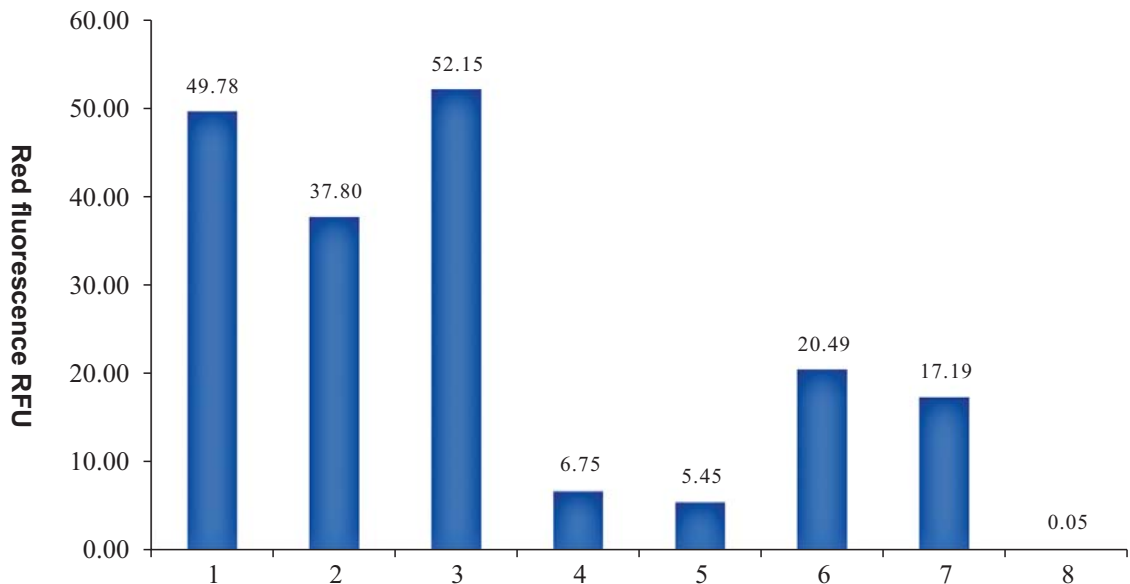


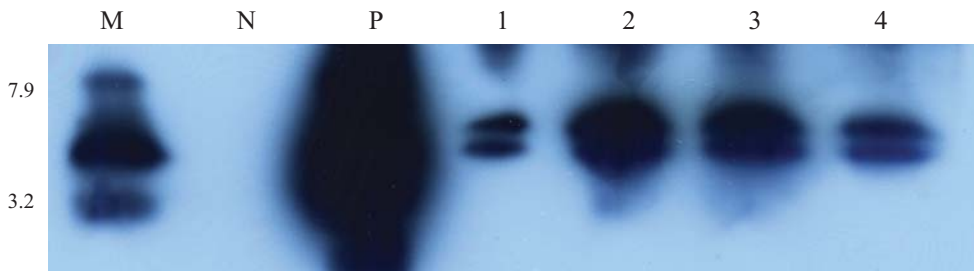
圖 ELISA 定量 RFP 之螢光值及相對蛋白表現量(資料來源：中原大學生物技術系)。

Fig. 4. ELISA analysis of DsRed protein using BmNPV in silkworm larvae.

二、家蠶當作生物反應器表現抗菌蛋白

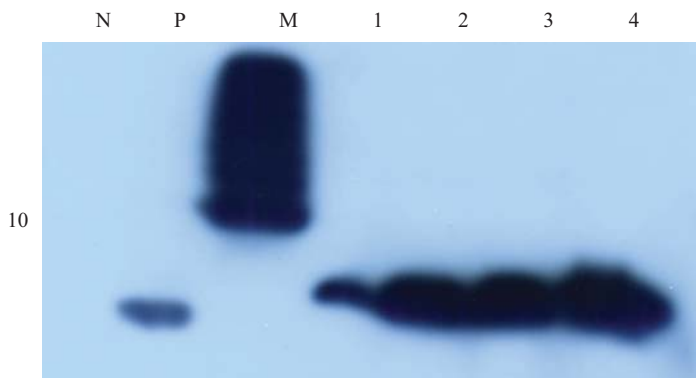
將含 Royalisin 及 Apisimin 產量高之病毒株以 TC-100 無血清培養液稀釋 100 倍供注射感染用。慣用品系 OJ03×OJ04 於 5 齡起蠶日，分別注射此兩種重組病毒，感染後第4日採集體液進行分析。以 20% SDS-PAGE 及西方墨漬免疫結果：

家蠶可生產 Royalisin 及 Apisimin，其大小和正對照組相同，約 6.7 及 5.5 kDa（圖六，第 1-4 行；圖六，第 1-4 行），而且未感染之家蠶體液有免疫表現（圖五及六，第 N 行）。以正對照組估算相對量，每隻家蠶平均可生產 Royalisin、Apisimin 約為 0.3 和 4 mg。



圖五 家蠶生產 Royalisin 之西方墨漬分析。第 M 行，蛋白質分子量標準品；第 N 行，未感染之家蠶體液；第 P 行，正對照組 (1 μ g/ μ l)。

Fig. 5. The immunoblotting analysis of the Royalisin peptide by silkworm larvae. Lane M, molecular weight markers. Lane N, haemolymphs from the silkworm uninfected with BmNPV. Lane P, Royalisin peptide as a positive control (1 μ g/ μ l). Lane 1-4, haemolymphs from the silkworms uninfected with BmNPV harboring Royalisin gene.



圖六 家蠶生產 Apisimin 之西方墨漬分析。第 N 行，未感染之家蠶體液；第 P 行，正對照組 (1 μ g/ μ l)；第 1-4 行，被感染之家蠶體液；第 M 行，蛋白質分子量標準品。

Fig. 6. The immunoblotting analysis of the Apisimin peptide by silkworm larvae. Lane N, haemolymphs from the silkworm uninfected with BmNPV. Lane P, Apisimin peptide as a positive control (1 g/l). Lane 1-4, haemolymphs from the silkworms uninfected with BmNPV harboring Apisimin gene. Lane M, molecular weight markers.

討 論

一、適合生產外源蛋白之蠶種選育

家蠶作為生物反應器生產高價蛋白質產物，早在 Maeda(1985)發表以家蠶活體高量表現人類 α 干擾素；之後陸續有其它的成功案例，如如 B 型肝炎表面抗原 (hepatitis B virys surface antigen, HBsAg) (洪，1989；Higashihashi *et al.*, 1991)、草魚生長激素 (Ho *et al.*, 1998) 及口蹄疫次單位疫苗 (Li *et al.*, 2008) 等。本場多年來致力於蠶種的選育及保存，自日據時代起，搜集及選育數百種蠶種，為國內唯一蠶種保育的機構。傳統家蠶的利用為蠶絲製作衣服布料等，因此選育目標往往為高絲量及抗病等。為建立家蠶作為生物反應器生產高價蛋白質產物，必須了解家蠶品系間的差異及表現外源蛋白的能力。為了有效且快速地篩選家蠶作為適當的生產工具，本試驗選擇易於觀察及分析的 RFP (DsRed) 當作標的蛋白。將來自紅珊瑚的 *rfp* 基因，以限制酵素剪切，片段置換桿狀病毒表現載體之多角體蛋白的轉錄區域，再和野生型病毒以共轉移 (cotransfection) 方式完成重組病毒。構築完成的重組病毒分別感染家蠶細胞株 (Bm cell line)，於感染後第 4 日分別收穫細胞液，進行西方墨漬法分析，以便於選擇具外源蛋白高產之病毒株，供家蠶感染及表現用。本試驗所使用之 *rfp* 重組基因之構築、細胞株感染等工作，由中原大學生物技術學系完成。

F_1 世代具有雜種優勢，蟲體大、抗病性及生育性強等優點，為使家蠶幼蟲更適合當作生物反應器生產外源蛋白，

本試驗選育適當 F_1 蠶種，將來作為生產外源蛋白的生產工具。本試驗將篩選之 OJ03 等 5 品系雜交獲得 OJ03×OJ04 等 6 個 F_1 組合，依慣行方法出庫、飼育。至 5 齡起蠶日，分別注射感染含 *rfp* 重組病毒株，感染後觀察及調查家蠶感染情形，於接種後第 4-5 日收集家蠶體液，進行 SDS-PAGE 及西方墨漬分析。

為提升單位蠶隻的生產量，選育 RFP 高產之蠶種有其必要性。依據本試驗結果，組合 OC05×FJ01 及 OC05×HJ04 生長勢強，蠶隻大，平均重量 2.3g，感染率高達 95% (含) 以上，且 RFP 生產量高，具高潛力成為優良生產蠶種。

二、家蠶當作生物反應器表現抗菌蛋白

為迎接未來無抗生素添加的政策，人們不斷尋求抗生素取代物質，因此，本試驗始終以生產畜禽用具抗菌效果的飼料添加物為標的產物，如豬隻豬鐵蛋白 (Porcine Lactoferrin)、Royalisin 及 Apisimin，後兩者來自蜂王漿。Royalisin 為抵禦素類 (defensin) 的一種抗菌肽，由 51 個胺基酸組成，其中含有 6 個 cysteine，在架構上形成 3 組雙硫鍵，使其架構更加穩定 (Fujiwara *et al.*, 1990)。Royalisin 能抗真菌、格蘭氏陽性菌及少數格蘭氏陰性菌。在蜜蜂上主要為抵抗、殺死白堊病及美洲幼蟲病的病原。Apisimin 為一多肽，同樣來自蜂王漿 (Bachanová *et al.*, 2002)。根據報導，此多肽在自然情況下，與蜂王漿主要蛋白 (Major protein 1, MRJP1) 以二聚體結構存在，功能未明，推測與營養保健及發育有關。並且，可於大腸桿菌中表現 (杜

等，2007)。因此，本試驗選擇以此2種蛋白為標的產物，以家蠶生物反應器生產平台確實可成功地表現 Royalisin 及 Apisimin。未來此平台亦將應用於畜禽類動物之飼料添加物的生產，除了可以提供飼料中優質蛋白質、具抗菌效果，減少或取代生產時抗生素之使用，創造優質的畜禽肉類產品，同時還可提升蠶業的附加價值。

由本試驗結果：以 *rfp* 為標的基因，篩選適合生產外源蛋白蠶種，以除了慣用品系 (OJ03×OJ04) 外，OC05×瀛富、OC05×FJ01 之蠶隻大且重，感染率高，生產 RFP 蛋白 28.50、32.20 μg/larvae，可供作生產工具。家蠶可生產抗菌肽 Royalisin 及 Apisimin，其大小分別為 6.7、5.5kDa，與預測大小符合。

誌 謝

本文承國家科學委員會及行政院農業委員會科技計畫補助，試驗期間承蒙本場林美芳小姐及劉享芳先生協助，謹此一併誌謝。

引用文獻

- 杜宏瀟、蘇松坤、梁勤、陶挺。2007。中華蜜蜂 Apisimin 基因的克隆及在大腸桿菌內的表達。海峽兩岸第六屆蜜蜂與蜂產品研討會論文第 43-46 頁。
- 洪秀妙。1989。家蠶核多角體病毒置換載體之構築。國立中興大學碩士論文。

- 彭及忠。2006。利用人造油體蛋白質純化系統生產蜂王漿抗菌蛋白質 Royalisin。台灣昆蟲特刊8：43-50。
- Bachanová K., J. Klaudiny, J. Kopernický, and J. Šimúth.** 2002. Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus* larvae through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamide gel. INRA/DIB-AGIB/EDP Sci. 259-269.
- Baird, G. S., D. A. Zacharias, and R. Y. Tsien.** 2000. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. PNAS 97:11984-11989.
- Bíliková, K., J. Hanes, E. Nordhoff, W. Saenger, J. Klaudiny, and J. Šimúth.** 2002. Apisimin, a new serine-valine-rich peptide from honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly: purification and molecular characterization. FFBS 528:125-129.
- Fujiwara, S., J. Imai, M. Fujiwara, T. Yaeshima, T. Kawashima, and K. Kobayashi.** 1990. A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. J. Biol. Chem. 265:11333-11337.
- Higashihashi, N., Y. Arai, T. Enjo, T. Horiuchi, Y. Saeki, K. Sakano, Y. Sato, K. Takeda, S. Takashina, and T. Takahashi.** 1991. High-level

expression and characterization of hepatitis B virus surface antigen in silkworm using a baculovirus vector. *J. Virol. Methods* 35:159-167.

Ho, K. K., Z. Q. Meng, H. R. Lin, C. T. Poon, Y. K. Leung, K. T. Yan, N. Dias, A. P. K. Che, J. Liu, W. M. Zheng, Y. Sun, and A. O. L. Wong. 1998. Expression of grass carp growth hormone by baculovirus in silkworm larvae. *Biochim. Biophys. Acta* 1381:331-339.

Kato, T., M. Kajikawa, K. Maenaka, and E. Y. Park. 2010. Silkworm expression system as a platform technology in life science. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85:459-470.

Li, Z., Y. Yi, X. Yin, Z. Zhang, and J. Liu. 2008. Expression of foot-and-mouth disease virus capsid proteins in silkworm-baculovirus expression system and its utilization as a subunit vaccine. *PloS One* 28: e2273.

Maeda, S. 1989. Expression of foreign genes in insects using baculovirus vectors. *Ann. Rev. Entomol.* 34:351-372.

Maeda, S., T. Kawai, M. Obinata, H. Fujiwara, T. Horiuchi, Y. Saeki, Y. Sato, and M. Furusawa. 1985. Production of human α -interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature* 315:592-594.

Miller, L. K. 1988. Baculoviruses as gene expression vectors. *Ann. Rev. Microbiol.* 42: 177~199. Nakamura, I., A. Watanabe, H. Tsunemitsu, N. Y. Kumura, K. I. Shimazaki, and Y. Yagi. 2001. Production of recombinant bovine lactoferrin N-Lobe in insect cells and its antimicrobial activity. *Protein Exp. and Puri.* 21:424-431.

Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

收件日期：2009年12月31日

接受日期：2010年06月08日

Study on the Production of Foreign Proteins in Silkworm (*Bombyx mori* L.)

Chin-Hsun Liao^{1*}, Yun-Chen Chan¹, Den-Jen Wu¹, Mei-June Lu¹,
Tzong-Yuan Wu², and Yu-Chan Chao³

¹Miaoli District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture, Executive Yuan, Miaoli, Taiwan, R. O. C.

²Department of Bioscience Technology, Chung Yuan Christian University, Chung Li, Taiwan, R. O. C.

³Institute of Molecular Biology, Academia Sinica, Taiwan, R. O. C.

ABSTRACT

In order to produce high economic proteins using Baculovirus expression vectors (BEVs) in silkworm larvae. We injected recombinant virus (vBmpDsRFP) expressing the red fluorescent protein (RFP) to 8 silkworm hybrids which the OJ03×OJ04 been a positive control. The primary results showed that OC05×FJ01, OJ03×OJ04 and OC05×YINFU that the fluorescent value in the hemolymph were 52.2, 49.8 and 37.8 unit, respectively, were the best potential candidates for producing RFP. The BEVs could also produce antimicrobial peptides, Royalisin and Apisimin from honeybee using silkworm larvae, and Apisimin were 4 mg/larvae in the hemolymph.

Key words: silkworm (*Bombyx mori* L.), nuclear polyhedrosis virus, baculovirus expression vectors, antimicrobial peptides

*Corresponding author, e-mail: jsliaw@mdais.gov.tw