

柯俐 胡小芬 王子龙 等. 基于 piggyBac 转座子系统的西方蜜蜂 *Rubia* 基因转移研究[J]. 江西农业大学学报, 2018 40(5): 1042-1047.



基于 piggyBac 转座子系统的西方蜜蜂 *Rubia* 基因转移研究

柯 俐 胡小芬 王子龙 曾志将 何旭江*

(江西农业大学 蜜蜂研究所 江西 南昌 330045)

摘要: 为探讨 piggyBac 载体在西方蜜蜂(*Apis mellifera*) 中的基因转移功能 并检测其可行性 研究以西方蜜蜂为实验材料 利用 piggyBac 转座子系统将外源性 *Rubia* 红色荧光蛋白基因转移至西方蜜蜂受精卵中 分析检测外源基因的整合与荧光表达情况。PCR 扩增和测序分析结果显示 piggyBac 转座子能够将外源性 *Rubia* 红色荧光蛋白基因整合到蜜蜂基因组上 且在显微注射组中检测到微弱的红色荧光蛋白表达。本研究证实 piggyBac 转座子系统可将外源性基因植入蜜蜂基因组。为今后的蜜蜂转基因基础研究和分子育种技术开发提供支撑。

关键词: piggyBac 转座子; *Rubia*; 西方蜜蜂; 基因转移; 显微注射

中图分类号: Q784 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2018) 05-1042-06

PiggyBac Transposon System-Mediated Transfer of *Rubia* Gene Transfer in *Apis mellifera*

KE Li ,HU Xiao-fen ,WANG Zi-long ,ZENG Zhi-jiang ,HE Xu-jiang*

(Honeybee Research Institute ,Jiangxi Agricultural University ,Nanchang 330045 ,China)

Abstract: To explore the gene transfer function of piggyBac transposon in western honeybees(*Apis mellifera*) and to further examine its feasibility *Apis mellifera* was used as an experimental material. The piggyBac transposon system was used to transfer the exogenous red fluorescent protein gene *Rubia* into the honeybee zygotes for the analysis and detection of foreign gene integration and fluorescence expression in honeybees. PCR amplification and sequencing analysis showed that the piggyBac transposon was able to integrate the exogenous *Rubia* red fluorescent protein gene into the honeybee genome. Fluorescence microscopy detection also showed a weak red fluorescent protein expression. This study confirms that the piggyBac transposon system could implant exogenous gene into honeybee genome. This would provide a basis for the future development of honeybee transgenic research and exploitation in molecular breeding.

Keywords: piggyBac transposon; *Rubia*; *Apis mellifera*; gene transfer; microinjection

蜜蜂是一种真社会性昆虫 其独特的生物学特性受到广泛关注 是神经生物学、行为学和分子生物学的新兴模式生物^[1]。蜜蜂的基因转移及转基因技术是研究蜜蜂生物学的重要手段。目前 精子

收稿日期: 2018-02-05 修回日期: 2018-04-04

基金项目: 国家蜂产业技术体系(CARS-44-kxj15) 和江西省教育厅科技计划项目(20171BAB214018)

Project supported by the Earmarked Fund for China Agriculture Research System(CARS-44-kxj15) and the Science and Technology Project of Education Department of Jiangxi Province(20171BAB214018)

作者简介: 柯俐(1994—) 男 硕士生 主要从事蜜蜂生物学研究 jnk1st@ 163.com; * 通信作者: 何旭江 助理研究员 , hexujiang3@ 163.com。

介导法^[2-4]、电穿孔法^[5-6]和基因定点编辑法^[7]已在蜜蜂中进行了大量试验,但均未获得良好效果。

piggyBac 转座子最早发现于鳞翅目昆虫粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)中,根据特征性的 TTAA 四核苷酸靶位点在基因组上完成切除与转座。其与 Minos、Hermes 和 mariner 等其它的 DNA 转座子不同,piggyBac 转座子家族因特异性识别 TTAA 序列并可以在基因组上自由移动,又被称为跳跃基因^[8]。目前,piggyBac 转座子在功能基因研究中拥有着强大的优势,具有转座频率高、转座后稳定,特别是物种适用性广泛等优点。该技术作为一种良好的外源基因导入手段,在许多鳞翅目和双翅目昆虫^[9-11]中广泛应用。

目前,piggyBac 在蜜蜂中的应用相对较少。2014 年 Schulte 等^[12]首次在蜜蜂中将 piggyBac 转座子与转座酶 mRNA 共注射,成功将外源性基因植入蜜蜂基因组中,并在子代中检测到荧光与插入染色体上位置。本研究基于 piggyBac 转座子系统,以西方蜜蜂为实验材料,利用显微注射技术将外源性 *Rubia* 红色荧光蛋白基因植入西方蜜蜂卵中,并检测其基因整合与荧光表达情况。该研究可为我国今后的蜜蜂转基因技术研究和分子育种技术提供科学理论基础。

1 材料与方 法

1.1 实验昆虫

本实验西方蜜蜂(*Apis mellifera*)选自江西农业大学蜜蜂研究所实验蜂场饲养的 3 群意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)。利用仿生免移虫王浆生产技术^[13]获取蜂王产卵 2 h 内受精卵。

1.2 piggyBac 质粒与菌株

感受态细胞 Trans5 α 购自广州全式金公司,质粒 pBac [6 \times P3-rubia]、质粒 pBac Transposase,由德国 Martin Beye 实验室馈赠。

1.3 主要试剂药品

限制性内切酶 *EcoRI* 2 kb、10 kb DNA marker 购自大连 Takara 公司;质粒提取试剂盒 Endofree Plasmid Midi Kit 50 preps 购于康为世纪生物科技有限公司;OMEGA DNA 提取试剂盒购自南昌赛尔生物公司;mMESSAGE mMACHINE[®] RNA 转录试剂盒,MEGAclear[™]回收试剂盒购自上海拜力生物科技有限公司。

1.4 显微注射与实验室培养

1.4.1 显微注射针 购自 eppendorf 公司,直径 2~5 μ m,针尖角度 37 $^\circ$,长度 5.1 cm,密封保存。

1.4.2 注射液体 质粒经质粒提取试剂盒提取,保存于-20 $^\circ$ C,在注射前取至室温 10 min;转座酶 mRNA 经转录试剂盒体外转录,保存于-80 $^\circ$ C,在注射前取至室温 10 min 待用。

1.4.3 蜜蜂卵的准备 利用仿生免移虫产卵器^[13]控王 2 h,获得约 80 粒卵供下一步试验所用。

1.4.4 意蜂卵的显微注射 将卵与上样显微注射针分别调试在倒置显微镜视野的中央。转座子 piggyBac 质粒的浓度为 20 μ L/ng。调节注射压力在 660 hPa,确认出液后备用,调整卵的角度至与针尖 70 $^\circ$ ~90 $^\circ$ 。令显微注射针从蜜蜂卵的尾端 1/3 注入,停留 1~2 s,看到蜂卵中出现液滴,移出针端。将注射后受精卵移至 35 $^\circ$ C,相对湿度 75%的培养箱内的盒子中培养。

1.4.5 蜜蜂卵的实验室培养 蜜蜂幼虫饲料配方参照 Vandenberg 等^[14]的方法,体外培养方法参照王倩等^[15]的方法。

1.5 piggyBac 质粒的提取与酶切

将菌株扩大培养后按照质粒提取试剂盒说明书提取转座质粒 piggyBac,用限制性内切酶 *EcoRI* 进行酶切 2 h,接着进行凝胶电泳,紫外成像观察。

表 1 本研究用到的引物

Tab.1 Oligonucleotide primers used in this study

基因名称 Gene	引物 Primers
Rubia	F: 5'-gatttaaggtcaagatggaggga-3'
Rubia	r: 5'-gtgtagtccccattatggctga-3'
piggy-out	rev: 5'-cagaccgataaaacacatgcctc-3'
EA-piggy	fw: 5'-ccatatacgcctcgggtgatctcg-3'

1.6 转 piggyBac 蜜蜂的分子生物学方法鉴定

提取蜜蜂基因组总 DNA。使用 Primer primer 5.0 软件设计引物两对,并由生工技术有限公司合成,

分别为 Rubia-F/r 阳性引物与 EA-piggy-fw/ piggy-out-rev 阴性引物。piggyBac 转座子在生物体内会在 BacR、BacL 两侧进行选择剪切形成两个活性臂,并插入染色体中。阴性引物位于 BacR 活性臂两侧,该对阴性引物参考自 Christina Schulte 的文章^[12]。目的产物胶回收产物送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.7 荧光显微镜检测

将蛹期蜜蜂置于 QLYMPUS-DP80 荧光显微镜观察结果。由于红色荧光蛋白的 6×P3 启动子在神经系统中特异表达,本实验选择神经系统较发达的头部进行观察。

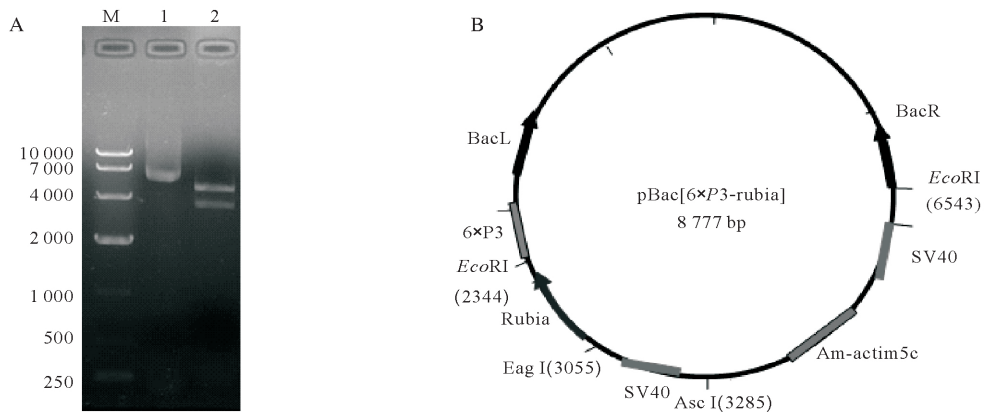
1.8 PCR 体外扩增与基因序列测序

将显微注射卵培养至蛹期。当蜜蜂蛹眼睛发育成熟并未出现颜色时,取其头部与腹部进行总 DNA 提取,并用上述引物进行 PCR 扩增。扩增反应体系为 25 μL,其中 2×Taq Master Mix 12.5 μL, 2 μL 模板 DNA,上下游引物各 1 μL, dd H₂O 补至终体积,94 °C 预变性 2 min,30 个循环(94 °C 变性 30 s; 56.7 °C 退火 45 s; 72 °C 延伸 90 s),72 °C 再延伸 10 min。电泳后切胶回收。送至生工生物工程股份有限公司进行基因测序。

2 结果与分析

2.1 转座质粒连接后构建

连接后的重组质粒长度为 8 777 bp,用酶切的方法鉴定 piggyBac 载体,用 EcoRI 限制酶酶切后在 Marker 3 900 bp 和 4 800 bp 附近或得两条目的条带(图 1-A 2 泳道),与预期的剪切结果一致。



A ,M: DNA Marker 10 000 ,1: pBac [6×P3-rubia] 质粒; 2: EcoRI 酶切; B pBac [6×P3-rubia] 重组质粒图谱 ,BacR、BacL: piggyBac 转座子的反向末端重复序列 6×P3: 6 个重复 Pax6 元件基因的核心启动子; SV40 SV40 多聚位点; Am-actin5c 启动子: 蜜蜂 actin5c 基因的上游翻译起始位点启动子; rubia: 编码红色荧光蛋白的报告基因

A ,M: DNA Marker 10 000; 1: pBac [6×P3-rubia] plasmid; 2: EcoRI digestion; B pBac [6×P3-rubia] recombinant plasmid map ,BacR ,BacL: piggyBac transposon inverted terminal repeats 6 × P3: core promoter of six repeat Pax6 element genes; SV40 SV40 polyadenylation sites; Am-actin5c promoter: upstream translation initiation promoter of honeybee actin5c gene; rubia: reporter genes encoding red and fluorescent proteins

图 1 pBac [6×P3-rubia] 重组质粒的酶切分析及图谱

Fig.1 Restriction analysis and mapping of recombinant plasmid pBac [6×P3-rubia]

2.2 蜜蜂培养数据

显微注射 232 粒卵,在恒温恒湿培养箱中室内培养,平均孵化率达 13.4%,成蛹率达 7.3%(表 2)。

表 2 注射转座子质粒与转座酶 mRNA 培养数据

Tab.2 Culture data of coinjection with transposon plasmid and transposase mRNA

组数 Groups	卵/粒 Egg/grain	孵化数 Number of hatching	孵化率 Hatching rate	蛹 Pupae	成蛹率 Pupae rate
1	74	10	13.5%	5	6.8%
2	81	11	13.6%	6	7.4%
3	77	10	13.0%	6	7.8%

2.3 转 piggyBac 蜜蜂表达鉴定

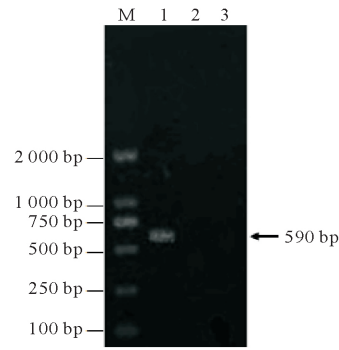
通过琼脂糖凝胶电泳, 获得特异性的 *Rubia* 目的产物(图 2), 产物条带大小与预期目的片段大小基本一致。

2.4 荧光显微镜观察

荧光显微镜检测 17 只显微注射蜜蜂蜂蛹, 结果表明: 显微注射实验组蜜蜂头部的吻与复眼有微弱的红色荧光信号, 而对照组无明显红色荧光信号, 表明 *Rubia* 红色荧光蛋白可在注射组蜜蜂蛹中进行微量表达(图 3)。

2.5 测序结果

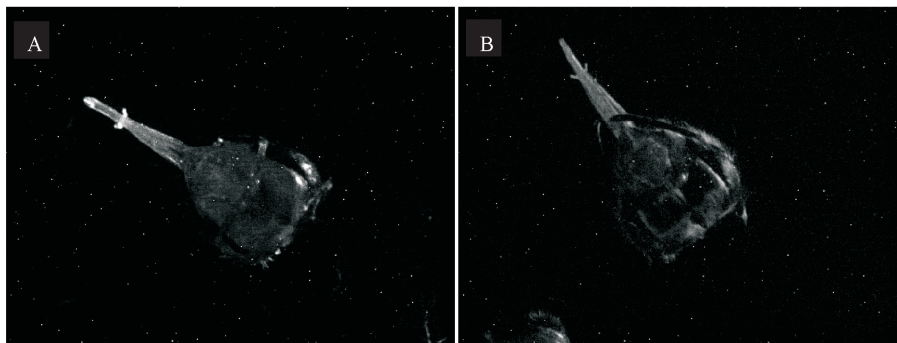
回收产物进行测序, 并在 NCBI 的 blast 进行比对。结果表明: 目的条带的基因序列与 piggyBac 转座子质粒中 *Rubia* 基因原始基因序列配比为 81.23%(图 4), 序列基本一致。



M: DL 2000; 1: 注射 piggyBac 转座质粒后意大利蜜蜂 DNA 引物阳性克隆; 2: 注射 piggyBac 转座质粒后意大利蜜蜂 DNA 阴性引物对照; 3: 野生型意大利蜜蜂

M: DL 2000; 1: Positive clone of *Apis mellifera ligustica* honeybee DNA primer after piggyBac transposing plasmid injection; 2: *Apis mellifera ligustica* honeybee DNA negative primer control after piggyBac transposing plasmid injection; 3: Wild-type *Apis mellifera ligustica* honeybee DNA

图 2 转座子质粒 *Rubia* 基因 PCR 分析
Fig.2 Transposon plasmid *Rubia* gene PCR analysis



A、B 分别为注射 piggyBac 质粒后蜜蜂头部与野生型蜜蜂头部对照组的红色荧光照片

A and B indicates the red fluorescence photos of the honeybee head with piggyBac plasmid injection and the wild type bee head control group respectively

图 3 荧光在蜜蜂头部中的表达观察

Fig.3 Fluorescent expression observation in honeybee

3 讨论

本实验通过在西方蜜蜂早期胚胎卵中注射 piggyBac 转座子和转座酶 mRNA, 研究了 *Rubia* 外源基因在蜜蜂受精卵中的转移与表达。本研究显微注射后的平均孵化率达 13.4%, 成蛹率达 7.3%, 与前人结果相近^[16]。表明显微注射 piggyBac 转座子系统与幼虫人工体外培养技术具有良好的操作性和成功率。通过荧光显微镜观察, 在注射组蜜蜂蛹头部出现部分红色荧光信号, 而未在对照组发现信号。同时, PCR 扩增也检测到了蜜蜂头胸部中外源基因 *Rubia* 片段。这一结果表明 piggyBac 转座系统可以将红色荧光蛋白 *Rubia* 转移入蜜蜂 DNA, 并进行微弱表达。

6×P3 启动子已经成功在黑腹果蝇^[17], 赤拟谷盗^[18], 异色瓢虫^[19], 蝴蝶^[20] 等的基因转移研究中应用, 在眼睛以及神经系统发育过程中至关重要^[21]。目前还没有蜜蜂特异性启动子的报道。因此本实验选用 6×P3 启动子, 但结果基因转移效率偏低, 可能该启动子在西方蜜蜂细胞中启动活性较弱有关。另外, 不同的启动子如 *Am-actin5c elp2l*, *Am-hsp83*, *Am-hsp70*, 6×P3 等在不同的时期与组织特异性表达。若能够选择构造出西方蜜蜂强表达特异性启动子, 外源基因在西方蜜蜂中的表达将会显著提高。

荧光蛋白标记技术在分子实验中应用广泛。本实验中选用的是 *Rubia* 红色荧光蛋白, 近年来用作果蝇^[22], 家蚕^[23], 斯氏按蚊^[24] 等昆虫转基因标记中。本实验中的阳性表达率与前人研究比较接近^[25],

Rubia	12	CGAGTTCGAGATTGAGGGAGA-GGAGAAGGCCGGCCTTACGAGGGCACACAAACCGCTAA
PCR products	243	CGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAA
Rubia	71	GCTCAAGGTCACAAAAGGAGGACCCCTCCCTTCTCTGGGATATTCTGAGCCCTCAGTT
PCR products	303	GCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCTTGCCTTCGCTGGGACATCCTGTCCCTCAGCT
Rubia	131	CCAGTACGGAAGCAAAGCCTATGTTAAACACCCCTGCCGACATCCCTGACTATCT-GAAGC
PCR products	363	CATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCGACTA-CTGGAAGC
Rubia	190	TCTCCTTCCCTGAAGGCTTCAAGTGGGAGAGATTGATGAACTTCGAGGACGGAGGCGTGG
PCR products	422	TGTCCTTCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGAGGCGTGG
Rubia	250	TGACAGTCACACAAGATAGCACCCCTCCAGGACGGAGAGTTTATTTATAAGGTGAAACTCA
PCR products	482	TGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAAGTGC
Rubia	310	GAGGAACCAACTTCCCTCCGATGGCCCTGTCATGC*****CAATGGGATGGGAAG
PCR products	542	GCGGCACCAACTTCCCTCCGACGGCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGG
Rubia	370	CCTCCACCGAGAGAATGTATCCTGAGGATGGCGCTCTGAAAGGCGAAAITAAAATGAGAC
PCR products	602	CCTCCATTGAGCGGTTGTACCCCGAGGACGGCGCTCTGAAAGGCGAGATCAAGCAGAGGC
Rubia	430	TGAAACTCAAAGACGGAGGACACTACGATGCCGAGGTCAAAACAACCTACAAGGCCAAGA
PCR products	662	TGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTC AAGACCACCTACAAGGCCAAGA
Rubia	490	AACAAGTGCAGCTGCCTGGGCG 511
PCR products	722	AGCCTGTGCAGCTGCCGGGCG 743

图 4 PCR 扩增产物测序与转座子 piggyBac 中 Rubia 基因序列比对结果

Fig.4 Comparison of PCR amplification products Sequencing and Rubia gene sequences in piggyBac transposon

但荧光表达比较弱。这可能与显微注射过程中转座事件的发生概率较低有关。此外,蜜蜂受精卵从蜂王生殖腺脱离后就开始快速激烈的卵裂、活化和分化等不同发育过程^[26]。本研究选取蜂王产卵 2 h 内的受精卵进行显微注射,可能受精卵已处于卵裂和分化等胚胎发育过程,影响了 piggyBac 转座系统的基因转移效率。实验组中幼虫的成活率比自然蜂群低,且孵化时间会延长。可能注射过程对受精卵有损伤效应,且外源基因 Rubia 对蜜蜂卵的孵化和幼虫发育也会造成一定影响。

蜜蜂是真社会昆虫,也是重要的经济昆虫。其社会分工、级型分化、单双倍体性别决定机制和工蜂监督等的生物学特性受到了广泛关注。piggyBac 转座技术在蜜蜂独特生物学的研究中具有良好的应用前景,也为蜜蜂分子育种提供了良好的技术手段。本研究利用 piggyBac 转座系统成功将 Rubia 蛋白成功转移至蜜蜂受精卵中。虽然转移效率偏低,且仅形成了嵌合体蜜蜂个体,但随着该技术不断的改进与突破,必将广泛应用到在今后的蜜蜂分子生物学研究与分子育种生产实践中。

参考文献:

[1] 郑火青,胡福良.蜜蜂:新兴的模式生物[J].昆虫学报,2009,52(2):210-215.
Zheng H Q, Hu F L. Honeybee: a newly emerged model organism[J]. Acta Entomologica Sinica, 2009, 52(2): 210-215.

[2] Robinson K, Ferguson H, Cobey S et al. Sperm-mediated transformation of the honey bee *Apis mellifera* [J]. Insect Molecular Biology, 2000, 9(6): 625-634.

[3] 郭冬生,张巧利,孙亮先.蜜蜂精子介导 GFP 基因转移研究[J].江西农业大学学报,2007,29(1):118-123.
Guo D S, Zhang Q L, Sun L X. Sperm-mediated GFP gene transfer in *Apis mellifera* Ligustica [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2007, 29(1): 118-123.

[4] 郭冬生,孙亮先,曾志将,等.中华蜜蜂精子介导 egfp 基因转移[J].昆虫学报,2007,50(9):878-882.
Guo D S, Sun L X, Zeng Z J et al. Sperm-mediated egfp gene transfer in the Chinese honeybee *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae) [J]. Acta Entomologica Sinica, 2007, 50(9): 878-882.

[5] Kunieda T, Kubo T. In vivo gene transfer into the adult honeybee brain by using electroporation [J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2004, 318(1): 25-31.

- [6] 郭冬生, 孙亮先, 黄志祥, 等. 电穿孔导入法在意大利蜜蜂卵基因转移上的应用[J]. 江西农业大学学报, 2008, 30(3): 418-421.
Guo D S, Sun L X, Huang Z X, et al. Application of electroporation in transferring exogenous DNA into *Apis mellifera* ligustica eggs[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis 2008, 30(3): 418-421.
- [7] 尉玮. 蜜蜂卵期发育基因敲除试验[D]. 福州: 福建农林大学, 2014.
Wei W. Stimulated knocking out developmental genes of honeybee at egg stage[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2014.
- [8] Brochta D, Atkinson P. Mini-review transposable elements and gene transformation in non-drosophilid insects[J]. Insect molecular biology, 1996, 26(8): 739-753.
- [9] Tamura T, Masafumi Y, Hiroshi N, et al. New and highly efficient method for silkworm transgenesis using autographa californica nucleopolyhedrovirus and piggyBac transposable elements[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2004, 88(7): 849-853.
- [10] Stern D, Crocker J, Ding Y, et al. Genetic and transgenic reagents for *Drosophila simulans*, *D. mauritiana*, *D. yakuba*, *D. santomea* and *D. virilis*[J]. G3-Genes Genomes Genetics, 2017, 7(1): 1339-1347.
- [11] Grossman G, Rafferty C, Clayton J, et al. Germline transformation of the malaria vector *Anopheles gambiae*, with the piggyBac transposable element[J]. Insect Molecular Biology, 2001, 10(6): 597-604.
- [12] Schulte C, Theilenberg E, Muller M, et al. Highly efficient integration and expression of piggyBac-derived cassettes in the honeybee (*Apis mellifera*) [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, 111(24): 9003-9008.
- [13] 曾志将, 吴小波, 张飞, 等. 蜂王浆机械化生产关键技术研究与应用(I): 仿生免移虫生产器设计[J]. 江西农业大学学报, 2013, 35(4): 842-847.
Zeng Z J, Wu X B, Zhang F, et al. Research and application of key technique for mechanized production of royal jelly(I): A design of bionic non-grafting larvae ovipositor[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2013, 35(4): 842-847.
- [14] Vandenberg J, Shimanuki H. Technique for rearing worker honeybees in the laboratory[J]. Journal of Apicultural Research, 1987, 6(2): 90-97.
- [15] 王倩, 孙亮先, 肖培新, 等. 室内人工培育中华蜜蜂幼虫技术研究[J]. 山东农业科学, 2009, 47(11): 113-116.
Wang Q, Sun L X, Xiao P X, et al. Study on technology for indoor artificial feeding of *Apis cerana cerana* Larva[J]. Shandong Agricultural Science, 2009, 47(11): 113-116.
- [16] 王倩, 胥保华. 蜜蜂卵显微注射转基因技术研究进展[C]//2008年全国蜂产品市场信息交流会论文集, 2008: 44-45.
Wang Q, Xu B H. Advances in transgenic technique of honeybee eggs microinjection research[C]//2008 proceedings of national bee product market information exchange, 2008: 44-45.
- [17] Horn C, Wimmer E. A versatile vector set for animal transgenesis[J]. Development Genes and Evolution, 2000, 210: 630-637.
- [18] Schinko J, Weber M, Viktorinova I. Functionality of the GAL4/UAS system in *Tribolium* requires the use of endogenous core promoters[J]. BMC Developmental Biology, 2010, 10(1): 1-12.
- [19] Kuwayama H, Yaginuma T, Yamashita O, et al. Germ-line transformation and RNAi of the ladybird beetle *Harmonia axyridis* [J]. Insect Molecular Biology, 2006, 15(4): 507-512.
- [20] Marcus J, Ramos D, Monteiro A. Germline transformation of the butterfly *Bicyclus anynana* [J]. Proceedings of the Royal Society, 2004, 271(5): 263-265.
- [21] Callaerts P, Halder G, Gehring W. Pax-6 in development and evolution[J]. Annual Review Neuroscience, 1997, 20(1): 483-532.
- [22] Grover D, Yang J, Ford D, et al. Simultaneous tracking of movement and gene expression in multiple *Drosophila melanogaster* flies using GFP and Dsred fluorescent reporter transgenes[J]. BMC Research Notes, 2009, 2(1): 1-11.
- [23] Wen H X, Lan X, Zhang Y S, et al. Transgenic silkworms (*Bombyx mori*) produce recombinant spider dragline silk in cocoons[J]. Molecular Biology Reports, 2010, 37(1): 1815-1821.
- [24] Gantz V, Jasinskiene N, Tatarenkova O, et al. Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015, 112(1): 6736-6743.
- [25] Genc H, Schetelig F, Nirmaka X, et al. Germline transformation of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae) with a piggyBac transposon vector[J]. Turkish Journal of Biology, 2016, 40(1): 845-855.
- [26] Cridge A, Lovegrove M, Skelly J, et al. The honeybee as a model insect for developmental genetics[J]. Genesis, 2017, 55(5): 01-12.