抑制性差减杂交技术在蚊虫研究中的应用*

刘斯璐[1**] 毛 芸[1,2**] 乔传令[1] 崔 峰[1***]

(1. 中国科学院动物研究所 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室 北京 100101;
2. 河南师范大学生命科学学院 新乡 453007)

摘 要 抑制性差减杂交技术(suppression subtractive hybridization)是在差减杂交和抑制性 PCR 技术的基础上发展起来的鉴别差异表达基因的实验方法,用于分离 2 种具有相同或者相似遗传背景,但是表型上有差异的生物样品中差异表达的基因。这项技术在蚊虫许多研究领域,如抗药性、病原体感染、生理特性等得到广泛的应用。本文对抑制性差减杂交技术在蚊虫各研究领域的应用情况进行了综述。

关键词 抑制性差减杂交技术,蚊虫,抗药性,病原体感染,生理特性

Application of suppression subtractive hybridization in mosquito researches

LIU Si-Lu[1**] MAO Yun[1,2**] QIAO Chuan-Ling[1] CUI Feng[1***]

(1. The State Key Laboratory of Integrated Pest Management, Institute of Zoology, Chinese of Sciences, Beijing 100101, China;
2. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract Suppression subtractive hybridization (SSH) is a technique based on subtractive hybridization and suppression PCR. SSH is an effective and sensitive way of identifying differently expressed genes in two samples with the same, or similar, genetic backgrounds but different phenotypes. This technique has been widely used in many areas of mosquito research, such as insecticide resistance, pathogenic infection, and physiology. Here we review progress in the application of SSH in these fields.

Key words uppression subtractive hybridization, mosquito, insecticide resistance, pathogenic infection, physiology

抑制性差减杂交技术是以差减杂交和抑制性 PCR 技术为基础的分离差异表达基因的方法(Diatchenko *et al.*,1996),该技术广泛用于分离 2 个具有相同或者相似遗传背景,但是表型不同的样品中差异表达的基因。抑制性差减杂交技术与其他的分离差异表达的技术相比,具有假阳性率低、特异性高、筛选效率高、操作简便、周期短等优点(Rebrikov *et al.*,2004;郑邈和刘文励,2006;刘静和赵颖,2008),被广泛应用于生命研究的各个领域(邱志鹏和王翀,2006;韩红玉等,2006)。

蚊虫是与我们生活密切相关的昆虫之一,由于其特殊的生理习性,蚊虫成为多种流行病(如疟疾、丝虫病、登革热、流行性乙型脑炎等)的传播媒介(Hay *et al.*, 2000)。目前抑制性差减杂交技术已应用到蚊虫的抗药性、病原体感染以及生理特性等方面的研究。本文介绍了抑制性差减杂交技术的原理和方法,及其在蚊虫研究中的应用。

1 抑制性差减杂交的原理

抑制性差减杂交技术是将差减杂交和抑制性 PCR 结合,以含有某种特殊表型的样品材料作为 Tester,不含该种表型的的样品为 Driver(正向差减杂交),Tester 和 Driver 的 cDNA 片段经过两轮杂交,去除共表达的基因片段,分离差异表达的片段,再经过 PCR 扩增,使差异表达的片段得到富集,从而构建差减文库,得到与该种特殊表型正向

* 资助项目:动物研究所知识创新工程青年人才领域前沿项目(KSCX3 - IOZ - 1006)。

**共同第一作者

***通讯作者,E-mail:cuif@ioz.ac.cn

收稿日期:2011-06-13,接受日期:2011-04-25

相关的基因片段。反向差减杂交则是将正向差减的 Tester、Driver 互换,最终经过差减杂交得到与该种特殊表型反向相关的基因片段。

抑制性差减杂交技术主要用于分离组织特异性表达和诱导型表达的基因,由于其筛选效率高、操作简便,可在一个反应过程中将稀有基因序列富集上千倍(黄鑫等,2006)。

2　抑制性差减杂交技术在蚊虫相关研究中的应用

2.1　抗药性研究

从 20 世纪中叶开始,人们大量施用杀虫剂对害虫进行防控,蚊虫普遍对杀虫剂产生抗性(王少丽等,2011)。目前对抗性机制的研究主要立足于代谢抗性和靶标抗性,但是,昆虫产生抗药性不是一个或者几个基因作用的结果,而是机体多方面代谢机制的进化调整,通过差减杂交的方法,可以得到更多的不被关注的抗性相关基因,从而进一步完善抗性机理。运用差减杂交的方法已经构建了多个不同蚊虫品系针对不同种杀虫剂的差减文库,并且从文库中筛选出大量抗性相关的新基因。

田海生等(2001)、Wu 等(2004)和 Liu 等(2007)用抑制性差减杂交方法筛选了淡色库蚊 *Culex pipiens pallens* 和致倦库蚊 *Culex pipiens quinquefasciatus* 抗溴氰菊酯抗性相关基因,并对这些基因进行了功能推测。Pridgeon 等(2009)从埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 氯菊酯抗性品系筛选了抗性基因,其中已知功能的基因有 7 个(表 1)。吴家红等(2006)运用抑制性差减杂交的方法初步构建了白纹伊蚊 *Aedes albopictus* 对溴氰菊酯抗性的差减 cDNA 文库,正向文库 580 个克隆,反向文库 477 个克隆,为白纹伊蚊溴氰菊酯抗性机理的研究打下基础。Wu 等(2004)和 Zhang 等(2011),用抑制性差减杂交方法和 cDNA 微列阵技术从淡色库蚊中筛到 *prag01* 基因,并证明了 *prag01* 基因与溴氰菊酯抗性相关。

蚊虫的抗药性是一个复杂的进化过程,除了与杀虫剂代谢有关的基因,如泛素化蛋白、烯醇酶等扩增表达,还有大量的功能性基因扩增表达,如核糖体蛋白、肌球蛋白、肌动蛋白等。除此之外,还发现了诸多功能未知的蛋白,为蚊虫抗药性的研究开辟了新的空间。抗药性的产生不仅是几个已知抗性相关的基因家族的调控,而是蚊虫在新陈代谢各个水平都因杀虫剂而产生变化,以使蚊虫能够适应杀虫剂的选择压力。

2.2　病原体感染相关研究

蚊虫是人类多种传染病的媒介,如疟疾、丝虫病等,这些疾病严重危害着人们的健康。运用差减杂交的方法构建蚊虫对寄生虫等的感染免疫 cDNA 文库,对差减文库中的差异表达基因进行进一步分析和研究,可以更加全面的了解蚊虫与这些病原微生物的作用下,组织基因表达的变化,以及组织细胞间的相互调节机制,从而更好的指导蚊媒病的防控。

表 2 列出了差减文库得到的疟原虫感染斯氏按蚊 *Anopheles stephensi* 相关的 37 种基因,其功能复杂。Oduol 等(2000)以大肠杆菌内毒素感染冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*,用抑制性差减杂交方法获得相关基因,这些基因可编码丝氨酸蛋白酶、核糖体蛋白、Limulu 血细胞因子等,还有 6 种编码蛋白功能未知(表 3)。Kumar 和 Paily(2008)通过抑制性差减杂交的方法构建了致倦库蚊感染班氏丝虫(*Wuchereria bancrofti*)的差减文库,并且从文库中筛选出 23 条与病原体感染相关的片段。张健等(2005)以感染约氏疟原虫 *Plasmodium yoelii* 的大劣按蚊 *Anopheles dirus* 为 Tester,未感染的为 Driver,经过差减杂交,初步得到大劣按蚊感染疟原虫的差异表达 cDNA 文库。Zhao 等(2010)通过抑制性差减杂交的方法发现致倦库蚊中金属镁在转录水平调控的相关基因,而镁为致倦库蚊中杆状病毒传播的重要物质。

2.3　生理特性相关研究

常见媒介蚊虫的雌虫和雄虫在生理上有很多差异,例如雌蚊吸血习性以及滞育越冬等。由于蚊虫存在这些生理方面的显著差异,对其生理特性相关的差异研究成为蚊虫研究的重要方面。通过对这些差异的原理机制的深入了解,能够有选择性的抑制雌蚊发育、吸血或产卵,从而阻断蚊虫的繁殖,为蚊虫以及蚊媒病的的防治开辟新途径(陈虹虹等,2007)。

雄蚊以吸食植物汁液为生,而雌蚊的卵巢需要经过吸食人或动物的血液才能发育成熟,雌蚊的嗜血习性使其成为多种疾病的传播媒介,也成为蚊虫研究的一个重要方面。陈虹虹等(2007)和 Chen 等(2007)通过抑制性差减杂交的方法构建

表 1 差减文库筛选得到的抗药性相关基因

Table 1 Resistance related genes identified from SSH library

蚊虫品系 Strain	差异倍数* Fold change	GenBank 登录号 GenBank number	推测功能 Predicted function	参考文献 Reference
淡色库蚊溴氰菊酯抗性品系 Deltamethrin-resistant strain of *Culex pipiens pallens*	4.57	BE247826	胰蛋白酶前体	田海生等,2001; Wu *et al.*,2004
	3.17	BE247832	核糖体蛋白 L22 mRNA	
	3.06	BE247812	视蛋白 mRNA	
	3.49	BE247801	胰凝乳蛋白酶前 mRNA	
	3.76	BE247804	40S 核糖体 RNA 蛋 S4	
	3.0	BE247829	16S 核糖体 RNA 基因	
	3.54	BE247806	线粒体	
	特异	AY034058	40S 核糖体蛋白 S29 基因	
	特异	AY034059	球蛋白调节轻链 2	
致倦库蚊溴氰菊酯抗性品系 Deltamethrin-resistant strain of *Culex pipiens quinquefasciatus*	18.0	EC093821	HAD 水解酶 IIB 亚族	Liu *et al.*,2007
	2.5	EC093825	脂肪酸合成酶	
	17.4	EC093833	细胞色素 P450 *CYP9K1*	
	15.2	EC093837	细胞色素 P450 *CYP9F2*	
	5.2	EC093819	视网膜色素	
	10.0	EC093836	Arrestin	
	4.8	EC093817	Rab-protein 5	
	5.3	EC093832	线粒体磷酸盐运载蛋白	
	6.7	EC093818	肌动蛋白	
	7.2	EC093824	肌特异性肌动蛋白 3	
	8.8	EC093816	F-box	
	7.4	EC093823	核糖体蛋白 L38	
	3.7	EC093831	核糖体蛋白 L19	
	2.7	EC093834	核糖体蛋白 L2/L8	
	2.2	EC093835	Elongation factor 1-α	
	7.4	EC093827	烯醇酶	
埃及伊蚊氯菊酯抗性品系 Permethrin-resistant strains of *Aedes aegypti*	2.6	AAP59419.1	溴氰菊酯抗性相关蛋白 NYD-OP5	Pridgeon *et al.*,2009
	2.5	EAA07773.3	冈比亚按蚊 ENSANGP00000016852 蛋白	
	4.0	AAX54868.1	分泌蛋白	
	3.1	ABD62340.1	细胞色素 C 氧化酶Ⅲ亚基蛋白	
	4.8	EAA04820.3	冈比亚按蚊 ENSANGP00000019508 蛋白	
	2.2	AAH75753.1	硫酸酶泛素化蛋白 CTD	
	3.7	I30010	线粒体 NADH2 脱氢酶	

* 抗性品系与敏感品系基因表达水平的比值。

* The ratio between the resistant strain and the susceptible strain.

了淡色库蚊雌蚊性别差异表达 cDNA 文库,共得到 98 个 ESTs 片段,其中 57 个片段与已知序列同源。其中有一条片段为雌蚊特异表达的基因,编码唾液蛋白,具有凝血方面的功能,Northern 杂交进一步证明其表达的特异性。唾液腺是嗜血蚊虫的重要器官,雌蚊唾液腺分泌蛋白中有多种与血液凝集相关的蛋白,这些蛋白在雌蚊唾液腺特定部位特异表达,吸食植物汁液的雄蚊不能分泌表达这类蛋白。

赵以睿等(2008)和 Geng 等人(2009)构建了嗜人按蚊 *Anopheles anthropophagus* 雌蚊性别差异差减文库,并运用 cDNA 芯片对文库中 3 074 个 ESTs 进行验证,其中 1 274 个在雌蚊中高表达。选取 12 个雌蚊差异表达的基因片段进行 real-time PCR 验证,对差减文库进行进一步的验证,其结果与芯片结果基本一致。

表 2　差减文库筛选得到的斯氏按蚊与疟原虫感染相关基因

Table 2　Genes related to plasmodium infection in *Anopheles stephensi* from SSH library

GenBank 登录号 GenBank number	推测功能 Predicted function	参考文献 Reference
BF381363	转录起始因子 ⅡD	
BF381365	羧酸酯酶末端残基泛素化 L3	
BF381378	α-天门冬氨酰二肽酶	
BF381369	前列腺酸性磷酸酶前体	
BF381370	天冬氨酸蛋白酶溶酶体前体	
BF381371	核苷二磷酸激酶	
BF381372	转录延伸因子 Tu 前体	
BF381374	丝氨酸 6 基因产物	
BF381375	CG8506 基因产物	
BF381376	DNA 复制因子 MCM7	
BF381377	依赖 NAD + 异柠檬酸脱氢酶	
BF381380	ADP/ATP 运载蛋白	
BF381368	人异亮氨酸 tRNA 合成酶	
BF381382	CG5354 基因产物	
EAA05234. 2	富半胱氨酸抗菌肽	徐晓春等,2001;
AAL16045. 1	气味结合蛋白	Dixit *et al.*,2009
AAO06833. 1	细胞骨架和形态发生	
AAO06831. 1	气味结合蛋白	
AAO06834. 1	表层抗菌肽	
AAO06834. 1	TT_ORF1	
AAO06827. 1	羧酸代谢	
AAO06287. 1	富脯氨酸识别序列	
EAA05902. 2	核糖体结构组分	
EAA06859. 2	钴螯合活性蛋白	
AAO06833. 1	宿主-异源物相互作用	
AAO06820. 1	DNA 依赖 ATP 酶	
BAE53440. 1	核核糖体运输	
AAO06828. 1	核苷酸合酶	
AAL16042. 1	气味结合蛋白	
AAL16042. 1	推测:跨膜蛋白	
AAO06831. 1	精氨酸脱亚胺酶	
AAO74840. 1	纤维连接蛋白	
NZ_AAAB02069259	细胞结构组分	
AAO74838. 1	Chordopox 病毒 G3 蛋白	
EAA06859. 2	蚊虫抗菌肽	
AAL16043. 1	气味结合蛋白	

表 3 差减文库筛选得到的冈比亚按蚊与大肠杆菌内毒素感染相关的基因

Table 3 Genes related to *Escherichia coli* endotoxin infection in *Anopheles gambiae* from SSH library

差异倍数 Fold change	GenBank 登录号 GenBank number	推测功能 Predicted function	参考文献 Reference
4	AF203339	丝氨酸蛋白酶抑制剂	
5	AF203333	α2-巨球蛋白和补体蛋白 C3 抑制剂	
30	AF203336	丝氨酸蛋白酶,类胰凝乳蛋白	
13	AF203334	丝氨酸蛋白切割域,凝血因子 X	
3	AF203337	丝氨酸蛋白,Limulu 血细胞因子 D	
100	AF203338	丝氨酸蛋白,类胰蛋白酶	
10	AF203335	丝氨酸蛋白,Limulu 血细胞因子 D	
8	AF283262	推测:DNA 损伤诱导蛋白	Oduol *et al.*,2000
4	AF283263	P10/OS	
19	AF283264	核估价依赖因子 A	
3	AF283265	β-乙糖胺酶,β 链	
100	AF283266	推测:DNA 酶同源蛋白	
1.5	AF283268	核糖体 S18 蛋白	
4	AF283269	核糖体 S26 蛋白	
9	AF283272	苯丙氨酸羟化酶	
12	AF283274	冈比亚按蚊 ce5	
7	AF283275	小惹激蛋白,hsp20 家族	
2	AF283260	未知	
5	AF283261	未知	
5	AF283267	未知	
7	AF283270	未知	
6	AF283271	未知	
2	AF283272	未知	

对蚊虫的研究通常以雌蚊为重点,对雄蚊的生长发育研究相对较少。Krzywinska 和 Krzywinski (2009)以雄蚊为研究对象,构建了冈比亚按蚊雄蚊差减文库,初步得到 23 条片段,并用 RT-PCR 对 5 条雄蚊特异表达的片段进行验证。

蚊虫通常以雌蚊成虫越冬,少数以卵或幼虫越冬。雌蚊在夏末秋初,因环境温湿度、光照周期等因素影响,进入滞育期。蚊虫滞育方面的研究主要集中在滞育的生理表现、环境因素以及激素调节 3 个方面,对蚊虫滞育的分子机制研究相对较少。差减杂交在蚊虫滞育相关基因的研究方面发挥了重要的作用。Robich 等(2007)构建了尖音库蚊早期滞育和晚期滞育正反向差减文库,用 Northern blot 对差减文库进行了验证。分别有 6 条、17 条基因片段在滞育早期、晚期高表达,2 条基因片段在整个滞育期高表达,2 条基因片段在滞育期低表达,5 条基因片段在滞育和非滞育期表达量没有明显差异。Urbanski 等(2010)构建了白纹伊蚊滞育差减文库,共 438 个克隆,对这些克隆进行序列分析后,得到 324 个不同的序列。

作为完全变态昆虫,蚊虫在不同的生理阶段具有明显的形态及生理差别。不同阶段的差异性成为蚊虫研究的另一重要方面。Krebs 等(2002)以埃及伊蚊为实验材料,分别构建了 4 龄蚊幼虫和蛹的差减文库。4 龄幼虫差减文库包括 103 个 cDNA 片段,其中 62 个与已知基因具有同源性,41 个为未知基因。蛹的差减文库有 116 个 cDNA 片段,其中 59 个与已知基因具有同源性,57 个为未知基因。用 cDNA 芯片对差减文库进行进一步验证,分别有 15%、19% 的基因在 4 龄幼虫和蛹期特异表达。

3 展望

抑制性差减杂交技术自问世以来,在生命科学领域得到了广泛的使用,通过这个技术,构建了多种生物物种的差减文库,发现了大量的新基因,

已经成为科学工作者发现、克隆新基因,研究基因的表达,探讨动植物等生理生化机制的有效手段。这项技术在蚊虫的研究领域也得到了很广泛的使用,并且与斑点杂交、Northern 杂交、基因芯片、RT-PCR、real-time PCR 等技术相结合,已经构建了蚊虫多种差减文库,发现了大量的新基因或基因片段。这项技术在蚊虫的防控研究中还将继续发挥重要的作用。

参考文献(References)

Chen HH, Zhang RL, Geng YJ, Cheng JQ, Zhang SX, Huang DN, Yu L, Gao ST, Zhu XQ, 2007. Identification of differentially expressed genes in female *Culex pipiens pallens*. *Parasitol. Res.*, 101(3):511—515.

Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD, 1996. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *PNAS*, 93(12):6025—6030.

Dixit R, Sharma A, Mourya DT, Kamaraju R, Patole MS, Shouche YS, 2009. Salivary gland transcriptome analysis during Plasmodium infection in malaria vector *Anopheles stephensi*. *Int. J. Infect. Dis.*, 13(5):636—646.

Geng YJ, Gao ST, Huang DN, Zhao YR, Liu JP, Li XH, Zhang RL, 2009. Differentially expressed genes between female and male adult *Anopheles anthropophagus*. *Parasitol. Res.*, 105(3):843—851.

Hay SI, Myers MF, Burke DS, Vaughn DW, Endy T, Ananda N, Shanks GD, Snow RW, Rogers DJ, 2000. Etiology of interepidemic periods of mosquito-borne disease. *PNAS*, 97(16):9335—9339.

Krebs KC, Brzoza KL, Lan Q, 2002. Use of subtracted libraries and macroarray to isolate developmentally specific genes from the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(12):1757—1767.

Krzywinska E, Krzywinski J, 2009. Analysis of expression in the *Anopheles gambiae* developing testes reveals rapidly evolving lineage-specific genes in mosquitoes. *BMC Genomics*, 10:300 doi:10.1186/147-2164-10300.

Kumar BA, Paily KP, 2008. Identification of immune-responsive genes in the mosquito *Cluex quinquefasciatus* infected with the filarial parasite *Wuchereria bancrofti*. *Med. Vet. Entomol.*, 22(4):394—398.

Liu NN, Liu H, Zhu F, Zhang L, 2007. Differential expression of genes in pyrethroid resistant and susceptible mosquitoes, *Culex quinquefasciatus* (S.). *Gene*, 394(1/2):61—68.

Oduol F, Xu J, Niare O, Natarajan R, Vernick KD, 2000. Genes identified by an expression screen of the vector mosquito *Anopheles gambiae* display differential molecular immune response to malaria parasites and bacteria. *PNAS*, 97(21):11397—11402.

Pridgeon JW, Becnel JJ, Clark GG, Linthicum KJ, 2009. Permethrin induces overexpression of multiple genes in *Aedes aegypti*. *J. Med. Entomol.*, 46(3):580—587.

Rebrikov DV, Desai SM, Siebert PD, Lukyanov SA, 2004. Suppression subtractive hybridization. *Methods Mol. Biol.*, 258:107—134.

Robich RM, Rinehart JP, Kitchen LJ, Denlinger DL, 2007. Diapause-specific gene expression in the northern house mosquito, *Culex pipiens* L., identified by suppressive subtractive hybridization. *J. Insect Physiol.*, 53(3):235—245.

Urbanski JM, Aruda A, Armbruster P, 2010. A transcriptional element of the diapause program in the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*, identified by suppressive subtractive hybridization. *J. Insect Physiol.*, doi: 10.1016/j.jinsphys.2010.03008.

Wu HW, Tian HS, Wu GL, Gretchen L, Jonathan K, Shen B, Ma L, Li XL, Gu Y, Hu XB, Zhu CL, 2004. *Culex pipiens pallens*: identification of genes differentially expressed in deltamethrin-resistant and-susceptible strains. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 79(3):75—83.

Zhang J, Yang M, Wang W, Sun H, Xu Y, Ma L, Sun Y, Zhu C, 2011. *prag01* a novel deltamethrin-resistance-associated gene from *Culex pipiens pallens*. *Parasitol. Res.*, 108(2):417—423.

Zhao LM, Becnel JJ, Clark GG, Linthicum KJ, Chen J, Jin X, 2010. Identification and expression profile of multiple genes in response to magnesium exposure in *Culex quinquefasciatus* larvae. *J. Med. Entomol.*, 47(6):1053—1061.

陈虹虹, 张仁利, 耿艺介, 程锦泉, 张韶华, 朱子立, 张秀梅, 高世同, 黄达娜, 朱兴全, 2007. 淡色库蚊性别差异表达 cDNA 文库的构建和分析. 热带医学杂志, 7(2):105—108 转 147.

韩红玉, 林矫矫, 黄兵, 2006. 抑制性消减杂交技术在寄生虫学研究中的应用. 生物技术通报, (2):50—55.

黄鑫, 戴思兰, 孟丽, 郑国生, 2006. 抑制性差减杂交(SSH)技术在分离植物差异表达基因中的应用. 分子植物育种, 4(5):735—746.

刘静，赵颖，2008. 抑制性消减杂交(SSH)技术及其应用. 河北化工，31(7):31—32 转 37.

邱志鹏，王翀，2006. 抑制消减杂交及其应用. 生物技术通报，增刊:246—250.

田海生，朱昌亮，高晓红，马磊，沈波，李秀兰，昊现陵，2001. 淡色库蚊对溴氰菊酯抗药性和敏感性相关基因克隆和序列分析. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志，19(4):193—197.

王少丽，张友军，李如美，吴青君，徐宝云，2011. 北京和湖南烟粉虱生物型及其抗药性监测. 应用昆虫学报，48(1):27—31.

吴家红，赵彤言，董言德，2006. 溴氰菊酯抗性白蚊依蚊抑制消减 cDNA 文库的构建. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志，24(4):281—284.

徐晓春，翟逢伊，宋关鸿，徐建农，2001. 蚊媒感染疟原虫后应答性表达增高基因的富集和筛选. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志，19(6):325—329.

张健，徐文岳，段建华，黄复生，王英，2005. 大劣按蚊抗约氏疟原虫感染相关 cDNA 文库的构建. 中国寄生虫病防治杂志，18(3):169—171.

赵以睿，张仁利，耿艺介，高世同，黄达娜，朱兴全，2008. 嗜人按蚊雌蚊消减 cDNA 文库的构建及分析. 中国人兽共患病学报，24(7):603—606 转 611.

郑邈，刘文励，2006. 抑制性消减杂交应用的研究进展. 基础医学与临床，26(11):1276—1280.