



致倦库蚊 *GSTe1* 和 *CYP9J40* 的时空表达特点*

王 炜^{1**} 陈少良¹ 崔 峰^{2***}

(1. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083 ;

2. 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)

摘 要 【目的】细胞色素 P450 单加氧酶 (P450) 和谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 是生物降解外源有毒物质的重要解毒酶家族, 在昆虫适应杀虫剂选择的过程中发挥重要的作用。以往在致倦库蚊 *Culex pipiens quinquefasciatus* 对硫磷抗性研究中, 发现了一个 Epsilon GST 基因 (*GSTe1*) 和一个 P450 CYP9 家族基因 (*CYP9J40*) 在抗性品系中高表达。研究它们在蚊虫中的时空表达模式对理解它们的生物学功能有重要意义。【方法】本研究利用实时定量 PCR 和原位杂交的方法探讨了这两个解毒酶基因在蚊虫中的时空表达。【结果】定量 PCR 显示 *GSTe1* 和 *CYP9J40* 在对硫磷抗性蚊虫中的转录水平分别是敏感蚊虫的 4.2 倍和 1.9 倍, 它们在蚊虫整个生活周期的表达模式相似, 均为幼虫期表达量相对较低, 从蛹期开始表达量显著升高, 到成虫期雌虫达到顶峰, 而雄虫与幼虫期表达量相当。原位杂交结果表明这两个基因在肌肉、消化道和卵巢中都有表达, 且 *CYP9J40* 的表达更广泛, 在脑和胸部神经节也有明显表达。【结论】基因表达的发育阶段特异性和广泛的组织分布说明 *GSTe1* 和 *CYP9J40* 除了参与蚊虫对杀虫剂的抗性, 还可能具有其它生理功能, 如对雌虫发育有重要的影响。

关键词 致倦库蚊, 解毒酶, 抗性, 抗药性, 时空表达

Temporal and spatial expression of the *GSTe1* and *CYP9J40* genes in *Culex pipiens quinquefasciatus*

WANG Wei^{1**} CHEN Shao-Liang¹ CUI Feng^{2***}

(1. College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract 【Objectives】Cytochrome P450 monooxygenase (P450) and glutathione S-transferase (GST) are important enzymes for the degradation of exogenous toxins in eukaryotes and play key roles in insecticide resistance in insects. In a previous study we found that the transcriptional levels of the Epsilon GST (*GSTe1*) and P450 CYP9 (*CYP9J40*) genes were up-regulated in a parathion-resistant strain of *Culex pipiens quinquefasciatus*. We here explore the temporal and spatial expression patterns of these two genes in order to further elaborate their biological functions. 【Methods】Real-time PCR and *in situ* hybridization were used to explore the temporal and spatial expression patterns of the two genes. 【Results】Real-time PCR showed that the transcription levels of *GSTe1* and *CYP9J40* in the parathion-resistant strain of *C. p. quinquefasciatus* were 4.2 and 1.9-fold higher, respectively, than those of a susceptible strain. These two genes had similar expression patterns over the mosquito life cycle; expression was low in larvae, increased in pupae, and peaked in female adults, whereas expression in male adults was the same as that in larvae. *In situ* hybridization demonstrated that both genes were expressed in

* 资助项目: 国家科技重大专项 (2012ZX10004219); 国家自然科学基金面上项目 (31272364)

** E-mail: 031150796@163.com

***通讯作者, E-mail: cuif@ioz.ac.cn

收稿日期: 2013-12-06, 接受日期: 2014-03-11

muscle, the digestive tract, and ovary. *CYP9J40* was, however, expressed in a greater range of tissues, including the brain and thoracic ganglion, than *GSTe1*. **[Conclusion]** The observed changes in expression levels during development and the expression of these genes in a wide range of tissues imply that, in addition to insecticide resistance, *GSTe1* and *CYP9J40* play a role in other metabolic processes, such as female development.

Key words *Culex pipiens quinquefasciatus*, detoxification enzyme, P450, GST, insecticide resistance, temporal and spatial expression

蚊虫由于其特殊的取食、生殖途径,已经成为多种疾病的传播媒介,危害人类健康。我国分布的优势种是尖音库蚊复组 *Culex pipiens complex*, 在南方主要是致倦库蚊 *Culex pipiens quinquefasciatus*, 在北方主要是淡色库蚊 *Culex pipiens pallens*, 它们是丝虫病和西尼罗河病等的主要传播媒介 (Hemingway and Ranson, 2000)。我国长期以来广泛使用有机磷杀虫剂,致使大部分区域的蚊虫对有机磷杀虫剂产生了抗药性(刘维德, 1990; Cui *et al.*, 2007)。抗药性机理主要包括两个方面: 代谢抗药性和靶标抗药性。代谢抗性产生的原因是蚊虫的解毒能力增强, 代谢加快。参与化学杀虫剂代谢抗性的三大解毒酶基因家族分别是羧酸酯酶 (CarE)、谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 和细胞色素 P450 单加氧酶 (P450) (Hemingway *et al.*, 2004), 在昆虫中这三个家族包含了许多基因, 如尖音库蚊基因组上有 71 个 CarE 基因、196 个 P450 基因和 35 个 GST 基因 (Yan *et al.*, 2012)。尖音库蚊对有机磷杀虫剂产生代谢抗性主要是两个 CarE 基因的过量表达, 在世界不同地理的尖音库蚊种群中已发现许多抗性 CarE 的等位基因, 对杀虫剂起屏蔽作用 (Raymond *et al.*, 2001; Cui *et al.*, 2007; Cheikh *et al.*, 2008)。

GST 和 P450 基因家族对杀虫剂的作用机制与 CarE 家族不同 (Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000; Coon, 2005; Hayes *et al.*, 2005)。GST 在细胞内转运和防御氧化胁迫两方面发挥作用 (Enayati *et al.*, 2005), 是通过结合还原型谷胱甘肽或者促进脱氯化氢作用, 以及清除毒性氧自由基, 从而使昆虫对有机磷、有机氯和拟除虫菊酯等杀虫剂产生抗性 (Syvanen *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1998; Vontas *et al.*, 2002)。在昆虫中, GST 分为胞质 GST、微粒体

GST 和线粒体 GST 三类, 其中胞质 GST 的 Delta 型和 Epsilon 型参与有机磷杀虫剂的抗性 (Enayati *et al.*, 2005)。P450 基因家族在昆虫蜕皮激素、保幼激素和自身化合物的合成、降解以及外源毒物的代谢中发挥着重要的作用, 能够使昆虫应对来自植物的化学物质和环境的杀虫剂的威胁 (Feyereisen, 1999)。有机磷杀虫剂在虫体内先被 P450 从硫代磷酸氧化成毒性更大的氧化型, 然后再被降解。昆虫 P450 包括 CYP2、CYP6、CYP9、CYP4 和线粒体 P450 家族, 其中 CYP6 家族参与昆虫抗药性的报道最多 (David *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007)。

在以往的研究中, 我们通过数字基因表达谱技术 (DGE) 分析了致倦库蚊对硫磷抗性品系和敏感品系的基因表达谱, 发现有 1 511 个基因在两个品系的表达有显著性差异, 其中 15 个解毒酶基因在对硫磷抗性品系中高表达, 包括 2 个 CarE 基因、6 个 GST 基因和 7 个 P450 基因 (Yan *et al.*, 2012)。本研究对其中一个 Epsilon GST 基因 *GSTe1* (CpipJ_CPIJ018629) 和 P450 基因 *CYP9J40* (CpipJ_CPIJ010543) 在两个品系的表达进行了验证, 并研究了它们在不同发育阶段和不同组织的表达, 为将来研究这两个基因与抗药性的关系奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 供试蚊虫

S-lab 品系是法国科学与进化研究所 Raymond 教授惠赠的致倦库蚊敏感品系, 本实验室长期饲养, 未接触任何杀虫剂。深桂品系 (SG) 是 2007 年采自广东佛山的致倦库蚊, 在实验室内已用对硫磷多代筛选, 其 3 龄幼虫对硫磷抗性是 S-lab 品系的 115 倍。蚊虫饲养条件为

(26 ± 1) °C, 光周期为 L:D=14:10。

1.2 生物信息学分析

GSTe1 和 *CYP9J40* 蛋白分子量用在线软件 (http://www.bio-soft.net/sms/prot_mw.html) 预测, 蛋白结构域使用 SMART 程序 (<http://smart.emb-l-heidelberg.de/>) 预测。将 *GSTe1* 和 *CYP9J40* 的 cDNA 在致倦库蚊基因组上进行 blast (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/culex_pipiens), 确定基因的内含子和外显子。

1.3 样品的收集、总 RNA 提取和反转录

Slab 品系的蚊虫所有龄期样品为 6 个生物学重复, 每个重复的样品数目为: 1 龄幼虫 20 只, 2 龄幼虫 20 只, 3 龄幼虫 10 只, 4 龄幼虫 10 只, 蛹期 5 只, 雄虫 5 只和雌虫 5 只。SG 品系 3 龄幼虫样品也为 6 个生物学重复, 每个重复包含 10 只幼虫。使用 Qiagen 公司的 RNeasy Mini Kit 试剂盒提取样品的总 RNA, 用 Ambion 公司的 TURBO DNA-free kit 消化基因组 DNA 污染。1 μ g 总 RNA 使用 Promega M-MLV 反转录试剂盒进行反转录。

1.4 荧光定量 PCR

用 Primer 6.0 软件设计 *GSTe1* 和 *CYP9J40* 的定量引物, 蚊虫肌动蛋白基因 β -actin (XM_001847218) 作为内参基因校正 cDNA 模板的量。*CYP9J40* 的定量引物为 5' CGAAGAG GCAGTTGAGAC 3' 和 5' ATAATCACGCACGC AGAG 3', 产物为 151 bp; *GSTe1* 定量引物为 5' CGCTTACGATTGGTGACT 3' 和 5' AATACG GCAGTTCCTTCAG 3', 产物为 126 bp; β -actin 定量引物为 5' CGGGTATTGTGCTGGACTC 3' 和 5' GCGACGTAGCACAGCTTCT 3', 产物为 214 bp。用 Roche 公司的 LightCycler 480 进行定量 PCR, 程序设置为 95°C 预变性 2 min, 然后 94°C 变性 20 s, 58°C 退火 15 s, 68°C 延伸 20 s, 循环 40 次, 并对熔解曲线做分析。用 CT 值表示各基因的表达量, 并用定量 PCR 仪数据处理程序计算样品间基因表达量的差异倍数, 差异显

著性用 SPSS 17.0 进行统计学分析, Slab 敏感品系不同龄期的比较使用单因素方差分析, 深桂品系和 Slab 敏感品系 3 龄幼虫的比较使用独立样本 *t*-检验。

1.5 组织原位杂交

根据 *GSTe1* 和 *CYP9J40* 的 cDNA 序列分别设计 TaqMan 正反义探针, *GSTe1* 的正反义探针分别为 5' CGAGTGGTCAACCTGATGGCTGG AGAT 3' 和 5' ATCTCCAGCCATCAGGTTGAC CACTCG 3', *CYP9J40* 的正反义探针分别为 5' GAGTACACCGGGCAGATGATTGATATC 3' 和 5' GATATCAATCATCTGCCCCGGTGTACTC 3'。反义链探针显示的是阳性信号, 正义链探针代表阴性对照。

将待固定的 Slab 雌虫置于冰上, 去除翅膀和腿, 用含有 0.25 % Titon X-100 的 4% 多聚甲醛 4°C 固定过夜, 用 75 % 乙醇稍加洗涤。样品用预热的 2% 的琼脂糖包埋后, 4°C 快速凝固。分别用 70%、80%、95% 的乙醇进行梯度脱水, 每次 30 min。然后分别用 1/2 二甲苯和 1/2 无水乙醇混合溶液、二甲苯、1/2 二甲苯和 1/2 石蜡混合溶液和石蜡洗涤两次, 每次 20 min。使用石蜡包埋机对样品进行包埋, 使用 Leica RM2235 切片机进行切片, 厚度 5 μ m。25°C 粘片, 45°C 烘箱中烤片过夜。切片材料经二甲苯透明后, 乙醇梯度脱水, 双蒸水润洗后, 用 20 μ g/mL 的蛋白酶 K 处理 20 min, 4 % 多聚甲醛再固定 10 min, 再使用乙酰化试剂处理 10 min。杂交在 55°C 中进行 18 h, 杂交后, 37°C 下用 4 $\times$ SSC、2 $\times$ SSC 和 1 $\times$ SSC 分别漂洗 15 min $\times$ 2 次, 37°C RNA 酶水处理 30 min, 0.2 $\times$ SSC 洗 10 min $\times$ 2 次, Washing buffer 漂洗 10 min $\times$ 2 次, Blocking buffer 静置 30 min, 抗地高辛的荧光抗体 (Anti-digoxigenin-fluorescein, Fab fragments from sheep) (Roche 公司) 1:1 000 稀释后, 37°C 孵育 2 h, 多余抗体用 Washing buffer 洗涤后, 使用 BCIP/NET 显色过夜。封片前使用核固红对组织细胞核染色, 封片后在明场下使用 Leica DM2500 成像系统观察并且拍照。

2 结果与分析

2.1 致倦库蚊 *GSTe1* 和 *CYP9J40* 基因的生物信息学分析

根据 *GSTe1* 和 *CYP9J40* 在致倦库蚊基因组上的信息,克隆得到这两个基因的开放阅读框。*GSTe1* 开放阅读框长度为 660 bp,编码 219 个氨基酸,预测蛋白的分子量为 24.58 ku。*CYP9J40* 开放阅读框长度为 1 605 bp,编码 534 个氨基酸,预测蛋白的分子量为 60.94 ku。将两个基因的开放阅读框在致倦库蚊基因组上比对,发现 *GSTe1* 基因全长 772 bp,含有 3 个外显子和 2 个内含子;*CYP9J40* 基因全长 1 669 bp,含有 2 个外显子和 1 个内含子(图 1: A)。蛋白结构域分析表明,*GSTe1* 有两个 GST domain,分别位于蛋白的 N 端(第 4~77 氨基酸)和 C 端(第 69~194 氨基酸);*CYP9J40* 有一个 N 端跨膜结构域(第 5~19 氨基酸)和一个 P450 domain(第 35~528 氨基酸)(图 1: B)。

2.2 *GSTe1* 和 *CYP9J40* 在抗性品系中高表达

本研究定量 PCR 结果显示(图 2),这两个基因在 SG 品系的表达量分别是 S-lab 的 4.2 倍和 1.9 倍,且差异显著。虽然两种实验方法得到的基因表达差异倍数不同,但得出的结论是一致的,即 *GSTe1* 和 *CYP9J40* 在对硫磷抗性品系中的转录水平是升高的。

2.3 *GSTe1* 和 *CYP9J40* 在蚊虫不同发育阶段的表达

对致倦库蚊 Slab 品系不同发育阶段 *GSTe1* 和 *CYP9J40* 基因表达进行定量 PCR 检测,结果表明,*GSTe1* 和 *CYP9J40* 在蚊虫整个生活周期的表达模式相似,均为幼虫期表达量相对较低,从蛹期开始表达量显著升高,到成虫期雌虫达到顶峰,而雄虫与幼虫期表达量相当(图 3)。说明这两个基因的表达有一定的发育阶段特异性,除了参与蚊虫对杀虫剂的抗性,这两个基因可能对蚊虫雌虫的发育有重要的影响。

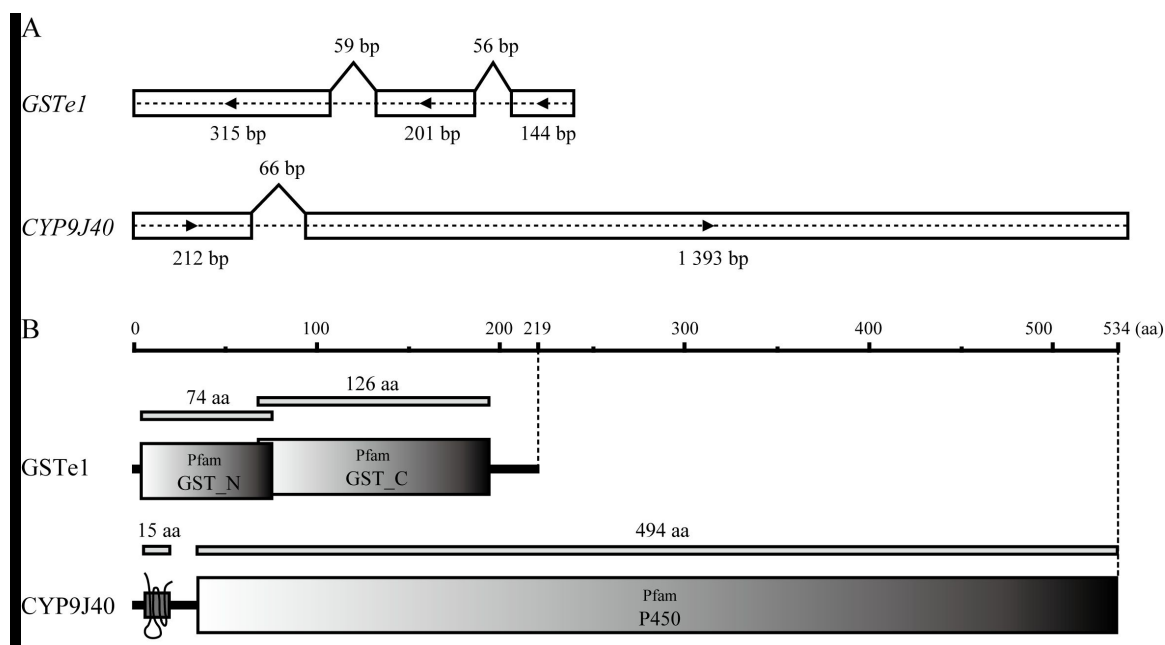


图 1 致倦库蚊 *GSTe1* 和 *CYP9J40* 基因和蛋白一级结构

Fig. 1 Gene and protein primary structures of *GSTe1* and *CYP9J40* in *Culex pipiens quinquefasciatus*

A: 基因结构 Gene structure, 黑色三角表示基因组转录方向 Black triangles indicate gene transcription direction;
B: 蛋白结构域 Protein domains.

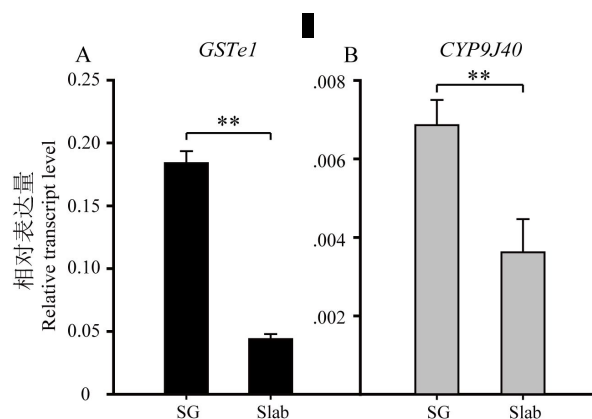


图2 *GSTe1* 和 *CYP9J40* 在抗性(SG)和敏感(S-lab)品系 3 龄幼虫的表达

Fig. 2 Expression of *GSTe1* and *CYP9J40* in 3rd instar of the resistant strain (SG) and susceptible strain (S-lab)

图中数据是平均值 $\pm$ SE; **表示差异显著($P < 0.01$)。

Data are mean $\pm$ SE; ** means significantly different ($P < 0.01$).

2.4 *GSTe1* 和 *CYP9J40* 在蚊虫不同组织的表达

对 Slab 雌虫成虫进行石蜡切片, 用 *GSTe1* 和 *CYP9J40* 正反义链 TaqMan 探针做原位杂交,

反义链 TaqMan 探针在某些组织的细胞中出现蓝紫色的荧光信号, 而用正义链 TaqMan 探针杂交未见明显的荧光信号, 说明设计的两个基因的探针专一性很高。*GSTe1* 在肌肉、消化道、卵巢中有明显的表达 (图 4: A), *CYP9J40* 在脑、胸部神经节、肌肉、消化道、卵巢中有明显表达 (图 4: B)。

3 讨论

本研究报道了致倦库蚊两个代谢解毒酶基因 *GSTe1* 和 *CYP9J40* 的时空表达, 比较了它们在有机磷抗性品系和敏感品系的表达, 发现这两个基因在抗性品系的转录水平明显高于敏感品系, 并且具有一定的发育阶段特异性和广泛的组织分布, 可能不仅参与了蚊虫对有机磷杀虫剂的抗性, 而且在雌虫发育中也发挥重要作用。

P450 是昆虫体内主要解毒酶系, 被认为是昆虫对杀虫剂产生抗性的主要机制之一, 目前已证实多个基因与昆虫抗药性有关, 如 *CYP6A*、

* 资助项目: 国家科技重大专项 (2012ZX10004219); 国家自然科学基金面上项目 (31272364)

** E-mail: 031150796@163.com

***通讯作者, E-mail: cuiif@ioz.ac.cn

收稿日期: 2013-12-06, 接受日期: 2014-03-11

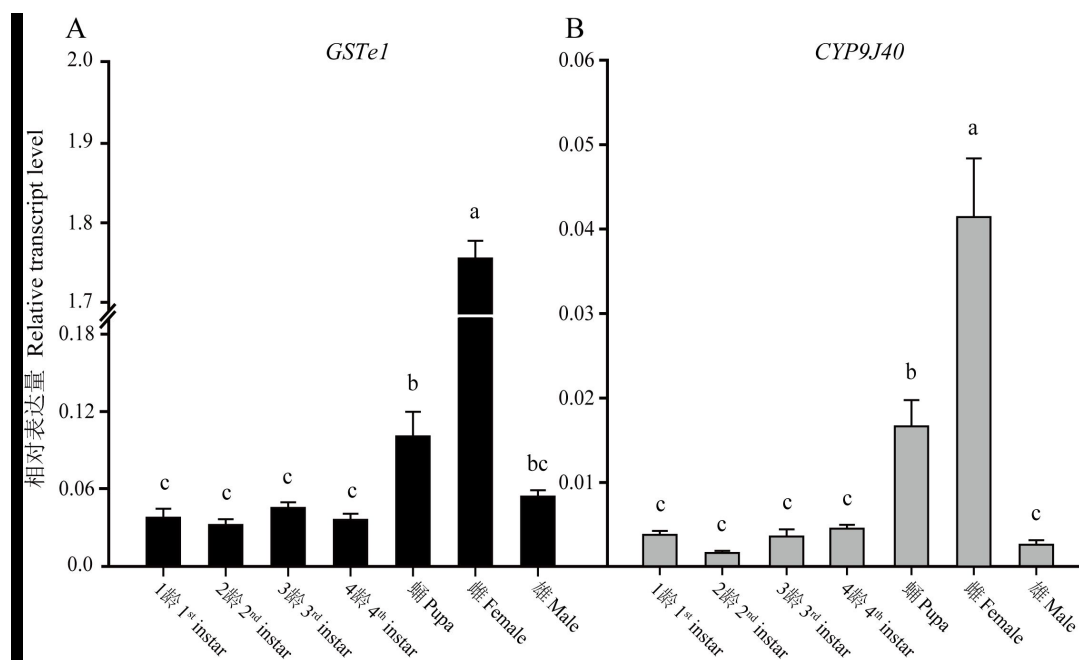


图3 *GSTe1* 和 *CYP9J40* 在致倦库蚊各发育阶段的表达

Fig. 3 Expression patterns of *GSTe1* and *CYP9J40* in different developmental stages of *Culex pipiens quinquefasciatus*

数据是平均值 $\pm$ SE；柱上标有不同字母表示显著性差异 ($P < 0.05$)。

Data are mean $\pm$ SE; histograms with different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

* 资助项目：国家科技重大专项 (2012ZX10004219)；国家自然科学基金面上项目 (31272364)

** E-mail：031150796@163.com

***通讯作者，E-mail: cuif@ioz.ac.cn

收稿日期: 2013-12-06，接受日期: 2014-03-11

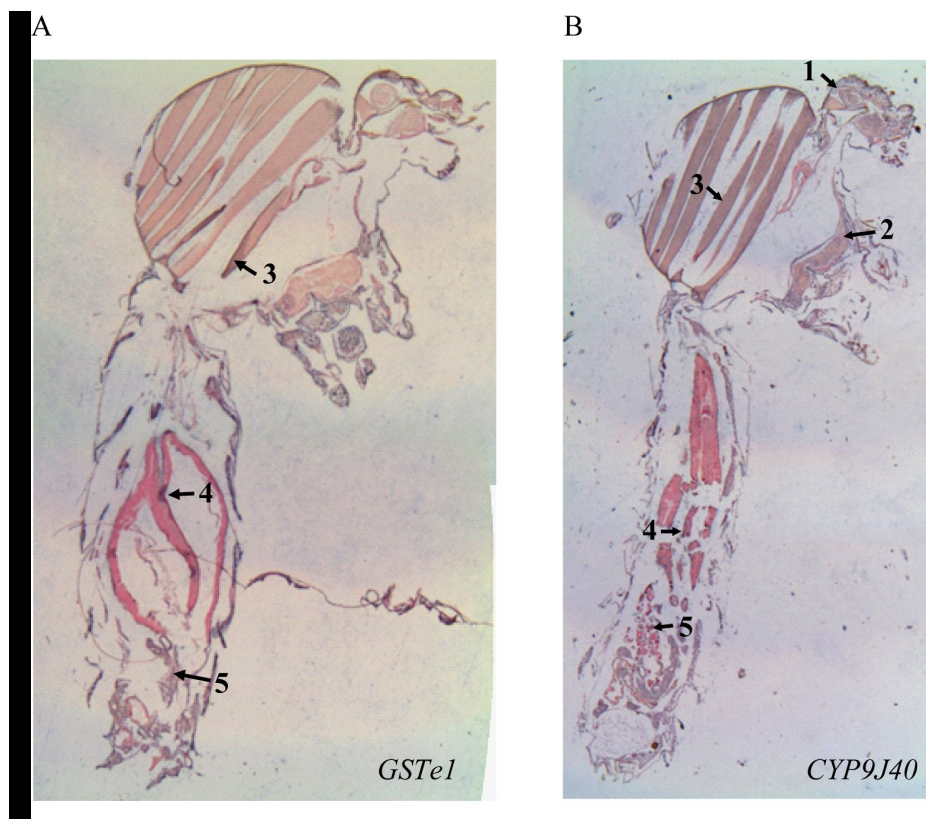


图 4 *GSTe1* 和 *CYP9J40* 在致倦库蚊雌虫的原位杂交

Fig. 4 *In situ* hybridization of *GSTe1* and *CYP9J40* in the female adults of *Culex pipiens quinquefasciatus*

A: *GSTe1* 基因 *GSTe1* gene; B: *CYP9J40* 基因 *CYP9J40* gene; 1: 脑 Brain; 2: 胸部神经节 Thorax ganglion; 3: 肌肉 Muscle; 4: 消化道 Digestive gut; 5: 卵巢 Ovary.

CYP6B 和 *CYP6D* 等。对拟除虫菊酯类杀虫剂产生抗性的果蝇和按蚊与 *CYP4* 基因的过量表达有关 (Nikou *et al.*, 2003)。Daborn 等 (2002) 在研究果蝇对 DDT 抗性中发现 *CYP6g1* 的过量表达与果蝇对 DDT 的抗性有关。本研究发现 *CYP9J40* 的转录水平在对硫磷抗性致倦库蚊中提高了近 1 倍, 而 Liu 等 (2011) 发现在氯菊酯抗性致倦库蚊中 *CYP9J40* 存在组成型过量表达和诱导型过量表达两种机制, 说明 *CYP9J40* 在蚊虫对有机磷和拟除虫菊酯杀虫剂的抗性中都有作用。Liu 等 (2011) 也发现 *CYP9J40* 在成虫期的表达量要高于幼虫期, 但并未对雌、雄虫分开检测, 而本研究发现 *CYP9J40* 仅在雌成虫高表达, 雌虫的耐药性可能要高于雄虫, 这在蚊虫的抗性上是一种适应性的进化, 保证雌虫的生存率从而使种群在受到杀虫剂的选择下仍然能

够繁育足够的后代。

GST 基因转录水平的提高致使昆虫对至少四类杀虫剂产生抗药性, GST 一般通过脱烷基化和脱芳基化反应参与对有机磷的降解, 在按蚊 *Anopheles subpictus* 中已证实 GSTs 能降解被 P450s 氧化的有机磷杀虫剂 (Hemingway *et al.*, 1991)。致倦库蚊有 35 个胞质 GST 基因, 大部分属于 Delta 和 Epsilon 家族 (Yan *et al.*, 2012), 它们与昆虫对几大类杀虫剂的抗药性有关 (Ranson *et al.*, 2002)。有些 GST 基因在按蚊、伊蚊和库蚊有直系同源基因, 如 *GSTe2*, *GSTe4* 和 *GSTe8*, 而 *GSTe1* 是致倦库蚊特有的, 在冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 和埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 中没有直系同源基因 (Yan *et al.*, 2012), 因此 *GSTe1* 转录水平升高使蚊虫对有机磷产生抗性可能是致倦库蚊特异的进化途径, 在蚊虫中

可能不具有普遍性,其如何导致抗性有待于进一步的研究。

总之,本研究确认了 *GSTe1* 和 *CYP9J40* 在致倦库蚊有机磷抗性品系中高表达,分析了它们的时空表达模式,使我们对这两类解毒酶有了进一步的认识,并为将来研究它们如何参与有机磷的抗药性奠定了基础。

参考文献 (References)

- Cheikh RB, Berticat C, Berthomieu A, Pasteur N, Cheikh HB, Weill M, 2008. Characterization of a novel high-activity esterase in Tunisian populations of the mosquito *Culex pipiens*. *J. Econ. Entomol.*, 101 (2): 484–491.
- Coon MJ, 2005. Cytochrome P450: Nature's most versatile biological catalyst. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45: 1–25.
- Cui F, Tan Y, Qiao CL, 2007. Filariasis vector in China: insecticide resistance and population structure of mosquito *Culex pipiens* complex. *Pest Manag. Sci.*, 63(5): 453–458.
- Daborn PJ, Yen JL, Bogwitz MR, Le Goff G, Feil E, Jeffers S, Tijet N, Perry T, Heckel D, Batterham P, Feyereisen R, Wilson TG, Rffrench-Constant RH, 2002. A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science*, 297(5590): 2253–2255.
- David JP, Strode C, Vontas J, Nikou D, Vaughan A, Pignatelli PM, Louis C, Hemingway J, Ranson H, 2005. The *Anopheles gambiae* detoxification chip: a highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102 (11): 4080–4084.
- Enayati AA, Ranson H, Hemingway J, 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol. Biol.*, 14 (1): 3–8.
- Feyereisen R, 1999. Insect P450 enzymes. *Annu. Rev. Entomol.*, 44 (1): 507–533.
- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR, 2005. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45: 51–88.
- Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H, 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34(7): 653–665.
- Hemingway J, Miyamoto J, Herath PRJ, 1991. A possible novel link between organophosphorus and DDT insecticide resistance genes in *Anopheles*: Supporting evidence from fenitrothion metabolism studies. *Pestic Biochem Physiol*, 39(1): 49–56.
- Hemingway J, Ranson H, 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu. Rev. Entomol.*, 45 (1): 371–391.
- Huang HS, Hu NT, Yao YE, Wu CY, Chiang SW, Sun CN, 1998. Molecular cloning and heterologous expression of a glutathione-S-transferase involved in insecticide resistance from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28(9): 651–658.
- Li X, Schuler MA, Berenbaum MR, 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.*, 52: 231–253.
- Liu N, Li T, Reid WR, Yang T, Zhang L, 2011. Multiple cytochrome P450 genes: their constitutive overexpression and permethrin induction in insecticide resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. *PLoS ONE*, 6 (8) : e23403.
- Nikou D, Ranson H, Hemingway J, 2003. An adult-specific CYP6 P450 gene is over expressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Gene*, 318: 91–102.
- Ranson H, Claudianos C, Ortell F, Abgrall C, Hemingway J, Sharakhova MV, Unger MF, Collins FH, Feyereisen R, 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science*, 298 (5591) : 179–181.
- Raymond M, Berticat C, Weill M, Pasteur N, Chevillon C, 2001. Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation? *Genetica*, 112/113: 287–296.
- Syvanen M, Zhou Z, Wharton J, Goldsburry C, Clark A, 1996. Heterogeneity of the glutathione transferase genes encoding enzymes responsible for insecticide degradation in the housefly. *J. Mol. Evol.*, 43 (3): 236–240.
- Vontas JG, Small GJ, Nikou DC, Ranson H, Hemingway J, 2002. Purification molecular cloning and heterologous expression of a glutathione-S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Biochem. J.*, 362: 329–337.
- Werck-Reichhart D, Feyereisen R, 2000. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol.*, 1 (6): 3003.1–3003.9.
- Yan L, Yang P, Jiang F, Cui N, Ma E, Qiao C, Cui F, 2012. Transcriptomic and phylogenetic analysis of *Culex pipiens quinquefasciatus* for three detoxification gene families. *BMC Genomics*, 13 (1): 609.
- 刘维德, 1990. 我国蚊类抗药性发展动向. 中国媒介生物学及控制杂志, 1 (1): 41–44. [Liu WD, 1990. The evolution of insecticides resistance of mosquitos in China. Chinese Journal of Vector Biology and Control, 1 (1): 41–44]