

致倦库蚊防御素基因的克隆与生物信息学分析*

李宏伟¹, 王 贇², 张春林^{3**}, 龙文涛³

(1. 贵阳医学院 人体解剖学教研室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵阳医学院 医学生物技术教研室, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵阳医学院 生物学教研室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 获取致倦库蚊(贵阳株)防御素基因 *CxDefensin* 全长编码序列。方法: 采用 RT-PCR 方法扩增致倦库蚊(贵阳株) *CxDefensin* 开放阅读框(ORF)序列, 并通过生物信息学方法分析其核苷酸和蛋白质序列。结果: *CxDefensin* ORF 序列全长 300 bp, 编码 99 个氨基酸, 包含 1 个内含子, 蛋白质分子量是 10.58 kDa, 等电点为 6.52。 *CxDefensin* 蛋白与其他昆虫的 defensin 蛋白具有同源性。结论: 所获致倦库蚊(贵阳株)防御素基因 *CxDefensin* 归属昆虫防御素基因家族, 为昆虫 β 型防御素。

[关键词] 致倦库蚊; 防御素类; 序列分析

[中图分类号] R384.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2012)04-0358-06

Cloning and Bioinformatic Analysis of *Culex quinquefasciatus* Defensin Gene

LI Hongwei¹, WANG Yun², ZHANG Chunlin³, LONG Wentao³

(1. Department of Anatomy, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Medical Biotechnology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Department of Biology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To obtain the full-length coding sequence of defensin gene *CxDefensin* of *Culex quinquefasciatus* (Guiyang strain). **Methods:** Open reading frames of *CxDefensin* of *Culex quinquefasciatus* were amplified by RT-PCR, and then bioinformatic methods were used to analyze the nucleotide and protein sequences of *CxDefensin*. **Results:** The full-length coding sequence of *CxDefensin* was 300 bp. *CxDefensin* encoded 99 amino acids including one intron, and the molecular weight of the protein was 10.58 kDa, isoelectric point was 6.52. *CxDefensin* was homology with defensin of other insect. **Conclusions:** The *CxDefensin* of *Culex quinquefasciatus* (Guiyang strain) belongs to defensin gene family of insect, which is one kind of β -defensin.

[Key words] *Culex quinquefasciatus*; defensins; sequence analysis

随着环境的改变和微生物的适应性进化, 大多数致病性微生物对传统抗生素产生耐药性已成为人们极为头痛的问题, 这使得开发新的抗菌药物成为科学研究者迫在眉睫的重大课题^[1]。昆虫抗菌肽相对分子量小, 抗菌谱广且效率高, 作用机制独特, 不易产生抗性^[2-4]。在抗生素耐药性日趋严重的情况下, 极可能成为新的抗菌药物来源。昆虫防御素属于富含半胱氨酸的抗菌肽, 据报道其对革兰阳性菌的抗菌活性较强^[5]。在昆虫中, 果蝇的防

御素基因是最早被克隆和鉴定的^[6]。蚊虫的防御素基因最先从埃及伊蚊中被克隆^[7]。Lowenberger, C. A. 等^[8]对埃及伊蚊 3 种不同类型的防御素基因进行了分析; 支国周等^[9]对白纹伊蚊防御素基因进行体外扩增及鉴定; 刘先凯等^[10,11]对埃及伊蚊和白纹伊蚊的防御素基因作了进一步研究; 阎晓宇等^[12]对中华按蚊防御素基因进行克隆和原核表达, 并对其重组产物的生物活性进行了初步的评价。而对致倦库蚊防御素的研究, 支国舟等^[13]

* [基金项目] 贵州省科技厅基金(黔科合 J 字(2006)2077 号); 贵州省人才领导小组基金(Q2007-2)

** 通讯作者 E-mail: zcl@gmc.edu.cn

曾尝试利用已发表的埃及伊蚊和冈比亚按蚊的防御素基因序列设计的引物进行 PCR 和 RT-PCR 扩增获得致倦库蚊的防御素基因序列,但没有获得成功。Kumar, B. A. 与 Paily, K. P.^[14] 建立了丝虫感染和未感染的致倦库蚊建立差减杂交库,公布了 1 条致倦库蚊防御素部分序列 (GenBank 登录号: ABU63294), 但此序列经比对后发现并非是昆虫防御素基因序列。本文将 Genbank 已公布的致倦库蚊 EST 库序列进行比对分析, 获得 1 条可能的致倦库蚊防御素的序列 (登录号: FF256359)。基于此 EST 序列, 设计具有酶切位点的引物, 通过 RT-PCR 方法获取致倦库蚊 (贵阳株) 的防御素序列, 并对其生物信息学分析, 为获得重组有活性的防御素蛋白和其生理活性研究提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料、菌株及主要试剂

致倦库蚊 (贵阳株) 于 2010 年采集于贵州贵阳, 由本实验室饲养。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 α 由本实验室保存。克隆载体 pMD18-T, *Taq*TM 酶、dNTP、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自大连宝生物工程有限公司。总 RNA 提取试剂 TRNzol 购自天根生化科技有限公司, 第一链 cDNA 合成试剂盒购自 MBI 公司。引物及测序由上海生工生物工程有限公司完成。

1.2 总 RNA 的提取及反转录合成单链 cDNA

采用 TRNzol 提取致倦库蚊成虫总 RNA。将新鲜组织于 TRNzol 中匀浆, 室温静置 20 min, 加入 0.2 ml 氯仿, 剧烈振荡 15 s, 室温静置 3 min, 离心 (4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min, 15 min); 取上清, 加等体积异丙醇, 混匀后 -20 $^{\circ}$ C 放置 30 min, 离心 (4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min, 10 min); 去上清, 沉淀用 75% 乙醇洗涤后溶解于 RNase-free ddH₂O 中。通过琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 紫外分光光度计检测 RNA 的纯度。按照 MBI First Strand cDNA Synthesis Kit 操作手册进行 cDNA 合成。

1.3 defensin 基因的克隆

1.3.1 引物的设计与合成 基于 Genbank 已公布的致倦库蚊 EST 库序列 (GenBank 登录号: FF256359) 设计 RT-PCR 引物, 设计时分别在上下游引物加入 BamH I 和 Hind III 酶切位点。上游引物: DefF5' -CGGATCCGATGAACCCGCTTGGACA-3'; 下游引物: DefR5' -CCCAAGCTTGTCCG-

GCAGACGCAGAC-3'。

1.3.2 defensin 基因的 PCR 扩增 以反转的致倦库蚊 cDNA 为模板, 使用 DefF/R 引物对其进行扩增, PCR 反应体系为 50 μ l, 包括: 10 倍 Buffer 缓冲液 5.0 μ l, MgCl₂ (25 mmol/L) 4.0 μ l, dNTPs Mixture (10 nmol/L) 4.0 μ l, DefF 和 R 引物 (10 mmol/L) 各 1.0 μ l, 模板 DNA 2.0 μ l, *Taq* 酶 (5 U/ μ l) 0.3 μ l, ddH₂O 32.7 μ l。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C, 5 min \rightarrow 30 循环 (94 $^{\circ}$ C, 1 min \rightarrow 55 $^{\circ}$ C, 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C, 1 min) \rightarrow 72 $^{\circ}$ C, 5 min。PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.3 TA 克隆与序列测定 回收 PCR 扩增的目的片段, 与 pMD18-T 载体连接, 连接产物转化 DH5 α 感受态细胞, 蓝白斑筛选阳性克隆并经菌落 PCR 验证后, 送上海生工生物工程有限公司测序。

1.4 生物信息学分析

将测序结果经 NCBI 的 VecScreen 比对去除两端的载体序列后, 通过 ORF finder 寻找开放阅读框, 并经 Blast 比对查找同源序列。利用蛋白质专家分析系统 ExPASy Proteomics Server 中的蛋白质分析工具对氨基酸序列的分子量、等电点、分子式、半衰期等基本理化性质进行分析。ProtScale 预测该蛋白的亲疏水性, TMHMM 分析其跨膜区, SignalP3.0 预测其信号肽区域, PSORT 分析致倦库蚊防御素的亚细胞定位, 利用 NetPhos 2.0 Server 分析其磷酸化位点。通过 PROSITE 数据库完成功能位点分析, 由 SMART 服务器分析功能结构域。运用 SOPMA 工具基于 PBIL LYON-GERLAND 信息库对致倦库蚊防御素进行二级结构预测。三级结构同源模建通过 ExPASy 的 SWISS-MODLE 网络服务器进行^[15]。

通过 GenBank 数据库, 获取了昆虫纲双翅目、鞘翅目、半翅目、膜翅目共 14 个物种的防御素氨基酸序列, 具体见表 1。利用 clustalX 2.0 软件对这些序列进行同源比对, MEGA 4.0 软件构建防御素蛋白的分子系统树 (表 1)。

2 结果

2.1 防御素基因的 RT-PCR 扩增结果及阳性克隆的验证

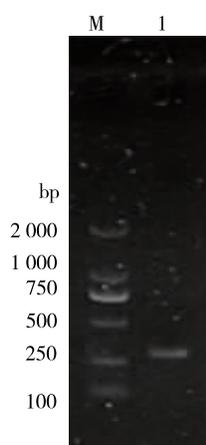
致倦库蚊总 RNA 反转录为 cDNA 后, 以 DefF 和 DefR 为引物扩增, 获得一条大小约 300 bp 的特异性扩增条带 (图 1)。将阳性克隆用特异性引物

DefF/R 和 pMD18-T 载体 M13 通用引物进行 PCR 扩增验证,分别获得约 300 bp 和 500 bp 的片段(图 2),证明菌落中有目的片段插入。

表 1 用于防御素蛋白同源比对的物种及登录号

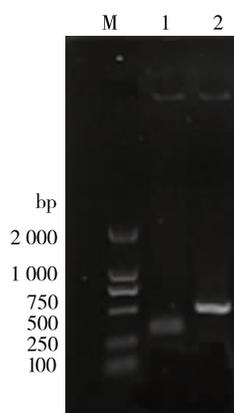
Tab. 1 Species and the accession number used for homology comparison of defensin

物种	Genbank 登录号
<i>Anopheles quadriannulatus</i>	ABB01001
<i>Anopheles gambiae</i>	ABB00987
<i>Anopheles arabiensis</i>	ABB00945
<i>Anopheles darlingi</i>	ACI30162
<i>Anopheles stephensi</i>	ABM92299
<i>Aedes aegypti</i> C2	AAD40116
<i>Aedes aegypti</i> C1	AAD40116
<i>Aedes aegypti</i> B2	AAD40115
<i>Aedes aegypti</i> B1	AAD40114
<i>Aedes aegypti</i> A2	AAD40113
<i>Aedes aegypti</i> A1	AAD40112
<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_523672
<i>Drosophila simulans</i>	XP_002080856
<i>Culex quinquefasciatus</i> A	XP_001842945
<i>Apis cerana japonica</i>	BAI81892
<i>Apis cerana cerana</i>	ACH96412
<i>Apis mellifera</i>	NP_001011638
<i>Anomala cuprea</i> A	BAD77966
<i>Anomala cuprea</i> B	BAD77967
<i>Rhodnius prolixus</i> C	AA074626
<i>Rhodnius prolixus</i> B	AA074625
<i>Rhodnius prolixus</i> A	AA074624



注: M: DNA标准DL2 000; 1:RT-PCR产物

图 1 致倦库蚊防御素 RT-PCR 结果
Fig. 1 RT-PCR result of defensin gene of *Culex quinquefasciatus*



注: M: DNA标准DL2000; 1:特异性引物扩增结果; 2:M13引物扩增结果

图 2 阳性克隆菌落 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of the positive clone by PCR

2.2 致倦库蚊 defensin 基因的生物信息学分析

测序结果去除两端引物后获得长 318 bp 片段,含有 300 bp 完整的开放阅读框,编码 99 个氨基酸,将其命名为 *CxDefensin* (图 3)。将此序列登陆 GenBank,登录号为 JQ799049。

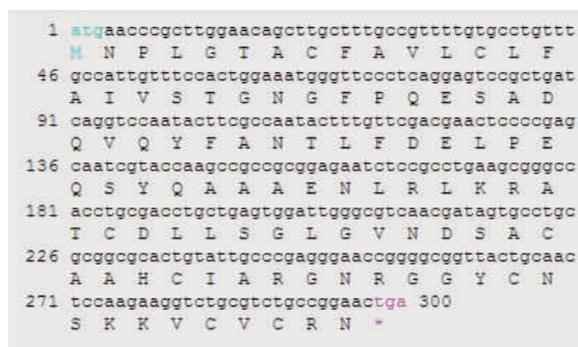


图 3 致倦库蚊防御素基因开放阅读框及翻译的氨基酸序列

Fig. 3 The open reading frame and translated amino acid sequences of defensin gene of *Culex quinquefasciatus*

经 Blast 比对, *CxDefensin* 与已登录的经基因组测序注释的致倦库蚊 defensin 基因序列(登录号: XP_001842945)相似性为 98%,有 6 个碱基差异; Blastp 比对显示氨基酸序列的相似性为 99%,并具有 defensin 基因家族的保守结构域。结果表明,成功地克隆了致倦库蚊防御素完整的开放阅读框。将测序结果与致倦库蚊基因组序列(登录号: NW_001886715)进行比对分析,表明该基因具有 1 个内含子,位于 DNA 序列的 184 ~ 244 bp 处,外显子与

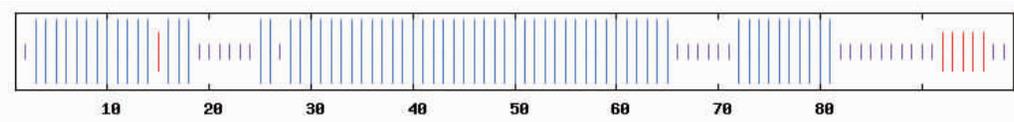
内含子连接具有典型的 GT-AG 组成,将 defensin 基因分成 2 个外显子。

ExPASy 分析 CxDefensin 理论分子量为 10.58 kD,等电点为 6.52,分子式为 $C_{454}H_{716}N_{132}O_{142}S_9$,在酵母中的半衰期大于 20 h,而在大肠杆菌中半衰期大于 10 h。ProtScale 预测 CxDefensin 在 1~20 位间有 1 个典型的疏水性区域,6~20 aa 为跨膜区,提示其可能作为膜受体起作用,也可能是位于膜的锚定蛋白或离子通道蛋白。SignalP 预测该蛋白 1~23 位氨基酸为其信号肽区域,成熟肽从第 24 个氨基酸开始。亚细胞定位显示该蛋白有 66.7% 分泌到细胞外,其余各有 11.1% 分布于细胞质、内质网和线粒体中,磷酸化位点分析显示该蛋白有 2 个

Tyr,1 个 Thr 可能成为蛋白激酶磷酸化位点。PROSITE 预测的功能位点,其中第 62 位和 89 位、75 位和 95 位、79 位和 97 位的半胱氨酸残基形成 3 个二硫键,SMART 分析结果显示该蛋白含有 1 个典型的 Knot1 domain,符合 defensin 基因家族的特点。

二级结构分析显示,CxDefensin 含有 66.5% 的 α 螺旋,28.53% 的无规则卷曲,6.06% 的 β 折叠。其中 α 螺旋散布于整个蛋白中(图 4)。

将 CxDefensin 的氨基酸序列递交到 SWISS-MODEL 进行同源建模,得到其氨基酸序列预测的三维结构(图 5),可以直观地看出,结构中含有 1 个 α 螺旋,2 个 β 折叠,5 个 β 转角,无规则卷曲分布于整个蛋白中。



注: α 螺旋、 β 折叠、无规则卷曲分别用高度依次降低的竖线表示

图 4 CxDefensin 的二级结构分析

Fig. 4 Secondary structure analysis of CxDefensin

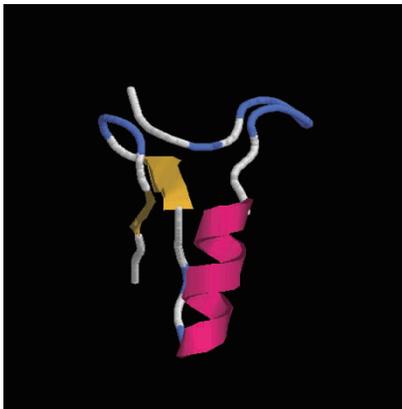


图 5 CxDefensin 三维结构预测

Fig. 5 Predicted three-dimensional model of CxDefensin

2.3 不同昆虫 defensin 蛋白序列的比较与分子进化分析

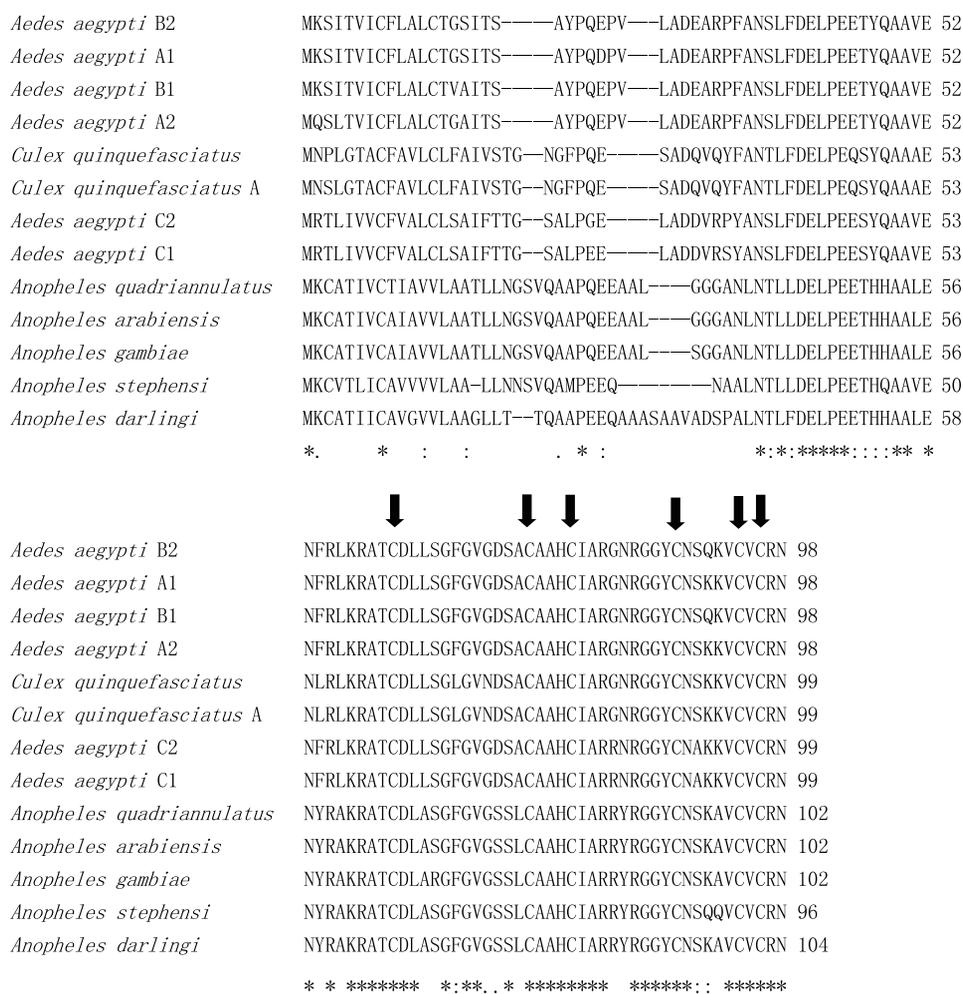
利用 clustalX 2.0 软件对表 1 中所列蚊种的 defensin 蛋白序列进行比对,结果(图 6)显示 Cx-Defensin 与埃及伊蚊 defensin 序列相似性较高,所有 defensin 序列成熟肽区域的氨基酸序列相似性较高,序列变异主要发生在信号肽部分,所有比对蚊种的 defensin 均具有保守的 6 个半胱氨酸残基。

利用 MEGA 4.0 软件,基于 14 种昆虫 defensin 蛋白序列,以邻位连接法(Neighbor-Joining, NJ)重复 1 000 次建立 50% 一致分子系统树,结果(图 7)显示 CxDefensin 与 GenBank 登录的致倦库蚊 defensin A 聚为一枝,再与埃及伊蚊 defensin 聚为一簇,而半翅目、膜翅目、鞘翅目的 defensin 各聚为一簇。

3 讨论

致倦库蚊是多种疾病的传播媒介,如乙型脑炎、班氏丝虫病,其幼虫孳生于污染的水体,如粪坑、水坑、水沟等,携带病原体数量多,而自身却并不生病,因而推测其体内具有强大的防御系统。

关于蚊虫防御素基因的研究,首先见支国舟等^[13]利用已发表的埃及伊蚊和冈比亚按蚊的防御素基因序列设计的引物进行 PCR 和 RT-PCR,以期扩增获得埃及伊蚊、白纹伊蚊、中华按蚊和致倦库蚊的防御素基因序列,结果他成功获得了埃及伊蚊和白纹伊蚊的防御素基因,但中华按蚊测序结果不是防御素基因,而致倦库蚊 PCR 和 RT-PCR 均无结果。Kumar, B. A. 与 Paily, K. P.^[14]利用丝虫感染和未感染的致倦库蚊建立差减杂交库,获得了 7



注：↓表示保守的半胱氨酸残基

图 6 致倦库蚊与其他蚊种 defensin 蛋白序列比对及功能位点分析

Fig.6 Multiple alignments of defensin protein between *Culex quinquefasciatus* and other mosquito and function site analysis on the protein

个与致倦库蚊免疫相关的基因,其中包括被注释为防御素基因的部分序列(GenBank 登录号:ABU63294)。但将此部分序列进行 Blast 比对发现,此序列并非防御素基因序列,而将其氨基酸序列与此次实验结果比对,两者相似性仅为 15%,因此认为 Kumar, B. A. 提交 GenBank 的序列 ABU63294 注释有误。目前对致倦库蚊防御素基因序列的报道,仅见 2009 年 Atkinson, P. W. 等在致倦库蚊基因组测序后,利用生物信息学方法预测的致倦库蚊防御素基因序列(登录号:XM_001842893.1),尚未见从转录水平对其防御素的研究^[15]。

本研究成功扩增了致倦库蚊(贵阳株)防御素基因全长编码 cDNA 序列。该序列与其他昆虫防御素的同源比对分析显示,其成熟肽部分的相似性较高,序列变异主要发生在信号肽部分,说明致倦

库蚊防御素基因具有多态性,但其变异主要发生在信号肽区域。其原因可能与成熟肽编码序列的选择压力大,而信号肽的编码序列选择压力相对较小有关。

致倦库蚊(贵阳株)防御素基因 ORF 全长 300 bp,编码 99 个氨基酸,结果与致倦库蚊基因组序列进行比对分析,表明该基因具有一个内含子,位于 DNA 序列的 184~244 bp 处,外显子与内含子连接具有典型的 GT-AG 组成,将防御素基因分成 2 个外显子。信号肽位于 1~23 位氨基酸残基,1~20 位氨基酸为该蛋白的疏水区,结合亚细胞定位预测致倦库蚊防御素为分泌蛋白。目前已克隆的所有蚊种的防御素都具备保守的 6 个半胱氨酸残基。致倦库蚊(贵阳株)防御素基因中具有 6 个保守的半胱氨酸残基,且符合 β 防御素典型的 Cys1-Cys4、

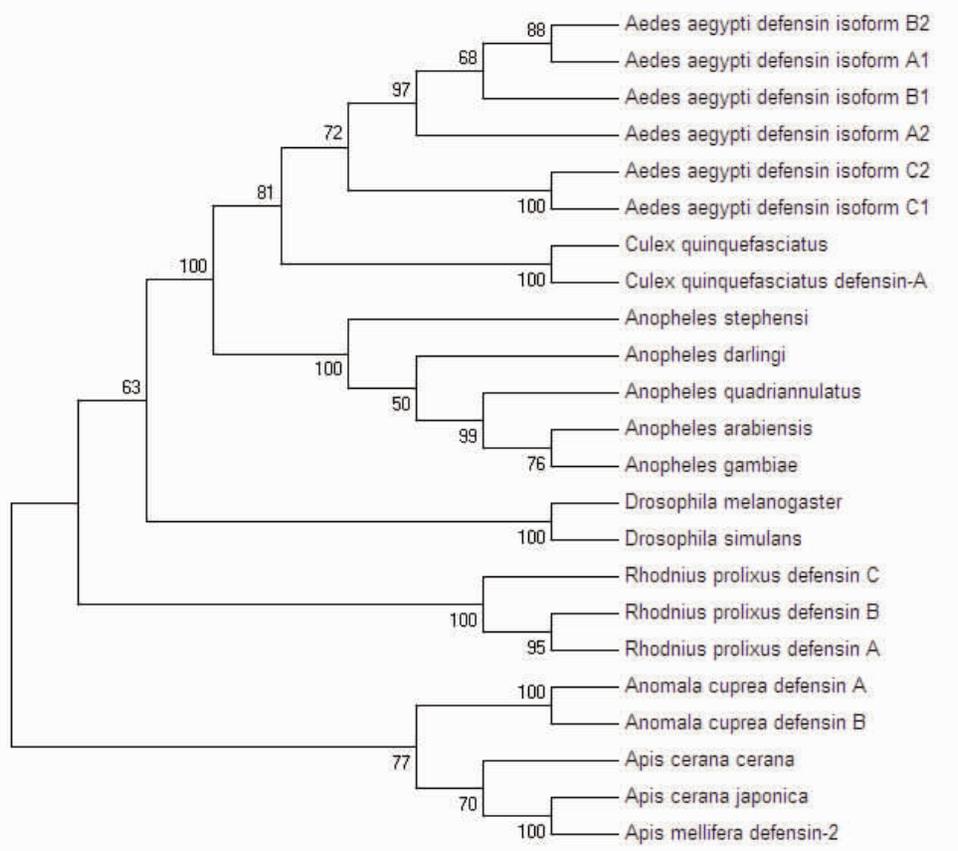


图7 defensin 蛋白分子进化分析

Fig. 7 Molecular evolution analysis on defensin protein

Cys2-Cys5、Cys3-Cys6 二硫键连接形式^[16]。因此,致倦库蚊(贵阳株)防御素为分泌型蛋白,属于 β 防御素。

此次研究成功克隆了致倦库蚊防御素基因全长 ORF 序列,并对其进行核苷酸序列和氨基酸序列比对分析和相关生物信息学分析,为进一步研究其功能奠定了基础。

4 参考文献

- [1] Harikrishna N, Rao MS, Murty US. Immune peptides modeling of *Culex pipiens* sp by in silico methods[J]. Journal of vector borne diseases, 2012(1):19-22.
- [2] 徐进暑,张双全. 昆虫抗菌肽对病原微生物作用的研究进展[J]. 昆虫学报, 2002(5):673-678.
- [3] Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, et al. Antimicrobial peptides in insects; structure and function[J]. Developmental & Comparative immunology, 1999 (23): 329-344.
- [4] Shin DM, Jo EK. Antimicrobial Peptides in Innate Immunity against *Mycobacteria*[J]. Immune Netw, 2011(5): 245-252.
- [5] 高琳琳,李卫东. 昆虫抗菌肽及其应用研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2010(5):710-713.
- [6] Dimarcq JL, Kwppi E, Dunbar b, et al. Characterization and transcriptional profiles of a drosophila gene encoding an insect defensin: A study in insect immunity[J]. Eur J Biochem, 1994 (1):201-209.
- [7] Chalk R, Albuquerque CM, Ham PJ, et al. Full sequence and characterization of two insect defensins; immune peptides from the mosquito *Aedes aegypti*[J]. Proc Biol Sci, 1995(1361): 217-221.
- [8] Lowenberger CA, Smartt CT, Bulet P, et al. Insect immunity: molecular cloning, expression, and characterization of cDNAs and genomic DNA encoding three isoforms of insect defensin in *Aedes aegypti*[J]. Insect Mol Biol, 1999(1):107-118.
- [9] 支国舟,陈晓光,吴焜. 白纹伊蚊防御素基因的体外扩增及鉴定[J]. 中国热带医学, 2003(3):285-286.
- [10] 刘先凯,赵彤言,朱礼华,等. 白纹伊蚊和埃及伊蚊 defensin A 基因克隆及序列分析[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2002(4):216-221.

(下转第 368 页)

有很高的 CRP 值,并且 CRP 随着代谢综合征组分的增加而升高。本研究结果显示与体重正常组比较,超重组和肥胖组均存在 hsCRP 水平增高($P < 0.001$);与超重组比较,肥胖组 hsCRP 水平增高($P < 0.001$),与国外有关报道基本一致。

Wang 等^[4]在其研究中发现校正 BMI 后,血清 lipocatin-2 水平与空腹血糖呈正相关。同时还发现,2 型糖尿病患者血清 lipocatin-2 浓度高于非糖尿病患者($P = 0.039$),但是这一差异在校正了 BMI 之后消失($P = 0.122$)。本研究中 MS 组各项指标与无代谢综合征比较,均存在统计学差异($P < 0.001$)。Lipocatin-2 在校正年龄、性别后代谢综合征组高于无代谢综合征组($P < 0.05$),但在校正 hsCRP 后,这种差别消失($P = 0.328$)。随着代谢异常数目的增加, lipocatin-2 水平增加无统计学意义($F = 1.891, P = 0.096$)。

本研究发现 lipocatin-2 与胰岛素抵抗及其代谢紊乱数目无明显关联,其与代谢综合征的相关性主要与 hsCRP 水平有关,这些结果与 Wang 等^[4]研究结果不相符,由于目前缺乏对其作用机制的研究,故其生理、病理作用及与代谢综合征的关系尚不明,尚需进一步加以研究证实。随着研究的不断深入, lipocatin-2 或许可成为肥胖患者及代谢综合征患者发生风险的预测因子并且可能成为肥胖、代谢综合征患者治疗的新靶点。

4 参考文献

- [1] Kelly T, Yang W, Chen CS, et al. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030 [J]. *Int J Obes (Lond)*, 2008(9):1431 - 1437.
- [2] Wood IS, de Heredia FP, Wang B, et al. Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity[J]. *Proc Nutr Soc*, 2009(4):370 - 377.
- [3] Haffner SM. The metabolic syndrome: inflammation, diabetes mellitus, and cardiovascular disease[J]. *Am J Cardiol*, 2006(2A):3A - 11A.
- [4] Wang Y, Lam KS, Kraegen EW, et al. Lipocalin-2 is an inflammatory marker closely associated with obesity, insulin resistance, and hyperglycemia in humans[J]. *Clin Chem*, 2007(1):34 - 41.
- [5] Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengel H, et al. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase[J]. *J Biol Chem*, 1993(14):10425 - 10432.
- [6] Yan QW, Yang Q, Mody N, et al. The adipokine lipocalin 2 is regulated by obesity and promotes insulin resistance[J]. *Diabetes*, 2007(10):2533 - 2540.
- [7] Lin Y, Rajala MW, Berger JP, et al. Hyperglycemia-induced production of acute phase reactants in adipose tissue[J]. *J Biol Chem*, 2001(45):42077 - 42083.
- [8] Florez H, Castillo-Florez S, Mendez A, et al. C-reactive protein is elevated in obese patients with the metabolic syndrome[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2006(1):92 - 100.
- [9] González AS, Guerrero DB, Soto MB, et al. Metabolic syndrome, insulin resistance and the inflammation markers C-reactive protein and ferritin[J]. *Eur J Clin Nutr*, 2006(8):802 - 809.
- [10] Rodilla E, Costa JA, Mares S, et al. Impact of metabolic syndrome on CRP levels[J]. *Rev Clin Esp*, 2006(8):363 - 368.
- (2012-05-04 收稿,2012-06-25 修回)
- 编辑:张丽君
- (上接第 363 页)
- [11] 刘先凯,赵彤言,朱礼华,等. 白纹伊蚊和埃及伊蚊防御素(defensin)成熟肽基因克隆及结构推测[J]. *寄生虫与医学昆虫学报*,2003(1):30 - 34.
- [12] 阎晓宇,陈晓光,彭鸿娟,等. 中华按蚊防御素基因的克隆、原核表达及其重组产物生物活性的初步评价[J]. *第一军医大学学报*,2005(4):371 - 376.
- [13] 支国舟,陈晓光,周晓红,等. 蚊防御素基因的克隆及序列分析[J]. *第一军医大学学报*,2002(6):499 - 502.
- [14] Kumar BA, Paily KP. Identification of immune-responsive genes in the mosquito *Culex quinquefasciatus* infected with the filarial parasite *Wuchereria bancrofti* [J]. *Med Vet Entomol*,2008(4):394 - 398.
- [15] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, et al. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling [J]. *Bioinformatics*, 2006(22):195 - 201.
- [16] 张亚晶,陈晓光. 中华按蚊防御素基因 dDNA 序列和基因组序列的克隆及鉴定[J]. *中国寄生虫与寄生虫病杂志*,2006(1):35 - 40.
- (2012-04-19 收稿,2012-05-30 修回)
- 编辑:张丽君