卵黄蛋白原启动子驱动的防御素基因在转基因按蚊中的高效可调控性表达

陈晓光 张亚晶 郑学礼 王春梅

(南方医科大学公共卫生与热带医学学院热带病研究所, 广州 510515. E-mail: xgchen@fimmu.com)

摘要 遗传修饰蚊虫, 使其不传播疾病或使蚊虫种群密度下降, 是一种控制蚊媒传染病的新策略. 该策略实施的前提是能够改造蚊虫的基因组, 使得效应分子在适宜启动子驱动下, 在转基因蚊中高效特异表达. 本研究旨在评价冈比亚按蚊卵黄蛋白原启动子驱动的中华按蚊防御素基因在转基因斯氏按蚊中的表达效果. 克隆冈比亚按蚊卵黄蛋白原启动子序列, 并将其与已克隆的中华按蚊防御素基因顺式插入穿梭载体 pSLFa, 然后再插入转化载体 pBac[3xP3-DsRedafm]的 *Asc* I 位点; 将重组质粒 pBac[3xP3DsRed-AgVgT2-DefA]和帮助质粒 phsp-*pBac* DNA 显微注射入斯氏按蚊的虫卵. 通过观察 G1 代幼虫眼部的特异荧光筛选出两株转基因阳性品系; Southern blot 证明, 防御素基因的表达元件以单拷贝的形式插入到蚊基因组中; RT-PCR 分析显示, 防御素基因在吸血后雌蚊的脂肪体中得到了特异高效表达, 而且防御素的表达比较内源性卵黄蛋白原能维持较长的时间, 因此多次吸血后的防御素表达呈现出可调性非周期型, 这对其发挥抗病原作用非常重要. 结果表明, 按蚊属蚊虫的卵黄蛋白原启动子和防御素基因在不同种按蚊中功能保守, 可以作为转基因抗疟研究中的候选调控分子和功能分子.

关键词 卵黄蛋白原 启动子 防御素 转基因 按蚊

疟疾是一种由媒介蚊虫传播的、严重威胁人类生命健康的热带传染病. 每年疟疾的临床病例大约有 3~5 亿, 死亡病例超过 200 万 [1]. 一直以来, 疟疾的防治主要靠药物杀虫、杀虫剂治蚊等措施, 但疟原虫抗药性和蚊虫对杀虫剂抗性的产生以及有效疫苗的缺乏, 使得人类不得不探求新的防治疟疾策略. 通过遗传修饰蚊虫使其不传播疾病或使蚊虫种群密度下降, 是一种控制蚊媒传染病的新策略. 1991 年, 世界卫生组织(WHO)开始启动通过遗传修饰按蚊以控制疟疾流行的研究计划 [2], 2003 年 10 月"利用转基因技术防治虫媒传染病"更成为"全球健康的重大挑战"(Grand Challenges in Global Health, GCGH)的一个重要研究方向 [3]. 10 多年来, 该领域取得了飞速发展, 克隆鉴定具有特异调节功能的启动子序列和具有抗疟原虫作用的效应分子一直是遗传防治疟疾策略的重要研究内容 [4~6].

卵黄蛋白原(vitelloginin, Vg)是只有产卵动物才具备的一种蛋白, 是主要卵黄蛋白的前体, 由卵巢外的组织, 如脊椎动物的肝脏、昆虫的脂肪体合成, 并分泌到血液或血淋巴液中, 然后由发育中的卵囊摄取. 蚊卵黄蛋白原在胚胎的发育过程中起着重要作用, 为其提供氨基酸、碳水化合物、脂类和离子等. 蚊媒的传病作用主要通过吸血来完成, 蚊卵黄蛋白原在蚊吸血后会高效大量表达, 因此其编码基因的启动子序列可以用来驱动外源基因通过吸血链激活并使其高效表达. 已有研究显示伊蚊的卵黄蛋白原启动子可以驱动外源基因在转基因伊蚊中特异高效表达 [7], 按蚊中尚未见类似报道.

对于外来病原的感染, 蚊虫会通过激活其内源的细胞和体液免疫以形成有效的防御系统. 蚊虫对于疟原虫的免疫反应已有诸多报道 [8,9], 这些免疫反应中重要的一环是激活编码抗病原蛋白或多肽的基因并大量表达. 依据序列的相似性, 昆虫的免疫蛋白分子主要分为蛾血素(cecropins)、富含半胱氨酸的抗微生物多肽(cysteine-rich antimicrobiol peptides)、富含甘氨酸的多肽(glycine rich peptides)和富含脯氨酸的多肽(proline-rich peptides)4 类. 目前最为人们所关注的是富含丝氨酸的一类多肽, 称为"防御素(defensin)".

2007-01-19 收稿, 2007-04-11 接受

国家自然科学基金(批准号: 30271162)和国家留学基金(批准号: 2003365035)资助项目

尽管防御素最早发现于棕尾别麻蝇*Sarcophaga peregrina*[10]和另一种麻蝇*Phormia terranovae*[11]中, 但果蝇的防御素基因是最先被克隆和定性的[12]. 蚊虫的防御素基因首先从埃及伊蚊中克隆[13], 现已阐明其有 2 个拷贝, 每个拷贝均含有 2 个外显子和 1 个内含子, 编码 98 个氨基酸的前体, 最后的成熟产物由 40 个氨基酸组成. 防御素在脂肪体中合成后分泌到血淋巴中, 已被证明是蚊虫对抗细菌和疟原虫入侵的重要免疫效应因子. 2000 年, Eggleston等人[14]报道了冈比亚按蚊防御素基因的DNA结构及其免疫调节作用, 体外研究也已证明防御素具有抗疟原虫的作用. 2006 年, 张亚晶等人[15]克隆了中华按蚊防御素的cDNA序列和基因组序列, 并比较了不同昆虫防御素基因的序列同源性.

斯氏按蚊(*Anopheles stephensi*)是疟疾在亚洲的重要传播媒介之一, 其转基因技术相对成熟[16]. 本研究将已克隆的中华按蚊防御素基因[15]与冈比亚按蚊Vg启动子构成表达元件, 并利用piggyBac转座子插入*An. stephensi*基因组中, 筛选转基因蚊并观察分析防御素基因的表达情况.

1 材料与方法

(ⅰ) 蚊虫. *An. stephensi* 幼虫饲以酵母粉, 成蚊饲养在 25℃, 相对湿度 75%~85%, 光照周期 18 h/d, 饲以葡萄干和水. 雌性成蚊每 3~4 天饲小白鼠血 1 次. 采用如下方式多次喂血: 首次喂血后将饱血的雌蚊分置于一笼; 72 h 后再次喂血并将饱血的雌蚊置于新笼; 同样, 再过 72 h 后第 3 次喂血并将饱血的雌蚊分置. 分别在每次喂血后的 24, 48 和 72 h 取 3 只雌蚊提取 RNA 进行 RT-PCR 分析.

(ⅱ) 转基因载体的构建. 根据已发表的冈比亚按蚊*VgT2* 序列(GenBank登录号: AF281078)设计合成一对引物VgPromfor(5′-cggaatcttggtccgcaataatgaaagtt-3′)和VgPromrev(5′-cgggatccggttcggttgttcgcagttg-3′), 以冈比亚按蚊基因组DNA为模板扩增出 1.7 kb的片段, 将其克隆入pGlow TOPO TA载体(Invitrogen), 经测序证实为启动子序列. 将此启动子序列、中华按蚊防御素基因的编码序列[15]以及牛生长激素(bovine growth hormone, BGH) poly-A 序列顺式克隆入穿梭质粒pSLFa[17], 然后再克隆入转化载体pBac[3xP3-DsRedafm][18]的*Asc* Ⅰ位点, 形成重组质粒pBac[3xP3-DsRed-AgVgT2-DefA](图 1), 测序证实插入接口和读码框架正确.

(ⅲ) 蚊卵的显微注射. 参照Ito等人[16]的方法, 用混合有帮助质粒phsp-*pBac* 的pBac[3xP3DsRed-AgVgT2-DefA] DNA显微注射*An. stephensi*的虫卵, 并使其发育为成虫, 将 3~5 只成活的雄性成蚊与 45~100 只野生型雌蚊交配, 或将 10 只成活的雌性成蚊与 10 只野生型雄蚊交配. 在荧光显微镜下观察交配后雌蚊产的卵孵化出的幼虫, 凡眼部呈现特异红色荧光的为转基因阳性, 对其形成的成蚊做进一步的分析.

(ⅳ) Southern blot. 提取羽化后 5 d 成蚊的基因组 DNA, 用 *Eco*R Ⅰ消化后进行琼脂糖凝胶电泳(0.8%), 然后转印到 Zeta-probe GT Genomic Tested Blotting Membranes (Bio-Rad)进行杂交. 探针是用*Eco*R Ⅰ和*Asc* Ⅰ双酶切pBac[3xP3DsRed-AgVgT2-DefA]得到的一长约 0.9 kb 的片段. ^{32}P 的标记按照 Random Primer Labeling Kit (Amersham-Pharmacia)的说明书进行. 转印的膜与探针在 65℃, 高严格 (high stringency) 条件下反应过夜, 然后在 65℃用 2×SSC/0.1% SDS 洗 2 次, 每次 15 min; 然后再用 0.1×SSC/0.1% SDS 洗 2 次, 每次 15 min. 将膜对 Kodak Biomax MR film 进行放射性自显影, –80℃保温 24 h.

(ⅴ) RT-PCR. 提取 5~7 d 龄的雄蚊、未吸血的雌蚊和吸血后不同时间的雌蚊, 以及幼虫、蛹和不同组织的总 RNA, One-step RT-PCR 扩增防御素、内源性卵黄原蛋白和核糖体蛋白 S26 的基因. 防御素的扩增引物序列为 DefAfor (5′-ATGTTCTGCAAAAATACACT-3′)和 DefArev (5′-TTAATTCCGGCAGACGCAAA-3′), 预期扩增产物长 324 bp. 内源性卵黄原蛋白的扩增引物序列是 AsVg1for (5′-CAACATCATGTCCAAGTCGGAGGTGA-3′)和 AsVg1rev (5′-CTTGA-

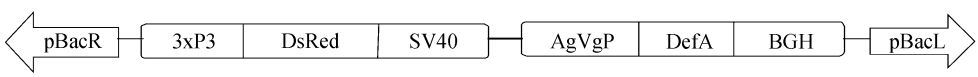


图 1 转化载体构成元件示意图

3xP3, 眼特异表达启动子; DsRed, 红色荧光蛋白的编码基因; SV40, Poly A 序列; AgVgP, 冈比亚按蚊卵黄蛋白原启动子; DefA, 防御素基因 A 的编码序列; BGH, 牛生长激素 Poly A 序列; pBacR, piggyBac 转座子的右臂; pBacL, piggyBac 转座子的左臂

AGCTTTCGTGCTCTTCCTCCG-3′), 预期扩增产物长 450 bp. 核糖体蛋白 S26 的扩增引物序列是 S26for (5′-AATCCTTCCCGAAGGACATGAACCG-3′)和 S26rev (5′-TACGAAACAAATCCCATCCTAATCGAAGC-3′), 预期扩增产物长 196 bp. 按“One Step RT-PCR Kit” (Qiagen)说明书进行 RT-PCR 反应.

2　结果

2.1　转基因蚊品系的建立

用混合有帮助质粒 phsp-*pBac* 的 pBac[3xP3-DsRed-AgVgT2-DefA] DNA 总共显微注射了 519 只蚊卵, 从中孵化出 125 只幼虫并羽化为 82 只成蚊. 通过筛选 G1 代幼虫眼部的特异红色荧光(图 2), 获得两株转基因阳性品系(L1 和 L2). 转基因蚊中外源基因的插入情况用 Southern Blot 进行检测(图 3). 经 *Eco*R Ⅰ充分消化的转基因蚊基因组 DNA 与 ^{32}P 标记的 pBacL 片段探针反应, 产生预期的约 1.5 kb 的杂交带, 显示防御素基因以单拷贝插入了 L1 和 L2 转基因蚊的基因组. 两个品系中杂交信号的不同, 可能是由于基因组 DNA 的上样量或探针量的不同导致.

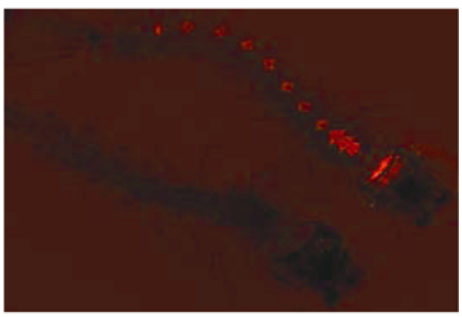


图 2　荧光显微镜下的按蚊幼虫

上方的幼虫为 DsRed 阳性, 可见其眼部和神经索部位有特异的红色荧光; 下方的为阴性对照

2.2　防御素基因在转基因蚊中的表达

用 RT-PCR 方法对防御素基因在转基因蚊中的特异表达情况进行了分析. 从图 4 可以看出, 只有在吸血后的转基因雌蚊可以看到防御素基因的特异表达, 而在蚊的幼虫期、蛹期、雄蚊和未吸血的雌性成蚊则检测不到防御素基因的表达, 非转基因蚊中也检测不到防御素基因的表达. 对吸血后转基因雌蚊不同组织中防御素基因的表达也进行了检测, 结果显示, 防御素基因只在脂肪体中表达, 而马氏管和卵巢中均未检测到(图 5). 以上结果说明, 中华按蚊防御素基因在卵黄蛋白原基因启动子的驱动下, 在转基因雌性按蚊吸血后的脂肪体中得到了特异表达. 与内源性卵黄蛋白原基因比较, 二者均在吸血后 24 h 达到了表达高峰, 所不同的是卵黄蛋白原基因在 24 h 后表达锐降, 72 h 已检测不到, 而防御素的基因表达则保持相对恒定, 在 24 h 后仍维持一定的水平, 至少

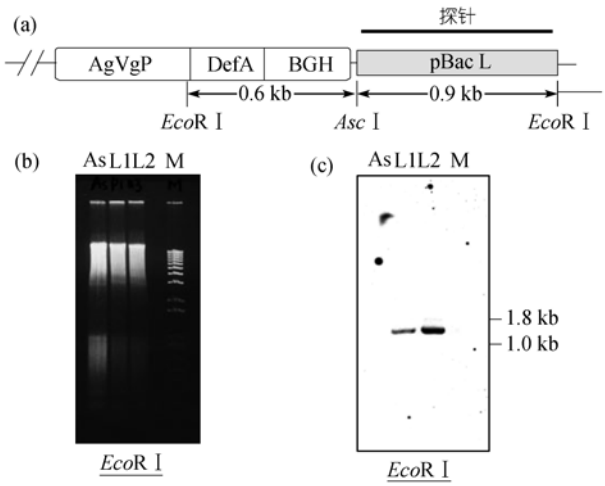


图 3　Southern blot 分析

(a) 探针与酶切位点示意图; (b) 酶切后基因组 DNA 电泳图; (c) 杂交结果图

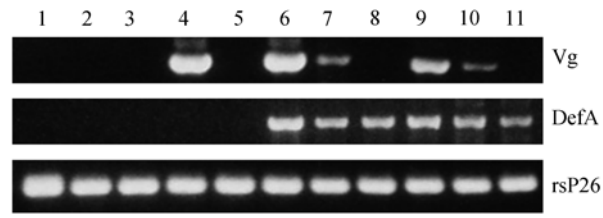


图 4　防御素基因在不同性别和不同时期蚊虫中的表达

1, 幼虫; 2, 蛹; 3, 雄性成蚊; 4, 未转基因的雌性成蚊吸血后 24 h; 5, 未吸血的转基因雌性成蚊; 6, 转基因 L1 雌蚊吸血后 24 h; 7, 转基因 L1 雌蚊吸血后 48 h; 8, 转基因 L1 雌蚊吸血后 72 h; 9, 转基因 L2 雌蚊吸血后 24 h; 10, 转基因 L2 雌蚊吸血后 48 h; 11, 转基因 L2 雌蚊吸血后 72 h. Vg, 卵黄蛋白原基因; DefA, 防御素基因; rsP26, 核糖体蛋白 S26 基因, 下同

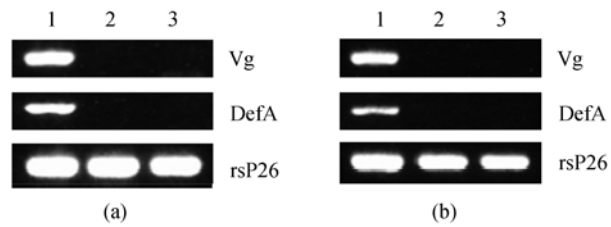


图 5　防御素基因在转基因蚊不同组织中的表达

(a) 转基因品系 L1; (b) 转基因品系 L2. 1, 脂肪体; 2, 马氏管; 3, 卵巢

在 72 h 仍能检测到.

2.3 蚊多次吸血后防御素基因的表达

一些媒介蚊虫包括斯氏按蚊具有多次吸血的生态习性, 本研究对蚊多次吸血后防御素基因的表达也进行了测试. 在实验室饲养条件下, 使雌蚊吸血后 3 d 再次吸血, 反复进行 3 次, 对每次吸血后不同时间(24, 48 和 72 h)防御素基因的表达进行 RT-PCR 检测. 结果显示, 每次吸血都能诱导防御素基因表达, 通常 24 h 达到高峰, 随后表达量有所降低, 但 72 h 仍能检测到, 至少持续到第 3 次吸血产卵周期. 比较而言, 内源性卵黄蛋白原的基因表达则呈现一种可诱导性周期性的表达模式, 吸血后 24 h 表达达到高峰, 然后迅速下降, 72 h 已检测不到(图 6). 防御素的基因表达在吸血后持续维持在一定的水平, 这对于发挥其抗病原作用非常重要.

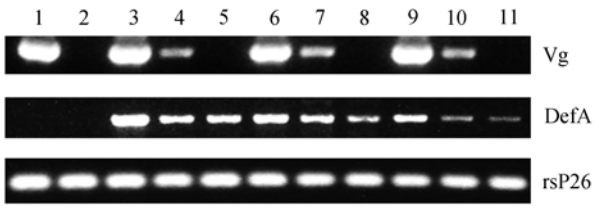


图 6 防御素基因在不同性别和不同时期蚊虫中的表达

1, 未转基因的雌性成蚊吸血后 24 h; 2, 未吸血的转基因雌性成蚊; 3, 转基因 L1 雌蚊第 1 次吸血后 24 h; 4, 转基因 L1 雌蚊第 1 次吸血后 48 h; 5, 转基因 L1 雌蚊第 1 次吸血后 72 h; 6, 转基因 L1 雌蚊第 2 次吸血后 24 h; 7, 转基因 L1 雌蚊第 2 次吸血后 48 h; 8, 转基因 L1 雌蚊第 2 次吸血后 72 h; 9, 转基因 L1 雌蚊第 3 次吸血后 24 h; 10, 转基因 L1 雌蚊第 3 次吸血后 48 h; 11, 转基因 L1 雌蚊第 3 次吸血后 72 h

3 讨论

通过基因改造的方法降低媒介蚊虫的种群数量(population reduction)或改变种群品质使其不传播疾病(population modification/replacement), 是一种新型的蚊媒传染病控制策略, 是对传统方法的补充和加强 [19]. 该策略实施的前提是能够对媒介蚊虫进行遗传学改造, 如在目标种群中高频率引入新的基因、鉴定抗病效应分子和启动子序列、使得效应分子在媒介蚊虫的适宜阶段和适宜组织中表达等 [20]. 本研究的目的是评价冈比亚按蚊卵黄蛋白原基因启动子驱动下的中华按蚊防御素基因在转基因斯氏按蚊中的特异表达状况. 冈比亚按蚊是非洲的重要疟疾蚊媒, 中华按蚊是中国的主要疟疾蚊媒, 斯氏按蚊是南亚的主要疟疾蚊媒, 本研究的另一目的是评价防御素基因表达和卵黄蛋白原基因启动子调控机制在不同媒介按蚊中是否具有一定的保守性.

对于按蚊属蚊虫的基因调控序列在不同种按蚊中功能的保守性已有一些研究报道. 例如, 冈比亚按蚊唾液腺特异表达基因*AgApy*的启动子(~800 bp)可以驱动报告基因在转基因斯氏按蚊的唾液腺中特异表达 [21], 但表达量比较低, 而且与内源性基因相比, 报告基因的表达失去了组织和性别特异性. 然而, 冈比亚按蚊中肠特异表达基因Adult Peritrophic Matrix Protein 1 (*AgAper1*)的调控序列(2.5 kb)却能驱动功能效应分子Phospholipase A2 (PLA2)在转基因斯氏按蚊中得到与内源基因一致的组织、时期和性别特异性的表达 [22]. 本研究结果也显示, 冈比亚按蚊卵黄蛋白原基因启动子序列(1.7 kb)驱动下的中华按蚊防御素基因在转基因斯氏按蚊中的表达谱与内源性基因基本一致, 说明按蚊属蚊虫的基因调控序列在不同种按蚊中具有一定的保守性, 保守性的高低可能与基因本身或采用的调控序列长度有关.

防御素是蚊虫天然免疫系统中的重要成员, 是转基因蚊抗病原效应的候选分子之一. 不同蚊种的防御素基因具有一定的序列同源性, 在羧基端高度保守, 在氨基端则差异很大 [15], 这也是本研究中基于中华按蚊防御素基因的引物序列只能扩增出中华按蚊的防御素基因, 而不能扩增出斯氏按蚊内源性防御素基因的原因. Kokoza等人 [23,24]将埃及伊蚊*Vg*基因启动子(2.1 kb)调控下的埃及伊蚊防御素基因转入埃及伊蚊中, 并得到了高效特异表达, 转基因蚊对疟原虫*Plasmodium gallinaceum*卵囊的发育起到了一定的抑制作用(65%~70%). 防御素基因在转基因按蚊中的调控表达情况尚未见报道. 本研究结果显示, 防御素基因可以在转基因雌蚊吸血后的脂肪体中得到高效特异表达, 与内源性卵黄蛋白原基因不同的是, 防御素的mRNA较为稳定, 至少在吸血后 72 h仍能检测到, 这个特点对防御素发挥抗病原作用非常重要, 因为一些病原如疟原虫通常在蚊吸血后一段时间才到达血淋巴腔, 防御素在血淋巴中的持续存在, 有利于发挥其抗病原作用. 防御素的mRNA为什么比内源性的卵黄蛋白原mRNA稳定, 目前尚不清楚. 可能与采用的启动子序列的长度、3′端UTR的序列或外源基因的序列有关.

蚊虫的基因表达模式基本可以分为 3 类: 组成型表达、可调型周期性表达和可调型非周期性表达. 蚊

核糖体蛋白 rsP26 属于组成型表达, 其在蚊虫的不同性别、不同时期以及不同组织细胞均有恒定的表达, 因此可作为加样量对比的内参照; 蚊卵黄蛋白原属于可调型周期性表达, 它仅在雌蚊吸血后的脂肪体中表达(图 6). 防御素基因在雌蚊吸血后的脂肪体中表达, 但不同于卵黄蛋白原的是其在吸血后至少 72 h 仍保持一定的表达水平, 因而在多次血餐的情况下, 防御素在转基因蚊中的表达呈现出可调型非周期性表达模式, 也就是说防御素将会在蚊血淋巴中持续维持在一定的水平(至少在本文检测的 9 d), 这对于发挥其防病抗虫作用非常重要. 例如, 疟原虫感染蚊媒后, 一般要经过 9~15 d (不同种类的疟原虫, 时间有所不同)才到达血淋巴腔, 持续存在的防御素就可能对疟原虫的生长发育产生影响. 目前, 我们还不知道本文构建的转基因表达体系, 只对防御素基因有这样的效果, 还是具有广谱的作用. 对其他基因的表达研究将会回答这个问题.

致谢 本研究的部分内容在美国加州大学 Anthony A. James 教授实验室完成, 特此致谢!

参 考 文 献

1 Guinovart C, Navia M M, Tanner M, et al. Malaria: Burden of disease. Curr Mol Med, 2006, 6(2): 137—140[DOI]

2 Anon. Prospects for malaria control by genetic manipulation of its vectors (TDR/BCV/MAL-ENT/91.3). Geneva: World Health Organization, 1991

3 Varmus H, Klausner R, Zerhouni E, et al. Public health. Grand challenges in global health. Science, 2003, 302: 398—399[DOI]

4 Christophides G K. Transgenic mosquitoes and malaria transmission. Cell Microbiol, 2005, 7(3): 325—333[DOI]

5 Catteruccia F, Benton J P, Crisanti A. An Anopheles transgenic sexing strain for vector control. Nat Biotechnol, 2005, 23: 1414—1417 [DOI]

6 Yoshida S, Watanabe H. Robust salivary gland-specific transgene expression in *Anopheles stephensi* mosquito. Insect Mol Biol, 2006, 15: 403—410[DOI]

7 Kokoza V, Ahmed A, Cho W L, et al. Engineering blood meal-activated systemic immunity in the yellow fever mosquito, Aedes aegypti. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 9144—9149[DOI]

8 Vernick K D. Mechanisms of immunity and refractoriness in insect vectors of eukaryotic parasites. In: Brey B T, Hultmark D, eds. Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects. London: Chapman & Hall, 1998. 261—309

9 Blandin S, Shiao S H, Moita L F, et al. Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*. Cell, 2004, 116: 661—670[DOI]

10 Matsuyana K, Natori S. Purification of three antibacterial proteins from the culture medium of NIH-Shape-4, an embryonic cell of *Sarcophaga peregrina*. J Biol Chem, 1988, 263: 17112—17116

11 Lambert J, Keppi E, Dimarcq J L, et al. Insect immunity: Isolation from immune blood of the dipteran Phormia terranovae of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 25: 867—873

12 Dimarcq J L, Hoffmann D, Meister M, et al. Characterization and transcriptional profiles of a Drosophila gene encoding an insect defensin. Eur J Biochem, 1994, 221: 201—209[DOI]

13 Chalk R, Albuquerque C M, Ham P J, et al. Full sequence and characterization of two insect defensins: Immune peptides from the mosquito *Aedes aegypti*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1995, 161: 217—402[DOI]

14 Eggleston P, Lu W, Zhao Y. Genomic organization and immune regulation of the defensin gene from the mosquito, *Anopheles gambiae*. Insect Mol Biol, 2000, 9: 481—490[DOI]

15 张亚晶, 陈晓光, 郑学礼, 等. 中华按蚊防御素基因 cDNA 序列和基因组序列的克隆与鉴定. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2006, 24(1): 35—41

16 Ito J, Ghosh A, Moreira L A, et al. Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. Nature, 2002, 417: 452—455[DOI]

17 Horn C, Wimmer E A. A versatile vector set for animal transgenesis. Dev Gene Evol, 2000, 210: 630—637[DOI]

18 Horn C, Schmid B G, Pogoda F S, et al. Fluorescent transformation markers for insect transgenesis. Insect Biochem Mol Biol, 2002, 32: 1221—1235[DOI]

19 Schneider D S, James A A. Bridging the gaps in vector biology. Workshop on the Molecular and Population Biology of Mosquitoes and other Disease Vectors. EMBO Rep, 2006, 7(3): 259—262[DOI]

20 James A A. Gene drive systems in mosquitoes: Rules of the road. Trends Parasitol, 2005, 21(2): 64—67[DOI]

21 Lombardo F, Nolan T, Lycett G, et al. An Anopheles gambiae salivary gland promoter analysis in *Drosophila melanogaster* and *Anopheles stephensi*. Insect Mol Biol, 2005, 14: 207—216[DOI]

22 Abraham E G, Donnelly-Doman M, Fujioka H, et al. Driving midgut-specific expression and secretion of a foreign protein in transgenic mosquitoes with AgAper1 regulatory elements. Insect Mol Biol, 2005, 14: 271—279[DOI]

23 Kokoza V A, Martin D, Mienaltowski M J, et al. Transcriptional regulation of the mosquito vitellogenin gene via a blood meal-triggered cascade. Gene, 2001, 274: 47—65[DOI]

24 Shin S W, Kokoza V A, Raikhel A S. Transgenesis and reverse genetics of mosquito innate immunity. J Exp Biol, 2003, 206(Pt 21): 3835—3843[DOI]