

利用抑制消减杂交技术筛选猪蛔虫性别差异表达基因

吴绍强, 邹丰才, 翁亚彪, 宋慧群, 林瑞庆, 朱兴全

(华南农业大学兽医学院, 广州 510642)

摘要: 为了筛选线虫的性别特异性基因, 为线虫乃至寄生虫的性别控制提供新的工具, 本研究选择猪蛔虫 (*Ascaris suum*) 为模型, 分别提取雌性和雄性成虫的 mRNA 后, 采用 Clontech 公司的 PCR-select™ 试剂盒进行反转录合成 cDNA 并进行抑制消减杂交 (SSH), 构建猪蛔虫雌、雄虫性别差异表达的消减 cDNA 文库, 并采用地高辛 (DIG) 标记的 cDNA 探针进行 Southern 杂交检验所构建文库的消减效率。结果表明, 雌、雄虫性别差异表达的消减 cDNA 文库均具有很强的性别特异性。随机从各库中各抽取 25 个克隆进行测序及在线 BLAST 分析, 发现在 25 个雄虫 ESTs 中有 20 个已知 ESTs, 5 个新的 ESTs; 25 个雌虫 ESTs 中有 11 个已知 ESTs, 还有 8 个可能为新基因。猪蛔虫性别差异表达的消减 cDNA 文库的成功构建, 为进一步研究性别特异基因的功能奠定了基础。

关键词: 猪蛔虫; 抑制消减杂交; 性别特异性基因; cDNA 文库; Southern blot

Profiling of Gender-Specific Gene Expression for *Ascaris suum* by Suppression Subtractive Hybridization

WU Shao-qiang, ZOU Feng-cai, WENG Ya-biao, SONG Hui-qun, LIN Rui-qing, ZHU Xing-quan

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

Abstract: Attempting a new method of gender-controlling nematode infection in animal production, differentially expressed male and female cDNA libraries of the adult *Ascaris suum* were constructed using the technique of suppression subtractive hybridization (SSH). The gender specificity of the constructed archives was determined using Southern blots with Digoxigenin(DIG)- labeled male and female cDNA probes. Twenty-five clones from each archive were selected *ad libitum* for sequence determination and homology analysis by BLAST online. Twenty of the 25 ESTs from the male cDNA library have a homology to the genes from *C. elegans* and 11 of the 19 ESTs from the female cDNA library have a homology to the genes from *C. elegans*. The successful construction of differentially expressed male and female cDNA libraries have provided a foundation for further study of the gender-specific genes.

Key words: *Ascaris suum*; Subtractive spression hbridization (SSH); Gender related gne; cDNA lbrary; Southern blot

中国是养猪大国, 由猪蛔虫 (*Ascaris suum*) 感染而导致的猪蛔虫病是危害猪体健康的重要疾病之一, 对中国养猪业造成的经济损失非常严重。据调查, 中国猪群蛔虫病的感染率从 17.3%^[1]到 80%^[2]不等, 感染强度与猪只饲养管理条件有关。目前, 猪蛔虫病主要以药物防治为主, 这不仅从一定程度上影响了肉品品质, 还容易导致蛔虫耐药性的产生。

猪蛔虫具有强大的繁殖力, 而且虫卵对外界环境抵抗力较强, 随粪便排至外界后可存活 3~5 年, 极易引起猪群的普遍感染。如能选择性地抑制或阻断猪蛔虫性别相关基因的表达, 则可抑制成虫的繁殖及产卵, 从而有效地控制猪蛔虫病的传播、流行。

近年来, 以研究基因功能为目的的“功能基因组学”发展十分迅速。抑制消减杂交技术 (suppression

收稿日期: 2004-08-06

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目 (30225033)、人事部留学回国人员科技活动择优资助项目、广东省自然科学基金重点项目 (36835) 和中国博士后科学基金项目 (2004035591) 资助

作者简介: 吴绍强 (1970-), 男, 山东临沭人, 博士, 主要从事寄生虫功能基因组学及分子疫苗的研究工作。Tel: 020-85283730; E-mail: sqwu@sina.com。朱兴全为通讯作者, Tel: 020-85283730; E-mail: xingquanzh@scau.edu.cn

subtractive hybridization, SSH) 是 1996 年提出的以消减杂交和抑制 PCR 结合而发展起来的一种克隆新基因的方法^[3], 该方法具有高度的敏感性, 即使低丰度的 mRNA 也能被检出, 而且效率高, 一次 SSH 反应可以同时分离几十或成百个差异表达基因^[4]。本研究通过将猪蛔虫雌、雄成虫 cDNA 进行相互抑制消减杂交 (SSH), 构建性别差异表达的消减 cDNA 文库, 从而大规模筛选性别差异表达基因, 为性别相关基因的功能及性别调控研究奠定基础, 并为最终研制成功性别控制疫苗或药物提供一个新的工具。

1 材料与方法

1.1 猪蛔虫成虫

自屠宰场采集猪蛔虫成虫, 于生理盐水内室温放置数小时、使其代谢物排出后, 根据生殖器官的差异鉴别性别, 将雌、雄性虫体分别放置于用 DEPC 溶液预处理的冻存管内, -86°C 保存。

1.2 猪蛔虫雌、雄虫总 RNA 和 mRNA 的提取

自 -86°C 取出约 1 g 雌性或雄性虫体, 放于预先加入液氮的研钵内, 研成粉末后, 加入 TriPure Isolation Reagent (Roche) 分离虫体总 RNA, 用 Biophotometer (Eppendorf) 测定含量后, 取约 2 mg, 按照 Poly (A) Purist 试剂盒 (Ambion) 操作说明分离 Poly(A)mRNA, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测无降解后, 用 Biophotometer 测定含量, -86°C 保存备用。

1.3 抑制消减杂交

按 PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒 (Clontech) 说明书进行。首先分别取约 2 μg mRNA 合成猪蛔虫雌、雄虫的双链 cDNA, 然后分别经 Rsa I 酶切消化后, 纯化, 加上接头 (adaptor) 并分析接头的连接效率; 以 adaptor-Rsa I -cDNA (δ) 为受试子 (Tester)、Rsa I -cDNA (φ) 为驱逐子 (Driver), 经过 68°C 8 h 和 20 h 两轮消减杂交后, 然后进行两轮抑制性 PCR, 获得特异性扩增的雄虫 cDNA; 同样, 以 adaptor-Rsa I -cDNA (φ) 为 Tester、Rsa I -cDNA (δ) 为 Driver 进行抑制消减杂交, 获得猪蛔虫雌虫差异表达的消减 cDNA。

1.4 Southern blot 检测

采用 Southern blot 评价所获得的 cDNA 的特异性。按照 DIG DNA labeling and detection 试剂盒 (Roche) 说明进行操作。

1.4.1 探针的标记 采用随机引物延伸法, 分别以 300 ng 经 Rsa I 酶切消化的猪蛔虫雌、雄虫的双链

cDNA 为模板, 制备 DIG 标记的雌、雄虫探针, 标记的探针经检测, 标记效率均为 $10 \text{ pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, 4°C 放置备用。

1.4.2 Southern blot 操作 各取约 1.0 μg 经抑制消减扩增的雌、雄虫 cDNA, 在无溴化乙锭 (EB) 的条件下进行 0.7% 琼脂糖凝胶电泳; 电泳结束后, 将凝胶修边、切除多余部分并作方向标记后, 先后在 $1.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 溶液中变性 45 min、在 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.4)、 $1.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 溶液中中和处理后, 以 $20\times$ SSC 溶液为转移缓冲液, 将 DNA 转移到带正电荷的尼龙膜 (Roche) 上, 连续转移 2 h。转移结束后, 将尼龙膜放于紫外交联仪 (Uvitec) 内, 254 nm 、 $1.5 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ 固定。采用 DIG Easy Hyb (Roche) 溶液在封闭的杂交袋 (Roche) 内进行预杂交 2 h, 然后采用雄虫探针含量为 $15 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的 DIG Easy Hyb 溶液, 在杂交炉 (Thermo) 内进行 37°C 过夜杂交。严格洗涤后, 采用 DIG Wash and block buffer 试剂盒 (Roche) 中的相应试剂将膜封闭、洗涤后显色并拍照, 以检测雌虫差异表达文库的消减效率。同样, 将转印后的尼龙膜采用 $15 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 雌虫探针进行杂交, 以检测雄虫差异表达文库的消减效率。

1.5 性别差异表达的消减 cDNA 文库的构建

将获得的猪蛔虫性别差异表达的 cDNA 插入 pGEM-T easy 载体 (Promega) 上, 转化 *E.coli* JM109 感受态细胞 (Promega), 蓝/白斑法筛选阳性克隆。

1.6 测序及序列比较分析

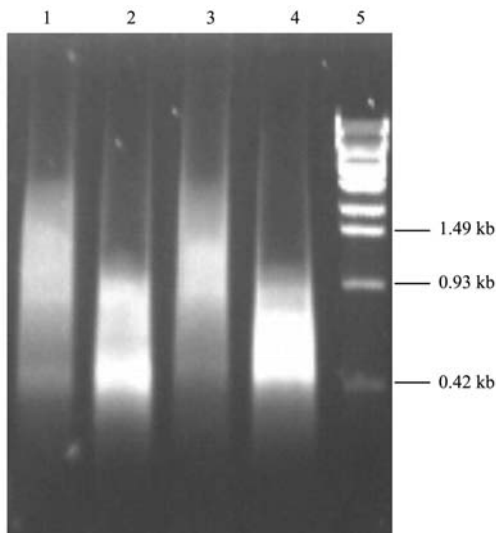
从猪蛔虫雌、雄虫性别差异表达的消减 cDNA 文库中随机挑选 40 个克隆, 采用质粒抽提试剂盒 (Vitagene) 提取质粒, 用 *EcoR* I 进行酶切鉴定后, 随机抽取 25 个阳性克隆送上海博亚生物工程公司用 ABI PRISM 377 测序仪进行测序。将所测 ESTs 序列在美国生物信息中心网站进行在线 BLAST 分析 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)。

2 结果与分析

2.1 抑制消减杂交 (SSH) 效率分析

采用 TriPure 分离虫体总 RNA, 得率约为 $3.44 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 组织, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测无降解; 取约 2 mg, 按照 Poly (A) Purist 试剂盒 (Ambion) 说明分离 Poly (A) mRNA, 经含量测定, 表明 mRNA 回收率约为 $7.12 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 组织, $\text{OD}_{260/280}=1.91$ 。将获得的 mRNA 用含 RNasin (Promega) 的 ddH₂O 溶解后, -86°C 保存备用。

在接头的连接效率为 61% 时, 进行 2 轮消减杂交和 2 轮特异性 PCR 扩增, 将获得的性别差异表达的 cDNA 进行电泳, 发现与没有消减的对照 cDNA 相比, 消减文库 cDNA 大小多在 0.4~1.0 kb 之间, 且得到明显扩增, 而较大的片段得到了明显的消减 (图 1)。



1. 未消减的雌虫 cDNA Tester 第 2 轮 PCR 产物; 2. 消减的雌虫 cDNA Tester 第 2 轮 PCR 产物; 3. 未消减的雄虫 cDNA Tester 第 2 轮 PCR 产物; 4. 消减的雄虫 cDNA Tester 第 2 轮 PCR 产物; 5. TaKaRa λ -EcoT14 I DNA Marker
1. The 2nd PCR products of un-subtracted female cDNA Tester; 2. The 2nd PCR products of subtracted female cDNA Tester; 3. The 2nd PCR products of un-subtracted male cDNA Tester; 4. The 2nd PCR products of subtracted male cDNA Tester; 5. TaKaRa λ -EcoT14 I DNA Marker

图 1 猪蛔虫雌、雄虫 cDNA 相互抑制消减杂交结果

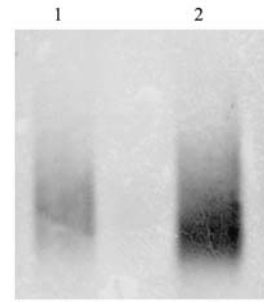
Fig.1 Results of the subtractive suppression hybridization with cDNA of the male and female adults of *Ascaris suum*

2.2 cDNA 特异性分析

采用地高辛标记探针进行 Southern blot 以检测文库特异性, 发现当采用雌虫探针进行杂交时, 雌虫消减文库信号较强, 杂交颜色较深, 而雄虫消减文库的颜色较淡; 同样, 当采用雄虫探针进行杂交时, 发现雄虫消减文库信号较强, 杂交颜色很深, 而雌虫消减文库的颜色非常浅淡。说明消减效果明显, 文库性别特异性较好。(图 2、3)。

2.3 插入片段的酶切分析

随机抽取各库中各 40 个克隆, 各加入 1.5 ml Amp^r LB 培养基中, 37℃ 过夜摇菌后, 提取质粒并进行 *EcoR* I 酶切、1% 琼脂糖电泳, 发现插入片段大小多在 600



1. 雄虫 SSH 文库; 2. 雌虫 SSH 文库
1. Male SSH library; 2. Female SSH library

图 2 采用地高辛标记雌虫探针文库进行 Southern blot 检测结果

Fig.2 Southern blot analysis of the male and female subtracted cDNA libraries using DIG-labeled female cDNA as probe



1. 雄虫 SSH 文库; 2. 雌虫 SSH 文库
1. Male SSH library; 2. Female SSH library

图 3 采用地高辛标记雄虫探针文库进行 Southern blot 检测结果

Fig.3 Southern blot analysis of the male and female subtracted cDNA libraries using DIG-labeled male cDNA as probe

bp 左右, 雄虫文库的阳性率为 97.5%, 40 个克隆中, 只有 1 个没有预计大小的插入片段; 雌虫文库的阳性率为 92.5%, 40 个克隆中, 有 3 个没有预计大小的插入片段。

2.4 测序及在线 BLAST 分析

随机抽取雌、雄虫文库中酶切鉴定为阳性的各 25 个克隆进行测序, 发现雄虫文库的所有 25 个克隆均没

有重叠 ESTs 序列, 通过 BLAST 分析在 DNA 数据库中 找到与 *C. elegans* 基因具有同源性的 ESTs 有 18 个, 其余 7 个为新基因; 雌虫文库的 25 个克隆中, 有 10 个克隆为 4 个 ESTs 序列的重叠群, 即只有 19 个 ESTs, 通过同源性比较, 其中 11 个为已知基因, 另外 8 个没有同源序列, 这些 ESTs 推测的功能见表。

表 猪蛔虫性别差异表达的 ESTs 与 *C. elegans* 的 ESTs 同源性比较

Table Comparative analysis of *A. suum* male-specific and female-specific ESTs with homologues in *C. elegans*

<i>C. elegans</i> 的相关 ESTs 的功能 Function of <i>C. elegans</i> homologue	雄虫文库中同源 ESTs 的数量 Male-specific ESTs	雌虫文库中同源 ESTs 的数量 Female-specific ESTs
主要精子蛋白 (MSP) Major sperm protein	3	-
卵黄蛋白原 (VIT) Vitellogenin	-	3
蛋白激酶 Protein kinase	4	-
肌动蛋白 (ACT) Actin	2	-
其它蛋白 Other proteins	11	8
功能不清 Unknown function	5	8

3 讨论

1996 年, Diatchenko 等人在抑制性 PCR 的基础上发明了抑制消减杂交 (SSH) 技术, 并构建了睾丸组织肿瘤特异性 cDNA 文库。此后, SSH 在肝细胞癌、肾癌、肺癌等^[5-7]肿瘤相关基因的克隆上均获得了成功, 验证了这一技术在筛选差异表达基因方面的高度敏感性, 它可使低丰度的基因富集 1 000 倍以上, 从而易于发现采用常规方法不能检测到的基因。

本研究对常规 SSH 方法进行了优化, 根据笔者经验, 接头的连接在变温条件下进行效果更好, 笔者采用先在 16℃ 连接 2 h, 然后 4℃ 过夜, 发现连接效率较高。在杂交时间上, 参照肖丙秀等^[4]经验, 为使 Tester cDNA 得到富集, 第 1 轮杂交时间以 8 h 为好 (<12 h), 第 2 轮杂交时间以 20 h 为好, 这样能够获得足够的差异片段。在进行第二轮杂交时, 同步混合也是获得较高消减效率的保证, 同时将第 2 次的扩增循环数降为 8, 以防止低含量的被消减片段在长时间的扩增后得到富集。

当对基因组文库进行 Southern 杂交时, 由于基因组 DNA 分子量较大, 通常采用 0.7% 的琼脂糖凝胶进

行过夜转移, 然后进行脱嘌呤处理以保证转移充分^[8]。本试验的检验对象为经过 Rsa I 酶切的性别特异性 cDNA, 大小约为 0.4~1.0 kb, 试验发现, 2 h 即可保证转移完全, 也无需脱嘌呤处理。为了保证杂交的特异性, 降低背景, 本试验采用了严格的预杂交和封闭, 预杂交时间延长至 2 h, 并采用新鲜配制的 1% 脱脂乳封闭 45 min, 获得了较好的效果, 无明显的非特异性核酸结合。

用地高辛 (digoxigenin, DIG) 标记核酸探针是近几年发展起来的非放射性标记技术, 它克服了放射性同位素标记危害性大、成本高等缺陷, 同样具有高灵敏度和特异性, 目前已为人们所接受并得到广泛的应用。付宝权等^[9]采用地高辛标记旋毛虫 5 日龄成虫期特异性基因, 获得了特异性探针 T671, 并用此从 cDNA 文库中筛选出了全长 cDNA, 编码旋毛虫角质胶原蛋白。黄志彪等^[10]根据马来丝虫 Hha 重复序列, 合成地高辛标记寡核苷酸探针用于平远县马来丝虫病的监测。发现该探针杂交检测方法特异性强, 敏感性高。本研究也发现, 地高辛标记核酸探针的灵敏度和特异性可以满足 Southern blot 检测的需要, 并且耗时少, 花费低, 值得推广应用。

本研究发现所测定的雄虫消减文库的 25 个克隆无一重叠序列, 而测定的雌虫文库中的 25 个克隆却只有 19 个独立的 ESTs, 这说明雄虫文库的 ESTs 含量明显高于雌虫, 这与 Jiang 等^[11]的结果是一致的, 在他们研究的 2 171 个 *C. elegans* 性别特异性基因中, 76% 为雄性特异性基因。Nisbet 和 Gasser^[12]构建了玻璃毛圆线虫 (*Trichostrongylus vitrinus*) 的性别特异性 SSH 文库, 亦发现雄性基因的比例高于雌性基因, 占 60%。

通过 BLAST 分析发现, 在雄虫特异性 SSH 文库中, 主要精子蛋白 (MSP) 基因 ESTs 的含量很高, 包括 *mSP-1*、*mSP-4* 和 *mSP-5* 三个成分, MSP 为线虫特异性的细胞骨架蛋白, 对维持精子的变形运动具有重要作用^[13]。进入雌虫子宫内的精子, 虽然要从不能自由运动的精细胞发育为可以活泼运动的精子的过程, 但其中没有 mRNA 的转录和翻译, 所以从雌虫抽提的 RNA 中 MSP 相应的 ESTs 的含量较低^[14]。另外, 在雄虫特异性 SSH 文库中, 蛋白激酶的含量也较高, 包括磷酸酯酶、酪氨酸激酶, 推测它们通过参与蛋白的翻译后修饰与加工而对精子的成熟起着重要的调节作用^[15]。

卵黄蛋白原 (VIT) 为雌性肠道上皮细胞合成的

一种具有脂类结合能力的蛋白质, 在本研究中所构建的雌性消减 cDNA 文库中含量也较高, 包括 *vit-1* 和 *vit-6*, 这与 Nisbet 和 Gasser^[12]采用玻璃毛圆线虫进行研究的結果是一致的。肠道上皮合成的卵黄蛋白原可以通过受体介导的细胞内吞作用而进入卵巢中的胚胎内^[16], 从而为后代的发育提供能量。另外, 有相当比例的 ESTs 在 DNA 数据库中无 *C. elegans* 同源序列, 说明了寄生生活线虫和自由生活的 *C. elegans* 在性别发育及调控方面确有不同^[17]。

4 结 论

本研究采用抑制消减杂交 (SSH) 技术, 成功构建了猪蛔虫性别差异表达的雌雄性成虫的 cDNA 文库, 经 Southern blot 检测, 性别特异性良好, 为研究寄生线虫性别特异性基因的功能及性别调控的机理提供了新的工具, 亦向最终采用性别控制的方法消灭寄生虫病迈出了坚实的一步。

致谢: 本教研室的朱建荣老师提供了本试验中的虫体样品, 特此致谢!

References

- [1] 赵俊龙, 何国声, 姚宝安, 夏雪山, 王 祥, 王丽华. 湖北省规模化猪场寄生虫病综合防控措施研究 I. 寄生虫感染情况调查. 湖北农业科学, 1998, 4: 51-53.
- Zhao J L, He G S, Yao B A, Xia X S, Wang X, Wang L H. Integrated control of parasitosis in pig farms of Hubei Province I. The investigation of parasitosis in pig farms. *Hubei Agricultural Science*, 1998, 4: 51-53. (in Chinese)
- [2] 刘 杰, 张 福, 吕长富, 常庄善, 路义鑫, 徐世文, 王 伟, 张玉军, 梁法忱, 马 才. 大庆地区集约化养猪猪蛔虫流行病学调查研究. 黑龙江畜牧兽医, 1998, (9): 20-21.
- Liu J, Zhang F, Lü C F, Chang Z S, Lu Y X, Xu S W, Wang W, Zhang Y J, Liang F C, Ma C. Epidemiological investigation of infection with *Ascaris suum* in infective pig farms in Daqing area. *Heilongjiang Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 1998, (9): 20-21. (in Chinese)
- [3] Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov E, Siebert P D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of National Academy of Science of USA*, 1996, 93 (12): 6 025-6 030.
- [4] 肖丙秀, 郭俊明, 赵 青. 抑制性消减杂交方法的建立. 宁波大学学报 (理工版), 2002, 15 (1): 97-99.
- Xiao B X, Guo J M, Zhao Q. Establishment of suppression subtractive hybridization method. *Journal of Ningbo University (NSEE)*, 2002, 15(1): 97-99. (in Chinese)
- [5] 朱武凌, 段芳龄, 韩有志, 刘东亮, 张 玲, 马 军, 白君修. 肝硬化患者发生的肝细胞癌差异表达基因文库的构建及初步筛选. 胃肠病学和肝病学杂志, 2000, 9 (4): 252-254.
- Zhu W L, Duan F L, Han Y Z, Liu D L, Zhang L, Ma J, Bai J X. Initial screening and library making of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma based on cirrhosis. *Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2000, 9(4): 252-254. (in Chinese)
- [6] 张 强, 张志文, 龚 侃, 辛殿旗, 那彦群, 郭应禄. 应用抑制性消减杂交技术克隆鉴定肾癌特异表达基因. 科学通报, 2000, 45(16): 1 758-1 762.
- Zhang Q, Zhang Z W, Gong K, Xin D Q, Na Y Q, Guo Y L. Identification of differentially expressed genes associated with venal cell carcinoma by suppression subtractive Hybridization. *Chinese Science Bulletin*, 2000, 45(16): 1 758-1 762. (in Chinese)
- [7] 陈 杰, 钱桂生, 黄桂君, 熊 玮, 李 靖. 应用抑制消减杂交 (SSH) 克隆肺腺癌多药耐药细胞特异表达基因. 第三军医大学学报, 2001, 23 (2): 131-134.
- Chen J, Qian G S, Huang G J, Xiong W, Li J. Suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in a human-lung adenocarcinoma multidrug resistance cell line. *Acta Academiae Militaris Tertiae*, 2001, 23(2): 131-134. (in Chinese)
- [8] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫等译. 北京: 科学出版社, 1999: 474-490.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd). Translated by Jin D Y, Li M F. Beijing: Science Press, 1999: 474-490. (in Chinese)
- [9] 付宝权, 王 峰, 吴秀萍, 牛廷敏, 卢 强, 刘明远. 旋毛虫成虫期特异性基因全长 cDNA 的克隆与序列分析. 中国寄生虫与寄生虫病杂志, 2003, 21(3): 154-156.
- Fu B Q, Wang F, Wu X P, Niu T M, Lu Q, Liu M Y. Cloning and sequence analysis of a novel stage-specific cDNA from adult *Trichinella spiralis*. *Chinese Journal of Parasitology and Parasite Disease*, 2003, 21(3): 154-156. (in Chinese)
- [10] 黄志彪, 黄少玉, 阮彩文, 潘 波, 吴旭光, 沈秀婷, 邓卓晖, 崔惠儿, 游恒龙, 姚良治. 马来丝虫非放射性寡核苷酸探针的制备及现场应用研究. 中国寄生虫病防治杂志, 2002, 15 (4): 211-213.
- Huang Z B, Huang S Y, Ruan C W, Pan B, Wu X G, Shen X T, Deng Z H, Cui H, You H L, Yao L Z. Preparation of a DIG-oligonucleotide

- probe of *Brugia malayi* and application in the field. *Chinese Journal of Parasite Diseases Control*, 2002, 15(4): 211-213. (in Chinese)
- [11] Jiang M, Ryu J, Kiraly M, Duke K, Reinke V, Kim S. Genome-wide analysis of developmental and sex-regulated gene expression profiles in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of National Academy of Science of USA*, 2001, 98(1): 218-223.
- [12] Nisbet A J, Gasser R B. Profiling of gender-specific gene expression for *Trichostrongylus vitrinus* (Nematoda: Strongylida) by microarray analysis of expressed sequence tag libraries constructed by suppressive-subtractive hybridization. *International Journal for Parasitology*, 2004, 34: 633-643.
- [13] Memoyo H, Makoto M, Naoto U, Yuji K, Yuichi L. Use of cDNA subtraction and RNA interference screens in combination reveals genes required for germ-line development in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of National Academy of Science of USA*, 2001, 98(15): 8 686-8 691.
- [14] Roberts T M, Stewart M. Acting like actin: the dynamics of the nematode major sperm protein (MSP) cytoskeleton indicate a push-pull mechanism for amoeboid cell motility. *Journal of Cell Biology*, 2000, 149: 7-12.
- [15] Reinke V, Smith H E, Nance J, Wang J, Van Doren C, Begley R, Jones S J M, Davis E B, Scherer S, Ward S, Kim S K. A global profile of germline gene expression in *C.elegans*. *Molecular Cell*, 2000, 6: 605-616.
- [16] Grant B, Hirsh D. Receptor-mediated endocytosis in the *caenorhabditis elegans* oocytes. *Molecular Biology Cell*, 1999, 10: 4 311-4 326.
- [17] Dessens J T, Margos G, Rodriguez M C, Sinden R E. Identification of differentially regulated genes of *Plasmodium* by suppression subtractive hybridization. *Parasitology Today*, 2000, 16(8): 354-356.

(责任编辑 林鉴非)