

黄粉虫幼虫小分子量抗菌肽的分离纯化^{*}

孙 龙^{**} 冯 颖^{***} 何 钊 陈智勇 赵 敏

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所 国家林业局资源昆虫培育与利用重点实验室 昆明 650224)

摘 要 昆虫抗菌肽具有良好的抑菌效果,有望开发成新一代抗生素。本文以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌混合液作为诱导源,采用针刺法使黄粉虫 *Tenebrio molitor* L. 幼虫感染微生物产生抗菌肽,并对抗菌肽进行了提取、色谱分离纯化及抑菌活性检测。结果显示,诱导组和对照组的三氟乙酸粗提物无抑菌活性;经 Sephadex G50、Superdex Peptide 凝胶色谱分离后,从诱导组和对照组均可获得对革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌有抑菌作用的组分,而且诱导组活性明显高于对照组;通过 Resource 15RPC 反相色谱分离纯化,从诱导组获得一具有明显抑制革兰氏阳性菌的组分,质谱检测该组分为混合肽,主要由分子量为 1 876. 21 u、1 904. 21 u 的小肽组成,可能是一种比 Thanatin 分子量更低的昆虫抗菌肽。

关键词 黄粉虫, 抗菌肽, 凝胶色谱, 质谱

Isolation and purification of small antimicrobial peptide from larvae of mealworm, *Tenebrio molitor*

SUN Long^{**} FENG Ying^{***} HE Zhao CHEN Zhi-Yong ZHAO Min

(Research Institute of Resources Insects, CAF; Key Laboratory of Cultivation and Utilization of Resource Insects, State Forestry Administration, Kunming 650224, China)

Abstract Antimicrobial peptides (AMPs) are so effective against bacteria that they are expected to become the new antibiotics. We induced mealworm, *Tenebrio molitor* L., larvae to produce AMPs by pricking their abdomens with a stainless needle that had been dipped in a suspension of living *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. AMPs were then isolated and purified by methods including 0. 1% trifluoroacetic acid (v:v) extraction, gel filtration chromatography on Sephadex G-50 and Superdex Peptide, and reverse phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). Eventually, a fraction was obtained from the induced group with strong anti-*S. aureus* and anti-*Bacillus subtilis* activities. The analysis of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) indicated that the fraction was composed of two small peptides with molecular masses of 1 876. 21 u and 1 904. 21 u respectively. This suggests that these peptides are insect AMPs of a lower molecular weight than Thanatin.

Key words *Tenebrio molitor*, antimicrobial peptide, gel chromatography, mass spectrometry

昆虫作为地球上种类最多、数量最大的生物类群,有其独特的防御系统,在受到某些物理刺激或被微生物感染后,会引起免疫反应产生一系列抗菌物质,其中最重要的就是抗菌肽。昆虫抗菌肽主要由脂肪体产生,含 10~50 个氨基酸,大多数为阳离子肽,具有水溶性好、热稳定高、活性广泛、细菌不易产生耐药性等优点 (Hancock and

Lehrer, 1998; Bulet *et al.*, 1999; Zasloff, 2002; 吴甜甜和杨洁, 2009), 极有可能成为新一代抗生素的候选药物,因而成为生命科学、药学和免疫学研究的热点之一。目前昆虫抗菌肽主要通过 3 种途径获得:天然来源、化学合成以及基因工程 (刘建涛等, 2006), 通过研究从虫体中提取的天然来源抗菌肽的性质,是化学合成抗菌肽和基因工程表

^{*} 资助项目:国家林业局基地建设项目 (1691116001242)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项项目 (rircf2011001M)、国家林业局引进国际先进林业科学技术项目 (20064116)。

^{**} E-mail: sunlong1818@126. com

^{***} 通讯作者, E-mail: yingf@ hotmail. com

收稿日期: 2011-09-18, 接受日期: 2012-03-28

达抗菌肽的基础。天然来源的昆虫抗菌肽一般是从整体匀浆或血淋巴抽提获得,由于昆虫抗菌肽种类繁多,不同的诱导和分离方法有可能获得不同的抗菌肽。因此,从虫体中提取分离仍然是抗菌肽研究的基础和不可或缺的部分。

黄粉虫 *Tenebrio molitor* L., 别名黄粉甲、大黃粉虫,俗称面包虫,属于鞘翅目拟步甲科拟步甲属,因其繁殖力强、饲养简单、蛋白质含量高,已成为开发利用较好的资源昆虫之一,主要用于饲用和食用。国内对黄粉虫的研究主要集中在营养成分(谢保令, 1994;杨兆芬等, 1999)、饲养技术(白耀宇和程家安, 2003)、保健用途(杨兆芬等, 1998;王文亮和孙爱东, 2005)以及防御物质(杨兆芬等, 2004;强承魁等, 2006)等方面,虽然近些年有一些抗菌肽的报道,但仅限于诱导源和诱导条件的探索(黄文等, 2005;王立新等, 2009;陶淑霞等, 2010)、初步分离和电泳方面的分析(王立新等, 2008;陶淑霞等, 2009),还未见纯化产品及理化性质的报道。国外韩国学者曾以大肠杆菌为诱导源,从其血淋巴中分离到一种含 43 个氨基酸残基碱性多肽,命名为 Tenecin 1,对革兰氏阳性菌尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌有较好的抑制作用(Moon *et al.*, 1994)。本文以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌混合菌液为诱导源,对诱导和非诱导条件下的黄粉虫幼虫抗菌肽进行了分离纯化和抑菌活性研究,获得了一分子量低于 2 000 u 的混合肽,为昆虫抗菌肽研究和进一步深入发掘黄粉虫的药用功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试虫 黄粉虫幼虫购自云南省昆明市景星花鸟市场,室温下人工饲养,备用。

1.1.2 菌种 革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和革兰氏阴性菌大肠杆菌(*Escherichia coli*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)菌株购自云南大学微生物研究所,4℃ 斜面低温保藏。

1.1.3 主要仪器和试剂 AKTA explorer 100 型全自动层析仪、Sephadex-G50 填料、Superdex Peptide、Resource 15RPC 预装层析柱(美国 GE HealthCare 医疗集团);DU-800 型紫外可见分光光度计(美国 Beckman-Coulter 公司);CT60e 型真空

冷冻干燥仪(丹麦 Heto-Holten 公司);基质辅助激光解析电离/飞行时间质谱仪(Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS)(日本岛津公司);蛋白酶抑制剂 Aprotinin、黑化抑制剂苯基硫脲(Phenylthiourea, PTU)(美国 Sigma 公司);三氟乙酸、乙腈为色谱纯(德国 Merck 公司),其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 免疫诱导 供试幼虫分为对照组(DZ)和诱导组(YD)。大肠杆菌和金黄色葡萄球菌斜面培养 18~24 h,超净工作台内分别用无菌生理盐水调至 0.5 个麦氏比浊度(1×10^8 CFU/mL),将 2 种菌液等体积混合,作为诱导源。诱导组黄粉虫幼虫表面剔除饲料,4 号昆虫针蘸取混合菌液,从虫体腹部刺入,一针一条,室温下继续饲喂 24 h。对照组未用菌液诱导,其他处理同诱导组。

1.2.2 提取 称取适量的对照组和诱导组幼虫,迅速加入液氮,研钵研磨,转入预冷的 5 倍体积 0.1% 三氟乙酸(v:v)提取液中(含 Aprotinin 和 PTU,终浓度分别为 5 μ g/mL 和 25 μ g/mL),冰水浴中提取 30 min,期间缓慢搅拌,4℃ 条件下 6 000 r/min 离心 15 min 以除去血细胞及组织碎片,取上清,冰箱过夜,4℃ 条件下 12 000 r/min 离心 20 min,冷冻干燥得粗提物,检测抑菌活性。

1.2.3 分离纯化

1.2.3.1 Sephadex-G50 凝胶柱纯化 取冻干的对照组和诱导组抗菌肽粗提物各 1 g,20 mL 0.1% 三氟乙酸复溶,12 000 r/min 离心 20 min,分批加入到 Sephadex-G50 柱顶部(1 000 mm $\times$ 26 mm),0.1% 三氟乙酸液洗脱,流速 0.7 mL/min,10 min/管,280 nm 波长下隔管检测吸光度,收集各主峰冷冻干燥,检测抑菌活性。

1.2.3.2 Superdex Peptide 凝胶柱纯化 对 1.2.3.1 洗脱峰中有活性的组分用少量 0.1% 三氟乙酸液复溶,离心后上样,0.1% 三氟乙酸液洗脱,0.5 mL/min,215 nm 波长下检测吸光度,收集各组分冷冻干燥,检测抑菌活性。

1.2.3.3 Resource 15RPC 反相柱纯化 对 1.2.3.2 洗脱峰中有活性的组分用少量 0.1% 三氟乙酸液复溶,离心后上样,0.1% 三氟乙酸~30% 乙腈(含 0.085% 三氟乙酸)梯度洗脱,0.5

mL/min, 215 nm 波长下检测吸光度, 收集各组分冷冻干燥, 检测抑菌活性。

1.2.4 MALDI-TOF 质谱测定 对 1.2.3.3 中活性组分进行质谱检测, 1 μ L 样品与 1 μ L 基质 α -氰基-4-羟基苯甲酸混合, 点板, 线性模式下测样。

1.2.5 抑菌活性测定 采用滤纸片法以大肠杆菌 (G^-)、绿脓杆菌 (G^-)、金黄色葡萄球菌 (G^+)、枯草芽孢杆菌 (G^+) 4 种菌为指示菌株进行抑菌试验, 方法参照文献(叶英妩等, 2006)并作适当改进。具体步骤为将供试菌株斜面过夜培养, 生理盐水调至 0.5 个麦氏比浊度 (1×10^8 CFU/mL), 各取 350 μ L 加入已倒好培养基的平皿中(直径 9 cm), 无菌棉签涂布均匀, 贴入已灭菌的滤纸片, 每片滤纸片加入 3~5 μ L 待测样品液, 每皿设一个空白对照(0.1% 三氟乙酸), 36 $^{\circ}$ C 倒置培养 18~24 h, 测量抑菌圈的大小, 每个样品重复 3 次, 取平均值。

2 结果与分析

2.1 抗菌肽粗提

本文以 5 倍体积的 0.1% 三氟乙酸液对黄粉

虫幼虫抗菌肽进行提取, 离心后上清液和冷冻干燥物作抑菌活性实验, 结果显示上清液及冷冻干燥物对指示菌株均无抑制作用。但粗提物经后续分离纯化后, 检测到了明显的抑菌活性。分析原因可能由于采用全虫匀浆, 虫体所含杂蛋白种类较多、含量较高, 而抗菌肽相对含量较低, 大量杂蛋白的存在使抗菌肽有效浓度太低, 致使其不能发挥抑菌作用。

2.2 抗菌肽分离纯化及抑菌活性

对照组和诱导组抗菌肽粗提物经 Sephadex-G50 凝胶柱后, 得到 2 个组分(图 1), 其中第 2 个峰 DZP2 和 YDP2(图 1 中箭头标记)对革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌均表现出明显的抑制作用, 但对革兰氏阴性菌大肠杆菌和绿脓杆菌无活性; 诱导组 YDP2 组分在较低浓度时对革兰氏阳性菌的抑菌圈直径大于对照组(表 1), 表明黄粉虫幼虫经诱导后, 抗菌肽的活性有所增强。

表 1 DZP2 和 YDP2 抑菌活性
Table 1 Antimicrobial activity of DZP2 and YDP2

组分 Fractions	抑菌浓度 Inhibitory concentration (mg/mL)	抑菌圈直径(mm) Inhibition zone diameter			
		大肠杆菌 <i>E. coli</i>	绿脓杆菌 <i>P. aeruginosa</i>	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>
DZP2	276.0	—	—	9.0	14.2
YDP2	265.5	—	—	13.3	17.6

注:— 表示未观察到抑菌圈。下表同。
— indicates no activity are detected. The same below.

采用 Superdex Peptide 凝胶柱对有活性的 DZP2 和 YDP2 组分进一步纯化, 各得到 6 个组分(图 2)。各组分冷冻干燥后检测抑菌活性, 结果显示, 对照组和诱导组各组分对革兰氏阴性菌大肠杆菌和绿脓杆菌无抑制活性; 对照组中除第 6 峰外, 其余 5 个组分对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌均有抑制作用, 其中以第 2 峰 DZP2-2(箭头标记)活性最强; 诱导组前 2 个组分对上述 2 种菌具有明显活性, 活性以第 2 峰 YDP2-2(箭头标记)较

强。由 DZP2-2 和 YDP2-2 抑菌活性比较可见, 诱导组抗菌肽经 2 步纯化后活性仍高于对照组(表 2)。

对活性较强的 DZP2-2 和 YDP2-2 采用 Resource 15RPC 反相柱纯化, 洗脱曲线见图 3, 2 个活性组分峰 DZP2-2-1、YDP2-2-1(图 3 中箭头标出)对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌具有明显的抑制作用。

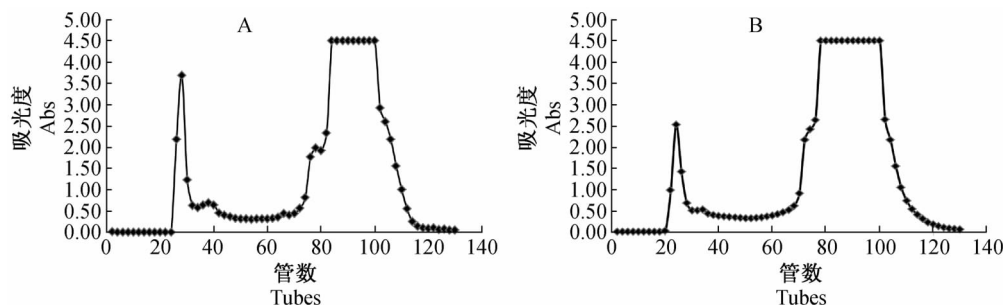


图1 黄粉虫幼虫抗菌肽 Sephadex-G50 洗脱曲线

Fig.1 Purification of antimicrobial peptides from larvae of *Tenebrio molitor* by Sephadex-G50

A:对照组 control;B:诱导组 induced.

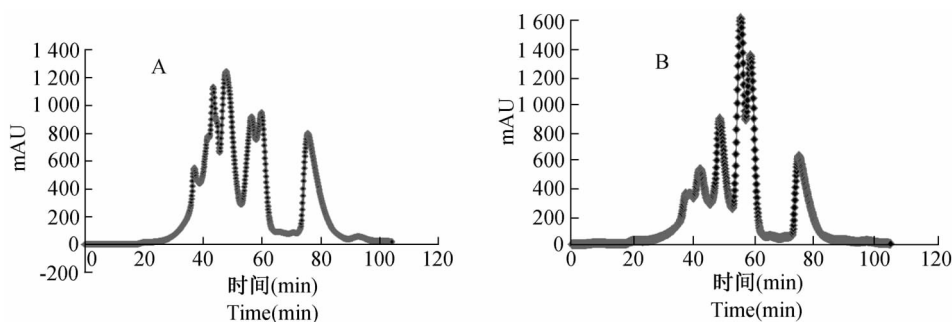


图2 DZP2 和 YDP2 经 Superdex Peptide 柱后洗脱曲线

Fig.2 Purification of DZP2 and YDP2 by Superdex Peptide

A:对照组 control;B:诱导组 induced.

表2 DZP2 和 YDP2 经 Superdex Peptide 柱后各峰抑菌活性

Table 2 Antimicrobial activity of fractions of DZP2 and YDP2 by Superdex Peptide

组分 Fractions	抑菌圈直径(mm) Inhibition zone diameters			
	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	绿脓杆菌 <i>P. aeruginosa</i>	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>
DZP2-2	—	—	11.2	12.2
YDP2-2	—	—	12.6	17.7

2.3 质谱

将 YDP2-2-1 脱盐后,进行 MALDI-TOF 质谱检测,结果见图4。由图4可知,YDP2-2-1 主要由分子量为 1 876.21、1 904.21 u 的2种小肽组成。

3 讨论

3.1 抗菌肽的诱导与非诱导

通常来说,昆虫在非诱导状态下,抗菌肽只有少量或基础表达,受到外界刺激或被感染后才有

高水平表达(Cheng *et al.*, 2006),因此昆虫抗菌肽提取前都要先进行人工诱导。人工诱导的方法主要有紫外线照射、超声波诱导、微生物感染、异物注射等,每种方法各有优缺点。紫外线照射、超声波诱导方法简便易行,可效果欠佳,应用范围有限;微生物感染、异物注射步骤繁杂费时,但效果明显,仍为国内外绝大多数研究者采用。起初,研究者一直认为昆虫抗菌肽的表达谱与诱导源的性质无关,所以实验时并未刻意选择诱导源。然而

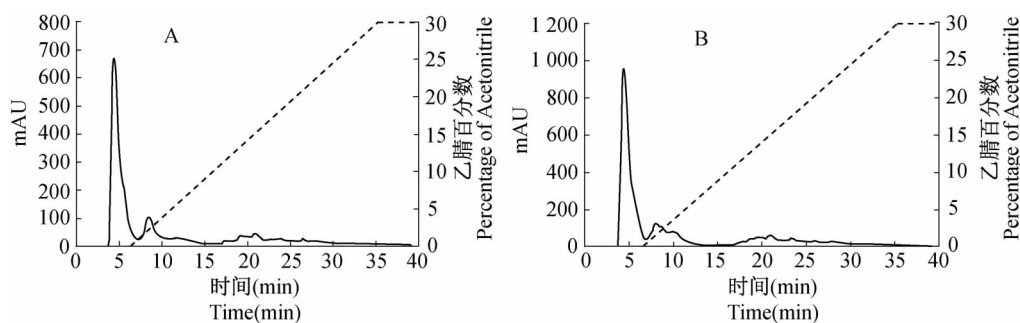


图3 DZP2-2 和 YDP2-2 经 Resource 15RPC 反相柱的洗脱曲线

Fig. 3 Purification of DZP2-2 and YDP2-2 by reverse-phase Resource 15RPC

A: 对照组 control; B: 诱导组 induced.

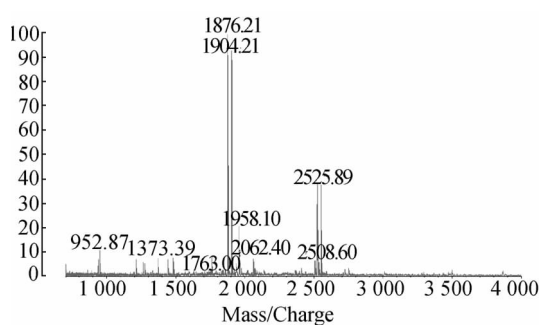


图4 YDP2-2-1 MALDI-TOF 质谱图

Fig. 4 MALDI-TOF mass spectrum of YDP2-2-1

近来有研究表明,昆虫免疫抗菌肽具有特异性,不同的微生物能特异地激活特定的抗菌肽基因表达,从而表现为在不同诱导源刺激下,昆虫机体会诱导产生不同的抗菌肽,同时产生的抗菌肽的强度也不同(刘建涛等, 2006),如分别用革兰氏阳性菌、真菌、革兰氏阴性菌作诱导源时,果蝇抗菌肽的表达谱是不同的(Michel *et al.*, 2001; Gottar *et al.*, 2002)。鉴于此,本文采用了革兰氏阳性菌和阴性菌的混合液作为诱导源。从分离纯化过程中的凝胶和反相色谱分离曲线看,诱导组与对照组峰数相同、峰值不同,说明两者在种类上基本一致,含量有所不同;结合抑菌试验,诱导组活性明显高于对照组,表明混合菌种感染可增强黄粉虫幼虫抗菌肽的诱导表达。

研究表明昆虫抗菌肽的种类较多,分属不同的基因家族,Hetru 等(2003)曾在果蝇体内鉴定出 7 种不同基因家族的抗菌肽,而且它们对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌活性各不相同。本文研究发现在黄粉虫幼虫抗菌肽 Superdex Peptide 柱分离阶段,对照组的前 5 个峰都有抑菌活性,而诱导

组只有前 2 个峰表现出活性的,对于这一现象,国内外还未见相关文献报道。Yang 等(2011)认为家蚕抗菌肽基因组存在着“主功能基因的免疫一致性”,即抗菌肽基因组由主功能基因和其他基因组成,主功能基因的基础表达较弱,形成虫体的初次防御,诱导后表达活性增强,发挥主要防御作用;而其他基因诱导表达活性很低,与主功能基因构成协同防御,主要起辅助作用,有时只针对某些特定微生物表现出抗菌活性。据此分析,本文分离纯化获得的对照组和诱导组前 2 个峰有可能为主功能基因编码的抗菌肽,未诱导时,抗菌肽主功能和其他基因成员均为基础表达,具有一定的抑菌活性;诱导后主功能基因表达上调,活性增强,其他基因表达较弱,在本文实验条件下未能检测出来。

3.2 抗菌肽的提取

天然昆虫抗菌肽主要提取自昆虫全虫体或血淋巴。一般来说,个体较大的昆虫,血淋巴较多,可以直接收集其血淋巴;体积较小或血淋巴抽取困难时,采用全虫液氮速冻,匀浆后加入合适的缓冲液提取(Shafer, 1997)。蛋白质在不同缓冲液中的溶解度有很大不同,影响其溶解度的因素很多,主要包括 pH 值、离子强度、温度、溶剂的极性 etc (Marshak *et al.*, 1999),合适的提取缓冲液对蛋白质的分离纯化至关重要。缓冲液的 pH 值是一个关键性参数,多数抗菌肽为碱性,理论上在酸性条件下有较大的溶解度。考虑到分离纯化过程需要进行多次冷冻干燥处理,挥发性溶液具有极大的优势,所以本文选择 0.1% 三氟乙酸为提取溶液。许多文献都报道,从虫体收集的血淋巴原液

具有抑菌活性,但是本文中抗菌肽粗提物并未检测到抑菌活性,分析其原因可能是直接收集的血淋巴中杂蛋白较少,抗菌肽的有效浓度(或含量)相对较高;而黄粉虫幼虫含有较多的粗蛋白,含量可达干体的 54.25% (谢保令,1994),虫体匀浆后所有的蛋白质混合在一起,杂蛋白种类、数量远远超过血淋巴,直接导致抗菌肽的有效浓度大大低于血淋巴,使其不能发挥抑菌活性。这可能是昆虫整体匀浆提取抗菌肽遇到的共同问题。

3.3 抗菌肽的抑菌活性

昆虫的种类繁多,不同种类的抗菌肽对细菌的抑菌活性不同,有的只对革兰氏阳性菌起作用,有的仅对革兰氏阴性菌有效果,还有的对这 2 种菌都有活性(Hazlett and Wu, 2011)。防御素是抗菌肽家族中的重要组成部分,其结构共性是分子内含有 6 个半胱氨酸并形成 3 个二硫键,主要对革兰氏阳性菌有抑制作用(Hoffmann and Hetru, 1992; Wong *et al.*, 2007)。已经从黄粉虫中分离到的 Tenecin 1, 就属于防御素类抗菌肽,但它分子量较大(4 300 u 左右)。本文所得小分子肽类,也对革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌)有活性,但质谱检测其分子量低于 2 000 u,不到 Tenecin 1 分子量的一半,比昆虫防御素家族中最小的 Thanatin(Fehlbaum *et al.*, 1996)分子量还低 400 u 左右。从文献报道和公开的抗菌肽数据库检索来看,在鞘翅目昆虫中还未发现如此低分子量的抗菌肽。该活性肽属于哪个抗菌肽家族以及其结构和功能等尚待进一步研究。

致谢:中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室对样品进行了质谱测定,并在谱图分析方面提供了帮助,在此表示感谢。

参考文献(References)

- Bulet P, Hetru C, Dimarcq J, Hoffmann D, 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev. Comp. Immunol.*, 23(4/5):329—344.
- Cheng TC, Zhao P, Liu C, Xu PZ, Gao ZH, Xia QY, Xiang ZH, 2006. Structures, regulatory regions, and inductive expression patterns of antimicrobial peptide genes in the silkworm *Bombyx mori*. *Genomics*, 87(3):356—365.
- Fehlbaum P, Bulet P, Chernysh S, Briand JP, Roussel JP, Letellier L, Hetru C, Hoffmann JA, 1996. Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. *PNAS*, 93(3):1221—1225.
- Gottar M, Gobert V, Michel T, Belvin M, Duyk G, Hoffmann JA, Ferrandon D, Royet J, 2002. The *Drosophila* immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. *Nature*, 416(6881):640—644.
- Hancock RE, Lehrer R, 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.*, 16(2):82—88.
- Hazlett L, Wu M, 2011. Defensins in innate immunity. *Cell Tissue Res.*, 343(1):175—188.
- Hetru C, Troxler L, Hoffmann JA, 2003. *Drosophila melanogaster* antimicrobial defense. *J. Infect. Dis.*, 187(Suppl. 2):S327—S334.
- Hoffmann JA, Hetru C, 1992. Insect defensins: inducible antibacterial peptides. *Immunol. Today*, 13(10):411—415.
- Marshak DR, Kadonaga JT, Burgess RR, Knuth MW, 1999. Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. 朱厚础译. 北京:科学出版社. 1—279.
- Michel T, Reichhart JM, Hoffmann JA, Royet J, 2001. *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature*, 414(6865):756—759.
- Moon HJ, Lee SY, Kurata S, Natori S, Lee BL, 1994. Purification and molecular of cDNA cloning for an inducible antimicrobial protein from larvae of coleopteran, *Tenebrio molitor*. *J. Biochem.*, 116(1):53—58.
- Shafer WM, 1997. Antibacterial Peptide Protocols. New Jersey:Humana Press. 35—49.
- Wong JH, Xia LX, Ng TB, 2007. A review of defensins of diverse origins. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 8(5):446—459.
- Yang WY, Cheng TC, Ye MQ, Deng XJ, Yi HY, Huang YD, Tan X, Han D, Wang B, Xiang ZH, Cao Y, Xia QY, 2011. Functional divergence among silkworm antimicrobial peptide paralogs by the activities of recombinant proteins and the induced expression profiles. *PLoS ONE*, 6(3):e18109.
- Zasloff M, 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870):389—395.
- 白耀宇, 程家安, 2003. 我国黄粉虫的营养价值和饲养方法. *昆虫知识*, 40(4):317—322.
- 黄文, 王芙蓉, 刘彬, 王佳璐, 周兴苗, 雷朝亮, 2005. 黄粉甲幼虫抗菌物质的诱导及其抗菌活性. *昆虫学报*, 48

- (1):7—12.
- 刘建涛, 苏志坚, 王方海, 李广宏, 宋少云, 2006. 昆虫抗菌肽的研究进展. 昆虫天敌, (1):36—43.
- 强承魁, 杨兆芬, 张绍雨, 2006. 黄粉虫防御性分泌物化学成分 GC/MS 分析. 昆虫知识, 43(3):385—389.
- 陶淑霞, 韩静菲, 李玉, 2009. 黄粉虫抗菌肽的生物学性质及初步分离纯化. 安徽农业科学, 37(29):14167—14170.
- 陶淑霞, 韩静菲, 李玉, 2010. 诱导源及其诱导剂量对黄粉虫幼虫血淋巴抗菌活性的影响. 吉林农业大学学报, 32(2):145—148.
- 王立新, 王姗姗, 戴四发, 路振香, 王金虎, 胡静, 2009. 黄粉虫不同生长阶段诱导抗菌肽的效果分析. 中国农学通报, 25(5):10—13.
- 王立新, 张伯卫, 戴四发, 张吉弟, 张传好, 李如兰, 王姗姗, 王金虎, 2008. 黄粉虫幼虫抗菌肽的诱导特性及电泳组分研究初报. 安徽农学通报, 14(21):43—46.
- 王文亮, 孙爱东, 2005. 黄粉虫食品研究开发现状及发展前景. 中国食物与营养, (6):18—20.
- 吴甜甜, 杨洁, 2009. 天然抗菌肽的研究进展及应用前景. 生物技术通报, (1):27—30.
- 谢保令, 1994. 黄粉虫营养成分的分析研究. 昆虫知识, 31(3):175—176.
- 杨兆芬, 林跃鑫, 陈寅山, 吴小楠, 1999. 黄粉虫幼虫营养成分分析和保健功能的实验研究. 昆虫知识, 36(2):97—100.
- 杨兆芬, 林跃鑫, 张东驰, 陈寅山, 1998. 黄粉虫复合氨基酸的提取及氨基酸虫酒的制作. 昆虫知识, 35(5):290—292.
- 杨兆芬, 刘怀如, 张素华, 彭玉玲, 2004. 黄粉虫防卫物质苯醌的测定及其去除. 昆虫知识, 41(3):248—251.
- 叶英妩, 王毓三, 申子瑜, 2006. 全国临床检验操作规程. 第3版. 南京:东南大学出版社. 890—912.