

DOI:10.13350/j.cjpb.220811

· 论著 ·

## 新产褐黄血蜱卵原生质蛋白组成和状态研究\*

李丹,徐义葳,程天印\*\*

(湖南农业大学动物医学院,湖南长沙 410128)

**【摘要】** 目的 分析新产褐黄血蜱卵原生质蛋白及功能,揭示蜱胚发育的物质需求,为创新免疫控蜱策略奠定基础。

**方法** 采用 LC/MS/MS 技术,搜索唾液腺转录组文库鉴定褐黄血蜱卵原生质蛋白和高丰度卵成分。 **结果** 检获特异性肽段 503 条,由此鉴定多肽 137 条,高可信的 82 条,属于 79 种蛋白,其中 34 种已知功能的分别属于酶类、蛋白酶抑制剂、转运蛋白、蛋白合成与修饰、免疫相关蛋白等五类;序列比对表明,在抑制剂和转运蛋白两类中,成员有明显的家族性;定量分析显示,在卵蛋白中,丰度最高的蛋白是 contig\_43009+19714,另外三种分别为 contig\_42244+44787、contig\_195、contig\_12613,其丰度排名依次为第 2、6、7。电泳显示,新鲜卵蛋白大小 25-400 ku 之间,但分布不均,在近 120 ku、90 ku 等 9 处形成浓染条带;切带分析显示,9 个条带中的高丰度蛋白均为 contig\_43009、contig\_19714、contig\_42244、contig\_44787 等 Vn 片段,说明蜱卵产出时其内的 Vn(或 Vg)已降解成大小不同的肽段。 **结论** 新产褐黄血蜱卵原生质蛋白具有多样性、系统性和家族性。

**【关键词】** 褐黄血蜱卵;LC/MS/MS;酶;蛋白酶抑制剂**【中图分类号】** R384.4**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1673-5234(2022)08-0924-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Aug.;17(8):924-928, 933.]

**Study on the components and status of periplasmic proteins from newly produced *Haemaphysalis flava* egg**

LI Dan, XU Yi-wei, CHENG Tian-yin (College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**【Abstract】 Objective** Investigation of the periplasmic proteins and its function from *Haemaphysalis flava* egg will help to reveal the material requirements of tick embryo development and lay a foundation for innovating the anti-tick strategy. **Methods** The periplasmic proteins and high-abundance components of *Haemaphysalis flava* egg were identified by LC/MS/MS assay with salivary transcriptome data. **Results** A total of 503 specific peptides were detected, and 137 polypeptides were identified, among which 82 were high confidence. They were derived from 79 proteins, 34 of which had known functions belonging to five categories, including enzymes, protease inhibitors, transporters, protein synthesis and modification, and immune-related proteins. Sequence alignment showed that the members of inhibitors and transporters were familial. The quantitative analysis showed that the highest abundance of egg proteins was contig\_43009+19714, the other three were contig\_42244+44787, contig\_195 and contig\_12613, ranking the second, sixth and seventh in sequence. Electrophoresis showed that the size of fresh egg protein ranged from 25-400 ku, but the distribution was not uniform, and concentrated bands were formed at 9 places, such as 120 ku and 90 ku. The results showed that the high abundance proteins in the nine bands were all contig\_43009, contig\_19714, contig\_42244, contig\_44787 and other Vn fragments, indicating that the Vn (or Vg) in tick eggs had been degraded into peptides of different sizes. **Conclusion** The periplasmic proteins of newly produced *Haemaphysalis flava* egg are diverse, systematic and familial.

**【Key words】** *Haemaphysalis flava* egg; LC/MS/MS; enzyme; protease inhibitor

\*\*\* 蜱属于以吸血为生的体外寄生虫,有卵、幼蜱、若蜱、成蜱四个阶段。卵是其个体生命的第一个阶段,其内含有受精卵及其发育所需的营养物质,故营养成分的缺少或不足会影响胚胎的发育。正因如此,人们一贯重视蜱卵成分的研究。1943年,Wigglesworth<sup>[1]</sup>发现一种含血红素的蛋白,后被 Bremner 等<sup>[2]</sup>证实为 Vitellin。之后,人们采用传统的生化技术先后从变异革蜱、微小扇头蜱等多种蜱卵中分离、鉴定了多种蛋白质,如 Vn, tick heme-binding aspartic proteinase, Boophilus Yolk pro-Cathepsin, vitellin-degrading cys-

teine endopeptidase, Glutathione S-transferases 等<sup>[3-7]</sup>。另外,借助 RT-PCR、WB 等方法证实蜱卵中还含有 ferritins、Disulfide isomerase、Cystatin 等蛋白<sup>[8-10]</sup>。

\* **【基金项目】** 国家自然科学基金青年项目(31902294);湖南省重点领域研发计划项目(2019NK2181)\*\* **【通讯作者】** 程天印, E-mail: hn5368@163.com**【作者简介】** 李丹(1998-),女,湖南益阳人,硕士研究生在读。研究方向:兽医寄生虫学。E-mail: 1356538286@qq.com

目前对一些蝉卵蛋白的结构、活性和功能已有所了解,但对蝉卵成分尚不十分清楚。蛋白质组学技术的发展为高通量、大规模、全面地鉴定蝉卵蛋白质及其含量提供了强有力的支撑,迄今为止已有关于蝉的唾液、淋巴、中肠内容物和唾液腺蛋白质成分的研究,以及蝉类卵蛋白质组学研究<sup>[11-12]</sup>。本研究拟用 Label free 法对褐黄血蝉卵中的卵蛋白质成分进行分析鉴定,为探索蝉类胚胎发育规律和由此衍生的控蝉措施奠定基础。

## 材料与方 法

### 1 材 料

**1.1 试剂与仪器** 氯仿、甲醇、甲酸、乙腈系国药集团化学试剂有限公司产品;胰蛋白酶购于 Promega(北京)生物技术有限公司;蛋白酶抑制剂混合物(Protease Inhibitor Cocktail)购于(福州)Phygene 公司。玻璃匀浆器和 Q Exactive 质谱仪为(美国)Thermo Fisher 生产;Sep-Pak C18 购于美国沃特世公司;液相色谱仪购于(美国)Agilent Technologies;电泳仪购于美国 Bio Rad 公司。

**1.2 蝉虫** 采自河南信阳刺猬体表,经鉴定为褐黄血蝉。

### 2 方 法

**2.1 卵蛋白的提取** 取新鲜褐黄血蝉卵 50 mg,按徐律等<sup>[12]</sup>的方法除其表面蜡质层。随后放入玻璃匀浆器中,加 SDT 裂解液(含 4% SDS, 1 mmol/L DTT, pH 8.0 的 150 mmol/L Tris-HCl, 以及蛋白酶抑制剂混合物)研磨,直至卵彻底匀浆。沸水浴 3 min,超声破碎 5 min, 12 000 r/min 离心 15 min, 留取上清液, BCA 法测定蛋白质浓度。

**2.2 卵蛋白 SDS-PAGE 分析** 取卵蛋白提取液 10  $\mu$ L, 加入 2  $\mu$ L 6 $\times$ Protein buffer, 混匀, 置于沸水中煮 5 min, 冰浴 2 min, 瞬时离心, 取 10  $\mu$ L 进行 SDS-PAGE 电泳。电泳胶于考马斯亮蓝中染色 20 min; 煮沸褪色。

#### 2.3 卵蛋白的消化

**2.3.1 粗提蛋白消化** 取卵蛋白提取上清液 80  $\mu$ L 至 10 ku 超滤膜管, 加入 1 mol/L DTT 液 10  $\mu$ L, 沸水浴 5~10 min, 冷却; 加 8 mol/L 尿素缓冲液 200  $\mu$ L, 12 000 r/min 离心 30 min, 重复 3 次; 加 100 mmol/L IAA 液 100  $\mu$ L, 避光放置 30 min, 同上离心; 加 8 mol/L 尿素缓冲液 100  $\mu$ L, 同上离心并重复 3 次; 加 25 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  液 100  $\mu$ L, 同上离心并重复 3 次; 将超滤管移至新的收集管, 加入消化液 100  $\mu$ L (含 Trypsin 酶 4  $\mu$ g), 37  $^\circ\text{C}$  酶切 16~18 h 后同上离心; 再加入 25 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  液 50  $\mu$ L, 同上离心。合

并滤液, 过 Sep-Pak C18 小柱去盐后测定滤液  $A_{280}$  值, 计算含肽浓度, 冻干<sup>[13]</sup>。

**2.3.2 胶内蛋白消化** 切取 SDS-PAGE 电泳后的清晰浓染的各蛋白条带, 分别放至 EP 管, 加入 ACN 脱色并用超纯水清洗至透明。每管加入 10  $\mu$ L 100 mmol/L DTT 和 90  $\mu$ L 100 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 56  $^\circ\text{C}$  孵育 30 min; 加入 30  $\mu$ L 200 mmol/L IAA, 70  $\mu$ L 100 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 暗室放置 30 min; 加入 100 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  和 ACN 冲洗, 加入 12.5 ng/mL Trypsin 和 25 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  混合液 37  $^\circ\text{C}$  过夜后用 60% ACN/0.1% TFA 反复抽提 3 次, 合并后冻干<sup>[14]</sup>。

**2.4 LC/MS/MS 分析** 称取酶切产物 2  $\mu$ g, 0.1% 三氟乙酸 40  $\mu$ L, 混匀。将样品注入毛细管高效液相色谱仪进行脱盐及分离。用 95% 的 A 液平衡色谱柱。液相梯度: 第 0-50 min, B 液线性梯度从 4% 到 50%; 第 50-54 min, B 液线性梯度从 50% 到 100%; 第 54-60 min, B 液维持在 100%。A 液为 0.1% 甲酸水溶液, B 液为 0.1% 甲酸乙腈水溶液(乙腈为 84%)。

用 Q-Exactive 质谱仪检测正离子, 每次全扫描后采集 10 个碎片图谱的方法来采集多肽和多肽碎片的质量电荷比。

**2.5 蛋白鉴定** 将质谱数据和 GSE67247 翻译文库分别导入 Mascot 2.2, 在 Enzyme = Trypsin, Missed cleavage = 2, Fixed modification: Carbamidomethyl (C), Variable modification: Oxidation (M), Peptides tolerance: 20ppm, MS/MS tolerance: 0.1Da, Mascot Score  $\geq 20$  下搜索特异性肽段及其匹配多肽。

**2.6 蛋白注释** 将高可信多肽序列上传至 Uniprot 数据库(共 202815 条序列, 下载时间为 2020/01/06, <http://www.uniprot.org/taxonomy/297308>)进行搜索、注释。

**2.7 未知功能高可信蛋白的生物信息学分析** 登陆 Omicsbean 网站(<http://www.omicsbean.cn/>)对褐黄血蝉未知功能高可信卵蛋白进行 GO 分析及 KEGG 分析。

## 结 果

### 1 卵蛋白鉴定

从新鲜褐黄血蝉卵蛋白粗提液检出特异性肽段 503 条, 鉴定多肽 137 条, 其中 82 条为可信的(unique peptides  $\geq 2$ ), 属于 79 种蛋白。搜索 Pubmed 和中国知网, 其中的 34 种或其同系物已被研究。基于参考文献将其归于酶类、蛋白酶抑制剂类、转运蛋白、蛋白质合成修饰、免疫相关蛋白等五大类(表 1)。

表 1 褐黄血蚬卵原生质蛋白功能分类  
Table 1 Functional classification of periplasmic proteins from *Haemaphysalis flava* egg

肽段编号 No. in GSE	蛋白 ID、名称与来源 Protein annotation	E 值 E-value	得分 Score	相似率 Idt(%)
转运蛋白(8/13)				
contig_43009+19714	A0A411G179, Vitellogenin, <i>Haemaphysalis flava</i> 2	1.40E-141	1,153	100.0
contig_44787+42244	Q5EG54, Vitellogenin, <i>Dermacentor variabilis</i>	5.50E-60	521	70.1
contig_195	A0A346JM06, Vitellogenin-2, <i>H. flava</i>	0	6,734	97.6
contig_12613	A0A346JM05, Vitellogenin-1, <i>H. flava</i>	0	8,294	100.0
contig_7244+1976	A0A346JM08, Vitellogenin-B, <i>H. flava</i>	0	5,904	100.0
contig_39954	A0A023GCN1, Lipocalin-51, <i>Amblyomma triste</i>	4.70E-70	550	58.0
contig_13276	A0A131Z2M7, Lipocalin, <i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	8.90E-46	388	53.1
contig_25547	M5AYG7, Ferritin, <i>Haemaphysalis longicornis</i>	4.10E-122	893	94.5
酶类(15/28)				
contig_20751	A0A6M2CGL6, Cathepsin D, <i>Rhipicephalus microplus</i>	4.40E-88	704	43.3
contig_11068	A0A224YC57, Cathepsin C, <i>Rhipicephalus zambeziensis</i>	3.00E-87	685	77.1
contig_14800	A0A131YZD9, Cathepsin C, <i>R. appendiculatus</i>	1.40E-147	1090	79.8
contig_27993	A0A6M2CJG1, Heme-binding aspartic peptidase, <i>R. microplus</i>	3.30E-61	503	72.7
contig_9170	Q2WFX6, Aspartic protease, <i>H. longicornis</i>	0	1,990	95.9
contig_18731	A0A1E1XAU4, Cysteine proteinase, <i>Amblyomma aureolatum</i>	0	2,337	84.5
contig_7575	A0A131Z310, Glutathione transferase, <i>R. appendiculatus</i>	3.10E-124	913	75.0
contig_2987	A0A023FXJ7, Glutathione s-transferase, <i>Amblyomma parvum</i>	2.00E-44	380	86.4
contig_12150	A0A6B0VEP5, Copper/zinc superoxide dismutase, <i>Ixodes ricinus</i>	0	1472	49.2
contig_10226	L7M7X5, Catalase, <i>Rhipicephalus pulchellus</i>	0	1964	91.6
contig_1683	A0A2P1DPZ4, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, <i>H. flava</i>	0	1730	100.0
contig_1384	A0A6M2CTD4, F0f1-type atp synthase, <i>R. microplus</i>	0	2629	94.6
contig_4096	L7MMY2, ATP synthase subunit alpha, <i>R. pulchellus</i>	3.10E-179	1316	91.6
contig_23044	A0A6M2D205, carboxypeptidase, <i>R. microplus</i>	0	1,345	62.8
contig_15	A5LHV9, Disulfide-isomerase, <i>H. longicornis</i>	0	2,514	96.2
蛋白酶抑制剂(6)				
contig_16838	A0A5P8H6S1, Serpin-a, <i>H. longicornis</i>	1.30E-37	344	56.1
contig_29203	A0A5P8H6S1, Serpin-a, <i>H. longicornis</i>	8.40E-33	313	59.3
contig_1782	A0A5P8H6S1, Serpin-a, <i>H. longicornis</i>	2.40E-126	953	65.6
contig_2853	A0A5P8H6S1, Serpin-a, <i>H. longicornis</i>	0	1762	87.2
contig_7475	A0A0S2CCT2, Serpin 2, <i>H. flava</i>	0	1,397	94.3
contig_13024	A0A023GN63, Serpins 9, <i>Amblyomma triste</i>	6.20E-105	806	62.0
蛋白质合成修饰(3)				
contig_949	A0A097A1J8, Heat shock 70 kDa protein, <i>H. flava</i>	0	3,102	100.0
contig_2705	A0A2D1C0A7, Heat shock protein 83, <i>H. flava</i>	0	3,719	99.3
contig_5711	A8E4J9, Calreticulin, <i>Haemaphysalis qinghaiensis</i>	0	2239	99.3
免疫相关蛋白(2)				
contig_228	A0A1E1WWG1, Microplusin-like antibacterial peptide, <i>A. aureolatum</i>	1.50E-09	134	33.8
contig_11256	A0A131YZT6, Fibrinogen-related domain containing protein, <i>R. appendiculatus</i>	0	2,420	80.5
分泌蛋白与未知蛋白(27)				
分泌蛋白(6)				
未知蛋白(21)				

蚬卵蛋白组成具有如下特点:酶是褐黄血蚬卵原生质蛋白中最多的一类,且半数与蛋白的分解有关;有多个 Vn 和 Serpin 家族成员并存现象,即具有家族性;Vn,酶及其抑制剂可构成完整的反应体系。

## 2 未知功能高可信蛋白生物信息学分析

对 45 种未知功能高可信蛋白进行 GO 分析,这些蛋白参与蛋白修饰、血液凝固等生物过程,构成囊泡、细胞器等细胞组分,发挥抗原结合、蛋白二聚化等分子功能(图 1)。

KEGG 分析表明,45 种未知功能高可信蛋白主要

富集在氨基酸合成、戊糖磷酸途径、凝血级联反应等通道(图 2)。

## 3 高可信蛋白的相对定量分析

在新产的褐黄血蚬卵中,iBAQ 值最高的是 contig\_43009+19714 和 contig\_42244+44787,均为 Vn。较高的蛋白是 Microplusin 类、Serpin 类和组织蛋白酶类(表 2)。

## 4 蚬卵蛋白 SDS-PAGE 分析

经 SDS-PAGE 电泳分析,新产蚬卵提取液的高丰度蛋白分子质量多在 72~130 ku 之间(图 3)。对 9 条

浓染电泳条带蛋白成分的分析表明,各条带中的高丰度蛋白成分极为相似,均为 contig\_43009、contig\_19714、contig\_42244、contig\_44787 等,说明 contig\_43009+19714、contig\_42244+44787 两蛋白已降解为大小不同的肽段。

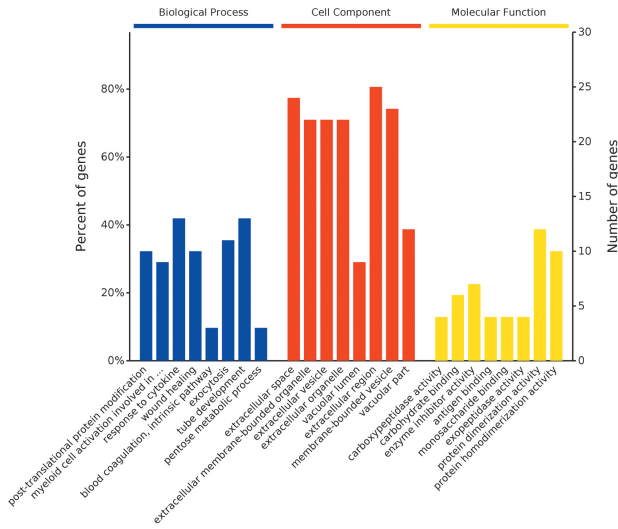


图 1 45 种未知功能高可信蛋白 GO 分析  
Fig. 1 GO analysis of 45 high-confidence proteins with unknown functions

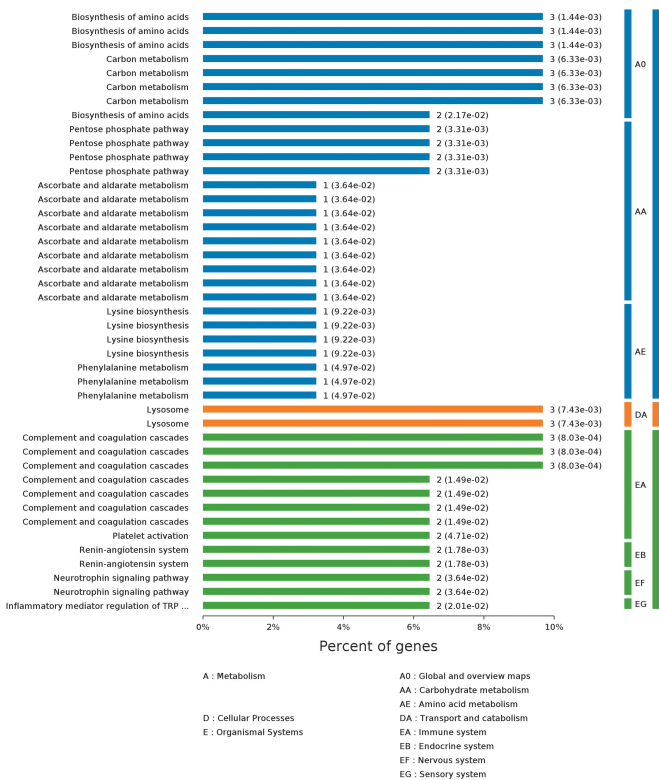


图 2 45 种未知功能高可信蛋白 KEGG 分析  
Fig. 2 KEGG analysis of 45 high-confidence proteins with unknown functions

### 讨论

在蜱卵原生质中内贮存了多种营养物质,如蛋白质、糖类、脂类、无机元素及遗传物质,其中蛋白质倍受

关注。尽管已经探明了一些卵蛋白的结构和功能,但对蜱卵原生质蛋白成分的总体情况尚不完全明了。本研究借助 LC/MS/MS 测定和唾液腺转录组数据鉴定褐黄血蜱卵原生质高可信多肽 82 条,属于 79 种蛋白,远多于徐律<sup>[12]</sup>鉴定的数量。通过追溯调查、试验验证发现,蜱卵一旦研磨破碎,其蛋白质将快速、无序地降解,严重影响鉴定多肽的数量,而 Protease Inhibitor Cocktail 含有 AEBSF、Bestatin、E-64、Phosphoramidon 和 Pepstatin A 等成分,对半胱氨酸蛋白酶、丝氨酸蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶等具有广谱的抑制性,从而有效地阻止蜱卵内蛋白的降解。

表 2 褐黄血蜱卵原生质蛋白相对丰度 (前 10)  
Table 2 The top 10 of iBAQ in periplasmic proteins from *Haemaphysalis flava* egg

序号	蛋白	iBAQ	排序	类别
1	contig_43009+19714	2760400000	1	Vn 类
2	contig_42244+44787	2448600000	2	Vn 类
3	contig_228	361180000	3	Microplusin 类
4	contig_16838	76981000	4	Serpin 类
5	contig_29203	52670000	5	Serpin 类
6	contig_195	50623000	6	Vn 类
7	contig_12613	39196000	7	Vn 类
8	contig_20751	37376000	8	组织蛋白酶类
9	contig_25547	32652000	9	Ferritin
10	contig_27993	26645000	10	组织蛋白酶类

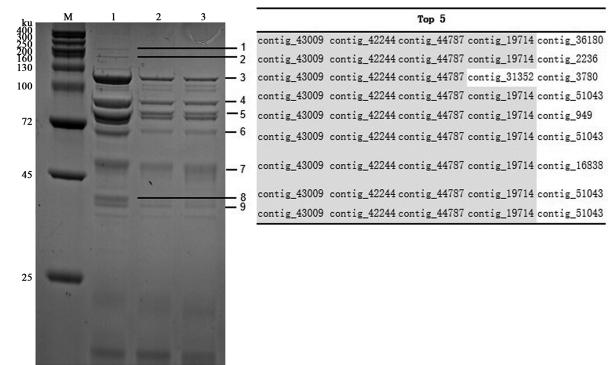


图 3 褐黄血蜱卵原生质蛋白提取物 SDS-PAGE 电泳分析  
M Protein maker 1-3 Sample  
Fig. 3 SDS-PAGE of the proteins extracted from *Haemaphysalis flava* egg periplasm

在基于 Label free 的蛋白组学研究中,Intensity、iBAQ 和 LQF 是常用的定量分析指标,其中 iBAQ 最适于样本内不同蛋白的丰度比较。从本研究鉴定的各蛋白 iBAQ 值看,Vn 在褐黄血蜱卵内丰度最高。Vg 是 Vn 的前体,可由卵巢、脂肪体、中肠合成,并通过血淋巴转移至卵巢,经卵母细胞摄取、加工形成 Vn,储存于卵黄颗粒,作为蜱类胚胎发育的氨基酸来源<sup>[15-17]</sup>。Vn 种类较多,在 *Dermacentor andersoni* 和 *Dermacentor variabilis* 中均有 2 种<sup>[18-19]</sup>,本研究检出多肽 9

条,属于6种Vn,因为Contig\_43009和Contig\_19714,contig\_7244和contig\_1976分别属于Vg(A0A411G179)和Vg-B(A0A346JM08)。最近,我们又成功克隆-mRNA(ON332576),它们编码的序列包含contig\_42244和contig\_44787两多肽片段。

对卵蛋白进行SDS-PAGE及其条带质谱分析的结果出人意料-9个条带的主要成分均为Contig\_43009、Contig\_19714,contig\_42244、contig\_44787,即Vg和Vn-a,暗示在卵产出时Vg和Vn已经降解,与Logullo在微小扇头蜱得出的蜱卵Vn降解始于产出当天结论一致<sup>[20]</sup>,由此认为,Rosell等人以卵蛋白的SDS-PAGE电泳条带推定Vn亚单位数有失严谨<sup>[21-23]</sup>。

天冬氨酸蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶是褐黄血蜱卵内最多的两类蛋白酶。已证实组织蛋白酶D和Heme-binding aspartic peptidase等均能催化Vn分解<sup>[24-25]</sup>。Zhao等<sup>[26]</sup>报道在长角血蜱胚胎发育的过程中,组织蛋白酶D的活性在第一天最高,随着发育的进行逐渐降低。以上这些酶在反应中产生的有毒自由基均能通过蜱的谷胱甘肽转移酶、超氧化物歧化酶、过氧化物酶来清除。

蜱中Serpins种类丰富,至今为止已发现120种以上,本研究从褐黄血蜱卵中检出6种Serpins。序列比对显示,它们都有Serpins家族的保守序列(NAVY-FKG, DVNEEG和PS00284)和中心反应环(RCL)(图4),即具有家族性。通过免疫实验、干扰实验证实Serpins在阻止血液凝固、血餐消化、胚胎发育等方面发挥作用<sup>[27]</sup>。本研究中contig\_2853与长角血蜱的Serpins-a相似率为87.2%。Serpins-a可抑制Cathepsin G,FXa和papin的蛋白酶活性且具有免疫抑制的作用<sup>[28]</sup>。

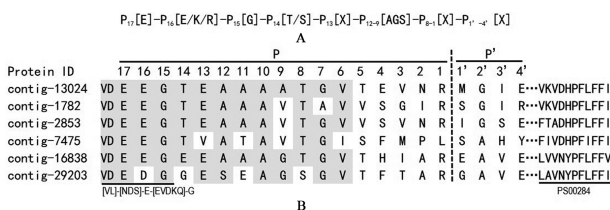


图4 Serpin RCL序列比对图

Fig. 4 Sequence alignment of serpin putative reactive center loops (RCL)

HSP70是一种分子伴侣、具有多种功能,如可呈递抗原,也参与蛋白折叠和转运<sup>[29-30]</sup>。和小明等<sup>[31]</sup>的研究表明蜱内HSP70无论是天然形式还是重组形式都具有抗凝活性。Microplusin是一种分子质量为10.204ku的抗菌肽,发现于微小扇头蜱,可以抵抗多种革兰阳性菌和真菌,在蜱的防御反应中起重要作用<sup>[32]</sup>。

【参考文献】

[1] Wigglesworth VB. The fate of haemoglobin in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and other blood-sucking arthropods[J]. The royal society, 1943(131):313-339.

[2] Bremner KC. Studies on "Haemixodovin", the pigment in the eggs of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae) [J]. Aust J Biol Sci, 1959(12):263-273.

[3] Thompson DM, Khalil SM, Jeffers LA, et al. Sequence and the developmental and tissue-specific regulation of the first complete vitellogenin messenger RNA from ticks responsible for heme sequestration[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2007, 37(4):363-374.

[4] Sorgine MH, Logullo C, Zingali RB, et al. A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick *Boophilus microplus* [J]. J Biol Chem, 2000, 275(37):28659-28665.

[5] Logullo C, Vaz Ida S, Sorgine MH, et al. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus* [J]. Parasitology, 1998, 116(Pt 6):525-532.

[6] Seixas A, Dos Santos PC, Velloso FF, et al. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase [J]. Parasitology, 2003, 126(Pt 2):155-163.

[7] Freitas DR, Rosa RM, Moraes J, et al. Relationship between glutathione S-transferase, catalase, oxygen consumption, lipid peroxidation and oxidative stress in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae) [J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2007, 146(4):688-694.

[8] Galay RL, Aung KM, Umemiya-Shirafuji R, et al. Multiple ferritins are vital to successful blood feeding and reproduction of the hard tick *Haemaphysalis longicornis* [J]. J Exp Biol, 2013, 216(Pt 10):1905-1915.

[9] Liao M, Hatta T, Umemiya R, et al. Identification of three protein disulfide isomerase members from *Haemaphysalis longicornis* tick [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2007, 37(7):641-654.

[10] Wang Y, Zhou Y, Gong H, et al. Functional characterization of a cystatin from the tick *Rhipicephalus haemaphysaloides* [J]. Parasit Vectors, 2015(8):140.

[11] 刘金宝, 程天印. 豪猪血蜱卵蛋白成分初步鉴定及其功能分类 [J]. 畜牧兽医学报, 2021, 52(10):2895-2904.

[12] 徐律, 程天印. 褐黄血蜱卵蛋白质组分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2019, 50(3):627-636.

[13] Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis [J]. Nat methods, 2009, 6(5):359-62.

[14] Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes [J]. Nat protoc, 2006, 1(6):2856-60.

[15] Giorgia F, Bradley JT, Nordin JH. Differential vitellin polypeptide processing in insect embryos [J]. Micron, 1999, 30(6):579-596.

[16] Coons LB, Lamoreaux WJ, Rosell-Davis R, et al. Onset of vitellogenin production and vitellogenesis, and their relationship to changes in the midgut epithelium and oocytes in the tick *Dermacentor variabilis* [J]. Exp Appl Acarol, 1989, 6(4):291-305.

(下转 933 页)

- cancer patients; A practical update[J]. Virulence, 2016, 7(3): 280-297.
- [3] Treccarichi EM, Pagano L, Candoni A, et al. Current epidemiology and antimicrobial resistance data for bacterial bloodstream infections in patients with hematologic malignancies: an Italian multi-centre prospective survey[J]. Clin Microbiol Infect, 2015, 24(4): 337-343.
- [4] Wu JN, Gan TE, Zhu YX, et al. Epidemiology and microbiology nosocomial bloodstream infection; analysis of 482 cases from a retrospective surveillance study[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2015, 16(1): 70-77.
- [5] GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013; a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013[J]. Lancet, 2015, 385(9963): 117-171.
- [6] 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准 [M]. 3版. 北京: 科学出版社, 2007.
- [7] 中华人民共和国卫生部. 医院感染诊断标准(试行)[J]. 中华医学杂志, 2001, 81(5): 314-320.
- [8] Nitin Bansal, Vidya Devarajan, Abdul Ghafur K, et al. Break-through saprochaete capitata infections among patients with hematological malignancies[J]. Leukem Lymph, 2018, 59(7): 1762-1763.
- [9] 张国扬, 吴裕丹, 谢双锋, 等. 2012-2016年血液病患者血流感染病原菌分布及耐药性[J]. 中国感染控制杂志, 2018, 17(10): 853-859.
- [10] 徐鸟飞, 唐晓琼, 毛敏, 等. 2017-2020年血液病患者血流感染病原菌分布及耐药性分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2021, 28(9): 1515-1520.
- [11] Meletis G. Carbapenem resistance; overview of the problem and future perspectives[J]. Ther Adv Infect Dis, 2016, 3(1): 15-21.
- [12] 傅爱林, 刘成印, 沈刚, 等. 血液肿瘤患者血流感染病原菌分布特点及危险因素研究[J]. 中国预防医学杂志, 2020, 21(1): 89-93.
- [13] 周靖, 黄知平. 血液肿瘤患者真菌感染相关危险因素及病原学特点分析[J]. 实用癌症杂志, 2017, 32(3): 520-522.
- [14] 刘丽霞, 陈庆贤, 黎宝仁, 等. 血液病患者血流感染病原菌耐药性与病死影响因素分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2020, 30(12): 1826-1830.
- [15] Song JU, Park HK, Kang HK, et al. Proposed risk factors for infection with multidrug-resistant pathogens in hemodialysis patients hospitalized with pneumonia[J]. BMC Infect Dis, 2017, 17(1): 681.
- 【收稿日期】 2022-04-25 【修回日期】 2022-07-15
- 
- (上接 928 页)
- [17] Rosell R, Coons LB. Determination of vitellogenin titer in the hemolymph of *Dermacentor variabilis* (Acarina: Ixodidae) using an indirect enzyme-linked immunosorbent assay [J]. J Med Entomol, 1991, 28(1): 41-44.
- [18] Boctor FN, Kamel MY. Purification and characterization of two lipovitellins from eggs of the tick, *Dermacentor andersoni* [J]. Insect Biochemistry, 1976, 6(3): 233-240.
- [19] Rosell R, Coons LB. Purification and characterization of vitellin from the eggs of *Dermacentor variabilis* [J]. Insect Biochemistry, 1991, 21(8): 871-885.
- [20] Logullo C, Moraes J, Dansa-Petretski M, et al. Binding and storage of heme by vitellin from the cattle tick, *Boophilus microplus* [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2002, 32(12): 1805-1811.
- [21] Rosell R, Coons LB. Purification and partial characterization of vitellin from the eggs of the hard tick, *Dermacentor variabilis* [J]. Insect Biochem Mol Biol, 1991, 21(8): 871-885.
- [22] Chinzei Y, Chino H, Takahashi K. Purification and properties of vitellogenin and vitellin from a tick, *Ornithodoros moubata* [J]. J Comp Physiol, 1983(152): 13-21.
- [23] Tellam RL, Kemp D, Riding G, et al. Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin [J]. Vet Parasitol, 2002, 103(1-2): 141-156.
- [24] 李孟孟. 温度对长角血蜱胚胎发育过程中卵黄蛋白降解及三种酶的影响[D]. 河北: 河北师范大学, 2020.
- [25] Sorgine MH, Logullo C, Zingali RB, et al. A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick *Boophilus microplus* [J]. J Biol Chem, 2000, 275(37): 28659-28665.
- [26] Qiu ZX, Li Y, Li MM, et al. Investigation of three enzymes and their roles in the embryonic development of parthenogenetic *Haemaphysalis longicornis* [J]. Parasit Vectors, 2020, 13(1): 46.
- [27] Chmelar J, Kotal J, Langhansov H, et al. Protease Inhibitors in Tick Saliva: The Role of Serpins and Cystatins in Tick-host-Pathogen Interaction [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017(7): 216.
- [28] Wang F, Song Z, Chen J, et al. The immunosuppressive functions of two novel tick serpins, HlSerpina and HlSerpina-b, from *Haemaphysalis longicornis* [J]. Immunology, 2020, 159(1): 109-120.
- [29] Busby AT, Ayllon N, Kocan KM. Expression of heat shock proteins and subolesin affects stress responses, *Anaplasma phagocytophilum* infection and questing behaviour in the tick, *Ixodes scapularis* [J]. Med Vet Entomol, 2012, 26(1): 92-102.
- [30] Contreras M, Alberdi P, Mateos-Hernandez L, et al. *Anaplasma phagocytophilum* MSP4 and HSP70 Proteins Are Involved in Interactions with Host Cells during Pathogen Infection [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017(7): 307.
- [31] 和小明. 褐黄血蜱热休克蛋白 70 家族的克隆、表达及抗凝血功能研究[D]. 湖南: 湖南农业大学, 2018.
- [32] Fogaa AC, Lorenzini DM, Kaku LM, et al. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile [J]. Dev Comp Immunol, 2004, 28(3): 191-200.
- 【收稿日期】 2022-03-25 【修回日期】 2022-06-11