

DOI:10.13350/j.cjpb.220212

• 论著 •

褐黄血蜱组织蛋白酶 L 的克隆和表达水平分析*

吴聪颖, 伍芷锋, 程天印**

(湖南农业大学动物医学院, 湖南长沙 410128)

【摘要】 目的 对褐黄血蜱组织蛋白酶 B(cathepsin L-like cysteine proteinase B, cathepsin L-lcp B) 基因进行克隆及表达分析。 **方法** 基于褐黄血蜱唾液腺转录组文库中的 Contig731 序列设计引物, RACE 法扩增 cathepsin L-lcp BcDNA(Hf-CLICPb)全长, qPCR 法分析 Hf-CLICPb 在不同吸血状态下雌成蜱不同组织的表达水平。 **结果** Hf-CLICPb 全长 1 547 bp, ORF 框长 1 005 bp, 编码 355 个氨基酸; 该基因在半饱血、饱血褐黄血蜱(♀)中的唾液腺表达量最高, 卵巢、中肠、体壳次之; Hf-CLICPb 在半饱血褐黄血蜱(♀)中的表达量高于饱血褐黄血蜱(♀)。 **结论** 成功克隆出褐黄血蜱 Hf-CLICPb 基因全长, qPCR 检测 Hf-CLICPb 基因在褐黄血蜱唾液腺中高表达。

【关键词】 褐黄血蜱; Hf-CLICPb; RACE; qPCR

【中图分类号】 R384.4

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)02-0186-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Feb;17(2):186-190.]

Cloning and Expression Analysis of Cathepsin L from *Haemaphysalis flava*

WU Cong-ying, WU Zhi-feng, CHENG Tian-yin (College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

【Abstract】 Objective To clone and analyze the expression of *Haemaphysalis flava* cathepsin L-like cysteine proteinase B gene. **Methods** Primers were designed based on Contig731 sequence in salivary gland transcriptome library of *H. flava*, the full-length cDNA of cathepsin L-like cysteine proteinase B (cathepsin L-lcpB) was amplified by RACE, and the expression levels of Hf-CLICPb in different tissues of female adult ticks in different feeding states were analyzed by qPCR.

Results The total length of Hf-CLICPb was 1 547 bp, the ORF frame was 1 005 bp, and it encoded 355 amino acids. The expression of Hf-CLICPb was the highest in salivary glands, followed by ovaries, midgut and body shell in semi-engorged and engorged *H. flava* (♀); the expression of Hf-CLICPb in semi-engorged *H. flava* (♀) was higher than that in engorged *H. flava* (♀). **Conclusion** The full-length Hf-CLICPb gene of *H. flava* was successfully cloned, and the high expression of Hf-CLICPb gene in salivary glands of *H. flava* was detected by qPCR.

【Key words】 *Haemaphysalis*; Hf-CLICPb; RACE; qPCR

*** Cathepsin L-like cysteine protein (Cathepsin L-lcp B) 是一种半胱氨酸蛋白酶, 参与溶酶体蛋白的降解^[1], 在寄生生物入侵宿主、蜕皮, 水解宿主免疫球蛋白和补体 C3, 逃避宿主的免疫方面发挥重要作用^[2-6]。目前已经克隆出布氏锥虫^[7]、豆状绦虫^[8]、棘球绦虫^[9]、大片吸虫^[10]、华支睾吸虫^[11]、美洲钩虫^[12]和曼氏血吸虫^[13]等多种寄生虫的 Cathepsin L-lcp BcDNA, 并证实蜱类的 Cathepsin L-lcp B 能够催化血红蛋白(Hb)^[14-15]和卵黄磷蛋白(vitellin)分解^[16], 在消化和生殖过程中发挥作用。作者前期从褐黄血蜱唾液腺转录组库中搜索到一 Unigene(Contig731), 长 437 bp, 与 AB020491.1 相似性为 90.34%。AB020491.1 是长角血蜱的 Cathepsin L-lcp B cDNA, 因此确定 Contig731 是褐黄血蜱的 Cathepsin L-lcp B cDNA (Hf-CLICPb) 的片段。

本研究基于 Contig731 设计引物, 借助 RACE 技术扩增 5' 和 3' 端缺失序列, 拼出 cDNA 全长; qPCR 法

检测其在饱血、半饱血两状态下褐黄血蜱唾液腺、卵巢、体壳、中肠中的表达量。

材料与方法

1 材料

1.1 褐黄血蜱 野生褐黄血蜱采自河南省信阳市郊。

1.2 主要试剂 SMARTer RACE 5/3' Kit 和 TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 购于宝生物工程(大连)有限公司; Easy Pure RNA Kit 和 Easy Script One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 购于北京全式金生物技术有限公

* **【基金项目】** 湖南省重点领域研发计划(No. 2019NK2181); 湖南农业大学“双一流”建设项目(No. SYL201802016)。

** **【通讯作者】** 程天印, E-mail: hn5368@163.com

【作者简介】 吴聪颖(1997-), 男, 湖南娄底人, 硕士, 主要从事动物寄生虫病防治研究。E-mail: 1826848721@qq.com 吴聪颖和伍芷锋同为第一作者。

司;pGM-T 克隆试剂盒购自 TaKaRa(北京)宝日生物技术有限公司;EasyPure® PCR Purification Kit 购自全式金(北京)生物技术有限公司;X-Gal, DH5 α 感受态细胞, IPTG 和 Ampicillin 购自上海生工有限公司。

1.3 主要仪器 PCR 仪(型号 2720)和 Real-time PCR 仪(型号 SetpOne) 为美国 ABI 公司生产;凝胶成像系统(Qantum ST5)为法国 Vilber Lourmat 公司生产;电泳仪(型号 DY9Y-6C)购于北京六一仪器厂。

2 方法

2.1 引物设计与合成 基于 Contig731 序列设计其 5'RACE、3'RACE、qPCR 引物,引物序列如表 1,由上海生工生物工程股份有限公司合成。

表 1 RACE 引物
Table 1 RACE primer sequences

Usage	Primer	Nucleotide sequence(5'-3')
5'RACE	GSP-R1	GAGCTGAGCTACCCGTACAG
	GSP-R2	TGAAATGGCACGTGCCGTCCGT
3'RACE	GSP-F1	TACTCTGAAGGTGTTACGATGAGC- GGG
	GSP-F2	GGG CATTTC AAGAAGACTGCTGT- GGG
qPCR for Hf-CLICPb	F- _{CLIC}	CCATCAAGAACTGGTCGGA
	R- _{CLIC}	CCCACAGCAGTCTTCTTGAA
qPCR for β -actin	F- _{act}	AGATCTGGCACCACAC
	R- _{act}	CTTCTCCCGGTTAGCCTTG

2.2 样品采集将洁净的饱血、半饱血 褐黄血蜱雌成蜱置于载玻片上,体视显微镜下解剖、采集唾液腺、卵巢、体壳、中肠,装入含有 Trizol 的离心管,-80 °C 保存。

2.3 RNA 提取分别取适量样品(半饱血、饱血褐黄血蜱雌成蜱及其体壳、中肠、卵巢、唾液腺) 在加入 Trizol 的干净玻璃匀浆管中研碎。按 Easy Pure RNA Kit 说明书提取其 RNA,-80 °C 保存。

2.4 Hf-CLICPb 基因的扩增 根据试剂盒 SMARTer RACE 5/3' Kit 说明书分别合成 5' 第一链模板 cDNA 和 3' 第一链模板。以第一链 cDNA 为模板,用 GSP-R1 或 GSP-F1 和 UPM 为引物,按 SMARTer RACE 5/3' Kit 配制反应体系。反应程序:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s,68 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 2 min,共 35 个循环;72 °C 再延伸 10 min,PCR 产物 4 °C 保存。以第一轮反应产物为模板,以 GSP-R2 或 GSP-F2 和 UPS 为引物,按 SMARTer RACE 5/3' Kit 制备反应体系进行第二轮扩增,扩增程序:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s,61 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 24 s,共 35 个循环;72 °C 再延伸 10 min,PCR 产物 4 °C 保存。取 20 μ l 第二轮产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,并进行胶纯化回收。

取回收产物 3 μ l,pGM-T 1 μ l,于 16 °C 条件下过

夜连接,连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,转化细胞涂布于含 X-Gal、IPTG 和 Amp 的 LB 固态培养基,37 °C 培养 12 h,挑取白色菌落扩大培养,PCR 法鉴定阳性克隆委托上海生工生物工程股份有限公司测序。

2.5 Cathepsin L-lcp B 基因的生物学信息分析 用 DNAMAN 对 Contig731 及其 5' 端与 3' 端序列进行拼接,获得基因全长。以 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 翻译 Hf-CLICPb,然后将推定多肽序列上传至 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> 和 <http://meme-suite.org/meme/tools/meme> 进行信号肽和模体结构分析,至 <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/> 和 <http://smart.embl-heidelberg.de/> 进行糖基化位点和结构域分析。

2.6 Hf-CLICPb 基因的 qPCR 检测

2.6.1 qPCR 方法的建立取半饱血 褐黄血蜱雌成蜱总 RNA 8 μ l,以 EasyScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 合成 cDNA。以 EASY Dilution 将其稀释 1、5、25、125、625 倍。分别以 F-_{CLIC} 和 R-_{CLIC}, F-_{act} 和 R-_{act} 为引物,按照 TB Green™ Premix Ex Taq™ II 试剂盒配置体系扩增 Hf-CLICPb、 β -actin cDNA,绘制溶解曲线和扩增曲线,建立标准曲线。

2.6.2 Hf-CLICPb 在半饱血、饱血 褐黄血蜱不同组织中表达水平分析分别以半饱血、饱血雌成蜱唾液腺、卵巢、体壳、中肠提取的 RNA 为模板,同 2.6.1 合成第一链 cDNA 后进行 qPCR 扩增,每个样品重复 3 次。计算 $2^{-\Delta\Delta CT}$,分析 Hf-CLICPb 在不同样品中的表达量。

结 果

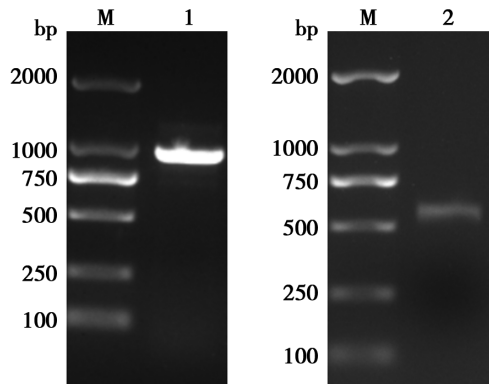
1 Hf-CLICPb 基因的克隆与分析

1.1 Contig731 的 5' 与 3' 克隆 经两轮扩增获得 Contig731 的 5'、3' 片段,电泳结果见图 1。测序显示其长度依次为 1 010 bp 和 547 bp。

1.2 Hf-CLICPb 序列分析 以 DNAMAN 对 Contig731、5' 端和 3' 端序列进行拼接,得到 Hf-CLICPb 全长,大小为 1547 bp (GenBank: MH400438. 1), ORF 大小 1005 bp。该 cDNA 编码蛋白长 335 aa,由信号肽(signal peptide)、前体抑制域(propeptide)和成熟肽(mature peptide)三部分组成。N 端 1-16 aa 为信号肽,成熟肽存在有结构保守基序 GCXGG,含有 Cys (C)、His (H)、Asn (N) 和 Gln (Q) 等高度保守位点^[17-21](图 2)。

1.3 Hf-CLICPb 保守性分析 基于本蛋白和 A0A023FWK4、 A0A023GN26、 A0A023FPA6、

A0A023GN18、A0A0224YBR4、A0A0131Z0I1、A0A00S2ZX71、A0A04D5RGJ6、A0A0K8REA0、A0A2R5LIH6 等其他蜚类 Cathepsin L-like cysteine protein 序列,分析该类蛋白结构域(图 3)。该蛋白结构保守,保守模体共 8 个。



M DNA 标志物 (DL2000) 1 5' RACERCR 产物 2 3'
RACEPCR 产物

图 1 Hf-CLICPb 基因 PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳分析

M Marker(DL2000) 1 Amplification product of 5'RACE 2
Amplification product of 3'RACE

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis results of Hf-CLICPb gene amplification products

[illegible]

注:下划线部分为信号肽,方框部分为预测的前肽抑制结构域,箭头示前体肽转变为成熟肽的切割点,英阴影部分为组织蛋白酶L标签序列 GXC⁺GG;氧阴离子洞 Gln(Q)和3个保守的催化位点 Cys(C)、His(H)和 Asn(N)加粗标记。

图 2 Hf-CLICPb 基因全长

Notes: Putative signal peptide sequence are underlined. The predicted propeptide inhibitor domain is in box. The putative cleavage site for propeptide is indicated by vertical arrow. The cathepsin L signature sequence GCXGG is showed in shadow. The oxyanion hole, glutamine (Q) and and three conserved catalytic sites (Cys, His and Asn) are bold.

Fig. 2 The full length of Hf-CLlCPb gene

2 Hf-CLICPb 基因的表达分析

2.1 溶解曲线 β -actin 和 Hf-CLICPb 两基因的 T_m 值分别为 88.2 °C 和 86.8 °C, 其溶解曲线均为单峰, 说

明扩增引物的特异性强,无二聚体的产生(图 4)。

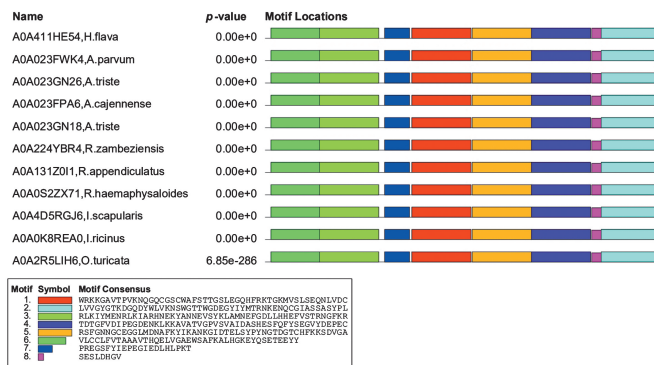


图 3 Hf-CLICPb 与其他蜚种 Cathepsin L-like cysteine protein 的基序比对

Fig. 3 Motif comparison between Hf-CLICPh and other tick species Cathepsin L-like cysteine protein

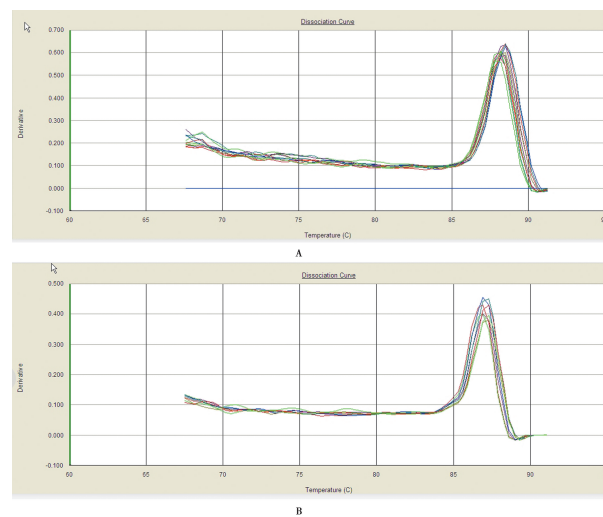


图 4 β -actin 基因(A)和 Hf-CLICPb 基因(B)的熔解曲线

Fig. 4 Melting curves of β -actin gene(A) and Hf-CLICPb gene(B)

2.2 标准曲线以梯度稀释的半饱血 褐黄血(雌)蜉总 RNA 为模板扩增 Hf-CLICPb 和 β -actin, 绘制标准曲线(图 5)。二者的 (R^2) 分别为 0.999499 和 0.995598, 扩增斜率(slope)分别为 3.323107 和 3.322703, 扩增效率(E)分别为 99.95% 和 99.97%, 表明扩增反应良好。

2.3 Hf-CLICPb 在半饱血、饱血 褐黄血蜱不同组织中的表达分析以半饱血、饱血褐黄血蜱(♀)唾液腺、卵巢、体壳及中肠总 RNA 为模板进行 qPCR, 记录 Ct 值, 计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$, 比较 Hf-CLICPb 在半饱血、饱血褐黄血(雌)蜱唾液腺、卵巢、体壳和中肠的表达水平, 并绘制成图(图 6)。可以看出, Hf-CLICPb 在半饱血、饱血褐黄血蜱(♀)中的唾液腺表达量最高, 卵巢、中肠、体壳次之, 且 Hf-CLICPb 于半饱血褐黄血蜱(♀)中的表达量高于饱血褐黄血蜱(♀)。

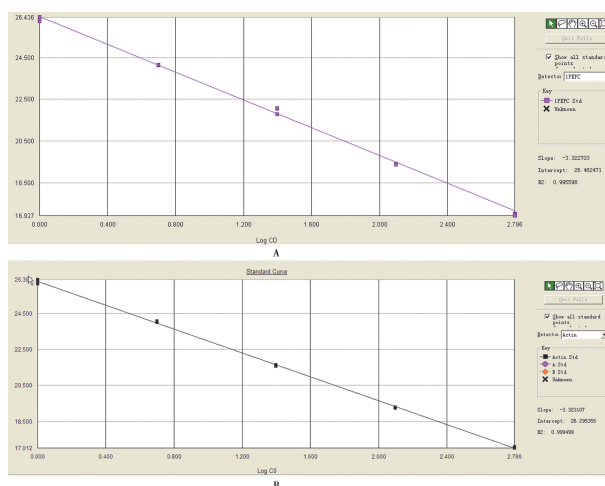


图5 β -actin 基因(A)和 Hf-CLICPb 基因(B)标准曲线
Fig. 5 Standard curve of β -actin gene(A) and Hf-CLICPb gene(B)

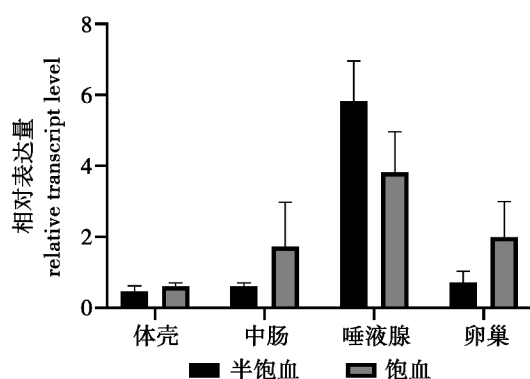


图6 Hf-CLICPb 在不同组织的表达情况
Fig. 6 Expression of Hf-CLICPb gene in *H. flava* at different organization

讨论

褐黄血蜱(*Haemaphysalis flava*)属于硬蜱科、血蜱属,亚洲各国均有分布,尤其是中国、日本和韩国。该蜱是我国中东部省份的优势蜱种^[22],可侵袭猪、黄牛、绵羊、马等经济动物和熊、鼠、刺猬、锦鸡等野生鸟兽^[23]。褐黄血蜱携带的病原体有新布尼亚病毒、无形体^[24]、立克次体^[25]、包柔螺旋体^[26]、巴尔通体、埃立克体和土拉杆菌等,对人畜健康有着潜在的公共卫生意义^[27-28]。

作者前期从褐黄血蜱(雌性,饱血)淋巴液中检出两个特异性肽段 NSWGTTWGDDGYIYMTR 和 TAVGATDSGYVDIPEGDEK。搜索自建的褐黄血蜱唾液腺转录组学文库发现,这两个肽段均存在于 Contig731 编码的多肽中。Contig731 长 437 bp,与 AB020491 相似性 90.34%,AB020491 是长角血蜱 Cathepsin L-lcp B 的编码基因。Contig731 推定多肽长 132 aa,与扇头蜱的 Cathepsin L-lcp B(Uniprot No. A0A131Z0I1)同源性 90.9%,据此确认 Contig731 编码蛋白为褐黄血蜱的 Cathepsin L-lcp B。与

AB020491 相比,Contig731 缺失 5'-end 和 3'-end。

本研究采用 RACE 技术扩增这些缺失序列,得到的 Contig731 全长 cDNA 大小为 1 547 bp(GenBank: MH400438.1),ORF 框 1 005 bp,编码蛋白 335 aa,由信号肽(signal peptide)、前体抑制域(propeptide)和成熟肽(mature peptide)三部分组成,其 N 端 1-16 aa 为信号肽,成熟肽存在有结构保守基序 GCXGG,含有 Cys(C)、His(H)、Asn(N)和 Gln(Q)等高度保守位点。cathepsin L 成熟肽保守位点 C、H、N 可构成催化三联体结构,是酶催化活性位点,Q 能帮助形成氧阴离子洞作用^[17-21],氧阴离子洞是氢键供体的排列,可通过与四面体氧阴离子的氢键结合来稳定过渡态,从而导致催化增强^[29],该蛋白结构保守,有 8 个保守模体。

1990 年,Fagotto 等^[30]在非洲钝缘蜱卵中检测到 cathepsin L-like cysteine protease,认为其在胚胎发育中发挥降解卵黄蛋白的作用。2000 年,Renard 等^[31]从微小牛蜱中克隆出首条 cathepsin L-like cysteine protease cDNA,其全长 1 123 bp。2010 年,Franta 等^[32]的研究发现 cathepsin L-like cysteine proteases 也存在于微小牛蜱和蓖子硬蜱的肠道中。2013 年 Yamaji 等^[33]的研究证实长角血蜱中的 cathepsin L-like cysteine protease 可消化肠道中的牛血红蛋白。2019 年,Xavier 等^[34]研究发现微小扇头蜱中的 cathepsin L-like cysteine protease 能通过直接的 6 种纤维蛋白原溶解活性作用于凝血酶诱导的纤维蛋白原凝血阻止血餐凝固,延长吸血时间。

本研究采用 qPCR 法分析了 Hf-CLICPb 在半饱血雌蜱的几个主要部位的表达,结果表明,Hf-CLICPb 在半饱血褐黄血蜱的唾液腺中表达水平最高,提示蜱唾液分泌的 Cathepsin L-like cysteine protein 进入中肠后催化血红蛋白的分解,但发挥作用的部位有待研究,因为蜱类的消化机制十分特殊,即消化道仅具储存和溶解红细胞功能,血红蛋白的降解过程主要在肠上皮细胞的 digestive vecicles(消化泡)中完成。

【参考文献】

- [1] 邱敏,陈波. 组织蛋白酶 L 对糖尿病大鼠肾脏炎症及氧化应激指标的影响[J]. 安徽医药,2021,25(6):1099-1103.
- [2] Na B, Kim S, Lee E, et al. Critical roles for excretory-secretory cysteine proteases during tissue invasion of *Paragonimus westermani* newly excysted metacercariae [J]. Cell Microbiol, 2006, 8(6):1034-1046.
- [3] Scholze H, Tannich E. Cysteine endopeptidases of *Entamoeba histolytica* [J]. Methods Enzymol, 1994, 244(1):512-523.
- [4] Rhoads M, Fetterer R. Extracellular matrix degradation by *Haemonchus contortus*[J]. JParasitol, 1996, 82(3):379-383.
- [5] Carmona C, Dowd A J, Smith A M, et al. Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated

- eosinophil attachment to newly excysted juveniles[J]. Mol Biochem Parasitol, 1993, 62(62): 9-17.
- [6] Smith A, Dowd A, Heffernan M, et al. *Fasciola hepatica*: a secreted cathepsin L-like proteinase cleaves host immunoglobulin[J]. Int J Parasitol, 1993, 23(8): 977-983.
- [7] Steverding D, Sexton D, Wang X, et al. *Trypanosoma brucei*: chemical evidence that cathepsin L is essential for survival and a relevant drug target[J]. Int J Parasitol, 2012, 42(5): 481-488.
- [8] Wang Q, Zhang S, Luo X, et al. Cloning and characterization of a cathepsin L-like cysteine protease from *T. pisiiformis* [J]. Vet Parasitol, 2013, 194(1): 26-34.
- [9] Sako Y, Yamasaki V, Nakaya K, et al. Cloning and characterization of cathepsin L-like peptidases of *Echinococcus multilocularis* metacystodes[J]. Mol Biochem Parasitol, 2007, 154(2): 181-189.
- [10] Sansri V, Changklungmoa N, Chaichanasak P, et al. Molecular cloning, characterization and functional analysis of a novel juvenile-specific cathepsin L of *Fasciola gigantica* [J]. Acta Trop, 2013, 128(1): 76-84.
- [11] Li Y, Hu X, Liu X, et al. Molecular cloning and analysis of stage and tissue-specific expression of Cathepsin L-like protease from *Clonorchis sinensis* [J]. Parasitol Res, 2009, 105(2): 447-452.
- [12] Ranjit N, Zhan B, Stenzel D, et al. A family of cathepsin B cysteine proteases expressed in the gut of the human hookworm, *Necator americanus* [J]. Mol Biochem Parasitol, 2008, 160(2): 90-99.
- [13] Dvorak J, Mashiyama S, Sajid M, et al. SmCL3, a gastrodermal cysteine protease of the human blood fluke *S. mansoni* [J]. PLoS Neglected Trop Dis, 2009, 3(6): 449.
- [14] Xavier MA, Tirloni L, Torquato R, et al. Blood anticlotting activity of a *Rhipicephalus microplus* cathepsin L-like enzyme [J]. Biochimie, 2019(163): 12-20.
- [15] Renard G, Lara FA, de Cardoso FC, et al. Expression and immunolocalization of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme [J]. Insect Mol Biol, 2002, 11(4): 325-328.
- [16] Zhang TT, Qiu ZX, Li Y, et al. The mRNA expression and enzymatic activity of three enzymes during embryonic development of the hard tick *Haemaphysalis longicornis* [J]. Parasites Vectors, 2019(12): 96.
- [17] Niu DH, Jin K, Wang L, et al. Molecular characterization and expression analysis of four cathepsin L genes in the razor clam, *Sinonovacula constricta* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2013, 35(2): 581-588.
- [18] Li WW, Jin XK, He L, et al. Molecular cloning, characterization, expression and activity analysis of cathepsin L in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 29(6): 1010-1018.
- [19] Arockiaraj J, Gnanam AJ, Muthukrishnan D, et al. *Macrobrachium rosenbergii* cathepsin L: molecular characterization and gene expression in response to viral and bacterial infections[J]. Microbiol Res, 2013, 168(9): 569-579.
- [20] 段亚飞, 刘萍, 陈萍, 等. 脊尾白虾组织蛋白酶 L 基因的克隆及其表达分析[J]. 动物学研究, 2013, 34(1): 39-46.
- [21] Ma JJ, Zhang DC, Jiang JJ, et al. Molecular characterization and expression analysis of cathepsin L1 cysteine protease from pearl oyster *Pinctada fucata* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 29(3): 501-507.
- [22] Zheng W, Chen H, Liu X, et al. Severe tick infestation in a hare and potential risk for transmitting pathogens to humans[J]. Korean J Parasitol, 2011, 49(4): 419-422.
- [23] Castro JJ. Sustainable tick and tick-borne disease control in livestock improvement in development countries[J]. Vet Parasitol, 1997, 71(2): 77-79.
- [24] Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China[J]. N Engl J Med, 2011, 364(16): 1523-1532.
- [25] Someya A, Ito R, Maeda A, et al. Detection of rickettsial DNA in ticks and wild boars in Kyoto City, Japan[J]. J Vet Med Sci, 2015, 77(1): 37-43.
- [26] Moon S, Gwack J, Hwang K, et al. Autochthonous Lyme borreliosis in humans and ticks in Korea[J]. Osong Public Health Res Perspect, 2013, 4(1): 52-56.
- [27] 姜志宽, 郑智民, 王忠灿, 等. 卫生害虫管理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 473-485.
- [28] 张荣彦. “四步法”综合防控蜱虫病[J]. 北方牧业, 2019, 86(8): 26-27.
- [29] Menard R, Storer AC. Oxyanion hole interactions in serine and cysteine proteases[J]. Biol Chem Hoppe Seyler, 1992, 373(7): 393-400.
- [30] Fagotto F. Yolk degradation in tick eggs: I. Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres [J]. Arch Insect Biochem Physiol, 1990, 14(4): 217-235.
- [31] Renard G, Garcia J, Cardoso F, et al. Cloning and functional expression of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2000, 30(11): 1017-1026.
- [32] Franta Z, Frantova H, Konvickova J, et al. Dynamics of digestive proteolytic system during blood feeding of the hard tick *I. ricinus* [J]. Parasit Vectors, 2010, 3(5): 119-124.
- [33] Yamaji K, Miyoshi T, Hatta T, et al. HICPL-A, a cathepsin L-like cysteine protease from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*, modulated midgut proteolytic enzymes and their inhibitors during blood meal digestion[J]. Infect Genet Evol, 2013, 16(6): 206-211.
- [34] Xavier A, Tirloni L, Torquato R, et al. Blood anticlotting activity of a *Rhipicephalus microplus* cathepsin L-like enzyme[J]. Biochimie, 2019, 163(7): 12-20.

【收稿日期】 2021-10-22 【修回日期】 2022-01-10