

褐黄血蜱卵蛋白质组分析

徐 律^{1,2,3}, 程天印^{1,2,3*}

(1. 湖南农业大学动物医学院, 长沙 410128; 2. 湖南畜禽安全生产协同创新中心, 长沙 410128;
3. 兽用蛋白质工程疫苗湖南省重点实验室, 长沙 410128)

摘 要: 本研究旨在探明褐黄血蜱卵内蛋白组分, 揭示蜱胚胎发育中的关键营养物质, 为筛选可干扰胚胎发育的抗原分子奠定基础。采用液相色谱-串联质谱法对新鲜褐黄血蜱的卵蛋白成分进行分析, 基于该蜱的唾液腺转录组翻译文库、中肠转录组翻译文库和 Uniprot 数据库对各蛋白成分进行鉴定。结果显示: 从褐黄血蜱卵黄蛋白提取液中检出特异性肽段 221 条, 由此鉴定蛋白 53 种, 其中高可信蛋白 12 种, 能够确定的功能蛋白有肌动蛋白(actin) 和卵黄蛋白原 II (vitellogenin 2, Vg-2), 且 Vg-2 与卵黄蛋白(vitellins, Vn) 一级结构相同。蜱卵原生质所含蛋白较少; Vg-2 是蜱卵内存在的唯一一种卵黄蛋白原。

关键词: 褐黄血蜱; 卵; 液相色谱-串联质谱; 卵黄蛋白原; 特异性肽段

中图分类号: S852.746

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2019)03-0627-10

Proteomics Analysis of *Haemaphysalis flava* Eggs

XU Lü^{1,2,3}, CHENG Tianyin^{1,2,3*}

(1. College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;
2. Hunan Co-Innovation Center of Animal Production Safety, Changsha 410128, China;
3. Hunan Provincial Key Laboratory of Protein Engineering in Animal Vaccines, Changsha 410128, China)

Abstract: The protein components of *Haemaphysalis flava* eggs were investigated, and the key nutrients were analyzed in the development of embryo, in order to lay a foundation for screening antigen molecules that can interfere with embryonic development. Firstly, the egg protein components of fresh *Haemaphysalis flava* were analyzed by LC-MS/MS, and based on the salivary gland transcriptome translation library, the midgut transcriptome translation library and the Uniprot database, each protein components were identified. A total of 221 unique peptides were detected from the yolk protein extract of *Haemaphysalis flava*, and 53 kinds of proteins were identified, among which 12 were highly confident proteins. The functional proteins that can be identified were actin and vitellogenin 2 (Vg-2). Vg-2 is completely same with the primary structure of vitellins (Vn). The protoplasts of the eggs contain less protein, and there is only one type of vitellogenin (Vg-2).

Key words: *Haemaphysalis flava*; egg; LC-MS/MS; vitellogenin; unique peptide

褐黄血蜱(*Haemaphysalis flava*)是一类广泛分布于东亚地区的多宿主体外寄生虫^[1], 文献显示, 该蜱主要寄生于刺猬, 也见于猪、黄牛、大熊猫等^[2],

褐黄血蜱叮咬人的事件近年来也曾有报道。它携带新布尼亚病毒^[3]、包柔螺旋体^[4]、立克次体^[5]等多种病原微生物, 具有潜在的公共卫生意义。

收稿日期: 2018-09-09

基金项目: 湖南省自然科学基金(2018JJ2167); 湖南农业大学“双一流”建设项目(SYL201802016)

作者简介: 徐 律(1993-), 男, 湖南浏阳人, 硕士生, 主要从事动物寄生虫病防治研究, E-mail: xulvedu@foxmail.com

* 通信作者: 程天印, 主要从事动物寄生虫病防治研究, E-mail: hn5368@163.com

雌性成蜱在吸食宿主血液后,消化血餐、吸收营养并合成多种化学物质,其中一些经卵巢转移、富集于卵原生质中,以供蜱类胚胎发育所需。但蜱卵原生质中有哪些成分以及对蜱发育的意义,迄今尚无研究报道。随着蜱类学研究的深入,一些学者也开始关注此方面问题,刘光远等^[6]建立了长角血蜱(*Haemaphysalis longicornis*)卵 cDNA 转录组文库;蜱类卵巢蛋白质组学的相关研究已有报道^[7];蜱类卵黄蛋白原(vitellogenins, Vg)相关研究也逐步深入,且已证实,饱血雌蜱的中肠和脂肪体合成 Vg 后释放入血淋巴,转运至卵巢,由受体介导的内吞作用而进入卵母细胞,经过修饰加工成为卵黄蛋白(vitellins, Vn)^[8-9]。卵黄蛋白原家族蛋白数量众多,属于载脂蛋白超家族^[10],其既参与物质转运,也是卵黄蛋白的前体物质^[11]。

免疫控蜱安全、易行、高效,是当前蜱虫防治的研究方向,但疫苗种类少,仅有基于微小扇头蜱(*Rhipicephalus microplus*) Bm86 成功制备的商业化疫苗 TickGARD 和 GAVAC^[12-13],且存在明显的局限性,仅对微小扇头蜱产生免疫保护作用,对其他蜱种无交叉免疫保护力,亟待人们发现更多的抗原分子。本研究拟采用液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)揭示褐黄血蜱卵内蛋白组分,结合褐黄血蜱唾液腺转录组文库和中肠转录组文库鉴定并确定蛋白的一级结构及其编码基因,为今后探索卵内蛋白的功能和利用蛋白免疫宿主,干扰卵内成分合成,影响雌蜱产卵及卵的孵化,发展绿色、环保的免疫控蜱措施奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂及仪器 氯仿、甲醛、乙腈、甲酸均购于国药集团化学试剂有限公司;胰蛋白酶购于美国 Promega(北京)生物技术有限公司;Q Exactive 质谱仪(Thermo Fisher);液相色谱仪(Agilent Technologies)。

1.1.2 褐黄血蜱卵 褐黄血蜱采自河南省信阳市刺猬体表,饱血褐黄血蜱雌蜱采集后放置于环境培养箱 9 d 后产的第一批卵收集用于试验。

1.2 方法

1.2.1 卵蜡质层的去除 取 0.3 g 卵均分为三等份,置于 3 个 1.5 mL 离心管中,每管各加入 1.5 mL 三氯甲烷/甲醇混合液(2:1)后涡旋 15~20 s,弃去

上清液。加入 1 mL 无菌去离子水,涡旋 15~20 s,弃去上清,保留卵母。

1.2.2 卵总蛋白的提取 取三管去除蜡质的卵分别于 3 支灭菌的玻璃匀浆器中,各加入 0.3 mL 无菌生理盐水研磨,直至卵彻底匀浆。移取匀浆液于 3 个 1.0 mL 离心管中,定容至 0.5 mL。4 °C 静置 30 min 后 5 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,吸取上清备用。

1.2.3 FASP 酶解 取总蛋白提取液经过冻干处理,加入 40 μL 胰蛋白酶,37 °C 孵育 16~18 h。

1.2.4 毛细管高效液相色谱 液相 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%)。色谱柱以 95% 的 A 液平衡。样品由自动进样器上样到色谱柱,再经色谱柱分离,相关液相梯度如下:第 0—50 分钟, B 液线性梯度从 4% 到 50%;第 50—54 分钟, B 液线性梯度从 50% 到 100%;第 54—60 分钟, B 液维持在 100%。

1.2.5 ESI 质谱鉴定 酶解产物经毛细管高效液相色谱脱盐及分离后用质谱仪进行质谱分析。检测方式:正离子。多肽和多肽碎片的质量电荷比按照下列方法采集:每次全扫描后采集 10 个碎片图谱。

1.2.6 ESI 质谱数据分析 原始文件用 Mascot 2.2 软件搜索相应数据库,最后得到鉴定的肽段和蛋白质结果。本次样品检索使用的数据库分别为自建的褐黄血蜱唾液腺(NCBI 文库登录号 GSE67247)和中肠转录组翻译文库(GSE69721),以及 Uniprot Ixodoidea 蜱总科蛋白数据库(包含 183 323 条序列,下载时间为 2018/06/06, <http://www.uniprot.org/taxonomy/297308>)。软件检索所用相关参数如下:Enzyme=Trypsin, Missed cleavage=2, Fixed modification: Carbamidomethyl(C), Variable modification: Oxidation(M)。Peptides tolerance: 20 ppm, MS/MS tolerance: 0.1 Da, Mascot 结果过滤参数: Mascot Score ≥ 20。

2 结果

2.1 SDS-PAGE 卵总蛋白检测

BCA 法测定表明,卵总蛋白提取液蛋白含量 2.7 μg·μL⁻¹; SDS-PAGE 电泳显示,卵内含有多种蛋白,其相对分子质量多在 10~150 ku,而大小在 10~25 ku 的丰度较高(图 1)。

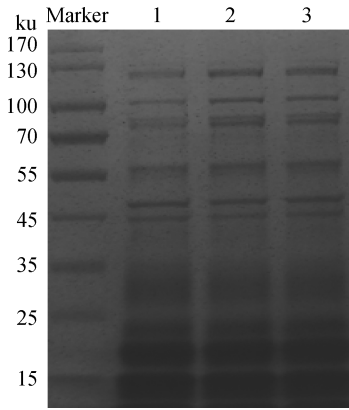


图 1 卵总蛋白提取液 SDS-PAGE 图(1、2、3 为重复样品)
Fig. 1 Proteins extracted from the eggs of *Haemaphysalis flava* (1, 2 and 3 were the paired samples)

2.2 液相色谱-质谱肽段检测

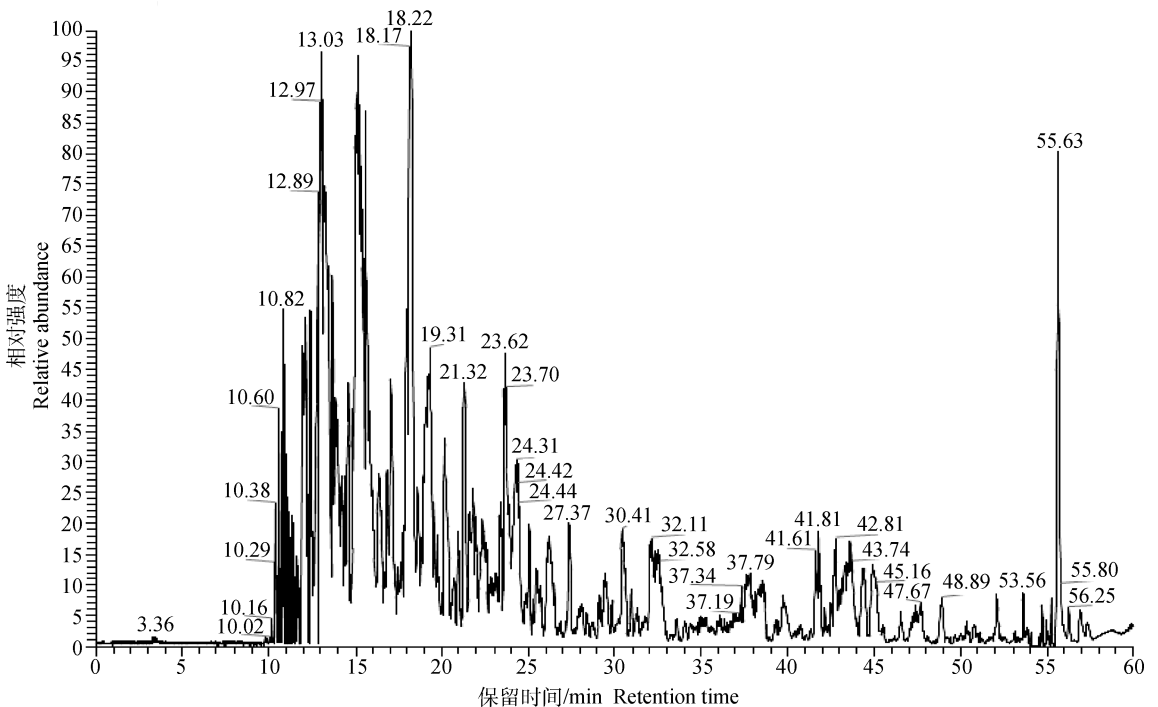
本次从卵总蛋白提取物中检出特异性肽段(unique peptide) 221 条(质谱图见图 2), 以此搜索唾液腺转录组翻译文库、中肠转录组翻译文库和 Uniprot 数据库(蜱总科), 鉴定蛋白 53 种, 其中高可信蛋白(unique peptide ≥ 2) 12 种(unique peptide ≥ 2 搜库结果见表 1), 各文库鉴定肽段情况见图 3。

将搜索唾液腺转录组翻译文库和中肠转录组翻译文库得到的蛋白序列上传 Uniprot, 基于同源蛋白对其进行注释, 结果见表 2。

3 讨论

本研究基于褐黄血蜱卵特异性肽段鉴定蛋白 53 种, 其中高可信蛋白 12 种。登录 Uniprot 数据库进行搜索、比对显示, 仅 cds. Contig217、cds. Contig27530 和 cds. Contig6575 有高同源性蛋白(identity $\geq 70\%$), 另外 9 种高可信蛋白无高同源性蛋白(identity $< 70\%$), 这充分说明蜱类卵蛋白信息尚不充足。

唾液腺转录组翻译文库(GSE67247)中的 Contig217 推定蛋白序列 206 个氨基酸残基, 与微小扇头蜱属的 *Rhipicephalus zambeziensis* 和 *Rhipicephalus microplus* 的肌动蛋白(actin)相似性 100%^[14], 与非洲钝缘蜱(*Ornithodoros moubata*)的相似性 99%^[15], 由此断定, cds. Contig217 为褐黄血蜱的 actin。Actin 几乎存在于所有的肌肉和非肌肉细胞结构^[16], 参与细胞运动和胞内运输^[17], 该蛋白也存在于蜱卵中, 它可能是构成卵原生质网的主要成分。



保留时间: 0.00~60.00 min; 离子强度: 7.70×10^9 ; 基峰 F: FTMS+p NSI; 全扫描: 350.0000~1800.0000; 质谱扫描: R866-1

RT: 0.00-60.00 min; NL: 7.70×10^9 ; Base Peak F: FTMS+p NSI; Full ms: 350.0000-1800.0000; MS: R866-1

图 2 卵总蛋白质谱图

Fig. 2 Mass spectrogram of total proteins

表 1 特异性肽段搜索结果 (unique peptides ≥ 2)

Table 1 Unique peptide search results

序号 No.	特异性肽段 Unique peptides	肽段检索文库 Peptides deduced from library	覆盖率/% Coverage
1	ANCETERHCADVSDSSTCQPGEYCR, CGGRSGPQCGSNQVCGYAR, L.KDCPSDPYECLFLEHKESR, SGPQCGSNQVCGYAR, TGLVCIK, TGLVCIKPCYGTDR	cds, contig-27530 in GSE67247	39.60
2	AVDVPVTCVPK, AVDVPVTCVPKK, HHYEHYDVP, KHHYEHYDVP, MLKDIQGG, TCVSTVK, TCVSTVKFPACK, VIYESGK, DMTLEVDPTFTK, KVIYESGK, RVIYESGK, AEFHHVYGPLK, ALVPLALGK, APHATGEEVYGYLK, ATGVYPPVLEHHEVLHK, AVVEKLEQAK, CEEHTLGGQLTSYACK, CVVTEVEFVNSYSFEYEK, DVEFVCFEK, DVEFVCFEKEHPK, DVEFVCFEKEHPK, DVPQYDLPVTCIQLQDYVK, DVPYVLLR, EAMVAVR, EEDYLEVFGADVEGLTER, EFGHLYSSLR, EFHVTVLVHTLSK, EQHHEFVTEPK, EKQLYLATIK, EKWWHPVAVR, EVHDHTAPVGLYHAPL- EHFLEHFAK, GLASVLSFSEPLTVVPVFSK, GLLSLQK, GLVFCPLGVTPK, GPYTSPLVEFSVSK, GYKPSQTEK, HAVDEPEFYVLEEQ, HHVVPVNTTEFK, HHVVPVNTTEFK, HLGVGLEVTGLTSEPEYNPLYK, HSVTHHPAVL- QPVLQTVVYFDKDEYELR, HTYPEDLK, HTYPEDLKTPVVEELYEK, IPKEEDYLEVFGADVEGLTER, KDVPYVLLR, KEAMVAVR, KEFGLHYSSLR, KVLDDGLSLAGTDSAANK, LAELIAFDLLEVK, LFTHETK, LGETYQQLDVLLDMLDQQ- FNFDTK, LRHPEALK, LTLDTDESEACQYLR, LTTEYVESPVVSK, LVTLHSLK, NAAPTLWLK, NDFGDSFLTVM, NPHAPVDEYK, PQGILSK, PVVFTVEHLK, QQLVATSVMSLELLFK, RDMTLEVDPTFTK, RDVEFVCFEK, RDVEFVCFEKEHPK, RGYKPSQTEK, SAVLSVPLKAPHATGEEVYGYLK, SFFTGVFEFTK, SLLPALER, SLVEAVVNPWAVSR, SPKPSPFK, SVALSLLLLSSPPEVLR, TADVPVTTVK, TMTYTTTAPFFFTAPQR, TPVYEELYEK, TYLHEHR, VGTPTYVSR, VHSALLK, VIVTAADPVAK, VLLDGLSLAGTDSAANK, VLELPR, VLPYPTAR, VNEVSEKEYLER, VTPVSTEDVVVYK, VVEATNLVSYK, VVLETTLLGTDLFLPVDK, VVLETTLLGTDLFLPVDKYFVK, VPTVVGYPPVALTTR, VVSIAPEELPEPVNLYR, WVHPVAVR, YLFTEGDPVSLADAFQR, YNGALSGLCGDNK, YNGALSGLCGDNKHEQHFEVTEPK, YPTVVVSLK, YSFELEATPSVQLEELALLSTEGAVK, AVDVPVTCVPKK, KMLKDIQGG, MLKDIQGGK, NAMKIR, TATKKHHYEHYDVP, TCVSTVKFPACK, VGTPTYVSRPQGILSK, VIYESGKTCVSTVKFPACK, YRVLPYPTAR, DMTLEVDPTFTKAVDVPVTCVPK, KVIYESGKTCVSTVK, NIMVKNAMKIR	cds, contig-11351 in GSE67247 cds, contig23972 in GSE67247 cds, contig-228 in GSE67247	1.52 9.09 13.33
3	ICTSPSAFIVRR, QPLGCPICPPPSLTQGLKER, RNDDGAVTLATDSCKR	cds, contig-11351 in GSE67247	1.52
4	CTSTVNKCICR, GLSVRCTSTVNKCICR	cds, contig23972 in GSE67247	9.09
5	KEYHDTAFTEAQR, RKEYHDTAFTEAQR	cds, contig-228 in GSE67247	13.33

(转下页 Carried forward)

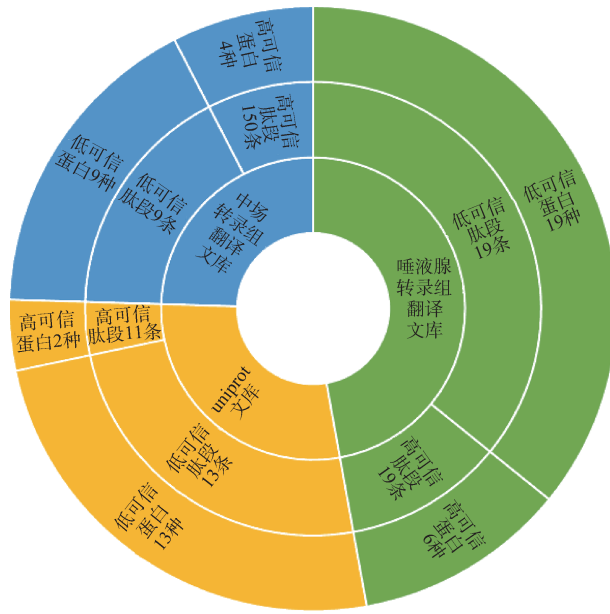


图 3 三库鉴定肽段分布旭日图

Fig. 3 Three library identification peptide distribution map

在本研究检出的特异性肽段中,107 个肽段与 cds. Contig6575 匹配。笔者基于 Contig6575 克隆出其 mRNA 全长(GenBank ID: MH891495),它编码的氨基酸序列与希伯来花蜱(*Amblyomma hebraeum*)的卵黄蛋白原 II (vitellogenin 2, Vg-2)高度相似(70.7%),故认为它是褐黄血蜱的卵黄蛋白原;107 个特异性肽段匹配于中肠转录组翻译文库(GS69721)中 cds. Contig6575 的不同部位(图 4),即在蜱类中肠合成的该蛋白原未经 Vg 转化为 Vn 的修饰过程^[18-20],而是直接为卵巢所用,储存于卵中。

在之前的研究中,从褐黄血蜱唾液中检出三种卵黄蛋白原,它们与长角血蜱的 Vitellogenin 1、Vitellogenin 2、Vitellogenin 3 相似度依次为 86.72%、87.8%、84.3%^[21]。基于褐黄血蜱唾液腺转录组文库^[22]中相应的 Unigene 克隆出的三种蛋白编码基因见 GenBank: MH178299、MH178300、MH178301。本研究显示,褐黄血蜱卵无上述三种卵黄蛋白原,即它们不是胚胎发育所需的营养物质。已有研究表明,蜱类卵黄蛋白原有两大主要功能,其一由蜱脂肪体和中肠合成^[23],经卵巢转化为卵黄蛋白^[11],储存于卵中,满足胚胎发育中的营养需求;其二属于载脂蛋白超家族成员,参与脂类物质的转运^[9]。结合先前的研究发现^[24],上述三种卵黄蛋白原在唾液腺中表达,而中肠中不表达,故笔者认为上述三种卵黄蛋白原的作用重在转运营养物质,之前人们分离、鉴定的

蜱的卵黄蛋白原的生物作用需要进一步考察确定。

高可信蛋白 cds. Contig27530 与 *Rhipicephalus pulchellus* 的 Putative secreted peptide 相似率为 75.9%,但其功能不得而知。

登录 Uniprot 数据库,搜索、比对结果显示: cds. Contig23972、cds. Contig228、cds. Contig28 无高同源蛋白, cds. Contig11351、cds. Contig8352、cds. Contig58213 暂被注释为 uncharacterized protein,此两类蛋白结构特点和生物活性尚无法预知。

以 HPEVKEWTR、SECRKTQGSSQLTVG-FTCLNR、VRELGTVGVLPTSTYPVTLEEK、TIG-PACTADCQR 等特异性肽段搜库显示,褐黄血蜱卵中含有与蛋白编号 A5Z1D7 和 G3MMR5 同源的两种蛋白,它们并非唾液腺和中肠表达,故其来源、结构、活性及其编码基因均未可知。

利用 LC-MS/MS 技术进行蛋白质组学研究,鉴定出的蛋白数量与可利用的数据库完善程度密切相关,但由于人们对蜱卵内蛋白研究的缺失,以检出的资料搜索 Uniprot 蜱总科蛋白数据库仅成功鉴定两种高可信蛋白。考虑到卵内蛋白的来源无外乎消化系统和生殖系统,笔者构建了褐黄血蜱唾液腺转录组翻译文库和中肠转录组翻译文库,搜索、鉴定了 10 种高可信蛋白,但总体来说,种类较少。能够明确的两种功能蛋白中,Actin 可能在胚胎肌肉组织形成中发挥作用;卵内的卵黄蛋白原家族蛋白仅有

表 2 高可信蛋白注释结果

Table 2 Highly confident protein annotation results

序号 No.	特异性基因 Unigene			注释蛋白 Annotation protein			
	基因编号 Contig No.	基因长度/ bp Nucleotide length	蛋白长度/ aa Proteinslength	蛋白 ID、名称与来源 Protein annotation	E 值 E-value	得分 Score	相似率/% Identity
1	Contig27530 in GSE67247	751	202	L7M8U5, Putative secreted peptide, <i>Rhipicephalus pulchellus</i>	4×10^{-96}	729	75.9
2	Contig6575 in GSE69721	6 098	1 942	V9NIJ9, Vitellogenin 2, <i>Amblyomma hebraeum</i>	0.0	7 080	70.7
3	Contig11351 in GSE67247	3 131	3 148	A0A131YW52, Uncharacterized protein, <i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	0.0	5 372	42.5
4	Contig23972 in GSE67247	707	176	A0A023FDL6, Putative secreted protein, <i>Amblyomma cajennense</i>	2×10^{-32}	300	61.3
5	Contig228 in GSE67247	517	105	A0A1E1WWG1, Putativemicroplusin-like antibacterial peptide, <i>Amblyomma aureolatum</i>	3×10^{-8}	134	33.8
6	Contig8352 in GSE67247	495	106	G3MSW4, Uncharacterized protein, <i>Amblyomma maculatum</i>	7×10^{-33}	297	54.9
7	Contig1283 in GSE69721	1 786	595	A0A034WTW0, Kunitz domain-containing protein 1, <i>Rhipicephalus microplus</i>	3.2×10^{-132}	1 056	35.2
	Contig12984 in GSE69721	1 269	280		8.1×10^{-81}	679	47.2
	Contig1284 in GSE69721	594	172		4.3×10^{-41}	392	42.3
8	Contig217 in GSE67247	698	206	A0A224YSP0, Actin, <i>Rhipicephalus zambeziensis</i>	0.0	1 967	100.0
9	Contig28 in GSE69721	550	100	A0A034WYT5, BmSEI-like 1, <i>Rhipicephalus microplus</i>	2.2×10^{-16}	188	41.6
10	Contig58213 in GSE69721	615	183	A0A293LXM7, Uncharacterized protein, <i>Ornithodoros erraticus</i>	6×10^{-11}	169	28.3

表中仅列举特异性肽段 ≥ 2 的高可信蛋白,E 值越小,得分越高,相似性越高

The tableonly exemplifies high confident protein peptides (Unique peptides ≥ 2). The smaller the E value, the higher the score and the higher the homology

A. hebraeum-Vitellogenin_2_seq	NRV FVGLIWAAMV	120
cds, Contig6575_seq	NRV FVGLIWAAMV	120
Consensus	NRV FVGLIWAAMV	
A. hebraeum-Vitellogenin_2_seq	NRV FVGLIWAAMV	240
cds, Contig6575_seq	NRV FVGLIWAAMV	240
Consensus	NRV FVGLIWAAMV	
A. hebraeum-Vitellogenin_2_seq	NRV FVGLIWAAMV	360
cds, Contig6575_seq	NRV FVGLIWAAMV	360
Consensus	NRV FVGLIWAAMV	
A. hebraeum-Vitellogenin_2_seq	NRV FVGLIWAAMV	480
cds, Contig6575_seq	NRV FVGLIWAAMV	480
Consensus	NRV FVGLIWAAMV	
A. hebraeum-Vitellogenin_2_seq	NRV FVGLIWAAMV	596
cds, Contig6575_seq	NRV FVGLIWAAMV	600
Consensus	NRV FVGLIWAAMV	
A. hebraeum-Vitellogenin_2_seq	NRV FVGLIWAAMV	716
cds, Contig6575_seq	NRV FVGLIWAAMV	720
Consensus	NRV FVGLIWAAMV	
A. hebraeum-Vitellogenin_2_seq	NRV FVGLIWAAMV	836
cds, Contig6575_seq	NRV FVGLIWAAMV	839
Consensus	NRV FVGLIWAAMV	
A. hebraeum-Vitellogenin_2_seq	NRV FVGLIWAAMV	956
cds, Contig6575_seq	NRV FVGLIWAAMV	959
Consensus	NRV FVGLIWAAMV	
A. hebraeum-Vitellogenin_2_seq	NRV FVGLIWAAMV	1076
cds, Contig6575_seq	NRV FVGLIWAAMV	1079
Consensus	NRV FVGLIWAAMV	
A. hebraeum-Vitellogenin_2_seq	NRV FVGLIWAAMV	1196
cds, Contig6575_seq	NRV FVGLIWAAMV	1199
Consensus	NRV FVGLIWAAMV	
A. hebraeum-Vitellogenin_2_seq	NRV FVGLIWAAMV	1316
cds, Contig6575_seq	NRV FVGLIWAAMV	1319
Consensus	NRV FVGLIWAAMV	
A. hebraeum-Vitellogenin_2_seq	NRV FVGLIWAAMV	1395
cds, Contig6575_seq	NRV FVGLIWAAMV	1439
Consensus	NRV FVGLIWAAMV	
A. hebraeum-Vitellogenin_2_seq	NRV FVGLIWAAMV	1515
cds, Contig6575_seq	NRV FVGLIWAAMV	1553
Consensus	NRV FVGLIWAAMV	
A. hebraeum-Vitellogenin_2_seq	NRV FVGLIWAAMV	1635
cds, Contig6575_seq	NRV FVGLIWAAMV	1675
Consensus	NRV FVGLIWAAMV	
A. hebraeum-Vitellogenin_2_seq	NRV FVGLIWAAMV	1755
cds, Contig6575_seq	NRV FVGLIWAAMV	1795
Consensus	NRV FVGLIWAAMV	
A. hebraeum-Vitellogenin_2_seq	NRV FVGLIWAAMV	1875
cds, Contig6575_seq	NRV FVGLIWAAMV	1915
Consensus	NRV FVGLIWAAMV	
A. hebraeum-Vitellogenin_2_seq	NRV FVGLIWAAMV	1924
cds, Contig6575_seq	NRV FVGLIWAAMV	1962
Consensus	NRV FVGLIWAAMV	

图 4 希伯来花蚱 Vg-2(Uniprot ID: V9NJJ9) 与 cds, Contig6575 相似性比对及褐黄血蚱卵中 Vg-2 特异性肽段分布图
 Fig. 4 The homology comparison between *Amblyomma hebraeum* Vg-2 (Uniprot ID: V9NJJ9) and cds, Contig6575 and the distribution of Vg-2 unique peptides in *Haemaphysalis flava* eggs

Vg-2, Vg-2 为胚胎发育提供了营养保障。设法敲除或消灭它们在卵中的含量,对蜱产卵率和卵孵化率有何影响,能否有作为抗原分子的潜力,有待进一步探究。为了探明褐黄血蜱卵中的更多蛋白及完善蜱类蛋白数据库,笔者正在构建褐黄血蜱生殖系统转录组文库。未来,笔者将对褐黄血蜱卵黄蛋白原家族在胚胎发育过程中的变化情况进行追踪,以期探明卵黄蛋白原的代谢通路及在胚胎发育过程中的消减情况,从而为根源防蜱提供理论参考。

4 结 论

从褐黄血蜱卵黄蛋白提取液中检出特异性肽段 221 条,由此鉴定蛋白 53 种,其中高可信蛋白 12 种,能够确定的功能蛋白有肌动蛋白、卵黄蛋白原 II (Vg-2); Vg-2 与卵黄蛋白(Vn)一级结构相同; Vg-2 是蜱卵内存在的唯一一种卵黄蛋白原。

参考文献 (References):

- [1] CHOI C Y, KANG C W, KIM E M, et al. Ticks collected from migratory birds, including a new record of *Haemaphysalis formosensis*, on Jeju Island, Korea[J]. *Exp Appl Acarol*, 2014, 62(4):557-566.
- [2] CHENG W Y, ZHAO G H, JIA Y Q, et al. Characterization of *Haemaphysalis flava* (Acari: Ixodidae) from Qingling subspecies of giant panda (*Ailuropoda melanoleuca qinlingensis*) in Qinling Mountains (Central China) by morphology and molecular markers[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7):e69793.
- [3] YUN S M, LEE Y J, CHOI W Y, et al. Molecular detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome and tick-borne encephalitis viruses in ixodid ticks collected from vegetation Republic of Korea, 2014 [J]. *Ticks Tick-Borne Dis*, 2016, 7 (5): 970-978.
- [4] LU X, LIN X D, WANG J B, et al. Molecular survey of hard ticks in endemic areas of tick-borne diseases in China[J]. *Ticks Tick-Borne Dis*, 2013, 4(4): 288-296.
- [5] NOH Y, LEE Y S, KIM H C, et al. Molecular detection of *Rickettsia* species in ticks collected from the southwestern provinces of the Republic of Korea[J]. *Parasit Vectors*, 2017, 10:20.
- [6] 刘光远, 田占成, 才学鹏, 等. 长角血蜱卵 cDNA 表达文库的构建[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(7): 2204-2208.
- LIU G Y, TIAN Z C, CAI X P, et al. Construction of cDNA expression library from eggs of *Haemaphysalis longicornis*[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(7):2204-2208. (in Chinese)
- [7] DI VENERE M, FUMAGALLI M, CAFISO A, et al. *Ixodes ricinus* and its endosymbiont *Mitochondria*: a comparative proteomic analysis of salivary glands and ovaries[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0138842.
- [8] KHALIL S M S, DONOHUE K V, THOMPSON D M, et al. Full-length sequence, regulation and developmental studies of a second vitellogenin gene from the American dog tick, *Dermacentor variabilis*[J]. *J Insect Physiol*, 2011, 57(3):400-408.
- [9] SMITH A D, KAUFMAN W R. Molecular characterization of two vitellogenin genes from the tick, *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae) [J]. *Ticks Tick-Borne Dis*, 2014, 5(6):821-833.
- [10] AVARRE J C, LUBZENS E, BABIN P J. Apolipoprotein, formerly vitellogenin, is the major egg yolk precursor protein in decapod crustaceans and is homologous to insect apolipoprotein II/I and vertebrate apolipoprotein B[J]. *BMC Evol Biol*, 2007, 7:3.
- [11] UTARABHAND P, BUNLIPATANON P. Plasma vitellogenin of grouper (*Epinephelus malabaricus*): isolation and properties [J]. *Comp Biochem Physiol Part C: Pharmacol Toxicol Endocrinol*, 1996, 115(2): 101-110.
- [12] SEIXAS A, LEAL A T, NASCIMENTO-SILVA M C L, et al. Vaccine potential of a tick vitellin-degrading enzyme (VTDCE) [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2008, 124(3-4):332-340.
- [13] DÍAZ-MARTÍN V, MANZANO-ROMÁN R, OBOLO-MVOULOUGA P, et al. Development of vaccines against *Ornithodoros* soft ticks: an update[J]. *Ticks Tick-Borne Dis*, 2015, 6(3):211-220.
- [14] LIU L, LIU Y S, LIU G H, et al. Proteomics analysis of faecal proteins in the tick *Haemaphysalis flava* [J]. *Parasit Vectors*, 2018, 11:89.
- [15] HORIGANE M, OGIHARA K, NAKAJIMA Y, et al. Identification and expression analysis of an actin gene from the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae) [J]. *Arch Insect Biochem Physiol*, 2007, 64(4):186-199.
- [16] VAN TROYS M, VANDEKERCKHOVE J, AMPE C. Structural modules in actin-binding proteins: towards a new classification[J]. *Biochim Biophys Ac-*

- ta-Biomembr*, 1999, 1448(3):323-348.
- [17] DA SILVA VAZ I Jr, IMAMURA S, NAKAJIMA C, et al. Molecular cloning and sequence analysis of cDNAs encoding for *Boophilus microplus*, *Haemaphysalis longicornis* and *Rhipicephalus appendiculatus* actins [J]. *Vet Parasitol*, 2005, 127(2):147-155.
- [18] RAIKHEL A S, DHADIALLA T S. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes[J]. *Ann Rev Entomol*, 1992, 37:217-251.
- [19] SAPPINGTON T W, RAIKHEL A S. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 1998, 28(5-6):277-300.
- [20] TUFAIL M, TAKEDA M. Molecular characteristics of insect vitellogenins[J]. *J Insect Physiol*, 2008, 54(12):1447-1458.
- [21] BOLDBAATAR D, UMEMIYA-SHIRAFUJI R, LIAO M, et al. Multiple vitellogenins from the *Haemaphysalis longicornis* tick are crucial for ovarian development[J]. *J Insect Physiol*, 2010, 56(11):1587-1598.
- [22] XU X L, CHENG T Y, YANG H, et al. De novo sequencing, assembly and analysis of salivary gland transcriptome of *Haemaphysalis flava* and identification of sialoprotein genes[J]. *Infect, Genet Evol*, 2015, 32:135-142.
- [23] CHINZEI Y, YANO I. Fat body is the site of vitellogenin synthesis in the soft tick, *Ornithodoros moubata* [J]. *J Comp Physiol B*, 1985, 155(6):671-678.
- [24] XU X L, CHENG T Y, YANG H, et al. De novo assembly and analysis of midgut transcriptome of *Haemaphysalis flava* and identification of genes involved in blood digestion, feeding and defending from pathogens[J]. *Infect, Genet Evol*, 2016, 38:62-72.

(编辑 白永平)