

蛋白质组学在蜱类研究中的应用及其进展*

杨潘怡** 王 辉 刘敬泽***

(教育部分子细胞生物学重点实验室, 河北省动物生理生化学与分子生物学重点实验室,
河北师范大学生命科学学院, 石家庄 050024)

摘 要 蜱是一类专性吸血的体表寄生节肢动物, 能够携带并传播多种病原体 and 毒素, 是畜牧传染疾病防控环节中的重要媒介生物。蜱类相关研究起步较晚, 相关基因组、转录组以及蛋白质组的背景信息不清晰, 蜱类生理调节特征、蜱媒疾病传播途径和致病机理、传播规律和预防防治策略等方面的研究尚不系统和深入。随着基因组测序技术以及基于质谱的蛋白质组学技术的发展, 为利用多种分子生物学技术开展蜱类基因和蛋白质相关研究创造了条件。本文回顾了近十年蛋白质组学技术在蜱类研究中的应用及进展, 解读了蜱类相关蛋白质研究的发展历程、研究现状和水平, 为开展蜱类的进一步研究、综合防治以及蜱媒疾病的预防和治疗等方面开阔了思路。

关键词 蜱; 蛋白质组学; 定量蛋白质组学; 研究进展

Progress in research on tick proteomics

YANG Pan-Yi** WANG Hui LIU Jing-Ze***

(Key Laboratory of Molecular Cell Biology, Ministry of Education, Hebei Key Laboratory of Animal Physiology, Biochemistry and Molecular Biology, College of Life Sciences, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, China)

Abstract Ticks are obligate blood-sucking parasitic arthropods that are important vectors of infectious viruses and other pathogens. Research on ticks began relatively late, and background information on their genomes, transcriptomes, and proteomes remains unclear. Research on the physiological regulation of ticks, the transmission routes of tick-borne pathogens, the pathogenic mechanisms of tick-borne diseases, transmission rules, prevention and control strategies, have not been systematically studied in-depth. With the innovation of genome sequencing and mass spectroscopy-based proteomics, tick gene and protein detection have become faster and easier, allowing the application of a variety of molecular techniques to tick-related studies. This paper reviews progress in the application of proteomics to tick research over the past decade, describes the current status and level of research on tick-related proteins, and presents our thoughts on the comprehensive prevention and control of ticks and the prevention and treatment of tick-borne diseases.

Key words tick; proteomics; quantitative proteomics; research progress

蜱隶属于蛛形纲 (Arachnida) 蜱螨亚纲 (Acari) 寄螨总目 (Parasitiformes) 蜱目 (Ixodida), 包括 4 科 21 属 960 种, 是一类能够在除鱼类以外其他脊椎动物体表专性吸血的寄生节肢动物 (陈泽和刘敬泽, 2020)。蜱能够在叮咬和吸食血液过程中将自身携带的多种病原

体传播给包括人类在内的许多宿主, 常造成多种蜱媒疾病的发生, 例如森林脑炎、斑点热、Q 热、莱姆病和出血热等 (Chen *et al.*, 2014), 给野生动物、家畜健康以及人类生产和生活带来极大危害 (Sonenshine, 1991; Jongejan and Uilenberg, 2004)。蜱对外界环境的适应能力强, 分布于世

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金 (32070494); 国家自然科学基金 (32271566)

**第一作者 First author, E-mail: yangpanyi2022@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: liujingze@hebtu.edu.cn

收稿日期 Received: 2023-01-12; 接受日期 Accepted: 2023-03-01

界各个地区,甚至接近极端严寒的两极地区也有分布(Frenot *et al.*, 2001)。蜚的宿主范围广泛,多数蜚在整个生活史中需要更换宿主,造成蜚媒疫病的大范围扩散。据统计每年因蜚媒疫病造成的危害和损失可达数亿美元。此外,蜚媒疫病在造成经济损失的同时也为动物食品安全带了隐患(Bowman and Nuttall, 2008)。近年来我国爆发的非洲猪瘟最初就是通过软蜚进行传播的,非洲猪瘟的爆发最终导致级联连锁反应,直接和间接损失难以估量(王述超等, 2019)。

随着高通量基因测序技术和蛋白质组学技术的高速发展和日益成熟,特别是蛋白质组学技术为精准解读蜚类各种生理变化过程中体内蛋白质的调节方式提供了基础,对蛋白质水平探寻蜚传播病原体的分子机制起到了推动作用。迄今为止利用蛋白质组学技术开展蜚类的研究报道较少,蜚类基因组序列信息在 GenBank 上仅公布了少数几个蜚种的全基因组序列,为基于基因组或转录组序列数据而进行的蛋白质组研究带来了一定困难。近几年在多种蛋白质组学技术以及高通量转录组测序技术的支持下开展了对蜚类各器官的发育和蛋白调节方式,繁殖过程中蛋白的调节变化,免疫相关蛋白的挖掘,宿主-媒介-病原体相互作用的蛋白途径,蜚媒疾病的传播和防治过程中靶蛋白的作用等方面的一系列研究(Ren *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020a; Martins *et al.*, 2021),为科学高效地控制蜚媒疾病的发生创造了条件。

1 蛋白质组学方法和研究进展

1.1 蛋白质组学和研究方法

蛋白质组(Proteome)的概念最初由 Wilkins 和 Williams 在 1994 年提出,并由 Wasinger 等逐渐完善(Pandey and Mann, 2000),是以全部蛋白质为研究对象,大规模、高通量、系统地研究细胞、组织或生物体的蛋白质组成及其变化规律的一门新兴学科,主要研究蛋白质的表达水平变化、蛋白质与蛋白质的相互作用、转录调控因子的功能分析、蛋白质的翻译后修饰等(Mavromati *et al.*, 2014),广泛应用于疾病诊疗、药物设计、

生物学相关研究以及食品科学等各领域(尹稳等, 2014)。蛋白质组学的主要研究方法包括以双向凝胶电泳为核心的蛋白质组前分离技术和基于质谱的蛋白质组高通量鉴定和定量技术,以及由蛋白质组学衍生出来的生物信息学等大数据分析方法(尹稳等, 2014)。

蛋白质的鉴定主要通过质谱仪完成,既可以鉴定单一蛋白质也可以鉴定混合蛋白质,分为 Bottom Up 和 Top Down 两种方式(Schaffer *et al.*, 2020)。基于质谱的蛋白质组学定量技术较复杂,主要包括基于细胞培养条件下稳定同位素标记技术 SILAC (Stable isotope labeling with amino acids in cell cultures),同位素标记相对和绝对定量的 iTRAQ (Isobaric tags for relative absolute quantitation)技术或 TMT (Tandem mass tags)技术,以及无需标记的 Label-free 技术(表 1)。Label-free 又分为数据依赖型采集技术 DDA (Data-dependent acquisition)和数据非依赖型采集技术 DIA (Data-independent acquisition)或 SWATH (Sequential windowed acquisition of all theoretical fragment ions)(Zecha *et al.*, 2019; Pino *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2021)。除此以外,多种抗体和化学富集方法的开发,实现 300 多种痕量的蛋白质翻译后修饰的鉴定和定量。

1.2 定量蛋白质组学

1.2.1 iTRAQ/TMT iTRAQ 和 TMT 技术分别由美国 AB Sciex 公司和 Thermo 公司研发,是稳定同位素多肽标记定量技术,成为近年来定量蛋白质组学中常用的高通量定量技术之一,其原理是利用稳定同位素标记蛋白酶解后多肽中赖氨酸侧链基团或者多肽 N 末端。标记试剂主要包括报告基团(Reporter group)、平衡基团(Balance group)和肽反应基团(Peptide reactive group)。不同样本标记后混合在一起进行质谱鉴定,通过高能碰撞解离(Higher-energy collision dissociation, HCD)等进行多肽碎裂,并最终通过二级谱图中报告基团的信号强度实现多肽以及蛋白的定量。iTRAQ 技术操作简单,检测效率较高,可同时多组复杂混合样品中的蛋白进行精确鉴定和定量分析(王林纤等, 2010; 谢秀枝等, 2011;

表 1 常见高通量定量蛋白质组学技术优缺点比较

Table 1 Comparison of advantages and disadvantages of common high-throughput quantitative proteomics technologies

技术类型 Type of technology	优点 Advantage	不足 Disadvantage
稳定同位素标记定量 Stable isotope labeling	iTRAQ (Isobaric tags for relative absolute quantitation) & TMT (Tandem mass tags) 检测效率较高, 可同时对多组复杂混合样品中的蛋白进行精确鉴定和定量分析, 高蛋白质组覆盖率 (Wang <i>et al.</i> , 2020b) High detection efficiency, precise identification and quantitative analysis of proteins in complex mixed samples simultaneous, and high proteome coverage (Wang <i>et al.</i> , 2020b)	成本高、鉴定样本通量较低 High experimental cost, limited sample quantity
	SILAC (Stable isotope labeling with amino acids in cell cultures) 活体标记 (更接近样品真实状态), 标记效率较高, 灵敏度和稳定性高, 样品混合后同时处理降低实验误差 (常乘和朱云平, 2015) In vivo labeling (closer to the real state of the sample), high labeling efficiency, high sensitivity and stability, and the sample is processed at the same time after mixing to reduce the experimental error (常乘和朱云平, 2015)	只能研究细胞, 鉴定样本通量极低 Only can research cells
非标记定量 Label-free	DDA (Data-dependent acquisition) 鉴定样本通量高, 鉴定蛋白质准确性高 (Defossez <i>et al.</i> , 2021) The flux of sample identification and the accuracy of protein identification is high (Defossez <i>et al.</i> , 2021)	液相色谱重现性要求高, 不同样本对比分析时容易出现缺失值, 样品鉴定数量低, 重现性低 Liquid chromatography requires high reproducibility, have missing values easily in the comparative analysis of different sample, the number of samples identified is low and the reproducibility is low
	DIA (Data-independent acquisition) & SWATH (Sequential windowed acquisition of all theoretical fragment ions) 鉴定样本通量高, 蛋白质鉴定数量多, 鉴定蛋白质准确性较高, 重现性高, 高缺失值少 (Casavant <i>et al.</i> , 2023) The flux of sample identification is high, the amount of protein identification is large, the accuracy of protein identification and the reproducibility is high, and high missing value is less (Casavant <i>et al.</i> , 2023) 定量测定复杂样品中几乎所有可检测的分子, 重现性和稳定性高 Quantitative determination of almost all detectable molecules in complex samples, high reproducibility and stability	液相色谱重现性要求高 Liquid chromatography requires high reproducibility

Ma *et al.*, 2022)。

1.2.2 SILAC SILAC 定量技术是在活细胞水平进行的体内标记技术, 接近样品的真实状态, 标记效率较高、效果稳定且不同样品能同时处理, 减少了实验误差 (常乘和朱云平, 2015)。主要在细胞培养基中加入轻、中或重型稳定同位

素标记的赖氨酸和精氨酸, 通过细胞代谢, 使新合成的蛋白质分别带上不同的稳定同位素标签, 然后等量混合各处理组样本, 酶解后进行质谱分析, 通过比较一级谱图不同样本中蛋白质的同位素峰面积来进行相对定量。

1.2.3 Label-free Label-free 是一种不依赖于

同位素标记的非标记蛋白质组定量技术, 无需使用昂贵的稳定同位素标签做内标, 只需分析大规模鉴定蛋白质时所产生的质谱数据, 比较不同样品中相同肽段的信号强度 (母离子峰面积), 从而对肽段以及对应的蛋白质进行相对定量。Label-free 技术实验灵活性强, 没有样本数量的限制 (Liang *et al.*, 2021; 宋如铮等, 2021)。

Label-free 又分为数据依赖型采集技术 DDA 和数据非依赖型采集技术 DIA 两种定量采集方法。

1.2.4 DDA DDA 基于鸟枪法 (Shot-gun) 质谱鉴定原理, 在每一个检测循环中优先采集信号相对较强的肽段离子进行碎裂, 得到二级谱图。每一张有效的二级谱图都对应一条肽段, 通过解析二级谱图进行肽段定性和定量分析。DDA 的缺点是检测灵敏度较低, 无法有效碎裂低丰度的信号, 采集结果具有一定随机性, 同时对大量样品系统性、可重复性的分析具有难度 (Yeom *et al.*, 2015)。

1.2.5 DIA/SWATH DIA 和 SWATH 技术分别由美国 Thermo 公司和 AB Sciex 公司研发, 两种方法的工作原理相同。DIA 与 DDA 的区别主要在于质谱扫描方式的不同。以 DIA 为例, DIA 技术通过同时碎裂一定 m/z 范围内的所有多肽, 实现连续且低偏差地获得样品中几乎所有多肽的二级谱图信息, 显著提高复杂样本的鉴定能力和效率 (Zhang *et al.*, 2020a), 显著降低样本检测的缺失值, 提高定量结果的准确性和重复性, 并且能够同时实现超大样本队列的蛋白质组定量分析 (Casavant *et al.*, 2023)。

1.2.6 蛋白质的翻译后修饰 蛋白质的翻译后修饰对于蛋白质发挥生物功能具有重要的意义, 如蛋白质磷酸化、乙酰化、泛素化等修饰实现了蛋白质的功能多样性, 一种蛋白质可执行多种功能, 为机体的发育、生殖、应激等生命过程提供快速、可逆和节能的调控策略 (Hawkins *et al.*, 2019)。随着蛋白质前处理技术的不断发展和高分辨、高精确质谱仪的出现, 很多翻译后修饰都能得到较完美的鉴定和定量 (林琳等, 2015)。研究蛋白质的翻译后修饰需要提前对发生修饰的肽段进行富集, 再通过质谱进行鉴定, 这就对样品量有一定要求, 蜱类个体小蛋白质含量低,

蛋白质的修饰鉴定和定量困难较大。随着一些最新型号质谱仪的诞生, 很多痕量的多肽能够实现完美鉴定, 支持了蜱类蛋白质翻译后修饰组学相关研究的开展, 使蛋白质能够实现全方位分析。

2 蛋白质组学技术在蜱类研究中的应用

2.1 蛋白质组学技术在蜱类生理研究中的应用

高通量基因组测序技术的快速发展和基因功能注释的逐步完善使人们获得了大量不同物种的基因组信息和转录组信息, 然而, 单一相对稳定的基因组信息并不能完全解释一个生物体如何调控其生理机能。转录组虽然在某一方面可反映基因的转录情况, 但真正实现生物功能的主要还是蛋白质。而这些蛋白质在生物体内外环境的影响下发生动态变化, 因此研究全部蛋白质的表达谱对于理解蜱类生理功能调节方式和传播病原体的致病机理等方面具有极其重要的意义 (张志林等, 2014)。

近年来, 9 个蜱种基因组测序的相继完成极大地带动了这一类群蛋白质组学的相关研究。蛋白质组学研究需要基于基因组序列来实现, 对基因组的依赖性较高。截止 2022 年 12 月 GenBank (<https://ncbi.nlm.nih.gov/protein>) 上公布了 366 464 条蜱类预测的蛋白质序列。主要包括血红扇头蜱 *Rhipicephalus sanguineus*、微小扇头蜱 *R. microplus*、靛盾扇头蜱 *R. pulchellus*、肩突硬蜱 *Ixodes scapularis*、蓖子硬蜱 *I. ricinus*、全沟硬蜱 *I. persulcatus*、长角血蜱 *Haemaphysalis longicornis*、亚洲璃眼蜱 *Hyalomma asiaticum* 和森林革蜱 *Dermacentor silvarum* 的测序结果。以上这些基因组数据为进一步开展蜱类蛋白质组学相关研究奠定了基础。目前关于蜱类发育、生殖以及介导病原体免疫相关蛋白等研究得到广泛开展 (图 1), 发现和解析了代表蜱媒疾病特征且与疾病发生、发展和早期诊断密切相关的一些关键蛋白质 (Villar *et al.*, 2017), 为蜱及蜱媒疾病的综合防治提供了基础数据, 并为蜱媒疾病的治疗以及药物或疫苗的开发奠定了基础 (周金林, 2004)。

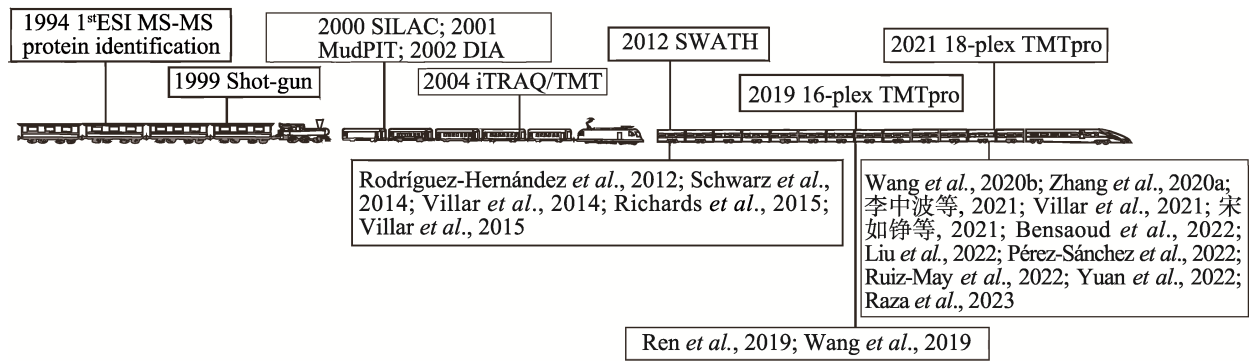


图 1 基于质谱的蛋白质组学在蜱中的发展历程

Fig. 1 The development of proteomics based on mass spectrometry in tick studies

通过大量和精准的分析蛋白质组数据,集中在以下方面对蜱类生理开展研究。蜱生命周期中的大部分时间处于非寄生状态,维持生存的能量主要依赖于吸血获得的储备,多数幼蜱、若蜱和成蜱在吸血后均会脱离宿主并继续完成发育或繁殖过程;生活史中蜱如何通过合理调节蛋白质表达来完成吸血、发育和繁殖过程;蜱在忍受饥饿以及外界复杂恶劣环境时如何通过蛋白质调节来完成应激反应等。

Villar 等(2014)采用荧光差异凝胶电泳(Differential gel electrophoresis, DIGE)结合质谱的方法分析了美洲花蜱 *Amblyomma americanum* 若蜱和成蜱全蛋白质的差异表达,发现与蜱的附着和摄食、热休克反应、蛋白酶抑制、血液消化和血红素解毒相关的蛋白质在这两个时期均出现差异,反映出不同发育阶段蛋白质独有的表达特点和功能行使模式。

蜱在吸血过程中,唾液腺的生长发育较为迅速,同时唾液分泌也异常活跃。本实验室利用 Bradford 蛋白定量法和 SDS-PAGE 电泳方法研究发现雌蜱附着、吸血、交配和饱血阶段唾液腺中蛋白质的表达水平均不同,饥饿期雌蜱的唾液腺蛋白含量最低,交配期唾液腺蛋白含量最多(王多等, 2015)。为进一步研究唾液腺发育阶段更多的蛋白调节策略和机制,本实验室运用基于 iTRAQ 的高通量定量蛋白质组学方法研究并分析了长角血蜱唾液腺在吸血后的蛋白质变化,确认了 α 微管蛋白、烯醇化酶、驱动蛋白、动力蛋白、异柠檬酸脱氢酶和柠檬酸合成酶等在摄食阶

段表达上调,而脱氧尿苷 5'-三磷酸核苷水解酶、聚腺苷酸结合蛋白-相互作用蛋白等在摄食阶段表达下调,发现并证实 2 种马达蛋白即驱动蛋白和动力蛋白在唾液腺快速发育过程中发挥着重要的作用(Ren *et al.*, 2019)。

蜱分泌的唾液成分在不同吸血阶段不尽相同。特别是不同性别的蜱,唾液成分存在较大差异,这很可能与它们的吸血特点有关。雌蜱需要吸食更多的血液使身体达到完全饱血状态,以完成产卵任务。Pérez 等(2022)采用转录组测序技术结合 SWATH 定量蛋白质组学技术分别分析了雌雄游走钝缘蜱 *Ornithodoros erraticus* 唾液中的蛋白质组成和差异,最终发现 97 个蛋白质在雌雄蜱的唾液中存在差异表达,其中血红素/铁结合蛋白以及一些蛋白酶、脂凝素和免疫相关蛋白在雌蜱唾液中含量最高,而糖酵解酶则在雄性唾液中被更多的发现,这项研究结果对于筛选唾液中潜在的蛋白抗原靶点,开发相关抗蜱疫苗等方面具有重要意义。

蜱是一类具有耐受饥饿能力的节肢动物,不进食时间最长可达一年以上,一旦发现宿主的踪迹就会从休眠状态迅速复苏并攀附到宿主身上,说明自身的神经系统和多种蛋白一直处于较活跃状态,这就必然会消耗能量。然而蜱却能在不进食状态下依然长期生存,说明其分子代谢能力具有其他物种等不可比拟的高效率。研究蜱类耐受饥饿的分子机制并借机干预这种能力,对于防治这种危险性极强的寄生虫具有重要指导意义。同时研究这种机制可能对人类器官移植、遨游太

空等一系列需要低能量供应活动的研究具有启发意义。分析长期饥饿的边缘革蜱 *D. marginatus* 转录组时发现其体内转录代谢、脂质代谢以及碳水化合物代谢相关蛋白的 mRNA 水平在长期饥饿状态下均上调,同时边缘革蜱体内半胱氨酸肽酶、天冬氨酸内肽酶、金属肽酶和丝氨酸肽酶的基因表达量显著上调用于水解血餐中的蛋白质,提供必要的维持生存的最低能量 (Hu *et al.*, 2020)。为进一步探究饥饿状态下蜱的蛋白调节策略,本实验室利用 DIA 定量蛋白质组学技术,研究了长期饥饿状态下长角血蜱唾液腺、中肠、卵巢和马氏管中蛋白质的动态,并通过多种生物信息学方法对结果进行了分析,特别指出谷氨酰胺合成酶、柠檬酸合成酶和 ATP 合成酶等在饥饿雌蜱唾液腺和马氏管中表达上调,ATP 合酶和琥珀酸脱氢酶在卵巢和马氏管中表达上调,而卵黄蛋白 1 和卵黄蛋白 2 则在卵巢和中肠中表达下调,它们可能对于蜱类长期耐受饥饿具有重要意义 (Wang *et al.*, 2022)。

蜱具有极强的繁殖能力,雌蜱摄入大量血液后卵巢开始发育,交配结束后卵巢随即加快发育速度并在不久后成熟。研究者对于卵巢的研究主要集中在卵黄原蛋白的发生等方面。通过常规生理生化方法在研究整个胚胎成熟过程中发现雌蜱合成并释放到血淋巴中的卵黄原蛋白被机体选择性吸收,经发育中的卵母细胞加工并最终形成卵黄蛋白,为胚胎的发育提供营养 (Raikhel and Dhadialla, 1992; Seixas *et al.*, 2003)。整个卵黄蛋白的发生、转运和定位需要多种蛋白质辅助完成,为进一步探究卵巢发育过程中更多蛋白质的调节变化规律,本实验室采用 DIA 定量蛋白质组学技术研究了饱血长角血蜱卵巢发育过程中全蛋白的表达特点以及蛋白磷酸化翻译后修饰的动态变化,发现卵黄蛋白在卵巢发育时期不断积累,随着卵巢的不断发育直至成熟,卵巢中许多蛋白质的表达量逐渐下调,但卵巢或者卵子中天冬氨酸蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶等一些蛋白酶的含量却逐渐在升高,且以非活化的形式存在,这很可能是为迎接卵在随后孵化过程中卵黄蛋白的降解而做准备,为卵孵化过程中细胞的

分裂提供能量和必须的氨基酸。此外,对差异表达的磷酸化蛋白进行 KEGG 通路分析,发现磷酸化蛋白主要参与 mTOR 信号通路、PI3K-AKT 信号通路和 Hippo 信号通路,进而调节细胞的生长、增值、凋亡以及自我更新 (Wang *et al.*, 2020a)。采用 TMT 定量蛋白质组学技术分析镰形扇头蜱的卵巢蛋白质组时认为热休克蛋白 HSP70 的表达水平可能受到唾液腺蛋白 RH36 表达水平的影响,当沉默 RH36 基因时发现 HSP70 的表达被显著抑制。利用 RNAi 方法敲低 RH36 或 HSP70 的 mRNA 后,卵黄原蛋白表达量均显著降低,表明其均可影响雌蜱卵巢的发育,但 HSP70 基因调控蜱卵母细胞发育的机制以及 RH36 与 HSP70 间的相互作用关系尚不清楚 (Villar *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2020c)。

以上蛋白质组学技术在蜱生理方面的应用完善了蜱的蛋白质组数据库并探索了唾液腺、卵巢等器官发育过程中蛋白质的分子调控机制,丰富了蜱类发育、生存和繁殖过程中蛋白质变化的相关研究数据,为蜱类和蜱媒疾病的防控提供了新的蛋白靶点,对蜱类的综合防治具有深远意义。

2.2 蛋白质组学技术在研究蜱类免疫调节中的应用

蜱通过吸食患病宿主血液而感染到的病原体,可通过唾液、中肠回流物、血淋巴、卵巢、甚至排泄物等将病原体传播给其他宿主 (Parola and Raoult, 2001; Sojka *et al.*, 2013)。患病宿主血液中的大部分病原体需要穿过蜱的中肠进入血淋巴完成在蜱体内的扩散,进而传递给下一个宿主,被病原体感染的血淋巴会促进病原体快速入侵蜱体内各组织 (袁冬琪等, 2021)。采用凝胶电泳结合液相色谱串联质谱的方法测定亚洲璃眼蜱雌蜱的血淋巴蛋白质组,鉴定出 13 种免疫相关蛋白,如肽聚糖识别蛋白、含硫酯蛋白和丝氨酸蛋白酶抑制剂等,通过生物信息学方法分析并筛选蜱传病原体控制的新靶点 (Yuan *et al.*, 2022)。对褐黄血蜱 *Haemaphysalis flava* 雌蜱的血淋巴蛋白质组学分析,发现 169 个蛋白,主要分为各种酶、酶抑制剂、转运蛋白、免

疫相关蛋白、肌肉蛋白和热休克蛋白等。通过 iTRAQ 方法进行定量显示,血淋巴中卵黄蛋白等蛋白的丰度最高 (Liu *et al.*, 2022)。

Rodríguez-Hernández 等 (2012) 运用双向电泳和 LC-MS/MS 相结合的蛋白质组学方法分析微小扇头蜱中肠细胞与巴贝斯虫间相互作用的蛋白质,发现一种电压依赖型阴离子选择通道样蛋白 (VDAC) 可直接与巴贝斯虫相互作用,推测在巴贝斯虫侵袭过程中起关键作用。利用 LC-MS/MS 的蛋白质组学方法研究褐黄血蜱饱血后不同阶段中肠蛋白质的变化,发现 123 种蛋白,其中 24 种蛋白含量变化明显,如 HSP90、丙酮酸激酶及异柠檬酸脱氢酶等蛋白表达上调,血浆铜蓝蛋白、磷酸甘油变位酶、D-多巴酚酞脱羧酶及肝素辅因子 2 等蛋白表达下调,表明这些蛋白很可能参与了血餐的消化,肌动蛋白和延长因子等含量变化不明显 (李中波等, 2021)。该研究为筛选可干扰消化血餐的抗原分子等提供线索。

蜱体内含有大量病原体,蜱却不会因此患病和死亡,这主要归因于宿主-病原体的相互作用机制。利用 NMR 和 LC-MS/MS 研究肩突硬蜱 ISE6 细胞感染嗜吞噬细胞无形体后的蛋白质含量变化以及涉及的基本代谢途径,发现 284 个蛋白在细胞感染前后存在差异,其中 HSP70 和 HSP90 等蛋白在侵染后的蜱细胞中表达量上调,己糖激酶和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶等蛋白的表达量下调,表明该病原体通过影响内质网蛋白质加工以限制蜱细胞的反应来促进感染,并降低蜱细胞葡萄糖代谢水平以限制病原体的感染能力,葡萄糖代谢水平的降低抑制了细胞凋亡,进而促进病原体感染。这些结果支持了蜱-无形体共同进化的推测,并揭示了蜱-病原体相互作用的细胞途径和分子机制 (Villar *et al.*, 2015)。

宿主在应对蜱叮咬时启动自身免疫反应,本实验室采用 DIA 定量蛋白质组学方法研究了哺乳动物皮肤抵抗长角血蜱叮咬过程中的分子免疫调控机制,发现被幼蜱、若蜱或成蜱分别叮咬过的兔皮肤组织中一些免疫相关蛋白的表达量和磷酸化翻译后修饰发生变化,DC-SIGN 可能

在被叮咬的兔皮细胞中参与了细胞内吞噬过程,用于加快清除皮肤中由于叮咬引起的异物和坏死细胞碎片;IL-4R 蛋白质的磷酸化水平升高说明其参与了被叮咬宿主免疫调节等生理过程 (Zhang *et al.*, 2020b);在被蜱叮咬后兔子皮肤中一些蛋白质的泛素化修饰水平发生变化 (Wang *et al.*, 2020d)。采用转录组测序技术结合 DIA 定量蛋白质组学技术分析不同条件下喂养的蓖子硬蜱唾液蛋白质组以及不同宿主经叮咬后的免疫反应,发现胱氨酸抑制剂在克服宿主的免疫反应过程中发挥了至关重要的作用,且兔和豚鼠经蓖子硬蜱叮咬后产生不同的免疫反应,豚鼠的抗毒反应更显著,表明该免疫过程和抗原产生的差异性以及蜱对不同动物宿主的不同适应策略 (Bensaoud *et al.*, 2022)。

以上利用蛋白质组学技术研究蜱类及其宿主免疫调节的分子机理,有助于快速高效地全面解析协助病原体传播的相关蛋白质的作用机制,阐明疾病传播的分子调节,为蜱媒疾病的治疗以及药物开发提供了重要的科学依据 (张志林等, 2014)。

2.3 蛋白质组学在蜱类防控中的应用

目前,蜱类防治主要依赖于化学杀虫剂,如苯二酸二甲酯、毒死蜱、伊维菌素等,杀虫剂的长期使用或滥用危害家畜以及人类健康,且造成环境污染。近年来随着伊维菌素的大量使用,导致一些蜱类产生耐药性。利用 TMT 与 SPS 相结合的蛋白质组学方法对伊维菌素敏感的微小扇头蜱和耐药微小扇头蜱种群的中肠蛋白质组进行了比较研究,发现对伊维菌素敏感的蜱与血液消化和抗凝血相关的蛋白质出现了过表达,而耐药蜱一些参与解毒功能的蛋白质如细胞色素 P450、谷胱甘肽-S 转移酶、ABC 转运蛋白等蛋白过度积累,表明这些耐药蜱拥有更强的解毒代谢能力。该研究为寻找解决蜱类耐药问题提供了潜在的新靶点和研究思路 (Ruiz-May *et al.*, 2022)。

抗蜱疫苗可有效保护宿主不被蜱类侵害,降低宿主患病机率。向宿主注射与蜱体内特有蛋白

质结构相同或相似的抗原, 激活宿主产生大量相应抗体, 可达到影响蜱类叮咬甚至繁殖和发育的目的。对于降低蜱类数量, 控制或预防蜱媒疾病的传播具有重要意义 (De La Fuente and Contreras, 2015)。商业化并推广应用的疫苗有来自微小扇头蜱 BM86 蛋白抗原的重组疫苗 TickGARD™ 和 Gavac™ 等 (吕立红等, 2021)。

随着基于基因组、转录组以及蛋白质组学的疫苗设计方法的兴起, 更多的抗蜱疫苗被设计和研发 (De La Fuente and Merino, 2013)。本实验室使用基于 iTRAQ 定量蛋白质组学方法研究饱血长角血蜱雌蜱时发现 F0F1 型 ATP 合成酶、NADH-泛醌氧化还原酶、细胞色素 C、AIF 等蛋白参与唾液腺的退化过程, RNAi 敲低这些蛋白的 mRNA 后, 雌蜱不能正常吸血, 且过早脱离宿主, 甚至不育 (Wang *et al.*, 2019)。因此, 这些蛋白质可作为候选成员开发蜱类疫苗。通过 2D-DIGE 和 LC-MS/MS 定量蛋白质组学方法分析了美洲花蜱若蜱和成蜱的全蛋白质组, 发现雄蜱和雌蜱没有显著性差异, 而若蜱和成蜱有 24 个蛋白质存在表达丰度差异, 且若蜱较成蜱多鉴定出 9 个蛋白质, 揭示了若蜱和成蜱在血液消化、血红素解毒和先天免疫等过程中存在差异 (Villar *et al.*, 2014)。这些靶蛋白为针对蜱早期发育阶段的疫苗设计提供了科学依据。

采用蛋白质组学技术已成功筛选并识别出一些潜在的蜱类保护抗原, 但绝大多数利用这些抗原研发出的候选疫苗并未投入实际应用 (Villar *et al.*, 2017)。

3 总结与展望

由于蜱类个体小, 能够提取的蛋白质少, 加之研究背景不清晰, 导致蜱类蛋白质组数据的测试和公布较为滞后, 在一定程度上限制了蜱类生理机能、蜱媒病原体传播规律和致病机理等研究工作的开展 (Villar *et al.*, 2017)。随着高通量蛋白质组学技术的发展以及该技术在蜱类生理机制、免疫调节以及综合防治等研究领域的应用, 显著提高了研究效率和研究深度, 为蜱类和蜱媒疾病的防控提供新思路。本文综述了近年来蛋白

质组学技术在蜱类研究方面的应用, 旨在增进对蛋白质组学技术的理解以及在蜱类研究中的合理运用。相信随着新型质谱仪性能的不断提高, 蜱类的空间蛋白质组学、单细胞蛋白质组学, 宿主抗体结构测定和设计, 基于质谱的蜱类蛋白质结构解析等方面将取得显著进展, 为更精准更高效的研发防蜱、驱蜱药物以及抗蜱疫苗创造了条件, 有助于解决困扰人类的蜱患问题。

参考文献 (References)

- Bowman A, Nuttall P, 2008. Ticks: Biology, Disease and Control. Cambridge: Cambridge University Press. 344–376.
- Bensaoud C, Tenzer S, Poplawski A, Medina JM, Jmel MA, Voet H, Mekki I, Aparicio-Puerta E, Cuveele B, Distler U, Marini F, Hackenberg M, Kotsyfakis M, 2022. Quantitative proteomics analysis reveals core and variable tick salivary proteins at the tick-vertebrate host interface. *Molecular Ecology*, 31(15): 4162–4175.
- Casavant EP, Liang J, Sankhe S, Mathews WR, Anania VG, 2023. Using SILAC to develop quantitative Data-independent acquisition (DIA) proteomic methods. *Methods in Molecular Biology*, 2603: 245–257.
- Chang C, Zhu YP, 2015. Strategies and algorithms for quantitative proteomics based on mass spectrometry. *Science Sinica Vitae*, 45(5): 425–438. [常乘, 朱云平, 2015. 基于质谱的定量蛋白质组学策略和方法研究进展. *中国科学: 生命科学*, 45(5): 425–438.]
- Chen CJ, Chou CY, Shu KH, Chen HC, Wang MC, Chang CC, Hsu BG, Wu MS, Yang YL, Liao WL, Yang C, Hsiao YT, Huang CC, 2021. Discovery of novel protein biomarkers in urine for diagnosis of urothelial cancer using iTRAQ proteomics. *Journal of Proteome Research*, 20(5): 2953–2963.
- Chen Z, Liu JZ, 2020. Recent progress in tick taxonomy and a global list of tick species. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 57(5): 1009–1045. [陈泽, 刘敬泽, 2020. 蜱分类学研究进展. *应用昆虫学报*, 57(5): 1009–1045.]
- Chen Z, Liu Q, Liu JQ, Xu BL, Lv S, Xia S, Zhou XN, 2014. Tick-borne pathogens and associated co-infections in ticks collected from domestic animals in central China. *Parasites & Vectors*, 7(1): 237.
- De La Fuente J, Contreras M, 2015. Tick vaccines: Current status and future directions. *Expert Review of Vaccines*, 14(10): 1367–1376.
- De La Fuente J, Merino O, 2013. Vaccinomics the new road to tick

- vaccines. *Vaccine*, 31(50): 5923–5929.
- Defossez E, Bourquin J, Reuss S, Rasmann S, Glauser G, 2021. Eight key rules for successful data-dependent acquisition in mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*, 42(1): 131–143.
- Frenot Y, De Oliveira E, Gauthier-Clerc M, Deunff J, Bellido A, Vernon P, 2001. Life cycle of the tick *Ixodes uriae* in penguin colonies: Relationships with host breeding activity. *International Journal for Parasitology*, 31(10): 1040–1047.
- Hawkins LJ, Wang M, Zhang B, Xiao Q, Wang H, Storey KB, 2019. Glucose and urea metabolic enzymes are differentially phosphorylated during freezing, anoxia, and dehydration exposures in a freeze tolerant frog. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics & Proteomics*, 30: 1–13.
- Hu E, Meng Y, Ma Y, Song R, Hu Z, Li M, Hao Y, Fan X, Wei L, Fan S, Chen S, Zhai X, Li Y, Zhang W, Zhang Y, Guo Q, Bayin C, 2020. De novo assembly and analysis of the transcriptome of the *Dermacentor marginatus* genes differentially expressed after blood-feeding and long-term starvation. *Parasites & Vectors*, 13(1): 563.
- Jongejan F, Uilenberg G, 2004. The global importance of ticks. *Parasitology*, 129(Suppl.): S3–S14.
- Li ZB, Yao GM, Hou QH, Cheng TY, 2021. Proteomic profiling of the midgut contents of female *Haemaphysalis flava* at different digestion stage. *China Animal Husbandry and Veterinary Science*, 48(2): 607–618. [李中波, 尧国民, 侯强红, 程天印, 2021. 褐黄血蜱雌蜱不同消化阶段中肠蛋白组学分析. 中国畜牧兽医, 48(2): 607–618.]
- Liang W, Yan F, Wang M, Li X, Zhang Z, Ma X, Hu J, Wang J, Wang L, 2021. Comprehensive phosphoproteomic analysis of nostoc flagelliforme in response to dehydration provides insights into plant ROS signaling transduction. *ACS Omega*, 6(21): 13554–13566.
- Lin L, Luo SS, Wang LJ, Yang J, Shen HN, Tian RJ, 2015. Progress and application of liquid chromatography-mass spectrometry technologies for characterizing protein post translational modifications. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 43(10): 1479–1489. [林琳, 罗树生, 王灵珏, 杨杰, 沈海南, 田瑞军, 2015. 色谱与质谱联用技术在蛋白质翻译后修饰研究中的进展及应用. 分析化学, 43(10): 1479–1489.]
- Liu L, Yan F, Zhang L, Wu ZF, Duan DY, Cheng TY, 2022. Protein profiling of hemolymph in *Haemaphysalis flava* ticks. *Parasites & Vectors*, 15(1): 179.
- Lv LH, Zhang JC, Hu YH, 2021. Research progress on tick protective antigens. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 39(4): 542–547. [吕立红, 张金成, 胡永红, 2021. 蜱类保护性抗原研究进展. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 39(4): 542–547.]
- Ma TL, Li WJ, Hong YS, Zhou YM, Tian L, Zhang XG, Liu FL, Liu P, 2022. TMT based proteomic profiling of *Sophora alopecuroides* leaves reveal flavonoid biosynthesis processes in response to salt stress. *Journal of Proteomics*, 253: 104457.
- Martins LA, Bensaoud C, Kotál J, Chmelař J, Kotsyfakis M, 2021. Tick salivary gland transcriptomics and proteomics. *Parasite Immunology*, 43(5): e12807.
- Mavromati J, Cash P, Restelli L, Soler L, 2014. Proteomics and protein analyses of ovine and caprine body fluids: Current studies and future promises. *Current Protein & Peptide Science*, 15(1): 45–55.
- Pandey A, Mann M, 2000. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 405(6788): 837–846.
- Parola P, Raoult D, 2001. Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 7(2): 80–83.
- Pérez-Sánchez R, Carnero-Morán A, Luz Valero M, Oleaga A, 2022. A proteomics informed by transcriptomics insight into the proteome of *Ornithodoros erraticus* adult tick saliva. *Parasites & Vectors*, 15(1): 1.
- Pino LK, Just SC, Maccoss MJ, Searle BC, 2020. Acquiring and analyzing data independent acquisition proteomics experiments without spectrum libraries. *Molecular & Cellular Proteomics*, 19(7): 1088–1103.
- Raikhel AS, Dhadialla TS, 1992. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annual Review of Entomology*, 37: 217–251.
- Raza A, Schulz BL, Nouwens A, Naseem MN, Kamran M, Mantilla Valdivieso EF, Kerr ED, Constantinoiu C, Jonsson NN, James P, Tabor AE, 2023. Application of quantitative proteomics to discover biomarkers for tick resistance in cattle. *Frontiers in Immunology*, 14: 1091066.
- Ren S, Zhang B, Xue X, Wang X, Zhao H, Zhang X, Wang M, Xiao Q, Wang H, Liu J, 2019. Salivary gland proteome analysis of developing adult female *Haemaphysalis longicornis* ticks: Molecular motor and TCA cycle-related proteins play an important role throughout development. *Parasites & Vectors*, 12(1): 613.
- Richards SA, Stutzer C, Bosman AM, Maritz-Olivier C, 2015. Transmembrane proteins-mining the cattle tick transcriptome. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 6(6): 695–710.
- Rodríguez-Hernández E, Mosqueda J, Alvarez-Sánchez ME, Neri AF,

- Mendoza-Hernández G, Camacho-Nuez M, 2012. The identification of a VDAC-like protein involved in the interaction of *Babesia bigemina* sexual stages with *Rhipicephalus microplus* midgut cells. *Veterinary Parasitology*, 187(3/4): 538–541.
- Ruiz-May E, Álvarez-Sánchez ME, Aguilar-Tipacamú G, Elizalde-Contreras JM, Bojórquez-Velázquez E, Zamora-Briseño JA, Vázquez-Carrillo LI, López-Esparza A, 2022. Comparative proteome analysis of the midgut of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) strains with contrasting resistance to ivermectin reveals the activation of proteins involved in the detoxification metabolism. *Journal of Proteomics*, 263: 104618.
- Schaffer LV, Millikin RJ, Shortreed MR, Scalf M, Smith LM, 2020. Improving proteoform identifications in complex systems through integration of Bottom-Up and Top-Down data. *Journal of Proteome Research*, 19(8): 3510–3517.
- Schwarz A, Tenzer S, Hackenberg M, Erhart J, Gerhold-Ay A, Mazur J, Kuharev J, Ribeiro JM, Kotsyfakis M, 2014. A systems level analysis reveals transcriptomic and proteomic complexity in *Ixodes ricinus* midgut and salivary glands during early attachment and feeding. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 13(10): 2725–2735.
- Seixas A, Dos Santos PC, Velloso FF, Da Silva Vaz I Jr, Masuda A, Horn F, Termignoni C, 2003. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. *Parasitology*, 126(2): 155–163.
- Sojka D, Franta Z, Horn M, Caffrey CR, Mareš M, Kopáček P, 2013. New insights into the machinery of blood digestion by ticks. *Trends in Parasitology*, 29(6): 276–285.
- Sonenshine DE, 1991. *Biology of Ticks*, Vol. 1. New York: Oxford University Press. 10–25.
- Song RZ, Peng Y, Wang GJ, Sun JG, 2021. Common techniques of quantitative proteomics and its application in the pathogenesis of hepatogenic diseases. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 26(5): 570–578. [宋如铮, 彭英, 王广基, 孙建国, 2021. 定量蛋白质组学常用研究技术及其在肝源性疾病发病机制中的应用进展. *中国临床药理学与治疗学*, 26(5): 570–578.]
- Villar M, Ayllón N, Alberdi P, Moreno A, Moreno M, Tobes R, Mateos-Hernández L, Weisheit S, Bell-Sakyi L, De La Fuente J, 2015. Integrated metabolomics, transcriptomics and proteomics identifies metabolic pathways affected by *Anaplasma phagocytophilum* infection in tick cells. *Molecular & Cellular Proteomics*, 14(12): 3154–3172.
- Villar M, Ayllón N, Busby AT, Galindo RC, Blouin EF, Kocan KM, Bonzón-Kulichenko E, Zivkovic Z, Almazán C, Torina A, Vázquez J, De La Fuente J, 2010. Expression of heat shock and other stress response proteins in ticks and cultured tick cells in response to *Anaplasma* spp. infection and heat shock. *International Journal of Proteomics*, 2010: 657261.
- Villar M, Marina A, De La Fuente J, 2017. Applying proteomics to tick vaccine development: Where are we? *Expert Review of Proteomics*, 14(3): 211–221.
- Villar M, Pacheco I, Mateos-Hernández L, Cabezas-Cruz A, Tabor AE, Rodríguez-Valle M, Mulenga A, Kocan KM, Blouin EF, De La Fuente J, 2021. Characterization of tick salivary gland and saliva alphagalactome reveals candidate alpha-gal syndrome disease biomarkers. *Expert Review of Proteomics*, 18(12): 1099–1116.
- Villar M, Popara M, Mangold AJ, De La Fuente J, 2014. Comparative proteomics for the characterization of the most relevant *Amblyomma* tick species as vectors of zoonotic pathogens worldwide. *Journal of Proteomics*, 105: 204–216.
- Wang D, Li HL, Liu JZ, 2015. Analysis on the composition of salivary gland proteins of female *Haemaphysalis longicornis* at different developmental stages. *Journal of Tianjin Normal University (Natural Science Edition)*, 35(3): 119–121. [王多, 李海龙, 刘敬泽, 2015. 长角血蜱雌蜱不同发育时期唾液腺蛋白的组成分析. *天津师范大学学报(自然科学版)*, 35(3): 119–121.]
- Wang D, Xiao Q, Zhang W, Wang X, Xue X, Zhang X, Yu Z, Zhao Y, Liu J, Wang H, 2020d. Landscape of ubiquitination events that occur in host skin in response to tick (*Haemaphysalis longicornis*) bitten. *Developmental and Comparative Immunology*, 104: 103572.
- Wang F, Wang Y, Wang G, Zhang H, Kuang C, Zhou Y, Cao J, Zhou J, 2020c. Ovary proteome analysis reveals RH36 regulates reproduction via vitellin uptake mediated by HSP70 protein in hard ticks. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10: 93.
- Wang H, Zhang X, Wang X, Zhang B, Wang M, Yang X, Han X, Wang R, Ren S, Hu Y, Liu J, 2019. Comprehensive analysis of the global protein changes that occur during salivary gland degeneration in female ixodid ticks *Haemaphysalis longicornis*. *Frontiers in Physiology*, 9: 1943.
- Wang LX, Dai Y, Tu ZG, 2010. iTRAQ labeling and biomarker discovery in comparative proteomic studies. *Chemistry of Life*, 2010(1): 135–140. [王林纤, 戴勇, 涂植光, 2010. iTRAQ 标记技术与差异蛋白质组学的生物标志物研究. *生命的化学*, 2010(1): 135–140.]
- Wang M, Hu Y, Li M, Xu Q, Zhang X, Wang X, Xue X, Xiao Q, Liu

- J, Wang H, 2020a. A proteomics analysis of the ovarian development in females of *Haemaphysalis longicornis*. *Experimental & Applied Acarology*, 80(2): 289–309.
- Wang N, Wang H, Ji A, Li N, Chang G, Liu J, Agwunobi DO, Wang H, 2022. Proteomic changes in various organs of *Haemaphysalis longicornis* under long-term starvation. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 16(8): e0010692.
- Wang SC, Zhang SF, Hu RL, 2019. Research progress of *Ornithodoros* ticks related to the epidemiology of African swine fever virus. *Acta Parasitologica et Medica Entomologica Sinica*, 26(4): 269–276. [王述超, 张守峰, 扈荣良, 2019. 非洲猪瘟流行病学与媒介钝蜱研究进展. 寄生虫与医学昆虫学报, 26(4): 269–276.]
- Wang Z, Yu K, Tan H, Wu Z, Cho JH, Han X, Sun H, Beach TG, Peng J, 2020b. 27-plex tandem mass tag mass spectrometry for profiling brain proteome in Alzheimer's disease. *Analytical Chemistry*, 92(10): 7162–7170.
- Xie XS, Wang X, Liu LH, Dong SL, Pi XG, Liu W, 2011. iTRAQ technology and its application in proteomics. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 27(7): 616–621. [谢秀枝, 王欣, 刘丽华, 董世雷, 皮雄娥, 刘伟, 2011. iTRAQ 技术及其在蛋白质组学中的应用. 中国生物化学与分子生物学报, 27(7): 616–621.]
- Yeom J, Kabir MH, Lee C, 2015. Impact of data-dependent exclusion list based mass spectrometry on label-free proteomic quantification. *Rapid Communication? Mass Spectrom*, 29(1): 128–134.
- Yin W, Fu X, Li P, 2014. Application research progress of proteomics. *Biotechnology Bulletin*, 2014(1): 32–38. [尹稳, 伏旭, 李平, 2014. 蛋白质组学的应用研究进展. 生物技术通报, 2014(1): 32–38.]
- Yuan C, Yang Q, Wu J, Peng Y, Li Y, Xiong S, Zhou J, Wang M, Hu Z, Zou Z, Xia Q, 2022. Proteomics reveals the hemolymph components of partially fed *Hyalomma asiaticum* ticks. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 13(6): 102032.
- Yuan DQ, Cao J, Zhou JL, 2021. Ferroptosis is involved in the degradation of tick salivary glands. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, Doi:10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20210615.001. [袁冬琪, 曹杰, 周金林, 2021. 程序性铁死亡及其与蜱唾液腺退化关系的研究进展. 中国动物传染病学报, Doi:10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20210615.001.]
- Zecha J, Satpathy S, Kanashova T, Avanesian SC, Kane MH, Clauser KR, Mertins P, Carr SA, Kuster B, 2019. TMT labeling for the masses: A robust and cost-efficient, in-solution labeling approach. *Molecular & Cellular Proteomics*, 18(7): 1468–1478.
- Zhang F, Ge W, Ruan G, Cai X, Guo T, 2020a. Data-independent acquisition mass spectrometry-based proteomics and software tools: A glimpse in 2020. *Proteomics*, 20(17/18): e1900276.
- Zhang X, Zhang B, Masoudi A, Wang X, Xue X, Li M, Xiao Q, Wang M, Liu J, Wang H, 2020b. Comprehensive analysis of protein expression levels and phosphorylation levels in host skin in response to tick (*Haemaphysalis longicornis*) bite. *Journal of Proteomics*, 226: 103898.
- Zhang ZL, Xiao R, Gou M, Li QW, 2014. Advances in tissue proteomics of blood-sucking animals. *Journal of Yangtze University (Natural Science Edition)*, 11(6): 116–122, 6. [张志林, 肖蓉, 勾萌, 李庆伟, 2014. 吸血类动物组织蛋白质组学研究进展. 长江大学学报(自然科学版), 11(6): 116–122, 6.]
- Zhou JL, 2004. Research progress on functional molecules from ticks and their application prospects. *Progress in Veterinary Medicine*, 25(1): 53–56. [周金林, 2004. 蜱的功能分子研究及其应用前景. 动物医学进展, 25(1): 53–56.]