

# 镰形扇头蜱两个组织蛋白酶 L-样半胱氨酸蛋白酶新基因的克隆与序列分析

陈灵芝<sup>1,2</sup> 周金林<sup>\*1</sup> 周勇志<sup>1</sup> 龚海燕<sup>1</sup> 李培英<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(中国农科院上海家畜寄生虫病研究所,农业部动物寄生虫学重点开放实验室,上海 200232)

<sup>2</sup>(安徽农业大学畜牧水产学院,合肥 230036)

**摘 要** 蜱是动物常见的外寄生虫,并且传播多种人和动物的疾病,严重危害畜牧业发展和人类健康。为了寻找基因工程疫苗候选抗原基因,根据半胱氨酸蛋白酶的保守性氨基酸序列及镰形扇头蜱氨基酸密码子偏好设计引物,PCR 扩增、测序并分析得到 2 个镰形扇头蜱的半胱氨酸蛋白酶基因片段 *cysA* 和 *cysB*,再通过 RACE 的方法得到全长基因序列。*cysA* 全长 1168bp,编码 332 个氨基酸;*cysB* 全长 1153bp,编码 335 个氨基酸。经过分析,*CysA* 和 *CysB* 均与其他蜱种或物种的组织蛋白酶 L-样半胱氨酸蛋白酶有高度同源性,两者均含有半胱氨酸蛋白酶活性位点处的保守性氨基酸序列,因此 *cysA*, *cysB* 均为镰形扇头蜱两个新的组织蛋白酶 L-样半胱氨酸蛋白酶基因。RT-PCR 分析表明,*CysA* 和 *CysB* 在镰形扇头蜱的不同发育阶段表达情况不一。

**关键词** 镰形扇头蜱,半胱氨酸蛋白酶

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)02-0203-06

蜱是人和家畜的体表寄生虫,更是人和家畜的多种虫媒病的传播者,可传播的病原体有病毒、立克次体、螺旋体、血液原虫<sup>[1]</sup>等等。目前,蜱的控制主要是靠化学杀虫剂,但是化学杀虫剂的使用伴随着蜱的抗药性、食品安全以及环境的污染等问题,因此需要研究新的蜱控制方法。自从 Willadsen<sup>[2]</sup>第一次将微小牛蜱中肠抗原 Bm86 免疫牛获得成功以后,免疫预防就成为最有前途的控制方法,而筛选有潜力的抗原基因是前提条件。近来许多研究表明,半胱氨酸蛋白酶在寄生虫体内有着许多必不可少的生物学功能。除了分解代谢功能和对蛋白质的加工处理功能以外,寄生虫的半胱氨酸蛋白酶还在寄生虫的免疫逃避、脱囊、包囊的形成中以及在侵入宿主细胞过程中起着关键的作用<sup>[3]</sup>,被认为是一类抗虫疫苗和药物研究的重要分子<sup>[4]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 蜱

镰形扇头蜱,采自湖北武昌,经兔体人工饲养获

得蜱的单雌蜱群。

### 1.2 试剂

TRIZOL 试剂、3'-RACE 和 5'-RACE 试剂盒购自 Invitrogen 公司;Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司;pGEM-T Easy 载体购自 Promega 公司;所用引物由赛百盛公司合成。

### 1.3 镰形扇头蜱总 RNA 的提取及反转录

取在兔体吸血 4d 的半饱血成蜱,清洁后,在液氮中充分研磨,加 TRIZOL 试剂,在匀浆器中充分匀浆。按 TRIZOL 试剂说明书的步骤提取镰形扇头蜱半饱血成蜱的总 RNA。约 5 $\mu$ g 的总 RNA 用于反转录得 cDNA 第一链。

### 1.4 目的基因片段的克隆与测序

根据半胱氨酸蛋白酶活性位点处的保守性氨基酸序列<sup>[6,7]</sup>(GQCSCWA 和 YWLVKMSW)和蜱的氨基酸密码子的使用频率,设计了一对 PCR 引物:

上游引物 5'ACC AGG GCC AGT GCG GCT CCT

GCT G 3'

下游引物 5'CCC AGC TGT TCT TGA CGA GC 3'

收稿日期 2003-08-13,修回日期 2003-12-10。

基金项目:基础研究重大项目前期研究专项基金资助(No. 2001CCA00900)。

\* 通讯作者。 Tel 86-21-54083188; Fax 86-21-54081818; E-mail zjlzc@online.sh.cn

本文报道的镰形扇头蜱两个组织蛋白酶 L-样半胱氨酸蛋白酶新基因序列已登录 GenBank,*cysA* 和 *cysB* 的基因序列号分别为 AY336797 和 AY336798。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

用镰形扇头蜱半饱血成蜱的 cDNA 为模板,用所设计的上下游引物进行 PCR 扩增,扩增条件:94℃ 3min 预变性,94℃ 40s,50℃ 40s,72℃ 1min,30 个循环,72℃ 延伸 7min。

PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳、回收目的条带,连接到 pGEM-T Easy 载体上,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  细胞,经 PCR 鉴定后,目的基因测序。

### 1.5 快速扩增 cDNA 5'端 (5'-RACE)<sup>[7]</sup>

根据目的基因片段的测序结果设计 5'-RACE 所用引物,

*cysA* :GSP1 = 5'-AGTGTCCAGCGCTCAATGGCTA-3',  
GSP2 = 5'-GATGTCTACAAAGCCGGTGTCCG-TTG-3',  
nestedGSP = 5'-ACCAGGGCCAGTGC GGCTCTCTGCTG-3';  
*cysB* :GSP1 = 5'-TAGACAC-CTTCCGAGTAGAAC-3',  
GSP2 = 5'-CGTGGCTGGCGTTCGATGCCAACTGAGAC-3',  
nestedGSP = 5'-ACCAGGGCCAGTGC GGCTCTCTGCTG-3'。

根据 5'-RACE 的方法扩增 cDNA 的 5'端,回收目的条带,连入 pGEM-T Easy 载体上,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  细胞,经 PCR 鉴定后,测序。

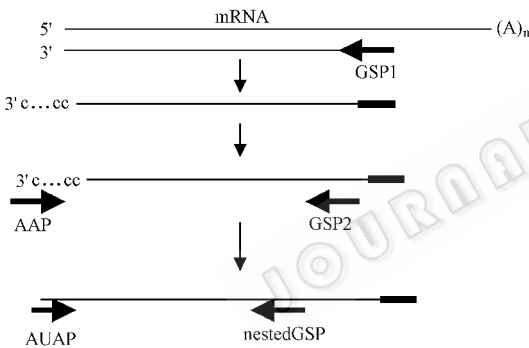


图 1 克隆 *cysA* 和 *cysB* 的 5'端示意图

Fig.1 Overview of cloning 5' ends of *cysA* and *cysB*

### 1.6 全长 cDNA 的克隆与测序

根据 5'端的测序结果设计扩增全长基因的上游引物 (*cysA* :GSP = 5'-GAGCTCTCCACCAGGTGC-ACC-3', *cysB* :GSP = 5'-AGGTCACCTGGGGTCTCCG-GC-3')。根据 3'RACE 的方法扩增<sup>[8]</sup> *cysA* 和 *cysB* 的全长 cDNA。扩增条件:94℃ 预变性 4min,94℃ 40s,53℃ 40s,72℃ 2min,35 个循环;72℃ 延伸 7min。PCR 产物回收,连入 pGEM-T Easy 载体,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  细胞,经 PCR 鉴定后,测序。

### 1.7 序列分析

用 Blastx 进行同源性分析;同时,采用 Gentyx-MAC 软件对该基因的开放阅读框、保守性氨基酸序列进行分析。

### 1.8 RT-PCR 分析 *CysA* 和 *CysB* 在镰形扇头蜱的

不同部位、不同发育阶段的表达情况

为了判断 *cysA*, *cysB* 在不同发育阶段和在不同组织器官中的表达情况,从不同发育阶段的镰形扇头蜱,包括卵、幼蜱、若蜱、未吸血成蜱、半饱血成蜱以及不同解剖部位包括壳、唾液腺、肠中分别提取总 RNA。分别以 1 $\mu$ g 总 RNA 反转录合成第一链 cDNA,并取 2 $\mu$ L 反转录产物作为 PCR 扩增模板。*cysA* 基因特异性引物:上游,5'-AAGCTTCTTGCCTCCACC-ATGCTGAG-3',下游,5'-CTCGAGGACGAGTGG-TAGCTGGCC-3';*cysB* 基因特异性引物:上游,5'-GAATTCATGCGGGGTACATTGTTTTGTGCTGC-3',下游,5'-GCCGCCGCGACGAGGATAGCTGGCG-3'。用 *cysA* 和 *cysB* 的重组质粒为模板的 PCR 反应设为阳性对照,用兔白细胞总 RNA 的反转录产物为模板的 PCR 反应设为阴性对照。取 5 $\mu$ L PCR 产物,经 1% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 目的基因片段的克隆与测序

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测,在约 500bp 位置有一明亮的带。该产物连接到质粒载体并转化,随机选取 20 个阳性克隆测序,结果获得 2 个序列明显不同的基因片段,经 NCBI 网站 Blastx 分析,这两个基因片段与已登录的其它物种的半胱氨酸蛋白酶序列有很高的同源性,初步鉴定为二个半胱氨酸蛋白酶基因片段,分别命名为 *cysA* 和 *cysB*。

### 2.2 快速扩增 cDNA 5'端 (5'-RACE)

5'-RACE 第一次 PCR 均没有特异带出现,Nested PCR 获得 500bp 左右的基因片段,插入 pGEM-T Easy 载体,经 PCR 鉴定后,挑取阳性克隆测序,结果获得 5'端序列。

### 2.3 二个基因全长 cDNA 的克隆与测序

根据 5'-RACE 结果,设计基因特异性引物,按 3'-RACE 的方法扩增全长基因。PCR 产物电泳,在 1.2kb 左右出现单一的亮带,与预期的大小基本相符。目的条带成功连入 pGEM-T Easy 载体,经 PCR 鉴定后,选取阳性克隆测序,结果获得全长基因。*cysA* (如图 2)全长 1168bp,在 3'端有 polyA 和 polyA 的信号序列 AATAAA,有一个开放阅读框,从第 58 个碱基到第 1053 个碱基,编码 332 个氨基酸序列,预测分子量为 36.33kD。对氨基酸的信号肽分析 ([www.psорт.org](http://www.psорт.org)),发现有一个 16 个氨基酸的信号肽,切割点在第 16 和第 17 个氨基酸之间;*cysB* (如图 3)全长 453bp,在 3'端有 polyA 和 polyA 的信号序

列 AATAAA, 开放阅读框从第 43 个碱基到第 1047 个碱基, 编码 335 个氨基酸, 预测分子量约为 37.56kD, 对氨基酸的信号肽分析( www. psort. org ), 发现有一个约 18 个氨基酸的信号肽, 切割点在第 18 和第 19

个氨基酸之间。尽管同源性分析表明, 二个基因均为组织 L-样半胱氨酸蛋白酶基因, 但核苷酸序列的同源性只有 63%。

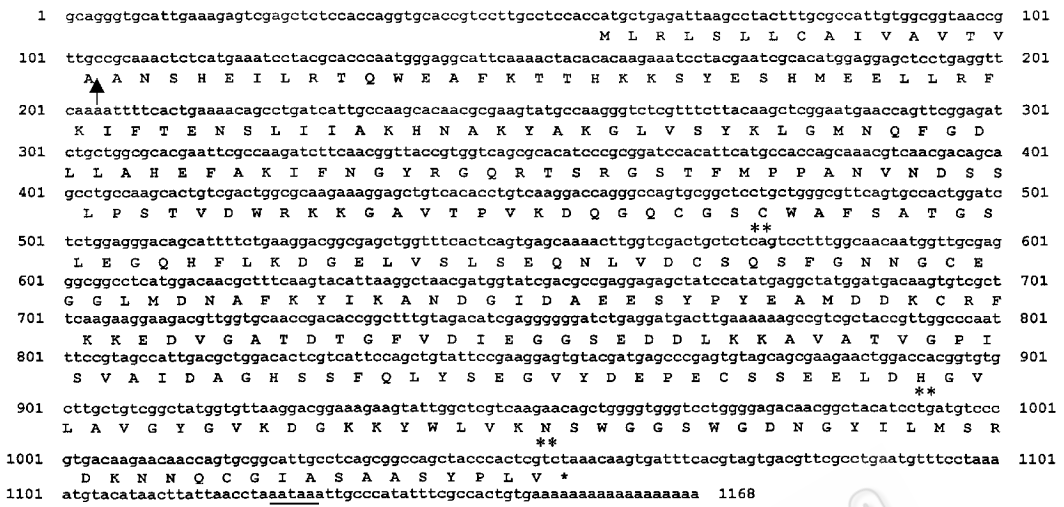


图 2 cysA 的全长基因序列和推测的氨基酸序列。

Fig.2 Nucleotide and the deduced amino acid sequence of cysA. The arrow indicates the putative cleavage point for the release of the signal peptide. Asterick(\*\*) = The conserved residues involved in catalysis.

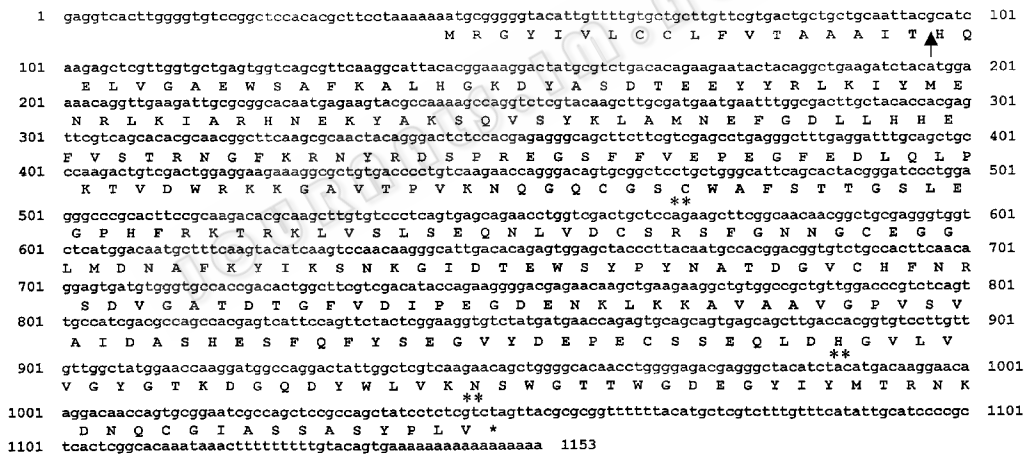


图 3 cysB 的全长基因序列和推测的氨基酸序列

Fig.3 Nucleotide and the deduced amino acid sequence of cysB. The arrow indicates the putative cleavage point for the release of the signal peptide. Asterick(\*\*) = The conserved residues involved in catalysis

2.4 与其它半胱氨酸蛋白酶的同源性分析

将 CysA 和 CysB 的氨基酸序列同已报道的具尾扇头蜱、微小牛蜱、伪步行虫 ( Tenebrio molitor )、麻蝇 ( Sarcophaga peregrina ) 的半胱氨酸蛋白酶进行同源性比较, 结果这两个序列均含有半胱氨酸蛋白酶活性位点 C<sup>25</sup>、H<sup>150</sup> 和 N<sup>175</sup> 处的保守性氨基酸序列( 如图 4 ), 且它们与其它蜱种或物种的组织蛋白酶 L-样半胱氨酸蛋白酶有很高的同源性, 其中, CysA 与其他蜱种或物种的半胱氨酸蛋白酶在氨基酸水平上的同源性为 58.5% ~ 79.8% ; CysB 与其他蜱种或物种的半胱氨酸蛋白酶在氨基酸水平上的同源性为

56.7% ~ 89.8%。

2.5 cysA 和 cysB 在镰形扇头蜱的不同发育时期、不同解剖部位的表达分析

从蜱的不同发育阶段提取 RNA, 反转录成 cDNA, 取等量 cDNA 为模板, 用二个基因的特异性引物分别进行 RT-PCR。结果如图 5 所示, 兔白细胞 cDNA 中均没有扩增出特异基因片段, 排除了 cysA 和 cysB 受兔血污染的可能性, CysA 在镰形扇头蜱的幼蜱、若蜱、未吸血成蜱和半饱血雌蜱中均有较高表达, 但在卵中的表达量很少。CysB 在镰形扇头蜱的卵、幼蜱、若蜱、半饱血雌蜱中均有较高表达, 但在未

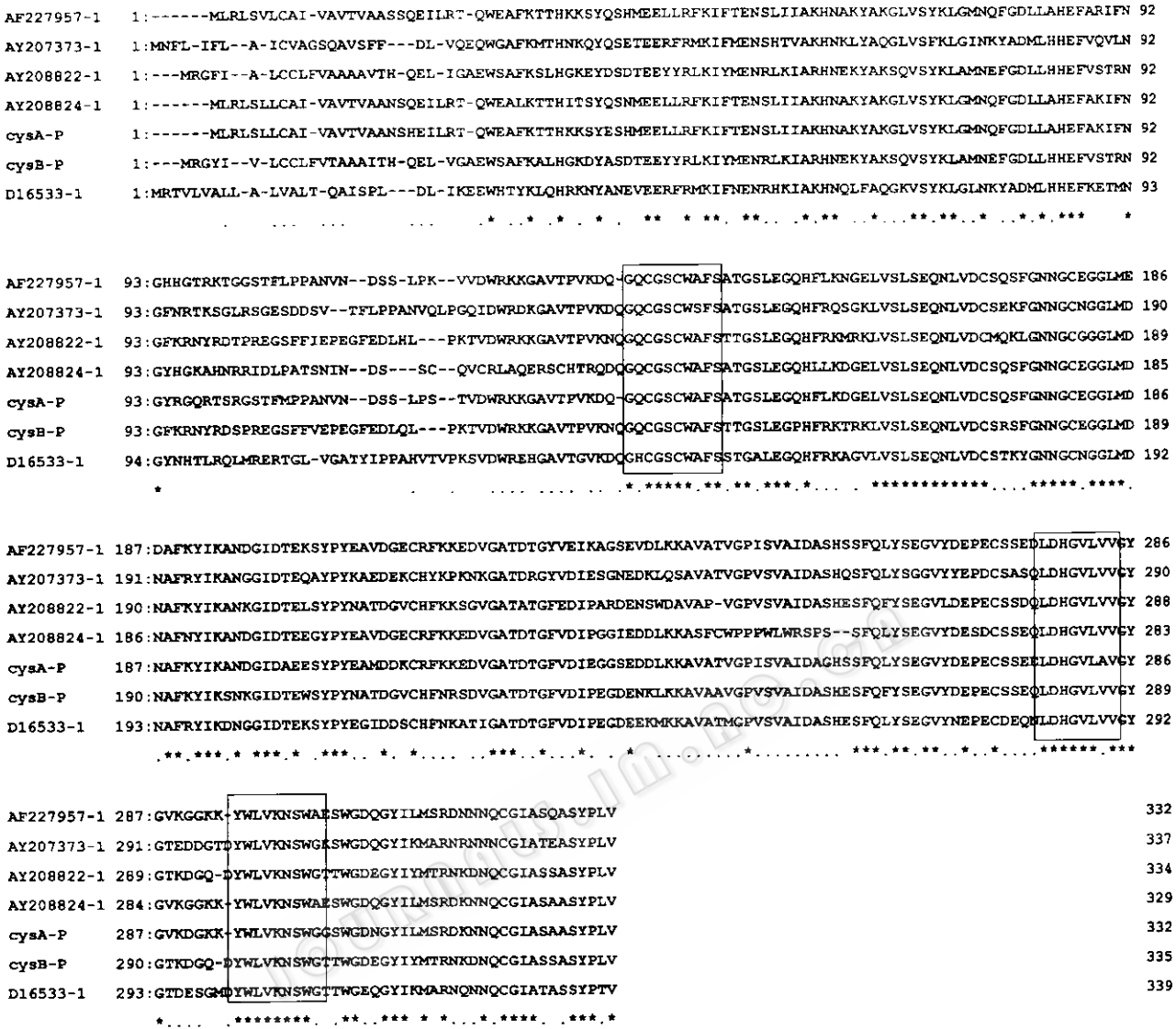


图 4 CysA 和 CysB 的预测氨基酸序列与其他物种已知半胱氨酸蛋白酶的同源性比较

Fig.4 Amino acid sequence similarity of CysA and CysB to known cysteine proteinases from the database

CysA = *Rhipicephalus haemaphysaloides haemaphysaloides* cathepsin L-like cysteine proteinase A (AY336797), CysB = *Rhipicephalus haemaphysaloides haemaphysaloides* cathepsin L-like cysteine proteinase B (AY336798), AY208824-1 = *Rhipicephalus appendiculatus* midgut cysteine proteinase 5 protein (amino acid sequence homology to CysA and CysB, 79.8% and 56.7% respectively), AF227957-1 = *Boophilus microplus* cathepsin L-like proteinase precursor protein (amino acid sequence homology to CysA and CysB, 89.2% and 66.6% respectively), AY207373-1 = *Tenebrio molitor* cathepsin L-like cysteine proteinase protein, (amino acid sequence homology to CysA and CysB, 63.1% and 61.1%, respectively), AY208822-1 = *Rhipicephalus appendiculatus* midgut cysteine proteinase 3 protein, (amino acid sequence homology to CysA and CysB, 64.5% and 89.8% respectively), D16533-1 = *Sarcophaga peregrina* cathepsin L-like precursor protein, (amino acid sequence homology to CysA and CysB, 58.5% and 61.4%, respectively). Asterisks (\*) = homologous regions, Box = motifs conserved in all papain-like cysteine proteinases

吸血成蜱中表达量极低,这一结果反映出 CysA 与 CysB 在蜱的不同发育时期的表达差异,推测与二个基因在体内不同的生物学功能有关。

二个基因在镰形扇头蜱的不同解剖部位的 RT-PCR 结果如图 6 所示, CysA 和 CysB 在肠中未见表达,但在唾液腺和壳中均有较高表达。

### 3 讨论

半胱氨酸蛋白酶广泛地存在于各种生物体中,包括病毒、细菌、原虫、蠕虫、昆虫、酵母、植物和哺乳动物中<sup>[9]</sup>。在蜱中也同样存在,现已从长角血蜱 (*Haemaphysalis longicornis*) (Albert Mulenga 等, 1999)、微小牛蜱 (*Boophilus microplus*) (Gaby Renard 等, 2000)

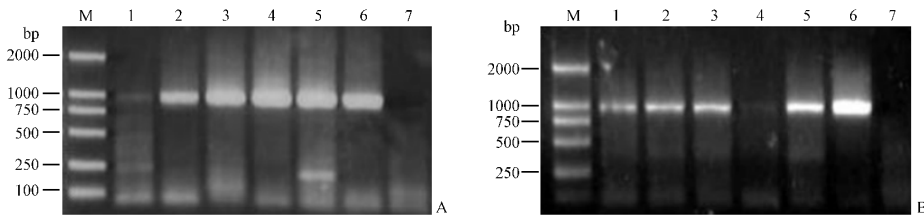


图 5 *cysA* (A) 和 *cysB* (B) 在不同发育阶段的表达情况

Fig.5 (A) Expression of *cysA* in the different periods of *Rhipicephalus haemaphysaloides haemaphysaloides* development ,

(B) Expression of *cysB* in the different periods of tick

1 ~ 5 7 indicate RT-PCR products of total RNAs from eggs , larva , nymphae , unfed adult , partially fed adult and rabbit leukocyte respectively , 6 indicate PCR product from recombinant plasmid of *cysA* or *cysB* .

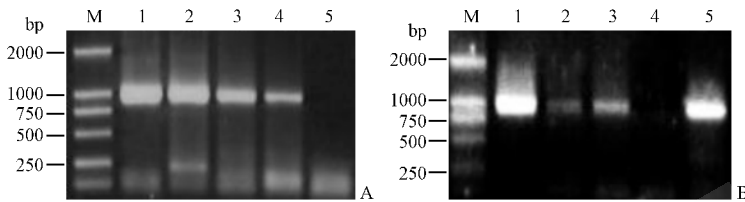


图 6 *cysA* (A) 和 *cysB* (B) 在镰形扇头蜱不同部位的表达分析

Fig.6 (A) Expression of *cysA* in the different parts of *Rhipicephalus haemaphysaloides haemaphysaloides* ,

(B) Expression of *cysB* in the different part of *Rhipicephalus haemaphysaloides haemaphysaloides*

(A) 1 indicates PCR product from recombinant plasmid of *cysA* , 2 ~ 5 indicate RT-PCR products of total RNAs from partially fed adult tick , shell , salivary gland , gut respectively ; (B) 1 indicates PCR product from recombinant plasmid of *cysB* , 2 ~ 5 indicate RT-PCR products of total RNAs from shell , salivary gland , gut , partially fed adult tick respectively

中克隆到组织蛋白酶 L-样半胱氨酸蛋白酶基因。镰形扇头蜱是我国南方的优势蜱种,可传播牛巴贝斯虫、泰勒焦虫等引起的多种疾病<sup>[10]</sup>,给我国的畜牧业发展带来很大的危害。本实验从镰形扇头蜱中克隆到两个半胱氨酸蛋白酶基因,分别命名为 *cysA* 和 *cysB*。序列分析结果, *CysA* 和 *CysB* 均含有木瓜样半胱氨酸蛋白酶的活性位点 C<sup>25</sup>、H<sup>150</sup> 和 N<sup>175</sup> 处保守的氨基酸序列,并且这两个蛋白的预测氨基酸序列与数据库中其它已知的半胱氨酸蛋白酶的同源性分别高达 58.5% ~ 79.8%、56.7% ~ 89.8%,分析表明,所克隆到的 *cysA* 和 *cysB* 是镰形扇头蜱的两个组织蛋白酶 L-样半胱氨酸蛋白酶基因。

近来许多研究表明,半胱氨酸蛋白酶在许多寄生原虫和蠕虫的致病性方面起着很重要的作用。如在恶性疟原虫中可降解血红蛋白<sup>[11]</sup>,在肝片吸虫中可切割宿主的免疫球蛋白(Ig)<sup>[12]</sup>等。半胱氨酸蛋白酶在蜱的生命活动中也起到重要的作用,初步研究表明,可能与降解宿主的血红蛋白有关<sup>[13]</sup>。由于寄生虫的半胱氨酸蛋白酶在其生命活动中的重要性,以及它们与哺乳动物的半胱氨酸蛋白酶在结构上的差异,故有许多研究将半胱氨酸蛋白酶作为药物设计的靶点和研制疫苗的抗原<sup>[11,14,15]</sup>。如:用半胱氨酸蛋白酶抑制剂( Fluoromethyl ketone )可抑制犬

恶丝虫的第三期和第四期幼虫的蜕皮<sup>[16]</sup>,用日本血吸虫组织蛋白酶 DNA 疫苗免疫小鼠,可使实验小鼠获得 24.2% 的减虫率和 34.9% 肝卵减少率<sup>[17]</sup>。而半胱氨酸蛋白酶在蜱及蜱传病防治中的应用还缺少研究,本研究克隆到镰形扇头蜱二个半胱氨酸蛋白酶新基因,将为探索应用半胱氨酸蛋白酶分子进行抗蜱及蜱传病疫苗或发展新药物提供基础。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Sonenshine D.E. *Biology of ticks* , Vol. I , Oxford university press , oxford ,1993 pp.1 - 65
- [ 2 ] Albert M , Chihiro S , Misao O. Issues in tick vaccine development identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. *Microbes and Infection* , 2000 **2** ( 11 ) :1353 - 1361
- [ 3 ] Sajid M , McKerrow JH. Cysteine proteases of parasitic organisms , *Molecular & Biochemical Parasitology* , 2002 **120** ( 1 ) :1 - 21
- [ 4 ] James H. McKerrow. Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases : insights on safety , target validation , and mechanism of action , *International Journal for Parasitology* , 1999 **29** ( 6 ) :833 - 837
- [ 5 ] Gaby R , José FG , Felipe CC *et al* . Cloning and functional expression of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme , *Insect Biochemistry and Molecular Biology* , 2000 **30** ( 11 ) :1017 - 1026
- [ 6 ] Albert M , Chihiro S , Geoffrey I *et al* . Molecular Cloning of Two

- Genes, *The Journal of Veterinary ( Medical Science )*, 1999, **61**( 5 ): 497 – 503
- [ 7 ] Carl W. Dieffenbach, Gabriela S. Dveksler. PCR Primer : A Laboratory Manual( PCR 技术实验指南 ), Science Press, 2002, pp.276 – 277
- [ 8 ] Carl W. Dieffenbach, Gabriela S. Dveksler. PCR Primer : A Laboratory Manual( PCR 技术实验指南 ), Science Press, 2002, pp.274 – 275
- [ 9 ] Boulangé A, Serveau C, Brillard M *et al.* Functional expression of the catalytic domains of two cysteine proteinases from *Trypanosoma congolense*, *International Journal for Parasitology*, 2001, **31**( 13 ):1435 – 1440
- [ 10 ] Chen T D( 陈天铎 ), Chen H( 陈华 ), Lin K Q( 林开铅 ) *et al.* Biological Character of *Rhipicephalus haemaphysaloides haemaphysaloides* in Fujian, China. *Journal of Fujian Agricultural College( 福建农林学院学报 )*, 1992, **2**( 1 ) 97 – 100
- [ 11 ] Coombs GH, Mottram JC. Parasite proteinases and amino acid metabolism : possibilities for chemotherapeutic exploitation. *The Journal of Parasitology*, 1997, **114**( Suppl ) S61 – S80
- [ 12 ] Angela MS, Andrew JD, Mary H *et al.* *Fasciola Hepatica* : A secreted cathepsin L-like proteinase cleaves host Immunoglobulin, *International Journal for Parasitology*, 1993, **23**( 8 ) 977 – 983
- [ 13 ] Gaby R, Flávio AL, Felipe CC *et al.* Expression and immunolocalization of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect Molecular Biology*, 2002, **11**( 4 ) 325 – 328
- [ 14 ] Authié E, Boulangé A, Muteti D *et al.* Immunisation of cattle with cysteine proteinases of *Trypanosoma congolense* : gargetting the disease rather than the parasite. *International Journal for Parasitology*, 2001, **31**( 13 ):1429 – 1433
- [ 15 ] Burton JB, John PD, Ciaran PB *et al.* Gut-associated immunolocalization of the *Schistosoma mansoni* cysteine proteases, SmCL1 and SmCL2. *The Journal of Parasitology* 2001, **87**( 2 ) 237 – 241
- [ 16 ] Jennifer KR, Garrett Hunt W, Judy AS *et al.* *Dirofilaria immitis* : Effect of fluoromethyl ketone cysteine protease inhibitors on the Third- to Fourth-Stage Molt. *Experimental Parasitology*, 1993, **76**( 3 ) 221 – 231
- [ 17 ] Tian M L( 田明礼 ), Yi X Y( 易新元 ), Zeng X F( 曾宪芳 ) *et al.* The effect of protective immunity by *Schistosoma japonicum* cathepsin B( Sj31B<sub>1</sub>N ) DNA vaccine, *Chinese Journal of Schistosoma control* ( 中国血吸虫病防治杂志 ) 2001, **13**( 4 ) 209 – 212

## Molecular Cloning of Two *Rhipicephalus haemaphysaloides haemaphysaloides* Cathepsin L-like Cysteine Proteinase Gene

CHEN Ling-Zhi<sup>1, 2</sup> ZHOU Jin-Lin<sup>1\*</sup> ZHOU Yong-Zhi<sup>1</sup> GONG Hai-Yan<sup>1</sup> LI Pei-Ying<sup>2</sup>

<sup>1</sup>( Shanghai Institute of Animal Parasitology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200232, China )

<sup>2</sup>( Anhui Agriculture University, Hefei 230036, China )

**Abstract** Ticks are obligate ectoparasites and vectors of arboviruses, rickettsiae, spirochetes and parasitic protozoa of humans and domestic animals. Immunological protection of mammalian hosts against tick infestation has been proposed as the most sustainable alternative tick control method to the current use of acaricides. The success of this method is dependent on the identification of key molecules for use as tick vaccine antigens. Proteolytic enzymes are involved in a wide range of cellular processes, thus they can be considered as good target antigens for a tick vaccine. In the present study, we used rapid amplification of cDNA ends protocol and primers that were designed based on the consensus amino acid motifs flanking present in all papain-like cysteine proteinases, to amplify, sequence and characterize two *Rhipicephalus haemaphysaloides haemaphysaloides* cathepsin L-like cysteine proteinases, named as *cysA* and *cysB*. The full length of *cysA* is 1168bp, encoding a 332 amino acid residue polypeptide with 36.33kD predicted molecular mass; the full length of *cysB* is 1153bp, encoding a 335 amino acid residue polypeptide with 37.56kD predicted molecular mass. The consensus amino acid motifs flanking presence in both deduced amino acid sequences. And both genes show high sequence homology to other tick cathepsin L-like cysteine proteinase, so they were identified as members of the cysteine proteinase gene family. Expression analysis by RT-PCR revealed that *cysA* and *cysB* were expressed differently in different periods of tick development.

**Key words** cathepsin L-like cysteine proteinase, *Rhipicephalus haemaphysaloides haemaphysaloides*

Received : 08-13-2003

This work was supported by Grant from Special Fund of Key Project of Basic Research( No.2001CCA00900 )

\* Corresponding author. Tel : 86-21-54083188 ; Fax : 86-21-54081818 ; E-mail : zjlzc@online.sh.cn