

翟瑞钰, 杨伏春, 屈海龙, 等. 基于 mRNA 技术制备与鉴定牛结节性皮肤病病毒焦磷酸酶多克隆抗体 [J]. 畜牧与兽医, 2026, 58 (4): 98-103.

ZHAI R Y, YANG F C, QU H L, et al. Preparation and identification of lumpy skin disease virus pyrophosphatase polyclonal antibody based on mRNA technology [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2026, 58 (4): 98-103.

基于 mRNA 技术制备与鉴定牛结节性皮肤病病毒 焦磷酸酶多克隆抗体

翟瑞钰^{1,2}, 杨伏春^{1,2,3}, 屈海龙³, 陈欢^{1,2}, 苗雨润^{1,2}, 常星³, 冯曼玉^{1,2},
李金明³, 郑龙三^{1,2}, 王志亮^{3*}, 钱莺娟^{1,2*}

(1. 南京农业大学三亚研究院, 海南 三亚 572000;

2. 南京农业大学动物医学院/教育部动物健康与食品安全国际合作联合实验室, 江苏 南京 210014;

3. 中国动物卫生与流行病学中心/国家牛结节性皮肤病参考实验室, 山东 青岛 266032)

摘要: 脱氧鸟苷三磷酸焦磷酸酶 (dUTPase) 作为核苷酸代谢的关键调控因子, 在自然界中广泛分布, 多种病毒基因组编码的 dUTPase 被报道具有独特的生物学功能。本研究旨在探究牛结节性皮肤病病毒 (LSDV) 编码的 dUTPase 具体功能。基于 LSDV/XJ/201901 毒株基因序列, 采用 mRNA 疫苗技术构建脂质纳米颗粒 (LNP) 包装的 LSDV dUTPase mRNA (LNP-dUTPase mRNA), 将其作为抗原免疫 BALB/c 小鼠, 制备抗 LSDV dUTPase 的多克隆抗体。经免疫印迹试验与间接免疫荧光试验验证, 所获抗体可特异性识别细胞外源表达蛋白。本研究创新性地通过 mRNA 免疫技术制备出抗 dUTPase 蛋白多克隆抗体, 为解析 LSDV dUTPase 的生物学功能提供了关键试验材料。

关键词: 牛结节性皮肤病病毒; dUTPase; 多克隆抗体

中图分类号: S852.651 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2026)04-0098-06

Preparation and identification of lumpy skin disease virus pyrophosphatase polyclonal antibody based on mRNA technology

ZHAI Ruiyu^{1,2}, YANG Fuchun^{1,2,3}, QU Hailong³, CHEN Huan^{1,2}, MIAO Yurun^{1,2}, CHANG Xing³,
FENG Manyu^{1,2}, LI Jinming³, JUNG Yong-Sam^{1,2}, WANG Zhiliang^{3*}, QIAN Yingjuan^{1,2*}

(1. Sanya Research Institute, Nanjing Agricultural University, Sanya 572000, China;

2. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University/MOE Joint International Research Laboratory of
Animal Health and Food Safety, Nanjing 210014, China;

3. China Animal Health and Epidemiology Center/National Lumpy Skin Disease Reference Laboratory, Qingdao 266032, China)

Abstract: Deoxyuridine triphosphate pyrophosphatase (dUTPase), as a key regulatory factor of nucleotide metabolism, is widely distributed in nature. dUTPase encoded by various viral genomes has been reported to have unique biological functions. However, the specific function of the dUTPase encoded by lumpy skin disease virus (LSDV) remains unclear. In this study, based on the gene sequence of the LSDV/XJ/201901 strain, lipid nanoparticle (LNP) packaged LSDV dUTPase mRNA (LNP dUTPase mRNA) was constructed using mRNA vaccine technology as an antigen to immunize BALB/c mice and prepare polyclonal antibodies against LSDV dUTPase. The results were that Western blot and indirect immunofluorescence assays confirmed that the obtained antibodies could specifically recognize exogenously expressed proteins. This study marked the first successful preparation of polyclonal antibodies against dUTPase protein using mRNA immunization technology, providing key experimental materials for elucidating the biological functions of LSDV dUTPase.

Keywords: lumpy skin disease virus; dUTPase; polyclonal antibody

收稿日期: 2025-05-16; 修回日期: 2026-02-02

基金项目: 国家重点研发计划子课题项目 (2022YFD1800504); 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (KYCXJC2024005)

第一作者: 翟瑞钰, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 钱莺娟, 教授, 研究方向为新发动物传染病、One Health 等, E-mail: yqian@njau.edu.cn; 王志亮, 研究员, 研究方向为重大外来动物疫病防控技术, E-mail: wangzhiliang@cahec.cn。

牛结节性皮肤病 (lumpy skin disease, LSD) 是由牛结节性皮肤病病毒 (lumpy skin disease virus, LSDV) 引发的重要传染病。该病具有急性、亚急性接触性传播特征, 对畜牧业生产具有高度经济危害性^[1-2]。世界动物卫生组织规定其为法定通报疫病^[3], 我国现行《动物疫病名录》将其列入二类动物疫病管理范畴^[4]。

LSDV 是一种双链 DNA 病毒, 属痘病毒科 (*Poxviridae*) 脊椎动物痘病毒亚科 (*Chordopoxvirinae*) 山羊痘病毒属 (*Capripoxvirus*)。LSDV 基因组大小约 151 kb, 共编辑 156 个开放阅读框 (ORFs), 包括保守的中心区域和两侧具有较高遗传变异特征的反向末端重复序列 (ITRs)^[5]。目前 LSDV 大多数编码蛋白功能仍处于预测阶段而无详细研究。

目前接种疫苗仍是控制 LSD 疫情的主要手段, 市售疫苗以弱毒活疫苗为主, 主要包括两类, 即基于 LSDV Neethling 株与 KSGP 2490 株的同源弱毒苗及基于羊痘的异源弱毒苗^[6]。研究表明, 弱毒苗对 LSDV 具有一定的保护效果, 然而也存在过敏反应、毒力返强与毒株重组风险, 相较之下灭活苗虽更为安全, 但免疫原性较低而依赖于佐剂或多次免疫^[7-8]。因此, 研究 LSDV 未知蛋白功能, 明确其在病毒感染中的作用, 有助于深入理解 LSDV 的致病机制, 有望为新型防控策略提供理论支撑。脱氧鸟苷三磷酸焦磷酸酶 (dUTP pyrophosphatase, dUTPase) 能够在病毒复制过程中减少 dUTP 的积累, 在维护病毒基因组完整性中起重要作用^[9]。目前对病毒 dUTPase 的研究多集中于其酶活性在病毒复制中的作用, 但已有研究发现, 病毒 dUTPase 也会参与调节宿主先天免疫^[10], 因此深入研究该病毒蛋白的功能对于 LSD 防控具有一定的积极意义。

常规抗体制备常采用纯化的蛋白作为抗原, 面临制备条件复杂、蛋白构象失真等局限^[11]。本实验室前期尝试使用大肠杆菌原核表达系统制备 LSDV 蛋白, 但在制备过程中出现蛋白表达水平低、复性效果差等问题。相比之下, mRNA 技术能够克服传统抗原蛋白表达与纯化的技术难题, 体外转录的 mRNA 抗原具有表达效率高、生产周期短、安全性高、免疫原性强等优势, 结合脂质纳米颗粒 (lipid nanoparticle, LNP) 递送系统则实现稳定递送并激发机体有效免疫应答^[12-13]。为探索 LSDV dUTPase 在 LSDV 感染过程中的作用, 本文基于 mRNA 技术设计获得 LNP-LSDV dUTPase mRNA, 免疫小鼠后制备多克隆抗体, 为深入研究 LSDV dUTPase 的功能奠定了材料基础。

1 材料与方法

1.1 细胞和实验动物

人胚胎肾 293T 细胞 (293T)、乳仓鼠肾细胞 (BHK21) 以及 pCAGGS-flag 质粒均由本实验室保存, 牛乳腺上皮细胞 (MAC-T) 购自海星生物公司。

SPF 级 4 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自扬州大学比较医学中心, 试验期间所有小鼠均饲养于南京农业大学实验动物中心。动物实验严格遵循实验动物福利伦理准则, 已通过南京农业大学动物医学院实验动物福利与伦理委员会审核。

1.2 主要试剂与仪器

帽类似物 7-甲基化鸟苷酸帽结构、T7 体外转录试剂盒 (含 DNaseI) 及 RNA 纯化试剂盒购自诺维赞公司; 转染试剂 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司; TMB 显色液购自天根生化科技有限公司; 高糖培养基 DMEM、胎牛血清购自美国 Gibco 公司。

His 标签特异性单克隆抗体购自美国 Proteintech 公司; HRP 偶联的羊抗鼠抗体购自南京 SunShine 公司; Alexa 488 标记羊抗鼠 IgG 购自美国 Invitrogen 公司; M- β -actin 特异性单克隆抗体购自美国 Proteintech 公司; Flag 标签特异性单克隆抗体、DAPI 均购自德国 Sigma-Aldrich 公司。

蛋白电泳仪 (型号: SE250-10A-1.0) 及转印仪 (型号: TE22) 购自美国 Hoefer 公司; 化学发光成像系统 (型号: Bio Spectrum 810 Imaging System) 购自美国 UVP 公司; 酶标仪 (型号: 800TS) 购自美国 BioTek Instruments 公司; 荧光显微镜 (型号: DS-Ri2) 购自德国徕卡公司。

1.3 抗原制备

1.3.1 mRNA 的制备

在 mRNA 疫苗构建过程中, 以 LSDV/XJ201901 毒株的 LSDV018 (dUTPase) 基因为靶点, 设计合成模板质粒。该 mRNA 抗原包含分泌信号肽、多个串联的 dUTPase mRNA 序列以及优化 mRNA 体内翻译的调控元件。将模板质粒通过酶切线性化, 采用磁珠纯化的方式回收线性化的 DNA 模板。限制性内切酶酶切线性化模板后, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳验证质粒构建是否成功。采用 T7 体外转录试剂盒合成 mRNA, 以纯化的线性质粒 DNA 为模板, 并在体系中加入帽类似物 7-甲基化鸟苷酸帽结构, 共转录合成 5' 端携带帽类似物的 mRNA。体外转录反应结束后, 使用 DNase 酶降解模板 DNA。

使用 RNA 纯化试剂盒, 纯化 naked mRNA (未包被的 mRNA)。使用分光光度计测定 RNA 浓度和纯

度,采用毛细管电泳法检测制备的 mRNA 完整性。

1.3.2 体外验证 LSDV dUTPase mRNA 表达情况

利用 Lipofectamine 2000 转染试剂将制备的用于 LNP 包被的 dUTPase mRNA 转染至 293T 细胞中。细胞密度约 60% 时更换新鲜培养基准备转染,3.5 cm 培养皿转染 1 μg mRNA。转染 48 h 后离心收集上清液作为分泌蛋白样品,细胞沉淀裂解后作为胞内蛋白样品,加入 350 μL 2 $\times$ SDS sample buffer,振荡裂解 5 min 后转移至 EP 管中,98 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴 10 min。

制备 12% 分离胶进行 SDS-PAGE 分离蛋白样品。经湿式转印法将蛋白转移至 PVDF 膜。3% 脱脂乳常温封闭 1 h 后,与 His 标签特异性单克隆抗体于 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育 12 h。经 PBST 充分洗涤后与 HRP 偶联的羊抗鼠抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育 4 h,最后用 ECL 发光成像系统显色。

1.3.3 合成 LNP-dUTPase mRNA

采用微流控技术混合 mRNA 与脂质纳米颗粒。其中脂类混合物包括可电离脂质 SM-102、辅助中性脂质 DSPC、胆固醇、DMG-PEG2000 共 4 种,混合摩尔比为 50 : 10 : 38.5 : 1.5, mRNA 与 LNP (4 种脂类混合物总和) 的质量比为 1 : 6。

将脂类混合物溶解于无水乙醇中, mRNA 溶解于 pH = 5.5 的柠檬酸盐缓冲液中,通过微流控混合器实现两相湍流混合。脂质分子通过疏水作用及静电吸附完成 mRNA 包载,获得 LNP-mRNA 粗产物,之后通过透析法浓缩及 PBS 换液操作,完成最终 LNP-mRNA 制剂制备。

1.4 动物免疫

按 10 μg /次剂量,双侧后肢肌注 LNP-dUTPase mRNA。首次免疫后每 14 d 加强免疫 1 次,共计 4 次免疫接种。首免前经眼眶静脉丛采血获取血清作为阴性对照。四免后采血测定血清效价。

1.5 ELISA 最佳抗原包被浓度测定

将全长 His 标签的 dUTPase mRNA 用 Lipofectamine 2000 转染 293T, 24 h 后收样。细胞弃去上清液,用预冷 PBS 洗涤 2 遍后加入 500 μL 蛋白裂解液,冰上静置 10 min。收集细胞裂解液并超声至液体透亮,离心收集上清液作为 ELISA 抗原。

用包被液将抗原按一定比例进行等比稀释,按 100 μL /孔包被 96 孔酶标板,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 12 h。次日弃包被液,3% 脱脂乳封闭。将多抗血清和阴性对照血清用 PBST 进行倍比稀释,各稀释度每孔 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h。洗板后将 HRP 偶联的羊抗鼠多克隆抗体作为二抗 (1 : 5 000 稀释),操作同一抗,结束

后用 TMB 显色液显色,终止后测定 $OD_{450\text{ nm}}$ 值。以阳性血清 $OD_{450\text{ nm}} \approx 1.0$ 且 P/N 值 (阳性与阴性的 $OD_{450\text{ nm}}$ 值比) 最大时对应的抗原浓度作为最佳包被浓度。

1.6 多克隆抗体效价测定

以 1.5 建立的间接 ELISA 法测定抗体效价。将过表达的细胞裂解液以 1 : 6 400 稀释度包被酶标板,免疫多抗血清用 PBS 进行 1 : 1 000 起始的连续梯度稀释。同时以 1 : 10 000 稀释的 His 抗体为阳性对照,未免疫小鼠血清为阴性对照。当检测孔 $OD_{450\text{ nm}}$ 值大于 1.0 时稀释倍数为抗体效价。

1.7 多克隆抗体的 Western blot 鉴定

将 MAC-T 细胞以 60% 密度提前 1 d 铺至 3.5 cm 培养皿中,转染前 4 h 更换新鲜培养基,之后转染全长 His 标签的 dUTPase mRNA,24 h 后收样。将 LSDV/XJ201901 毒株的 dUTPase 基因,以及经密码子优化后的 dUTPaseOP 基因,均通过酶切连接法分别构建至 pCAGGS-flag 质粒中,成功构建出重组质粒 pCAGGS-flag-dUTPase 与 pCAGGS-flag-dUTPaseOP。将 BHK21 细胞以 60% 密度提前 1 d 铺至 3.5 cm 培养皿中,20 h 后转染 pCAGGS-flag-dUTPase 或 pCAGGS-flag-dUTPaseOP,转染后 6 h 换液,24 h 后收样。将蛋白样品进行 SDS-PAGE 后湿转至 PVDF 膜上。将制备多抗用 PBST 按 1 : 100 稀释作为一抗,以 1 : 3 000 稀释的 HRP 羊抗鼠 IgG 作为二抗,利用 ECL 发光成像系统显色。

1.8 多克隆抗体的间接免疫荧光试验 (IFA) 鉴定

将盖玻片蘸取酒精在酒精灯上点燃,表面无水痕后置于 6 孔板中,每孔加入 1 mL PBS 润洗 1 遍,再加入 1 mL 营养液润洗一遍,每孔接种 5×10^5 个 MAC-T 细胞,次日转染。

转染 24 h 后弃去细胞上清液,加入 1 mL PBS 润洗 3 遍后吸净上清液,多聚甲醛固定液 1 mL/孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 固定 30 min。每孔 1 mL 含甘氨酸 (Glycine) 的 PBS 润洗 2 遍,再加入 1 mL PBS 润洗 3 遍。多克隆抗体用 PBS 1 : 100 稀释,抗 His 多抗 1 : 500 稀释,分别滴加 100 μL 于玻片上,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育,弃去一抗后每孔加入 1 mL PBS,摇床轻柔振荡 5 min,重复洗涤 3 遍。之后避光孵育二抗,将 Alexa 488 标记羊抗鼠 IgG 用 PBS 1 : 500 稀释滴加 100 μL 于玻片上,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,之后同一抗步骤洗涤。细胞核用 DAPI 染色,按 1 : 5 000 稀释于 PBS 中,每孔加入 1 mL,染色完成后 PBS 润洗,将玻片倒置于载玻片上,指甲油封片,置于倒置荧光显微镜下观察。

2 结果

2.1 LNP-dUTPase mRNA 的合成与理化参数测定

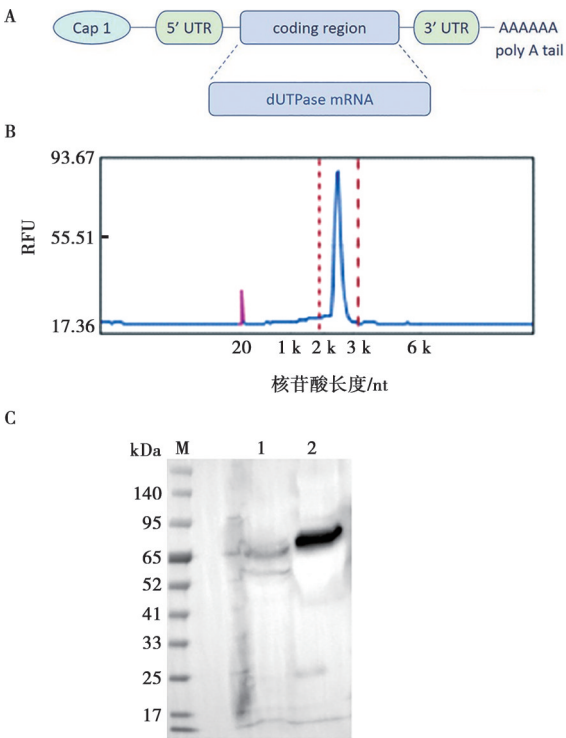
设计的 LSDV dUTPase mRNA 抗原结构如图 1A 所示, mRNA 分子从 5'端开始依次为 Cap 1 帽结构, 5'UTR, 编码区 (含分泌信号肽、多个串联 dUTPase mRNA 及利于 mRNA 体内翻译的元件), 3'UTR, 最后为 polyA 尾, 编码蛋白分子量约 65 kDa。毛细管电泳法验证合成的 mRNA 在 2 000~3 000 nt 间有目标单峰, 且周围无杂峰, 表明合成 mRNA 无模版 DNA 残留, 降解程度低, 完整性较高 (图 1B)。Western blot 验证合成的 mRNA 转染细胞后翻译蛋白为分泌型, 在 65 kDa 大小处有相应条带, 表明 mRNA 抗原制备成功 (图 1C)。

用 LNP 试剂包被合成的 mRNA 检测制备完成的 LNP-dUTPase mRNA 理化参数, 结果表明 LNP 包封率为 82%, 聚合物粒径 143 nm, 颗粒多分散指数 (polydispersity index, PDI) 为 0.171。理化参数结果表明 LNP-dUTPase mRNA 颗粒大小分布较为均匀, 属于良好范围, 利于维持 LNP-dUTPase mRNA 稳定性和有效性。

2.2 间接 ELISA 最佳包被条件的测定

用转染 dUTPase mRNA 的 293T 细胞裂解液作为抗原, 分别包被不同稀释度, 并用不同稀释倍数的小鼠多抗血清作为一抗, 采用间接 ELISA 的方法测定抗原最佳包被浓度。结果显示细胞裂解液作为抗原的

最佳包被稀释度为 1 : 12 800, 此时检测孔 $OD_{450\text{ nm}}$ 值在 1.0 左右且与阴性血清比值最大 (表 1)。



A. dUTPase mRNA 体外转录取体的结构; B. 毛细管电泳法检测制备的 mRNA 完整性; C. Western blot 验证 dUTPase mRNA 转染 293T 细胞的蛋白表达结果, 其中 M 为蛋白 Marker, 1 为胞内裂解蛋白, 2 为分泌蛋白 (上清液)。

图 1 LSDV dUTPase mRNA 抗原的设计与合成

表 1 间接 ELISA 最佳抗原包被条件的测定结果 ($OD_{450\text{ nm}}$ 值)

抗原稀释度	阳性血清稀释度					
	1 : 1 000	1 : 2 000	1 : 4 000	1 : 8 000	1 : 16 000	1 : 32 000
1 : 200	0.483	0.350	0.230	0.157	0.106	0.089
1 : 400	0.425	0.298	0.215	0.156	0.108	0.098
1 : 800	0.474	0.358	0.214	0.155	0.105	0.091
1 : 1 600	0.707	0.502	0.349	0.208	0.134	0.101
1 : 3 200	0.837	0.666	0.447	0.283	0.183	0.126
1 : 6 400	0.984	0.696	0.460	0.289	0.180	0.135
1 : 12 800	0.994	0.720	0.435	0.286	0.185	0.123
1 : 25 600	0.673	0.515	0.323	0.207	0.138	0.107
抗原稀释度	阴性血清稀释度					
	1 : 1 000	1 : 2 000	1 : 4 000	1 : 8 000	1 : 16 000	1 : 32 000
1 : 200	0.084	0.085	0.085	0.094	0.109	0.147
1 : 400	0.098	0.104	0.121	0.127	0.141	0.183
1 : 800	0.084	0.105	0.092	0.098	0.110	0.168
1 : 1 600	0.093	0.099	0.102	0.109	0.126	0.168
1 : 3 200	0.112	0.111	0.108	0.115	0.119	0.187
1 : 6 400	0.120	0.131	0.141	0.150	0.169	0.225
1 : 12 800	0.106	0.113	0.106	0.111	0.129	0.198
1 : 25 600	0.103	0.107	0.109	0.127	0.163	0.206

2.3 LNP-dUTPase mRNA 免疫小鼠血清效价的测定

使用 LNP-dUTPase mRNA 免疫小鼠，每 2 周肌肉内注射 100 ng，四免后眼眶采血分离血清测定血清中多克隆抗体效价。将小鼠血清倍比稀释至 1：32 000 作为 ELISA 一抗，结果如图 2 所示，1 号小鼠血清中抗 dUTPase 多克隆抗体效价最高，大于 1：4 000。

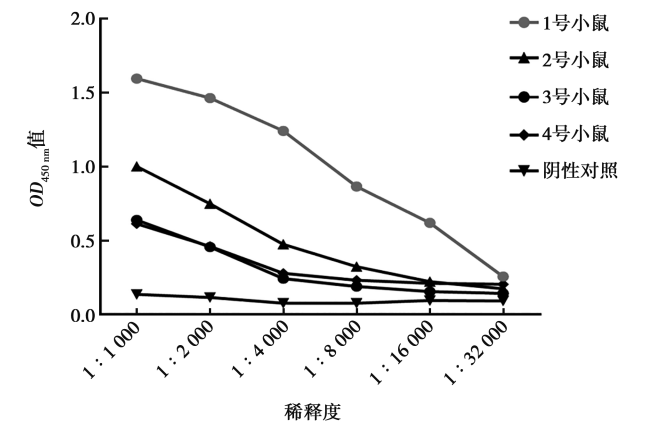


图 2 多克隆抗体血清效价测定

2.4 多克隆抗体的 Western blot 鉴定

将 4 次免疫后获得的多抗血清作为一抗，对 MAC-T、BHK21 细胞过表达 dUTPase 的细胞样品进行 Western blot 鉴定。结果显示：所获得的多抗能够特异性识别 MAC-T 细胞中过表达的 dUTPase mRNA，质粒转染的 dUTPase 及密码子优化后的 dUTPaseOP，条带大小约 18 kDa，与标签抗体阳性对照一致（图 3A、B）

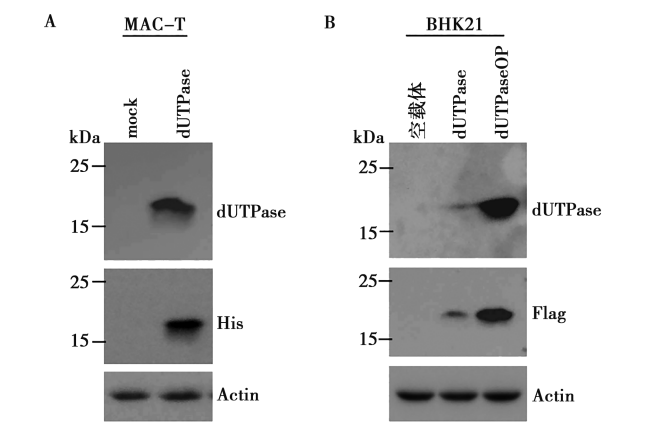


图 3 多克隆抗体的 Western blot 鉴定

2.5 多克隆抗体的 IFA 鉴定

分别使用本试验制备的抗 dUTPase 多克隆抗体与

抗 His 多克隆抗体作为一抗，对过表达 dUTPase 的 MAC-T 进行 IFA 检测。如图 4 所示，与空白对照相比，多克隆抗体组呈现特异性绿色荧光，其荧光定位与 His 阳性对照组一致，主要分布于细胞质。试验结果表明该多克隆抗体适用于 IFA 检测。

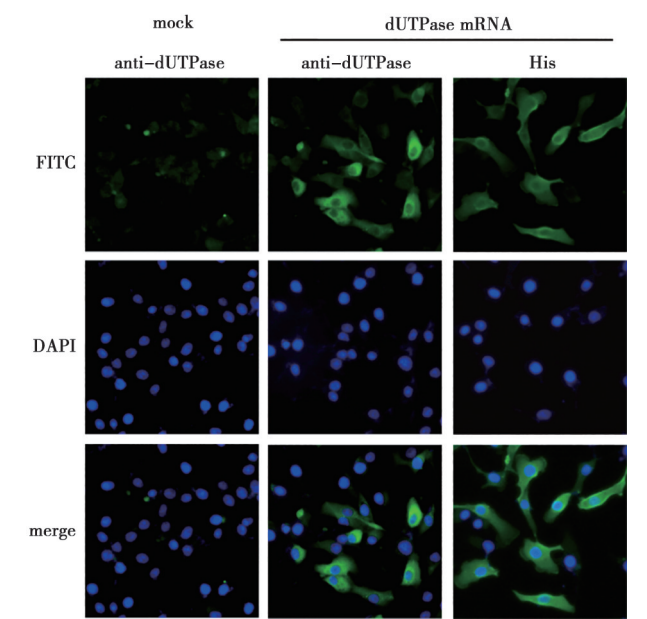


图 4 多克隆抗体的 IFA 鉴定（200×）

3 讨论

LSD 目前已形成全球性流行态势，我国自 2019 年起疫情已波及多个省市，防控形势严峻^[1-2]。当前以疫苗预防为主的 LSD 防控体系仍然面临免疫保护效力不确定与病毒重组进化的风险^[14-15]。LSDV 编码蛋白的功能解析将为新型防控策略的开发提供理论依据。

dUTPase 广泛存在于自然界生物中，作为维持基因组完整性的关键酶，其基础功能是催化 dUTP 水解为 dUMP 和焦磷酸盐，既防止尿嘧啶错误掺入 DNA 链，又为胸腺嘧啶合成提供前体物质^[10]。在病毒系统中，dUTPase 的功能呈现显著差别。部分病毒，如鼠巨细胞病毒、锦鲤疱疹病毒、蛙虹彩病毒等 dUTPase 对病毒复制无显著影响^[16-19]，而人类免疫缺陷病毒（HIV）等依赖其酶活性增强病毒复制能力^[20]。此外，人巨细胞病毒的 dUTPase 类似基因 UL82 编码的 dUTPase 无酶活性，但可通过与 RNA 输出因子 Rae1 互作，参与病毒的核质转运，增强病毒感染能力^[21]；人类疱疹病毒 EB 病毒 BLLF3 编码的 dUTPase 可通过激活活化素 A/IL-21 信号轴促进病毒潜伏感染^[22]。亦有研究揭示，病毒编码 dUTPase 也能参与病毒免疫逃逸过程，如 α-疱疹病毒编码的

dUTPase UL50 可加速溶酶体降解 IFNAR1^[23]; 山羊关节炎脑炎病毒 dUTPase 通过抑制 IRF3 信号通路下调 IFN- β 表达^[24]; 禽流感病毒 FAdV-9 ORF1 编码的 dUTPase 则通过调控 I 型干扰素应答影响宿主免疫反应强度^[25]。这些研究结果充分体现了病毒 dUTPase 功能的物种特异性。

综上, 本研究创新性采用 mRNA-LNP 递送系统成功合成 LNP-dUTPase mRNA, 并成功制备抗 dUTPase 多克隆抗体。经验证, 该抗体在 Western blot 与 IFA 检测中表现出优异特异性, 为深入探究 LSDV dUTPase 蛋白的分子功能及其在病毒感染中的作用机制奠定了重要的试验基础。

参考文献:

- [1] SUDHAKAR S B, MISHRA N, KALAIYARASU S, et al. Lumpy skin disease (LSD) outbreaks in cattle in *Odisha state*, India in August 2019: epidemiological features and molecular studies [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2020, 67 (6): 2408-2422.
- [2] TURAN N, YILMAZ A, TEKELIOGLU B K, et al. Lumpy skin disease: global and Turkish perspectives [J]. *Appro Poult Dairy & Vet Sci*, 2017. DOI: 10.31031/APDV. 2017.01.000504.
- [3] WHITTLE L, CHAPMAN R, WILLIAMSON A L. Lumpy skin disease—an emerging cattle disease in Europe and Asia [J]. *Vaccines*, 2023, 11 (3): 578.
- [4] 陈晓军, 李晔虎. 牛结节性皮肤病的诊断及防控 [J]. *畜牧兽医杂志*, 2023, 42 (4): 122-124.
- [5] TULMAN E R, AFONSO C L, LU Z, et al. Genome of lumpy skin disease virus [J]. *J Virol*, 2001, 75 (15): 7122-7130.
- [6] TUPPURAINEN E, DIETZE K, WOLFF J, et al. Review: vaccines and vaccination against lumpy skin disease [J]. *Vaccines*, 2021, 9 (10): 1136.
- [7] ABUTARBUSH S M, TUPPURAINEN E S M. Serological and clinical evaluation of the Yugoslavian RM65 sheep pox strain vaccine use in cattle against lumpy skin disease [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2018, 65 (6): 1657-1663.
- [8] WOLFF J, MORITZ T, SCHLOTTAU K, et al. Development of a safe and highly efficient inactivated vaccine candidate against lumpy skin disease virus [J]. *Vaccines*, 2020, 9 (1): 4.
- [9] 陈巧林, 任宏伟, 茹炳根. dUTP 焦磷酸酶研究进展 [J]. *生命的化学*, 2002, 22 (4): 356-359.
- [10] ARIZA M E, COX B, MARTINEZ B, et al. Viral dUTPases: modulators of innate immunity [J]. *Biomolecules*, 2022, 12 (2): 227.
- [11] FERROZ H, KWON H, PENG J, et al. Improving extraction and post-purification concentration of membrane proteins [J]. *Analyst*, 2018, 143 (6): 1378-1386.
- [12] NIAZI S K, NIAZI S K. Affordable mRNA novel proteins, recombinant protein conversions, and biosimilars: advice to developers and regulatory agencies [J]. *Biomedicines*, 2025, 13 (1): 97.
- [13] XU S, YANG K, LI R, et al. mRNA vaccine era—mechanisms, drug platform and clinical prospect [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (18): 6582.
- [14] HAMDI J, BOUMART Z, DAOUAM S, et al. Development and evaluation of an inactivated lumpy skin disease vaccine for cattle [J]. *Vet Microbiol*, 2020, 245: 108689.
- [15] SPRYGIN A, PESTOVA Y, BJADOVSKAYA O, et al. Evidence of recombination of vaccine strains of lumpy skin disease virus with field strains, causing disease [J]. *PLoS One*, 2020, 15 (5): e0232584.
- [16] PEI Y, CORREDOR J C, KRELL P J, et al. Fowl adenovirus 9 ORF19 a lipase homolog, is nonessential for virus replication and is suitable for foreign gene expression [J]. *Virus Res*, 2019, 260: 129-134.
- [17] SCHRÖDER L, KLAFAK S, BERGMANN S M, et al. Generation of a potential koi herpesvirus live vaccine by simultaneous deletion of the viral thymidine kinase and dUTPase genes [J]. *J Gen Virol*, 2019, 100 (4): 642-655.
- [18] ZHAO Z, KE F, GUI J, et al. Characterization of an early gene encoding for dUTPase in *Rana grylio* virus [J]. *Virus Res*, 2007, 123 (2): 128-137.
- [19] WARD T M, WILLIAMS M V, TRAINA-DORGE V, et al. The Simian Varicella virus uracil DNA glycosylase and dUTPase genes are expressed *in vivo*, but are non-essential for replication in cell culture [J]. *Virus Res*, 2009, 142 (1-2): 78-84.
- [20] GOPAL S, PEREZ E Jr, XIA A Y, et al. Murine cytomegalovirus M72 promotes acute virus replication *in vivo* and is a substrate of the TRiC/CCT complex [J]. *Virology*, 2018, 522: 92-105.
- [21] EBERHAGE J, BRESCH I P, RAMANI R, et al. Crystal structure of the tegument protein UL82 (pp71) from human cytomegalovirus [J]. *Protein Sci*, 2024, 33 (3): e4915.
- [22] WILLIAMS M V, MENA-PALOMO I, COX B, et al. EBV dUTPase: a novel modulator of inflammation and the tumor microenvironment in EBV-associated malignancies [J]. *Cancers*, 2023, 15 (3): 855.
- [23] ZHANG R, XU A, QIN C, et al. Pseudorabies virus dUTPase UL50 induces lysosomal degradation of type I interferon receptor 1 and antagonizes the alpha interferon response [J]. *J Virol*, 2017, 91 (21): e01148-e01117.
- [24] SHI J, LI X, ZHU M, et al. The dUTPase of caprine arthritis-encephalitis virus negatively regulates interferon signaling pathway [J]. *Iran J Vet Res*, 2021, 22 (3): 209-216.
- [25] DENG L, GRIFFIN B D, PEI Y, et al. Fowl aviadenovirus 9 dUTPase plays a role in regulation of the host immune response [J]. *Viral Immunol*, 2017, 30 (9): 662-670.