

王彦伟, 岳亚男, 张素玲, 等. 非洲猪瘟病毒 C129R 蛋白与 E165R 蛋白的可溶性表达、胞外酶活力测定与结构预测分析 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (7): 52-57.

WANG Y W, YUE Y N, ZHANG S L, et al. Soluble expression, extracellular enzyme activity and structure prediction of C129R and E165R proteins of African swine fever virus [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (7): 52-57.

非洲猪瘟病毒 C129R 蛋白与 E165R 蛋白的可溶性表达、胞外酶活力测定与结构预测分析

王彦伟^{1,2#}, 岳亚男^{1,2#}, 张素玲^{1,2}, 李欢欢^{1,2}, 陈赵媛^{1,2},
刘月月^{1,2}, 逢文强^{1,2*}, 田克恭^{1,2*}

(1. 国家兽用药品工程技术研究中心, 河南 洛阳 471000; 2. 普莱柯生物工程股份有限公司, 河南 洛阳 471000)

摘要: C129R 和 E165R 分别是非洲猪瘟病毒 (ASFV) 基因组编码的一种 Mn 依赖的超氧化物歧化酶和尿嘧啶脱氧核糖核苷三磷酸酶, 2 种酶均参与 ASFV 的复制过程。通过研究 ASFV C129R 蛋白与 E165R 蛋白的功能, 以指导非洲猪瘟的诊断及免疫预防研究。对 ASFV SY-18 株的 C129R 和 E165R 基因序列进行密码子优化后, 利用大肠杆菌进行表达, 纯化后获得重组蛋白, 通过 Western blot 鉴定其反应性, 并对其胞外酶活力进行测定, 对 C129R 蛋白的结构预测结果进行分析。结果: 实现了 C129R 蛋白与 E165R 蛋白的可溶性表达, 重组蛋白分子量分别约为 15 kDa 和 18 kDa, Western blot 显示 C129R 与 E165R 蛋白均能与 ASFV 阳性血清产生特异性反应; 胞外酶活力测定显示, C129R 与 E165R 蛋白在胞外均有酶学活性, 比酶活力分别为 (60.2±3.8) U/mg 和 (32.6±2.4) U/mg; 蛋白质结构预测结果显示, C129R 为双结构域蛋白, 主要由 N 端 α 螺旋结构域和 C 末端 α/β 结构域组成, C129R 蛋白 N 端 α 螺旋结构域和 C 末端 α/β 结构域的交界处可能是其主要活性位点, 序列保守的 β -折叠桶 (K₃₂~A₁₀₁) 可能在其发挥功能时起重要作用。

关键词: 非洲猪瘟病毒; C129R 蛋白; E165R 蛋白; 可溶性表达; 酶学活性; 结构预测

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2024)07-0052-06

Soluble expression, extracellular enzyme activity and structure prediction of C129R and E165R proteins of African swine fever virus

WANG Yanwei^{1,2#}, YUE Ya'nan^{1,2#}, ZHANG Suling^{1,2}, LI Huanhuan^{1,2}, CHEN-ZHAO Yuan^{1,2},
LIU Yueyue^{1,2}, PANG Wenqiang^{1,2*}, TIAN Kegong^{1,2*}

(1. National Research Center for Veterinary Medicine, Luoyang 471000, China;

2. Pulike Bioengineering Co., Ltd., Luoyang 471000, China)

Abstract: C129R is a Mn dependent superoxide dismutase encoded by the African swine fever virus (ASFV) genome, and E165R is a uridine deoxyribonucleoside triphosphate encoded by the ASFV genome, both of which are involved in the replication of ASFV. In order to study the extracellular functions of the C129R protein and E165R protein of ASFV, and to guide the diagnostic method and immunoprophylactic research of ASFV. In order to detect the functions of the C129R protein and E165R protein of African swine fever virus (ASFV), and to guide the diagnostic method for and immunoprophylactic research on ASFV. Codon optimization was executed on the sequences of C129R and E165R of ASFV SY-18, and the recombinant protein were expressed in *Escherichia coli* and purified. Then, the reactions of C129R and E165R were identified using Western blot and their extracellular enzyme activity was measured. Finally, the structure of C129R was predicted and analyzed, and soluble expression of the C129R and E165R proteins was achieved, with recombinant protein molecular weights of approximately 15 kDa and approximately 18 kDa, respectively. Western blot showed that C129R protein and E165R could produce specific reactions with ASFV positive serum. The determination of extracellular enzyme activity showed that both C129R and E165R had extracellular enzymatic

收稿日期: 2023-05-18; 修回日期: 2024-04-19

基金项目: 洛阳市重大科技专项 (1901029A)

第一作者: 王彦伟, 男, 硕士; 岳亚男, 女, 硕士。*共同第一作者

*通信作者: 逢文强, 高级工程师, 主要从事动物疫病诊断与防控技术研究, E-mail: pangwq123@hotmail.com; 田克恭, 教授, 主要从事动物疫病诊断与防控技术研究, E-mail: vetvac@126.com。

activity, with specific enzyme activity of (60.2±3.8) U/mg and (32.6±2.4) U/mg, respectively. The structural prediction result of C129R showed that it was a dual domain protein, mainly composed of the N-terminal α domain and C-Terminal α/β domain. The junction of the C129R N-terminal α domain and C-Terminal α/β domain might be the main active site, and conservative β bucket ($K_{32}-A_{101}$) might play an important role in its function. This study laid a foundation for the diagnosis and immunoprophylaxis of ASFV.

Keywords: African swine fever virus; C129R; E165R; soluble expression; enzymatic activity; structural prediction

非洲猪瘟 (African swine fever, ASF) 是由非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 引起猪的一种急性、热性、高度传染性疾病, 对养猪业危害巨大, 世界动物卫生组织 (WOAH) 将其列为必须报告的动物疫病之一, 我国将其列为一类动物疫病^[1]。ASFV 是唯一一种虫媒传播的 DNA 病毒^[2], 主要感染家猪和野猪, ASF 暴发后可对养猪业造成毁灭性的危害。目前非洲猪瘟尚缺乏有效的疫苗, 主要以加强检疫检测、严防病毒侵入为主, 对暴发地区则只能迅速封锁防疫区、扑杀感染动物, 直至彻底根除疫病^[3-4]。

ASFV 是一种具有囊膜的双股 DNA 病毒, ASFV 颗粒为多层结构颗粒, 包含基因组核心, 向外依次是内脂质囊膜, 二十面体衣壳和外脂质囊膜, 基因组长度在 170~193 kb 之间, 包含 151~167 个开放阅读框, 可编码 150~200 种蛋白质, 其中 50 多种为结构蛋白^[5-6]。C129R 为 ASFV 编码的一种 Mn 依赖的超氧化物歧化酶 (SOD), 理论分子量大小为 15 kDa 左右^[7]。SOD 是生物体内的一种抗氧化金属酶, 能够催化超氧阴离子自由基歧化生成氧和过氧化氢, 在机体氧化与抗氧化平衡中至关重要^[8-9]。按照 SOD 中金属辅基的不同, 大致可将 SOD 分为 3 大类, 分别为 Cu/Zn-SOD、Mn-SOD 和 Fe-SOD^[10]。病毒的 SOD 可能参与调节宿主的细胞功能。结节性皮肤病病毒 (LSDV) 中的 SOD 同系物可以诱导细胞凋亡, 又能抑制喜树碱诱导的细胞凋亡^[11], 而 LSDV 中 SOD 同源物的缺失则会降低病毒在牛肾细胞 (MDBK) 和 CAM 上的生长^[12]。SOD 通常是双结构域蛋白, 主要由 N 端 α 螺旋结构域和 C 末端 α/β 结构域组成^[13]; 目前已经解析出 4 个不同物种的 Mn-SOD 晶体结构, 均显示为双结构域蛋白, 活性位点位于 N 端 α -螺旋结构域和 C 末端 α/β 结构域的交界处^[14-17]。

E165R 为 ASFV 编码的一种尿嘧啶脱氧核糖核苷三磷酸酶 (dUTPase), 参与核苷酸代谢过程, 为病毒复制提供能量。E165R 是一种三聚体, 且高度特异, 在感染的早期和晚期都有表达, 并定位于感染细胞的细胞质中。E165R-dUMP 复合物的晶体结构证实了 E165R 具有焦磷酸酶活性, 可以将 dUTP 降解为 dUMP 和焦磷酸, 与 dUMP 形成氢键的基序 II 中的 S72、基序 III 的 D91 和基序 IV 的 Q120 在不同种类

dUTPase 中高度保守^[18-19]。E165R 的单抗研究表明, ASFV dUTPase 的基序 V 中存在一个特异性的抗体结合抗原表位, 针对该表位的单抗仅识别 ASFV dUTPase, 而不识别猪的 dUTPase^[20], 可能是潜在的 ASFV 抗体药物开发的靶点之一。

本研究通过大肠杆菌表达系统实现了 ASFV C129R 与 E165R 蛋白的可溶性表达与纯化, 对蛋白的免疫原性和胞外酶活力进行了初步的探究, 预测了 C129R 蛋白的三级结构, 并初步推测出其发挥功能的主要活性位点与保守区域, 为 ASF 的诊断和免疫预防研究奠定了一定的基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大肠杆菌 Trans1-T1 与 2×TransStart FastPfu PCR SuperMix (-dye) 高保真 DNA 聚合酶购自北京全式金生物技术股份有限公司; BL21 (DE3) 感受态细胞和质粒提试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司; pET28a 载体由本实验室保藏; 引物及基因序列合成和测序工作均由苏州金唯智生物科技有限公司完成; T4 DNA 连接酶和限制性内切酶均购自赛默飞世尔科技公司; Ni Sepharose 6 Fast Flow 购自 GE 公司; ASF 阳性参考血清购自欧洲非洲猪瘟参考实验室 (Centro de Investigación en Sanidad Animal, CISA-INIA, Madrid, Spain); HRP 标记的羊抗猪 IgG 购自 Sigma 公司; dUTP 购自 Promega 公司; SOD 活性检测试剂盒购自北京盒子生工科技有限公司; BCA 蛋白定量测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。

1.2 基因合成与表达载体构建

C129R 与 E165R 序列来自 GenBank 中 ASFV SY-18 毒株全基因序列 (GenBank: MH766894.1), C129R 基因序列全长 390 bp, 编码 129 个氨基酸, 预测分子量为 15.0 kDa, E165R 基因序列全长 498 bp, 编码 165 个氨基酸, 预测分子量为 18.3 kDa。运用在线软件 (<https://www.genscript.com/tools/gensmart-codon-optimization>) 分别对 C129R 与 E165R 基因序列进行大肠杆菌密码子优化, 优化后的基因序列由苏州金唯智生物科技有限公司合成, 以合成的序列为模板, 设计相应的 PCR 引物 (表 1) 用于目的片段的

PCR 扩增。PCR 反应程序为：95 °C 预变性 5 min；95 °C 变性 20 s，56 °C 退火 20 s，72 °C 延伸 30 s，共进行 32 个循环；72 °C 终延伸 7 min。PCR 产物经胶回收后与 pET28a 空载体经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切后回收，回收产物由 *T4* DNA 连接酶 16 °C 过夜连接，

然后转化 Trans1-T1 感受态细胞，并在卡那霉素抗性平板上筛选阳性克隆，质粒双酶切验证正确后，将质粒进行送测验证，验证正确的表达载体分别命名为 pET28a-C129R 和 pET28a-E165R。

表 1 C129R 与 E165R 基因扩增引物及序列

引物名称	引物序列 (5'→3')
C129R-F	GGAATTCCATATGGAACACCCGTCTACC (下划线为 <i>Nde</i> I 酶切位点)
C129R-R	CCGCTCGAGTTAACGGATTTAGAAGC (下划线为 <i>Xho</i> I 酶切位点)
E165R-F	GGAATTCCATATGCTACCAACTTCTTC (下划线为 <i>Nde</i> I 酶切位点)
E165R-R	CCGCTCGAGTTAGTACGCATGATACC (下划线为 <i>Xho</i> I 酶切位点)

1.3 表达菌株的构建及目的蛋白的表达

将表达载体 pET28a-C129R 和 pET28a-E165R 分别转化 BL21 (DE3) 感受态细胞，涂布卡那霉素抗性平板，37 °C 培养过夜，平板上的单克隆菌落即为相应的目的蛋白表达菌株。挑选相应抗性平板上的单克隆接种 LB 培养基，37 °C、220 r/min 过夜培养以制备种子液，种子液按 1 : 100 的比例接种摇瓶，37 °C 震荡培养至菌体 OD_{600} 为 0.6 ~ 1.0，降温至 28 °C 后，添加终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导目的蛋白的表达。诱导 14 h 后 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体，菌体按 1 : 20 (质量/体积) 的比例用 Buffer1 (20 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, pH = 7.0) 重悬，高压均质机破碎菌体，离心收集上清液和沉淀，然后通过 SDS-PAGE 检测蛋白表达情况。

1.4 目的蛋白的纯化和鉴定

菌体破碎上清液加入终浓度 20 mmol/L 的咪唑，经 0.45 μm 滤器过滤后用蛋白层析纯化系统进行层析纯化。层析介质为 Ni Sepharose 6 Fast Flow，收集洗脱产物，洗脱产物经 SDS-PAGE 检测后，进一步用 Western blot 进行鉴定。蛋白经 SDS-PAGE 后，转印至 NC 膜，分别将 ASFV 阴性血清和 ASFV 阳性血清用封闭液 1 : 1 000 稀释后，室温孵育 2 h，以羊抗猪 HRP IgG 为二抗，进行 Western blot 显色分析，鉴定目的蛋白 C129R 与 E165R 与 ASFV 阳性血清的反应结果。

1.5 酶活力测定

亲和层析纯化后的蛋白进行透析，用 BCA 法定量蛋白浓度，再进行相关酶活力的测定。C129R 蛋白酶活单位定义及测定严格按 SOD 活性检测试剂盒的标准操作步骤进行。E165R 蛋白酶活定义与测定参照刘振勇测定 dUTPase 方法进行^[21]，首先绘制焦磷酸盐的标准曲线，之后将蛋白与底物 dUTP 混合，并添加终浓度为 2 mmol/L $MgCl_2$ 后 37 °C 水浴反应 1 h，终止反应，测定 575 nm 的光吸收值。C129R 蛋

白与 E165R 蛋白的酶活力分别单独进行 3 次测定，并利用 SPSS 统计软件进行数据统计分析，数据以“平均数 ± 标准差”表示。阳性对照 (NC) 为透析液。

1.6 三级结构预测与分析

根据 C129R 氨基酸序列，利用 Alphafold2 蛋白质结构预测网站 (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb#scrollTo=UGUBLzB3C6WN>) 预测 C129R 蛋白的三级结构，预测结果利用 PyMOL 进行分析。E165R 的晶结构已被解析^[18]，因此本文未再进行预测。

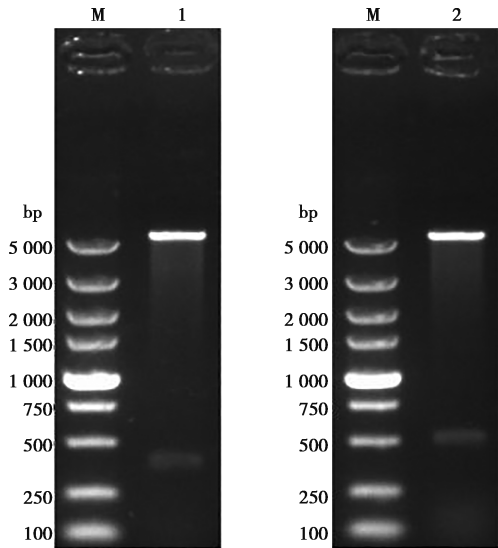
1.7 同源序列比对分析

在 NCBI 中 BLAST 分析 C129R 氨基酸序列，利用 Clustal W (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) 在线软件进行 C129R 蛋白的同源序列比对，选择基因 I 型 BA71V 株的 C129R 序列 (GenBank: YP_009702796.1)、基因 II 型 Georgia 2007 株的 C129R 序列 (GenBank: FR682468.2) 和鲍鱼非洲猪瘟样病毒 (Abalone asfa-like virus, AbALV) 的 C129R 同源蛋白序列 (GenBank: BCY04552.1)，并用 ESPript 3.0 (<http://esprict.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>) 在线软件对对比结果进行分析。

2 结果

2.1 表达载体的构建

利用 *Nde* I 和 *Xho* I 内切酶对 PCR 扩增后的目的片段和 pET28a 载体进行双酶切，酶切产物连接后转化 Trans1-T1 感受态细胞，挑选不同的单克隆菌落培养后提取质粒进行酶切鉴定，初步筛选阳性克隆。酶切结果显示 (图 1)，与 C129R 片段连接后的载体可见 400 bp 左右的片段，与 E165R 片段连接后的载体可见 500 bp 左右的片段。将酶切鉴定为阳性的载体送测序，结果显示重组载体核酸序列与预期一致，表达载体构建成功。

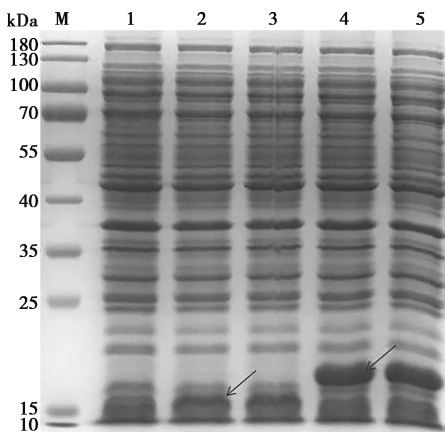


M. DNA Marker; 1. pET28a-C129R 双酶切产物;
2. pET28a-E165R 双酶切产物。

图1 pET28a-C129R 和 pET28a-E165R 双酶切鉴定

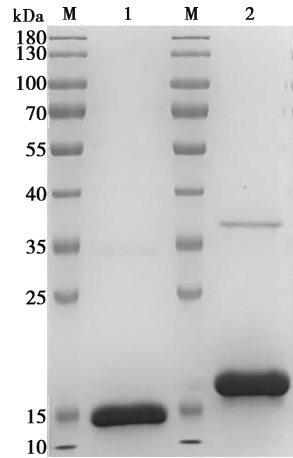
2.2 蛋白的表达与纯化

将验证正确的载体 pET28a-C129R 和 pET28a-E165R 分别转化 BL21 (DE3) 感受态细胞进行摇瓶发酵, 以验证蛋白的表达情况。SDS-PAGE 检测结果显示 (图 2), C129R 和 E165R 蛋白在破碎上清液中都有明显的表达, 蛋白大小分别为 15 和 18 kDa 左右, 与理论的蛋白分子量相符。采用镍柱亲和层析的方法分别对上清液中可溶形式表达的 C129R 和 E165R 蛋白进行纯化。纯化结果显示 (图 3), 蛋白 C129R 与 E165R 经镍柱亲和层析均可获得较高纯度的目的蛋白。



M. 蛋白质 Marker; 1. 阴性对照; 2. 诱导后 C129R 菌体裂解液;
3. 诱导后 C129R 菌体裂解液上清液; 4. 诱导后 E165R 菌体裂解液;
5. 诱导后 E165R 菌体裂解液上清液。

图2 重组蛋白 C129R 和 E165R 表达后的 SDS-PAGE 分析

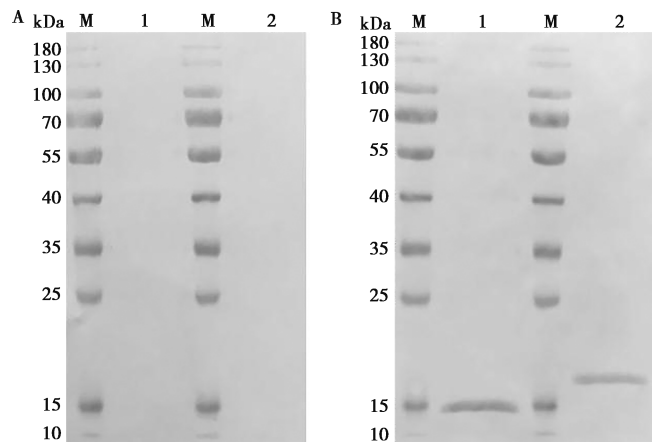


M. 蛋白质 Marker; 1. 纯化的重组 C129R 蛋白; 2. 纯化的重组 E165R 蛋白。

图3 纯化的重组 C129R 蛋白和 E165R 蛋白 SDS-PAGE 分析

2.3 Western blot 鉴定

对纯化后 C129R 与 E165R 蛋白进行 Western blot 鉴定, 结果显示 (图 4), 纯化后的 C129R 蛋白在 15 kDa 处可鉴定出 1 条明显的特异性条带, E165R 蛋白在 18 kDa 处可鉴定出 1 条明显的特异性条带, E165R 在 SDS-PAGE 检测时出现的约 37 kDa 大小处条带未显现出来, 说明此条带为杂蛋白。Western blot 鉴定结果表明纯化后 C129R 与 E165R 蛋白均能与 ASFV 阳性血清产生特异性反应, 具有良好的反应原性。



M. 蛋白质 Marker; 1. 纯化的重组 C129R 蛋白; 2. 纯化的重组 E165R 蛋白。

图4 重组蛋白分别与阴性血清 (A) 和阳性血清 (B) 的 Western blot 分析

2.4 酶活力的测定

对纯化后 C129R 与 E165R 蛋白进行体外酶活力

高度保守；而与 AbALV C129R 同源蛋白序列的对比结果发现，序列保守的 β -折叠桶 ($K_{32} \sim A_{101}$) 可能在 C129R 蛋白功能中发挥重要作用；loop1 区 ($K_{18} \sim K_{25}$) 被预测位于 N 端结构域的 2 个 α 螺旋交接处，可能影响 C129R 的活性位点，其单抗可能抑制病毒的复制。

E165R 是一种 dUTPase，是 ASFV 相关治疗的重要靶蛋白。dUTPase 可被多种分子靶向，通过与底物竞争酶催化位点来抑制酶的活性，从而影响病毒在细胞中的复制^[22]。目前已有结合与抑制 dUTPase 的抗体被用于对抗 EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 感染^[23-24]，此研究发现 E165R 蛋白具有一定的胞外酶催化活性，进一步印证了其在 ASFV 亚单位疫苗开发及相关诊断、治疗试剂研究方面具有巨大的潜力。

综上，本研究通过原核表达系统实现了 C129R 与 E165R 的可溶性表达。2 种蛋白均能够与 ASFV 阳性血清反应，表明 ASFV 感染猪产生的抗体能够特异性识别 C129R 与 E165R 抗原蛋白，证明利用大肠杆菌产生 C129R 与 E165R 蛋白可以作为候选抗原蛋白用于 ASFV 的相关研究。本研究还对 C129R 和 E165R 蛋白的功能进行了初步的探索，显示 C129R 和 E165R 都有体外的酶催化活性，同时预测了 C129R 蛋白的三级结构，并对其序列进行同源性比对分析，预测其发挥功能的活性位点，为 ASF 的诊断和免疫预防研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 王功民, 田克恭. 非洲猪瘟 [M], 北京: 中国农业出版社, 2010.
- [2] 王彦伟, 王孟月, 张素玲, 等. 非洲猪瘟病毒 pS273R 蛋白酶的可溶性表达与胞外活性鉴定 [J]. 病毒学报, 2020, 36 (5): 879-884.
- [3] 王涛, 孙元, 罗玉子, 等. 非洲猪瘟防控及疫苗研发: 挑战与对策 [J]. 生物工程学报, 2018, 34 (12): 1931-1942.
- [4] 何洋, 康桦华, 冯锈华, 等. 非洲猪瘟疫苗研究进展 [J]. 传染病信息, 2019, 32 (1): 76-80.
- [5] ALEJO A, MATAMOROS T, GUERRA M, et al. A proteomic atlas of the African swine fever virus particle [J]. J Virol, 2018, 92 (23): e01293-18.
- [6] TULMAN E R, DELHON G A, KU B K, et al. African swine fever virus [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2009, 328: 43-87.
- [7] DIXON L K, CHAPMAN D A G, NETHERTON C L, et al. African swine fever virus replication and genomics [J]. Virus Res, 2013, 173 (1): 3-14.
- [8] 徐靖. 超氧化物歧化酶及其应用的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2013, 34 (12): 387-391.
- [9] FUJII J, HOMMA T, OSAKI T. Superoxide radicals in the execution of cell death [J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11 (3): 501.
- [10] ZELKO I N, MARIANI T J, FOLZ R J. Superoxide dismutase multi-gene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression [J]. Free Radic Biol Med, 2002, 33 (3): 337-349.
- [11] MUNYANDUKI H, DOUGLASS N, OFFERMAN K, et al. Influence of the lumpy skin disease virus (LSDV) superoxide dismutase homologue on host transcriptional activity, apoptosis and histopathology [J]. J Gen Virol, 2020, 101 (6): 645-650.
- [12] DOUGLASS N, MUNYANDUKI H, OMAR R, et al. Influence of the viral superoxide dismutase (SOD) homologue on lumpy skin disease virus (LSDV) growth, histopathology and pathogenicity [J]. Vaccines (Basel), 2020, 8 (4): 664.
- [13] STALLINGS W C, PATTRIDGE K A, STRONG R K, et al. Manganese and iron superoxide dismutases are structural homologs [J]. J Biol Chem, 1984, 259 (17): 10695-10699.
- [14] BORGSTAHL G E, PARGE H E, HICKEY M J, et al. The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles [J]. Cell, 1992, 71 (1): 107-118.
- [15] LUDWIG M L, METZGER A L, PATTRIDGE K A, et al. Manganese superoxide dismutase from *Thermus thermophilus*: a structural model refined at 1.8 Å resolution [J]. J Mol Biol, 1991, 219 (2): 335-358.
- [16] PARKER M W, BLAKE C C. Crystal structure of manganese superoxide dismutase from *Bacillus stearothermophilus* at 2.4 Å resolution [J]. J Mol Biol, 1988, 199 (4): 649-661.
- [17] EDWARDS R A, BAKER H M, WHITTAKER M M, et al. Crystal structure of *Escherichia coli* manganese superoxide dismutase at 2.1-Å resolution [J]. J Biol Inorg Chem, 1998, 3: 161-171.
- [18] LI C, CHAI Y, SONG H, et al. Crystal structure of African swine fever virus dUTPase reveals a potential drug target [J]. mBio, 2019, 10 (5): e02483-19.
- [19] OLIVEROS M, GARCÍA-ESCUADERO R, ALEJO A, et al. African swine fever virus dUTPase is a highly specific enzyme required for efficient replication in swine macrophages [J]. J Virol, 1999, 73 (11): 8934-8943.
- [20] ZHANG S, WANG R, ZHU X, et al. Identification and characterization of a novel epitope of ASFV-encoded dUTPase by monoclonal antibodies [J]. 2021, Viruses, 13 (11): 2175.
- [21] 刘振勇. 猪囊尾蚴 dUTPase 的表达、活性分析及结构预测 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.
- [22] YOKOGAWA T, YANO W, TSUKIOKA S, et al. dUTPase inhibition confers susceptibility to a thymidylate synthase inhibitor in DNA-repair-defective human cancer cells [J]. Cancer Sci, 2021, 112 (1): 422-432.
- [23] LERNER A M, ARIZA M E, WILLIAMS M, et al. Antibody to Epstein-Barr virus deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase and deoxyribonucleotide polymerase in a chronic fatigue syndrome subset [J]. PLoS One, 2012, 7 (11): e47891.
- [24] WALDMAN W J, WILLIAMS M V Jr, LEMESHOW S, et al. Epstein-Barr virus-encoded dUTPase enhances proinflammatory cytokine production by macrophages in contact with endothelial cells: evidence for depression-induced atherosclerotic risk [J]. Brain Behav Immun, 2008, 22 (2): 215-223.