

谢立兰, 董珮玲. 猪传染性胃肠炎病毒 N 蛋白单克隆抗体的制备及其识别表位鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (12): 130-140.

XIE L L, DONG P L. Preparation of monoclonal antibodies against N protein of transmissible gastroenteritis virus of swine and its epitope identification [J].

Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (12): 130-140.

猪传染性胃肠炎病毒 N 蛋白单克隆抗体的制备及其识别表位鉴定

谢立兰^{1,2#}, 董珮玲^{2#}

(1. 湖北理工学院医学院肾脏疾病发生与干预湖北省重点实验室, 湖北 黄石 435003;

2. 武汉生物工程学院湖北省病毒载体工程技术研究中心, 湖北 武汉 430415)

摘要: 为解析猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV) N 蛋白的抗原表位并探究其亚细胞定位特性, 制备 N 蛋白单克隆抗体 (McAb)。通过原核表达系统制备 TGEV N 蛋白并纯化, 以其免疫 BALB/c 小鼠, 经细胞融合与亚克隆筛选获得稳定分泌抗 N 蛋白 McAb 的杂交瘤细胞株, 采用 Western blot 和间接免疫荧光 (IFA) 鉴定 McAb 的特异性, 构建 N 基因截短突变体质粒, 通过 IFA 鉴定抗原表位, 同时利用 McAb 动态观察 N 蛋白的亚细胞定位。结果: 成功获得高特异性 McAb 2F10 (腹水效价 2^{13}), 该抗体能特异识别 TGEV N 蛋白; 截短突变体分析鉴定出 N 蛋白 255~265 aa 区域为新的线性 B 细胞表位, 结构分析显示该表位位于 N 蛋白表面; 亚细胞定位研究显示, TGEV 感染 PK-15 细胞后, N 蛋白在感染早期 (2~6 h) 主要定位于细胞核内呈点状分布, 8 h 后部分转移至细胞质, 10 h 时主要分布于细胞质, 呈核质穿梭特性。综上, 本研究成功制备了抗 TGEV N 蛋白单抗 2F10, 鉴定了位于 255~265 aa 的新线性表位, 并揭示了 N 蛋白的核质穿梭规律, 为 TGEV 感染的诊断及 N 蛋白研究提供工具。

关键词: 猪传染性胃肠炎病毒; 核衣壳蛋白; 单克隆抗体; 抗原表位; 亚细胞定位

中图分类号: S828

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2025)12-0130-11

Preparation of monoclonal antibodies against N protein of transmissible gastroenteritis virus of swine and its epitope identification

XIE Lilan^{1,2#}, DONG Peiling^{2#}

(1. Hubei Province Key Laboratory for Kidney Disease Pathogenesis and Intervention, School of Medicine, Hubei Polytechnic University, Huangshi 435003, China;

2. Hubei Province Engineering Research Center of Viral Vector, Wuhan Institute of Biological Engineering, Wuhan 430415, China)

Abstract: To further elucidate the antigenic epitopes of the nucleocapsid (N) protein of transmissible gastroenteritis virus of swine (TGEV) and investigate its subcellular localization properties, the TGEV N protein was expressed in a prokaryotic system, followed by purification. The purified protein was then used to immunize BALB/c mice. Hybridoma cell lines that stably secrete monoclonal antibodies (McAbs) against the N protein were generated through cell fusion and sub-cloning techniques. The specificity of these McAbs was validated using Western blot and indirect immunofluorescence assay (IFA). Additionally, the truncated mutants of the N gene were constructed, and the potential B-cell epitopes were mapped by IFA. The subcellular localization of the N protein was dynamically monitored by employing the generated McAbs. The results showed that a highly specific McAb, designated 2F10 (ascites antibody titer of 2^{13}), was successfully generated, which specifically recognized the TGEV N protein. The analysis of the truncated mutants identified a novel linear B-cell epitope located at amino acids 255-265 of the N protein. The structural analysis revealed that this epitope was surface-exposed. The subcellular localization studies showed that, following TGEV infection of the PK-15 cells, the N protein was predominantly localized in the nucleus with a punctate distribution at early time points (2-6 h post-infection), partially translocated to the cytoplasm at 8 h, and mainly distributed in the cytoplasm by 10 h, exhibiting a distinct nucleocytoplasmic shuttling behavior. In conclusion, this study successfully developed a monoclonal antibody (2F10) against the TGEV N protein, identified a novel linear epitope at residues 255-265, and revealed the dynamic nucleocytoplasmic

收稿日期: 2025-02-1; 修回日期: 2025-10-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31972692); 湖北理工学院校级科研项目 (24xjz31R)

第一作者: 谢立兰, 女, 博士; 董珮玲, 女, 硕士研究生。#为共同第一作者。

mic shuttling of the N protein during viral infection. These findings provided valuable tools for and insights into development of TGEV diagnostic assays and functional research on the N protein.

Keywords: transmissible gastroenteritis virus of swine; nucleocapsid protein; monoclonal antibody; antigenic epitope; subcellular localization

猪传染性胃肠炎病毒 (transmissible gastroenteritis virus, TGEV) 是猪肠道的致病性冠状病毒, 各年龄段猪均易感, 病猪主要表现为呕吐、水样腹泻以及脱水等临床症状^[1], 其中 2 周龄内仔猪的致死率高达 70%~100%。猪传染性胃肠炎 (TGE) 在世界范围内的流行严重阻碍了全球养猪业的发展^[2]。尽管 TGEV 的流行近年来因疫苗应用有所控制, 但与其猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 等冠状病毒的混合感染仍对防控提出挑战^[3]。因此, 开发高灵敏度的诊断工具, 仍是当前研究的重点方向。

TGEV 属于冠状病毒科成员, 病毒粒子呈球形或多边形, 直径为 80~200 nm, 具有囊膜结构^[4]。TGEV 的核衣壳 (N) 蛋白不仅具有高度序列保守性, 还能有效诱导宿主产生强烈的体液免疫应答, 在早期感染猪体内可刺激机体产生高水平特异性抗体, 因此猪场暴发大规模疫情时, TGEV N 蛋白可作为早期检测及诊断的理想靶抗原^[5-6]。然而, 针对 TGEV N 蛋白的高效单克隆抗体 McAb 制备及其表位鉴定研究较为有限。迄今仅有 2 项研究系统鉴定了 TGEV N 蛋白的抗原表位, 共报道 5 个特异性表位^[7-8]。

冠状病毒的 N 蛋白作为病毒结构蛋白中含量最丰富的组分, 在病毒基因组 RNA 的包装、复制及免疫逃逸中发挥关键作用^[9]。在病毒感染的细胞中, 不同冠状病毒 N 蛋白的亚细胞定位存在差异, 如传染性支气管炎病毒 (IBV) 的 N 蛋白可单独定位于细胞质, 或同时在细胞质与核仁共定位^[10], 而 SARS-CoV 的 N 蛋白主要分布于细胞质^[11]。对 TGEV N 蛋白的功能和亚细胞定位研究尚不够深入。

鉴于此, 本研究原核表达 TGEV N 蛋白, 并将其作为抗原免疫 BALB/c 小鼠, 通过细胞融合及亚克隆筛选技术制备 McAb 并鉴定表位, 利用该 McAb 检测 TGEV 感染细胞后 N 蛋白在细胞内的亚细胞定位, 为开发基于该表位的 TGEV 检测方法和 N 蛋白生物学特性研究提供了基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

TGEV WH-1 株, 猪肾上皮细胞 (PK-15), 骨髓瘤细胞 (SP2/0), 大肠杆菌 DH5 α 、BL21, 原核表达质粒 pET-28a-N (包含 N 基因全长, 位于 HQ462571.1 序列的 26 917~28 065 bp) 和真核表达

载体 pEGFP-N1, 保存于湖北省病毒载体工程技术研究中心。BALB/c 小鼠购自湖北省疾病预防控制中心实验动物中心。限制性内切酶购于宝生物工程 (大连) 有限公司。2 \times T5 Super PCR Mix (Colony) 购自北京擎科生物科技股份有限公司。DMEM、RPMI 1640 细胞培养基购自上海源培生物科技股份有限公司; 胎牛血清 (FBS)、EDTA-胰蛋白酶消化液购自 PAN 公司; ELISA 显色液购自上海碧云天生物技术有限公司; 羊抗鼠 IgG-HRP 购自武汉爱博泰克生物技术有限公司; Alexa Fluor 555 标记 (红色荧光) 驴抗小鼠抗体购自上海碧云天生物技术有限公司; CELL-BANKER2 细胞冻存液购自日本 ZENOAQ 公司。

1.2 重组蛋白的诱导表达

将 pET-28a-N 原核表达质粒转化到 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 挑取单菌落过夜培养, 取菌液按 1:100 的比例加入含相应抗生素的新鲜 LB 液体培养基中进行二次活化, 37 $^{\circ}$ C 200 r/min。当 OD_{600} 值在 0.6~0.8 之间时加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 22 $^{\circ}$ C 诱导表达 16 h; 将诱导后的菌液离心取菌体, 用 PBS 洗涤和重悬菌体沉淀后进行超声波破碎, 离心后收集上清液和沉淀, 通过 SDS-PAGE 鉴定目的蛋白的表达情况。同时设置空载诱导和重组未诱导组作为对照。

1.3 重组蛋白的大量表达与纯化

将重组蛋白大量诱导表达后, 采用切胶回收法纯化: 破碎菌体沉淀经变性 SDS-PAGE 后, 将凝胶置于 0.25 mol/L KCl 溶液中 4 $^{\circ}$ C 避光浸泡 5 min, 待目的蛋白条带 (泛白) 显影, 切下该条带并碾碎, 浸泡于 PBS 中; 接着将凝胶-PBS 混合液于 -20 $^{\circ}$ C 反复冻融 3 次, 4 $^{\circ}$ C、5 000 r/min 离心 5 min 取上清液, 即为纯化蛋白, 分装后保存于 -80 $^{\circ}$ C; 最后取适量纯化蛋白进行 SDS-PAGE, 经考马斯亮蓝染液染色观察, 验证纯化效果。

1.4 TGEV N 蛋白 McAb 的制备

1.4.1 小鼠免疫

选取 5 只 5 周龄 BALB/c 小鼠 (编号 1~5), 以纯化的重组 TGEV N 蛋白为抗原, 采用弗氏完全佐剂 (初次免疫) 与弗氏不完全佐剂 (加强免疫) 按适当比例乳化后, 通过皮下多点注射法进行免疫。初次免疫后, 每隔 2 周进行一次加强免疫, 共免疫 3 次。末次免疫后第 7~10 天, 通过眼眶采血法收集小鼠外周

血，静置凝固后于 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min，分离血清并分装保存于 -20 ℃ 备用。同时，取未免疫的 BALB/c 小鼠血清作为阴性对照。采用间接 ELISA 方法测定血清抗体效价，最后选取效价最高的 1 只小鼠进行 3 次加强免疫后进行细胞融合。

间接 ELISA 检测方法：将重组蛋白 (1 μg/mL) 包被酶标板，5% 脱脂奶粉封闭后，以梯度稀释的免疫血清 (1:100~1:12 800) 作为一抗，HRP 标记羊抗鼠 IgG 为二抗。TMB 显色后测定 450 nm 吸光度进行 ELISA 检测。

1.4.2 杂交瘤细胞融合及筛选

无菌分离免疫 BALB/c 小鼠的脾淋巴细胞，与 SP2/0 骨髓瘤细胞经 50% 聚乙二醇 (PEG) 介导融合后，采用 HAT/HT 选择性培养基体系进行克隆筛选。通过间接 ELISA 检测培养上清液的抗体效价，以 OD_{450} 值超过阴性对照 2 倍为阳性标准。阳性克隆经有限稀释法单克隆化培养至抗体分泌稳定性达标，最终建立单克隆杂交瘤细胞系并于液氮冻存。

1.4.3 腹水制备与纯化

经液体石蜡 (500 μL/只) 预处理的 BALB/c 小鼠，腹腔内接种阳性杂交瘤细胞 ($4 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个/只)，10~15 d 后采集腹水，经离心澄清后通过 ELISA 法评估腹水效价，经双滤纸过滤后采用 Protein G 亲和层析技术获得高纯度 McAb。

1.5 Western blot 鉴定

为了分析 McAb 的特异性，诱导 pET-28a-N 质粒表达重组 N 蛋白，同时设无关蛋白 Nsp14a (由质粒 pET-Nsp14a 经 IPTG 诱导表达) 作为阴性对照，再以鼠源抗 His 标签 McAb 或阳性单克隆株细胞上清液为一抗通过 Western blot 检测蛋白表达。另一方面，将 PK-15 细胞悬液接种于 6 孔细胞培养板，待细胞长至细胞孔的 80%~90% 时，以感染复数 (MOI) = 1 感染 TGEV WH-1 株。当有 70%~80% 的细胞病变后收取细胞蛋白质样品 (未感染 TGEV 的 PK-15 细胞作为阴性对照)。以病毒感染细胞表达的 N 蛋白作为

反应抗原，以阳性单克隆株细胞上清液为一抗通过 Western blot 检测蛋白表达。

Western blot 检测：收取的蛋白样品经 SDS-PAGE 分离后，采用恒压 100 V 转印至 PVDF 膜；转印完成后，将膜浸泡于封闭液 (含 5% 脱脂奶粉的 PBST) 中，室温封闭 2 h 或 4 ℃ 孵育过夜；封闭结束后，用上述相应一抗在相同条件下 (室温 2 h 或 4 ℃ 过夜) 孵育，随后用 PBST 缓冲液洗涤 3 次 (每次 10 min)，接着用 1:5 000 稀释的羊抗鼠 IgG-HRP 二抗孵育 2 h，最后经 PBST 洗涤 3 次后进行 Western blot 显影。

1.6 免疫荧光检测 (IFA)

以不同剂量 (0.01、0.1 或 1 MOI) 的 TGEV 感染 PK-15 细胞，12 h 后使用 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min，PBS 洗涤 3 次；随后加入 TritonX-100 进行通透，室温静置 10~15 min，再用 PBS 洗涤 3 次；接着使用封闭液进行封闭，室温或 37 ℃ 孵育 30~60 min，或 4 ℃ 过夜，PBS 洗涤 3 次；最后以所制备的 McAb 为一抗，Alexa Fluor 555 标记的驴抗小鼠抗体 (1:1 500 稀释，避光操作) 为二抗，进行 IFA。

1.7 抗原表位的鉴定

通过生物信息学软件 Primer 5.0 分析 TGEV N 蛋白的抗原表位，并基于此对该蛋白氨基酸序列进行系统性的截短设计引物，送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行合成引物 (表 1)。将各截短序列克隆至 pEGFP-N1 载体，构建不同片段大小的 TGEV N 蛋白截短突变体质粒，使用 *EcoR* I 和 *Xho* I 这 2 种限制性内切酶进行双酶切鉴定或参照 2×T5 Super PCR Mix (Colony) 试剂盒说明书进行菌落 PCR 鉴定，并经上海生工生物工程有限公司武汉测序部验证序列准确性。随后将测序正确的截短突变体转染到 PK-15 细胞中，进行真核表达。以制备的 McAb 为一抗，利用 IFA 鉴定。采用逐步截短策略，最终确定 McAb 所识别的特异性抗原表位。

表 1 PCR 扩增引物

引物	序列 (5'→3')	内切酶
GFP-N-F	TATCTCGAGGCCACCATGCGCAACAGGGACAACGT	<i>Xho</i> I
GFP-N-R	CGGGAATTCGGCCTCCGCTCCGTTTCGTTACCTCATCAATTAT	<i>EcoR</i> I
GFP-N-198R	ATAGAATTCGGCCTCCGCTCCAAAGTGGGCAAGAAGCAGCTG	<i>EcoR</i> I
GFP-N-199F	CCGCTCGAGGCCACCATGAAAAAGTTAGGTGTTGACACA	<i>Xho</i> I
GFP-N-330R	CGGGAATTCGGCCTCCGCTCCAGCATAGGCATTAATCTGCTG	<i>EcoR</i> I
GFP-N-331F	TATCTCGAGGCCACCATGCGTCCATCAGAAGTGCCAAA	<i>Xho</i> I
GFP-N-260R	TATGAATTCGGCCTCCGCTCCACCAAAATTGGCTGAAGTCTG	<i>EcoR</i> I

续表1

引物	序列 (5'→3')	内切酶
GFP-N-226F	CCGCTCGAGGCCACCATGGATACTACACCTAAGAATGAA	<i>Xho</i> I
GFP-N-280R	ATAGAATTTCGGCTCCGCCTCCACATTCAGCCAGTTGTGGGTA	<i>EcoR</i> I
GFP-N-250F	CCGCTCGAGGCCACCATGTATGGAGCTAGAAGCAGTTCA	<i>Xho</i> I
GFP-N-270R	ATAGAATTTCGGCTCCGCCTCCACTGCTCCCATTTGGCAACGAG	<i>EcoR</i> I
GFP-N-255F	CCGCTCGAGGCCACCATGAGTTCAGCCAATTTTGGTGAC	<i>Xho</i> I
GFP-N-265R	ATAGAATTTCGGCTCCGCCTCCAACGAGGTCAGTGTACACAAA	<i>EcoR</i> I

1.8 抗原表位的空间结构预测

利用 Phyre2 服务器 (<https://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 对全长 TGEV N 蛋白进行 3D 结构建模。下载生成的 3D 结构模型文件 (PDB 格式), 使用蛋白质结构可视化软件 (PyMOL) 打开并分析下载的 PDB 文件。在结构可视化软件中, 根据抗原表位的氨基酸位置信息, 定位表位在 3D 结构模型中的具体位置。

1.9 TGEV N 蛋白亚细胞定位的研究

以 1 MOI 的 TGEV 感染 PK-15 细胞, 分别于感染后 2、4、6、8 或 10 h 收集细胞样品, 参照 1.6 方法进行 IFA。

1.10 数据统计与分析

结果以“平均值 ± 标准差”表示, 组间差异的

显著性检验采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 TGEV N 蛋白的表达及纯化

SDS-PAGE 结果显示, 目的蛋白大小约为 47 kDa, 与预期结果相符 (图 1A), 表明成功表达重组 N 蛋白, 且 N 蛋白主要存在于上清液, 为可溶性蛋白。后续采用胶回收的方式纯化蛋白, SDS-PAGE 鉴定结果呈现单一条带, 说明得到了纯度较高的 N 蛋白 (图 1B)。

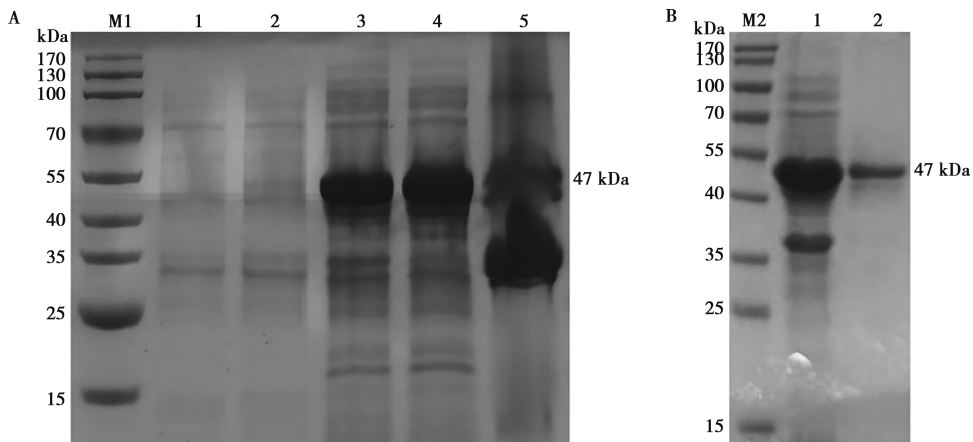


图 1 重组 TGEV N 蛋白的原核诱导表达及纯化

2.2 TGEV N 蛋白单克隆抗体的制备

为了获得 TGEV N 蛋白的单克隆抗体, 用纯化的重组 TGEV N 蛋白免疫 5 周龄的 BALB/c 小鼠。第 3 次免疫 1 周后, 采血, 参照间接 ELISA 方法检测血清中的抗体浓度。如图 2A 所示, 1 号小鼠的血清抗

体效价为 1 : 25 600, 达到了融合要求。取小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞进行细胞融合, 对抗体阳性孔进行连续 3 次亚克隆以及抗体滴度检测, 获得 1 株稳定分泌 TGEV N 蛋白抗体的特异性杂交瘤细胞 2F10 (图 2B), 并进行扩大培养和冻存。

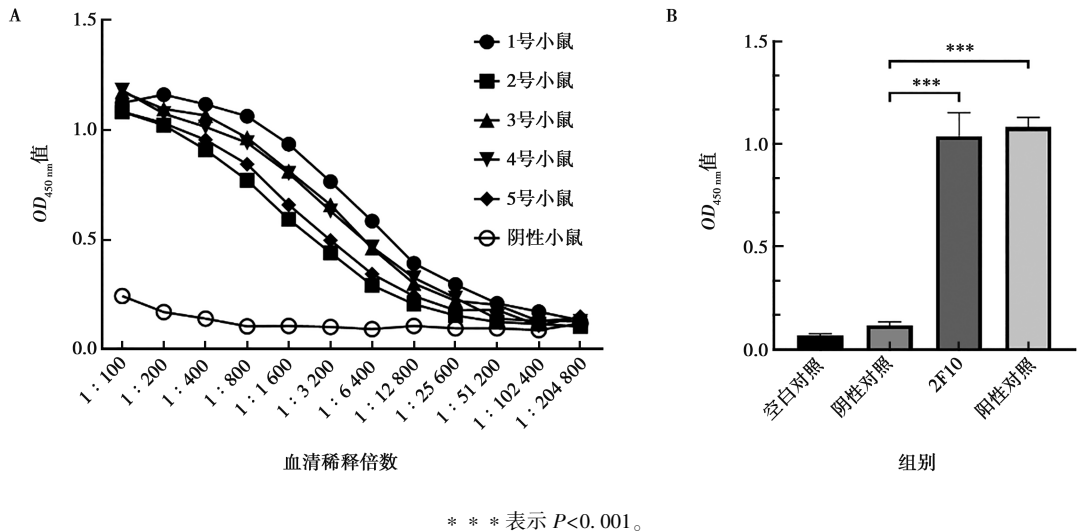
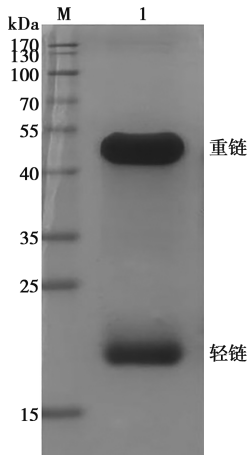


图2 免疫小鼠血清抗体效价的测定 (A) 和抗 TGEV N 蛋白 McAb 的筛选 (B)

通过诱生 BALB/c 小鼠腹水的方法制备了大量的 2F10 McAb, 并采用间接 ELISA 检测腹水的抗体滴度为 2¹³。使用 Protein G 填料纯化腹水, SDS-PAGE 可见经纯化后腹水杂带较少, 50 kDa 大小条带为重链, 20 kDa 大小条带为轻链, 表明抗体的纯化效果良好, 可用于后续试验 (图 3)。



M. 蛋白质分子质量标准; 1. 纯化的 McAb。

图3 纯化单克隆抗体的鉴定

Western blot 结果显示重组 N 蛋白和无关蛋白 Nsp14a 均成功表达 (图 4A), 2F10 McAb 仅与 N 蛋白反应, 不与无关蛋白 Nsp14a 反应 (图 4B)。此外, 以 0.01 MOI TGEV 感染 PK-15 细胞, 24 h 收集细胞样品提取蛋白 (同时设未感染 TGEV 的 PK-15 细胞作为阴性对照), 以 2F10 McAb 为一抗进行 Western

blot 检测。结果如图 5 所示, 与对照组相比, 病毒感染组显示特异性条带, 说明 2F10 McAb 与 TGEV 复制过程中产生的 N 蛋白发生特异性反应。

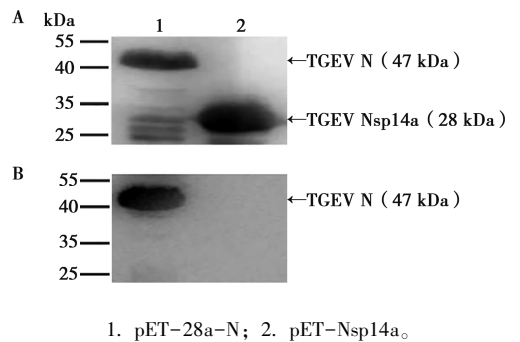


图4 重组 N 蛋白与鼠源抗 His McAb (A) 和 2F10 McAb (B) 免疫反应性

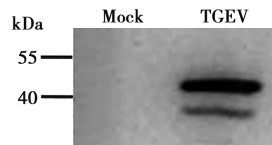


图5 TGEV 感染细胞蛋白样品与 2F10 McAb 免疫反应性

IFA 结果表明制备的 2F10 McAb 与 TGEV 感染产生的 N 蛋白结合良好, 在显微镜下可见红色荧光, 荧光细胞数量与 TGEV 感染复数呈正比, 而未感染的细胞对照无荧光呈现 (图 6), 说明该抗体可用于 TGEV 感染细胞的 IFA 检测。

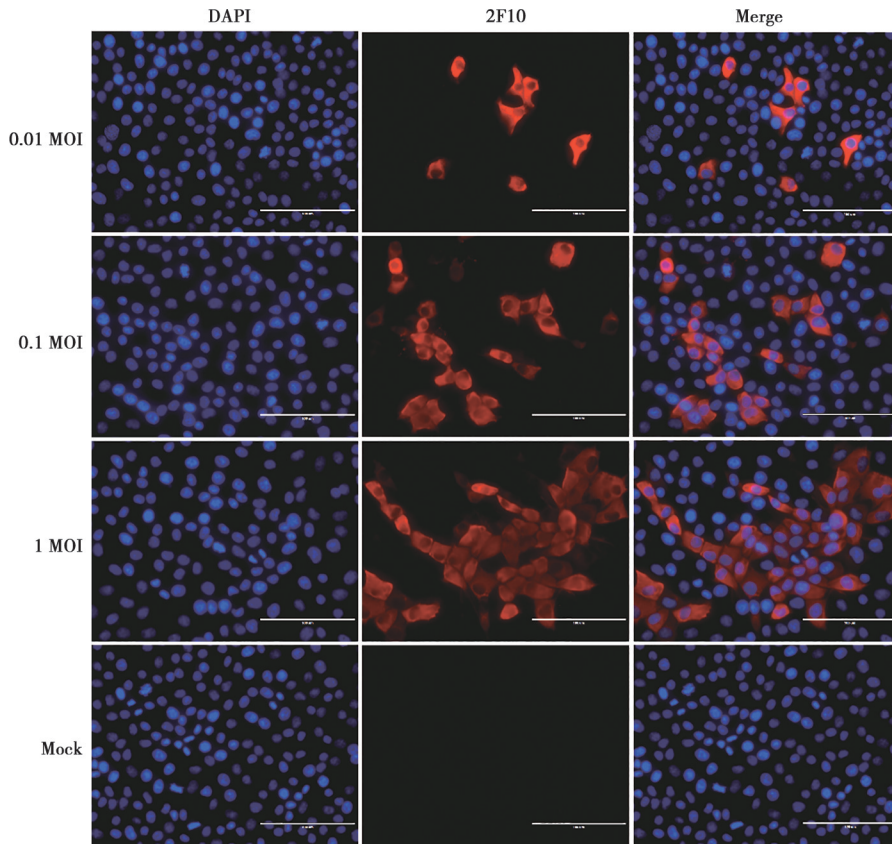


图6 IFA 鉴定 2F10 McAb 的特异性 (比例尺=100 μm)

2.3 2F10 McAb 抗体识别表位的鉴定

为了鉴定 2F10 McAb 的识别表位, 根据 TGEV N 蛋白的结构特点, 以 pEGFP-N1 质粒为载体, 分 3 轮构建了一系列 N 基因的截短突变体质粒 (图 7~图 8)。将突变体质粒、全长野生型质粒及空载体质粒转染至 PK-15 细胞中进行真核表达, 以制备的 2F10 McAb 作为一抗, 进行 IFA 鉴定。第一轮表位鉴定结果显示, 2F10 McAb 特异性识别了 GFP-VN₁ (1~382 aa) 以及截短质粒 GFP-VN₂ (199~382 aa) 和 GFP-VN₃ (199~330 aa) (图 9), 而不与 GFP-VN₄ (331~382 aa) 反应, 表明 2F10 McAb 识别的抗原表位位于 199~330 aa 区域。随后将 GFP-VN₃ 区域分为具有重叠部分的 2 个片段, 分别命名为 GFP-VN₅ (199~260 aa) 和 GFP-VN₆ (226~330 aa) (第二轮), IFA 鉴定表明 2F10 McAb 识别的抗原表位位于 VN₆ 肽段区域 (226~330 aa) (图 9)。最后对 VN₆ 区域进行逐一缩减氨基酸并设置重叠区域, 结果显示 McAb 特异性识别 GFP-VN₇ (255~330 aa) 和 GFP-VN₉ (226~265 aa), 而不与 GFP-VN₈ (261~330 aa) 反应, 表明 2F10 单克隆抗体所识别的精确

抗原表位序列为²⁵⁵SSANFGD²⁶⁵LDLV²⁶⁵ (图 9)。

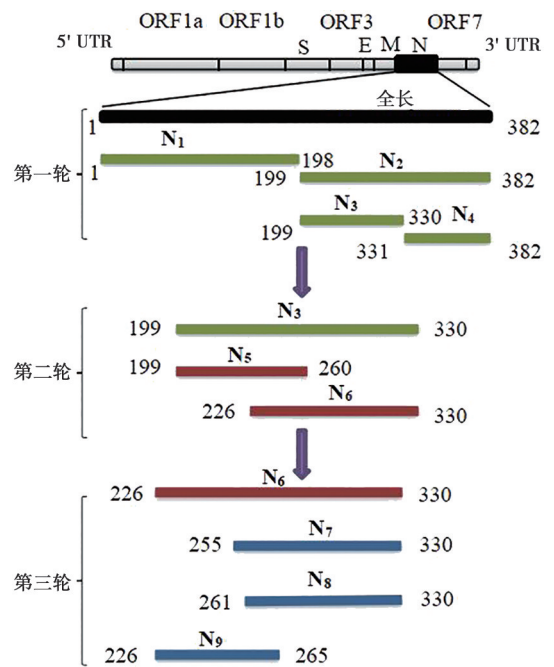
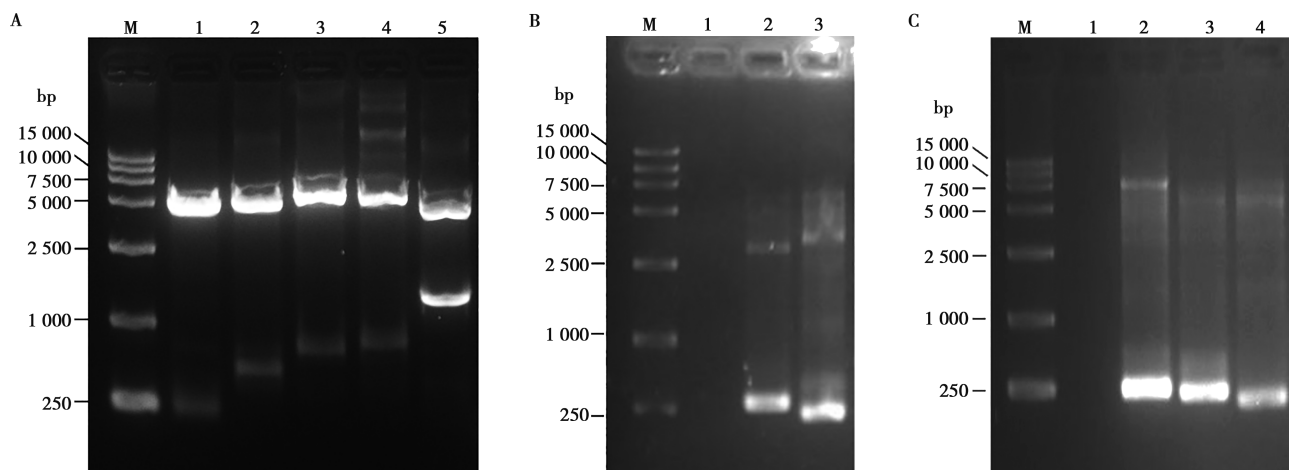
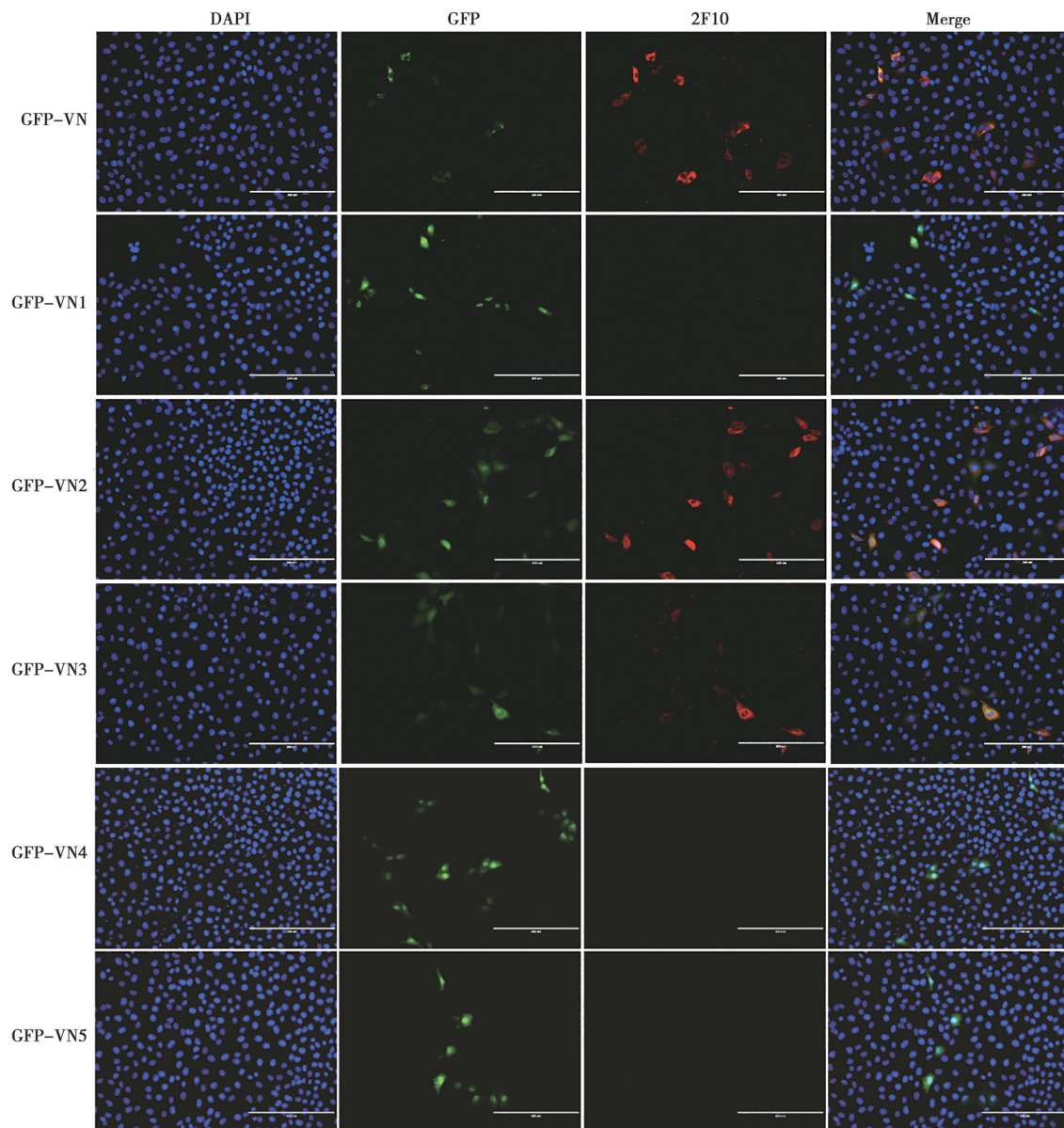


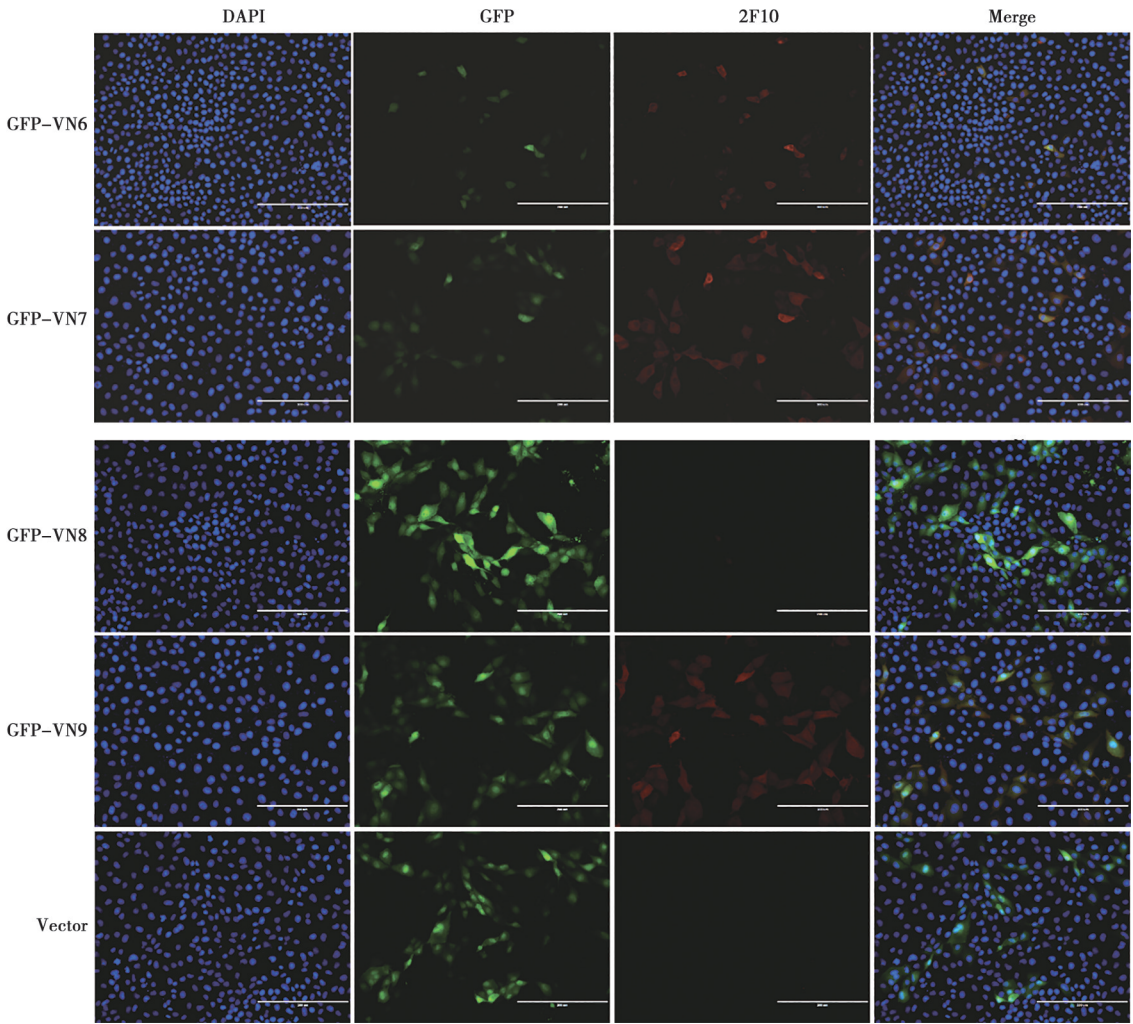
图7 TGEV N 蛋白系列截短突变体质粒构建示意



A. 第一轮截短质粒的酶切鉴定, M 为 DNA Marker, 1~5 泳道分别为 GFP-VN₄, GFP-VN₃, GFP-VN₂, GFP-VN₁ 和 GFP-VN; B. 第二轮截短质粒的 PCR 鉴定, M 为 DNA Marker, 1~3 泳道分别为阴性对照, GFP-VN₆ 和 GFP-VN₅; C. 第三轮截短质粒的 PCR 鉴定, M 为 DNA Marker, 1~4 泳道分别为阴性对照, GFP-VN₉, GFP-VN₈ 和 GFP-VN₇。

图 8 截短质粒的鉴定





GFP-VN: 1~382 aa; GFP-VN₁: 1~198 aa; GFP-VN₂: 199~382 aa; GFP-VN₃: 199~330 aa; GFP-VN₄: 331~382 aa; GFP-VN₅: 199~260 aa; GFP-VN₆: 226~330 aa; GFP-VN₇: 255~330 aa; GFP-VN₈: 261~330 aa; GFP-VN₉: 226~265 aa。

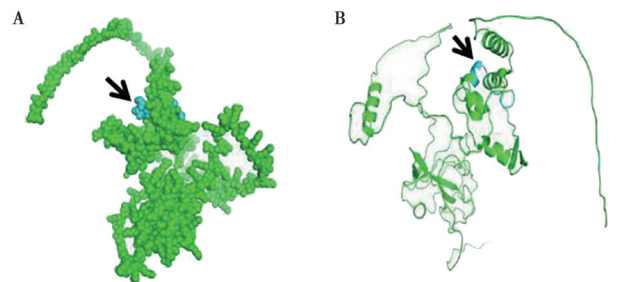
图9 2F10 McAb 抗原表位的鉴定 (比例尺=200 μm)

2.4 2F10 McAb 抗原表位的空间结构预测

由图 10 可知，单抗 2F10 识别的 TGEV N 蛋白抗原表位 (255~265 aa) 位于该蛋白三维结构的表面 (图 10)。球状图与卡通图中，蓝色片段标示该表位区域，显示其暴露于分子表面，具备抗体识别潜力。

2.5 2F10 McAb 应用于 TGEV N 蛋白亚细胞定位的分析

由图 11 可知，在病毒感染的 PK-15 细胞中，N 蛋白在感染初期 (2~6 h) 主要定位于细胞核且呈点状分布，在感染后 8 h 部分细胞的 N 蛋白易位到细胞质，在感染后 10 h 病毒感染细胞的 N 蛋白主要表达于细胞质，表明 TGEV N 蛋白具有明显的出核现象。



A. 球状; B. 卡通。蓝色片段为 2F10 单抗识别的表位区域。

图 10 TGEV N 蛋白的空间结构建模

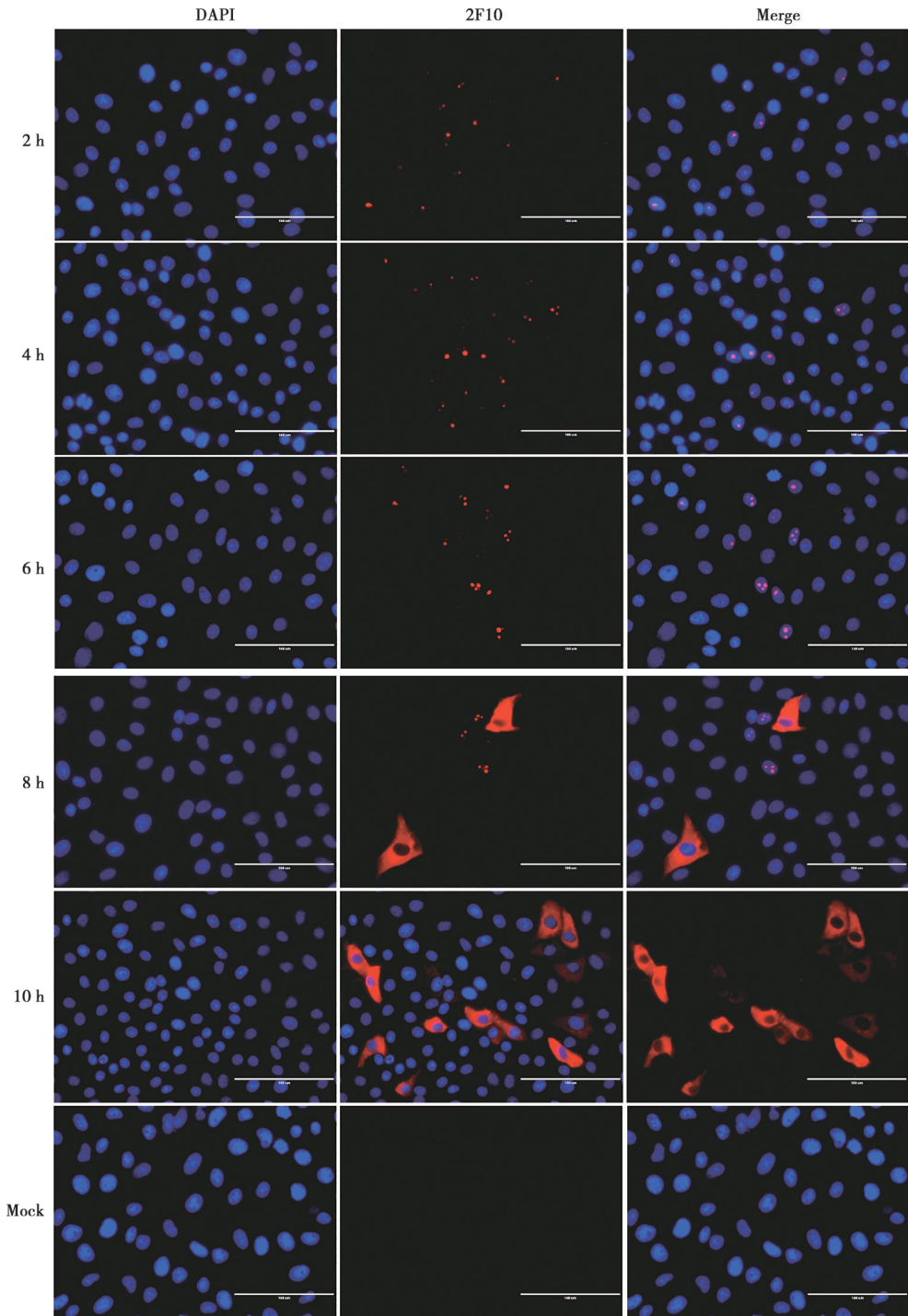


图 11 TGEV N 蛋白出/入核时间的鉴定 (比例尺 = 100 μm)

3 讨论

冠状病毒的 N 蛋白是一种 RNA 结合蛋白，主要负责 RNA 的复制功能，也是病毒核衣壳内最重要且含量最丰富的蛋白之一^[9]。作为一种高度免疫原性蛋白，N 蛋白突变概率低，可以诱导感染后的细胞免疫和体液免疫应答，且研究表明 N 蛋白能在临床症状出现前 1 d 被检测到^[12-13]，使 N 蛋白可以成为早

期快速诊断冠状病毒病和疫苗研发的关键靶标。

表位是抗原引起免疫应答以及与抗体产生特异反应的基本结构。目前有关 TGEV 的抗原表位研究多关于 S 蛋白，针对 TGEV N 蛋白抗原表位的鉴定研究仍较为有限。Antón 等^[7]于 1995 年首次报道了 TGEV N 蛋白的 3 个抗原表位 (46 ~ 60 aa、272 ~ 286 aa 和 321 ~ 335 aa)；此后近二十年间未发现新增表位，直至 2016 年 Zhang 等^[8]进一步补充鉴定了 2 个表位

(189~202 aa 和 246~257 aa)。为了推动 TGEV N 蛋白单克隆抗体针对性抗原表位的进展,本研究针对 TGEV WH-1 株 N 基因,构建以 pET-28a 为载体的重组质粒并诱导 N 蛋白大量表达,采用胶回收的方式纯化蛋白后免疫 BALB/c 小鼠,运用杂交瘤技术筛选获得了鼠源单克隆抗体 2F10。随后,本研究以 2F10 McAb 作为一抗开展 IFA 试验,通过系统性截短 TGEV N 蛋白氨基酸序列,逐步定位并精细解析 mAb 2F10 识别的抗原表位,最终成功鉴定出一个全新的 TGEV N 蛋白线性表位:²⁵⁵-SSANFGDSDLV-²⁶⁵。此外,研究还对 2F10 McAb 进行了全面鉴定,结果显示该单克隆抗体具有高效价和高特异性,为后续抗体的应用研究奠定了基础。

基于序列比对和一些代表性冠状病毒的结构数据分析,所有 N 蛋白都包含 3 个结构域: N 端结构域 (NTD)、连接区 (LKR) 和 C 端结构域 (CTD)^[14]。针对人类冠状病毒 N 蛋白的结构和功能的一些研究显示, N 蛋白的 NTD 主要负责与病毒 RNA 的结合, LKR 是 NTD 和 CTD 之间的一个无序结构域^[15-16], 而 CTD 主要负责自结合形成稳定的二聚体和随后的寡聚体^[17]。Ye 等^[18]纯化了 SARS-CoV-2 N 蛋白的一系列截短体,发现截短蛋白 (247~419 aa) 在溶液中形成同源四聚体,截短体 (247~364 aa) 形成二聚体,而 C 末端无序结构域残基 (365~419 aa) 仅以单体和二聚体的形式存在。因此,该研究团队推测 SARS-CoV-2 N 蛋白的自组装过程主要基于 N-CTD 结构域 (247~364 aa) 的二聚化。此外,除了 N 端结构域 (NTD) 具有 RNA 结合能力外,研究发现 SARS-CoV-2 的 CTD 也能够结合病毒 RNA,且对特定的 RNA 序列具有较高亲和力,其结合核酸的能力与 N 蛋白的液-液相分离等功能密切相关,在病毒基因组的包装和转录调控等过程中发挥重要作用^[19]。Guo 等^[20]的研究显示 SARS-CoV-2 N 蛋白可通过其 CTD 区域阻止 TAK1-TAB2/3 复合物的组装,从而抑制 NF- κ B 通路的激活及其下游信号传导。目前,对 TGEV N 蛋白 CTD 结构域的功能尚不清楚。在本研究中,鉴定出的 2F10 McAb 的线性表位²⁵⁵-SSANFGDSDLV-²⁶⁵位于 TGEV N 蛋白的 CTD (224~337 aa) 区域表面,且位于 248~365 aa 区域,有研究表明该区域可能会比 NTD 具有更强的核酸结合活性^[21],因此本研究鉴定的抗原表位可能有助于进一步阐明 TGEV N 蛋白 CTD 结构域的功能。

病毒结构蛋白的亚细胞定位与其生物学功能密切相关。作为冠状病毒中高度保守的结构蛋白,已有研究团队对 TGEV N 蛋白的亚细胞定位特性开展了探索。Wurm 等^[22]首次报道了 TGEV N 蛋白的核仁定位

现象:通过转染真核表达质粒 pCi-TGEV-N 于 LLC-Pk1 和 Vero 细胞,共聚焦显微分析显示 N 蛋白呈现细胞质-核仁双定位特征,且经抗核仁标志蛋白 nucleolin 的免疫共定位试验证实其核仁定位特异性。Calvo 等^[23]在天然宿主 ST 细胞感染模型中发现,TGEV N 蛋白主要定位于高尔基体-内质网-高尔基中间体 (ERGIC) 复合结构域,未检测到 N 蛋白与核仁共定位。上述研究提示,TGEV N 蛋白的亚细胞定位具有复杂性,其核仁定位在转染系统中明确,但在自然感染模型中未被证实。这种差异可能反映 N 蛋白功能的多态性,或不同试验条件对其定位的影响。基于此,本研究进一步运用制备的 2F10 McAb 系统研究了 TGEV N 蛋白的时空动态分布特征。IFA 试验显示:在感染后 2 h 即可观察到细胞核内点状阳性信号。TGEV 是典型的 RNA 病毒,其生物合成过程发生在胞质,在病毒感染后 2 h 分布于细胞核内的 N 蛋白表明病毒感染早期可能存在入核现象,但由于试验条件的限制,本研究尚未捕捉到 N 蛋白入核的时间点;在感染后 2~6 h, N 蛋白主要定位于细胞核呈点状分布,且随着感染时间的延长,核内的荧光信号逐渐增多;在感染后 8 h, N 蛋白呈现核质双相分布,部分细胞的荧光信号分布于细胞质;在感染后 10 h, N 蛋白主要表达于细胞质,表明 TGEV N 蛋白的亚细胞定位是动态的,且存在明显的由细胞核内向细胞质的动态迁移现象。本研究的发现为阐释冠状病毒 N 蛋白的时空动态调控提供了重要试验证据,提示其定位特征可能受病毒复制周期阶段、宿主细胞类型及翻译后修饰状态等多因素调控。后续研究需整合类器官感染模型和超高分辨率显微成像等技术,系统阐明 N 蛋白核质穿梭的分子驱动机制及其在病毒装配过程中的生物学意义。

综上,本研究制备了 1 株针对抗 TGEV N 蛋白的鼠源 McAb 2F10 并探究了 N 蛋白的亚细胞定位特征。经鉴定,2F10 McAb 所识别的 TGEV N 蛋白抗原表位为²⁵⁵-SSANFGDSDLV-²⁶⁵,该表位位于 CTD 区域表面。进一步的亚细胞定位研究显示,在感染状态下,TGEV N 的亚细胞定位呈现时空动态特性。本研究为 TGEV 血清学检测和 N 蛋白生物学功能的研究提供了新的材料。

参考文献:

- [1] 郭庆. 猪干扰素诱导蛋白 44L 对猪传染性胃肠炎病毒增殖的影响及其多克隆抗体的制备 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2022.
- [2] 陈刚. 浅谈猪传染性胃肠炎 [J]. 吉林畜牧兽医, 2021, 42 (7): 12-14.
- [3] LUO T, LI K, LI C, et al. Development of a triplex quantitative

- reverse transcription–polymerase chain reaction for the detection of porcine epidemic diarrhea virus, porcine transmissible gastroenteritis virus, and porcine rotavirus A [J]. *Front Microbiol*, 2024, 15: 1390328.
- [4] CHENY, ZHANGY, WANG X, et al. Transmissible gastroenteritis virus: an update review and perspective [J]. *Viruses*, 2023, 15 (2): 359
- [5] NIU Z, XU S, ZHANG Y, et al. Transmissible gastroenteritis virus nucleocapsid protein interacts with Na⁺/H⁺ exchanger 3 to reduce Na⁺/H⁺ exchanger activity and promote piglet diarrhea [J]. *J Virol*, 2022, 96 (22): e0147322.
- [6] ZÚÑIGA S, CRUZ J L G, SOLA I, et al. Coronavirus nucleocapsid protein facilitates template switching and is required for efficient transcription [J]. *J Virol*, 2010, 84 (4): 2169–2175.
- [7] ANTÓNIM, SUÑÉ C, MELOENRH, et al. A transmissible gastroenteritis coronavirus nucleoprotein epitope elicits T helper cells that collaborate in the *in vitro* antibody synthesis to the three major structural viral proteins [J]. *Virology*, 1995, 212 (2): 746–751.
- [8] ZHANG X, ZHAO X, DONG H, et al. Characterization of two monoclonal antibodies that recognize linker region and carboxyl terminal domain of coronavirus nucleocapsid protein [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (9): e0163920.
- [9] MCBRIDE R, VAN ZYL M, FIELDING B C. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein [J]. *Viruses*, 2014, 6 (8): 2991–3018.
- [10] HISCOXJA, WURM T, WILSON L, et al. The coronavirus infectious bronchitis virus nucleoprotein localizes to the nucleolus [J]. *J Virol*, 2001, 75 (1): 506–512.
- [11] YOU J, DOVEBK, ENJUANES L, et al. Subcellular localization of the severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein [J]. *J Gen Virol*, 2005, 86 (Pt 12): 3303–3310.
- [12] 王坤, 张玲, 王超男, 等. 新型冠状病毒 N 蛋白优势表位区段抗原的克隆表达及其诊断价值初步评价 [J]. *生物技术通讯*, 2020, 31 (6): 670–674.
- [13] DI B, HAO W, GAO Y, et al. Monoclonal antibody–based antigen capture enzyme–linked immunosorbent assay reveals high sensitivity of the nucleocapsid protein in acute–phase sera of severe acute respiratory syndrome patients [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2005, 12 (1): 135–140.
- [14] ZHENG Y, GAO C. Phase separation: the robust modulator of innate antiviral signaling and SARS–CoV–2 infection [J]. *Pathogens*, 2023, 12 (2): 243.
- [15] TSENG Y Y, LIAO G R, LIEN A, et al. Current concepts in the development of therapeutics against human and animal coronavirus diseases by targeting NP [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2021, 19: 1072–1080.
- [16] ZHANG B, TIAN J, ZHANG Q, et al. Comparing the nucleocapsid proteins of human coronaviruses: structure, immunoregulation, vaccine, and targeted drug [J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 9: 761173.
- [17] ZINZULA L, BASQUIN J, BOHN S, et al. High–resolution structure and biophysical characterization of the nucleocapsid phosphoprotein dimerization domain from the Covid–19 severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 538: 54–62.
- [18] YE Q, WEST A M V, SILLETTI S, et al. Architecture and self–assembly of the SARS–CoV–2 nucleocapsid protein [J]. *Protein Sci*, 2020, 29 (9): 1890–1901.
- [19] DANG M, SONG J. CTD of SARS–CoV–2 N protein is a cryptic domain for binding ATP and nucleic acid that interplay in modulating phase separation [J]. *Protein Sci*, 2022, 31 (2): 345–356.
- [20] GUO X, YANG S, CAI Z, et al. SARS – CoV – 2 specific adaptations in N protein inhibit NF–κB activation and alter pathogenesis [J]. *J Cell Biol*, 2025, 224 (1): e202404131.
- [21] CHENGY, CHANGCK, CHANGYW, et al. Structure of the SARS coronavirus nucleocapsid protein RNA–binding dimerization domain suggests a mechanism for helical packaging of viral RNA [J]. *J Mol Biol*, 2007, 368 (4): 1075–1086.
- [22] WURM T, CHEN H, HODGSON T, et al. Localization to the nucleolus is a common feature of coronavirus nucleoproteins, and the protein may disrupt host cell division [J]. *J Virol*, 2001, 75 (19): 9345–9356.
- [23] CALVO E, ESCORS D, LÓPEZ J A, et al. Phosphorylation and subcellular localization of transmissible gastroenteritis virus nucleocapsid protein in infected cells [J]. *J Gen Virol*, 2005, 86 (Pt 8): 2255–2267.