

DOI:10.12113/202009004

新型冠状病毒 Wuhan-Hu-1 株 Np 空间结构 及其 B 细胞抗原表位的预测

高珂星, 鲁非, 高竞溪, 胡志刚, 纪锋*, 郭志刚*

(南京师范大学 生命科学学院, 南京 210046)

摘要:新型冠状病毒(Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, SARS-CoV-2)是最新发现的一种可侵染人体的 β 属冠状病毒, 该病毒入侵机体可引发新型冠状病毒肺炎(Coronavirus Disease 2019, COVID-19), 该疫情的暴发在国内甚至国际上造成了严重影响。核衣壳蛋白(Nucleocapsid phosphoprotein, Np)相较于病毒编码的其它三种结构蛋白保守性更强, 在病原诊断、疫苗设计和治疗等方面占据重要地位。预测 Wuhan-Hu-1 Np 的空间结构及其 B 细胞抗原表位, 为开发 SARS-CoV-2 的表位疫苗和相关单抗奠定基础。采用 MEGA5.05 中的 Neighbor-joining 法构建基于 SARS-CoV-2 Np 的碱基序列的系统发生树; 以 SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 株为研究对象, 其柔性区段、亲水性指数、抗原指数和蛋白质表面可能性等参数由 DNASTar 软件中的 Protean 模块进行分析预测, 结合 Phyre2 在线工具模拟的空间结构, 综合预测 Wuhan-Hu-1 Np 的 B 细胞优势抗原表位。结果发现: 不同地区 SARS-CoV-2 Np 的碱基序列高度相似(99.6%~100%), Wuhan-Hu-1 Np 氨基酸序列长 419 aa, 其空间构型相对规则, 仅含少量 α -螺旋而多见 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲结构; 多参数综合分析结果指示, 可能的 B 细胞抗原表位位于 52~59, 69~75, 83~89, 106~115, 119~124, 130~136, 154~166, 217~227, 243~249, 267~273, 299~315, 333~339, 347~363, 379~385, 389~401, 403~411 氨基酸区段。本研究旨在为开发 SARS-CoV-2 表位疫苗、快速诊断试剂、单克隆抗体等提供理论信息, 为医治 COVID-19 给予一些新策略。

关键词:新型冠状病毒肺炎(COVID-19); 新型冠状病毒(SARS-CoV-2); Wuhan-Hu-1; 核衣壳蛋白; 空间结构; B 细胞抗原表位
中图分类号: R563.1; R392.11 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-5565(2022)01-020-08

Spatial structure of Np of novel coronavirus Wuhan-Hu-1 strain and prediction of its B-cell epitope

GAO Kexing, LU Fei, GAO Jingxi, HU Zhigang, JI Feng*, GUO Zhigang*

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is a newly discovered infectious coronavirus, which can cause Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). The outbreak of the disease has caused severe impact both at home and abroad. Compared with the other three structural proteins encoded by SARS-CoV-2, Nucleocapsid phosphoprotein (Np) is more conservative and plays an important role in pathogen diagnosis, vaccine design, and treatment. This paper aims to predict the spatial structure of Np in Wuhan-Hu-1 strain and its B-cell epitope, and lay a foundation for the development of epitope vaccine and related monoclonal antibody of SARS-CoV-2. In this study, the Neighbor-joining method in MEGA5.05 was used to construct a phylogenetic tree based on the base sequence of Np of SARS-CoV-2 strain. The SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 strain was used as the research object, and parameters such as hydrophilicity index, flexible region, surface possibility, and antigenic index were analyzed and predicted by the Protean module in the DNASTar software, combined with the spatial structure simulated by the Phyre2 online tool, so as to comprehensively predict the dominant B-cell epitopes of Np of Wuhan-Hu-1. Results

收稿日期: 2020-09-11; 修回日期: 2021-01-04.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No.81872284).

作者简介: 高珂星, 女, 本科生, 研究方向: 生物科学. E-mail: xingke_gao@163.com.

* 通信作者: 纪锋, 男, 博士, 研究方向: 病毒学和细胞免疫治疗. E-mail: Fengji@foxmail.com.

郭志刚, 男, 教授, 研究方向: DNA 损伤修复和抗肿瘤研究、抗体工程及治疗性抗体的开发与应用. E-mail: guo@njnu.edu.cn.

show that the gene sequences of Np of SARS-CoV-2 isolated from different regions were highly similar (99.6%-100%). The amino acid sequence of Np in Wuhan-Hu-1 strain was 419 aa. The spatial structure of Np in Wuhan-Hu-1 strain was fairly regular. It contained only a small amount of α -helices, while most of the structures were β -sheets, β -turns, and random coils. Results of multi-parameter comprehensive analysis showed that the possible antigenic epitope regions of B-cell were located in the amino acid regions of 52-59, 69-75, 83-89, 106-115, 119-124, 130-136, 154-166, 217-227, 243-249, 267-273, 299-315, 333-339, 347-363, 379-385, 389-401, and 403-411. The results of this study can provide theoretical information for the development of epitope vaccine, rapid diagnostic reagents, and monoclonal antibodies with respect to SARS-CoV-2, and offer new strategies for COVID-19 treatments.

Keywords: Coronavirus Disease 2019 (COVID-19); Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2); Wuhan-Hu-1; Nucleocapsid phosphoprotein; Spatial structure; B-cell epitope

基于系统学、分类学等的研究, SARS-CoV-2 被归为冠状病毒中的 Beta 属, 遗传物质为单股正链 RNA, 颗粒多为球状, 直径一般在 60 ~ 140 nm, 通常具有多形性^[1], 病毒衣壳外由刺突样结构包裹, 显微结构呈皇冠状。2020 年 1 月 7 日, 该病毒被初次检出且已被证明是截至目前第 7 种可以侵染人的冠状病毒, 该病毒入侵机体可引发 COVID-19。2019 年 12 月, SARS-CoV-2 的首例感染患者出现在湖北省武汉市, 之后疫情迅速传播到中国众多省份及其他 169 个国家和地区^[2]。COVID-19 的初期临床病征通常与普通感冒相似, 以浑身发热、乏力为主, 部分严重个体可发展为脓毒症、凝血功能障碍等^[3], 有时甚至会危及神经系统。

与其他侵染人的冠状病毒相比, SARS-CoV-2 的基因特征存在显著差别。据研究显示, 生活于云南省的一种蝙蝠 (*Rhinolophus affinis*) 可能为 SARS-CoV-2 的自然宿主, 其体内检测到的冠状病毒 (BatCovRaTG13) 在基因水平上与 SARS-CoV-2 极其相似, 两者相似率高达 96.2 %^[4]。

棘突蛋白 (Spike protein, S)、核衣壳蛋白 (Nucleocapsid phosphoprotein, Np)、小包膜蛋白 (Envelope protein, E)、囊膜蛋白 (Membrane protein, M) 为 SARS-CoV-2 编码的四种结构蛋白^[5]。其中, Np 相较其它三种蛋白 (S、E、M) 表达量更高, 其为多功能碱性磷酸化蛋白, 具有 RNA 伴侣活性, 于细胞质中与 RNA 结合组成核糖核蛋白颗粒, 从而保护病毒自身的遗传物质^[6]。同时, 它在病毒自身的复制、转录、组装等方面也占据了重要地位^[7-8]。因具有免疫原性强和保守性高的特征, Np 不仅能够诊断冠状病毒, 而且可以作为抗病毒治疗的理想靶标^[9-10]。

本研究通过对 Wuhan-Hu-1 株 Np 的碱基序列进行进化分析, 并通过对 Np 氨基酸序列的空间结构及其 B 细胞优势抗原表位的分析预测, 结合多种因素综合剖析以筛选合适的 B 细胞优势抗原表位,

为研制 SARS-CoV-2 表位疫苗、快速诊断试剂和制备其单克隆抗体奠定基础, 从而进一步解决 COVID-19 迫切的防控及治疗问题。

1 材料与方法

1.1 材料

从 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中获取 Wuhan-Hu-1 株 Np 氨基酸序列 (Protein ID: YP_009724397.2)。

1.2 方法

1.2.1 不同地区 SARS-CoV-2 N 蛋白基因进化分析

以 NCBI 数据库中不同国家地区多株 SARS-CoV-2 N 蛋白基因为研究对象, 采用 MEGA5.05 软件中的 Neighbor-joining 法进行分析, 构建 SARS-CoV-2 N 蛋白碱基序列的系统发生树, 并应用 MegAlign 软件分析不同毒株间的遗传距离。

1.2.2 Wuhan-Hu-1 株 Np 三维结构的预测

以 Wuhan-Hu-1 株 Np 氨基酸序列为研究对象, 应用 Phyre2 在线工具 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 预测其三维空间结构, 并应用 Chimera 软件模拟其立体结构。

1.2.3 Wuhan-Hu-1 株 Np 的二级结构和抗原表位分析

以 DNASTar 软件中的 Protean 模块下的方法剖析 Wuhan-Hu-1 株 Np, 步骤如下: 首先对 Np 的二级结构 (Garnier-Robson 法和 Chou-Fasman 法)、柔性区段 (Karplus-Schulz 法)、表面可能性 (Emini 法) 进行预测; 然后分析 Np 的亲水性 (Kyte-Doolittle 法), 再预测其抗原指数和抗原表位指数 (分别用 Jameson-Wolf 法和 Kolaskar-Tongaonkar 法 (http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input)); 最后, 参考 Np 的三维结构, 对 Wuhan-Hu-1 株 Np 的 B 细胞优势抗原表位进行综合预测。

2 结果与分析

2.1 SARS-CoV-2 N 蛋白基因进化分析

以 Wuhan-Hu-1 株 (WHU01) N 蛋白和其他不同国家地区的 SARS-CoV-2 毒株 N 蛋白的碱基序列为分析对象, 采用 Neighbor-joining 法 (步长 1 000,

boot-strap 值 > 20 %) 构建系统发生树 (见图 1)。MegAlign 软件分析结果显示: 不同国家地区分离的 SARS-CoV-2 毒株 N 蛋白碱基序列存在极高相似性 (99.6 % ~ 100 %)。结果表明, 不同国家地区间的 SARS-CoV-2 毒株 N 蛋白碱基序列差异性很小, 指示 SARS-CoV-2 毒株 N 蛋白基因高度保守。

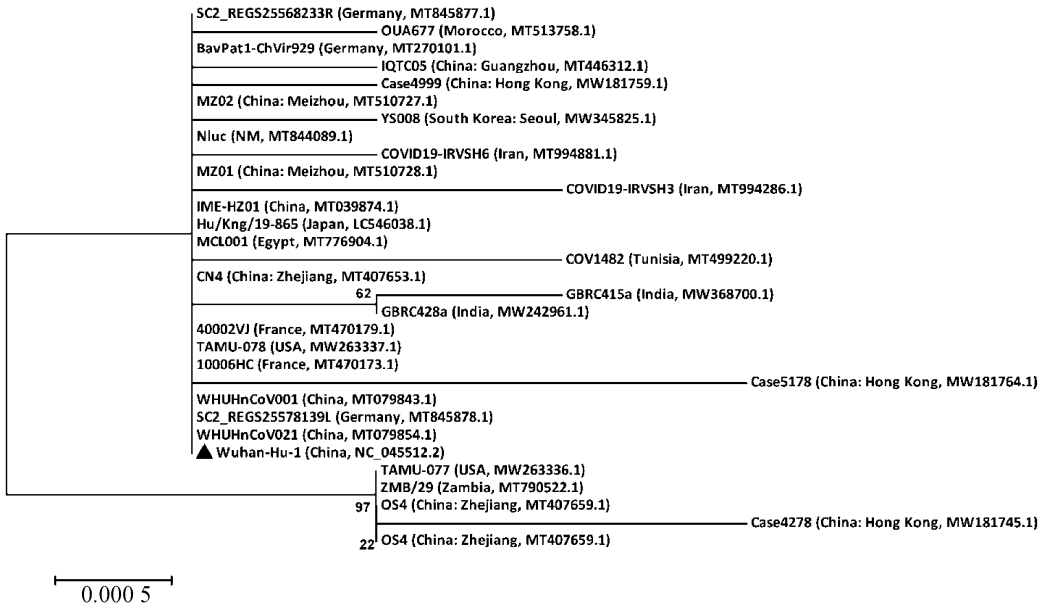


图 1 不同国家地区 SARS-CoV-2 N 蛋白碱基序列系统发生树

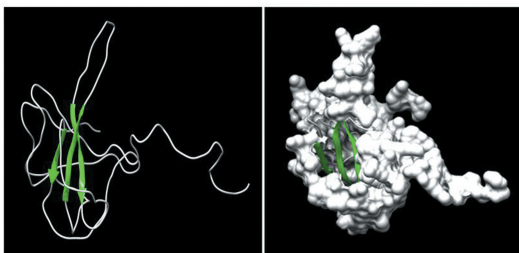
Fig.1 Phylogenetic tree of SARS-CoV-2 N protein base sequence isolated from different countries and regions

2.2 Np 空间三维结构预测

应用 Chimera 软件模拟得到的 Wuhan-Hu-1 株 Np 的 3D 结构如图所示: 蛋白中央存在一定数量的 β -折叠, 指示其内部可能含有大量疏水性残基; 蛋白外围分布有一定数量的 β -转角和无规则卷曲结构, 且含少量的 α -螺旋 (见图 2)。

2.3 Wuhan-Hu-1 株 Np 的二级结构

以两种不同的方法分别剖析 Np 的二级结构, 最终结果可相互佐证。Garnier-Robson 法预测的 α -螺旋主要分布在氨基酸序列的中后段, 且 366 ~ 385 区段跨度最大 (20 aa), 存在单个氨基酸组成的 α -螺旋; 有较多数量的 β -折叠, 其分布较均匀, 最大的一个区段为 262 ~ 274 (13 aa); β -转角分布也较均匀, 其中 189 ~ 196 区段最大 (8 aa), 存在单个氨基酸。Chou-Fasman 法与 Garnier-Robson 法预测结果有部分区域重叠: α -螺旋呈分散分布, 其中 368 ~ 382 区段存在跨最大区域的 α -螺旋 (15 aa), β -折叠呈分散分布, 其预测数量相对较少; β -转角区域分布均匀, 最大的一个区段为 182 ~ 209 (28 aa) (见图 3、表 1、表 2)。以 Karplus-Schulz 法预测出的 Wuhan-Hu-1 株 Np 柔性区段分布在 5 ~ 15, 17 ~ 50, 57 ~ 83, 89 ~ 106, 114 ~ 119, 125 ~ 128, 136 ~ 153, 161 ~ 169, 174 ~ 208, 211 ~ 216, 225 ~ 250, 254 ~ 266, 275 ~ 299, 309 ~ 310, 325 ~ 329, 339 ~ 348, 361 ~ 392, 401 ~ 416, 可见 Np 存在多个柔性区段, 有可能形成多个优势表位 (见图 4)。



(a) Np 的结构预测 (b) β -折叠在 Np 3D 结构中的位置

图 2 Wuhan-Hu-1 株 Np 的结构预测

Fig.2 Protein structure prediction of Np in Wuhan-Hu-1 strain

注: (a) 中亮绿色区域代表 β -折叠结构, 白色区域代表 α -螺旋、 β -转角及无规则卷曲结构。

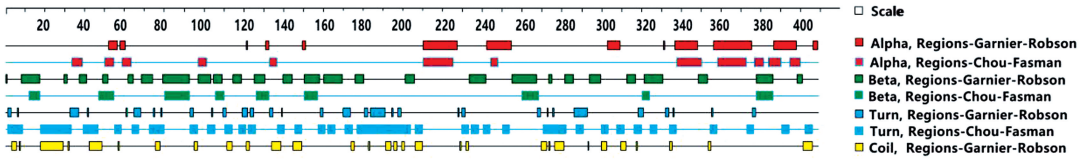


图 3 不同方法预测 Wuhan-Hu-1 株 Np 的二级结构

Fig.3 Secondary structure of Np in Wuhan-Hu-1 strain predicted by different methods

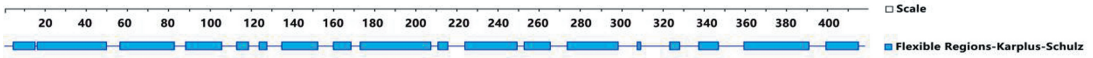


图 4 Karplus-Schulz 法预测 Wuhan-Hu-1 株 Np 的柔性区段

Fig.4 Flexible regions of Np in Wuhan-Hu-1 strain predicted by Karplus-Schulz method

表 1 Garnier-Robson 法预测的 Wuhan-Hu-1 株 Np 的二级结构

Table 1 Secondary structure of Np in Wuhan-Hu-1 strain predicted by Garnier-Robson method

Secondary structure	Location
α -helix	54~58,60~62,125,135~136,154~155,216~233,249~261,311~317,340,346~357,366~385,397~408,417~419
β -turn	1,9~18,31~32,39~42,51~53,64~66,71~76,82~95,100~106,108~112,118~122,129~134,144~148,155~162,165~174,181~185,207~211,240~248,262~274,281~282,289~293,302~307,321~325,330~339,358~362,388~396,409~411
β -sheet	2~3,7,34~38,43,63,67~69,77,81,96~97,107,113~114,123~125,127~128,137~138,143,163~164,175~178,186~187,189~196,200,203~204,234,236~237,275~276,280,283,294~300,327~329,341~342,345,365,386~387
random coil structure	4~6,8,19~30,33,44~50,59,78~80,98~99,115~117,125~126,138~142,149~153,179~180,188,197~199,201~202,205~206,212~215,235,238~239,277~279,281,284~288,301,308~310,318~320,326,343~344,363~364,412~416

表 2 Chou-Fasman 法预测的 Wuhan-Hu-1 株 Np 的二级结构

Table 2 Secondary structure of Np in Wuhan-Hu-1 strain predicted by Chou-Fasman method

Secondary structure	Location
α -helix	35~40,52~56,61~65,100~104,137~140,216~231,251~254,347~359,368~382,387~391,394~400,405~410
β -turn	13~18,49~56,83~95,109~113,130~136,155~161,267~275,329~332,388~396
β -sheet	2~9,19~34,41~48,57~60,66~69,75~82,96~99,105~108,114~117,121~124,126~129,141~144,150~153,162~165,167~170,176~179,182~209,212~215,236~239,241~244,247~250,257~260,278~289,295~298,308~311,316~319,325~328,333~336,343~346,364~367,383~385,401~404,413~416

2.4 Wuhan-Hu-1 株 Np 的亲水性和表面可能性

亲水性 (Kyte-Doolittle 法) 分析显示 (见图 5), Np 亲水区段占比较高,几乎覆盖大多数区域,进一步证明该蛋白亲水性较强。表面可能性 (Emini 法) 分析显示 (见图 6), 1~13, 20~49, 58~68, 75~97,

182~207, 226~270, 276~283, 294~301, 339~347, 356~390, 401~410, 414~419 区域的表面可能性较大。分析结果指示,两种方法预测的重复部分,极有可能位于 Np 表面,具备作为病毒抗原表位的特性。

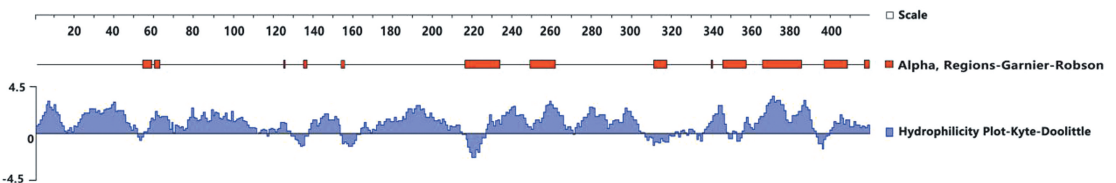


图 5 Wuhan-Hu-1 株 Np 的亲水性

Fig.5 Hydrophilicity of Np in Wuhan-Hu-1 strain

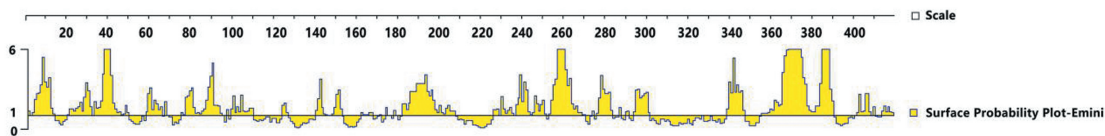


图6 Wuhan-Hu-1 株 Np 的表面可能性

Fig. 6 Surface probability of Np in Wuhan-Hu-1 strain

2.5 Wuhan-Hu-1 株 Np 的抗原指数

Jameson-Wolf 法预测结果显示(见图7),有多个抗原指数较高的区域分布于 Wuhan-Hu-1 株 Np 中,如 2~12, 17~48, 58~71, 75~85, 88~108, 113~130, 137~153, 171~216, 226~267, 274~300, 337~349, 355~390 区域,其中 171~216 为抗原指数最高

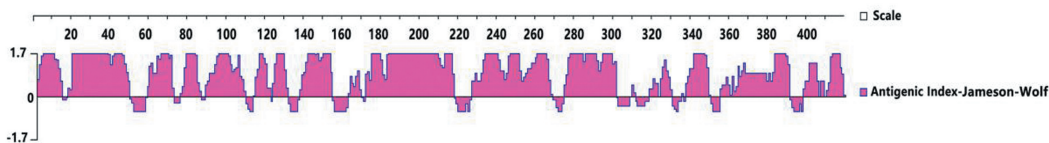


图7 Wuhan-Hu-1 株 Np 的抗原指数

Fig. 7 Antigenic index of Np in Wuhan-Hu-1 strain

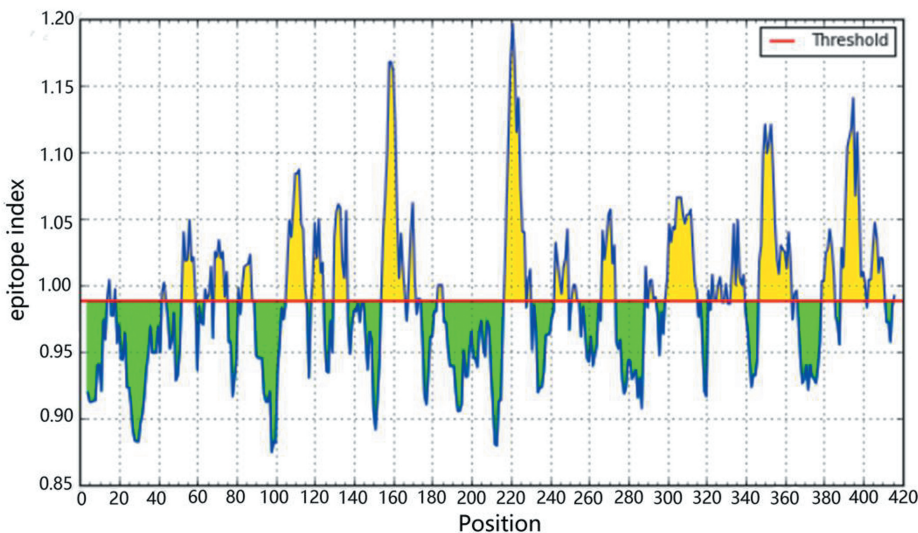


图8 Wuhan-Hu-1 株 Np 的抗原表位指数

Fig. 8 Antigenic epitope index of Np in Wuhan-Hu-1 strain

2.7 Wuhan-Hu-1 株 Np 的 B 细胞表位预测结果

先对 Wuhan-Hu-1 株 Np 序列的柔性区段、亲水性指数、抗原指数、蛋白质表面可能性等抗原表位参数进行分析,再参考抗原表位指数结果,预测:如果某一区段满足抗原指数 ≥ 0.988 (均值)、表面可能性 ≥ 1 、亲水性 ≥ 0 ,至少包含 6 个氨基酸残基,且内部或邻近区存在柔性区段,则推测该区段很大概率可以作为 Np 的 B 细胞抗原表位。结合空间预测结果,共筛选出符合上述条件的 16 个优势表位(见表 3)。

的区段,最有可能作为优势表位。

2.6 Wuhan-Hu-1 株 Np 的抗原表位指数

Kolaskar-Tongaonkar 法预测结果显示(见图8),Wuhan-Hu-1 株 Np 的抗原指数在 0.874~1.197 之间波动,均值为 0.988。

3 讨论

抗原表位 (Epitope) 是指决定抗原特异性且位于分子表面的氨基酸序列及其组成的空间结构^[11]。抗体或淋巴细胞表面与抗原相结合部位的形状、大小需与抗原表位相适合才能发挥其免疫学效应^[12]。表位的分子量一般很小(5~7 aa),所在区段结构多数比较松散、具有可移动性。作为病毒抗原性的物质基础,表位预测可为疾病的诊断、药物的筛选与合

成及表位疫苗的制备等奠定理论基础^[13]。本研究从 NCBI 获取了 Wuhan-Hu-1 株 Np 氨基酸序列(419 aa),空间结构预测结果指示,Wuhan-Hu-1 株 Np 空间构象形似锤状,中央的疏水核心聚集了一定数量的 β -折叠且有较多的 β -转角和无规则卷曲分布于

蛋白表面,同时存在少量的 α -螺旋。近期有报道称欧洲 SARS-CoV-2 基因发生突变并传入中国^[14-16],鉴于该病毒中 Np 较强的抗原性和保守性,准确预测 Wuhan-Hu-1 株 Np 抗原表位可以为未来进一步的工作提供方向。

表 3 Wuhan-Hu-1 株 Np B 细胞抗原表位的氨基酸序列

Table 3 Amino acid sequence of B-cell antigenic epitope of Np in Wuhan-Hu-1 strain

Sequence number	Initial position	Terminal position	Amino acid sequence of B-cell antigenic epitope	Length/aa
1	52	59	WFTALTQH	8
2	69	75	GQGV PIN	7
3	83	89	QIGYYRR	7
4	106	115	PRWYFY YLGT	10
5	119	124	AGLPYG	6
6	130	136	IIWVATE	7
7	154	166	NAAIVLQLPQGT T	13
8	217	227	AALALLLLDRL	11
9	243	249	GQTVTKK	7
10	267	273	AYNVTQA	7
11	299	315	KHWPQIAQFAPSASAFF	17
12	333	339	YTGAIKL	7
13	347	363	KDQVILLNKHIDAYKTF	17
14	379	385	TQALPQR	7
15	389	401	QQTVTLLPAADLD	13
16	403	411	FSKQLQQSM	9

SARS-CoV-2 粒子多呈皇冠状^[17],Np 是其主要编码的四种结构蛋白(Np、M、E、S)之一,在复制初期产生并与病毒遗传物质组成核壳体结构^[6, 18]。Np 通常大量表达于病毒感染的初期^[19-20],具有很强的抗原性。因此,常作为其他 Beta 冠状病毒如 SARS-CoV、MERS-CoV 等的快速诊断抗原和相关疫苗设计的靶标^[21-24],具有特异、敏感、重复性好的优势。值得一提的是,广谱抗病毒药物和疫苗可对后续由病毒变异引起的新型传染病起到关键性作用,而 Np 在种属间的高度保守性^[25],正使其占领了独特的优势。目前京天成生物、BioSS 等科研机构已研制出针对 Wuhan-Hu-1 株 Np 的抗体,虽然还未进入临床使用,但为靶向 Np 抗体的设计开创了先例,而可识别 Np 的表位疫苗研制却存在较大空白。对于疫苗的制备,小分子蛋白更易做到快速、大量地表达,表位疫苗相对于减毒活疫苗和死疫苗又能达到更高的安全性^[26]。所以,准确推断 B 细胞抗原表位的特定氨基酸序列,并通过表达相应基因以实现工厂化生产具有免疫原性的低毒多肽,可以成为制备诊断试剂、表位疫苗、单抗的新手段。为提高准确度,本研究采用新兴的多参数综合预测法。分析结果指示,Np 抗

原指数均值为 0.988,抗原表位指数较高的区域分布均匀,最大值为 1.197,其中 52~59、69~75、83~89、106~115、119~124、130~136、154~166、217~227、243~249、267~273、299~315、333~339、347~363、379~385、389~401、403~411 氨基酸区段覆盖了大部分抗原指数较高的区域,指示这些区段可能具有作为表位的潜能。本研究基于同源建模(TBM)参数预测结果,通过与同一毒株的小角 X 射线散射(SAXS)获得的低分辨率三维结构(pdb id: 6yun)^[27]进行比较,发现二者内部均由若干近乎平行的 β -折叠形成的领结形状偏离了中心的菱形瓦片结构组成,这与已报道的基于 saxs 的两个浮动 NTD 模型是相容的^[28-29],但二者结果仍然存在一定的结构差异。这也许是由不同预测方法造成的,同时也体现了多参数预测以及后期验证的重要性。

Hopp-Woods 开创的亲水性参数预测法^[30-31]为抗原表位的预测奠定了基础,但与单一参数分析法相比,多参数预测的准确率明显更高^[26, 32]。可见,由于抗原表位的多态性,表位抗原性取决于多种因素的互动而非任意单一条件决定。B 细胞抗原表位应位于蛋白质表面且具有一定程度的灵活性,为更准确地与

抗体或淋巴细胞表面配体相结合,抗原构象通常需要产生一定程度的改变,即其多具有柔韧性;此外,抗原表位生物学特性与其二级结构和三级结构也有较高相关性。准确剖析 N_p 的抗原表位不但有助于进一步认识其表现出抗原性的结构基础,而且能够为指导药物的合成筛选、快速诊断试剂的研发制备和表位疫苗的设计生产等提供理论基础^[33]。

4 结 论

通过对 Wuhan-Hu-1 株 N_p 的碱基序列进行进化分析,并通过单独分析 N_p 的二级结构、柔韧性、亲水性、表面可能性、抗原指数等多种参数,再利用三级结构预测结果筛选表位,最终综合以上所有参数多维筛选确定 N_p 的 B 细胞优势抗原表位。研究结果为进一步阐明 N_p 的结构特征及深入探究 SARS-CoV-2 入侵和致病机制提供了参考,以期助力解决 SARS-CoV-2 感染引发的肺炎疫情及迫切的防控问题。

参考文献(References)

- [1] 詹菁,刘倩,张雨竹,等. 新型冠状病毒 2019-nCoV 的一些初步认识[J]. 环境化学, 2020, 39(2): 283-291. DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108. 2020021501.
ZHAN Jing, LIU Qian, ZHANG Yuzhu, et al. Preliminary understanding of the novel coronavirus 2019-nCoV[J]. Environmental Chemistry, 2020, 39(2): 283-291. DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108. 2020021501.
- [2] LIU Yingxia, YANG Yang, ZHANG Cong, et al. Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury[J]. Science China(Life Sciences), 2020, 63(3): 364-374. DOI: 10.1007/s11427-020-1643-8.
- [3] HUANG Chaolin, WANG Yeming, LI Xingwang, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China[J]. Lancet, 2020, 395(10223): 497-506. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
- [4] ZHOU Ping, YANG Xingluo, WANG Xianguang, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J]. Nature, 2020, 579: 270-273. DOI: 10.1038/s41586-020-2012-7.
- [5] 边葶蒯,周继勇,廖敏. 冠状病毒非结构蛋白的研究进展[J]. 中国动物传染病学报, 2013, 21(4): 67-74. DOI: 10.3969/j.issn.1674-6422.2013.04.013.
BIAN Tingli, ZHOU Jiyong, LIAO Min. Research advance on nonstructural proteins of coronavirus[J]. Chinese Journal of Veterinary Parasitology, 2013, 21(4): 67-74. DOI: 10.3969/j.issn.1674-6422.2013.04.013.
- [6] STURMAN L S, HOLMES K V, BEHNKE J. Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid[J]. Journal of Virology, 1980, 33(1): 449-462. DOI: 10.1128/JVI.33.1.449-462.1980.
- [7] CHAN J F W, LAU S K P, TO K K W, et al. Middle east respiratory syndrome coronavirus; another zoonotic betacoronavirus causing SARS-Like disease[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2015, 28(2): 465-522. DOI: 10.1128/CMR.00102-14.
- [8] ZUMLA A, CHAN J F W, AZHAR E I, et al. Coronavirus—drug discovery and therapeutic options[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2016, 15(5): 327-347. DOI: 10.1038/nrd.2015.37.
- [9] 杨海燕. 利用噬菌体肽库技术筛选 SARS 冠状病毒 N 蛋白 B 细胞表位的研究[D]. 广州:第一军医大学, 2006.
YANG Haiyan. Screening of B cell epitopes of SARS-cov N protein by phage display peptide library[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2006.
- [10] 魏珊. 猪 δ 冠状病毒 N 蛋白单克隆抗体制备及抗原表位的初步鉴定[D]. 大庆:黑龙江八一农垦大学, 2018.
WEI Shan. Preparation of N protein monoclonal antibody of porcine delta coronavirus and identification of its antigenic epitope[D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2018.
- [11] 朱锡华,吴玉章. 对表位生物学研究的认识 and 体会[J]. 上海免疫学杂志, 1998(1): 1-2.
ZHU Xihua, WU Yuzhang. Understanding and understanding of epitope biology[J]. Shanghai Journal of Immunology, 1998(1): 1-2.
- [12] RUF J, CARAYON P, SARLES-PHILIP N, et al. Specificity of monoclonal antibodies against human thyroglobulin; comparison with autoimmune antibodies[J]. EMBO Journal, 1983, 2(10): 1821-1826. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1983.tb01664.
- [13] 李海侠,毛旭虎. 蛋白质抗原表位研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2007(1): 54-58. DOI: 10.13309/j.cnki.pmi.2007.01.015.
LI Haixia, MAO Xuhu. Progress in the study of protein antigenic epitopes[J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2007(1): 54-58. DOI: 10.13309/j.cnki.pmi.2007.01.015.
- [14] PACHETTI M, MARINI B, BENEDETTI F, et al. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant[J]. Journal of Translational Medicine, 2020, 18(1): 179. DOI: 10.1186/s12967-020-02344-6.
- [15] European Centre for Disease Prevention and Control. Rapid increase of a SARS-CoV-2 variant with multiple spike protein mutations observed in the United Kingdom, December 2020[N]. ECDC: Stockholm, 2020.
- [16] CHEN H, HUANG X, ZHAO X, et al. The first case of new variant COVID-19 originating in the united kingdom

- detected in a returning student — Shanghai Municipality [N]. *China CDC Weekly*, 2021, 3(1): 1–3.
- [17] ZHU N, ZHANG D, WANG W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019 [J]. *New England Journal of Medicine*, 2020, 382(8): 727–733. DOI: 10.1056/NEJMoa2001017.
- [18] ESCORS D, ORTEGO J, LAUDE H, et al. The membrane M protein carboxy terminus binds to transmissible gastroenteritis coronavirus core and contributes to core stability [J]. *Journal of Virology*, 2001, 75(3): 1312–1324. DOI: 10.1128/JVI.75.3.1312–1324.2001.
- [19] KUO L, MASTERS P S. Genetic evidence for a structural interaction between the carboxy termini of the membrane and nucleocapsid proteins of mouse hepatitis virus [J]. *Journal of Virology*, 2002, 76(10): 4987–4999. DOI: 10.1128/jvi.76.10.4987–4999.2002.
- [20] NARAYANAN K, CHEN C J, MAEDA J, et al. Nucleocapsid-independent specific viral RNA packaging via viral envelope protein and viral RNA signal [J]. *Journal of Virology*, 2003, 77(5): 2922–2927. DOI: 10.1128/jvi.77.5.2922–2927.2003.
- [21] 李秀华,王佑春. 抗 SARS 病毒 N 蛋白单克隆抗体的制备和初步应用 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2004, 18(3): 255–257. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003–9279.2004.03.015.
- LI Xiuhua, WANG Youchun. Development and preliminary application of monoclonal antibodies against N protein of SARS virus [J]. *Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology*, 2004, 18(3): 255–257. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003–9279.2004.03.015.
- [22] 王平,黄庆生,薛小平,等. SARS 冠状病毒核衣壳蛋白的重组表达及其单克隆抗体的制备 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, 3(1): 50–52. DOI: 10.3321/j.issn:1007–8738.2005.01.014.
- WANG Ping, HUANG Qingsheng, XUE Xiaoping, et al. Preparation of specific monoclonal antibody against nucleocapsid protein of SARS coronavirus [J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2005, 3(1): 50–52. DOI: 10.3321/j.issn:1007–8738.2005.01.014.
- [23] HU D, ZHU C, AI L, et al. Genomic characterization and infectivity of a novel SARS-like coronavirus in Chinese bats [J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2019, 7(1): 1–10. DOI: 10.1038/s41426–018–0155–5.
- [24] SONG D, HA G, SERHAN W, et al. Development and validation of a rapid immunochromatographic assay for detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus antigen in dromedary camels [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2015, 53(4): 1178–1182. DOI: 10.1128/JCM.03096–14.
- [25] ZHOU P, YANG X L, WANG X G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin [J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 270–273. DOI: 10.1038/s41586–020–2012–7.
- [26] 郭春艳,赵向绒,胡军. B 细胞抗原表位的研究进展及其应用 [J]. *生物技术通讯*, 2013, 24(2): 266–270. DOI: 10.3969/j.issn.1009–0002.2013.02.029.
- GUO Chunyan, ZHAO Xiangrong, HU Jun. Research and application of B cell epitope [J]. *Letters in Biotechnology*, 2013, 24(2): 266–270. DOI: 10.3969/j.issn.1009–0002.2013.02.029.
- [27] 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]. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 2021, 538: 54–62. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.09.131.
- [28] ZENG Weihong, LIU Guangfeng, MA Huan, et al. Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein [J]. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 2020, 527(3): 618–623. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.04.136.
- [29] CHANG C K, HSU Y L, CHANG Y H, et al. Multiple nucleic acid binding sites and intrinsic disorder of severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein: implications for ribonucleocapsid protein packaging [J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(5): 2255–2264. DOI: 10.1128/JVI.02001–08.
- [30] HOPP T P, WOODS K R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1981, 78(6): 3824–3828. DOI: 10.1073/pnas.78.6.3824.
- [31] KYTE J, DOOLITTLE R F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1982, 157(1): 105–132. DOI: 10.1016/0022–2836(82)90515–0.
- [32] 孙建宏,曹殿军. 细胞的抗原表位研究方法 [J]. *动物医学进展*, 2004, 25(5): 18–21. DOI: 10.3969/j.issn.1007–5038.2004.05.006.
- SUN Jianhong, CAO Dianjun. New approach for antigen epitope study [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2004, 25(5): 18–21. DOI: 10.3969/j.issn.1007–5038.2004.05.006.
- [33] 纪锋,徐黎明,赵景壮,等. 鲤春病毒血症病毒 Shlj1 株糖蛋白空间结构及其 B 细胞抗原表位的预测 [J]. *大连海洋大学学报*, 2017, 32(4): 440–446. DOI: 10.16535/j.cnki.dlhyxb.2017.04.011.
- JI Feng, XU Liming, ZHAO Jingzhuang, et al. Prediction of spatial structure and B cell antigenic epitope of glycoprotein in Shlj 1 strain of Spring Viremia of Carp [J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2017, 32(4): 440–446. DOI: 10.16535/j.cnki.dlhyxb.2017.04.011.