

# 抗 SARS-CoV N 蛋白单克隆抗体的特异性及其 识别抗原表位的初步鉴定\*

王健伟<sup>1\*\*</sup>, 王彦斌<sup>1</sup>, 常昭瑞<sup>1</sup>, 闫克夏<sup>1</sup>, 谭文杰<sup>1</sup>,  
屈建国<sup>1</sup>, 夏宁邵<sup>2\*\*</sup>, 阮力<sup>1</sup>, 洪涛<sup>1</sup>

(1. 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 100052; 2. 福建省医学分子病毒学研究中心, 厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005)

## Specificity and Epitope Mapping of Four Monoclonal Antibodies against SARS-CoV Nucleocapsid Protein

WANG Jian-wei<sup>1\*</sup>, WANG Yan-bin<sup>1</sup>, CHANG Zhao-rui<sup>1</sup>, YAN Ke-xia<sup>1</sup>, TAN Wen-jie<sup>1</sup>,  
QU Jian-guo<sup>1</sup>, XIA Ning-shao<sup>2\*</sup>, RUAN Li<sup>1</sup>, HUNG Tao<sup>1</sup>

(1. National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China; 2. The Research Center for Molecular Virology of Fujian Province, The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** In order to characterize the specificity of the monoclonal antibodies (McAbs) against SARS-associated coronavirus (SARS-CoV) nucleocapsid protein and to identify the epitopes recognized by the McAbs, the nucleocapsid proteins of human coronavirus OC43 (HCoV-OC43) and 229E (HCoV-229E) was expressed in *E.coli*. The specificities of four McAbs (1-1C2, 2-2E5, 1-1D6, and 2-8F11) were examined by Western blotting as well as indirect fluorescence assay. Twelve different recombinant truncated N proteins were then used to identify the epitopes recognized by the McAbs by Western blotting. The results showed that: (1) McAbs 1-1C2, 2-2E5, and 1-1D6 recognized neither human coronaviruses HCoV-OC43 and HCoV-229E nor their nucleocapsid proteins, implying a possible specificity of these 3 McAbs to SARS-CoV; (2) The epitopes recognized by McAbs 2-8F11, 2-2E5, and 1-1D6 were located between the 30th and 60th amino acid (a.a.) residues of the SARS-CoV N protein, while the epitopes recognized by the McAb1-1C2 were located between 170th and 184th a.a. residues. The identification of the specific epitopes of SARS-CoV N protein is paramount for the immunological characterization, the development of accurate immunological assay as well as for exploring the pathogenesis of SARS-CoV.

**Key words:** SARS-associated coronavirus (SARS-CoV); Nucleocapsid protein; Monoclonal antibody; Epitope

**摘要:** 为了明确抗 SARS-CoV N 蛋白单克隆抗体的特异性, 并鉴定其识别表位, 首先在 *E.coli* 中表达了人类冠状病毒 229E (HCoV-229E) 和 OC43 (HCoV-OC4) N 蛋白, 用 Western blotting 和间接免疫荧光方法分别检测了 4 株抗 SARS-CoV N 蛋白单克隆抗体 (1-1C2、1-1D6、2-8F11 和 2-2E5) 与 HCoV-OC43 和 HCoV-229E 及其 N 蛋白的交叉反应情况, 而后应用 12 种重组截短型 SARS-CoV N 蛋白对上述 4 种单克隆抗体的识别表位进行了初步定位。结果显示: (1) 在 4 株抗 N 蛋白单克隆抗体中, 1-1C2、1-1D6 和 2-2E5 不与 HCoV-OC43 和 HCoV-229E 及其 N 蛋白发生交叉反应, 为 SARS-CoV N 蛋白特异性抗体; (2) 2-8F11、1-1D6 和 2-2E5 针对的抗原表位位于

收稿日期: 2005-11-09, 修回日期: 2005-12-22

\* 基金项目: 国家 863 计划“非典型肺炎防治关键技术及产品研制”专项 (2003AA208403); 欧盟科技项目 EPISARS (511063)

\*\* 通讯作者: 王健伟 (1968-), 山东烟台人, 博士, 副研究员, 主要从事病毒基因工程与分子病毒学研究。

Corresponding authors. E-mail: wangjw28@vip.sina.com, nsxia@jianxian.xmu.edu.cn

SARS-CoV N 蛋白的 aa 30-60, 1-1C2 针对的抗原表位则位于 SARS-CoV N 蛋白的 aa 170-184。这一研究为阐明 SARS-CoV N 蛋白的免疫学特征, 建立特异性免疫诊断技术和研究其致病机制提供了必要的依据和材料。

**关键词:** SARS 相关冠状病毒(SARS-CoV); 核衣壳蛋白; 单克隆抗体; 抗原表位

**中图分类号:** R511

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1003-5125(2006)03-0207-06

SARS 为新发疾病, 其致病机理不清, 尚无有效的治疗手段, 而且该病病程短、发展快、愈后差, 所以寻找快速有效的诊断方法, 早期发现、早期治疗就显得尤为重要。目前国内外常用的针对 SARS 相关冠状病毒 (SARS-associated coronavirus, SARS-CoV) 的检测方法主要有三种: (1) 应用荧光定量 RT-PCR、RT-PCR 等检测病毒 RNA<sup>[1-3]</sup>; (2) 应用间接免疫荧光, 或应用重组 N 蛋白或灭活全病毒作抗原的 ELISA 检测抗体<sup>[4]</sup>; (3) 应用夹心 ELISA 检测病毒 N 蛋白<sup>[5]</sup>。SARS 病人血液里的 IgM 抗体通常在感染 7d 后出现, 14d 出现高峰<sup>[6]</sup>, 所以抗体检测显然不适用于早期诊断。通过 RT-PCR 检测病毒 RNA 比较敏感, 对 SARS 早期病原诊断有一定价值, 但是 RT-PCR 方法容易发生样品交叉污染而出现假阳性结果。由于已知 SARS-CoV N 蛋白抗体与其它人类冠状病毒 OC43 和 229E 存在交叉反应<sup>[7,8]</sup>, 如果能筛选出 SARS-CoV 的特异性表位, 基于该表位的抗原和针对该表位的抗体则可以为 SARS-CoV 的特异性检测提供保障。为此, 我们对自行制备的抗 SARS-CoV N 蛋白的单克隆抗体 (monoclonal antibody, McAb) 的特异性进行了鉴定, 并利用这些 McAb 筛选出若干 SARS-CoV 特异性的抗原表位, 以期为 SARS-CoV 的抗原或抗体特异性检测的深入研究提供参考和依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

碱性磷酸酶标记的抗鼠 IgG 抗体为美国 Pierce 公司产品。FITC 标记的抗鼠 IgG 抗体为美国 Sigma 公司产品。抗 6×His 单克隆抗体为美国 Sigma 公司产品。HCoV-229E 和 HCoV-OC4 毒株, 小鼠抗 HCoV-229E 和抗 HCoV-OC43 多克隆抗体均由本所应急反应中心提供。抗 SARS-CoV N 蛋白 McAb 1-1C2、1-1D6、2-8F11 和 2-2E5 为本室自行制备<sup>[9]</sup>。*E.coli* 菌株 DH5 $\alpha$  和 BL21 (DE3), 表达质粒 pET-30a 均为美国 Novagen 公司产品。

全长 SARS-CoV N 蛋白为 *E.coli* 表达产物, 为本室制备<sup>[10]</sup>。纯化的系列 SARS-CoV N 蛋白的截短突变体, 由厦门大学夏宁邵教授提供, 其对应的氨基酸位置分别为: PN160 (aa1-160)、PN194 (aa1-

194)、PN267 (aa1-267)、PN301 (aa1-301)、PN363 (aa1-363)、PN170 (aa1-170)、PN184 (aa1-184)、PN185 (aa30-214)、PN155 (aa60-214)、PN125 (aa90-214)、PN95 (aa120-214) 和 PN75 (aa140-214)<sup>[11]</sup>。

### 1.2 人冠状病毒 229E 和 OC43 N 蛋白的表达

根据 GenBank 公布的人冠状病毒 229E (AF304460) 和 OC43 (AY391777) 基因序列, 人工合成 229E 和 OC43 N 蛋白全长的编码基因, 并在基因的 5' 端和 3' 端分别引入酶切位点 *Sal* I 和 *Xho* I。将合成的 229E 和 OC43 N 蛋白编码基因分别插入表达载体 pET30a, 经 *Sal* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定并经测序正确后, 将表达质粒转入感受态 *E.coli* BL21(DE3), 随机挑取单菌落接种于卡那霉素抗性的 LB 培养基, 于 37℃ 培养过夜, 将过夜培养菌按 1:100 转接 100 mL LB 培养基, 置 37℃ 培养 2h, 以终浓度为 1mmol/L 的 IPTG 诱导 5h 后, 离心收集菌体。

### 1.3 表达蛋白的检测

按文献<sup>[12]</sup>方法进行。将 SDS-PAGE 分离蛋白电转到硝酸纤维素膜上, 用 5% 脱脂奶 4℃ 封闭过夜, 用不同的抗体结合后, 用碱性磷酸酶标记的抗鼠 IgG 抗体反应, 显色后显示杂交信号。

### 1.4 间接免疫荧光试验

用 HCoV-229E 和 HCoV-OC43 感染人横纹肌瘤细胞 (RD $\alpha$ ) (m.o.i.=5), 将感染的细胞制成涂片, 待干燥后, 按文献<sup>[13]</sup>方法用 30% 丙酮-甲醛固定。分别与抗 SARS-CoV N 蛋白 McAb 或抗 HCoV-229E 和 HCoV-OC4 的多克隆抗体以及 FITC 标记的抗鼠 IgG 37℃ 孵育, 在荧光显微镜下观察结果并照相。

## 2 结 果

### 2.1 HCoV-229E 和 HCoV-OC43 N 蛋白的表达

根据 GenBank 公布的 HCoV-229E 和 HCoV-OC43 基因序列, 我们合成了 229E 和 OC43 N 蛋白全长的编码基因, 将其分别插入表达载体 pET-30a, 并转化 *E.coli* BL21 (DE3), 经 IPTG 诱导表达后, 收集菌体, 进行 SDS-PAGE 检测。结果显示, 在 54kD (HCoV-OC43 N) 和 48kD (HCoV-229E N) 处各出现一条明显的特异性蛋白条带, 大小与预期结果相符 (图 1A), 表明 2 种蛋白都得到有效表

达。Western blotting 检测表明, 这些含有 6×His Tag 的重组蛋白均可与抗 6×His 抗体反应, 提示表达产物是正确的 (图 1B)。

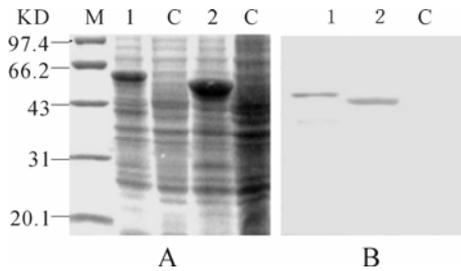


图1 重组 HCoV-229E 和 HCoV-OC43 N 蛋白在 *E.coli* 中的表达  
Fig. 1 Analysis of the recombinant nucleocapsid proteins of HCoV-OC43 and HCoV-229E expressed in *E. coli*.

A: SDS-PAGE. B: Western blotting. 1: OC43 N protein; 2: 229E N protein; C: Negative control; M: Protein markers

## 2.2 抗 SARS-CoV N 蛋白单克隆抗体与 HCoV-229E 和 HCoV-OC43 的交叉反应分析

为了确定抗 SARS-CoV N 蛋白 McAb 的特异性, 我们首先检测了这些抗体与经典人类冠状病毒 HCoV-229E 和 HCoV-OC43 的交叉反应情况。将 HCoV-229E 和 HCoV-OC43 感染的细胞分别制成涂片, 分别用 4 株抗 SARS-CoV N 蛋白 McAb 1-1D6、2-2E5、2-8F11 和 1-1C2 进行了间接免疫荧光试验, 以小鼠抗 HCoV-229E 和抗 HCoV-OC43 多克隆抗体作为阳性对照, 以正常小鼠血清为阴性对照。结果显示, 除阳性对照外, 各标本的细胞浆内均未见到特异性荧光 (见图 2), 提示这些单抗均不与 HCoV-229E 和 HCoV-OC43 发生交叉反应。

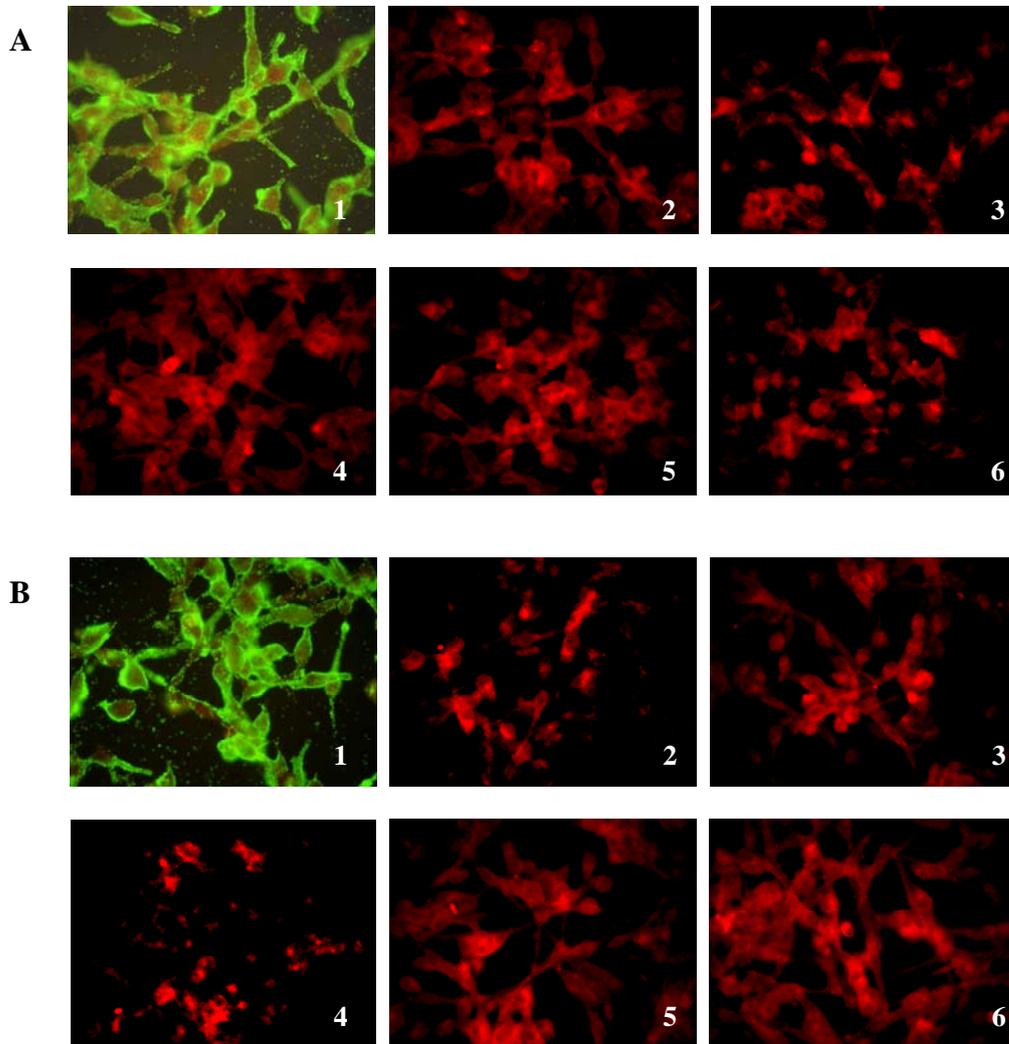


图2 抗 SARS-CoV N 蛋白单克隆抗体与 HCoV-229E 和 HCoV-OC43 感染 RD-A 细胞的间接免疫荧光分析  
Fig. 2 Indirect immunofluorescence assay of HCoV-229E and HCoV-OC43 in RDa cells with different monoclonal antibodies against SARS-CoV nucleocapsid protein

A: HCoV-229E. B: HCoV-OC43. 1, Positive control; 2, 1-1C2; 3, 1-1D6; 4, Negative control; 5, 2-2E5; 6, 2-8F11.

### 2.3 抗 SARS-CoV N 蛋白单克隆抗体与 HCoV-229E 和 HCoV-OC43 N 蛋白的交叉反应分析

为了进一步明确抗 SARS-CoV N 蛋白 McAb 是否和 HCoV-229E 和 HCoV-OC43 N 蛋白发生交叉反应,我们将 *E.coli* 表达的 SARS-CoV、HCoV-229E 和 HCoV-OC43 重组 N 蛋白用 SDS-PAGE 分离后,分别用 4 株 McAb 进行 Western blotting 检测,观察其与 HCoV-229E 和 HCoV-OC43 N 蛋白的反应情况。结果显示: 1-1D6、2-2E5 和 1-1C2 与 HCoV-229E N 蛋白(48 KD)和 HCoV-OC43 N 蛋白(54 KD)相应位置均无特异性反应条带出现,而 2-8F11 分泌上清液则与 HCoV-229E N 蛋白和 HCoV-OC43 N 蛋白均发生交叉反应;4 株 McAb 与 SARS-CoV N 蛋白在相应大小位置(46 KD)均有特异性反应条带出现(图 3)。说明在我们获得的 4 株单抗中,有 3 株是特异性识别 SARS-CoV N 蛋白的。

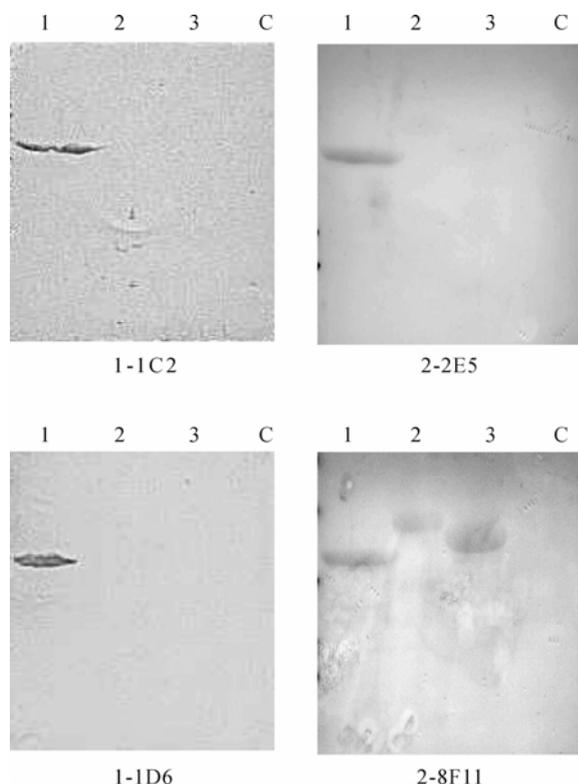


图 3 抗 SARS-CoV N 蛋白单克隆抗体与 HCoV-229E 和 HCoV-OC43 重组 N 蛋白的 Western blotting 反应

Fig.3 Reaction of HCoV-229E and HCoV-OC43 nucleocapsid protein with anti-SARS-CoV nucleocapsid protein monoclonal antibodies by Western blotting.

1: SARS-CoV nucleocapsid protein (Positive control); 2: HCoV-OC43 nucleocapsid protein; 3: HCoV-229E nucleocapsid protein; C: Negative control.

### 2.4 单克隆抗体与多种 SARS-CoV N 蛋白截短突变体的反应

在上述工作基础上,我们用不同长度的

SARS-CoV N 蛋白截短突变体与 4 株单克隆抗体分别进行 Western blotting 反应,以初步确定 McAb 的识别表位。首先我们选用 PN160 (aa 1-160)、PN194 (aa 1-194)、PN267 (aa 1-267)、PN301 (aa 1-301) 和 PN363 (aa 1-363) 5 种蛋白进行检测,结果显示,1-1D6、2-2E5 和 2-8F11 与 5 种蛋白区段均发生反应,1-1C2 则与 PN194、PN267、PN301 和 PN363 4 种蛋白区段反应,而不与 PN160 区段反应(见表 1)。说明 1-1D6、2-2E5、2-8F11 识别的表位位于 aa1-160 内;而 1-1C2 株识别的表位位于 aa 160-194。

为了对 4 株 McAb 进行更精确的定位,根据以上的定位结果,我们又用 8 个不同长度的重组 SARS-CoV N 蛋白区段,与上述 4 株单克隆抗体进行 Western blotting 反应,其中 PN160 (aa1-160)、PN170 (aa1-170) 和 PN184 (aa1-184) 用于 1-1C2 株检测,PN185 (aa30-214)、PN155 (aa60-214)、PN125 (aa90-214)、PN95 (aa120-214) 和 PN75 (aa140-214) 用于 1-1D6、2-2E5 和 2-8F11 株检测,结果显示,1-1C2 只与 PN184(aa1-184)反应,1-1D6、2-2E5 和 2-8F11 只与 PN185 (aa30-214) 反应(见表 1)。这些结果提示单克隆抗体 1-1D6、2-2E5、2-8F11 识别的表位可能位于 aa30-60,而 1-1C2 株识别的表位大致位于 aa 170-184。

表 1 4 株单克隆抗体与不同重组 SARS-CoV N 蛋白区段的反应情况

Table 1 Reaction of different nucleocapsid protein fragments with 4 monoclonal antibodies by Western blotting

Truncated proteins		Monoclonal antibodies			
Name	Domain (aa)	1-1D6	2-2E5	2-8F11	1-1C2
PN160	1~160	+	+	+	-
PN170	1~170	/	/	/	-
PN184	1~184	/	/	/	+
PN194	1~194	+	+	+	+
PN267	1~267	+	+	+	+
PN301	1~301	+	+	+	+
PN363	1~363	+	+	+	+
PN185	30~214	+	+	+	/
PN155	60~214	-	-	-	/
PN125	90~214	-	-	-	/
PN95	120~214	-	-	-	/
PN75	140~214	-	-	-	/

Notes: +: Positive; -: Negative; /: Not Done.

## 3 讨论

N 蛋白在 SARS-CoV 诊断中具有重要地位。首先该蛋白氨基酸序列相对保守,与其他冠状病毒的同源性为 22.6%~33.0%<sup>[14]</sup>。刘树春等利用生物信息

学方法比较了中15株来自不同国家和地区的 SARS-CoV N蛋白的核苷酸和氨基酸序列, 发现其核苷酸和氨基酸的长度是完全相同的, 对该15株N蛋白的核苷酸比对分析发现, 其同源性可达99%以上<sup>[15]</sup>。其次, N蛋白在SARS-CoV感染的过程中大量复制, 其mRNA和蛋白含量在所有病毒编码产物中是最高的<sup>[16]</sup>。在感染12h后, N蛋白的mRNA表达较其它结构蛋白高3-10倍<sup>[17]</sup>, 因此便于检测。再次, 大多数冠状病毒N蛋白极性氨基酸含量高, 亲水性和抗原性都很强<sup>[18-20]</sup>, 研究发现, SARS-CoV N蛋白也具有很强的免疫原性, 可以诱导机体产生很强的免疫应答。我们对SARS血清中抗体的检测研究发现, 针对N蛋白的抗体出现的较早而且滴度较其它结构蛋白要高<sup>[21]</sup>。Krokhin等对SARS-CoV基因编码的蛋白质质谱分析结果也表明N蛋白是主要的免疫原, 可用作早期诊断<sup>[22]</sup>。因此对其抗原或抗体的检测对于SARS诊断具有重要意义。

但近来有研究发现, 人冠状病毒OC43或229E感染的患者恢复期血清可以与SARS-CoV N蛋白发生交叉反应, 这提示SARS-CoV的N蛋白可能和这2种人冠状病毒OC43和229E有共同抗原表位, 因此在应用SARS-CoV抗体检测N蛋白或用N蛋白作抗原检测抗体的过程中就有可能出现假阳性结果, 给SARS的预防控制决策造成干扰。故而要继续使用N蛋白作为检测抗原, 就必须确定其特异性表位, 并据此改造现有的基因工程抗原, 使改造过的抗原能摒弃交叉反应抗原的干扰, 可用于SARS-CoV特异性抗体的检测。在此基础上也可利用这些表位确定SARS-CoV N蛋白的特异性单克隆抗体, 用于SARS-CoV的早期抗原诊断。为了确定所获抗SARS-CoV N蛋白McAb的特异性, 我们分别将4株McAb与培养的人冠状病毒OC43和229E进行间接免疫荧光试验, 并与表达OC43和229E的N蛋白进行Western blotting反应, 结果显示其中3株(1-1C2、1-1D6和2-2E5)不与HCoV-OC43和HCoV-229E及其N蛋白发生交叉反应, 可能为SARS-CoV N蛋白特异性抗体, 这为SARS患者血清N蛋白特异性检测打下基础。

一些学者已对SARS-CoV N蛋白抗原决定簇进行了研究, Chen等分析了SARS-CoV N蛋白不同区域的抗原性, 鉴定出4个主要的抗原决定簇区域, 分别命名为EP1(aa51-71)、EP2(aa134~208)、EP3(aa249~273)和EP4(aa349~422)<sup>[23]</sup>。另外, Lin等研究显示N1(aa21-44)是SARS-CoV N蛋白中抗原性较强的决定簇<sup>[24]</sup>。为了确定我们所获抗SARS-CoV

N蛋白单克隆抗体识别的抗原表位, 我们用表达的截短型N蛋白对4种SARS-CoV N蛋白McAb识别表位进行了初步定位, 发现其中3株McAb(2-8F11、1-1D6和2-2E5)针对的抗原表位位于SARS-CoV N蛋白的aa30~60, 另外1株McAb(1-1C2)针对的抗原表位则位于SARS-CoV N蛋白的aa170-184。这些抗原决定簇所处区域与我们初步确定的抗原表位相重叠, 由此推断: 2-8F11、1-1D6和2-2E5可能位于aa30-44或aa51-60区域。识别不同结构域McAb的获得, 为N蛋白功能的研究打下基础, 也为SARS-CoV N蛋白抗原或抗体检测方法的进一步研究提供了必要的信息。

## References

- [1] Jiang S S, Chen T C, Yang J Y, *et al.* Sensitive and quantitative detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection by real-time nested polymerase chain reaction [J]. *Clin Infect Dis*, 2004, 38:293-296.
- [2] Poon L L, Chan K H, Wong O K, *et al.* Detection of SARS coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome by conventional and real-time quantitative reverse transcription-PCR assays [J]. *Clin Chem*, 2004, 50:67-72.
- [3] Yam, W C, Chan K H, Poon L L, *et al.* Evaluation of reverse transcription-PCR assays for rapid diagnosis of severe acute respiratory syndrome associated with a novel coronavirus [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41:4521-4524.
- [4] Shi, Y L, Yi Y P, Li P, *et al.* Diagnosis of severe acute respiratory syndrome (SARS) by detection of SARS coronavirus nucleocapsid antibodies in an antigen-capturing enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41:5781-5782.
- [5] 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, 12:135-40.
- [6] Li G, Chen X, Xu A. Profile of specific antibodies to the SARS-associated coronavirus [J]. *N Engl J Med*, 2003, 349 (5): 508-509.
- [7] Woo P C, Lau S K, Wong B H, *et al.* False-positive results in a recombinant severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) nucleocapsid enzyme-linked immunosorbent assay due to HCoV-OC43 and HCoV-229E rectified by Western blotting with recombinant SARS-CoV spike polypeptide [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42:5885-5888.
- [8] Che X Y, Qiu L W, Liao Z Y, *et al.* Antigenic cross-reactivity

- between severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus and human coronaviruses 229E and OC43 [J]. *J Infect Dis*. 2005, 191: 2033-2037
- [9] Wang Y B, Chang Z R, Wang J W, (王彦斌, 常昭瑞, 王健伟) *et al*. Preparation and characterization of monoclonal antibodies against SARS-associated coronavirus nucleocapsid protein [J]. *Chin J Exp Clin Virol (中华实验和临床病毒学杂志)*, 2004, 18: 316-320.
- [10] Wang Y B, Chang Z Y, Wei H Y, (王彦斌, 常昭瑞, 魏海燕) *et al*. Comparison of potentials of structural proteins of SARS associated coronavirus for serological diagnosis [J]. *Chin J Virol (病毒学报)*, 2005, 21 (4): 259-263.
- [11] Lin J, Ge S X, Wang Y B, (林 鉴, 葛胜祥, 王颖彬) *et al*. Prokaryotic expression of different regions of SARS-CoV nucleocapsid protein[J]. *Chin J Virol (病毒学报)*, 2005, 21 (2): 81-87.
- [12] Jin D Y, Li M F (金冬雁, 黎孟枫). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (分子克隆实验指南)[M]*. 2nd Ed, Science Press (科学出版社), 1993, 880-898.
- [13] Zhu L P, Chen X Q (朱立平, 陈学清). *Immunological Methods (免疫学实验方法) [M]*. People's Military Medicine Press (人民军医出版社), 2000, 368-369.
- [14] Marra M A, Jones S J, Astell C R, *et al*. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus[J]. *Science*, 2003, 300 :1399-1404.
- [15] Liu S C, Zhao Y J, Zhang X, (刘树春, 赵雨杰, 张 学) *et al*. Bioinformatics analysis of function and structure of putative nucleocapsid protein sequence of SARS-CoV[J]. *Chin Biotechnol (中国生物工程杂志)*, 2003, 23(12): 99-102.
- [16] Lai M M and Cavanagh D. The molecular biology of coronaviruses [J]. *Adv Virus Res*, 1997, 48:1-100.
- [17] Hiscox J A, Cavanagh D, Britton P. Quantitation of individual subgenomic mRNA species during replication of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus [J]. *Virus Res*, 1995, 36:119-130.
- [18] Molenkamp R, Spaan W J. Identification of a specific interaction between the coronavirus mouse hepatitis virus A59 nucleocapsid protein and packaging signal [J]. *Virology*, 1997, 239:78-86.
- [19] Akin A, Lin T L, Wu C C, *et al*. Nucleocapsid protein gene sequence analysis reveals close genomic relationship between turkey coronavirus and avian infectious bronchitis virus [J]. *Acta Virol*, 2001, 45:31-38.
- [20] Yu L, Liu W, Schnitzlein W M, *et al*. Study of protection by recombinant fowl poxvirus expressing C-terminal nucleocapsid protein of infectious bronchitis virus against challenge [J]. *Avian Dis*, 2001, 45:340-348.
- [21] Wang Y B, Chang Z R, Ouyang J, *et al*. Profiles of IgG Antibodies to Nucleocapsid and Spike Proteins of SARS-Associated Coronavirus in SARS Patients [J]. *DNA Cell Biol*, 2005, 24: 521-527.
- [22] Krokhin O, Li Y, Andonov A, *et al*. Mass spectrometric characterization of proteins from the SARS virus: a preliminary report [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2003, 2:346-356.
- [23] Chen Z, Pei D, Jiang L, *et al*. Antigenicity analysis of different regions of the severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein [J]. *Clin Chem*, 2004, 50(6):988-995.
- [24] Lin Y, Xu S, Yang R F, *et al*. Identification of an epitope of SARS-coronavirus nucleocapsid protein [J]. *Cell Research*, 2003, 13:141-145.