

分类号：  
学 号：20222113049

密 级：公开  
单位代码：10759

# 石河子大学

## 硕士学位论文



### 牛冠状病毒 S 蛋白多克隆抗体制备、在杆状病毒系统中的真核表达及生物学活性鉴定

学 位 申 请 人	韩翔舒
指 导 教 师	蒋松 副教授 夏俊 研究员
申请学位门类级别	专业硕士
学 科、专 业 名 称	兽医
研 究 方 向	动物临床疾病诊断与防控技术
所 在 学 院	动物科技学院

中国·新疆·石河子  
2024 年 5 月

分类号：  
学 号：20222113049

密 级：公开  
单位代码：10759

# 石河子大学

## 硕 士 学 位 论 文



### 牛冠状病毒 S 蛋白多克隆抗体制备、在杆状病毒 系统中的真核表达及生物学活性鉴定

学 位 申 请 人	韩翔舒
指 导 教 师	蒋松 副教授 夏俊 研究员
申请学位门类级别	专业硕士
学 科、专 业 名 称	兽医
研 究 方 向	动物临床疾病诊断与防控技术
所 在 学 院	动物科技学院

中国·新疆·石河子

2024 年 5 月

**Preparation of polyclonal antibody to bovine coronavirus S protein,  
eukaryotic expression and biological activity identification in  
baculovirus system**

A Dissertation Submitted to

**Shihezi University**

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

**Master of Agriculture**

By

**Han Xiangshu**

**(Master of Veterinary Science)**

Dissertation Supervisor: Prof. Jiang Song

Boffin. Xia Jun

Shihezi, Xinjiang, China

May,2025

# 石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

## 学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：韩翔宇 时间： 2025 年 5 月 20 日

## 使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：韩翔宇 时间： 2025 年 5 月 20 日

导师签名：陈松 时间： 2025 年 5 月 20 日

本研究由

自治区重大科技专项

新疆畜禽疫病防控体系质量提升工程

(项目编号：2023A02007)

天山英才-青年科技拔尖人才项目

牛羊幼畜群发病防控关键技术研究

(项目编号：2022TSYCCX0046)

提供资助

## 摘要

**目的:** 牛冠状病毒 (Bovine Coronavirus, BCoV) 是导致牛腹泻及呼吸道疾病的重要病原体, 其刺突蛋白 (Spike Protein, S 蛋白) 在病毒入侵宿主细胞及诱导免疫应答中发挥关键作用。本研究通过生物信息学分析、原核与真核表达系统构建、多克隆抗体制备及免疫保护性评估, 系统探究了 BCoV S 蛋白的生物学特性及其作为疫苗候选抗原的潜力, 为 BCoV 的防控及诊断技术研发提供理论依据。

**方法:** (1) 基于 BCoV 新疆分离株 XJ-SHZ-37 的 S 基因序列, 利用生物信息学软件预测 S 蛋白的理化性质、跨膜结构域、信号肽、二级与三级结构及 B 细胞表位。克隆 S 蛋白受体结合域 (Receptor Binding Domain, RBD, 310-612aa), 构建重组质粒 pET30a-RBD, 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 中诱导表达。通过镍柱纯化包涵体蛋白, 免疫 Balb/c 小鼠制备多克隆抗体, 并通过间接 ELISA、Western blot 及间接免疫荧光 (IFA) 检测抗体效价与特异性。(2) 扩增 S 蛋白全长基因, 构建重组杆状病毒质粒 pFB-S, 转染至 Sf9 昆虫细胞中表达重组 S 蛋白。通过 PCR、IFA 及 Western blot 验证表达效果, 并优化感染复数 (MOI) 与感染时间。以重组 S 蛋白免疫小鼠, 检测血清中 IL-12、IFN- $\gamma$  及 IL-10 水平, 评估 Th1/Th2 免疫应答; 通过攻毒实验分析免疫组与对照组肠道内容物中 BCoV 核酸阳性率差异。

**结果:** (1) S 蛋白由 1364 个氨基酸组成, 分子量 150.81 kDa, 等电点 5.51。预测其含信号肽位置为 1-14aa、跨膜区位置为 1308-1330aa 及 36 个 B 细胞表位 (RBD 含 12 个)。二级结构以无规卷曲为主, 三级结构与预测模型一致。成功表达 39 kDa 的 RBD 蛋白, 纯化后免疫小鼠获得效价达 1:128,000 的多克隆抗体。Western blot 与 IFA 证实抗体可特异性识别天然 S 蛋白及感染 BCoV 的 HRT-18 细胞。(2) 重组杆状病毒 rBV-S 在 Sf9 细胞中高效表达 150 kDa 全长 S 蛋白, 最佳表达条件为 MOI=1、感染时间 96 h。IFA 显示重组蛋白可被多克隆抗体特异性识别。免疫组小鼠血清 IL-12 与 IFN- $\gamma$  水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), 攻毒后肠道内容物 BCoV 核酸阳性率 (rBV-200 组: 33.3%) 显著低于对照组 (83.3%), 表明重组 S 蛋白可诱导 Th1 型免疫应答并降低感染风险。

**结论:** 本研究成功制备了高特异性 RBD 多克隆抗体, 并建立了杆状病毒真核表达系统用于 S 蛋白的高效生产。免疫实验证实重组 S 蛋白可显著增强细胞免疫应答为 BCoV 亚单位疫苗及诊断试剂的研发奠定了重要基础。

**关键词:** 牛冠状病毒; S 蛋白; 生物学特性; 多克隆抗体; 真核表达

## Abstract

**Objective:** The current cattle breeding industry is severely affected by diarrhea diseases. Previous studies have shown that bovine coronavirus (BCoV) is one of the main pathogens causing cattle diarrhea. This experiment predicted and analyzed the structure and potential functions of the spike protein (S protein) of bovine coronavirus (BCoV), and conducted cloning expression and polyclonal antibody preparation. The S protein of bovine coronavirus was expressed through the eukaryotic expression system, and the cytokine levels were measured after immunizing mice to evaluate its immunogenicity as an immunogen. This provides a basis for vaccine research and laboratory diagnosis.

**Methods:** (1) The biological characteristics of the S protein were predicted and analyzed using bioinformatics software. The receptor binding domain (RBD) gene was cloned and ligated to the prokaryotic expression vector pET-30a(+), and the recombinant plasmid was constructed and transformed into BL21 competent cells. The expression was induced by IPTG, and the expressed protein was purified by nickel column and used to immunize mice to prepare polyclonal antibodies and detect them. (2) The full-length S gene was amplified by PCR and cloned into the pFastBacHT B vector to construct the recombinant plasmid pFB-S. The pFB-S with correct sequencing was transformed into DH10Bac competent cells to obtain the recombinant bacmid (rBacmid-S), which was verified by PCR and then transfected into Sf9 cells to obtain the recombinant baculovirus (rBV-S) and identified by indirect immunofluorescence (IFA). After optimizing the expression conditions, mice were immunized and the levels of IL-12 and IFN- $\gamma$  in mouse serum were determined.

**Results:** (1) The S protein is composed of 1364 amino acids, with a relative molecular mass of 150.81 kDa and an isoelectric point of 5.51. The instability index is 33.22 and the hydrophobicity index is 87.22. The amino acids 1-1307 are the extracellular region, 1308-1330aa are the transmembrane region, and 1331-1363aa are the intracellular region. The amino acids 1-14 are the signal peptide, and 310-612aa are the RBD. There are 36 potential B-cell epitopes, with 12 in the RBD. The  $\alpha$ -helix accounts for 27.95%, the  $\beta$ -sheet accounts for 23.04%, and the random coil accounts for 49.01% of the protein. The analysis of the tertiary structure of the S protein is basically consistent with the prediction of the secondary structure. (2) The RBD of the S protein was successfully cloned, and its size was consistent with the expectation. After ligation with the vector pET-30a(+), double enzyme digestion and sequencing verification showed that the vector was successfully constructed. After SDS-PAGE and Western blot verification of successful protein expression, the purified protein was used to immunize mice and the serum was isolated. The titer could reach 1: 128000. Indirect immunofluorescence and Western blot verification showed that the polyclonal antibody could recognize the viral S protein, indicating that the recombinant protein has good

immunogenicity and can induce the production of virus-specific antibodies. (3) PCR identification and sequencing results showed that the recombinant plasmid was successfully constructed. Sf9 cells infected with rBV could produce an immune fluorescence reaction with the polyclonal antibody against bovine coronavirus, indicating that the S gene was correctly expressed in rBV. (4) After optimizing the expression conditions, rBV-S was massively cultured, and the culture supernatant was harvested to immunize mice. Seven days later, 200  $\mu$ L (TCID<sub>50</sub>) of BCoV virus liquid was injected, and the levels of IL-12 and IFN- $\gamma$  in mouse serum were determined. The results showed that with the increase of immunization times, the levels of cytokines in serum increased. Compared with the control group, the positive rate of BCoV PCR in the intestinal contents of immunized mice after challenge was reduced, indicating that rBV-S has immunogenicity.

**Conclusion:** The structure and function of the S protein of bovine coronavirus were successfully analyzed and predicted. The recombinant protein and polyclonal antibody of the receptor binding domain of the S protein were obtained. The S protein was successfully expressed and used as an immunogen to immunize mice, which could induce the production of cytokines and reduce the positive rate of BCoV nucleic acid in challenged mice. This laid the foundation for the research of recombinant protein subunit vaccines.

**Key words:** Bovine coronavirus; S protein; Biological characteristics; Polyclonal antibody; Eukaryotic expression

# 目 录

摘要.....	I
Abstract.....	II
缩略词表.....	VII
第 1 章 绪论.....	1
1.1 BCoV 的研究进展.....	1
1.1.1 BCoV 的形态结构及理化特性.....	1
1.1.2 BCoV 基因组学研究进展.....	2
1.1.3 BCoV 的结构蛋白及功能.....	2
1.1.4 BCoV 的流行病学特点.....	4
1.1.5 BCoV 的临床症状.....	6
1.1.6 BCoV 的病理变化及预防方法.....	7
1.1.7 BCoV 实验室检测技术.....	9
1.2 刺突蛋白在冠状病毒感染中的作用.....	10
1.3 杆状病毒表达系统研究进展.....	12
1.4 研究目的与研究意义.....	13
1.5 研究内容.....	13
1.5.1 BCoV S 蛋白生物学特性分析及其受体结合域的多克隆抗体制备.....	13
1.5.2 BCoV S 蛋白真核表达及生物学活性分析.....	14
第 2 章 牛冠状病毒 S 蛋白遗传进化分析与受体结合域的多克隆抗体制备.....	15
2.1 材料与方法.....	15
2.1.1 细胞、病毒和实验动物.....	15
2.1.2 试验试剂和器材设备.....	16
2.1.3 遗传进化分析.....	17
2.1.4 生物学信息分析.....	17
2.1.5 空载质粒载体的扩增及提取.....	17
2.1.6 病毒 RNA 提取及反转录.....	17
2.1.7 目的片段的扩增及回收.....	18
2.1.8 质粒双酶切.....	19
2.1.9 同源重组及质粒转化与鉴定.....	19
2.1.10 目的质粒转化及诱导表达.....	19

2.1.11	蛋白最佳表达条件确定 .....	19
2.1.12	包涵体蛋白纯化 .....	20
2.1.13	多克隆抗体制备及效价测定 .....	20
2.1.14	多克隆抗体 Western blot 鉴定 .....	20
2.1.15	多克隆抗体间接免疫荧光鉴定 .....	21
2.2	结果与分析 .....	21
2.2.1	遗传进化树构建 .....	21
2.2.2	生物信息学分析 .....	22
2.2.3	目的基因片段扩增结果 .....	24
2.2.4	重组转载体菌液鉴定 .....	24
2.2.5	重组转化载体双酶切鉴定结果 .....	24
2.2.6	蛋白表达与表达形式检测结果 .....	25
2.2.7	表达条件筛选结果 .....	25
2.2.8	蛋白 Western blot 分析 .....	26
2.2.9	蛋白纯化结果 .....	26
2.2.10	多克隆抗体效价测定 .....	27
2.2.11	应用多克隆抗体进行间接免疫荧光检测 .....	27
2.3	讨论 .....	28
2.4	小结 .....	29
第 3 章	牛冠状病毒 S 蛋白真核表达及生物学活性分析 .....	30
3.1	材料与方法 .....	30
3.1.1	试验动物 .....	30
3.1.2	细胞、病毒 .....	30
3.1.3	试验试剂和器材设备 .....	31
3.1.4	空载质粒载体的扩增及提取 .....	31
3.1.5	病毒 RNA 提取及反转录 .....	31
3.1.6	目的片段的扩增及回收 .....	31
3.1.7	质粒双酶切 .....	32
3.1.8	同源重组及质粒转化与鉴定 .....	32
3.1.9	重组质粒转化 DH10Bac 感受态细胞 .....	33
3.1.10	穿梭杆粒 Bacmid 提取及验证 .....	33
3.1.11	SF9 细胞复苏及传代 .....	34
3.1.12	重组杆状病毒转染 SF9 细胞及传代 .....	34
3.1.13	重组杆状病毒间接免疫荧光鉴定 .....	34

3.1.14 重组杆状病毒 Western blot 验证 .....	34
3.1.15 重组杆状病毒表达条件优化 .....	35
3.1.16 重组蛋白的大量表达 .....	35
3.1.17 小鼠免疫攻毒 .....	35
3.2 结果与分析 .....	37
3.2.1 目的基因片段扩增结果 .....	37
3.2.2 重组载体载体 pFastBacHTB-S 双酶切鉴定 .....	37
3.2.3 重组病毒杆粒 rBacmid-S 的 M13 PCR 鉴定 .....	37
3.2.4 重组杆状病毒感染昆虫细胞 .....	38
3.2.5 P0、P1、P2 代病毒液核酸的 M13 鉴定 .....	38
3.2.6 目的蛋白的表达及间接免疫荧光鉴定 .....	39
3.2.7 目的蛋白表达条件优化 .....	39
3.2.8 细胞因子 IL-10 的检测结果 .....	40
3.2.9 细胞因子 IL-12 的检测结果 .....	41
3.2.10 细胞因子 IFN- $\gamma$ 的检测结果 .....	41
3.2.11 免疫攻毒后小鼠腹腔剖检及小肠组织 RT-PCR 鉴定结果 .....	42
3.3 讨论 .....	43
3.4 小结 .....	43
全文结论 .....	44

## 缩略词表

英文缩写	英文全称	中文名称
BCoV	Bovine coronavirus	牛冠状病毒
UTR	Untranslated Regions	非翻译区
HCT-8	Human Ileocecal Colorectal Adenocarcinoma Cell Line	人回盲肠癌细胞
HRT-18	Human Rectal Tumor-18	人结肠癌肿瘤细胞
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附实验
CRCoV	Canine respiratory coronavirus	犬型呼吸道冠状病毒
BRDC	Bovine respiratory disease complex	牛呼吸疾病综合征
FITC	Fluorescein 5-isothiocyanate	异硫氰酸荧光素酯
PBS	Phosphate-Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
ORF	Open reading frame	开放阅读框
OD	Optical density	光密度
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-Thiogalactopyranoside	异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷
CPE	Cytopathic effect	细胞病变效应
BCA	Bicinchoninic acid	蛋白浓度定量测定

## 第1章 绪论

近年来,随着社会经济发展和人民生活水平提高,畜产品的需求也逐渐增大,推动了养殖业的显著发展。与此同时,牛冠状病毒感染所引发的引发问题也日渐严重,牛冠状病毒是一种常见的牛腹泻病原,美国早在1972年就报道并分离了此病毒<sup>[1]</sup>。BCoV不仅严重危害动物健康,也危害人类健康。BCoV在世界范围内广泛感染,感染导致的犊牛腹泻、成年牛的冬季腹泻及犊牛的呼吸系统疾病,都对畜牧行业带来了重大的经济损失<sup>[2,3]</sup>。除此之外,牛冠状病毒(BCoV)还具有广泛的宿主范围和强大的跨物种传播能力,能够感染多种动物,包括牛、骆驼、鹿等<sup>[4]</sup>。研究表明,BCoV的基因组具有较高的变异性,这可能为其跨物种传播提供了分子基础<sup>[6]</sup>。这种特性使得BCoV在自然界中广泛传播,使其成为畜牧业中一种危害严重的病原体<sup>[5]</sup>,并可能通过跨物种感染对其他动物甚至人类健康构成潜在威胁。基于以上研究,监测病毒变异和跨物种传播风险是防控工作的重点之一。感染BCoV的牛可能长期携带病毒,成为隐性传染源。病毒颗粒通过粪便排出体外后仍保持感染性,这为病毒在牛群中的持续传播创造了条件<sup>[7]</sup>。在冬季较长的地区新疆,低温环境为病毒的存活提供了有利条件,增加了牛群大规模感染的风险。因此,冬季是防控BCoV传播的关键时期。因此,我们更加需要通过加强监测、研发疫苗、优化环境管理以及推动跨学科合作,可以有效控制病毒的传播,保障养牛业的健康发展的同时为其他冠状病毒的防控提供借鉴<sup>[8-12]</sup>。

### 1.1 BCoV 的研究进展

#### 1.1.1 BCoV 的形态结构及理化特性

BCoV 是一种有包膜、无节段、单链正链 RNA 病毒,呈球形,直径在 60 nm -220 nm 之间,包膜外具有独特的刺突糖蛋白,类似于皇冠,这是冠状病毒名称的由来<sup>[13]</sup>。

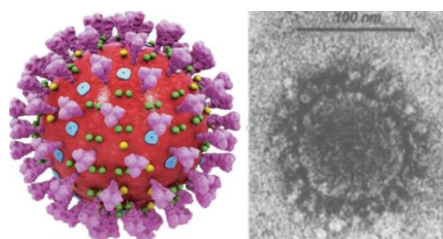


图 1-1 冠状病毒结构模式图与病毒粒子电镜图

Figure 1-1 Structural model of the coronavirus and electron microscope image of the virus particle

BCoV 的环境稳定性受多种因素影响,包括温度、湿度、pH 值以及化学和物理灭活方式。BCoV 在低温和高湿度的条件下表现出较强的稳定性。研究表明,病毒在此类环境中可存活长达 120 小时,这为其在寒冷季节的传播提供了潜在条件。同时 BCoV 对热极为敏感,在 56°C 的高温下,仅需 10 分钟即可使病毒失活;而在 37°C 的环境中,病毒在数小时内便会丧失感染能力。这种热敏感性表明,高温环境或热处理可有效抑制病毒传播。并且 BCoV 在粪便中至少可存活 96 小时,这表明粪便可能是病毒传播的重要媒介之一,因此在畜牧业养殖过程中或动物密集的环境中需要特别注意卫生管理<sup>[14-16]</sup>。作为包膜病毒,BCoV 对洗涤剂和脂质溶剂乙醚、氯仿等高度敏感,这些物质能够破坏病毒的脂质包膜,使其失去活性,常规消毒剂福尔马林也能有效灭活 BCoV,这为病毒防控提供了多种化学手段<sup>[17]</sup>。BCoV 在 pH 值为 5.0 的环境中表现出一定的耐受性,但在 pH 值过高或过低的极端条件下,其结构蛋白会遭到破坏,从而导致感染力显著下降。紫外辐射能够直接破坏病毒的 RNA,抑制其复制和传播能力,因此紫外线消毒是一种高效的物理灭活方法。除了上述因素外,BCoV 的稳定性还可能受到有机物质蛋白质、脂肪等的影响。这些物质可能为病毒提供保护,使其在特定环境中存活更长时间。

### 1.1.2 BCoV 基因组学研究进展

冠状病毒基因组是一不分节段的单股正链 RNA,基因组长度约为 26 kb~32 kb。BCoV 基因组在两端具有 5'UTR 和 3'UTR 非翻译区,在 5'端具有甲基化帽结构,在 3'端具有 ploy(A) 尾部结构<sup>[18,19]</sup>。冠状病毒属于正链 RNA 病毒,其结构特征与其他正链 RNA 病毒相似,但在复制机制和基因组表达方面具有独特的特点。成熟的冠状病毒粒子由核衣壳和包膜组成。核衣壳包含病毒基因组 RNA 和核蛋白(N 蛋白),而包膜上镶嵌有刺突蛋白(S 蛋白)、膜蛋白(M 蛋白)和包膜蛋白(E 蛋白)<sup>[20]</sup>。这些结构蛋白在病毒吸附、侵入和组装过程中发挥关键作用,但是成熟的病毒粒子中并不包含 RNA 病毒复制所需的 RNA 依赖性 RNA 聚合酶。这一特性与其他一些 RNA 病毒具有不同之处,后者在病毒粒子中携带依赖性 RNA 聚合酶<sup>[21]</sup>。

### 1.1.3 BCoV 的结构蛋白及功能

牛冠状病毒属于  $\beta$  冠状病毒属, BCoV 基因组拥有 10 个开放阅读框,其中部分阅读框用于编码 HE、S、E、M、N 蛋白。同时,阅读框 1a 和 1b 专门编码非结构复制酶多蛋白 pp1a 和 pp1ab<sup>[22,23]</sup>。病毒编码的木瓜样蛋白酶和 3C 样蛋白酶水解这两种蛋白,并且加工而后产生 16 种调节 RNA 合成和修饰的非结构蛋白。

BCoV HE 基因序列长为 1275 bp,编码的 HE 蛋白在病毒生物学和宿主感染过程中

具有独特且重要的作用。HE 蛋白包含多个功能域, 包括信号肽、受体结合域和中心酯酶域。其中, 凝集素功能结构域和酯酶功能结构域是其核心功能区域, 凝集素功能结构域使 HE 蛋白能够与动物红细胞表面的 O-乙酰唾液酸结合, 引发血凝反应<sup>[24]</sup>。这一特性是 BCoV 区别于其他冠状病毒的重要特征, 酯酶功能结构域能够从 9-O-乙酰化神经氨酸中切割乙酰基, 因此这种乙酰酯酶活性在病毒与宿主细胞的相互作用中可能起到重要的调节作用。HE 蛋白能够与 O-乙酰唾液酸结合, 抑制宿主免疫系统对病毒的攻击, 从而促进病毒的传播和感染<sup>[25]</sup>。此外 HE 蛋白还可以帮助病毒更有效地吸附和侵入宿主细胞, 这种多重附着机制可能增强了 BCoV 的感染效率<sup>[26, 27]</sup>。HE 蛋白还具有引发中和抗体的能力, 同时兼具感染性、抗原性和免疫遮蔽性<sup>[26, 27]</sup>。这些特性使其成为病毒免疫逃逸的重要因素, 免疫遮蔽性使得 HE 蛋白能够在一定程度上逃避宿主免疫系统的识别, 从而延长病毒在宿主体内的存活时间。

BCoV S 基因全长 4092 bp, 编码 1364 个氨基酸<sup>[28]</sup>。作为 I 类病毒的融合蛋白, S 蛋白不仅包含丰富的抗原表位, 而且在生物学功能上扮演着关键角色。此外, S 蛋白还可以参与病毒的转录和翻译过程, 并且可能影响病毒的潜伏期和传染力<sup>[29]</sup>。由于 S 蛋白是所有冠状病毒中的一个共通特征, 这使得 S 蛋白成为深入研究和理解病毒侵染过程以及开发防治策略的重要焦点<sup>[30]</sup>。该蛋白包含两个疏水区域, 裂解后形成 S1 和 S2 两个亚基, 主要参与细胞的黏附、血凝和膜融合。具体而言, S1 亚基包括信号肽、超变区、毒力位点以及糖基化位点, 其功能主要涵盖病毒与宿主细胞的识别与结合。S2 包括疏水区、跨膜区、毒力位点及糖基化位点, 与病毒细胞间的融合有关<sup>[31]</sup>。

BCoV N 基因全长 1347 bp, 编码 449 个氨基酸, 是病毒基因组中相对保守的区域之一。尽管 N 基因在不同地区可能存在核苷酸变异, 但其保守性使其成为病毒检测和系统发育分析的重要靶标。N 蛋白的 RNA 结合域能够与病毒基因组 RNA 紧密结合, 参与病毒 RNA 的合成和包装。此研究表明, N 蛋白能够促进亚基因组 RNA 的合成, 从而高效表达病毒的结构蛋白和非结构蛋白。

BCoV M 基因全长 693 bp, 编码 231 个氨基酸, 形成包膜 M 蛋白, M 蛋白是病毒包膜的重要组成部分, 在病毒的合成过程中发挥着多种关键作用<sup>[32]</sup>。其包含 3 个跨膜域, 这些结构使其能够嵌入病毒包膜中, 维持病毒颗粒的结构稳定性<sup>[33]</sup>。同时其还具有高度保守的结构域, 这些区域在冠状病毒家族中普遍存在<sup>[34]</sup>。M 蛋白在病毒颗粒的组装和释放过程中起核心作用, 它与病毒的其他结构蛋白 S 蛋白和 E 蛋白相互作用, 促进病毒包膜的形成和病毒颗粒的成熟, 并且它能够携带脂质、核糖体等多种分子, 为病毒提供所需的能量和物质基础<sup>[35]</sup>。M 蛋白是病毒包膜的主要成分之一, 通过与宿主细胞膜的相互作用, 帮助病毒从宿主细胞中出芽释放<sup>[36]</sup>。

BCoV E 基因全长 255 个核苷酸, 编码预测蛋白质 85 个氨基酸。E 蛋白位于膜蛋白的内部, 在病毒粒子包装、病毒粒子释放和发病机理中起作用时发挥重要作用<sup>[37]</sup>。小衣

壳蛋白包含一个单一疏水结构域、靶向高尔基体复合膜，并且在体外具有阳离子通道活性，离子电导也受膜脂质组成的控制，只有少数包膜蛋白被组装成病毒粒子<sup>[38]</sup>。病毒粒子的组装由冠状病毒的 E 蛋白和 M 蛋白控制，研究证实缺失 E 蛋白的突变株失去了其致病力<sup>[39]</sup>。

#### 1.1.4 BCoV 的流行病学特点

BCoV 起源于 Mebus 等人在 1972 年分离鉴定出的一种可以引起犊牛严重腹泻的病毒，通过实验室诊断，将该病毒鉴定为冠状病毒，并且观察到病毒损伤犊牛肠组织。McNulty 等人在 1984 年从犊牛肺脏中分离出一株 BCoV，该犊牛临床诊断为支气管肺炎<sup>[40]</sup>。因此，确定 BCoV 除引起牛消化道感染也会引起呼吸道感染。

自从 BCoV 被首次发现之后，世界各地均有 BCoV 引起腹泻的报道，但因为国家不同，犊牛腹泻的发病率和发病时间也各不相同。在 2000 年前，发病情况主要集中在美洲、欧洲，其中美洲的美国、加拿大检测引起犊牛腹泻的 BCoV 阳性率较高，最高达 84%。欧洲的英国和比利时的阳性检出率分别为 14% 和 8%<sup>[41, 42]</sup>。2000~2009 年，美洲的巴西仍检测出 68.6% 较高的阳性率，亚洲的韩国其次，阳性率最高为 58.2%；欧洲荷兰和意大利的阳性率也在不断升高，分别为 2.80% 和 46.74%<sup>[43, 44]</sup>。到了 2010 至 2019 年，BCoV 在世界范围内出现了蔓延的趋势，各个州的阳性率不断升高，非洲也出现了 BCoV 感染的情况，阿尔及利亚的粪便样本的阳性率为 20.73%。根据目前的数据，BCoV 首先在美洲被发现，然后相继在亚洲、欧洲、大洋洲和非洲出现，并出现全世界流行的趋势。根据目前血清学的调查分析，虽然每个国家的血清抗体阳性率不同，但阳性率都很高，其中在加拿大和瑞典，阳性率最高达 100%，美国的血清检测阳性率在 11%~91% 之间，法国的血清检测阳性率在 16%~72% 之间，加纳的病原体检测阳性率仅为 0.3%，但血清抗体阳性率达到 55.8%<sup>[45, 46]</sup>。

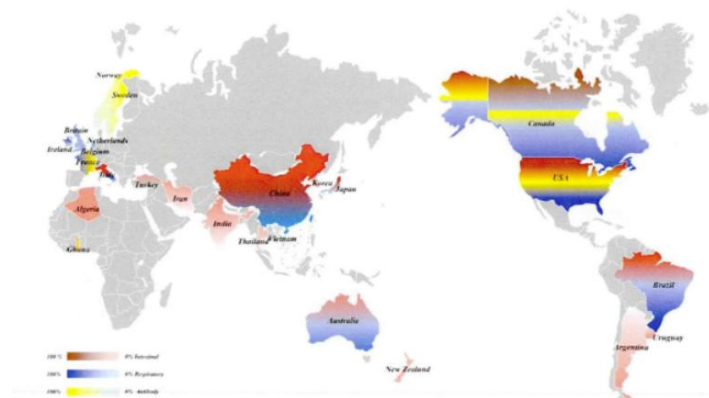


图 1-2 BCoV 全球传播情况<sup>[47]</sup>

Figure 1-2 Global transmission of BCoV

1988 年王继远等首次在我国发现 BCoV，随后其他省份也陆续检有 BCoVd 的报道