

网络出版时间:2022-1-25 7:58 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20220124.0940.017.html

抗 SARS-CoV-2 N 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定

刘江丽^{1*}, 李盈盈^{1*}, 王佳雯¹, 许喻钧^{1,2}, 张艳¹, 黄江涛^{1,2}, 胡祖权¹, 曾柱^{1,2}

摘要 目的 制备针对严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (SARS-CoV-2) 核衣壳蛋白 (N) 的单克隆抗体 (mAbs) 并鉴定其生物学特性。方法 利用大肠杆菌原核表达重组 SARS-CoV-2 N 蛋白, 通过杂交瘤技术将小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 与经重组蛋白免疫的 BALB/c 小鼠的脾细胞进行融合, 采用间接 ELISA 法和有限稀释法筛选出阳性杂交瘤细胞株, 并鉴定其亚型, 腹水法制备 mAbs, Protein G 亲和柱纯化后通过 SDS-PAGE、间接 ELISA 和 Western blot 检测其纯度、效价及特异性。结果 获得 5 株能稳定分泌抗 SARS-CoV-2 N 蛋白

mAbs 的杂交瘤细胞株, 分别命名为 N1~5。通过腹水法制备获得 5 个 mAbs, 亚型鉴定结果显示 1 个为 IgG2a * κ 型, 4 个为 IgG1 * κ 型, 其效价均达到 2×10^4 以上。Western blot 结果表明 5 个 mAbs 都能与重组 SARS-CoV-2 N 蛋白结合。结论 通过杂交瘤技术成功制备了 5 个能特异性识别重组 SARS-CoV-2 N 蛋白的 mAbs, 为开发免疫诊断试剂奠定了基础。

关键词 严重急性呼吸综合征冠状病毒 2; 核衣壳蛋白; 单克隆抗体; 免疫学检测

中图分类号 R 392.11; Q 786

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)03-0429-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.03.017

2021-08-26 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:31660258); 贵州省科学技术基金(编号:黔科合支撑[2019]2787号; 黔科合平台人才[2016]5676); 国家级大学生创新创业训练项目(编号:202010660035)

作者单位: 贵州医科大学¹ 生物与工程学院贵州省感染免疫与抗体工程特色重点实验室/生物与医学工程重点实验室、² 省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵阳 550025

作者简介: 刘江丽, 女, 硕士研究生;

胡祖权, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: huzhuan@gmc.edu.cn;

曾柱, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: zengzhu@gmc.edu.cn

* 对本文具有同等贡献

2019 年开始, 由严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 感染引起的肺炎在全球范围内大流行^[1]。SARS-CoV-2 传染性强, 传播速度快, 被世界卫生组织列为对人类危害最严重的病毒之一, 严重危害全球公共卫生安全, 研制预防、诊断和治疗的方法具有重要意义。在 SARS-CoV-2 的 4 种结构蛋白 (S、M、E、N) 中, N 蛋白高度保守, 具有很高的免疫原性, 并在感染过程中大量表达^[2]。因此, N 蛋白被认为是冠状病毒检测及抑制剂药物的靶点, 对

infarction (AMI) of rats. **Methods** Forty rats were randomly divided into five groups: Sham group, Model group, DHI low-dose (0.5 ml/kg) group, mid-dose (1.0 ml/kg) group, high-dose (2.0 ml/kg) group. The mouse model of AMI was induced by ligation of the left anterior descending coronary artery. Rats were treated with different doses of DHI (0.5, 1.0, 2.0 ml/kg) for 7 days. Cardiac function of rats was indicated by left ventricular ejection fraction (LVEF) and fractional shortening (LVFS), serum levels of troponin T (TN-T) and brain natriuretic peptide (BNP), myocardial pathological damage, CD34 positive microvessel density (MVD), the expression of Von willebr and factor (vWF), alpha-smooth muscle actin (α -SMA) and vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) were measured by echocardiography, enzyme linked immunosorbent assay, HE staining, immunohistochemistry and Western blot, respectively. **Results** Compared with Sham group, LVEF, LVFS in Model group increased ($P < 0.01$), serum levels of TN-T and BNP decreased ($P < 0.01$), α -SMA ($P < 0.05$), CD34, vWF, VEGF-A ($P < 0.01$) were up-regulated. Compared with Model group, LVEF, LVFS and the expression of CD34, vWF in mid-dose and high-dose groups increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). TN-T, BNP in all dosage groups were reduced while the expression of α -SMA, VEGF-A were further upgraded ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Besides, the pathological damage in the marginal zone of infarcted myocardium was lessened. **Conclusion** DHI has an effect on therapeutic angiogenesis for AMI in rats.

Key words danhong injection; acute myocardial infarction; therapeutic angiogenesis

SARS-CoV-2 的诊断和排查具有重要价值^[3]。鉴于, 该研究以 SARS-CoV-2 N 蛋白为研究对象, 通过杂交瘤技术制备重组 SARS-CoV-2 N 蛋白的特异单克隆抗体 (monoclonal antibody, mAb), 为 SARS-CoV-2 的免疫学检测和抑制剂药物的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 载体、细胞与实验动物 重组质粒 pET-28a-SARS-CoV-2-N 由广东省实验动物监测所丛锋老师惠赠; 小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 购自江苏无锡福阳生物科技有限公司; 6 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠, 购自辽宁省实验动物资源中心, 生产许可证号: SCXK(辽)2015-0001。

1.2 主要试剂 Tryptone、Yeast extract 购自英国 Oxoid 公司; 蛋白 Marker 购自美国 Thermo-Fisher 公司; 抗 His 鼠单克隆抗体购自北京全式金生物技术有限公司; HRP 标记山羊抗鼠 IgG 抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司; HT、HAT 选择培养基、AP 标记山羊抗鼠 IgG 抗体、对硝基苯磷酸二钠购自美国 Sigma-Aldrich 公司; ECL 发光试剂盒购自大连美仑生物技术有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; BCIP/NBT 显色试剂购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 SARS-CoV-2 N 重组蛋白的表达、纯化与鉴定

1.3.1 SARS-CoV-2 N 重组蛋白的表达与纯化 取 20 μ l 重组菌株 BL21 (DE3)/pET-28a-SARS-CoV-2-N 接种于 20 ml 2TY 液体培养基 (含 50 μ g/ml Kan) 中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 14 h。次日取 5 ml 菌液转接到 200 ml 2TY 培养基 (含 50 μ g/ml Kan) 中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养至 OD_{600 nm} 达到 0.5~0.6 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 25 $^{\circ}$ C、200 r/min 诱导培养 12~14 h。4 $^{\circ}$ C、6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 加入 12 ml PBS 缓冲液重悬菌体, 经超声波破碎处理后, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 经 Ni-NTA 基质纯化后用 BCA 蛋白定量试剂盒定量, 取 3 μ g 重组蛋白进行 SDS-PAGE 检测。

1.3.2 重组 SARS-CoV-2 N 蛋白的鉴定 用 BCA 蛋白定量试剂盒测定重组蛋白浓度后, 取 1 μ g 重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 转印至 PVDF 膜, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 2 h, 以抗 His 鼠单克隆抗体 (1:5 000) 为一抗、AP 标记山羊抗鼠 IgG (1:5 000) 为二抗分别孵育 1.5 h, 最后用 BCIP/NBT 显色试剂盒显色。

1.4 阳性杂交瘤细胞株的筛选

1.4.1 动物免疫与抗血清滴度检测 采取皮下多点注射的方式对 6 周龄 BALB/c 小鼠进行免疫 (25 μ g/只), 免疫 3 次。初次免疫使用弗氏完全佐剂与目的蛋白等体积混合并充分乳化; 第 2 次和第 3 次免疫用弗氏不完全佐剂等体积混合并乳化。第 3 次免疫后第 10 天取小鼠尾静脉血, 通过间接 ELISA 法检测抗血清效价, 选择效价高的小鼠用于细胞融合。在融合前 3 d, 腹腔注射不加佐剂的目的蛋白 25 μ g, 进行加强免疫。

1.4.2 细胞融合与杂交瘤细胞的筛选 用 PEG1500 将分离得到的脾细胞与提前复苏的 SP2/0 骨髓瘤细胞按 2:1 至 5:1 的比例融合, 融合后使用 HAT 及 HT 培养基进行换液培养。培养约 3 d 后吸取细胞培养上清液, 通过间接 ELISA 筛选阳性杂交瘤细胞。采用有限稀释法进行亚克隆, 直至所有克隆化细胞孔检测阳性率为 100% 时, 即可确定已获得阳性杂交瘤细胞株。

1.5 mAbs 的大量制备与纯化 取 6 周龄 BALB/c 小鼠, 腹腔注射 0.5 ml 液体石蜡致敏, 1~2 周后, 每只小鼠腹腔注射 1×10^6 个杂交瘤细胞, 待腹水产生后收集, 10 000 r/min 离心 10 min, 取中间腹水层用 Protein G 亲和柱纯化得 mAbs, 置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.6 mAbs 特性鉴定

1.6.1 mAbs 亚型鉴定 重组 N 蛋白稀释至 1 μ g/ml, 取 100 μ l 加入 ELISA 板孔中作为包被抗原。用 2% BSA 封闭 1 h 后, 每孔加入 100 μ l 杂交瘤细胞培养上清液作为一抗, HRP 标记各抗体分型及亚类抗体作为二抗。最后在每孔中加 100 μ l 可溶型单组分 TMB 底物溶液, 黑暗条件下反应 30 min, 每孔中加入 100 μ l 1 mol/L H₂SO₄ 溶液终止反应, 使用酶标仪读取 OD_{450 nm} 值。

1.6.2 mAbs 纯度检测 用 BCA 蛋白定量试剂盒测定纯化后的 mAbs 浓度。用 SDS-PAGE 凝胶电泳试剂盒配制 12% 分离胶, 5% 浓缩胶。取 6 μ g 样品, 加入 5 \times SDS 蛋白上样缓冲液, 充分混匀后沸水煮 8 min, 置于冰上备用。电泳槽中加入 1 \times Tris-甘氨酸电泳缓冲液, 取样品上样, 先用 80 V 电泳 40 min, 再用 120 V 电泳 1 h。SDS-PAGE 胶用考马斯亮蓝染色液染色 30 min, 加入脱色液脱色, 用凝胶成像系统扫描。

1.6.3 mAbs 效价测定 利用间接 ELISA 法测定抗体效价, 重组 N 蛋白用 PBS 稀释至 1 μ g/ml, 取 100 μ l 加入 ELISA 板孔中作为包被抗原, 同时设置空白对照和阴性对照 (空白对照为包被抗原, 不加

一抗的处理组;阴性对照为不包被抗原,加一抗的处理组)。以 1 000、3 000、9 000、27 000、81 000、2 430 000 倍比梯度稀释的腹水作为一抗、AP 标记山羊抗鼠 IgG(1 : 5 000)为二抗分别孵育 1.5 h,最后在每孔中加入 100 μ l 0.2% 对硝基苯磷酸二钠显色液,黑暗条件下显色 30 min,使用酶标仪测定 OD_{405 nm} 值。 $\Delta A_{405 nm} = (\text{实验组 OD}_{405 nm} - \text{空白对照 OD}_{405 nm}) / \text{阴性对照 OD}_{405 nm}$,其值大于 2 倍的最大稀释倍数为 mAbs 的效价。

1.7 Western blot 检测 mAbs 的结合特性 取 1 μ g 重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,转印至 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 2 h,分别以制备的 5 个 mAbs(1 : 1 500)为一抗,HRP 标记山羊抗鼠 IgG(1 : 10 000)为二抗孵育 1 h,最后使用 ECL 发光试剂盒显色。

2 结果

2.1 SARS-CoV-2 N 重组蛋白的制备及鉴定 重组菌株 BL21 (DE3)/pET-28a-SARS-CoV-2-N 经 1 mmol/L IPTG 诱导,在 25 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下培养 12 ~ 14 h 后提取菌体蛋白。重组 N 蛋白通过 Ni-NTA 基质纯化后,SDS-PAGE 电泳检测。结果如图 1A 所示,在约 52 ku 处有一目的条带,且蛋白大小与预期一致,纯度大于 90%,可作为免疫抗原。使用抗 His 单克隆抗体对纯化后的重组 N 蛋白进行 Western blot 检测。结果如图 1B 所示,在相应位置有印迹条带,与 SDS-PAGE 结果相符,说明获得了预期的目的蛋白。

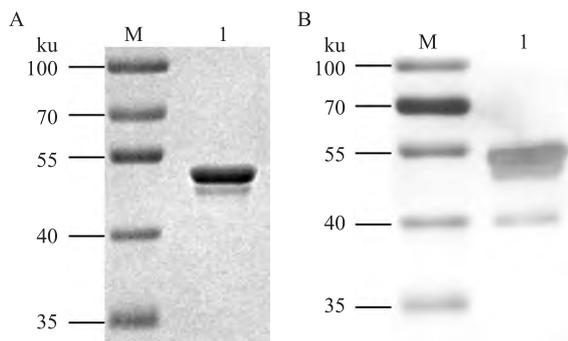


图 1 SDS-PAGE 及 Western blot 检测重组 SARS-CoV-2 N 蛋白

A: SDS-PAGE; B: Western blot; M: 10 ~ 170 ku 预染蛋白分子量标准; 1: 重组 SARS-CoV-2 N 蛋白

2.2 mAbs 亚型鉴定 经过 3 次亚克隆,获得 5 个 mAbs,分别命名为 N1、N2、N3、N4 和 N5。通过间接 ELISA 法鉴定制备的 mAbs 亚型,结果表明,N1 的重

链为 IgG2a, N2、N3、N4 和 N5 的重链为 IgG1,轻链均为 κ 链。

2.3 SDS-PAGE 电泳检测纯化的 mAbs 将纯化后的 mAbs 经 BCA 蛋白定量试剂盒测定浓度后,取 6 μ g 抗体样品进行 SDS-PAGE 电泳检测。结果如图 2 所示,抗体重链大小约为 50 ku,轻链大小约为 25 ku,但大小存在较大差异。

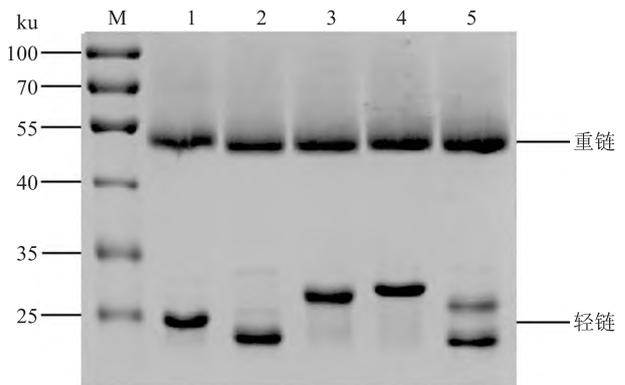


图 2 SDS-PAGE 电泳检测纯化的 mAbs

M: 10 ~ 170 ku 预染蛋白分子量标准; 1 ~ 5: 纯化的 N1、N2、N3、N4、N5 mAbs

2.4 mAbs 效价测定 分别将 5 个 mAbs 以倍比梯度稀释,采用间接 ELISA 法测定 mAbs 的效价。结果如图 3 所示,5 个 mAbs 都表现出与重组 SARS-CoV-2 N 蛋白较高的结合能力,其效价均达到 2×10^4 以上。

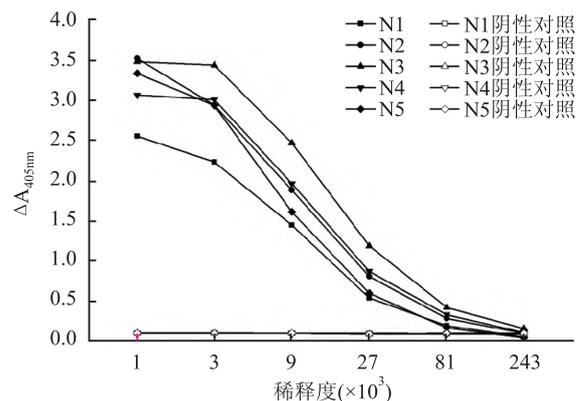


图 3 间接 ELISA 分析 mAbs 的效价

2.5 Western blot 检测 mAbs 的结合特性 取 1 μ g 重组 SARS-CoV-2 N 蛋白作为抗原,分别以制备的 5 个 mAbs 为一抗进行 Western blot 检测。结果如图 4 所示,在相应位置出现目的条带,说明 5 个 mAbs 均能特异性识别重组 N 蛋白。

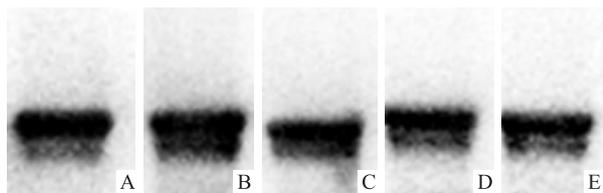


图4 Western blot 检测 mAbs 的结合特性

A ~ E: 5 个 mAbs (N1 ~ N5) 与重组 SARS-CoV-2 N 蛋白的免疫印迹反应

3 讨论

迄今为止,已出现多种威胁人类生命健康的病毒,包括尼帕病毒、狂犬病毒、埃博拉病毒、寨卡病毒、中东呼吸综合征冠状病毒、严重急性呼吸综合征冠状病毒和 SARS-CoV-2 等^[4-5]。SARS-CoV-2 是继中东呼吸综合征冠状病毒和严重急性呼吸综合征冠状病毒之后,近二十年来出现的第 3 种高致病性人类冠状病毒,对人类健康和公共卫生安全构成了严重威胁和挑战。

针对当前新冠肺炎疫情,目前有抗 SARS-CoV-2 的特效治疗药物,以病毒表面蛋白易感部位为靶点的单克隆抗体被认为是一种有前途的抗病毒药物^[6],单克隆抗体是由单一 B 细胞克隆产生的仅针对某一抗原决定簇的特异性抗体,由于其特异性强,灵敏度高,被广泛应用于生物学研究、疾病诊断和治疗^[7]。经过三十多年的研究和发 展,单抗药物在恶性肿瘤、呼吸道疾病和自身免疫性疾病治疗领域取得了巨大进展,同时也是医药领域最具有前景的研发方向。目前,已有 4 种抗病毒单克隆抗体作为上市药物应用于临床,分别是防治小儿呼吸道合胞病毒感染的 palivizumab、治疗人类免疫缺陷病毒感染的 ibalizumab、用于狂犬病毒暴露后预防的 rabishield 以及用于治疗埃博拉病毒感染的 inmazeb^[8-10]。Wang et al^[11]筛选出可以同时结合 SARS 和 SARS-CoV-2 S 蛋白 RBD 结构域的人源单抗 47D11,该抗体能抑制 S 蛋白与 hACE2 受体的结合,无论是单独或联合使用 47D11 都有预防或治疗 SARS-CoV-2 的潜力。Ju et al^[12]从 8 例 SARS-CoV-2 感染者中分离出多种 RBD 特异性 mAbs,这些抗体可以联合使用,产生协同抗病毒作用。

本研究采用原核表达系统对重组 SARS-CoV-2 N 蛋白进行诱导表达,确定在 IPTG 终浓度为 1 mmol/L、诱导温度为 25 °C 时,培养 12 ~ 14 h 能够获得大量可溶性表达的重组蛋白。利用 Ni-NTA 基质

进行蛋白亲和层析纯化后进行 SDS-PAGE 及 Western blot 检测,结果显示重组蛋白大小约 52 ku 且纯度较高,但通过 His 标签纯化后仍有少量杂蛋白。利用杂交瘤技术将小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 与经重组蛋白免疫的 BALB/c 小鼠的脾细胞进行融合,采用间接 ELISA 法和有限稀释法筛选出 5 株能稳定分泌抗 N 蛋白 mAbs 的杂交瘤细胞株。间接 ELISA 法检测结果显示这些 mAbs 的效价均达到 2×10^4 以上。Western blot 验证结果表明,获得的 5 个 mAbs 均能特异性识别重组 SARS-CoV-2 N 蛋白,但同时也能够检测到较重组 N 蛋白略小的一条蛋白条带,可能是原核表达过程中存在少量截短表达的重组蛋白。Gralinski et al^[13]指出 SARS-CoV-2 N 蛋白与 SARS-CoV N 蛋白有较高的同源性,本研究筛选得到的 mAbs 与 SARS-CoV 可能存在交叉反应,鉴于这一类病毒的危害都较大,利用这些抗体开发检测试剂盒仍具有重要的临床价值。综上所述,本研究制备的 5 个 mAbs 为 SARS-CoV-2 免疫诊断和抑制剂药物的研发奠定了实验基础。

参考文献

- [1] Shu C J, Huang X, Tang H H, et al. Mutations in spike protein and allele variations in ACE2 impact targeted therapy strategies against SARS-CoV-2[J]. Zool Res, 2021, 42(2): 170-81.
- [2] Arya R, Kumari S, Pandey B, et al. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins[J]. J Mol Biol, 2021, 433(2): 166725.
- [3] Azad G K. Identification and molecular characterization of mutations in nucleocapsid phosphoprotein of SARS-CoV-2[J]. PeerJ, 2021, 9: e10666.
- [4] Jansi R S, Khuro A, Agastian P, et al. Emerging paradigms of viral diseases and paramount role of natural resources as antiviral agents[J]. Sci Total Environ, 2021, 759: 143539.
- [5] Santacroce L, Charitos I A, Carretta D M, et al. The human coronaviruses (HCoVs) and the molecular mechanisms of SARS-CoV-2 infection[J]. J Mol Med (Berl), 2021, 99(1): 93-106.
- [6] Jahanshahlu L, Rezaei N. Monoclonal antibody as a potential anti-COVID-19[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 129: 110337.
- [7] Parry H A, Shukla S, Samal S, et al. Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 85: 106639.
- [8] Pelfrene E, Mura M, Sanches A C, et al. Monoclonal antibodies as anti-infective products: a promising future? [J]. Clin Microbiol Infect, 2019, 25(1): 60-4.
- [9] Markham A. REGN-EB3: first approval[J]. Drugs, 2021, 81(1): 175-8.
- [10] Castelli M S, Mcgonigle P, Hornby P J. The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies[J]. Pharmacol Res Perspect, 2019, 7(6): e00535.

(下转第 437 页)

ges, and the expression level of intracellular apoptosis-related proteins Caspase-3, Caspase-8 and PARP were detected by Western blot. **Results** Sorafenib had an inhibitory effect on the proliferation of RKO cells in a concentration-dependent manner. The IC_{50} of sorafenib on RKO cell lines was 10 $\mu\text{mol/L}$. Compared with the control group, sorafenib (10 $\mu\text{mol/L}$) could inhibit the clone formation ability of RKO cells ($P < 0.001$) and increase the apoptosis rate [(32.53 \pm 6.64) % vs (4.47 \pm 2.09) % , $P < 0.01$], affect the cell cycle ($P < 0.01$) and promote the expression levels of apoptosis-related proteins Caspase-3, Caspase-8 and PARP ($P < 0.05$). **Conclusion** Sorafenib has the ability to inhibit the proliferation of human colorectal cancer RKO cells, and its mechanism may be related to promoting RKO cells apoptosis and affecting the cell cycle.

Key words sorafenib; RKO cells; cell cycle; cell apoptosis

(上接第 432 页)

- [11] Wang C, Li W, Drabek D, et al. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2251.
- [12] Ju B, Zhang Q, Ge J, et al. Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection [J]. *Nature*, 2020, 584(7819): 115 – 9.
- [13] Gralinski L E, Menachery V D. Return of the coronavirus; 2019-nCoV [J]. *Viruses*, 2020, 12(2): 135.

Preparation and identification of monoclonal antibodies against SARS-CoV-2 nucleocapsid protein

Liu Jiangli¹, Li Yingying¹, Wang Jiawen¹, Xu Yujun^{1,2}, Zhang Yan¹, Huang Jiangtao^{1,2}, Hu Zuquan¹, Zeng Zhu^{1,2}

(¹Key Laboratory of Infectious Immune and Antibody Engineering of Guizhou Province/Key Laboratory of Biology and Medical Engineering, School of Biology and Engineering, ²State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550025)

Abstract Objective To prepare monoclonal antibodies (mAbs) against nucleocapsid protein (N) of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and identify their biological characteristics. **Methods** The recombinant SARS-CoV-2 N protein was induced for expression in *Escherichia coli*. Based on hybridoma technology, SP2/0 mouse myeloma cells were fused with the spleen cells of BALB/c mice immunized with the recombinant protein. The positive hybridoma cell lines were screened by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and limiting dilution method. The subtype of mAbs was also identified by indirect ELISA. Then, a large amount of mAbs was produced by ascites injection. After purification with Protein G affinity column, the purity, titer and specificity of mAbs were measured by SDS-PAGE, indirect ELISA and Western blot. **Results** A total of five hybridoma cell lines that could stably secrete SARS-CoV-2 N protein specific mAbs were obtained and named as N1 to N5. Five mAbs were collected from ascites. Their subtypes were identified as IgG2a * κ for one mAb and IgG1 * κ for the others, and their titers were above 2×10^4 . Western blot showed that the five mAbs could bind to recombinant SARS-CoV-2 N protein. **Conclusion** Five mAbs that can specifically recognize recombinant SARS-CoV-2 N protein were successfully prepared by hybridoma technology, which lays a foundation for exploration of immunodiagnostic reagents.

Key words severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; nucleocapsid protein; monoclonal antibodies; immunological detection