

基于比色法原理的新冠病毒主蛋白酶小分子抑制剂高通量筛选模型的优化与应用

闫千千¹, 闫浩浩¹, 刘志成¹, 戚海燕¹, 刘晓丽¹, 刘晓平¹, 张晶^{2*}, 陈云雨^{1*}

(1. 皖南医学院, 药物筛选与评价研究所, 安徽 芜湖 241002; 2. 中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: 本研究优化并建立了新冠病毒主蛋白酶 (main protease, M^{pro}) 小分子抑制剂比色法高通量筛选模型, 以期快速筛选天然产物来源的新型苗头化合物。基于比色法原理, 以 TSAVLQ-pNA (*para*-nitroanilide) 作为 M^{pro} 水解底物, 通过优化 pNA 底物浓度、M^{pro} 工作浓度、最佳反应时间、二甲基亚砜耐受浓度等影响因素, 建立 M^{pro} 小分子抑制剂比色法高通量筛选模型并用于天然产物化合物库的快速筛选。通过一系列反应条件优化, 选择 0.4 μmol·L⁻¹ M^{pro} 和 100 μmol·L⁻¹ pNA 底物, 成功地建立了 Z' 因子值为 0.9 的比色法高通量筛选模型。通过对天然产物化合物库进行高通量筛选, 证实了白果新酸 (ginkgolic acid C13:0) 在体外对 M^{pro} 酶活性具有良好的竞争性抑制作用。本研究成功建立了新冠病毒 M^{pro} 小分子抑制剂比色法高通量筛选模型, 为抗新冠病毒药物先导化合物的筛选与发现奠定了实验基础。

关键词: 新冠病毒; 主蛋白酶抑制剂; 比色法; 荧光共振能量转移; 荧光偏振; 白果新酸
中图分类号: R965 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-4870(2022)10-3019-08

Discovery of a novel SARS-CoV-2 main protease inhibitor by a simple and optimized colorimetric screening assay

YAN Gan-gan¹, YAN Hao-hao¹, LIU Zhi-cheng¹, QI Hai-yan¹, LIU Xiao-li¹, LIU Xiao-ping¹, ZHANG Jing^{2*}, CHEN Yun-yu^{1*}

(1. Institute for Drug Screening and Evaluation, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China; 2. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: For rapid discovery of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) main protease (M^{pro}) inhibitors from a natural product library, a novel colorimetric screening assay was developed. According to the colorimetric principle, the synthetic peptide TSAVLQ-*para*-nitroanilide (pNA) was used as the M^{pro} hydrolysis substrate. Subsequently, the working concentration of pNA substrate, M^{pro} working concentration, hydrolysis time and DMSO tolerance were optimized for the development of a simple and robust colorimetric screening assay. Through these systematic optimizations, we selected 0.4 μmol·L⁻¹ M^{pro} and 100 μmol·L⁻¹ pNA substrate as the optimal working concentrations in this colorimetric screening assay, and a high Z' factor of 0.9 was achieved. Using this screening assay, natural product ginkgolic acid C13:0 (GA13:0) was identified as a novel competitive M^{pro} inhibitor *in vitro*. Taken together, we have successfully developed a simple and optimized

收稿日期: 2022-03-28; 修回日期: 2022-05-01.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81370087, 81703546); 安徽省自然科学基金资助项目 (1808085QH265); 安徽省高等学校自然科学基金项目 (KJ2019ZD30, KJ2021A0839, YJS20210549); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程资助项目 (2021-I2M-1-054); 皖南医学院青年骨干人才资助项目 (wyqnyx202104).

*通讯作者 Tel: 86-10-63180623, E-mail: jingjing-506@hotmail.com;

Tel: 86-553-3932414, E-mail: chenyunyu1984@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0365

colorimetric screening assay, which will be vital for the discovery of novel SARS-CoV-2 M^{pro} inhibitors.

Key words: SARS-CoV-2; main protease inhibitor; colorimetric screening assay; fluorescence resonance energy transfer; fluorescence polarization; ginkgolic acid C13:0

自2019年12月迄今,新冠病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)感染引发了新冠病毒肺炎(coronavirus disease, COVID-19)的全球大流行。由于新冠病毒高频基因突变,导致了奥密克戎(omicron)变异株的全球蔓延,具有载毒量大、传染性强、传播速度快、传播隐匿等特点,严重危害人类的生命健康与经济发展^[1-3]。虽然通过新冠病毒疫苗接种建立了有效的群体免疫屏障,降低了COVID-19重症发病率,但多种变异毒株的不断出现和流行,其中有些会逃逸现有疫苗的抗体免疫反应,使疫苗保护力下降,引起突破性感染,给疫情防控带来了严峻挑战。因此,积极开发安全有效的抗新冠病毒药物具有重要意义^[4-6]。

SARS-CoV-2是单股正链RNA病毒,主要通过刺突糖蛋白(spike glycoprotein)的受体结合域(receptor binding domain, RBD)特异性结合宿主细胞表面的受体血管紧张素转化酶2(angiotensin converting enzyme 2, ACE2)吸附到宿主细胞上,通过核内体或溶酶体途径依赖的蛋白质水解作用进入宿主细胞。当病毒与宿主细胞发生膜融合后,病毒基因组RNA被释放到宿主细胞的细胞质中,利用宿主细胞的核糖体翻译为2条多聚蛋白质体(polyprotein)即pp1a和pp1ab。多聚蛋白质体可在自剪切作用产生的主蛋白酶(main protease, M^{pro})和木瓜样蛋白酶(pain-like protease, PL^{pro})的水解作用下生成16个非结构蛋白质(non-structural protein, NSP)。其中, M^{pro}是具有同源二聚体结构特征的半胱氨酸蛋白酶,其在多聚蛋白质体上含有11个酶切位点,负责加工包括RNA依赖的RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)以及复制-转录复合物的其他亚基等12个非结构蛋白质,调控病毒基因组RNA复制与免疫逃逸^[7]。M^{pro}对多聚蛋白质体的水解作用是SARS-CoV-2生命周期与病毒基因组RNA复制过程中的核心步骤^[8]。鉴于进化保守的M^{pro}在新冠病毒基因组RNA复制中具有重要的调控功能,且人体不存在其同源蛋白酶, M^{pro}被认为是抗新冠病毒药物开发的理想靶标之一^[9,10]。

自COVID-19疫情暴发以来,以“清肺排毒汤”、“莲花清瘟胶囊”、“化湿败毒方”、“宣肺败毒方”为代表的中药名方在疫情防控与治疗中发挥了巨大作用,取得了良好的临床治疗效果^[11]。传统中药虽疗效显著,具有多组分、多靶点、转阴快、复阳低等药效学特点,但对其活性

物质组分与功能尚缺少深入的研究^[12,13]。为了探讨中药抗疫的物质基础与药理机制,本研究基于比色法原理,通过系统的优化方案,建立一种简便快速的新冠病毒M^{pro}小分子抑制剂高通量筛选模型,并对传统中药来源的天然产物化合物库进行筛选,以期获得新型苗头化合物,为抗新冠病毒药物的研究与开发奠定基础。

材料与方法

试剂与仪器 氨苄西林、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-β-D-thiogalactoside, IPTG)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、羟乙基哌嗪乙磺酸[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, HEPES] (Aladdin公司); HisTrapTM层析柱(Cytiva公司); 全黑半底96孔板、透明半底96孔板(Corning公司); 天然产物化合物库(L6810)、白果新酸(ginkgolic acid C13:0, GA13:0)、GC-376(TargetMol公司); 对硝基苯胺(para-nitroaniline, pNA)标记的比色法底物(pNA底物: TSAVLQ-pNA)、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)与生物素(biotin)标记的荧光探针(FITC-substrate-biotin: FITC-AVLQSGFRKK-biotin, λ_{ex}/λ_{em}: 485/535 nm)、7-甲氧基香豆素-4-乙酸(7-methoxycoumarin-4-acetic acid, MCA)与2,4-二硝基苯酚(2,4-dinitrophenol, Dnp)标记的荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)底物[MCA-AVLQSGFR-Lys(Dnp)-Lys-NH₂, λ_{ex}/λ_{em}: 320/405 nm]由吉尔生化(上海)有限公司合成; AKTA Pure蛋白质纯化仪(Cytiva公司); 多功能酶标仪(BioTek公司)。

新冠病毒M^{pro}原核表达、分离纯化与酶活性测定 按照文献^[14]所述方法进行SARS-CoV-2 M^{pro}原核表达、分离纯化与酶活性测定。利用FRET方法,根据M^{pro}对FRET底物的水解反应曲线,计算其比活力(U·mg⁻¹)。根据米氏方程,计算其米氏常数(Michaelis constant, K_m)与催化常数(catalytic number, k_{cat})。

pNA底物最佳工作浓度的确定 将2 mmol·L⁻¹ pNA底物以HEPES缓冲液(10 mmol·L⁻¹ HEPES、50 mmol·L⁻¹ NaCl、1 mmol·L⁻¹ DTT, pH 7.0)稀释至50、100、150、200、250、300、350、400 μmol·L⁻¹,依次加入到透明半底96孔板中,每孔50 μL,各反应组设置3组复孔。再将4 μmol·L⁻¹ M^{pro}加入到上述各孔中,每孔

50 μL , 室温反应 10 min, 以多功能酶标仪检测吸光度 A_{405} 值。设定加入 50 μL HEPES 缓冲液孔为空白对照组, 当 $A_{405}(\text{反应组})/A_{405}(\text{空白组}) \geq 3$ 时, 所使用 pNA 底物的最低浓度即为 pNA 底物最佳工作浓度。

M^{pro} 最佳工作浓度的确定 将 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pNA 底物加入到透明半底 96 孔板中, 每孔 50 μL , 每组设置 3 组复孔。再依次加入 0.062 5、0.125、0.25、0.5、1、2、4、8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ M^{pro} 到上述 96 孔板中, 每孔 50 μL , 室温反应 10 min, 以多功能酶标仪检测 A_{405} 值。利用 GraphPad Prism 8.0 拟合 M^{pro} 水解反应曲线, 计算其半数有效浓度值 (half maximal effective concentration, EC₅₀)。

M^{pro} 最佳反应时间的确定 将 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pNA 底物加入到透明半底 96 孔板中, 每孔 50 μL , 每组设置 3 组复孔。再加入 0.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ M^{pro} 到上述 96 孔板中, 每孔 50 μL 。设置检测总时间为 60 min, 检测间隔为 20 s, 以多功能酶标仪检测 A_{405} 值。利用 GraphPad Prism 8.0 拟合 M^{pro} 水解反应曲线, 设定到达水解反应曲线平台期的最短时间为 M^{pro} 最佳反应时间。

DMSO 耐受性实验 将 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pNA 底物加入到透明半底 96 孔板中, 每孔 50 μL , 再加入 0.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ M^{pro} 到上述 96 孔板中, 每孔 50 μL 。上述反应体系中含 DMSO 分别为 0%、1%、2%、3%、4%、5%, 每组设置 3 组复孔。室温反应 30 min 后, 以多功能酶标仪检测 A_{405} 值。通过 DMSO 浓度对上述各反应组中 A_{405} 值的影响, 判断本比色法筛选模型对 DMSO 的耐受性。

GC-376 抑制活性实验 将 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ GC-376 以含 0.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ M^{pro} 的 HEPES 缓冲液进行 2 倍倍比稀释, 以 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为起始浓度, 共稀释 6 个浓度梯度, 加入到透明半底 96 孔板中, 每孔 50 μL , 室温孵育 30 min。再加入 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pNA 底物, 每孔 50 μL , 室温孵育 30 min 后, 以多功能酶标仪检测 A_{405} 值。设置 DMSO 孔为阴性对照组, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pNA 底物孔为空白对照组, 各检测浓度下 GC-376 抑制率按公式 (1) 计算。以 GraphPad Prime 8.0 拟合其抑制曲线, 计算 GC-376 的半数抑制浓度值 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)。

$$\text{GC-376 抑制率 (\%)} = \frac{A_{405}(\text{DMSO}) - A_{405}(\text{GC-376})}{A_{405}(\text{DMSO}) - A_{405}(\text{pNA 底物})} \times 100\% \quad (1)$$

比色法高通量筛选模型的综合评价 按照“GC-376 抑制活性实验”所述方法设定 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GC-376 孔为阳性对照组, DMSO 孔为阴性对照组, 每组各 48 个孔, 以多功能酶标仪检测 A_{405} 值后, 按公式 (2)~(5) 分别计算本筛选模型的 Z' 因子值、信号窗值 (signal window, SW)、信号本底比值 (signal to background, S/B) 与信噪比值 (signal to noise, S/N)^[15,16]。

$$Z' = 1 - \frac{3 \times (\text{SD}_{\text{DMSO}} - \text{SD}_{\text{GC-376}})}{|\mu_{\text{DMSO}} - \mu_{\text{GC-376}}|} \quad (2)$$

$$\text{SW} = \mu_{\text{DMSO}} - \mu_{\text{GC-376}} \quad (3)$$

$$\text{S/B} = \frac{\mu_{\text{DMSO}}}{\mu_{\text{GC-376}}} \quad (4)$$

$$\text{S/N} = \frac{\mu_{\text{DMSO}} - \mu_{\text{GC-376}}}{\sqrt{\text{SD}_{\text{DMSO}}^2 + \text{SD}_{\text{GC-376}}^2}} \quad (5)$$

式中, SD_{DMSO} 为阴性对照组 A_{405} 值的标准差, $\text{SD}_{\text{GC-376}}$ 为阳性对照组 A_{405} 值的标准差, μ_{DMSO} 为阴性对照组 A_{405} 值的平均值, $\mu_{\text{GC-376}}$ 为阳性对照组 A_{405} 值的平均值。

天然产物化合物库的高通量筛选 将含 0.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ M^{pro} 的 HEPES 缓冲液加入到透明半底 96 孔板中, 每孔 49 μL , 再加入 1 μL 天然产物 (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 室温孵育 30 min。将 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pNA 底物加入到上述反应中, 每孔 50 μL , 室温反应 30 min 后, 以多功能酶标仪检测 A_{405} 值。设定 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GC-376 孔为阳性对照组, DMSO 孔为阴性对照组, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pNA 底物孔为本底组, 以抑制率 $\geq 50\%$ 作为苗头化合物 (hit) 的候选标准, 同法进行第二轮复筛。按公式 (6) 计算苗头化合物抑制率。

$$\text{苗头化合物抑制率 (\%)} = \frac{A_{405}(\text{DMSO}) - A_{405}(\text{hit})}{A_{405}(\text{DMSO}) - A_{405}(\text{GC-376})} \times 100\% \quad (6)$$

白果新酸在比色法筛选模型中的抑制活性 将 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 白果新酸以含 0.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ M^{pro} 的 HEPES 缓冲液稀释至 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 再以 2 倍倍比法稀释 8 个浓度梯度后, 将上述溶液加入到透明半底 96 孔板中, 每孔 50 μL , 室温孵育 30 min。再将 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pNA 底物加入到上述各孔中, 每孔 50 μL , 室温反应 30 min 后, 以多功能酶标仪检测 A_{405} 值。按公式 (6) 计算白果新酸在比色法筛选模型中对 M^{pro} 酶活性的抑制率, 以 GraphPad Prism 8.0 拟合抑制曲线, 计算其在上述筛选模型中的 IC₅₀ 值。

白果新酸在三明治样荧光偏振筛选模型中的抑制活性 利用文献^[17,18]所述的三明治样荧光偏振筛选模型进行白果新酸的抑制活性评价。将 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 白果新酸以含 0.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ M^{pro} 的 Tris 缓冲液 (10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris、50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA、1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT, pH 8.0) 稀释至 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 再以 2 倍倍比法稀释 6 个浓度梯度后, 加入到全黑半底 96 孔板中, 每孔 30 μL , 每组设置 3 组复孔, 室温孵育 35 min。上述各孔中再加入 60 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FITC-substrate-biotin 荧光探针反应液, 每孔 20 μL , 室温孵育 20 min 后, 加入 300 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亲和素反应液, 每孔 10 μL , 室温孵育 5 min 后, 以多功能酶标仪检测毫偏值 (millipolariza-

tion unit, mP)。设定 DMSO 孔为阴性对照组, 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GC-376 孔为阳性对照组。按照公式 (7) 计算白果新酸在三明治样荧光偏振筛选模型中对 M^{pro} 酶活性的抑制率, 利用 GraphPad Prism 8.0 拟合抑制曲线, 计算其在上述筛选模型中的 IC_{50} 值。

$$\text{白果新酸抑制率}(\%) = \frac{\text{mP}_{\text{白果新酸}} - \text{mP}_{\text{DMSO}}}{\text{mP}_{\text{GC-376}} - \text{mP}_{\text{DMSO}}} \times 100\% \quad (7)$$

白果新酸在 FRET 筛选模型中的抑制活性 利用文献^[15]所述的 FRET 筛选模型进行白果新酸的抑制活性评价。将 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 白果新酸以含 0.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ M^{pro} 的 HEPES 缓冲液稀释至 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 再以 2 倍比法稀释 6 个浓度梯度后, 加入到全黑半底 96 孔板中, 每孔 25 μL , 每组设置 3 组复孔, 室温孵育 30 min。上述各孔中再加入 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FRET 底物, 每孔 25 μL , 以多功能酶标仪检测相对荧光强度值 (relative fluorescence units, RFU)。根据 30 s 内酶促反应曲线的斜率计算反应初速度 ($V = \Delta\text{RFU}\cdot\text{s}^{-1}$)。设定 DMSO 孔为阴性对照组, 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GC-376 孔为阳性对照组。以公式 (8) 计算白果新酸在 FRET 筛选模型中对 M^{pro} 酶活性的抑制率, 以 GraphPad Prism 8.0 拟合抑制曲线, 计算其在上述筛选模型中的 IC_{50} 值。

$$\text{白果新酸抑制率}(\%) = 1 - \frac{V_{\text{白果新酸}}}{V_{\text{DMSO}}} \times 100\% \quad (8)$$

白果新酸的抑制机制及抑制常数值的测定 将 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 白果新酸以含 0.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ M^{pro} 的 HEPES 缓冲液稀释至 12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 并加入到全黑半底 96 孔板中, 每孔 25 μL , 室温孵育 30 min 后, 分别加入 10、20、30、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FRET 底物, 每孔 25 μL 。按照 FRET 筛选模型所述的方法, 以多功能酶标仪检测 RFU 值, 计算反应初速度。设定白果新酸的浓度为 0、4、8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 重复上述实验操作。利用林贝 (Lineweaver-Burk) 双倒数作图法, 分析白果新酸的抑制机制并计算其抑制

常数 (inhibitory constant, K_i)。

数据分析与统计 采用 GraphPad Prism 8.0 软件拟合 M^{pro} 水解反应曲线和白果新酸在上述筛选模型中的抑制曲线, 计算其 EC_{50} 和 IC_{50} 值。

结果

1 新冠病毒 M^{pro} 原核表达、分离纯化与酶活性测定

工程菌经 IPTG 诱导后, 在预期分子质量 34 kD 位置有明显的目的蛋白质表达条带。由于在 M^{pro} 的羧基端融合有多聚组氨酸标签, 故此菌株裂解上清液以 HisTrapTM 亲和层析柱进行了 M^{pro} 的分离纯化, 其纯度为 95%, 质量浓度为 1.6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (图 1A)。以 FRET 法测定 M^{pro} 比活力, 实验结果表明, 纯化的 M^{pro} 具有良好的水解活性, 其比活力不低于 40 000 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (图 1B)。通过图 1C 拟合的米氏方程, 计算其 K_m 值为 19.28 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, k_{cat} 值为 0.127 $\cdot\text{s}^{-1}$, 专一性常数 (k_{cat}/K_m) 为 6 587.1 $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, 说明成功地制备了高活性 M^{pro} , 为比色法高通量筛选模型的建立奠定了实验基础。

2 新冠病毒 M^{pro} 小分子抑制剂比色法高通量筛选模型的基本原理

本筛选模型的基本原理概述如下 (图 2): 将 TSAV-LQ-pNA 作为 M^{pro} 水解底物, 其经 M^{pro} 水解反应后将释放自由的 pNA 分子, 基于比色法原理, 建立 M^{pro} 小分子抑制剂高通量筛选模型。活性化合物可抑制 M^{pro} 对 pNA 底物的水解作用, 不能释放自由的 pNA 分子, 将表现较低的 A_{405} 值。反之, 非活性化合物导致自由的 pNA 分子增加, 将表现较高的 A_{405} 值。通过判断 A_{405} 值的改变, 即可快速筛选 M^{pro} 小分子抑制剂。

3 新冠病毒 M^{pro} 小分子抑制剂比色法高通量筛选模型的优化与建立

将 pNA 底物稀释 8 个浓度, 加入 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ M^{pro} 使

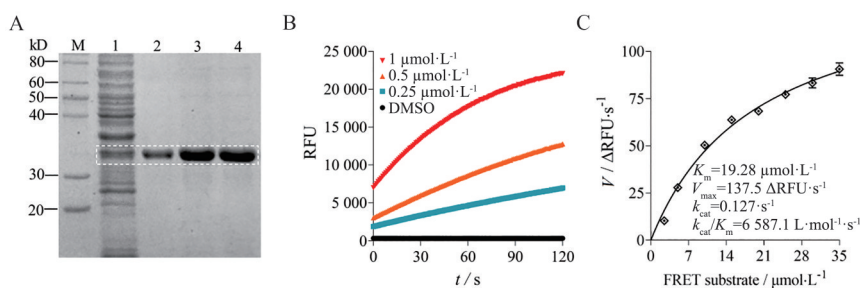


Figure 1 Production and characterization of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) main protease (M^{pro}). A: Expression and purification of SARS-CoV-2 M^{pro} in *Escherichia coli* (*E. coli*) cells. The purified M^{pro} band is marked by a white box line in a stained gel. M: Protein mark; 1: Total cell proteins; 2-4: Purified M^{pro} band (34 kD); B: Enzymatic activity analysis of purified M^{pro} . The specific activity of purified M^{pro} was determined by the fluorescence resonance energy transfer (FRET) assay; C: Determination of the enzymatic parameters of purified M^{pro} . According to the initial velocity (V) in the FRET assay, the Michaelis constant (K_m), V_{max} and catalytic number (k_{cat}) values were calculated using a Michaelis-Menten equation. RFU: Relative fluorescence unit

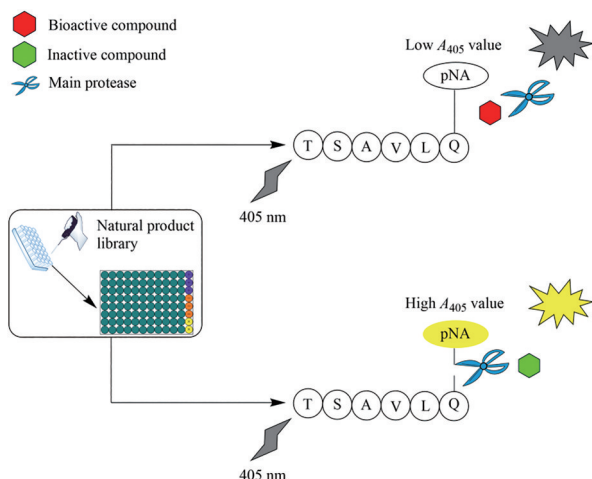


Figure 2 Graphic diagram of the colorimetric screening assay. The synthetic peptide TSAVLQ-*para*-nitroanilide (pNA) is used as the M^{pro} hydrolysis substrate, and its cleavage at the Q-pNA bond by SARS-CoV-2 M^{pro} (blue scissor) releases free pNA, which turns the color of the solution to yellow. This color change can be continuously monitored using a microplate reader (BioTek) at 405 nm. Hence, the presence of bioactive compounds (red hexagon) that inhibit the enzymatic activity of M^{pro} will lower the A_{405} value using this screening assay, whereas the cleaved, the free pNA will be released from pNA substrate because of the exciting of inactive compound (green hexagon)

其充分水解后,以多功能酶标仪检测 A_{405} 值。实验结果表明,当 pNA 底物浓度大于 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, $A_{405}(\text{反应组})/A_{405}(\text{空白组}) \geq 3$, 满足了高通量筛选的基本要求(图 3A)。为了保持实验体系的高灵敏度和低本底值,选择 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为 pNA 底物的最佳工作浓度。

将 2 倍倍比稀释的 M^{pro} 与 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pNA 底物进行 10 min 水解反应后,以多功能酶标仪检测 A_{405} 值。M^{pro} 水解反应曲线表明, M^{pro} 对 pNA 底物具有良好的水解活性,其水解反应的 EC_{50} 值为 $0.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在筛选模型的实验体系中, M^{pro} 使用量是决定其灵敏性的重要因素。为了保持实验体系的高灵敏度,选择 $0.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为 M^{pro} 的最佳工作浓度(图 3B)。

将 $0.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ M^{pro} 与 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pNA 底物进行 60 min 水解反应,其水解反应动力学曲线表明,随着水解反应时间的不断延长, A_{405} 值逐渐升高。当水解反应时间达到 30 min 时, A_{405} 值趋于平稳并达到最大值,这说明 M^{pro} 彻底地完成了水解反应(图 3C)。为了保证在筛选模型的实验体系中 M^{pro} 水解反应彻底完成,选择 30 min 作为其最佳反应时间。

按照上述确定的 pNA 底物与 M^{pro} 最佳工作浓度,将 M^{pro} 水解反应置于不同浓度的 DMSO 条件下,分析本筛选模型对 DMSO 的耐受性。结果表明,当 DMSO

浓度低于 2% 时,其 A_{405} 值为 0.16, 波动极小。当 DMSO 浓度高于 2% 时,其 A_{405} 值略有降低,差异显著。考虑到 DMSO 是药物筛选中最常使用的有机溶剂,在进行天然产物化合物库筛选时,需控制 DMSO 量低于 2% (图 3D)。

GC-376 是已报道的 M^{pro} 小分子抑制剂,已被广泛用于药物高通量筛选模型的特异性评价^[19-21]。在上述建立的 M^{pro} 小分子抑制剂比色法筛选模型中, GC-376 表现出了良好的抑制活性,其 IC_{50} 值为 $(0.67 \pm 0.4) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 3E), 与文献^[20,21]报道基本一致,说明本筛选模型具有良好的特异性。

Z'因子是评价药物高通量筛选模型稳定性、灵敏性和特异性的核心参数之一,一般要求 Z'因子值大于 0.5 才能满足高通量筛选的基本要求^[16]。以 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GC-376 作为阳性对照组,对本筛选模型的 Z'因子值进行分析。实验结果表明,本筛选模型的 Z'因子值为 0.9 (图 3F)。另外,本筛选模型的 S/B 值为 3.22、S/N 值为 11.65、SW 值为 0.12, 满足高通量筛选的基本要求(表 1)。

4 新冠病毒 M^{pro} 小分子抑制剂比色法高通量筛选模型的应用

本比色法高通量筛选模型使用时主要包括 2 步操作: 首先,将 $0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ M^{pro} (每孔 50 μL) 与天然产物室温孵育 30 min, 再加入 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pNA 底物(每孔

Table 1 The general evaluation of an optimized colorimetric screening assay. HTS: High-throughput screening; S/N: Signal to noise; SW: Signal window

Indicator	Requirement of HTS	Result of HTS
S/B	> 3	3.22
S/N	> 10	11.65
SW	Not determined	0.12
Z' factor	> 0.5	0.9

50 μL) 进行 30 min 水解反应后,以多功能酶标仪检测 A_{405} 值(图 4A)。为了保证本筛选模型的稳定性和可靠性,在每轮筛选中,应按照图 4B 所示进行筛选样品的布局。每轮筛选板中均应包括阳性对照组 ($0.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ M^{pro} + $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GC-376 + pNA 底物)、阴性对照组 ($0.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ M^{pro} + DMSO + pNA 底物) 和本底组 ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pNA 底物)。利用上述已建立的比色法高通量筛选模型对传统中药来源的天然产物化合物库进行筛选,以初筛抑制率大于 50% 作为阳性化合物基准线,共获得 6 个候选苗头化合物(图 4C)。

5 白果新酸对新冠病毒 M^{pro} 酶活性的抑制作用、抑制机制与抑制常数

利用已建立的比色法筛选模型,对初筛获得的 6 个候选苗头化合物进行复筛,发现白果新酸在本筛

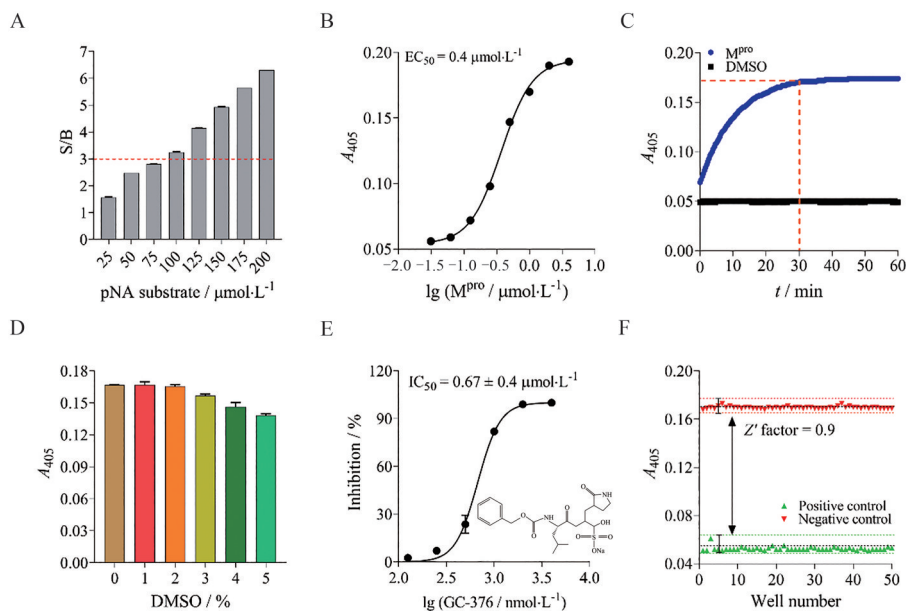


Figure 3 Development of an optimized colorimetric screening assay for the discovery of SARS-CoV-2 M^{pro} inhibitors. A: Determination of an optimal concentration of pNA substrate. The red dotted line indicated the baseline of signal to background (S/B) in this colorimetric screening assay; B: Determination of an optimal concentration of M^{pro} used in the colorimetric screening assay. A half maximal effective concentration (EC_{50}) value was calculated according to the proteolytic reaction curve of M^{pro} . For a high sensitivity of screening assay, an optimal working concentration of M^{pro} should be equal to this EC_{50} value; C: Time course trajectory in the colorimetric screening assay. The proteolytic reaction was monitored at A_{405} every 20 s for 60 min by a microplate reader (BioTek). Based on this proteolytic reaction curve, the incubation time could be defined in 30 min in this screening assay; D: Dimethyl sulfoxide (DMSO) tolerance assay; E: The inhibitory activity of GC-376 in the colorimetric screening assay. The chemical structure of GC-376 was shown; F: Determination of Z' factor in the colorimetric screening assay. GC-376 and DMSO were used as positive and negative controls, respectively. IC_{50} : Half maximal inhibitory concentration

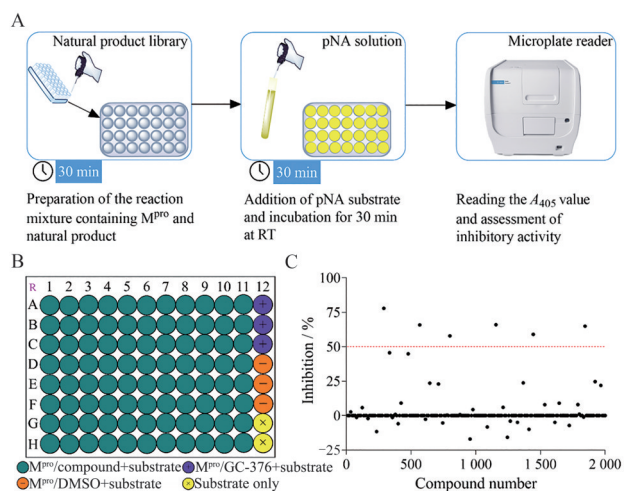


Figure 4 Application of the colorimetric screening assay for the discovery of SARS-CoV-2 M^{pro} inhibitors. A: Basic screening protocol of the colorimetric screening assay for the discovery of M^{pro} inhibitors; B: The natural products layout in a 96-well microplate for HTS. The positive wells (GC-376), negative wells and background wells were highlighted; C: The illustration for the primary screening cycle of natural product library using the colorimetric screening assay. The red dotted line indicated a baseline in the primary screening cycle, and 6 candidate compounds were identified

选模型中对 M^{pro} 酶活性的抑制作用具有明显的量效关系, 其 IC_{50} 值为 $(16.11 \pm 1.2) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 5A、B)。另外, 白果新酸在三明治样荧光偏振筛选模型和 FRET 筛选模型中对 M^{pro} 酶活性均表现出良好的抑制作用, 其 IC_{50} 值分别为 $(7.8 \pm 0.2) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $(7.6 \pm 0.1) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 5C、D), 证实了白果新酸在体外对 M^{pro} 酶活性具有良好的抑制作用。林贝双倒数曲线表明, 白果新酸对 M^{pro} 酶活性的抑制方式为竞争性抑制, 其 K_i 值为 $3.86 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 5E、F)。

讨论

目前, 新冠病毒感染引起的 COVID-19 疫情仍在全球蔓延, 尤其是高传染性奥密克戎变异株的大流行, 使感染与死亡病例数再度激增。新冠病毒的高频基因突变使其传染性升高和疫苗保护力下降, 积极开发抗新冠病毒药物刻不容缓^[4-6]。在新冠病毒的生命周期中, M^{pro} 是调控病毒基因组 RNA 复制的关键功能蛋白, 其活性位点在各变异株中具有高度保守性, 这使 M^{pro} 成为广谱抗新冠病毒药物开发的理想靶标之一^[9,10,22]。

目前, 已报道了 FRET 筛选法、三明治样荧光偏

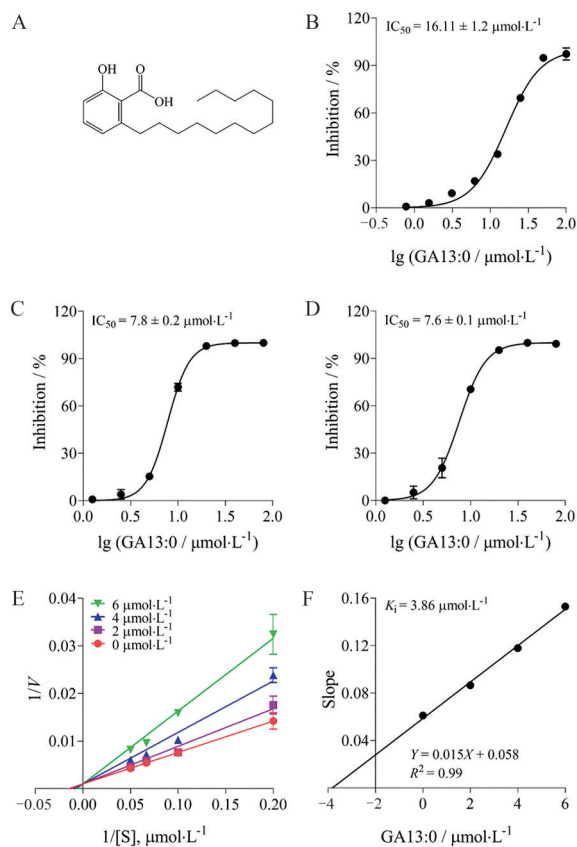


Figure 5 The inhibitory activity and inhibition mechanism of ginkgolic acid C13:0 (GA13:0) on SARS-CoV-2 M^{pro} . A: The chemical structure of GA13:0; B: Concentration-response curve of GA13:0 in the colorimetric screening assay; C: Concentration-response curve of GA13:0 in the sandwich-like fluorescence polarization (FP) screening assay; D: Concentration-response curve of GA13:0 in the FRET screening assay. All the calculated IC_{50} values of GA13:0 in the mentioned biochemical assays were shown, respectively; E: The Lineweaver-Burk double-reciprocal plots for inhibition of GA13:0 on M^{pro} for the FRET substrate (S); F: The secondary plots for a K_i value

振筛选法、细胞模型筛选法和表型筛选法等多种生化实验筛选法用于 M^{pro} 小分子抑制剂的筛选与发现^[15,17,18,23-26]。其中, FRET 筛选法被认为是 M^{pro} 小分子抑制剂最主要的筛选方法, 但其水解动力学过程易受环境、温度等条件影响, 重复性和稳定性较差, 并易于产生假阳性化合物。三明治样荧光偏振筛选法虽具有操作简便、高灵敏性、经济稳定等诸多优点, 但其对多功能酶标仪的配置要求较高, 必须配备高端的荧光偏振检测功能模块才可使用上述方法筛选 M^{pro} 小分子抑制剂, 这使其在基层实验室的推广应用仍具有一定的局限性。另外, 细胞模型筛选法和表型筛选法还具有操作繁琐、筛选周期长、筛选成本高和稳定性差等缺点。因此, 积极开发简便快速、稳定可靠、易于基层推

广的新型高通量筛选模型具有重要意义。

本研究基于比色法原理, 以 TSAVLQ-pNA 作为 M^{pro} 水解底物, 通过判断 M^{pro} 水解反应中由于游离 pNA 浓度改变导致的 A_{405} 值变化, 即可快速筛选到活性化合物。与上述已报道的筛选法相比, 本研究建立的比色法筛选模型更好地避免了天然产物自身荧光对筛选模型可靠性的干扰, 只需使用酶标仪的吸收光检测功能即可实现活性化合物的快速筛选, 具有操作简便、稳定可靠、易于推广等优点, 非常适合基层实验室使用。但在比色法筛选模型的使用过程中, 由于 pNA 底物具有不稳定性, 需在实验过程中新鲜配制并使用。另外, M^{pro} 在长时间冻存或反复冻融后会使其酶活性降低, 定期采用 FRET 方法对其进行比活力测定也是至关重要的。在筛选过程中, 尽量室温操作, 最大限度地降低外界环境因素波动对 M^{pro} 水解反应的影响。

白果新酸是传统中药白果中酚酸类提取物的组成成分之一, 具有抗菌、抗病毒、抗寄生虫等药理作用^[27-30]。近期已有研究证实, 白果新酸可能是新冠病毒 M^{pro} 小分子抑制剂, 且白果新酸的结构类似物银杏酸和漆树酸对新冠病毒具有良好的抗病毒活性, 其 EC_{50} 值约为 $8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[31,32]。本研究证实, 白果新酸对新冠病毒 M^{pro} 酶活性具有良好的竞争性抑制作用。但白果新酸仍具有一定的细胞毒性, 还需深入进行化学改造, 以降低其细胞毒性, 提高其靶向性与抗病毒活性。

综上所述, 本研究成功建立了新冠病毒 M^{pro} 小分子抑制剂比色法高通量筛选模型, 初步证实了白果新酸在体外对 M^{pro} 酶活性具有良好的竞争性抑制作用, 为抗新冠病毒药物先导化合物的筛选与发现奠定了实验基础。

致谢: 衷心感谢北京大学化学与分子工程学院来鲁华教授和孙琦博士在比色法筛选模型设计中给予的悉心指导和无私帮助。

作者贡献: 闫干干、张晶和陈云雨负责完成实验设计与论文撰写; 闫干干负责完成主体实验部分; 闫浩浩、刘志成、威海燕、刘晓丽和刘晓平负责完成实验数据分析。所有作者均对本文有所贡献。

利益冲突: 无利益冲突。

References

- [1] Ahn DG, Shin HJ, Kim MH, et al. Current status of epidemiology, diagnosis, therapeutics, and vaccines for novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2020, 30: 313-324.
- [2] Rahman S, Montero MTV, Rowe K, et al. Epidemiology, pathogenesis, clinical presentations, diagnosis and treatment of COVID-19: a review of current evidence [J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2021, 14: 601-621.

- [3] Wang X, Zhang X, He J. Challenges to the system of reserve medical supplies for public health emergencies: reflections on the outbreak of the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) epidemic in China [J]. *Biosci Trends*, 2020, 14: 3-8.
- [4] Gao SJ, Guo H, Luo G. Omicron variant (B.1.1.529) of SARS-CoV-2, a global urgent public health alert [J]. *J Med Virol*, 2022, 94: 1255-1256.
- [5] Araf Y, Akter F, Tang YD, et al. Omicron variant of SARS-CoV-2: genomics, transmissibility, and responses to current COVID-19 vaccines [J]. *J Med Virol*, 2022, 94: 1825-1832.
- [6] Thakur V, Ratho RK. Omicron (B.1.1.529): a new SARS-CoV-2 variant of concern mounting worldwide fear [J]. *J Med Virol*, 2022, 94: 1821-1824.
- [7] Liu J, Zheng X, Tong Q, et al. Overlapping and discrete aspects of the pathology and pathogenesis of the emerging human pathogenic coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and 2019-nCoV [J]. *J Med Virol*, 2020, 92: 491-494.
- [8] Zhu W, Shyr Z, Lo DC, et al. Viral proteases as targets for coronavirus disease 2019 drug development [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2021, 378: 166-172.
- [9] Jin Z, Du X, Xu Y, et al. Structure of M^{pro} from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors [J]. *Nature*, 2020, 582: 289-293.
- [10] Ullrich S, Nitsche C. The SARS-CoV-2 main protease as drug target [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2020, 30: 127377.
- [11] Lyu M, Fan G, Xiao G, et al. Traditional Chinese medicine in COVID-19 [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11: 3337-3363.
- [12] Zong Y, Yao WF, Ju WZ. Exploring the antiviral traditional Chinese medicine for the treatment of Coronavirus Disease 2019 based on the cytokine storm and Chinese medicine theory "damp toxin invading the lung" [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 1091-1097.
- [13] Liu AL, Du GH. Drug discovery for COVID-19 treatment based on drug targets [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 1073-1080.
- [14] Chen YY, Fu ZH, Yan GG, et al. Optimization of expression conditions and determination the proteolytic activity of codon-optimized SARS-CoV-2 main protease in *Escherichia coli* [J]. *Chin J Biotech (生物工程学报)*, 2021, 37: 1334-1345.
- [15] Yan GG, Li DS, Qi HY, et al. Discovery of SARS-CoV-2 main protease inhibitors using an optimized FRET-based high-throughput screening assay [J]. *Chin J Biotech (生物工程学报)*, 2022. DOI: 10.13345/j.cjb.210657.
- [16] Chen Y, Fu Z, Li D, et al. Optimizations of a novel fluorescence polarization-based high-throughput screening assay for β -catenin/LEF1 interaction inhibitors [J]. *Anal Biochem*, 2021, 612: 113966.
- [17] Yan G, Li D, Lin Y, et al. Development of a simple and miniaturized sandwich-like fluorescence polarization assay for rapid screening of SARS-CoV-2 main protease inhibitors [J]. *Cell Biosci*, 2021, 11: 199.
- [18] Yan HH, Yan GG, Qi HY, et al. Identifying SARS-CoV-2 main protease inhibitors by a novel sandwich-like fluorescence polarization screening assay [J]. *Chin J Biotech (生物工程学报)*, 2022. DOI: 10.13345/j.cjb.210949.
- [19] Hung HC, Ke YY, Huang SY, et al. Discovery of M protease inhibitors encoded by SARS-CoV-2 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2020, 64: e00872-20.
- [20] Vuong W, Khan MB, Fischer C, et al. Feline coronavirus drug inhibits the main protease of SARS-CoV-2 and blocks virus replication [J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 4282.
- [21] Fu L, Ye F, Feng Y, et al. Both Boceprevir and GC376 efficaciously inhibit SARS-CoV-2 by targeting its main protease [J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 4417.
- [22] Sacco MD, Hu Y, Gongora MV, et al. The P132H mutation in the main protease of Omicron SARS-CoV-2 decreases thermal stability without compromising catalysis or small-molecule drug inhibition [J]. *Cell Res*, 2022, 32: 498-500.
- [23] Ma L, Zhao JY, Guo SS, et al. Establishment of a cell-based screening assay for inhibitors of SARS-CoV-2 3CL protease [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 2122-2126.
- [24] Froggatt HM, Heaton BE, Heaton NS. Development of a fluorescence-based, high-throughput SARS-CoV-2 3CL^{pro} reporter assay [J]. *J Virol*, 2020, 94: e01265-20.
- [25] Riva L, Yuan S, Yin X, et al. Discovery of SARS-CoV-2 antiviral drugs through large-scale compound repurposing [J]. *Nature*, 2020, 586: 113-119.
- [26] Qi HY, Yan GG, Fu ZH, et al. Miniaturized high-throughput screening assays for the discovery of SARS-CoV-2 main protease inhibitors [J]. *Chem Life (生命的化学)*, 2021, 41: 207-214.
- [27] Wen Z, Zhao Y, Gong Z, et al. The mechanism of action of ginkgolic acid (15:1) against gram-positive bacteria involves cross talk with iron homeostasis [J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10: e0099121.
- [28] Bhatta MS, Sausen DG, Gallo ES, et al. Ginkgolic acid inhibits coronavirus strain 229E infection of human epithelial lung cells [J]. *Pharmaceuticals*, 2021, 14: 980.
- [29] Campos D, Navarro S, Llamas-González YY, et al. Broad antiviral activity of ginkgolic acid against Chikungunya, Mayaro, Una, and Zika viruses [J]. *Viruses*, 2020, 12: 449.
- [30] Ugwu CE, Jiang YY, Wu L, et al. *In vitro* screening of ginkgolic acids for antiparasitic activity against *Cryptosporidium andersoni* [J]. *Biomed Environ Sci*, 2019, 32: 300-303.
- [31] Xiong Y, Zhu GH, Wang HN, et al. Discovery of naturally occurring inhibitors against SARS-CoV-2 3CL^{pro} from *Ginkgo biloba* leaves *via* large-scale screening [J]. *Fitoterapia*, 2021, 152: 104909.
- [32] Chen Z, Cui Q, Cooper L, et al. Ginkgolic acid and anacardic acid are specific covalent inhibitors of SARS-CoV-2 cysteine proteases [J]. *Cell Biosci*, 2021, 11: 45.