

• 医药生物技术 •

新冠病毒主蛋白酶特异性荧光底物 ddRFP-M 的制备与鉴定

张锐[#], 闫浩浩[#], 刘志成, 刘晓丽, 闫千千, 刘晓平, 陈云雨^{*}

皖南医学院药物筛选与评价研究所, 安徽 芜湖 241002

张锐, 闫浩浩, 刘志成, 刘晓丽, 闫千千, 刘晓平, 陈云雨. 新冠病毒主蛋白酶特异性荧光底物 ddRFP-M 的制备与鉴定[J]. 生物工程学报, 2024, 40(2): 496-506.

ZHANG Rui, YAN Haohao, LIU Zhicheng, LIU Xiaoli, YAN Gangan, LIU Xiaoping, CHEN Yunyu. Preparation and characterization of a fluorogenic ddRFP-M biosensor as a specific SARS-CoV-2 main protease substrate[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(2): 496-506.

摘要: 传统的新冠病毒主蛋白酶(main protease, Mpro)多肽底物具有制备成本高、稳定性差和合成工艺复杂等缺点, 积极开发廉价稳定的新型底物具有重要意义。本研究基于二聚化红色荧光蛋白(dimerization-dependent red fluorescent protein, ddRFP)原理, 以 AVLQS 为连接肽, 利用基因工程技术制备 Mpro 特异性荧光底物 ddRFP-M, 用于 Mpro 抑制剂的药理活性评价。将连接肽基因插入到密码子优化的 *RFP-A_I* 与 *RFP-B_I* 基因之间, 构建 *ddRFP-M* 基因, 再将其克隆到 pET-28a 载体中构建重组质粒。将重组质粒转化至大肠杆菌 Rosetta(DE3)感受态细胞中, 以卡那霉素抗性法筛选重组子。重组子经低温诱导后, 在大肠杆菌中进行荧光底物 ddRFP-M 的可溶表达, 并以 HisTrapTM 层析柱进行分离纯化。以荧光动力学检测法和电泳法测定 ddRFP-M 的底物特异性, 并利用荧光底物 ddRFP-M 评价恩赛特韦和黄芩素的药理活性。结果显示, 荧光底物 ddRFP-M 在大肠杆菌中呈可溶表达并成功进行了分离纯化, 其具有良好的底物特异性、灵敏性和可靠性。新冠病毒 Mpro 特异性荧光底物 ddRFP-M 的制备, 为新冠病毒 Mpro 抑制剂的药理活性评价奠定了基础。

关键词: 新冠病毒; 主蛋白酶; 荧光底物; 二聚化红色荧光蛋白; 恩赛特韦; 黄芩素

资助项目: 安徽省自然科学基金(1808085QH265); 安徽省高等学校自然科学研究项目(KJ2021A0839); 皖南医学院青年骨干人才资助项目(wyqnyx202104); 安徽省研究生学术创新项目(2022xscx129)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Anhui Province, China (1808085QH265), the University Natural Science Research Project of Anhui Province, China (KJ2021A0839), the Young Talent Project of Wannan Medical College, China (wyqnyx202104), and the Postgraduate Academic Innovation Program of Anhui Province, China (2022xscx129).

[#]These authors contributed equally to this study.

^{*}Corresponding author. E-mail: chenyunyu1984@163.com

Received: 2023-07-11; Accepted: 2023-09-27; Published online: 2023-10-20

Preparation and characterization of a fluorogenic ddRFP-M biosensor as a specific SARS-CoV-2 main protease substrate

ZHANG Rui[#], YAN Haohao[#], LIU Zhicheng, LIU Xiaoli, YAN Gangan, LIU Xiaoping, CHEN Yunyu^{*}

Institute for Drug Screening and Evaluation, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China

Abstract: The conventional peptide substrates of SARS-CoV-2 main protease (Mpro) are frequently associated with high cost, unstable kinetics, and multistep synthesis. Hence, there is an urgent need to design affordable and stable Mpro substrates for pharmacological research. Herein, we designed a functional Mpro substrate based on a dimerization-dependent red fluorescent protein (ddRFP) for the evaluation of Mpro inhibitors *in vitro*. The codon-optimized DNA fragment encoding RFP-A₁ domain, a polypeptide linker containing Mpro cleavage sequence (AVLQS), and the RFP-B₁ domain was subcloned into the pET-28a vector. After transformation into *Escherichia coli* Rosetta(DE3) cells, the kanamycin resistant transformants were selected. Using a low temperature induction strategy, most of the target proteins (ddRFP-M) presented in the supernatant fractions were collected and purified by a HisTrapTM chelating column. Subsequently, the inhibition of Mpro by ensitrelvir and baicalein was assessed using ddRFP-M assay, and the biochemical properties of ddRFP-M substrate were analyzed. Our results showed that the fluorogenic substrate ddRFP-M was successfully prepared from *E. coli* cells, and this biosensor exhibited the expected specificity, sensitivity, and reliability. In conclusion, the production of the fluorogenic substrate ddRFP-M provides an expedient avenue for the assessment of Mpro inhibitors *in vitro*.

Keywords: SARS-CoV-2; main protease; fluorogenic substrate; dimerization-dependent red fluorescent protein; ensitrelvir; baicalein

由新冠病毒引发的新冠病毒感染(coronavirus disease 2019, COVID-19)疫情已成为全球公共卫生关注的焦点。虽然通过接种疫苗建立了群体免疫屏障,但新冠病毒高频基因突变导致疫苗保护力下降,且新冠病毒变异株感染病例已在全球多地呈上升趋势,积极开发安全有效的广谱抗新冠病毒药物具有重要意义^[1-2]。

新冠病毒主要通过刺突糖蛋白(spike glycoprotein)与宿主细胞血管紧张素转化酶 2(angiotensin converting enzyme 2, ACE2)受体结合侵入宿主细胞。病毒释放遗传物质 RNA 后,

借助宿主细胞核糖体翻译为 2 条多聚蛋白质体。在新冠病毒主蛋白酶(main protease, Mpro)的水解作用下,多聚蛋白质体被切割成 12 个调控病毒复制与免疫逃逸的非结构蛋白质,进而完成子代病毒的组装与释放^[3-4]。由于进化保守的新冠病毒 Mpro 在调控病毒复制与免疫逃逸过程中具有重要的作用,且人体缺乏其同源蛋白酶,这使 Mpro 成为抗新冠病毒药物开发的理想靶标之一^[5]。

目前,荧光共振能量转移法(fluorescence resonance energy transfer, FRET)和荧光偏振法

(fluorescence polarization, FP)被广泛应用于 Mpro 抑制剂的高通量筛选^[6-11],但在上述筛选方法中,所使用的多肽底物具有制备成本高、稳定性差和合成工艺复杂等缺点,且部分天然产物可以淬灭多肽底物的荧光而产生假阳性结果^[12-13]。因此,积极开发稳定、经济、灵敏的新型 Mpro 底物具有重要意义。

基于二聚化红色荧光蛋白(dimerization-dependent red fluorescent protein, ddRFP)原理制备的荧光底物 ddRFP-M (55 kDa)是由淬灭态的 RFP-A₁ 结构域(29 kDa)和无荧光的 RFP-B₁ 结构域(26 kDa)通过连接肽即 Mpro 切割位点(AVLQS)连接形成的具有强荧光特性的异源二聚体。当连接肽被 Mpro 切割时,高荧光强度的 ddRFP-M 被切割为两个单体结构域,将产生较低的荧光值(relative fluorescence unit, RFU)。因此,活性化合物能够抑制 Mpro 对连接肽的切割作用,在荧光动力学检测中表现较高的 RFU 值;非活性化合物不能抑制 Mpro 对连接肽的切割作用,在荧光动力学检测中则表现较低的 RFU 值。此外,研究者也可以利用简便的电泳法分析荧光底物 ddRFP-M 能否被 Mpro 水解为 RFP-A₁ 和 RFP-B₁ 片段,进而定性评价 Mpro 抑制剂的药理活性(图 1)。

本研究旨在利用大肠杆菌制备新冠病毒 Mpro 特异性荧光底物 ddRFP-M,为 Mpro 抑制剂的药理活性评价奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

质粒提取试剂盒购自 TransGen 公司;大肠杆菌(*Escherichia coli*) Rosetta(DE3)感受态细胞、Nde I、Xho I、DNA 标准分子量和蛋白质标准分

子量购自通用生物(安徽)股份有限公司;酵母粉、蛋白胨、琼脂粉购自 Oxide 公司;卡那霉素、异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、二硫苏糖醇(1,4-dithiothreitol, DTT)和乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)购自 Aladdin 公司;0.45 μ m 微孔滤膜购自 Millipore 公司;HisTrapTM 层析柱购自 Cytiva 公司;蛋白质定量试剂盒购自 Thermo 公司;全黑半底 96 孔板购自 Corning 公司;GC-376、恩赛特韦(ensitrelvir)、黄芩素(baicalin)购自 TargetMol 公司;pET-28a 载体、重组新冠病毒主蛋白酶、重组新冠病毒木瓜样蛋白酶(papain-like protease, PLpro)由本室保存;其他生化试剂为国产分析纯试剂。

1.1.2 仪器

超净工作台购自 AIRTECH 公司;琼脂糖凝胶水平电泳仪购自北京六一生物科技有限公司;恒温振荡培养箱购自上海知楚仪器有限公司;超声波细胞粉碎仪购自 SCIENTZ 公司;高速冷冻离心机购自艾本德公司;蛋白质电泳仪购自 WIX 公司;AKTA Pure 25M 购自 Cytiva 公司;凝胶成像系统购自 CLINX 公司;多功能酶标仪购自 BioTek 公司。

1.2 方法

1.2.1 ddRFP-M 原核表达质粒的构建

检索 RFP-A₁ 基因序列(GenBank 登录号: JN381545.1)和 RFP-B₁ 基因序列(GenBank 登录号: JN381546.1),利用 JAVA Codon Adaption Tool 软件优化密码子^[14]。设定基因序列 GCCGTTCTG CAGAGC (AVLQS)为连接肽,将其插入到 RFP-A₁ 和 RFP-B₁ 基因之间,构建 ddRFP-M 基因。以 Nde I 和 Xho I 作为酶切位点,将 ddRFP-M 基因克隆到 pET-28a 载体中,构建重组质粒 pET-28a-ddRFP-M,再以双酶切法和基因测序法进行鉴定。

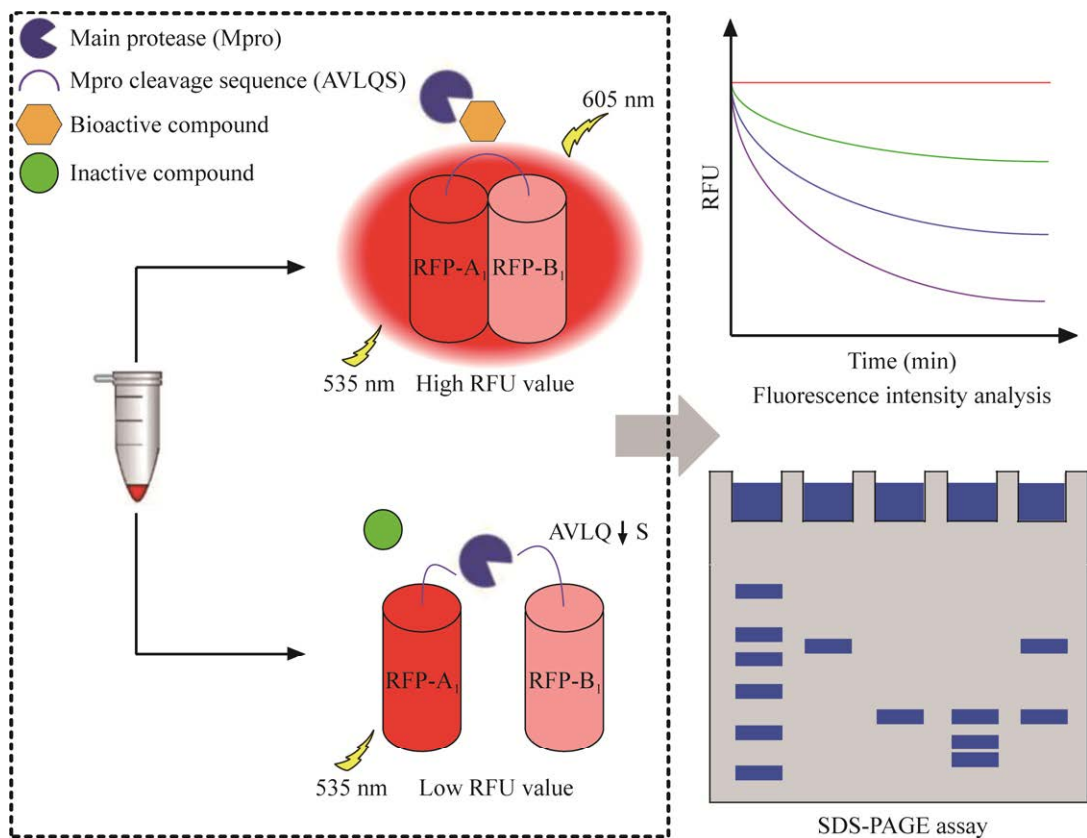


图 1 荧光底物 ddRFP-M 设计原理示意图 淬灭态的 RFP-A₁ 和无荧光的 RFP-B₁ 通过连接肽即 Mpro 切割位点(AVLQS)连接形成 ddRFP-M. 当 Mpro 抑制剂存在时, ddRFP-M 表现较高的 RFU 值. 反之, ddRFP-M 被 Mpro 水解为 RFP-A₁ 和 RFP-B₁ 片段, 表现较低的 RFU 值. 通过联合应用荧光动力学检测法和电泳法即可准确地评价化合物对 Mpro 酶活性的体外抑制作用

Figure 1 Concise sketch map of a fluorogenic substrate ddRFP-M design. Briefly, the quenched RFP-A₁ and nonfluorescent RFP-B₁ domains are tethered together to form a functional ddRFP biosensor that exhibits a high RFU value in the presence of Mpro inhibitors. Subsequently, Mpro cleaves the linker containing its cleavage sequence (AVLQS) to generate two separate RFP domains in the absence of Mpro inhibitors, resulting in a low RFU value. Regardless of the cleavage of ddRFP biosensor by Mpro, the fluorescence intensity measurement and SDS-PAGE assay are used to confirm this effect.

1.2.2 ddRFP-M 可溶表达与分离纯化

将重组质粒 pET-28a-ddRFP-M 转化至 *E. coli* Rosetta(DE3)感受态细胞中, 以卡那霉素抗性法筛选重组子。将重组子接种到 6 mL LB 液体培养基(含 50 μg/mL 卡那霉素)中, 37 °C 培养 8 h, 加入 1 mmol/L IPTG, 设定诱导温度 25 °C, 诱导起始时间点为 0 h, 每隔 2 h 收集 0.8 mL 菌液, 共收集 6 个时间点的样品, 用 SDS-PAGE 分析

各诱导时间点 ddRFP-M 的表达量。

收集 25 °C 诱导 10 h 的菌体, 用 TBS 溶液 (25 mmol/L Tris, 0.5 mol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 重悬。超声波法破碎菌体后, 离心收集上清液和沉淀, SDS-PAGE 分析 ddRFP-M 的可溶表达量。

将工程菌扩大培养后, 超声波法破碎菌体。收集的上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后, 用

HisTrap™ 层析柱分离纯化 ddRFP-M, 再用 SDS-PAGE 分析其纯度^[14]。纯化的 ddRFP-M 经透析和浓缩后, 用蛋白质定量试剂盒进行浓度测定。

1.2.3 ddRFP-M 底物特异性的测定

将 ddRFP-M 用 HEPES 溶液(10 mmol/L HEPES, 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, pH 7.0)稀释至 20 $\mu\text{mol/L}$, 25 μL /孔加入到 96 孔板中, 再等体积加入 0、1、2、4 $\mu\text{mol/L}$ Mpro, 室温孵育 30 min。设置检测温度 25 $^{\circ}\text{C}$, 增益值 78, 激发光波长 535 nm, 发射光波长范围 550–700 nm, 用多功能酶标仪扫描 ddRFP-M 的发射光强度, 产生最大发射光强度的波长即为 ddRFP-M 最佳发射光波长。

将 ddRFP-M 以 HEPES 溶液稀释至 5、10、20、40、60、80、100 $\mu\text{mol/L}$, 分别以 25 μL /孔加入到 96 孔板中, 再等体积加入 4 $\mu\text{mol/L}$ Mpro, 室温孵育 10 min。设置检测时间间隔 1 min, 检测总时长 30 min, 用荧光动力学检测法测定 RFU 值, 计算各组底物浓度对应的酶促反应初速度($\Delta\text{RFU}/\text{min}$)。利用 GraphPad Prism 8.0 拟合米氏方程, 计算 Mpro 米氏常数(K_m)、最大反应速度(maximal velocity, V_{\max})、催化常数(catalytic number, k_{cat})及专一性常数(k_{cat}/K_m)。

将 ddRFP-M 以 HEPES 溶液稀释至 20 $\mu\text{mol/L}$, 以 25 μL /孔加入到 96 孔板中, 再等体积加入 0、1、2、4 $\mu\text{mol/L}$ Mpro 与 4 $\mu\text{mol/L}$ PLpro。以荧光动力学检测法测定 RFU 值, 绘制 Mpro 水解反应曲线。

将 ddRFP-M 以 HEPES 溶液稀释至 1 $\mu\text{mol/L}$, 分别取 40 μL ddRFP-M 到微型离心管中, 再加入 0、0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$ Mpro, 室温孵育 1 h。将上述反应液煮沸 10 min 后, 取 20 μL 样品上样, 进行 SDS-PAGE 分析。设定 PLpro 浓度为

0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$, 重复上述实验操作。

1.2.4 ddRFP-M 在恩赛特韦和黄芩素药理活性评价中的应用

将恩赛特韦用含 4 $\mu\text{mol/L}$ Mpro 的 HEPES 溶液稀释 6 个浓度梯度(2.0 $\mu\text{mol/L}$ –62.5 nmol/L), 以 25 μL /孔加入到 96 孔板中, 室温孵育 30 min。再等体积加入 20 $\mu\text{mol/L}$ ddRFP-M, 室温孵育 10 min 后, 按照上述荧光动力学检测法测定 RFU 值, 计算各组恩赛特韦测试浓度对应的酶促反应初速度($\Delta\text{RFU}/\text{min}$)。设定 GC-376 (10 $\mu\text{mol/L}$)和 DMSO 为阳性对照组和阴性对照组。恩赛特韦抑制率计算公式如下:

$$\text{Inhibition (\%)} = 1 - \frac{V_{\text{entsitrelvir}}}{V_{\text{DMSO}}} \times 100$$

式中: $V_{\text{entsitrelvir}}$ 代表各组恩赛特韦测试浓度对应的酶促反应初速度, V_{DMSO} 代表 DMSO 组酶促反应的初速度。以 GraphPad Prism 8.0 拟合恩赛特韦量效曲线, 计算其半数抑制浓度值(half-maximal inhibitory concentration, IC_{50})。同法稀释黄芩素为 200 $\mu\text{mol/L}$, 再以 2 倍倍比稀释法稀释 6 个浓度梯度, 同法测定其药理活性。

同法稀释恩赛特韦至 0、0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$, 以 25 μL /孔加入到 96 孔板中, 室温孵育 30 min。在其单一抑制浓度条件下, 等体积加入 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ ddRFP-M, 室温孵育 10 min 后, 按照上述荧光动力学检测法测定 RFU 值, 计算恩赛特韦在不同浓度 ddRFP-M 中酶促反应的初速度($\Delta\text{RFU}/\text{min}$)。利用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 推导恩赛特韦的抑制机制, 计算恩赛特韦的抑制常数(inhibitory constant, K_i)。

同法稀释恩赛特韦和黄芩素至 2、20、200 $\mu\text{mol/L}$, 以 25 μL /孔加入到 96 孔板中, 室温孵育 30 min。再等体积加入 20 $\mu\text{mol/L}$ ddRFP-M, 室温孵育 10 min 后, 按照上述荧光动力学检测法测定 RFU 值, 绘制 Mpro 水解曲线。设定

GC-376 (10 $\mu\text{mol/L}$)和 DMSO 为阳性对照组和阴性对照组。

将恩赛特韦和黄芩素用含 2 $\mu\text{mol/L}$ Mpro 的 HEPES 溶液稀释至 1、10、100 $\mu\text{mol/L}$, 室温孵育 30 min 后, 分别取 40 μL 样品到微型离心管中。再加入 1 $\mu\text{mol/L}$ ddRFP-M, 室温孵育 1 h。将上述反应液煮沸 10 min 后, 取 20 μL 样品上样, 进行 SDS-PAGE 分析。设定 GC-376 (10 $\mu\text{mol/L}$) 和 DMSO 为阳性对照组和阴性对照组。

2 结果与分析

2.1 ddRFP-M 原核表达质粒的构建与鉴定

在密码子优化的 *RFP-A_I* 和 *RFP-B_I* 基因之间插入连接肽 (AVLQS) 基因序列, 构建 *ddRFP-M* 基因。以 *Nde* I 和 *Xho* I 作为酶切位点, 将 *ddRFP-M* 基因克隆到 pET-28a 载体中, 构建重组质粒 pET-28a-ddRFP-M (图 2A)。重组质粒经双酶切后, 得到了与预期大小(1 413 bp)一致

的目的基因片段(图 2B)。基因测序结果证实, 重组质粒连接的基因序列与 *ddRFP-M* 预期序列完全相同。

2.2 ddRFP-M 可溶表达与分离纯化

SDS-PAGE 结果表明, 当诱导温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 时, ddRFP-M 表达量随诱导时间的延长而增加。当诱导时间达 10 h 时, ddRFP-M 表达量基本达到峰值(图 3A)。将 25 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 10 h 的菌体破碎, SDS-PAGE 结果表明, 菌体裂解上清液中存在大量目的蛋白质, 但沉淀中目的蛋白质含量较少, 说明在低温诱导条件下, ddRFP-M 在大肠杆菌中呈可溶表达。菌体裂解上清液经亲和层析后, 含有纯化样品的电泳胶经考马斯亮蓝染色, 在 55 kDa 处有单一条带, 且纯度大于 90% (图 3B)。

2.3 ddRFP-M 底物特异性的测定

发射光光谱扫描实验结果表明, ddRFP-M 在 605 nm 具有最大发射光强度, 故确定 605 nm

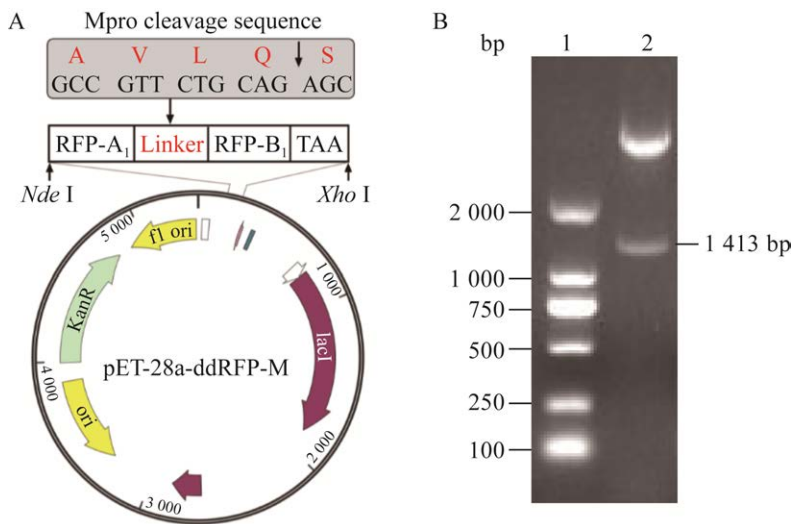


图 2 ddRFP-M 原核表达质粒的构建与鉴定 A: 重组质粒 pET-28a-ddRFP-M 构建示意图. B: 重组质粒 pET-28a-ddRFP-M 的双酶切鉴定. 1: DNA 标准分子量; 2: *ddRFP-M* 基因片段(1 413 bp)

Figure 2 Construction and identification of the recombinant plasmid for ddRFP-M expression. A: Schematic illustration for the construction of pET-28a-ddRFP-M plasmid. B: Double digestion assay of pET-28a-ddRFP-M plasmid. 1: DNA marker; 2: *ddRFP-M* gene fragment (1 413 bp).

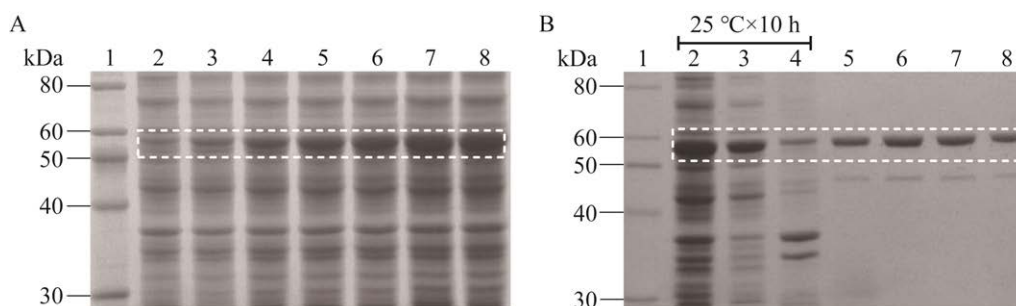


图3 ddRFP-M 原核表达与分离纯化 A: ddRFP-M 在 25 °C 条件下不同诱导时间点的原核表达量. 1: 蛋白质标准分子量; 2: 0 h; 3: 2 h; 4: 4 h; 5: 6 h; 6: 8 h; 7: 10 h; 8: 12 h. B: ddRFP-M 在 25 °C 诱导 10 h 条件下的可溶表达与分离纯化. 1: 蛋白质标准分子量; 2: 全菌蛋白质; 3: 裂解上清液; 4: 沉淀; 5-8: 纯化的 ddRFP-M (55 kDa)

Figure 3 Expression and purification of ddRFP-M. A: Analysis of ddRFP-M expression in *E. coli* cells at 25 °C from 0 h to 12 h. 1: Protein marker; 2: 0 h; 3: 2 h; 4: 4 h; 5: 6 h; 6: 8 h; 7: 10 h; 8: 12 h. B: Purification of soluble ddRFP-M biosensor from *E. coli* cells at 25 °C for 10 h. 1: Protein marker; 2: Total cell proteins; 3: Supernatant; 4: Pellet; 5-8: Pure ddRFP-M (55 kDa).

为 ddRFP-M 的最佳发射光波长。将 ddRFP-M 作为 Mpro 水解底物, 随着 Mpro 剂量的增加, 其发射光强度逐渐降低(图 4A), 说明 ddRFP-M 能被 Mpro 水解导致其发射光强度逐渐降低。通过 Mpro 酶促反应的初速度拟合米氏方程, 计算 Mpro 的 K_m 值为 57.9 $\mu\text{mol/L}$ 、 V_{\max} 值为 1 905 $\Delta\text{RFU/min}$ 、 k_{cat} 值为 1.55/min、 k_{cat}/K_m 值为 26 792 $\text{L}/(\text{mol} \cdot \text{min})$ (图 4B)。荧光动力学实验结果表明, Mpro 能剂量依赖式水解 ddRFP-M 导致其 RFU 值逐渐降低, 但 PLpro 水解曲线的 RFU 值却保持平稳, 说明 ddRFP-M 不能被 PLpro 水解, 其具有良好的底物特异性(图 4C)。电泳法实验结果表明, Mpro 可水解 ddRFP-M 为 RFP-A₁ 和 RFP-B₁ 片段, 但 PLpro 不能水解 ddRFP-M (图 4D), 其与图 4C 结果一致。上述结果说明, ddRFP-M 可作为 Mpro 水解反应的特异性荧光底物。

2.4 荧光底物 ddRFP-M 在恩赛特韦和黄芩素药理活性评价中的应用

将 ddRFP-M 作为 Mpro 酶促反应的底物,

联合应用荧光动力学检测法和电泳法分析恩赛特韦和黄芩素的药理活性。实验结果表明, 恩赛特韦对 Mpro 酶活性具有良好的抑制作用, 其 IC_{50} 值为 $(0.34 \pm 0.04) \mu\text{mol/L}$, K_i 值为 0.41 $\mu\text{mol/L}$, 且为竞争型 Mpro 抑制剂(图 5A-5D), 但黄芩素对 Mpro 酶活性未有明显的抑制作用, 其 IC_{50} 值大于 100 $\mu\text{mol/L}$ (图 5E、5F)。当恩赛特韦浓度达到 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, Mpro 水解反应曲线表现较高的 RFU 值(图 5G), 说明恩赛特韦可以抑制 Mpro 对荧光底物 ddRFP-M 的水解。当黄芩素浓度达到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, Mpro 水解反应曲线却表现较低的 RFU 值(图 5H), 说明黄芩素不能抑制 Mpro 对荧光底物 ddRFP-M 的水解。电泳法实验结果表明, 恩赛特韦可以抑制 Mpro 水解荧光底物 ddRFP-M 为 RFP-A₁ 和 RFP-B₁ 片段, 但黄芩素却是无效的 Mpro 抑制剂(图 5I)。上述结果说明, 所制备的荧光底物 ddRFP-M 具有良好的特异性、灵敏性和可靠性, 可用于 Mpro 抑制剂的体外药理活性评价。

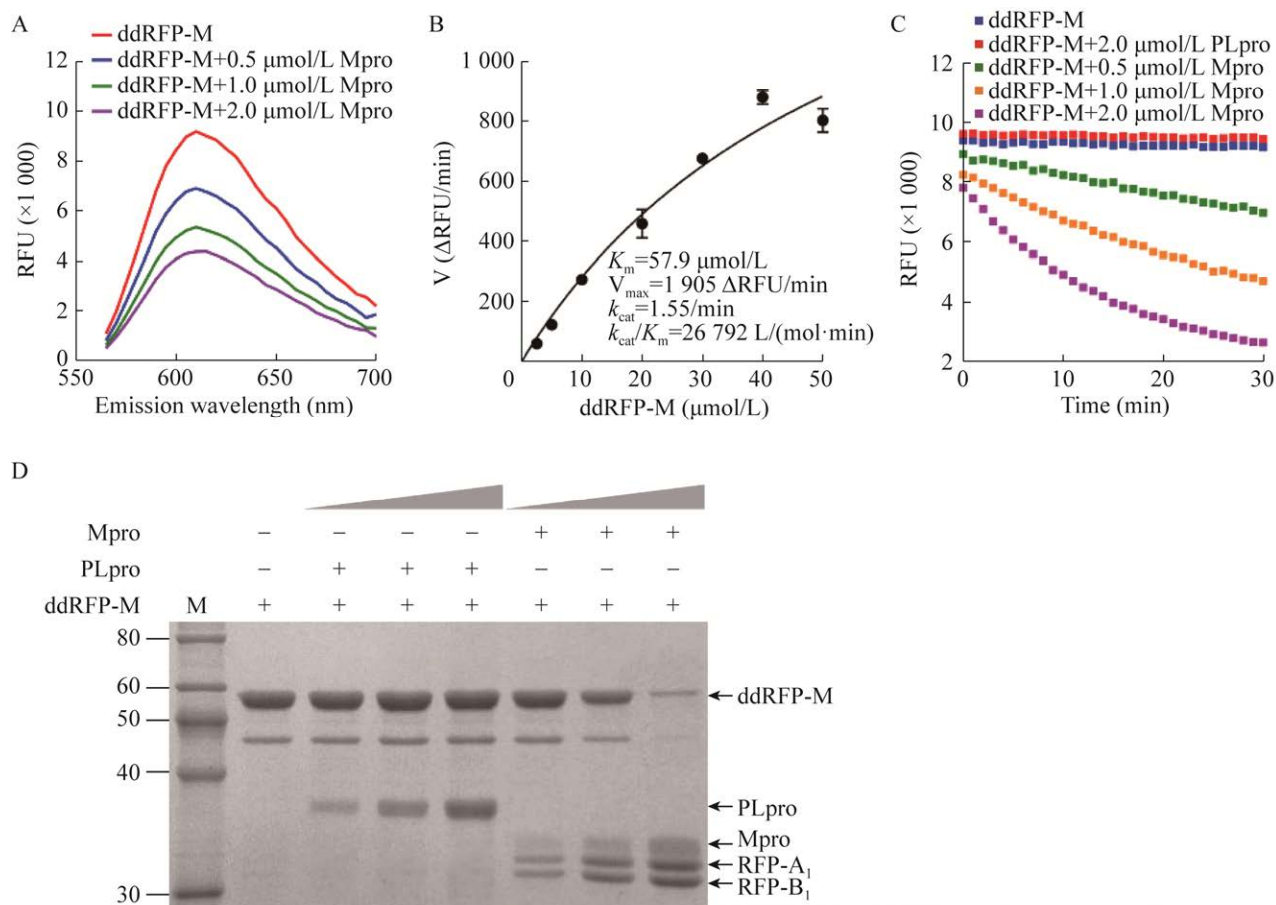


图 4 ddRFP-M 底物特异性的测定 A: 不同浓度 Mpro 水解荧光底物 ddRFP-M 的发射光光谱. B: Mpro 酶促反应的米氏方程. C: 不同浓度 Mpro 与 PLpro 水解荧光底物 ddRFP-M 的荧光动力学曲线. D: 电泳法检测不同浓度 Mpro 与 PLpro 水解荧光底物 ddRFP-M

Figure 4 The substrate specificity analysis of ddRFP-M. A: Emission wavelength scan of ddRFP-M at the indicated concentrations of Mpro. B: The Michaelis-Menten equation of Mpro enzyme reaction. C: The time course trajectories of ddRFP-M catalyzed by Mpro and PLpro enzymes. D: Cleavage analysis of ddRFP-M catalyzed by Mpro and PLpro enzymes using SDS-PAGE assay.

3 讨论与结论

大肠杆菌是最常用的外源基因表达系统之一, 具有操作简便、成本低廉、培养周期短和表达量高等优点。利用大肠杆菌表达 ddRFP-M 时, 虽然密码子偏爱性影响 ddRFP-M 的原核表达量, 但 mRNA 稳定性、蛋白质折叠和培养条件优化等也是影响 ddRFP-M 表达量的重要因素^[15]。在后续研究中, 应综合考虑上述因素对

ddRFP-M 原核表达量的协同影响, 进一步优化原核表达条件, 提高 ddRFP-M 在大肠杆菌中的表达量。此外, 采用低温诱导策略进行 ddRFP-M 的原核表达, 不仅有助于目的蛋白质的正确折叠, 还能促进其可溶表达, 最大程度地保持蛋白质的天然构象^[16]。

目前, 已报道的 Mpro 抑制剂筛选方法主要包括虚拟筛选法、细胞模型筛选法、FRET 筛选法和荧光偏振筛选法等^[6-11,17-18]。其中, 虚

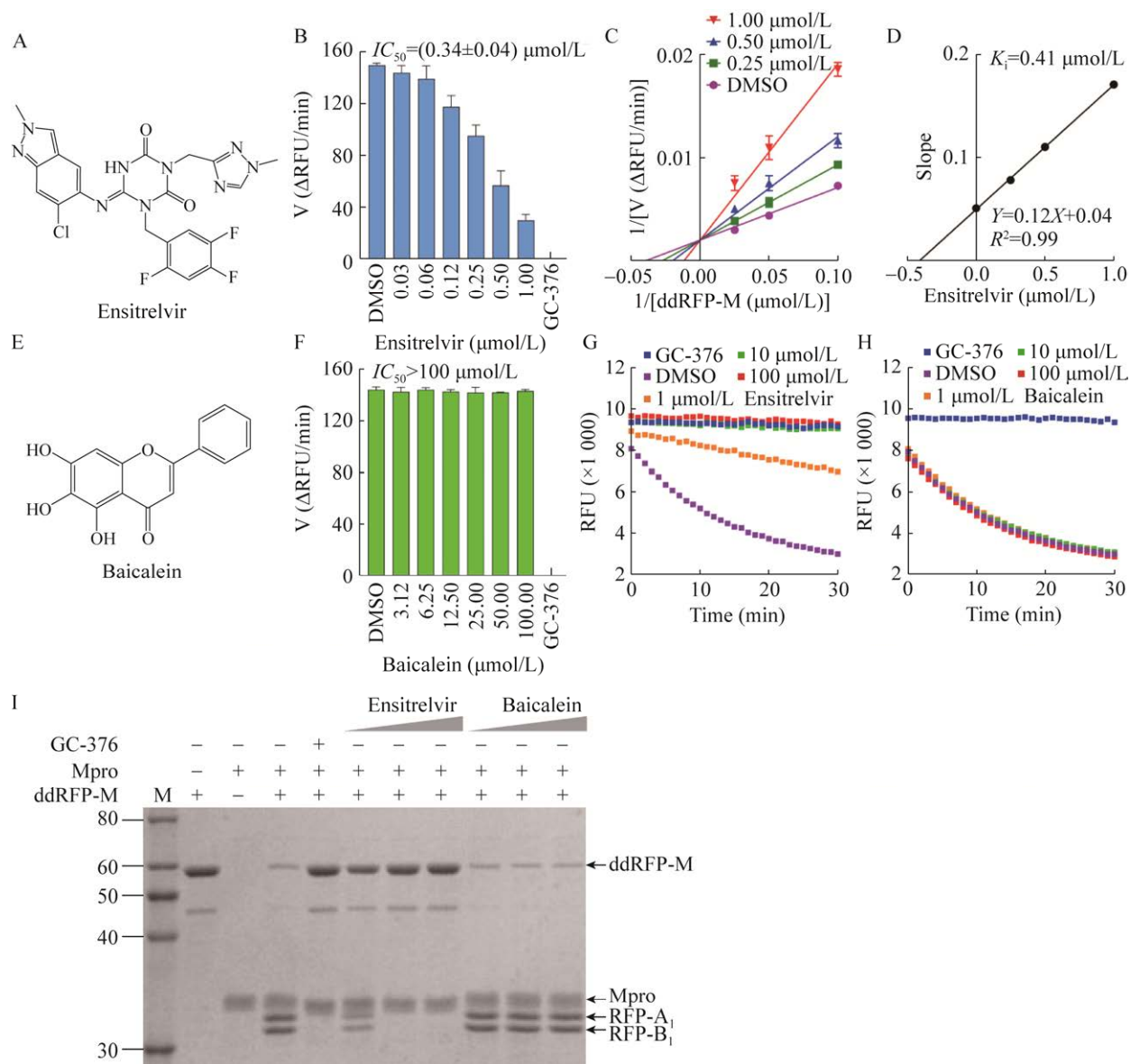


图 5 荧光底物 ddRFP-M 在恩赛特韦和黄芩素药理活性评价中的应用 A: 恩赛特韦化学结构式. B: 恩赛特韦对 Mpro 酶活性的抑制作用. C、D: 恩赛特韦的抑制机制与抑制常数值. E: 黄芩素化学结构式. F: 黄芩素对 Mpro 酶活性的抑制作用. G、H: 基于 Mpro 水解荧光底物 ddRFP-M 的荧光动力学曲线分析恩赛特韦和黄芩素对 Mpro 酶活性的抑制作用. I: 基于 Mpro 水解荧光底物 ddRFP-M 的电泳实验分析恩赛特韦和黄芩素对 Mpro 酶活性的抑制作用

Figure 5 Application of a fluorogenic substrate ddRFP-M for the assessment of ensitrelvir and baicalein *in vitro*. A: The chemical structure of ensitrelvir. B: Inhibition of Mpro by ensitrelvir using ddRFP-M assay. C, D: The inhibition mechanism and K_i value of ensitrelvir using ddRFP-M assay. E: The chemical structure of baicalein. F: Inhibition of Mpro by baicalein using ddRFP-M assay. G, H: The time course trajectories of a fluorogenic substrate ddRFP-M in the presence of ensitrelvir and baicalein at the indicated concentrations. I: Gel-based assay of a fluorogenic substrate ddRFP-M cleavage by ensitrelvir and baicalein *in vitro*. In SDS-PAGE analysis, GC-376 (10 μmol/L) and DMSO served as the positive and negative controls, respectively. The working concentrations of ensitrelvir and baicalein were 1, 10, and 100 μmol/L.

拟筛选法是利用分子对接软件模拟靶标与候选药物之间的相互作用,进而发现先导化合物的药物筛选方法。虚拟筛选法的假阳性率较高,必须与实验筛选技术结合才能确定候选化合物的潜在活性。细胞模型筛选法是基于瞬转细胞株建立的筛选方法,其在大规模高通量筛选中具有筛选成本高、筛选周期长和稳定性差等缺点。在 FRET 筛选法和荧光偏振筛选法中,普遍使用荧光多肽作为 Mpro 水解底物,仅通过单一的荧光强度值检测进行 Mpro 抑制剂的筛选。所使用的多肽底物具有化学合成工艺复杂、制备成本高、稳定性差且需要荧光分子标记等缺点。另外,部分天然产物或化合物的荧光淬灭效应极易产生假阳性实验结果^[12-13]。

本研究基于 ddRFP 原理制备的 Mpro 特异性荧光底物 ddRFP-M 具有理想的光谱特性($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$: 535 nm/605 nm),更好地避免了与部分天然产物自身荧光波长的重叠,提高了高通量筛选的准确性。此外,传统的多肽底物只能局限在 FRET 或荧光偏振筛选法中使用,不能有效地排除化合物自身荧光对筛选结果的干扰。本研究制备的荧光底物 ddRFP-M 具有良好的多功能性,不但可以使用荧光动力学法检测,还可以使用电泳法进行药理活性评价,有效地排除了化合物自身荧光对筛选模型的干扰。将 ddRFP-M 作为 Mpro 的酶促反应底物,通过荧光动力学检测法和电泳法证实了恩赛特韦对 Mpro 酶活性具有良好的抑制作用,但黄芩素是无效的 Mpro 抑制剂,其结果与文献报道一致^[8,18-20],说明了所制备的荧光底物 ddRFP-M 具有良好的特异性、灵敏性和可靠性。荧光底物 ddRFP-M 的应用有效弥补了传统药理学活性评价方法的不足,进一步提高了抗新冠病毒药物筛选与评价的准确性,具有重要的应用价值。但不同连接肽形成的 ddRFP-M 可能具有不同的二级结

构,进而导致迥异的底物特异性与转换数。因此,还需进一步优化连接肽序列以提高荧光底物 ddRFP-M 的特异性和水解效率,具体的实验优化方案仍有待研究。

综上所述,本研究利用大肠杆菌成功制备了新冠病毒 Mpro 特异性荧光底物 ddRFP-M,为新冠病毒 Mpro 抑制剂的药理活性评价奠定了基础。

REFERENCES

- [1] GAO SJ, GUO HT, LUO GX. Omicron variant (B.1.1.529) of SARS-CoV-2, a global urgent public health alert![J]. *Journal of Medical Virology*, 2022, 94(4): 1255-1256.
- [2] CAO YL, WANG J, JIAN FC, XIAO TH, SONG WL, YISIMAYI A, HUANG WJ, LI QQ, WANG P, AN R, WANG J, WANG Y, NIU X, YANG SJ, LIANG H, SUN HY, LI T, YU YL, CUI QQ, LIU S, et al. Omicron escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies[J]. *Nature*, 2022, 602(7898): 657-663.
- [3] MEDINA-ENRÍQUEZ MM, LOPEZ-LEÓN S, CARLOS-ESCALANTE JA, APONTE-TORRES Z, CUAPIO A, WEGMAN-OSTROSKY T. ACE2: the molecular doorway to SARS-CoV-2[J]. *Cell & Bioscience*, 2020, 10(1): 148.
- [4] SHANG J, WAN YS, LUO CM, YE G, GENG QB, AUERBACH A, LI F. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(21): 11727-11734.
- [5] ANIRUDHAN V, LEE H, CHENG H, COOPER L, RONG LJ. Targeting SARS-CoV-2 viral proteases as a therapeutic strategy to treat COVID-19[J]. *Journal of Medical Virology*, 2021, 93(5): 2722-2734.
- [6] CHEN ZN, CUI QH, COOPER L, ZHANG P, LEE H, CHEN ZY, WANG YY, LIU XY, RONG LJ, DU RK. Ginkgolic acid and anacardic acid are specific covalent inhibitors of SARS-CoV-2 cysteine proteases[J]. *Cell & Bioscience*, 2021, 11(1): 45.
- [7] MILLIGAN JC, ZEISNER TU, PAPAGEORGIOU G, JOSHI D, SOUDY C, ULFERTS R, WU M, LIM CT, TAN KW, WEISSMANN F, CANAL B, FUJISAWA R, DEEGAN T, NAGARAJ H, BINEVA-TODD G,

- BASIER C, CURRAN JF, HOWELL M, BEALE R, LABIB K, et al. Identifying SARS-CoV-2 antiviral compounds by screening for small molecule inhibitors of Nsp5 main protease[J]. *Biochemical Journal*, 2021, 478(13): 2499-2515.
- [8] 闫干干, 李东升, 戚海燕, 付正豪, 刘晓平, 张晶, 陈云雨. 新冠病毒主蛋白酶小分子抑制剂荧光共振能量转移高通量筛选模型的优化与应用[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(6): 2236-2249.
- YAN GG, LI DS, QI HY, FU ZH, LIU XP, ZHANG J, CHEN YY. Discovery of SARS-CoV-2 main protease inhibitors using an optimized FRET-based high-throughput screening assay[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(6): 2236-2249 (in Chinese).
- [9] YAN GG, LI DS, LIN Y, FU ZH, QI HY, LIU XP, ZHANG J, SI S, CHEN YY. Development of a simple and miniaturized sandwich-like fluorescence polarization assay for rapid screening of SARS-CoV-2 main protease inhibitors[J]. *Cell & Bioscience*, 2021, 11(1): 199.
- [10] ZHANG J, YAN HH, YAN GG, LIU XP, WANG YC, CHEN YY. Protocol for high-throughput screening of SARS-CoV-2 main protease inhibitors using a robust fluorescence polarization assay[J]. *STAR Protocols*, 2022, 3(4): 101794.
- [11] 闫浩浩, 闫干干, 戚海燕, 刘志成, 刘晓丽, 刘晓平, 李霓, 陈云雨. 新型三明治样荧光偏振筛选模型在新型冠状病毒主蛋白酶小分子抑制剂筛选中的应用[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(6): 2352-2364.
- YAN HH, YAN GG, QI HY, LIU ZC, LIU XL, LIU XP, LI N, CHEN YY. Identifying SARS-CoV-2 main protease inhibitors by a novel sandwich-like fluorescence polarization screening assay[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(6): 2352-2364 (in Chinese).
- [12] ZHANG R, YAN HH, ZHOU JH, LIU XP, CHEN YY. Invalidation of geraniin as a potential inhibitor against SARS-CoV-2 main protease[J]. *Natural Product Research*, 2023. DOI: 10.1080/14786419.2023.2241973.
- [13] YAN HH, ZHANG R, LIU XP, WANG YC, CHEN YY. Reframing quercetin as a promiscuous inhibitor against SARS-CoV-2 main protease[J]. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(37): e2309289120.
- [14] 陈云雨, 付正豪, 闫干干, 林媛, 刘晓平. 基于密码子优化策略的新型冠状病毒主蛋白酶在大肠杆菌中的表达条件优化与活性鉴定[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(4): 1334-1345.
- CHEN YY, FU ZH, YAN GG, LIN Y, LIU XP. Optimization of expression conditions and determination the proteolytic activity of codon-optimized SARS-CoV-2 main protease in *Escherichia coli*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(4): 1334-1345 (in Chinese).
- [15] JIA BL, JEON CO. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives[J]. *Open Biology*, 2016, 6(8): 160196.
- [16] KAUR J, KUMAR A, KAUR J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: roadblocks and reinforcements[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 106: 803-822.
- [17] LI Z, LI X, HUANG YY, WU YX, LIU RD, ZHOU LL, LIN YX, WU DY, ZHANG L, LIU H, XU XM, YU KQ, ZHANG YX, CUI J, ZHAN CG, WANG X, LUO HB. Identify potent SARS-CoV-2 main protease inhibitors via accelerated free energy perturbation-based virtual screening of existing drugs[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(44): 27381-27387.
- [18] MA C, TAN H, CHOZA J, WANG J. Validation and invalidation of SARS-CoV-2 main protease inhibitors using the Flip-GFP and Protease-Glo luciferase assays[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2022, 12(4): 1636-1651.
- [19] UNOB Y, UEHARA S, NAKAHARA K, NOBORI H, YAMATSU Y, YAMAMOTO S, MARUYAMA Y, TAODA Y, KASAMATSU K, SUTO T, KOUKI K, NAKAHASHI A, KAWASHIMA S, SANAKI T, TOBA S, UEMURA K, MIZUTARE T, ANDO S, SASAKI M, ORBA Y, et al. Discovery of S-217622, a noncovalent oral SARS-CoV-2 3CL protease inhibitor clinical candidate for treating COVID-19[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2022, 65(9): 6499-6512.
- [20] YAN HH, ZHANG R, YAN GG, LIU XP, LI N, CHEN YY. Validation of baicalein and oridonin as nonspecific SARS-CoV-2 main protease inhibitors[J]. *Phytotherapy Research*, 2023. DOI: 10.1002/ptr.7829.

(本文责编 郝丽芳)