

丙型肝炎病毒蛋白酶抑制剂高通量 筛选模型的建立及应用

李健蕊, 武燕彬, 司书毅, 陈鸿珊, 蒋建东, 彭宗根

中国医学科学院 北京协和医学院 医药生物技术研究所以病毒室, 北京 100050

通信作者: 彭宗根 电话: 010-63010984, 电子邮件: pumcpzg@126.com

摘要: **目的** 应用荧光共振能量转移 (FRET) 法检测丙型肝炎病毒 (HCV) 丝氨酸蛋白酶 (NS3-4A) 活性, 建立 HCV 蛋白酶抑制剂筛选模型。**方法** 将质粒 pMAL-c2/NS3-4A 转化到大肠杆菌 K_{12} TB₁ 中, 经异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达, 亲和层析柱纯化得到麦芽糖结合的 NS3-4A 融合蛋白, 用 FRET 法测定蛋白水解酶活性, 建立特异性蛋白酶抑制剂筛选模型, 优化反应体系, 评价模型的可靠性。**结果** 建立了 HCV 蛋白酶抑制剂高通量筛选模型, 经优化确定了酶及底物用量。在模型可靠性评价中, Z 因子高达 0.80, 变异系数为 1.91%。蛋白酶的 K_m 值为 4.74 $\mu\text{mol/L}$, 测得已知 HCV 蛋白酶抑制剂 BILN 2061 的 K_i 值为 0.30 nmol/L 。**结论** 建立的 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂 FRET 法筛选模型稳定可靠, 适用于高通量筛选。

关键词: 丙型肝炎病毒; 丝氨酸蛋白酶; 高通量筛选模型; 荧光共振能量转移

中图分类号: R373-33 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-503X(2011)01-0098-04

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2011.01.022

Establishment and Application of High Throughput Screening Model for Hepatitis C Virus NS3-4A Protease Inhibitors *in vitro*

LI Jian-rui, WU Yan-bin, SI Shu-yi, CHEN Hong-shan, JIANG Jian-dong, PENG Zong-gen

Department of Virology, Institute of Medicinal Biotechnology, CAMS and PUMC, Beijing 100050, China

Corresponding author: PENG Zong-gen Tel: 010-63010984, E-mail: pumcpzg@126.com

ABSTRACT: Objective To establish fluorescence resonance energy transfer (FRET) assay method of detecting proteolytic activity of non-structural protein 3-4A (NS3-4A) serine protease of hepatitis C virus (HCV) for high throughput screening inhibitors against HCV *in vitro*. **Methods** HCV recombinant plasmid pMAL-c2/NS3-4A was transformed into the *E. coli* strain K_{12} TB₁. Maltose-binding-protein (MBP) NS3-4A fusion protein expression was induced by adding isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranoside (IPTG) and purified by affinity chromatography. The proteolytic activity of MBP-NS3-4A protease was analyzed by FRET with the special protease substrate. The reaction system in this model was optimized, and the reliability of the model was evaluated. **Results** High throughput screening model for HCV NS3-4A protease inhibitors was established, and the best concentrations of enzyme and substrate were optimized. In the model, the K_m value of protease was 4.74 $\mu\text{mol/L}$, Z factor was up to 0.80, and coefficient of variation (CV) was 1.91%. BILN 2061, one of

基金项目: 科技部国际合作项目 (2006DFA31450)、国家新药创制重大专项 (2009ZX09302-004) 和中央级公益性科研院所基本科研业务专项 (IMBF-200902) Supported by International S&T Cooperation Program of China (2006DFA31450), Key-program of "Innovative Drugs" of the Ministry of Science & Technology of China (2009ZX09302-004), and Central Public-interest Scientific Institution Basic Research Fund (IMBF-200902)

the known HCV protease inhibitors, was measured with the K_i of 0.30 nmol/L. **Conclusion** The assay model using FRET method for HCV NS3-4A serine protease is stable and reliable, and the model is suitable for high throughput screening for HCV NS3-4A protease inhibitors.

Key words: hepatitis C virus; serine protease; high throughput screening; fluorescence resonance energy transfer

Acta Acad Med Sin, 2011, 33(1): 98-101

临床以干扰素联合利巴韦林治疗丙型肝炎的效果有限,且患者耐受性差,因此急需研发新的药物用于联合治疗^[1]。丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)非结构蛋白3(non-structural protein 3, NS3)蛋白酶在HCV复制中起重要作用,使其成为抗HCV治疗的理想靶点之一,蛋白酶抑制剂的临床研究也显示了较好的疗效^[2-3],但面临着耐药等问题^[4]。因此建立蛋白酶抑制剂筛选模型用于寻找新型抗HCV蛋白酶药物具有重要意义。早期应用放射性核素法测定NS3蛋白酶抑制剂活性,操作复杂,且有放射性核素的污染^[5],而高效液相色谱测定法要求抑制剂的纯度高,且也不适于大量筛选^[6]。我国早年报道用酶联免疫吸附法进行筛选^[7],但测定方法繁琐,灵敏度低,成本高,未能广泛应用。本研究应用荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)法测定HCV蛋白酶活性,并优化反应条件,旨在建立适于高通量筛选的HCV蛋白酶抑制剂活性测定模型。

材料和方法

实验材料 质粒 pMAL-c2/NS3-4A 为本实验室制备,亲和层析填料 Amylose resin 购自 New England Biolabs 公司,底物 HCV Protease FRET Substrate (RET S1) 购自美国 AnaSpec 公司,蛋白定量试剂盒购自 Bio-Rad 公司,阳性化合物 BILN 2061 购自上海乐晨国际贸易有限公司, Polarstar 荧光检测仪为德国 BMG 公司产品。

HCV NS3-4A 融合蛋白的制备及含量测定 按照参考文献 [7] 方法制备 HCV NS3-4A 融合蛋白,以牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)作为标准,用蛋白定量试剂盒检测蛋白含量。

高通量筛选模型的建立及条件优化 本模型所采用 HCV 蛋白酶底物 RET S1 为 Ac-Asp-Glu-Asp (EDANS)-Glu-Glu-Abu-ψ-[COO]-Ala-Ser-Lys (DABCYL)-NH₂^[8], 1 × 反应缓冲液 (30 mmol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl₂, 10 mmol/L DTT, 50 mmol/L Tris), 反应温度设为

37℃, 在荧光检测仪中以 355 nm 激发光和 520 nm 发射光连续读数。优化反应体积及反应缓冲液 pH 值,最终修订为反应体积 200 μl, 缓冲液 pH 值为 7.5。在此条件下,于 96 孔荧光酶标反应板中分别加入 1 × 缓冲液 160 μL、终浓度为 73 μg/ml 的蛋白酶 20 μL, 不同浓度蛋白酶底物 20 μL, 对底物浓度进行优化,并用米氏方程计算出蛋白酶 K_m 值。选择不同底物和蛋白酶浓度,对 NS3-4A 蛋白酶浓度进行优选。计算 Z 因子和变异系数(coefficient of variation, CV): $Z = 1 - 3 \times (\sigma_s + \sigma_b) / (\mu_s - \mu_b)$, $CV = \sigma / \mu \times 100\%$, 其中 σ 为标准差, μ 为平均值, s 为信号, b 为背景,判断模型可靠性^[9]。二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO) 常用为化合物助溶剂,为观察 DMSO 浓度对酶促反应的影响,选择终浓度为 0.5%、1%、2%、4% 和 8% 的 DMSO, 分析反应体系中 DMSO 的含量对酶促反应的作用。

阳性化合物 BILN 2061 抑制蛋白酶活性的测定 测定终浓度为 20、4、0.8、0.16 和 0.032 nmol/L 的 BILN 2061 对蛋白酶的活性,采用 Reed-Muench 方法计算化合物对蛋白酶的半数抑制浓度(50% inhibitory concentration, IC₅₀), 并计算 K_i 值: $K_i = IC_{50} / (1 + [S] / K_m)$ ^[10], 其中 [S] 为底物浓度。

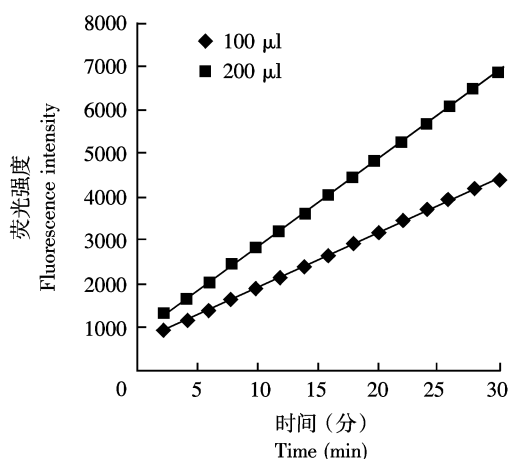
蛋白酶抑制剂的高通量筛选 利用建立的蛋白酶抑制剂筛选模型,对国家新药(微生物)筛选中心样品库中 4000 个化合物进行筛选,筛选浓度为 1 μg/mL,并对阳性化合物进行复筛。

结 果

NS3-4A 融合蛋白的含量测定 以 BSA 作为标准计算,经测定 HCV NS3-4A 融合蛋白的含量为 1.47 mg/mL。

反应体积的优化 在浓度等其他因素相同的条件下,200 μl 反应体积的荧光强度高于 100 μl 反应体积的荧光强度(图 1)。

pH 值优化 调反应缓冲液 pH 值分别为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 和 8.5,用浓度为 73 μg/mL 的



HCV: 丙型肝炎病毒

HCV: hepatitis C virus

图 1 反应体积对 HCV 蛋白酶酶促反应的影响

Fig 1 Effect of total reaction volume on the HCV protease enzymatic reaction kinetics

蛋白酶和 0.5 μmol/L 的蛋白酶底物进行测定。在测定 30 min 时, 显示 pH 值 7.0 至 7.5 时荧光强度最高 (图 2)。

蛋白酶 Km 值 对不同浓度底物的荧光-时间曲线做线性回归求得斜率, 得出不同底物浓度下的起始速率 (图 3), 用米氏方程计算蛋白酶 Km 值为 4.74 μmol/L。

蛋白酶浓度及底物浓度的选择 反应用 25、50 或 100 μg/ml 的蛋白酶浓度和 0.25 或 0.5 μmol/L 底物浓度。在底物浓度为 0.5 μmol/L、酶浓度为 50 μg/mL 时, Z 因子为 0.80, CV 值为 1.91%。

DMSO 对酶促反应的影响 在 DMSO 浓度为 0.5% 时对酶促反应无影响, 但随 DMSO 浓度的升高, 对酶促反应的抑制作用增加 (图 4)。

阳性化合物 BILN 2061 抑制蛋白酶活性 应用本模型测得已知化合物 BILN 2061 的 Ki 值为 0.30 nmol/L。

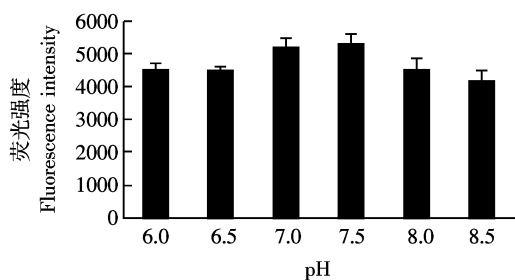


图 2 pH 值改变对 HCV 蛋白酶活性的影响

Fig 2 Influence of the change of reaction buffer pH value on HCV protease activity

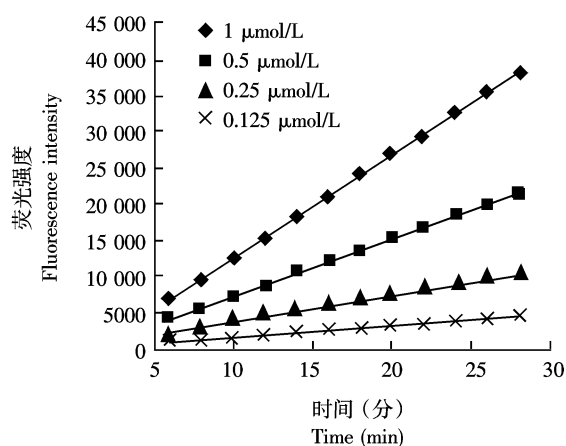
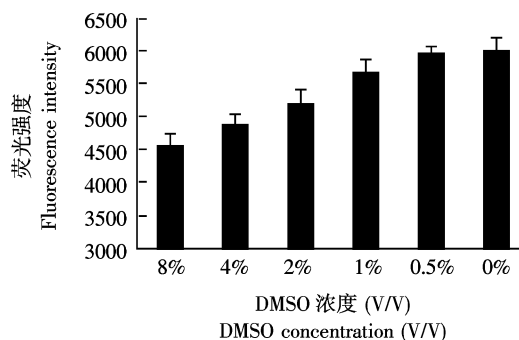


图 3 不同底物浓度的荧光-时间曲线

Fig 3 Fluorescent intensity-reaction time curves based on different substrate concentration



DMSO: 二甲基亚砜

DMSO: dimethyl sulfoxide

图 4 DMSO 对 HCV 蛋白酶酶促反应的影响

Fig 4 Effect of DMSO on HCV protease enzymatic reaction kinetics

蛋白酶抑制剂筛选 应用本模型对国家新药 (微生物) 筛选中心样品库中的 4000 个化合物进行初步筛选, 除部分化合物有自发荧光无法测定外, 获得 4 个有活性的化合物, 样品库编号为 2040B-531、2040B-541、2040B-561 和 2040B-571, 其 IC₅₀ 为 0.84 ~ 2.80 μg/mL。

讨 论

迄今为止, 临床抗 HCV 治疗只有干扰素联合利巴韦林, 药物研究进展缓慢。HCV NS3-4A 蛋白酶抑制剂是目前最有望进入临床应用的药物^[11], 但目前此类抑制剂的种类有限^[12], 因此, 建立高通量筛选模型, 从有我国特色的资源库中筛选, 有望获得新结构类型的高效抗 HCV 药物。

本实验通过对反应体系的优化,标定了最佳反应条件,建立了FRET法筛选HCV蛋白酶抑制剂模型,并通过Z因子、CV值等指标验证了本筛选模型具有高可靠性。利用本模型测得HCV NS3-4A的 K_m 值为 $4.74 \mu\text{mol/L}$,检测已知蛋白酶抑制剂BILN 2061的 K_i 值为 0.30 nmol/L ,与文献报道相近^[13],说明通过本实验方法得出的结果具有可比性。利用建立的筛选模型,从部分样品库中进行筛选,其重复性好,并获得了阳性化合物,提示此方法用于高通量筛选HCV蛋白酶抑制剂具有可行性。因此本筛选模型的建立为加快研发具有我国知识产权的抗HCV药物奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Zeuzem S. Interferon-based therapy for chronic hepatitis C: current and future perspectives [J]. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 2008, 5(11):610-622.
- [2] Weisberg IS, Jacobson IM. Telaprevir: hope on the horizon, getting closer [J]. *Clin Liver Dis*, 2009, 13(3):441-452.
- [3] Berman K, Kwo PY. Boceprevir, an NS3 protease inhibitor of HCV [J]. *Clin Liver Dis*, 2009, 13(3):429-439.
- [4] Soriano V, Peters MG, Zeuzem S. New therapies for hepatitis C virus infection [J]. *Clin Infect Dis*, 2009, 48(3):313-320.
- [5] Lin C, Rice CM. The hepatitis C virus NS3 serine proteinase and NS4A cofactor: establishment of a cell-free trans-processing assay [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(17):7622-7626.
- [6] Sudo K, Inoue H, Shimizu Y, et al. Establishment of an *in vitro* assay system for screening hepatitis C virus protease inhibitors using high performance liquid chromatography [J]. *Antiviral Res*, 1996, 32(1):9-18.
- [7] 陈湘红, 郭巨涛, 陈鸿珊, 等. 酶联免疫吸附试验检测HCV NS3-4A蛋白酶活性 [J]. *中国医学科学院学报*, 2000, 22(3):300-302.
- [8] Perni RB, Almquist SJ, Byrn RA, et al. Preclinical profile of VX-950, a potent, selective, and orally bioavailable inhibitor of hepatitis C virus NS3-4A serine protease [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(3):899-909.
- [9] Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays [J]. *J Biomol Screen*, 1999, 4(2):67-73.
- [10] Lin C, Lin K, Luong YP, et al. *In vitro* resistance studies of hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061: structural analysis indicates different resistance mechanisms [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(17):17508-17514.
- [11] Pereira AA, Jacobson IM. New and experimental therapies for HCV [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2009, 6(7):403-411.
- [12] Chen KX, Njoroge FG. A review of HCV protease inhibitors [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2009, 10(8):821-837.
- [13] Mao SS, DiMuzio J, McHale C, et al. A time-resolved, internally quenched fluorescence assay to characterize inhibition of hepatitis C virus nonstructural protein 3-4A protease at low enzyme concentrations [J]. *Anal Biochem*, 2008, 373(1):1-8.

(收稿日期: 2010-07-05)