

新型冠状病毒小分子抑制剂的筛选和竞争抑制研究

Screening and Competitive Inhibition Study of Small Molecular Inhibitors against SARS-CoV-2

王静*

天然药物及仿生药物全国重点实验室，药学院，北京大学，北京

*通讯作者邮箱: wangjing1988@bjmu.edu.cn

摘要

新型冠状病毒肺炎（COVID-19）是由一种严重急性呼吸道综合征冠状病毒 2 型（SARS-CoV-2）引发的疾病。SARS-CoV-2 利用人血管紧张素转换酶 2（hACE2）作为其刺突糖蛋白受体结合区域（RBD）的细胞受体进入宿主细胞。在本实验案例中，前期采用一种人工智能的药物筛选方法，从临床批准的小分子药物库中筛选出 20 种可能阻断 SARS-CoV-2 RBD 与 hACE2 结合的潜在的小分子抑制剂。接下来，使用表面等离子共振仪 Biacore 8K 对这 20 个小分子药物分别与 SARS-CoV-2 RBD 和 hACE2 结合的亲和力和动力学进行检测，并利用 Biacore 8K 的 A-B-A 进样方法研究小分子药物对 SARS-CoV-2 RBD 和 hACE2 结合的竞争抑制作用。结果发现 Tannic acid 可以作为预防和治疗 SARS-CoV-2 感染的一种有潜力的小分子抑制剂。Biacore 8K 具有高通量、非标记、高灵敏度、实时监测、独特的 A-B-A 进样模式等优点，特别适合早期药物筛选和验证。

关键词：表面等离子共振仪，药物筛选，小分子抑制剂，竞争抑制，Biacore

材料与试剂

1. 重组 SARS-CoV-2 RBD蛋白 (Sino Biological, 产品目录号: 40592-V08H)
2. hACE2蛋白 (Sino Biological, 产品目录号: 10108-H08H)
3. 小分子药物库 (FDA-approved Drug Library, TargetMol, 产品目录号: L4200)
4. S系列CM5芯片 (Cytiva, Series S Sensor Chip CM5, 产品目录号: 29149603)
5. 氨基偶联试剂盒 (Cytiva, 产品目录号: BR100050)
6. 醋酸钠缓冲液 (Cytiva, Acetate 4.5, 产品目录号: BR100350; Acetate 5.0, 产品目录号: BR100351; Acetate 5.5, 产品目录号: BR100352)
7. 96孔板 (Cytiva, 产品目录号: BR100503)
8. 96孔板封膜 (Cytiva, 产品目录号: 28975816)
9. 10× PBS-P 缓冲液 (Cytiva, 产品目录号: 8995084)
10. 二甲基亚砜 (DMSO, MP, 产品目录号: 196055)
11. 50 mM NaOH溶液 (Cytiva, 产品目录号: BR100358)
12. 1.5 mL EP管 (KIRGEN, 产品目录号: KG2211)
13. 1000 mL 0.2 μ m NY 过滤器 (康宁, 产品目录号: 430515)
14. 1.05× PBS-P缓冲液 (见溶液配方)
15. 含5% DMSO的1× PBS-P缓冲液 (见溶液配方)
16. 蛋白母液 (见溶液配方)
17. 小分子药物母液 (见溶液配方)
18. 不同浓度的DMSO溶剂校正溶液 (见溶液配方)
19. 50% DMSO溶液 (见溶液配方)
20. 5 mM NaOH溶液 (见溶液配方)

仪器设备

1. Milli-Q 纯水仪 (密理博, Millipore)
2. 表面等离子共振仪 (Cytiva, Biacore 8K)
3. 台式离心机 (贝克曼, Microfuge 20)
4. 循环水多用真空泵 (郑州特尔仪器设备有限公司, SHZ-D(III))

实验步骤

一、实验准备

打开 Biacore 8K 仪器和控制软件 Biacore 8K Control Software，输入软件登录密码。流动池和样品舱的温度在 4~40 °C 可调，通常都设置为 25 °C。

将仪器右侧标记 buffer 的管子插入 1.05× PBS-P 缓冲液瓶子里，将标记 water 和 reagent 的管子插入超纯水的瓶子里。

在 Biacore 8K Control Software 的 System setup 模块，点击 Change chip，放入新的 CM5 芯片，在仪器控制软件上填写芯片相关信息，然后点击 Dock chip。

在 Biacore 8K Control Software 的 System setup 模块，点击 Change solutions，默认设置，点击 Ready to start。缓冲液会以较高的流速冲洗仪器整个内部流路系统，整个过程耗时 6 分钟。

二、配体偶联

(1) 计算配体偶联量

$$R_{\max} = \frac{\text{analyte MW}}{\text{ligand MW}} \times R_L \times S_m$$

根据以下公式计算配体目标偶联量：

其中，R_{max} 为芯片表面最大结合容量，通常设为 100 RU；Analyte MW 为小分子分子量，ligand MW 为蛋白分子量；S_m 为化学计量比，通常设成 1；配体目标偶联量通常设为 1.5 倍的 R_L。在本研究案例中，SARS-CoV-2 RBD 的分子量为 26 kDa，hACE2 的分子量为 86 kDa，小分子药物的分子量范围是 300~1,900 Da。经公式计算，SARS-CoV-2 RBD 目标偶联量为 2,000~14,000 RU，hACE2 目标偶联量为 6,700~43,000 RU。

(2) 配体预富集

将 SARS-CoV-2 RBD 蛋白和 hACE2 蛋白粉末用超纯水溶成 1 mg/mL 母液。

根据蛋白等电点（SARS-CoV-2 RBD 等电点为 8.9，hACE2 等电点为 5.5），使用 10 mM pH 5.5 和 10 mM pH 5.0 的醋酸钠溶液稀释 SARS-CoV-2 RBD 蛋白至 20 μg/mL，使用 10 mM pH 5.0 和 4.5 的醋酸钠溶液稀释 hACE2 蛋白至 20 μg/mL。

在 Biacore 8K Control Software 里，点击 New method，选择 Surface preparation，打开 pH scouting 方法。方法里包含四个步骤。第一步 Method definition，设置 Analyte 的 Contact time 为 120 s；第二步 Variables and positioning，选择 channel 1~4，修改 Analyte Solution 名称分别为 SARS-CoV-2 RBD acetate pH 5.5、SARS-CoV-2 RBD acetate pH 5.0、hACE2 acetate pH 5.0、hACE2 acetate pH 4.5；第三步 Cycle overview 不需要做任何改动；第四步 Plate layout，显示了 96 孔板里样品放置位置和需要体积（图 1）。按照第四步的要求将样品加到 96 孔板里。考虑到进样针吸取样品时会有死体积，因此每个样品多加 10 μL 体积。

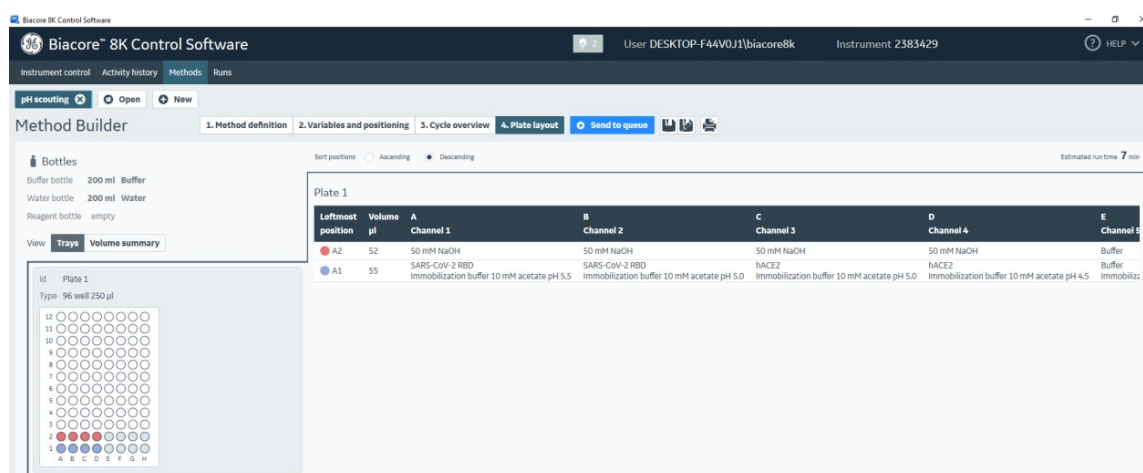


图 1 配体预富集实验方法编辑

在 Biacore 8K Control Software 的 Instrument control 界面，Hotel door 处点击 open，把样品架从样品舱里取出来，把加好样品的 96 孔板放置到样品架上，然后放到仪器里面，把样品舱的门关闭。在 Methods 界面，点击第四步 Plate layout 后面的 Send to queue，点击 Ready to start 和 Save，方法开始运行。

根据预富集实验结果（图 2），确定 SARS-CoV-2 RBD 蛋白的偶联条件为 10 mM pH 5.5 的醋酸钠溶液，hACE2 蛋白的偶联条件为 10 mM pH 4.5 的醋酸钠溶液。

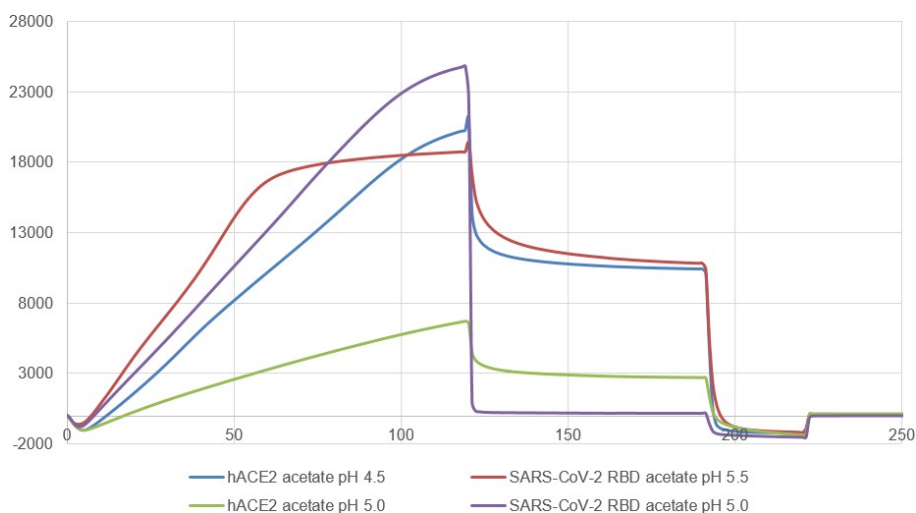


图 2 预富集实验结果

(3) 配体偶联

在 Biacore 8K Control Software 里，点击 New method，选择 Surface preparation，打开 Immobilization 方法。方法里包含两个步骤。如图 3，第一步 Method definition，选择 Immobilize in Fc 2，activate/deactivate in 1，点击 Enter custom mode。将 EDC + NHS 的 Contact time 设置成 1,200 s，Ligand 的 Contact time 设置成 600

s, Ethanolamine 的 Contact time 设置成 1,200 s。Channel 选择 1~8。其中 Channel 1~4 固定 SARS-CoV-2 RBD 蛋白, Channel 5~8 固定 hACE2 蛋白。第二步 Positioning and plate layout, 显示了 96 孔板里样品放置位置和需要体积(图 4), 按照要求将样品加到 96 孔板里。考虑到进样针吸取样品时会有死体积, 因此每个样品多加 10 μL 体积。其中 EDC、NHS 和 Ethanolamine 用氨基偶联试剂盒的配套试剂, SARS-CoV-2 RBD 蛋白用 10 mM pH 5.5 的醋酸钠稀释至 20 $\mu\text{g/mL}$, hACE2 蛋白用 10 mM pH 4.5 的醋酸钠稀释至 40 $\mu\text{g/mL}$ 。

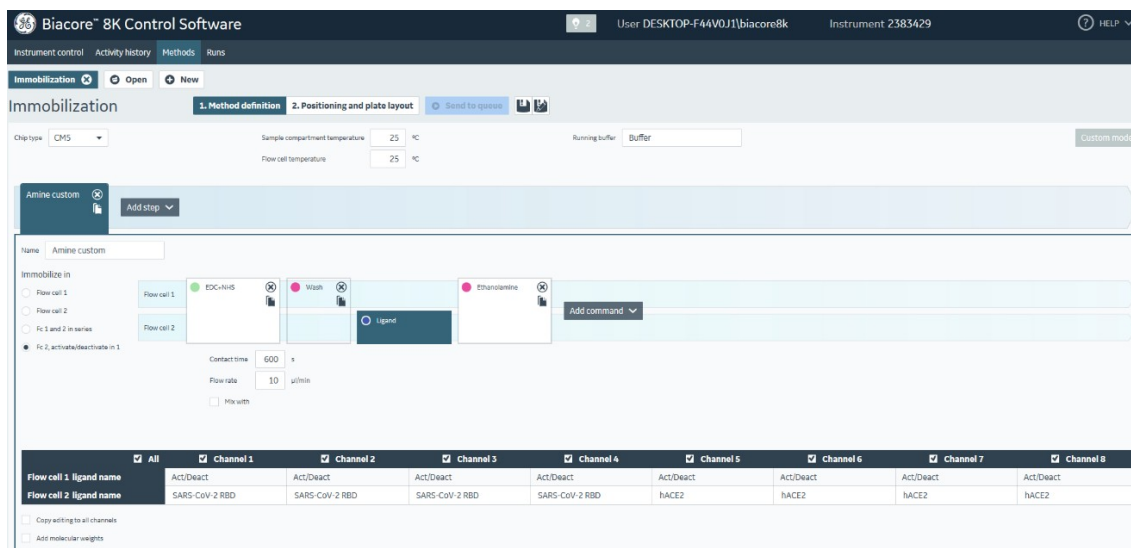


图 3 配体偶联的方法设置

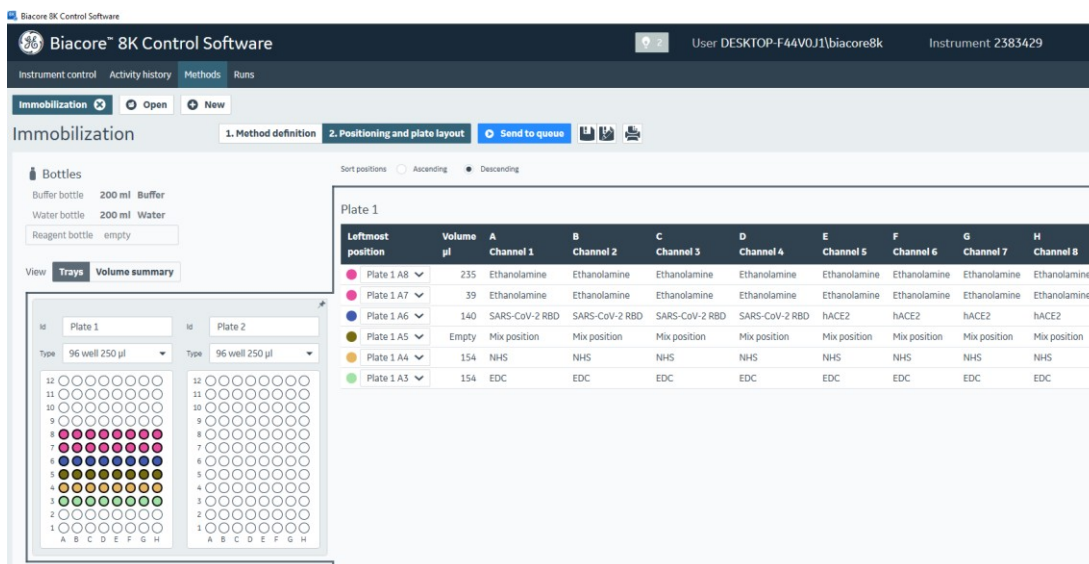


图 4 配体偶联的样品板位置和所需样品体积

在 Biacore 8K Control Software 的 Instrument control 界面，在 hotel door 处点击 open，把样品架从样品舱里取出来，把加好样品的 96 孔板放置到样品架上，然后放到仪器里，关闭样品舱的门。在 Methods 界面，点击第二步 Positioning and plate layout 后面的 Send to queue，点击 Ready to start 和 Save，方法开始运行。运行结束后，结果显示 SARS-CoV-2 RBD 蛋白偶联了~14,000 RU（图 5），hACE2 蛋白偶联了~10,000 RU（图 6）。

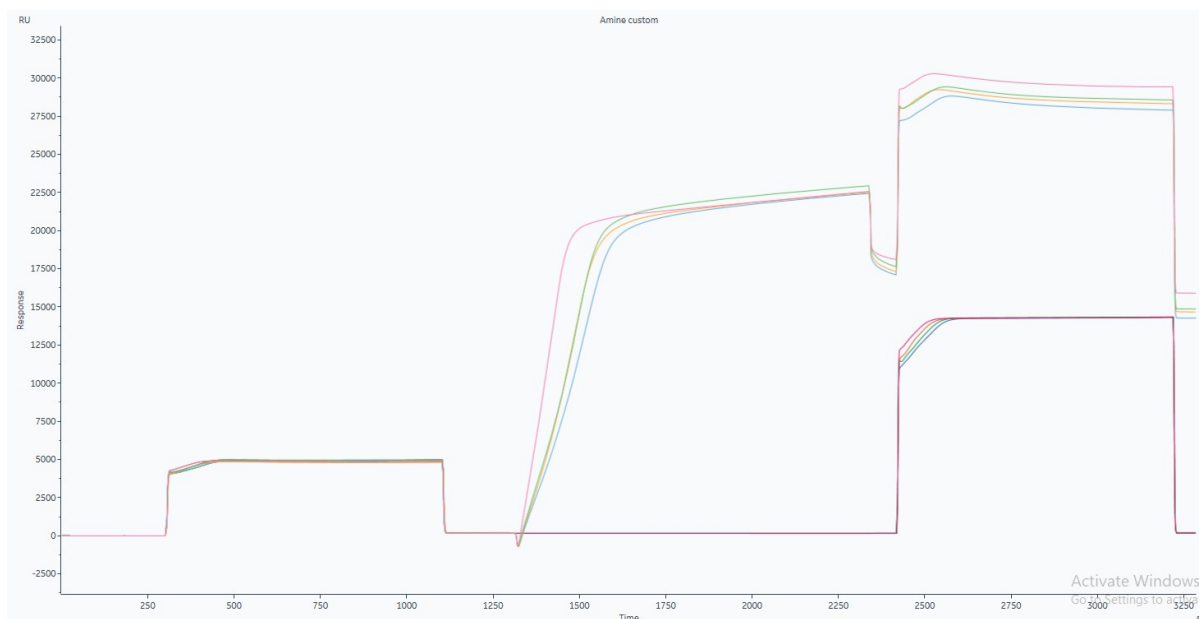


图 5 SARS-CoV-2 RBD 蛋白偶联情况

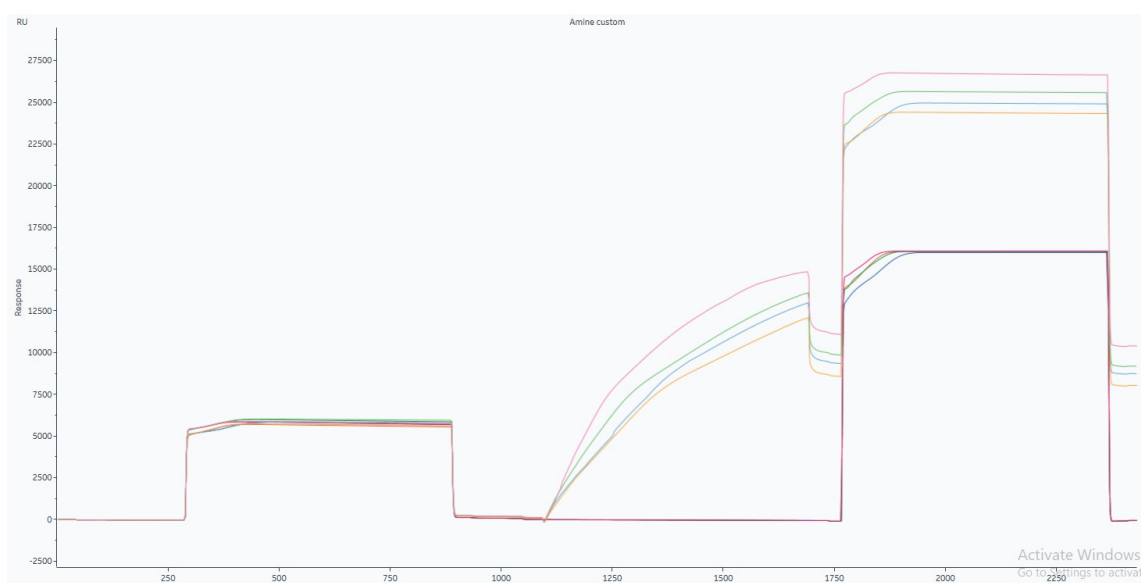


图 6 hACE2 蛋白偶联情况

三、新型冠状病毒小分子抑制剂的筛选

前期研究工作中，通过虚拟筛选确定了 20 个小分子药物（见表 1）可能作为潜在的小分子抑制剂，抑制 SARS-CoV-2 RBD 和 hACE2 结合。

表 1 通过虚拟筛选确定的 20 个小分子药物信息

序号	小分子药物名称	Cas号	分子量 (Da)
1	Tannic acid	1401-55-4	1701
2	Nystatin	1400-61-9	926
3	Sodium aescinate	20977-05-3	1124
4	Teichomycin	61036-62-2	1879
5	Aescin	6805-41-0	1131
6	Ginsenoside Rc	11021-14-0	1079
7	Amphotericin B	1397-89-3	924
8	Acarbose	56180-94-0	645
9	Geniposide	24512-63-8	388
10	VancomycinHCL	1404-93-9	1485
11	Mevastatin	73573-88-3	390
12	Ambroxol	18683-91-5	378
13	Dapagliflozin	461432-26-8	408
14	Canagliflozin	842133-18-0	444
15	Simvastatin	79902-63-9	418
16	Cytomel	55-06-1	672
17	Sodium Picosulfate	10040-45-6	481
18	Fasiglifam	1000413-72-8	524
19	Pseudolaric acid B	82508-31-4	432
20	Thyroxine	51-48-9	776

接下来，使用 Biacore 8K 对这 20 个小分子药物与 SARS-CoV-2 RBD 和 hACE2 的亲力和动力学进行了检测。

将仪器右侧 1.05× PBS-P 缓冲液换成含 5% DMSO 的 1× PBS-P 缓冲液，在 Biacore 8K Control Software 的 System setup 模块，点击 Change solutions，默认设置，点击 Ready to start。

在 1.5 mL EP 管里，先加入 9 μL DMSO，再加入 6 μL 10 mM 小分子药物母液，混合后加入 285 μL 1.05× PBS-P 溶液，混合均匀即得到 200 μM 5% DMSO 的小分子药物溶液。用离心机 13,000× g 离心 5 分钟，然后取 240 μL 上清液作为小分子药物最高浓度。接下来，用含 5% DMSO 的 1× PBS-P 配置小分子药物浓度梯度，2 倍稀释，共九个浓度梯度。

在 Biacore 8K Control Software, 点击 New method, 选择 Kinetics/affinity, 在 LMW 里选择 LMW kinetics/affinity, 打开 LMW multi-cycle kinetics/affinity 方法。第一步 Method definition, 将 Concentration unit 改成 μM。在 Analysis 里, Analyte 的 Contact time 设置成 60 s, Dissociation time 设置成 90 s。将 Startup 里的 Analyte 设置成和 Analysis 里完全一样的实验条件。第二步 Variables and positioning, 在 Analysis 里, Add cycle 至 30

个循环，将 Analyte Solution 改为小分子药物名称，浓度分别设置成 0、0.78、1.56、3.13、6.25、12.5、25、50、100、200 μM 。在 Startup 里，Add cycle 至 5 个循环。第三步 Cycle overview 不需要做任何改动。第四步 Plate layout，如图 7~10 所示，将样品配好加到 96 孔板里，其中 0 浓度和 buffer 为含 5% DMSO 的 1 $\times$ PBS-P 缓冲液，Solvent Correction 1~4 为表格 3 里的四点溶剂校正溶液。然后给 96 孔板贴上封膜，放到仪器里，点击 Send to queue，Ready to start 和 Save，方法开始运行。

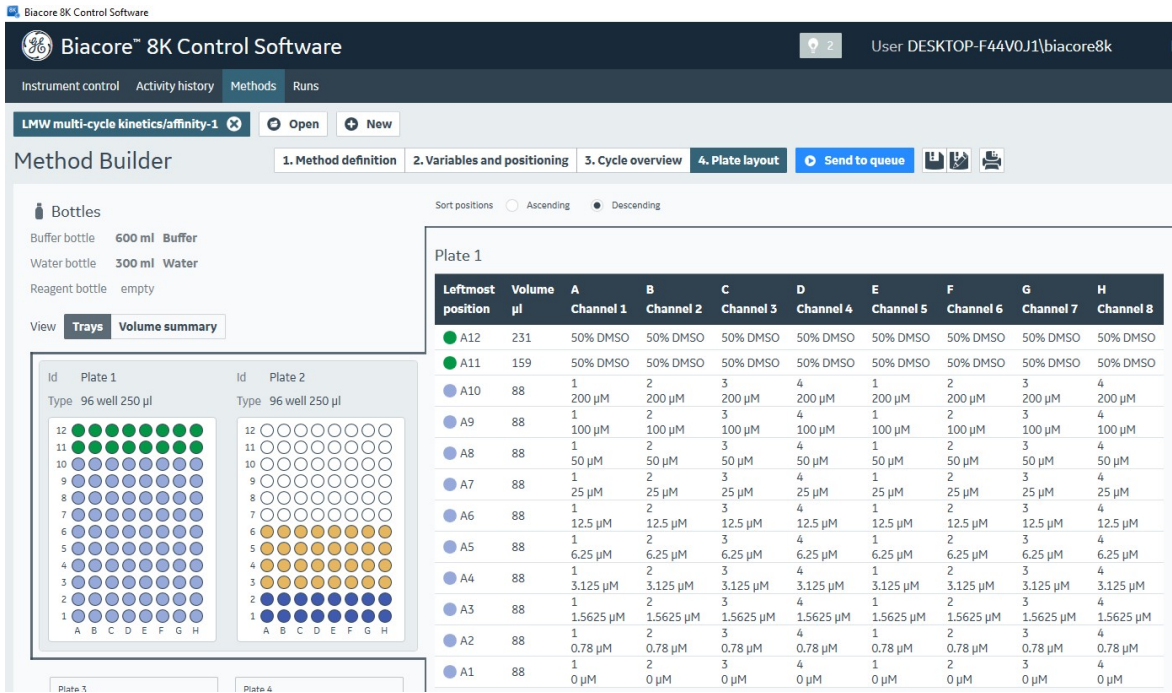


图 7 Plate 1 的样品名称、位置和所需体积

Plate 2									
Leftmost position	Volume μl	A Channel 1	B Channel 2	C Channel 3	D Channel 4	E Channel 5	F Channel 6	G Channel 7	H Channel 8
A6	185	Solvent Correction 4	Solvent Correction 4	Solvent Correction 4	Solvent Correction 4	Solvent Correction 4	Solvent Correction 4	Solvent Correction 4	Solvent Correction 4
A5	185	Solvent Correction 3	Solvent Correction 3	Solvent Correction 3	Solvent Correction 3	Solvent Correction 3	Solvent Correction 3	Solvent Correction 3	Solvent Correction 3
A4	185	Solvent Correction 2	Solvent Correction 2	Solvent Correction 2	Solvent Correction 2	Solvent Correction 2	Solvent Correction 2	Solvent Correction 2	Solvent Correction 2
A3	185	Solvent Correction 1	Solvent Correction 1	Solvent Correction 1	Solvent Correction 1	Solvent Correction 1	Solvent Correction 1	Solvent Correction 1	Solvent Correction 1
A2	161	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A1	234	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer

图 8 Plate 2 的样品名称、位置和所需体积

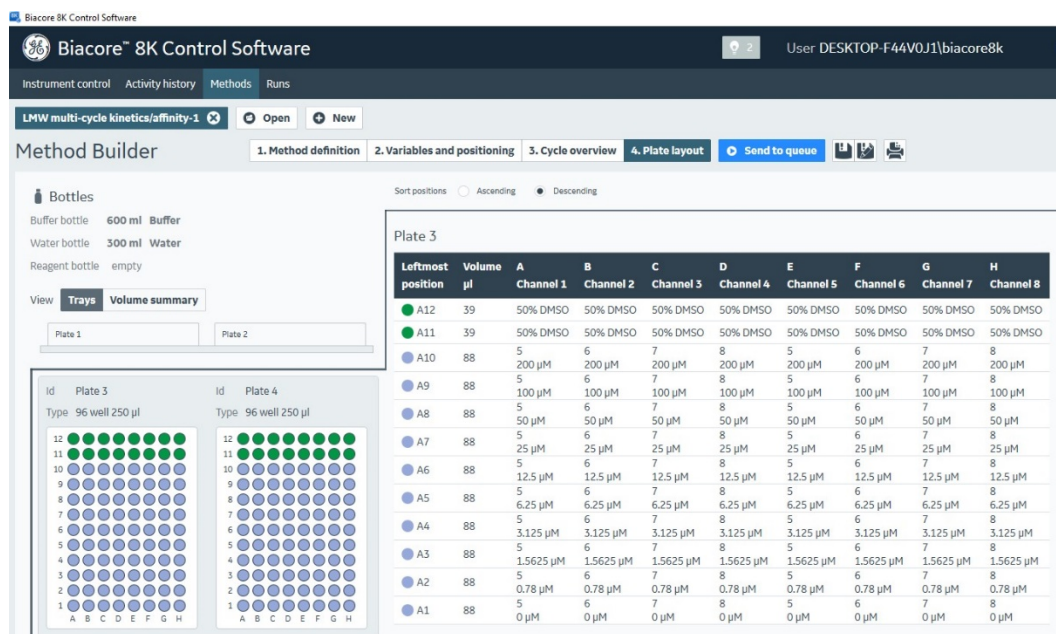


图 9 Plate 3 的样品名称、位置和所需体积

Plate 4									
Leftmost position	Volume µl	A Channel 1	B Channel 2	C Channel 3	D Channel 4	E Channel 5	F Channel 6	G Channel 7	H Channel 8
A12	231	50% DMSO	50% DMSO	50% DMSO	50% DMSO	50% DMSO	50% DMSO	50% DMSO	50% DMSO
A11	231	50% DMSO	50% DMSO	50% DMSO	50% DMSO	50% DMSO	50% DMSO	50% DMSO	50% DMSO
A10	88	9	10	11	12	9	10	11	12
A9	88	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM
A8	88	9	10	11	12	9	10	11	12
A7	88	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM
A6	88	9	10	11	12	9	10	11	12
A5	88	50 µM	50 µM	50 µM	50 µM	50 µM	50 µM	50 µM	50 µM
A4	88	9	10	11	12	9	10	11	12
A3	88	25 µM	25 µM	25 µM	25 µM	25 µM	25 µM	25 µM	25 µM
A2	88	9	10	11	12	9	10	11	12
A1	88	12.5 µM	12.5 µM	12.5 µM	12.5 µM	12.5 µM	12.5 µM	12.5 µM	12.5 µM
		5	6	7	8	5	6	7	8
		6.25 µM	6.25 µM	6.25 µM	6.25 µM	6.25 µM	6.25 µM	6.25 µM	6.25 µM
		5	6	7	8	5	6	7	8
		3.125 µM	3.125 µM	3.125 µM	3.125 µM	3.125 µM	3.125 µM	3.125 µM	3.125 µM
		5	6	7	8	5	6	7	8
		1.5625 µM	1.5625 µM	1.5625 µM	1.5625 µM	1.5625 µM	1.5625 µM	1.5625 µM	1.5625 µM
		5	6	7	8	5	6	7	8
		0.78 µM	0.78 µM	0.78 µM	0.78 µM	0.78 µM	0.78 µM	0.78 µM	0.78 µM
		5	6	7	8	5	6	7	8
		0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM

图 10 Plate 4 的样品名称、位置和所需体积

由于 Channel 1~4 固定 SARS-CoV-2 RBD 蛋白，Channel 5~8 固定 hACE2 蛋白，使用 Biacore 8K 仪器一次最多放置 4 块 96 孔板，因此每个蛋白一轮最多可以做 12 个化合物。在本实验案例中，20 个小分子药物需要使用 Biacore 8K 仪器做两轮实验。

四、小分子药物对 SARS-CoV-2 RBD 和 hACE2 相互作用的竞争抑制研究

通过上述 Biacore 8K 的结合实验，确定了四种小分子药物 Tannic acid、Amphotericin B、Aescin 和 Fasigifam 对 SARS-CoV-2 RBD 或 hACE2 的亲和力较强。接下来使用 Biacore 8K 独特的 A-B-A 进样方法研究这四种小分子药物对 SARS-CoV-2 RBD 和 hACE2 相互作用的竞争抑制作用。

用一张新的 CM5 芯片，通过上述配体偶联方法固定 hACE2，偶连量为~2000 RU。Solution A 为单独的小分子药物溶液，用来预先和芯片上的 hACE2 孵育。小分子药物+SARS-CoV-2 RBD 作为 Solution B。通过观察加入小分子药物后，SARS-CoV-2 RBD 与 hACE2 的结合信号是否降低来判断小分子药物对 SARS-CoV-2 RBD 和 hACE2 相互作用的竞争抑制作用。

在 Biacore 8K Control Software 里，点击 New method，在 Assay Development 里选择 Buffer scouting using A-B-A。第一步 Method definition，如图 11，在 Analysis 里，Injections A 的 Pre-analyte 和 Post-analyte 的 contact time 设置成 60 s，Injections B 的 Contact time 设置成 120 s，Concentration 为 40 nM。Regeneration 使用 5mM NaOH 溶液，Contact time 设置成 30 s，Flow rate 为 30 μ L/min。第二步 Variables and positioning，Channels 选择 1~4，Solution A 为小分子药物，浓度为 100 μ M，Solution B 为小分子药物+SARS-CoV-2 RBD，其中 SARS-CoV-2 RBD 的浓度为 40 nM，小分子药物浓度为 100 μ M。Solution B 中，只加 SARS-CoV-2 RBD，不加小分子药物，作为对照。第三步 Cycle overview 不需要做任何改动。第四步 Plate layout，如图 12，将样品配好加到 96 孔板里，贴上封膜，放到仪器里，点击 Send to queue，Ready to start 和 Save，方法开始运行。

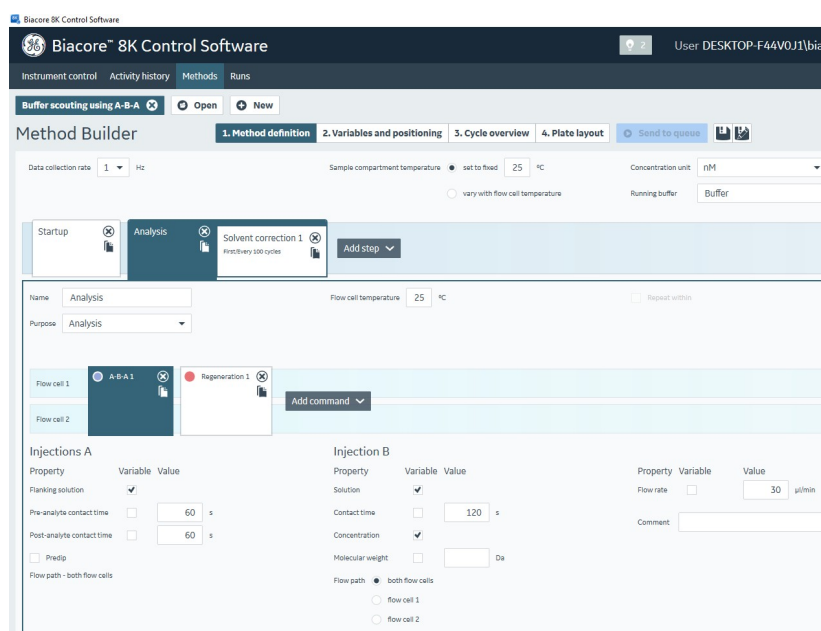


图 11 A-B-A 实验的方法设置

Plate 1

Leftmost position	Volume μ l	A Channel 1	B Channel 2	C Channel 3	D Channel 4	E Channel 5	F Channel 6	G Channel 7	H Channel 8
A4	113	Tannic acid+RBD 40 nM	Amphotericin B+RBD 40 nM	Aescin+RBD 40 nM	Fasigifam+RBD 40 nM	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A3	113	Tannic acid+RBD 0 nM	Amphotericin B+RBD 0 nM	Aescin+RBD 0 nM	Fasigifam+RBD 0 nM	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A2	113	RBD 40 nM	RBD 40 nM	RBD 40 nM	RBD 40 nM	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A1	113	RBD 0 nM	RBD 0 nM	RBD 0 nM	RBD 0 nM	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer

Plate 2

Leftmost position	Volume μ l	A Channel 1	B Channel 2	C Channel 3	D Channel 4	E Channel 5	F Channel 6	G Channel 7	H Channel 8
A9	125	Solvent Correction 4	Solvent Correction 4	Solvent Correction 4	Solvent Correction 4	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A8	125	Solvent Correction 3	Solvent Correction 3	Solvent Correction 3	Solvent Correction 3	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A7	125	Solvent Correction 2	Solvent Correction 2	Solvent Correction 2	Solvent Correction 2	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A6	125	Solvent Correction 1	Solvent Correction 1	Solvent Correction 1	Solvent Correction 1	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A5	373	5mM NaOH	5mM NaOH	5mM NaOH	5mM NaOH	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A4	386	Tannic acid	Amphotericin B	Aescin	Fasigifam	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A3	386	buffer	buffer	buffer	buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A2	905	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A1	530	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer

图 12 样品名称、位置和所需体积

进一步，使用 Biacore 8K 的 A-B-A 方法研究小分子药物 Tannic acid 抑制 SARS-CoV-2 RBD 和 hACE2 相互作用的量效关系。在 A-B-A 的第二步 Variables and positioning，Solution B 设置为不同浓度的小分子药物 +40 nM SARS-CoV-2 RBD，Solution A 为不同浓度的小分子药物。图 13~15 为样品板里的样品名称、位置和所需体积。

Plate 1

Leftmost position	Volume μ l	A Channel 1	B Channel 2	C Channel 3	D Channel 4	E Channel 5	F Channel 6	G Channel 7	H Channel 8
A12	113	25 μ M Tannic acid+RBD 40 nM	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A11	113	25 μ M Tannic acid+RBD 0 nM	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A10	113	1.56 μ M Tannic acid+RBD 40 nM	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A9	113	1.56 μ M Tannic acid+RBD 0 nM	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A8	113	0.39 μ M Tannic acid+RBD 40 nM	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A7	113	0.39 μ M Tannic acid+RBD 0 nM	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A6	113	0.098 μ M Tannic acid+RBD 40 nM	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A5	113	0.098 μ M Tannic acid+RBD 0 nM	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A4	113	0.012 μ M Tannic acid+RBD 40 nM	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A3	113	0.012 μ M Tannic acid+RBD 0 nM	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A2	113	RBD 40 nM	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A1	113	RBD 0 nM	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer

图 13 Plate 1 的样品名称、位置和所需体积

Plate 2

Leftmost position	Volume μ l	A Channel 1	B Channel 2	C Channel 3	D Channel 4	E Channel 5	F Channel 6	G Channel 7	H Channel 8
A9	719	5mM NaOH	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A8	436	25 μ M Tannic acid	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A7	436	1.56 μ M Tannic acid	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A6	436	0.39 μ M Tannic acid	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A5	436	0.098 μ M Tannic acid	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A4	436	0.012 μ M Tannic acid	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A3	436	buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A2	955	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A1	580	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer

图 14 Plate 2 的样品名称、位置和所需体积

Plate 3

Leftmost position	Volume μ l	A Channel 1	B Channel 2	C Channel 3	D Channel 4	E Channel 5	F Channel 6	G Channel 7	H Channel 8
A4	100	Solvent Correction 4	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A3	100	Solvent Correction 3	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A2	100	Solvent Correction 2	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
A1	100	Solvent Correction 1	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer

图 15 Plate 3 的样品名称、位置和所需体积

实验注意要点

1. 配体偶联

对于蛋白和小分子相互作用实验，配体蛋白偶联量约 10,000 RU 即可开展实验。如果不确定配体蛋白的实际偶联效果，可以在 Immobilization 方法里先去掉封闭 Ethanolamine 这步，等蛋白偶联量达到预期后，再使用 Immobilization 方法单独运行 Ethanolamine 这步。

2. 小分子药物溶液配制

很多小分子药物溶解性不好，需要 DMSO 助溶。小分子药物配成最高实验浓度后，需要离心观察是否有沉淀，如果离心后没有看到沉淀，则取上清液做浓度梯度稀释，如果离心后看到沉淀，则需要降低小分子药物的最高实验浓度。在表面等离子共振仪实验中，小分子药物做分析物，其浓度必须是准确的，否则会影响亲和力 KD 的数值。

3. 小分子药物 A-B-A 竞争抑制实验的浓度设置

Solution A 为小分子药物, 如果小分子药物和芯片上的蛋白有一定的结合信号, 小分子药物的浓度需要设置为能使芯片上蛋白位点饱和的浓度, 数值通常比较高, 如 100 μM 或 200 μM , 并且小分子药物的结合信号可以通过设置 A-A-A 作为零浓度进行扣减。

Solution B 中蛋白的浓度通常设为蛋白和蛋白亲和力 KD 同样数量级的浓度。

由于很多小分子药物是快结合快解离的模式, 因此 Solution B 中需要同样添加和 Solution A 中一样浓度的小分子药物。

结果与数据分析

1. 小分子药物与 SARS-CoV-2 RBD 的亲和力和动力学检测

使用 Biacore 8K 的分析软件 Biacore Insight Evaluation software 对结果进行分析。在 Create new evaluation 界面, 找到要处理的文件, 在 Predefined 界面, 选择 Kinetics/affinity 里的 LMW, 选择 LMW multi-cycle kinetics- Evaluation method。在溶剂校正界面, 点击 Apply and close。仪器默认的会把进样前后的部分曲线截掉, 如果不想截掉, 点击图右侧的小齿轮, 在 Remove range 里, 去掉勾选的 Remove ranges at start and end of injections。在 Select sensorgrams, 点击 More option, 在 Analyte 里选择浓度。在 Kinetics/Affinity mode 点击 Kinetics, Fit models 选择 1:1 binding 模型, 在 Initial values 里, RI 选择 Fit local, Rmax 选择 Fit local, 点击 Perform fit, 即得到拟合结果, 包括结合速率 k_a , 解离速率 k_d , Rmax 和亲和力 KD。

如图 16, 结果显示有 15 个小分子药物与 SARS-CoV-2 RBD 有特异性结合, 亲和力范围是 179 nM 到 273 μM 。其中, Tannic acid、Amphotericin B 和 Aescin 与 SARS-CoV-2 RBD 的亲和力最强, 并且具有较慢的解离速率, 提示可能具有更长的滞靶时间, 因此用来做进一步的竞争抑制实验。

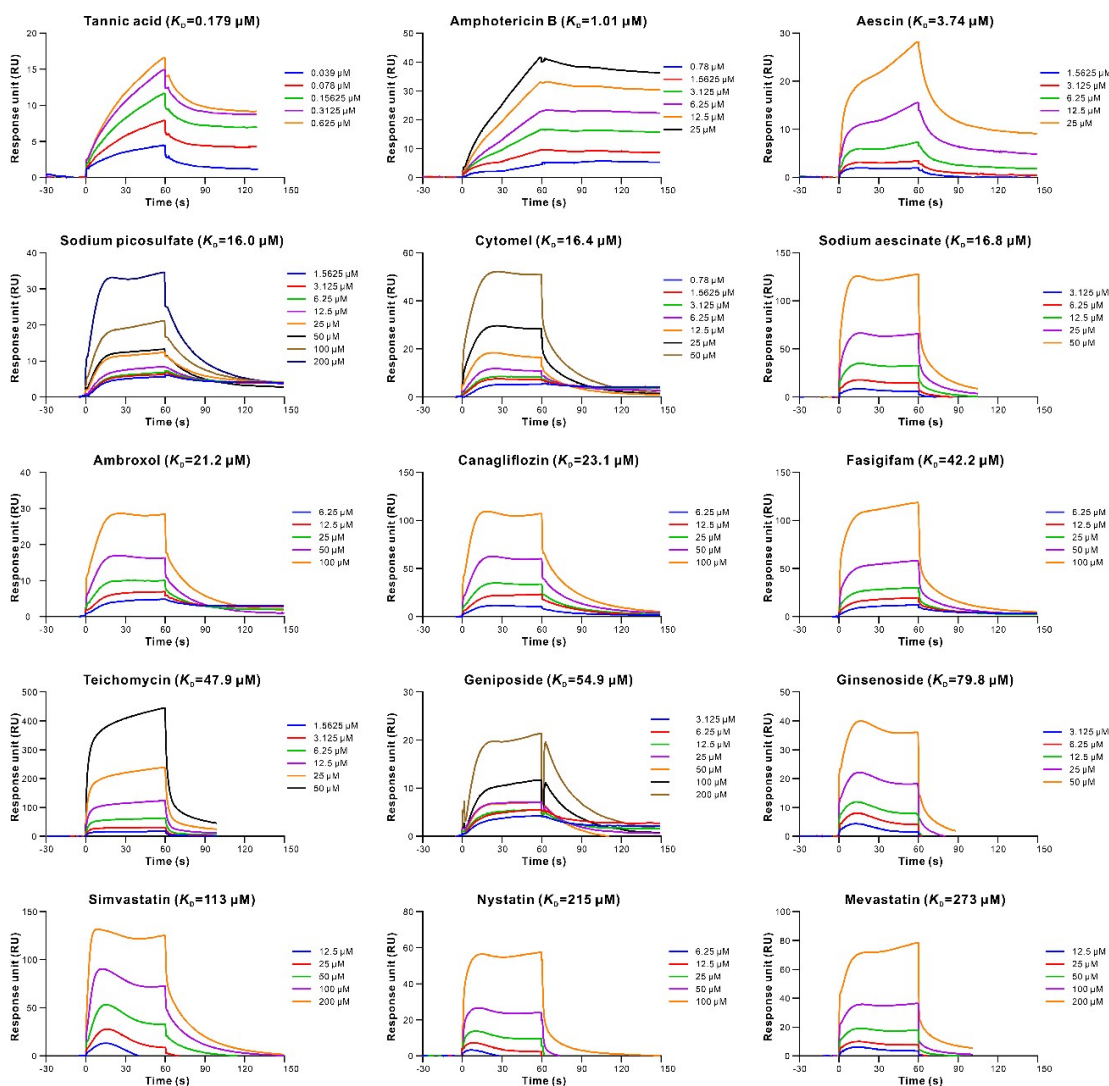


图 16 Biacore 8k 检测小分子药物与 SARS-CoV-2 RBD 的亲力和动力学。

2. 小分子药物与 hACE2 的亲力和动力学检测:

使用 Biacore 8K 的分析软件 Biacore Insight Evaluation software 对结果进行分析。选择 LMW multi-cycle kinetics-Evaluation method, 在溶剂校正界面, 点击 Apply and close, 在 Kinetics/Affinity mode 位置点击 Kinetics, Fit models 选择 1:1 binding 模型, 在 Initial values 里, RI 选择 Fit local, Rmax 选择 Fit local, 点击 Perform fit, 即得到拟合结果, 包括结合速率 k_a , 解离速率 k_d , Rmax 和亲和力 KD。

如图 17, 结果显示有 9 个小分子药物与 hACE2 有特异性结合, 亲和力范围是 8.55 μM 到 250 μM 。其中, Tannic acid、Amphotericin B 和 Fasigifam 与 hACE2 的亲和力最强, 用来做进一步的竞争抑制实验。

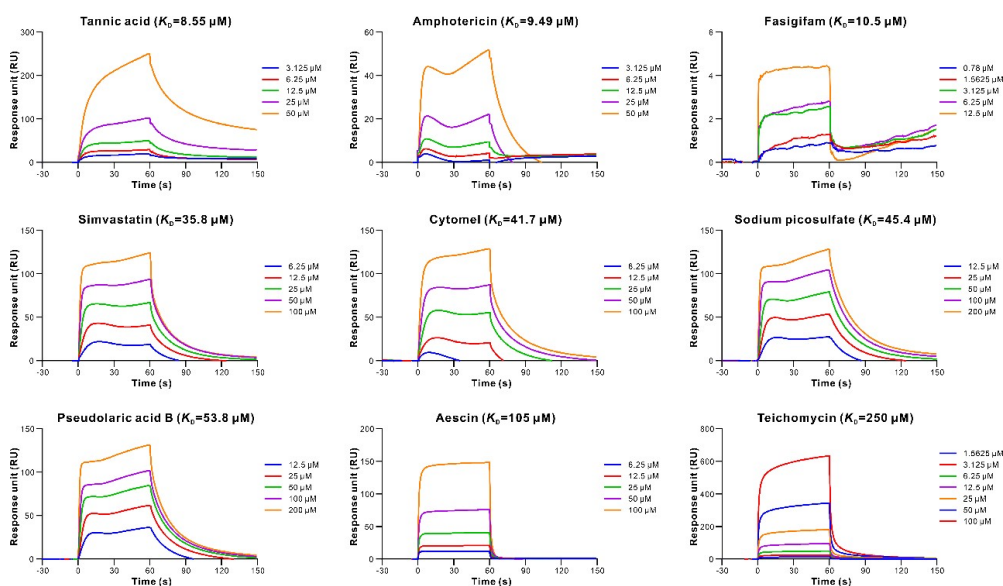


图 17 Biacore 8k 检测小分子药物与 hACE2 的亲力和动力学。

3. 小分子药物对 SARS-CoV-2 RBD 和 hACE2 相互作用的竞争抑制研究

使用 Biacore 8K 的 A-B-A 进样方法研究 Tannic acid、Amphotericin B、Aescin 和 Fasigifam 四种小分子药物能否对 SARS-CoV-2 RBD 和 hACE2 的结合发挥竞争抑制作用。如图 18，SARS-CoV-2 RBD 和 hACE2 本身存在较强的相互作用（蓝线），在 100 μ M Tannic acid 作用下，SARS-CoV-2 RBD 和 hACE2 几乎不结合，而在 100 μ M Amphotericin B、Aescin 或 Fasigifam 作用下，SARS-CoV-2 RBD 与 hACE2 的结合信号没有明显下降，即没有表现出明显的竞争抑制作用。

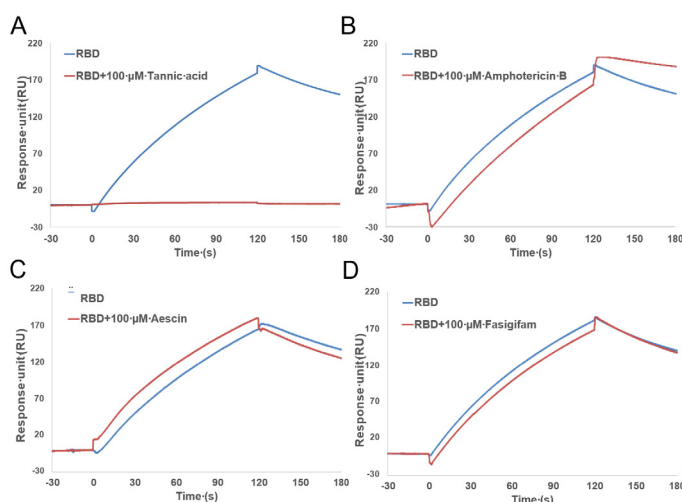


图 18 小分子药物对 SARS-CoV-2 RBD 和 hACE2 结合的竞争抑制研究。蓝线：SARS-CoV-2 RBD 和 hACE2 的结合信号。红线：加入小分子药物后，SARS-CoV-2 RBD 和 hACE2 的结合信号。

进一步，如图 19，研究了不同浓度的 Tannic acid 对 SARS-CoV-2 RBD 与 hACE2 结合的影响。可以看到，随着 Tannic acid 浓度升高，SARS-CoV-2 RBD 与 hACE2 的结合信号越来越低，当 Tannic acid 浓度达到 25 μM 时，已完全抑制 SARS-CoV-2 RBD 与 hACE2 的结合，从体外分子水平证明了 Tannic acid 能作为新型冠状病毒的潜在的小分子抑制剂直接阻断 SARS-CoV-2 RBD 与 hACE2 的结合。

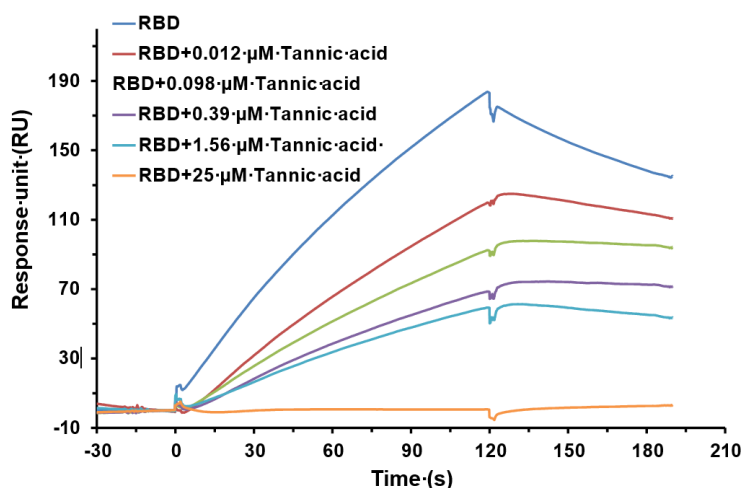


图 19 不同浓度的 Tannic acid 对 SARS-CoV-2 RBD 与 hACE2 结合的影响

溶液配方

1. 1.05× PBS-P 缓冲液

量取 210 mL 10× PBS-P 缓冲液，加 1,790 mL 超纯水，使用 0.2 μm 过滤器和循环水多用真空泵过滤到装缓冲液的瓶子里。

2. 含5% DMSO的1× PBS-P缓冲液

从 1.05× PBS-P 缓冲液中量取 1,425 mL 到装缓冲液的瓶子里，加入 75 mL 用 0.22 μm 有机滤膜过滤后的 DMSO。

3. 蛋白母液

将 SARS-CoV-2 RBD 蛋白和 hACE2 蛋白粉末用超纯水溶成 1 mg/mL 母液。

4. 小分子药物母液

将小分子药物粉末用 DMSO 溶解并配成 10 mM 母液。

5. 不同浓度的DMSO溶剂校正溶液

按表 2，配制 4.5% DMSO 和 5.8% DMSO 的 PBS-P 溶液。

表 2 溶剂校正的溶液配方

	4.5% DMSO	5.8% DMSO
1.05× PBS-P	9.5 mL	9.5 mL
100% DMSO	0.45 mL	0.58 mL
终体积	~10 mL	~10 mL

4.5%和 5.8% DMSO 的 PBS-P 溶液按一定比例混合得到四点溶剂校正溶液（表 3）。

表 3 四点溶剂校正溶液配方

	1	2	3	4
4.5% DMSO	0	400 μ L	2,400 μ L	2,800 μ L
5.8% DMSO	2,800 μ L	2,400 μ L	400 μ L	0

6. 50% DMSO溶液

取 5 mL 超纯水，加入 5 mL 用 0.22 μ m 有机滤膜过滤后的 DMSO。

7. 5 mM NaOH溶液

取 100 μ L 50 mM NaOH，加入 900 μ L 超纯水，混匀。

致谢

感谢北京大学药学院天然药物及仿生药物全国重点实验室提供仪器技术支撑。感谢北京大学医学部基础医学院王月丹教授和初明副教授课题组提供实验数据。感谢王子元同学的帮助。

参考文献

1. Chen, X., Wang, Z., Wang, J., Yao, Y., Wang, Q., Huang, J., Xiang, X., Zhou, Y., Xue, Y., Li, Y., et al. (2022). Role of tannic acid against SARS-cov-2 cell entry by targeting the interface region between S-protein-RBD and human ACE2. *Front Pharmacol.* 13: e940628. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.940628>