

## 新型冠状病毒M<sup>pro</sup>/3CL<sup>pro</sup>抑制剂筛选试剂盒

产品编号	产品名称	包装
P0312S	新型冠状病毒M <sup>pro</sup> /3CL <sup>pro</sup> 抑制剂筛选试剂盒	100次
P0312M	新型冠状病毒M <sup>pro</sup> /3CL <sup>pro</sup> 抑制剂筛选试剂盒	500次

### 产品简介:

- 碧云天研发生产的新型冠状病毒M<sup>pro</sup>/3CL<sup>pro</sup>抑制剂筛选试剂盒(2019-nCoV M<sup>pro</sup>/3CL<sup>pro</sup> Inhibitor Screening Kit)是一种利用荧光检测,简单、快速、灵敏地用于新型冠状病毒M<sup>pro</sup>/3CL<sup>pro</sup>蛋白酶抑制剂高通量筛选的试剂盒。本试剂盒使用的是和天然新型冠状病毒主蛋白酶(main protease, 简称M<sup>pro</sup>, 也称3C-like protease, 简称3CL<sup>pro</sup>)的氨基酸序列完全相同的新型冠状病毒M<sup>pro</sup>/3CL<sup>pro</sup>蛋白酶,没有任何额外的标签和氨基酸,确保筛选结果更加真实可信。
- 2019年底由新型冠状病毒引起的肺炎疫情,从2020年初开始在全球大流行,感染病例快速上升,引发全球关注。该病毒被世界卫生组织(WHO)命名为2019-nCoV,被国际病毒分类委员会命名为严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)。由新型冠状病毒感染导致的肺炎,被世界卫生组织命名为2019冠状病毒肺炎(Corona Virus Disease 2019, COVID-19),通常称为新型冠状病毒肺炎,简称“新冠肺炎”。
- 新型冠状病毒(2019-nCoV)属于单正链的RNA病毒,与SARS-CoV以及MERS-CoV具有较高的同源性,该病毒感染进入宿主细胞后,在宿主细胞的帮助下,其遗传物质RNA的ORF1a/b首先翻译表达出两条多聚蛋白前体(pp1a和pp1ab),多聚蛋白前体在主蛋白酶(main protease, 简称M<sup>pro</sup>)和木瓜样蛋白酶(papain like proteases)的作用下发生分子内的切割产生多个非结构蛋白。M<sup>pro</sup>也被称为3C-like protease (3CL<sup>pro</sup>),因为其切割位点的特异性与微小RNA病毒(picornavirus)的3C蛋白酶(3C protease)很相似,两者并称为M<sup>pro</sup>/3CL<sup>pro</sup>。多聚蛋白前体产生的非结构蛋白参与了病毒亚基因RNA和四个结构蛋白(envelope/E蛋白、membrane/M蛋白、spike/S蛋白和nucleocapsid/N蛋白)的产生,进而完成子代病毒的繁衍与释放。由于M<sup>pro</sup>蛋白酶在病毒的生命周期中起到了至关重要的作用,且人体内没有同源蛋白,故M<sup>pro</sup>主蛋白酶是一个抗病毒药物研发的理想靶点,自2003年SARS爆发后,已有大量基于M<sup>pro</sup>结构为基础的抗SARS药物的研究。Lopinavir(洛匹那韦)与Ritonavir(利托那韦)等抗HIV药物也是作用于类似的蛋白酶靶点,并在临床上得到很好的验证。同时,M<sup>pro</sup>在β冠状病毒中保守性高,筛选出的M<sup>pro</sup>抑制剂具有一定程度的广谱抗冠状病毒能力,甚至可能用于猪冠状病毒等相关的其它动物疾病的治疗。
- 新型冠状病毒(2019-nCoV) M<sup>pro</sup>/3CL<sup>pro</sup>抑制剂筛选试剂盒采用荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)的方法,其检测原理如下。Edans是荧光供体(Donor),Dabcyl是荧光受体(Acceptor)或称为淬灭基团(Quencher),这两个荧光基团的吸收光谱有一定的重叠,当这两个荧光基团间的距离合适时(一般7-10nm),荧光能量由供体向受体转移,导致供体荧光分子自身的荧光强度衰减。Edans和Dabcyl被连接到2019-nCoV M<sup>pro</sup>/3CL<sup>pro</sup>蛋白酶的天然底物上的两端,即Dabcyl-KTSAVLQSGFRKME-Edans。当2019-nCoV M<sup>pro</sup>/3CL<sup>pro</sup>蛋白酶没有切割该底物时,两个基团足够接近,发生荧光共振能量转移,即Dabcyl可淬灭Edans的荧光而导致检测不到荧光;当该底物被2019-nCoV M<sup>pro</sup>/3CL<sup>pro</sup>蛋白酶切割后,多肽的首尾两端分离,两个基团分开,Edans的荧光不再被Dabcyl淬灭,即可检测到Edans的荧光,这样通过荧光检测就可以非常灵敏地检测2019-nCoV M<sup>pro</sup>/3CL<sup>pro</sup>蛋白酶的酶活性。如果在反应体系中加入2019-nCoV M<sup>pro</sup>/3CL<sup>pro</sup>的抑制剂(Inhibitor),荧光的生成会被抑制,荧光强度与抑制剂的抑制效果成反比,这样就可以检测出2019-nCoV M<sup>pro</sup>/3CL<sup>pro</sup>蛋白酶抑制剂的抑制效果。Edans的最大激发波长为340nm,最大发射波长为490nm。

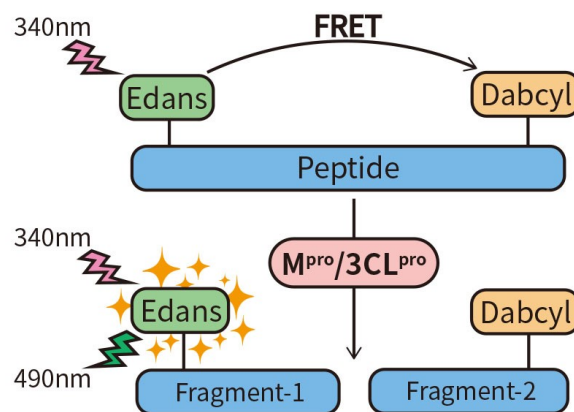


图1. 新型冠状病毒(2019-nCoV) M<sup>pro</sup>/3CL<sup>pro</sup>抑制剂筛选试剂盒检测M<sup>pro</sup>/3CL<sup>pro</sup>酶活性的原理图。

- 本试剂盒抑制剂筛选结果更加真实可信。2019-nCoV M<sup>pro</sup>/3CL<sup>pro</sup>与SARS-CoV的M<sup>pro</sup>/3CL<sup>pro</sup>只差12个氨基酸,同源性大于

96%，两者结构基本一致，因此2019-nCoV M<sup>Pro</sup>/3CL<sup>Pro</sup>抑制剂筛选时，使用和天然的2019-nCoV M<sup>Pro</sup>/3CL<sup>Pro</sup>蛋白序列完全相同的重组蛋白至关重要。碧云天通过2019-nCoV M<sup>Pro</sup>/3CL<sup>Pro</sup>和其特异性底物，开发出新型冠状病毒(2019-nCoV) M<sup>Pro</sup>/3CL<sup>Pro</sup>抑制剂筛选试剂盒。本试剂盒中使用的2019-nCoV M<sup>Pro</sup>/3CL<sup>Pro</sup>是碧云天采用自主研发的PerfectProtein™蛋白表达技术平台纯化而来，使表达的重组2019-nCoV M<sup>Pro</sup>/3CL<sup>Pro</sup>蛋白没有任何额外的标签，没有任何一个额外的氨基酸，确保与2019-nCoV病毒的M<sup>Pro</sup>/3CL<sup>Pro</sup>氨基酸序列完全一致。采用本试剂盒用于新型冠状病毒抑制剂的筛选，可确保筛选获得的抑制剂更加真实可信，避免因存在的额外氨基酸而筛选出“假阳性”的抑制剂。

- **本试剂盒兼容性强。**常用溶剂如DMSO、无水乙醇、甘油等对本试剂盒的检测结果影响较小，实测反应体系中DMSO或无水乙醇、甘油含量达10%时对检测结果基本没有影响，含量达20%时孵育10分钟信号下降不超过10%；去垢剂如Triton X-100等的含量在0.4%时孵育10分钟基本无影响，含量达1%时孵育10分钟信号下降不超过25%。
- **本试剂盒信号稳定性好，信号佳。**孵育5分钟后，信号即趋于稳定并在20分钟内几乎没有变化。同时，100%酶活性信号约为背景信号的20倍，确保有足够的信号范围用于抑制剂的筛选。
- 本试剂盒中提供了2019-nCoV M<sup>Pro</sup>/3CL<sup>Pro</sup>、底物(Substrate)、阳性对照2019-nCoV M<sup>Pro</sup>/3CL<sup>Pro</sup>抑制剂(Ebselen)，并且对2019-nCoV M<sup>Pro</sup>/3CL<sup>Pro</sup>和底物的使用量进行了优化。不仅能检测出IC<sub>50</sub>很低的抑制剂，也能检测出IC<sub>50</sub>较高的抑制剂。本试剂盒提供了阳性对照Ebselen (依布硒)，公开发表的数据显示Ebselen在体外的IC<sub>50</sub>约为0.67μM，实测数据会略有偏差。
- 用于96孔板检测时，本试剂盒小包装P0312S可以进行100次检测，中包装P0312M可以进行500次检测。

#### 包装清单：

产品编号	产品名称	包装
P0312S-1	Assay Buffer	30ml
P0312S-2	2019-nCoV M <sup>Pro</sup> /3CL <sup>Pro</sup>	100μl
P0312S-3	Substrate	200μl
P0312S-4	Ebselen (10mM)	20μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P0312M-1	Assay Buffer	125ml
P0312M-2	2019-nCoV M <sup>Pro</sup> /3CL <sup>Pro</sup>	500μl
P0312M-3	Substrate	1ml
P0312M-4	Ebselen (10mM)	100μl
—	说明书	1份

#### 保存条件：

-20℃保存，一年有效。其中P0312-3 Substrate需避光保存。

#### 注意事项：

- Assay Buffer、Substrate和Ebselen (10mM)需完全解冻并平衡至室温后再使用，否则会影响检测结果。2019-nCoV M<sup>Pro</sup>/3CL<sup>Pro</sup>在使用时应置于冰上。使用完毕后各试剂应立即按照试剂盒要求的条件保存。
- 请确保样品pH值在7-8之间，或确保加入样品后反应体系的pH值在7-8之间，否则可能会影响检测结果的信号值和稳定性。
- 待测抑制剂样品的溶剂可能会对检测产生干扰，推荐使用本试剂盒提供的Assay Buffer为溶剂配制、稀释样品，如样品必须用其它试剂配制、稀释，请进行一定的测试，并添加与样品等量的溶剂作为100%酶活性对照。经测试，反应体系中DMSO、无水乙醇浓度达10%时对检测结果没有影响，但仍然建议进行一定的预实验并尽量降低DMSO、无水乙醇等溶剂在反应体系中的浓度。
- 由于Ebselen (10mM)阳性对照抑制剂的水溶性不是很好，须使用DMSO进行稀释。
- 体积较小的试剂首次使用时建议先离心数秒使液体沉降于管底，然后再使用。结冻的试剂必须完全融化并混匀后使用。
- 检测时建议使用96孔黑板，推荐选购碧云天的BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(FCP966)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

#### 使用说明：

##### 1. 样品的准备。

取适量待测定的抑制剂样品，用Assay Buffer或DMSO等适当的溶剂配制成适宜浓度的溶液，如果有必要可配制成适当的浓度梯度待用。

##### 2. 阳性对照的准备。

本试剂盒提供的阳性对照抑制剂Ebselen浓度为10mM，配制在DMSO中，可以根据需要使用与待测抑制剂一样的溶剂稀释成所需浓度或浓度梯度。通常Ebselen的IC<sub>50</sub>约为0.5μM-2μM，使用本试剂盒时Ebselen的抑制效果参考图2。

##### 3. 样品测定。

a. 根据样品数量(含相关对照)，参考下表配制适量的Assay Reagent。注：由于2019-nCoV M<sup>Pro</sup>/3CL<sup>Pro</sup>的甘油含量较高，微

量吸取时要注意避免吸头吸附损失并吹打完全，加入2019-nCoV M<sup>pro</sup>/3CL<sup>pro</sup>后需要注意充分混匀。

	1个样品	5个样品	10个样品	20个样品
Assay Buffer	92μl	460μl	920μl	1.84ml
2019-nCoV M <sup>pro</sup> /3CL <sup>pro</sup>	1μl	5μl	10μl	20μl

- b. 参考下表，使用96孔黑板设置各组别，并按照下表依次加入检测试剂和样品。加入待测样品后，混匀。为获得更加可靠的检测结果，建议每个样品至少应该进行2个重复孔的检测。

	空白对照	100%酶活性对照	阳性抑制剂对照	样品
Assay Buffer	93μl	-	-	-
Assay Reagent	-	93μl	93μl	93μl
Ebselen溶液	-	-	5μl	-
样品溶剂	5μl	5μl	-	-
待测样品	-	-	-	5μl

注：样品溶剂是指配制和稀释待测抑制剂所用的溶剂。

- c. 各孔快速加入Substrate 2μl，混匀。注：加入Substrate后反应会立即开始，如果孔数较多的情况下，建议在低温或使用排枪操作以减小各孔间加入Substrate的时间差而导致的误差，混匀操作可在培养板振荡器上进行。
- d. 37°C避光孵育5分钟后信号即趋于稳定，可在5-20分钟内使用多功能酶标进行荧光测定。激发波长为340nm，发射波长为490nm。当荧光读数偏低时，也可适当延长孵育时间至20-30分钟。

注：也可在步骤a中将待测样品加入后37°C孵育10分钟，再将Substrate加入反应体系中。37°C孵育10分钟再加入Substrate可能会降低抑制剂的IC<sub>50</sub>。建议通过预实验确定未知抑制剂比较适合的孵育时间。

#### 4. 计算：

- a. 计算每个样品孔和空白对照孔的平均荧光值，可分别记录为RFU<sub>空白对照</sub>、RFU<sub>100%酶活性对照</sub>、RFU<sub>阳性对照</sub>和RFU<sub>样品</sub>。RFU, Relative Fluorescence Unit。
- b. 计算每个样品的抑制百分率。计算公式如下：  
抑制率(%) = (RFU<sub>100%酶活性对照</sub> - RFU<sub>样品</sub>) / (RFU<sub>100%酶活性对照</sub> - RFU<sub>空白对照</sub>) × 100%
- c. 对于检测发现有效的抑制剂，通过检测该抑制剂的剂量效应就可以计算出该抑制剂的IC<sub>50</sub>。使用本试剂盒检测Ebselen对于M<sup>pro</sup>/3CL<sup>pro</sup>的抑制作用的检测结果参考图2，Substrate直接加入反应体系中，然后孵育10分钟进行荧光测定，IC<sub>50</sub>约为0.8μM。

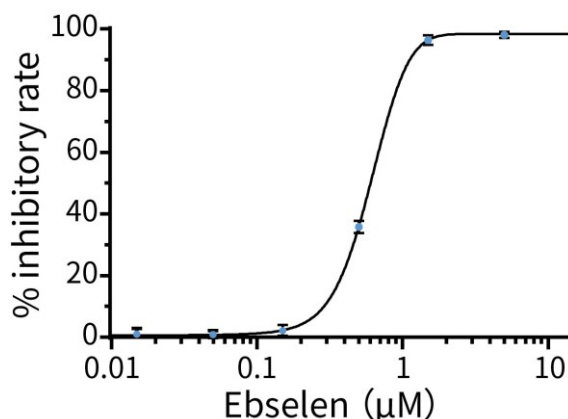


图2. 新型冠状病毒(2019-nCoV) M<sup>pro</sup>/3CL<sup>pro</sup>抑制剂筛选试剂盒检测Ebselen的效果图。实际检测结果可能会因样品和检测条件等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

#### 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
D8006S	新型冠状病毒(2019-nCoV)双荧光qRT-PCR试剂盒	100次
D8006M	新型冠状病毒(2019-nCoV)双荧光qRT-PCR试剂盒	500次
P0313S	冠状病毒M <sup>pro</sup> /3CL <sup>pro</sup> 活性荧光检测试剂盒	100次
P0313M	冠状病毒M <sup>pro</sup> /3CL <sup>pro</sup> 活性荧光检测试剂盒	500次
P9731-0.1ml	MCA-AVLQSGFR-Lys(Dnp)-Lys-NH <sub>2</sub> (冠状病毒主蛋白酶荧光底物)	20mM×0.1ml
P9731-5mg	MCA-AVLQSGFR-Lys(Dnp)-Lys-NH <sub>2</sub> (冠状病毒主蛋白酶荧光底物)	5mg
P9731-25mg	MCA-AVLQSGFR-Lys(Dnp)-Lys-NH <sub>2</sub> (冠状病毒主蛋白酶荧光底物)	25mg

P9733-0.1ml	Dabcyl-KTSAVLQSGFRKME-Edans (冠状病毒主蛋白酶荧光底物)	20mM×0.1ml
P9733-5mg	Dabcyl-KTSAVLQSGFRKME-Edans (冠状病毒主蛋白酶荧光底物)	5mg
P9733-25mg	Dabcyl-KTSAVLQSGFRKME-Edans (冠状病毒主蛋白酶荧光底物)	25mg
R0011	Beyozol (总RNA抽提试剂)	100ml
R0016	Trizol (总RNA抽提试剂)	100ml
R0021	DEPC水(DNase、RNase free)	100ml
R0022	DEPC水(DNase、RNase free)	500ml
R0035S	RNAeasy™病毒RNA抽提试剂盒(离心柱式)	12次
R0035M	RNAeasy™病毒RNA抽提试剂盒(离心柱式)	50次
R0035L	RNAeasy™病毒RNA抽提试剂盒(离心柱式)	200次
R0036-200µg	Carrier RNA	200µg
R0036-1mg	Carrier RNA	1mg
R0123	RNase and DNase Away	250ml
R0125	RNase, DNase and DNA Away	250ml
R0127	RNase, DNase, RNA and DNA Away	250ml
R0141-100ml	RNA Later™病毒RNA稳定保存液	100ml
R0141-500ml	RNA Later™病毒RNA稳定保存液	500ml
R0143-100ml	病毒样品常规保存液	100ml
R0143-500ml	病毒样品常规保存液	500ml
R0145-100ml	BeyoDirect™ RNA病毒直接qRT-PCR保存液	100ml
R0145-500ml	BeyoDirect™ RNA病毒直接qRT-PCR保存液	500ml
FSF002	荧光定量PCR用封板膜(ABI分装)	10片
FTUB333	荧光定量PCR用96孔板(ABI原装)	10个
FTUB384	荧光定量PCR用384孔板(ABI分装)	10个

Version 2020.09.20