

Тест-система: Бесклеточная система скрининга потенциальных ингибиторов протеазы Mpro (3CLpro) SARS-CoV-2 на основе методов флуоресцентного анализа: дифференциальной сканирующей флуориметрии и микротермофореза

Мишень/тест-система	Протеаза 3CLpro (Mpro) SARS-CoV-2
Клеточная линия	бесклеточная система
Метод детекции	Флуоресценция, коэффициент термодиффузии
Активность	Связывание: константа диссоциации
Методы контроля	Положительный контроль: ингибитор кальпаина

Краткое описание тест-системы

Анализ эффективности взаимодействия основной протеазы 3CL-Pro (NSP5) коронавируса SARS-CoV-2 с потенциальными ингибиторами проводится методом микротермофореза. Для постановки эксперимента анализируемый белок флуоресцентно метится. Отсутствие конформационных изменений, а также степень агрегированности препарата контролируется методом дифференциальной сканирующей флуориметрии. Измерение взаимодействия флуоресцентно меченного белка с потенциальным ингибитором проводится в растворе без иммобилизации образцов.

Для анализа конформационной стабильности протеазы методом дифференциальной сканирующей флуориметрии раствор белка загружается в стеклянные капилляры и подвергается последовательному нагреву в диапазоне температуры 15° – 95°С с шагом 1°С/мин.

Анализ взаимодействия флуоресцентно меченного препарата белка с лигандом проводится в стеклянных капиллярах при постоянной концентрации белка и различных концентрациях анализируемого соединения.

Протокол

Для анализа конформационной целостности и агрегационной устойчивости препарата протеазы 3CL-Pro (NSP5) методом дифференциальной сканирующей флуориметрии образец белка в объеме 10 мкл загружается в стеклянные капилляры (Standard capillaries Prometheus NT.48, NanoTemper Technologies GmbH) и помещается на термоплатформу. Анализ изменения конформации белка в условиях тепловой денатурации проводится по детекции изменения флуоресценции ароматических аминокислотных остатков, входящих в его состав. Возбуждение флуоресценции осуществляется с помощью светодиода при длине волны 285 нм. Измерение флуоресценции проводится одновременно с помощью двойного UV-детектора на длинах волн 330 нм и 350 нм каждые 3 секунды сканирования всей платформы. Во время эксперимента образцы измеряются непрерывно, что обеспечивает сверхвысокое разрешение с более чем 20 экспериментальными точками в минуту. Образцы нагреваются в диапазоне от 15°С до 95°С с шагом от 1°С/мин. Одновременно с определением конформационной стабильности белковой молекулы в процессе тепловой денатурации детектируются коллоидные свойства раствора, дающие информацию об агрегационной устойчивости образца. Детектирование проводится с помощью дополнительной оптики путем измерения потери интенсивности отраженного света в результате рассеивания.

Анализ взаимодействия протеазы с потенциальными ингибиторами проводится в растворе методом микротермофореза. Для проведения эксперимента протеаза 3CL-Pro (NSP5) метится

флуоресцентным красителем (Monolith His-Tag Labeling Kit RED-tris-NTA 2nd Generation, Nanotemper Technologies GmbH) по шести остаткам гистидина на С-конце белка. В данном случае флуоресцентная метка не нарушает активный центр белка. Краситель обладает высокой аффинностью к анализируемому белку при значении константы диссоциации $K_D = (11 \pm 3)$ нМ. Эксперимент по анализу степени сродства анализируемых лигандов проводится в условиях последовательного титрования. Готовится 16 реакционных смесей, где флуоресцентномеченый белок поддерживается в постоянной концентрации, анализируемый лиганд - в изменяющейся. После этого реакционные смеси инкубируются в темноте при 25°C в течение 30 минут. После инкубации смеси центрифугируются в течение 3 минут, 13000 об/мин при 25°C. Далее образцы последовательно загружаются в стеклянные капилляры (Standard capillaries Monolith NT.115, NanoTemper Technologies GmbH) и проводится эксперимент. Реакционный буфер для проведения эксперимента: 50 мМ HEPES-K, 2 мМ EDTA, 1 мМ DTT, 0.02% Tween-20, 10% глицерин, pH 7.6. Измерение проводится при интенсивности детектирующего лазера 30%, инфракрасного лазера 40%.

Интерпретация результатов

Анализ данных тепловой денатурации проводится с использованием программного обеспечения установки – PR. ThermControl v.2.0.2.

Построение кривых и анализ данных, полученных методом микротермофореза осуществляется с помощью программы GraphPad Prism. Полученные значения аппроксимируются нелинейной регрессией квадратичной функции:

$$y = y_{\min} + \frac{(y_{\max} - y_{\min}) \times \left((z + x + K_D) - \sqrt{(z + x + K_D)^2 - 4zx} \right)}{2z};$$

где x – концентрация лиганда, z – концентрация флуоресцентномеченого компонента (постоянная величина для конкретного эксперимента).

Ссылки на методику или ее аналоги, описанные в литературе (при наличии)

Vinogradova D.S., Zegarra V., Maksimova E., Nakamoto J.A., Kasatsky P., Paleskava A., Konevega A.L., Milón P. How the initiating ribosome copes with ppGpp to translate mRNAs // PLoS biology. - 2020. - Vol. 18. - P. e3000593.

Bartoschik T., Galinec S., Kleusch C., Walkiewicz K., Breitsprecher D., Weigert S., Muller Y.A., You C., Piehler J., Vercruyse T., Daelemans D., Tschammer N. Near-native, site-specific and purification-free protein labeling for quantitative protein interaction analysis by MicroScale Thermophoresis // Scientific Reports. - 2018. - Vol. 8. - P. 4977.

Препарат сравнения, использованный для валидации методики; результаты валидации

Для проверки корректности условий экспериментальной системы проводили контрольный анализ взаимодействия белка с кальпаиновым ингибитором методом микротермофореза, где флуоресцентномеченый NSP5 поддерживался в постоянной концентрации, составляющей 50 нМ при изменяющейся концентрации кальпаинового ингибитора. В качестве условий проведения эксперимента была выбрана инкубация при температуре 25°C в течение 30 минут. Интенсивность детектирующего лазера составляла 80%, ИК-лазера 40%. Полученное значение константы диссоциации отражало связывание в микромолярном диапазоне: $K_D = 5 \pm 2$ мкМ.

Дополнительные характеристики

Количество вещества для проведения одного исследования	От 4 мкл белка, содержащего флуорофор в концентрации 50 нМ
Производительность тест-системы	нМ

15 мин на одно измерение
аффинности

Организация

ФГБУ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт»

Отделение молекулярной и радиационной биофизики

<https://bio.pnpi.nrcki.ru/>

188300, г. Гатчина Ленинградской обл., мкр. Орлова Роща

Контактное лицо

Конева Андрей Леонидович, эл. почта: konevega_al@pnpi.nrcki.ru

Виноградова Дарья Сергеевна, эл. почта: vinogradova_ds@pnpi.nrcki.ru