



圣路易斯脑炎病毒 NS2B-NS3 蛋白酶的原核表达及其抑制剂的筛选

周婷婷^{1*}, 高梦茹², 杜梦繁², 于凡¹, 冯磊¹

¹江南大学无锡医学院, 江苏 无锡 214122

²江南大学药学院, 江苏 无锡 214122

摘要:【目的】圣路易斯脑炎病毒(St. Louis encephalitis virus, SLEV)属于黄病毒科, 是一种单股正链 RNA 病毒。黄病毒编码的非结构蛋白 NS3 在病毒复制以及多聚蛋白加工过程中起着重要作用, NS2B 是其发挥作用的重要辅助因子。因此, NS2B-NS3 蛋白酶复合物是抗病毒药物的重要靶标。本研究旨在构建 SLEV NS2B-NS3 蛋白酶的原核表达系统并建立其抑制剂的高通量筛选方法, 从而发现其小分子抑制剂。【方法】通过 PCR 扩增 SLEV NS2B-NS3 蛋白的编码区, 构建原核表达质粒; 在大肠杆菌 BL21(DE3)中, 经异丙基硫代半乳糖苷(Isopropyl β -D-thiogalactoside)诱导得到可溶性的 NS2B-NS3 蛋白, 并用镍亲和层析方法进行纯化; 基于荧光共振能量转移(Fluorescence resonance energy transfer)技术检测 NS2B-NS3 蛋白酶活性, 建立其抑制剂的高通量筛选平台。【结果】SLEV NS2B-NS3 蛋白酶纯化程度高达 95% 以上, 基于酶活测定的抑制剂筛选平台准确可行。对 700 多个上市药物进行筛选后, 发现原花青素对 SLEV NS2B-NS3 蛋白酶具有明显的抑制活性。【结论】本研究为 SLEV NS2B-NS3 蛋白酶抑制剂提供了一种操作方便、高通量的筛选方法, 并首次发现了原花青素具有抑制 SLEV NS2B-NS3 蛋白酶活性的功能, 可以作为治疗 SLEV 感染的潜在靶向药物。

关键词: 圣路易斯脑炎病毒, NS2B-NS3 蛋白酶, 丝氨酸蛋白酶活性, 抑制剂, 筛选

圣路易斯脑炎病毒(St. Louis encephalitis virus, SLEV)属于蚊、禽类传播的黄病毒属 B 组, 其基因组为单股正链 RNA, 与日本脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)和西尼罗河脑炎病毒(West Nile virus, WNV)高度相似^[1]。该病毒颗

粒直径大小为 40–50 nm, 有表面突起的囊膜和浓集的核心, 可在 pH 6.0–7.9 凝集禽类的红细胞, 可导致人畜共患中枢神经系统的感染性疾病。SLEV 于 1933 年在美国被首次发现, 该病毒流行于北美洲, 主要在密西西比河和俄亥俄河流域以及加利福

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金(JUSRP11863); 国家自然科学基金(81800430)

*通信作者。Tel/Fax: +86-510-85914599; E-mail: tingtingzhou@126.com

收稿日期: 2018-06-03; 修回日期: 2018-08-16; 网络出版日期: 2018-09-11

尼亚、佛罗里达、得克萨斯等地,能够侵袭人中枢神经系统,引发急性脑炎发热^[2-3]。有统计显示在美国临床感染病例中每 300 例患者就有一例为该病毒引起,致死率约为 8%,高龄是该病致死的高危因素^[4]。虽然由该病毒所致的脑炎主要在美国流行,但是随着气候变暖、人口快速增长与流动,该病毒传入我国的风险不容忽视。对于圣路易斯脑炎的治疗,目前临床上也没有 SLEV 的特异性治疗药物和疫苗接种,其治疗还是以对症治疗为主。因此,寻找抗该病毒的特异性药物具有重要意义。

SLEV 病毒在宿主细胞的细胞质中进行 RNA 的复制和蛋白质的合成,不影响宿主的新陈代谢。如同其他黄病毒一样,该病毒基因组包含约 11 kb 的单链 RNA,共编码 3 个结构蛋白分别为 C 蛋白(核心壳蛋白)、M 蛋白(膜蛋白)和 E 蛋白(包膜蛋白),7 个非结构蛋白分别为 NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 和 NS5^[5]。NS3 在病毒的复制及病毒与细胞的相互作用中扮演着十分重要的角色,它具有丝氨酸蛋白酶、核苷三磷酸酶(Nucleoside triphosphatase, NTPase)、RNA 解旋酶活性,主要负责 RNA 的自我复制以及对病毒的多聚蛋白进行剪切和修饰^[6-7]。

为了抑制黄病毒的感染,寻找抑制病毒复制周期的关键酶活性的化合物是一种有效的研究策略。NS3 的 N 端 180 个氨基酸含有丝氨酸蛋白酶(催化三联体 H、D 和 S)的保守结构域,但作为辅因子的 NS2B 的中央亲水结构域是 NS3 发挥催化活性不可缺少的部分^[8-9]。NS2B-NS3 在多聚体蛋白中的酶切位点主要有 NS2A/NS2B、NS2B/NS3、NS3/NS4A、NS4B/NS5 的连接位点,以及 NS4A、NS3、NS2A 和 C 蛋白内的酶切位点^[10]。因此,抑

制 NS2B-NS3 的丝氨酸蛋白酶活性已成为抗病毒研究的重要方向,是近年来抗病毒治疗研究的关键靶标^[11]。通过抑制 NS2B-NS3 的丝氨酸蛋白酶活性有可能成为潜在的治疗 SLEV 感染的方法。体外研究表明针对其他黄病毒如登革脑炎病毒和 WNV,越来越多的 NS2B-NS3 蛋白酶抑制剂能够发挥抗病毒作用,但是,目前还没有 SLEV 的 NS2B-NS3 蛋白酶小分子抑制剂被报道^[12]。本研究针对 SLEV 的非结构 NS2B-NS3 蛋白酶进行了原核系统的表达与纯化,首次建立了高通量的抑制剂筛选平台,并发现老药原花青素是其小分子抑制剂。

1 材料和方法

1.1 实验材料

DH5 α 、*E. coli* BL21 及 pET22b 质粒载体均由本实验室保存。质粒提取、琼脂糖凝胶、DNA 回收试剂盒均购自天根公司;高保真酶 PrimeSTAR、限制性内切酶 *EcoR* I/*Xho* I/*Nde* I、T4 DNA 连接酶均购自 NEB 公司;NTA His·Bind 树脂购自 GE 公司;荧光底物 Bz-Nle-Lys-Arg-Arg-AMC (Bz-Nle-KRR-AMC)购自吉尔生化有限公司;抑肽酶 (Aprotinin)购自 Sigma 公司;异丙基硫代半乳糖苷 (Isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG)、氨基青霉素购于上海生工有限公司。PCR 仪、水平电泳仪及凝胶成像仪购自伯乐公司,全波长多功能酶标仪(SpectraMax M5)购自美谷生物公司,FPLC 购自 AKTA 公司。

1.2 SLEV NS2B-NS3 蛋白酶重组质粒的构建及鉴定

根据 SLEV 的基因组序列(GenBank 序列号为

JF460774.1), 合成从第 4023 位到 5114 位基因片段, 分别设计引物(引物序列见表 1)将含有中央亲水结构的 NS2B 片段(47 个氨基酸)和含有蛋白酶活性的 NS3 N 端(179 个氨基酸)片段扩增后, 通过 *EcoR* I 连接后, 形成 NS2B-EF-NS3 基因序列, 再与双酶切后的 pET22b 载体 16 °C 连接, 形成重组质粒(示意图如图 1)。连接产物转化 DH5 α 感受态细胞, 转化产物经上海生工公司测序鉴定。

表 1. PCR 引物序列

Table 1. Primers used in this study

Primer name	Primer Sequences (5'→3')	Endonuclease
NS2B-F	ACGTTACATATGGCAGA AATGTGGATTGAGAAAGC	<i>Nde</i> I
NS2B-R	TTTGAATTCGTGCACTGGA GCTCCAGG	<i>EcoR</i> I
NS3-F	AGAGAATTCGGAAAACAC TCGAAGCGAG	<i>EcoR</i> I
NS3-R	CATCTCGAGCTCTTCTGTC CTTTCCCCTTG	<i>Xho</i> I

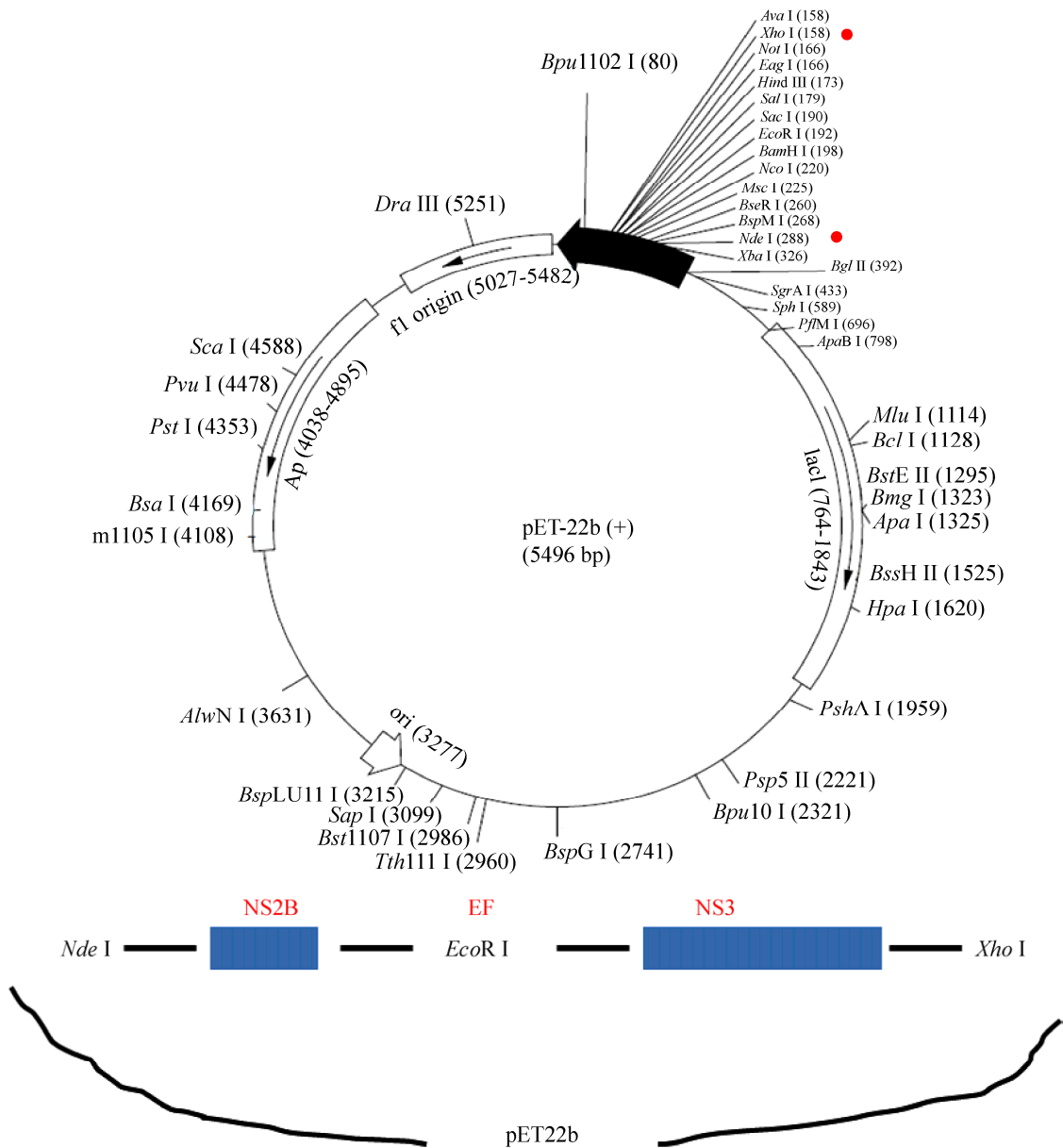


图 1. 重组质粒构建示意图

Figure 1. The schematic diagram of construction for recombinant plasmid SLEV pET22b-NS2B-NS3 protease.

1.3 SLEV NS2B-NS3 蛋白质的表达与纯化

取测序正确的重组质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞, 接种于 LB 液体培养基(含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氨苄青霉素)中, 待生长到对数期以后(OD_{600} 约为 1.2), 加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG, 诱导表达 20 h (16 $^{\circ}\text{C}$ 恒温、210 r/min)。诱导后离心收集菌体, 倒去培养基, 用裂解液(50 mmol/L HEPES, 0.3 mol/L NaCl, 5% 甘油, pH 7.5)重悬菌体, 再一次离心, 除去上清, 沉淀冻存于 -80°C 冰箱。取出细菌沉淀, 加裂解液振荡重悬, 冰上超声破碎细胞, 离心收集上清和沉淀作 SDS-PAGE 分析, 裂解液上清采用 Ni^{2+} -NTA 亲和层析技术纯化、透析, 经 FPLC 分子筛纯化、浓缩后, 紫外分光光度计下测定蛋白浓度。

1.4 SLEV NS2B-NS3 蛋白质的丝氨酸蛋白酶活性检测

设计一段多肽(Bz-Nle-KRR-AMC, N 端标记荧光基团, C 端标记淬灭基团)能够被 NS3 蛋白酶识别并酶切, 根据荧光共振能量转移的原理建立蛋白酶活性的测定方法。该多肽完整时荧光被淬灭, 加入 NS2B-NS3 蛋白酶后, 多肽被切割, 荧光基团和淬灭基团分离, 从而可检测到荧光(AMC 具有荧光值: 激发光 380 nm, 发射光 460 nm)。基于上述的反应原理, 我们采用 100 μL 的反应体系: 缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L NaCl, 5% 甘油, pH 9.0)和 NS2B-NS3 蛋白酶(终浓度 0.1、0.2、0.4 $\mu\text{mol}/\text{L}$)。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后, 加入 10 μL 的 Bz-Nle-KRR-AMC (终浓度 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$)启动反应。立即在酶标仪中检测荧光值变化, 连续测值 15 min, 取酶反应曲线的斜率为反应初速度来表征 NS2B-NS3 的丝氨酸蛋白酶活性。

1.5 SLEV NS2B-NS3 的丝氨酸蛋白酶抑制剂筛选平台的建立

将待筛选化合物用 DMSO 溶解成 2 mmol/L 母液备用, 使用上述 100 μL 的酶反应体系: 缓冲液 88 μL , NS2B-NS3 1 MI (终浓度 0.4 $\mu\text{mol}/\text{L}$), 化合物母液(终浓度 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$)或 DMSO 1 μL 。化合物与 NS2B-NS3 蛋白酶在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后, 加入 10 μL Bz-Nle-KRR-AMC (终浓度 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$)启动反应, 迅速在酶标仪中测定 NS2B-NS3 蛋白酶的活性。在用 96 孔黑色酶标板进行高通量筛选时, 使用广谱的丝氨酸蛋白酶抑制剂 Aprotinin 作为阳性化合物(终浓度为 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$)。抑制率按照公式(1)计算。

$$\text{抑制率}(\%) = (A - B) / A \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

A 是 DMSO(阴性对照), 只有酶和底物时 NS2B-NS3 的反应初速度; B 是加入化合物时 NS2B-NS3 的反应初速度。抑制剂类型是通过 Lineweaver-Burk 确定的。

2 结果和分析

2.1 重组质粒 SLEV NS2B-NS3 的构建及鉴定

将 NS2B 片段(47 个氨基酸, 141 bp)和 NS3 N 端(179 个氨基酸, 537 bp)片段扩增, DNA 凝胶电泳检测, 片段大小基本相符(图 2-A)。然后通过 T4 DNA 连接酶连接, 形成 NS2B-EF-NS3 基因序列, 再进一步扩增(684 bp, 图 2-B)。与 pET22b 质粒载体双酶切(*Nde* I/*Xho* I)后 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜, 连接产物转化 DH5 α 感受态细胞。转化产物重组质粒经过上海生工公司测序鉴定, 与 GenBank 数据库的参考序列一致。抽取重组质粒转化到 BL21(DE3)宿主菌, -80°C 保存菌种备用。

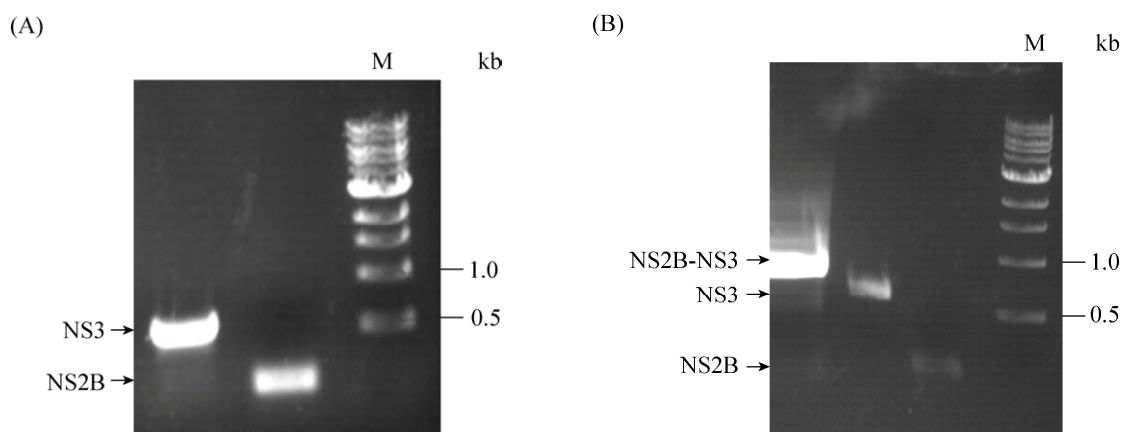


图 2. 重组质粒 SLEV NS2B-NS3 的构建

Figure 2. Construction of recombinant plasmid SLEV NS2B-NS3 protease. The PCR assay of NS2B/NS3 (A) and NS2B-NS3 (B). M: marker.

2.2 SLEV NS2B-NS3 蛋白酶的表达与纯化

将含有质粒 SLEV NS2B-NS3 的 BL21(DE3) 均匀涂布在带有抗性(100 mg/mL 的氨苄青霉素)的 LB 培养基固体平板上, 37 °C 倒置培养过夜。次日从平板上挑取单克隆至 10 mL 的带有氨苄抗性的 LB 液体培养基中, 37 °C、210 r/min 条件下培养过夜后, 转入 1 L 含有抗性的 LB 液体培养基中, 在相同条件下培养至 OD_{600} 为 1.2 左右时, 加入

IPTG (终浓度为 0.2 mmol/L), 在 16 °C、210 r/min 的条件下诱导 20 h。4000 r/min、30 min、4 °C 离心收集菌体, 倒去培养基, 用裂解液(50 mmol/L HEPES, 0.3 mol/L NaCl, 5%甘油, pH 7.5)重悬菌体, 再次离心, 除去上清, 冻存于-80 °C。初步裂解菌体行 SDS-PAGE 发现, SLEV NS2B-NS3 蛋白酶被 IPTG 诱导后, 表达量明显增加, 菌体裂解液上清中也具有高表达(图 3-A)。将冻存于-80 °C

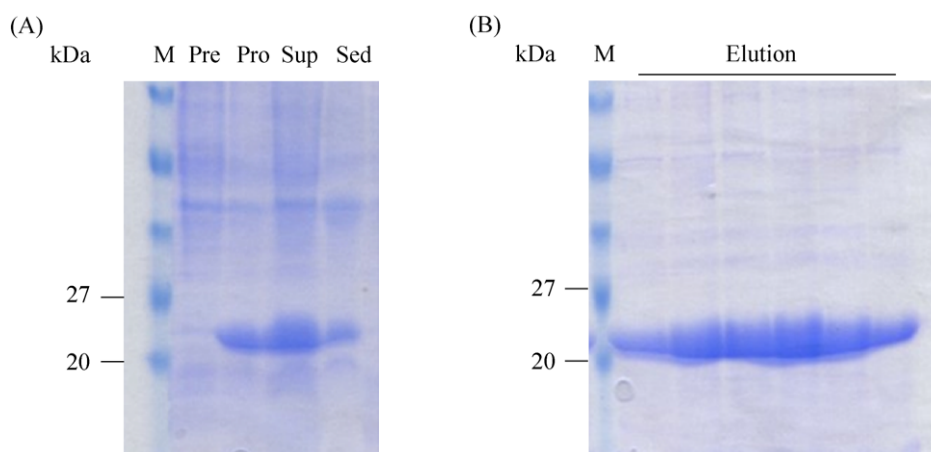


图 3. SLEV NS2B-NS3 蛋白酶的表达(A)与纯化(B)

Figure 3. Expression (A) and purification (B) of SLEV NS2B-NS3 protease. M: Protein marker; Pre: Before the induction of IPTG; Pro: After the induction of IPTG; Sup: Supernatant liquor; Sed: Sediment; Elution: Protein elution.

的菌体取出, 加入 15 mL 裂解液, 充分悬浮后置于冰上进行超声破碎 30 min 至菌液变澄清状。13000 r/min、4 °C 离心 30 min, 收集破碎后的上清。将上清倒入用裂解液平衡过的 2–3 mL Ni⁺-NTA 树脂中, 混匀, 在 4 °C 结合 2 h (期间每隔 15 min 上下混匀 1 次), 将上清液缓慢流出。然后依次用 5 倍柱体积的洗涤缓冲液(20 mmol/L、50 mmol/L、100 mmol/L 咪唑, 0.3 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5)梯度洗柱, 最后用洗脱缓冲液(200 mmol/L 咪唑, 0.3 mol/L NaCl, 50 mmol/L HEPES, pH 8.0)洗脱下目的蛋白 NS2B-NS3 蛋白酶, 进行 SDS-PAGE 鉴定纯度大于 95% (图 3-B)。

将洗脱下来的 SLEV NS2B-NS3 蛋白酶用透析液(50 mmol/L HEPES, 0.3 mol/L NaCl, 5% 甘油, pH 7.5)在 4 °C 透析 3 次, 每次时间为 3 h。透析后的蛋白经过 FPLC 进一步分离纯化(图 4-A)后, 收集相应的蛋白洗脱液, 使用浓缩离心管浓缩(图 4-B)至 10 mg/mL, 分装于 1.5 mL EP 管中, 并冻存于 -80 °C 冰箱。蛋白浓度用紫外分光光度仪测定。

2.3 SLEV NS2B-NS3 的丝氨酸蛋白酶活性的测定

NS2B-NS3 蛋白酶可以特异性地酶切底物

Bz-Nle-KRR-AMC, 从而检测到 AMC 的荧光值(激发光 380 nm, 发射光 460 nm), 以此表征蛋白酶活性。结果表明, NS2B-NS3 蛋白酶对底物 Bz-Nle-KRR-AMC 酶切反应很明显, 而且蛋白浓度越高, 酶切反应活性越高(图 5-A), Aprotinin (1、2、3 μmol/L)作为阳性化合物对酶活反应具有剂量依赖性抑制(图 5-B), 说明我们构建的酶活测定方法准确可行。

2.4 SLEV NS2B-NS3 蛋白酶抑制剂的筛选

我们对实验室的老药库(700 个上市药物集合)进行 20 μmol/L 浓度的初筛, 发现编号为 49、206、376、514、559、587 和 599 的抑制率均超过 70%(抑制率依次为 72%、83%、86%、90%、83%、87% 和 95%), 其中 599 号(原花青素 Procyanidine, Pro)化合物的抑制率高达 95%。因此, 选择 Pro 进行下一步研究, 复筛结果显示 Pro 能够抑制 NS2B-NS3 的丝氨酸蛋白酶活性(图 6-A)。检测不同剂量的原花青素(10^{-8} – 10^{-4} mol/L)的抑制率, 从而拟合出其半抑制浓度(Half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)为 1.86 μmol/L(图 6-B), 并进一步发现原花青素为 NS2B-NS3 蛋白酶的竞争性抑制剂(图 6-C)。

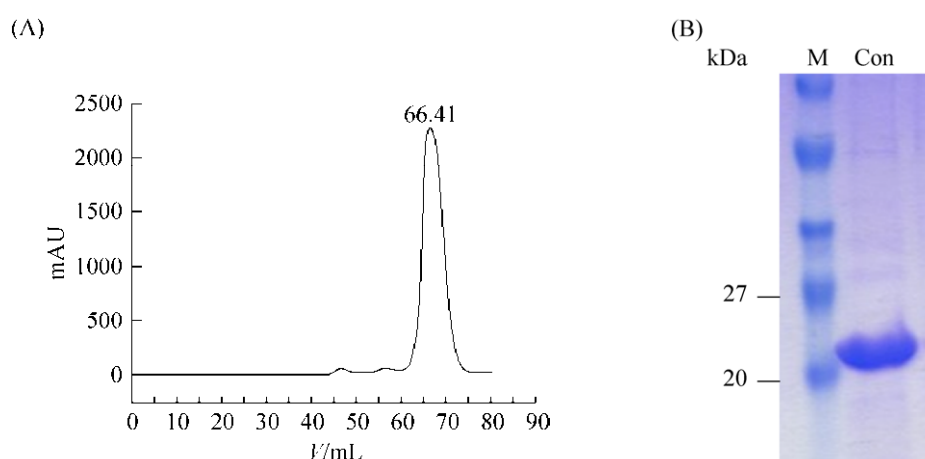


图 4. SLEV NS2B-NS3 蛋白酶的分子筛纯化(A)及物理浓缩(B)

Figure 4. Purification of SLEV NS2B-NS3 protease by FPLC (A) and concentration (B) of SLEV NS2B-NS3 protease. M: Protein marker; Con: Concentration.

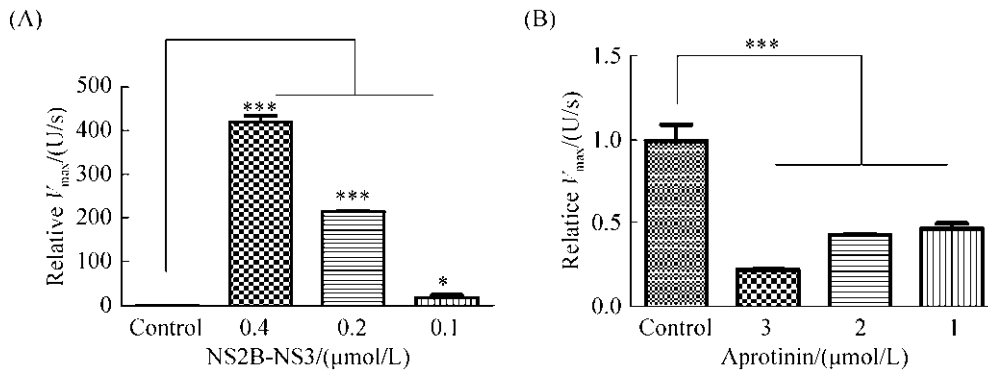


图 5. SLEV NS2B-NS3 的丝氨酸蛋白酶活性的测定

Figure 5. Serine protease activity assay of SLEV NS2B-NS3 protease. A: NS2B-NS3 (0.1, 0.2, 0.4 $\mu\text{mol/L}$) dose-dependently digested enzyme substrate (100 $\mu\text{mol/L}$). B: Aprotinin (1, 2, 3 $\mu\text{mol/L}$) inhibited serine protease activity of SLEV NS2B-NS3 protease in a dose dependent manner. *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$.

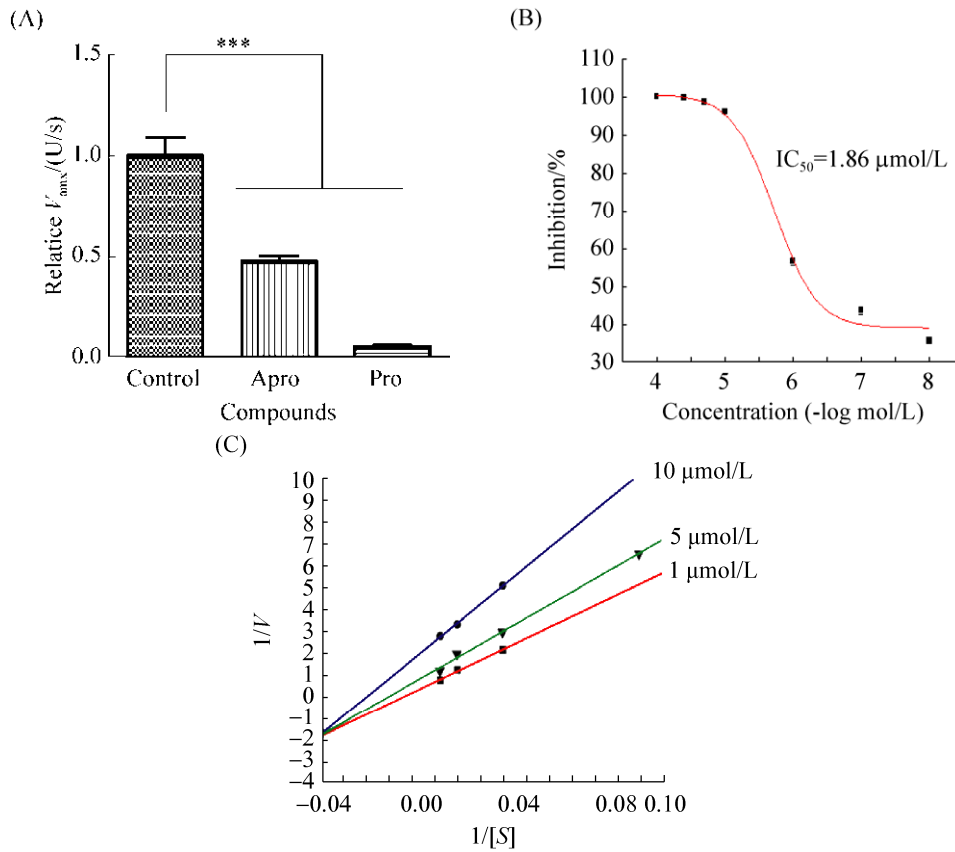


图 6. 原花青素抑制 SLEV NS2B-NS3 的丝氨酸蛋白酶活性

Figure 6. Procyanidine inhibited serine protease activity of SLEV NS2B-NS3 protease. A: Procyanidine (20 $\mu\text{mol/L}$) was identified as a potent inhibitor of the protease. B: The dose-dependent inhibitory effect of procyanidine against the serine protease activity of SLEV NS2B/NS3 protease, with an IC_{50} of 1.86 $\mu\text{mol/L}$. C: Kinetic analysis of procyanidine against NS2B-NS3 protease via double reciprocal plots of $1/V$ versus $1/[S]$. The Lineweaver-Burk plot analysis indicated that procyanidine acted as a competitive inhibitor against SLEV NS2B-NS3 protease. ***: $P < 0.001$. Apro: aprotinin; Pro: procyanidine.

3 讨论

SLEV 是属于黄病毒属的单链 RNA 病毒, 引起圣路易斯脑炎, 经蚊媒介传播可使人畜共患中枢神经系统感染性疾病。到目前为止, 仍然没有被批准的针对圣路易斯脑炎的疫苗或药物上市。黄病毒编码的 NS2B-NS3 蛋白酶复合物, 具有丝氨酸蛋白酶、NTPase 和 RNA 解旋酶的活性, 完成病毒 RNA 的复制和前体蛋白的剪切和修饰, 在病毒复制和蛋白翻译后加工过程起关键作用。因此通过抑制 NS2B-NS3 蛋白酶的活性将会成为潜在的治疗 SLEV 感染的有效策略^[13]。丝氨酸蛋白酶作为抗病毒的靶点, 已经在治疗人类免疫缺陷病毒和丙型肝炎病毒中取得了显著的疗效^[14-15]。因此, 对 NS2B-NS3 蛋白酶活性的抑制已经成为抗病毒研究的重要方向。虽然 Aprotinin 对黄病毒的 NS2B-NS3 丝氨酸蛋白酶活性都具有抑制作用, 但是 Aprotinin 的分子量大且没有选择性^[16]。所以, 特异性的小分子抑制剂研究是比较有前景的治疗圣路易斯脑炎的途径, 而且有关 SLEV NS2B-NS3 蛋白酶小分子抑制剂还没有相关报道。基于老药库的药物发现研究, 可以大大缩短新药研发时间, 也具有更好的安全性。

因此, 我们以 NS2B-NS3 蛋白酶为靶点对实验室收集的老药库进行抑制剂筛选, 得到了具有高抑制丝氨酸蛋白酶活性的原花青素, 为研发潜在的抗 SLEV 药物提供了先导化合物结构, 在圣路易斯脑炎治疗研究中具有重要的意义, 也开拓了原花青素潜在的新用途。

原花青素是植物中广泛存在的生物类黄酮, 是国际上公认的有效清除人体内自由基的天然抗氧化剂。临床上主要用于改善血液循环、治疗糖尿病性视网膜病、减轻水肿和抑制静脉

曲张等。已有研究表明, 原花青素除了抗氧化, 还具有抗微生物、抗糖尿病、抗肥胖和心脏保护作用^[17-18]。

由于原花青素是一类特殊结构的化合物总称, 究竟是哪些化合物单体是 SLEV NS2B-NS3 蛋白酶小分子抑制剂还有待进一步研究确证。由于 NS2B-NS3 蛋白酶具有多种蛋白酶活性, 本研究只研究了其丝氨酸蛋白酶活性, 原花青素对于 NS2B-NS3 的 NTPase 和 RNA 解旋酶活性的影响还有待进一步研究。同时还要深入研究原花青素对其他黄病毒家族 NS2B-NS3 蛋白酶活性的影响, 并且需要评价原花青素的体内外抗病毒活性。

参考文献

- [1] Zuza AL, Barros HLS, de Mattos Silva Oliveira TF, Chávez-Pavoni JH, Zanon RG. Astrocyte response to St. Louis encephalitis virus. *Virus Research*, 2016, 217: 92-100.
- [2] Bredeck JF. The story of the epidemic of encephalitis in St. Louis. *American Journal of Public Health and the Nation's Health*, 1933, 23(11): 1135-1140.
- [3] Lumsden LL, Jellison WL. St. Louis encephalitis in 1933: observations on epidemiological features. *Public Health Reports*, 1958, 73(4): 340-353.
- [4] Spinsanti LI, Díaz LA, Glatstein N, Arselán S, Morales MA, Farías AA, Fabbri C, Aguilar JJ, Ré V, Frías M, Almirón WR, Hunsperger E, Siirin M, Da Rosa AT, Tesh RB, Enría D, Contigiani M. Human outbreak of St. Louis encephalitis detected in Argentina, 2005. *Journal of Clinical Virology*, 2008, 42(1): 27-33.
- [5] Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual Review of Microbiology*, 1990, 44: 649-688.
- [6] Melino S, Paci M. Progress for dengue virus diseases. Towards the NS2B-NS3pro inhibition for a therapeutic-based approach. *The FEBS Journal*, 2007, 274(12): 2986-3002.
- [7] Kadaré G, Haenni AL. Virus-encoded RNA helicases. *Journal of Virology*, 1997, 71(4): 2583-2590.

- [8] Pastorino BAM, Peyrefitte CN, Grandadam M, Lebrun R, Moinier D, Rolland D, Tolou HJ, Bessaud M. Unexpected altered specificity is responsible for St. Louis encephalitis virus recombinant protease autoproteolysis. *Protein & Peptide Letters*, 2007, 14(1): 79–82.
- [9] Niyomrattanakit P, Winoyanu wattikun P, Chanprapaph S, Angsuthanasombat C, Panyim S, Katzenmeier G. Identification of residues in the dengue virus type 2 NS2B cofactor that are critical for NS3 protease activation. *Journal of Virology*, 2004, 78(24): 13708–13716.
- [10] Leung D, Schroder K, White H, Fang NX, Stoermer MJ, Abbenante G, Martin JL, Young PR, Fairlie DP. Activity of recombinant dengue 2 virus NS3 protease in the presence of a truncated NS2B co-factor, small peptide substrates, and inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(49): 45762–45771.
- [11] Steuber H, Hilgenfeld R. Recent advances in targeting viral proteases for the discovery of novel antivirals. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2010, 10(3): 323–345.
- [12] Pastorino B, Rolland D, Peyrefitte CN, Wurtz N, Almeras L, Bessaud M, Tolou HJ. Improvement of the purification of Saint Louis encephalitis virus NS2B-NS3 recombinant protease expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Chromatography B*, 2008, 868(1/2): 58–63.
- [13] Bessaud M, Pastorino BAM, Peyrefitte CN, Rolland D, Grandadam M, Tolou HJ. Functional characterization of the NS2B/NS3 protease complex from seven viruses belonging to different groups inside the genus *Flavivirus*. *Virus Research*, 2006, 120(1/2): 79–90.
- [14] Hughes PJ, Cretton-Scott E, Teague A, Wensel TM. Protease inhibitors for patients with HIV-1 infection: a comparative overview. *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 2011, 36(6): 332–345.
- [15] Forns X, Lawitz E, Zeuzem S, Gane E, Bronowicki JP, Andreone P, Horban A, Brown A, Peeters M, Lenz O, Ouwkerk-Mahadevan S, Scott J, de La Rosa G, Kalmeijer R, Sinha R, Beumont-Mauviel M. Simeprevir with peginterferon and ribavirin leads to high rates of SVR in patients with HCV genotype 1 who relapsed after previous therapy: a phase 3 trial. *Gastroenterology*, 2014, 146(7): 1669–1679.e3.
- [16] Lin KH, Ali A, Rusere LN, Soumana DI, Kurt Yilmaz N, Schiffer CA. Dengue virus NS2B/NS3 protease inhibitors exploiting the prime side. *Journal of Virology*, 2017, 91(10): e00045–17.
- [17] Cos P, de Bruyne T, Hermans N, Apers S, Vanden Berghe D, Vlietinck AJ. Proanthocyanidins in health care: current and new trends. *Current Medicinal Chemistry*, 2004, 11(10): 1345–1359.
- [18] Jing SQ, Zhang XM, Yan LJ. Antioxidant activity, antitumor effect, and antiaging property of proanthocyanidins extracted from *Kunlun Chrysanthemum* flowers. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 2015: 983484.

Expression and inhibitors screening of St. Louis encephalitis virus NS2B-NS3 protease

Tingting Zhou^{1*}, Mengru Gao², Mengfan Du², Fan Yu¹, Lei Feng¹

¹ Wuxi School of Medicine, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

² School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] St. Louis encephalitis virus (SLEV) is a single-stranded and positive-sense RNA virus, belonging to the Flaviviridae family. Non-structural protein 3 (NS3) encoded by flaviviruses plays an important role in virus replication and polyprotein precursor modification. NS2B is an essential element that acts as a co-factor to enhance the activity of NS3. Therefore, the NS2B-NS3 protease is considered as a crucial target for anti-flavivirus drug development. In the current study, we constructed recombinant plasmid of SLEV NS2B-NS3 protease, and expressed and purified the protein to screen inhibitors. [Methods] We obtained the NS2B-NS3 recombinant gene by PCR and subcloned the prokaryotic recombinant expression plasmid. The NS2B-NS3 protease was expressed in soluble form induced by isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside in *Escherichia coli* BL21(DE3). The fusion protein was purified with Ni⁺-NTA affinity column. Then the serine protease activity was determined by a fluorescence resonance energy transfer assay and the screening platform for inhibitors was constructed. [Results] The purity NS2B-NS3 protease was up to 95%. After screening for 700 old drugs, we found that procyanidine efficiently inhibited the enzymatic activity of the NS2B-NS3 protease. [Conclusion] Our current study provided a convenient and high-throughput method for screening of SLEV NS2B-NS3 protease inhibitors. Procyanidine has been found to inhibit the activity of SLEV NS2B-NS3 protease for the first time, and might become a potential drug to treat SLEV infection.

Keywords: St. Louis encephalitis virus (SLEV), NS2B-NS3 protease, serine protease enzymatic activity, inhibitor, screen

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (JUSRP11863) and by the National Natural Science Foundation of China (81800430)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85914599; E-mail: tingtingzhou@126.com

Received: 3 June 2018; Revised: 16 August 2018; Published online: 11 September 2018