

DOI:10.13350/j.cjpb.170805

• 论著 •

EV71 3C 蛋白酶表达纯化、活性分析及与抑制剂模拟对接研究*

尧晨光, 奚彩丽, 朱祥, 柳科峰, 纪梦莹, 刘媛, 胡康洪, 魏艳红**

(湖北工业大学生物工程与食品学院, 发酵工程湖北省协同创新中心, 湖北武汉 430068)

【摘要】目的 表达和纯化肠道病毒 71 型(EV71)3C 蛋白酶并通过与抑制剂相互作用预测其活性位点。**方法** 将 3C 蛋白酶片段克隆至 pET-28a 原核表达载体, 重组质粒导入大肠埃希菌 BL21(DE3), IPTG 诱导表达, 获得 3C 蛋白酶融合蛋白, 经 Ni-NTA 柱亲和纯化后以荧光多肽为底物检测 3C 蛋白酶的活性。使用 AutoDock 模拟 3C 蛋白酶与芦丁(Rutin)和芦平曲韦(Lupintrivir)对接。**结果** 经酶切、PCR、测序证明 pET28a-3C 重组质粒构建成功, 表达产物分子质量约 23×10^3 , 纯化的 3C 蛋白酶酶活较好; 对接结果表明 Rutin 和 Lupintrivir 通过形成氢键网和疏水键与 3C 蛋白酶底物结合位点结合, 结合的活性氨基酸残基有 His161、Gly163、Gly164、Phe170。**结论** 成功制备了具有生物学活性的高纯度 EV71 3C 蛋白酶, 建立了预测能力较好的对接模型, 为以 3C 蛋白酶为靶点的药物设计和筛选奠定了基础。

【关键词】 肠道病毒 71 型(EV71); 3C 蛋白酶; 蛋白纯化; 酶活检测; 分子对接**【中图分类号】** R373.2**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1673-5234(2017)08-0722-05[*Journal of Pathogen Biology. 2017 Aug; 12(8): 722–726.*]

Expression, purification, evaluation of activity, and analysis of inhibitor docking of enterovirus 71 3C protease

YAO Chen-guang, XI Cai-li, ZHU Xiang, LIU Ke-feng, JI Meng-ying, LIU Yuan, HU Kang-hong, WEI Yan-hong (Hubei University of Technology, Sino-German Biomedical Center, Wuhan 430068, China)

【Abstract】 **Objective** To construct a recombinant plasmid carrying the gene encoding the 3C protease of enterovirus 71 (EV71) and to express and purify EV71 3C protease and predict its active sites through interaction with inhibitors.

Methods A DNA fragment encoding 3C protease was cloned into a pET-28a prokaryotic expression vector. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) and protein expression was induced with IPTG. The expression protein was purified using affinity chromatography (Ni-NTA). Highly pure 3C protease was obtained and its functional activity was evaluated using a fluorescent peptide. AutoDock4.2.6 was used to simulate Rutin and Lupintrivir docking with 3C protease. **Results** Restriction analysis and sequencing verified that the recombinant plasmid pET28a-3C was correctly constructed. The purified 3C protease was about 23×10^3 in size and displayed a high level of enzymatic activity. The classic Michaelis-Menten equation was $y = 2.4481x + 0.04$, $R^2 = 0.925$. Docking results indicated that a network of hydrogen bonds and hydrophobic bonds were constructed between ligands and receptors with active amino acid residues like His161, Gly163, Gly164, and Phe170. **Conclusion** The recombinant plasmid pET28a-3C was created and 3C protease with a high level of functional activity and a predictable docking mode was prepared, laying the foundation for drug design and drug selection targeting 3C protease.

【Key words】 Enterovirus 71 (EV71); 3C protease; protein purification; evaluation of activity; docking

* ** 肠道病毒 71 型(简称 EV71), 属小核糖核酸病毒, 是导致婴幼儿手足口病的主要病原体之一^[1]。EV71 感染相关疾病在多个国家和地区广泛流行^[2-3], 我国的上海、山东、安徽等十多个省市均有报道, 其中台湾疫情严峻^[4-7]。EV71 感染除了引起手足口病等轻微病症之外, 还可导致病毒性脑膜炎、心肌炎、肺水肿等并发症, 且病死率高^[8]。目前, 临床使用的治疗手足口病药物为传统的广谱抗病毒药物, 特异性靶向 EV71 的药物鲜有报道。

3C 蛋白酶是由 183 个氨基酸组成有催化活性的

EV71 功能蛋白, 能催化 EV71 前体多聚蛋白裂解成成熟的结构蛋白和非结构蛋白, 并能降解宿主蛋白(如 Poly A 结合蛋白)从而干扰宿主 mRNA 合成^[9-10]。鉴于 3C 蛋白酶在 EV71 生命周期和病毒宿主相互作

* 【基金项目】国家自然科学基金青年项目(No. 31400153); 湖北工业大学博士科研启动项目(No. BSQD2015004)。
** 【通讯作者】魏艳红, E-mail: weianhong925@163.com
【作者简介】尧晨光(1989—), 男, 湖北人, 硕士研究生, 主要从事生物工程研究。E-mail: mengqingchenguang@163.com

用过程中的特殊功能,抑制3C蛋白酶的活性可有效阻断EV71复制。本研究将EV71 3C蛋白酶基因克隆至pET-28a载体,在BL21中诱导表达3C蛋白酶,并进行纯化,应用荧光共振能量转移技术检测3C蛋白酶活性,为抗EV71药物开发奠定基础。

芦平曲韦(Rupintrivir)是3C蛋白酶抑制剂,对多种病毒的3C蛋白酶有抑制作用,其机制主要是Rupintrivir与3C蛋白酶活性口袋P2半胱氨酸残基结合,占据了酶的催化中心,从而抑制3C蛋白酶活性^[11-12]。芦丁(Rutin)是一种从植物体内提取的抗病毒消炎黄酮类药物,能有效抑制EV71的复制,Cao等^[13]报道该药物对3C蛋白酶的活性有较强抑制作用,但其分子作用位点尚不明确。本研究使用分子对接软件AutoDock4.2.6将Rutin和Rupintrivir分别与EV71 3C蛋白酶进行刚性对接,从分子水平解析抑制剂与3C蛋白酶的作用机制,以指导靶向3C蛋白酶抗EV71药物的设计。

材料与方法

1 材料

EV71毒株EV71/wuhan/3018/2010,人横纹肌瘤细胞(RD),大肠埃希菌DH5 α 和BL21均由本室保存。载体pET-28a由华中师范大学生命科学学院刘德立馈赠。荧光多肽由上海凯靖生物科技有限公司合成,序列为Dabcyl-RTATVQGPSLDDE-Edans,模拟3B/3C多肽切割位点。

2 方法

2.1 引物设计与合成 通过NCBI数据库查询EV71/wuhan/3018/2010毒株3C蛋白酶基因序列,使用Primer 5软件设计N端带有his标签的3C蛋白酶引物。引物F:5'-CGCCCATGGGGCCCAGCT-TAGACTTCG-3'; R:5'-CCCAAGCTTTATT-GCTCGCTGGCAAAATAAC-3'(均含有Nco I和Hind III酶切位点)。引物由华大基因公司合成。

2.2 重组质粒构建 EV71感染RD细胞48 h后,提取总RNA并进行反转录,收获cDNA作为PCR模板,进行PCR扩增,根据引物TM值以及目的片段的长度确定PCR反应条件:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,56℃退火30 s,72℃延伸30 s,共30个循环;72℃延伸5 min。PCR产物和载体pET-28a分别经Nco I、Hind III 37℃酶切4 h,T4连接酶4℃连接过夜。连接产物转化DH5 α ,涂布于含卡纳青霉素的LB平板培养,挑取阳性克隆富集培养后提取质粒,进行PCR和酶切鉴定,鉴定正确的质粒送华大基因公司测序。

2.3 3C蛋白酶原核表达与纯化 将重组质粒

pET28a-3C转化BL21,涂布于含卡纳青霉素的LB平板培养,挑取单菌落,接种LB液体培养基37℃、220 r/min震荡培养至菌液A₆₀₀值为0.8时,加入终浓度0.5 mmol/L IPTG于18℃诱导过夜。收集菌体,超声裂解30 min(功率30%,每次5 s,间隔5 s)。菌体裂解液以13 000 r/min,4℃离心20 min,收集上清即为粗酶液。

装Ni-NTA柱,加入2 ml树脂,加入3倍柱体积的裂解缓冲液平衡后注入粗酶液,控制流速为1 ml/min左右,收集流出液,上样结束后加入含一定浓度咪唑的冲洗缓冲液冲洗杂蛋白,最后加入1倍柱体积的洗脱液洗脱目的蛋白,采用考马斯亮蓝法测定洗脱液蛋白浓度并进行12%聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。

2.4 3C蛋白酶酶活测定 反应体系:50 mmol/L Tris-HCl,200 mmol/L NaCl,2 mmol/L DTT,1 μmol/L 3C蛋白酶,5~120 μmol/L 荧光多肽底物,混匀后在多功能酶标仪上检测。检测条件:激发波长为340 nm,发射波长为500 nm,反应温度37℃,每隔30 s读取一个数值,时间为30 min。

2.5 Rutin和Rupintrivir与3C蛋白酶对接 分子对接工具(AutoDockTools,ADT)下载地址:<http://mgltools.scripps.edu/downloads>,分子对接软件AutoDock4(AD4)下载地址为:<http://autodock.scripps.edu>。小分子Rutin、Rupintrivir和3C蛋白酶3D结构PDB文件来自NCBI数据库。对接步骤:(1)准备配体文件。合并配体非极性氢原子并加上Gasteiger电荷,检测根原子,保存为pdbqt格式。(2)准备受体文件。给受体加氢并计算Gasteiger电荷,保存为pdbqt格式。(3)设置对接参数。将格子栅x、y、z维个点数分别设为70、70、70,空间大小设为0.375 Å,盒子中心为29.337、27.569、41.832,其它未提及的参数均为该软件默认参数。

结 果

1 重组质粒鉴定

以EV71 RNA反转录获得的cDNA为模板,加入EV71 3C蛋白酶引物进行PCR扩增,扩增产物大小为549 bp(图1),与理论值一致。目的片段经酶切后与pET-28a载体连接,转化大肠埃希菌DH5 α ,提取质粒进行双酶切鉴定(图2),对重组质粒进行测序验证,结果均与预期相符。

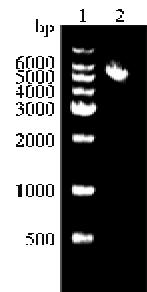
2 3C蛋白酶诱导表达

重组质粒pET28a-3C转化BL21后用0.5 mmol/L IPTG 18℃诱导过夜。收集菌体,超声破碎,13 000 g离心30 min,取上清,经12% SDS-PAGE电泳鉴定。3C蛋白酶在BL21中成功表达,其分子质量

单位(M_r)为 23×10^3 (图3)。

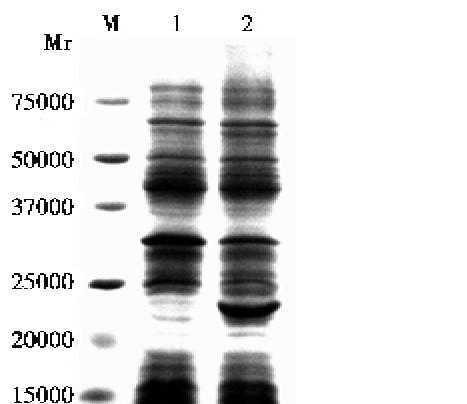


1 DNA 标志物(DL2000) 2 3C蛋白酶基因
图 1 3C 蛋白酶基因 PCR 扩增
1 DNA marker (DL2000) 2 3C protease gene
Fig. 1 3C protease gene amplification by PCR



1 DNA 标志物 2 Nco I / Hind III 双酶切
图 2 重组质粒 pET28a-3C 酶切鉴定

1 DNA marker 2 Dual-enzyme digestion with Nco I / Hind III
Fig. 2 The recombinant plasmid pET28a-3C identification by
Dual-enzyme digestion



M 蛋白分子质量标准 1 重组菌未诱导 2 重组菌 IPTG 诱导表达产物
图 3 重组 3C 蛋白酶在 BL21 中的表达鉴定

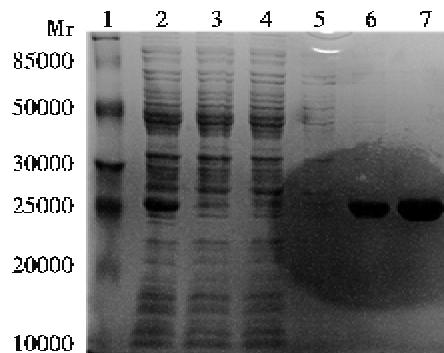
M Marker (Broad) 1 Uninduced 2 Induced with IPTG
Fig. 3 IPTG inducing 3C protease expression in BL21

3 3C 蛋白酶 Ni-NTA 柱纯化

IPTG 诱导后的重组菌 3C 蛋白酶粗酶液经 Ni-NTA 柱纯化后进行 12% SDS-PAGE 电泳(图 4)，结果表明 3C 蛋白酶在 BL21 中可溶性表达，主要存在于超声破菌上清中。SDS-PAGE 电泳分析洗脱液蛋白纯度较高，无杂带。考马斯亮蓝法测得 1 次洗脱蛋白浓度为 $2.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ，2 次洗脱蛋白浓度为 $3.7 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。

柱层析时 N 端带 His 标签的 3C 蛋白酶能被 30 mmol/L 咪唑从镍柱洗脱，而 C 端带 His 标签的 3C 蛋白酶不能被 50 mmol/L 咪唑洗脱液洗脱(图 5)，表明

His 标签位于 3C 蛋白酶 C 端具有较强的 NTA 亲和力。His 标签位于 N 端的 3C 蛋白酶在 18°C 诱导时可溶性表达沉淀中含量较低， 37°C 诱导时则主要存在于沉淀中，这可能因为 37°C 诱导蛋白易产生错误折叠而形成包涵体，而 C 端带 His 标签的 3C 蛋白酶的表达不受温度的影响，说明位于 N 端的 His 标签会影响 3C 蛋白酶的活性。

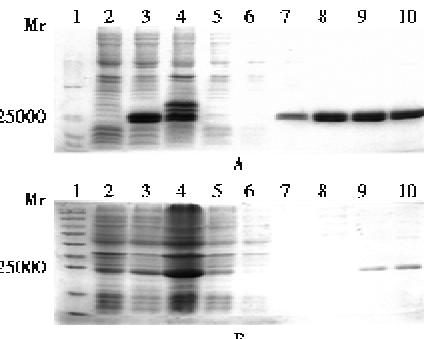


1 蛋白分子质量标准 2 重组菌裂解上清 3 重组菌裂解沉淀
4 柱层析结合后收集液 5 冲洗后收集液 6 1 次洗脱收集液
7 2 次洗脱收集液

图 4 Ni-NTA 柱纯化 3C 蛋白酶 SDS-PAGE 分析

1 Marker (Broad) 2 The supernatant of cell lysate 3 Precipitate 4 The fractions of flow through the Ni-NTA 5 The washed fraction 6 The first eluted fractions of Ni-NTA 7 The second eluted fractions of Ni-NTA

Fig. 4 3C protease purification with Ni-NTA



1 蛋白分子质量标准 2 重组菌未诱导 3 重组菌 IPTG 诱导后破碎上清 4 重组菌 IPTG 诱导后破碎沉淀 5 柱层析流出液
6 10 mmol/L 咪唑冲洗收集液 7 30 mmol/L 咪唑冲洗收集液
8 50 mmol/L 咪唑冲洗收集液 9 200 mmol/L 咪唑洗脱液 10 200 mmol/L 咪唑重复洗脱液

图 5 SDS-PAGE 电泳分析 His 标签的位置对 3C 蛋白酶纯化的影响
(A: C 端带 His 标签的 3C 蛋白酶; B: N 端带 His 标签的 3C 蛋白酶)

1 Marker Broad 2 Uninduced 3 The supernatant of cell lysate induced with IPTG 4 Precipitate 5 The fractions of binding flow through the Ni-NTA 6 The fractions of washing with 10 mM imidazole 7 The fractions of washing with 30 mM imidazole 8 The fractions of washing with 50 mM imidazole 9 The fractions of the first elution with 200 mM imidazole 10 The fractions of the second elution with 200 mM imidazole

Fig. 5 SDS-PAGE electrophoresis analysing the influence of 3C protease purification related to the position of His-tag (A. His-tag locating in the C terminal of 3C protease; B. His-tag locating in the N terminal of 3C protease)

4 3C 蛋白酶酶活性的动力学测定

反应体系($100 \mu\text{l}$)：荧光底物浓度分别为 $0, 5, 25, 50, 80, 100, 120 \mu\text{mol/L}$ ，3C 蛋白酶浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ ，混匀后立即进行动力学检测，得到底物浓度与荧光强

度的关系(表1)。根据每一组反应前10 min 对应的荧光值选取计算反应初速度, 定义酶反应初速度为单位时间内切割荧光底物产生的荧光强度。以底物浓度的倒数为横坐标, 酶反应速率的倒数为纵坐标建立米氏方程的模拟形式。通过作散点图得到仿米氏方程一般式为 $y = 2.4481x + 0.04, R^2 = 0.925$ 。选取荧光底物浓度为 20 μmol/L, 3C 蛋白酶浓度为 1 μmol/L 进行动力学反应, 荧光强度与时间的线性关系为 $y = 10.242x + 5.0303, R^2 = 0.9963$ (图 6)。

$$1/V = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

(V 代表反应速度, S 代表底物浓度, V_{max} 代表最大反应速度, K_m 代表仿米氏常数)

通过在线软件(<http://arep.med.harvard.edu/johnson/predict/>)分析 EV71 3C 蛋白酶结构见图 7。3C 蛋白酶 N 末端为 α 螺旋, H 键较多, 这对维持蛋白的高级结构起重要作用。His 标签连接在 N 端, 可影响 α 融合 H 键的形成及其稳定性, 从而影响酶的活性。3C 蛋白酶 C 末端无特殊三级结构, 摆动性强, 可暴露在整个蛋白的外表面, 也可贴于表面甚至插入内部, 连接 His 标签后对于 3C 蛋白酶活性影响较小。

表 1 3C 蛋白酶活性的动力学测定(荧光强度)
Table 1 Reaction kinetics of 3C protease

时间(min) Time(min)	底物浓度 Substrate concentrations(μmol/L)					
	5	25	50	80	100	120
0.0	14	21	28	32	37	77
0.5	15	24	35	41	49	94
1.0	11	27	44	52	64	109
1.5	21	37	50	53	68	130
2.5	17	46	61	72	92	151
3.0	23	49	66	76	100	164
3.5	23	56	73	84	110	175
4.0	18	56	79	92	122	186
4.5	18	61	84	98	122	199
5.0	25	66	88	99	136	211
5.5	21	68	93	107	148	223
6.0	21	72	96	113	157	236
6.5	19	73	101	118	167	249
7.0	20	76	105	124	174	260
7.5	20	80	109	128	181	269
8.0	21	83	113	132	188	280
8.5	21	86	118	138	194	291
9.0	21	90	121	141	202	300
9.5	24	92	127	145	208	308
10.0	24	96	130	151	215	316

5 3C 蛋白酶与 Rutin 和 Rupintrivir 对接结果

将 3C 蛋白酶视为刚性受体, Rutin 和 Rupintrivir 作为可变构象的配体, 运用拉马克遗传算法进行对接, 按照结合能量从低到高排序, 得到 9 种可能的不同构象, 结果见表 2。所选前 9 个构象结合能(BE) 均 < 0, 说明配体分子均能与受体分子自发结合, Rutin 和

Rupintrivir 最低结合能分别为 -4.16 kJ/mol 和 -3.01 kJ/mol。根据能量最低构象最佳原则选择 1 号并应用 ADT 分析对接结果, 得到配体与受体残基相互作用的模式(图 8)。EV71 3C 蛋白酶活性位点集中分布在空穴口袋, 主要包括以下氨基酸残基: Asn22、Gly23、Lys24、Phe25、His40、Glu71、Asn107、Leu127、Ser128、Gly129、Asn130、Thr132、Thr142、Lys143、Ser144、Gly145、Tyr146、Cys147、His161、Val162、Gly163、Gly164、Asn165、Gly166、Phe170。Rutin 和 Rupintrivir 除了通过疏水作用和范德华力与 3C 蛋白酶作用外, 还与活性口袋形成氢键网, 增强了与受体结合的稳定性, 封闭了 3C 蛋白酶的活性区域。Rutin 的氢键网 P2 区活性氨基酸残基主要包括 His161、Gly163、Gly164、Phe170 等, Rupintrivir 包括 His161、Val162、Gly163、Gly164、Phe170 等。

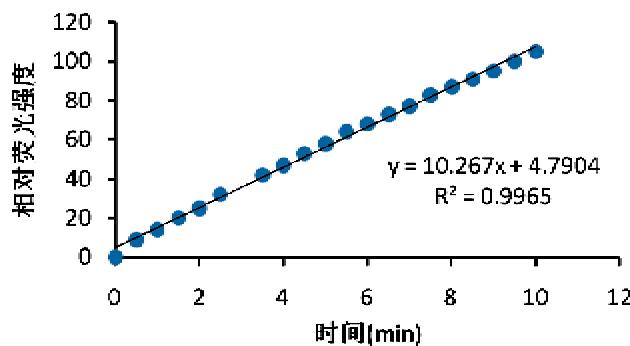


图 6 酶活性的动力学测定
Fig. 6 Reaction rate of 3C protease

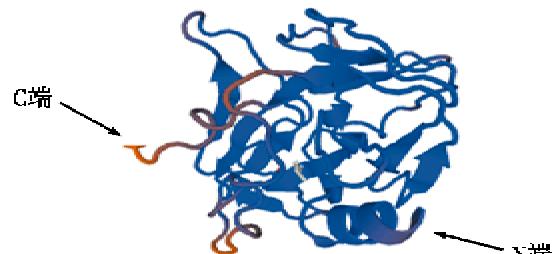


图 7 3C 蛋白酶三级结构预测
Fig. 7 Tertiary structure prediction for 3C protease

表 2 配体与 EV71 3C 蛋白酶结合自由能
Table 2 The binding free energy of ligands with 3C protease

配体 Ligands	构象 Conformations								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Rutin (BE)kJ/mol	-4.16	-2.97	-2.53	-2.23	-2.19	-1.86	-0.93	-0.88	-0.84
Rupintrivir (BE)kJ/mol	-3.01	-2.55	-2.25	-2.16	-2.07	-1.69	-1.68	-1.51	-1.39

讨 论

3C 蛋白酶作为 EV71 关键的功能蛋白, 可识别并切割病毒和宿主特定的多肽位点, 对病毒核酸的复制、结构蛋白的成熟和包装有重要作用, 因此针对 3C 蛋

白酶筛选和设计抗EV71药物备受关注。本研究利用pET28a载体构建3C蛋白酶重组质粒,在大肠埃希菌中诱导表达,分离纯化后检测分析3C蛋白酶活性。结果表明成功实现了3C蛋白酶在体外的诱导表达,

且纯化后仍具有较强的切割多肽活性,为研究3C蛋白酶特性和体外建立3C蛋白酶抑制剂筛选系统奠定了基础。

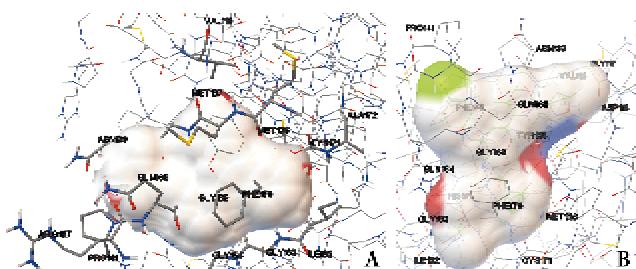


图8 配体Rutin(A)和Rupintrivir(B)与EV71 3C蛋白酶活性位点作用模式

Fig. 8 The binding mode of ligands(Rutin and Rupintrivir)against EV71 3C protease active sites

本研究运用Ni-NTA柱纯化EV71 3C蛋白酶,位于3C蛋白酶C端或N端His标签的存在及其所在位置有可能会影响3C蛋白酶的活性。Kuo等^[14]报道His标签位于3C蛋白酶氨基酸序列的C端不影响该酶活性,而位于N端3C蛋白酶活性会下降20倍。因此,本实验采用C端带His标签的3C蛋白酶进行酶活分析。

Rupintrivir作为EV71 3C蛋白酶抑制剂,抗病毒效果达nmol/L级,通过分子对接模拟合成的多种衍生物也用于抗EV71。Rutin分子结构与Rupintrivir不同,但两者对3C蛋白酶的作用机制颇为相似,均形成氢键网结构封闭3C蛋白酶活性域,His161、Gly163、Gly164、Phe170是共同的氢键残基。Phe170位于3C蛋白酶P2β桶^[15]侧面,是疏水结构的核心,易形成疏水键,由于位置的特殊Phe170氨基易形成氢键。推测Rutin的酚羟基和糖苷羟基及Rupintrivir的类似多肽结构对氢键网结构的形成有重要作用,这对3C蛋白酶抑制剂的设计有指导意义。

【参考文献】

- [1] Alexander JP Jr, Baden L, Pallansch MA, et al. Enterovirus 71 infection and neurologic disease—United States, 1977–1991[J]. J Infect Dis, 1994, 169(4): 905–8.
- [2] Guan D, Vander Sanden S, Zeng H, et al. Population dynamics and genetic diversity of C4 strains of human enterovirus 71 in Mainland China, 1998–2010[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e44386.
- [3] Jacobs SE, Lamson DM, St GK, et al. Human rhinoviruses[J]. Clin Microbiol Rev, 2013, 26(1): 135–162.
- [4] Zhang Y, Tan XJ, Wang HY, et al. An outbreak of hand, foot, and mouth disease associated with subgenotype C4 of human enterovirus 71 in Shandong, China[J]. J Clin Virol, 2009, 44(4): 262–7.
- [5] Zhang Y, Zhu Z, Yang WZ, et al. An emerging recombinant human enterovirus 71 responsible for the 2008 outbreak of hand foot and mouth disease in Fuyang city of China[J]. Virol J, 2010, 7: 94.
- [6] Mao YJ, Sun L, Xie JG, et al. Epidemiological features and spatio-temporal clusters of hand-foot-mouth disease at town level in Fuyang, Anhui Province, China (2008–2013)[J]. Epidemiol Infect, 2016, 144(15): 3184–97.
- [7] An Q, Wu J, Fan X, et al. Using a negative binomial regression model for early warning at the start of a hand foot mouth disease epidemic in Dalian, Liaoning Province, China[J]. PLoS One, 2016, 11(6): e0157815.
- [8] Ooi MII, Wong SC, Podin Y, et al. Human enterovirus 71 disease in Sarawak, Malaysia: a prospective clinical, virological, and molecular epidemiological study[J]. Clin Infect Dis, 2007, 44(5): 646–56.
- [9] Rivera CI, Lloyd RE. Modulation of enteroviral proteinase cleavage of poly(A)-binding protein (PABP) by conformation and PABP-associated factors[J]. Virology, 2008, 375(1): 59–72.
- [10] Chau DH, Yuan J, Zhang H, et al. Coxsackievirus B3 proteases 2A and 3C induce apoptotic cell death through mitochondrial injury and alervage of eIF4GI but not DAP5/p97/NAT1 [J]. Apoptosis, 2007, 12(3): 513–24.
- [11] Kawatkar SP, Gagnon M, Hoesch V, et al. Design and structure-activity relationships of novel inhibitors of human rhinovirus 3C protease[J]. Bioorgan Med Chem Let, 2016, 26(14): 3248–52.
- [12] Wu CM, Cai QX, Lin TY, et al. Structures of Enterovirus 713C proteinase (strain E2004104-TW-CDC) and its complex with rupintrivir[J]. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2013, 69(5): 866–71.
- [13] Cao Z, Ding Y, Ke Z, et al. Luteoloside acts as 3c protease inhibitor of enterovirus 71 in vitro[J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0148693.
- [14] Kuo CJ, Shie JJ, Fang JM, et al. Design, synthesis, and evaluation of 3C protease inhibitors as anti-enterovirus 71 agents[J]. Bioorg Med Chem, 2008, 16(15): 7388–98.
- [15] Cui S, Wang J, Fan T, et al. Crystal structure of human enterovirus 71 3C protease[J]. J Mol Biol, 2011, 408(3): 449–61.