



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113368112 B

(45) 授权公告日 2022. 09. 27

(21) 申请号 202110503114.8

(22) 申请日 2021.05.10

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113368112 A

(43) 申请公布日 2021.09.10

(73) 专利权人 河南农业大学
地址 450046 河南省郑州市郑东新区龙子湖高校园区15号

(72) 发明人 万博 张改平 翟云云 杜永坤
魏战勇 蒋大为 王江 韩世充
何文瑞 任子昱 杨中元 郭娟娟
樊帅 钟函 陈星

(74) 专利代理机构 郑州华隆知识产权代理事务
所(普通合伙) 41144
专利代理师 徐小磊

(51) Int.Cl.
A61K 31/506 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 110101705 A, 2019.08.09
CN 111265521 A, 2020.06.12

US 2008/0167229 A1, 2008.07.10

US 2015/0344443 A1, 2015.12.03

朱惠惠 等. 泛素特异性蛋白酶在抗病毒感染免疫中的作用研究进展.《浙江大学学报(医学版)》.2015, (第05期), 第578-583页.

朱凤 等. 自噬相关去泛素化酶及其小分子抑制剂的研究进展.《生物化学与生物物理进展》.2020, 第47卷(第3期), 第210-223页.

赵伟 等. TBK1在抗病毒感染免疫中的作用及其调控机制.《中山大学学报(医学版)》.2020, 第41卷(第1期), 第1-6页.

Pang Y et al. The ubiquitin proteasome system is necessary for efficient proliferation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus.《Veterinary Microbiology》.2020, 第253卷第108947页.

Yu Z et al. USP1-UAF1 deubiquitinase complex stabilizes TBK1 and enhances antiviral responses.《The Journal of Experimental Medicine》.2017, 第214卷(第12期), 第3553-3563页.

审查员 刘雁南

权利要求书1页 说明书15页
序列表6页 附图7页

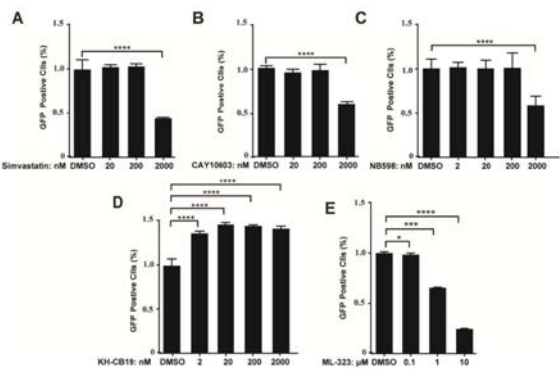
(54) 发明名称

USP1-UAF1抑制剂在制备药物中的应用, 药物组合物

(57) 摘要

本发明属于药物领域, 具体公开了USP1-UAF1抑制剂在制备防治猪繁殖与呼吸综合征药物中的应用, 药物组合物。本发明先在化合物库中筛选出ML323, 通过Western blot、Q-PCR等验证ML323对PRRSV在细胞感染中的作用, 再分别针对USP1、UAF1设计siRNA, 验证下调USP1、UAF1表达对PRRSV感染的影响, 同时构建USP1过表达细胞系, 验证上调USP1表达对PRRSV感染的影响。实验结果表明, ML323对PRRSV在细胞中的增殖具有抑制作用, 特别是ML323抑制细胞USP1、UAF1表

达, 抑制PRRSV N蛋白表达, 抑制PRRSV ORF7mRNA表达。



1. USP1-UAF1抑制剂在制备抗病毒药物中的应用,其特征在于:所述抗病毒药物为抗PRRSV感染药物;所述USP1-UAF1抑制剂为siRNA。

2. USP1-UAF1抑制剂在制备抗病毒药物中的应用,其特征在于:所述抗病毒药物为抗PRRSV感染药物;所述USP1-UAF1抑制剂为ML323。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于:所述ML323抑制PRRSV在细胞中的感染或增殖。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于:所述ML323抑制细胞USP1、UAF1蛋白的表达,降低USP1、UAF1 mRNA的表达水平。

5. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于:所述ML323抑制PRRSV N蛋白的表达,抑制PRRSV ORF7 mRNA的表达,抑制PRRSV子代病毒粒子的形成。

USP1-UAF1抑制剂在制备药物中的应用, 药物组合物

技术领域

[0001] 本发明属于药物领域, 具体涉及USP1-UAF1抑制剂在制备防治猪繁殖与呼吸综合征药物中的应用, 以及药物组合物。

背景技术

[0002] 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 是引起猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS) 的病原体。该病主要侵害猪的呼吸道系统和生殖系统, 怀孕母猪感染后主要表现为情绪低落, 食欲不振, 耳朵腹部皮肤发绀, 随后发生早产, 流产, 死胎, 木乃伊胎, 产后仔猪死亡率增加; 公猪表现为厌食、嗜睡、受精率和配种率下降, 育肥猪则出现食欲不振、呼吸困难。

[0003] PRRSV属于动脉炎病毒科、动脉炎病毒属, 是一种含有囊膜的单股正链RNA病毒。它的基因组大小约为15.4kb, 包含至少10个开放阅读框 (ORF), 由5'端至3'端分别编码ORF1a-ORF1b-ORF2a-ORF2b-ORF3-ORF4-ORF5/ORF5a-ORF6-ORF7。ORF1a和ORF1b约占整个基因组的75%, 主要编码非结构蛋白, 其编码的蛋白主要发挥RNA复制酶和RNA聚合酶作用。ORF2至ORF7编码8种结构蛋白, 主要参与形成病毒粒子。

[0004] PRRSV的感染特征极其复杂, 作为RNA病毒其基因组极易变异, 直到当前仍有新的变异株出现。PRRS还被认为是一种免疫抑制性疾病, 可以抑制天然免疫, 如对体液免疫有部分抑制作用并延迟中和抗体的产生, 也可以抑制细胞免疫, 一旦感染便会终生带毒, 且具有垂直传播特点, 致使仔猪生存率下降。PRRSV对养猪业造成了巨大的损失, 虽然有疫苗使用, 但是不能做到全面有效的保护, 究其原因在于市场上的疫苗质量参差不齐, 每个养殖场的免疫背景也不清晰, 加之疫苗免疫程序不能做到严格管控, 部分不合格疫苗和不规范操作加剧了PRRSV感染, 使得防控工作难度加大。并且到目前为止尚未研究出有效的药物用于PRRSV的疾病防治。因此, 筛选有效的抗病毒药物成为预防和治疗PRRS的主要手段之一。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种USP1-UAF1抑制剂在制备药物中的应用, 尤其是ML323在制备抗病毒药物, 特别是抗PRRSV感染药物中的应用。

[0006] 同时, 本发明还提供一种包含USP1-UAF1抑制剂的药物组合物。

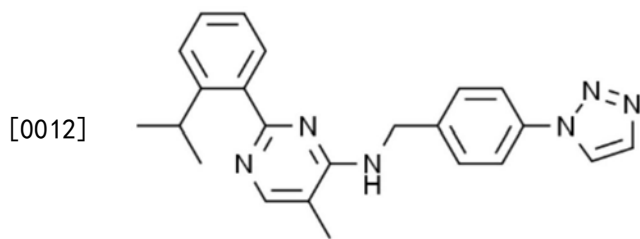
[0007] 为了实现以上目的, 本发明所采用的技术方案是:

[0008] USP1-UAF1抑制剂在制备药物中的应用, 具体的, USP1-UAF1抑制剂在制备抗病毒药物中的应用。

[0009] 作为一种优选的实施方案, USP1-UAF1抑制剂在制备抗PRRSV感染药物中的应用。

[0010] 作为一种优选的实施方式, 所述USP1-UAF1抑制剂为ML323。进一步优选地, 所述ML323在制备抗PRRSV感染药物中的应用。

[0011] ML323是一种强效的、选择性的USP1-UAF1抑制剂, CAS:1572414-83-5, 分子式: $C_{23}H_{24}N_6$, 分子量:384.48, 结构式如下:



[0013] 作为一种优选的实施方式,ML323在制备抗PRRSV感染药物中的应用,具体的,ML323抑制PRRSV在细胞中的感染。实验结果表明,ML323对PRRSV在细胞中的复制和增殖具有抑制作用,特别是ML323抑制细胞USP1、UAF1蛋白的表达,降低USP1、UAF1 mRNA的表达水平,从而抑制PRRSV N蛋白的表达,抑制PRRSV ORF7 mRNA的表达,抑制PRRSV子代病毒粒子的形成。随着ML323浓度的增加,抑制效应逐渐加强;随着ML323作用时间的延长,抑制效应也逐渐加强。并且,ML323对PRRSV感染细胞无毒性作用,不影响细胞的正常增殖。进一步的实验结果表明,PRRSV的非结构蛋白Nsp1 β 主要是K48泛素化类型的修饰,ML323对USP1去泛素化作用的抑制促进了Nsp1 β 在K48位的泛素化链的形成,从而降低了Nsp1 β 的表达。

[0014] 药物组合物,至少包含USP1-UAF1抑制剂,所述USP1-UAF1抑制剂优选ML323。

[0015] 作为一种优选的实施方式,所述药物为抗病毒药物。进一步优选地,所述抗病毒药物为抗PRRSV感染药物。

[0016] 作为一种优选的实施方式,所述药物组合物中ML323的质量百分含量为0.01%-99.99%。进一步优选地,所述药物组合物中ML323的质量百分含量为0.01-50%。进一步优选地,所述药物组合物中ML323的质量百分含量为0.1-5%。

[0017] 作为一种优选的实施方式,所述药物组合物中还包含药学上可接受的载体或辅料。

[0018] 作为一种优选的实施方式,所述ML323作为唯一的药物活性成分,或者与其他药物活性成分联合使用。

[0019] 作为一种优选的实施方式,所述药物组合物可以制成固体制剂或液体制剂。所述固体制剂(口服)如散剂(包括预混剂)、水溶性粉剂(包括水扩散性粉剂、水溶性颗粒剂)、片剂等。所述液体制剂如溶液剂(包括混悬液、乳浊液)、注射剂(包括水针、粉针)等。

[0020] 本发明的有益效果:

[0021] 本发明以PRRSV-BJ4和PRRSV-GFP为模式病毒,利用构建的小分子化合物库筛选显著抑制PRRSV感染并与泛素化相关的小分子化物。以USP1-UAF1复合体的特异性抑制剂ML323为切入点,通过RT-qPCR等方法验证ML323对PRRSV在MARC-145细胞和PAM-Tang细胞中增殖的调控作用,并呈浓度依赖性和时间依赖性。利用siRNA干扰细胞内USP1、UAF1的表达,同时构建过表达细胞系,验证其在PRRSV感染细胞过程中的作用。通过Co-IP方法挖掘PRRSV-BJ4编码病毒蛋白主要结合的泛素化位点,明确PRRSV-BJ4编码病毒蛋白对泛素化作用的调控机制。Western blot、RT-qPCR、TCID₅₀等实验结果表明,ML323可以抑制PRRSV在MARC-145、PAM-Tang细胞中的增殖,PRRSV感染促进USP1、UAF1的表达;siRNA干扰UAF1、USP1表达后,Western blot、RT-qPCR、滴度等实验验证PRRSV感染会受到显著抑制,而过表达USP1会显著促进PRRSV的增殖;Co-IP实验发现PRRSV-BJ4的非结构蛋白Nsp1 β 主要结合K48类型的泛素,并且ML323抑制USP1去泛素化作用的发挥促进了Nsp1 β 在K48位的泛素化链的形成。

[0022] 以上实验结果表明,PRRSV感染会促进USP1、UAF1的表达,而USP1-UAF1复合体的特异性抑制剂ML323可以抑制病毒感染。ML323促进Nsp1BK48泛素链的形成,抑制Nsp1 β 的表达,从而抑制病毒感染。本发明将小分子化合物ML323制备成药物用于PRRS的抗感染治疗,为PRRS治疗药物的开发提供了新的思路。

附图说明

[0023] 图1为实验例中抑制PRRSV-GFP小分子化合物的筛选结果,A-E分别为Simvastatin、CAY10603、NK598、KH-CB19、ML323对PRRSV-GFP病毒的影响;

[0024] 图2为实验例中ML323对MARC-145细胞毒性的检测结果,ML323在1 μ M、3 μ M、10 μ M、20 μ M浓度下的处理MARC-145不同时间点,通过CCK-8检测后在1 μ M、3 μ M、10 μ M浓度下对MARC-145细胞无毒性;

[0025] 图3为实验例中ML323抑制PRRSV在MARC-145感染作用的验证;A:随着ML323浓度的增加,MARC-145细胞中USP1、UAF1蛋白水平和PRRSV-BJ4病毒的N蛋白的表达水平得到抑制,并且随着化合物浓度的增加,抑制情况也更加显著;B:MARC-145细胞中USP1、UAF1的mRNA水平和PRRSV-BJ4病毒的OPF7的mRNA水平随着化合物浓度增加,逐渐加剧抑制作用;C:荧光拍照结果和流式检测结果显示PRRSV-GFP病毒的荧光含量也随着ML323的浓度变化显著抑制;D:TCID₅₀测定的自带病毒的含量也随着ML323的浓度增加逐渐加剧了抑制作用;

[0026] 图4为实验例中ML323抑制PRRSV在PAM-Tang感染作用的验证,A-C分别显示PAM-Tang细胞中USP1、UAF1的mRNA水平和PRRSV-BJ4病毒的OPF7的mRNA水平随着ML323浓度增加,抑制作用逐渐加剧;

[0027] 图5为实验例中ML323以时间依赖抑制PRRSV感染MARC-145细胞,A-C分别显示MARC-145细胞中USP1、UAF1的mRNA水平和PRRSV-BJ4病毒的ORF7的mRNA水平随着化合物作用不同时间点均被抑制;

[0028] 图6为实验例中ML323以时间依赖抑制PRRSV感染PAM-Tang细胞,A-C分别显示PAM-Tang细胞中USP1、UAF1的mRNA水平和PRRSV-BJ4病毒的ORF7的mRNA水平随着化合物作用不同时间点均被抑制;

[0029] 图7为实验例中MARC-145-siUAF1细胞系干扰效率的检测结果;A:Western Blot结果显示,UAF1siRNA1更为显著的抑制UAF1蛋白的表达;B:Q-PCR结果显示,UAF1siRNA1更为显著的抑制UAF1 mRNA的表达;

[0030] 图8为实验例中干扰UAF1抑制PRRSV感染MARC-145细胞的实验结果;A:干扰MARC-145细胞中的UAF1的蛋白抑制PRRSV-BJ4病毒N蛋白的表达;B:干扰UAF1显著抑制PRRSV-BJ4病毒ORF7的mRNA;C:瞬时转染siUAF1到MARC-145细胞中显著抑制PRRSV-BJ4子代病毒的形成;D:荧光拍照和流式检测结果都显示,MARC-145-UAF1siRNA1细胞中PRRSV-GFP病毒的荧光显著低于正常细胞;

[0031] 图9为实验例中PAM-Tang-UAF1siRNA细胞系干扰效率的检测结果;A:Western Blot结果显示,UAF1siRNA2对UAF1蛋白的干扰效率更加显著;B:Q-PCR结果显示,UAF1siRNA2对UAF1的mRNA的水平抑制效果更明显;

[0032] 图10为实验例中干扰UAF1抑制PRRSV感染PAM-Tang细胞的实验结果;A:干扰PAM-Tang细胞中的UAF1的蛋白抑制PRRSV-BJ4病毒N蛋白的表达;B:干扰UAF1显著抑制PRRSV-

BJ4病毒ORF7的mRNA;

[0033] 图11为实验例中MARC-145-USP1siRNA细胞系干扰效率的检测结果;A:Q-PCR结果显示,USP1siRNA3更为显著的抑制USP1的mRNA水平;B:Western Blot结果也同样显示,USP1siRNA3对USP1蛋白水平有更为显著的下调作用;

[0034] 图12为实验例中干扰USP1抑制PRRSV感染MARC-145细胞的实验结果;A:干扰MARC-145细胞中的USP1的蛋白抑制PRRSV-BJ4病毒N蛋白的表达;B:干扰USP1显著抑制PRRSV-BJ4病毒ORF7的mRNA;C:瞬时转染USP1siRNA到MARC-145细胞中显著抑制PRRSV-BJ4子代病毒的形成;

[0035] 图13为实验例中PAM-Tang-USP1siRNA细胞系干扰效率的检测结果;A:Western Blot结果显示,USP1siRNA1对PAM-Tang细胞中USP1蛋白干扰效率最为显著;B:Q-PCR结果显示,USP1siRNA1对USP1的mRNA有最显著的干扰效率;

[0036] 图14为实验例中干扰USP1抑制PRRSV感染PAM-Tang细胞的实验结果;A:PAM-Tang细胞中的USP1蛋白下调后抑制PRRSV-BJ4病毒N蛋白的表达;B:干扰PAM-Tang细胞中的USP1显著抑制PRRSV-BJ4病毒ORF7的mRNA;

[0037] 图15为实验例中MARC-145-USP1过表达细胞系构建表达结果,Western Blot结果显示,过表达USP1后MARC-145细胞中的USP1蛋白水平显著增加;

[0038] 图16为实验例中过表达USP1促进PRRSV感染MARC-145细胞的实验结果;A:过表达MARC-145细胞中的USP1蛋白促进PRRSV-BJ4病毒N蛋白的表达;B:过表达USP1显著促进PRRSV-BJ4子代病毒的形成;C:荧光拍照结果和流式检测结果显示PRRSV-GFP病毒的荧光含量在过表达USP1得到显著的促进;

[0039] 图17为实验例中PAM-Tang-USP1过表达细胞系构建表达结果,Western Blot结果显示,过表达USP1后PAM-Tang细胞中的USP1蛋白水平显著增加;

[0040] 图18为实验例中过表达USP1促进PRRSV感染PAM-Tang细胞的实验结果,过表达PAM-Tang细胞中的USP1蛋白促进PRRSV-BJ4病毒N蛋白的表达;

[0041] 图19为实验例中3×Flag-CMV-Nsp1β真核表达质粒构建表达结果;A:Nsp1β目的序列的扩增;B:Western blot结果显示Nsp1β真核表达质粒成功表达;

[0042] 图20为实验例中Nsp1β主要结合的泛素类型的实验结果,其中3×Flag-CMV-Nsp1β与PRK-HA-WT-Ubi,PRK-HA-K480-Ubi,PRK-HA-K630-Ubi都有相互作用,Co-IP结果显示Nsp1β主要是K48泛素化类型的修饰;

[0043] 图21为实验例中ML323抑制Nsp1β的表达并促进其K48修饰。

[0044] 为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案,以上对实验例中使用的附图作简单地介绍。应当理解,上述附图仅示出了本发明的某些实验例,因此不应被看作是对权利保护范围的限制。对于本领域的普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他相关的附图。

具体实施方式

[0045] 为了使本发明所解决的技术问题、采取的技术方案和达到的技术效果更容易理解,下面结合具体实施例对本发明的技术方案进行详细、完整和清楚地说明。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或者产品制造商建议的条件进行。实施例实验例中使用的试

剂、仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售途径购买获得的常规产品。

[0046] 实施例1

[0047] 本实施例中USP1-UAF1抑制剂ML323在制备抗PRRSV感染药物中的应用。具体的,抗PRRSV感染药物包含有效量的ML323。

[0048] 实施例2

[0049] 本实施例的药物组合物,包含有效量的USP1-UAF1抑制剂ML323和药学上可接受的辅料。所述药物组合物可以制备成散剂,方便饲喂猪只,适量使用。

[0050] 实验例

[0051] 一、材料

[0052] 细胞系:MARC-145(非洲绿猴胚胎肾细胞)、PAM-Tang(猪肺巨噬细胞)和HEK293T(人胚胎肾上皮细胞衍生细胞系)。

[0053] 病毒:猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV-BJ4)和猪繁殖与呼吸综合征重组荧光病毒(PRRSV-GFP)。

[0054] 质粒:Chlo-3×Flag-CMV-USP1-14、SUS-3×Flag-CMV-USP1-14由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,以及3×Flag-CMV-14、PRK-HA、PRK-HA-WT-Ubi、PRK-HA-K480-Ubi、PRK-HA-K630-Ubi质粒。

[0055] 感受态细胞:E.coli Top10感受态细胞购自北京鼎国昌盛公司。

[0056] 细胞培养耗材:MARC-145、HEK293T传代培养基为含有10%的胎牛血清(Fetal Bovine Serum,FBS)的DMEM。PAM-Tang传代培养基为含有10%FBS的1640。MARC-145细胞维持培养基为含有2%FBS的DMEM。PAM-Tang细胞维持培养基为含有2%FBS的1640,以上均购自美国Thermo公司。

[0057] 主要试剂:15%、12.5%、10%、7.5%凝胶快速制备试剂盒均购自上海雅酶生物科技有限公司。ML323购自MCE。DNA Marker均购自北京全式金生物。蛋白Marker购自SMOBIO。Monoclonal Anti-HA-Peroxidase antibody produced in mouse、单克隆抗-FLAG[®]M2-过氧化物酶(HRP)小鼠抗体,二甲亚砜(DMSO)购自美国Sigma公司。T4 DNA连接酶,EcoR 1-HF内切酶,Xba I内切酶购自NEW ENGLAND Biolabs。USP1单克隆抗体,UAF1(WDR48)单克隆抗体均购自proteintech。线性聚乙烯亚胺(PEI)购自上海YEASEN。HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。SsoAdvanced Universal SYBR[®]Green Supermix购自英国BIO-RAD。Takara Primer STAR Max DNA Polymerase购自日本TAKARA。

[0058] 细胞维持培养基:吸取1mL FBS加入到49mL DMEM培养基中,配制成2%FBS的DMEM;吸取1mL FBS加入到49mL 1640培养基中,配制成2%FBS的1640。

[0059] 细胞冻存液:FBS:DMSO按照9:1的比例配制得到。

[0060] M2洗脱Buffer:取100mL玻璃烧杯,加入0.5mL的1M Tris-HCl、0.5mL的NP-40,0.1mL的5M NaCl,0.6mL的0.5M EDTA,0.6mL的0.5M EGTA,定容至100mL。

[0061] 2×SDS Loading:取1L玻璃烧杯,加入60.57g Tris,20g SDS,100mL甘油,0.1g溴酚蓝,定容至500mL;使用时加入β-巯基乙醇(每50mL加入1mL,现用现配)。

[0062] PEI:取1L玻璃烧杯,将1g PEI 25000粉末加入900mL超纯水,边搅拌边滴加盐酸(12mol/L)调节pH,直至pH<2.0,至完全溶解,整个过程保持pH<2.0。边搅拌边滴加入NaOH

(10mol/L) 调节pH,直至pH至6.9-7.1。将溶液转入量筒,定容至1L。使用0.22 μ m滤器过滤除菌,得到1mg/mL的储存液。

[0063] PBS:分别称量NaCl 80g,KCl 2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 14.4g, KH_2PO_4 2.4g于1L烧杯中,加入800mL的去离子水,混合溶解;调节pH至7.0-7.2,定容至1L;湿热灭菌,室温保存。使用时按水:10 $\times$ PBS=9:1稀释,即1 $\times$ PBS。

[0064] TBS/TBST:称量NaCl 88g,取1M Tris-HCl (PH=8.0) 200mL于1L烧杯中,加去离子水定容至1L,室温保存。使用时按水:10 $\times$ TBS=9:1稀释,每1L 1 $\times$ TBS中加3mL 25% Tween-20,即1 $\times$ TBST。

[0065] 二、实验方法

[0066] A、E.coli Top10感受态的制备

[0067] CaCl_2 法制备E.coli Top10感受态细胞需全程无菌,具体操作如下:

[0068] (1) 取Top10甘油菌,划线接种于无抗生素的LB固体平板培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养;

[0069] (2) 挑取单个菌落接种于含2mL LB的玻璃试管中,37 $^{\circ}\text{C}$ 220rpm培养过夜;

[0070] (3) 次日将2mL菌液接种于250mL锥形瓶中,添加100mL LB液体培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 220rpm培养1.5-2h;

[0071] (4) 定时监测菌液的OD600值(培养1小时后每半小时测定一次);

[0072] (5) 当OD600值达到0.4时,从摇床中取出摇瓶,置于冰上冷却15min;

[0073] (6) 冰浴后的菌液转移至50mL离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 4000g离心10min,弃上清;

[0074] (7) 按每5mL菌液加入1mL已灭菌预冷的100mM CaCl_2 ,吹打重悬菌体;

[0075] (8) 冰浴30min后,4 $^{\circ}\text{C}$ 4000g离心10min,弃上清;

[0076] (9) 每50mL菌液(锥形瓶培养的原菌液)加入1mL已灭菌预冷的15%甘油、100mM CaCl_2 ,吹打重悬菌体;

[0077] (10) 按50 μ L等份分装至1.5-2mL离心管中,于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存(如需要,可在液氮中速冻后保存于-80 $^{\circ}\text{C}$)。

[0078] B、引物设计与合成

[0079] 1、siRNA引物设计:通过NCBI数据库查询非洲绿猴UAF1基因组序列(GeneBank:NW_023666063.1),以及猪UAF1基因序列(GeneBank:NC_010455.5),根据非洲绿猴UAF1基因和猪UAF1基因序列分别设计两条siRNA,siRNA引物序列见表1,SEQ ID NO:1-8。通过NCBI数据库查询非洲绿猴USP1基因组序列(GeneBank:NW_023666033.1),以及猪USP1基因序列(GeneBank:NC_010448.4),根据非洲绿猴USP1基因和猪USP1基因序列分别设计三条siRNA,siRNA引物序列见表2,SEQ ID NO:9-20。

[0080] 表1 siRNA引物序列表

名称	序列 (5'-3')
Chlo- UAF1siRNA1	F: GGUCGAGACUCUAUCAUAATT R: UUAUGAUAGAGUCUCGACCTT
Chlo- UAF1siRNA2	F: CCACUAGCUCUUCUAAUAATT R: UUAUUAGAAGAGCUAGUGGTT
SUS- UAF1siRNA1	F: CCUGACAUUCGGGUGCUAATT R: UUAGCACCCGAAUGUCAGGTT
SUS- UAF1siRNA2	F: CCACUAGCUCUUCUAAUAATT R: UUAUUAGAAGAGCUAGUGGTT

[0082] 表2 siRNA引物序列表

名称	序列 (5'-3')
Chlo- USP1siRNA1	F: GGAUUUCACAGAUUCUCAATT R: UUGAGAAUCUGUGAAAUCCTT
Chlo- USP1siRNA2	F: GCAGUUUACAGUCCUAAUUTT R: AUUAAGGACUGUAAACUGCTT
Chlo- USP1siRNA3	F: GGAUUUGAAUCUCCAGGAATT R: UUCCUGGAGAUUCAAUCCCTT
SUS- USP1siRNA1	F: GGAUUUCACAGAUUCUCAATT R: UUGAGAAUCUGUGAAAUCCTT
SUS- USP1siRNA2	F: GCAGUUUACAGUCCUAAUUTT R: AUUAAGGACUGUAAACUGCTT
SUS- USP1siRNA3	F: GGAUUUGAAUCUCCAGGAATT R: UUCCUGGAGAUUCAAUCCCTT

[0084] 2、Q-PCR扩增引物设计

[0085] 通过NCBI数据库查询所要检测的基因mRNA序列,利用Primer7.0软件设计Q-PCR引物,见表3,SEQ ID NO:21-34。

[0086] 表3 Q-PCR引物序表

名称	序列 (5'-3')	片段大小 (bp)
Q- Chlo-USP1-F	ACACAACCTCATGCTTGTGGATT	214
Q- Chlo-USP1-R	ACTGGCACACTGATGTCCTGCTG	
Q- Chlo-UAF1-F	GGGTGAGACTGAGTCGATGC	180
Q- Chlo-UAF1-R	CGGACTTGGAGCATGTCACT	
Q- Chlo-β-actin-F	CGTGGACATCCGTAAAGAC	182
Q- Chlo-β-actin-R	GGAAGGTGGACAGCGAGGC	
Q- SUS-USP1-F	TGGGACTGAATAATCTCGGCA	178
Q- SUS-USP1-R	TCTTCTTTGCAATTTCATTTCCT	
Q- SUS-UAF1-F	GGGTGAGACTGAGTCGATGC	180
Q- SUS-UAF1-R	CGGACTTGGAGCATGTCACT	
Q- SUS-β-actin-F	CTGAACCCCAAAGCCAACCGT	317
Q- SUS-β-actin-R	TTCTCCTTGATGTCCCGCACG	
Q- PRRSV-ORF7-F	AGATCATCGCCCAACAAAAC	144
Q- PRRSV-ORF7-R	GACACAATTGCCGCTCACTA	

[0088] C、CCK-8检测细胞毒性:

[0089] 将MARC-145细胞以 1×10^4 个/孔接种于96孔板,当细胞密度达到80%时进行CCK-8检测。具体操作如下:当细胞密度达到80%时,弃去原培养基,用10%FBS的DMEM按0 μ M,1 μ M,3 μ M,10 μ M,20 μ M,30 μ M稀释化合物,每孔100 μ L,每个浓度重复18个孔。分别于6h,12h,24h,36h,48h,72h加入10 μ L的CCK-8检测试剂,放置于37℃二氧化碳培养箱反应2h。每个时间点各浓度重复检测3个样本,使用全波长酶标仪于450nm处检测吸光值。

[0090] D、真核表达质粒的构建

[0091] 1、Nsp1 β 表达质粒PCR扩增引物设计

[0092] PRRSV-BJ4 Nsp1 β 基因PCR扩增引物序列见表4,SEQ ID NO:35-36(斜体为酶切位点,加粗为同源臂)。

[0093] 表4 PCR扩增引物序列表

	名称	序列 (5'-3')	限制性内切酶
[0094]	p-PRRSV-BJ4-Nsp1 β -Flag-F	TGCGGCCGCGA <i>ATTCGGAGCAACTCACGTGTTGACC</i>	EcoR I
	p-PRRSV-BJ4-Nsp1 β -Flag-R	CCGGGATCCTCTAG <i>AGTACCACTTGTGACTGCCAAA</i>	Xba I

[0095] 2、Nsp1 β 目的片段扩增

[0096] 分别将引物加入适量的去离子水溶解为终浓度100 μ M,然后分别取上下游引物各20 μ L,加入160 μ L的去离子水稀释至20 μ M,命名为p-PRRSV-BJ4-Nsp1 β -Flag-F/R混合引物。PCR扩增体系为(30 μ L):H₂O 8 μ L,PRRSV-BJ4-cDNA 5 μ L,p-PRRSV-BJ4-Nsp1 β -Flag-F/R混合引物2 μ L,PrimerSTAR Max DNA Polymerase 15 μ L。

[0097] PCR扩增程序为:98℃3min;98℃30s,60℃30s,72℃1min 30s,35cycle;72℃10min,4℃hold。

[0098] 3、载体质粒酶切与回收

[0099] 质粒酶切体系为(50 μ L):H₂O 39 μ L,3 $\times$ Flag-CMV-14质粒(1 μ g/ μ L) 2 μ L,10 $\times$ NEB Buffer 2 5 μ L,Xba I 2 μ L,EcoR I 2 μ L。

[0100] 胶回收酶切产物:37℃酶切2h后,吸取12 μ L 6 $\times$ DNA Loading Buffer加入酶切产物中,电泳完毕后在紫外灯下切取目的DNA片段并用胶回收试剂盒回收,存放于-20℃冰箱。

[0101] 4、重组质粒的连接、转化及鉴定

[0102] 目的片段与载体连接:将酶切的载体与目的片段通过同源重组试剂盒进行连接,连接体系为(20 μ L):双酶切的载体胶回收片段6 μ L,胶回收的目的片段6 μ L,5 $\times$ CE II Buffer4 μ L,Exnase II 2 μ L,ddH₂O 2 μ L;反应程序为:37℃30min,4℃hold。

[0103] 连接产物转化至E.coli Top10感受态细胞,涂板,在37℃培养箱过夜培养,每个平板挑取4个单菌落进行扩大培养并进行测序。

[0104] 5、中提重组质粒并鉴定表达

[0105] 将测序正确的菌液吸出200 μ L加入到300mL的含有100 μ g/mL Amp的液体LB培养基中,于37℃220rpm培养15h左右,之后利用质粒中提试剂盒提取,并定容到1 μ g/ μ L。

[0106] 将HEK293T细胞按照 1×10^6 个/孔接种于12孔板中,共需要5个孔。待细胞密度达到70%进行转染。实验设计为3 $\times$ Flag-CMV-14(空载),p-PRRSV-BJ4-Nsp1 β -Flag。PEI转染体系为:A液,质粒2 μ L,Opti-MEM 50 μ L;B液,PEI 4 μ L,Opti-MEM 50 μ L。

[0107] 将B液配好螺旋轻柔吹打混匀,室温静置5min,同时配A液螺旋轻柔吹打混匀,5min后将A液螺旋加入B液中,螺旋轻柔吹打混匀,室温静置20min,静置结束后将混合液轻轻滴

加到细胞培养基中,轻轻晃动12孔板,于37℃二氧化碳培养箱培养24h,之后进行Western Blot检测鉴定质粒的表达情况。

[0108] E、流式检测:

[0109] 将细胞以 2.5×10^4 个/孔接种于24孔板,具体操作步骤如下:细胞样品处理结束后,于48h弃去培养基,用PBS洗涤2遍,胰酶润洗1遍,37℃二氧化碳培养箱中消化5-6min后加入500 μ L 10%FBS的DMEM终止消化,将消化的细胞吹散至单个细胞后,转移至EP管中进行流式检测。以没有感染PRRSV-GFP的MARC-145细胞的为空白对照,数据利用Flowjo软件分析。

[0110] F、PPRSV TCID₅₀测定:

[0111] 1、病毒的扩增和收取

[0112] 将MARC-145细胞按照 1×10^5 个/孔接种于12孔板,具体操作步骤如下:

[0113] (1) 化合物预处理:当细胞密度达到40%时,弃去原培养基,用ML323按0 μ M,1 μ M,3 μ M,10 μ M各浓度预处理细胞4h;

[0114] (2) 病毒接种:4h后弃去培养基,PBS清洗1遍后,以MOI=10感染PRRSV-BJ4;

[0115] (3) 换液:细胞感染PRRSV-BJ4 2h后弃去原培养基,PBS清洗2遍后加入维持培养基后继续培养48h;

[0116] (4) 病毒收集:于-80℃反复冻融两次,融化的病毒于5000rpm离心5min,吸取上清液进行TCID₅₀测定,或暂时保存于-80℃冰箱。

[0117] 2、病毒TCID₅₀的测定

[0118] MARC-145细胞以 1×10^4 个/孔接种于96孔板,当细胞密度达到80%时进行TCID₅₀测定,方法如下:

[0119] (1) 病毒液用纯的DMEM以10倍体积倍比稀释 10^{-1} - 10^{-10} 倍后,加入细胞在37℃孵育1h;

[0120] (2) 弃去病毒液,细胞换为2%FBS的DMEM维持培养基在37℃、5%CO₂的环境下培养;

[0121] (3) 每隔12h观察细胞病变情况,连续观察5天并记录每个稀释比例的病变孔数,通过Reed-Muench方法计算出TCID₅₀。

[0122] G、Western Blot检测:

[0123] 1、细胞总蛋白的收取

[0124] 以12孔板的细胞收取蛋白为例,方法如下:

[0125] (1) 弃去孔中原培养基,每孔加入100 μ L 2 $\times$ SDS蛋白Loading Buffer,移液枪扎上枪头,沿着顺时针方向搅拌1-2min,待液体由粘稠变得顺滑,将其转移至1.5mL EP管中;

[0126] (2) 95℃,敷育30min;

[0127] (3) 30min后将样品取出离心震荡混匀,可于-20℃冰箱存放或进行下一步实验。

[0128] 2、电泳及转膜

[0129] (1) SDS-PAGE凝胶电泳:向电泳槽中加入电泳缓冲液,于加样孔中加入10 μ L样品,电压120V待样品进入分离胶后调至160V,继续电泳40min;

[0130] (2) 转膜:电泳结束后,电压110V,75min后将蛋白转移到PVDF膜上;

[0131] (3) 封闭:PVDF膜浸入含5%脱脂奶粉的TBST中,室温封闭30min;

- [0132] (4) 洗膜:将5%脱脂奶粉的TBST回收-20℃冻存,TBS清洗1遍;
- [0133] (5) 孵育一抗:然后用含有2%脱脂奶粉的TBST稀释的单克隆抗体(1:1000稀释),与PVDF膜室温40rpm孵育1h;
- [0134] (6) 洗膜:将2%脱脂奶粉的TBST稀释的单克隆抗体回收-20℃冻存,室温60rpm,TBST洗4次,5min每次,TBS洗2次,5min每次;
- [0135] (7) 孵育二抗:配置含有2%脱脂奶粉的TBST稀释的HRP标记的二抗(1:5000稀释),与PVDF膜室温40rpm孵育1h;
- [0136] (8) 洗膜:将2%脱脂奶粉的TBST稀释的HRP标记的二抗回收-20℃冻存,室温60rpm,TBST洗4次,5min每次,TBS洗2次,5min每次;
- [0137] (9) 显影。
- [0138] H、Q-PCR检测:
- [0139] 1、提取细胞总RNA
- [0140] 以12孔板的细胞收取RNA为例,方法如下:
- [0141] (1) 弃去原培养基,吸取500μL RNAiso Plus加入细胞中,裂解2min,用移液枪吹打20次,转移至新的进口1.5mL EP管中;
- [0142] (2) 每管加入100μL氯仿剧烈震荡10s,静置5min;
- [0143] (3) 12000rpm 4℃离心15min,用移液器缓慢地吸取200μL上层到提前标记的1.5mL EP管中,然后加入等体积的异丙醇,上下轻柔颠倒混匀沉淀,冰上静置10min;
- [0144] (4) 12000rpm 4℃离心15min后弃去上清,加入1mL 70%乙醇(DEPC水配制)洗涤沉淀;
- [0145] (5) 12000rpm 4℃离心10min后弃去上清;
- [0146] (6) 加入的100μL DEPC水,室温溶解10min;
- [0147] (7) 震荡混匀,测定浓度定容至1μg/μL,进行反转录。
- [0148] 2、反转录合成cDNA
- [0149] 将提取的RNA进行反转录,具体的操作为:反应体系(20μL):RNase-free H₂O 11μL,5×Hiscript qRTSuper MIX 4μL,Total RNA 5μL;反应程序:50℃15min,85℃5s,4℃Hold;反应结束后,cDNA放置-80℃冰箱保存。
- [0150] 3、Q-PCR检测分析
- [0151] Q-PCR扩增体系(11μL):SYBR Green mix 5μL,上/下游引物(10μM)各0.5μL,cDNA 5μL。
- [0152] I、MARC-145-siRNA与PAM-Tang-siRNA细胞系构建与检测:
- [0153] 将MARC-145或PAM-Tang细胞按照 1×10^6 个/孔接种于6孔板中,在二氧化碳培养箱中培养12-18h,待细胞密度达到70%进行siRNA转染。实验设计分别为Negative Control (NC)、siRNA1、siRNA2、siRNA3。Lipofectamine 2000转染体系为:取3μL siRNA,取6μL Lipofectamine 2000,加入到200μL Opti-MEM中,轻轻混匀,室温静置20min,静置结束后将混合液轻轻滴加到细胞培养基中,轻轻晃动6孔板,于37℃二氧化碳培养箱培养8-10h,之后弃去原培养基,换成10%FBS的DMEM继续培养36-48h,然后取一部分进行WB、Q-PCR检测鉴定siRNA的干扰效率,另外一部分细胞感染PRRSV-BJ4或者感染PRRSV-GFP,进行下一步验证。
- [0154] J、Co-IP检测:

[0155] (1) 细胞样品制备:转染方法同质粒鉴定方法,在二氧化碳培养箱中培养24h后进行收样;

[0156] (2) 取出细胞,弃去培养基,PBS洗涤一次,加入1mL的PBS,用细胞刮刮下细胞,收集至1.5mL的EP管中;

[0157] (3) 于4℃离心机1000g离心5min,弃上清,加入1mL的NP-40裂解液,用1mL枪头吹打20次,冰上静置裂解10min;

[0158] (4) 超声破碎,超声5s间歇5s,共计超声3次;

[0159] (5) 4℃离心机,12000g离心10min,小心的将上清转移至新的1.5mL的EP管中;

[0160] (6) 取出50μL加入50μL的2×SDS Loading到新的1.5mL的EP管中,孵育器95℃变性10min,此管标记为Input;

[0161] (7) 另取新的1.5mL的EP管,取900μL上清加入10μL的Flag beads,4℃翻转结合3h,取出后4℃9000g离心1min,小心的弃去上清;

[0162] (8) 加入1mL的M2洗脱Buffer,颠倒混匀20次后,4℃离心机9000g离心30s,用真空泵小心吸去上清;此步骤重复操作3次;

[0163] (9) 4℃离心机,9000g离心1min,用移液枪小心的弃干净上清,加入100μL的2×SDS Loading,95℃孵育器变性30min,此管标记为IP;

[0164] (10) 将样品进行SDS PAGE凝胶电泳检测。

[0165] K、数据处理:

[0166] 利用t-test对Q-PCR结果进行分析检验,根据t-test检验结果: $P>0.05$ ns为两组数据差异不显著, $P<0.05$ *为两组数据差异显著; $P<0.001$ **为两组数据差异极显著; $P<0.0001$ ***为两组数据差异非常显著; $P<0.00009$ ****为两组数据差异极其显著。

[0167] 三、实验结果与分析

[0168] 1、抑制PRRSV-GFP小分子化合物的筛选

[0169] 以PRRSV-GFP为模式病毒,将MARC-145细胞以 1×10^5 个/孔接种于12孔板中,先经化合物预处理4h后,以 $MOI=10$ 的PRRSV-GFP感染细胞1h,后换上细胞维持液,于48h收样进行流式检测,结果见图1, $P>0.05$ ns, $P<0.05$ *, $P<0.0001$ ***, $P<0.00009$ ****。

[0170] 从图1可以看出,ML323以浓度依赖显著的抑制病毒的GFP荧光强度。

[0171] 2、USP1抑制剂ML323对MARC-145细胞毒性的影响

[0172] 通过CCK-8检测不同浓度的ML323对MARC-145细胞增殖活性的影响,结果见图2, $P>0.05$ ns, $P<0.001$ **, $P<0.0001$ ***。

[0173] 从图2可以看出,在72h之内化合物ML323在1μM、3μM、10μM、20μM浓度下对MARC-145细胞的增殖均无影响。

[0174] 3、ML323抑制PRRSV感染细胞具有浓度依赖性

[0175] (1) ML323抑制PRRSV感染MARC-145细胞具有浓度依赖性

[0176] 通过Western Blot,Q-PCR检测,流式检测,TCID₅₀测定等实验测定ML323抑制PRRSV在MARC-145细胞中的感染情况。取ML323在0μM、1μM、3μM、10μM浓度预处理MARC-145细胞4h,后弃去原培养基,PBS洗一遍,以 $MOI=10$ 的PRRSV病毒液稀释液,37℃二氧化碳培养箱吸附1h后换为维持培养基,于48h进行收样检测,结果见图3, $P>0.05$ ns, $P<0.05$ *, $P<0.001$ **, $P<0.0001$ ***, $P<0.00009$ ****。

[0177] 从图3可以看出,Western Blot结果显示ML323抑制细胞USP1、UAF1蛋白水平的表达,同时抑制PRRSV-BJ4病毒N蛋白的表达,并且随着化合物浓度的增加,抑制效果也逐渐显著;Q-PCR检测结果表明,随着化合物浓度的增加可以抑制USP1、UAF1的mRNA表达水平,同时抑制PRRSV-BJ4病毒ORF7的mRNA表达;TCID₅₀测定表明随着化合物浓度的增加,有效的抑制了PRRSV-BJ4子代病毒粒子的形成;流式检测为:在48h利用荧光显微镜拍照观察细胞中GFP荧光强度,同时用流式细胞仪检测细胞中GFP荧光强度,检测结果表明MARC-145细胞中GFP荧光强度随着化合物浓度的增加显著降低,表明化合物ML323可以显著的抑制PRRSV-GFP在MARC-145细胞中增殖。

[0178] (2) ML323抑制PRRSV感染PAM-Tang细胞具有浓度依赖性

[0179] 同上,检测ML323抑制PRRSV在PAM-Tang细胞中的感染情况,结果见图4, $P>0.05ns$, $P<0.0001***$, $P<0.00009****$ 。

[0180] 从图4可以看出,Q-PCR检测结果表明,随着化合物浓度的增加抑制了USP1、UAF1的mRNA表达水平,同时抑制PRRSV-BJ4病毒ORF7的mRNA表达。

[0181] 4、ML323抑制PRRSV感染细胞具有时间依赖性

[0182] (1) ML323抑制PRRSV感染MARC-145细胞具有时间依赖性

[0183] 在化合物10 μ M浓度的处理条件下,通过Q-PCR测定ML323处理不同时间点对PRRSV感染细胞的情况,结果见图5, $P>0.05ns$, $P<0.05*$, $P<0.001**$, $P<0.0001***$ 。

[0184] 从图5可以看出,ML323处理不同时间点均可抑制USP1、UAF1的mRNA表达水平,同时抑制PRRSV-BJ4病毒ORF7的mRNA表达。

[0185] (2) ML323抑制PRRSV感染PAM-Tang细胞具有时间依赖性

[0186] 同上,通过Q-PCR检测ML323在浓度10 μ M处理条件下,对PRRSV在PAM-Tang细胞中的影响,结果见图6, $P>0.05ns$, $P<0.05*$, $P<0.001**$, $P<0.0001***$ 。

[0187] 从图6可以看粗,随着化合物处理时间的延长逐渐加剧了抑制PRRSV-BJ4病毒ORF7的mRNA表达。

[0188] 5、UAF1siRNA细胞系的构建以及对PRRSV感染细胞的影响

[0189] (1) MARC-145-UAF1siRNA细胞系的构建

[0190] 为检测UAF1在PRRSV感染中的作用,设计两条针对UAF1的小干扰RNA(引物见表1),瞬时转染MARC-145细胞48h后,通过Western Blot和Q-PCR检测siRNA的干扰效率,结果见图7, $P>0.05ns$, $P<0.0001***$, $P<0.00009****$ 。

[0191] 从图7可以看出,设计的两条siRNA在蛋白水平和mRNA水平都有干扰作用,其中UAF1siRNA1的干扰效率更为显著。

[0192] (2) MARC-145-UAF1siRNA细胞系对PRRSV感染的影响

[0193] 以上确定MARC-145-UAF1siRNA1的干扰效率后,将siRNA转染至MARC-145细胞,48h后感染PRRSV于37℃二氧化碳培养箱中吸附1h,后换上维持培养基于48h进行Western Blot,Q-PCR检测,流式检测,TCID₅₀测定等实验,结果见图8, $P>0.05ns$, $P<0.05*$, $P<0.0001***$, $P<0.00009****$ 。

[0194] 从图8可以看出,Western Blot结果表明干扰UAF1的蛋白表达后,可以抑制PRRSV-BJ4病毒N蛋白的表达;Q-PCR检测结果表明干扰UAF1的mRNA表达后,PRRSV-BJ4病毒ORF7的mRNA表达也显著下调;TCID₅₀测定表明瞬时转染siUAF1到MARC-145细胞后,有效的抑制了

PRRSV-BJ4子代病毒粒子的形成;流式检测为:瞬时转染UAF1siRNA后,通过荧光显微镜拍照观察细胞中GFP荧光强度和用流式细胞仪检测细胞中GFP荧光强度,检测结果表明MARC-145-UAF1siRNA1细胞中GFP荧光强度显著低于对照组,表明干扰UAF1可以显著的抑制PRRSV-GFP在MARC-145细胞中的增殖。

[0195] (3) PAM-Tang-UAF1siRNA细胞系的构建

[0196] 针对PAM-Tang细胞构建两条UAF1的小干扰RNA(引物见表1),实验操作同MARC-145细胞一样,瞬时转染PAM-Tang细胞48h后通过Western Blot和Q-PCR检测siRNA的干扰效率,结果见图9, $P>0.05$ ns, $P<0.001$ **, $P<0.0001$ ***。

[0197] 从图9可以看出,设计的两条siRNA在蛋白水平和mRNA都有干扰作用,其中UAF1siRNA2的干扰效率更显著。

[0198] (4) PAM-Tang-UAF1siRNA细胞系对PRRSV感染的影响

[0199] 以上确定PAM-Tang-UAF1siRNA2的干扰效率后,瞬时转染UAF1siRNA2到PAM-Tang细胞中,48h后感染PRRSV在37℃二氧化碳培养箱中吸附1h,之后换上维持培养基于48h后进行检测,主要通过Western Blot,Q-PCR检测,结果见图10, $P>0.05$ ns, $P<0.00009$ ****。

[0200] 从图10可以看出,Western Blot结果表明干扰PAM-Tang细胞UAF1蛋白的表达后,抑制了PRRSV-BJ4病毒N蛋白的表达;Q-PCR检测结果表明干扰PAM-Tang细胞UAF1的mRNA表达后,抑制了PRRSV-BJ4病毒ORF7的mRNA表达。

[0201] 6、USP1siRNA细胞系的构建以及对PRRSV感染细胞的影响

[0202] (1) MARC-145-USP1siRNA细胞系的构建

[0203] 为检测USP1在PRRSV感染中的作用,设计三条针对USP1的小干扰RNA(引物见表2),瞬时转染MARC-145细胞48h后通过Western Blot和Q-PCR检测siRNA的干扰效率,结果见图11, $P>0.05$ ns, $P<0.00009$ ****。

[0204] 从图11可以看出,设计的三条siRNA在蛋白水平和mRNA都有干扰作用,其中USP1siRNA3的干扰效率更加明显。

[0205] (2) MARC-145-USP1siRNA细胞系对PRRSV感染的影响

[0206] 以上确定MARC-145-USP1siRNA3的干扰效率后,构建MARC-145-USP1siRNA细胞系后,感染PRRSV-BJ4于二氧化碳培养箱吸附1h,后换上维持培养基于48h进行Western Blot检测,Q-PCR检测和TCID₅₀测定,结果见图12, $P>0.05$ ns, $P<0.05$ *, $P<0.00009$ ****。

[0207] 从图12可以看出,Western Blot结果表明干扰MARC-145细胞USP1蛋白的表达后,可以显著抑制PRRSV-BJ4病毒N蛋白的表达;Q-PCR检测结果表明干扰MARC-145细胞USP1的mRNA表达后,PRRSV-BJ4 ORF7的mRNA水平也显著下调;TCID₅₀测定表明瞬时转染USP1siRNA到MARC-145细胞后,有效的抑制了PRRSV-BJ4子代病毒粒子的形成。

[0208] (3) PAM-Tang-USP1siRNA细胞系的构建

[0209] 针对PAM-Tang细胞构建三条针对USP1的小干扰RNA(引物见表2),实验操作同MARC-145细胞一样,瞬时转染PAM-Tang细胞48h后通过Western Blot和Q-PCR检测siRNA的干扰效率,结果见图13, $P>0.05$ ns, $P<0.05$ *, $P<0.0001$ ***。

[0210] 从图13可以看出,设计的三条siRNA在蛋白水平和mRNA都有干扰作用,其中USP1siRNA1的干扰效率更加显著。

[0211] (4) PAM-Tang-USP1siRNA细胞系对PRRSV感染的影响

[0212] 以上确定PAM-Tang-USP1siRNA1的干扰效率后,构建PAM-Tang-USP1siRNA细胞,感染病毒操作同MARC-145-USP1siRNA细胞系对PRRSV感染的影响,进行Western Blot检测,Q-PCR检测,结果见图14, $P>0.05$ ns, $P<0.00009$ ****。

[0213] 从图14可以看出,Western Blot结果表明干扰PAM-Tang细胞USP1蛋白的表达后,同样显著抑制PRRSV-BJ4病毒N蛋白的表达;Q-PCR检测结果也表明干扰PAM-Tang细胞USP1的mRNA表达后,也显著下调PRRSV-BJ4病毒ORF7的mRNA水平。

[0214] 7、过表达USP1细胞系的构建以及对PRRSV感染细胞的影响

[0215] (1) MARC-145过表达USP1细胞系的构建

[0216] 为检测USP1在PRRSV感染中的作用,构建猴源的USP1过表达质粒,瞬时转染MARC-145细胞24h后通过Western Blot检测USP1过表达效率,结果见图15。

[0217] 从图15可以看出,分别瞬时转染1 μ g、2 μ g的Chlo-3 $\times$ Flag-CMV-USP1-14质粒后,用Flag单克隆抗体孵育,在110kDa处有特异性条带,同时孵育USP1抗体,可以看出过表达USP1后蛋白表达水平上调。表明过表达质粒构建表达成功,USP1过表达细胞系构建成功。

[0218] (2) 在MARC-145细胞中过表达USP1对PRRSV感染的影响

[0219] 瞬时转染2 μ g的Chlo-3 $\times$ Flag-CMV-USP1-14质粒到MARC-145细胞24h后,感染PRRSV在37 $^{\circ}$ C二氧化碳培养箱中吸附1h,之后换上维持培养基于48h进行检测,主要通过Western Blot,流式检测,TCID₅₀测定等实验,结果见图16, $P>0.05$ ns, $P<0.05$ *, $P<0.0001$ ***。

[0220] 从图16可以看出,Western Blot结果表明过表达MARC-145细胞中的USP1蛋白表达后,促进了PRRSV-BJ4病毒N蛋白的表达;TCID₅₀测定表明过表达USP1到MARC-145细胞后,有效的促进了PRRSV-BJ4子代病毒粒子的形成;流式检测为:过表达USP1后利用荧光显微镜拍照观察细胞中GFP荧光强度,同时用流式细胞仪检测细胞中GFP荧光强度,检测结果表明MARC-145细胞中GFP荧光显著增多,说明过表达USP1可以显著的促进PRRSV在MARC-145细胞中的增殖。

[0221] (3) PAM-Tang过表达USP1细胞系的构建

[0222] 同上,构建猪源的USP1过表达质粒,之后通过Western Blot检测USP1过表达效率,结果见图17。

[0223] 从图17可以看出,猪源过表达质粒构建表达成功,USP1过表达细胞系构建成功。

[0224] (4) 在PAM-Tang细胞中过表达USP1对PRRSV感染的影响

[0225] 瞬时转染2 μ g的SUS-3 $\times$ Flag-CMV-USP1-14质粒至PAM-Tang细胞中,感染PRRSV-BJ4于细胞培养箱中吸附1h,换上维持培养基48h后进行检测,主要通过Western Blot检测,结果见图18。

[0226] 从图18可以看出,Western Blot结果表明PAM-Tang细胞USP1蛋白过表达后,促进了PRRSV-BJ4 N蛋白的表达。

[0227] 8、ML323对PRRSV非结构蛋白Nsp1 β 的影响

[0228] (1) 3 $\times$ Flag-CMV-Nsp1 β 真核表达质粒的构建与鉴定

[0229] 为探寻USP1在PRRSV感染细胞过程中的调节靶点,分别构建14个PRRSV-BJ4非结构蛋白的真核表达质粒,并进行表达鉴定。经鉴定发现ML323可以调节Nsp1 β 的表达。

[0230] 琼脂糖凝胶电泳结果显示在687bp处有核酸条带,与预期的目的片段大小一致。将

测序正确的质粒进行中提,同时瞬时转染HEK293T细胞,收取蛋白进行质粒表达鉴定,结果见图19,DNA Marker:2000bp。

[0231] 从图19可以看出,Western blot结果显示Flag单克隆抗体敷育后于29kDa处有特异性条带,表明真核表达质粒3×Flag-CMV-Nsp1β构建并表达成功。

[0232] (2) Nsp1β蛋白主要结合的泛素类型

[0233] 将3×Flag-CMV-Nsp1β质粒分别与PRK-HA(空载)、PRK-HA-WT-Ubi、PRK-HA-K480-Ubi、PRK-HA-K630-Ubi质粒共同转染KEK297T细胞,在37℃二氧化碳培养箱培养24h,Co-IP检测Nsp1β蛋白主要结合的泛素类型,结果见图20。

[0234] 从图20可以看出,Nsp1β主要是K48泛素化类型的修饰。

[0235] (3) ML323对Nsp1β泛素化修饰的影响

[0236] 3×Flag-CMV-Nsp1β质粒分别与PRK-HA-空载、PRK-HA-K480-Ubi质粒共同转染KEK297T细胞8h后,一组用10μM的ML323处理,另外一组用DMSO处理做对照组,于24h后进行Co-IP检测,结果见图21。

[0237] 从图21可以看出,ML323处理后Nsp1β的蛋白表达少于对照组,并且相比于对照组ML323处理后加剧了Nsp1β的K48泛素化修饰。

[0238] 通过以上实验结果可以看出,本发明先在化合物库中筛选出ML323,分别在不同浓度和不同时间的处理条件下,通过Western blot、Q-PCR、流式检测、TCID50等方法,验证ML323对PRRSV在细胞感染中的作用,再分别针对USP1和UAF1设计siRNA且成功构建siUAF1、siUSP1的MARC-145细胞系和PAM-Tang细胞系,在此基础上感染PRRSV,验证下调USP1、UAF1的表达后对病毒感染的影响,同时构建USP1过表达细胞系,验证上调USP1的表达对PRRSV在细胞中增殖的影响;Co-IP实验发现PRRSV-BJ4非结构蛋白Nsp1β主要是K48泛素化类型修饰,用ML323处理后能够影响Nsp1β蛋白的泛素化。

[0239] 本发明为PRRSV在感染细胞过程中泛素化修饰过程提供数据支撑,并为PRRS的防治以及控制PRRSV的感染提供了新的思路。ML323作为USP1-UAF1复合体的特异性抑制剂,同时又有抗病毒作用,可以作为新的廉价的小分子治疗药物。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 河南农业大学
- [0003] <120> USP1-UAF1抑制剂在制备药物中的应用,药物组合物
- [0004] <141> 2021-05-10
- [0005] <160> 36
- [0006] <170> SIP0SequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 21
- [0009] <212> DNA/RNA
- [0010] <213> Artificial Sequence
- [0011] <400> 1
- [0012] ggucgagacu cuaucauaat t 21
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 21
- [0015] <212> DNA/RNA
- [0016] <213> Artificial Sequence
- [0017] <400> 2
- [0018] uuaugauaga gucucgacct t 21
- [0019] <210> 3
- [0020] <211> 21
- [0021] <212> DNA/RNA
- [0022] <213> Artificial Sequence
- [0023] <400> 3
- [0024] ccacuagcuc uucuaauaat t 21
- [0025] <210> 4
- [0026] <211> 21
- [0027] <212> DNA/RNA
- [0028] <213> Artificial Sequence
- [0029] <400> 4
- [0030] uuauuagaag agcuaguggt t 21
- [0031] <210> 5
- [0032] <211> 21
- [0033] <212> DNA/RNA
- [0034] <213> Artificial Sequence
- [0035] <400> 5
- [0036] ccugacauuc gggugcuaat t 21
- [0037] <210> 6
- [0038] <211> 21

[0039]	<212> DNA/RNA
[0040]	<213> Artificial Sequence
[0041]	<400> 6
[0042]	uuagcacccg aaugucaggt t 21
[0043]	<210> 7
[0044]	<211> 21
[0045]	<212> DNA/RNA
[0046]	<213> Artificial Sequence
[0047]	<400> 7
[0048]	ccacuagcuc uucuaauaat t 21
[0049]	<210> 8
[0050]	<211> 21
[0051]	<212> DNA/RNA
[0052]	<213> Artificial Sequence
[0053]	<400> 8
[0054]	uuauuagaag agcuaguggt t 21
[0055]	<210> 9
[0056]	<211> 21
[0057]	<212> DNA/RNA
[0058]	<213> Artificial Sequence
[0059]	<400> 9
[0060]	ggauuucaca gauucucaat t 21
[0061]	<210> 10
[0062]	<211> 21
[0063]	<212> DNA/RNA
[0064]	<213> Artificial Sequence
[0065]	<400> 10
[0066]	uugagaauucu gugaaaucct t 21
[0067]	<210> 11
[0068]	<211> 21
[0069]	<212> DNA/RNA
[0070]	<213> Artificial Sequence
[0071]	<400> 11
[0072]	gcaguuuaca guccuuaaut t 21
[0073]	<210> 12
[0074]	<211> 21
[0075]	<212> DNA/RNA
[0076]	<213> Artificial Sequence
[0077]	<400> 12

[0078] auuaaggacu guaaacugct t 21
[0079] <210> 13
[0080] <211> 21
[0081] <212> DNA/RNA
[0082] <213> Artificial Sequence
[0083] <400> 13
[0084] ggauuugaau cuccaggaat t 21
[0085] <210> 14
[0086] <211> 21
[0087] <212> DNA/RNA
[0088] <213> Artificial Sequence
[0089] <400> 14
[0090] uuccuggaga uucaaacct t 21
[0091] <210> 15
[0092] <211> 21
[0093] <212> DNA/RNA
[0094] <213> Artificial Sequence
[0095] <400> 15
[0096] ggauuucaca gauucucaat t 21
[0097] <210> 16
[0098] <211> 21
[0099] <212> DNA/RNA
[0100] <213> Artificial Sequence
[0101] <400> 16
[0102] uugagaaucu gugaaacct t 21
[0103] <210> 17
[0104] <211> 21
[0105] <212> DNA/RNA
[0106] <213> Artificial Sequence
[0107] <400> 17
[0108] gcaguuuaca guccuuaat t 21
[0109] <210> 18
[0110] <211> 21
[0111] <212> DNA/RNA
[0112] <213> Artificial Sequence
[0113] <400> 18
[0114] auuaaggacu guaaacugct t 21
[0115] <210> 19
[0116] <211> 21

[0117] <212> DNA/RNA
[0118] <213> Artificial Sequence
[0119] <400> 19
[0120] ggauuugaau cuccaggaat t 21
[0121] <210> 20
[0122] <211> 21
[0123] <212> DNA/RNA
[0124] <213> Artificial Sequence
[0125] <400> 20
[0126] uuccuggaga uucaaaucct t 21
[0127] <210> 21
[0128] <211> 22
[0129] <212> DNA
[0130] <213> Artificial Sequence
[0131] <400> 21
[0132] acacaactca tgcttggtga tt 22
[0133] <210> 22
[0134] <211> 23
[0135] <212> DNA
[0136] <213> Artificial Sequence
[0137] <400> 22
[0138] actggcacac tgatgtcctg ctg 23
[0139] <210> 23
[0140] <211> 20
[0141] <212> DNA
[0142] <213> Artificial Sequence
[0143] <400> 23
[0144] gggtagact gagtcgatgc 20
[0145] <210> 24
[0146] <211> 20
[0147] <212> DNA
[0148] <213> Artificial Sequence
[0149] <400> 24
[0150] cggacttgga gcatgtcact 20
[0151] <210> 25
[0152] <211> 19
[0153] <212> DNA
[0154] <213> Artificial Sequence
[0155] <400> 25

[0156] cgtggacatc cgtaaagac 19
[0157] <210> 26
[0158] <211> 19
[0159] <212> DNA
[0160] <213> Artificial Sequence
[0161] <400> 26
[0162] ggaaggtgga cagcgaggc 19
[0163] <210> 28
[0164] <211> 21
[0165] <212> DNA
[0166] <213> Artificial Sequence
[0167] <400> 28
[0168] tgggactgaa taatctcggc a 21
[0169] <210> 28
[0170] <211> 25
[0171] <212> DNA
[0172] <213> Artificial Sequence
[0173] <400> 28
[0174] tcttctttgc aatttcatt tccct 25
[0175] <210> 29
[0176] <211> 20
[0177] <212> DNA
[0178] <213> Artificial Sequence
[0179] <400> 29
[0180] gggtagact gagtcgatgc 20
[0181] <210> 30
[0182] <211> 20
[0183] <212> DNA
[0184] <213> Artificial Sequence
[0185] <400> 30
[0186] cggacttgga gcatgtcact 20
[0187] <210> 31
[0188] <211> 21
[0189] <212> DNA
[0190] <213> Artificial Sequence
[0191] <400> 31
[0192] ctgaacccca aagccaaccg t 21
[0193] <210> 32
[0194] <211> 21

[0195]	<212> DNA
[0196]	<213> Artificial Sequence
[0197]	<400> 32
[0198]	ttctccttga tgtcccgcac g 21
[0199]	<210> 33
[0200]	<211> 20
[0201]	<212> DNA
[0202]	<213> Artificial Sequence
[0203]	<400> 33
[0204]	agatcatcgc ccaacaaaac 20
[0205]	<210> 34
[0206]	<211> 20
[0207]	<212> DNA
[0208]	<213> Artificial Sequence
[0209]	<400> 34
[0210]	gacacaattg ccgctcacta 20
[0211]	<210> 35
[0212]	<211> 36
[0213]	<212> DNA
[0214]	<213> Artificial Sequence
[0215]	<400> 35
[0216]	tgcgccgcg aattcggagc aactcacgtg ttgacc 36
[0217]	<210> 36
[0218]	<211> 36
[0219]	<212> DNA
[0220]	<213> Artificial Sequence
[0221]	<400> 36
[0222]	ccgggatcct ctagagtacc acttgtgact gccaaa 36

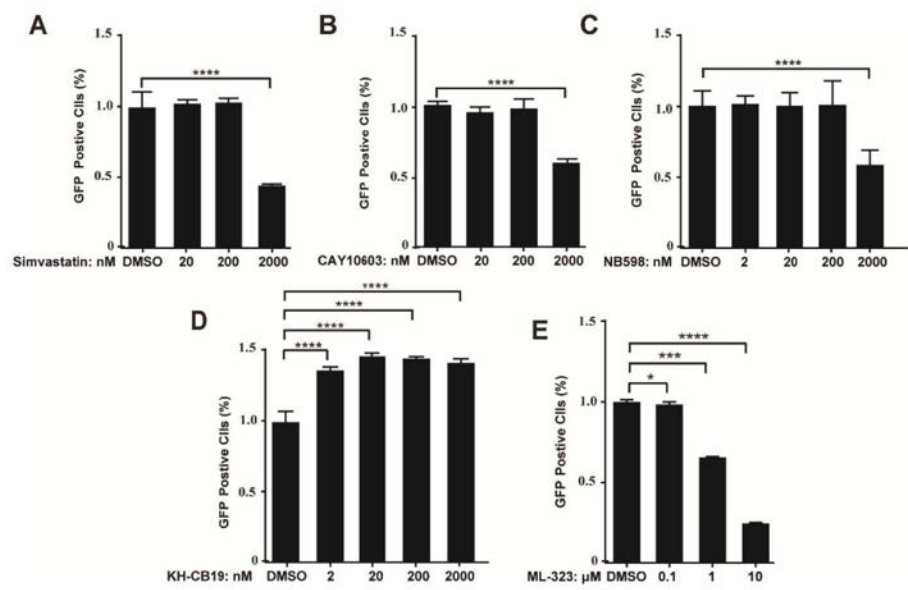


图1

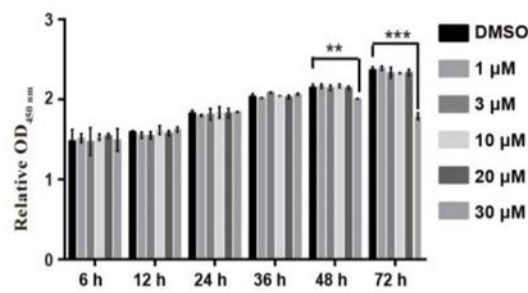


图2

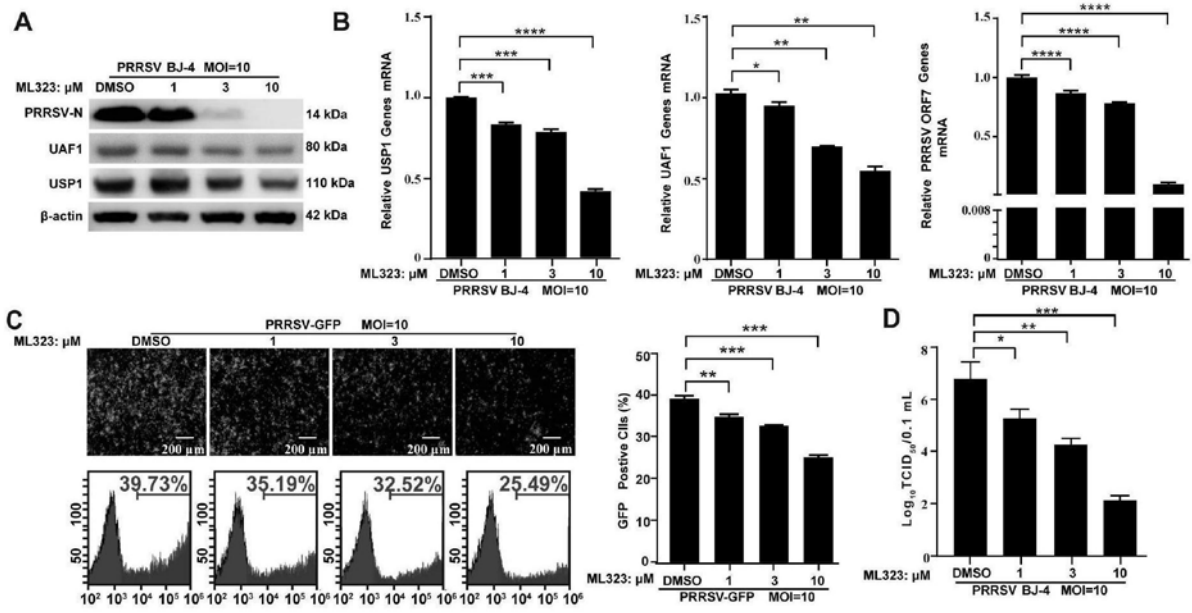


图3

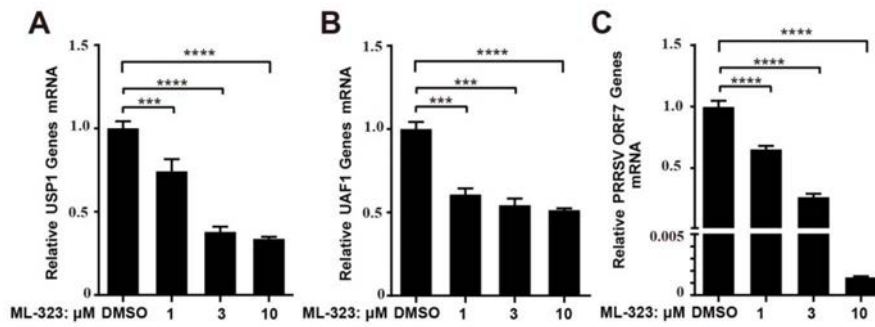


图4

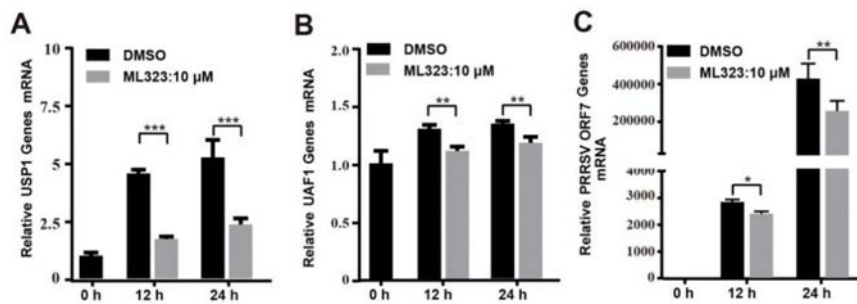


图5

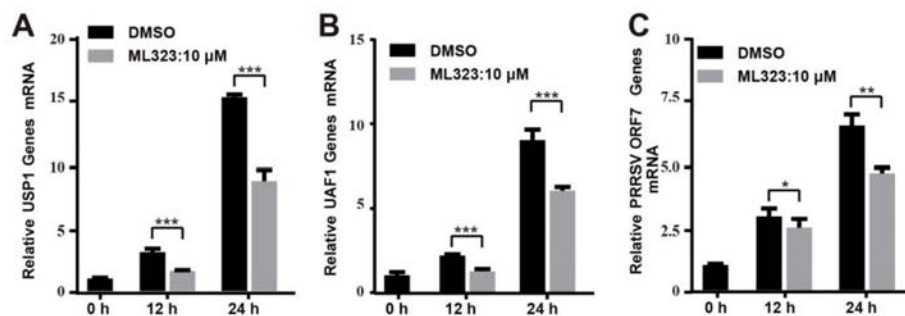


图6

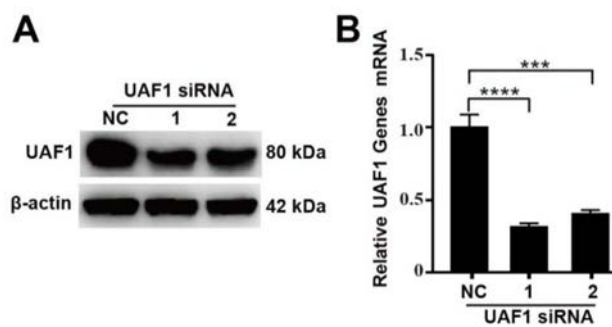


图7

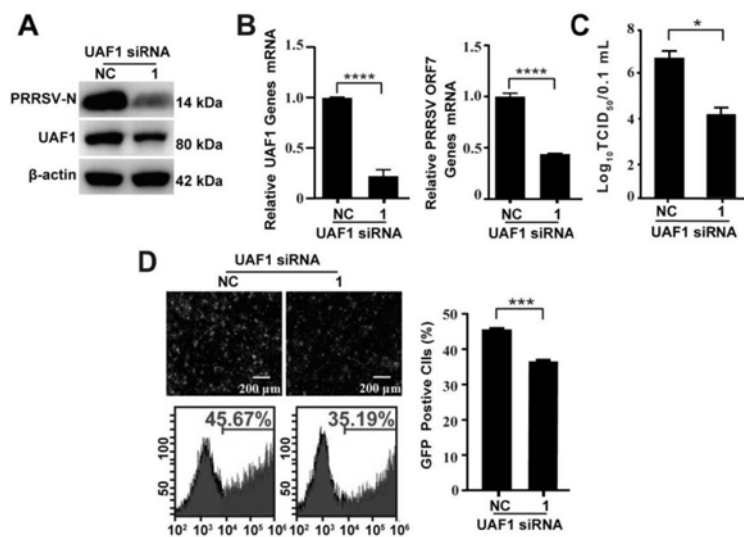


图8

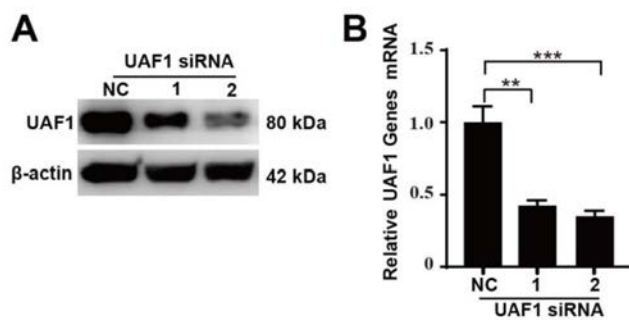


图9

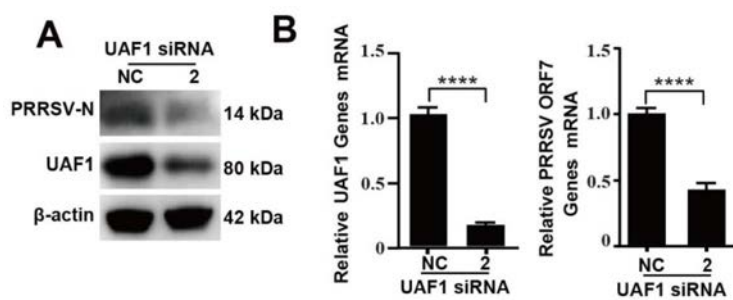


图10

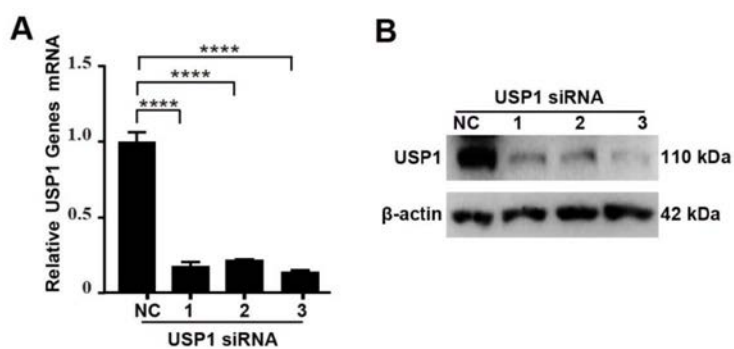


图11

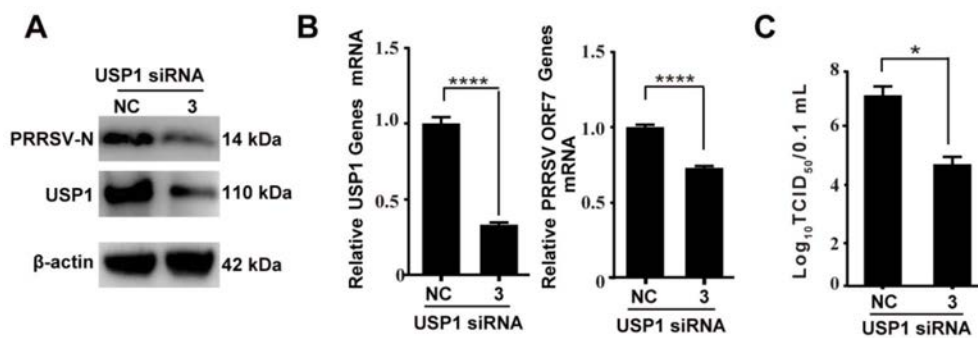


图12

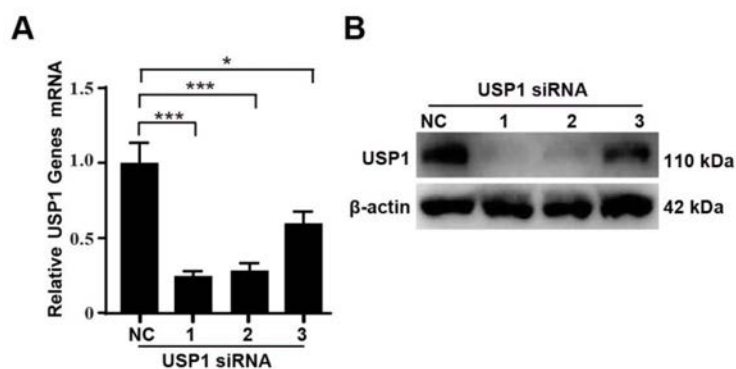


图13

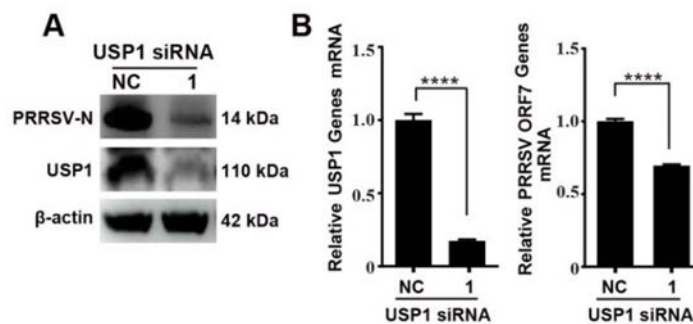


图14

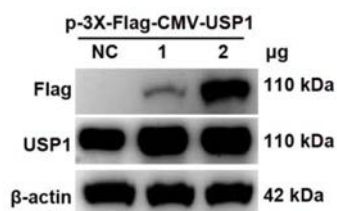


图15

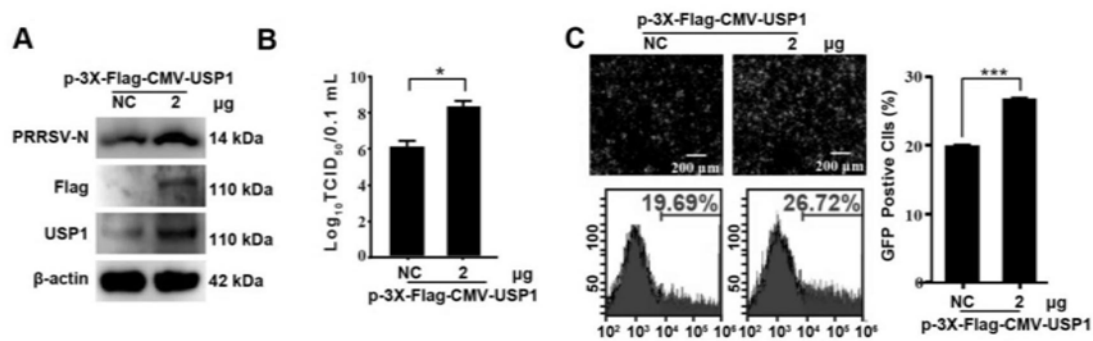


图16

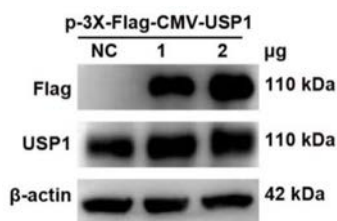


图17

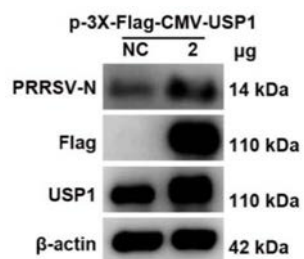


图18

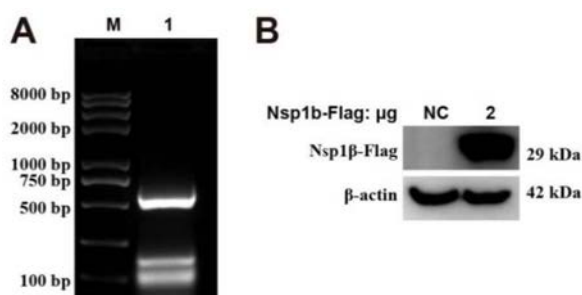


图19

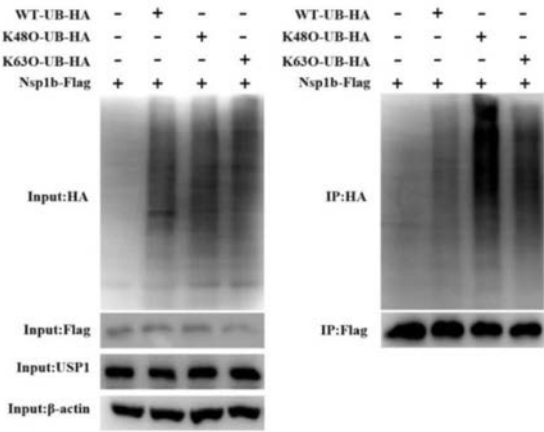


图20

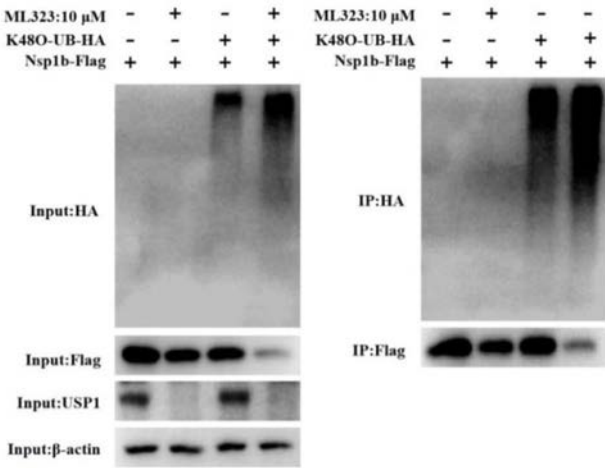


图21