

猪传染性胃肠炎病毒 M 基因酵母 双杂交诱饵载体的构建及鉴定^①

王 丽, 代先进, 胡 洋, 叶翠芳,
董 伟, 宋 寒, 宋振辉

西南大学(荣昌校区) 动物医学系, 重庆 402460

摘要: 筛选与猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)M 蛋白相互作用的宿主蛋白, 构建 M 蛋白的诱饵载体 pGBKT7-M. 首先利用 PCR 技术从重组表达载体 pFastBacTM-M 中扩增得到 M 基因, 定向克隆至载体 pMD19-T simple, 验证正确后克隆至酵母双杂交系统诱饵表达载体 pGBKT7, 经双酶切、PCR 反应及测序验证其正确插入后, 利用 PEG/LiAc 法将构建好的重组诱饵载体 pGBKT7-M 及空载体 pGBKT7 分别转化到酵母 Y2HGold 感受态细胞中, 检测其对酵母菌株是否有毒性作用和自激活活性及诱饵蛋白在酵母细胞内的表达情况. 结果表明: 扩增得到 M 基因 738 bp, 成功构建了诱饵表达载体 pGBKT7-M, 此诱饵载体对酵母细胞无细胞毒性和自激活活性. Western blot 检测到 5×10^4 左右的蛋白条带, 显示诱饵蛋白在酵母细胞内稳定表达.

关 键 词: 猪传染性胃肠炎病毒; M 蛋白; 酵母双杂交; 诱饵载体

中图分类号: S852.65⁺1

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)09-0013-07

猪传染性胃肠炎(porcine transmissible gastroenteritis, TGE)是由猪传染性胃肠炎病毒(porcine transmissible gastroenteritis virus, TGEV)引起的一种以严重腹泻、呕吐和脱水为临床症状的高度胃肠道传染性[1-2], 尤其对 2 周龄以内的仔猪有很高的致死率, 据报道死亡率可达 100%^[3]. 该病最早发现于美国, 目前呈世界性分布, 给养猪业造成了巨大的损失. TGEV 属冠状病毒科冠状病毒属、基因组不分节段的单股正链 RNA, 长约 2.86×10^4 bp^[4-5]. 其主要包括 4 种结构蛋白: M 蛋白、E 蛋白、S 蛋白和 N 蛋白^[4]. 其中 M 基因是一个重要的编码基因, 全长 789 bp, 可编码 262 个氨基酸, 不同毒株间 M 蛋白具有高度保守性. 该蛋白从 N 端到 C 端可分为信号肽、膜外区、跨膜区、歧性区及突出于病毒粒子的 C 端区 5 个功能域, 主要包埋在病毒脂质囊膜中, 在病毒颗粒装配过程中将核衣壳连接到囊膜上. 冠状病毒 M 蛋白在病毒粒子的组装和出芽中起最重要的作用^[6-7], 但 M 蛋白自身不能够出芽, 必须与 sM 蛋白相结合^[8]. M 蛋白是一种 3 次跨越囊膜的完整膜糖蛋白, 是冠状病毒最丰富的囊膜蛋白^[9-10]. M 蛋白不仅影响病毒的变异, 并局限于内质网膜上决定病毒的装配位点^[11], 从而在病毒装配期间将核衣壳连接到囊膜上^[12]; M 蛋白能自我相互作用, 形成均一的复合体, 也能与 S, E, N 蛋白等作用形成不均一复合体, M 蛋白与这些结构

① 收稿日期: 2016-10-14

基金项目: 重庆市前沿与基础研究项目(cstc2014jcyjA80015); 重庆市研究生科研创新项目(CYS14057, CYS2015076).

作者简介: 王 丽(1990-), 女, 新疆博乐人, 硕士研究生, 主要从事动物微生物学与免疫学研究.

蛋白相互作用,使得它们能共同组装成病毒粒子,但是 M 蛋白必须首先与 E 蛋白作用才能被装入病毒粒子,单独 M 蛋白不能诱导病毒样颗粒(VLPs)的形成。

有囊膜的病毒通过出芽的方式从宿主细胞获得囊膜,在此过程中病毒的囊膜蛋白形成 1 个特殊的膜相结构与其他病毒组分共同协作促使病毒出芽^[13]。例如,一些病毒包括人 HIV 以外吐的方式从宿主细胞的质膜出芽和释放病毒颗粒。一些有囊膜的病毒在细胞内膜出芽^[14-15]。病毒颗粒用细胞内膜结合的隔室包装自己,如内质网、高尔基体及新发现的病毒从宿主细胞出芽的细胞分泌途径^[16]。然而病毒粒子组装与出芽方式的详细机制,尤其是宿主因子在病毒粒子组装与出芽过程中的作用,在很多病毒的研究中还未有报道。本研究以猪传染性胃肠炎病毒 M 蛋白构建酵母双杂交的诱饵载体 pGBKT7-M,检测其对酵母细胞是否有毒性、自激活活性及在酵母细胞内的表达情况,为了解宿主因子在病毒粒子组装、出芽和成熟过程中的相关作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

含有 TGEV M 基因全长的 pFastBacTM-M 质粒由本试验室构建并保存;质粒提取试剂盒购自 Genview 公司;pMD19-T simple 克隆载体、限制性内切酶、T4 DNA ligase 及所用 Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司;大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司;MatchmakerTM Gold Yeast Two-Hybrid System、酵母转化试剂盒、X- α -Gal、酵母菌株、Aureobasidin A 等均购自 Clontech 公司;各种营养缺陷型培养基、酵母蛋白提取试剂盒购自上海生工生物公司;YNB 购自北京索莱宝生物公司;胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司;c-Myc 标签抗体购自 ProteinTech 公司;ECL 显色试剂盒购自碧云天生物公司;引物合成和测序由上海生工生物公司完成。

1.2 方法

1.2.1 M 基因的扩增、回收及鉴定

根据本试验室构建并保存的含有 TGEV M 基因全长的 pFastBacTMDual-M 质粒的序列,设计 M 基因引物为上游引物:5'-CCGGAATTCATGCGCTATTGTGCTATGAAAT-3',其 5' 端下划线部分为限制性酶切位点 *Eco*R I;下游引物:5'-GGGGGATCCTTATACCATATGTAATAATTTTCTTG-3',其 5' 端下划线部分为限制性酶切位点 *Bam*H I。预期扩增片段大小为 738 bp,为 M 基因去除信号肽片段大小。

PCR 反应体系如下:2 $\times$ Taq PCR Master Mix 25 μ L,上、下游引物(20 μ mol/L)各 0.5 μ L,pFastBacTMDual-M 质粒 2 μ L,ddH₂O 22 μ L。

PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 3 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,33 个循环,72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,胶回收试剂盒对目的条带进行回收纯化,取 3 μ L 回收产物电泳检测胶回收纯化是否成功。

1.2.2 pMD19-T Simple-M 重组质粒的构建及鉴定

将胶回收纯化后的 PCR 产物与克隆载体 pMD19-T Simple 进行连接,反应体系为 pMD19-T Simple vector 1 μ L,M 基因胶回收产物 3 μ L,ddH₂O 1 μ L,solution I 5 μ L,16 $^{\circ}$ C 连接 4 h。将连接产物转化成 DH5 α 感受态细胞,涂布于含 Amp 的 LB 平板上进行蓝白斑筛选,37 $^{\circ}$ C 倒置培养 8~12 h。随机挑取单个阳性克隆摇床培养 8~12 h,参照质粒提取试剂盒提取重组质粒,经 PCR 反应、*Eco*R I/*Bam*H I 双酶切验证,且对阳性质粒进行测序鉴定,鉴定正确的重组质粒命名为 pMD19-T Simple-M。

1.2.3 诱饵质粒 pGBKT7-M 的构建及鉴定

将阳性质粒 pMD19-T Simple-M 及诱饵载体 pGBKT7 分别进行 *Eco*R I/*Bam*H I 双酶切反应,胶回收纯化后使用 T4 DNA 连接酶将双酶切后的 M 基因片段与 pGBKT7 16 $^{\circ}$ C 连接 10 h。连接产物转化大肠杆

菌 DH5 α 感受态细胞,涂布于含 Kan 抗性的 LB 固体平板上,37 ℃ 倒置培养 8~12 h,随机挑取单菌落到含 Kan 抗性的 LB 液体培养基中,37 ℃ 摇床培养 8~12 h,提取重组质粒经 PCR 反应及双酶切验证,并经过阳性质粒测序鉴定,鉴定正确的重组质粒命名为 pGBKT7-M.

1.2.4 酵母感受态细胞的制备及转化

采用 TE/LiAc 法制备酵母菌感受态细胞,将酵母菌 Y2HGold 从 -80 ℃ 冰箱取出,划线接种至固体 YPDA 平板上,30 ℃ 倒置培养 3~5 d,挑取 1 个 2~3 mm 的单菌落接种于含 3 mL 液体 YPDA 培养基上,230 r/min 30 ℃ 摇床培养 8~12 h,取 5 μ L 培养物于 50 mL YPDA 培养基中,230 r/min 30 ℃ 摇床培养至 $OD_{600\text{ nm}}=0.15\sim0.3$,2 450 r/min 离心 5 min,弃上清,用新鲜的 YPDA 培养基 100 mL 重悬细胞沉淀,230 r/min 30 ℃ 摇床培养至 $OD_{600\text{ nm}}=0.4\sim0.5$,将培养物分至两个 50 mL 管中,2 450 r/min 离心 5 min,弃上清,每管用 30 mL 灭菌去离子水重悬细胞沉淀,2 450 r/min 离心 5 min,弃上清,每管沉淀用 1.5 mL 1.1 $\times$ TE/LiAc 重悬,转移细胞悬液于 2 个 1.5 mL 灭菌管中,高速离心 15 s,再分别用 600 μ L 1.1 $\times$ TE/LiAc 重悬细胞沉淀,此时感受态细胞已制备完成.

在预冷的 1.5 mL 灭菌管中分别加入 pGBKT7-M 重组质粒和 pGBKT7 空质粒 100 ng,经变性处理后的 Yeastmaker Carrier DNA 5 μ L,感受态细胞 60 μ L,轻柔地混匀后加入新鲜配制的 PEG/LiAc 500 μ L,轻柔地混匀,30 ℃ 温箱内静置孵育 50 min(每 10 min 轻柔地颠倒混匀 1 次),加入 20 μ L DMSO 混匀后 42 ℃ 水浴 15 min(每 5 min 轻柔地混匀 1 次),2 450 r/min 离心 5 min 后弃上清,用 1 mL YPD plus Medium 重悬细胞沉淀,220 r/min 30 ℃ 摇床培养 50 min,高速离心 15 s 后弃上清,使用 1 mL 0.9% (W/V) NaCl 溶液重悬细胞沉淀.将转化产物 1:10 稀释后取 100 μ L 涂布于 SD/-Trp 营养缺陷培养基,30 ℃ 培养箱内倒置培养 3~5 d.

1.2.5 诱饵质粒 pGBKT7-M 毒性检测

将空载体 pGBKT7 和诱饵载体 pGBKT7-M 分别转化至酵母菌 Y2HGold 感受态细胞,转化产物分别按 1:10,1:100 进行稀释,各取 100 μ L 涂布于 SD/-Trp 平板,30 ℃ 倒置培养 3~5 d.从平板上随机挑取直径为 2~3 mm 单菌落接种到 SD/-Trp 液体培养基中培养,220 r/min 30 ℃ 摇床培养 20~24 h 后测 $OD_{600\text{ nm}}$ 值.以空载体 pGBKT7 为对照,对比诱饵载体 pGBKT7-M 平板上菌落的数量及菌落大小,评价构建的诱饵载体对酵母菌株的毒性作用.

1.2.6 诱饵载体 pGBKT7-M 自激活活性的检测

将诱饵载体 pGBKT7-M 转化至 Y2HGold 酵母感受态细胞,转化产物按 1:10,1:100 进行稀释后,分别涂布 100 μ L 到 SD/-Trp,SD/-Trp/X- α -Gal,SD/-Trp/X- α -Gal/AbA 平板上,30 ℃ 恒温箱内倒置培养 3~5 d,观察比较各平板上菌落生长情况.

1.2.7 诱饵蛋白在酵母中的表达验证

参照酵母蛋白提取试剂盒提取诱饵蛋白,SDS-PAGE 电泳后转膜,5%脱脂奶粉常温封闭 4 h,加入一抗 c-Myc 标签抗体 4 ℃ 孵育 8~12 h,洗涤 3 次,每次 10 min 后再加入二抗常温孵育 2 h,ECL 显色.

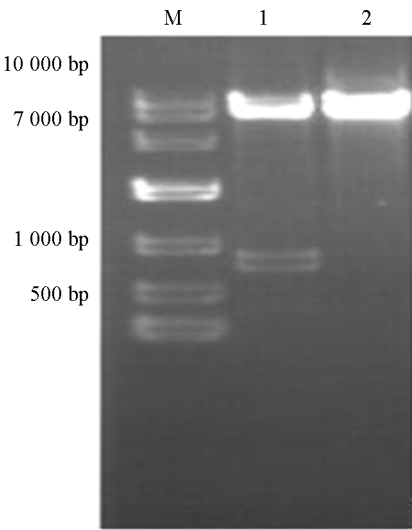
2 结 果

2.1 诱饵载体 pGBKT7-M 的酶切鉴定

提取重组质粒,经 *Eco*R I/*Bam*H I 双酶切验证,pGBKT7 大小为 7 300 bp,M 基因为 738 bp,电泳结果显示符合目的条带大小基本一致(图 1),且测序结果显示碱基序列未发生突变与缺失.

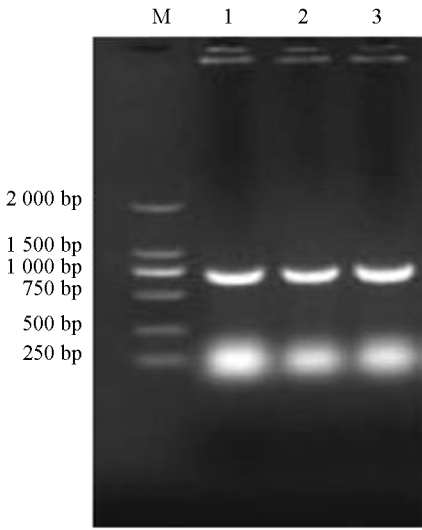
2.2 诱饵载体转化酵母菌 Y2HGold 的鉴定

挑取选择培养基 SD/-Trp 平板上长出的单菌落进行菌落 PCR,经 1%琼脂糖电泳后,所得目的条带 738 bp 左右,与预期大小相符(图 2).



M: DNA 相对分子质量标准; 1: 诱饵载体 pGBKT7-M *Eco*R I / *Bam*H I 双酶切产物; 2: 诱饵载体 pGBKT7-M.

图 1 诱饵载体 pGBKT7-M *Eco*R I / *Bam*H I 双酶切鉴定

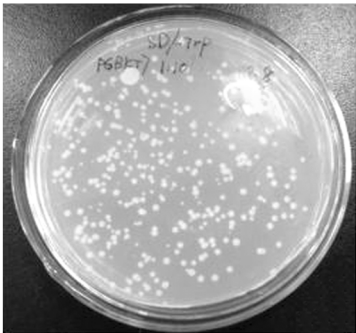


M: DNA 相对分子质量标准; 1—3: PCR 扩增产物.

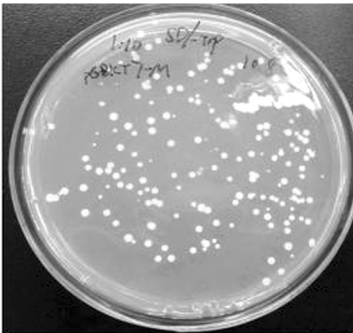
图 2 诱饵载体转化酵母细胞菌落 PCR 鉴定

2.3 诱饵表达载体 pGBKT7-M 的毒性检测

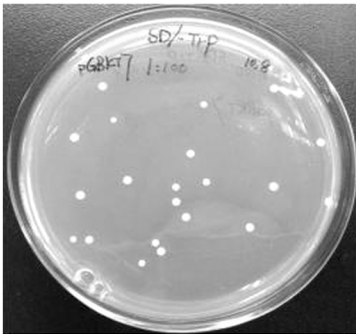
将空载体 pGBKT7 和构建的诱饵载体 pGBKT7-M 分别转化至 Y2HGold 酵母感受态细胞中, 对选择性培养基 SD/-Trp 平板上长出的菌落数量及菌落大小进行差异对比, 结果证明空载体和诱饵载体的菌落大小基本一致, 诱饵载体 pGBKT7-M 上的菌落数量略少于空载体 pGBKT7(图 3), 统计学分析无明显差异, 说明诱饵载体 pGBKT7-M 对酵母 Y2HGold 细胞没有明显毒性.



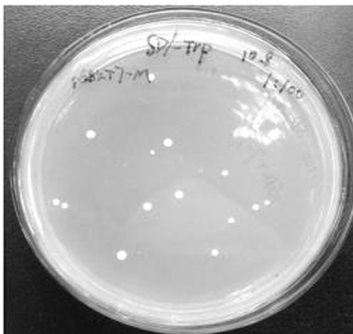
(a) 空载体 pGBKT7 1:10 稀释



(b) 诱饵载体 pGBKT7-M 1:10 稀释



(c) 空载体 pGBKT7 1:100 稀释



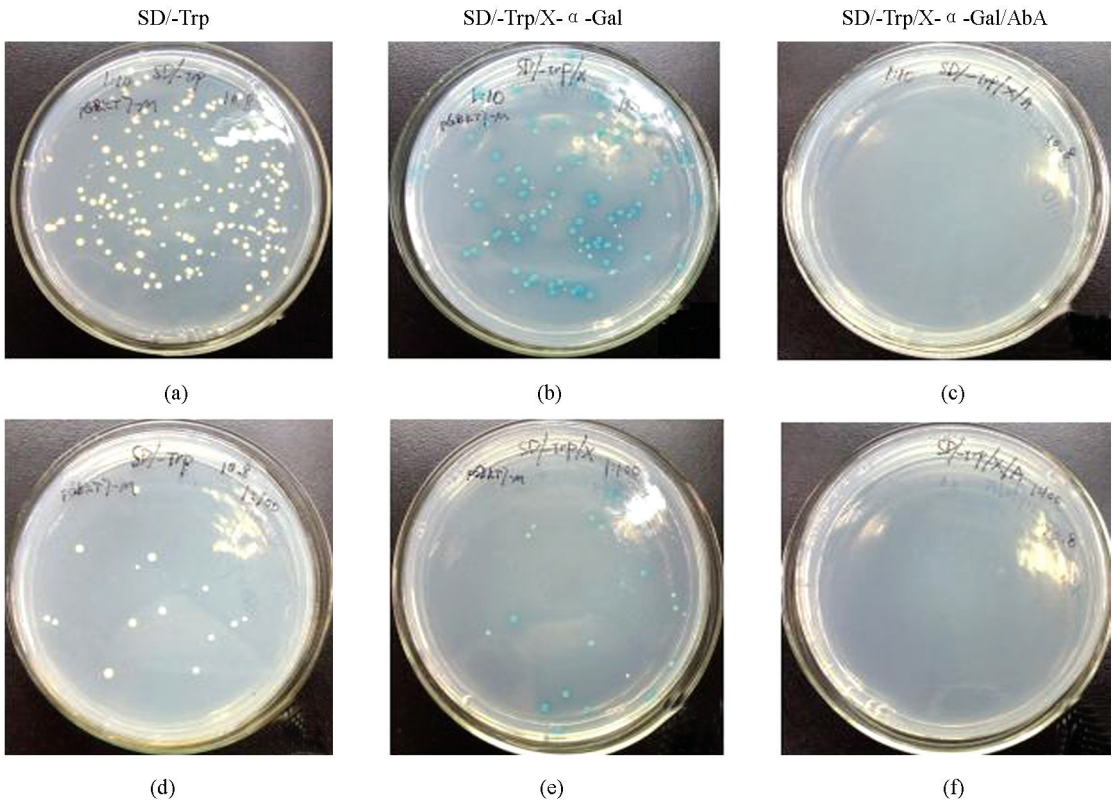
(d) 诱饵载体 pGBKT7-M 1:100 稀释

图 3 诱饵载体 pGBKT7-M 的毒性检测

2.4 诱饵载体 pGBKT7-M 的自激活检测

将诱饵载体 pGBKT7-M 转化至酵母 Y2HGold 感受态细胞中, 转化产物按 1 : 10, 1 : 100 进行稀释后,

分别涂布于选择性培养基 SD/-Trp, SD/-Trp/X-α-Gal, SD/-Trp/X-α-Gal/AbA 平板上进行培养, 可观察到在 SD/-Trp 平板上为白色菌落, SD/-Trp/X-α-Gal 平板上为蓝色菌落, SD/-Trp/X-α-Gal/AbA 平板上没有菌落生长(图 4).



a,b,c: 诱饵载体 pGBKT7-M 1 : 10 稀释后自激活检测; d,e,f: 诱饵载体 pGBKT7-M 1 : 100 稀释后自激活检测.

图 4 诱饵表达载体 pGBKT7-M 自激活检测

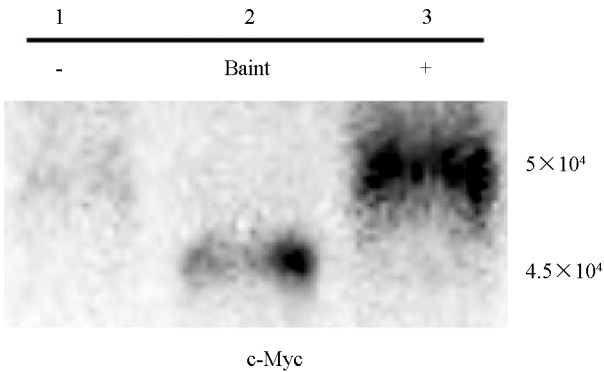
2.5 诱饵蛋白的表达检测

提取 pGBKT7-M 酵母蛋白, 经 Western blot 分析可见融合蛋白表达, 蛋白大小约为 5×10^4 , 阳性对照 pGBKT7-53 蛋白大小约为 5.7×10^4 , 与预期结果一致, 说明诱饵载体在酵母细胞 Y2HGold 中正确表达(图 5).

3 讨 论

蛋白-蛋白相互作用对执行各种生物功能、病毒与宿主互作方面具有极其重要的作用, 蛋白间互作的机制将有助于对已知全长基因但未知功能基因的功能分析^[17]. 在蛋白质相互作用的研究方法中, 酵母双杂交系统(Y2H)是最常见的蛋白互作方法^[18], 由于此方法巧妙地把研究复杂蛋白质之间的相互作用转换成易操作的核酸研究, 并能进行高通量的蛋白筛选, 为研究蛋白质之间的相互作用提供了一条捷径. 自从 1989 年由 Fields 等^[19]在进行真核基因转录调控研究中用来检测酵母体内蛋白与蛋白相互作用的系统, 这种研究蛋白质相互作用的试验方法已得到越来越广泛的应用.

为筛选 TGEV M 蛋白与宿主细胞猪小肠上皮细胞中相互作用的蛋白, 本试验成功构建了用于酵母双



1: pGBKT7 空载体阴性对照; 2: 诱饵载体 pGBKT7-M 表达产物;
3: pGBKT7-53 阳性对照.

图 5 诱饵载体 pGBKT7-M 在酵母菌 Y2HGold 中蛋白表达 Western blot 结果

杂交的诱饵载体 pGBKT7-M. 表达载体 pGBKT7 含有色氨酸编码基因及 Kan 抗性筛选基因, 故构建的诱饵质粒 pGBKT7-M 能在 SD/-Trp/Kan (50 $\mu\text{g/mL}$) 平板上正常生长, 菌落的大小和生长速度与空载体 pGBKT7 无显著差异, 表明诱饵载体 pGBKT7-M 无毒性. 诱饵载体 pGBKT7-M 在 SD/-Trp/Kan 平板上正常生长白色菌落, SD/-Trp/X- α -Gal/AbA 平板上无菌落长出, 表明构建的诱饵载体 pGBKT7-M 无自激活活性. 因此, 构建的重组诱饵载体 pGBKT7-M 可用于酵母双杂交系统筛选与 M 蛋白相互作用的宿主蛋白.

病毒感染宿主以吸附到宿主细胞表面开始, 之后将核酸注入到宿主细胞, 并在其中大量繁殖, 该过程需要宿主细胞膜上的病毒受体及细胞中的相关蛋白辅助完成^[20]. 因此, 研究病毒与宿主细胞的相互作用对阐明 TGEV 的感染机制有重要意义. 关于 TGEV 病毒的致病机理、与宿主相互作用机制的可用信息相对较少, 当前的研究主要集中在病毒基因组结构和功能的研究^[21], 宿主细胞病毒受体的发现将有助于揭示病毒与机体相互作用的本质, 从而了解病毒的致病机制和免疫机理^[22]. 本试验构建的诱饵质粒 pGBKT7-M 符合筛选酵母双杂交宿主细胞 cDNA 文库的需要, 为进一步筛选与 M 蛋白相互作用的蛋白奠定了一定的基础, 有助于揭示病毒的分子致病机制、与宿主细胞的相互作用机制和寻找病毒的作用靶标, 为病毒的预防诊治提供理论依据和解决途径^[23].

参考文献:

- [1] LAMPHEAR B J, JILKA J L, KESL L, et al. A Corn-Based Delivery System for Animal Vaccines: an Oral Transmissible Gastroenteritis Virus Vaccine Boosts Lactogenic Immunity in Swine [J]. Vaccine, 2004, 22(19): 2420—2424.
- [2] ZOU H, ZARLENGA D S, SESTAK K, et al. Transmissible Gastroenteritis Virus: Identification of M Protein-Binding Peptide Ligands with Antiviral and Diagnostic Potential [J]. Antiviral Research, 2013, 99(3): 383—390.
- [3] SCHWEGMANN-WESSELS C, HERRLER G. Transmissible Gastroenteritis Virus Infection: a Vanishing Specter [J]. Dtsch Tierarztl Wochenschr, 2006, 113(4): 157—159.
- [4] de HAAN C A, VENNMAE H, ROTTIERO P J. Assembly of the Coronavirus Envelope: Homotypic Interactions between the M Proteins [J]. Journal of Virology, 2000, 74(11): 4967—4978.
- [5] WANG Ji-bin, FANG Shou-guo, XIAO Han, et al. Interaction of the Coronavirus Infectious Bronchitis Virus Membrane Protein with β -Actin and its Implication in Virion Assembly and Budding [J]. Plos One, 2009, 4(3): e4908.
- [6] LIN K P, LIU D X. The Missing Link in Coronavirus Assembly [J]. J Biol Chem, 2001, 276(3): 17515—17523.
- [7] GAROFF H, HEWSON R, OPSTELTEN D J. Virus Maturation by Budding [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 1998, 62(4): 1171—1190.
- [8] GISSEN P, MAHER E R. Cargos and Genes: Insights into Vesicular Transport from Inherited Human Disease [J]. Journal of Medical Genetics, 2007, 44(9): 545—555.
- [9] GRIFFITHS G, ROTTIER P. Cell Biology of Viruses that Assemble along the Biosynthetic Pathway [J]. Semin Cell Biol, 1992, 3(5): 367—381.
- [10] SIDDLE S G, ANDERSON R, CAVANGNAGH D, et al. Coronaviridae [J]. Intervirology, 1983, 20(4): 181—189.
- [11] SPAAN W, CAVANAGH D, HORZINEK M C. Coronaviruses: Structure and Genome Expression [J]. J Gen Virol, 1988, 69(12): 2939—2952.
- [12] STURMAN L S, HOLMES K V, BEHNKE J. Isolation of Coronavirus Envelope Glycoproteins and Interaction with the Nucleocapsid [J]. J Virol, 1980, 33(1): 449—462.
- [13] 韩国全, 郭万柱, 赖维莉, 等. 猪传染性胃肠炎病毒四川株 M 蛋白基因克隆分析及真核表达载体构建 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2007, 01: 66—68.
- [14] KLUMPERMAN J, LOCKER J K, MEIJER A, et al. Coronavirus M Proteins Accumulate in the Golgi Complex beyond the Site of Virion Budding [J]. Journal of Virology, 1994, 68(10): 6523—6534.
- [15] ESCORS D, ORTEGO J, LAUDE H, et al. The Membrane M Protein Carboxy Terminal Binds to Transmissible Gastroenteritis Coronavirus Core and Contribute to Core Stability [J]. Journal of Virology, 2001, 75(3): 1312—1324.
- [16] ITO T, CHIBA T, OZAWA R, et al. A Comprehensive Two-Hybrid Analysis to Explore the Yeast Protein Interactome [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, 98(8): 4569—4574.

[17] SHI Y H, CHEN J, LI C H, et al. The Establishment of a Library Screening Method Based on Yeast Two-Hybrid System and Its Use to Determine the Potential Interactions of Liver Proteins in Ayu, *Plecoglossus Altivelis* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2011, 30(4): 1184—1187.

[18] MEGAN M S, DARLA D, ERIC H, et al. Detecting Protein-Protein Interactions in Vesicular Stomatitis Virus Using a Cytoplasmic Yeast Two Hybrid System [J]. *Journal of Virological Methods*, 2011, 173(2): 203—212.

[19] FIELD S, SONG O. A Novel Genetic System to Detect Protein-Protein Interaction [J]. *Nature*, 1989, 340(6230): 245—246.

[20] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997.

[21] 王 华, 孙成友, 王淑娟, 等. 蛋白组学在病毒致病机理研究中的应用 [J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(13): 2583—2585.

[22] 蒙学莲, 朱学亮, 翟军军, 等. 小反刍兽疫病毒酵母双杂交诱饵载体 pGBKT7-tH 的构建、表达和鉴定 [J]. *中国兽医学报*, 2011, 31(4): 509—512.

[23] DONG Bo, GAO Wei, LU Hui-jun, et al. A Small Region of Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus Spike Protein Interacts with the Neural Cell Adhesion Molecule [J]. *Intervirolgy*, 2015, 58(2): 130—137.

Construction and Identification of a Bait Vector with
TGEV Protein in the Yeast Two-Hybrid System

WANG Li, DAI Xian-jin, HU Yang,
YE Cui-fang, DONG Wei, SONG Han, SONG Zhen-hui

Department of Veterinary Medicine, Southwest University (Rongchang Campus), Chongqing 402460, China

Abstract: A bait vector for M protein (pGBKT7-M) was constructed for screening the host proteins of the interactions between TGEV and M protein. First, the gene from the structural proteins M was amplified from pFastBacTM-M by PCR and cloned into the vector pMD19-T simple. After being verified, it was directly cloned into the bait vector pGBKT7 of the yeast two-hybrid system. Then the recombinant plasmid was identified by PCR, restriction enzyme digestion and sequence analysis and transformed into the yeast cells Y2HGold by the PEG/LiAc method. Toxicity and self-activation of the bait protein were detected using different dropout minimal bases, and the bait vector pGBKT7-M was shown to have no toxicity to the yeast cells and no self-activation phenomenon to the report genes. The above results indicated that the constructed bait vector pGBKT7-M can be used for screening the host proteins interacting with TGEV M protein using the yeast two-hybrid system.

Key words: porcine transmissible gastroenteritis virus; M protein; yeast two-hybrid system; bait vector

责任编辑 夏 娟

