

幽门螺杆菌空泡毒素 P58 亚单位在 酵母系统中的表达

黄增荣¹, 王建华¹, 兰春慧²

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨陵 712100; 2 第三军医大学 大坪医院野战外科研究所消化内科, 重庆 400042)

[摘要] **【目的】**构建幽门螺杆菌空泡毒素(VacA)P58 亚单位酵母双杂交诱饵表达载体,为应用酵母双杂交系统筛选与空泡毒素 P58 亚单位相互作用的蛋白奠定基础。**【方法】**采用 PCR 方法,从幽门螺杆菌 s1/m1 型标准毒株 NCT11637 基因组中扩增空泡毒素 P58 亚单位,经 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切后克隆入经同样酶切处理的酵母双杂交诱饵载体 pGBKT7 中,构建 pGBKT7-VacA P58 重组质粒,并将其转化 *E. coli* DH5 α ,提取质粒经 *Bam*H I、*EcoR* I 双酶切、测序鉴定正确后,转化入宿主酵母菌 AH109,色氨酸(Trp)缺陷压力筛选,对阳性转化酵母菌扩大培养,提取总蛋白进行 Western-blot 鉴定,同时检测重组蛋白有无毒性、渗漏和自激活活性。**【结果】**成功扩增长度为 1 202 bp 的空泡毒素 P58 片段,重组质粒 pGBKT7-VacA P58 经 *Bam*H I、*EcoR* I 双酶切可得到 1 202 bp 大小的片段,测序结果显示扩增产物序列与参考序列完全匹配。重组质粒 pGBKT7-VacA P58 成功地转化至酵母细胞 AH109 中。表达的诱饵蛋白无毒性、无渗漏及无自激活活性,Western-blot 分析证实酵母菌 AH109 细胞正确表达了重组蛋白。**【结论】**成功构建了幽门螺杆菌空泡毒素 P58 亚单位酵母诱饵表达载体,其可在酵母菌系统中成功表达,且表达产物正确。

[关键词] 幽门螺杆菌;酵母双杂交;空泡毒素;P58 亚单位

[中图分类号] Q786

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)05-0012-05

Construction and identification of the Yeast Two-Hybrid System bait expression vector of *Helicobacter pylori* Vacuolating cytotoxin A P58 subunit

HUANG Zeng-rong¹, WANG Jian-hua¹, LAN Chun-hui²

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Department of Gastroenterology, Daping Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **【Objective】**The study was to construct the bait expression plasmid pGBKT7-VacA P58 of *Helicobacter pylori* Vacuolating cytotoxin A P58 subunit in order to lay a foundation for screening unknown protein interacting with P58 subunit from the Yeast Two-Hybrid System. **【Method】**The P58 gene fragment was amplified from *Helicobacter pylori* type strain NCTC11637 genomic DNA and in frame into vector pGBKT7. Verified by sequencing, the bait vector was transfected into AH109 yeast cells. And the expression of the bait protein was analyzed by Western-blot. Meanwhile, the toxicity and self-activation of the bait protein were detected. **【Result】***Helicobacter pylori* Vacuolating cytotoxin A P58 subunit was amplified and cloned into the vector pGBKT7 successfully. The bait vector was then transferred into AH109 yeast cells successfully, and no toxicity and self-activation were found. The expression of the bait protein was con-

* [收稿日期] 2008-12-15

[基金项目] 国家自然科学基金项目(NO. 30500012)

[作者简介] 黄增荣(1982—),男,贵州三穗人,在读博士,主要从事免疫毒理学研究。E-mail:huangzengrong@126.com

[通信作者] 兰春慧(1973—),女,重庆市人,副教授,博士,主要从事胃病发病机制及其防治研究。

E-mail:tiandaozhouqin99@hotmail.com

firmed by Western-blot.【Conclusion】The bait expression vector pGBKT7-VacA P58 was constructed successfully, thus providing a foundation for further studies on the proteins interacting with Vac A in order to reveal the molecule mechanisms of invasion and toxic effect and signal transduction pathway ultimately.

Key words: *Helicobacter pylori*; Yeast Two-Hybrid System; VacA; P58 subunit

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是人体内最常见的病原微生物之一。已有研究表明, Hp 感染与慢性活动性胃炎、胃溃疡、MALT 淋巴瘤和胃癌的发生有密切关系^[1-4]。世界卫生组织(WHO)已把 Hp 列为胃癌的首要致病因子^[5]。Xia 等^[6]报道, Hp 感染引起的胃上皮细胞凋亡异常, 在胃癌发生发展中起主要作用; 体内外试验均已证实, Hp 感染可导致胃粘膜上皮细胞凋亡^[7], 但 Hp 引发胃癌的机制仍未阐明。

1988 年, Leunk 等^[8]报道, Hp 肉汤培养上清液可以引起体外培养的真核细胞空泡样变性, 这种细胞效应直至 1992 年才被证实是由 Hp 的惟一已知外分泌蛋白毒素——空泡细胞毒素(Vacuolating cytotoxin A, VacA)引起的^[9]。VacA 是一种 AB 型毒素^[10], 中间含有暴露在表面的含带电氨基酸的环区(exposed loop), 在此处, VacA 可以降解为 N 端 P37 小片段和 C 端 P58 大片段, 其中 P37 相当于 AB 型毒素的活性亚单位, P58 相当于细胞结合亚单位。有研究表明, P58 亚单位在细菌粘附、毒素侵袭及内化过程中起关键作用, 并推测其作用方式可能与细胞特异性受体结合^[11-13]。但目前尚无有关与 VacA P58 相结合的特异性受体得到鉴定的报道。本研究构建了 VacA P58 毒素亚单位的酵母双杂交诱饵表达载体, 并对其表达产物进行检测, 以期为进一步运用酵母双杂交技术筛选与之相互作用的蛋白, 并为幽门螺杆菌空泡毒素的致病机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒

幽门螺杆菌标准 s1/ml 型毒株 NCTC11637, 由第三军医大学临床微生物教研室惠赠; 大肠杆菌 DH5 α , 由第三军医大学野战外科研究所 7 室冻存; pGBKT7-BD 克隆载体、酵母菌株 AH109, 均购自美国 Clontech 公司。

1.2 生化试剂、培养基、抗体

细菌基因组提取试剂盒购自台湾 Geneaid 公司; 质粒小量提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司; 限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I 购自 Promega 公

司; T4 连接酶购自 NEB 公司; 高保真酶 PrimerstarHotStart、PCR 试剂及 DNA marker 等购自 TaKaRa 公司; 胰蛋白胨、酵母提取物、葡萄糖为 Oxide 公司产品; 酵母转化试剂盒、SD 基础培养基、各种缺陷培养基、X- α -gal 等购自美国 Clontech 公司; 硫酸腺嘌呤、玻璃珠为美国 Sigma 公司产品; 混合蛋白酶抑制剂 Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets 为 Roche 公司产品; VacA 鼠单克隆抗体 VacA(5E4): sc-32756 购自美国 Santa Cruz 公司; 二抗羊抗鼠多克隆抗体(HRP)为美国 Santa Cruz 公司产品; 化学发光试剂盒 Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate(34079)为 Pierce 公司产品; 显影蛋白 Biotinylated Protein Ladder Detection(#7727)为 Cell Signaling 公司产品。

1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 中发表的幽门螺杆菌 NCTC11637 空泡毒素基因序列(登录号为 AF049653), 设计特异性扩增引物, 上游引物 5'-CG GAATTCACGATTAGAGTGGGAGGGTA-3' (下划线碱基为 *Eco*R I 酶切位点); 下游引物 5'-CAG-GATCCAGTCAGGGTTGTTCACCATG-3' (下划线碱基为 *Bam*H I 酶切位点)。引物由上海生工合成, 预期扩增产物长度为 1 202 bp。

1.4 VacA P58 基因的 PCR 扩增

参照 Geneaid 公司产细菌基因组提取试剂盒说明, 提取幽门螺杆菌标准毒株 NCTC11637 基因组 DNA, 以其为模板进行 VacA P58 基因的 PCR 扩增。PCR 反应体系为: 5 $\times$ Buffer 10 μ L, dNTP 4 μ L, 10 pmol/L 上、下游引物各 1 μ L, 高保真酶 PrimerstarHotStart 0.5 μ L, 基因组 DNA 模板 100 ng, 加 ddH₂O 补足 50 μ L。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min, 最后 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测, 用 PCR 产物纯化试剂盒回收目的条带, 并测其浓度。

1.5 重组质粒 pGBKT7-VacA P58 的构建

用 *Eco*R I 和 *Bam*H I 酶对 VacA P58 PCR 产物和 pGBKT7 空质粒分别进行双酶切, 酶切体系: 10 $\times$ E Buffer 4 μ L, 牛血清白蛋白(BSA)0.4 μ L,

DNA 2 μg , *EcoR* I 1 μL , *Bam*H I 1 μL , 加 ddH₂O 补足 40 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 4 h 后终止反应, 对酶切产物分别进行纯化, 测其浓度并计算物质的量比。将酶切后的 *VacA* P58 基因片段与 pGBKT7 载体按 5 : 1(物质的量比)的比例, 于 16 $^{\circ}\text{C}$ 用 T4 连接酶连接过夜, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 接种含 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kan⁺ 的 LB 平板培养。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后挑取单克隆菌落接种 Kan⁺/LB 肉汤进行扩大培养, 提取质粒进行 *EcoR* I、*Bam*H I 双酶切鉴定, 将酶切鉴定为阳性的克隆送上海生工进行测序鉴定。将阳性质粒命名为 pGBKT7-*VacA* P58。

1.6 重组质粒 pGBKT7-*VacA* P58 转化酵母菌 AH109

酵母感受态细胞的制备及诱饵质粒转化感受态酵母细胞, 参考 Clontech 公司的 MATCHMAKER Two-Hybrid System 3 User Manual、Yeast Protocols Handbook 进行。具体方法简述如下: 先用 TE/LiAc 法制备酵母感受态细胞, 然后用 PEG/LiAc 法将重组质粒 pGBKT7-*VacA* P58 转化酵母感受态细胞 AH109, 将转化子铺色氨基酸缺陷平板(SD/-Trp), 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3~5 d, 挑取直径为 2~3 mm 的菌落接种于 SD/-Trp/Kan⁺ 液体培养基, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 振荡培养 3 d 后, 提取酵母质粒并转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 之后进行 Kan⁺ 抗性筛选, 挑取阳性单克隆进行扩大培养、鉴定, 以确认重组质粒 pGBKT7-*VacA* P58 是否转化入酵母菌 AH109 细胞中。

1.7 重组 *VacA* P58 蛋白的 Western-blot 分析

参照 Clontech 公司的 Yeast Protocols Handbook 说明书, 提取 1.6 的重组 *VacA* P58 蛋白, 对总蛋白定量后进行 SDS-PAGE 电泳检测, 转印聚偏二氟乙烯(PVDF)膜, 30 V 恒压湿转过夜。将转印膜用 50 g/L 脱脂奶粉封闭 2 h, TBST 洗膜 3 次, 15 min/次; 一抗 *VacA* 鼠单克隆抗体孵育于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, TBST 洗膜 3 次, 15 min/次; 二抗羊抗鼠多克隆抗体孵育于常温下反应 1 h, TBST 洗膜 3 次, 10 min/次, 最后化学发光法显影。

1.8 诱饵蛋白毒性、渗漏和自激活活性的检测

分别将转化有目的质粒 pGBKT7-*VacA* P58 的 AH109 酵母菌落和转化空质粒 pGBKT7 的 AH109 酵母菌落(对照), 接种于 50 mL SD/-Trp/Kan⁺ 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、300 r/min 培养 24 h, 用分光光度计测 OD₆₀₀ 值, 通过比较相同培养条件下两者的生长速率, 判断诱饵蛋白对宿主菌是否具有毒性作用。同时将目的转化子液体培养物分别均匀涂布于

SD/-Trp、SD/-Trp/X- α -gal、SD/-Trp/-His/X- α -gal 固体培养盘, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1 周, 观察培养盘中菌落的生长情况, 检测诱饵蛋白的渗漏和自激活活性。

2 结果与分析

2.1 *VacA* 基因 P58 亚单位的 PCR 扩增

图 1 显示, 扩增产物条带长度约为 1 200 bp, 与预期结果一致, 表明 *VacA* 基因 P58 亚单位已成功扩增。

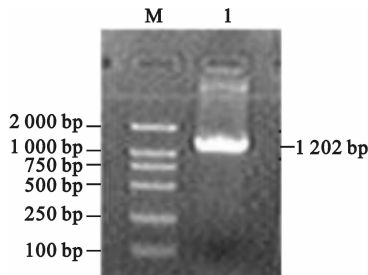


图 1 *VacA* 基因 P58 亚单位的 PCR 扩增结果
M, Marker DL2000; 1. *VacA* 基因 P58 亚单位

Fig. 1 PCR products of *VacA* gene P58 subunit
M, Marker DL2000; 1. *VacA* gene P58 subunit products

2.2 重组质粒 pGBKT7-*VacA* P58 的双酶切鉴定及测序分析

重组质粒 pGBKT7-*VacA* P58 的双酶切鉴定结果见图 2。由图 2 可见, 重组质粒 pGBKT7-*VacA* P58 经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切, 可以得到 1 202 bp 的目的片段, 与预期结果一致; 测序结果显示, 此次扩增得到的产物序列与 NCTC11637 空泡毒素基因(登录号为 AF049653)序列完全匹配, 表明重组质粒 pGBKT7-*VacA* P58 构建成功。

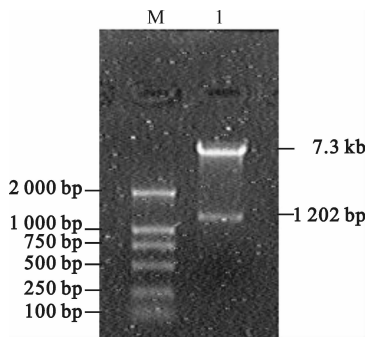


图 2 重组质粒 pGBKT7-*VacA* P58 的 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定结果

M, Marker DL2000; 1. 重组质粒 pGBKT7-*VacA* P58

Fig. 2 Identification of the recombinant plasmid pGBKT7-*VacA* P58 by restriction enzymes *Bam*H I and *Eco*R I digestion
M, Marker DL2000; 1. Recombined plasmid pGBKT7-*VacA* P58 digested by restriction enzymes *Bam*H I and *Eco*R I

2.3 重组质粒 pGBKT7-VacA P58 转化酵母菌 AH109 的鉴定

重组质粒 pGBKT7-VacA P58 转化酵母菌 AH109,经选择培养基筛选后,提取酵母质粒再复转大肠杆菌 DH5 α ,对转化后的大肠杆菌进行酶切鉴定,结果与图 2 一致,说明重组质粒 pGBKT7-VacA P58 已经成功转入酵母菌 AH109 细胞中。

2.4 重组 VacA P58 蛋白的 Western-blot 分析

Western-blot 分析结果(图 3)显示,重组 VacA P58 蛋白分子质量约为 35ku,与预期结果相符,说明诱饵蛋白在酵母菌 AH109 中得到正确表达,可以进行下一步的试验。

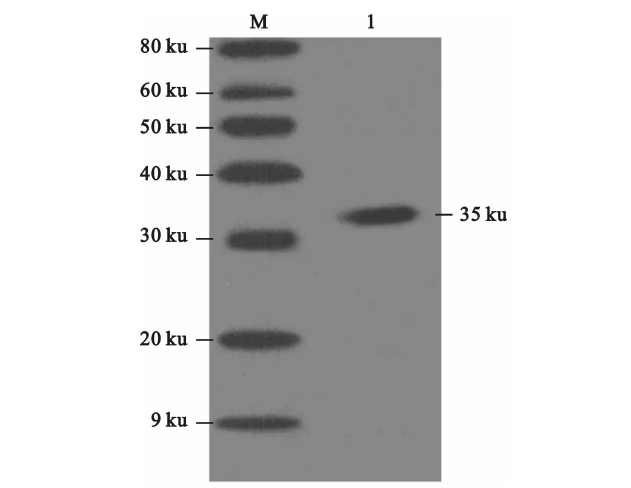


图 3 重组 VacA P58 蛋白的 Western-blot 分析结果
M. 蛋白质 Marker;1. VacA P58 蛋白的 Western-Blot 分析结果

Fig. 3 Results of Western-blot detection of VacA P58 protein
M. Protein Ladder Marker;1. Immunoblotting of VacA P58 protein

2.5 重组 VacA P58 蛋白的毒性、渗漏和自激活活性检测

分别将转化有空质粒 pGBKT7 和重组质粒 pGBKT7-VacA P58 的 AH109 酵母菌,接种于 50 mL SD/-Trp/kan⁺ 液体培养基,30 ℃、300 r/min 培养 24 h 后,测得的 OD₆₀₀ 分别为 0.885 和 0.864,经 *t* 检验发现二者差异不显著($P>0.05$)。将重组质粒转化子分别接种于 SD/-Trp、SD/-Trp/X- α -gal、SD/-Trp/-His/X- α -gal 固体培养盘,30 ℃培养 1 周后,发现转化克隆仅在 SD/-Trp、SD/-Trp/X- α -gal 培养盘上生长,且菌落均匀,在 SD/-Trp/-His/X- α -gal 培养盘中不能生长。此外,转化克隆在 SD/-Trp/X- α -gal 培养盘中未出现蓝色菌落,说明重组质粒无渗漏、无自激活活性。

3 讨论

幽门螺杆菌(Hp)是人体内常见的病原微生物,其感染率较高,同时未感染人群也普遍易感。Hp 是微需氧革兰氏阴性杆菌,持续定植于胃黏膜,可导致胃组织从炎症、溃疡向癌症演变。Hp 有多种致病因子,其中 VacA 是目前倍受关注的毒力因子之一。胃癌患者所感染的 Hp 大多含有 VacA,推测其在胃癌发生过程中起着较为重要的作用。

作为一种 A B 型毒素,VacA 经水解后分成 P37 和 P58 两个功能亚单位,将 P37 N 末端疏水区域 6~27 位氨基酸缺失,虽然不影响 VacA 与 Hela 细胞膜的结合,但不能使细胞发生空泡样变性^[14],如果将该区第 9 位脯氨酸或第 14 位甘氨酸发生点突变,几乎可以使 VacA 空泡毒性完全丧失^[15],P58 特异性抗血清可以抑制 VacA 与细胞的结合^[10]。上述结果表明,VacA 通过 p58 与宿主细胞膜结合,通过 p37 发挥毒素活性。

利用间接免疫荧光法和流式细胞仪分析发现,VacA 与 Hela 细胞表面通过高亲和力受体结合^[12]。而利用经典的配体结合法显示,I¹²⁵ VacA 与 Hela 细胞结合没有饱和性^[16],推测这种结合是非特异性结合,或是仅有一些亲和力极低的受体参与反应。用荧光显微镜观察也发现,VacA 以非常缓慢的、温度依赖的方式进入细胞,似乎未受受体介导的影响^[11]。目前报道的一些 VacA 受体,仍未得到成功鉴定^[17]。VacA 与宿主细胞膜的黏附及其内化的方式还不十分明确,研究结果也不一致。因此,找到与 VacA 蛋白相互作用、介导其进入细胞内发挥细胞毒作用的特异性受体,对阐明 Hp 致病的分子机制尤为重要。

体外重组蛋白是否具有天然蛋白的活性,一直是研究蛋白质功能的重要难题。Manetti 等^[18]利用 *E. coli* 表达重组 VacA 蛋白,但未能成功诱导 Hela 细胞空泡化,究其原因可能是因为蛋白从包涵体中纯化时不能正确折叠所致;Kuck 等^[19]和袁建平^[20]利用真核细胞表达重组 VacA 蛋白,发现其与天然毒素类似的生物学效应。

酵母双杂交系统(Yeast Two-Hybrid System),是 1989 年 Fields 与等^[21]建立的一种研究真核细胞中蛋白质-蛋白质相互作用的基因分析方法,目前主要应用于钓取与已知蛋白直接相互作用的分子,对于蛋白质功能、作用方式、细胞内信号转导途径等研究,具有明确的指示作用。鉴于上述基础,本研究

成功构建了 VacA 基因 P58 亚基的酵母双杂交诱饵表达载体,并通过 Western-blot 检测此基因在酵母中得到正确高效表达;同时验证了此表达载体的在酵母双杂交系统内无毒性、无自激活活性、无渗漏。其结果为运用酵母双杂交技术钓取与幽门螺杆菌空泡毒素相互作用的特异性受体,以及最终阐明幽门螺杆菌致病的分子机理奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Blaser M J. *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation [J]. Journal of Infectious Diseases, 1990, 161(4): 626-633.
- [2] Marshall B J. *Helicobacter pylori* [J]. The American Journal of Gastroenterology, 1994, 89(88): 116-128.
- [3] Cover T L, Blaser M J. *Helicobacter pylori*: A bacterial cause of gastritis, peptic ulcer disease, and gastric cancer [J]. American Society for Microbiology News, 1995, 61: 21-26.
- [4] Walker M M, Pretolani S, Gasbarrini G. Gastric carcinoma and gastric lymphoma [J]. Current Opinion Gastroenterology, 1996, 12(S1): 33-36.
- [5] NIH. Consensus development panel on *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease [J]. American Medicine Association, 1994, 272: 65-69.
- [6] Xia H H, Talley N J. Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection: implications in gastric carcinogenesis [J]. American Journal of Gastroenterology, 2001, 96: 16-26.
- [7] Maeda S, Yoshida H, Mitsuno Y, et al. Analysis of apoptotic and antiapoptotic signalling pathways induced by *Helicobacter pylori* [J]. Gut, 2002, 50: 771-778.
- [8] Leunk R D, Johnson P T, David B C, et al. Cytotoxic activity in broth culture filtrates of *Campylobacter pylori* [J]. Journal of Medicine Microbiology, 1988, 26: 93-99.
- [9] Cover T L, Blaser M J. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1992, 267: 10570-10575.
- [10] Lupei P, Heuser J E, Manehi R, et al. Oligomeric and subunit structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin [J]. The Journal of Cell Biology, 1996, 133(4): 801-807.
- [11] Julia G, Cover T L. Binding and internalization of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by epithelial cells [J]. Infection and Immunity, 1996, 64(10): 4197-4203.
- [12] Massari P, Manetti R, Burrioni D, et al. Binding of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin to target cells [J]. Infection and Immunity, 1998, 66(8): 3981-3984.
- [13] Hung J W, Wen C W. Expression and binding analysis of GST-VacA fusions reveals that the C-Terminal; 100-residue segment of exotoxin is crucial for binding in hela cells [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 278: 449-454.
- [14] Vinion-Dubiel A D, Mc Cillan M S, Czajkowska D M, et al. A dominant negative mutant of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) inhibit VacA-induced cell vacuolation [J]. Journal of Biology and Chemistry, 1999, 274(53): 37736-37742.
- [15] Ye D, Blanke S R. Mutational analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin amino terminus: identification of amino acids essential for cellular vacuolation [J]. Infection Immunology, 2000, 68(7): 4354-4357.
- [16] McClmn M S, Schraw W, Ricci V, et al. Acid activation of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) results in toxin internalization by eukaryotic cells [J]. Molecule Microbiology, 2000, 37(2): 433-442.
- [17] Yahiro K, Niidome T, Hatakeyama T, et al. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin binds to the 140-kDa protein in human gastric cancer cell lines: AZ-521 and AGS [J]. Biochemistry Biophysics Research Communication, 1997, 238(2): 629-632.
- [18] Manetti R, Massari P, Burrioni D, et al. *Helicobacter pylori* cytotoxin: importance of native conformation for induction of neutralizing antibodies [J]. Infection and Immunity, 1995, 63(11): 4476-4480.
- [19] Kuck D, Kolmerer B, Kling-Konert C, et al. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS [J]. Infection and Immunity, 2001, 69(8): 5080-5087.
- [20] 袁建平, 赵蔚, 杨贵珍, 等. 幽门螺杆菌 VacA 真核表达载体的构建及其诱导细胞空泡化和凋亡 [J]. 中国微生态学杂志, 2003, 15(2): 66-68.
Yuan J P, Zhao W, Yang G Z, et al. *Helicobacter pylori* VacA induces vacuole formation and apoptosis by transfection of eukaryotic expression vector of VacA gene [J]. Chinese Journal of Microecology, 2003, 15(2): 66-68. (in Chinese)
- [21] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions [J]. Nature, 1989, 340(6230): 245-246.