

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(7):984-990; 4 July 2011
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

结核分枝杆菌分泌蛋白 EspB 在 RAW264.7 细胞中的稳定表达

李浩, 殷瑛, 董大勇, 张军, 付玲, 任军, 徐俊杰*, 陈薇*

军事医学科学院微生物流行病学研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

摘要: 【目的】建立能够稳定表达结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb) 分泌蛋白 EspB (Rv3881c) 的 RAW264.7 细胞系, 为研究 EspB 蛋白在调控巨噬细胞功能中所起的作用提供科学依据。【方法】首先成功构建的重组质粒 pEGFP-C1-EspB, 然后将重组载体 pEGFP-C1-EspB 和空载体 pEGFP-C1 以脂质体介导的方法转染至小鼠巨噬细胞 RAW264.7 中, 经过 G418 筛选后建立稳定表达 EGFP-EspB 融合蛋白以及 EGFP 的细胞系, 并通过 RT-PCR、荧光显微镜及 Western blot 方法, 在基因和蛋白两个水平对所建立的稳转细胞系进行鉴定。【结果】EGFP-ESAT6 融合基因成功整合入 RAW264.7 细胞基因组并能够稳定表达, 成功获得了能够稳定表达 EGFP-EspB 融合蛋白以及 EGFP 的细胞系。【结论】本试验利用脂质体介导的方法, 将构建的重组载体 pEGFP-C1-EspB 和空载体 pEGFP-C1 转染至 Raw264.7 细胞系中, 获得了稳定表达 EGFP-EspB 融合蛋白的巨噬细胞系, 为阐明 EspB 分泌蛋白在调控巨噬细胞功能中所起的作用以及 EspB 与巨噬细胞蛋白之间的相互作用提供了研究平台。

关键词: EspB, EGFP, RAW264.7, 稳定转染, 表达

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011)07-0984-07

结核病是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb) 引发的一种严重危害人类健康的传染病。近年, 由于人口流动增加、多重耐药菌株的出现以及结核分枝杆菌与人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的联合感染导致结核病再度在全球形成流行趋势^[1]。研究表明固有免疫应答在结核分枝杆菌的感染中发挥着重要的作用, 而巨噬细胞是固有免疫应答中最主要的细胞, 它是机体抗 Mtb 感染的第一道防线^[2-3]。因此研究结核分枝杆菌重要蛋白对巨噬细胞功能的调控作用可进一步阐明结核分枝杆菌侵袭机体并潜伏繁殖的机制。

EspB 基因具有 1380 bp 的开放阅读框, 由结核分枝杆菌 Rv3881c 基因编码, 因此又被称为

Rv3881c 蛋白。EspB 在结核分枝杆菌中分子量为 55 kDa, 分泌出来后其 C 端被切除, 分子量变为 48 kDa。EspB 抗原富含丙氨酸和甘氨酸, EspB 所在的基因组区域 Rv3866-Rv3881c 是一个毒力基因簇, 在该区域中有若干个待证实的毒力基因^[4-5]。有研究发现, 其调控元件在大肠杆菌中也具有有效的表达调控功能^[6]。EspB 具有较高的诊断应用价值, 研究表明这种新型的结核分泌蛋白在抗原与其它结核抗原具有互补性, 因此可以有效的提高血清学检测的敏感性和特异性^[7]。EspB 同样是结核分枝杆菌 ESX-4 分泌系统的重要组成部分, EspB 在分泌的过程中其 C 端会被切除, 并且在保持 ESAT6 的细胞内的分泌水平是必需的, EspB, CFP-10 和

基金项目: 国家自然科学基金 (30972772, 81025018)

* 通信作者: Tel: +86-10-66948492; E-mail: xujunjiel@gmail.com; cw789661@yahoo.com

作者简介: 作者简介: 李浩 (1986-) 男, 河南信阳人, 硕士研究生, 从事微生物学研究。E-mail: boyleehao@126.com

收稿日期: 2011-01-18; 修回日期: 2011-03-20

ESAT6 的协同分泌是分枝杆菌在巨噬细胞中增殖和抑制吞噬体成熟所必需的,其中 C 端起着重性的作用^[8-9]。

目前主要通过结核分枝杆菌野生型和突变株感染巨噬细胞这一途径来进行 Rv3881c 调控巨噬细胞功能的相关研究,因此很难排除其他细菌蛋白或相关成分对 EspB 蛋白的影响。为进一步探讨 EspB 蛋白对巨噬细胞的作用,本研究构建了真核表达载体 pEGFP-C1-EspB,并将其转染小鼠巨噬细胞系 RAW264.7,经筛选获得稳定表达 EspB 的稳转巨噬细胞系,为后续试验提供了研究平台。

1 材料和方法

1.1 材料和方法

1.1.1 质粒:质粒 pET21a(+)-EspB 为本实验室构建。

1.1.2 主要试剂和仪器:Universal Genomic DNA Extraction kit ver. 3.0 以及 Probest® DNA 聚合酶 II 购自 TaKaRa 公司。限制性核酸内切酶 *Xho* I、*Bam*HI 以及 T4 DNA 连接酶均购自 New England Biolabs 公司。Endo-free plasmid mini kit I 质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司。感受态 DH5 α 细胞、Quantscript RT kit Quant cDNA 第一链合成试剂盒以及 RNA simple Total RNA kit 购自 Tiangen 公司。真核细胞转染试剂 Lipofectamine™ LTX and PLUS™ Reagents 购自 invitrogen 公司。Anti-GFP antibody 购自 ebioscience 公司, EspB 单抗为本实验室制备。HRP 标记的 Goat anti-Mouse IgG 购自 Santa Cruze 公司。DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司, GFP 标签蛋白裂解液(分子量:35 kDa) 购自北京康为世纪公司, RIPA 裂解缓冲液购自普利莱公司。小鼠巨噬细胞 RAW264.7 和 pEGFP-C1 载体为本实验保存。引物均由上海英俊公司合成。其它试剂均为国产和进口分析纯。

1.2 EspB 基因的扩增

以 pET21a(+)-EspB 为模板,使用引物(F1, R1) 利用 PCR 方法扩增出 EspB 基因。PCR 条件为: 94℃ 1 min; 94℃ 1 min; 58℃ 2 min; 72℃ 2 min, 30 个循环; 72℃ 5 min。

1.3 质粒的构建和鉴定

通过 *Xho*I 和 *Bam*HI 限制酶切位点将 PCR 产

物双酶切后连入表达载体 pEGFP-C1, 将连接产物转化入大肠杆菌 DH5 α 进行扩增, 随机挑选菌落进行菌落 PCR 鉴定, 并进行酶切鉴定, 送上海英俊有限公司测序。测序正确的质粒命名为 pEGFP-C1-EspB。

1.4 细胞转染和筛选

转染前 1 天接种 RAW264.7 细胞于 24 孔板(每孔约 2.0×10^5 个), 待细胞汇合度达到 60% - 80% 时用于转染。转染当天, 先给细胞换液, 向每孔加入 0.5 mL 完全培养基(不加抗生素)。转染时分为脂质体对照组、pEGFP-C1 组和 pEGFP-C1-EspB 组, 每组设置 2 个复孔。pEGFP-C1 和 pEGFP-C1-EspB 质粒均转染 1.2 μ g, PLUS 和 LTX 的用量均分别为 1 μ L 和 3 μ L。转染 24 h 后加入 G418 至终浓度为 800 μ g/mL, 每 2 天更换培养液, 同时以未转染的 RAW264.7 细胞作为阴性对照。培养 14 天后, 转染细胞有抗 G418 的克隆长出, 而阴性对照细胞全部死亡。将转染细胞有限稀释并克隆化培养于 96 孔培养板中。培养 6 天后, 挑选单克隆细胞生长孔于倒置荧光显微镜下观察, 有绿色荧光的细胞为阳性细胞。将挑选的阳性单克隆传代同时命名为 RAW-EGFP 和 RAW-EspB。

1.5 EspB 基因整合的 PCR 检测

分别收集 RAW-EGFP 和 RAW-EspB 细胞。按 Universal Genomic DNA Extraction kit ver. 3.0. 试剂盒操作说明提取全基因组, 根据 pEGFP-C1 的特征在 *Xho*I 和 *Bam*HI 酶切位点附近设计两条引物(F2, R2)。若 pEGFP-C1-EspB 整合入细胞染色体, 则扩增出 *EGFP-EspB* 的全长约为 2268 bp, 相反只能扩增出 *EGFP* 的长度约 888 bp。

1.6 EspB 基因的转录水平的 RT-PCR 检测

收集 RAW-EGFP 和 RAW-EspB 细胞。按 RNA 全基因组提取试剂盒进行细胞总 RNA 的提取, 在 0.25 mL 的 Eppendorf 管进行反转录, 获得第 1 条 cDNA 链。随机引物 (10 μ mol/L) 2 μ L, dNTPs (DEPC 水溶解) 2 μ L, RNase-free 水 12 μ L, Quant Reverse Transcriptase 1 μ L, 模板 RNA 1 μ L, 总反应体积为 20 μ L, 37℃ 60 min。-80℃ 保存。取 5 μ L cDNA 用于 PCR 扩增 *EspB*, β -*actin* 基因作为内参, 引物为(F3, R3)。

1.7 荧光显微镜观察

使用 6 孔板培养转入 RAW-EGFP 和 RAW-

EspB 细胞系,待细胞的汇合度为 60% 时,置于荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达,并采集图像。

1.8 Western blot 检测 EspB 的表达

分别收集 RAW-EGFP 和 RAW-EspB 细胞,使用 RIPA 裂解缓冲液裂解细胞后,4℃,12000 × g 离心 10 min,取上清获得细胞总蛋白产物。使用抗 GFP 抗体对 RAW-EGFP 细胞系进行 Western blot 鉴定。样品制备成功后进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后恒流 300 mA,90 min 将蛋白转移至 NC 膜上。使用丽春红染色检验蛋白是否已经转移至 NC 膜上,将膜置于 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,以 1:1000 浓度稀释抗 GFP 抗体,热封,4℃ 孵育过夜, TBST (20 mmol/L Tris-HCl, 500mmol/L NaCl, 0.1% v/v Tween 20) 洗 3 次,每次 10 min。以 1:2000 浓度稀释二抗,热封,室温下摇动 1.5 h, TBST 洗 3 次,每次 10 min。加入化学发光剂,去暗室显影。使用抗 EspB 抗体按照上述同样的步骤进行 RAW-EspB 细胞系的鉴定,其中一抗稀释度为 1:1000,二抗的稀释度为 1:2000。

表 1 PCR 反应中所用的引物

Table 1 Primers used for amplifying the PCR products

Primer name	Primer sequence (5'→3')
F1	AGACCTCGAGCTACGCAGTCGCAGACCCGTGACGGTG
R1	AGACGGATCCTATCACTTCGACTCCTTACTGTCCTGGC
F2	CCGAGCTGGTTTAGTGAACCCGTCAGATC
R2	CCGCAAGTAAACCTCTACAAATGTGCTATGG
F3	GTACGCCAACACAGTGCT
R3	TCCTGCTTGCTGATCCAC

2 结果

2.1 表达载体的构建

EspB 基因全长 1383 bp, pEGFP-C1 基因的全长约为 4.7 kb。使用 PCR 技术扩增 EspB 基因后连入 pEGFP-C1 载体后,将重组质粒 pEGFP-C1-EspB 送往英俊公司测序,测序结果与 GenBank 序列相同,证明重组真核表达质粒 pEGFP-C1-EspB 构建成功。

2.2 稳定表达 EspB 蛋白的 RAW264.7 细胞系的获得

转染细胞常规培养于含 800 μg/mL G418 的 DMEM 完全培养基中,培养 15 d 左右,对照组细胞全部死亡,而 pEGFP-C1 和 pEGFP-C1-EspB 转染的细胞随培养时间延长死亡细胞逐渐减少,培养 30 d

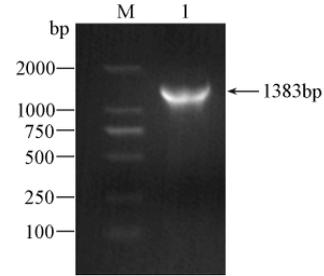


图 1 PCR 扩增 EspB 结果

Fig. 1 PCR results of EspB. A: 1. EspB, M. DNA marker (DL2000).

后无细胞死亡,提示筛选成功,将培养液更换为含 200 μg/mL G418 的 DMEM 完全培养基进行维持和克隆化。经 2 次克隆化后获得的稳转细胞系分别命名为 RAW-EGFP 和 RAW-EspB。

2.3 EspB 基因整合及转录水平的检测结果

利用 pEGFP-C1 上设计的引物对细胞基因组 DNA 进行 PCR 扩增,核酸电泳结果显示 RAW-EGFP 细胞系仅扩增出来大小约为 888 bp 的片段,而 RAW-EspB 细胞系扩增出大约为 2268 bp 的基因片段,与预测相符,表明 EspB 基因整合入 RAW-EspB 细胞系 (图 2-A)。

采用 RT-PCR 分析 mRNA 水平, RAW-EGFP 稳转细胞系和 RAW-EspB 稳转细胞系均可扩增出片段大小为 204 bp 的内参基因 β-actin (图 2-B),相反在 RAW-EspB 细胞系中能扩增出大小为 1383 bp 左右的条带,大小与 EspB 相符,但 RAW-EGFP 细胞系则无目的片段的的存在 (图 2-C)。这表明在 RAW-EspB 细胞系中有 EspB 的 mRNA 表达。

2.4 在转染并经筛选的 RAW264.7 细胞中观察融合蛋白的表达

本实验中 EspB 基因连入 pEGFP-C1 载体,与上游的 EGFP 报告基因在同一阅读框中共同表达融合蛋白。在荧光显微镜下观察 RAW-EspB 以及 RAW-EGFP 巨噬细胞系,发现两种细胞系均显示稳定均匀的绿色荧光,表明 EGFP-EspB 融合蛋白和 EGFP 均能够分别稳定表达于 RAW-EspB 和 RAW-EGFP 巨噬细胞系 (图 3)。

2.5 稳转细胞中重组蛋白的表达

使用抗 GFP 抗体的 Western blot 检测结果显示, RAW-EGFP 细胞系以及 RAW-EspB 细胞系分别能够稳定表达 EGFP 和 EGFP-EspB 融合蛋白

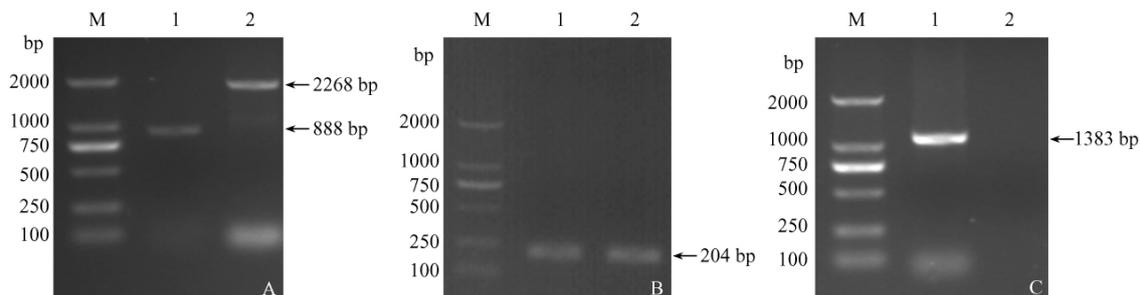


图 2 *EspB* 基因整合以及转录水平的分析

Fig. 2 Analysis of *EspB* gene integration and transcription in the cell lines RAW-EGFP and RAW-EspB.

A, PCR analysis of genomic DNA extracted from the transfected cell lines. 1, PCR fragment amplified from genomic DNA of RAW-EGFP; 2, PCR fragment amplified from genomic DNA of RAW-EspB; M: DNA marker. (B-C), RT-PCR analysis of total RNA extracted from the transfected cell lines. B, β -actin was used as an internal control for RT-PCR. 1, RT-PCR fragment of β -actin amplified from RNA extracted from RAW-EspB; 2, RT-PCR fragment of β -actin amplified from RNA extracted from RAW-EGFP. C, RT-PCR of *EspB* gene. 1, PCR fragment of *EspB* amplified from RNA of RAW-EspB; 2, PCR result of *EspB* amplified from RNA of RAW-EGFP. M: DNA marker.

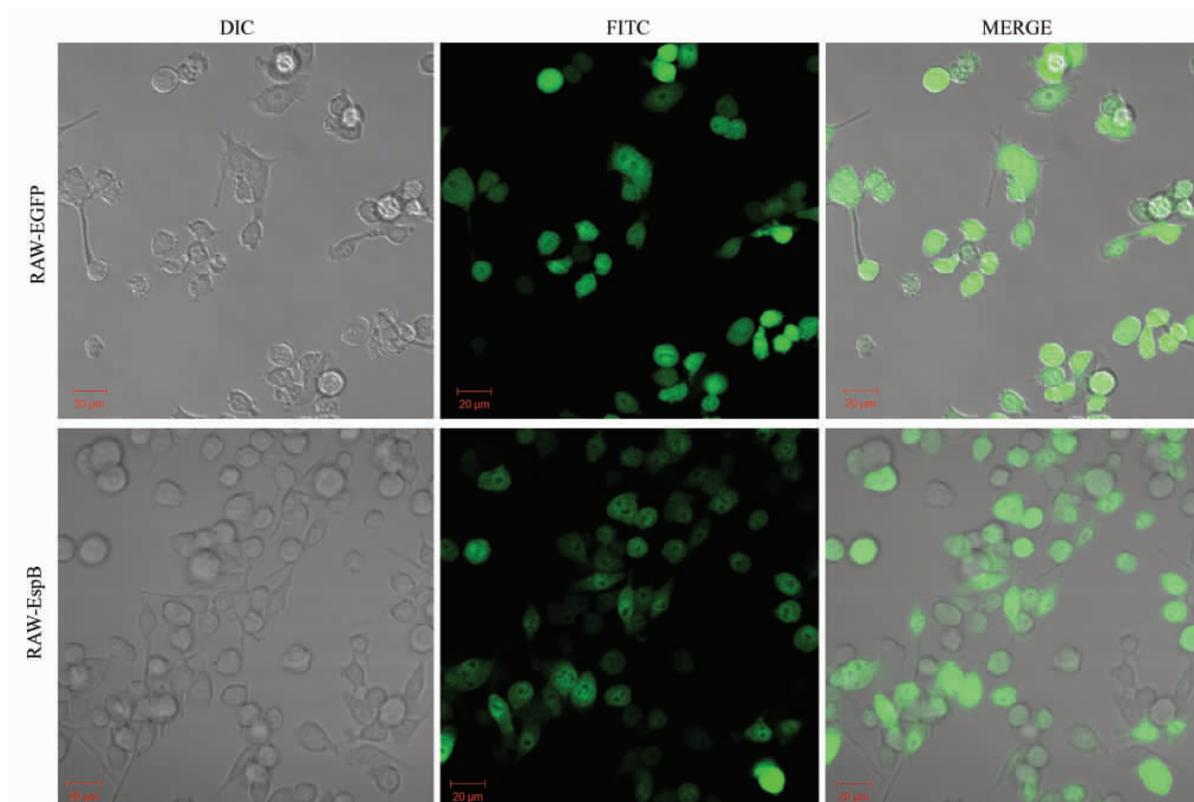


图 3 荧光显微镜下观察 EGFP 以及 EGFP-EspB 蛋白的表达

Fig. 3 The stable expression of EGFP and EGFP-EspB proteins in transfected cell lines as observed by fluorescence microscopy (40 \times). The cell lines RAW-EGFP and RAW-EspB were plated and examined by fluorescence microscopy under DIC and FITC optics to evaluate the expression of proteins. Merged images represented regions of overlap between the EGFP fluorescence (green) and DIC image.

(图 4-A), 分子量大小符合预期大小, EGFP 蛋白的分子量大小为 27 kDa, EGFP-EspB 融合蛋白分子量大小为 82 kDa。使用 EspB 抗体的 Western

blot 检测结果同样证实 RAW-EspB 细胞系能够表达 EGFP-EspB 融合蛋白, 分子量大小符合预期大小(图 4-B)。

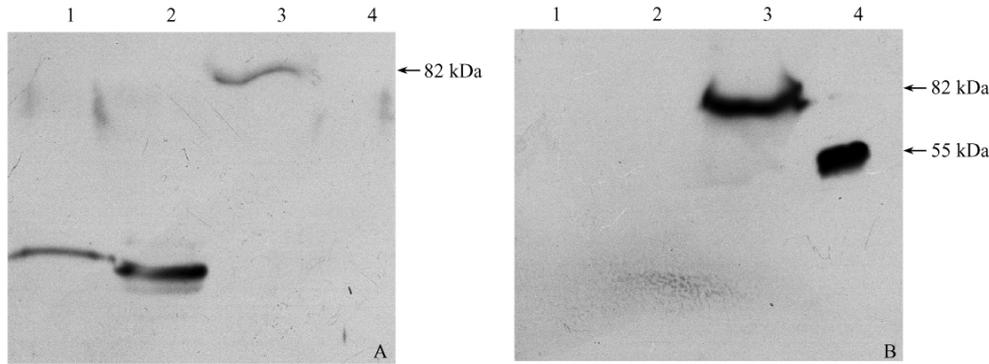


图4 Western blot 鉴定 EGFP 蛋白以及 EGFP-EspB 蛋白在稳定表达 RAW264.7 细胞系中的表达

Fig. 4 Identification of the expression of EGFP and EGFP-EspB proteins in stable transfected RAW264.7 cell lines by Western blot. A, Identification of the expression of EGFP and EGFP-EspB separately in RAW-EGFP and RAW-EspB cell lines by GFP polyclonal antibody. 1, an unrelated GFP-tagged protein (35 kDa) as a positive control; 2, RAW-EGFP cell lysate; 3, RAW-EspB cell lysate; 4, purified EspB as a negative control. B, Identification of the expression of EGFP-EspB in RAW-EspB cell line by EspB monoclonal antibody. 1, an unrelated GFP-tagged protein (35 kDa) as a positive control; 2, RAW-EGFP cell lysate; 3, RAW-EspB cell lysate; 4, purified EspB as a negative control.

3 讨论

结核分枝杆菌进入巨噬细胞吞噬体后,不与细胞内的溶酶体融合,无法形成成熟的吞噬溶酶体,因此免遭消化降解;同时细菌还可以从巨噬细胞吞噬体中逃逸,在巨噬细胞中长期存活,并在一定的时期扩散到其他组织细胞;感染结核分枝杆菌的巨噬细胞不易凋亡,并在一定的时期裂解细胞扩散到其他组织细胞;感染结核分枝杆菌的巨噬细胞不易凋亡,为结核菌的长期生存创造了条件^[10-12]。EspB、CFP-10 和 ESAT-6 的共分泌对结核菌在巨噬细胞内的生长非常重要,并且能抑制巨噬细胞吞噬体的成熟。敲除 EspB 基因的突变菌株几乎丧失毒力, EspB 对毒力的贡献似乎比 CFP-10 和 ESAT-6 更大。有研究显示一个 CFP-10 和 ESAT-6 以外的 ESX-4 分泌蛋白对抑制吞噬体的成熟是必需的^[13], EspB 很可能就是这个关键分子。目前国际上对 EspB 蛋白的毒力研究还比较少,仅有的研究也是通过结核分枝杆菌直接感染细胞而进行的研究,这种方法有一种局限性即难以排除其他结核分枝杆菌蛋白的影响从而不能很好的定义 EspB 蛋白单独对巨噬细胞

的调控作用。因此,建立能够稳定表达 EspB 蛋白的巨噬细胞系有助于对其调控巨噬细胞的分子机理的更深入的研究。由于巨噬细胞转染效率较低,获得稳转巨噬细胞系一直是一个技术难题,但是通过对转染条件的摸索,我们成功建立了能够稳定表达融合有 EGFP 标签的 EspB 蛋白的稳转巨噬细胞系,而国内外尚未有相关报道。

EGFP 是一种被广泛使用的荧光标记物,因其对蛋白分子的功能影响很小,因此通常被用于检测蛋白质分子的定位、迁移,还可以研究蛋白质分子的相互作用以及蛋白质构象变化^[14-15]。因此,本研究获得的表达 EGFP-EspB 融合蛋白的稳转细胞系一方面可用于 EspB 蛋白调控巨噬细胞相关功能的研究,同时其荧光特点也为研究 EspB 蛋白与细胞蛋白之间的相互作用提供了便利。目前本实验室正在进行相关的功能实验研究。

总之,我们首次建立了能够稳定表达 EspB 蛋白的稳转 RAW264.7 细胞系,试图初步阐明这 EspB 分泌蛋白在调控巨噬细胞功能中所起的作用以及 EspB 与巨噬细胞蛋白之间的相互作用,从而增加我们对 ESX-4 分泌系统致病机理的了解,并为新的结核防治药物的研制提供理论依据。

参考文献

- [1] El-Sadr WM, Tsiouris SJ. HIV-associated tuberculosis: diagnostic and treatment challenges. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 2008, 29(5): 525-531.
- [2] Fremont CM, Yeremeev V, Nicolle DM, Jacobs M, Quesniaux VF, Ryffel B. Fatal Mycobacterium tuberculosis infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88. *The Journal of Clinical Investigation*, 2004, 114(12): 1790-1799.
- [3] Pieters J. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes and Infection*, 2001, 3(3): 249-255.
- [4] Gao LY, Guo S, McLaughlin B, Morisaki H, Engel JN, Brown EJ. A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion. *Molecular Microbiology*, 2004, 53(6): 1677-1693.
- [5] McLaughlin B, Chon JS, MacGurn JA, Carlsson F, Cheng TL, Cox JS, Brown EJ. A mycobacterium ESX-1-secreted virulence factor with unique requirements for export. *PLoS Pathogens*, 2007, 3(8): e105.
- [6] Satchidanandam V, Amara RR, Uchil PD, Singh V. The regulatory elements of the Mycobacterium tuberculosis gene Rv3881c function efficiently in Escherichia coli. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 218(2): 365-370.
- [7] Lodes MJ, Dillon DC, Mohamath R, Day CH, Benson DR, Reynolds LD, McNeill P, Sampaio DP, Skeiky YA, Badaro R, Persing DH, Reed SG, Houghton RL. Serological expression cloning and immunological evaluation of MTB48, a novel Mycobacterium tuberculosis antigen. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(7): 2485-2493.
- [8] Xu J, Laine O, Masciocchi M, Manoranjan J, Smith J, Du SJ, Edwards N, Zhu X, Fenselau C, Gao LY. A unique Mycobacterium ESX-1 protein co-secreted with CFP-10/ESAT-6 and is necessary for inhibiting phagosome maturation. *Molecular Microbiology*, 2007, 66(3): 787-800.
- [9] 李浩, 徐俊杰, 陈薇. 结核分枝杆菌 RD-1 区编码蛋白的结构和功能. *生物化学与生物物理进展 (Progress in Biochemistry and Biophysics)*, 2009, 36(10): 1260-1266.
- [10] Deretic V, Singh S, Master S, Harris J, Roberts E, Kyei G, Davis A, de Haro S, Naylor J, Lee HH, Vergne I. Mycobacterium tuberculosis inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defence mechanism. *Cellular Microbiology*, 2006, 8(5): 719-727.
- [11] Derrick SC, Morris SL. The ESAT6 protein of Mycobacterium tuberculosis induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. *Cellular Microbiology*, 2007, 9(6): 1547-1555.
- [12] Houben EN, Nguyen L, Pieters J. Interaction of pathogenic mycobacteria with the host immune system. *Current Opinion in Microbiology*, 2006, 9(1): 76-85.
- [13] Tan T, Lee WL, Alexander DC, Grinstein S, Liu J. The ESAT-6/CFP-10 secretion system of Mycobacterium marinum modulates phagosome maturation. *Cellular Microbiology*, 2006, 8(9): 1417-1429.
- [14] Chalfie M. GFP: Lighting up life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(25): 10073-10080.
- [15] Lorang JM, Tuori RP, Martinez JP, Sawyer TL, Redman RS, Rollins JA, Wolpert TJ, Johnson KB, Rodriguez RJ, Dickman MB, Ciuffetti LM. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(5): 1987-1994.

Stable expression of *Mycobacterium tuberculosis* protein EspB in RAW264.7

Hao Li, Ying Yin, Dayong Dong, Jun Zhang, Ling Fu, Jun Ren, Junjie Xu*, Wei Chen*

State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China

Abstract: [Objective] We established a cell line stably expressing *Mycobacterium tuberculosis* secretory protein EspB in order to provide evidences for studying EspB in modulating the functions of macrophage. [Methods] The recombinant plasmid pEGFP-C1-EspB was first constructed, then RAW264.7 cell was transfected with pEGFP-C1-EspB and pEGFP-C1 by liposome respectively. After screening with a high level of G418, the macrophage cell lines that stably expressed EGFP-EspB fusion protein or EGFP were established. The gene and protein expression levels were further analyzed by RT-PCR, fluorescence microscopy and western blot. [Results] The *EGFP-EspB* fusion gene was integrated into the chromosome and the protein was stably expressed in the selected macrophage cell line. The macrophage cell lines that stably expressed EGFP-EspB fusion protein or EGFP were established. [Conclusion] These results gave us a tool for the future study in the effects of EspB protein in modulating the functions of macrophage and its interaction with other molecules of macrophage.

Keywords: EspB, EGFP, RAW264.7, stable transfection, expression

(本文责编:张晓丽)

Supported by the the National Natural Science Foundation of China (no. 30972772 and 81025018)

* Corresponding authors. Tel: +86-10-66948491; Fax: +86-10-63815273; E-mail: xujunjie1@gmail.com; chewei0226@yahoo.com.cn

Received: 18 January/Revised: 21 March 2011

《微生物学报》审稿程序

问:贵刊的审稿程序是怎样的?一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答:本刊严格遵守“三审制”,即:编辑部内审,专家外审,主编总审。从投稿日期开始,争取在2个月之内给出审稿结果,5-7个月之内发表。

- (1) 收到来稿后,首先将请2位专家进行初审,再送主编进行最后的总审,这个过程一般不会超过2个月。如果初审2位专家的意见分歧较大,编辑部将再请第3位专家进行初审,之后再送主编总审,那么此稿的审理时间可能会超过2个月。
- (2) 完成审稿后(即主编给出总审意见),编辑会给作者发出E-mail告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的)。作者在返回修改稿后,经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者,在没有完成全部审稿之前,不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。