



## 幽门螺杆菌分子伴侣 GroEL 相互作用蛋白分析

翟康乐<sup>1</sup>, 宫雅楠<sup>1</sup>, 肖迪<sup>1</sup>, 孙路<sup>1</sup>, 何利华<sup>1</sup>, 房梦颺<sup>1,2</sup>, 尤元海<sup>1</sup>, 王磊<sup>1</sup>,  
闫笑梅<sup>1</sup>, 张建中<sup>1\*</sup>

1 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 传染病预防控制国家重点实验室, 北京 102206

2 南京医科大学公共卫生学院, 江苏 南京 211166

翟康乐, 宫雅楠, 肖迪, 孙路, 何利华, 房梦颺, 尤元海, 王磊, 闫笑梅, 张建中. 幽门螺杆菌分子伴侣 GroEL 相互作用蛋白分析[J]. 微生物学报, 2023, 63(5): 1970-1981.

ZHAI Kangle, GONG Yanan, XIAO Di, SUN Lu, HE Lihua, FANG Mengyang, YOU Yuanhai, WANG Lei, YAN Xiaomei, ZHANG Jianzhong. Interacting proteins of *Helicobacter pylori* GroEL protein[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(5): 1970-1981.

**摘要:** 【目的】获得幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, HP) GroEL 结合蛋白质组构成谱, 为进一步探究 GroEL 及其与相互作用蛋白在 HP 致病机制中的作用提供新思路。【方法】在构建 HP GroEL 原核表达重组大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)<sup>pET-28a(+)-groEL</sup> 基础上, 纯化带有 His 标签的 GroEL 蛋白, 与 HP 全菌蛋白提取液共孵育后, 利用 Protein G 磁珠和抗 His 标签抗体免疫沉淀法对复合物进行捕获, 然后对复合物中 GroEL 及其结合的蛋白质进行质谱法鉴定, 根据主要功能对其进行分类, 并完成蛋白质相互关系网络分析。【结果】对 GroEL 蛋白捕获成分进行分析, 共鉴定出 59 种可能与 GroEL 结合的蛋白质, 其中包括 19 种代谢酶类(KatA、GltA 和 AhpC 等参与氧化还原相关酶类 7 种, PepA、RocF 和 HtrA 等肽酶 5 种, 以及 2 种参与脂肪代谢酶、2 种参与 ATP 合成酶、2 种尿素酶和 HP17\_08079 蛋白等)、15 种外膜蛋白(黏附素 BabA、SabA、HapA 及其他膜蛋白等)、8 种转录翻译相关蛋白(Tuf、RpoBC 等)、5 种分子伴侣(DnaK、GroES 等)、3 种细胞毒素相关蛋白(CagA 等)、3 种氧化还原相关蛋白(TrxA 等)、2 种信号转导蛋白(TlpB、TlpD)和 4 种功能尚不明确蛋白。蛋白质相互关系网络分析发现, 可形成多个分簇, 并以 GroEL 为网络的中心节点。外膜蛋白, 特别是重要黏附素 BabA、SabA、HapA 等与 GroEL 的广泛关联, 提示 GroEL 可能在 HP 与宿主胃黏膜上皮细胞相互作用中发挥重要作用。【结论】HP 中 GroEL 结合蛋白质谱广泛, 功能涉及 HP 代谢、转录翻译、氧化还原和黏附等, 并参与 HP 生存适应、定殖及致病过程。GroEL 有望成为一种新的研究 HP 致病性及发展感染干预策略的重要靶点。

**关键词:** 幽门螺杆菌; 分子伴侣 GroEL; 免疫共沉淀; 质谱

资助项目: 国家科技重大专项(2018ZX10712-001)

This work was supported by the National Major Science and Technology Projects of China (2018ZX10712-001).

\*Corresponding author. E-mail: zhangjianzhong@icdc.cn

Received: 2023-02-27; Accepted: 2023-04-18; Published online: 2023-04-23

# Interacting proteins of *Helicobacter pylori* GroEL protein

ZHAI Kangle<sup>1</sup>, GONG Yanan<sup>1</sup>, XIAO Di<sup>1</sup>, SUN Lu<sup>1</sup>, HE Lihua<sup>1</sup>, FANG Mengyang<sup>1,2</sup>, YOU Yuanhai<sup>1</sup>, WANG Lei<sup>1</sup>, YAN Xiaomei<sup>1</sup>, ZHANG Jianzhong<sup>1\*</sup>

1 State Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China  
2 School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, Jiangsu, China

**Abstract: [Objective]** To obtain the composition spectrum of *Helicobacter pylori* (HP) GroEL binding proteins and provide new insights into the role of GroEL and its interacting proteins in the pathogenesis of *H. pylori*. **[Methods]** Based on the construction of *H. pylori* GroEL prokaryotic expression recombinant bacteria *Escherichia coli* BL21(DE3)<sup>pET-28a(+)-groEL</sup>, the His-tagged GroEL protein was purified and incubated with *H. pylori* whole-cell protein extract. The complex was captured using Protein G magnetic beads and anti-His tag antibody immunoprecipitation, and the GroEL and its possible binding proteins were identified by mass spectrometry. The proteins were classified according to their main functions, and protein interaction network analysis was performed. **[Results]** A total of 59 proteins were identified as possible binding partners of GroEL, including 19 metabolic enzymes (7 of which are involved in oxidative stress, such as KatA, GltA, and AhpC; 5 peptidases, such as PepA, RocF, and HtrA; 2 enzymes involved in lipid metabolism; 2 enzymes involved in ATP synthesis; HP17\_08079 and 2 urease enzymes), 15 outer membrane proteins (including adhesins BabA, SabA, HapA, and other membrane proteins), 8 transcription and translation-related proteins (such as Tuf and RpoBC), 5 molecular chaperones (such as DnaK and GroES), 3 cytotoxin-related proteins (such as CagA), 3 oxidative stress-related proteins (such as TrxA), 2 signal transduction proteins (TlpB and TlpD), and 4 proteins with unknown functions. Protein interaction analysis revealed that the entire network could form multiple clusters, with GroEL as the central node of the network. The extensive association of outer membrane proteins, particularly the important adhesins BabA, SabA, HapA, with GroEL suggests that GroEL may play an important role in the interaction between *H. pylori* and host gastric mucosal epithelial cells. **[Conclusion]** The spectrum of *H. pylori* GroEL binding proteins is extensive, and the related proteins are involved in *H. pylori* metabolism, transcription and translation, oxidation-reduction, and adhesion, participating in the survival, colonization, and pathogenic processes. GroEL is expected to become a novel important target for studying *H. pylori* pathogenicity and developing infection intervention strategies.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*; chaperone GroEL; immunoprecipitation; mass spectrometry

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, HP)是革兰染色阴性、呈螺旋状的微需氧菌。HP持续感染可引发胃部慢性活动性炎症<sup>[1]</sup>,其中约15%–20%会发生消化性溃疡<sup>[2]</sup>,5%–10%发生相

关性消化不良<sup>[3]</sup>,约1%会发展为胃恶性肿瘤(胃癌、黏膜相关淋巴组织淋巴瘤)<sup>[4]</sup>。HP致病作用广泛,疾病负担重,但致病机制尚未完全明确。

HP的分子伴侣 GroEL,是热休克蛋白 60

(heat shock protein, HSP60)在原核生物中的同源蛋白,其主要功能是帮助蛋白转运、完成正确折叠及恢复天然构象<sup>[5]</sup>。在HP相关研究中发现,GroEL也是一种重要的致病相关抗原成分,超过80%的HP感染人群可产生针对GroEL的抗体<sup>[6-7]</sup>,且GroEL抗体的持续存在被认为与HP引起的胃部病变进展为胃癌存在关联<sup>[8-9]</sup>,GroEL也可能在HP诱发炎症向胃癌进展过程中发挥重要作用。由于HP的GroEL与人HSP60同源性较高,其抗体介导的交叉反应在动脉粥样硬化的发生中起到一定的作用<sup>[10]</sup>。作为一种重要的分子伴侣毒力因子,GroEL在HP生物学中的作用非常广泛和重要,虽然人类对HP的分子生物学研究已经有40年的历史,但目前仍缺乏对GroEL与其他蛋白质相互作用的系统性研究。本研究拟通过表达、纯化获得带有His标签的GroEL蛋白,用免疫沉淀法捕获HP中可能与GroEL结合的蛋白质,通过对可能与GroEL结合的蛋白质组成谱的解析和相互关系网络分析,为GroEL及其相关蛋白在HP致病中的作用机制研究及可能的感染防控靶点探索提供新的思路。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌株、质粒及试剂

HP标准菌株ATCC 43504购自美国典型微生物菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)并由本实验室保藏,感受态细胞*E. coli* DH5 $\alpha$ 、*E. coli* BL21(DE3)、表达质粒pET-28a(+)及5K DNA Marker购自北京全式金生物技术股份有限公司,基因组提取试剂盒QIAamp DNA Mini Kit购自QIAGEN公司,限制性内切酶*Bam*H I、*Xho* I和Q5<sup>®</sup>超保真2 $\times$ PCR预混液购自纽英伦生物技术(北京)有限公司,质粒提取试剂盒E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid DNA Mini Kit、

胶回收试剂盒E.Z.N.A.<sup>®</sup> Gel Extraction Kit购自OMEGA公司,T4 DNA连接酶购自TaKaRa公司,His标签蛋白纯化磁珠HisPur<sup>™</sup> Ni-NTA、免疫沉淀磁珠Dynabeads<sup>™</sup> Protein G Immunoprecipitation Kit购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司,鼠抗His标签单抗和鼠抗GST标签单抗购自艾博抗(上海)贸易有限公司,蛋白marker和咪唑(分析纯)购自北京索莱宝科技有限公司,培养基及蛋白纯化、质谱鉴定所用缓冲液等其他试剂均按照需要购买或配制。

### 1.2 引物设计和合成

从NCBI获取ATCC 43504基因组数据(GCF\_900478294.1),提取*groEL*基因序列并设计引物,引物序列为*groEL*-F: 5'-CGGGATCC (*Bam*H I) ATGGCAAAGAAATCAAATTTTCA G-3'; *groEL*-R: 5'-CCGCTCGAG (*Xho* I) CATC ATTCCGCCCATGCCT-3'。引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成。

### 1.3 *groEL* 基因 PCR 扩增

刮取培养48 h的新鲜ATCC 43504菌体,提取其基因组DNA用作模板,分别以*groEL*-F和*groEL*-R为上、下游引物,进行PCR扩增。25  $\mu$ L扩增体系:模板(150 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L,上、下游引物各(10  $\mu$ mol/L) 0.5  $\mu$ L, 2 $\times$ PCR预混液12.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 10.5  $\mu$ L。扩增程序:94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 65  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 90 s, 30个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min, 4  $^{\circ}$ C保存。采用1.5%琼脂糖凝胶电泳进行PCR产物检测,胶回收试剂盒纯化PCR产物。

### 1.4 *groEL* 原核表达系统构建

用*Bam*H I和*Xho* I分别酶切1  $\mu$ g的pET-28a(+)质粒和1  $\mu$ g的胶回收纯化*groEL*,经1.5%琼脂糖凝胶电泳后切胶回收,测量浓度后将*groEL*片段和线性化的pET-28a(+)按3:1比例混合,加入T4 DNA连接酶16  $^{\circ}$ C过夜,连

接产物热激转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 挑取阳性单克隆菌落, 37 °C 过夜培养, 经菌液 PCR 鉴定 *groEL* 基因阳性后送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序确认。选择测序结果正确的 *E. coli* DH5 $\alpha$  克隆, 提取重组表达质粒 pET-28a(+)-*groEL* 后热激转化 *E. coli* BL21(DE3), 挑选阳性单克隆, 培养过夜, 经菌液 PCR 鉴定 *groEL* 基因阳性后, 即完成原核表达重组菌 *E. coli* BL21(DE3)<sup>pET-28a(+)-*groEL*</sup> 的构建。

### 1.5 GroEL 诱导表达

将 *E. coli* BL21(DE3)<sup>pET-28a(+)-*groEL*</sup> 置于 LB 液体培养基中, 37 °C 振荡培养至  $OD_{600}$  为 0.6–1.0 时, 加入 1.0 mmol/L IPTG, 37 °C、180 r/min 振荡培养 4 h, 诱导 GroEL 蛋白表达。离心收集菌体, 用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)重悬, 冰浴超声裂解, 高速离心, 分别收集上清和沉淀, SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达情况。

### 1.6 GroEL 纯化及鉴定

将 500 mL 诱导后的菌液离心后, 用 25 mL 含 50 mmol 咪唑的平衡缓冲液重悬菌体, 冰浴超声裂解, 高速离心收集上清, 即为待纯化样品, 按 400  $\mu$ L 待纯化样品用 40  $\mu$ L HisPur<sup>TM</sup> Ni-NTA 磁珠的比例进行纯化。将待纯化样品加入磁珠中, 涡旋 10 s, 孵育 30 min, 用含 100 mmol/L 咪唑的洗涤缓冲液洗涤磁珠 2 次, 用含 300 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液洗脱 2 次, 分别收集洗脱液, 采用二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定洗脱液中蛋白浓度并经 SDS-PAGE 检测纯化效果。40  $\mu$ L 含 GroEL 的洗脱液经 50 mmol/L 碳酸氢铵(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) 3 次超滤换液后, 加入 1  $\mu$ L 200 mmol/L 三(2-羧乙基)膦[tris(2-carboxyethyl)phosphine, TCEP]室温静置 1 h, 加入 1  $\mu$ L 375 mmol/L 碘乙酰胺(iodoacetamide, IAA)室温避光静置 30 min, 加入

1  $\mu$ g 胰酶 37 °C 过夜, 用 Pierce<sup>®</sup> C<sub>18</sub> Spin Columns 脱盐柱脱盐后, 4 °C 真空离心浓缩, 用 10  $\mu$ L 0.1% 甲酸(formic acid, FA)重悬后, 经高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)获取原始谱图。用 Proteome Discoverer (V. 2.4)软件对原始谱图进行蛋白库(UniProtKB/Swiss-Prot)搜索, 分析鉴定相应肽段及所匹配到的蛋白质。

### 1.7 HP ATCC 43504 中可能和 GroEL 结合的蛋白质的鉴定及分类

将 2  $\mu$ g 鼠抗 His 单抗与 50  $\mu$ L (1.5 mg) Protein G 磁珠室温孵育 10 min, 结合至 Protein G 磁珠上; 将新鲜培养的 ATCC 43504 用 PBS 洗涤 2 次, 离心收集菌体, 按 1 g 湿重菌体/10 mL PBS 的比例重悬, 冰浴超声裂解, 高速离心后收集上清, 即为 ATCC 43504 蛋白提取液。向 500  $\mu$ L ATCC 43504 蛋白提取液中加入 5  $\mu$ g 纯化后的 GroEL 蛋白, 室温孵育 1 h, 加至结合了鼠抗 His 单抗的 Protein G 磁珠中, 室温孵育 10 min, 用 200  $\mu$ L 洗涤液洗涤磁珠 3 次, 加入 20  $\mu$ L 洗脱液振荡孵育 2 min, 收集洗脱液用于下游质谱鉴定。将 2  $\mu$ g 鼠抗 GST 单抗结合至 50  $\mu$ L (1.5 mg) Protein G 磁珠上, 用作阴性对照, 其他条件与实验组一致。洗脱液中蛋白质的质谱鉴定方法同 1.6 所述。在 Uniprot 蛋白数据库(<https://www.uniprot.org/>)中查阅鉴定出的蛋白质信息, 并根据主要功能进行分类。

### 1.8 GroEL 及可能和其结合的蛋白质的相互关系网络分析

在 STRING (search tool for the retrieval of interacting genes/proteins)数据库(<https://string-db.org/>, version 11.5)中, 首先选择“Protein by name”功能, “Protein name”输入“GroEL”, “Organisms”选择“*Helicobacter pylori* 26695”, 查询数据库中预测的 GroEL 功能伙伴蛋白, 然后选择“Multiple proteins”功能, “List of names”中

导入实验中鉴定出的蛋白质列表,“Organisms”选择“*Helicobacter pylori* 26695”,进行多个蛋白质的相互关系网络分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 *groEL* 基因 PCR 扩增

以 ATCC 43504 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 1.5%琼脂糖凝胶电泳显示扩增产物条带介于 1 500–2 000 bp 之间(图 1), 产物大小符合预期(1 655 bp)。

### 2.2 GroEL 表达系统构建、表达和纯化

经菌液 PCR 鉴定 *groEL* 基因阳性, 并通过测序确认目的片段与参考序列完全一致, 成功构建了原核表达重组菌并命名为 *E. coli* BL21(DE3)<sup>pET-28a(+)-groEL</sup>。通过加入 1.0 mmol/L IPTG, 在 37 °C、180 r/min 振荡培养的诱导条件下, SDS-PAGE 显示目的蛋白条带介于 63–75 kDa, 大小符合预期, 目的条带在沉淀中占较大比重, 上清中也有一定表达(图 2), 表明目的蛋白在诱

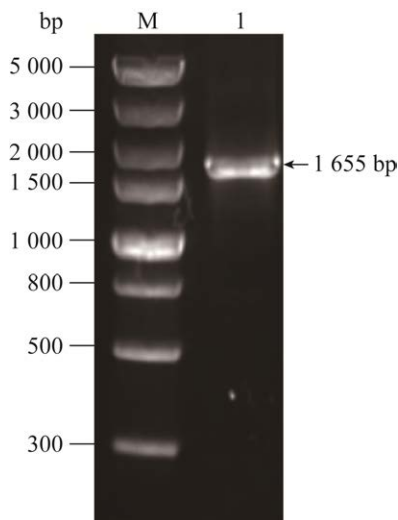


图 1 *groEL* 基因 PCR 扩增结果

Figure 1 Amplification results of *groEL* gene by PCR. M: DNA marker; 1: PCR amplification product of the *groEL* gene.

导过程中能大量表达, 表达后的目的蛋白能以可溶性形式存在, 但主要形成包涵体。可溶性蛋白经 Ni-NTA 磁珠亲和纯化后, SDS-PAGE 显示洗脱液中目的蛋白条带明显, 且纯度较高(图 3)。

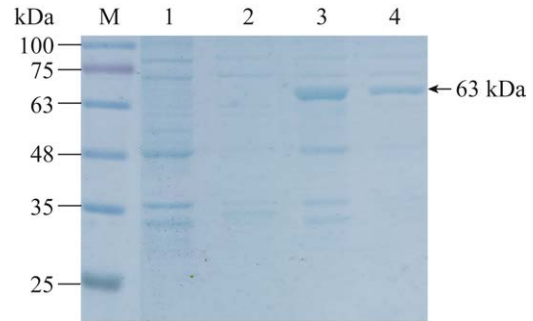


图 2 GroEL 蛋白的诱导表达结果

Figure 2 Induced expression results of GroEL protein. M: Protein marker; 1: Precipitation of the cell lysate from uninduced *E. coli* BL21(DE3)<sup>pET-28a(+)-groEL</sup> cells; 2: Supernatant of the cell lysate from uninduced *E. coli* BL21(DE3)<sup>pET-28a(+)-groEL</sup> cells; 3: Precipitation of the cell lysate from induced *E. coli* BL21(DE3)<sup>pET-28a(+)-groEL</sup> cells; 4: Supernatant of the cell lysate from induced *E. coli* BL21(DE3)<sup>pET-28a(+)-groEL</sup> cells.

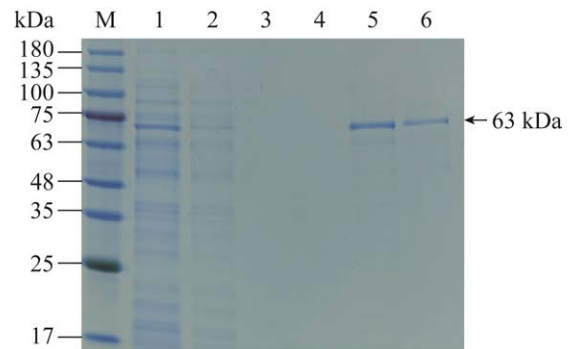


图 3 GroEL 蛋白纯化结果

Figure 3 Purification results of GroEL protein. M: Protein marker; 1: Sample before Ni-NTA magnetic beads incubation; 2: Sample after Ni-NTA magnetic beads incubation; 3, 4: The first and second magnetic beads washing solution; 5, 6: The first and second magnetic beads elution solution.

### 2.3 GroEL 蛋白的质谱鉴定

纯化后的目的蛋白经质谱鉴定, 结果显示其与 HP 的 GroEL 蛋白相匹配并且获得极高的质谱评分, 表明原核表达重组菌 *E. coli* BL21(DE3)<sup>pET-28a(+)-groEL</sup> 表达目的蛋白 GroEL 成功。

### 2.4 HP ATCC 43504 中可能和 GroEL 结合的蛋白鉴定及分类

从 ATCC 43504 的蛋白提取液中捕获了可能与 GroEL 结合的蛋白质, 经质谱鉴定出 59 种蛋白, 具体信息见表 1。对蛋白做功能分类发现,

主要包括 19 种代谢酶类(参与氧化还原相关酶类 7 种, 包括 KatA、GltA、AhpC 等; 肽酶 5 种, PepA、RocF、HtrA 等; 参与脂肪代谢酶类 2 种; 参与 ATP 合成酶类 2 种; 尿素酶 2 种)、15 种外膜蛋白(黏附素 BabA、SabA、HapA 及其他膜蛋白等)、8 种转录翻译相关蛋白(Tuf、RpoBC 等)、5 种分子伴侣(DnaK、GroES 等)、3 种细胞毒素相关蛋白(CagA 等)、3 种氧化还原相关蛋白(TrxA 等)、2 种信号转导蛋白(TlpB、TlpD)和 4 种功能不明蛋白, 具体如表 2 所示。

表 1 可能与 GroEL 结合的蛋白质的质谱鉴定

Table 1 Mass spectrometry identification of proteins possibly binding to GroEL

Accession No.	Description	Coverage (%)	Peptides	PSMs	Unique peptides	AAs	MW (kDa)	calc pI	Score
WP_000961643.1	Peroxiredoxin (AhpC)	35	6	9	6	198	22.2	6.30	25.54
WP_108169803.1	Hop family adhesin HopQ (HopQ)	17	7	8	7	641	69.7	9.11	21.25
WP_108169269.1	Hop family adhesin BabA (BabA)	13	8	8	8	744	80.4	8.81	20.33
WP_001040578.1	Elongation factor Tu (Tuf)	33	9	9	9	399	43.6	5.26	20.19
WP_108169606.1	Methyl-accepting chemotaxis protein TlpB (TlpB)	17	8	8	8	565	62.7	6.42	17.21
WP_000724287.1	Urease subunit beta (UreB)	12	6	6	6	569	61.7	6.01	16.52
WP_108169537.1	Outer membrane beta-barrel protein	9	5	6	5	699	76.0	8.53	16.00
WP_108169053.1	Hop family adhesin AlpA (AlpA)	14	4	5	4	518	56.1	9.10	14.20
WP_000795968.1	LPP20 family lipoprotein (Lpp20)	26	5	5	5	175	19.1	9.51	12.97
WP_108169033.1	Catalase (KatA)	10	4	5	4	505	58.6	8.66	12.29
WP_000323696.1	DUF3944 domain-containing protein (NY40_0613)	24	5	5	5	253	28.4	5.43	12.24
WP_000779223.1	Urease subunit alpha (UreA)	13	4	5	4	238	26.5	8.47	12.21
WP_108169170.1	Outer membrane beta-barrel protein HofC (B0X38_04460)	9	4	5	4	528	59.4	9.33	12.09
WP_108168926.1	Sialic acid-binding protein (SabA)	32	4	5	4	152	17.6	8.72	11.67
WP_000080506.1	F0F1 ATP synthase subunit alpha (AtpA)	9	4	4	4	503	55.1	5.40	9.41
WP_001861912.1	F0F1 ATP synthase subunit beta (AtpD)	10	4	4	4	466	51.1	5.34	9.00
WP_000671927.1	Co-chaperone GroES (GroES)	23	3	3	3	118	13.0	6.60	8.92
WP_108169412.1	TonB-dependent receptor (FrpB)	6	4	4	4	863	95.9	9.14	8.36
WP_108169054.1	Hop family adhesin AlpB (AlpB)	7	3	3	3	528	56.8	9.19	8.32
WP_108169330.1	Hop family outer membrane protein HopA (HopA)	10	3	3	3	482	52.8	9.44	7.23

(待续)

(续表 1)

Accession No.	Description	Coverage (%)	Peptides	PSMs	Unique peptides	AAs	MW (kDa)	calc pI	Score
WP_108168983.1	MULTISPECIES: flagellar sheath lipoprotein HpaA ( <i>Proteobacteria</i> ) (HpaA)	16	3	3	3	260	29.1	8.27	7.02
WP_097551802.1	Tumor necrosis factor alpha-inducing protein (TipA)	21	3	3	3	192	21.8	8.51	6.96
WP_108169924.1	Chemotaxis chemoreceptor TlpD (TlpD)	9	3	3	3	433	48.4	6.25	6.84
WP_108169893.1	Type IV secretion system oncogenic effector CagA (CagA)	3	3	3	3	1 247	139.0	8.84	6.66
WP_162296893.1	S41 family peptidase (C2R77_03000)	6	3	3	3	454	50.0	9.38	6.56
WP_108169905.1	Leucyl aminopeptidase (PepA)	8	3	3	3	496	54.4	7.09	6.11
WP_033765600.1	Outer membrane protein Omp18 (Omp18)	18	2	2	2	179	19.9	6.09	5.57
WP_108169611.1	Molecular chaperone DnaK (DnaK)	4	2	2	2	620	67.1	5.10	5.49
WP_108169113.1	HpaA2 protein (HpaA2)	10	2	2	2	249	28.3	7.39	5.38
WP_108169113.1	30S ribosomal protein S12 (RpsL)	10	2	2	2	249	28.3	7.39	5.38
WP_000020199.1	Thioredoxin (TrxA)	25	2	2	2	106	11.8	5.22	5.01
WP_000086604.1	50S ribosomal protein L6 (RplF)	10	2	2	2	178	19.5	9.83	4.72
WP_108169722.1	50S ribosomal protein L2 (RplB)	8	2	2	2	276	30.2	10.36	4.50
WP_001018219.1	50S ribosomal protein L7/L12 (RplL)	21	2	2	2	125	13.3	4.98	4.41
WP_162296871.1	Bifunctional aconitate hydratase 2/2-methylisocitrate dehydratase (HP17_08079)	3	2	2	2	852	92.6	6.57	4.38
WP_108169000.1	Thioredoxin-disulfide reductase (TrxB)	8	2	2	2	311	33.4	6.09	4.32
WP_108169788.1	Elongation factor G (FusA)	2	2	2	2	692	77.0	5.39	4.15
WP_108169306.1	AAA family ATPase (EC537_00185)	3	2	2	2	856	96.5	6.13	4.08
WP_108168981.1	Trigger factor (Tig)	4	2	2	2	451	51.8	5.31	3.89
WP_108169883.1	Cag pathogenicity island protein CagI (BHU51_05410)	12	1	1	1	115	12.4	8.44	2.71
WP_000889333.1	50S ribosomal protein L25/general stress protein Ctc (RplY)	5	1	1	1	178	19.9	9.39	2.64
WP_108169809.1	Outer membrane beta-barrel protein HofH (AOD76_0206895)	3	1	1	1	471	52.7	9.48	2.36
WP_108169980.1	Zinc ribbon domain-containing protein	2	1	1	1	412	43.6	6.65	2.22
WP_108169980.1	Beta-ketoacyl-ACP synthase II (BB414_08470)	2	1	1	1	412	43.6	6.65	2.22
WP_108169314.1	Hop family outer membrane protein HopF (HopF)	1	1	1	1	485	53.1	9.41	2.17

(待续)

(续表 1)

Accession No.	Description	Coverage (%)	Peptides	PSMs	Unique peptides	AAs	MW (kDa)	calc pI	Score
WP_000117433.1	Citrate synthase (GltA)	3	1	1	1	426	48.3	7.88	2.09
WP_001183652.1	Fumarate reductase cytochrome b subunit (FrdC)	4	1	1	1	255	28.8	9.44	2.04
WP_108169352.1	Acyl-ACP-UDP-N-acetylglucosamine O-acyltransferase (LpxA)	4	1	1	1	270	29.8	7.08	2.04
WP_108169612.1	Nucleotide exchange factor GrpE (GrpE)	7	1	1	1	191	22.2	5.41	2.02
WP_108169634.1	Cytochrome-c oxidase, cbb3-type subunit III (OUK_0478)	3	1	1	1	292	32.6	6.18	2.02
WP_000976634.1	Do family serine endopeptidase	1	1	1	1	476	51.5	9.19	2.02
WP_108169978.1	Cag pathogenicity island type IV secretion system protein CagD (CagD)	4	1	1	1	207	24.0	8.16	1.99
WP_108169513.1	ABC transporter substrate-binding protein	4	1	1	1	333	37.2	8.95	1.97
WP_108169787.1	DNA-directed RNA polymerase subunit beta/beta' (RpoBC)	0	1	1	1	2 890	323.3	7.06	1.95
WP_108169488.1	arginase (RocF)	4	1	1	1	322	36.8	6.99	1.93
WP_108168925.1	DUF1104 domain-containing protein (AA977_03345)	10	1	1	1	140	16.0	9.52	1.92
WP_108169590.1	FAD-dependent oxidoreductase (Mqo)	2	1	1	1	450	50.7	7.64	1.92
WP_108169497.1	Cytochrome c1 (HPK25_00925)	3	1	1	1	285	31.7	8.54	1.92
WP_108169917.1	2-oxoglutarate synthase subunit alpha (BZK19_00840)	2	1	1	1	375	41.4	6.40	1.90

AA: Length of protein; calc: pI, calculated isoelectric point; MW: Molecular weight; PSM: Peptide spectrum match.

表 2 可能与 GroEL 结合的蛋白质的分类

Table 2 Classification of proteins possibly binding to GroEL

Protein group	Proteins	Count*
Enzyme		19
Redox-related enzyme	GltA, KatA, AhpC, TrxB, FrdC, Mqo, BZK19_00840	7
Peptidase	PepA, RocF, HtrA, AA977_03345, C2R77_03000	5
Other enzymes	UreA, UreB, AtpA, AtpD, LpxA, BB414_08470, HP17_08079	7
Outer membrane protein	FrpB, AlpA, AlpB, AOD76_0206895, B0X38_04460, BabA, HopA, HopF, HopQ, HpaA, HpaA2, Omp18, SabA, Outer membrane beta-barrel protein, Lpp20	15
Transcription-translation-associated proteins	FusA, RplB, RplF, RplL, RplY, RpoBC, RpsL, Tuf	8
Chaperone	DnaK, GroES, GrpE, Tig, ClpB	5
Cag pathogenicity island related proteins	CagA, CagD, BHU51_05410	3
Redox-related proteins	TrxA, HPK25_00925, OUK_0478	3
Signal transduction related proteins	TlpB, TlpD	2
Proteins with function not established	AA977_03345, TipA, Zinc ribbon domain-containing protein, ABC transporter substrate-binding protein	4

\*: Indicates the number of proteins classified into the group.



## 2.5 GroEL 和其可能结合蛋白的相互关系网络分析

STRING 数据库中预测的 GroEL 功能伙伴蛋白有 10 种, 其中 7 种为分子伴侣, 另外 3 种为柠檬酸合酶(GltA)、F0F1 ATP 合酶亚基  $\beta$  (AtpD)和 DNA 导向的 RNA 聚合酶亚基  $\beta/\beta'$  (RpoBC) (图 4)。本研究鉴定出的 59 种蛋白, 30 种在 STRING 数据库中有收录, 其中 8 种是数据库中预测的 GroEL 功能伙伴蛋白。STRING 数据库分别从基因邻接、基因融合、基因共现、基因共表达、实验数据、数据库数据、文本挖掘数据和同源性 8 个方面对蛋白的相互关系进行评分, 高评分表示蛋白之间发生相互作用的可能性越大, 本研究中鉴定出的蛋白质与 GroEL 的关系紧密度评分详见表 3。相互关系

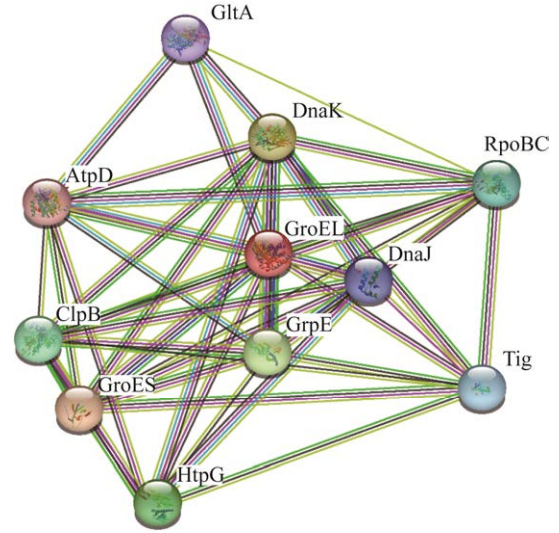


图 4 GroEL 与其预测的功能伙伴相互关系的网络分析

Figure 4 Network analysis of the relationship between GroEL and its predicted functional partners.

表 3 GroEL 与其可能结合蛋白的关系评分结果

Table 3 Scoring results of the relationship between GroEL and its possible binding proteins

Protein	Neighborhood	Gene fusion	Cooccurrence	Homology	Coexpression	Experiments	Databases	Textmining	Score
GroES	0.832	0	0.438	0	0.874	0.957	0	0.945	0.999
DnaK	0.081	0	0.462	0	0.871	0.335	0	0.933	0.996
GrpE	0.163	0	0.212	0	0.869	0.133	0.449	0.894	0.994
ClpB	0.060	0	0	0	0.870	0	0	0.889	0.985
RpoBC	0	0	0	0	0.086	0.959	0	0.611	0.984
Tig	0	0	0	0	0.096	0.300	0	0.882	0.918
GltA	0	0	0	0	0.071	0.074	0.572	0.791	0.913
AtpD	0.070	0	0	0	0.062	0.043	0.565	0.794	0.911
AhpC	0	0	0	0	0.234	0.139	0.138	0.827	0.889
AtpA	0	0	0	0	0.089	0.094	0.572	0.678	0.871
FusA	0	0	0	0	0.146	0.297	0	0.793	0.865
RplL	0	0	0.245	0	0.093	0	0	0.808	0.857
Tuf	0	0	0	0	0.265	0.138	0	0.793	0.857
UreA	0.117	0	0	0	0	0.788	0	0.281	0.853
UreB	0.043	0	0	0	0	0.319	0	0.768	0.835
RplY	0	0	0	0	0.081	0	0	0.791	0.800
KatA	0	0	0	0	0.061	0	0	0.794	0.798
CagA	0	0	0	0	0.058	0	0	0.767	0.771
HpaA	0	0	0	0	0	0	0	0.769	0.769
TrxA	0.043	0	0	0	0.072	0.338	0	0.645	0.763
TrxB	0.043	0	0	0	0.065	0	0	0.696	0.704
PepA	0.071	0	0	0	0.117	0.134	0	0.506	0.602
Lpp20	0	0	0	0	0	0	0	0.542	0.542
RplB	0	0	0	0	0.156	0	0	0.376	0.450
RpsL	0	0	0	0	0.150	0	0	0.363	0.435

网络分析发现 GroEL 处于中心节点, 整个网络可形成 3 个较为明显的分簇, 如图 5 所示, 最大的簇是以绿色节点表示的 16 种蛋白所形成的网络, 主要包括分子伴侣、尿素酶(UreA、UreB)、硫氧还蛋白(TrxA)、硫氧还蛋白二硫化物还原酶(TrxB)、过氧化氢酶(KatA)、黏附素 HpaA 和细胞毒素相关蛋白 CagA 等; 其次是以红色节点表示的 10 种蛋白所形成的网络, 主要是转录和翻译相关的蛋白; 最小的簇是以蓝色节点表示的 5 种蛋白所形成的网络, 包括 3 种与三羧酸循环相关的酶(GltA、FrdC、Mqo)和 2 种与 ATP 合成相关的酶(AtpA、AtpD)。

### 3 讨论与结论

在进行免疫沉淀或者 Pulldown 实验时, 降低本底非特异性结合非常重要。本研究选择 Protein G 磁珠结合抗 His 标签抗体免疫沉淀的方法, 可以从以下几个方面降低非特异性结合。首先, 利用纯化后的 GroEL 蛋白与 HP 全菌蛋白提取液进行相互作用, 可最大限度减少可能存在的高丰度 *E. coli* 蛋白的影响; 其次, 经过抗 His 标签抗体预先与 Protein G 磁珠结合, 可以起到封闭磁珠及 Protein G 的作用, 降低杂蛋白与磁珠及 Protein G 的非特异性结合。因此, 当实验

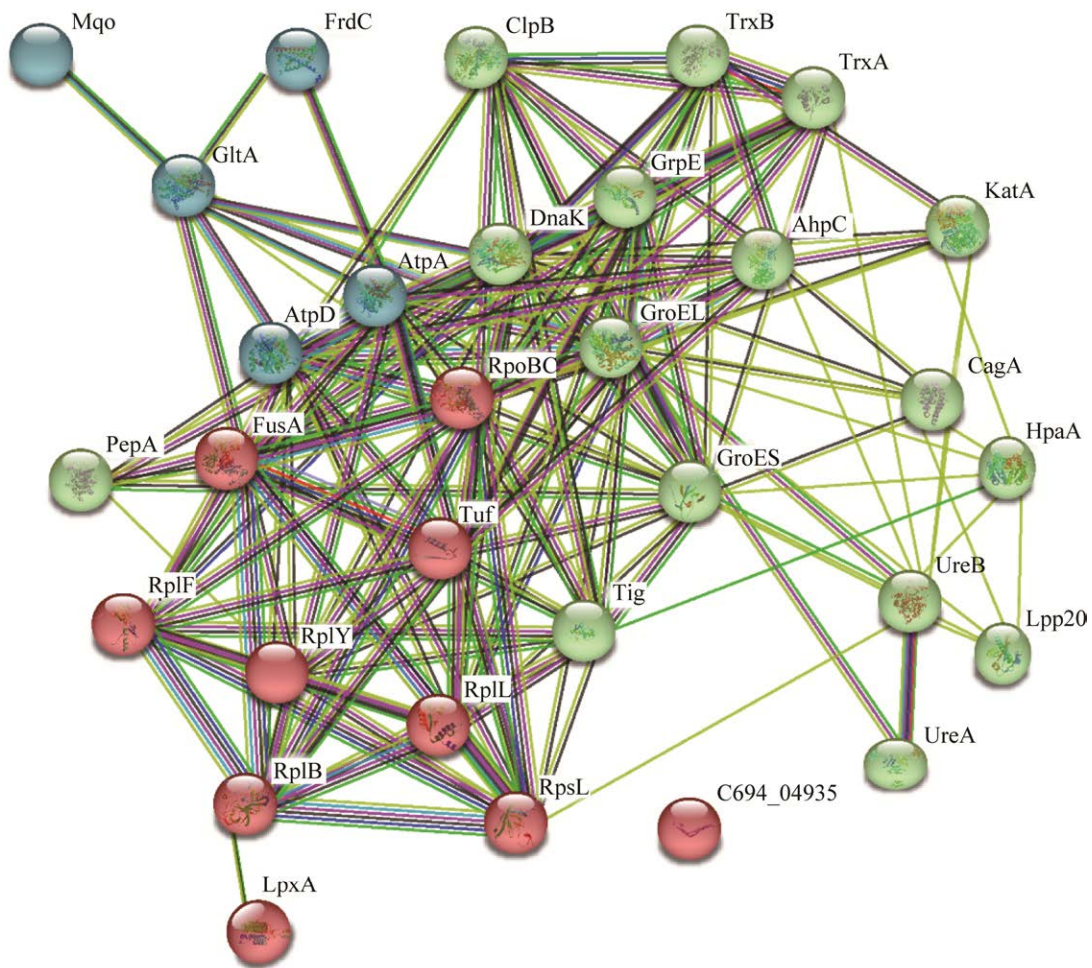


图 5 GroEL 与其可能结合蛋白相互关系的网络分析

Figure 5 Network analysis of the relationship between GroEL and its possible binding proteins.

组中加入的 GroEL 蛋白含量占绝对优势时, 极少量的 *E. coli* 杂蛋白及 HP 蛋白提取液中的非特异性结合蛋白对实验结果的影响是较为有限的。

作为分子伴侣, GroEL 通常在细胞质中形成具有 2 个空腔的圆柱形寡聚体, 并在 GroES 的协助下完成对底物蛋白的重新折叠。在大肠杆菌中, GroEL 只能折叠其蛋白质组 10% 的蛋白<sup>[11]</sup>, 说明其折叠的底物存在一定的偏好性。进一步的研究发现, 大肠杆菌中 GroEL 结合底物中丰度最高的 52 种蛋白主要为氨基酸、糖等代谢相关的酶类及参与转录翻译的蛋白质<sup>[12]</sup>。本研究较为系统地鉴定出了 HP 中可能与 GroEL 结合的 59 种蛋白质, 初步揭示了 HP 中分子伴侣 GroEL 的底物蛋白种类和数量, 这为深入了解 GroEL 的生物学功能提供了重要的参考。

本研究鉴定出的蛋白质中, 有 19 种参与各种代谢的酶类, 8 种参与转录翻译的蛋白, 表明 GroEL 在维持代谢和蛋白质转录翻译中扮演着重要角色。本研究发现 15 种外膜蛋白, 包括 BabA、HpaA、SabA 等重要黏附素, 可能与 GroEL 结合。先前的研究表明, GroEL 可定位在 HP 外膜上<sup>[13]</sup>, 也可出现在 HP 产生的膜外囊泡中<sup>[14]</sup>, 这都提示 GroEL 可能与外膜蛋白存在广泛的关联, 但目前 GroEL 通过何种途径从胞质转位到外膜, 以及其在外膜和膜外囊泡中的作用尚不明确。有研究报道, 在斑疹伤寒立克次体中, 外膜蛋白 OmpB 与 GroEL 在胞质内结合后共同转位到外膜<sup>[15]</sup>, 对于 HP 中的 GroEL, 是否也是外膜蛋白与之结合后共转位到外膜上, 需要进一步研究证实。此外, 有研究报道, GroEL 与外膜蛋白 OMPc 是支气管败血博德特氏菌 (*Bordetella septicaemia*) 来源的膜外囊泡中的主要抗原, 可以诱导小鼠产生保护性免疫反应<sup>[16]</sup>, HP 膜外囊泡中的 GroEL 能否发挥类似的作用, 值得进一步探索。本研究发现, 有 10 种与氧化

还原相关的酶和蛋白可能与 GroEL 结合, 提示 GroEL 在 HP 面临氧化应激时对于维持这些酶和蛋白的活性可能起作用, 已有研究报道 GroEL 可协同亚砷还原酶(sulfoxide reductase) 修复因氧化受损的过氧化氢酶(KatA)并恢复其活性<sup>[17]</sup>。本研究发现, 维持 HP 生存至关重要的尿素酶(UreA 和 UreB 亚单位)可能与 GroEL 结合, 提示 GroEL 在帮助 HP 适应严苛的胃内环境方面发挥着作用, 其中 UreA 与 GroEL 的相互作用已经得到实验证实<sup>[18-19]</sup>。此外, HP 最重要的毒力因子 CagA 也可能与 GroEL 结合, 提示 GroEL 可能参与 CagA 引起的机体病理损伤过程。

综上所述, 本研究报道了 HP 中可与 GroEL 相互作用的蛋白质组成谱, 功能分类和相互关系网络分析发现 GroEL 结合的蛋白质种类繁多, 功能涉及 HP 代谢、转录翻译、氧化还原和黏附等, 并参与 HP 生存适应、定殖及致病过程。GroEL 有望成为一种新的研究 HP 致病性及发展感染干预策略的重要靶点。

## 参考文献

- [1] SONNENBERG A, LASH RH, GENTA RM. A national study of *Helicobacter pylori* infection in gastric biopsy specimens[J]. *Gastroenterology*, 2010, 139(6): 1894-1901.e2.
- [2] SIPPONEN P. Natural history of gastritis and its relationship to peptic ulcer disease[J]. *Digestion*, 1992, 51(suppl 1): 70-75.
- [3] MOAYYEDI P, FORMAN D, BRAUNHOLTZ D, FELTBOWER R, CROCOMBE W, LIPTROTT M, AXON A. The proportion of upper gastrointestinal symptoms in the community associated with *Helicobacter pylori*, lifestyle factors, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs[J]. *The American Journal of Gastroenterology*, 2000, 95(6): 1448-1455.
- [4] SUGANO K. Screening of gastric cancer in Asia[J]. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 2015, 29(6): 895-905.
- [5] RONCARATI D, SCARLATO V. Roles and regulation of the heat shock proteins of the major human pathogen *Helicobacter pylori*[M]//Regulation of Heat

- Shock Protein Responses. Cham: Springer International Publishing. 2018: 411-427.
- [6] FERNÁNDEZ-DE-LARREA N, MICHEL A, ROMERO B, BUTT J, PAWLITA M, PÉREZ-GÓMEZ B, CASTAÑO-VINYALS G, MORENO V, MARTÍN V, AMIANO P, CASTILLA J, FERNÁNDEZ-TARDÓN G, DIERSSEN-SOTOS T, CLOFENT J, ALGUACIL J, HUERTA JM, JIMÉNEZ-MOLEÓN JJ, BARRICARTE A, MOLINUEVO A, FERNÁNDEZ-VILLA T, et al. Antibody reactivity against *Helicobacter pylori* proteins in a sample of the Spanish adult population in 2008–2013[J]. *Helicobacter*, 2017, 22(5): 10.1111/hel.12401.
- [7] MICHEL A, PAWLITA M, BOEING H, GISSMANN L, WATERBOER T. *Helicobacter pylori* antibody patterns in Germany: a cross-sectional population study[J]. *Gut Pathogens*, 2014, 6: 10.
- [8] PAN KF, FORMICHELLA L, ZHANG L, ZHANG Y, MA JL, LI ZX, LIU C, WANG YM, GOETTNER G, ULM K, CLASSEN M, YOU WC, GERHARD M. *Helicobacter pylori* antibody responses and evolution of precancerous gastric lesions in a Chinese population[J]. *International Journal of Cancer*, 2014, 134(9): 2118-2125.
- [9] GAO L, MICHEL A, WECK MN, ARNDT V, PAWLITA M, BRENNER H. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer risk: evaluation of 15 *H. pylori* proteins determined by novel multiplex serology[J]. *Cancer Research*, 2009, 69(15): 6164-6170.
- [10] FORD PJ, GEMMELL E, HAMLET SM, HASAN A, WALKER PJ, WEST MJ, CULLINAN MP, SEYMOUR GJ. Cross-reactivity of GroEL antibodies with human heat shock protein 60 and quantification of pathogens in atherosclerosis[J]. *Oral Microbiology and Immunology*, 2005, 20(5): 296-302.
- [11] EWALT KL, HENDRICK JP, HOURLY WA, HARTL FU. *In vivo* observation of polypeptide flux through the bacterial chaperonin system[J]. *Cell*, 1997, 90(3): 491-500.
- [12] HOURLY WA, FRISHMAN D, ECKERSKORN C, LOTTSPREICH F, HARTL FU. Identification of *in vivo* substrates of the chaperonin GroEL[J]. *Nature*, 1999, 402(6758): 147-154.
- [13] PHADNIS SH, PARLOW MH, LEVY M, ILVER D, CAULKINS CM, CONNORS JB, DUNN BE. Surface localization of *Helicobacter pylori* urease and a heat shock protein homolog requires bacterial autolysis[J]. *Infection and Immunity*, 1996, 64(3): 905-912.
- [14] OLOFSSON A, VALLSTRÖM A, PETZOLD K, TEGTMEYER N, SCHLEUCHER J, CARLSSON S, HAAS R, BACKERT S, WAI SN, GRÖBNER G, ARNQVIST A. Biochemical and functional characterization of *Helicobacter pylori* vesicles[J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 77(6): 1539-1555.
- [15] RAUCH J, BARTON J, KWIATKOWSKI M, WUNDERLICH M, STEFFEN P, MODERZYNSKI K, PAPP S, HÖHN K, SCHWANKE H, WITT S, RICHARDT U, MEHLHOOP U, SCHLÜTER H, PIANKA V, FLEISCHER B, TAPPE D, OSTERLOH A. GroEL is an immunodominant surface-exposed antigen of *Rickettsia typhi*[J]. *PLoS One*, 2021, 16(6): e0253084.
- [16] BOTTERO D, ZURITA ME, GAILLARD ME, BARTEL E, VERCELLINI C, HOZBOR D. Membrane vesicles derived from *Bordetella bronchiseptica*: active constituent of a new vaccine against infections caused by this pathogen[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(4): e01877-e01817.
- [17] MAHAWAR M, TRAN V, SHARP JS, MAIER RJ. Synergistic roles of *Helicobacter pylori* methionine sulfoxide reductase and GroEL in repairing oxidant-damaged catalase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(21): 19159-19169.
- [18] EVANS DJ Jr, EVANS DG, ENGSTRAND L, GRAHAM DY. Urease-associated heat shock protein of *Helicobacter pylori*[J]. *Infection and Immunity*, 1992, 60(5): 2125-2127.
- [19] ZHAO HL, WU YL, XU Z, MA R, DING YF, BAI XL, RONG QY, ZHANG Y, LI BQ, JI XF. Mechanistic insight into the interaction between *Helicobacter pylori* urease subunit  $\alpha$  and its molecular chaperone Hsp60[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 153.

张建中, 传染病预防控制国家重点实验室 PI, 感染性疾病诊治协同创新中心 PI, 中国疾控中心传染病所研究员, 博士生导师。中国生态学会人类生态与生态健康专业委员会荣誉主任委员, 中华医学会公共卫生分会荣誉主任委员, 国家食品安全风险评估专家委员会委员。“首批新世纪百千万人才工程国家级人选”, 享受国务院特殊津贴。从事传染病诊断及预防控制工作 30 余年, 承担国家自然科学基金项目、“863”项目和科技重大专项多项课题。负责幽门螺杆菌病感染防控工作, 为中国幽门螺杆菌菌株库和“中国幽门螺杆菌耐药地图”负责人。曾获国家科技进步奖二等奖 1 项、省部级科技奖 11 项, 发表论文 300 余篇, 其中 SCI 论文 100 余篇。

