

· 医药生物技术 ·

生殖支原体 GroEL 蛋白的生物信息学分析、表达纯化及致炎分析

陈丽¹, 苏晓玲¹, 罗浩荡¹, 王婧芸¹, 廖道庸¹, 甘甜¹, 于建威¹, 何军^{1,2,3*}

1 南华大学附属南华医院检验科, 湖南 衡阳 421001

2 南华大学附属南华医院输血科, 湖南 衡阳 421001

3 南华大学附属南华医院临床研究所, 湖南 衡阳 421001

陈丽, 苏晓玲, 罗浩荡, 王婧芸, 廖道庸, 甘甜, 于建威, 何军. 生殖支原体 GroEL 蛋白的生物信息学分析、表达纯化及致炎分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 4084-4097.

CHEN Li, SU Xiaoling, LUO Haodang, WANG Jingyun, LIAO Daoyong, GAN Tian, YU Jianwei, HE Jun. Bioinformatics, expression, purification, and inflammation-inducing effect of *Mycoplasma genitalium* GroEL protein[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 4084-4097.

摘要: 为了解生殖支原体(*Mycoplasma genitalium*, Mg) GroEL 蛋白的致病机制, 本研究运用生物信息学软件对 Mg GroEL 蛋白结构和功能进行预测和分析, 构建 pET-28a-GroEL 重组质粒, 使用 0.2 mmol/L IPTG 诱导蛋白表达, 通过 Ni-亚氨基二乙酸(iminodicyclic acid, IDA)柱亲和纯化获得 Mg rGroEL 蛋白。将浓度为 2 μg/mL 的 Mg rGroEL 蛋白作用于人单核细胞白血病 THP-1 细胞, 通过 ELISA 检测细胞上清液中炎症因子 IL-1β 和 TNF-α 的含量, 使用全自动化学发光仪检测细胞上清液中炎症因子 IL-6 的含量, 通过细胞免疫荧光和 Western blotting 观察 NF-κB 信号通路激活情况。结果表明, Mg GroEL 蛋白是含有 543 个氨基酸的酸性带负电荷蛋白, 相对分子质量为 58.44 kDa, 等电点为 5.68, 分子式为 C₂₅₆₈H₄₃₀₀N₇₀₀O₈₂₅S₈, 为稳定的亲水性蛋白; 二级结构以 α-螺旋和无规则卷曲为主; Mg GroEL 蛋白存在 12 个 B 细胞优势抗原表位和 10 个 T 细胞优势抗原表位。与肺炎支原体、无乳支原体、关节炎支原体、猪肺炎支原体和牛支原体的 GroEL 蛋白高度同源; Mg rGroEL 蛋白能激活 THP-1 细胞 NF-κB 信号通路并促进 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的分泌。这些结果表明 Mg GroEL 具有较好的抗原性, 能诱导宿主细胞发生炎症反应, 本研究为进一步研究 GroEL 蛋白在 Mg 中的功能及其致病机制奠定了理论基础。

关键词: 生殖支原体; GroEL 蛋白; 原核表达; 生物信息学; 炎症

资助项目: 湖南省自然科学基金(2023JJ60055, 2024JJ7459, 2024JJ9397); 湖南省卫生健康委卫生科研课题(20201915); 湖南省卫生健康委高层次人才支持计划(20240304128); 衡阳市科技计划(202250045307)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province (2023JJ60055, 2024JJ7459, 2024JJ9397), the Health Research Project of Hunan Provincial Health Commission (20201915), the Hunan Provincial Health High Level Talent Support Project (20240304128), and the Hengyang Science and Technology Project (202250045307).

*Corresponding author. E-mail: junhe@usc.edu.cn

Received: 2024-02-07; Accepted: 2024-05-27; Published online: 2024-06-03

Bioinformatics, expression, purification, and inflammation-inducing effect of *Mycoplasma genitalium* GroEL protein

CHEN Li¹, SU Xiaoling¹, LUO Haodang¹, WANG Jingyun¹, LIAO Daoyong¹, GAN Tian¹, YU Jianwei¹, HE Jun^{1,2,3*}

1 Department of Laboratory Medicine, Affiliated Nanhua Hospital, University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China

2 Department of Blood Transfusion, Affiliated Nanhua Hospital, University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China

3 Clinical Research Institute, Affiliated Nanhua Hospital, University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China

Abstract: To preliminarily understand the pathogenic mechanism of *Mycoplasma genitalium* (Mg) GroEL protein, we used bioinformatics tools to predict the structure and function of Mg GroEL protein and then constructed the recombinant plasmid pET-28a-GroEL. The protein expression was induced by 0.2 mmol/L IPTG, and the expressed protein was purified by Ni-iminodiacetic acid (IDA) column affinity. Tohoku Hospital Pediatrics-1 (THP-1) cells were exposed to 2 µg/mL Mg rGroEL. The levels of interleukin (IL)-1β and tumor necrosis factor (TNF)-α in the cell supernatant were measured by ELISA, and that of IL-6 was measured by an automatic chemiluminescence instrument. The activation of the nuclear factor-kappa B (NF-κB) signaling pathway was visualized by immunofluorescence and Western blotting. The results showed that Mg GroEL was a stable hydrophilic protein composed of 543 amino acid residues, with the relative molecular mass of 58.44 kDa, an isoelectric point of 5.68, and a molecular formula of C₂₅₆₈H₄₃₀₀N₇₀₀O₈₂₅S₈. The secondary structure was mainly composed of α-helices and random coils. Mg GroEL contained 12 B-cell dominant epitopes and 10 T-cell dominant epitopes. It exhibited high homology with the GroEL proteins from *Mycoplasma pneumoniae*, *M. agalactiae*, *M. arthritidis*, *M. hyopneumoniae*, and *M. bovis*. Mg rGroEL activated the NF-κB signaling pathway and promoted the secretion of IL-1β, IL-6, and TNF-α in THP-1 cells. These results suggest that Mg GroEL exhibits substantial antigenicity and possesses the capability of triggering inflammation in host cells. This study establishes a theoretical basis for future investigations pertaining to the role and pathogenic mechanisms of Mg GroEL.

Keywords: *Mycoplasma genitalium*; GroEL protein; prokaryotic expression; bioinformatics; inflammation

生殖支原体(*Mycoplasma genitalium*, Mg)属于柔膜菌纲支原体科, 是目前已发现的最小原核细胞型病原菌, 基因组大小仅有 580 kb, 其对培养基要求苛刻且体外生长较缓慢^[1]。1981 年在

非淋菌性尿道炎(non-gonococcal urethritis, NGU)的男性患者中首次发现 Mg, 之后其也在呼吸、滑膜及心脏组织中被分离出来^[2-3]。Mg 可导致男性急慢性 NGU, 女性输卵管炎、盆腔炎及宫

颈炎等多种生殖道疾病^[4]。此外, Mg 感染与多种癌症的发生发展存在一定的联系, 并且能与人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)共同感染, 使 HIV 感染者加速发展为获得性免疫缺陷综合征(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)^[5]。流行病学研究显示, Mg 的感染率正逐年上升, 将在 2027 年达到高峰^[6], 因此需要更深入地研究 Mg 的致病机理。

GroEL 蛋白属于热休克蛋白家族, 其在蛋白质折叠、细胞内蛋白质转运以及修复和降解受损蛋白的反应中发挥重要作用^[7]。此外, GroEL 蛋白也是许多病原菌重要的致病分子。例如, 肠杆菌 GroEL 蛋白能促进细菌生物膜形成, 增强其黏附和侵袭能力^[8]; 口蹄疫病毒 GroEL 蛋白通过促进病毒的复制来增强病毒的感染性^[9]; 立克次体和鸡毒支原体(*Mycoplasma gallisepticum*, MG)的 GroEL 蛋白在免疫小鼠和兔时, 可诱导宿主体内抗 GroEL 抗体水平显著增高, 且该抗体对宿主有很好的保护效果^[10-11]。

截至目前, 国内外尚未开展针对 Mg GroEL 蛋白功能的相关研究。本课题组前期通过基因序列对比发现, Mg GroEL 与许多病原菌的 GroEL 蛋白序列具有较高的同源性。因此, 本研究拟采用生物信息学方法对 Mg GroEL 蛋白进行系统的生物学特征分析; 随后构建 pET-28a-GroEL 重组质粒进行蛋白表达, 纯化后得到 rGroEL 蛋白; 最后评估 rGroEL 蛋白对 THP-1 细胞的致炎能力, 以期为深入研究 Mg 的致病机制提供理论依据, 并为疫苗开发提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 材 料

pET-28a(+)质粒、大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21 感受态细胞、卡那霉素(kanamycin, Kan)和 LB 培养基由 HonorGene 提供; *Xba* I 和 *Xho* I

购自 TaKaRa 公司; Protein marker 购自 Thermo 公司; IPTG、Acr、Bis、Tris 购自 Sigma 公司; SDS 购自 Amresco 公司; Ni-IDA 亲和层析胶购自 Novagen 公司; 多聚甲醛购自 Biosharp 公司; Triton X-100 购自 MP Biomedicals 公司; NF- κ B p65、p-I κ B 抗体购自 Immunoway 公司; Bay 11-7821 购自 APEX BIO 公司; 人源性 IL-1 β 检测试剂盒购自北京四正柏生物科技有限公司; TNF- α 试剂盒购自 Thermo Fisher 公司; IL-6 试剂购自北京万泰生物药业股份有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 Mg GroEL 蛋白的生物信息学分析

利用从 NCBI 数据库中检索到的 Mg GroEL 蛋白的全部氨基酸序列, 对其理化性质、跨膜结构域、信号肽、亲水性、二/三级结构及 T、B 细胞抗原表位进行预测分析, 所用的分析软件见表 1; 通过 MEGA-X 软件进行多重序列比对并用邻近法构建系统进化树。

1.2.2 原核表达载体 pET-28a-GroEL 的构建

首先对 Mg GroEL 蛋白全基因序列(GenBank 登录号: 88282577)根据密码子偏好性进行优化, 委托 HonorGene 公司进行基因合成并构建至 pET-28a(+)原核表达载体中。构建好的重组质粒经 *Xba* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定并进行测序验证, 验证成功的重组质粒命名为 pET-28a-GroEL。

1.2.3 Mg rGroEL 蛋白的表达纯化和鉴定

将 pET-28a-GroEL 质粒转化至 *E. coli* BL21 感受态细胞, 挑取单克隆菌落接种至 3 mL 含有 Kan 的 LB 的培养液中, 37 °C 振荡过夜培养, 再按 1:100 的比例将菌液接种到 LB 培养液中, 摇菌至 OD_{600} 为 0.6–0.8。加入终浓度为 0.2 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG), 37 °C 振摇 4 h; 诱导液经 25 W 超声破菌 25 s, 分别取上清液与沉淀液加入上样缓冲液重悬, 12%二烷基硫酸钠-聚丙烯

表 1 生物信息学分析软件

Table 1 Bioinformatics analysis software

Software name	Website	Forecasting purpose
ProtParam	https://web.expasy.org/protparam/	Physicochemical properties of protein
TMHMM Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/	Transmembrane domain
SignalP-5.0 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP	Signal peptide
ProtScale	https://web.expasy.org/protscale/	Hydrophilic
SOPMA	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl	Secondary structure
SWISS-MODEL	https://swissmodel.expasy.org	Third structure
IEDB	http://www.icdb.org/	B cell epitope antigen
ABCpred	https://webs.iitd.edu.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html	
SYFPEITHI	http://www.syfpeithi.de/bin/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm	T cell epitope antigen
VaxiJen2.0	http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html	Protective antigen prediction

酰胺凝胶(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)电泳进行鉴定;其上清液经 Ni-IDA 柱亲和纯化获得 2 mg 的 Mg rGroEL 蛋白,使用多黏菌素 B 去除内毒素。

1.2.4 ELISA 和全自动化学发光仪检测细胞上清液炎症因子的含量

将人单核细胞白血病细胞(Tohoku Hospital Pediatrics-1, THP-1)铺于 12 孔板内并调至适合的细胞密度。使用浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Mg rGroEL 蛋白刺激 THP-1 细胞, 100 ng/mL LPS 作为阳性对照, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h 后, 收集细胞上清液。使用 ELISA 试剂盒检测 IL-1 β 和 TNF- α 的浓度, 具体操作按照说明书进行。IL-6 使用万泰全自动化学发光仪 Caris200 进行测定^[12]。

1.2.5 细胞免疫荧光染色检测 p65 亚基入核

用 Mg rGroEL 蛋白刺激 THP-1 细胞 6 h, PBS 洗涤细胞 3 次, 4%多聚甲醛室温固定 1 h, 0.3% Triton X-100 透膜 10 min, 1640 完全培养基 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h, 加入 NF- κB p65 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜, 加入相应的荧光二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 滴加含有 DAPI 防荧光淬灭剂, 使用荧光倒置显微镜观察 NF- κB p65 亚基核转移情况^[13]。

1.2.6 Western blotting 检测 I κ B 磷酸化

将 Mg rGroEL 蛋白加入到 THP-1 细胞中,

分别作用 15 min、30 min、1 h、2 h 后收集细胞。加入细胞裂解液, 冰上裂解细胞 1 h 后获取总蛋白, BCA 测定蛋白浓度, 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 10 min 变性。12% SDS-PAGE 电泳后将蛋白转印至 NC 膜上, 5%脱脂牛奶室温摇床封闭 1.5 h, 以抗 I κ B (1:1 000 比例稀释)抗体为一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜, 1:5 000 稀释二抗, 室温摇床孵育 1 h, 显影观察 I κ B 磷酸化水平。

1.2.7 统计学分析

本实验所有数据均使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行分析, 所有数据分析以均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用两独立样本 t 检验对所得数据进行统计学分析。 $P<0.05$ 则认为具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 Mg GroEL 蛋白生物信息学分析结果

2.1.1 理化特性

利用在线软件 ProtParam 预测 Mg GroEL 蛋白的理化性质, 结果显示该蛋白是一种酸性蛋白, 由 543 个氨基酸组成。其中带负电荷的氨基酸残基(天冬氨酸和谷氨酸) 75 个, 带正电荷的氨基酸残基(精氨酸和赖氨酸) 71 个。含量最多的是赖氨酸(10.1%), 其次为谷氨酸(9.2%)和

丙氨酸(9.0%) (表 2)。GroEL 蛋白相对分子质量为 58.44 kDa, 分子式为 $C_{2568}H_{4300}N_{700}O_{825}S_8$, 等电点为 5.68, 不稳定指数为 27.24; 脂溶性指数为 105.95, 亲水性总平均值为-0.169, 表明 GroEL 蛋白是一个稳定的亲水性蛋白。

2.1.2 亲水性、跨膜结构及信号肽的预测

应用 ProtScale 软件分析 Mg GroEL 蛋白整个氨基酸序列的亲(疏)水性, 预测结果显示, E434 亲水性最强, 分值为-2.800; A163 疏水性最强, 分值为 2.233; 亲水性氨基酸>疏水性氨基酸(图 1), 与上述 ProtParam 软件评估一致, 即 Mg GroEL 蛋白是一种亲水性蛋白。

表 2 GroEL 蛋白的氨基酸组成

Table 2 Amino acid composition of GroEL protein

Amino acids	Number	Frequencies (%)	Amino acids	Number	Frequencies (%)
Ala	49	9.0	Lys	55	10.1
Arg	16	2.9	Met	6	1.1
Asn	37	6.8	Phe	8	1.5
Asp	25	4.6	Pro	12	2.2
Cys	2	0.4	Ser	30	5.5
Gln	15	2.8	Thr	40	7.4
Glu	50	9.2	Trp	0	0.0
Gly	41	7.6	Tyr	9	1.7
His	1	0.2	Val	47	8.7
Ile	53	9.8	Pyl	0	0.0
Leu	47	8.7	Sec	0	0.0

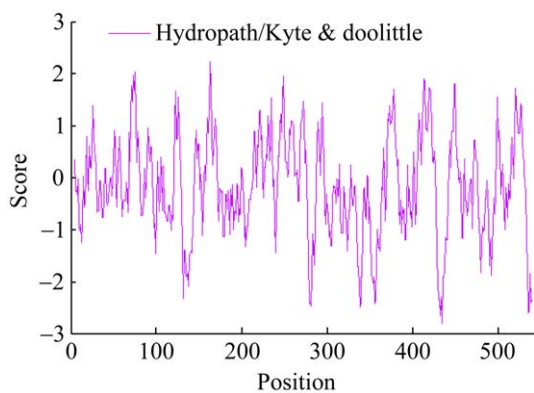


图 1 Mg GroEL 蛋白亲水性分析

Figure 1 Hydrophilic analysis of Mg GroEL protein.

应用 TMHMM Server 在线软件分析, 结果显示 Mg GroEL 蛋白的跨膜螺旋数为 0, 预测其跨膜氨基酸数为 0.053 09 (>18 表示可能为跨膜蛋白), 表明该蛋白无跨膜结构域, 不属于跨膜蛋白(图 2A)。SignalP-5.0 Server 在线软件预测 GroEL 蛋白信号肽, 其存在信号肽的可能性接近 0.013, 而非信号肽蛋白质类型可能性为 0.987 (图 2B)。因此可以推测 Mg GroEL 蛋白不存在信号肽剪切位点, 提示其属于非分泌型蛋白。

2.1.3 二级结构和三级结构分析

利用 SOPMA 软件分析 Mg GroEL 氨基酸序列, 结果显示, GroEL 蛋白有 α -螺旋 302 个, 比例为 55.62%; β 转角 43 个, 占 7.92%; 延长链为 63 个, 占 11.60%; 无规则卷曲为 135 个, 占 24.86% (图 3A)。利用在线软件 Swiss-Model 预测 Mg GroEL 蛋白的三级结构模型, 全局模型质量评估 GMQE 评分为 0.9, 表示所得模型质量较好(图 3B)。

2.1.4 多序列比对分析及系统进化树构建

本研究利用 NCBI 在线 Blastp 对 Mg GroEL 蛋白同源序列比对后发现, Mg GroEL 蛋白与肺炎支原体(*Mycoplasmoides pneumoniae*, Mp)、无乳支原体(*Mycoplasmopsis agalactiae*, MA)、关节炎支原体(*Mycoplasma arthritis*, Mar)、猪肺炎支原体(*Mycoplasma hyopneumoniae*, Mhp)和牛支原体(*Mycoplasmopsis bovis*)的 GroEL 蛋白高度同源, 同源性分别为 85.08%、86.24%、85.95%、89.40%和 87.04%。此外, 通过 MEGA 软件对与 Mg GroEL 蛋白同源性较高的 10 种支原体的 GroEL 蛋白, 采用邻近法构建系统进化树。由图 4 可知, Mg GroEL 蛋白与 Mp、MA、Mar、Mhp 和 *M. bovis* 亲缘关系最近。

2.1.5 B 细胞抗原表位预测

利用在线软件 IEDB 对 Mg GroEL 蛋白的 B 细胞抗原表位进行预测, 共得到 24 个 B 细胞表位,

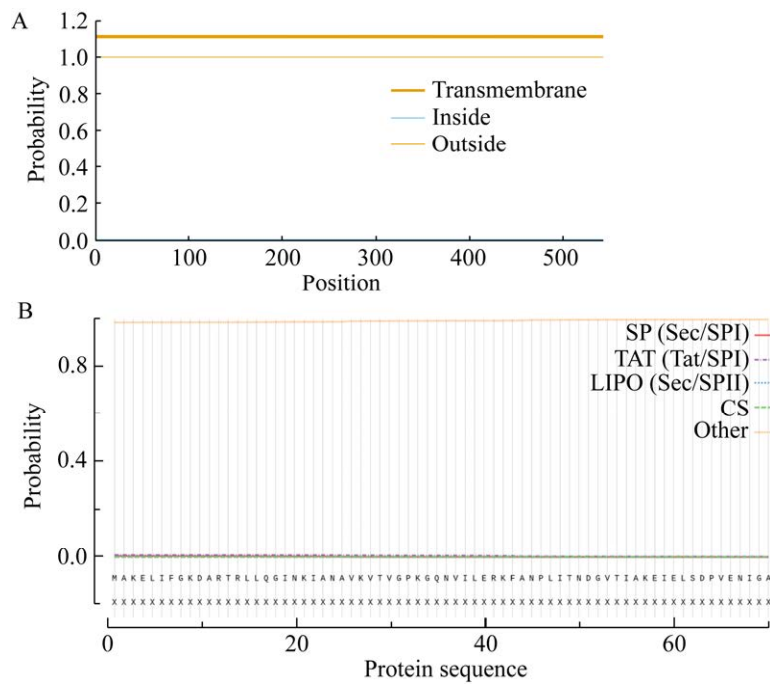


图 2 Mg GroEL 蛋白跨膜结构域(A)与信号肽的预测(B)

Figure 2 Transmembrane structure (A) and signalpeptide prediction (B) of Mg GroEL protein. SP (Sec/SPI): Secretory signal peptide; TAT (Tat/SPI): Twin-arginine translocation signal peptide; LIPO (Sec/SPII): Lipoprotein signal peptide; CS: Signal peptide cleavage site. Other indicates no signal peptide at all.

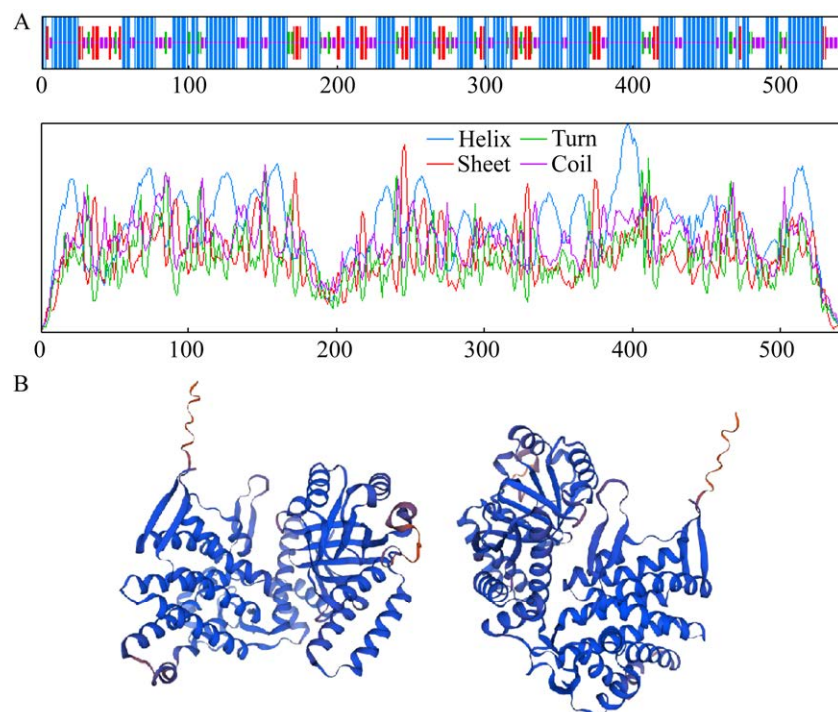


图 3 Mg GroEL 蛋白二级结构(A)和三级结构(B)预测

Figure 3 Secondary structure (A) and third structure (B) prediction of Mg GroEL protein.

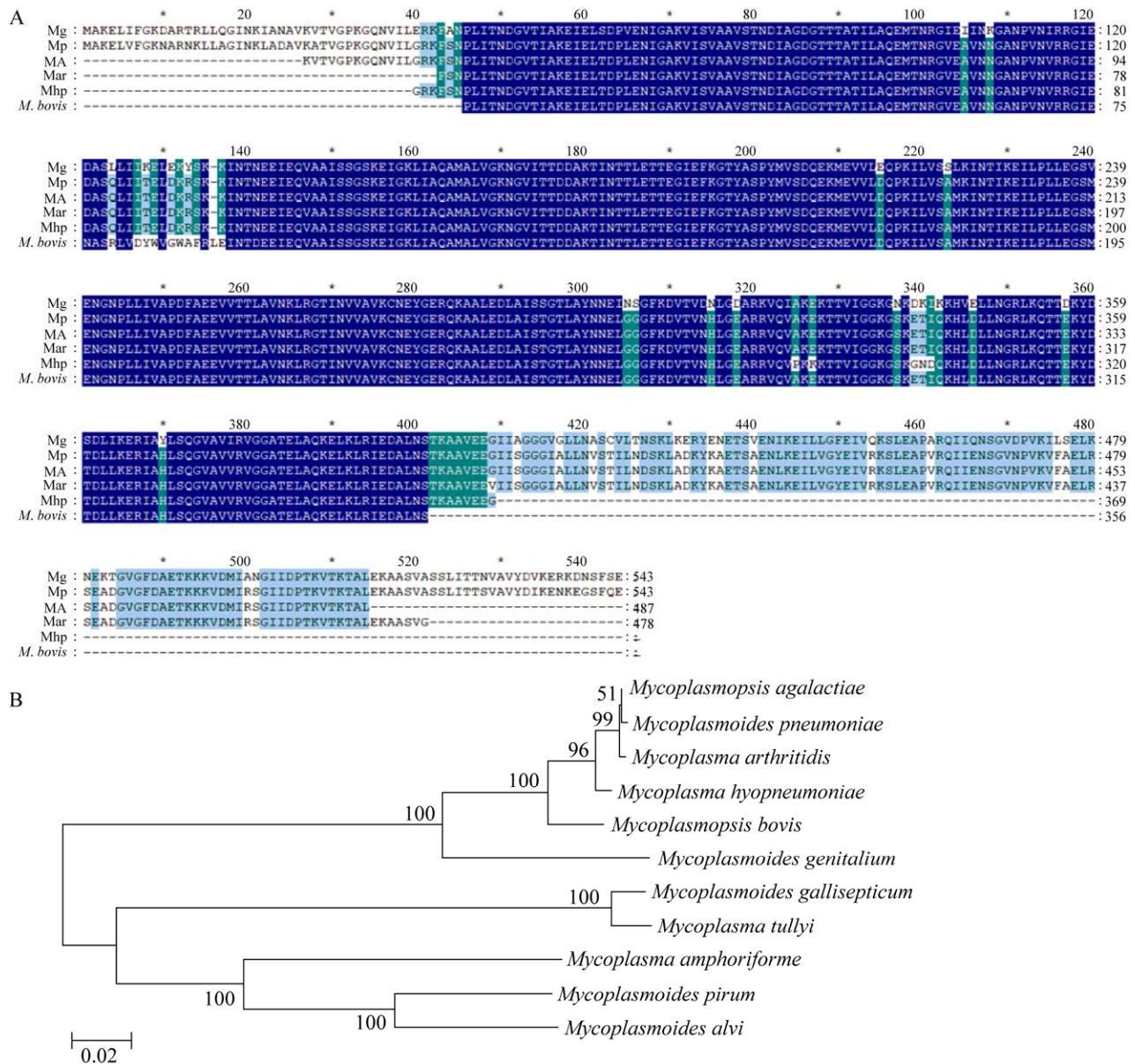


图 4 Mg 与其他支原体 GroEL 蛋白的多重序列比对(A)和系统进化树(B)

Figure 4 Multiple sequence alignment (A) and phylogenetic tree (B) of Mg with other Mycoplasma GroEL proteins.

其中氨基酸(amino acids, aa)个数>10 的有 8 个, 分别为 131–145 aa、224–233 aa、239–256 aa、275–286 aa、299–317 aa、322–346 aa、348–371 aa、428–444 aa。利用 ABCpred 软件对 GroEL 蛋白的 B 细胞抗原表位进行分析, 阈值设置为 0.51, 共预测得到 57 个 B 细胞表位, 其中评分大于

0.85 的总共有 10 个, 分别为 93–108 aa、124–139 aa、200–215 aa、244–259 aa、253–268 aa、290–305 aa、349–364 aa、462–477 aa、499–414 aa、526–541 aa。将优势表位抗原进一步用在线软件 VaxiJen2.0 进行评估, 最终结果显示预测的 B 细胞抗原表位数量分别有 7 个和 5 个(表 3)。

表 3 Mg GroEL 蛋白 B 细胞表位预测

Table 3 Prediction of Mg GroEL protein B cell epitope

Method	Peptide fragment	Position
IEDB	EKYSKKINTNEEIEQ	131-145
	VENGNPLLIVAPDFAEEV	239-256
	KCNEYGERQKAA	275-286
	YNNEINSGFKDVTVDNLGD	299-317
	QIAKEKTTVIGGKGNKDKIKKHVEL	322-346
	NGRLKQTTDKYDSDLIKERIAYLS	348-371
	KLKERYENETSVENIKE	428-444
ABCpred	PYMVSDQEKMEVVLEQ	200-215
	PLLIVAPDFAEEVVT	244-259
	LAISSGTLAYNNEINS	290-305
	GRLKQTTDKYDSDLIK	349-364
	TNAVAVYDVKERKDNSF	526-541

2.1.6 T 细胞抗原表位预测

通过在线程序 SYFPEITHI 预测, 选择等位基因 HLA-DRB1*0401 预测 Th 细胞抗原表位, 氨基酸长度为 15 个, 阈值设定为 25。随后选定 HLA-A*0201 等位基因预测 CTL 细胞抗原表位, 氨基酸长度为 9 个, 阈值设定为 23。结果共筛选出 GroEL 蛋白的 Th 细胞抗原表位 12 个、CTL 细胞抗原表位 19 个。将预测出的 T 细胞表位利用在线软件 VaxiJen2.0 对其抗原性进行评估, 最终确定 HLA-DRB1*0401 的 Th 细胞优势表位和 HLA-A*0201 的 CTL 细胞优势抗原表位数量均为 5 个(表 4)。

2.2 酶切鉴定 pET-28a-GroEL 重组质粒

将合成的 *Mg-GroEL* 基因片段构建至 pET-28a(+)原核表达载体后获得重组质粒。构建好的 pET-28a-GroEL 重组质粒用 *Xba* I 和 *Xho* I 进行双酶切, 电泳结果与预期 *Mg GroEL* 片段大小 1 700 bp 相符(图 5)。将该质粒进行测序, 测序结果与 NCBI 上的 *Mg GroEL* 核苷酸序列 100% 一致, 表明 pET-28a-GroEL 重组质粒构建成功。

表 4 SYFPEITHI 预测 Th 细胞表位和 CTL 细胞表位

Table 4 Th cell epitope and CTL cell epitope predicted by SYFPEITHI

Name	Peptide fragment	Starting position	Score
HLA-DRB1*0401	VISVAAVSTNDIAGD	72	26
	TNDIAGDGTITATIL	80	26
	KLRIEDALNSTKAAV	391	26
	KERYENETSVENIKE	430	28
	VKILSELKNEKTGVG	472	26
HLA-A*0201	NIGAKVISV	67	25
	DLAISSGTL	289	23
	ELAQKELKL	384	23
	IIAGGGVGL	409	29
	IAGGGVGLL	410	24

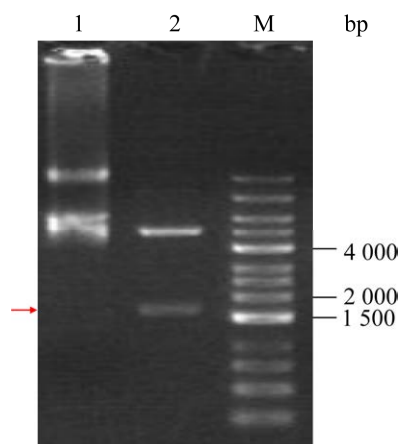


图 5 重组质粒酶切后 PCR 产物电泳分析

Figure 5 Electrophoretic analysis of PCR products after restriction of recombinant plasmid. Lane 1: pET-28a-MG-GroEL plasmid; Lane 2: pET-28a-MG-GroEL plasmid digested by *Xba* I and *Xho* I enzyme; Lane M: DNA marker. Arrows indicate the recombinant target gene.

2.3 Mg rGroEL 蛋白的表达和纯化

菌液经 0.2 mmol/L IPTG 诱导后, 离心收集沉淀, 超声波破碎处理, 离心后分别向上清液和沉淀加入上样缓冲液。抽提蛋白后进行 12% SDS-PAGE 分析及考马斯亮蓝染色脱色, 结果

显示 IPTG 诱导后及诱导破碎后上清中, 在分子量大小约 58 kDa 处可见清晰条带(图 6A), 符合预期大小。将经超声波破碎离心后收集的上清经 Ni-IDA 柱亲和纯化后, 进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分析, 可见单一电泳条带, 纯度>85%。表明已获得纯化的 Mg GroEL 重组蛋白(图 6B)。

2.4 Mg rGroEL 蛋白刺激 THP-1 细胞后细胞因子的检测

Mg rGroEL 蛋白刺激 THP-1 细胞 24 h 后, 收集上清液, 检测细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达水平。结果显示, 经 Mg rGroEL 蛋白刺激后的 THP-1 细胞上清液中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 较空白对照对照组显著升高($P<0.05$) (图 7A-7C)。

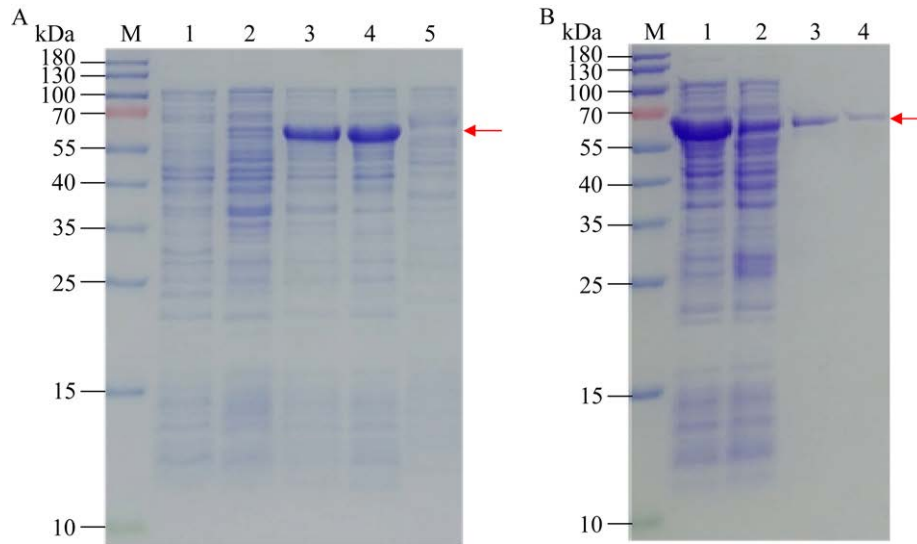


图 6 重组蛋白诱导表达(A)与纯化(B)

Figure 6 Induced expression and purification of recombinant protein. A: Induced expression of recombinant protein. Lane M: Protein molecular mass standard; Lane 1: pET28a induced (no-load); Lane 2: Uninduced; Lane 3: Induced; Lane 4: Supernatant after induced crushing; Lane 5: Precipitation after induced crushing. B: Purification of recombinant protein. Lane M: Protein molecular mass standard; Lane 1: Crushed sample; Lane 2: Elution; Lane 3 and 4: Imidazole elution. Arrows indicate the recombinant target proteins.

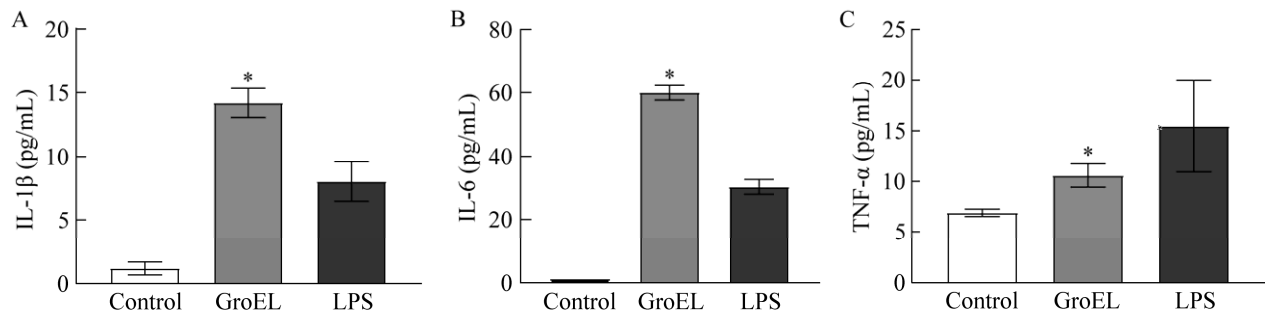


图 7 Mg rGroEL 蛋白刺激 THP-1 细胞后 IL-1 β (A)、IL-6 (B)和 TNF- α (C)水平变化

Figure 7 Changes of IL-1 β (A), IL-6 (B) and TNF- α (C) levels in THP-1 cells stimulated by Mg rGroEL protein. The data were presented by $\bar{x} \pm s$. P values were determined by t -test. *: $P<0.05$.

可见 Mg rGroEL 蛋白具有诱导 THP-1 细胞分泌 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的能力。

2.5 Mg rGroEL 蛋白诱导 THP-1 细胞激活 NF- κ B

将 Mg rGroEL 蛋白处理 THP-1 细胞 6 h 后, 检测 NF- κ B p65 亚基核转移情况。免疫荧光结果显示, 与空白组相比, Mg rGroEL 蛋白能很明显地诱导 THP-1 细胞中 NF- κ B p65 亚基入核 (图 8A)。Mg rGroEL 蛋白处理 THP-1 细胞 15 min、30 min、1 h、2 h 后, Western blotting 检测 I κ B 磷酸化水平。结果显示, Mg rGroEL 蛋白作用于 THP-1 细胞后, I κ B 发生了明显的磷酸化 (图 8B)。以上结果表明, Mg rGroEL 蛋白能够激活 THP-1 细胞的 NF- κ B 通路。

2.6 抑制 NF- κ B 通路后细胞因子水平检测

采用 NF- κ B 特异性抑制剂 Bay 11-7821 预

处理 THP-1 细胞 40 min 后, 再加入 Mg rGroEL 蛋白联合刺激 THP-1 细胞 6 h, 免疫荧光结果显示, Bay 11-7821 能很明显地抑制 Mg rGroEL 蛋白诱导 THP-1 细胞 NF- κ B p65 亚基核转移 (图 9A)。Bay 11-7821 预处理 THP-1 细胞 40 min 后, 加入 Mg rGroEL 蛋白联合作用 THP-1 细胞 24 h, 收集细胞检测 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的分泌水平, 结果显示, Bay 11-7821 可以明显抑制 Mg rGroEL 诱导 THP-1 细胞分泌 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α ($P < 0.05$) (图 9B-9D)。可见 Mg rGroEL 蛋白能通过 NF- κ B 信号通路诱导 THP-1 细胞分泌 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 。

3 讨论与结论

Mg 是一种重要的性传播致病菌, 主要引起泌尿生殖道疾病^[14]。由于其感染的临床症状通常较轻, 容易被忽视, 未及时治疗易成为生殖道炎症相关性不孕的危险因素^[15]。此外, 由于缺乏细胞壁, 针对治疗 Mg 的药物种类有限^[16], 且随着抗生素的滥用, Mg 也出现了耐药趋势^[17]。因此, 探究 Mg 的毒力因子及致病机制, 对 Mg 感染的防治十分关键。

目前, 生物信息学已被广泛用于蛋白质结构、功能以及抗原表位等多方面的预测, 为后期的研究提供理论基础, 能有效地缩短时间并降低成本^[18]。本研究对 Mg GroEL 蛋白进行理化性质分析, 结果表明, Mg GroEL 蛋白是一种性质稳定亲水性较强, 位于细胞外膜的蛋白, 这与李小余等^[19]对钩端螺旋体和黄海峰等^[20]对类鼻疽伯克霍尔德菌 GroEL 蛋白的研究结果一致。Mg GroEL 蛋白二级结构中无规则卷曲含量较高, 该结构相对松散灵活, 较易形成潜在的抗原表位, 故可针对该结构进行疫苗的研究^[21]。经分析 Mg GroEL 蛋白存在多个 T、B 细胞抗原表位, 说明该蛋白具有被宿主免疫系统识别并

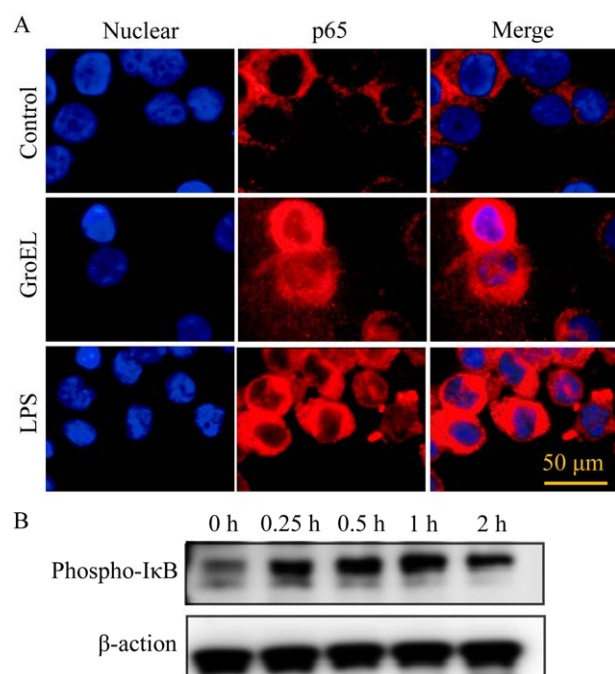


图 8 GroEL 蛋白刺激 THP-1 细胞后 p65 的核转位(A)和 I κ B 磷酸化(B)

Figure 8 Nuclear translocation of p65 (A) and phosphorylation of I κ B (B) after stimulation of THP-1 cells by GroEL protein. Bar=50 μ m.

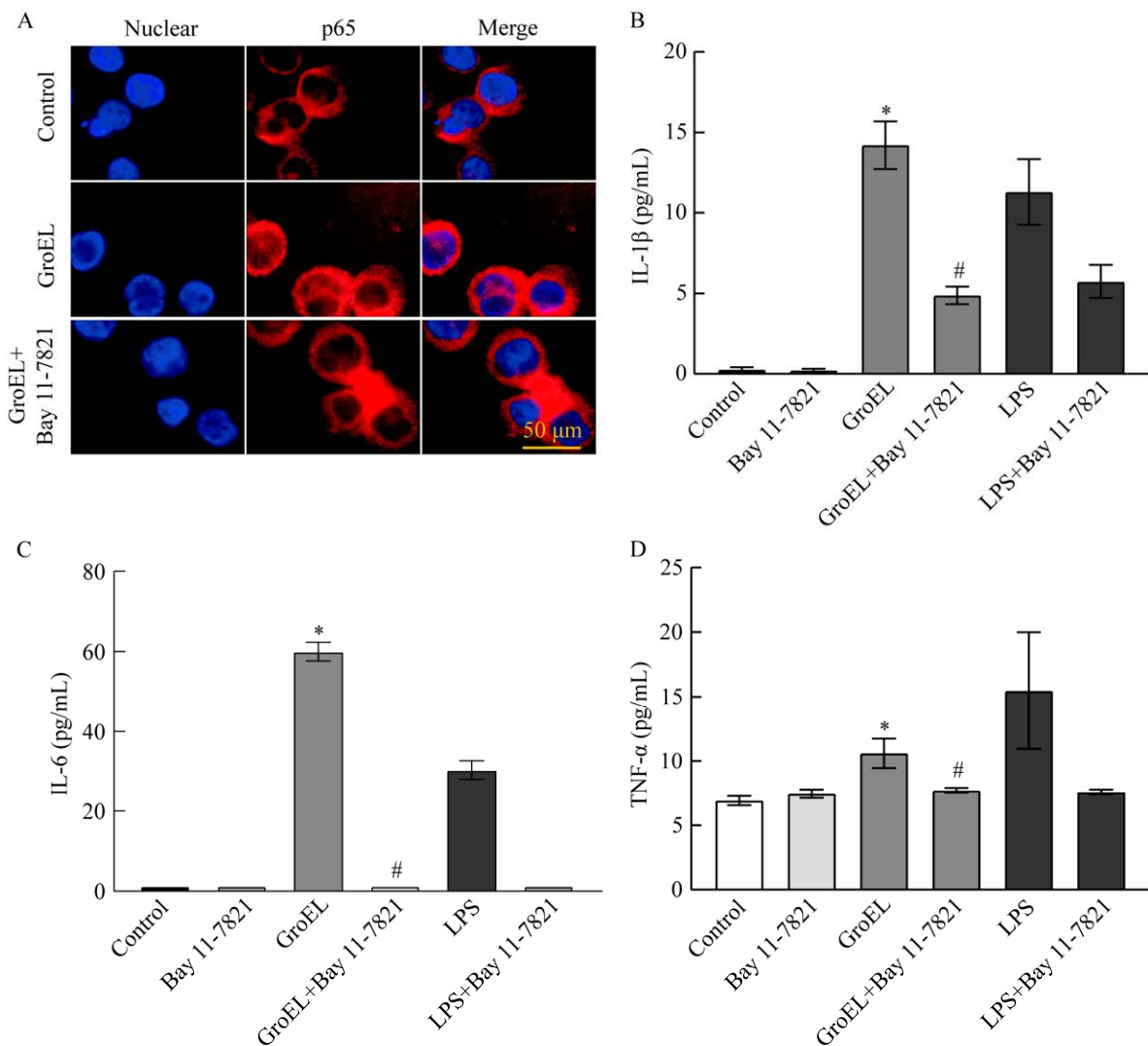


图9 Bay 11-7821 对 Mg rGroEL 蛋白诱导的 THP-1 细胞 p53 核转位(A)和 IL-1 β (B)、IL-6 (C)和 TNF- α (D)分泌水平的影响

Figure 9 Effect of Bay 11-7821 on Mg rGroEL protein-induced p53 nuclear translocation (A) and IL-1 β (B), IL-6 (C) and TNF- α (D) secretion levels in THP-1 cells. Bar=50 μ m. The data were presented by $\bar{x} \pm s$. *P* values were determined by *t*-test. *: *P*<0.05 vs. control; #: *P*<0.05 vs. GroEL.

引起特定的免疫应答的能力，是一种优秀的抗原分子。通过序列比对分析发现，Mg GroEL 蛋白与多种支原体的 GroEL 蛋白具有较高同源性。其中，Mp rGroEL 蛋白被发现具有免疫活性，能增加支原体与宿主细胞的黏附性，从而促进感染^[22]。MG rGroEL 蛋白与膜受体 Annexin A2 相互作用诱导宿主细胞发生凋亡^[23]。因此，推测

GroEL 蛋白可能是 Mg 一种新的毒力因子。

炎症反应是 Mg 感染宿主后引起机体病理损伤的主要因素^[24]。目前，Mg 诱导炎症反应的主要毒力因子包括膜脂相关蛋白(lipid associated membrane protein, LAMP)，黏附蛋白以及核酸酶等^[2]。Mg LAMP 能够通过 Toll 样受体 2 (Toll-like receptor 2, TLR2)通路诱导宿主细胞

分泌 TNF- α 等炎性介质^[25]。Mg 感染后可通过黏附蛋白 MgPa 激活 ERK-NF- κ B 通路诱导 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 等炎症因子的分泌^[26]。为进一步了解 Mg GroEL 蛋白的功能,本研究构建了 pET-28a-GroEL 重组质粒,成功表达得到 Mg rGroEL 蛋白,探究了该蛋白是否具有与以上毒力因子相似的功能。本研究证实 Mg rGroEL 蛋白能够上调 THP-1 细胞炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的分泌,表明该蛋白对宿主细胞具有一定的致炎作用。在 Kamalakannan 等^[27]和 Ho 等^[28]的研究中也有相同的发现,但并未阐明这些炎症因子是通过哪条通路产生。NF- κ B 信号通路参与调控上述细胞因子的分泌,且 Mg 能通过激活 NF- κ B 信号通路诱导宿主产生 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 等细胞因子。同时,Shin 等^[29]使用铜绿假单胞菌 rGroEL 蛋白刺激巨噬细胞时,发现该蛋白可以激活 NF- κ B 信号通路。牙龈卟啉单胞菌 rGroEL 蛋白也能激活牙周韧带细胞的 NF- κ B 信号通路^[30]。本研究结果表明,Mg rGroEL 蛋白能促进 THP-1 细胞中的 p65 进入细胞核且使 I κ B 蛋白发生磷酸化,有效激活 NF- κ B 信号通路。在阻断 NF- κ B 信号通路后,IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的分泌水平明显减少,表明 Mg rGroEL 蛋白能通过激活 NF- κ B 诱导炎症的反应。

综上所述,本研究通过生物信息学方法得知 Mg GroEL 蛋白的理化性质及抗原表位,且与多种病原菌 GroEL 蛋白具有同源性并存在能使宿主细胞产生免疫应答的能力。本研究为 Mg 的致炎系统的研究提供了参考,但仍需深入研究 Mg GroEL 蛋白的功能。本研究通过生物信息学分析发现 Mg GroEL 蛋白存在多个 T、B 细胞优势抗原表位,证明了该蛋白能引起巨噬细胞的免疫应答,而其介导宿主发生细胞和体液免疫需要进一步通过动物实验验证。其次,

NF- κ B 信号通路被抑制后能有效减少 TNF- α 和 IL-6 的分泌,但并没有完全抑制 IL-1 β 的产生。Bent 等^[31]发现 MYD88-MKK-HIF1 能参与 IL-1 β 的上调,且该通路不依赖 NF- κ B 的激活,Mg rGroEL 蛋白是否激活 NF- κ B 通路还有待进一步研究。同时,IL-1 β 的分泌依赖炎性小体的多蛋白复合物的激活,也被认为是细胞焦亡的指标^[32]。Mg rGroEL 蛋白是否能激活炎性复合小体进而引起宿主细胞发生细胞焦亡也是值得继续深入研究的问题。

REFERENCES

- [1] PINTO-SANDER N, SONI S. *Mycoplasma genitalium* infection[J]. *British Medical Journal*, 2019: 15820.
- [2] WU YY, XIU FC, XI YX, LIU L, CHEN YW, YOU XX. Pathogenicity and virulence of *Mycoplasma genitalium*: Unraveling Ariadne's Thread[J]. *Virulence*, 2022, 13(1): 1161-1183.
- [3] RAMAKRISHNAN G, KRONIG I, GAÏA N, LAZAREVIC V, SCHRENZEL J. *Mycoplasma genitalium* endocarditis in prosthetic aortic valve[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2023, 29(10): 2164-2166.
- [4] HUGHES G, SAUNDERS J. *Mycoplasma genitalium*: the next sexually transmitted superbug?[J]. *British Medical Journal*, 2018, 363: k4376.
- [5] GNANADURAI R, FIFER H. *Mycoplasma genitalium*: a review[J]. *Microbiology*, 2020, 166(1): 21-29.
- [6] JENSEN JS, CUSINI M, GOMBERG M, MOI H, WILSON J, UNEMO M. 2021 European guideline on the management of *Mycoplasma genitalium* infections[J]. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2022, 36(5): 641-650.
- [7] ZHANG L, CHENG L, CUI YJ, WU ZP, CAI LY, YANG L, DUAN MM, ZHANG DM, ZHOU CC, XIE J. The virulence factor GroEL directs the osteogenic and adipogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells through the involvement of JNK/MAPK and NF- κ B signaling[J]. *Journal of Periodontology*, 2021, 92(11): 103-115.
- [8] ZHU DD, FAN YF, WANG XY, LI P, HUANG YP,

- JIAO JB, ZHAO CM, LI Y, WANG S, DU XJ. Characterization of molecular chaperone GroEL as a potential virulence factor in *Cronobacter sakazakii*[J]. Foods, 2023, 12(18): 3404.
- [9] TANG JL, ABDULLAH SW, LI PH, WU JE, PEI CC, MU SY, WANG YL, SUN SQ, GUO HC. Heat shock protein 60 is involved in viral replication complex formation and facilitates foot and mouth virus replication by stabilizing viral nonstructural proteins 3A and 2C[J]. mBio, 2022, 13(5): e0143422.
- [10] 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.
- [11] TAN L, HU MR, YU SQ, WANG X, LU F, LIU F, QIU XS, SONG CP, SUN YJ, DING C. Characterization of the chaperonin GroEL in *Mycoplasma gallisepticum*[J]. Archives of Microbiology, 2015, 197(2): 235-244.
- [12] 刘珂, 李双法, 李奎, 于林, 程云龙. IL-6 磁微粒化学发光定量检测方法的建立和评价[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(16): 1988-1993.
- LIU K, LI SF, LI K, YU L, CHENG YL. Development and evaluation of magnetic microparticle chemiluminescence analysis for quantitation of IL-6 in human serum[J]. Chinese Journal of Immunology, 2020, 36(16): 1988-1993 (in Chinese).
- [13] LUO H, HE J, QIN L, CHEN Y, CHEN L, LI R, ZENG Y, ZHU C, YOU X, WU Y. *Mycoplasma pneumoniae* lipids license TLR-4 for activation of NLRP3 inflammasome and autophagy to evoke a proinflammatory response[J]. Clinical and Experimental Immunology, 2020, 203(1): 66-79.
- [14] WORKOWSKI KA, BACHMANN LH, CHAN PA, JOHNSTON CM, MUZYNY CA, PARK I, RENO H, ZENILMAN JM, BOLAN GA. Sexually transmitted infections treatment guidelines, 2021[J]. MMWR Recommendations and Reports: Morbidity and Mortality Weekly Report Recommendations and Reports, 2021, 70(4): 1-187.
- [15] YU JW, ZHOU Y, LUO HD, SU XL, GAN T, WANG JY, YE ZF, DENG ZL, HE J. *Mycoplasma genitalium* infection in the female reproductive system: diseases and treatment[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1098276.
- [16] PEEL J, AUNG E, BOND S, BRADSHAW C. Recent advances in understanding and combatting *Mycoplasma genitalium*[J]. Faculty Reviews, 2020, 9: 3.
- [17] MURRAY GL, BODIYABADU K, DANIELEWSKI J, GARLAND SM, MACHALEK DA, FAIRLEY CK, JENSEN JS, WILLIAMSON DA, TAN LY, MOKANY E, DURUKAN D, BRADSHAW CS. Moxifloxacin and sitafloxacin treatment failure in *Mycoplasma genitalium* infection: association with parC mutation G248T (S83I) and concurrent gyrA mutations[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2020, 221(6): 1017-1024.
- [18] KHAN M, KHAN S, ALI A, AKBAR H, SAYAF AM, KHAN A, WEI DQ. Immunoinformatics approaches to explore *Helicobacter Pylori* proteome (Virulence Factors) to design B and T cell multi-epitope subunit vaccine[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 13321.
- [19] 李小余, 王银环, 严杰, 程东庆. 钩端螺旋体 groEL 基因原核表达及其产物免疫保护作用[J]. 浙江大学学报(医学版), 2013, 42(2): 164-170.
- LI XY, WANG YH, YAN J, CHENG DQ. Prokaryotic expression of *Leptospira interrogans* groEL gene and immunoprotection of its products in hamsters[J]. Journal of Zhejiang University (Medical Sciences), 2013, 42(2): 164-170 (in Chinese).
- [20] 黄海峰, 张振兴, 杨小健, 曹瑞勇, 李宝宝, 聂鑫, 朱姝, 李国华, 彭冬梅, 李亚颖, 王凤阳, 杜丽. 类鼻疽伯克霍尔德菌 groEL 基因的克隆、原核表达及其蛋白的生物信息学分析[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(2): 302-309.
- HUANG HF, ZHANG ZX, YANG XJ, CAO RY, LI BB, NIE X, ZHU S, LI GH, PENG DM, LI YY, WANG FY, DU L. Cloning, prokaryotic expression and protein bioinformatics analysis of groEL gene of *Burkholderia pseudomallei*[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2018, 45(2): 302-309 (in Chinese).
- [21] 钱思彤, 李琳, 杨婷婷, 刘艺. 新型冠状病毒相关蛋白 DPP1 的生物信息学分析及分子对接研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2023, 18(2): 125-131.
- QIAN ST, LI L, YANG TT, LIU Y. Bioinformatic analysis and molecular docking studies of SARS-CoV-2 related protein DPP1[J]. Journal of Pathogen Biology, 2023, 18(2): 125-131 (in Chinese).
- [22] HAGEMANN L, GRÜNDEL A, JACOBS E, DUMKE R. The surface-displayed chaperones GroEL and DnaK of *Mycoplasma pneumoniae* interact with human

- plasminogen and components of the extracellular matrix[J]. *Pathogens and Disease*, 2017, 75(3): fix017.
- [23] YU Y, ZHANG L, CHEN Y, LI Y, WANG ZZ, LI GW, WANG G, XIN JQ. GroEL protein (heat shock protein 60) of *Mycoplasma gallisepticum* induces apoptosis in host cells by interacting with annexin A2[J]. *Infection and Immunity*, 2019, 87(9): e00248-19.
- [24] WAITES KB, CRABB DM, RATLIFF AE, GEISLER WM, ATKINSON TP, XIAO L. Latest advances in laboratory detection of *Mycoplasma genitalium*[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2023, 61(3): e0079021.
- [25] HE J, WANG SP, ZENG YH, YOU XX, MA XH, WU N, WU YM. Binding of CD14 to *Mycoplasma genitalium*-derived lipid-associated membrane proteins upregulates TNF- α [J]. *Inflammation*, 2014, 37(2): 322-330.
- [26] LI LL, LUO D, LIAO YT, PENG KL, ZENG YH. *Mycoplasma genitalium* protein of adhesion induces inflammatory cytokines via cyclophilin A-CD147 activating the ERK-NF- κ B pathway in human urothelial cells[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 2052.
- [27] KAMALAKANNAN V, KIRTHIKA S, HARIPRIYA K, BABU S, NARAYANAN RB. *Wolbachia* heat shock protein 60 induces pro-inflammatory cytokines and apoptosis in monocytes *in vitro*[J]. *Microbes and Infection*, 2012, 14(7/8): 610-618.
- [28] HO JD, TAKARA LEM, MONARIS D, GONÇALVES AP, SOUZA-FILHO AF, de SOUZA GO, HEINEMANN MB, HO PL, ABREU PAE. GroEL protein of the *Leptospira* spp. interacts with host proteins and induces cytokines secretion on macrophages[J]. *BMC Microbiology*, 2021, 21(1): 99.
- [29] SHIN H, JEON J, LEE JH, JIN SG, HA UH. *Pseudomonas aeruginosa* GroEL stimulates production of PTX3 by activating the NF- κ B pathway and simultaneously downregulating microRNA-9[J]. *Infection and Immunity*, 2017, 85(3): e00935-16.
- [30] LIN HH, LIN YW, WU CY, HSIAO FP, LAI YL, HUNG SL. Stimulatory effects of *Porphyromonas gingivalis* GroEL protein on interleukin-6 and interleukin-8 in human osteoblasts[J]. *Journal of the Formosan Medical Association*, 2021, 120(1 Pt 1): 150-156.
- [31] BENT R, MOLL L, GRABBE S, BROS M. Interleukin-1 beta-a friend or foe in malignancies?[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(8): 2155.
- [32] MALIK A, KANNEGANTI TD. Function and regulation of IL-1 α in inflammatory diseases and cancer[J]. *Immunological Reviews*, 2018, 281(1): 124-137.

(本文责编 郝丽芳)