

## M41 型 A 群链球菌的 I 型胶原样蛋白与人低密度脂蛋白的相互作用

梁纯伟<sup>1,3</sup>, 赵瑞东<sup>1,3</sup>, 高玉敏<sup>2,3</sup>, 韩润林<sup>2,3\*</sup>

(内蒙古农业大学,<sup>1</sup> 生命科学学院,<sup>2</sup> 兽医学院,<sup>3</sup> 血浆脂蛋白免疫学研究中心, 呼和浩特 010018)

**摘要:**【目的】检测 M41 型 A 群链球菌(GAS) ATCC12373 中 I 型胶原样蛋白(ScI1)与人低密度脂蛋白(LDL)的相互作用。【方法】克隆了 M41 型 GAS ATCC12373 的 I 型胶原样蛋白(ScI1)及其 V 区(ScI1-V)基因, 并表达、纯化重组蛋白 rScI1(C176)和 rScI1-V(C176V)。通过重组蛋白与人血浆的亲合色谱层析、Western blot 及酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 C176、C176V 与 LDL 的相互作用;通过 GAS 与 LDL 的 ELISA 试验和人血浆与 GAS 的共孵育试验, 检测 GAS 与 LDL 的相互作用。【结果】结果证明 C176 和 C176V 可以与 LDL 特异性结合;表达 ScI1 的 M41 型 GAS 可以与 LDL 相结合。【结论】M41 型 GAS 的 ScI1 可以与 LDL 特异性结合。

**关键词:** A 群链球菌; I 型胶原样蛋白; 低密度脂蛋白

**中图分类号:** Q936      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 07-0903-06

A 群链球菌 (*Streptococcus pyogenes* or group A *streptococcus*, GAS) 是一种革兰氏阳性致病菌, 它定植于咽部或皮肤, 可引起化脓性感染, 如咽炎、猩红热、中毒性休克综合症、坏死性筋膜炎、败血病等, 并可导致非化脓性后遗症, 如急性肾小球肾炎和风湿热等疾病<sup>[1-2]</sup>。根据细菌表面 M 蛋白的不同, GAS 被分为 100 多个 M 型<sup>[3]</sup>。GAS 表面含多种毒力因子, 主要包括 M 蛋白<sup>[4]</sup>、透明质酸荚膜<sup>[5]</sup>、脂磷壁酸<sup>[6]</sup>、纤连蛋白结合蛋白<sup>[7]</sup>及胶原样蛋白<sup>[8]</sup>。

GAS 的胶原样蛋白 (Streptococcal collagen-like protein, ScI) 是 2000 年后新发现的一种蛋白质, 分为 ScI1 和 ScI2 两种<sup>[8]</sup>, 也被称为 ScIa 和 ScIb<sup>[9-10]</sup>, 其结构与哺乳动物的胶原蛋白类似。ScI1 N-末端含有信号肽, 但在成熟过程中被切除, 成熟的 ScI1 的结构包括 N-末端非胶原可变区 (variable region, V 区), 及相邻的胶原样区 (collagen-like region, CL 区)、连接区 (linker region, L 区) 和细胞壁区 (cell-

wall/membrane region, WM 区), 与 ScI1 相比, ScI2 在结构上缺少 L 区<sup>[8]</sup>。对于 ScI1 的功能, 人们已进行了一些研究, 发现不同 M 型的 GAS 菌株中的 ScI1 可分别与人的肺上皮细胞<sup>[8]</sup>、整联蛋白  $\alpha_2\beta_1$ <sup>[11]</sup>、补体调节蛋白 H 因子<sup>[12]</sup>、凝血酶激活的纤维蛋白溶解抑制物<sup>[13]</sup> 结合, 从而有利于 GAS 对宿主的感染。另外, 研究发现 GAS 的 M2<sup>[12]</sup> 和 M1、M12、M28、M41 (MGAS6183)<sup>[14]</sup> 型菌株的 ScI1 可以通过其 V 区与低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL) 结合, 但其病理生理意义目前还不清楚。同时, 研究也发现 M6 型 GAS 的 ScI1 不与 LDL 结合<sup>[12]</sup>。

我们发现另一株 M41 型 GAS ATCC12373 的 ScI1 的核苷酸及氨基酸序列 (与 M41 型 GAS CMCC32198 的 ScI1 序列相同, GenBank 收录号: EU915249) 与 MGAS6183 的 ScI1 (GenBank 收录号: AY452037) 有较大差别, 二者 V 区氨基酸序列的一致性为 65% (图 1)。本研究中, 我们根据菌株

**基金项目:** 内蒙古农业大学引进人才科研启动金 (K32615); 内蒙古高等学校科研项目 (NJZY07004)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-471-4310523; E-mail: han-runlin@163.com

**作者简介:** 梁纯伟 (1982-), 男, 内蒙古乌海人, 硕士研究生, 主要从事血浆脂蛋白免疫学的研究。E-mail: chunweiliang@yahoo.cn

**收稿日期:** 2009-12-09; **修回日期:** 2010-03-15

ATCC12373 的 SclI 及其 V 区 (SclI-V) 基因, 克隆、表达和纯化了包含其 V 区、CL 区及部分 L 区的重组蛋白 rSclI (C176) 和 rSclI-V (C176V) (见图 2), 证实该菌株的 SclI 仍能与 LDL 特异性结合, 这种结

合似乎在 GAS 中具有一定的普遍性, 为进一步分析 SclI 与 LDL 相互作用的分子结构及其生物学意义提供了基础材料。

```

ATCC12373 SclI-V: 1 DIWDQEQSRRAELLRKLTDLQSSQNDVPKTNDIQQENTWWT 42
MGAS6183 SclI-V: 1 EDSETATARRTKLLEKLTTELRSQSQDRVPQTSDITQAYTLWGT 42

ATCC12373 SclI-V: 43 SYDSVELYNYLKRTEEYLEKQKDHEEKWKQEIITDGLKSDALR 84
MGAS6183 SclI-V: 43 SYDSVELYKYLQQIEEYLQKQKYHEEQWKKEITDGLKSGALR 84
  
```

图 1 M41 型 GAS ATCC12373 的 SclI-V 与 MGAS6183 的 SclI-V 的氨基酸序列的异同 (方框内为相同氨基酸)

Fig. 1 Protein sequence alignment between SclI-V from two M41-type GAS strains, ATCC12373 and MGAS6183 (the same amino acids are marked with rectangles).

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和载体:** GAS ATCC12373 (M41 型, 简称 M41) 购自美国标准菌种收藏所, GAS CMCC32175 (M6 型, 简称 M6) 购自中国医学微生物菌种保藏管理中心, 大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 购自上海生工生物工程技术有限公司, pASK-IBA2 载体购自 IBA 公司。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 限制性内切酶 *Bsa* I 购自 NEB 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒和质粒提取试剂盒购自北京天根生物科技有限公司; 核酸胶回收和纯化试剂盒购自 Promega 公司; DNA 连接试剂盒购自 TaKaRa 公司; *Strep*-Tactin Sepharose、10 × *Strep*-tag Elution Buffer (Buffer E)、10 × *Strep*-tag Regeneration Buffer (Buffer R)、anhydrotetracycline 和 *Strep*-Tactin-HRP 购自 IBA 公司; 蛋白含量测定试剂盒购自 Pierce 公司; LDL 购自 Chemicon 公司; 羊抗人 LDL 多抗购自 Sigma 公司; 驴抗羊 IgG-HRP 购自 R&D Systems; Typtone、Yeast Extraction 和 Agarose 均购自 OXOID; Bacto™ Todd Hewitt Broth 购自 BD 公

司; 营养肉汤购自北京双旋微生物培养基制品厂; 其他常规试剂为国产分析纯或进口分装。PCR 仪购自杭州博日科技有限公司; 酶标仪购自 BioTek 公司; CO<sub>2</sub> 培养箱购自 SANYO 公司; 台式冷冻离心机购自 Eppendorf 公司; 凝胶图像分析系统购自上海天能科技有限公司。

### 1.2 细菌培养<sup>[14]</sup>

在 LB 培养基中培养 *E. coli*, 培养条件为: 37°C, 200 r/min; 诱导表达重组蛋白时 *E. coli* 的培养条件为: 30°C, 200 r/min。培养 M41 型和 M6 型 GAS 时, 先分别取 200 μL 冻存菌液涂布于血平板 (营养肉汤 1.8%, Agar 2%, 脱纤维羊血 10%) 上, 在 CO<sub>2</sub> 培养箱内过夜培养, 培养条件为: 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 然后用无菌棉签刮取血平板上的细菌接入 100 mL THY 培养基中, 在 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养至 OD<sub>600</sub> = 0.5 - 0.6。

### 1.3 基因克隆

**1.3.1 引物:** 使用 IBA 公司的 Primer D'Signer 软件设计引物。根据 SclI. 41 基因测序结果, 以 pASK-IBA2 为表达载体, *Bsa* I 为酶切位点设计 SclI (C176) 及其 V 区 (C176V) 引物 (引物序列见表 1)。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer	Sequences (5'→3') ( <i>BSA</i> I Recognition site underlined)	PCR product/bp
SCL1 <sup>[8]</sup>	FORWARD: CTCCACAAAAGAGTGATCACTG REVERSE: TTAGTTGTTTTCTTTGCGTTT	1299
C176	FORWARD: ATGGTAGGTCTCAGGCCGATATCTGGGACCAGGAGCAAAG REVERSE: ATGGTAGGTCTCAGCGCTTGTTCGCCCTGGTTGCTCTGGC	989
C176V	FORWARD: ATGGTAGGTCTCAGGCCGATATCTGGGACCAGGAGCAAAG REVERSE: ATGGTAGGTCTCAGCGCTACGTAAGCATCGCTCTTAAGACC	287

**1.3.2 扩增 SclI 基因:** 从 M41 型 GAS 中提取基因组 DNA, 用 SclI 基因引物 (引物序列见表 1) 扩增

SclI 基因, 扩增条件为: 94°C 2 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min 40 s, 30 个循环; 72°C, 5 min<sup>[8]</sup>。引

物由上海生工生物工程有限公司合成;扩增产物由北京利嘉泰成生物技术有限公司进行测序。

**1.3.3 扩增 C176 和 C176V:**以 M41 型 GAS 基因组为模板,扩增 C176 和 C176V。C176 扩增条件为:94℃ 2 min;94℃ 30 s,68℃ 30 s,72℃ 1 min,30 个循环;72℃,5 min。C176V 扩增条件为:94℃ 2 min;94℃ 30 s,68℃ 30 s,72℃ 30 s,30 个循环;72℃,5 min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。扩增的 C176 序列为编码 V 区(252 bp)、CL 区(639 bp)及部分 L 区(63 bp)的基因,共 954 bp;扩增的 C176V 序列为编码 V 区(252 bp)的基因。然后用 *Bsa* I 分别酶切 pASK-IBA2 及纯化后的扩增产物,酶切产物切胶回收后进行连接,连接产物转化感受态 *E. coli* BL21(DE3),用菌落 PCR 鉴定阳性克隆。

#### 1.4 重组蛋白的诱导表达及纯化

重组蛋白 C176 和 C176V 的诱导表达及纯化方法参照 IBA 公司操作手册。纯化后的蛋白用 PBS 透析 24 h,然后测定蛋白含量。

#### 1.5 C176 和 C176V 与人 LDL 的结合实验

**1.5.1 亲和色谱层析<sup>[14]</sup>:**取 3 个 5 mL 层析柱分别加入 0.2 mL 的 *Strep*-Tactin Sepharose (50% suspension),并用 Buffer W 平衡。取纯化的 C176 和 C176V 各 50 μg 加入其中 2 个层析柱中,使 C176 和 C176V 通过 C-末端 *Strep*-tag II 与 *Strep*-Tactin Sepharose 结合,另 1 个层析柱不加蛋白作为阴性对照,然后用 Buffer W 清洗层析柱以洗去未结合蛋白,再向 3 个层析柱中各加入 0.5 mL 人血浆,之后用 Buffer W 过柱以洗去未结合蛋白,再用 Buffer E 洗脱,收集流出物。分别将收集的样品用 10% 的三氯乙酸沉淀,冰浴 1 h 后,4℃,10000 r/min 离心 10 min,去上清,蛋白沉淀用 30 μL 1 mol/L Tris-HCl pH8.0 悬浮,然后加 10 μL 4 × Sample Buffer,煮沸 5 min,处理后样品做 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测。

**1.5.2 Dot blot:**将亲和色谱层析后制备的各电泳样品点在 2 块硝酸纤维素膜上,分别用来检测 LDL 和重组蛋白。用来检测 LDL 的膜用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭,以羊抗人 LDL 多抗(1:20000 倍稀释)为一抗,驴抗羊 IgG-HRP(1:4000 倍稀释)为二抗,加入化学发光底物后于暗室内显影。用来检测重组蛋白的膜用含 2.5% 牛血清白蛋白的 TBST 封闭,以 *Strep*-Tactin-HRP(1:100000 倍稀释)为抗体,加入化学发光底物后于暗室内显影。

**1.5.3 酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked**

immunosorbent assay, ELISA):分别取纯化的 C176 和 C176V,用 PBS 稀释至浓度为 2 μmol/L,每孔取 100 μL 室温下包被 96 孔酶标板 1.5 h,同时设阳性及阴性对照;之后用 TBST 洗涤酶标板 3 次,再用含 1% 牛血清白蛋白的 TBST 封闭 1.5 h;封闭后洗涤酶标板,加入 3 个浓度的纯化 LDL(分别为 10 ng/孔、5 ng/孔、2.5 ng/孔)室温下孵育 1.5 h;然后用 TBST 洗涤 3 次,以羊抗人 LDL 多抗(1:15000 倍稀释)为一抗,驴抗羊 IgG-HRP(1:1000 倍稀释)为二抗,四甲基联苯胺(tetramethyl benzidine, TMB)为底物,加入终止液后,检测  $OD_{450}$ 。

#### 1.6 M41 型和 M6 型 GAS 与人 LDL 的结合实验

**1.6.1 ELISA:**将 M41 型和 M6 型 GAS 分别培养于 100 mL THY 培养基中,于 37℃,5% CO<sub>2</sub> 条件下培养至  $OD_{600} = 0.5 - 0.6$ ,离心菌液收集细菌,用 PBSA (PBS 中含 0.02% NaN<sub>3</sub>)洗菌 3 次后离心,去上清。然后用 PBSA 将细菌稀释为 3 个浓度, $OD_{600}$  分别为 0.06、0.10、0.16,取各浓度菌液每孔 100 μL 室温下包被 96 孔酶标板 1.5 h,同时设阳性及阴性对照;之后用 TBST 洗涤酶标板 3 次,用含 1% 牛血清白蛋白的 TBST 室温下封闭 1.5 h;再用 TBST 洗涤 3 次,加入 LDL 0.5 ng/孔,室温下孵育 1.5 h;然后用 TBST 洗涤,以羊抗人 LDL 多抗(1:15000 倍稀释)为一抗,驴抗羊 IgG-HRP(1:1000 倍稀释)为二抗,TMB 为底物,加入终止液后,检测  $OD_{450}$ 。

**1.6.2 共孵育实验<sup>[14]</sup>:**按上述方法培养 M41 型和 M6 型 GAS 至  $OD_{600} = 0.5 - 0.6$ ,离心收集细菌,用 PBSA 洗菌 3 次后离心去上清;用 5 mL PBSA 悬浮细菌沉淀,各取 1 mL 悬浮后菌液,分别加入 0.1 mL 人血浆及 0.1 mL PBSA(阴性对照),混匀后冰浴 1 h,然后 4℃,10000 r/min 离心 5 min,弃上清;细菌沉淀用 1 mL PBSA 洗 3 次,然后离心,弃上清,再用 200 μL 0.1 mol/L PH 2.0 甘氨酸悬浮细菌沉淀,室温作用 15 min,然后 4℃,10000 r/min 离心 10 min,吸取上清;将上清液用 10% 三氯乙酸沉淀,冰浴 1 h,之后 4℃,10000 r/min 离心 10 min,弃上清;蛋白沉淀用 30 μL 1 mol/L Tris-HCl PH8.0 悬浮,加 10 μL 4 × Sample Buffer,煮沸 5 min,备用。

**1.6.3 Western blot:**取共孵育试验制备的样品做 SDS-PAGE(4% 浓缩胶,6% 分离胶),电泳后将蛋白转于硝酸纤维素膜上,湿转条件:横流 400 mA,3 h。然后将膜用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭,其余步骤与之前 Dot blot 检测 LDL 的方法相同。

## 2 结果

### 2.1 基因克隆及蛋白表达, 纯化

以 M41 型 GAS ATCC12373 基因组 DNA 为模板, 扩增 Scl1 基因后测序。测序结果表明该 Scl1 基因序列与 M41 型 GAS CMCC32198 Scl1 基因 (GenBank 收录号: EU915249, 本实验室提交) 序列完全相同。扩增的 C176 和 C176V 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 显示片段大小与理论值一致, 将扩增产物酶切、连接、转化后通过菌落 PCR 鉴定阳性克隆, 并将阳性克隆进行测序, 测序结果完全正确, 从而构建了 pASK-IBA2-C176, pASK-IBA2-C176V 表达载体, 然后诱导表达并纯化重组蛋白 (重组蛋白 C176, C176V 结构示意图见图 2)。

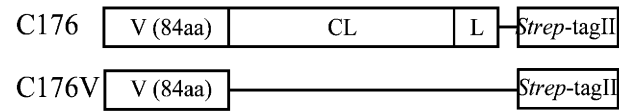


图 2 重组蛋白 C176, C176V 结构示意图

Fig. 2 Schematic representation of rScl1 constructs (not to scale).

V, variable region; CL, collagen-like region; L, linker region.

### 2.2 C176 和 C176V 与人血浆的亲亲和色谱层析试验结果

取纯化后的重组蛋白 C176 和 C176V 与人血浆做亲和和色谱层析试验, 试验后得到的样品用 SDS-PAGE 及 Dot blot 检测, 结果 (图 3) 表明 C176,

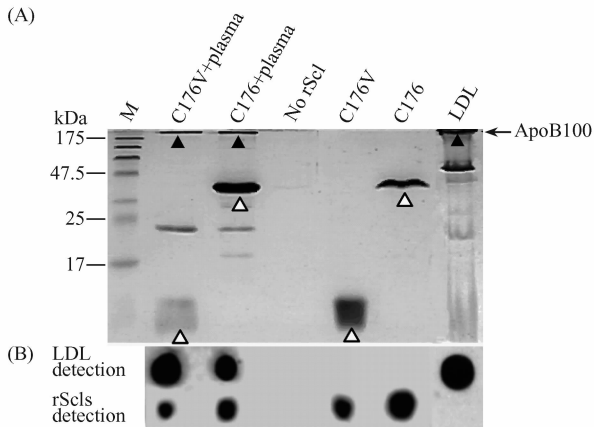


图 3 通过亲和和色谱层析获得的样品的 SDS-PAGE (A) 及 Dot blot (B) 检测结果

Fig. 3 Eluted fractions from affinity chromatography-binding assay were analyzed by 15% SDS-PAGE (A) and Dot blot (B) to detect the interactions of C176, C176V with human plasma LDL. Bands corresponding to C176, C176V are marked with open triangles, solid triangles stand for ApoB100. No rScl (recombinant Scl1) lane is the control without rScl protein immobilized. LDL and rScl preparations were used as markers. M: Molecular mass marker.

C176V 均可与 LDL 的主要成分 ApoB100 (apolipoprotein B100) 结合, 即图 3-A 中实心三角标记的条带, 之前我们的研究已证实该条带为 ApoB100<sup>[14]</sup>。因为 Scl1 的 CL 区与 ApoB100/LDL 不结合<sup>[14]</sup>, 所以 Scl1 的 V 区为与 ApoB100/LDL 结合的主要区域。

### 2.3 C176 和 C176V 与人 LDL 的 ELISA 试验结果

取纯化后的重组蛋白 C176 和 C176V 与人 LDL 做 ELISA 检测, 结果 (图 4) 表明 C176 和 C176V 均与 LDL 结合并呈浓度梯度依赖关系 ( $P < 0.05$ , 差异显著), 说明这种结合是一种特异性的相互作用。

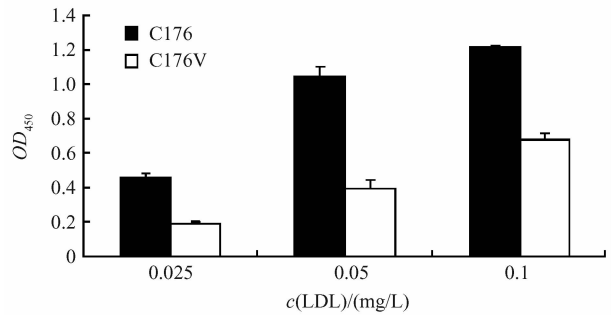


图 4 C176、C176V 与 LDL 的 ELISA 结果

Fig. 4 Interactions of C176, C176V with purified LDL detected with ELISA.

### 2.4 M41 型和 M6 型 GAS 与人 LDL 结合试验结果

培养 M41 型和 M6 型 GAS 与人 LDL 做 ELISA 试验, 结果 (图 5-A) 表明 M41 型 GAS 可以通过其表面的 Scl1 与 LDL 结合并呈浓度梯度依赖关系 ( $P < 0.05$ , 差异显著), 而 M6 型 GAS 不与 LDL 结合。之前的研究表明, M6 型 GAS MGAS6169 的 Scl1 不与 LDL 结合<sup>[12]</sup>, 而本研究中所用菌株 M6 型 GAS CMCC32175 的 Scl1 序列经测序与 MGAS6169 Scl1. 6 (GenBank 收录号: EU127997) 序列完全相同, 推测该 M6 型菌株也不与 LDL 结合, 与本研究的结果相吻合, 可作为本研究中的阴性对照。同时, 取 M41 型和 M6 型 GAS 与人血浆共孵育试验后制备的样品做 Western blot, 检测 LDL, 结果 (图 5-B) 表明 M41 型 GAS 可以与人血浆中的 LDL 结合, 而 M6 型 GAS 不能, 该结果与 ELISA 结果一致。

## 3 讨论

血浆脂蛋白 (主要包括高密度脂蛋白, high-density lipoproteins, HDL; LDL; 极低密度脂蛋白, very-low-density lipoproteins, VLDL 等) 的基本作用是参与脂类运输。LDL 是血浆脂蛋白的主要成分之

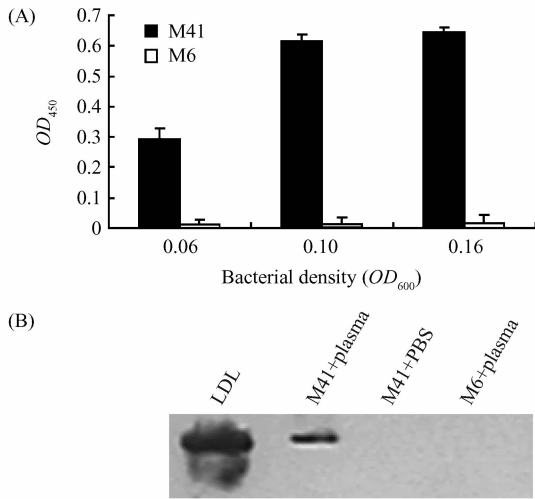


图5 M41型、M6型 GAS 与 LDL 的 ELISA(A) 结果及其与人血浆共孵育实验得到的样品的 Western blot(B) 检测结果

Fig. 5 Interactions of M41-type, M6-type GAS cells with LDL detected with ELISA (A) and Western blot (B), the samples analyzed in Western blot were derived from whole cell binding assays.

一,它通过与组织细胞表面的 LDL 受体结合,向肝外组织转运胆固醇,一般认为,高浓度的 LDL-胆固醇容易导致动脉粥样硬化,是导致心血管疾病的危险因素<sup>[15]</sup>,但是,一些证据表明 LDL 在防御病原微生物感染方面具有的积极的作用<sup>[16-19]</sup>。如 LDL 可以灭活金黄色葡萄球菌的  $\alpha$ -毒素<sup>[20]</sup>,VLDL 和 LDL 也具有抗特定病毒的活性,如一些披膜病毒(乙型肝炎病毒, *Japanese encephalitis virus*<sup>[21]</sup>; 风疹病毒, *Rubella virus*<sup>[22]</sup>) 及一些杆状病毒<sup>[23]</sup>(狂犬病毒, *Rabies virus*; 水泡性口膜炎病毒, *Vesicular stomatitis virus*),也可以与轮状病毒(SA-11 *rotavirus*) 结合,比较有效地抑制病毒感染<sup>[24]</sup>。另外,LDL 可以和鼠疫耶氏菌(*Yersinia pestis*) 表面的 pH6-antigen 结合<sup>[25]</sup>,也可以与多种 M 型的 GAS 表面的 Scl1 结合<sup>[12,14]</sup>。我们的研究发现,尽管 M41 型 GAS ATCC12373 与 MGAS6183 的 Scl1 在氨基酸序列上有一定差异,V 区氨基酸序列一致性仅为 65%,但其仍可与 LDL 特异性结合,这种结合似乎在 GAS 中具有一定的普遍性。本研究为进一步分析 Scl1 与 LDL 相互作用的分子结构提供了基础材料,这种相互作用是有利于机体的抗感染作用还是有利于病菌入侵,还有待于进一步的研究。

## 参考文献

[ 1 ] Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 2000, 13 (3): 470-511.

- [ 2 ] Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections and their sequelae. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2008, 609: 29-42.
- [ 3 ] Beall B, Facklam R, Thompson T. Sequencing emm-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, 34 (4): 953-958.
- [ 4 ] McNamara C, Zinkernagel AS, Macheboeuf P, Cunningham MW, Nizet V, Ghosh P. Coiled-coil irregularities and instabilities in group A *Streptococcus* M1 are required for virulence. *Science*, 2008, 319 (5868): 1405-1408.
- [ 5 ] Churchward G. The two faces of Janus: virulence gene regulation by CovR/S in group A streptococci. *Molecular Microbiology*, 2007, 64 (1): 34-41.
- [ 6 ] Kristian SA, Datta V, Weidenmaier C, Kansal R, Fedtke I, Peschel A, Gallo RL, Nizet V. D-alanylation of teichoic acids promotes group a streptococcus antimicrobial peptide resistance, neutrophil survival, and epithelial cell invasion. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187 (19): 6719-6725.
- [ 7 ] Bisno AL, Brito MO, Collins CM. Molecular basis of group A streptococcal virulence. *Lancet Infectious Diseases*, 2003, 3 (4): 191-200.
- [ 8 ] Lukomski S, Nakashima K, Abdi I, Cipriano VJ, Ireland RM, Reid SD, Adams GG, Musser JM. Identification and characterization of the scl gene encoding a group A *Streptococcus* extracellular protein virulence factor with similarity to human collagen. *Infection and Immunity*, 2000, 68 (12): 6542-6553.
- [ 9 ] Rasmussen M, Eden A, Bjorck L. SclA, a novel collagen-like surface protein of *Streptococcus pyogenes*. *Infection and Immunity*, 2000, 68 (11): 6370-6377.
- [ 10 ] Rasmussen M, Bjorck L. Unique regulation of SclB - a novel collagen-like surface protein of *Streptococcus pyogenes*. *Molecular Microbiology*, 2001, 40 (6): 1427-1438.
- [ 11 ] Humtsoe JO, Kim JK, Xu Y, Keene DR, Hook M, Lukomski S, Wary KK. A streptococcal collagen-like protein interacts with the alpha2beta1 integrin and induces intracellular signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280 (14): 13848-13857.
- [ 12 ] Caswell CC, Han R, Hovis KM, Ciborowski P, Keene DR, Marconi RT, Lukomski S. The Scl1 protein of M6-type group A *Streptococcus* binds the human complement regulatory protein, factor H, and inhibits the alternative pathway of complement. *Molecular Microbiology*, 2008, 67 (3): 584-596.
- [ 13 ] Pahlman LI, Marx PF, Morgelin M, Lukomski S, Meijers JC, Herwald H. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor binds to *Streptococcus pyogenes* by interacting with collagen-like proteins A and B. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282 (34): 24873-24881.

- [14] Han R, Caswell CC, Lukomska E, Keene DR, Pawlowski M, Bujnicki JM, Kim JK, Lukowski S. Binding of the low-density lipoprotein by streptococcal collagen-like protein Scl1 of *Streptococcus pyogenes*. *Molecular Microbiology*, 2006, 61 (2): 351-367.
- [15] Lipid Research Clinics Program. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial Results: II. Reduction in Incidence of Coronary Heart Disease. *Journal of the American Medical Association*, 1984, 251 (3): 365-374.
- [16] Han R. Plasma lipoproteins are important components of the host defense system? *Journal of Immunology*, 2009, 182: 134-74.
- [17] Khovidhunkit W, Kim MS, Memon RA, Shigenaga JK, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism; mechanisms and consequences to the host. *Journal of Lipid Research*, 2004, 45 (7): 1169-1196.
- [18] Ravnskov U. High cholesterol may protect against infections and atherosclerosis. *An International Journal of Medicine*, 2003, 96 (12): 927-934.
- [19] Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clinical Microbiology Reviews*, 2003, 16 (3): 379-414.
- [20] Bhakdi S, Tranum-Jensen J, Utermann G, Fussle R. Binding and partial inactivation of *Staphylococcus aureus* alpha-toxin by human plasma low density lipoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 1983, 258 (9): 5899-5904.
- [21] Ho WK, Shortridge KF. The role of lipids in the serum lipoproteins as inhibitors of hemagglutination by Japanese encephalitis virus. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 1976, 29 (5): 283-287.
- [22] Shortridge KF, Ho WK. Comparison of the activities in inhibition of haemagglutination by different togaviruses for human serum lipoproteins and their constituents. *Journal of General Virology*, 1976, 33 (3): 523-527.
- [23] Seganti L, Grassi M, Mastromarino P, Pana A, Superti F, Orsi N. Activity of human serum lipoproteins on the infectivity of rhabdoviruses. *Microbiologica*, 1983, 6 (2): 91-99.
- [24] Superti F, Seganti L, Marchetti M, Marziano ML, Orsi N. SA-11 rotavirus binding to human serum lipoproteins. *Medical Microbiology and Immunology*, 1992, 181 (2): 77-86.
- [25] Makoveichuk E, Cherepanov P, Lundberg S, Forsberg A, Olivecrona G. pH6 antigen of *Yersinia pestis* interacts with plasma lipoproteins and cell membranes. *Journal of Lipid Research*, 2003, 44 (2): 320-330.

## Scl1 of M41-type group A *streptococcus* binds low-density lipoprotein

Chunwei Liang<sup>1,3</sup>, Ruidong Zhao<sup>1,3</sup>, Yuming Gao<sup>2,3</sup>, Runlin Han<sup>2,3\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Sciences, <sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, <sup>3</sup>Research Center of Plasma Lipoprotein Immunology, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

**Abstract:** [Objective] To study the interaction of streptococcal collagen-like protein 1 (Scl1) of M41-type group A *streptococcus* (GAS) ATCC12373 with low-density lipoprotein (LDL). [Methods] We cloned, expressed and purified the recombinant proteins rScl1 and its V region rScl1-V, designated as C176 and C176V, derived from Scl1.41 of M41-type GAS. The binding of rScl1 to LDL was detected with affinity chromatography-binding assay, Western blot analysis and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and whole cell binding assays were used to detect the interactions of whole GAS cells with LDL. [Results] The results demonstrated that C176 and C176V could specifically bind purified LDL, and M41-type GAS cells expressing native Scl1 could bind LDL whereas M6-type GAS could not. [Conclusion] The Scl1 of M41-type GAS specifically binds LDL.

**Keywords:** group A *streptococcus*; streptococcal collagen-like protein 1; low-density lipoprotein

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Start-up Grant from the Inner Mongolia Agricultural University (K32615) and the Scientific Research Foundation of Inner Mongolia Higher Education (NJZY07044)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-471-4310523; E-mail: han-runlin@163.com

Received: 9 December 2009/ Revised: 15 March 2010