

利用固定化金属亲和层析和质谱技术鉴定 化脓性链球菌铜结合蛋白

贺翔[△] 银兴峰[△] 张留辉 阳小燕 孙雪松^{*}

(暨南大学生命与健康工程研究院 广东 广州 510632)

摘要: 化脓性链球菌是一种常见的高致病性革兰氏阳性菌, 每年都在全球范围内引发大量的感染现象与病死案例。金属蛋白在微生物的代谢以及毒性构成中的作用已经逐渐得到重视。通过固定化金属离子亲和层析技术对化脓性链球菌中铜结合蛋白进行分离, 配合质谱技术的使用, 共鉴定出 21 个铜结合蛋白, 这些蛋白分别在翻译、代谢、离子通道等各个生理进程中发挥相应作用。

关键词: 化脓性链球菌, IMAC, 金属蛋白, 铜结合蛋白

Identification of Copper Binding Proteins of *Streptococcus pyogenes* with IMAC and LC-MS/MS

HE Xiang[△] YIN Xing-Feng[△] ZHANG Liu-Hui YANG Xiao-Yan SUN Xue-Song^{*}

(Institute of Life and Health Engineering, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

Abstract: *Streptococcus pyogenes* is a common pathogenic Gram-positive bacterium causing worldwide diseases with high morbidity and mortality every year. Metalloproteins have been highlighted for their essential roles in the metabolisms and virulence of pathogens. In this study, Cu-binding proteins of *Streptococcus pyogenes* were isolated by using immobilized metal ion chromatography and identified with LC-MS/MS. Totally, 21 proteins were identified and the network of interactions of the proteins was established. These proteins function in many biological processes such as translation, metabolism and ion transporting.

Keywords: *Streptococcus pyogenes*, IMAC, Metalloproteins, Cu-binding proteins

金属蛋白在生物体中的重要性已经得到了越来越多的重视。作为一类成员繁杂的蛋白质, 金属蛋白需要由金属原子来帮助它实现各种生理功能^[1]。铜是生物体中含量相对较多的微量元素之一, 在生物体内有 Cu⁺与 Cu²⁺两种离子形式^[2]。目前的研究发现, 铜的生理作用主要为帮助部分氧化还原酶中的

电子转移与基因转录过程的顺利进行, 以及氧的传递等。而最常见的铜蛋白, 除了作为各种酶之外, 主要还有调节铜的内环境稳定以及细胞内铜离子储存的蛋白^[3]。由于铜在生物体内的含量很小, 且过多的铜将对细胞造成毒害, 因此, 许多物种都进化出了其特定的铜转运调控系统, 以稳定细胞内铜的含

基金项目: 暨南大学引进优秀人才启动经费项目(No. JNU 51208047); 暨南大学科研培育与创新基金项目(No. 21609301)

* 通讯作者: Tel: 86-20-85224372; 信箱: tsunxs@jnu.edu.cn

[△]共同第一作者

收稿日期: 2010-06-07; 接受日期: 2010-09-07

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

量^[4]。另一方面,正因为铜的这种重要性及潜在毒性,对微生物中铜蛋白的研究将为人们在致病性微生物新的药物治疗方法的探寻中提供不一样的视野。

化脓性链球菌作为一种常见又具有高致病性的革兰氏阳性菌,能通过皮肤创口、飞沫传播等途径在人群中造成交叉感染,引发多种疾病^[5]。目前针对化脓性链球菌铜蛋白的研究还极少见报道。固定化金属亲和层析技术(IMAC)由于能有效分离到与某种金属离子有较强结合能力的蛋白,使其在复杂的蛋白组分中得以纯化,所以该技术在金属蛋白研究中的地位已经得到了广泛认可。而本实验室所配备的LTQ Orbitrap质谱仪是一款液相质谱/线性离子阱/轨道阱组合质谱。其线性离子阱具有高速(每秒10次全扫描)、高通量、高灵敏度、单位分辨的特点,轨道阱具有高分辨、高质量精度的特点,每秒扫描1次,能有效地对复杂的肽复杂物进行分析和鉴定。这两套技术的配合使用,给予了本研究极大的可行性,保证了结果的可信度。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

本研究所采用的菌种为化脓性链球菌MGAS5005菌株,所用的培养基为Todd-Hewitt Broth与酵母提取物配置(均由OXIOD公司生产)。使用Eppendorf公司生产的1.5 mL离心管保存菌体与蛋白。配制裂解液的尿素、硫脲、CHAPS、PMSF、DTT均由Sigma公司生产,IPG缓冲液与核酸酶混合物则购自GE公司。IMAC技术中所用的IDA-Agarose购自Pierce公司,层析柱购自Bio-Rad公司,氯化铜购自Sigma公司。超滤膜购自Bio-Rad公司,规格为3 kD。溶液酶解所用的胰蛋白酶购自Promega公司,IAA和碳酸氢铵购自Sigma公司。其他试剂均为国产分析纯试剂。

主要设备包括Millipore公司生产的纯水机、Thermo公司生产的台式低温离心机与Eppendorf公司生产的小型低温离心机、上海力新仪器有限公司生产的二氧化碳培养箱、宁波新芝生物仪器公司生产的超声仪、Amersham公司生产的分光光度计以及由Thermo公司生产的LTQ-Orbitrap XL质谱仪。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养与收集:细菌培养过程在37°C、5%浓度的CO₂环境中进行,培养于含0.5%酵母提取物

的Todd-Hewitt Broth培养基中。当细菌的生长达到对数期中期时($OD_{600} = 0.7$),在4°C以5000 × g离心10 min收集细菌菌体,并用冰上预冷的无菌PBS洗涤,离心(4°C, 500 × g 10 min)收集洗净后的菌体沉淀。洗涤过程重复3次^[6]。将PBS吸净后,所得的菌体在后续使用之前置入干净的Eppendorf管中于-80°C冻存。

1.2.2 细菌蛋白的提取:细菌的裂解由加入裂解液后的反复冻融及超声方法来实现。所用裂解液含7 mol/L尿素、2 mol/L硫脲、4% *m/V*的CHAPS、1% *m/V*的DTT、2% *V/V*的IPG缓冲液(pH 4-7)、1% *m/V*的PMSF以及15 mmol/L的Tris-HCl, pH为8.0,超纯水配置。所取得的菌体在加入上述裂解液后,充分涡旋混匀,在液氮中速冻10 min,随后于37°C解冻。冻融过程重复3次。反复冻融后,使用超声仪(30%功率)以5 s脉冲超声法超声15 min进行充分裂解。超声后在冰上静置15 min冷却,加入1% *V/V*的核酸酶混合物,冰上静置30 min。于4°C以13200 r/min离心30 min,取上清。以Brandford蛋白定量法测定其所含蛋白浓度后,置于-80°C保存以备后续使用^[7]。

1.2.3 固定化铜离子亲和层析:将1 mL的IDA-Agarose装入干净的层析柱,静置沉降1 h后打开层析柱下端开口,用10 mL的超纯水冲洗柱体,加入3 mL的50 mmol/L氯化铜溶液,随后以5 mL超纯水冲洗以去除未结合的铜离子,并用5 mL的结合缓冲液(含20 mmol/L磷酸钠、0.5 mol/L氯化钠,pH 7.0)平衡柱体。将以结合缓冲液稀释10倍后的蛋白样品加入层析柱,随后分别用5 mL结合缓冲液除去未结合蛋白,5 mL含5 mmol/L咪唑的结合缓冲液去除非特异性结合蛋白。至此与铜离子存在假吸附现象的蛋白已基本被去除。最后,以3.5 mL含500 mmol/L咪唑的结合缓冲液进行流加,此部分缓冲液即为将特异与铜结合的蛋白加以洗脱的部分,从柱体下端出口收集本部分溶液^[8]。用超滤膜对该部分蛋白样品进行除盐和浓缩。以BrandFord蛋白定量法测定其所含蛋白浓度。

1.2.4 溶液酶解:在所得铜结合蛋白样品中,加入终浓度为10 mmol/L的二硫苏糖醇(DTT),在37°C水浴进行3 h的还原反应,随后加入终浓度为20 mmol/L的碘乙酰胺(IAA)在室温避光处进行1 h的烷基化处理。加入4倍体积的丙酮在-20°C进行

12 h 的蛋白沉淀处理, 在 4°C, 以 12000 r/min 离心 40 min 收集蛋白, 1 mL 无水乙醇冲洗 2 次。往蛋白沉淀中加入 50 mmol/L 的碳酸氢铵, 所采用的体积为使蛋白溶解后的浓度在 5 g/L 的量。冰水浴超声将蛋白沉淀打碎后, 按酶:蛋白的质量比为 1:50 的量加入胰蛋白酶, 于 37°C 作用 20 h 进行酶解反应。反应结束后于真空干燥仪中使酶解所得的肽段干燥^[7]。

1.2.5 铜结合蛋白的质谱鉴定: 用溶解液(含 0.5% 的 CAN, 0.1% 的甲酸)将酶解之后的肽段溶解之后, 通过自动进样器上样到 Trap 柱上面脱盐, 经过 C18 反相柱(Michrom, Bioresources, Auburn, CA)分离后直接用质谱 LTQ-Orbitrap XL 检测。肽段在反向柱上的洗脱梯度是用 0–35% CAN (含 0.1% 的甲酸)在 250 nL/min 的流速下洗脱 150 min。质谱主要参数和数据采集方法的设置中, ion transfer tube 温度是 200°C; Electrospray voltage 是 1.85 kV, 一级质谱在 Orbitrap 里扫描, 二级在 LTQ 里用 CID 碰撞模式完成。一级质谱扫描范围是 400–2000 D, 二级质谱中的标准化碰撞能量、活化 q 值和活化时间分别是 35%、0.25 和 30 ms。用 BioWorks 3.3.1 (Thermo Finnigan, San Jose, CA)对所有的原始数据进行处理, 得到 Peak list 文件, 再用 SEQUEST 软件检索美国国立生物技术信息中心(NCBI)中的化脓链球菌

MGAS5005 数据库, 完成蛋白的鉴定^[9]。

1.2.6 铜结合蛋白的分类及相互作用分析: 根据质谱鉴定数据, 在美国国立生物技术信息中心(NCBI)的数据库对鉴定出的蛋白进行逐一检索, 根据其功能的不同做出分类, 并在专门的蛋白质相互作用信息检索网站 <http://string.embl.de> 中使用相应工具对所得蛋白信息进行分析, 生成相互作用图。

2 结果

2.1 化脓性链球菌铜结合蛋白的鉴定结果

在将经固定化铜离子亲和层析纯化过的蛋白进行酶解之后, 通过质谱仪 LTQ-Orbitrap 的质谱分析以及软件 Bioworks 3.3.1 (Thermo Finnigan, San Jose, CA)的处理, 得到 Peak list 文件, 随后使用软件 SEQUEST 对美国国立生物技术信息中心(NCBI)中的化脓性链球菌 MGAS5005 数据库进行检索, 匹配出了 21 个化脓性链球菌铜结合蛋白的信息。所得的质谱数据中, 典型的 LTQ 质谱图如图 1 所示。根据各个蛋白功能的不同, 将所获得的 21 个化脓性链球菌铜结合蛋白进行分类, 其中一些蛋白能够在多种功能类别当中发挥相应作用。除了氯离子通道蛋白 (Chloride channel protein) 和膜蛋白酶 (Membrane protease family protein) 位于膜上, 这些蛋白主要都定位于细胞质中。具体分类情况由表 1 列出。

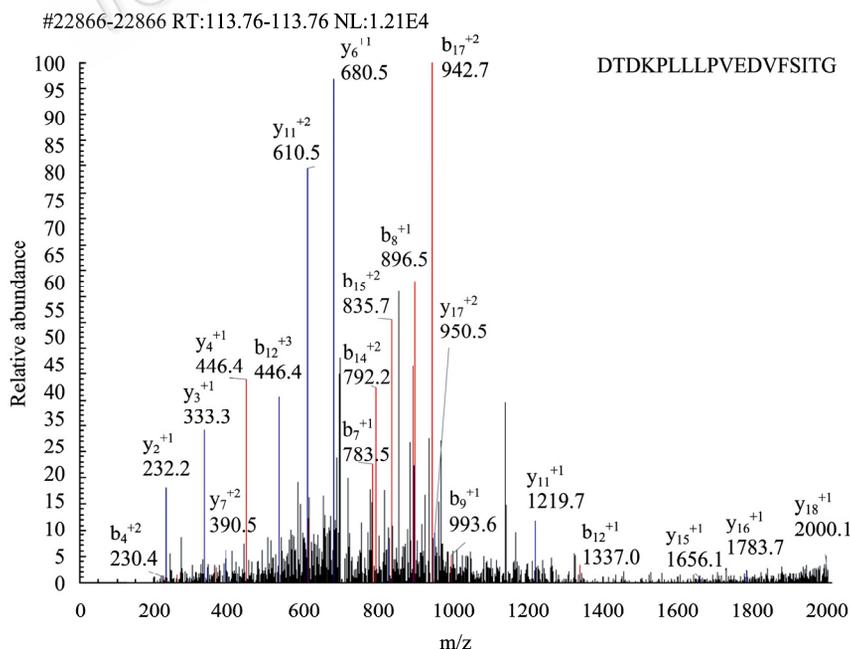


图 1 LTQ 质谱鉴定到的铜结合肽段(DTDKPLLLPVEDVFSITG)的二级图谱

Fig. 1 MS² spectra of typical Cu-binding peptide (DTDKPLLLPVEDVFSITG) get from the LTQ mass spectrometer

表 1 鉴定所得化脓性链球菌铜结合蛋白及功能分类信息
Table 1 Identified Cu-binding proteins in *S. pyogenes* and their functions

Accession No. ^a	Protein name ^a	Sf ^b	Coverage ^c	Protein MW	Gene name ^d
Translation					
71911593	30S ribosomal protein S2	4.93	17.30	28382.83	rpsB
71909864	30S ribosomal protein S3	0.98	7.40	24118.89	rpsC
71911644	30S ribosomal protein S4	4.27	26.10	23108.31	rpsD
71909857	30S ribosomal protein S10	0.75	0.00	11606.34	rpsJ
71909883	30S ribosomal protein S11	0.95	10.20	13362.19	rpsK
71909861	50S ribosomal protein L2	0.95	6.10	29858.21	rplB
71911460	50S ribosomal protein L13	0.83	0.00	16120.63	rplM
71909865	50S ribosomal protein L16	1.81	18.20	15442.35	rplP
71910321	Elongation factor Tu	4.56	17.80	43828.44	tuf
71910046	Elongation factor G	5.52	17.30	76480.73	fus
Carbohydrate metabolism					
71910369	Phosphopyruvate hydratase	8.35	35.90	47325.04	eno
71910686	L-lactate dehydrogenase	0.99	13.10	35250.23	ldh
71909999	Glucose-6-phosphate isomerase	0.81	0.00	49422.30	pgi
71909853	Bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase	0.60	13.00	96676.05	
71910047	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	5.69	17.90	35920.35	gap
Lipid metabolism					
71911306	Acyl carrier protein	0.86	14.90	8338.06	acpP
Protein metabolism					
71911414	Membrane protease family protein	0.97	9.80	33045.74	Pre2
Oxidation					
71910686	L-lactate dehydrogenase	0.99	13.10	35250.23	ldh
71910047	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	5.69	17.90	35920.35	gap
71909853	Bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase	0.60	13.00	96676.05	
Membrane transporters/binding proteins					
71910650	Chloride channel protein	0.22	16.50	55984.53	Spy_1114
Other					
71910743	Hypothetical protein M5005_Spy_0930	0.09	7.8	29998.30	Spy_0930
71910933	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase	0.97	2.90	63095.86	pstI
71911213	PTS system, galactose-specific IIB component	0.12	18.80	11280.73	Spy_1710

Note: ^a: Accession number and Protein description in the NCBI database of *Streptococcus pyogenes* MGAS5005; ^b: Final score; ^c: Percentage of protein sequence covered by the experimentally detected peptides; ^d: Gene name obtained from Uniport database of *S. pyogenes* MGAS5005. Searching parameters: Filter(s)...deltaacn \geq 0.100; xc(\pm 1, 2, 3) = 1.80, 2.20, 2.80.

2.2 铜离子结合基序分析

蛋白对金属离子的结合能力依赖于其相应的空间结构和特定的氨基酸序列^[10]。目前已经有研究表明,在蛋白的氨基酸序列中,半胱氨酸、组氨酸与甲硫氨酸的侧基尤其有利于铜离子的结合^[11]。对铜离子结合肽段序列的统计与分析表明,以下基序是蛋

白潜在的铜离子结合位点: C(X)₂C; C(X)_nH(n = 2-9); H(X)_mH(m = 0-11); H(X)_iM(i = 0-10)和 M(X)_tM(t = 8 或 12)^[12]。对本研究鉴定到的铜结合蛋白进行此类基序的分析与寻找,发现除了酰基载体蛋白(Acyl carrier protein)和假定蛋白 M5005_Spy_0930,其他蛋白的肽段序列中均能找到相应的潜在铜离子结合

基序, 具体基序情况举例如表 2 所示。

2.3 假定蛋白 Spy_0930 的同源性蛋白分析

在鉴定到的 21 个铜结合蛋白中, 假定蛋白 Spy_0930 的功能目前仍然未知。通过 NCBI 的相似性检索功能, 我们检索出与该蛋白同源性较高的一部分蛋白, 相关信息由表 3 列出。这些蛋白有一个共同点, 都具有一个大的与 ADP-核糖有较高亲和力的结构域^[20], 预示着这个假定蛋白也可能具备同样的结构域。目前这些蛋白的信息主要通过基因组的比较得出, 对蛋白本身表征方面的研究并不多, 表明这些蛋白还有着非常广阔的研究空间。

2.4 化脓性链球菌铜结合蛋白相互作用图

根据 String 数据库中提供的信息以及蛋白质相互作用分析软件的使用, 得到化脓性链球菌中铜结合蛋白的相互作用信息。如图 2 所示, 在鉴定出的 21 个化脓性链球菌铜结合蛋白中, 其中有 15 个蛋白彼此之间直接相关。相关的蛋白主要涉及到蛋白质的翻译以及糖的代谢。另有 2 个蛋白在 String 数据库中未找到其相互作用信息。其中, 作为翻译相关蛋白的 rpsK 与 fus 与糖代谢相关蛋白中的 gap 与 eno 有着直接的相互作用, 预示着它们在翻译和代谢的生理连接上处于相对关键的位置。

表 2 鉴定的化脓性链球菌中铜蛋白铜结合肽段基序
Table 2 Identified Cu-binding peptide with motifs from the digest of whole *S. pyogenes* lysate

Peptide sequence	Protein name	Motif
HFGHQTRRWPNKM	30S ribosomal protein S2	H(X) ₂ H; H(X) ₈ M
MGQKVHPIGM	30S ribosomal protein S3	M(X) ₈ M; H(X) ₃ M
ARQFVNHGHI	30S ribosomal protein S4	H(X) ₁ H
SREQFEMRTH	30S ribosomal protein S10	H(X) ₂ M
HIHATFNNTIVM	30S ribosomal protein S11	H(X) ₁ H; H(X) ₈ M; H(X) ₁₀ M
HQGGGHRHYR	50S ribosomal protein L2	H(X) ₂ H; H(X) ₄ H
MKLKVFVGGETH	50S ribosomal protein L13	H(X) ₁ H; H(X) ₉ M
HRREFRGKMRGE	50S ribosomal protein L16	H(X) ₇ M
HIDAPGHADYVKNM	Elongation factor Tu	H(X) ₅ H; H(X) ₆ M
LHDRLQANAH	Elongation factor G	H(X) ₇ H
MMNIINGGSH	Phosphopyruvate hydratase	H(X) ₈ M; H(X) ₉ M
VHAYIMGEHG	L-lactate dehydrogenase	H(X) ₂ M; H(X) ₃ M; H(X) ₆ H
LNHHFANLQTAK	Glucose-6-phosphate isomerase	H(X) ₀ H
MAFANAFLGISHSM	Bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase	M(X) ₁₂ M
TTNCLAPMAKALH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	H(X) ₄ M
HQVAEEMSTY	Membrane protease family protein	H(X) ₅ M
MAIAVVTFSYLVLM	Chloride channel protein	M(X) ₁₂ M
HLMVLADPEM	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase	H(X) ₁ M; H(X) ₈ M
MSDRGYDVHCDAVM	PTS system, galactose-specific IIB component	M(X) ₁₂ M; H(X) ₄ M

表 3 与假定蛋白 Spy_0930 同源性高蛋白举例
Table 3 Proteins show high homology with hypothetical protein M5005_Spy_0930

Accession	Description	Query coverage (%)
ZP_00789461.1	Appr-1-p processing enzyme family domain protein [<i>Streptococcus agalactiae</i> 515]	98
ZP_00785413.1	Appr-1-p processing enzyme family domain protein [<i>Streptococcus agalactiae</i> COH1]	98
ZP_05737608.1	Appr-1-p processing enzyme family domain protein [<i>Granulicatella adiacens</i> ATCC 49175]	96
ZP_05852148.1	Appr-1-p processing enzyme [<i>Granulicatella elegans</i> ATCC 700633]	84
CAQ48843.1	Protein in Tap1-dppD intergenic region [<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ST398]	88
ZP_04062002.1	Protein in Tap1-dppD intergenic region [<i>Streptococcus salivarius</i> SK126]	84
CBK77976.1	Predicted phosphatase homologous to the C-terminal domain of histone macroH2A1 [<i>Clostridium</i> cf. <i>saccharolyticum</i> K10]	87
ZP_06340971.1	Macro domain-containing protein [<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> H19]	73

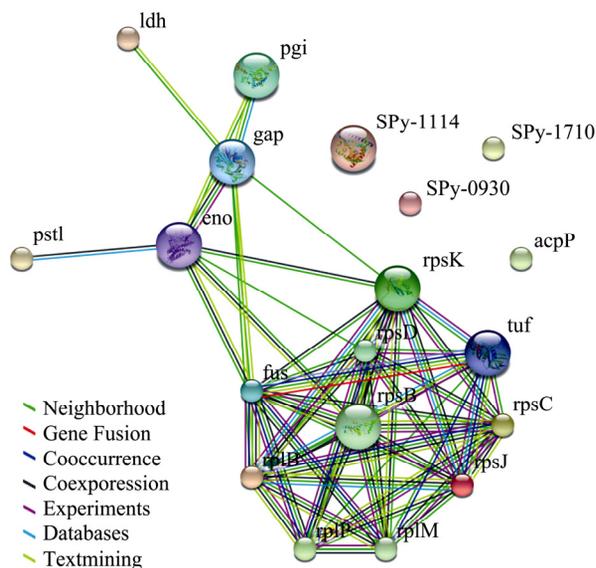


图2 鉴定到的化脓性链球菌铜结合蛋白相互作用图示
Fig. 2 Protein-protein interaction network of the identified Cu-binding proteins of *S. pyogenes*

3 讨论

化脓性链球菌分布广,致病力强,是咽炎、猩红热和小脓疱疹等疾病的主要病原体,而抗生素的持续使用使得该致病菌表现出越来越强的耐药性,因此探寻有别于抗生素治疗的抑菌方法已经迫在眉睫^[13]。各个物种在其进化过程中,都选择了一部分金属元素作为维持其正常生理代谢及行使特定生理功能时的必要元素^[14]。然而,对于致病微生物金属蛋白的研究目前仍处于起步阶段,而具体到铜结合蛋白,已经开展的工作更是少之又少。

本研究最终成功分离并鉴定的化脓性链球菌铜结合蛋白一共有21个,这些蛋白分别在化脓性链球菌的翻译、糖代谢、脂代谢、蛋白质代谢、离子转运、氧化还原等各种生理过程中发挥作用。其中,许多翻译相关蛋白,如核糖体的多个亚基,两种延伸因子等都能结合铜,可以反映出铜在翻译过程中的作用。其中延伸因子Tu更是与细菌的粘附能力相关,这意味着铜离子可能在与细菌寄居能力息息相关的粘附作用中起着相应的作用^[15]。另一方面,铜离子在以上叙述的核糖体亚基中具体扮演着什么样的角色,目前却没有十分明确的定论^[16]。金属离子在酶中作为辅基的现象早已被发现,本研究能够直接表现出与铜离子结合能力较强的酶有磷酸丙酮酸水合酶、L-乳酸脱氢酶、双功能乙醛辅酶A/乙醇脱氢

酶、膜蛋白酶和甘油醛-3-磷酸脱氢酶等。酰基载体蛋白(Acyl carrier protein)作为一个脂肪酸合成的重要蛋白,反映出铜在该物种脂类代谢中的地位^[17],膜蛋白酶家族中的蛋白对铜离子的结合(Membrane protease family protein)则说明了铜在蛋白质降解过程中的作用^[18]。另外一个重要的蛋白——氯离子通道蛋白(Chloride channel protein)主要是一个与氯离子等多种物质转运相关的蛋白。然而,关于氯离子通道蛋白是否具备在铜离子转运方面的功能,目前并没有报道。本研究发现氯离子通道蛋白在体外环境中有结合铜的实际能力,其肽段序列中,也存在着潜在的铜离子结合基序,说明它可能在化脓性链球菌的铜转运调控过程中起着某种作用^[19]。本次铜蛋白纯化分离工作还分离到了一个功能未知的假定蛋白 Spy_0930。通过对该蛋白与其他蛋白的同源性比对,发现在由表3列出的与其同源性较高的蛋白中,几乎都是一些研究较少、功能较不明朗的蛋白,但通过基因组的比对,目前关于这几种蛋白功能的预测中都将它们阐述为对ADP-核糖有高度亲和力的某种蛋白^[20]。至于这一类蛋白是否与铜离子的转运调控相关,还需要进行更加深入的工作。

综上所述,通过对化脓性链球菌中铜结合蛋白的分离和鉴定,揭示出了铜元素在该物种中的重要性及功能的广泛性。由此可知,若能有效地控制细菌的铜转运系统,势将大面积地影响到细菌的蛋白翻译、多种代谢的进行以及氧化还原等各个生理过程。因此,对化脓性链球菌铜离子转运调节系统的研究,对于新的抑菌药物的开发将有着可以预见的广阔前景。

参考文献

- [1] Shi W, Zhan C, Ignatov A, *et al.* Metalloproteomics: high-throughput structural and functional annotation of proteins in structural genomics. *Structure*, 2005, **13**(10): 1473-1486.
- [2] Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, *et al.* Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*, 1999, **284**(5415): 805-808.
- [3] Andreini C, Bertini I, Rosato A, *et al.* Metalloproteomes: a bioinformatic approach. *Acc Chem Res*, 2009, **42**(10): 1471-1479.
- [4] Banci L, Rosato A. Structural genomics of proteins involved in copper homeostasis. *Acc Chem Res*, 2003,

- 36(3): 215–221.
- [5] Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev*, 2000, **13**(3): 470–511.
- [6] Savic DJ, McShan WM, Ferretti JJ, *et al.* Autonomous expression of the *slo* gene of the bicistronic nga-slo operon of *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun*, 2002, **70**(5): 2730–2733.
- [7] Sun X, Ge F, Xiao CL, *et al.* Phosphoproteomic analysis reveals the multiple roles of phosphorylation in pathogenic bacterium *Streptococcus pneumoniae*. *J Proteome Res*, 2010, **9**(1):275–282.
- [8] Watanabe S, Nagano S, Duce J, *et al.* Increased affinity for copper mediated by cysteine 111 in forms of mutant superoxide dismutase 1 linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med*, 2007, **42**(10): 1534–1542.
- [9] Yan GR, Xiao CL, He GW, *et al.* Global phosphoproteomic effects of natural tyrosine kinase inhibitor, genistein, on signaling pathways. *Proteomics*, 2010, **10**(5): 976–986.
- [10] S Karlin, ZY Zhu, KD Karlin. The extended environment of mononuclear metal centers in protein structures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(26):14225–14230.
- [11] RG Pearson. Hard and soft acids and bases. *J Am Chem Soc*, 1963(85): 3533–3539.
- [12] She YM, Narindrasorasak S, Yang S, *et al.* Identification of metal-binding proteins in human hepatoma lines by immobilized metal affinity chromatography and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 2003, **2**(12): 1306–1318.
- [13] Kaplan EL, Johnson DR. Eradication of group A streptococci from the upper respiratory tract by amoxicillin with clavulanate after oral penicillin V treatment failure. *J Pediatr*, 1988, **113**(2): 400–403.
- [14] Nielsen FH. Evolutionary events culminating in specific minerals becoming essential for life. *Eur J Nutr*, 2000, **39**(2): 62–66.
- [15] Severin A, Nickbarg E, Wooters J, *et al.* Proteomic analysis and identification of *Streptococcus pyogenes* surface-associated proteins. *J Bacteriol*, 2007, **189**(5): 1514–1522.
- [16] Kaczanowska M, Ryden-Aulin M. Ribosome biogenesis and the translation process in *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2007, **71**(3): 477–494.
- [17] Amoroso JW, Borketey LS, Prasad G, *et al.* Direct acylation of carrier proteins with functionalized beta-lactones. *Org Lett*, 2010, **12**(10): 2330–2333.
- [18] Kilian M, Reinholdt J, Lomholt H, *et al.* Biological significance of IgA1 proteases in bacterial colonization and pathogenesis: critical evaluation of experimental evidence. *Apmis*, 1996, **104**(5): 321–338.
- [19] Wang T, Weinman SA. Involvement of chloride channels in hepatic copper metabolism: CIC-4 promotes copper incorporation into ceruloplasmin. *Gastroenterology*, 2004, **126**(4): 1157–1166.
- [20] Tettelin H, Masignani V, Cieslewicz MJ, *et al.* Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome". *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(39): 13950–13955.

稿件书写规范

论文中统计学符号书写规则

统计学符号一般用斜体。本刊常用统计学符号介绍如下，希望作者参照执行。

样本的算术平均数用英文小写 x ，不用大写 X ，也不用 $Mean$ 。标准差用英文小写 s ，不用 SD 。标准误差用英文小写 $s_{\bar{x}}$ ，不用 SE 。 t 检验用英文小写 t 。 F 检验用英文大写 F 。卡方检验用希文小写 χ^2 。相关系数用英文小写 r 。样本数用英文小写 n 。概率用英文大写 P 。