

重组溶葡萄球菌酶的 PEG 定点修饰

陆海荣^{1,2}, 张宜涛¹, 黄青山^{1,2}

1 上海高科联合生物技术研发有限公司, 上海 201206

2 复旦大学生命科学院 遗传学研究所 遗传工程国家重点实验室, 上海 200433

陆海荣, 张宜涛, 黄青山. 重组溶葡萄球菌酶的 PEG 定点修饰. 生物工程学报, 2016, 32(1): 127-134.

Lu HR, Zhang YT, Huang QS. Site-specific PEGylation of recombinant lysostaphin. Chin J Biotech, 2016, 32(1): 127-134.

摘要: 为获得高抗菌活性聚乙二醇 (PEG) 定点修饰的溶葡萄球菌酶 (Lysn), 根据该酶的高级结构, 在它的催化域和结合域上优选 8 个位点 (Q9、N13、N40、T172、N174、G197、V240 和 T244), 将其分别突变成半胱氨酸, 纯化后的溶葡萄球菌酶突变体经 DTT 处理后与 20 kDa 的单甲氧基聚乙二醇马来酰亚胺 (mPEG-MAL) 进行定点修饰反应, RP-HPLC 分析显示 PEG 修饰率大于 70%, 修饰产物经 MacroCap SP 阳离子交换层析纯化后, PEG 化溶葡萄球菌酶的纯度大于 95%。比浊法和最小抑菌浓度 (MIC) 实验表明 20K-PEG-LysnV240C 和 20K-PEG-LysnT244C 的抗菌活性维持在原来的 50% 左右。研究结果为溶葡萄球菌酶全身给药治疗金黄色葡萄球菌感染奠定基础。

关键词: 溶葡萄球菌酶, 金黄色葡萄球菌, 抗菌活性, 最小抑菌浓度

Site-specific PEGylation of recombinant lysostaphin

Hairong Lu^{1,2}, Yitao Zhang¹, and Qingshan Huang^{1,2}

1 Shanghai Hi-Tech United Bio-Technological R&D Co. Ltd., Shanghai 201206, China

2 State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Genetics, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

Abstract: Lysostaphin (Lysn) is an antibacterial metalloendopeptidase that cleaves the pentaglycin bridges in the cell wall of *Staphylococci*. Although many studies have demonstrated its high activity *in vitro*, the medical application of Lysn has been hampered by its short half-life *in vivo*. In order to enhance its stability *in vivo* without significantly suppressing the

Received: March 11, 2015; **Accepted:** May 21, 2015

Supported by: China Postdoctoral Science Foundation (No. 2014M551322), Post-doctor Research Foundation Project of Shanghai (No. 14R21421300), Shanghai Engineering Research Center of Industrial Microorganisms (No. 13DZ2252000).

Corresponding author: Qingshan Huang. Tel: +86-21-65642814; E-mail: qshuang@fudan.edu.cn

中国博士后科学基金 (No. 2014M551322), 上海市博士后科研资助计划 (No. 14R21421300), 上海市工业菌株工程技术研究中心 (No. 13DZ2252000) 资助。

网络出版时间: 2015-06-08

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150608.1417.002.html>

enzymatic activity, we designed and tested eight single cysteine substitutions in Lysn for covalent attachment of polyethylene glycol chains (PEGylation). The purified mutants, fully reduced by Dithiothreitol (DTT), were treated with mPEG-MAL(20 kDa). The PEG modification efficiency was above 70% as determined by reverse-phase high-pressure liquid chromatography (HPLC) analysis. The PEG-Lysn proteins were further purified by cation exchange chromatography (MacroCap SP), reaching at least 95% purity. The activities of the PEG-Lysn proteins were determined by the turbidity and minimum inhibitory concentration (MIC) assays. We found that the PEGylated V240C and T244C mutants retained about 50% of the original antibacterial activity of Lysn. Overall, this study will help develop highly stable and active PEG-Lysn to treat systemic *S. aureus* infections.

Keywords: lysostaphin, *Staphylococcus aureus*, antibacterial activity, minimum inhibitory concentration

金黄色葡萄球菌是临床主要病原菌,它能引起肺炎、骨髓炎、心内膜炎及败血症等多种感染性疾病^[1-2]。随着抗生素的广泛使用,金葡菌耐药性问题日益突出,尤其是耐甲氧西林金葡菌(MRSA)^[3-4]。MRSA已经造成临床治疗上的困难及病死率增高,严重威胁人类健康^[5-6]。

溶葡萄球菌酶(Lysostaphin, Lysn)是1964年Schindler和Schuhar^[7]首次从模仿葡萄球菌培养上清中发现并分离的一种细菌素。它是一种含锌的金属蛋白酶,由特异性靶向细菌细胞壁的结合结构域和高效水解葡萄球菌细胞壁肽聚糖中甘氨酸肽键的催化结构域组成(图1)。Lysn通过溶解细菌细胞壁,从而达到杀菌目的,其对葡萄球菌(包括MRSA)具有很强的杀菌作用(MICs在0.003-0.125 μg/mL之间)^[8],并且不容易诱导产生耐药菌株。但由于Lysn的体内半衰期非常短(<1 h)^[9],它的临床应用还停留在局部外用阶段,主要用于治疗创面金葡菌感染和清除鼻部定殖的金葡菌^[10-13]。

如何改善Lysn的体内稳定性,是扩大其临床应用所面临的关键问题。近年来,国内外开展了Lysn的PEG修饰方面的工作。Walsh等^[14]报道通过偶联PEG到Lysn的赖氨酸,PEG化Lysn的体内半衰期从原来的不到1 h提高至24 h

以上;同时,ELISA检测显示,PEG化Lysn抗体的产生水平比PEG化前降低了10倍以上,说明Lysn经PEG化后,不但延长了其体内半衰期,而且显著降低了抗体产生。然而由于是非定点修饰(Lysn有16个赖氨酸可被修饰),修饰后产物的异构体多,其中大部分位点的修饰会降低Lysn与细菌细胞壁(大的网状结构)的亲合力,导致生物活性急剧下降。最近,王永等^[15]同样也进行了Lysn的PEG非定点修饰工作,获得的PEG-Lysn的生物活性只有原来的25%。吴宏等^[16]在Lysn两个结构域之间的连接区引入半胱氨酸,再进行PEG定点修饰(偶联PEG至半胱氨酸的巯基),虽然产物单一,但抗菌活性只有修饰前的20%左右。

之前PEG修饰Lysn研究的一个重要限制因素是该酶的空间结构尚不明确,因此只有充分了解Lysn的作用机制以及两个结构域之间的相互关系,才能更好地进行该酶的PEG修饰。最近我们^[17]和Sabala等^[18]对Lysn高级结构的研究,阐明了该酶高效裂解细菌细胞壁的作用依赖于两个结构域之间一定范围内的相对运动。为获得高抗菌活性PEG定点修饰的Lysn,本文根据Lysn高级结构,优选8个位点,将其分别突变成半胱氨酸,再进行PEG定点修饰,并进

一步用比浊法和最小抑菌浓度 (MIC) 法评价了 PEG 化 Lysn 的体外抗菌活性。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

表达载体 pET28a(+)、大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3) 购自 Novagen 公司;金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 购自中国生物制品检定所;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司;DNA marker、低分子量标准蛋白质购自 TaKaRa 公司;质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自天根生化科技有限公司;定点突变引物由上海生工生物工程有限服务公司合成;QuikChange lightning site-directed mutagenesis kit 购自 Stratagene 公司;mPEG-MAL (单甲氧基聚乙二醇马来酰亚胺) 购自北京键凯科技有限公司;

1.2 Lysn 的表达和纯化

为在大肠杆菌中表达 Lysn, 在编码成熟 Lysn 基因的 5'端引入 *Nco* I 位点和编码 OmpA 信号肽的基因序列;在其 3'端引入 *Hind* III 位点。*OmpA-Lysn* 基因片段经 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切, 割胶回收 *OmpA-Lysn* 基因片段, 克隆到 pET28a(+) 载体的 *Nco* I 和 *Hind* III 位点之间, 构建重组表达质粒 pET28a-OmpA-Lysn, 阳性克隆送上海英骏生物公司测序。将测序正确的表达质粒转化 BL21 (DE3) 感受态细胞, 获得表达 Lysn 的工程菌。

挑单克隆接种于 LB 培养液 (含 30 mg/L 卡那霉素), 37 °C 振荡培养过夜, 按 1% 接种到相同的 LB 培养液中, 37 °C 振荡培养至光密度值 (波长 600 nm) 约为 0.6 时, 加入终浓度为 0.05 mmol/L

的 IPTG 诱导蛋白表达, 继续 37 °C 振荡培养, 诱导 4 h 左右, 离心收集发酵上清, 保存于 4 °C。

将离心后发酵上清进样至预先用 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 9.0) 平衡的 Capto MMC 阳离子交换层析柱 (26 mm×60 mm), 用含 1.0 mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱, 收集目的峰。收集峰经超滤浓缩后, 进样至 Sephadex G50 凝胶过滤层析柱进行精纯, 用含 150 mmol/L NaCl 的 PBS 缓冲液 (pH 7.0) 进行洗脱, 收集目的峰。纯化后的样品经超滤浓缩后置于 -20 °C 冷冻保存备用。

用 12% SDS-PAGE 测定重组蛋白样品的大小和纯度。以牛血清白蛋白为标准蛋白, 用 BCA (Bicinchoninic acid, 二喹啉甲酸) 法测定蛋白浓度。

1.3 Lysn 半胱氨酸 (Cysteine, Cys) 突变体的表达和纯化

Lysn 不含 Cys, 通过定点突变技术在拟 PEG 修饰的位置引入一个 Cys, 利用 Cys 的巯基和 mPEG-MAL 的特异性反应实现定点修饰。为减少 PEG 修饰对 Lysn 生物活性的影响, 我们根据 Lysn 的高级结构优选 8 个位点进行 Cys 突变, 如图 1 所示。拟突变的位点需要满足 3 个条件: 必须在分子表面;不在结构域的活性中心一侧;不在两个结构域的相互作用界面上。

为表达 Lysn 突变体, 设计合成系列引物, 以 pET28a-OmpA-Lysn 为模板, 按照 QuikChange[®] lightning site-directed mutagenesis 试剂盒的标准操作进行扩增, 产物用 *Dpn* I 消化模板, 然后转化 DH5 α 。挑克隆测序分析, 将测序正确的表达质粒转化 BL21 (DE3) 感受态细胞, 获得表达 Lysn 突变体的工程菌。蛋白的诱导表达和纯化方法同上。

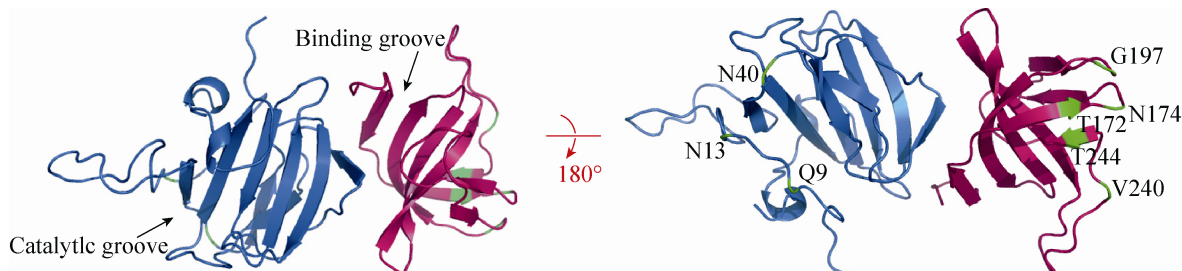


图 1 溶葡萄球菌酶中 8 个 Cys 突变位点

Fig. 1 Eight selected sites in lysostaphin for cysteine substitutions.

1.4 比浊法测定重组蛋白抗菌活性

采用比浊法^[19],在特定条件下细菌悬液浊度下降值代表 Lysn 的酶活。将过夜培养的金葡萄球菌 (ATCC 6538) 转接后生长到对数中期 (OD_{600} 大约 0.5),离心 ($5\ 000 \times g$, 5 min) 收集菌体。菌体用 PBS (pH 7.2) 清洗 2 次,然后重悬于含 150 mmol/L NaCl 的 PBS 缓冲液中 (OD_{600} 约为 1.0)。在比色皿中加入 20 μ L 样品 (0.5 mg/mL) 和 2 mL 的菌悬液,室温 (25 $^{\circ}$ C) 下在分光光度计 600 nm 波长下读数 (间隔 1 min,共 15 min)。

1.5 重组蛋白的 PEG 修饰以及纯化

将纯化获得的 Lysn 突变体用 20 mmol/L 的 DTT 处理 (室温 15 min),DTT 处理的样品经 SP-650M 阳离子柱纯化去除 DTT。将洗脱峰与分子量 20 kDa 的 mPEG-MAL 修饰剂按 1 : 5 摩尔比混合,再加入 10% 的 DMSO,于 4 $^{\circ}$ C 反应 2–3 h,RP-HPLC 分析 PEG 修饰率。反应混合物与纯水 1 : 5 稀释后,进样至预先用 50 mmol/L NaAc 缓冲液 (pH 4.5) 平衡的 MacroCap SP 阳离子交换层析柱 (16 mm \times 30 mm),用含 1.0 mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 9.0) 梯度洗脱,收集目的峰。纯化后的样品置于 -20 $^{\circ}$ C 冷冻保存备用。用 12% SDS-PAGE 测定 PEG 修饰样品的大小和纯度。以牛血清白蛋白为标准蛋白,用 BCA 法测定 PEG 修饰样品的蛋白浓度。

1.6 最小抑菌浓度 (MIC) 检测

采用二倍稀释法测定 MIC。将金黄色葡萄球菌 ATCC6538 复苏,细菌在营养琼脂平板上培养过夜,经过 MH 液体培养基逐级稀释至细菌浓度为 10^4 – 10^5 CFU/mL,备用。待检样品用 MH 培养基二倍稀释成各种所需浓度,分别加 100 μ L 到 96 孔板中,再加入 100 μ L 含受试菌液的 MH 培养基到 96 孔板中与待检样品混匀,置 35 $^{\circ}$ C 培养 18–24 h 后观察结果。肉眼未见细菌生长的样品孔中所含药物最小的浓度即为 MIC 值。

2 结果

2.1 Lysn 及其突变体的表达和纯化

根据 Lysn 的高级结构,优选 8 个位点进行 Cys 突变。通过 QuikChange[®] lightning site-directed mutagenesis 点突变试剂盒构建 8 个 Lysn 突变体的表达载体,DNA 测序结果显示突变体的 DNA 序列均正确。

将表达 Lysn 和 Lysn 突变体的重组质粒转化 BL21 (DE3) 感受态,经 IPTG 诱导表达。Lysn 在信号肽的作用下分泌至发酵上清中。经 Capto MMC 阳离子交换和 Sephadex G50 凝胶排阻纯化,SDS-PAGE 显示重组蛋白位于 27 kDa 处,与理论分子量 (26 941 Da) 相符,且纯度大于 95% (图 2)。

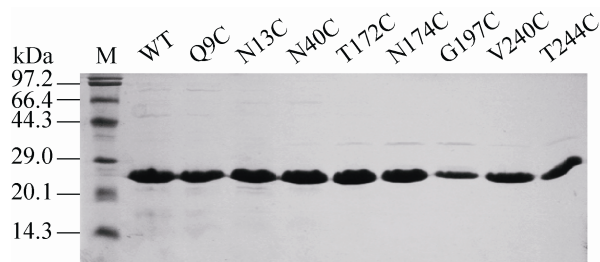


图 2 溶葡萄球菌酶半胱氨酸突变体的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of single cysteine substitutions in lysostaphin.

2.2 重组蛋白的生物活性测定

采用比浊法^[19]测定重组 Lysn 及其 Cys 突变体的生物活性。结果显示,与 Lysn 的溶菌活性相比,突变体 N40C、V240C 和 T244C 的活性基本没有下降,分别为 Lysn 酶活性的 95%、100% 和 98%;突变体 Q9C 和 G197C 的活性有轻微下降,分别为 Lysn 酶活性的 88% 和 91%;而突变体 N13C、T172C 和 N174C 的活性下降了近 20%,为 Lysn 酶活性的 82%、81% 和 83% (图 3)。说明这些位点的突变对 Lysn 的结构和功能影响并不明显,纯化获得的突变体可进一步用于 PEG 修饰。

2.3 PEG 定点修饰及 PEG-Lysn 的纯化

将 Lysn 突变体与 mPEG-MAL (分子量 20 kDa) 按 1:5 摩尔比 4 °C 反应 2–3 h 后,RP-HPLC 分析结果显示 Lysn 突变体的 PEG 修饰率大于 70% (数据未显示)。将 mPEG-MAL 与 Lysn 的反应液经 MacroCap SP 柱纯化。通过梯度洗脱,PEG-Lysn 最先被洗脱下来。Lysn 被 PEG 修饰后,蛋白分子表面的带电基团被 PEG 覆盖,导致 PEG-Lysn 带电荷比 Lysn 少,因此与 MacroCap SP 阳离子纯化介质的结合能力减弱。SDS-PAGE 显示经纯化后的 PEG-Lysn 的纯度达

到了 95% 以上 (图 4)。电泳显示 PEG-Lysn 位于 70 kDa 处,比理论分子量 (47 kDa) 大,可能是由于线性 PEG 分子在 SDS-PAGE 中的泳动速度比橄榄型蛋白分子慢所致。

2.4 PEG-Lysn 的生物活性测定

采用比浊法和 MIC 法测定 PEG-Lysn 的生物活性。结果显示,与 Lysn 的溶菌活性相比,突变体 V240C 和 T244C 经 PEG 修饰后的生物活性保留较高,分别为 Lysn 酶活性的 45% 和 51%;突变体 N174C 和 G197C 经 PEG 修饰后

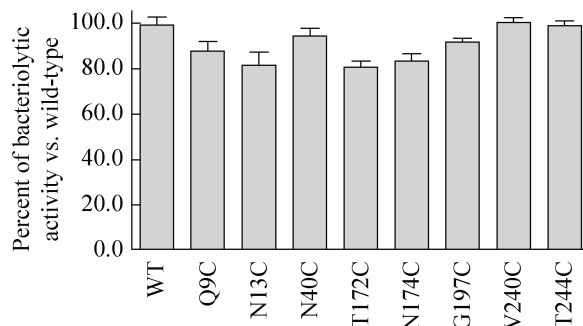


图 3 溶葡萄球菌酶 Cys 突变体的生物活性分析

Fig. 3 The bacteriolytic activities of single cysteine substitutions in lysostaphin.

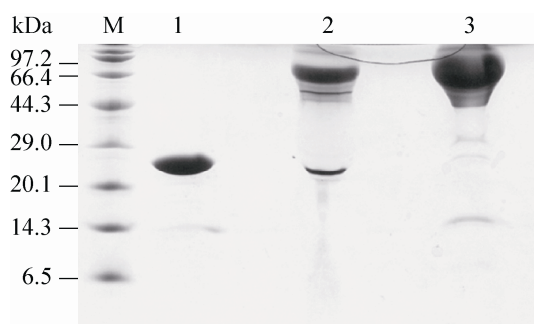


图 4 PEG 修饰溶葡萄球菌酶的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of PEGylated lysostaphin. M: protein marker; 1: single-cysteine mutant (LysnQ9C); 2: PEGylation reaction mixture; 3: purified 20K-PEG-LysnQ9C.

的生物活性有明显下降,分别为 Lysn 酶活性的 29%和 36%;而突变体 Q9C、N13C、N40C 和 T174C 经 PEG 修饰后活性急剧下降,分别只有 Lysn 酶活性的 9%、11%、20%和 23%(图 5)。

MIC 实验结果显示,20K-PEG-LysnT244C 和 20K-PEG-LysnV240C 对金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 的 MIC 均为 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,MIC 值是 Lysn 的 2 倍。其他 PEG-Lysn 的 MIC 值在 0.5–1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间,抗菌活性明显低于 Lysn (表 1)。

3 讨论

病原菌耐药性问题日趋严重,尤其是 MRSA,因此迫切需要研发具有新型作用模式的抗菌药物。近年来,抗菌蛋白(包括细菌素、噬菌体裂解酶、细菌自溶素等)因其能高效裂解细菌细胞壁而具有很好的应用前景^[20-23]。其中 Lysn 的研究最为广泛^[24],它作为治疗创面金黄色葡萄球菌感染的新药,目前处于临床 III 期研究阶段。但由于 Lysn 的体内半衰期问题,它只能局部外用。PEG 修饰已被广泛应用于蛋白类药物,它能显著延长药物体内半衰期并减少免疫原性,

增强药物的生物利用度^[25-26]。目前有多个 PEG 修饰药物已经上市销售,还有大量 PEG 修饰药物处于临床研究阶段,然而前期 PEG 修饰 Lysn 的研究进展并不顺利^[14-16]。

为获得高生物活性的 PEG-Lysn,本研究基于 Lysn 最新研究的高级结构,在其分子表面优选 8 个位点,通过定点突变技术分别引入 Cys,完成 8 个突变体的构建、表达和生物活性分析。进一步建立了简便可控、适合放大的 PEG 修饰和纯化工艺。由于是定点修饰,因此不存在多 PEG 修饰产物或者同分异构体,降低了 PEG-Lysn 质量控制的难度。研究过程中发现,在 PEG 修饰前通过 DTT 处理,能显著提高 PEG 的修饰率,这可能是由于在表达和纯化过程中部分巯基已经被氧化,导致无法被 mPEG-MAL 修饰,经过快速 DTT 处理,还原 Cys 上的巯基。PEG 修饰可以延长 Lysn 的体内半衰期,从而延长体内作用时间,但由于引入的 PEG 会对 Lysn 与细菌细胞壁的结合产生空间位阻,使其溶菌活性急剧下降。之前,王永等^[15]和吴宏等^[16]的研究结果表明,Lysn 分子中赖氨酸的随机 PEG 修饰

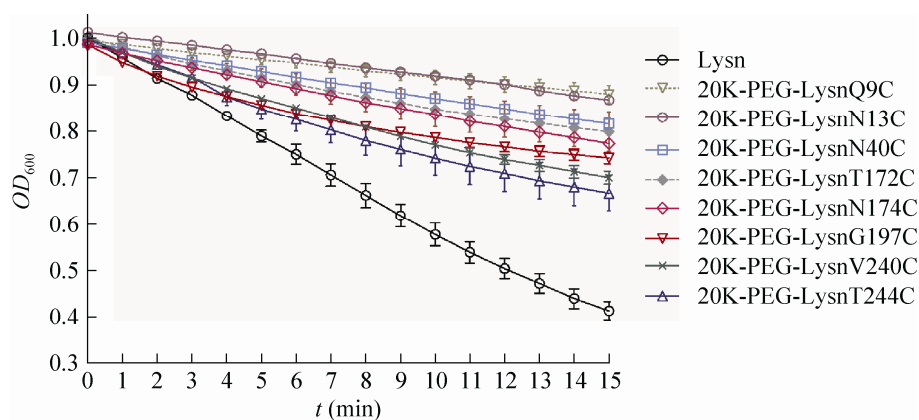


图 5 PEG 化溶葡萄球菌酶的生物活性分析

Fig. 5 The bacteriolytic activities of PEGylated lysostaphin.

表 1 Lysn 和 PEG-Lysn 对金葡萄菌的最小抑菌浓度 (MIC)

Table 1 Antibacterial activity of Lysn and PEG-Lysn against *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)

Sample	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Lysn	0.125
20K-PEG-LysnQ9C	1.000
20K-PEG-LysnN13C	1.000
20K-PEG-LysnN40C	0.500
20K-PEG-LysnT172C	0.500
20K-PEG-LysnN174C	0.500
20K-PEG-LysnG197C	0.500
20K-PEG-LysnV240C	0.250
20K-PEG-LysnT244C	0.250

产物和 Lysn 两个结构域之间 linker 处的定点 PEG 修饰产物的溶菌活性都显著下降。与这些报道相似,我们在研究过程中也发现催化域上的一些位点 (LysnQ9C 和 LysnN13C) 经 PEG 修饰后,其溶菌活性只有修饰前的 10%左右 (图 5),提示这些位点的 PEG 修饰严重影响了 Lysn 催化域与细菌细胞壁的结合。

当我们在位于 Lysn 结合域的 LysnT244C 和 LysnV240C 进行 PEG 定点修饰后发现,修饰产物的生物活性能维持在原来的 50%左右,可能是由于这些位点的修饰对 Lysn 结合域与细菌细胞壁结合的影响相对较小;同时,这些位点远离 Lysn 催化域和结合域的相互作用界面,因此也不会影响两个结构域之间的协作。由于本研究中选择 PEG 修饰的位点数量有限,不排除有更好的位点可被用来 PEG 修饰,从而进一步提高 PEG-Lysn 的生物活性。在下一步工作中,将通过金葡萄菌感染动物模型来验证高活性 PEG-Lysn 的体内生物学活性。

REFERENCES

- [1] Lowy FD. Medical progress: *Staphylococcus aureus* infections. *New Engl J Med*, 1998, 339(8): 520–532.
- [2] Whitby M, McLaws ML, Berry G. Risk of death from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a meta-analysis. *Med J Aust*, 2001, 175(5): 264–267.
- [3] Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(9): 629–641.
- [4] Hu FP, Zhu DM, Wang F, et al. CHINET 2013 surveillance of bacterial resistance in China. *Chin J Infect Chemother*, 2014, 14(5): 369–378 (in Chinese). 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2013 年中国 CHINET 细菌耐药性监测. *中国感染与化疗杂志*, 2014, 14(5): 369–378.
- [5] Dombrowski JC, Winston LG. Clinical failures of appropriately-treated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *J Infect*, 2008, 57(2): 110–115.
- [6] Schindler CA, Schuhardt VT. Lysostaphin: a new bacteriolytic agent for the *Staphylococcus*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1964, 51(3): 414–421.
- [7] Lodise TP, Graves J, Evans A, et al. Relationship between vancomycin MIC and failure among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia treated with vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(9): 3315–3320.
- [8] Yang XY, Li CR, Lou RH, et al. *In vitro* activity of recombinant lysostaphin against *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals in Beijing, China. *J Med Microbiol*, 2007, 56(1): 71–76.
- [9] Tang ZM, Liu XW, Song HF. *Pharmacokinetics of Bio-technology Derived Drugs*. Beijing: Chemical Industry Press, 2004: 300–302 (in Chinese). 汤仲民, 刘秀文, 宋海峰. *生物技术药物药代动力学*. 北京: 化学工业出版社, 2004: 300–302.
- [10] Quickel Jr KE, Selden R, Caldwell JR, et al. Efficacy and safety of topical lysostaphin treatment

- of persistent nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol*, 1971, 22(3): 446–450.
- [11] Chen L, Guo L, Xiong AB. Antibiotic effect of lysostaphin on granulation wound. *Acta Acad Med Milit Tert*, 2006, 28(14): 1517–1519 (in Chinese).
陈莉, 郭力, 熊爱兵. 溶葡萄球菌酶对创面肉芽组织抗菌效果的临床研究. *第三军医大学学报*, 2006, 28(14): 1517–1519.
- [12] Miao JJ, Pangule RC, Paskaleva EE, et al. Lysostaphin-functionalized cellulose fibers with antistaphylococcal activity for wound healing applications. *Biomaterials*, 2011, 32(36): 9557–9567.
- [13] Belyansky I, Tsirlina VB, Martin TR, et al. The addition of lysostaphin dramatically improves survival, protects porcine biomes from infection, and improves graft tensile shear strength. *J Surg Res*, 2011, 171(2): 409–415.
- [14] Walsh S, Shah A, Mond J. Improved pharmacokinetics and reduced antibody reactivity of lysostaphin conjugated to polyethylene glycol. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(2): 554–558.
- [15] Wang Y, Liu MR, Wan HT, et al. Chemical modification of lysostaphin with activated polyethylene glycol. *China Biotechnol*, 2013, 33(6): 12–17 (in Chinese).
王永, 刘沐荣, 万海同, 等. 聚乙二醇修饰重组溶葡萄球菌酶的初步研究. *中国生物工程杂志*, 2013, 33(6): 12–17.
- [16] Wu H, Fang W, Yuan J, et al. Site-directed mutagenesis and sulfhydryl PEGylation of lysostaphin. *Chin J Biotech*, 2011, 27(11): 1623–1630 (in Chinese).
吴宏, 房伟, 袁璟, 等. 溶葡萄球菌酶的定点突变与 PEG 巯基定点修饰. *生物工程学报*, 2011, 27(11): 1623–1630.
- [17] Lu HR, Gu MG, Huang Q, et al. Hydrogen/Deuterium exchange mass spectrometry and site-directed disulfide cross-linking suggest an important dynamic interface between the two lysostaphin domains. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(4): 1872–1881.
- [18] Sabala I, Jagielska E, Bardelang PT, et al. Crystal structure of the antimicrobial peptidase lysostaphin from *Staphylococcus simulans*. *FEBS J*, 2014, 281(18): 4112–4122.
- [19] Kusuma CM, Kokai-Kun JF. Comparison of four methods for determining lysostaphin susceptibility of various strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(8): 3256–3263.
- [20] Villa TG, Crespo PV. *Enzybiotics: Antibiotic Enzymes as Drugs and Therapeutics*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010.
- [21] Szveda P, Schielmann M, Kotlowski R, et al. Peptidoglycan hydrolases-potential weapons against *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 96(5): 1157–1174.
- [22] Pastagia M, Schuch R, Fischetti VA, et al. Lysins: the arrival of pathogen-directed anti-infectives. *J Med Microbiol*, 2013, 62(10): 1506–1516.
- [23] Rodríguez-Rubio L, Martínez B, Donovan DM, et al. Bacteriophage virion-associated peptidoglycan hydrolases: potential new enzybiotics. *Crit Rev Microbiol*, 2013, 39(4): 427–434.
- [24] Kumar JK. Lysostaphin: an antistaphylococcal agent. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 80(4): 555–561.
- [25] Harris JM, Chess RB. Effect of PEGylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2(3): 214–221.
- [26] Pasut G, Veronese FM. State of the art in PEGylation: the great versatility achieved after forty years of research. *J Control Release*, 2012, 161(2): 461–472.

(本文责编 郝丽芳)