

呼吸与危重症

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001714

一种新型抗菌剂——噬菌体裂解酶的研究进展

杜丽娟¹, 杨婷¹, 张宗德², 郭述良¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院呼吸与危重症医学科, 重庆 400016; 2. 北京市结核病胸部肿瘤研究所, 北京 101100)

【摘要】随着抗生素的广泛使用, 耐药菌株的不断出现给临床治疗严重感染性疾病带来严峻的挑战, 新型抗菌药及制剂的研发与开发迫在眉睫。噬菌体裂解酶是由双链 DNA 噬菌体感染后期表达的、能裂解细菌细胞壁的一类蛋白水解酶。近年来对噬菌体裂解酶研究显示其在原核细胞中能成功克隆表达, 且表达的裂解酶具有较强的体内外杀菌作用。大量动物实验研究表明裂解酶制剂能特异性抗宿主菌, 抗菌作用迅速, 对机体安全、无害, 且裂解酶之间以及与传统的抗菌剂之间具有协同杀菌作用。噬菌体裂解酶的这些特性使其在临床治疗耐药感染性疾病方面具有广阔的应用前景。

【关键词】噬菌体裂解酶; 基因重组; 克隆表达; 感染; 抗菌剂

【中图分类号】R915

【文献标志码】A

【收稿日期】2017-01-09

Research progress of a novel antimicrobial agent—phage lytic enzyme

Du Lijuan¹, Yang Ting¹, Zhang Zongde², Guo Shuliang¹

(1. Department of Respiratory & Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; 2. Beijing Tuberculosis and Thoracic Tumor Research Institute)

【Abstract】With the widespread use of antibiotics, increasing drug-resistant strains bring more challenges to clinical serious infectious disease, therefore, the research and development of the novel antibacterial agent is in urgency. Phage lysine is a kind of protease which is expressed in the last infectious phase of double-stranded DNA phage and has the ability to crack bacterial cell wall. In recent years, studies of phage lysine have showed that it can be cloned and expressed in prokaryocyte, with expressed lysins having potency to kill bacteria *in vitro* and *vivo*. A number of experiments on animal showed that lysin agents can specifically resist the host bacteria, featuring efficiency, specificity, safety and synergy. These characteristics of phage lysin make it possible to be applied widely in treating clinical drug-resistant diseases.

【Key words】phage lysins; gene recombinant; cloning expression; infection; antimicrobial

噬菌体是一类能特异性识别并感染细菌的病毒, 以细菌为宿主进行复制和繁殖。噬菌体裂解酶是双链 DNA 噬菌体感染后期编码的、依靠宿主菌合成的一类蛋白水解酶, 该类蛋白水解酶可以水解细菌细胞壁肽聚糖, 导致细菌裂解并释放子代噬菌体。

1 噬菌体及其裂解酶

1.1 噬菌体及其裂解酶的发现

噬菌体在地球上广泛存在, 早在 1915 年就被英国的

Twort 发现并首次将噬菌体应用于抗菌治疗的研究。直至 19 世纪 40 年代, 随着青霉素等抗生素的发现和广泛应用, 噬菌体抗菌治疗法逐渐淡出人们的视线。近来随着抗生素的广泛使用, 耐药菌株不断出现, 噬菌体抗菌治疗再次引起人们的关注。而噬菌体感染并裂解宿主菌主要依赖其裂解酶的裂解作用, 早在 1958 年 Jacob 等^[1]就发现噬菌体编码的一类蛋白质具有裂解细菌的特性, 并将其命名为 endolysin, 并于 1958 年首次报道了纯化的裂解酶具有杀菌能力。

1.2 裂解酶的结构与抗菌机制

噬菌体裂解酶在结构上具有相似性, 均含有 2 个主要结构域: N 端结构域具有催化活性, 能够特异地切断肽聚糖中的化学键; C 端结构域具有结合细菌细胞壁的功能, 能与宿主菌细胞壁上底物特异性结合; N 端与 C 端通过一段小肽连接^[2], 如图 1 所示。大量研究者将各种裂解酶的序列进行比对得知其催化区是高度保守的, 而 C 端结合

作者介绍: 杜丽娟, Email: 13883721437@163.com,

研究方向: 分枝杆菌噬菌体裂解酶。

通信作者: 郭述良, Email: guosl999@sina.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81570010)。

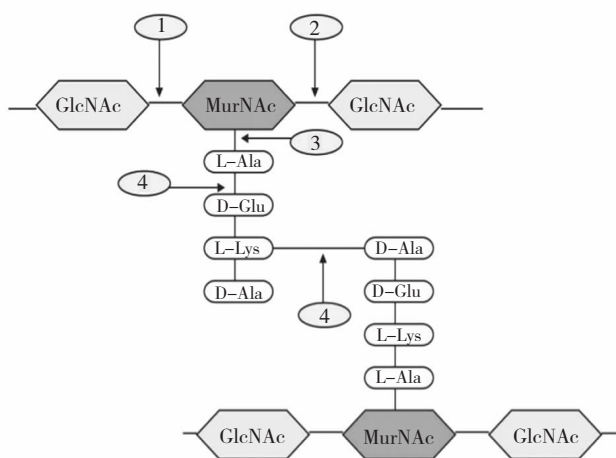
优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180517.1552.036.html>

(2018-05-18)

域是可变的。但也有例外, Simmons 等^[9]研究发现产气荚膜梭菌的两株噬菌体裂解酶, 其 C 端结合域显示 100% 序列相似, 而在 N 端功能区序列只有 55% 的相似性。多数噬菌体具有编码 3 种细胞壁裂解酶的基因, 分别为: 溶菌酶 (lysozyme), 具有水解氨基糖之间的糖苷键的作用; 酰胺酶 (N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase), 具有水解 N-乙酰胞壁酸和 L-丙氨酸之间的酰胺键的作用; 内肽酶 (endopeptidases), 具有切割 2 个氨基酸之间肽键的功能^[4], 如图 2 所示。



图 1 噬菌体裂解酶的主要结构



1. N-乙酰胞壁酸酶; 2. 内 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶; 3. 酰胺酶 (N-乙酰胞壁酰基-L-丙氨酸酰胺酶); 4. 肽链内切酶; GlcNAc: N-乙酰葡萄糖胺; MurNAc: N-乙酰胞壁酸

图 2 噬菌体裂解酶在革兰阳性菌的肽聚糖结构的作用靶点

通过对裂解酶进行电子显微镜观察, 发现裂解酶对宿主菌的致死作用主要是通过裂解细菌细胞壁肽聚糖, 在细胞壁上打孔来破坏细菌细胞壁完整性从而导致胞质溢出, 造成细菌细胞低渗而最终裂解死亡^[5]。裂解酶与抗生素作用机制不同, 抗生素抗菌性通常是广谱的, 而不同噬菌体的裂解酶在蛋白结构和酶活性上存在较大差异, 通常只能表现出对该种 (或亚种) 细菌的杀菌活性, 正因裂解酶这种宿主菌属特异性, 所以对人类其他正常菌群几乎没有影响。

1.3 裂解酶的嵌合物

噬菌体裂解酶具有高度特异性, 一般只裂解其宿主菌, 对其他菌群无裂解作用。研究者们试图通过对裂解酶的不同作用区域进行调整、转换, 构建裂解酶的嵌合形式, 以提高裂解酶的杀菌活性、拓宽裂解酶的抗菌谱。Diez-Martinez 等^[6]将整合基因表达的嵌合酶 Cpl-711 用于抗菌活性研究, 发现 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 Cpl-711 嵌合酶短时间内就可以使肺炎链球菌 R6

菌株降低 7.5 个数量级, 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 Cpl-711 嵌合酶就可以使已形成生物膜的肺炎链球菌降低 4 个数量级, 嵌合酶 Cpl-711 较原噬菌体裂解酶显著提高了其抗菌活性。Schmelcher 等^[7]研究发现裂解酶的 CHAP 区域较全长裂解酶有 3 倍高的抗葡萄球菌活性, 该嵌合酶对耐甲氧西林的金葡萄菌株 (*Methicillin-resistant S. aureus*, MRSA) 菌显示较强杀菌活性。在 Pastagia 等^[8]研究中也显示嵌合裂解酶对宿主菌具有较强杀菌性。Wang 等^[9]研究发现, 艰难梭状芽孢杆菌噬菌体裂解酶催化区域嵌合酶 PlyCD1-174 与表达全长的裂解酶 PlyCD1 相比, 在抗芽孢杆菌属有更强的杀菌效力及更广的抗菌谱。因此, 通过对裂解酶嵌合形式的探索是对拓宽噬菌体裂解酶抗菌谱、提高其抗菌效率的一种新尝试。

2 噬菌体裂解酶用作抗菌剂的优势

2.1 裂解酶对宿主菌具有相对特异性

噬菌体裂解酶因其 C 端具有肽聚糖结合域, 能与相应的宿主菌进行特异性结合, 因此裂解酶抗菌具有很好的特异性。但其特异性介于原噬菌体与抗生素之间, 相对于原噬菌体来说, 裂解酶的抗菌谱扩大了, 具体机制还有待进一步研究, 在 Gong 等^[10]研究中发现 IME-EFm5 噬菌体裂解酶 Ly-sEFm5 与原噬菌体株相比有较广的抗菌谱, 可以裂解 23 种肠球菌中的 19 种, 其中包括 7 种耐万古霉素菌株。在 Mishra^[11]和 Kong^[12]等的研究中, 也显示了裂解酶较其原噬菌体具有较广的抗菌谱^[11-12]。相对于抗生素来说, 裂解酶因其 C 端高度结合宿主菌细胞壁肽聚糖的特性使其具有很好的特异性, 只裂解其相应的宿主菌群, 对其他正常菌群无影响^[12-13]。而传统的抗生素在杀死病原菌的同时, 也杀死一部分正常有益菌群, 导致菌群失调。

2.2 裂解酶抗菌作用迅速

大量体内外实验表明, 纳克级的裂解酶在与细菌接触的短时间内就可使细菌浊度下降几个数量级。在 Son 等^[14]研究中, 只需 5 μg 纯化的裂解酶 LysB4, 在 5 min 内就可以使蜡样芽孢杆菌裂解; 在 15 min 内可致菌数下降 3~4 个数量级。在 Rashe 等^[15]研究中, 经克隆表达的金黄色葡萄球菌噬菌体裂解酶 MV-L 在 15 min 内就可以达到完全杀菌作用。接着, 研究者使用该裂解酶对感染 MRSA 的小鼠模型进行治疗, 发现裂解酶治疗组与对照组小鼠相比, 感染的细菌数量明显下降, 且在治疗组所用的 9 只感染模型的小鼠中就有 1 只实现感染细菌的完全消除, 而对照治疗组小鼠在其鼻腔中仍具有较高的细菌滴度。以上研究表明, 裂解酶抗菌作用迅速, 可在短时间内发挥其杀菌作用。

2.3 裂解酶之间以及与抗生素之间具有协同抗菌性

两种抗菌剂联合使用可以减少抗菌剂使用剂量、减少毒副作用, 增强杀菌作用及减少耐药菌的产生^[16]。研究发现裂解酶与抗生素之间具有协同抗菌效应, 且裂解酶与裂解酶之间也具有协同抗菌作用。Thummeepak 等^[17]的研究中发现重

组表达的噬菌体裂解酶 lysABP-01 与黏菌素具有协同抗鲍曼不动杆菌的作用。Wang^[9]、Rashel^[15]等研究发现,裂解酶与万古霉素具有协同杀菌作用。Daniel 等^[18]研究发现裂解酶与抗生素具有协同抗菌效应。除此之外,裂解酶与裂解酶之间也具有协同杀菌性,Rodriguezrubio 等^[19]研究发现裂解酶 Hy-dH5 与其裂解酶衍生物具有协同杀菌作用,这可能与 2 种酶具有不同结合位点有关,并利用该特性更有效地杀灭耐药葡萄球菌。因此,利用抗菌剂之间的协同作用来联合多种抗菌剂,尽量在覆盖病原菌的同时消除致病菌,减少药物毒副作用及耐药菌的发生。

2.4 细菌对裂解酶不产生抗性

噬菌体在与宿主菌共同进化的成千上万年里,随着宿主菌进化,其噬菌体也进化。而其裂解酶为噬菌体裂解宿主菌并释放子代噬菌体所必需,故产生宿主菌耐噬菌体裂解酶的可能性极小。这可能是噬菌体为了配合宿主菌的变异,其裂解酶的结合结构域针对宿主细胞壁受体分子也经过演化,使其具有特异性识别并杀死细菌的能力。也可能与裂解酶在细菌细胞壁的受体是胆碱,而胆碱为宿主菌生长所必需,因此细菌对裂解酶很难产生抵抗性^[4]。

2.5 裂解酶的抗体不会削弱其裂解杀菌作用

裂解酶是一种较大的蛋白质分子,通过血液循环进入机体内的裂解酶可引起机体免疫反应产生相应的裂解酶抗体,当裂解酶再次进入血液循环时,裂解酶会与裂解酶抗体形成抗原抗体免疫复合物。但多项研究发现裂解酶中和性抗体的产生并不会削弱裂解酶的杀菌效率。Rashel 等^[15]克隆表达了金黄色葡萄球菌噬菌体 ΦMR11 的裂解酶 MV-L,并将其作用于感染的小鼠模型,结果在小鼠体内产生了免疫性的抗裂解酶抗体,再次给予裂解酶制剂同样具有较强的杀菌作用,说明产生的裂解酶抗体不会削弱裂解酶的杀菌活性。同样的现象在 Daniel 等^[18]、Pastagia 等^[19]的研究中也得到同样的结论。究其原因可能是裂解酶与细菌细胞壁的结合效率远比抗体与裂解酶的结合力强所致,当裂解酶进入血液循环中,还来不及发生抗原抗体的反应时就很快与细菌细胞壁结合而发挥杀菌作用。

3 国内外对噬菌体裂解酶的克隆重组与应用研究

3.1 噬菌体裂解酶的克隆重组

随着日益增长的耐药菌出现,人们正关注于新型抗菌药的研究。大量的前期研究显示噬菌体裂解酶可以有效控制体内外细菌感染,且裂解酶具有高度特异性、较强杀菌活性、不破坏正常菌群等优点使裂解酶有望成为理想的抗菌剂。近年来,随着分子克隆技术的广泛应用,裂解酶在大肠杆菌、耻垢分枝杆菌、乳酸菌等宿主菌中得到成功克隆表达,推动了对裂解酶分子结构、功能研究的进一步发展。其中研究较多的噬菌体裂解酶来源于难治性芽孢杆菌、鲍曼不动杆菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、结核分枝杆菌等,见表 1。

3.2 裂解酶的应用

3.2.1 检测病原菌 因裂解酶 C 端具有与细菌肽聚糖结合的结构域(C-terminal binding domain,CBD),对其宿主菌具有高度特异性和较强的亲和力,因此可以利用该特性来特异性检测相应病原菌。Schmelcher 等^[26]将绿色荧光蛋白与来自李斯特菌噬菌体的裂解酶 C 端结合域组成融合标签蛋白,发现该融合蛋白具有将绿色荧光蛋白定位于待测细菌细胞壁的能力,可特异性标记混合物中的李氏特菌属,并且检测方法简便快捷。Kretzer 等^[27]利用裂解酶 C 端特异性结合功能来固定和分离病原菌,在 20~40 min 内,90%的活菌可被固定和分离。这些研究结果表明,可有效利用裂解酶 C 端对病原菌的高亲和力来快速检测混合物中的病原菌。

3.2.2 治疗人畜感染性疾病 杀灭病原菌裂解酶作为一种高效抗菌剂不仅可应用于检测及控制食源性、乳源性细菌感染^[28],还可应用于治疗人畜感染性疾病。Shen 等^[29]首次报道天然的裂解酶可以穿过细胞膜清除细胞内的链球菌。在研究中发现 PlyC 裂解酶可以特异性穿过感染链球菌的咽细胞并裂解胞内链球菌而对咽细胞无损害。这种靶向作用可能与细胞内细菌的裂解酶受体有关。体内动物实验研究也显示裂解酶能治疗感染模型的小鼠,提高其生存率降低病死率,并且对小鼠自身无毒副作用^[15]。因此裂解酶有望成为治疗人畜感染性疾病的理想抗菌剂。

3.2.2.1 裂解酶抗金黄色葡萄球菌 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是一种重要的条件致病菌,是临床感染的最常见病原菌之一,金黄色葡萄球菌可引起皮肤和软组织的感染,并可导致威胁生命的肺炎、菌血症及包括心内膜炎、脓毒性关节炎、骨髓炎等在内的严重并发症。随着广谱抗生素不断应用于临床,金黄色葡萄球菌也呈现高耐药性,其中特别突出的是 MRSA。MRSA 导致的感染具有较高的致死率,且用传统的抗生素难以治愈^[30]。因此新型抗 MRSA 制剂有待被研制与开发。而金葡萄噬菌体作为一种天然的抗菌剂,其相应的裂解酶被广泛研究。Rodriguezrubio^[19]和 Gilmer^[31]等发现,噬菌体裂解酶具有较强体外抗金黄色葡萄球菌活性,且裂解酶具有协同抗菌性和较广抗菌谱。Rashel 等^[15]通过克隆表达噬菌体 MR11 裂解酶,发现其具有高效裂解耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)和耐万古霉素金黄色葡萄球菌的作用。因此,噬菌体裂解酶有望成为控制金黄色葡萄球菌感染包括 MRSA 感染的高效抗菌剂。

3.2.2.2 裂解酶抗结核分枝杆菌 2016 年 WHO 公布了结核病新疫情,耐药、耐药药广泛耐药结核病形式依然十分严峻^[32]。因此,新型有效的抗耐药结核菌制剂亟待研制与开发。结核分枝杆菌噬菌体能特异性识别并感染结核分枝杆菌,而结核分枝杆菌噬菌体裂解酶是一种能特异性裂解结核分枝杆菌细胞壁的蛋白水解酶,可导致结核分枝杆菌崩解。Lai 等^[32]发现分枝杆菌噬菌体 BTCU-1 裂解酶 LysA 和 LysB 均具有胞内外杀耻垢分枝杆菌活性。本作者通过对结核分枝杆菌噬菌体裂解酶的研究,结果也显示结核分枝杆菌噬菌体裂解酶

表 1 各噬菌体裂解酶的克隆重组及表达

来源	年份	噬菌体	裂解酶	大小	表达载体	表达菌株	应用	结论	参考文献
芽孢杆菌	2015年	芽孢杆菌的前噬菌体	PlyCD、PlyCD1-174	28 kD、20 kD	pBAD24	<i>E.coli</i>	体内外研究裂解酶抗菌活性	裂解酶可以裂解芽孢杆菌,并与万古霉素具有协同杀菌效应	[9]
	2015年	PBC1	LysPBC1	29.4 kD	pET15b	<i>E.coli</i> (DE3)	抗菌活性研究	裂解酶较原噬菌体具有较广的抗菌谱	[12]
	2012年	BPS13	LysBPS13	35 kD	pET15b	<i>E.coli</i> (DE3)	抗菌活性研究	裂解酶显示很强的抗芽孢杆菌活性	[20]
葡萄球菌	2012年	ΦSH2	ΦSH2 lysin	20~50 kD	pET21a	<i>E.coli</i> (DE3)	部分酶和全长酶抗菌活性研究	CHAP区域酶较全长裂解酶有3倍高的抗菌活性	[7]
	2012年	SA4	LysSA4	30 kD	pQE30-UA	<i>E.coli</i> M15	抗菌活性研究	有望治疗金黄色葡萄球菌引起的感染	[11]
	2011年	phiNM3	ClyS	-10 kD	pJML6	<i>E.coli</i> DH5a	嵌合裂解酶的抗菌活性研究	嵌合酶显示有较强的裂解葡萄球菌属的活性	[18] [8]
链球菌	2015年	Cp-1	Cpl771	/	pT7-7	<i>E.coli</i> (DE3)	嵌合裂解酶抗菌活性研究	嵌合酶较全长裂解酶具有更强的抗菌活性及更广的抗菌谱	[6]
尿肠球菌	2016年	IME-EFm5	LysEFm5	/	/	/	抗菌活性研究	裂解酶较原噬菌体具有较广的抗菌谱	[10]
鲍曼不动杆菌	2016年	ØABP-01	lysABP-01	21.1 kD		<i>E.coli</i> (DE3)	抗菌活性研究	裂解酶与黏菌素具有协同抗MDRAB的效应	[17]
结核分枝杆菌	2016年	Che12	lysA	/	/	/	结构预测及裂解机制研究	为进一步了解噬菌体裂解宿主菌的机制奠定基础	[21]
分枝杆菌	2015年	BTCU-1	LysA、LysB	63 kD、34 kD	pET-30b	<i>E.coli</i> (DE3)	抗菌活性研究	具有胞内外杀耻垢分枝杆菌的活性	[22]
	2013年	D29	LysA	54.8 kD	pMV261, pET21b	耻垢分枝杆菌(<i>Ms.m</i>) <i>E.coli</i> (DE3)	克隆表达	D29裂解酶在大肠杆菌和分枝杆菌均得到成功表达	[23]
	2010年	TM4	LysA	58.6 kD	pQE60	<i>E.coli</i>	克隆表达	在大肠杆菌中成功克隆表达TM4裂解酶	[24]
	2011年	Ms6	LysA	43.2 kD、27.1 kD	pET29b, pQE30	<i>E.coli</i> , <i>Ms.</i>	克隆表达及LysA基因功能研究	LysA基因是噬菌体生长所必需, LysA酶具有抗菌活性	[25]

具有较强裂解结核分枝杆菌的作用(未公布)。以上研究结果表明分枝杆菌噬菌体裂解酶具有裂解分枝杆菌的作用,如果更多的分枝杆菌噬菌体裂解酶被开发与应用,则有望为治疗耐多药、广泛耐药结核病带来新的希望。当然,纯化的裂解酶用于治疗人类感染性疾病还需要通过大量临床试验来探索其最佳用药时间、剂量、浓度等。

4 结 语

噬菌体裂解酶因其具有较强的抗菌活性、抗菌作用迅速;具有高度特异性、对正常菌群无影响;作用于细胞壁肽聚糖,对人体细胞安全、无害;多种裂解酶之间以及裂解酶与传统的抗生素之间具有协同杀菌作用等特性,在耐药、耐多药、广泛耐药持续存在的今天,噬菌体裂解酶作为一种新型高效抗菌剂具有巨大研究与应用价值。且各种病原菌的噬菌体广

泛存在,较易获取,并且大多数已得到发现并分离测序。基因克隆及蛋白表达相关技术的成熟为研究裂解酶克隆重组、构建嵌合裂解酶、纯化裂解酶蛋白等奠定了基础,通过原核克隆表达可以得到浓度高、纯度大的噬菌体裂解酶,因此裂解酶作为一种新型抗菌剂的研究与应用具有较大优势。当然裂解酶研发与应用仍具有一些局限性,比如研发成本高、抗菌谱窄等。研究者试图优化建立简便快捷的纯化裂解酶的技术,并通过改变、调换其结合区域等构建嵌合裂解酶来拓宽其抗菌谱、增强其抗菌活性。相信这些技术的进步终将使裂解酶抗菌剂应用于临床治疗耐药感染性疾病成为可能。

参 考 文 献

- [1] Jacob F, Fuerst CR. The mechanism of lysis by phage studied with defective lysogenic bacteria[J]. J Gen Microbiol, 1958, 18(2):518-526.

- [2] Pastagia M, Schuch R, Fischetti VA, et al. Lysins: the arrival of pathogen-directed anti-infectives[J]. J Med Microbiol, 2013, 62(Pt 10): 1506–1516.
- [3] Simmons M, Donovan DM, Siragusa GR. Recombinant expression of two bacteriophage proteins that lyse *Clostridium perfringens* and share identical sequences in the C-terminal cell wall binding domain of the molecules but are dissimilar in their N-terminal active domains [J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(19): 10330–10337.
- [4] Fenton M, Ross P, McAuliffe O, et al. Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials[J]. Bioeng Bugs, 2010, 1(1): 9–16.
- [5] Fischetti VA. Bacteriophage lysins as effective antibacterials[J]. Curr Opin Microbiol, 2008, 11(5): 393–400.
- [6] Díez-Martínez R, De Paz HD, García-Fernández E, et al. A novel chimeric phage lysin with high in vitro and in vivo bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae*[J]. J Antimicrob Chemother, 2015, 70(6): 1763–1773.
- [7] Schmelcher M, Korobova O, Schischkova N, et al. *Staphylococcus haemolyticus* prophage ΦSH2 endolysin relies on cysteine, histidine-dependent amidohydrolases/peptidases activity for lysis ‘from without’ [J]. J Biotechnol, 2012, 162(2–3): 289–298.
- [8] Pastagia M, Euler C, Chahales P, et al. A novel chimeric lysin shows superiority to mupirocin for skin decolonization of methicillin-resistant and -sensitive *Staphylococcus aureus* strains[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(2): 738–744.
- [9] Wang Q, Euler CW, Delaune A, et al. Using a novel lysin to help control *Clostridium difficile* infections[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(12): 7447–7457.
- [10] Gong P, Cheng M, Li X, et al. Characterization of *Enterococcus faecium* bacteriophage IME-EFm5 and its endolysin LysEFm5[J]. Virology, 2016, 492: 11–20.
- [11] Mishra AK, Rawat M, Viswas KN, et al. Expression and lytic efficacy assessment of the *Staphylococcus aureus* phage SA4 lysin gene[J]. J Vet Sci, 2013, 14(1): 37–43.
- [12] Kong M, Ryu S. Bacteriophage PBC1 and its endolysin as an antimicrobial agent against *Bacillus cereus*[J]. Appl Environ Microbiol, 2015, 81(7): 2274–2283.
- [13] Gervasi T, Horn N, Wegmann U, et al. Expression and delivery of an endolysin to combat *Clostridium perfringens*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(6): 2495–2505.
- [14] Son B, Yun J, Lim J, et al. Characterization of LysB4, an endolysin from the *Bacillus cereus*-infecting bacteriophage B4[J]. BMC Microbiology, 2012, 12: 33.
- [15] Rashel M, Uchiyama J, Ujihara T, et al. Efficient elimination of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysin derived from bacteriophage phi MR11[J]. J Infect Dis, 2007, 196(8): 1237–1247.
- [16] Xia F, Li X, Wang B, et al. Combination therapy of LysGH15 and apigenin as a new strategy for treating pneumonia caused by *Staphylococcus aureus*[J]. Appl Environ Microbiol, 2016, 82(1): 87–94.
- [17] Thummeepak R, Kittit T, Kunthalert D, et al. Enhanced antibacterial activity of *Acinetobacter baumannii* bacteriophage øABP-01 endolysin (LysABP-01) in combination with Colistin[J]. Front Microbiol, 2016, 7: 1402.
- [18] Daniel A, Euler C, Collin M, et al. Synergism between a novel chimeric lysin and oxacillin protects against infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(4): 1603–1612.
- [19] Rodríguezrubio L, Martínez B, Rodríguez A, et al. Enhanced staphylytic activity of the *Staphylococcus aureus* bacteriophage vB-SauS-phiPLA88 HydH5 virion-associated peptidoglycan hydrolase: fusions, deletions, and synergy with LysH5[J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(7): 2241–2248.
- [20] Park J, Yun J, Lim JA, et al. Characterization of an endolysin, LysBPS13, from a *Bacillus cereus* bacteriophage[J]. FEMS Microbiol Lett, 2012, 332(1): 76–83.
- [21] Saadhali SA, Hassan S, Hanna LE, et al. Homology modeling, substrate docking, and molecular simulation studies of *Mycobacteriophage* Che12 lysin A[J]. J Mol Model, 2016, 22(8): 180.
- [22] Lai MJ, Liu CC, Jiang SJ, et al. Antimycobacterial activities of endolysins derived from a mycobacteriophage, BTCU-1[J]. Molecules, 2015, 20(10): 19277–19290.
- [23] Pohane AA, Joshi H, Jain V. Molecular dissection of phage endolysin: an interdomain interaction confers host specificity in Lysin A of mycobacterium phage D29[J]. J Biol Chem, 2014, 289(17): 12085–12095.
- [24] Henry M, Begley M, Neve H, et al. Cloning and expression of a mureinolytic enzyme from the mycobacteriophage TM4[J]. FEMS Microbiol Lett, 2010, 311(2): 126–132.
- [25] Catalao MJ, Milho C, Gil F, et al. A second endolysin gene is fully embedded in-frame with the, lysA, gene of mycobacteriophage Ms6[J]. PLoS One, 2012, 6(6): e20515.
- [26] Schmelcher M, Shabarova T, Eugster MR, et al. Rapid multiplex detection and differentiation of *Listeria* cells by use of fluorescent phage endolysin cell wall binding domains[J]. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(17): 5745–5756.
- [27] Kretzer JW, Lehmann R, Schmelcher M, et al. Use of high-affinity cell wall-binding domains of bacteriophage endolysins for immobilization and separation of bacterial cells[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(6): 1992–2000.
- [28] Schmelcher M, Loessner MJ. Bacteriophage endolysins: applications for food safety[J]. Curr Opin Biotechnol, 2016, 37: 76–87.
- [29] Shen Y, Barros M, Vennemann T, et al. A bacteriophage endolysin that eliminates intracellular streptococci[J]. Elife, 2016, 5: e13152.
- [30] Fischetti VA. Lysin therapy for *Staphylococcus aureus* and other bacterial pathogens[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2016: 409.
- [31] Gilmer DB, Schmitz JE, Euler CW, et al. Novel bacteriophage lysin with broad lytic activity protects against mixed infection by *Streptococcus pyogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(6): 2743–2750.
- [32] World Health Organization. Global tuberculosis report 2016[R]. WHO Library, 2016.