

噬菌体裂解酶专家共识——齐鲁公共卫生云讲堂

顾敬敏¹, 杨航², 李锦铨³, 严亚贤⁴, 卢雪梅⁵, 张炜⁶, 胡永飞⁷, 王冉^{8*}, 童贻刚^{9*}, 胡福泉^{10*}, 危宏平^{2*}, 刘玉庆^{11*}, 韩文瑜^{1*} (1.吉林大学 动物医学学院, 吉林 长春 130062; 2.中国科学院 武汉病毒研究所, 湖北 武汉 430071; 3.华中农业大学 食品科学技术学院, 湖北 武汉 430070; 4.上海交通大学 农业与生物学院, 上海 200240; 5.山东大学 微生物技术国家重点实验室, 山东 青岛 250100; 6.南京农业大学 动物医学院, 江苏 南京 210095; 7.中国农业大学 动物营养学国家重点实验室, 北京 100083; 8.江苏省农业科学院 农产品质量安全与营养研究所, 江苏 南京 210014; 9.北京化工大学, 北京 100029; 10.陆军军医大学 微生物学教研室, 重庆 400038; 11.山东省农业科学院 畜牧兽医研究所, 山东 济南 250100)

摘要:随着抗生素持续、不合理应用乃至滥用,使得细菌对抗生素的耐药性日益严重。特别是抗多黏菌素 *mcr-1* 基因以及耐万古霉素“超级细菌”的发现,标志着“后抗生素时代”的来临。为了应对细菌的耐药性、抗生素残留所导致的机体免疫力下降以及环境污染等问题,我国正在全力推进“减抗、限抗、禁抗”战略的实施,这是破解抗生素长期应用引发系列问题的根本之策,是事关畜禽健康养殖、公共卫生安全和人类健康的一件大事。这一战略的实施也对“安全、有效、质量可控,无残留、无污染”的绿色新型替代剂的研发提出新的需求,亟需在这些方面寻求新的突破口,其中噬菌体裂解酶是一个重要的突破方向。噬菌体裂解酶作为一类新型抗菌蛋白,在应对细菌耐药性方面具有独特优势,在减抗、降抗中具有公共卫生战略价值。为推动噬菌体裂解酶的研究与应用,现汇聚全国十多位从事噬菌体裂解酶研究的专家和相关企业,联合齐鲁公共卫生云讲堂、噬菌体国际研讨会和《中国兽医学报》,专题研讨国内外关于噬菌体裂解酶的基础研究成果和实际应用案例,对噬菌体裂解酶的发展趋势进行分析、研判,形成一系列共识。

关键词:噬菌体;裂解酶;专家共识;齐鲁公共卫生云讲堂

中图分类号:Q939.48

文献标志码:A

文章编号:1005-4545(2021)08-1451-07

DOI:10.16303/j.cnki.1005-4545.2021.08.01

Expert consensus on bacteriophage endolysin: Qilu Public Health Cloud Forum

GU Jingmin¹, YANG Hang², LI Jinquan³, YAN Yaxian⁴, LU Xuemei⁵, ZHANG Wei⁶, HU Yongfei⁷, WANG Ran^{8*}, TONG Yigang^{9*}, HU Fuquan^{10*}, WEI Hongping^{2*}, LIU Yuqing^{11*}, HAN Wenyu^{1*} (1.College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China; 2.Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China; 3.College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 4.School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; 5.State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao, Shandong 250100, China; 6.College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 7.State Key Laboratory of Animal Nutrition, China Agricultural University, Beijing 100083, China; 8.Institute of Food Safety and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 9.Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China; 10.Department of Microbiology, Army Medical University, Chongqing 400038, China; 11.Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China)

收稿日期:2021-05-21

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31872505, U19A2038, 32072824); 吉林省科技发展计划优秀青年人才基金资助项目(20190103106JH); 吉林省自然科学基金资助项目(20200201120JC)

作者简介:顾敬敏(1986-),男,教授,博士。

* 通讯作者, E-mail: hanwy@jlu.edu.cn; liuyiqing@163.com; hpwei@wh.iov.cn; hufuquan2009@aliyun.com; tongyigang@gmail.com; ranwang@jaas.ac.cn

Abstract: With the continuous and unreasonable use and abuse of antibiotics, bacterial resistance to antibiotics is becoming increasingly serious. In particular, the discovery of polymyxin resistant *mcr-1* gene and vancomycin resistant “superbacteria” mark the coming of “post antibiotic era”. In order to deal with the drug resistance of bacteria, the decline of immunity and environmental pollution caused by antibiotics and antibiotic residues, China is vigorously promoting the implementation of the strategy of “reducing antibiotics, limiting antibiotics and banning antibiotics”, which is the fundamental strategy to solve the series of problems caused by the long-term application of antibiotics, and is a major event related to the healthy breeding of livestock and poultry, public health and human health. The implementation of this strategy also puts forward new demands for the research and development of new substitute agents which are safe, effective, quality controllable, residue free and pollution-free. Bacteriophage endolysin is an important breakthrough direction. As a new class of antibacterial proteins, phage lysin has unique advantages in dealing with antibiotics resistant bacteria, and has a public health strategic value in reducing antibiotics-resistance. In order to promote the research and application of phage lysin. In this research, 13 experts and related enterprises in China were gathered, in collaboration with Qilu Public Health Cloud Forum, phage international symposium and *Chinese Journal of Veterinary Science*, to discuss the basic research and practical application of phage lysin, and analyze and judge the development trend of phage lysin. A series of consensus has been formed.

Keywords: bacteriophage; endolysin; expert consensus; Qilu Public Health Cloud Forum

* Corresponding authors, E-mail: hanwy@jlu.edu.cn; liuiqing@163.com; hpwei@wh.iov.cn; hufuquan2009@aliyun.com; tongyigang@gmail.com; ranwang@jaas.ac.cn

人类在发现细菌并确立病原学说之后,很快发现了噬菌体、青霉素、溶菌酶这些生态系统中天然抗菌物质, 抗生素因为结构简单、性质稳定、易于使用和标准化等优点, 成为抗菌药物主体, 支撑了现代医疗体系。但是抗生素存在致命弱点, 其作用靶位是细菌主要生化过程的关键酶, 易变异, 且细菌的代谢途径容易调整替代, 并能很快适应治疗浓度的抗生素, 同时抗生素种类有限, 出现目前普遍存在的抗药性问题^[1-3]。

不管是应对当前紧迫的细菌抗药性危机, 还是长远的抗菌策略与抗菌药物布局, 都应该加强抗药性流行病学监测, 对噬菌体及其抗菌蛋白等新型抗菌物质作系统研究、开发和产品储备。为此, 我国制定了《全国遏制动物源细菌耐药行动计划(2017—2020年)》, 设立了国家科技重大专项“超耐药性病原菌流行病学及防治技术研究”、国家重点研发计划“畜禽重要病原耐药性检测与控制技术研究”和“非天然噬菌体的设计合成”等科研项目, 全力推进“监抗、减抗、替抗、降抗”战略的实施, 这是事关畜牧业高质量发展、公共卫生安全和人类健康的战略要务, 其中噬菌体裂解酶作为一类新型抗菌蛋白, 是一个重要的突破方向^[4-7]。

为推动抗药性监测与噬菌体及其抗菌蛋白的研发应用, 2021年山东省农业科学院举办了齐鲁公共卫生云讲堂, 汇聚了全国十多位从事噬菌体裂解酶研究的专家和相关企业, 联合齐鲁公共卫生云讲堂、噬菌体国际研讨会和《中国兽医学报》, 专题研讨国内外关于噬菌体裂解酶的基础研究成果和实际应用案例, 对噬菌体裂解酶的发展趋势进行分析、研判, 形成以下共识。

1 噬菌体裂解酶的抗菌机制

1958年 JACOB 等^[8]发现噬菌体感染革兰阳性菌的末期由噬菌体基因编码合成的一种细胞壁肽聚糖水解酶或转糖苷酶, 使细菌在渗透压的作用下发生瞬间的崩解、死亡, 将其命名为裂解酶或内溶素(endolysin)。革兰阴性菌噬菌体编码的能水解细胞外基质多糖(EPS)的解聚酶(depolymerase)、噬菌体编码的穿孔素(holin)、病毒粒子相关肽聚糖水解酶(virion-associated peptidoglycan hydrolases, VAPGHs)等, 不在本次讨论范围。

革兰阳性细菌的噬菌体裂解酶一般包括催化域和细胞壁结合域(图1)^[7], 不同的裂解酶其催化域

和结合域的数量和连接顺序有所不同。而革兰阴性菌的裂解酶通常只有催化域。N端的酶催化结构域(enzymatically active domains, EADs)是裂解酶实现裂解功能的必需结构,根据其在肽聚糖上的水解位点可将裂解酶分为至少5类^[1]:胞壁酸酶(N-acetyl muramidase)、裂解性转糖苷酶(lytic transglycosylase)、N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖苷酶(N-acetyl-β-D-glucosaminidase)、N-乙酰基胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶(N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase)和 内肽酶(endopeptidase)。

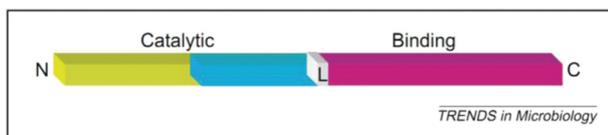


图1 噬菌体裂解酶结构示意图^[7]

如图2所示,前2种酶作用位点均为N-乙酰胞壁酸和N-乙酰葡糖胺之间的β-1,4-糖苷键。N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖苷酶的水解位点为N-乙酰葡糖胺和N-乙酰胞壁酸之间的β-1,4-糖苷键。N-乙酰基胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶的作用部位是N-乙酰胞壁酰残基和L-丙氨酸残基之间的酰胺键。内肽酶作用于主肽链或肽桥上的肽键。

细胞壁结合域是与宿主细胞壁上的特异性受体发挥结合作用的区域。它识别细胞壁上特有的多糖和磷壁酸等保守组分,如N-乙酰葡糖胺、胆碱和聚半乳糖等,与这些受体发生特异、高亲和力的结合,使与之相连的催化域和其酶解底物之间接触的几率大大增加,因此结合域和催化域的协同作用可共同促进裂解酶高效、特异的杀菌活性^[9]。

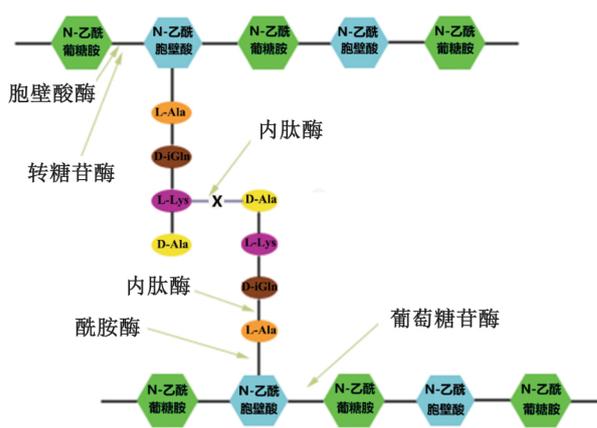
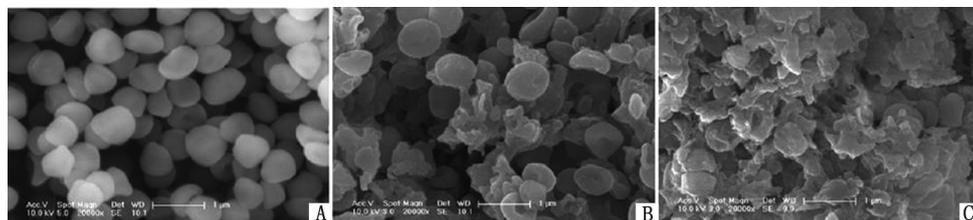


图2 催化域作用于细菌肽聚糖上位点

2 裂解酶作为新型抗菌剂的优势

传统的抗菌药物作用机制是抑制细菌重要生化过程的关键酶,而酶容易变异,另外细菌有阻止进入和外排、代谢代偿和修复等机制,因此容易形成抗药性。相比之下,裂解酶则作用于细菌肽聚糖的重要共价键,降解单纯底物的生化反应,细菌肽聚糖不易变异。因此,裂解酶作为一种新型抗菌生物制剂具有新的优势:高效快速、底物特异性、不易使细菌产生抗性、酶蛋白易于编辑改造、可与其他抗菌物质联合应用、抗体不影响其抗菌活性等^[10]。

2.1 杀菌作用高效、快速 裂解酶从外部接触到靶细菌后可以在几秒到几十秒将其细胞壁肽聚糖酶解,不必如噬菌体大量复制那样需要时间,也不必如抗生素那样需要多个环节才能进入细胞去结合靶蛋白,显示出高效性(图3)。另外,不论是代谢旺盛的



A.0 min; B.1 min; C.2 min

图3 LysGH15快速、高效杀灭MRSA菌株^[12]

细菌营养体、休止的滞留菌、还是处于生物被膜中的菌体,裂解酶都能无选择地裂解其肽聚糖,表现出杀菌的彻底性^[11]。

2.2 杀菌作用的特异性和安全性 由于省去噬菌

体对细菌的各种感染环节,以及裂解酶的底物单纯性和结合受体的有限性,裂解酶抗菌谱比噬菌体宽,但是比抗生素窄,对于非靶细菌和动物细胞没有损害^[13-14]。多数革兰阴性菌噬菌体裂解酶仅作用于该

种细菌,且菌株的差异性较小^[15]。而革兰阴性菌裂解酶通常具有较宽的杀菌谱,可以裂解多种细菌。裂解酶裂解时间短,加上蛋白酶和免疫清除作用,在体内降解迅速,半衰期较短,没有抗菌药物似的残留。

2.3 不易产生抗性 多个研究团队都尝试过体外诱导裂解酶的抗性菌株,但均未产生抗裂解酶突变菌株^[14,16-17]。主要是因为裂解酶结合的细胞壁受体种类有限且是细菌必需的细胞壁保守组分,且裂解酶发挥杀菌作用的时间极短(秒级),细菌在倍增时间内(15 min左右)来不及产生针对裂解酶的抗性;再者,裂解酶是噬菌体(包括溶源性噬菌体)与细菌长期进化的产物,具有进化优势,故宿主菌产生耐噬菌体裂解酶的可能性极小。

2.4 易于生产和改造 裂解酶本质是蛋白质,可以通过基因编辑进行定向改造,通过规模化发酵大量生产。裂解酶基因为模块式串联结构,可以将不同的细胞壁结合域与不同的催化域进行组合,或对碱基序列进行理性设计,构建具有更好酶学性质的嵌合酶,譬如,拓宽裂解谱^[18-19]、提高裂解活性^[20-22]、增加耐热性、降低细胞毒性^[23]、改善药代动力学^[24]等。常用的一般蛋白质表达体系都可以用于表达裂解酶,如大肠杆菌、乳酸菌、枯草芽胞杆菌等原核表达系统以及酿酒酵母、昆虫细胞系等真核表达体系。

2.5 裂解酶的抗体不会中和其杀菌作用 裂解酶是一种异源蛋白质分子,通过黏膜或经注射进入动物体内时会诱导机体产生特异性抗体,与裂解酶发生结合,但不会显著影响裂解酶的杀菌活性^[16]。可能有以下几方面原因:首先,裂解酶抗体通常针对裂解酶表面的突起抗原表位,而裂解酶发挥结合和催化作用的关键活性域主要分布在内陷的凹槽当中^[25],抗体很难封闭这些结构(图4)。其次,裂解酶与细菌细胞壁上靶位的亲和力大于与抗体的亲和力,再加上裂解酶作用的高效性,而机体产生抗体需要较长时间,所以抗体对其抗菌作用的影响较小。

2.6 可与其他抗菌药物协同应用 将具有不同肽聚糖酶解位点的裂解酶联合使用可以起到协同杀菌作用,降低裂解酶的有效使用剂量。裂解酶对肽聚糖的快速、高效裂解,破坏了其细胞壁完整性,为其他抗菌药物进入细菌胞内打开门户,有利于与其他抗菌药物协同使用,起到减抗降抗作用。裂解酶在短时间内造成细胞内毒素大量释放,易引起机体的急性炎症反应^[26],因此将具有抗炎作用的中药单体等与裂解酶联合使用可以取得更好的治疗效果(图5)^[12]。

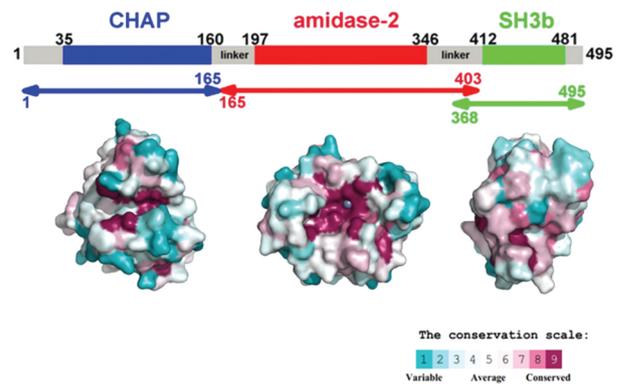


图4 裂解酶(LysGH15)的各活性域都处于凹槽结构^[25]

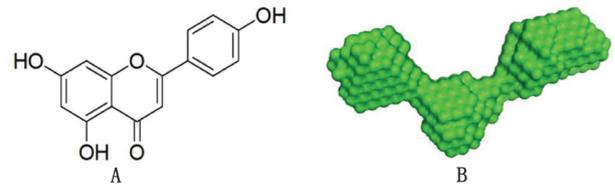


图5 中药单体芹菜素(A)与裂解酶 LysGH15(B)联合应用^[12]

3 裂解酶的应用领域

FREIMER等^[27]1959年首次报道纯化的裂解酶具有杀菌能力;2013年全球第1个噬菌体裂解酶产品 gladskin上市,用于辅助治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)引起的炎症性皮肤病;2019年全球第1个通过静脉注射可治疗金黄色葡萄球菌系统性感染的药物 CF-301(又名 Exebacase),进入III期临床试验。裂解酶在多领域细菌防控方面具有应用潜力,包括畜禽养殖、宠物医疗、食品安全、医学临床和病原菌检测等领域。

3.1 畜禽养殖 现代化畜禽养殖越来越趋于集约化,对于细菌性疾病的预防远比治疗重要得多。裂解酶可用于饲养环境、动物体表、种蛋表面的消杀,降低生产环境中重要病原菌的载量,从而降低细菌性疾病的发生率。可以通过乳池灌注将针对链球菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的裂解酶联合治疗奶牛乳房炎,从而达到降低甚至清除乳腺中病原菌的效果^[28]。裂解酶用于肉、蛋、奶及其产品的净化,能够降低病原细菌通过食物链传播的风险。裂解酶在畜禽养殖方面的应用主要受到经济成本的约束,因此,裂解酶高效、低成本的生产体系是非常有前景的探索领域。

3.2 宠物保健 宠物在饲养过程中也会感染细菌

性疾病,如细菌性皮炎、耳炎、外伤和手术缝合口感染等。在这些适应症中,可将裂解酶制作成喷剂或者涂抹剂用于患病宠物的治疗^[29]。

3.3 食品安全 食源性病原菌很容易通过食品传递给人,如单增李斯特菌、沙门菌和致病性大肠杆菌等^[30-31]。将针对这些病原的裂解酶喷雾肉品或者附着在包装材料上,对即食食品进行安全灭菌,可延长生鲜食品的储存时间,降低食源性病原传播感染的风险。

3.4 医学临床 裂解酶适合用于治疗人的各种细菌性感染疾病,如外伤或者手术伤口感染、肺部感染、假肢关节感染以及全身性感染等。印度 Ganga-Gen 公司开发了针对金黄色葡萄球菌的裂解酶,主要将其用于杀灭鼻腔内金黄色葡萄球菌,已经进入 II 期临床;美国 ContraFect 公司开发了 1 款针对金黄色葡萄球菌的裂解酶药物 Exebacase,主要用于治疗菌血症、心内膜炎等,目前已经进入 III 期临床;荷兰 MICREOS 公司也获得投资支持,完成了针对金黄色葡萄球菌的一系列面部使用产品的研发,主要用于控制酒糟鼻、痤疮和变应性皮炎等,目前产品已经上市。

3.5 病原检测 裂解酶细胞壁结合域对靶细菌具有特异性的结合作用(图 6)^[14],因此可以利用这类结构域与其他功能蛋白分子或者多肽进行串联,从而靶向特定的细菌^[32];利用细胞壁结合域特异性结

合靶细菌的属性,也可实现对相应细菌的富集和检测^[33-34]。裂解酶结合域 LysEF-P10B 与绿色荧光蛋白融合表达,纯化的蛋白与经 Hoechst(No.33342)染色的粪肠球菌孵育,检测裂解酶结合域 LysEF-P10B 的结合活性(图 6)。

4 裂解酶研究与应用中存在的问题和需要开展的工作

任何抗菌药物都有其特点,需要扬长避短,综合利用。虽然裂解酶具有很多独特的优势,但裂解酶作为蛋白质类抗菌物质,在研究和应用中还存在一些有待解决的问题^[12]。

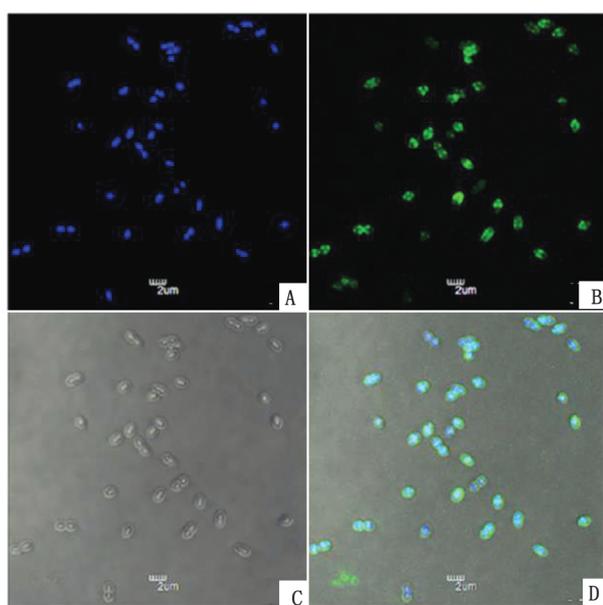
4.1 生产成本有待降低 裂解酶多数利用大肠杆菌基因工程表达,亲和层析纯化和清除内毒素导致生产成本较高。用革兰阳性菌(如枯草芽胞杆菌或者乳酸杆菌)或酵母表达系统来扩大规模,完善裂解酶大规模生产后的纯化工艺,可以降低生产端成本。此外,设计具有更高裂解活性的嵌合裂解酶可以从出发端降低成本^[31]。

4.2 稳定性有待改善 尽管裂解酶需要的裂解时间很短,但是因为体内蛋白酶和免疫清除作用,在体内的半衰期较短,譬如肺炎链球菌噬菌体裂解酶 Cpl-1 的半衰期约为 20 min^[35],通过蛋白酶和免疫系统的驯化筛选有可能得到改善。裂解酶对于多种因素比较敏感,如温度、pH 值、盐离子浓度等。很多裂解酶在生理温度下容易发生沉淀,通过酶分子的理性设计,提高热稳定性,可借鉴饲料酶制剂的冷藏保存和运输经验用于裂解酶的制剂工艺优化。

4.3 药理学体系亟待建立 目前裂解酶尚未列入国家新药申报目录,裂解酶用于临床治疗的前提是建立完善的药理学研究和评价体系,包括药代动力学、免疫反应、对病原菌的药效动力学等。据此确定对于不同病原菌的最低杀菌浓度和时间、临床单位体质量使用剂量等。裂解酶比噬菌体更接近于抗菌药物,更接近目前的抗菌药物审批、管理模式,这也是行业人士倾向于研发裂解酶的主要原因,国外研发速度最快的裂解酶已经推进到 III 期人医临床研究,国内还未见相关临床研究报道,需要加快力度和进度。

5 加快共用平台建设和新兽药申报

为提高裂解酶的研发成效,要尽快建设噬菌体



A.405 nm 波长下由 Hoechst (No.33342)激发蓝色荧光;B.488 nm 波长下由绿色荧光蛋白激发绿色荧光;C.正常光下菌体影像;D.将 A、B、C 叠加;标尺为 2 μm

图 6 裂解酶结合域对细菌特异性结合作用^[14]

裂解酶及其基因序列的高通量挖掘设计平台、高效表达纯化平台、高活性裂解酶的高通量筛选平台以及高效评价平台,其中高通量挖掘平台可以与人工智能和深度学习相结合,可以利用无细胞表达体系实现快速筛选。以山东省农业科学院畜牧兽医研究所的 Varms 菌毒株资源为依托,建立全国农业领域噬菌体裂解酶筛选和综合评价平台。通过筛选和改造来获得抗菌谱更宽、抗菌活性更强、稳定性更好、体内半衰期更长、表达量更高的裂解酶。

不仅裂解酶产品研发需要创新,国家对新兽药的管理模式也需要创新。作为研究者,需要开展对裂解酶的系统研究,按照新兽药“安全、有效、质量可控”的要求完成产品的研发,并同新药评审专家充分沟通,共同确定其作为新兽药的注册资料要求,推动主管部门审时度势,将裂解酶纳入新兽药申报目录。

6 加强噬菌体及其裂解酶的专家交流、公众科普教育和国际合作交流

通过齐鲁公共卫生云讲堂、噬菌体国际研讨会等形式,将噬菌体领域的专家和企业家协会汇集到一起,充分交流研究进展和遇到的问题,从而推动国内裂解酶研究走向深入和系统。通过研究论文、专著、科普性文章、公众号等手段,进行科普宣传,加深公众和主管部门对噬菌体裂解酶的认知,实现“从科学来,到群众去”。同时在全球化的公共卫生时代,开展广泛的裂解酶国际合作研究和交流,共同推进,使裂解酶产品在应对细菌感染特别是耐药性细菌感染中发挥应有的作用,为公共卫生安全、人类健康和畜牧业高质量发展做出贡献。

参考文献:

[1] HU Y, YANG X, QIN J, et al. Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota[J]. Nat Commun, 2013(4): 2151.

[2] HU Y F, YANG X, LI J, et al. The bacterial mobile resistome transfer network connecting the animal and human microbiomes [J]. Appl Environ Microbiol, 2016, 82(22): 6672-6681.

[3] 顾晓晓, 邬琴, 陶乔孝慈, 等. 羊源大肠杆菌对氨基糖苷类药物耐药表型及耐药基因的检测[J]. 中国兽医学报, 2020, 40(8): 1566-1570.

[4] CHANDRADHISH G, PARAMITA S, RAHAF I, et al. Alternatives to conventional antibiotics in the era of

antimicrobial resistance[J]. Trends Microbiol, 2019, 27(4): 323-338.

[5] HERMOSO J A, GARCÍA J L, GARCÍA P. Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics[J]. Curr Opin Microbiol, 2007, 10(5): 461-472.

[6] FISCHETTI V A. Bacteriophage lysins as effective antibacterials[J]. Curr Opin Microbiol, 2008, 11(5): 393-400.

[7] FISCHETTI V A. Bacteriophage lytic enzymes: Novel anti-infectives[J]. Trends Microbiol, 2005, 13(10): 491-496.

[8] JACOB F, FUERST C R. The mechanism of lysis by phage studied with defective lysogenic bacteria[J]. J Microbiol, 1958, 18(2): 518-526.

[9] YOUNG R. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation[J]. Microbiol Rev, 1992, 56(3): 430-481.

[10] GU J, XI H, CHENG M, et al. Phage-derived lysins as therapeutic agents against multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* [J]. Future Microbiol, 2018, 13: 275-278.

[11] ZHANG Y, CHENG M, ZHANG H, et al. Antibacterial effects of phage lysin lysgh15 on planktonic cells and biofilms of diverse *Staphylococci* [J]. Appl Environ Microbiol, 2018, 84(15): e00886-18.

[12] XIA F, XIN L, 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.

[13] 郭浩然, 许菁彦, 周洋, 等. 噬菌体的分布广泛性及口服安全性[J]. 中国食品学报, 2021, 21(2): 349-357.

[14] CHENG M, ZHANG Y, LI X, et al. Endolysin LysEF-P10 shows potential as an alternative treatment strategy for multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* infections[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 10164.

[15] GU J, XU W, LEI L, et al. LysGH15, a novel bacteriophage lysin, protects a murine bacteremia model efficiently against lethal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(1): 111-117.

[16] ZHANG L, LI D, LI X, et al. LysGH15 kills *Staphylococcus aureus* without being affected by the humoral immune response or inducing inflammation [J]. Sci Rep, 2016(6): 29344.

[17] HANG Y, GONG Y J, ZHANG H D, et al. ClyJ is a novel pneumococcal chimeric lysin with a cysteine- and histidine-dependent amidohydrolase/peptidase catalytic domain[J]. Antimicrob Agents Chemother,

- 2019,63(4):e02043-18.
- [18] YANG H, LINDEN S B, WANG J, et al. A chimeric lysin with extended-spectrum streptococcal host range found by an induced lysis-based rapid screening method[J]. Sci Rep, 2015, 5(1):17257.
- [19] YANG H, XU J, GONG Y, et al. Internal cell-penetrating peptide-mediated internalization enables a chimeric lysin to target intracellular pathogens[J]. Int J Pharmaceut, 2021, 599:120449.
- [20] YANG H, ZHANG Y, YU J, et al. Novel chimeric lysin with high-level antimicrobial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* *in vitro* and *in vivo* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(1):536-542.
- [21] YANG H, ZHANG H, WANG J, et al. A novel chimeric lysin with robust antibacterial activity against planktonic and biofilm methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Sci Rep, 2017(7):40182.
- [22] HUANG L, LUO D, GONDIL V S, et al. Construction and characterization of a chimeric lysin ClyV with improved bactericidal activity against *Streptococcus agalactiae* *in vitro* and *in vivo* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2020, 104(4):1609-1619.
- [23] HANG Y, LUO D H, IRINA E, et al. Linker editing of pneumococcal lysin clyj conveys improved bactericidal activity[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2020, 64(2):e01610-19.
- [24] LUO D, HUANG L, GONDIL V S, et al. A choline-recognizing monomeric lysin ClyJ-3m showing elevated activity against *Streptococcus pneumoniae* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2020, 64(12):e00311-20.
- [25] GU J, FENG Y, FENG X, et al. Structural and biochemical characterization reveals lysGH15 as an unprecedented "EF-hand-like" calcium-binding phage lysin[J]. PLoS Pathog, 2014, 10(5):e1004109.
- [26] GU J, JING Z, LEI L, et al. LysGH15 reduces the inflammation caused by lethal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in mice[J]. Bioeng Bugs, 2011, 2(2):96-99.
- [27] FREIMER E H, KRAUSE R M, MCCARTY M. Studies of L forms and protoplasts of group A streptococci. I. Isolation, growth, and bacteriologic characteristics[J]. J Exp Med, 1959, 110(6):853-874.
- [28] JI Y L, XIAO F, ZHU W, et al. LysGH15 effectively control murine mastitis caused by *Staphylococcus aureus* [J]. Pak Vet J, 2020, 40(4):519-522.
- [29] CHENG M, ZHANG L, ZHANG H, et al. An ointment consisting of the phage lysin lysGH15 and apigenin for decolonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from skin wounds[J]. Viruses, 2018, 10(5):244.
- [30] XU S, CAMPISI E, LI J, et al. Decontamination of *Escherichia coli* O157:H7 on fresh romaine lettuce using a novel bacteriophage lysin[J]. Int J Food Microbiol, 2021, 341:109068.
- [31] 吕阳, 尹平. 噬菌体在食品安全控制中的研究进展[J]. 食品科学, 2018, 39(15):240-246.
- [32] GU J, RONG L, LIU X, et al. LysGH15B, the SH3b domain of *Staphylococcal* phage endolysin LysGH15, retains high affinity to *Staphylococci* [J]. Curr Microbiol, 2011, 63(6):538.
- [33] 魏麟, 朱方莉, 周洋, 等. 噬菌体在检测食源性病原菌中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2018, 39(17):314-322.
- [34] YU J, ZHANG Y, LI H, et al. Sensitive and rapid detection of *Staphylococcus aureus* in milk via cell binding domain of lysin[J]. Biosens Bioelectron, 2016, 77(15):366-371.
- [35] RESCH G, MOREILLON P, FISCHETTI V A. A stable phage lysin (Cpl-1) dimer with increased anti-pneumococcal activity and decreased plasma clearance [J]. Int J Antimicrob Agents, 2011, 38(6):516-521.