

噬菌体裂解酶 Lys162 基因重组菌株的构建及重组酶抗菌活性评价

谭镇炜^{1,2}, 徐莉莉^{3,4}, 高敏², 张琳², 吕红珍², 王亚雯², 齐永华⁵,
原丽红^{6*}, 王承民^{2,3,4*}

1 广东药科大学 医药化工学院, 广东 广州

2 广东省科学院动物研究所, 广东省动物保护与资源利用重点实验室, 广东省野生动物保护与利用公共实验室, 广东 广州

3 优宜邦生物科技(上海)有限公司, 上海

4 南陵万泽生物工程研究院有限公司, 安徽 南陵

5 新乡学院 药学院, 河南 新乡

6 广东药科大学 生命科学与生物制药学院, 广东 广州

谭镇炜, 徐莉莉, 高敏, 张琳, 吕红珍, 王亚雯, 齐永华, 原丽红, 王承民. 噬菌体裂解酶 Lys162 基因重组菌株的构建及重组酶抗菌活性评价[J]. 微生物学报, 2026, 66(5): 2481-2497.

TAN Zhenwei, XU Lili, GAO Min, ZHANG Lin, LYU Hongzhen, WANG Yawen, QI Yonghua, YUAN Lihong, WANG Chengmin. Development of a recombinant bacterial strain for the expression of bacteriophage lytic enzyme Lys162 and assessment of the antibacterial activity of the recombinant enzyme[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(5): 2481-2497.

摘要: 【目的】构建一株能够表达噬菌体裂解酶 Lys162 的重组大肠杆菌工程菌, 以获得一种高效、广谱的重组裂解酶, 为开发新型抗菌制剂提供技术支撑。【方法】基于噬菌体 pEC.M2929.1AR.1 的全基因组测序数据, 利用生物信息学工具预测其蛋白结构, 并通过分子对接分析评估其与底物的结合能力。构建 pET28a(+)-Lys162 表达载体及大肠杆菌 BL21(DE3)工程菌表达体系。进一步对噬菌体来源的重组裂解酶 Lys162 进行环境稳定性、体外抗菌活性及裂解谱评估。【结果】预测结果显示, Lys162 为具有 N-乙酰胞壁质酶活性的裂解酶, 含有保守的裂解酶结构域; 分子对接证实其与肽聚糖结合紧密。该酶在 BL21(DE3)中以可溶形式表达, 纯化后浓度达 1.89 mg/mL。体外实验表明, 125 μg/mL 的 Lys162 对大肠杆菌 M2929.1AR 具有显著裂解活性, 对肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、不动杆菌属等多种病原菌也表现出良好的裂解能力。该酶在 pH 4.0-11.0 及 4-60 °C 范围内均能保持稳定的活性。【结论】Lys162 突破了原噬菌体的宿主范围限制, 表现出广谱的抗菌活性与环境适应性。其与 EDTA 的协同作用为实际应用提供了策略优化方向。本研究结果为开

资助项目: 河南省自然科学基金重点研究发展计划(252300420214)

This work was supported by the Key Research and Development Program of the Natural Science Foundation of Henan Province (252300420214).

*Corresponding authors. E-mail: WANG Chengmin, wangchm@giz.gd.cn; YUAN Lihong, ylh@gdpu.edu.cn

Received: 2025-12-05; Accepted: 2026-01-24; Published online: 2026-02-02

发应对细菌耐药挑战的新型抗菌制剂奠定了基础。

关键词：噬菌体；结构分析；裂解酶；重组表达；溶菌

Development of a recombinant bacterial strain for the expression of bacteriophage lytic enzyme Lys162 and assessment of the antibacterial activity of the recombinant enzyme

TAN Zhenwei^{1,2}, XU Lili^{3,4}, GAO Min², ZHANG Lin², LYU Hongzhen², WANG Yawen², QI Yonghua⁵, YUAN Lihong^{6*}, WANG Chengmin^{2,3,4*}

1 School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong, China

2 Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization, Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Institute of Zoology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong, China

3 Uibio Biotechnology (Shanghai) Co., Ltd., Shanghai, China

4 Nanling Wanze Microbial Engineering Research Institute Co., Ltd. Nanling, Anhui, China

5 College of Pharmacy, Xinxiang University, Xinxiang, Henan, China

6 School of Life Sciences and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong, China

Abstract: [Objective] To construct a recombinant *Escherichia coli* strain for the expression of the bacteriophage-derived lytic enzyme Lys162, an efficient and broad-spectrum recombinant enzyme, thus providing a technological foundation for developing novel antimicrobial agents. **[Methods]** On the basis of the whole-genome sequencing data of bacteriophage pEC.M2929.1AR.1, the protein structure was predicted *via* bioinformatics tools, and molecular docking analysis was performed to evaluate the substrate-binding affinity. The expression vector pET28a(+)-Lys162 and the engineered *E. coli* BL21(DE3) expression system were constructed. Lys162 was further assessed for its environmental stability, *in vitro* antibacterial activity, and lytic spectrum. **[Results]** Structural analysis predicted that Lys162 was an *N*-acetylmuramidase-type lytic enzyme containing a conserved catalytic domain. Molecular docking confirmed its high-affinity binding to peptidoglycan. The enzyme was expressed in a soluble form in *E. coli* BL21(DE3) and purified to reach a concentration of 1.89 mg/mL. *In vitro* assays demonstrated that Lys162 at 125 µg/mL exhibited significant lytic activity against *E. coli* M2929.1AR, along with potent lytic effects against multiple pathogenic bacteria including *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. The enzyme retained stable activity within a pH range of 4.0–11.0 and at temperatures between 4 °C and 60 °C. **[Conclusion]** Lys162 transcends the host specificity of its parental phage, demonstrating broad-spectrum antimicrobial activity and considerable environmental adaptability. Its synergistic effect with EDTA suggests a practical strategy for

performance optimization. These results establish a foundation for developing novel enzymatic antimicrobials to address challenges associated with bacterial antibiotic resistance.

Keywords: bacteriophage; structural analysis; lytic enzyme; recombinant expression; lysis

细菌耐药性问题已成为全球公共卫生体系面临的严峻挑战, 世界卫生组织已将抗菌药物耐药性列入 21 世纪人类健康十大威胁清单, 随着耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)、碳青霉烯耐药肠杆菌(carbapenem resistant *Enterobacteriaceae*, CRE) 和多重耐药鲍曼不动杆菌(multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, MDR-AB)等多种多重耐药菌株的持续扩散, 传统抗菌药物的治疗效果明显降低, 甚至面临缺乏有效治疗手段的难题^[1]。2019 年全球范围内由细菌耐药性直接造成的死亡病例约 127 万例^[2], 超过艾滋病或疟疾导致的死亡数量, 这一严峻现状促使科研人员加速探索新型抗菌方案。

噬菌体及其衍生物作为后抗生素时代的重要研究方向, 因其独特的杀菌机制和不易诱发耐药性的特点而备受关注, 天然噬菌体能够特异性侵染并裂解细菌宿主, 早在百年前噬菌体治疗就已被应用于细菌感染处理, 但随着抗生素时代的到来相关研究逐渐停滞^[3]。当前, 在耐药菌株激增与新型抗菌药物短缺的双重压力下, 噬菌体治疗重新获得重视, 多个国家已启动临床研究项目^[4]。尽管噬菌体疗法已经证明了其在靶向多重耐药(multidrug-resistant, MDR)病原体 and 通过裂解活性和酶降解破坏生物膜方面的前景, 但仍需面临噬菌体抗性、宿主特异性和监管限制等挑战^[5], 且天然噬菌体携带的耐药基因可能通过水平转移在细菌间传播进而助长耐药性蔓延^[6]。

相较之下噬菌体裂解酶展现出更佳的应用前景, 这类肽聚糖水解酶通过特异性降解细胞壁发挥抗菌作用, 鉴于其作用靶点的高度保守性, 细菌难以通过简单突变产生耐药性^[7], 这类

酶通常采用模块化架构, 包含催化功能区和靶向结合区, 使其能够通过基因改造进行功能优化^[8]。研究报道显示, 针对革兰氏阳性菌的裂解酶 LysGH15 及其催化结构域 CHAPLysGH15^[9]能有效抑制牛奶中的细菌生长, 具有应用于乳制品生物防腐的潜力。Abdelkader 等^[10]通过将抗菌肽 CecropinA 融合到具有内在抗菌活性的溶菌素 LysMK34 的 N 端, 构建了工程化溶菌素 eLysMK34, 该酶对鲍曼不动杆菌具有显著体外抗菌活性, 且对人上皮细胞无细胞毒性。Golosova 等^[11]发现新型裂解酶 LysSte134_1 对多种葡萄球菌肽聚糖具有降解活性, 现有研究已验证通过重组技术制备这些酶制剂用于外部治疗的可行性。然而, 裂解酶的实际应用仍存在技术瓶颈, 对于革兰氏阴性菌其外膜结构会阻隔酶制剂接触内层肽聚糖影响催化作用发挥。Lim 等^[12]通过融合穿膜肽来提升其穿透能力, 尽管实验室研究取得积极进展, 但裂解酶仍面临对革兰氏阴性菌穿透效率有限、在体内复杂环境中稳定性不足以及工业化生产质量管控等现实问题^[13]。为推动其实际应用, 未来需着力推进蛋白质工程技术革新、开发新型递送系统并探索联合治疗模式^[14]。

本研究以天然噬菌体 pEC.M2929.1AR.1 为材料, 通过克隆与表达获得重组蛋白 Lys162, 并系统评估了该酶的理化特性及其对代表性革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌的抗菌活性。在当前抗生素耐药性不断增加的时代, Lys162 展现出替代和补充传统抗生素的巨大潜力。本研究旨在探索噬菌体裂解酶在生物医学领域的应用潜力, 阐明其在抗菌治疗中的作用机制, 并为新型抗菌药物研发提供关键科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和噬菌体

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、BL21(DE3)感受态细胞、质粒提取试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;大肠杆菌 M2929.1AR.1 及其噬菌体 pEC.M2929.1AR.1,以及其他测试菌株均由本实验分离、鉴定和保藏(表 1)。

1.1.2 主要试剂和仪器

限制性核酸内切酶 *EcoR* I、限制性核酸内切酶 *Xho* I、凝胶回收试剂盒、质粒 pET-28a(+),北京全式金生物技术有限公司;十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳制备试剂盒,安徽白鲨生物技术有限公司;蛋白定量试剂盒(BCA 法),北京索莱宝科技有限公司。

基因扩增仪,杭州柏恒科技有限公司;酶标分析仪,北京普朗新技术有限公司;全自动凝胶成像分析系统,上海嘉鹏科技有限公司;

数显恒温水浴锅,上海捷昂仪器有限公司;紫外可见分光光度计,上海佑科仪器仪表有限公司。

1.2 重组蛋白 Lys162 的结构性质分析

通过 NCBI 数据库对 Lys162 氨基酸序列进行同源性比对;使用 MEGA 12 软件构建噬菌体裂解酶系统发育树;利用在线工具预测裂解酶氨基酸序列的理论分子量、理论等电点、带正负电荷的氨基酸数量等理化特性(<https://www.expasy.org/>);使用 TMHMM (v2.0) 在线工具(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)分析跨膜结构域;使用 SignalP-6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>) 预测信号肽序列;使用 Protein-sol (<https://protein-sol.manchester.ac.uk/>)分析蛋白质溶解度。利用 Phyre 在线工具(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/>)分析二级结构,通过 AlphaFold 2 (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2>。

表 1 受试菌株

Table 1 Test strains

Strain names	Specie	Host	Phage lytic	Endolysin lytic
Δ 4M186-2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Human feces	-	+
N3262-3AT	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Human feces	-	+
M2951-2AR	<i>Escherichia coli</i>	Giant panda	-	+
3103-3AT	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Severe human sputum	-	+
N618-3T	<i>Acinetobacter</i>	Elephant	-	+
N1094-1At	<i>Salmonella enterica</i>	Farmland soil samples	-	-
N3204-2At	<i>Escherichia coli</i>	Human feces	-	-
N3229-3DT.1	<i>Escherichia coli</i>	Human feces	-	+
N3236-2AT	<i>Shigella flexneri</i>	Human feces	-	+
N3680-1At	<i>Enterococcus faecalis</i>	Human feces	-	-
S3687-2Ab	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Feces	-	+
S3683-2Ar	<i>Escherichia coli</i>	Feces	-	+
N1089-2AT	<i>Salmonella enterica</i>	Camel	-	-
BM419-3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Human	-	+
N3161-2dt	<i>Streptococcus</i>	Human feces	-	-
M2929.1AR	<i>Escherichia coli</i>	Golden snub-nosed monkey	+	+

+: Lytic; -: No lytic.

ipynb)在线工具预测 Lys162 蛋白质三级结构, 从 UniProt 上获取肽聚糖小分子结构, 使用 CB-Dock2 分子对接在线工具 (<https://cadd.labshare.cn/cb-dock2/php/index.php>)分析 Lys162 与肽聚糖小分子结合位点与结合能情况。

1.3 重组蛋白 Lys162 的克隆、表达和纯化

根据全基因组预测及功能分析结果初步判断噬菌体 pEC.M2929.1AR.1 的 ORF162 基因片段为表达裂解酶片段。使用 SnapGene 软件设计一对裂解酶引物 M2929.1AR.1-F (5'-TAAGAA TTCATGGCTAAAGTAGTTGATGTGTTG-3')和 M2929.1AR.1-R (5'-TAACTCGAGGTTATAAGC GTCTAATGTTCCAGT-3') (下划线的序列分别为 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点)和一对 pET28a(+) 载体 T7 启动子引物 pET-28a(+)引物 28a-T7-F (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')和 28a-T7-R (5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'), 由北京睿博兴科生物技术有限公司广州分公司合成及测序。

以噬菌体 pEC.M2929.1AR.1 基因组为模板, 通过 PCR 扩增 Lys162 基因。PCR 反应体系 (50 μ L): 2 \times Taq PCR Master Mix 25 μ L, 上、下游引物 (6.5 nmol/L)各 2 μ L, DNA 模板 5 μ L, ddH₂O 16 μ L。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 57.5 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。使用胶回收试剂盒回收目的基因片段。*EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切的 pET28a(+)载体片段, 胶回收 pET28a(+)载体片段。使用 T4 连接酶在 25 $^{\circ}$ C 下连接目的基因片段与 pET28a(+)载体片段, 将重组质粒[pET28a(+)-Lys162]转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 用对应上、下游引物进行阳性克隆验证。将 PCR 验证为阳性的克隆进行测序验证。

将验证正确的重组质粒[pET28a(+)-Lys162]转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中,

37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 将 PCR 验证为阳性的克隆再次送至北京睿博兴科生物技术有限公司测序。将验证正确的携带重组质粒的大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞接种至 100 mL 含有终浓度 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 中, 培养至 OD_{600} 值约为 0.6-0.8, 加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度 0.1 mmol/L, 16 $^{\circ}$ C 诱导培养 18 h。对诱导菌液 4 $^{\circ}$ C、8 000/min 离心 10 min 收集菌体, 用无菌 PBS 洗涤 2 次, 然后将其重悬于 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4, 含 300 mmol/L NaCl) 中, 用高压均质仪进行破碎, 保留待测样本为携带重组质粒的大肠杆菌 BL21(DE3)感受态的细菌裂解液、沉淀和上清液。将待测样本与蛋白上样缓冲液进行 SDS-PAGE, 结束后对凝胶进行考马斯染色和脱色。同时检测纯化后的 Lys162 浓度, Lys162 最终储存在含 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4, 含 20 mmol/L NaCl) 中 (非特指皆采用此缓冲液)。

1.4 噬菌体 pEC.M2929.1AR.1 宿主谱

参考 Sofy 等^[15]方法, 取表 1 中的菌株重新复壮至对数生长期 (OD_{600} =0.6), 将 100 μ L 菌液与预热的半固体培养基混匀, 倾倒入平板表面, 待上层培养基凝固后, 取 10 μ L 噬菌体富集液滴于半固体培养基表面, 于恒温培养箱 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 12 h 以确认宿主范围。

1.5 Lys162 酶活性测定

参考 Nelson 等^[16]的方法, 并做适当修改。取对数生长期的受试菌株 (M2929.1AR) 菌液于 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液。用 Tris-HCl 缓冲液洗涤沉淀 2 次并重悬。采用 200 μ L 反应体系 (含 100 μ L 菌悬液、50 μ L 缓冲液、50 μ L 待测活性样品), 在 96 孔板中依次加入 100 μ L 菌悬液、50 μ L 缓冲液和 50 μ L Lys162 于 37 $^{\circ}$ C 静置培养 2 h, 用酶标仪检测波长 600 nm 处的 OD 值。设置 3 组重复平行实验, 以不加裂解酶组作为对照, 以不加菌液组为空白组。浊度降低率如公式(1)所示。

浊度降低率=[对照组 OD_{600} 值-(试验组 OD_{600} 值-空白组 OD_{600} 值)]/对照组 OD_{600} 值 $\times 100\%$ (1)

1.6 不同浓度的 Lys162 对宿主菌的活性检测

取不同浓度的裂解酶 Lys162 (200、400、600、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$)置于 1.5 mL EP 管中。每孔加入 100 μL 菌重悬液,再取 50 μL 裂解酶和 50 μL 缓冲液加入 96 孔板中(每孔裂解酶终浓度分别为 50、100、150、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。对照组为 100 μL Tris-HCl 缓冲液和 100 μL 菌悬液,空白组为 100 μL 裂解酶 Lys162 和 100 μL Tris-HCl 缓冲液。设置 3 组重复平行实验。

1.7 Lys162 的稳定性试验

1.7.1 温度稳定性

取 200 μL 裂解酶 Lys162 (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)置于 1.5 mL EP 管中,分别置于 4、20、37、50、60、70 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后,取 50 μL 孵育后的裂解酶和 50 μL 缓冲液加入 96 孔板中(每孔中裂解酶终浓度为 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$),每孔再加入 100 μL 菌悬液。对照组为 100 μL Tris-HCl 缓冲液和 100 μL 菌悬液,空白组为 100 μL 裂解酶 Lys162 和 100 μL Tris-HCl 缓冲液。设置 3 组重复平行实验。

1.7.2 pH 值稳定性

取 200 μL 裂解酶 Lys162 (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)置于 1.5 mL EP 管中,分别置于 pH 为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 的 Tris-HCl 缓冲液中孵育 30 min 后,取 50 μL 孵育后的裂解酶和 50 μL 缓冲液加入 96 孔板中(每孔中裂解酶终浓度为 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$),每孔再加入 100 μL 菌悬液。对照组为 100 μL Tris-HCl 缓冲液和 100 μL 菌悬液,空白组为 100 μL 裂解酶 Lys162 和 100 μL Tris-HCl 缓冲液。设置 3 组重复平行实验。

1.8 Lys162 与 EDTA 联合作用

参考 Celia 等^[17]的方法,并做适当修改。取对数生长期的受试菌株(M2929.1AR)菌液于

4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液。用 Tris-HCl 缓冲液洗涤沉淀 2 次并重悬。第 1 组(Lys162、EDTA 组):在 96 孔板中分别加入 50 μL (终浓度为 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) Lys162、50 μL EDTA (终浓度为 0.5 mmol/L)。第 2 组(EDTA 对照组):分别加入 50 μL Tris-HCl、50 μL EDTA (0.5 mmol/L)。第 3 组(Lys162 组):分别加入 50 μL (终浓度为 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) Lys162、50 μL Tris-HCl;第 4 组(Tris-HCl 对照组):加入 100 μL Tris-HCl。每组各孔均加入 100 μL 菌悬液。上述各组均在 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 2 h 后测定 OD_{600} 值,设置 3 组重复平行实验。

1.9 Lys162 的裂解谱测定

处理测试菌液得到 $OD_{600}=0.6$ 的重悬液,取 100 μL 各菌悬液加入 96 孔板中,分别加入 50 μL Tris-HCl 和 50 μL Lys162 (终浓度为 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$),对照组为 100 μL Tris-HCl 和 100 μL 菌悬液。将反应体系置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下孵育 2 h 后测定 OD_{600} 值,通过浊度的变化分析 Lys162 的裂解谱。

1.10 统计分析

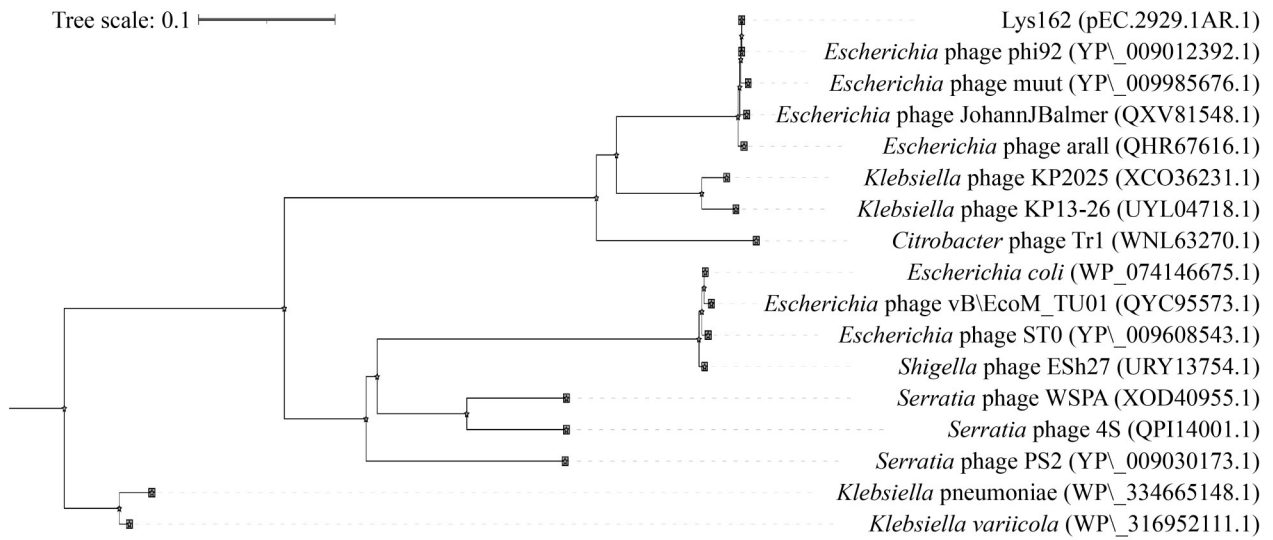
试验数据采用 SPSS 24.0 软件进行 t 检验评估定量数据间的统计学差异。所有数据均以均值 \pm 标准差表示($n=3$ 独立实验)。双尾检验中 $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 噬菌体 pEC.M2929.1AR.1 基因结构与细菌宿主谱

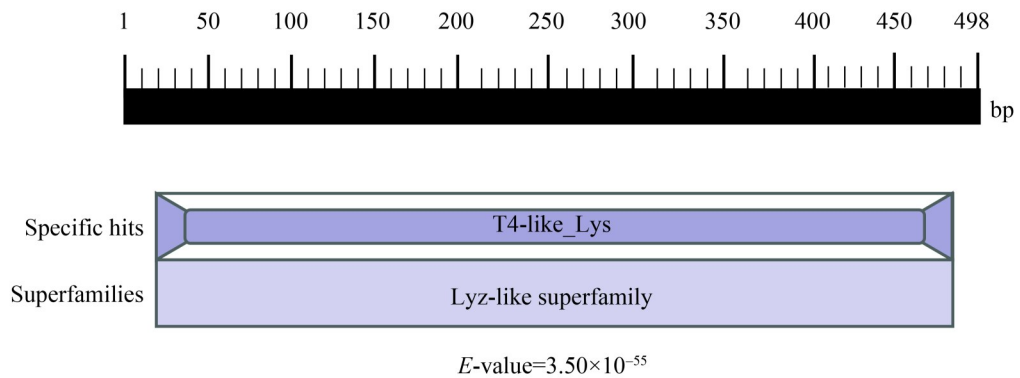
已测序噬菌体 pEC.M2929.1AR.1 的全基因组如图 1 所示,其大小为 145 425 bp。通过观察 16 株细菌双层平板是否出现噬菌斑,测定 pEC.M2929.1AR.1 的宿主谱。结果显示,pEC.M2929.1AR.1 仅能裂解大肠杆菌 M2929.1AR (表 1)。

A

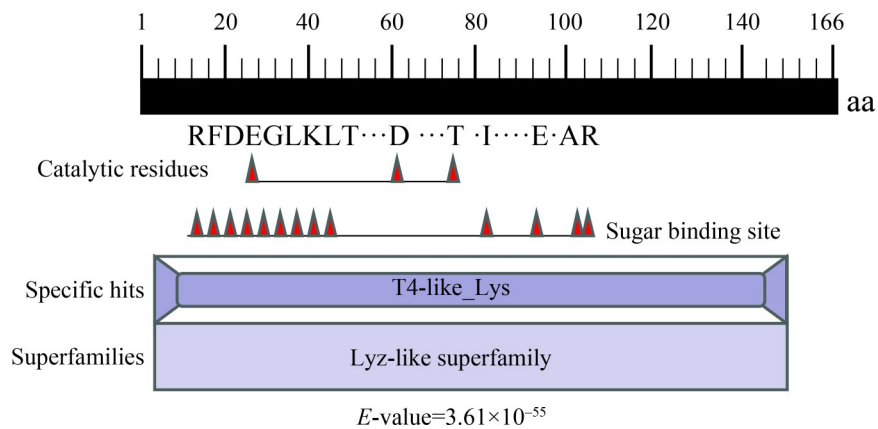


B

Nucleotide level



Protein level



N-乙酰胞壁酰胺酶活性。该结构域具有溶菌酶活性，在细胞壁大分子降解和肽聚糖降解等生物过程中发挥关键作用。进一步序列分析表明，位于 Lys162 的 N 端(氨基酸残基 12–20 位)的糖基结合位点可能作为噬菌体裂解酶的细胞壁结合域(cell wall binding domain, CBD)，负责识别并附着于肽聚糖。其 C 端存在多个 T4 溶菌酶特征性结构域，很可能构成负责协调肽聚糖水解活性的催化结构域^[18](catalytic domain, CD)。通过 MEGA 12 基于具有 T4-like_lys 保守结构域的裂解酶中的序列簇和亚家族等级选择代表性成员(CDD 登录号为 cd00735)。如图 2C 所示，发现 Lys162 蛋白包含 13 个完整保守残基(E15、G16、Y22、D24、G27、T30、G32、G34、T63、A102、G111、W142 和 V153)。综合上述分析，推断 Lys162 是一种具有 *N*-乙酰胞壁酰胺酶活性的裂解酶。该酶可能通过水解细菌肽聚糖异聚糖中连接 *N*-乙酰葡糖胺(*N*-acetyl-D-glucosamine, GlcNAc) C4 位点与 *N*-乙酰胞壁酸(*N*-acetylmuramic acid, MurNAc) C1 位点的 β -(1,4)糖苷键发挥作用。

2.3 噬菌体裂解酶 Lys162 蛋白结构预测与底物分子对接

为预测 Lys162 蛋白结构并分析其与肽聚糖小分子能否结合，首先通过 AlphaFold 2 对其三维结构进行了预测(图 3A)。从 UniProt 数据库获取 N-A-D-G (*N*-乙酰基-D-氨基葡萄糖)的三维结构，最后使用 CB-Dock2 进行了分子对接分析。分子对接结果显示(图 3B)，Lys162 与 N-A-D-G 基于结构的分子对接结合能为 -7.6 kcal/mol，并对其相互作用力分析。如图 3C 所示，结果显示 Lys162 与 N-A-D-G 之间通过多个极性氨基酸残基形成稳定氢键(2.80–3.36 Å)，周围残基构建的三维口袋为结合提供空间与疏水性支撑。结合文献[19]和本研究结果，认为 Lys162 与该肽聚糖小分子具有较强的结合能力^[19]。在模块

对接所识别的 29 个关键氨基酸残基中有 7 个关键氨基酸残基(E15、Y22、D24、T30、G32、G34、W142)与上述多序列比对的完整保守残基相同。此外，E15 氨基酸残基位于 Lys162 N 端的糖结合区内。据此推断，该蛋白 N 端的糖基结合位点为其裂解活性的关键结合结构域，能够与肽聚糖小分子结合，进而发挥催化功能。

2.4 裂解酶 Lys162 基因重组菌株的构建及重组蛋白的表达与纯化

构建的质粒经 PCR 验证(图 4A、4B)，结果显示 Lys162 成功连接到 pET28a(+)质粒中。表达蛋白的 SDS-PAGE 分析显示，Lys162 在 BL21 中作为可溶性蛋白良好表达(图 4C)。表达并纯化裂解酶后，裂解酶的最终浓度为 1.89 mg/mL。

2.5 重组蛋白 Lys162 的稳定性及体外杀菌活性检测

通过稳定性实验评估 Lys162 (非特指均采用终浓度为 125 μ g/mL)在不同条件下的酶活性。在 pH 稳定性实验中(图 5A)，Lys162 在 pH 4.0–11.0 范围内均具有裂解活性，并且在 pH 7.0 时表现出最高活性；随着 pH 升高或降低，其活性逐渐下降。在温度稳定性试验中(图 5B)，Lys162 具有较为良好的耐受性，在 60 °C 时仍可检测到裂解活性。上述结果表明，Lys162 在中性条件下能发挥较强的裂解活性，且表现出较强的耐受性。进一步通过不同浓度的酶液对宿主菌的活性测定发现，浓度梯度试验表明(图 5C)，裂解酶 Lys162 的裂解活性随酶浓度增加而增强，裂解率分别为 21.92% (终浓度为 50 μ g/mL)、32.41% (终浓度为 100 μ g/mL)、31.06% (终浓度为 150 μ g/mL)、31.74% (终浓度为 200 μ g/mL)，但随着浓度的增加，裂解率趋于平缓，提示酶浓度继续增加对裂解活性的提升有限。与 EDTA 联合作用体系中，将 Lys162 与 EDTA (0.5 mmol/L)联用(图 5D)，数据显示

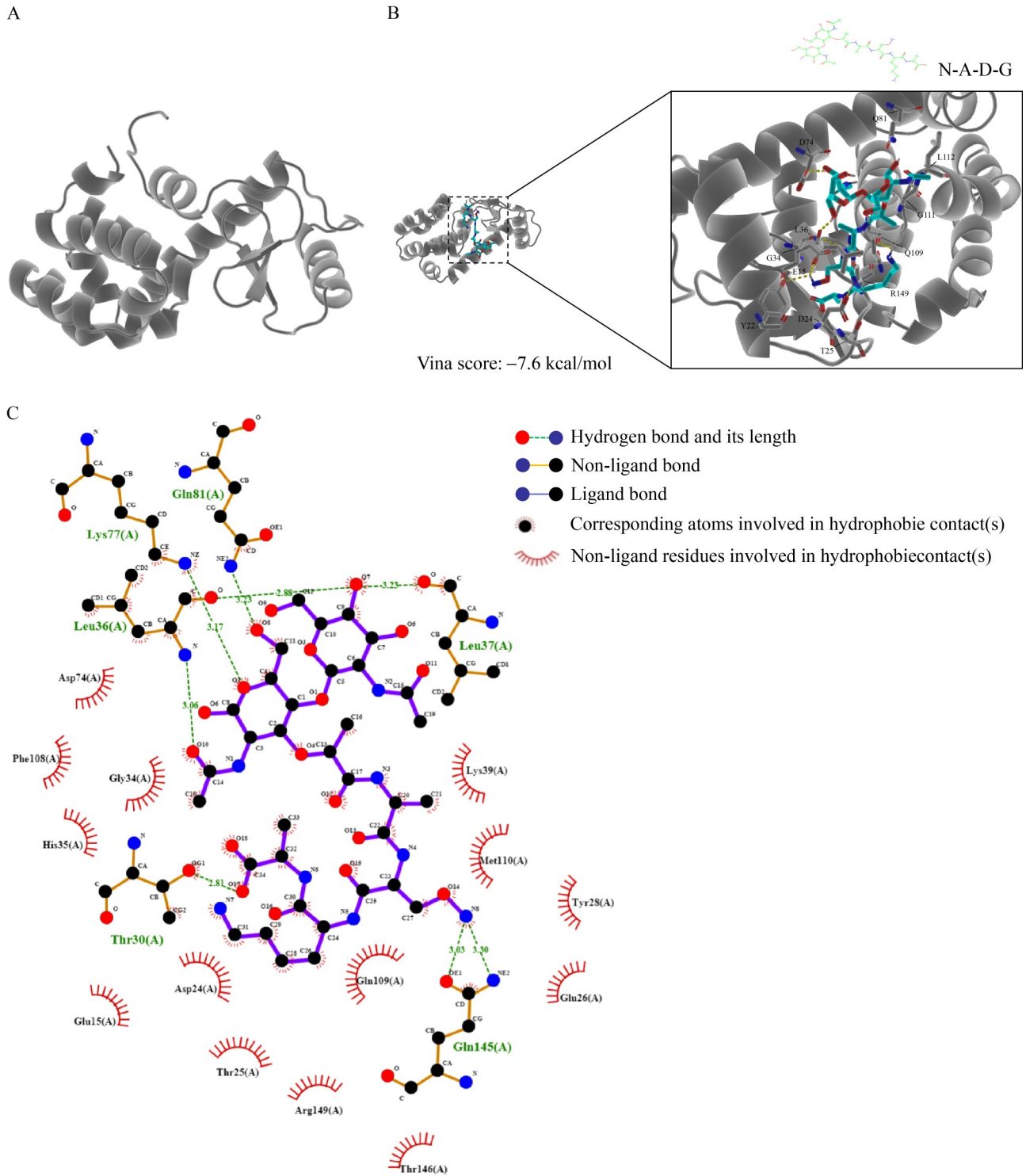


图3 Lys162结构与分子对接

Figure 3 Lys162 structure and molecular docking. A: Tertiary structure model of Lys162 in the cleavage enzyme; B: Module-based molecular docking of Lys162 with N-A-D-G; C: Molecular interaction forces between Lys162 and N-A-D-G.

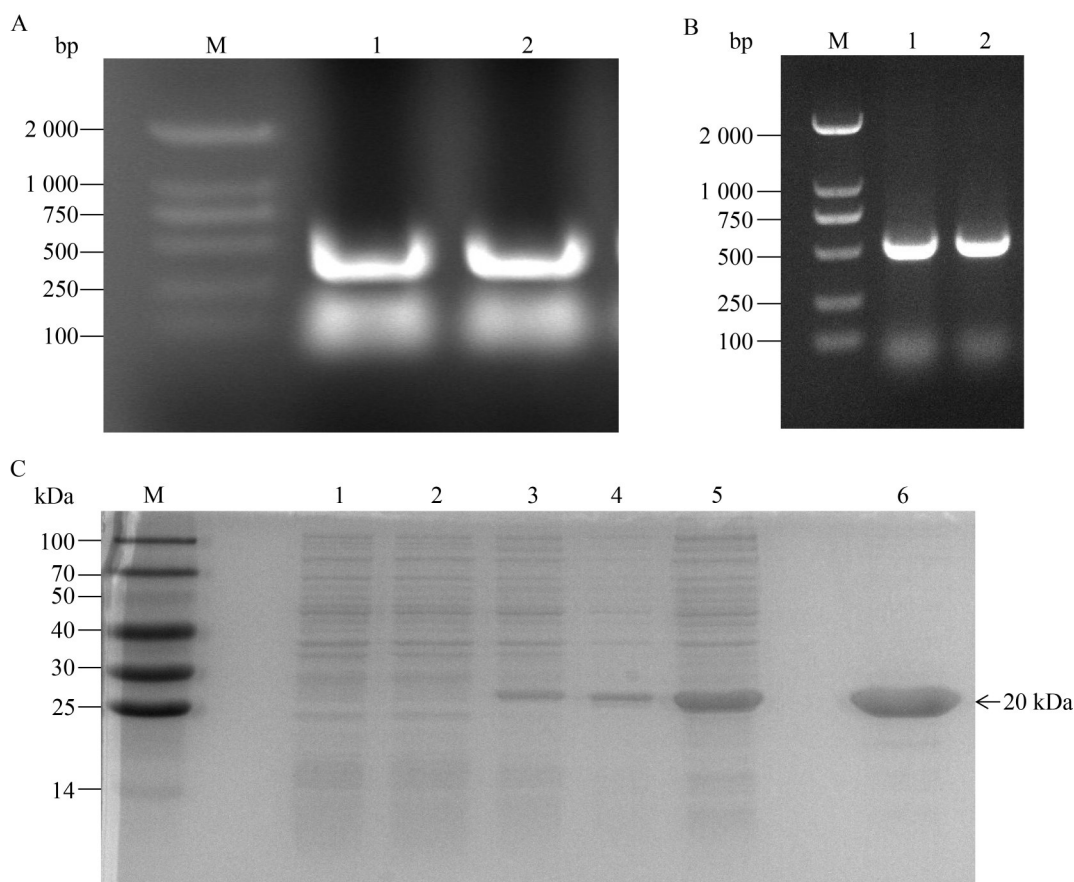


图4 Lys162 PCR产物及蛋白纯化电泳图

Figure 4 Lys162 PCR products and protein purification electrophoresis. A: The PCR amplification products of Lys162 (Lane M: DL2000 DNA marker; Lanes 1, 2: ORF162 PCR products); B: The Colony PCR amplification products of Lys162 [Lane M: DL2000 DNA marker; Lanes 1–2: 162-BL21-28a(+) colony PCR products]; C: SDS-PAGE analysis of recombinant lyase Lys162 before and after purification [Lane M: Protein molecular weight standard (100 kDa); Lane 1: pET28a(+)/BL21 empty vector uninduced whole cells; Lane 2: pET28a(+)/BL21 empty vector induced whole cells; Lane 3: pET28a(+)-Lys162/BL21 uninduced whole cells; Lane 4: pET28a(+)-Lys162/BL21 induced whole cells; Lane 5: pET28a(+)-Lys162/BL21 bacterial supernatant after IPTG induction; Lane 6: Purified Lys162].

Lys162 与 EDTA 联用组的溶菌活性显著高于无 EDTA 组，较无 EDTA 组提高了 1.6 倍。

Lys162 不仅对原宿主大肠杆菌 M2929.1AR 具有裂解作用，而且对其他大肠杆菌如 M2951-2AR、N3229-3DT.1 同样具有裂解活性。除此之外，Lys162 还对肺炎克雷伯菌 Δ 4M186-2、N3262-3AT、BM419-3，铜绿假单胞菌 3103-3aT、S3687-2Ab，不动杆菌 N618-3T，福氏志贺氏菌 N3236-2AT 也显示出裂解活性(图 5E)。

3 讨论与结论

随着细菌抗药性逐渐增强及多药耐药性菌株扩散，特别是表现出多重耐药性的菌株，如鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌等，它们是医院内一些最严重感染的根源，常引发较高的患病率和死亡风险^[20]。噬菌体作为一种能够治疗细菌性感染的替代疗法，已重新进入大众视野，成为抗生素替代研究领

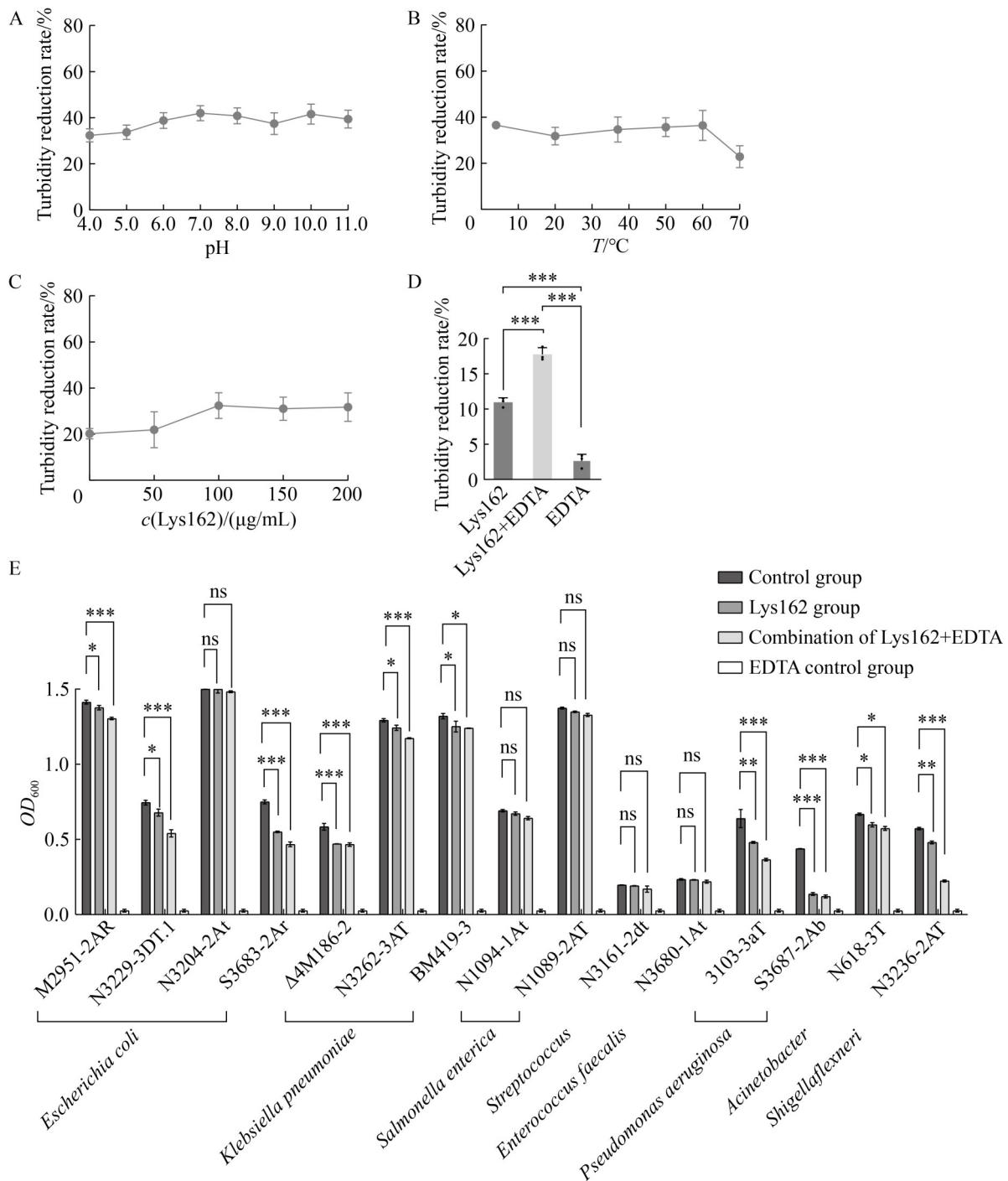


图5 Lys162裂解活性、稳定性及裂解谱

Figure 5 Lys162 cleavage activity, stability, and cleavage spectrum. A: pH; B: Temperature; C: Concentration; D: Cleavage activity; E: Cleavage spectrum. $P < 0.05$ was considered statistically significant; * indicates significant differences within the same group ($P < 0.05$); ** indicates highly significant differences within the same group ($P < 0.01$); *** indicates extremely significant differences between groups ($P < 0.001$); ns indicates no significant differences between groups ($P > 0.05$).

域的一大新兴热点^[21]。将噬菌体作为后抗生素时代治疗细菌感染的新手段，不仅具有重要的实际应用价值，还具备显著优势^[22]。目前，天然噬菌体在抑制细菌方面仍存在一定缺陷，如噬菌体由于自身特异性，抗菌范围较窄；作为病毒，噬菌体本身可能存在未知的毒力基因，直接应用于动植物可能会抑制体内正常益生菌的生长^[23]。裂解酶作为噬菌体衍生出的水解酶，被认为具有作为有效对抗抗生素抗性细菌感染的新治疗剂的显著潜力，尽管在革兰氏阴性菌中，因其脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)涂层表面保护的肽聚糖层，裂解酶的抗菌效果受限于它们难以穿透革兰氏阴性菌的外膜层，但已有研究表明噬菌体裂解酶相较于噬菌体本身裂解谱更宽^[24]，且目前并无研究表明噬菌体裂解酶能产生耐受性。

本研究以北京动物园金丝猴源大肠杆菌噬菌体 pEC.M2929.1AR.1 为研究对象，完成了其全基因组测序与分析。在该噬菌体基因组中鉴定出裂解酶基因(ORF162, 命名为 Lys162)及 holin 基因。通常情况下，裂解酶基因在噬菌体基因组中与 holin 基因紧密相邻^[25]，但 pEC.M2929.1AR.1 中这 2 个基因相距较远，这一现象较为特殊。系统发育分析显示，Lys162 与大肠杆菌噬菌体 phi92 的裂解酶基因具有高度相似性；然而 phi92 的裂解酶尚未有深入的表征研究^[26-27]，提示 Lys162 具备新颖的研究价值。InterPro 与 BLASTp 数据比对表明 Lys162 是一种具有 N-乙酰胞壁酰胺酶活性的裂解酶。鉴于该家族成员普遍以细菌肽聚糖为作用靶标，推测 Lys162 可能具备降解肽聚糖的能力并具有潜在的抗菌应用前景。为探究 Lys162 在 lyz 样超家族中的保守性与多样性，选取了 7 个来源多样且与 Lys162 同源性较低的同家族噬菌体裂解酶进行氨基酸序列比对。通过 MEGA 软件对 Lys162 与这 7 个同源蛋白进行分子结构比对，鉴定出其氨基酸序列中 13 个完全保守的残基，分别为 E15、G16、Y22、D24、G27、T30、

G32、G34、T63、A102、G111、W142 和 V153。

利用 ExPASy 工具预测显示，Lys162 的等电点(pI)为 9.67。Low 等^[28]的研究指出，细菌表面通常带有负电荷，主要归因于其高脂质含量以及与脂质双层和肽聚糖层密切相关的次级细胞壁聚合物的存在，同时噬菌体裂解酶催化结构域的净正电荷是影响其裂解活性与宿主范围的关键因素。基于 Lys162 所表现出的结构特征及其较高的等电点，推测其与细菌表面之间的静电相互作用可能有助于酶在细胞表面的定位，并通过静电导向作用促进其穿透细胞壁屏障。为了在分子层面验证该静电导向与穿透机制并探究 Lys162 与细菌细胞壁主要成分的相互作用。尽管不同细菌的肽聚糖来源存在差异，但所有细菌的肽聚糖均共享保守的基本骨架，因此选取 N-乙酰基-D-氨基葡萄糖(N-A-D-G)作为肽聚糖的代表性底物进行分子对接。分子对接结果显示，Lys162 的 E15、Y22、D24、T30、G32、G34 和 W142 残基作为结合位点与 N-A-D-G 相互作用；相互作用力分析进一步表明，Lys162 与 N-A-D-G 之间通过多个极性氨基酸残基形成稳定的氢键。此外，将 Lys162 与痢疾志贺氏菌噬菌体裂解酶 P9ly^[29]进行对比，发现两者构建酶催化中心的关键残基(E15、D24、T30)完全重合。此外，包括 Lys162 在内的 6 个同家族噬菌体裂解酶进行分子对接并比较其与 N-A-D-G 的结合能(图 6)，结果表明 Lys162 的结合能显著强于其余 5 种裂解酶；除 vB_EluM_RZH 外，其余酶在对接过程中均有谷氨酸残基参与结合。由此推定分子对接所鉴定的 7 个关键氨基酸残基对 Lys162 的功能至关重要。尤其是谷氨酸残基不仅构成酶催化中心的关键组分，还作为重要的糖基结合位点，推测其兼具催化活性与肽聚糖结合功能，其双重作用机制有待通过定点诱变实验进一步验证。总体而言，氨基酸序列比对鉴定出的 29 个关键氨基酸残基同时参与 Lys162 的细胞裂解活性与肽聚糖结合过程，这与已有研究结论(93.9% 感染革兰氏阴性菌的噬

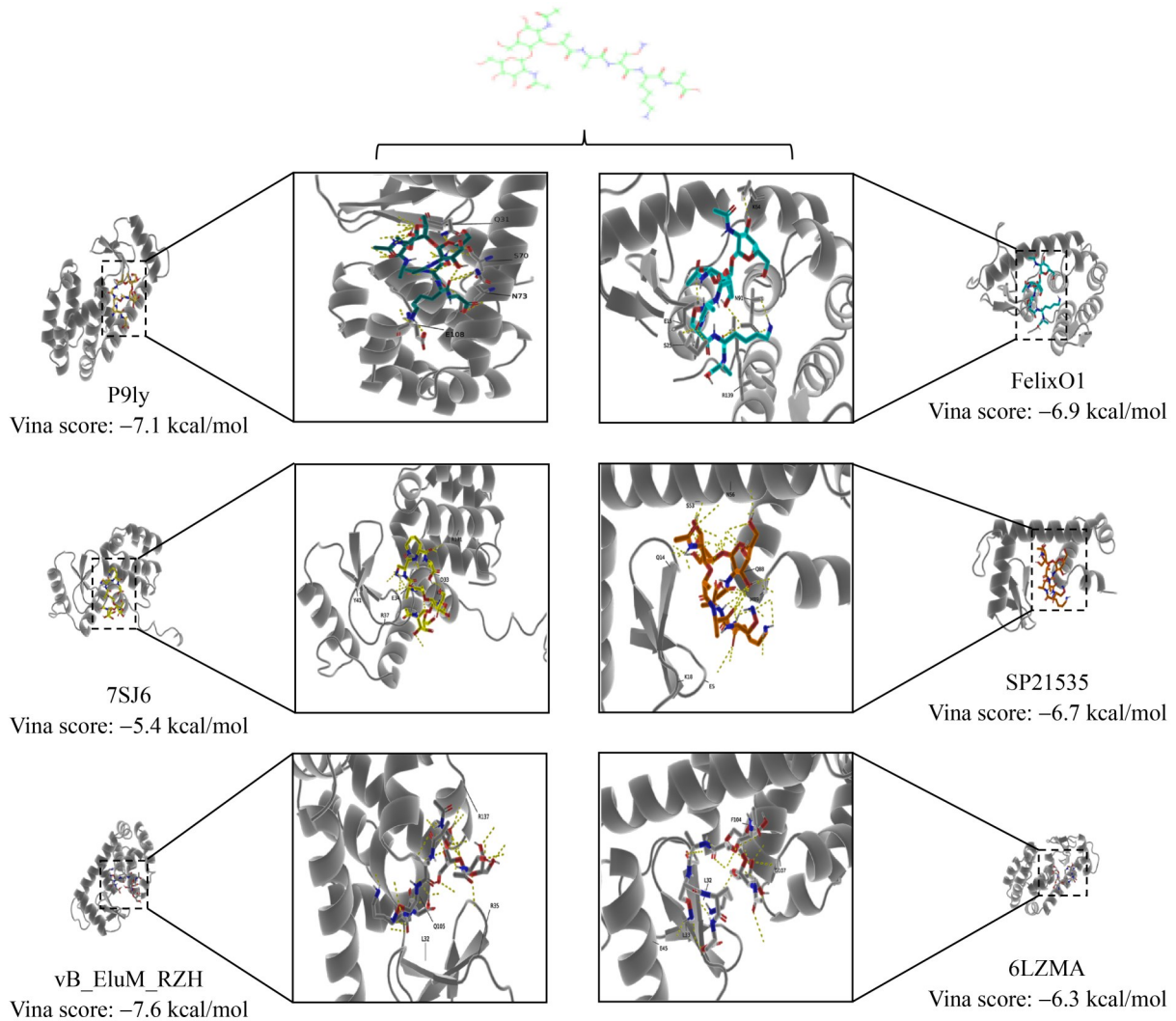


图6 Lyz样家族其他6个成员的分子对接

Figure 6 Molecular docking of the other six members of the Lyz-like family. The small molecule is *N*-acetyl-D-glucosamine; Accession numbers P9ly, FelixO1, 7SJ6, SP21535, 6LZMA, and vB_EluM_RZH represent the lytic enzymes from *Shigella dysenteriae* cell body PSD9 (GenBank ID: QXV72475.1), the lytic enzyme from *Salmonella* phage FelixO1 (GenBank ID: NP944846.1), the lytic enzyme from *Escherichia coli* phage T4 (GenBank ID: 2321481732), the lytic enzyme from *Shigella* phage SP21535 (GenBank ID: XPN41046.1), the lytic enzyme from *Escherichia coli* phage T4 (GenBank ID: 157837110), and the tail lysinase from *Escherichia coli* phage vB_IM_RZH (GenBank ID: XFC52777.1); Vina score denotes molecular docking binding energy.

菌体，其裂解酶均为球状结构)一致^[30]。未来可通过氨基酸定点突变实验，从分子层面更精准地阐明 Lys162 的作用机制。

本研究对噬菌体 pEC.M2929.1AR.1 基因组编码的 Lys162 进行克隆、表达及纯化，成功获

得重组 Lys162 蛋白。该蛋白在较宽的温度和 pH 范围内保持稳定。研究表明，Lys162 在不依赖 holin 蛋白的情况下仍可有效介导细菌裂解，提示其具备一定的穿透革兰氏阴性菌外膜的能力，从而能够抵达并作用于细胞壁肽聚糖层。然而，

已有大量研究表明^[31], 外源表达的裂解酶作为抗菌剂使用时通常需借助外膜通透剂破坏细菌外膜屏障以协助裂解酶抵达肽聚糖靶点并实现高效降解。Oliveira 等^[32]发现, 在柠檬酸和苹果酸存在条件下, 裂解酶 ABgp46 可将鲍曼不动杆菌的菌量降至检测限以下, 并使铜绿假单胞菌和鼠伤寒沙门氏菌的菌量下降超过 4 个对数级, Walmagh 等^[33]鉴定的 5 种裂解酶(BcepC6gp22), 在 0.5 mmol/L EDTA 辅助下可使铜绿假单胞菌 PAO1 的菌载量下降 1.89–3.08 个对数级。本研究中使用 0.5 mmol/L EDTA 与 Lys162 联用时(图 5A), 对大肠杆菌 M2929.1AR 的溶菌活性较单独使用 Lys162 提升了 1.6 倍。天然噬菌体通常具有严格的宿主特异性, 其狭窄的宿主谱限制了抗菌应用范围。重组蛋白 Lys162 通过靶向细菌肽聚糖层的保守结构域, 不仅可杀伤大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌、肠沙门氏菌等革兰氏阴性菌, 还能作用于链球菌等革兰氏阳性菌, 突破了原始噬菌体的宿主受体限制, 展现出跨物种溶菌活性及更广泛的抗菌潜力。

综上所述, 本研究报告了噬菌体裂解酶 Lys162 的鉴定、生产与表征, 该裂解酶 Lys162 来源于天然噬菌体 pEC.M2929.1AR.1。Lys162 不仅对大肠杆菌具备较为良好的抗菌活性, 还对多种条件病原菌具备一定的抗菌活性, 如肺炎克雷伯氏菌、铜绿假单胞菌等。这表明 Lys162 是一种广谱、高效的抗菌物质。此外, Lys162 和 EDTA 联合使用表现出改善的抑菌效果, 在当前抗生素耐药性不断增加的时代, Lys162 展现出代替和补充传统抗生素的巨大潜力。

作者贡献声明

谭镇炜: 数据分析、撰写文章; 徐莉莉: 提供资源、论文审阅; 高敏: 课题执行、撰写文章; 张琳: 方法论、软件程序分析; 吕红珍: 软件程序分析; 王亚雯: 软件程序分析、论文审阅; 齐永华: 方法论、论文审阅; 原丽红: 项目管理、论文审阅; 王承民: 提出概念, 获取基金、项目管理和论文审阅。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Ikuta KS, Swetschinski LR, Aguilar GR, Sharara F, Mestrovic T, Gray AP, Weaver ND, Wool EE, Han C, Hayoon AG, Aali A, Abate SM, Mohsen AK, Zninab AK, Sherie AE, Abebe G, Abedi A, Abhari AP, Abidi H, Aboagye RG, et al. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. *The Lancet*, 2022, 400(10369): 2221-2248.
- [2] Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Aguilar GR, Gray A, Han C, Bisignano C, Rao P, Wool E, Johnson SC, Browne AJ, Chipeta MG, Fell F, Hackett S, Georgina H-W, Hamadani BHK, Kumaran EAP, McManigal B, Agarwal R, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis[J]. *The Lancet*, 2022, 399 (10325): 629-655.
- [3] Kingwell K. Bacteriophage therapies re-enter clinical trials[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2015, 14(8): 515-516.
- [4] Cahan E. As superbugs flourish, bacteriophage therapy recaptures researchers' interest[J]. *JAMA*, 2023, 329(10): 781-784.
- [5] Anastassopoulou C, Panagiotopoulos AP, Feros S, Tsakris A. Phages connect the biological dots of antimicrobial resistance: from genesis and spread to alternative treatment modules[J]. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2025, 80(11): 2892-2901.
- [6] Lekunberri I, Subirats J, Borrego CM, Balcázar JL. Exploring the contribution of bacteriophages to antibiotic resistance[J]. *Environmental Pollution*, 2017, 220: 981-984.
- [7] Fischetti VA. Phage lysins: novel alternative to antibiotics[M]//*Phage Therapy: A Practical Approach*. Cham: Springer International Publishing, 2019: 317-334.
- [8] Vázquez R, García E, García P. Sequence-function relationships in phage-encoded bacterial cell wall lytic enzymes and their implications for phage-derived product design[J]. *Journal of Virology*, 2021, 95(14): e00321.
- [9] Yan JA, Yang RJ, Yu SH, Zhao W. The application of the lytic domain of endolysin from *Staphylococcus aureus* bacteriophage in milk[J]. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(3): 2641-2653.
- [10] Abdelkader K, Gutiérrez D, Tamés-Caunedo H, Ruas-Madiedo P, Safaan A, Khairalla AS, Gaber Y, Dishisha T, Briers Y. Engineering a lysin with intrinsic antibacterial activity (LysMK34) by cecropin a fusion enhances its antibacterial properties against *Acinetobacter baumannii*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2022, 88(1): e01515-21.
- [11] Golosova NN, Matveev AL, Tikunova NV, Khlusevich YA, Kozlova YN, Morozova VV, Babkin IV, Ushakova TA, Zhirakovskaya EV, Panina EA, Ryabchikova EI,

- Tikunov AY. Bacteriophage vB_SepP₁₃₄ and endolysin LysSte_{134_1} as potential *Staphylococcus*-biofilm-removing biological agents[J]. *Viruses*, 2024, 16(3): 385.
- [12] Lim J, Hong J, Jung Y, Ha J, Kim H, Myung H, Song M. Bactericidal effect of cecropin a fused endolysin on drug-resistant Gram-negative pathogens[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2022, 32(6): 816-823.
- [13] Khan FM, Rasheed F, Yang YL, Liu B, Zhang R. Endolysins: a new antimicrobial agent against antimicrobial resistance. strategies and opportunities in overcoming the challenges of endolysins against Gram-negative bacteria[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2024, 15: 1385261.
- [14] Wang YC, Khanal D, Alreja AB, Yang H, Yk Chang R, Tai WT, Li MY, Nelson DC, Britton WJ, Chan HK. Bacteriophage endolysin powders for inhaled delivery against pulmonary infections[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2023, 635: 122679.
- [15] Sofy AR, El-Dougoudou NK, Refaey EE, Dawoud RA, Hmed AA. Characterization and full genome sequence of novel KPP-5 lytic phage against *Klebsiella pneumoniae* responsible for recalcitrant infection[J]. *Biomedicines*, 2021, 9(4): 342.
- [16] Nelson D, Loomis L, Fischetti VA. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme[J]. *PNAS*, 2001, 98(7): 4107-4112.
- [17] Celia LK, Nelson D, Kerr DE. Characterization of a bacteriophage lysin (Ply700) from *Streptococcus uberis*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2008, 130(1/2): 107-117.
- [18] Meile S, Du JM, Dunne M, Kilcher S, Loessner MJ. Engineering therapeutic phages for enhanced antibacterial efficacy[J]. *Current Opinion in Virology*, 2022, 52: 182-191.
- [19] Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading[J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2010, 31(2): 455-461.
- [20] Troeger C, Blacker B, Khalil LA, Rao PC, Cao J, Zimsen SRM, Albertson SB, Deshpande A, Farag T, Abebe Z, Adetifa IMO, Adhikari TB, Akibu M, Lami FHA, Ayman A-E, Nelson A-G, Amare AT, Amoako YA, Antonio CA, Aremu O, et al. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2018, 18(11): 1191-1210.
- [21] Wang J, Liang SY, Lu XF, Xu Q, Zhu Y, Yu SY, Zhang WJ, Liu SG, Xie F. Bacteriophage endolysin Ply113 as a potent antibacterial agent against polymicrobial biofilms formed by enterococci and *Staphylococcus aureus*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1304932.
- [22] Wu JL, Zeng H, Qian XJ, Li YH, Xue F, Ren JL, Dai JJ, Tang F. Pre-treatment with phages achieved greater protection of mice against infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* than post-treatment[J]. *Research in Veterinary Science*, 2022, 150: 72-78.
- [23] 蔡健锋, 杨天浩, 陈慧芳, 白银山. 噬菌体在抑制细菌中的应用研究进展[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2021(8): 40-46, 151-152.
- Cai JF, Yang TH, Chen HF, Bai YS. Advances in the application of bacteriophages in the inhibition of bacteria[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2021(8): 40-46, 151-152 (in Chinese).
- [24] Soontarach R, Srimanote P, Arechanajan B, Nakkaew A, Voravuthikunchai SP, Chusri S. Characterization of a novel bacteriophage endolysin (LysAB1245) with extended lytic activity against distinct capsular types associated with *Acinetobacter baumannii* resistance[J]. *PLoS One*, 2024, 19(1): e0296453.
- [25] Pasqua M, Zennaro A, Trirocco R, Fanelli G, Micheli G, Grossi M, Colonna B, Prosseda G. Modulation of OMV production by the lysis module of the DLP12 defective prophage of *Escherichia coli* K12[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(2): 369.
- [26] Schwarzer D, Buettner FFR, Browning C, Nazarov S, Rabsch W, Bethé A, Oberbeck A, Bowman VD, Stummeyer K, Mühlhoff M, Leiman PG, Gerardy-Schahn R. A multivalent adsorption apparatus explains the broad host range of phage phi92: a comprehensive genomic and structural analysis[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(19): 10384-10398.
- [27] Kwiatkowski B, Boschek B, Thiele H, Stirm S. Substrate specificity of two bacteriophage-associated endo-*N*-acetylneuraminidases[J]. *Journal of Virology*, 1983, 45(1): 367-374.
- [28] Low LY, Yang C, Perego M, Osterman A, Liddington R. Role of net charge on catalytic domain and influence of cell wall binding domain on bactericidal activity, specificity, and host range of phage lysins[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(39): 34391-34403.
- [29] Wang F, Xiao Y, Lu Y, Deng ZY, Deng XY, Lin LB. Bacteriophage lytic enzyme P9ly as an alternative antibacterial agent against antibiotic-resistant *Shigella dysenteriae* and *Staphylococcus aureus*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 821989.
- [30] Briers Y, Lavigne R. Breaking barriers: expansion of the use of endolysins as novel antibacterials against Gram-negative bacteria[J]. *Future Microbiology*, 2015, 10(3): 377-390.
- [31] Zhang PF, Zeng P, Lai CKC, Ip M, To KKW, Zuo Z, Xia J, Leung SSY. Synergism of colistin and globular endolysins against multidrug-resistant Gram-negative bacteria[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 278(Pt 2): 134670.
- [32] Oliveira H, Vilas Boas D, Mesnage S, Kluskens LD, Lavigne R, Sillankorva S, Secundo F, Azeredo J. Structural and enzymatic characterization of ABgp46, a novel phage endolysin with broad anti-Gram-negative bacterial activity[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 208.
- [33] Walmagh M, Boczkowska B, Grymonprez B, Briers Y, Drulis-Kawa Z, Lavigne R. Characterization of five novel endolysins from Gram-negative infecting bacteriophages[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(10): 4369-4375.