

溶葡球菌酶的定点突变与 PEG 巯基定点修饰

吴宏, 房伟, 袁璟, 彭惠, 张学成, 王永中, 肖亚中

安徽大学生命科学学院 安徽省微生物与生物催化工程技术研究中心, 合肥 230039

摘要: 为了建立聚乙二醇 (PEG) 巯基定点修饰溶葡球菌酶的方法, 并检验假定连接区的突变与修饰对酶活的影响, 对溶葡球菌酶的假定连接区进行了巯基聚乙二醇定点修饰研究。通过分析溶葡球菌酶的结构特征, 选择两个结构域之间的氨基酸 (133-154aa) 进行定点突变引入半胱氨酸残基。使用单甲氧基聚乙二醇马来酰亚胺 (mPEG-MAL) 进行定点修饰, 对修饰后的酶进行纯化并测定酶活性。结果表明定点突变的半胱氨酸残基 PEG 修饰效率高、产物单一, 运用简便的 Ni^{2+} -NTA 柱亲和层析法实现了一步分离, 获得了高纯度的目标蛋白, 但在连接区进行定点突变及 PEG 定点修饰后的酶活有不同程度的降低, 表明假定连接区部分位点的 PEG 修饰会对溶葡球菌酶的催化活性产生一定影响。

关键词: 溶葡球菌酶, 定点突变, PEG 巯基定点修饰

Site-directed mutagenesis and sulfhydryl PEGylation of lysostaphin

Hong Wu, Wei Fang, Jing Yuan, Hui Peng, Xuecheng Zhang, Yongzhong Wang, and Yazhong Xiao

Anhui Provincial Engineering Technology Research Center of Microorganisms and Biocatalysis, School of Life Science, Anhui University, Hefei 230039, China

Abstract: The purpose of this paper is to establish sulfhydryl site-directed PEGylation method for lysostaphin and to evaluate effects of mutagenesis and modification of amino acid residue within putative linker on enzyme activity. On the basis of structural analysis of lysostaphin, amino acid 133–154 of tentative linker between the N-terminal and C-terminal domain were chosen as the candidate residues for site-directed mutagenesis to cysteine. Subsequently, sulfhydryl site-directed PEGylation was performed by reacting PEG-maleimide reagent with the newly introduced cysteine residue of the mutant lysostaphin. The Cys-mutant and PEG-modified proteins were both purified, and their enzymatic activity were further determined. The results show that the modification method for lysostaphin was highly efficient, resulting in the single uniform PEGylated lysostaphins. The mono-PEGylated lysostaphins were separated from unmodified lysostaphins through highly efficient one step method with Ni^{2+} -NTA column chromatography. However, both Cys-mutant and PEGylated lysostaphin only retained partial activities of the wild-type enzyme. It suggests that sulfhydryl site-directed PEGylation modification of the

Received: April 18, 2011; **Accepted:** June 3, 2011

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81072608), Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 090413076), Key Project of Natural Science of Education Department of Anhui Province (No. KJ2009A004Z).

Corresponding author: Yongzhong Wang. +86-551-5108509; E-mail: yongzhong00@126.com

Yazhong Xiao. +86-551-5108509; E-mail: xiaoyz@yahoo.cn

国家自然科学基金 (No. 81072608), 安徽省自然科学基金 (No. 090413076), 安徽省教育厅自然科学研究重点项目 (No. KJ2009A004Z) 资助。

tentative linker between the N-terminal and C-terminal domain may affect the catalytic activity of lysostaphin.

Keywords: lysostaphin, site-directed mutagenesis, sulfhydryl site-directed PEG modification

溶葡萄球菌酶 (Lysostaphin) 是 1964 年由 Schindler 等从模仿葡萄球菌 *Staphylococcus simulans* 的培养物中发现的一种含 Zn^{2+} 金属蛋白酶, 为 246 个氨基酸组成的单链分子^[1], 该酶属于 LAS 蛋白家族^[2-3], 具有特异性杀灭金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 和表皮葡萄球菌 *Staphylococcus epidermidis* 的作用, 尤其对耐药金葡萄球菌的杀菌作用明显, 有潜在的药用价值^[4]。然而, 溶葡萄球菌酶作为一种异源性蛋白, 具有潜在的免疫原性, 且在体内半衰期极短, 难以用于全身给药治疗由金葡萄球菌耐药菌 (如 MRSA) 引起的菌血症、心内膜炎等感染。

PEG 化技术 (PEGylation) 对蛋白质药物进行修饰是克服与解决上述问题的一种比较有效的方法, 包括随机修饰和定点修饰。其中定点修饰可以选择不影响蛋白质活性中心的氨基酸残基, 又能选择性干扰某些抗原位点, 因而较随机修饰有更多的优点。根据所修饰基团的不同, PEG 定点修饰主要可分为 4 类: 1) 巯基定点修饰; 2) N 端氨基定点修饰; 3) 羧基定点修饰; 4) 糖类残基和 N 端氧化后定点修饰。

目前关于溶葡萄球菌酶 PEG 修饰的研究很少, 仅 Walsh 等^[5]针对此酶的氨基酸序列中存在 16 个 Lys 和 6 个 Arg 位点, 运用随机聚乙二醇修饰法对该其侧链氨基进行过修饰研究。但是这种方法存在修饰产物不均一、分离困难、蛋白活性下降严重等缺点。巯基定点修饰法是在氨基随机修饰得不到理想产物的背景下发展起来的, 具有产物种类较少, 易分离纯化等优点^[6]。溶葡萄球菌酶不含半胱氨酸残基 (即不含巯基), 目前尚未见溶葡萄球菌酶的巯基定点 PEG 修饰研究。

巯基定点修饰通常选择非活性区域的残基作为修饰位点, 虽然溶葡萄球菌酶的晶体结构

目前尚不明确, 但是通过结构模拟分析, 发现溶葡萄球菌酶可能具有 N 端/C 端两个功能结构域。其中, N 端结构域与 LytM 蛋白的同源性最高, 大于 65%^[7-8]; C 端结构域与 ALE1 蛋白的同源性最高, 大于 85%^[9-11]。这 2 个结构域之间存在 22 个功能未知的氨基酸残基, 对其进行二级结构预测, 不具有明确的二级结构, 推测这段区域可能为结构域之间的连接区^[12]。

根据溶葡萄球菌酶结构的理论分析结果, 本文将探讨将假定连接区的氨基酸残基突变为半胱氨酸, 以及进一步的 PEG 巯基定点修饰对其酶活的影响, 并建立高效、快速、简便的 PEG 巯基定点修饰溶葡萄球菌酶的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 BL21 (DE3) 宿主菌、大肠杆菌 DH5 α /pMD18T-Lys 工程菌、pET-22b 表达载体、金黄色葡萄球菌 *S. aureus* ATCC25923, 均为本实验室保存。

QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit 购自 Stratagene 公司; mPEG-MAL 购自上海炎怡生物科技有限公司; *Xho* I、*Nco* I、T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司; Chelating sepharose FF 购自 Amersham Pharmacia Biotech (GE) 公司。定点突变引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 引物序列见表 1。

1.2 方法

1.2.1 溶葡萄球菌酶的序列分析及二级结构预测

在 NCBI 站点上对溶葡萄球菌酶进行保守结构域分析 (Conserved domain search), 同时运用 GOR, Jpred 软件对溶葡萄球菌酶连接区进行二级结构预测。

表 1 引物及其序列

Table 1 Primers used in the study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
K ¹³⁶ C forward	ACTGCCCAAGATCCAATGCCTTTCTTAT GC AGCGCAGGATATGG
K ¹³⁶ C reverse	CCATATCCTGCGCT GC ATAAGAAAGGCATTGGATCTTGGGCAGT
A ¹⁴³ C forward	CCTTTCTTAAAGAGCGCAGGATATGGAAAA TG CGGTGGTACAGTAACTCC
A ¹⁴³ C reverse	GGAGTTACTGTACCACCG GC ATTTTCCATATCCTGCGCTCTTTAAGAAAGG
G ¹⁴⁴ C forward	GCAGGATATGGAAAAGCAT GT GGTACAGTAACTCCAA
G ¹⁴⁴ C reverse	TTGGAGTTACTGTACC AC ATGCTTTTCCATATCCTGC
T ¹⁴⁶ C forward	GGATATGGAAAAGCAGGTGGT TG CGTAACTCCAACGCCGAATACA
T ¹⁴⁶ C reverse	TGTATTGGCGGTGGAGTTAC GC AACCACCTGCTTTTCCATATCC
T ¹⁵⁰ C forward	GCAGGTGGTACAGTAACTCCAT GC CCGAATACAGGTTGG
T ¹⁵⁰ C reverse	CCAACCTGTATTCGGG GC ATGGAGTTACTGTACCACCTGC

1.2.2 基因定点突变及其重组质粒的构建

采用 *Dpn* I 酶介导的快速 PCR 定点突变方法对溶葡萄球菌酶进行定点突变引入编码 Cys 的密码子 TGC。以 pMD18T-Lys 作为模版, 拟突变位点的碱基为中心设计突变引物, 突变引物设计原则参考 Stratagene 公司 QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit 说明书。PCR 程序: 95 °C 2 min 预变性; 95 °C 20 s, 60 °C 10 s, 68 °C 2 min, 20 个循环; 68 °C 5 min; 保存于 4 °C。突变后的质粒经 *Nco* I 和 *Xho* I 酶切, 与经相同酶切的原核表达载体 pET-22b 连接, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 后筛选重组子并进行序列测定。

1.2.3 重组蛋白的诱导表达和蛋白纯化

将含有重组质粒的大肠杆菌 BL21 (DE3) 接种于 5 mL 氨苄青霉素抗性 (50 µg/mL) LB 培养基, 37 °C、220 r/min 振荡过夜, 按 1 : 100 比例转接至 1 L 氨苄青霉素抗性培养基, 37 °C 振荡培养至 *OD*₆₀₀≈0.6, 加入诱导剂 IPTG (终浓度为 1.0 mmol/L) 诱导表达, 28 °C、180 r/min 诱导 6 h。离心收集菌体, 将菌体悬浮于 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.9), 500 mmol/L NaCl, 5 mmol/L 咪唑溶液中, 超声破碎, 离心收集上清。上清用 Ni²⁺-NTA 柱进行亲和层析, 纯化过

程参照 GE 使用说明书, 纯化的蛋白利用 SDS-PAGE 检测纯度。对纯化后的蛋白进行透析以置换其中缓冲液, 将咪唑溶液置换为 Tris-HCl 缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, pH 7.9)。

1.2.4 酶的蛋白含量及活性测定

采用 Bradford 的方法测定蛋白含量^[13]。采用比浊法测定溶葡萄球菌酶的内切肽酶活性, 通过测定该酶对金黄色葡萄球菌的溶菌能力来表示。先将金葡菌在胰酶大豆肉汤 (TSB) 培养基上培养过夜, 用 20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl 溶液 (pH 7.9) 冲洗收集, 稀释至吸光度约为 0.8 (λ=650 nm), 加入溶葡萄球菌酶至终浓度 5.4 µg/mL, 在 37 °C 孵育, 10 min 内每隔 1 min 测定吸光度。

1.2.5 PEG 修饰及修饰产物的纯化

首先将溶葡萄球菌酶突变蛋白经 DTT 处理, 将其中的二聚体还原为单体, 过量的 DTT 经透析除去。将纯化的突变蛋白与分子量 20 kDa 的 mPEG-MAL 按摩尔比 1 : 10 的比例混合, 置 4 °C 反应 18 h。反应混合物经 Ni²⁺-NTA 柱纯化, 纯化的蛋白利用 SDS-PAGE 检测纯度, 并将缓冲液置换为 20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl 溶液 (pH 7.9) 后, 采用比浊法测定其活力 (同 1.2.4)。

2 结果与分析

2.1 溶葡萄球菌酶序列分析, 二级结构预测

溶葡萄球菌酶序列分析结果如图 1 所示, 通过分析, 发现溶葡萄球菌酶具有 N 端和 C 端 2 个功能结构域。位于 N 端的结构域 (约 132 个氨基酸残基) 属于 M23 肽酶超家族, 具有内切肽酶活性, 催化肽聚糖 Gly 五肽桥联中 Gly-Gly 肽键的水解, 与抗葡萄球菌活性直接相关; 而位于 C 端的结构域 (约 92 个氨基酸残基) 属于 SH3b 家族, 可以靶向细胞壁, 促进该酶与细胞壁肽聚糖的结合。在 2 个结构域中间有 22 个氨基酸残基 (133~154 位) 将 2 个结构域相连。

对溶葡萄球菌酶进行二级结构预测, 发现第 133~154 位氨基酸不具有明确的二级结构, 推测可能为两结构域之间的连接区。PEG 修饰通常选择非功能区域的氨基酸残基作为修饰位点, 因此本研究将定点突变及修饰位点定位在 2 个结构域之间的连接区域。

2.2 基因定点突变及其重组质粒的构建

在结构域之间的连接区中分别选取 K136、A143、G144、T146、T150 五个位点氨基酸残基进行定点突变。通过 PCR 的方法构建 5 个溶葡萄球菌酶

突变基因, 并将其连接到表达载体 pET-22b 上, 分别得到重组质粒, 序列测定结果表明所有突变位点和 DNA 序列均正确 (图 2)。

2.3 重组蛋白的诱导表达及纯化

将重组质粒转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, IPTG 诱导表达, 突变蛋白均可以正常表达。运用 Ni^{2+} -NTA 柱亲和层析法纯化诱导产物, 突变蛋白可被 120 mmol/L 的咪唑溶液特异性洗脱。洗脱产物经 SDS-PAGE 电泳检测, 结果如图 3 所示, 突变蛋白单体的条带单一, 大小与溶葡萄球菌酶一致, 表明突变蛋白已被成功纯化, 可用于下游 PEG 修饰操作。

2.4 突变蛋白生物活性的测定

纯化后的突变蛋白采用比浊法测定其溶菌活性, 结果见图 4 和表 2。由图可见, 对比野生型溶葡萄球菌酶, 突变体 K136C、A143C、T146C、T150C 的酶活略有下降, 分别为原酶活的 78%、89%、91%、83%; 而第 144 位的 Gly 被 Cys 所取代后, 其酶活则下降了 39%, 推测第 144 位的 Gly 对两结构域间的相互协调发挥重要作用, 当被定点突变成 Cys 后, 可能会造成一定的空间位阻, 影响了结构域间的相互作用, 最终导致酶活较大下降。

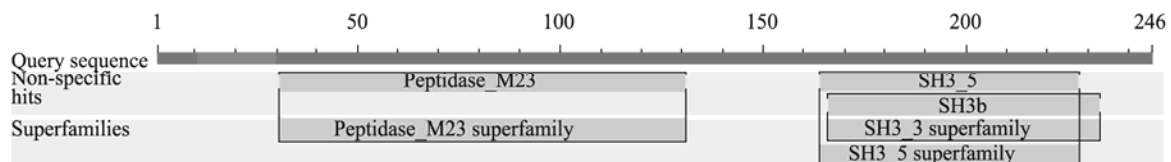


图 1 溶葡萄球菌酶序列分析

Fig. 1 Conserved domain search analysis of lysostaphin.



图 2 溶葡萄球菌酶突变体的测序结果

Fig. 2 Sequence of lysostaphin mutants. 1: wild type lysostaphin; 2-6: lysostaphin mutants; 2: K136C; 3: A143C; 4: G144C; 5: T146C; 6: T150C.

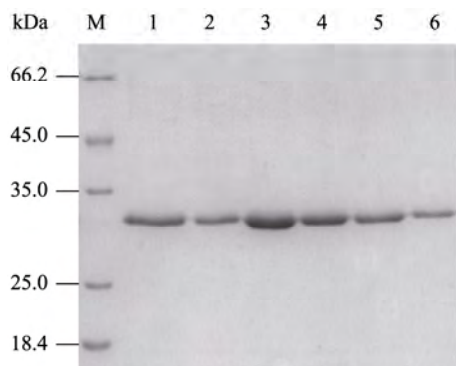


图3 溶葡萄球菌酶突变体的 SDS-PAGE 检测

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of lysostaphin mutants. M: protein marker; 1: wild type lysostaphin; 2-6: lysostaphin mutants; (2: K136C; 3: A143C; 4: G144C; 5: T146C; 6: T150C).

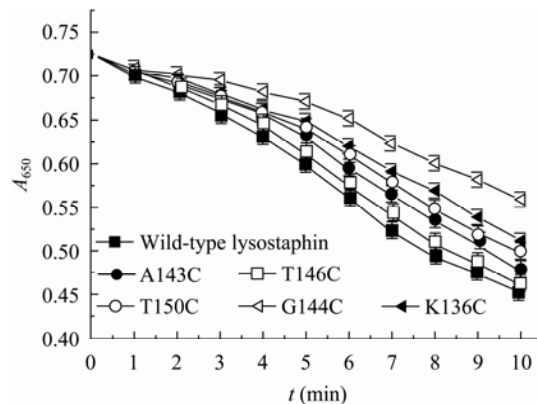


图4 溶葡萄球菌酶突变体的溶菌活性

Fig. 4 The lytic activity of lysostaphin mutants against *S. aureus*.

表2 各种类型酶的活性比较

Table 2 comparison of enzyme activity

Ratio of enzyme activity	Mutant				
	K136C	A143C	G144C	T146C	T150C
Mutant/wild type	0.78	0.89	0.61	0.91	0.83
PEGylated/mutant	0.13	0.22	0.09	0.25	0.19
PEGylated/wild type	0.10	0.18	0.05	0.20	0.15

2.5 PEG 巯基定点修饰及产物纯化

将突变蛋白与 mPEG-MAL20000 在适宜的条件下进行巯基修饰反应。产物经 SDS-PAGE 检测发现: 修饰产物单一, 且以单修饰体形式存在; 大部分蛋白都已被修饰, 修饰效率高, 采用凝胶成像系统扫描蛋白组分进行定量分析, 计算修饰率达 70% 以上 (图 5)。另外, 电泳图谱结果显示修饰产物的表观分子量大于理论分子量, 推测可能是由于线性的 PEG 的分子延展在蛋白分子表面, 使蛋白的泳动速率降低; 或 PEG 分子的水化程度高造成修饰蛋白移动速度减慢所致。

将 PEG 修饰后的混合产物经 Ni^{2+} -NTA 柱进行分离纯化。通过改变咪唑浓度, 优化洗脱条件, 发现 PEG 修饰后的酶与 Ni^{2+} -NTA 柱结合能力显著下降, 可以在低浓度的咪唑 (60 mmol/L) 下特异性洗脱; 而未修饰的酶依然需要较高浓度的咪唑

(120 mmol/L) 才能洗脱。60 mmol/L 咪唑洗脱产物的 SDS-PAGE 检测结果如图 6 所示, 电泳条带单一, 可见运用简便的 Ni^{2+} -NTA 柱纯化法实现了反应产物的一步分离, 获得了高纯度的目标蛋白。

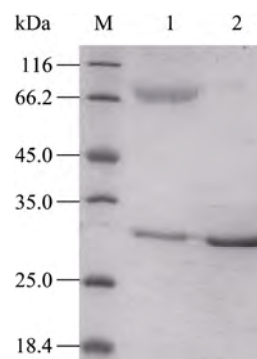


图5 PEG 修饰产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of PEGylated lysostaphin solution. M: protein marker; 1: lysostaphin; 2: PEGylated lysostaphin solution.

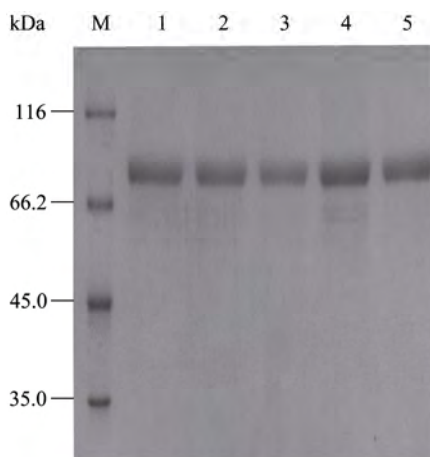


图6 PEG修饰溶葡萄球菌酶的SDS-PAGE检测

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of PEGylated lysostaphin fractionation through Ni^{2+} -NTA column. M: protein marker; 1: K136C-PEG; 2: A143C-PEG; 3: G144C-PEG; 4: T146C-PEG; 5: T150C-PEG.

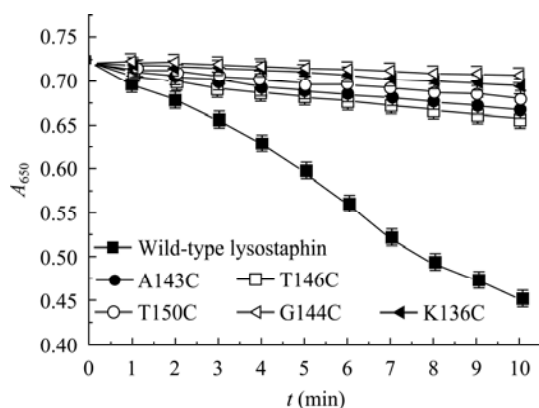


图7 PEG修饰溶葡萄球菌酶的溶菌活性

Fig. 7 The lytic activity of PEGylated lysostaphins against *S. aureus*.

2.6 PEG修饰产物的酶活测定

纯化后的PEG修饰蛋白采用比浊法测定酶溶菌活性,结果见图7和表2。由图可见,PEG修饰后所有蛋白酶活均有不同程度的下降。对比突变型溶葡萄球菌酶,PEG-LysG144C的活性保留率为9%,这进一步说明了第144位的Gly在酶的变构效应中可能发挥重要作用;K136C、A143C、T146C、T150C突变蛋白PEG修饰后产物体外活性保留率分别为

13%、22%、25%和19%,酶活最高的PEG-LysT146C酶活为原酶活的20%。PEG修饰导致酶活的下降,可能的原因为部分位点的PEG修饰产生了较大的空间位阻,从而影响到靶向域与催化域之间的协调作用;亦或PEG引起的位阻效应导致其与受体的亲和力下降,最终对溶葡萄球菌酶的催化活性产生了一定影响。

3 讨论

溶葡萄球菌酶对耐药金葡菌具有良好的杀菌活性,该酶用于全身给药治疗MRSA等引起的感染在临床上有巨大潜在需求。迄今,对溶葡萄球菌酶应用研究大多集中在局部感染的治疗上,例如溶葡萄球菌酶乳膏用于清除皮肤感染与鼻腔定植的金葡菌^[14-16]。而治疗金葡菌的全身感染(如血液、器官感染等)的研究报道相对较少^[17],其原因与该酶具有潜在的免疫原性与极短的体内半衰期有关^[5](<1 h)。因此,血药浓度欲维持在抗菌水平需反复给药,而反复给药又可刺激抗体的产生并加速其清除。

聚乙二醇修饰技术是目前延长蛋白质药物在体内半衰期、降低免疫原性和改善其药代特性的有效方法之一^[18-19]。巯基定点修饰是第2代PEG修饰技术中应用较多的一种定点修饰方式,由于蛋白质多肽中的巯基相对于氨基数量较少,且巯基的亲核活性通常较 α -氨基、 ϵ -氨基或羟基等基团高,故选择特定的巯基修饰位点可以达到降低修饰度、减少产物种类等较好的定点修饰结果^[20-22]。如李智华等通过定点突变将一个Cys残基引入hL-11的N末端,利用PGE实现定点修饰,修饰产物的体外活性保留率为hL-11活性的30%^[23]。本研究根据溶葡萄球菌酶的结构特征以及该酶不含半胱氨酸残基的特点,通过在合适位置定向引入了巯基,然后利用与Cys巯基特异性反应的mPEG-马来酰亚胺来实现定点修饰,PEG修饰效率高,达到了70%以上,并且修饰后得到的产物单一,突变蛋白和PEG修饰蛋白均运

用简便的 Ni^{2+} -NTA 柱亲和层析法实现了一步纯化, 获得了高纯度的目标蛋白。由于该分离方法的简便与高效, 这将为溶葡萄球菌酶的 PEG 修饰研究提供一个高效的技术平台。

PEG 修饰技术在改善蛋白质药物药代特性同时, 常常以牺牲其活性为代价。当溶菌酶偶联上一个 PEG 分子时其活性保留率为 13%^[24]。对促红细胞生成素进行聚乙二醇 (mPEG-ALD) 修饰, 其单修饰产物的体外活性比修饰前减少 30%^[25]。Walsh 等^[5]曾运用聚乙二醇 (PEG) 随机修饰法对溶葡萄球菌酶的侧链氨基进行过修饰研究, 结果显示静脉注射 PEG 修饰溶葡萄球菌酶在血液中的半衰期可延长至 24 h, 抗体亲和力降低了 90% 以上, 但修饰度大于 2 的溶葡萄球菌酶, 其杀菌活性大大降低, 低于原酶活的 1%。为了减少修饰对酶活的影响, 必须依据溶葡萄球菌酶的构效关系, 选择那些活性区域以外的残基作为修饰位点。由于溶葡萄球菌酶的晶体结构尚未解析, 本文通过对溶葡萄球菌酶结构的分子模拟, 选择 2 个结构域之间的氨基酸残基进行突变和修饰, 在对该连接区的 5 个氨基酸残基进行定点突变和 PEG 定点修饰后发现酶活均发生不同程度的降低, 活性保留率最高的为 T146C 位点, 为原酶活的 20%。分析 PEG 修饰后引起酶生物活性的降低的原因, 可能有以下几方面: 部分位点的 PEG 修饰产生了较大的空间位阻, 从而影响到靶向域与催化域之间的协调作用; PEG 为链状高分子, 在与蛋白表面特定基团偶联时, 不可避免地会在一定程度上遮蔽蛋白表面的活性位点或受体结合部位, 造成其生物活性的降低; PEG 修饰后与未修饰的蛋白相比, 其静电结合性质、疏水性、构象等物理化学性质会发生改变, 与受体连接的亲和力经常受到这些理化性质变化的影响而降低^[25-27]。推测可能是以上多种因素综合影响最终导致溶葡萄球菌酶的催化活性的下降。因此在进行 PEG 修饰时, 如何充分考虑蛋白质药物的 PK (药代动力学) 和 PD (药效学) 特征来选择合适的修饰位点以期得到最优的修饰效果, 仍将

是我们的研究课题。

总之, 本研究成功获得定点 PEG 修饰的溶葡萄球菌酶, 同时建立了高效、快速、简便的 PEG 巯基定点修饰溶葡萄球菌酶的方法。为利用 PEG 修饰方法来定向改造溶葡萄球菌酶, 提高其药效的应用研究打下了基础, 同时也为该酶用于治疗金葡菌所致的全身感染提供物质基础。

REFERENCES

- [1] Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med, 1998, 339(8): 520-532.
- [2] Archer GL, Climo MW. *Staphylococcus aureus* bacteremia-consider the source. N Engl J Med, 2001, 344(1): 55-56.
- [3] Wu AH, Ren N, Wen XM, et al. One-day prevalence survey of nosocomial infection in 159 hospitals. Chin J Infect Control, 2005, 4(1): 12-17.
吴安华, 任南, 文细毛, 等. 159 所医院医院感染现患率调查结果与分析. 中国感染控制杂志, 2005, 4(1): 12-17.
- [4] Deresinski S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. Clin Infect Dis, 2005, 40(4): 562-573.
- [5] 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.
- [6] Roberts MJ, Bentley MD, Harris JM. Chemistry for peptide and protein PEGylation. Adv Drug Deliv Rev, 2002, 54(4): 459-476.
- [7] Surovtsev VI, Borzenkov VM, Fedorov TV, et al. Ionogenic groups in the active site of lysostaphin. Kinetic and thermodynamic data compared with x-ray crystallographic data. Biochemistry (Mosc), 2007, 72(9): 989-993.
- [8] Bochtler M, Odintsov SG, Marcyjaniak M, et al. Similar active sites in lysostaphins and D-Ala-D-Ala metalloproteinases. Protein Sci, 2004, 13(4): 854-861.
- [9] Kumar JK. Lysostaphin: an antistaphylococcal agent. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 80(4): 555-561.
- [10] Baba T, Schneewind O. Target cell specificity of a

- bacteriocin molecule: a C-terminal signal directs lysostaphin to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. EMBO J, 1996, 15(18): 4789–4797.
- [11] Gründling A, Schneewind O. Cross-linked peptidoglycan mediates lysostaphin binding to the cell wall envelope of *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 2006, 188(7): 2463–2472.
- [12] Warfield R, Bardelang P, Saunders H, et al. Internally quenched peptides for the study of lysostaphin: an antimicrobial protease that kills *Staphylococcus aureus*. Org Biomol Chem, 2006, 4(19): 3626–3638.
- [13] Zuo SS, Lundahl P. A micro-Bradford membrane protein assay. Anal Biochem, 2000, 284(1), 162–164.
- [14] Kokai-Kun JF, Walsh SM, Chanturiya T, et al. Lysostaphin cream eradicates *Staphylococcus aureus* nasal colonization in a cotton rat model. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(5): 1589–1597.
- [15] Walsh S, Kokai-Kun J, Shah A, et al. Extended nasal residence time of lysostaphin and an anti-staphylococcal monoclonal antibody by delivery in semisolid or polymeric carriers. Pharm Res, 2004, 21(10): 1770–1775.
- [16] McCoy M. Killing staph together: Start-up Biosynex places fermentation project in newly started Avecia facility. Chem Eng News, 2004, 82(14): 36–40.
- [17] Kokai-Kun JF, Chanturiya T, Mond JJ. Lysostaphin as a treatment for systemic *Staphylococcus aureus* infection in a mouse model. J Antimicrob Chemother, 2007, 60(5): 1051–1059.
- [18] Ryan SM, Mantovani G, Wang X, et al. Advances in PEGylation of important biotech molecules: delivery aspects. Expert Opin Drug Deliv, 2008, 5(4): 371–383.
- [19] Veronese FM, Pasut G. PEGylation, successful approach to drug delivery. Drug Discov Today, 2005, 10(21): 1451–1458.
- [20] Balan S, Choi JW, Godwin A, et al. Site-specific PEGylation of protein disulfide bonds using a three-carbon bridge. Bioconjug Chem, 2007, 18(1): 61–76.
- [21] Doherty DH, Rosendahl MS, Smith DJ, et al. Site-specific PEGylation of engineered cysteine analogues of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Bioconjug Chem, 2005, 16(5): 1291–1298.
- [22] Shaunak S, Godwin A, Choi JW, et al. Site-specific PEGylation of native disulfide bonds in therapeutic proteins. Nat Chem Biol, 2006, 2(6): 312–313.
- [23] Li ZH, Hu MC, Yan LM, et al. Site-specific PEGylation of engineered cysteine analogues of recombinant human interleukin-11. China Biotechnol, 2009, 29(6): 20–24.
李智华, 胡满仓, 阎玲梅, 等. 人白细胞介素 11 的定点聚乙二醇修饰. 中国生物工程杂志, 2009, 29(6) : 20–24.
- [24] Wu J, Hu ZY, Lv XB, et al. Chemical modification of activated polyethylene glycol to lysozyme and granulocyte colony-stimulating factor. Chin J Biochem Pharma, 2004, 25(1): 8–10.
吴洁, 胡卓逸, 吕小斌, 等. 聚乙二醇对溶菌酶和粒细胞集落刺激因子的初步化学修饰. 中国生化药物杂志, 2004, 25(1): 8–10.
- [25] Hao SJ, Wang YJ, Kang AJ, et al. Site-specific PEGylation of recombinant human non-glycosylated erythropoietin and characterization of the mono-PEGylated conjugate. Chem J Chin Univ, 2010, 31(11): 2239–2245.
郝素娟, 汪音爵, 康爱君, 等. 非糖基化促红细胞生成素的聚乙二醇定点修饰及修饰产物性质. 高等学校化学学报, 2010, 31(11): 2239–2245.
- [26] Zhang B. Cloning, expression, purification and PEGylation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor and biology activity *in vitro* and *in vivo*[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2008.
张兵. 重组人粒细胞集落刺激因子的克隆、表达、纯化和 PEG 单修饰以及修饰前后的体内外生物学活性[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2008.
- [27] Ma TT. Research on the PEGylation of recombinant human granulocyte and macrophage colony-stimulating factor[D]. Changchun: Jilin University, 2007.
马婷婷. 重组人粒细胞巨噬细胞刺激因子聚乙二醇化修饰研究[D]. 长春: 吉林大学, 2007.