链球菌噬菌体透明质酸裂解酶的异源表达及酶学性质表征

延泉德[1]，马 瑞[2]，邱 旭[1]，吴金鸿[3]，张 勇[1]*

（1. 上海交通大学生命科学技术学院，微生物代谢国家重点实验室，上海 200240；2. 菏泽市立医院，山东菏泽 274000；
3. 上海交通大学农业生物技术学院，食品科学与工程系，上海 200240）

摘要：透明质酸酶是一类能降解透明质酸的酶的总称，在生物医药及药物递送等多方面具有重要的应用价值。为了挖掘高活性、高底物特异性及高稳定性的透明质酸酶，对来自链球菌噬菌体的透明质酸裂解酶（HylP）进行了异源表达及酶学性质表征。结果表明 HylP 由 337 个氨基酸残基构成，是多糖裂解酶家族 16（PL16）新成员，重组 HylP 可在大肠埃希菌 BL21（DE3）中可溶性表达，纯化产率可达到 30 mg/L，最适酶活反应条件为 40 ℃、pH 6.0，且在 35 ℃及 pH 6.0 ～ 7.0 的中性条件下较为稳定。HylP 专一性作用于透明质酸，比活力为 24 u/mg；该酶的米氏常数（K_m）为 0.13 mg/mL，催化常数（k_{cat}）为 13.80 s^{-1}，具有较好的催化活性。链球菌噬菌体来源的 HylP 具有中温、高特异性、高酶活的特性，在绿色制备功能性低分子透明质酸上有潜在应用价值。

关键词：透明质酸裂解酶；噬菌体；重组；异源表达；酶学性质

中图分类号：Q816、Q814.1 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255（2023）01-0067-08

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.01.008

Heterologous Expression and Enzymatic Property Characterization of Hyaluronate Lyase from *Streptococcus* Bacteriophage

YAN Quande[1], MA Rui[2], QIU Xu[1], WU Jinhong[3], ZHANG Yong[1]*

(*1. State Key Lab. of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240; 2. Heze Municipal Hospital, Heze 274000; 3. Dept. of Food Science & Technology, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240*)

ABSTRACT: Hyaluronidase is capable of degrading hyaluronic acid (HA) and has essential applications in biological medicine and drug delivery. The hyaluronate lyase (HylP) from *Streptococcus* bacteriophage was heterologously expressed and characterized in order to explore hyaluronidase with high activity, high substrate specificity and high stability. The results showed that HylP consisted of 337 amino acids belonged to the polysaccharide lyase family 16 (PL16). The recombinant HylP could be expressed as a soluble form in *Escherichia coli* (DE3) with purified yield of 30 mg/L. The optimal temperature of recombinant HylP was 40 ℃, and the optimal pH value was 6.0. The HylP was stable under the temperature of 35 ℃ and pH 6.0 − 7.0, and it could degrade HA specifically with an activity of 24 u/mg. Enzymatic kinetic analysis showed that Michealis constant (K_m) and catalytic constant (k_{cat}) of HylP towards HA were 0.13 mg/mL and 13.80 s^{-1}, respectively. In conclusion, HylP was a mesophilic, highly specific and active lyase towards HA, which had a potential application in producing functional low molecular weight HA.

Key Words: hyaluronate lyase; bacteriophage; recombination; heterologous expression; characterization

透明质酸（hyaluronic acid，HA）是由 D- 葡萄糖醛酸和 *N*- 乙酰氨基葡萄糖以 β-1,3- 糖苷键连接构成二糖单元，再以 β-1,4- 糖苷键连接而成的高分子糖胺聚糖[1]。HA 作为细胞间基质的主要成分，

收稿日期：2022-05-12

基金项目：国家重点研发计划（2019YFD0901901）

作者简介：延泉德（1995—），男，硕士研究生，专业方向：应用酶学。

通信作者：张 勇（1977—），男，博士，副研究员，从事酶分子机制及酶工程研究。

E-mail：yzhang2011@sjtu.edu.cn

对细胞的黏附、迁移和分化都有重要作用。不同相对分子质量的HA以其独特的理化性质在机体内有不同的生理功能，高分子HA（5×10^6 ～ 2×10^{11}）有较强的保湿性和润滑性，常被制成注射液治疗关节炎症，以及制成滴眼液润滑眼球等；低分子HA（1×10^4 ～ 5×10^4）则具有促进骨生成与免疫调节等功能；寡聚HA（$<1\times10^4$）具有促进血管生成、刺激内皮细胞增殖等生理作用。

透明质酸酶（hyaluronidase，HAase）是一类分解HA的酶的总称[2]。根据酶的底物特异性和作用机制不同，可将HAase分为3类。第1类多来源于哺乳动物以及动物毒液，如牛睾丸、蜂毒等，为内切-β-*N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶（EC 3.2.1.35），可特异性水解二糖单元间的β-1,4-糖苷键，生成四糖或者六糖终产物；第2类多来源于水蛭唾液腺，为内切-β-葡糖苷酸酶（EC 3.2.1.36），可水解二糖单元内的β-1,3-糖苷键，生成四糖终产物；第3类多来源于微生物，属于透明质酸裂解酶（hyaluronate lyase，HylP，EC 4.2.2.1），可裂解二糖单位间的β-1,4-糖苷键，生成不饱和二糖。在医疗及美容领域，HAase有广泛应用，如从牛和绵羊的睾丸中提取的HAase可用于局部浸润麻醉、作为药物注射添加剂促进机体对药物的吸收及鞘内注射用以治疗结核性脑膜炎；而重组人HAase可用于治疗注射HA后引发的术后并发症，如血运障碍、血管栓塞等[3]。HAase在工业中可用于制备低分子及寡聚HA，具有重要的实用价值[4]。生物酶法的特异性好，且具有反应温和、重复性好、降解可控等优点[5—6]。

噬菌体是能够侵染细菌、真菌、放线菌或螺旋体等微生物的病毒。一些噬菌体在与寄主微生物共进化的过程中，产生了多种多糖解聚酶来降解宿主细胞表面的多糖基质，促进自身与细菌的膜表面结合以完成侵染。化脓性链球菌（*Streptococcus pyogenes*）即A组链球菌，是一种革兰阳性致病球菌，主要通过呼吸道和皮肤接触感染宿主，一定条件下可引发猩红热、风湿性心脏病等。目前已知*S. pyogenes*菌株基因组编码数个HAase，其中含有注释为噬菌体来源的HylP[7]。由于天然噬菌体蛋白分离纯化困难，对噬菌体HylP的酶学特性了解相对较少。本研究对链球菌噬菌体的HylP进行了异源重组表达及酶学性质表征。结果显示纯化得到的重组HylP为同源三聚体，在35 ℃及中性pH条件下稳定，能特异性降解HA，在绿色制备功能性低分子HA中有潜在应用价值。

1　仪器与试药

M1282-0002型恒温摇床（德国New Brunswick Scientific公司）；CR21G Ⅲ型冷冻高速离心机（日本日立公司）；UH-06型高压均质机（上海永联生物科技有限公司）；AKTApurifier™ 10型蛋白质快速纯化系统、Superdex 200 increase 10/300 G凝胶过滤预装柱（美国GE Healthcare公司）；Nanodrop 2000型微量分光光度计、QuantStudio 5实时荧光定量聚合酶链式反应（PCR）系统（美国Thermo Fisher Scientific公司）；UV-2550型紫外分光光度计（日本岛津公司）；SpectraMax M3型酶标仪（美国Molecular Devices公司）。

高分子HA（批号210729）购自山东丰泰生物科技有限公司；蛋白Marker购自美国Bio-Rad公司；咪唑（批号A600277-0500）、考马斯亮蓝（批号A600038-0100）、牛血清蛋白（批号C102301-0002）、硫酸卡那霉素（批号A506636-0100）和异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside，IPTG，批号A100487-0100）购自生工生物工程（上海）股份有限公司；SYPRO Orange染料购自美国Thermo Fisher Scientific公司；TLC Silica gel 60 F_{254}购自美国默克公司；Ni-NTA Beads购自常州天地人和生物科技有限公司；肉膏蛋白胨（Luria-Bertani，LB）培养基及不同pH值的磷酸盐缓冲液（PBS）购自上海睿谷生物科技有限公司；其他化学试剂均为分析纯，购自上海泰坦科技股份有限公司。

使用在线密码子优化工具将*S. pyogenes*噬菌体HylP（protein accession：WP 159330802）序列进行大肠埃希菌（*Escherichia coli*）宿主表达优化，交深圳华大基因科技有限公司合成，所得产物经限制性内切酶Noc Ⅰ/Xho Ⅰ双酶切后亚克隆到pET28a(+)载体中，获得质粒pET28A-HylP。*E. coli* BL21（DE3）感受态细胞购自上海新格元生物科技有限公司。

2　方法与结果

2.1　HylP序列分析

检索美国国家生物技术信息中心（National

Center for Biotechnology Information，NCBI）的数据库，获得 *S. pyogenes* 噬菌体 HylP 序列。HylP 由 337 个氨基酸构成，通过 SignalP 5.0 工具（http://www.cbs.dtu.dk/servi Ces/Signa LP/）对该蛋白进行信号肽预测，结果未见信号肽特征序列，推测该蛋白为胞内表达[8]。根据碳水化合物活性酶数据库（CAZy 数据库）信息，多数已报道的、细菌来源的 HAase 分布于多糖裂解酶（polysaccharide lyase，PL）的 PL8 和 PL16 家族[9]。为了分析 HylP 的蛋白序列进化特征，利用 MEGA 11.0 软件，将 HylP 蛋白序列与 PL16 家族、PL4 家族和 PL8 家族的已知序列的多个酶蛋白构建邻接（neighbor-joining）树，进行聚类分析。结果 *S. pyogenes* 基因组中的 HylP 与 PL16 家族的多个酶聚为一个深分支的簇，表明 HylP 属于多糖裂解酶 PL16 家族（图 1）。目前，仅 4 个来自 PL16 家族的 HAase 开展过酶学鉴定和结构研究，HylP 与这些已鉴定酶的氨基酸序列的相似度约为 70%。

2.2 HylP 的异源表达和纯化

LB 液体培养基 /（$g\cdot L^{-1}$）：胰蛋白胨 110、氯化钠 10、酵母粉 5；121 ℃，灭菌 20 min。

LB 固体培养基 /（$g\cdot L^{-1}$）：胰蛋白胨 110、氯化钠 10、酵母粉 5，琼脂粉 15；121 ℃，灭菌 20 min。

将构建的 pET28a-HylP 质粒 500 ng 加至 *E. coli* BL21（DE3）感受态细胞 100 μL 中，冰上放置 30 min 后，于 42 ℃热激 90 s，加入少量无抗性 LB 液体培养基后，在 37 ℃中复苏 1 h，涂板于含 50 mg/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基上，37 ℃培养 15 h。挑取阳性单克隆菌落，接种于含 50 mg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基 10 mL 中，在 37 ℃、220 r/min 条件下过夜培养，然后照 1%的比例转接至含 50 mg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基 1.0 L 中，于 37 ℃、220 r/min 条件下进行振荡培养。在 OD_{600} 达到 0.8 ～ 1.0 时，将培养温度调节至 20 ℃，加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导培养 18 h。诱导结束后，离心（6 000×*g*）20 min 收集 *E. coli* 细胞。将细胞重悬于缓冲液（含 200 mmol/L Tris-HCl 和 500 mmol/L NaCl，pH 8.0）40 mL 中，使用高压均质机进行破碎，离心（13 000×*g*）40 min，取上清液，即得到粗酶液。

将粗酶液通过 Ni-NTA 预装重力柱进行亲和色谱纯化，用洗脱液（含 200 mmol/L Tris-HCl、500 mmol/L NaCl 和 200 mmol/L 咪唑，pH 8.0）进行洗脱。在 *E. coli* 中被诱导表达的是与 C 端 6×His 标签重组的 HylP，通过 Compute pI/Mw 工具在线计算，结果显示理论相对分子质量约为 37 420，等电点为 8.41。经 Ni 柱亲和色谱纯化后证实重组 HylP 为可溶性表达，通过微量分光光度计测定蛋白浓度，计算得产率约为 30 mg/L。采用 12%的 SDS-PAGE 对所得蛋白进行分析（电压 200 V，考马斯亮蓝染色），再使用脱色液［冰乙酸、乙醇和水（体积比 2 ∶ 1 ∶ 17）的混合液］进行脱色，得到 SDS-PAGE 图。结果表明，重组 HylP 纯化后纯度达到 90%以上，相对分子质量约为 38 000，与理论值（37 420）接近（图 2A）。使用 Superdex 200 increase 10/300 G 凝胶过滤预装柱于蛋白质快速纯化系统上进行凝胶过滤色谱分析，结果显示出峰位置在 13 mL。对比同样色谱条件下的标准蛋白相对分子质量，显示该出峰位置相应的相对分子质量约为 120 000，表明重组 HylP 在溶液中以同源三聚体的形式存在（图 2B）。

2.3 HylP 的最适反应温度、热稳定性与熔解温度（T_m）考察

标准酶活测试：将 HylP（10 μg/mL）50 μL 加至 HA 反应液（2 mg/mL，溶于 pH 6.0 PBS）450 μL 中，于 40 ℃水浴中反应 10 min，煮沸 5 min 以终止反应，使用酶标仪检测反应液于 232 nm 处的吸光度值变化，测定酶活。以煮沸失活的酶蛋白同上进行酶活测试，作空白对照。平行试验 3 次。将酶催化反应在 232 nm 波长下每 1 min 产生 1 μmol 不饱和双键所需的酶量定义为一个酶活单位，分子消光系数值为 5 500 $L\cdot mol^{-1}\cdot cm^{-1}$。

按上述标准酶活测试方法，分别在 25、30、35、40、45、50、55 和 60 ℃下反应，分析温度对 HylP 活性的影响。结果表明 HylP 的最适反应温度为 40 ℃，之后随温度升高，酶活逐渐下降，50 ℃时相对活性下降到 20%，60 ℃可使 HylP 完全失活

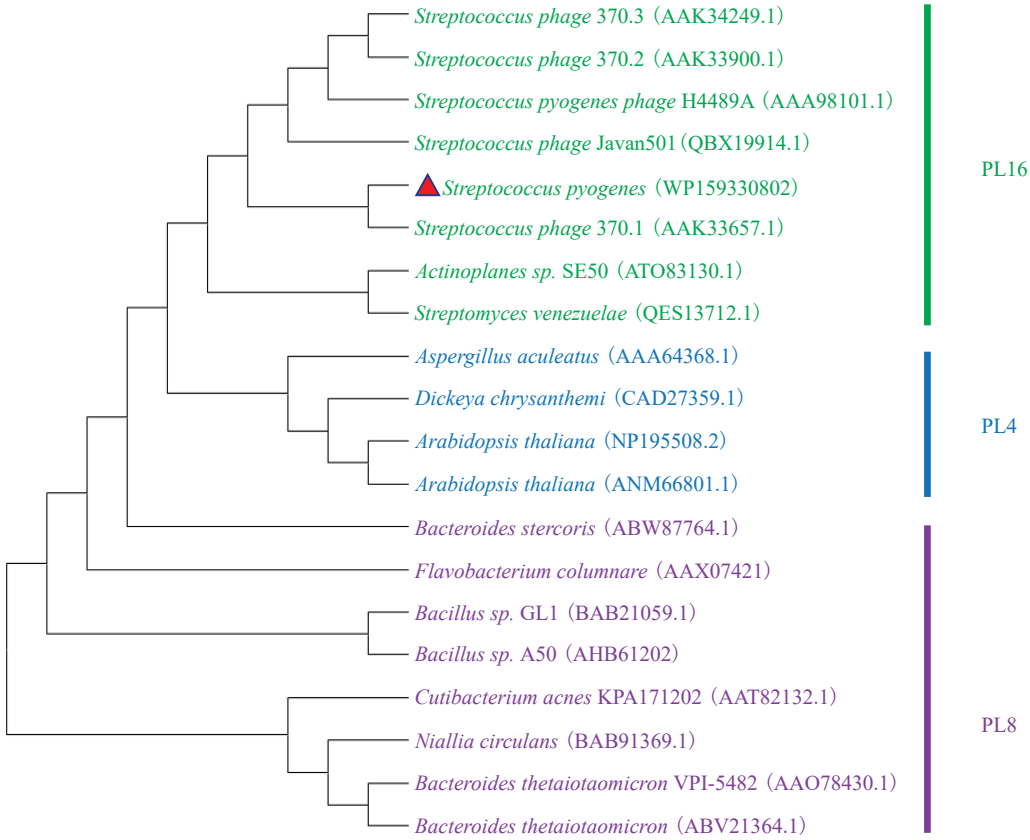
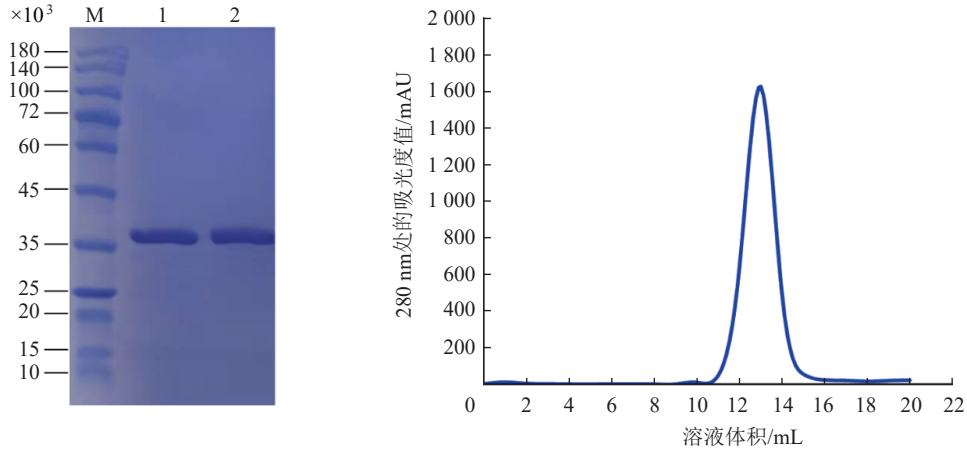


图 1　HylP 与 PL16、PL4 和 PL8 家族中的一些多糖裂解酶构建的系统发育分析

Fig.1　Phylogenetic Analysis of HylP and Several Polysaccharide Lyases from PL16, PL4 and PL8 Family



A—重组 HylP 的 12% SDS-PAGE 分析（M—蛋白 Marker；泳道 1—200 mmol/L 咪唑洗脱液；泳道 2—Superdex 凝胶过滤色谱纯化后的蛋白）；B—HylP 的 Superdex 200 凝胶过滤色谱分析。

图 2　*S. pyogenes* 噬菌体 HylP 的重组表达与纯化

Fig.2　Recombinant Expression and Purification of HylP from Bacteriophage of *S. pyogenes*

（图 3A）。

为分析酶的热稳定性，将 10 μg/mL HylP 分别置 35、40、45 和 50 ℃水浴中孵育，在 0、20、60、80 和 100 min 时分别取 HylP 进行标准酶活性测试。结果表明，35 ℃下酶活较为稳定，相对活性约为 80%，随温度升高，酶活逐渐降低；50 ℃热处理 100 min 后，仅保留 25%相对活性（图 3B）。

T_m 表示蛋白去折叠一半时的温度，常被作为衡量蛋白热动力学稳定性的重要参数。本研究通过差示扫描荧光法测定了 HylP 的熔解温度，将 100×SYPRO Orange 荧光染料 1.0 μL 与 0.2 mg/mL 重组 HylP 19.0 μL 于八连管中混匀，在荧光定量 PCR 仪中程序性升温（25 ～ 70 ℃），连续扫描荧光信号变化以分析荧光值改变点相对应的温度值。平行试验 3 次。结果表明重组 HylP 是 T_m 值为 41 ℃的中温酶（图 3C）。

2.4 HylP 的最适反应 pH 值及 pH 稳定性

按“**2.3**”项下标准酶活性测试条件，分别在枸橼酸 - 枸橼酸钠缓冲液（pH 4.0）、Na_2HPO_4-NaH_2PO_4 缓冲液（pH 5.0 ～ 7.0）、Tris-HCl 缓冲液（pH 8.0 ～ 9.0）中进行酶活测试，确定最适反应 pH 值。结果表明 HylP 是中性 HAase，该酶的最适反应发生在 pH 6.0（图 4A）。

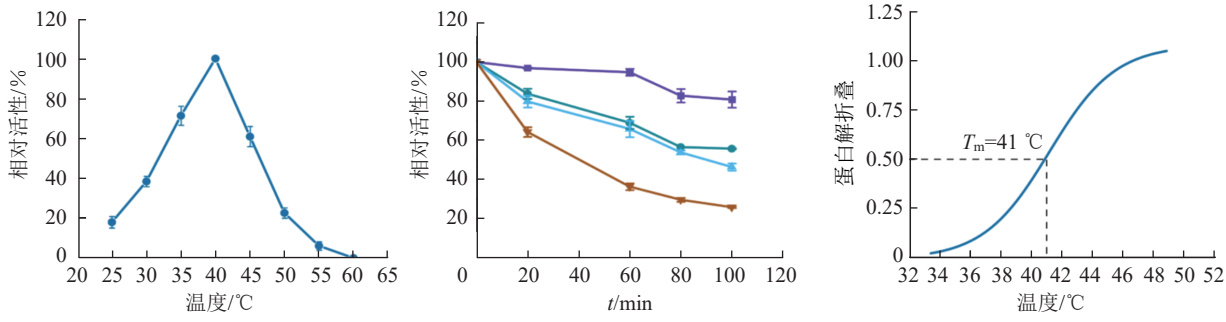
为分析 HylP 的 pH 稳定性，分别用枸橼酸 - 枸橼酸钠缓冲液 pH 4.0、Na_2HPO_4-NaH_2PO_4 缓冲液（pH 5.0 ～ 7.0）、Tris-HCl 缓冲液（pH 8.0 ～ 9.0）稀释 HylP 至终质量浓度为 10 μg/mL，于 4 ℃放置 6 h，按“**2.3**”项下方法进行活性分析。结果显示，HylP 在 pH 6.0 ～ 7.0 稳定性较好，pH 6.0 条件下孵育 6 h 仍保持了 95%相对活性，而在酸性（pH 3.0 ～ 4.0）以及碱性（pH 8.0～9.0）条件下的酶活大幅下降（图 4B）。在 pH 8.0 条件下孵育 6 h 后，酶完全失去活性，原因可能是 pH 8.0 接近 HylP 蛋白理论等电点 8.41，造成了蛋白可溶性下降。

2.5 金属离子及表面活性剂对 HylP 活性影响

金属离子及表面活性剂对酶常有激活或抑制作用，为了分析各种金属离子对 HylP 催化活性的影响，于反应体系中分别加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 KCl、LiCl、$NiCl_2$、$CaCl_2$、$BaCl_2$、$MgCl_2$、EDTA、SDS，按“**2.3**”项下标准酶活测试方法进行活性分析。结果表明，与不加金属离子的对照组相比，金属离子 Ni^{2+} 和 Mg^{2+} 对酶活几乎无影响，而 K^+、Li^+、Ca^{2+} 与 Ba^{2+} 均轻微地抑制 HylP 的活性，EDTA 则能轻微地增强酶催化活性，SDS 几乎完全抑制了 HylP 的活性（图 5）。

2.6 HylP 的催化特异性

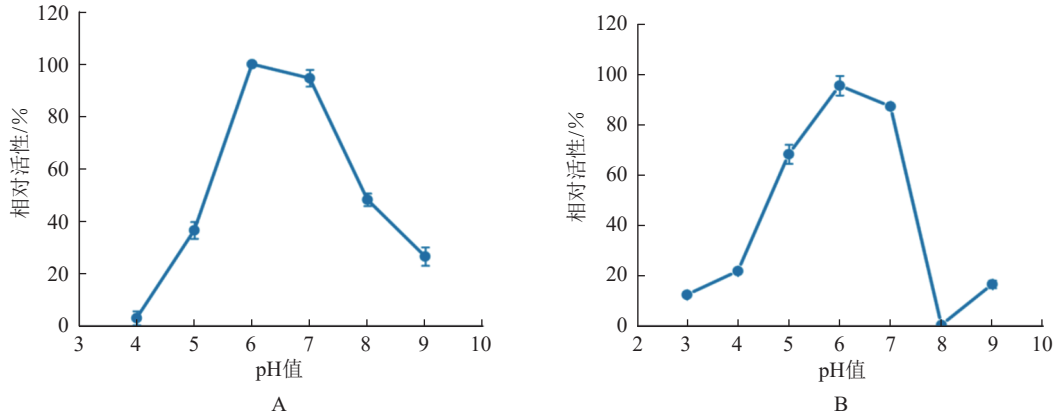
不同来源的 HAase 催化底物的特异性有所差异，一些 HAase 除了分解 HA，还可降解其他的糖胺聚糖[10]。为了分析重组 HylP 的底物特异性，使用 pH 6.0 的 50 mmol/L PBS 分别配制 2 mg/mL 的



A—重组 HylP 在 25 ～ 60 ℃下的相对活性 - 时间曲线；B—不同温度下重组 HylP 的热稳定性（■—35 ℃；●—40 ℃；▲—45 ℃；▼—50 ℃）；C—重组 HylP 的差示扫描荧光图。

图 3 HylP 在不同温度下的活性与热稳定性分析（n=3）

Fig.3 Activity and Thermal Stability Analysis of HylP at Different Temperatures (n=3)



A—重组 HylP 在 pH 4.0 ～ 9.0 条件下的相对活性分析；B—重组 HylP 在 pH 4.0 ～ 9.0 条件下的稳定性分析。

图 4　HylP 的最适反应 pH 值及 pH 稳定性（*n*=3）

Fig.4　Optimal Reaction pH and pH Stability of HylP (*n*=3)

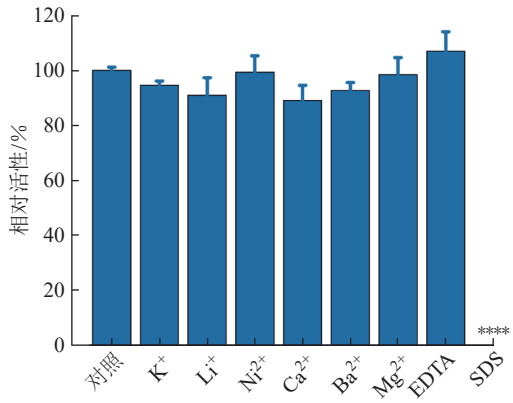


图 5　金属离子、表面活性剂及螯合剂对 HylP 活性的影响（**** 表示 *P*<0.000 1；*n*=3）

Fig.5　Effects of Metal Ions, Surfactants and Chelators on HylP Activity (**** Represents *P*<0.000 1; *n*=3)

HA、硫酸软骨素 A 钠盐、硫酸软骨素 C 钠盐、海藻酸钠溶液。将 HylP 与不同的底物混合反应后按“**2.3**”项下方法进行活性测试，确定酶底物的特异性。3 次平行试验结果显示，重组 HylP 无法降硫酸软骨素 A 钠盐、硫酸软骨素 C 钠盐和海藻酸钠（重组 HylP 的相对活性都为 0），仅特异性降解 HA，比活为（24±0.46）u/mg，相对活性为 100%。

2.7　HylP 的酶催化动力学分析

用 PBS（50 mmol/L，pH 6.0）配制质量浓度分别为 0.062 5、0.125 0、0.187 5、0.312 5、0.365 0、0.500 0 和 0.600 0 mg/mL 的 HA 溶液。将 10 μg/mL 的 HylP 溶液 50 μL 加至不同质量浓度的 HA 溶液 450 μL 中，于 40 ℃水浴中反应 3 min 后，煮沸 5 min 以终止反应。将反应液于 232 nm 下检测吸光度，计算其变化值，利用 GraphPad Prism 8 软件进行 Michaelis-Menten 方程分析，计算动力学参数。结果（图 6）显示，酶动力学参数 V_{max} 为 0.02 μmol/min，米氏常数 K_m 为 0.13 mg/mL，催化常数 k_{cat} 为 13.80 s^{-1}。

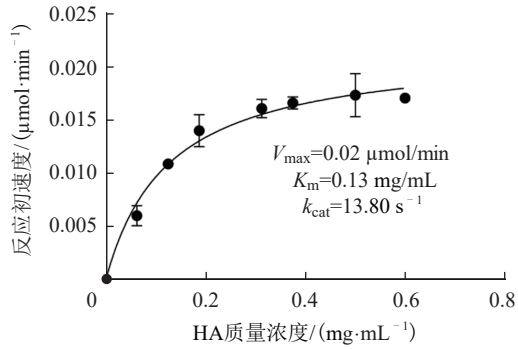


图 6　HylP 的米氏动力学分析（*n*=3）

Fig.6　Michaelis-Menten Kinetic Analysis of HylP (*n*=3)

2.8　HylP 对 HA 的降解过程分析

为了探究 HylP 降解 HA 的过程，将重组 HylP（10 u/mL）50 μL 加至 HA 溶液（2 mg/mL）450 μL 中，在 35 ℃条件下分别孵育 0、1、5、10、20、30 和 60 min。用薄层色谱（TLC）法对不同时间的降解产物进行分析。在硅胶薄层板上上样 1.0 μL，吹干后，放入含有展开剂［正丁醇、乙酸和水（体积比

2 ∶ 1 ∶ 1）的混合液］的展开缸中，2 次展层后，使用显色剂［丙酮、磷酸、苯胺和二苯胺（体积比 50 ∶ 5 ∶ 1 ∶ 1）的混合液］进行显色。通过 TLC 对 HylP 降解 HA 的不同时间段进行分析，可见高分子 HA 被降解为数个特定相对分子质量的低分子 HA（图 7），表明重组 HylP 属于内切酶。TLC 分析中未见二糖形式的 HA 终产物，可能是反应体系中添加的酶量不足。

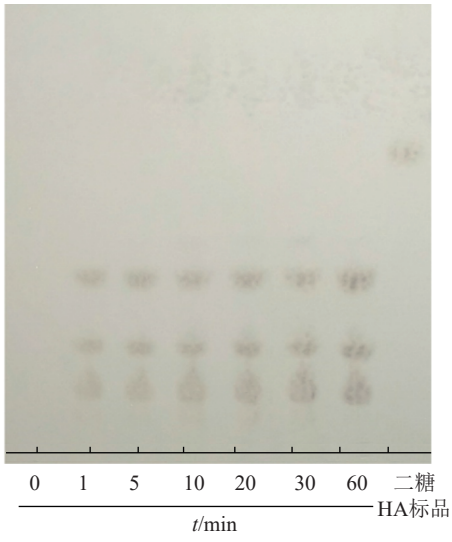


图 7 HylP 降解 HA 过程的 TLC 分析

Fig.7 TLC Analysis of HA Degradation with HylP

3 讨论

噬菌体可以产生糖苷酶降解细菌荚膜基质中的多糖成分，帮助噬菌体更好地侵入细菌。与细菌来源的酶相比，噬菌体酶通常相对分子质量较低、活性较高。为了理解 *S. pyogenes* 噬菌体 HylP 的酶学性质，挖掘可特异性分解 HA 的新酶，本研究在 *E. coli* 中异源表达并鉴定了重组 HylP。系统发育分析表明 *S. pyogenes* 噬菌体 HylP 同样是 PL16 家族酶，与已鉴定的 PL16 家族中 *S. pyogenes* H4489A 噬菌体来源的酶序列同源性较高，反映了这些酶在进化上的高保守性。已知的 PL16 家族的 HAase 催化残基为 Arg、Tyr、Gln，在 232 nm 处检测 HylP 的催化活性，可见明显的吸光度值增加，符合裂解酶通过 β 消除反应将 HA 降解为 4,5- 不饱和透明质酸二糖[11] 的规律。纯化的噬菌体重组 HylP 在分子筛的出峰位置表明其为同源三聚体分子，提示该酶与同源 *S. pyogenes* SF370 噬菌体 HAase 相似，构成了噬菌体的“酶针”，有助于其侵入细菌[12]。

牛睾丸来源的 HAase（Hyal）的最适 pH 值为 5.0，噬菌体重组 HylP 与同家族中的链霉菌属 HAase——rHyal_Sk[13] 相似，最适 pH 值为 6.0，表明这些微生物酶与动物来源酶多为弱酸性和中性酶。噬菌体 HylP 在 pH 6.0 ～ 7.0 范围内稳定性好，且活性受金属离子的影响较小，有利于其在复杂环境中进行催化反应。已鉴定的动物及微生物来源的 HAase 最适反应温度主要分布在 20 ～ 50 ℃，HylP 的最适反应温度为 40 ℃，属于中温酶。HylP 专一性地降解 HA，相似的酶学活性也见于 *S. pyogenes* SF370 及马链球菌（*S. equi*）的噬菌体 HAase[14]。本研究通过紫外法测得 HylP 的比活为 24 u/mg，优于报道 *Thermasporomyces composti* DSM22891 TcHly8C（10.91 u/mg）及 *Vibrio sp.* FC509 CLase Er（13.8 u/mg）[15—16]。HylP 的酶动力学参数 K_m 为 0.13 mg/mL，表明其与底物 HA 有较强的亲和性。HylP 与来自 *S. equi* 的前噬菌体 HAase 相似，均为内切酶[14]。

本研究异源表达、纯化和表征了来自 *S. pyogenes* 噬菌体的 HylP。该酶在弱酸性和中性条件下活性较高，受金属离子的影响较小，能专一性地降解 HA，且与 HA 亲和力强，显示出其在绿色制备生物活性低分子及寡聚 HA 的应用前景。

致谢：上海交通大学分析测试中心王瑞斌博士在蛋白稳定性试验中给予协助。

参考文献：

[1] WEISSMANN B, MEYER K. The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord 1, 2 [J]. *J Am Chem Soc*, 1954, **76**(7): 1753-1757.

[2] 李 漫, 刘建建, 苏江伟, 等. 透明质酸酶的研究进展[J]. 食品与药品, 2019, **21**(4): 336-340.

[3] 陈筑昕, 蒋承安, 刘 凯. 透明质酸酶在透明质酸软组织填充并发症治疗中的应用[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2017, **13**(3): 175-177.

[4] 岑潇龙, 雷 曦, 马诗云, 等. 金黄色葡萄球菌透明质酸裂解酶Hy1S的异源表达与特性研究[J]. 生物技术通报,

2022, **38**(1): 157-167.

[5] 李憬昱, 王凤山. 低分子质量和寡聚透明质酸制备、活性与应用研究进展[J]. 药物生物技术, 2019, **26**(1): 64-68.

[6] 陈怡斐, 李茜茜, 荣绍丰, 等. 重组兽疫链球菌透明质酸酶在大肠杆菌中的表达及其酶活力[J]. 中国医药工业杂志, 2015, **46**(11): 1173-1177.

[7] HYNES W L, HANCOCK L, FERRETTI J J. Analysis of a second bacteriophage hyaluronidase gene from *Streptococcus pyogenes*: evidence for a third hyaluronidase involved in extracellular enzymatic activity [J]. *Infect Immol*, 1995, **63**(8): 3015-3020.

[8] ALMAGRO ARMENTEROS J J, TSIRIGOS K D, SØNDERBY C K, *et al*. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, **37**(4): 420-423.

[9] GARRON M L, CYGLER M. Structural and mechanistic classification of uronic acid-containing polysaccharide lyases [J]. *Glycobiology*, 2010, **20**(12): 1547-1573.

[10] BAKER J R, DONG S L, PRITCHARD D G. The hyaluronan lyase of *Streptococcus pyogenes* bacteriophage H4489A [J]. *Biochem J*, 2002, **365**(Pt1): 317-322.

[11] 雷　曦, 张　蕊, 黄遵锡, 等. 透明质酸酶的研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, **48**(3): 882-895.

[12] SMITH N L, TAYLOR E J, LINDSAY A, *et al*. Structure of a group A *streptococcal* phage-encoded virulence factor reveals a catalytically active triple-stranded β-helix [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, **102**(49): 17652-17657.

[13] MESSINA L, GAVIRA J A, PERNAGALLO S, *et al*. Identification and characterization of a bacterial hyaluronidase and its production in recombinant form [J]. *FEBS Lett*, 2016, **590**(14): 2180-2189.

[14] LINDSAY A M, ZHANG M, MITCHELL Z, *et al*. The *Streptococcus* equi prophage-encoded protein SEQ2045 is a hyaluronan-specific hyaluronate lyase that is produced during equine infection [J]. *Microbiology* (Reading), 2009, **155**(Pt2): 443-449.

[15] LI Y J, ZHANG S L, WU H, *et al*. Biochemical characterization of a thermophilic hyaluronate lyase TcHly8C from thermasporomyces composti DSM22891 [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, **165**(Pt A): 1211-1218.

[16] PENG C N, WANG Q B, WANG S M, *et al*. A chondroitin sulfate and hyaluronic acid lyase with poor activity to glucuronyl 4,6-*O*-disulfated *N*-acetylgalactosamine (E-type)-containing structures [J]. *J Biol Chem*, 2018, **293**(12): 4230-4243.