

# 猪精液酸性N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶的 纯化及性质\*

黄小红 罗忠宝 黄一帆\*\* 陈欣颖 黄俊平

(福建农林大学动物科学学院动物保健研究所 福州 350002)

**摘要** 以杜洛克猪精液为材料, 采用硫酸铵分级沉淀、DEAE-32阴离子交换柱层析和Sephadex G-100分子筛柱层析纯化, 获得纯化倍数为27.64、比活力为1 773.25 U mg<sup>-1</sup>的酸性N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶纯酶制剂。经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定, 纯酶两种亚基相对分子质量分别为129.13×10<sup>3</sup>和62.24×10<sup>3</sup>。对其酶学性质的研究结果表明, 酶的等电点为5.10, 最适pH值为5.5, 最适温度为60 ℃。酶在pH 3.6~9.2、温度10 ℃~55 ℃的范围内较稳定。以对硝基苯-N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷(pNP-NAG)为底物, 测得米氏常数K<sub>m</sub>为0.455 mmol L<sup>-1</sup>, 最大反应速度V<sub>m</sub>为17.34 μmol L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, 活化能为41.70 kJ mol<sup>-1</sup>。图8 表1 参15

**关键词** 猪精液; 酸性N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶; 纯化; 酶学性质

CLC Q556.2 : Q959.842.06

## Purification and Properties of the Acidic N-acetyl-β-D-glucosaminidase from Porcine Semen\*

HUANG Xiaohong, LUO Zhongbao, HUANG Yifan\*\*, CHEN Xinying & HUANG Junping

(Institute of Animal Health, College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract** The acidic N-acetyl-β-D-glucosaminidase (EC3.2.1.52) was purified from the porcine semen by ammonium sulfate fractionation, chromatography on DEAE-32 and Sephadex G-100. The specific activity of the enzyme was 1 773.25 U mg<sup>-1</sup>. The purified enzyme preparation was homogeneous judged by polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weights of two subunits of the purified enzyme were determined to be 129.13×10<sup>3</sup> and 62.24×10<sup>3</sup>, respectively. The pI value was calculated to be 5.10 by isoelectric focusing. The optimum temperature and pH of the enzyme were 60 ℃ and 5.5. The enzyme was stable in the pH ranges from 3.6 to 9.2 under 37 ℃ and at temperature ranges from 10 to 55 ℃. The K<sub>m</sub> and V<sub>m</sub> values were determined to be 0.455 mmol/L and 17.34 μmol L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> at pH 5.6 and at 37 ℃, respectively. The activation energy of the enzyme for hydrolysis of the substrate was 41.70 kJ mol<sup>-1</sup>. Fig 8, Tab 1, Ref 15

**Keywords** porcine semen; acidic N-acetyl-β-D-glucosaminidase; purification; enzyme property

CLC Q556.2 : Q959.842.06

N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(N-acetyl-β-D-glucosaminidase, NAGase, EC 3.3.1.52)广泛分布在动物、植物、昆虫和微生物中<sup>[1-4]</sup>, 为细胞内溶酶体水解酶, 主要水解糖蛋白、几丁质和多糖等分子内的糖苷键。兔子精浆<sup>[5]</sup>和人精子<sup>[6]</sup>有很高的NAGase活性。有研究发现, 依据母水牛发情末期唾液中NAGase的活性变化来确定排卵时间、进行人工授精, 可显著提高产犊率<sup>[7]</sup>。NAGase可以帮助精子穿越透明带<sup>[8]</sup>。当用NAGase处理小鼠卵子, 卵子失去与精子的结合能力<sup>[9]</sup>, 表明精子中的NAGase有可能在受精后, 水解卵子表面参与精卵结合的糖蛋白链, 从而阻止多精受精。可见, 动物体内的NAGase与其繁殖机能有一定的相关性。但是, NAGase在高等动物精卵识别中的作用机理还不清楚, 而NAGase的分离纯化是进行相关研究的基础。

本试验以猪精液为材料, 在分离纯化得到猪精液碱性NAGase<sup>[10]</sup>的基础上, 应用现代生物化学技术纯化酸性NAGase, 研究其理化性质, 为进一步探讨猪精液中的NAGase在猪体内的生理功能以及酶活性与精液品质、繁殖机能之间的关系奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

猪精液系通过人工采精方法从福建厦门大旺种猪场的杜洛克健康猪只采集获得。对硝基苯-N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷(pNP-NAG)为上海医药工业研究院生化室产品; 标准对硝基酚(pNP)为England产品; Sephadex G-100和DEAE-32系Amersham和Whatman产品; SDS-聚丙烯酰胺凝胶平板电泳的标准蛋白采用Amersham次高分子量Marker; 牛血清蛋白为上海楷洋生物技术有限公司产品。

### 1.2 方 法

1.2.1 NAGase活力测定 酶活力的测定参照文献[10]的方法。酶活力单位(U)定义: 在37 ℃条件下, 每L溶液中每min催化水解pNP-NAG产生1 μmol pNP所需的酶量。比活力定义为每

收稿日期: 2009-07-16 接受日期: 2009-08-31

\*福建省自然科学基金项目(No. B0710001)和2006年福建省高等学校新世纪支持计划资助 Supported by the Natural Sciences Foundation of Fujian, China (No. B0710001) and the Project for the Excellent Talents of Universities of Fujian, China

\*\*通讯作者 Corresponding author (E-mail: zjhyfang@163.com)

mg酶蛋白所具有的酶活力单位数。

1.2.2 蛋白浓度测定 采用Folin-酚试剂法<sup>[11]</sup>测定蛋白浓度。

1.2.3 酶的分离纯化 取在-20℃冷冻保存的精液,经多次反复冻融破碎精子细胞,以纱网滤掉精液里的胶状物,按1:1的比例加入4℃预冷的0.01 mol L<sup>-1</sup> Tris-HCl缓冲液(pH 7.5,内含0.2 mol L<sup>-1</sup> NaCl)抽提过夜,4℃10 000 g离心30 min,取上清液,采用硫酸铵分级分离,收集35%~75%饱和度的沉淀蛋白,经溶解透析后得到粗酶制剂。粗酶通过DEAE-32阴离子交换柱层析纯化,采用0~1.5 mol L<sup>-1</sup> NaCl线性梯度的0.01 mol L<sup>-1</sup> Tris-HCl缓冲液洗脱,收集酶活性部分。柱规格为3.0 cm × 20 cm,流速为10 mL h<sup>-1</sup>,自动部分收集,每25 min收集一管,每管4 mL。从DEAE-32阴离子交换柱层析的洗脱管收集的酶液通过Sephadex G-100分子筛凝胶过滤柱层析纯化,采用0.01 mol L<sup>-1</sup> Tris-HCl缓冲液(pH 7.5,内含0.2 mol L<sup>-1</sup> NaCl)洗脱,收集酶液备用。柱规格为2.6 cm × 60 cm,流速为10 mL h<sup>-1</sup>,自动部分收集,每25 min收集一管,每管4 mL。

1.2.4 纯度鉴定 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法。聚丙烯酰胺凝胶电泳的分离胶为7.5%,浓缩胶浓度为10%。采用考马斯亮蓝染色法。

1.2.5 酶分子亚基分子量的测定 酶分子的亚基数及亚基分子量测定采用SDS-聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳法(SDS-PAGE)。分离胶浓度为10%,浓缩胶浓度为10%。采用考马斯亮蓝染色法。

1.2.6 酶分子的等电点测定 采用聚丙烯酰胺等电聚焦圆盘电泳法(电泳管规格为5×100 mm)<sup>[11]</sup>。两性电解质的pH梯度为3.0~9.5。

1.2.7 pH对酶活力的影响和酶的酸碱稳定性 按文献[10]的方法进行。

1.2.8 温度对酶活力的影响和酶的热稳定性 按文献[10]的方法进行。

1.2.9 酶催化pNP-NAG水解的动力学参数测定 在37℃、pH 5.6的测活体系中,改变底物(pNP-NAG)浓度[S],测定酶促反应的初速度(V<sub>0</sub>),以V<sub>0</sub>对[S]作图,以V<sub>0</sub>对[S]<sup>-1</sup>作图,从直线的截距求得NAGase催化底物水解的米氏常数K<sub>m</sub>和最大速度V<sub>m</sub>。

1.2.10 酶催化底物pNP-NAG水解反应的活化能测定 按文献[10]的方法进行。温度设定为37、40、45、50和55℃。

## 2 结果

### 2.1 NAGase的分离纯化及纯度鉴定

猪精液酸性NAGase的纯化图谱见图1。DEAE-32离子交换柱层析图谱中有2个蛋白峰和2个酶活力峰,分别出现在淋洗管和洗脱管(图1-A)。可见猪精液中的NAGase有两种同工酶。洗脱管的酶液经Sephadex G-100分子筛柱层析纯化得到6个蛋白峰和1个酶活力峰(图1-B)。纯化过程的各步参数见表1。所得到的酶制剂经聚丙烯酰胺凝胶电泳只出现一条电泳带(图2)。说明该酶制剂已达电泳纯。

### 2.2 酶的亚基分子量

纯酶经SDS-PAGE垂直板状电泳呈现二条蛋白带(图3-A),根据标准蛋白(分子量分别为200×10<sup>3</sup>、130×10<sup>3</sup>、97×10<sup>3</sup>、66×10<sup>3</sup>和43×10<sup>3</sup>)的电泳迁移率(图3-B)以及NAGase样品的迁移率,可求得猪精液酸性NAGase各亚基分子量分别为129.13×10<sup>3</sup>和62.24×10<sup>3</sup>。

### 2.3 酶的等电点

猪精液酸性NAGase经聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳,测定标准胶条从阳极至阴极的pH梯度,测定结果见图4。根据测定胶上的酶蛋白位置,测定酶蛋白相距阳极的距离,换算

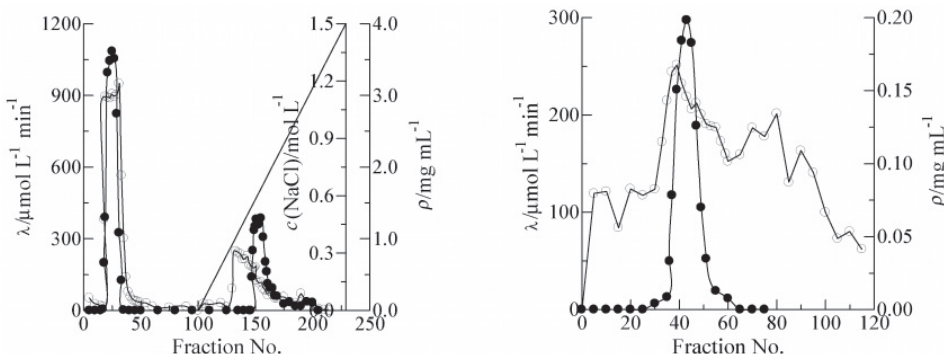


图1 酸性NAGase的DEAE-32图谱(A)和G-100图谱(B)

Fig. 1 Purification chromatography of the acidic NAGase on DEAE-32 (A) and Sephadex G-100 (B)

—●—酶活力; --○-- 蛋白浓度 —●—Enzyme activity; --○-- Protein content

表1 猪精液酸性NAGase分离纯化各步参数

Table 1 Purification parameters of the acidic NAGase from pig semen

纯化步骤 Purification	总蛋白量 Total protein (m/mg)	总活力 Total activity (A/U)	比活力 Specific activity (A/U mg <sup>-1</sup> )	纯化倍数 Purification	回收率 Recovery (r/%)
抽提离心液 Crude preparation	5852.00	374990.91	64.08	1.00	100%
35%~75%硫酸铵沉淀 35%~75% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitation	3638.52	273668.18	75.21	1.17	72.98%
DEAE-32	37.96	21513.48	566.74	8.84	5.74%
G-100	7.17	12714.26	1773.25	27.64	3.39%



图 2 NAGase的PAGE电泳图谱  
Fig. 2 PAGE of the purified acidic β-N-acetyl-D-glucosaminidase

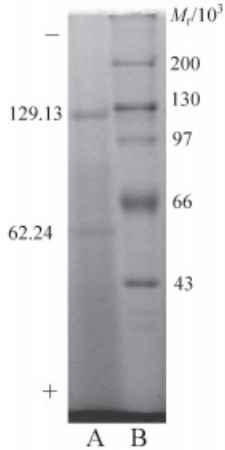


图 3 酸性NAGase的电泳图谱  
Fig. 3 SDS-PAGE and PAGE of the purified acidic β-N-acetyl-D-glucosaminidase

A: 样品; B: 标准蛋白 A: Sample; B Standard protein

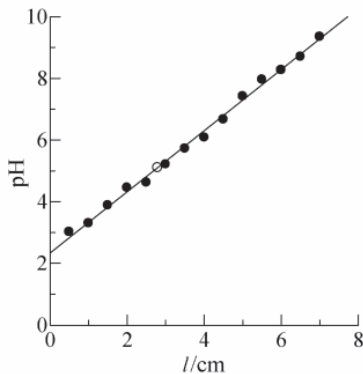


图 4 猪精液酸性NAGase等电点的测定  
Fig. 4 Measurement of isoelectric point of the enzyme by isoelectric focusing electrophoresis

(●) 标准胶条上每隔 0.5 cm 的 pH 测定值 pH at 0.5 cm interval; (○) NAGase 成标准胶条上的相应位置, 从标准胶pH梯度曲线可以求得猪精液酸性NAGase酶分子的等电点pI 为5.10.

2.4 酶的最适pH值与酸碱稳定性

在不同pH值 (3.0~8.9) 条件下测定酶活力, 作pH-酶活力曲线 (图5a). 结果表明, 猪精液酸性NAGase的最适pH为 5.50.

将一定的酶液分别放在不同pH值缓冲液中 (pH 3.0~12.6), 4 °C 放置 24 h 后, 测定酶剩余活力, 结果表明该酶在pH 3.60~9.20范围内较稳定 (图5b).

2.5 酶的最适温度和温度稳定性

在不同温度下测定酶活力, 作温度-酶活力曲线 (图6a), 测得酶最适温度为 60 °C.

将一定的酶液分别放在不同温度下热处理 30 min 后, 测定酶剩余活力, 结果表明酶的温度稳定性较好, 在 10~55 °C 范围内酶活基本保持不变, 高于 55 °C 酶活力迅速下降, 70 °C

完全失活 (图6b).

2.6 酶催化底物pNP-NAG 水解反应的动力学参数测定

在pH 5.50的0.2 mol L<sup>-1</sup>磷酸缓冲液的测活体系中, 改变底物浓度, 37 °C下测定猪精液酸性NAGase催化pNP-NAG水解反应的初速度. 以酶促反应初速度对底物浓度作图, 从图7中内插图观察到在底物浓度小于0.7 mmol L<sup>-1</sup>时, 反应速度随底物的增加而迅速升高并达到最大值; 当底物浓度超过0.7 mmol L<sup>-1</sup>后, 反应速度不再升高, 反而开始下降, 可见底物达到一定浓度后, 底物对酶的催化水解反应表现出抑制作用.

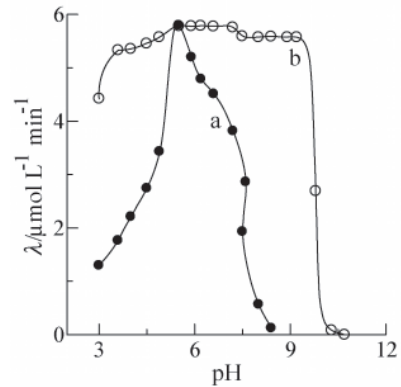


图 5 pH对酸性NAGase的影响 (a) 和酸性NAGase的pH稳定性 (b)  
Fig. 5 Effect of pH on enzyme activity (a) and the pH stability (b)

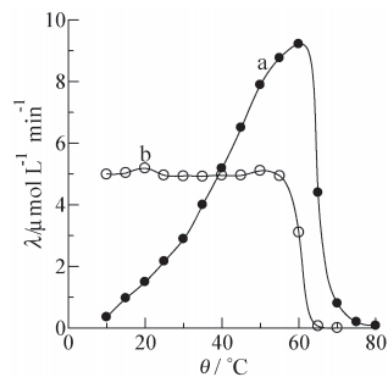


图 6 温度对酸性NAGase活力的影响 (a) 和酸性NAGase的温度稳定性 (b)  
Fig. 6 Effect of temperature on enzyme activity (a) and the temperature stability (b)

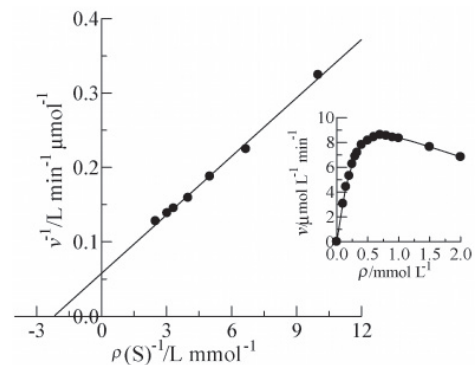


图 7 酸性NAGase催化pNP-NAG水解的Lineweaver-Burk双倒数图  
Fig. 7 Lineweaver-Burk plot of acidic NAGase for hydrolysis of pNP-NAG. The inset shows the relationship between initial rate and substrate

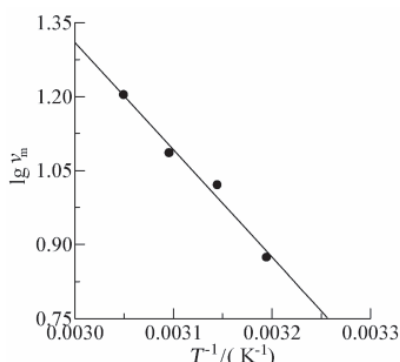


图8 酸性 NAGase 催化底物 pNP-NAG 水解反应的活化能测定  
Fig. 8 Determination of the activation energy of the enzyme for hydrolysis of pNP-NAG

猪精液酸性NAGase催化pNP-NAG水解反应的 $K_m$ 和 $V_m$ 分别为 $0.455 \text{ mmol L}^{-1}$ 和 $17.34 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ .

### 2.7 酶催化底物pNP-NAG水解反应的活化能测定

在不同温度下测定酶催化pNP-NAG水解反应的 $V_m$ 值. 以最大反应速度之对数 $\lg V_m$ 对 $T^{-1}$ 作图, 得到一直线(图8), 直线的方程为 $Y = -2177.66 X + 7.84272$ , 根据此方程计算出酶催化pNP-NAG水解反应的活化能为 $41.70 \text{ kJ mol}^{-1}$ .

## 3 讨论

本研究纯化获得了猪精液酸性的NAGase. 粗酶液经DEAE-32离子交换柱层析纯化时, 酶活力峰出现在洗脱液, 说明在pH 7.50条件下酶蛋白带负电荷, 可与DEAE-32阴离子交换柱进行离子交换后被NaCl洗脱下来. 提示酶蛋白是酸性蛋白质. 经聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳法测定NAGase的pI为5.10, 进一步证实纯化的酶是一种酸性的蛋白.

从SDS-PAGE电泳的结果来看, 猪精液酸性NAGase有两种亚基, 从牛的脾脏分离纯化出的酸性NAGase, 也有两种亚基<sup>[12]</sup>.

正常猪精液的pH值为7.0~7.8, 呈弱碱性. 在这范围, 猪精液中酸性NAGase水解pNP-NAG的能力剩下13.01%~68.31%. 随着pH的增大, 酶活力不断降低. 可见, 生殖道pH值的大小会直接影响酶活性的发挥.

成年猪的正常体温是38~39.5 °C. 猪精液中酸性NAGase的最适温度为60 °C. 在正常的体温条件下, 酶活力只发挥55%左右, 但温度的稳定性较好. 与猪精液中酸性酶不同, 猪碱性NAGase的最适温度为50 °C, 在正常的体温条件下, 酶活力发挥85%左右. 番鸭睾丸NAGase的最适温度为55 °C<sup>[1]</sup>, 日本沼虾NAGase的最适温度为60 °C<sup>[13]</sup>, 中华绒螯蟹NAGase的最适温度为45 °C<sup>[14]</sup>, 而从一株嗜热古细菌中克隆到NAGase基因并在大肠杆菌中表达, 其最适温度高达80 °C<sup>[15]</sup>. 可见, 不同生物来源的NAGase受温度的影响差异较大.

底物浓度对猪精液中两种同工酶的影响程度不同. 当酶浓度不变时, 底物浓度低于 $0.7 \text{ mmol L}^{-1}$ 时, 酸性NAGase符合米氏双曲线方程, 反应的初速度随底物浓度的上升而提高, 当底物浓度达到 $0.7 \text{ mmol L}^{-1}$ 时反应的速度达到最大, 随后反应的速度有降低的趋势, 出现了底物抑制酶活性的现象. 说明当细胞内底物超过一定量时, 酶活性会受到底物的抑制,

即底物浓度可以调节酸性NAGase的活性. 而碱性NAGase同工酶即使底物浓度高达 $2.0 \text{ mmol L}^{-1}$ , 也未见底物抑制酶活性的现象<sup>[10]</sup>.

$K_m$ 是酶的一个重要的特征常数, 反映了酶与底物之间的亲和力. 猪精液酸性NAGase水解pNP-NAG的 $K_m$ 为 $0.455 \text{ mmol L}^{-1}$ , 碱性NAGase水解pNP-NAG的 $K_m$ 为 $1.94 \text{ mmol L}^{-1}$ <sup>[10]</sup>. 猪精液中的两种同工酶催化同一底物的 $K_m$ 差异较大, 说明两种同工酶与底物的亲和力差别很大. 番鸭睾丸NAGase水解pNP-NAG的 $K_m$ 为 $0.215 \text{ mmol L}^{-1}$ <sup>[1]</sup>. 猪精液酸性NAGase与底物pNP-NAG的亲和力要比猪精液碱性NAGase要大, 比番鸭睾丸NAGase的小.

本文对猪精液中酸性NAGase纯化过程和酶学性质的阐明, 不但为进一步探讨猪精液中的酶与精液品质、繁殖机能之间的关系奠定基础, 也为猪体内其他酶的研究提供理论依据和技术借鉴.

## References

- 1 Wang CK (王长康), Huang YF (黄一帆), Huang XH (黄小红), Chen HH (陈宏惠). Preliminary purification and properties of the  $\beta$ -N-acetyl-D-glucosaminidase from *Cairina moschata*. *Acta Veter Et Zootech Sin* (畜牧兽医学报), 2007, **38** (6): 552-557
- 2 Austin PR. Chitin, Chitosan and Related Enzymes. New York, USA: Academic Press, 1984
- 3 Huang XH (黄小红), Chen QX (陈清西), You MS (尤民生), Wang J (王君), Guan X (关雄). Isolation purification and partial characterization of the  $\beta$ -N-acetyl-D-glucosaminidase from the pupae of *Helicoverpa armigera*. *Acta Entomol Sin* (昆虫学报), 2005, **48**: 498-502
- 4 Keyhani NO, Roseman S. The chitin catabolic cascade in the marine bacterium *Vibrio furnissii*. *J Biol Chem*, 1996, **271** (52): 33425-33432
- 5 Farooqui AA, Srivastava PN. Isolation of N-acetylhexosaminidase from rabbit semen and its role in fertilization. *Biochem J*, 1980, **191**: 827
- 6 Xia XZ (夏兴中), Sun C (孙册), Shen ZW (沈昭文). Glycosidases in ejaculated human spermatozoa. *Acta Biochim et Biophys Sin* (生物化学与生物物理学报), 1989, **21** (3): 227-233
- 7 Feng JC (冯健超), Yuan HJ (袁华均), Pan HY (潘厚炎). Relationship between salivary activity of N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase and ovulation time in swamp buffalo cows. *Huazhong (Central China) Agric Univ*, 1997, **16** (4): 357-360
- 8 Miller DJ, Gong X, Shur BD. Sperm require beta-N-acetyl glucosaminidase to penetrate through the egg zona pellucida. *Development*, 1993, **118**: 1279-1289
- 9 Miller DJ, Gong X, Decker G, Shur BD. Egg cortical granule N-acetyl glucosaminidase is required for the mouse zona block to polyspermy. *J Cell Biol*, 1993, **123**: 1431-1440
- 10 Huang XH (黄小红), Luo ZB (罗忠宝), Li MW (李明伟), Huang YF (黄一帆). Study on purification and properties of the alkaline N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase from porcine semen. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2008, **41** (9): 2843-2849
- 11 Li JW (李建武), Xiao NG (萧能庚), Yu LY (余瑞元). Principle and method of biochemistry. Beijing, China (北京): University of Beijing Press, 1997

- 12 Vehpoorte JA. Purification of two  $\beta$ -N-acetyl-D-glucosaminidase from beef spleen. *Biol Chem*, 1972, **247** (15): 4781~4793
- 13 Huang XH (黄小红), Wang SK (王寿昆), Huang YF (黄一帆), Chen HH (陈宏惠). Preliminary purification and some properties of the  $\beta$ -N-acetyl-D-glucosaminidase from *Macrobrachium nipponense*. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2006, **12** (6): 804~808
- 14 Huang XH (黄小红), Chen HH (陈宏惠), Huang YF (黄一帆). Preliminary studies on isolation, purification and some properties of the  $\beta$ -N-acetyl-D-glucosaminidase from *Eriocheir sinensis*. *Acta Hydrobiol Sin* (水生生物学报), 2007, **31** (4): 563~569
- 15 Takeshi T, Toshiaki F, Haruyuki A. Characterization of an exo- $\beta$ -D-glucosaminidase involved in a novel chitinolytic pathway from the hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J Bacteriol*, 2003, **185** (17): 5175~5181

## 草坪学通论

张自和 柴琦 主编 科学出版社 出版(2009年9月)

978-7-03-025325-5 ¥68.00

### 内容简介

本书在论述草坪发展历程及生态、社会、体育、美学等多种功能的基础上,重点介绍了草坪植物的类别、植物与生态学特性、草坪建植及养护管理的技术与方法、各类运动草坪及其他公众草坪的建植与养护技术、草坪机具及使用、草坪质量评价与运行实务管理,国内外草坪科技进展及发展动向。全书内容概括,图文并茂,具有系统性、实践性与创新性。

本书可作为草业、园艺、农学、林学、生态、环保等学科领域的本科生、研究生的教材或教学参考书,也可供相关领域技术人员、管理者、从业者参考。

邮购地址:北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社

邮编:100717

联系人:李韶文(010-64000849),周文字(010-64031535)

网址:<http://www.lifescience.com.cn>

