

# 尼罗罗非鱼肝脏 N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖苷酶 的分离纯化及性质研究

陈晓佳<sup>1</sup>, 孙林浩<sup>1</sup>, 袁阳<sup>1</sup>, 黄小红<sup>1\*</sup>, 张伟妮<sup>1,2\*</sup>

(1. 福建农林大学中西兽医结合与动物保健福建省高校重点实验室, 福建 福州 350002; 2. 福建农林大学海洋研究院, 福建 福州 350002)

**摘要:** N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖苷酶(简称为 NAGase), 是生物体内主要的溶酶体水解酶之一, 广泛存在于动植物和微生物体内。以尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) 肝脏作为材料, 采用硫酸铵(30%~70%)分级沉淀、DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换层析、Sephadex G-200 分子筛层析的方法分离纯化 NAGase, 得到比活力为 2988 U/mg 的酶制剂。经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测呈现为单一条带, 说明所得酶为 PAGE 单一纯。进一步测定了罗非鱼肝脏 NAGase 的酶学性质: 通过 Sephadex G-200 层析法测得肝脏 NAGase 的总分子量为 61.8 ku, 结合 SDS-PAGE 结果, 说明该酶只有一个亚基; NAGase 水解底物 pNP-NAG 的最适温度为 55 °C, 该酶的温度稳定范围为 0~55 °C, 超过 75 °C 时完全丧失活性; NAGase 水解底物的最适 pH 为 5.5, pH 稳定性范围为 pH 4.0~9.0, pH 大于 9 时迅速失活; 该酶水解底物的动力学参数  $K_m$  和  $V_m$  分别为 0.229 mmol/L 和 9.314  $\mu$ mol/(L·min); 运用化学修饰法研究了尼罗罗非鱼肝脏 NAGase 的活性必需基团, 发现二硫键、氨基、组氨酸咪唑基和色氨酸吲哚基均是该酶的活性必需基团, 而精氨酸胍基则不是其活性必需基团。

**关键词:** 尼罗罗非鱼; N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖苷酶; 纯化; 酶学性质; 功能基团

**中图分类号:** Q 556.2      **文献标志码:** A

自 20 世纪 90 年代, 我国的罗非鱼产业发展迅速, 稳居世界最大的罗非鱼生产国家。据联合国粮农组织数据, 近年我国罗非鱼年产量均占全球总产量的 32% 以上<sup>[1]</sup>。然而随着集约化养殖程度的提高, 细菌性疾病的发生也越来越频繁。尤其是由无乳链球菌感染导致的链球菌病在罗非鱼养殖过程中屡见不鲜, 给广东、海南和福建等地的罗非鱼养殖造成极大的威胁<sup>[2]</sup>。目前关于罗非鱼细菌性疾病的研究多集中在病原、药物及疫苗开发等方面<sup>[2]</sup>, 而宿主对细菌感染抵御机制方面的报道较少。

N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖苷酶(N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase, EC 3.2.1.52, 简称 NAGase),

**收稿日期:** 2018-10-16    **录用日期:** 2018-11-26

**基金项目:** 国家自然科学基金(31572484); 福建省自然科学基金(2015J01605)

**\*通信作者:** xhhuang@vip.sina.com (黄小红); zhangweini@fafu.edu.cn (张伟妮)

隶属于糖基水解酶家族，是一种重要的溶酶体酶，主要水解糖蛋白、蛋白聚糖和多糖分子内以 $\beta$ -1,4-糖苷键连接的N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖苷键<sup>[3]</sup>。有些NAGase还可以水解N-乙酰- $\beta$ -D-氨基半乳糖苷（N-acetyl- $\beta$ -D-galactosamine），又被称为N-乙酰- $\beta$ -D-氨基己糖苷酶（N-acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidase，简称Hex）。目前，在哺乳动物细胞中已发现3种Hex同工酶：HexA、HexB和HexS，其中HexA是由 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基组成的异二聚体，HexB和HexS分别是由2个 $\beta$ 亚基和2个 $\alpha$ 亚基组成的同二聚体<sup>[3]</sup>。

NAGase来源广泛，几乎在所有的原核和真核生物体中都存在，且该酶在不同种类甚至同一机体的不同部位都有明显的功能差异<sup>[4]</sup>。近年来NAGase作为一种先天性免疫因子在抵抗细菌感染方面的作用受到学者们的关注。果蝇S2细胞在被海鱼分枝杆菌（*Mycobacterium marinum*）感染后能够特异性地分泌Hex，且与细菌浓度呈剂量依赖关系<sup>[5]</sup>。据报道，该酶在小鼠抵抗表皮葡萄球菌感染的过程中也起到重要作用<sup>[6]</sup>。

本实验室前期研究发现尼罗罗非鱼（*Oreochromis niloticus*）内脏组织抽提液中肝脏NAGase的比活力最高（肝脏196.5 U/mg，肾脏42.3 U/mg，精巢36.3 U/mg，脾脏12.6 U/mg，卵巢6.1 U/mg），本研究就尼罗罗非鱼肝脏NAGase的纯化过程及酶学性质进行研究，为进一步探讨该酶在罗非鱼体内的功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本实验所用的200条尼罗罗非鱼由福建省淡水养殖良种繁育科研中式基地提供，并取其肝脏，分离纯化出NAGase供本研究使用，均为同一批次。底物对硝基苯-N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖苷（pNP-NAG）为上海医药工业研究院产品，乙酰丙酮和N-溴代琥珀酰亚胺购于阿拉丁试剂公司，溴代乙酸由上海麦克林生化科技有限公司生产，二硫苏糖醇购于索莱宝试剂公司，甲醛和巯基乙醇等试剂（国产分析纯）均是国药集团化学试剂有限公司产品。本实验所用水均为双蒸水。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 酶活力测定

1酶活力单位是指在特定条件下，在1 min内能转化1  $\mu$ mol底物的酶量。酶活力测定方法：在2 mL含浓度0.1 mol/L磷酸盐缓冲液的测酶活力体系中，先在37  $^{\circ}$ C水浴中预热5 min

后，再加入一定量的酶液，反应 10 min 后，加入 2 mL 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液终止反应，用分光光度计（Beckman DU-800）在 405 nm 处测定吸光度值。

### 1.2.2 蛋白含量测定

测定酶蛋白含量的方法为 Folin-酚法。使用牛血清白蛋白为标准蛋白，用分光光度计（Beckman DU-800）测定其在 650 nm 处的吸光度值。

### 1.2.3 酶的分离纯化

剖取 200 条尼罗罗非鱼肝脏，按 1: 3 (W: V) 的比例加入预冷的 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5, 含 0.2 mol/L NaCl)，高速组织匀浆机匀浆 1 min 后，4 °C 抽提过夜。抽提液 4 °C，30 000 g 离心 30 min，弃上清液，用硫酸铵分级沉淀分离，收集饱和度为 30%~70% 的沉淀蛋白，经过充分透析得到粗酶液。采用 DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换柱层析，先使用淋洗液 (0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液，pH 7.5) 淋洗除杂蛋白，然后用 0.01 mol/L (含 0~1 mol/L NaCl) 的 Tris-HCl 进行梯度洗脱，收集合并酶活力峰。得到的酶制剂进一步使用 Sephadex G-200 分子筛凝胶过滤层析进行纯化。

### 1.2.4 酶的纯度鉴定

采用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 鉴定纯度。使用 10% (质量浓度) 的浓缩胶和 5% (质量浓度) 的分离胶，考马斯亮蓝染色法染色。

### 1.2.5 酶总分子量测定

采用 Sephadex G-200 分子筛凝胶过滤柱层析法测定酶的总分子量。本实验采用卵清蛋白 (OA, 44.3 ku)、牛血清白蛋白 (BSA, 66.4 ku) 和碱性磷酸酶 (ALP, 100 ku) 为标准蛋白。在同一条件下层析，并收集各种标准蛋白的洗脱液，测量各标准蛋白的洗脱体积  $V_e$ 。以洗脱体积  $V_e$  为纵坐标，蛋白质分子质量  $M$  为横坐标作图，将测得 NAGase 的  $V_e$  代入曲线方程中，得到罗非鱼肝脏 NAGase 的总分子量。

### 1.2.6 酶催化底物的最适温度测定

在含有 0.1 mol/L PBS 缓冲液 (pH 5.7) 的体系中，以 pNP-NAG 为底物，加入 10  $\mu$ L 罗非鱼肝脏 NAGase 样品酶液，反应温度为 5~80 °C，测定罗非鱼肝脏 NAGase 的活力，剩余 NAGase 活力测定采用 1.2.1 中的方法，记录数据，并绘制曲线。

### 1.2.7 酶催化底物的最适 pH 测定

配制 pH 梯度的缓冲液 (pH 3.6~5.7 为 0.1 mol/L HAc-NaAc, pH 5.7~7.8 为 0.1 mol/L PBS, pH 7.8~9.0 为 0.1 mol/L Tris-HCl, pH 9.0~10.6 为 0.1 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub>)，加入等量酶

液，温度 37 °C，以 pNP-NAG 为底物，测定不同 pH 下罗非鱼 NAGase 的活力，记录数据，并绘制曲线。

### 1.2.8 酶催化底物的热稳定性

取 10 μL 的罗非鱼 NAGase 样品，将其放置于不同温度（5~80 °C）下处理 30 min，在 pH 5.7、37 °C 的活力测定体系条件下，测定 NAGase 的剩余活力，确定使该酶稳定的温度范围。

### 1.2.9 酶催化底物的 pH 稳定性

取 10 μL 的罗非鱼 NAGase 样品，等体积与不同 pH 值的缓冲液混合，4 °C 作用 24 h。在 37 °C，pH 5.7 的活力测定体系中，测定 NAGase 的剩余活力。

### 1.2.10 酶催化底物的动力学参数测定

酶促反应方程米氏方程（Michaelis-Menten） $V_0 = V_m \times [S] / (K_m + [S])$ ，其中  $K_m$  值称为米氏常数（Michaelis-Menten constant,  $K_m$ ）， $V_m$  是酶被底物饱和时的反应速度（maximum velocity,  $V_m$ ）， $[S]$  为底物浓度。通过改变底物 pNP-NAG 的浓度  $[S]$ ，测定酶促反应的初速度  $V_0$ ，取  $1/V$  和  $1/[S]$  作图，为一直线，从直线的截距求得酶催化底物 pNP-NAG 水解反应的米氏常数  $K_m$  和最大反应速度  $V_m$ 。

### 1.2.11 酶必需基团的化学修饰

配制一定浓度梯度的化学修饰剂（巯基乙醇、二巯苏糖醇、甲醛、溴代乙酸、N-溴代琥珀酰亚胺、乙酰丙酮），加入 20 μL 酶液，用缓冲液补至 50 μL 后修饰 30 min。正常测活体系下，加入修饰后的酶液 50 μL，测定 NAGase 的剩余活力。以化学修饰剂浓度为横坐标，用相对酶活力作纵坐标作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 罗非鱼肝脏 NAGase 的分离纯化

罗非鱼肝脏破碎抽提盐析后得到粗酶液，再将粗酶液通过 DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换柱层析和 Sephadex G-200 分子筛凝胶过滤层析进行分离纯化，最后得到比活力为 2988 U/mg 的酶，纯化倍数 46.6。罗非鱼肝脏 NAGase 纯化图谱见图 1，纯化各过程结果见表 1。由表 1 可知，酶活力值随着离子交换柱层析和分子筛凝胶过滤层析的作用出现了明显的峰值，且和蛋白浓度的峰值相吻合。可见层析效果良好，酶逐渐被纯化。

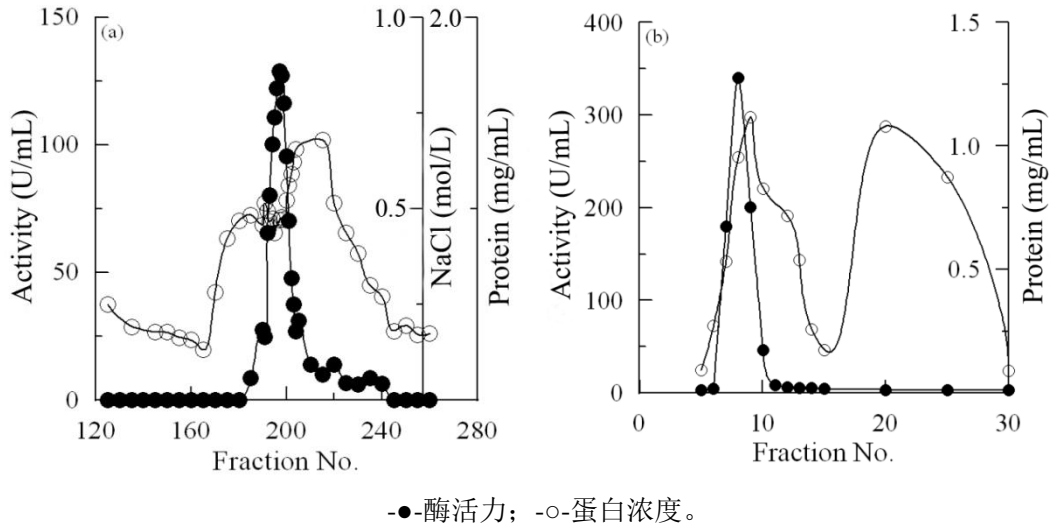


图1 罗非鱼肝脏 NAGase 的 DEAE Sepharose Fast Flow (a) 和 Sephadex G-200 (b) 层析图谱  
 Fig. 1 Column chromatography of NAGase from tilapia liver on DEAE--sepharose Fast Flow (a) and Sephadex G-200 (b)

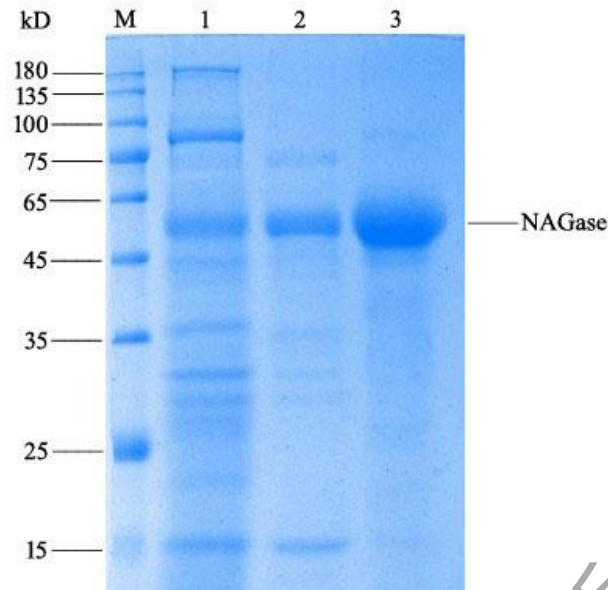
表 1 罗非鱼肝脏 NAGase 的分离纯化步骤

Tab. 1 Summary of the purification of NAGase from tilapia liver

步骤	总活力/U	蛋白质质量/mg	比活力/(U/mg)	纯化倍数	得率 /%
匀浆上清液	11313068	176394	64	1	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (30%~70%)	4892045	13723	356	5.6	43.2
DEAE-sepharose fast flow	1104489	698	1582	24.7	9.8
Sephadex G-200	964251	323	2988	46.6	8.5

## 2.2 罗非鱼肝脏 NAGase 的纯度鉴定

将上述的酶制剂用聚乙二醇浓缩，纯度鉴定采用 SDS-PAGE 方法，实验结果见图 2。由图可见，经过 30%~70%的硫酸铵分级沉淀和 DEAE-sepharose Fast Flow 层析纯化后，存在的杂质蛋白逐渐减少，经 Sephadex G-200 柱层析纯化后的样品在 SDS-PAGE 检测图上呈现出单一条带，说明得到的酶已达到电泳纯，且测得其分子量约为 60 ku。



M. marker; 1. 硫酸铵分级沉淀后样品; 2. DEAE Fast Flow 柱层析后样品; 3. Sephadex G-200 柱层析后样品。

图2 罗非鱼肝脏 NAGase 的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis of purified NAGase from tilapia liver determined by SDS-PAGE

### 2.3 罗非鱼肝脏 NAGase 的总分子量

依据不同标准蛋白  $M$  对数与  $V_e$  绘制标准曲线, 如图 3 所示。将测得的罗非鱼肝脏 NAGase 的  $V_e$  代入曲线方程, 可计算得 NAGase 的总分子量为 61.8 ku。

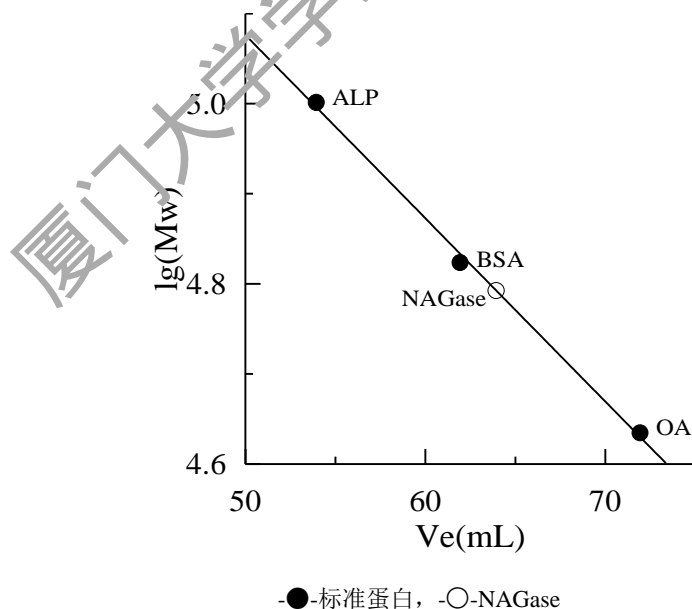
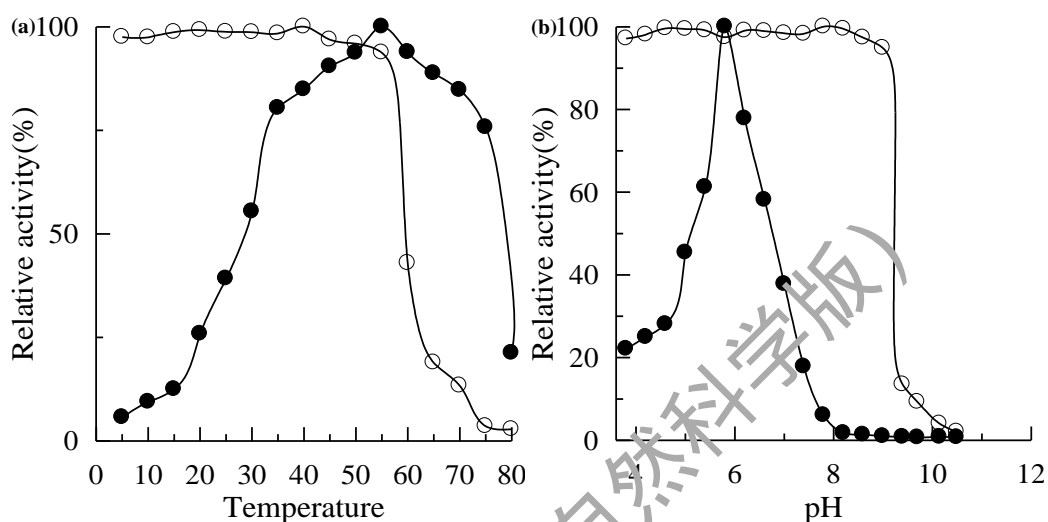


图3 罗非鱼肝脏 NAGase 分子量测定的标准曲线

Fig. 3 Standard curve for determination of molecular weight of NAGase from tilapia liver

### 2.4 罗非鱼肝脏 NAGase 的最适温度和热稳定性

将各温度下测得的 NAGase 酶活力绘制成曲线图, 如图 4 (a) 所示, 以相对酶活力为纵坐标, 以温度为横坐标, 从图中可以看到 NAGase 的最适温度为 55 °C, 从 0~55 °C, 酶活力逐渐增强, 而超过最适温度后, 酶活力逐渐减弱, 超过 75 °C 时, 酶活力急剧减弱。用同一坐标, 绘制 NAGase 的热稳定性图谱, 图中反映出该酶在低于 55 °C 内都能保持较稳定的活性, 其热稳定性在 55 °C 之上急剧下降, 75 °C 时热稳定性完全丧失。



(a)-●-最适温度, -○-热稳定性 (b)-●-最适 pH, -○-pH 稳定性。

图 4 温度 (a) 和 pH (b) 对 NAGase 活力的影响

Fig.4 Effects of temperature (a) and pH (b) on NAGase activity

## 2.5 罗非鱼肝脏 NAGase 的最适 pH 和 pH 稳定性

将各 pH 下测得的 NAGase 酶活力绘制成曲线图, 如图 4 (b) 所示, 在 37 °C 的条件下, 以相对酶活力为纵坐标, 以 pH 为横坐标, 由图可知 NAGase 的最适 pH 为 5.8, 当 pH 高于 8 时酶活力完全丧失。在同一坐标, 绘制 NAGase 的 pH 稳定性曲线图, 图中反映出在 4 °C 条件下, 其 pH 稳定性范围为 4.0~9.0, 当 pH 高于 9 时, 酶的稳定性急剧减弱。

## 2.6 罗非鱼肝脏 NAGase 催化底物的动力学参数

根据 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 如图 5 所示, 从直线与 x 轴的截距可以得到  $1/K_m$  的绝对值为 4.362, 而  $1/V_m$  是直线与 y 轴的截距为 0.107, 故 NAGase 的  $K_m$  为 0.229 mmol/L,  $V_m$  为 9.314  $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ , 动力学参数方程为  $V_0=9.314[S]/(0.229+[S])$ 。

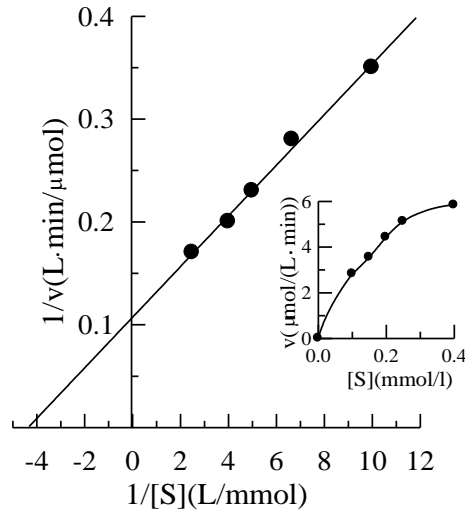


图 5 NAGase 催化底物的 Lineweaver-Burk 双倒数关系图

Fig. 5 Lineweaver-Burk double reciprocal relation diagram of NAGase catalytic substrate

## 2.7 罗非鱼肝脏 NAGase 的化学修饰

### 2.7.1 二硫键的化学修饰

巯基乙醇 (ME) 是二硫键 (-S-S-) 的特异性修饰剂。在 pH 8.0 的 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中加入不同浓度梯度的 ME, 再加入 20  $\mu$ L NAGase, 37  $^{\circ}$ C 下修饰 30 min, 测定 NAGase 剩余酶活力, 见图 6 (a)。从图中可以看出, 随着 ME 浓度的增大, 相对酶活力不断减小。为了进一步证实这个结论, 将二硫苏糖醇 (DTT) 也作为 NAGase 的化学修饰剂。二硫苏糖醇是一种高效专一的还原剂, 能够使二硫键断裂。如图 6 (b) 所示, DTT 的结果与 ME 的结果一致。故二硫键为罗非鱼肝脏 NAGase 的活性必需基团。

### 2.7.2 氨基的化学修饰

在碱性环境中, 甲醛 (HCHO) 对蛋白的氨基有修饰作用。将 HCHO 按照不同浓度加入到含有 20  $\mu$ L NAGase, pH 8.0 的 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液的修饰体系中, 4  $^{\circ}$ C 下作用 30 min。结果如图 6 (c) 所示, 随着 HCHO 浓度的增大, 酶活力迅速降低, 说明氨基是 NAGase 的活性必需基团。

### 2.7.3 组氨酸咪唑基的化学修饰

溴代乙酸 (BrAc) 常用于蛋白组氨酸咪唑基的修饰。室温下, NAGase 在含有不同浓度 BrAc 的 0.1 mol/L NaAc-HAc (pH 5.0) 缓冲液中作用 30 min。在正常测活体系中, 测得 NAGase 剩余酶活力。从图 6 (d) 可见, 剩余酶活力与 BrAc 呈浓度依赖性关系, 随着 BrAc 浓度的



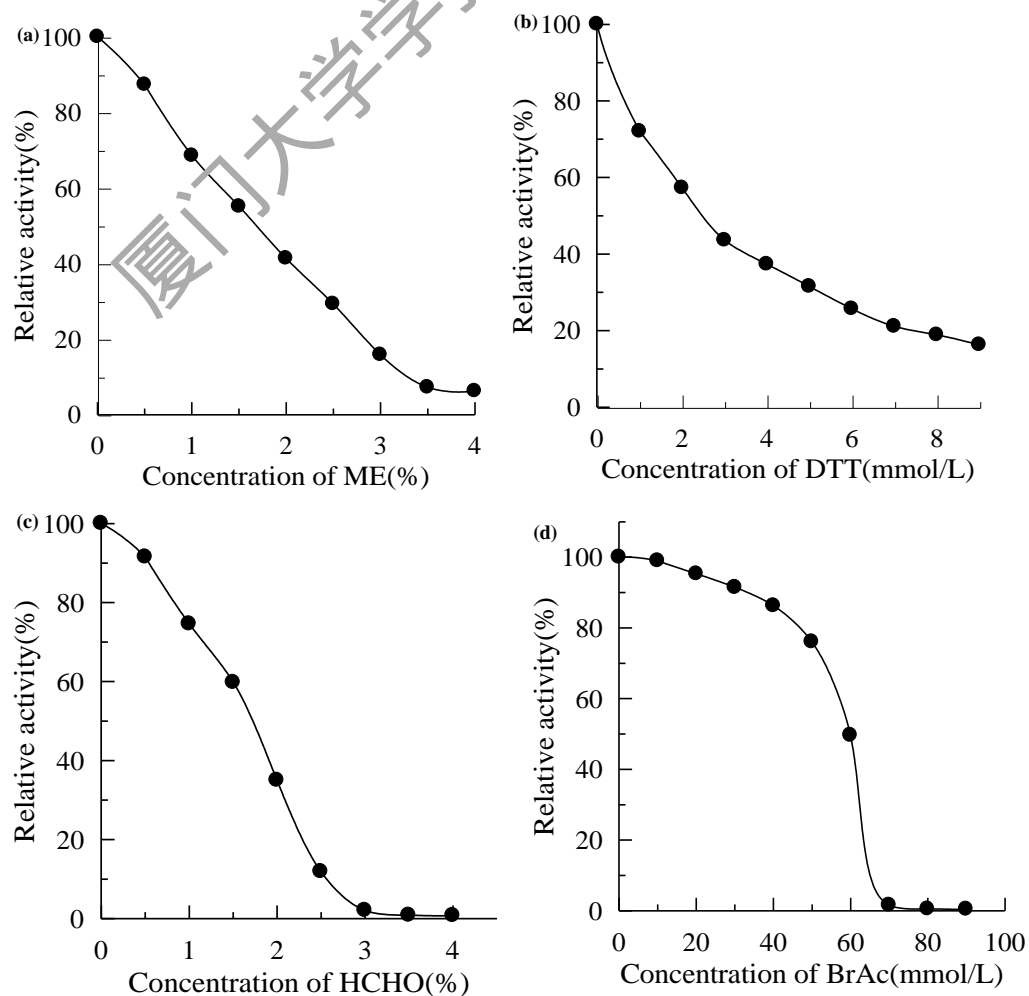
上升，酶活力不断降低；当 BrAc 浓度为 60 mmol/L 时，酶活力下降 50%；当 BrAc 到 70 mmol/L 时，NAGase 几乎完全失去活力。故组氨酸咪唑基为 NAGase 的活性必需基团。

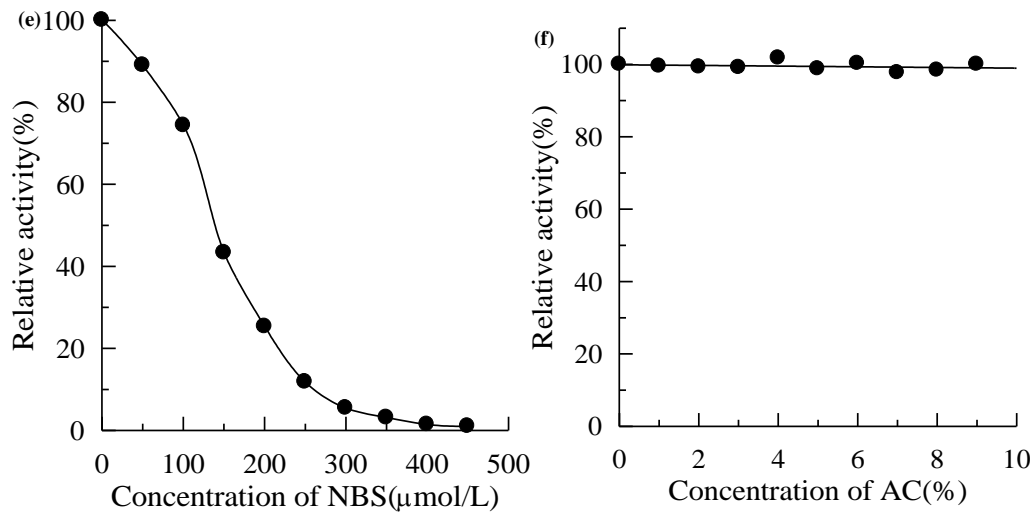
### 2.7.4 色氨酸吲哚基的化学修饰

N-溴代琥珀酰亚胺 (NBS) 可以与大多数蛋白的色氨酸吲哚基反应，使其氧化成羟吲哚衍生物，因此将 NBS 作为色氨酸吲哚基的化学修饰剂。37 °C 下，NAGase 在含有不同浓度 NBS 的 0.1 mol/L NaAc-HAc (pH 5.0) 缓冲液中作用 30 min。正常测活体系中，测得剩余酶活力。由图 6 (e) 可见，NAGase 的活力随着 NBS 的浓度升高而减小；使酶活力下降至 50% 时的 NBS 浓度为 150  $\mu$ mol/L；NBS 浓度超过 400  $\mu$ mol/L 后，NAGase 活力几乎完全丧失。故色氨酸吲哚基为 NAGase 的活性必需基团。

### 2.7.5 精氨酸胍基的化学修饰

在碱性条件下，乙酰丙酮 (AC) 能特异性地与酶的精氨酸胍基反应，使酶丧失活力。室温下，NAGase 在含有不同浓度 AC 的 0.1 mol/L NaAc-HAc (pH 5.0) 缓冲液中作用 30 min。正常测活体系中，测得剩余酶活力。由图 6 (f) 可知，随着 AC 浓度的升高，NAGase 的活力并没有下降；当 AC 达到 10% 时，酶活力仍保持不变，说明精氨酸胍基非 NAGase 的活性必需基团。





a: ME; b: DTT; c: HCHO; d: BrAc; e: NBS; f: AC

图 6 NAGase 的活性必需基团测定

Fig.6 Determination of essential active groups of NAGase

### 3 讨论

本实验选用尼罗罗非鱼作为实验材料，首先将肝脏抽提液通过硫酸铵分级沉淀法得到粗酶制剂， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  沉淀通常作为酶分离纯化的初始步骤，主要是用于除去粗提物中的杂蛋白。王勤等<sup>[7]</sup>在研究过程中发现，30%~70%的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  沉淀法使来自杂交罗非鱼肠道的胰蛋白酶活性增加了 2.7 倍，而本实验通过上述方法进行处理，纯化倍数增加了 5.6 倍。然后通过 DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换层析后，发现在洗脱管中出现酶的活力峰，蛋白进一步被纯化。最后通过 Sephadex G-200 分子筛凝胶层析的方法获得了比活力 2988 U/mg 的纯酶制剂。由此可见本试验采用的纯化方法以及操作过程是可行的。

以标准蛋白洗脱体积对其分子量对数作图求得罗非鱼肝脏 NAGase 的分子量为 61.8 ku，且经 SDS-PAGE 检测仅有单一条带，说明罗非鱼肝脏 NAGase 仅有一个亚基。本课题组前期研究发现分离自罗非鱼精巢的 NAGase 分子量为 118 ku<sup>[8]</sup>，可见相同动物不同组织的 NAGase 也存在差异，说明跟哺乳动物相似，鱼类 NAGase 也存在多种同工酶。从表 2 中可知来自不同动物的 NAGase 分子量也不尽相同，这可能是由于不同动物中的 NAGase 分子结构、氨基酸数量不同的原因，NAGase 功能与其分子量是否存在相关性还需要进一步探讨。

此外，从表 2 还可见，不同来源 NAGase 的最适 pH 稍有差异，但 pH 稳定性则相差较大，如克氏原螯虾、蝾螺的 pH 稳定范围相近、偏酸，鲤鱼 NAGase 的 pH 稳定范围则偏碱，

而罗非鱼精巢和肝脏 NAGase 则在一定的酸性和碱性条件下均可保持良好的活性；此外，罗非鱼的最适温度和热稳定性相较于其他水生动物而言更高一些。这与罗非鱼适应能力强，能适应较高的温度和较大的酸碱范围是相吻合的。

表 2 不同来源 NAGase 的部分性质  
Tab. 2 Partial properties of NAGase from different sources

来源	最适 pH	pH 稳定性	最适温度/°C	热稳定性/°C	分子量/ku
锯缘青蟹 <sup>[9]</sup>	5.6	4.6-8.6	50	<45	132
克氏原螯虾 <sup>[10]</sup>	5.5	3.6-5.9	40	<55	118.66
蝾螺 <sup>[11]</sup>	4.5	3.5-6.0	45	<40	/
菜青虫 <sup>[12]</sup>	6.2	4.0-9.0	42	<45	106
槐猪 <sup>[13]</sup>	5.7	3.0-8.6	50	<50	71
鲤鱼 <sup>[14]</sup>	6.5	7.0-11.0			122
扇贝 <sup>[15]</sup>	3.7	3.5-5.5	45		56
罗非鱼精巢 <sup>[8]</sup>	5.7	3.7-9.1	55	<65	118
罗非鱼肝脏	5.8	4.0-9.0	55	<55	60.17

化学修饰是通过基团的引入或除去来改变蛋白质或者核酸的共价结构。蛋白质的化学修饰是研究酶活性中心必需功能基团的重要手段。本试验使用一些特异性的化学修饰剂对 NAGase 的某一特定基团进行修饰，从而改变该基团的结构，再通过检测酶活力的变化情况，来确认 NAGase 的活性必需基团。本试验结果表明，二硫键、氨基、组氨酸残基咪唑基和色氨酸残基吡咯基是 NAGase 的活性必需基团。而 NAGase 在乙酰丙酮的高修饰浓度下仍保持 99% 的酶活力，说明罗非鱼肝脏 NAGase 的活性必需基团不包括精氨酸胍基。

目前有关鱼类的 NAGase 研究较少，本实验对罗非鱼肝脏 NAGase 的分离纯化、理化性质和活性基团进行研究，可为后续该酶的功能研究提供基础。

## 参考文献:

- [1] 张红燕, 袁永明, 贺艳辉, 等. 世界罗非鱼生产和贸易现状分析[J]. 农业展望, 2016, 5: 77-85.

- [2] 魏顺, 张泽, 李宇辉, 等. 广东地区吉富罗非鱼无乳链球菌病的流行情况与耐药性[J]. 水产学报, 2016, 40(3): 503-511.
- [3] AKEBOSHI H, CHIBA Y, KASAHARA Y, et al. Production of recombinant  $\beta$ -hexosaminidase A, a potential enzyme for replacement therapy for Tay-Sachs and Sandhoff diseases, in the methylotrophic yeast *Ogataea minuta* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73: 4805-4812.
- [4] SLAMOVA K, BOJAROVA P, PETRASKOVA L, et al.  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase: what's in a name? [J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28: 682-693.
- [5] KOO I C, OHOL Y M, WU P, et al. Role for lysosomal enzyme  $\beta$ -hexosaminidase in the control of mycobacteria infection [J]. *PNAS*, 2008, 105: 710-715.
- [6] FUKUIISHI N, MURAKAMI S, OHNO A, et al. Does  $\beta$ -hexosaminidase function only as a degranulation indicator in mast cells? The primary role of  $\beta$ -hexosaminidase in mast cell granules [J]. *The Journal of Immunology*, 2014, 193: 1886-1894.
- [7] WANG Q, GAO Z X, ZHANG N, et al. Purification and characterization of trypsin from the intestine of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*  $\times$  *O. aureus*) [J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2010, 58(1): 655-659.
- [8] ZHANG W N, BAI D P, HUANG Y F, et al. Enzymatic characterizations and activity regulations of N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase from the spermary of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014, 17(2): 153-157.
- [9] XIE X L, CHEN Q X, LIN J C, et al. Purification and some properties of  $\beta$ -N-acetyl-D-glucosaminidase from prawn (*Penaeus vannamei*) [J]. *Marine Biology*, 2004, 146(1): 143-148.
- [10] 陈欣颖. 克氏原螯虾 N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖苷酶的性质及活力调控[D]. 福州: 福建农林大学, 2010.
- [11] 林建城, 陈清西, 李少伟, 等. 蛛螺(*Turbo cornutus* Solander) N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖苷酶的分离纯化及性质的初步研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2004, 43(5): 697-701.
- [12] SHI Y, JIANG Z, HAN P, et al. Purification and some properties of  $\beta$ -N-acetyl-D-glucosaminidase from the cabbage butterfly (*Pieris rapae*) [J]. *Biochimie*, 2007, 89(3): 347-354.
- [13] 章文. 槐猪精液 NAGase 的酶学性质与活力调控[D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
- [14] UENO R, YUJIN S. Purification and properties of neutral beta-N-acetylglucosaminidase from carp blood [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1991, 1074: 79-84.
- [15] SAKAI T, NAKANISHI Y, KATO I. Purification and characterization of beta-N-acetyl-D-hexosaminidase from the mid-gut gland of scallop (*Patinopecten yessoensis*) [J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1993, 57(6): 965-968.

## **Purification and properties study of N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase from the liver of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)**

CHEN Xiaojia<sup>1</sup>, SUN Linhao<sup>1</sup>, YUAN Yang<sup>1</sup>, HUANG Xiaohong<sup>1\*</sup>,  
ZHANG Weini<sup>1, 2\*</sup>

(1. University Key Laboratory for Integrated Chinese Traditional and Western Veterinary Medicine and Animal Healthcare in Fujian Province, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Institute of Oceanology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAGase) is one of the main lysosomal hydrolases in organisms, which widely exists in animals, plants and microorganisms. In this study, NAGase was purified from the liver of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by the following techniques:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fractionation (30~70%), DEAE Sepharose Fast Flow ion exchange chromatography and Sephadex G-200 gel filtration. The specific activity of the purified enzyme was 2988 U/mg. The purity of the enzyme was determined by SDS-PAGE which showed one single band. The enzymatic properties of NAGase from tilapia liver were further determined. The molecular weight of NAGase was estimated to be 61.8 ku, and it was composed of only one subunit by using SDS-PAGE and Sephadex G-200 chromatography. The optimum temperature of the enzyme for hydrolysis of pNP-NAG was to be at 55 °C, the enzyme was stable under 55 °C, and its activity was completely lost above 75 °C. The optimum pH of NAGase was 5.8, and it was stable in the range of pH 4.0~9.0. The enzyme was totally inactivated when pH was higher than 9.0. The kinetic parameters  $K_m$  and  $v_m$  was determined to be 0.229 mmol/L and 9.314  $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ , respectively. The essential active groups of NAGase from tilapia liver was determined by using chemistry modification method. The results demonstrated that essential active groups of NAGase include disulfide bond, amidogen, imidazole of histidine, and indolyl of tryptophan. However, guanidyl of arginine was not an essential active group of the enzyme.

**Keywords:** *Oreochromis niloticus*; N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase; purification; enzymatic properties; essential groups