

果糖对莆田黑猪精液中NAGase的抑制动力学*

沈林松 张颖 张伟妮 赖育河 黄小红**

福建农林大学中西兽医结合与动物医学保健福建省高校重点实验室 福州 350002

摘要 为了解精液中不同类型糖类物质对精子细胞中N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(NAGase)的影响,以莆田黑猪精液NAGase为材料,研究精液和精液稀释液主要成分之一果糖对酶的抑制作用.结果显示,果糖对NAGase具有浓度效应($IC_{50} = 575 \text{ mmol L}^{-1}$).果糖对NAGase的抑制类型是可逆的非竞争性抑制,抑制常数是 $1.27 \times 10^{-2} \text{ mmol L}^{-1}$.应用底物反应的动力学方法研究果糖对该酶的抑制动力学,建立了抑制动力学模型,证明了果糖对该酶的影响是快速结合再缓慢失活的过程.本研究表明,在高浓度的抑制剂溶液中NAGase将完全失活,底物对其无保护作用.图6表1参24

关键词 果糖;莆田黑猪;精液;N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶;抑制动力学

CLC Q556.2 : S828.34

Inhibitory kinetics of fructose on NAGase in semen of Putian black pigs*

SHEN Linsong, ZHANG Ying, ZHANG Weini, LAI Yuhe & HUANG Xiaohong**

Fujian Higher Education Key Laboratory for Integrated Chinese Traditional and Western Veterinary Medicine and Animal Healthcare, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract This research aimed to understand the effects of different types of sugar on the N-Acetyl- β -D-glucosaminidase (EC 3.2.1.52, NAGase) in sperm cells. NAGase from semen of Putian black pigs was used as the material to study the effects of fructose, one of the main components of the sperm and semen dilutions. The inhibition kinetics of fructose on the enzyme model was set up by using the kinetic method of substrate reaction. The results showed that NAGase was dose-dependent on fructose ($IC_{50} = 575 \text{ mmol L}^{-1}$) and the inhibition type of fructose on NAGase was reversible noncompetitive inhibition, with the inhibition constant as $1.27 \times 10^{-2} \text{ mmol L}^{-1}$. The process of fructose on the enzyme was first slow deactivation then rapid combination. These results suggested that the enzyme is completely deactivated in fructose solution of high concentration, where the substrate has no protection to the enzyme.

Keywords fructose; Putian black pig; semen; N-Acetyl- β -D-glucosaminidase; inhibitory kinetics

随着我国经济的发展和人民生活水平的提高,消费者对猪肉的需求逐渐转向优质、味美的产品.莆田黑猪作为福建省的优良地方猪种,在2006年被列入农业部《国家级畜禽遗传资源保护名录》,是福建省珍贵遗传资源^[1].莆田黑猪因其肉质风味独特,在消费市场上很受欢迎.但改革开放以来,受外来猪种的冲击,莆田黑猪的数量急剧下降.莆田市于2001年组建了莆田黑猪原种场,建立核心群,开展品种抢救保护工作,主要采取人工授精方式来避免莆田黑猪灭绝和优良基因资源的流失^[2-3].

早在20世纪60年代就有学者发现,在猪附睾内含有很高活性的N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(EC3.2.1.52, N-acetyl- β -D-glucosaminidase, 简称NAGase)^[4],此后的研究还发现在人精子顶体、牛睾丸、猪的精液中都有大量NAGase存在^[5-6].并且从海鞘卵、果蝇、人类以及其他哺乳动物中获得了NAGase参与配子结合的证据^[7-9].Yoshida从人类精液中分离得到了

两种NAGase同工酶并进行了相关性质研究,发现该酶参与了人类精子与透明带结合初期的过程^[10].David等应用NAGase处理小鼠卵子后,卵子与精子的结合功能丧失,表明精子中该酶有可能在受精后参与卵子表面糖链的水解,破坏精卵识别机制,从而阻止多精受精^[11].目前对于果糖对莆田黑猪精液中NAGase抑制动力学的研究尚未见报道.我们以地方品种莆田黑猪精液NAGase为材料,开展果糖对酶活力的影响及抑制动力学的研究,以期为该酶活力的人工调控提供理论基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料与试剂 本实验用的NAGase分离纯化自莆田市黑猪原种场的莆田黑猪精液^[12];对硝基苯-N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷(pNP-GlcNAc)为上海医药工业研究院产品;果糖及其他无机试剂(国产分析纯AR)均是国药集团化学试剂有限公司产品.

1.1.2 主要仪器与设备 Uvmini-1240紫外可见分光光度计(岛津公司),DU-800核酸蛋白分析仪(Beckman).

收稿日期 Received: 2014-07-10 接受日期 Accepted: 2014-08-10

*福建省科技计划项目重点项目(2012N0002)资助 Support by the Science and Technology Major Project of Fujian Province (2012N0002)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: xhhuang138@hotmail.com)

1.2 方法

1.2.1 果糖对NAGase活力的影响 酶活力的测定参照文献[13]的方法, 果糖对酶的抑制机理采用参考文献[14]的方法, 果糖对酶的抑制类型采用参考文献[15]的方法.

1.2.2 果糖微观速率常数的测定 按Tsou所介绍的酶失活过程中的底物反应动力学方法^[16], 在37 °C下2.0 mL的测活体系中(含0.2 mmol L⁻¹ pNP-GlcNac, 0.1 mol L⁻¹的磷酸缓冲液, pH 5.7) 分别加入不同浓度的果糖, 加入适量酶液, 监测底物反应的过程曲线. 同时, 改变底物浓度, 以同样的方法监测不同底物浓度下果糖影响酶促反应的进程曲线, 根据相应的动力学方程和作图方法, 计算果糖对莆田黑猪NAGase的微观抑制速度常数.

2 结果与分析

2.1 果糖对酶活力的影响

果糖浓度在0、200、400、600 mmol L⁻¹范围时, 酶的相对活力是下降的, 对酶的作用有浓度效应, 果糖的浓度为575 mmol L⁻¹时, 酶的相对活力为50% (图1). 结果表明, 果糖对莆田黑猪精液中NAGase具有抑制作用.

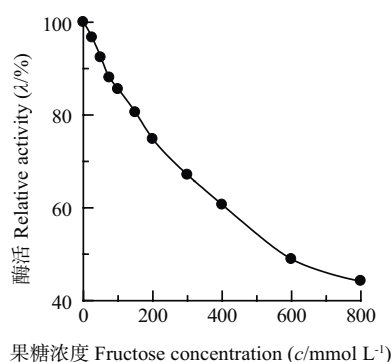


图1 果糖对莆田黑猪NAGase的影响.

Fig. 1 Effects of fructose on the activity of NAGase.

2.2 果糖对酶的抑制机理及抑制类型

果糖浓度分别选用0、50、150、200、400 mmol L⁻¹时, 以酶量为横坐标, 以酶的相对活力为纵坐标作图, 可以得到一组通过原点的直线, 而且这些直线的斜率随着果糖浓度的增加而逐渐降低 (图2), 由此可以判断, 果糖对莆田黑猪NAGase的抑制类型为可逆抑制.

进一步通过改变底物浓度 (0, 25, 50, 100, 150 mmol L⁻¹), 测定不同底物浓度对酶促反应的影响效果, 从而研究果糖对莆田黑猪NAGase的抑制作用类型. 通过Lineweaver-Burk双倒数作图得到一组相交于横轴的直线 (图3), 从图中可以看出, 最大反应速度 (V_m) 随果糖浓度增加而减小, 而 K_m 不变. 结果说明, 效应物果糖的加入并不影响底物与酶的亲和力, 只是降低了 V_m . 由此可以判断出果糖的抑制机理为非竞争性抑制.

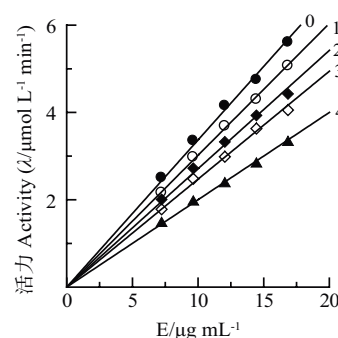


图2 果糖对莆田黑猪NAGase活力的抑制机理. 0-4: 果糖浓度分别为0、50、150、200、400 mmol L⁻¹.

Fig. 2 Inhibition mechanism of fructose on NAGase. 0-4: Fructose concentrations as 0, 50, 150, 200, and 400 mmol L⁻¹, respectively.

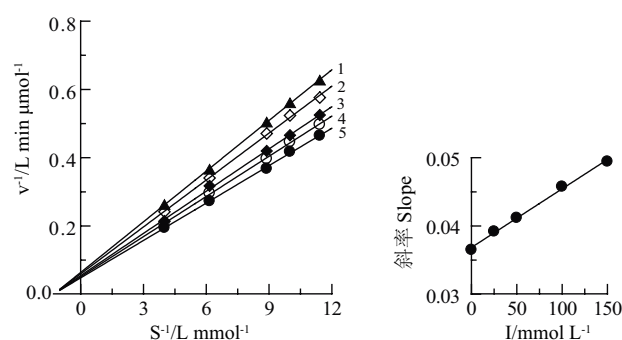


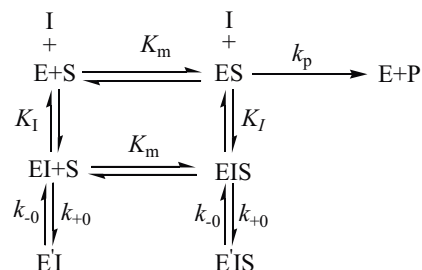
图3 果糖对莆田黑猪NAGase抑制效应的Lineweaver-Burk图. 1-5: 底物浓度分别为0、25、50、100、150 mmol L⁻¹.

Fig. 3 Lineweaver-Burk Plots for NAGase inhibited by fructose. 1-5: Substrate concentration as 0, 25, 50, 100, and 150 mmol L⁻¹, respectively.

2.3 果糖对酶的抑制动力学

2.3.1 不同果糖浓度对酶的抑制动力学 图4 (A) 为果糖浓度分别为100、200、400、600 mmol L⁻¹时, 酶催化0.25 mmol L⁻¹的pNP-GlcNac水解的动力学过程, 在图中可以看出其产物形成的速率随着反应时间的延长而逐渐趋向于一条稳定斜率的直线, 而且此直线的斜率随着果糖浓度的增大而减小, 结果说明, 果糖溶液对酶的抑制作用是一种可逆过程. 而且在所分析的果糖浓度下, 酶仍保留一定的剩余活力.

参考文献[17], 果糖对酶的可逆抑制动力学模型可以表示如下:



图式中E、S、I和P 分别代表酶、底物、抑制剂和产物, ES、EI和EIS分别为相应的络合物. E'I和E'IS分别为失活酶形式. K_I 为抑制剂的抑制常数, k_{+0} 和 k_{-0} 分别为正向微观失活速率常数和逆向微观复活速率常数.

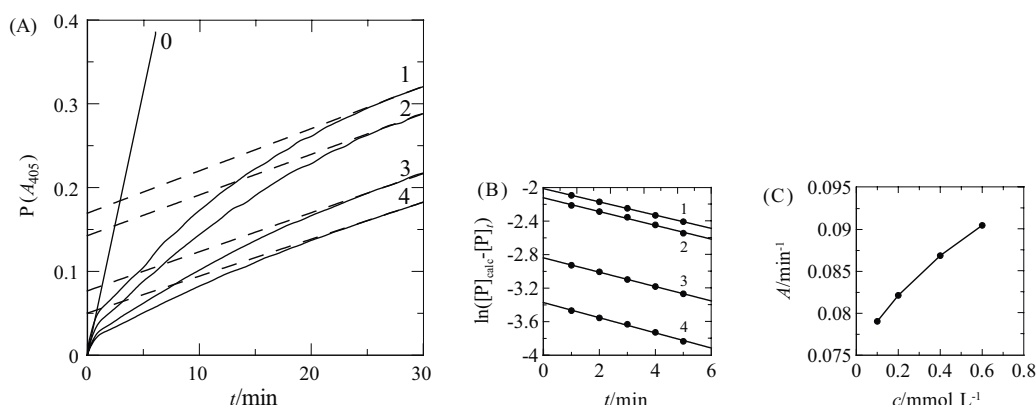


图4 酶在不同浓度果糖的抑制作用动力学曲线。(A) 1-4: 果糖浓度分别为100、200、400、600 mmol L⁻¹。(B) $\ln ([P]_{calc}-[P]_t)$ 对时间 t 的对数图, 数据由A中1-4获得。(C) 不同果糖浓度对应的表观速率常数。

Fig. 4 Inhibition kinetics for NAGase by fructose of different concentrations. (A) Course of substrate reaction in the presence of fructose of different concentrations. The fructose concentrations for curves 1- 4 were 100, 200, 400, and 600 mmol L⁻¹, respectively. (B) Semilogarithmic plot of $\ln([P]_{calc}-[P]_t)$ against time, with data taken from curves 1- 4 in (A). (C) Apparent forward inhibition rate constants for different fructose concentrations.

当 $[S] \geq [E_0]$, $[I] \geq [E_0]$, 根据快速平衡理论, 产物生成量可以用下式表示:

$$[P]_t = \frac{k_0 v}{A} \cdot t + \frac{(A - k_0) v}{A^2} (1 - e^{-A \cdot t}) \quad (1)$$

其中,

$$A = \frac{k_{+0} [I]}{K_I + [I]} + k_0, \quad B = k_0 \quad (2)$$

这里 $[P]_t$ 是在反应任何时间(t)时的产物浓度, v 为无抑制剂下的反应初速度, A 为失活的表观速率常数, B 为复活的表观速率常数。

当反应时间足够长, 反应曲线变成直线, 这时的产物的生成 $[P]_{calc}$:

$$[P]_{calc} = \frac{k_0 v}{A} \cdot t + \frac{(A - k_0) v}{A^2} \quad (3)$$

由上式可得 $[P]_{calc}$ 对 t 作图得一直线斜率为:

$$\text{slope} = \frac{k_0 v}{A} \quad (4)$$

由式(1)和(3)可得:

$$[P]_{calc} - [P]_t = \frac{(A - k_0) v}{A^2} \cdot e^{-A \cdot t} \quad (5)$$

$$\ln ([P]_{calc} - [P]_t) = \ln \frac{(A - k_0) v}{A^2} - A \cdot t \quad (6)$$

以 $\ln([P]_{calc} - [P]_t)$ 对反应时间(t)作图, 得到一直线, 斜率为 $-A$ 。根据式(4), 以 $[P]_{calc}$ 对 t 作图, 为一直线斜率为 vk_0/A , 从而可得 k_0 , 其值为 $3.32 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ 。

由式(2)可得:

$$\frac{I}{A - k_0} = \frac{K_I}{k_{+0}} \cdot \frac{1}{[I]} + \frac{1}{k_{+0}} \quad (7)$$

以 $1/(A - k_0)$ 对 $1/[I]$ 作图, 得一直线, 斜率为 K_I/k_{+0} , 纵截距

为 $1/k_{+0}$, 横截距为 $-1/K_I$ 。从而可得 k_{+0} 及 K_I 。

由上述公式(3)以 $[P]_{calc}$ 对时间 t 作图, 不同果糖浓度下得到一系列斜率为 (vk_0/A) 的直线。由上公式(6)以 $([P]_{calc} - [P]_t)$ 对时间 t 作图得到不同果糖浓度一系列斜率为 $-A$ 的直线, 如图3(B)。不同浓度果糖下的表观失活速率常数 A 如图3(C)。

果糖对酶的抑制参数见表1。不同抑制浓度下逆向微观复活常数 k_0 相近。由上述公式(7), 以 $1/(A - k_0)$ 对 $1/[I]$ 作图得一直线(图5), 结果符合最小二乘法分析。直线的纵截距与横截距分别代表 $1/k_{+0}$ 和 $-1/K_I$ 。由此可得正向微观抑制速率常数 $k_{+0} = 8.68 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ 和抑制常数 $K_I = 1.27 \times 10^{-2} \text{ mmol L}^{-1}$ 。

表1 果糖对酶的抑制参数

Table 1 Inhibition parameters for enzyme by fructose

$c/mmoll^{-1}$	0.1 mol/L	0.2 mol/L	0.4 mol/L	0.6 mol/L
$c^{-1}/mmoll^{-1} L$	10	5	2.5	1.66
A/min^{-1}	0.07904	0.08214	0.08568	0.09049
Vk_0/A^{-1}	0.00504	0.00485	0.00466	0.00441
k_0/min^{-1}	0.00331	0.00332	0.00332	0.00332
$A - k_0$	0.07572	0.07882	0.08236	0.08717
$(A - k_0)^{-1}$	13.2065	12.5071	12.1418	11.8718

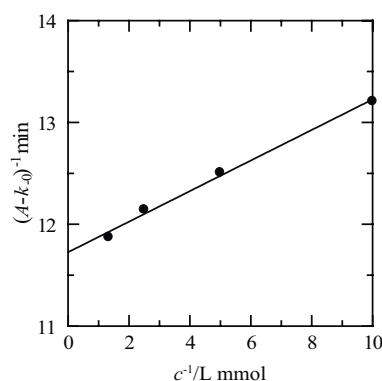


图5 $(A - k_0)^{-1}$ 对果糖浓度 c^{-1} 作图。

Fig. 5 Plot of $(A - k_0)^{-1}$ versus reciprocal of concentration of fructose.

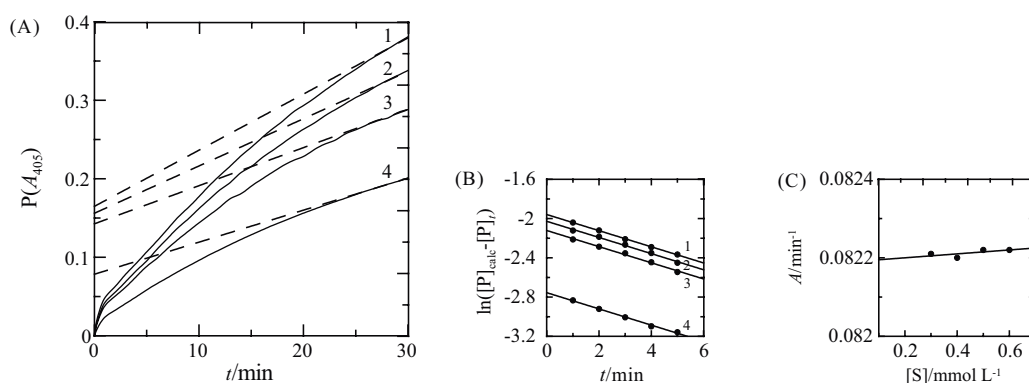


图6 不同底物浓度下 0.6 mol L^{-1} 的果糖对酶的抑制作用. (A) 曲线1-4表示底物浓度为 0.3 、 0.4 、 0.5 、 0.6 mmol L^{-1} . (B) $\ln([P]_{\text{calc}} - [P])$ 对时间 t 的对数图, 数据由A中1-4获得. (C) 不同底物浓度所对应的表观速率常数.

Fig. 6 Course of substrate reaction in the presence of 0.6 mol L^{-1} fructose. (A) Progress curves (1 - 4) for substrate concentrations of 0.3 , 0.4 , 0.5 , and 0.6 mmol L^{-1} , respectively; (B) Semilogarithmic plot of $\ln([P]_{\text{calc}} - [P])$ against time with data taken from curves 1-4 in (A); (C) Plot of the apparent forward inhibition rate constants A versus substrate concentrations.

2.3.2 不同底物浓度下果糖对酶的抑制动力学 为研究不同底物浓度下果糖对酶的抑制动力学, 以反应时间 t 为横坐标, 以 $P(A405)$ 为纵坐标作图可以得到在 600 mmol L^{-1} 的果糖浓度下不同底物浓度的抑制曲线 (如图6(A)). 然后再以 $\ln([P]_{\text{calc}} - [P])$ 对时间 t 作图可以得到一组以 $-A$ 为斜率的直线, 如图6(B). 从图6(B)可以得到失活的表观速率常数 A . 再以 A 对底物浓度 S 作图, 可以得到一条水平直线, 如图6(C), 结果表明, 底物浓度 S 对酶的微观速率常数 k_{+0} 及 k_0 没有影响.

3 讨论

NAGase作为一种水解酶在动物中主要参与多糖、蛋白聚糖和糖蛋白等分子的水解反应, 最终生成葡萄糖^[18]. 对于精子而言, 葡萄糖是精子细胞代谢的重要能量来源. 因此葡萄糖会影响精液中NAGase的活性变化^[19], 进而直接影响着精子细胞的活力^[20]. 稀释剂中的葡萄糖作为主要营养剂添加, 以保证精子在代谢过程中消耗掉的能量能得到及时补充, 果糖与葡萄糖是同分异构体, 果糖酵解后被精子代谢所利用, 同时D-果糖是精液中可被精子分解产生能量的能源物质^[21]. 另有研究发现母水牛发情末期NAGase活性会发生规律性变化, 可以凭此来确定排卵时间, 进行人工授精, 提高产犊率^[22].

精液稀释液的组分是影响人工授精的一个因素, 稀释液成分的选择和配比会直接影响到NAGase的活力, 从而可能影响到受精效率. 果糖作为精液稀释液中的另一主要供能物质, 为精子的运动提供能源, 同时也可以延长精液的保存时间^[23]. 刘玉等的研究表明, 单糖在维持精子活力中的作用非常显著^[23]. 本研究实验结果表明, 果糖可以抑制精液稀释液中的NAGase活力, 因此研究果糖对猪生殖生理密切相关的NAGase酶活力的影响及其机理具有重要意义. 林心宇等报道葡萄糖对酶活力有先扬后抑的作用^[19], 低浓度的葡萄糖对酶活力表现为激活作用, 随着其浓度的增加激活作用减弱, 在浓度达到 60 mmol L^{-1} 时对酶活力无影响. 在传统的猪的精液稀释液配方中, 葡萄糖浓度达到了 5% ($277.8 \text{ mmol L}^{-1}$), 说明该配方已经使NAGase的活力受到了抑制. 而正常猪精液中D-果糖浓度约为 0.5 mmol L^{-1} ^[21], 从本试验结果可以看出该浓度下, 果糖对NAGase活力基本无影响. 所以是否可以用果糖取代葡萄糖, 在精液稀释中发挥供能的作用有待后续研究.

本文还研究了果糖对该酶的抑制动力学, 建立了抑制作用模型, 测定了微观速率常数. 结果表明果糖对酶的抑制是快速结合再缓慢失活的过程. 从微观失活速度常数 k_{+0} 及微观复活速度常数 k_0 比较分析可见, 在高浓度的果糖溶液中酶将完全失活, 底物对酶无保护作用. 果糖对莆田黑猪精液中NAGase有可逆的非竞争性抑制作用. 潘小芳等报道了果糖对黄粉虫NAGase有抑制作用^[24], 这与本文果糖对莆田黑猪精液中NAGase有抑制作用的结果一致, 表明不同物种间的NAGase性质具有一定的相似性. 并且, 最新研究发现抑制精液中NAGase的活力会直接降低受精效率^[20]. 因此, 研究精液稀释液中的添加成分对NAGase的影响, 可为人工授精提供实验依据.

参考文献 [References]

- 方金福, 吴国为, 林国徐, 李超雄, 肖天放, 占飞豹. 莆田黑猪调查[J]. 福建畜牧兽医, 2004, **26** (1): 6-7 [Fang JF, Wu GW, Lin GX, Li CX, Xiao TF, Zhan FB. The survey of Putian black pig [J]. *Acta Veter Zootech Sin Fujian*, 2004, **26** (1): 6-7]
- 肖天放, 连森阳, 林国徐, 吴国为, 陈玉敏. 莆田黑猪繁殖性状遗传规律的研究[J]. 江西农业大学学报, 2005, **27** (3): 435-438 [Xiao TF, Liang SY, Lin GX, Wu GW, Chen YM. A study on heredity of reproductive traits in Putian black soews [J]. *Acta Agric Univ Jiangxiensis*, 2005, **27** (3): 435-438]
- 肖天放, 吴国为, 林国徐, 李超雄, 陈玉敏. 莆田黑猪的肥育性能和胴体肉质性状研究[J]. 江西农业大学学报, 2006, **28** (3): 1-5 [Xiao TF, Wu GW, Lin GX, Li CX, Chen YM. A study on finishing performance and meat quality of Putian black pig [J]. *Acta Agric Univ Jiangxiensis*, 2006, **28** (3): 1-5]

- 4 Leaback DH, Walker PG. Some properties pig epididymal N-Acetyl- β -D-glucosaminidase [J]. 1967, **104**: 70
- 5 黄小红, 罗忠宝, 李明伟, 黄一帆. 猪精液碱性N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶的纯化与酶学性质研究[J]. 中国农业科学, 2008, **41** (9): 2843-2849 [Huang XH, Luo ZB, Li MW, Huang YF. Study on purification and properties of the alkaline N-acetyl- β -D-glucosaminidase from porcine semen [J]. *Sci Agric Sin*, 2008, **41** (9): 2843-2849]
- 6 黄小红, 罗忠宝, 黄一帆, 陈欣颖. 猪精液酸性N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶的纯化及性质[J]. 应用与环境生物学报, 2009, **15** (6): 819-823 [Huang XH, Luo ZB, Huang YF, Chen XY. Study on purification and properties of the acidic N-acetyl- β -D-glucosaminidase from porcine semen [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2009, **15** (6): 819-823]
- 7 Koyanagi R, Honerger TG. Molecular cloning and sequence analysis of an ascidian egg beta-N-acetyl-hexosaminidase with a potential role in fertilization [J]. *Dev Growth Differ*, 2003, **45** (3): 209
- 8 Miranda PV, Gonzalez-Echeverria F, Blaquier JA, Mahuran DJ, Tezón JG. Evidence for the participation of beta-hexosaminidase in human sperm-zona pellucida interaction *in vitro* [J]. *Mol Hum Reprod*, 2000, **6** (8): 699-706
- 9 Cattaneo F, Ogiso M, Hoshi M, Perotti ME, Pasini ME. Purification and characterization of the plasma membrane glycosidases of *Drosophila melanogaster* spermatozoa [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2002, **32** (8): 929-941
- 10 Yoshida K, Uchijima Y, Kobayashi N, Saitoh H. Separation and properties of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from human seminal plasma [J]. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi*, 1989, **80** (11): 1625-1631
- 11 David JM, Gong XH, Barry DS. Sperm require β -N-acetylglucosaminidase to penetrate through the egg zona pellucida [J]. *Development*, 1993, **118**: 1279-1289
- 12 赖育河, 林心宇, 黄小红. 莆田黑猪精液中NAGase酶学特性研究[J]. 中国兽医畜牧学报, 2014, **41** (11): 160 [Lai YH, Lin XY, Huang XH. Study on properties of the N-acetyl- β -D-glucosaminidase from Putian black pig semen [J]. *Acta Veter Zootech Sin*, 2014, **41** (11): 160]
- 13 黄小红, 陈清西, 尤民生, 王君, 关雄. 棉铃虫N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶的分离纯化及酶学性质[J]. 昆虫学报, 2005, **48** (4): 498-502 [Huang XH, Chen QX, You MS, Wang J, Guang X. Isolation purification and partial characterization of the N-acetyl- β -D-glucosaminidase from rabbit semen and its role in fertilization [J]. *Biochem J*, 2005, **48** (4): 498-502]
- 14 Zhang JP, Chen QX, Wang Q, Xie JJ. Purification and some properties of beta-N-acetyl-D-glucosaminidase from viscera of green crab (*Scylla serrata*) [J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2006, **71** (suppl 1): 55-59
- 15 Chen QX, Song KK, Wang Q, Huang H. Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by some alkylbenzaldehydes [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2003, **18** (6): 491-496
- 16 Tsou CL. Kinetics of substrate reaction during irreversible modification of enzyme activity [J]. *Agric Biol Chem*, 1990, **54** (8): 2145-2147
- 17 Zhang RQ, Chen QX, Zheng WZ, Liu JY, Zhuang ZL, Zhou HM. Inhibition kinetics of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase activity by dithiothreitol or 2-mercaptoethanol [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000, **32** (8): 865-872
- 18 Keyhanian O, Roseman S. The chitin catabolic cascade in the marine bacterium *Vibrio furnissii*. Molecular cloning, isolation, and characterization of a periplasmic beta-N-acetylglucosaminidase [J]. *J Biol Chem*, 1996, **271** (52): 33425-33432
- 19 林心宇, 胡崇伟, 章文, 翁丽蓉, 罗忠宝, 黄一帆, 黄小红. 稀释液成分对猪精液碱性N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶的影响[J]. 中国兽医学报, 2012, **32** (11): 1730-1734 [Lin XY, Hu CW, Zhang W, Weng LR, Huang YF, Huang XH. Effect of diluter ingredient on the alkaline N-acetyl- β -D-glucosaminidase from porcine semen [J]. *Acta Veter Zootech Sin*, 2012, **32** (11): 1730-1734]
- 20 Sarosiek B, Glogowski J, Cejko BI, Kujawa R, Szczepkowski M, Dobosz S, Kowalski RK. Inhibition of β -N-acetylglucosaminidase by acetamide affects sperm motility and fertilization success of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) [J]. *Theriogenology*, 2014, **81**: 723-732
- 21 张忠诚. 家畜繁殖学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007: 66 [Zhang ZC. Science of animal reproduction [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2007: 66]
- 22 冯健超, 袁华均, 潘厚炎, 胡腊英, 肖应艺. 水牛唾液N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶的变化规律与排卵[J]. 华中农业大学学报, 1997, **16** (4): 357-360 [Feng JC, Yuan HJ, Fan HY, Hu LY, Xiao YY. Relationship between salivary activity of N-acetyl- β -D-glucosaminidase and ovulation time swamp buffalo cows [J]. *J Huangzhong Agric Agric Sci*, 1997, **16** (4): 357-360]
- 23 刘玉. 猪常温精液稀释液配方的筛选与优化[J]. 西北农业学报, 2013, **42** (4): 13-15 [Liu Y. Selection and optimization of diluent formulation of boar semen stored at room temperature [J]. *J Northwest Agric*, 2013, **42** (4): 13-15]
- 24 潘小芳, 辛碧芬, 谢晓兰, 齐娟, 赖志青. 几种单糖对黄粉虫NAGase活力的影响[J]. 泉州师范学院学报(自然科学), 2006, **24** (6): 99-103 [Fan XF, Xin BF, Xie XL, Qi J, Lai ZQ. Effect of monosaccharide on activity of N-acetyl- β -D-glucosaminidase from *Tenebrio molitor* Linneus [J]. *J Quanzhou Norm Univ (Nat Sci)*, 2006, **24** (6): 99-103]