

次声信号对碱性磷酸酶活力的影响

沈持衡 欧阳培

(厦门大学电子工程系) (厦门大学生物系)

提 要

本文提出一种激活碱性磷酸酶的新方法,即采用低频次声信号振动碱性磷酸酶。如次声频率和声压适合,可将含有少许杂蛋白质的酶活力(比对照组)提高 20% 左右,但对较纯酶则无显著作用。同时发现用过渡金属离子激活此酶,然后再以适合的次声信号处理,可将活力再提高。此外,用次声信号处理培养缸内的金鱼,在两天后,杀鱼取酶,其平均活力亦被提高。

前 言

人们很早就发现磁性对某些酶有激活作用,此外如超声,光,热等物理因素,均能引起酶的反应,亦为早已知道的事实。唯关于次声信号对酶的作用,则尚未见报道。本文作者曾做过用次声处理其他生物的实验^[1-3]。发现其可使生长率增加。由此启发,对碱性磷酸酶进行次声振动实验,发现其具有将此种酶的比活力较对照组提高 20% 左右的作用。此法具有创新意义,至于更详尽的以及其他酶类的试验,将继续进行,再行报道。

材 料 与 方 法

(甲) 次声信号系统 用 20 瓦低频信号发生器(自 1 Hz 至 100 Hz),推动一 10 瓦飞乐牌 YD 10-2504 十吋口径十瓦橡皮边喇叭,将一个 $\phi 2$ 厘米浅盘盛酶液置于喇叭口中心^[3,4]下面,喇叭置木板上,用 2 毫米纸板垫高,以留出泄放空气的间隙。改变发生器的频率及强度。测量酶液面上的声压、次声频率与波形,用丹麦 BK 公司出产的次声 4147 型传声器及 2631 型传声器载波系统,以及美 HP 3582 A 型频谱分析仪。由于所用喇叭谐振频率在 30 赫附近,故在使用

频率为 5 赫及 10 赫时,30 赫谐波特别显著,为证实此较高频谐波,不影响低频信号对酶的活力作用。用 30 赫信号激动酶,观察其对酶活力的影响,结果显示其激活作用低于次声信号(见图 3)。以 20 微帕(μPa)为 0 分贝作为声压基准。

(乙) 碱性磷酸酶之提取 采用厦门海沧的牡蛎,去壳将新鲜组织捣碎,按 Morton 法^[5,6],用正丁醇处理,并用硫酸铵分级沉淀分离,如此获得酶液,储于 5℃ 冰箱内,供三、四日内之实验。

酶活力的测定:(a) 按 Garen 法^[7],在 0.1 mol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液中(内含激活剂 Mg^{++}),加入对硝基苯磷酸二钠(PNPP)作底物,测量时加入稀释后的酶液 0.5 ml,使其总体积为 2.0 ml。此时其底物的终浓度为 1 mmol/L。在 37℃ 下保持 10 分钟后,立即加入 0.1 mol/L NaOH 终止反应剂。冷却后,用美制 Beckman 厂 Du-8 B 紫外-可见分光光度计,在 400 nm 测量反应产物的吸收值 A ,然后以对硝基苯酚(PNP)制作标准曲线,计算其酶活力。(b) 底物及酶促反应条件全同(a),但不加终止剂,而采用动力分析法^[8],在 Du-8 D 光度计中,加温到一定温度后,自动记录其每分

钟(或每两分钟)之 A 值, 由此制成曲线(如图 1、2、3), 并可从此计算其 $\Delta A/\text{min}$ 值, 亦即此曲线之斜率, 斜率愈高, 则活力愈大。

蛋白质浓度测定: 按 Lowry^[2] 的 Folin 酚试剂法测定, 以牛血清清蛋白作标准。

实 验 结 果

一、不同频率及不同声压的次声信号对碱性磷酸酶活力的影响

(1) 依照乙项 (b) 法, 取酶液各 5.0 ml 置于浅盘中, 分别用 5, 10, 15, 20 赫频率 (f) 而声压 (P_s) 几乎相同的信号激动。经过 1 小时后, 与对照酶液 E 同时放入光度计内, 在 400 nm 波长、及 37℃ 下测定其各自吸收强度 A 值的变化, 绘成曲线, 如图 1。再用同法, 固定频率于 10 赫而变化其声压, 绘成曲线如图 2。最后固定其声压为 127.7 分贝, 而变化其频率为 10, 20

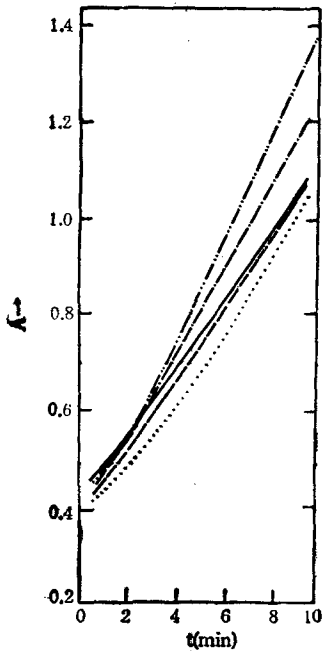


图 1 不同频率时吸收值 (A)—时间 (t) 曲线

E: 表示对照组(后同)

f	P_s	$\Delta A/\text{min}$
..... 20Hz	127 db	0.071
--- 15Hz	127.7db	0.088
..... 10Hz	127.7db	0.012
--- 5Hz	128.3db	0.080
—— E		0.076

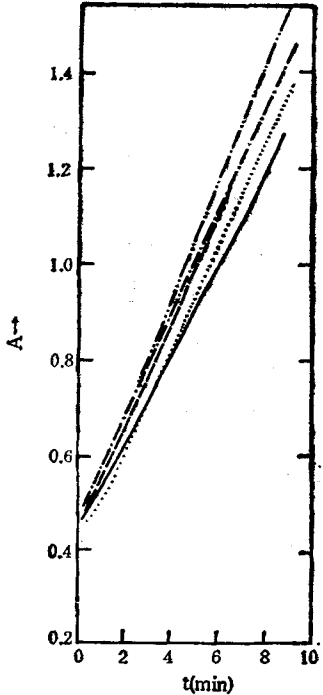


图 2 不同声压时吸收值 (A)—时间 (t) 曲线

$f = 10\text{Hz}$ $\Delta A/\text{min}$

P_s	$\Delta A/\text{min}$
..... 129.7db	0.112
--- 127.7db	0.133
--- 126.7db	0.102
--- 123.7db	0.102
—— E	0.094

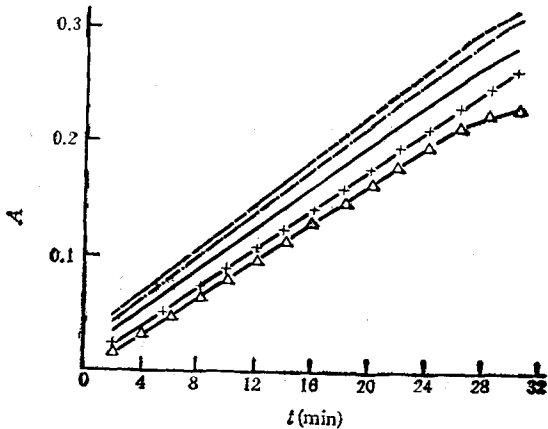


图 3 不同频率时吸收值 (A)—时间 (t) 曲线

——	E
——	10Hz(1)
---	10Hz(2)
-x-x-	20Hz
-△-△-	30Hz
T	303°K

及 30 赫,同用上法在温度 303°K 下测量,绘成曲线如图 3。

由图 1 可见,以 10 赫激活之 A 值曲线,高于其他频率及对照组 (E),其平均斜率 $\Delta A/\text{min}$,亦最大,即其激活力最高。于是即取 10 赫频率为准,变化其声压,在图 2 中表示出以 127.7 分贝之声压激活之曲线斜率最大,由此得出初步粗估值,以 10 赫及 127.7 分贝对碱性磷

酸酶之激活作用最高。又如图 3、其 30 赫之次声作用不但低于 10 赫的,而且更低于对照组 E、可见以次声范围内之 10 赫频率激活作用最大,而由喇叭产生之 30 赫谐波作用,无大影响。

(图 3 所用的碱性磷酸酶,系自文蛤中提出的,曾用 40℃ 及 45℃ 做实验,主要结果皆相同)。

表 1 不同次声频率与酶的比活力增值关系

次 声 信 号		酶	
频率 $f(\text{Hz})$	声压 $P_s(\text{db})$	比 活 力 $\mu\text{mPnP}/\text{mg}(\text{Pro})/\text{min}$	比活力增值 (%)
—	E	2.27	—
10	128.3	2.59	14.1
10	128.3	2.58	13.7
15	125.5	2.23	-1.8
15	125.5	2.22	-2.2
15	129.7	2.20	-3.1
15	129.7	2.21	-2.64
20	128.3	2.15	-5.29
20	128.3	2.13	-6.17
—	E	2.19	—
10	125.5	2.21	0.913
10	125.5	2.28	4.11
10	129.7	2.32	5.94
20	129.7	2.30	6.02
20	125.5	2.14	-2.40
20	125.5	2.16	-1.37
20	128.3	2.00	-8.60
20	128.3	2.05	-6.40

注: a 蛋白浓度 0.600 mg/ml b 蛋白浓度 0.538 mg/ml

表 2 不同次声声压对酶的比活力增值关系

次 声 信 号		酶	
$f(\text{Hz})$	$P_s(\text{db})$	比 活 力 $\mu\text{mPnP}/\text{mg}(\text{Pro})/\text{min}$	比活力增值 (%)
—	E	2.29	—
10	126.7	2.54	10.9
10	126.7	2.45	6.99
10	127.7	2.67	16.5
10	127.7	2.67	16.5
10	127.7	2.67	16.5
10	127.7	2.76	20.5
10	128.3	2.58	12.7
10	128.3	2.63	14.8

注: 蛋白浓度 0.600 mg/ml

(2) 依照(乙)项(a)法,测定并计算酶比活力列表如1,2及3。在表1中看出,三种频率中以10赫的比活力增值为最大;在表2中,可看出,同为10赫频率时,以127.7分贝的比

活力增值最大,在16.5%至20%间。表3所列,由于采用从美Sigma公司购买之纯酶,其次声激活作用,不明显。

表3 不同声压对纯(近似)酶活力增值的关系

次 声 信 号		酶	
f(Hz)	P _i (db)	比 活 力 μmPnP/mg(Pro)/min	比活力增值 (%)
—	E	15.0	—
10	123.9	14.7	-1.97
10	123.9	14.7	-1.97
10	125.5	15.4	1.97
10	125.5	15.4	1.97
10	127.7	15.7	3.95
10	127.7	15.7	3.95
10	129.7	15.2	1.32
10	129.7	15.2	1.32

注: 蛋白浓度 0.079 mg/ml

表4 次声信号对加入微量金属离子后的酶活性影响

次 声 信 号		酶或加入微量金属离子之酶	
f(Hz)	P _i (db)	比 活 力 μmPnP/mg(Pro)/min	比活力增值 (%)
对照1	E1	1.77 ^a	—
对照2	E2	1.88	6.21 ^c
5	128.3	2.04	15.3
5	128.3	1.90	1.06
10	127.7	2.58	37.2
10	127.7	2.43	29.2
对照3	E3	2.23	26.0 ^c
5	128.3	2.53	13.5
5	128.3	2.48	11.2
10	127.7	2.75	23.3
10	127.7	2.68	20.2

注: E1 未加金属离子及未加次声处理; E2 加 Mn²⁺ 但未经次声处理; E3 加 Fe²⁺, 但未经次声处理; a. 蛋白浓度 0.523 mg/ml; b. 蛋白浓度 0.514 mg/ml; c. E2 或 E3 与 E1 比较之活力增值; d. 加次声后对 E2 或 E3 比活力之增值。

二、次声信号对加入过渡金属离子于酶体的激活作用

在一定量酶液中,分别加入一定浓度的各种过渡金属离子,摇匀后,各吸取 5.0 ml,以不同频率及声压的次声信号处理,1 小时后,求出其活力变化。结果分别列于表 4 及 5 中。

由 4,5 二表可见,加入 Mn²⁺ 和 Co²⁺ 后,经次声处理,其比活力增加最多,加入 Ni²⁺ 的

次之,加入 Cu²⁺ 的无显著变化,而加入 Zn²⁺ 的其活力较未经次声处理的略减。

三、用次声信号振动水中金鱼后,其酶活力的变化

第一批在 4000 ml 培养缸,培养约 4 厘米长的金鱼,在两天内每天换水一次,并加入同样的饵料,分 A, B, C 三缸。A 缸为对照组,不供氧不加次声处理; B 缸只加次声处理; C 缸只

用小气泵打气。每天测量C缸溶氧量为饱和值的100%，B缸为55%，A缸为45%。二天后杀鱼，分别捣碎，每条金鱼各加入5.0 ml的0.01 mol/L Tris-HCl (pH 7.5 内含有0.1mol/L NaCl) 提取酶液，过滤后分别吸取酶液0.5 ml，按乙项(a)法测定，其结果如表6。

由表6可见，用次声处理的B缸，其水中溶

氧量虽较打气的为低，但其酶的平均比活力反而较高。

第二批用二个培养缸培养同上项相同的金鱼。一缸全日只打气供氧；另一缸每半日只打气供氧一小时，其余时间用次声振动，在次声振动半日后测氧，其溶氧量为饱和值的60%左右，而打气供氧的经常维持饱和。如此处理二

表5 次声信号对加入微量金属离子后酶活性的影响

次 声 信 号		酶或加入微量金属离子之酶	
f(Hz)	P _r (db)	比 活 力 μmPnP/mg(Pro)/min	比活力增值 (%)
对照	E1	1.84 ^a	—
对照	E2	1.85	0.54 ^c
10	127.7	2.20	18.9
10	127.7	2.27	22.7
对照	E3	1.86	1.09 ^c
10	127.7	2.27	15.6
10	127.7	2.17	16.7
对照	E4	1.93	3.76 ^c
10	127.7	2.12	9.84
10	127.7	2.12	9.84
对照	E5	1.85	0.54 ^c
10	127.7	1.83	-0.54
10	127.7	1.81	-1.63

E1 未加金属离子及未经次声处理之酶； E2 加入微量 Co²⁺，但未经次声处理之酶； E3 加入微量 Ni²⁺，但未经次声处理之酶； E4 加入微量 Cu²⁺，但未经次声处理之酶； E5 加入微量 Zn²⁺，但未经次声处理之酶； a. 蛋白浓度 0.53 mg/ml； b. 蛋白浓度 0.518 mg/ml； c. E2, E3, E4 或 E5 与 E1 比较之比活力增值； d. 加次声后对 E2, E3, E4 或 E5 比活力之增值。

表6 次声信号对金鱼体内酶活力的影响

金鱼编号	蛋白浓度 (mg/ml)	酶	
		比 活 力 μmPnP/mg(Pro)/min	平均比活力增值 (%)
A {	1	0.0448	—
	2	0.0431	
	3	0.0840	
	4	0.0954	
	5	0.0762	
B {	6	0.0883	71.2%
	7	0.1993	
	8	0.1029	
	9	0.1050	
	10	0.0926	
C {	11	0.1264	21.7%
	12	0.0521	
	13	0.0724	

表7 次声信号与打气供氧处理后金鱼酶活力的比较

酶			
金鱼编号	蛋白浓度 mg/ml	比活力 $\mu\text{mPnP}/\text{mg}(\text{Pro})/\text{min}$	平均比活力增值 (%)
A $\begin{cases} 1 \\ 2 \\ 3 \end{cases}$	7.75	0.057	—
	5.30	0.066	
	5.80	0.057	
		平均值 0.060	
B $\begin{cases} 1 \\ 2 \\ 3 \\ 4 \end{cases}$	17.55	0.073	38.3%
	8.50	0.079	
	5.20	0.087	
	4.75	0.092	
		平均值 0.083	

日后杀鱼,与上批同法测定其比活力,结果如表7。

由表7可见,用次声振动的酶活力仍高于只供氧的活力。

讨 论

总结上述结果,可见在使用某一给定频率及声压范围内的次声信号,对含有不同量粗杂蛋白的碱性磷酸酶液振动后,可以产生明显的激活作用,尤其在用金属离子初步激活酶活力后,再加以次声处理,更能增加其活力。目前虽不能对其机理加以解释,但此种实验结果,对酶结构的了解有启发性的作用。但此种酶所含杂蛋白低于若干值时则无法用次声激活。次声对

其他酶液的作用如何,为一值得研究的问题(1986年有人曾对几种重要酶液做过此种次声实验,均无法激活,其资料未发表)。

参 考 文 献

- [1] 沈持衡、陈柏云等:《海洋通讯》,4,58,1985。
- [2] 沈持衡、陈世杰等:《福建水产》,(2),21,1986。
- [3] 沈持衡等:《第五届全国生物医学电子学术会议论文选集》,3—5,1984。
- [4] 郑志成等:《厦门大学学报》25(1),84,1986。
- [5] Morton R. K.: *Nature*, 166, 1092, 1950。
- [6] 欧阳培等:《热带海洋》5,1,1985。
- [7] Garen A. and Levinthal, C: *Biochem. Biophys. Acta*, 138(3), 470, 1960。
- [8] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951。

【本文于1987年2月5日收到】

(上接第24页)

酶。老鼠口服大剂量的灰黄霉素引起肝肿大,出现原卟啉积累,并且与亚铁螯合酶活性降低成正比关系。实验性卟啉症为研究缺陷酶调节机制提供了有用的模型。

此外,铅中毒的特征为ALA和粪卟啉的排出量增加,是由于铅抑制ALA脱水酶和亚铁螯合酶之故。亚铁螯合酶活性的降低引起血红素合成减少,影响珠蛋白的合成,从而导致铁粒幼红细胞性贫血。

参 考 文 献

- [1] Porra, R. J.: *Anal. Biochem.*, 68, 289, 1975。
- [2] Dailey, H. A.: *J. Bacteriol*, 132, 302, 1977。
- [3] Labbe, R. F. et al.: *Biochem. Biophys. Acta.*, 41,

- 185, 1960。
- [4] Mailer, K. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 96, 777, 1980。
- [5] Taketani, S. et al.: *J. Biol. Chem.*, 256, 12748, 1981。
- [6] Dailey, H. A.: *J. Biol. Chem.*, 236, 14714, 1962。
- [7] Mazanowska, A. M. et al.: *Biochem. J.* 98, 117, 1966。
- [8] 麦克利恩, N(鲁子贤等译):《血红蛋白》,科学出版社,30页,1983。
- [9] Susan, P. C. et al.: *Molecular and Cellular Biochemistry*, 64, 127, 1984。
- [10] Viljoen, D. J. et al.: *Am. J. Hematol*, 6, 185, 1979。
- [11] George, R. R.: *Science*, 198, 199, 1977。
- [12] Matteis, F.: *Enzyme*, 16, 266, 1973。

【本文于1986年11月19日收到】