

• 研究论文 •

Cu²⁺和铜锌超氧化物歧化酶作用的光谱学研究

盛良全^{a,b} 郑晓云^b 童红武^b 刘少民^b 刘清亮^{*,b}

(^a 阜阳师范学院化学系 阜阳 236032)

(^b 中国科学技术大学化学与材料学院 合肥 230026)

摘要 利用邻苯三酚自氧化法监测在磷酸盐缓冲体系中 Cu²⁺对猪肝铜锌超氧化物歧化酶(CuZnSOD)活力的影响, 认为 Cu²⁺与猪肝 CuZnSOD 存在直接相互作用. 通过荧光光谱方法研究了这种相互作用, 内源荧光的猝灭实验表明 Cu²⁺与 CuZnSOD 形成 1 : 1 型稳定配合物; 荧光猝灭的动力学分析表明配合物形成过程由两个独立步骤完成: 第一步是双分子快速缔合过程, 形成了结合疏松的配合物, 第二步是单分子慢速过程, 即松散的配合物“异构化”成为结合紧密的配合物. FTIR 和 CD 证实相互作用过程伴随了蛋白分子构象的变化.

关键词 铜锌超氧化物歧化酶; 荧光光谱; Cu²⁺; 猪肝

Study on Interaction Between Copper Ion and Hog Liver CuZnSOD by Spectroscopy

SHENG, Liang-Quan^{a,b} ZHENG, Xiao-Yun^b TONG, Hong-Wu^b
LIU, Shao-Min^b LIU, Qing-Liang^{*,b}

(^a Department of Chemistry, Fuyang Teacher's College, Fuyang 236032)

(^b Department of Chemistry, University of Science & Technology of China, Hefei 230026)

Abstract The influence of copper ion on enzyme activity of hog liver copper zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) was monitored by using the pyrogallol autoxidation inhibition assay. The direct interaction of copper ion with CuZnSOD was studied by fluorescence spectroscopy, and a type of 1 : 1 stable complex has been generated, which was certified by the quenching experiment of intrinsic fluorescence. The process of the generated complex shown by dynamic analysis of fluorescence quenching, consisted of two steps, in which the first step was a quick association process of double molecules to generate a loose complex, and the second step was a slow process of single molecule, where the loose complex was isomerized into the compact complex. The change of enzyme conformation was due to the binding of Cu²⁺ to SOD, which was confirmed by FTIR and CD spectra.

Keywords CuZnSOD; fluorescence spectroscopy; copper ion; hog liver

铜锌超氧化物歧化酶(CuZnSOD)是一类重要的抗氧化金属酶, 分子内 Cu(II)特殊的五配位结构是该酶的活性位点, 而包埋于疏水基团中的 Zn(II)在 CuZnSOD 分子中起着维持结构稳定、保证高酶活性的重要作用^[1]. CuZnSOD 酶活性中心的金属离子在水溶液中可以与氨

基酸、小肽、碱基等生物小分子配体发生作用, 使酶活性部位的 Cu(II)和 Zn(II)被部分诱导出来, 破坏了酶的催化活性. 金属离子与蛋白酶的相互作用影响酶学特征, 近年来, 胡皆汉等^[2,3]应用核磁共振、顺磁共振等溶液直接光谱法研究了这种作用的溶液平衡过程, 郑学仿

* E-mail: qliu@ustc.edu.cn

Received February 18, 2005; revised April 25, 2005; accepted June 14, 2005.

国家自然科学基金(No. 30270321)资助项目.

等^[4]证明氨基酸-Co(II)可以将 CuZnSOD 酶中的部分 Cu(II)和 Zn(II)诱导、置换出来, Co(II)进入酶中 Cu(II)和 Zn(II)的结合位点, 形成 Co(II)的 SOD 酶衍生物, 并相应影响了 CuZnSOD 酶的活性; 徐通敏等^[5]研究了在低浓度范围内, 增加外源 Cu^{2+} 浓度可提高 CuZnSOD 酶活性. 我们以前的工作表明超过一定浓度的外源 Cu^{2+} 对烟草 CuZnSOD 的活性有较大的影响, 可使酶的活性降低乃至完全消失^[6]. 这些结论结合本文的实验说明 Cu^{2+} 对 CuZnSOD 的活性可能存在着“低促高抑”现象. 荧光光谱是研究蛋白质分子溶液行为的重要手段, 但有关超氧化物歧化酶的荧光光谱的报道较少, 前文^[7]报道了烟草 CuZnSOD 的荧光光谱特性, 提出了 H_2O_2 对烟草 CuZnSOD 的荧光猝灭属于动态猝灭和氧化还原猝灭的双重机制. 本文用荧光滴定、荧光动力学等手段证实了 Cu^{2+} 与 CuZnSOD 之间的相互作用, 计算了结合常数以及结合位点数; 荧光猝灭的动力学分析表明配合物形成过程由两个独立步骤完成: 第一步是双分子快速缔合过程, 形成了结合疏松的配合物, 第二步是单分子慢速过程, 即松散的配合物“异构化”成为结合紧密的配合物. 同时, 使用 FTIR 和 CD 证实相互作用过程伴随了蛋白分子构象的变化.

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

Lamda 2 型紫外-可见分光光度计(美国 Pekin Elmer 公司); 751-GW 紫外可见分光光度计(惠普上海分析仪器有限公司); LS55 荧光分光光度计(美国 Pekin Elmer 公司); Nicolet Magna IR 750 FTIR 750 spectrometer (Nicolet Corp.); JASCO J-720 spectropolarimeter.

新鲜猪肝购自市场, 磷酸氢二钾(分析纯, 上海恒信化学试剂有限公司), 磷酸二氢钾(分析纯, 广东西陇化工厂), 硫酸铜(分析纯, 淮南市化学试剂厂), 猪肝 CuZnSOD(电泳纯, 自制, 按文献^[8]略作改动). 其它药品均为分析纯, 实验用水为去离子水.

1.2 实验方法

1.2.1 活力测定

取 4.5 mL, 50 mmol/L PBS (pH 8.2) 缓冲液, 加入适量酶液和硫酸铜工作液, 用微量注射器加入 50 mmol/L 邻苯三酚 10 μL , 同时计时, 在 751-GW 分光光度计上监测吸光度的变化. 以加入各相应量硫酸铜工作液为空白作对照, 根据吸光度随时间的变化率(邻苯三酚自氧化速率)定义酶的相对活力.

1.2.2 荧光光谱测定

配制 50 mmol/L 的磷酸盐缓冲液, 以此缓冲液分别

配制各种试剂贮备液. 在 1 cm 荧光比色皿中加入 2.5 mL (50 mmol/L) 的缓冲液. 用微量注射器注入一定量的猪肝 CuZnSOD 贮备液, 逐次注射适量试剂溶液, 室温放置 2 min, 在荧光光度计上, 以激发带宽和发射带宽均为 10 nm, 扫描速度 60 nm/min 进行各种荧光测定(以各相应缓冲液为空白).

1.2.3 荧光猝灭动力学实验(Time drive)

在 LS55 荧光分光光度计上, 以激发带宽和发射带宽均为 10 nm, 激发波长 280 nm, 发射波长 315 nm, 不加酶的缓冲液为空白, 监测猪肝 CuZnSOD 的荧光强度在加入一定量的硫酸铜工作液后随时间的变化.

1.2.4 FTIR 和 CD 谱测定

红外光谱的测定采用 Nicolet Magna IR 750 FTIR 750 spectrometer (Nicolet Corp.). 样品采用 1.6 mg/mL 的 SOD, 用 N_2 吹干后用 KBr 压片室温下测定, 扫描 128 次, 分辨率 4 cm^{-1} , CD 谱的测定(190~250 nm)采用 JASCO J-720 spectropolarimeter. SOD 样品浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$, 结果取三次平均值.

2 结果和讨论

2.1 Cu^{2+} 对猪肝 CuZnSOD 活力的影响

取 15 μL 酶液加入到各装有 4.5 mL 50 mmol/L 的 PBS 缓冲液(pH 8.2)的样品管中, 再加入不同量的 0.1 mol/L 外源试剂, 使外源试剂终浓度小于 1 mmol/L, 于室温保持 15 min, 测定各样品的酶活力. 实验结果表明: 当浓度达 0.1 mmol/L 时, 酶活力开始明显降低, 至 0.2 mmol/L 时, 活力损失很大, 再增加外源离子浓度, 活力无显著变化(图 1). 外源 Cu^{2+} 的加入引起猪肝 CuZnSOD 活力的损失, 可能是由于 Cu^{2+} 与猪肝 CuZnSOD 之间发生了相互作用, 形成了复合物, 引起酶分子构象的变化.

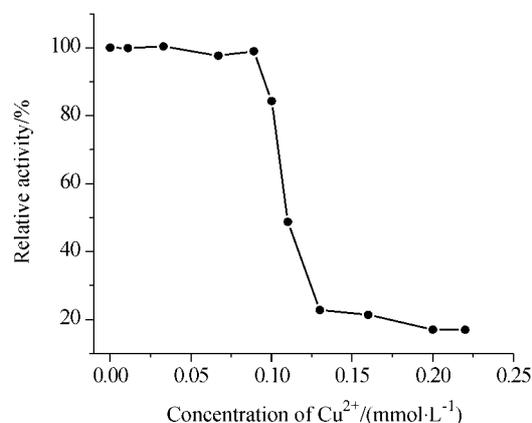


图 1 外源 Cu^{2+} 对酶活力的影响

Figure 1 Effect of outer copper ion on the enzyme activity

2.2 猪肝 CuZnSOD 的荧光光谱

猪肝 CuZnSOD 的内源荧光来源于 Tyr 残基, 在 pH 7.6 的磷酸盐缓冲液中 $\lambda_{\text{max}}^{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max}}^{\text{em}} = 315 \text{ nm}$, 没有出现 Trp 残基的特征峰; 游离的 Tyr 的 $\lambda_{\text{max}}^{\text{ex}} = 278 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max}}^{\text{em}} = 307 \text{ nm}$, 猪肝 CuZnSOD 的最大发射峰相对于游离的 Tyr 发射峰红移 8 nm. Shimizu 等^[9,10]研究了不同浓度的磷酸盐 (pH 7.5) 体系中 Tyr 蛋白(不含色氨酸)的荧光光谱, 认为随着磷酸盐浓度的增大, 305 nm 处的荧光强度降低, 在 345 nm 处出现一个新峰(其强度随着磷酸盐浓度的增大而增强). 我们的实验没有观察到此现象(扣除相应空白).

2.3 Cu^{2+} 对猪肝 CuZnSOD 的内源荧光的猝灭作用

图 2 表明: Cu^{2+} 对 Tyr 和猪肝 CuZnSOD 的荧光发射强度都有影响, 但对两者的荧光发射峰位影响不大, 当 $[\text{Cu}^{2+}] : [\text{SOD}]$ 达到 9 : 1.6 时, 猪肝 CuZnSOD 荧光发射峰位红移 2 nm. 虽然游离 Tyr 和猪肝 CuZnSOD 的荧光

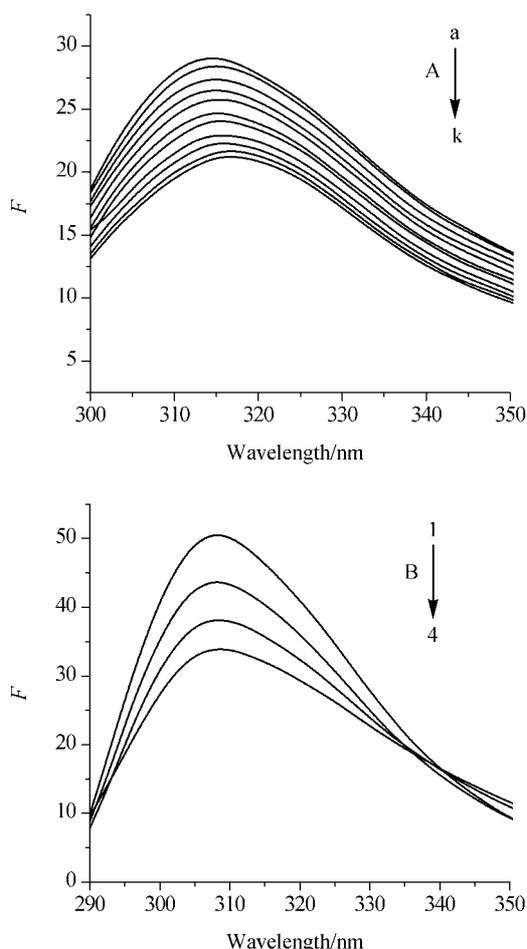


图 2 Cu^{2+} 滴定 CuZnSOD 和 Tyr 的荧光发射光谱

Figure 2 Intrinsic fluorescence emission spectra of CuZnSOD (A) and Tyr (B), and titration with Cu^{2+} ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$)

a→k $[\text{Cu}^{2+}] : [\text{SOD}] = 0; 1 : 1.6; 2 : 1.6; 3 : 1.6; 4 : 1.6; 5 : 1.6; 6 : 1.6; 7 : 1.6; 8 : 1.6; 9 : 1.6; 10 : 1.6$. 1→4 $[\text{Cu}^{2+}] : [\text{Tyr}] = 0; 1 : 1; 2 : 1; 3 : 1$

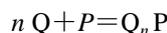
强度在相同条件下都随着 Cu^{2+} 浓度的增大而有猝灭作用, 但 Cu^{2+} 对前者的猝灭程度更大一些, 这说明猪肝 CuZnSOD 分子中的 Tyr 残基和游离的 Tyr 所处的微环境不同. 荧光发射峰位没有发生明显的变化, 说明在磷酸盐体系中, 外源 Cu^{2+} 的作用并未使 Tyr 残基的极性环境进一步发生显著的变化.

2.4 猝灭机理及形成常数的确定

荧光猝灭可由动态猝灭、静态猝灭所引起, 动态猝灭服从 Stern-Volmer 方程: $F_0/F = 1 + K_q\tau_0[\text{Q}] = 1 + K_{\text{SV}}[\text{Q}]$. 式中 F_0, F 分别表示猝灭剂加入前后的荧光强度, $[\text{Q}]$ 为猝灭剂浓度, K_{SV} 为 Stern-Volmer 猝灭常数. 根据图 2, Cu^{2+} 对猪肝 CuZnSOD 荧光的猝灭关系, 将 315 nm 处的荧光强度按 Stern-Volmer 方程进行线性拟合, 求出 $K_{\text{SV}} = 1.76 \times 10^5 \text{ (mol/L)}$, 线性相关系数为 0.9989. 由于生物大分子的荧光寿命约为 10 ns 数量级, 则可得 $K_q = 1.76 \times 10^{13} \text{ (mol}\cdot\text{L}^{-1})^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, 此值远大于猝灭剂对生物大分子的最大扩散猝灭常数 $2.0 \times 10^{10} \text{ (mol}\cdot\text{L}^{-1})^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, 表明猪肝 CuZnSOD 荧光猝灭由静态猝灭引起. 而当荧光体与猝灭体之间形成不发荧光的 1 : 1 型复合物时, 静态猝灭满足 Lineweaver-Burk 方程: $(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K_D \cdot (F_0[\text{Q}])^{-1}$. 将 315 nm 处的荧光强度按 Lineweaver-Burk 作线性拟合, 线性相关系数为 0.9988, $K_D = 6.15 \times 10^{-6} \text{ (mol}\cdot\text{L}^{-1})$, 则 $K_A = 1/K_D = 1.63 \times 10^5 \text{ (mol}\cdot\text{L}^{-1})^{-1}$, 说明 Cu^{2+} 与猪肝 CuZnSOD 形成了相对稳定的复合物.

2.5 形成常数的进一步求算和结合位点数的计算

在静态猝灭作用中, 静态猝灭荧光强度与猝灭剂的关系可由荧光体-猝灭剂分子之间的结合常数表达式推导求出. 设蛋白质分子(P)与猝灭剂分子(Q)键合时有 n 个结合位点^[11], 则有:



其形成常数 K_A 为:

$$K_A = [\text{Q}_n \text{ P}] / [\text{Q}]^n [\text{P}]$$

若蛋白质初始浓度为 $[\text{P}_0]$, 则有 $[\text{P}_0] = [\text{P}] + [\text{Q}_n \text{ P}]$. 设生成的复合物 $\text{Q}_n \text{ P}$ 无荧光特性, 在静态猝灭中, 荧光体的荧光强度与其游离浓度成正比, 有 $[\text{P}] / [\text{P}_0] = F / F_0$. 将各浓度关系代入形成常数表达式, 整理后得:

$$\lg(F_0 - F) / F = \lg K_A + n \lg[\text{Q}]$$

按此公式作线性拟合, 相应的线性相关系数为 0.9992, 结合常数 $K_A = 4.46 \times 10^5 \text{ (mol}\cdot\text{L}^{-1})^{-1}$, $n = 1.07$. 进一步说明 Cu^{2+} 与猪肝 CuZnSOD 形成了 1 : 1 型相对稳定的复合物.

2.6 荧光猝灭的动力学分析

进一步考察了室温下酪氨酸残基荧光猝灭的动力学过程. 固定激发波长为 280 nm, 记录发射波长为 315 nm 时的荧光动力学曲线(图 3). 由图可见酪氨酸残基的荧光强度随着时间的变化呈指数衰减, 在 Cu^{2+} 与猪肝 CuZnSOD 生成复合物的过程中, 猪肝 CuZnSOD 分子的电荷分布和分子构象发生变化, 进一步扰动 Tyr 残基的微环境导致荧光猝灭, 约 20 s 以后, Cu^{2+} 与猪肝 CuZnSOD 的复合作用基本完毕, 体系荧光强度趋于不变.

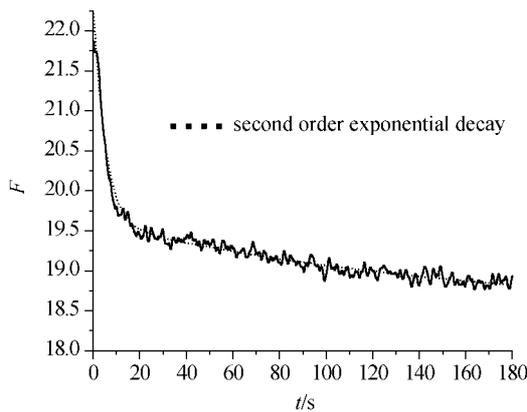
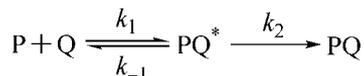


图3 CuZnSOD 溶液中加入 Cu^{2+} 后荧光强度随时间的变化

Figure 3 The fluorescence intensity of CuZnSOD changed with the time after adding Cu^{2+}

假设 Cu^{2+} -猪肝 CuZnSOD 复合物的形成满足如下过程:



P 是蛋白质分子, Q 是外源离子. 利用稳态法进行处理有:

$$k_1[\text{P}][\text{Q}] = (k_{-1} + k_2)[\text{PQ}^*] \quad (1)$$

$$[\text{P}] = [\text{P}]_0 - [\text{PQ}^*] - [\text{PQ}] \quad (2)$$

(1)代入(2)得:

$$[\text{PQ}^*] = \{k_1[\text{P}]_0[\text{Q}] - k_1[\text{PQ}][\text{Q}]\} / \{k_1[\text{Q}] + k_{-1} + k_2\} \quad (3)$$

$$d[\text{PQ}]/dt = k_2[\text{PQ}^*]$$

$$d[\text{PQ}]/dt = k_2 \{k_1[\text{P}]_0[\text{Q}] - k_1[\text{PQ}][\text{Q}]\} / \{k_1[\text{Q}] + k_{-1} + k_2\} \quad (4)$$

$$\text{令 } \tau^{-1} = k_2 k_1 [\text{Q}] / \{k_1[\text{Q}] + k_{-1} + k_2\}$$

$$\text{则: } d[\text{PQ}]/dt = \tau^{-1}[\text{P}]_0 - \tau^{-1}[\text{PQ}] \quad (5)$$

解微分方程得: $A \exp(-t/\tau) = \tau^{-1}[\text{P}]_0 - \tau^{-1}[\text{PQ}]$

当 $t=0$ 时, $[\text{PQ}]=0$, $A = \tau^{-1}[\text{P}]_0$, 将 A 与(2)式代入上式得:

$$[\text{P}]_0 \exp(-t/\tau) = [\text{P}] + [\text{PQ}^*] \quad (6)$$

设生成物 PQ^* 无荧光, 起始时刻荧光强度 F_0 正比于 $[\text{P}]_0$, t 时刻荧光强度 F_t 正比于 $[\text{P}]$, 反应完全时荧光强度为 F_∞ , 可得下式^[12]:

$$F_t - F_\infty = (F_0 - F_\infty) \exp(-t/\tau) \quad (7)$$

利用 Origin 7.0 软件对实验数据进行单指数衰减拟合, 曲线方程为: $F_t = 19.06 + 2.64 \exp(-t/10.76)$ ($R^2 = 0.8566$), 与以上推导结果基本吻合; 对实验数据进行双指数衰减拟合, 曲线方程为: $F = 2.68 \exp(-t/5.00) + 1.18 \exp(-t/169.98) + 18.41$ ($R^2 = 0.9720$). 显然双指数曲线拟合吻合程度更高. 对于简单酶反应, 其曲线一般含有两个指数项^[13], 总过程可表示为:

$$x = A_0 + A_1 \exp(-k_1 t) + A_2 \exp(-k_2 t)$$

式中 A_0, A_1 及 A_2 为常数, k_1 和 k_2 分别为两个过程的表现速度常数, 若各指数项对应的弛豫时间差别较大时, 则可把这个反应分解成两个独立的过程. 据此, 我们认为在 Cu^{2+} 与猪肝 CuZnSOD 相互作用中, 由于两个指数项对应的弛豫时间差别较大(分别为: 5.00 和 169.98), 可把该反应分解成两个独立的过程, 第一步是双分子快速缔合过程, 形成了结合疏松的配合物, 第二步是单分子慢速过程, 即松散的配合物“异构化”成为结合紧密的配合物.

2.7 Cu^{2+} 作用前后的红外光谱

通过 128 次反复扫描并去除背景后, 得到 SOD 在不同状态的红外光谱. SOD 与不同量的铜离子作用后, SOD 的红外光谱强度和峰位均有所改变, 说明 Cu^{2+} 与 SOD 的相互作用引起了蛋白质的二级结构发生相应变化.

红外谱图中的特征吸收带($1600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$)为蛋白质的酰胺 I 带, 对于研究蛋白质的二级结构最有价值. 通常认为: $1600 \sim 1640 \text{ cm}^{-1}$ 为 β 折叠, $1650 \sim 1658 \text{ cm}^{-1}$ 为 α 螺旋, $1640 \sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ 和 $1660 \sim 1695 \text{ cm}^{-1}$ 为其他结构^[14]. 为了得到更为详细的信息, 利用 Origin 7.0 软件, 采用 9 点 Savitsk-Golay 函数平滑后, 根据二阶导数和傅立叶去卷积, 确定子峰个数和峰位, 对谱图进行高斯拟合并计算二级结构(图 4)(表 1). 加入 Cu^{2+} 后, 表征 β 折叠的两个吸收带的峰的强度有所降低, 而其他结构的含量在增加, 尤其当 $n_{\text{Cu}^{2+}} : n_{\text{SOD}} = 20 : 1$ 时, α 螺旋和 β 折叠均有所降低, 其他结构含量增加明显. 结合活性实验, 可以看出二级结构的变化和酶的活性变化存在协同性, 说明当 Cu^{2+} 加入量较大时, 酶的活性变化可能是源于酶的二级结构的变化.

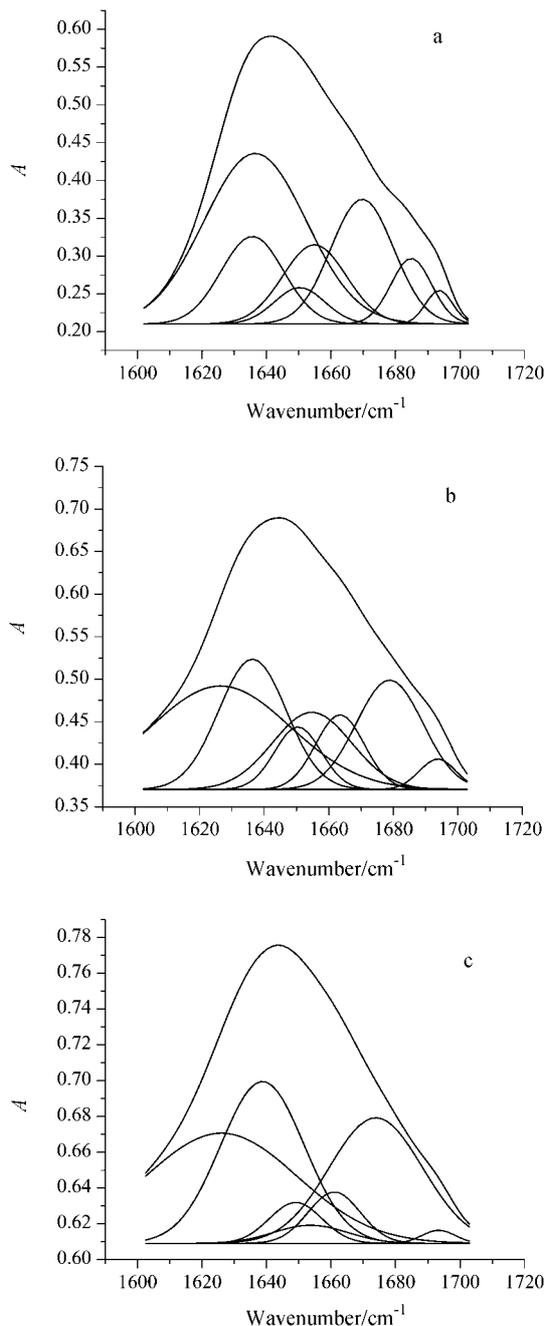
图4 CuZnSOD加入 Cu^{2+} 前后拟合结果Figure 4 Curve fit of CuZnSOD spectra on addition of Cu^{2+}
a, $n_{\text{Cu}^{2+}} : n_{\text{SOD}} = 0 : 1$; b, $n_{\text{Cu}^{2+}} : n_{\text{SOD}} = 10 : 1$; c, $n_{\text{Cu}^{2+}} : n_{\text{SOD}} = 20 : 1$

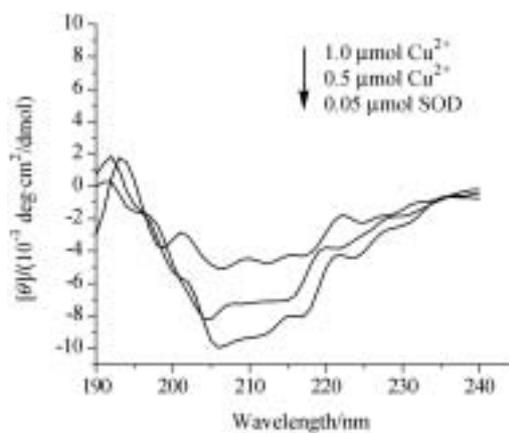
表1 CuZnSOD的二级结构含量(高斯拟合计算结果)

Table 1 Content of secondary structure of CuZnSOD by Gauss fitting to spectra

$n_{\text{Cu}^{2+}} : n_{\text{SOD}}$	0 : 1	10 : 1	20 : 1
α -Helix	12.2%	13.8%	3.0%
β -Fold	55.6%	52.5%	50.2%
Random coil	32.2%	33.7%	47.8%

2.8 Cu^{2+} 作用前后的CD谱

在0.05 μmol 的CuZnSOD酶溶液中分别加入0.5, 1.0 μmol CuSO_4 溶液后, SOD酶208 nm处的 $[\theta]$ 负吸收值减小, 表征酶分子 β 折叠结构的222 nm处 $[\theta]$ 负吸收值减小(与红外光谱的结果一致), 说明 Cu^{2+} 与酶分子配位后, 改变了酶分子的二级结构, 致使在 Cu^{2+} 加入一定量以后对酶的活性产生较大影响。

图5 加入 Cu^{2+} 前后CuZnSOD的CD谱Figure 5 Dependence of CuZnSOD spectra on concentration of Cu^{2+}

References

- Tainer, J. A.; Getzoff, E. D.; Been, K. M.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. *J. Mol. Biol.* **1982**, *160*, 181.
- Wang, J.-Y.; Zheng, X.-F.; An, L.-J.; Gai, H.-W.; Hu, J. H. *Spectrosc. Spec. Anal.* **2001**, *21*(4), 432 (in Chinese). (王静云, 郑学仿, 安利佳, 盖宏伟, 胡皆汗, 光谱与光谱学分析, **2001**, *21*(4), 432).
- Zheng, X.-F.; Wang, J.-Y.; Wang, Y.; An, L.-J.; Gai, H.-W.; Hu, J.-H. *Spectrosc. Spec. Anal.* **2001**, *21*(6), 804 (in Chinese). (郑学仿, 王静云, 王园, 安利佳, 盖宏伟, 胡皆汗, 光谱与光谱学分析, **2001**, *21*(6), 804).
- Zheng, X.-F.; Hu, J.-H.; Cheng, G.-B.; Xu, Y.-T.; Zhao, Y.-K.; Liu, M.-H. *Spectrosc. Spec. Anal.* **1999**, *19*, 798 (in Chinese). (郑学仿, 胡皆汗, 程国宝, 许永廷, 赵永魁, 刘美华, 光谱与光谱学分析, **1999**, *19*, 798.)
- Xu, T.-M.; Zhou, T.-S.; Jin, L.-T. *Chem. J. Chin. Univ.* **1995**, *16*, 1700 (in Chinese). (徐通敏, 周天舒, 金利通, 高等学校化学学报, **1995**, *16*, 1700.)
- Sheng, L.-Q.; Liu, S.-M.; Ye, J.-H.; Xu, X.-L.; Xie, Y.-S.; Liu, Q.-L. *Chin. J. Inorg. Chem.* **2003**, *19*(2), 191 (in Chinese). (盛良全, 刘少民, 叶纪华, 徐小龙, 解永树, 刘清亮, 无机化学学报, **2003**, *19*(2), 191.)

- 7 Sheng, L.-Q.; Liu, S.-M.; Zhang, Y.; Xu, X.-L.; Xie, Y.-S.; Liu, Q.-L. *Spectrosc. Spectr. Anal.* **2003**, 23(5), 888 (in Chinese).
(盛良全, 刘少民, 张燕, 徐小龙, 解永树, 刘清亮, 光谱学与光谱分析, **2003**, 23(5), 888.)
- 8 Sheng, L.-Q.; Zheng, X.-Y.; Song, Z.-T.; Liu, S.-M.; Du, J.-H.; Liu, Q.-L. *Plant Sci.* **2004**, 167, 1235.
- 9 Shimizu, O.; Imakubo, K. *Photochem. Photobiol.* **1977**, 26, 541.
- 10 Szabo, A.; Lynn, K. R.; Krajcarski, K. T.; Rayner, D. M. *FEBS Lett.* **1978**, 94, 249.
- 11 Yang, P.; Gao, F. *The Principles of Bioinorganic Chemistry*, Science Press, Beijing, **2002** (in Chinese).
- (杨频, 高飞, 生物无机化学原理, 科学出版社, 北京, **2002**.)
- 12 Bai, H.-J.; Liu, W.; Yang, B.-S. *Acta Chim. Sinica* **2002**, 60(7), 1253 (in Chinese).
(白海静, 刘文, 杨斌盛, 化学学报, **2002**, 60(7), 1253.)
- 13 Yan, S.-X.; Cai, H.-Y. *The Principles and Methods of Catalytic Dynamics of Enzyme*, Xiamen University Press, Xiamen, **1987**.
(颜思旭, 蔡红玉, 酶催化动力学原理与方法, 厦门大学出版社, 厦门, **1987**.)
- 14 Byler, D. M.; Brouillette, J. N.; Susi, H. *Spectroscopy* **1986**, 1(3), 29.

(A0502183 ZHAO, X. J.; DONG, H. Z.)