

[Article]

www.whxb.pku.edu.cn

牛血清白蛋白的光损伤和光氧化机理

程伶俐 赵萍 王玫 朱慧 朱融融 孙晓宇 汪世龙*

(同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092)

摘要: 运用激光闪光解瞬态吸收技术, 在 266 nm 激光激励下, 研究了牛血清白蛋白(BSA)光损伤和被 $\text{SO}_4^{\bullet-}$ 单电子氧化的反应机理, 表征了反应过程中生成的自由基. 结果表明, 在 266 nm 激光照射下, BSA 可同时发生光电离和光激发, 生成色氨酸阳离子自由基($\text{Trp}/\text{NH}^{\bullet+}$), 由 $\text{Trp}/\text{NH}^{\bullet+}$ 快速脱质子形成的色氨酸中性自由基($\text{Trp}/\text{N}^{\bullet}$) 及色氨酸三重激发态($^3\text{Trp}^*$), $^3\text{Trp}^*$ 再与酪氨酸(Tyr)发生分子内电子转移生成酪氨酸中性自由基($\text{Tyr}/\text{O}^{\bullet}$). 在 $\text{SO}_4^{\bullet-}$ 单电子氧化的反应中, 借助减谱技术, 求得 BSA 中 Tyr 和色氨酸(Trp) 自由基的表观生成速率常数, 但未发现分子内电子转移现象, 阐明了 $\text{SO}_4^{\bullet-}$ 自由基是通过与 BSA 中的 Tyr 和 Trp 发生电子转移反应来氧化 BSA 的, $\text{SO}_4^{\bullet-}$ 氧化 BSA 的反应速率常数为 $1.51 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 从而为进一步研究血清白蛋白的氧化还原代谢过程提供理论基础.

关键词: 牛血清白蛋白; 光电离; 光激发; 电子转移; 单电子氧化

中图分类号: O644

Photodamage and Photooxidation Mechanisms of Bovine Serum Albumin

CHENG Ling-Li ZHAO Ping WANG Mei ZHU Hui

ZHU Rong-Rong SUN Xiao-Yu WANG Shi-Long*

(School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, P. R. China)

Abstract: Photodamage and photooxidation mechanisms of bovine serum albumin (BSA) as induced by UV radiation and one-electron oxidation by $\text{SO}_4^{\bullet-}$ were investigated by 266 nm laser flash photolysis. BSA can be photoionized and photoexcited by 266 nm photons to give tryptophan ($\text{Trp}/\text{NH}^{\bullet+}$), $\text{Trp}/\text{N}^{\bullet}$ resulting from the rapid deprotonation of $\text{Trp}/\text{NH}^{\bullet+}$, and $^3\text{Trp}^*$. Through intermolecular electron transfer between $^3\text{Trp}^*$ and tyrosine (Tyr), $\text{Tyr}/\text{O}^{\bullet}$ was produced. In one-electron oxidation of BSA by $\text{SO}_4^{\bullet-}$ the apparent set up rate constants of Tyr and Trp radicals were calculated but intermolecular electron transfer was not observed. We propose that $\text{SO}_4^{\bullet-}$ oxidizes BSA by electron transfer to the Tyr and Trp of BSA with a rate constant of $1.51 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. This research provides an introductory theory to enable further study on the redox metabolic process of BSA.

Key Words: Bovine serum albumin; Photo-ionization; Photo-excitation; Electron transfer; One-electron oxidization

蛋白质是生物体中一类重要的大分子, 对于维持生命是十分重要和必不可少的. 血清白蛋白是哺乳动物血浆中含量最丰富的蛋白质, 它能够储存和转运众多内源性和外源性物质. 由于血清白蛋白在生理上的重要性以及易于分离、提纯而常被用作模

型球蛋白^[1-4]. 牛血清白蛋白(BSA)由于其重要的生物化学和生物物理学意义, 在过去的 40 年内被广泛地研究^[5]. BSA 是一种广泛应用的球蛋白, 它的分子结构中含有 583 个氨基酸残基, 其中有 78 个氨基酸容易被氧化 (2 个色氨酸、4 个甲硫氨酸、17 个组氨

Received: July 25, 2008; Revised: September 30, 2008; Published on Web: November 12, 2008.

* Corresponding author. Email: wsl@mail.tongji.edu.cn; Tel: +8621-65982595.

国家自然科学基金(30570376, 50673078)、上海市基础重点项目(06JC14068)及上海市教委科技创新项目(08DZ21)资助

© Editorial office of Acta Physico-Chimica Sinica

酸、20个酪氨酸和35个半胱氨酸)^[6],作为动物体内重要的转运蛋白,BSA参与了动物体内一系列重要的氧化还原反应.在光生物学和辐射生物学中,光及电离辐射与氨基酸、肽链及蛋白质相互作用是近年来生命科学研究的热门课题,由于这些研究均涉及自由基和激发态过程,与生物体内的氧化还原反应,酶催化反应及生物体对辐射(包括紫外光)的保护和敏化作用有着极其密切的关系^[7],所以探讨BSA的光损伤和光氧化反应机理就显得非常必要.

由于生命体系的原初反应过程都是微观动态过程,本研究采用纳秒激光光解技术研究了BSA的光损伤和 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 自由基氧化BSA的反应,初步阐述了BSA在水溶液中的光损伤和光氧化反应机理,从而为进一步研究血清白蛋白的氧化还原代谢过程提供理论基础.

1 实验部分

1.1 实验试剂

牛血清白蛋白(BSA, 99%, Sigma公司),未经进一步纯化直接使用.过硫酸钾($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$)(分析纯,国药集团化学试剂有限公司),重结晶后使用,其它试剂均为分析纯.实验体系均为磷酸盐缓冲液(pH=7); N_2 、 N_2O 和 O_2 为99.99%的高纯气体.除非特殊说明,本实验所用溶液均用Millipore纯水配制,并且保存在暗处,尽量避免光照.溶液根据需要,分别在实验前用高纯气体鼓泡20 min处理研究样品,所有实验均在室温下进行.

1.2 实验装置

研究在同济大学生命科学与技术学院的纳秒级激光光解装置上进行^[8,9],采用YAG固体激光器为激励光源,脉宽为3–6 ns,输出激光波长为266 nm时,单脉冲最大能量为60 mJ,氙灯作为全光谱分析检测光源,与激光光路垂直,分析光经透镜系统汇聚于1 cm石英样品池,经单色仪分光后由R955光电倍增管转化为电信号,为安捷伦1G高速数字示波器记录,数据转至计算机后用自编软件进行分析处理.可控流量通气仪为本实验室研制;所用仪器还有紫外-可见分光光度计(Cary 50 Probe, VARIAN, 美国)、电子分析天平(AL204, Mettler Toledo, 瑞士)、pH计(DELTA 320, Mettler Toledo, 瑞士)、超声清洗仪(DL-360D, 上海之信仪器有限公司)、恒温干燥箱(DHG-9140A, 上海精宏实验设备有限公司)及超纯水器(Milli-Q, Millipore, 美国).

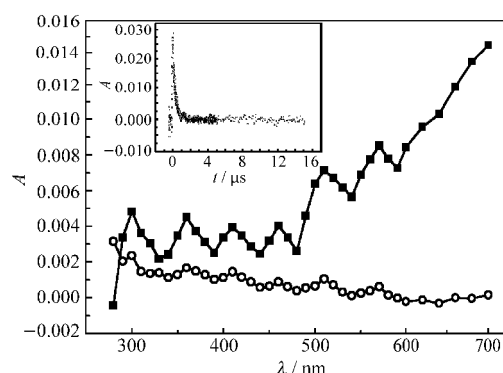


图1 BSA激光光解后不同时刻的瞬态吸收光谱
Fig.1 Transient absorption spectra of BSA

The spectra were recorded at 0.1 μs (■), 5 μs (○) following 266 nm laser pulse excitation of N_2 -saturated aqueous solution containing $7.55 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA. Inset shows the transient absorption curve observed at 680 nm.

2 结果与讨论

2.1 266 nm 激光作用下 BSA 光损伤机理研究

配制 $7.55 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氮气饱和的 BSA 中性水溶液, 266 nm 激光光解后得到图 1 所示不同时刻的瞬态吸收谱. 从图 1 可以看出, BSA 水溶液在 266 nm 的激光作用后, 在 0.1 μs 时, 在 500–750 nm 范围内出现瞬态吸收, 通入水合电子清除剂 N_2O 后该区域的瞬态吸收几乎消失(图 2), 具有水合电子的瞬态吸收特征, 因此可判定这一吸收为水合电子的贡献. 根据水合电子的存在, 可以初步判定 BSA 在 266 nm 激光的作用下发生了光电离^[10].

分别对比在 N_2 、 N_2O 和 O_2 饱和条件下, 同一时刻 BSA 中性水溶液的瞬态吸收光谱(图 2), 在 N_2 和

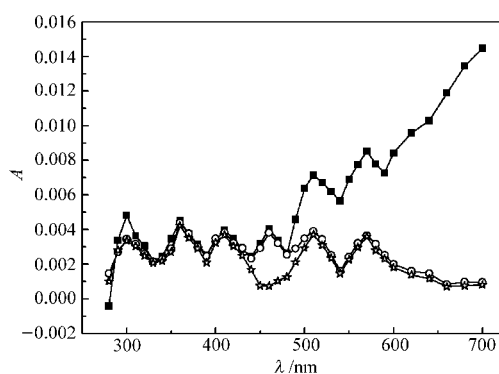


图2 不同气氛下 BSA 激光光解后的瞬态吸收光谱
Fig.2 Transient absorption spectra of BSA recorded at different saturated solutions

The spectra were recorded at 0.1 μs following 266 nm laser pulse excitation of N_2 -saturated (■), N_2O -saturated (○), and O_2 -saturated (☆) aqueous solution containing $7.55 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA.

N_2O 饱和条件下, 均可以观察到 360、410、460、510 和 570 nm 的特征吸收峰, 而在 O_2 饱和条件下, 460 nm 处的吸收峰消失. 由于 O_2 是激发三重态的猝灭剂, 意味着 460 nm 处可能是激发三重态的贡献. Bensasson 等^[11]曾经报道过, 蛋白质中的芳香氨基酸, 由于其氧化电位是氨基酸中最低的, 对 UV 光和氧化剂敏感, 因此是蛋白质光氧化损伤的重要位置. 在蛋白质的化学和放射性损伤过程中, 常常出现色氨酸吲哚自由基($TrpN^{\bullet}$)和酪氨酸酚氧自由基($TyrO^{\bullet}$). 根据文献[12–15]报道, $^3Trp^*$ 的特征吸收在 460 nm 处, 而 Trp/NH^{\bullet} 的特征吸收在约 350 和 560 nm 处, $TrpN^{\bullet}$ 和 $TyrO^{\bullet}$ 的特征吸收分别位于约 520 和 410 nm 处. 故上述 BSA 中性水溶液瞬态吸收谱中 360 和 570 nm 处的特征吸收峰可归属为 Trp/NH^{\bullet} 的贡献, 510 nm 处的可归属为 $TrpN^{\bullet}$ 的贡献, 410 nm 处的可归属为 $TyrO^{\bullet}$ 的贡献, 460 nm 处的归属为 $^3Trp^*$ 的贡献.

对比氮气饱和条件下, 460 和 410 nm 处时间衰减谱图(图3), 观察到伴随着460 nm处 $^3Trp^*$ 的衰减, 410 nm 处 $TyrO^{\bullet}$ 呈现一个迅速生成, 然后缓慢衰减的过程. 故初步可推断体系经历了两个过程: 首先, Trp 残基被光激发生成 $^3Trp^*$, 随后 $^3Trp^*$ 通过分子内电子转移氧化 Tyr 残基, 生成 $TyrOH^{\bullet}$, 其 pK_a 值(弱酸性或弱碱性物质在 50%解离时溶液的 pH 值)为-1, 在此体系中迅速脱质子生成 $TyrO^{\bullet}$ ^[16]. 其原因可能是, Trp在266 nm的摩尔消光系数比Tyr大近10倍, 在此体系中, 激光能量主要被Trp吸收, 光解生成

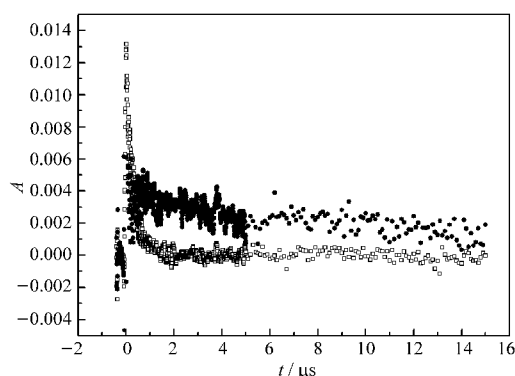


图3 BSA 激光光解后在 460 nm(□)和 410 nm (●)记录的时间衰减谱曲线

Fig.3 Transient absorption curves of BSA at 460 nm (□) and 410 nm (●)

N_2 -saturated aqueous solution containing $7.55 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA excited by 266 nm laser pulse.

$TrpNH^{\bullet}$ 和 $^3Trp^*$. Trp的 pK_a 值为4.3, 在此体系中会迅速脱质子形成 $TrpN^{\bullet}$, 而由于 Tyr 的氧化电位比Trp低(Trp 1.05 V, Tyr 0.94 V(*vs* NHE))^[17], 故 Tyr 可以被 Trp^{\bullet} 所氧化, 且 $^3Trp^*$ 的氧化性大于 $TrpNH^{\bullet}$ 和 $TrpN^{\bullet}$, 所以推测是由 $^3Trp^*$ 通过分子内电子转移氧化 Tyr 残基, 最终生成 $TyrO^{\bullet}$.

2.2 266 nm 激光作用下 $SO_4^{\bullet-}$ 自由基氧化 BSA 的机理研究

实验体系中 $K_2S_2O_8$ 与 BSA 的浓度配比是将二者的 266 nm 吸光度之比保持在 100 以上, 这样可以保证激光能量主要被 $S_2O_8^{2-}$ 吸收. 在氮气饱和条件下, $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 过硫酸钾中性水溶液经 266 nm 激光激发后得到的 $0.1 \mu\text{s}$ 瞬态吸收谱具有 300–570 nm 处的宽吸收峰, 其中特征吸收位于 460 nm 处(见图 4 插图), 此谱与文献中得到的过硫酸钾瞬态吸收谱完全吻合, 可将其归为 $SO_4^{\bullet-}$ 自由基的瞬态吸收谱^[18]. 当含有 $7.55 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA 和 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 过硫酸钾中性水溶液经 266 nm 激光激发后, $10 \mu\text{s}$ 时得到的瞬态吸收谱如图 4 所示. 激光光解后, 很快可以观察到 $SO_4^{\bullet-}$ 自由基的特征吸收峰, 随着 $SO_4^{\bullet-}$ 自由基的衰减, 含 BSA 的二元体系在 350、410、520 和 560 nm 处有新的吸收, 说明有新的瞬态物种生成, 由于在此体系中激光能量基本都被过硫酸钾吸收, BSA 几乎不发生光电离, 所以新的瞬态物种是由过硫酸钾光电离产生的 $SO_4^{\bullet-}$ 自由基氧化 BSA 产生的. 改变 BSA 的浓度, 发现 $SO_4^{\bullet-}$ 自由基的衰减随 BSA 浓度增加而加快(图5), 进一步说明 $SO_4^{\bullet-}$ 自由基确实与

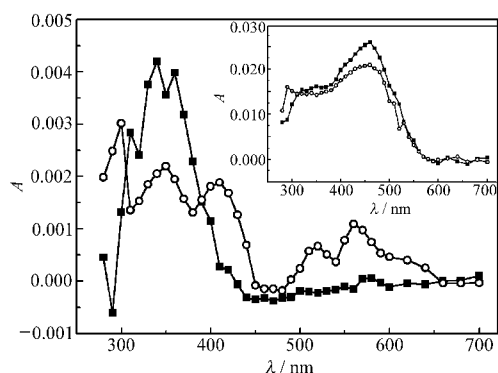


图4 过硫酸钾在有(○)无(■)BSA 条件下的瞬态吸收谱
Fig.4 Transient absorption spectra of $K_2S_2O_8$ without (■) or with (○) BSA

The spectra were recorded at $10 \mu\text{s}$ following 266 nm laser pulse excitation of N_2 -saturated aqueous solution containing $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $K_2S_2O_8$ and $7.55 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA (○) or only containing $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $K_2S_2O_8$ (■). Inset shows the spectra recorded at $0.1 \mu\text{s}$ under the same condition.

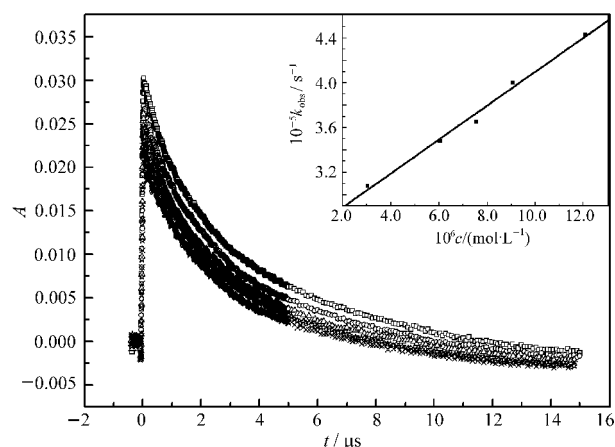


图5 过硫酸钾在不同浓度 BSA 时 460 nm 处的时间衰减谱图

Fig.5 Transient absorption curves of $K_2S_2O_8$ with different concentrations of BSA at 460 nm

N_2 -saturated aqueous solution containing $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} K_2S_2O_8$ with 3.02×10^{-6} (\square), 6.04×10^{-6} (\circ), 7.55×10^{-6} (\triangle), 9.06×10^{-6} (\star), or 12.08×10^{-6} (\times) $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BSA excited by 266 nm laser pulse. Inset shows the dependence of the $SO_4^{\bullet-}$ decay rate constant (k_{obs}) with concentration of BSA.

BSA 发生了作用. 因此, 在研究的体系中, 初步判断 $10 \mu\text{s}$ 时得到的瞬态吸收谱应该是 $SO_4^{\bullet-}$ 自由基和氨基酸自由基的叠加谱.

BSA 中的 TrpNH 和 TyrOH 残基提供电子给 $SO_4^{\bullet-}$, 生成 SO_4^{2-} 和对应的氨基酸阳离子自由基 (TrpNH $^{\bullet+}$ 或

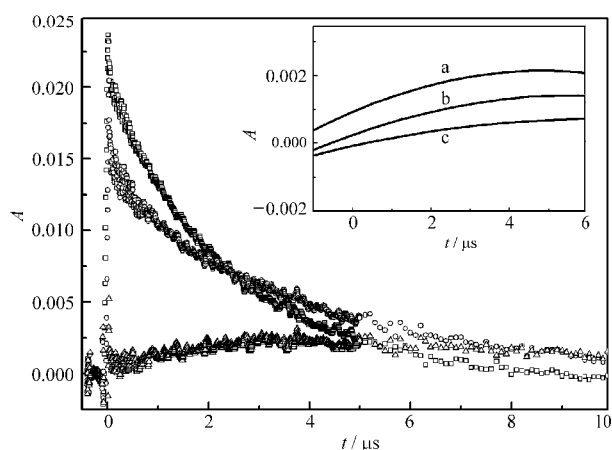


图6 过硫酸钾和 BSA 激光光解后在 350 nm (\circ)、460 nm (\square) 和 350–460 nm (\triangle) 处的时间衰减谱曲线

Fig.6 Transient absorption curves of $K_2S_2O_8$ and BSA at 350 nm (\circ), 460 nm (\square), and 350–460 nm (\triangle)

N_2 -saturated aqueous solution containing $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} K_2S_2O_8$ and $7.55\times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BSA excited by 266 nm laser pulse. 350–460 nm represents the set up and decay curve of TrpNH $^{\bullet+}$ obtained by subtract 460 nm from 350 nm. Inset shows the set up transient absorption curves observed at 520 nm (a), 410 nm (b), and 560 nm (c).

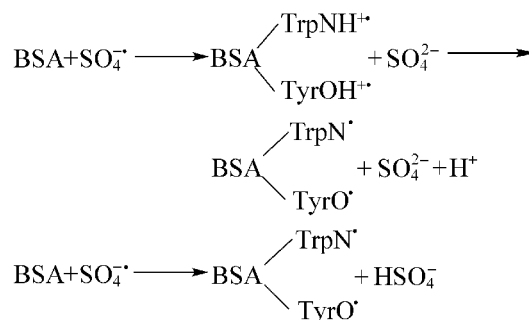
表1 TrpNH $^{\bullet+}$ 、TrpN $^{\bullet}$ 和 TyrO $^{\bullet}$ 表现生成速率常数
Table 1 Apparent set up rate constants of TrpNH $^{\bullet+}$, TrpN $^{\bullet}$ and TyrO $^{\bullet}$

Transient product	Maximum absorption (nm)	$10^{-5}k_{obs}/s^{-1}$
TrpNH $^{\bullet+}$	350	2.78
	560	2.74
TrpN $^{\bullet}$	520	3.72
TyrO $^{\bullet}$	410	3.22

TyrOH $^{\bullet}$). 根据前面对 TrpNH $^{\bullet+}$ 和 TyrOH $^{\bullet}$ 特征吸收峰的分析, 可将图4过硫酸钾和 BSA 二元体系中出现 的 350 和 560 nm 的特征吸收峰归属为 TrpNH $^{\bullet+}$ 的贡献. 在本实验条件下 (pH=7), TrpNH $^{\bullet+}$ ($pK_a=4.3$) 和 TyrOH $^{\bullet}$ ($pK_a=-1$) 会脱质子, 转变为中性自由基 TrpN $^{\bullet}$ 和 TyrO $^{\bullet}$ [13,16]. 结合前面对 TrpN $^{\bullet}$ 和 TyrO $^{\bullet}$ 特征吸收谱的分析, 可将图4过硫酸钾和 BSA 二元体系中出现 的 520 和 410 nm 的特征吸收峰分别归属为 TrpN $^{\bullet}$ 和 TyrO $^{\bullet}$ 的贡献.

但由于氨基酸自由基的吸收和 $SO_4^{\bullet-}$ 的吸收发生重叠, 很难直接观察到氨基酸自由基的生成. 故采用减谱技术 [19], 扣除 $SO_4^{\bullet-}$ 瞬态吸收的贡献, 得到了 TrpNH $^{\bullet+}$ (350 和 560 nm)、TrpN $^{\bullet}$ (520 nm) 和 TyrO $^{\bullet}$ (410 nm) 的净生成曲线 (图 6), 分别求得其表现生成速率常数如表 1 所示. 在此体系中, 未观察到分子内电子转移现象, 其可能的原因是在此体系中, 光子能量主要被 $K_2S_2O_8$ 吸收, 生成强氧化剂 $SO_4^{\bullet-}$, 故 Trp 不可能发生光激发产生 $^3\text{Trp}^*$, 因此不能观察到上述的分子内电子转移现象.

根据以上分析, 推断 $SO_4^{\bullet-}$ 与 BSA 之间可能发生了如下反应:



由于此二元体系中所产生的 $SO_4^{\bullet-}$ 的浓度远远大于其氧化所生成的氨基酸残基自由基的浓度, 故保证二元体系中过硫酸钾的浓度不变, 在一定范围内改变 BSA 的浓度, 分别计算 460 nm 处 $SO_4^{\bullet-}$ 的表现衰减速率常数, 然后对 BSA 的浓度作图 (见图 5 插

图),斜率即为 BSA 猝灭 $\text{SO}_4^{\bullet-}$ 的反应速率常数,求得此值为 $1.51 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. 此值大于 $\text{SO}_4^{\bullet-}$ 与氨基酸反应的速率常数^[20],这是因为本实验所用的 BSA 的浓度是根据其分子量算得的摩尔浓度,而非氨基酸残基所表示的摩尔浓度.

3 结 论

利用纳秒级激光光解技术,对 BSA 的紫外光损伤和 $\text{SO}_4^{\bullet-}$ 氧化 BSA 的机理进行了系统的研究. 发现在 266 nm 激光作用下,BSA 中的 Trp 残基首先以脱电子和发生分子内电子能级跃迁的形式受到破坏,进而通过分子内电子转移的形式氧化 Tyr 残基,最终其光损伤以这两种氨基酸残基自由基的形式表现出来. 而在 $\text{SO}_4^{\bullet-}$ 氧化 BSA 的体系中, $\text{SO}_4^{\bullet-}$ 可通过与 BSA 中的 Trp 和 Tyr 残基发生电子转移而氧化 BSA,并且求得了这些氨基酸残基自由基的表观生成速率常数,获得了 $\text{SO}_4^{\bullet-}$ 氧化 BSA 的反应速率常数. 本研究为进一步理解 BSA 参与的某些生物体内的氧化还原反应和探讨蛋白质的光损伤机理提供了理论依据.

References

- Deep, S.; Ahluwalia, J. C. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2001**, *3*: 4583
- Vasilescu, M.; Angelescu, D.; Almgren, M.; Valstar, A. *Langmuir*, **1999**, *15*: 2635
- Giancola, C.; de Sena, C.; Fessas, D.; Graziano, G.; Barone, G. *Int. J. Biol. Macromol.*, **1997**, *20*: 193
- Saboury, A. A. *J. Chem. Thermodyn.*, **2003**, *35*: 1975
- Gelamo, E. L.; Itri, R.; Alonso, A.; Silva, J. V. D.; Tabak, M. *J. Colloid Interface Sci.*, **2004**, *277*: 471
- Hirayama, K.; Akashi, S.; Furuya, M.; Fukuhara, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1990**, *173*: 639
- Chu, G. S.; Song, Q. H.; Wang, Z. Y.; Ge, X. W.; Zhang, Z. C.; Wang, W. F.; Yao, S. D. *Acta Phys. -Chim. Sin.*, **2000**, *16*(3): 232
- [储高升, 宋钦华, 王忠义, 葛学武, 张志成, 王文峰, 姚思德. 物理化学学报, **2000**, *16*(3): 232]
- Sun, X. Y.; Zhang, C. J.; Wang, M.; Wang, S. L.; Ni, Y. M.; Yao, S. D. *Sci. China Ser. B*, **2002**, *32*(4): 148 [孙晓宇, 张超杰, 王玫, 汪世龙, 倪亚明, 姚思德. 中国科学 B 辑, **2002**, *32*(4): 148]
- Zhao, P.; Wang, M.; Zhang, S. P.; Shao, S. C.; Sun, X. Y.; Yao, S. D.; Wang, S. L. *Sci. China Ser. B*, **2008**, *38*(7): 618 [赵萍, 王玫, 张淑萍, 邵思常, 孙晓宇, 姚思德, 汪世龙. 中国科学 B 辑, **2008**, *38*(7): 618]
- Fang, H. J.; Dong, W. B.; Zhang, R. X.; Hou, H. Q. *Acta Phys. -Chim. Sin.*, **2006**, *22*(6): 761 [房豪杰, 董文博, 张仁熙, 侯惠奇. 物理化学学报, **2006**, *22*(6): 761]
- Bensasson, R. V.; Land, E. J.; Truscott, T. G. *Protein and component in excited states and free radicals in biology and medicine*. Oxford: Oxford University Press, 1993: 103-142
- Swagata, B.; Sharmistha, D. C.; Swagata, D.; Samita, B. J. *Luminescence*, **2008**, *128*: 437
- Filipe, P.; Morlière, P.; Patterson, L. K.; Hug, G. L.; Mazière, J. C.; Freitas, J. P.; Fernandes, A.; Santus, R. *Biochemistry*, **2002**, *41*: 11057
- Solar, S.; Getoff, N.; Surdhar, P. S.; Armstrong, D. A.; Singh, A. *J. Phys. Chem.*, **1991**, *95*: 3639
- Bent, D. V.; Hayon, E. *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, *97*: 2612
- Galian, R. E.; Pastor-Pérez, L.; Miranda, M. A.; Pérez-Prieto, J. *Chem. Eur. J.*, **2005**, *11*: 3443
- Deflippis, M. R.; Murthy, C. P.; Faraggi, M.; Klapper, M. H. *Biochemistry*, **1989**, *28*: 4847
- Fu, H. Y.; Wu, G. Z.; Long, D. W.; Liu, Y. D.; Wang, W. F.; Yao, S. D. *Acta Chim. Sin.*, **2006**, *64*(6): 483 [付海英, 吴国忠, 龙德武, 刘耀东, 王文峰, 姚思德. 化学学报, **2006**, *64*(6): 483]
- Zhu, H. P.; Zhang, Z. X.; Zhao, H. W.; Wang, W. F.; Yao, S. D. *Sci. China Ser. B*, **2006**, *36*(1): 76 [朱红平, 张兆霞, 赵红卫, 王文峰, 姚思德. 中国科学 B 辑, **2006**, *36*(1): 76]
- Wang, S. L.; Sun, X. Y.; Zhang, C. J.; Wang, M.; Li, W. Z.; Liu, S. H.; Ni, Y. M.; Yao, S. D. *Sci. China Ser. B*, **2002**, *32*(3): 278 [汪世龙, 孙晓宇, 张超杰, 王玫, 李文哲, 刘仕姮, 倪亚明, 姚思德. 中国科学 B 辑, **2002**, *32*(3): 278]