

紫外照射下高铁肌红蛋白变化的同步荧光光谱指认

吴名草¹ 金邦荃¹ 陈许明¹ 冯玉英² 黄鹤勇²

(¹ 南京师范大学食品科学与营养系, 江苏 南京 210097)
(² 南京师范大学分析检测中心, 江苏 南京 210046)

摘要 研究了猪心肌和马心肌高铁肌红蛋白(pMetMb、hMetMb)被紫外光照射后的荧光光谱变化,紫外光照射时间共设6个梯度,分别是0、5、10、20、30、60 min。随着紫外光的照射,MetMb高级结构发生蜕变。利用同步荧光光谱指认了紫外照射对酪氨酸(Tyr)和色氨酸(Trp)的影响,紫外照射0~5 min氨基酸残基吸收强度减小;5~30 min吸收强度总体保持上升趋势;30~60 min吸收强度减小。且指出MetMb中Trp在该蛋白质肽链中的比例高于Tyr,pMetMb和hMetMb两种荧光光谱谱征变化类似。进一步指出了MetMb的heme-Fe³⁺荧光谱征变化,照射5 min时heme-Fe³⁺荧光吸收强度降低,10 min时荧光吸收强度有所跳跃,20 min后持续下降,heme-Fe³⁺高级结构明显降解或被破坏,可能是MetMb丧失生物活性的又一荧光光谱变化特征。

关键词 光谱学;紫外光照射;高铁肌红蛋白;heme-Fe³⁺残基;氨基酸残基

中图分类号 O436 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/LOP50.053001

Synchronous Fluorescence Spectra Study on Changes in Metmyoglobin under Ultraviolet Irradiation

Wu Mingcao¹ Jin Bangquan¹ Chen Xuming¹ Feng Yuying² Huang Heyong²

¹ Department of Food Science and Nutrition, Nanjing Normal University,
Nanjing, Jiangsu 210097, China

² Center for Analysis and Testing, Nanjing Normal University, Nanjing, Jiangsu 210046, China

Abstract The changes in porcine myocardial metmyoglobin (pMetMb) and horse myocardial metmyoglobin (hMetMb) under ultraviolet irradiation are studied comparatively by synchronous fluorescence spectra. The ultraviolet irradiation is designed for the six gradients of 0, 5, 10, 20, 30, 60 min. With the irradiation of ultraviolet light, disintegration happens in the senior structure of MetMb. Synchronous fluorescence spectra can identify the influences of ultraviolet induction on tyrosine (Tyr) and tryptophan (Trp). The amino acid absorption value decreases for 0~5min, increases for 5~30 min, and decreases again for 30~60 min. It is identified that the ratio of Trp in the protein peptide chain is higher than the proportion of Tyr and two kinds of fluorescence spectra in pMetMb and hMetMb have similar changes. Synchronous fluorescence spectra further identify the heme-Fe³⁺ fluorescence spectra sign change in MetMb. The heme-Fe³⁺ fluorescence intensity is reduced when MetMb has been exposed for 5 min, and fluorescence intensity becomes higher for 10 min. After 20 min, the senior structure of heme-Fe³⁺ may be degraded or destroyed obviously, that may be fluorescence spectra variation characteristics in MetMb caused by the loss of biological activity.

Key words spectroscopy; ultraviolet irradiation; metmyoglobin; heme-Fe³⁺ residue; amino acid residue

OCIS codes 300.6280; 300.6170; 300.6540

收稿日期: 2012-10-29; **收到修改稿日期**: 2013-01-10; **网络出版日期**: 2013-05-06

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK2009402)和江苏省农业科技自主创新资金[CX(11)1301]资助课题。

作者简介: 吴名草(1988—),女,硕士研究生,主要从事食品科学和蛋白质结构等方面的研究。

E-mail: noviamary01@163.com

导师简介: 金邦荃(1956—),女,博士,教授,主要从事食品科学和营养学等方面的研究。

E-mail: jinbangquan@njnu.edu.cn(通信联系人)

1 引言

肌红蛋白(Mb)在生物体内起着储存氧和促进氧在细胞中扩散的作用,它由一条多肽链和一个血红素残基(heme-)构成,血红素残基由位于中心的一个铁离子和卟啉环组成^[1]。铁离子有6条键,4条与卟啉环的吡啶氮结合,第5条与Mb肽链近端的93位组氨酸(His)结合^[2],剩下的第6条键可以与羟基结合,即形成高铁肌红蛋白(MetMb)^[3]。当Mb转化成MetMb时,亚铁血红素中的亚铁离子氧化为三价铁离子^[4]。紫外(UV)光是一种高能量的短波辐射^[5],当蛋白质受到紫外照射时会产生单线态氧($^1\text{O}_2$)等自由基^[6]。自由基对蛋白质进攻的位置主要是氨基酸的侧链和肽链骨架,这种攻击会使得蛋白质发生片段化和聚合作用^[7]。

为此,本文利用荧光光谱学方法来研究紫外诱导下猪心肌高铁肌红蛋白(pMetMb)的分子结构动态变化及其与马心肌高铁肌红蛋白(hMetMb)的荧光光谱的差异。

2 实验

2.1 实验材料

实验采用纯度高于93%的pMetMb,由本实验室从猪心肌中制备^[8];纯度高于90%的hMetMb,购自美国Sigma公司。

2.2 实验仪器及光谱条件

实验仪器包括LS50-B荧光分光光度计(Perkin-Elmer)和ZW15S19W紫外照射仪(江苏巨光光电有限公司)。工作条件设定为600 nm/min的扫描速度和中等响应时间,狭缝宽度为10 nm^[9]。其他工作条件也严格控制,尤其是MetMb溶液工作环境。

2.3 实验方法

移取1.5 mL 2 mmol/L的MetMb溶液至1.5 mL dorf管中,放置在暗箱中,在距离15 W紫外灯10 cm处进行紫外光照,在紫外照射过程中,每隔一段时间取样测量,条件设计如表1所示^[10]。取2 mL 0.2 mmol/L MetMb溶液,置于1 cm石英比色皿中,进行荧光光谱实验。通过同步荧光研究MetMb酪氨酸(Tyr)残基、色氨酸(Trp)残基和卟啉环(heme-Fe³⁺)残基在紫外照射下的变化。实验采用的波长差为 $\Delta\lambda=20$ nm,80nm和167 nm。

表1 紫外照射MetMb同步荧光光谱条件设计

Table 1 Design of synchronous fluorescence spectroscopy of MetMb under ultraviolet irradiation

Sample	pMetMb, hMetMb
Number	3
Wavelength interval $\Delta\lambda$ /nm	20, 80, 167
UV irradiation time T /min	0, 5, 10, 20, 30, 60

2.4 图谱分析与数据处理

采用Origin 6.0软件(GF3S5-9489\7800000)解析MetMb荧光光谱和高级结构,并经计算机对图像信号进行加权处理,得到 $\bar{X} \pm \sigma$ (\bar{X} 为均值, σ 为标准差)标准图谱,且 $\sigma < 0.05$ 。用SPSS 10.0软件(ISBN7-980009-06-1)对所有数据进行组间差异性比较,当差异显著或极显著时,分别用 $p < 0.05$ 或 $p < 0.01$ 表示。

3 结果与讨论

以20、80、167 nm波长差($\Delta\lambda$)分别进行MetMb的同步荧光光谱分析,来研究MetMb的氨基酸残基和heme-Fe³⁺残基的官能团荧光光谱位置以及这些残基在紫外诱导下的变化。

3.1 紫外照射对MetMb中Tyr残基的干扰

同步荧光光谱图中hMetMb和pMetMb都在312 nm出现特征峰,此特征峰为肽链中Tyr残基的特征峰^[11,12],其吸收强度[强度值采用任意单位(a. u.)]前者达到108.15,后者达到201.31,无紫外照射时为对照组(CK),如图1、图2所示。与对照组相比,在相同光谱条件下,紫外照射可使蛋白质肽链中Tyr残基荧光光谱发生改变。研究发现紫外光照射5~20 min时,312 nm处MetMb中Tyr残基的荧光特征峰的波长由312 nm变为313.5 nm,基本没有发生变化。紫外光照射5~20 min时,312 nm处hMetMb中Tyr残基的

荧光吸收强度由 177.95 上升为 224.67, 20~60 min 吸收强度由 224.6 降低为 214.50 [图 1(b), $p < 0.01$]; 而紫外光照射 5~30 min 时 pMetMb 中 Tyr 残基的荧光吸收强度由 94.17 上升为 129.86, 30~60 min 吸收强度由 129.86 降低为 82.85 [图 2(b), $p < 0.01$].

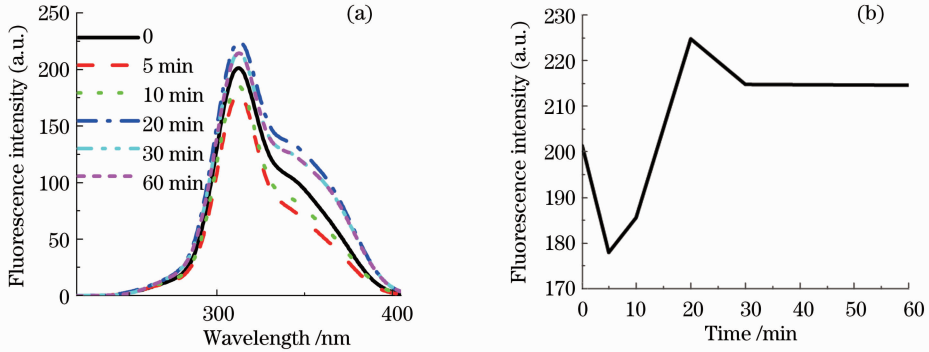


图 1 紫外照射下 hMetMb Tyr 残基同步荧光光谱图 ($\Delta\lambda = 20$ nm)

Fig. 1 Synchronous fluorescence spectra of hMetMb Tyr-residue under ultraviolet irradiation ($\Delta\lambda = 20$ nm)

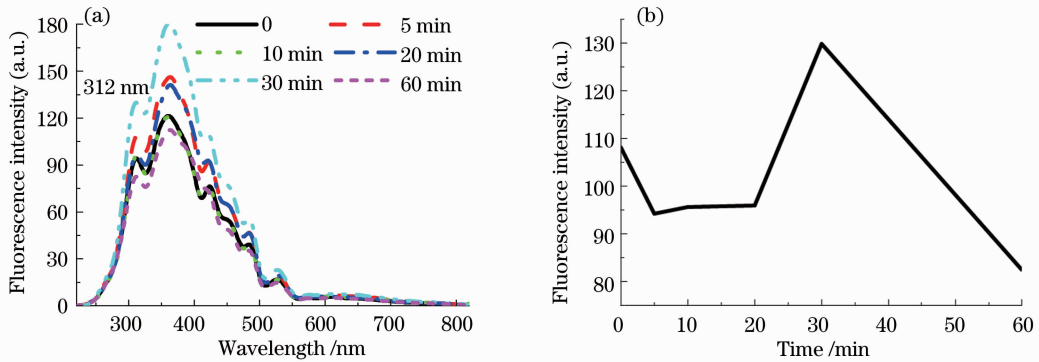


图 2 紫外照射下 pMetMb Tyr 残基同步荧光光谱图 ($\Delta\lambda = 20$ nm)

Fig. 2 Synchronous fluorescence spectra of pMetMb Tyr-residue under ultraviolet irradiation ($\Delta\lambda = 20$ nm)

hMetMb 和 pMetMb Tyr 残基荧光吸收强度受紫外照射的变化趋势相同, 先升高后降低。由于紫外辐照是通过样品溶液环境诱导导致使体系温度升高即内能增加^[13], 促进分子间的运动, 在达到临界值后最终导致分子构象的变化或结构的破坏, 因而 hMetMb 和 pMetMb 的第一个临界时间为 5 min, 第二个临界时间分别为 20 min 和 30 min。第二个临界时间不同有可能是因为两种蛋白质的稳定性不同, 这与提取纯化、冷冻干燥处理都关。紫外诱导 5~60 min, MetMb 的 Tyr 特征峰波长没有变化, 这是因为 Tyr 对外界环境不敏感。

构成蛋白质的非极性氨基酸残基分布在分子内部形成疏水内核, 极性氨基酸残基分布在蛋白质表面的亲水环境中。MetMb 在 280~400 nm 的荧光主要来自于芳香族氨基酸, Tyr 是中度疏水的极性基团, Trp 是高度疏水的非极性基团, 因而 Tyr 残基分布在 MetMb 的表面, Trp 残基处于血红素口袋中。当溶液浓度不变时, 溶液的荧光强度与溶液内的荧光物质浓度成正比^[14]。氨基酸残基的吸收值减小, 说明溶液中荧光性物质的含量减少。

疏水键是维持蛋白质三级结构的最重要作用力, 在天然蛋白质中, 疏水作用对蛋白质的稳定性、构象和蛋白质功能具有重要意义^[15]。紫外照射会使溶液产生大量的离子和水自由基等活性粒子^[6], 这些活性粒子迅速通过蛋白质表面引发一系列的化学反应, 使蛋白质变性, 蛋白质分子内部结构被破坏, 蛋白质分子从原来的有序卷曲紧密结构变成了无序松散的结构, 原来处于分子内部的疏水性基团大量暴露在分子表面, 而亲水基团在分子表面的分布则相对减小^[16,17]。紫外光照射 5~20 min, MetMb Tyr 残基的吸收强度增加, 即是因为 Tyr 残基暴露在蛋白质表面。在自然状态的 Mb 中, 能量由 Tyr 传递给 Trp 和 heme-Fe²⁺^[18]。紫外照射 20~30 min, MetMb 的疏水性仍然增加, Tyr 和 Trp、heme-Fe²⁺ 残基的距离增加, 使得 Tyr 残基不能传递能量, 从而保护自己的能量, 吸收强度增加。

3.2 紫外照射对 MetMb 中 Trp 残基的干扰

同步荧光光谱图中 hMetMb 在 347 nm 出现特征峰,其吸收强度达到 162.48;pMetMb 在 355 nm 出现特征峰,其吸收强度达到 131.42。347/355 nm 的特征峰为肽链中 Trp 残基的特征峰^[12](图 3,图 4)。

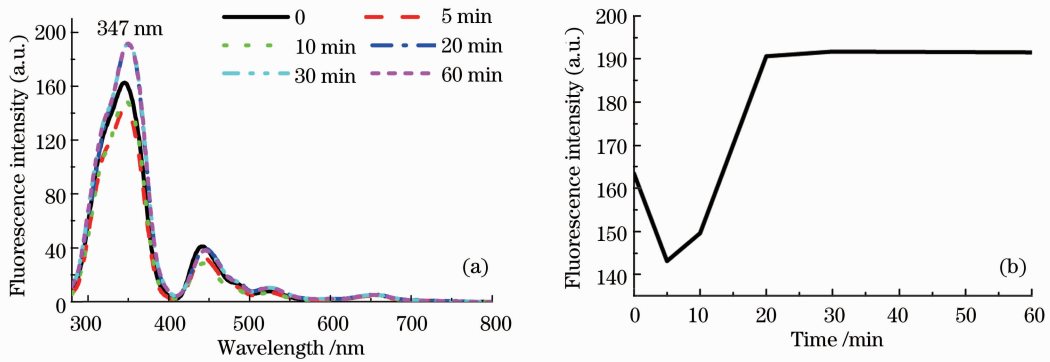


图 3 紫外照射下 hMetMb Trp 残基同步荧光光谱图($\Delta\lambda=80$ nm)

Fig. 3 Synchronous fluorescence spectra of hMetMb Trp-residue under ultraviolet irradiation ($\Delta\lambda=80$ nm)

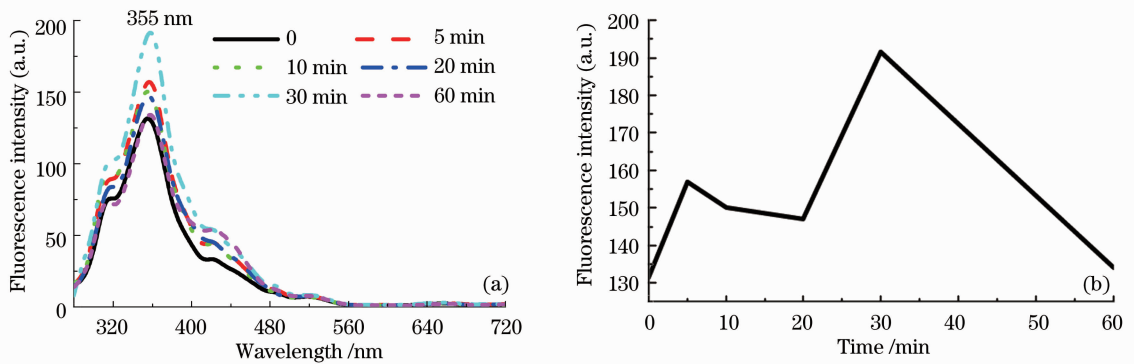


图 4 紫外照射下 pMetMb Trp 残基同步荧光光谱图($\Delta\lambda=80$ nm)

Fig. 4 Synchronous fluorescence spectra of pMetMb Trp-residue under ultraviolet irradiation ($\Delta\lambda=80$ nm)

与对照组相比,在相同光谱条件下,紫外照射可使蛋白质肽链中 Trp 残基荧光光谱发生改变。研究发现紫外光照射 5~20 min 时,347 nm 处 MetMb 中 Trp 残基的荧光特征峰的波长基本没有发生变化,hMetMb 由 347 nm 变为 350 nm,pMetMb 由 355 nm 变为 357.5 nm。紫外光照射 0~5 min,347 nm 处 hMetMb 中 Trp 残基的荧光吸收强度由 62.48 下降为 143.04,5~60 min 吸收强度由 143.04 上升为 191.57 [图 3(b), $p<0.01$];而紫外光照射 5~30 min 355 nm 处 pMetMb 中 Trp 残基的荧光吸收强度由 157.03 上升为 191.49,30~60 min 吸收强度由 191.49 下降为 134.02 [图 4(b), $p<0.01$]。

诱导 20 min 内 hMetMb 的 Trp 残基吸收强度先降低再升高,而 pMetMb 的 Trp 残基吸收强度先升高再降低,但是 10 min 时两者的 Trp 残基吸收强度均低于对照组,有可能是因为 pMetMb 的 Trp 残基在诱导过程中受到蛋白质中其他残基的影响。诱导 10 min 后 hMetMb 和 pMetMb 的 Trp 残基吸收强度先升高再降低。由于 Trp 是肽链低聚排列的内在指示物,Trp 的存在使得水分子易于进入血红素中,使其产生自氧化过程^[19]。紫外照射 20~30 min,有可能是因为水分子进入血红素口袋反应,MetMb 的 Trp 残基所处的微环境的疏水性升高,肽链的伸展结构减少,极性减小,增加了芳香氨基酸残基间的能量传递^[20],使 Trp 残基荧光强度升高。紫外照射会产生 H_2O_2 , H_2O_2 与 Mb 产生蛋白自由基^[21]。同理,随着紫外照射的时间大于 30 min,MetMb 受到紫外照射产生的自由基的攻击^[22],蛋白质变性。蛋白质分子变性使肽链伸展,增加了芳香氨基酸残基之间的距离,降低了残基间的共振能量传递,使 Trp 残基荧光强度降低,Tyr 残基荧光部分恢复,但是仍体现下降趋势。在紫外照射下,pMetMb 的 Trp 残基的荧光变化比 Tyr 残基更显著,说明 pMetMb 自发荧光性主要由 Trp 残基提供,也说明 Trp 残基受外界因素影响大。

3.3 紫外照射对 MetMb 中 heme-Fe³⁺ 残基的干扰

同步荧光光谱图中 hMetMb 在 599 nm 出现特征峰,其吸收强度达到 3.94;pMetMb 都在 627 nm 出现特征峰,其吸收强度达到 21.38;599/627 nm 的特征峰为肽链中 heme-Fe³⁺ 残基的特征峰^[23](图 5,图 6)。

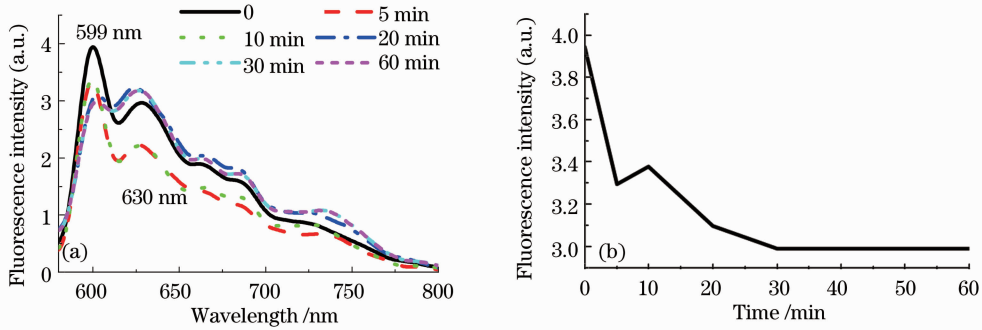


图 5 紫外照射下 hMetMb 卟啉环同步荧光光谱图($\Delta\lambda=167$ nm)

Fig. 5 Synchronous fluorescence spectra of hMetMb porphyrin ring under ultraviolet irradiation ($\Delta\lambda=167$ nm)

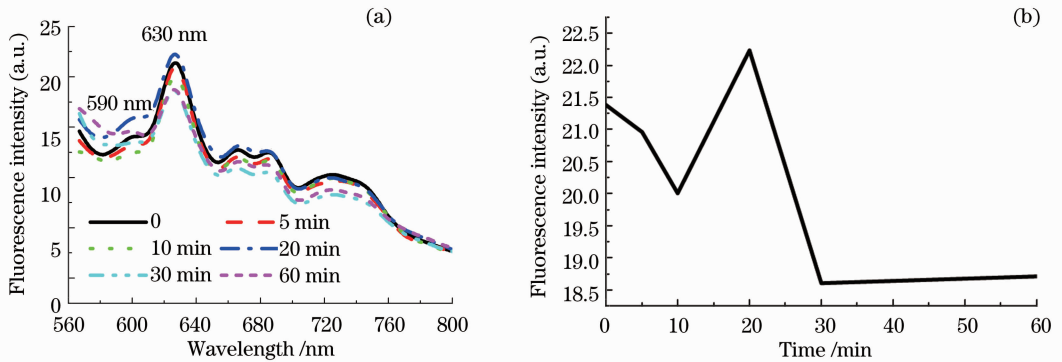


图 6 紫外照射下 pMetMb 卟啉环同步荧光光谱图($\Delta\lambda=167$ nm)

Fig. 6 Synchronous fluorescence spectra of pMetMb porphyrin ring under ultraviolet irradiation ($\Delta\lambda=167$ nm)

与对照组相比,在相同光谱条件下,紫外照射可使 heme-Fe³⁺ 残基荧光光谱发生改变。研究发现紫外光照射 5~20 min 时,hMetMb 和 pMetMb 的 heme-Fe³⁺ 残基的荧光特征峰的波长基本没有发生变化,且两者的 heme-Fe³⁺ 残基的荧光吸收强度变化趋势一致。紫外光照射 5~10 min,599 nm 处 hMetMb 中 heme-Fe³⁺ 残基的荧光吸收强度先降低再升高,由 3.29 升高为 3.37,10~60 min 吸收强度由 3.37 下降为 2.98 [图 5(b), $p<0.01$];紫外光照射 5~20 min,pMetMb 中 heme-Fe³⁺ 残基的荧光吸收强度由 20.95 升高为 22.23,20~60 min 吸收强度由 22.23 下降为 18.71 [图 6(b), $p<0.01$]。

Heme-Fe³⁺ 的特征峰在 630 nm,处于配体向金属电荷转移(LMCT)带,因而 MetMb 的卟啉环残基处于六配位低自旋状态(6-cLs),且其为对称性的八面体结构^[24]。hMetMb 紫外照射 0~5 min,pMetMb 紫外照射 0~10 min,MetMb 中的原子核发生重排会发生光还原反应,三价铁还原为二价铁,使得原先与卟啉环结合的水分子脱离,失去水分子后铁卟啉由原来的六配位转变为五配位高自旋状态(5-cHs)^[25],特征峰荧光强度减小。在自然状态的 Mb 中,heme-Fe²⁺ 的能量主要是由 Tyr 残基传递得到的^[18],同理在 MetMb 中 heme-Fe³⁺ 的能量也主要是由 Tyr 残基传递得到的。在紫外照射 10~20 min 时,Tyr 残基荧光吸收强度增加,则传递给 heme-Fe³⁺ 的能量也增加,使得 heme-Fe³⁺ 的吸收强度增加。hMetMb heme-Fe³⁺ 吸收强度在紫外照射 10 min 后达到最大值,而 pMetMb 在 20 min 达到最大值,这可能是由于实验室提取的 pMetMb 含有杂质,使得 pMetMb 的能量不能有效地由氨基酸残基传递给卟啉环残基。

随着紫外照射时间的增加(超过 20 min),反应体系中产生单线态氧(¹O₂)和超氧阴离子(O₂⁻)^[21],MetMb 会和其作用产生氧络合铁色素(ferry1Mb,Fe⁴⁺=O)和蛋白自由基^[26]。李涛等^[27]曾报道在溶液中,铁卟啉 Fe(III)TPPCl 容易与 H₂O 反应转化为二聚体 μ -[TPP Fe(III)₂]O,Fe(III)TPPCl 是非荧光系物质。这种现象与我们发现的 MetMb 活性中心铁卟啉 630 nm 处荧光强度不断下降的现象极为相似,并且文中提

到 Fe(III)TPPCL 见光分解。我们据此推测 MetMb 经紫外照射后产生的 ferry1Mb 有可能是非荧光物质,因而紫外照射后 MetMb 的 heme-Fe³⁺ 荧光强度总体表现下降趋势。

4 结 论

紫外照射过程中 MetMb 氨基酸残基和卟啉环残基波长基本没有发生变化,但荧光强度随着紫外照射时间的变化会发生相应变化。5 min 和 30 min 是 MetMb 氨基酸残基紫外照射的临界时间,紫外照射 0~5 min 时氨基酸残基吸收强度减小,5~30 min 时氨基酸残基吸收强度总体保持上升趋势,紫外照射 30~60 min 使氨基酸残基吸收强度减小。10 min 和 20 min 分别是 hMetMb 和 pMetMb 的卟啉环残基紫外照射的临界时间,对于 MetMb 卟啉环残基随着紫外照射时间的增加,吸收强度基本保持下降趋势。随着紫外照射时间的增加,色氨酸残基的荧光变化比酪氨酸残基更显著,且卟啉环残基荧光强度变化趋势和氨基酸残基的基本一致。

参 考 文 献

- 1 Jia Yingping, Zheng Xuefang, Hu Jiehan. Interaction between the metal ion in the active site of cytochrome C and copper sulfate by ultraviolet spectroscopy [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2001, **21**(1): 54~56
贾颖萍,郑学仿,胡皆汉. 紫外-可见光谱法研究细胞色素 C 活性中心金属离子与硫酸铜的相互作用[J]. 光谱学与光谱分析, 2001, **21**(1): 54~56
- 2 Zhang Yingying, Cao Hongyu, Tang Qian *et al.*. Interaction between different classes of surfactants and metmyoglobin [J]. *Acta Physico-Chimica Sinica*, 2011, **27**(2): 2907~2914
张莹莹,曹洪玉,唐 乾等. 不同类型表面活性剂与高铁肌红蛋白相互作用[J]. 物理化学学报, 2011, **27**(2): 2907~2914
- 3 R. A. Mancini, M. C. Hunt. Current research in meat color [J]. *Meat Science*, 2005, **71**(1): 100~121
- 4 C. Faustman, Q. Sun, R. Mancini *et al.*. Myoglobin and lipid oxidation interaction: mechanistic bases and control [J]. *Meat Science*, 2010, **86**(9): 86~94
- 5 Bi Hai, Zhang Guangming, Wang Wei. Changes of phycocyanin in *Spirulina platensis* after ultraviolet light irradiation [J]. *J. Agro-Environment Science*, 2007, **26**(3): 1033~1039
毕 海,张光明,王 伟. 紫外辐照对钝顶螺旋藻藻蓝蛋白的影响研究[J]. 农业环境科学学报, 2007, **26**(3): 1033~1039
- 6 W. K. Chan, C. Faustman, M. Yin. Lipid oxidation induced by oxymyoglobin and metmyoglobin with involvement of H₂O₂ and superoxide anion [J]. *Meat Science*, 1997, **46**(2): 181~190
- 7 Huang Li, Kong Baohua, Li Jing *et al.*. Advances in studies of quality deterioration mechanism of meat and meat products caused by oxidation and influencing factors [J]. *Food Science*, 2011, **32**(9): 319~323
黄 莉,孔保华,李 菁等. 氧化引起肉及肉制品品质裂变的机理及影响因素[J]. 食品科学, 2011, **32**(9): 319~323
- 8 Tang Xiangming, Jin Bangquan, Liu Xingyu. The Extraction and Purification from Metmyoglobin in Myocardial [P]. Chinese Patent, 200610037909. X, 2008-01-25
汤祥明,金邦荃,刘兴余. 从心肌中提取纯化高铁肌红蛋白的方法[P]. 中国专利, 200610037909. X, 2008-01-25
- 9 B. Apicella, A. Ciajolo, A. Tregrossi. Fluorescence spectroscopy of complex aromatic mixtures [J]. *Analytical Chemistry*, 2004, **76**(7): 2138~2143
- 10 Zhou Huawei, Cao Hongyu, Tang Qian *et al.*. Spectral study on the photoreduction of metmyoglobin [J]. *Acta Chimica Sinica*, 2011, **27**(3): 445~450
周华伟,曹洪玉,唐 乾等. 光谱法研究高铁肌红蛋白活性中心与咪唑基的配位反应[J]. 无机化学学报, 2011, **27**(3): 445~450
- 11 W. J. Liu, X. Guo, R. Guo. The interaction between hemoglobin and two surfactants with different charges [J]. *International J. Biological Macromolecules*, 2007, **41**(5): 548~557
- 12 Jian Ju, Feng Yuying, Yang Xiujian *et al.*. Synchronous fluorescence spectra of myoglobin [J]. *Chinese J. Analytical Chemistry*, 2001, **29**(2): 219~221
剑 菊,冯玉英,杨秀娟等. 肌红蛋白的同步荧光光谱[J]. 分析化学, 2001, **29**(2): 219~221
- 13 Wang Qi, Dong Fengzhong, Liang Yunxian *et al.*. Experimental comparison investigation on emission spectra of reheating double and single pulses laser-induced Fe plasma [J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, **31**(10): 1030002

- 王琦,董凤忠,梁云仙等. 再加热双脉冲与单脉冲激光诱导 Fe 等离子体发射光谱实验对比研究[J]. 光学学报, 2011, **31**(10): 1030002
- 14 Wang Shouye, Xu Xiaolong, Liu Qingliang *et al.*. The application of fluorescence spectroscopy in the study on protein conformation [J]. *Progress in Chemistry*, 2001, **13**(4): 257~260
- 王守业,徐小龙,刘清亮等. 荧光光谱在蛋白质分子构象研究中的应用[J]. 化学进展, 2001, **13**(4): 257~260
- 15 A. Veberg, G. Vogt, J. P. Wold. Fluorescence in aldehyde model systems related to lipid oxidation [J]. *Food Science and Technology*, 2006, **39**(5): 562~570
- 16 Zhang Mingqi, Gao Meixu, Zhi Yuxiang *et al.*. Effects of irradiation on biochemical properties and antigenicity of crab allergen [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, **42**(9): 3259~3264
- 张明琦,高美须,支玉香等. 辐照对蟹过敏蛋白生化性质和抗原性的影响[J]. 中国农业科学, 2009, **42**(9): 3259~3264
- 17 Ma Jing, Zheng Xuefang, Tang Qian *et al.*. Spectroscopic studies on the interaction of Cu^{2+} with myoglobin [J]. *Chemical J. Chinese Universities*, 2008, **29**(2): 258~263
- 马静,郑学仿,唐乾等. 光谱学研究 Cu^{2+} 与肌红蛋白的相互作用[J]. 高等学校化学学报, 2008, **29**(2): 258~263
- 18 L. Tofani, A. Feis, R. E. Snoke *et al.*. Spectroscopic and interfacial properties of myoglobin/surfactant complexes [J]. *Biophysical Journal*, 2004, **87**(2): 1186~1195
- 19 L. M. Moreria, P. S. Santiago, E. V. Almeida *et al.*. Interaction of giant extracellular *Glossoscolex paulistus* hemoglobin (HbGp) with zwitterionic surfactant N-hexadecyl-N, N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate (HPS): effects of oligomeric dissociation [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2008, **61**(2): 153~163
- 20 Wei Xiaofang, Ding Ximing, Liu Huizhou. Spectral study of the microenvironment change of aromatic amino-acid residues in BSA induced by pH [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2000, **20**(4): 556~559
- 魏晓芳,丁西明,刘会洲. pH 诱导牛血清白蛋白芳香氨基酸残基微环境变化的光谱分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2000, **20**(4): 556~559
- 21 Gao Bo, Zhu Debin, Xing Da. A study of the relationship between lipid peroxidation and production of $^1\text{O}_2$ and O_2^- induced by UVA [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2007, **16**(2): 156~158
- 高波,朱德斌,邢达. UVA 诱发 $^1\text{O}_2$ 和 O_2^- 产生与脂质过氧化水平关系的研究[J]. 激光生物学报, 2007, **16**(2): 156~158
- 22 Luo Xiaosen, Ni Xiaowu, Lu Jian *et al.*. Study of fluorescent spectrum of blood induced by lights of different wavelengths [J]. *Chinese J. Lasers*, 2003, **30**(1): 93~96
- 骆晓森,倪晓武,陆建等. 不同波长光照射血液诱发的荧光光谱研究[J]. 中国激光, 2003, **30**(1): 93~96
- 23 A. Veberg, O. Sorheim, J. Moan *et al.*. Measurement of lipid oxidation and porphyrins in high oxygen modified atmosphere and vacuum-packed minced turkey and pork meat by fluorescence spectra and images [J]. *Meat Science*, 2006, **73**(6): 511~520
- 24 J. Wakamatsu, T. Nishimura, A. Hattori. A Zn-porphyrin complex contributes to bright red color in Parma ham [J]. *Meat Science*, 2004, **67**(1): 95~100
- 25 J. Y. Ma, X. F. Zheng, M. Guo *et al.*. Investigation on the photo-induced deoxygenization process of myoglobin in solution with fluorescence spectroscopy (chapter three) [J]. *Science in China Ser. B*, 2008, **38**(1): 55~59
- 26 A. B. Das, P. Nagy, H. F. Abbott. Reactions of superoxide with the myoglobin tyrosyl radical [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2010, **48**(11): 1540~1547
- 27 Li Tao, Hu Wangxia, Qi Wangcun. Steady-state fluorescence spectroscopic analysis of $[\text{TPPF}e(\text{III})^2]\text{O}$ [J]. *J. China Three Gorges University (Natural Sciences)*, 2004, **26**(1): 90~92
- 李涛,胡望霞,戚万存. $[\text{TPPF}e(\text{III})^2]\text{O}$ 的稳态荧光光谱分析[J]. 三峡大学学报(自然科学版), 2004, **26**(1): 90~92