

紫外光照下高铁肌红蛋白的还原

安良梅¹ 曹洪玉^{1,2} 唐 乾¹ 郑学仿^{*,1,2}

(¹ 大连大学生命科学与技术学院, 大连 116622)

(² 辽宁省生物有机化学重点实验室, 大连大学, 大连 116622)

摘要: 实验中我们发现紫外波段光源照射高铁肌红蛋白(metmyoglobin, metMb)时, 能发生与添加化学还原剂还原 metMb 相似的过程, 本文采用紫外可见吸收光谱(UV-Vis), 圆二色光谱(CD)研究了 metMb 在特定紫外光源下的还原过程。580 nm 和 544 nm 处还原峰的面积变化显示, metMb 在光照时能被还原至 MbFe(II)H₂O 状态, 且不同的光源、特定紫外定波长、温度、pH 以及不同气体存在等条件下 metMb 的还原程度不同。在温度为 10 °C, 偏碱性条件时, 定波长 254 nm 照射有利于 metMb 还原; 气体存在时, 由于气体小分子与血红素铁的配位能力不同, 不同气体对光照 metMb 还原的催化作用程度也有差异, CO 和 O₂ 的存在对此过程有催化促进作用, 这一结论在医学和生理学上有重要的意义。

关键词: 高铁肌红蛋白; 紫外光照射; 光照还原; 紫外可见吸收光谱; 气体小分子

中图分类号: O629.73; O644.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2012)07-1461-08

Photoreduction of Metmyoglobin by Ultraviolet Irradiation

AN Liang-Mei¹ CAO Hong-Yu^{1,2} TANG Qian¹ ZHENG Xue-Fang^{*,1,2}

(¹ College of Life Science and Biotechnology, Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China)

(² Liaoning Key Laboratory of Bio-organic Chemistry, Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China)

Abstract: According to the experiment, we have discovered that the photoreduction procedure of metMb is similar to the chemical reduction course. In this research, the photoreduction induced by direct irradiation in the ultraviolet region was investigated by means of UV-Vis absorption and circular dichroism (CD) spectra. By comparing the changes of new absorption peak area at 580 and 544 nm of the Q band, we observed the reduction extent under different light sources, specific UV fixed wavelengths, temperature, pH values and gas exposure; metMb is reduced to MbFe(II)H₂O state after the illumination; the alkaline conditions are favored for reduction at 10 °C in 254 nm wavelength UV; as the coordination abilities of heme iron with gas molecules differ, the catalytic process of reduction varies under UV irradiation in the presence of gas. CO or O₂ can facilitate the photoreduction process. These conclusions have a promised significance in medicine and physiology.

Key words: metmyoglobin; UV irradiation; photoreduction; UV-Vis absorption spectra; gas molecules

0 引言

血红素蛋白在生物体内具有很多重要的功能, 如储存和运输 O₂、电子转移、生物催化剂和小分子

生物感应器(O₂, NO 和 CO)等^[1-2]。肌红蛋白(myoglobin, Mb)是研究蛋白质结合动力学^[3]和分子构象改变^[4]的模型蛋白, 由一条多肽链和一个血红素辅基构成, 在体内与 O₂ 分子结合起着储存和促进氧在细胞中

收稿日期: 2011-11-28。收修改稿日期: 2012-03-22。

国家自然科学基金(No.20871024); 辽宁省高校创新团队(No.2006T002, 2008T005, 2009T003); 辽宁省教育厅(No.2009A069, 2009A071)和大连市科技计划(No.2008E11SF170)资助项目。

*通讯联系人。E-mail: dlxfzheng@126.com, Tel: +86-0411-87403720

扩散的作用;它还能与 CO 和 NO^[5]等小分子配体可逆结合,从而调控其它蛋白的生理功能。Mb 活性中心的血红素 Fe(Fe²⁺或 Fe³⁺状态)有 6 个配位轨道,其中 4 个与卟啉环的 N 原子相连,第五配位与近端 His 93 残基的咪唑氮结合^[6],第六配位空置(deoxyMb)或与小分子配体结合。血红素内 Fe 呈 Fe²⁺状态时可以与小分子配体如 O₂ 和 CO 结合形成 MbO₂ 和 MbCO,呈 Fe³⁺状态时可以与水分子配体结合形成 metMb。远端 His 64 是 O₂ 或其他小分子配体进入血红素疏水空穴的通道,MbO₂ 中的 O₂ 和 metMb 的 H₂O 分子通过氢键与 His 64 的 N 紧密连接^[7-8]。

目前国内外多是在极端低温条件下利用 X-射线或外加光敏剂照射 metMb 晶体,研究其光还原过程^[9-10]。在超低温时抹香鲸的 metMb 被 X-射线还原能产生 Fe(II)低自旋肌红蛋白中间态^[9,11-12]。此中间态仍然结合一水分子,但是卟啉环的铁由三价高自旋态变成了二价低自旋态,中间态 MbFe(II)H₂O 通过水分子的氢键与远端 His 64 稳固连接。X 射线照射还原的 MbFe(II)H₂O 在低于 140 K 时为亚稳态;温度升高时,水分子解离,变成高自旋的 deoxyMb^[13],近端 His 93 距离铁平面缩短了 0.015 nm,铁平面的位置变换有利于 H₂O 解离^[14],同时珠蛋白构象发生变化,此发现具有重要的医学和生理学意义。

上述研究 metMb 的还原过程多在超低温晶体条件下,我们前期研究发现,在普通光照条件下,就能把 metMb 还原到二价状态,其紫外光照还原机理为光诱导的分子内电子转移^[15],本文进一步研究此还原过程,运用紫外可见光谱、紫外二阶导数光谱、圆二色光谱等方法,通过研究光照后 Q 带还原峰面积的变化,探讨 metMb 溶液在常温下的光照还原机制及其对不同外界因素的依赖性。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

紫外可见分光光度计(V-560,日本 Jasco 公司),荧光分光光度计(FP-5600,日本 Jasco 公司),圆二色分光光度计(J-810,日本 Jasco 公司),制冷和加热循环器(F-12,德国 Julabo 公司),实验室 pH 计(PHSJ-4A,上海雷磁分析仪器厂),紫外杀菌灯(ZW20S19W,天津特种光源有限公司)。实验用光源为荧光分光光度计氙灯、紫外杀菌灯、日光灯以及阳光。

将马心肌红蛋白(metMb)样品(美国 Sigma 公

司),溶解于 0.05 mol·L⁻¹ 的 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲体系(pH=6.0,7.4,8.0)中,制备成浓度为 1×10⁻⁵ mol·L⁻¹ 的蛋白溶液,冷冻避光保存。还原剂为 0.1 mol·L⁻¹ 连二亚硫酸钠溶液,氧化剂为 0.1 mol·L⁻¹ 的铁氰化钾。

1.2 实验方法

1.2.1 样品处理

metMb 溶液纯度的鉴定^[15]:向马心肌红蛋白样品中加入过量 0.1 mol·L⁻¹ 氧化剂铁氰化钾(最终浓度比为 1:100 时),经过柱层析后测得紫外吸收光谱发现,样品的吸收带形状几乎没有变化,所以购买的马心肌红蛋白几乎全部是高铁肌红蛋白(metMb)。

(i) 光源:取 3 mL pH=7.4 的 metMb 溶液置于 5 mL 离心管中,将样品置于冰上,保持温度恒定,分别在正午阳光、日光灯、紫外杀菌灯 3 种光源下照射 2 h;对对照样不做其他任何处理。

(ii) 定波长:取 3 mL pH=7.4 的 metMb 溶液置于荧光比色皿中,在 FP-6500 型荧光光谱仪中分别使用 254、280、409 和 430 nm 4 种波长在 20℃下照射蛋白样品 2 h;

(iii) 温度:取 3 mL pH=7.4 的 metMb 溶液置于荧光比色皿中,置于 FP-6500 型荧光光谱仪中使用 254 nm 波长照射 2 h,照射时的温度分别设为 4、10、25 和 35℃;

(iv) pH:分别取 3 mL pH 为 6.0、7.4 和 8.0 的 metMb 溶液,置于荧光比色皿中,置于 FP-6500 型荧光光谱仪中使用 254 nm 波长在 10℃下照射 2 h;

(v) 气体:取 3 mL pH=7.4 的 metMb 溶液,控温在 10℃置于 FP-6500 型荧光光谱仪中使用 254 nm 波长照射 2 h,照射的同时分别通入恒定的气体流(分别为 O₂、N₂ 和 CO)。

1.2.2 光谱测定

紫外可见光谱测定:狭缝宽度 2 nm,扫描波长范围为 220~750 nm,扫描速度 200 nm·min⁻¹,响应时间为中等,扫描 3 次。

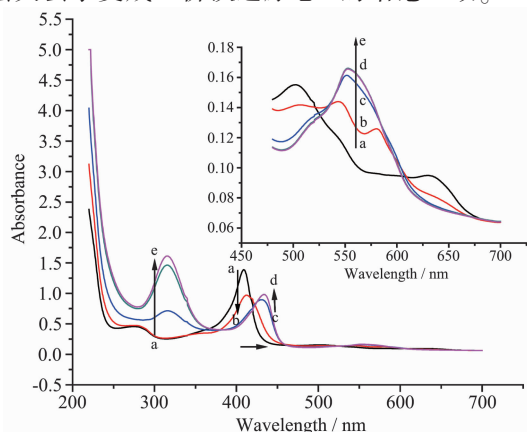
圆二色光谱测定:带宽为 4 nm,扫描波长范围为 250~190 nm,灵敏度为标准,扫描速度 50 nm·min⁻¹,响应时间 2 s,扫描 3 次。

2 结果与讨论

2.1 metMb 化学还原与光照还原比较

metMb 的三价铁结合水的吸收峰在 409、502

和 630 nm 左右,而肌红蛋白二价铁结合态在波长 420、540 和 580 nm 左右处有最大吸收峰,二价铁离子还原态的最大吸收峰在 430 和 560 nm 左右^[6]。metMb 溶液在 409 nm(Soret 带)处吸收强度最大,加入连二亚硫酸钠(与 metMb 的物质的量浓度为 5:1)时,metMb 在 409 nm 处吸光度降低并红移,在 Q 吸收带 544 nm 和 580 nm 处出现新吸收峰;当二者浓度比达到 10:1 时,Soret 吸收带红移到 430 nm,而 544 nm 和 580 nm 的两个峰逐渐合成一个在 552 nm 的大吸收峰;继续增加连二亚硫酸钠的浓度,Soret 带和 Q 带吸收峰位置和强度均变化不大。由此可知连二亚硫酸钠还原 metMb 的过程是分三个不同阶段: $\text{MbFe(III)H}_2\text{O(a 态)} \rightleftharpoons \text{MbFe(II)H}_2\text{O(b 态)} \rightleftharpoons \text{MbFe(II)(c, d 态)}$,如图 1 所示。这与文献报道的在超低温晶体状态时,X-射线晶体衍射实验将高铁肌红蛋白还原,并得到稳定的结合水的中间态^[12],温度升高后中间态会失去水变成二价铁还原态^[13]的结论一致。



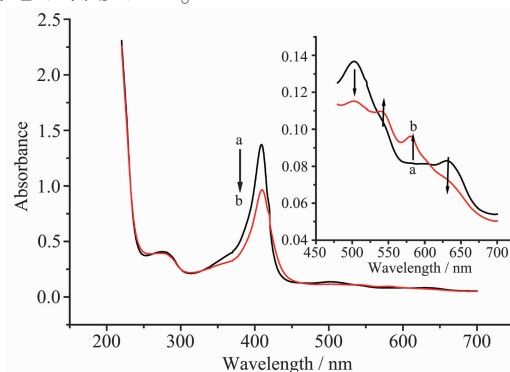
a~e: metMb added sodium dithionite 0, 0.01, 0.02, 0.03 and 0.04 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively

图 1 还原剂连二亚硫酸钠对 metMb 的紫外可见光谱的影响

Fig.1 Effects of sodium dithionite on UV-Vis absorbance spectra of metMb

我们在常见条件下光照还原 metMb 时,发现与上述过程类似的现象。实验中我们对 metMb 溶液进行不同光照时间处理时,发现光还原可使 metMb 达到二价结合水的状态,即 $\text{MbFe(III)H}_2\text{O(a 态)} \rightleftharpoons \text{MbFe(II)H}_2\text{O(b 态)}$,如图 2 所示。光照还原 metMb 的机理^[15]为光诱导的分子内电子转移,这是由于在光照过程中,metMb 的辅基铁卟啉环受激发后发生了电子跃迁,在 409 nm 左右 $a_{1u}(\pi) \rightarrow e_g(\pi^*)$ 电子跃迁产生的 Soret 带可归属为 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁产生的第二电子激发态 S_2 ^[18];在 500~650 nm 区间由 $a_{2u}(\pi) \rightarrow e_g(\pi^*)$ 电子

跃迁产生的 4 个 Q 带归属于 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁产生的第一电子激发态 S_1 ,还有金属 Fe 离子也可以占有 d 轨道,出现 d-d 跃迁^[20],这些光诱导的轨道跃迁属于分子内电子转移跃迁。



a: metMb samples; b: protein samples irradiated for 2 h

图 2 metMb 光照前后图谱

Fig.2 UV-Vis absorbance spectra of metMb before and after the irradiation

2.2 不同条件下光照还原 metMb

2.2.1 光源不同

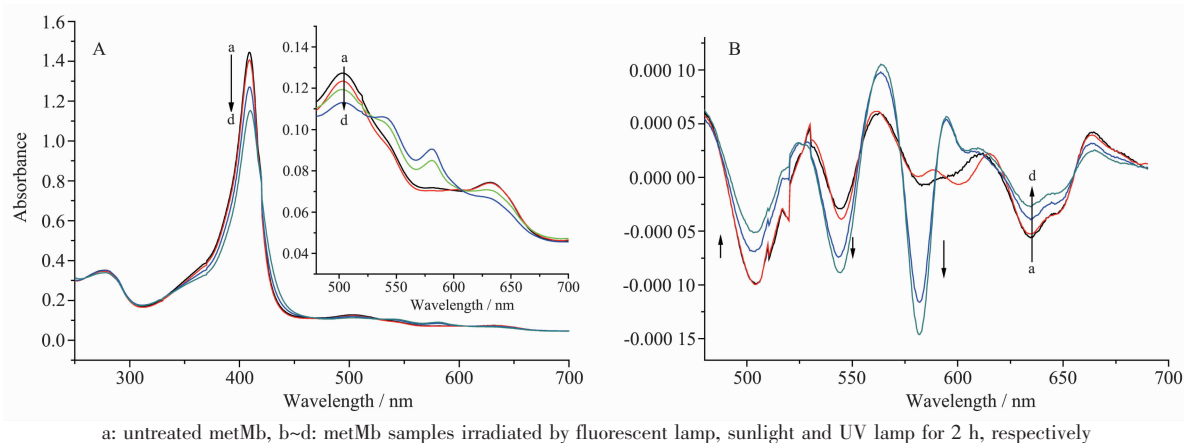
从紫外可见吸收光谱(图 3A)和紫外二阶导数光谱(图 3B)可见各吸收峰强度的变化情况;未经光照射处理的样品,在 Q 吸收带 503 nm 和 630 nm 处光吸收强度最大;日光灯照射的样品与未经光照射处理的样品相比,基本没有变化;阳光和紫外灯照射的样品光谱在 503 nm 和 630 nm 处吸收峰强度减小,544 nm 和 580 nm 处吸收峰强度明显增大,并且紫外灯照射引起的光吸收强度变化最大。

因此在相同的照射时间下,metMb 被还原的程度趋势为:在紫外灯下还原程度最大;阳光相对紫外灯光源,紫外线强度低,引起 metMb 被还原的程度减小;而日光灯的波长范围基本在可见光范围,即 400 nm 到 750 nm,不能激发蛋白以提供还原所需的电子,相应的紫外吸收光谱基本没有变化。由此可见是紫外波段光的光源引起 metMb 部分还原。

2.2.2 不同定紫外波长下 metMb 光照还原

为进一步考察紫外波段光源照射 metMb 还原情况,我们选用 FP-6500 型荧光光谱仪上氙灯的不同定波长来光照 metMb。

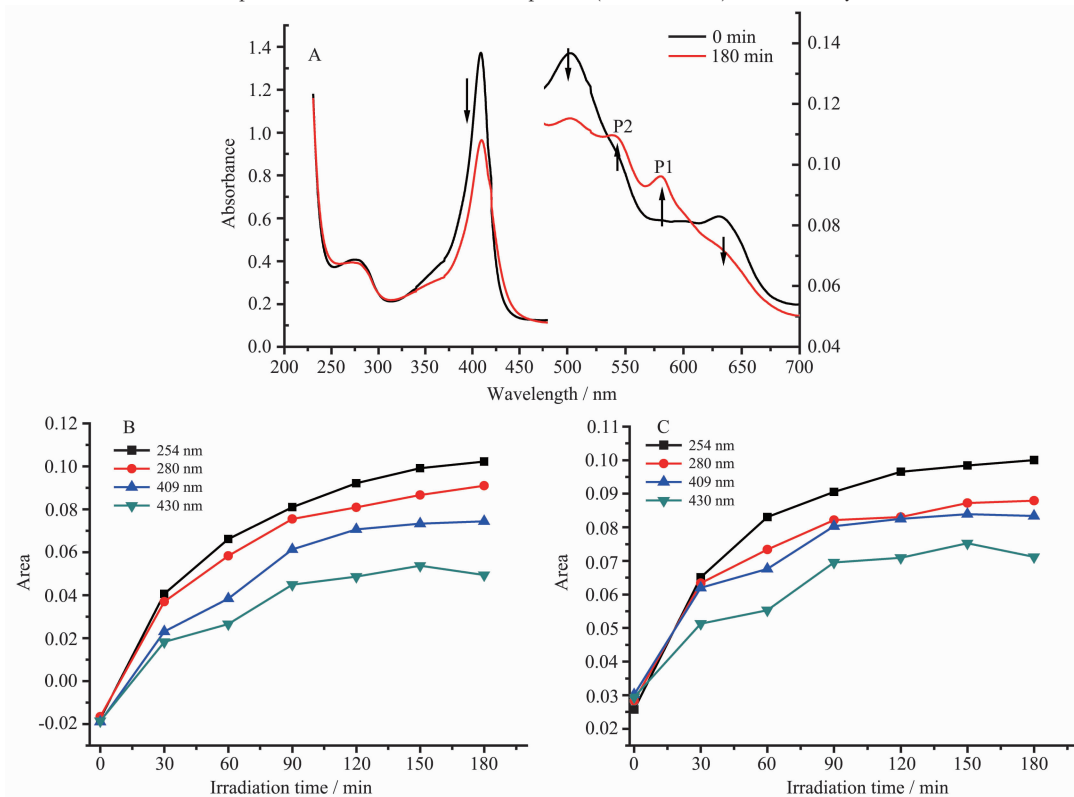
metMb 样品在不同定波长(254, 280, 409 和 430 nm)氙灯光照后 Soret 带 409 nm 处峰强度降低并轻微的红移,在 Q 带 503 nm 和 630 nm 处峰吸收强度降低,544 nm 和 580 nm 处峰吸收强度增强(图 4A);544 nm 和 580 nm 处峰面积在随着光照时间增加不



a: untreated metMb, b~d: metMb samples irradiated by fluorescent lamp, sunlight and UV lamp for 2 h, respectively

图 3 不同光源下 metMb 变化的紫外吸收光谱和紫外二阶导数光谱 (450~700 nm)

Fig.3 UV-Vis absorbance spectra and second derivative spectra (450~700 nm) of metMb by different irradiation sources



A: UV-Vis absorbance spectra; B: Peak area changes at 580 nm; C: Peak area changes at 544 nm

图 4 氙灯光照 metMb (pH=7.4) 180 min 后紫外可见光谱(A)及不同定波长氙灯光照后吸收峰的面积随光照时间变化图

Fig.4 UV-Vis absorbance spectra of metMb (pH=7.4) irradiated by xenon lamp for 180 min (A) and the peak area changes over time at different fixed wavelengths

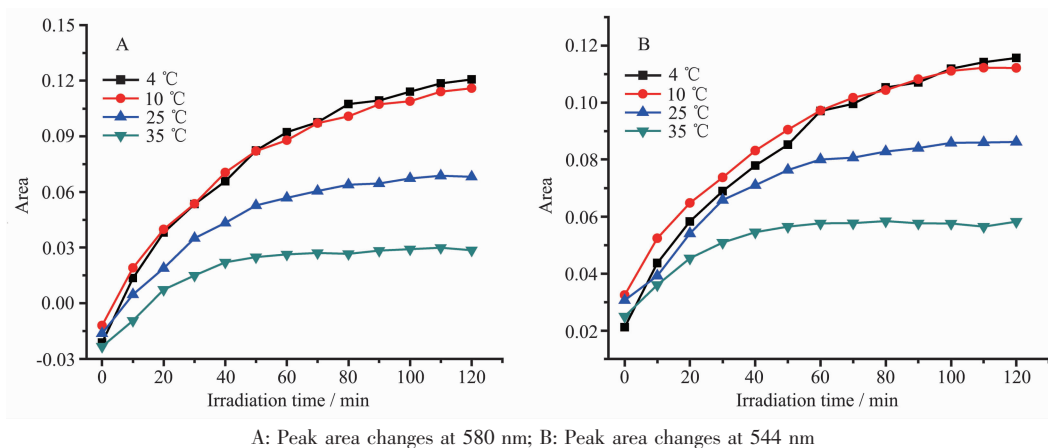
断增大 (图 4B、C)。当使用不同定波长的光照射蛋白时, Q 带的峰的面积变化也不相同, 其中 254 nm 光照射时 544 nm 和 580 nm 峰的面积增加的趋势最大, 即还原产物 MbFe(II)H₂O 较多。

由此可见, 紫外光能量越高, metMb 更易被还原。在近紫外光区(200~400 nm) 周围波段光源易于其还原, 可能与蛋白含芳香族氨基酸 (如 Tyr 或 Trp)

有关, 芳香族氨基酸残基可作为电子供体引导还原反应^[21]。

2.2.3 不同温度下 metMb 紫外光照还原

从图 5 可以看出, metMb 在 580 nm 和 544 nm 处峰面积随着光照时间延长呈现递增的趋势。在温度为 4 °C 或 10 °C 时, 光照后的蛋白在 580 nm 和 544 nm 处的峰面积增加较大。温度为 35 °C 时峰面



A: Peak area changes at 580 nm; B: Peak area changes at 544 nm

图5 在 pH=7.4,不同温度下使用 254 nm 波长光照 metMb 峰面积随时间变化图

Fig.5 Peak area changes of metMb over time at various temperatures, pH=7.4, 254 nm irradiation

积变化最小,光照 40 min 后峰面积增加平缓。图 5 说明溶液状态下低温有利于 metMb 的还原,即在光还原 $\text{MbFe(III)H}_2\text{O} \rightarrow \text{MbFe(II)H}_2\text{O}$ 过程中,温度越低,metMb 被光照还原的能力越强。

2.2.4 不同 pH 下 metMb 光照还原

肌红蛋白溶液在酸性条件下为单体,在 pH 达到 9 时溶液中氢氧根的浓度足够大,从而取代了原

来血红素中第六配位的水进行配位^[22],紫外图谱中在 586 nm 处已经形成一个新峰,pH>9 时肌红蛋白还易形成二聚体,酸性条件下蛋白易变性,为此我们考察了 pH 为 6.0、7.4、8.0 的高铁肌红蛋白缓冲溶液的光照情况。在 3 个 pH 值下,metMb 在 Soret 带(表 1)和 Q 带(图 6A)的吸收强度基本不变。在温度 10 °C 下,使用氙灯 254 nm 单色光分别照射 3 种

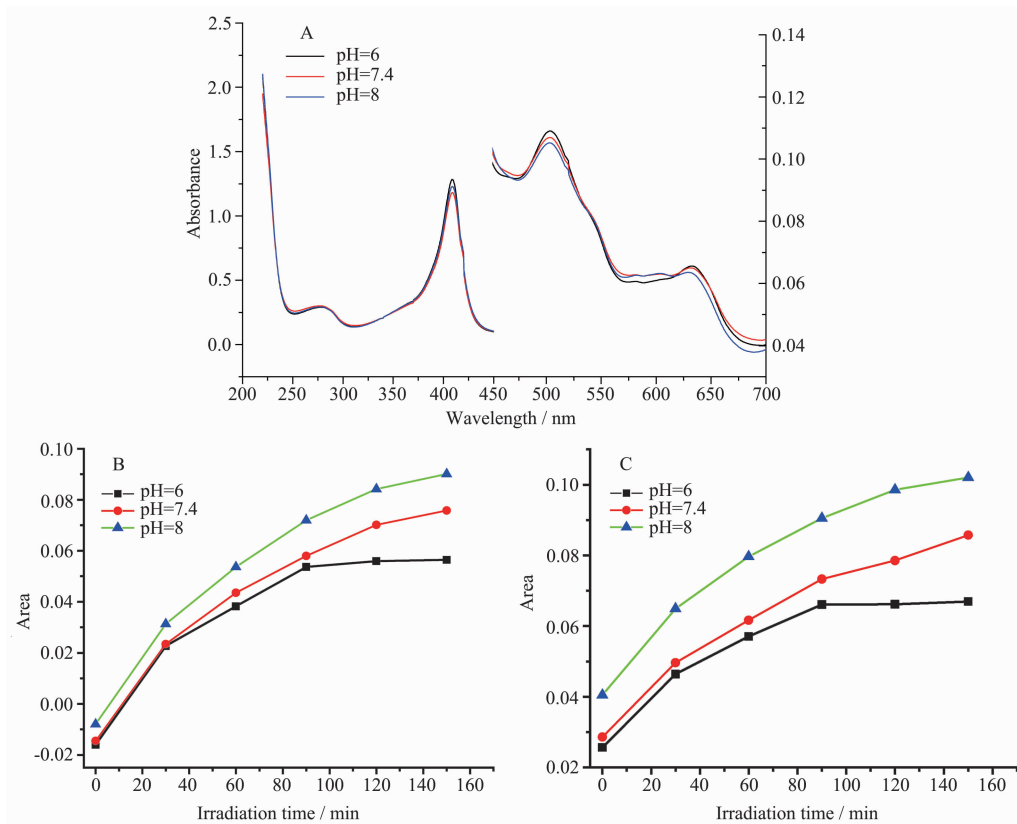


图6 10 °C下使用 254 nm 氙灯照射不同 pH 的 metMb,其 580 nm (B)和 544 nm (C)吸收峰面积随时间变化图

Fig.6 Peak area changes of metMb over different pH values at 580 nm (B) and 544 nm (C), 10 °C, 254 nm irradiation of xenon lamp

不同 pH 值下的 metMb 溶液, 其 580 nm 和 544 nm 处峰面积随照射时间变化的谱图如图 6B、C。在光照处理前后, pH 为 8.0 时两处峰面积均比 pH 为 7.4 或 6.0 时面积大; pH 为 6.0 的样品在光照的前 90 min, 两处峰面积均有所增加, 90 min 后基本不再变化; 而 pH 为 7.4 和 8.0 样品两处峰面积均随着光照时间的增加而增大, 说明偏碱性条件有利于 metMb 的光照还原。

表 1 在温度为 10 °C, 254 nm 光照不同 pH 的 metMb, 对 Soret 带的影响

Table 1 Effects of Soret band at 10 °C, 254 nm Irradiation under different pH values of metMb

pH	Before Irradiation		After Irradiation		$\Delta\varepsilon \times 10^5$
	$\lambda_{\max}$ / nm	$\varepsilon \times 10^5$	$\lambda_{\max}$ / nm	$\varepsilon \times 10^5$	
6.0	409	1.283 4	409.5	1.124 3	0.159 1
7.4	409	1.181 3	409.5	1.000 4	0.181 0
8.0	409	1.228 9	410	1.013 6	0.215 3

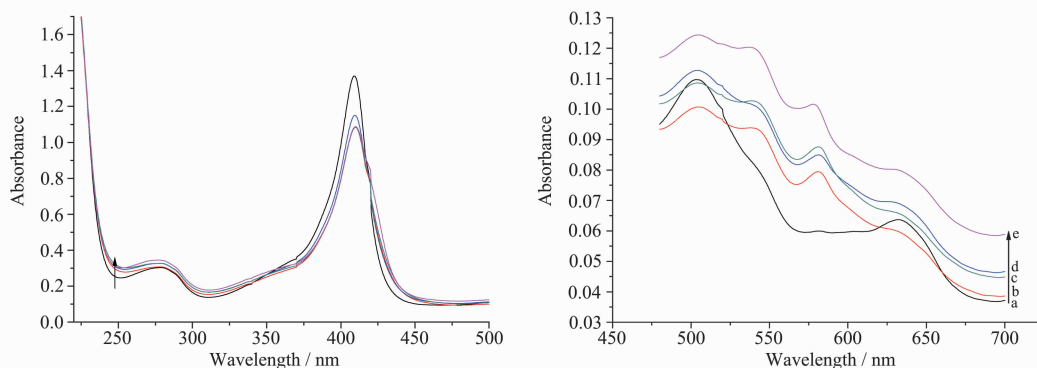
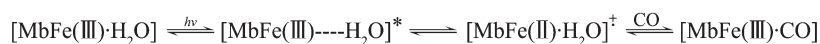
* $\lambda_{\max}$: Wavelength of maximum absorption peak; ε : Molar extinction coefficient.

光照 metMb 在不同 pH 时对 Soret 带的影响如表 1 所示, 随着 pH 的增加, 光照影响 Soret 带的吸收强度变化由 0.159 1 升高到 0.215 3, 并且其在光照后 Soret 带发生红移, 碱性条件下红移更大。metMb 在偏碱性条件下易于被光照还原, 可能与 metMb 在不同 pH 时的结合态有关。在偏碱性时易

于形成稳定的高自旋三价结合水态; 在酸性条件下, 高铁肌红蛋白的组氨酸残基发生质子化, 转移氢键, 三价结合水态较不稳定^[23]。

2.2.5 通入气体对光照 metMb 还原的影响

CO、O₂ 分子都可以与还原态肌红蛋白^[24]结合, 不与高铁肌红蛋白结合, 图 7 是不同气体存在条件下光照引起高铁肌红蛋白还原的结果。光照条件下有无气体都能引起 metMb 的还原, 但在有气体特别是 CO 和 O₂ 时, 更有利于蛋白还原。在 540 nm、579 nm 出现 MbCO(e) 的特征吸收峰, 证明 metMb 被还原后立刻与通入的 CO 结合; 544 nm 和 581 nm 处峰显示 N₂ 存在时 metMb 转化率较低, 相比较 O₂ 存在时 metMb 光照下被还原转化率则较高。O₂ 存在下光照的样品(c)与没有外加气体仅光照 2 h 的蛋白样品(b)紫外光谱图基本相似, 说明空气中氧气量足以催化 metMb 还原。这可能是由于气体与 Fe²⁺ 的配位能力 CO>O₂>H₂O>N₂, 根据配位能力气体对光照还原的 metMb 催化促进作用也不同; 与 H₂O 相比 CO、O₂ 能更好的与 Fe²⁺ 结合, 使光还原 MbFe(III)H₂O → MbFe(II)H₂O 更易于向正反应方向进行, CO、O₂ 对光照还原 metMb 有正催化促进作用。这是由于 metMb 在光照后卟啉环上的电子受激发, 发生了 π - π^* 电子跃迁, 电子从卟啉环转移到中心铁原子, 使得三价铁得到一个电子变为二价铁, 当有 CO 存在时更能稳定的结合到还原的二价铁上, 使还原后的蛋白形成稳定的 MbCO^[21]。其反应式如下:



a: metMb sample; b: protein sample irradiated for 2 h without gas; c~e: protein samples irradiated for 2 h with O₂, N₂, CO, respectively

图 7 10 °C 下通入 O₂, N₂, CO 对 254 nm 氙灯照射 metMb 还原的影响

Fig.7 Effects of O₂, N₂, CO on the photoreduction of metMb at 10 °C, 254 nm irradiation of xenon lamp

2.3 不同气体存在时 metMb 光照还原的二级结构变化

蛋白质折叠结构不同, 其活性生色基团的光学

活性也不同, 圆二色性将呈现较大的差异。根据所测得蛋白远紫外 CD 谱, 能反映出蛋白二级结构的信息^[25-26]。

光照时不同气体的通入引起 metMb 二级结构变化是不同的。如图 8 CD 图谱所示通入 O_2 或在空气中光照 2 h 的蛋白样品与通入 N_2 时明显不同, N_2 存在时 metMb 还原率明显降低, 这与图 7 紫外光谱图结论一致。通过圆二色光谱二级结构分析软件算出, 光照还原后蛋白 α -螺旋含量由光照前的 64.9% 下降到 56.6%, CO 、 O_2 存在时 α -螺旋含量下降最大, 分别下降 9.3% 和 8.7%, 而 N_2 存在时 α -螺旋含量反而增加 1.8%; β -折叠含量增加, β -转角和无规则卷曲含量变化不大。

由以上结果说明, 溶液中的溶解氧分子对光照还原 metMb 有一定的促进作用, 当溶液中充满 N_2 时其还原的效率降低; 而 metMb 经光照后, 在 CO 气体存在时更容易被还原, 且还原后的蛋白较快的与 CO 气体结合, 形成与 CO 的复合物 MbCO。

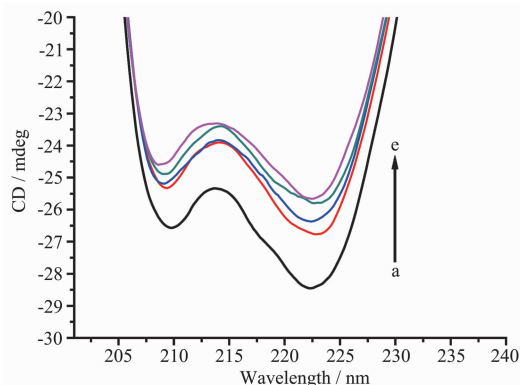


图 8 不同气体存在下 metMb 光照 2 h 后的 CD 光谱

Fig.8 CD spectra of metMb under the presence of different gases after 2 h of irradiation

3 结 论

本文采用紫外光源对 metMb 缓冲溶液进行光照实验, 结果表明, 其在定波长(254 nm)的氙灯光源光照过程中, 紫外可见光谱中 Soret 吸收带 409 nm 处吸收强度下降并轻微红移, 同时在 Q 带 580 nm 和 544 nm 处出现新的吸收峰, 且吸收峰面积随着光照时间不断增加。metMb 光照后可被还原成 $Fe(II)$ 的中间亚稳态, 通过比较 Q 吸收带 580 nm 和 544 nm 处吸收峰面积的变化, 在紫外光源的照射下, 波长、温度、pH 以及气体等外界因素对高铁肌红蛋白的还原均有影响。metMb 在定波长 254 nm 照射, 温度为 10 $^{\circ}C$, 偏碱性的适宜条件下, 对其光还原较有利。根据气体小分子与血红素铁的配位能力不同, 可不同程度的催化 metMb 的还原过程, 气体对 metMb 光照还原有催化作用与 Fe^{2+} 和气体配位能力

有关。通过圆二色光谱表明不同气体存在时光照 metMb, 其二级结构变化也有相应变化。紫外光照高铁肌红蛋白的还原过程以及气体小分子与 $Fe(II)$ 配位催化还原过程在医学和生理学上具有重要意义。

参考文献:

- [1] Cowan J A. *Inorganic Biochemistry: An Introduction*. New York: Wiley-VCH, **1997**:133-147
- [2] LIN Ying-Wu(林英武), Huang Zhong-Xian(黄仲贤). *World Sci-Tech. R. D.(Shijie Keji Yanjiu Yu Fazhan)*, **2006**,**28**(1):8-13
- [3] Austin R H, Beeson K W, Eisenstein L, et al. *Biochemistry*, **1975**,**14**(24):5355-5373
- [4] Galina B P, Yuri E K, Elena M Y. *Eur. J. Biochem.*, **1991**, **198**(1):233-241
- [5] Laverman L E, Wanat A, Oszejka J, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**,**123**(2):285-293
- [6] Phillips S E V. *J. Mol. Biol.*, **1980**,**142**:531-554
- [7] Olson J S, Phillips G N Jr. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **1997**,**2**:544-552
- [8] Phillips S E V, Schoenborn B P. *Nature*, **1981**,**292**:81-82
- [9] Lamb D C, Ostermann A, Prusakov V E, et al. *Eur. Biophys. J.*, **1998**,**27**:113-125
- [10] Prusakov V E, Lamb D C, Parak F G, et al. *Chem. Phys. Rep.*, **1999**,**18**:835-853
- [11] Prusakov V E, Steyer J, Parak F G. *Biophys. J.*, **1995**,**68**:2524-2530
- [12] Engler N, Ostermann A, Gassmann A, et al. *Biophys. J.*, **2000**,**78**:2081-2092
- [13] Engler N, Prusakov V, Ostermann A, et al. *Eur. Biophys. J.*, **2003**,**31**:595-607
- [14] Longa S D, Arcovito A, Benfatto M, et al. *Biophys. J.*, **2003**, **85**(1):549-558
- [16] ZHOU Hua-Wei(周华伟), CAO Hong-Yu(曹洪玉), TANG Qian(唐乾), et al. *Acta Chim. Sin.(Huaxue Xuebao)*, **2011**, **13**(69):1559-1564
- [15] Antonini E, Brunori M. *Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands*. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, **1971**:328
- [17] SUN Jing-Xin(孙京新), ZHOU Guang-Hong(周光宏), XU Xing-Lian(徐幸莲), et al. *Food Sci.(Shipin Kexue)*, **2002**,**23**(12):27-31
- [18] ZHANG Gen-Cheng(张根成), FAN Su(范苏). *Chinese J. Inorg. Chem.(Wuji Huaxue Xuebao)*, **2009**,**25**(7):1199-1204
- [19] ZHOU Hua-Wei(周华伟), CAO Hong-Yu(曹洪玉), TANG Qian(唐乾), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.(Wuji Huaxue Xuebao)*, **2011**,**27**(3):445-450

- [20]SHI Ying-Yan(石莹岩), ZHENG Wen-Qi(郑文琦), LI Xiang-Qing(李向清), et al. *Chem. J. Chinese Universities(Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao)*, **2005**,**26**(1):9-12
- [21]Hiromi S, Hiroto O, Mitsuyoshi U, et al. *Biochemistry*, **2000**, **39**(47):14595-14602
- [22]Fleischer E B, Palmer J M, Srivastava T S, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**,**93**:3162-3167
- [23]WU Zheng-Jie(吴正洁), KANG Li-Li(康立丽), HUANG Bao-Tian(黄宝添), et al. *Acta Biophys. Sin. (Shengwu Wuli Xuebao)*, **2009**,**25**(S1):334-335
- [24]LI Tao(李涛), LÜ Rong(吕荣), YU An-Chi(于安池). *Acta Phys.-Chim. Sin.(Wuli Huaxue Xuebao)*, **2010**,**26**(1):18-22
- [25]SHEN Xing-Can(沈星灿), LIANG Hong(梁宏), HE Xi-Wen(何锡文), et al. *Anal. Chem.(Fenxi Huaxue)*, **2004**,**32**:388-394
- [26]HUANG Han-Chang(黄汉昌), JIANG Zhao-Feng(姜招峰), ZHU Hong-Ji(朱宏吉). *Chemistry Bulletin(Huaxue Tongbao)*, **2007**,**7**:501-506