

核黄素光敏损伤溶菌酶的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳研究^{*}

张兆霞^{①②} 赵红卫^① 朱红平^{①②} 葛 敏^{①②} 王文锋^{①**} 姚思德^① 李文新^①

(① 中国科学院上海应用物理研究所, 上海 201800; ② 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 在 315~375 nm 波长光照射下核黄素能够造成溶菌酶的光敏损伤, 通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对稳态产物的研究分析发现, 溶菌酶的光敏损伤途径和损伤产物与核黄素浓度、光照时间、体系的气氛等密切相关. 在氮气气氛下为 I 型光敏损伤机制; 在有氧条件下溶菌酶的损伤是 I 型和 II 型反应协同作用的结果, 并以 II 型反应为主. 初步考察了褪黑激素等抗氧化剂对溶菌酶的保护作用.

关键词 溶菌酶 核黄素 光敏损伤 SDS-PAGE 抗氧化剂

核黄素(Riboflavin, RF)即维生素B₂是维持生物体健康的重要组分, 广泛存在于有氧细胞中. 人类可以从牛奶、啤酒酵母和叶状蔬菜等食物中摄取. RF在可见光以及UVA(320~380 nm)和UVB(290~320 nm)波段有很强的吸收, 见图 1(a). 在光激发下RF能够产生激发态, 其激发单重态寿命约为 12 ns, 它与物质发生反应的几率很小, 具有较高的系间窜越系数($\Phi_{isc}=0.67$), 即RF易从短寿命的激发单重态转化为长寿命的激发三重态, 激发三重态寿命为 42 μ s^[1], 且具有较高的激发能(194.9 kJ·mol⁻¹)和还原电位(1.7 V vs NHE)^[2]. 因此RF有着丰富和复杂的光化学和光生物学性质. 研究发现, RF激发态可通过两种机制与生物靶分子作用, 一是 I 型反应机制即RF激发态直接

与底物发生电子或氢原子转移诱发底物的损伤; 二是 II 型反应机制即RF激发态与基态氧发生激发能转移产生单线态氧或通过电子转移产生超氧阴离子自由基, 继而引发底物的损伤^[3,4]. 生物分子的这种光敏氧化损伤会进而导致细胞死亡或凋亡, 加速机体的衰老^[5]. 目前, RF对DNA的光敏损伤已经有了比较广泛的研究, 其光敏损伤机理不同于卟啉类光敏剂, 卟啉类主要通过单线态氧损伤DNA, 而RF主要通过电子转移的方式光敏损伤DNA^[6,7]. 相对于DNA来说, RF光敏损伤蛋白质方面的研究要少得多. 光敏剂可与蛋白质发生复杂的光化学反应, 攻击蛋白质引起结构和构象改变, 造成肽键的断裂^[8]、聚合与交联^[1]. 在眼晶状体中黄素敏化的光过程被认为是蛋白质积

收稿日期: 2006-01-21; 接受日期: 2006-04-06

* 国家自然科学基金(批准号: 20373086, 10574134)和中国科学院领域前沿项目资助

** 联系人, E-mail: wfwang@sinap.ac.cn

聚进而引起老化和白内障的原因之一^[9]。目前, RF引发蛋白质损伤的研究主要集中在单个氨基酸或肽上, 并取得了一定的结果, 但是由于蛋白质结构复杂种类繁多, RF光敏损伤蛋白质的机理仍知之甚少。事实上, 蛋白质约占细胞和组织干重的 68%, RF光敏损伤蛋白质的几率要比DNA的几率大得多, 因此蛋白质是光氧化损伤的主要靶分子之一。

最近研究表明RF能够敏化杀死肿瘤细胞和细胞内外的艾滋病毒^[10,11]。因此RF在光动力治疗(PDT)中具有潜在的应用前景。尽管在肿瘤致死的光动力治疗中做了大量的工作, 但是其中的光化学机理并不清楚, 尤其是在光敏损伤蛋白质方面。RF作为一种重要的维生素和内源性的光敏剂, 研究其与蛋白质之间的光化学反应对于阐明光动力学机理具有非常重要的意义。

本文以溶菌酶(Lysozyme, Lyso)为模型, 利用稳态光照及SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法, 研究了UVA光照条件下RF对Lyso的光敏损伤, 探讨了损伤机理, 获得的结果对进一步理解RF对蛋白质光动力学行为的机理很有帮助, 也为PDT提供一定的理论基础。最近本实验室利用快速反应动力学研究表明抗氧化剂不仅可以通过竞争反应清除有害自由基, 而且可以对已受损伤的生物分子进行快速修复, 减轻自由基对生物体的损伤^[12]。本文初步研究了不同抗氧化剂对蛋白质的保护作用。

1 材料与方法

1.1 药品

RF是Sigma试剂公司产品, 褪黑激素(melatonin, ML)、没食子儿茶素(epicatechin, EC)、绿原酸(CA)和抗坏血酸(ascorbic acid, Vc)等抗氧化剂均购自Sigma试剂公司。Lyso(分子量为 14.6 kDa)是Fluka公司产品。试剂均未经进一步处理直接使用。实验溶液使用Millipore纯水新鲜配制。

1.2 实验装置与检测方法

实验采用 500 W 的氙灯作为稳态光照光源, 经透射波长为 315~375 nm 的滤光片, 聚焦到石英样品池上。光辐照能量为 $34.3 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。经稳态光照处理

的样品利用 Laemmli 方法进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳实验, 电泳结束后用考马斯亮蓝 G-250 染色, 经甲醇-乙酸溶液脱色后, 用 Bio-Rad 公司的 Quantity one 成像分析系统成像并分析结果, 凝胶电泳仪型号为 Mini-PROTEIN[®] 3 Cell。紫外光谱仪为 U-3010 分光光度计, 扫描速度为 $300 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$, 狭缝宽度为 0.5 nm。

激光光解实验装置采用 Nd: YAG 激光器作为激励光源, 激光波长为 355 nm。

2 实验结果

2.1 光照波长的选定

图 1 为测得的RF水溶液和Lyso水溶液的吸收谱。RF在可见光以及UVA波段有 375, 450 nm处的两个吸收峰, 主要为 π - π^* 吸收^[2]。而Lyso在大于 315 nm的波长范围内几乎无吸收, 因此本文实验中选用了中心波长为 345 nm, 波带宽为 60 nm的干涉滤色片滤光。

2.2 气氛的影响

图 2 为 $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Lyso 溶液及 RF($1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和 Lyso($5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的混合溶液分别在氮气(N_2)、空气和氧气(O_2)饱和的条件下光照 30 min 后, 得到的 SDS-PAGE 图。实验结果表明, 上述溶液在不同气氛下光照, 均在 28~29 kDa 处出现大分子量的蛋白质片段, 该片段恰好是 Lyso 分子量 14.6 kDa 的两倍, 说明其为二聚产物。相同气氛条件下, RF 的存在使二聚产物明显增加, 说明 RF 会敏化 Lyso 的损伤; 不同气氛条件下, 氧气饱和时 Lyso 的损伤最严重, 并在 38~39 kDa 处出现了明显的第三条带; 空气饱和下损伤程度次之。氮气饱和条件下 Lyso 也受到了损伤但损伤程度相对最小, 此结果表明, 氮气气氛下, RF 通过 I 型光氧化反应直接造成 Lyso 的损伤。有氧条件下, 氧气的浓度越大, 损伤程度越强(即 $\text{O}_2 > \text{空气}$), 表明 RF 对 Lyso 的损伤同时也存在 II 型反应机理, 而在氧气条件下 Lyso 的光敏损伤明显大于在氮气条件下的损伤, 说明 RF 对 Lyso 的光敏损伤是 I 型和 II 型反应协同作用的结果并以 II 型反应为主。另外, 有氧条件下第三条带的出现说明除交联反应外还发

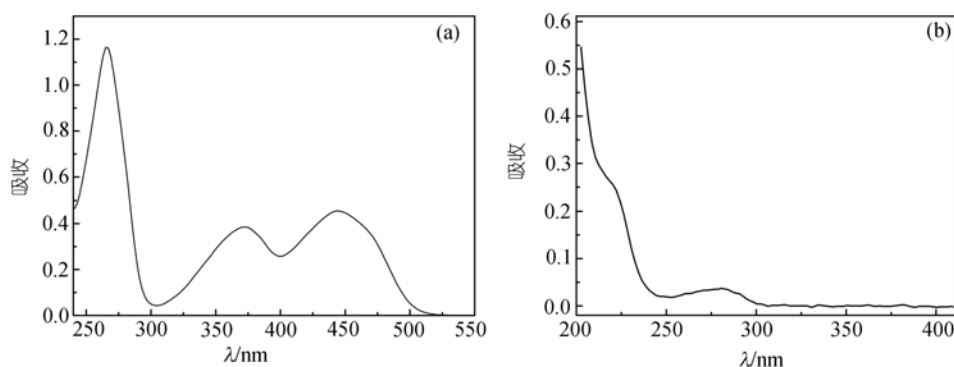


图1 紫外-可见光吸收谱

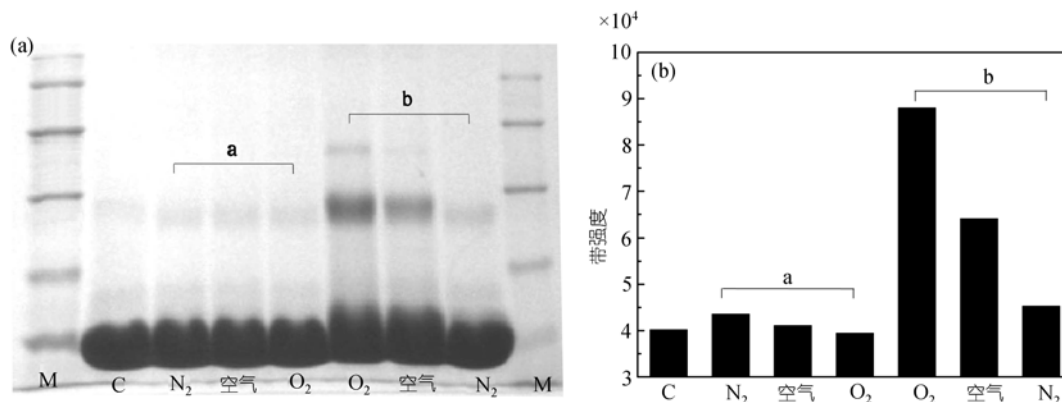
(a) $4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 RF 水溶液; (b) $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Lyso 水溶液

图2 不同气氛下 RF 对 Lyso 的光敏损伤

光照时间均为 30 min. a, $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Lyso 体系; b, $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RF 和 Lyso ($5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的混合溶液; C, 对照组; M 为 Marker, 其分子量从下至上分别为 14.4, 20.1, 31, 43, 66.2 kDa. (a) 为 SDS-PAGE 图; (b) 为 28~29 kDa 处条带的强度图, 此数据是三次实验的平均结果

生了 Lyso 的断裂反应, 断裂的小分子继续与二聚体或其他分子反应生成分子量为 38~39 kDa 的产物.

2.3 RF 浓度的影响

图 3 为 $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Lyso 及不同浓度 RF 的混合溶液在空气条件下光照 30 min 后所得到的电泳图. 可以看出, 随 RF 浓度在 $5 \times 10^{-7} \sim 7 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内的增加在 28~29 kDa 处出现的二聚产物条带强度逐渐增大. 当混合溶液中 RF 浓度不小于 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (即 Lyso 和 RF 的浓度比为 50) 时 38~39 kDa 处出现第三条带, 并随 RF 浓度的增加其强度继续增强. 表明随 RF 浓度增加 Lyso 的损伤加剧. RF 浓度的增加使 RF 吸收更多光能转化为激发态, 激发态通过 I 型和 II 型反应促进了 Lyso 的光敏损伤.

2.4 光照时间的影响

图 4 为空气条件下, $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Lyso 和 $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RF 的混合溶液经不同时间的光照后进行 SDS-PAGE 实验并成像的结果. 光照 10 min 后即可在 28~29 kDa 位置观察到第二条带, 光照时间大于 30 min 则在 38~39 kDa 位置处出现第三条带, 光照 1 h 后在 52 kDa 附近出现第四条带. 结果表明, 随光照时间的延长, 新出现的条带强度逐渐增强, RF 对 Lyso 的光敏损伤加剧. RF 损伤 Lyso 的光照时间效应与 RF 浓度效应相似, 光照时间的延长会产生更多的 RF 激发态, 并通过电子转移和激发能转移这两种途径加剧 Lyso 的光敏损伤.

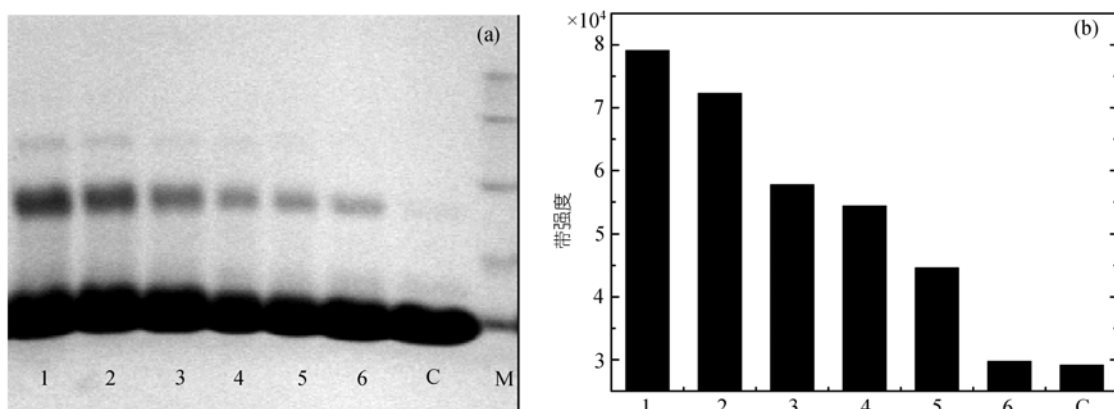


图3 RF 光敏损伤 Lyso 的浓度效应

以空气饱和, 光照 30 min, 混合溶液中 Lyso 浓度为 $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 改变其中 RF 的浓度, 1~6 的 RF 浓度分别为 7×10^{-5} , 4×10^{-5} , 1×10^{-5} , 2.5×10^{-6} , 5×10^{-7} , $0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; C, 对照组; M 为 Marker, 其分子量从下至上分别为: 14.4, 20.1, 31, 43, 66.2 kDa. (a) 为 SDS-PAGE 图; (b) 为 28~29 kDa 处条带的强度图, 为三次实验结果的平均数据

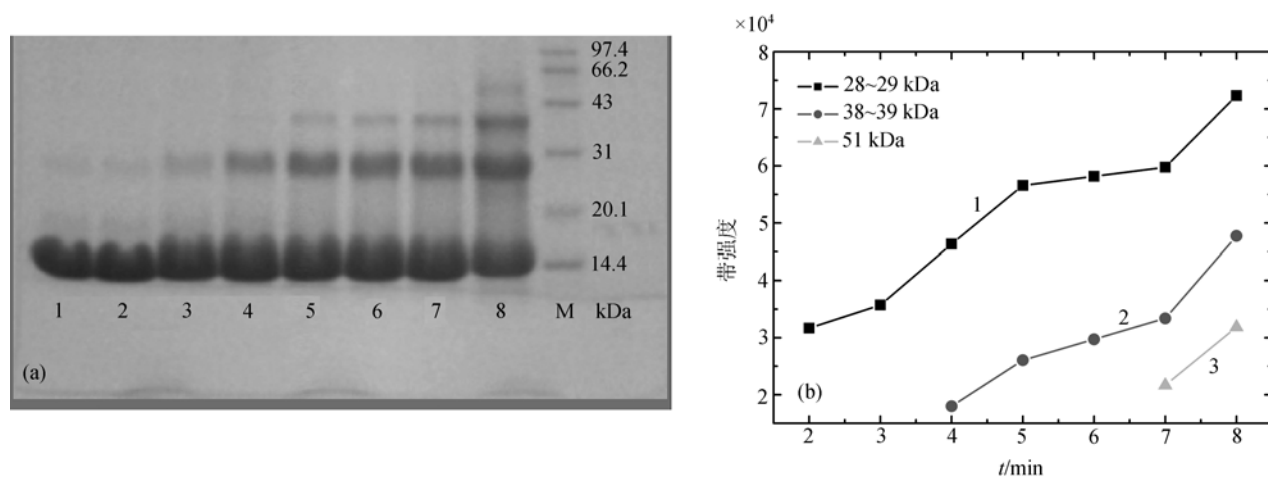


图4 RF 光敏损伤 Lyso 的时间效应

以空气饱和, 光照 $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Lyso 和 $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RF 的混合溶液; 图中 2~8 光照时间分别为 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min, 1 为对照组; M 为 Marker, 其分子量如图所示. (a) 为 SDS-PAGE 图; (b) 为新产生的条带强度与光照时间的关系图, 1, 28~29 kDa; 2, 38~39 kDa; 3, 51 kDa. 此数据为三次实验的平均结果

2.5 抗氧化剂的影响

$5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ML, EC, CA 与 Vc 分别加入到 Lyso ($5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 RF ($7 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的混合溶液中, 在空气饱和条件下光照 30 min, 以相同的方法处理并观察成像后的图片(图 5). 实验表明加入抗氧化剂后 28~29 kDa 处的条带强度明显减弱, 同时并未观察到第三条带的出现, 说明抗氧化剂的加入有效的降低了 RF 对 Lyso 的光敏损伤程度. 各种抗氧化剂对 Lyso 的保护效果不同, 从图 5 可以得出保护效果

依次为 $\text{CA} > \text{ML} > \text{Vc} > \text{EC}$.

各种抗氧化剂与 $^3\text{RF}^*$ 反应的速率常数如表 1 所示. 在有氧条件下, 参考表 1 可知抗氧化剂除直接与 RF 三重态反应外, 还可以与单线态氧反应从而减轻了对 Lyso 的光敏损伤作用, 并有可能与 Lyso 受损后形成的自由基发生反应使其得到修复^[12].

Lyso 与 $^3\text{RF}^*$ 反应的速率常数为 $3.7 \times 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. 在氮气条件下, Lyso 和抗氧化剂均与 $^3\text{RF}^*$ 反应^[18], 即二者形成竞争反应. 由此可计算得出抗氧化剂在竞争反应中所占的比例 ϕ , ϕ 均大于 97%,

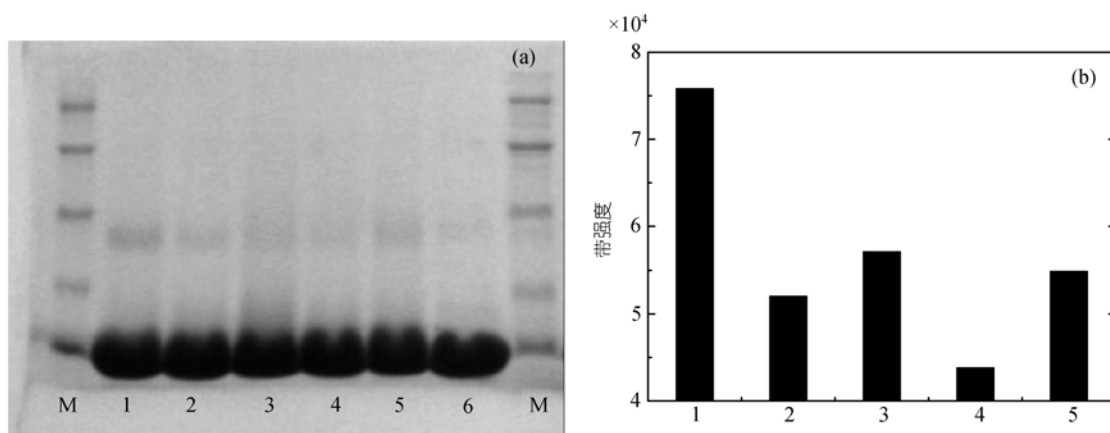


图 5 抗氧化剂对 RF 光敏损伤 Lyso 的影响

$5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Lyso, $7 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RF 与 $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗氧化剂的混和溶液, 空气饱和的条件下, 光照 30 min; 1 中无抗氧化剂, 2~5 中抗氧化剂分别为 ML, EC, CA, Vc, 6 为对照组, M 为 Marker, 其分子量从下至上分别为: 14.4, 20.1, 31, 43, 66.2 kDa. (a) 为 SDS-PAGE 图; (b) 为 28-29 kDa 处条带的强度图, 此数据是三次实验的平均结果

表 1 抗氧化剂与 $^3\text{RF}^*$ 和 $^1\text{O}_2$ 反应的速率常数 $k(^3\text{RF}^*)$ 和 $k(^1\text{O}_2)$ 、抗氧化剂的氧化电位 E_{ox} 以及 $^3\text{RF}^*$ 与抗氧化剂之间电子转移反应的自由能变化值 ΔG

抗氧化剂	$k(^3\text{RF}^*)$ / $10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$k(^1\text{O}_2)$ / $10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	E_{ox}/V	$\Delta G^{\text{a)}}$ / $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$
ML	1.4 ^[13]			
CA	2.1	3.4 ^[14]	0.749 vs NHE ^[14]	-94.5
EC	2.1	0.0132 ^[15]	0.909 vs NHE ^[15]	-79.0
Vc	1.6	0.8 ^[16]	0.479 vs NHE ^[17]	-120.5
色氨酸	1.8 ^[18]		1.01 vs NHE ^[19,20]	-68.5
酪氨酸	1.5 ^[18]		0.93 vs NHE ^[19,20]	-76.2

a) ΔG 为根据 Rehm-Weller 方程计算得 $^3\text{RF}^*$ 与抗氧化剂之间电子转移反应的自由能变化值

此结果表明在氮气条件下四种抗氧化剂主要通过直接与 $^3\text{RF}^*$ 反应的方式保护了 Lyso.

3 讨论

溶菌酶是由 129 个氨基酸组成的单肽链蛋白酶, 其结构高度稳定. 其中 3 个酪氨酸均位于分子的内部, 不易暴露在溶剂中, 对稳定 Lyso 的结构有非常重要的作用^[21]. 6 个色氨酸, 4 个在酶分子表层部位, 2 个位于溶菌酶的活性中心部位, 参与溶菌酶的催化过程. 实验结果显示, 在氮气条件下, RF 也能够光敏损伤 Lyso. Lyso 在溶剂中 6 个色氨酸都会不同程度地暴露出来^[22], 溶菌酶结构中最易暴露的色氨酸残基是自由基攻击的主要目标之一, 其对核黄素三重态表现出很高的反应活性^[2,4], 核黄素三重态与色氨酸残基可以发生电子转移反应, 产生的自由基能够使两个

色氨酸残基之间成键, 这个反应是蛋白质交联主要原因^[4]. 在氮气条件下, RF 光敏损伤溶菌酶的途径主要为 RF 激发三重态直接与溶菌酶中的色氨酸残基反应造成的即 I 型反应机制.

在空气饱和的 RF 水溶液中, 单线态氧和超氧阴离子的量子产额分别为 0.48 和 0.009^[23], 因此有氧条件下主要是发生 RF 激发态将能量转移给氧气产生单线态氧的反应. 侧链上的不同氨基酸残基与单线态氧的反应速率差别很大, 导致特定氨基酸的选择性损伤, 如单线态氧对色氨酸的反应速率高达 $3 \times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ^[24]. Lyso 中色氨酸残基不同程度地暴露在溶剂中, 使其成为单线态氧和 RF 激发态攻击的主要目标, 反应产生的自由基能够使色氨酸之间成键, 这也是溶菌酶交联的原因之一. 随着氧浓度的提高、光照时间的延长、核黄素浓度的增大溶液中的自由基浓

度增大, 促进蛋白质的交联反应. 研究结果表明在有氧条件下Lyso的光敏损伤明显大于在氮气条件下的损伤, 说明RF对Lyso的光敏损伤是 I 型和 II 型反应协同作用的结果并以 II 型反应为主, 这与RF主要通过电子转移的方式即 I 型机理光敏损伤DNA^[6]明显不同.

事实上也不能忽略其他类型的氨基酸残基(如酪氨酸)的参与, 通过酪氨酸到色氨酸自由基的分子内长程电子转移可导致色氨酸残基的重新形成, 并且生成酪氨酸自由基^[1]. 本文实验中出现了 38~39 kDa 位置处的第三条电泳条带(如图 2, 3), 说明RF对Lyso光敏损伤不仅造成了Lyso交联而且还使其发生了断裂, 断裂的小分子片段与二聚体结合产生了更高分子量的蛋白质片段^[8,9,18]. 我们将进一步研究判断RF光敏造成Lyso的断裂位点.

抗氧化剂的加入使Lyso的损伤明显减弱, 即抗氧化剂起到保护Lyso的作用. 根据快速反应动力学研究结果, 在氮气饱和的条件下, 四种抗氧化剂主要通过直接与RF激发三重态反应的方式保护Lyso. 在有氧条件下, 本文的实验中所用四种抗氧化剂对Lyso的保护效果依次为CA>AML>Vc>EC, 此条件下抗氧化剂既可以直接与RF激发三重态及单线态氧反应, 生成相对稳定的酚氧自由基, 同时又可能与受损伤的自由基发生电荷转移反应, 从而起到对底物的保护作用^[12,25].

4 结论

RF 在 315~375 nm 波长光照下, 能够选择性地损伤特定氨基酸如色氨酸和酪氨酸, 形成的自由基能够使氨基酸之间成键, 导致 Lyso 发生两分子交联. Lyso 的损伤程度随 RF 浓度的增大而增强, 随光照时间的延长而加剧. 抗氧化剂的加入在一定程度上阻止了 Lyso 的双分子交联, 有效地抑制 RF 光敏作用对 Lyso 造成的损伤. 不同的抗氧化剂对 Lyso 损伤的阻止程度不同, 褪黑激素和绿原酸作用比较明显.

参 考 文 献

- 1 Viteri G, Edwards A M, Fuente J D L, Silva E. Study of the Interaction between triplet riboflavin and the α -, β_H - and β_L -crystallins of the eye lens. *Photochem Photobiol*, 2003, 77(5): 535—540[DOI]
- 2 Heelis R F. The photophysical and photochemical properties of riboflavin (isoalloxazines). *Chem Soc Rev*, 1982, 11: 15—39[DOI]
- 3 Foote C S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol*, 1991, 54(5): 659
- 4 Silva E, Ugarte R, Andrade A, Edwards A M. Riboflavin-sensitized photoprocesses of tryptophan. *J Photochem Photobiol B*, 1994, 23: 43—48[DOI]
- 5 Donoso M N, Valenzuela A, Silva E. Tryptophan-riboflavin photoinduced adduct and hepatic dysfunction in rats. *Nutr Rep Int*, 1988, 37: 599—606
- 6 Ito K, Inoue S, Yamamoto K, Kawanishi S. 8-Hydroxydeoxyguanosine formation at the 5' site of 5'-GG-3' sequences in double-stranded DNA by UV radiation with riboflavin. *J Bio Chem*, 1993, 268(18): 13221—13227
- 7 张连文, 林维真, 潘景喜, 韩镇辉, 姚思德, 林念芸. 核黄素光敏损伤 DNA 的凝胶电泳研究. *中国科学, C 辑*, 2001, 31(2): 178—184
- 8 Davies K J A. Protein damage and degradation by oxygen radicals I. General aspects. *J Bio Chem*, 1987, 262(20): 9895—9901
- 9 Mancini M, Edwards A M, Becker M I, Ioannes A D, Silva E. Reactivity of monoclonal antibodies against a tryptophanriboflavin adduct toward irradiated and non-irradiated bovine-eye-lens protein fractions: an indicator of *in vivo* visible-light-mediated phototransformations. *J Photochem Photobiol B: Biol*, 2000, 55: 9—15[DOI]
- 10 Edwards A M, Silva E, Jofré B, Becker M I, Ioannes A E D. Visible light effects on tumoral cells in a culture medium enriched with tryptophan and riboflavin. *J Photochem Photobiol B: Biol*, 1994, 240(3): 179—186[DOI]
- 11 Goodrich R P. The use of riboflavin for the inactivation of pathogens in blood products. *Vox Sanguinis*, 2000, 78(suppl. 2): 211—215
- 12 赵晨阳, 石益民, 王文锋, 姚思德, 范波涛, 郑荣梁, 芦丁, 槲皮素快速修复嘌呤脱氧核苷酸阳离子自由基. *中国科学, C辑*, 2001, 31(6): 550—556[摘要]
- 13 朱红平, 张兆霞, 赵红卫, 王文锋, 姚思德. 褪黑激素的瞬态产物及其性质. *中国科学, B辑*, 2006, 36(1): 76—81[摘要]
- 14 Foley S, Navaratnam S, Mcgarvey D J, Land E, Truscott T G, Rice-Evans C A. Singlet oxygen quenching and the redox properties of hydroxycinnamic acids. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26: 1202—1208[DOI]
- 15 Mukai K, Nagai S, Ohara K. Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by tea catechins in ethanol solution. *Free Radic Biol Med*, 2005, 39: 752—761[DOI]

- 16 Chou P -T, Khan A U. L-ascorbic acid quenching of singlet delta molecular oxygen in aqueous media: Generalized antioxidant property of vitamin C. *Biochem Biophys Res Commun*, 1983, 115: 932—937[DOI]
- 17 Halliwell B. Vitamin C and genomic stability. *Mutat Res*, 2001, 475: 29—35
- 18 陆长元. 核黄素和 FAD 光敏化与辐射敏化 DNA 及其它生物分子的机理研究. 中国科学院上海应用物理研究所博士学位论文, 2000
- 19 DeFlippis M R, Murthy C P, Faraggi M, Klapper M H. Pulse radiolytic measurement of redox potentials: the tyrosine and tryptophan radicals. *Biochem*, 1989, 28: 4847—4853[DOI]
- 20 Steenken S, Jovanovic S V. How easily oxidizable is DNA one-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution. *J Am Chem Soc*, 1997, 119: 617—618[DOI]
- 21 Blake C C F, Koenig D F, Mair G A, North A C T, Phillips D C, Sarma V R. Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature*, 1965, 206: 757—763
- 22 Edwards A M, Silva E. Exposure of tryptophanyl residues in α -lactalbumin and lysozyme. Quantitative determination by fluorescence quenching studies. *Radiat Environ Biophys*, 1986, 25: 113—122[DOI]
- 23 Krishna C M, Uppuluri S, Riesz P, Zigler J S, Balasubramanian D. A study of the photodynamic efficiencies of some eye lens constituents. *Photochem Photobiol*, 1991, 54: 51—58
- 24 Matheson I B C, Etheridge R D, Kratoch N R, Lee J. The quenching of singlet oxygen by amino acids and proteins. *Photochem Photobiol*, 1975, 21: 165—171
- 25 Mayo J C, Tan D X, Sainz R M, Natarajan M, Lopez-Burillo S, Reiter R J. Protection against oxidative protein damage induced by metal-catalyzed reaction or alkylperoxyl radicals: comparative effects of melatonin and other antioxidants. *Biochimica Biophysica Acta*, 2003, 1620: 139—150