

光谱法研究铬(VI)与血红蛋白的相互作用

张根成* 范 苏

(盐城师范学院应用化学与环境工程研究所, 盐城 224002)

摘要: 运用荧光光谱、紫外光谱、CD 光谱法研究了 $K_2Cr_2O_7$ 与牛血红蛋白(BHb)的相互作用。紫外光谱表明,加入铬(VI)酸根离子后,BHb 分子中 Soret 带的吸收持续降低,峰位红移,说明铬(VI)酸根离子可能使部分血红素辅基从 BHb 的空腔中脱离出来,部分转变为高铁血红蛋白。荧光光谱表明,铬(VI)酸根离子与 BHb 形成基态复合物导致 BHb 内源荧光猝灭,猝灭机理主要为静态猝灭。测定了不同温度下该反应的热力学参数,表明上述作用过程是一个熵增加、自由能降低的自发分子间作用过程,铬(VI)酸根离子与 BHb 之间以氢键和范德华力相互作用为主;并用同步荧光和 CD 光谱技术考察了铬(VI)对 BHb 结构的影响。

关键词: 铬(VI); 牛血红蛋白; 荧光光谱; 热力学参数

中图分类号: O614.61*3; O613.72

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2009)07-1199-06

Interaction between Chromium(VI) and Hemoglobin: Spectroscopic Approach

ZHANG Gen-Cheng* FAN Su

(Institute of Applied Chemistry and Environmental Engineering, Yancheng Teachers University, Yancheng, Jiangsu 224002)

Abstract: The interaction between chromium(VI) and bovine hemoglobin (BHb) was investigated using fluorescence, UV-Vis and CD spectroscopy. The experimental results showed that the Soret band was decreased gradually with the increased amount of $Cr(VI)$, suggesting the detachment of some heme chromophores from their matrixes in BHb and the formation of MetHb; the fluorescence quenching of BHb by chromium(VI) is a result of the formation of $Cr(VI)$ -BHb complex; static quenching was confirmed to result in the fluorescence quenching. The corresponding thermodynamic parameters were measured at different temperatures. The process of binding $Cr(VI)$ on BHb was a spontaneous molecular interaction procedure in which entropy increased and Gibbs free energy decreased. The hydrogen bonds and Van der Waals forces interactions play a major role in stabilizing the complex. The effect of $Cr(VI)$ on the conformation of BHb was analyzed using synchronous fluorescence and CD spectroscopy.

Key words: chromium(VI); bovine hemoglobin; fluorescence spectroscopy; thermodynamic parameters

铬是环境中常见的重金属污染物,铬有多种价态,其中 $Cr(VI)$ 对生物机体具有重要的毒理学意义,被国际癌症研究机构归为一类人类职业致癌物^[1]。许多研究发现^[2,3], $Cr(VI)$ 能够引起 DNA 构象变化,在较高剂量时即可引起不可修复的 DNA 损伤,从而导致细胞凋亡甚至肿瘤的发生。另外 $Cr(VI)$ 能够改变

蛋白质等生物大分子的生物活性,可使血红蛋白转变为高铁血红蛋白,并可干扰体内的氧化、还原和水解过程,从而对机体产生毒性^[4]。目前 $Cr(VI)$ 引起生物机体畸变的原因还不是很清楚^[5],研究 $Cr(VI)$ 与蛋白的作用机理,不但有利于解释 $Cr(VI)$ 在体内的代谢过程,而且可以评价其毒性。关于铬离子与血清蛋

收稿日期:2009-03-09。收修改稿日期:2009-05-12。

江苏盐城师范学院教授基金资助项目(No.06YSYJB0205)。

*通讯联系人。E-mail:zgchx406@163.com

第一作者:张根成,男,53岁,教授;研究方向:环境污染控制及荧光分析。

白的相互作用已有报道^[5],但是铬离子在体内的吸收、转运情况还不清楚。血红蛋白是动物及人体内执行输氧任务的蛋白质,是生命机体进行各种生理活动的主要承担者。蛋白质空间结构的任何变化引起的构象变化都意味着蛋白质分子的活性改变^[6,7]。目前,关于 Cr(VI)与血红蛋白相互作用的报道较少,因此深入探讨 Cr(VI)与血红蛋白的结合机理,有助于更为全面深入地研究 Cr(VI)毒性作用机制。本文在模拟动物体生理条件下,用 UV-Vis 吸收光谱、荧光光谱和 CD 光谱研究了 Cr(VI)与牛血红蛋白的相互作用,讨论了 Cr(VI)对牛血红蛋白(BHb)的荧光猝灭作用,得到了 Cr(VI)与 BHb 的表观结合常数、结合作用力类型和热力学参数等,并用同步荧光及 CD 光谱技术考察了 BHb 构象的变化,为研究 Cr(VI)对血红蛋白性能的影响提供了一些基础信息。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

带恒温系统的 LS-50B 型荧光光度计(美国 Perkin-Elmer 公司);Spectral S-600 紫外-可见光谱仪(德国,耶拿);J-810 圆二色分光光度计(Japan, Jasco);高纯水制备仪(日本 Millipore 公司)。PHS-3C 型精密 pH 计(上海雷磁仪器厂);ZC-18Q 智能型超级恒温水槽(宁波天恒仪器厂)。

把重铬酸钾($K_2Cr_2O_7$, A.R.)配制成 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cr(VI)储备液待用;牛血红蛋白(购于 Sigma 公司)用 $\text{pH}=7.4$ 的三羟甲基氨基甲烷(Tris)缓冲溶液(内含 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 维持离子强度)配制成 $3.0 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备溶液并于冰箱中(温度低于 $5 \text{ }^\circ\text{C}$)保存。除 Tris 为生化试剂外,其余试剂均为分析纯试剂,实验用水为高纯水(电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)。

1.2 实验方法

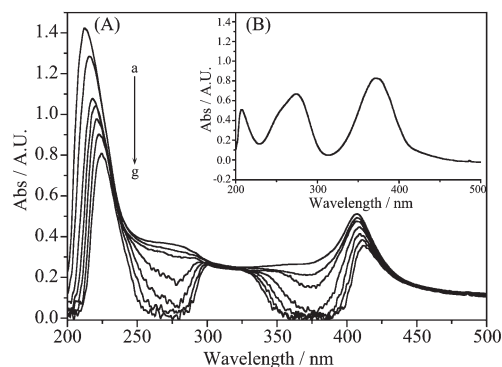
将 $3.0 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 牛血红蛋白溶液移取到 12 个 10 mL 的容量瓶中,用微量进样器依次向容量瓶中加入 0、20、40、60、80、100、120、140、160、180、200、220 μL 的 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cr(VI)溶液($K_2Cr_2O_7$ 浓度为 $0.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),并同时放入恒温水槽中恒温 20 min。以 280 nm 为激发波长,激发单色器和发射单色器的狭缝宽度均为 10.0 nm ,扫描速度 $1000 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$,在 LS-50B 型荧光分光光度计上记录 295~500 nm 波长范围内的发射光谱;固定 $\Delta\lambda=15 \text{ nm}$ 或 $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$,记录 Cr(VI)与 BHb 作用的同步荧光光谱。在室温,200~500 nm 范围内,以相应的 Cr(VI)溶液作

为参比,用 Spectral S-600 紫外-可见光谱仪记录 BHb 溶液和 Cr(VI)-BHb 混合溶液的紫外吸收光谱。CD 光谱测试使用 1 mm 石英池,在 200~250 nm 波长范围,对比测试 BHb 溶液及相同条件下 BHb 与 Cr(VI)作用的远紫外区 CD 光谱。

2 结果与讨论

2.1 UV-Vis 光谱

图 1 为 Cr(VI)与 BHb 的紫外示差吸收光谱。当溶液中不含 Cr(VI)时,在 200~500 nm 吸收范围内可观察到 212、270 和 407 nm 处的 3 个吸收峰,它们分别是血红蛋白肽链中氨基酸残基的吸收峰、色氨酸和酪氨酸残基的芳香杂环的吸收峰和血红素的特征峰^[8]。随着溶液中 Cr(VI)与血红蛋白物质的量比的增加,BHb 的紫外吸收光谱发生明显的减色效应,212 nm 和 407 nm 峰的吸光度降低,峰位发生了红移,表明 BHb 的构象发生了变化。血红蛋白的 212 nm 附近的峰主要是由血红蛋白特征键肽键 $C=O$ 的 $n-\pi^*$ 跃迁引起的,与蛋白分子的 α -螺旋有关,其吸光度降低,峰位的红移,表明可能是 Cr(VI)与氨基酸中含氧或含氮基团发生配位,引起生色基被翻转到极性较小的区域^[9]。407 nm 处的吸收峰就是血红素的 Soret 谱带特征峰,这是血红蛋白中血红素辅基与氨基酸残基间的 $\pi-\pi^*$ 跃迁带^[10]。BHb 分子中血红素基团被包埋在蛋白链形成的疏水空腔中,避免了极性分子或氧化剂进入,从而保护在 BHb 分子中 Fe(II)血红素的稳定。它的吸收峰吸光度的降低和峰位的红移,表明 Cr(VI)使部分血红素辅基脱离疏



$c_{\text{BHb}}=3.0 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{Cr(VI)}} / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$: a, 0.75; b, 1.50; c, 2.25; d, 3.0; e, 3.75; f, 4.50; g, 6.0

图 1 Cr(VI)与血红蛋白混合溶液的紫外示差吸收光谱(A)和 Cr(VI)溶液的紫外吸收光谱(B)

Fig.1 Differential absorption spectra of BHb, Cr(VI)-BHb mixture (A) and the absorption spectra of Cr(VI) (B)

水空腔^[11],血红素中的亚铁离子被氧化,形成高铁血红蛋白^[7,11],Cr(VI)的氧化毒性得到体现。

2.2 Cr(VI)对 BHb 的荧光猝灭机理

BHb 在 280 nm 光激发下,其发射光谱(见图 2)在 295~500 nm 范围内有 2 个发射峰,336 nm 为 BHb 中色氨酸和酪氨酸残基的荧光发射峰,437 nm 的荧光发射峰反映了卟啉和结合蛋白质分子的某些独特的相互作用^[12]。血红蛋白分子中 α 链和 β 链含有的色氨酸(Trp)残基分别为 α -14Trp、 β -15Trp、 β -37Trp。位于疏水腔内的 β -37Trp 是血红蛋白内源荧光的主要来源。图 2 为固定 BHb 浓度下体系的荧光发射光谱随 Cr(VI)浓度的变化谱图。可以看出,随着 Cr(VI)浓度的增加,336 nm 处的荧光峰强度有规律地降低,峰位发生明显的蓝移,说明两者之间存在着相互作用,表明色氨酸残基所处微环境的疏水性增加,血红蛋白空间构象发生改变^[13]。

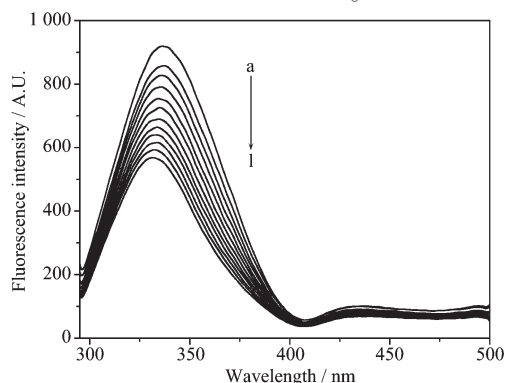


Fig.2 Effect of Cr(VI) on the fluorescence spectra of BHb
T=288 K, pH=7.40; λ_{ex} =280 nm; c_{BHb} =3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ in all cases; $c_{Cr(VI)}$ / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) from a to i: 0, 3.0, 6.0, 9.0, 12.0, 15.0, 18.0, 21.0, 24.0, 27.0, 30.0, 33.0

图 2 Cr(VI)对BHb 的荧光光谱的影响

Fig.2 Effect of Cr(VI) on the fluorescence spectra of BHb

表 1 Cr(VI)与 BHb 结合的 Stern-Volmer 常数和相应的直线关系

Table 1 Stern-Volmer quenching constant of the system of Cr(VI)-BHb at different temperatures

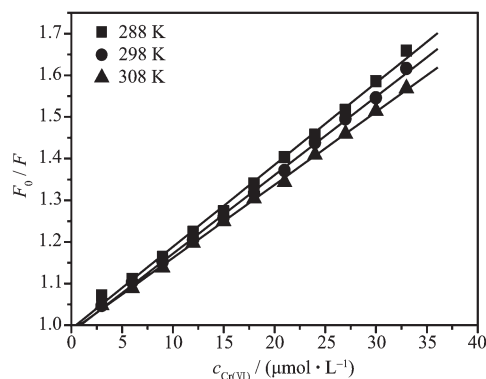
T / K	Linear regression equation	R	K_{sv} / ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$)	K_q / ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
288	$F_0/F=0.991+1.969\times10^4c_Q$	0.998 6	1.969×10^4	1.969×10^{12}
298	$F_0/F=0.983+1.886\times10^4c_Q$	0.999 4	1.886×10^4	1.886×10^{12}
308	$F_0/F=0.986+1.754\times10^4c_Q$	0.999 6	1.754×10^4	1.754×10^{12}

从表 1 可以看出, K_q 的数值在 10^{12} 数量级,远大于动态猝灭的 K_q 值 $2.0\times10^{10} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$,随着温度的升高 K_{sv} 有所降低,从这种意义上考虑,Cr(VI)对 BHb 的荧光猝灭作用不是由扩散和碰撞引起的动态猝灭,而是 Cr(VI)与 BHb 形成了基态复合物,对 BHb 内源性荧光的猝灭过程应为静态猝灭。这与 Cr(VI)与 BHb 的紫外示差吸收光谱表明的结果相吻合。

荧光猝灭过程通常可以分为动态猝灭和静态猝灭。动态猝灭是猝灭剂和荧光物质的激发态分子之间的相互作用引起的,其过程遵循 Stern-Volmer 方程^[14]:

$$F_0/F=1+K_{sv}c_Q=1+K_q\tau_0c_Q \quad (1)$$

式中 F_0 和 F 分别表示不加入和加入猝灭剂时体系的相对荧光强度; K_{sv} 为动态猝灭常数 (即 Stern-Volmer 猝灭常数), c_Q 为猝灭剂的浓度; K_q 为荧光猝灭速率常数, 各类猝灭剂对生物大分子的最大 K_q 值一般为 $2.0\times10^{10} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$; τ_0 为不存在猝灭剂时荧光物质的平均寿命,生物大分子的荧光平均寿命一般约为 10^{-8} s ^[14]。根据图 2,假设 Cr(VI)对 BHb 的荧光猝灭过程为动态猝灭,则由式(1)作出荧光发射峰在 336 nm 处 BHb 荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线,如图 3 所示: 由图中直线的斜率及截矩可求出 K_{sv} 和 K_q , 计算结果见表 1。



λ_{ex} =280 nm; λ_{em} =336 nm; pH=7.40; c_{BHb} =3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

图 3 不同温度下 Cr(VI)和 BHb 的 Stern-Volmer 图

Fig.3 Stern-Volmer plots of Cr(VI) and BHb at different temperatures

2.3 Cr(VI)与 BHb 结合位点数及表观结合常数

Cr(VI)对 BHb 的猝灭机理为静态猝灭,二者的结合符合荧光物质-猝灭剂间的结合表达式^[6,15]。设生物大分子含有 n 个相同且独立的结合位置,则有:

$$\lg[(F_0-F)/F]=\lg K_{sv}+n\lg c_Q \quad (2)$$

由式(2)作 $\lg[(F_0-F)/F]\sim\lg c_Q$ 图,由图中直线的斜率及截矩计算 Cr(VI)与 BHb 表观结合常数 K_A 及结

合位点数 n (表 2)。表 2 数据表明, Cr(VI)与 BHb 分子之间具有较强的相互作用,且大约一个 Cr(VI)分子与一个蛋白质分子结合形成复合物,而表观结合常数

随反应温度的升高而减少,生成复合物的稳定性降低,进一步说明推断该反应过程为静态猝灭机理的合理性。

表 2 Cr(VI)与 BHb 结合位点数及表观结合常数

Table 2 Binding constants K_A and binding sites n at different temperatures

T / K	Linear regression equation	R	$K_A / (L \cdot mol^{-1})$	n
288	$\lg[(F_0-F)/F]=4.829+1.127 \times \lg c_0$	0.999 1	6.745×10^4	1.127
298	$\lg[(F_0-F)/F]=4.545+1.062 \times \lg c_0$	0.999 7	3.508×10^4	1.062
308	$\lg[(F_0-F)/F]=4.475+1.054 \times \lg c_0$	0.999 3	2.985×10^4	1.054

2.4 Cr(VI)与 BHb 的结合热力学参数和结合力类型

小分子物质与蛋白质等生物大分子之间的结合力主要有疏水作用力、氢键、Van der Waals 力和静电作用力等^[10]。在温度变化范围不大时,可以近似的认为反应的 $\Delta H^\ominus$ 为一常数,可由 Vant-Hoff 方程求得结合反应的标准吉布斯自由能变 $\Delta G^\ominus$ 、焓变 $\Delta H^\ominus$ 、熵变 $\Delta S^\ominus$ ^[14]。

$$\ln K^\ominus = -\Delta H^\ominus / (RT) + \Delta S^\ominus / R \quad (3)$$

$$\Delta G^\ominus = \Delta H^\ominus - T\Delta S^\ominus \quad (4)$$

式(3)中 $K^\ominus$ 为表观结合常数, R 为摩尔气体常数,以不同温度下 $\ln K^\ominus$ 对 $1/T$ 作图,得直线 $y = -1.590 + 3.638 \times 10^3 x$,根据直线的斜率及截矩可求出 $\Delta H^\ominus$ 和 $\Delta S^\ominus$,根据公式(4)计算出不同温度的 $\Delta G^\ominus$,相应数据见表 3。从热力学角度来看:反应的 $\Delta G^\ominus < 0$,说明 Cr(VI)与 BHb 的结合反应能够自发进行,而由 $\Delta H^\ominus < 0, \Delta S^\ominus < 0$ 等实验事实表明 Cr(VI)与 BHb 之间的作用力主要为氢键或 Van der Waals 力^[17]。

表 3 Cr(VI)与 BHb 相互作用的热力学函数

Table 3 Thermodynamic parameters of Cr(VI)-BHb interaction at pH 7.4 (tris buffer)

T / K	$\Delta H^\ominus / (kJ \cdot mol^{-1})$	$\Delta S^\ominus / (J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1})$	$\Delta G^\ominus / (kJ \cdot mol^{-1})$
288	-30.246	-13.219	-26.624
298	-30.246	-13.219	-25.929
308	-30.246	-13.219	-26.385

2.5 Cr(VI)和 BHb 作用距离计算

根据 Förster 能量转移理论^[18],能量转移效率 E 与供体-受体间距离 r 以及临界能量转移距离 R_0 之间的关系为:

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (5)$$

式中 R_0 为 $E=50\%$ 时临界距离,

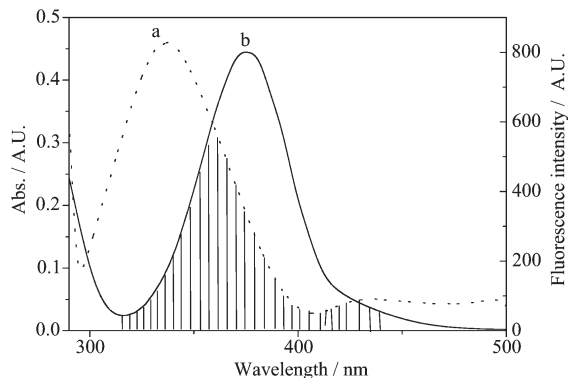
$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-25} K^2 N^4 \phi J \quad (6)$$

式中 K^2 为偶极空间取向因子, N 为介质的折射系数, ϕ 为供体(BHb)的荧光量子产率, J 为供体(BHb)荧光光谱与受体(Cr(VI))吸收光谱的重叠积分

$$J = \frac{\int_0^\infty F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F(\lambda) d\lambda} \quad (7)$$

式中 $F(\lambda)$ 为荧光供体(BHb)在波长 λ 处的荧光强度, $\varepsilon(\lambda)$ 为受体(Cr(VI))在波长 λ 处的摩尔吸光系数。

图 4 为 BHb 荧光发射光谱与 Cr(VI)吸收光谱的重叠图,由(7)式计算的重叠积分 $J=1.42 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$;取向因子取供体-受体各项随机分布的平均值,即 $K^2=2/3$;根据文献^[19]取 BHb 中色氨酸残基的荧光量子产率 ϕ 为 0.062, N 折射指数取水和有机物平均值 N 为 1.336;将上述数值和 298 K $3.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BHb 的 F_0 以及 BHb 与 Cr(VI)浓度都为 $3.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合溶液 F 值代入式(5),(6)求得 $E=0.045$; $R_0=1.59 \text{ nm}$, $r=2.65 \text{ nm}$,同时从计算的结果看出, Cr(VI)与 BHb 分子中色氨酸残基的距离 $r < 7 \text{ nm}$,表明 BHb 与 Cr(VI)之间存在能量转移的可能性较大。



$c_{\text{BHb}}=3.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{\text{Cr(VI)}}=0.20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH=7.40

图 4 BHb 的荧光光谱(a)与 Cr(VI)的吸收光谱(b)

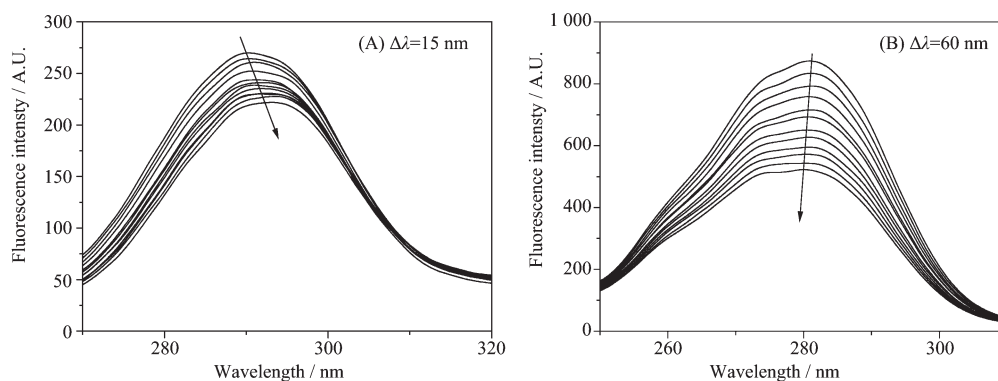
Fig.4 Fluorescence emission spectrum of BHb (a) and the absorption spectrum of Cr(VI) (b)

2.6 Cr(VI)对BHb构象的影响

同步荧光具有灵敏度高和选择性好等优点,通过选择合适的波长差可在普通荧光光谱上相互重叠的荧光峰分开。对于蛋白质的同步荧光光谱, $\Delta\lambda=15\text{ nm}$ 时仅表现为酪氨酸残基的荧光, $\Delta\lambda=60\text{ nm}$ 时则显示色氨酸残基的荧光^[20]。若最大发射波长红移,表明残基所处环境的极性增加,蓝移则疏水性增加。

固定BHb浓度,逐渐增大Cr(VI)的浓度,绘制BHb的同步荧光光谱(图5A、B)。从图5中可以看出,随着Cr(VI)浓度增大,酪氨酸残基荧光被猝灭,荧

光光谱峰位置发生红移,表明Cr(VI)使酪氨酸残基所处微环境的极性增加,疏水性减小;色氨酸残基的荧光峰位发生蓝移,表明色氨酸残基所处微环境的疏水性增加^[13]。在血红蛋白 $\alpha 1\beta 2$ 亚基界面的 α -42 Tyr, α -140Tyr, β -37Trp和 β -145Tyr等芳香氨基酸残基对维系血红蛋白结构与功能是不可缺少的^[10]。随着Cr(VI)加入量的增加,色氨酸残基的荧光峰的强度下降的程度要比酪氨酸残基的荧光峰大,这反映了Cr(VI)与色氨酸残基的作用比与酪氨酸残基强,Cr(VI)更接近与色氨酸残基,可能主要猝灭 β -37Trp和 α -42Tyr, α -140Tyr, β -145Tyr的荧光。



pH=7.40; $T=288\text{ K}$; $c_{\text{BHb}}: 3.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ in all cases; $c_{\text{Cr(VI)}}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$ (from up to down): 0, 3.0, 6.0, 9.0, 12.0, 15.0, 18.0, 21.0, 24.0, 27.0, 30.0, 33.0

图5 BHb的同步荧光光谱

Fig.5 Synchronous fluorescence spectrum of BHb

为研究Cr(VI)与BHb作用过程中BHb二级构象的变化,对比测试了BHb及Cr(VI)-BHb体系的圆二色谱。如图6所示,BHb在210和225 nm表现出2个负的吸收峰,为BHb α -螺旋结构的CD光谱特征^[10]。BHb与Cr(VI)作用后,CD光谱的负峰峰高振幅减弱,说明Cr(VI)与BHb结合引起其微构象的变化,

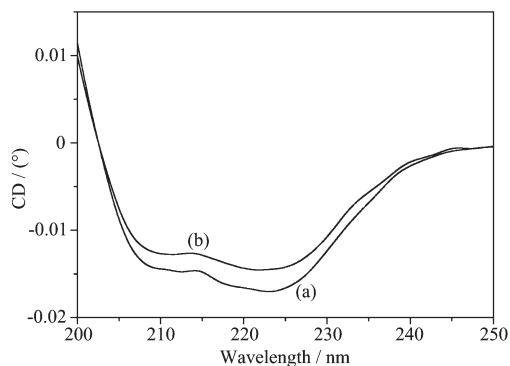
使BHb肽链部分伸展,改变了BHb的二级结构。根据文献^[21]的计算方法,在 $3.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BHb中加入 $9.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Cr(VI)会使 α -螺旋的百分数从46.05%减少到42.10%。这与Cr(VI)与BHb的紫外示差吸收光谱中212nm附近吸收峰的减弱相吻合。

3 结论

本文运用荧光光谱、紫外光谱、CD光谱法研究了 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 与BHb的相互作用。发现铬(VI)酸根离子可能使部分血红素辅基从BHb的空腔中脱离出来,铬(VI)酸根离子与BHb形成基态复合物导致BHb内源荧光猝灭,铬(VI)酸根离子与BHb之间以氢键和范德华力相互作用为主,并引起BHb构象的改变,扰动了芳香氨基酸残基所处的微环境。这些实验结果有助于了解Cr(VI)在体内的贮运过程及其氧化毒性作用机制。

参考文献:

[1] Pritchard D E, Ceryak S, Ha L, et al. *Cell Growth Differ.*,



$c_{\text{BHb}}=3.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; Cr(VI) concentrations for Cr(VI)-BHb system (from a to b) were 0 and $9\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

图6 BHb的圆二色谱

Fig.6 Far-UV CD spectra of BHb in absence and presence of Cr(VI)

- 2001,12**:486~496
- [2] O'Brien T J, Witcher P L, Brooks B, et al. *Mutation Research*, **2009,663**:77~83
- [3] YANG Pei-Hui(杨培慧), ZHANG Wen-Hao(张文豪), ZHAO Qiu-Xiang(赵秋香), et al. *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2006,22**(3):488~495
- [4] Travis J O, Susan C. *Mutation Research*, **2003,533**:33~36
- [5] Ananth K M, Rajara R, Ramasami T. *Biochem. Biophys. Commun.*, **2000,273**:1138~1143
- [6] BIAN He-Dong(边贺东), LI Mei(李梅), YU Qing(于青), et al. *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2006,22**(5):845~851
- [7] Wang Y Q, Zhang H M, Chang G C, et al. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2007,41**:243~250
- [8] White A, Handler P, Smith E L. *Principle of Biochemistry*. Beijing: Science Press, **1978**.110
- [9] ZHANG Hai-Rong(张海蓉), BIAN He-Dong(边贺东), NI Shou-Hai(倪寿海), et al. *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2009,25**(2):306~311
- [10] SHEN Xing-Can(沈星灿), LIU Xin-Yan(刘新艳), LIANG Hong(梁宏), et al. *Acta Chim. Sinica(Huaxue Xuebao)*, **2006,64**(6):469~474
- [11] Jia Y P, Wood F, Menu P, et al. *Biochim. Biophys. Acta*, **2004,1672**:164~167
- [12] CHENG Yi(程驿), LIN Hua-Kuan(林华宽), WANG Kui(王夔). *Chem. J. Chinese Universities(Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao)*, **1998,19**(6):876~878
- [13] Shen X C, Liou X Y, Ye L P, et al. *J. Colloid. Interf. Sci.*, **2007,311**:400~406
- [14] MA Gui-Bin(马贵斌), GAO Fei(高飞), REN Bin-Zhi(任斌知), et al. *Acta Chim. Sinica(Huaxue Xuebao)*, **1995,53**:1193~1197
- [15] XIE Meng-Xia(谢孟峡), JIANG Min(蒋敏), LIU Yuan(刘媛), et al. *Acta Chim. Sinica(Huaxue Xuebao)*, **2004,62**(16):1460~1466
- [16] WANG Yan-Qing(王彦卿), ZHANG Hong-Mei(张红梅), ZHANG Gen-Cheng(张根成). *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2006,22**(5):895~899
- [17] CHEN Ke-Hai(陈克海), WANG Yu-Lian(王玉莲), GUO Ming(郭明), et al. *Spectrosc. Spect. Anal. (Guangpu Xuebao Yu Guangpu Fenxi)*, **2008,28**(6):1375~1378
- [18] CHEN Xiao-Bo(陈晓波), KANG Dong-Gao(康栋国), LI Song(李崧), et al. *Spectrosc. Spect. Anal. (Guangpu Xuebao Yu Guangpu Fenxi)*, **2006,26**(4):674~682
- [19] Haouz A, Mohsni S E, Zentz C, et al. *Eur. J. Biochem.*, **1999,264**:250~259
- [20] SHANG Zhi-Cai(商志才), YI Ping-Gui(易平贵), YU Qing-Sen(俞庆森), et al. *Acta Phys.-Chim. Sin. (Wuli Huaxue Xuebao)*, **2001,17**(10):873~878
- [21] Zhang X F, Xie L, Liu Y, et al. *J. Mol. Struct.*, **2008,888**:145~151