[Review]

www.chem.pku.edu.cn/whxb

光谱法研究蛋白质与表面活性剂的相互作用

吴 丹 徐桂英*

(山东大学胶体与界面化学教育部重点实验室, 济南 250100)

摘要 结合本课题组的工作, 较系统地总结了近年来有关紫外吸收光谱、荧光光谱、圆二色光谱和电子自旋共振光谱技术在蛋白质-表面活性剂混合体系研究中的应用. 大量研究表明, 借助于光谱技术不仅可以研究蛋白质结构与功能的关系, 而且可以探讨蛋白质与表面活性剂的作用机理.

关键词: 蛋白质, 表面活性剂, 紫外吸收光谱, 荧光光谱, 圆二色光谱, 电子自旋共振光谱, 相互作用
中图分类号: O648, O647

Study on Protein-Surfactant Interaction by Spectroscopic Methods

WU, Dan XU, Gui-Ying*

(Key Laboratory of Colloid & Interface Chemistry, Ministry of Education, Shandong University, Jinan 250100, P. R. China)

Abstract Our results and the applications of spectroscopic methods in studying protein-surfactant system are systematically summarized. Those methods include UV absorption spectroscopy, fluorescence spectroscopy, circular dichroism and electron spin resonance. Many studies indicate that spectroscopic methods can be used to not only study the relationship between structure and function of protein but also probe the interaction mechanism of protein and surfactant.

Keywords: Protein, Surfactant, UV absorption spectroscopy, Fluorescence spectroscopy, Circular dichroism, Electron spin resonance, Interaction

蛋白质-表面活性剂混合体系在药物、化妆品、生物及食品等领域中具有广泛而重要的应用. 例如, 人发和羊毛就是经常暴露于表面活性剂中的两种蛋白质底物; 一些食品配方中常常同时含有蛋白质和表面活性剂. 因此蛋白质和表面活性剂相互作用的研究是多年来人们一直十分感兴趣的课题^[1-7]. 蛋白质和表面活性剂的相互作用与聚合物和表面活性剂的相互作用有许多相似之处. 但从分子结构考虑, 蛋白质是一类具有特殊结构的两性聚电解质, 存在等电点, 随着溶液 pH 的不同, 分子的荷电性质发生很大变化. 尤其是蛋白质具有二级和三级结构, 明显不同于其它类型的聚电解质, 因此, 蛋白质与表面活性剂的相互作用具有许多独特之处, 而且更

为复杂.

研究表面活性剂与蛋白质相互作用的方法很多^[8-23], 最早使用的有表面张力、电导、离子选择性电极和粘度法等. 目前研究最多、应用最广的有光散射、光谱法以及新发展起来的小角 X-射线散射、小角中子散射、Brewster 角显微镜等方法. 我们曾在蛋白质和小分子物质的相互作用方面开展了一些工作^[24-30], 采用表面张力和光谱法等手段研究过蛋白质与表面活性剂的相互作用, 并探讨了混合体系的铺展行为和泡沫性能等. 本文结合课题组的工作, 着重阐述了光谱法中的紫外吸收光谱、荧光光谱及近年来兴起的圆二色光谱、电子自旋共振光谱在蛋白质-表面活性剂相互作用研究中的应用.

Received: July 8, 2005; Revised: August 22, 2005. *Correspondent, E-mail: xuguiling@sdu.edu.cn; Tel: 0531-88365436.

国家“十·五”科技攻关项目(2004BA313B20)和山东省自然科学基金(Y2004B06)资助

© Editorial office of Acta Physico-Chimica Sinica

1 紫外吸收光谱

蛋白质之所以能产生紫外吸收光谱,其主要原因是色氨酸(Trp)和酪氨酸(Tyr)残基的侧链基团对光的吸收,其次是苯丙氨酸(Phe)、组氨酸(His)、半胱氨酸(Cys)残基的侧链基团对光的吸收,此外还有肽键对光的强烈吸收.其中,Trp、Tyr、Phe 3 个残基,由于其生色基团的不同而有不同的紫外吸收光谱. Trp 和 Tyr 在 280 nm 波长附近有一个吸收峰;Phe 在 257 nm 波长附近有一个吸收峰;肽键在 225 nm 波长附近给出一个特征吸收峰.当向蛋白质溶液中加入表面活性剂后,往往导致蛋白质生色基团紫外吸收光谱的变化^[31-32],据此便可了解氨基酸残基微环境的变化,从而推断蛋白质分子在溶液中的构象变化.

Pombo 等^[33]通过紫外吸收光谱研究了 25 °C、pH=10.0 时阳离子表面活性剂 *n*-烷基(C₁₀~C₁₆)三甲基溴化铵诱导牛胰岛素构象的变化.以 275 nm 处的吸光度与表面活性剂浓度绘图求得了 *n*-烷基三甲基溴化铵-牛胰岛素复合物在水中的 Gibbs 自由能变化(ΔG_w^0)和疏水环境中 Gibbs 自由能变化(ΔG_{hc}^0).研究表明, ΔG_w^0 值为 $-(11.8 \pm 1.8) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$,该值与烷基链的长度无关并且与 *n*-烷基(C₁₀~C₁₆)硫酸盐-牛胰岛素复合物的 ΔG_w^0 数值^[34]接近.由此推断,两类表面活性剂诱导牛胰岛素构象变化的机理类似;当链长从 C₁₀ 增加到 C₁₆ 时, ΔG_{hc}^0 从 $-88 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 降低到 $-100 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.而从 ΔG_{hc}^0 对 *n*-烷基三甲基溴化铵的烷基链长和 *n*-烷基硫酸盐的烷基链长作图所得的两条曲线基本重合可知, ΔG_{hc}^0 与表面活性剂头基的性质无关.通过 ΔG_{hc}^0 的变化趋势可以断定牛胰岛素分子上所带的正、负电荷密度基本相同(牛胰岛素分子含有 6 个阳离子氨基酸残基和 6 个阴离子氨基酸残基).

2 荧光光谱

荧光光谱技术在表面活性剂与蛋白质相互作用研究中的应用已经有大量报道^[35-42].通过荧光光谱不仅可以测量胶束的聚集数,体系的微极性和微粘度,还可以研究表面活性剂与蛋白质的结合常数等.常见的方法有内源荧光、外源荧光和非辐射能量转移等.

2.1 内源荧光

蛋白质分子中的 Trp、Tyr 和 Phe 残基能够吸收 270~300 nm 的紫外光而发出紫外荧光. Trp、Tyr 和 Phe 由于其侧链生色基团不同而产生不同的荧光光谱,其荧光峰(λ_{max})分别位于 348、303 和 282 nm,其

中,Trp 的荧光强度最大,Phe 的荧光强度最小.因此蛋白质的内源荧光主要是由 Trp 和 Tyr 残基所发射.当蛋白质溶液中加入表面活性剂时,表面活性剂与蛋白质之间的相互作用会导致蛋白质荧光的猝灭,利用此猝灭现象可以确定蛋白质的荧光猝灭机理以及它们的结合常数等.

荧光猝灭作用可分为动态猝灭和静态猝灭作用,可分别用动态猝灭常数 K_{SV} (即 Stern-Volmer 猝灭常数)和静态猝灭结合常数 K_{LB} 来描述荧光物质分子与猝灭剂分子之间相互作用的程度和猝灭作用的性质. Lissi 等^[43]通过内源荧光的测定研究了牛血清白蛋白(BSA)和烷基吡啶盐的相互作用,得到了烷基吡啶盐碳链长度对 BSA 内源荧光猝灭的影响规律.八烷基吡啶盐对 BSA 的荧光猝灭严格遵循动态猝灭方程 $F_0/F=1+K_q\tau_0c_Q=1+K_{SV}c_Q$ (其中 F_0 为未加猝灭剂时荧光分子的荧光强度, F 为猝灭剂浓度为 c_Q 时荧光物质的荧光强度, K_q 为双分子猝灭过程的速率常数, τ_0 为不含猝灭剂时荧光分子的平均寿命, K_{SV} 是 Stern-Volmer 猝灭常数,即双分子猝灭速率常数与单分子衰变速率常数的比率),在水溶液中和 $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素存在时其动态猝灭常数 K_{SV} 分别为 310 和 $280 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$.十二烷基吡啶盐和十六烷基吡啶盐是 BSA 的有效猝灭剂,其动态猝灭曲线向上弯曲,说明体系同时存在动态和静态猝灭.由烷基吡啶盐在 BSA 上的结合常数变化推断,它们之间的相互作用主要是疏水力所致,静电相互作用是次要的.

我们^[44]通过 BSA 内源荧光测定研究了其与非离子表面活性剂吐温-20(Tween-20)之间的相互作用.发现 BSA 的荧光强度随 Tween-20 浓度的增大而降低,而且最大发射峰波长发生蓝移,表明 Tween-20 与 BSA 之间发生了相互作用.结合文献^[45]求算了在不同的 I_0/I 值(I_0 为 BSA 的荧光强度, I 为含有不同浓度 Tween-20 时 BSA 的荧光强度)时, Tween-20 与 BSA 的拟结合常数(pseudo-binding constant)以及与 1 mol BSA 结合的 Tween-20 分子的平均数目(n).

2.2 外源荧光

对于蛋白质的研究不仅可以利用其内源荧光,而且可以通过外源荧光性质研究获得更多关于蛋白质分子的信息.对蛋白质-表面活性剂体系而言,最常用的荧光探针有芘(Py)、1-苯胺基萘-8-磺酸(ANS)、2-对-甲苯胺基萘-6-磺酸(TNS)、1-(*N*-二甲基胺)-萘-5-磺酸(DNS)等,这些荧光探针在水溶液中的量子产

图1 含与不含 BSA 时 TNS 的荧光强度随 SDS 浓度的变化^[47]

Fig.1 Fluorescence intensity of TNS in the presence and absence of BSA as a function of SDS concentration^[47]

BSA: bovine serum albumin; SDS: sodium dodecyl sulphate; TNS: 2-*p*-toluidinylnaphthalenesulfonate

率很低,但在非极性溶剂中,其量子产率明显增大,且荧光峰蓝移。

2.2.1 稳态荧光

在蛋白质-表面活性剂混合体系的稳态荧光测量中,以 Py 为探针可获得以下信息^[46]: (1) 以 Py 的第三峰(384 nm)与第一峰(373 nm)荧光强度之比(I_3/I_1)对表面活性剂浓度作图,可求得蛋白质与表面活性剂相互作用的临界聚集浓度(cac);同时得到 Py 分子所处微环境的极性强弱(I_3/I_1 越小,微环境的极性越强); (2) 以 Py 为探针,苯甲酮为猝灭剂,可求得表面活性剂在混合体系中的聚集数; (3) 通过 Py 的激基缔合物与单体荧光强度之比(I_2/I_m)可推断出蛋白质-表面活性剂聚集体的微粘度及表面活性剂聚集尺寸的变化。

Turro 等^[47]利用荧光光谱详细研究了十二烷基硫酸钠(SDS)/BSA 体系。采用的荧光探针是 Py 和 TNS。与 Py 不同的是, TNS 是带有一个阴离子磺酸基的亲水性探针,它可与 SDS 分子的亲水基团 $-\text{OSO}_3^-$ 发生竞争作用而结合到蛋白质的阳离子部位。TNS 在水溶液中的荧光强度很低,在 SDS 胶束溶液中其荧光强度仍然很弱,这表明 TNS 没有在 SDS 胶束中浓集(如图 1 所示)。当 TNS 加入到含有 1%(w)BSA 的 SDS 溶液中,探针的荧光强度显著增加,同时也发现 Py 的 I_3/I_1 也有类似的变化趋势(图 2)。由图 1 可看出,当 SDS 浓度较低时, TNS 荧光强度增加得比较快,表明探针周围疏水性增强,这归因于 SDS

图2 含与不含 BSA 时花的 I_3/I_1 值随 SDS 浓度的变化^[47]

Fig.2 I_3/I_1 ratio of pyrene in the presence and absence of BSA as a function of SDS concentration^[47]

和 TNS 在 BSA 疏水微区附近协同与 BSA 相结合。随着 SDS 浓度的增加,探针周围的疏水性降低,表明 SDS 与 BSA 的结合占据了部分 TNS 与 BSA 结合的部位,导致部分 TNS 分子被释放到极性较强的环境中。当 SDS 的浓度大于 $2.7 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, TNS 荧光强度又突然增强,说明 SDS 与 BSA 结合导致蛋白质链伸展,所以蛋白质的疏水微区数目显著增加。继续增加 SDS 浓度至 $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,部分与蛋白质结合的 TNS 被 SDS 所取代,致使 TNS 又进入水相中,所以其荧光强度又趋于降低。

2.2.2 时间分辨荧光

时间分辨荧光光谱是依据待测组分荧光衰减特性的差异而进行选择测定,不仅可消除瑞利和拉曼散射的干扰,还可以根据荧光寿命的差异对荧光光谱重叠组分进行测定,为复杂体系的荧光测量提供了选择性基础。该方法的出现为蛋白质-表面活性剂混合体系的研究开辟了新的途径^[47-49]。

Vasilescu 等^[50]以 Py 为探针,苯甲酮为猝灭剂,采用稳态和时间分辨荧光光谱研究了非离子表面活性剂八聚乙二醇十二烷基醚(octaxyethylene glycol *n*-dodecyl ether, C_{12}E_8)与 BSA 混合体系的聚集行为。结果表明,采用稳态和时间分辨荧光光谱测得的聚集数基本接近。当 C_{12}E_8 的浓度为 $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,不含 BSA 时, C_{12}E_8 胶束的聚集数为 77;若含有 1%(w)BSA,其聚集数降为 35。但当 C_{12}E_8 浓度高达 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,含与不含 1% BSA 时 C_{12}E_8 胶束的聚集数差别较小。

2.3 共振光散射光谱

共振光散射又叫共振瑞利散射(resonance light scattering, RLS), 它是指在普通的荧光分光光度计上选择合适的激发和发射通带宽度, 采用相等的激发和发射波长同时扫描激发和发射单色器所得的同步荧光光谱(即 $\Delta\lambda=0$). 应用该技术已成功地建立了高灵敏度的测定蛋白质的分析方法, 为研究表面活性剂和蛋白质等生物大分子的相互作用提供了一个重要的方法^[51-53]. Yang 等^[54]采用共振光散射研究了 SDS 和十二烷基苯磺酸钠(SDBS)与 BSA 的相互作用, 据此建立了测定痕量蛋白质的方法. 实验表明, 在相同条件下, SDBS-BSA 混合体系的 RLS 强度要远比 SDS-BSA 混合体系的大; 并且 RLS 强度与 BSA 的浓度成正比. 在 SDBS-BSA 混合体系中, BSA 的线性范围为 $7.5 \times 10^{-9} \sim 1.5 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 检测限为 $1.8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. 并用所拟方法测定了合成样品中 BSA 的含量, 相对标准偏差小于 3.6%.

2.4 荧光共振能量转移

1948 年, Forster 提出了荧光共振能量转移理论, 它是能量给体分子(donor)和受体分子(acceptor)偶极-偶极相互作用的结果. 根据 Forster 能量转移理论^[55], 当 2 种化合物发生荧光共振能量转移时必须满足 3 个条件:(1) 能量给体分子发荧光;(2) 能量给体分子的荧光发射光谱与能量受体分子的吸收光谱有足够重叠;(3) 能量给体分子与能量受体分子足够接近, 最大距离不超过 7 nm. 能量转移效率(E)与给体和受体间作用距离(R)之间的关系可用下式表示:

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + R^6)$$

其中, R_0 是能量转移效率为 50% 时的给体-受体之间的距离.

De 等^[49]根据能量转移理论研究了 SDS、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)和非离子表面活性剂 Triton X-100 对 BSA 中 Trp 给体与探针 ANS 受体之间能量转移效率的影响. 研究表明, 表面活性剂存在时 Trp 与 ANS 之间的能量转移效率降低, 作用距离增加. 由于三种表面活性剂都能与 BSA 发生相互作用, 并且均能有效地让给体和受体暴露在溶剂中, 因此增加了给体和受体间的作用距离, 降低了能量转移的可能性. 在这三种蛋白质/表面活性剂混合体系中, 能量转移的速率常数的数量级均为 10^8 s^{-1} , 其顺序依次为 BSA/Triton X-100 > BSA/CTAB > BSA/SDS.

3 圆二色光谱法

蛋白质在溶液中存在多种二级结构, 如 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角以及无规卷曲等. 加入表面活性剂后, 由于表面活性剂与蛋白质的相互作用, 往往会使蛋白质的结构发生一些变化, 如折叠以及去折叠等. 通常圆二色(circular dichroism, CD)光谱法可用于研究表面活性剂诱导蛋白质二级结构的变化.

蛋白质的 CD 光谱一般分为两个波长范围, 即 178~250 nm 为远紫外区 CD 光谱, 250~320 nm 为近紫外区 CD 光谱. 远紫外区是肽键的吸收峰范围, 反映了主链构象. 在远紫外区, 一般天然蛋白质的 CD 光谱包含一个正峰(在 190 nm 波长左右)和一个负槽(在 205~235 nm 波长范围), 其中, 负槽的形状与主链构象密切相关. 如图 3 所示^[56], α -螺旋给出 209 和 222 nm 左右的两个负槽, 称为双槽曲线; β -折叠给出 215 nm 左右的负槽. 近紫外区主要与侧链生色团有关, 近紫外 CD 光谱可灵敏地反映出芳香氨基酸残基以及二硫键的微环境变化.

Ghosh 等^[57]采用远紫外区 CD 光谱研究了胰蛋白酶与 SDS 的相互作用. 图 4 示出了 SDS 对胰蛋白酶 CD 光谱的影响. 可见当胰蛋白酶的浓度较高时, 曲线 G、H 和 I 在 220~222 nm 出现一个负槽, 表明 α -螺旋含量在逐渐增加. 固定胰蛋白酶的浓度, 改变 SDS 的浓度考察混合体系 CD 光谱(图略)的变化时发现, 当 SDS 浓度为 $0.003 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 胰蛋白酶的 α -螺旋含量为 28%, 比无 SDS 时的 α -螺旋含量(60%)低, β -折叠和无规卷曲的含量却比无 SDS 时高. SDS 浓度较高时, α -螺旋含量达到 100% 并且形成了胰蛋白酶-SDS 聚集体. 胰蛋白酶-SDS 聚集体间强烈的静电斥力使得蛋白质分子伸展并且引起蛋白质变性.

正因为 CD 光谱对于蛋白质的二级结构十分敏

图3 多肽的 CD 光谱^[56]

Fig.3 CD spectra of polypeptides^[56]

●) β -sheet, ▽) β -turn, ○) α -helix

图4 SDS-胰蛋白酶混合体系的 CD 光谱^[57]Fig.4 CD spectra of SDS-trypsin mixtures^[57]

A: 0.1 mol·L⁻¹ SDS, B: 0.1 g·L⁻¹ trypsin, C-I: SDS (0.1 mol·L⁻¹)-trypsin (the concentration of trypsin is 0.001, 0.005, 0.01, 0.03, 0.05, 0.08, 0.1 g·L⁻¹, respectively)

感, 所以 CD 光谱技术对于研究溶液中蛋白质的二级结构及结构变化等信息具有极大的理论与实际意义^[58-60]. 随着 CD 光谱技术的进一步发展, 它必将在蛋白质与表面活性剂相互作用的研究领域中发挥重要的作用.

4 电子自旋共振光谱

电子自旋共振(electron spin resonance, ESR), 又叫电子顺磁共振, 它是一种微波吸收光谱技术, 用来研究含有未成对电子的顺磁性物质. 使用自旋探针可把抗磁性物质体系转变成顺磁性体系, 因此自旋探针的使用扩大了 ESR 方法的应用范围. 由于 ESR 方法具有直接检测单电子, 灵敏度高, 检测后样品不受破坏和对化学反应无干扰等优点, 近年来已在生物化学和胶体化学等领域中获得了广泛的应用^[61-64].

最常用的自旋探针是氮氧自由基, 它能以简单的在环境中分溶的方式反映出体系内不同分子的微环境, 因而可从分子水平上了解体系的变化, 而且可由 ESR 光谱求得超精细分裂常数(A_N)和旋转相关时间(τ_c)^[65-66]. A_N 反映了自旋探针分子所处微环境的极性; τ_c 的变化则反映了自旋探针分子所处微环境粘度的变化, τ_c 值越大, 说明微环境粘度越大. τ_c 可从下面的公式求得:

$$\tau_c = 6.5 \times 10^{-10} \times \Delta H_0 \left[\left(\frac{h_0}{h_{-1}} \right)^{1/2} + \left(\frac{h_0}{h_{+1}} \right)^{1/2} - 2 \right]$$

式中 ΔH_0 为中央峰的线宽; h_0 , h_{-1} 和 h_{+1} 分别是中央峰、高场峰和低场峰的峰高.

Turro 等^[47]以 5-氮氧自由基硬脂酸(5-doxyl

图5 5-氮氧自由基硬脂酸在 BSA-SDS 溶液中的 ESR 光谱^[47]

Fig.5 ESR spectra of 5-doxyl stearic acid in BSA solution as a function of SDS concentration^[47]
5-doxyl stearic acid concentration: 1×10^{-4} mol·L⁻¹

stearic acid, 5-DSA)为探针采用 ESR 光谱研究了 BSA 和 SDS 混合体系微环境的性质(图 5). 5-DSA 在水中和 SDS 胶束中的电子自旋光谱都显示出三个峰, 且在 SDS 胶束中的三个峰线型比在水介质中要宽. 对于 BSA-SDS 混合体系而言, 当 SDS 浓度增加到 1.0~2.0 mmol·L⁻¹ 时, 探针分子探测到体系处于粘度较低的一类水环境中(三个峰比较尖), 说明探针分子被 SDS 分子替代进入到极性更强、更易流动的区域中, 这种现象与荧光数据得到的信息是一致的; 当 SDS 浓度为 3.6 mmol·L⁻¹ 时, 被表面活性剂替代的探针又重新增溶到疏水区域; 继续增大 SDS 浓度至 25.0 mmol·L⁻¹ 时, 探针的运动要比在无 BSA 溶液中的运动受到更多的约束.

5 结束语

通过以上的介绍可见, 借助于光谱技术可以研究蛋白质结构与功能的关系以及蛋白质与表面活性剂之间的作用机理等. 紫外吸收光谱、荧光光谱、圆二色光谱和电子自旋共振光谱可提供相同且互为补充的信息. 例如, 利用荧光光谱和电子自旋共振光谱均可研究蛋白质-表面活性剂混合体系的微环境和微粘度, 前者还可以测量胶束的聚集数及尺寸大小. 可以相信, 光谱法必将在蛋白质-表面活性剂混合体系的研究中发挥越来越重要的作用. 但是随着科学研究的不断发展与深入, 单一的光谱技术不能满足蛋白质-表面活性剂混合体系物理化学性能与结构

研究的需求,而应该和其它技术结合起来使用,获得更多的信息,以便更深入地理解它们相互作用的本
质.同时,新的蛋白质-表面活性剂混合体系的光谱
研究方法的不断涌现,必将推动生命科学和胶体科
学的向前迈进.

References

- 1 Lucassen-Reynders, E. H. Physical chemistry of surfactant action (Surfactant science series Vol. 11). New York: Marcel Dekker Inc., 1981: 131
- 2 Goddard, E. D.; Ananthapadmanabhan, K. P. Interaction of surfactants with polymers and protein. New York: CRC Press, 1993: 320
- 3 Kwak, J. C. T. Polymer-surfactant systems. New York: Marcel Dekker Inc., 1998: 267
- 4 Nielsen, A. D.; Borch, K.; Westh, P. *Biochim. Biophys. Acta*, **2000**, **1479**(1-2): 321
- 5 Otzen, D. E. *Biophys. J.*, **2002**, **83**(4): 2219
- 6 Fainerman, V. B.; Zholob, S. A.; Leser, M. E.; Michel, M.; Miller, R. J. *Colloid Interface Sci.*, **2004**, **274**: 496
- 7 Velev, O. D.; Pan, Y. H.; Kaler, E. W.; Lenhoff, A. M. *Cryst. Growth Des.*, **2005**, **5**(1): 351
- 8 Fainerman, V. B.; Zholob, S. A.; Leser, M. E.; Michel, M.; Miller, R. J. *Phys. Chem. B*, **2004**, **108**: 16780
- 9 Gharibi, H.; Javadian, S.; Hashemianzadeh, M. *Colloid Surf. A*, **2004**, **232**: 77
- 10 Dickinson, E. *Colloid Surf. B*, **1999**, **15**: 161
- 11 Miller, R.; Fainerman, V. B.; Leser, M. E.; Michel, M. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **2004**, **9**: 350
- 12 Miller, R.; Fainerman, V. B.; Leser, M. E.; Michel, M. *Colloid Surf. A*, **2004**, **233**: 39
- 13 Giancola, C.; Sena, C. D.; Fessas, D.; Graziano, G.; Barone, G. *Int. J. Biol. Macromol.*, **1997**, **20**(3): 193
- 14 Tribout, M.; Paredes, S.; González-Mañas, J. M.; Goñi, F. M. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **1991**, **22**(2): 129
- 15 Sarmiento, F.; Ruso, J. M.; Prieto, G.; Mosquera, V. *Langmuir*, **1998**, **14**: 5725
- 16 Stenstam, A.; Montalvo, G.; Grillo, I.; Gradzielski, M. *J. Phys. Chem. B*, **2003**, **107**: 12331
- 17 Stenstam, A.; Topgaard, D.; Wennerström, H. *J. Phys. Chem. B*, **2003**, **107**: 7987
- 18 Mackie, A. R.; Gunning, A. P.; Ridout, M. J.; Wilde, P. J.; Patino, J. R. *Biomacromolecules*, **2001**, **2**: 1001
- 19 Gunning, P. A.; Mackie, A. R.; Gunning, A. P.; Woodward, N. C.; Wilde, P. J.; Morris, V. J. *Biomacromolecules*, **2004**, **5**: 984
- 20 Green, R. J.; Su, T. J.; Lu, J. R.; Webster, J. R. P. *J. Phys. Chem. B*, **2001**, **105**: 9331
- 21 Valstar, A.; Almgren, M.; Brown, W. *Langmuir*, **2000**, **16**: 922
- 22 Ruso, J. M.; Deo, N.; Somasundaran, P. *Langmuir*, **2004**, **20**: 8988
- 23 Zhang, H. J.; Bi, Z. C.; Cui, G. C.; Li, J. B. *High Technology Communication*, **2000**, **8**: 22 [张恒建, 毕只初, 崔光晨, 李峻柏. 高技术通讯 (*Gaojishu Tongxun*), **2000**, **8**: 22]
- 24 Liu, J.; Xu, G. Y.; Liu, J.; Yu, L.; Zhang, H. L.; Yu, X. F. *Acta Phys.-Chim. Sin.*, **2005**, **21**(8): 862 [刘 静, 徐桂英, 刘 军, 于 丽, 张洪林, 于秀芳. 物理化学学报 (*Wuli Huaxue Xuebao*), **2005**, **21**(8): 862]
- 25 Liu, J.; Xu, G. Y.; Liu, J.; Xin, X.; Luan, Y. X. *J. Disper. Sci. Technol.*, **2005**, **26**: 1
- 26 Wei, Q.; Wu, D.; Du, B.; Zhang, H.; Ou, Q. Y. *Chinese J. Chem.*, **2004**, **22**(7): 714
- 27 Wei, Q.; Wu, D.; Du, B.; Li, Y.; Duan, C. H. *Spectrochim. Acta Part A*, **2005**, (in press)
- 28 Wei, Q.; Wu, D.; Du, B.; Li, Y.; Wang, J. H. *Anal. Sci.*, (Accepted)
- 29 Wei, Q.; Wu, D.; Du, B.; Ou, Q. Y. *Chinese Chem. Lett.*, **2004**, **15**(6): 667
- 30 Liu, J.; Xu, G. Y.; Yuan, S. L.; Jiang, P. J. *Disper. Sci. Technol.*, **2003**, **24**(6): 779
- 31 Ruso, J. M.; González-Pérez, A.; Prieto, G.; Sarmiento, F. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2003**, **33**: 67
- 32 Tao, W. S.; Li, W.; Jiang, Y. M. The basic of protein molecules (second edition). Beijing: Higher Education Press, 1995: 238 [陶慰孙, 李 帷, 姜涌明. 蛋白质分子基础(第二版). 北京: 高等教育出版社, 1995: 238]
- 33 Pombo, C.; Prieto, G.; del Rio, J. M.; Sarmiento, F.; Jones, M. N. *Int. J. Biol. Macromol.*, **1996**, **18**: 55
- 34 Housaindokht, M. R.; Jones, M. N.; Newall, J. F.; Prieto, G.; Sarmiento, F. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1993**, **89**: 1963
- 35 Ruiz, D. L. R.; Torres, A. L. C.; García, E. A.; García, M. E. D. *Analyst*, **1998**, **123**: 2257
- 36 Zanette, D.; Lima, C. F.; Ruzza, A. A.; Belarmino, A. T. N.; Santos, S. D. F.; Frescura, V. L. A.; Marconi, D. M. O.; Froehner, S. J. *Colloids Surf. A*, **1999**, **147**: 89
- 37 Moriyama, Y.; Ohta, D.; Hachiya, K.; Mitsui, Y.; Takeda, K. *J. Protein Chem.*, **1996**, **15**(3): 265

- 38 Gorinstein, S.; Goshev, I.; Moncheva, S.; Zemser, M.; Weisz, M.; Caspi, A.; Libman, I.; Lerner, H. T.; Trakhtenberg, S.; Martin-Belloso, O. *J. Protein Chem.*, **2000**, **19**(8): 637
- 39 Daban, J. R.; Samsó, M.; Bartolomé, S. *Anal. Biochem.*, **1991**, **199**(2): 162
- 40 Lee, C. T.; Smith, K. A.; Hatton, T. A. *Biochemistry*, **2005**, **44**: 524
- 41 Tofani, L.; Feis, A.; Snoke, R. E.; Berti, D.; Baglioni, P.; Smulevich, G. *Biophys. J.*, **2004**, **87**: 1186
- 42 Ji, Y.; Zhang, X. H.; Guo, R. *Acta Chimica Sinica*, **2004**, **62**(4): 345 [纪云, 张晓红, 郭荣. 化学学报 (*Huaxue Xuebao*), **2004**, **62**(4): 345]
- 43 Diaz, X.; Abuin, E.; Lissi, E. *J. Photoch. Photobio. A*, **2003**, **155**: 157
- 44 Liu, J. Master Dissertation. Shandong: Shandong University, 2004 [刘静. 硕士学位论文. 山东: 山东大学, 2004]
- 45 Lissi, E.; Abuin, E.; Lanio, M. E.; Alvarez, C. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2002**, **50**: 261
- 46 Xu, G. Y.; Luan, Y. X.; Liu, J.; Yu, L. *Acta Phys.-Chim. Sin.*, **2005**, **21**(5): 577 [徐桂英, 栾玉霞, 刘静, 于丽. 物理化学学报(*Wuli Huaxue Xuebao*), **2005**, **21**(5): 577]
- 47 Turro, N. J.; Lei, X. G.; Ananthapadmanabhan, K. P.; Aronson, M. *Langmuir*, **1995**, **11**: 2525
- 48 Gelamo, E. L.; Silva, C. H. T. P.; Imasato, H.; Tabak, M. *Biochim. Biophys. Acta*, **2002**, **1594**: 84
- 49 De, S.; Girigoswami, A.; Das, S. *J. Colloid Interf. Sci.*, **2005**, **285**: 562
- 50 Vasilescu, M.; Angelescu, D. *Langmuir*, **1999**, **15**: 2635
- 51 Jiang, B.; Hu, Q. H. *Chinese J. Anal. Lab.*, **2002**, **21**(3): 27 [江波, 胡庆红. 分析实验室(*Fenxi Shiyanshi*), **2002**, **21**(3): 27]
- 52 Jiang, B.; Hu, Q. H. *Journal of Guanxi Normal University*, **2002**, **20**(2): 60 [江波, 胡庆红. 广西师范大学学报(*Guangxi Shifan Daxue Xuebao*), **2002**, **20**(2): 60]
- 53 Hu, Q. H.; Jiang, B. *Chin. J. Anal. Chem.*, **2003**, **31**(9): 1123 [胡庆红, 江波. 分析化学(*Fenxi Huaxue*), **2003**, **31**(9): 1123]
- 54 Liu, R. T.; Yang, J. H.; Sun, C. X.; Wu, X.; Li, L.; Li, Z. M. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2003**, **377**: 375
- 55 Clegg, R. M. *Curr. Opin. Biotech.*, **1995**, **6**: 103
- 56 Brahms, S.; Brahms, J. *J. Mol. Biol.*, **1980**, **138**(2): 149
- 57 Ghosh, S.; Banerjee, A. *Biomacromolecules*, **2002**, **3**: 9
- 58 Moriyama, Y.; Takeda, K. *Langmuir*, **2005**, **21**(12): 5524
- 59 Sun, C. X.; Yang, J. H.; Wu, X.; Huang, X. R.; Wang, F.; Liu, S. *F. Biophys. J.*, **2005**, **88**(5): 3518
- 60 Deep, S.; Ahluwalia, J. C. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2001**, **3**: 4583
- 61 Fukuda, H.; Goto, A.; Yoshioka, H.; Goto, R.; Morigaki, K.; Walde, P. *Langmuir*, **2001**, **17**: 4223
- 62 Hai, M. T.; Han, B. X.; Yan, H. K. *J. Phys. Chem. B*, **2001**, **105**: 4824
- 63 Gelamo, E. L.; Itri, R.; Alonso, A.; Silva da, J. V.; Tabak, M. *J. Colloid Interf. Sci.*, **2004**, **277**: 471
- 64 Middleton, H.; English, R. J.; Williams, P. A.; Broze, G. *Langmuir*, **2005**, **21**(11): 5174
- 65 Shi, S.; Hao, J. C.; Lu, R. H.; Wang, T. T.; Wang, H. Q. *China Surfactant Detergent & Cosmetics*, **1997**, **1**: 53 [石硕, 郝京诚, 鲁润华, 王淘淘, 汪汉卿. 日用化学工业 (*Riyong Huaxue Gongye*), **1997**, **1**: 53]
- 66 Dong, S. L.; Xu, G. Y. *Acta Chimica Sinica*, **2004**, **62**(7): 674 [董姝丽, 徐桂英. 化学学报(*Huaxue Xuebao*), **2004**, **62**(7): 674]