# 变性蛋白在复性过程中的结构变化研究进展

邹 灵,任丽琨,李笑梅,陈凤莲,高 健,李祥鹏,石彦国,张 娜\*

(哈尔滨商业大学食品工程学院,哈尔滨 150076)

**摘 要:** 蛋白质在一定条件下会发生变性,对于部分变性蛋白来说在合适条件下会发生复性,其在复性过程 中结构会发生一系列变化,对蛋白质复性过程结构变化的研究,对于生命科学以及食品行业有着深远的意义。 本文首先对蛋白质在不同处理条件下变性及复性技术的研究现状进行了阐述,对蛋白质复性过程结构变化常 用的表征方法进行总结,其次对蛋白质热力学及动力学的研究进行了综述,最后介绍了蛋白质在复性过程中 可能存在的中间态,并就蛋白质复性过程中结构变化探索的焦点和热点进行了展望。 **关键词:** 蛋白质;变性;复性;表征方法;中间态

# Research progress in structural changes of denatured proteins during renaturation

ZOU Ling, REN Li-Kun, LI Xiao-Mei, CHEN Feng-Lian, GAO Jian, LI Xiang-Peng, SHI Yan-Guo, ZHANG Na<sup>\*</sup>

(College of Food Science and Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

**ABSTRACT:** Proteins undergo denaturation under certain conditions. For some denatured proteins, renaturation will occur under appropriate conditions. The structure of the protein will undergo a series of changes during the renaturation process. The research on the structural change of protein renaturation process is of great significance to life science and food industry. This paper described the research status of denaturation and renaturation techniques of proteins under different treatment conditions, summarized the commonly used characterization methods of structural changes in protein renaturation process, reviewed the research on the thermodynamics and kinetics of proteins, and introduced the possible intermediate states of proteins in the refolding process.

KEY WORDS: protein; denaturation; renaturation; characterization method; intermediate state

1 引 言

天然蛋白质分子在热、紫外线照射、高压以及外加一 些化学试剂等处理条件下会发生蛋白质变性现象,从而可 能导致部分生物活性的丧失。对于可逆变性蛋白来说,当 其变性程度比较小时,如若将变性因素除去,或者改变它 们所处外界环境,这些变性蛋白能部分恢复其原来的构象 及功能,甚至对于有些蛋白来说可以全部恢复原有的构象 及功能性质<sup>[1-3]</sup>。

我国生物化学家吴宪教授<sup>[4]</sup>,在 20 世纪 30 年代提出 了世界上第一个蛋白质变性理论,他指出"天然蛋白质之 分子,由环境种种之关系,从有序而坚密之构造(天然态), 为无序而散漫之构造(变性态),为变性作用"。一般将蛋白 质变性理解为是一个过程,在此过程中,蛋白质由非共价

\*通讯作者: 张娜, 教授, 博士, 主要研究方向为食品蛋白与食品安全。E-mail: foodzhangna@163.com

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31871747)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31871747)

<sup>\*</sup>Corresponding author: ZHANG Na, Professor, Ph.D, Harbin University of Commerce, No.138, Tongda Road, Daoli District, Harbin 150076, China. E-mail: foodzhangna@163.com

键形成的特定立体结构被破坏,与特定立体结构密切关联 的生物活性也相继丧失,但维持蛋白质肽链一级结构的共 价键依旧完好<sup>[5]</sup>。而对于蛋白质的复性机制则存在 2 种假 设:一种假设认为,变性蛋白质肽链中的局部肽段,最先 形成 α-螺旋、β-折叠等构象单元,之后由这些构象单元逐 渐进行整合,最后形成蛋白质的三级结构;另一种假设则 认为,刚开始先由肽链内部疏水相互作用形成一个坍塌的 过程,随后再逐步形成具有差异层次的结构<sup>[6]</sup>。

不同变性条件所导致的蛋白质复性机制也有所不同, 为了更全面阐释蛋白质复性过程的结构变化,首先对导致 蛋白质变性的主要因素进行探讨总结,这些变性因素主要 包括 2 大类: 物理因素和化学因素。常用来研究蛋白质变 性的物理技术有高温、高压、紫外线、超声波等, 化学方 法有强酸、强碱、部分重金属盐等<sup>[7]</sup>。Prezcamero 等<sup>[8]</sup>在 研究多聚谷氨酸和多聚赖氨酸的构象时,发现多聚物在不 带电荷的情况下可以形成螺旋,一旦pH值发生变化,使其 带有电荷,则静电之间相互作用会使它们构象变成无序结 构,这些氨基酸残基一旦失去电荷,会造成分子内部相互作 用间失去平衡,从而导致蛋白质构象发生改变,当这些改变 累积到一定程度时, 就会导致变性<sup>[9]</sup>。Chakraborty 等<sup>[10,11]</sup> 证实了这一现象,还发现在中性及碱性条件下,酪蛋白主 要以无规则卷曲的构象存在,当溶剂调节至酸性(pH 5.0~7.0)时, 添加的质子可以补偿酪蛋白上的负电荷, 从而 减少相似带电残基之间的排斥,继而使酪蛋白链发生再折 叠。热变性导致蛋白质变性的现象很常见,温度一旦升高, 就会促进原子和基团分子内发生振动,这样则可能导致稳 定蛋白质空间结构的次级键遭到破坏,使肽链变得松散, 进而致使蛋白质发生热变性[12]。蛋白质热变性的程度不但 与加热的时间、温度有关,蛋白质所处溶液体系也会对其 造成很大影响<sup>[13]</sup>。Mitra 等<sup>[14]</sup>研究发现,人血清白蛋白的热 展开过程在55℃以下是可逆的,超过该温度,该过程则不 可逆。又有研究者在对碳酸酐酶进行热变性研究时也出现 了类似的结果,研究发现该酶在 70 ℃的条件下加热 6 min 就导致不可逆变性。常用来对蛋白质变性现象进行研究的 化学试剂大致可以分成 3 类: 脲和盐酸胍、去垢剂、有机 溶剂。这些化学试剂中最为常用是极性相对较强的脲和盐 酸胍<sup>[15]</sup>。Canchl 等<sup>[16]</sup>通过尿素对蛋白质变性的平衡研究发 现,变性是由尿素与蛋白质通过静电力和范德华力直接相 互作用而引起。张学忠等<sup>[17]</sup>通过对 α-淀粉酶进行研究,发 现其经 8 mol/L 脲变性 24 h, 残留的酶活力仍有 50%左右, 但是当钙离子螯合剂乙二胺四乙酸(1 mmol/L )存在时, 会 大大增强脲变性能力, 25 ℃下经 24 h 的脲变性, 无论脲浓 度是高还是低,α-淀粉酶的活性几乎都降为零。

本文通过对蛋白质复性技术及复性过程中的结构表 征方法进行概述,揭示蛋白质的复性机制,并从热力学及 动力学的角度对蛋白质复性过程结构变化进行探讨分析, 最后对蛋白质复性过程中可能存在的中间态进行总结,通 过对变性蛋白复性过程中结构变化的研究,继而从更深入 的层次建立起蛋白质结构与其相关功能之间的联系,以期 对生命科学和食品行业在理论和实际应用产生重要意义。

## 2 蛋白质复性技术

目前常用于复性研究的蛋白质都是一些结构比较简 单的蛋白质,常见的有牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、溶菌酶(lysozyme, LZM)、碱性磷酸酶、牛 碳酸酐酶(bovine carbonic anhydrase, BCA),而对于复杂蛋 白质的复性研究则较少<sup>[18,19]</sup>。用于研究蛋白质复性技术有 稀释复性、色谱复性等<sup>[20-22]</sup>。近些年人工分子伴侣辅助复 性技术被越来越多的研究者所应用<sup>[23,24]</sup>。一般蛋白质复性 所需的有效条件通常满足以下要求: (1)变性剂浓度降低到 保留分子内非共价相互作用(如氢键、疏水相互作用)水平; (2)保证在一定的氧化环境条件下可以正确形成二硫键; (3)保证变性蛋白浓度维持在较低水平,以避免分子间发生 聚集<sup>[25]</sup>。

稀释复性是最为传统的复性技术,相比于其他复性 方法来说操作也较为容易,因此常以此方法为基础来研究 其他复性方法。稀释复性在进行操作时,要注意调控变性 蛋白质溶液加入复性液中的速率,因为操作速率的快慢是 整个稀释复性的关键所在,与此同时,还要维持相对来说 比较低的蛋白质浓度,从而减少甚至可以避免聚集体产生, 以此来提高复性率<sup>[26]</sup>。Samuel等<sup>[27]</sup>发现脯氨酸可以防止 蛋白质复性过程中发生聚集,实验表明脯氨酸可以的止 蛋白质复性过程中发生聚集,实验表明脯氨酸可以和复性 中间产物相结合,以此来抑制蛋白质发生聚集。后来又有 研究相继发现,通过向复性液中添加甘油、环糊精、葡萄 糖、L-精氨酸、短链醇等物质,这些物质能够借助非共价 相互作用,进一步抑制聚集体形成,以此提高蛋白质的复 性产率<sup>[28]</sup>。然而,由于蛋白质的种类繁多,而其性质又极 其多样,这些用来抑制聚集体形成的添加剂并没有普遍的 适用性。

Rozema等<sup>[29]</sup>受伴侣分子 GroE(GroEL和 GroES)和两 亲性蛋白质机制的启发,他们发现在没有添加剂的条件 下,依次加入 2 种低分子量试剂可促进蛋白质天然构象 的形成,抑制聚集("错误复性")蛋白质的形成,并在此基 础之上给出人工伴侣辅助复性的机制(图 1),该机制主要 包括两步:第一步,利用去污剂与蛋白质相结合,然后形 成"蛋白质-去污剂复合物",从而防止发生集聚现象;第 二步,利用环糊精将去污剂从形成的"蛋白质-去污剂复 合物"上剥离掉,促使变性蛋白朝着准确方向进行复性。 后来 Gull等<sup>[30]</sup>采用该机制对 BSA 进行复性研究发现当去 污剂和 β-环糊精的浓度分别为 0.1 mmol/L 和 0.5 mmol/L 时,复性后得到的蛋白质的 α-螺旋含量和天然蛋白质含 量近似相同。



图 1 人工伴侣辅助蛋白质复性的示意图 Fig.1 Schematic view of artificial chaperone-assisted protein Renaturation

# 3 蛋白质复性过程的结构表征方法

复性是蛋白质由展开状态转变成折叠状态的过程, 蛋白质构象的变化可以通过一些检测手段对其进行结构 表征<sup>[31]</sup>。圆二色谱法(circular dichroism, CD)、荧光光谱 法常常被用来对蛋白质的二级、三级结构进行表征,动态 光散射则可用来对蛋白质的粒径进行表征,诸如此类的 检测手段也常常被用来对蛋白质复性过程期间结构的变 化进行表征。

#### 3.1 圆二色谱法

圆二色谱可以表征蛋白质在展开和复性过程中的二、 三级结构变化,并且还可用来验证荧光发射实验结果<sup>[32]</sup>。 近紫外 CD 能快速、简便且较为准确的对稀溶液体系中蛋 白质三级结构变化进行表征, 而远紫外 CD 则用来对二级 结构进行检测,并且可以检测算出蛋白质各种类型的二级 结构相对含量<sup>[33]</sup>。早在 1977 年日本学者 Kitamura 等<sup>[34]</sup>对 大豆球蛋白(11S)复性现象进行探索,他们首先用 8 mol/L 脲对 11S 进行处理, 然后采用透析复性, 最后对复性后的 11S 进行分离纯化, 研究发现, 经过纯化的 11S CD 曲线与 天然态 CD 曲线几乎完全重合。在蛋白质复性过程中,常 常需要通过添加表面活性剂来抑制聚集体的产生, 它们可 以在一定浓度范围内防止聚集体生成并提高复性率。后来 Upendra 等<sup>[35]</sup>发现酸变性状态时的细胞色素 C 在 200~ 220 nm 处显示出较宽的负带, 向其加入阴离子表面活性剂 1-丁基-3-甲基咪唑辛基硫酸盐[C<sub>4</sub>mim] [C<sub>8</sub>OSO<sub>3</sub>]后,变性 的细胞色素 C 开始重新折叠并获得与天然构象相同的峰 值。研究发现,此类表面活性剂还具有类似特点:(1)加速蛋 白质复性,(2)稳定蛋白质结构,(3)防止蛋白质聚集。

### 3.2 荧光光谱法

荧光光谱法主要通过测定蛋白质的内源荧光变化情况,可以清楚地了解蛋白质的变性或复性过程<sup>[36]</sup>。蛋白质 在不同操作条件下最大吸收波长(*l*max)的红移程度,可以 用来反映蛋白质的构象变化,反过来,对于蛋白质复性而 言,则可以通过测定蛋白质 λmax 蓝移的程度,来推算其整 体构象变化的程度<sup>[37,38]</sup>。Gull 等<sup>[39]</sup>在对亮氨酸肽酶(leucine peptidase, LAP)复性研究过程中发现,LAP 和去污剂之间 的复合物在最初的 20 min 内形成,在添加环糊精 20 h 后获 得了与天然酶类似的最大荧光值。

#### 3.3 动态光散射

动态光散射可以用来测定蛋白质在变性和复性过程 中的尺寸变化, 通过对不同处理条件下蛋白质粒径变化的 研究,可以推测蛋白质粒径的变化趋势。Mohd 等<sup>[40]</sup>通过 对 BSA 进行研究时发现, 天然 BSA 的流体力学半径为 (3.4±0.08) nm, 经6 mol/L 盐酸胍变性后观察到蛋白质样品 的流体力学半径大约在(42.1±1.74) nm, 然后分别使用十 六烷基三甲基溴化铵和β-环糊精对变性蛋白溶液进行处理, 其流体力学半径值减小至(7.8±0.17) nm。Frigori 等<sup>[41]</sup>对 LZM 进行研究, 通过流体力学半径检测发现, 天然状态下 的 LZM 流体力学半径为(2.1±0.06) nm, 经过 6 mol/L 盐酸 胍变性处理后 LZM 的流体力学半径为(7.6±0.22) nm, 通过 浓度为 60 mmol/L 磷酸盐缓冲液对变性 LZM 溶液进行稀 释处理,当变性剂的浓度稀释至 60 mmol/L 时,变性 LZM 的流体力学半径为(5.1±0.16) nm, 研究结果发现, 随着变 性剂浓度的降低, 变性 LZM 的流体力学半径有渐渐向天 然态靠近的趋势。

# 4 蛋白质热力学及动力学变化研究进展

变性蛋白在复性过程中,热力学及动力学均会发生 变化,因此通过对热力学及动力学变化的研究,可以更好 地对蛋白质的复性机制进行分析<sup>[42]</sup>。

### 4.1 蛋白质热力学

美国著名科学家 Anfisen, 在对牛胰核糖核酸酶进行 复性研究时, 提出蛋白质复性"热力学假说", 该假说指出,

处于特定环境之下天然蛋白质多肽链的构象呈现热力学上 最稳定的结果,整个体系总自由能最低,并且处于特定环 境之中的变性状态的多肽链能够自发复性到天然构象<sup>[42]</sup>。 就蛋白质变性和复性而言,肽链复性是肽链有序化的过程, 变性才能无序化, 变性后的多肽链都有复性形成高级结构 的倾向<sup>[43]</sup>。Joseph 等<sup>[44]</sup>通过对蛋白质复性的能量景观研究, 发现蛋白质的复性遵循热力学假说<sup>[45]</sup>。通过相关热力学参 数可以为蛋白质的构象特征分析、预测提供强大的理论支 撑,因此,相关热力学参数的测定变得尤为重 要<sup>[46]</sup>。常 见的热力学参数测定的技术有等温滴定量热法(isothermal titration calorimetry, ITC)、差示扫描量热法(differential scanning calorimetry, DSC)。ITC 的最大优势是只需经过一 次滴定就可以提供被研究体系的相关热力学参数;而在程 序控温的情况下, DSC 可以测量样品和参比物之间的热量 差与温度之间的关系, DSC 在蛋白质复性的热力学研究中 占有一席之地[47,48]。

# 4.2 蛋白质动力学

蛋白质动力学基于热力学假说,并在此之上进一步 的完善和发展。对于不同的蛋白质来说, 它们的复性方式 也各不相同<sup>[49]</sup>。就单体蛋白及小分子蛋白来说,其复性过 程相对简单,在热力学的调控之下,变性和复性现象变得 很容易发生。但是对于部分结构较为复杂的蛋白质来说, 即便它们仍会受到热力学上的调控,但此时起主导作用的 则是动力学,因此动力学就显得尤为重要<sup>[50]</sup>。常用来研究 蛋白质动力学的分析方法有荧光共振能量转移、停流光谱 分析、X 射线晶体学、核磁振光谱学,这些分析方法能够 给出蛋白质结构的动力学测量数据<sup>[51-53]</sup>。近年来,分子动 力学模拟成为探索蛋白质复性过程的重要技术之一, 它是 一种在氨基酸残基水平上揭示蛋白质的变性/复性机制的 技术,可以用分子动力学模拟精确地再现蛋白质的部分复 性轨迹,其在分析及预测蛋白质结构及其功能之间的关系 等方面,应用越来越广<sup>[54]</sup>。但是,不同的技术手段都有一 定的局限性,因此动力学研究结果常常受技术手段的限制 而具有一定的局限性;此外,由于蛋白质复性过程有快有 慢,对于一些发生得很快的过程,现有的技术则难以观察 得到结果。

# 5 蛋白质复性过程中的中间态

蛋白质在复性过程中可能出现多个中间态,但是真 正起到重要作用的中间态并不是很多,因为其中多数中间 态,只是瞬间存在的<sup>[55]</sup>。最初人们认为,无论是蛋白质的 变性过程,还是复性过程,都不存在中间态,而是直接从 天然态过渡到变性态,逆过程则为从变性态到天然态<sup>[56]</sup>。 随着人们对蛋白质复性技术不断深入研究,发现了中间态 的存在。首先天然蛋白质经变性后变为伸展态,随后完全 展开的蛋白经前期折叠进入到中间态,最后经中间态过渡 至天然态(如图 2)<sup>[57]</sup>。后来,研究者又有新的发现,当蛋白 质在回到天然态的期间,处于中间态的蛋白质,有可能沿 着两条互不相同的路径进行反应,其中一条是形成具有生 物活性的蛋白;而另一条路径则生成无生物活性的聚集 体<sup>[58]</sup>。当确定蛋白质复性过程会出现中间态后,人们开始 对蛋白质复性过程所出现的中间态进行捕获,并对此进行 初步分析<sup>[59]</sup>。

蛋白质复性中间产物的研究在近些年迅速成熟。 Ohgushi 等<sup>[60]</sup>在对马细胞色素 C 研究时首次提出熔球态中 间态的概念。随后 Ptitsyn<sup>[61]</sup>通过一系列的研究,提出了预 熔球态中间态的概念。目前已知球蛋白至少存在4种构型: 天然态、熔球态、预熔球态和变性态<sup>[62,63]</sup>。不少国内外学 者对蛋白质复性过程中的中间态进行了系统研究,并取得 了一定突破。Natalia 等<sup>[64]</sup>对牛碳酸酐酶II(BCA-II)复性途 径中部分构象进行研究,结果发现 BCA-II 的平衡展开涂 径具有多个中间态的存在。Prokhorov 等<sup>[65]</sup>对脲诱导牛碳 酸酐酶 B(BCA-B)进行研究,结果发现脲诱导 BCA-B 在变 性过程中存在一个中间态, Cleland 等<sup>[66]</sup>通过类似实验研究, 发现经变性剂变性的 BCA-B. 在复性的过程中也出现类似 结果。国内相关学者在这方面也进行了一定的研究探索, Gu 等<sup>[67]</sup>研究发现在中性或弱碱性的低浓度缓冲液中,并 且满足无氧化还原试剂存在的条件,即可获得稳定的变性 LZM 平衡中间态, 该中间态包含 8 个游离巯基基团。郑会 娟<sup>[68]</sup>采用盐酸胍、尿素作为诱导剂,对芽抱杆菌淀粉酶进 行研究,发现复性过程存在一个稳定的中间态。傅容淇、 张潭等<sup>[69,70]</sup>通过对蛋白质变性和复性过程的研究,在不同 的处理条件下分别捕获到了不同的中间态。



注: 完全变性态(U)、中间态(I)和天然态(N)。 图 2 蛋白质复性过程中结构转变示意图 Fig.2 Schematic diagram structure transitions during protein renaturation

# 6 总结与展望

蛋白质的变性并非全部可逆,且过程非常复杂。虽然

已有不少学者对蛋白质的变性及复性过程进行了大量研究, 但是研究对象也只局限于一些结构较为简单的蛋白,对于 蛋白质复性机制的研究还不是太透彻,对于中间态的研究 也只进行捕获,而对于其具体的结构变化、功能性目前鲜 有人研究。随着人们对蛋白质变性及复性过程更深入的研 究,对其复性过程中所存在的结构变化会不断明确,许多 新的研究方法也会不断出现,继而从更深入的层次来了解 蛋白质复性过程中的结构变化,从而建立起蛋白质的结构 与其相关功能之间的联系,使其广泛应用于食品或其他领 域之中。

#### 参考文献

- Freire E, Schön A, Hutchins BM, *et al.* Chemical denaturation as a tool in the formulation optimization of biologics [J]. Drug Discov Today, 2013, 18(19–20): 1007–1013.
- [2] Ptitsyn OB. Protein folding: Hypotheses and experiments [J]. J Protein Chem, 1987, 6(4): 273–293.
- [3] Dobson CM. Protein folding and misfolding [J]. Nature, 2003, 426(6968): 884–90.
- [4] 黄津瑜.蛋白质变性学说的首创者吴宪教授[J].中国科技史杂志, 1980, (2): 48.

Huang JY. The founder of protein denaturation theory [J]. Chin J Sci Technol History, 1980, (2): 48

- [5] 王克夷. 蛋白质导论[M]. 北京: 科学出版社, 2007.Wang KY. Introduction to protein [M]. Beijing: Science Press, 2007.
- [6] 史晋辉. 蛋白质复性[J]. 生命的化学, 2000, 20(6): 283–285.
   Shi JH. Protein refolding [J]. Chem Life, 2000, 20(6): 283–285.
- [7] Gregersen SB, Wiking L, Hammershøj M. Acceleration of acid gel formation by high intensity ultrasound is linked to whey protein denaturation and formation of functional milk fat globule–protein complexes [J]. J Food Eng, 2019, 254: 17–24.
- [8] Prezcamero G, Congregado F, Bou JJ, et al. Biosynthesis and ultrasonic degradation of bacterial poly(–glutamic acid) [J]. Biotechnol Bioeng, 2015, 63(1): 110–115.
- [9] Svilenov H, Markoja U, Winter G. Isothermal chemical denaturation as a complementary tool to overcome limitations of thermal differential scanning fluorimetry in predicting physical stability of protein formulations [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2018, 125: 106–113.
- [10] Chakraborty A, Basak S. pH–induced structural transitions of caseins [J]. J Photoch Photobio B, 2007, 87(3): 191–199.
- [11] Devaraj KB, Kumar PR, Prakash V. Characterization of acid-induced molten globule like state of ficin [J]. Int J Biol Macromol, 2009, 45(3): 0–254.
- [12] Park BK, Yi N, Park J, et al. Monitoring protein denaturation using thermal conductivity probe [J]. Int J Biol Macromol, 2013, 52: 353–357.
- [13] German B, Damodaran S, Kinsella JE. Thermal dissociation and association behavior of soy proteins [J]. J Agric Food Chem, 1982, 30(5): 807–811.
- [14] Mitra RK, Sinha SS, Pal SK. Hydration in protein folding: Thermal unfolding/refolding of human serum albumin [J]. Langmuir, 2007, 23(20): 10224–10229.

- [15] Cao Y, Li HB. How do chemical denaturants affect the mechanical folding and unfolding of proteins? [J]. J Mol Biol, 2008, 375(1): 0–324.
- [16] Canchi DR, Paschek D, García AE. Equilibrium study of protein denaturation by urea [J]. J Am Chem Soc, 2010, 132(7): 2338–2344.
- [17] 张学忠,吴晓霞,吴华. a-淀粉酶在脲变性过程中构象与活性的变化
  [J]. 吉林大学自然科学学报, 1994, (2): 115–118.
  Zhang XZ, Wu XX, Wu H. Changes in conformation and activity of a-amylase during urea degeneration [J]. J Nat Sci Jilin Univ, 1994, (2): 115–118.
- [18] Gull N, Mir MA, Khan JM, et al. Refolding of bovine serum albumin via artificial chaperone protocol using gemini surfactants [J]. J Colloid Interf Sci, 2011, 364(1): 157–162.
- [19] Banjare MK, Behera K, Banjare RK, et al. Interaction of ionic liquid with silver nanoparticles: Potential application in induced structural changes of globular proteins [J]. Acs Sustain Chem Eng, 2019, 7(13): 11088–11100.
- [20] Omanovic ME, Manfield I, Wilkins T. Application of isothermal titration calorimetry in evaluation of protein–nanoparticle interactions [J]. J Therm Anal Calorim, 2017, 127(1): 1–9.
- [21] Wetlaufer DB, XIE YC. Control of aggregation in protein refolding: A variety of surfactants promote renaturation of carbonic anhydrase II [J]. Protein Sci, 2010, 4(8): 1535–1543.
- [22] Volodina KV, Avnir D, Vinogradov V. Alumina nanoparticle-assisted enzyme refolding: A versatile methodology for proteins renaturation [J]. Sci Rep–UK, 2017, 7(1): 1458.
- [23] Yazdanpast R, Khodagholi F, Souri E. Alkaline phosphatase refolding assisted by sequential use of oppositely charged detergents: A new artificial chaperone system [J]. Int J Biol Macromol, 2008, 42(2): 195–202.
- [24] Kashanian F, Masoudi MM, Shamloo A, et al. Modeling, simulation, and employing dilution–dialysis microfluidic chip (DDMC) for heightening proteins refolding efficiency [J]. Bioprocess Biosystems Eng, 2018, 41(5): 707–714.
- [25] Yamaguchi S, Yamamoto E, Mannen T, et al. Protein refolding using chemical refolding additives [J]. Biotechnol J, 2013, 8(1): 17–31.
- [26] Gabrielczyk J, Joerdening HJ. Ion exchange resins as additives for efficient protein refolding by dialysis [J]. Protein Expres Purif, 2017, (133): 35–40.
- [27] Samuel D, Kumar TK, Ganesh G. Proline inhibits aggregation during protein refolding [J]. Protein Sci, 2000, 9(2): 344–352.
- [28] Chen YC, Liu HS. Chaperon solvent plug design in size-exclusion chromatography protein refolding process [J]. Enzyme Microb Tech, 2011, 49(2): 203–208.
- [29] Rozema D, Gellman SH. Artificial chaperones: Protein refolding via sequential use of detergent and cyclodextrin [J]. J Am Chem Soc, 1995, 117(8): 2373–2374.
- [30] Gull N, Mir MA, Khan JM, et al. Refolding of bovine serum albumin via artificial chaperone protocol using gemini surfactants [J]. J Colloid Interf Sci, 2011, 364(1): 157–162.
- [31] Kumar D. 2. 54-protein refolding/renaturation [M]. Comprehensive Biotechnology, 2011.
- [32] Walters J, Milam SL, Clark AC. Chapter 1 practical approaches to protein folding and assembly spectroscopic strategies in thermodynamics and

kinetics [J]. Method Enzymol, 2009, 455(8): 1-39

- [33] Mizutani H, Sugawara H, Buckle AM, et al. Refold: A new and sustainable gateway to experimental protocols for protein refolding [J]. Bmc Struct Biol, 2018, 17(1): 4.
- [34] Kitamura K, Takagi T, Shibasaki K. Renaturation of soybean 11S globulin[J]. Agril Biol Chem, 1977, 41(5): 833–840.
- [35] Upendra KS, Meena K, Farooq AW. Refolding of acid denatured cytochrome *c* by anionic surface–active ionic liquid: Choice of anion plays key role in refolding of proteins [J]. Colloid Surface A, 2019, 582: 123872.
- [36] Bhaswati B, Gaurimisra MT. Chapter 2–circular dichroism data processing handbook for complex [M]. Biological Data Sources, 2019.
- [37] Davis CM, Reddish MJ, Dyer RB. Dual time-resolved temperature-jump fluorescence and infrared spectroscopy for the study of fast protein dynamics [J]. Spectrochim Acta A, 2017, (178): 185–191.
- [38] Schneider C, Sepp–Lorenzino L, Nimmesgern E, et al. Pharmacologic shifting of a balance between protein refolding and degradation mediated by Hsp90 [J]. P Natl A Sci India B, 1996, 93(25): 14536–14541.
- [39] Gull N, Ishtikhar M, Alam MS, et al. Spectroscopic studies on the comparative refolding of guanidinium hydrochloride denatured hen egg-white lysozyme and Rhizopus niveus lipase assisted by cationic single-chain/gemini surfactants via artificial chaperone protocol [J]. Rsc Adv, 2017, 7(45): 28452–28460.
- [40] Mohd I, Nand K. Comparative refolding of guanidinium hydrochloride denatured serum albumin assisted by surfactants via artificial chaperone protocol: Biophysical insight [J]. Biophys J, 2018, 114(3): 52–61.
- [41] Frigori RB. Phast: Protein–like heteropolymer analysis by statistical thermodynamics [J]. Comput Phys Commun, 2017, (215): 165–172.
- [42] Anfinsen B. Principles that govern the folding of protein chains [J]. Science, 1973, 181(96): 223–230.
- [43] 王克夷. 蛋白质研究的挑战:无固有折叠模式的肽链[J]. 科学, 2007, (1): 4, 34-38.

Wang KY. The challenge of protein research: peptide chains without inherent folding patterns [J]. Science, 2007, (1): 4, 34–38.

- [44] Joseph D, Bryngelson, José NO, et al. Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: A synthesis [J]. Proteins, 1995, (21): 167–195.
- [45] Rees DC, Robertson AD. Some thermodynamic implications for the thermostability of proteins [J]. Protein Sci, 2001, 10(6): 1187–1194.
- [46] Gummadi SN. What is the role of thermodynamics on protein stability? [J]. Biotechnol Bioproc E, 2003, 8(1): 9–18.
- [47] Ibarra-Molero B, Naganathan AN, Sanchez-Ruiz JM, et al. Modern analysis of protein folding by differential scanning calorimetry [J]. Method Enzymol, 2015, 567: 281–318.
- [48] Woolfson DN, Cooper A, Harding MM, et al. Protein folding in the absence of the solvent ordering contribution to the hydrophobic interaction [J]. J Mol Biol, 1993, 229(2): 0–511.
- [49] Anfinsen CB, Haber E. Studies on the reduction and re-formation of protein disulfide bonds [J]. J Biol Chem, 1961, 236(A11): 1361–1363.
- [50] Kumar, Rajesh. Analysis of the pH-dependent thermodynamic stability, local motions, and microsecond folding kinetics of carbonmonoxycytochrome c [J]. Arch Biochem Biophys, 2016, 606:

16-25.

- [51] Yamamoto M, Nakagawa K, Fujiwara K, *et al.* A native disulfide stabilizes non-native helical structures in partially folded states of equine β-Lactoglobulin [J]. Biochemistry–US, 2011, 50(49): 10590–10597.
- [52] Khalifah RG. The carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase I. Stop–flow kinetic studies on the native human isoenzymes B and C [J]. J Biol Chem, 1971, 246(8): 2561–2573.
- [53] Rapaport DC, Blumberg RL, Mckay SR, et al. The art of molecular dynamics simulation [J]. Comput Phys, 1998, 10(1): 70–71.
- [54] Chowdhury SC, Elder RM, Sirk TW, et al. Modeling of glycidoxypropyltrimethoxy silane compositions using molecular dynamics simulations [J]. Comp Mater Sci, 2017, 140: 82–88.
- [55] Papaioannou A, Kuyucak S, Kuncic Z. Computational study of the activity, dynamics, energetics and conformations of insulin analogues using molecular dynamics simulations: Application to hyperinsulinemia and the critical residue B26 [J]. BB Reports, 2017: 182–190.
- [56] Gianni S, Ivarsson Y, Jemth P, et al. Identification and characterization of protein folding intermediates [J]. Biophys Chem, 2007, 128(2–3): 105–113.
- [57] Popot JL, Engelman DM. Membrane protein folding and oligomerization: The two-stage model [J]. Biochemistry–US, 1990, 29(17): 4031–4037.
- [58] Ikura T, Tsurupa GP, Kuwajima K. Kinetic folding and cis/trans prolyl isomerization of staphylococcal nuclease. A study by stopped–flow absorption, stopped–flow circular dichroism, and molecular dynamics simulations [J]. Biochemistry–US, 1997, 36(21): 6529.
- [59] Buchner J, Schmidt M, Fuchs M, et al. GroE facilitates refolding of citrate synthase by suppressing aggregation [J]. Biochemistry–US, 1991, 30(6): 1586–1591.
- [60] Ohgushi M, Wada A. 'Molten–globule state': A compact form of globular proteins with mobile side–chains [J]. Febs Lett, 1983, 164(1): 0–24.
- [61] Ptitsyn OB. Structures of folding intermediates [Z].
- [62] Vitagliano L, Vergara A, Bonomi G, et al. Spectroscopic and crystallographic characterization of armtetrameric hemoglobin oxidation reveals structural featuresrnof the functional intermediate relaxed/tense state [J]. J Am Chem Soc, 2008, 130(32): 10527–10535.
- [63] Pawar S, Aglucose/xylose, Deshpande VV. Characterization of acid-induced unfolding intermediates of isomerase [J]. Eur J Biochem, 2000, 267: 6331–6338.
- [64] Natalia A. Bushmarina, Irina M, et al. Partially folded conformations in the folding pathway of bovine carbonic anhydrase II: A fluorescence spectroscopic analysis [J]. Chembiochem, 2001, 2(11): 813–821.
- [65] Prokhorov DA, Timchenko AA, Uversky VN, et al. Dynamics of oligomer formation by denatured carbonic anhydrase II [J]. Bba–Proteins Proteom, 2008, 1784(5): 834–842.
- [66] Cleland JL, Wang DIC. Transient association of the first intermediate during the refolding of bovine carbonic anhydrase B [J]. Biotechnol Prog, 2010, 8(2): 97–103.
- [67] Gu ZY, Zhu XN, Ni SW, et al. Conformational changes of lysozyme refolding intermediates and implications for aggregation and renaturation [J]. Int J Biochem Cell B, 2004, 36(5): 0–805.
- [68] 郑会娟. 变性剂诱导的淀粉液化芽孢杆菌 α-淀粉酶去折叠过程和重折 叠过程的研究[D]. 西安: 西北大学, 2009.

Zheng HJ. Study on the unfolding process and refolding process of bacterial liquefaction of  $\alpha$ -amylase induced by denaturant [D]. Xian: Northwest University, 2009.

[69] 张潭. 变性剂诱导的蛋白溶菌酶分子去折叠和重折叠过程各稳定构象态的分布和过渡[D]. 西安: 西北大学, 2010.

Zhang T. Distribution and transition of each conformational state during the unfolding and refolding procedures of egg white lysozyme induced by denaturant [D]. Xian : Northwest University, 2010.

[70] 傅容湛. 牛血清白蛋白变性复性过程及其部分折叠中间体的研究[D]. 西安: 西北大学, 2006.

Fu RZ. Study on the renaturation process of bovine serum albumin and its partially folded intermediates [D]. Xian : Northwest University, 2006.

(责任编辑: 王 欣)





邹 灵,硕士研究生,主要研究方向
 为食品蛋白质。
 E-mail: 1406124641@qq.com

张 娜, 博士, 教授, 主要研究方向为 食品蛋白与食品安全。 E-mail: foodzhangna@163.com

# "农药、兽药以及重金属残留分析"专题征稿函

食用产品中农药、兽药以及重金属的残留问题是国内外广泛关注的课题。

鉴于此,本刊特别策划了"农药、兽药以及重金属残留分析"专题,由福州大学化学学院的付风富教授和中山大学化学 学院的李攻科教授共同担任专题主编主要围绕食品中农兽药残留与重金属检测方法与风险评估、重金属与农药分析、农 兽药的代谢与迁移转化、农兽药与重金属残留样品前处理方法、农兽药与重金属残留检测技术与应用、农兽药与重金属 残留现场检测技术、农兽药与重金属残留市场监测与结果分析等或者您认为与本专题相关有意义的领域展开论述和研究, 综述及研究论文均可。

鉴于您在该领域丰富的研究经历和突出的学术造诣,本刊主编**吴永宁研究员**、专题主编**付凤富教授、李攻科教授**及 编辑部全体成员特别邀请您为本专题撰写稿件,综述、研究论文、研究简报均可,以期进一步提升该专题的学术质量和影 响力。

本专题计划在 2020 年 8 月出版,请在 2020 年 6 月 15 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后 优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下,再次感谢您的关怀与支持!

谢谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com(备注: 投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者登录-注册投稿-投稿选择"专题: 农药、 兽药以及重金属残留分析")

E-mail: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部