

尿素对经动态高压微射流(DHPM)诱导去折叠胰蛋白酶构象变化的影响

刘军平, 刘伟*, 邹立强, 刘成梅, 方丽淳, 张兆琴
(南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047)

摘要: 以牛胰蛋白酶为原料, 通过紫外吸收光谱、荧光发射光谱和圆二色谱研究尿素对天然胰蛋白酶和经动态高压微射流(DHPM)诱导去折叠胰蛋白酶的构象变化。结果显示: 天然胰蛋白酶构象在尿素浓度 4.0~6.0mol/L 之间变化最显著, 紫外吸光度从 0.2746 降至 0.1824, 吸收峰从波长 279nm 红移至 283nm, 相对荧光强度从 105.9 降至 98.27, 发射峰从波长 352nm 红移至 355nm, β -折叠含量从 46.9% 降至 30.6%; 而去折叠胰蛋白酶构象在尿素浓度 2.0~4.0mol/L 之间变化最显著, 紫外吸光度从 0.3121 降至 0.2159, 吸收峰从波长 281nm 红移至 283nm, 相对荧光强度从 108.24 降至 99.07, 发射峰从波长 353nm 红移至 360nm, β -折叠含量从 40.6% 降至 38.9%。表明尿素对经 DHPM 处理后处于部分去折叠胰蛋白酶构象的影响更为显著。不同浓度尿素导致胰蛋白酶产生不同构象的中间体, 表现出“熔球态”模型特征。

关键词: 尿素; 胰蛋白酶; 动态高压微射流; 构象

Effect of Urea on Conformation Changes of Dynamic High-pressure Microfluidization (DHPM)-induced Unfolded Trypsin

LIU Jun-ping, LIU Wei*, ZOU Li-qiang, LIU Cheng-mei, FANG Li-chun, ZHANG Zhao-qin
(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: The conformational changes of native trypsin and DHPM-induced unfolded trypsin during the denaturation by urea have been investigated using the methods of ultraviolet (UV) spectroscopy, fluorescence spectroscopy and circular dichroism spectroscopy. Results indicated that native trypsin showed the most significant changes when the concentration of urea was from 4.0 to 6.0 mol/L. The absorbance at 280 nm decreased from 0.2746 to 0.1824, and the absorption peak showed red shift from 279 to 283 nm; the relative fluorescence intensity decreased from 105.9 to 98.27, and the emission peak showed red shift from 352 to 355 nm. The percentage of β -sheet content decreased from 46.9% to 30.6%. In contrast, the most significant changes were observed in unfolded trypsin when the concentration of urea was from 2.0 to 4.0 mol/L. The UV absorbance decreased from 0.3121 to 0.2159 and the peak showed red shift from 281 to 283 nm; the fluorescence intensity decreased from 108.24 to 99.07 and the emission peak showed red shift from 353 to 360 nm. The percentage of β -sheet content decreased from 40.6% to 38.9%. These findings show that urea has a more significant impact on DHPM-induced unfolded trypsin compared with native trypsin. In the presence of urea at different concentrations, trypsin has different conformations of intermediates that show characteristics of molten globule state.

Key words: urea; trypsin; dynamic high-pressure microfluidization (DHPM); conformation

中图分类号: Q556.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)21-0080-06

胰蛋白酶(EC 3.4.21.4)属于丝氨酸蛋白水解酶类, 普遍存在于动物体的肝胰腺体中, 含有 223 个氨基酸残基, 5 个二硫键, 相对分子质量约为 23800; 活性中心

存在于保守的 His、Asp 和 Ser 活性三联体上^[1]。胰蛋白酶在消化可食性蛋白方面被认为是最重要的酶^[2], 是一种内切酶, 能高度特异地水解精氨酸或赖氨酸羧基参

收稿日期: 2011-06-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(31060209); 国家重点实验室重点青年骨干研究基金项目(SKLF-QN-201101)

作者简介: 刘军平(1985—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品质量与安全。E-mail: ljpf@163.com

*通信作者: 刘伟(1972—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品高新技术与资源综合利用。E-mail: liuwei@ncu.edu.cn

与形成的肽键、酰胺键和酯键；能活化糜蛋白酶原、羧肽酶原、磷脂酶原等其他酶的前体^[3]，因此在食品、生物、医药等领域有着广泛的应用。

近年来，蛋白质折叠问题是研究的前沿，该过程中涉及了蛋白质天然态、过渡态和去折叠态等构象的变化。蛋白质的折叠/去折叠机制十分复杂，此过程中的“二态模型”被大多数科学家所接受^[4]，该模型认为蛋白质的去折叠是从天然态直接到完全去折叠态，属于一个“全或无”的过程。但越来越多的研究表明，该过程中存在着有亚基构成的部分折叠中间体，称之为“熔球态”(molten globule)^[5]，该中间态拥有几乎和天然态蛋白质相似的二级结构，而三级结构则相对要松散些，疏水内核有部分外露，并保有一定的四级结构。目前，蛋白质折叠/去折叠机理的研究主要从其过程的平衡中间态和反应动力学两方面进行。平衡中间态主要是利用紫外吸收光谱法、荧光光谱法、拉曼散射光谱法、圆二色谱法等方法研究其构象变化^[6-9]，而动力学由于其反应的瞬时性，主要是采用毫秒级的快速停留扫描法(stopped-flow spectrophotometry)^[10]。

在某些物理作用(如压力、紫外、超声等)或化学作用(如酸、碱、盐酸胍、尿素等)下，蛋白质的非共价键会发生不同程度的破坏，发生变性反应，变性后的去折叠态与天然态在功能和构象上是不同的。利用某些技术捕捉去折叠过程中中间态的构象变化信息，可以为研究蛋白质折叠/去折叠机理提供可靠的依据。在化学因素下，有报道利用盐酸胍或尿素诱导细胞色素C、NCS-1、牛碳酸苷酶B、 β -内酰胺酶等的变性反应^[11-14]。尿素作为一种常用的变性剂能够激活蛋白质中不同发色团之间发生一定程度的能量传递，使蛋白质处于去折叠态^[15]，一定浓度下的尿素对蛋白的变性作用是可逆的^[16]。

本课题组前期报道了一种物理手段——动态高压微射流(dynamic high-pressure microfluidization, DHPM)处理后天然胰蛋白酶提高了其热稳定性和pH值稳定性，同时DHPM处理导致胰蛋白酶的分子构象部分去折叠，表现在其荧光强度增强、游离巯基含量增加，总巯基含量减少、紫外吸收强度减弱、 α -螺旋含量降低等方面^[17]。本实验在前期DHPM诱导的胰蛋白酶部分去折叠态的基础上，以尿素对去折叠胰蛋白酶进一步研究其折叠/去折叠过程，通过紫外光谱法、荧光光谱法和圆二色谱法表征胰蛋白酶在不同状态下构象变化的影响。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

胰蛋白酶(UI > 2500U/mg) 美国 Amresco 公司；尿素(分析纯) 美国 Sigma 公司；磷酸二氢钠、磷酸氢二钠等均为分析纯。

1.2 仪器与设备

M-110EH30型超高压微射流均质机 美国 Microfluidics 公司；UV-1600PC型紫外-可见分光光度计 上海美谱达仪器有限公司；F-4500型荧光分光光度计 日本 Hitachi 公司；MOS 405型圆二色谱仪 法国 Bio-Logic 公司。

1.3 方法

1.3.1 DHPM 诱导胰蛋白酶的去折叠

参照 Liu 等^[17]的方法，用 50mmol/L 的磷酸盐缓冲液(Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, pH7.4)配制质量浓度为 0.5mg/mL 的胰蛋白酶溶液，采用 M-110EH30 动态高压微射流(DHPM)均质机在 80MPa 下处理 1 次，获得去折叠态胰蛋白酶溶液。

1.3.2 去折叠态胰蛋白酶与尿素的反应

用磷酸盐缓冲液(50mmol/L, pH7.4)配制浓度为 10.0mol/L 的尿素溶液，取适量的去折叠胰蛋白酶溶液和尿素溶液，使胰蛋白酶的最终质量浓度为 0.3mg/mL，尿素溶液的浓度分别为 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0mol/L，在 25℃ 反应 24h 后，进行紫外光谱、荧光光谱和圆二色谱检测。

1.3.3 紫外吸收光谱分析

采用 UV-1600PC 型紫外-可见分光光度计测定与尿素反应前后胰蛋白酶溶液的紫外吸收光谱，扫描的波长范围为 200~400nm。

1.3.4 荧光发射光谱分析

采用 F-4500 型荧光分光光度计测定与尿素反应前后胰蛋白酶的荧光发射光谱，设定激发光波长为 280nm，狭缝宽度为 5nm，扫描 300~450nm 的发射光谱。

1.3.5 圆二色谱(CD)分析

胰蛋白酶的圆二色谱采用 MOS-405 圆二色谱仪测定，设定光径为 1mmol/L，在远紫外区段(190~250nm)扫描 3 次得圆二色谱，谱带宽度 1.0nm。CD 数据用平均残基椭圆度(θ)表示，单位用(deg·cm²)/dmol 表示，利用 DichroWeb 在线软件 Selcon3 计算酶的不同二级结构含量^[18]。

1.3.6 数据统计

采用 Origin 8.5 对实验数据进行处理分析，因素显著性分析采用 ANOVA， $P < 0.05$ 则认为有显著影响。

2 结果与分析

2.1 尿素对去折叠胰蛋白酶构象影响的紫外光谱分析

胰蛋白酶的紫外光谱主要来自于多肽链中苯丙氨酸(Phe)、酪氨酸(Tyr)和色氨酸(Trp)的特征吸收光谱，这些氨基酸苯环含有共轭双键产生 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁而产生紫外吸收，Phe、Tyr 和 Trp 的特征吸收峰分别位于波长 257、275nm 和 280nm 处，大部分蛋白质在波长 280nm 附近有吸收峰。

不同浓度尿素对天然态和 DHPM 诱导去折叠态胰蛋白酶紫外吸收光谱的影响如图 1、2 所示。随着尿素浓度的增加,天然胰蛋白酶吸光度降低,下降幅度最大的是从 4.0mol/L 的 0.2746 降至 6.0mol/L 的 0.1824,其最大吸收峰从 4.0mol/L 时的波长 279nm 红移至 6.0mol/L 时的波长 283nm,当尿素浓度高于 6.0mol/L 时,吸光度变化和红移不再明显(图 1);去折叠胰蛋白酶紫外吸光度也是随尿素浓度增加而降低,但紫外吸光度下降幅度最大的区间是从 2.0mol/L 的 0.3121 下降至 4.0mol/L 的 0.2159,其最大吸收峰是从 2.0mol/L 时的波长 281nm 红移至 4.0mol/L 时的波长 283nm,当尿素浓度高于 4.0mol/L 之后变化不明显(图 2)。相比较而言,在同一尿素浓度下,去折叠胰蛋白酶的吸光度均比天然态的高,而且最大吸收峰发生红移,如尿素浓度为 2.0mol/L 时,去折叠胰蛋白酶吸光度从天然态的 0.3069 升至 0.3121,其最大吸收峰从天然态的波长 278nm 红移至 281nm。

胰蛋白酶的紫外吸收峰红移可能是尿素导致胰蛋白酶的发色基团(Phe、Tyr 和 Trp)从疏水环境中暴露出来所引起的。当尿素浓度在 4.0mol/L 之后,天然胰蛋白酶发色基团的疏水环境变化最显著,而在 6.0mol/L 之后变化程度达到最大,这与 Busti 等^[19]所报道尿素浓度高于 6.0mol/L 时对 β -乳球蛋白的紫外吸光度趋于平缓的现象相一致。而 DHPM 诱导去折叠胰蛋白酶在 2.0mol/L 之后发色团疏水环境就产生显著影响。这说明 DHPM 诱导去折叠胰蛋白酶的发色基团已有一定程度的暴露,而尿素的加入导致这种暴露程度可能进一步加深。

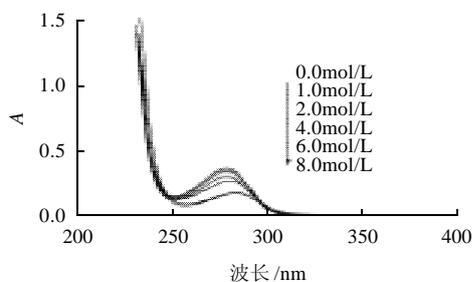


图 1 天然胰蛋白酶在不同尿素浓度条件下的紫外吸收光谱图
Fig.1 UV absorption spectra of native trypsin with various concentrations of urea

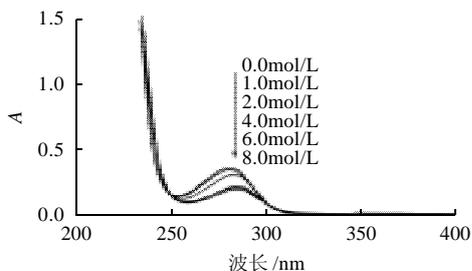


图 2 去折叠胰蛋白酶在不同尿素浓度条件下的紫外吸收光谱图
Fig.2 UV absorption spectra of unfolded trypsin with various concentrations of urea

2.2 尿素对去折叠态胰蛋白酶构象影响的荧光光谱分析
牛胰蛋白酶有 4 个色氨酸残基(Trp51、Trp 141、Trp 215、Trp 237)能够发出内源荧光^[20]。一般而言,蛋白质内的芳香族氨基酸——苯丙氨酸(Phe)、酪氨酸(Tyr)和色氨酸(Trp)残基都能产生荧光,由于在蛋白质构象中所处的侧链环境及结构的不同,Trp 残基荧光强度最大且对微环境变化很敏感而被广泛应用于蛋白质内源荧光的测定和蛋白质构象变化的分析^[21]。在牛胰蛋白酶内半胱氨酸会对色氨酸的荧光产生强烈的淬灭效果,只有与半胱氨酸相对位置比较远的色氨酸残基才表现出很强的荧光发射光谱^[20]。

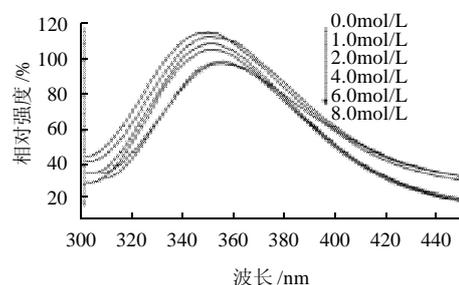


图 3 天然胰蛋白酶在不同尿素浓度条件下的荧光发射光谱图
Fig.3 Intrinsic fluorescence spectra of native trypsin with various concentrations of urea

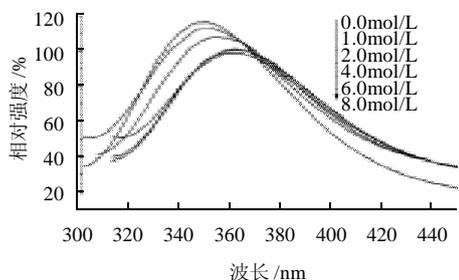


图 4 去折叠胰蛋白酶在不同尿素浓度条件下的荧光发射光谱图
Fig.4 Intrinsic fluorescence spectra of unfolded trypsin with various concentrations of urea

图 3 和图 4 分别表示不同浓度尿素对天然胰蛋白酶和去折叠胰蛋白酶的荧光发射光谱图的影响。随着尿素浓度的增加,天然胰蛋白酶的相对荧光强度下降,最大发射峰红移。在 4.0~6.0mol/L 之间变化最显著,相对荧光强度从 4.0mol/L 时的 105.9 降至 6.0mol/L 时的 98.27,最大发射峰从 4.0mol/L 时的波长 352nm 红移至 6.0mol/L 时的波长 355nm;去折叠胰蛋白酶随着尿素浓度增加相对荧光强度和最大发射峰的变化趋势与天然酶一致,但变化幅度不一样,尿素浓度在 2.0~4.0mol/L 之间变化最显著,相对荧光强度从 2.0mol/L 的 108.24 降至 4.0mol/L 的 99.07,最大发射峰从 2.0mol/L 时的波长 353nm

红移至 4.0mol/L 时的波长 360nm。相比较而言, 在同一个尿素浓度下, 去折叠胰蛋白酶的相对荧光强度增加, 最大发射峰红移。

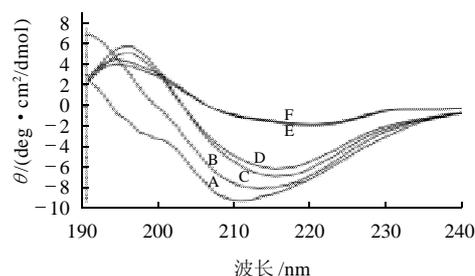
分析原因可能是尿素使胰蛋白酶的芳香族氨基酸残基及其微环境发生了变化, 尤其是 Trp 残基附近的胰蛋白酶构象的变化, 导致胰蛋白酶内源荧光发生了变化, 从而使荧光最大发射峰发生红移, 同时由于更多的芳香族氨基酸残基可能与附近淬灭基团发生了反应导致荧光强度下降^[16,22]。根据 Wei 等^[23]报道尿素对糖蛋白微环境的影响表明: 糖蛋白内源荧光发射峰随着尿素浓度的增加而红移, 当尿素浓度高于 3.0mol/L 时, 糖蛋白的构象发生了明显的变化。在本实验中, 当尿素浓度高于 4.0mol/L 之后, 天然胰蛋白酶微环境变化最显著, 浓度达 6.0mol/L 之后, 胰蛋白酶的微环境没有进一步变化, 而去折叠胰蛋白酶微环境的变化在 4.0mol/L 之后就趋于平缓。根据 Burstein 理论: 荧光发射光谱峰在波长 350~352nm 之间时 Trp 残基完全暴露于极性环境中^[24]。天然胰蛋白酶和去折叠胰蛋白酶的荧光发射峰的最大值均大于 350nm, 因此, 天然胰蛋白酶在尿素浓度为 6.0mol/L 时, Trp 残基已经完全暴露于溶剂中, 而去折叠胰蛋白酶在 4.0mol/L 时, Trp 残基已经完全暴露。

根据 Ruan 等^[25]报道, 通过荧光发射光谱分析, 胰蛋白酶在尿素浓度为 8.0mol/L 时完全变性, 在静压力为 650MPa 时处于部分去折叠状态, 在天然态和完全变性态之间存在中间体——“熔球态”; Fan 等^[26]研究表明二氢叶酸还原酶在 0.5~2.0mol/L 的低尿素浓度下也处于“熔球态”, “熔球态”被认为仍然具有丰富的二级结构和缜密的分子构型, 疏水内核部分暴露, 蛋白质分子内具有明显的柔性^[27]。在本实验中, 天然胰蛋白酶在尿素浓度 0.0~6.0mol/L 之间的荧光强度和最大发射峰是一个渐变的过程, 而高于 6.0mol/L 时几乎恒定不变, 这与上述报道中的荧光发射光谱图的变化趋势相似, 表明在 0.0~6.0mol/L 之间胰蛋白酶存在着中间体。同理, DHPM 诱导去折叠胰蛋白酶在尿素浓度 0.0~4.0 mol/L 之间也存在着中间体, 这种中间体可能就

是“熔球态”。而 DHPM 诱导去折叠胰蛋白酶在尿素浓度为 4.0mol/L 时就发生了最大变化, 其原因可能是经过 DHPM 处理引起了胰蛋白酶微环境的变化, 导致分子的柔性和可运动性增加, 从而加深了尿素对胰蛋白酶的影响程度。

2.3 尿素对去折叠态胰蛋白酶构象影响的圆二色谱分析

圆二色谱(CD)属于旋光色散分析法(ORD), 以光学活性物质的不对称分子平面偏振光的旋光色散为基础。平面圆偏振光通过不对称的光学活性物质时, 左、右圆偏振光产生吸收差, 造成振幅的改变, 在这个方向上的矢量和即成为椭圆偏振光^[28]。在蛋白质中, 能够产生圆二色性的主要有肽键、芳香族氨基酸残基、二硫键, 而蛋白质的一些高级结构(如 α -螺旋、 β -折叠等)也是不对称的, 因此, 蛋白质的圆二色谱是这些作用的总体效果^[29]。蛋白质的圆二色谱分为远紫外区(185~250nm)和近紫外区(250~360nm), 前者主要反映蛋白质的二级结构信息, 而后者主要反映其三级结构中微环境的信息。



A~F.尿素浓度分别为0.0、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0mol/L。图6同。

图5 天然胰蛋白酶在不同尿素浓度条件下的圆二色谱图

Fig.5 Far-UV CD spectra of native trypsin with various concentrations of urea

由图 5 可见, 随着尿素浓度的增大, 天然胰蛋白酶圆二色谱吸收峰的椭圆度(θ)增大, 在 4.0~6.0mol/L 之间变化幅度最大; 而去折叠胰蛋白酶椭圆度(θ)变化最大

表 1 天然态胰蛋白酶和去折叠态胰蛋白酶在不同浓度尿素条件下的二级结构信息

Table 1 Various secondary protein structure contents of native trypsin and unfolded trypsin with various concentrations of urea

尿素浓度/(mol/L)	二级结构含量/%							
	α -螺旋		β -折叠		β -转角		无规卷曲	
	天然态	去折叠态	天然态	去折叠态	天然态	去折叠态	天然态	去折叠态
0.0	16.2 ± 0.7	14.2 ± 0.5	55.6 ± 0.8	51.8 ± 1.9	15.0 ± 0.4	16.3 ± 0.5	13.2 ± 0.3	17.7 ± 0.8
1.0	15.2 ± 0.4	23.5 ± 1.0	50.9 ± 1.6	45.2 ± 0.5	16.3 ± 0.3	11.7 ± 0.4	17.6 ± 0.7	19.6 ± 0.7
2.0	6.6 ± 0.3	22.4 ± 0.8	46.7 ± 2.1	40.6 ± 0.6	19.5 ± 0.9	8.9 ± 0.4	27.2 ± 1.2	28.1 ± 1.0
4.0	13.6 ± 0.6	11.3 ± 0.6	46.9 ± 1.6	38.9 ± 1.0	5.2 ± 0.2	3.1 ± 0.1	34.3 ± 0.8	46.7 ± 1.1
6.0	10.9 ± 0.3	5.9 ± 0.2	30.6 ± 0.7	29.8 ± 1.2	4.4 ± 0.1	4.4 ± 0.2	54.1 ± 1.3	59.9 ± 0.9
8.0	8.4 ± 0.1	8.4 ± 0.3	27.9 ± 1.1	26.8 ± 1.1	6.8 ± 0.3	3.0 ± 0.1	56.9 ± 2.4	61.8 ± 1.3

的幅度是在 2.0~4.0mol/L 之间(图 6)。在同一尿素浓度条件下,去折叠态胰蛋白酶的椭圆度要高于天然酶。这种变化趋势与紫外和荧光的测定结果也相验证。

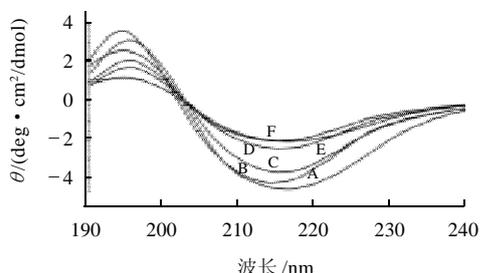


图 6 去折叠胰蛋白酶在不同浓度尿素条件下的圆二色谱图
Fig.6 Far-UV CD spectra of unfolded trypsin with various concentration of urea

由表 1 可知,天然胰蛋白酶的 β - 折叠含量为 55.6%,该结果符合胰蛋白酶属全 β 型蛋白质的特点(β - 折叠含量大于 40%)^[30]。随着尿素浓度的增加, β - 折叠含量下降,天然胰蛋白酶的 β - 折叠含量从 55.6% 降至 27.9%,而去折叠胰蛋白酶从 51.8% 降至 26.8%;同时,其无规卷曲含量逐渐增加,并且增加的幅度很大,天然胰蛋白酶的无规卷曲含量从 13.2% 增至 56.9%,去折叠胰蛋白酶从 17.7% 增至 61.8%;在同一尿素浓度条件下,去折叠胰蛋白酶的无规卷曲含量均高于天然酶。实验测得其 α - 螺旋含量的变化没有明显规律。根据 Simon 等^[31]报道,胰蛋白酶的 β - 折叠随着乙醇体积分数的增加而降低,但在 95% 乙醇条件下反而上升,且 α - 螺旋的变化与 β - 折叠的变化趋势刚好相反。胰蛋白酶的二级结构随着尿素浓度的增加会逐渐发生变化,而荧光发射光谱分析表明微环境也是随着尿素浓度的增加而逐渐变化的,且在天然态与去折叠态之间存在稳定的中间体,因而这些中间体都具有一定的二级结构,这与荧光发射光谱分析的“熔球态”性质相一致。研究表明,“熔球态”的结构范围可能很广泛,从接近天然态高度有序的中间体到去折叠的前熔球态都可以称之为“熔球态”^[25],而且在高浓度尿素(8.0mol/L)条件下,蛋白质的结构更倾向于无序状态^[32]。在 DHPM 处理后,胰蛋白酶的无规卷曲要高于天然酶,说明 DHPM 影响了胰蛋白酶的二级结构,导致其更趋于无序状态,这种状态可能也是一种“熔球态”的中间体,因此,同一尿素浓度条件下,对 DHPM 处理后的胰蛋白酶的影响程度要比天然酶大。在高浓度尿素条件下,天然酶和去折叠胰蛋白酶的无规卷曲含量高达 56.9% 和 61.8%,可能已经达到尿素引起的胰蛋白酶最大无序状态。

3 结 论

3.1 不同浓度的尿素对胰蛋白酶的去折叠效果不同,

这种效果与胰蛋白酶的 DHPM 前处理诱导相关。当尿素浓度为 6.0mol/L 时,天然胰蛋白酶的构象变化达最大幅度,而在 4.0mol/L 时 DHPM 诱导去折叠胰蛋白酶就已经达到这种程度。表明尿素对经 DHPM 处理后处于部分去折叠胰蛋白酶构象的影响更为显著。

3.2 尿素对胰蛋白酶的变性过程是一个渐变过程,符合“熔球态”模型特征。在胰蛋白酶的折叠态与去折叠态过程中存在着稳定的中间体,不同的尿素浓度导致的中间体构象是不同的,这些中间体均属于“熔球态”范畴。“熔球态”胰蛋白酶的芳香族氨基酸从疏水环境中暴露出来,导致胰蛋白酶的紫外吸收光谱和荧光发射光谱的变化。

参 考 文 献:

- [1] KOSSIAKOFF A A, CHAMBERS J L, KAY L M, et al. Structure of bovine trypsinogen at 1.9 Å resolution[J]. *Biochemistry*, 1977, 16(4): 654-664.
- [2] TIDWELL J H, ALLAN G L. Fish as food: aquaculture's contribution . ecological and economic impacts and contributions of fish farming and capture fisheries[J]. *Embo Reports*, 2001, 2(11): 958-963.
- [3] CAO Minjie, OSATOMI K, SUZUKI M, et al. Purification and characterization of two anionic trypsins from the hepatopancreas of carp[J]. *Fisheries Science*, 2000, 66(6): 1172-1179.
- [4] FREIRE E, MURPHY K P. Molecular: basis of cooperativity in protein folding[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1991, 222(3): 687-698.
- [5] PTITSYN O B, PAIN R H, SEMISOTNOV G V, et al. Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding[J]. *Febs Letters*, 1990, 262(1): 20-24.
- [6] FABIAN H, YU Zhiwu, WANG Yanwei, et al. Generalized 2D and time-resolved FTIR studies of protein unfolding events[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2010, 974(1/3): 203-209.
- [7] KAMATARI Y O, KONNO T, KATAOKA M, et al. The methanol-induced globular and expanded denatured states of cytochrome c: a study by CD fluorescence, NMR and small-angle X-ray scattering[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1996, 259(3): 512-523.
- [8] KUZNETSOVA I M, TUOVEROV K K, UVERSKY V N. Use of the phase diagram method to analyze the protein unfolding-refolding reactions: fishing out the“invisible”intermediates[J]. *Journal of Proteome Research*, 2004, 3(3): 485-494.
- [9] KELLY S M, PRICE N C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1997, 1338(2): 161-185.
- [10] PAOLO A D, BALBEUR D, PAUW E D, et al. Rapid collapse into a molten globule is followed by simple two-state kinetics in the folding of lysozyme from bacteriophage lambda[J]. *Biochemistry*, 2010, 49(39): 8646-8657.
- [11] LATYPOV R F, CHENG Hong, RODER N A, et al. Structural characterization of an equilibrium unfolding intermediate in cytochrome c[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2006, 357(3): 1009-1025.
- [12] MURALIDHAR D, JOBBY M K, KRISHNAN K, et al. Equilibrium unfolding of neuronal calcium sensor-1-N-terminal myristoylation influences unfolding and reduces protein stiffening in the presence of calcium [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(16): 15569-15578.
- [13] UVERSKY V N, PTITSYN O B. Further evidence on the equilibrium

- “pre-molten globule state”: four-state guanidinium chloride-induced unfolding of carbonic anhydrase B at low temperature[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1996, 255(1): 215-228.
- [14] UVERSKY V N, PTITSYN O B. Partly folded state, a new equilibrium state of protein molecules-4-state guanidinium chloride-induced unfolding of beta-lactamase at low-temperature[J]. *Biochemistry*, 1994, 33(10): 2782-2791.
- [15] PATRA A K, UDGAONKAR J B. Characterization of the folding and unfolding reactions of single-chain monellin: evidence for multiple intermediates and competing pathways[J]. *Biochemistry*, 2007, 46(42): 11727-11743.
- [16] DEVARAJ K B, KUMAR P R, PRAKASH V. Comparison of activity and conformational changes of ficin during denaturation by urea and guanidine hydrochloride[J]. *Process Biochemistry*, 2011, 46(2): 458-464.
- [17] LIU Wei, ZHANG Zhaoqin, LIU Chengmei, et al. The effect of dynamic high-pressure microfluidization on the activity, stability and conformation of trypsin[J]. *Food Chemistry*, 2010, 123(3): 616-621.
- [18] WHITMORE L, WALLACE B A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(2): 668-673.
- [19] BUSTI P, SCARPECI S, GATTI C A, et al. Binding of alkylsulfonate ligands to bovine beta-lactoglobulin: effects on protein denaturation by urea[J]. *Food Hydrocolloids*, 2005, 19(2): 249-255.
- [20] KOUTSOPOULOS S, PATZSCH K, BOSKER W, et al. Adsorption of trypsin on hydrophilic and hydrophobic surfaces[J]. *Langmuir*, 2007, 23(4): 2000-2006.
- [21] RESHETNYAK Y K, KOSHEVNIK Y, BURSTEIN E A. Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. III. correlation between fluorescence and microenvironment parameters of individual tryptophan residues[J]. *Biophysical Journal*, 2001, 81(3): 1735-1758.
- [22] SOMMERS P B, KRONMAN M J. Comparative fluorescence properties of bovine, goat, human and guinea pig α lactalbumin: characterization of the environments of individual tryptophan residues in partially folded conformers[J]. *Biophysical Chemistry*, 1980, 11(2): 217-232.
- [23] WEI Xiang, WANG Xiaoyun, ZHOU Bo, et al. Effect of urea on activity and conformation of a glycoprotein[J]. *Tsinghua Science and Technology*, 2006, 11(4): 400-407.
- [24] BURSTEIN E A, VEDENKINA N S, IVKOVA M N. Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules[J]. *Photochemistry and Photobiology*, 1973, 18(4): 263-279.
- [25] RUAN Kangcheng, LANGE R, BEC N, et al. A stable partly denatured state of trypsin induced by high hydrostatic pressure[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 239(1): 150-154.
- [26] FAN Yingxin, JU Ming, ZHOU Junmei, et al. Activation of chicken liver dihydrofolate reductase by urea and guanidine hydrochloride is accompanied by conformational change at the active site[J]. *Biochemical Journal*, 1996, 315(1): 97-102.
- [27] PTITSYN O B. Molten globule and protein folding[J]. *Advances in Protein Chemistry*, 1995, 47: 83-229.
- [28] KELLY S M, PRICE N C. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function[J]. *Current Protein and Peptide Science*, 2000, 1(4): 349-384.
- [29] KELLY S M, JESS T J, PRICE N C. How to study proteins by circular dichroism[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1751(2): 119-139.
- [30] MANAVALAN P, JOHNSON W C. Sensitivity of circular-dichroism to protein tertiary structure class[J]. *Nature*, 1983, 305: 831-832.
- [31] SIMON L M, KOTORMAN M, GARAB G, et al. Structure and activity of alpha-chymotrypsin and trypsin in aqueous organic media[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 280(5): 1367-1371.
- [32] SHORTLE D, ACKERMAN M S. Persistence of native-like topology in a denatured protein in 8 M urea[J]. *Science*, 2001, 293: 487-489.