

# 抗冻蛋白抗冻机理研究的进展

刘志东<sup>1</sup>, 马庆保<sup>1,2</sup>, 陈雪忠<sup>1\*</sup><sup>1</sup>中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090; <sup>2</sup>上海海洋大学食品学院, 上海 201306

**摘要:** 抗冻蛋白(AFPs)是一类具有抗冻活性的特殊蛋白质,因其独特的功能特性受到广泛的关注。抗冻机理的研究是 AFPs 研究的关键,本文综述了现有 AFPs 抗冻机制的基本原理,主要的抗冻理论及其优势与不足,抗冻机理研究相关技术的发展,展望了未来的发展方向,期望本文能够加深对 AFPs 抗冻机制的认识,推动 AFPs 抗冻机理的研究。

**关键词:** 抗冻蛋白;抗冻机理;进展

中图分类号: Q514; TS254

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.S.034

## Review on Antifreeze Mechanism of Antifreeze Proteins

LIU Zhi-dong<sup>1</sup>, MA Qing-bao<sup>1,2</sup>, CHEN Xue-zhong<sup>1\*</sup><sup>1</sup>East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;<sup>2</sup>College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

**Abstract:** Antifreeze proteins (AFP) are special proteins with antifreeze activity. Due to its particular function, AFPs are widely focused on. The antifreeze mechanism of AFPs, main antifreeze hypothesizes and their advantages and disadvantages, relative technologies developing direction of AFPs antifreeze mechanism were reviewed in this paper.

**Key words:** antifreeze proteins; antifreeze mechanism; progress

抗冻蛋白(Antifreeze proteins, AFPs),亦称热滞蛋白(Thermal hysteresis proteins, THPs)、冰结合蛋白(Ice binding proteins, IBPs)、冰结构蛋白(Ice structuring proteins, ISPs),是一类可以非依数性地降低体系的冰点、改变冰晶形态、抑制冰晶生长的特殊蛋白质,是生物体抵御低温胁迫所产生的一类物质<sup>[1]</sup>。1969年, DeVries 在南极鱼(*Trematomus borchgrevinki*)的血液中首次发现了 AFPs 的存在<sup>[2]</sup>。目前,已在极区生物、越冬生物、耐寒植物及细菌、真菌、动物等生物体中发现 AFPs 的存在。按照来源的不同, AFPs 可以分为鱼类 AFPs、节肢类 AFPs、昆虫 AFPs、植物 AFPs、微生物 AFPs。AFP 是生物学领域较特殊的一类蛋白,其丰富多样的来源,复杂的结构特征及独特的作用机理给生物学研究提出了一系列非常引人注目又具有挑战性的问题。因其独特的功能特性, AFPs 在食品工业,器官移植,转基因生物等领域具有广泛的应用前景。关于 AFPs 抗冻机

理的研究,伴随着第一个 AFP 的发现就已经开始,并且一直是 AFPs 领域研究的热点问题。由于 AFPs 来源的不同,结构的迥异,虽然 AFPs 抗冻机理研究已经取得了令人振奋的成果,但仍有许多问题有待解决<sup>[3,4]</sup>。本文综述了 AFPs 抗冻机理的发展历程,比较了不同抗冻机理之间的特点,展望了抗冻机理评价研究的发展趋势,期望能够推动 AFPs 抗冻理论的研究。

## 1 AFPs 的抗冻机理

### 1.1 冰晶形成的基本原理

冰晶的形成主要包括两个步骤:成核,即形成稳定的冰晶核(胚);生长,通过冰核的增长实现冰晶的长大。冰晶的成核通常围绕外来分子发生(异质成核),或在绝对纯水情况下,通过分子的固有振动自发成核(同质成核)。当温度在零度范围内通过不同机理波动(如较小冰晶的消失和较大冰晶的长大)时,就会发生冰晶的重结晶现象。AFP 的特性包括降低体系的冷冻温度而不影响融化温度(所谓的热滞活性),改变冰晶形态,抑制冰晶生长(重结晶)<sup>[5]</sup>。研究表明, AFPs 与冰晶结合面的差异会导

收稿日期: 2017-10-27 接受日期: 2018-02-02

基金项目: 国家自然科学基金(31471687); 上海市自然科学基金(13ZR1449900); 上海市科技兴农项目(2015-5-5); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2016HY-ZD0903)

\* 通讯作者 E-mail: zdlui1976@163.com

致冰晶形态的不同,只结合到冰晶棱面的 AFPs 会促使冰晶沿 *c* 轴生长,冰晶呈双锥型或针状等;能同时结合到冰晶棱面和基面的 AFPs 则能促使冰晶沿 *a* 轴生长,冰晶呈盘状等。

目前,关于 AFPs 抗冻机制研究的假说主要有吸附-抑制机制,开尔文效应,扣垫机制, Hall-Lips 机制,氢键结合机制,疏水作用与范德华力机制和包合锚定机制。这些抗冻假说虽然多数属于理论方面的探索,但实验方面的证据也间接证实了部分假说。因此,这些抗冻假说的提出极大地促进了 AFPs 抗冻机理研究的进程。

## 1.2 吸附-抑制机制

1977 年, Raymond 和 DeVries<sup>[6]</sup> 首次提出了 AFPs 的吸附-抑制机制。该机制认为 AFPs 主要吸附在冰晶的部分表面,而非整个表面;以一种类似网状结构的形式存在, AFPs 彼此之间存在一定的间隔。吸附-抑制机制认为 AFPs 会改变冰水界面上局部表面张力,抑制其所覆盖区域的冰晶生长,而其他区域仍然正常生长,引起冰晶表面弯曲。当比表面积的增加超过热力学上有利于冰晶生长自发的点时,或当所吸附的 AFPs 彼此之间的平均间隔等于或小于两倍冰晶冰峰的临界曲率半径时,冰晶的生长就会受到抑制,同时界面能也会降低,冰点下降<sup>[7,9]</sup>。该机制获得了 AFPs 研究人员较广泛的认可,该机制常用于解释 AFPs 的热滞活性,但是该机制没有解释 AFPs 是如何识别特定的冰晶表面以及以何种方式结合到特定冰晶表面,这些问题也是 AFPs 抗冻机理研究的焦点问题。

最初的吸附-抑制机制假设 AFPs 分子吸附在冰阶,阻碍冰阶流动。然而,这种假设只适用于基面,因为在大气压下在水中生长的其他冰面在融点附近是粗糙的。因此,该机制被修改为“枕头上的石头”或“床垫上的按钮”模型, AFPs 分子不可逆地吸附在冰晶表面(即使粗糙),因而,阻碍冰晶的正常生长。然而,基于冰晶生长形状的观察,通常认为中等活性的 AFPs 与冰晶基面之间没有相互作用,而高活性的 AFPs 会被吸附到冰晶基面。这些观点已经通过 AFPs 冰单晶蚀刻实验法或荧光蛋白标记的 AFPs 分子直接观察 AFPs 分子吸附到特定冰晶面而得到证实。

然后,通过测定生长速率和过冷度之间的关系,检验基面的三种生长机制(正常成核,螺旋成核和二维成核)。最后,通过测量不同生长机制凹坑的

数量密度讨论凹坑的形成机制。结果表明,在二维核生长期间凹坑的形成机制与螺旋生长期间的凹坑形成机制相同。在螺旋生长期间凹坑的形成机制中,假设 AFP-III 型分子仅在基面的中等光滑表面上可逆吸附,然后推断 AFPs 分子在隆起的广冰阶上不可逆的吸附,其在分子层次上可以被视为棱面。研究发现,大分子的可逆吸附是非常普遍的,许多中等活性的 AFPs 分子已经被证明可以不可逆的吸附到冰的棱面。然而,在该机制中, AFPs 分子与冰之间是否可逆或不可逆的逆吸附在分子水平的相互作用没有被考虑。凹陷的形成受 AFPs 分子与冰吸附速率的影响,取决于 AFPs 分子与冰表面的相互作用和 AFPs 的浓度。凹陷在相对平滑基面的形成似乎与传统观点相矛盾,即 AFP-III 型分子不能不可逆地吸附在基面上。然而,根据提出的凹坑形成机制,如果仅考虑 AFPs 分子在光滑表面上的可逆吸附,而不假设在平滑表面上的不可逆吸附,则可以解释凹坑的形成。

Knight 和 DeVries (2009) 通过分析在 AFGP 溶液中冰的生长形状,认为热滞活性由 AFPs 阻断从基底平面生长的新形成的冰的能力决定。这种新形成的冰层可以被认为是由于 AFPs 阻碍而产生的二次成核现象。除了吸附到冰表面的分子之外,这种动态方法需要溶液中游离 AFPs 的存在。研究表明,如果冰晶体在基面方向持续生长,而棱面方向受到抑制,就会形成双棱体形状的尖端,并且没有暴露的基面。该机制适用于不吸附到冰晶基面的 AFPs 和 AFGP 分子抗冻机制。在吸附于基面的高活性 AFPs,暴露的敏感平面的观点是不相关的<sup>[10,11]</sup>。

## 1.3 开尔文效应

Kelvin (Gibbs-Thomson) 效应认为能量壁垒的产生是为了使冰晶围绕 AFPs 分子生长而需要增加的局部表面积。如果 AFPs 分子发生过饱和,进而导致二维冰晶冰峰的临界半径小于分子的平均间隔时,能量壁垒就会产生。由于开尔文效应的存在,通过运用开尔文方程,可以推导出水的平衡冰点降低的表达式<sup>[5]</sup>。因此, Kelvin (Gibbs-Thomson) 效应认为 AFPs “结合”到一个或多个冰晶表面,产生冰表面的微曲率,阻碍了冰的进一步生长。Haymet 等认为 AFPs 与冰晶面之间的相互作用被认为是一种受体-配体关系。Wierzbicki 等提出 AFPs 被吸附到冰/水界面,认为受体-配体的相互作用没有考虑两个水相之间的界面<sup>[12]</sup>。

## 1.4 扣垫机制

Knight 等(1991)从物理学的角度发展了吸附-抑制机制,提出 AFPs 抑制了冰锋的增长,而不是 DeVries 提出冰晶生长尽在二维表面,该机制再次描述了基于开尔文效应的最大曲率维持<sup>[13]</sup>。冰锋的生长仅发生在过冷增加和冰-水界面能够克服达到最小曲率能量壁垒时。实际上,冰叶必须长成为冰晶胚胎大小,即超过冰晶生长临界半径阈值以上时,冰晶才会继续生长。因此,扣垫机制将开尔文效应转化为三维而不是二维。

Knight 利用半球实验(冰蚀刻实验)将冰晶形成和热滞特性结合起来。AFP-I 冰晶半球上的斑块表示 AFPs 分子结合到特定冰晶面并阻止冰晶的生长。基于三维视角,产生了钮垫表面,冰叶在这个表面上可能连接在一起或突破 AFPs 的障碍,当他们达到生长的临界点时,他们能够继续生长直到另一层 AFPs 分子能够阻止他们。此外,在扣垫机制中,冰晶生长的粗糙表面被强制简化为粗糙的形式。通过缓慢生长,导致可能形成可描述的粗糙面,并且可以停止生长。

## 1.5 Hall-Lips 机制

Hall-Lips(1999)提出了一种新的机制。该机制与钮垫机制的区别在于,冰晶与 AFPs 分子吸附的持久性。Knight 认为 AFPs 在冰晶表面的吸附是永久的。开尔文效应定义 AFPs 被不可逆的吸附才能阻止晶体的生长。如果它们不能被吸附,将从冰晶表面分离,立刻发生水分子的附着<sup>[14]</sup>。Hall-Lips 认为 AFPs 可逆地吸附到粗糙表面并通过热动力学影响粗糙化转变,使其平滑。因此,当温度从熔点降低时,冰晶面开始产生热滞现象。相反,吸附-抑制机制提出,AFPs 或者锚定在经刻蚀的冰晶表面;或者如扣垫机制,锚定在一个粗糙的表面并使其更加平坦。

在现有的抗冻机制中,普遍认为,AFPs 吸附到冰晶面,他们提高了生长的自由能壁垒到一定程度,此时冰晶的进一步增长(粗糙或平滑)被抑制。Hall-Lips 认为在冰晶表面上覆盖单层 AFPs 分子并在冰-水界面进行分子动力学交换。由于二维表面核的抑制或错位生长,这种平衡减缓了粗糙面的生长,并最终将其转化为平面而抑制其生长。Hall-Lip 机制是基于通过逐步吸附逐渐提高自由能的理念并降低二维表面的成核速率。Hall-Lip 机制的优点在于它推导了滞后-浓度关系的数学预测,这与先前的

吸附-抑制机制相一致。

## 1.6 氢键结合机制

Devries<sup>[15]</sup>等以鱼 AFP-I 为研究对象,指出 AFPs 与冰晶之间的结合力为氢键,AFP-I 是富含丙氨酸的两亲性  $\alpha$  螺旋,亲水的一侧以氢键和冰相结合,氢键是由亲水一侧整齐的排列的苏氨酸羟基以及天冬氨酸羧基等极性基团与冰晶上的氧原子产生。并且此类基团很可能会冻结到冰晶的表面去产生更多的氢键,从而使 AFPs 吸附到冰晶表面<sup>[16,17]</sup>。该机制很好的解释了 AFPs 是依靠何种作用力吸附到冰晶表面的,并且也得到了其他类型 AFPs 的验证。Sicheri 等<sup>[18]</sup>也确定了一种 AFPs-I (HPLC6)的 X-ray 晶体结构(分辨率为 1.5 Å)。结果表明,苏氨酸侧链羟基可以以氢键结合冰上。该机制强调了亲水的氨基酸与冰晶之间产生的氢键是 AFPs 吸附到冰晶上的作用力,并且该机制也得到了计算机模拟实验的支持。

然而,Chao 等<sup>[19]</sup>合成了 AFPs-I 一种亚型(HPLC6)的突变体,该突变体的两个中心苏氨酸残基(Thr13, Thr24)被丝氨酸(侧链基团只有羟基基团)或缬氨酸(侧链基团只有甲基基团)替代。双丝氨酸的突变体失去了所有的活性,而双缬氨酸的突变体保留有 80% ~ 90% 的活性。Haymet 等<sup>[20]</sup>的研究结果表明极性基团对于 AFPs 的抗冻活性可能不是至关重要的,而极性基团是形成氢键的重要来源。但氢键作为一种弱的作用力,要比化学键弱很多,无法保证 AFPs 不可逆的吸附于冰晶表面。这些问题都对氢键结合机制的合理性提出了质疑。

最初的氢键结合机制主要被支持包含疏水作用的机制的人反驳。束缚水在 AFPs 结合冰上释放增加熵值的理论受到了疏水冰结合表面可以组织表面束缚水成为能融冰的类冰(包含物)形式的理论挑战。即使这是一个有吸引力的假说,表面束缚水在冰结合位点的停留时间不能太长,可能只能略超过其他表面。由于研究人员认识到不同 AFPs 特征结构和冰晶面的结合机制很复杂,尽管发现了一些共同的特征和模式。因此,需要发现和描述更多 AFPs 特征结构来阐述其内在的机制<sup>[21]</sup>。

## 1.7 疏水作用与范德华力机制

作为氢键结合机制的替代,范德华力和疏水作用被认为对 AFPs 的结合发挥了重要作用。Baardnes 等<sup>[22]</sup>开展了 AFPs-I 不同蛋白表面突变实验研究,将 Ala17, Ala19, Ala20 和 Ala21 残基用亮氨酸进

行替换。结果表明,当蛋白相对疏水侧的 Ala17 或 Ala21 被替换之后, AFPs 的活性全部失去或损失严重,而亲水侧的两个丙氨酸被替换之后,热滞活性的影响则很小。这表明疏水作用力对于 AFPs 与冰晶结合至关重要,丙氨酸丰富的相对疏水的侧面才是 AFP-I 的结合位点。该机制认为 AFPs 的疏水表面结合到冰晶表面,疏水面上无极性的氨基酸之间有规律的相互间隔,在 AFPs 吸附到冰晶上时,由于其冰晶结合位点是疏水的,导致冰晶结合位点上的水释放到溶液中,增加体系的熵值,并且驱动 AFPs 朝着吸附到冰晶的方向进行<sup>[23-25]</sup>,因此, AFPs 依靠疏水作用或范德华力与冰晶表面相结合<sup>[26,27]</sup>。该机制认为 AFPs 与冰晶之间形成氢键的作用在于抑制冰晶的生长,而不是 AFPs 与冰晶结合的主要作用力。

研究发现 AFP-III 与冰晶结合的位点是相对疏水的,虽然组成其冰晶结合位点的氨基酸已被确定,但是其所吸附的冰晶面却没有确定<sup>[28-34]</sup>。Antson 等<sup>[35]</sup>指出 AFP-III 依靠其相对疏水的冰晶结合面能够吸附到多个冰晶面;根据能量计算, {20-21} 棱面具有最低的结合能,且 Val41 能与冰晶面会形成最佳的范德华相互作用,这也得到了 AFP-III 动力学研究的支持。但是,仅仅依靠疏水作用与范德华力机制还无法合理解释一些问题,特别是 AFPs 与的冰晶特异性。此外, AFPs 的抗冻机制中氢键确实发挥了一定的作用<sup>[36]</sup>。Lal 等(1993)结合蒙特卡洛法和分子动力学方法模拟 AFPs 的结合,生成了真空中冰晶的棱面和基面的模型。预测到  $W_f$ AFP 与锥面和基面的氢键能只有轻微的区别。然而,发现 AFP 与棱面的范德华相互作用的能量明显大于基面。因此,基于高度互补性,提出了“锁-匙”机制来解释为什么  $W_f$ AFP 与棱面结合。Brooke-Taylor 等在 0 °C 的分子动力学模拟发现 AFPs 疏水区域的水往往会形成氢键基团。作者提出  $W_f$ AFP 通过氢键与冰相互作用,而 AFPs 的疏水基团阻止了水分子与冰的进一步结合,阻碍了冰晶的生长。

### 1.8 包含锚定机制

基于 3 种高活性的昆虫 AFPs 的研究发现, AFP 的结构特征虽然差异显著,但是其冰晶结合位点却有着几个共同特征:冰晶结合位点较为平坦,其占蛋白总表面积的比例很大,整体相对疏水但也包含几个潜在的氢键供体或受体。 AFPs 的这些共同特征适用于目前所研究的大多数的 AFPs 冰晶结合位

点,即使不同 AFPs 的冰晶结合位点上亲水和疏水基团差异较大<sup>[37]</sup>。基于此, Garnham 等<sup>[38]</sup>提出了包含锚定机制(anchored clathrate pattern)。认为 IBPs 通过笼型结合水吸附到冰晶表面。这种机制解释了 IBPs/AFP 与特定的冰面(或一组平面)具有特异性,且不能直接接触它们的配体,因为类液层(quasi-liquid layer)充当蛋白表面和冰晶格之间的屏障。在两层中固定水的灵活性可能有助于它们的合并。该机制认为在 AFPs 结合到冰晶过程中,疏水作用与氢键都发挥了重要作用, AFPs 的冰晶结合位点是相对疏水的,但同时也存在着很多潜在的氢键供受体。通过疏水作用, AFPs 与其冰晶结合位点周围束缚水分子形成一种类冰晶水(Ice-like waters),随后通过氢键将其固定到 AFPs 的主链或者邻近侧链上(见图 1)。此类冰晶水与冰晶表面形成的类液层相似,且这两类冰晶液层能够相互融合形成冰晶,并在体系温度低于冰晶融点时将 AFPs 结合于冰晶的表面, AFPs 不可逆的吸附于冰晶的表面。包含锚定机制很好地总结了冰晶结合域水合作用主要特征。

由于冰晶结合位点是相对疏水的一个平面,因此 AFPs 在吸附于冰晶过程中, AFPs 之间存在相互结合在一起的趋势,这阻碍了冰晶结合位点上类冰晶水的观测<sup>[39]</sup>。最近两种 AFPs 晶体结构研究表明 AFPs 的疏水冰晶结合位点存在着普遍类冰晶水合作用,进一步证实了该机制的合理性<sup>[40]</sup>。如在一种南极细菌抗冻蛋白( $Mp$ AFP)中,重复模体 xGT-GND 构成其冰晶结合位点,水分子会围绕着成列苏氨酸上的甲基原子形成类冰晶形式,并依靠氢键固定到羟基侧链及主链上。另一种 AFP-I 的同工型异构体,也能通过包含锚定机制进行解释<sup>[41]</sup>。但研究也发现某些物质如甘油,柠檬酸等对 AFPs 的抗冻活性具有显著的增强效应,该机制对这些现象还无法给出合理的解释<sup>[42]</sup>。

包含锚定机制的另一些证据来自于 X 射线晶体学研究,如果它们的冰晶结合位点暴露于溶剂中, IBPs/AFP 将全部或部分结晶。 $Mp$ AFP 的冰晶结合位点研究显示,它们中的许多会围绕着疏水部分形成笼型结构,如甲基基团的 Thr,而笼中的至少一个“成员”会以氢键结合到邻近的亲水基团上,如肽骨架酰胺或羰基或 Thr 羟基。以这种方式,包含水被瞬时定向和固定成为类冰晶水,并与类液层相匹配。这种机制解释了为何 Thr 是冰晶结合位点上的常见残基。此外, AFPs/IBPs 吸附到冰晶表面的蛋白质-

配体相互作用表明配体是水的结晶固体状态,并且液态水似乎介导相互作用而不模糊其特异性。事实上,AFPs/IBPs 是一种特殊的生物矿化蛋白,当所有生物矿化蛋白在水溶液中以结合固体配体发挥作用时,仅 AFPs/IBPs 既可将水作为溶剂又作为配体(冰)。这种现象的最简单表现是冬季比目鱼 AFP-I (HPLC-6 同种型)与冰的 20~21 平面的结合,导致冰晶形成一种长宽比为 3.3:1 的对称的 12 边的六角双锥体晶体形状<sup>[43]</sup>。

## 2 AFPs 抗冻机理相关技术的研究进展

AFPs 抗冻机理的研究同时也伴随着相关技术的发展而发展。Knight<sup>[13,44,45]</sup> 等采用冰蚀刻技术(ice-etching technique)研究 AFPs 吸附的冰晶面。目前,该技术是确定冰晶吸附面的唯一可靠的方式。Garnham 等<sup>[46-48]</sup> 通过对 AFPs 添加荧光标记,能够更加直观,简便和有效的确定不同种类 AFPs 吸附的冰晶面和冰晶结合位点。定点突变技术(Site-directed mutagenesis)<sup>[22]</sup> 和核磁共振(Solid-state NMR)技术<sup>[29]</sup> 在研究 AFPs 的冰晶结合位点方面发挥了积极作用。振动频率和代光谱学也用于研究蛋白质表面的水的结构。Yeh&Feeney 采用该技术测量蛋白质在冰上的蓄积。研究发现,即使在室温下也能得到 AFP-III 表面上的冰信号。利用来自 *Dendroica canadensis* 的高活性抗冻蛋白(DcAFP)重复这些实验(DcAFP)是 TmAFP 的同源物能够观察到高度有序的苏氨酸,但是保持水的状态没有成冰的迹象。采用太赫兹吸收光谱法研究了 AFGP, AFP-I 和昆虫 hypAFP 的冰结合位点可以从蛋白表面延迟高达 20Å 的氢键动力学,这是预期的几倍。虽然该延迟可以被解释为替代机制,可以从 AFP 抑制水的冻结能力方面解释热滞活性,但是它也可以被认为是长期在冰结合表面固定水层的结果,类似于冰使周围的水流入类液层这种方式<sup>[43]</sup>。

虽然随着晶体学,分子动力学,微热力学等学科的不断深入,针对 AFPs 抗冻机理的研究不断深入,但依然存在很多问题有待解决<sup>[49]</sup>。因此,AFPs 的确切抗冻机理仍未阐明。AFPs 结合到冰晶基面能够表现出更高的抗冻活性,但为何大多数的天然 AFPs 却选择吸附于冰晶的棱面;AFP-III 的突变实验发现一些突变体具有冰晶修饰能力但却没有表现出热滞活性;植物 AFPs 相比于其他来源 AFPs,分子

量更大结构更复杂,虽然其热滞活性较低,但冰晶重结晶抑制活性却很高,其内在的抗冻机制还有待进一步探索。上述问题的解决,只有通过研究 AFPs 的抗冻机理,深入了解 AFPs 起源以及演化进程,才能做出科学的阐释。

## 3 结论

本文综述了 AFPs 抗冻机理研究的进展。AFPs 复杂的抗冻机制,一方面给相关研究者对抗冻机理的探索带来挑战;另一方面也推动 AFPs 研究在深入认识微观机理的基础上,进入新的阶段。伴随着相关学科的发展及微观层面实验技术和研究方法的深入,AFPs 抗冻机理研究的技术手段也发生了深刻变化:从对特定状态和结果的描述转向过程建模、过程模拟和过程可视化;从概化的粗略模拟转向细化的精细仿真,并借助高性能计算机及分子动力学的进步而发展。针对 AFPs 作用全过程的模拟分析和特性捕捉,已经成为理解和认识 AFPs 抗冻机理的关键所在。因此,未来 AFPs 抗冻机理研究的重点主要是基于不同来源 AFPs 的相似现象/特性,将不同的抗冻假说抽象化和公理化,再通过统一的方法加以处理,获得一般性的结论。因此,关于 AFPs 抗冻机理的研究对于物理低温生物学基础科学问题认识的丰富和发展,AFPs 应用的发展都具有重要的理论及实际意义。

### 参考文献

- 1 Clarke CJ, et al. Ice structuring proteins-a new name for antifreeze proteins[J]. *Cryoletters*, 2002, 23: 89-92.
- 2 DeVries AL, et al. Freezing resistance in some Antarctic fishes[J]. *Science*, 1969, 163: 1073-1075.
- 3 Li WK (李文轲), et al. Present properties, mechanism and prediction of antifreeze proteins[J]. *Sci Bull (生命科学)*, 2012, 24: 1089-1097.
- 4 Ustun NS, et al. Antifreeze Proteins: Characteristics, function, mechanism of action, sources and application to foods [J]. *J Food Process Pres*, 2015, 39: 3189-3197.
- 5 Yang C, et al. The mechanism of the type III antifreeze protein action; a computational study[J]. *Biophys Chem*, 2004, 109: 137-148.
- 6 Raymond JA, et al. Adsorption inhibition as a mechanism of freezing resistance in polar fishes[J]. *PNAS*, 1977, 74: 2589-93.
- 7 Knight CA. Structural biology. Adding to the antifreeze agen-

- da[J]. *Nature*,2006,406:249-251.
- 8 Kutschan B, *et al.* Dynamical mechanism of antifreeze proteins to prevent ice growth[J]. *Physical Review E Statistical Nonlinear & Soft*,2014,90:022711.
- 9 Drori RDP, *et al.* Experimental correlation between thermal hysteresis activity and the distance between antifreeze proteins on an ice surface [J]. *Rsc Advances*, 2015, 5: 7848-7853.
- 10 Takaaki I, *et al.* Pit Formation on the basal plane of ice in antifreeze protein type III solution for different growth mechanisms of ice[J]. *Cryst. Growth Des*,2016,16:3587-3595.
- 11 Wang SY (汪少芸), *et al.* Research progress in antifreeze mechanism and genetic engineering of antifreeze protein[J]. *J Beijing Tech & Biz Univ: Nat Sci* (北京工商大学学报: 自科版), 2012, 30: 58-63.
- 12 Wierzbicki A, *et al.* Antifreeze proteins at the ice/water interface: Three calculated discriminating properties for orientation of type I proteins[J]. *Biophys J*,2007,93:1442-1451.
- 13 Knight CA, *et al.* Adsorption of alpha-helical antifreeze peptides on specific ice crystal surface planes [J]. *Biophys J*, 1991, 59: 409-418.
- 14 Todde G, *et al.* Influence of antifreeze proteins on the ice/water interface[J]. *J Phys Chem B*,2015,119:3407-3413.
- 15 Devries AL, *et al.* Structure of a peptide antifreeze and mechanism of adsorption to ice[J]. *BBA*,1977,495:388-392.
- 16 Jorov AL, *et al.* Theoretical study of interaction of winter flounder antifreeze protein with ice [J]. *Protein Science*, 2004, 13: 1524-1537.
- 17 Buckley SL, *et al.* Antifreeze proteins: Their structure, binding and use[J]. *Mod Biopoly Sci*,2009:93-128.
- 18 DeVries AL. Antifreeze peptides and glycopeptides in cold-water fishes[J]. *Annual Review of Physiology*,1983,45:245-260.
- 19 Sicheri F, *et al.* Ice-binding structure and mechanism of an antifreeze protein from winter flounder [J]. *Nature*, 1995, 375: 427-431.
- 20 Chao H, *et al.* A diminished role for hydrogen bonds in antifreeze protein binding to ice [J]. *Biochemistry*, 1997, 36: 14652-14660.
- 21 Haymet AD, *et al.* Valine substituted winter flounder antifreeze: preservation of ice growth hysteresis [J]. *FEBS Lett*, 1998, 430: 301-306.
- 22 Lin FH, *et al.* The Thr-and Ala-rich hyperactive antifreeze protein from inchworm folds as a flat silk-like  $\beta$ -Helix [J]. *Biochemistry*,2011,50:4467-4478.
- 23 Baardsnes J, *et al.* New ice-binding face for type I antifreeze protein [J]. *FEBS Lett*,1999,463:87-91.
- 24 Harding MM, *et al.* Type I antifreeze proteins. Structure activity studies and mechanisms of ice growth inhibition [J]. *European Journal of Biochemistry*,1999,264:653-665.
- 25 Jia ZC, *et al.* Antifreeze proteins: An unusual receptor-ligand interaction [J]. *Trends in Biochem Sci*,2002,27:101-106.
- 26 26 Garnham CP, *et al.* A  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent bacterial antifreeze protein domain has a novel beta-helical ice-binding fold [J]. *Biochem J*,2008,411:171-180
- 27 Yang DS, *et al.* Identification of the ice-binding surface on type III antifreeze protein with a 'flatness function' algorithm [J]. *Biophysical Journal*,1998,74:2142-2151.
- 28 Yao J (姚佳), *et al.* Research on the progress of antifreeze protein and its antifreeze mechanism [J]. *Sichuan Anim & Vet Sci* (四川畜牧兽医),2013,4:30-32.
- 29 Siemer AB, *et al.* Solid-state NMR on a type III antifreeze protein in the presence of ice [J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 17394-17399.
- 30 Siemer AB, *et al.* Protein-ice interaction of an antifreeze protein observed with solid-state NMR [J]. *PNAS*, 2010, 107: 17580-17585.
- 31 Sonnichsen FD, *et al.* The nonhelical structure of antifreeze protein type III [J]. *Science*,1993,259:1154-1157.
- 32 Sonnichsen FD, *et al.* Refined solution structure of type III antifreeze protein: hydrophobic groups may be involved in the energetics of the protein-ice interaction [J]. *Structure*, 1996, 4: 1325-1337.
- 33 De Luca CI, *et al.* Effect of type III antifreeze protein dilution and mutation on the growth inhibition of ice [J]. *Biophys. J*, 1996, 71: 2346-2355.
- 34 Graether SP, *et al.* Quantitative and qualitative analysis of type III antifreeze protein structure and function [J]. *J Biol Chem*,1999,274:11842-11847.
- 35 Baardsnes J, *et al.* Contribution of hydrophobic residues to ice binding by fish type III antifreeze protein [J]. *BBA*, 2002, 1601: 49-54.
- 36 Antson AA, *et al.* Understanding the mechanism of ice binding by type III antifreeze proteins [J]. *J Mol Biol*,2001,305:875-889.
- 37 Davies PL, *et al.* Structure and function of antifreeze proteins [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society London Series B*,2002,357:927-935.
- 38 Banerjee R, *et al.* Distinct molecular features facilitating ice-binding mechanisms in hyperactive antifreeze proteins closely related to an Antarctic sea ice bacterium [J]. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamic*,2014,33:1.
- 39 Garnham CP, *et al.* Anchored clathrate waters bind antifreeze proteins to ice [J]. *PNAS*,2011,108:7363-7367.