

抗冻蛋白的特性、来源及其应用研究进展

Advances in study of properties, resources and potential uses of antifreeze proteins

胡小颖, 沈继红

(国家海洋局 第一海洋研究所, 山东 青岛 266061)

中图分类号: Q51

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)03-0077-06

20 世纪 70 年代以来, 世界上很多实验室陆续从低温生长的生物中分离纯化出一种特殊的蛋白质——抗冻蛋白(AFP), 其能抑制冰晶生长, 以非依数形式降低溶液的冰点, 但对熔点影响甚微, 将这种水溶液的熔点和冰点之间出现的差值称为热滞活性(thermal hysteresis activity, THA)。由于这些生物一般生活在亚极带或南北两极等低温自然环境以及冰箱、冷柜等人为低温环境中, 其经过长期的适应进化, 有着适应低温环境的特殊结构, 而其产生的这种特殊蛋白质也有着特殊的生理活性和结构特征。目前从鱼类、昆虫、植物中均分离纯化出具有不同热滞活性的抗冻蛋白, 特别是近几年, 在《Nature》、《Science》和其他一些权威刊物上经常报道抗冻蛋白方面的最新研究进展。作者就近年来在抗冻蛋白的特性, 主要是热滞活性、季节性、热稳定性和分子结构多样性, 来源及其潜在应用价值方面进行简要的概述。

1 抗冻蛋白的特性

1.1 抗冻蛋白的热滞活性

抗冻蛋白是低温生物为适应极端寒冷环境而产生的一类多肽或糖肽。最早发现于动物中, 尤其是海洋硬骨鱼(Righteye flounders, Sculpins, Longhorn sculpin)^[1]和陆地节肢动物; 近来又有报道在 6 种冬季生长的被子植物(*Dicentra cucularia*、*Daucus carota*、*Hemerocallis fulva*、*Populus deltoides*、*Quercus alba*、*Triticum aestivum*)、非被子植物如常绿圣诞树(*Polystichum acrostichoides*)、马尾(*Equisetum hymenale*)、石松(*Lycopodium dendroideum*)、银杏树(*Gynko biloba*)、3 种苔藓(*Mnium cuspidatum*、*Polytrichum ohioense*、*Brachythecium salcbrosum*)、真菌如冬菇(*Flammulina velupites*)、牡蛎菇(*Pleurotus ostreatus*)、两种多孔菌(*Coriolus versicolor*、*Stereum* sp.)、两种在 3 培养的细菌(*Rhodococcus erythropolis*、*Micrococcus cryophilus*)

中都有发现^[2], 同时在南极细菌中也发现了具有抗冻活性的成分^[3], 而在桃树(*Prunus persica*)皮中也显示有抗冻活性的成分存在^[4]。

有报道称抗冻蛋白在动物肝脏中合成, 首先合成分泌性蛋白质前体, 经降解生成抗冻蛋白, 而后分泌到体液中。不过近来发现 AFP 同工型在上皮组织(皮肤鳞片、鳍、腮)中产生, 可能是抵御寒冷的第一道防线。抗冻糖蛋白(antifreezing glycoprotein, AFGP)在肝中合成后分布到鱼体全身组织间隙液中。在体质量 40~60 kg 的 *Dissostichus mawsoni* 中研究抗冻糖蛋白的分布, 发现在腹水、心包被和硬脑膜外液中均含有 8 种抗冻糖蛋白, 其合成不受环境因素影响^[5]。

对于 AFP 的抗冻机制还没达成一致认识, 特别是几种不同类型抗冻蛋白结构的多样性, 使这个问题更加复杂^[6]。

不过一般认为抗冻蛋白吸附于微小冰晶的表面, 在分子水平上抑制冰晶的形成, 从而降低生物体液的冰点, 使其冰点低于熔点, 这种特性称为热滞活性。而且一般来说, 热滞活性程度取决于 AFP 的活性和浓度^[7,8]。Li 等^[9]对冬比目鱼(Winter flounder)在大肠杆菌(*Escheichia coli*)中表达的研究, 也显示了此类蛋白普遍具有的 3 个特性: 抗冻活性、非依数降低冰点和热滞活性。

现有研究显示抗冻蛋白热滞活性的种属差异性很大: 昆虫 AFP 的热滞活性最高, 高达 6 ; 鱼类其次, 多在 0.6~1.5 之间; 植物最低, 一般为 0.2~0.4^[10-12]。Steffen 等^[13]曾报道昆虫的最高热滞活性是鱼类的 3~4 倍, 同时在微摩尔级浓度其活性

收稿日期: 2005-05-09; 修回日期: 2005-10-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40306027)

作者简介: 胡小颖(1980-), 女, 天津蓟县人, 学士, 主要从事海洋生物学研究, 电话: 0532-88967422, E-mail: hxy6688@eyou.com

更高,是平常的 10~100 倍。

Graham 等^[14]从黄粉虫 (*Tenebrio molitor*) 中分离到一种蛋白,其抗冻活性是鱼类的 100 倍,富含苏氨酸、半胱氨酸,相对分子质量为 8 400,主要由 12 个氨基酸的重复序列组成。Tyshenko 等^[15]从云杉青虫 (*Choristoneura fumiferana*) 中发现富含苏氨酸及半胱氨酸的 9 ku 抗冻蛋白,对冰晶形态具有显著的作用,同时活性是已知鱼类抗冻蛋白的 10~30 倍。Li 等^[9]从大肠杆菌中表达的冬比目鱼中分离到 2 个抗冻蛋白,在 1.5 mmol/L 时热滞活性分别为 0.67 ± 0.03 和 0.94 ± 0.02 。而 Marshall 等^[16]从北半球常见的美洲鳔 (*Pleuronectes americanus*) 中发现一罕见抗冻蛋白,其活性和昆虫的一样高。

同时抗冻活性可受外界物质的影响,越冬昆虫 *Dendrodes canadensis* 幼虫的 AFP 可因添加低分子质量溶质而增强热滞活性。其中效果最强的为柠檬酸,提高热滞活性近 6 倍;其次是琥珀酸、苹果酸、天冬氨酸、谷氨酸和硫酸铵,提高热滞活性约 4 倍^[17]。

1.2 抗冻蛋白的产生具有季节性

以热滞活性为衡量抗冻蛋白活性的指标,众多的研究表明抗冻蛋白的产生具有明显的季节性。如 Slaughter 等^[18]对海渡鸦 (*Hemipterus americanus*) 抗冻蛋白的研究揭示了这种季节性。作者分别在 10 月、11 月、12 月、1 月 4 个不同的月份进行采样,结果发现每毫升血清中抗冻蛋白的量由 10 月初的 0.02 mg 上升到了 10 月中旬的 0.1 mg,到 11 月中旬时已为 1.9 mg,到 12 月末时为 3.3 mg,而到 1 月末时为 5.0 mg。而冰点降低值也相应地发生了明显的变化,表现为由 10 月初的 -0.60,到 11 月中旬的 -0.90,到 1 月末时为 -1.21,显示了明显的季节性。但从南极 *Trematomus borchgrevinki* 血清中分离到的 8 个大小不同的抗冻糖蛋白 (2.6~33 ku),其蛋白水平不随季节而变化,这可能与当地海水全年处于结冰状态有关^[18]。

Patterson 等^[19]发现,在相对湿度较低的环境中培育的伪步行虫 (*Tenebrio molito*) 幼虫,能够在血淋巴中产生高浓度的 AFP,同时这类幼虫能更好地适应低湿度环境。Duman 等^[20]发现赤翅甲虫 (*Dendroides canadensis*) 抗冻蛋白的季节性更明显,其活性在早秋时增加,仲冬达到高峰,然后开始下降;夏季也有较低水平的热滞活性 (1 或更小),从夏季到冬季其 AFP 和 mRNA 量成倍地增加,最高可达 1 000 倍。黄盖鳔血清中 AFP 水平受季节影响

更大,仲冬高达 10 g/L,晚夏降低 3 个数量级,另外还受环境温度、光周期和内分泌腺的影响。

1980 年 Davies^[21~23]从美洲黄盖鳔 (*Pseudopleuronectes americanus*) 中发现由 8 种氨基酸组成的抗冻多肽,仅仅甘氨酸就占全部氨基酸的 60%。同时和南极其他鱼类全年都有抗冻糖蛋白产生不同,黄盖鳔的抗冻蛋白具有季节性,冬季丰富(血清中达到了 10~20 mg/L),而夏季没有抗冻蛋白存在。Doucet 等^[24]发现云杉青虫两种抗冻蛋白的转录物在冬季达到高峰,而另一种蛋白的转录物只在云杉青虫生长中期才检测到,作者揭示这种蛋白家族的转录主要受生长的调节,而不是随季节变化。

1.3 抗冻蛋白的热稳定性

与一般蛋白质不同,抗冻蛋白具有很好的热稳定性。2000 年 Sidebottom 等^[25]从常年生越冬黑麦草 (*Olium perenne*) 中发现能耐受 100 高温的抗冻蛋白,不过其活性比从南极鱼类和昆虫中发现的抗冻活性低,但也能很好地抑制冰晶重结晶。同年 Steffen 等^[13]发现云杉青虫抗冻蛋白也具有极大的热稳定性潜力。

有研究者从蛋白结构上对这种热稳定性进行了分析。例如 Duman 等^[26]从 *D. canadensis* 幼虫血淋巴中分离出 2 种能耐受 100 高温的 AFP-1 和 AFP-2,分子质量约 8.7 ku,由 83 和 84 个氨基酸残基组成的 7 个含 12~13 个氨基酸残基的重复单元: -C-T-X₃-S-X₅-C-X₈-X₉-A-X₁₁-T-X₁₃-,每 6 个残基中有一个半胱氨酸。通过测定半胱氨酸残基发现 16 个半胱氨酸残基形成 8 对二硫键,7 对二硫键位于重复单元内,一对位于重复单元之间,可能正是这些二硫键的作用使 AFP-1、AFP-2 结构稳定,能耐受 100 的高温^[27]。2003 年 Pudney 等^[28]从多年生草 *Lolium perenne* 中发现了这种冷诱导、耐高温的蛋白,其热滞活性也较低。同时冰结合行为同任何鱼或昆虫蛋白都不同,进一步实验发现具有一特殊的 β -折叠二级结构。

1.4 抗冻蛋白的分子和结构多样性

抗冻蛋白的显著特征是分子和结构多样性^[1],目前发现的能合成抗冻蛋白的每种鱼都能合成多种抗冻成分。根据发现的时间顺序,鱼类 AFP 分为 α 、 β 、 γ 型: α 型 AFP 是从比目鱼和与其没有亲源关系的杜父鱼 (Sculpins) 中发现的,是 3~4 个小肽的聚合物,这些小肽分别由 11 个氨基酸组成,呈 TxxD/Nxxxxxxx 结构,其中 x 可以是任何氨基酸,但以甘氨酸为主; β 型 AFP 是从几种亲源关系较远的鱼类美绒杜父鱼 (*Hemipterus americanus*)

(Gmelin)、胡瓜鱼 (*Osmerus eprlanus mordax* (Mictchill)) 以及太平洋鲱鱼 (*Clupea pallasii*) 中分离的,是富含胱氨酸的球蛋白,与钙依赖型的 C 型凝集素的碳水化合物识别区同源; 型 AFP 是从绵鲱 (*Zoarces elongatus* Kner) 和狼鱼中分离的带有短的链的小型球蛋白; 型抗冻蛋白是从多刺床杜父鱼 (*Myoxocephalus octodecemspinus* (Mitchill)) 中分离到的,其分子质量为 12.3 ku,与可替换的脱辅基蛋白家族的成员有 20% 的序列同源。4 种抗冻蛋白立体结构表面有大量的亲水和疏水基团,这些基团能分别与冰晶结合或者能阻止水分子靠近冰晶,从而抑制冰晶生长。抗冻糖蛋白 (AFGP) 在南极鱼类 (*Antarctic nothothenioids*) 以及南北极鳕鱼 (*Arctogadus glacialis*) 中都有发现,是一族由三肽重复单元甘氨酸-甘氨酸-苏氨酸构成的聚合物,其中苏氨酸与一个二糖单位即葡萄糖-N-乙酰半乳糖胺相连接,糖基是抗冻活性的主要基团,亲水基团能与水形成氢键阻止冰晶形成,化学修饰糖基(乙酰化和过氧化)后能导致抗冻活性丧失。硼酸钠可与处于顺式构象的相邻羟基结合,用 0.15 mol/L 硼酸钠处理 AFGP 溶液,热滞活性丧失,这说明二糖结构中顺式构象的相邻羟基对热滞活性至关重要^[29-31]。

从北半球鳕科鱼中都发现了 AFGP,且分离出分子质量从 337 ku 到 2.6 ku 的 AFGP1~8。对冬鲱 AFPI 的研究较为深入,冬鲱 AFPI 是 3~5 ku 的较小多肽。最初报道 AFPI 经离子交换分离出 3 种组分,后经反相 HPLC 至少分离出 7 个组分,但主要组分 A、B 各占 AFPI 的 55% 和 35%,二者均由 37 个氨基酸组成,且只差一个氨基酸。但在二级结构上,组分 A 中赖氨酸 18—甘氨酸 22 之间能形成盐键^[51]。

Evans 等^[32] 从南极狮子鱼 (*Liparis atlanticus*) 和微暗狮子鱼 (*Liparis gibbus*) 血浆中发现一种奇特的 AFPI,比报道过的 AFPI 都大;而从狮子鱼皮肤组织中分离纯化的 AFPI 能产生约 0.7 kb 的 mRNA,在其他组织包括肝中都没发现;同时发现血浆、上皮组织中 AFP 都是皮肤组织 mRNA 表达的产物。另外还发现狮子鱼皮肤组织的 AFP 与短角杜父鱼 (*Shorthorn sculpin*) 皮肤组织 AFP 相似,不过热滞活性比冬杜父鱼的热滞活性要低^[1]。Graether 等^[33] 在 30 和 5 对云杉青虫抗冻蛋白进行 1H-15N 核磁共振动力学分析,结果显示在 5 时抗冻蛋白更加结构化,这也证实了随着温度的降低,抗冻蛋白结构更加刚性。

硬骨鱼产生 AFP 的多样性是基因进化的很好例子,这也证实抗冻蛋白显著的多样性和看来偶然的系统分布是为应对几百万年前两极的冰河作用而

发生了进化,使不同地区所得 AFP 基因的表达明显不同。目前广泛研究的冬比目鱼,其抗冻表达受生长激素的控制有着固定的循环周期,而垂体释放生长激素又随着季节变化不同^[61]。

2 抗冻蛋白的来源

抗冻蛋白潜在的应用价值,使对它的研究越来越受到重视,而其来源概括起来主要有以下几点。

2.1 自然条件下采集

Slaughter 等^[18] 研究海渡鸦抗冻蛋白时,海渡鸦采自纽芬兰的 Witless Bay,然后养在具有季节变化的海水中,一段时间后从相同培养条件下的鱼体中采集不同季节下海渡鸦的血清样品,魏令波等^[34,35] 研究沙冬青 (*Ammopiptanthus monogolicus*) 抗冻蛋白时,其 150 g 样品是 1994 年冬季采自内蒙古自治区乌海市郊;Wilkins 等^[35,36] 研究南极海绵 (*Homaxinella balfourensis*) 时,其 450 g 样品是 1993 年 11 月采自南极 McMurdo 海峡。

将采集回来的样品立刻进行处理,避免因温度变化而导致蛋白活性的改变。一般先破碎细胞,根据不同的样品选取不同的破碎方法,如匀浆、液氮研磨、超声破碎、酶融等;之后离心,上清液作下步柱层析用,可经几次柱层析;然后测定组分的热滞活性,可用显微镜观察法、渗透压法、差式扫描量热法^[10,37,38],以此判断抗冻蛋白的存在及其活性大小;可在此基础上进行结构和分子生物学研究,一般用圆二色谱法测定结构。

作者以 2001 年第 18 次南极科学考察时从南极海水和浮冰中采集分离出来的南极冰藻 (*Chlorophyceae* L-4) 为研究对象,在约 4 的冰柜中大规模培养,离心收集藻体,进行冰藻抗冻蛋白的分离纯化工作,也初步取得了一些结果。

2.2 低温选育^[39]

有些样品限于低温自然环境采集的局限性,常将从低温环境中采集的样品分离、培养、纯化得样种。然后给予适当条件在人为低温环境中大规模培养,待收集一定样品量时进行实验研究。

Smallwood 等^[40] 在研究胡萝卜 (*Daucus carota*) 时,首先在温室下培养 12 周,然后转移到 4 的冷室或可控温室(白天 8 h 设置 6,夜晚 16 h 设置 2) 培养。Hon 等^[41] 研究雪霉病诱导的冬黑麦 (*Secale cereale*) 非原质体蛋白缺乏抗冻活性时,也是将 20 / 16 (白天/黑夜) 培养 16 h 的冬黑麦转到室温 5 / 2 培养来进行生理生化特性研究。

2.3 低温或脱落酸(ABA)诱导

许多研究揭示了 ABA 可代替低温诱导抗寒植物抗寒力的产生,提高抗寒力,并认为 ABA 可诱导抗寒基因表达及蛋白质的合成,但这种蛋白质的作用多数还不清楚。

Robertson 等^[42,43]曾用 ABA 从苜蓿(*Medicago sativa*)及雀麦(*Bromus inermis* Leyss cv Manchar)悬浮细胞中诱导出细胞分泌蛋白,但作者没有进一步证实这种蛋白是否有抗冻活性。卢存福等^[44]用 ABA 低温诱导唐古特红景天(*Rhodiola algida* var *tangutica*),也发现 ABA 可有效地诱导其悬浮细胞使其抗冻能力提高,使细胞分泌蛋白发生变化,同时作者证实了这些蛋白为糖蛋白,具有 AFP 活性。

尽管许多冷调控的基因能在寒冷、干旱或 ABA 诱导下表达,但 Yu 等^[2,45]研究冬黑麦(*Secale cereale*)发现 ABA 并不能诱导冬黑麦 AFP 的产生。但用乙烯处理 120 h 后其非原质体有高水平的抗冻活性;同时用乙烯利(一种植物生长调节剂)或乙烯前体氨基环丙烷羧酸酯(ACC)分别处理 168、144 h 后,当非原质体蛋白浓度达到高峰时,都显示有相当水平的抗冻活性^[45]。

而 2002 年陈玉珍等^[46]低温诱导水母雪莲(*Saussurea meduasa* Maxim)的悬浮细胞,发现也能增强抗冻能力,但作者也没证实是否为抗冻蛋白。

3 抗冻蛋白的应用研究

3.1 抗冻蛋白在细胞低温保存中的应用

王君晖等^[47]对抗冻蛋白在细胞低温和超低温保存中的作用做了研究,发现当 AFP 质量浓度为 1~4 g/L 时,利于多种样品低温保存;当 AFP 质量浓度为 0.01~0.06 g/L,利于克服重冰晶;当 AFP 质量浓度为 20~40 g/L 时,利于一些蛋白玻璃化法储存。Wang 等^[48]对胡萝卜抗冻蛋白自身低温保存中的稳定性进行研究,揭示抗冻蛋白活性在贮存过程中急剧下降。在 -80 或 -196 保存 10~20 周后活性达到初始活性的一半,而 40 周后仅有初始活性的 2%~3%,这表明胡萝卜抗冻蛋白对于组织低温贮藏没有效果。

3.2 抗冻蛋白对动植物的低温保护作用

通过基因工程可以将抗冻蛋白的基因转入到原来没有抗冻蛋白的动植物体内,使其产生抗冻蛋白,提高动植物抗冻耐寒能力,实现不同地区动植物的转移培养。

李晶等^[49]通过将抗冻蛋白的基因转移到热带罗非鱼(*Oreochromis massambicus*)中,发现转基因鱼

对低温有一定的抵抗能力,这在北方自然水域中培育罗非鱼提供了可能性。由于鱼类 AFP 及植物类似 AFP 基因克隆成功,有望在今后数年内将植物内源 AFP 基因克隆成功。植物内源 AFP 基因更适合在植物体内表达,由此产生的转基因植物可能会表现出更明显的抗寒性^[48]。

但 Kenward 等^[50]将 AFP 基因转移到西红柿中,并没有发现对初秋霜降的抵抗力和野生植株有何不同。而 Worrall 等^[51]将胡萝卜抗冻蛋白基因转移到西红柿中表达,却导致了在温室生长的植株非原质体抗冻活性的积累。

3.3 抗冻蛋白在食品中的应用

食品冷冻贮藏时,抗冻蛋白能够抑制重晶化的作用,一方面可以保持食品柔软的质地,如生产冰激凌时加入少量抗冻蛋白,可避免产生大的冰晶,而改变口感^[52];另一方面可减少细胞损伤而保持食品质地;同时还可减少滴液而降低了营养成分的损失,如肉制品冷冻时,加入抗冻蛋白,可有效地减少渗水和冰晶形成,而保持原有组织结构,减少营养流失^[53]。科学家不仅对抗冻蛋白在食品应用中的安全性及可行性进行了评估,同时认为抗冻蛋白既无毒性,同时其功能特性与任何毒性蛋白也没有关联。而对鱼类消费过程中的中毒事件,都与抗冻蛋白无关^[53]。

3.4 抗冻蛋白在器官移植中的作用

曾有科学家表示,抗冻蛋白有着广泛的应用前景,如应用到器官移植、食品保鲜、低温水域水产养殖等。Amir 等^[55]通过研究南极鱼抗冻蛋白对低温保存 24 h 用于移植的鼠(isoimmune Sprague dawley)心脏的影响,发现抗冻蛋白可以很好地解决用于移植的哺乳动物心脏在低温贮藏过程中的结冰问题。Karanova 等^[56]研究发现抗冻糖蛋白能增加 4 保存的鲤鱼精子的存活率,不过这种存活率并不依赖于抗冻蛋白的浓度。但 Koshimoto 等^[57]研究抗冻蛋白对鼠精子的影响发现:增加 1~100 g/L 的 AFP-I、AFP-III 和 AFGP 并不能保护已解冻的精子细胞,反而随蛋白浓度的增加而降低精子的存活率。作者推测抗冻蛋白这种副作用可能与鼠精子对各种机械压力特别敏感有关。不过对于抗冻蛋白不利于一些样品的低温和超低温保存的机制还需要进一步的研究来证实。

虽然已经认识到抗冻蛋白很多潜在的应用价值,但是如何能更好地实现其产业化,更好地应用其价值,这也是急需研究解决的问题。不过相信随着科学研究的不断发展和研究者的不断努力,抗冻蛋白必将为工业、农业、医学等更广泛的领域提供更多的服务。

参考文献:

- [1] Ewart K V, Lin Q, Hew C L, *et al.* Structure, function and evolution of antifreeze proteins[J]. **Cell Mol Life Sci**, 1999, 55: 271-283.
- [2] Yu X Y, Griffith M. Winter rye antifreeze activity increases in response to cold and drought, but not abscisic acid [J]. **Physiologia Plantarum**, 2001, 112 (1): 78-86.
- [3] Gilbert J A, Hill P J, Dodd C E, *et al.* Demonstration of antifreeze protein activity in antarctic lake bacteria [J]. **Microbiology**, 2004, 150(1):171-180.
- [4] Wisniewski M, Webb R, Balsamo R, *et al.* Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60: a dehydrin from peach (*Prunus persica*) [J]. **Physiologia Plantarum**, 1999, 105 (4): 600-608.
- [5] 刘万勃,宋明,张中灵,等.抗冻蛋白的研究进展[J].生物学杂志,2000,17(4):7-8.
- [6] Fletcher G L, Hew C L, Davies P L, *et al.* Antifreeze proteins of teleost fishes [J]. **Annu Rev Physiol**, 2001, 63:359-390.
- [7] 陈廷超,张极震.差式扫描量热法直接测定抗冻蛋白溶液的热滞效应[J].生物物理学报,1995,11(3):309-313.
- [8] 李前忠,罗辽复.抗冻蛋白溶液的热滞理论[J].生物物理学报,1994,10(3):465-468.
- [9] Li T, Lin Q S, Wang W K, *et al.* Expression, purification and characterization of a winter flounder antifreeze polypeptide from *Escherichia coli* [J]. **Protein Expression and Purification**, 2000, 18: 175-180.
- [10] Andorfer C A. Isolation and characterization of cDNA clones encoding antifreeze proteins of the pyrochroid beetle *Dendroides canadensis* [J]. **Journal of Insect Physiology**, 2000, 46: 365-372.
- [11] 陈晓军.抗冻蛋白研究进展[J].生命的化学,2000,20(4):170-174.
- [12] Tomczak M M, Hinch D K, Estrada S D, *et al.* Antifreeze proteins differentially affect model membranes during freezing [J]. **Biochemistry et Biophysica Acta**, 2001, 1511(2):255-263.
- [13] Steffen P, Graether S P, Kuiper M J, *et al.* Beta-helix structure and ice-binding properties of a hyperactive antifreeze protein from an insect [J]. **Nature**, 2000, 406: 325-328.
- [14] Graham L A, Liou Y C, Walker V K, *et al.* Hyperactive antifreeze protein from beetles[J]. **Nature**, 1997, 388: 727-728.
- [15] Tyshenko M G, Doucet D, Davies P L, *et al.* The antifreeze potential of the spruce budworm thermal hysteresis protein[J]. **Nat Biotechnol**, 1997, 15(9): 887-890.
- [16] Marshall C B, Fletcher G L, Davies P L. Hyperactive antifreeze protein in a fish[J]. **Nature**, 2004, 429: 153.
- [17] 李芳,王博,艾秀莲,等.抗冻蛋白研究进展[J].新疆农业科学,2003,40(6):349-352.
- [18] Slaughter D, Fletcher G L, Ananthanarayanan V S, *et al.* Antifreeze proteins from the sea raven, *Hemirhamphys americanus* further evidence for diversity among fish polypeptide antifreeze [J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 1961, 256: 2022-2026.
- [19] Petterson J L, Duman J G. The role of thermal hysteresis producing proteins in the low temperature tolerance and water balance of larvae of the mealworm *Tenebrio molitor*[J]. **Journal of Experimental Biology**, 1978, 74: 37-45.
- [20] Duman J G. Factors involved in the overwintering survival of the freeze tolerant beetle *Dendroides canadensis*[J]. **Journal of Comparative Physiology**, 1980, 136: 53-59.
- [21] Davies P L, Hew C L. Isolation and characterization of the antifreeze protein messenger RNA from the winter flounder [J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 1980, 255: 8729-8734.
- [22] Avijit C, Ananthanarayanan V S, Hew C L, *et al.* Structure-function relationships in a winter flounder antifreeze polypeptide [J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 1989, 264(5): 11307-11312.
- [23] Avijit C, Yangll D S C, Hew C L. Structure-function relationship in a winter flounder antifreeze polypeptide [J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 1989, 264(5): 11313-11316.
- [24] Doucet D, Tyshenko M G, Davies P L, *et al.* A family of expressed antifreeze protein genes from the moth, *Choristoneura fumiferana*[J]. **Eur J Biochem**, 2002, 269(1): 38-46.
- [25] Sidebottom C, Buckley S, Pudney P, *et al.* Heat-stable antifreeze protein from grass[J]. **Nature**, 2000, 406: 325-328.
- [26] Duman J G, Li N, Verleye D, *et al.* Molecular characterization and sequencing of antifreeze proteins from larvae of the beetle *Dendroides canadensis*[J]. **J Comp Physiol B**, 1998, 168: 225-232.
- [27] Li N, Bakshy A K, Castellino F J, *et al.* Mapping of disulfide bridges in antifreeze proteins from overwintering larvae of the beetle *Dendroides canadensis* [J]. **Biochemistry**, 1998, 37: 6343-6350.
- [28] Pudney P D, Buckley S L, Sidebottom C M, *et al.* The physico-chemical characterization of a boiling stable antifreeze protein from a perennial grass (*Lolium perenne*) [J]. **Arch Biochem Biophys**, 2003, 410(2): 238-245.
- [29] 江勇,贾士荣,费云标,等.抗冻蛋白及其在植物抗冻生理中的作用[J].植物学报,1999,41(7):677-685.
- [30] 刘晨临,黄晓航,李光友.抗冻蛋白的研究及其在生物

- 技术中的应用[J]. 海洋科学进展, 2002, 20(3), 102 - 110.
- [31] Cheng C H. Evolution of the diverse antifreeze proteins[J]. **Current Opinion in Genetics & Development**, 1998, 8: 715-720.
- [32] Evans R P, Fletcher G L. Isolation and characterization of type I antifreeze proteins from atlantic snailfish (*Liparis atlanticus*) and dusky snailfish (*Liparis gibbus*) [J]. **Biochim Biophys Acta**, 2001, 1547: 235-244.
- [33] Graether S P, Gagne S M, Spyropoulos L, et al. Spruce budworm antifreeze protein: changes in structure and dynamics at low temperature[J]. **J Mol Biol**, 2003, 327(5): 1155-1168.
- [34] 魏令波, 江勇, 舒念红, 等. 沙冬青叶片热稳定性抗冻蛋白特性分析[J]. 植物学报, 1999, 41(8): 78-83.
- [35] 费云标, 魏令波, 高素琴, 等. 沙冬青抗冻蛋白的分离、纯化及其理化特性分析[J]. 科学通报, 2000, 45(20): 2185-2189.
- [36] Wilkins S P, Blum A J, Burkepile D E. Isolation of an antifreeze peptide from the antarctic sponge *Homonella balfourensis* [J]. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2002, 59: 2210-2215.
- [37] Wang W X, Wei L B, Wang G L. Multistep purification of an antifreeze protein from *Ammopiathanthus mongolicus* by chromatographic and electrophoretic methods [J]. **Journal of Chromatographic Science**, 2003, 41(9): 489-493.
- [38] Devries L. Glycoproteins as biological antifreeze agents in Antarctic fishes[J]. **Science**, 1971, 172: 1152-1155.
- [39] Liou Y C, Thibault P, Walker V K, et al. A complex family of highly heterogeneous and internally repetitive hyperactive antifreeze proteins from the beetle *Tenebrio molitor* [J]. **Biochemistry**, 1999, 38(35): 11415-11424.
- [40] Smallwood M, Worrall D, Byass L, et al. Isolation and characterization of a novel antifreeze protein from carrot (*Daucus carota*) [J]. **Biochem J**, 1999, 340: 385-391.
- [41] Hon W C, Griffith M, Mlynarz A, et al. Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins[J]. **Plant Physiol**, 1995, 109: 879-889.
- [42] Robertson A J, Gusta L V. Abscisic acid and low temperature induced polypeptide changes in alfalfa (*Medicago sativa*) cell suspension cultures[J]. **Can J Bot**, 1986, 64(10): 2758-2763.
- [43] Robertson A J, Gusta L V, Reaney M T T, et al. Identification of proteins correlated with increased freezing tolerance in brome grass (*Bromus inermis* Leyss. cv Manchar) cell cultures [J]. **Plant Physiol**, 1988, 86(2): 344-347.
- [44] 卢存福, 简令成, 匡廷云, 等. 低温诱导唐古特红景天细胞分泌抗冻蛋白[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(5): 555-558.
- [45] Yu X M, Griffith M, Wiseman S B, et al. Ethylene induced antifreeze activity in winter rye leaves [J]. **Plant Physiol**, 2001, 126(3): 1232-1240.
- [46] 陈玉珍, 卢存福. 水母雪莲愈伤组织和悬浮培养细胞的抗冻性研究[J]. 植物学通报, 2002, 19(2): 219-223.
- [47] 王君晖, 边红武, 黄纯农, 等. 抗冻蛋白应用于水稻悬浮细胞超低温保存的研究[J]. 实验生物学报, 1999, 32(3): 271-275.
- [48] Wang L H, Wusteman M C, Smallwood M, et al. The stability during low-temperature storage of an antifreeze protein isolated from the roots of cold-acclimated carrots[J]. **Cryobiology**, 2002, 44(3): 307-310.
- [49] 李晶, 李蓉萍, 张舒梅, 等. 低温对转抗冻蛋白基因罗非鱼影响的初步研究[J]. 生物技术, 1996, 6(5): 9-10.
- [50] Kenward K D, Brandle J, Mcpherson J, et al. Type II fish antifreeze protein accumulation in transgenic tobacco does not confer frost resistance[J]. **Transgenic Research**, 1999, 8: 105-117.
- [51] Worrall D, Elias L, Ashford D, et al. A carrot leucine-rich-repeat protein that inhibits ice recrystallization [J]. **Science**, 1998, 282: 115-117.
- [52] Warren C J, Mueller G M. Ice crystal growth suppression polypeptides and methods of preparation[J]. **DNA Plant Technology Corp**, 1992, 118: 792-794.
- [53] Payne S R, Young O A. Effects of pre-slaughter administration of antifreeze proteins on frozen meat quality[J]. **Meat Sci**, 1995, 41: 147-155.
- [54] Feeney R E, Yeh Y. Antifreeze proteins current status and possible food uses [J]. **Trends in Food Sci Tech**, 1998, 9: 102-106.
- [55] Amir G, Rubinsky B, Horowitz L, et al. Prolonged 24-hour subzero preservation of heterotopically transplanted rat hearts using antifreeze proteins derived from arctic fish[J]. **Ann Thorac Surg**, 2004, 77(5): 1648-1655.
- [56] Karanova M V, Pronina N D, Tsvetkova L I. The effect of antifreeze glycoproteins on survival and quality of fish spermatozoa under the conditions of long-term storage at 4°C (Article in Russian) [J]. **Izv Akad Nauk Ser Biol**, 2002, 1: 88-92.
- [57] Koshimoto C, Mazur P. Effects of warming rate, temperature, and antifreeze proteins on the survival of mouse spermatozoa frozen at an optimal rate[J]. **Cryobiology**, 2002, 45(1): 49-59.

(本文编辑: 张培新)