

“表面互补”模型^{*} ——抗冻蛋白通用的分子机理

王金发, 张党权

(中山大学生命科学学院 // 教育部基因工程重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 抗冻蛋白 (antifreeze protein, AFPs) 是一类能控制冰晶生长和抑制冰晶之间发生重结晶的蛋白质, 能在结冰或亚结冰条件下保护生物体不受伤害。AFPs 具有两种明显不同的活性——热滞活性和重结晶抑制活性。AFPs 虽然在氨基酸序列、物种来源和高级结构等方面具有很大的差异, 但都能通过吸附作用与特定的冰晶表面相结合, 从而表现出相应的抗冻活性。AFPs 与冰晶结合的分子机理主要有“氢键结合”模型和“表面互补”模型, 而后者具有更强的优势, 已逐渐发展成 AFPs 通用性的分子机理。目前已测定或建模了三维结构的 AFPs 都能与冰晶的特定表面形成表面互补, 但形成这种表面互补的各种作用力还有待于进一步的研究。

关键词: 抗冻蛋白; 表面互补; 热滞; 重结晶抑制; 冰晶结合位点

中图分类号: Q575 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2004) 06-0017-06

抗冻蛋白 (antifreeze protein, AFP) 从 20 世纪 60 年代末期被发现以来, 引起了许多实验室的研究兴趣, 研究对象先后从极地鱼类扩展到昆虫, 后来又扩展到植物甚至微生物。至目前为止, 已分别从鱼类、昆虫和植物中分离出数十种抗冻蛋白。依据来源的不同, 可将抗冻蛋白分为鱼类抗冻蛋白、昆虫抗冻蛋白、植物抗冻蛋白和微生物抗冻蛋白四大类。鱼类抗冻蛋白又分为 5 大类: 抗冻糖蛋白 (antifreeze glycoprotein, AFGP) 和 I—IV 型抗冻蛋白 (AFP I、AFP II、AFP III、AFP IV)。昆虫抗冻蛋白主要包括黄粉虫 *Tenebrio molitor* AFP (TmAFP)、云杉卷夜蛾 *Choristoneura fumiferana* AFP (CfAFP) 和甲虫 *Dendroides canadensis* AFP (DAFP)。植物抗冻蛋白被研究的材料虽然最为广泛, 但研究得比较深入的主要为胡萝卜 *Daucus carota* 抗冻蛋白 (DcAFP) 和黑麦草 *Lolium perenne* 抗冻蛋白 (LpAFP)。对微生物抗冻蛋白的研究则还处于起步阶段。虽然对 AFP 进行了大量深入的研究, 但至今还没有得到一个统一的通用的分子机理。本文在分析了大量的文献的基础上, 剔除了部分矛盾性的结论, 结合我们的研究结果, 全面阐述了一个 AFP 通用的分子机理——“表面互补”模型。

1 抗冻蛋白的特性

AFP 通过特异地吸附于冰晶表面, 阻止冰晶生

长, 进而非依数性地降低溶液冰点, 但不影响溶液的熔点, 导致熔点与冰点之间出现差值, 这一现象称为 AFP 的热滞 (thermal hysteresis, TH) 活性。因此, AFP 又被称为热滞蛋白 (thermal hysteresis protein, THP)。正是由于 AFP 的这一特殊的 TH 活性, 才赋予了各种耐寒生物体的抗冻性能。AFP 除了拥有 TH 活性以外, 还拥有另一重要特性, 即重结晶抑制 (recrystallization inhibition) 活性^[1]。所谓重结晶是指在已经形成的冰晶体颗粒大小的重新分布, 即一些冰晶增大, 而另一些减小, 并且大的冰晶愈长愈大, 小的越来越小, 直至消失。在耐冻植物内和耐冰昆虫 (仅限于细胞外结冰) 体内, 重结晶抑制作用可能比热滞效应更为重要。在植物体内 AFPs 的热滞值通常为 0.1~0.6 °C, 对降低冰点和避免结晶的作用是很小的。植物 AFPs 主要通过重结晶抑制作用来避免冰晶体对细胞组织的伤害, 因为重结晶的抑制作用比冰晶生长的抑制作用更容易达到和控制, 只需少量的 AFPs 就能产生较高的重结晶抑制活性^[2]。

通过对那些研究得比较深入的抗冻蛋白的特性进行汇总^[3-6], 发现它们在相对分子质量、TH 活性、氨基酸序列特征和高级结构等方面都有很大的差异 (表 1)。

* 收稿日期: 2004-08-26

基金项目: 国家自然科学基金植物转基因重大专项资助项目 (J00-A-009); 广东省自然科学基金资助项目 (990258)

作者简介: 王金发 (1947 年生), 男, 教授, 博士生导师; E-mail: ls19@zsu.edu.cn

表 1 部分抗冻蛋白的特性
Tab 1 Characteristics of some AFPs

	TH activity	Repeat	Tertiary structure	Interesting features	Species
AFGP (2 600 ~ 33 000)	1.5 ℃	Ala-Ala-Thr repeat	Extended polyproline helix	Disaccharides are attached to Thr residues	Antarctic nototheniids northern cods
AFP I (3 300 ~ 4 500)	1.5 ℃	Ala rich; 11 residue repeats	Single α -helix	Repeats thought to match ice lattice	Right eye flounders; winter flounder; shorthorn sculpin
AFP II (11 000 ~ 24 000)	1.5 ℃	Homology to lectins	Globular with α and β coil	Some isoforms require Ca^{2+}	Sea raven; smelt; herring
AFP III (6 800 ~ 14 000)	1.5 ℃	Relatively hydrophobic	Globular with irregular β -strands	Flat ice-binding surface	Eel pouts; ocean pouts; wolffish
AFP IV (12 300)	1.5 ℃	22 residue repeats	Four α -helix bundles	17% Gln	Longhorn sculpin
CEAFP (9 000 ~ 12 000)	5 ~ 10 ℃	Thr/Ser-rich, ~ 15 residue repeats	Globular with β -helix fold	Left-handed β -helix with triangular crosssection	Choristoneura fumiferana
TmAFP (9 000 ~ 14 000)	4 ~ 8 ℃	~ 12 residue repeats, Thr/Ser, Cys rich 40% ~ 60%	Regular right-handed β -helix	16 Disulphides	Tenebrio molitor
DAFP (9 000 ~ 14 000)	4 ~ 8 ℃	Sequence identity to TmAFP	Regular right-handed β -helix	40% ~ 60% sequence identity to TmAFP	Dendroides canadensis
DcAFP (36 800)	0.35 ℃	Leucine rich repeats of ~ 24 residues	Regular right-handed β -helix (predicted)	Homology to polygalacturonase inhibiting proteins	Daucus carota
LpAFP (13 000)	0.1 ℃	7-residue repeating motif of XXNXVXG	Regular right-handed β -helix (predicted)	Very hydrophilic, Asp (25%), Val (16%), Ser (15%), Thr (10%)	Lolium perenne

2 抗冻蛋白对冰晶形态的修饰效果

AFPs 对冰晶形态具有明显的修饰效果。当 AFPs 与冰晶结合之后，水分子将被限制进入结合有 AFPs 的冰晶表面，导致冰晶的平直表面发生弯曲，从而引起冰晶的总表面积增大（图 1A 中插入的放大图）。这种总表面积增大通过一种开尔文效应抑制了水分子与冰晶的平直表面结合的趋势，最终导致溶液冰点的非依数性降低和 TH 活性的产生^[7]。当测量 AFPs 的 TH 活性时，AFPs 能改变冰晶的形状，而且形状各异，大小也差别较大，但基本上可分为两大类：六棱双金字塔（hexagonal bipyramid）和六棱盘（hexagonal plate）或六棱柱（hexagonal column）^[8]（图 1）。
一个特定的冰晶表面在与 AFPs 结合之后，生长速度将明显变慢，而且会导致许多小刻面的形成和增大。当小刻面变得越来越多后，这个特定的冰晶表面将完全停止生长。最终，冰晶在所有方向的表面都被完全蚀刻，导致冰晶生长的被彻底停止。通过冰蚀刻（ice etching）技术可证实 AFPs 与冰晶表面的结合，而且可用于发现能与 AFPs 结合的特定的冰晶表面^[9]。冰蚀刻技术的原理是，将已生长

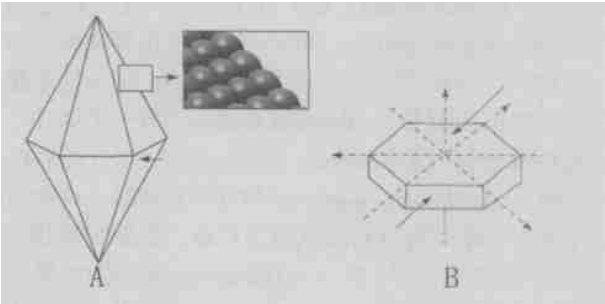


图 1 AFPs 修饰的冰晶形态
Fig 1 Ice crystal morphology produced by AFPs

至半球形状的冰晶置于稀释后的 AFPs 溶液中，AFPs 虽然能与冰晶结合，但由于自身浓度过低，故不能抑制冰晶的生长，因而 AFPs 被整合到继续生长的冰晶的内部。将冰晶从溶液中移出，然后让其缓慢升华，而被整合到冰晶内部的 AFPs 则被逐渐暴露出来，在冰晶表面上呈现出白色的蚀刻点。通过冰晶蚀刻技术，已经刻画了多个与不同 AFPs 相结合的冰晶表面。

对六棱双金字塔形状的冰晶而言，其被 AFPs 修饰的冰晶表面为一种锥面（pyramidal plane）（图 1A），而对六棱盘形状的冰晶而言，冰晶表面分为

棱面 (prism plane) 和基面 (basal plane) (图 1B)。当鱼类和植物 AFPs 与一个特定的锥面结合时, 由于冰晶六角形的对称关系, 意味着 AFPs 同时与 12 个锥面进行结合, 导致冰晶被修饰成六棱双金字塔形状^[9]。昆虫 AFPs 可以同时与冰晶的基面和棱面相结合, 导致冰晶被修饰成六棱盘形状^[19]。

3 抗冻蛋白的作用模型

3.1 抗冻蛋白的“氢键结合”模型

随着越来越多的 AFPs 的发现及其特征的揭示, 对 AFPs 的分子机理的理解也越来越深入, 先后提出多个模型来解释这一特殊的机理。1977 年, Raymond 等^[3]首先提出了“吸附—抑制”模型来解释 AFPs 的作用机理, 至今, 这一学说已成为其它试图解释 AFPs 的作用机理的理论的基础。“吸附—抑制”模型认为, AFPs 通过自身吸附到冰晶表面从而抑制冰晶生长, 而不是通过把水与冰进行隔离, 使得水不再结冰。对大多数蛋白质而言, 缓慢生长的冰晶能把这些蛋白质从冰的前面推开, 从而阻止蛋白质与冰晶相结合, 导致与冰结合的蛋白质含量低于溶液中的 10%, 而 AFPs 却与之相反, 其中的 89% 结合于冰上。AFPs 与冰之间的相互作用是非常稳定的。在 10 mg/mL AFGP 存在的情况下, 冰晶在 -0.6°C 温度下没有任何生长, AFGP 也没有被释放出来, 表明 AFPs 与冰晶表面的结合有着几乎无限的亲和力^[3]。AFPs 与冰之间这种特殊的结合能力表明这种结合方式不是一种非共价的相互作用, 因为它要求 AFPs 的脱离比率为 0。对这一现象的解释是, AFGP 通过糖基上的氢原子与晶冰上的原子形成 3 个氢键 (1 个与氢原子, 另外 2 个与氧原子), 从而与冰晶牢固地结合^[11]。AFGP 若从冰晶上解吸附的话, 需要这 3 个氢键同时断裂, 而这种情况几乎是不可能发生的, 因而导致 AFGP 几乎可以永久性地吸附在冰晶上。

1983 年, DeVries^[12]提出了“晶格匹配”模型, 该模型也被称为“氢键匹配”模型。在“晶格匹配”模型中, 冬季比目鱼 AFP I 的两亲性的 α 螺旋通过规律排布的突出螺旋外的 Thr 和 Asx 残基与冰晶的棱面相结合。在这个特异的冰晶结合棱面被鉴定后, 发现这种“晶格匹配”模型似乎也可适用于部分其它的冰晶表面^[13]。

1988 年, Yang 等^[14]提出了“偶极子—偶极子”模型。该模型认为, AFP 有显著平行于其螺旋轴亲水基团和疏水基团的偶极子 (dipole)。冬季比目鱼 AFP I 是一种单一的 α 螺旋。在冰晶表面也存在着偶极子。该模型假设 AFP I 的偶极子与冰晶周围

的水分子的偶极子相互作用, 即由螺旋产生的偶极子是 AFP 与冰晶相互作用的特异性识别的起始推动力, 两亲性的 α 螺旋经亲水侧链的定位, 提供与冰格相互作用的氢键, 而疏水侧链则阻止冰晶的生长。

1993 年, Knight 等^[11]提出了“晶格占有”模型, 该模型是在“晶格匹配”模型的基础上演变而来。“晶格匹配”模型自从被提出来以后, 就遇到一个难以回答的难题: 为什么 AFPs 能通过氢键模式优先地与冰晶表面相结合, 而不是与包围 AFPs 的水分子优先相结合; 而且, 数量很少的氢键似乎不能解释 AFPs 与冰之间的不可逆结合。“晶格占有”模型认为, AFPs 中的部分氢键基团通过“占有”了冰晶表面上的氧原子的位置, 从而与临近的氧原子同时形成了多个氢键, 这样就使得氢键的数量增加了几倍, 最终导致 AFPs 与冰晶之间形成了不可逆结合。

上述的 4 个模型虽然侧重点各不相同, 但是它们的有着一个共同之处, 即 AFPs 与冰晶之间通过氢键进行结合, 只是氢键的数量和形成的方式不同而已。因而, 将此 4 个模型归为“氢键结合”模型这一大类。

3.2 抗冻蛋白的“表面互补”模型

上述的 4 个模型都有着各自的特点, 都能在一定程度上对 AFPs 的活性进行解释, 但这种解释仅适合于一种或者几种 AFPs, 而对其它的 AFPs 则不能进行合理的解释。如“吸附—抑制”模型和“晶格匹配”模型都强调了 AFPs 与冰晶之间的氢键的重要性, 但后来的研究表明, 如果 AFPs 没有预先结合到冰晶上, 那么 AFPs 与冰晶之间的高度亲和性将要求 AFPs 有一个缓慢的吸附速率与解吸附速率, 对此现象的实验依据是, 当纯冰晶被加入到 AFPs 的溶液中后, 冰晶的生长立刻就被抑制了^[15], 这些结果动摇了 AFPs 与冰晶之间的氢键的重要性。而对“偶极子—偶极子”模型而言, 到目前为止仍然缺乏实验数据的支持^[16]。对鱼类 AFP I 进行的氨基酸残基替换实验的结果表明, AFP I 上的 Asx 残基或者 Thr 残基的 OH 基团对其与冰晶之间的结合都不是必需的, 而且, AFP I 的冰晶结合位点被修订为 α 螺旋上由保守 Ala 及其临近的 Thr 组成的疏水表面^[17]; 在已经测定了鱼类 AFP III 及其它一些 AFPs 的三维结构的基础上, 发现这些抗冻蛋白的冰晶结合位点上的侧链过于密集, 从而阻碍了氨基酸残基凸入到冰格中, 导致两者之间不能形成有效的氢键^[18], 这些结果弱化了“晶格占有”模型的作用及其适用性。

2002 年, Jia 等^[9] 提出了一个可适用于目前已经发现的抗冻蛋白的作用模型, 即“表面互补”模型。这个模型也被称为“受体—配体”模型, AFPs 是受体, 冰是配体。“表面互补”模型的核心内容是 AFPs 的冰晶结合位点所形成的表面能与冰晶的表面形成互补。该模型认为, AFPs 与冰晶之间所形成的表面互补与多种相互作用力有关, 互补的表面越大则相互作用力越强, AFPs 如果从冰晶上脱离下来则必须同时断裂这些相互作用力, 而这在动力学上几乎是不可能的, 因而导致了 AFPs 与冰晶之间结合的不可逆性。这种不可逆性是必要的, 因为任何显著的脱离速率都将导致冰晶的生长。该模型还认为, 不同类型的 AFPs 能与不同形状的冰晶表面结合。目前已经发现的 AFPs 具有极大的差异, 除了进化上的原因之外, 另一个原因是冰晶含有许多不相同的表面, 每个表面的拓扑结构和氧原子间距都不相同, AFPs 在与任何一个冰晶表面结合后都将阻止冰晶的生长。冰晶就像配体一样, 通过表面互补选择性地与不同的受体 (AFPs) 结合。这种表面互补方式可适用于所有的 AFPs, 形成表面互补的相互作用力主要是疏水作用和范德华力, 氢键起着次要的作用, 任何破坏 AFPs 的冰晶结合表面的突变都将导致与冰晶表面的互补性降低, 从而导致 TH 活性降低^[19]。

综上所述, 抗冻蛋白的作用模型可分为两大类, 即“氢键结合”模型和“表面互补”模型, 而后者更具有说服力。迄今为止, 从鱼类、昆虫和植物中发现的 AFPs 结构各异, 起源上互不相关, 但是它们的冰晶结合位点可能拥有共同的特征, 困难在于如何将这种特征转换成理解 AFPs 与冰晶结合的线索。不同 AFPs 的冰晶结合位点尽管在氨基酸序列和结构上有着差别, 但应该有一个共同的模式, 这个模式可能就是“表面互补”模型。

4 抗冻蛋白的冰晶结合位点

至目前为止, 已经测定了鱼类 AFPs 和昆虫 AFPs 的高级结构, 而植物 AFPs 除了 LpAFP 和 DcAFP 有理论模型外, 还没有一个通过实验 (核磁共振或晶体衍射) 得到的高级结构。以 AFPs 的结构或者理论模型为基础, 获得并分析它们的冰晶结合位点, 以及该位点与冰晶表面的结合方式, 从而加速了在分子水平上理解 AFPs 的机理的进程。

4.1 鱼类抗冻蛋白的冰晶结合位点

对鱼类 AFPs 的冰晶结合位点的研究主要集中在 AFGP 和 AFP I—III, AFP IV 由于发现的时间较晚, 目前还没有进行结构方面的研究, 但推测与

AFP I 多聚体的结构相类似^[20]。目前比较被接受的观点是, AFGP 的左手螺旋上 Ala 组成的疏水表面可能是潜在的冰晶结合位点, 并且通过表面互补的方式与冰晶表面进行结合^[21], 然而, 这个推测还需要更多的实验支持。对于 AFP I 的冰晶结合位点, 现在一般认为是由保守 Ala 及其临近的 Thr 组成的疏水表面, 而这个疏水表面可以同时通过氢键和范德华力与冰晶表面相互结合^[9], 从而导致两者之间产生紧密的表面互补, 表明 AFP I 可以用“表面互补”进行有效的解释。AFP II 的冰晶结合位点为一个由 19 个氨基酸残基组成的小块 (K37, L38, Y20, E22, Y21, I19, L57, T56, F53, M127, T128, F129, R17, C7, N6, P5, G10, Q1, W11) 能与两者类型的冰晶表面都形成完美的表面互补, 表明这个 19 残基组成的小块可能就是 AFP II 的冰晶结合位点^[22]。AFP II 的冰晶结合位点是一种高平面度的疏水表面, 表通过“表面互补”模型与冰晶表面进行结合。在对一个超高分辨率 (0.62 Å) 的晶体衍射结构进行分析后, 最终将 AFP II 的冰晶结合位点确定为: Gln9, Leu10, Pro12, Ile13, Asn14, Thr15, Ala16, Thr18, Ile20, Met21, Gln44^[23]。通过以上对 4 种鱼类的结构和冰晶结合位点的分析, 表明这四个 AFPs 与冰晶的结合都可以用“表面互补”模型进行有效的解释。

4.2 昆虫抗冻蛋白的冰晶结合位点

在已经发现的 3 种昆虫 AFPs 中, TmAFP 和 CfAFP 的结构研究得较为深入, 而 DAFP 的结构在目前为止还没有被测定。“氢键结合”模式首先被用来解释 TmAFP 与冰晶的结合作用, 但却遇到了极大的困难^[15]。然而, “表面互补”模型却能很好地进行解释。TmAFP 的冰晶结合位点由规律排列的“TCT”残基簇组成, 形成了一个刚性的、疏水性的冰晶结合表面, 能与冰晶表面形成紧密的互补^[24]。CfAFP 的冰晶结合位点为规律排列的“TXT”重复单元中的 Thr 组成, 该位点能同时与冰晶的棱面和基面相结合。由于 CfAFP 具有最强的 TH 活性, 而“氢键结合”模型无力对此进行有效的解释, 而“表面互补”模型则有效地解释 CfAFP 的超强活性。“表面互补”模型牵涉到更多的分子间作用力, 而氢键只是这些作用力的一种, 因而就可以把氢键作用的特性全部保留下来, 同时又强调了其它作用力的重要性, 如疏水作用和范德华力等^[25]。

4.3 植物抗冻蛋白的冰晶结合位点

虽然植物 AFPs 被发现的时间与昆虫 AFPs 的相同, 但由于植物 AFPs 的 TH 活性很低, 没有引起

研究者的足够重视,导致对它们的结构和冰晶结合位点的研究几乎停滞不前,目前为止只获得了胡萝卜抗冻蛋白 DcAFP 和黑麦草 *Lolium perenne* 抗冻蛋白 LpAFP 的理论三维结构。

LpAFP 理论的三维结构为一个由圆环组成的非常有规律的右手 β 螺旋,螺旋上的每个圆环含有 14 ~ 15 个氨基酸残基,形成了两个保守的重复单元“XXNXVVG”,推测这个重复单元包含有 LpAFP 的冰晶结合位点,但还没有确定具体的氨基酸^[29]。“表面互补模型”被用来解释 LpAFP 的冰晶结合位点及其与冰晶表面的结合模式。在重复单元“XXNXVVG”中,N 和 V 以及 V 和 G 之间主要是 Thr 残基,即“TVT”残基簇,与 TmAFP 和 CfAFP 的冰晶结合位点“TXT”十分相似,可能是 LpAFP 的冰晶结合位点,差别在于 LpAFP 的 Thr 残基的保守性较差,但 LpAFP 的冰晶结合表面仍能可以和冰晶棱面形成紧密的表面互补^[26]。

从中国胡萝卜栽培品种中克隆的 DcAFP^[27-29]的理论三维结构为一个非常有规律的右手 β 螺旋,螺旋的每个 β 环由 LRR 基序的 24 (23 ~ 25) 个氨基酸残基组成,结构特征主要为由保守的 L (包括 I) 组成的疏水核心和保守的 P 和 G 组成的 β 转角^[30]。DcAFP 的理论三维结构与冰晶表面的对接结果显示,其潜在的冰晶结合位点是保守 N 及其两侧的氨基酸,能与冰晶的 1010 棱面形成不完全的表面互补^[30]。

5 展 望

通过以上对鱼类、昆虫和植物 AFPs 的结构和冰晶结合位点的综合分析,发现虽然它们的结构各不相同,冰晶结合位点也有极大的差异,但“表面互补”模型可以较好地解释它们与冰晶之间的相互作用,可能发展成 AFPs 的共同机理。而对微生物抗冻蛋白而言,由于还没有纯化出特定的 AFP,因而无法对其结构进行研究,对其分子机理也无法进行分析,但认为“表面互补”模型可能也适用^[31]。“表面互补”模型也面临着很多困难,如至今还无法确定“表面互补”模型中到底含有多少种作用力的存在,每种作用力的贡献程度和作用方式更是需要进一步的研究。我们认为,范德华力和疏水作用可能起着主要的作用,氢键起着辅助的作用,但这些都需深入的研究。

参考文献:

[1] RAYMOND J A, DeVRIES A L. Adsorption inhibition as a mechanism of freezing resistance in polar fishes[J]. Proc Natl

Acad Sci USA, 1977, 74(6): 2589—2593.

- [2] URRUTIA M E, DUMAN J G, KNIGHT C A. Plant thermal hysteresis proteins[J]. Biochim Biophys Acta, 1992, 1121 (1): 199—206.
- [3] DAVIES P L, SYKES B D. Antifreeze proteins[J]. Curr Opin Struct Biol, 1997, 7(6): 828—834.
- [4] 卢存福, 王红, 简令成, 等. 抗冻蛋白研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 1998, 25(3): 210—215.
- [5] 钟其旺, 樊廷俊. 鱼类抗冻蛋白的研究进展[J]. 生物化学与生物物理学报, 2002, 34(2): 124—130.
- [6] JIA Z, DAVIES P L. Antifreeze proteins: an unusual receptor-ligand interaction[J]. Trends Biochem Sci, 2002, 27(2): 101—106.
- [7] WILSON P W. Explaining thermal hysteresis by the Kelvin effect[J]. Cryo Letters, 1993, 14(2): 31—36.
- [8] WILSON P W, GOULD M, DeVRIES A L. Hexagonal shaped ice spicules in frozen antifreeze protein solutions[J]. Cryobiology, 2002, 44(3): 240—250.
- [9] KNIGHT C A, CHENG C C, DeVRIES A L. Adsorption of alpha helical antifreeze peptides on specific ice crystal surface planes[J]. Biophys J, 1991, 59(2): 409—418.
- [10] GRAETHER S P, KUIPER M J, GAGNÉ S M, et al. β -helix structure and ice-binding properties of a hyperactive antifreeze protein from an insect[J]. Nature, 2000, 406 (6793): 325—328.
- [11] KNIGHT C A, DRIGGERS E, DeVRIES A L. Adsorption to ice of fish antifreeze glycopeptides 7 and 8[J]. Biophys J, 1993, 64(1): 252—259.
- [12] DeVRIES A L. Antifreeze peptides and glycopeptides in cold-water fishes[J]. Annu Rev Physiol, 1983, 45: 245—260.
- [13] YEH Y, FEENEY R E. Antifreeze proteins: structures and mechanisms of function[J]. Chem Rev, 1996, 28(2): 601—618.
- [14] YANG D S, SAX M, CHAKRABARTY A, et al. Crystal structure of an antifreeze polypeptide and its mechanistic implications[J]. Nature, 1988, 333(6170): 232—237.
- [15] HALL D G, LIPS A. Phenomenology and mechanism of antifreeze peptide activity[J]. Langmuir, 1999, 15(6): 1905—1912.
- [16] HOLT C B. The effect of antifreeze proteins and poly(vinyl alcohol) on the nucleation of ice: a preliminary study[J]. Cryo Letters, 2003, 24(5): 323—330.
- [17] BAARDSNES J, KONDEJEWSKI L H, HODGES R S, et al. New ice-binding face for type I antifreeze protein[J]. FEBS Lett, 1999, 463(1): 87—91.
- [18] ANTSON A A, SMITH D J, ROPER D I, et al. Understanding the mechanism of ice binding by type III antifreeze proteins[J]. J Mol Biol, 2001, 305(4): 875—889.
- [19] ATICI O, NALBANTOGLU B. Antifreeze proteins in higher plants[J]. Phytochemistry, 2003, 64(7): 1187—1196.
- [20] DENG G, LAURSEN R A. Isolation and characterization of an antifreeze protein from the longhorn sculpin,

- Myoxocephalus octadecimspinosus* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1388 (2): 305—314.
- [21] HARDING M M, ANDERBERG P I, HAYMET A D. “Antifreeze” glycoproteins from polar fish [J]. *Eur J Biochem*, 2003, 270 (7): 1381—1392.
- [22] CHENG Y, YANG Z, TAN H, et al. Analysis of ice-binding sites in fish type II antifreeze protein by quantum mechanic [J]. *Biophys J*, 2002, 83 (4): 2202—2210.
- [23] KO T P, ROBINSON H, GAO Y G, et al. The refined crystal structure of an eel pout type III antifreeze protein RD1 at 0.62 Å resolution reveals structural heterogeneity of protein and solvation [J]. *Biophys J*, 2003, 84 (2): 1228—1237.
- [24] DALEY M E, SPYRACOPOULOS L, JIA Z, et al. Structure and dynamics of a β -helical antifreeze protein [J]. *Biochemistry*, 2002, 41 (17): 5515—5525.
- [25] LEINALA E K, DAVIES P L, JIA Z. Crystal structure of β -helical antifreeze protein points to a general ice-binding model [J]. *Structure*, 2002, 10 (5): 619—627.
- [26] KUIPER M J, DAVIES P L, WALKER V K. A theoretical model of a plant antifreeze protein from *Lolium perenne* [J]. *Biophys J*, 2001, 81 (6): 3560—3565.
- [27] 范云, 刘兵, 王宏斌, 等. 胡萝卜抗冻蛋白基因的克隆及其在 *E. coli* 中的表达 [J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2002, 41 (3): 53—56.
- [28] FAN Y, LIU B, WANG H B, et al. Cloning of an antifreeze protein gene in carrot and influence on freeze tolerance of transgenic tobaccos [J]. *Plant Cell Rep*, 2002, 21 (4): 296—301.
- [29] 张党权, 刘兵, 范云, 等. 胡萝卜抗冻蛋白在大肠杆菌中的高效表达 [J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2003, 42 (3): 51—55.
- [30] ZHANG D Q, LIU B, FENG D R, et al. Significance of conservative asparagines in the thermal hysteresis activity of carrot antifreeze protein [J]. *Biochem J*, 2004, 377 (3): 589—595.
- [31] 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.

Model “Surface Complementarity” Points to a General Molecular Mechanism of Antifreeze Proteins

WANG Jin fa, ZHANG Dang quan

(School of Life Sciences // The Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Antifreeze proteins (AFPs) are a family of proteins capable of protecting organisms from damage in freezing or sub freezing conditions by controlling the growth of ice and inhibiting the recrystallization between ice granules, which were termed thermal hysteresis (TH) activity and recrystallization inhibition (RI) activity respectively. There is a distinct diversity between AFPs in amino acid sequence, species and higher order structure, however, both AFPs exhibit suitable antifreeze activity by binding to a specific face of ice with adsorption. Two kinds of models of “hydrogen bonding match” and “surface complementarity” were presented to explain the molecular mechanism of AFPs, and the latter has been gradually developed to the general mechanism for its stronger advantages. At present AFPs with solved or modeled three-dimensional structure can dock to specific faces of ice by surface complementarity, though diversified forces leading to the formation of this surface complementarity should be further investigated.

Key words: antifreeze protein; surface complementarity; thermal hysteresis; recrystallization inhibition; ice binding site