

# 抗冻蛋白在超低温保存中作用机制的新模型\*

钱卓蕾 王君晖\*\* 边红武 韩凝

(浙江大学生命科学院 杭州 310012)

在超低温保存(cryopreservation,  $-80^{\circ}\text{C}$ — $-196^{\circ}\text{C}$ )中,抗冻蛋白(antifreeze proteins, AFPs)对细胞存活率和热力学特性的影响十分复杂<sup>[1]</sup>。在一些实验条件下,抗冻蛋白表现出保护活性;在另一些实验条件下,它却表现出毒害性。换句话说,它既能阻遏冰晶生长,又能促使成冰核效应(ice nucleation effect)发生。在总结最新实验结果的基础上,结合抗冻蛋白进化和结构生物学方面的新进展,我们提出了一个新模型<sup>[2]</sup>,该模型对抗冻蛋白功能的两面性作了较好的诠释。

## 一、超低温保存中应用抗冻蛋白的基本实验结果

抗冻蛋白具有三个显著特性。第一,通过阻遏冰晶的正常生长习性而使体液维持过冷状态<sup>[3]</sup>;第二,具有阻止重结晶(recrystallization inhibition)的能力<sup>[4]</sup>;第三,低温环境中作为质膜的保护剂<sup>[5]</sup>。正是这三个特性促使科学家们在超低温保存中应用抗冻蛋白。实际作用效果分为以下三种结论。

### 1. 抗冻蛋白是有效的保护剂

研究认为,1—40mg/ml不同分子量的抗冻蛋白都有助于保持细胞结构完整性。猪未成熟卵母细胞和二细胞胚玻璃化保存时,40mg/ml的抗冻糖蛋白(antifreeze glycoproteins)对维持细胞结构的完整性起到了惊人的作用,证实这些蛋白质具有阻止膜表面冰晶形成的能力<sup>[5]</sup>。小鼠卵母细胞在 $0^{\circ}\text{C}$  6 mol/L二甲亚砜加1mg/ml抗冻糖蛋白的冰冻保护剂中处理后置于液氮保存,受精率显著提高。

### 2. 抗冻蛋白不是保护剂

研究表明,两步法保存鸵鸟卵母细胞和马胚胎细胞,抗冻蛋白并无特殊益处<sup>[6]</sup>。玻璃化法保存牛桑葚期胚细胞,抗冻蛋白也不起作用。浓度在25—1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的抗冻蛋白可以毁坏超低温保存于甘油中的人红细胞。有人甚至认为抗冻蛋白增加了细胞间冻结的可能性,从而使细胞恢复生长率降低。

### 3. 冻蛋白具有双重效应

在相对低浓度,如5—150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,抗冻蛋白提高了红细胞的存活率,而在毫克浓度时,虽然在理论上抗冻蛋白能更加有效地阻止重结晶,实际上却

降低了红细胞的存活率<sup>[7]</sup>。超低温保存水稻悬浮细胞,由于抗冻蛋白浓度、具体保存方法、冷冻保护剂组成与浓度以及细胞生理特性等方面的差异,抗冻蛋白的积极效应与消极效应均可被观察到<sup>[8]</sup>。抗冻蛋白作用的两面性也可用低温显微镜技术和差示扫描量热仪(differential scanning calorimeter)观察<sup>[7]</sup>。

## 二、抗冻蛋白的确切功能及其影响因素

为了全面了解抗冻蛋白的功能,有必要总结一下抗冻蛋白在低温保存中(hypothermic preservation,  $4\sim-20^{\circ}\text{C}$ )的作用。这方面的结果分成三组:一些报道认为,抗冻蛋白是膜保护剂,其机制是封闭离子通道,从而平衡了跨膜电解质梯度(transmembrane electrolyte gradients)<sup>[9]</sup>。另一些报道认为,抗冻蛋白是膜毒害剂,所有类型的抗冻蛋白都使菠菜类囊体冻害加剧<sup>[10]</sup>。还有一些报道认为抗冻蛋白具有膜保护作用,但它是与磷脂双分子层发生相互作用,而不是与离子通道发生相互作用。将脂质体作为模式系统来检查抗冻蛋白与脂质膜的相互作用,荧光素标记显示,抗冻蛋白十分有效地阻止了标记物的渗漏<sup>[11,12]</sup>。

将低温保存和超低温保存中应用抗冻蛋白的最新结果进行全面总结,我们可以得出以下结论:抗冻蛋白能和细胞膜作用,但有时起膜保护作用,有时起膜毒害作用;抗冻蛋白能和冰晶作用,但有时抑制冰晶生长,有时促进冰晶生长,两者的平衡取决于许多因素,如,冷冻保护剂组成和浓度,降温和复温速度,抗冻蛋白类型和浓度,最初冰核数目,以及被冻细胞表面特征等<sup>[2]</sup>。

## 三、抗冻蛋白与冰晶相互作用的 结构生物学进展

抗冻蛋白改变冰晶生长的机制称为吸附抑制方式(adsorption inhibition),主要是指在含有少量冰核的体系中,抗冻蛋白侧链的亲水面通过氢键与冰晶

\* 国家自然科学基金资助项目(39900012)。

\*\* 通讯联系人。

的棱柱面(冰晶易生长面)匹配结合,暴露出高表面自由能的疏水面,屏蔽了冰晶的进一步生长。结果,冰晶只在其基面非常有限地生长直至完全停止;抗冻蛋白含量不同,最终冰晶形状也不同,主要有双锥形和骨针形<sup>[3]</sup>。

近年来,通过几项结构生物学技术的应用,如,X射线结晶学、计算机模拟、定点突变等,对于抗冻蛋白与冰晶互补结合的认识大大地加深了。研究者已用1.5Å的分辨率分析了I型抗冻蛋白(线状 $\alpha$ -螺旋)的冰晶结合区。研究表明,熵效应和范德华力在该类抗冻蛋白与冰晶的匹配结合中起到了举足轻重的作用<sup>[13]</sup>。III型抗冻蛋白(球状,以1.25Å的分辨率研究)具有扁平状两性冰晶结合区(flat amphipathic ice-binding site),该区有5个H原子与2个O原子构成<sup>[14]</sup>。对II型抗冻蛋白以及抗冻糖蛋白的结构生物学研究也在进行之中。最近,昆虫抗冻蛋白的结构生物学研究取得很大进展。云杉芽尖虫抗冻蛋白的活性特别高,研究者观察到一种几个规律排列的苏氨酸-某氨基酸-苏氨酸(TXT)组成的结构,该结构与冰晶的棱柱面和基面都能匹配结合<sup>[15]</sup>。另一昆虫抗冻蛋白,苏氨酸-半胱氨酸-苏氨酸结构排列成一种扁平的 $\beta$ -片层结构,该结构中诸羟基间的空隙正好和冰晶晶格吻合,所以它就是冰晶结合面<sup>[16]</sup>。

#### 四、抗冻蛋白在超低温保存中作用机制的新模型

##### 1. 传统模型及其不足

传统模型主要认为<sup>[17,18]</sup>,当细胞大小与骨针状冰晶大小相近时,冰晶对细胞穿刺作用所造成的机械损伤显得十分剧烈,抗冻蛋白呈破坏作用;当细胞体积很大(如卵细胞)时,冰晶对细胞穿刺作用所造

成的机械损伤显得相对不剧烈,此时抗冻蛋白抑制重结晶的效应不被掩盖,它表现为保护作用。该模型不能解释所有实验结果。如,抗冻蛋白并非只在保存体积大的细胞时才起保护作用;又如,毫克浓度和微克浓度的抗冻蛋白应用于人红细胞保存,理论上前者抑制重结晶效应更明显,但实际上前者降低存活率,而后者提高存活率<sup>[7]</sup>;再如,此模型显然忽略了抗冻蛋白与细胞膜的相互作用。

##### 2. 亲和相互作用偶联团聚模型

这个新模型认为抗冻蛋白不仅与冰晶作用,而且又与细胞膜和冷冻保护剂中的其他分子发生亲和相互作用<sup>[2]</sup>。抗冻蛋白在结合冰晶后所暴露的疏水面能够与细胞膜磷脂双分子层发生相互作用。事实上,能够和抗冻蛋白或抗冻蛋白-冰晶复合体发生相互作用的分子是广泛存在的<sup>[2]</sup>。研究表明,II型抗冻蛋白是从C类动物凝集素的碳水化合物识别区演化而来,后者可结合细胞膜上的糖蛋白<sup>[19]</sup>。体外实验证明,抗冻蛋白活性可通过一系列低分子化合物来提高或减弱<sup>[20]</sup>。一种含有碳水化合物的细菌抗冻蛋白,既具抗冻活性,又具冰核活性;去除碳水化合物部分,冰核活性也随之消失<sup>[21]</sup>。

当抗冻蛋白-冰晶复合体与其他分子的亲和相互作用达到一定程度时,抗冻蛋白-冰晶复合体就团聚起来,从而使冰核变大,表面自由能降低,冰晶生长被促进,抗冻蛋白呈破坏作用;反之,若亲和相互作用小,抗冻蛋白-冰晶复合体不团聚,抗冻蛋白仅起到抑制重结晶的作用,它有利于超低温保存。

按照这个模型,前面讲到的诸因子,即,冷冻保护剂组成和浓度,降温 and 复温速度,抗冻蛋白类型和浓度,最初冰核数目,以及被冻细胞表面特征等等,实际上可能影响了亲和相互作用的强烈程度。新模型可简化为图1。

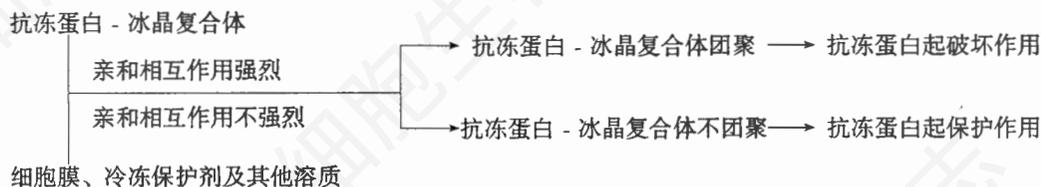


图1 亲和相互作用偶联团聚模型(自绘)

#### 五、小结与展望

抗冻蛋白在超低温保存中具有双重作用。最新进展,包括抗冻蛋白分子进化、结构生物学以及可逆

激活等,使建立一个新模型来解释这种双重作用成为可能。亲和相互作用偶联团聚模型很好地解释了这种双重作用。当然这个新模型也存在一定缺陷,例如,有些学者认为抗冻蛋白样品中易含有杂质,而

正是这些杂质促使成冰核效应发生;又如,不同类型的抗冻蛋白表现出不同的成冰核行为。这些都是新模型不曾包含的内容,有待进一步研究。

目前对鱼类四种抗冻蛋白(I型到IV型)及一种抗冻糖蛋白的研究比较详细,对植物抗冻蛋白<sup>[22,23]</sup>和昆虫抗冻蛋白<sup>[15,16]</sup>的研究也在不断深入。黑麦草(*Lolium perenne*)抗冻蛋白阻止重结晶的能力比鱼类抗冻蛋白和昆虫抗冻蛋白强得多,并且与脱水蛋白(dehydrins)一样,它们是煮沸稳定蛋白<sup>[22]</sup>。转基因烟草稳定合成胡萝卜抗冻蛋白,在温室生长条件下就有很强的抗冻性<sup>[23]</sup>。总体来说,无论对应用低温生物学还是对理论低温生物学,抗冻蛋白都具有重要意义。

### 参 考 文 献

- [1] 王君晖、黄纯农,1996,细胞生物学杂志,18:107-111.  
 [2] Wang J H,2000, *Cryobiology*,41:1-9.  
 [3] Yang D, Sax M, Chakrabartty A, et al., 1988, *Nature*, 1988,333:232-237.  
 [4] Knight C, DeVries A L, Oolman L D, 1984, *Nature*, 308: 295-296.  
 [5] Rubinsky B, Arav A, Fletcher G, 1991, *Biochem Biophys Res Commun*, 180:566-571.  
 [6] Naidenko T, 1997, *Cryoletters*, 18:375-382.  
 [7] Carpenter J F, Hansen T N, 1992, *Proc Natl Acad Sci*

USA, 89:8953-8957.

- [8] 王君晖等,1999,实验生物学报,32:271-276.  
 [9] Rubinsky B, Arav A, Mattioli M, et al., 1990, *Biochem Biophys Res Commun*, 173:1369-1374.  
 [10] Hinch D K, DeVries A L, Schmitt J M, 1993, *Biochem Biophys Acta*, 146:258-264.  
 [11] Hays L M, Feeney R E, Crowe L M, et al., 1996, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:6835-6840.  
 [12] Wu Y L, Fletcher G L, *Biochem Biophys Acta*, 2000, 1524:11-16.  
 [13] Cheng A, Merz K M, 1997, *Biophys J*, 73:2851-2873.  
 [14] Jia Z C, DeLuca C I, Chao H, et al., 1996, *Nature*, 21: 285-288.  
 [15] Graether S P, Kuiper M J, Gagne S M, et al., 2000, *Nature*, 406:325-328.  
 [16] Lion Y C, Tocilj A, Davies P L, et al., 2000, *Nature*, 406:322-324.  
 [17] Wang T, Zhu Q, Yang X, et al., 1994, *Cryobiology*, 31: 185-192.  
 [18] Pham L, Dahiya R, Rubinsky B, 1999, *Cryobiology*, 38: 169-175.  
 [19] Ewart K V, Li Z, Yang D S, et al., 1998, *Biochemistry*, 37:4080-4985.  
 [20] Li N, Andorfer C A, Duman J G, 1998, *J Exp Biol*, 201: 2243-2251.  
 [21] Xu H, Griffith M, Patten C L, et al., 1998, *Can J Microbiol*, 44:64-73.  
 [22] Chris S, Sarah B, Paul P, et al., 2000, *Nature*, 406:256.  
 [23] Dawn W, Luisa E, David A, et al., 1998, *Science*, 282: 115-117.

## 绿色荧光蛋白及其在细胞生物学研究中的应用\*

吴春利 刘洁生\*\* 杨维东

(暨南大学生物工程学系 广州 510632)

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的发现和应 用被称为细胞生物学上的一次革命。1962年 Shimomura<sup>[1]</sup>等首先从一种水母类动物 *Aequorea Victoria* 中分离纯化出了 GFP, 1992年 Prasher<sup>[2]</sup>等克隆了 GFP 基因的 cDNA 并分析了 GFP 的一级结构, 1994年 M. Chalfie<sup>[3]</sup>等最早用重组野生型 GFP 基因做报告基因, 成功地在原核和真核生物中得到表达。此后, 人们对 GFP 的性质和应用进行了不断深入的研究, 现在它已经发展成了现代生物学研究的一个精确工具。目前 GFP 在细胞生物学、植物学、动物学、微生物学等学科研究中都有着相当广泛的应用。随着人们对 GFP 发光机制研究的深入, 通过对其发光团区域和其它区域进行随机诱变, 已经得到了许多 GFP 突变型, 有的发蓝光或黄光而不是绿光<sup>[4]</sup>; 有的发出的荧光比野生型

的强很多, 激发后很容易用肉眼观察到; 有的则是温度突变型, 其表达不受温度的限制<sup>[5]</sup>; 有的突变体则可以特异地在某些物种中高效表达。这些突变体极大地拓宽了 GFP 的应用范围, 使 GFP 在生物学的应用显示出更为广阔和诱人的前景。

### 一、绿色荧光蛋白的分子特性及发光机制

随着对绿色荧光蛋白研究的深入, 人们发现从不同动物体内提取的荧光蛋白的结构、性质不尽相同, 不同动物品种的荧光产生机理也有很大的差别。目前研究得较为深入的是来自多管水母科

\* 教育部科学技术研究重点项目(00214)和广州市科技项目(2001-Z-056-01)资助课题。

\*\* 通讯联系人。