

昆虫抗冻蛋白：规则结构适应功能

邵 强, 李海峰, 徐存拴

(河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007)

摘要：抗冻蛋白在环境温度低于体液熔点时能够结合到生物体内的冰核表面, 通过限制冰核生长和抑制冰晶重结晶而保护有机体免受结冰引起的伤害。与其他生物抗冻蛋白比较, 昆虫抗冻蛋白有很强的活性, 结构上具有显著特征, 如一级结构规律重复, 超二级结构为 β -螺旋, 可与冰晶发生相互作用, 具有 TXT 基序等。该文综述了近年来关于昆虫抗冻蛋白的结构以及分子生物学等方面研究的新进展, 讨论了其结构与功能的关系。

关键词：昆虫；抗冻蛋白； β -螺旋结构；TXT 基序；表达

中图分类号：Q966 文献标识码：A 文章编号：0454-6296(2006)03-0491-06

New advances on insect antifreeze proteins : Regular structure suitable for function

SHAO Qiang, LI Hai-Feng, XU Cun-Shuan (College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007, China)

Abstract : Antifreeze proteins are also defined as thermal hysteresis proteins. They are one kind of functional proteins discovered in many organisms. When the temperature is subzero, they can bind to the surface of the ice nucleations to restrict their growth so as to protect organisms from injury caused by freezing. Insect antifreeze proteins have special structures such as repeat sequences, β -helix and TXT motifs. Additionally, they have stronger antifreeze activity than antifreeze proteins of other organisms. In this article, the special properties of insect antifreeze protein are introduced in detail; new advances on their structure and molecular biology are reviewed. Meanwhile, the function of TXT motif and the relationship between structure and function are discussed.

Key words : Insect; antifreeze protein; β -helix; TXT motif; expression

抗冻蛋白(antifreeze protein, AFP)又被称为热滞蛋白(thermal hysteresis protein, THP), 具有热滞效应和重结晶抑制效应, 能够保护生物有机体免受结冰引起的伤害, 其抗冻活性通常定义为热滞性, 大小用热滞系数表示。目前已经在鱼类、昆虫、植物体、细菌和真菌体内发现多种抗冻蛋白(Jack *et al.*, 2004; Steffen and Brian, 2004)。在自然选择和平行进化作用下(Swanson and Charles, 2002) 这些蛋白质结构呈现多样性(Leinala *et al.*, 2002b)。

Grimstone 等(1968)首先证明黄粉甲 *Tenebrio molitor* 幼虫能够产生抗冻蛋白, 随后科学家们在多种昆虫体内发现了抗冻蛋白的存在。Duman 等(2004)分别检测了生活在美国阿拉斯加州的 75 种

昆虫和 6 种蜘蛛的血淋巴, 在 18 种昆虫和 3 种蜘蛛中检测到了抗冻蛋白, 这说明抗冻蛋白在昆虫中是比较普遍存在的。目前研究比较透彻的昆虫抗冻蛋白是黄粉甲、云杉卷叶蛾 *Choristoneura fumiferana* 和赤翅甲 *Dendroides canadensis* 抗冻蛋白, 它们都包括一系列结构相似、长度相同或不不同的同系物(Eeva *et al.*, 2002)。NCBI 数据库显示(截至 2006 年 2 月) 3 种昆虫已知的抗冻蛋白氨基酸序列分别有 23、16 和 19 种。

另外, Kristiansen 等(2005)在松皮天牛 *Rhagium inquisitor* 血淋巴中发现 6 种抗冻蛋白, 这些蛋白质分子量在 12.5 ~ 12.8 kD 之间, 等电点在 8 以上。通过离子交换层析已经纯化得到了其中 3 种, 处于主

导地位的是 RiAFP(H4),在阴离子和阳离子状态下,该蛋白都能与冰相互作用。与以上 3 种昆虫的抗冻蛋白相比,抗冻蛋白 RiAFP(H4)具有较少的半胱氨酸残基和较多的苏氨酸残基。经胰蛋白酶消化后,其肽指纹图谱与已知的蛋白质都不能互相匹配。Li 等(2000)在日本松盒瘦蚊 *Thecodiplosis japonensis* 越冬幼虫中分离纯化到两种抗冻蛋白,分子量分别是 34.9 和 37.8 kD,分子量为 37.8 kD 的抗冻蛋白在浓度为 50 mg/mL 时,热滞活性大约为 11°C。

费云标等(2000)对昆虫的抗冻蛋白曾作过综述。景晓红等(2002)以昆虫对低温的适应为题综述了昆虫抗冻蛋白的研究进展,其文献引用截止于 2000 年。近几年,国际上昆虫抗冻蛋白的研究进展很快,尤其在结构生物学和分子生物学方面,国内的相关研究工作也开始起步,本文结合作者的研究方向,综述了该领域的最新研究进展。

1 昆虫抗冻蛋白的特点

1.1 很强的抗冻活性

在生理状态下,昆虫抗冻蛋白可以把血淋巴的冰点降低 5°C 甚至更多,而一般鱼类抗冻蛋白只能把体液冰点降低 1.5°C,昆虫抗冻蛋白比大多数已发现的其他来源的抗冻蛋白活性都强(Yang *et al.*, 2003)。作为例外,Marshall 等(2004b)在极地鱼美洲拟鲈 *Pleuronectes americanus* 中发现了一种活性与昆虫抗冻蛋白活性相当的抗冻蛋白,能够使这种鱼在 -1.9°C 的环境中生存,但该蛋白质在常温下失活。体外表达的几种昆虫抗冻蛋白最大抗冻活性是一般鱼类抗冻蛋白的 3~4 倍(Graether *et al.*, 2000)。而在微摩尔级浓度时,一种富含苏氨酸和半胱氨酸的 84 个氨基酸残基的黄粉甲抗冻蛋白,其热滞活性为鱼类抗冻蛋白的 10~100 倍(Liou *et al.*, 1999)。

1.2 一级结构富有规律

黄粉甲抗冻蛋白是具有右手平行 β -螺旋结构的小分子蛋白,通过多个二硫键交连,螺旋结构内包含串联重复的由 12 个氨基酸残基(TCTXSXXCXXAX)组成的环(Liou *et al.*, 2000b)。云杉卷叶蛾抗冻蛋白(CfAFP)具有左手 β -螺旋结构,每环由 15 个氨基酸残基组成(Doucet *et al.*, 2002)。赤翅甲抗冻蛋白(DcAFP)具有右手 β -螺旋结构,氨基酸序列包含由 12 或 13 个氨基酸残基组成的重复序列:Cys-Thr-X3-Ser-X5-X6-Cys-X8-X9-Ala-X11-Thr-X13,在成熟蛋白质中每隔 6 个氨基酸有 1 个半胱氨酸,这与黄粉

甲抗冻蛋白类似(Duman *et al.*, 2002)。

1.3 基因转录和表达的双重调节及组织特异性

Graham 等(2000)研究表明,在适宜的生存环境下,低龄黄粉甲幼虫(11~13 mg)含有低水平的抗冻蛋白和抗冻蛋白 mRNA,当幼虫发育到最后阶段(体重 > 190 mg),两者的水平分别增加 10 倍和 18 倍。低温、干燥和饥饿都能使抗冻蛋白和抗冻蛋白 mRNA 的水平增高。Graham 等(2000)的工作同时表明,在化蛹期抗冻蛋白 mRNA 的水平至少下降 20 倍,抗冻蛋白表达水平也下降,但下降速度缓慢,低温处理不能逆转这种下降趋势。Doucet 等(2002)对云杉卷叶蛾抗冻蛋白的差异表达研究表明,云杉卷叶蛾抗冻蛋白家族 9 kD 蛋白质的转录主要受发育阶段的调节,而季节性的低温起次要作用。这些研究说明抗冻蛋白基因的转录和表达既受环境的影响,也受发育阶段的影响。

抗冻蛋白的表达还具有组织特异性。赤翅甲抗冻蛋白家族包括 12 种相似的蛋白质,这些蛋白质由于序列不同而分属于 3 组(Duman *et al.*, 2002)。用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱法(MALDI-TOF)研究表明,血淋巴中只含有第 1 组赤翅甲抗冻蛋白(DcAFP-I, II, IV, VI),在中央管体液中则含有第 2 组(DcAFP-VIII, IX, X, XI)和第 3 组(DcAFP-III, V, VII, XII)抗冻蛋白。RT-PCR 显示在脂肪体中 12 种赤翅甲抗冻蛋白的基因都转录,而在中央管上皮组织中只转录第 2 组和第 3 组赤翅甲抗冻蛋白的基因(Duman *et al.*, 2002)。在黄粉甲体内,脂肪体细胞抗冻蛋白的表达量明显高于其他组织(Graham *et al.*, 2000)。

2 昆虫抗冻蛋白的立体结构

已知立体结构的昆虫抗冻蛋白都具有 β -螺旋结构(Steffen *et al.*, 2004)和串联重复的螺旋环(Duman *et al.*, 2002; Daley *et al.*, 2002; Leinala *et al.*, 2002a)。形成这种结构可能的原因是 β -螺旋蛋白中螺旋环之间的距离(4.75 Å)与冰格内氧原子之间的距离(4.5 Å)很接近,且原子排列相似,因而两者能够紧密互补(Graether *et al.*, 2000)。其中黄粉甲抗冻蛋白被认为是自然界结构最规则的蛋白质之一,除了其 N 端 14 个氨基酸组成的帽子结构外,各个螺旋环几乎保持相同的构象。

2.1 黄粉甲抗冻蛋白的晶体结构和 NMR 结构

到目前为止,共解析出 3 种成熟蛋白质氨基酸

残基数目为 84 的黄粉甲抗冻蛋白的晶体结构或溶液中的 NMR 结构, PDB 编号分别为 1EZG-A、1EZG-B (Liou *et al.*, 2000b) 和 1L11-A (Daley *et al.*, 2002)。Liou 等(2000b)详细研究了 84 个氨基酸残基的黄粉甲抗冻蛋白的晶体结构, 其分辨率为 1.4 Å, 结果表明蛋白质主链中的 6 个环氨基酸序列保守性很高, 保守的氨基酸的侧链也朝向同一个方向。蛋白质几乎没有疏水核心, 螺旋环结构核心具有丝氨酸残基, 构象主要通过多个二硫键和氢键得以稳定 (Steffen *et al.*, 2004)。黄粉甲抗冻蛋白总的形状是一个三棱柱体, 表面积为 1 180 Å², 有一个由 6 个 β-折叠股参与构成的面积为 6.5 Å × 15 Å 的长方形平坦表面, 该表面被认为是与冰晶发生相互作用的部位。其 NMR 结构与晶体结构非常相似, 只不过在 NMR 结构中未显示出 C 末端螺旋圈的 β-折叠股, N-末端重叠也较少, 这可能是由于这一部分结构在溶液中比较松弛 (Liou *et al.*, 2000b)。

2.2 云杉卷叶蛾抗冻蛋白 337 和 501 及其结构

云杉卷叶蛾抗冻蛋白 337 是一种研究比较透彻的昆虫抗冻蛋白。Leinala 等(2002a)解析出了这种蛋白质的晶体结构, 分辨率为 2.3 Å, 正是这个晶体结构揭示了云杉卷叶蛾抗冻蛋白的左手 β-螺旋结构, 重复的螺旋环以及重复的 Thr-Xxx-Thr 基序 (TXT motif)。除了包括云杉卷叶蛾抗冻蛋白 337 在内的分子量大约为 9 kD 的同系物外, 云杉卷叶蛾体内还能产生另一组分子量大约为 12 kD 的抗冻蛋白同系物, 这组同系物比 9 kD 的同系物多了一段 30 或 31 个氨基酸残基组成的插入序列。Eeva 等(2002)对这组同系物的一种云杉卷叶蛾抗冻蛋白 501 进行了详细研究, 解析得到了它的晶体结构。云杉卷叶蛾抗冻蛋白 501 保留了云杉卷叶蛾抗冻蛋白 337 的左手螺旋结构, 与云杉卷叶蛾抗冻蛋白 337 相比序列的保守性很高, 但比云杉卷叶蛾抗冻蛋白 337 多了 31 个氨基酸的插入序列。比较二者晶体结构发现, 云杉卷叶蛾抗冻蛋白 501 比云杉卷叶蛾抗冻蛋白 337 在 β-螺旋结构的中央区域形成了额外的两个环 (16 + 15), 从而延长了 β-螺旋结构的长度。这有效地增大了二维苏氨酸序列与冰结合的面积, 增强了抗冻活性。实验证明, 云杉卷叶蛾抗冻蛋白 501 的热滞活性是云杉卷叶蛾抗冻蛋白 337 的 3 倍。在 cDNA 水平上切去编码云杉卷叶蛾抗冻蛋白 501 插入部分的基因, 表达的蛋白质其活性和较短的云杉卷叶蛾抗冻蛋白即 9 kD 的同系物相似。这说明云杉卷叶蛾抗冻蛋白 501 的活性与其 β-螺旋结构的长度和冰

结合面积的大小直接呈正相关 (Eeva *et al.*, 2002)。最近, Li 等(2005)解析出了云杉卷叶蛾抗冻蛋白 501 的溶液 NMR 结构, 结果显示在溶液中该蛋白保持了其刚性和规则的结构, 除了 N-端和 C-端外, 其 NMR 结构与其晶体结构相似。

3 TXT 基序

抗冻蛋白吸附到体液中的冰表面, 抑制冰晶生长并降低冰点 (Daley *et al.*, 2002; Jason *et al.*, 2003) 通过非共价吸附-抑制机制保护多种有机体免受结冰引起的伤害 (Swanson *et al.*, 2002)。冰和蛋白质面对面的互补对于二者形成氢键从而紧密结合起着关键作用 (Davies *et al.*, 2002)。黄粉甲和云杉卷叶蛾抗冻蛋白表面都具有重复的 TXT 基序, 能够与冰晶形成紧密的面对面的互补体 (Eeva *et al.*, 2002; Marshall *et al.*, 2002)。

3.1 TXT 基序的保守性

通过定点突变技术, 用 Val 或 Arg 取代分子量为 12 kD 的云杉卷叶蛾抗冻蛋白中 TXT 基序的第 1 位 Thr, 重组蛋白质显示出一定的活性; 相对而言, 云杉卷叶蛾 TXT 基序中第 2 位 Thr 则较保守, 对高活性的抗冻蛋白来说, 第 2 位 Thr 在蛋白质和冰的相互作用中非常重要 (Doucet *et al.*, 2000)。Marshall 等(2002)用基因突变技术使黄粉甲抗冻蛋白 TXT 基序中 Thr 残基发生突变, 虽然核磁共振波谱分析显示多数突变体可以折叠完好, 但多数突变体导致抗冻蛋白活性大幅度下降。当 26、38、40、62 位的苏氨酸突变为酪氨酸, 引起 90% 活性的丧失; 40 位的苏氨酸突变为赖氨酸时, 同样引起 90% 活性的丧失, 如果突变为亮氨酸, 突变体则保持 25% 的活性。以上研究表明 TXT 基序具有相当的保守性, 在维持抗冻蛋白的活性方面起着重要作用。

3.2 TXT 基序与冰晶网格相互匹配

证明具有 TXT 基序的表面与冰核的表面相结合的直接证据则来自于晶体结构分析。在云杉卷叶蛾抗冻蛋白 337 和云杉卷叶蛾抗冻蛋白 501 的一个表面上, TXT 基序中的 Thr 残基序列形成了与冰的结合位点 (Eeva *et al.*, 2002; Leinala *et al.*, 2002a)。

冰冻蚀刻实验和冰晶形态学实验表明, 一种 9 kD 的云杉卷叶蛾抗冻蛋白在与冰晶结合面上, 9 个 TXT 基序中的 Thr 既与冰核的底面冰格匹配, 又可与冰核的侧面冰格匹配, 所以抗冻蛋白与冰核的两个表面结合, 这个模型也可以解释云杉卷叶蛾抗冻

蛋白很强的活性 (Graether *et al.*, 2000)。

在接近结冰温度时,黄粉甲抗冻蛋白 TXT 基序的 Thr 侧链可形成一种处于优势的构型,而由 Thr 侧链形成的这种优势构型在抗冻蛋白-冰晶界面能够与冰晶网格相互匹配 (Margaret *et al.*, 2003)。

3.3 TXT 基序与水分子

Liou 等(2000b)对 8.4 kD 的黄粉甲抗冻蛋白的晶体结构研究表明,与冰晶发生作用前,与冰格产生近乎完美匹配 TXT 基序中 Thr 的羟基,和外部的水分子紧密结合,使涉及到的 3 列氧原子形成一个平面结构。Yang 等(2003)研究了黄粉甲抗冻蛋白-水、黄粉甲抗冻蛋白-水-冰和黄粉甲抗冻蛋白-冰三种系统的稳定性、相互之间的能量、轨道的重叠等特征,并分析了它们的构象,证明在与冰晶结合之前,水分子是黄粉甲抗冻蛋白完整结构的一部分,它们可以帮助黄粉甲抗冻蛋白识别和结合冰晶;在两者结合后,水分子被排除出抗冻蛋白-冰复合体之外,水分子的离去有利于抗冻蛋白和冰形成较好的二维匹配结构。

以上这些研究表明,在具有 TXT 基序的昆虫抗冻蛋白中,包含 TXT 基序的面就是蛋白质与冰晶结合的表面。在二者的结合中重复的 TXT 基序起着重要作用,其中的 Thr 侧链以及水分子起着关键作用。如果 Thr 残基发生突变,则影响了蛋白质和冰的完美互补,进而影响蛋白质的活性。应该指出, TXT 基序并不是所有昆虫抗冻蛋白的必需结构 (Steffen *et al.*, 2004),这可能是由于不同种类的昆虫对抗冻蛋白的要求不一样,有的昆虫是避免结冰的昆虫,对热滞性要求高;而有的昆虫虽然也能够产生抗冻蛋白,但它们可以忍受胞间结冰 (Duman *et al.*, 2004),所以不含 TXT 基序的抗冻蛋白就能够帮助它们免受伤害。

4 昆虫抗冻蛋白分子生物学研究进展

4.1 基因的克隆

NCBI 数据库资料(截至 2006 年 2 月)表明,黄粉甲 23 种抗冻蛋白的 DNA 序列或 cDNA 序列已经被确定,其中包括本实验室克隆到的仅编码 72 个氨基酸的黄粉甲抗冻蛋白 cDNA 序列 (GenBank 登录号: AY929389)及其他 5 种 cDNA 序列;云杉卷叶蛾抗冻蛋白和赤翅甲抗冻蛋白也分别有 17 种和 19 种 DNA 序列或 cDNA 序列被确定。Doucet 等(2002)克隆了编码 9 kD 云杉卷叶蛾抗冻蛋白同系物的基因

afp-Lu1 和编码 12 kD 云杉卷叶蛾抗冻蛋白同系物的基因 *afp-Lu1*,发现这两个基因都有一段 3~3.6 kb 的内含子, Southern 印迹显示云杉卷叶蛾抗冻蛋白家族大约有 17 种基因。Qin 和 Walker(2006)分析了 11 种黄粉甲基因的片段,未发现内含子的存在,但发现具有相似的调控序列。上述基因的克隆和调控序列的确定为在体外表达系统中表达重组昆虫抗冻蛋白和进行转昆虫抗冻蛋白基因研究奠定了基础。

4.2 体外表达

Gauthier 等(1998)用大肠杆菌表达系统表达云杉卷叶蛾抗冻蛋白 337, Eeva 等(2002)在大肠杆菌表达系统中表达云杉卷叶蛾抗冻蛋白 501,重组蛋白都得到了表达,但都是无活性的包含体,经过处理,蛋白质重新折叠后,经高效液相层析,在洗脱中前者出现两个峰,分别为错误折叠和正确折叠的蛋白,而后者只出现一个峰即折叠完好的蛋白质洗脱峰,这说明经过后期处理后,重组的云杉卷叶蛾抗冻蛋白 501 能够全部形成正确折叠的有活性的蛋白,而云杉卷叶蛾抗冻蛋白 337 重组蛋白则只有一部分能够形成有活性的蛋白。

Liou 等(2000a)在大肠杆菌中表达一种 8.5 kD、包含 8 个二硫键的黄粉甲抗冻蛋白,重组蛋白大部分聚集在上清液中,但也呈现无活性的非折叠状态。在 22℃ 或 4℃ 时,分别经过数天或数周才能完成正确折叠。样品经过反相 HPLC 除去折叠错误的蛋白后,核磁共振和二级结构分析结果与 β -螺旋模型一致,重组蛋白没有自由-SH 基。在浓度为 1 mg/mL 时,热滞活性为 2.5℃,而一般的鱼类抗冻蛋白在 10~20 mg/mL 时,热滞活性大约为 1℃。这说明重组蛋白的活性还是相当高的。

Marshall 等(2004a)在 84 个氨基酸的黄粉甲抗冻蛋白基因序列的基础上减去或者加上螺旋环,分别构建了包含 6~11 个螺旋环的重组基因,表达产物通过冰亲和层析剔除了错误折叠的蛋白质。结果表明,9-螺旋环的蛋白活性最强,在 0.7 mg/mL 时,热滞活性达到 6.5℃,但当螺旋环增加到 10~11 时,活性开始下降。

国内刘忠渊等(2005)在大肠杆菌中以融合蛋白形式表达赤翅甲抗冻蛋白获得成功,抗冻融合蛋白能在一定程度上提高细菌的耐寒能力。以上实验说明大肠杆菌表达系统表达的昆虫抗冻蛋白,经过后期处理能够形成有活性的抗冻蛋白。

Marshall 等(2004a)以及 Liu 等(2005)的研究结果表明:在一定范围内,随着串联重复的螺旋环数

量的增加,抗冻蛋白的 β -螺旋与冰晶之间的匹配程度逐渐上升,螺旋环数量达到一定数量时,相互作用能量达到上限。

4.3 转基因研究

通过农杆菌 *Agrobacterium* 介导, Huang 等(2002)把编码赤翅甲抗冻蛋白的基因转入一种唐松草属植物 *Arabidopsis thaliana*, 在转基因植物体内, 包含和不包含信号肽的抗冻蛋白都有表达, 提取的蛋白质和叶片质外体的体液都表现出热滞性。与野生型相比, 虽然转基因植物没有显示出明显的适应冰冻的生存能力, 但环境变冷时, 转基因植物胞外体液的冰点明显低于野生型。

Holmberg 等(2001)模仿烟草高效表达的一个核基因来选择密码子, 把编码烟草致病相关蛋白 1 b 先导序列的基因和编码成熟云杉卷叶蛾抗冻蛋白的主要序列融合, 通过花椰菜花叶病毒介导, 把合成基因导入烟草基因组。在强启动子作用下, 转基因成功的烟草表现出增强的抗冻能力。

5 结语

目前, 国内对昆虫抗冻蛋白的研究刚刚起步, 涉及范围包括昆虫抗冻活性研究(Chen and Kang, 2002), 对昆虫抗冻蛋白活性的理论分析(Yang *et al.*, 2003); 获得表达的昆虫抗冻蛋白有赤翅甲抗冻蛋白(刘忠渊等, 2005)、新疆准噶尔小胸螯甲 *Microdera punctipennis dzunarica* 抗冻蛋白(赵干等, 2005)和黄粉甲抗冻蛋白(本实验室, 待发表)。由于昆虫抗冻蛋白具有很强的活性和特殊的结构, 因而具有理论研究和应用研究的双重价值。相信在不远的将来, 国内昆虫抗冻蛋白的研究会有一个较大的发展。

参 考 文 献 (References)

- Chen B, Kang L, 2002. Cold hardiness and supercooling capacity in the pea leafminer *Liriomyza huidobrensis*. *Cryo Letters*, 23(3): 173–182.
- Daley ME, Spyrapoulos L, Jia Z, Davies PL, Sykes BD, 2002. Structure and dynamics of a β -helical antifreeze protein. *Biochemistry*, 41(17): 5 515–5 525.
- Davies PL, Baardsnes J, Kuiper MJ, Walker VK, 2002. Structure and function of antifreeze proteins. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 357: 927–935.
- Doucet D, Tyshenko MG, Davies PL, Walker VK, 2002. A family of expressed antifreeze protein genes from the moth, *Choristoneura fumiferana*. *Eur. J. Biochem.*, 269(1): 38–46.
- Doucet D, Tyshenko MG, Kuiper MJ, Graether SP, Sykes BD, Daugulis AJ, Davis PL, Walker VK, 2000. Structure-function relationships in spruce budworm antifreeze protein revealed by isoform diversity. *Eur. J. Biochem.*, 267(19): 6 082–6 088.
- Duman JG, Bennett V, Sformo T, Hochstrasser R, Bames BM, 2004. Antifreeze proteins in Alaskan insects and spiders. *Journal of Insect Physiology*, 50: 259–266.
- Duman JG, Verleye D, Li N, 2002. Site-specific forms of antifreeze protein in the beetle *Dendroides canadensis*. *J. Comp. Physiol. (B)*, 172(6): 547–552.
- Eeva KL, Davies PL, Doucet D, Tyshenko MG, Walker VK, Jia Z, 2002. A β -helical antifreeze protein isoform with increased activity. *J. Biol. Chem.*, 277(36): 33 349–33 362.
- Fei YB, Jiang Y, Zhao SH, 2000. Advances in insect antifreeze protein research. *Acta Entomol. Sin.*, 43(1): 99–102. [费云标, 江勇, 赵淑慧, 2000. 昆虫抗冻蛋白的研究进展. *昆虫学报*, 43(1): 99–102]
- Gauthier SY, Kay CM, Sykes BD, Walker VK, Davies PL, 1998. Disulfide bond mapping and structural characterization of spruce budworm antifreeze protein. *Eur. J. Biochem.*, 258: 445–453.
- Graether SP, Kuiper MJ, Gagne SM, Walker VK, Jia Z, Sykes BD, Davies PL, 2000. β -helix structure and ice-binding properties of a hyperactive antifreeze protein from an insect. *Nature*, 406(6 793): 325–328.
- Graham LA, Walker VK, Davies PL, 2000. Developmental and environmental regulation of antifreeze proteins in the mealworm beetle *Tenebrio molitor*. *Eur. J. Biochem.*, 267(21): 6 452–6 458.
- Grimstone AV, Mullinger AM, Ramsay JA, 1968. Further studies on the rectal complex of the meal worm, *Tenebrio molitor*. *Philos. Trans. R. Soc. London B.*, 253: 343–382.
- Holmberg N, Farres J, Bailey JE, Kallio PT, 2001. Targeted expression of a synthetic codon optimized gene, encoding the spruce budworm antifreeze protein, leads to accumulation of antifreeze activity in the apoplasts of transgenic tobacco. *Gene*, 275(1): 115–124.
- Huang T, Nicodemus J, Zarka DG, Thomashow MF, Wisniewski M, Duman JG, 2002. Expression of an insect (*Dendroides canadensis*) antifreeze protein in *Arabidopsis thaliana* results in a decrease in plant freezing temperature. *Plant Mol. Biol.*, 50(3): 333–344.
- Jack A, Hill PG, Dodd CE, Laybourn-Parry J, 2004. Demonstration of antifreeze protein activity in Antarctic lake bacteria. *Microbiology*, 150: 171–180.
- Jason B, Michael JK, Peter LD, 2003. Antifreeze protein dimer: When two ice-binding faces are better than one. *J. Biol. Chem.*, 278(40): 38 942–38 947.
- Jing XH, Hao SG, Kang L, 2002. Cold adaptation in insects: progress in antifreeze protein research. *Acta Entomol. Sin.*, 45(5): 679–683 [景晓红, 郝树广, 康乐, 2002. 昆虫对低温的适应——抗冻蛋白研究进展. *昆虫学报*, 45(5): 679–683]
- Kristiansen E, Ramlov H, Hagen L, Pedersen SA, Andersen RA, Zachariassen KE, 2005. Isolation and characterization of hemolymph antifreeze proteins from larvae of the longhorn beetle *Rhagium inquisitor* (L.). *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 142(1): 90–97.

- Leinala EK, Davies PL, Jia Z, 2002a. Crystal structure of *beta*-helical antifreeze protein points to a general ice binding model. *Structure (Camb)*, 10(5): 619–627.
- Leinala EK, Davies PL, Jia Z, 2002b. Elevated temperature and tyrosine iodination aid in the crystallization and structure determination of an antifreeze protein. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 58: 1081–1083.
- Li C, Guo X, Jia Z, Xia B, Jin C, 2005. Solution structure of an antifreeze protein CfAFP-501 from *Choristoneura fumiferana*. *Biomol. NMR*, 32(3): 251–256.
- Li Y, Gong H, Park HY, 2000. Purification and partial characterization of thermal hysteresis proteins from over wintering larvae of pine needle gall midge, *Thecodiplosis japonensis* (Diptera: Cecidomyiidae). *Cryo Letters*, 21(2): 117–124.
- Liou YC, Daley ME, Graham LA, Kay CM, Walker VK, Sykes BD, Davies PL, 2000a. Folding and structural characterization of highly disulfide-bonded beetle antifreeze protein produced in bacteria. *Protein Expr. Purif.*, 19(1): 148–157.
- Liou YC, Thibault P, Walker VK, Davies PL, Graham LA, 1999. A complex family of highly heterogeneous and internally repetitive hyperactive antifreeze proteins from the beetle *Tenebrio molitor*. *Biochemistry*, 38(35): 11415–11424.
- Liou YC, Tocilj A, Davies PL, Jia Z, 2000b. Mimicry of ice structure by surface hydroxyls and water of a *beta*-helix antifreeze protein. *Nature*, 406(6793): 322–324.
- Liu K, Jia Z, Chen G, 2005. Systematic size study of an insect antifreeze protein and its interaction with ice. *Biophys. J.*, 88(2): 953–958.
- Liu ZY, Zhang FC, Wang Y, Lu GD, 2005. Expression of the antifreeze protein gene of a pyrochroid beetle *Dendroides canadensis* in prokaryote and detection of the protein biological activity. *Acta Entomol. Sin.*, 42(2): 179–183. [刘志渊, 张富春, 王芸, 吕国栋, 2005. 赤翅甲抗冻蛋白基因的原核表达及蛋白生物活性检测. *昆虫学报*, 42(2): 179–183]
- Margaret ED, Brian DS, 2003. The role of side chain conformational flexibility in surface recognition by *Tenebrio molitor* antifreeze protein. *Protein Science*, 12: 1323–1331.
- Marshall CB, Daley ME, Graham LA, 2002. Identification of the ice-binding face of antifreeze protein from *Tenebrio molitor*. *FEBS Lett.*, 529(2–3): 261–267.
- Marshall CB, Daley ME, Sykes BD, 2004a. Enhancing the activity of a *beta*-helical antifreeze protein by the engineered addition of coils. *Biochemistry*, 43(37): 11637–11646.
- Marshall CB, Fletcher GL, Davies PL, 2004b. Hyperactive antifreeze protein in a fish. *Nature*, 429(153): 1038.
- Qin W, Walker VK, 2006. *Tenebrio molitor* antifreeze protein gene identification and regulation. *Gene*, 367: 142–149.
- Steffen PG, Brian D, 2004. Cold survival in freeze-intolerant insects: the structure and function of *beta*-helical antifreeze proteins. *Eur. J. Biochem.*, 271: 3285–3296.
- Swanson WJ, Charles FA, 2002. Positive Darwinian selection promotes heterogeneity among members of the antifreeze protein multigene family. *J. Mol. Evol.*, 54(3): 403–410.
- Zhao G, Ma J, Xue N, Yang CG, Zhuan FF, Zhang FC, 2005. Cloning of a cDNA encoding antifreeze protein and its activity assay in *Microdera punctipennis dzunarica* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Acta Entomol. Sin.*, 48(5): 667–673. [赵干, 马纪, 薛娜, 杨长庚, 专芳芳, 张富春, 2005. 新疆准噶尔小胸鳖甲抗冻蛋白基因的克隆和抗冻活性分析. *昆虫学报*, 48(5): 667–673]
- Yang ZY, Zhou YX, Liu K, Cheng YH, Liu RZ, Chen GJ, Jia ZC, 2003. Computational study on the function of water within a β -helix antifreeze protein dimer and in the process of ice-protein binding. *Biophysical Journal*, 85: 2599–2605.

(责任编辑: 黄玲巧)