

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.19213

南极鱼抗冻蛋白功能和进化及其应用研究进展

张俊芳^{1, 2, 3}, 陶筱帆¹, 韩兵社^{1, 2, 3}

1. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

3. 上海海洋大学, 海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306

摘要: 南极海域在大约 2000 万年降到了零度以下, 在大多数鱼类由于无法适应极端寒冷环境而灭绝的情况下, 长期生活在极端寒冷、氧气充足的南极海域中的南极鱼亚目(Notothenioids)鱼类由于发生适应性进化而存活下来, 并且达 120 多种类。南极鱼在生化和生理等方面发生了众多适应性改变, 抗冻蛋白的产生是其中最重要的适应性特征之一。目前在极地鱼类中发现抗冻蛋白有 5 种类型, 包括抗冻糖蛋白(AFGP)和 4 种抗冻蛋白(AFP I、AFP II、AFP III 和 AFP IV)。虽然这些抗冻蛋白的起源和进化有所不同, 但他们都具有抗冻的功能。作为一类能够抑制冰晶生长的蛋白质, 南极鱼抗冻蛋白能使鱼的体液冰点降低至 $-2.2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 所以其体液在海水冰点之下仍能保持流动性, 避免冷冻损伤的发生。由于抗冻蛋白的热滞活性、冰重结晶抑制等天然活性, 使其在食品、农业、医药等领域具有良好的应用前景。本文将对南极鱼抗冻蛋白的起源、进化、功能、应用和目前存在的问题进行概括性的综述。

关键词: 南极鱼; 抗冻蛋白; 进化; 冷冻保存; 应用

中图分类号: S93

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)03-0355-07

在 6500 万年前的新生代时期, 南极大陆开始缓慢移动, 同时其温度逐渐降低, 到大约 2000 万年前温度降到 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下。随着海水温度的降低, 多数鱼类由于无法适应而灭绝^[1]。部分鱼类发生了适应性进化, 适应了极端寒冷环境而生存下来, 形成了现在的南极鱼类。据统计, 占地球海洋总面积约 10% 的南大洋拥有的鱼类包括 50 个科, 322 个种, 仅占地球鱼类总数的 1.3%。其中硬骨鱼南极鱼亚目(Notothenioids) 鱼类达 120 多种, 占南大洋所有鱼类的 46%, 而在南极洲周围海域南极鱼亚目比例高达 90%^[2]。

南极鱼常年生活在稳定的、极端寒冷和氧气充足的南极海域中, 在生化和生理功能等方面发生了许多适应性改变和新的性状以适应南极的极端环境, 其中抗冻蛋白是南极鱼适应极端寒冷环境的最重要特征之一^[3-4]。20 世纪 60 年代, 科学家首次在南极冰鱼(Nototheniidae)血液中发现抗

冻糖蛋白(antifreeze glycoprotein, AFGP)^[4]。目前已知大多极地鱼类和冷水鱼体内都可以产生抗冻蛋白(antifreeze protein, AFP)或抗冻糖蛋白, 这些蛋白质可以把鱼类体液的冰点降低, 从而在环境水域冰点之下仍能保持体液的流动性, 避免冷冻损伤的发生^[5]。近年来研究发现, 其他极地物种包括昆虫、植物、微生物也可以产生抗冻蛋白^[6]。随着对抗冻蛋白认识的不断深入, 科学家渐渐把抗冻蛋白应用在农业、医药、食品和工业等多个领域。

1 南极鱼类抗冻蛋白分子特征和适应性进化

目前至少 1 种抗冻糖蛋白和 4 种抗冻蛋白已经被鉴定出来, 它们分布在多种分类地位相差很远的极地鱼类中。这些抗冻蛋白的氨基酸序列和空间结构都不相同, 但都具有结合冰晶并抑制冰晶生长的功能。最初在南极冰鱼(Nototheniidae)

收稿日期: 2019-08-18; 修订日期: 2019-10-19.

基金项目: 中国工程院战略研究项目(2018-ZD-08).

作者简介: 张俊芳, 教授, 从事鱼类环境适应和表观遗传学研究. E-mail: jfzhang@shou.edu.cn

中发现 AFGP, 由一个糖三肽(Thr-Ala-Ala)基本结构单位重复组成, Thr 残基上可以连接双糖基团(β -D 半乳糖基, 1,3- α -N-乙酰氨基半乳糖), 糖基上发生化学修饰会降低 AFGP 的抗冻活性。鱼类可以合成一系列大小不一的 AFGP 分子, 由不同数量的糖三肽单位聚合而成。根据糖三肽单位重复数目不同, AFGP 可分为 8 个类别, 重复数为 4~50, 分子量从 2.7~32 kD^[7]。

鱼类的 AFP 也根据氨基酸组成和结构差异进行分类。I 型抗冻蛋白(AFP I)存在于北极和北大西洋的扁鱼(*Pleuronecte* spp.)和杜父鱼(*Myoxocephalus* spp.)中, 是 3.5~4.5 kD 的小分子肽。AFP I 分子中富含丙氨酸(Ala), 形成一个几乎规范的 α 螺旋结构^[8]。II 型抗冻蛋白(AFP II)是分子量 14~17 kD 的多肽, 富含半胱氨酸(Cys), 分布范围较窄, 目前仅在大西洋鲱(*Clupea harengus*)和美绒杜父鱼(*Hemitripterus americanus*)等几种鱼中发现 AFP II^[9]。III 型抗冻蛋白(AFP III)是研究最为广泛的一种抗冻蛋白, 主要分布在极地海域和大西洋的几种绵鲷亚目(Zoarcidae)的鱼中, 包括断线真狼绵鲷(*Lychodyichthys dearborni*)和北极狼绵鲷(*Locode spolaris*)^[10]。目前已经从南极大头鳕(*Lycodichthys dearborni*)的血浆中分离出 8 种 AFP III 成分, 包括 3 种主要成分(RD1、RD2、RD3)和 5 种少量成分^[11-12]。AFP IV 是从多棘床杜父鱼(*Myoxocephalus octodecimspinosus*)血清中分离到的一种抗冻蛋白(LS12)^[13], 分子量约 12.3 kD, 含 108 个氨基酸残基, 其中 17%是谷氨酰胺, N 末端被焦谷氨酰胺基团所封闭。AFP IV 广泛分布于硬骨鱼类中, 具有降低冰点和冰晶修饰等 AFP 的特征性功能^[13]。

抗冻蛋白的进化是南极鱼寒冷适应的一个重要机制, 其中南极鱼的 AFGP 从头进化机制是近年来的重要发现。南极鱼类的 AFGP 基因由功能上不相关的胰蛋白酶原基因(trypsinogen)演化而来。trypsinogen 第一内含子和第二外显子交接处的编码 Thr-Ala-Ala 的 9 核苷酸序列在 5'端微卫星 DNA 序列的引导下扩增, 首先形成一个 trypsinogen-AFGP 中间分子, 随后经历了大部分 trypsinogen 编码区序列缺失而形成独立的 AFGP

编码基因, 并进一步通过分子内大规模扩增形成一个庞大的 AFGP 基因家族^[14]。北极鱼类的 AFGP 蛋白在氨基酸序列上与南极鱼类的 AFGP 几乎没有区别, 但经过研究却发现北极鱼类的 AFGP 蛋白在基因进化上与 trypsinogen 毫无关系^[4]。有研究发现来自于南极大头鳕的 AFP III 基因起源于一个唾液酸合成酶(SAS)基因拷贝^[15]。IV 型 AFP 与其他类型的鱼类 AFP 相似度较低, 被鉴定并归类为新的 IV 型 AFP, 并且这种蛋白质被认为是从载脂蛋白进化而来的^[13]。抗冻蛋白基因起源的发现揭示了一种新基因起源的进化机制, 同时也把分子进化、环境适应和物种分化紧密地联系在一起。

2 抗冻蛋白的作用机制

抗冻蛋白作用机制在于可以结合微小的冰晶并抑制冰晶的继续生长。抗冻蛋白以非依数性形式降低水溶液的冰点而对其熔点(melting point, MP)影响甚微, 从而导致水溶液的熔点(MP)和冰点(freezing point, FP)之间出现差值, 这个差值称为热滞活性(thermal hysteresis activity, THA)^[16]。THA 已被用于定量描述 AFP 的活性(图 1), 对于大多数鱼类 AFP, 观察到的 THA 约为 1 °C。在冬季(-1.9 °C), 这种温度差距可以为海水提供足够的缓冲, 使极地鱼在寒冷的环境中生存^[17]。抗冻蛋白的第二个功能是冰重结晶抑制(ice recrystallization inhibition, IRI)。冰重结晶(IR)解释了一个热力学上有利的过程, 其中较大的冰晶的形成以牺牲较小的冰晶为代价。较大的冰晶对于冷冻保存的细胞以及栖息在极地或寒冷地区的生物体可能是致命的, 而抗冻蛋白可以在非常低的浓度下抑制冰重结晶, 冰晶晶体之间界面处的 AFP 可以与冰粒表面结合并抑制其生长过程, 其依赖 AFP 的冰重结晶抑制机制仍不是很明确^[18-19]。将含 AFP 的溶液与 30%蔗糖以 1:1 的比例混合。将混合溶液点在两个盖玻片之间并快速冷冻。然后, 将样品置于-6 °C, 并在特定时间段内观察变化。如图 1 所示, 较大的冰粒以较小的冰晶为代价而增长, 而在 AFP 存在的情况下, 在较低的面板中停止生长^[20]。冰重结晶抑制更可能是耐寒生物在

极冷环境中生存的关键属性,冰重结晶抑制被认为可以保护细胞膜免受冻伤。

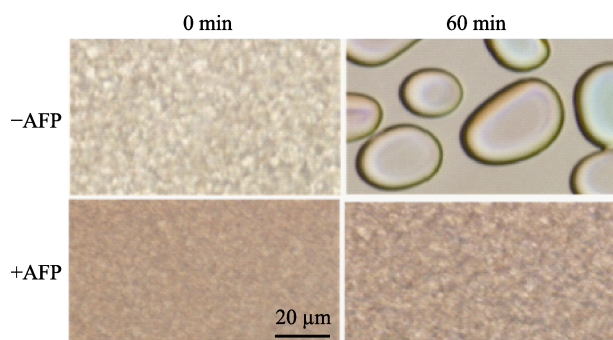


图1 使用改良的激冷板实验检测 AFP 的冰重结晶抑制功能^[20]

Fig. 1 Ice recrystallization inhibition assay of AFP using modified splat assay^[20]

热滞活性(THA)和冰重结晶抑制(IRI)均基于 AFP 对冰的亲合力。然而, THA 并不总是与 IRI 活性成正比(图 2), 较低 THA 活性的 AFP 可以表现出较高的 IRI 活性^[20]。Olijve 等^[21]证明了 AFP III 及其突变体显示出不同的 THA 值, 但具有几乎相同的 IRI 活性。与中度热滞活性的抗冻蛋白 *LeIBP* 相比, 高热滞活性的抗冻蛋白 *FfIBP* 却在 IRI 中表现出较低活性^[22]。这些结果提示, 抗冻蛋白的 THA 并不能够直接转化为生物样品的冷冻保存效率, 因此不能仅靠 THA 来考虑 AFP 在冷冻保存中的应用。

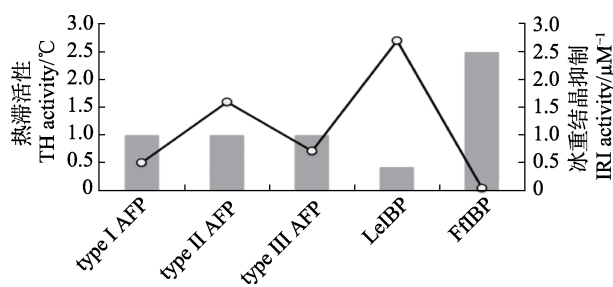


图2 海洋生物抗冻蛋白的热滞活性和冰重结晶抑制活性对比^[20]

Fig. 2 Comparison of THA and IRI of marine derived AFPs^[20]

3 抗冻蛋白在医学领域的应用研究

抗冻蛋白的热滞活性(THA)和冰重结晶抑制(IRI)活性使其在冷冻保存中具有重要作用。冷冻

保存可用于在极低温度下储存各种类型的细胞、组织和器官、鲜冷食品等,已成为生命科学、医药卫生、食品、农业等领域的关键技术。冷冻保存中最重要的是避免冰晶形成导致的细胞损伤。目前常用的冷冻保存剂(如二甲基亚砷和甘油)可以减少冰的形成,但高浓度的冷冻保存剂对细胞具有毒性^[23]。解冻期间的冰再结晶也是冷冻保存对细胞损伤的重要因素,而 AFP 在抑制冰再结晶,提高冷冻保存效率方面具有良好的应用潜力。

3.1 在生殖医学领域中的应用

冷冻保存是生殖医学领域的关键技术之一,可以解决不孕不育、延迟生育等问题。AFP 可应用于精子、卵子和胚胎等组织器官的冷冻保存^[24]。研究报道极地鱼类来源的抗冻蛋白 AFP III 对小鼠卵母细胞的冷冻保存具有显著的保护作用。使用抗冻蛋白明显降低了小鼠卵母细胞冷冻保存-复苏后的损伤,ROS 的产生、DNA 双链断裂程度和细胞凋亡的程度明显降低,复苏后卵子的发育完整性增强,使用抗冻蛋白冷冻保存的受精卵发育水平明显高于对照组^[25-26]。在牛的卵子玻璃化冷冻保存研究中发现,抗冻蛋白 AFGP-8 的加入也明显降低了冷冻损伤的发生,提高了冷冻卵母细胞复苏后正常发育的水平^[27]。在鱼类的胚胎冷冻保存实验中也发现,用加入含有 AFP I 的冷冻保存液进行显微注射或孵育的鱼胚胎,在低温(4 °C 或 -10 °C)冷却后存活率显著提高^[28-29]。哺乳动物精子的冷冻保存技术比较成熟,但也有研究报道 AFP 和 AFGP 在精子冷冻保存中发挥重要作用,可明显降低冷冻损伤,提高精子的活力和浆膜的完整性^[30-32]。这些研究表明 AFP 在精子、卵子、胚胎冷冻保存中具有广泛的应用价值。

3.2 在外科中的应用

冷冻手术是目前肿瘤治疗的一项关键技术,研究报道手术前将少许 AFP 注射到待切除组织中,可以提高手术成功率,减少冷冻手术后的目标组织发生冷冻损伤问题^[33]。AFP 也被用于器官移植手术的组织、器官的冷冻保存,AFP 在器官冷冻储存中的保护效果受多种因素的影响,包括 AFP 的浓度、冷冻保护液的成分等。如有研究发现较高浓度的 AFGP 对低温储存的心脏没有保护作用^[34]。

同时有报道 AFP 可以保护低温保存的大鼠心脏, 用含有 AFP 的保存液保存的心脏在移植手术后具有更高的存活率、表现出更好的血流动力学参数和更低的细胞凋亡水平^[35-36]。目前对 AFP 在组织、器官低温储存中的作用机理和应用潜能方面的研究较薄弱, 该方面的基础研究对 AFP 在医学领域的应用开发是急需开展的。

4 抗冻蛋白在食品领域的应用研究

抗冻蛋白作为食品添加剂可以抑制冰晶生长, 改善冷冻食品的品质^[37]。添加有 AFP 的冰激凌, 冰碴的产生显著减少, 而未加 AFP 的冰淇淋样品中冰晶较大且不均匀, AFP 添加改善了冰激凌的质量和口感^[38]。抗冻蛋白还可以应用在冷鲜、冷冻食品的储存和运输环节。研究发现 AFP 在肉类的冷冻保存中, 可以减少肌肉细胞内冰晶的产生, 可以保持肌球蛋白 ATP 酶的活性, 从而提高冷冻肉类的品质和口感^[39-40]。在羔羊屠宰前注射 AFP, 宰后肉在-20℃冻藏 2~16 周后解冻检测产品质量发现: 屠宰前注射 AFP 均可显著降低冰晶的体积和液滴的数量^[41]。速冻果蔬容易出现汁液流失、软烂、失去原有形态。运用基因工程的方法将异源高活性抗冻蛋白基因导入果蔬中, 能够有效改善这种状况。美国 DNA 工程公司把抗冻蛋白基因导入番茄中, 这种新的转基因番茄耐寒性能增强, 可以在-6℃生存几个小时, 而且果实冷藏后不变形^[42]。

5 抗冻蛋白在农业中的应用研究

5.1 抗冻蛋白转基因技术提高动植物的耐寒能力

低温冷害是农业生产的一个重要危害, 每年因低温冷害造成巨大的经济损失, 提高动植物的耐寒能力是解决这一问题的关键。近年来, 随着转基因技术的不断成熟, 抗冻蛋白基因被引入植物和动物物种, 以扩大其地理适应范围, 增加低温生存的能力。目前科学家已经生产出多种能够合成抗冻基因的转基因物种, 包括烟草, 番茄和马铃薯植物等, 初步观察发现这些转基因植物中获得了增加的抗冻能力^[43-44]。而表达外源 AGFP

的小鼠对于低温引起的冻伤具有更好的抵抗力^[45], 同样表达外源 AGFP 的果蝇也具有更强的低温耐受能力^[46]。抗冻蛋白转基因作物的推广, 将有效地帮助农业生产避免恶劣天气带来的损失, 扩展作物的栽种范围和生长季节, 提高农作物的产量和质量。此外, 抗冻蛋白转基因农作物还有望在后续的运输、低温储藏和加工等多个环节更加有效和便利, 抗冻蛋白在农业和食品行业极具应用前景。

5.2 抗冻蛋白转基因能有效提高水产经济鱼类的耐寒能力

每年因低温冷害造成的渔业损失巨大, 将抗冻蛋白基因转入温度敏感经济鱼类, 可以提高这些鱼类的抗寒能力, 改善这些鱼类的养殖区域。20 世纪 90 年代, 科学家发现将抗冻蛋白转基因罗非鱼显示出增强的耐寒能力, 但当时由于转基因技术还不成熟, 抗冻蛋白的表达水平比较低^[47]。直接显微注射南极鱼抗冻蛋白到斑马鱼受精卵, 斑马鱼发育成熟后表现出强的耐寒能力^[29]。美国 AquaBounty Technologies 公司拥有世界上首个被批准上市的转基因鱼, 他们研发的转基因三文鱼 *AquAdvantage* 被转入了两种基因: 太平洋奇努克三文鱼的生长激素基因和大洋鳕的抗冻蛋白基因, 使其可以在大西洋寒冷的底部也能快速持续生长^[48]。由于来自极地鱼类的抗冻蛋白属于长期被人类食用的天然蛋白, 在食品安全方面没有问题, 容易被大众接受。

6 南极鱼抗冻蛋白研究和应用开发所存在的问题

尽管南极鱼抗冻蛋白在医药、食品、农业等领域都有良好的应用前景, 但是目前在生产成本和产业化等方面还存在一些限制和不足, 生产仅限于研究和专门的应用。因此, 如何低成本地生产高活性的抗冻蛋白是其应用开发的技术关键。目前有学者通过原核或真核表达系统成功表达和纯化了重组的南极鱼 AFP^[49-50], 但上述研究仍停留在实验室阶段, 有待于进一步提高表达量和规模化生产。此外, 也有研究报道通过混合使用多种 AFP 或表达多种 AFP 的融合蛋白来增加 AFPs

与冰晶结合的能力, 以提高 AFP 的热滞活性^[51]。

AFP 的应用开发需要解决以下几个问题。首先, 应建立 AFP 的基因工程产业体系, 大规模生产 AFP, 降低其成本; 其次, 充分研究 AFP 在冷冻介质中的行为和作用机制。高浓度的冷冻剂, 如 DMSO、乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮等, 可能使 AFP 不稳定, 甚至功能丧失; 第三, 应该设计和开发高活性的 AFP, 以克服天然 AFPs 的局限性。如有研究表明, 含有三个结构域的 AFP III 抗冻活性明显高于一个和两个结构域的 AFP III^[52]。杨敏等^[53]报道人工合成含有 4 个结构域的 AFP III 抗冻蛋白(LD4)具有更强的抗冻、抗寒活性。LD4 由 4 个 AFP III 分子通过 9 个氨基酸的 linker 串联而成, 具有 4 个与冰晶结合的活性平面。LD4 不仅具有抗冻功能, 而且具有在非冰冻温度下抵抗低温伤害的抗寒功能, 转 LD4 基因的斑马鱼细胞可获得强的耐寒特性。天然 AFP 无法穿透细胞膜, 有报道进行细胞内化或穿透 AFP 的研发, 这样有利于 AFPs 在组织、胚胎等的冷冻保存中更好地发挥作用, 从而减少冷冻液中冷冻剂的使用量, 提高冷冻保存的效率^[20]。总之, 如何获得大量的高效抗冻蛋白, 降低抗冻蛋白的成本, 是实现其广泛应用的关键。

参考文献:

- [1] Verde C, Parisi E, di Prisco G. The evolution of thermal adaptation in polar fish[J]. *Gene*, 2006, 385: 137-145.
- [2] Eastman J T. The nature of the diversity of Antarctic fishes[J]. *Polar Biology*, 2005, 28(2): 93-107.
- [3] DeVries A L, Wohlschlag D E. Freezing resistance in some Antarctic fishes[J]. *Science*, 1969, 163(3871): 1073-1075.
- [4] Chen L, DeVries A L, Cheng C H C. Convergent evolution of antifreeze glycoproteins in Antarctic notothenioid fish and Arctic cod[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(8): 3817-3822.
- [5] Raymond J A, DeVries A L. Adsorption inhibition as a mechanism of freezing resistance in polar fishes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977, 74(6): 2589-2593.
- [6] Jin Z Y, Liu B L. Antifreeze proteins and its application research[J]. *Food Research and Development*, 2014, 35(20): 142-146. [金周筠, 刘宝林. 抗冻蛋白及其应用前景[J]. *食品研究与开发*, 2014, 35(20): 142-146.]
- [7] DeVries A L. Glycoproteins as biological antifreeze agents in Antarctic fishes[J]. *Science*, 1971, 172(3988): 1152-1155.
- [8] Chakrabarty A, Hew C L, Shears M, et al. Primary structures of the alanine-rich antifreeze polypeptides from grubby sculpin, *Myoxocephalus aeneus*[J]. *Canadian Journal of Zoology*, 1988, 66(2): 403-408.
- [9] Ewart K V, Fletcher G L. Herring antifreeze protein: primary structure and evidence for a C-type lectin evolutionary origin[J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1993, 2(1): 20-27.
- [10] Cheng C H C, DeVries A L. Structures of antifreeze peptides from the antarctic eel pout, *Austrolycichthys brachycephalus*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1989, 997(1-2): 55-64.
- [11] Wang X, DeVries A L, Cheng C H C. Antifreeze peptide heterogeneity in an Antarctic eel pout includes an unusually large major variant comprised of two 7 kDa type III AFPs linked in tandem[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1995, 1247(2): 163-172.
- [12] Wang X, DeVries A L, Cheng C H C, et al. Genomic basis for antifreeze peptide heterogeneity and abundance in an Antarctic eel pout: gene structures and organization[J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1995, 4(2): 135-147.
- [13] Deng G J, Laursen R A. Isolation and characterization of an antifreeze protein from the longhorn sculpin, *Myoxocephalus octodecimspinosus*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1998, 1388(2): 305-314.
- [14] Chen L, DeVries A L, Cheng C H C. Evolution of antifreeze glycoprotein gene from a trypsinogen gene in Antarctic notothenioid fish[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(8): 3811-3816.
- [15] Deng C, Cheng C H C, Ye H, et al. Evolution of an antifreeze protein by neofunctionalization under escape from adaptive conflict[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(50): 21593-21598.
- [16] Barrett J. Thermal hysteresis proteins[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2001, 33(2): 105-117.
- [17] Kristiansen E, Zachariassen K E. The mechanism by which fish antifreeze proteins cause thermal hysteresis[J]. *Cryobiology*, 2005, 51(3): 262-280.
- [18] Sidebottom C, Buckley S, Pudney P, et al. Heat-stable antifreeze protein from grass[J]. *Nature*, 2000, 406(6793): 256.
- [19] Rahman A T, Arai T, Yamauchi A, et al. Ice recrystallization is strongly inhibited when antifreeze proteins bind to multiple ice planes[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 2212.
- [20] Kim H J, Lee J H, Hur Y B, et al. Marine Antifreeze proteins: Structure, function, and application to cryopreservation as a potential cryoprotectant[J]. *Marine Drugs*, 2017, 15(2): 27.
- [21] Olijve L L C, Oude Vrielink A S, Voets I K, et al. A simple and quantitative method to evaluate ice recrystallization kinetics using the circle Hough transform algorithm[J]. *Crystal Growth & Design*, 2016, 16(8): 4190-4195.
- [22] Park K S, Do H, Lee J H, et al. Characterization of the ice-binding protein from Arctic yeast *Leucosporidium* sp. AY30

- [J]. Cryobiology, 2012, 64(3): 286-296.
- [23] Taylor M J, Weegman B P, Baicu S C, et al. New approaches to cryopreservation of cells, tissues, and organs[J]. Transfusion Medicine and Hemotherapy, 2019, 46(3): 197-215.
- [24] Robles V, Valcarce D G, Riesco M F. The use of antifreeze proteins in the cryopreservation of gametes and embryos[J]. Biomolecules, 2019, 9(5): 181-192.
- [25] Lee H H, Lee H J, Kim H J, et al. Effects of antifreeze proteins on the vitrification of mouse oocytes: Comparison of three different antifreeze proteins[J]. Human Reproduction, 2015, 30(9): 2110-2119.
- [26] Wen Y, Zhao S Q, Chao L, et al. The protective role of antifreeze protein 3 on the structure and function of mature mouse oocytes in vitrification[J]. Cryobiology, 2014, 69(3): 394-401.
- [27] Liang S, Yuan B, Kwon J W, et al. Effect of antifreeze glycoprotein 8 supplementation during vitrification on the developmental competence of bovine oocytes[J]. Theriogenology, 2016, 86(2): 485-494.e1.
- [28] Robles V, Barbosa V, Herráez M P, et al. The antifreeze protein type I (AFP I) increases seabream (*Sparus aurata*) embryos tolerance to low temperatures[J]. Theriogenology, 2007, 68(2): 284-289.
- [29] Martínez-Páramo S, Barbosa V, Pérez-Cereales S, et al. Cryoprotective effects of antifreeze proteins delivered into zebrafish embryos[J]. Cryobiology, 2009, 58(2): 128-133.
- [30] Prathalingam N S, Holt W V, Revell S G, et al. Impact of antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw[J]. Theriogenology, 2006, 66(8): 1894-1900.
- [31] Qadeer S, Khan M A, Ansari M S, et al. Efficiency of antifreeze glycoproteins for cryopreservation of Nili-Ravi (*Bubalus bubalis*) buffalo bull sperm[J]. Animal Reproduction Science, 2015, 157: 56-62.
- [32] Nishijima K, Tanaka M, Sakai Y, et al. Effects of type III antifreeze protein on sperm and embryo cryopreservation in rabbit[J]. Cryobiology, 2014, 69(1): 22-25.
- [33] Muldrew K, Rewcastle J, Donnelly B J, et al. Flounder antifreeze peptides increase the efficacy of cryosurgery [J]. Cryobiology, 2001, 42(3): 182-189.
- [34] Wang T, Zhu Q Y, Yang X P, et al. Antifreeze glycoproteins from Antarctic notothenioid fishes fail to protect the rat cardiac explant during hypothermic and freezing preservation[J]. Cryobiology, 1994, 31(2): 185-192.
- [35] Amir G, Rubinsky B, Basheer S Y, et al. Improved viability and reduced apoptosis in sub-zero 21-hour preservation of transplanted rat hearts using anti-freeze proteins[J]. The Journal of Heart and Lung Transplantation, 2005, 24(11): 1915-1929.
- [36] Amir G, Horowitz L, Rubinsky B, et al. Subzero nonfreezing cryopreservation of rat hearts using antifreeze protein I and antifreeze protein III[J]. Cryobiology, 2004, 48(3): 273-282.
- [37] Cao J F, Cao H, Xu F, et al. Research progress in antifreeze proteins and its application to food industry[J]. Industrial Microbiology. 2018, 48(3): 62-68. [曹吉芳, 曹慧, 徐斐, 等. 抗冻蛋白及其在食品中应用的研究进展[J]. 工业微生物, 2018, 48(3): 62-68.]
- [38] Dai H Q, Guo S J, Lu C F. Antifreeze proteins and their application in food industry[J]. Food and Fermentation Industries, 2001, 27(12): 44-49. [代焕琴, 郭索娟, 卢存福. 抗冻蛋白及其在食品工业中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(12): 44-49.]
- [39] Boonsupthip W, Lee T C. Application of antifreeze protein for food preservation: Effect of type III antifreeze protein for preservation of gel forming of frozen and chilled actomyosin [J]. Journal of Food Science, 2003, 68(5): 1804-1809.
- [40] Payne S R, Sandford D, Harris A, et al. The effects of antifreeze proteins on chilled and frozen meat[J]. Meat Science, 1994, 37(3): 429-438.
- [41] Jia Z C, Davies P L. Antifreeze proteins: An unusual receptor-ligand interaction[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2002, 27(2): 101-106.
- [42] Hu A J, Zhen J, Qiu T Q. Antifreeze proteins and their application in food[J]. China Western Cereals & Oils Technology, 2002, 27(2): 28-31. [胡爱军, 郑捷, 丘泰球. 抗冻蛋白及其在食品中的应用[J]. 西部粮油科技, 2002, 27(2): 28-31.]
- [43] Huang Y F, Wang Q Y, Fu G R, et al. The research on introducing flounder antigreeze protein gene (afp) into tomato[J]. Chinese Biochemical Journal, 1997, 13(4): 418-422. [黄永芬, 汪清胤, 付桂荣, 等. 美洲拟鲽抗冻蛋白基因 (afp) 导入番茄的研究[J]. 生物化学杂志, 1997, 13(4): 418-422.]
- [44] Shen L X, Chen L G. Research progress of cold resistance genetic engineering of plant[J]. Journal of Biology, 1998, 15(6): 2-4. [沈立晓, 陈力耕. 植物抗寒基因工程的研究进展[J]. 生物学杂志, 1998, 15(6): 2-4.]
- [45] Heisig M, Mattesich S, Rembisz A, et al. Frostbite protection in mice expressing an antifreeze glycoprotein[J]. PLoS ONE, 2015, 10(2): e0116562.
- [46] Neelakanta G, Hudson A M, Sultana H, et al. Expression of Ixodes scapularis antifreeze glycoprotein enhances cold tolerance in *Drosophila melanogaster*[J]. PLoS ONE, 2012, 7(3): e33447.
- [47] Li J, Li R P, Zhang S M, et al. The influence of low temperature on tilapia of transferred antifreeze protein gene[J]. Biotechnology, 1996, 6(5): 9-10. [李晶, 李荣萍, 张淑梅, 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.]
- [48] Clifford H. AquAdvantage® Salmon - a pioneering application of biotechnology in aquaculture[J]. BMC Proceedings, 2014, 8(S4): O31.
- [49] Yang M, Huang Q, Chen L B. Construction of type III antifreeze protein eukaryotic expression plasmid and expression in zebrafish cell line[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2016, 28(11): 1862-1866. [杨敏, 黄巧, 陈良标. 南极鱼Ⅲ型抗冻基因真核表达质粒的构建及其细胞表达[J]. 浙江农业学报, 2016, 28(11): 1862-1866.]
- [50] Hao F X, Hu W G, Fu W C, et al. Prokaryotic expression, purification and polyclonal antibody preparation of antifreeze protein AFPIII[J]. Fisheries Science, 2009, 28(11): 671-674.

- [郝凤霞, 胡文革, 付伟超, 等. 抗冻蛋白 AFPⅢ的原核表达、纯化及多克隆抗体的制备[J]. 水产科学, 2009, 28(11): 671-674.]
- [51] Phippen S W, Stevens C A, Vance T D R, et al. Multivalent display of antifreeze proteins by fusion to self-assembling protein cages enhances ice-binding activities[J]. *Biochemistry*, 2016, 55(49): 6811-6820.
- [52] Can Ö, Holland N B. Utilizing avidity to improve antifreeze protein activity: A type III antifreeze protein trimer exhibits increased thermal hysteresis activity[J]. *Biochemistry*, 2013, 52(48): 8745-8752.
- [53] Yang M. A preliminary study on the functions of a multimer type III antifreeze protein in low temperature tolerance[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016. [杨敏. 一种南极鱼Ⅲ型抗冻蛋白抵抗低温分子机制的初步研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.]

Function, evolution, and application of antifreeze proteins in Antarctic fish

ZHANG Junfang^{1,2,3}, TAO Xiaofan¹, HAN Bingshe^{1,2,3}

1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China
3. International Research Center for Marine Biosciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

Abstract: Ever since the Antarctic waters began to cool about 20 million years ago, Antarctic notothenioid fishes, comprising more than 120 species, have been living in the stable, extremely cold, and oxygen-rich Antarctic waters, when all other temperate fishes gradually disappeared. In order to survive the coldest area in the world, Antarctic notothenioid fishes have evolved many adaptive changes in their biochemical and physiological functions; among these changes, the origin and evolution of antifreeze proteins is one of the most important adaptations of Antarctic fishes. Antifreeze proteins are a family of macromolecules that are essential for survival in extreme cold conditions. For the time being, at least one antifreeze glycoprotein (AFGP) and four structurally different antifreeze protein (AFPs) types, known as AFP I, AFP II, AFP III, and AFP IV, have been identified from polar and subpolar fishes. Although these AFPs have similar structures and functions, their origin and evolution are significantly different. AFPs have also been found in insects, plants, and bacteria living in cold habitats. In fish, AFPs are typically secreted into the blood and also produced in the skin, scales, fin, and gills. AFPs cause ice recrystallization inhibition and contribute to non-colligative freezing point depression by binding to small ice crystals in order to inhibit their growth. AFPs can reduce the freezing point of Antarctic notothenioid fishes' body fluids to $-2.2\text{ }^{\circ}\text{C}$; this preserves the fluidity of body fluids at sub-zero temperatures and protects fishes from freezing damage. Due to the natural biological properties of AFPs, such as the thermal hysteresis activity (THA) and the inhibition of ice recrystallization activities (IRI), they have several commercial applications. AFPs can be used in the food industry for food preservation and ice cream production; they can also be used in the agricultural and biomedical fields to freeze and preserve a wide variety of biological samples including body tissues (cells, organs, embryos, and gametes) of human beings, animals, and fishes. Additionally, AFP transgenic plants show enhanced cold tolerance. Studies have demonstrated that AFPs are up to 300 times more effective than traditional antifreeze chemicals at the same concentrations and they can improve post-thaw viability regardless of the freezing method. Since AFPs show promising potential application prospects in the fields of medicine, food industry, agriculture, etc., there has been an accumulation of relevant published research recently. In this paper, the evolution, function, application, and current concerns regarding the use of AFPs were reviewed.

Key words: Antarctic fish; AFPs; evolution; cryopreservation; application

Corresponding author: ZHANG Junfang. E-mail: jfzhang@shou.edu.cn