

抗冻蛋白及其基因的研究进展

PROGRESS IN THE STUDY ON ANTIFREEZING PROTEINS AND GENES

蒋耀青

(中国科学院 遗传所)

Jiang Yaoqing

(Institute of Genetics, CAS)

关键词 综述, 抗冻蛋白、基因、进展

KEY WORDS Roundup, Antifreezing proteins, Genes, Progress

抗冻蛋白及其基因的研究, 一直是分子生物学的热点。

一、大多海洋硬骨鱼的血清冰点为 $-0.5\sim-0.8^{\circ}\text{C}$ 。但是, 极地及北方海域的海水温度却可以低至 $-1.4\sim-2^{\circ}\text{C}$, 如果没有生理和生化上的适应, 生活在那里的鱼就有冻死的危险。Scholander等(1957)发现北极鱼的血清冰点为 -1.4°C , 从而推测鱼血清中可能存在一种能降低血清冰点的物质。De Vries(1969)从极地海鱼 Nototheniid 血液中发现一种能使血清冰点降低的糖蛋白。自此, 抗冻蛋白获得了广泛深入的研究。目前, 对抗冻蛋白的结构、功能、特性等都有了较深入的了解。现在已知有两类抗冻蛋白质: 抗冻糖蛋白(Antifreeze glycoprotein, AFGP)及抗冻蛋白(Antifreeze protein, AFP)。

1. 抗冻糖蛋白 分子量相对较高, $2.5\sim 33\text{kDa}$, 它们由三肽重复组成 $(\text{Ala}-\text{Ala}-\text{Thr})_n$, 由N-乙酰半乳糖胺和兰乳糖通过羟基氧原子与Thr残基相连。AFGP在血清中浓度不随季节而变化的。

2. 抗冻蛋白 根据化学结构的不同, 又分为Type I AFP, Type II AFP和Type III AFP。

(1) Type I AFP 分子量为 $3.3\sim 4.5\text{kDa}$, 富含Ala。最早由Duman及De Vries从美洲拟鲈(*Pseudopleuronectes americanus*)冬季血清中分离并鉴定, 其主要成分有37个氨基酸, 包含3个11个氨基酸的重复单位: $(\text{Thr})(\text{Ala})_2\text{Asp}$ 或 $\text{Asn}(\text{Ala})_7$ 。它随着季节而含量变化, 冬季可达 $10\text{mg}/\text{ml}$ 血清, 夏季至少降低3倍。它是一个多基因家族, 30~40拷贝。

(2) Type II AFP 分子量为 14kDa , 是富含Cys的大分子蛋白质, 它首先发现于Sea Raven, (*Hemitripterus americanus*)的冬季血清中, 它也随季节而变化, 它的基因组有40多个拷贝。

(3) Type III AFP 分子大小居中, 分子量为 $5\sim 6.7\text{kDa}$, 它不富含Ala, 也不含

Cys。它首先从 Ocean pout (*Macrozoarces americanus*) 的冬季血清中分离鉴定, 其基因含 150 个拷贝。以上四种抗冻蛋白质, 虽氨基酸组成和蛋白质结构有明显差异, 但与冰的作用方式都是相同的, 它们优先结合在冰核表面, 阻止冰晶水平生长。

近年人们更从无脊椎动物, 两栖类, 爬虫类等中找到了抗冻蛋白, 也有从植物中分离得抗冻蛋白的。

如加拿大首次从冷驯化的黑麦中分离出抗冻蛋白。每毫升水中加 60mg 抗冻蛋白, 可使冰点降至 -1.1°C 。

芬兰的 Sirpa Kurkela 等 (1990) 从拟南芥菜 *Arabidopsis thaliana* 中, 筛选出一个 Kin I 基因。这个基因可由低温 (4°C), 脱落酸 (ABA) 及干旱诱导。此基因的核苷酸序列已被测定, 其蛋白质的分子量为 6.5KDa。此蛋白质也富含 Ala 及 Gly, Lyc, 故类似鱼的 AFP。Northern Blot 的结果显示, 低温, 干旱及 ABA 可使 Kin I 的 mRNA 大量增加。

二、关于抗冻蛋白质的作用方面很多学者做了大量的工作, 尤其 Rubinsiky 和 De Vries, 工作非常出色, 他们用组织、器官、整体动、植物细胞等做了很多实验, 发现, 抗冻蛋白质除了有与冰晶结合降低血清冰点的功能外, 还能通过与细胞表面和离子通道的相互作用, 从而保护细胞和膜免受低温的破坏, 阻止离子渗漏。

1. 将猪的卵母细胞暴露在 4°C , 当溶液中加入 AFGP 时, 80% 的卵母细胞保持完整的卵膜, 而 70% 有正常的膜潜能, 而没有加 AFGP 的对照组卵膜完全被破坏。

2. 将未发育成熟的牛卵母细胞暴露在 4°C 中 24 小时, 分别加入 Type I, Type II 及 Type III AFP, 结果保持完整渗透压的卵母细胞数增大了 4 倍, 能体外发育成熟的卵母细胞数增大 3 倍, 这一发现对短期保存哺乳动物细胞有重要的应用价值。

3. 猪的 2-细胞胚胎, 当每毫升保护剂中加 40mg AFGP, 按每分钟 1700°C 的速度降温至 -130°C , 十五分钟后, 再按每分钟 1700°C 的速度, 升至室温。体外培养并观察胚胎的形态及发育情况时, 结果, 不加 AFGP 的 2-细胞胚胎, 完全没有存活的; 而加 AFGP 的则存活率可高达 82.5%。

这一结果引起科学工作者的巨大兴趣, 已有人致力于将它应用于改良动、植物品种, 食物保鲜以及动植物组织、器官等的冷冻保存中。如日本已将抗冻蛋白应用于西红柿等蔬菜水果的保鲜生产中, 因而对生产实践有巨大的应用前景。

三、也有许多学者, 将抗冻蛋白基因转入动、植物, 尤其是鱼类中, 以期获得提高抗冻能力优良品种。

1. Davies 等人 (1987) 将抗冻蛋白基因转移到郁金香、烟草中, 发现抗冻蛋白能通过降低叶子的冰点, 明显提高植物的抗冻能力。

2. Georges (1990) 将 AFP 基因接到 CMV35S 启动子上, 用电击法打进五米的原生质体中, 检测到了蛋白质水平的表达。

3. Huang 等 (1987) 用一种药物筛选性载体 PRSVgpt, 采用磷酸钙沉淀法, DEAE 葡聚糖法, 电击法等技术, 将克隆的美洲拟鲈 AFP 基因转入虹鳟, Bluegill 及鲑鱼的细胞系中, 他们观察到了细胞中 AFP DNA 的存在, 并根据 AFP mRNA 合成检测到了该基因的表达。

4. 加拿大 Fletcher 小组的 Rancourt 等 (1987) 用果蝇作模型, 将 AFP 基因——果蝇热

休克启动子 (HSP-70) 重组基因, 转移到果蝇中。通过显微注射建立了六个转化系。每个转化系均有其独有的染色体整合位点。而且热休克能诱导 AFP 基因的表达。Northern Blot 的结果显示转化系果蝇中, 当热休克时, 才出现 AFP mRNA。而 Western 印迹杂交证明, 热休克转化体的血液中存在有抗冻蛋白质。

5. Fletchers 等 (1988, 1990) 将美洲拟鲽 AFP 基因注射到大西洋鲑中。所用的 DNA 是基因组亚克隆 2A-7。每 2-3ml 中约有 10 个拷贝的线性 DNA。受精后 3 小时内通过受精孔注射入鲑鱼中。结果 1800 个大西洋鲑卵中约有 80% 存活孵化。注射后 8 个月, 1-2 克重的小鱼个体用 Southern 印迹杂交分析, 结果 6.6% (2/30) 的小鱼的 DNA 可与美洲拟鲽 AFP 基因 DNA 探针杂交。Western 印迹杂交证明, 有三条小鱼中有抗冻蛋白的表达。Davies 等人 (1990) 也曾将 AFP 基因导入大西洋鲑中。近年这些学者已有初步证据证明, 美洲拟鲽 AFP 基因可在转基因鲑中表达, 但是其表达水平还较低, 尚未达到功能性抗冻所需的浓度——5-10mg/ml 血清。

可见 AFP 转基因的研究, 虽目前尚未产生引人注目的经济效益, 但应用前景是乐观的。

由于抗冻基因的重要应用价值, 又因其结构特点, 蛋白质产物的特性, 以及它在细胞系及个体中的表达及导入等都已较深入的研究, 因此, 抗冻蛋白及其基因的研究仍将是分子生物学中的热点。

四、国内的研究进展

1. 克隆 AFP 基因, 或研究 AFP 基因的导入整合和表达等。

(1) 费云标 (1992) 发现淡水瓦氏雅罗鱼基因组内含有 AFP 基因。

(2) 宁诗铎等 (1988) 用美洲拟鲽 AFP mRNA 进行了体外翻译。

(3) 杨志兴等 (1992) 将美洲拟鲽 AFP 基因以融合蛋白形式在大肠杆菌中表达。

(4) 蒋耀青等从 1986 年起对我国黄海的黄盖鲽抗冻蛋白进行了一系列研究, 首次在国内找到了含抗冻蛋白的鱼类——黄盖鲽, 证明其 AFP 是一类小分子蛋白质, 分子量为 3000-4500Da, 富含 Ala, 季节性产生, 其特点证明其为 Type I AFP, 类似美洲拟鲽。在分离克隆此 AFP cDNA 的基础上, 还研究了它在大肠杆菌中的表达。1993 年还研究了美洲拟鲽 AFP 基因在爪蟾卵母细胞中的表达。

(5) 青岛海洋所王壬学, 将美洲 Ocean pout 的 AFP 基因注射入金鱼卵, 整合率达 19.7%, 某些后 F0 转基因鱼及一条 F1 的血清及组织中都存在有 AFP。

2. 中科院发育所费云标等 (1993, 1994), 从西藏的雪莲中分离并检出了抗冻蛋白。1 毫升水中加入 5-10 克抗冻蛋白时, 在 -6℃ 时才融化。他们还从植物沙冬青中分离检出了抗冻蛋白, 1 毫升蒸馏水中加入 20-33 毫克此抗冻蛋白时, 其融点可为 -14~-15℃。目前他们正在建立基因文库, 以期克隆出抗冻蛋白基因。

参 考 文 献

- [1] 王壬学, 1989. 中科院海洋生物所博士论文。
- [2] 费云标, 1993. 生化杂志 (第七次全国生物化学学术会议汇编 p.100)。
- [3] 费云标, 1994. 植物学报, 第 8 期。

- [4] 蒋耀青等, 1990. 遗传学报, 17 (3): 202~209.
- [5] 杨志兴等, 1992. 遗传, 14 (1): 12-15.
- [6] Davies, P. L. et al, 1990. In "Transgenic Models in Medicine and Agriculture", p. 141-161.
- [7] DeVries, A. L. et al, 1970. J. Biol. chem. 245: 2901-2913.
- [8] Fletcher, G. L. et al, 1988. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45: 352-357.
- [9] Georgesr, F, et al. 1990. Gene, 91: 159-165.
- [10] Huang, R. C. et al, 1987. Fed. Proc. 46: 2238.
- [11] Rancouret, D. E. et al, 1987, Mol. Cell Biol. 7: 2188-2195.
- [12] Rubinsky, B. et al, 1990. Biochem, Biophy, Res commun, 173: 1369-1374.
- [13] Rubinsky, B. et al, 1991, Biochem, Biophy, Res commun, 180: 566-571.
- [14] Scholander, PF. et al, 1957. J. Cell Comp. Physiol, 49: 8-24.
- [15] Sirpa Ku rkela et al, 1990. Plant Mol. Biol. 125: 137-144.