

研究论文

DOI: 10.12211/2096-8280.2025-019

“EKylation”策略改造真菌抗冻蛋白及机制解析

崔忠信^{1,2}, 王怡¹, 张雷^{1,2}, 齐海山^{1,2}

(¹ 天津大学合成生物与生物制造学院, 天津 300072; ² 天津大学合成生物技术全国重点实验室, 教育部合成生物学前沿科学中心, 天津 300072)

摘要: 抗冻蛋白 (antifreeze protein, AFP) 是一类通过非依数性机制降低冰点并有效抑制冰晶生长的生物大分子, 广泛分布于极地鱼类、昆虫及耐寒微生物等生物体内以维持其低温适应性, 在食品冷冻保存、低温医学及低温生物技术等领域具有广泛应用, 开发高活性 AFP 具有重要研究价值。本研究利用“EKylation”策略对雪腐病核瑚菌 (*Typhula ishikariensis*) 来源的 AFP (RCSB ID: 5B5H) 开展分子改造研究。基于两性离子多肽的电荷可调特性与蛋白质稳定化机制, 将两性离子多肽 (EK)₂₀ 定点偶联至 5B5H 的 N 端结构域, 经两性离子改造的重组蛋白 5B5H-EK 高级结构保持稳定, 热滞活性较野生型提升 27.8%。分子动力学模拟进一步揭示 5B5H-EK 的冰晶结合面并未发生改变, 且具有更强的抑制冰晶生长能力和冰晶结合能力, 促使水分子形成短程有序的“类冰水”结构。该研究为理性设计高效抗冻蛋白及环境适应性抗冻材料提供了新策略。

关键词: EK 多肽修饰策略 (EKylation); 抗冻蛋白; 两性离子多肽; 热滞活性; 分子动力学模拟

中图分类号: Q81 文献标志码: A

Engineering fungal antifreeze proteins through “EKylation” and its mechanism analysis

CUI Zhongxin^{1,2}, WANG Yi¹, ZHANG Lei^{1,2}, QI Haishan^{1,2}

(¹School of Synthetic Biology and Biomanufacturing, Tianjin University, Tianjin 300072, China; ²State Key Laboratory of Synthetic Biology, Frontiers Science Center for Synthetic Biology (Ministry of Education), Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Antifreeze proteins (AFPs), a functionally unique and diverse class of biomolecules, possess the ability to depress the freezing point of aqueous solutions non-colligatively and inhibit the damaging process of ice recrystallization. These critical activities stem from their surface-adsorption mechanism at the ice-water interface, preventing ice crystal growth and maturation. Consequently, the strategic development of novel AFP analogues exhibiting significantly enhanced activity and stability represents an area of substantial research interest and practical value. Herein, we introduce and implement an “EKylation” strategy designed to rationally engineer the AFP (RCSB ID: 5B5H) derived from the freeze-tolerant fungus *Typhula ishikariensis*. This approach specifically leverages the charge-

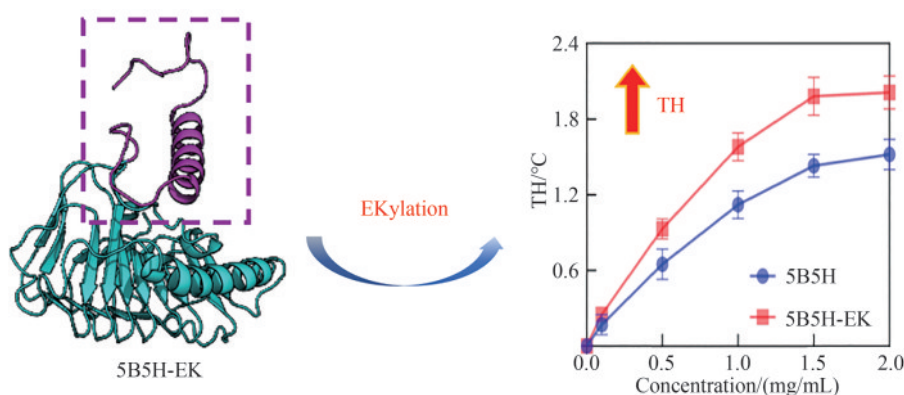
收稿日期: 2025-03-19 修回日期: 2025-07-18

基金项目: 国家重点研发计划 (2022YFC2104800)

引用本文: 崔忠信, 王怡, 张雷, 齐海山. “EKylation”策略改造真菌抗冻蛋白及机制解析[J]. 合成生物学, 2025, 6(6): 1435-1447

Citation: CUI Zhongxin, WANG Yi, ZHANG Lei, QI Haishan. Engineering fungal antifreeze proteins through “EKylation” and its mechanism analysis [J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6(6): 1435-1447

tunable properties inherent to zwitterionic peptides to modify protein surfaces. We chemically coupled the synthetic zwitterionic polypeptide (EK)₂₀, comprising alternating glutamate (E, negatively charged) and lysine (K, positively charged) residues, to the N-terminal structural domain of the wild-type 5B5H, which yielded the recombinant conjugate, designated 5B5H-EK. Comprehensive biophysical characterization revealed that the 5B5H-EK conjugate exhibited markedly enhanced structural stability compared to its unmodified counterpart. Crucially, this conjugation strategy led to a significant functional improvement, with the modified protein demonstrating a thermal hysteresis (TH) activity of 27.8%, representing a substantial enhancement over the wild-type AFP. Further insight into the molecular basis of this activity boost was gained through molecular dynamics (MD) simulations. These simulations indicated that the core ice crystal binding surface architecture of 5B5H-EK was largely preserved. Therefore, the conjugated zwitterionic chain significantly augmented the protein's inherent ability to inhibit ice crystal growth and bind tenaciously to the ice surface. Analysis of water dynamics near the modified protein surface suggested that the (EK)₂₀ chain promotes the formation of an extensive, short-range ordered hydration shell, effectively structuring interfacial water molecules into an "ice-water-like" layer distinct from bulk water. This engineered interfacial hydration likely contributes synergistically to the enhanced TH performance by reinforcing the AFP's anchoring to the quasi-liquid layer and facilitating greater surface coverage. In conclusion, this study proposes a novel and effective protein engineering strategy, utilizing zwitterionic peptide conjugation ("EKylation"), for generating highly efficient antifreeze proteins and informs the rational design of next-generation, environmentally adaptable antifreeze materials.



Keywords: EKylation; antifreeze proteins; zwitterionic peptides; thermal hysteresis activity; molecular dynamics modelling

抗冻蛋白 (antifreeze proteins, AFP) 是一类具有独特冰晶调控功能的生物大分子, 广泛分布于适应低温环境的生物体内, 如极地鱼类、耐寒昆虫、低温植物及嗜冷微生物等^[1-3]。其分子机制主要依赖于调控冰晶界面动力学, 通过特异性吸附于冰晶表面, 抑制冰晶生长及重结晶, 进而减少其宿主冷冻损伤的风险^[4-5]。AFP通过冰结合面 (ice-binding face, IBF) 与冰晶晶格形成氢键网络, 改变冰-水界面自由能, 实现热力学抑制与动力学阻碍的双重调控^[6-8]。AFP具有非依数性热滞

效应 (non-colligative thermal hysteresis), 可降低冰点而不影响熔点, 这一特性使其在低温生物学中具有独特优势^[9-10]。在应用方面, AFP已扩展至多个领域: 食品科学中用于改善冷冻食品品质并减少冰晶损伤^[11]; 低温医学中作为保护剂提高细胞、组织及器官冷冻保存效率^[12]; 农业生物技术中通过基因工程提高植物抗寒性^[13]; 低温环境工程中用于制备防冰涂层材料等^[14-15]。

尽管天然 AFP 在低温环境中展现出一定的抗冻活性, 但在实际应用中面临诸多限制^[16-18]。如天

然抗冻蛋白中, 鱼类抗冻蛋白的抑制冰晶重结晶活性和热滞活性均不够理想; 植物抗冻蛋白展现出较优的抑制冰晶重结晶活性, 但是热滞活性较差, 而热滞活性最强的昆虫抗冻蛋白抑制冰晶重结晶活性不够理想。细菌和真菌抗冻蛋白的热滞活性和抑制冰晶重结晶活性均处于中等水平, 有一定提升空间。当前研究聚焦于通过工程改造优化APF冰晶结合面、定向进化提升天然AFP抗冻活性^[11-12, 17, 19-20], 在早期的实验中, 位点特异性突变技术被用来探测哪些氨基酸残基参与了抗冻蛋白与冰的结合, 但是单个突变通常会导致抗冻活性下降^[21-23]。之后, 抗冻蛋白被改造为二聚体来提高其抗冻活性, 在物质的量浓度层次上热滞活性提升了50%以上, 能够在更低的温度下保持生物体的活性。通过扩展天然抗冻蛋白中的循环结构, 可增加抗冻蛋白的冰结合表面, 使其比野生型具有更高的抗冻活性, 在不改变抗冻蛋白基本结构的前提下, 通过增加冰结合位点来提高其抗冻活性^[24]。但上述两种方法并未在质量浓度层次上提升热滞活性, 因此需要进一步研究更有效的提升热滞活性改造方法。

EKylation策略指在功能蛋白的C端或N端连接两性离子多肽EK, 在蛋白质工程领域展现出独特的优势, 为蛋白质功能优化提供了创新的研究途径^[25-27]。两性离子多肽的电荷互补特性可能驱动分子间静电交联, 在特定条件下形成动态网络结构, 通过协同氢键和疏水作用增强蛋白聚集体稳定性。与传统的蛋白质修饰方法相比, EKylation在保持蛋白自身结构稳定的同时进一步提升功能活性^[28-29]。EKylation已对赖氨酸脱羧酶、有机磷水解酶和胰高血糖素等功能蛋白进行成功改造, 在不影响酶自身结构同时, 提升其热稳定性和活性^[30-31]。分子动力学模拟证明, AFP的非冰晶结合面亲水性与其抗冻活性存在联系^[32], 因此亲水性修饰非冰晶结合面有望提升AFP与冰晶的结合能力。综上所述, EKylation为蛋白质工程提供了新策略, 对AFP冰晶结合面修饰有望提升抗冻蛋白稳定性和活性。

本研究通过EKylation策略对雪腐病核瑚菌抗冻蛋白5B5H的非冰晶结合面进行分子改造, 增强了抗冻活性和稳定性, 同时探讨其分子机制。首先, 利用Robetta构建了(EK)₂₀改造前后5B5H的空

间结构, 并对其稳定性及构象变化进行了分析, 发现改造后结构稳定性增强。随后, 表达纯化了改造前后5B5H, 获得了纯度超过95%的蛋白质样品。Microcal VP-DSC抗冻实验表明, 经过EKylation改造后的5B5H热滞活性显著增强。进一步利用分子动力学模拟(molecular dynamic simulation, MD)对改造前后抗冻蛋白抑制冰晶能力进行标准化和量化分析, 通过研究改造后抗冻蛋白冰晶结合面的结构稳定性以及周围水分子的氢键寿命和结合能力发现, 分子改造未影响其冰晶结合面的结构, 且抗冻蛋白与冰晶的结合能得到提升。这些结果为设计改造高效抗冻蛋白提供了支撑。

1 实验方法

1.1 菌株构建

将雪腐病核瑚菌抗冻蛋白5B5H的序列进行密码子优化, 并在5'端和3'端分别引入*Nde* I和*Hind* III限制性内切酶位点。随后, 将这些优化后的序列克隆到pET-28a载体中, 以构建天然抗冻蛋白表达质粒。将(EK)₂₀序列插入到5B5H的N端, 获得改造后的抗冻蛋白5B5H-EK表达质粒, 上述操作由金唯智公司完成。而后将改造前后抗冻蛋白的质粒各1 μg加入至冰浴的感受态大肠杆菌细胞中, 混合后静置于冰浴30 min。快速热激处理(43 °C水浴90 s)并迅速冷却。接着, 加入800 μL无抗生素LB培养基, 在37 °C下以1500 r/min振荡45 min。随后, 将200 μL的已转化细胞涂布于含有相应抗生素的LB固体平板上, 标记后倒置培养12~16 h。通过挑取单菌落并进行PCR扩增来验证转化效果。加入2×Power Tag Master Mix、引物(表1)和无菌水后进行PCR(polymerase chain reaction)反应。电泳分析使用0.15 g琼脂糖和15 mL TAE配制凝胶, 加入DNA染料后, 将PCR产物和DNA marker上样。电泳结果用于确认目的基因是否成功整合和表达, 并进行测序, 从而确定菌株是否成功构建。

1.2 抗冻蛋白表达与分离纯化

将5B5H和5B5H-EK基因工程菌株接种于含

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

蛋白名称	5'端引物序列	3'端引物序列
5B5H	TGGGCAGCAGCCATCATCAT	TGGTGGTGGTGGTGCTC
5B5H-EK	GTGGGCAGCAGCCATCATCAT	TGGTGGTGGTGGTGCTCT

LB培养基的锥形瓶,于37 °C、220 r/min振荡培养16 h进行活化。取1 mL菌液转接至新鲜LB培养基,继续培养至OD₆₀₀达0.6~0.8,加入0.8 mmol/L IPTG于16 °C、180 r/min低温诱导24 h。菌体经4 °C、9000g离心10 min收集,PBS缓冲液(pH 7.4)洗涤后,采用超声破碎仪(工作周期3 s/间隔5 s)在冰浴条件下裂解细胞,裂解液经12000g离心15 min获取上清液。使用AKTA Pure系统进行亲和色谱纯化:依次用20%乙醇、结合缓冲液(20 mmol/L磷酸钠,500 mmol/L NaCl,20 mmol/L咪唑,pH 7.4)平衡Ni-NTA柱,上样后以含500 mmol/L咪唑的洗脱缓冲液进行线性梯度洗脱(0~100%,50 min),收集UV280检测的蛋白峰。向BeyoDesalt™ G-25 Spin脱盐柱中加入缓冲液充满柱管,每次约2 mL,待柱管中的缓冲液全部进入脱盐柱后,再次倒入缓冲液充满柱管,重复此步骤3~4次。通过12% SDS-PAGE电泳验证:样品与Laemmli缓冲液按4:1混合,沸水浴变性10 min,电泳后考马斯亮蓝R-250染色2 h,脱色液处理至背景透明,使用ChemiDoc成像系统记录电泳图谱。

1.3 热滞活性测量

将AFP密封于铝制坩埚中,放置在样品池中央,以空铝皿为参比。设备稳定后,以1.0 °C/min的升降温速率从室温降温至-40 °C,然后升温至

20 °C,再降温至-40 °C,获得AFP的熔融焓(ΔH_m)和熔点(T_m)。接着,从-40 °C缓慢升温至样品体系为固液混合物状态,称为保留温度(T_h),停留5 min,使冰晶完全孵化,再将温度从 T_h 降低至-40 °C,重复上述过程,记录样品结晶的起始温度(T_0)。热滞活性(TH)为保留温度与样品结晶的起始温度差值^[33-34],如式(1)。

$$TH = T_h - T_0 \quad (1)$$

1.4 Robetta预测蛋白空间结构

使用Robetta在线平台(<https://robetta.bakerlab.org/>)对抗冻蛋白5B5H及改造结果5B5H-EK的空间结构进行预测^[35-37]。首先,获取5B5H和5B5H-EK的氨基酸序列(表2),并将其提交至Robetta平台进行结构预测。Robetta平台利用同源建模方法,通过比对已知结构的同源蛋白质生成模型,并使用能量最小化进一步优化预测结构。采用Robetta平台的“full-chain”预测模式。

1.5 水环境分子动力学模拟

通过GROMACS分子动力学模拟工具对(EK)₂₀,5B5H和5B5H-EK蛋白进行100 ns的分子动力学模拟,以研究其在水溶液中的稳定性及动态行为^[38-39]。首先,通过gmx_pdb2gmx命令将pdb文件转化为gro文件,使用TIP3P水模型作为溶剂模型,CHARMM作为作用力场。通过gmx_editconf

表2 5B5H和5B5H-EK氨基酸序列

Table 2 Amino acid sequences of 5B5H and 5B5H-EK

种类	序列
5B5H	AGPTAVPLGTAGNYAILASAGVSTVPQSVITGAVGLSPAAATFLTGFSLTMSSTGTGFSTSTQVTGQLTAADYGTPTPSILTTAIGDMGTAYVNAATRSGPNFLEIYTGALGGKILPPGLYKWTSPVGASADFTIIGTSTDTWIFQIAGTLGLAAGKKIILAGGAQAKNIVWVAVGAVSIEAGAKFEGVILAKTAVTLKTGSSLNGLRILSQTAVALQKATVVQK
5B5H-EK	EKEKEKEKEKEKEKEKEKEKEKEKEKEKEKEKAGPTAVPLGTAGNYAILASAGVSTVPQSVITGAVGLSPAAATFLTGFSLTMSSTGTGFSTSTQVTGQLTAADYGTPTPSILTTAIGDMGTAYVNAATRSGPNFLEIYTGALGGKILPPGLYKWTSPVGASADFTIIGTSTDTWIFQIAGTLGLAAGKKIILAGGAQAKNIVWVAVGAVSIEAGAKFEGVILAKTAVTLKTGSSLNGLRILSQTAVALQKATVVQK

命令, 创建 $10\text{ nm}\times 10\text{ nm}\times 10\text{ nm}$ 周期性模拟盒子。以 $500\text{ kJ}/(\text{mol}\cdot\text{nm})$ 为能量最小化收敛, 0.01 为初始步长进行能量最小化处理, 以去除任何潜在的空间构象不合理性^[40]。随后, 进行NVT [粒子数(N)、体积(V)、温度(T)] 和NPT [粒子数(N)、压强(p)、温度(T)] 平衡阶段, 以确保体系在 298 K 和 10^5 Pa 的条件下达到稳定状态。平衡过程完成后进行模拟, 模拟时间设置为 50 ns , 进行5次平行模拟重复, 并在此过程中收集体系的动态数据。

1.6 冰水环境分子动力学模拟

本研究采用 TIP4P/Ice 模型构建了冰晶结构与液态水共存的稳定体系, 以模拟冰水混合体系^[41]。在此基础上, 将抗冻蛋白置于冰水界面, 构建蛋白-冰水复合体系, 并通过能量最小化及NPT系综平衡过程确保体系的稳定性。随后, 进行 200 ns 的动力学模拟, 统计整体环境的冰晶生长情况, 进行5次平行模拟重复。并通过轨迹数据, 利用 Umbrella Sampling 计算蛋白与冰晶的结合自由能^[42]。并通过模拟结果的轨迹文件, 使用 Python 包 MDAnalysis 计算氢键寿命^[43-44]。

2 结果与讨论

2.1 雪腐病核瑚菌抗冻蛋白结构模拟及稳定性分析

5B5H 结构主要由一个大的右旋 β -螺旋结构域和一个额外的长 α -螺旋组成。 β -折叠结构域由六个折叠组成, 它们构成三个平行的 β -片 (面 a、b 和 c) 和一个三角形截面。这6个螺旋按 $\beta 1$ - $\beta 6$ - $\beta 5$ - $\beta 4$ - $\beta 3$ - $\beta 2$ 的顺序不规则堆叠, 因此, 多肽链的N端和C端在 β -折叠中间以“首尾相连”的方式相邻^[45] [图1(a)]。Robetta 是一种基于多尺度分子建模的蛋白质结构预测工具, 结合了模板依赖 (homology-based) 和模板无关 (*ab initio*) 算法, 适用于高精度三维结构建模^[37, 46]。为了探究在C端和N端进行EK修饰对5B5H自身结果的影响, 通过 Robetta 平台分别对两者的空间结构进行了预测, 结果如图1(b)和(c)所示。

利用 GROMACS 分子动力学模拟平台, 研究

抗冻蛋白 5B5H 及其C端和N端修饰EK在水环境中的结构稳定性, 并通过回旋半径 (gyration, R_g) 和均方根偏差 (root mean square deviation, RMSD) 对其稳定性进行量化分析。模拟采用 CHARMM 力场, 将蛋白置于溶剂化的 TIP3P 水模型中, 添加 10 个 Na^+ 和 14 个 Cl^- 以维持体系电中性并还原离子对蛋白活性影响。经过能量最小化、平衡模拟 (NVT 与 NPT) 以及 50 ns 分子动力学模拟, 以确保结果的可靠性和准确性。在 5B5H 的模拟中, R_g 值在整个模拟过程中表现为相对稳定, 平均值约为 1.7 nm , 但在模拟后期出现轻微波动, 表明蛋白结构紧凑性有所减弱 [图1(d)]。这表明 5B5H 整体结构具有一定稳定性, 但存在局部构象调整的趋势, 可能与其柔性区域有关。相比之下, 5B5H (N端修饰) 的 R_g 值整体更为稳定, 且在后续模拟过程中波动更小, 其整体结构稳定性更为稳定 [图1(e)]。然而 5B5H (C端修饰) 的 R_g 全程在 2 nm 到 3 nm 之间波动, 证明在C端修饰EK对 5B5H 具有较大影响 [图1(f)]。5B5H (N端修饰) 的 RMSD 值在模拟阶段相较于 5B5H 迅速达到平稳状态, 平均值为 0.11 nm [图1(g)和(h)], 然而 5B5H (C端修饰) 的 RMSD 也展现出较大的波动 [图1(i)], 进一步证明在C端修饰EK不利于 5B5H 的结构稳定性。因此, 在N端修饰EK比在C端修饰EK更有利于 5B5H 的自身稳定性, 且表明 5B5H-EK (N端修饰) 在水环境中的全局构象相较于 5B5H 更加稳定。

2.2 真菌抗冻蛋白表达纯化及热滞性能检测

抗冻蛋白存在于能够在极端环境中生存的生物体内, 其独特的抗冻机制使其在食品保存、医药冷链以及农业抗冻等领域具有重要的应用潜力。为了验证 5B5H 及 5B5H-EK 的功能, 构建了相应表达载体, 将目标基因导入大肠杆菌 BL21(DE3) 中进行表达。首先获得了 5B5H 和 5B5H-EK 基因片段, 并将其分别克隆至 pET-28a(+) 表达载体中 [图2(a)]。接着将重组质粒转化至大肠杆菌 BL21 中。为了筛选获得稳定表达的单菌落, 在培养基中添加卡那霉素进行菌落筛选, 经过优化的表达条件使得目标蛋白能够高效且以可溶性形式表达。

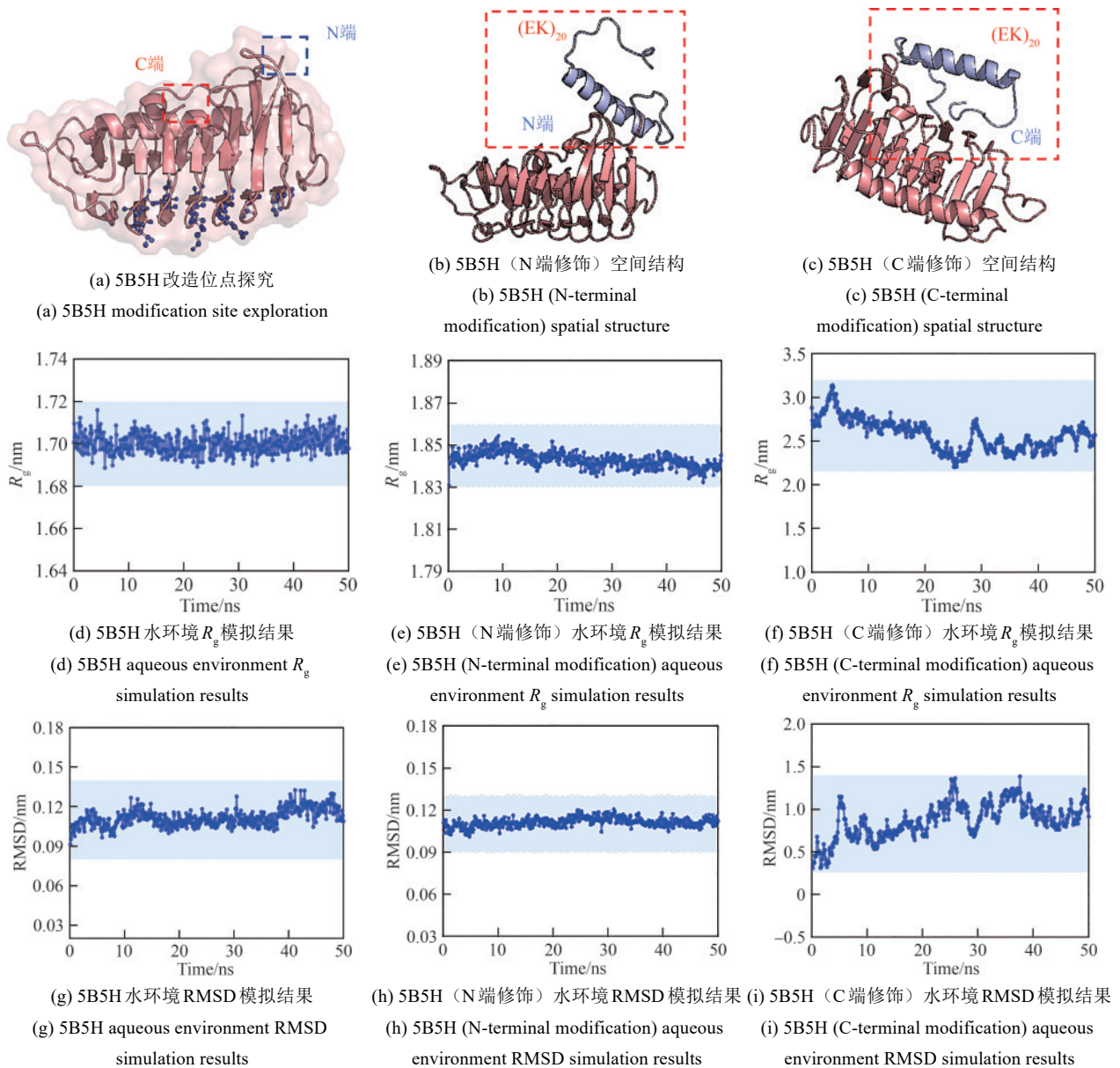


图1 改造前后5B5H抗冻蛋白结构稳定性解析

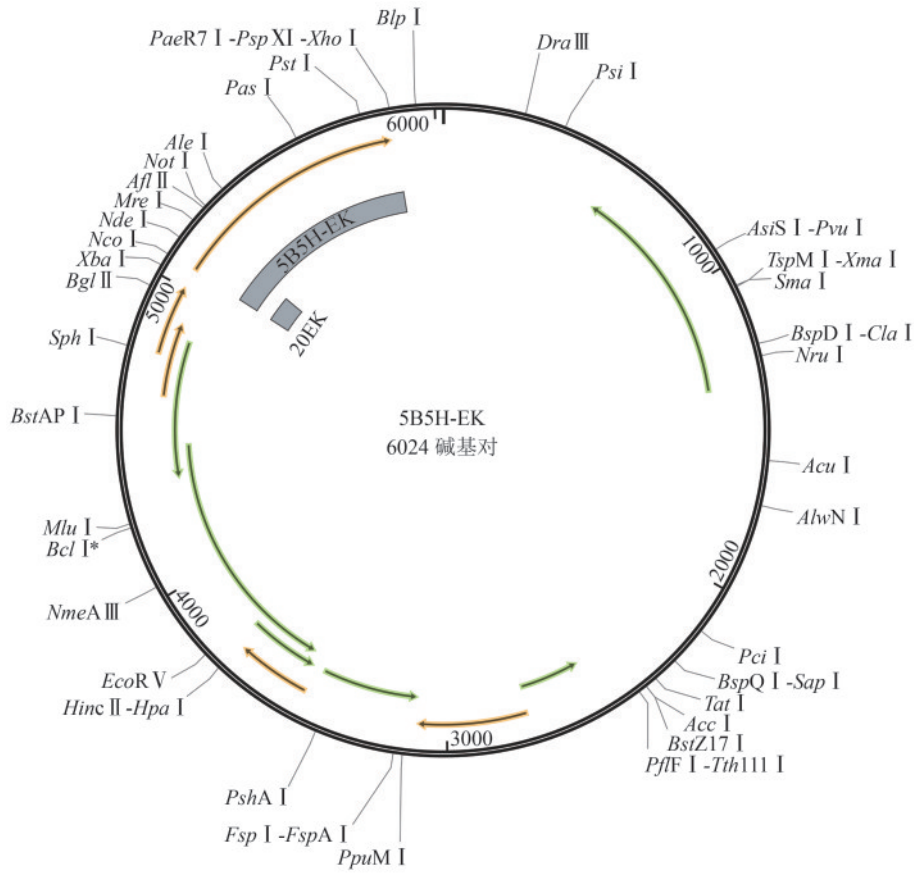
Fig. 1 Conformation resolution of EK, 5B5H and 5B5H-EK

为了进一步纯化目标蛋白，采用了镍亲和色谱法。首先通过超声波破碎细胞，将大肠杆菌裂解后离心分离，获得含有可溶性蛋白的上清液。采用Ni-NTA亲和色谱柱进行两步洗脱。第一步，使用20 mmol/L咪唑的洗脱缓冲液去除非特异性结合蛋白；第二步，使用300 mmol/L咪唑的洗脱液将目标蛋白洗脱下来。纯化后的蛋白通过SDS-PAGE分析显示，目标蛋白带的纯度高于95% [图2(b)]。而后对5B5H和5B5H-EK抗冻蛋白的热滞活性进行评估，在2 mg/mL下，5B5H-EK的

起始温度 (T_0) 要低于5B5H [图2(c)]。在不同的浓度下，突变体5B5H-EK的热滞活性均高于天然的5B5H，抗冻蛋白热滞活性随着浓度增加而提升，并在1.5 mg/mL后进入平台期，5B5H的热滞活性为1.52 °C，而5B5H-EK蛋白的热滞活性为1.94 °C，提升了27.8% [图2(d)]。

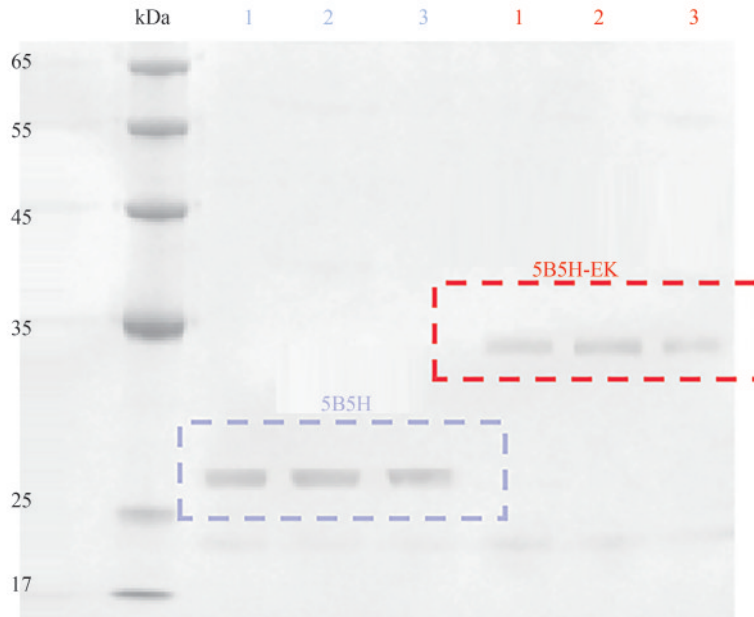
2.3 MD模拟AFP抑制冰晶生长

在极低温环境下，冰晶生长对生物体尤其是



(a) 5B5H-EK 质粒图谱

(a) Plasmid of 5B5H-EK



(b) 5B5H 和 5B5H-EK 蛋白纯化结果

(1, 2, 3 泳道分别为同一种蛋白的平行样品)

(b) Purification results of 5B5H and 5B5H-EK proteins

(Lanes 1, 2, and 3 are parallel samples of the same protein)

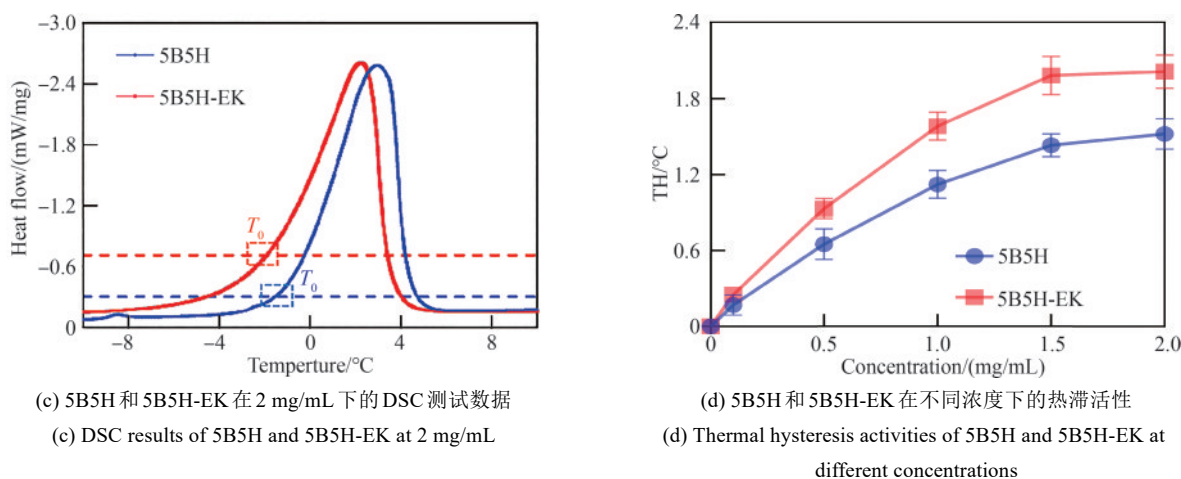


图2 5B5H和5B5H-EK的发酵, 纯化和热滞活性测量

Fig. 2 Fermentation, purification and heat-lag activity measurements of 5B5H and 5B5H-EK

细胞结构的破坏性影响广泛存在, 尤其在细胞冷冻保存和冷冻干燥过程中, 冰晶的形成可能导致细胞膜破裂或其他细胞损伤^[47-49]。本文通过分子动力学模拟, 利用GROMACS软件分析抗冻蛋白5B5H及突变体5B5H-EK在冰水环境中抑制冰晶生长的能力。通过模拟两种蛋白质在低温环境下的动态行为, 探讨其抑制冰晶生长的能力。

首先, 所用的抗冻蛋白5B5H及突变体5B5H-EK的三维结构通过PDB2GMX工具转换为GROMACS所需的输入文件格式。为保证模拟的准确性, 对蛋白质的结构进行了必要的优化, 包括去除水分子和配体, 修正缺失的氨基酸残基, 并对结构进行了能量最小化处理, 以消除可能的结构不合理性。针对冰水环境, 模拟的溶剂系统为水分子, 并且在系统中加入了冰晶的初始结构, 以模拟低温下冰晶的形成和蛋白质的相互作用。为了进行分子动力学模拟, 采用了GROMACS中的CHARMM力场^[50-51]。模拟过程中, 系统的温度和压力被控制在250 K和1 atm (1 atm=101325 Pa)条件下。为了模拟冰晶生长和蛋白质与冰晶的相互作用, 采用长时间尺度的模拟, 系统总时间为200 ns。通过模拟, 冰水环境中抗冻蛋白与冰晶的结合过程及其抑制冰晶生长的效果如图3(a)所示。

图3(a)模拟结果显示, (EK)₂₀并未展示出抑制冰晶生长能力, 这是由于其作为亲水性聚合物形成了致密的水化层, 无法展现出与冰晶结合能力从而抑制冰晶生长^[52-53]。而5B5H蛋白在冰水环

境中能够与冰晶表面结合, 并有效阻止冰晶的进一步生长。通过对冰晶生长过程的跟踪, 发现5B5H在冰晶表面形成了较为稳定的吸附层, 从而改变了冰晶的形态和生长模式, 200 ns后有20%水分子未结冰。然而, 5B5H-EK表现出更强的抑制效果, 200 ns后有37%水分子未结冰。在水合物的模拟中, 会通过角度序参数三体序参数 F_3 (也称四面体序参数, tetrahedral order parameter)和四体序参数 F_4 (four-body order parameter)来表征水分子所处的状态, 当 F_3 和 F_4 分别为0.1和-0.1时, 整体环境为纯水环境, 当 F_3 和 F_4 分别为0.01和-0.4时, 整体环境全部为冰分子^[54]。以此为标准, 可衡量整体环境结冰速率, 被应用于进一步量化改造前后抗冻蛋白的抑制冰晶生长效果。如图3(b)和(c)所示, 在0 ns时, 5B5H和5B5H-EK的 F_3 和 F_4 均相近 ($F_3=0.042$; $F_4=-0.25$), 在200 ns时5B5H和5B5H-EK的 F_3 和 F_4 分别为0.011、0.017和-0.39、-0.36。进一步计算发现, 200 ns时, 在5B5H的冰水环境中, 81%的水分子变成了冰, 而在5B5H-EK的冰水环境中只有65%的水分子变成了冰。因此, 5B5H-EK展现出更强的抑制冰晶生长能力, 证明EKylation改造策略提升了抗冻蛋白的抑制冰晶生长能力。

2.4 真菌抗冻蛋白抗冻机理探究

在冰水环境中, 如何抑制冰晶的生长是研究其作用机制的核心问题之一。本文利用分子动力

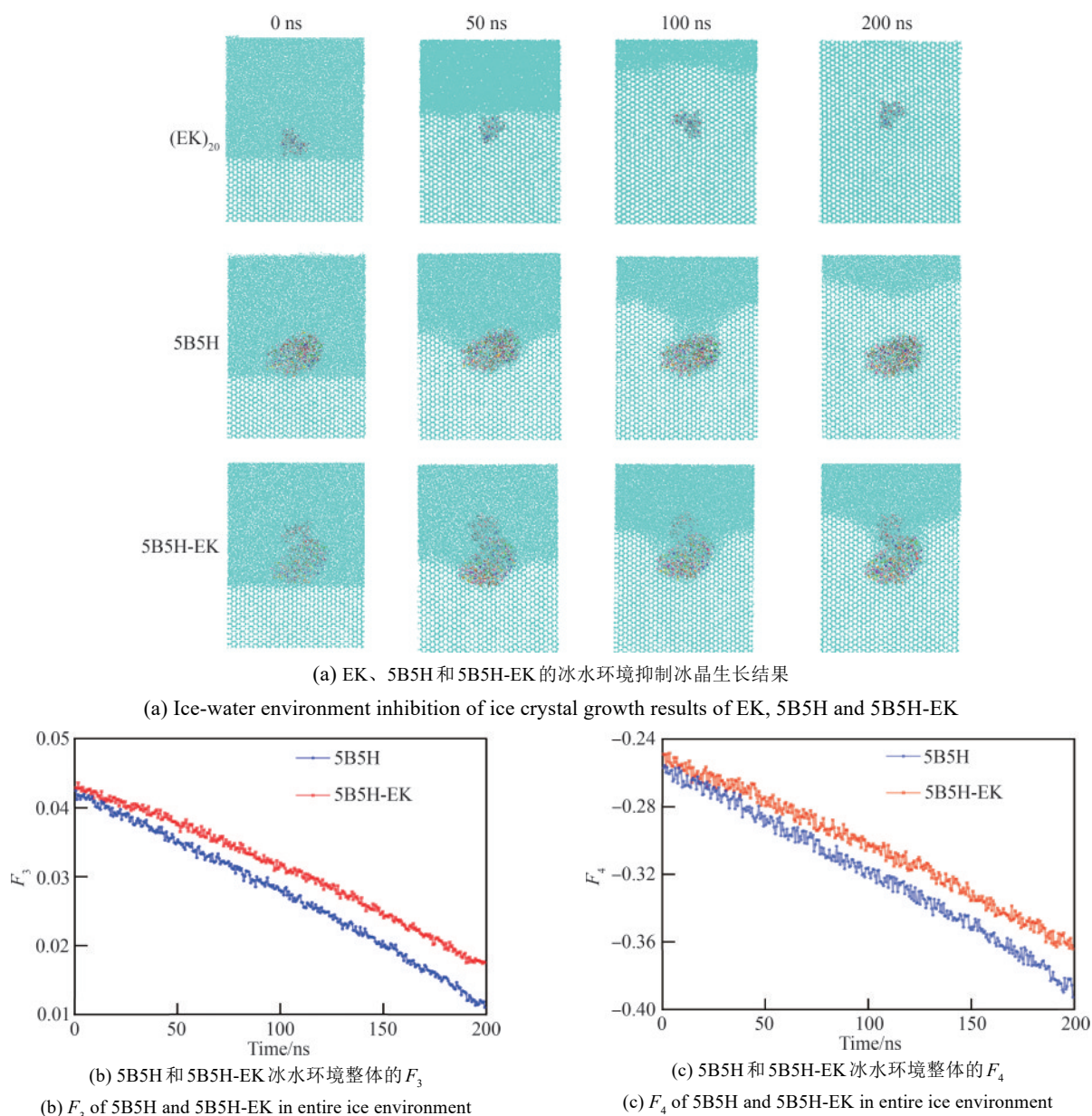


图3 5B5H和5B5H-EK冰水环境模拟结果

Fig. 3 5B5H and 5B5H-EK ice-water environment simulation results

学模拟，从冰晶结合面结构变化、周围水环境变化以及冰晶结合面结合强度等方面，对5B5H和5B5H-EK的抗冻机理进行了探究。

冰晶结合面是抗冻蛋白与冰晶相互作用的关键区域，其结构特征直接影响抗冻蛋白的功能^[55-56]。通过对5B5H和5B5H-EK的三维结构进行对比分析，发现两者的冰晶结合面在空间构象上高度一致，关键氨基酸残基的排列和取向未发生变化[图4(a)和(b)]。分子动力学模拟分析表面，5B5H冰晶结合面的结构保持了稳定性[图4(c)]。

进一步分析发现，5B5H-EK的冰晶结合面的 R_g 在动态过程中稳定在0.45左右，而5B5H的 R_g 在0.4和0.8之间波动，证明EKylation使5B5H的冰晶结合面具有了更高的稳定性，为其与冰晶的结合提供了更优的空间构象条件[图4(d)]。

通过gmx_mmpbsa和Umbrella Sampling两种方法计算结合自由能，结果表明5B5H-EK与冰晶结合能力均优于5B5H[图4(e)]。gmx_mmpbsa算法下5B5H与冰晶的结合能为-29 kJ/mol，而5B5H-EK为-42 kJ/mol，提升了44.83%，Umbrella

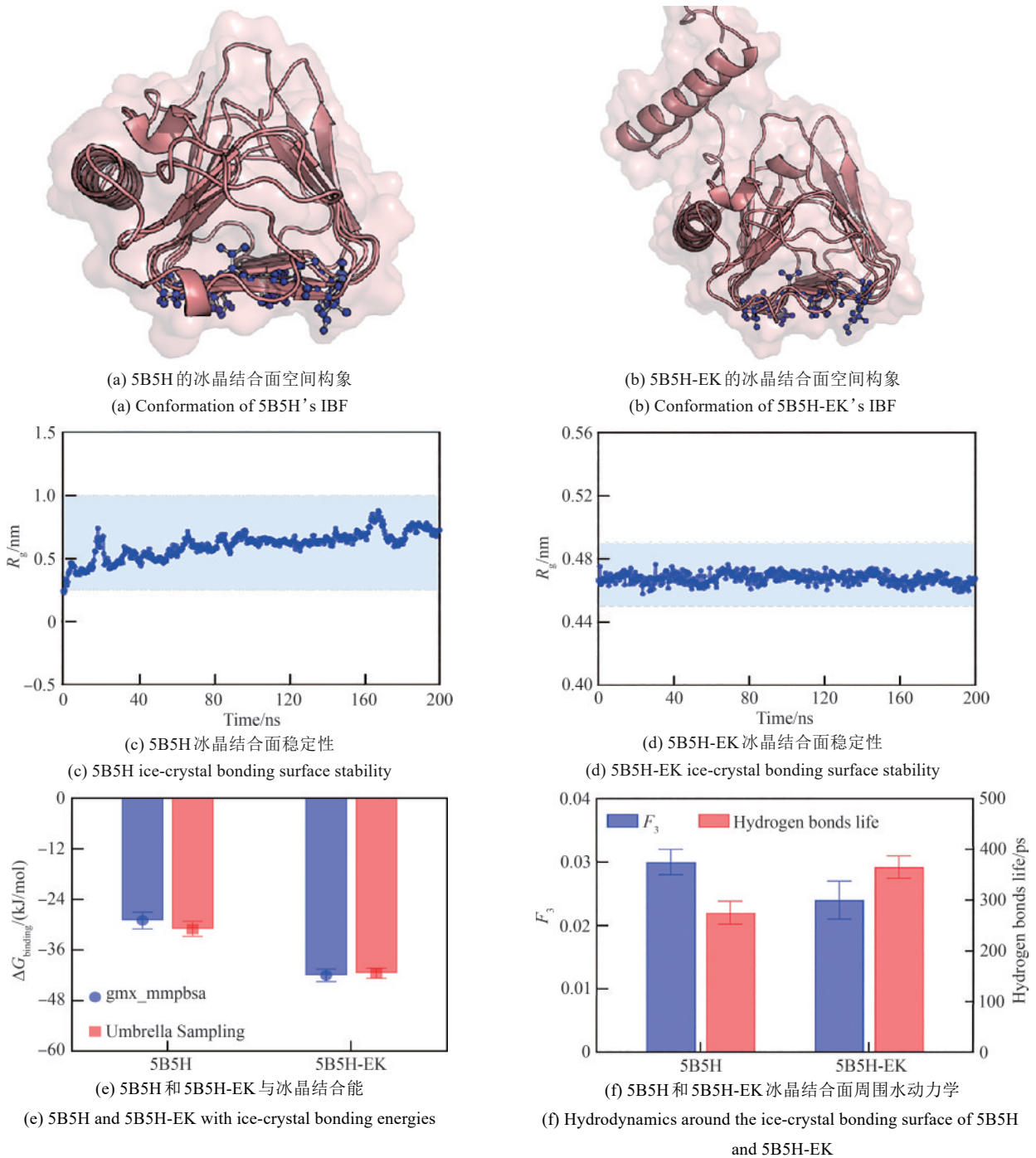


图4 5B5H和5B5H-EK冰晶结合面解析

Fig.4 5B5H and 5B5H-EK ice-crystal bonding surface resolution

Sampling 算法也表现出类似的效果 (5B5H 为 -31 kJ/mol; 5B5H-EK 为 -41.5 kJ/mol), 证明了改造策略可提升雪腐病核瑚菌抗冻蛋白与冰晶的结合能力。水分子在抗冻蛋白与冰晶相互作用过程中扮演着重要角色, 通过分子动力学模拟分析 5B5H 和 5B5H-EK 冰晶结合面周围的水分子动力学

行为, 发现 F_3 发生了变化, 水分子趋向于更加接近于冰的状态, 从而有助于抗冻蛋白与冰晶的结合, 这为其抗冻活性的提升提供了分子机制的解释 [图4(f)]。EKylation 对蛋白的修饰, 促进冰晶结合面结合位点与水分子形成更加稳定的氢键, 结合位点周围的平均氢键寿命从 275 ps 提升到了

362 ps。同时，冰晶结合面周围的水分子排列更加有序，形成了类似冰晶的局部结构^[4, 57]。这种水动力学行为的变化可能促进了5B5H-EK与冰晶表面的结合，并增强了其抑制冰晶生长的能力。

综上所述，EKylation改造5B5H，并未对其冰晶结合面的整体结构产生影响，但改变了冰晶结合面周围的水分子动力学行为，促进了类冰水结构的形成，增强了5B5H与冰晶的结合能力。这为改造抗冻蛋白提供了新思路，具有重要的应用前景，特别是在生物医药、食品冷链和农业等领域。

3 结论

抗冻蛋白在低温医学与食品工业领域展现出应用潜力。在生物样本低温保存方面，其通过特异性结合冰晶表面抑制重结晶化过程，有效降低冰晶机械损伤，同时通过稳定细胞膜脂质双分子层结构，维持细胞渗透压平衡，保护线粒体等亚细胞器功能完整性。本研究针对雪腐病核瑚菌抗冻蛋白5B5H，通过“EKylation”策略，改造得到了突变体5B5H-EK，相较于野生型5B5H，单位质量浓度的5B5H-EK热滞活性较野生型提升27.8%。为了解析EKylation对抗冻功能的影响，采用了分子动力学模拟对5B5H和5B5H-EK的结构及与冰晶的相互作用进行了解析。模拟结果表明，5B5H-EK展现出更优的抑制冰晶生长能力，其冰晶结合面构象并未发生改变，但冰晶结合能提高，在结合位点周围的水分子呈现出更有序的结构，这可能是其抗冻效果提升的关键因素。综上所述，本研究通过“EKylation”策略改造天然抗冻蛋白，显著提升了其抗冻活性，为设计高效抗冻蛋白提供了新思路，也为开发高效的抗冻材料提供了理论支撑和实验依据。

参 考 文 献

- [1] YU H Q, ZHENG H Y, LIU Y, et al. Antifreeze protein from *Ammopiptanthus nanus* functions in temperature-stress through domain A[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 8458.
- [2] SRETER J A, FOXALL T L, VARGA K. Intracellular and extracellular antifreeze protein significantly improves mammalian cell cryopreservation[J]. Biomolecules, 2022, 12(5): 669.
- [3] LI X L, WANG L Q, YIN C, et al. Antifreeze protein from *Anatolia polita* (ApAFP914) improved outcome of vitrified *in vitro* sheep embryos[J]. Cryobiology, 2020, 93: 109-114.
- [4] HUDAIT A, MOBERG D R, QIU Y Q, et al. Preordering of water is not needed for ice recognition by hyperactive antifreeze proteins[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(33): 8266-8271.
- [5] ZIELKIEWICZ J. Solvation of molecules from the family of “domain of unknown function” 3494 and their ability to bind to ice[J]. The Journal of Chemical Physics, 2024, 161(16): 165/01.
- [6] CHAKRABORTY S, JANA B. Optimum number of anchored clathrate water and its instantaneous fluctuations dictate ice plane recognition specificities of insect antifreeze protein[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2018, 122(12): 3056-3067.
- [7] DRORI R, STEVENS C A. Divergent mechanisms of ice growth inhibition by antifreeze proteins[J]. Methods in Molecular Biology, 2024, 2730: 169-181.
- [8] KAR R K, BHUNIA A. Biophysical and biochemical aspects of antifreeze proteins: using computational tools to extract atomistic information[J]. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 2015, 119(2): 194-204.
- [9] CHAKRABORTY S, JANA B. Molecular insight into the adsorption of spruce budworm antifreeze protein to an ice surface: a clathrate-mediated recognition mechanism[J]. Langmuir, 2017, 33(28): 7202-7214.
- [10] GRABOWSKA J, KUFFEL A, ZIELKIEWICZ J. Molecular dynamics study on the role of solvation water in the adsorption of hyperactive AFP to the ice surface[J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2018, 20(39): 25365-25376.
- [11] EKPO M D, XIE J X, HU Y Y, et al. Antifreeze proteins: novel applications and navigation towards their clinical application in cryobanking[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(5): 2639.
- [12] ELLIOTT G D, WANG S P, FULLER B J. Cryoprotectants: a review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures[J]. Cryobiology, 2017, 76: 74-91.
- [13] XIANG H, YANG X H, KE L, et al. The properties, biotechnologies, and applications of antifreeze proteins[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 153: 661-675.
- [14] KASAHARA K, WAKU T, WILSON P W, et al. The inhibition of icing and frosting on glass surfaces by the coating of polyethylene glycol and polypeptide mimicking antifreeze protein[J]. Biomolecules, 2020, 10(2): 259.
- [15] GAO Y H, QI H S, FAN D D, et al. Beetle and mussel-inspired

- chimeric protein for fabricating anti-icing coating[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2022, 210: 112252.
- [16] LIU Z L, YANG W G, WEI H M, et al. The mechanisms and applications of cryoprotectants in aquatic products: an overview[J]. *Food Chemistry*, 2023, 408: 135202.
- [17] 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.
- [18] DIAO H Y, LIN S Y, LI D M, et al. Control on moisture distribution and protein changes of Antarctic krill meat by antifreeze protein during multiple freeze-thaw cycles[J]. *Journal of Food Science*, 2022, 87(10): 4440-4452.
- [19] RADZIOW K, WEEKS A M. Protein engineering for selective proteomics[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2021, 60: 10-19.
- [20] SAMINENI L, ACHARYA B, BEHERA H, et al. Protein engineering of pores for separation, sensing, and sequencing [J]. *Cell Systems*, 2023, 14(8): 676-691.
- [21] LUTZ S, IAMURRI S M. Protein engineering: past, present, and future[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2018, 1685: 1-12.
- [22] RENNELLA E, SAHTOE D D, BAKER D, et al. Exploiting conformational dynamics to modulate the function of designed proteins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(18): e2303149120.
- [23] YANG Q F, TANG C. On the necessity of an integrative approach to understand protein structural dynamics[J]. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 2019, 20(6): 496-502.
- [24] MARSHALL C B, DALEY M E, SYKES B D, et al. Enhancing the activity of a beta-helical antifreeze protein by the engineered addition of coils[J]. *Biochemistry*, 2004, 43(37): 11637-11646.
- [25] KEEFE A J, JIANG S Y. Poly(zwitterionic)protein conjugates offer increased stability without sacrificing binding affinity or bioactivity[J]. *Nature Chemistry*, 2012, 4(1): 59-63.
- [26] CUI Z X, WANG Y F, ZHANG L, et al. Zwitterionic peptides: from mechanism, design strategies to applications[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2024, 16(42): 56497-56518.
- [27] LIU E J, SINCLAIR A, KEEFE A J, et al. EKylation: addition of an alternating-charge peptide stabilizes proteins[J]. *Biomacromolecules*, 2015, 16(10): 3357-3361.
- [28] LIU E J, JIANG S Y. Expressing a monomeric organophosphate hydrolase as an EK fusion protein[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2018, 29(11): 3686-3690.
- [29] YUAN Z F, LI B W, NIU L Q, et al. Zwitterionic peptide cloak mimics protein surfaces for protein protection[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(50): 22378-22381.
- [30] SHAO Q. Effect of conjugated (EK)₁₀ peptide on structural and dynamic properties of ubiquitin protein: a molecular dynamics simulation study[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2020, 8(31): 6934-6943.
- [31] TENG J M, LIU Y T, SHEN Z L, et al. Molecular simulation of zwitterionic polypeptides on protecting glucagon-like peptide-1 (GLP-1) [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 174: 519-526.
- [32] BISWAS A D, BARONE V, DAIDONE I. High water density at non-ice-binding surfaces contributes to the hyperactivity of antifreeze proteins[J]. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2021, 12(36): 8777-8783.
- [33] FARAG H, PETERS B. Engulfment avalanches and thermal hysteresis for antifreeze proteins on supercooled ice[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2023, 127(24): 5422-5431.
- [34] KIM E J, LEE J H, LEE S G, et al. Improving thermal hysteresis activity of antifreeze protein from recombinant *Pichia pastoris* by removal of *N*-glycosylation[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2017, 47(3): 299-304.
- [35] KIM D E, CHIVIAN D, BAKER D. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(Web Server issue): W526-W531.
- [36] CHIVIAN D, KIM D E, MALMSTRÖM L, et al. Automated prediction of CASP-5 structures using the Robetta server[J]. *Proteins*, 2003, 53(S6): 524-533.
- [37] PARK H, KIM D E, OVCHINNIKOV S, et al. Automatic structure prediction of oligomeric assemblies using Robetta in CASP12[J]. *Proteins*, 2018, 86(S1): 283-291.
- [38] PÁLL S, ZHMUROV A, BAUER P, et al. Heterogeneous parallelization and acceleration of molecular dynamics simulations in GROMACS[J]. *The Journal of Chemical Physics*, 2020, 153(13): 134110.
- [39] HESS B, KUTZNER C, VAN DER SPOEL D, et al. GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation[J]. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2008, 4(3): 435-447.
- [40] LINSE J B, HUB J S. Three- and four-site models for heavy water: SPC/E-HW, TIP3P-HW, and TIP4P/2005-HW[J]. *The Journal of Chemical Physics*, 2021, 154(19): 194501.
- [41] BORE S L, PIAGGI P M, CAR R, et al. Phase diagram of the TIP4P/Ice water model by enhanced sampling simulations[J]. *The Journal of Chemical Physics*, 2022, 157(5): 054504.
- [42] NGO S T, PHAM M Q. Umbrella sampling-based method to compute ligand-binding affinity[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2022, 2385: 313-323.
- [43] SHARPEE T O, DESTEXHE A, KAWATO M, et al. 25th Annual computational neuroscience meeting: CNS-2016[J]. *BMC Neuroscience*, 2016, 17(S1): 54.
- [44] KOZUCH D J, STILLINGER F H, DEBENEDETTI P G. Combined molecular dynamics and neural network method for predicting protein antifreeze activity[J]. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(52): 13252-13257.
- [45] CHENG J, HANADA Y, MIURA A, et al. Hydrophobic ice-binding sites confer hyperactivity of an antifreeze protein from a snow mold fungus[J]. *The Biochemical Journal*, 2016, 473(21): 4011-4026.
- [46] AZZAZ F, FANTINI J. The epigenetic dimension of protein structure[J]. *Biomolecular Concepts*, 2022, 13(1): 55-60.
- [47] WANG Y, MIYAZAKI R, SAITOU S, et al. The effect of ice crystals formations on the flesh quality of frozen horse mackerel (*Trachurus japonicus*)[J]. *Journal of Texture Studies*, 2018, 49(5): 485-491.
- [48] FENG S H, YI J Y, WU X Y, et al. Effects of cell morphology on the textural attributes of fruit cubes in freeze-drying: apples, strawberries, and mangoes as examples[J]. *Journal of Texture Studies*, 2023, 54(5): 775-786.
- [49] SCHAUDINN C, TAUTZ C, LAUE M. Thin polyester filters as versatile sample substrates for high-pressure freezing of bacterial biofilms, suspended microorganisms and adherent eukaryotic cells[J]. *Journal of Microscopy*, 2019, 274(2): 92-101.
- [50] LEE J M, HITZENBERGER M, RIEGER M, et al. CHARMM-GUI supports the Amber force fields[J]. *The Journal of Chemical Physics*, 2020, 153(3): 035103.
- [51] KOGNOLE A A, LEE J M, PARK S J, et al. CHARMM-GUI Drude prepper for molecular dynamics simulation using the classical Drude polarizable force field[J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2022, 43(5): 359-375.
- [52] MCMULLEN P, FANG L, QIAO Q, et al. Impacts of a zwitterionic peptide on its fusion protein[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2022, 33(8): 1485-1493.
- [53] LI C X, XIA Y Q, LIU C J, et al. Lubricin-inspired loop zwitterionic peptide for fabrication of superior antifouling surfaces[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2021, 13(35): 41978-41986.
- [54] NAKATE P, GHOSH B, DAS S, et al. Molecular dynamics study on growth of carbon dioxide and methane hydrate from a seed crystal[J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2019, 27(9): 2074-2080.
- [55] DALAL P, SÖNNICHSEN F D. Source of the ice-binding specificity of antifreeze protein type I [J]. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 2000, 40(5): 1276-1284.
- [56] JUNG W, CAMPBELL R L, GWAK Y, et al. New cysteine-rich ice-binding protein secreted from Antarctic microalga, *Chloromonas* sp[J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0154056.
- [57] HUDAIT A, QIU Y Q, ODENDAHL N, et al. Hydrogen-bonding and hydrophobic groups contribute equally to the binding of hyperactive antifreeze and ice-nucleating proteins to ice[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(19): 7887-7898.



通讯作者: 齐海山(1986—),男,博士,副教授。研究方向为功能蛋白合成生物技术、细胞工厂智能创建。
E-mail: hsqi@tju.edu.cn



共同通讯作者: 张雷(1980—),男,博士,教授,博士生导师。研究方向为合成生物学、生物医学工程、生物材料与细胞冷冻保存技术。
E-mail: lei_zhang@tju.edu.cn



第一作者: 崔忠信(1999—),男,博士研究生。研究方向为功能蛋白的智能设计。
E-mail: 1024207243@tju.edu.cn

广告索引:天津大学合成生物技术全国重点实验室(后彩一)/安及义实业(上海)有限公司(后彩二)/北京擎科生物科技股份有限公司(后彩三)/上海润度生物科技有限公司(后彩四)/安徽华恒生物科技股份有限公司(后彩五)/诚志生命科技有限公司(封三)