



抗冻蛋白理性设计进展及挑战

张相宇, 张雷*

合成生物技术全国重点实验室, 天津大学合成生物与生物制造学院生物工程系, 天津 300350

* 联系人, E-mail: lei_zhang@tju.edu.cn

收稿日期: 2025-07-02; 接受日期: 2025-09-01; 网络版发表日期: 2025-09-26

国家自然科学基金(批准号: 22525804, 22508295, 22478296, U23B20121)资助

极地、高原等环境常年处于零下温度, 是大多数生物的“生命禁区”。然而, 依然有一些生命活跃在这些极端环境中。这是由于为了抵御严寒, 它们在漫长的自然进化过程中演化出了抗冻蛋白(AFPs)这类高效抑冰分子, 赋予它们在低温环境中生存的能力。1957年, Scholander等人^[1]首次在北极鱼类体液中检测到具有降低冰点活性的分子。1969年, DeVries和Wohlschlag^[2]首次成功从南极鱼类血清中分离纯化出抗冻蛋白分子, 并进行了深入研究。他们的工作揭示: 这类蛋白能特异性地将鱼类体液冰点降至环境海水冰点以下, 使其在过冷海水中保持液态, 保障其生存, 且不影响血浆渗透压。更关键的是, 他们观察到在低于冰点时, AFP能显著减缓冰晶的生长速度。

之后, 多种AFP在极地鱼类中被陆续发现和报道。根据序列和结构特征, 鱼类AFP被系统分为五类^[3]: AFGP, AFP I, AFP II, AFP III和AFP IV。随着研究深入, 已发现的AFP来源广泛, 不仅限于鱼类, 还包括昆虫^[4]、植物^[5]、真菌^[6]、细菌^[7]等生物。由于耐寒生物种类及其环境差异巨大, 抗冻蛋白在种类、结构和序列上呈现出高度多样性^[8](图1)。

凭借其独特的抑制冰晶生长与修饰冰晶形态的能力, 抗冻蛋白在诸多领域具有应用前景。例如, 在细胞低温冷冻保存领域, 抗冻蛋白可降低冰晶生长速率, 修饰冰晶形貌减少冰晶尖锐度, 同时可以吸附在细胞膜

表面, 保护细胞膜的完整性与流动性。目前, 已有相关研究将AFP II, AFP III, LeAFP, FfAFP等用于精子及卵细胞的低温冷冻保存。结果表明, 微量抗冻蛋白的加入可提高细胞的保存效率, 最高可达 97.1%^[9~11]; 在食品工业领域, 抗冻蛋白可以有效地减少低温保藏食品过程中冰晶的形成以及冰晶重结晶行为的发生。2006年, 中国卫生部已将冰结构蛋白(即抗冻蛋白)列为可用于冷冻食品的新型食品添加剂。

但是, 随着对抗冻蛋白基础研究和应用探索的不断深入, 天然抗冻蛋白的一些局限性逐渐显现。首先, 天然抗冻蛋白主要存在于某些特定的高寒或高海拔生物体内, 不但获取困难且含量极低, 从这些生物体中提取并纯化抗冻蛋白的成本极高。并且, 通过微生物发酵天然抗冻蛋白也存在产量低、难纯化的问题。目前, Kim等人^[12]利用大肠杆菌作为生物反应器, 通过大规模发酵(20 L)获得南极细菌抗冻蛋白, 产量达到了 1.6 g/L, 是目前文献报道的最高水平; 其次, 天然抗冻蛋白存在潜在的毒性和免疫原性风险, 限制了其在生物样本冻存、食品保存等领域的应用^[13]。因此, 理性设计高效、高生物安全性的抗冻蛋白, 并实现其大规模生产, 是实现抗冻蛋白大规模应用的基础。

然而, 由于对天然抗冻蛋白探索局限性和冰晶生长认知局限性, 对于天然抗冻蛋白的探究仍处于起步阶段, 从而导致抗冻蛋白的构效关系不清晰^[13,14], 抗

引用格式: 张相宇, 张雷. 抗冻蛋白理性设计进展及挑战. 中国科学: 生命科学, 2025, 55: 2198–2202

Zhang X Y, Zhang L. Rational design of antifreeze proteins: advances, challenges, and perspectives (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2025, 55: 2198–2202, doi: 10.1360/SSV-2025-0212

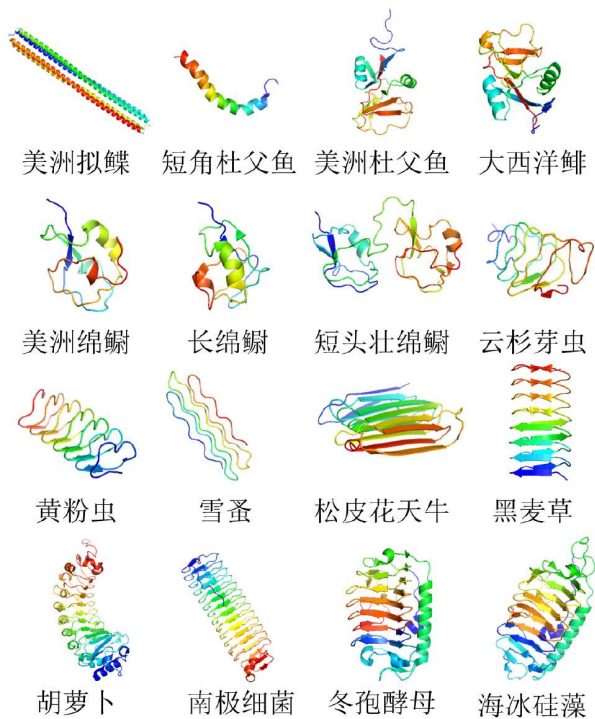


图 1 不同来源的抗冻蛋白结构
Figure 1 Structures of different antifreeze proteins

冻机理不明确, 尚无法实现从底层分子角度启发设计新型抗冻蛋白。我们认为, 对于天然抗冻蛋白的研究难点包括: 一、由于天然抗冻蛋白种类丰富, 结构多样(包括 α -螺旋、 β -螺旋管等二级结构, 也有高度折叠等特点), 其复杂的结构组成严重限制了抗冻蛋白分子层面机理的统一性研究。二、抗冻蛋白不同于酶类蛋白分子通过单一且固定的识别位点进行催化反应, 抗冻蛋白抑制冰晶生长的过程类似于材料间识别并吸附的复杂过程, 由序列、结构等多级因素决定。因此, 对于抗冻蛋白的理性设计目前仍处于起步阶段。

1 抗冻蛋白理性设计进展

蛋白质设计的核心在于从复杂的氨基酸序列空间中精准预测并优化其三维结构和功能。得益于大型语言模型(LLM)的兴起和超级计算机算力的指数级增长, 研究人员正积极开发创新性的计算框架, 旨在实现蛋白质的高效理性设计。例如, Google DeepMind的AlphaFold及其后续版本^[15]、Meta的ESMFold^[16]以及Da-

vid Baker团队的Rosetta^[17]等蛋白质结构预测工具, 已经能够以惊人的精度预测蛋白质的三维结构, 甚至从头设计全新的蛋白质骨架结构^[18,19]。在此基础上, 诸如Rfdiffusion和ProteinMPNN等反向折叠算法^[20], 则能够根据预设的骨架结构设计出相应的氨基酸序列, 并通过RoseTTAFold^[21]和AlphaFold等工具对新设计的蛋白质折叠进行验证。这些AI工具的集成应用极大地缩短了设计周期, 并显著提升了设计的效率和成功率, 使得研究人员能够更加便捷地设计出针对特定目标的结合物, 甚至设计出具有特定发光功能或催化活性的传感器蛋白。

基于此, 计算设计与AI辅助已成为推动抗冻蛋白理性设计的核心驱动力。例如, 通过分析和学习大量天然AFPs的结构和序列特征, AI模型能够识别出关键的冰结合位点和结构基序, 从而指导更高性能的AFPs设计^[21,22], 甚至构建出超越天然AFPs性能的超抗冻蛋白。但受限于已知抗冻蛋白的数量不足以支撑大数据学习, 目前尚未构建出针对抗冻蛋白的准确AI模型。在此背景下, de Haas等人^[23]另辟蹊径, 忽略抗冻蛋白结合位点等问题, 选择了具有特殊扭曲约束螺旋结构的type I抗冻蛋白, 通过对其结构特异性剖析, 从头设计得到相同结构的抗冻蛋白, 并验证得到, 扭曲螺旋结构是此类抗冻蛋白具有独特抗冻能力的关键。但是此篇文章仅对抗冻蛋白的冰结合位点与结构的匹配度进行研究, 依旧局限于天然抗冻蛋白骨架结构。目前, 不依赖于天然抗冻蛋白结构与序列, 从头设计抗冻蛋白的工作, 依旧是空缺状态。

相较于完整的抗冻蛋白, 抗冻多肽(AFPTs)作为其短链衍生物, 通常由较少的氨基酸组成, 但仍能保留其抗冻特性^[13,14,24], 是实现抗冻蛋白理性设计的基础单元。目前, 基于抗冻多肽独特的与冰晶吸附的能力, Gibson团队^[14]利用噬菌体展示技术, 从天然多肽库中筛选抗冻多肽。首先, 选择9~14个氨基酸的多肽, 在每条多肽中插入四个半胱氨酸, 四个半胱氨酸可随机两两配对, 形成单环肽或者双环肽。随机突变多肽序列中其他氨基酸, 构建得到含有约 2×10^{10} 条多肽的多肽库。通过噬菌体展示的方法, 将多肽序列展示出来, 通过冰分离的方法, 将具有抗冻能力的多肽从多肽库中筛选出来。最终, 获得一条具有优异抑制冰晶重结晶能力的多肽, 在磷酸盐缓冲液(PBS)环境中将冰晶降低至20%以下。但是, 此工作依然是依赖于非

理性筛选策略。

2025年, 本团队^[25]提出“位点-距离”(site to distance)设计原则, 首次实现了AFPTs的理性设计。该设计原则指出, 高效AFPTs的人工设计包括两个关键步骤: 首先是获得最强的冰结合氨基酸残基(site)。本团队通过计算20种天然氨基酸与冰晶的结合能, 发现了多个非天然冰结合残基, 包括谷氨酸(E)、天冬氨酸(D)、精氨酸(R)、赖氨酸(K)等。尤其是谷氨酸(E)与冰晶的结合能力是天然抗冻蛋白中最佳的位点苏氨酸^[26](T)的4倍(图2)。其次是冰结合位点之间距离(distance)的调控。在明确最强位点E后, 通过调控两个E在肽链中的位置及多肽序列, 使它们的距离与冰晶晶格中不同的氧原子精准匹配, 从而设计出一系列新型AFPTs。并且, 通过实验测试发现, 人工设计的AFPTs抑冰性能显著优于来源于天然的和已报道的100多条AFPTs。此研究是首次理性设计出非天然AFPTs, 为理性设计新型抗冻蛋白提供了新思路。

2 抗冻蛋白理性设计的挑战

抗冻蛋白的功能依赖于其复杂的三维结构和动态行为。尽管AI在蛋白质结构预测方面已表现出卓越的能力, 但准确预测蛋白在低温下(0℃以下)的精准结构依然是未解决的问题。温度会影响水分子与蛋白分子、蛋白分子内的相互作用, 例如氢键、疏水相互作用, 从而导致蛋白构象的转变。针对此问题, 本团队^[25]通过动力学模拟, 将温度参数引入蛋白结构预测过程, 通过温度修正, 实现了在零下低温环境下抗冻蛋白与抗冻多肽的结构预测。但是此低温预测平台目

前尚未实现自动化, 无法用于抗冻蛋白的AI迭代设计模型。

进一步的, 准确预测蛋白质的相互作用, 尤其是与复杂冰晶界面的特异性结合, 也是巨大的挑战。由于抗冻蛋白与冰晶的相互作用机制极为复杂, 涉及分子水平的识别、氢键网络、水合层结构以及冰晶生长动力学等多个层面^[27,28]。目前, 对于不同类型AFPs如何诱导多样化的冰晶形态(如双锥体等), 以及这些分子相互作用如何影响冰晶的机械应力和内部结构等, 仍需进一步深入阐明。缺乏对这些微观机制的全面理解, 将限制理性设计的精准性和创新性, 使得设计过程仍带有一定的试错性质。例如, 如何精确设计AFPs以特异性地结合冰晶的某个晶面, 并有效抑制该晶面的生长, 从而实现对冰晶形态的精确控制, 仍是一个悬而未决的问题。

虽然AI可以在蛋白机制不明的背景下, 通过大数据学习训练出底层网络, 从大规模蛋白数据库中筛选抗冻蛋白。但是由于缺乏足够的高质量、多样化的蛋白质-冰晶相互作用的训练数据, AI在设计冰晶结合的抗冻蛋白方面的可靠性和普适性仍有待提高。如何通过更先进的计算方法, 更精准地预测和优化抗冻蛋白的冰结合能力(ice binding ability, IBA)、热滞活性(thermal hysteresis, TH)和重结晶抑制活性(ice recrystallization inhibition, IRI)等关键功能参数, 是亟需解决的问题。这需要更精细的分子动力学模拟、更准确的量子化学计算以及更大量的高通量实验数据来共同驱动AI模型的迭代优化。

再者, 生物相容性与毒性评估是不可忽视的挑战。尤其是在生物医学领域, 理性设计的抗冻蛋白需要具

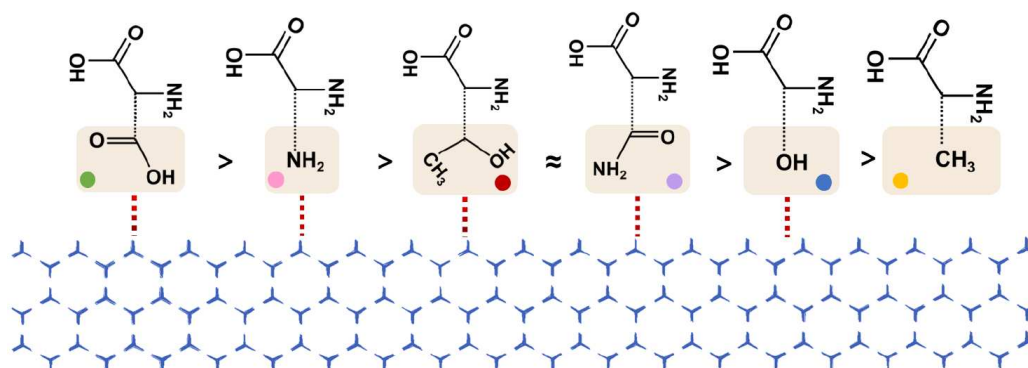


图2 不同氨基酸残基与冰晶结合能力排序
Figure 2 Ice binding energy between amino acids and ice crystals

备优异的生物相容性, 确保在体内或体外应用中不会产生细胞毒性、免疫原性或其他不良反应. 虽然一些天然AFPs被认为是安全的, 但其高浓度使用或长期暴露的潜在影响仍需详尽的毒理学和免疫学评估. 这要求设计者在追求功能优化的同时, 必须兼顾生物安全性, 这往往需要在活性和安全性之间进行精妙的平衡.

最后, 临床转化与实际应用中的挑战依然巨大. 尽管抗冻蛋白在低温保存方面展现出巨大潜力, 但将其成功应用于组织器官的临床低温保存仍面临着从实验室到临床的巨大鸿沟. 对于大尺度、复杂结构的生物样本(如肝脏、肾脏等), 如何确保AFPs能够均匀、高效地渗透到所有细胞中, 并有效防止在冰成核、冰生长和冰重结晶过程中受到的损伤^[29], 是亟待解决的关键问题. AFPs在复杂组织中渗透性差、分布不均, 以及可能与细胞成分产生非特异性结合等问题, 都严重制约了其在器官低温保存中的应用. 同时, AFPs在复

杂生理条件下的稳定性、活性保持, 以及其在降温复温过程中的行为, 也都需要深入研究.

3 总结

综上所述, 未来抗冻蛋白的理性设计将更加依赖于多学科交叉融合, 包括先进的AI算法、高通量筛选技术、结构生物学解析以及合成生物学策略. 通过对天然抗冻蛋白机制的深入理解和借鉴, 结合创新性的计算设计和实验验证, 有望逐步克服现有挑战, 开发出高效、安全、可控的新型抗冻蛋白, 从而在生物医学(如细胞治疗、器官移植)、食品工业(如冷冻食品)以及工程领域(如防冰涂层)等广泛的应用场景中实现突破, 为人类应对低温挑战提供更具前瞻性和可持续性的解决方案. 这将是一个漫长而充满希望的科学探索之旅, 需要全球科研工作者的共同努力.

参考文献

- Scholander P F, van Dam L, Kanwisher J W, et al. Supercooling and osmoregulation in arctic fish. *J Cell Comp Physiol*, 1957, 49: 5–24
- DeVries A L, Wohlschlag D E. Freezing resistance in some antarctic fishes. *Science*, 1969, 163: 1073–1075
- Kim H, Lee J, Hur Y, et al. Marine antifreeze proteins: structure, function, and application to cryopreservation as a potential cryoprotectant. *Mar Drugs*, 2017, 15: 27
- Graether S P, Kuiper M J, Gagné S M, et al. β -Helix structure and ice-binding properties of a hyperactive antifreeze protein from an insect. *Nature*, 2000, 406: 325–328
- Sidebottom C, Buckley S, Pudney P, et al. Heat-stable antifreeze protein from grass. *Nature*, 2000, 406: 256
- Bar Dolev M, Braslavsky I, Davies P L. Ice-binding proteins and their function. *Annu Rev Biochem*, 2016, 85: 515–542
- Yamashita Y, Nakamura N, Omiya K, et al. Identification of an antifreeze lipoprotein from *Moraxella* sp. of Antarctic origin. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, 66: 239–247
- Biggs C I, Bailey T L, Ben Graham T L, et al. Polymer mimics of biomacromolecular antifreezes. *Nat Commun*, 2017, 8: 1546
- Kamijima T, Sakashita M, Miura A, et al. Antifreeze protein prolongs the life-time of insulinoma cells during hypothermic preservation. *PLoS One*, 2013, 8: e73643
- 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. *Hum Reprod*, 2015, 30: 2110–2119
- Sun W S, Jang H, Kwon H J, et al. The protective effect of Leucosporidium-derived ice-binding protein (LeIBP) on bovine oocytes and embryos during vitrification. *Theriogenology*, 2020, 151: 137–143
- Kim E J, Kim J E, Hwang J S, et al. Increased productivity and antifreeze activity of ice-binding protein from *Flavobacterium frigidum* PS1 produced using *Escherichia coli* as bioreactor. *Appl Biochem Microbiol*, 2019, 55: 489–494
- Zhang X, Qi H, Yang J, et al. Development of low immunogenic antifreeze peptides for cryopreservation. *Ind Eng Chem Res*, 2023, 62: 12063–12072
- Stevens C A, Bachtiger F, Kong X D, et al. A minimalistic cyclic ice-binding peptide from phage display. *Nat Commun*, 2021, 12: 2675
- Senior A W, Evans R, Jumper J, et al. Improved protein structure prediction using potentials from deep learning. *Nature*, 2020, 577: 706–710
- Lin Z, Akin H, Rao R, et al. Evolutionary-scale prediction of atomic-level protein structure with a language model. *Science*, 2023, 379: 1123–

1130

- 17 Leaver-Fay A, Tyka M, Lewis S M, et al. Rosetta3: an object-oriented software suite for the simulation and design of macromolecules. *Method Enzymol*, 2011, 487: 545–574
- 18 Abramson J, Adler J, Dunger J, et al. Addendum: accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, 2024, 636: E4
- 19 Koepnick B, Flatten J, Husain T, et al. *De novo* protein design by citizen scientists. *Nature*, 2019, 570: 390–394
- 20 Dauparas J, Anishchenko I, Bennett N, et al. Robust deep learning-based protein sequence design using ProteinMPNN. *Science*, 2022, 378: 49–56
- 21 Wu J, Liu Y, Zhu Y, et al. Improving antifreeze proteins prediction with protein language models and hybrid feature extraction networks. *IEEE ACM Trans Comput Biol Bioinf*, 2024, 21: 2349–2358
- 22 Kozuch D J, Stillinger F H, Debenedetti P G. Combined molecular dynamics and neural network method for predicting protein antifreeze activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 13252–13257
- 23 de Haas R J, Tas R P, van den Broek D, et al. *De novo* designed ice-binding proteins from twist-constrained helices. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120: e2220380120
- 24 Graham B, Bailey T L, Healey J R J, et al. Polyproline as a minimal antifreeze protein mimic that enhances the cryopreservation of cell monolayers. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 15941–15944
- 25 Zhang X, Yang J, Tian Y, et al. Precise *de novo* design principle of antifreeze peptides. *J Am Chem Soc*, 2025, 147: 17682–17688
- 26 Lee J, Lee S Y, Lim D K, et al. Antifreezing gold colloids. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 18682–18693
- 27 Komatsu K, Machida S, Noritake F, et al. Ice I_c without stacking disorder by evacuating hydrogen from hydrogen hydrate. *Nat Commun*, 2020, 11: 464
- 28 Zheligovskaya E A, Malenkov G G. Crystalline water ices. *Russ Chem Rev*, 2006, 75: 57–76
- 29 Liu X, Shu Z, Zhang L, et al. Organ preservation: history, advancements, and perspectives. *Engineering*, 2025, 44: 112–134

Rational design of antifreeze proteins: advances, challenges, and perspectives

ZHANG XiangYu & ZHANG Lei*

State Key Laboratory of Synthetic Biology, Department of Bioengineering, School of Synthetic Biology and Biomufacturing, Tianjin University, Tianjin 300350, China

* Corresponding author, E-mail: lei_zhang@tju.edu.cn

doi: 10.1360/SSV-2025-0212