

昆虫对低温的适应——抗冻蛋白研究进展

景晓红, 郝树广, 康 乐*

(中国科学院动物研究所, 农业鼠害综合治理国家重点实验室, 北京 100080)

摘要: 昆虫抗冻蛋白的研究主要在几种昆虫中展开, 到目前为止已有二十多种昆虫抗冻蛋白被分离纯化。本文综述了关于昆虫抗冻蛋白的结构、组成、生物学活性及功能等方面的研究进展。昆虫抗冻蛋白的二级结构为 β 折叠和 β 转角, 在其特殊的氨基酸序列结构中, 半胱氨酸形成的二硫键对稳定其结构和活性起着很重要的作用。影响昆虫抗冻蛋白的因子, 如活化蛋白及低分子量溶质的发现开辟了昆虫抗冻蛋白研究的新领域。

关键词: 昆虫; 抗冻蛋白; 热滞

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296 (2002) 05-0679-05

Cold adaptation in insects: progress in antifreeze protein research

JING Xiao-Hong, HAO Shu-Guang, KANG Le* (State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: Studies on insect antifreeze proteins have focused on several species, so far over twenty antifreeze proteins (AFPs) had been isolated. This paper reviews the present state of knowledge of antifreeze protein structure, composition, bioactivity, biosynthesis and the application of these substances. The secondary structure of AFPs is mainly β -sheet and turns and their most striking feature is the occurrence of cysteines every six residues throughout their length. Almost all Cys residues are disulfide-bridged, which imposes significant structural constraints. Understanding the factors that affect AFP activity, such as activating proteins and low molecular solutes, is important for further progress in AFP research.

Key words: insect; antifreeze protein; thermal hysteresis

抗冻蛋白 (antifreeze protein, AFP) 是一些植物、寒带鱼类和在极地或温带生活的昆虫及蜘蛛等在秋、冬季体内产生的一类能提高其抗冻能力的多肽。产生抗冻蛋白是许多昆虫的一个重要的越冬策略 (Duman and Horwath, 1983; Zachariassen, 1985)。一般认为抗冻蛋白在脂肪体中合成, 然后释放到血淋巴中通过氢键与冰晶连接阻止冰晶的进一步增长, 从而降低体液的结冰点, 增大熔点与冰点之间的差异, 这现象被称为热滞现象。这些蛋白称为热滞蛋白 (thermal hysteresis protein, THP) (Horwath *et al.*, 1996), 又称抗冻蛋白 (antifreeze protein, AFP), 由它所导致的冰点与熔点之差称为热滞温度或热滞活性 (thermal hysteresis activity, THA)。

近年来, 越来越多的越冬昆虫被认为以产生热滞蛋白作为其对低温适应的策略 (Horwath *et al.*, 1996), 不仅在昆虫的体液, 而且在昆虫的肠液和

细胞内液中都有抗冻蛋白的产生 (Kristiansen *et al.*, 1999), 研究对象涉及弹尾目、襀翅目、直翅目、半翅目、长翅目和鞘翅目等的一些昆虫。可能由于可操作性方面的原因, 对鞘翅目昆虫抗冻蛋白的研究比较全面和深入, 近期陆续报道了多种抗冻蛋白的氨基酸序列 (Graham *et al.*, 1997), 并对不同来源的抗冻蛋白进行了比较和分析, 分离和纯化了编码抗冻蛋白的 cDNA (Graham *et al.*, 1997; Andorfer and Duman, 2000)。这些研究对于进一步了解抗冻蛋白的结构、功能及控制抗冻蛋白合成的季节模式以及与主要环境和生理因子的联系等方面提供了重要的信息。在国内, 费云标等 (2000) 对昆虫的抗冻蛋白曾作了综述, 但主要针对 1993 年以前的工作。本文综述近 10 年来对昆虫抗冻蛋白研究的最新进展, 并对其应用前景进行了探讨。

基金项目: 中国科学院一期创新项目 (KSCX2-1-02-02)

第一作者简介: 景晓红, 女, 1975 年 8 月生, 山西闻喜人, 在读博士生, E-mail: jingxh@panda.ioz.ac.cn

* 通讯作者 Author for correspondence

收稿日期 Received: 2001-04-12; 接受日期 Accepted: 2002-01-16

1 结构研究

得益于对鱼类抗冻蛋白结构和功能的较深入的研究和前人所做的大量的基础性工作, 在昆虫中已经提取出二十多种抗冻蛋白 (Duman *et al.*, 1991; Horwath *et al.*, 1996; Graham *et al.*, 1997; Kristiansen *et al.*, 1999; Andorfer and Duman, 2000)。昆虫抗冻蛋白的分子量大都在 7~20 kD 之间。从对昆虫抗冻蛋白的分子结构分析, 昆虫的抗冻蛋白中含有比鱼类更多的亲水性氨基酸, 氢键和二硫键形成是抗冻蛋白活性所不可缺少的 (Hew *et al.*, 1983)。

昆虫抗冻蛋白的氨基酸序列的 N 端封闭, 对其测序的研究曾一度受阻。近年来, 用内切蛋白酶处理黄粉甲 *Tenebrio molitor* 抗冻蛋白, 并对其释放的内部片段进行 PCR 扩增和筛选得到了 4 条完整的抗冻蛋白变异体的编码序列 (Graham *et al.*, 1997)。证明它的抗冻蛋白是由 12 个氨基酸组成的重复序列。最近在 *Dendroides canadensis* 中又纯化出 9 种新的抗冻蛋白, 与以前已经在小蠹中纯化的 4 种抗冻蛋白相比, 除了氨基酸的组成上有所差异外, 也是由 12~13 个氨基酸组成的重复片段构成的连续序列, 而且在氨基酸的 N 端都有一个疏水区域, 这与真核生物信号肽序列的结构一致 (Duman *et al.*, 1998)。在小蠹中抗冻蛋白的多样性暗示了这些抗冻蛋白可能由多基因家族控制编码。而且这种结构在一定程度上决定了它们产生热滞活性的潜在机制。

尽管不同的抗冻蛋白氨基酸序列和组成不同, 但都有很多关键的残基具有保守性, 这些氨基酸可能在维持抗冻蛋白结构和功能的完整性中发挥着重要的作用。例如在黄粉甲和小蠹的抗冻蛋白中有 48%~67% 的氨基酸水平的同源性, 而且所有的半胱氨酸都是高度保守的, 都以每 6 个氨基酸残基有 1 个半胱氨酸的模式始终贯穿于抗冻蛋白的整个氨基酸链中 (Andofer and Duman, 2000), 所有的这些半胱氨酸都与二硫键的形成有关, 由于它们能适当地安排氢键的排列, 因而能够形成稳定的蛋白结构 (Li and Kendrick *et al.*, 1998)。另外在抗冻蛋白重复片段不同位置上的其它氨基酸也有保守性, 包括丝氨酸、苏氨酸和丙氨酸, 并且发现丙氨酸在蛋白二级结构的上部转角处保守, 而丝氨酸在其二级结构的底部转角处保守。目前, 已经证实小蠹的抗冻蛋白二级结构是 β 折叠和 β 转角 (Li and Andofer *et*

al., 1998), 由半胱氨酸形成的二硫键在维持抗冻蛋白高度有序的结构中起到了极其重要的作用 (Andorfer and Duman, 2000)。丝氨酸和苏氨酸有侧链羟基基团, 有可能形成氢键从而与冰连接。不同的是云杉卷叶蛾 *Choristoneura fumifera* 的抗冻蛋白序列只含有 8 个半胱氨酸, 不像以上两种昆虫的排列有规律 (Tyshenko *et al.*, 1997)。

2 生物学活性研究

2.1 抗冻蛋白的纯化及其热滞活性的检测

抗冻蛋白都是从经过冬季低温驯化的虫体内提取和纯化的, 所用技术包括离子交换柱色谱分析、乙醇抽提、凝胶过滤层析、聚丙烯酰胺凝胶电泳以及反相高效液相色谱等。对于提取纯化抗冻蛋白的具体的技术方法, Horwath 等 (1996) 做了大量的工作。

降低血淋巴的冰点而产生热滞效应是昆虫抗冻蛋白的最重要的特征, 这一特征形成了检测抗冻蛋白的存在以及测定其热滞活性的技术基础。该技术的发明, 首先用来测小体积样本的熔点, 之后被用来测昆虫血淋巴冰点的下降程度, Horwath 等用毛细管方法来检测, 当样本的温度升高或降低时, 通过体视显微镜来观察熔点和冰点之间的差异, 这一方法简单易行, 一直延用至今, 但是这种方法有较大的人为操作误差。在国外, 一种极微量的冰点渗透压计也用来测量含有抗冻蛋白的溶液的结冰点。Hassen 和 Baust (1988) 报道用一个差示扫描热力学计 (differential scanning calorimeter, DSC) 来测量热滞活性, 该项技术比微量渗透计在冰核比例较低的情况下能检测出更大的活性, 可避免人为误差, 但价格昂贵。

在昆虫体内脂肪体是抗冻蛋白的主要来源, 为了更加灵敏地检测与体外系统有关的抗冻蛋白的活性, Horwath 等 (1996) 的实验室建立了一套昆虫脂肪体细胞的离体培养系统, 这样可以更加直接地观察抗冻蛋白合成与作用机制。但因为可检测到的抗冻蛋白的浓度很小, 脂肪体离体培养系统的一个缺陷在于它只能有很少的细胞与体内相近。所以有必要探索一种潜在的更灵敏的方法, 因此重结晶抑制 (recrystallization inhibition, RI) 便被作为抗冻蛋白的一个活性指标加以应用。研究表明对黄粉甲体内的一种分子量为 12.86 kD 的抗冻蛋白活性 RI 检测效果比以前的热滞筛选技术灵敏度要高 100 倍左右

(Horwath *et al.*, 1996)。

2.2 影响抗冻蛋白热滞活性的因子

昆虫体液的热滞活性与这些抗冻蛋白本身的比活性和浓度有关，绝大多数越冬态昆虫血淋巴的平均热滞活性是 3~6℃，但也有个别达 8~9℃。昆虫抗冻蛋白的比活性成百倍地大于鱼类抗冻蛋白的比活性，其热滞活性也大于鱼类的热滞活性。最近用黄粉甲体内一种特定抗冻蛋白的抗体与含不同浓度该蛋白的昆虫体液进行 Western 杂交，实验结果认为热滞活性和抗冻蛋白的浓度之间的关系是双曲线型的 (Graham *et al.*, 1997)，并发现在曲线的斜率变化最大处的浓度，与昆虫体内抗冻蛋白的生理浓度非常吻合，这说明在昆虫的体内抗冻蛋白浓度较小的改变就会对其热滞活性造成较大的影响。体液中抗冻蛋白的热滞活性与冰晶的大小有一个对数的线性负相关关系，因此在研究热滞活性时冰晶的大小应考虑在内 (Kristiansen *et al.*, 1999)。

有研究发现在小蠹的体内有一些物质可以提高纯化的抗冻蛋白的活性，经分离鉴定它是一种分子量为 70 kD 的蛋白质，它能使抗冻蛋白的活性从 1.6℃ 提高到 5.24℃ (Wu and Duman, 1991)，称为活化蛋白，这一概念的提出引起很多有关抗冻蛋白结构-功能机制的有趣问题。目前已经从黄粉甲中提取出一种能使分子量为 12.86 kD 的抗冻蛋白的活性大幅度提高的内源性活化蛋白，但它本身并没有热滞活性，与以前描述的活化蛋白不同的是，这一蛋白的相对分子质量较小 (小于 12.86 kD)，而且它可以使任何浓度的抗冻蛋白的活性都增强，甚至在可检测到的较低浓度下，也可使其活性增加 10 倍左右 (Horwath *et al.*, 1996)。也许是作用方式的不相同，但无论如何，这种专化的活化蛋白的出现开辟了一个热滞活性的季节模式调节机制的新领域。以前的研究认为热滞活性是抗冻蛋白水平的反应，活化蛋白的研究对这一理论提出了挑战，研究认为热滞活性是抗冻蛋白与活化蛋白共同作用的结果。特别是某些昆虫中分子量较大的冰核蛋白，也显示出轻微的活化作用 (Duman *et al.*, 1993)。除此而外，一些小分子量的物质也能提高昆虫抗冻蛋白活性，最明显的是柠檬酸，它能使小蠹抗冻蛋白活性增加 6 倍，琥珀酸、苹果酸和天冬氨酸等能提高 4 倍，甘油等能提高 3 倍 (Tyshenko *et al.*, 1997)，有关它们作用的具体机制还不清楚。

3 抗冻蛋白及其在昆虫抗冻生理中的作用

昆虫体内的热滞蛋白不是作为溶质来降低体液的结冰点，也不改变体液的渗透压，这样就避免了渗透压增长所带来的潜在的破坏作用。而低温下昆虫体内产生的多元醇则会因提高了体液的渗透压而造成组织受损，这也是抗冻蛋白作为一种越冬适应策略优于多元醇的地方。越冬的拟步行甲虫 *Mera-cantha contracta* 幼虫的血淋巴热滞活性可高达 4℃，热滞蛋白在 9 月中旬开始出现，秋天积累，11 月至 2 月达到高峰期，春季则渐渐下降直至 5 月末消失 (Kristiansen *et al.*, 1999)。热滞蛋白的这种消除和产生的季节性模式与其它的抗冻物质的变化模式不一致，这样昆虫可以在较温暖的天气产生或维持其抗冻蛋白 (比如在早秋或晚春)，以免偶尔有轻微的结冰温度出现造成的损伤。昆虫抗冻蛋白的作用不仅仅是通过热滞活性使冰点下降，它也是昆虫协调其行为、生理和生化机制的一个重要的组成部分。

3.1 修饰冰晶与抑制重结晶

目前对昆虫抗冻蛋白的作用机制还未十分明确，一般认为它们不是作为溶质而使昆虫血淋巴的渗透压增加进而使冰点下降，而是吸附于冰晶表面阻止它的进一步增长，从而降低血淋巴的冰点，即所谓的吸附抑制理论。抗冻蛋白吸附于冰晶表面的证据是：当冰晶在溶液中增长时，抗冻蛋白不像其它的溶质那样会被浓缩于液相，而是包围在冰晶的表面。抗冻蛋白吸附在冰晶上的机制还不十分清楚，但氢键肯定参与其中，因为所有的羟基、羧基和氨基都能与冰晶格中的氧原子和氢原子形成氢键。

典型的越冬昆虫的血淋巴有 3~6℃ 的热滞活性，但在这些昆虫中抗冻蛋白抑制冰晶增长的实际水平还未精确测得，但预计的应比实测的高，因为抗冻蛋白的热滞活性与冰晶的大小呈反比的关系，因此，具有 5℃ 热滞活性的昆虫的抗冻蛋白，实际上可以提供大于 5℃ 的保护。当在含有抗冻蛋白的小蠹血淋巴中加入多克隆抗体时，血淋巴的热滞活性增加了，Wu 和 Duman (1991) 认为抗体和抗冻蛋白的结合仍然允许抗冻蛋白连接到冰晶上。由于抗原 (分子量为 15 000) - 抗体 (分子量 150 000) 复合体要比单独的抗冻蛋白大得多，因此，可覆盖

更大面积的冰晶种,使得它的增加更不容易。对于昆虫体内活化蛋白的具体作用机制还不清楚,也许抗冻蛋白与活化蛋白的结合与抗冻蛋白-抗体复合体一样,这些聚集的蛋白比单独的抗冻蛋白能覆盖更大面积的冰晶,也可能会改变它们和冰晶的连接特点,使得这种复合体能更好地连接至冰晶表面,因此阻止冰晶在 *a* 轴上的增长,也可阻止其在 *c* 轴上的增长。同时沿着 *a* 轴和 *c* 轴抑制冰晶的增长,能更有效地提高其热滞水平 (Duman *et al.*, 1991)。

对于昆虫的热滞蛋白比鱼类热滞蛋白活性高的一个可能的解释是:昆虫抗冻蛋白与冰晶结合的部位更加多元化,并且这些部位或者是能识别不同特点的冰晶,或者是能在冰晶格的不同方向上进行重复表达。这些特点能够增加抗冻蛋白与冰晶结合的频率,从而更好地抑制冰晶增长 (Graham *et al.*, 1997)。昆虫抗冻蛋白与鱼类抗冻蛋白出现在溶液中时冰晶的形状不同,前者为二枝状,而后者多为双锥形,也有其它形状,随不同鱼类的抗冻蛋白有不同的冰晶形态或兼有之,这种差别也是昆虫抗冻蛋白活性高于鱼类的一个潜在的因素 (Li and Chibber *et al.*, 1998)。

抗冻蛋白也可以通过抑制重结晶而提高耐结冰 (freeze tolerance) 昆虫的耐结冰能力。在亚致死温度下,在昆虫体内常可看到冰晶大小的重新分布有的变大,有的变小,这一重结晶过程,被认为是通过增长的晶体的机械损伤而导致组织损伤。昆虫的抗冻蛋白甚至在浓度很低时也能抑制重结晶 (Knight *et al.*, 1988)。

3.2 维持昆虫过冷却状态

过去传统的研究结果已经证明,过冷却点对于不耐结冰 (freezing susceptible) 的昆虫来说是一个与其生态特性密切相关的参数。因此,以抗冻蛋白来稳定亚稳态的过冷却状态或降低过冷却点是这些昆虫的一个重要的适应机制。对于抗冻蛋白可提高昆虫过冷却能力的最直接的证据由 Zachariassen 和 Husby (1982) 提供,他们认为抗冻蛋白能长时间地维持亚稳态的过冷却状态,而这一特点正是不耐结冰的昆虫越冬时所需要的。抗冻蛋白也能够阻止越冬场所的冰通过昆虫的表皮进入体液中,它们的作用远远大于仅通过其热滞活性而导致冰点下降 3 ~ 6℃ (Olsen *et al.*, 1998; Gehrken, 1992)。另外,抗冻蛋白不仅能提高血淋巴的过冷却能力,还可以通过抑制冰核剂在肠液中的出现而提高肠液的过冷却能力。细胞内产生的抗冻蛋白在维持冷暴露的昆

虫体内的离子梯度中也有重要的功能 (Olsen and Duman, 1997)。

4 昆虫抗冻蛋白的研究和应用展望

昆虫抗冻蛋白在昆虫的抗冻生理中仍是一个比较新的领域,昆虫抗冻蛋白比植物和鱼类抗冻蛋白的特殊之处在于它有非常高的热滞活性,因此,它如何发挥抗冻功能,调节细胞的状态是一个值得关注的问题。目前对少数几种昆虫抗冻蛋白的分析,还不能从普遍意义上解释其抗冻生理,因此,一方面要利用现存的生物化学及分子生物学手段继续分离纯化昆虫中高活性的抗冻蛋白,鉴定蛋白质分子立体结构和基因结构;另一方面需要建立一个分析昆虫抗冻蛋白作用机制的稳定、可靠的实验方法,更进一步研究一些抗冻蛋白与昆虫耐寒性的基本问题,比如抗冻蛋白和其它蛋白的相互作用等,从而为利用昆虫抗冻蛋白来加强其它材料耐寒性提供坚实的基础。

20 世纪 90 年代初,由于对鱼类抗冻蛋白和冰晶的相互作用以及抗冻蛋白和细胞膜相互作用的进一步的了解,发现抗冻蛋白能有效地防止细胞在冷冻-解冻中的损伤,将它应用于动物材料的低温和超低温保存已成为一个重要的研究领域,并取得了重要的成果。有人已将鱼类抗冻肽前体的基因导入果蝇、大肠杆菌及拟南芥菜并使之表达,表达产物的抗冻活力与天然肽的一样。

由于昆虫抗冻蛋白的活性很高,同时存在内源性活化因子,对于分离它们的基因进行转基因动植物和蛋白质工程的研究可能具有更重要的理论和实践意义。抗冻蛋白在化工、食品、日用化学品等方面具有广泛的应用前景。如果能从昆虫中用基因工程的方法得到大量的抗冻蛋白,我们就能获得有效的抗冻新手段。

参 考 文 献 (References)

- Andorfer C A, Duman J G, 2000. Isolation and characterization of cDNA clones encoding antifreeze proteins of the pyrochroid beetle *Dendroides canadensis*. *J. Insect Physiol.*, 46: 365 - 372.
- Duman J G, Horwath K L, 1983. The role of hemolymph proteins in the cold tolerance of insects. *Annu. Rev. Physiol.*, 46: 261 - 270.
- Duman J G, Wu D W, Olsen T M, Urrutia M, Tursman D, 1993. Thermal-hysteresis proteins. *Adv. Low-Temp. Biol.*, 2: 131 - 182.
- Duman J G, Xu L, Neven L G, Tursman D, Wu D W, 1991. Hemolymph proteins involved in insect subzero-temperature tolerance ice nucleators

- and antifreeze proteins. In: Lee R E, and Denlinger D L. ed. *Insects at Low Temperature*. New York: Chapman and Hall, New York. 94 – 127.
- Duman J G, Li N, Verleye D, Goetz F W, Wu D W, Andorfer C A, 1998. Molecular characterization and sequencing of antifreeze proteins from larvae of the beetle *Dendroides canadensis*. *J. Comp. Physiol.* (B), 168: 225 – 232.
- Fei Y B, Jiang Y, Zhao S H, 2000. Research advances in insect antifreeze protein. *Acta Entomol. Sin.*, 43: 98 – 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: 98 – 102].
- Gehrken V, 1992. Inoculative freezing and thermal hysteresis in the adult beetles *Ips acuminatus* and *Rhagium inquisitor*. *J. Insect Physiol.*, 38: 519 – 524.
- Graham L A, Liou Y-C, Walker V K, Davies P L, 1997. Hyperactive antifreeze protein from beetles. *Nature*, 388: 727 – 728.
- Hansen T N, Baust J G, 1988. Differential scanning calorimetric analysis of antifreeze protein activity in the common mealworm, *Tenebrio molitor*. *Biochim. Biophys. Acta*, 957: 217 – 221.
- Hew C L, Kao M H, So Y P, 1983. Presence of cystine-containing antifreeze proteins on the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Can. J. Zool.*, 61: 2 324 – 2 328.
- Horwath K L, Easton C M, Poggioli T J, 1996. Tracking the profile of a specific antifreeze protein and its contribution to the thermal hysteresis activity in cold hardy insects. *Eur. J. Entomol.*, 93: 419 – 433.
- Knight C A, Hallett J, DeVries A L, 1988. Solute effects on ice recrystallization: an assessment technique. *Cryobiology*, 25: 55 – 60.
- Kristiansen E, Pedersen S, Ramlov H, 1999. Antifreeze activity in the cerambycid beetle *Rhagium inquisitor*. *J. Comp. Physiol.* (B), 169: 55 – 60.
- Li N, Andorfer C A, Duman J G, 1998. Enhancement of insect antifreeze protein activity by solutes of low molecular mass. *J. Exp. Biol.*, 201: 2 243 – 2 251.
- Li N, Kendrick B, Manning M, 1998. Secondary structure of antifreeze proteins from overwintering larvae of the beetle *Dendroides canadensis*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 360: 25 – 33.
- Li N, Chibber B, Castellino F J, Duman J G, 1998. Mapping of the disulfide bridges in antifreeze proteins from overwintering larvae of the beetle *Dendroides canadensis*. *Biochemistry*, 37: 6 343 – 6 350.
- Olsen T M, Duman J G, 1997. Maintenance of the supercooled state in the gut of overwintering Pyrochroid beetle larvae, *Dendroides canadensis*: role of gut ice nucleators and antifreeze proteins. *J. Comp. Physiol.* (B), 167: 114 – 122.
- Olsen T M, Seass S J, Li N, and Duman J G, 1998. Factors contributing to seasonal increases in inoculative freezing resistance in overwintering firecolored beetle larvae *Dendroides canadensis* (Pyrochroidae). *J. Exp. Bio.*, 201: 1 585 – 1 594.
- Tyshenko M G, Doucet D, Davies P L, and Walker V K, 1997. The antifreeze potential of spruce budworm thermal hysteresis protein. *Nature Biotech.*, 15: 887 – 890.
- Wu D W, Duman J G, 1991. Amplification of insect antifreeze protein from the beetle *Dendroides canadensis*. *J. Comp. Physiol.* (B), 161: 279 – 283.
- Zachariassen K E, 1985. Physiology of cold tolerance in insects. *Physiol. Rev.*, 64: 799 – 832.
- Zachariassen K E, Husby J A, 1982. Antifreeze effect of thermal hysteresis agents protects highly supercooled insects. *Nature*, 298: 285 – 287.