





Y1736433

## 原创性声明

本人声明：所呈交的学位论文是本人在导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除本文已经注明引用的内容外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得内蒙古大学及其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：栗丽芳

指导教师签名：梁群佳

日 期：2010.5.25

日 期：2010.5.25

## 在学期间研究成果使用承诺书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，即：内蒙古大学有权将学位论文的全部内容或部分保留并向国家有关机构、部门送交学位论文的复印件和磁盘，允许编入有关数据库进行检索，也可以采用影印、缩印或其他复制手段保存、汇编学位论文。为保护学院和导师的知识产权，作者在学期间取得的研究成果属于内蒙古大学。作者今后使用涉及在学期间主要研究内容或研究成果，须征得内蒙古大学就读期间导师的同意；若用于发表论文，版权单位必须署名为内蒙古大学方可投稿或公开发表。

学位论文作者签名：栗丽芳

指导教师签名：梁群佳

日 期：2010.5.25

日 期：2010.5.25



# 第一类抗冻蛋白的统计力学研究

## 摘 要

随着科学技术的发展和实验条件的不断完善,人们陆续从海洋鱼类、陆地昆虫、植物、细菌和真菌等各类生物体中分离得到多种不同类型的抗冻蛋白,并测定了它们的基因序列和结构.这些蛋白质不仅具有丰富的结构信息,而且具有特殊的抗冻性质,这样使得抗冻蛋白有着广阔的应用前景,从而对它们的研究在很多领域备受关注,从分子生物学到生物物理学到化学领域,从渔业海洋学到生态学再到生物进化领域,近年来还引起了商业团体的兴趣.本文利用统计热力学的理论,建立了适用于解释第一类抗冻蛋白热滞活性的统计力学模型.在不计入分子间相互作用的近似下,用溶液格点模型详细讨论了链状蛋白质分子溶液的热力学性质;在此基础上,计入蛋白质分子与水分子间相互作用的影响,讨论了第一类抗冻蛋白溶液的热力学性质;理论计算了第一类抗冻蛋白分子与冰晶的相互作用能;进一步研究了计入抗冻蛋白分子在冰晶表面的吸附方向性后的统计力学模型.获得的主要结果有:

一、利用统计热力学的基本理论,建立了适用于解释第一类抗冻蛋白热滞活性的统计力学模型,计算了几种第一类抗冻蛋白的热滞温度随浓度的变化曲线.计算过程中,分别给出了抗冻蛋白分子吸附前后冰晶表面系统的配分函数及自由能,同时,认为抗冻蛋白分子在冰晶表面的吸附方式与理想气体表面吸附方式相同.给出了热滞温度与覆盖度的关系表达式,并计算了几种第一类

抗冻蛋白的热滞温度，并且与已有的实验结果进行了比较。结果表明，理论结果与实验结果符合较好，统计力学模型可以较好地解释抗冻蛋白的热滞活性；抗冻蛋白化学势的增加会导致热滞温度的升高，抗冻蛋白与冰晶间的相互作用能明显影响热滞温度。

二、 利用统计热力学理论和溶液格点模型，在不计入分子间相互作用影响的初级近似下，讨论了链状蛋白质分子溶液的热力学性质。结果表明，溶液的吉布斯函数随蛋白质分子浓度增加先降低后升高，吉布斯函数的最小值随蛋白质分子链长增加而向其浓度小的方向移动；溶液吉布斯函数随温度升高而降低。蛋白质分子的化学势随其浓度增加而增加；当溶液浓度很低时，蛋白质分子化学势随温度的升高而降低，当超过一定浓度时，蛋白质分子化学势随温度的升高而增加。作为该理论的应用，计算了第一类抗冻蛋白分子的化学势。将计算结果与理想溶液模型结果比较发现，即使浓度很低，抗冻蛋白溶液也不能简单地用理想溶液模型描述。

三、 计入蛋白质分子与水分子间相互作用的影响，详细讨论了第一类抗冻蛋白溶液的热力学性质。结果发现，溶液的吉布斯函数随浓度的变化先降低，而后很快升高；溶液中第一类抗冻蛋白分子的化学势随浓度增加而增大，水分子的化学势随抗冻蛋白分子浓度的增加而降低，从而使得溶液的吉布斯函数先降低后升高。同时，还分析了加入抗冻蛋白分子使得溶液冰点温度的降低即依数效应。计算给出的冰点温度降低值很小，在讨论溶液性质及抗冻蛋白热滞活性时通常被忽略，这表明抗冻蛋白的抗冻机理以非依数效应为主。

四、 鉴于抗冻蛋白分子与冰晶间的相互作用能对热滞温度有重要影响，理论计算了抗冻蛋白分子与冰晶的相互作用能。计算中，假定与冰晶有相互作

用的只是处于某些位置的氨基酸基团，且为 Van der Waals 相互作用，同时计入相邻基团间排斥相互作用的影响。以几种第一类抗冻蛋白为例，计算了蛋白质分子与冰晶的相互作用能。结果发现，第一类抗冻蛋白与冰晶的相互作用能与他们的丙氨酸（或苏氨酸）上的甲基的个数有关，同时，与这些氨基酸与冰晶的距离也有关系，甲基的个数越多，相互作用能越大，与冰晶的距离越大，相互作用能越小。

五、 进一步改进统计力学模型，计入蛋白质分子在冰晶表面吸附时的取向，重新计算了第一类抗冻蛋白分子的热滞活性。结果表明，计入吸附方向性后的热滞温度略小于不考虑吸附方向性的结果，这是由于计入吸附方向性后的覆盖度较原来小造成的。抗冻蛋白分子的化学势及其与冰晶的相互作用能的大小影响其在冰晶表面的覆盖度，进而影响热滞温度的大小。计入吸附方向性的统计力学模型可以更好的解释第一类抗冻蛋白的热滞活性，故吸附方向性不能忽略。

关键词：第一类抗冻蛋白；热滞活性；统计热力学；配分函数；自由能；吉布斯函数；化学势；相互作用能；吸附方向

# THE STATISTICAL MECHANICS STUDIES OF TYPE I ANTIFREEZE PROTEINS

## ABSTRACT

With the development of scientific technology and test conditions, people gradually isolated different types of antifreeze proteins from the organisms of ocean fishes, terrestrial insects, plants, bacteria and fungi, and the gene sequences and structures of these antifreeze proteins were also determined. These proteins have not only a wealth of structural information, but also the special anti-freezing properties, so that it makes these antifreeze proteins have broad applicational prospects, and thus their study is also concerned in many fields, from molecular biology to biological physics to chemical field, from oceanography to fisheries ecology and then to the field of biological evolution. In recent years, it has also attracted the interest of the business community. In this paper, based on the statistical mechanics and statistical thermodynamics theory, the statistical mechanics model is established, and it is applicable to explain the thermal hysteresis activity of the type I antifreeze protein(AFPI). By using the solution lattice model and non-considering the

interaction between molecules, the thermodynamic properties of linear protein molecular solution are discussed in detail; based on this, the thermodynamic properties of AFPI solution are studied further when the protein-water interaction is also considered. The interaction energy between AFPI and ice crystal is calculated theoretically. Finally, the adsorption orientation of AFPIs on the ice surface is considered in the statistical mechanics model. Some main results of the thesis are generalized as following:

[1] By using statistical thermodynamics theory, the statistical mechanics model is established, and it is applicable to explain the thermal hysteresis activity of AFPI. Thermal hysteresis temperatures of some mutants of AFPIs as functions of antifreeze proteins concentration are calculated. In the calculating process, it gives the partition functions and free energies of the ice crystal with AFPIs adsorption, and without AFPI adsorption, respectively. Mean while, it is considered the adsorption fashion of AFPI on the ice surface is same as that of ideal gas on surface. The function which expresses the relation of thermal hysteresis temperature and coverage rate is given, and the thermal hysteresis temperatures of some mutants of AFPI are calculated and compared with the experimental data. The results show that the theoretical results are in agreement with the experimental data, and our statistical mechanics model can explain the thermal hysteresis activity of AFPI successfully; the increase of AFPI chemical potential will result in the increase of thermal hysteresis temperature, and the interaction energy between AFPI and ice also influences the thermal hysteresis temperature obviously.

[2] With the preliminary approximation of non-considering the influence of interactions between molecules, statistical thermodynamics theory and solution lattice model are applied to discuss the thermodynamic properties of linear protein solution. The results show that the Gibbs function of the solution decreases with the protein concentration, and with the continuing increase of protein concentration, the Gibbs function will be increased, and the minimum of Gibbs function moves to the smaller concentration when the protein molecular chain is longer. The Gibbs function decreases with the increasing of temperature. The chemical potential of protein increases with the increase of its concentration, and it decreases with the increase of temperature when the concentration is small, and it increases with the temperature when the concentration exceeds a center value. Finally, as an application of the theory, the chemical potential of AFPI is calculated. Comparing the result with that of ideal solution, it can be found that, the solution is can not be discussed simply as an ideal solution even though the solution is dilute.

[3] Considering the interaction between protein and water molecules, the thermodynamic properties of AFPI solution are discussed in detail. The results show the Gibbs function of the solution with concentration decreases firstly, and it increases quickly as the concentration still increases; the chemical potential of AFPI in the solution increases with the increase of AFPI concentration, and the chemical potential of water in the solution decreases with the increasing of AFPI concentration, and these result in the fact that the Gibbs function of the solution varies with the AFPI concentration, and this variety first decreases and then

increases. Mean while, it gives the result that the depression of the solution freezing point caused by the addition of AFPI is a colligative effect, and the depression of freezing point is calculated. It is found that this temperature depression is very small, and usually can be omitted when discussing the properties of the solution and the thermal hysteresis activity of antifreeze proteins, and this means that the antifreeze activity of AFPs is a non-colligative effect.

[4] The formal statistical mechanics model gives the conclusion that the interaction energy between antifreeze proteins and ice plays the important part on the thermal hysteresis temperature, and then the interaction energy between AFPI and ice are calculated theoretically. In the calculation process, it is considered that only some amino acid groups at certain locations can interact with ice, and this interaction is Van der Waals interaction, and at the mean while, the repulsive interaction between same neighboring groups is also considered in the calculation. As an example, the protein-ice interaction energies of some mutants of AFPIs are calculated. The results show the interaction energy between AFPI and ice relates to the number of methyl groups on the alanines (or threonines), and it is also influenced by the distance between AFPI and ice. The more the number of methyl groups, the larger the interaction energy is; the larger the distance between AFPI and ice, the smaller the interaction energy is.

[5] With the further improvement of the statistical mechanics model, the thermal hysteresis of AFPI is discussed when the adsorption orientation is included. The results show the thermal hysteresis temperature is smaller than that of

non-considering adsorption orientation, and this is because the coverage rate of the former is smaller than the latter. Both of the chemical potential of AFPI and the AFPI-ice interaction energy influence the coverage rate, and then affect the thermal hysteresis. The statistical mechanics model including the adsorption orientation can express the thermal hysteresis of AFPI better, and the adsorption orientation can not be neglected.

**KEYWORDS:** type I antifreeze protein(AFPI); thermal hysteresis; statistical thermodynamics; partition function; free energy; Gibbs function; chemical potential; interaction energy; adsorption orientation

# 目 录

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| 第一章 绪论 .....                      | 1  |
| §1.1 国内外研究现状.....                 | 1  |
| §1.2 论文研究内容及安排.....               | 7  |
| 第二章 第一类抗冻蛋白热滞活性的统计力学模型的建立 .....   | 10 |
| §2.1 引言.....                      | 10 |
| §2.2 模型与理论.....                   | 10 |
| §2.3 计算结果与讨论.....                 | 15 |
| §2.4 结论.....                      | 20 |
| 第三章 链状蛋白质分子溶液的统计热力学性质 .....       | 21 |
| §3.1 引言.....                      | 21 |
| §3.2 模型与理论.....                   | 21 |
| §3.3 计算结果与讨论.....                 | 23 |
| §3.3.1 链状蛋白质分子溶液的热力学性质 .....      | 23 |
| §3.3.2 AFPI 溶液中 AFPI 分子的化学势 ..... | 28 |
| §3.4 结论.....                      | 30 |
| 第四章 AFPI 溶液的热力学性质.....            | 31 |
| §4.1 引言.....                      | 31 |
| §4.2 模型与理论.....                   | 31 |
| §4.3 计算结果与讨论.....                 | 32 |
| §4.4 结论.....                      | 38 |
| 第五章 AFPI 分子与冰晶的相互作用能的计算.....      | 39 |
| §5.1 引言.....                      | 39 |
| §5.2 模型与理论.....                   | 39 |

§5.3 计算结果与讨论.....41

§5.4 结论.....45

第六章 AFPI 分子吸附方向性对热滞的影响..... 46

§6.1 引言.....46

§6.2 模型与理论.....46

    §6.2.1 覆盖度的计算 .....46

    §6.2.2 热滞温度与覆盖度的关系 .....48

§6.3 计算结果与讨论.....50

§6.4 结论.....55

第七章 总结 ..... 57

参考文献 ..... 59

致 谢 ..... 71

攻读学位期间发表和完成的论文 ..... 72

## 第一章 绪论

### § 1.1 国内外研究现状

冷冻对大多数生物的存活是有害的。不同的生物对冷冻环境的适应能力也大不一样，许多生物都能够在较冷的环境中生存，有些生物甚至可以在低于正常生存温度的环境下生存，其原因是这些生物体内有能抗冻的生物分子，这种特殊的抗冻分子作为一种生物抗冻剂越来越引起人们的重视。1969年，DeVries首次发现某些鱼类体内有抗冷冻的物质[1]，提出了抗冻蛋白的概念。几十年来，对抗冻蛋白的研究引起了科学家们的兴趣[2-17]。至今为止，国内外研究人员已经从海洋鱼类、陆地昆虫、植物、细菌和真菌等各类生物体中分离得到多种抗冻蛋白，并测定了它们的基因序列及结构，近些年的研究工作主要是在抗冻蛋白结构信息的基础上对其抗冻机制的探索[2-14]。大量研究发现，虽然不同种类的抗冻蛋白结构各不相同，但是它们有一个共同的性质[15-17]：可以降低溶液的冰晶生长点温度，抑制冰晶的生长，产生热滞现象。由于特殊的抗冻机制，使得抗冻蛋白在很多领域都有广泛的应用[18-26]：在农业上，它可以起到对植物的低温保护作用；在水产养殖上，它可以使转基因鱼类安全过冬；在医药上，抗冻蛋白在冰冻手术、器官移植及低温储藏等方面都有重要的应用，等等。另外，抗冻蛋白可以影响冰晶的生长，这种特殊的性质可能会使得抗冻蛋白未来在生物矿化研究以及纳米技术方面有重要的应用。由于其广阔的应用前景使得对抗冻蛋白的研究受到广泛的关注[27]，从分子生物学到生物物理学到化学领域，从渔业海洋学到生态学再到生物进化领域，近年来还引起了商业团体的兴趣。

从首次发现至今，人们对抗冻蛋白的组成和结构做了大量的研究发现，具有降低冰晶生长点温度的抗冻蛋白大体上分为两类[6]，为抗冻糖蛋白(AFGP)和抗冻蛋白(AFP)。AFP根据其发现时间的不同，又可分为AFPI、AFPII、AFPIII及AFPIV。几十年来，人们在对AFGP和AFPI的研究中发现[5,27-34]，组成它们分子的67%的氨基酸是丙氨酸(alanine)，但它们的结构是完全不同的：AFGP分子主要是由3肽糖单位[-Ala-Ala-Thr(双糖基)-]以不同重复度串联而成，分子量一般在2.5-33.7kDa之间，分子内无 $\alpha$ 螺旋结构。AFPI是由3个重复的[-Thr-X(2)-Asx-X(7)-]片段串联而成的 $\alpha$ 螺旋单体结构[30,31]，研究最多的

是冬鲈(winter flounder)产生的 AFPI, 包括两种亚型共四种, 即: 肝脏型 AFPs, 包括 HPLC-6、HPLC-8、AFP9 和皮肤型 SAFPI[33-37]. AFPII 是从胡瓜鱼 (*Osmerus eprlanus mordax*) 以及太平洋鲱鱼 (*Clupea pallasii*) 中分离的富含胱氨酸的球蛋白, 与钙依赖型的 C 型凝聚素碳水化合物识别区同源[38-41]. AFPIII 是从绵鳚 (*Zoarces elongates Kner*) 中分离出的一种球状结构的蛋白分子, 其分子组成与其它的抗冻蛋白完全不同, 没有占优势的非极性氨基酸[40-44]. AFPIV 是从多刺床杜父鱼 (*Myoxocephalus octodecemspinosus*) 中分离得到的一种抗冻蛋白, 约 108 个氨基酸残基, 与可替换的脱辅基蛋白家族的成员有 20% 的序列同源[28].

随着对抗冻蛋白研究的深入发展, 人们又从昆虫、植物及细菌真菌等体内分离出了结构各异的多种抗冻蛋白. 昆虫体内的抗冻蛋白, 研究较多的是从甲虫 (*Tenebriomolitor*) 体内分离的抗冻蛋白和从云杉蚜虫 (*Choristoneura fumiferana*) 体内分离出的抗冻蛋白. 甲虫抗冻蛋白 (TmAFP) 为分子量为 8.4kDa 的规则右手  $\beta$ -螺旋结构的分子; 云杉蚜虫抗冻蛋白 (CfAFP) 的分子量在 9.0kDa 左右, 其结构为规则的左手  $\beta$ -螺旋结构. 研究发现, 在相同的条件下, 昆虫的热滞活性比鱼类抗冻蛋白的热滞活性要高许多, 有时可达 10-100 倍[7-10,45-54].

对植物体内抗冻蛋白的研究发现, 其抗冻蛋白活性最低, 一般为 0.2~0.4°C[11,12,55-58]. 同时, 发现南极细菌体内也具有抗冻活性的成分[14].

几十年来, 人们研究发现, 各种抗冻蛋白的氨基酸组成各不相同, 空间结构也存在很大差别, 但是它们的抗冻机理基本相同, 即: 与冰晶的某些特定的晶面结合, 改变冰晶的生长习惯或阻碍冰晶继续生长, 降低溶液的冰晶生长点温度, 而不影响冰晶的熔点温度, 产生热滞效应[15-17]. 冰晶的熔点温度与冰晶生长点温度之差叫做热滞温度, 用来描述抗冻蛋白的热滞活性. 抗冻蛋白非依数地降低冰晶生长点的温度, 当溶剂的种类和数量确定后, 其热滞温度仅与抗冻蛋白分子在溶液中的数量(浓度)有关, 随浓度的增加, 热滞温度非依数性的增加, 同时, 当浓度继续增加达到一定值后, 热滞温度不再增加, 而是趋于一个定值, 即达到一最大值[57-61]. 将纯水中的冰晶形状与有抗冻蛋白的水溶液中冰晶的形状进行对比, 发现抗冻蛋白吸附于冰晶表面后, 改变了冰晶的生长习性, 而不同的抗冻蛋白对冰晶生长习惯的改变也不相同, 有的使冰晶变为双金字塔型, 有的抗冻蛋白使冰晶变为六棱柱型, 等等[62-66].

随着对抗冻蛋白的研究越来越多, 对抗冻蛋白抗冻机理的理论研究也越来越受到人们的关注, 出现了许多理论模型来解释抗冻蛋白的抗冻机制. 根据其基本理论的不同, 对抗冻蛋白抗冻机制的理论研究大体上分为三类: 依数现象, 成核抑制和吸附抑制. 依数现象

理论是根据 Flory 的溶液晶格理论, 认为溶液的冰点温度和冰晶生长点温度是同一个值, 抗冻蛋白的加入会导致溶液的冰点温度以正比于抗冻蛋白浓度的方式降低, 但是, 事实上, 抗冻蛋白的存在仅降低了溶液中冰晶生长点的温度, 而溶液的冰点温度没有变化, 理论与实验事实不符[16,67-68]; 成核抑制理论认为, 冰核存在一个临界半径  $r$ , 当溶液中的冰核半径大于临界半径  $r$  时, 冰核可以继续生长; 当冰核的半径小于  $r$  时, 冰核会消失在溶液中. 溶液中抗冻蛋白通过降低冰核的成核速率, 阻碍冰核的形成来降低溶液中冰晶的生长点温度, 引起热滞[16,69], 而实验观察到, 多数抗冻蛋白可以改变冰晶的生长习性, 使冰晶的形状发生改变, 但溶液中的冰晶并不消失; 吸附抑制理论认为, 抗冻蛋白吸附于冰晶的表面, 从而抑制冰晶的生长, 改变冰晶的生长形状, 使溶液的冰晶生长点温度降低[15-16,70-71]. 到目前为止, 没有一个理论可以解释所有的抗冻蛋白的抗冻机制, 但吸附抑制理论是最能为大家所接受、应用最广泛的用来解释抗冻机制的理论.

吸附抑制理论应用于解释抗冻机制最早由 Ramond 和 Devries 于 1977 年引入, 基于该理论, 他们提出了 Gibbs-Thomson 模型, 即 Kelvin 模型来解释抗冻蛋白的热滞活性[70]. 紧随其后, 人们提出了吸附-抑制模型, 该模型认为, 抗冻蛋白分子不可逆的吸附于生长的冰晶上, 使得相邻抗冻蛋白分子间的冰晶的生长受到限制, 而曲面自由能随表面曲率的增加而增加, 故吸附了抗冻蛋白分子后, 水分子就不易再与冰晶表面结合, 即冰晶不再生长, 而增加吸附于冰晶上的抗冻蛋白分子的个数即可抑制冰晶的继续生长[71,72]. 据此理论, 李前忠和罗辽复于 1993 年提出了聚合物吸附模型来解释热滞活性[73,74], 该模型认为, 在有抗冻蛋白存在的冰晶水溶液中, 冰晶总的吉布斯自由能的改变由两部分组成: 一部分是温度下降引起的冰晶本身的自由能的变化; 另外一部分则是由抗冻蛋白在冰晶表面的吸附引起的, 这一部分的自由能的改变是由于抗冻蛋白与冰晶的相互作用取代了水与冰晶间的相互作用而产生的. 根据溶液中的晶体生长理论[75], 当晶体的吉布斯自由能不变时, 晶体不再生长, 故由两部分自由能组成的总的吉布斯自由能的变化为零, 得到热滞温度与抗冻蛋白浓度的关系, 图 1.1 给出该理论计算得到的鱼类抗冻蛋白的结果.

Sander 和 Tkachenko 于 2004 年提出了“石头压海绵”模型, 该模型指出, 热滞的产生是由抗冻蛋白分子的几何性质引起的[76]. Kristiansen 和 Zachariassen 认为[15], 抗冻蛋白的吸附使生长的冰晶表面变得弯曲, 而热滞的产生是由于生长的冰晶曲面和周围溶液环境间的压强平衡引起的, 同时指出, 抗冻蛋白在冰晶表面的吸附过程分为两步: 在溶液的熔点温度下, 抗冻蛋白在冰晶表面的吸附是可逆的, 冰晶上和溶液中的抗冻蛋白分子可平衡交换; 随着温度降低, 溶液中的抗冻蛋白分子不可逆的吸附于冰晶表面, 从而改变冰晶的生

长形状或抑制其生长。

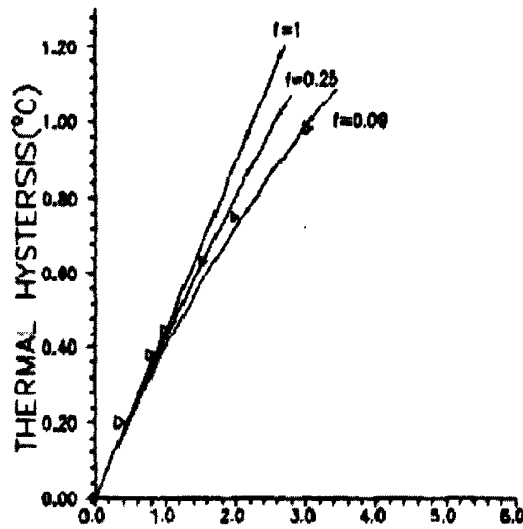


图 1.1 鱼类抗冻蛋白热滞温度随浓度的变化曲线。分离的点表示实验结果，实线表示理论计算值（引自文献[74]）。

Figure 1.1 Freezing point depression of fish antifreeze protein as a function of concentration. Experimental curve is given by points. Solid lines show theoretical values (From Ref. [74]).

基于吸附抑制理论和抗冻蛋白在冰晶表面吸附的特殊方式，刘俊杰、李前忠等人最近给出了二维吸附模型来解释抗冻蛋白的热滞活性[77-79]，他们认为，抗冻蛋白在冰晶表面的覆盖是造成冰晶生长点温度下降的主要原因，随着抗冻蛋白浓度的增加，其在冰晶表面的覆盖度也随之增大，当浓度达到一定值时，覆盖度趋近一饱和值，此时，热滞温度亦达到其最大值，所以当浓度继续增加时，覆盖度保持不变，故热滞温度无明显变化。

随着研究的深入，人们发现，有一些抗冻蛋白在冰晶上的吸附受其它已吸附的近邻抗冻蛋白分子的影响，即抗冻蛋白分子的协同性效应对他们在冰晶表面的吸附有很大影响，从而影响热滞活性[80,81]；也有的研究者认为，协同性效应在多数抗冻蛋白分子间是不存在的，他们对几种不同的抗冻蛋白在同一种溶液中的抗冻活性进行观察，发现不同的抗冻蛋白吸附于不同的冰晶晶面，而相互之间没有显著的影响，他们认为，尽管溶液的热滞活性有所增加，那也是由于多种抗冻蛋白分子在多个冰晶表面吸附，导致抗冻蛋白分子在冰晶表面的覆盖度增加而引起的[82,83]。

由于抗冻蛋白热滞活性与其溶液浓度的关系密切,使得对溶液性质的研究也变得很有意义,特别是对蛋白质大分子溶液的统计热力学性质的研究。对大分子溶液的统计热力学性质的研究可以追溯到上世纪五、六十年代:1951年, Kirkwood 和 Buff 给出了用径向分布函数表示的溶液的统计热力学理论[84]。Mazo 于 1958 年讨论了溶液的统计热力学性质,他用的方法是将配分函数用泰勒展开进行计算,该计算方法太过复杂,故很少用来分析某种具体溶液的热力学性质[85]。1962 年, Hill 提出了小系统热力学理论,用于讨论胶粒等大分子溶液的热力学性质,但其理论主要是讨论粒子数较少或体系尺寸较小时,系统的热力学性质和传统意义上的宏观系统热力学性质的异同[86]。公认的对大分子溶液的热力学性质给出系统描述的是 Flory 的大分子溶液格点模型理论[68]。Freed 等人发展了 Flory 的理论,提出了晶格团簇理论(LCT),该理论用严格而又系统的集团展开对 Flory 的平均场理论做出了必要的修正,同时,还解析的给出了聚合物单体的结构对其热力学性质的影响, LCT 理论可以成功应用于讨论多组分聚合物系统的相变问题,但是,其结果的繁杂冗长的数学表达形式限制了该理论的广泛应用[87-89]。基于积分方程的理论, Curro 和 Schweizer 等人提出了相互作用聚合物非晶格自治模型,该理论可以把分子内的相互作用对聚合物系统热力学性质的影响清晰的表达出来,从而为直接研究分子内的屏蔽效应问题提供了方法,但是该理论在低浓度范围内的结果不够精确[90-91]。Sanchez 和 Lacombe 基于统计力学模型的物态方程理论给出了晶格流体模型,该模型用于预测大分子聚合物系统中的等温吸附和气体的溶解度[92-93]。1997 年, Sjöberg 和 Mortensen 用小角度中子散射和 Monto Carlo 模拟方法,讨论了胶粒非理想溶液的结构和热力学性质[94]。2002 年,李和赵讨论了大分子液体的统计热力学性质,他们应用的方法是统计热力学方法,先给出系统的配分函数,进而通过配分函数给出系统的其他物理学量,但他们给出的是纯的大分子液体的热力学性质,而不是溶液的性质[95]。Prausnitz 于 2003 年从分子热力学的角度分析了蛋白质水溶液的相平衡及蛋白质分子间的相互作用[96],同年, Graziano 用统计力学的方法研究了 Van der Waals 液体的热力学性质,同时,还给出了二元溶液中溶质的化学势,指出极低浓度时化学势与其浓度的关系是一个对数关系[97]。

随着对抗冻蛋白抗冻活性的深入研究,发现吸附于冰晶上的抗冻蛋白与冰晶表面的相互作用对抗冻蛋白的抗冻活性起着至关重要的作用,相应地,对抗冻蛋白与冰晶相互作用具体方式的研究也取得了很大的进步[98-115]。由于规则的  $\alpha$ -螺旋结构及其结构良好的稳定性,使得 HPLC-6 成为研究上应用的最多的一种抗冻蛋白,其分子由 3 个重复片段构成,每个片段中含 11 个氨基酸,对其研究表明,位于 2, 13, 24, 35 位置上的苏氨酸(threonine)

对抗冻蛋白分子在冰晶表面的吸附起决定性作用[15-17,27,104]。早期的理论研究认为[29,116-118], 抗冻蛋白通过氢键相互作用吸附于冰晶表面, 但是, 实验结果表明, 抗冻蛋白在冰晶表面的结合优先于水分子在冰晶表面的占据, 而水分子间也是氢键相互作用, 故该理论无法完整解释实验事实。由于实验手段还不能直接探测溶液中抗冻蛋白和冰晶表面结合的动态过程, 也无法明确观测到抗冻蛋白在冰晶上的具体作用方式, 最近几年, 研究人员用计算机模拟抗冻蛋白在溶液中与冰晶相互结合的动态过程, 从而使人们对抗冻蛋白在冰晶表面的吸附方式有了更细致的了解[17,51]。人们发现, 由于组成抗冻蛋白氨基酸亲水和疏水性质的不同, 使得冰晶表面的抗冻蛋白分子通过亲水的侧链与冰晶表面相互作用, 而其疏水面朝向溶液, 阻碍水分子靠近冰晶, 抑制冰晶的继续生长, 大量研究表明, 疏水作用在抗冻蛋白的表面吸附中占据了很重要的地位[117-121]。最近, 对 AFPI 和 AFPIII 的研究显示[120-125], 与冰晶有相互作用的侧链的亲水性和疏水性并不是导致抗冻蛋白分子与冰晶结合的主要原因, 组成抗冻蛋白分子的苏氨酸(threonine)或丙氨酸(alanine)上的甲基(methyl groups)与冰晶表面有作用, 而其上的羟基(hydroxyl groups)对相互作用的贡献是次要的, 也就是说, 侧链的某些氨基酸上的甲基与冰晶间的 Van der Waals 相互作用在抗冻蛋白与冰晶的结合中起着很重要的作用, 而氢键相互作用的影响不占主导地位, 对该观点具有强有力支持的实验是 1998 年 Zhang 等人的实验[120]: 用苏氨酸的同分异构体来替代 HPLC-6 上的四个苏氨酸, 结果发现, 替代后的抗冻蛋白分子在浓度达到 1mM 时仍没有明显的抗冻活性。基于此, 人们认为, 抗冻蛋白与冰晶间的 Van der Waals 相互作用, 或者叫“形状互补”, 是引起抗冻蛋白抗冻活性的真正原因[43,106,107]。其实, 抗冻蛋白的抗冻活性受很多因素的影响, 比如, 不同抗冻蛋白分子的溶解度不同, 静电能不同, 侧链手性特征的差异等都对抗冻蛋白在冰晶表面的吸附有不同程度的影响, 最后影响其抗冻活性。

基于相互作用方式的研究进展, 人们对抗冻蛋白与冰晶的相互作用能量进行了计算。1993 年, Lal 等人用 Monte Carlo 方法结合分子动力学, 模拟冬鲮的抗冻蛋白(WFAFP)分子在冰晶表面的吸附, 给出了 AFP 与金字塔形冰晶表面的相互作用能为 -84kcal/mol[126]。1997 年, Cheng 和 Merz 用分子动力学模拟方法给出, WFAFP 与冰晶的相互作用能为 -157kcal/mol, 约为 Lal 等人得到的结果的两倍[110]。1999 年, Chen 和 Jia 用计算技术给出了 AFPIII 与冰晶的相互作用能, 发现: AFPIII 与随机冰晶的相互作用能低于与金字塔形冰晶的相互作用能, 与金字塔形冰晶的相互作用能在 -100kcal/mol 左右[127]。2004 年, Jorov 等人用 Monte Carlo 最小化模拟得到, AFPI 与冰晶的相互作用能的值约为 -5.0kcal/mol, 计算过程中计入了 Van der Waals 相互作用及溶解能的影响[17]。2005

年, Liu 和 Jia 等人用分子力学和分子动力学结合, 讨论了 TmAFP 与冰晶的相互作用能的大小与其分子的螺旋个数的关系[51].

从上面的介绍, 我们也可以看到, 尽管对抗冻蛋白的研究工作无论是从实验上还是理论上都已经取得了很大的成就, 但其研究工作并不是十分完美. 到目前为止, 对抗冻蛋白抗冻机制做出解释的诸多理论模型中, 未见完整的统计力学模型, 我们的工作是要建立一个完整的统计力学模型来探索抗冻蛋白的抗冻机制. 基于吸附抑制理论的很多模型都没有从理论上明确给出抗冻蛋白在冰晶表面的覆盖度与其在溶液中的浓度的关系, 前人工作对抗冻蛋白热滞温度的理论计算, 有的没有计入覆盖度的影响, 而考虑覆盖度影响的理论也仅是根据一个简单的唯象关系式来计算热滞温度, 该关系式为  $\Delta T = \theta \Delta T_m$ , 其中:  $\theta$  为抗冻蛋白在冰晶表面的覆盖度,  $\Delta T_m$  为热滞温度能达到的最大值, 该关系式是由实验结果而给出的, 缺乏必要的理论根据. 对蛋白质溶液的热力学性质的讨论很少, 尤其是对链状蛋白质分子水溶液的统计热力学性质的讨论, 也少有对抗冻蛋白溶液的热力学性质的理论研究. 到目前为止, 人们对抗冻蛋白和冰晶的相互作用的讨论多集中在对相互作用具体方式的研究, 而抗冻蛋白和冰晶相互作用能的值的给出还限于实验或计算机模拟结果, 由于实验条件或人为因素的影响, 导致得到的同一种抗冻蛋白与冰晶的相互作用能的值偏差很大, 同时, 也没有严格的理论去计算抗冻蛋白与冰晶间的相互作用能的具体值.

综上所述, 由于抗冻蛋白有特殊的抗冻活性, 其在诸多方面都有广阔的应用前景, 因此, 从统计热力学的角度去研究抗冻蛋白的抗冻活性, 对其溶液的热力学性质及其与冰晶的相互作用能做进一步的研究, 将有助于进一步理解抗冻蛋白的抗冻机制, 对其以后的理论研究和现实应用都有重要的意义.

## § 1.2 论文研究内容及安排

对抗冻蛋白热滞活性的理论研究很多, 有的没有计入覆盖度的影响, 有的仅是用一个唯象的关系式来给出热滞温度与覆盖度的关系, 而对热滞温度起主要作用的就是抗冻蛋白在冰晶表面的覆盖度, 所以, 从理论上讨论抗冻蛋白的热滞温度与覆盖度的关系具有一定意义. 抗冻蛋白溶液的性质对其热滞活性起着重要的作用, 故很有必要研究其溶液的热力学性质. 本文以第一类抗冻蛋白在冰晶表面的吸附为例, 从统计热力学的角度, 分析了抗冻蛋白在冰晶表面的覆盖度对热滞温度的影响, 建立了适用于第一类抗冻蛋白的统计力学模型, 同时, 对链状蛋白质溶液的热力学性质及第一类抗冻蛋白溶液的热力学性质进行了

讨论, 还给出了第一类抗冻蛋白与冰晶的相互作用能的简单计算结果。

全文包括七个部分:

第一部分 简要地介绍了各种抗冻蛋白的结构, 以及理论和实验上对抗冻蛋白研究的进展情况, 并对溶液的热力学性质研究进行了简单介绍, 指出了建立抗冻蛋白的统计力学模型及研究其溶液热力学性质的意义。

第二部分 利用统计热力学理论, 建立了 AFPI 在冰晶表面吸附的统计力学模型。计算过程中, 认为抗冻蛋白分子在冰晶表面的吸附与理想气体表面吸附相似, 运用了理想稀溶液的溶质化学势与浓度关系的表达式, 计入了抗冻蛋白分子在冰晶表面的吸附对冰晶自由能的影响, 同时, 还计入了温度下降导致的冰晶本身自由能的变化, 解析地给出了热滞温度与抗冻蛋白在冰晶表面覆盖度的关系表达式, 并且讨论了 AFPI 化学势及其与冰晶的相互作用能对热滞温度的影响。

第三部分 由于抗冻蛋白的热滞活性与其溶液浓度有密切关系, 所以本部分在不计入分子间相互作用的初级近似下, 建立了链状蛋白质分子溶液的二维格点模型, 用统计热力学理论研究了链状蛋白质溶液的热力学性质, 讨论了链状蛋白质分子溶液系统的熵, 吉布斯函数, 蛋白质分子化学势等物理量对溶液浓度, 温度及蛋白质分子链长的依赖。作为该理论的应用, 讨论了第一类抗冻蛋白的化学势, 并与理想溶液模型结果进行了比较。

第四部分 因为 AFPI 在水溶液中的两亲性, 致使该蛋白质分子与水分子间有较强的疏水相互作用, 即使当其溶液浓度很低时, 该相互作用也不能忽略。将第三部分的溶液格点模型做进一步改进, 计入蛋白质分子与水分子的疏水相互作用, 进一步讨论了 AFPI 溶液的热力学性质, 着重讨论了几种 AFPI 分子在溶液中的化学势随溶液浓度, 温度及分子链长的变化, 并讨论了由于 AFPI 分子的加入而导致的溶液冰点温度降低的现象, 以及此现象与热滞活性的不同。

第五部分 吸附抑制理论认为, 抗冻蛋白分子在冰晶表面的吸附是造成其热滞活性的根本原因, 实验研究发现, 抗冻蛋白分子在冰晶表面的吸附主要是其某些位置上的氨基酸与冰晶间的 Van der Waals 相互作用引起的, 氢键作用处于

次要地位. 基于此, 本部分计算了 AFPI 分子与冰晶的相互作用能的具体值, 讨论了相互作用能和其分子上与冰晶有相互作用的甲基个数的关系, 以及抗冻蛋白分子与冰晶间的距离对其相互作用能的影响, 同时, 计算过程中还考虑了相邻甲基间的排斥相互作用对最后结果的影响. 最后给出了几种 AFPI 与冰晶的相互作用能, 并和实验结果进行了比较.

第六部分 由于 AFPI 分子规则的  $\alpha$  螺旋结构, 使得其在冰晶表面的吸附沿着一定的方向, 本部分计入 AFPI 分子在冰晶表面吸附方向性的影响, 利用统计力学模型, 重新讨论了 AFPI 的热滞活性. 计算了几种 AFPI 分子的热滞温度随浓度的变化关系, 并与实验结果及第二部分的理论结果进行了比较.

第七部分 对全文进行总结.

## 第二章 第一类抗冻蛋白热滞活性的统计力学模型的建立

### § 2.1 引言

温度低于溶液的冰点温度时, 抗冻蛋白分子会吸附到冰晶的某些特定的晶面, 从而抑制冰晶的继续生长, 产生热滞现象. 这种对抗冻蛋白的抗冻机制做出解释的吸附抑制理论一直是人们应用的最广泛的理论, 也能够很好的解释许多抗冻蛋白的抗冻活性. 但是, 到目前为止, 没有一种理论是基于统计力学的理论, 也没有一种理论明确地给出抗冻蛋白在冰晶表面的覆盖度和热滞温度的关系表达式, 这样就使得对其从统计热力学角度的讨论变得十分重要.

本章采用统计热力学理论, 以吸附抑制理论为基础, 详细讨论了第一类抗冻蛋白的热滞活性和其在冰晶表面覆盖度的理论关系, 初步建立了能应用于解释第一类抗冻蛋白热滞活性的统计力学模型. 计算过程中, 认为抗冻蛋白(为表述简单, 下面提到的抗冻蛋白是指第一类抗冻蛋白)在冰晶表面的吸附与理想气体的表面吸附类似, 同时, 由于抗冻蛋白溶液很稀, 所以其化学势近似取理想稀溶液中溶质化学势的表达式. 作为理论的应用, 给出了三种抗冻蛋白的热滞温度随浓度的变化曲线, 并与实验结果进行了比较[128].

### § 2.2 模型与理论

从吸附抑制理论出发, 认为热滞的产生是抗冻蛋白分子在冰晶表面的吸附所导致的. 由于与冰晶表面分子的吸引相互作用, 抗冻蛋白分子可吸附于冰晶的表面. 温度下降时, 被吸附的抗冻蛋白分子与生长的冰晶共同形成表面层. 这时, 冰晶表面层的表面有一部分位点被抗冻蛋白占据. 含抗冻蛋白分子的冰晶表面层的吉布斯函数高于相同温度、压强下的纯水冰晶表面层的相应值, 因此凝固过程不能继续, 产生热滞. 当温度下降至某一临界值(可称为临界温度)时, 抗冻蛋白的抑制作用不再能阻碍冰晶生长, 冰晶将继续增大, 直至全部凝固. 纯水熔点(凝固)温度与冰晶生长点温度之差为热滞温度. 显然, 热滞温度应与冰晶表面被抗冻蛋白分子覆盖的程度有关.

引入覆盖度  $\theta$ , 表示冰晶表面被抗冻蛋白分子覆盖的位点数与总位点数之比. 设表面层总的位点数为  $N_1$ , 吸附于表面的抗冻蛋白分子的个数为  $N_2$ , 每个抗冻蛋白分子可覆盖的位点个数为  $\chi$ , 则有

$$\theta = \frac{\chi N_2}{N_1}. \quad (2.2.1)$$

设抗冻蛋白分子在冰晶表面的吸附与理想气体表面吸附方式相同, 溶液中抗冻蛋白分子的化学势为  $\mu$ , 当有一个抗冻蛋白分子被吸附时, 能量变化值为  $\varepsilon$  (即为抗冻蛋白分子与冰晶的相互作用能), 由统计力学计算理想气体表面吸附覆盖度的方法, 则冰晶表面最多可吸附  $N_1/\chi$  个抗冻蛋白分子, 当有  $N$  个抗冻蛋白分子吸附于冰晶表面时, 其能量等于  $N\varepsilon$ , 抗冻蛋白分子在冰晶表面分布的微观状态数为

$$C_{N_1/\chi}^N = \frac{(N_1/\chi)!}{N![(N_1/\chi) - N]}, \quad (2.2.2)$$

表面吸附的抗冻蛋白分子系统的巨配分函数为

$$\Xi = \sum_{N=0}^{N_1/\chi} C_{N_1/\chi}^N e^{-\beta \varepsilon N} e^{\beta \mu N} = \sum_{N=0}^{N_1/\chi} \frac{(N_1/\chi)!}{N![(N_1/\chi) - N]} e^{-\beta \varepsilon N} e^{\beta \mu N} = [1 + e^{\beta(\mu - \varepsilon)}]^{N_1/\chi}, \quad (2.2.3)$$

$N$  个抗冻蛋白分子被吸附的概率为

$$P(N) = \frac{1}{\Xi} \frac{(N_1/\chi)!}{N![(N_1/\chi) - N]} e^{-\beta \varepsilon N} e^{\beta \mu N}, \quad (2.2.4)$$

因此, 被吸附的抗冻蛋白分子的平均数为

$$N_2 = \sum_{N=0}^{N_1/\chi} NP(N) = \frac{1}{\Xi} \sum_{N=0}^{N_1/\chi} N \frac{(N_1/\chi)!}{N![(N_1/\chi) - N]} e^{-\beta \varepsilon N} e^{\beta \mu N} = \frac{N_1/\chi}{1 + e^{-\beta(\mu - \varepsilon)}}, \quad (2.2.5)$$

抗冻蛋白分子在冰晶表面的覆盖度的表达式为

$$\theta = \frac{\chi N_2}{N_1} = \frac{1}{1 + \exp[-\beta(\mu - \varepsilon)]}. \quad (2.2.6)$$

由于抗冻蛋白溶液很稀, 所以用理想稀溶液中溶质化学势的表达形式, 给出抗冻蛋白的化学势为[86]

$$\mu = \mu_0(T) + RT \ln m_s, \quad (2.2.7)$$

其中,  $m_s$  为溶液的浓度;  $\mu_0$  为抗冻蛋白分子的标准化学势, 仅与温度有关, 在温度变化不大的热滞温度范围内, 认为其为一常数.

所以, 抗冻蛋白分子的表面覆盖度表示为

$$\theta = \frac{m_s}{\exp[-\beta(\mu_0 - \varepsilon)] + m_s}. \quad (2.2.8)$$

同理，水分子在冰晶表面的覆盖度的表达式也为

$$\theta_0 = \frac{1}{1 + \exp[-\beta(\mu_w - \varepsilon_w)]}. \quad (2.2.9)$$

对于水分子来说，其化学势  $\mu_w$  的量级为  $10\text{J/mol}$ ，而能量  $\varepsilon_w$  为水分子氢键能的量级  $1000\text{J/mol}$ ，所以有  $|\mu_w| \ll |\varepsilon_w|$ ，故有

$$\exp[-\beta(\mu_w - \varepsilon_w)] \approx \exp(\beta\varepsilon_w) \ll 1, \quad (2.2.10)$$

所以，近似认为水分子在冰晶表面的覆盖度为

$$\theta_0 = 1. \quad (2.2.11)$$

冰晶吸附抗冻蛋白后，继续生长的表面层由两部分构成：生长到一定厚度的冰层与有抗冻蛋白分子覆盖的表面单层。引起吉布斯函数变化的只是后者[73,74]。所以先分析由于抗冻蛋白吸附导致的表面单层的自由能的变化。

考虑表面单层体系。分两种情况：

当温度处于平衡温度  $T_e$  时，冰晶表面的冰分子数为  $N_1$ ，表面无抗冻蛋白分子吸附，设此时有  $N_0$  个水分子吸附于冰晶表面，则表面层体系的能量为

$$E_0 = N_1\varepsilon_1 + E_{0,1}, \quad (2.2.12)$$

其中  $\varepsilon_1$  为一个冰分子的能量； $E_{0,1}$  为  $N_0$  个水分子与  $N_1$  个表面冰分子的相互作用能。

$N_0$  个水分子在冰晶表面（由  $N_1$  个冰分子组成）分布的微观状态数为

$$\Omega_{N_0, N_1} = C_{N_1}^{N_0} = \frac{N_1!}{N_0!(N_1 - N_0)!}, \quad (2.2.13)$$

系统的配分函数为

$$Z_0 = \Omega_{N_0, N_1} \cdot e^{-\beta E_0}. \quad (2.2.14)$$

由公式 (2.2.12)，(2.2.13) 和 (2.2.14)，得到系统的自由能为

$$F_0 = -kT_e \ln Z_0 = -kT_e \ln \left\{ \frac{N_1!}{N_0!(N_1 - N_0)!} \right\} + N_1\varepsilon_1 + E_{0,1}. \quad (2.2.15)$$

当温度低于平衡温度  $T_e$  时，设有  $N_2$  个抗冻蛋白分子和  $N_3$  个水分子吸附于冰晶表面，同时认为，一个抗冻蛋白分子可覆盖  $\chi$  个位点，可结合  $\sigma$  个位点，冰晶表面没有与抗冻蛋白分子结合的位点仍可有水分子吸附，则此时，表面层系统的能量为

$$E = N_1 \varepsilon_1 + E_{2,\sigma_2} + E_{3,1-\sigma_2}, \quad (2.2.16)$$

其中,  $E_{2,\sigma_2}$ ,  $E_{3,1-\sigma_2}$  分别为  $N_2$  个抗冻蛋白分子与  $\sigma N_2$  个冰分子,  $N_3$  个水分子与  $N_1 - \sigma N_2$  个冰分子的相互作用能。

由于冰晶表面最多可吸附  $N_1/\chi$  个抗冻蛋白分子, 将  $N_2$  个抗冻蛋白分子在冰晶表面的吸附看作是  $N_2$  个分子在  $N_1/\chi$  个位点表面上的单位吸附 (一个分子占据一个位点), 得到  $N_2$  个抗冻蛋白分子在冰晶表面分布的微观状态数为

$$\Omega_{N_2, N_1} = \frac{(N_1/\chi)!}{[(N_1/\chi) - N_2] N_2!}, \quad (2.2.17)$$

$N_3$  个水分子在  $N_1 - \sigma N_2$  个表面位点上分布的微观状态数为

$$\Omega_{N_3, N_1 - \sigma N_2} = C_{N_1 - \sigma N_2}^{N_3} = \frac{(N_1 - \sigma N_2)!}{[(N_1 - \sigma N_2) - N_3] N_3!}. \quad (2.2.18)$$

所以, 系统的配分函数为

$$Z = \Omega_{N_3, N_1 - \sigma N_2} \bullet \Omega_{N_2, N_1} \bullet e^{-\beta E}, \quad (2.2.19)$$

自由能为

$$F = -kT \ln Z = -kT \ln \Omega_{N_3, N_1 - \sigma N_2} - kT \ln \Omega_{N_2, N_1} + N_1 \varepsilon_1 + E_{2,\sigma_2} + E_{3,1-\sigma_2}. \quad (2.2.20)$$

所以, 由于抗冻蛋白分子的吸附导致的表面自由能的增加量为

$$\Delta F = F - F_0 = kT_e \ln \Omega_{N_0, N_1} - kT \ln \Omega_{N_3, N_1 - \sigma N_2} - kT \ln \Omega_{N_2, N_1} + E_{2,\sigma_2} + E_{3,1-\sigma_2} - E_{0,1}. \quad (2.2.21)$$

用斯特林公式计算各阶乘数值有

$$\ln \Omega_{N_0, N_1} = N_1 \ln \left( \frac{N_1}{N_1 - N_0} \right) + N_0 \ln \left( \frac{N_1 - N_0}{N_0} \right), \quad (2.2.22)$$

$$\ln \Omega_{N_2, N_1} = (N_1/\chi) \ln \left( \frac{N_1}{N_1 - \chi N_2} \right) + N_2 \ln \left( \frac{N_1 - \chi N_2}{\chi N_2} \right), \quad (2.2.23)$$

$$\ln \Omega_{N_3, N_1 - \sigma N_2} = (N_1 - \sigma N_2) \ln \left( \frac{N_1 - \sigma N_2}{N_1 - \sigma N_2 - N_3} \right) + N_3 \ln \left( \frac{N_1 - \sigma N_2 - N_3}{N_3} \right), \quad (2.2.24)$$

$N_2$  个抗冻蛋白分子与冰晶的相互作用能为  $E_{2,\sigma_2} = N_2 \varepsilon$ ,  $\varepsilon$  为一个抗冻蛋白分子与冰晶的相互作用能; 水分子与冰分子间的相互作用为氢键作用, 所以,  $N_0$  个水分子与冰晶的相互作用能为  $E_{0,1} = N_0(-h\gamma)$ ,  $N_3$  个水分子与冰晶的相互作用能为  $E_{3,1-\sigma_2} = N_3(-h\gamma)$ ,  $-h\gamma$  为水分子的氢键相互作用能。

将 (2.2.22), (2.2.23) 和 (2.2.24) 及各相互作用能的表达式代入 (2.2.21), 经计算得到表面自由能的增加量为 (为方便计算, 在以下计算中将分子数  $N$  换为摩尔数  $n$ )

$$\begin{aligned} \Delta F = & RT_e \left\{ n_1 \ln \left( \frac{n_1}{n_1 - n_0} \right) + n_0 \ln \left( \frac{n_1 - n_0}{n_0} \right) \right\} \\ & - RT \left\{ (n_1 - \sigma n_2) \ln \left( \frac{n_1 - \sigma n_2}{n_1 - \sigma n_2 - n_3} \right) + n_3 \ln \left( \frac{n_1 - \sigma n_2 - n_3}{n_3} \right) \right\}, \quad (2.2.25) \\ & - RT \left\{ (n_1 / \chi) \ln \left( \frac{n_1}{n_1 - \chi n_2} \right) + n_2 \ln \left( \frac{n_1 - \chi n_2}{\chi n_2} \right) \right\} + n_2 \varepsilon + n_3 (-h\gamma) - n_0 (-h\gamma) \end{aligned}$$

其中,  $n_1$  为组成表面层的冰分子的摩尔数,  $n_0$ ,  $n_3$  分别为抗冻蛋白分子吸附前后冰晶表面上的水分子的摩尔数,  $n_2$  为冰晶表面吸附的抗冻蛋白分子的摩尔数.

由于水分子在冰晶表面的覆盖度  $\theta_0=1$ , 所以有  $n_0=\theta_0 n_1=n_1$ ,  $n_3=\theta_0(n_1-\sigma n_2)=n_1-\sigma n_2$ , 有

$$\Delta F = -RT \left\{ (n_1 / \chi) \ln \left( \frac{n_1}{n_1 - \chi n_2} \right) + n_2 \ln \left( \frac{n_1 - \chi n_2}{\chi n_2} \right) \right\} + n_2 (\sigma h\gamma + \varepsilon), \quad (2.2.26)$$

将式子 (2.2.1) 代入, 得到自由能变化量的表达式为

$$\Delta F = n_1 RT [\theta \ln \theta + (1 - \theta) \ln (1 - \theta)] / \chi + n_1 \theta (\sigma h\gamma + \varepsilon) / \chi. \quad (2.2.27)$$

根据热力学理论, 系统处于平衡状态, 两相的单位体积吉布斯函数相等, 当温度低于熔点温度时, 固相吉布斯函数低于液相吉布斯函数, 其差值的大小随温度的降低而增大, 低于熔点温度时冰水间摩尔吉布斯函数的差值为[15]

$$\Delta G_m = \Delta H - T\Delta S. \quad (2.2.28)$$

当温度处于平衡温度  $T_e$  时, 有

$$\Delta G_m = 0 \Rightarrow \Delta S = \Delta H / T_e. \quad (2.2.29)$$

设  $\Delta H$  和  $\Delta S$  与温度无关, 当温度低于平衡温度  $T_e$  时, 有[75]

$$\Delta G_m = \Delta H - (T\Delta H / T_e) = \Delta H [1 - (T / T_e)] = \Delta H [(T_e - T) / T_e] = \Delta H \Delta T / T_e, \quad (2.2.30)$$

由于系统的焓变等于吸收的热量, 故有

$$\Delta G_m = \lambda \Delta T / T_e, \quad (2.2.31)$$

其中,  $\lambda$  为水的相变潜热.

计入由于抗冻蛋白分子在冰晶表面的吸附所引起的自由能的增加后, 整个系统 (生长到一定厚度的冰晶层及其表面单层) 的吉布斯函数的变化为[73,74]

$$\Delta G = -n_L \Delta G_m + \Delta F = -n_L \lambda \Delta T / T_e + \Delta F, \quad (2.2.32)$$

其中,  $n_L$  为冰晶层生长的冰分子的摩尔数.

将自由能增加值的表达式 (2.2.27) 代入 (2.2.32), 得到

$$\Delta G = -\frac{n_L \lambda \Delta T}{T_e} + n_1 RT [\theta \ln \theta + (1-\theta) \ln(1-\theta)] / \chi + n_1 \theta (\sigma h \gamma + \varepsilon) / \chi. \quad (2.2.33)$$

根据溶液中晶体的生长理论[75], 当晶体的吉布斯函数不变时, 晶体不再生长, 也就是说, 当系统的吉布斯函数的变化为零时, 冰晶不再生长, 产生热滞现象.

所以, 由  $\Delta G=0$ , 得到

$$-\frac{n_L \lambda \Delta T}{T_e} + n_1 RT [\theta \ln \theta + (1-\theta) \ln(1-\theta)] / \chi + n_1 \theta (\sigma h \gamma + \varepsilon) / \chi = 0, \quad (2.2.34)$$

其中,  $T = T_e - \Delta T$ ; 同时, 由冰晶的球形生长模型, 表面冰分子数占生长的冰晶总分子数的比值为 0.075[70,73], 则有  $n_L = n_1 / 0.075$ .

最后得到热滞温度与覆盖度的关系表达式为

$$\Delta T = \frac{RT_e [\theta \ln \theta + (1-\theta) \ln(1-\theta)] + \theta (\sigma h \gamma + \varepsilon)}{\chi \lambda / 0.075 T_e + R [\theta \ln \theta + (1-\theta) \ln(1-\theta)]}. \quad (2.2.35)$$

## § 2.3 计算结果与讨论

我们以 AFP9、HPLC-6 (TTTT) 和 AAAA2kE 三种 AFPI 分子为例, 计算了抗冻蛋白分子的热滞温度随浓度的变化关系. 计算结果由图 2.3.1-2.3.4 给出.

计算过程中, 链长  $\chi$  用抗冻蛋白分子分子量与水分子分子量的比值表示, 即  $\chi = M/18$ ,  $M$  为抗冻蛋白分子的分子量. HPLC-6 的分子量为 3300Da[106], 所以  $\chi=183$ ; 由于 AAAA2kE 的组成与 HPLC-6 的区别仅是某些位置上氨基酸的不同, 所以其链长与 HPLC-6 的链长相同, 也为  $\chi=183$ ; AFP9 分子比 HPLC-6 多一个由 11 个氨基酸组成的重复片段[109], 而 HPLC-6 分子是由 3 个 11 个氨基酸组成的重复片段构成, 所以 AFP9 分子的链长应为 HPLC-6 的 4/3 倍, 为  $\chi=244$ . 同样, AFP9 与冰晶的相互作用能的取值也为 HPLC-6 与冰晶相互作用能的 4/3 倍. AFP9 的参考化学势的取值见文献[17], 同时, 将该文献中的求解参考化学势的方法应用于 HPLC-6 和 AAAA2kE. 水的相变潜热  $\lambda=1436\text{cal/mol}$ [70], 根据水分子的振动光谱分析,  $\gamma=1650\text{cm}^{-1}$ [129].

图 2.3.1 和 2.3.2 给出了 AFP9 的热滞温度随溶液浓度的变化关系曲线. 由于参考化学势的值为  $-4.0\text{kcal/mol}$ , 所以图 2.3.1 中参考化学势的值分别为  $-3.9\text{kcal/mol}$ ,  $-4.0\text{kcal/mol}$  和  $-4.1\text{kcal/mol}$ , AFP 与冰晶的相互作用能为  $-6.5\text{kcal/mol}$ ; 图 2.3.2 中 AFP 与冰晶的相互作用能的取值分别为  $-6.4\text{kcal/mol}$ ,  $-6.5\text{kcal/mol}$ ,  $-6.6\text{kcal/mol}$ , 参考化学势为  $-4.0\text{kcal/mol}$ . 计算过程中, 可结合的位点个数  $\sigma=7$ [109].

图 2.3.1 和 2.3.2 表明, 热滞温度的大小强烈依赖于溶液的浓度, 当溶液浓度很小时, 其值随浓度的增加很快增加; 随着浓度的逐渐增加, 其增加速度逐渐变慢, 最后当浓度达到一定值时, 热滞温度达到一个最大值. 从图 2.3.1 还可以看出, 理论计算与实验结果符合较好.

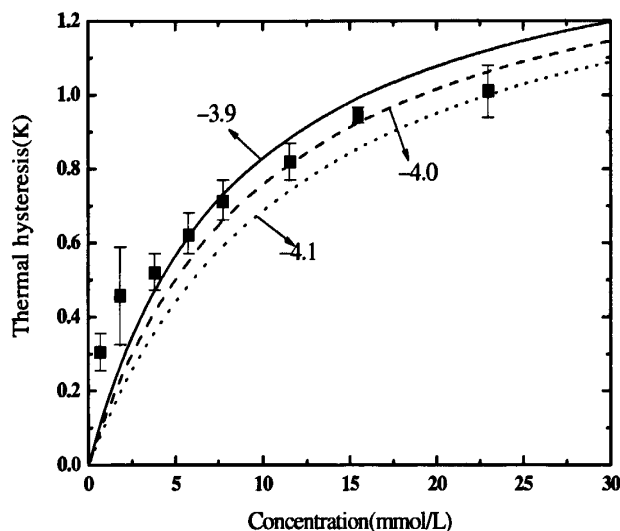


图 2.3.1 AFP9 的热滞温度随浓度的变化曲线. 其中, 相互作用能  $\epsilon=-6.5$ , 参考化学势取值分别为  $\mu_0=-3.9$ ,  $-4.0$  和  $-4.1$ , 实验结果[109]用 ■ 表示.

Fig. 2.3.1 Thermal hysteresis temperatures as functions of the molar concentration of AFP solution for AFP9 at interaction energy  $\epsilon=-6.5$ , and the standard chemical potentials  $\mu_0 = -3.9$ ,  $-4.0$  and  $-4.1$ , respectively. The experimental data [109] are shown by ■.

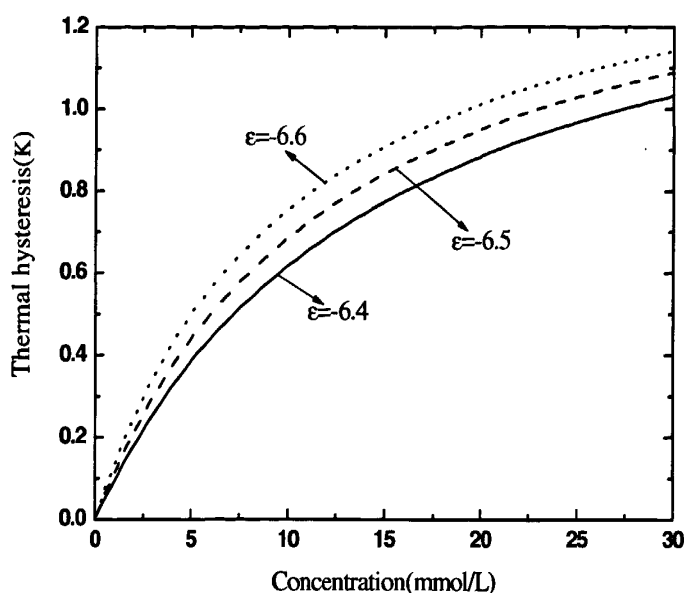


图 2.3.2 AFP9 的热滞温度随浓度的变化曲线。其中，参考化学势取值为  $\mu_0 = -4.0$ ，相互作用能分别为  $\epsilon = -6.4$ ， $-6.5$  和  $-6.6$ 。

Fig. 2.3.2 Thermal hysteresis temperatures as functions of the molar concentration of AFP solution for AFP9 at standard chemical potential  $\mu_0 = -4.0$ , and interaction energy  $\epsilon = -6.4$ ,  $-6.5$  and  $-6.6$ , respectively.

为讨论化学势对热滞的影响，图 2.3.1 给出了参考化学势取不同值时的热滞曲线。结果表明，热滞温度随参考化学势的增大而升高。这是因为，参考化学势越大，溶液中 AFP 的化学势越高，则 AFP 分子越容易在冰晶表面吸附，所以吸附到冰晶表面的 AFP 分子就越多，以致热滞就越大。

图 2.3.2 给出了 AFP 与冰晶的相互作用能的大小对热滞的影响。结果显示，相互作用能越大，热滞越大。由于 AFP 分子与冰晶间的相互作用越强，AFP 分子在冰晶表面的吸附率越大，从而热滞温度就越大。

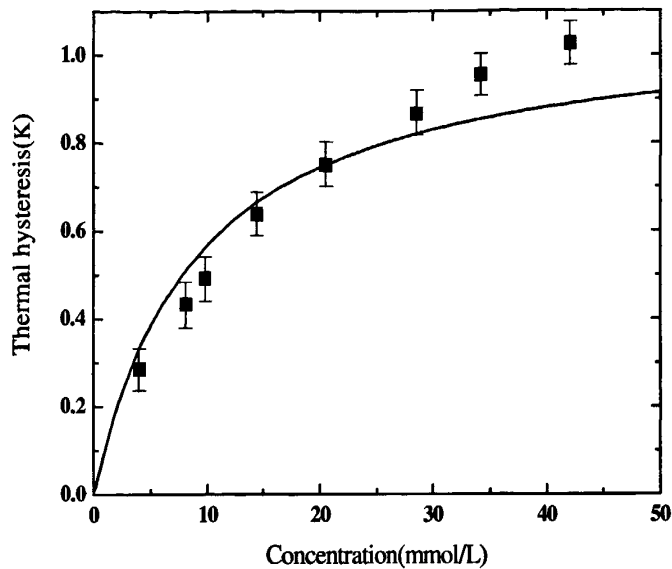


图 2.3.3 HPLC-6 的热滞温度随浓度的变化曲线，实验结果 [2] 用 ■ 表示。

Fig. 2.3.3 The thermal hysteresis temperature as a function of the molar concentration of AFP solution for HPLC-6, and the experimental results[2] are given by ■.

图 2.3.3 给出了 HPLC-6 的热滞温度随浓度的变化关系曲线。计算过程中，可结合的位点数  $\sigma=4$ ，AFP 与冰晶的相互作用能为  $-4.9\text{kcal/mol}$ [17]。用类似于参考文献[17]中的方法，得到 HPLC-6 的参考化学势为  $-2.3\text{kcal/mol}$ 。结果显示，HPLC-6 的热滞温度随浓度的变化曲线与 AFP9 的热滞-浓度关系很相似，理论结果与实验结果符合较好。

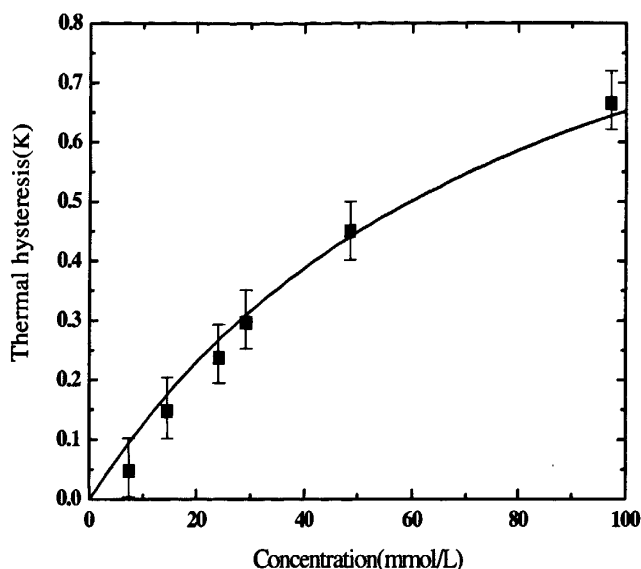


图 2.3.4 AAAA2kE 的热滞温度随浓度的变化曲线, 实验结果[2]用■表示。

Fig. 2.3.4 The thermal hysteresis temperature as a function of the molar concentration of AFP solution for AAAA2kE, and the experimental results[2] are given by ■.

AAAA2kE 的热滞温度随浓度的变化关系由图 2.3.4 给出。尽管 AAAA2kE 与 HPLC-6 的链长及可结合的位点数 ( $\sigma=4$ ) 均相同, 但是, 其与冰晶的相互作用能为  $-3.5\text{kcal/mol}$ [17], 低于 HPLC-6 分子与冰晶的相互作用能, 所以, 我们认为其参考化学势的值也比 HPLC-6 的参考化学势略低一些, 计算过程中 AAAA2kE 的参考化学势取值为  $-2.1\text{kcal/mol}$ 。理论计算结果与实验结果符合很好。

统计力学模型应用于计算 AFPI 的热滞温度时, 我们认为, 不是整个覆盖到冰晶表面的所有  $\chi$  个位点都与冰晶有相互作用, 仅仅是 AFPI 分子上某些位置的苏氨酸(对于 AAAA2kE 是丙氨酸)与冰晶间有相互作用, 导致了系统的吉布斯函数增加, 从而引起热滞现象。AFP9 分子有 7 个可与冰晶相结合的苏氨酸, 比 HPLC-6(可供结合的苏氨酸个数为 4)和 AAAA2kE(可供结合的丙氨酸个数为 4)分子上的可供结合的氨基酸个数多, 所以其热滞温度比 HPLC-6 和 AAAA2kE 的热滞温度要大一些。我们的结论与实验结果一致。

我们也可以看到, AFPI 分子的化学势对其在冰晶表面的覆盖度有很大的影响(公式

(2.2.6)). 计算过程中, 对于化学势对浓度的依赖关系, 我们应用了理想稀溶液中溶质的化学势的表达式, 这是对 AFPI 分子化学势的简单估计, 同时, 其它 AFPI 分子的参考化学势的值也用了特别简单的关系而得到, 这可能会使得由于化学势的不精确而导致最后的计算结果出现偏差. 因此, 对于 AFPI 溶液的热力学性质, 特别是 AFPI 分子化学势的精确理论分析是很有必要的.

## § 2.4 结论

在本章中, 基于吸附抑制理论, 利用统计热力学理论, 建立了可用于解释 AFPI 热滞活性的统计力学模型. 应用该理论, 明确给出了 AFPI 的热滞温度与其在冰晶表面覆盖度的定量关系, 并从理论上给出了 AFPI 溶液浓度对热滞温度的影响. 同时, 还讨论了溶液中 AFPI 分子的化学势及其与冰晶的相互作用能的大小对热滞温度的影响. 模型应用于计算几种 AFPI 的热滞活性, 得到的结果与实验结果均有较好的符合.

### 第三章 链状蛋白质分子溶液的统计热力学性质

#### § 3.1 引言

对溶液性质的研究，特别是大分子溶液的热力学性质，无论是从理论上还是实验上都有很广泛的讨论。Flory 的溶液格点模型理论是对大分子溶液的热力学性质最早的研究，之后很多用于解释大分子溶液性质的理论都是基于 Flory 的理论。研究大分子溶液的性质在应用上也越来越重要。

我们前面提到，AFPI 溶液的性质对其热滞有很大的影响，而具有  $\alpha$  螺旋结构的 AFPI 分子可以看作是链状分子，所以对大分子溶液的性质，特别是对链状蛋白质分子溶液热力学性质的研究就很有必要。本章应用统计热力学的理论，基于溶液的格点模型，在不计入分子间相互作用的初级近似下，讨论了链状蛋白质分子溶液的热力学性质，详细讨论了蛋白质分子的浓度，分子链长，溶液温度等对溶液热力学性质的影响。作为该理论的应用，最后讨论了 AFPI 分子的化学势，并与理想溶液模型结果进行了比较。

#### § 3.2 模型与理论

实际上，蛋白质分子与水分子间的相互作用依赖于具体的蛋白质分子本身的性质，蛋白质分子不同，导致其与水分子的相互作用也不相同。但是，为计算简单，我们近似地认为蛋白质分子与水分子间的相互作用与水分子间的相互作用相同，且计算过程中不计入分子间相互作用的影响，认为系统的熵变仅仅是溶质与溶剂间的混合引起的。

将链状蛋白质分子溶液看作由  $N$  个蛋白质分子和  $N_0$  个水分子组成的格点：蛋白质分子在格点模型中占据连续的格点，每个蛋白质分子占据  $x$  个连续的格点，每个水分子占据一个格点，所以，溶液总的格点数为

$$N_t = N_0 + xN. \quad (3.2.1)$$

系统的配分函数很简单，为

$$Z = \text{const.} \times \Omega_T \Omega_C, \quad (3.2.2)$$

其中,  $\text{const.}$  为一常数项, 与分子间的相互作用能有关, 由于模型中不计入相互作用的影响, 所以有  $\text{const.}=1$ ;  $\Omega_T$  是  $N$  个分子在  $N_t$  个格点上分布的微观状态数;  $\Omega_C$  是固定了分子链起点位置的  $N$  个蛋白质分子分布的微观状态数.  $\Omega_T$  和  $\Omega_C$  的表达式与 Li 和 Zhao 对格点聚合物液体的表达式相同, 分别为[95]

$$\Omega_T = C_{N_t}^N = \frac{N_t!}{(N_t - N)!N!}, \quad (3.2.3)$$

$$\Omega_C = \left( \frac{z-1}{N_t} \right)^{xN} \frac{(N_t - 1)!}{(N_t - xN - 1)!}, \quad (3.2.4)$$

其中,  $z$  是格点模型的最近邻位点数. 由于蛋白质分子是链状结构, 所以认为格点模型是二维的, 也就是说, 计算过程中,  $z=4$ .

用 Stirling 近似来表示式 (3.2.3) 和 (3.2.4) 中的大数因子, 溶液的自由能为

$$\begin{aligned} F &= -kT \ln Z \\ &= -kT \left[ N_t \ln \left( \frac{N_t}{N_t - N} \right) + N \ln \left( \frac{N_t - N}{N} \right) \right] \\ &\quad - kT \left\{ xN [\ln(z-1) - 1] + (N_t - 1) \ln \left( \frac{N_t - 1}{N_t - xN - 1} \right) + xN \ln \left( \frac{N_t - xN - 1}{N_t} \right) \right\} \end{aligned} \quad (3.2.5)$$

其中,  $N_t$  为溶液的所有格点, 有  $N_t \gg 1$ , 所以有,  $N_t - 1 \approx N_t$ ,  $N_t - xN - 1 \approx N_t - xN$ . 自由能的表达式可写为

$$\begin{aligned} F &= -kT \ln Z \\ &= -kT \left\{ -N_t \ln(1 - N/N_t) + N \ln(N_t/N - 1) + xN [\ln(z-1) - 1] \right. \\ &\quad \left. + (N_t - xN) \ln[N_t/(N_t - xN)] \right\} \end{aligned} \quad (3.2.6)$$

式 (3.2.6) 表示系统的热力学势, 是温度和体积的函数. 系统的其他热力学函数可利用统计热力学理论, 通过该热力学势求得.

设系统的体积为  $V = vN_t$ , 其中  $v$  是溶液的每个格点的平均体积. 系统的吉布斯函数为

$$G = -kT \ln Z + PV = -kT \ln Z + vPN_t, \quad (3.2.7)$$

又由于吉布斯函数取极小值时系统平衡, 所以有

$$\frac{\partial G}{\partial N_t} = -kT \frac{\partial}{\partial N_t} \ln Z + P \frac{\partial}{\partial N_t} V = -kT \frac{\partial}{\partial N_t} \ln Z + Pv = 0, \quad (3.2.8)$$

于是, 压强为

$$\begin{aligned}
 P &= \frac{kT}{v} \frac{\partial}{\partial N_i} \ln Z \\
 &= \frac{kT}{v} \{-\ln(1 - N/N_i) - \ln(1 - xN/N_i) - xN/N_i\}
 \end{aligned}
 \quad (3.2.9)$$

所以, 系统的状态方程为

$$PV = \{-N_i \ln(1 - N/N_i) - N_i \ln(1 - xN/N_i) - xN\}kT. \quad (3.2.10)$$

溶液系统的熵为

$$\begin{aligned}
 S &= -\frac{\partial F}{\partial T} \\
 &= k\{-N_i \ln(1 - N/N_i) + N \ln(N_i/N - 1) + xN[\ln(z - 1) - 1] \\
 &\quad + (N_i - xN) \ln[N_i/(N_i - xN)]\}
 \end{aligned}
 \quad (3.2.11)$$

系统的吉布斯函数为

$$G = F + PV = -RT\{n \ln(n_i/n - 1) + xn[\ln(z - 1) - 1] + xn \ln(1 - xn/n_i) + xn\}, \quad (3.2.12)$$

其中, 为计算方便, 将分子个数用分子摩尔数来替代.

溶液中蛋白质分子的化学势可由吉布斯函数对蛋白质分子的偏摩尔求导得到, 为

$$\mu = \frac{\partial G}{\partial n} = -RT\{\ln(n_i/n - 1) - 1/(1 - n/n_i) + x \ln(z - 1) + x \ln(1 - xn/n_i) - x^2 n/(n_i - xn)\}. \quad (3.2.13)$$

### § 3.3 计算结果与讨论

为具体地理解链状蛋白质溶液的热力学性质, 我们分别计算了溶液系统的熵, 吉布斯函数和溶液中蛋白质分子的化学势随蛋白质浓度, 温度的变化关系, 以及蛋白质分子链长对热力学性质的影响. 同时, 作为该理论应用的例子, 还讨论了第一类抗冻蛋白溶液中的抗冻蛋白分子的化学势.

#### § 3.3.1 链状蛋白质分子溶液的热力学性质

图 3.3.1-3.3.5 给出了溶液的熵, 吉布斯函数及溶液中蛋白质分子的化学势随蛋白质浓度及温度的变化曲线.

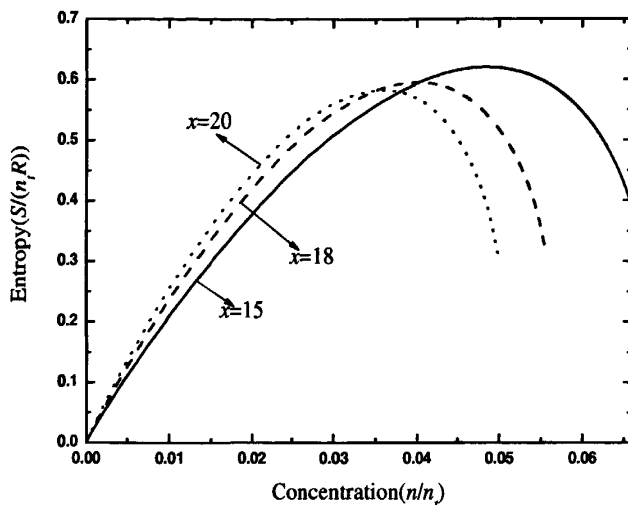


图 3.3.1 溶液的熵随浓度的变化曲线,  $x$  分别为 15, 18, 20.

Fig. 3.3.1 Molar entropies ( $S/n_i R$ ) of the solution as functions of concentration, with  $x=15$ , 18, and 20, respectively.

图 3.3.1 给出了在不同链长条件下溶液的熵随蛋白质分子浓度的变化关系。从图中可以看出, 溶液的熵随蛋白质浓度的增加先增大; 当浓度持续增加至一定浓度时, 熵达到一最大值; 随着浓度的继续增加, 熵逐渐减少。熵的最大值点随链长的增加逐渐向浓度小的方向移动。蛋白质分子的链长越长, 熵的最大值越小。

图 3.3.2 给出了在不同链长及不同温度情况下溶液的吉布斯函数随蛋白质浓度的变化曲线。从图中可以看出, 当蛋白质浓度很小时, 系统的吉布斯函数随浓度的增加降低很慢; 链长越长或温度越高, 吉布斯函数随蛋白质浓度降低的速度越快; 当浓度持续增加达到某个值时, 吉布斯函数达到一最小值, 之后随浓度的增加而增加。这是因为溶质和溶剂对溶液吉布斯函数的贡献是此消彼长的关系。蛋白质分子的链长越长, 吉布斯函数的最小值越大, 同时, 吉布斯函数的最小值点随链长的增加向浓度值小的方向移动。这是由于溶液熵的最大值随链长增大而减少, 随着熵的减少, 吉布斯函数增大而造成的, 同时, 熵的最大值点随链长的增加向浓度小的方向移动, 造成了吉布斯函数最小值也向浓度小的方向移

动. 溶液的温度越高, 吉布斯函数的最小值越小.

图 3.3.3 给出在不同浓度及不同链长情况下溶液的吉布斯函数随温度的变化曲线. 从图中可以清楚地看出, 系统的吉布斯函数随温度的增加而降低; 当溶液浓度小于使得吉布斯函数取最小值的浓度时, 例如, 浓度为  $n/n_i = 0.002$  时, 蛋白质分子的链长越小, 系统的吉布斯函数越大; 当溶液浓度大于使得吉布斯函数取最小值的浓度时, 如  $n/n_i = 0.03$ , 蛋白质分子链长越大, 吉布斯函数越大 (图 3.3.2 也可看出).

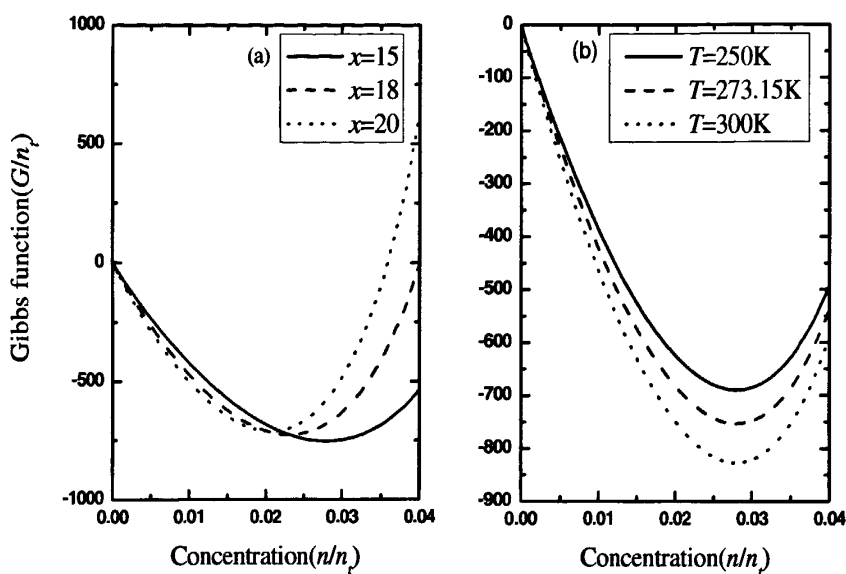


图 3.3.2 溶液的摩尔吉布斯函数 ( $G/n_i$ ) 随浓度的变化曲线: (a)  $T=273.15\text{K}$ ,  $x$  分别取 15, 18 和 20; (b)  $x=15$ ,  $T$  分别取 250, 273.15, 300 K.

Fig. 3.3.2 Molar Gibbs functions ( $G/n_i$ ) of the solution as functions of concentration: (a)  $T = 273.15\text{ K}$ , and  $x = 15, 18$  and 20; (b)  $x = 15$ , and  $T = 250, 273.15, 300\text{ K}$ , respectively.

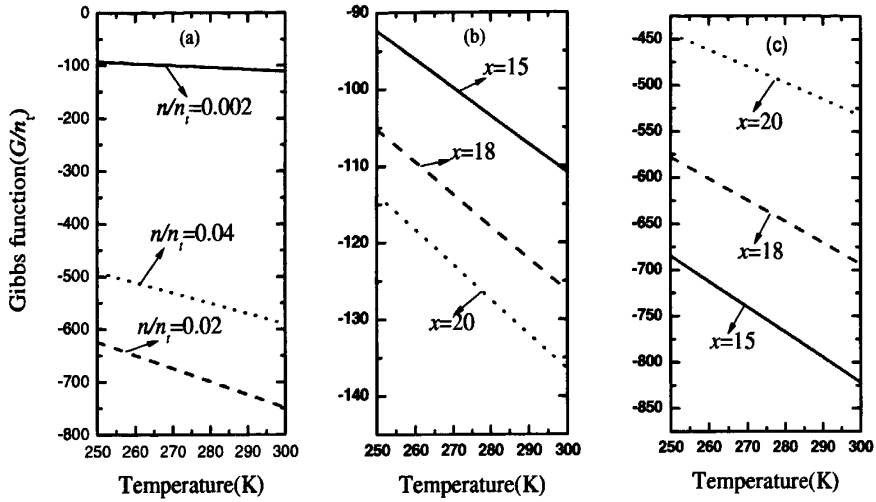


图 3.3.3 溶液的摩尔吉布斯函数 ( $G/n_i$ ) 随温度的变化曲线: (a)  $x=15$ ,  $n/n_i$  分别取 0.002, 0.02, 0.04; (b)  $n/n_i=0.002$ ,  $x$  分别取 15, 18, 20; (c)  $n/n_i=0.03$ ,  $x$  分别取 15, 18, 20.

Fig. 3.3.3 Molar Gibbs functions ( $G/n_i$ ) of the solution as functions of the temperature: (a)  $x=15$ , and  $n/n_i=0.002, 0.02, 0.04$ ; (b)  $n/n_i=0.002$ , and  $x=15, 18$  and 20; (c)  $n/n_i=0.03$ , and  $x=15, 18$  and 20, respectively.

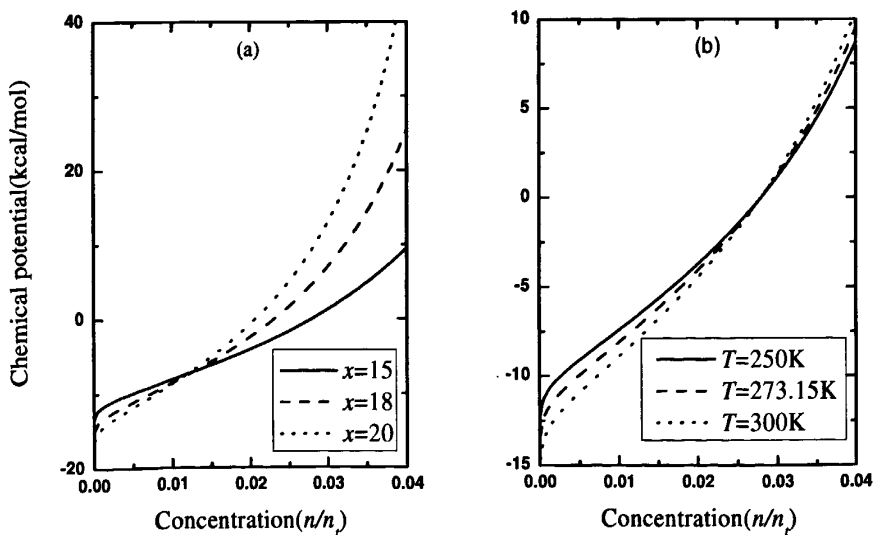


图 3.3.4 蛋白化学势随浓度的变化曲线: (a)  $T = 273.15\text{ K}$ ,  $x = 15, 18, 20$ ; (b)  $x = 15$ ,  $T = 250, 273.15, 300\text{ K}$ .

Fig. 3.3.4 Protein chemical potentials as functions of concentration: (a)  $T = 273.15\text{ K}$ , and  $x = 15, 18, 20$ ; (b)  $x = 15$ , and  $T = 250, 273.15, 300\text{ K}$ , respectively.

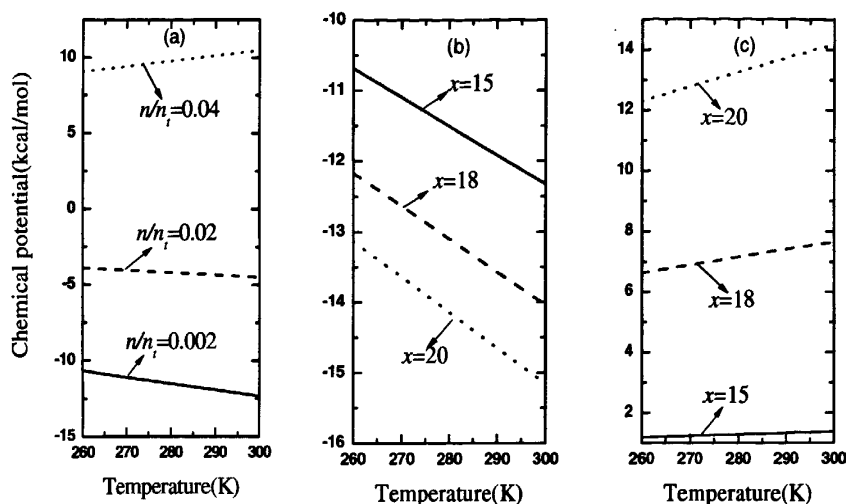


图 3.3.5 蛋白质分子化学势随温度的变化: (a)  $x=15$ ,  $n/n_i = 0.002, 0.02, 0.04$ ; (b)  $n/n_i = 0.002$ ,  $x = 15, 18, 20$ ; (c)  $n/n_i = 0.03$ ,  $x = 15, 18, 20$ .

Fig. 3.3.5 Protein chemical potentials as functions of temperature: (a)  $x=15$ , and  $n/n_i = 0.002, 0.02, 0.04$ ; (b)  $n/n_i = 0.002$ , and  $x = 15, 18$  and  $20$ ; (c)  $n/n_i = 0.03$ , and  $x = 15, 18$  and  $20$ , respectively.

溶质的化学势在讨论溶液性质的问题中有很重要的作用。图 3.3.4 和 3.3.5 分别给出了在蛋白质分子链长不同的情况下，溶液中蛋白质分子的化学势随蛋白质浓度，以及温度的变化曲线。

从图 3.3.4 很容易看出，蛋白质化学势随浓度的增加而增加；当浓度很低时，其化学势增加很快；浓度逐渐增大时，其增加幅度逐渐变小，最后近似于线性增加。溶质化学势是溶液吉布斯函数对溶质的偏摩尔导数，溶质化学势随浓度的变化与系统吉布斯函数随浓度的变化关系不同，对于稀溶液来说，系统吉布斯函数随浓度增加而减小。随着浓度的增加，溶质化学势增加，而溶剂化学势降低；当溶液浓度很低时，溶剂对系统吉布斯函数的贡献占主要地位，所以系统的吉布斯函数减小；随着溶质浓度的增加，溶质对系统吉布斯函数

的贡献越来越重要,直至其地位超过溶剂的贡献,所以当浓度超过一定浓度时,系统的吉布斯函数随浓度的增加而增加(图 3.3.2)。从图中还可知道,当浓度很低时,化学势随链长增加而降低,且链长对化学势的影响不大;随着浓度的增加,其化学势随链长的增加而增加,链长对化学势的影响越来越明显。

蛋白质分子的链长不同时,蛋白质化学势随浓度变化曲线的曲率也不相同,所以,当溶液浓度为某一值时,几条曲线交于一点;当温度  $T = 273.15K$ , 溶液浓度为  $n/n_t \approx 0.01$  时,蛋白质化学势有相同的值,与蛋白质分子的链长无关。随着浓度的增加,温度对蛋白质化学势的影响越来越小,最后这个差别很小而忽略不计。

从图 3.3.5 也可看出,在浓度不同及蛋白质分子链长不同的情况下,蛋白质化学势随温度的变化也不相同。当蛋白质浓度很小时,蛋白质化学势随温度的增加线性降低,随链长的增加而降低;当浓度变大时,蛋白质化学势随温度升高而增大,随链长增加而增大。

### § 3.3.2 AFPI 溶液中 AFPI 分子的化学势

作为该理论的应用,我们讨论了几种 AFPI 的化学势。

由于 AFPI 分子是  $\alpha$  螺旋状结构,可以将其看作链状分子,故 AFPI 溶液中 AFPI 分子的化学势可由式 (3.2.13) 计算得出。设 AFPI 分子的长度用  $L$  表示,水分子间的距离约为  $4\text{\AA}$ [130],前面定义的分子链长用  $x=L/4$  给出。AFP9 分子长度为  $80\text{\AA}$ [109],故  $x=20$ ; HPLC-6 和 AAAA2kE 分子长度为  $60\text{\AA}$ [77],它们在溶液模型中分子链长为  $x=15$ 。我们计算了 AFP9, HPLC-6 和 AAAA2kE 溶液中蛋白质分子的化学势。事实上,AFPI 溶液很稀,所以计算过程中用水的摩尔浓度  $55\text{mol/L}$  来代替溶液总的摩尔浓度。图 3.3.6 给出了 AFP9, HPLC-6 和 AAAA2kE 的化学势随 AFPI 浓度的变化关系曲线。

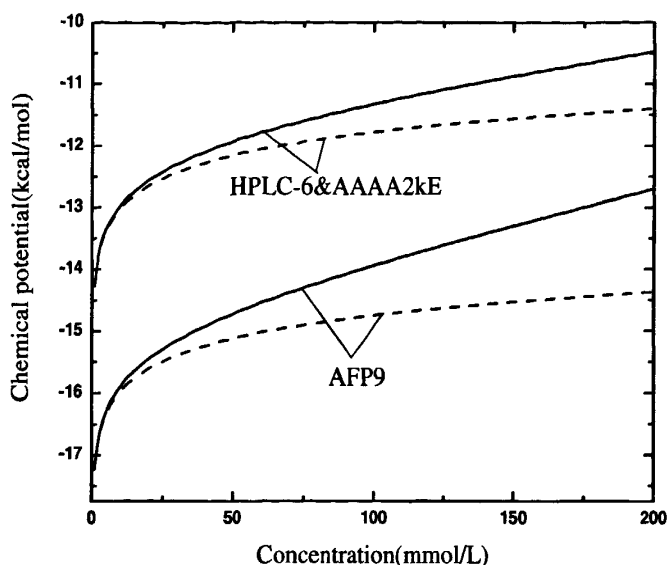


图 3.3.6 AFP9, HPLC-6 和 AAAA2kE 的化学势随浓度的变化曲线, 温度为  $T=273.15K$ . 实线是我们计算的结果, 虚线表示理想溶液模型给出的化学势的结果.

Fig. 3.3.6 Calculated chemical potentials of AFP9, HPLC-6 and AAAA2kE as functions of concentration at  $T=273.15K$ . The calculating results are shown by solid lines, and the dashed lines are given by the ideal solution model.

从图 3.3.6 看出, 在 AFP9, HPLC-6 和 AAAA2kE 溶液中, AFPI 分子的化学势随浓度增加而增大, 在溶液浓度极低时, 化学势增长方式与对数方式相同, 随着浓度的增加, 化学势增长快于对数形式增长.

将我们的计算结果与理想溶液模型结果比较. 理想溶液中, 溶质化学势通常是溶质浓度的对数项与一个与浓度无关的常数项的和, 为下面的形式[86]

$$\mu = \mu_0(T) + RT \ln C, \quad (3.3.1)$$

其中,  $C$  是溶液中 AFPI 分子的浓度,  $\mu_0$  称为参考化学势, 其值与温度及溶质本身的性质有关. 当溶液浓度极低时, 溶质化学势表达式 (3.2.13) 变为与表达式 (3.3.1) 相似的形式, 其参考化学势为

$$\mu_0(T) = -RT[\ln(55) + x\ln(z-1) - 1], \quad (3.3.2)$$

其中, 溶液的浓度为 55mol/L.

为比较我们的计算结果与理想溶液模型结果的不同, 图 3.3.6 中还给出了 (3.3.1) 表示的曲线. 可以看出, 化学势的对数形式变化仅在 AFPI 浓度极低的时候成立; 当蛋白质浓度升高约超过 10mmol/L 时, 我们的计算结果与理想溶液模型结果的差异就变得显著. 实际上, 实验观测到的 AFPI 分子的浓度常大于 10mmol/L, 所以, 将 AFPI 溶液简单当作理想溶液来讨论是不合适的, 即使是不考虑蛋白质分子与水分子间的相互作用的影响, AFPI 溶液与理想溶液的性质也不完全相同.

根据式 (3.3.2), AFP9 的参考化学势为 -11kcal/mol, 该值显然低于半实验值 -4.0 kcal/mol 和模拟值 -5.0kcal/mol[17]. 我们可以知道, 通过 AFPI 的化学势在浓度很大的极限情况下的取值得到的 AFPI 分子的“参考化学势”, 不能从理想溶液模型中简单得到. 此外, 溶质与溶剂间相互作用的影响也应该考虑.

### § 3.4 结论

本章中, 在不计入分子间相互作用的初级近似下, 用格点模型详细讨论了链状蛋白质分子溶液的热力学性质. 结果表明, 系统的熵随蛋白质浓度的增加先增大后减小, 导致其吉布斯函数随蛋白质浓度的增加先降低后升高. 系统的吉布斯函数随温度升高而减小. 蛋白质分子的链长越长, 吉布斯函数的最小值越大, 同时, 吉布斯函数的最小值点随链长的增加向浓度值小的方向移动.

溶液中蛋白质分子的化学势随其浓度的增加而增加, 蛋白质分子的链长不同时, 蛋白质化学势随浓度变化的曲率也不相同; 当蛋白质浓度很小时, 其化学势随温度的升高而降低, 随链长的增加而降低; 当浓度变大时, 蛋白质化学势随温度升高而增大, 随链长增加而增大.

作为该理论的应用, 讨论了几种 AFPI 的化学势. 结果表明, 即使是不计入蛋白质分子与水分子间的相互作用, 理想溶液模型也不适用于讨论 AFPI 溶液的热力学性质. 实际上, 蛋白质分子与水分子间的相互作用不应被忽略, 我们在下一章中将对问题作进一步讨论.

## 第四章 AFPI 溶液的热力学性质

### § 4.1 引言

上一章的讨论显示,理想溶液模型的结果不适用于讨论 AFPI 溶液的热力学性质,格点模型得到的参考化学势的结果与实验结果有较大偏离,同时,由于蛋白质分子与水分子间的相互作用与水分子间的相互作用不同,所以,蛋白质分子与水分子间相互作用对溶液热力学性质的影响也不能忽略。

本章在第三章的模型基础上,进一步计入蛋白质分子与水分子间相互作用的影响,讨论了几种 AFPI 溶液的热力学性质对温度,蛋白质分子浓度及分子链长等因素的依赖。

### § 4.2 模型与理论

模型与第三章相同,但计入蛋白质分子与水分子间相互作用的影响:考虑到实际上 AFPI 溶液很稀,溶液中蛋白质分子彼此相邻的可能性很小,故不考虑蛋白质分子间的相互作用,只计入蛋白质分子与水分子间相互作用的影响,此时,系统的配分函数为

$$Z = \frac{N_t!}{(N_t - N)!N!} \left( \frac{z-1}{N_t} \right)^{xN} \cdot \frac{(N_t - 1)!}{(N_t - xN - 1)!} \exp(-\beta N \epsilon_0), \quad (4.2.1)$$

其中,  $\epsilon_0$  为一个 AFPI 分子与水分子间的相互作用能,其他参数的表达式及其物理意义与第三章相同。

用 Stirling 公式及与第三章中相同的近似,系统的自由能为

$$\begin{aligned} F &= -kT \ln Z \\ &= -kT \left\{ -N_t \ln(1 - N/N_t) + N \ln(N_t/N - 1) + xN [\ln(z-1) - 1] \right. \\ &\quad \left. + (N_t - xN) \ln[N_t/(N_t - xN)] \right\} + N \epsilon_0 \end{aligned} \quad (4.2.2)$$

系统的状态方程为

$$PV = \left\{ -N_t \ln(1 - N/N_t) - N_t \ln(1 - xN/N_t) - xN \right\} kT, \quad (4.2.3)$$

与第三章给出的系统的状态方程相同。

当溶液很稀时, 有  $\ln(1-N/N_t) \approx -N/N_t$ ,  $\ln(1-xN/N_t) \approx -xN/N_t$ , 系统的状态方程变为

$$PV = NkT. \quad (4.2.4)$$

(4.2.4) 形式与理想气体状态方程相同.

系统的内能为

$$U = F - T \frac{\partial F}{\partial T} = N\epsilon_0. \quad (4.2.5)$$

系统的熵为

$$\begin{aligned} S &= -\frac{\partial F}{\partial T} \\ &= k\{-N_t \ln(1-N/N_t) + N \ln(N_t/N-1) + xN[\ln(z-1)-1] \\ &\quad + (N_t-xN) \ln[N_t/(N_t-xN)]\} \end{aligned} \quad (4.2.6)$$

溶液的吉布斯函数为

$$G = F + PV = -RT\{n \ln(n_t/n-1) + xn[\ln(z-1)-1] + xn \ln(1-xn/n_t) + xn\} + n\epsilon_0, \quad (4.2.7)$$

其中, 用分子的摩尔数来代替分子个数.

溶液中, AFPI 分子的化学势为

$$\mu_{AFPI} = \frac{\partial G}{\partial n} = -RT\{\ln(n_t/n-1) - 1/(1-n/n_t) + x \ln(z-1) + x \ln(1-xn/n_t) - x^2 n/(n_t-xn)\} + \epsilon_0. \quad (4.2.8)$$

类似的, 水分子的化学势为

$$\begin{aligned} \mu_{water} &= RT\left[\ln(n_t/n-1) - 1/(1-n/n_t) + x \ln(z-1) + x \ln(1-xn/n_t) - x^2 n/(n_t-xn)\right] / x \\ &\quad - \epsilon_0/x \end{aligned} \quad (4.2.9)$$

### § 4.3 计算结果与讨论

式 (4.2.7) 和 (4.2.8) 显示, 与第三章得到的结果不同, AFPI 溶液的吉布斯函数和 AFPI 分子的化学势都与 AFPI 分子与水分子间的相互作用能有关.

为清楚理解 AFPI 溶液的热力学性质, 我们计算了几种 AFPI 溶液的吉布斯函数及其溶液中 AFPI 分子的化学势. 计算过程中, 由于溶液很稀, 溶液的浓度取 55mol/L(水的浓度). 分子链长  $x$  的取值方式与第三章相同, 对于 AFP9, HPLC-6 和 AAAA2kE 来说, 分别为  $x=20$ , 15, 15. 由于溶液为二维模型, 故  $z=4$ .

利用组成 AFPI 分子的氨基酸的亲水性及疏水性特征来估算 AFPI 分子与水分子间的相互作用能. 文献[111]指出, HPLC-6 分子上可与冰晶表面接触的氨基酸分别位于位置 2, 3,

5, 6, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 25, 27, 28, 31, 32, 34, 35, 36 上, 这些位置的氨基酸残基相对较为突出, 据此, 我们认为这些位置的氨基酸可与水分子相互作用, 其他位置的氨基酸由于其位置靠近分子内侧, 所以认为其对相互作用不起作用. 由不同的氨基酸的不同的亲水和疏水参数的值[131-134], 同时计入周围疏水性氨基酸对个别氨基酸亲水性的削弱作用, 将 HPLC-6 与水的相互作用能估算为  $7.8\text{kcal/mol}$ . 由于丙氨酸 (alanine) 的疏水性略高于苏氨酸 (threonine), 则 AAAA2kE 与水的疏水相互作用能高于 HPLC-6 与水的疏水相互作用能, 其与冰晶的相互作用能估算为  $8.0\text{kcal/mol}$ . 由文献[109]给出的 AFP9 的氨基酸的组成结构, 根据它与冰晶结合表面的氨基酸的组成, 将其与水的相互作用能估算为  $9.5\text{kcal/mol}$ .

图 4.3.1-4.3.3 给出了当温度为  $T=273.15\text{K}$  时, AFP9, HPLC-6 和 AAAA2kE 溶液的吉布斯函数, 溶液中 AFPI 的化学势及水分子的化学势随 AFPI 浓度的变化曲线.

图 4.3.1 给出, AFPI 溶液的吉布斯函数随 AFPI 浓度的增加先降低, 而后很快升高, 当浓度处于某一值时, 吉布斯函数有一个最小值. 由上一章的结论, 吉布斯函数取最小值的浓度随蛋白质分子链长的增加向浓度小的方向移动, AFP9 分子链长大于 HPLC-6 和 AAAA2kE, 使得溶液吉布斯函数取最小值的浓度也是前者小于后者. 同时, HPLC-6 和 AAAA2kE 的吉布斯函数最小值点的浓度相同, 它们的吉布斯函数最小值高于 AFP9 溶液的吉布斯函数的最小值, 这是由于最小值不仅与溶液的熵的变化有关, 还与溶液中分子间的相互作用大小有关. 应该指出, 吉布斯函数的曲线仅浓度很低的部分是合理的, 这是因为理论中对 AFPI 与水分子间相互作用的计入是在浓度很低的情况下简单计入的, 如果要讨论浓度大的情况, 相互作用能的表示形式应比原来复杂的多. 实际上, AFPI 浓度连图中的  $n/n_i=0.02$  的位置都达不到, 也就是说, 后来吉布斯函数升高很快的部分是不合理的.

对于 AFPI 溶液的吉布斯函数随浓度变化的关系曲线, 可以通过分析溶液中 AFPI 分子及水分子的化学势来进一步讨论.

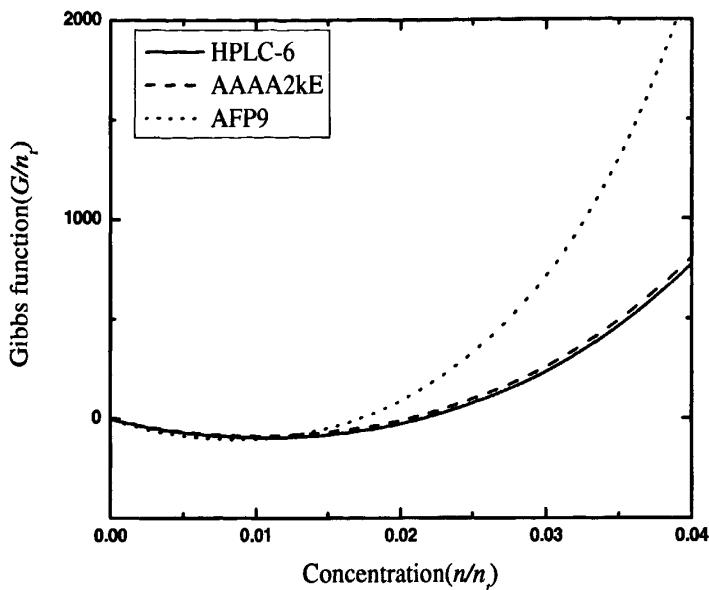


图 4.3.1 AFP9, HPLC-6 和 AAAA2kE 溶液的吉布斯函数随 AFPI 浓度的变化曲线, 温度  $T=273.15K$ .

Fig. 4.3.1 Gibbs functions as functions of the AFPI concentration for AFP9, HPLC-6 and AAAA2kE solutions at  $T = 273.15K$ .

下面来分析 AFPI 的抗冻机制是溶液冰点温度的依数性降低, 还是冰晶生长点温度的非依数性降低. 通常, AFPI 溶液很稀, 所以, 溶液的吉布斯函数随浓度的增加而减少, 如图 4.3.1 所示. 相应的, 溶液的冰点温度随 AFPI 浓度的增加而降低. 下面计算纯水的冰点温度与 AFPI 溶液冰点温度间的差值.

液体的摩尔吉布斯函数变化为[15,135]

$$\Delta G = \Delta L \Delta T / T_e, \quad (4.3.1)$$

其中,  $\Delta L$  是水的相变潜热,  $\Delta T$  是冰点的降低值,  $T_e$  是纯水的冰点温度.

将溶液中的冰晶看作一不可压缩系统. 对于不可压缩系统, 也就是当系统的体积不变时, 系统的吉布斯函数的变化 ( $\Delta G$ ) 是压强变化的函数, 为  $\Delta G = V \Delta P$  [15,135]. 同时, 由 (4.2.4), 得到系统压强变化约为

$$\Delta P = (N/N_i) kT/v. \quad (4.3.2)$$

所以溶液的冰点温度降低值为

$$\Delta T = RT_e^2(N/N_t)/\Delta L. \quad (4.3.3)$$

AFPI 分子的加入会导致溶液的冰点温度降低, 式 (4.3.3) 表明, 溶液冰点温度的降低值仅与溶质的浓度有关, 而与其化学性质无关, 冰点温度随 AFPI 浓度的降低现象为依数效应. 水的相变潜热  $\Delta L=1436\text{cal/mol}$ [70], 纯水的冰点温度为  $T_e=273.15\text{K}$ , 从式 (4.3.3) 计算得到, 当溶质浓度为  $30\text{mmol/L}$  时, 冰点温度的降低值为  $0.05^\circ\text{C}$ ; 实际上, 当 AFP 浓度为  $30\text{mmol/L}$  时, 热滞温度达到  $1^\circ\text{C}$  甚至更大[2,106]. 很显然, AFP 的抗冻活性是一种非依数效应. 与热滞温度比较, 依数的溶液冰点温度的降低值很小, 故可忽略. 所以, 在讨论 AFP 溶液的吉布斯函数及化学势等热力学性质时, 取溶液温度为  $T=273.15\text{K}$ .

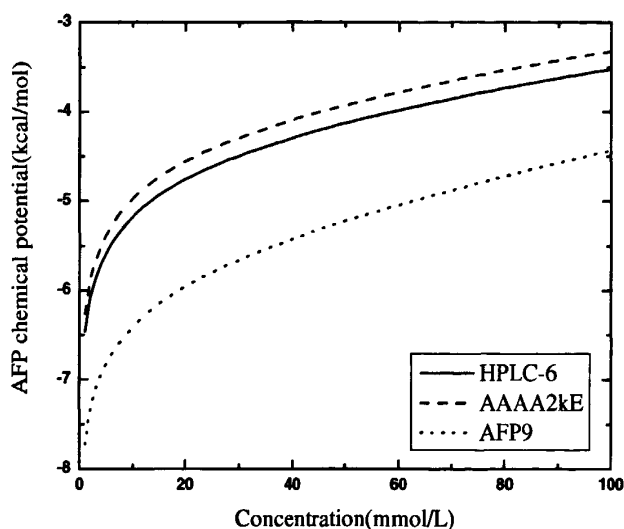


图 4.3.2 AFP9, HPLC-6 和 AAAA2kE 溶液中 AFPI 化学势随 AFPI 浓度的变化曲线, 温度  $T=273.15\text{K}$ .

Fig. 4.3.2 Chemical potentials of AFPI as functions of the AFPI concentration for AFP9, HPLC-6 and AAAA2kE solutions at  $T = 273.15\text{K}$ .

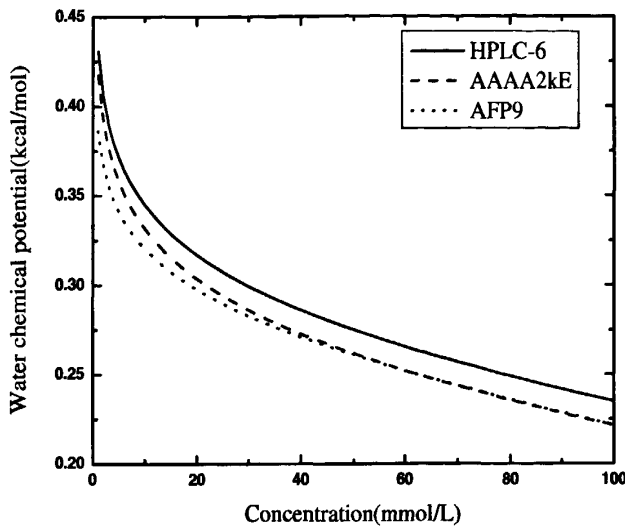


图 4.3.3 AFP9, HPLC-6 和 AAAA2kE 溶液中水分子的化学势随 AFPI 浓度的变化曲线, 温度  $T=273.15K$ .

Fig. 4.3.3 Chemical potentials of water as functions of the AFPI concentration for AFP9, HPLC-6 and AAAA2kE solutions at  $T = 273.15K$ .

图 4.3.2 显示溶液中 AFPI 的化学势随 AFPI 浓度的增加而增大; 图 4.3.3 显示水分子的化学势随 AFPI 浓度的增加而降低. 我们知道, 溶液中溶质的化学势随其浓度的增加而增大, 所以 AFPI 的化学势随其浓度的增加而增大; 溶液中 AFPI 分子的增加意味着水分子含量降低, 所以水分子的化学势随 AFPI 浓度的增加而减小. 第三章已经给出, 当溶液浓度很小时, 蛋白质化学势随其链长增加而降低, 由于 AFPI 溶液很稀, 所以 AFPI 的化学势随其分子的链长增加而降低.

AFPI 溶液的浓度通常很低, 而水分子在溶液中所占的比例很大, 所以水分子的贡献在系统的吉布斯函数中占主要地位, 而水分子的化学势随 AFPI 浓度的增加而减小 (图 4.3.3), 所以溶液的吉布斯函数随 AFPI 浓度的增加而降低; 随着 AFPI 浓度的继续增大, AFPI 分子在溶液中的比例逐渐增大, 其对系统吉布斯函数的贡献也越来越明显, 而 AFPI 化学势随其浓度的增加而增加, 所以溶液的吉布斯函数会达到一个最低值, 后来随着 AFPI 浓度的增加而升高, 该现象在图 4.3.1 中给出.

图 4.3.2 给出, 三种 AFPI 分子的化学势随 AFPI 浓度变化的方式相同, 当浓度很低时,

其变化方式类似于对数增长，与理想溶液中溶质化学势增长方式相同。

AFPI 化学势在其浓度很低时增长很快，后来随浓度的增加，其增加逐渐变缓，最后趋于一个固定值，该固定值在理想溶液模型中被称为参考化学势。图 4.3.2 显示，HPLC-6 和 AAAA2kE 的参考化学势约为  $-3.5\text{kcal/mol}$ ，AFP9 的参考化学势约为  $-4.5\text{kcal/mol}$ 。AFPI 分子的半经验参考化学势为  $-4.0\text{kcal/mol}$  或  $-5.0\text{kcal/mol}$ [17]。我们计算得到的结果与半经验结果符合不是很好，这是由于我们的模型与理想溶液模型不同，得到的参考化学势也与理想溶液的结果有些差异。

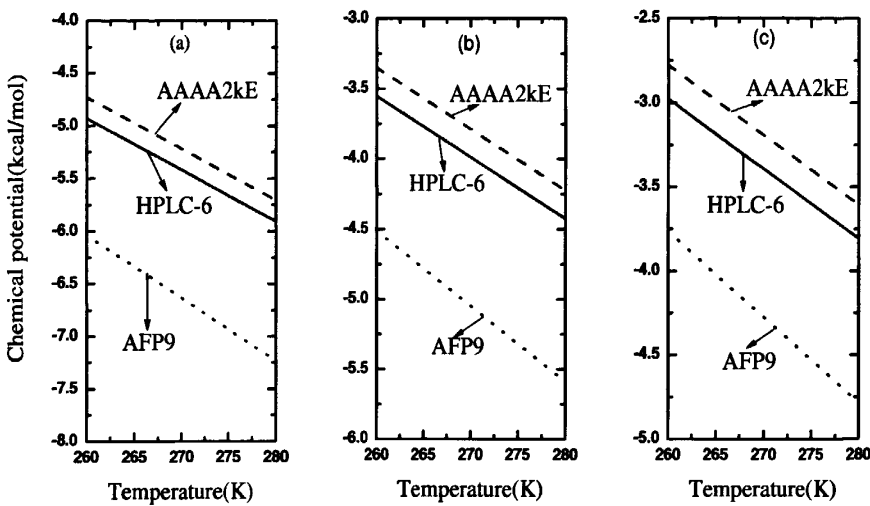


图 4.3.4 AFP9, HPLC-6 和 AAAA2kE 溶液中 AFPI 化学势随温度变化关系曲线: (a) 5mmol/L, (b) 50mmol/L, (c) 100mmol/L.

Fig. 4.3.4 Chemical potentials of AFPI as functions of the temperature for AFP9, HPCL-6 and AAAA2kE solutions, with the concentration (a) 5mmol/L, (b) 50mmol/L and (c) 100mmol/L.

图 4.3.4 给出了 AFPI 浓度分别在 5、50、100mmol/L 时，AFP9、HPLC-6 和 AAAA2kE 的化学势随温度的变化曲线。从图中看出，AFPI 化学势随温度变化而线性变化，随温度升高而降低。不同 AFPI 化学势对温度的依赖关系相类似，其关系曲线彼此平行。

从图 4.3.2 和 4.3.4 看出，AFPI 化学势对其分子的大小变化很敏感，分子链长越长 ( $x$  越大)，其化学势越低；由于链长较长，故 AFP9 化学势 ( $x=20$ ) 低于 HPLC-6 和 AAAA2kE ( $x=15$ ) 的化学势。由于 HPLC-6 和 AAAA2kE 有相同的分子链长，所以它们的化学势非

常接近；后者的化学势略高于前者，是由于其分子与水分子间的疏水相互作用略大于前者造成的。

如果上面建立的 AFPI 化学势的理论可用于对 AFP 抗冻活性的讨论，这将是对我们第二章建立的 AFPI 统计力学模型理论的进一步补充。

#### § 4.4 结论

本章在第三章的基础上，计入 AFPI 与水分子间相互作用的影响，讨论了 AFPI 溶液的吉布斯函数及 AFPI 化学势对 AFPI 浓度，链长及溶液温度的依赖关系。结果表明，溶液的吉布斯函数随浓度的增加而降低，达到一最小值后，随浓度的继续升高而增加；吉布斯函数最小值点随链长增加向浓度较小的方向移动；吉布斯函数最小值的大小不仅与链长有关，还与溶液中 AFPI 与水分子间的相互作用有关。

由于 AFPI 分子的加入导致的溶液冰点温度降低现象为依数效应，冰点温度的降低值很小，通常可忽略，说明 AFPI 的抗冻活性以非依数效应为主。

AFPI 的化学势随其浓度增加而升高，溶液中水分子的化学势随 AFPI 浓度的增加而降低，从而导致溶液的吉布斯函数随浓度增加呈现先降低后升高的变化现象。AFPI 化学势随温度增加线性降低。对几种 AFPI 化学势的计算表明，AFPI 分子链长越长，其化学势越低。

## 第五章 AFPI 分子与冰晶的相互作用能的计算

### § 5.1 引言

抗冻蛋白的抗冻机制是抗冻蛋白分子在冰晶表面的吸附导致冰晶不再生长, 而对其吸附机制的探索也有许多相关的实验和理论结果. 对抗冻蛋白分子在冰晶表面的具体吸附方式的研究观点分为两种: 一种认为, 抗冻蛋白分子通过氢键相互作用与冰晶表面结合; 而另一种观点, 认为抗冻蛋白分子通过其自身的某些氨基酸与冰晶表面的 Van der Waals 相互作用吸附于冰晶之上, 近几年来, 越来越多的实验和理论研究倾向于后一种观点. 抗冻蛋白与冰晶间的相互作用对其抗冻活性有重要的影响, 其对热滞温度的影响我们在第二章也曾有介绍.

在本章中, 我们认为 AFPI 分子与冰晶的相互作用为 AFPI 分子上某些特定位置的氨基酸上的甲基与冰晶表面的 Van der Waals 相互作用, 同时, 计入相邻甲基对其相互作用的影响, 简单计算了几种 AFPI 分子与冰晶间的相互作用能, 讨论了吸附的 AFPI 分子与冰晶间的距离对其相互作用能的影响. 并将计算结果与实验结果进行了比较.

### § 5.2 模型与理论

实际上, AFP 分子与冰晶的相互作用受到很多因素的影响, 比如 AFP 分子在水中的溶解度, AFP 分子的链长等等, 但是, 很多实验结果说明, AFP 分子的某些氨基酸上的疏水残基对 AFP 的抗冻活性起着重要的作用, 而氢键相互作用在 AFP 与冰晶的相互作用中不占主导地位.

很多研究结果给出, AFPI 分子在冰晶表面的吸附主要依赖于其苏氨酸 (threonine) 或丙氨酸 (alanine) 上有疏水性的甲基与冰晶表面的相互作用, 在此基础上, 我们认为, 这些甲基与冰晶表面的 Van der Waals 相互作用在 AFPI 分子与冰晶的相互作用中起主要作用. 下面首先给出一个甲基与冰晶表面的 Van der Waals 相互作用能.

假设分子间距为  $r$  的两个原子或者两个小分子间的相互作用仅仅是吸引作用, 且作用

能形式为[136]

$$w(r) = -C/r^l, \quad (5.2.1)$$

那么, 一个分子与一个平面固体间的相互作用能就是该分子与组成该固体的所有分子的作用能的加和.

设  $\rho$  为固体的原子数密度, 则固体中半径为  $x$ , 面积为  $dx dz$  的圆环的体积为  $2\pi\rho x dx dz$ , 距离固体表面垂直距离为  $D$  处的原子与固体间的相互作用能为[136]

$$\begin{aligned} w(D) &= -2\pi C \rho \int_{z=D}^{\infty} dz \int_0^{\infty} \frac{x dx}{(z^2 + x^2)^{l/2}} \\ &= -\frac{2\pi C \rho}{(l-2)} \int_D^{\infty} \frac{dz}{z^{l-2}} \\ &= -\frac{2\pi C \rho}{(l-2)(l-3)D^{l-3}} \end{aligned} \quad (5.2.2)$$

相对于一个甲基, 我们认为冰晶为无限大固体, 其间相互作用能可用式 (5.2.2) 给出, 且其间相互作用为 Van der Waals 相互作用, 即  $l=6$ , 则一个甲基与冰晶的相互作用能为

$$w(D) = -\pi C \rho / 6D^3, \quad (5.2.3)$$

其中,  $D$  是甲基与冰晶表面的垂直距离,  $\rho$  是组成冰晶的冰分子数密度.

根据 Landon 的理论, 两个不同原子间的 Van der Waals 相互作用能的表达式为[136]

$$w(r) = -\frac{3}{2} \frac{\alpha_{01} \alpha_{02}}{(4\pi\epsilon_0)^2} \frac{I_1 I_2}{r^6 I_1 + I_2}, \quad (5.2.4)$$

则 (5.2.3) 中常数  $C$  的表达式为

$$C = \frac{3}{2} \frac{\alpha_{01} \alpha_{02}}{(4\pi\epsilon_0)^2} \frac{I_1 I_2}{I_1 + I_2}, \quad (5.2.5)$$

其中,  $\alpha_{01}/4\pi\epsilon_0$ ,  $\alpha_{02}/4\pi\epsilon_0$  分别为冰分子和甲基的电子极化率;  $I_1$ ,  $I_2$  分别为冰分子和甲基的第一电离能.

组成冰晶的冰分子数密度可写为

$$\rho = \frac{\rho_0}{M} \times N_0, \quad (5.2.6)$$

其中,  $\rho_0$  是冰的密度,  $M$  是冰的摩尔质量,  $N_0=6.02 \times 10^{23}/\text{mol}$  是阿伏伽德罗常数.

将 (5.2.5) 和 (5.2.6) 代入 (5.2.3), 得到一个甲基与冰晶的相互作用能的表达式为

$$w = -\frac{3\pi}{2} \frac{\alpha_{01}\alpha_{02}}{(4\pi\epsilon_0)^2} \frac{I_1 I_2}{I_1 + I_2} \frac{\rho_0 N_0}{M} \frac{1}{6D^3}. \quad (5.2.7)$$

假设一个 AFPI 分子上有  $n$  个甲基对其在冰晶表面的吸附起作用, 且这  $n$  个甲基间的距离足够大, 它们在冰晶表面的吸附不受其他甲基的影响, 此时, AFPI 分子与冰晶的相互作用能为  $n$  个甲基与冰晶的相互作用能的和, 其表达式为

$$E = wn = -\frac{3\pi}{2} \frac{\alpha_{01}\alpha_{02}}{(4\pi\epsilon_0)^2} \frac{I_1 I_2}{I_1 + I_2} \frac{\rho_0 N_0}{M} \frac{1}{6D^3} \times n. \quad (5.2.8)$$

另一种情形, 对 AFPI 分子在冰晶表面吸附起作用的甲基中有些甲基是相邻的, 它们之间的距离很小, 以至于两个相邻的甲基之间的排斥相互作用会对甲基在冰晶表面的吸附产生影响, 实验结果也显示, 相邻的苏氨酸 (threonine) 对 AFP9 在冰晶表面的吸附有一定的影响[109]. 也就是说, 在甲基相邻的情形下, AFPI 在冰晶表面的吸附不仅仅受到甲基与冰晶的 Van der Waals 吸引相互作用的影响, 而且相邻甲基间的相互作用也对相互作用能有贡献. 相邻甲基间的相互作用对 AFPI 分子与冰晶的相互作用能的影响用  $E_a$  表示, 则在这种情况下, AFPI 分子与冰晶间的相互作用能可表示为

$$E = -\frac{3\pi}{2} \frac{\alpha_{01}\alpha_{02}}{(4\pi\epsilon_0)^2} \frac{I_1 I_2}{I_1 + I_2} \frac{\rho_0 N_0}{M} \frac{1}{6D^3} \times n + E_a. \quad (5.2.9)$$

根据链状烷烃的内聚能理论[136], 假设每一对 (两个相邻的) 甲基对相互作用能的贡献值为 1.4kcal/mol, 当 AFPI 分子上有  $m$  对甲基相邻时, 相邻甲基间相互作用对总相互作用能的贡献值  $E_a=1.4m$ , 则 AFPI 分子与冰晶的相互作用能为

$$E = -\frac{3\pi}{2} \frac{\alpha_{01}\alpha_{02}}{(4\pi\epsilon_0)^2} \frac{I_1 I_2}{I_1 + I_2} \frac{\rho_0 N_0}{M} \frac{1}{6D^3} \times n + 1.4m. \quad (5.2.10)$$

上式给出了 AFPI 分子与冰晶的相互作用能, 当  $m=0$  时, AFPI 与冰晶间的相互作用仅为 Van der Waals 吸引相互作用, 其表达式为 (5.2.9).

### § 5.3 计算结果与讨论

式 (5.2.9) 明确给出, 当对吸附起作用的甲基不相邻时, AFPI 与冰晶间的相互作用能随苏氨酸 (threonine) 或缬氨酸 (valine) 上的甲基的个数的增加而线性增大, 随 AFPI 与冰晶间距离的增加而减少. AFPI 与冰晶间的相互作用能还受到相邻甲基间相互作用的影响, 该影响计入时, AFPI 与冰晶的相互作用能由式 (5.2.10) 给出. 计算结果表明, AFPI 分子

与冰晶间的相互作用不仅与分子上甲基的个数有关系, 还受到甲基位置的影响.

计算过程中, 对于冰分子来说[136],  $\alpha_{01}/4\pi\epsilon_0=1.48*10^{-30}\text{m}^3$ ,  $I_1=12.6\text{eV}$ ; 对于甲基[135],  $\alpha_{02}/4\pi\epsilon_0=1.84*10^{-30}\text{m}^3$ ,  $I_2=10.4\text{eV}$ . 对于冰晶,  $\rho_0=0.9*10^3\text{kg/m}^3$ ,  $M=18\text{g/mol}$ .

图 5.3.1 给出了  $m=0$ ,  $n$  分别取 4, 7 和 8 时, AFPI 分子与冰晶的相互作用能随 AFPI 分子与冰晶间距  $D$  的变化曲线.

AFP9 分子有 7 个苏氨酸对吸附起作用, 每个苏氨酸上有一个甲基, 则  $n=7$ , 对其结构研究表明, 分子上有两对苏氨酸相邻, 所以  $m=2$ [109]; HPLC-6 上有 4 个苏氨酸, 且它们的位置分别在 2, 13, 24 和 35, 互不相邻, 所以  $n=4$ ,  $m=0$ [16,122]; AAAA2kE 上有 4 个丙氨酸可与冰晶作用, 这 4 个丙氨酸的位置与 HPLC-6 上苏氨酸的位置相同, 且每个丙氨酸上有一个甲基, 所以  $n=4$ ,  $m=0$ [122]; 每个缬氨酸上有两个甲基, 且这两个甲基相邻, 所以对于 VVVV2kE 来说,  $n=8$ ,  $m=4$ [122]. 图 5.3.2 给出了 AFP9, HPLC-6, AAAA2kE 和 VVVV2kE 与冰晶的相互作用能随其分子与冰晶间距离的变化曲线.

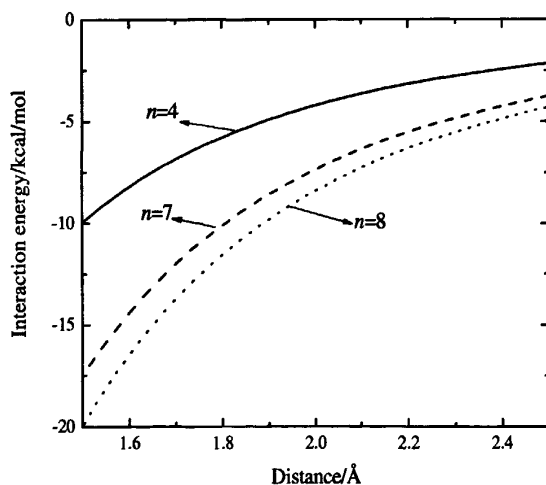


图 5.3.1 AFPI 分子与冰晶的相互作用能随距离  $D$  的变化曲线:  $m=0$ ,  $n$  分别取 4, 7, 8.

Fig. 5.3.1 Interaction energies of AFPI-ice as functions of the distance  $D$  when  $m=0$ , and  $n=4, 7$  and  $8$ , respectively.

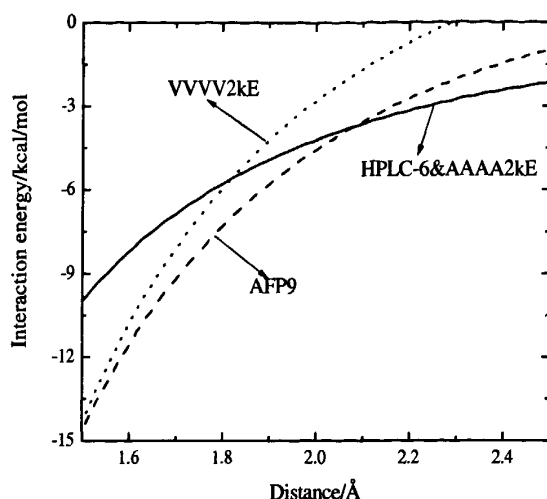


图 5.3.2 AFP9, HPLC-6, AAAA2kE, VVVV2kE 分子与冰晶的相互作用能随距离  $D$  的变化曲线.

Fig. 5.3.2 Interaction energies of AFP-ice as functions of the distance  $D$  for AFP9, HPLC-6, AAAA2kE and VVVV2kE, respectively.

图 5.3.1 给出, 当  $m=0$  时, 即 AFPI 与冰晶的相互作用仅为甲基与冰晶间的 Van der Waals 吸引相互作用时, 相互作用能随甲基个数的增加而增大, 随 AFPI 分子与冰晶间距离的增大而减小. 这是由于该相互作用为吸引相互作用, 其作用随距离增大而逐渐变弱, 所以相互作用能也就逐渐减小.

比较图 5.3.1 和图 5.3.2 发现, 对于某一种确定的 AFPI 分子来说, 其与冰晶的相互作用能的大小还受到分子上相邻甲基间相互作用的影响, 这种影响是很重要的, 不能被忽略. 图 5.3.2 给出, 当 AFPI 分子与冰晶的距离很小时, AFP9 和 VVVV2kE 与冰晶的相互作用能大于 HPLC-6 及 AAAA2kE 与冰晶的相互作用能, 但是随着该距离的逐渐增加, 前者小于后者. 这是由于当距离很小时, Van der Waals 吸引相互作用在 AFPI 分子与冰晶的相互作用中占主要地位, 其贡献是主要的, 所以用于和冰晶吸附的甲基的个数越多, 其 Van der Waals 吸引相互作用越大 (如方程 (5.2.10) 所示), AFP9 和 VVVV2kE 用于吸附的甲基个数多于 HPLC-6 和 AAAA2kE, 所以前者能量高于后者; 随着距离的逐渐增大, Van der Waals 吸引相互作用的贡献越来越小, 相邻甲基间的排斥作用对相互作用的贡献显得越来越重要, 所以总的吸引相互作用越来越弱, 因此, 在分子与冰晶的间距变大时, AFP9 和 VVVV2kE

与冰晶的相互作用能低于 HPLC-6 和 AAAA2kE 与冰晶的相互作用能。同时，我们也可以看出，AFPI 分子与冰晶表面的距离决定了相互作用能的大小。

C-H 键键长为 1Å，水分子半径为 1.38Å。AFPI 分子吸附于冰晶之上，所以，对于 AFP9，HPLC-6 和 VVVV2kE 来说，AFPI 分子上甲基与冰晶间垂直距离的取值  $D=1.38+0.5=1.88\text{Å}$ ；实验结果显示，AAAA2kE 分子丙氨酸上的甲基不如 HPLC-6 分子苏氨酸或 VVVV2kE 分子缬氨酸上甲基的位置突出[122]，即丙氨酸上的甲基与冰晶的距离稍远于苏氨酸或缬氨酸上甲基与冰晶的距离，所以对于 AAAA2kE 来说，我们取  $D=2.18\text{Å}$ 。表 5.3.1 给出了计算过程中用到的参数及 AFP9，HPLC-6，AAAA2kE，VVVV2kE 与冰晶的相互作用能的计算结果。

表 5.3.1 计算过程中用到的参数及几种 AFPI 分子与冰晶的相互作用能的计算结果。

Table 5.3.1 The parameters in calculation and AFP-ice interaction energies of some mutants of AFPI.

| Mutants of type I<br>antifreeze protein | Distance between<br>methyl group and<br>ice $D(\text{Å})$ | Number of methyl<br>groups $n$ | Pairs of neighboring<br>methyl groups $m$ | Calculating<br>results(kcal/mol) |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------|
| AFP9                                    | 1.88                                                      | 7                              | 2                                         | -6.1                             |
| HPLC-6                                  | 1.88                                                      | 4                              | 0                                         | -5.1                             |
| AAAA2kE                                 | 2.18                                                      | 4                              | 0                                         | -3.3                             |
| VVVV2kE                                 | 1.88                                                      | 8                              | 4                                         | -4.5                             |

AFP9 与冰晶的相互作用能的计算结果为 -6.1kcal/mol，与其实验结果 -6.5kcal/mol 有较好符合；HPLC-6 与冰晶的相互作用能为 -5.1kcal/mol，实验值为 -4.9kcal/mol[17]，理论计算与实验结果一致；AAAA2kE 的计算结果 -3.3kcal/mol，与其实验结果 -3.5kcal/mol 也很接近[17]。计算结果表明，AAAA2kE 与冰晶的相互作用弱于 HPLC-6 与冰晶的相互作用，该结论与实验结论一致。VVVV2kE 与冰晶的相互作用能的理论计算值为 -4.5kcal/mol，与实验得到的结果 -7.9kcal/mol 有较大的差距[17]。

通过与实验结果比较，可以发现，HPLC-6 和 AAAA2kE 与冰晶的相互作用能的计算结果与实验结果有很好的符合，相比之下，AFP9 和 VVVV2kE 与冰晶的相互作用能的理论值与实验值有较大的差距，尤其是 VVVV2kE，其理论值与实验结果差距最大。造成这种结果的原因是，HPLC-6 和 AAAA2kE 与冰晶相互作用的甲基是分离的，与冰晶的相互作用仅为甲基与冰晶的 Van der Waals 吸引相互作用，所以其理论计算与实验结果符合较好；AFP9 和 VVVV2kE，它们与冰晶的相互作用还受到其分子上相邻的甲基间排斥相互作用的影响，而对于这种排斥作用的贡献，我们仅简单而粗略的给出其贡献值，事实上，AFP9 上甲基的

相邻是由于苏氨酸的相邻造成的，而 VVVV2kE 则是一个缬氨酸上有两个甲基造成的甲基相邻，所以这两种分子上相邻甲基对最后相互作用能的影响应该是不同的，而计算过程中，我们简单认为一对相邻甲基对相互作用能的贡献是相同的。对排斥能的简单估算是造成其计算结果与实验值有较大偏差的原因，如果对该作用的影响做详细讨论，结果或许会更好一些。

## § 5.4 结论

近期许多研究表明，AFPI 分子上某些位置的氨基酸上的甲基与冰晶的相互作用对其在冰晶表面的吸附起主要作用，本章在此基础上，认为这些甲基与冰晶间的 Van der Waals 吸引相互作用对 AFPI 与冰晶的相互作用的贡献占主要地位，并计入相邻的甲基对相互作用能的影响，计算了 AFPI 分子与冰晶的相互作用能，讨论了 AFPI 分子与冰晶的距离，AFPI 分子上对吸附起作用的甲基的个数，以及相邻的甲基间的排斥作用对相互作用能的影响。甲基的个数越多，相互作用能越大，AFPI 分子与冰晶的距离越大，相互作用能越小。最后计算了几种 AFPI 分子与冰晶的相互作用能，并与实验结果进行了比较，发现理论计算结果与实验结果符合较好。

## 第六章 AFPI 分子吸附方向性对热滞的影响

### § 6.1 引言

AFPI 分子具有规则的  $\alpha$  螺旋结构, 当外界温度在热滞温度范围内变化时, 它们这种规则的结构不会变化, 使得 AFPI 分子在冰晶表面吸附时也保持其规则的结构, 即其吸附方式具有方向性. 不同的 AFPI 分子在冰晶表面的吸附沿不同的方向, 且同一种分子在冰晶表面沿相同的方向吸附, 这种吸附方向性对其热滞活性也有影响.

在第二章统计力学模型的基础上, 本部分计入 AFPI 分子吸附方向性的影响, 用统计力学的理论重新讨论了 AFPI 分子在冰晶表面的覆盖度, 及热滞温度与覆盖度的关系. 最后给出了几种 AFPI 的热滞温度随浓度的变化关系曲线, 并将计算结果与实验结果及第二章的结果进行了比较. 计算过程中, 用到的 AFPI 分子的化学势, 及其与冰晶的相互作用能均用第四章和第五章给出的理论结果.

### § 6.2 模型与理论

与第二章中的理论分析过程相似, 我们先给出 AFPI 分子在冰晶表面的覆盖度的表达式; 然后再利用热力学理论, 进一步分析给出热滞温度与覆盖度的关系.

#### § 6.2.1 覆盖度的计算

由于 AFPI 分子由几个重复片段构成, 每个片段含 11 个氨基酸, 所以, 我们认为, 每一个重复片段占据一个格点, 冰晶表面可供吸附的格点总数为  $N_t$ , 每个 AFPI 分子占据  $y$  个连续的格点. AFPI 分子具有规则的  $\alpha$  螺旋结构, 使得其在冰晶表面的吸附沿着一定的方向, 且同一种 AFPI 分子沿相同的方向吸附, 所以, 认为 AFPI 分子在冰晶表面的吸附为一维棒状吸附,  $N$  个 AFPI 分子在冰晶表面吸附的微观状态数为[137,138]

$$C_{N_t}^N = \frac{(N_t - yN + N)!}{(N_t - yN)!N!}. \quad (6.2.1)$$

将吸附在冰晶表面的 AFPI 分子看作一个系统，则系统的巨配分函数为

$$\Xi = \sum_N \frac{(N_t - yN + N)!}{(N_t - yN)!N!} \exp[N\beta(\mu - \varepsilon)], \quad (6.2.2)$$

其中， $\mu$  是 AFPI 分子的化学势， $\varepsilon$  是 AFPI 分子与冰晶的相互作用能。

由于系统为宏观系统，因此，我们采用 Bragg-Williams 近似方法[139-141]，用巨配分函数  $\Xi$  求和项中的最大项来代替求和项。

下面求解巨配分函数 (6.2.2) 中的最大项：

为求解方便，令

$$P = \frac{(N_t - yN + N)!}{(N_t - yN)!N!} \exp[N\beta(\mu - \varepsilon)]. \quad (6.2.3)$$

利用 Stirling 近似，有

$$\ln P = (N_t - yN + N) \ln(N_t - yN + N) - (N_t - yN) \ln(N_t - yN) - N \ln N + N\beta(\mu - \varepsilon), \quad (6.2.4)$$

$$\begin{aligned} \left. \frac{\partial \ln P}{\partial N} \right|_{N_t, \mu, \varepsilon, \beta} &= 0 = (-y+1) \ln(N_t - yN^* + N^*) - y+1 + y \ln(N_t - yN^*) \\ &\quad + y - \ln N^* - 1 + \beta(\mu - \varepsilon) \\ &= -y \ln \left( \frac{N_t - yN^* + N^*}{N_t - yN^*} \right) + \ln \left( \frac{N_t - yN^* + N^*}{N^*} \right) + \beta(\mu - \varepsilon) \end{aligned} \quad (6.2.5)$$

$N^*$  为使得  $P$  取最大值的  $N$  的值，上式表明， $N^*$  为  $N_t$ ,  $\mu$ ,  $\varepsilon$ ,  $T$  的函数。

所以，巨配分函数的对数为

$$\begin{aligned} \ln \Xi &= \ln P(N^*) \\ &= (N_t - yN^* + N^*) \ln(N_t - yN^* + N^*) - (N_t - yN^*) \ln(N_t - yN^*) \\ &\quad - N^* \ln N^* + N^* \beta(\mu - \varepsilon) \end{aligned} \quad (6.2.6)$$

根据统计热力学理论，吸附的 AFPI 分子的平均数由下式给出：

$$N_2 = kT \frac{\partial \ln \Xi}{\partial \mu} = kT \frac{\partial \ln P(N^*)}{\partial \mu}. \quad (6.2.7)$$

由于  $N^*$  是  $\mu$  的函数，所以有

$$\frac{\partial \ln P(N^*)}{\partial \mu} = \left. \frac{\partial \ln P(N^*)}{\partial \mu} \right|_{N^*} + \frac{\partial \ln P(N^*)}{\partial N^*} \frac{\partial N^*}{\partial \mu}. \quad (6.2.8)$$

由式 (6.2.5) 可知，

$$\frac{\partial \ln P(N^*)}{\partial N^*} = 0, \quad (6.2.9)$$

由式 (6.2.6), 易知

$$\left. \frac{\partial \ln P(N^*)}{\partial \mu} \right|_{N^*} = N^* \beta. \quad (6.2.10)$$

将 (6.2.8), (6.2.9) 和 (6.2.10) 代入 (6.2.7), 最后得到吸附于冰晶表面的 AFPI 的分子个数  $N_2$  为

$$N_2 = N^*. \quad (6.2.11)$$

由式 (6.2.5), 得到吸附的 AFPI 分子个数  $N_2$  与冰晶表面总的格点个数  $N_t$  的关系表达式为

$$-y \ln \left( \frac{N_t - yN_2 + N_2}{N_t - yN_2} \right) + \ln \left( \frac{N_t - yN_2 + N_2}{N_2} \right) = -\frac{(\mu - \varepsilon)}{kT}. \quad (6.2.12)$$

与第二章的覆盖度的定义相似, 我们定义吸附的  $N_2$  个 AFPI 分子覆盖的格点个数与可供吸附的冰晶表面总的格点个数  $N_t$  之比为覆盖度, 用  $\theta$  表示, 则有

$$\theta = \frac{yN_2}{N_t}, \quad (6.2.13)$$

将 (6.2.13) 代入 (6.2.12), 得到与覆盖度  $\theta$  有关的方程, 其表达式为

$$-y \ln \left( \frac{1 - \theta + \theta/y}{1 - \theta} \right) + \ln \left( \frac{1 - \theta + \theta/y}{\theta/y} \right) = -\frac{(\mu - \varepsilon)}{kT}. \quad (6.2.14)$$

### § 6.2.2 热滞温度与覆盖度的关系

在我们的模型中, 认为 AFPI 分子的一个由 11 个氨基酸组成的重复片段占据一个位点, 所以组成冰晶表面的冰分子的个数远大于其表面可供吸附的格点个数, 计算过程中, 认为组成冰晶表面的冰分子的个数  $N_1$  与冰晶表面可供 AFPI 吸附的格点的个数  $N_t$  的比值为  $A$ , 则组成表面冰晶的冰分子的个数为  $N_1 = A N_t$ .

下面的分析与第二章类似.

当温度处于平衡温度  $T_e$  时, 无 AFPI 吸附, 仅有水分子吸附, 系统的自由能的表达式与第二章相同, 为

$$F_0 = -kT_e \ln \Omega_1 + N_1 \varepsilon_1 + N_0 (-h\gamma), \quad (6.2.15)$$

其中, 各参数的意义及表达形式与第二章 (2.2.15) 中参数的意义相同, 此处不再重复.

当温度  $T$  小于平衡温度  $T_e$  时, 有  $N_2$  个 AFPI 分子吸附,  $N_3$  个水分子吸附, 则系统的能量为

$$E = N_1 \varepsilon_1 + N_2 \varepsilon + N_3 (-h\gamma), \quad (6.2.16)$$

其中, 各参数代表的意义与第二章 (2.2.16) 中参数的意义相同.

由于 AFPI 分子在冰晶表面的吸附沿一定的方向, 所以  $N_2$  个 AFPI 分子吸附的微观状态数为

$$\Omega_2 = C_{N_1}^{N_2} = \frac{(N_1 - yN_2 + N_2)!}{(N_1 - yN_2)! N_2!}. \quad (6.2.17)$$

$N_3$  个水分子吸附的微观状态数为

$$\Omega_3 = C_{N_1 - \sigma N_2}^{N_3} = \frac{(N_1 - \sigma N_2)!}{N_3! (N_1 - \sigma N_2 - N_3)!}, \quad (6.2.18)$$

其中, 各参数的意义与第二章 (2.2.18) 中参数的意义相同.

所以, 系统的自由能为

$$F = -kT \ln \Omega_2 - kT \ln \Omega_3 + N_1 \varepsilon_1 + N_2 \varepsilon - N_3 h\gamma \quad (6.2.19)$$

根据第二章中的计算, 水分子在冰晶表面的覆盖度为 1, 所以有  $N_0 = N_1$ ,  $N_3 = N_1 - \sigma N_2$ , 同时,  $\Omega_1 = 1$ ,  $\Omega_3 = 1$ .

利用 Stirling 近似, 同时用分子的摩尔数来代替分子个数, 用 (6.2.19) 减去 (6.2.15), 得到 AFPI 吸附导致的自由能的增加为

$$\begin{aligned} \Delta F &= -RT[(n_1 - yn_2 + n_2) \ln(n_1 - yn_2 + n_2) - (n_1 - yn_2) \ln(n_1 - yn_2) \\ &\quad - n_2 \ln n_2] + n_2 \varepsilon + \sigma n_2 h\gamma \\ &= -RT \left[ (n_1 - yn_2) \ln \left( \frac{n_1 - yn_2 + n_2}{n_1 - yn_2} \right) + n_2 \ln \left( \frac{n_1 - yn_2 + n_2}{n_2} \right) \right] \\ &\quad + n_2 \varepsilon + \sigma n_2 h\gamma \end{aligned} \quad (6.2.20)$$

由覆盖度的定义式 (6.2.13), 得到

$$\Delta F = -n_1 RT \left[ (1 - \theta) \ln \left( \frac{1 - \theta + \theta/y}{1 - \theta} \right) + (\theta/y) \ln \left( \frac{1 - \theta + \theta/y}{\theta/y} \right) \right] + n_1 \theta (\sigma h\gamma + \varepsilon)/y. \quad (6.2.21)$$

跟第二章的分析相同, 生长的冰晶的吉布斯函数变化为两部分之和: 冰晶本身的吉布斯函数变化和由于 AFPI 分子吸附引起的自由能变化之和. 所以系统总的吉布斯函数变化为

$$\begin{aligned}\Delta G &= -n_l \Delta g + \Delta F = -(n_l/0.075)\lambda \Delta T/T_e + \Delta F \\ &= -(An_l/0.075)\lambda \Delta T/T_e + \Delta F\end{aligned}\quad (6.2.22)$$

其中, 各参数的意义与第二章 (2.2.32) 中参数的意义相同。

将 (6.2.21) 代入 (6.2.22), 同时由  $\Delta G=0$ , 最后得到热滞温度的表达式为

$$\Delta T = \frac{-RT_e \left[ y(1-\theta) \ln \left( \frac{1-\theta+\theta/y}{1-\theta} \right) + \theta \ln \left( \frac{1-\theta+\theta/y}{\theta/y} \right) \right] + \theta(\sigma h \gamma + \varepsilon)}{yA\lambda/(0.075T_e) - R \left[ y(1-\theta) \ln \left( \frac{1-\theta+\theta/y}{1-\theta} \right) + \theta \ln \left( \frac{1-\theta+\theta/y}{\theta/y} \right) \right]}. \quad (6.2.23)$$

AFPI 分子的化学势由第四章理论结果 (4.2.8) 式给出, 为

$$\mu = -RT \left[ \ln(n_l/n-1) - 1/(1-n/n_l) + x \ln(z-1) + x \ln(1-xn/n_l) - x^2 n/(n_l - xn) \right] + \varepsilon_0, \quad (6.2.24)$$

其中,  $T=T_e-\Delta T$ , 各参数的意义与第四章 (4.2.8) 中的意义相同。

(6.2.14), (6.2.23) 和 (6.2.24) 联立组成关于  $\Delta T$ ,  $\theta$  和  $\mu$  的三元方程组, 求解该方程组, 解出热滞温度  $\Delta T$ 。

### § 6.3 计算结果与讨论

由于 AFP9 分子由 4 个 11 个氨基酸组成的重复片段构成, 所以  $y=4[109]$ ; HPLC-6 由 3 个 11 个氨基酸组成的重复片段构成, 因此,  $y=3[15-17]$ ; AAAA2kE 和 VVVV2kE 的结构与 HPLC-6 相同, 均由 3 个 11 个氨基酸组成的重复片段构成, 所以对于这两种分子, 同样有  $y=3[17,122]$ 。

组成冰晶表面冰分子的个数  $N_l$  与冰晶表面可供 AFPI 吸附的格点的个数  $N_t$  的比值为  $A$ , 每个 AFPI 分子可覆盖的表面冰分子的个数用其分子量与水分子分子量的比值来给出,  $\chi=M/18$ ,  $M$  为 AFPI 分子的分子量; 每个 AFPI 覆盖的格点个数为  $y$ , 所以有  $A=\chi/y$ , 也就是  $yA=\chi$ 。

化学势表达式 (6.2.24) 中, 由于 AFPI 溶液很稀, 所以用水的浓度 55mol/L 近似代替溶液的浓度, 由于溶液模型为二维模型, 所以  $z=4$ 。与冰晶的相互作用能的值由第五章的计算结果表 5.3.1 中给出。计算过程中用到其它各参数的值由表 6.3.1 给出: 其中, VVVV2kE 在水溶液中与水的相互作用能的取值与 HPLC-6 与水的相互作用能的值相同, 这是因为, 实验观测发现 VVVV2kE 溶液与 HPLC-6 溶液的性质没有明显的差别[15,122]; 其它参数的

取值前面几章中都有介绍，这里不再重复。

表 6. 3. 1 计算过程中用到的参数列表.

Table 6.3.1 The parameters in the calculation of thermal hysteresis temperatures.

|         | $\chi$ | $y$ | $\sigma$ | $x$ | $\varepsilon_0(\text{kcal/mol})$ | $\varepsilon(\text{kcal/mol})$ |
|---------|--------|-----|----------|-----|----------------------------------|--------------------------------|
| AFP9    | 244    | 4   | 7        | 20  | 9.5                              | -6.1                           |
| HPLC-6  | 183    | 3   | 4        | 15  | 7.8                              | -5.1                           |
| AAAA2kE | 183    | 3   | 4        | 15  | 8.0                              | -3.3                           |
| VVVV2kE | 183    | 3   | 4        | 15  | 7.8                              | -3.5                           |

图 6.3.1-6.3.4 给出了 AFP9, HPLC-6, AAAA2kE 和 VVVV2kE 的热滞温度随浓度的变化关系曲线. 为便于分析比较, 图中还同时给出了第二章的理论曲线及实验结果.

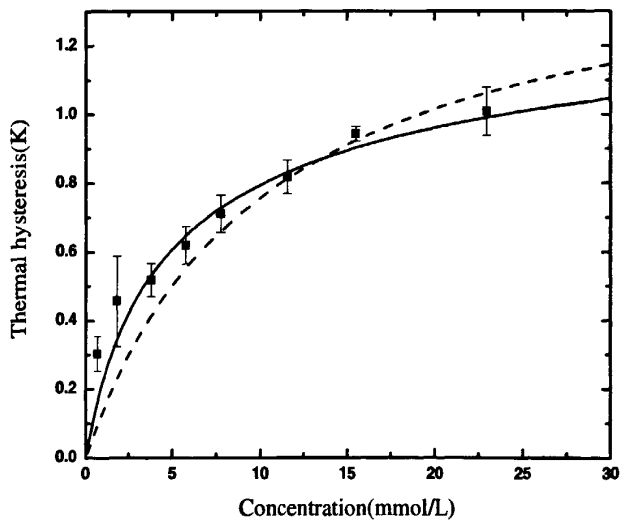


图 6. 3. 1 AFP9 的热滞温度随其浓度的变化关系. 考虑了吸附方向性(实线), 不考虑吸附方向性(虚线), 实验结果 [109] 用 ■表示.

Fig. 6.3.1 The thermal hysteresis temperature of AFP9 as a function of AFP concentration with adsorption orientation (solid line), without adsorption orientation (dashed line), and the experimental data[109] are given as ■.

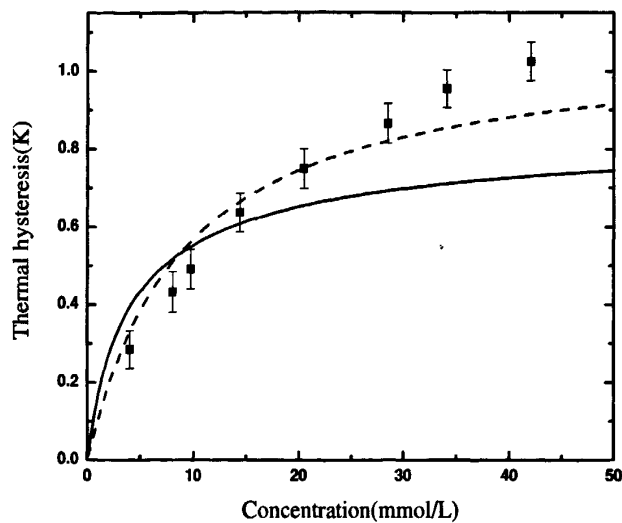


图 6.3.2 HPLC-6 的热滞温度随其浓度的变化关系。考虑了吸附方向性 (实线), 不考虑吸附方向性 (虚线), 实验结果[2]用■表示。

Fig. 6.3.2 The thermal hysteresis temperature of HPLC-6 as a function of AFP concentration with adsorption orientation (solid line), without adsorption orientation (dashed line), and the experimental data[2] are given as ■.

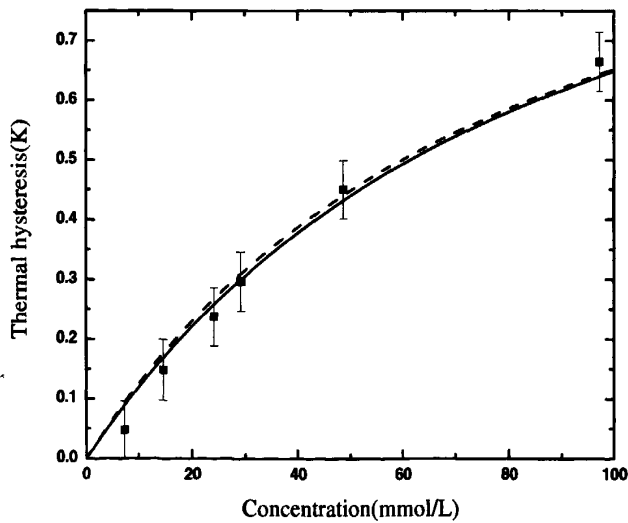


图 6.3.3 AAAA2kE 的热滞温度随其浓度的变化关系。考虑了吸附方向性 (实线), 不考虑吸附方向性 (虚

线), 实验结果 [2] 用 ■ 表示.

Fig. 6.3.3 The thermal hysteresis temperature of AAAA2kE as a function of AFP concentration with adsorption orientation (solid line), without adsorption orientation (dashed line), and the experimental data[2] are given as ■.

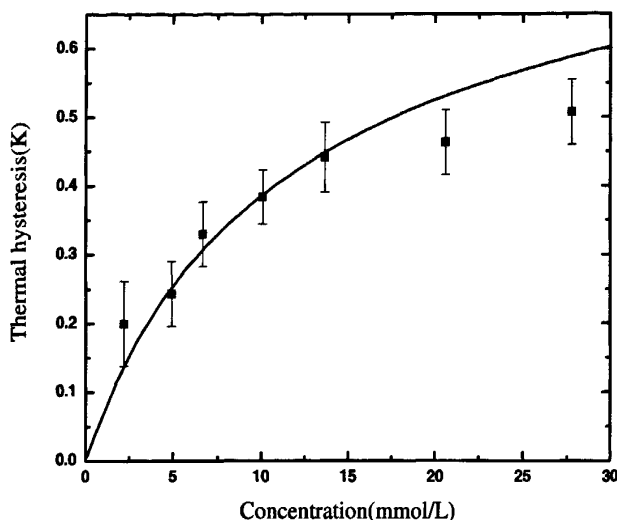


图 6.3.4 VVVV2kE 的热滞温度随其浓度的变化关系, 实验结果 [2] 用 ■ 表示.

Fig. 6.3.4 The thermal hysteresis temperature of VVVV2kE as a function of AFP concentration, and the experimental data[2] are given as ■.

从图 6.3.1-6.3.3 可以很容易看出, 计入了吸附方向性的热滞温度 (实线) 比不考虑吸附方向性影响的热滞温度 (虚线) 的值略小. 这是因为 AFPI 分子的热滞活性主要是由其分子在冰晶表面的吸附覆盖引起的, 因此, AFPI 在冰晶表面的覆盖度  $\theta$  的大小对热滞温度影响很大, 覆盖度越大, 其热滞温度越大. 计入了吸附方向性后, AFPI 分子在冰晶表面的覆盖度小于不计入吸附方向性时的覆盖度的值, 所以导致其热滞温度变小. 覆盖度对热滞温度的大小起着决定性的作用, 故下面讨论 AFPI 分子可覆盖的格点个数  $y$ , AFPI 的化学势及其与冰晶的相互作用能对覆盖度的影响. 以 HPLC-6 为例, 图 6.3.5 给出了吸附方向性对 AFPI 在冰晶表面的覆盖度的影响; 图 6.3.6 分别给出了 AFPI 分子的化学势, AFPI 分子与冰晶的相互作用能对其在冰晶表面的覆盖度的影响.

图 6.3.5 给出了 HPLC-6 在冰晶表面的覆盖度随浓度的变化曲线, 虚线表示不计入吸附方向性 (即  $y=1$ ) 的情形, 由第二章中的 (2.2.6) 式给出. 从图中看出, 当溶液浓度很低时,

考虑了吸附方向性的覆盖度（实线）大于不考虑吸附方向性的情形（虚线）；随浓度的增加，其覆盖度（实线）小于不计入吸附方向性的结果（虚线）。这是因为，随着 AFPI 分子的吸附，多个连续的  $y$  个格点被占据，这样使得吸附的 AFPI 分子分布的微观状态数较单位吸附（虚线）变小，从而使得覆盖度随浓度的增加而逐渐变小。由于覆盖度的变小，使得热滞温度比不考虑吸附方向性时的热滞温度要小，如图 6.3.1-6.3.3 所示。

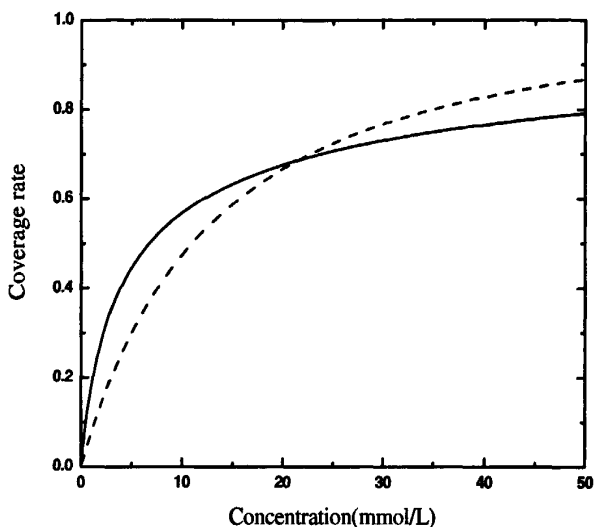


图 6.3.5 HPLC-6 在冰晶表面的覆盖度随浓度的变化关系，计入吸附方向性（实线）和不考虑吸附方向性的结果（虚线）。

Fig. 6.3.5 Coverage rates of HPLC-6 as functions of AFP concentration with adsorption orientation (solid line), and without adsorption orientation (dashed line).

从图 6.3.6 (a) 可以知道，覆盖度随 AFPI 与冰晶的相互作用能的增大而增大。这是因为 AFPI 分子与冰晶的相互作用能的增大，意味着 AFPI 与冰晶间的吸引相互作用变强，就更容易吸附，从而导致覆盖度增大；覆盖度增大，最后导致热滞温度增大，也就是说，热滞温度随相互作用能的增大而增大，如第二章中图 2.3.2 结果所示。图 6.3.6 (b) 显示，覆盖度随溶液中 AFPI 分子与水分子间的疏水作用能的增大而增大。从化学势的表达式 (6.2.24) 看出，AFPI 分子与水分子间的疏水作用能越大，化学势越大；疏水作用越大，AFPI 分子越难溶于水，也就越易于在冰晶表面吸附，也就是说，化学势越大，越易于吸附，覆盖度越大，最后热滞温度也就必然越大；与第二章图 2.3.1 的结果一致，热滞温度随化学势增加而增大。

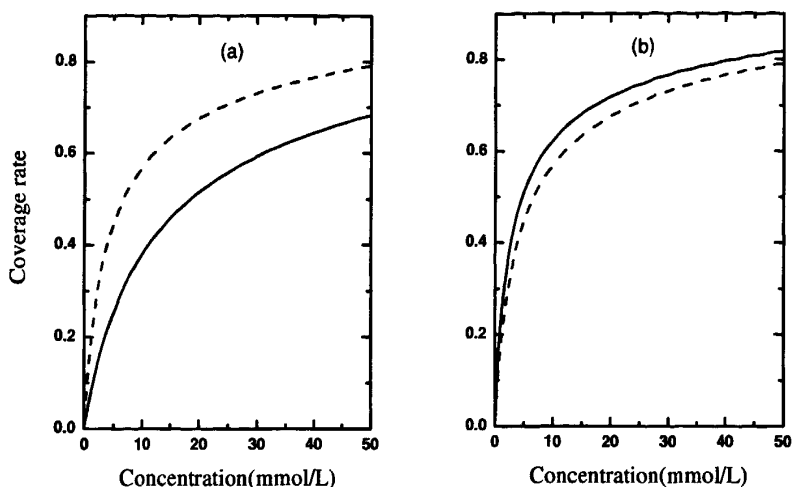


图 6.3.6 HPLC-6 覆盖度随浓度的变化关系: (a) AFPI 分子与冰晶的相互作用能为  $-4.5\text{kcal/mol}$  (实线),  $-5.1\text{kcal/mol}$  (虚线); (b) AFPI 分子与水分子间的疏水作用能为  $8.0\text{kcal/mol}$  (实线),  $7.8\text{kcal/mol}$  (虚线).

Fig. 6.3.6 Coverage rates of HPLC-6 as functions of AFP concentration: (a) the AFPI-ice interaction energy are  $-4.5\text{kcal/mol}$  (solid line), and  $-5.1\text{kcal/mol}$  (dashed line); (b) the AFPI-water hydrophobic interaction energy are  $8.0\text{kcal/mol}$  (solid line), and  $7.8\text{kcal/mol}$  (dashed line), respectively.

从图 6.3.6 可以知道, 覆盖度受到 AFPI 分子的化学势和其与冰晶的相互作用能两者的共同影响. 当化学势相同或相差无几时, 相互作用能的影响占主要地位, 例如 HPLC-6, AAAA2kE 和 VVVV2kE, HPLC-6 的化学势与 VVVV2kE 相同, 而 HPLC-6 与冰晶的相互作用能大于 VVVV2kE 与冰晶的相互作用能, 所以 HPLC-6 的热滞温度大于 VVVV2kE 的热滞温度, 如图 6.3.2 和 6.3.4 所示; 虽然 AAAA2kE 化学势略大于 HPLC-6 和 VVVV2kE, 但是其与冰晶的相互作用能却远小于后面二者, 导致前者热滞温度小于 HPLC-6 和 VVVV2kE 的热滞温度, 如图 6.3.2-6.3.4 所示. 该结论与实验结果一致.

## § 6.4 结论

本章在第二章的统计力学模型的理论基础上, 计入了 AFPI 分子在冰晶表面吸附的方向

性的影响，重新给出了热滞温度与覆盖度关系的解析表达式，讨论了热滞温度随浓度的变化关系。以几种 AFPI 为例，计算了其热滞温度随浓度的变化关系，同时与不考虑吸附方向性的理论结果及实验结果进行了比较，发现计入吸附方向性后与实验结果符合更好。同时，还以 HPLC-6 为例，讨论了吸附方向性，AFPI 分子化学势及其与冰晶的相互作用能对覆盖度的影响，得出结论：计入吸附方向性使得 AFPI 分子的覆盖度变小，从而热滞温度变小；覆盖度随 AFPI 分子的化学势的增大而增大，从而热滞温度随化学势的增大而增大；覆盖度随 AFPI 分子与冰晶的相互作用能的增大而增大，从而使得其热滞温度随相互作用能的增大而增大。解释了第二章中 AFPI 分子化学势及其与冰晶的相互作用能的大小对热滞温度大小的影响。

## 第七章 总结

本文利用统计力学和统计热力学理论,建立了适用于分析 AFPI 热滞活性的统计力学模型.利用格点模型和统计热力学理论,在不计入分子间相互作用的初级近似下,分析了链状蛋白质分子溶液的热力学性质.并在此基础之上,计入 AFPI 分子与水分子间相互作用的影响,研究了 AFPI 溶液的热力学性质,着重讨论了 AFPI 分子的化学势.还计算了 AFPI 分子与冰晶的相互作用能.最后,计入 AFPI 分子吸附方向性的影响,进一步改进了最初建立的统计力学模型.

首先,以 AFPI 分子为例,用统计热力学的理论,认为 AFPI 分子在冰晶表面的吸附为单位吸附,即不考虑吸附方向性的影响,建立了适用于分析其热滞活性的统计力学模型,给出了热滞温度与其在冰晶表面的覆盖度的关系表达式.计算了几种 AFPI 的热滞温度随浓度的变化关系曲线,并与实验结果进行了比较.结果表明,统计力学模型可以很好的应用于 AFPI 热滞活性的计算,理论计算结果与实验结果符合较好;同时发现,热滞温度随抗冻蛋白分子化学势的增大而增大,随其与冰晶间的相互作用能的减小而减小.

用格点模型和统计热力学理论,在不计入分子间相互作用影响的初级近似下,讨论了链状蛋白质分子溶液的热力学性质.结果表明,当溶液很稀时,系统的吉布斯函数随蛋白质浓度的增加而减少,随浓度的增加,吉布斯函数随浓度的增加而增大;蛋白质的化学势随其浓度的增加而增加.系统的吉布斯函数随温度升高而降低;浓度很低时,蛋白质的化学势随温度的升高而降低,随着浓度的增加,其化学势随温度的升高而升高.溶液的热力学性质与蛋白质分子的链长有关:系统吉布斯函数的最小值点随链长的增加向浓度值小的方向移动;浓度很小时,蛋白质化学势随链长增加而降低,当浓度变大时,其化学势随链长增加而升高.即使不计入分子间相互作用的影响,在溶液浓度很低时,溶液的性质也不同于理想溶液,不能用理想溶液模型来简单描述.

在链状蛋白质分子溶液的热力学性质的理论基础上,计入 AFPI 分子与水分子间相互作用的影响,并考虑到 AFPI 溶液为稀溶液的实际情况,研究了 AFPI 溶液的热力学性质,着重分析了 AFPI 分子的化学势,同时还讨论了由于 AFPI 分子的加入导致的溶液冰点温度的降低.结果表明,溶液中 AFPI 分子的化学势随其浓度的增加而增大,水分子的化学势随

AFPI 浓度的增加而减小,从而导致溶液的吉布斯自由能随浓度的增加先减少后增加;由于分子间相互作用能的简单计入,致使溶液的吉布斯函数随浓度的变化关系仅在浓度很低的范围内是合理的;AFPI 化学势随其分子链长的增加而降低,随温度的升高而减小;AFPI 分子的加入导致的溶液冰点温度的降低为依数效应,不同于 AFPI 热滞活性的非依数效应,且该降低值很小,在讨论溶液的热力学性质及 AFPI 热滞活性时通常可忽略。

由于 AFPI 分子与冰晶的相互作用能对其热滞有很重要的作用,接下来计算了 AFPI 分子与冰晶的相互作用能。结果表明,相互作用能的大小与对 AFPI 分子吸附起作用的甲基的个数成正比,个数越多,相互作用能越大,随 AFPI 分子与冰晶间距离的增加而减小。同时,相邻甲基间的排斥作用对 AFPI 分子与冰晶的相互作用能的大小也有影响。最后给出了几种 AFPI 分子与冰晶的相互作用能,并与实验结果进行了比较,发现理论计算与实验结果符合较好。

最后,考虑到 AFPI 分子在冰晶表面吸附具有一定的方向性,计入吸附方向性的影响,改进了统计力学模型理论,重新给出了热滞温度与覆盖度的关系表达式,利用前面给出的化学势及相互作用能的理论值,计算了几种 AFPI 的热滞温度随浓度的变化关系。结果表明,由于计入吸附方向性后的覆盖度略小于不考虑吸附方向性的结果,导致前者的热滞温度也略低于后者。同时发现,覆盖度随化学势的增大而增大,从而导致热滞温度增大;覆盖度随 AFPI 与冰晶的相互作用能增加而增大,导致热滞温度随相互作用能增大而增大。通过与前面的计算结果及实验结果比较,发现计入吸附方向性的理论结果与实验结果符合更好,吸附方向性的影响不能忽略。

总之,利用统计力学和统计热力学理论,建立了适用于分析 AFPI 热滞活性的统计力学模型。同时讨论了链状蛋白质分子溶液及 AFPI 溶液的热力学性质。另外还计算了 AFPI 分子与冰晶的相互作用能。并在考虑 AFPI 吸附方向性的情况下,改进了统计力学模型理论。我们希望本文能对研究抗冻蛋白热滞活性方面的科学工作有一些帮助。

## 参考文献

- [1] A. L. DeVries and D. E. Wohlschlag. Freezing resistance in some Antarctic fishes, *Science*, 1969, 163(3871), 1073-1075
- [2] A. D. J. Haymet, L. G. Ward and M. M. Harding. Hydrophobic analogues of the winter flounder 'antifreeze' protein, *FEBS Lett.*, 2001, 491(3), 285-288
- [3] D. H. Nguyen, M. E. Colvin, Y. Yeh, R. E. Feeney and W. H. Fink. The dynamics, structure, and conformational free energy of proline-containing antifreeze glycoprotein, *Biophys. J.*, 2002, 82(6), 2892-2905
- [4] S. R. Inglis, M. J. McGann, W. S. Price and M. M. Harding. Diffusion NMR studies on fish antifreeze proteins and synthetic analogues, *FEBS Lett.*, 2006, 580(16), 3911-3915
- [5] P. L. Davies and B. Sykes. Antifreeze proteins, *Current Opinion in Structural Biology*, 1997, 7(6), 828-834
- [6] V. Robles, V. Barbosa, M. P. Herráez, S. Martínez-Páramo and M. L. Cancela. The antifreeze protein type I (AFPI) increases seabream (*Sparus aurata*) embryos tolerance to low temperatures, *Theriogenology*, 2007, 68(2), 284-289
- [7] Y. C. Liou, A. Tocilj, P. L. Davies & Z. C. Jia. Mimicry of ice structure by surface hydroxyls and water of a  $\beta$ -helix antifreeze protein, *Nature*, 2000, 406, 322-324
- [8] R. Dhawan, S. Joseph, A. Sethi, A. K. Lala. Purification and characterization of a short insect toxin from the venom of the scorpion *Buthus tamulus*, *FEBS Letters*, 2002, 528(1), 261-266
- [9] S. P. Graether and B. D. Sykes. Cold survival in freeze-intolerant insects: The structure and function of  $\beta$ -helical antifreeze proteins, *Eur. J. Biochem.*, 2004, 271, 3285-3296
- [10] E. K. Leinala, P. L. Davies, D. Doucet, M. G. Tyshenko, V. K. Walker, and Z. C. Jia. A  $\beta$ -Helical Antifreeze Protein Isoform with Increased Activity, *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(36), 33349-33352
- [11] D. Q. Zhang, B. Liu, D. R. Feng, Y. M. He and J. F. Wang. Expression, purification, and

- antifreeze activity of carrot antifreeze protein and its mutants, *Protein expression and purification*, 2004, 35(2), 257-263
- [12] M. E. Urrutia, J. G. Duman, C. A. Knight. Plant thermal hysteresis proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, 1121(1-2), 199-206
- [13] M. Antikainen, M. Griffith. Antifreeze protein accumulation in freezing tolerant cereals, *Physiol. Plantarum*, 1997, 99(3), 423-432
- [14] J. A. Gilbert, P. J. Hill, C. E. R. Dodd & J. Laybourn-Parry. Demonstration of antifreeze protein activity in Antarctic lake bacteria, *Microbiology*, 2004, 150, 171-180
- [15] E. Kristiansen and K. E. Zachariassen. The mechanism by which fish antifreeze proteins cause thermal hysteresis, *Cryobiology*, 2005, 51(3), 262-280
- [16] Y. Yeh and R. E. Feeney. Antifreeze proteins: Structures and mechanisms of function, *Chem. Rev.*, 1996, 96(2), 601-618
- [17] A. Jorov, B. S. Zhorov and D. S. C. Yang. Theoretical study of interaction of winter flounder antifreeze protein with ice, *Protein Science*, 2004, 13(6), 1524-1537
- [18] H. K. Khanna and G. E. Daggard. Targeted expression of redesigned and codon optimised synthetic gene leads to recrystallisation inhibition and reduced electrolyte leakage in spring wheat at subzero temperatures, *Plant Cell Rep.*, 2006, 25(12), 1336-1346
- [19] M. Giffith and K. V. Ewart. Antifreeze proteins and their potential use in frozen foods, *Biotechnol. Adv.*, 1995, 13, 375-402
- [20] G. Breton, J. Danyluk, F. Ouellet and F. Sarhan. Biotechnological applications of plant freezing associated proteins, *Biotechnol. Annu. Rev.*, 2000, 6, 59-101
- [21] B. Rubinsky, A. Arav and A. L. Devries. The cryoprotective effect of antifreeze glycopeptides from Antarctic fishes, *Cryobiology*, 1992, 29(1), 69-79
- [22] B. Li, and D. W. Sun. Novel methods for rapid freezing and thawing of foods—a review, *J. Food Eng.*, 2002, 54(3), 175-182
- [23] C. Hew, R. Poon, F. Xiong, S. Gauthier, M. Shears, M. King, P. Devies, and G. Fletcher. Liver-specific and seasonal expression of transgenic Atlantic salmon harboring the winter flounder antifreeze protein gene, *Transgenic Res.*, 1999, 8(6), 405-414
- [24] R. M. S. Cruz, M. C. Vieira, C. L. M. Silva. The response of watercress (*Nasturtium officinale*) to vacuum impregnation: effect of an antifreeze protein type I, *Journal of Food*

Engineering, 2009, 95, 339-345

- [25] S. Martínez-Páramo, V. Barbosa, S. Pérez-Cereales, V. Robles, M. P. Herráez. Cryoprotective effects of antifreeze proteins delibered into zebrafish embryos, *Cryobiology*, 2009, 58, 128-133
- [26] S. P. Graether, C. M. Slupsky and B. D. Sykes. Freezing of a fish antifreeze protein results in amyloid fibril formation, *Biophysical Journal*, 2003, 84, 552-557
- [27] G. L. Fletcher, C. L. Hew and P. L. Davies. Antifreeze proteins of teleost fishes, *Annu. Rev. Physiol.*, 2001, 63, 359-390
- [28] L. DeVries. Glycoproteins as biological antifreeze agents in Antarctic fish, *Science*, 1971, 172(3988), 1152-1155
- [29] J. A. Raymand, A. L. DeVries. Freezing behavior of fish blood glycoproteins with antifreeze properties, *Cryobiology*, 1972, 9(6), 541-547
- [30] R. E. Feeney, T. S. Burcham and Y. Yeh. Antifreeze glycoprotein from polar fish blood, *Ann. Rev. Biophys. Chem.*, 1986, 15, 59-78
- [31] F. Sicheri, D. S. C. Yang. Ice-binding structure and mechanism of an antifreeze protein from winter flounder, *Nature*, 1995, 375, 427-431
- [32] Y. Tachibana, G. L. Fletcher, N. Fujitani, S. Tsuda, K. Monde and S.-I. Nishimura. Antifreeze glycoproteins: Elucidation of the structural motifs that are essential for antifreeze activity, *Angewandte Chemie International Edition*, 2004, 43(7), 856-862
- [33] W. K. Low, M. Miao, K. V. Ewart, D. S. Yang, G. L. Fletcher and C. L. Hew. Skin-type antifreeze protein from the shorthorn sculpin, *J. Biol. Chem.*, 1998, 273(36), 23098-23103
- [34] A. N. Lane, L. M. Hays, N. Tsvetkova, R. E. Feeney, L. M. Crowe and J. H. Crowe. Comparison of the solution conformation and dynamics of antifreeze glycoproteins from Antarctic fish, *Biophysical Journal*, 2000, 78, 3195-3207
- [35] S. P. Graether, C. M. Slupsky, P. L. Davies and B. D. Sykes. Structure of type I antifreeze protein and mutants in supercooled water, *Biophysical Journal*, 2001, 81, 1677-1683
- [36] M. H. Margaret, G. W. Leanne and A. D. J. Haymet. Type I 'antifreeze' proteins: structure-activity studies and mechanisms of ice growth inhibition, *Eur. J. Biochem.*, 1999, 264(3), 653-665
- [37] Z. Gong, K. V. Ewart and G. L. Fletcher. Skin antifreeze protein genes of the winter

- p flounder, encode distinct and active polypeptides without the secretory signal and prosequences,
- J. Biol. Chem.*
- , 1996, 271, 4106-4112
- [38] F. D. Sonnichsen, B. D. Sykes and P. L. Davies. Comparative modeling of the three dimensional structure of type II antifreeze protein, *Protein Sci.*, 1995, 4(3), 460-471
- [39] P. Duncker, S. Y. Gauthier and P. L. Davies. Evidence for a proprotein intermediate during maturation of type II antifreeze protein in sea raven, *Hemitripterus americanus*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1996, 1292(2), 312-316
- [40] Y. Yamashita, R. Miura, Y. Takemoto, S. Tsuda, H. Kawahara, H. Obata. Type II antifreeze protein from a mid-latitude freshwater fish, Japanese Smelt (*Hypomesus nipponensis*), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2003, 67(3), 461-466
- [41] W. Gronwald, M. C. Loewen, B. Lix, A. J. Daugulis, F. D. Sönnichsen, P. L. Davies, B. D. Sykes. The solution structure of type II antifreeze protein reveals a new member of the lectin family, *biochemistry*, 1998, 37(14), 4712-4721
- [42] F. D. Sönnichsen, C. I. Deluca, P. L. Davies, B. D. Sykes. Refined solution structure of type III antifreeze protein: hydrophobic groups may be involved in the energetics of the protein-ice interaction, *Structure*, 1996, 4(11), 1325-1337
- [43] D. Yang, W. Hon, S. Bubanko, Y. Xue, J. Seetharaman, C. Hew, F. Sicheri. Identification of the ice-binding surface on a type III antifreeze protein with a “flatness function” algorithm, *Biophys. J.*, 1998, 74(5), 2142-2151
- [44] S. P. Graether, C. I. DeLuca, J. Baardsnes, G. A. Hill, P. L. Davies and Z. C. Jia. Quantitative and qualitative analysis of type III antifreeze protein structure and function, *J. Boil. Chem.*, 1999, 274(17), 11842-11847
- [45] L. A. Graham, Y. C. Liou, V. K. Walker, P. L. Davies. Hyperactive antifreeze protein from beetles, *Nature*, 1997, 388, 727-728
- [46] W. S. Qin, M. G. Tyshenko, D. Doucet, V. K. Walker. Characterization of antifreeze protein gene expression in summer spruce budworm larvae, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 36(3), 210-218
- [47] W. S. Qin, V. K. Walker. *Tenebrio molitor* antifreeze protein gene identification and regulation, *Gene*, 2006, 367, 142-149
- [48] C. B. Marshall, Margaret E. Daley, B. D. Sykes and P. L. Davies. Enhancing the activity of

- a  $\beta$ -helical antifreeze protein by the engineered additional of coils, *Biochemistry*, 2004, 43(37), 11637-11646
- [49] C. B. Marshall, M. E. Daley, L. A. Graham, B. D. Sykes, P. L. Davies. Identification of the ice-binding face of the antifreeze protein from *Tenebrio molitor*, *FEBS Letters*, 2002, 529(2), 261-267
- [50] E. K. Leinala, P. L. Davies and Z. C. Jia. Crystal structure of  $\beta$ -helical antifreeze protein points to a general ice binding model, *Structure*, 2002, 10(5), 619-627
- [51] K. Liu, Z. C. Jia, G. J. Chen, C. Tung and R. Z. Liu. Systematic size study of an insect antifreeze protein and its interaction with ice, *Biophysical Journal*, 2005, 88(2), 953-958
- [52] N. Pertaya, C. B. Marshall, Y. Celik, P. L. Davies and I. Braslavsky. Direct visualization of Spruce budworm antifreeze protein interaction with ice crystals: basal plane affinity confers hyperactivity, *Biophysical Journal*, 2008, 95(1), 333-341
- [53] C. S. Strom, X. Y. Liu and Z. C. Jia. Why does insect antifreeze protein from *Tenebrio molitor* produce pyramidal ice crystallites, *Biophysical Journal*, 2005, 89(4), 2618-2627
- [54] H. Xu, S. Perumal, X. B. Zhao, N. Du, X. Y. Liu, Z. C. Jia and J. R. Lu. Interfacial adsorption of antifreeze proteins: a neutron reflection study, *Biophysical Journal*, 2008, 94, 4405-4413
- [55] T. Huang and G. D. John. Cloning and characterization of a thermal hysteresis (antifreeze) protein with DNA-binding activity from winter bittersweet nightshade, *Solanum dulcamara*, *Plant Mol. Biol.*, 2002, 48(4), 339-395
- [56] M. J. Kuiper, P. L. Davies and V. K. Walker. A theoretical model of a plant antifreeze protein from *Lolium perenne*, *Biophys. J.*, 2001, 81(6), 3560-3565
- [57] D. J. Simpson, M. Smallwood, S. Twigg, C. J. Doucet, J. Ross, D. Bowles. Purification and characterisation of an antifreeze protein from *Forsythia suspense* (L.), *Cryobiology*, 2005, 51, 230-234
- [58] A. J. Middleton, A. M. Brown, P. L. Davies, V. K. Walker. Identification of the ice-binding face of a plant antifreeze protein, *FEBS Letters*, 2009, 583, 815-819
- [59] J. D. Schrag, S. M. Gray and A. L. DeVries. Relationship of amino acid composition and molecular weight of antifreeze glycopeptide to non-colligative freezing point depression, *Biochemical et Biophysica Acta*, 717(2), 1982, 322-326

- [60] R. E. Feeney and R. Hofmann. Depression of freezing point by glycoproteins from an Antarctic fish, *Nature*, 1973, 243, 357-359
- [61] T. S. Burcham, D. T. Osuga and Y. A. Yeh. Kinetic description of antifreeze glycoprotein activity, *J. Biol. Chem.*, 1986, 261, 6390-6397
- [62] Q. Z. Li and L. F. Luo. A study of the growth rate and growth habits of ice crystals in a solution of antifreeze (glyco)proteins, *Chem. Phys. Lett.*, 1996, 263(5), 651-654
- [63] R. E. Feeney and W. Fink. Investigation of the differential affinity of antifreeze glycoprotein for single crystal of ice, *Journal of crystal growth*, 1991, 113(3-4), 417-429
- [64] P. W. Wilson, M. Gould and A. L. DeVries. Hexagonal shaped ice spicules in frozen antifreeze protein solutions, *Cryobiology*, 2002, 44(3), 240-250
- [65] S. Grandum, A. Yabe, K. Nakagomi, M. Tanaka, F. Takemura, Y. Kobayashi, P-E. Frivik. Analysis of ice crystal growth for a crystal surface containing adsorbed antifreeze proteins, *Journal of crystal Growth*, 1999, 205(3), 382-390
- [66] T. Inada, A. Yabe, S. Grandum, T. Saito. Control of molecular-level ice crystallization using antifreeze protein and silane coupling agent, *Materials Science and Engineering A*, 2000, 292(2), 149-154
- [67] D. F. Eggers, N. W. Gregory, G. D. Halsey, B. S. Rabinovitch. *Physical chemistry*, 1964, John Wiley & Sons: New York NY
- [68] P. J. Flory. *Principles of polymer chemistry*, 1953, Cornell Univ. press, Ithaca, New York
- [69] P. V. Hobbs. *Ice physics*, 1974, Clarendon Press, Oxford
- [70] J. A. Raymond and A. L. Devries. Adsorption inhibition as a mechanism of freezing resistance in polar fishes, *Proc. Natl. Sci. USA*, 1977, 74(6), 2589-2593
- [71] C. A. Knight, C. C. Cheng and A. L. Devries. Adsorption of  $\alpha$ -helical antifreeze peptides on specific ice crystal surface planes, *Biophys. J.*, 1991, 59(2), 409-418
- [72] C. A. Knight and A. Wierzbicki. Adsorption of biomolecules to ice and their effects upon ice growth. 2. A discussion of the basic mechanism of 'antifreeze' phenomena, *Cryst. Growth. Des.*, 2001, 1(6), 439-446
- [73] Q. Z. Li and L. F. Luo. The kinetic theory of thermal hysteresis of a macromolecule solution, *Chemical Physics Letters*, 1993, 216(3,4,5,6), 453-457
- [74] Q. Z. Li and L. F. Luo. Further discussion on the thermal hysteresis of the ice growth

- inhibitor, *Chemical Physics Letters*, 1994, 223(3), 181-184
- [75] J.C. Brice. *The growth of crystals from liquids*, 1973, north-Holland, Amsterdam, p.78
- [76] L. M. Sander, A. V. Tkachenko. Kinetic pinning and biological antifreezes, *P. R. L.*, 2004, 93(12), 128102-1-4
- [77] J. J. Liu, Q. Z. Li. A theoretical model on thermal hysteresis activity of the winter flounder protein 'HPLC-6', *Chemical Physics Letters*, 2003, 378(3-4), 238-243
- [78] Q. Z. Li, Y. Yeh, J. J. Liu, R. E. Feeney, V. V. Krishnan. A two-dimensional adsorption kinetic model for thermal hysteresis activity in antifreeze proteins, *The Journal of Chemical Physics*, 2006, 124(20), 204702-204702-8
- [79] J. J. Liu, Q. Z. Li. Theoretical model of antifreeze protein-ice adsorption: Binding of large ligands to a two-dimensional homogeneous lattice, *Chemical Physics Letters*, 2006, 422(1-3), 67-71
- [80] D. Y. Wen and R. A. Laursen. Structure-function relationships in an antifreeze polypeptide, the role of neutral, polar amino acids, *The journal of Biological Chemistry*, 1992, 257(20), 14102-14108
- [81] D. Y. Wen and R. A. Laursen. A D-antifreeze polypeptide displays the same activity as its natural L-enantiomer, *FEBS Lett.*, 1993, 317(1,2), 31-34
- [82] C. I. Deluca, R. Comley and P. L. Davies. Antifreeze proteins binding independently to ice, *Biophysical Journal*, 1998, 74, 1502-1508
- [83] H. Chao, C. I. Deluca, P. L. Davies. Mixing antifreeze protein types changes ice crystal morphology without affecting antifreeze activity, *FEBS Letters*, 1995, 357, 183-186
- [84] J. G. Kirkwood, F. P. Buff. The statistical mechanical theory of solutions. I, *The journal of chemical physics*, 1951, 19(6), 1122-1128
- [85] R. M. Mazo. On the statistical mechanical theory of solutions, *the journal of chemical physics*, 1958, 29(5), 774-777
- [86] T. L. Hill. *Thermodynamics of small systems*, 1962, W. A. Benjamin, Inc., New York
- [87] K. F. Freed. New lattice model for interacting, avoiding polymers with controlled length distribution, *J. Phys. A*, 1985, 18(5), 871-887
- [88] K. F. Freed and J. Dudowicz. Lattice cluster theory for pedestrians: The incompressible limit and the miscibility of polyolefin blends, *Macromolecules*, 1998, 31(19), 6681-6690

- [89] J. Dudowicz, K. F. Freed and J. F. Douglas. Beyond Flory-Huggins theory: New classes of blend miscibility associated with monomer structural asymmetry, *Phys. Rev. Lett.*, 2002, 88(9), 095503-1-4
- [90] J. G. Curro and K. S. Schweizer. Theory of polymer melts: An integral equation approach, *Macromolecules*, 1987, 20(8), 1928-1934
- [91] J. G. Curro and K. S. Schweizer. Integral equation theory for compressible polymer alloys: thermodynamics, scattering, and miscibility of Gaussian chains, *Macromolecules*, 1991, 24(25), 6736-6747
- [92] I. C. Sanchez and R. H. Lacombe. An elementary molecular theory of classical fluids. Pure fluids, *J. Phys. Chem.*, 1976, 80(21), 2352-2362
- [93] I. C. Sanchez and R. H. Lacombe. Statistical thermodynamics of polymer solutions, *Macromolecules*, 1978, 11(6), 1145-1156
- [94] B. Sjöberg, K. Mortensen. Structure and thermodynamics of nonideal solutions of colloidal particles: Investigation of salt-free solutions of human serum albumin by using small-angle neutron scattering and Monte Carlo simulation, *Biophysical Chemistry*, 1997, 65, 75-83
- [95] X. Y. Li and D. L. Zhao. Statistical thermodynamics of lattice polymer fluid, *J. Chem. Phys.*, 2002, 117(14), 6803-6809
- [96] J. M. Prausnitz. Molecular thermodynamics for some applications in biotechnology, *J. Chem. Thermodynamics*, 2003, 35, 21-39
- [97] G. Graziano. Solvation thermodynamics in a van der Waals liquid, *Thermochimica Acta*, 2003, 399, 181-187
- [98] D. Y. Wen and R. A. Laursen. A model for binding of an antifreeze polypeptide to ice, *Biophys. J.*, 1992, 63(6), 1659-1662
- [99] M. C. Loewen, H. Chao, M. E. Houston, J. Baardsnes, R. S. Hodges, C. M. Kay, B. D. Sykes, F. D. Sönnichsen and P. L. Davies. Alternative roles for putative ice-Binding residues in type I antifreeze protein, *Biochemistry*, 1999, 38(15), 4743-4749
- [100] C. A. Knight, A. L. DeVries and L. D. Oolman. Fish antifreeze protein and the freezing and recrystallization of ice, *Nature*, 1984, 308, 295-296
- [101] A. L. DeVries, S. K. Komatsu, R. E. Feeney. Chemical and physical properties of freezing point-depressing glycoproteins from Antarctic fishes, *J. Biol. Chem.*, 1970, 245(11),

2901-2908

- [102] K. C. Chou. Energy-optimized structure of antifreeze protein and its binding mechanism, *J. Mol. Biol.*, 1992, 223(2), 509-517
- [103] A. Chakrabartty, V. S. Ananthanarayanan and C. L. Hew. Structure-function relationships in a winter flounder antifreeze polypeptide: I. Stabilization of an alpha-helical antifreeze polypeptide by charged-group and hydrophobic interactions, *Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(19), 11307-11312
- [104] A. Saxena, A. M. G. Redman, X. L. Jiang, O. Lockridge and B. P. Doctor. A diminished role for hydrogen bonds in antifreeze protein binding to ice, *Biochemistry*, 1997, 36 (48), 14652-14660
- [105] E. Baruch, A. M. Belostotskii, Y. Mastai. Relationship between the antifreeze activities and the chemical structures of polyols, *Journal of Molecular Structure*, 2008, 874(1-3), 170-177
- [106] J. Baardsnes, L. H. Kondejewski, R. S. Hodges, H. Chao, C. Kay, P. L. Davies. New ice-binding face for type I antifreeze protein, *FEBS Letters*, 1999, 463(1), 87-91
- [107] Z. C. Jia, P. L. Davies. Antifreeze proteins: an unusual receptor-ligand interaction, *Trends Biochem Sci*, 2002, 27, 101-106.
- [108] M. E. Houston, H. Chao, R. S. Hodges, B. D. Sykes, C. M. Kay, F. D. Sönnichsen, M. C. Loewen and P. L. Davies. Binding of an oligopeptide to a special plane of ice, *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(19), 11714-11718
- [109] H. Chao, R. S. Hodges, C. M. Kay, S. Y. Gauthier and P. L. Davies. A natural variant of Type I antifreeze protein with four ice-binding repeats is a particularly potent antifreeze, *Protein Science*, 1996, 5(6), 1150-1156
- [110] A. L. Cheng and K. M. Merz. Ice-binding mechanism of winter flounder antifreeze protein, *Biophysical Journal*, 1997, 73(6), 2851-2873
- [111] P. Dalal and F. D. Sönnichsen. Source of ice-binding specificity of antifreeze protein type I, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 2000, 40(5), 1276-1284
- [112] J. Baardsnes, M. Jelokhani-niaraki, L. H. Kondejewski, M. J. Kuiper, C. M. Kay, R. S. Hodges and P. L. Davies. Antifreeze protein from shorthorn sculpin: identification of the ice-binding surface, *Protein Science*, 2001, 10(12), 2566-2576

- [113] J. D. Mardura, K. Baran and A. Wierzbicki. Molecular recognition and binding of thermal hysteresis protein to ice, *J. Mol. Recognit.*, 2000, 13(2), 101-113
- [114] C. I. Deluca, P. L. Davies, Q. Ye and Z. Jia. The effects of steric mutations on the structure of type III antifreeze protein and its interaction with ice, *J. Mol. Biol.*, 1998, 275(3), 515-525
- [115] A. Wierzbicki, P. Dalal, T. E. Cheatham III, J. E. Knickelbein, A. D. J. Haymet and J. D. Madura. Antifreeze proteins at the ice/water interface: three calculated discriminating properties for orientation of type I proteins, *Biophysical Journal*, 2007, 93, 1442-1451
- [116] A L. DeVries. Antifreeze peptides and glycopeptides in cold-water fishes, *Annu. Rev. Physiol.*, 1983, 45, 245-260
- [117] A. Knight, E. Driggers and A. L. Devries. Adsorption to ice of fish antifreeze glycopeptides 7 and 8, *Biophys. J.*, 1993, 64(1), 252-259
- [118] D. S. C. Yang, M. Sax, A. Chakrabarty and C. L. Hew. Crystal structure of antifreeze polypeptide and its mechanistic implications, *Nature*, 1988, 333, 232-237
- [119] H. Jorgensen, H. Matsui, M. Kanaoka, H. Yanagi, Y. Yabussaki and Y. Kikuzono. Molecular dynamics simulations of winter flounder antifreeze protein variants in solution: correlation between side chain spacing and ice lattice, *Protein Engin.*, 1993, 6(1), 19-27
- [120] W. Zhang, R. A. Laursen. Structure-function relationship in a type I antifreeze polypeptide. The role of threonine methyl and hydroxyl groups in antifreeze activity, *J. Biol. Chem.*, 1998, 273(52), 34806-34812
- [121] A. D. J. Haymet, L. G. Ward, M. M. Harding, C. A. Knight. Valine substituted winter flounder 'antifreeze': preservation of ice growth hysteresis, *FEBS Letters*, 1998, 430(3), 301-306
- [122] A. D. J. Haymet, L. G. Ward, M. M. Harding. Winter flounder "antifreeze protein": synthesis and ice growth inhibition of analogues that probe the relative importance of hydrophobic and hydrogen-bonding interaction, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121(5), 941-948
- [123] Y. K. Ann, K. Fairley and P. L. Anderberg. Solution structure of a recombinant type I sculpin antifreeze protein, *Biochemistry*, 2005, 44(6), 1980-1988
- [124] Y. Cheng and A. Kim. Sharp hydrophobic tendency of polar group hydration as a major force in type I antifreeze protein recognition, *Proteins*, 2005, 59(2), 266-274

- [125] J. Baardsnes, P. L. Davies. Contribution of hydrophobic residues to ice binding by fish type III antifreeze protein, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1601(1), 49-54
- [126] M. Lal, A. H. Clark, A. Lips, J. N. Ruddock and D. N. J. White. Inhibition of ice crystal growth by preferential peptide adsorption: A molecular modeling study, *Faraday discuss.*, 1993, 95, 299-306
- [127] G. J. Chen and Z. C. Jia. Ice-binding surface of fish type III antifreeze, *Biophysical Journal*, 1999, 77(3), 1602-1608
- [128] L. F. Li, X. X. Liang and Q. Z. Li. The thermal hysteresis activity of the type I antifreeze protein: A statistical mechanics model, *Chemical Physics Letters*, 2009, 472, 124-127
- [129] D. Eisenberg and W. Kanzmann. *The structure and properties of water*, 1969, Oxford Univ. Press, Oxford
- [130] J. L. Kavanau. *Water and Solute-Water Interactions*, 1964, Holden-Day, Inc., San Francisco-London-Amsterdam
- [131] Y. Nozali and C. Tanford. The solubility of amino acids and two Glycine peptides in aqueous ethanol and dioxane solutions, *the journal of biological chemistry*, 1971, 246(7), 2211-2217
- [132] M. Levitt. A simplified representation of protein conformation for rapid simulation of protein folding, *J. Mol. Biol.*, 1976, 104, 59-10
- [133] Y. Nozaki and C. Tanford. The solubility of amino acids, diglycine, and triglycine in aqueous guanidine hydrochloride solutions, *the journal of biological chemistry*, 1970, 245(7), 1648-1652
- [134] J. Kyte and R. F. Doolittle. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *J. Mol. Biol.*, 1982, 157, 105-132
- [135] B. Chalmers. *Principles of solidification*, 1964, John Wiley, New York
- [136] J. N. Israelachvili. *Intermolecular and surface forces: with applications to colloidal and biological systems*, 1985, Academic Press
- [137] I. R. Epstein. Cooperative and non-cooperative binding of large ligands to a finite one-dimensional lattice. A model for ligand-oligonucleotide interactions, *Biophysical Chemistry*, 1978, 8, 327-339
- [138] P. D. Munro, C. M. Jackson and D. J. Winzor. Consequences of the non-specific binding of

a protein to a linear polymer: reconciliation of stoichiometric and equilibrium titration data for the thrombin-heparin interaction, *J. Theor. Biol.*, 2000, 203, 407-418

- [139] W. L. Bragg and E. J. Williams. The effect of thermal agitation on atomic arrangement in alloys, *Proc. R. Soc. Lond. A.*, 1934, 145, 699-730
- [140] W. L. Bragg and E. J. Williams. The effect of thermal agitation on atomic arrangement in alloys II, *Proc. R. Soc. Lond. A.*, 1935, 151, 540-566
- [141] E. J. Williams. The effect of thermal agitation on atomic arrangement in alloys III, *Proc. R. Soc. Lond. A.*, 1935, 152, 231-252

## 致 谢

本文是在导师梁希侠教授的悉心指导下完成的。首先，我要诚挚的感谢我的导师梁希侠先生五年来的悉心培养和谆谆教导。从论文的选题、写作到定稿过程中，自始至终都倾注着先生的心血。先生严谨的治学之道，渊博的知识，敏锐的科研洞察力及高尚的人格，为我树立了一辈子学习的典范。从先生身上，不仅学到了科研知识，还学会了如何面对和解决科研工作及生活中遇到的困难。先生的教诲将使我终身受益。

我要以最诚挚的心意感谢物理科学与技术学院的李前忠教授。从论文的初始思路到论文的完成，每一步都有李前忠教授的思想在里面。感谢李前忠教授在百忙之中一次次对我的指导，帮助我解决科研工作中遇到的许多难题。

借此机会，我真诚的感谢固体物理研究室的班士良教授，云国宏教授，闫祖威教授的教诲和关怀；感谢赵国军老师，王志平老师，宫箭老师，周文平老师，崔鑫老师，邢雁老师，刘俊杰老师的关心和帮助；感谢物理科学与技术学院的李健教授对我学习和生活的关心和鼓励；感谢所有给予我热情帮助的老师们。

感谢赵增茹、宋铁磊、张媛媛、张丽、张娟娟、赵巧燕等姐妹、师弟的关心和帮助。

最后，我要特别感谢我的父母，他们在我求学路上付出的一切是我前进的动力。感谢我的爱人、姐姐和弟弟对我的理解，支持和鼓励。谨以此文献给他们。

作 者

2010年3月于呼和浩特

## 攻读学位期间发表和完成的论文

- [1] Li-Fen Li, X.X. Liang, Q.Z. Li, The thermal hysteresis activity of the type I antifreeze protein: a statistical mechanics model, Chemical Physics Letters, 2009, 472, 124–127 (SCI)
- [2] Li-Fen Li, X.X. Liang, Q.Z. Li, Thermodynamic properties of linear protein solution, Chinese Journal of Chemical Physics, 2010, 23(2), 180-184 (SCIE)
- [3] Li-Fen Li, X.X. Liang, Q.Z. Li, A simple calculation of interaction energy of Type I antifreeze protein and ice crystal. 内蒙古大学学报, (已录用)
- [4] Li-Fen Li, X.X. Liang, Q.Z. Li, Thermodynamic properties of Type I antifreeze protein solution (submitted)
- [5] Li-Fen Li, X.X. Liang, Q.Z. Li, A revision of the statistical mechanics model: The influence of the specific fashion of adsorption (to be submitted)