高等学校化学学报
CHEMICAL JOURNAL OF CHINESE UNIVERSITIES
研究论文

酪氨酸突变对黄粉虫抗冻蛋白抑制甲烷水合物生长的影响：分子动力学模拟

崔韶丽[1#]，张天俐[2#]，杜炳辉[2]，马若瑾[1]，靳永灿[1]，叶　卓[3]，徐永涛[2]
（1. 河南医药大学法医学院，2. 医学工程学院，新乡 453003；
3. 河南师范大学化学化工学院，新乡 453003）

摘要　黄粉虫抗冻蛋白（*Tm*AFP）因其优异的冰晶抑制能力，被视为潜在的绿色甲烷水合物动力学抑制剂. 然而，其抑制水合物生长的构效关系尚不明确. 本文采用分子动力学模拟，研究了*Tm*AFP关键苏氨酸（Thr）突变为酪氨酸（Tyr）对水合物生长抑制的影响，构建了野生型及T27Y，T39Y，T44Y突变体与水合物的复合体系. 结果表明，选择体积更大、疏水性相似的TYR并未增强*Tm*AFP的抑制能力. 值得注意的是，T44Y突变体虽保留80%的热滞活性，却几乎完全丧失了对甲烷水合物生长的抑制能力，表明热滞活性与水合物抑制活性之间不存在正相关. 进一步分析表明，T44Y突变保留了IBS与甲烷水合物表面的局部几何互补性，但削弱了蛋白质构象刚性和界面氢键稳定性，表明静态结构匹配并不足以保证稳定吸附；而T27Y和T39Y突变则主要通过破坏IBS关键残基间距与水合物笼状结构之间的匹配，削弱蛋白质的吸附与抑制作用. 本研究揭示了*Tm*AFP抑制甲烷水合物生长不仅依赖冰结合面与表面的结构互补，还需要蛋白质整体刚性与残基锚定能力的协同. 这一发现为理性设计基于抗冻蛋白的高效、绿色水合物抑制剂提供了理论依据.

关键词　黄粉虫抗冻蛋白；酪氨酸定点突变；甲烷水合物；分子动力学模拟；抑制机制
中图分类号　O643　　**文献标志码**　A　　doi：10.7503/cjcu20260236

Influence of Tyrosine Mutations on the Inhibition of Methane Hydrate Growth by Tenebrio Molitor Antifreeze Protein: A Molecular Dynamics Simulation Study

CUI Shaoli[1#*], ZHANG Tianli[2#], DU Binghui[2], MA Ruojin[1],
JIN Yongcan[1], YE Zhuo[3], XU Yongtao[2*]
(*1. School of Forensic Medicine*,
2. School of Medical Engineering, *Henan Medical University*, *Xinxiang* 453003, *China*;
3. School of Chemistry and Chemical Engineering, *Henan Normal University*, *Xinxiang* 453003, *China*)

Abstract　*Tenebrio molitor* antifreeze protein (*Tm*AFP) is considered a potential environmentally benign kinetic inhibitor for methane hydrate due to its excellent ice recrystallization inhibition activity. However, the structure-activity relationship of *Tm*AFP in inhibiting methane hydrate growth remains unclear. In this study, molecular

收稿日期：2026-06-12. 网络首发日期：2026-09-01.
联系人简介：崔韶丽，女，博士，讲师，主要从事分子模拟方面的研究. E-mail：shaolicui@163.com
徐永涛，男，博士，教授，主要从事计算机辅助药物设计方面的研究. E-mail：yxu@xxmu.edu.cn
基金项目：河南省自然科学基金（批准号：252300420805，262300422437，252300421457）、河南省科技研发计划联合基金(学科类)（批准号：252103810367）和河南省高等学校重点科研项目(批准号：25B150017)资助.
Supported by the Natural Science Foundation of Henan Province, China(Nos. 252300420805, 262300422437, 252300421457), the Joint Foundation for Science and Technology Research Projects of Henan Province, China(No.252103810367) and the Key Scientific Research Project of Higher Education Institutions in Henan Province, China(No.25B150017).
共同第一作者.

dynamics simulations were performed to investigate the effects of mutating key threonine (Thr) residues to tyrosine (Tyr) in *Tm*AFP on methane hydrate growth inhibition. In the Thr array, residues at positions 27, 39, and 44 exhibit a greater influence on the thermal hysteresis activity of the antifreeze protein than other sites. Furthermore, the substitution with amino acids possessing larger side chains than Thr, such as tyrosine, may interfere with the ice-binding process through steric hindrance. We constructed the complex systems of wild-type and T27Y, T39Y, and T44Y mutants with methane hydrate. The results show that wild-type *Tm*AFP exhibits the strongest inhibitory effect on methane hydrate growth, while Tyr point mutations significantly weaken this activity. Notably, although the T44Y mutant retains approximately 80% of the thermal hysteresis activity of wild-type *Tm*AFP, it almost completely loses its ability to inhibit methane hydrate growth, indicating no positive correlation between the thermal hysteresis activity of antifreeze protein and its methane hydrate inhibition activity. Further analysis indicates that the T44Y mutation preserves the local geometric complementarity between the ice-binding surface (IBS) and the methane hydrate surface, it concurrently reduces both the conformational rigidity of the protein and the stability of interfacial hydrogen bonds. This indicates that static structural matching alone is not sufficient to guarantee stable adsorption. In contrast, the T27Y and T39Y mutations primarily impair inhibition by disrupting the matching between key residue spacings on the IBS and the cage structures of methane hydrate. This study demonstrates that the inhibition of methane hydrate growth by *Tm*AFP requires not only structural complementarity between the IBS and the hydrate surface, but also synergy between the overall rigidity of the protein and the anchoring ability of residues on the hydrate surface. These findings provide molecular-level theoretical guidance for the rational design of efficient and green antifreeze protein-based hydrate inhibitors.

Keywords *Tenebrio molitor* antifreeze protein; Tyrosine site-directed mutation; Methane hydrate; Molecular dynamics simulation; Inhibitory mechanism

随着全球能源需求的增加和能源结构向低碳转型，天然气在能源供应领域的地位逐渐上升. 天然气水合物是由水和诸如甲烷之类的客体分子在油气管道相对低温和高压下形成的非化学计量的类冰固体化合物[1,2]. 在天然气水合物中，水分子通过氢键结合形成一个三维晶格结构，甲烷、乙烷和丙烷等气体被封存于水分子笼状结构的空洞之中. 甲烷分子容易形成sI型水合物，是地球上最丰富的天然气水合物结构. 在油气生产与运输过程中，天然气水合物的形成易造成管路堵塞，引发严重的经济损失与安全风险. 为了解决天然气水合物堵塞问题，工业界主要加注热力学抑制剂(Thermodynamic hydrate inhibitors, THIs)和动力学抑制剂(Kinetic hydrate inhibitors, KHIs)进行防控[3~6]. THIs通过改变相平衡来发挥抑制作用，但加注量通常高达60%(质量分数)，毒性大且成本高昂[7~9]；而KHIs虽用量低(通常质量分数<3%)，但普遍存在生物降解性差，难以满足日益严苛的环保要求[10]. 因此，开发可以抑制以甲烷为代表的天然气水合物生长的高效且环保的动力学水合物抑制剂迫在眉睫.

抗冻蛋白(Antifreeze proteins, AFPs)是高寒地区耐寒生物体内天然存在的功能性蛋白，因优异的抑制冰晶生长特性而受到关注，也被认为是一类极具应用潜力的环境友好型KHIs[11~14]. AFPs可通过与冰晶表面特异性结合，非依数性地降低溶液冰点、抑制冰晶生长和较强的抑制冰晶重结晶能力. 其具有极低的有效作用浓度、优异的生物相容性与环境友好性，已被广泛应用于食品冷冻保鲜、低温生物组织保存等领域[15,16]. 由于甲烷水合物的主体晶格具有与冰晶高度相似的类冰四面体氢键网络结构. 近年来，越来越多的研究聚焦于抗冻蛋白对甲烷水合物成核、生长与聚集行为的调控作用，探索其作为新型绿色水合物抑制剂的应用潜力[3,11,17,18]. 研究表明，不同来源的抗冻蛋白(包括鱼类来源的I型/III型AFP、昆虫来源的黄粉虫AFP、植物来源的冬黑麦AFP等)均表现出不同程度的甲烷水合物抑制活性，可有效延长水合物成核诱导时间、降低水合物生长速率[17,19~21]. Gordienko等[22]研究证实了AFPs具有附着在甲烷水合物表面，抑制甲烷水合物生长并修饰甲烷水合物晶体形态的能力. Perfeldt等[19]进一步通过实验验证了AFPs可以有效地抑制水合物的成核和生长. Maddah等[23]研究发现III型AFP及其突变体对甲烷水合物生长界面的几何结构很敏感. Shen等[24]研究环境友好型氨基酸与甲烷水合物作用时发现分子侧链间距与水合物表面的笼状结构之间的匹配程度影响吸附亲和力. Bagherzadeh等[21]研究

表明冬季比目鱼AFP可以吸附在甲烷水合物的特定平面上，覆盖了甲烷水合物表面，从而增加甲烷和水分子的质量传质阻力．Zhang等[25]研究表明了水合物生长被抑制，这归因于AFPs形状互补性和结合残基的灵活性．

黄粉虫抗冻蛋白(*Tenebrio molitor* antifreeze protein，*Tm*AFP)是目前已知活性最高的昆虫来源抗冻蛋白之一，其具有规则的右手β-螺旋三维结构，每一圈螺旋由12个氨基酸残基构成，包含高度保守的TCT(Thr-Cys-Thr)重复基序，整体结构对称性高、刚性强[26,27]．其中，*Tm*AFP的冰结合面(Ice-binding surface，IBS)由平行排列的β-折叠上规则排布的苏氨酸残基(Thr)阵列构成[28]．*Tm*AFP的IBS是其抗冻活性的关键区域[29]．研究表明，其抗冻活性对IBS氨基酸组成的细微变化很敏感[30~32]，抗冻活性与IBS的面积也有关[33]．Marshall等[34]研究表明，Thr阵列中27，39，44位点比其它位点更能影响抗冻蛋白的热滞活性，进一步，选择体积比THR大的氨基酸，如酪氨酸(Tyr)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)等，其可能通过空间上的阻碍作用以干扰其与冰晶结合的过程．另外，Tyr和Thr具有相似的Kyte-Doolittle疏水性值，且Tyr具有形成β-sheet的高倾向性，在相邻的β-strands之间，Tyr和Thr的配对已被证实能够形成一种特别稳定的相互作用．因此，本文选择Tyr在空间上替换Thr，即T27Y，T39Y和T44Y突变以期揭示其对甲烷水合物生长抑制的影响．另一方面，研究表明T44Y突变虽然保留较高的抗冻活性，但由于T44位点不在IBS上，IBS的关键残基得以完整保留．T27Y，T39Y和T44Y突变分别保留了野生型活性的20%，10%和80%，那么抗冻蛋白的活性与抑制甲烷水合物生长的能力之间的关系有待探索．

针对上述问题，本文采用全原子分子动力学(Molecular dynamics，MD)模拟方法[35]，系统探究不同突变体同时对比野生型*Tm*AFP对甲烷水合物生长的抑制机制．从分子层面揭示Tyr突变对甲烷水合物生长抑制的影响，同时阐明抗冻蛋白热滞活性与甲烷水合物抑制活性之间的内在关联性．研究结果为高效、绿色、环境友好型水合物动力学抑制剂的理性设计与分子改造提供理论依据．

1　实验部分

1.1　模型设计

野生型黄粉虫抗冻蛋白(*Tm*AFP)的三维晶体结构取自蛋白质数据库(PDB编号：1EZG)[27]．为了研究特定位置酪氨酸突变对*Tm*AFP抑制甲烷水合物生长的影响，通过CHARMM-GUI在线平台(https://charmm-gui.org/)完成构建T27Y，T39Y，T44Y突变体[36]．因此，本文共构建了4种抗冻蛋白-甲烷水合物-甲烷/水溶液模型，各体系细节如表1所示．所有sI型甲烷水合物的初始晶面结构均通过GenIce[37]程序生成．甲烷sI晶胞由两个小的十二面体笼(每个面有12个五边形面5^{12}个)和6个大的十四面体笼(每个面有2个六边形面和12个五边形面$5^{12}6^2$)组成[2,38]．选取文献中已证实的甲烷水合物优势生长晶面(001)作为蛋白质结合界面，该晶面具有优异的热力学稳定性，表层完整水合物笼结构占比最高，悬垂的未成键水分子数量最少，是抗冻蛋白与水合物晶格发生特异性结合的主要作用面，也是调控水合物生长的核心靶点[37]．

Table 1　Molecular assemblies investigated

System	Molecular assembly	Atom	Box/nm^3	Time/ns	Run*
S1	*Tm*AFP-methane hydrate-methane/water molecule assembly	62769	7.1×7.1×9.5	400	3
S2	*Tm*AFP(T39Y)-methane hydrate-methane/water molecule assembly	62686	7.1×7.1×9.5	400	3
S3	*Tm*AFP(T27Y)-methane hydrate-methane/water molecule assembly	62731	7.1×7.1×9.5	400	3
S4	*Tm*AFP(T44Y)-methane hydrate-methane/water molecule assembly	62691	7.1×7.1×9.5	400	3

* Independent MD runs.

通过手动调控*Tm*AFP及其突变体的初始空间取向，确保蛋白质的冰结合面正对甲烷水合物(001)晶面，且冰结合面与水合物晶面的初始垂直距离设定为1.0 nm．在所有模拟过程中，蛋白质的质心均未被限制在其初始位置．采用Packmol程序生成甲烷/水混合液相的初始构象[39]．体系内水分子与甲烷

分子的摩尔比设为46∶8，与sI型甲烷水合物100%笼占有率下甲烷水合物形成的条件完全匹配[2]. 为保证体系整体呈电中性，向每组体系内加入2个Na^+，同时将其限制在盒子的边缘，以避免其对甲烷水合物成核与生长的过程产生干扰. 为了防止初始甲烷水合物的解离，将其约束在初始位置[40]. 施加在抗衡离子和甲烷水合物中甲烷分子的约束力常数均为1000 kJ·mol^{-1}·nm^{-2}；为了防止由于周期性边界导致盒子右侧生成新的甲烷水合物，约束了盒子上方0.5 nm厚无序层中的水分子作为甲烷水合物生长的屏障. 构建的体系模型如图1所示.

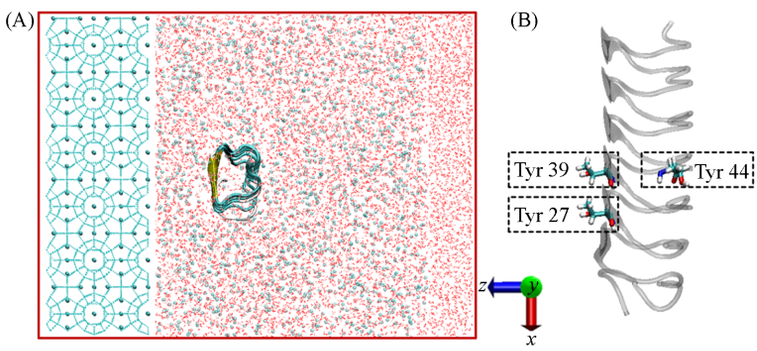


Fig. 1　System model diagram(A) and schematic diagram(B) of *Tm*AFP and mutation sites

(A) Blue represents the initial methane hydrate, the middle area represents the mixed solution, and the right side represents the 1 nm water layer. Protein is represented by NewCartoon, methane molecules are represented by Beads in blue, and water and methane hydrate are represented by chemical bonds and hydrogen bonds, respectively.

1.2　分子动力学模拟

所有MD模拟均采用GROMACS 2020.2软件[41]完成，使用CHARMM27力场参数描述AFPs[42]，使用TIP4P/ICE水模型中的参数描述水分子[43]. 该水模型中sI型甲烷水合物的熔融温度为302 K，与实验观测值297.23 K吻合[44]，已有研究表明，CHARMM27力场和TIP4P/ICE水模型的结合可用于描述AFPs在水合物界面的吸附过程. 采用V-rescale[45]和Parrinello-Rahman[46]分别控制所有体系的温度和压力在250 K和45 MPa[25]. 采用LINCS算法[47]对所有含氢原子的共价键限制在其平衡长度. 运动方程的积分时间步长设定为2 fs. 范德华相互作用与短程静电相互作用的截断半径设置为1.2 nm，长程静电相互作用采用粒子网格埃瓦尔德(Particle Mesh Ewald，PME)方法进行计算[48,49].

首先，通过最速下降算法，使每个体系的初始能量最小化5000步，消除体系内不合理的空间位阻与原子间重叠作用力. 随后在正则(NVT)系综下完成100 ps的模拟，在等温等压(NPT)系综下完成100 ps的模拟，实现体系压力与体积的稳定收敛，最后在NPT系综中对各体系分别进行400 ns的MD模拟，同时每组体系均进行了3次独立的平行模拟. 使用VMD1.9.4软件完成[50]模拟轨迹的可视化处理与数据分析. 采用CHILL+算法识别甲烷水合物[51]. 采用GRADE[52]统计5^{12}小笼与$5^{12}6^2$大笼数量.

2　结果与讨论

2.1　*Tm*AFP及其突变体对甲烷水合物生长速率的影响

为了研究*Tm*AFP及其突变体对甲烷水合物生长速率的影响，使用CHILL+[51]算法将水分子识别为水合物、界面水合物和液态水(其它)，并计算了各体系中甲烷水合物含量($P_{hydrate}$)随模拟时间的变化，如图2(A)所示. 结果表明了S1体系中甲烷水合物的含量最低，其抑制甲烷水合物生长的速率高于突变体体系. 然而，S4体系中抗冻蛋白虽保持有较高抗冻活性，但其抑制甲烷水合物生长的能力最差. 进一步分析了$P_{A_2D_2}$(体系中具有饱和氢键结构的水分子占所有水分子结构的百分比)，其含量越高表明甲烷水合物的含量越高[图2(B)]. 结果表明，几种突变体体系中甲烷水合物的含量均高于野生型抗冻蛋白，即突变成Tyr后，突变体的活性降低其抑制甲烷水合物生长的能力也明显下降，与图2(A)的结果保持一致.

进一步分析了*Tm*AFP及其突变体对甲烷水合物形成中5^{12}和$5^{12}6^2$笼子数量的影响[图2(C)和(D)]. 结果表明，S1体系中5^{12}和$5^{12}6^2$两种笼子的数量都低于突变体体系，且S4体系中5^{12}和$5^{12}6^2$两种笼子数

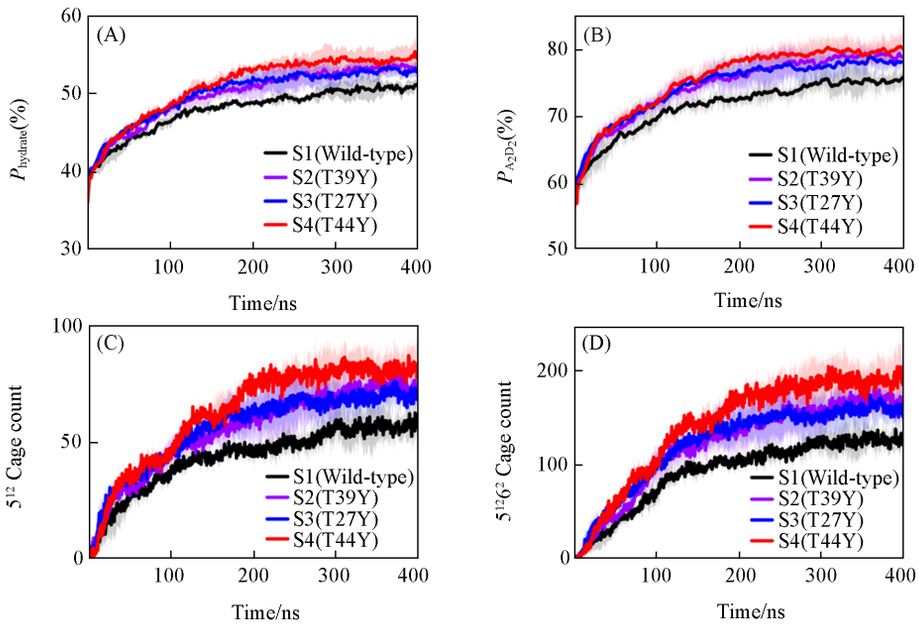


Fig. 2 Time evolution of the content of methane hydrate(A), $P_{A_2D_2}$ in the designated areas(B), 5^{12} cage(C) and $5^{12}6^2$ cage(D) in assembly S1, S2, S3 and assembly S4

All data are the average values of three independent simulations, and the shaded areas indicate the error bars.

量均最高. 初步表明了特定位点Tyr突变, 削弱了其抑制甲烷水合物生长的能力. S4体系虽保留了抗冻活性的80%, 但其抑制甲烷水合物生长的能力最弱, 模拟结果也初步表明了*Tm*AFP的活性与抑制甲烷水合物的生长能力之间不存在正相关.

2.2 *Tm*AFP及其突变体吸附稳定性的差异

为了揭示*Tm*AFP及其突变体在甲烷水合物表面吸附稳定性的差异, 首先计算了*Tm*AFP及其突变体与周围水分子形成的氢键数量和氢键寿命自相关函数, 如图3(A)和(B)所示. 结果表明, S4体系虽

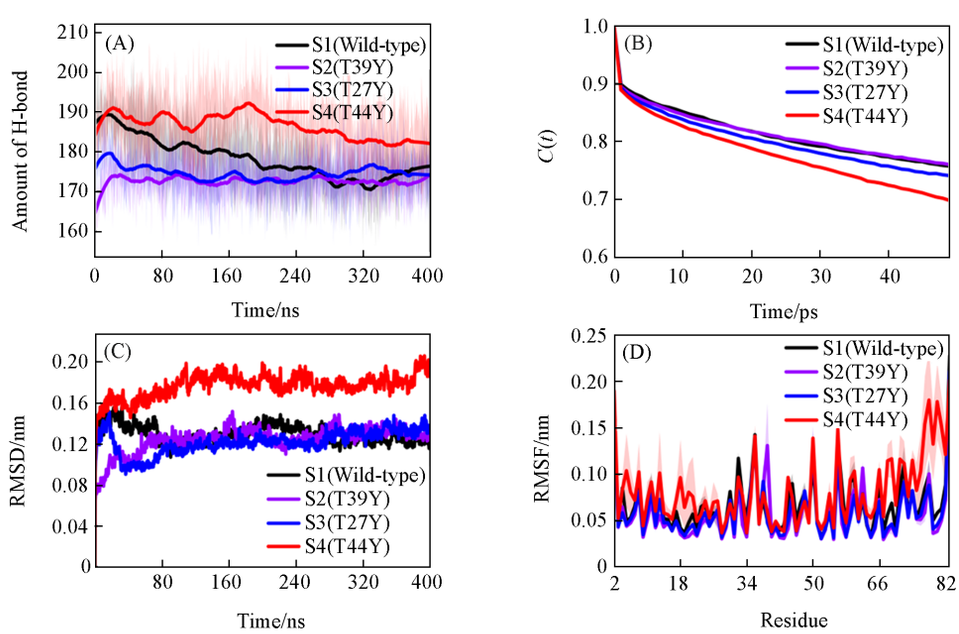


Fig. 3 Time evolution of hydrogen bond numbers between protein-water in the assemblies S1—S4(A), hydrogen bond lifetime correlation functions[$C(t)$] between water molecules and *Tm*AFP and its mutants are adsorbed on methane hydrate(B), RMSD(C) and RMSF(D) of *Tm*AFP and its mutants in assemblies

The shaded areas in panels A and D represent the error bands, and the curve in panel A has been smoothed.

然形成的氢键最多但其稳定存在时间衰减较快，S1体系中形成的氢键较多且氢键稳定存在时间较长，有利于其与甲烷水合物结合，S2和S3体系氢键数量和氢键自相关函数几乎相同.

进一步分析了模拟过程中蛋白质的RMSD和RMSF，以表征在模拟过程中蛋白质构象的变化，如图3(C)和(D)所示. 结果均表明S1在模拟的最后100 ns体系中蛋白质构象变化相对较小，S4体系在整个模拟时间内波动均最显著. 在S4体系中，进行T44Y突变明显增加了抗冻蛋白的柔性，使得模拟过程中蛋白质的构象变化较大，因此其不能稳定吸附在甲烷水合物表面.

2.3 *Tm*AFP及其突变体吸附结构的差异

为了进一步研究Tyr突变对*Tm*AFP影响甲烷水合物生长差异的原因，分析了*Tm*AFP及其突变体稳定吸附时的结构. 从模拟轨迹中选取0，150，200和400 ns时的模拟吸附快照，并绘制了IBS氨基酸与周围0. 5 nm之内水分子的氢键网络结构(图4). 结果表明，S1体系中*Tm*AFP在200 ns后可以稳定地吸附在甲烷水合物的表面，形成稳定且较密实的氢键网络，从而有效抑制甲烷水合物的生长. S2体系中T39Y突变导致*Tm*AFP残基只有少部分可以吸附在甲烷水合物上且在模拟中处于吸附解吸的动态中. S3体系中T27Y突变导致抗冻蛋白可以部分吸附在甲烷水合物表面，但是由图3可知，这种吸附能力并不强，导致其抑制甲烷水合物生长的能力较野生型*Tm*AFP减弱. S4体系中T44Y突变导致抗冻蛋白不能吸附在甲烷水合物的表面. 结合模拟的轨迹可知，甲烷水合物生长受到抑制主要是由于蛋白质在体系中较大构象的变化导致的扰动较大. 结构聚类分析的结果也表明了S4体系中构象簇较多(图S1，见本文支持信息). 研究结果也表明了虽然T44Y突变使得抗冻蛋白具有较高的抗冻活性，但是其抑制甲烷水合物生长的能力却是最弱，抗冻活性与抑制甲烷水合物生长的能力之间并不存在着正相关. 因此，在特定位点选择体积比Thr大的氨基酸Tyr突变，虽然Tyr在相邻的β-strands之间与Thr的配对能够形成一种特别稳定的相互作用，但是却不能增加其抑制甲烷水合物生长的能力.

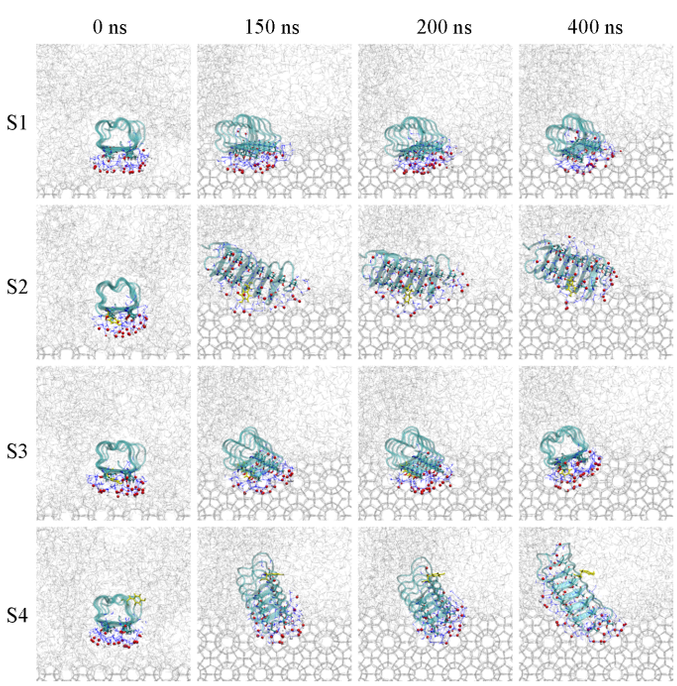


Fig. 4 Snapshots of periodic images of the simulation cells of methane hydrate growth obtained from the MD trajectory, at 0, 150, 200, and 400 ns, along with the hydrogen bond network diagram of water molecules within 0. 5 nm around the IBS amino acids

Water molecules are displayed in red using beads.

2.4 *Tm*AFP及其突变体抑制甲烷水合物生长能力不同的原因

为了进一步揭示各体系抑制能力不同的机制，计算了IBS上5对关键Thr残基对(Thr27-29，Thr29-41，Thr29-53，Thr27-39，Thr27-51)的间距随模拟时间的变化(图S2，见本文支持信息)，并

与sI型甲烷水合物笼间距标准[1,2](两个5^{12}小笼之间的距离为0.764~0.816 nm，$5^{12}6^2$大笼与5^{12}小笼之间的距离为0.753~0.903 nm，两个$5^{12}6^2$大笼之间的距离为0.742~0.990 nm)进行对比，以期阐明Tyr突变对残基空间排布的调控作用及其与吸附稳定性和抑制能力的影响，结果如图5和表S1(见本文支持信息)所示.

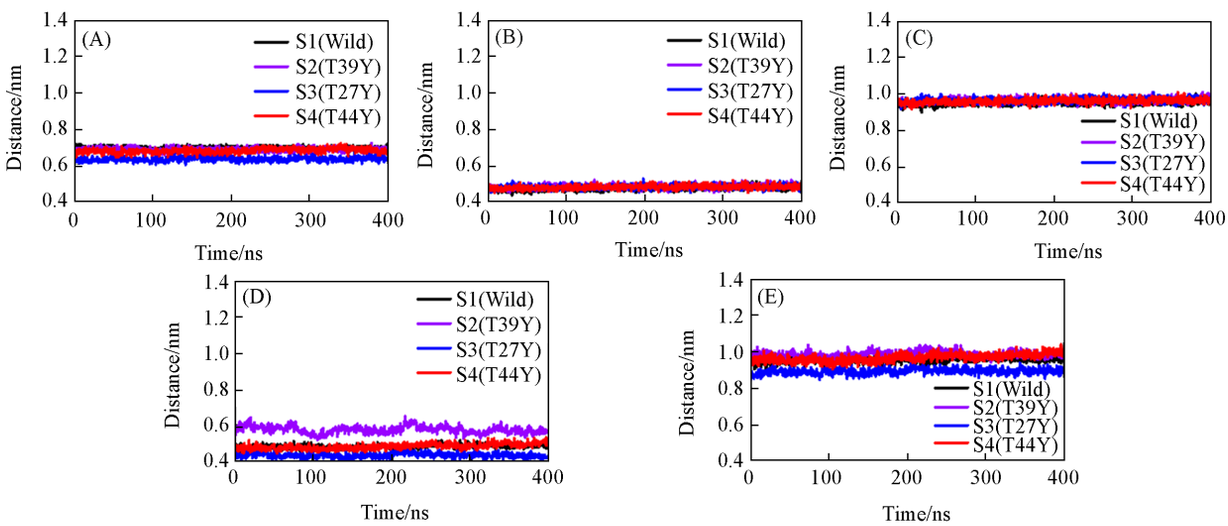


Fig. 5 Time evolution of changes in the spacing between five pairs of Thr27-29(A), Thr29-41(B), Thr29-53(C), Thr27-39(D) and Thr27-51(E) of key Thr residues on the IBS

在S1体系中，野生型*Tm*AFP的Thr29-53和Thr27-51残基的间距满足两个$5^{12}6^2$大笼之间的距离，THR27-29残基的间距满足两个5^{12}小笼之间的距离，Thr29-41和Thr27-39残基的间距则不能满足两个5^{12}小笼之间的距离. 在S2体系中，39位点苏氨酸突变主要影响Thr27-39残基的间距，虽有所增大但仍达不到5^{12}小笼之间的距离，所以不能更好地吸附在甲烷水合物上. 在S3体系中，27位点苏氨酸突变主要降低Thr27-29，Thr27-39和Thr27-51残基的间距，从而使得其与甲烷水合物笼的匹配程度降低. 然而，值得注意的是，在S4体系中，44位点苏氨酸突变对IBS上5对关键Thr残基间距没有产生影响，但是却增加了抗冻蛋白的柔性(图3)，使得抗冻蛋白的构象变化较多，不利于其在甲烷水合物表面吸附. 综上可知，选择体积比Thr大的氨基酸，残基之间的距离受到调整后并不能更好地与甲烷水合物笼相匹配，其主要通过空间上的阻碍作用[34]以干扰其与甲烷水合物的结合.

进一步，计算了S1体系中Thr残基与氮、碳原子形成的二面角$\varphi_{\text{N-CA-CB-CG2}}$和$\varphi_{\text{N-CA-CB-OG1}}$随模拟时间的变化. 由于Tyr结构不同于Thr(图S3，见本文支持信息)，在Tyr突变体系中，计算了Tyr残基与氮、碳原子形成的二面角$\varphi_{\text{N-CA-CB-CG}}$和$\varphi_{\text{CA-CB-CG-CD1}}$. $\varphi_{\text{N-CA-CB-CG2}}$和$\varphi_{\text{N-CA-CB-CG}}$曲线的趋势表明了甲基和亚甲基上$\gamma$-碳原子作为半笼客体分子的稳定性，$\varphi_{\text{N-CA-CB-OG1}}$曲线的趋势表明了羟基与周围水分子形成氢键的稳定性，$\varphi_{\text{CA-CB-CG-CD1}}$反映了苯环侧链的扭转行为和苯环的翻转剧烈程度，结果如图6所示. 与S1体系对比可以看出，将关键位点Thr突变成Tyr，并未增强其与甲烷水合物结合的能力. 由于Tyr含有苯环，这个苯环极可能因为较大的空间位阻导致碳原子和氮原子等无法翻转. 二面角的概率分布图(图S4，见本文支持信息)进一步表明了突变体系中二面角的分布表现出更大的灵活性和更大的结构自由度，这会对水合物结合能力或者模式产生影响. Maddah等[23]又指出AFPs侧链与甲烷水合物表面的相互作用对侧链的几何形状高度敏感. 虽然T44Y突变体的IBS残基间距与野生型高度接近结构完整，能够保持较高的热滞活性，但是突变后氨基酸的疏水性增加(表S2，见本文支持信息)，过度疏水反而会削弱抗冻蛋白在水合物表面的吸附能力[53]. 在甲烷水合物体系中，T44Y突变导致抗冻蛋白的构象变化较大(RMSD值上升)、残基波动增大(RMSF值变化大)且抗冻蛋白与周围水分子形成的氢键寿命明显缩短，最终使蛋白质无法稳定吸附在甲烷水合物表面. 因此，在设计提高抗冻蛋白抑制性能的同时不能只关注热滞活性，更应该多关注IBS的结构与甲烷水合物的匹配程度以及蛋白质整体刚性与残基锚定能力的协同.

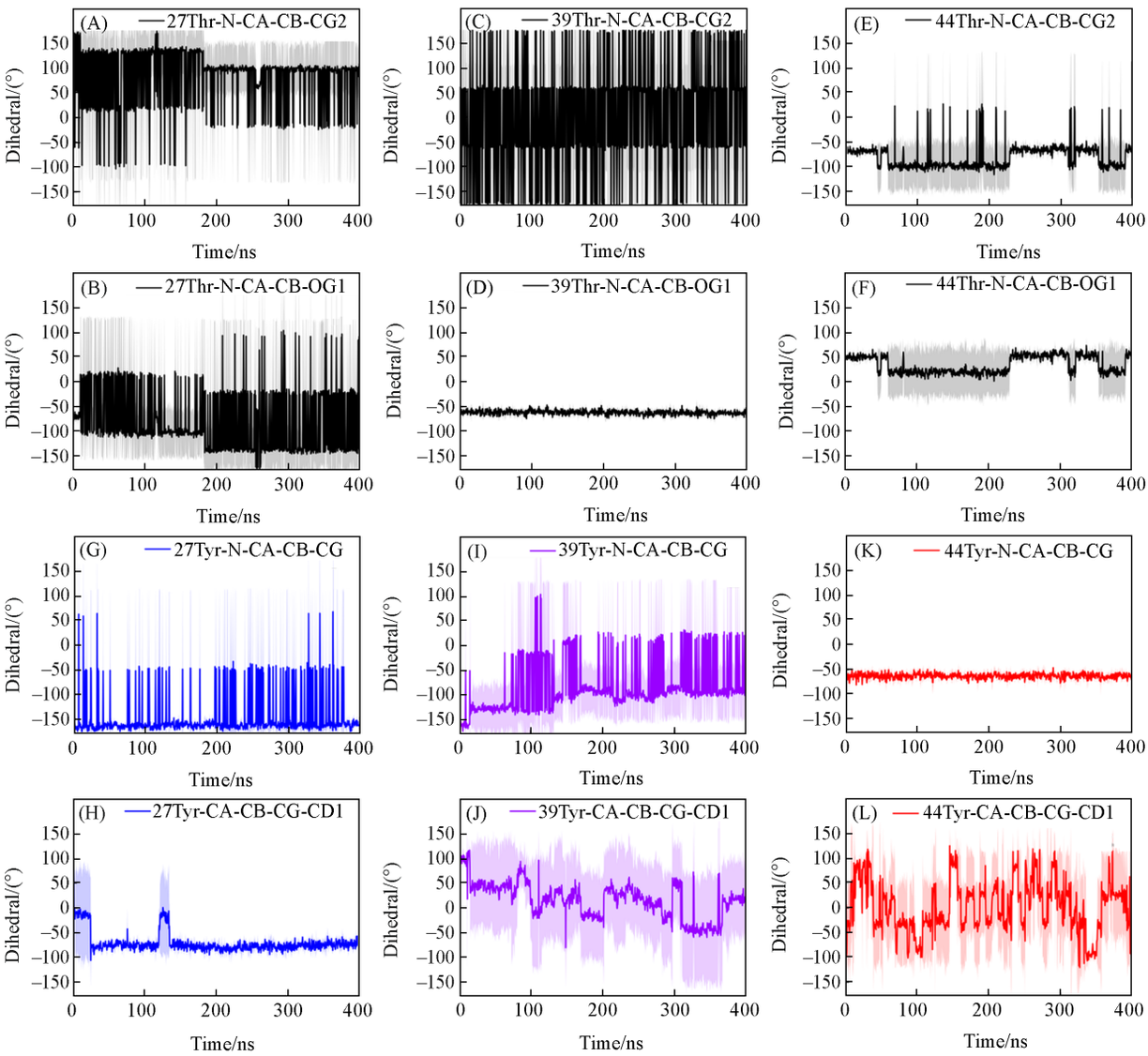


Fig. 6 Time evolution of $\varphi_{\text{N-CA-CB-CG2}}$(A, C, E) and $\varphi_{\text{N-CA-CB-OG1}}$(B, D, F) of Thr27(A, B), Thr39(C, D) and Thr44(E, F) in assembly S1, time evolution of $\varphi_{\text{N-CA-CB-CG}}$(G, I, K) and $\varphi_{\text{CA-CB-CG-CD1}}$(H, J, L) of Tyr27 in assembly S3(G, H), Tyr39 in assembly S2(I, J), and Tyr44 in assembly S4(K, L)

The curves in the panel represent the average values of three independent simulations, and the error bars are indicated by shading.

3 结　　论

以野生型 *Tm*AFP 及其 T27Y，T39Y，T44Y 突变体为研究对象，构建了相应的模拟体系并开展 400 ns 的分子动力学模拟，系统探究了 TYR 突变对 *Tm*AFP 抑制甲烷水合物生长能力的影响．重点分析了不同体系中甲烷水合物生长的速率、吸附的稳定性、吸附结构的差异以及抑制能力不同的原因．研究表明，野生型 *Tm*AFP 较其突变体对甲烷水合物生长的抑制作用强，Tyr 突变会破坏 IBS 上特定残基对的间距，不利于其与甲烷水合物笼结构的空间匹配，削弱 *Tm*AFP 对甲烷水合物生长的抑制能力．其中，T44Y 突变体虽保留了 80% 的抗冻活性，但是其在与甲烷水合物吸附时构象变化和残基波动均较大，所形成的氢键数量虽较多但是氢键寿命较短，二面角 $\varphi_{\text{N-CA-CB-OG1}}$ 和 $\varphi_{\text{CA-CB-CG-CD1}}$ 的值及其分布表现出更大的灵活性和更大的结构自由度，只有少部分残基吸附在甲烷水合物表面，因此，其抑制甲烷水合物生长的能力最差，研究也表明了抗冻蛋白的热滞活性与其抑制甲烷水合物生长的能力之间不存在正相

关. T44Y突变体具有较高的抑制冰晶生长的能力，这是因为其抑制主要依赖IBS上Thr残基与冰晶格之间的结构匹配和氢键互补. 值得注意的是，其抑制甲烷水合物生长则需要IBS与甲烷水合物表面的结构匹配、抗冻蛋白整体的构象刚性以及残基侧链空间位阻与锚定能力的协同. 在开发基于抗冻蛋白的绿色水合物抑制剂时，不能仅以热滞活性作为筛选指标，而应重点关注蛋白质在水合物界面的吸附稳定性、构象刚性与残基侧链的空间匹配特性. 未来研究可进一步探索通过定点突变增强抗冻蛋白的构象刚性或优化界面疏水-亲水平衡的策略，以协同提升抗冻蛋白的水合物抑制性能.

支持信息见http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/cjcu20260236.

参 考 文 献

[1] Hassanpouryouzband A., Joonaki E., Farahani M. V., Takeya S., Ruppel C., Yang J. H., English N. J., Schicks J. M., Edlmann K., Mehrabian H., Aman Z. M., Tohidi B., *Chem. Soc. Rev.*, **2020**, *49*(15), 5225—5309
[2] Cui S. L., Zhang W. J., Shao X. G., Cai W. S., *Chem. J. Chinese Universities*, **2022**, *43*(3), 20210838(崔韶丽, 张维佳, 邵学广, 蔡文生. 高等学校化学学报, **2022**, *43*(3), 20210838)
[3] Jensen L., Thomsen K., von Solms N., *Energy Fuels*, **2011**, *25*(1), 17—23
[4] McLaurin G., Shin K., Alavi S., Ripmeester J. A., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, *53*(39), 10429—10433
[5] Shi Q., Lin Y. W., Hao Y. C., Song Z. X., Zhou Z. Y., Fu Y. Q., Zhang Z. S., Wu J. Y., *Energy*, **2023**, *282*, 128337
[6] Zhang S. W., Shang L. Y., Zhou L., Lv Z. B., *Energy Fuels*, **2022**, *36*(4), 1747—1775
[7] Cheng L. W., Li Z., Cui J. L., Zhu R., Li J., Qin H. B., Liu B., Chen G. J., Ning F. L., *J. Mol. Liq.*, **2023**, *376*, 121466
[8] Liang F. F., Han L., Cai W. S., Shao X. G., *Chem. J. Chinese Universities*, **2025**, *46*(2), 20240424(梁繁繁, 韩丽, 蔡文生, 邵学广. 高等学校化学学报, **2025**, *46*(2), 20240424)
[9] Lin Y. W., Hao Y. C., Shi Q., Xu Y. H., Song Z. X., Zhou Z. Y., Fu Y. Q., Zhang Z. S., Wu J. Y., *Energy*, **2024**, *289*, 130080
[10] Wang Z., Wu X. E., Wang L., Song T. R., Hu Q. C., *Mar. Petrol. Geol.*, **2024**, *162*, 106743
[11] Midya U. S., Bandyopadhyay S., *J. Phys. Chem. B*, **2023**, *127*(1), 121—132
[12] Gajanayake S. M., Gamage R. P., Li X. S., Huppert H., *Energy Rev.*, **2023**, *2*, 100013
[13] Gao Y. H., Qi H. S., Zhang L., *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2023**, *62*(20), 7839—7858
[14] Li L. F., Liang X. X., Li Q. Z., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2012**, *28*(6), 1070—1073
[15] Qiu Y. Q., Hudait A., Molinero V., *J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, *141*(18), 7439—7452
[16] Qi H. S., Gao Y. H., Zhang L., Cui Z. X., Sui X. J., Ma J. F., Yang J., Shu Z. Q., Zhang L., *Engineering*, **2024**, *34*, 164—173
[17] Jensen L., Ramlov H., Thomsen K., von Solms N., *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2010**, *49*(4), 1486—1492
[18] Jia Y. X., Zhao Y., Li M., Zhang L. X., Liu Y. Z., Dong H. S., Zhao J. F., Yang L., Song Y. C., *ACS Sustainable Chem. Eng.*, **2022**, *10*(34), 11320—11329
[19] Perfeldt C. M., Chua P. C., Daraboina N., Friis D., Kristiansen E., Ramlov H., Woodley J. M., Kelland M. A., von Solms N., *Energy Fuels*, **2014**, *28*(6), 3666—3672
[20] Kumari S., Muthachikavil A., Tiwari J. K., Punnathanam S. N., *Langmuir*, **2020**, *36*(9), 2439—2448
[21] Bagherzadeh S. A., Alavi S., Ripmeester J. A., Englezos P., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2015**, *17*(15), 9984—9990
[22] Gordienko R., Ohno H., Singh V. K., Jia Z. C., Ripmeester J. A., Walker V. K., *Plos One*, **2010**, *5*(2), e8953
[23] Maddah M., Maddah M., Peyvandi K., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2019**, *21*(39), 21836—21846
[24] Shen X. D., Li Y., Li Y. X., Shen L., Maeda N., Zhang Y. D., Wang H., Wang X. G., *ACS Sustainable Chem. Eng.*, **2023**, *11*(24), 8774—8785
[25] Zhang N., Du Y. T., Yao P. Q., Huang H. Y., Zhang L. R., Zhang F. S., Liu J. J., *J. Phys. Chem. B*, **2023**, *127*(49), 10469—10477
[26] Foroutan S., Mohsenzade H., Dashti A., Roosta H., *Fuel*, **2020**, *276*, 118029
[27] Zhang Y., Hu W. F., Sun J. Y., Li Y. H., Chen C., *Chem. Phys.*, **2020**, *538*, 110860
[28] Zhang Y., Chen Z. R., Yuan C. Y., Sun J. Y., Chen C., Liang X. D., von Solms N., Song Y. C., *Chem. Eng. J.*, **2024**, *481*, 148387
[29] Bugaje A. A. B., Dioha M. O., Abraham-Dukuma M. C., Wakil M., *Energy Res. Soc. Sci.*, **2022**, *90*, 102604
[30] Hudait A., Qiu Y. Q., Odendahl N., Molinero V., *J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, *141*(19), 7887—7898
[31] Midya U. S., Bandyopadhyay S., *J. Phys. Chem. B*, **2018**, *122*(40), 9389—9398
[32] de Haas R. J., Pyles H., Huddy E. B., van Ossenbruggen J., Zheng C. B., van den Broek D., Giezen S. N., Carr A., Bera A. K., Kang A. L., Brackenbrough E., Emily C., Joyce E., Sankaran B., Baker D., Voets I. K., De Vries R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2025**, *122*(48), 2514871122
[33] Scholl C. L., Davies P. L., *FEBS Lett.*, **2023**, *597*(4), 538—546
[34] Marshall C. B., Daley M. E., Graham L. A., Sykes B. D., Davies P. L., *FEBS Lett.*, **2002**, *529*(2/3), 261—267
[35] Du Z. Y., Luan M. J., Hou Z. H., Huang G. M., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2026**, *42*(2), 586—596
[36] Jo S., Kim T., Iyer V. G., Im W., *J. Comput. Chem.*, **2008**, *29*(11), 1859—1865

[37] Matsumoto M., Yagasaki T., Tanaka H., *J. Comput. Chem.*, **2018**, *39*(1), 61—64
[38] Sufe G., *Appl. Energy*, **2026**, *412*, 127647
[39] Martínez L., Andrade R., Birgin E. G., Martínez J. M., *J. Comput. Chem.*, **2009**, *30*(13), 2157—2164
[40] Kuiper M. J., Morton C. J., Abraham S. E., Gray-Weale A., *eLife*, **2015**, *4*, e05142
[41] Bjelkmar P., Larsson P., Cuendet M. A., Hess B., Lindahl E., *J. Chem. Theory Comput.*, **2010**, *6*(2), 459—466
[42] Zhao J. F., Lang C., Chu J. W., Yang L., Zhang L. X., *J. Phys. Chem. C*, **2023**, *127*(28), 13439—13450
[43] Wei N., Xie C. Y., Sun W. T., Li H. T., Jiang L., Zhang S. H., *Front Energy Res.*, **2021**, *9*, 699356
[44] Conde M. M., Vega C., *J. Chem. Phys.*, **2010**, *133*(6), 064507
[45] Bussi G., Donadio D., Parrinello M., *J. Chem. Phys.*, **2007**, *126*(1), 014101
[46] Li K. H., Chen B. B., Yang M. J., Song Y. C., Sum A. K., *J. Chem. Phys.*, **2023**, *159*(24), 244505
[47] Hess B., *J. Chem. Theory Comput.*, **2008**, *4*(1), 116—122
[48] Cui S. L., Liu F. X., Song P. P., Lu J. R., Han D., Liu T. G., Wang M. T., Song Y. Y., He G. J., Xu Y. T., *Results Eng.*, **2025**, *28*, 107721
[49] Cui S. L., Liu F. X., Zhang T. L., Du B. H., Wang G. N., Lu J. R., Han D., Liu T. G., Wang M. T., He G. J., Xu Y. T., *J. Chem. Phys.*, **2026**, *164*(19), 194501
[50] Mackoy T., Kale B., Papka M. E., Wheeler R. A., *Comput. Phys. Commun.*, **2001**, *264*, 107881
[51] Nguyen A. H., Molinero V., *J. Phys. Chem. B*, **2015**, *119*(29), 9369—9376
[52] Chen Y., Chen C., Sum A. K., *J. Phys. Chem. B*, **2020**, *124*(22), 4661—4671
[53] Lv X. Y., Zhang J., Zhong J., Wang Z. L., *BIO Web Conf.*, **2024**, *111*, 01012

(Ed.: Y, K, V)