

藤壶附着：从基底探测到胶的固化

张欣康 刘兴平 曾 玲 叶宗煌 胡碧茹* 吴文健

(国防科学技术大学理学院, 长沙 410073)

摘要 藤壶在水下设施上的牢固黏附一方面造成极大的污损和危害, 另一方面为水下的牢固粘接提供了灵感. 相关的防污和 underwater 超粘接等技术的解决强烈依赖于对其附着过程及分子机制的理解. 目前, 对藤壶黏附的宏观过程已有了较为深入的了解, 主要包括基底探测、信号传导、胶液分泌以及胶的固化, 但对该过程中作用的分子机制如受体蛋白的识别、基因表达的调控以及胶蛋白的交联固化的研究依然有限, 而上述任何阶段的干扰都可为防污或水下粘接提供重要的理论指导. 因此, 深入理解各阶段的相关分子机制对防污和水下粘接至关重要. 本文综述了近年来对藤壶附着的相关进展, 介绍附着过程中的内部信号分子响应以及胶液分泌过程中的固化交联机制, 指出了存在的问题, 并提出进一步可能的研究要点.

关键词 藤壶, 基底探测, 信号通路, 胶分泌与固化

学科分类号 Q819

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0390

浸入海水的任何物体, 表面都会受到某些海洋生物的永久附着而造成污损, 给各种水下设施与舰船设备造成巨大损失. 贻贝和藤壶是其中的强势污损生物, 它们通过分泌生物胶在水下界面黏附固化而实现牢固附着. 其中, 附着物体表面的贻贝死亡后, 在海水的冲刷下容易剥离, 而藤壶在各种物体表面的黏附是永久性的, 给防污带来了极大困难, 但同时在水下粘合方面也为人们提供了很好的仿生灵感, 引起人们的广泛关注.

早在 1861 年, 达尔文进行环球航行时就对藤壶产生兴趣, 并在后来对其进行了 8 年之久的分类等相关研究工作^[1-2]. 经过了多年的研究, 人们对藤壶的生活习性、生活周期、藤壶的养殖及其黏附的宏观过程已经有了较为深入的认识. 藤壶属于节肢动物门甲壳纲藤壶亚属, 其生长周期包括无节幼虫、腺介幼虫和成虫 3 个阶段: 从卵块中孵化出的无节幼虫, 经过 6 个时期的浮游生活, 在水中摄取食物, 进行生长; 到腺介幼虫时期, 通过感受器寻找可依附的物体表面, 当发现适宜基底之后, 藤壶胶腺开始分泌胶液, 经胶腺导管, 到达底盘, 与基底进行接触, 实现附着, 此过程受到外界环境的诱导和基因表达的调控; 进入成虫时期, 成虫幼体(金星幼虫)边缘开始长出钙质外壳, 内部仍持续分

泌液态胶, 进行进一步的永久附着. 与此同时, 虫体逐渐往向下、向外进行生长, 发育成最终的成虫.

针对藤壶的黏附过程, 研究人员在防污方面展开了大量的研究. 早期主要通过防污涂层中释放毒性较大的有机锡毒杀污损生物^[3], 到随后使用较为低毒的氧化亚铜等, 给环境造成了不同程度的生物富集危害; 近年来, 各国纷纷开展环境友好型防污涂料研究, 如设计低表面能防污涂层防止生物附着^[4-5]、释放天然防污剂对污损生物进行趋避等绿色有效的防污技术^[6], 虽具有一定的效果, 但并没有完全解决防污的关键难题, 其根本原因是未能从分子层面上理解藤壶污损附着机制, 对仿生防污技术的研究和开发缺乏有效地指导.

藤壶的附着过程主要包括基底探测、信号传导、胶的分泌和体外的黏附固化. 其中起着决定作用的主要有两个关键因素: 一是藤壶幼虫对外界基底的探测导致内部信号通路的传递, 引起下游各种神经信号、激素和酶等物质的产生, 介导液态胶的

* 通讯联系人.

Tel: 0731-84574247, E-mail: brhu@yeah.net

收稿日期: 2016-12-29, 接受日期: 2017-02-28

分泌;二是在外界各种因子的诱导下,胶液中各种蛋白质间的协同作用,完成生物胶的黏附固化.上述每一因素的抑制都能有效防止藤壶的附着.因此,理解藤壶在附着过程中关键因素的分子机制,一方面可以为防污技术提供新的指导,另一方面对藤壶生物胶的黏附固化机制的深入认识也可为仿生水下强力粘合提供新的灵感.本论文主要从信号探测、信号传导以及最终胶的分泌对藤壶的黏附过程进行综述.

1 信号探测及通路分析

藤壶幼虫的附着过程,主要通过触角上的受体蛋白对基底进行识别,经过内部信号分子的传递引发的上下游基因之间的相互调控,最终导致胶蛋白基因的表达,进而分泌藤壶胶.目前,主要的研究方法是参照其他同源性较为接近的已知生物的特定信号通路,通过添加相应的抑制剂,对幼虫的附着行为进行观察,并结合荧光定量 PCR 以及转录组等结果,对有差异表达的,黏附相关的已知基因进行比较、未知基因进行预测,找出其中的关键性基因,并分析基因的相互调控关系,通过分析抑制剂与内部信号的作用机理,为防污剂的筛选提供指导.

1.1 探测过程

藤壶对基底的探测过程主要发生在腺介幼虫时期,参与附着的主要结构为触角以及与之相连的胶腺,如图 1 所示.幼虫探测的过程中,触角部位的受体蛋白对基底材料进行识别与选择,随后在神经、肌肉组织的参与下,各种信号分子的协同作用引发下游胶腺分泌胶液,从而形成有效附着.目前,幼虫相关受体的研究鲜有报道,主要集中在幼虫附着的诱导物的研究,通过相关诱导物的结构性推测幼虫受体蛋白的结构.

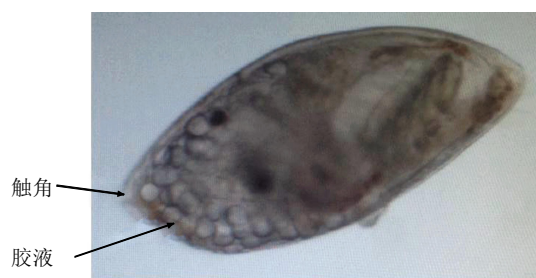


Fig. 1 The structure of the cypris larvae

图 1 腺介幼虫的组织结构

而早在 1962 年, Crisp 等^[7]发现藤壶成虫的组织对幼虫的附着变态过程具有重要的诱导作用,猜想其中可能含有某种能够诱导幼虫附着的物质.随后, Matsumura 等^[8]对纹藤壶成虫组织通过色谱分离、纯化得到了具备诱导功能的物质——诱导固着蛋白质复合物(settlement-inducing protein complex, SIPC),通过 SDS-PAGE 发现其主要为 260 ku 大小的蛋白,包含 3 个大小分别为 76、88、98 ku 的亚基,并能分别独立诱导幼虫进行附着. Dreanno 等^[9]通过序列比对,发现这种蛋白与哺乳动物中的 α_2 巨球蛋白具有较高的同源性,而后者主要在胞膜的识别以及免疫过程中发挥重要作用,以此推测 SIPC 在幼虫的基底表面识别过程中产生巨大作用.随后, Pagett 等^[10]根据荧光检测液相色谱的方法,在 SIPC 中发现 7 个甘露糖蛋白受体位点,这种糖蛋白对细胞表面以及溶液中的识别起到了重要的作用.例如在桡足类动物中,这种类似物主要参与到异性的求偶过程. Matsumura 通过添加该糖蛋白的抑制物 - 扁豆凝集素,发现幼虫的附着受到了明显的抑制.由此推断甘露糖受体在幼虫探测的过程中起到了重要作用^[11-12]. Dreanno 等^[13]通过表面等离子共振检测发现,经过幼虫触角探测的基底表面上会留下明显的“足迹”,而这些“足迹”,会吸引更多的幼虫前来附着. Matsumura 等^[14]经过免疫共沉淀的方法证实,“足迹”中含有 SIPC.因此,截至目前, SIPC 仍是主要的固着诱导物质.但其具体作用机理还有待进一步验证.

除了化学信号以外, Matsumura 等通过观察藤壶的探测过程,发现腺介幼虫对基底的顏色选择具有一定的偏好性,比如,在红色的基底上,幼虫的附着量明显增加,由荧光显微镜还发现,藤壶成虫的外壳上能散发红色荧光,这可能对幼虫的附着具有诱导作用^[15].由此推测,幼虫在探测的过程中,视觉也起到了不可忽视的作用.

目前,藤壶幼虫的探测过程研究较为广泛,但大多局限于观察幼虫的探测行为,而对其中的受体识别、信号探测等具体方式研究工作还有待深入开展.

1.2 信号网络

当受体识别基底之后,随着信号分子的传递,完成各项生理过程.其中,胶基因的表达以及液态胶的分泌与幼虫的附着行为密切相关.但由于目前胶基因的通路研究有限,主要是通过观察外界刺激与幼虫附着行为的关联,结合荧光定量 PCR 检测

虽然目前在藤壶体内发现了一些与附着密切相关的信号通路, 但是这些通路是否与胶的分泌相关, 还未得到证实. 已知的几种信号通路很可能与胶液分泌的过程相互关联, 共同作用. 因此, 进一步挖掘与胶分泌密切相关的信号通路十分有必要.

1.3 未知基因的挖掘

通过基因表达差异找出幼虫在附着过程中的调控基因, 进而解析幼虫黏附过程中的调控规律. 而

目前, 藤壶的基因组未见报道, 已知的基因非常有限, 极大阻碍了内在调控机制的研究. 随着生物学技术的发展, 通过转录组以及蛋白质组等组学的方法获得大量表达差异, 可找出对附着起作用的未知基因和蛋白, 图3反应藤壶相关组学的研究过程. 具体而言, 针对不同条件的藤壶的转录组数据进行聚类分析, 可以得到有表达差异的基因, 进而解释幼虫在基底上的黏附模式.

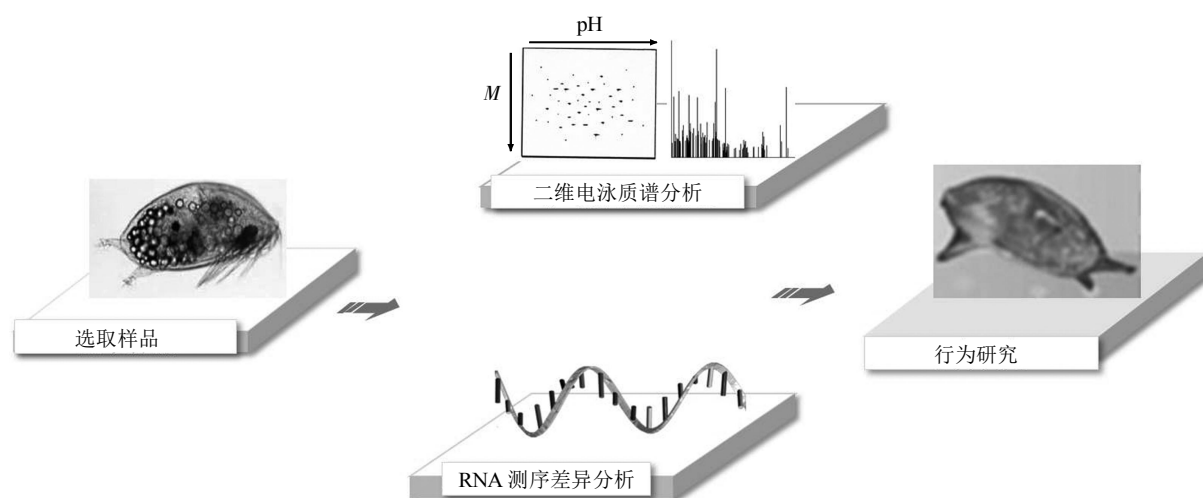


Fig. 3 The research process of omics

图3 组学的研究流程

Qian 通过转录组实验, 比较不同时期的纹藤壶基因表达差异, 通过分析腺介幼虫时期大量表达的基因, 找出与幼虫固着变态密切相关的基因, 如: 提供能量的卵黄蛋白原、黏附过程中的甘露糖受体以及关键的胶基因 *cp20k*. 随后对所获得的大量数据进行通路分析, 验证甘露糖受体在幼虫固着过程中的重要作用, 但原位杂交实验的结果显示, 该受体在触角部位并未得到检测, 分析其可能仅是一种机械性刺激的感受器^[28]. 藤壶与昆虫、十足类动物具有一定的近源性, 根据这些生物的蛋白质序列, 从转录组数据中可以得到大量神经肽与肽激素等相关的序列^[29], 例如: 在腺介幼虫时期大量表达的参与组织供能的卵黄蛋白原, 以及金星幼虫时期大量表达的酪氨酸激酶, 前者可能主要为附着过程中的能源物质, 其中富含的油脂被认为在后续幼虫附着过程中起到了重要作用^[30], 而后者主要被认为参与到幼虫的变态发育过程^[31].

组学的研究从微观上找出了藤壶幼虫中关键的未知基因, 同时在宏观上也能对藤壶的具体生理活动进行说明, 通过比较不同时期藤壶的基因表达差异, 从宏观上发现, 在无节期间, 渗透压、细胞增殖等信号通路发生作用, 腺介期主要是血液固化、表皮形成等通路, 这些通路与特定时期的行为密切相关. 蛋白质组分析也证实在腺介幼虫时期的蛋白主要参与到能量代谢、神经、信号传导, 而金星幼虫时期主要是骨架形成、增殖矿化、转录翻译^[32].

虽然目前已经有一些进展, 但是对于藤壶附着的认识还是十分有限, 尤其是可供观测的参数主要是通过观察幼虫的附着率来进行比较, 很难确定具体何种信号通路在藤壶体内的具体功能, 究竟是抑制了其中胶液的分泌或者是机体自身对于不良环境的趋避, 以及这些信号通路是否对生物的其他行为产生影响, 这些因素为特异性的友好型防污剂设计增添了极大阻碍. 随着转录组、蛋白质组的工作

不断深入, 各种机体内部的信号将会得到进一步的解析, 未来将充分了解藤壶机体的各项生理活动的机制, 从而针对其中的关键步骤, 设计特异性的环境友好型防污剂.

2 藤壶生物胶的研究现状

藤壶胶一直都是水下生物胶研究的难点, 获取藤壶胶中各蛋白成分、结构并开展功能研究是理解其黏附固化机制的关键, 将为防污新技术和仿生水下超强粘合材料研究提供新的启示.

2.1 藤壶胶的组成及结构分析

藤壶胶的采集与溶解十分困难, 严重阻碍了生化成分的分析. 最早 Barnes 发现鹅颈藤壶的胶液在十二烷基硫酸钠- 巯基乙醇(SDS-2Me)中具有较好的溶解性^[33], 随后严涛等利用变性剂(如 SDS、巯基乙醇、尿素以及氯仿- 甲醇等)对网纹藤壶的固化胶进行溶解, 其中, 93%的藤壶胶得到了溶解, 不溶部分经红外光谱检测均为蛋白质^[34].

Kamino 等^[35]通过 7 mol/L GdnHCl、0.5 mol/L DTT, 在 pH 9.0 条件下, 60℃加热将大部分固化胶溶解, 其中 6 种组分已经被鉴定: cp100k、cp52k、cp68k、cp20k、cp19k 和 cp16k. 它们按照氨基酸的组成特点和功能分为以下 4 类: 富含带电氨基酸的蛋白质(charged amino acid-rich)、疏水性蛋白质(hydrophobic)、6 种氨基酸偏好的蛋白质(six amino acid-biased)和酶(enzyme).

2.1.1 6 种氨基酸偏好的蛋白

cp68k 与 cp19 有相似的氨基酸偏好性, 包含甘氨酸(15.6%)、苏氨酸(12.1%)、丝氨酸(10.4%)、丙氨酸(10.4%)、赖氨酸(9.8%)和缬氨酸(8.1%), 这 6 种氨基酸为主要成分. 藤壶胶蛋白 cp68k 的初级结构可以分为 2 个区域, 富含丝氨酸、苏氨酸、丙氨酸和甘氨酸的 N 端和偏好赖氨酸、脯氨酸、色氨酸、半胱氨酸和疏水性氨基酸的 C 端, 而 cp19k 则由多个类似 cp68k 中区域交替形成, 这 2 种胶蛋白被认为用于取代界面水化层起表面黏附作用, 梁超等通过大肠杆菌异源表达获取了白脊藤壶的 *balcp19k*, 通过透析发现其具有较强的黏性, 为界面蛋白的理论提供了很好的支持^[36].

2.1.2 富含带电氨基酸的蛋白质

cp20k 含有丰富的带电氨基酸和半胱氨酸. 在红巨藤壶胶蛋白 *Mrcp20k* 中, 3 种带电氨基酸: Asp、Glu 和 His 共占据氨基酸组成的 32%, Cys 则占据了 17.5%. 水溶液中, 重组胶蛋白 *rMrcp20k*

能够选择性地吸附在方解石和金属氧化物表面, 因此 cp20k 可能在黏附至钙质基底过程中起重要作用^[34].

2.1.3 疏水性蛋白质

cp100k 和 cp52k 为疏水性藤壶胶蛋白质, 是藤壶胶中的主要成分. 二者在溶解性、氨基酸组成和疏水性上的相似性表明, 两者在水下黏附过程中可能具有类似的作用. Kamino 等^[37]通过化学合成方式获取 cp52k 的重复序列肽段, 在特定溶液条件下肽段二级结构会转变为 β 片层, 并且能自发组装形成淀粉样纤维, 这与固化胶中存在淀粉样纤维一致, 表明 cp52k 可能通过自组装形成纤维构成水不溶胶的主体^[38-39].

2.1.4 具有酶活性的胶蛋白

cp16k 的氨基酸序列与果蝇溶菌酶 P(lysozyme-P)具有 47% 的相似度, 且 cp16k 对藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*)形成的菌膜具有裂解性, 这表明 cp16k 可能起去除基底表面的生物薄膜和保护交联固化的藤壶胶免受微生物的降解的作用(具体功能如表 1 所示).

Table 1 The function of barnacle cement proteins

表 1 藤壶胶蛋白的生理作用

胶蛋白名称	作用
cp20k	特异性地吸附钙质底盘
cp68k、cp19k	对材料的结合具有重要作用
cp52k、cp100k	维持蛋白质构象, 增强蛋白质间的相互作用
cp16k	保护藤壶胶不受外界微生物的影响

基于藤壶胶蛋白的结构功能, 结合蛋白质免疫印迹以及杂交等技术, Kamino 提出可能的藤壶黏附模型(图 4 所示).

该模型指出, cp68k、cp19k 和 cp20k 蛋白参与基底表面的水化层的取代、藤壶胶在材料表面的扩散及表面偶联的步骤. 当钙质底板和水下基底表面发生偶联的同时或不久后, 胶蛋白通过自组装将两种材料粘接在一起. 此时, 藤壶胶中含量丰富且疏水性极强的两种蛋白 cp52k 和 cp100k, 它们可能通过分子间疏水性相互作用或其他未知的机制快速地形成网络结构, 从而使其他胶蛋白结合在一起. 而 cp16k 能防止微生物的降解作用, 从而维持藤壶在基底的牢固黏附^[40].

近年来, 转录组深度测序技术在解析藤壶黏附相关基因方面取得了显著成果. Lin 等^[41]对依靠膜

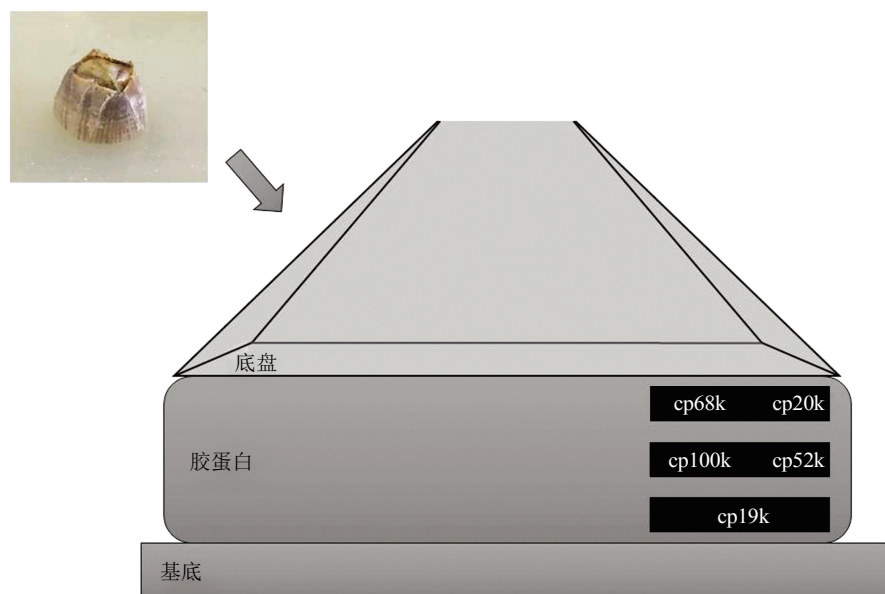


Fig. 4 The structure formation in barnacle adhesion

图4 藤壶胶黏附模型

附着的日本笠藤壶(*Tetraclita japonica formosana*)进行下一代转录测序,并结合纹藤壶与红巨藤壶的序列从转录组数据中调取该藤壶的胶基因序列,发现其中 *Tjcp20k* 基因并未得到检测,推测或许存在不同的黏附机制。钱培源等^[28]通过解析纹藤壶转录组数据发现,2个初级结构和化学组成高度相似的与红巨藤壶胶蛋白 *Mrcp20k* 同源的蛋白,并命名为 *Aamcp20k-1*、*Aamcp20k-2*,这表明藤壶胶中可能含有一些具有特定功能的“家族”蛋白, *Aamcp20k-1* 和 *Aamcp20k-2* 分别定位于胶液腺 α 分泌细胞和 β 分泌细胞,不同的定位表明这两种蛋白在分泌过程中可能存在不同的调控机制。美国纳瓦实验室多位科学家通过转录组以及转录组结合蛋白质组学的研究方式^[42]发现了纹藤壶中与红巨藤壶胶蛋白 *Mrcp19k* 具有同源性的 *Amacp19k*、与纹藤壶 *Amacp100k* 具有极高相似性的 *Amacp114k*。Christopher 等^[43]有目的地利用使淀粉样纤维“去组装”的强极性溶剂 6-氟异丙醇溶解了纹藤壶固化胶,结合蛋白质组学和转录组学的方式通过 MASCOT 本地搜库获取到了与丝蛋白有较高相似性的新蛋白 *Amacp43k*,从其氨基酸组成来看它可能是 *Mrcp68k* 的同源蛋白,此外还发现了纹藤壶胶蛋白中具有“*Amacp19k* 家族”、“*Amacp43k* 家族”、

“*Amacp52k* 家族”、“*Amacp57k* 家族”、多种氧化酶和蛋白酶。这些结果表明藤壶胶中相同大小的蛋白质序列,极可能含有多种不同的结构差异,这给后续的固化机制研究带来了极大挑战。

2.2 胶的黏附固化机制研究

虽然对藤壶胶中的蛋白质组分以及功能有了一个较为清晰的认识,但并未有更科学的证据证实蛋白间的具体机制。不同于贻贝足丝蛋白中,依赖二羟基苯丙氨酸(DOPA)的强力吸附^[44],藤壶的黏附主要是凭借藤壶胶的附着,而胶液中并没有检测到 DOPA 的存在。据此,针对藤壶胶的固化、交联机制,研究人员开展了一系列的探索研究。

2.2.1 醌交联

醌交联机制认为蛋白质和双酚类物质在多酚氧化酶作用形成交联键,如图 5a,这一机制在皮革鞣化、昆虫表皮硬化等过程中普遍存在^[45]。20 世纪 70 年代, Walker^[46]对藤壶幼虫进行显微观察,发现蛋白性的藤壶胶分别储存在胶腺(长达 120 μm , 肾形)的两种不同类型的颗粒(α 和 β)中,并在 α 颗粒中鉴定到蛋白质、酚类和多酚氧化酶组分,由此他们推测,相互分离的胶黏剂组分在释放和加工过程中,经由醌交联作用形成硬质的胶黏剂斑块。然而成虫胶中并没有发现酚类分子或前体,醌交联会

产生副产物——黑色素分子，Lindner 在检测藤壶胶中黑色素时只有极微弱的阳性反应，固化后的藤壶胶呈明显的白色、半透明状也表明没有黑色素存在^[47]。Nigrelli 等^[48]将酚氧化酶的抑制剂(如氰化钾、

碘化钾和邻苯二酚)加入藤壶胶中，发现其对胶的交联固化过程没有影响。基于这些证据藤壶胶醌交联固化理论未得到广泛认可。

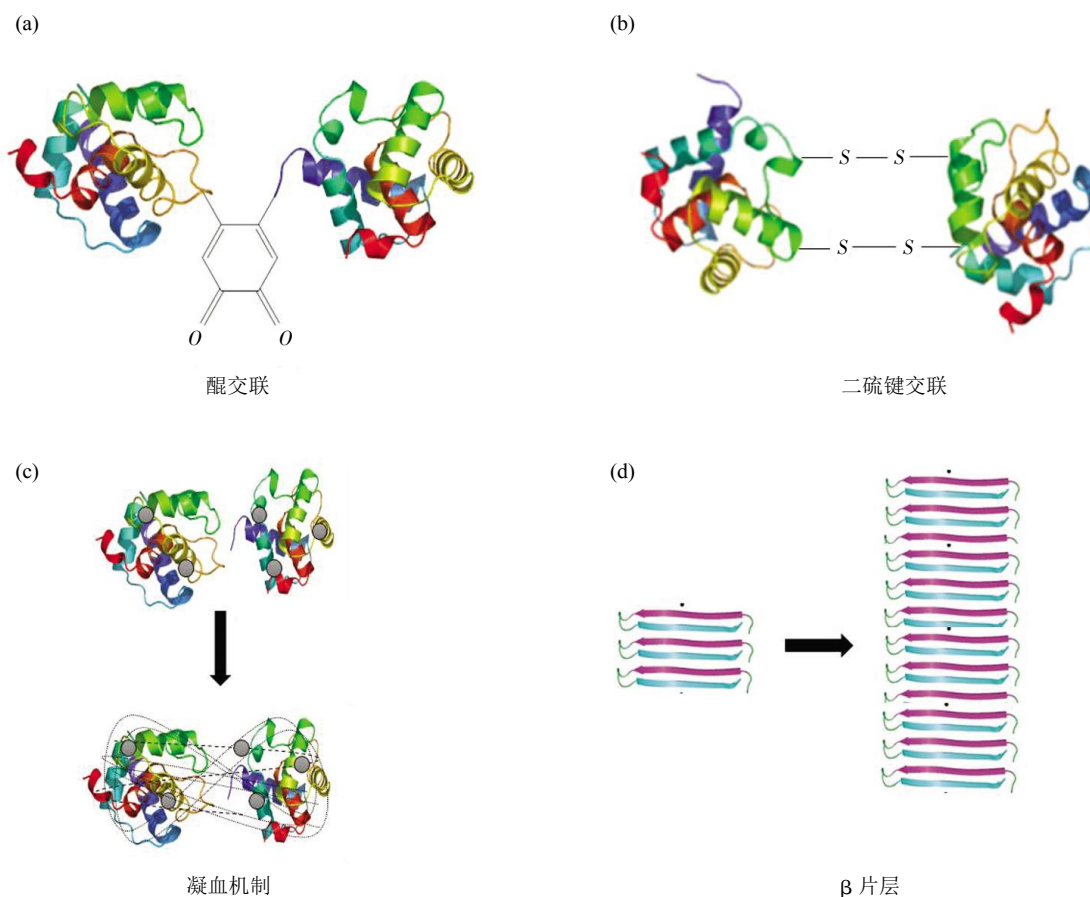


Fig. 5 The diagram of barnacle glue crosslinking

图5 藤壶胶交联假说示意图

2.2.2 二硫键交联

Dougherty 等发现 *Chthamalus fragilis* 的液态胶中具有酶活受钙离子浓度调控锌金属蛋白酶^[46]，通过液态胶作用与具有特定酶切位点的多肽，发现这种锌金属蛋白酶本质是一种羧肽酶，作者认为这种酶可能与修饰胶蛋白前体，使巯基暴露进而形成稳定的二硫键从而固化有关^[49]，如图 5b；Kamino 等^[50]通过还原剂处理使部分藤壶胶溶解，这意味着破坏二硫键能部分破坏藤壶胶交联结构，因此人们提出二硫键可能在藤壶胶交联固化中的重要作用。而拉曼光谱在藤壶胶中只检测到极低信号强度的 S—S 键信号，这表明二硫键可能并不起主要交联作用^[43]。

2.2.3 类血液凝固机制

Dickinson 等^[34]通过串联质谱鉴定和蛋白质印迹的方式发现未固化的纹藤壶液态胶中具有与牛胰蛋白酶同源以及与人转谷氨酰胺酶同源的蛋白酶，后续酶活测试验证了这一结论。转谷氨酰胺酶是血液凝固过程中重要蛋白酶，因此作者推测藤壶胶固化机制类似于血液凝固，藤壶液态胶中具有前体胶蛋白、无活性转谷氨酰胺酶和胰蛋白酶，胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶激活转谷氨酰胺酶、胶蛋白前体，胶蛋白在界面发生构象变化和自组装进而在转谷氨酰胺酶作用下交联，如图 5c。然而，由于液态胶采集容易受到组织液污染，虽然观察到人为采集的液态胶能够转变成固态胶，但这不足以说明转谷氨

酰胺酶不是源自组织液污染, Kamino 等也因此提出质疑。

2.2.4 淀粉样纤维聚集

淀粉样纤维的黏附蛋白广泛存在于自然界中, 如阿尔茨海默病由淀粉样蛋白聚集引起; 卷曲菌毛超微结构主要为淀粉样纤维, 大肠杆菌依赖菌毛降低表面张力以形成生物膜。Barlow 等通过圆二色谱和 ATR/FTIR 对藤壶胶进行表征, 发现藤壶胶中 β 片层二级结构达到 40%, 而大量堆叠的 β 片层是形成淀粉样纤维的前提^[51], 如图 5d。Sullan 等通过 AFM 观察到胶中有大量的纤维, 长度 50 nm 至 100 nm, 纤维占比接近 5%, 通过特异荧光染料 ThT 鉴定表明这些纤维是淀粉样纤维^[52]。Kamino 等通过化学合成得到 Mrcp20k 和 Mrcp52k 的重叠序列肽段, 在特定离子强度和 pH 条件下这些肽段空间结构会转化为 β 片层, 并能自组装形成淀粉样纤维^[39]。淀粉样纤维极度疏水, 这恰好可以解释藤壶胶难溶性, Christopher 因此提出用特异溶解淀粉样纤维的强极性溶剂 6- 氟异丙醇“去组装”的方式溶解藤壶胶, 基于该方法作者从纹藤壶固化胶中分离到全新蛋白 Aamcp43k 以及其他蛋白家族^[43]。藤壶胶中含有大量淀粉样纤维已经被广泛认可, 但其自组装依赖何种驱动力、是否有酶参与尚无定论。

2.2.5 磷酸化蛋白的作用

贻贝、沙堡蠕虫、海黄瓜胶中均存在磷酸化修饰蛋白, 其能与带电界面发生强烈亲和吸附从而起到黏附作用, 此外磷酸化蛋白还可能参与生物矿化^[12, 15, 53]。Burden 发现藤壶金星幼虫胶的分泌是逐步进行的, 脂质先分泌到界面上排开海水, 进而富含磷酸蛋白的第二组分分泌到界面上实现固化、黏附^[54]。Dickinson 等^[55]通过磷酸化特异的染料染色和磷酸化蛋白抗体免疫印迹证明无柄藤壶纹藤壶成虫液态胶中存在磷酸化蛋白, 通过胶内矿化分析表明这些磷酸化蛋白能在胶内诱导形成碳酸钙晶体也即矿化作用。

2.2.6 其他机理

最近几年, 人们渐渐关注藤壶胶中的特殊蛋白和非蛋白成分。尽管藤壶胶中存在的糖类、脂质以及无机物等的含量很低, 但它们可能在其中发挥的粘接及固化作用不容忽视。a. 多糖复合: Jonker 等^[56]通过拉曼检测到多羟基醛信号表明胶中可能有多糖存在, Otness 等^[57]发现胶中有氨基己糖的存在, 因此猜测蛋白质与多糖形成复合物可能与胶固

化有关, 而 Cheung 等^[58]发现添加淀粉酶并不影响液态胶的固化作用, 这表明碳水化合物可能在胶固化过程中并不起作用。b. 金属元素可能的作用: 藤壶胶在一定离子强度的海水中固化并发挥作用, 因此人们猜测离子可能与固化有关^[59]。Jonker 等^[56, 60]通过扫描电镜能谱分析 (SEM-EDS) 检测到 Na, Mg, Ca, Cl, Al, Si, K 等金属元素, 但拉曼光谱并没有检测到蛋白质与金属相互作用的信号, 这表明无机金属元素可能在胶固化中并不起作用。

综上所述, 到目前为止, 仍没有一个完全被接受的藤壶胶交联固化模型, 特别诱导藤壶胶从液态到固态的关键因素并不清楚。然而, 以上的研究给我们许多启发: 在研究藤壶胶的交联固化时, 一方面搞清各胶蛋白质成分的结构和功能, 另一方面, 也要重视一些特殊形式的蛋白质和非蛋白成分在其中发挥的作用。如此这样, 将对藤壶胶的固化交联研究有突破性进展。

3 总结展望

随着海洋资源与环境日益受到人们的关注, 认识到藤壶对海上设施的污损日益突出。为了减少经济损失, 建立一套经济、高效的藤壶防治措施是海洋战略中急需的一环。而藤壶所分泌的胶液, 因为具有在水下进行交联固化的本领, 其研究具有十分重要的意义。从发展趋势上看, 今后的研究可能集中在以下几点:

a. 与藤壶胶分泌密切相关信号通路探讨。生物体内的信号通路众多, 而真正调控胶腺分泌液态胶的基因非常有限, 找出与之相关的信号通路, 将有利于特异性针对藤壶附着的这一生理过程进行防污设计, 为防污领域提供理论指导。

b. 不同防污剂处理后藤壶内部的转录组差异。组学的方法已经逐步引起了人们的重视, 通过比较不同时期的基因差异表达可找出关键性的信号通路以及胶基因, 而经过防污剂刺激前后的转录组差异研究将更为直接地找出黏附相关的信号通路提供依据。

c. 发现新的蛋白质, 表达出更多新的蛋白开展黏附固化机制研究, 完善机制, 更好地为防污和水下粘合服务。从液态胶源头分析生物胶的成分, 发现更多新的蛋白, 液态胶的采集与研究。固态胶的结构稳定, 抗水解能力强, 难以直接进行分子生物学的检测, 而通过适当倒置的方法, 可以持续不断地采集液态胶, 为深入了解藤壶胶的性质提供技

术支持, 彻底解开藤壶黏附机理的神秘面纱。

参 考 文 献

- [1] Grosvenor P C. Darwin and the barnacle: the story of one tiny creature and history's most spectacular scientific breakthrough (review). *Perspectives in Biology and Medicine*, 2004, **47** (4): 624-626
- [2] Knightjones E W, Crisp D J. Gregariousness in barnacles in relation to the fouling of ships and to anti-fouling research. *Nature*, 1953, **171**(4364): 1109-1110
- [3] Callow J A, Callow M E. Trends in the development of environmentally friendly fouling-resistant marine coatings. *Nature Communications*, 2011, **2**(1): 244
- [4] Graham P D, Joint I, Nevell T G, *et al.* Bacterial colonisation and settlement of algal spores and barnacle larvae on low surface energy materials. *Biofouling*, 2000, **16**(2-4): 289-299
- [5] Di Fino A, Petrone L, Aldred N, *et al.* Correlation between surface chemistry and settlement behaviour in barnacle cyprids (*Balanus improvisus*). *Biofouling*, 2014, **30**(2): 143-152
- [6] Berglin M, Wynne K J, Gatenholm P. Fouling-release coatings prepared from alpha, om-ega-dihydroxypoly (dimethylsiloxane) cross-linked with (heptadecafluoro-1, 1, 2, 2-tetrahydrodecyl) tri-ethoxysilane. *Journal of Colloid & Interface Science*, 2003, **257**(2): 383-391
- [7] Crisp D J, Walker G, Young G A, *et al.* Adhesion and substrate choice in mussels and barnacles. *Journal of Colloid & Interface Science*, 1985, **104**(1): 40-50
- [8] Matsumura K, Nagano M, Fusetani N. Purification of a larval settlement-inducing protein complex (SIPC) of the barnacle, *Balanus amphitrite*. *Journal of Experimental Zoology*, 1998, **281**(1): 12-20
- [9] Dreanno C, Matsumura K, Dohmae N, *et al.* An alpha2-macroglobulin-like protein is the cue to gregarious settlement of the barnacle *Balanus amphitrite*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(39): 14396-14401
- [10] Pagett H E, Abrahams J L, Bones J, *et al.* Structural characterisation of the N-glycan moiety of the barnacle settlement-inducing protein complex (SIPC). *J Exp Biol*, 2012, **215**(Pt 7): 1192-1198
- [11] Dreanno C, Kirby R R, Clare A S. Involvement of the barnacle settlement-inducing protein complex (SIPC) in species recognition at settlement. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2007, **351**(1-2): 276-282
- [12] Stewart R J, Wang C S. Adaptation of caddisfly larval silks to aquatic habitats by phosphorylation of h-fibroin serines. *Biomacromolecules*, 2010, **11**(4): 969-974
- [13] Dreanno C, Kirby R R, Clare A S. Smelly feet are not always a bad thing: the relationship between cyprid footprint protein and the barnacle settlement pheromone. *Biology Letters*, 2006, **2** (3): 423-425
- [14] Matsumura K, Nagano M, Kato-Yoshinaga Y, *et al.* Immunological studies on the settlement-inducing protein complex (SIPC) of the barnacle *Balanus amphitrite* and its possible involvement in larva - larva interactions. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, 1998, **265**(1408): 1825-1830
- [15] Stewart R J, Weaver J C, Morse D E, *et al.* The tube cement of *Phragmatopoma californica*: a solid foam. *Journal of Experimental Biology*, 2004, **207**(26): 4727-4734
- [16] Yamamoto H, Tachibana A, Matsumura K, *et al.* Protein kinase C (PKC) signal transduction system involved in larval metamorphosis of the barnacle, *balanus amphitrite*. *Zoological Science*, 1995, **12**(4): 391-396
- [17] Hisashi Y, Tatsufumi O, Erina Y, *et al.* Methyl farnesoate induces larval metamorphosis of the barnacle, *Balanus amphitrite* *via* protein kinase C activation. *Journal of Experimental Zoology*, 1997, **278**(278): 349-355
- [18] Clare A, Thomas R, Rittschof D. Evidence for the involvement of cyclic AMP in the pheromonal modulation of barnacle settlement. *The Journal of Experimental Biology*, 1995, **198**(3): 655-664
- [19] Chen Z F, Wang H, Matsumura K, *et al.* Expression of calmodulin and myosin light chain kinase during larval settlement of the Barnacle *Balanus amphitrite*. *PLoS One*, 2012, **7**(2): e31337
- [20] Yamamoto H, Tachibana A, Kawaii S, *et al.* Serotonin involvement in larval settlement of the barnacle, *Balanus amphitrite*. *Journal of Experimental Zoology*, 1996, **275**(5): 339-345
- [21] Yamamoto H, Tachibana A, Saikawa W, *et al.* Effects of calmodulin inhibitors on cyprid larvae of the barnacle, *Balanus amphitrite*. *Journal of Experimental Zoology*, 1998, **280**(1): 8-17
- [22] Zhang Y, He L S, Zhang G, *et al.* The regulatory role of the NO/cGMP signal transduction cascade during larval attachment and metamorphosis of the barnacle *Balanus (=Amphibalanus) amphitrite*. *J Exp Biol*, 2012, **215**(Pt 21): 3813-3822
- [23] Zhang G, Wong Y H, Zhang Y, *et al.* Nitric oxide inhibits larval settlement in *Amphibalanus amphitrite* cyprids by repressing muscle locomotion and molting. *PROTEOMICS*, 2015, **15** (22): 3854-3864
- [24] He L S, Xu Y, Matsumura K, *et al.* Evidence for the involvement of p38 MAPK activation in barnacle larval settlement. *PLoS One*, 2012, **7**(10): e47195
- [25] Zhang G, He L S, Wong Y H, *et al.* MKK3 was involved in larval settlement of the barnacle *Amphibalanus amphitrite* through activating the kinase activity of p38MAPK. *PLoS One*, 2013, **8**(7): e69510
- [26] Zhang G, He L S, Wong Y H, *et al.* siRNA transfection in larvae of the barnacle *Amphibalanus amphitrite*. *J Exp Biol*, 2015, **218**(Pt 16): 2505-2509.
- [27] Zhang G, Yan G Y, Yang X X, *et al.* Characterization of arginine kinase in the barnacle *amphibalanus amphitrite* and its role in the larval settlement. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 2016, **326** (4): 237-249
- [28] Chen Z F, Matsumura K, Wang H, *et al.* Toward an understanding of the molecular mechanisms of barnacle larval settlement: a comparative transcriptomic approach. *PLoS One*, 2011, **6**(7): 65-65

- [29] Yan X C, Chen Z F, Sun J, *et al.* Transcriptomic analysis of neuropeptides and peptide hormones in the barnacle *Balanus amphitrite*: evidence of roles in larval settlement. *PLoS One*, 2012, **7**(10): e46513
- [30] Gohad N V, Aldred N, Hartshorn C M, *et al.* Synergistic roles for lipids and proteins in the permanent adhesive of barnacle larvae. *Nat Commun*, 2014, **5**: 4414
- [31] Riddiford L M. Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis. *American Zoologist*, 1993, **3**(3): 203–209
- [32] Chen Z F, Zhang H, Wang H, *et al.* Quantitative proteomics study of larval settlement in the Barnacle *Balanus amphitrite*. *PLoS One*, 2014, **9**(2): e88744
- [33] Barnes I, Dobney K M, Young J P W. The molecular palaeoecology of geese: identification of archaeological goose remains using ancient DNA analysis. *International Journal of Osteoarchaeology*, 1998, **8**(4): 280–287
- [34] Yan T, Fang Z, Zhang S, *et al.* The separation of barnacle cement components. *Tropic Oceanology*, 1996, **15**(3): 61–66
- [35] Kamino K, Maruyama T. Cement proteins of the acorn barnacle, *megabalanus rosa*. *The Biological Bulletin*, 1996, **190**(3): 403–409
- [36] Liang C, Li Y, Liu Z, *et al.* Protein aggregation formed by recombinant cp19k homologue of *Balanus albicostatus* combined with an 18 kDa N-terminus encoded by pET-32a(+) plasmid having adhesion strength comparable to several commercial glues. *Plos One*, 2015, **10**(8): e0136493
- [37] Nakano M, Shen J R, Kamino K. Self-assembling peptide inspired by a barnacle underwater adhesive protein. *Biomacromolecules*, 2007, **8**(6): 1830–1835
- [38] Kamino K, Nakano M, Kanai S. Significance of the conformation of building blocks in curing of barnacle underwater adhesive. *FEBS J*, 2012, **279**(10): 1750–1760
- [39] Nakano M, Kamino K. Amyloid-like conformation and interaction for the self-assembly in barnacle underwater cement. *Biochemistry*, 2015, **54**(3): 826–835
- [40] Kamino K. Mini-review: barnacle adhesives and adhesion. *Biofouling*, 2013, **29**(6): 735–749
- [41] Lin H C, Wong Y H, Tsang L M, *et al.* First study on gene expression of cement proteins and potential adhesion-related genes of a membranous-based barnacle as revealed from Next-Generation Sequencing technology. *Biofouling*, 2014, **30**(2): 169–181
- [42] Wang Z, Leary D H, Liu J, *et al.* Molt-dependent transcriptomic analysis of cement proteins in the barnacle *Amphibalanus amphitrite*. *BMC Genomics*, 2015, **16**(1): 1–14
- [43] So C R, Fears K P, Leary D H, *et al.* Sequence basis of Barnacle Cement Nanostructure is Defined by Proteins with Silk Homology. *Sci Rep*, 2016, **6**: 36219
- [44] Anderson T H, Yu J, Estrada A, *et al.* The contribution of DOPA to substrate-peptide adhesion and internal cohesion of mussel-inspired synthetic peptide films. *Advanced Functional Materials*, 2010, **20**(23): 4196–4205
- [45] Rutter P R, Dazzo F B, Freter R, *et al.* Mechanisms of adhesion. *Life Sciences Research Reports*, 1984, **31**(1): 4–19
- [46] Dougherty W J. Zinc metalloprotease activity in the cement precursor secretion of the barnacle, *Chthamalus fragilis* Darwin. *Tissue & Cell*, 1996, **28**(4): 439–447
- [47] Zheden V, Klepal W, Byern J V, *et al.* Biochemical analyses of the cement float of the goose barnacle *Dosima fascicularis*——a preliminary study. *Biofouling*, 2014, **30**(8): 949–963
- [48] Nigrelli R F, Jr S M, Ruggieri G D, *et al.* Substances of potential biomedical importance from marine organisms. *Federation Proceedings*, 1967, **26**(4): 1197–1205
- [49] Dougherty W. Carboxypeptidase activity of the zinc metalloprotease in the cement precursor secretion of the barnacle, *Chthamalus fragilis* Darwin. *Comparative Biochemistry & Physiology B Comparative Biochemistry*, 1997, **28**(4): 439–447
- [50] Kamino K, Inoue K, Maruyama T, *et al.* Barnacle cement proteins. Importance of disulfide bonds in their insolubility. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, **275**(35): 27360–27365
- [51] Barlow D E, Dickinson G H, Orihuela B, *et al.* Characterization of the adhesive plaque of the barnacle *Balanus amphitrite*: amyloid-like nanofibrils are a major component. *Langmuir*, 2010, **26**(9): 6549–6556
- [52] Sullan R M A, Gunari N, Tanur A E, *et al.* Nanoscale structures and mechanics of barnacle cement. *Biofouling*, 2009, **25**(3): 263–275
- [53] Flammang P, Lambert A, Bailly P, *et al.* Polyphosphoprotein-containing marine adhesives. *Journal of Adhesion*, 2009, **85** (8): 447–464
- [54] Burden D K, Barlow D E, Spillmann C M, *et al.* Barnacle *Balanus amphitrite* adheres by a stepwise cementing process. *Langmuir the Acs Journal of Surfaces & Colloids*, 2012, **28**(37): 13364–13372
- [55] Dickinson G H, Yang X, Wu F, *et al.* Localization of phosphoproteins within the barnacle adhesive interface. *Biol Bull*, 2016, **230**(3): 233–242
- [56] Jonker J L, Von Byern J, Flammang P, *et al.* Unusual adhesive production system in the barnacle *Lepas anatifera*: an ultrastructural and histochemical investigation. *J Morphol*, 2012, **273**(12): 1377–1391
- [57] Otness J S, Medcalf D G. Chemical and physical characterization of barnacle cement. *Comparative Biochemistry & Physiology Part B Comparative Biochemistry*, 1972, **43**(2): 443–444
- [58] Cheung P J, Nigrelli R F. Secretory activity of the cement gland in different developmental stages of the barnacle *Balanus eburneus*. *Marine Biology*, 1975, **32**(1): 99–103
- [59] Senkbeil T, Mohamed T, Simon R, *et al.* *In vivo* and *in situ* synchrotron radiation-based mu-XRF reveals elemental distributions during the early attachment phase of barnacle larvae and juvenile barnacles. *Anal Bioanal Chem*, 2016, **408** (5): 1487–1496
- [60] Jonker J L, Morrison L, Lynch E P, *et al.* The chemistry of stalked barnacle adhesive (*Lepas anatifera*). *Interface Focus*, 2015, **5** (1): 20140062

Barnacle Adhesion: From Substrate Detection to Cement Curing

ZHANG Xin-Kang, LIU Xing-Ping, ZENG Ling, YE Zong-Huang, HU Bi-Ru*, WU Wen-Jian

(College of Science, National University of Defense Technology, Changsha 410073, China)

Abstract The strong adhesion of barnacles to underwater facilities causes great fouling, on the other hand, it provides a platform for underwater attachment research. The associated anti-fouling and underwater adhesion techniques are strongly dependent on the understanding of their attachment processes and molecular mechanisms. At present, the macroscopic process of the adhesion of the barnacles has a more in-depth development, including the substrate detection, signal transmission, glue secretion and curing, but the molecular mechanism of the process such as receptor recognition and the regulation of gene are still limited. Biological and biochemical studies have been motivated mainly by understanding the nature of the adhesion, which indicate that the various stages of molecular mechanisms related to anti-fouling and adhesion is essential. In this paper, the focuses are on the common themes and interconnections in three related areas: the process of barnacle attachment, the internal signal molecular response during adhesion, and the mechanism of curing during the process of glue secretion. The existing problems were also given to analyze further possible research.

Key words barnacle, base-detection, signal pathway, glue secretion and curing

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0390

*Corresponding author.

Tel: 86-731-84574247, E-mail: brhu@yeah.net

Received: December 29, 2016 Accepted: February 28, 2017