

变性剂对藤壶胶的溶解作用*

严文侠

潘苏华

(中国科学院南海海洋研究所) (华南热带作物产品加工设计研究所)

一些学者和我们的工作证实藤壶胶的主要成分为蛋白质^[1,2,7,11,13]。Lindner 等(1969)对缺刻藤壶 *Balanus crenatus* Bruguieri 进行了溶解试验,结果表明这种藤壶胶不溶于苯、稀酸、稀碱等溶剂^[10];李刚等(1978)认为藤壶胶是一种交联度很高、结合很牢固的蛋白质^[1]。有些学者提出藤壶胶是一种由醌交联的蛋白质^[11,12],而 Barnes 等(1976)依据 *Lepas fascicularis* Ellis & Solander 胶粘物能全部溶于1%的十二烷基硫酸钠-巯基乙醇水溶液中,提出藤壶胶是二硫键连接的聚合物,进一步亦可用十二烷基硫酸钠断裂的次级键键合起来^[5]。

到目前为止,除 *Lepas fascicularis* 胶外,还没有见到用上述试剂对藤壶亚目的胶粘物(胶)进行研究的报道。我们用十二烷基硫酸钠、巯基乙醇、尿素的水溶液和氯仿-甲醇溶剂试验已固化的网纹藤壶次生胶(Secondary cement of *Balanus reticulatus*) 溶解情况,探索稳定藤壶胶蛋白的化学键,为深入研究藤壶胶的固化机理积累资料。

一、材料和方法

1. 胶样和试剂

实验用的胶样是1977年采集保存于干燥器内的网纹藤壶次生胶^[2],使用前先在玛瑙研钵中充分研碎。

所用的试剂一般都是分析纯。十二烷基硫酸钠(SDS)为化学纯,用乙醇重结晶;巯基乙醇(2Me)和甲叉双丙烯酰胺级别为纯;丙烯酰胺和考马斯亮蓝 R-250 为实验试剂。

2. 溶解试验

每管试验胶样约为20毫克。

用五种试剂——尿素、氯仿、甲醇、SDS和2Me分成七组对藤壶胶进行溶解试验,其中第2—6组胶样先经一些试剂抽提(或溶解),不溶物再溶于1%的SDS-2Me中。除第2组氯仿-甲醇抽提外,每个步骤都需在38℃内恒温五天,结果见表1。

3. SDS-聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳

上述几种试剂对藤壶胶的溶解效果,用SDS-聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳进行检测。

10% 丙烯酰胺溶液: 22.2克丙烯酰胺和0.4克甲叉双丙烯酰胺,加蒸馏水溶成100毫升。藤壶胶的8M尿素、1% 2Me、或1% 2Me-8M尿素的抽提液加入SDS成1%SDS溶

* 中国科学院上海生物化学研究所沈昭文、戚正武教授、酶学研究室副主任王庆诚同志审查原稿并提出宝贵意见;交通部湛江港务局航道科提供藤壶胶胶样;广州市环境保护研究所颜丽英同志进行凝胶密度扫描;福建师范大学陈天佑同志进行红外分析;张前玉同志拍摄照片,特此一并致谢。
本刊编辑部收到稿件日期:1980年7月14日。

表 1 网纹藤壶胶溶解试验

组 别	氯仿-甲醇 ¹⁾ (2:1) 6 毫升	1% SDS 10 毫升	8M 尿 素 10 毫升	1%SDS-8M 尿素 10 毫升	1%2Me-8M 尿素 10 毫升	1%SDS-2Me 10 毫升	1% 2Me 10 毫升
1						+	
2	+					+	
3		+				+	
4			+			+	
5				+		+	
6					+	+	
7							+

1) 2 毫升氯仿-甲醇溶液在室温下抽提胶样,抽提后的不溶物用同样方法再进行两次,整个步骤需时二天。

“+”表示胶样在这类溶液中抽提或溶解,整个试验共 65 管。

液。取 0.2 毫升藤壶胶溶解液进行电泳分离。电泳条件: 电流 5—6 毫安/每支凝胶, 电压 7—13 伏/厘米, 时间 3—5 小时。此外, 凝胶制备方法, 电泳操作步骤, 凝胶染色和脱色, 以及胶蛋白的区带相对泳动率 (R_m) 的测定都同于 Weber 等 (1969) 的方法^[4]。用日本岛津 CS-900 型双波长色层扫描仪进行密度扫描, 样品波长 550 毫微米, 参比波长 730 毫微米, 狭缝 0.2×0.4 毫米。

藤壶胶蛋白的组份分子量测定: 选择牛血清白蛋白, 人 γ -球蛋白, 卵清蛋白, 胃蛋白酶, 牛糜蛋白酶原和核糖核酸酶五种标准蛋白样品, 各称取 3—5 毫克, 分别溶于 10 毫升 0.01M 磷酸缓冲液内 (内含 1% SDS-2Me), 电泳条件与藤壶胶溶解液一样。

4. 红外光谱分析

藤壶胶的 1% SDS-2Me 不溶物与 1% KBr 压片成盘状, 进行红外测定。

二、结 果

1. 用 1% SDS-2Me 处理

重量为 19.9 毫克、15.4 毫克和 19.9 毫克的胶样, 分别溶于 1% SDS-2Me 液内, 在 38°C 恒温五天后离心, 沉淀物用蒸馏水洗涤几次, 干燥, 称恒重。三管沉淀物占各自胶样的 6.28%, 8.77% 和 5.65%, 这样, 胶样平均溶解量为 93.1%。

胶溶解液经 SDS-凝胶电泳后, 在染色的凝胶条上可识别出十四个区带 (图 1), 其中第 2, 3, 4, 10, 12 和 14 区带颜色较深, 估计这几个组份的蛋白含量较高。

第 2—7 区带的相对泳动率 (R_m) 0.18—0.28, 分子量在 70,000 以上 (估计第 2—4 区带分子量在 100,000 以上), R_m 0.32—0.73 的第 8—13 区带, 蛋白质组份的分子量在 70,000—13,000 之间, 其中第 10 区带分子量不到 40,000, 第 14 区带 R_m 0.89, 估计分子量不到 10,000。

1% SDS-2Me 的不溶物进行红外分析, 在 3350—3080 厘米⁻¹ (—NH 键), 1620—1510 厘米⁻¹ (肽键) 1250 厘米⁻¹, 1450 厘米⁻¹ 和 1060 厘米⁻¹ 处有吸收峰, 其中 1620—1510 厘米⁻¹ 处吸收最强 (图 2)。这些吸收峰都是蛋白质的特征吸收谱带, 清楚表明不溶物主要成分仍是蛋白质, 由于分子量较大和氢键的影响, 使吸收谱带有些飘移。

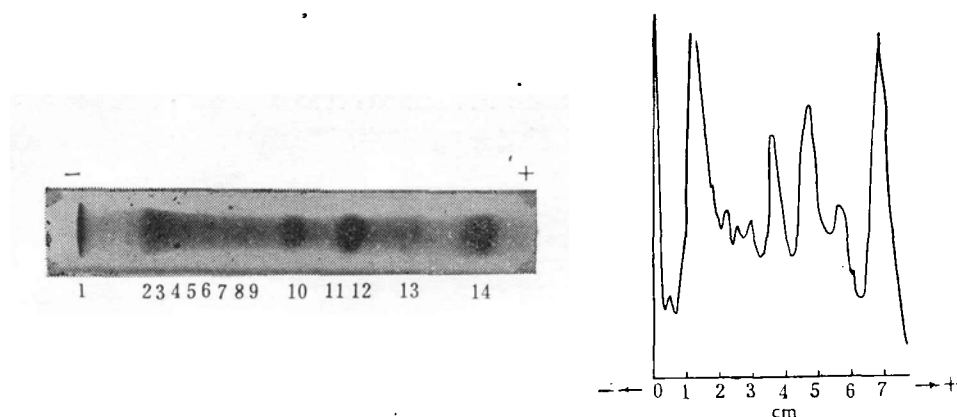


图 1 网纹藤壶胶 1% SDS-2Me 溶解液电泳图谱和密度扫描

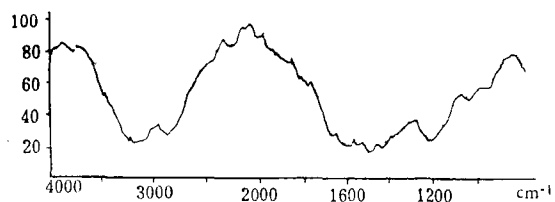


图 2 胶样 1% SDS-2Me 不溶物的红外图谱

2. 用氯仿-甲醇处理

胶样先用氯仿-甲醇 (2:1) 抽提二天, 不溶部分再溶于 1% SDS-2Me 中, 溶解液电泳结果见图 3。从图上可以看出被氯仿-甲醇预先抽提过的胶样 1% SDS-2Me 溶解液电泳图谱与第一组的结果十分相似, 分出 14 个区带, 不同的是第 12 和 14 两区带的含量大为降低(与图 1 比较)。

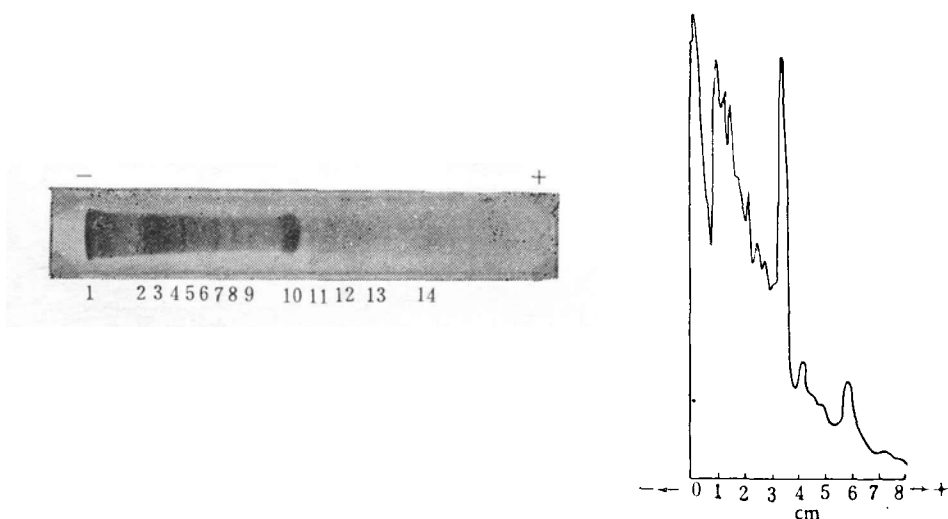


图 3 氯仿-甲醇 (2:1) 抽提后的胶样 1% SDS-2Me 溶解液电泳图谱和密度扫描

又用氯仿和甲醇分别处理胶样(方法同氯仿-甲醇法),查清影响第 12,14 两区带的溶剂(图 4)。图上明显看出影响这两个区带的试剂主要是甲醇。

藤壶胶的氯仿-甲醇抽提液在 38℃ 真空下挥发溶剂,待溶剂除尽后,加入 1% SDS 溶液,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,但未分离出蛋白区带。

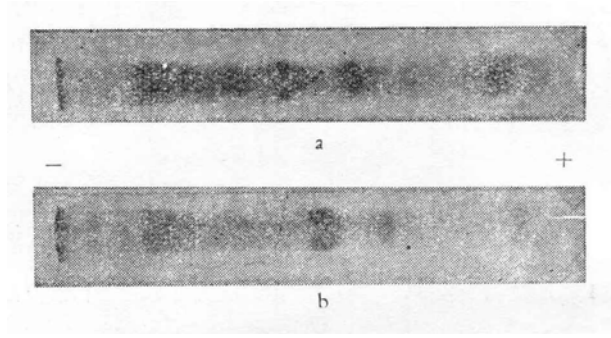


图 4 胶样 1% SDS-2Me 溶解液电泳图谱
a. 氯仿抽提过的胶样; b. 甲醇抽提过的胶样。

3. 用 SDS 处理

藤壶胶在 1% SDS 溶液内膨胀,溶解液进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,显示出两个区带(图 5a),第 2 个区带位置类似于全胶 1%SDS-2Me 溶液的第 7 区带。电泳加样量为一般用量的一倍,凝胶上区带狭窄色浅,这都说明单用 SDS,网纹藤壶胶的溶解量很小。

藤壶胶的 SDS 不溶部分在 1% SDS-2Me 溶液中溶解,电泳图谱基本类似于全胶样溶解液的结果,不同的是第 7 区带消失,第 12,14 两区带含量降低(图 5b)。

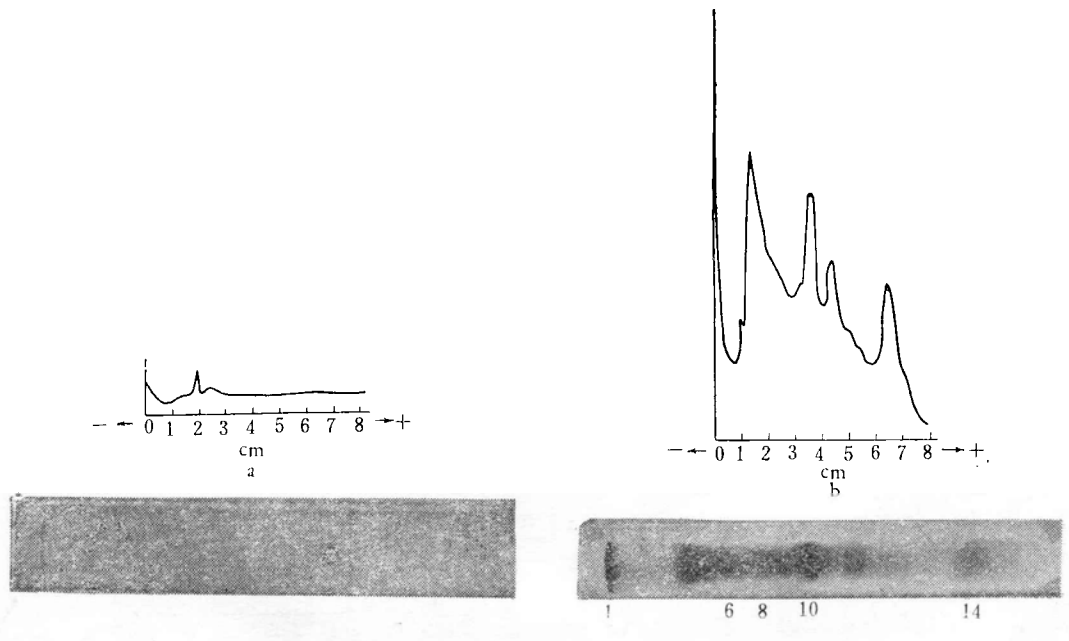


图 5 胶样溶解液电泳图谱和密度扫描
a. 1% SDS; b. 1% SDS 不溶物溶于 1% SDS-2Me。

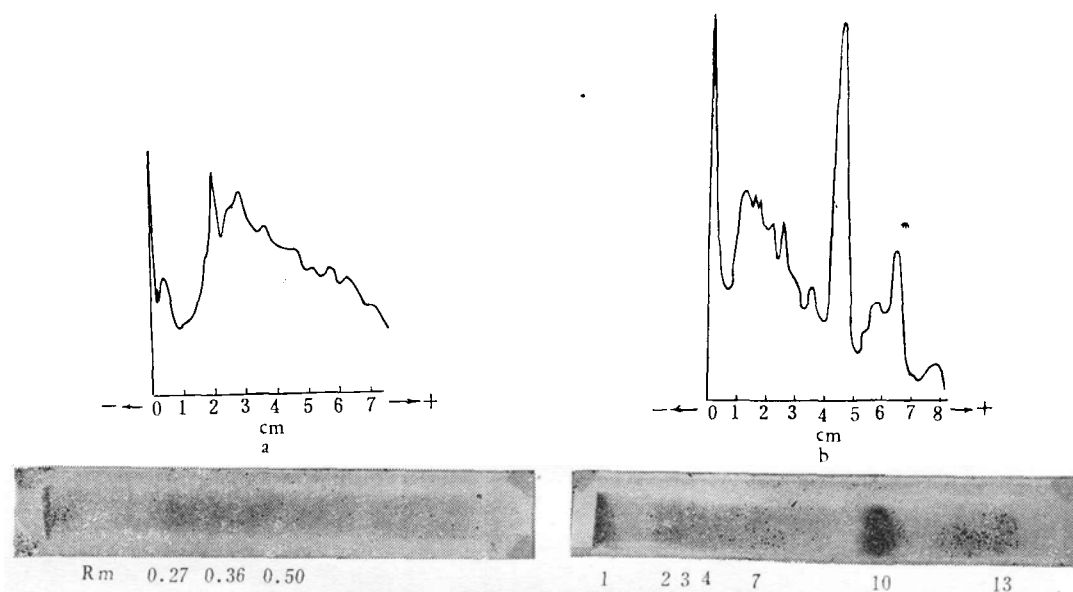


图6 胶样溶解液电泳图谱和密度扫描

a. 8M 尿素; b. 溶于 1% SDS-2Me 中的尿素不溶物的胶样。

4. 用尿素处理

从电泳结果来看, 8M 尿素对藤壶胶的溶解量大于 1% SDS 溶液, 凝胶上有四个区带, 其中 R_m 0.27 的区带含量最高(图 6a)。

将尿素不溶物的胶样再溶于 1% SDS-2Me 中, 电泳结果比之全胶溶解液电泳图谱在第 10、13 区带含量相对提高, 尤其是第 10 区带, 而第 2、3、4、12 和 14 区带, 蛋白含量明显下降(图 6b)。

5. 用 SDS-尿素处理

用 1% SDS-8M 尿素溶液将胶样溶解, 从电泳结果来看, 凝胶上出现八个区带, 比藤壶胶尿素溶解液增加了四个区带, R_m 值是 0.18, 0.21, 0.32 和 0.67 (图 7a), 其中 R_m 0.27 和 0.50 区带颜色最深。这一混合溶剂的溶解量高于 1% SDS 或 8M 尿素单独对藤壶胶的作用。

将藤壶胶的不溶物再溶于 1% SDS-2Me 中, 溶解液内的蛋白含量降低, 电泳时所需的溶解液高于一般用量 (0.4 毫升), 凝胶上呈现出九个区带, 相当于全胶溶解液电泳图谱的第 3、4、5、6、10、11、12 和 14 区带, 第 10 区带含量最高, 第 5 和第 6 区带隐约可见(图 7b)。

6. 用巯基乙醇-尿素处理

这一混合溶剂对藤壶胶溶解量较大, 电泳时所需的溶解液小于一般用量 (0.15 毫升), 凝胶上出现九个区带, R_m 0.89 区带蛋白含量最高, 其次是 R_m 0.50 (图 8a); 其溶解效果不同于 8M 尿素的作用, 多出现 R_m 0.32, 0.67, 0.73, 0.77 和 0.89 五个区带, 与 1% SDS-8M 尿素作用相比, R_m 0.50 区带蛋白含量提高, 出现 0.73, 0.77 和 0.89 三个区带。

将藤壶胶的 1% 2Me-8M 尿素不溶物再溶于 1% SDS-2Me 中, 电泳图谱上的蛋白区带数减少, 电泳所需的溶液量大于一般用量 (0.4 毫升), 凝胶上出现五个区带, 相当于全胶溶

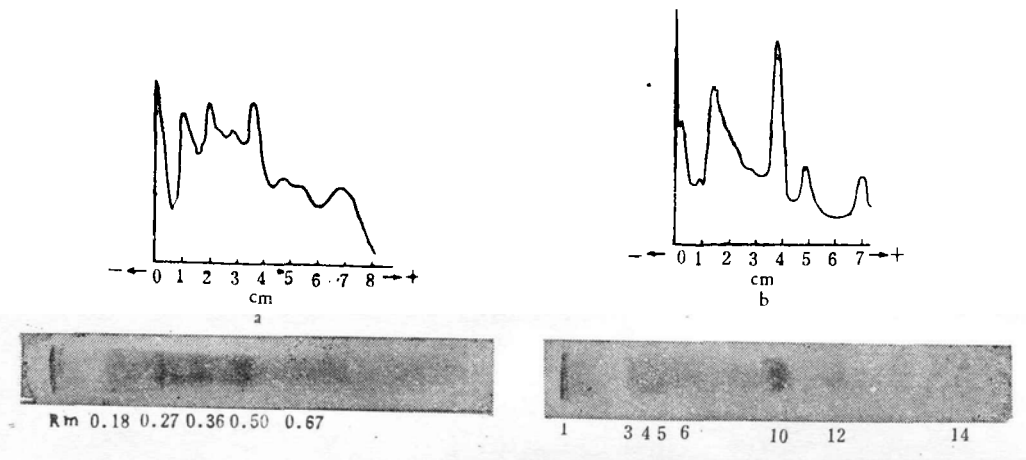


图7 胶样溶解液电泳图谱和密度扫描

a. 1% SDS-8M 尿素; b. 溶于1% SDS-2Me 中的1% SDS-8M 尿素不溶物。

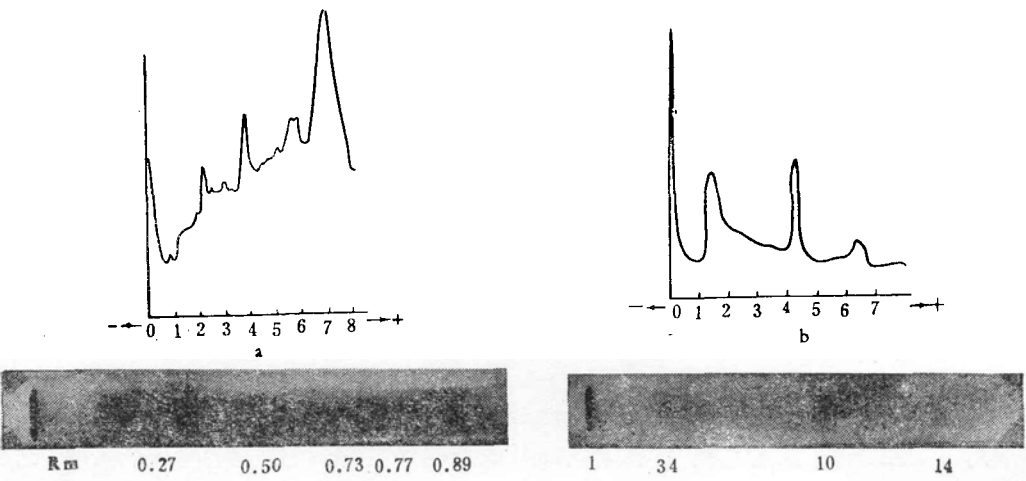


图8 胶样溶解液电泳图谱和密度扫描

a. 1% 2Me-8M 尿素; b. 溶于1% SDS-2Me 中的1% 2Me-8M 尿素不溶物。

解液的第1, 3, 4, 10 和 14 区带, 第10 区带含量降得最显著, 这说明1% 2Me-8M 尿素溶液可以溶解大部分藤壶胶蛋白(图8b)。

7. 用巯基乙醇处理

用1% 巯基乙醇浸泡藤壶胶时, 胶样不膨胀, 在电泳图谱上未显出蛋白区带, 表明单独用巯基乙醇不能使藤壶胶解离。

三、讨论

Barnes 等(1976)报道 *Lepas fascicularis* 胶粘物能全部溶于1% SDS-2Me 的溶剂中^[5], 我们的工作证实网纹藤壶次生胶在1% SDS-2Me 的溶解量为93.1%, 有近7% 的不溶物。经红外光谱分析, 不溶物主要成分为蛋白质, 如果考虑到胶样采自长期生活在海中的藤壶

的外壳底板上,不可避免地会带进一些不溶的有机物或无机物,所以在 1% SDS-2Me 溶液内不溶物的藤壶胶残余物,实际应小于 7%。

一般蛋白质都具有壹级、贰级、叁级和肆级结构,藤壶胶蛋白也不应例外,因此用一些能使蛋白解离的试剂(例如尿素、SDS、巯基乙醇等)作用于藤壶胶,如能使其降解,就可能推测稳定藤壶胶蛋白结构的某些化学键。尿素具有破坏氢键的作用,SDS 则破坏疏水键,巯基乙醇可以还原二硫键和防止巯基氧化成能生成聚合物的二硫化物。我们用 1% SDS, 8M 尿素和 1% SDS-8M 尿素溶液,只能部分解离网纹藤壶胶(图 5, 6, 7; 50% 的 *Lepas fascicularis* 胶粘物可溶于 1% SDS 内^[5]); 要使绝大部分胶样解离,必须在 SDS 溶液内加入巯基乙醇(图 1); 8M 尿素溶液内加有 1% 2Me, 使藤壶胶的溶解效果大于单独用尿素的作用,凝胶上出现含量很高的 R_m 0.89 区带(图 6a, 8a)。这些结果说明二硫键在稳定藤壶胶蛋白的结构中起重要作用。单独用 1% 2Me 不能溶解胶样,说明藤壶胶蛋白的多肽链间存在着较强的次级键。Cheung 等(1974)用圆盘电泳分离 *Balanus eburneus* 液态胶,分离出三条清晰的蛋白区带^[6],说明液态胶至少有三种蛋白质组分。因此,可以推测已固化的藤壶次生胶是由相同或不不同的多肽链组成的几种蛋白质聚合起来的,它主要由二硫键和能被 SDS 或尿素断裂的次级键维持蛋白结构的稳定。

Barnes 等不同一些学者提出藤壶胶蛋白的稳定是丹宁化过程,即醌与游离氨基酸交联^[5]。我们的试验结果表明在 1% SDS-巯基乙醇溶液内网纹藤壶胶和 *Lepas fascicularis* 胶粘物有类似的溶解效果,估计这二种来源的胶有相似的蛋白结构。二硫键在稳定藤壶胶蛋白的结构中起很大作用,可以推测液态胶的固化可能是由二硫键交联实现的。但是,还不能排除存在其它交联键(例如醌交联)的可能性。当藤壶液态胶从胶管内流到体外时,胶内蛋白可能已存在二硫键和次级键,估计藤壶胶从液态到固态的转变是由其它化学键来完成的。用 1% SDS-2Me 解离已固化的藤壶胶,有少于 7% 的胶残余物存在,藤壶胶溶解液的第 2—4 区带分子量在十万以上,这些都表明胶蛋白内可能存在其它化学键(除肽键和二硫键)。因此 SDS、尿素或巯基乙醇溶解藤壶胶的作用,还不能足以说明藤壶胶的固化机理。本文初步揭示出藤壶胶的一些特性,但要完全准确地解释其固化机理,必须进行深入的研究。

参 考 文 献

- [1] 李刚、刘承松, 1978. 网纹藤壶初生胶化学和物理特性的研究. 海洋与湖沼 9: 224—229.
- [2] 严文侠、唐延林, 1980. 网纹藤壶和高峰藤壶次生胶生化成分. 南海海洋科学集刊 2 (即将出版).
- [3] 钱元任、张友尚、曹天钦, 1964. 病毒蛋白的解离和聚合作用. 1. 烟草花叶病毒 (TMV) 的解离及其蛋白亚基的构型变化. 生物化学与生物物理学报 4: 610—621.
- [4] Barnes, H. & J. Blackstock, 1974. Biochemical composition of the seminal plasma of the cirripede *Balanus balanus* (L.) With particular respect to free amino acids and proteins. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 16: 47—85.
- [5] ————, ————, 1976. Further observations on the biochemical composition of the cement of *Lepas fascicularis* Ellis & Solander; electrophoretic examination of the protein moieties under various conditions. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 25: 263—271.
- [6] Cheung, P. J., G. D. Ruggieri & R. F. Nigrelli, 1974. Studies on the biogenesis and chemistry of the adhesive substance secreted by the cyprid and metamorphosed stages of the barnacle *Balanus* AD-A Report AD-A012595, U. S. Naval Technical Information Services, pp. 39.
- [7] Cook, M., 1970. Composition of mussel and barnacle deposits at the attachment interface, In:

- Adhesion in biological systems, Academic press, pp. 139—15.
- [8] Cooper, T. G., 1977. The tools of biochemistry. John Wiley & Sons, New York pp. 206—208.
- [9] Haschemeyer, R. H., & A. E. V. Haschemeyer, 1973. *Proteins*; A guide to study by physical and chemical methods. John Wiley & Sons. N. Y. pp. 420.
- [10] Lindner, E. & C. A. Dooley, 1969. Chemical characterization on barnacle cement AD-856070.
- [11] ———, ———, 1973. Chemical bonding in cirriped adhesive. Proc. 3rd Int. Congress on marine corrosion and fouling pp. 653—673. Gaithersburg, Maryland, National Bureau of Standards, U. S. A.
- [12] ———, ———, 1977. Studies of the reaction mechanism of the adhesive of barnacle Proc. 4th Int. congress on marine corrosion and fouling. pp. 333—350.
- [13] Walker, G., 1972. The biochemical composition of the cement of two barnacle species, *Balanus hameris* and *Balanus crenatus*. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 52: 429—435.
- [14] Weber, K. & M. Oshorn, 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis *J. Biol. Chem.* 244: 4406—4412.

THE SOLUBILIZING EFFECT OF DENATURATION CHEMICALS ON THE CEMENT OF *BALANUS RETICULATUS* UTINOMI

Yan Wenxia

(South China Sea Institute of Oceanology, Academia Sinica)

and

Pan Suhua

(South China Tropical Crop Products Processing Research and Design Institute)

ABSTRACT

The secondary cement of *Balanus reticulatus* Utinomi was solubilized with chloroform-methanol (2:1), 1% sodium dodecylsulfate (SDS), 1% mercaptoethanol (2Me), 8M urea, 1% SDS-2Me and 1% 2Me-8M urea solutions. The results assessed through the SDS-polyacrylamide gel disc electrophoresis, which show that all these chemical compounds except 1% 2Me exhibit some solubilizing effect on the cement. 1% SDS-2Me dissolves 93.1% of the whole cement and fourteen protein bands can be discerned on its electrophoretogram. From the effect of the above mentioned reagents on the protein, it may be ascertained that disulfide bond should play an important role in stabilizing the structure of the cement protein and the secondary bonds should also have some effect. The cement appears to be a polymer consisting of several similar or dissimilar polypeptides.