

网纹藤壶¹⁾初生胶化学和 物理特性的研究*

李刚 刘承松

(中国科学院南海海洋研究所)

藤壶 *Balanus reticulatus* Utinomi 是海洋污损生物中危害最大的种类之一。藤壶的生活史包括短暂的浮游生活幼虫期和固着生活的成体期。藤壶自金星幼虫附着在一个表面上变态为成体后,在其正常的生长发育过程中,每蜕皮一次就需要分泌一圈胶粘物质,以保持底盘与附着基表面的粘着状态,这种胶粘物质称为藤壶初生胶;而藤壶在各种意外损伤情况下,用来重新固着、修补底盘裂缝或填充底盘与附着基表面之间的空隙所分泌的胶粘物质称为藤壶次生胶^[9,12,13,14]。

了解藤壶初生胶的化学和物理特性,一方面能为海洋污损生物的防除提供重要依据;另一方面能为人工合成优质的水下粘合剂提供模式数据。近年来已有不少人对蔓足类的胶粘物质作过全面的化学分析,其中包括藤壶属四个种 (*Balanus crenatus*、*B. hameri*、*B. glandula* 和 *B. nubilus*) 的次生胶^[5,9,11,14,15]和茗荷儿属两个种 (*Lepas fascicularis* 和 *L. anatifera*) 的初生胶^[4,17]。但至今还未见对藤壶属的初生胶进行全面的化学分析的报道。

我们采用海上挂板的方法,历经两年,采集到湛江港的藤壶优势种——网纹藤壶 *Balanus reticulatus* Utinomi 的初生胶样品(以下简称胶样),对其进行了化学和物理特性的研究。

材 料 和 方 法

1. 胶样的采集 参照 Krivis 等人的方法进行^[7]。将经洗液浸泡并冲洗干净的玻璃板(7×15厘米)垂直悬挂于湛江港特呈岛附近海面的浮筏下约两周,玻璃板上长满了各种生物。用铲刀轻轻铲去其他生物和藤壶外壳及其软体部分,仅留下网纹藤壶的底盘。把这些玻璃板带回实验室,浸于自来水中数小时,用刷子仔细刷洗干净。再以稀盐酸(pH控制在1.5—2.0)浸泡玻璃板2—3天,至底盘脱钙完全。然后,在自来水冲洗下,用毛笔轻轻拂去脱钙底盘的辐管残骸,经蒸馏水冲洗后,晾干。用解剖刀轻轻地把一圈圈呈不规则同心圆状的初生胶刮至称量瓶内,置于装有 P₂O₅ 和 NaOH 的真空干燥器中减压干燥,备用。一般六十块左右的玻璃板,一次可刮得干胶样约 10 毫克。

1) 过去误定为布纹藤壶 *Balanus amphitrite communis* Darwin, 现经中国科学院海洋研究所任先秋同志订正为网纹藤壶 *Balanus reticulatus* Utinomi。

* 本文的氨基酸分析仪测定、红外光谱、光谱半定量分析和电子显微镜观察分别由北京市中药科学研究所仪器分析组、广州市药品检定所、我所地质研究室光谱组和中山大学生物系电镜室协助进行,特此一并致谢。

2. 蛋白质含量测定 以凯氏定氮法测出胶样的含氮量，经换算得初生胶的蛋白质含量。

3. 类脂物含量测定 用氯仿-甲醇(2:1, V/V)液提取后, 105℃烘干, 称重。

4. 碳水化合物含量测定 按 Dubois 等(1956)的酚-硫酸法测定^[6]。

5. 灰分含量测定 胶样置马福炉中, 550—600℃灰化五小时后, 称重。

6. 氨基酸组成测定 (1) 用双向纸层析法作胶样氨基酸组成的预检定^[1]。胶样用 6NHCl, 在 105℃下水解 24 小时。先碱相展开两次, 溶剂为正丁醇:12% 氨水:95% 酒精 = 13:3:3 (V/V/V)。后酸相展开一次, 溶剂为正丁醇:85% 甲酸:水 = 15:3:2 (V/V/V)。用 0.5% 茚三酮的无水丙酮溶液显色; (2) 在日立 KLA-5 型氨基酸分析仪上进行定量分析。

7. 红外吸收光谱测定 在日立 285 光栅红外吸收光谱仪上进行: (1) 研细胶样, 与 KBr 一道压片, 测得初生胶红外吸收光谱; (2) 在电炉上烧去胶样的有机物。把剩下的无机残渣与 KBr 一道压片, 测得初生胶无机残渣的红外吸收光谱。

8. 光谱半定量分析 胶样烧成无机灰分后, 在光谱仪上进行。

9. 电子显微镜观察 在日立 HU-12A 型电子显微镜上进行: (1) 研细胶样, 用火棉胶粘于铜片上, 真空喷镀金后用作扫描观察; (2) 用 812 环氧树脂或邻苯二甲酸二丙烯酸酯包埋胶样, 超薄切片, 以醋酸双氧铀作正染色后, 透射观察。

结 果

我们所采集到的胶样, 从外观上看是淡黄色的不透明脆性薄片。

胶样的化学分析结果列于表 1。

表 1 网纹藤壶初生胶的化学组成

成 分	含 量 (%)	
	占 胶 样	占 有 机 组 分
蛋 白 质	65.50	95.61
碳 水 化 合 物	1.83	2.67
类 脂 物	1.18	1.72
无 机 灰 分	26.90	—

凯氏定氮测得胶样含氮 10.48%, 以换算因子(蛋白质含氮 16%)换算得胶样的蛋白质含量为 65.50%。与灰分、碳水化合物和类脂物加在一起, 共占胶样的 95.41%。在有机组分中, 蛋白质占 95.61%, 而碳水化合物和类脂物仅分别占 2.67% 和 1.72%。胶样的红外吸收光谱(图 1, 上)显示出蛋白质共同的吸收峰(3400、1640 和 1530 cm^{-1})^[2], 整个图谱与 *B. crenatus* 次生胶的几乎完全一致^[9], 这说明胶样的有机组分主要是蛋白质。

双向纸层析预检定结果表明, 胶样水解液中含有 17 个明晰的茚三酮显色斑点, 其中 R_f 值与 Asp、Glu 和 Gly 相对应的斑点显色特别深。用氨基酸分析仪测得的胶样氨基酸组成与文献报道的结果比较于表 2。表中可见网纹藤壶初生胶的氨基酸组成与其他种的

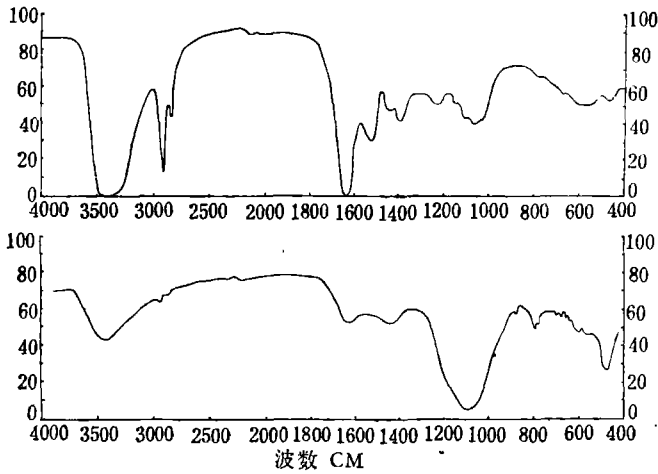


图1 网纹藤壶初生胶(上)及其无机残渣(下)的红外吸收光谱。

表2 各类胶氨基酸组成的比较(残基数/100 残基)

作者 Authors	本文 This paper	Barnes, et al. (1974) ^[4]	Walker, et al. (1975) ^[17]	Cook (1970) ^[5]	Walker (1972) ^[13]	Lindner, et al. (1973) ^[9]	Walker (1972) ^[15]
种别 Species	<i>B. reticulatus</i>	<i>L. fascicularis</i>	<i>L. anatifera</i>	<i>B. crenatus</i> ¹⁾	<i>B. crenatus</i>	<i>B. crenatus</i>	<i>B. hameri</i>
胶 Cement	初生 Primary	初生 Primary	初生 Primary	次生 Secondary	次生 Secondary	次生 Secondary	次生 Secondary
天门冬氨酸 Asp	10.58	10.12	8.75	9.5	8.28	9.14	7.81
苏氨酸 Thr	6.47	6.35	5.25	5.0	6.23	6.67	6.56
丝氨酸 Ser	7.24	9.88	8.75	5.1	7.69	7.69	11.36
谷氨酸 Glu	10.00	11.41	9.10	7.95	8.63	8.56	9.05
脯氨酸 Pro	7.80	4.35	4.99	6.3	6.06	6.67	8.39
甘氨酸 Gly	9.76	8.71	9.57	9.5	8.59	12.62	8.29
丙氨酸 Ala	6.43	9.88	8.99	6.9	6.47	7.40	6.87
胱氨酸 Cyss	微量	0.24	1.10	—	7.28	0.73	6.81
缬氨酸 Val	6.47	7.76	6.65	6.25	2.19	5.51	2.74
甲硫氨酸 Met	0.31	0.59	0.56	0.7	0.67	0.29	0.72
异亮氨酸 Ileu	4.05	6.82	5.91	4.25	5.34	3.92	4.43
亮氨酸 Leu	6.70	9.76	9.79	8.85	8.11	6.96	8.78
酪氨酸 Tyr	3.45	0.12	3.69	5.85	5.38	1.89	4.92
苯丙氨酸 Phe	2.80	4.94	3.69	4.85	3.98	3.05	3.67
赖氨酸 Lys	6.10	2.47	3.85	6.5	6.79	8.56	5.47
组氨酸 His	2.30	0.47	2.70	2.7	2.16	1.89	2.28
精氨酸 Arg	5.94	6.12	6.07	7.4	6.13	5.22	5.85
半胱氨酸 Cys	—	—	—	—	—	3.19	—
牛磺酸 Tau	—	—	0.03	—	—	—	—
色氨酸 Try	—	—	0.56	—	—	—	—
X ₁ ²⁾	1.36	—	—	—	—	—	—
X ₂ ³⁾	2.24	—	—	—	—	—	—

1) 两次采集的平均值; 2) 未鉴定峰, 位于 Lys 之前, 与 Leu 比较估算定量; 3) 未鉴定峰, 位于 Asp 之前, 与 Leu 比较估算定量。

结果大致相似: 其中酸性氨基酸 (Asp 和 Glu) 占 20.6%, 碱性氨基酸 (Lys, His 和 Arg) 占 14.4%, 含羟基氨基酸 (Thr, Ser 和 Tyr) 占 17.2%, 非极性氨基酸 (Ala, Val, Ileu, Leu, Pro, Phe 和 Met) 占 34.6%。含量最高的三种氨基酸 (Asp, Glu 和 Gly) 都各在 10% 左右。分析中还发现胶样水解液含游离氨量达 4.0% (W/W)。

表 3 网纹藤壶初生胶无机灰分的光谱半定量分析

元 素	含 量 (%)	元 素	含 量 (%)
硅 SiO ₂	≫10	钨 W	0.01—0.03
铁 Fe ₂ O ₃	5—8	锡 Sn	0.003—0.01
镁 MgO	~5	锑 Sb	0.003—0.01
钙 CaO	~3	镍 Ni	0.003—0.01
铝 Al ₂ O ₃	~1	铬 Cr	0.003—0.01
钾 K ₂ O	~1	铜 Cu	~0.003
钠 Na ₂ O	~0.5	铅 Pb	~0.003
锌 Zn	0.1—0.3	锆 Zr	~0.003
铀 U	0.03—0.1	银 Ag	~0.001
钛 TiO ₂	~0.03	钴 Co	≤0.001
锰 MnO ₂	0.01—0.03		

胶样中无机灰分量高达 26.90%。光谱分析表明(见表 3)灰分中硅(SiO₂)是主要成分(≫10%),胶样无机残渣的红外吸收光谱(图 1,下)也显出二氧化硅的特征吸收峰(1100、800 和 470 cm⁻¹)^[10]。其他较富有的元素包括铁(Fe₂O₃)、镁(MgO)、钙(CaO)、铝(Al₂O₃)、钾(K₂O)和钠(Na₂O),加起来约占无机灰分的 17% 左右。微量元素中最引人注目的是锌(Zn)和铀(U),分别占无机灰分的 0.1—0.3% 和 0.03—0.1%。

扫描电镜照片(图版 I)显示胶样具有层状结构。从超薄切片的电镜照片(图版 II)可见各层呈扁长的“梳”形,而且具有一定的方向性,“梳齿”与另一层成疏松连接,“梳背”上有短棒状的凹陷。

讨 论

把网纹藤壶初生胶的化学分析结果与其他作者有关藤壶次生胶的结果相比较就会发现,尽管蛋白质含量最低(65.50%),但在有机组分中还是占绝对数量的(95.61%),而碳水化合物和类脂物的百分比极小^[5,9,11,14,15]。最显著的差异是网纹藤壶初生胶以二氧化硅为主的无机灰分竟高达 26.90%。虽然初生胶和次生胶都来自同一的胶腺细胞系统^[12],但却是在正常与非正常(损伤)两种不同的情况下分泌的。因此无机灰分含量上的这种显著差异可能反映了初生胶和次生胶实质上的差别;当然,这种差异也可能是海上挂板采样期间,其他可变因素所引起的。

胶样的无机灰分中两种微量元素(锌和铀)的含量特别高,这是值得注意的。Walker 等(1975)^[16]的工作证明藤壶能富集锌,与海水相比富集系数为 1.5—2.6 × 10⁵(克锌/克软体组织干重:克锌/克海水),他们认为藤壶可作为海水锌污染的指标种,因此胶样无机灰分中含锌 0.1—0.3% 是可以理解的。但胶样无机灰分中含铀亦高达 0.03—0.1%,而海

水中平均丰度只有 0.03 毫克/升^[3],这是否意味着藤壶也能富集铀?

氨基酸组成分析中,尚有两个峰未能鉴定出来。对照其他作者的分析结果(见表 2),参考双向纸层析预检定的结果和氨基酸自动分析仪层析图谱中峰洗脱的位置推测: X₁可能是色氨酸(Try), X₂可能是牛磺酸(Tau)。另外分析中还发现胶样水解液含 4.0% (W/W)的氨。这些氨除了水解时来自部分氨基酸(如 Ser 和 Thr 等)^[1]、葡糖胺和半乳糖胺^[7]的降解外,可能主要是由酰胺基释放的。因而尽管酸性氨基酸(Asp 和 Glu)在胶原蛋白中所占残基数量达 20.6%,但藤壶胶在组织化学研究中仍显示出碱性蛋白的特性^[9,14]。

对已固化的藤壶胶来说,要进一步研究其蛋白质的氨基酸序列和结构,首先就要溶解它。我们进行过溶解胶样的初步试验,结果与 Lindner 和 Dooley (1973)^[9]的一致:藤壶胶不溶于已试验过的任何溶剂,只有强酸、强碱和强氧化剂可使胶样水解或降解。这表明藤壶胶是交联度很高、结合很牢固的蛋白质。我们的溶解试验还表明,胶样在室温下以过甲酸试剂处理未见任何变化。氨基酸组成分析也证实胶原蛋白中只有微量的胱氨酸(见表 2),这就排除了胶原蛋白主要以二硫键交联的可能性。Lindner 和 Dooley (1973)^[9]对藤壶胶的固化机理提出过一个“自鞣化”(Autotanning)假说,但他们并未能分离出交联醌或交联醌的前体,而且至今对胶原蛋白氨基酸组成的分析结果表明,在“自鞣化”假说中,起关键性作用的两种氨基酸——Tyr 和 Lys 的含量是多变的(见表 2)。

利用电子显微镜对藤壶胶进行观察能为我们了解胶的结构及其分泌过程,进而为研究胶的固化机理提供信息,但目前仍缺少这方面的资料。我们的电镜照片显示初生胶具层状结构,这启示我们,同一圈胶的分泌和挤出过程是一个非连续过程。Saroyan 等(1968 和 1970)^[12,13]指出藤壶(*B. crenatus*, *B. nubilus* 和 *B. glandula* 等)胶腺系统的主导管与支导管的连接处有囊(vesicle)状结构,这些囊起控制胶分泌的泵和瓣膜作用。他们还发现大多数已用过并废弃了的胶导管都是空的,因此他们推断同一圈胶的分泌过程分为两个期:分泌期和冲洗期。Lacombe (1970)^[8]的工作证实藤壶(*B. amphitrite*, *B. eburneus* 和 *B. balanoides*)的卵泡和胶腺之间的结缔组织中有具横纹的肌纤维,她认为这些肌纤维的收缩有助于把胶从管道系统挤向底盘下的出口。综上所述,我们认为对胶样的电镜观察结果可作如下的解释:藤壶每次蜕皮后分泌新的一圈胶需多次重复分泌—冲洗过程。层状结构是胶(能被醋酸双氧铀染色的蛋白质)多次分泌与挤出的结果,各层“梳”状的形态反映了分泌—冲洗的循环过程,层与层之间的空白(醋酸双氧铀不染色)也许是非蛋白的冲洗液所造成的。因此“梳背”朝向附着基表面,“梳齿”指向藤壶底盘,“梳背”上的短棒状凹陷是肌纤维收缩挤压后的松弛在未完全固化的胶上所留下的痕迹。

参 考 文 献

- [1] 潘家秀等, 1962. 蛋白质化学研究技术. 科学出版社, 51—57, 87 页。
- [2] Bellamy, L. J., 1958. 复杂分子的红外光谱。(黄维垣、聂崇实译), 科学出版社, 272 页。
- [3] Horne, R. A., 1969. 海洋化学(厦门大学海洋系海洋化学教研室译), 科学出版社, 95 页。
- [4] Barnes, H. & J., Blackstock, 1974. The biochemical composition of the cement of a pedunculate cirripede. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 16:87—91.
- [5] Cook, M., 1970. Composition of mussel and barnacle deposits at the attachment interface. *Adhesion in biological systems*. Academic Press, New York and London, pp. 139—150.
- [6] Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & F. Smith, 1956. Colorimetric method

- for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350—356.
- [7] Krivis, A. F. & M. D. Martz, 1973. Marine adhesives. IV. Hexosamine content of *Balanus eburneus* adhesive. *Microchem. J.* 18:354—357.
- [8] Lacombe, D., 1970. A comparative study of the cement glands in some Balanid barnacles (Cirripedia, Balanidae). *Biol. Bull.* 139: 164—179.
- [9] Lindner, E. & C. A. Dooley, 1973. Chemical bonding in cirripede adhesive. *Proceedings of the 3rd International Congress on Marine Corrosion and Fouling, Gaithersburg*, 1972: pp. 653—673
- [10] Nyquist, R. A. & R. O. Kagel, 1971. Infrared spectra of inorganic compounds (3800—45 cm^{-1}). Academic Press, New York & London. pp. 94—95, 208—209, 210—211.
- [11] Otness, J. S. & D. G. Medcalf, 1972. Chemical and physical characterization of barnacle cement. *Comp. Biochem. Physiol.* 43(2B):443—450.
- [12] Saroyan, J. R., Lindner, E. & C. A. Dooley, 1968. Attachment mechanism of barnacles. *2nd International Congress on Marine Corrosion and Fouling*. pp. 495—511.
- [13] Saroyan, J. R., Lindner, E. & C. A. Dooley, 1970. Repair and reattachment in the Balanidae as related to their cementing mechanism. *Biol. Bull.* 139:333—350.
- [14] Saroyan, J. R., Lindner, E., Dooley, C. A. & H. R. Bleile, 1970. Barnacle cement: Key to 2nd generation antifouling coatings. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Develop.* 9:122—133.
- [15] Walker, G., 1972. The biochemical composition of the cement of two barnacle species, *Balanus hameri* and *Balanus crenatus*. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 52:429—435.
- [16] Walker, G., Rainbow, P. A., Foster, P. & D. J. Crisp, 1975. Barnacles: possible indicators of zinc pollution? *Mar. Biol.* 30:57—65.
- [17] Walker, G. & A. Youngson, 1975. The biochemical composition of *Lepas anatifera* (L.) cement (Crustacea; Cirripedia). *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 55:703—707.

STUDIES ON THE CHEMICAL AND PHYSICAL CHARACTERISTIC OF THE PRIMARY CEMENT OF BARNACLE, *BALANUS RETICULATUS*

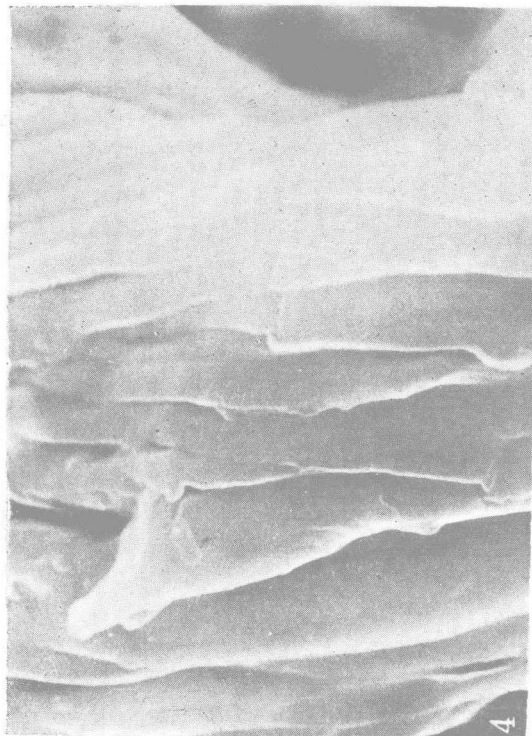
Li Gang and Liu Chengsong

(South China Sea Institute of Oceanology, Academia Sinica)

ABSTRACT

The chemical composition of the primary cement of *Balanus reticulatus* Utinomi has been analysed. The organic constituents are almost proteins (95.84%). Ash is high up to 26.90%, which is made up largely of SiO_2 . Among the trace elements, the contents of Zn and U are notable.

The electron microscopy reveals the fact that the primary cement is of lamellate structure. It suggests that the secretion and extrusion of the primary cement are the discontinuous processes. Based on the results of electron microscopic studies, the mechanism of cement secretion is discussed.



网纹藤壶 (*B. reticulatus* Utinomi) 初生胶的扫描电子显微照片。胶样具有层状结构。



1) $\times 20000$;



2) $\times 20000$ 。

网纹藤壶 (*B. reticulatus* Utinomi) 初生胶超薄切片的电子显微照片。胶样各层呈扁长的“梳”形。“梳齿”与另一层成疏松连接，“梳背”上有短棒状的凹陷。