



· 综述 ·

藤壶幼虫附着的分子机理研究进展：转录组和蛋白质组

黄敬亮, 刘欢, 李伟华*

(中山大学化学工程与技术学院, 广东 珠海 100059)

摘要: 藤壶是一种重要的海洋污损生物, 其在海洋工程设备表面的附着严重地影响着设备的使用, 造成巨大的经济损失。发展环境友好的藤壶防除技术离不开对藤壶附着机理的深刻理解, 而目前对于藤壶附着变态过程的调控机理尚未研究清楚。藤壶幼虫的附着涉及幼虫的生长发育、基底的探索、变态过程以及藤壶胶的分泌等多个复杂过程, 传统的细胞生物学和分子生物学方法难以对这些过程进行详尽地分析。近年来, 基于高通量测序技术的转录组学和蛋白质组学成为研究污损生物附着过程的重要手段, 在揭示藤壶幼虫附着机理方面积累了大量的数据。本文综述了近年来国内外对于藤壶附着机理的研究, 总结了利用组学方法研究藤壶幼虫的附着和变态过程、藤壶胶的成分和固化机理方面的研究进展, 对未来防污技术的研究方向提出建议。

关键词: 藤壶幼虫; 污损生物; 信号转导通路; 藤壶胶; 转录组; 蛋白质组; 防污技术

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

海洋生物污损是指浸入海水中的人工设备表面聚集了有害的微生物、植物和动物, 这些生物统称为污损生物^[1]。藤壶是一种全球性的海洋污损生物, 能够附着生长在海工装备表面, 缩短装备服役年限。其附着在船底会改变船底的流线型结构, 导致船底阻力增大从而降低船舶航速。已有报道中, 藤壶等海洋污损生物的附着可增加船体 40% 的阻力, 从而增大油耗^[1-2]。另外, 藤壶对渔业养殖也有影响。在箱体养殖渔业中, 藤壶附着在网衣上会与养殖的鱼类和贝类竞争生存空间, 并降低箱体中的溶解氧含量, 导致鱼类和贝类的死亡, 降低经济效益^[3]。在我国南海海域, 藤壶附着产生的危害尤为严重^[4], 这是由于南海地区海水平均温度较高, 藤壶食物来源丰富, 使其能

够快速生长繁殖。藤壶附着在材料表面之后就很难去除, 即使用酸处理或者热处理将其杀死, 其外壳依然黏附在材料表面, 只能通过机械刮除, 这需要耗费大量的人力和能源, 同时还会对材料表面造成不可避免的损伤。

利用防污涂层能够有效减少藤壶等污损生物的附着, 但是目前的防污涂层在长效性和静态防污方面效果不佳^[5]。国内在生物污损方面的研究起步较晚, 科研经费投入也严重不足, 目前尚未开发出长期有效的涂层^[6]。而开发新型高效的防污涂层离不开对污损生物附着机理的深入研究。本文总结国内外学者近年来对藤壶幼虫附着机理的研究进展, 重点关注组学方法在解析藤壶幼虫附着变态和藤壶胶固化分子机理方面的应用, 为

收稿日期: 2021-03-30 修回日期: 2021-10-02

资助项目: 国家杰出青年科学基金(51525903); 中山大学高校基本科研业务费青年教师培育项目(76110-31610013)

第一作者: 黄敬亮(照片), 从事海洋贝类矿化和海洋生物污损研究, E-mail: huangjiliang3@mail.sysu.edu.cn; 刘欢, 从事防污涂层和保温隔热材料的研究, E-mail: liuhuan034@163.com

通信作者: 李伟华, 从事钢筋阻锈技术、海洋腐蚀与海洋污损及其防护技术研究, E-mail: liweihua3@mail.sysu.edu.cn



将来防污技术的发展提供参考。

1 藤壶幼虫的发育过程

藤壶是一种节肢动物，属于甲壳纲 (Crustacea) 无柄蔓足类 (Cirripedia: Seessilia) 藤壶科 (Balanus)。根据其生理结构可以将藤壶的生长发育过程划分为两个阶段：幼虫期与成虫期^[7] (图 1)。幼虫期又可根据其形态分为无节幼虫与腺介幼虫 (也叫金星幼虫)。无节幼虫共有 6 个时期，经过 5 次蜕变发育成为腺介幼虫，并且在第 6 期发育出复眼。无节幼虫时期以积累营养物质、生长发育为主，当其积累足够营养物质后，将变态发育为腺介幼虫，这个过程一般需要 2~3 周^[8]。腺介幼虫的形态呈扁平梭形，头部触角生有大量细小刚毛，头部内侧聚集大量小油滴，中后段一侧有 6 根游泳足，并且尾部甲壳缝隙旁有一对尾肢。这一时期幼虫停止进食，开始寻找适宜的表界面进行固着生长。在接触到基底后，幼虫会先分泌出一种临时胶质，胶质经过数小时的键和作用后发生硬

化进行临时附着^[9-10]。基底若不适宜永久寄生，藤壶继续游离至新基底；若适宜永久寄生，藤壶将分泌永久性胶质进行固着，并发育成藤壶成体。

永久附着后，藤壶外壳逐步发育成为硬壳。随着内脏器官的增长，藤壶外壳逐步外扩，最终形成“小火山”的形状。藤壶成体最底部为一层致密的藤壶胶，厚度非常薄，一般为微米级别^[11]。藤壶胶连接外壳，外壳由底壳、侧壳、壳盖三部分组成，三者的主要成分均为碳酸钙^[12]。藤壶上端壳盖可自主打开，伸出过滤性刚毛，以便于进行觅食与繁殖。藤壶是雌雄同体，虽然部分学者认为藤壶存在自体受精，但是主流学者认为藤壶进行的是异体受精^[13]。其繁殖期主要与海水温度相关，在温暖的海域，藤壶一年四季均可进行繁殖，如南海、印度洋；在温差大的海域则与季节相关，如东海的藤壶在冬天停止繁殖活动^[14]。当藤壶进行繁殖时，藤壶会打开壳盖，将输精管从壳内伸出，寻找临近的藤壶个体进行受精。输精管外部包含数根刚毛，起到保护作用。藤壶成体

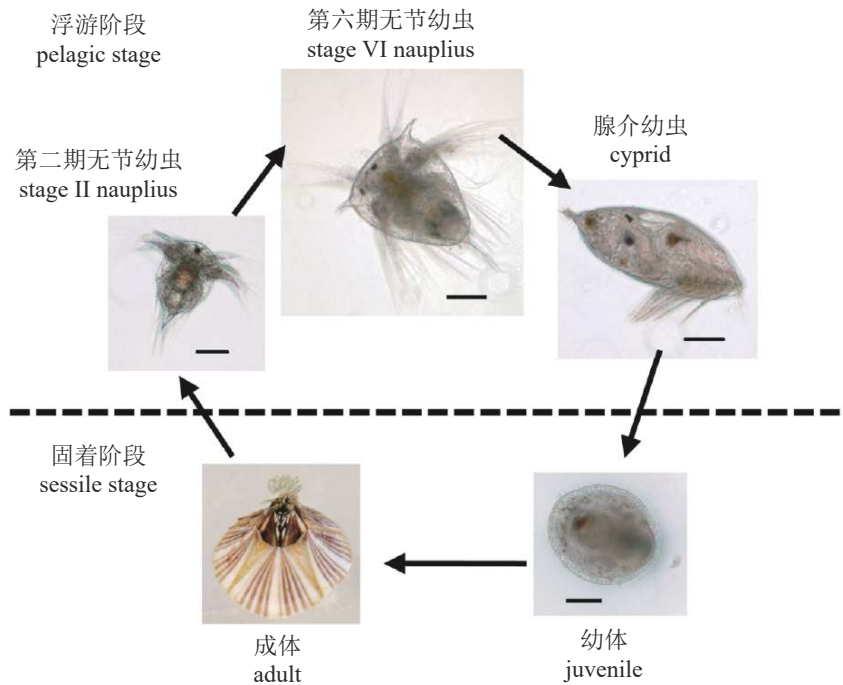


图 1 纹藤壶幼虫发育过程的几个主要阶段^[7]

虚线上方为浮游阶段，虚线下方为固着生长阶段。浮游阶段包括 I~VI 期的无节幼虫 (图中展示 II 和 VI 期幼虫在体积上的差异) 和腺介幼虫时期。腺介幼虫在遇到合适的表界面后开始附着并变态发育为藤壶稚虫，最终成长为性成熟的成体。图中成体的直径为 2 cm，标尺=100 μm

Fig. 1 Principal stages of barnacle *Amphibalanus amphitrite* larval development^[7]

Above the dashed line is the planktonic stage and below the dashed line is the sessile stage. The planktonic stages include stages I-VI nauplius (the images show the differences in size between stage II and VI nauplii) and cyprid. After encountering a suitable surface, the cyprid begins to attach and metamorphose into juvenile, which eventually grows into sexually mature adult. The diameter of the adult in the figure is 2 cm. Scale bar = 100 μm

一旦固着在基底后便不能再移动, 所以藤壶一般会聚集生长以便于繁殖。

2 藤壶幼虫在材料表面的附着机制

2.1 信号转导通路

藤壶幼虫发育至腺介幼虫时期后, 会游到材料表面利用触角进行探索, 判断此处基底是否适合生长。找到合适的表面时, 幼虫体内就会产生相应的生理反应, 开始分泌藤壶胶进行黏附^[7]。为了解析幼虫感知固体表面的理化性质并引起相关生理反应的作用机制, 鉴定其中的细胞表面受体及其配体分子是关键。由于目前缺少完整的藤壶基因组信息, 转录组学和蛋白质组学成为研究调控幼虫附着和变态发育信号通路的重要手段(表1, 表2)。

幼虫附着变态过程的相关受体 转录组学通过分析组织和细胞的 mRNA 来研究转录水平上发生的事件, 具有时间和空间特异性, 能够反映出特定条件下活跃表达的基因信息。常用的转录组测序方法包括反转录得到的全长 cDNA 文库, 表达序列标签 Expressed Sequence Tag (EST) 和基于新一代高通量测序的 RNA-seq, 相关介绍可参

考 Li 等^[30] 的综述。Anthony S. Clare 课题组首先构建了纹藤壶 (*A. amphitrite*, 即 *Balanus amphitrite*) 成熟个体的 cDNA 文库^[31], 并测到了 609 个 ESTs, 但是这只占总体编码蛋白的 2%。随后该课题组构建了不同发育阶段的 EST 文库: 无节幼虫 (I 期和 II 期混合)、腺介幼虫和成体。通过数据库比对, 鉴定到 2 个与凝集素 lectin 同源的转录本, 分别在腺介幼体和成体中表达。上述两个同源转录本与甘露糖受体 C type 1 相匹配, 其核苷酸序列与刺巨藤壶 (*Megabalanus volcano*) 中的 lectin 的同源性分别为 33% 和 31%^[30]。Lectin 能够识别附着诱导蛋白复合物 (SIPC) 上的糖链^[32], 因此藤壶成体和幼虫中的 lectin 同源蛋白很可能与幼虫的附着相关。

与此同时, 钱培元课题组也开始利用转录组学方法研究藤壶幼虫附着。他们通过比较幼体和成体的转录组, 发现了将近 8 000 个差异表达基因, 部分基因通过实时定量 PCR 和原位杂交得到验证^[7]。其中, vitellogenin (卵黄蛋白原) 是在无节幼虫后期特异表达的蛋白, 可能是接下来不进食的腺介幼虫时期的能量来源(图2)。该研究还鉴定了 4 个甘露糖受体, 但是原位杂交结果未发现在幼虫触角上分布。推测 4 个甘露糖受体与幼虫附着过程中化学或机械感应有关, 而不是识别 SIPC

表 1 藤壶幼虫附着过程的信号转导通路转录组学研究

Tab. 1 Transcriptomic analysis of signal transduction pathway in barnacle larval adhesion

| 物种 species | 研究目的/假说 objectives/hypothesis | 方法 approach | 关键发现/结果 key findings/results | 文献 references |
|----------------------------|----------------------------------|---------------------|---|------------------|
| <i>A. amphitrite</i> | 幼虫附着的分子机理 | 454焦磷酸测序 | 发现一个20 ku的胶蛋白同源蛋白, 在胶液腺中表达, 可能参与了附着过程。受体酪氨酸激酶和甘露糖受体可能与信号感知有关。 | [7] |
| <i>A. amphitrite</i> | 了解藤壶的遗传特性 | 归一化表达序列标签 (EST) | 鉴定了2个lectin-like isotigs, 在腺介幼体或者成体中表达, 与甘露糖受体相匹配。 | [15] |
| <i>Megabalanus volcano</i> | 幼虫附着的分子机理 | 比较转录组 | 鉴定到2个与视觉相关的成分, 均属于G蛋白偶联受体。 | [16] |
| <i>A. amphitrite</i> | 构建非模式物种的全基因组数据集 | 转录组, 蛋白质组 | 声音感受系统蛋白在第6期无节幼体中有很高的表达丰度。 | [17] |
| <i>B. improvisus</i> | 了解附着行为中涉及的感觉系统 | 腺介幼虫触角的转录组 | 鉴定了若干个可能的化学感受受体和13个潜在的机械感应基因。 | [18] |
| <i>A. amphitrite</i> | SIPC诱导藤壶幼虫附着的机理 | RNA-seq | SIPC处理对SNARE互作有显著影响, GO聚类发现差异基因富集在牙釉质矿化通路。 | [19] |
| <i>B. improvisus</i> | 鉴定藤壶的水溶性信息素(WSP)同源物 | 利用已发表的藤壶幼虫和成体RNA数据集 | 鉴定出6个WSP同源蛋白, 均含有N端信号肽、保守的核心区域和多变的C端区域。 | [20] |
| <i>A. amphitrite</i> | 鉴定藤壶神经肽及其在幼虫附着过程中的作用 | 转录组测序、RACE、实时定量PCR | 鉴定了16个神经肽家族, 部分神经肽与幼虫附着相关。 | [21] |
| <i>A. amphitrite</i> | 揭示无节幼虫发育以及在红海海域生存的分子机制 | 转录组学和蛋白质组学 | 与翻译、氧化磷酸化和细胞骨架发育相关的基因有很高的丰度。与发育、胁迫响应 (HSPs, chaperonin, annexin) 和渗透压调节相关蛋白有显著差异。 | [22] |

表 2 藤壶幼虫附着过程的信号转导通路蛋白质组学研究

Tab. 2 Proteomic analysis of signal transduction pathway in barnacle larval adhesion

| 物种 species | 研究目的/假说 objectives/hypothesis | 方法 approach | 关键发现/结果 key findings/results | 文献 references |
|---|--|------------------------------------|--|---------------|
| <i>A. amphitrite</i> | 探究幼虫发育和变态过程中的总蛋白种类和表达模式 | 二维电泳(2-DE), 蛋白质串联质谱(MALDI-TOF/TOF) | 鉴定了大量在浮游藤壶幼虫中丰度较高的差异蛋白, 这些蛋白属于信号转导通路和幼虫激素结合蛋白。 | [23] |
| <i>A. amphitrite</i> <i>Bugula neritina</i> | 解析污损动物幼虫变态过程中蛋白质磷酸化水平的变化 | 基于二维电泳(2-DE)的蛋白质谱和磷酸化蛋白质谱 | 在抑制剂或者诱导剂的作用下, 幼虫变态过程中的蛋白质组变化主要发生在磷酸化水平上, 而不是新蛋白的合成。 | [24] |
| <i>A. amphitrite</i> , <i>Bugula neritina</i> , <i>Pseudopolydora vexillosa</i> | 验证假设: 蛋白质糖基化的种间差异导致了发育过程的差异 | 二维电泳(2-DE), 蛋白质串联质谱(MALDI-TOF/TOF) | 鉴定了19个高丰度的糖基化蛋白, <i>A. amphitrite</i> 和 <i>P. vexillosa</i> 的糖基化程度在变态前较高, <i>B. neritina</i> 的糖基化在变态后升高。 | [25] |
| <i>A. amphitrite</i> | 研究腺介幼虫发育/熟化和防污剂butenolide处理后蛋白质组和磷酸化蛋白质组变化 | 蛋白质二维电泳(2-DE)复合荧光染色方法 | 蛋白质的表达量和翻译后修饰的程度都是高度动态的。胁迫相关的蛋白和能量代谢相关的蛋白在腺介幼虫的发育中具有差异性表达。 | [26] |
| <i>A. amphitrite</i> | 检测聚酯B对幼虫蛋白质组的影响 | 二维电泳(2-DE)复合荧光染色和ESI-QTOF | 聚酯B可能是通过干扰氧化还原调节机制来控制藤壶幼虫的附着。 | [27] |
| <i>A. amphitrite</i> | 鉴定幼虫附着和变态过程中差异表达的蛋白 | 无标记定量蛋白质谱 | 能量代谢、神经系统和信号转导蛋白在腺介幼虫中上调。细胞骨架、转录和翻译、生物矿化蛋白在稚体中上调。 | [28] |
| <i>A. amphitrite</i> | 探究防污剂meleagrins对腺介幼虫发育和熟化过程中蛋白表达的影响 | 定量蛋白质谱(iTRAQ), 二维串联质谱(LC-MS/MS) | meleagrins影响胁迫和能量代谢相关蛋白表达, 可能是通过影响细胞间钙平衡来抑制幼虫附着。不同防污剂的作用机理可能不同。 | [29] |

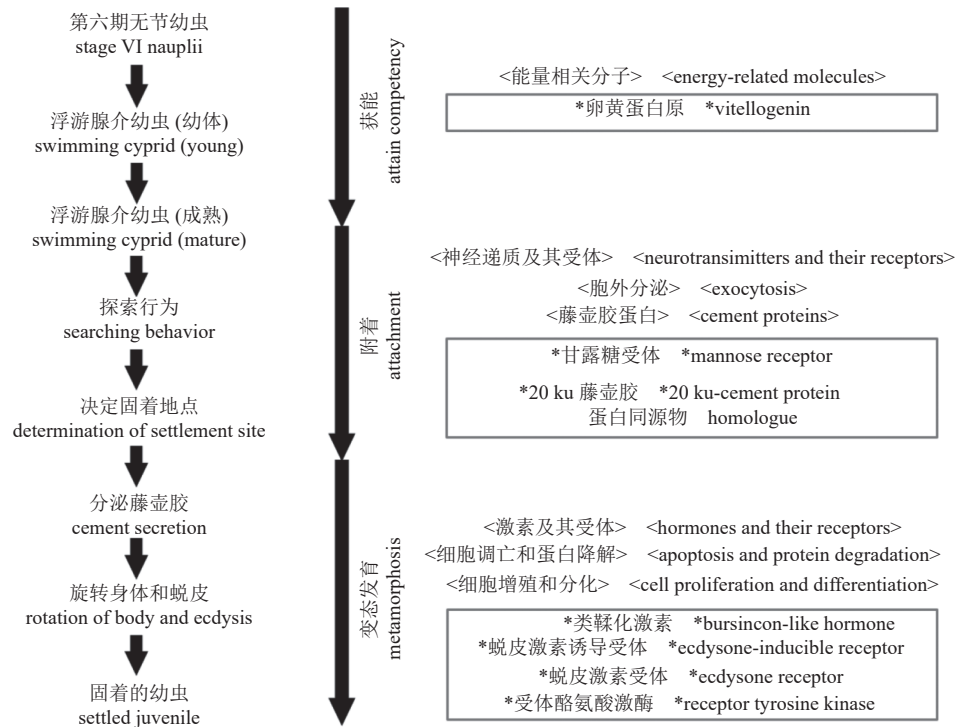


图 2 纹藤壶幼虫附着过程不同阶段的生理反应^[7]

中间的长箭头显示附着的三个主要阶段, 左边显示相应的生理反应过程, 右边显示附着过程中可能相关的差异基因(星号)和基因群(方括号), 重绘自文献

Fig. 2 Physiological responses of *A. amphitrite* larva at different stages during the adhesion process^[7]

The long arrows in the middle indicate the three principal stages of the adhesion process, the corresponding physiological responses are showed on the left, differentially expressed genes (stars) and gene clusters (square brackets) that may be involved in adhesion are showed on the right. The figure is redrawn from the reference

上的甘露糖基团。实时定量 PCR 结果表明, 受体酪氨酸激酶家族的基因在腺介幼虫时期高表达, 可能与信号感知有关。

转录组学可以从转录水平上比较基因表达的差异, 但是由于蛋白质的翻译以及翻译后修饰相对于转录的 mRNA 有一定的延迟, 因此, 转录组的结果有时并不能完全反映个体在特定阶段的实时生理状态。蛋白质组学可以很好地弥补转录组的这一不足。实际上, 早在 2008 年, Thiyagarajan 等^[23]就开展了藤壶幼虫蛋白质组学的研究, 比较了无节幼虫、浮游腺介幼虫和附着变态的腺介幼虫三个时期的蛋白质二维电泳, 发现无节幼虫显著区别于其他时期, 电泳胶上的点也更多。附着变态的腺介幼虫与其他时期相比, 其电泳蛋白点最少, 表明浮游时期的部分幼虫蛋白在附着后终止了表达。质谱分析进一步表明, 在浮游的腺介幼虫中, 表达较高的差异蛋白属于信号转导通路(例如腺苷酸环化酶和钙调蛋白)和幼虫激素结合蛋白。

Yan 等^[16]利用比较转录组学研究刺巨藤壶幼虫附着变态调控的信号通路, 发现神经肽及其相应的受体在腺介幼虫中高表达, 在成体中显著下调。有意思的是, 该研究鉴定到 2 个与视觉相关的成分, 均属于 G 蛋白偶联受体, 其中 Mv-opsin5 与美洲鲎 (*Limulus polyphemus*) 视蛋白 (opsin5) 有较高的同源性。转录组和实时定量结果都显示 Mv-opsin5 在腺介幼虫中表达量更高。此前有研究表明, 藤壶幼虫可以被成体外壳发出的红色荧光所吸引, 从而实现藤壶的群聚生长^[33]。因此视蛋白在腺介幼虫中特异表达可能与基底探索有关。此外, 藤壶幼虫的听觉也可能参与了这一过程。Sarah 等^[17]结合转录组和蛋白质组, 首次发现声音感受系统蛋白在第 6 期无节幼体中有很高的表达, 提示腺介幼虫可能根据藤壶成体发出的声音信号判断是否附着。但是海洋环境中充斥着各种噪音, 藤壶这种小型生物发出的声波信号能否有效地传递信息还有待验证。我们认为还存在另一种可能: 幼虫中的听觉相关蛋白有利于其在海水中, 尤其是在晚上或者光照不良的条件下辨别海岸的方位, 而海浪拍击礁石的声音是一个持续稳定的信号源。此外该研究还发现, 幼虫在浮游期间盐度和高渗透压胁迫响应、Wnt 信号通路强烈上调, 而 MAPK 通路、脂代谢和皮壳发育相关基因则下调^[17], 表明藤壶幼虫的附着变态是一个复杂的调控过程。

Anna 等^[18]从致密纹藤壶 (*B. improvisus*) 的腺介幼虫中分离出触角并进行转录组测序, 利用 Hidden Markov Models 模型来检索感觉受体, 从中鉴定了若干个可能的化学感应受体, 包括离子移变受体 IR25a、IR8a 和 IR93a, 以及其他 IR 候选基因。同时还鉴定了 13 个潜在的机械感应基因, 包括多个瞬时受体电压通道家族 (transient receptor potential channel)。另外, 研究者找到一个味觉 (gustatory-like) 受体而没有发现气味剂 (odorant) 受体或者 odorant 结合蛋白。实时定量 PCR 结果表明, 部分感应基因在幼虫的附着过程中有差异表达, 这些研究结果为防污新技术的开发提供了新的思路。

幼虫附着变态过程相关的信息素 鉴定附着变态过程相关的信息素并阐明其作用机理是研究藤壶附着的关键科学问题。附着诱导蛋白复合物 (SIPC) 是较早被鉴定的诱导藤壶群聚生长的信号分子。SIPC 蛋白的分子量非常大 (约 170 ku), 主要分布在藤壶的内脏、外壳及幼虫的足迹中^[34], 可能是通过与藤壶幼虫触角直接接触来发挥作用。SIPC 的诱导活性是由不同结构或者糖基化修饰引起的^[35], 但是其具体作用机理尚未研究清楚。国防科技大学的胡碧如课题组利用提取的天然 SIPC 刺激纹藤壶的腺介幼虫来研究 SIPC 激活的胞内信号通路^[19]。结果发现了 389 个差异表达基因, 但是藤壶胶蛋白的基因却没有显著变化。KEGG 富集分析发现 SIPC 处理对膜转运蛋白 (SNARE) 有显著影响, 表明 SIPC 可能激活了囊泡运输和蛋白分泌。GO 聚类结果发现差异基因富集在牙釉质矿化通路, 提示 SIPC 可能参与了生物矿化的激活。

考虑到幼虫主要以浮游的方式运动, 可能存在不同类型的水溶性信息素。在过去十几年中, 只有少数水溶性信息素被鉴定或上传至公开数据库^[35-36]。Abramova 等^[20]根据已知的水溶性附着信息素 (WSP), 从致密纹藤壶的转录组数据中分析鉴定出 6 个 WSP 同源蛋白, 均含有 N 端信号肽、保守的核心区域和多变的 C 端区域; C 端由若干个 GR 和 HDDH 模体构成。Bi-WSP 与纹藤壶的 WSP 同源性最高, 表达丰度也最高, 并且在附着的各个阶段表达量保持稳定。但是其他的几个同源蛋白则是在幼体时期具有最高表达。多个信息素的存在表明, 藤壶同种群聚行为可能是由各个信息素的序列特征和浓度综合作用的结果。但是该项工作对于信息素与藤壶幼虫附着率的直接关

系没有进行探讨,而且有些信号分子尽管曾经被鉴定为信息素,但是后续的研究却发现其不具有相应的活性^[37]。

环境中的信息素介导了藤壶个体之间的交流,而体内的信息素则是藤壶对环境做出生理反应的重要信号。钱培元课题组从神经肽组中发掘与幼虫附着相关的神经肽/肽激素,根据纹藤壶的转录组数据,找到了16个神经肽家族,其中14个得到了从DNA末端快速扩增(RACE)的验证^[21]。从前体多肽的结构和成熟多肽的序列中发现,其中一部分与昆虫神经肽有一定相似性。其中 pigment dispersing hormone、SIFamide、calcitonin 和 B-type allatostatin 在腺介幼虫中表达量最高,而 tachykinin-related peptide 在腺介幼虫和幼体中都下降。实时定量 PCR 和生物活性检测发现,某些神经肽与幼虫附着相关。但是生物活性检测实验中使用的前激素转化酶抑制剂没有特异性,能影响所有的前激素转化,因此不能确定具体是哪些激素起作用。此外, Yan 等^[16] 利用比较转录组学研究刺巨藤壶幼虫附着变态调控的信号通路,发现神经肽及其相应的受体在腺介幼虫中高表达。在果蝇中,神经肽 ASTA 参与了脂类的加速利用分解,并调节代谢和进食过程。因此在腺介幼虫中 ASTA 可能与脂类的利用和抑制进食有关。

环境因素的影响 海洋是一个复杂多变的环境,藤壶幼虫在海水中常常会面临各种环境因素的影响;同时幼虫也会根据周围环境条件做出反应,寻找适合其生长的栖息地。因此研究环境变化对幼虫发育的影响有助于理解幼虫的生长发育过程。

Chandramouli 等^[22] 通过比较香港附近海域与红海地区藤壶幼虫的转录组和蛋白质组,发现在转录组中,与翻译、氧化磷酸化、细胞骨架相关的基因呈现高表达。蛋白质组结果表明,与发育、胁迫响应(HSPs、chaperonin、annexin)和渗透压调节相关(ATPase、转运蛋白、乙酰胆碱受体)的蛋白在两个地区的藤壶幼虫中有显著差异,这可能与幼虫对高盐高温极端环境的适应有关。Gan 等^[38] 将深海物种鹅颈藤壶(*Lepas anatifera*)与浅海物种进行比较,发现深海物种为入侵物种;并且深海物种的DNA修复、信号转导和糖类代谢相关的基因有显著的扩张,以适应深海的环境。

蛋白质的翻译修饰是生物个体在分子水平上对环境胁迫做出快速响应的重要方式^[39]。钱培元课题组对两种主要的污损无脊椎动物苔藓虫(*Bug-*

ula neritina)和纹藤壶幼虫变态过程的蛋白质表达和磷酸化水平进行分析,结果显示在抑制剂或诱导剂的刺激下,幼虫变态过程中蛋白质组的变化主要发生在磷酸化上,而不是新蛋白的合成^[24]。这与变态过程的快速发生是相符的,因为新蛋白的合成是一个较缓慢的过程。并且,在变态抑制剂 genistein 处理后,藤壶幼虫的磷酸化蛋白数量显著增加^[24],这表明蛋白质磷酸化在幼虫发育过程中起到了重要的调控作用。蛋白质的翻译后修饰还包括糖基化修饰。在纹藤壶中,变态前参与细胞胁迫响应及能量代谢有关的蛋白质糖基化程度较高,表明海洋动物幼虫是通过改变蛋白质的翻译后修饰模式,来响应氧化胁迫和能量平衡的转化^[25]。此外,在胚胎-幼体转变过程中,蛋白的磷酸化程度与转录翻译的变化不完全一致^[26],这也说明了在蛋白质水平上检测幼虫生理反应的必要性。

自然界中有许多物种进化出应对生物污损的策略,有的生物通过释放信号分子来抑制污损生物的附着^[27]。研究天然防污剂的作用机理能够指导高效环保防污剂的合成和筛选。Zhang 等^[26] 研究天然防污剂 butenolide 对幼虫附着变态的影响,发现在幼虫发育过程中,蛋白质的表达量和翻译后修饰的程度都是高度动态的,并且环境胁迫和能量代谢相关的蛋白在腺介幼虫发育中呈现差异表达。同时,该项工作还鉴定出16个差异蛋白(包括表达或磷酸化水平差异),这些蛋白的表达量受到了防污剂 butenolide 的干扰却可保持不变,导致发育的迟滞^[26]。Chen 等^[27] 通过二维电泳结合总蛋白质谱和总磷酸化蛋白质谱来研究 Poly-ether B (聚酯 B)对腺介幼虫的影响,发现许多与能量代谢、氧化应激和分子伴侣相关磷酸化蛋白出现上调或者下调,表明聚酯 B 可能是通过干扰氧化还原调节机制来控制藤壶幼虫的附着。对另一种防污剂 meleagrins 的研究表明,处理组中腺介幼虫的差异蛋白与其他防污处理研究中的差异蛋白不一致^[29]。由此可见,不同防污剂的防污原理可能是有区别的。

2.2 藤壶胶的分泌和固化机理

当藤壶幼虫确定了附着地点后,胶液腺便通过导管将藤壶胶分泌到界面处,将其自身与基底黏着在一起。藤壶胶具有很强的水下黏附能力,是藤壶进行附着生长的关键。了解藤壶胶的分泌和固化机理有助于阐明防污涂层的失效机制,并指导新型高效防污技术的开发。

藤壶胶的收集 对藤壶胶进行分析研究时, 需要收集大量的藤壶胶(液), 方法主要有以下4种: ①直接刮取。将藤壶从基底上完整取下, 用金属探针将底面的胶黏物刮下(图3-a)^[40]。这种方法收集的藤壶胶含有部分底壳的成分, 一般适用于实验室内培养的藤壶个体, 因为从野外采集的藤壶基底组成复杂, 可能含有大量的有机物杂质。②底壳脱钙法。这种方法同样主要适用于实验室内培养的藤壶。将长在基底上的藤壶移除组织细胞和四周外壳, 留下底壳黏在基底上(图3-b)。然后用EDTA进行脱钙处理, 并移除残留的底壳

有机基质, 剩余物质即为藤壶胶。③倒置培养法。将藤壶个体从基底上完整取下后, 利用一种特殊的培养装置将藤壶倒置培养, 使其底壳朝上露出水面, 并覆盖一片硼硅酸盐盖玻片用于收集藤壶新分泌的胶液(图3-c)^[40]。④玻璃微珠法。将完整的藤壶个体放在一层玻璃微珠表面进行培养, 利用玻璃微珠松散容易剥离的特点收集新分泌的藤壶胶(图3-d-e)^[40]。后面两种方法可用于实验室培养的和野外采集的藤壶, 并且获得的胶液分泌时间不长, 可能有未完全凝固的胶液, 但是能采集到的胶液总量较少。

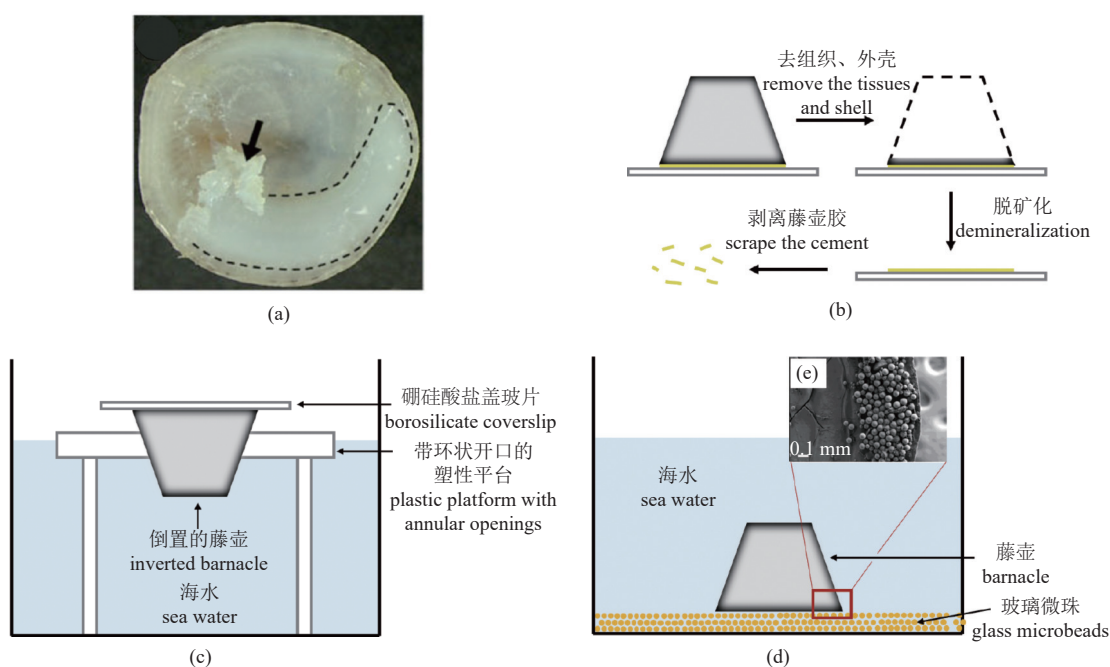


图3 藤壶胶的采集方法

(a) 从完整取下的藤壶个体底部直接刮取(箭头指示刮取的藤壶胶, 虚线区为未刮取部位)。 (b) 去除藤壶组织和外壳后, 对底壳进行脱矿化处理并去除脱矿化后残留的有机基质, 余下黏在基底上的有机膜即为藤壶胶样品。 (c) 利用带环状开口的塑性平台, 将藤壶进行倒置培养, 用硼硅酸盐盖玻片盖在藤壶底壳上收集藤壶胶。 (d)-(e) 将完整的藤壶个体放在铺满玻璃微珠的海水中培养, 然后收集黏在微珠上的胶液。 (a) 图来自文献^[41], (c) 图重绘自文献^[40], (e) 图为玻璃微珠黏连在藤壶底部的扫描电镜突破, 结果来自文献^[40]

Fig. 3 Methods for barnacle glue collection

(a) scrape directly from the bottom of an intact barnacle (arrow indicated the scraped barnacle glue, the dotted line area showed the part not scraped). (b) after removing the barnacle tissue and shell, the bottom shell is demineralized, and the remaining organic matrix post demineralization is removed. The resultant organic matrix sticking to the base was regarded as the barnacle glue sample. (c) barnacle was inverted placed on a plastic platform with a circular opening, and the barnacle glue was collected on the bottom with a borosilicate coverslip. (d)-(e) the whole barnacle was cultured in seawater where the bottom was covered with glass microspheres, and then the glue stuck to the microspheres was collected. (a) was taken from reference^[41], (c) was redrawn from reference^[40], and (e) was the SEM image of the glass microspheres sticking to the bottom of barnacle, and taken from reference^[40]

藤壶胶90%以上组分是蛋白质, 性质稳定, 不易降解, 可以耐受强酸强碱的腐蚀, 收集的藤壶胶需要经过特殊处理才能进一步分析^[50]。研究表明, 含有高浓度二硫苏糖醇还原剂的酸胍溶液是有效的藤壶胶溶解液^[51]。Schultzhaus等^[41]发现,

通过循环加压技术可以显著提高藤壶胶的水解速率, 从而鉴定更多的胶蛋白, 甚至可以使原来不适用的溶剂(尿素和甲醇)也能够很好地溶解藤壶胶。

藤壶胶成分的鉴定 藤壶胶是由胶腺组织分泌的, 通过特定的管道输送到体外, 排到底壳

附近,黏着在基底表面,为后续底壳的沉积铺垫一层有机膜。Wang 等^[42]将成体藤壶分为主体和次外套膜组织,比较蜕皮前后的转录组,同时结合藤壶分泌蛋白的蛋白质组学,发现藤壶胶蛋白在次外套膜组织中高表达(表 3),印证了胶腺在次外套膜组织中。此外,在蜕皮前,与外壳发育、生物矿化和蛋白质水解相关的基因有较高表达,但是发现蜕皮前后藤壶胶蛋白的表达量没有显著差异。即胶液蛋白在整个生命周期中的表达可能

都是比较稳定的。Lin 等^[43]首次利用基于 Illumina 的二代测序技术,检测膜基底日本笠藤壶 (*T. japonica formosana*) 附着相关基因的种类、表达分布和模式,结果发现藤壶胶蛋白 CP-19K、CP-52K 和 CP-100K 的同源蛋白均在基底组织中高表达,而胶液腺复合体正是位于这一区域。但是在成体的转录组中却没有检测到 CP-20K,表明这一基因是在特定时期表达,或者是膜基底藤壶和钙化基底藤壶之间有着不同的附着机制。

表 3 藤壶胶成分鉴定和固化机理的组学研究

Tab. 3 Omics studies of the barnacle glue proteins and mechanism underlying the glue curing

| 物种 species | 研究目的/假说 objectives/hypothesis | 方法 approach | 关键发现/结果 key findings/results | 文献 references |
|--------------------------------------|----------------------------------|----------------------|--|------------------|
| <i>A. amphitrite</i> | 研究胶黏剂纳米结构的共同序列基础 | 蛋白质组学 | 藤壶胶与蚕丝相关组分,例如蚕丝蛋白和梨形蛛丝蛋白等具有同源关系。 | [40] |
| <i>A. amphitrite</i> | 开发更有效的藤壶胶蛋白提取方法 | 循环加压技术结合蛋白质组 | 循环加压技术可以显著促进藤壶胶的水解,从而鉴定更多的胶蛋白。 | [41] |
| <i>A. amphitrite</i> | 蜕皮相关和藤壶胶蛋白的组织特异性表达 | RNA测序和液质联用(LC-MS/MS) | 在蜕皮前,与外壳发育、生物矿化和蛋白质水解相关的基因有较高表达。 | [42] |
| <i>Tetraclita japonica formosana</i> | 研究一种膜基底藤壶附着相关基因的种类、表达定位和分布模式 | 第二代测序技术 | CP-19K、CP-52K和CP-100K以及其他藤壶胶蛋白的同源蛋白均在含有液腺复合体的基底组织中高表达。 | [43] |
| <i>Pollicipes pollicipes</i> | 鉴定鹅颈藤壶中可能有用的转录本 | 4310 表达序列标签 (ESTs) | 鹅颈藤壶的胶蛋白与笠藤壶胶蛋白聚类在一起,表明其可能有着相近的来源。 | [44] |
| <i>L. anatifera</i> | 鉴定藤壶胶蛋白的黏性来源 | 蛋白质谱 | 笠藤壶蛋白抗体ab-cp-52k和ab-cp-68k能与 <i>L. anatifera</i> 胶液电泳条带杂交呈阳性,表明其中含有同源蛋白。 | [45] |
| <i>P. pollicipes</i> | 鉴定鹅颈藤壶的附着蛋白 | 无标记的液质联用高通量蛋白质组学 | 首次发现藤壶胶中50%的成分不是经典的胶蛋白,而是一些化学信号、蛋白酶抑制剂以及未注释的蛋白。附着蛋白只占三分之一,其中CP-52k丰度最高。 | [46] |
| <i>A. amphitrite</i> | 分析藤壶外壳的蛋白成分 | 蛋白质组学 | 鉴定chorion peroxidase, C-type lectin-like domains, serine proteases and proteinase inhibitor proteins等蛋白。 | [47] |
| <i>A. amphitrite</i> | 验证藤壶体液和藤壶胶固化源于伤口愈合与天然免疫反应 | 非胰蛋白酶水解,蛋白质组学 | 大量细胞外基质蛋白被鉴定,提示胶固化可能源于血液凝块和伤口修复。 | [48] |
| <i>M. volcano</i> | 藤壶腺介幼虫胶结的分子机理 | 比较转录组 | 唾液分泌信号通路在胶液腺中富集,赖氨酸氧化酶在胶液腺也有较高表达。 | [49] |

鹅颈藤壶 (*Pollicipes pollicipes*) 不属于严格意义上的藤壶,而是属于茗荷科 (Lepas), 与藤壶科 (Balanus) 同属于蔓足类。虽然形态上有较大的差异,但是鹅颈藤壶也是通过藤壶胶附着在固体表面(表 3)。Perina 等^[44]从鹅颈藤壶中测序得到了 4 310 个 ESTs,但是大部分无法注释。鹅颈藤壶的胶蛋白与笠藤壶聚为一支,表明其可能有着相近的来源。Jonker 等^[45]对另一类鹅颈藤壶(茗荷)的胶液进行分析,SDS-PAGE 结果表明胶液中至少有 10 个条带,蛋白质质谱检测到了 52 个多肽,氨基酸序列与最亲缘的藤壶 *Dosima fascicularis* 有一定的相似性,但是匹配不到任何转录组的序列。

另外,笠藤壶蛋白抗体能与茗荷 *L. anatifera* 胶液电泳条带杂交呈阳性,表明其中含有同源蛋白。根据发表的 EST 文库提取的胶蛋白序列与笠藤壶胶蛋白的比对结果也证实了这一点。Dominguez-Pérez 等^[46]利用定量质谱对鹅颈藤壶的胶液腺和藤壶胶进行分析,分别鉴定出 1 616 和 1 568 个蛋白质。胶液腺中主要有肌肉相关、细胞骨架和一些未知的蛋白。有意思的是,藤壶胶中的附着蛋白只占了三分之一,其中 CP-52k 丰度最高。另外一部分未注释的蛋白质性质与已知的胶蛋白相似,而其他的蛋白功能则有待研究。

藤壶胶的固化机理和假说 关于藤壶胶的

固化机理目前还没有明确的结论, 相关理论包括醌交联、二硫键交联、类凝血机制、淀粉样纤维聚集和磷酸化蛋白等假说, 关于这些理论的总结分析在张欣康等^[52]的综述中已经有详细的讨论, 本文只介绍组学方法在阐释藤壶胶固化机理方面的研究。Yan 等^[49]从腺介幼虫中分离胶液腺, 与余下的组织进行比较, 进行转录组测序。总共检测到 9060 个差异表达基因, 其中有 4383 个在胶液腺中表达上调。在胶液腺中检测到 352 个蛋白富集, 其中包含 4 个藤壶胶蛋白: Mvcp113k、Mvcp130k、Mvcp52k 和 Mvlcp1-122k。KEGG 分析发现, 唾液分泌信号通路在胶液腺中富集, 表明腺介幼虫黏附蛋白的分泌可能与唾液分泌相似。此外, 赖氨酸氧化酶在胶腺中也有较高的表达, 提示其在胶液固化中的作用。

藤壶黏附蛋白与其他海洋胶黏剂没有同源性, 并且缺乏一个普适性序列理论基础来阐明胶黏剂的纳米结构功能是如何实现的。So 等^[40]通过分析

蛋白质谱, 发现部分胶蛋白是由低复杂性的蛋白组成。这些蛋白与蚕丝蛋白模体有同源性, 是由含有大量的 Gly/Ala/Ser/Thr 重复序列的模块组成。此外, 多种赖氨酸氧化酶和过氧化酶的存在表明藤壶胶与蚕丝相关蛋白(如梨形蛛丝蛋白)具有同源关系。

Essock-Burns 等^[48]利用古老的天然免疫反应作为基本框架, 通过蛋白质组和酶活性检测, 验证藤壶体液和藤壶胶的固化源于伤口愈合与天然免疫反应的假设。结果找到了其中存在一种促酚氧化酶系统的证据, 包括激活因子、丝氨酸蛋白酶和丝氨酸蛋白酶抑制剂。通过酶特异性底物测定发现, 在胶液和底壳外围存在苯氧苯胺类活性, 化学抑制和加热处理证实类酚氧化酶活性的性质为变性酶。而氧化酶类的存在进一步证实了藤壶胶具有活性氧介导的抗菌活性。此外, 大量细胞外基质蛋白被鉴定, 提示胶固化可能源于初始凝块稳定和伤口修复(图 4)。

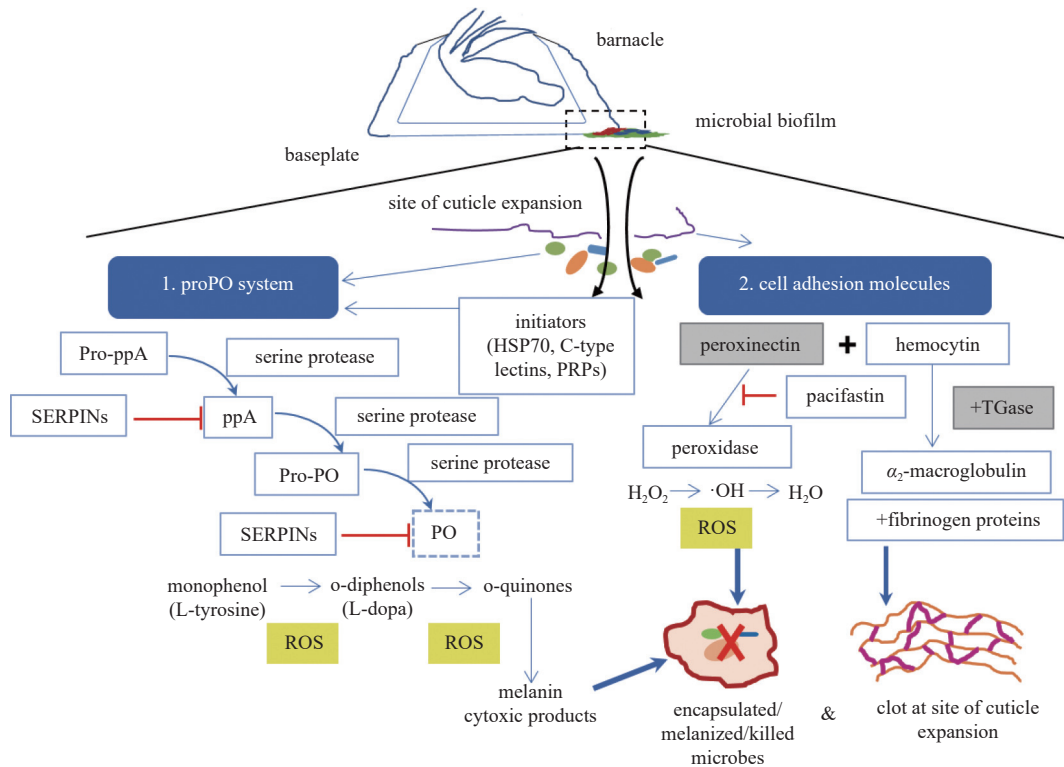


图 4 酚氧化酶原级联反应介导的藤壶胶凝机制新假说^[48]

在藤壶的生长过程中, 角质层在基底的外缘延伸到生物被膜的表面上(虚线框)。随着角质层的伸展(紫色), 释放出来的胶液与微生物接触, 从而将微生物相关分子样式(microbe-associated molecular patterns, MAMPs)呈递给宿主的天然免疫系统

Fig. 4 Emerging hypothesis on the mechanism of barnacle glue coagulation mediated by prophenoloxidase cascade^[48]

During barnacle growth, the cuticle extends from the outer edge of the basement to the surface of the biofilm (dashed line frame). As the cuticle stretches (purple), the released gel comes into contact with the microbes, presenting microbe-associated molecular patterns (MAMPs) to the host's natural immune system

3 新型防污技术的发展

传统的防污技术是在防污涂层中加入大量的氧化亚铜 (Cu_2O)，或者后来的有机锡 (TBT)，是利用生物杀灭剂将涂层表面的海洋生物杀死，从而实现广谱的防污效果^[53-54]。传统防污涂层会带来严重的环境问题，因此开发环保的新型防污材料势在必行。目前热门研究的防污新材料包括自抛光涂层、超疏水涂层、低模量涂层和仿生材料等，这在以往的综述中已有详尽的介绍^[1, 6, 55-56]，本文只分析目前防污技术研究的短板和未来的发展方向。许多新型防污涂层在实验室或者短期的临海试验中表现良好，但是还无法应用至实际海洋工况中。例如自抛光涂层在动态条件下具有很好的防污效果，但是在静态下效果欠佳，而且难以实现长期的防污目的^[5]。仿生材料例如仿鲨鱼皮肤和仿荷叶表面微观结构的材料在浅海环境中的防污效果欠佳^[1]，因为其微观结构很容易被近海的泥沙所覆盖，而且很难进行大面积的制备。

开发环境友好的天然防污剂是另一种途径，目前有不少学者从海绵、海带和贻贝等海洋生物中提取了具有防污活性的天然产物，并且在海区挂板试验中都表现出了一定的防污效果^[57-58]。但是这些研究大多集中在天然产物的分离纯化和性能检测上，对于这些活性物质抑制藤壶等污损生物附着的机理则研究得比较少。由于缺乏对污损生物附着过程调控机理的了解，目前天然防污剂的筛选有很大的随机性，这限制了我们通过改性已有防污剂来提高其防污性能。因此，从分子生物学的角度揭示藤壶等污损生物的附着机理，找到关键调控蛋白，对于防污涂层的定向设计有着重要的意义。

此外，许多学者致力于广谱且长效的防污技术研究，但是由于海洋环境的复杂多变以及污损生物的多样性，使得相关研究进展缓慢。也许我们需要换一种新的思考角度，海洋防污不一定需要防除所有污损生物。正如现代医学并不追求包治百病的万能药，而是针对特定的病人、特定的疾病使用个性化的治疗手段，即精准医疗。类似的，将海工装备按照服役时间、服役环境等因素进行系统分类，针对性地设计配套防污方案，提高防污涂层的效率并降低使用成本，这也许是未来海洋防污领域的出路。但是目前市场上的防污涂层还比较单一，未来值得投入更多的研究来开发在不同环境下使用的防污涂层，增加防污技术

的多样性。

4 结论与展望

当前的防污材料无论是防污涂层还是复合金属材料，大多从生理毒性角度出发，即掺杂生物毒性物质来发挥作用^[1, 54]。这样虽然可以达到广谱防污的效果，但也会衍生出许多问题，例如微塑料，海洋生态破坏等^[54]。未来海洋防污的研究方向必然是开发具备环保、普适性、长效性等特征的防污材料。转录组学和蛋白质组学研究方法在生物污损领域的应用，加深了我们对于包括藤壶在内的污损生物的生长发育和幼虫附着过程的了解，尤其是在揭示藤壶幼虫附着变态的分子调控机理等方面发挥了重要的作用。但是转录组和蛋白质组数据往往只能作为一种预测和筛选手段，例如预测藤壶触角的物理和化学信号受体蛋白。如果要鉴定并明确这些受体的生理功能，还需要结合其他研究手段，例如实时定量 PCR、荧光原位杂交技术 (FISH)、RNAi 等。此外，部分已发表的工作对转录组和蛋白质组数据的分析和挖掘较为有限，如何整合当前已发表的海量组学数据也是将来生物污损领域研究需要考虑的。

黄敬亮与刘欢为共同第一作者。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Yebra D M, Kiil S, Dam-Johansen K. Antifouling technology - past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings[J]. *Progress in Organic Coatings*, 2004, 50(2): 75-104.
- [2] 杨宗澄, 白秀琴, 姜欢, 等. 船体表面海洋污损生物附着规律分析[J]. *船舶工程*, 2016, 38(2): 29-33, 79. Yang Z C, Bai X Q, Jiang H, et al. Analysis of biofouling occurrence trends on ship hull surface[J]. *Ship Engineering*, 2016, 38(2): 29-33, 79 (in Chinese).
- [3] Bannister J, Sievers M, Bush F, et al. Biofouling in marine aquaculture: A review of recent research and developments[J]. *Biofouling*, 2019, 35(6): 631-648.
- [4] 刘勳伶, 严涛. 南海污损生物生态研究进展[J]. *海洋通报*, 2006, 25(1): 84-91.

Liu M L, Yan T. A review of marine fouling communit-

- ies in the South China Sea[J]. *Marine Science Bulletin*, 2006, 25(1): 84-91 (in Chinese).
- [5] Kwon S H, Lee I, Park H, *et al.* Decomposition mechanisms of self-polishing copolymers for antifouling coating materials through first-principles approach[J]. *Progress in Organic Coatings*, 2020, 138: 105406.
- [6] 李跃瑞, 蔺存国, 王利. 海洋污损生物黏附机制与酶防污技术研究进展[J]. *舰船科学技术*, 2017, 39(4): 1-7.
- Li Y R, Lin C G, Wang L. Attachment mechanisms of marine fouling organisms and progress of enzyme based antifouling technology[J]. *Ship Science and Technology*, 2017, 39(4): 1-7 (in Chinese).
- [7] Chen Z F, Kiyotaka M, Wang H, *et al.* Toward an understanding of the molecular mechanisms of barnacle larval settlement: A comparative transcriptomic approach[J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22913.
- [8] Liang C, Strickland J, Ye Z H, *et al.* Biochemistry of barnacle adhesion: An updated review[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2019, 6: 565.
- [9] Gohad N V, Aldred N, Hartshorn C M, *et al.* Synergistic roles for lipids and proteins in the permanent adhesive of barnacle larvae[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4414.
- [10] Kamino K. Mini-review: Barnacle adhesives and adhesion[J]. *Biofouling*, 2013, 29(6): 735-749.
- [11] 张慧, 曹文浩, 黄立, 等. 藤壶胶的特性及其作用机理[J]. *材料导报A:综述篇*, 2014, 28(3): 108-111,127.
- Zhang H, Cao W H, Huang L, *et al.* Characteristic and mechanism of barnacle cement[J]. *Materials Reports A:A Review*, 2014, 28(3): 108-111,127 (in Chinese).
- [12] Khalifa G M, Weiner S, Addadi L. Mineral and matrix components of the operculum and shell of the barnacle *Balanus amphitrite*: Calcite crystal growth in a hydrogel[J]. *Crystal Growth & Design*, 2011, 11(11): 5122-5130.
- [13] Barazandeh M, Davis C S, Neufeld C J, *et al.* Something Darwin didn't know about barnacles: Spermcast mating in a common stalked species[J]. *Proceedings of the Royal Society B:Biological Sciences*, 2013, 280(1754): 20122919.
- [14] 严涛, 黎祖福, 胡煜峰, 等. 中国沿海无柄蔓足类研究进展[J]. *生态学报*, 2012, 32(16): 5230-5241.
- Yan T, Li Z F, Hu Y F, *et al.* A review on the balanomorph barnacles in the coastal waters of China[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(16): 5230-5241 (in Chinese).
- [15] De Gregoris T B, Rupp O, Klages S, *et al.* Deep sequencing of naupliar-, cyprid- and adult-specific normalised Expressed Sequence Tag (EST) libraries of the acorn barnacle *Balanus amphitrite*[J]. *Biofouling*, 2011, 27(4): 367-374.
- [16] Yan G Y, Zhang G, Huang J M, *et al.* Comparative transcriptomic analysis reveals candidate genes and pathways involved in larval settlement of the barnacle *Megalobalanus volcano*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(11): 2253.
- [17] Al-Aqeel S, Ryu T, Zhang H M, *et al.* Transcriptome and proteome studies reveal candidate attachment genes during the development of the barnacle *Amphibalanus amphitrite*[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2016, 3: 171.
- [18] Abramova A, Rosenblad M A, Blomberg A, *et al.* Sensory receptor repertoire in cyprid antennules of the barnacle *Balanus improvisus*[J]. *PLoS One*, 2019, 14(5): e0216294.
- [19] Zhang X K, Liang C, Song J Y, *et al.* Transcriptome analyses suggest a molecular mechanism for the SIPC response of *Amphibalanus amphitrite*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, 525(4): 823-829.
- [20] Abramova A, Lind U, Blomberg A, *et al.* The complex barnacle perfume: identification of waterborne pheromone homologues in *Balanus improvisus* and their differential expression during settlement[J]. *Biofouling*, 2019, 35(4): 416-428.
- [21] 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[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e46513.
- [22] Chandramouli K H, Al-Aqeel S, Ryu T, *et al.* Transcriptome and proteome dynamics in larvae of the barnacle *Balanus amphitrite* from the Red Sea[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 1063.
- [23] Thiyyagarajan V, Qian P Y. Proteomic analysis of larvae during development, attachment, and metamorphosis in the fouling barnacle, *Balanus amphitrite*[J]. *Proteomics*, 2008, 8(15): 3164-3172.
- [24] Thiyyagarajan V, Wong T, Qian P Y. 2D gel-based proteome and phosphoproteome analysis during larval metamorphosis in two major marine biofouling

- invertebrates[J]. *Journal of Proteome Research*, 2009, 8(6): 2708-2719.
- [25] Chandramouli K H, Zhang Y, Wong Y H, *et al.* Comparative glycoproteome analysis: dynamics of protein glycosylation during metamorphic transition from pelagic to benthic life stages in three invertebrates[J]. *Journal of Proteome Research*, 2012, 11(2): 1330-1340.
- [26] Zhang Y, Xu Y, Arellano S M, *et al.* Comparative proteome and phosphoproteome analyses during cyprid development of the barnacle *Balanus (=Amphibalanus) amphitrite*[J]. *Journal of Proteome Research*, 2010, 9(6): 3146-3157.
- [27] Dash S, Chandramouli K H, Zhang Y, *et al.* Effects of poly-ether B on proteome and phosphoproteome expression in biofouling *Balanus amphitrite* cyprids[J]. *Biofouling*, 2012, 28(4): 405-415.
- [28] Chen Z F, Zhang H M, Wang H, *et al.* Quantitative proteomics study of larval settlement in the Barnacle *Balanus amphitrite*[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88744.
- [29] Han Z, Sun J, Zhang Y, *et al.* iTRAQ-based proteomic profiling of the barnacle *Balanus amphitrite* in response to the antifouling compound meleagrins[J]. *Journal of Proteome Research*, 2013, 12(5): 2090-2100.
- [30] Li X, Li S G, Huang X N, *et al.* Protein-mediated bioadhesion in marine organisms: a review[J]. *Marine Environmental Research*, 2021, 170: 105409.
- [31] De Gregoris T B, Borra M, Biffali E, *et al.* Construction of an adult barnacle (*Balanus amphitrite*) cDNA library and selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies[J]. *BMC Molecular Biology*, 2009, 10: 62.
- [32] Matsumura K, Mori S, Nagano M, *et al.* Lentil lectin inhibits adult extract-induced settlement of the barnacle, *Balanus amphitrite*[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1998, 280(3): 213-219.
- [33] Matsumura K, Qian P Y. Larval vision contributes to gregarious settlement in barnacles: adult red fluorescence as a possible visual signal[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2014, 217(5): 743-750.
- [34] Yorisue T, Matsumura K, Hirota H, *et al.* Possible molecular mechanisms of species recognition by barnacle larvae inferred from multi-specific sequencing analysis of proteinaceous settlement-inducing pheromone[J]. *Biofouling*, 2012, 28(6): 605-611.
- [35] Kotsiri M, Protopapa M, Mouratidis S, *et al.* Should I stay or should I go? The settlement-inducing protein complex guides barnacle settlement decisions[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2018, 221(22): jeb185348.
- [36] Ferrier G A, Kim S J, Kaddis C S, *et al.* MULTIFUNCTION: a multifunctional protein cue induces habitat selection by, and predation on, barnacles[J]. *Integrative and Comparative Biology*, 2016, 56(5): 901-913.
- [37] Clare A S and Yamazaki, M. Inactivity of glycyl-glycyl-arginine and two putative (QSAR) peptide analogues of barnacle waterborne settlement pheromone[J]. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2000, 80(5): 945-946.
- [38] Gan Z B, Yuan J B, Liu X M, *et al.* Comparative transcriptomic analysis of deep- and shallow-water barnacle species (Cirripedia, Poecilasmatidae) provides insights into deep-sea adaptation of sessile crustaceans[J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 240.
- [39] Chandramouli K H, Qian P Y, Ravasi T. Proteomics insights: proteins related to larval attachment and metamorphosis of marine invertebrates[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2014, 1: 52.
- [40] So C R, Fears K P, Leary D H, *et al.* Sequence basis of barnacle cement nanostructure is defined by proteins with silk homology[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 36219.
- [41] Schultzhause J N, Dean S N, Leary D H, *et al.* Pressure cycling technology for challenging proteomic sample processing: application to barnacle adhesive[J]. *Integrative Biology*, 2019, 11(5): 235-247.
- [42] Wang Z, Leary D H, Liu J, *et al.* Molt-dependent transcriptomic analysis of cement proteins in the barnacle *Amphibalanus amphitrite*[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 859.
- [43] 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[J]. *Biofouling*, 2014, 30(2): 169-181.
- [44] Perina A, von Reumont B M, Martínez-Lage A, *et al.* Accessing transcriptomic data for ecologically important genes in the goose barnacle (*Pollicipes pollicipes*), with particular focus on cement proteins[J]. *Marine Genomics*, 2014, 15: 9-11.
- [45] Jonker J L, Abram F, Pires E, *et al.* Adhesive proteins of

- stalked and acorn barnacles display homology with low sequence similarities[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e108902.
- [46] Domínguez-Pérez D, Almeida D, Wissing J, *et al.* The quantitative proteome of the cement and adhesive gland of the pedunculate barnacle, *Pollicipes pollicipes*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(7): 2524.
- [47] Zhang G, He L S, Wong Y H, *et al.* Chemical component and proteomic study of the *Amphibalanus* (= *Balanus*) *amphitrite* shell[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0133866.
- [48] Essock-Burns T, Soderblom E J, Orihuela B, *et al.* Hypothesis testing with proteomics: a case study using wound healing mechanisms in fluids associated with barnacle glue[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2019, 6: 343.
- [49] Yan G Y, Sun J, Wang Z S, *et al.* Insights into the synthesis, secretion and curing of barnacle cyprid adhesive via transcriptomic and proteomic analyses of the cement gland[J]. *Marine Drugs*, 2020, 18(4): 186.
- [50] 彭宪宇, 马传栋, 纪佳馨, 等. 海洋生物水下粘附机理及仿生研究[J]. *摩擦学学报*, 2020, 40(6): 816-830.
- Peng X Y, Ma C D, Ji J X, *et al.* Underwater adhesion mechanisms and biomimetic study of marine life[J]. *Tri-bology*, 2020, 40(6): 816-830 (in Chinese).
- [51] Kamino K, Inoue K, Maruyama T, *et al.* Barnacle cement proteins. Importance of disulfide bonds in their insolubility[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(35): 27360-27365.
- [52] 张欣康, 刘兴平, 曾玲, 等. 藤壶附着: 从基底探测到胶的固化[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2017, 44(3): 204-214.
- Zhang X K, Liu X P, Zeng L, *et al.* Barnacle adhesion: from substrate detection to cement curing[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2017, 44(3): 204-214 (in Chinese).
- [53] Yebra D M, Kiil S, Weinell C E, *et al.* Presence and effects of marine microbial biofilms on biocide-based antifouling paints[J]. *Biofouling*, 2006, 22(1): 33-41.
- [54] Champ M A. Economic and environmental impacts on ports and harbors from the convention to ban harmful marine anti-fouling systems[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2003, 46(8): 935-940.
- [55] 段继周, 刘超, 刘会莲, 等. 海洋水下设施生物污损及其控制技术研究进展[J]. *研究综述*, 2020, 44(8): 162-177.
- Duan J Z, Liu C, Liu H L, *et al.* Research progress of biofouling and its control technology in marine underwater facilities[J]. *Marine Sciences*, 2020, 44(8): 162-177 (in Chinese).
- [56] 石建高, 余雯雯, 赵奎, 等. 海水网箱网衣防污技术的研究进展[J]. *水产学报*, 2021, 45(3): 472-485.
- Shi J G, Yu W W, Zhao K, *et al.* Progress in research of antifouling technology of offshore cage netting[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(3): 472-485 (in Chinese).
- [57] Bers A V, D'Souza F, Klijnstra J W, *et al.* Chemical defence in mussels: antifouling effect of crude extracts of the periostracum of the blue mussel *Mytilus edulis*[J]. *Biofouling*, 2006, 22(4): 251-259.
- [58] Almeida J R, Vasconcelos V. Natural antifouling compounds: effectiveness in preventing invertebrate settlement and adhesion[J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(3-4): 343-357.

Mechanism underlying barnacle larval adhesion to material surface: transcriptome and proteome

HUANG Jingliang, LIU Huan, LI Weihua*

(School of Chemical Engineering and Technology, Sun Yat-sen University, Zhuhai 100059, China)

Abstract: Barnacle is an important marine biofouling organism and its attachment to the surface of marine engineering equipment has a strong impact on the use of the equipment and causes huge economic losses. The development of environmentally friendly antifouling technology against barnacle is inseparable from fundamental studies of the molecular regulatory mechanism underlying the larval attachment and metamorphosis process which has not been fully studied. The attachment of barnacle larvae involves many complex processes, such as the growth and development of the larvae, the exploration of the substrate for permanent attachment, the metamorphosis process and the secretion of barnacle glue. These processes are difficult to be analyzed in detail by the traditional methods of cell biology and molecular biology. In recent years, transcriptomics and proteomics based on high-throughput sequencing technology have played an important role in studying the attachment process of marine biofouling organisms, and have accumulated a large amount of data in revealing the attachment mechanism of barnacle larvae. In the present paper, recent studies on the barnacle adhesion mechanism at home and abroad were reviewed. We mainly focused on omics studies on the attachment and metamorphosis of the barnacle larvae, composition and curing of the barnacle glue. The collective archives have revealed an increasing application of omics tools in the biofouling field since the pioneering work of Anthony Clare's group. Transcriptome and proteome data provide insights into the signaling pathways in barnacle larval adhesion. It was found that receptor tyrosine kinases and mannose receptors may be involved in signal perception. In addition, many receptors related to vision, auditory and mechanical senses were identified and supposed to be involved in cyprid searching and attachment. Some studies focused on the water-soluble pheromone which are crucial for the aggregation of barnacles. As for the identification of the cement proteins, proteome analyses were commonly applied, which yielded characterization of biomineralization-related and adhesion-related proteins, as well as some proteins involved in other cellular processes. These findings inferred that the attachment of the cyprids and adult barnacles was a complex biochemical reaction coupling several physiological responses. At last, we briefly discussed the future perspectives of antifouling technology. Much attention has been paid to developing antifouling coatings with prevalent and long-term effects. However, the tests were usually conducted in the lab, while the real scenarios are extremely complex where multi-factors are coupled. And we suggest that individualized antifouling design according to the local marine environment, work site and other factors, rather than a cure-all, may improve efficiency and reduce the cost in the future.

Key words: barnacle larvae; biofouling organism; signal transduction pathway; barnacle glue; transcriptome; proteome; antifouling technology

Corresponding author: LI Weihua. E-mail: liweihua3@mail.sysu.edu.cn

Funding projects: National Science Foundation for Distinguished Young Scholars (51525903); Young Teacher Training Project of Basic Scientific Research Funds of Sun Yat-sen University (76110-31610013)