

HPLC 和 MALD F-TOF 质谱技术研究 海兔口腔神经节多肽组分与分布

吴韩志, 陈东仕, 冯丽剑, 颜利, 黄慧英, 黄河清*

(厦门大学生命科学学院 分析测试中心, 福建 厦门 361005)

摘要: 蓝斑背肛海兔中枢神经系统相比于其他海兔, 缺少脏神经节。口腔神经节是蓝斑背肛海兔的主要神经节之一, 它控制着口腔和其他附属器官的生理活动, 其中多肽起着重要的作用。本文选用反相高效液相色谱和质谱非在线联用技术分析口腔神经节多肽组成与分布情况, 发现口腔神经节含有丰富的神经活性多肽组分, 以颊肽、肌肉调节素、心脏活性小肽、肌动蛋白片段和吸引素为主。经 Paws 软件和数据库检索分析后, 发现部分多肽组成来自于前体蛋白的酶解产物, 认为这些酶解产物与其他多肽一同参与执行口腔神经节各种不同的生理功能。

关键词: 海兔; 口腔神经节; 神经肽; 高效液相色谱; 质谱

中图分类号: Q 51

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2006) S-0202-05

天然活性肽可介导细胞与细胞、蛋白质与蛋白质、细胞与蛋白质及其他非肽类物质、蛋白调控因子与基因表达之间的相互作用。尽管这些多肽在动物体内含量很少, 但它们所发挥的功能作用不可忽视。如何采用蛋白质工程技术研究神经多肽结构与功能越来越受到神经科学研究领域的关注。美国加州海兔神经系统中的袋细胞是“神经分泌”细胞, 它具有合成专一性低分子量蛋白质的能力。从袋细胞提取的产卵激素 (ELH) 直接注入海兔时, 会引起产卵行为发生。多肽合成研究指出, 海兔神经末梢所释放的多数多肽种类均是前体的分解产物。海兔心脏激动肽 $Asn-D-Tip-Phe-NH_2$ (NdW Fam ide) 在中枢神经和神经管路及心血管等器官中均有分布。它不但增强了海兔心室肌细胞 L 型 Ca^{2+} 流, 还加强了前触角的自动收缩。如果用 L-Tip 替代 D-Tip, 其合成肽活性比天然肽活性小 1000 倍^[1]。蓝斑背肛海兔 (Notarcus leachii cirrosus Stimpson, NLCS) 中枢神经系统相比于其他海兔, 缺少脏神经节, 神经系统更为简单。口腔神经节 (Buccal ganglion, BG) 是 NLCS 的主要神经节之一, 它支配咽、唾液腺、食道、喉囊、胃以及口腔肌肉的活动, 控制舌头的伸缩。海兔 BG 中富含具有不同功能的神经多肽。前人在研究大脑神经节中的大脑多肽 1 (CP1) 时, 动用了 1 000 个体积比 BG 大 4~5 倍的脑神经节^[2]。由此可见, 研

究 BG 蛋白质及多肽的组成与分布有一定的难度。本论文选用 HPLC 分离技术与 MALD F-TOF 质谱仪检测技术, 采用非在线联用方法, 开展 BG 多肽组成与分布研究, 为今后开展 BG 神经多肽结构与功能研究奠定良好的研究基础。

1 材料与方法

1.1 样品

蓝斑背肛海兔在 4、5 月份时分别采集自厦门市潮间带, 采集后立刻置于 -70 冻存备用。

1.2 仪器

高效液相色谱仪由 Waters 公司生产。采用 Waters 1515 系列泵, Waters 2487 系列 uv 检测器, Water Breeze 软件, C18 反相柱 (3.9 mm × 300 mm)。质谱仪: 德国 BRUKER 公司生产的 REFLEX 型 MALD F-TOF 质谱仪。超声波清洗器: KQ-50B 型, 昆山市超声仪器有限公司。

1.3 主要试剂

乙腈 (Acetonitrile): 色谱纯, 上海实验试剂有限公司; 甲醇 (Methanol): 色谱纯, 上海化学试剂研究所; 甲酸 (Formic acid): 分析纯, 上海光铎科技有限公司化学试剂分公司; 三氟乙酸 (Trifluoroacetic acid): 色谱纯, MERCK-Schuchardt 公司; 2,5-二羟基苯甲酸 (2,5-dihydroxybenzoic acid, DHB): 色谱纯, 美国 CN 生物医学公司。

1.3 BG 样品制备

将蓝斑背肛海兔解剖, 取其 BG20 对, 用研钵研

收稿日期: 2005-12-25

基金项目: 福建省自然科学基金 (C0310006) 和厦门大学预研基金 (2004xdex207, XDKJCX20051009) 资助

作者简介: 吴韩志 (1976-), 男, 助理工程师。

*通讯作者: hqhuang@xmu.edu.cn

磨,然后加溶解液进行溶解,溶解液组成为 V(丙酮): V(水) V(盐酸) = 60 4 1. 样品溶液在 4 ℃ 下静置 1 h 而后于 12 000 r/min 下离心 5min, 收集上清. 过 22 μm 的滤膜. 收集滤液备用.

1. 4 HPLC分离条件

流动相分别采用 1: 20%乙腈和 0. 1%三氟乙酸 (TFA); 2: 40%乙腈和 0. 1%三氟乙酸; 3: 60%乙腈和 0. 1%三氟乙酸. 双波长 (220, 280 nm)检测. 流速 2 mL/min, 进样 200 μL 时间 20 min

1. 5 质谱检测

每管吸取 0. 8 μL 与等体积基质 DHB 混合、点样, 作质谱分析. 质谱条件: 脉冲氮激光 (337 nm) 作为离子解吸电离源. 分析模型分别选用反射模式 (m/z : 0 ~ 6 000) 和线性模型 (m/z : > 6 000), 加速电压控制在 20 kV. 平均每次测定样品的激光脉冲次数在 120 次左右. 采用外标法标定多肽质谱峰峰位.

2 结果与讨论

2. 1 结果

实验结果表明, 采用 20%乙腈和 0. 1%三氟乙酸为分离条件时, 由于 BG 多肽与分离介质结合力较强, 使洗脱液的极性强度无法取代结合在分离介质上的多肽组分, 因而使多数多肽组分无法得到有效分离. 改用 40%乙腈和 0. 1%三氟乙酸作为分离条件时, 质谱分析结果发现 BG 多肽组成能得到较理想的分离效果. 为了进一步优化分离效果, 作者把乙腈浓度提升到 60% (0. 1%三氟乙酸), 但所获得多肽种类及含量反而减少, 这说明了 40%乙腈和 0. 1%三氟乙酸组成的分离条件较为适合于 BG 多肽组成的分离与纯化. 根据质谱分析多肽结果, 结合 NCB I 海兔蛋白数据库和 Paws 软件分析, 在设定相对误差小于 $< 1 \times 10^{-4}$ 条件进行检索, 其 BG 多肽检索结果总结在表 1 ~ 3. 图 1

~ 3 分别是分析得到的几个重要组分 BucR、SCP-B、MME 质谱图.

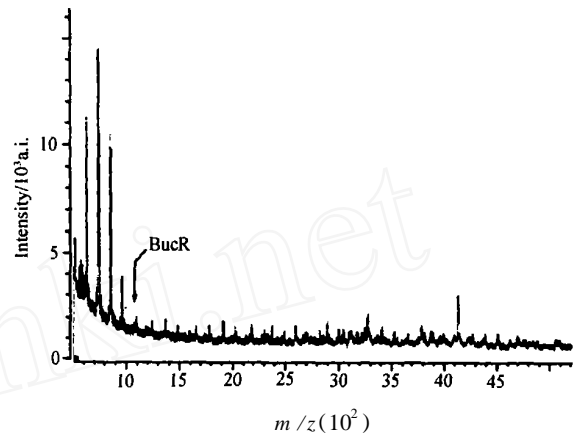


图 1 质谱分析得到的 BucR 组分

Fig 1 BucR analyzed by MALD FTOFMS

表 1 BG 多肽组分

Tab 1 The peptide composition of BG

实验值 M + H ⁺ (m/z)	理论值 M (m/z)	多肽组分名称
574.46	574.0	Met-enkephalin
598.40	599.0	EMRFamide
646.62	645.8	PRQFamide
725.48	725.0	FRFB
764.31	766.41	FRFA
819.41	818.47	MyomodulinI
830.17	829.48	MyomodulinE
833.87	832.5	MyomodulinG
1035.99	1035.5	Vasopressin-like peptidev
1095.52	1097.7	BucR
1142.74	1141.0	SCP-B
2899.48	2899.9	pGlu-R3-14I
3996.35	3999.0	R15-1

表 2 BG 多肽片段组分

Tab 2 The peptide fragments of BG

实验值 M + H ⁺ (m/z)	理论值 M (Mw)	多肽组分名称	实验值 M + H ⁺ (m/z)	理论值 M (Mw)	多肽组分名称
528.66	527.6	Buccalin precursor [430 - 435]	667.86	666.9	Actin[189 - 193]
553.71	552.7	Actin[373 - 376]	682.71	682.7	SCP-B precursor[76 - 80]
568.67	568.7	SCP-B precursor[58 - 90]	691.65	690.7	Buccalin precursor[46 - 51]
573.80	572.7	beta tubulin[150 - 154]	698.85	697.8	Buccalin precursor[224 - 230]. [251 - 257]. [264 - 270]. [291 - 297]. [304 - 310]
587.71	587.7	SCP-B precursor[131 - 135] or [132 - 136]	735.96	734.9	Buccalin precursor[466 - 471]
589.55	589.6	SCP-B precursor[72 - 76]	741.72	740.8	Mollusk-derived growth factor[520 - 525]
594.72	593.7	Buccalin precursor[11 - 15] or [12 - 16]	854.10	853.0	Actin[256 - 262] or [257 - 263]
630.67	630.7	SCP-B precursor[70 - 75] or [94 - 98]	1002.19	1001.2	Buccalin precursor[5 - 12]
652.74	652.7	SCP-B precursor[1 - 6]			

实验值 M + H ⁺ (m/z)	理论值 M (Mw)	多肽组分名称	实验值 M + H ⁺ (m/z)	理论值 M (Mw)	多肽组分名称
1242.50	1241.5	Buccalin precursor[315 - 326] or [371 - 382]	3413.94	3413.9	SCP - B precursor[82 - 113]
1370.28	1369.4	Attractin[42 - 54]	3416.36	3415.2	Actin[300 - 331]
1602.77	1602.8	SCP - B precursor[97 - 110]	3529.59	3528.8	Actin[215 - 245]
1917.32	1917.4	SCP - B precursor[3 - 20]	3660.07	3659.1	Actin[271 - 304]
2032.47	2032.4	SCP - B precursor[78 - 97]	3789.47	3788.2	Attractin[2 - 35]
2183.39	2183.5	SCP - B precursor[82 - 102]	3879.48	3879.7	SCP - B precursor[4 - 39]
2310.65	2309.6	Buccalin precursor[310 - 330]	4131.80	4130.7	Actin[341 - 376]
2497.02	2495.9	Buccalin precursor[87 - 109] or [89 - 111]	4271.52	4270.6	Actin[219 - 256]
2698.60	2697.7	Buccalin precursor[479 - 501] or [480 - 502]	4394.54	4393.3	Actin[310 - 349] or [311 - 350]
2827.44	2828.5	ELH[15 - 36]	4511.50	4510.4	Actin[312 - 352]
3003.75	3002.5	Buccalin precursor[400 - 425]	4697.26	4697.2	SCP - B precursor[79 - 122]
3047.86	3046.8	Actin[307 - 334]	5786.58	5785.7	Neuropeptide Y[10 - 60]
3119.91	3118.6	Buccalin precursor[84 - 112]	5883.86	5883.4	Actin[195 - 245]
3280.64	3279.6	Attractin[22 - 51]	5891.80	5890.8	Actin[97 - 149]

表 3 未能检索到的 BG 多肽组分

Tab 3 The BG peptides of BG in the absence of database

未知的多肽组分实验值 M + H ⁺ (m/z)						
510.15	510.15	540.42	549.25	559.85	627.98	651.94
653.12	662.98	666.18	685.13	700.37	742.19	778.50
804.29	808.46	853.16	872.72	895.4	1244.03	1486.38
1657.31	1787.69	2030.79	2181.04	2597.34	3180.14	5966.48

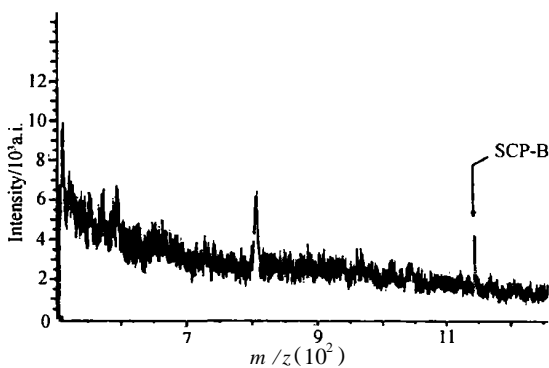


图 2 质谱分析得到的 SCP-B 组分

Fig 2 SCP-B analyzed by MALD FT-TOF-MS

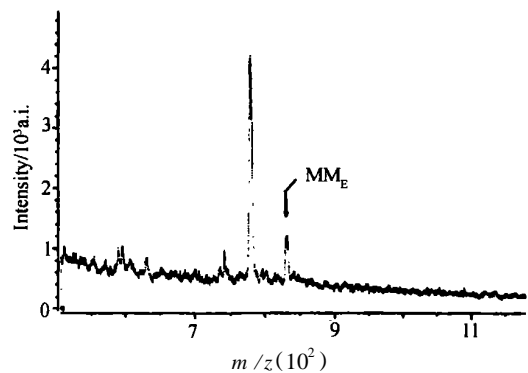


图 3 质谱分析得到的 MM_E

Fig 3 MM_E analyzed by MALD FT-TOF-MS

2.2 讨论

表 1~3 分别是 BG 的完整多肽组分,多肽片段以及未知多肽组分归类.从中可以看出,NLCS 的 BG 含有丰富多肽组份.它们反映了 NLCS 的 BG 中所存在的多肽组份与分布情况.其中部分多肽与其他类型的海兔神经节多肽很相似,但是在多肽的种类、分布情况、数量等方面仍然存在着很大的差异性,由表中数据

可知,有完整序列的多肽组分一共是 13 个,多肽片段 45 个.另外,未知的多肽组分 29 个,占到多肽种类总数近三分之一.这些已知多肽与片段,绝大多数与神经节的结构与功能关系紧密,而未知的多肽组分,其性质与功能尚不清楚,有待于进一步研究.

海兔 BG 及口腔肌肉组织中均含有颊肽 (buccalin),调节着口腔肌肉的活动.目前,有研究报道的颊

肽高达 19种,是由它的前体蛋白酶解产生,其前体蛋白一级结构由 505 个氨基酸组成,分子量为 53 516.5 Da 实验结果发现,在 NLCS 的 BG 中,不同结构的肽种类很少,仅仅有 Buc R (序列为:MDQFS-FGPGL,文中序列信息均取自 NCBI 蛋白质数据库)一种(图 1)。对于这一结果,我们认为,有可能是由于 NLCS 较为低等,它的一些多肽的剪切及相关功能并未阐明,缺乏相关的信息,从而导致检索肽组分偏少的现象。当 BG 调节口腔肌肉活动时,肽主要作用于前突触部位,它对于肌肉的松弛没有影响,可以减少触动神经元的促收缩作用,但对乙酰胆碱不起作用。肽作为 BG 中的最主要多肽, NLCS 的 BG 中存在形式是以前体蛋白为主。而在行使其功能时,才大量剪切成熟。因为在实验中,发现有大量肽前体蛋白片段的在存在。其剪切部位复杂,这些片段有可能是我们未知的活性多肽,并在 BG 中实施某些特殊功能。

另外两种重要的多肽(图 2, 3)是心脏活性小肽 (Small cardioactive peptide, SCP)和肌肉调节素 (myomodulin, MM),它们均作用于后突触。当前突触端释放出神经传递物质之后,这些化学物质便利用扩散的方式抵达后突触区,并且和其上的受体相互结合,此时将引发一个动作电位,使得这个讯号得以传到下一个神经细胞上。SCP 与 MM 配合肽就可以起到完整的神经传导作用。它们在质谱图中有完整分子量的描述。从质谱图中峰值的高低情况可以较为简明直观地分析出该种组分相对含量的高低情况。结果显示 SCP 在 BG 中的含量相当丰富。这一看法与数据库中所描述的 BG 中含有大量 SCP 的结果是一致的。

海兔 SCP 主要有 SCP-A 和 SCP-B 两种,但含量上有所不同, NLCS 的 BG 中主要以 SCP-B (序列为: MN YLA FPRM) 为主。SCP 是一种重要且起调控作用的多肽,它与 5 羟色氨酸,被称为是两大神经调节传递因子。实验结果还表明, BG 中也含有 FMRMamide 小肽。它是另外一种重要的神经多肽,有报导说它能与 SCP 共同协作,完成对肌肉的调节过程。Lyle 和 Philip 在研究神经多肽释放对行为可塑性的影响时,发现海兔口腔肌肉 Ba 受两种神经元 (B3 和 B38) 支配,而它们又分别释放出 FMRMamide 和 SCP 来共同完成肌肉收缩活动^[3]。Ned 和 Steven 也发现 FMRMamide 和 SCP-B 在海兔感觉神经元超极化 Cl⁻离子流时,起到相反的作用^[4]。尽管如此,有关 SCP-A 实验证据还未在 NLCS 的 BG 中得到证实。

MM 在神经系统中起着调节肌肉活动的作用。现已发现的有 9 种之多 (从 MM-A 到 MM-I),而在 NLCS 的 BG 中发现了 3 种: MM-E (序列为: GLQMLRL), MM-G (序列为: TLSMLR), MM-I (序列为: SLSMLRL)。

MM 多肽主要作用是调节肌肉的伸缩活动。口舌和周边肌肉的伸缩活动在海兔的日常行为中是常见反射行为。在海兔胸膜神经节的感觉神经元中,肌肉调节素通过与 5 羟色氨酸相反的作用来控制其尾部的收缩反射^[5],并对口舌及周边的附属器官进行调控,从而达到控制进食行为的效果。由于 NLCS 的 BG 中只含有 3 种 MM,这也说明了它在进化上比 CA 来得低等。这 3 种 MM 如何行使它们的功能,还有待进一步的研究。

此外,还有一些类脑啡肽与后叶加压素的多肽组分存在,这些组分能够在实验中得到检测,说明它们在 NLCS 的 BG 中也有相当数量的存在。它们虽然在海兔神经系统的相关文献中未见报导,但作用不能忽视。因此进一步的深入研究它们的作用与功能也很有意义。

由表 2 的多肽片段组分实验结果可知,在 NLCS 的 BG 中存在着丰富的多肽片段。这些片段主要有肌动蛋白 (actin)、吸引素 (attractin)、肽前体蛋白 (bucalin precursor)、微管蛋白 (tubulin)、SCP-B 前体蛋白 (SCP-B precursor) 以及 Neuropeptide Y (NPY)。

RP-HPLC 在分离 BG 多肽组成与分布显示了特殊优势。与 MALD FTOFMS 进行非在线联用分析,这不仅能充分了解 BG 多肽组成与分布情况,而且对阐明多肽结构和了解多肽功能中均起着重要的作用和提供了有价值科学理论研究依据。在多肽的研究中,直接将组织样品与基质混合,置于质谱靶上测定,也是快速了解组织一定部位的多肽特性的一种方式。Kruise^[6]等将腹神经节直接放在 MALD FTOFMS 靶上混以基质得到如表 4 的多肽组分结果。

表 4 腹神经节 MALD FTOFMS 分析结果
Tab 4 The analysis result of AG by MALD FTOFMS

多 肽	细 胞
-BCP1-7	Bag cells
a-BCP1-9	Bag cells
pGlu Peptide II	R3-14
Peptide II	R3-14
ELH (188-203)	Bag cells
-BCP	Bag cells
AP (9-27)	Bag cells
AP	Bag cells
ELH (110-144)	Bag Cells
ELH	Bag cells
-BCP	Bag cells
Peptide V	R3-14
ELH (103-148)	Bag cells

腹神经节中的多肽是以袋细胞多肽为主的。而袋细胞是一种肽能细胞,即能产生大量活性多肽的细胞。

这一特点也决定了 AG 中的袋细胞成为研究的热点之一。然而,用质谱直接分析的结果,从表 4 中可以看出,有完整的多肽组分只检测到 7 个,多肽片段有 6 个。对于腹神经节这样一个多肽含量丰富的组织,也只有少量的多肽信息得以展现。比较表 1~3 与表 4 中腹神经节与口腔神经节的多肽组分可以看出,它们均有各自的特点所在。腹神经节有大量的产卵激素和 BCP 存在,而口腔神经节有大量颊肽及前体片段的存在,这与它们所属的部位与功能性质相对应。从实验方法的角度可以看出:用高效液相色谱与质谱联用的分析方法得到的组分多,信息量大,更能反映神经节内部的情况。这一结果与 Floyd^[7]等人对神经连索多肽组分用两种方法所做的分析结果,所反映的事实相符。通过比较进一步证明了这种高效液相色谱结合 MALD I-TOF-MS 非在线检测上的优越性。

参考文献:

- [1] Fumihito M, Yuka N, Sachie K. A novel D-amino-acid-containing peptide isolated from Aplysia heart [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 240: 354 - 358
- [2] Wang Y, Price D A, Sahley C L. Identification and characterization of a myomodulin-like peptide in the leech [J]. *Peptides*, 1998, 19 (3): 487 - 493
- [3] Lyle F, Philip E L. Evidence that post-Tetanic potentiation is mediated by neuropeptide release in Aplysia [J]. *J. Neurophysiol*, 2001, 86: 2845 - 2855
- [4] Ned B, Steven A S. Antagonistic modulation of a hyperpolarization-activated Cl⁻ current in Aplysia sensory neurons by SCPB and FMRFamide [J]. *J. Neurophysiol*, 2003, 90: 586 - 598
- [5] Critz S D, Baxter D A, Byrne J H. Modulatory effects of serotonin, FMRFamide, and myomodulin on the duration of action potentials, excitability, and membrane currents in tail sensory neurons of Aplysia [J]. *J. Neurophys*, 1991, 66: 1912 - 1926
- [6] Kruse R, Sweedler J V. Spatial profiling invertebrate ganglia using MALD IMS [J]. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2003, 7: 752 - 759
- [7] Floyd P D, Li L J, Tatiana P. Characterization of peptides from Aplysia using microbore liquid chromatography with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry guided purification [J]. *Journal of Chromatography A*, 1999, 830: 105 - 113

Analysis Peptides Composition and Distribution of Buccal Ganglion of Aplysia by HPLC and MALD I-TOF MS

WU Han-zhi, CHEN Dong-shi, FENG Li-jian, YAN Li,
HUANG Hui-ying, HUANG He-qing*

(Analysis and Testing Center, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Compared to other Aplysia, the center nervous system (CNS) from the Aplysia Notarcus leachii cirrosus Stimpson (NLCS) lacks abdominal ganglion (AG). Buccal ganglion (BG) is one of main ganglion in NLCS. Peptides in BG have important function. They controlled many organs and modulated their actions. In this paper, combined off-line method of RP-HPLC with MS technology, Peptides of BG of NLCS were studied. There were many Peptides found in BG such as buccalin, myomodulin, small cardioactive peptide (SCP), actin and attractin. The information of Peptides was searched in database and analyzed by Paws software. The results showed that some peptides come from their precursor proteins. The Peptides and their precursor proteins were both taking part in achieving different physiological function.

Key words: Aplysia; buccal ganglion; neuropeptide; HPLC; MS