

# 质谱技术研究蓝斑背肛海兔胸膜神经节 连索外表层多肽组成与分布

吴韩志, 王磊, 翁鹭娜, 黄慧英, 黄河清\*

(厦门大学生命科学学院分析测试中心; 厦门大学化学生物学福建省重点实验室, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 选用基质辅助激光解吸电离化飞行时间(MALDI-TOF)质谱技术研究蓝斑背肛海兔侧膜神经节与腹部之间神经连索外表层的多肽组成和分布。采用比对法和 Paws 软件分析多肽序列和酶解位点, 发现该神经连索表层含有丰富的酸性多肽(AP)的酶解产物, 其酶解过程由 AP 的 C 到 N 端。表明海兔中枢神经系统外表层不仅含有丰富的多肽种类, 而且还参与信号传导等调控作用。

**关键词:** 海兔; 神经连索; 神经多肽; 质谱

**中图分类号:** Q503      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1671-5470(2007)01-0064-04

## Peptide composition and distribution on the outside connection surface of pleural ganglion from *Aplysia* with techniques of mass spectrometry

WU Hang-zhi, WANG Lei, WENG Lu-na, HUANG Hui-ying, HUANG He-qing

(The Center of Analysis and Testing, School of Life Science, Key Lab. of Chemical

Biology of Fujian Province, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

**Abstract** The peptide composition and distribution on the outside surface of neural connection between pleural ganglion and abdomen were studied by matrix-assisted laser desorption ionization/time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. With compared methods, Paws software, abundant enzymolysis products of acidic peptide (AP) and enzymolysis sites were found. The result suggests that the products occur from the N to C end of AP. It is indicated that the outside connection surface of central neural system from the *Aplysia* has abundant peptide kinds and these peptides play an important role in the modulation of signal transportation.

**Key words** *Aplysia*; neural connective; neuropeptide; mass spectrometry

海兔 (*Aplysia*) 隶属于软体动物门腹足纲后腮亚纲侧循目海兔科, 主要分布在热带及亚热带的浅海海域。海兔中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 结构简单, 易于分离和进行细胞定位等研究。海兔的 CNS 由口腔神经节 (buccal ganglion, BG)、大脑神经节 (cerebral ganglion, CG)、胸膜与足部神经节 (pleural/pedal ganglion, PLG/PDG)、腹部神经节 (abdominal ganglion, AG) 和复杂的神经连索组成, 其中大脑和口腔神经节外表均含有丰富的多肽组成<sup>[1-2]</sup>。前人<sup>[3-5]</sup>曾采用基质辅助激光解吸电离化飞行时间 (matrix-assisted laser desorption ionization/time of flight, MALDI-TOF) 质谱技术研究海兔 CNS 多肽组成与分布过程中, 分别发现酸性多肽 (acidic peptide, AP)、酶解产物和内切酶。位于胸膜和腹部神经节之间的神经连索 (pleural-abdominal connective, PAC) 内也含有 AP。高效液相色谱和 MALDI-TOF 质谱非在线联用技术初步证实了海兔 BG 和 CG 中含有 Leu-Leu 多肽酶, 并能酶解 AP 中的 Leu-Leu 酰胺键, 形成不同的酶解产物<sup>[5-7]</sup>。

本试验采用 MALDI-TOF 质谱技术对蓝斑背肛海兔 (*Notarcus leachii cirrosus* Stimpson, NLCS) 侧膜神经节与肌肉连索外表面多肽组成与分布情况进行了研究, 其分析技术和研究结果将有助于了解 CNS 和肌肉之间的信号传递、信号中止以及相关生理过程。目前, 还没有将这种方法用于海兔神经连索研究的报道。

收稿日期: 2006-10-16      修回日期: 2007-01-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30470372); 福建省自然科学基金资助项目 (C031006); 厦门大学预研基金资助项目 (xdkjcx20061026, xdkjcx20051006)。

作者简介: 吴韩志 (1976-), 男, 硕士。研究方向: 蛋白质结构与功能。

\* 通讯作者: 黄河清 (1956-), 男, 教授, 博士生导师。研究方向: 蛋白质结构与功能。Email: hqhuang@xmu.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

NLCS 捕获于厦门岛东部近海区域. 试验所需的海兔净重均控制在 250 g 内. 分离神经连索之前, 海兔饲养在 14 °C 人工海水中. 基质 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) 购置于美国 ICN 生物医学公司.

### 1.2 神经连索分离

随机选取海兔 10–15 只, 分别称量其体重, 按照 1 g 折算成 1 mL 的方式, 向其体内注射体重一半的  $MgCl_2$  ( $390\text{ mmol} \cdot L^{-1}$ ). 待数分钟海兔麻醉后, 迅速解剖, 分离出 PLG 与肌肉之间的连索, 剪取 5 cm 左右的一段, 剔除连索表面残留组织, 随后置于人工海水中备用.

### 1.3 PLG 与腹部肌肉神经连索表面多肽组分的萃取

已分离的神经连索置于小离心管中, 每管放置 3–5 根, 保持连索 2 端截断面露于管外 (防止连索内部多肽成分从断口释放于萃取液中). 选用  $0.025\text{ mol} \cdot L^{-1}$  Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0) 清洗连索中部 2–3 次后, 将中部浸泡于 100  $\mu$ L 提取液 (水与乙腈的体积比为 1:1) 中萃取表面多肽组分. 在室温下萃取 2 h 后取出神经连索. 将萃取液于  $12500\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min 收集上清液备用.

### 1.4 基质和样品配置

将适量 DHB 干粉与二次重蒸水混合, 涡旋振荡 30 min 或者超声波溶解 10 min 使 DHB 充分溶解, 最终配制成饱和水溶液. 上样前将神经连索表面多肽萃取液与基质溶液按体积比为 1:1 预先混匀 60 s 然后取 0.8–1.0  $\mu$ L 上样于质谱专用样品靶. 混和液自然干燥后, 即可把样品靶置入质谱仪靶室内开始测量.

### 1.5 质谱测定条件

采用德国 BRUKER 公司生产的 REFLEX 四型 MALD FT OF 质谱仪. 以脉冲氮激光 (337 nm) 作为离子解吸电离源. 为提高灵敏度, 降低噪音干扰, 分析模型选用高分辨率反射模型, 加速电压控制在 20 kV. 测定分子质量范围设定为  $< 6000\text{ u}$  平均每次测定样品的激光脉冲次数在 25–30 次. 检测结束后使用质谱仪配套软件以外标法标定多肽质谱峰位.

## 2 结果与分析

采用合理萃取神经连索管表层多肽的方法是阻止连索管内的多肽和蛋白质释放于介质中, 获得准确测定结果的有效手段之一. 尽管萃取后的神经连索外表层多肽含量可能处于纳摩尔级, 但仍然可采用 MALD FT OF 质谱技术分析多肽组成与结构, 并获得神经连索管表层多肽组成与分布信息. 利用 Paws 软件对所获得的多肽质谱数据进行逐一分析与比对, 发现其中部分多肽组成和结构与近期发现的 AP、大脑多肽 1 (CP1)、大脑多肽 2 (CP2)、神经肽等组成极为相似, 进而推测这些多肽参与信号传导.

### 2.1 AP 和 CP1 的酶解产物

参比已获得的侧膜神经节与腹部之间神经连索外表层的多肽质谱图 (略), 通过比对法和 Paws 软件分析后, 其结果总结于表 1. 2 从表 1. 2 可以看出, AP 与 CP1 的酶解片段的酶解方式有一定的相似性, 推测神经连索表层不仅含有丰富的多肽内切酶, 而且该酶能同时对 AP 和 CP1 进行酶解, 从而产生相似酶切位点的多肽产物, 这一现象与近期林庆梅等<sup>[5]</sup>报道的海兔大脑神经节中含有酶解 L-R (氨基酸残基) 多肽内切酶的试验结果极为相似. 酶解 AP 和 CP1 的多肽内切酶分布于海兔 CNS 各区域, 主要功能是提供酶解产物, 以满足 CNS 执行信号传导作用的需求.

从表 1. 2 还可以看出, 神经连索表层不仅含有丰富的 AP 酶解产物, 而且其中多数产物序列均属于 Leu-Leu 键裂解的产物, 因而可以认为 AP 的 Leu-Leu 键易被酶解. 进一步分析表 1 结果可以发现, AP 酶解产物中占 50% 多肽短肽均以 Leu 残基作为末端, 说明 Leu-R (R 代表除 Leu 以外的其他氨基酸残基) 键键能小, 易受水解酶、物理、化学等因素影响而断裂<sup>[6–7]</sup>. AP 降解产物的形成可能受多种内切酶协同作用, 其主要起因在于: (1) 亮氨酸内切酶特异性作用于 Leu-Leu 键; (2) 一些其他种类的内切酶则作用于 Leu-R 键. 这样就产生了大量以 Leu 残基作为末端的片段产物. 在 CP1 片段中也存在着 Ser-Ser 酰胺键, 具有较高的键能. CP1 的酶切片段中以 Leu 和 Ser 残基为酶解位点的数目较多, 这说明多肽内切酶起着调控 CP1 功

能的重要作用. 根据 AP 序列, 其一级结构的 N 端具有 Ser-Ser 酰胺键, 推测它对酸性多肽 C 端 Leu-Leu 酰胺键产生易酶解的影响, 而使 N 端的 Leu-Leu 酰胺键趋于稳定, 不易发生酶解. 显然, 酶切位点与 AP 的 Leu-Leu 酰胺键位点有关, 即与 AP 分子结构有关.

表 1 PLG 与腹部肌肉神经连索外表层 AP 酶解碎片

Table 1 AP segments on the surface of connective between PLG and abdomen muscle

AP 序列: SSGVSLTNSKDEEQRELLKAENLLD		
测量值 /u	理论值 /u	一级结构
1113 57	(1) 1113 52	ELLKAISNLL
1228 55	(1) 1228 56	EEQRELIKAI
	(2) 1228 62	ELLKAISNLLD
1413 82	(1) 1413 82	EQRELLKAENL
1574 21	(1) 1574 90	LLTSNKDEEQRELL
	(2) 1574 90	LTSNKDEEQRELL
1688 14	(1) 1688 08	LLTSNKDEEQRELL
1879 09	(1) 1879 21	SSGVSLTNSKDEEQRE
2304 68	(1) 2304 85	SSGVSLTNSKDEEQRELKAI
2645 50	(1) 2645 33	SGVSLTNSKDEEQRELLKAISNL
2845 32	(1) 2845 60	SSGVSLTNSKDEEQRELKAIISNLL

表 2 PLG 与腹部肌肉神经连索外表层 CP1 片段

Table 2 CP1 segments on the surface of connective between PLG and abdomen muscle

CP1 序列: FSGLMSEGSSLEA		
测量值 /u	理论值 /u	一级结构
680 27	(1) 679 84	SGLMSEG
	(2) 679 84	GIMSEGS
709 49	(1) 709 86	LMSEGSS
	(2) 709 86	MSEGSSL
778 76	(1) 778 87	SEGSSLEA
827 54	(1) 827 03	FSGIMSEG
854 20	(1) 854 02	SGLMSEGSS
880 57	(1) 880 11	GIMSEGSSL
914 62	(1) 914 12	FSGIMSEGS
1079 73	(1) 1080 33	GIMSEGSSLEA
1113 83	(1) 1114 39	FSGIMSEGSSL

作为一种信息传递物质, 神经多肽必然要经历在特定细胞的合成与释放, 与靶细胞受体的识别与相互作用, 并引发一系列生理生化反应, 最终降解失活的过程. 在此之前, Morishita et al.<sup>[8]</sup> 研究了加州海兔心脏兴奋多肽 (cardioexcitatory peptide) 的膜催化降解过程, 发现其首要的步骤就是羧基端的脱酰胺作用, 该反应由一种脱酰胺酶来完成. 在海兔体内这种由酶催化的 C 末端脱酰胺作用可能存在着一定的普遍性, 即 AP 的降解也由此开始. 结合上述 Ser-Ser 对 N 末端起稳定作用的推论, 说明 AP 酶解过程的一种可能形式是从 C 端开始, 由亮氨酸内切酶等多种内切酶催化, 作用位点集中于 3 对 Leu-Leu 键附近, 形成以 Leu 残基为末端的片段产物. 而对于上述内切酶的具体定位目前仍需要进一步的试验.

## 2.2 CP2 酶解产物

CP2 的一级结构与 AP 和 CP1 不同之处在于 Leu 和 Ser 位点较少, 因而酶解产物不同于 AP 和 CP1 的酶解产物.

从表 3 可以看出, CP2 的酶切片段普遍较长, 酶切位点多样化, 而且酶切片段多位于整条肽链的中段. 另外, 最小的酶切片段含有 18 个氨基酸残基, 估计此时酶切即告终止. 因此, 作者认为在海兔 CNS 内, 对于此类神经活性多肽, 其实现调控功能之后, 通过酶切终止时, 是按照以下原理来进行的: (1) 酶解从多肽的 N 端和 C 端同时进行; (2) 每次酶切数在 1-3 个氨基酸残基之间; (3) 酶切过程在多肽活性丧失时, 即告终止; (4) 此类多肽的活性部位很可能位于多肽的两端处.

这一发现有助于对此类多肽活动机理有更深层次的了解, 可以针对它们的特性作更深入的研究.

表 3 PLG 与腹部肌肉神经连索外表层 CP2 片段

Table 3 CP2 segments on the surface of connective between PLG and abdomen muscle

CP2 序列: FDFGFAGLDITYDAHRALEQPARGTSNSGSGYNM LMKMQRH		
测量值 /u	理论值 /u	一级结构
1865.02	(1) 1865 20	RALEQPARGTNSGSGYN
1968.02	(1) 1967 35	DAHRALEQPARGTNSGSGS
2116.36	(1) 2115 51	DTYDAHRALEQPARGTNS
	(2) 2115 50	HRALEQPARGTNSGSGYN
2491.48	(1) 2491 14	HRALEQPARGTNSGSGYNMIM
2645.50	(1) 2645 17	AGLDITYDAHRALEQPARGTNSGSG
2680.37	(1) 2680 20	LDTYDAHRALEQPARGTNSGSGY
	(2) 2681 14	DTYDAHRALEQPARGTNSGSGYN
2710.31	(1) 2709 31	YDAHRALEQPARGTNSGSGYNML
3370.96	(1) 3371 13	GFAGLDITYDAHRALEQPARGTNSGSGYNML
3600.58	(1) 3600 49	DTYDAHRALEQPARGTNSGSGYNMIMKQR
3630.45	(1) 3630 53	GFAGLDITYDAHRALEQPARGTNSGSGYNMIMK
3777.08	(1) 3777 72	FGFAGLDITYDAHRALEQPARGTNSGSGYNMIMK

### 2.3 神经肽酶解特性

神经肽是一种在神经系统中广泛存在的活性肽, 由于其氨基酸组成少, 分子质量较小, 因此只要有一个小段的氨基酸残基缺失即可影响到神经肽在体内的活性. 在质谱分析的结果中发现, 神经肽显然酶解的片段比较少. 从表 4 可以看到, 只要是 N 端或 C 端缺失 1-2 个氨基酸残基, 神经肽的构象就改变了, 功能就被抑制了, 可以猜测其活性已极大地降低或者完全消失了. 若把神经肽比作长肽的一个活性中心的话, 这一结果也从另一个角度说明了, 多肽的活性中心氨基酸残基成分的微小改变, 即可影响到整个功能的实现.

通过以上的分析可以看出, 在 PLG 与腹部肌肉神经连索的外表面存在着大量与多肽片段相同的组分. 由于试验中这些数据存在着一定的重复性, 所以可以推测这些多肽片段极有可能是上述神经多肽类物质的合成中间物或降解产物. 以往的研究已经证实, 上述 4 种多肽在海兔 CNS 的信息传导过程中起着重要的作用<sup>[9-11]</sup>, 但对于存在于连索表面的多肽的研究报道较少. 从这些多肽片段的信息可以了解它们在信号传导中的一些特性, 及它们在神经连索表层的性质及表现, 为深入了解神经活性多肽提供了帮助.

### 参考文献

[1] RUBAKHIN S S, GARDEN R W, FULLER R R, et al Measuring the peptides in individual organelles with mass spectrometry [J]. Nature Biotechnology, 2000, 18(1): 172-175.

[2] PHILIP D F, LING JUN L, TATIANA P, et al Characterization of specificity of subtilisin carlsberg towards peptide T by high-performance liquid chromatography and electrospray mass spectrometry [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 26(5/6): 374-380.

[3] LIL J, TATIANA PM, REBECCA W G, et al Mass spectrometric survey of interganglionically transported peptides in *Aplysia* [J]. Peptides, 1998, 19(8): 1425-1433.

[4] FLOYD P D, LIL J, MOROZ T P, et al 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(1): 105-113.

[5] 林庆梅, 黄慧英, 黄河清, 等. 质谱技术研究海兔大脑神经节超微量多肽内切酶和酸性多肽酶解产物 [J]. 分析化学, 2006, 34(9): S95-S99.

[6] HHUMMON A B, HUANG H Q, KELLEY W P, et al A novel prohormone processing site in *Aplysia californica* the Leu-Leu motif [J]. J Neurochemistry, 2002, 82(10): 1398-1405.

[7] 黄河清, KM W, MAO H. MALDI-TOF 质谱技术研究多肽一级结构特性 [J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(6): 79-83.

[8] MORISHITA E, MATSUSHIMA O, FURUKAWA Y, et al Deamidase inactivates a d-amino acid-containing *Aplysia* neuropeptide [J]. Peptides, 2003, 24(1): 45-51.

[9] GREGG A, PHILIP E L. Purification, primary structure, and neuronal localization of cerebral peptide 1 from *Aplysia* [J]. Peptides, 1996, 17(5): 753-761.

[10] VILM F S, ALEXEEVA V, MOROZ L L, et al Cloning, expression and processing of the CP2 neuropeptide precursor of *Aplysia* [J]. Peptides, 2001, 22(12): 2027-2038.

[11] ZHANG L H, NANCY L W, NANCY M S, et al Biological and immunological characterization of multiple GnRH in an isothorax mollusk *Aplysia californica* [J]. General and Comparative Endocrinology, 2000, 118(1): 77-89.

(责任编辑: 施晓棠)