

# 基质辅助激光解吸/电离质谱法研究 海兔卵多肽内切酶组成、结构与功能

黄河清<sup>\* 1,2,3</sup> 陆永进<sup>1</sup> 林庆梅<sup>1,3</sup> 卓慧钦<sup>1</sup> 黄慧英<sup>1</sup>

(厦门大学生命科学学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室<sup>1</sup>;

化学化工学院物理化学固体表面国家重点实验室<sup>2</sup>;

海洋与环境学院近海海洋环境科学国家重点实验室<sup>3</sup>; 厦门 361005)

**摘要** 选择 DEAE-52 纤维素和 Sephadex G-150 为分离介质, 采用柱层析法分离纯化海兔卵多肽酶 (Endopeptidase of *Aplysia egg*, AEE)。选用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 法测定 AEE 纯度和亚基分子量 (约 39 kDa)。基质辅助激光解吸/电离 (MALDI-TOF) 质谱技术测定 AEE 由单类型亚基 (M) 组成, 其  $m/z$  比值分别为 12738.17、18108.79 和 38221.42, 即分子式为  $[M^{3+}]$ 、 $[M^{2+}]$  和  $[M^+]$ 。其中 AEE 分子量为 38221.42 Da (称为 AEE<sub>39</sub>), 是一种含金属锌的多肽酶。以胰岛素 (INS) 为探针, 研究 AEE<sub>39</sub> 酶切 INS 能力, 其酶切产物  $m/z$  比值为 1449.51、2085.84、4080.41 和 4165.42。自行设计 INS 序列分析软件, 鉴定 AEE<sub>39</sub> 酶切 INS 的位点, 发现易酶切位点是 Leu-X (氨基酸残基), 其次是 Gly-X, 部分 Phe-X, Asn-X 和 Ser-X 结构也可以发生酶切。通过 INS 和海兔吸引素的分子结构比对后, 指出海兔卵中的 AEE<sub>39</sub> 主要功能之一是负责酶切海兔吸引素, 起着海兔之间信息交往、召唤、识别和交配的重要作用。AEE<sub>39</sub> 具有酶切酸性多肽 (acidic peptide AP) 中 Leu-Leu 的能力, 属于一种广谱性多肽内切酶。

**关键词** 海兔, 多肽内切酶, 质谱分析, 吸引素, 胰岛素

## 1 引言

海兔属于腹足纲软体动物, 它是开展神经结构生物学研究的重要模式生物之一。海兔是雌雄同体类动物, 通常以独立食宿方式生活, 只有在产卵受精期间, 才聚集成群。吸引素来源于海兔卵腺 (egg cordons), 是一种由 58 个氨基酸残基组成的水溶性多肽, 它的空间结构包含两个  $\alpha$ -螺旋<sup>[1,2]</sup>, 其分子结构类似人胰岛素, 均具有三对链内二硫键。部分吸引素合成后直接释放到海水中, 并作为海兔之间的信息传递与交流媒介<sup>[1,3]</sup>。研究吸引素结构与功能和如何识别海水中超微量吸引素及酶切片段均具有重要的生物学意义, 拟开展相关研究工作的关键技术之一, 在于建立的最佳分析技术。

目前已从海兔卵带中分离出 4 种吸引素酶切片段, 其分子序列分别从吸引素的 N 端到 C 端的第 1-46、1-31、1-29 和 1-24 位多肽<sup>[4]</sup>, 这种现象说明了吸引素在卵带中发生了降解过程, 卵内含吸引素多肽内切酶。近年来有关吸引素的组成、结构和功能已进行较为详细地研究<sup>[1-6]</sup>, 但有关吸引素多肽酶和酶切吸引素的途径和机理尚未见报道。其主要原因是至今尚未发现吸引素多肽酶, 并供结构与功能研究。本研究采用生物工程下游技术分离纯化 AEE<sub>39</sub>, 选用类似吸引素结构的 INS 为探针, 采用 MALDI-TOF 质谱技术筛选与鉴定海兔卵 AEE<sub>39</sub>, 并阐明 AEE<sub>39</sub> 酶切吸引素和 INS 途径, 其机理为阐明吸引素在海兔之间信息交往、召唤、识别和交配以及对理解动物本能起到至关重要的作用。

## 2 实验部分

### 2.1 材料、试剂与仪器

每年 4~5 月份, 在厦门市潮间带采集蓝斑背肛海兔 (*Notarca leacii cirrosus stimpson*, NLCS) 卵带, 之后立刻置于 -70℃ 冻存备用; DEAE-52 纤维素 (Waters 公司)、葡聚糖凝胶 Sephadex G-150 (Phar-

2006-07-10 收稿; 2007-02-05 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 30470372) 和厦门大学科研基金 (No. 2004xdex207, xdkjcx200510009) 资助项目

\* E-mail: hqhuang@xmu.edu.cn

macia)、2,5-二羟基苯甲酸 (DHB)、芥子酸 (SA) (美国 ICN 生物医学公司); NS 注射液 (徐州万邦生化制药有限公司)。Reflex III 型 MALDI-TOF 质谱仪和 HPLC-ESI-Q-TOF 质谱仪 (德国 Bruker 公司)。根据吸引素和 NS 分子结构特殊性和相似性,自行设计分析软件鉴定 NS 和吸引素的酶切位点。

## 2.2 AEP<sub>39</sub> 的分离纯化实验

取 50 g 海兔卵于含有 25.0 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH = 7.4 下同) 的研钵中,加入少量的石英砂进行人工捣碎 10 min,随后离心 30 min (6 000 g, 4 °C),收集上清液,并用真空冻干法将上清液冻成干粉。取适量干粉,溶于 Tris-HCl 缓冲液,得粗酶液。选用离子交换柱 DEAE-52 纤维素 (20 mm × 200 mm) 对粗酶液进行分离,平衡液为 25 mmol/L Tris-HCl 缓冲液。样品洗脱液 NaCl 浓度分别配制为 0.10, 0.20, 0.30 和 0.40 mol/L (25 mmol/L Tris-HCl 缓冲液),并采用非线性梯度洗脱法依次分离样品。每 5 min 收集一管样品,每管 50 μL (图 1),并按文献 [7] 的质谱筛选法,筛选出含有 AEE<sub>39</sub> 样品管,再真空浓缩。随后通过 Sephadex G-150 层析柱 (10 mm × 250 mm) 纯化样品 (图 2),采用质谱筛选方法筛选 AEP<sub>39</sub> 样品,并用聚丙烯酰胺凝胶电泳法鉴定 AEP<sub>39</sub> 纯度。

## 2.3 质谱分析

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。选用反射模式,加速电压控制 20 kV 为分析基本条件。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。

## 2.4 质谱法检测 AEP<sub>39</sub> 酶切 NS 活性

取 10 μL 胰岛素、约为 0.3 μg 的 AEE<sub>39</sub> 和 50 μL 缓冲液均匀混合混匀后,常温下反应 30 min,随后进行质谱分析。按上述反应条件,以 10 μL 缓冲液替代 NS 作为空白对照。酶切产物以新增 NS 分解产物为依据。NS 分解产物按自行设计软件进行比对分析。AEE<sub>39</sub> 亚基类型和分子量测定,按常规的 SDS-PAGE 方法进行分析与测定。

**2.5 分析 AEE<sub>39</sub> 活性中心重金属** 取 50 μL EDTA (250 mmol/L) 溶液与 700 μL 电泳纯 AEE<sub>39</sub> 均匀混合反应 10 min,采用超滤膜管离心过滤的方式,去除样品中 EDTA 和其它游离重金属离子,收集 apo AEE<sub>39</sub>,反复进行 3 次。取适量 Tris-HCl 缓冲液溶解 AEE<sub>39</sub>,并按 2.4 节的方法测定 AEE<sub>39</sub> 酶解 NS 活性和精确测定 AEE<sub>39</sub> 质荷比 (相对分子量)<sup>[7]</sup>。采用石墨炉原子吸收光谱法测定 AEE<sub>39</sub> 重金属种类与含量。

# 3 结果与讨论

## 3.1 液相层析法分离与纯化 AEE<sub>39</sub>

图 1 是第 2 次采用 DEAE-52 纤维素层析柱分离纯化 AEE<sub>39</sub> 的层析图。从图中可以看出, AEE<sub>39</sub> 粗酶主要分布在样品收集管第 6~15 管之间,其中第 10 管含量最高。洗脱液 NaCl 浓度约为 0.06 mol/L,属于低离子浓度交换类型的蛋白质。DEAE-52 纤维素属于阴离子交换树脂,它可有效地分离 AEE<sub>39</sub> 介质,但仅需要低浓度 NaCl。可见 AEE<sub>39</sub> 蛋白壳表层含有可交换的阴离子基团数目并不多,难于通过离子交换介质的途径获得电泳纯 AEE<sub>39</sub>。

为了获得电泳纯 AEE<sub>39</sub>,实验选用 Sephadex G-150 为分离介质。利用 AEE<sub>39</sub> 与其它蛋白质之间的分子尺寸差异进行高效分离,并获得图 2 结果。由图 2 可见,经 DEAE-52 纤维素分离后的 AEE<sub>39</sub>,再次经 Sephadex G-150 凝胶介质分离后,即可获得纯度较高 AEE<sub>39</sub> 组分 (图 2A),同时去除部分杂蛋白,经聚丙烯酰胺凝胶电泳再次分离后,获得单一蛋白层析条带,这一现象说明所收集的 AEE<sub>39</sub> 样品 (图 2A) 已达到电泳纯,可供质谱分析。

## 3.2 AEE<sub>39</sub> 亚基组成

图 3 是 AEE<sub>39</sub> 的 SDS-PAGE 图谱。从图中可看出, AEE<sub>39</sub> 呈单亚基类型。参考标准分子量迁移率,可计算获得 AEE<sub>39</sub> 亚基分子量约为 39 kDa。林庆梅等合成了酸性多肽 (Acidic peptide, AP), 选用 RP-HPLC 和 MALDI-TOF 质谱非在线技术研究海兔大脑神经节中的多肽与酶蛋白质组成时,发现该神经节内含有超微量的 Leu-X (任何氨基酸残基) 多肽内切酶,其精确分子量为 78218.25 Da 约高于 AEE<sub>39</sub> 亚

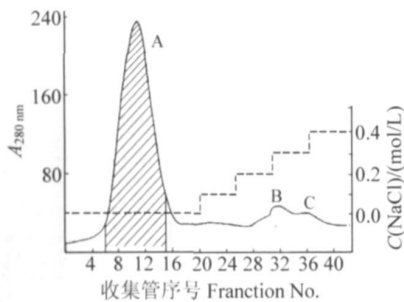


图 1 第 2 次 DEAE-52 纤维素分离纯化 AEE<sub>39</sub> 层析图

Fig 1 Chromatogram of endopeptidase of aplysia egg (AEE<sub>39</sub>) separated and purified with DEAE-52 cellulose for second times

A. 粗 AEE<sub>39</sub> ( crude AEE<sub>39</sub> ); B, C. 杂蛋白 ( remanin proteins except for AEE<sub>39</sub> )

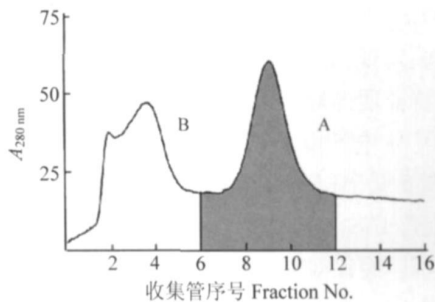


图 2 Sephadex G-150 介质分离纯化 AEE<sub>39</sub> 层析图

Fig 2 Chromatogram of AEE<sub>39</sub> separated and purified with Sephadex G-150

A. 电泳纯 AEE<sub>39</sub> ( AEE<sub>39</sub> with electrophoresis degree); B. 杂蛋白 ( remanin proteins except for AEE<sub>39</sub> )

基分子量 1 倍。如果采用 MALDI-TOF 质谱技术分析 AEE<sub>39</sub> 的组成、结构与功能, 其实验结果和论点对于理解 AEE<sub>39</sub> 结构与功能起着重要的作用。

### 3.3 AEE<sub>39</sub> 质谱特性和酶活性

采用 MALDI-TOF 质谱技术直接测定 AEE<sub>39</sub>, 可获得图 4a 结果。由图 4a 可看出, 在质荷比位于 8000 至 80000 范围内, AEE<sub>39</sub> 显示出 4 个特征质谱峰, 其质荷比分别为 12738.17, 19108.79, 38221.42 和 75442.34。参考图 3 结果可以看出, 图 2A 样品属于质谱纯。AEE<sub>39</sub> 由单类型单亚基组成, 其分子量为 38221.42 Da 称为 [M<sup>+</sup>]。由此类推, 图 4 中所显示的质谱峰均为 AEE<sub>39</sub> 亚基多电荷及聚合物组成, 其分子式可视为 [M<sup>3+</sup>]、[M<sup>2+</sup>]、[M<sup>+</sup>] 和 [2M<sup>+</sup>]。为了了解 AEE<sub>39</sub> 是否属于金属酶, 选用广谱性金属螯合剂 EDTA 作为金属络合剂, 并作用于 AEE<sub>39</sub>, 获得图 5 结果。比较图 4a 和图 4b, 可发现 AEE<sub>39</sub> 各自对应的质谱峰的质荷比值具有一定的差异, EDTA 络合 AEE<sub>39</sub> 中的金属离子, 导致脱金属 AEE<sub>39</sub> ( apo AEE<sub>39</sub> ) 质谱峰所对应的质荷比值稍微降低 (除了

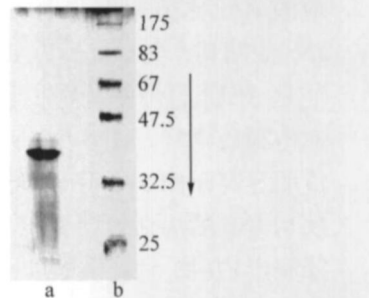


图 3 采用 SDS-PAGE 测定 AEE<sub>39</sub> 亚基分子量

Fig 3 Molecular weight of AEE<sub>39</sub> subunit measured with SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) method. A. AEE<sub>39</sub> 亚基 ( AEE<sub>39</sub> subunit ); B 系列标准蛋白分子量 ( markers )。

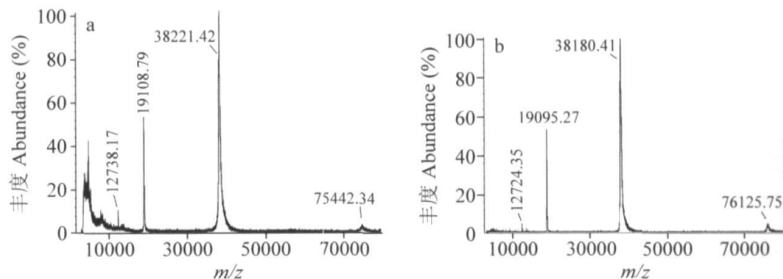


图 4 AEE<sub>39</sub> ( a ) 和经 EDTA 处理 ( b ) 的 MALDI-TOF 质谱图

Fig 4 Mass spectrum of AEE<sub>39</sub> ( a ) and treated by EDTA ( b ) measured with MALDI time of flight (TOF)-MS

*m/z* 76125.75 稍微增加外), 说明 AEE<sub>39</sub> 属于金属多肽内切酶。采用原子吸收分光光谱法测定, AEE<sub>39</sub> 含有较高浓度的锌离子, 推测金属锌是 AEE<sub>39</sub> 活性中心的必需基团。为了证实这一问题, 实验采用 apoAEE<sub>39</sub> 与微量锌盐直接重组后, 其 apoAEE<sub>39</sub> 酶切 NS 活性可明显得到改善。此外, 作者选用 NS 作为探针, 自行设计 NS 序列分析软件, 研究 AEE<sub>39</sub> 酶切 NS 位点和机理。

### 3.4 AEE<sub>39</sub>酶切 INS 过程与途径

实验发现,在弱酸性 (pH 2.0~3.5)条件下,INS 只显示 3 个特征质谱峰,  $m/z$  比值分别为 2892.31(双电荷峰)、6784.20(单电荷峰)和 11568.23(二聚体峰,绝对强度很弱)。图 5 是 AEE<sub>39</sub>酶切 INS 后的质谱图,约为 10 个质谱峰,分别是 NS、INS 酶切产物和 AEE<sub>39</sub>自降解产物所对应的质谱峰。经比对对照样品质谱峰数目和  $m/z$  比值后,可获悉图 5 中  $m/z$  为 1449.51、4915.89 和 5781.39 为 NS 酶切产物和 NS,其余质谱峰均为 AEE<sub>39</sub>自降解产物。为了了解 apoAEE<sub>39</sub>酶切 INS 的能力,实验采用 EDTA 和膜过滤方式去除 AEE<sub>39</sub>中 Zn<sup>2+</sup>,收集电泳纯 apoAEE<sub>39</sub>,并按相同条件研究 apoAEE<sub>39</sub>酶切 INS 能力,并获得图 6 结果。由图 7 结果可看出中,apoAEE<sub>39</sub>仍然具有酶切 INS 的能力,但酶活性明显减弱。采用比较法,可观察到 NS 酶切产物质谱峰所对应的  $m/z$  比值分别为 2085.84、4080.41 和 4167.42 均为 NS 的酶切产物。 $m/z$  为 4294.88 和 4457.79 的质谱峰,可能是 AEE<sub>39</sub>自降解产物。图 6 中  $m/z$  为 2894.76 是 NS 的双电荷质谱峰。图 6 中 NS 质谱峰 ( $m/z$  6780.64)绝对强度明显高于图 5 中 INS 质谱峰强度近 9 倍,说明 apoAEE<sub>39</sub>酶切 INS 的酶活性明显低于 AEE<sub>39</sub>,因而只产生少量的自降解产物(图 5)。参比上述实验结果,虽然 AEE<sub>39</sub>是金属酶, Zn<sup>2+</sup>是 AEE<sub>39</sub>活性中心的必需基团,但该 AEE<sub>39</sub>是一种广谱性多肽内切酶,所以 apoAEE<sub>39</sub>仍然可以酶切 INS,但酶切位点不同于 AEE<sub>39</sub>。根据图 5 图 6 结果和自行设计分析 NS 酶切位点软件,对 AEE<sub>39</sub>和 apoAEE<sub>39</sub>酶切 INS 产物进行逐点分析,可获得表 1 结果。从表 1 中可获悉最容易被酶切的位点是 Leu-X,其次是 Glu-X。

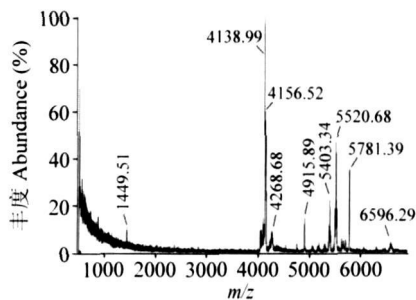


图 5 AEE<sub>39</sub>酶切 INS 的质谱图

Fig 5 Mass spectrum of insulin (INS) lysated with AEE<sub>39</sub>

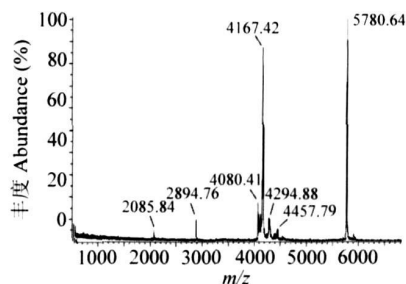


图 6 ApoAEE<sub>39</sub>酶切 INS 的质谱图

Fig 6 Mass spectrum of INS lysated with apoAEE<sub>39</sub>

表 1 AEE<sub>39</sub>和 apoAEE<sub>39</sub>酶切 INS 的产物和位点

Table 1 Enzymolysis produces and cleavages of INS by both AEE<sub>39</sub> and apoAEE<sub>39</sub>

$m/z$	理论值 Theory data (Da)	相对误差 Relative error ( $10^{-6}$ )	酶切位点和多肽序列 Enzymolysis cleavage and peptide sequence
4167.42	4165.15	554	Ser-His Leu-Tyr Glu-Arg 
4080.41	4080.33	20	Leu-Tyr Asn-Tyr Glu-Arg 
2085.84	2086.58	387	Leu-Tyr Leu-Tyr Phe-Phe 
1449.91	1450.75	815	Leu-Tyr Leu-Val Glu-Arg 

在 Phe-X、Asn-X 和 Ser-X 均发生了酶切。从海兔卵鞘中分离出吸引素 4 种肽片段, 其中酶切位点分别为 Phe-Gly, Gly-Gly, Ile-Ile 和 Asn-Gly, 与上述表 1 中所描述的酶切位点很类似, 只有 Ile-Ile 差异性<sup>[1]</sup>。实验选用 AP 为探针发现, AEE<sub>39</sub> 具有酶切 AP 中的 Leu-Leu 酰胺键能力。MALDI-TOF 质谱和肽指纹联用分析技术<sup>[8-9]</sup> 研究发现, NLCS 口腔神经节中含有一定量的吸引素<sup>[10]</sup>, 推测它可能也含有吸引素多肽内切酶。由此看来, AEE<sub>39</sub> 是一种广谱性多肽内切酶, 它具有酶切 NS 吸引素和 AP 的能力, 是海兔卵腺和卵内一种极其重要的工具酶, 起着酶切和活化前体多肽及酶蛋白的作用。如果能人工合成吸引素, 并分析 AEE<sub>39</sub> 酶切吸引素的位点, 其结果和论点将能进一步证实上述论点的可靠性。

海兔以含糖量较高的藻类及海草为食物, 这表明 AEE<sub>39</sub> 具备高效酶切 NS 的能力, 以维持机体中的含糖类组分比例, 起着平衡体内新陈代谢的重要作用。当海兔一旦需要通过吸引素吸引或阻止同类交配时, 它将启动 AEE<sub>39</sub> 的调控作用, 以调节吸引素分泌速率、含量和释放等生物功能的重要作用。MALDI-TOF 质谱技术是筛选生物体内酶蛋白及多肽组成、结构与功能的有效分析手段之一, 相关的研究已获得一系列突破性的研究进展<sup>[8-9, 11, 12]</sup>。

## References

- Cummings S F, Nichols A E, Schein C H, Nagle G T. *Peptides*, **2006**, 27(3): 597~ 606
- Fan X, Wu B, Nagle G T, Painter S D. *Mol Brain Res*, **1997**, 48(1): 167~ 170
- Cummings S F, Nichols A E, Warsaw C J, Nagle G T. *Peptides*, **2005**, 26(2): 351~ 359
- Panter D S, Clough B, Garden W R. *Biol Bull*, **1998**, 194: 120~ 131
- Akala David B G, Cummings S F, Painter S D, Nagle G T. *Peptides*, **2003**, 23(8): 1117~ 1122
- Muto Y, Sato K. *Mol Brain Res*, **2003**, 111(1/2): 111~ 122
- Lin Qing-Mei (林庆梅), Huang Hu-Ying (黄慧英), Huang He-Qing (黄河清), Cai Zong-Wei (蔡宗苇). *Chinese J. Anal Chem.* (分析化学), **2006**, 34: S95~ S99
- Dai Jing-Quan (代景泉), Li Xiao-Hai (李晓海), Cai Yun (蔡耘), Qian Xiao-Hong (钱小红). *Chinese J. Anal Chem.* (分析化学), **2005**, 33(2): 145~ 149
- Zhu J Y, Huang H Q, Bao X D, Lin Q M, Cai Z. *Aquatic Toxicology*, **2006**, 78(1): 127~ 135
- Chen Dong-Shi (陈东仕), Huang He-Qing (黄河清), Wu Han-Zhi (吴韩志), Cai Zong-Wei (蔡宗苇). *Chemical Journal of Chinese Universities* (高等学校化学学报), **2006**, 27(7): 1257~ 1261
- Liu Shang-Yi (刘尚义), Liu Xi-Wen (刘秀文), Cai Yun (蔡耘), Song Hai-Feng (宋海峰), Ying Wan-Tao (应万涛), Zhu Bao-Zhen (朱宝珍), Li Lei (李蕾), Tang Zhong-Ming (汤仲明), Qian Xiao-Hong (钱小红). *Chinese J. Anal Chem.* (分析化学), **2003**, 31(3): 277~ 282
- Sun Ming-Zhong (孙明忠), Ji Yi-Ping (季怡萍), Ding Lan (丁兰), Zhao Da-Qing (赵大庆), Ni Jia-Zhan (倪嘉缙). *Chinese J. Anal Chem.* (分析化学), **1999**, 27(9): 297~ 299

## Composition, Structure and Function from Endopeptidase of *Aplysia Egg* Analyzed with Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry

Huang He-Qing<sup>\*1,2,3</sup>, Lu Yong-Jin<sup>1</sup>, Lin Qing-Mei<sup>1,3</sup>, Zhuo Hu-Qin<sup>1</sup>, Huang Hu-Ying<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences,

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Physical Chemistry of Solid Surface, Collage Chemistry & Chemical Engineering,

<sup>3</sup>State Key Laboratory of Marine Environmental Science, College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005)

**Abstract** Endopeptidase of *Aplysia egg* (AEE) was separated and purified by column chromatography using

separation gel both DEAE-52 cellulose. The purity of AEE and its molecular weight of the subunit (approximately 39.0 kDa) were determined by Sephadex G-150 and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) methods. The results from MALDI-TOF mass spectrometry indicated that AEE<sub>39</sub> consisted of single subunit type (M), and its ratio of mass to charge ( $m/z$ ) was 12738.17, 18108.79 and 38221.42, called  $[M^{3+}]$ ,  $[M^{2+}]$ , and  $[M^+]$ , respectively. Using probe of insulin (NS), a combined technology with both metal chelator EDTA and MALDI-TOF mass spectrometry was employed to measure molecular weight of AEE<sub>39</sub> and to identify an endopeptidase with metal zinc, showing molecular weight with 38221.42 Da, called AEE<sub>39</sub>. It was found that AEE<sub>39</sub> has the capacity for lysating NS, giving enzymolysis produces with  $m/z$  1449.51, 2085.84, 4080.41, 4165.42. The software designed with ourselves was used to analyze the produces sequences and to identify the cleavage of NS. As a conclusion, it was found that the best sensitive cleavage for enzymolysis was Leu( leucine)-X (X: residues of amino acid), next one is Glu( glutamic acid)-X. In addition, Phe(phenylalanine)-X, Asn( asparagine)-X and Ser( serine)-X in NS can be lysated once in a while. Compared to molecular structure both NS and attraction, it indicated that one of main functions of AEE<sub>39</sub> was responsible for lysating the attraction in egg, which played an important role in informational intercourse, recalling, recognizing and mating. In addition, AEE<sub>39</sub> had another novel function for enzymolysis Leu-Leu in acidic peptide, which was a multifunctional endopeptidase.

**Keywords** *Aplysia*, endopeptidase, mass spectrometry, attraction, insulin

(Received 10 July 2006; accepted 5 February 2007)

## 首届沈阳国际微流控学学术论坛 ( SICOM I ) 第一轮会议通知

首届沈阳国际微流控学学术论坛 (The First Shenyang International Colloquium on Microfluidics) 将于 2007 年 10 月 21~24 日在沈阳举行。本届会议由沈阳市政府、国家自然科学基金委员会主办, 东北大学承办。方肇伦院士担任会议主席。

会议主要议题包括: 微流控和纳流控操控技术及理论模型、微流控和纳流控元件及装置加工方法与技术、微流控芯片新材料及材料改性方法与技术、微流控系统的进样及试样处理与分离、微流控检测系统的微型化与集成化以及微流控系统在化学、生物学和医学中的应用。会议同时举办相关设备和产品的展览会。

会议将邀请微流控学领域 14 位国际知名学者作大会报告。此次会议旨在为从事微流控学基础、应用和开发研究的学者提供多学科交叉的、可实现广泛和深入学术交流的平台, 促进微流控学的发展。竭诚欢迎从事微流控学及相关领域研究的专家、学者以及从事本领域内产品研发的公司代表参加本届会议。

详细信息请浏览 [www.sicom.org.cn](http://www.sicom.org.cn)

联系方式: 东北大学分析科学研究中心 332 信箱秘书处; 邮政编码: 110004

电话: 024-83687659; 传真: 024-83676698; 电子邮件: [sicom@mail.neu.edu.cn](mailto:sicom@mail.neu.edu.cn)

首届沈阳国际微流控学学术论坛组委会