

## MALDI-TOF 质谱技术研究海兔神经连索外表层的多肽组成

黄河清<sup>1</sup>, Kim Won-Suk<sup>2</sup>, 林庆梅<sup>1</sup>

(1. 厦门大学生命科学学院生物学系, 海洋与环境教育部重点实验室, 福建 厦门 361005; 2. Department of Chemistry and Beckman Institute, University of Illinois, Urbana, IL 61801, USA)

**摘要:** 厦门蓝斑背肛海兔(*Notarcus leachii cirrosus*) 中枢神经系统(Central Nervous System, CNS)缺少腹神经节。杂斑海兔(*Aplysia juliana* Quoy & Gaimard) 和美国加州海兔(*Aplysia californica*) 的 CNS 均有腹神经节。生物质谱技术研究表明, 美国加州海兔和厦门蓝斑背肛海兔的 CNS 的神经连索外表层含有丰富的多肽组成, 部分多肽表现出转移特性。

**关键词:** 海兔(*Aplysia*); 中枢神经系统; 神经连索; 多肽组成; 质谱

**中图分类号:** Q54      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-3096(2004)05-0053-05

神经多肽对许多神经网络功能起着极其重要的作用, 是执行神经系统传递信息的主要生物大分子之一。近 10 年来, 神经多肽结构与功能研究的取材主要来自于软体动物和足类动物的神经系统。海兔(*Aplysia*) 的中枢神经系统(CNS)是目前无脊椎和脊椎动物神经多肽结构与功能研究的主要经典模型之一, 其原因在于它的神经系统较为简单, 大约由 10 000 神经细胞所组成。海兔 CNS 中的部分神经细胞体积相对比较大, 很容易用形态学、常规固定方法和生化技术等给予定位, 为研究海兔 CNS 的生物化学、分子生物学和行为神经科学特性奠定了可行性基础。美国加州海兔(*Aplysia californica*) CNS 主要由口腔神经节(Buccal ganglion, BG)、大脑神经节(Cerebral ganglion, CG)、胸膜与足部神经节(Pleural/Pedal ganglion, PLG/PDG)、腹神经节(Abdominal ganalion, AG)和胸膜与腹神经节之间的神经连索(Pleural-abdominal connective, PAC)等部分组成。由于这些神经节和神经连索内含有丰富多肽组成, 并具有一定生物活性, 因而常常被选择为研究对象, 并有详细研究报道。但由于神经节及神经连索外表层的酶蛋白及多肽含量极微, 不易获取和分离, 并进行研究, 导致相关的研究报道甚少。

近期, 基质辅助激光解吸离子化飞行时间(Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight, MALDI-TOF) 质谱技术已被用于分析软体动物和足类动物神经节内的多肽种类和结构, 其研究结果表现出高灵敏度、超微量和快速等优势。作者采用

MALDI-TOF 质谱技术研究海兔 CNS 神经节之间的神经连索外表层多肽组成, 初步探讨这些多肽的功能和作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

美国加州海兔(*Aplysia californica*) 购置于美国海兔研究中心, 厦门蓝斑背肛海兔(*Notarcus leachii cirrosus*) 和杂斑海兔(*Aplysia juliana* Quoy & Gaimard) 捕获于厦门近海区域。每只海兔质量在 80~200 g 之间。海兔神经节及其神经连索分离前, 动物暂时饲养于人工模拟 14 ℃ 海水中。海兔酸性多肽(Acidic peptide, AP) 由美国伊利诺大学生物技术中心合成, 相对分子质量为 2 961.5 u(M+H<sup>+</sup>)。基质 2, 5-dihydroxybenzoic acid (DHB) 购置美国 ICN 生物医学公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 分离海兔神经节及神经连索

取海兔 5~10 只, 根据海兔体质量, 按每克换算

收稿日期: 2002-12-06; 修回日期: 2003-02-13

基金项目: 国家自然科学基金(40276033); 海洋环境科学教育部重点实验室基金资助

作者简介: 黄河清(1956-), 教授, 从事神经生物学和蛋白质组学研究, E-mail: hqhuang@jingxian.xmu.edu.cn

成毫升方式,注入约海兔体质量一半体积氯化镁(390 nmol/L)于海兔内。等待数分钟后,迅速解剖海兔,取出海兔 CNS,分离出 BG,CG,PLG-PDG,AG 和 CG 之间的神经连索,并置于人工海水中备用。

### 1.2.2 神经连索外表层多肽组成的萃取

分别切取海兔 CNS 的 BG 和 CG 或 CG 和 PLG / PDG 之间的神经连索长度各为 3.0 cm。神经连索两端露出在浸泡液外(避免神经连索内的多肽组成释放于浸泡液中造成污染),而连索中部浸泡在 20  $\mu$ L 浸泡液(含有 5% 丙酮的 0.025 mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH7.0)中,浸泡时间 2 h,浸泡温度为 35  $^{\circ}$ C。随后,取出神经连索,离心(12 500 r/min)萃取 5 min,取上清液备用。

### 1.2.3 基质和样品配制

实验所需的 DBH 基质采用二次重蒸水搅拌溶解 30 min,配制 DHB 成饱和水溶液。神经连索浸泡萃取液和基质溶液(体积分数为 1:1)事先混合 60 s,然后取混合液 0.8  $\mu$ L 滴在 MALDI-TOF 质谱仪专用样品靶上,待样品自然干燥后,放入样品靶于质谱仪靶箱内进行样品分析。

### 1.2.4 质谱测定条件

实验所需的质谱仪选用美国应用生物系统公司生产的 Voyager DE-STR 和德国 BRUKER 公司生产的 REFLEX III 型 MALDI-TOF 质谱仪。脉冲氮激光(337 nm)作为离子解吸电离源。分析模型选用高分辨率反射分析模型。所有实验测试过程中的激光强度恒定在 2400(内部单位),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 次之间。采用 AP 作为多肽质谱峰峰位的标准标定物。

## 2 结果与讨论

### 2.1 杂斑海兔 CNS

从厦门岛内海域捕获了 2 种海兔,其中一种海兔外型、皮肤色彩和斑点与加州海兔很相似,经相关专业文献资料对比,确定为杂斑海兔,另一种被确认为厦门蓝斑背肛海兔。经解剖比较后,发现杂斑海兔的 CNS 与美国加州海兔很相似,均含有 AG。图 1 是杂斑海兔的 CNS 示意图。由图 1 可见,杂斑海兔的 CNS 由 4 种成对神经节组成,它们分别是 BG,CG,PDG 和 PLG。除外,杂斑海兔的 CNS 还有未成对的 AG 和各神经节之间的神经连索等组成。经进一步比较,厦门蓝斑背肛海兔的 CNS 与杂斑海兔、美国加州海兔不同之处是缺少 AG,但厦门蓝斑背肛海兔的内脏各器官或部位均由神经连索与 PLG/PDG 相连接,这一现象说明了缺少 AG 的厦门

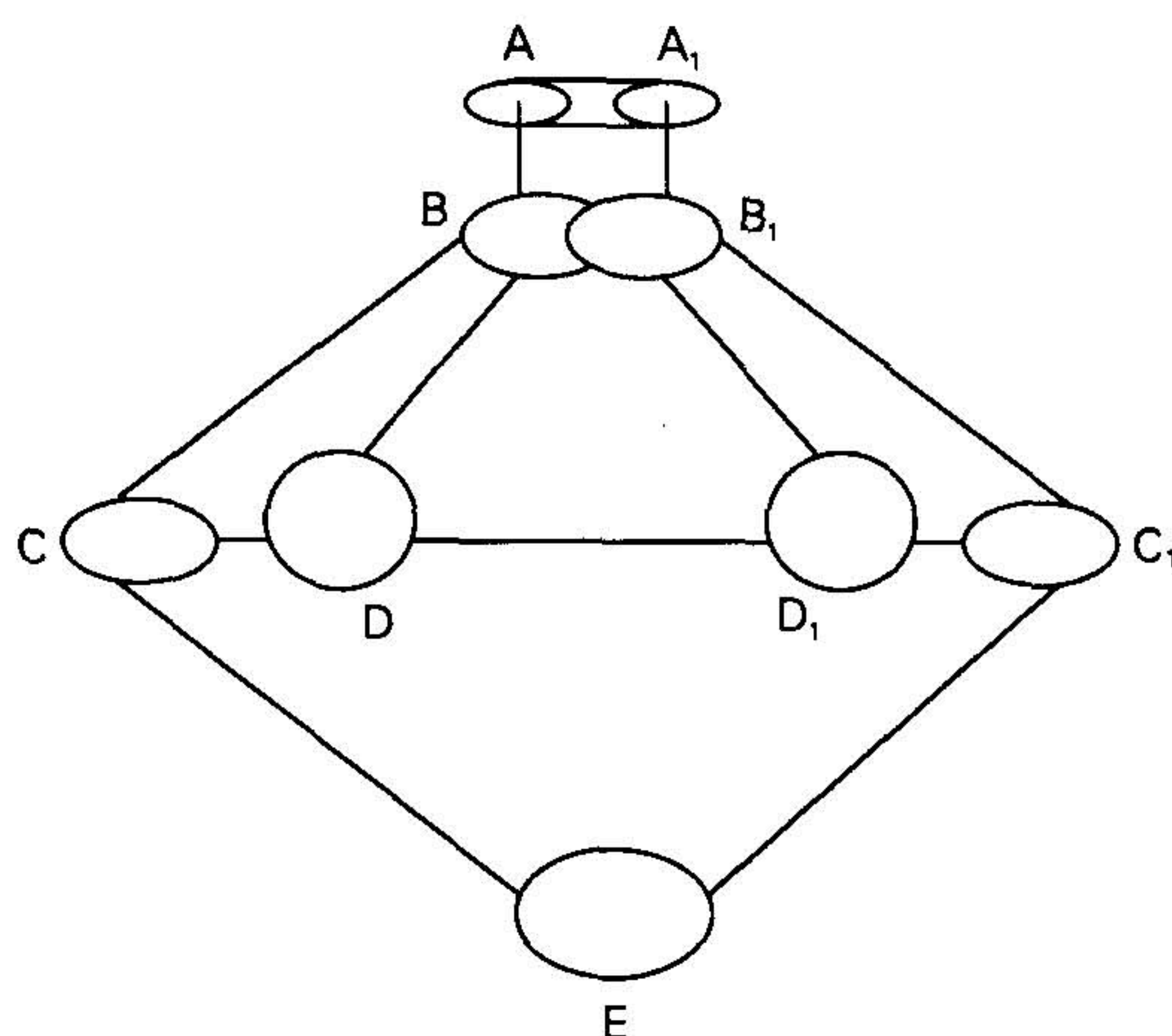


图 1 美国加州海兔和杂斑海兔的 CNS 神经节和神经连索示意图

Fig. 1 Sketch maps of the ganglia and its connective of central nervous system from the *Aplysia californica* and *Aplysia juliana* Quoy & Gaimard  
BG: A, A<sub>1</sub>; CG: B, B<sub>1</sub>; PDG: C, C<sub>1</sub>; PLG: D, D<sub>1</sub>; AG: E

蓝斑背肛海兔的内脏和腹部运动等生理活动可能受它的 PLG/PDG 和神经连索的调控。

### 2.2 美国加州海兔的 BG 和 CG 的神经连索外表层的多肽质谱特性

图 2 是美国加州海兔的 BG 与 CG 神经连索外表层多肽的质谱图。由图 2 可见,在质荷比值位于 799~1 401 范围内,该神经连索外表层显示出总数大于 20 个质谱峰,表现出复杂结构组成和不同种类的多肽化合物特性。参考前人已报道肌调谐肽 E (Myomodulin E, MM<sub>E</sub>),激活心脏小肽 (Small cardioactive peptide B, SCP<sub>B</sub>)和口腔神经节 B 肽 (Buccal ganglion B, BG<sub>B</sub>)的分子量,并比较图 2 结果,可获得表 1 结果,即 BG 和 CG 神经连索外表层含有 3 种已知的多肽组成,它们分别是 EE<sub>M</sub>、SCP<sub>B</sub> 和 BG<sub>B</sub>。

神经多肽的调谐作用对神经进行信号传导活动起着重要的作用。据报道,相对分子质量范围位于 599~5 022 u 之间,已测定出软体动物 CNS 的 BG,CG 和 BG、CG 神经连索内的多肽种类约为 26 种,其中相对分子质量位于 799~1 401 u 范围内的多肽种类约为 21 种。通过文献检索可知,目前已发现了 BG 内多肽种类达 21 种,其中相对分子质量位于 799~1 401 u 之间种类高达 19 种;肌调谐肽族 (Myomodulins) 是神经多肽家族的主要成员之一,它担负着执行行为的调谐作用;MM<sub>E</sub> 也是肌调谐肽

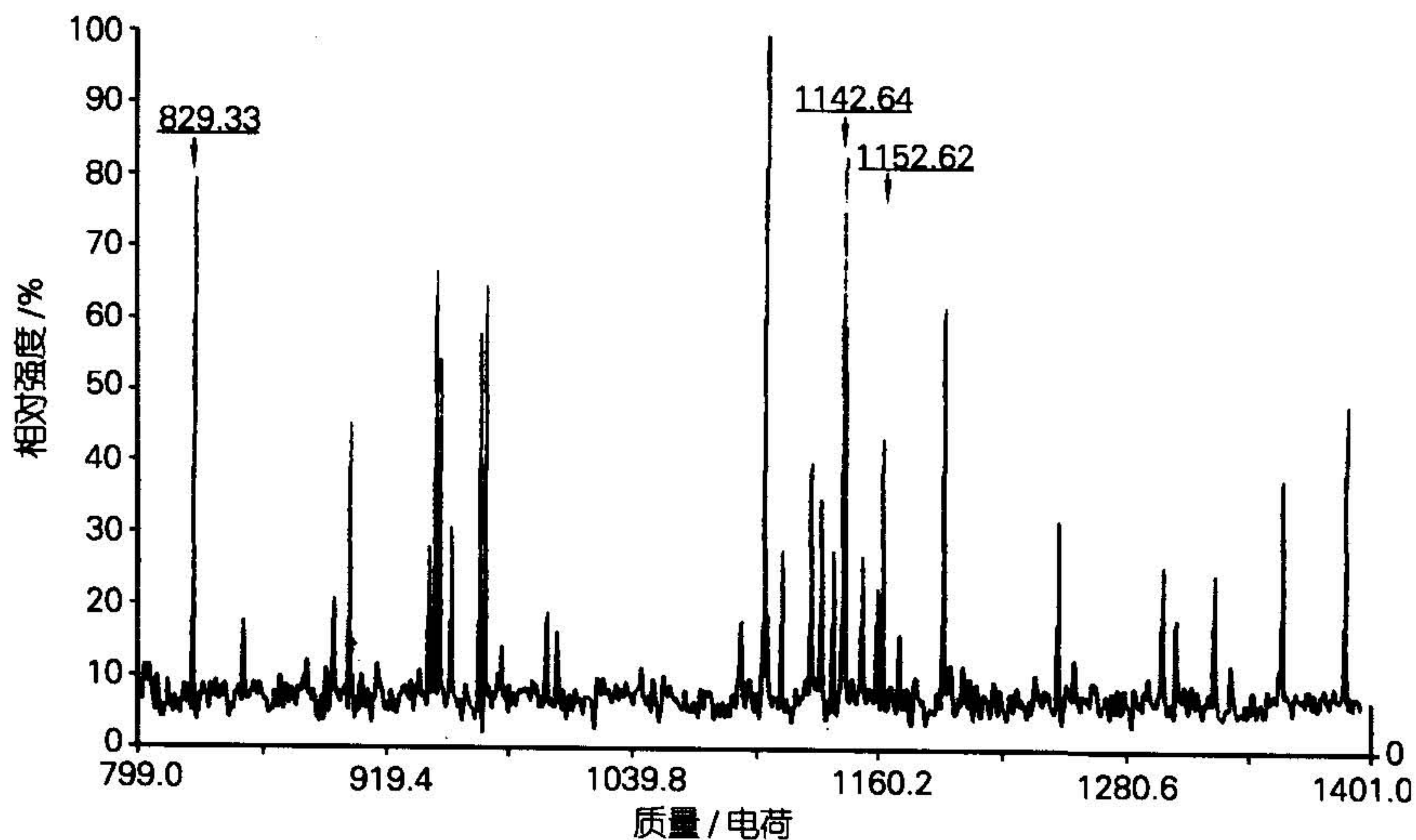


图 2 美国加州海兔的 BG 和 CG 之间的神经连索外表层多肽的质谱图

Fig. 2 Mass spectrogram of the peptides on the outside surface of the ganglion connective both BG and CG from the *Aplysia californica*

表 1 美国加州海兔的 BG 和 CG 之间的神经连索外表层的多肽组成

Tab.1 Peptide composition on the outside surface of the ganglion connective both BG and CG from the *Aplysia californica*

| 多肽类型              | 理论值      | 测量值      | 绝对误差  |
|-------------------|----------|----------|-------|
|                   | (u)      |          | (%)   |
| Myomodulin E      | 829.48   | 829.33   | 0.018 |
| SCP <sub>B</sub>  | 1 141.90 | 1 142.64 | 0.065 |
| Buccal Ganglion B | 1 152.00 | 1 152.62 | 0.053 |

族成员之一，它的一级结构为 GLQMLRL - NH<sub>2</sub>，并参与肌调谐作用；SCP<sub>B</sub> 具有激活神经之间的相互作用的功能和参与调谐传感神经的作用。参考前人的研究结果和图 2，作者建议性地提出 BG 和 CG 神经连索外表层丰富多肽组成可能与它们神经连索内的多肽组成一起参与神经细胞之间和 CNS 与肌肉之间的激活与调谐作用，并对动物行为的产生和可塑性起着一定的调谐作用。详细机理将有待于进一步研究。

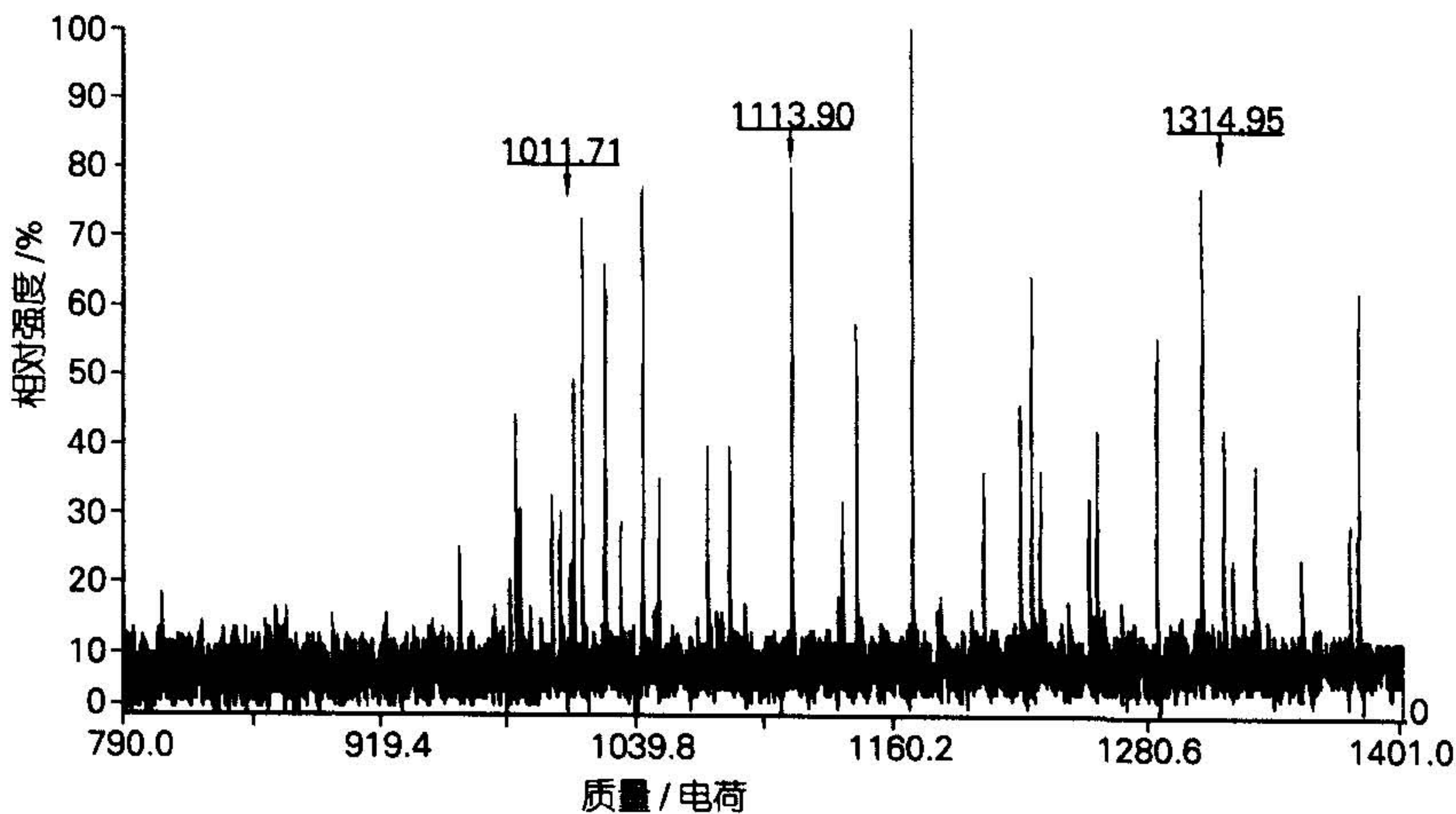


图 3 美国加州海兔的 CG 与 PLG 神经连索外表层多肽的质谱图

Fig. 3 Mass spectrogram of the peptides on the outside surface of the ganglion connective both CG and PLG from the *Aplysia californica*

表 2 美国加州海兔的 CG 和 PLG 神经连索外表层的多肽组成

Tab.2 Peptide composition on the outside surface of the ganglion connective both CG and PLG from the *Aplysia californica*

| 多肽类型                              | 理论值<br>(u) | 测量值<br>(u) | 绝对误差<br>(%) |
|-----------------------------------|------------|------------|-------------|
| $\alpha$ -BCP 1-8                 | 1 012.0    | 1 011.71   | 0.028       |
| Cholecystokinin<br>- like peptide | 1 113.5    | 1 113.90   | 0.036       |
| CP1                               | 1 314.9    | 1 314.95   | 0.038       |

2.3 美国加州海兔的 CG 和 PLG 之间的神经连索外表层多肽的质谱特性

近期研究报道,海兔大脑神经节里含有大脑多肽 1(Cerebral peptide1, CP1) 和大脑多肽 2(Cerebral peptide 2, CP2)成分,经分离提纯后,发现 CP1 和 CP2 分别由 13 个和 41 个氨基酸残基组成,相对分子质量分别为 1 314.9 和 4 590.8 u,其中 CP1 一级结构为 FSGLMSSLGA。图 3 是 CG 和 PLG 之间的神经连索外表层多肽质谱图。根据图 3 所显示的质谱峰峰数,推测在质荷比值位于 799 至 1 401 范围内,该神经连索外表层至少含有 20 种不同结构或组成的多肽。如参考前人已报道海兔 CNS 神经连索内的多肽相对分子质量、质荷比值和图 3 质谱峰所对应的质荷比值,即

可得出表 2 结果,图 3 中质谱峰所对应的质荷比值为 1 314.95 与单电荷 CP1 相对分子质量 (1 314.9 u) 极为相近。因而认为,位于 CG 和 PLG 之间的神经连索外表层上也含有带单电荷的 CP1 组成。

据 Phares and Lloyd 报道,从 1 000 个 CG 中可提取 6 nmol/L 的 CP1。而图 3 中所反映的 CP1 质谱峰强度来源于神经连索长度为 1.20 cm (浸出部位) 的外表层 CP1 含量。可想而知,此时 CP1 的浓度极低,属于超微量范围。但由于 MALDI-TOF 质谱仪具备极高灵敏度 (fmol/L) 特点,所以仍然可检测出该神经连索外表层的组成。从表 2 和其他辅助实验结果还可看出,位于 CG 和 PLG 之间的神经连索外表层含有缩胆囊素和 SCP 组成,而在 PLG 和 AG 之间的神经连索外表层上却未发现这两种多肽组成。近期的研究表明,神经连索由 PLG 延伸到靠近 AG 处内含有细胞囊 (bag cell),该囊表层含有多肽,称为细胞囊肽 (bag cell peptide, BCP),可分为  $\alpha$  和  $\beta$  型。进一步研究表明,神经节之间的多肽具有转移迹象;缩胆囊素 (Cholecystokinin) 常见于在胃肠内或在调控胃肠的神经节和神经连索内,是一种胃肠激素和胰神经肽,具有调节和促进胰岛素释放的作用。由此看来,位于 CG 和 PLG 之间的神经连索外表层上的 SCP 和缩胆囊素组成可能是来自于 PLG 内,它们可能通过神经连索途径由内层转移到外表层上。

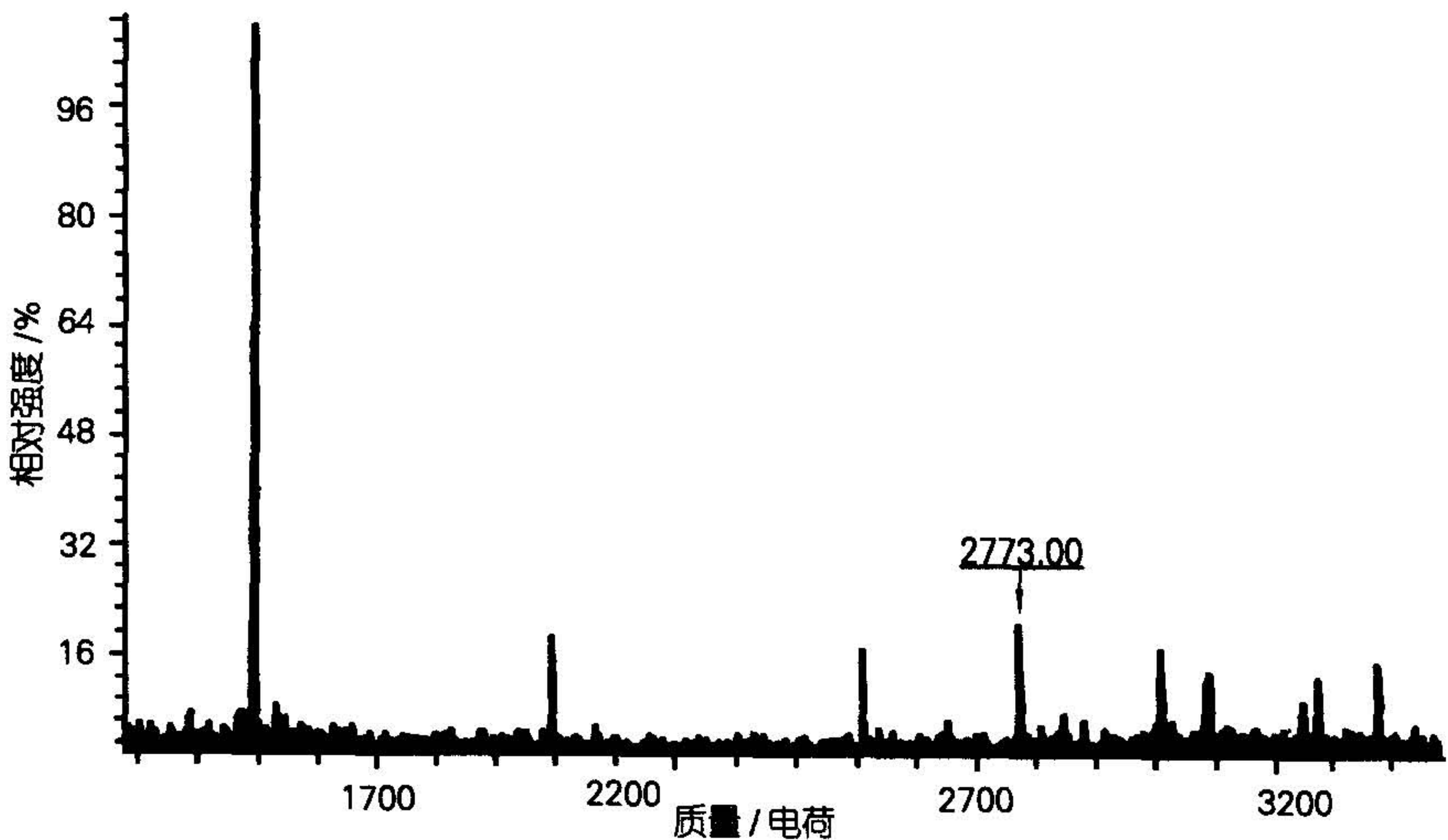


图 4 厦门蓝斑背肛海兔的 BG 和 PDG 之间神经连索外表层的多肽质谱图  
Fig. 4 Mass spectrogram of the peptides on the outside surface of the ganglion connective both BG and PDG from the *Notarcus leachii cirrosus*

表 3 厦门蓝斑背肛海兔的 CG 和 PLG 神经连索外表层的多肽组成

Tab.3 Peptide composition on the outside surface of the ganalion connective both CG and PLG from the *Notarcus leachii cirrosus*

| 多肽类型       | 理论值 (u)  | 测量值      | 绝对误差 (%) |
|------------|----------|----------|----------|
| Sensorin B | 2 772.50 | 2 773.00 | 0.18     |

2.4 厦门蓝斑背肛海兔的 CG 和 PDG 神经连索外表层的多肽质谱特性

海兔的 CNS 有一对对称的足神经节 (图 1), 它们通过神经管连接 CG, 起到控制足、辅助足、游泳和头运动等作用。从图 3 中可看出, 质荷比位于 1 300~3 500 范围内, 厦门蓝斑背肛海兔的 CG 和 PDG 之间的神经连索外表层仅显示出 9 种不同多肽类型, 比美国加州海兔神经连索外表层 (图 1-2) 所显示的多肽种类少, 其中只有一种已知肽, 质荷比位于 2 773 处。经文献检索和对比后, 确认是感应肽 B (Sensorin B, 表 1), 属于一种相对分子质量较大的多肽化合物。尽管有关感应肽 B 结构与功能研究尚未有详细报道, 但推测该多肽可能参与动物行为产生、可塑性、变化和应答表现等活动有关。

采用 MALDI-TOF 质谱技术测定多肽和蛋白时, MALDI 所形成的准分子离子峰很强, 几乎无碎片离子。但在自然界中, 还是有些例外, 例如铁蛋白在物理电极上呈非电中性, 并在芥子酸辅助和激光解吸电离条件下, 可形成带多电荷的分子离子峰。因此, 上述图 1~3 中所显示的质谱峰峰数并不一定都是由多肽准分子离子形成, 即多肽种类数目小于质谱峰峰数。

参考文献:

[1] 黄河清, 孔波, 林庆梅, 等. MALDI-TOF 质谱技术研究铁蛋白蛋白壳表层的电荷分布[J]. 生物物理学报, 2002, 18:99-103.

[2] 黄河清. 激光强度影响酸性多肽解吸电离和稳定性的研究[J]. 分析仪器, 2003, 135:37-41.

[3] Storozhuk M, Castellucci V F. Modulation of cholinergic transmission in the neuronal network of the gill and siphon withdrawal reflex in *Aplysia* [J]. *Neuroscience*, 1999, 90:291-301.

[4] Furuya K, Hackett M, Cirelli M A, et al. A cardioactive

peptide from the southern armyworm, *Spodoptera eridania* [J]. *Peptide*, 1999, 20:53-61.

[5] Angers A, Zappulla J P, Zollinger Z M, et al. Gene produces from LUQ neurons in the Abdominal ganglion are present at the renal pore of *Aplysia californica* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 2000, 126:435-443.

[6] Hummon A B, Huang H Q, Kelley W P, et al. A novel prohormone process site in *Aplysia californica*: Leu-Leu rule [J]. *J Neurochemistry*, 2002, 82:1398-1405.

[7] Vilim F S, Alexeeva V, Moroz L L, et al. Cloning, expression and processing of the CP2 Neuropeptide precursor of *Aplysia* [J]. *Peptides*, 2001, 22:2027-2038.

[8] Floyd P D, Li L, 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*, 1999, 830:105-113.

[9] Li L, Moroz T P, Garden R W, et al. Mass spectrometric survey of interganglionically transported peptides in *Aplysia* [J]. *Peptides*, 1998, 19:1425-1433.

[10] Salzet M, Verger-Bocquet M, Vandenbulcke F. et al. Leech egg-laying like hormone: structure, neuronal distribution and phylogeny [J]. *Molecular Brain Research*, 1997, 49:211-221.

[11] Wang Y, Price D A, Sahley C L. Identification and characterization of a myomodulin-like peptide in the leech [J]. *Peptides*, 1998, 19:487-483.

[12] Furuya K, Hackett M, Cirelli M A, et al. A cardioactive peptide from the southern armyworm, *Spodoptera eridania* [J]. *Peptides*, 1999, 20:53-61.

[13] Morishita F, Sasaki K, Kanemaru K, et al. NdW Famide: A novel excitatory peptide involved in cardiovascular regulation of *Aplysia* [J]. *Peptides*, 2001, 22:183-189.

[14] Lloyd P E, Connolly C M. Sequence of pedal peptide: A novel neuropeptide from the central nervous system of *Aplysia* [J]. *J Neurosci*, 1989, 9:312-317.

[15] Huang H Q, Lin Q M, Wang T L. Kinetics of iron release from pig spleen ferritin with bare platinum electrode reduction [J]. *Biophysical Chemistry*, 2002, 97:17-27.

(下转第 62 页)

(上接 第 57 页)

## Study on peptides composition on the nervous connective surface from *Aplysia* using maldi – tof mass spectrometry technology

Huang He – qing<sup>1</sup>, Kim Won – suk<sup>2</sup>, Lin Qing – mei<sup>1</sup>

(1. School of Life Sciences, MEO Laboratory of Marine and Environmental Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Department of Chemistry and Beckman Institute, University of Illinois, Urbana, IL 61801, USA)

Received: Dec., 6, 2003

**Key words:** *Aplysia*; central nervous system; neural connective; peptide composition; mass spectragram

**Abstract:** The central nervous system (CNS) of *Notarcus leachii cirrosus* off Xiamen lacks abdominal ganalion. *Aplysia juliana* Quoy & Gaimard and *Aplysia californica*, however, have ganalion. Using biological mass spectrometry, results show that the connective surface of the CNS of both *Aplysia californica* and *Notarcus leachii cirrosus* have abundant peptides, indicating that some of these peptides indicating these peptides play some part in the transmission among ganalions.

(本文编辑:张培新)