

## 磺化修饰结合离子交换色谱和生物质谱富集鉴定含组氨酸肽段

曹 冬<sup>1,2</sup>, 周春喜<sup>2</sup>, 张养军<sup>2</sup>, 韩春光<sup>2</sup>, 邓玉林<sup>1</sup>, 钱小红<sup>2\*</sup>

(1. 北京理工大学, 北京 100081;

2. 北京蛋白质组研究中心 蛋白质组学国家重点实验室 北京放射与辐射医学研究所, 北京 102206)

**摘要** 通过在肽段的 N 端引入磺酸基, 从而使含组氨酸的肽段与其他肽段在 pH < 3.0 的条件下产生电荷差异, 建立了一种基于强阳离子交换色谱 (SCX) 结合生物质谱富集鉴定含组氨酸肽段的方法, 并以含有组氨酸的标准蛋白质为模型, 进行了方法学考察。结果表明, 经 N 端磺酸化后, 含组氨酸的肽段能有效地被阳离子交换色谱富集, 且在肽的 N 端引入磺酸基促进了肽的裂解, 使之产生简单而信息丰富的二级质谱图, 从而得到完美的质谱鉴定结果。这说明磺化修饰结合强阳离子交换色谱用于含组氨酸肽段的富集鉴定是可行的, 且具有在蛋白质组研究中的应用的潜力。

**关键词** 强阳离子交换色谱; 基质辅助激光解吸电离飞行时间串联质谱; 磺化修饰; 富集; 鉴定; 组氨酸标签肽

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2009)02-0158-06 栏目类别: 研究论文

## Sulfonation modification-assisted enrichment and identification of histidine-containing peptides by strong cation exchange chromatography and mass spectrometry

CAO Dong<sup>1,2</sup>, ZHOU Chunxi<sup>2</sup>, ZHANG Yangjun<sup>2</sup>, HAN Chunguang<sup>2</sup>,  
DENG Yulin<sup>1</sup>, QIAN Xiaohong<sup>2\*</sup>

(1. Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China; 2. State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 102206, China)

**Abstract**: By the sulfonation at the N-terminal of peptides, the charge state of histidine-containing peptides is different from that of other peptides in pH < 3.0 solution. Based on this difference, a new method was developed to isolate and identify sulfonated histidine-containing peptides from tryptic digest of proteins by strong cation exchange (SCX) chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS/MS). Using the standard proteins containing histidines as the model, the methodology was evaluated. The results show that sulfonated histidine-containing peptides were efficiently enriched by SCX, and the N-terminal sulfonation of the peptides simplifies the interpretation of the acquired mass spectra and facilitates the sequencing of histidine-containing peptides by producing consecutive and predominant ions in positive mode MS<sup>2</sup> spectra, which is thought to be the result of the charge neutralization of b ions by the N-terminal sulfonic acid group. The discrimination of b ions and y ions can greatly enhance the confidence in peptide and subsequent protein identification. It is feasible to isolate and enrich the histidine-containing peptides by using this method which has the potential applications in proteomics.

**Key words**: strong cation exchange chromatography (SCX); matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS/MS); sulfonation modification; enrichment; identification; histidine-containing peptides

随着电喷雾电离 (ESI) 和基质辅助激光解吸电离 (MALDI) 等软电离质谱技术的进步, 生物质谱在

蛋白质组学研究中发挥着越来越重要的作用。但对于复杂的生物样品, 现有的质谱仪无法直接对其进

\* 通讯联系人: 钱小红, 研究员, 博士生导师. Tel: (010) 80705055, E-mail: qianxh@nic.bmi.ac.cn.

基金项目: 国家自然科学基金课题 (No. 20505018, 20635010, 20735005, 20875101) 和国家重点基础研究发展规划项目 (No. 2007CB914104, 2006AA02A308).

收稿日期: 2008-11-03

行完全的分析,通常是通过预分离来降低体系的复杂程度,以提高被鉴定蛋白质的数目。降低肽段混合物复杂程度的策略主要有两种,一种是通过采用多维色谱来提高分离效率,通常是阳离子交换色谱结合反相液相色谱<sup>[1]</sup>。Yates 等<sup>[2]</sup>采用蛋白质多维鉴定技术(MudPIT)分析了酵母的蛋白质组,从中鉴定了 1 484 个蛋白质。但要进一步提高色谱的分离效率还面临很多的挑战。据分析<sup>[3]</sup>,很多细胞类型的蛋白质组经胰蛋白酶酶切可产生至少  $10^5$  个多肽,而当前液相色谱-质谱联用仪的最好分辨能力只能达到  $10^4$  个多肽,比需要的水平低一个数量级。然而,由于数据库和搜索软件的帮助,鉴定一个蛋白质并不需要对其所有肽段进行鉴定。具有高度序列特异性和一定长度的一个肽段往往就可以作为标签肽,用于其母蛋白质的鉴定。第二种策略是采用标签肽分离技术来减少待分析肽段的数目,通过选择性分离含低丰度氨基酸残基的标签肽,可以大大降低肽段混合物的复杂程度,提高标签肽的相对丰度及被鉴定的机会。目前已经发展成熟的技术如蛋白质 N 端肽的富集鉴定技术<sup>[4-7]</sup>、针对半胱氨酸残基进行选择性富集的标签肽蛋白质组学方法(signature peptide proteomics methods)<sup>[8]</sup>、广泛内标技术(global internal standard techniques)<sup>[9]</sup>和同位素标记亲和和标签技术(isotopically coded affinity tags)<sup>[10]</sup>等。

组氨酸是蛋白质中丰度相对较低的一种氨基酸,因此含组氨酸肽段可被用作标签肽。已有文献报道采用固相金属亲和色谱法(IMAC)来富集含组氨酸肽段<sup>[11,12]</sup>。该方法利用结合在固相螯合剂上的 Cu(II)离子与组氨酸残基之间的亲和作用来选择性捕获含组氨酸肽段<sup>[13]</sup>。但 IMAC 柱对含组氨酸肽段的亲和力与选择性都不是很强,不仅有些含组氨酸肽段不能被有效捕获,而且有些不含组氨酸肽段(如半胱氨酸肽和酪氨酸肽)也会与之结合<sup>[14]</sup>。Regnier 等<sup>[15]</sup>用标准蛋白质对 IMAC 柱的选择性、回收率、柱寿命、重现性和结合特异性等进行了考察,从多方面评价了 IMAC 柱对含组氨酸肽段的选择性,结果发现,IMAC 柱的选择性、回收率和重现性受洗脱条件的影响很大,只有约 85% 的含组氨酸肽段被有效捕获。该方法不仅存在一定程度的非特异结合,而且金属离子的流失会导致保留时间的重现性及柱结合容量的降低。

本研究通过在肽段的 N 端引入磺酸基,从而使含组氨酸的肽段与其他肽段在 pH < 3.0 的条件下产生电荷差异,建立了一种基于强阳离子交换色谱和质谱富集鉴定组氨酸标签肽段的新方法。该方法

不仅可以有效地富集含组氨酸的肽段并对其进行鉴定,而且通过在肽段的 N 端引入磺酸基,促进了肽的裂解,使之产生简单而信息丰富的二级质谱图,甚至不需要通过数据库检索即可进行从头测序<sup>[16,17]</sup>。采用含有组氨酸的标准蛋白为样本对方法进行的评价结果表明,本方法既可以降低肽段混合物的复杂程度,又可以提高肽鉴定的可信度,在蛋白质组学研究中具有一定的应用前景。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

基质辅助激光解吸电离飞行时间串联质谱(MALDI-TOF MS/MS)仪(4700 Proteomics Analyzer,美国应用生物系统公司)。大连依利特公司 P230 液相色谱系统,配备二元梯度泵、可变波长紫外检测器。

肯普肽(kemptide, LRRASLG)、马心肌红蛋白、牛  $\beta$ -乳球蛋白、鸡溶酶蛋白和  $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)购自美国 Sigma 公司。二硫苏糖醇(DTT)和测序级胰蛋白酶购自美国 Promega 公司。三氟乙酸、O-甲基异脲硫酸氢盐、碘乙酰胺(IAA)和四氢呋喃(THF)购自美国 Acros Organics 公司,2-磺基苯甲酸环酐(SACA)购自德国 Aldrich 公司,色谱纯乙腈和甲醇购自美国 J. T. Baker 公司。其他试剂为分析纯,购自北京化学试剂公司。实验用水经 Millipore 公司 Milli-Q A10 型纯水仪制备。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 蛋白质的还原烷基化及酶切

用 0.2 mol/L 硼酸盐缓冲液(pH 8.0,含 6 mol/L 盐酸胍)配制 1 mg/mL 的肌红蛋白、 $\beta$ -乳球蛋白和溶酶蛋白溶液。各取 0.1 mL,加入 2  $\mu$ L 10 mmol/L DTT,于 37  $^{\circ}$ C 下反应 1 h。冷至室温后,加入 2  $\mu$ L 20 mmol/L IAA,室温下反应 1 h。所得溶液用 0.2 mol/L 硼酸盐缓冲液稀释 6 倍后,按 1:50 的质量比加入胰蛋白酶,于 37  $^{\circ}$ C 下过夜。

#### 1.2.2 标准肽的磺化反应条件优化实验

取样品管两组,每组各 8 个,在管中各加入 1 nmol 标准肽肯普肽,再分别加入 pH 值为 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 和 9.5 的 100  $\mu$ L 0.2 mol/L 缓冲液,混匀后两组分别加入 10 nmol 和 200 nmol 的 SACA(使 SACA 分别过量 10 倍和 200 倍)。室温反应 4 h 后,脱盐点靶,分别在正离子和负离子模式下进行 MS 分析。根据峰高的比值  $H_{956}/(H_{956} + H_{772})$ (正离子模式下  $H_{956}$  代表磺化后肯普肽的质谱峰强度,  $H_{772}$  代表原肯普肽的质谱峰强度)和  $H_{954}/(H_{954} + H_{770})$ (负离子模式下  $H_{954}$  代

表磺化后肯普肽的质谱峰强度,  $H_{770}$  代表原肯普肽的质谱峰强度)来评估磺化反应的完全程度。

### 1.2.3 肽段的胍基化及磺化与含组氨酸肽段的色谱富集及质谱鉴定

蛋白质酶切肽段在 pH 11 的 0.1 mol/L O-甲基异脲中于 37 °C 下反应 4 h 后, 调 pH 至 8, 加入 20 mmol/L SACA, 于室温下反应 1 h。参照 Betancourt 等<sup>[18]</sup>的方法, 稍作修改, 通过强阳离子交换色谱法富集含组氨酸肽段。通过反相液相色谱柱(粒度 5 μm, 孔径 30 nm (300 Å), 200 mm × 4.6 mm)分离并脱盐后, 把强阳离子交换色谱柱(粒度 5 μm, 孔径 20 nm (200 Å), 200 mm × 4.6 mm, PolySULFOETHYL A, PolyLC)接到反相液相色谱柱后, 用流动相 A 相(60% 甲醇水溶液, 含 1% 乙酸)冲洗 10 min, 去除不保留组分; 用流动相 B 相(60% 甲醇水溶液, 含 1% 乙酸和 0.5 mol/L NaCl 溶液)洗脱, 收集馏分并进行质谱分析。

根据常规方法<sup>[19]</sup>稍作改动, 在 MALDI-TOF MS/MS 仪上对样品进行质谱分析。用氮气吹去馏分中的甲醇后, 取 6 μL 用 C<sub>18</sub> Zip Tip 小柱(美国密里博公司)脱盐, 用 6 μL 基质溶液(5 mg/mL CHCA 溶于含 0.1% TFA 的 50% 乙腈水溶液中)洗脱, 取 0.6 μL 洗脱液(约含 0.1 μg 肽段)点靶。用标准多

肽混合物进行质谱仪的外标校正。在正离子或负离子反射模式下采集一级质谱图, 在正离子反射模式下采集二级质谱图, 加速电压为 1 kV, 碰撞诱导裂解(CID)功能设置为关闭。所有质谱图用 4700 ExplorerV 2.0 软件(美国应用生物系统公司)进行分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 方法的原理

本方法的原理如图 1 所示: 首先对蛋白质进行还原烷基化和酶切, 再通过胍基化反应保护肽段中赖氨酸侧链的氨基, 通过酰化反应在其 N 端引入磺酸基, 然后通过反相液相色谱脱盐和强阳离子交换色谱分离富集含组氨酸肽段, 最后通过质谱进行肽段的序列分析。根据 Beausoleil 等<sup>[20]</sup>的报道, 在 pH 2.7 时, 只有 α-氨基、ε-氨基、胍基和咪唑基带有电荷。胰蛋白酶酶切产生的肽段(除部分末端肽外)几乎都有 N 端的一个 α-氨基和 C 端的一个 ε-氨基或胍基, 所以绝大多数肽都带有 2 个以上的正电荷。当肽的 N 端氨基上引入带负电荷的磺酸基后, 其 C 端的正电荷即被中和, 所以只有含组氨酸的肽会带上与其所含组氨酸残基数相同的正电荷, 不含组氨酸的肽段所带的净电荷数为零。因此, 可以通过阳离子交换色谱来分离富集含组氨酸肽段。

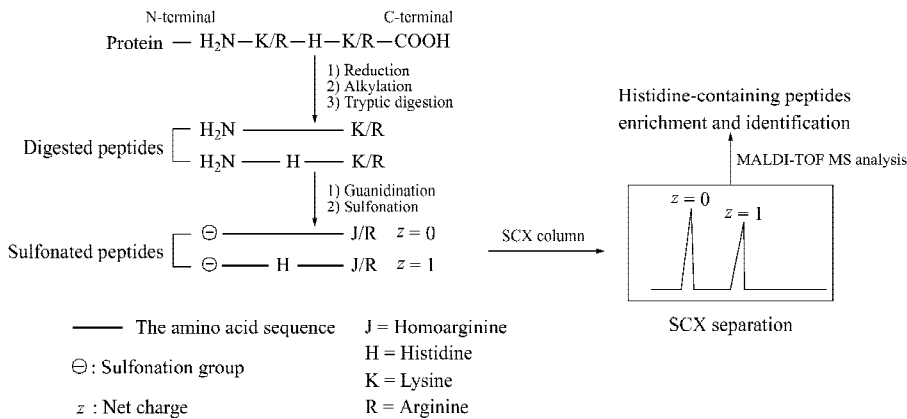


图 1 磺化修饰辅助的含组氨酸肽段的富集鉴定方法的原理示意图

Fig. 1 Principle for the enrichment and identification of sulfonated histidine-containing peptides by SCX chromatographic column

通过对人类蛋白质数据库(Swiss Prot 46.0 版)中 11 936 个蛋白质的统计分析表明, 97.1% 的蛋白质都含有组氨酸, 而只有 18.3% (127 143/694 584) 的肽段含有组氨酸, 平均每个蛋白质含有 11 个含组氨酸肽段, 而大多数(52.7%)的蛋白质含有 2 至 9 个含组氨酸肽段。也就是说, 通过富集含组氨酸肽段既可以大大降低肽段混合物的复杂程度(降低 81.7%), 又可以留下足够数量的肽段用于蛋白质的鉴定。而且, 如果数据库检索时限定为含组

氨酸肽段, 就可以大大地减少搜库所需的时间。据统计, 蛋白质组中含组氨酸的肽段与含半胱氨酸的肽段在蛋白质覆盖率方面很接近(97.3% 和 96.1%)<sup>[21]</sup>。因此, 用本方法富集含组氨酸肽段与用 ICAT 法(isotope coded affinity tag)富集含半胱氨酸肽段的作用是相当的。

### 2.2 肽的磺化反应条件的优化

肯普肽含有 2 个精氨酸残基, 被磺基化后仍带正电荷, 易于在正离子模式下被质谱检测, 因此可作为

观察磺化反应程度的模型肽。但相对于正离子模式而言,磺化的肯普肽在负离子模式下更易于电离。因此,在负离子模式下测出的转化率稍高于正离子模式下测得的转化率(见图 2)。图 2 中曲线分别表示 SACA 过量 200 倍和 10 倍时,在正、负离子检测模式下肽的磺化反应产率随溶液 pH 值的变化。肯普肽的 2-磺基苯甲酰化反应的实质是氨基与酸酐的酰胺化反应,其反应程度主要受溶液 pH 值的影响。当 SACA 量较少(过量 10 倍)时表现得更为明显,pH 为 7.5 时转化率最高,当 pH 大于 9.0 时几乎不反应。当 SACA 量较多(过量 200 倍)时 pH 造成的这种影响在一定程度上被掩盖,在 pH 6.0~8.5 范围内转化率都很高,但 pH 为 9.0 时转化率较低(见图 2)。这是由于 2-磺基苯甲酸环酐在溶液中存在胺解与水解两个竞争反应。在 pH 6.0~7.5 范围内以胺解反应为主,pH 值的升高有利于 N 端氨基的解离( $pK_a$  约为 7.5),从而有利于胺解反应的进行。但随着 pH 值的继续升高,水解反应逐渐占优。在所试验的条件下,未见侧链羟基的 2-磺基苯甲酰化反应。

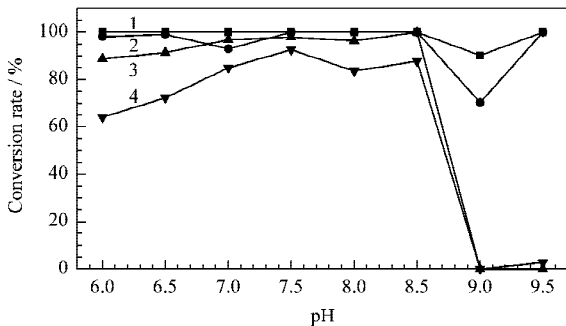


图 2 溶液 pH 值对肽的磺化反应的影响

Fig. 2 Effect of pH on the sulfonation modification of peptides

200 times SACA excess to kemptide : 1. in negative mode ;  
2. in positive mode. 10 times SACA excess to kemptide : 3. in negative mode ; 4. in positive mode.

### 2.3 含组氨酸肽段的色谱分离与质谱鉴定

阳离子交换色谱分离主要是基于被分析物所带的净电荷数<sup>[22]</sup>,所以净电荷数为零的不含组氨酸肽段在阳离子交换色谱柱上几乎不保留,而带有正的净电荷的含组氨酸肽段则保留(见图 3),所以可通过阳离子交换色谱对含组氨酸肽段进行分离富集。结果表明,含组氨酸肽段被有效富集(见表 1 和图 4)。

值得一提的是,本实验发现,除了含组氨酸肽段,含有漏切位点因而带有正的净电荷的不含组氨酸肽段也被富集。这一现象提示通过优化酶切条件减少漏切位点,可以提高本方法富集含组氨酸肽段的特异性。对于简单样品,为了减少馏分数和缩短分离时间,可以采用图 3 所示的阶梯梯度进行含组氨酸肽段的洗脱;但对于复杂样品,应采用较缓慢的线性盐梯度对含组氨酸肽段进行洗脱与分离。

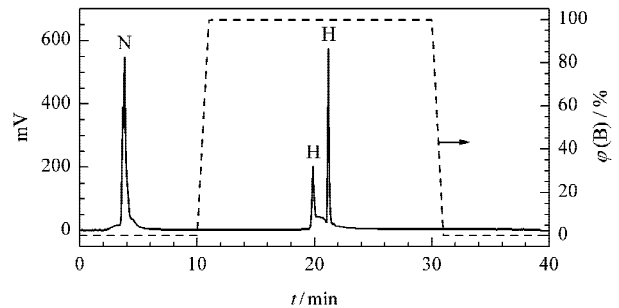


图 3 胍基化和磺化修饰后的肌红蛋白酶切肽段的强阳离子交换色谱图

Fig. 3 SCX chromatogram of guanidinated and sulfonated tryptic peptides of myoglobin

Experimental conditions : strong cation exchange chromatographic column (5  $\mu\text{m}$ , 20 nm (200  $\text{\AA}$ ), 200 mm  $\times$  4.6 mm, PolySULFOETHYL A, PolyLC); mobile phases : A, 60% MeOH containing 1% acetic acid; B, 60% MeOH containing 1% acetic acid and 0.5 mol/L NaCl solution; flow rate : 1 mL/min; detection wavelength : 214 nm.

H. histidine-containing peptides; N. non-histidine-containing peptides.

表 1 3 种模型蛋白质中含组氨酸肽段的富集

Table 1 Enrichment histidine-containing peptides in three model proteins

Model protein	Number of tryptic peptides <sup>1)</sup>	Number of expected histidine-containing peptides	$M_r$	Isolated peptides ( net charge <sup>2)</sup> )
Myoglobin	12	6	1946.6	#LFTGHPETLEJ ( + 1 )
			1603.8	#HGTVVLTALGGILJ ( + 1 )
			1727.6	#HPGDFGADAQGAMTJ ( + 1 )
			1789.8	#VEADLAGHGQEVLR ( + 1 )
			2110.0	#YLEFISDAIHVLHSJ ( + 2 )
			2020.9	#GHEAELPLAQSHATJ ( + 4 )
			1002.4	#HJIPLJ ( + 2 )
			951.3	#FDJFJ ( + 1 )
			1020.4	#ALPMHIR ( + 1 )
			1057.4	#HGLDNYR ( + 1 )
$\beta$ -Lactoglobulin	13	1 <sup>3)</sup>	831.3	#JVFGR ( + 1 )
			1558.6	#CJGTDVQAWIR ( + 1 )
Lysozyme	10	1		

1) The number of theoretical tryptic peptides with  $M_r > 500$ . 2) the net charge of peptides in pH < 3.0 solution. 3) The histidine-containing peptide ( LSFNPTQLLEEQCHI ) is C-terminal of  $\beta$ -lactoglobulin, and does not contain lysine or arginine, the net charge of this peptide is zero, not enriched by our method.

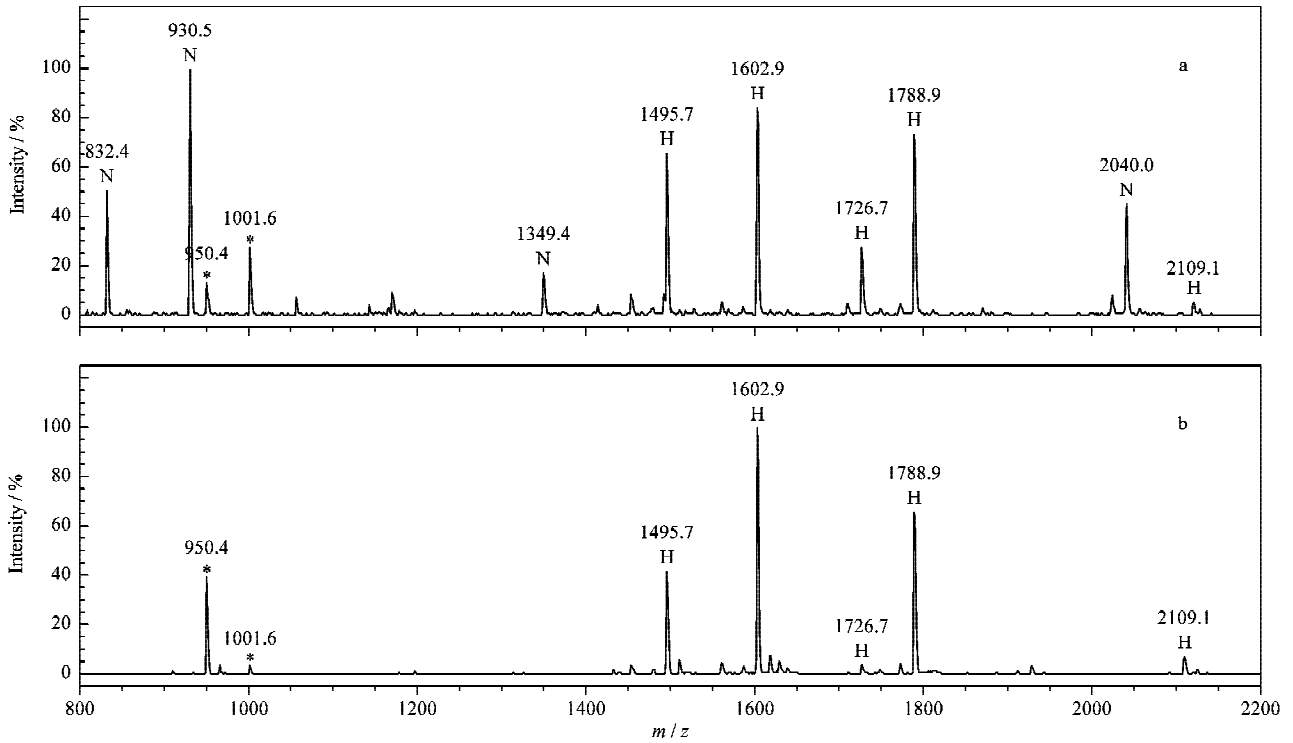


图 4 胍基化和磺化的肌红蛋白酶切肽段在离子交换色谱( a )分离前与( b )分离后负离子模式检测的质谱图比较

Fig. 4 Mass spectra of guanidinated and sulfonated tryptic peptides of myoglobin

( a ) before SCX separation and ( b ) after SCX separation in negative mode

H. histidine-containing peptides ; N. non-histidine-containing peptides. \* . missed cleavage sites-containing peptides.

如图 5 所示, N 端磺化后, 含组氨酸肽段的二级质谱图表现为强而连续的 y 离子, 非常有利于对其进行从头测序<sup>[23-25]</sup>。含组氨酸肽段的二级质谱图之所以以强而连续的 y 离子为主, 主要有两方面的原因。一方面, 根据移动质子模型( mobile proton model )<sup>[26-27]</sup>, 当肽段 C 端碱性氨基酸的正电荷被中和后, 来自磺酸基的游离质子更容易与肽键上的酰胺基随机结合, 并诱导质子化位点处的酰胺键的裂解, 从而使肽链骨架的断裂更随机; 另一方面, 由于磺酸基的引入, 使得 b 离子的电正性降低, 很难被质谱检测。

由于 C 端的正电荷被强酸性磺酸基的负电荷中和, 磺化肽段在正离子模式下的离子化效率不如在负离子模式下高, 但在负离子模式下其二级裂解又很差, 所以可以先在负离子模式下采集一级质谱数据, 识别磺化肽段, 然后切换到正离子模式下采集磺化肽段的二级质谱数据。与不含组氨酸的肽段相比, 由于组氨酸残基具有一定的质子亲和力, 因此含组氨酸肽段即使被磺化后在正离子模式下仍具有较好的离子化效率( 见图 6 )。这非常有利于在正离子模式下对含组氨酸肽段进行质谱测序和鉴定。

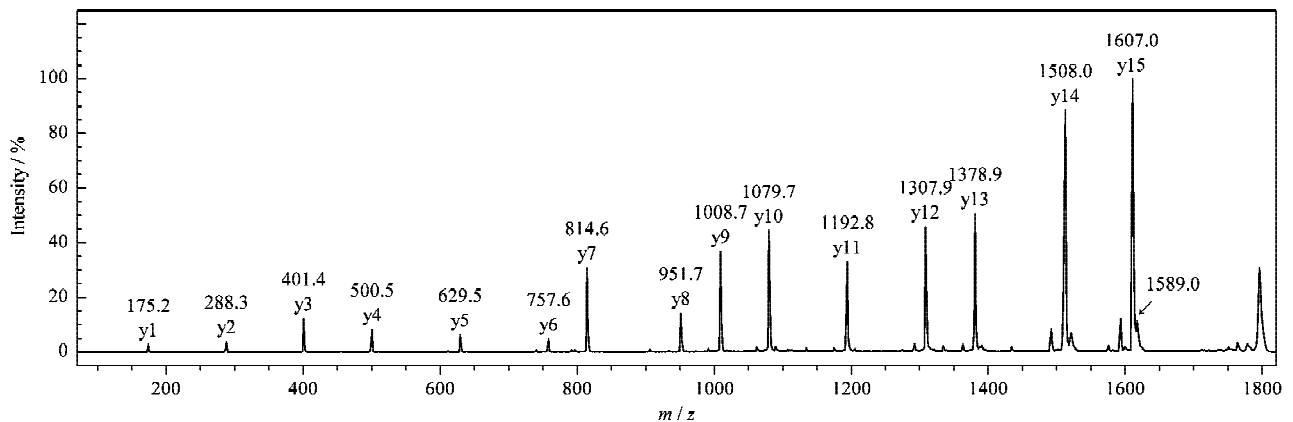


图 5 胍基化和磺化的含组氨酸肽段在正离子模式下的二级质谱图

Fig. 5 MS<sup>2</sup> spectrum of a guanidinated and sulfonated histidine-containing peptide in positive mode

Histidine-containing peptide : #VEADIAGHGQEVLR , which was dominated by a series of consecutive y ions.

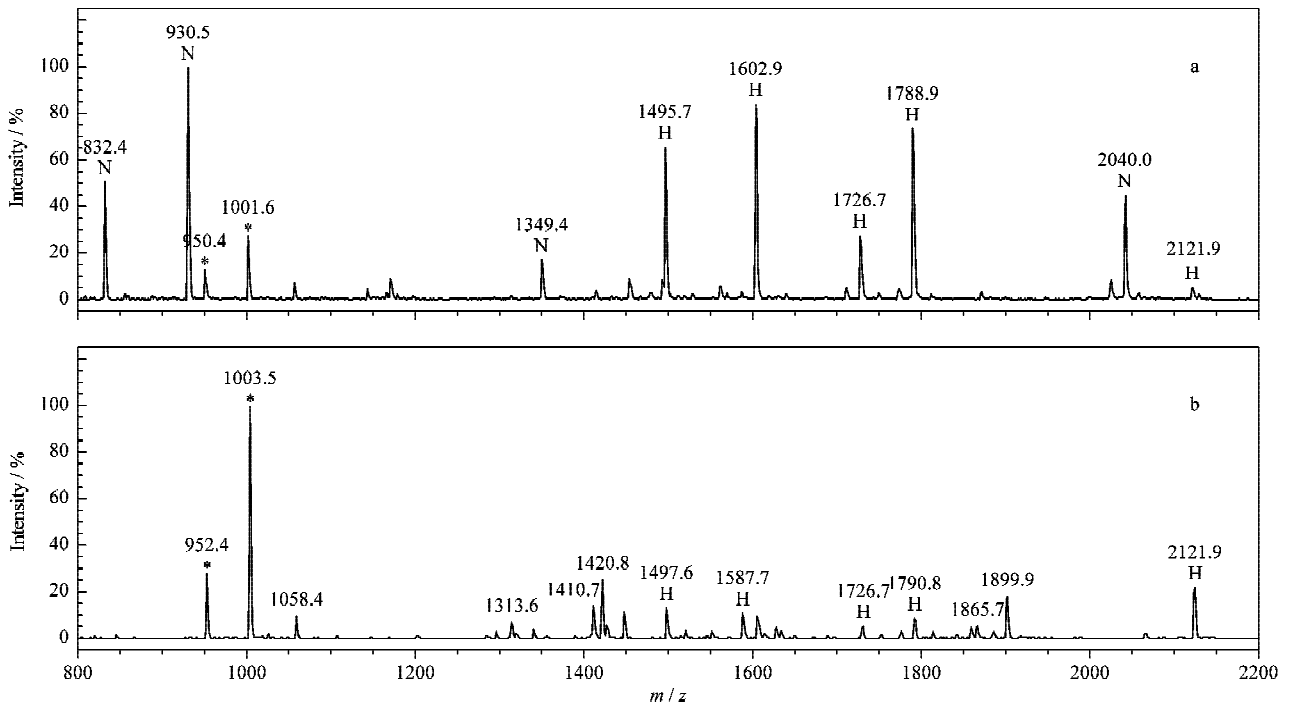


图 6 肌基化和磺化后肌红蛋白酶切肽段在 (a) 负离子模式和 (b) 正离子模式下的质谱图比较

Fig. 6 Comparison of mass spectra of guanidinated and sulfonated tryptic peptides of myoglobin (a) in negative mode and (b) in positive mode

For H, N and \*, see Fig. 4.

### 3 结论

本文选择适当的蛋白质和多肽作为模型,对肽段磺化反应的条件进行了优化,并在此基础上提出了一种从蛋白质混合物中富集鉴定含组氨酸肽段的新方法,且通过 3 种模型蛋白质对此方法进行了验证。结果发现,溶液 pH 值为 8 左右时,有利于肽段 N 端氨基的磺化反应。胰蛋白酶酶切肽段 N 端的磺化修饰,不仅有助于阳离子交换色谱法对肽段混合物中含组氨酸肽段的富集,降低肽段混合物的复杂程度,还有利于含组氨酸肽段的质谱从头测序,提高序列分析及蛋白质鉴定的可信度。对 3 种模型蛋白质的分析表明,本方法可以有效地富集鉴定含组氨酸肽段,具有在蛋白质组学中的应用的潜力。

### 参考文献:

- [ 1 ] Takahashi N, Takahashi Y, Putnam F W. *J Chromatogr A*, 1983, 266 : 511
- [ 2 ] Washburn M P, Wolters D, Yates J R. *Nat Biotech*, 2001, 19( 3 ) : 242
- [ 3 ] Julka S, Regnier F E. *J Proteome Res*, 2004, 3( 3 ) : 350
- [ 4 ] Nakazawa T, Yamaguchi M, Okamura T A, et al. *Proteomics*, 2008, 8( 4 ) : 673
- [ 5 ] Meinnel T, Giglione C. *Proteomics*, 2008, 8( 4 ) : 626
- [ 6 ] Mikami T, Takao T. *Anal Chem*, 2007, 79( 20 ) : 7 910
- [ 7 ] Shen P T, Hsu J L, Chen S H. *Anal Chem*, 2007, 79( 24 ) : 9 520
- [ 8 ] Geng M, Ji J, Regnier F E. *J Chromatogr A*, 2000, 870 : 295
- [ 9 ] Wang S, Regnier F E. *J Chromatogr A*, 2001, 924 : 345
- [ 10 ] Gygi S P, Rist B, Gerber S A, et al. *Nat Biotechnol*, 1999, 17( 10 ) : 994
- [ 11 ] Ji J, Chakraborty A, Geng M, et al. *J Chromatogr B*, 2000, 745( 1 ) : 197
- [ 12 ] Hansen P, Lindeberg G. *J Chromatogr A*, 1995, 690( 2 ) : 155
- [ 13 ] Chaga G S. *J Biochem Biophys Methods*, 2001, 49 : 313
- [ 14 ] Amini A, Chakraborty A, Regnier F E. *J Chromatogr B*, 2002, 772( 1 ) : 35
- [ 15 ] Ren D, Penner N A, Slentz B E, et al. *J Proteome Res*, 2003, 2( 3 ) : 321
- [ 16 ] Keough T, Youngquist R S, Lacey M P. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96( 13 ) : 7 131
- [ 17 ] Keough T, Lacey M P, Youngquist R S. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2000, 14( 24 ) : 2 348
- [ 18 ] Betancourt L, Gil J, Besada V, et al. *J Proteome Res*, 2005, 4( 2 ) : 491
- [ 19 ] Dai J Q, Zhang Y J, Wang J L, et al. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, 19( 9 ) : 1 130
- [ 20 ] Beausoleil S A, Jedrychowski M, Schwartz D, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101( 33 ) : 12 130
- [ 21 ] Zhang H, Yan W, Aebersold R. *Curr Opin Chem Biol*, 2004, 8 : 66
- [ 22 ] Alpert A J, Andrews P C. *J Chromatogr*, 1988, 443 : 85
- [ 23 ] Lee Y H, Han H, Chang S B, et al. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2004, 18( 24 ) : 3 019
- [ 24 ] Chen P, Nie S, Mi W, et al. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2004, 18( 2 ) : 191
- [ 25 ] Rabenstein D L, Hari S P, Kaerner A. *Anal Chem*, 1997, 69( 21 ) : 4 310
- [ 26 ] Dongre A R, Somogyi A, Wysocki V H. *J Mass Spectrom*, 1996, 31( 4 ) : 339
- [ 27 ] Paizs B, Suhai S. *Mass Spectrom Rev*, 2005, 24( 4 ) : 508