

液相色谱-串联质谱法研究重组水蛭素 12 肽与瑞替普酶融合蛋白 (HV12p-rPA) 的一级结构

余蓉^{1,2*}, 张贵锋², 高玲¹, 苏志国², 吴梧桐³

(1. 四川大学 华西药学院 靶向药物及释药系统教育部重点实验室, 四川 成都 610041;

2. 中国科学院 过程工程研究所 生化工程国家重点实验室, 北京 100080;

3. 中国药科大学 生命科学与技术学院, 江苏 南京 210009)

摘要: 利用液质联用研究重组水蛭素 12 肽与瑞替普酶融合蛋白(HV12p-rPA)的一级结构。采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)测定水蛭素 12 肽与瑞替普酶融合蛋白(HV12p-rPA)的相对分子质量;采用液质联用分别分析 HV12p-rPA 的胰蛋白酶(trypsin)和胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)酶解产物。MALDI-TOF-MS 测得 HV12p-rPA 的相对分子质量为 41 472 Da, 与理论值相符;HV12p-rPA 的胰蛋白酶(trypsin)酶解产物进行液质联用分析结果表明该融合蛋白中含有瑞替普酶序列;HV12p-rPA 的胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)酶解产物进行液质联用分析,结果表明融合蛋白中含有水蛭素 12 肽,并检测出融合蛋白中的链接肽(DEGGGSY),融合蛋白的 N 末端 MASDF 和 C 末端 LDWIRDNMRP;采用液质联用进行肽图分析,识别出的多肽匹配度 Xcorr 均超过 1.5,部分多肽的 Xcorr 超过 3.0,表明本实验测定过程中多肽识别结果准确可靠;目标蛋白的氨基酸序列覆盖率超过 85%。结果确定了 HV12p-rPA 融合蛋白的序列与理论值相符。

关键词: 高效液相色谱质谱联用;水蛭素 12 肽与瑞替普酶融合蛋白;相对分子质量;氨基酸序列

中图分类号: R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-4870(2008)07-0737-06

Primary structure determination of hirudin and reteplase fusion protein by LC/ESI-MS/MS spectrometry

YU Rong^{1,2*}, ZHANG Gui-feng², GAO Ling¹, SU Zhi-guo², WU Wu-tong³

(1. Key Laboratory of Drug Targeting and Drug Delivery System of Education Ministry, West China School of Pharmacy,

Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. State Key Laboratory of Biochemical Engineering,

Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

3. School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: The aim is to determine the primary structure of a new hirudin and reteplase fusion protein (HV12p-rPA) by LC-ESI-MS/MS spectrometry. The molecular weight of the hirudin and reteplase fusion protein (HV12p-rPA) was measured by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). The HV12p-rPA was digested with trypsin and chymotrypsin separately and the peptides in the digest mixtures were identified by LC-ESI-MS/MS. The molecular weight of HV12p-rPA was 41 472 Da, which was in accordance with the theoretical value. The peptide fragments of HV12p-rPA digested with trypsin were identified by LC-ESI-MS/MS spectrometry and the results indicated that the fusion protein contained r-PA. Then, the peptides of HV12p-rPA digested with chymotrypsin were identified by the same method. The results indicated that the fusion protein contained HV12p and the linker-containing peptide, DEGGGSY. MASDF and LDWIRDNMRP were identified as the N-terminal and C-terminal containing peptides in the chymotryptic digest mixture of the fusion protein. All of the Xcorr

收稿日期: 2008-03-03.

基金项目: 生化工程国家重点实验室开放基金资助项目(2005 KT2-23); 教育部博士点基金资助项目(20040316005).

* 通讯作者 Tel / Fax: 86-28-85503012, E-mail: yurong@scu.edu.cn

values exceeded 1.5, some of which were above 3.0, showing that the results were correct and credible and a sequence coverage of 85% was achieved. HPLC/MS analysis coupled with uncompleted digestion indicated that all these peptides were arranged with the correct order as expected. Thus, sequence of the fusion protein was confirmed and it was consistent with our design in upstream construction.

Key words: HPLC-ESI-MS/MS; hirudin and reteplase fusion protein; molecular weight; amino acid sequence

蛋白质工程药物分子设计是第3代基因工程药物的特征,合理的蛋白质工程是按照预先设计突变体的序列或组成,采用基因重组、基因敲除、基因突变及蛋白融合等蛋白质工程技术构建新型目标蛋白质是进行创新药物研究的有效手段。心脑血管疾病现已成为对人类健康的最大威胁之一,研究高效的溶栓、抗凝药已成为临床的迫切要求。瑞替普酶(reteplase, r-PA)是具有特异性强、半衰期长、不良反应小等特点的重组人组织型纤维蛋白溶解酶原激活剂缺失变异体^[1]。水蛭素是迄今发现作用最强的凝血酶抑制剂,已发现水蛭素C端12肽是具有抗凝血酶功能的最小结构片段。目前蛋白质工程设计具有抗凝、溶栓双功能的新药已经成为现代药学的研究重点。本研究通过生物信息学和计算机辅助药物设计以及基因融合重组等蛋白质工程技术获得了兼有溶栓和抗凝活性双重功效水蛭素12肽-瑞替普酶融合蛋白(HV12p-rPA)^[2]。如何对这类新型蛋白质药物进行结构测定是一个需要解决的迫切问题。氨基酸组成分析、氨基酸序列测定、分子质量测定和肽图分析是基因重组药物一级结构确证及质量控制的重要组成部分^[3~6]。为此,本文采用物质谱法对该融合蛋白进行了相对分子质量测定,并通过多肽序列标签法对其氨基酸序列进行了测定。研究结果表明HV12p-rPA的一级结构完全与分子设计相符,所建立的相对分子质量、肽图谱和氨基酸序列的一级结构分析测试方法对如何准确地分析不断出现的具有崭新结构的蛋白质工程药物具有参考价值。

材料与方法

试剂和仪器 胰蛋白酶(trypsin)和胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)购自Promega公司,二硫苏糖醇(DTT)购自Sigma试剂公司,三氟乙酸和乙腈为Merck公司产品,其他试剂为市售分析纯。液相色谱质谱联用系统由美国Agilent1100和美国Thermo Finnigan公司的LCQ Deca^{XP}组成,离子源为电喷雾离子源(ESI),二极管阵列检测器为UV6000(Finnigan MAT,热电公司)。分离多肽的色谱柱为

SB C₁₈(150 mm × 2.1 mm, 5 μm)。基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)为德国Bruker公司的Ultraflex III TOF/TOF质谱仪。

样品制备及相对分子质量测定 HV12p-rPA在大肠杆菌中以包涵体形式表达。诱导表达后的菌体经超声破碎、洗涤收集得到HV12p-rPA融合蛋白包涵体,以包涵体1 g/10 mL变性剂(8 mol · L⁻¹尿素, 0.05 mol · L⁻¹ Tris-HCl和1% β-Me, pH 8.5)的比例加入变性剂,40 °C变性8 h即可获得变性HV12p-rPA融合蛋白溶液。考马斯亮兰法测定其蛋白浓度为35 mg · mL⁻¹。将变性蛋白溶液用缓冲液(含8 mol · L⁻¹尿素和0.05 mol · L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.5)稀释至10 mg · mL⁻¹,使用半制备反相色谱柱分离纯化蛋白样品。反相分离纯化得到的HV12p-rPA融合蛋白纯度≥95%,该样品采用MALDI-TOF-MS测定相对分子质量。

反相色谱分离纯化条件 PST半制备色谱柱(300 mm × 7.8 mm, 30 μm, 孔径30 nm),流动相A:超纯水(含0.1% TFA),流动相B:乙腈(含0.1% TFA),上样量:100 μL,梯度条件:40 min内线性20% B→80% B,流速2.0 mL · min⁻¹,温度:室温;检测波长:280 nm。

酶解条件 将1 mg · mL⁻¹ HV12p-rPA变性蛋白溶液(2 mol · L⁻¹尿素, 0.05 mol · L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0)离心,取200 μL,加入1 μg · μL⁻¹胰蛋白酶溶液(0.05 mol · L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0) 5 μL, 37 °C酶解12 h后向多肽混合物中加入1 μmol · μL⁻¹ DTT溶液1 μL, 37 °C反应30 min以还原全部二硫键。多肽混合物冷冻保存或直接进行液相色谱质谱联用分析。在对比实验中,利用相同的条件进行蛋白质酶切处理,将酶切时间降低为8 h和4 h,酶解产物经DTT处理后直接使用高效液相色谱-质谱联用系统进行多肽识别。

取蛋白溶液200 μL,加入1 μg · μL⁻¹胰凝乳蛋白酶溶液(0.05 mol · L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0) 5 μL, 37 °C酶解6 h,酶解反应结束后向多肽混合物中加入1 μmol · μL⁻¹ DTT 1 μL, 37 °C反应30 min,多肽

混合物冷冻保存或直接进行液相色谱质谱联用分析。

HPLC-MS 分析条件

色谱条件 色谱柱 SB C₁₈ (150 mm × 2.1 mm, 5 μm); 流动相 A: 水(含 0.1% TFA), 流动相 B: 乙腈(含 0.1% TFA); 流速: 0.2 mL · min⁻¹; 紫外检测波长 214 nm。流动相经二极管阵列检测器后直接导入质谱的离子源。

质谱条件 电喷雾离子源的鞘气(sheath gas): 400 kPa, 喷雾电压: 4.5 kV; 扫描范围: *m/z* 300 ~ 2 000 正离子模式; 精确质量数扫描(zoom scan)和二级质谱扫描(MS/MS)均为数据依赖型扫描(data dependent scan), 二级质谱碰撞能量为 35%。液相色谱分离出的多肽经精确质量数扫描确定其带电荷数, 多肽的序列通过二级质谱确认。数据处理软件为 Bioworks 3.1, 序列分析软件为 DenoX (Bioworks 3.1 整合软件)。

数据处理与分析 将 HV12p-rPA 融合蛋白的氨基酸序列导入 Bioworks 软件的蛋白质数据库。将质谱分析产生的 MS/MS 图谱, 用整合到 Bioworks 3.1 软件包中的 SEQUEST 软件对融合蛋白序列数据库进行搜索, 目标离子的质量数偏差范围为 1.4, 分组次数为 1, 二级质谱碎片离子数量最少为 15。当搜索结果用如下参数进行过滤时, 所产生的肽片段被认为是阳性结果, 即当多肽片段带电荷数为 1 时, $X_{corr} \geq 1.5$, 带 2 个电荷时, $X_{corr} \geq 2.0$, 带 3 个电荷时, $X_{corr} \geq 2.5$; 同时, $C_n \geq 0.1$ 。当多肽的二级质谱碎片数量低于 15 时, 需要通过 zoom scan 质谱图确定多肽离子的电荷数, 使用 Mass works 软件确定母离子的同位素峰的相对丰度以及精确质量数, 并综合考虑信号峰比噪音峰高以及 b 离子和 Y 离子之间的匹配连续性等。对于融合蛋白的氨基酸序列中为检出的多肽, 通过一级质谱质量数提取离子, 通过整合到 Bioworks 3.1 软件包中 DenoX 软件解析其氨基酸序列。

结果

1 HV12p-rPA 融合蛋白相对分子质量测定

用 MALDI-TOF-MS 测定了纯化后蛋白样品的相对分子质量。HV12p-rPA 由 373 个氨基酸组成, 其氨基酸序列计算的理论相对分子质量为 41 472.38 Da。经同位素丰度校正后质谱测定该蛋白的质荷比为 *m/z* 41 473, 蛋白质经基质辅助激光解析电离后通常产生带 1 个电荷的准分子离子峰, 因此测定该融合蛋白相对分子质量为 41 472 Da, 在

误差允许范围内与所设计融合蛋白的理论值相符。

2 胰蛋白酶理论酶切结果分析

胰蛋白酶专一性酶切位点在肽链中赖氨酸(K, Lys)和精氨酸(R, Arg)的羧基端。HV12p-rPA 融合蛋白的理论氨基酸全序列如图 1, 共有 373 个氨基酸, 胰蛋白酶完全水解后理论上可以产生 37 个肽段或氨基酸。图 1 中 T1 ~ T37 为 37 个肽段的编号及所在位置, 标在每个肽段的羧基端。

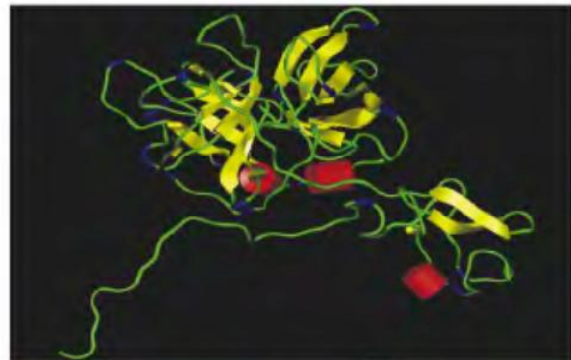


Figure 1 Primary structure of hirudin and reteplase fusion protein (HV12p-rPA). Yellow zone: β -Sheet structure; Green zone: Random coil; Blue zone: β -Turn; Red zone: α -Helix; T1 - T37: 37 Peptides

3 液质联用分析

实验使用胰蛋白酶将 HV12p-rPA 融合蛋白进行降解并进行高效液相色谱分离, 图 2A 是 HV12p-rPA 融合蛋白经胰蛋白酶处理 8 h 后的多肽混合物经液质联用分析得到的总离子流图。以保留时间为 43.3 min 的色谱峰为例, 其一级质谱扫描结果表明该色谱峰中存在离子 *m/z* 1 179.8 和 *m/z* 590.7 的离子(图 3), 精确质量数扫描结果表明离子 *m/z* 590.7 带双电荷, 离子 *m/z* 1 179.8 为单电荷离子(图 3), 数据库检索结果表明其二级质谱与多肽 VTNLYLDWIR 相对应(图 4), X_{corr} 为 1.9, C_n 为 0.6, 表明该蛋白质的氨基酸序列中存在 VTNLYLDWIR 的局部序列, 实验利用相同的方法对其他色谱峰的归属进行了识别, 检测出的离子及其对应的多肽序列见表 1。

由于 HV12p-rPA 存在 9 对二硫键,因此,含有 Cys 的多肽难以直接检测,为了消除二硫键对多肽识别的影响,实验使用 DTT 对酶解产物进行处理以打开全部的二硫键。比较结果酶解产物未经 DTT 处理时多肽的识别率仅为 36%,而经 DTT 处理后多肽的识别率显著提高。

为确认识别出的多肽以正确的顺序连接,实验测定了酶解 8 h 后多肽混合物中的多肽的序列,并与酶解 12 h 后产生的多肽进行比对。结果表明酶

解 8 h 后多肽混合物存在许多未被完全降解的多肽,这些多肽的氨基酸序列中存在精氨酸或赖氨酸。如融合蛋白经胰蛋白酶处理 8 h 后的产物中检测出离子 m/z 1 262.0(图 5),精确质量数扫描结构表明该离子带电荷数为 2(图 6),二级质谱扫描结果表明该离子来源于多肽 MTLVGHSWGLGCGQKDVPGVYTK(图 6), X_{corr} 为 2.1, C_n 为 0.9,该多肽在酶解 12 h 后的产物中未被检测出,表明该多肽被降解为两个多肽 DVPGVYTK 和 MTLVGHSWGLGCGQK。比

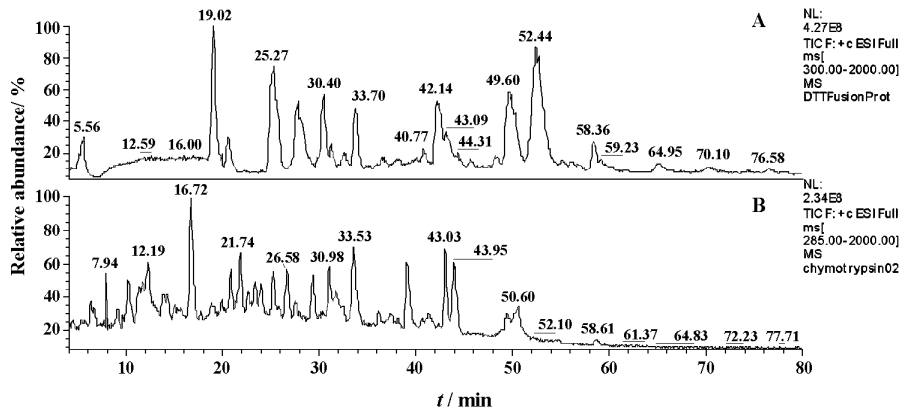


Figure 2 Total ion chromatogram of digested HV12p-rPA fusion protein. A: Tryptic digestion; B: Chymotryptic digestion

Table 1 Peptides of HV12p-rPA identified by LC/ESI-MS/MS spectrometry

No.	Site	Amino acid sequence	m/z^a	m/z^b	X_{corr}
1	1-5	MASDF ^c	570.2	570.1	1.6
2	6-13	PIPEDAY ^c	933.4	933.2	1.7
3	6-20	PIPEDAYDEGGGSY ^c	1 599.6	1 599.2	2.6
4	14-20	DEGGGSY ^c	684.6	684.4	1.8
5	21-27	QGNSDCY ^c	786.8	786.5	2.0
6	36-58(T2)	GTHSLTESGASCLPWNSMILIGK	2 403.76	1 202.3 ^d	1.9
7	59-74(T3)	VYTAQNPSAQALGLGK	1 618.8	1 617.9	2.7
8	80-93(T5 + T6)	NPDGDAK PWCHVLK	1 580.8	1 579.8	2.5
9	97-113(T9)	LTWEYGDVPSGSLGRLR	1 934.2	1 933.2	2.8
10	114-121(T10)	QYSQPQFR	1 054.1	1 053.5	3.0
11	124-142(T12)	GGLFADIASHPWQAIFAK	2 001.3	1 101.3 ^d	4.1
12	145-173(T15 + T16)	SPGERFLCGGILISSCWILSAAHCFQER	3 082.5	1 540.7 ^d	2.5
13	151-173(T16)	FLCGGILISSCWILSAAHCFQER	2 556.03	1 277.8 ^d	2.6
14	151-185(T16 + T17)	FLCGGILISSCWILSAAHCFQERFPFHHLTVILGR	3 924.2	1 961.5 ^d	2.7
15	189-202(T19 + T20)	VVPGEEEQKFEVEK	1 647.8	1 646.9	2.0
16	203-207(T21)	YIVHK	659.80	659.5	1.7
17	225-229(T23)	SDSSR	551.5	551.2	2.5
18	239-262(T25)	TVCLPPADLQLPDWTECELSGYGK	2 636.9	2 636.1	2.4
19	263-273(T26)	HEALSPFYSER	1 336.4	1 335.6	1.8
20	281-286(T29)	LYPSSR	722.8	722.4	2.3
21	296-308(T31)	TVTDNMLCAGDTR	1 397.6	1 396.6	2.5
22	336-351(T33)	MTLVGHSWGLGCGQK	1 664.0	1 662.9	2.9
23	352-359(T34)	DVPGVYTK	878.9	878.5	3.1
24	360-368(T35)	VTNYLDWIR	1 180.3	1 179.6	2.7
25	364-373	LDWIRDNMRP ^c	1 315.6	1 315.4	2.8

^aTheoretical mean; ^bExperimental value; ^cChymotrypsin digestion, otherwise trypsin digestion; ^dIon of double charges

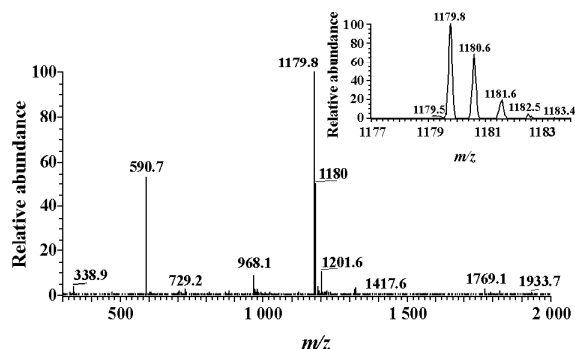


Figure 3 Mass spectrum of chromatographic peak with retention time of 43.3 min and its zoom scan spectrum (inset)

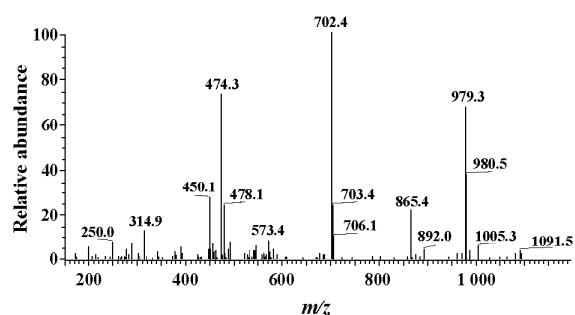


Figure 4 MS/MS of ion with mass to charge ratio of 1 179.8

较研究表明, 酶解 12 h 后 DVPGVYTK 和 MTLVG-IISWGLGCGQK 的浓度远高于酶解 8 h 产物中的浓度, 其他被检测出含有精氨酸和赖氨酸的多肽列于表 1。蛋白质的氨基酸序列中, Gly³⁶-Pro³⁷³ 的局部序列中识别出的氨基酸覆盖率为 75%。

HV12p-rPA 融合蛋白经胰蛋白酶处理后理论上产生 m/z 3 771.8 的离子, 即 N 末端的多肽 MASDF-EPIPEDAYDEGGGSYQGNSDCYFGNGSAYR, 但多肽混合物中未能直接识别出该多肽, 其原因可能是由于该多肽的相对分子质量超过 3 500 Da, 且序列中缺乏精氨酸和赖氨酸, 二级质谱产生的碎片离子过多而不利于多肽识别。因此为检测融合蛋白的 N 末端序列与实验设计的序列是否一致, 实验使用胰凝乳蛋白酶对融合蛋白进行了酶切处理, 并使用液质联用系统对产生的多肽进行了识别。图 2B 中保留时间为 9.9 min 的色谱峰中存在带单电荷的离子 m/z 684.2 (图 7), 二级质谱分析结果表明该离子为多肽 DEGGGSY (图 7), 即融合蛋白的序列中存在连接肽, 并确认了融合蛋白序列中水蛭素 12 肽与瑞替普酶的先后顺序。利用相同的方法, 识别出了多肽 M¹ASDF⁵ (m/z 570.3), E⁶PIPEDAY¹³ (m/z 933.2),

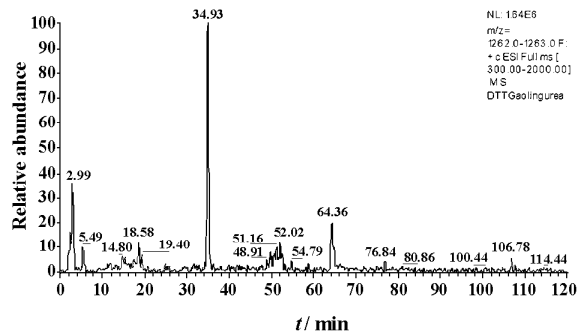


Figure 5 Extracted ion chromatogram of ion with mass to charge ratio of 1 262.0

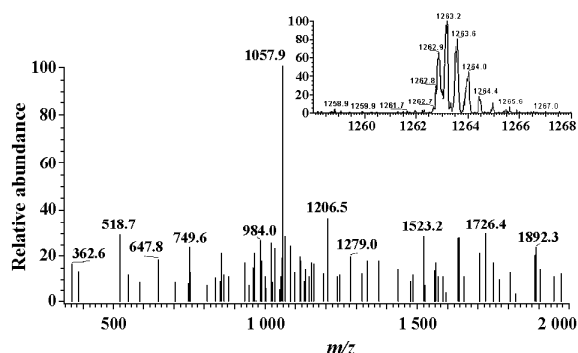


Figure 6 MS/MS of ion with mass to charge ratio of m/z 1 262.5 and its zoom scan spectrum (inset)

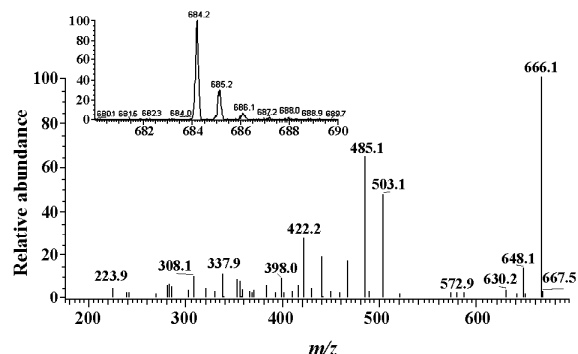


Figure 7 MS/MS of ion with m/z 684.2 and its zoom scan spectrum (inset)

E⁶PIPEDAYDEGGGSY²⁰ (m/z 1 599.2), Q²¹GNSDCY²⁷ (m/z 786.5), L³⁶⁴DWIRDNMRP³⁷³ (m/z 1 315.4) (表 1)。

结果表明: 用液质联用进行肽图分析, 识别出的多肽匹配度 Xcorr 均超过 1.5, 部分多肽的 Xcorr 超过 3.0, 表明测定结果准确可靠; 胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶酶解后进行液质联用分析, 目标蛋白的氨基酸总覆盖率超过 85%; 对融合蛋白的 N 末端结构分析, 采用胰凝乳蛋白酶对融合蛋白进行了酶切处理,

并使用液质联用系统对产生的多肽进行了识别,从而确定了该融合蛋白的 N 末端和 C 末端的多肽序列与理论值相符。结合 MALDI-TOF-MS 测定相对分子质量的结果可确认该融合蛋白的序列与设计的序列相符。

讨论

相对分子质量是蛋白质的主要特征参数之一,也是一个重组产品质量控制的重要参数,其正确与否往往代表着所测定的蛋白质一级结构正确与否。应用 MALDI-TOF-MS 技术对蛋白质可准确测定相对分子质量信息,而采用液质联用技术可得到完整而精确的肽质量图谱^[7],可确证蛋白质氨基酸序列是否正确,并由此推断 DNA 序列是否正确,是鉴定蛋白质一级结构的完整性和准确性的重要方法^[3]。

本研究采用 MALDI-TOF-MS 准确测定了 HV12p-rPA 的相对分子质量(测定结果在误差允许范围内与理论值相符),使用胰蛋白酶和糜蛋白酶将融合蛋白进行降解,LC-ESI-MS/MS 液质联用技术对酶解产物中的多肽进行了识别,使用肽序列标签法对目标蛋白的氨基酸序列进行了分析。对于相对分子质量大小适中的蛋白质(30~60 kDa),胰蛋白酶酶切后氨基酸序列覆盖率一般在 50%~80%^[8,9],而对于相对分子质量比较小的蛋白质(10~30 kDa)胰蛋白酶酶切后氨基酸序列覆盖率可达 90%以上^[10,11]。HV12p-rPA 经胰蛋白酶处理后利用液质联用技术对酶解产物中的多肽进行了序列分析,并检测出了瑞普替酶序列中的多肽;在酶解过程中分时取样验证了检测出的多肽的排列顺序与理论一致。由于胰蛋白酶酶解位点仅针对赖氨酸和精氨酸,且质谱法识别的多肽相对分子质量不易过高(一般低于 3 500),胰蛋白酶解产物中未能直接检测出来源于水蛭素 12 肽的多肽序列。为识别 HV12p-rPA 中的水蛭素 12 肽和连接肽,实验使用胰凝乳蛋白酶对其进行降解,质谱分析确定了 HV12p-rPA 融合蛋白的 N 末端。部分降解的酶解产物中质谱分析结果表明,C 末端的多肽序列与理论值相符,表明 HV12p-rPA 融合蛋白序列中存在水蛭素 12 肽和瑞普替酶的序列,而连接肽 DEGGGSY 表明水蛭素 12 肽和瑞普替酶在融合蛋白中的连接顺序与设计的序列一致。

综合相对分子质量测定、肽图序列分析以及 N 末端和 C 末端测定结果,可以确认该融合蛋白的序列与设计的序列相符。具有全新结构和功能的蛋白

质工程药物新品种迅速增加,对其结构鉴定分析迫切需要准确灵敏的方法。本实验中使用两种酶分别对 HV12p-rPA 处理,以提高多肽的覆盖率,并确定了目标蛋白的 N 末端和 C 末端序列以及融合蛋白中水蛭素 12 肽和瑞普替酶的顺序。本文采用生物质谱建立了适宜的分离分析色谱条件,取得了良好的结果,并运用相关的数据库,实现对具有全新结构的 HV12p-rPA 融合蛋白的迅速鉴别,为蛋白质工程药物的结构解析提供思路。

References

- [1] Druteika D, Sunderji R, Zed P. Reteplase (r-PA) [J]. Drug Therap Newslett, 2002,9:6-8.
- [2] Yu R, Wei LJ, Wu WT, et al. Simulation, construction and expression of a fusion protein made of 12 peptides of hirudin and reteplase [J]. Pharm Biotechnol (药物生物技术), 2007,14:168-172.
- [3] Lu Z, Wang S, Cai Y, et al. Primary structure determination of recombinant human erythropoietin by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-time of flight-mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem (分析化学), 2006,34:591-597.
- [4] Chen J, Sun HY, Chen SQ. Identification of recombinant human parathyroid hormone (1-34) by nanoelectrospray ionization-quadrupole-time of flight tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem (分析化学), 2006,34:603-607.
- [5] Yang Y, Rao CR, Wang W, et al. Peptide mapping analysis of recombinant human interleukin-11 with HPLC-ESI-Q-TOF/MS spectrometry [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2006,41:756-760.
- [6] Yang Y, Rao CM, Wang JZ, et al. Identification of rhIL-11 by HPLC-ESI-Q-TOF-MS spectrometry [J]. J Chin Mass Spectrom Soc (质谱学报), 2006,27:117-121.
- [7] Zhou L, Beuerman RW, Barathi A, et al. Analysis of rabbit tear proteins by high-pressure liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2003,17:401-412.
- [8] Finehout EJ, Lee KH. Comparison of automated in-gel digest methods for femtomole level samples [J]. Electrophoresis, 2003,24:3508-3516.
- [9] Kadleik V, Strohalm M, Kodicek M. Citraconylation — a simple method for high protein sequence coverage in MALDI-TOF mass spectrometry [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003,305:1091-1093.
- [10] Barnett DA, Eills B, Guevremont R, et al. Application of ESI-FAIMS-MS to the analysis of tryptic peptides [J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2002,13:1282-1291.
- [11] Bernardo K, Fleer S, Pakulat N, et al. Identification of staphylococcus aureus exotoxins by combined sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry [J]. Proteomics, 2002,2:740-746.