

## 毛细管整体柱在线二维分离系统应用于 人体软骨的蛋白质组分析

谢沙洁<sup>1</sup>, 王方军<sup>1</sup>, 晏丹<sup>2</sup>, 周广东<sup>2</sup>, 叶明亮<sup>1</sup>, 邹汉法<sup>1\*</sup>

( 1. 中国科学院大连化学物理研究所, 中国科学院分离分析化学重点实验室,  
国家色谱研究分析中心, 辽宁 大连 116023 ; 2. 组织工程国家工程研究中心,  
上海交通大学医学院附属第九人民医院整形外科, 上海 200011 )

**摘要** : 将已建立的 7 cm 柱长的磷酸基团强阳离子交换富集整体柱与 85 cm 柱长的 C12 烷基反相整体柱结合的在线二维分离平台应用于软骨提取蛋白的蛋白质组分析。对 20 μg 软骨提取蛋白的酶解产物进行 14 个盐梯度的分级, 然后对 14 个馏分进行反相色谱梯度分离及串联质谱鉴定, 成功地鉴定得到了 7 434 个独立肽段对应的 1 901 个非冗余蛋白质。对所鉴定到的蛋白质进行定位分类, 结果表明鉴定到的大部分蛋白质是来自于软骨细胞内部的低丰度蛋白质, 这对于许多关节类疾病的研究有重要意义。

**关键词** : 整体柱 ; 在线二维分离 ; 蛋白质组学 ; 软骨组织

中图分类号 : O658 文献标识码 : A 文章编号 : 1000-8713( 2010 )02-0140-06

## Application of online two-dimensional separation system using monolithic columns for proteome analysis of human cartilage

XIE Shajie<sup>1</sup>, WANG Fangjun<sup>1</sup>, YAN Dan<sup>2</sup>, ZHOU Guangdong<sup>2</sup>, YE Mingliang<sup>1</sup>, ZOU Hanfa<sup>1\*</sup>

( 1. Key Laboratory of Separation Science for Analytical Chemistry, National Chromatographic R. & A. Center, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China ;  
2. National Tissue Engineering Center of China, Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Shanghai 9th People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China )

**Abstract** : In Shotgun proteome analysis, where nano-flow is adopted to increase the sensitivity as well as extremely complicated samples such as proteolytic digest are inevitably confronted, monolithic capillary columns are widely used to improve the liquid chromatography separation performance. It is known that cartilage contains extensive amounts of extracellular matrix ( ECM ), in which collagens and aggrecans being the most abundant macromolecules. It is obvious that the high content of ECM components causes a challenge in the comprehensive proteome analysis of cartilage. In this study, a 7 cm × 150 μm i. d. phosphate strong cation exchange ( SCX ) monolithic capillary column was coupled with an 85 cm × 75 μm i. d. C12 reversed-phase monolithic capillary column for online two-dimensional separation of 20 μg tryptic digest of proteins extracted from human cartilage. After 14 salt steps fractionation and following gradient separation coupled with tandem mass spectrometry detection, finally 7 434 unique peptides, corresponding to 1 901 distinct proteins were positively identified. Then, the identified proteins were analyzed by Gene Ontology ( GO ), and it was found that most of the identified proteins were come from articular chondrocytes with low abundance, which is important for the researches of articular diseases.

**Key words** : monolithic column ; online two-dimensional separation ; proteomics ; cartilage tissue

\* 通讯联系人 : 邹汉法, 博士生导师, 研究员. Tel : ( 0411 ) 84379610, Fax : ( 0411 ) 84379620, E-mail : hanfazou@dicp.ac.cn.  
基金项目 : 国家自然科学基金项目 ( Nos. 20675081, 20735004 ).  
收稿日期 : 2009-08-11

“鸟枪法”(Shotgun)蛋白质组学是将蛋白质混合物先进行酶解,然后通过鉴定酶解后的肽段来鉴定蛋白质的一种“从下至上”(bottom up)的蛋白质组学研究策略<sup>[1-3]</sup>。毛细管纳升液相色谱与串联质谱联用( $\mu$ HPLC-MS/MS)是“鸟枪法”蛋白质组学的技术核心,通过毛细管液相色谱对微量蛋白质酶解样品的高效分离,极大地提高了质谱对复杂样品进行蛋白质鉴定分析的能力<sup>[4]</sup>。在蛋白质组学样品中具有重要生物学意义的蛋白质往往是低丰度蛋白质,进一步提高毛细管液相色谱的分离能力对低丰度蛋白质的质谱鉴定具有重要意义。多维液相色谱分离是最强大的液相色谱分离模式<sup>[5-7]</sup>,而在线多维液相色谱分离又具有高效快速、样品用量小、样品损失少、无样品污染等诸多优点。在蛋白质组学研究中,对于微量的蛋白质样品,在线多维分离具有更大的优势<sup>[8-10]</sup>。

Yates 等<sup>[11-13]</sup>在同一根 100  $\mu$ m 的毛细管中以先后顺序分别填充了反相(RP)分离填料和强阳离子交换(SCX)填料,将蛋白质的酶解物先上样到 SCX 部分,然后通过不同的盐梯度将富集在 SCX 部分的肽段分级冲洗到 RP 部分,再分别进行反相梯度分离和串联质谱的检测,从而实现了在线二维分离和串联质谱检测联用,对蛋白质样品具有强大的分离鉴定能力。这种方法也被称为“多维蛋白质鉴定技术(MuDPIT)”的方法,在蛋白质组学研究中得到了广泛的应用。但是由于 Yates 等人应用的是毛细管填充柱,分离柱的反压大,上样速度慢;而且为了保证反相部分的分离能力,强阳离子交换填料填充部分不能太长,上样能力受到限制的同时也降低了第一维的分级分辨率<sup>[14]</sup>。相对于填充柱而言,整体柱具有的多孔结构使其具有很高的渗透性和传质速率,从而实现高效快速分离。近年来,毛细管整体柱已经被广泛地应用到纳升毛细管液相色谱中,极大地推动了蛋白质组学的发展<sup>[15-21]</sup>。

关节软骨包括软骨细胞(~1%,体积分数)和细胞外基质(ECM),其中 ECM 的主要组成部分包括胶原蛋白和蛋白聚糖。由于大量细胞外基质的存在,要对软骨细胞中的蛋白质进行充分的提取就必须对软骨组织进行充分的切片或研磨。但软骨组织被充分破坏后将导致大量的胶原和蛋白聚糖进入提取液,由于其丰度非常高,将极大地影响液相色谱-质谱联用对蛋白质样品中低丰度蛋白质的分析鉴定<sup>[22]</sup>。现阶段人们对软骨组织蛋白质的组成了解不多,对软骨蛋白的大规模鉴定到现在为止还是一个难题。在已有的文献报道中,采用双向电泳方法

的软骨蛋白质组分析只鉴定了不到 200 个蛋白质<sup>[23,24]</sup>。

我们以带有磷酸基团的 SCX 整体柱为富集柱,以带有 C12 基团的整体柱为反相分离柱组成二维分离系统,以串联质谱作为检测手段构建了一套自动在线多维分离-串联质谱联用系统<sup>[14,25,26]</sup>。本文将该系统应用于软骨蛋白质组分析,通过对 20  $\mu$ g 软骨提取蛋白质的胰蛋白酶酶解物进行分析,在假阳性率(FPR)小于 1% 的情况下共鉴定得到了 7 434 个独立肽段(unique peptide),对应于 1 901 个非冗余蛋白质。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

2-(甲基丙烯酰氧)乙基磷酸酯(EGMP)、亚甲基双丙烯酰胺(bis-acrylamide)、二甲基亚砜(DMSO)、十二醇、二甲基甲酰胺(DMF)、十二烷基甲基丙烯酸酯(LMA)、二甲基丙烯酸乙二酯(EDMA)和  $\gamma$ -甲基丙烯酰氧基丙基三甲氧基硅烷( $\gamma$ -MAPS)均购于美国 Sigma 公司;偶氮二异丁腈(AIBN)购于上海第四试剂厂;胰蛋白酶购于美国 Promega 公司;二硫苏糖醇(DTT)、碘代乙酰胺(IAA)和蛋白酶抑制剂购于北京 Sino-American 生物技术公司;75  $\mu$ m 和 150  $\mu$ m 内径毛细管购于美国 Polymicro 公司;乙腈为色谱纯,购于美国 Merck 公司;实验用水为 Milli-Q 超纯水。

Surveyor HPLC 液相色谱系统(美国热电公司)配有脱气机和四元液相泵。3 种分离流动相为:流动相 A,0.1% 甲酸水溶液;流动相 B,0.1% 甲酸乙腈溶液;流动相 C,1 mol/L 醋酸铵溶液(pH 3)。流动相从液相色谱流出后通过一个三通阀分流,使其达到分离所需的 200 nL/min 的流速。LTQ 线性离子阱质谱(美国热电公司),配有纳升电喷雾离子源和一个六通阀。

### 1.2 软骨蛋白的提取和酶解

100 mg 人体软骨(上海第九人民医院提供)放置于研钵中,加入液氮,充分多次研磨。然后将研磨后的软骨粉末转移到 1.5 mL 的离心管中,加入 1 mL 含有 6 mol/L 盐酸胍、0.1 mol/L Tris 和蛋白酶抑制剂的蛋白质提取液(pH 7.4),在室温下充分振荡 2 h。将离心管在 9 100 r/min (6 000 g)离心 5 min,上清液转移到 10 mL 离心管中并用氯仿/甲醇沉淀法将上清液中的蛋白质沉淀出来。离心出来的沉淀物在用甲醇清洗后复溶于 1 mL 含 8 mol/L 尿素和 0.05 mol/L Tris (pH 8.1)的变性试剂中,

蛋白质浓度通过 Bradford 方法进行测定。然后该蛋白质样品在 37 °C 用 DTT 还原 2 h,并在避光的环境下用 IAA 对打开的二硫键进行封端 40 min。随后用 0.05 mol/L 的 Tris 溶液(pH 8.1)将溶液的尿素浓度稀释到 1 mol/L。最后加入胰蛋白酶(其质量为蛋白质总量的 1/25),并在 37 °C 下保持 24 h。所得到的胰蛋白酶酶解物用实验室自制的 C18 固相萃取柱进行除盐纯化并复溶于 0.1% 的甲酸水溶液中。该样品储存于 -20 °C 冰箱中待用。

### 1.3 整体柱的制备

两种整体柱的制作与以前报道的方法一致<sup>[14,16,25]</sup>。制作强阳离子交换毛细管整体柱时,将 80  $\mu\text{L}$  EGMP、60 mg 亚甲基双丙烯酰胺、270  $\mu\text{L}$  DMSO、200  $\mu\text{L}$  十二醇、50  $\mu\text{L}$  DMF 和 2 mg AIBN 混合并超声振荡 15 min。配制的聚合溶液通过虹吸进入 150  $\mu\text{m}$  内径毛细管,将毛细管两端用硅橡胶封口,然后放入 60 °C 水浴反应 12 h,最后用甲醇冲洗出未反应的聚合单体及致孔剂即可。制作反相毛细管整体柱时,将 100  $\mu\text{L}$  LMA、100  $\mu\text{L}$  EDMA、170  $\mu\text{L}$  正丙醇、130  $\mu\text{L}$  1,4-丁二醇、20  $\mu\text{L}$  水和 2 mg AIBN 混合,然后通过虹吸进入 75  $\mu\text{m}$  内径毛细管,其余步骤与 SCX 整体柱制作步骤相同。对于反相毛细管整体柱,在制作完成后还要在冲水的情况下在柱子的出水端用丁烷焰拉制一个内径约为 5  $\mu\text{m}$  的电喷雾针头。

### 1.4 样品自动进样及液相色谱分离

样品自动进样及在线二维分离系统如图 1 所示。7 cm 长的 150  $\mu\text{m}$  内径 SCX 整体柱通过四通阀和六通阀与 85 cm 长的 75  $\mu\text{m}$  内径 RP 柱相连,RP 分离柱通过电喷雾针头直接与质谱偶联,电喷雾的电压通过铂丝加在四通阀的一个出口上。在上样时,六通阀处于实线位置,蛋白酶解样品以 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  的流速上样到 SCX 整体柱上,废液通过六

通阀排出;分析时六通阀切换至虚线位置开启分流通路,流动相通过三通阀分流后以 200 nL/min 的流速通过两种整体柱进行分离。

在进行在线二维分离时,先将 20  $\mu\text{g}$  软骨提取蛋白的胰蛋白酶酶解物自动上样到 SCX 整体柱上,然后将流动相 A(0.1% 甲酸水溶液)和流动相 C(pH 值为 3 的 1 mol/L 醋酸铵水溶液)以不同的比例混合得到不同浓度的  $\text{NH}_4\text{Ac}$  盐溶液流动相,14 种不同浓度的盐溶液以 200 nL/min 的流速将 SCX 整体柱上富集的肽段分级洗脱到 RP 整体柱上。分离梯度设置:循环 1 由流动相 A 和流动相 B 组成的混合流动相以 0% B 到 8% B 洗脱 2 min,从 8% B 到 30% B 洗脱 90 min,从 30% B 到 0% B 洗脱 2 min,然后整个系统用 100% A 平衡 25 min。接下来的 12 个分离循环都为 250 min,其设置如下:先用 X%(以流动相 C 比例计)的混合流动相(由流动相 A 和 C 混合所得)冲洗 5 min,100% A 平衡 10 min,然后由流动相 A 和 B 组成的 RP 分离梯度进行分离,其梯度程序为:从 0% B 到 8% B 洗脱 5 min,从 8% B 到 30% B 洗脱 205 min,从 30% B 到 0% B 洗脱 5 min,然后整个系统用 100% A 平衡 20 min;其中 5 分钟的 X% 设置为:循环 2 5%;循环 3 10%;循环 4 15%;循环 5 20%;循环 6 25%;循环 7 30%;循环 8 35%;循环 9 40%;循环 10 45%;循环 11 50%;循环 12 60%;循环 13 80%。最后一个分离循环设置为:100% C 冲洗 10 min,100% A 平衡 10 min,然后由流动相 A 和 B 组成的 RP 分离梯度进行分离,其梯度程序为:从 0% B 到 8% B 洗脱 5 min,从 8% B 到 30% B 洗脱 205 min,从 30% B 到 80% B 洗脱 10 min,保持 80% B 冲洗 10 min,然后整个系统用 100% A 平衡 25 min<sup>[14,25]</sup>。

图 2 是 20  $\mu\text{g}$  软骨提取蛋白的胰蛋白酶酶解物经 14 个盐梯度分级后反相色谱梯度分离的质谱检测基峰图。

### 1.5 质谱检测条件及数据库搜索

LTQ 质谱在正离子模式下操作,离子传输毛细管的温度为 200 °C,喷雾电压为 1.8 kV,归一化碰撞能量为 35%。所有一级谱(MS)和二级谱(MS/MS)在 Data Dependent Analysis(DDA)模式下操作。一个一级谱扫描后对其中强度最高的 6 个峰进行二级质谱分析。系统的操作和数据的采集都使用 Xcalibur 软件(v1.4,热电公司)完成。

所收集的 MS/MS 谱图通过 SEQUEST 程序(BioWorks 3.2,热电公司)进行数据库检索。为了评价检索结果的假阳性率,将人 IPI(International

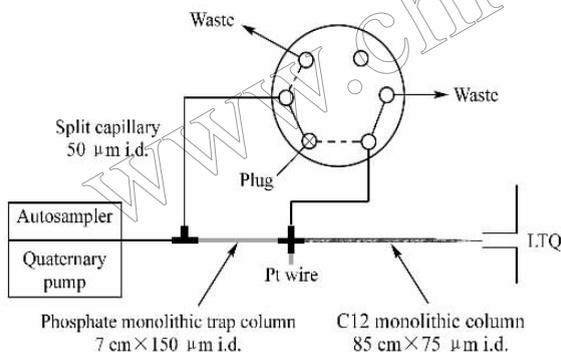


图 1 整体柱在线二维分离系统示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the online multidimensional separation system using monolithic capillary columns

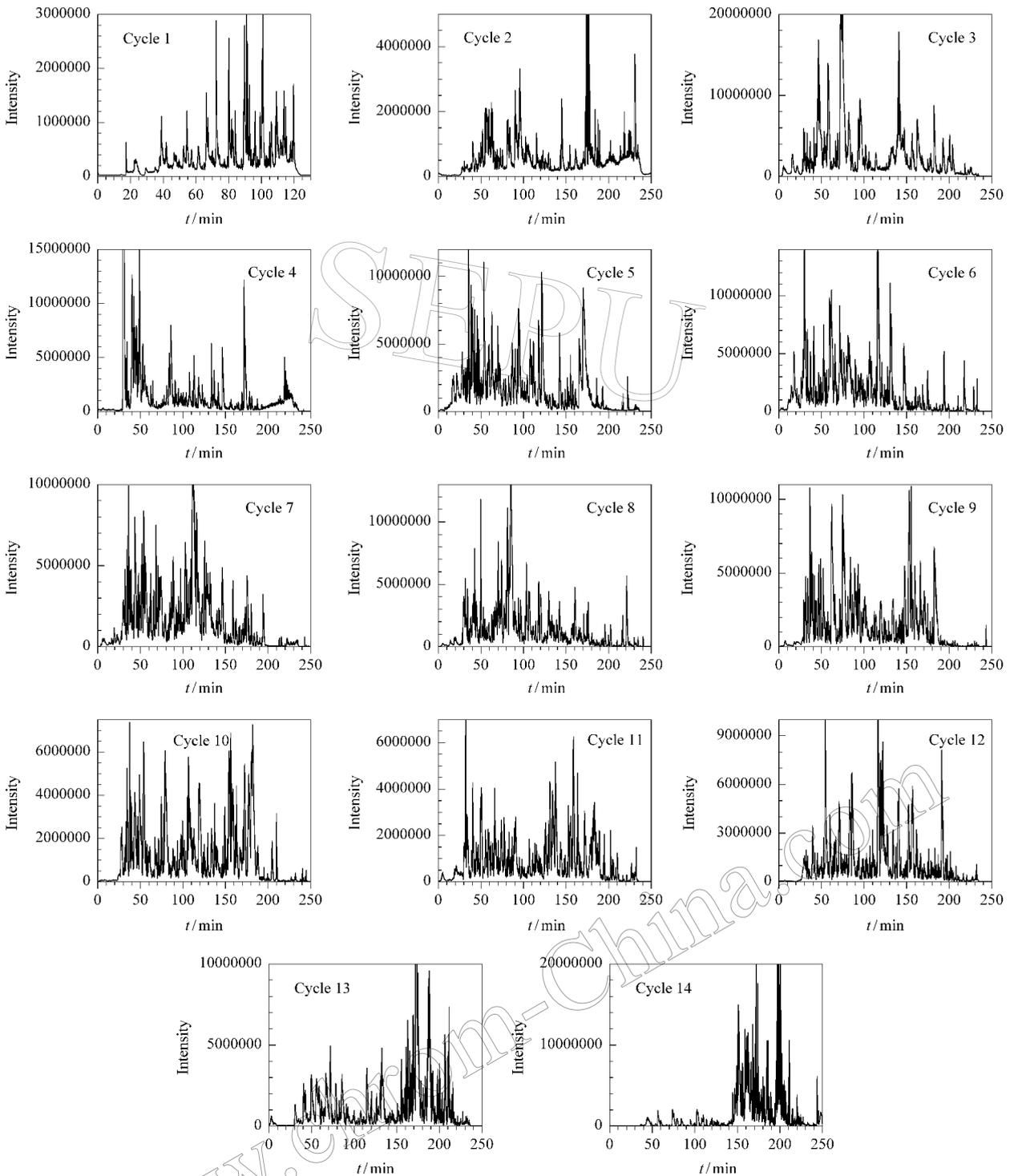


图 2 20  $\mu\text{g}$  软骨提取蛋白质的胰蛋白酶酶解物 14 个循环在线二维色谱分离的纳升电喷雾质谱检测基峰图

**Fig. 2 Base peak chromatograms of a 14-cycle online two-dimensional analysis of 20  $\mu\text{g}$  cartilage proteins tryptic digest**

Conditions: The three buffer solutions used for the chromatography were 0.1% formic acid aqueous solution (buffer A), 0.1% formic acid acetonitrile solution (buffer B), and 1 mol/L ammonium acetate at pH 3 (buffer C). Cycle 1 consisted of a 2-min gradient from 0 to 8% buffer B, a 90-min gradient from 8% to 30% buffer B, and after a 2-min gradient from 30% to 0 buffer B, the system was equilibrated with 100% buffer A for 25 min. Each of the next 12 cycles was 250 min with the following procedures: 5 min of X% buffer C in the mixture of buffer A and buffer C, 10 min of 100% buffer A, then the separation gradient was set from 0 to 8% buffer B for 5 min, from 8% to 30% buffer B for 205 min, and after a 5-min gradient from 30% to 0 buffer B, the system was equilibrated with 100% buffer A for 20 min. The 5-min buffer C in cycle 2–13 was as follows: cycle 2, 5%; cycle 3, 10%; cycle 4, 15%; cycle 5, 20%; cycle 6, 25%; cycle 7, 30%; cycle 8, 35%; cycle 9, 40%; cycle 10, 45%; cycle 11, 50%; cycle 12, 60%; cycle 13, 80%. Cycle 14 consisted of a 10-min 100% buffer C wash followed by a 10-min 100% buffer A wash, and the separation gradient was set from 0 to 8% buffer B for 5 min, from 8% to 30% buffer B for 205 min, from 30% to 80% buffer B for 10 min, and after the a 10-min holding at 80% buffer B, the system was equilibrated with 100% buffer A for 25 min.

Protein Index)蛋白质数据库(v3.17)(包含60236个蛋白质条目)的反库与正库合并。半胱氨酸残基在数据库搜索过程中带有57.0215 Da的固定修饰;甲硫氨酸残基在数据库搜索过程中带有15.9949 Da的可变修饰。肽段在数据库搜索中应用两端完全酶解限制,允许2个漏切位点。对母离子的质量偏差允许为2 Da,对碎片离子的质量偏差允许为1 Da。 $X_{corr}$ 函数值设定为对于单电荷肽段大于1.9,双电荷肽段大于2.2,三电荷肽段大于3.75。 $\Delta C_n$ 值设置为0.3,保证鉴定的FPR小于1%。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱分离与蛋白质鉴定效果

从图2中可以看出富集于SCX整体柱上的肽段被充分地分级为14个馏分,每个馏分肽段的基峰强度都是较为一致的,证明了在线二维色谱分离的有效性。另外也可以看到,当用1 mol/L的醋酸铵冲洗时(图2循环14)所得到的峰的数目明显比其他组分少,说明富集到SCX整体柱上的肽段已经基本上被完全洗脱下来了。将所收集到的串联质谱数据用SEQUEST按照实验部分所述的方法进行数据库检索,最后鉴定得到了7434个独立肽段和1901个非冗余蛋白质(蛋白质簇,每一个蛋白质簇中包含的多个可能蛋白质只记为一个鉴定到的非冗余蛋白质)。其中,由两段或两段以上肽段所鉴定到的蛋白质有1112个,占鉴定蛋白质总数的58.5%。该数目远远多于以往文献所报道的已鉴定得到的软骨蛋白质数目,充分证明了该在线二维分离系统在大规模蛋白质组学鉴定中的优势。为了证明该在线二维分离串联质谱检测系统的重现性,相同的实验又重复进行了一次。在相同的数据筛选条件下,成功鉴定到了7487个独立肽段和2014个非冗余蛋白质(蛋白质簇)。由两段或两段以上肽段所鉴定到的蛋白质有1129个,占鉴定蛋白质总数的56.1%。在两次实验中都得到鉴定的独立肽段和非冗余蛋白质的数目分别为5229和1458个,占到了实验鉴定总数的70.3%和76.7%。

图3是14个盐梯度上新鉴定到的独立肽段和非冗余蛋白质数目的分布情况,从中可以看出实验中鉴定到的肽段和蛋白质充分对称地分布于14个盐梯度上。最后一个1 mol/L的盐梯度上鉴定到的蛋白质和肽段数目都明显变少,再次证明了富集到的肽段已经基本上洗脱完全了。14个盐梯度上肽段和蛋白质的分布结果与图2中所得到的基峰图的分布结果是一致的,也说明了该在线二维分离的有

效性,SCX整体柱与RP整体柱良好的正交性对肽段和蛋白质的鉴定有很大的帮助。

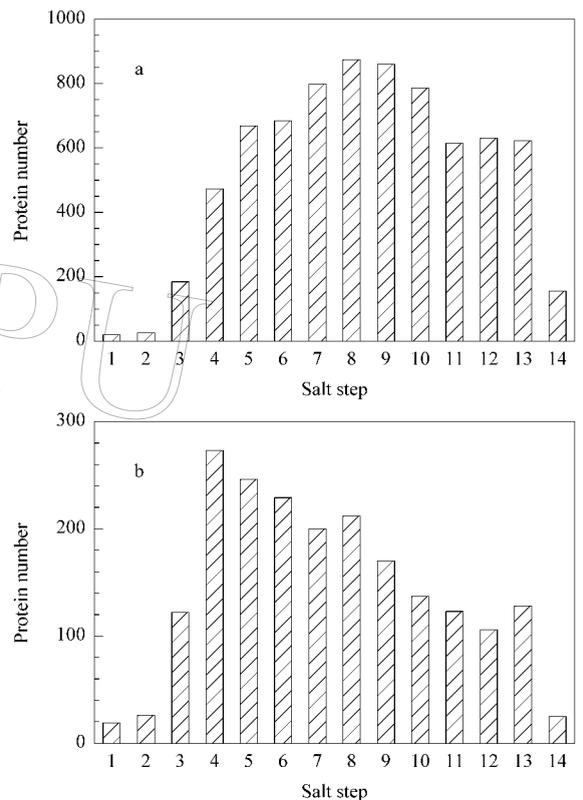


图3 经14个盐梯度在线二维分离新鉴定到的(a)肽段和(b)蛋白质的分布图

Fig. 3 Distribution of the newly identified (a) unique peptides and (b) distinct proteins by the 14 salt steps in online two-dimensional separation

第一维分离与第二维分离的正交性是决定二维分离能力的关键因素。在以往的研究中,SCX与RP的填充柱被广泛地应用于离线和在线多维分离中,取得了很好的结果<sup>[5-10]</sup>。在本工作中,我们应用了7 cm长的SCX整体柱,提高了分级的分辨率<sup>[27]</sup>。基峰图和鉴定到的肽段和蛋白质在14个盐梯度上的对称分布都很好地说明了这一点。另外,由于整体柱良好的渗透性,在反相梯度分离中应用了85 cm长的C12有机整体柱,保证了第二维的分离能力,这也是该系统能很好地分离肽段、鉴定得到1901个软骨蛋白质的原因之一。

### 2.2 蛋白质分类分析

软骨组织存在着大量的细胞外介质,其中主要是胶原蛋白和蛋白聚糖,它们是提取出来的蛋白质中的主要成分。大量的高丰度蛋白质极大地阻碍了广泛存在的低丰度蛋白质的鉴定,这也是软骨蛋白鉴定的难点所在。在本工作中,我们通过整体柱和在线二维分离的应用极大地提高了系统的分离能力,从而成功地鉴定到了1901个软骨蛋白质。采

用蛋白质分类软件 Gene Ontology (GO) 对所鉴定到的蛋白质按其来源进行分类,结果见表 1。可以看出,丰度排名前 30 位的高丰度蛋白质来自于细胞外基质的有 16 种而只有 9 种来自软骨细胞内,说明细胞外基质中的高丰度蛋白质在样品中是大量存在的,但对所鉴定得到的所有软骨蛋白来说,有 938 种蛋白质来自于软骨细胞内部,只有 68 种来自于细胞外基质。该表充分说明了虽然高丰度的蛋白质大量存在,但是由于该二维系统的分离能力,软骨细胞内部的低丰度蛋白质也得到了充分的鉴定,这对于研究许多软骨疾病如关节炎等都是非常有帮助的<sup>[22-24]</sup>。

表 1 蛋白质在软骨组织中的来源分类表

Table 1 Categorization of the identified cartilage proteins based on cellular component

Cellular component	a	b
Cell	9	938
Extracellular matrix	16	68
Extracellular region	17	130
Organelle	4	663
Protein complex	4	271

a. GO categorization of the 30 most abundant proteins based on cellular components. b. GO categorization of all the identified proteins based on cellular components.

### 3 结论

本文将 7 cm 长的 SCX 整体柱和 85 cm 长的 RP 整体柱所构建的在线自动二维分离平台应用于软骨蛋白质组分析。20  $\mu$ g 软骨提取蛋白质的胰蛋白酶酶解产物经  $\mu$ LC-MS/MS 分离鉴定分析,最后成功地鉴定得到了 7 434 个独立肽段和 1 901 个非冗余蛋白质。据我们的文献调研,这是迄今有关软骨蛋白质组学大规模鉴定的最好结果。根据生物信息学的分析,大部分鉴定到的蛋白质都是来自于软骨细胞内部的低丰度蛋白质,这对于许多关节类疾病的研究有重要意义。

### 参考文献:

[ 1 ] Aebersold R, Mann M. *Nature*, 2003, 422 : 198  
 [ 2 ] Peng J M, Schwartz D, Elias J E, et al. *Nat Biotechnol*, 2003, 21 : 921

[ 3 ] Beausoleil S A, Villén J, Gerber S A, et al. *Nat Biotechnol*, 2006, 24 : 1285  
 [ 4 ] Ye M L, Jiang X G, Feng S, et al. *Trends Anal Chem*, 2007, 26 : 80  
 [ 5 ] Link A J. *Trends Biotechnol*, 2002, 20( 12, Suppl ) : S8  
 [ 6 ] Vollmer M, Hörth P, Nägele E. *Anal Chem*, 2004, 76 : 5180  
 [ 7 ] Jin W H, Dai J, Li S J, et al. *J Proteome Res*, 2005, 4 : 613  
 [ 8 ] Peng J, Elias J E, Thoreen C C, et al. *J Proteome Res*, 2003, 2 : 43  
 [ 9 ] Jiang X G, Feng S, Tian R J, et al. *Proteomics*, 2007, 7 : 528  
 [ 10 ] Wagner K, Miliotis T, Marko-Varga G, et al. *Anal Chem*, 2002, 74 : 809  
 [ 11 ] Link A J, Eng J, Schieltz D M, et al. *Nat Biotechnol*, 1999, 17 : 676  
 [ 12 ] Wolters D A, Washburn M P, Yates J R III. *Anal Chem*, 2001, 73 : 5683  
 [ 13 ] Washburn M P, Wolters D, Yates J R III. *Nat Biotechnol*, 2001, 19 : 242  
 [ 14 ] Wang F J, Dong J, Ye M L, et al. *J Proteome Res*, 2008, 7 : 306  
 [ 15 ] Xie C H, Ye M L, Jiang X G, et al. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5 : 454  
 [ 16 ] Wu R A, Hu L H, Wang F J, et al. *J Chromatogr A*, 2008, 1184 : 369  
 [ 17 ] Yue G H, Luo Q Z, Zhang J, et al. *Anal Chem*, 2007, 79 : 938  
 [ 18 ] Luo Q Z, Yue G H, Valaskovic G A, et al. *Anal Chem*, 2007, 79 : 6174  
 [ 19 ] Wei F, Lin B, Feng Y Q. *Chinese Journal of Chromatography* (魏芳, 林博, 冯钰琦. 色谱), 2007, 25( 2 ) : 150  
 [ 20 ] Xie J X, Bi K S, Qian X H, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (谢晶鑫, 毕开顺, 钱小红, 等. 色谱), 2009, 27( 2 ) : 186  
 [ 21 ] Gu C Y, Lin L, Fang N H, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (谷从影, 蔺丽, 方能虎, 等. 色谱), 2007, 25( 2 ) : 174  
 [ 22 ] Lammi M J, Häyrynen J, Mahonen A. *Electrophoresis*, 2006, 27 : 2687  
 [ 23 ] Vincourt J B, Lionneton F, Kratassiouk G, et al. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5 : 1984  
 [ 24 ] Garcia B A, Platt M D, Born T L, et al. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20 : 2999  
 [ 25 ] Wang F J, Dong J, Jiang X G, et al. *Anal Chem*, 2007, 79 : 6599  
 [ 26 ] Wang F J, Dong J, Ye M L, et al. *J Chromatogr A*, 2009, 1216 : 3887  
 [ 27 ] Gu B H, Chen Z Y, Thulin C D, et al. *Anal Chem*, 2006, 78 : 3509