

强阳离子交换色谱分离多肽混合物的条件优化

王璐¹, 周兰兰¹, 钱小红², 张养军^{2*}

(1. 安徽医科大学, 安徽 合肥 230032; 2. 蛋白质组学国家重点实验室, 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京蛋白质组研究中心, 北京 102206)

摘要:以酵母全蛋白提取液的胰蛋白酶切产物为研究对象,对多维色谱分离中常用的强阳离子交换色谱的分离条件,包括上样量、盐的种类、调节缓冲液 pH 值的酸的种类及有机溶剂的比例进行了考察和比较。结果表明,在强阳离子交换色谱分离线性上样量范围内,在氯化铵溶液作为流动相,用磷酸调节流动相缓冲液 pH 值至 2.7,且流动相中乙腈的体积分数为 30% 条件下进行梯度洗脱时,可获得最佳的分离结果。本结果可为采用二维色谱-质谱策略分析多肽混合物时的第一维强阳离子交换色谱分离条件的选择提供有益的参考。

关键词:强阳离子交换色谱;蛋白质组学;多肽分离

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2010)04-0368-06

Optimization of conditions for the separation of peptide mixtures using strong cation exchange chromatography

WANG Lu¹, ZHOU Lanlan¹, QIAN Xiaohong², ZHANG Yangjun^{2*}

(1. Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 2. State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing Proteome Research Center, Beijing 102206, China)

Abstract: The separation conditions for strong cation exchange chromatography were investigated and compared using tryptic digest of protein extract from yeast. The conditions included the loading amount of the sample, the type of the salt in mobile phase, the type of the acid used to adjust the pH of the mobile phase and the proportion of organic solvent added in the elution solution. The experimental results indicated that high separation efficiency can be obtained by using ammonium chloride solution as optimal mobile phase, phosphoric acid to adjust the pH of mobile phases and 30% (v/v) organic solvent in mobile phases. The results suggested that a beneficial reference was presented for the selection of separation conditions of strong cation exchange chromatography when applying in two-dimensional chromatography-mass spectrometry strategy in proteomic research.

Key words: strong cation exchange chromatography; proteomics; peptide separation

作为二维凝胶电泳分离技术的重要补充,多维色谱分离技术已经在蛋白质组学研究中获得了广泛的应用,特别是采用“从下向上(bottom up)”技术对蛋白质组进行分离分析时,多维色谱技术更加受到重视^[1-4]。作为蛋白质组学核心技术之一的生物质谱,虽然其具有很高的分辨率,但将其直接用于动态范围宽、组成极其复杂的生物样品分析时,也很难获得更多肽段的信息,难以发挥其重要作用,所以分

离度问题是我们面临的巨大挑战,也对分离技术及分离策略提出了更高的要求。目前,针对复杂生物样本,主要采用的是多维分离分析系统,例如应用最为广泛的方法之一的多维蛋白质鉴定技术(Mud-PIT)^[5],即采用强阳离子交换色谱和反相液相色谱两种分离原理正交的分离方法构成多维分离,结合串联质谱组成一种多维分离鉴定技术。这两种分离方法既可以在线方式,也可以离线方式进行组

* 通讯联系人:张养军,研究员,研究方向为分离分析方法在蛋白质组学相关研究中的应用。E-mail: zhangyangjun6314@yahoo.com.cn.

基金项目:国家重点基础研究规划项目(2006CB910803, 2007CB914104)、国家自然科学基金项目(30621063, 20635010, 20735005, 20875101)和蛋白质组学国家重点实验室项目(SKLP-K200807, SKLP-O200808)。

收稿日期:2009-10-12

合应用于蛋白质组学研究中。两种组合各有利弊,相对于在线二维来说,离线分离方式更加灵活,两个维度的分离方法可以进行独立的条件优化,更适合于极端复杂及大量样品的分离分析^[6]。

鉴于二维液相色谱在分离复杂多肽混合物中的优越性,国际上一些著名实验室,如 Gygi^[7]、Yates^[8]、Mann^[9]和 Smith^[10]等实验室都在使用这种鉴定策略,只是在实验条件上进行了不同程度的改进和优化。在采用二维液相色谱结合生物质谱对复杂生物样品进行分离分析过程中,反相液相色谱的分离条件比较成熟和确定,但强阳离子交换色谱的分离条件依然有多种选择,以洗脱时选择的流动相为例,虽然大多数实验室采用的都是利用盐梯度洗脱方法,但在盐的种类及浓度选择方面却各不相

同。有些实验室使用醋酸铵,有些实验室选择氯化钾,还有研究者选择氯化铵或甲酸铵。除此之外,在缓冲液的选择方面,各实验室也不尽相同。一些常用的离子交换色谱分离条件总结于表 1 中。从表 1 可看出,我们关注的流动相的组成存在显著性差异,哪种组合更适合复杂多肽样品的分离,目前还没有对此进行过比较及优化。

本文旨在对二维色谱分离中经常选择的强阳离子交换色谱分离条件,诸如上样量、盐的种类、调节缓冲液 pH 值的酸的种类以及有机溶剂的比例对色谱行为的影响进行考察和优化,期望为研究人员采用二维色谱分离复杂多肽混合物,并以强阳离子交换色谱作为一维色谱时的最佳分离条件选择提供参考。

表 1 不同强阳离子交换色谱分离条件

Table 1 Conditions for different strong cation exchange chromatographies

Column	Detection mode	Combination mode of 2-dimension	Salt	Buffer solution	Organic phase	Ref.
20 cm × 2.1 mm, 5 μm (polysulfoethyl A, 30 nm)	UV (214 nm)	off-line	KCl	PBS	acetonitrile (25%)	[7]
4 cm × 100 μm, 5 μm (Partisphere SCX)	MS	on-line	NH ₄ AC	0.02% HFBA	acetonitrile (5%)	[8]
20 cm × 3.0 mm (1 mL Resource S)	UV	off-line	KCl	KH ₂ PO ₄	acetonitrile (30%)	[9]
200 mm × 4.6 mm, 5 μm (polysulfoethyl A, 30 nm)	UV (280 nm)	off-line	HCOONH ₄	HCOOH	acetonitrile (25%)	[10]
150 mm × 4.6 mm, 5 μm (Hypersil SCX, 30 nm)	UV (214 nm)	off-line	NH ₄ Cl	NH ₄ H ₂ PO ₄	acetonitrile (40%)	[11]
150 mm × 1.0 mm, 5 μm (Zarbax, 30 nm)	MS	on-line	NH ₄ AC	0.1% TFA	acetonitrile (2%)	[12]

PBS: phosphate buffer containing NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄; HFBA: heptafluorobutyric acid; TFA: trifluoroacetic acid.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

P230 型高效液相色谱仪由高压恒流双泵及紫外检测器组成(大连依利特分析仪器有限公司),并连接一台自动馏分收集器;恒温水浴箱(北京精科华瑞仪器有限公司);超声清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);GL-88B 涡旋混合仪(其林贝尔仪器制造有限公司);DNA 混合器(宁波新芝科器研究所)。

三氟乙酸(TFA,纯度为 99%)、甲醇、乙腈及酵母全蛋白(酿酒酵母,II 型)均购自美国 Sigma 公司;胰蛋白酶(trypsin)、二硫苏糖醇(DTT)均购自美国 Promega 公司;碘乙酰胺(IAA)为比利时 Acros 公司产品;氯化钾、氯化铵、甲酸铵、醋酸铵、磷酸二氢钾均购自北京化学试剂公司;磷酸、甲酸、盐酸均购自北京化工厂;强阳离子交换分析柱(Pro-

teomix SCX-NP5, 150 mm × 4.6 mm, 5 μm, 无孔, Sepax Technologies, Inc.)、强阳离子交换预柱(10 mm × 4.0 mm, Sepax Technologies, Inc.);微量进样针(250 μL, 美国 Hamilton 公司);试验用水为超纯水,由 Milli-Q 纯水系统(美国 Millipore 公司)制备。

裂解液(20 mL)配方:9.5 mol/L 尿素(终浓度);1% DTT(每 100 mL 裂解液中加入 1 g DTT);鸡尾酒 400 μL(每 1 mL 裂解液中加入 20 μL 鸡尾酒)。

1.2 样品制备

酵母全蛋白的提取:每次称取 300 mg 酵母干粉,加入 1 mL 裂解液,涡旋混合后于室温条件下继续混合 15 min,之后进行超声提取及离心。超声仪设置为脉冲工作模式,即工作 1 s,间隔 1 s,总时间为 30 s,循环 8 次。破碎后的酵母细胞继续在室温条件下用 DNA 混合器混合 30 min,使蛋白质充分

溶解,最后在 10 °C 下以 40 000 r/min 离心 1 h,取上清液测定蛋白质浓度后备用。

酵母全蛋白酶切:取适量提取的酵母蛋白于 1.5 mL Eppendorf 管中,加入 DTT(0.1 mol/L)使其终浓度至 10 mmol/L,于 37 °C 水浴加热 4 h,使蛋白质充分溶解变性;按 IAA 与 DTT 的终浓度比例为 5:1 加入 IAA 溶液,暗处放置 1 h,以封闭蛋白质上的巯基和多余的 DTT;因蛋白质提取时使用的是 9.5 mol/L 的尿素,所以在酶切前用 50 mmol/L NH_4HCO_3 溶液使蛋白质中的尿素浓度降至 1 mol/L 以下,再按蛋白质与酶的质量比为 100:1 加入胰蛋白酶,在 37 °C 水浴中孵育 16 h,取出后脱盐,分装后冷冻干燥,于 -80 °C 保存备用。

1.3 实验方法

流动相的配制:流动相 A 为 5 mmol/L 磷酸二氢钾中加入一定比例的乙腈,流动相 B 为 5 mmol/L 磷酸二氢钾中加入一定浓度的盐和一定比例的乙腈,并且先将溶液 pH 值调至 2.7,之后按比例加入乙腈。

在考察色谱线性上样量时,流动相 A 为 5 mmol/L KH_2PO_4 (pH 2.7)+30%(v/v)ACN;流动相 B 为 5 mmol/L KH_2PO_4 (pH 2.7)+1 mol/L KCl+30%(v/v)ACN,两相均用磷酸调节 pH 值。

在考察盐的种类对分离度的影响时,缓冲液为 5 mmol/L KH_2PO_4 ,用磷酸调节其 pH 值,乙腈为 30%(v/v),分别考察氯化钾、氯化铵、醋酸铵和甲酸铵对分离度的影响。氯化钾和氯化铵的浓度均为 1 mol/L,醋酸铵和甲酸铵的浓度均为 0.5 mol/L,因为当乙腈为 30%(v/v)时,醋酸铵和甲酸铵会从溶液中析出,因此适当地降低了这两种盐的浓度。

在考察调节缓冲液 pH 值的酸的种类时,将使用之前筛选出的最合适的盐溶液作为流动相,且缓冲液为 5 mmol/L KH_2PO_4 ,乙腈为 30%(v/v),分别使用盐酸、磷酸、甲酸和三氟乙酸调节缓冲液 pH 值至 2.7。

在考察流动相中乙腈的比例对分离度的影响时,将使用之前筛选出的最合适的盐溶液作为流动相,并采用最合适的酸来调节溶液的 pH 值,考察不同比例(10%、20%、30% 和 40%(体积分数))乙腈对分离度的影响。

样品上样前处理:根据不同的实验,用相应的流动相 A 溶解酵母蛋白的胰蛋白酶酶切物冻干粉末,溶液质量浓度为 5 g/L。之后,用微量进样针进样进行色谱分析。

色谱条件:使用氯化铵和氯化钾洗脱时,洗脱梯

度为 0~60 min,0~20% B;60~70 min,20% B~100% B;70~80 min,100% B;80~85 min,100% B~100% A;85~100 min,100% A。使用醋酸铵和甲酸铵洗脱时,洗脱梯度为 0~60 min,0~40% B;60~70 min,40% B~100% B;70~80 min,100% B;80~85 min,100% B~100% A;85~100 min,100% A。流速 0.7 mL/min,检测波长 214 nm。

2 结果与讨论

2.1 上样量对分离度的影响

由于超载会严重影响色谱的分离度,为了获得高的分离效率并易于对色谱性能进行考察,需将上样量控制在线性色谱范围内。一般测定色谱的线性负载时,常采用标准合成肽段来测定线性色谱的上样量范围,但考虑到强阳离子交换柱的负载量比较大,同时也考虑到在复杂多肽混合物方面的应用,因此选择复杂程度较高的酵母蛋白的胰蛋白酶酶切物为研究对象来测定线性色谱的上样量范围。实验中,选取酵母蛋白的酶切物分离中的一个色谱峰进行观察,如图 1 所示,不同上样量时的分离结果相似,只是色谱峰的峰高不同。当上样量从 100 μg 增加到 1 200 μg 时,上样量 X (μg)与峰高 Y (mV)呈较好的线性关系 $Y=1.6889X$, $r^2=0.9914$ 。当上样量为 1 200 μg 时,虽然可能没有达到最大线性色谱的负载量,但由于色谱分离的最高峰呈现平头,说明检测器已达饱和状态,故在此条件下,以 1 200 μg 为最大线性上样量。另外,考虑到样品的消耗量,我们选择 400 μg 作为以下实验的上样量。

2.2 盐的种类对分离度的影响

在阳离子交换色谱分离中,由于溶质阳离子与构成盐的阳离子存在竞争,且构成盐的离子的紫外吸收背景会影响色谱图的质量,因此,构成盐的阴、阳离子种类和浓度是影响分离结果的重要因素之一。在液相色谱使用梯度分离时,反映分离度的参数是峰容量,所以在以下的讨论中将以峰容量为指标来表征色谱分离度。为了考察盐的种类对分离度的影响,分别考察了经常使用的氯化钾、氯化铵、醋酸铵和甲酸铵的溶液作为流动相进行梯度洗脱时的峰容量,以此来评价这几种盐对分离结果的影响。实验结果显示,氯化铵溶液作为流动相进行梯度洗脱时,色谱峰的峰容量最大,峰容量为 61(见图 2a);氯化钾的洗脱能力次之,峰容量为 33(见图 2b),而使用醋酸铵和甲酸铵作为盐进行梯度洗脱的分离效果不理想,峰容量分别为 16 和 13(见图 2c 和图 2d),主要原因是:甲酸铵和醋酸铵中的羧基在

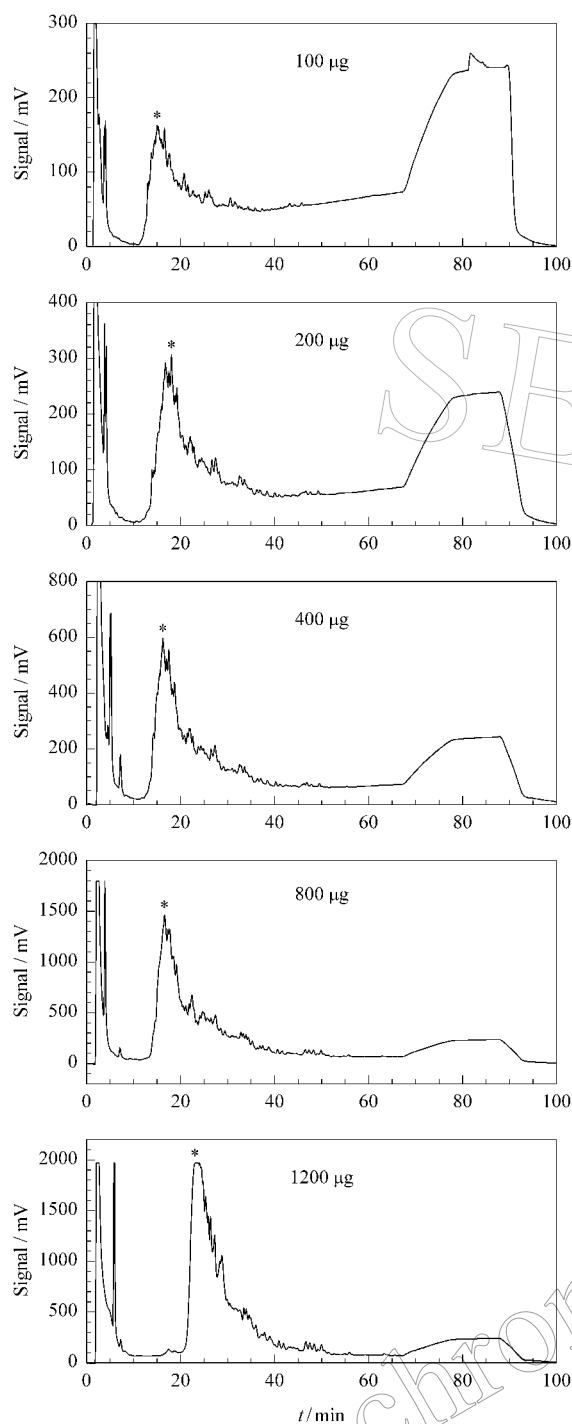


图 1 不同上样量时酵母全蛋白的胰蛋白酶酶切物的强阳离子交换色谱分离图

Fig. 1 Chromatograms of the tryptic digest of protein extract from the yeast by strong cation exchange chromatography with different loading amounts

Chromatographic conditions: flow rate, 0.7 mL/min; detection wavelength, 214 nm; mobile phase A, 5 mmol/L KH_2PO_4 (pH 2.7) + 30% (v/v) ACN; mobile phase B, 5 mmol/L KH_2PO_4 (pH 2.7) + 1 mol/L KCl + 30% (v/v) ACN. Elution gradient, 0–60 min, 0–20% B; 60–70 min, 20% B–100% B; 70–80 min, 100% B; 80–85 min, 100% B–100% A; 85–100 min, 100% A.

* The peaks used for linear correlation research.

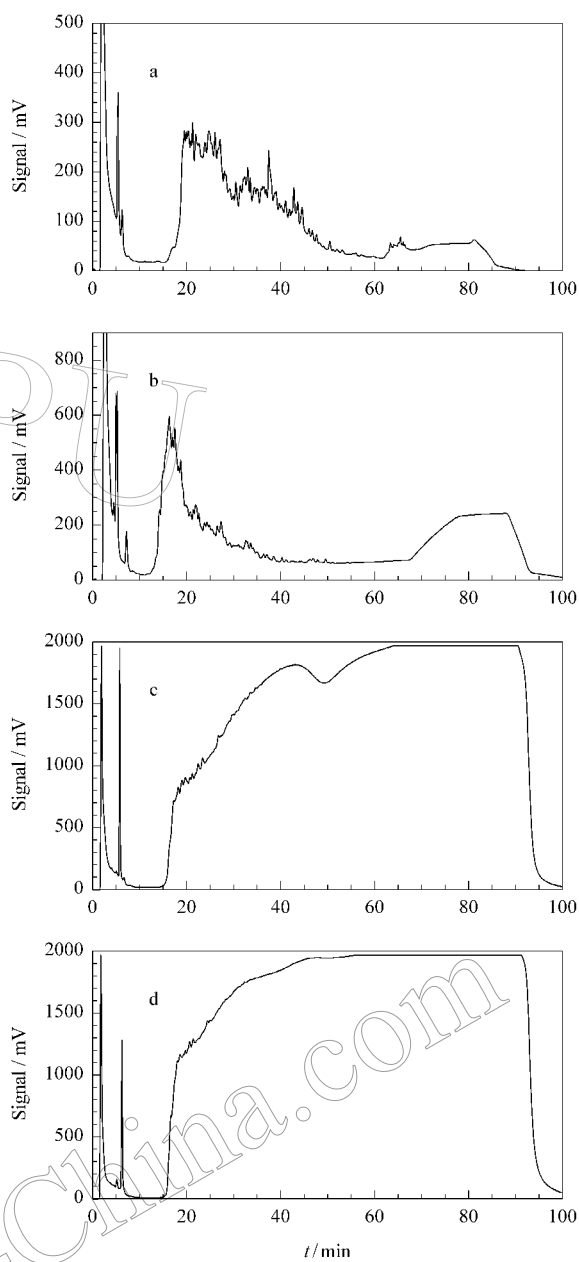


图 2 流动相中使用不同的盐时酵母全蛋白胰蛋白酶酶切物的强阳离子交换色谱图

Fig. 2 Chromatograms of the tryptic digest of protein extract from yeast by strong cation exchange chromatography with different salts in the mobile phases

Mobile phases: a. A, 5 mmol/L KH_2PO_4 (pH 2.7) + 30% (v/v) ACN; B, 5 mmol/L KH_2PO_4 (pH 2.7) + 1 mol/L NH_4Cl + 30% (v/v) ACN. b. A, 5 mmol/L KH_2PO_4 (pH 2.7) + 30% (v/v) ACN; B, 5 mmol/L KH_2PO_4 (pH 2.7) + 1 mol/L KCl + 30% (v/v) ACN. Elution gradient: 0–60 min, 0–20% B; 60–70 min, 20% B–100% B; 70–80 min, 100% B; 80–85 min, 100% B–100% A. c. A, 5 mmol/L KH_2PO_4 (pH 2.7) + 30% (v/v) ACN; B, 5 mmol/L KH_2PO_4 (pH 2.7) + 1 mol/L NH_4AC + 30% (v/v) ACN. d. A, 5 mmol/L KH_2PO_4 (pH 2.7) + 30% (v/v) ACN; B, 5 mmol/L KH_2PO_4 (pH 2.7) + 1 mol/L HCOONH_4 + 30% (v/v) ACN. Elution gradient: 0–60 min, 0–40% B; 60–70 min, 40% B–100% B; 70–80 min, 100% B; 80–85 min, 100% B–100% A; 85–100 min, 100% A.

210 nm 处附近有紫外吸收,而一般分离多肽混合物时选择的检测波长为 214 nm,两个检测波长比较接近,因此随着流动相 B 比例的不断增大,甲酸铵和醋酸铵的浓度也越来越高,其吸收峰越来越强以致于会干扰对肽色谱峰的识别。虽然当这两种盐溶液用于在线二维色谱分离并与质谱联用时不涉及紫外检测,对后续分离分析的结果影响不大,但在离线二维色谱-质谱联用分离分析的过程中,需要将强阳离子交换分离得到的组分进行收集并用于第二维的反相液相色谱分离,此时如果由于这两种盐本身的干扰导致一维分离的色谱峰不易识别,便会影响到分离出来的肽段组分的收集,进而影响到第二维色谱的分离效果,最终会影响到该方法的分析结果。因此,在采用离线二维色谱分析并以 214 nm 作为紫外检测器的检测波长时,不宜选择醋酸铵和甲酸铵溶液作为流动相。另外, Gygi 等采用酵母蛋白的酶切产物为研究对象时,在类似的强阳离子交换色谱分离条件下,以氯化钾溶液为流动相进行分离得到的色谱峰的峰容量是 $36^{[7]}$,比我们采用氯化铵为流动相进行分离时得到的峰容量小。因此,在进行复杂多肽混合物的阳离子交换色谱分离时,氯化铵应作为优先选择的盐类。

2.3 用于调节流动相 pH 值的酸的种类对分离度的影响

采用强阳离子交换色谱对肽混合物进行分离时,首先需要将流动相和肽混合物的 pH 值调至肽段的等电点以下,以便使肽段带正电荷,并与离子交换色谱填料上带负电荷的离子相互作用而保留在色谱柱上。因此,溶液的 pH 值是影响阳离子交换色谱分离的重要因素之一。除此之外,组成酸的阴离子与肽离子以及其他阳离子的作用强弱也会影响离子交换色谱的分离效果,为此,我们分别选用常用的盐酸、磷酸、甲酸和三氟乙酸调节流动相的 pH 值,比较了用这几种酸调节流动相的 pH 的分离效果,流动相均为含 30% (v/v) 乙腈的 1 mol/L 的氯化铵溶液。结果表明,采用磷酸调节流动相 pH 值时,强阳离子交换色谱分离酵母蛋白的胰蛋白酶酶切物的峰容量最多,峰容量为 61 (如图 2a); 使用盐酸时的分离效果与使用磷酸的分离结果无显著差异,峰容量为 55; 使用甲酸调节流动相 pH 值时,峰容量为 35; 用三氟乙酸调节流动相 pH 值时,在同等条件下峰容量最少,峰容量为 22,其原因是三氟乙酸是常用的离子对试剂,易于与离子状态的肽段结合形成中性化合物,这样一方面与离子交换树脂电荷基团结合的肽离子数目减少了,另一方面形成的中性化

合物还可能部分与色谱填料的疏水性部位结合,从而在梯度盐洗脱时,分离得到的肽色谱峰数目减少。因此,在采用强阳离子交换色谱进行多肽混合物分离时,为了更好的分离效果,宜选择磷酸调节缓冲液的 pH 值,而应避免使用三氟乙酸。

2.4 有机溶剂的比例对分离度的影响

对于强阳离子交换色谱而言,肽段在色谱柱上的保留依赖于其与填料上阴离子基团的静电相互作用,但大多数离子交换树脂的磺酰聚合物骨架又具有一定的疏水性,使得其与肽段会产生一定疏水相互作用而影响静电相互作用^[13]。我们使用的色谱填料为核-壳型色谱填料,其基质为聚苯乙烯-二乙烯基苯,同样具有一定的疏水性。另外,连接修饰基团的间隔臂也有一定的疏水性,因此在流动相中加入一定比例的有机溶剂如乙腈,可以减少肽段与树脂间的疏水相互作用,使肽段在阳离子交换色谱上仅有静电相互作用保留机理,提高其分离度。在在线二维色谱分离过程中,考虑到与第二维反相液相色谱的兼容性,强阳离子交换色谱中乙腈的比例通常控制在 5% (v/v) 以内,但在离线二维色谱分离过程中,由于两个维度的分离可以独立优化,因此在使用强阳离子交换色谱时,适当提高乙腈的比例以减少肽段与离子交换树脂骨架间的疏水相互作用,但流动相中乙腈的比例为多少才能达到最佳分离效果却不得而知,因此,我们在 1 mol/L 氯化铵为流动相的溶液中加入不同比例的乙腈,比较了乙腈比例不同的流动相的分离效果。结果显示,当流动相中乙腈比例为 30% (v/v) 时,分离效果最好 (见图 2a)。乙腈比例小于 30% 或大于 30% 时,分离效果均不理想; 乙腈比例为 10%、20% 和 40% 时的峰容量分别是 12、19 和 16。原因可能是乙腈比例偏低时,一方面是酵母蛋白酶切样品在流动相 A 中不能完全溶解,因此未溶解部分的肽段便被预柱截留而未能进入分析柱; 另一方面,乙腈比例较低时,对肽段与骨架间的疏水相互作用不能得到有效抑制,会导致一部分肽段以疏水相互作用保留于阳离子色谱柱上,使分离机理复杂,分离效果变差。当乙腈比例超过 30% 时,高比例的乙腈可能会使色谱柱填料发生溶胀而改变填料性质,从而在一定程度上影响分离效果。另外,高比例的乙腈会使流动相中的盐析出且不利于后续反相液相色谱的分离。所以在进行强阳离子交换色谱分离时,有机相的比例控制在 30% 左右有利于强阳离子交换色谱分离。但是在采用离线二维色谱对多肽混合物进行分离分析时,强阳离子交换色谱中使用较高比例的乙腈不利于反相液相色

谱中样品在反相色谱柱上的保留,因此,对于强阳离子交换色谱的馏分需要进一步地处理,一般使用氮气吹干、真空离心干燥或采用稀释的方法将乙腈的比例降至 5% 以下,以利于样品在反相色谱柱上的保留。

3 结论

以酵母全蛋白提取液的胰蛋白酶酶切产物为研究对象,对蛋白质组学研究中经常采用的多维色谱分离中的强阳离子交换色谱的分离条件如上样量、盐的种类、调节流动相 pH 值的酸的种类以及有机溶剂的比例等进行了比较。实验结果表明,在色谱线性上样量范围内,使用氯化铵溶液作为流动相,用磷酸调节流动相的 pH 值至 2.7,采用有机相乙腈的比例为 30%,进行梯度洗脱时可获得最佳的分离结果。该结果虽然是在 Sepax 公司提供的强阳离子交换色谱柱的特定条件下得出的,并非在所有 SCX 柱上都通用,但仍具有一定的借鉴作用,为蛋白质组学中采用二维色谱-质谱联用方法分离分析复杂多肽混合物的研究人员选择强阳离子交换色谱作为一维分离的最佳分离条件提供了有益的参考。

参考文献:

- [1] McCormack A L, Schieltz D M, Goode B, et al. *Anal Chem*, 1997, 69(4): 767
- [2] Wolters D A, Washburn M P, Yates J R. *Anal Chem*, 2001, 73(23): 5683
- [3] Washburn M P, Ulaszek R, Deciu C, et al. *Anal Chem*, 2002, 74(7): 1650
- [4] Wang N, Xie C H, Young J B, et al. *Anal Chem*, 2009, 81(3): 1049
- [5] Link A J, Eng J, Schieltz D M, et al. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(7): 676
- [6] Yates J R. *Anal Chem*, 2008, 80(19): 7187
- [7] Peng J M, Elias J E, Thoreen C C, et al. *J Proteome Res*, 2003, 2(1): 43
- [8] Washburn M P, Wolters D, Yates J R. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(3): 242
- [9] Zanivan S, Gnad F, Wickström S A, et al. *J Proteome Res*, 2008, 7(12): 5314
- [10] Qian W J, Jacobs J M, Camp D G, et al. *Proteomics*, 2005, 5(2): 572
- [11] Sui S H, Wang J L, Lu Z, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (隋少卉, 王京兰, 卢庄, 等. 色谱), 2008, 26(2): 195
- [12] Gao M X, Deng C H, Yu W J, et al. *Proteomics*, 2008, 8(5): 939
- [13] Motoyama A, Xu T, Ruse C I, et al. *Anal Chem*, 2007, 79(10): 3623

www.chrom-China.com