

反相 C18 固相萃取小柱用于蛋白质组分析中少量样品预处理

王丹琪, 孙伟, 邹丽莉, 王翌

中国医学科学院 北京协和医学院 基础医学研究所 中心实验室, 北京 100005

王丹琪, 孙伟, 邹丽莉, 等. 反相 C18 固相萃取小柱用于蛋白质组分析中少量样品预处理. 生物工程学报, 2015, 31(11): 1643–1650.

Wang DQ, Sun W, Zou LL, et al. Application of reverse phase C18 tip in pretreatment of small amount complex proteomic samples. Chin J Biotech, 2015, 31(11): 1643–1650.

摘 要: 针对少量且复杂蛋白质组样品, 开发一种耗时短、操作简便的分离方法。以人的脑海马组织蛋白样品为研究对象, 采用反相 C18 固相萃取小柱, 采用不同乙腈浓度对酶切后样品进行梯度洗脱, 与反相高效液相色谱法对比分离效果。通过比较不同乙腈梯度洗脱方案所鉴定到的谱图数、非冗余多肽数、蛋白数和各洗脱组分间重复率分析, 确定一种样品量少、简单易行、分离效果好的实验方案。虽然反相 C18 固相萃取小柱法鉴定蛋白总数占高效液相色谱法的 85.5%, 但其操作简单, 耗时少。通过 4 种不同乙腈浓度方案比较, 确定乙腈洗脱浓度优化为 5%、15%、20%和 90%时, 分离 30 μg 人的海马多肽混合物可以得到较优的分离效果。其蛋白鉴定数为反相液相色谱法的 67.0%, 且重复性良好。该结果证实反相 C18 固相萃取小柱分离效果比反相高效液相色谱法稍差, 但此方法可以分离少量复杂蛋白质组样品。该方法分离样品充分, 操作易行, 耗时短, 是进行蛋白质组学分析中少量样品的一个简便预处理方法。

关键词: 反相色谱, C18 固相萃取小柱, 乙腈浓度, 多肽分离, 蛋白鉴定

Received: December 15, 2014; **Accepted:** January 21, 2015

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (Nos. 2013CB530805, 2014CBA02005), Key Basic Research Program of the Ministry of Science and Technology of China (No. 2013FY114100).

Corresponding author: Wei Sun. Tel: +86-10-69156943; Fax: +86-10-69156995; E-mail: sunwei1018@sina.com

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (Nos. 2013CB530805, 2014CBA02005) 中国科技部重点基础研究计划 (No. 2013FY114100) 资助。

网络出版时间: 2015-06-08

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150608.1436.005.html>

Application of reverse phase C18 tip in pretreatment of small amount complex proteomic samples

Danqi Wang, Wei Sun, Lili Zou, and Zhao Wang

Core Facility of Instrument, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

Abstract: To develop a timesaving and easy operating Reverse Phase (RP) chromatography method, we adopted Thermo Pierce® RP C18 Tip to separate small amount hippocampus peptide mixtures and to compare with high performance liquid chromatography (HPLC). According to the separation performance of 4 ACN gradient optimization methods, we determined the best ACN concentration gradient. The results showed that, the experiment took only 10 min by separating with eight ACN concentration gradient, which accounted 1/4 for HPLC. But as for the identified proteins, RP C18 Tip accounted 85.5% for HPLC. ACN gradient of 5%, 15%, 20% and 90% had best repeatability ($P=0.429$) and result for separating 30 μg peptides. This method is easy to operate, timesaving and has low cost. It could be used into pretreatment of small amount complex proteomic samples.

Keywords: reverse phase chromatography, C18 tip, ACN concentration, peptide separation, protein identification

近年来,“自下而上 (Bottom-up)”蛋白质组学研究得到大力发展。在多肽鉴定过程中,高效的色谱分离技术起着关键作用^[1-4]。反相液相色谱,作为一种以疏水作用为基础的色谱分离模式,具有分辨率高、回收率高、与质谱兼容性强等优点^[1]。与传统的强阳或强阴离子色谱柱与反相色谱联用技术相比,离线高 pH 反相色谱分离与在线低 pH 反相色谱分离联用技术可以获得更好的分离效率,得到更高的蛋白质鉴定,目前已成为蛋白质组学研究领域主流的技术方法^[5-6]。虽然这种方法可以得到很好的分离效果,但应用常规色谱分离需要的样品量较大。而目前很多蛋白质组分析的样品的量都很少,如临床病理切片、免疫沉淀等,很难采用这种技术进行分离鉴定。反相 C18 固相萃取是一种常用的质谱前样品处理的方法,可以处理少量的多肽样品,因此本文试图使用 Thermo Pierce® 反相 C18 固相萃取小柱分离少量人的海马多肽混合

物,以达到进行蛋白质组学鉴定的目的。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

二硫苏糖醇 (Dithiothreitol, DTT)、碘乙酰胺 (Iodoacetamide, IAA)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris (hydroxymethyl)aminomethane, Tris)、尿素、硫脲、血管紧张素 II、氨水购自 Sigma 公司;质谱级胰蛋白酶购自 Promega 公司;色谱级乙腈、甲酸、三氟乙酸和碳酸氢氨购自 Merck 公司;氯化钠、盐酸等购自北京化学试剂公司。反相 C18 固相萃取小柱 (载量: 80 μg , 柱层体积: 100 μL , 货号 87783, Thermo Pierce®); 高效液相色谱 (Waters 公司)。

1.2 样品制备

1.2.1 蛋白提取

将 10 个正常人的脑海马组织研磨成浆状,加入蛋白裂解液 (7 mol/L 尿素, 100 mmol/L 硫

脲, 60 mmol/L DTT, 50 mmol/L Tris) 使蛋白充分裂解。提取出的海马蛋白使用考马斯亮蓝法 (Bradford 法) 测量蛋白浓度, 使用酶标仪检测。将 10 个样品等质量混合保存于 -80°C 。

1.2.2 蛋白酶切

取出等质量混合后海马组织蛋白 1 mg 进行膜辅助溶液内酶解^[7], 按照 20 mmol/L 比例加入 DTT 放入 37°C 水浴锅内 1 h 随后按照 50 mmol/L 比例加入 IAA 避光保存 45 min。12 100 r/min 离心 10 min, 取出上清。放入 10 kDa 超滤管内酶解, 其中按照蛋白质量: 胰酶=50:1 的比例加入胰酶, 微波 1 min 后, 37°C 水浴过夜酶解。次日, 使用 Waters C18 萃取柱纯化样品, 随后使用 SPD 管式浓缩器进行干燥处理。多肽样品重溶于 0.1% 甲酸后用 BCA 法测定多肽浓度。

1.3 方法

1.3.1 流动相配制

缓冲液组成为 pH 10.0 的乙腈水溶液。氨水调节缓冲液 pH。预实验乙腈比例 (V/V) 分别设置为: 2%、5%、10%、15%、20%、25%、30% 和 90%。

1.3.2 多肽混合物预分离

50 μL 50% 乙腈 (V/V) 反复吹打反相 C18 固相萃取小柱进行活化除杂。随后加入 50 μL 2% 乙腈 (V/V) 平衡反相 C18 固相萃取小柱。将海马多肽混合物样品溶于 20 μL 2% 乙腈 (V/V) 缓冲液中, 缓慢反复吹打 15 次使多肽充分结合于反相 C18 固相萃取小柱上。20 μL 2% 乙腈 (V/V) 洗脱多肽混合物。之后按乙腈比例依次增大逐一洗脱, 收集各组分。使用 SPD 管式浓缩器进行干燥处理保存于 -80°C 。

1.3.3 LC-MS/MS 分析

将反相 C18 分离所得各组分多肽混合物重溶于 100 μL 0.1% 甲酸溶液中。经过在线反相

C18 毛细管色谱柱 (75 $\mu\text{m}\times 100\text{ mm}$, 3 μm) 分离, 洗脱缓冲液为 5%–30% 梯度 0.1% 甲酸, 99.9% 乙腈 (pH 2.0)。流速为 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。使用 LTQ Orbitrap 质谱仪分析鉴定多肽混合物。仪器参数设置为: 全扫描范围为 300–2 000 amu (1 个微扫描), 之后为 20 个信号依赖二级扫描 (扫描宽度为 3 amu, 35% 标准化能量碰撞, 动态排除 1 min)。

1.3.4 数据分析

所得质谱图经过 Mascot 软件 (版本号 2.3.02) 和 Scaffold 软件 (版本号 4.4.3) 检索, 数据库为 Swissprot 人蛋白质数据库 (www.uniprot.org)。检索参数为: 胰蛋白酶, 1% 误切率, 误切位点为 2, 母离子质量误差为 0.05 Da, 固定修饰为脲甲基化修饰 Carbamidomethy (C), 无可变修饰。

2 结果与分析

2.1 八个乙腈梯度多肽预分离

本实验首先使用反相 C18 固相萃取小柱分离人海马的多肽混合物上样量 100 μg (同时满足离子交换柱负载量)。为了评价不同乙腈浓度对分离效果的影响, 首先设置了 8 个乙腈浓度梯度 (2%、5%、10%、15%、20%、25%、30% 和 90% (V/V)) (pH 10.0)。经过液质联用分析, 各浓度梯度鉴定的谱图数、非冗余性多肽数与蛋白质数如表 1A 所示。8 个乙腈浓度梯度共鉴定谱图 55 530 个, 非冗余多肽 13 988 个, 总蛋白 2 386 个。鉴定谱图及非冗余多肽在 2%–10% 区间递增, 之后随乙腈浓度升高, 鉴定数量随之减少。在蛋白鉴定水平, 各浓度梯度蛋白数量分布较均一, 均值为 1 034 个。

为了验证反相 C18 固相萃取小柱的分离效果, 我们用离线连续乙腈浓度梯度 (5%–30%)

表 1 反相 C18 固相萃取小柱及反相高效液相色谱分离鉴定谱图数、非冗余肽段数及蛋白数

Table 1 Spectrums, unique peptides and proteins identified in reverse phase (RP) C18 Tip and high performance liquid chromatography (HPLC)

Reverse phase (RP) C18 Tip				High performance liquid chromatography			
Fraction	Spectra	Unique peptide	Protein	Fraction	Spectra	Unique peptide	Protein
2%	8 669	5 270	994	1	4 881	2 312	826
5%	9 223	5 357	1 112	2	5 360	2 819	956
10%	9 247	5 255	1 051	3	6 245	2 808	872
15%	8 834	5 068	1 061	4	5 981	2 807	959
20%	7 371	4 551	1 116	5	5 873	2 762	927
25%	6 653	3 938	1 036	6	6 650	3 367	1 080
30%	6 042	3 802	996	7	5 372	2 472	869
90%	5 891	3 673	909	8	5 230	2 461	855
Total	55 530	13 988	2 386	Total	52 942	23 046	2 789

反相高效液相色谱 (pH 10.0) 分离相同样品量的多肽混合物, 所收集组分合并为 8 个样品。经过液质联用分析, 鉴定的谱图数、非冗余性多肽数与蛋白质数如表 1B 所示。8 个样品鉴定谱图数、非冗余多肽数及蛋白数少于反相 C18 固相萃取小柱分离法。但其总体鉴定效果要优于后者 (反相 C18 固相萃取小柱分离法鉴定蛋白总数占液相色谱法的 85.5%), 说明反相液相色谱法对样品的分离效果更好。但固相萃取小柱操作简便, 各梯度分离实验耗时 10 min, 不需特殊仪器即可开展使用。

2.2 梯度优化

为了进一步简化实验流程, 对 8 个乙腈浓度梯度质谱分析结果进行了比较分析, 拟优化 8 个乙腈浓度为 4 个乙腈浓度。预设实验方案如下: 1) 两两组分合并: 2%与 20%, 5%与 25%, 10%与 30%, 15%与 90%; 2) 在保留 90%乙腈浓度的前提下, 根据 8 个乙腈浓度梯度鉴定谱图、非冗余多肽和蛋白数量, 各浓度梯度间多肽重复率比对分析 (表 2), 选取鉴定数量较多、且多肽重复率相对较低的另外 3 种乙腈浓度:

2%、10%、20%、90%; 5%、15%、25%、90%; 5%、15%、20%、90%。各方案鉴定谱图、非冗余多肽及蛋白结果见表 3。

据表 3 可知, 第 1 种实验方案由于间隔组分两两合并, 各组分鉴定谱图、非冗余多肽、蛋白数较为均一。对于其他 3 种实验方案, 乙腈浓度在前 3 个乙腈浓度区间内分离得到谱图, 非冗余多肽与蛋白较多, 乙腈浓度升高到 90% 时三者鉴定数量随之下降。第 4 种实验方案鉴定总谱图数 31 059, 非冗余多肽数 11 918, 较其他 3 种实验方案多。对于鉴定总蛋白数, 第 4 种实验方案最多, 为 1 869 个。与 8 个乙腈

表 2 反相 C18 固相萃取小柱各组分间多肽重复率
Table 2 Peptide repetition rate between each group in RP C18 Tip

Fraction	2%	5%	10%	15%	20%	25%	30%
5%	31.2%						
10%	28.9%	29.1%					
15%	21.6%	17.5%	26.8%				
20%	15.2%	10.0%	14.5%	23.0%			
25%	11.5%	7.2%	9.9%	15.6%	27.0%		
30%	13.1%	9.1%	11.8%	15.6%	23.2%	32.0%	
90%	14.1%	10.0%	12.8%	16.4%	21.7%	26.0%	32.0%

表 3 反相 C18 固相萃取小柱分离优化乙腈浓度 (%) 鉴定谱图数、非冗余肽段数及蛋白数

Table 3 Spectrums, unique peptides and proteins identified in optimized acetonitrile (ACN)% of RP C18 Tip

Fraction	2% 20%	5% 25%	10% 30%	15% 90%	Total
Spectra	9 174	8 876	9 496	9 042	32 508
Unique peptide	5 635	6 070	7 800	7 110	14 805
Protein	965	1 150	1 178	1 182	1 770
Fraction	2%	10%	20%	90%	Total
Spectra	9 480	8 938	8 010	7 783	30 753
Unique peptide	5 323	5 424	5 203	5 465	11 492
Protein	958	1 052	1 156	949	1 758
Fraction	5%	15%	20%	90%	Total
Spectra	8 428	7 942	8 268	5 319	26 126
Unique peptide	4 877	4 800	5 010	3 110	10 206
Protein	952	974	1 088	732	1 674
Fraction	5%	15%	25%	90%	Total
Spectra	9 979	7 894	9 547	6 599	31 059
Unique peptide	5 619	4 735	6 208	4 386	11 918
Protein	1 008	967	1 300	954	1 869

浓度梯度结果作比较分析, 尽管多肽上样量为 8 个乙腈浓度梯度分离法的 30%, 但第 4 种实验方案 (5%、15%、20%、90%) 鉴定总谱图数占 8 个乙腈浓度梯度分离法的 55.9%, 非冗余多肽数占 85.2%, 蛋白数占 78.3%。与反相高效液相色谱法相比较, 第 4 种实验方案鉴定总蛋白数占其 67.0%。

比较 4 种优化方案中多肽在 4 个乙腈浓度梯度中鉴定数量百分比 (在 n 个组分中鉴定的多肽数量/总多肽数量 ($n=1, 2, 3, 4$)) (图 1), 4 种实验方案中仅在一个乙腈浓度梯度中鉴定的多肽百分比分别为 43.6%、56.0%、60.7%、61.7%; 第 4 种实验方案仅在一个乙腈浓度梯度中鉴定的多肽最多, 由此说明此方案设置的 4 个乙腈浓度梯度 (5%、15%、20%和 90%) 将多肽混合

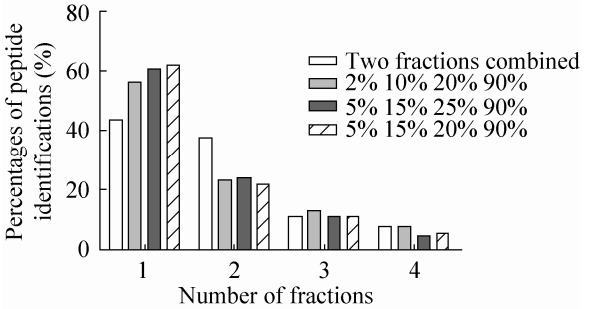


图 1 四种实验方案分离的多肽在 1-4 个组分中鉴定数量百分比

Fig. 1 Pie chart depict percentages of peptide identifications in four experiment approaches associated with one to four fractions.

物充分分离, 分离效果较好。综合鉴定总谱图数, 总非冗余多肽数及总蛋白数, 我们得出使用反相 C18 固相萃取小柱分离多肽混合物, 流动相合适的乙腈稀释浓度为 5%、15%、20%、90%。

2.3 重复性分析

为了进一步验证反相 C18 固相萃取小柱分离梯度 (5%、15%、20%和 90%) 分离效果, 在相同实验条件下作实验技术重复。由图 2A 可知, 两次实验重复性良好。第 2 次实验 4 个乙腈浓度梯度鉴定蛋白数量分别为 995 (5%)、1 045 (15%)、1 143 (20%)、972 (90%)。与第一次实验对应乙腈浓度相比鉴定数量最高相差 12%, 最低仅相差 1.2%。4 个浓度梯度鉴定蛋白总数为 1 820, 较第一次实验鉴定蛋白总数仅减少 2.0%。经过非参数的二项式检验, P 值为 0.429 (>0.05), 无显著性差异。说明此方法重复性良好。图 2B 对两次重复实验相同浓度梯度作蛋白重复率分析, 各浓度梯度蛋白重复率均值约为 60.3% ($>50\%$) 4 个浓度梯度合并后鉴定蛋白重复率为 70.0%, 与以往液质联用分析的重复率相近^[8], 说明本方法重复率较高。

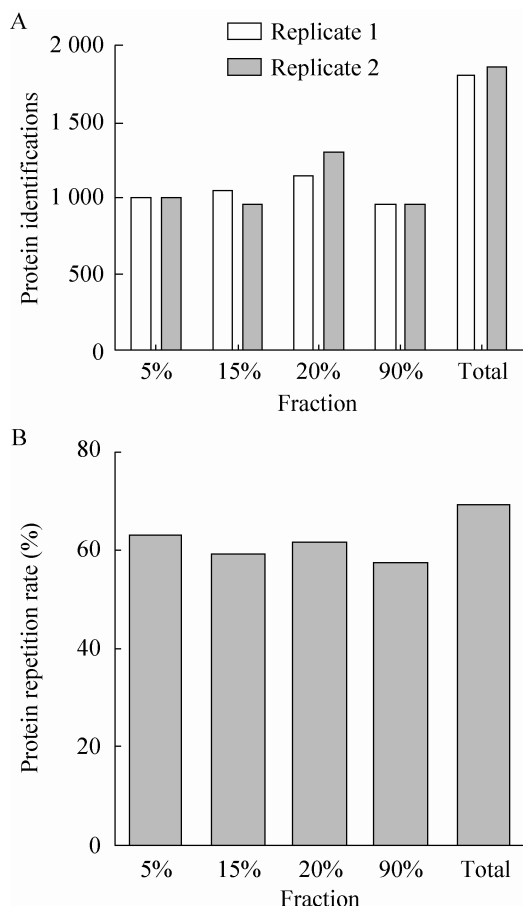


图 2 反相 C18 固相萃取小柱乙腈分离梯度优化后两次重复实验鉴定蛋白数 (A) 及蛋白重复率 (B)

Fig. 2 Histogram distribution of proteins identified (A) and protein repetitive rate (B) in two optimized RP C18 Tip.

3 讨论

选择合适的分离分析方法可充分分离酶切后多肽混合物, 提高蛋白质谱鉴定数量^[5,9-10]。反相色谱分离法依据多肽疏水性的不同进行样品分离, 特别适用于分子量小的蛋白以及多肽混合物的分离和鉴定, 近年来应用较为广泛^[11-15]。此分离方法比较成熟, 反相分离缓冲液使用挥发性体系, 从而大大减少了样本除盐的操作与

样本损失, 并且较易与质谱分析结合^[5,11-12]。研究证实离线高 pH 反相串联在线低 pH 反相色谱分离多肽混合物得到了良好的分离效果, 可取代传统的在线强阳串联反相色谱分离法^[5,13]。但此分离方法所需样品量比较大, 需要高效液相色谱仪, 同时操作技术性强, 耗时长^[13,16-17]。本文建立了反相 C18 固相萃取小柱分离法, 在高 pH 条件下, 选取 8 个乙腈浓度梯度分离人的海马多肽混合物。并将此方法与反相高效液相色谱法作比较分析, 实验结果显示反相高效液相色谱法分离鉴定效果较萃取小柱法好, 鉴定蛋白总数后者占前者 85.5%。但反相 C18 固相萃取小柱分离法耗时短, 简便快捷。

据反相 C18 固相萃取小柱产品介绍, 此小柱可萃取多肽回收率高达 85% 以上, 多肽混合物检测限为 0.5–80 μg 。本实验的目的是开发针对少量复杂多肽混合物的分离方法, 并对流动相乙腈的比例浓度进行方法学优化。通过对预设 4 种优化方案实验结果进行比对分析, 得到了较优的乙腈浓度设置 (5%、15%、20% 和 90% (V/V))。按此梯度设置, 仅在某一个组分中鉴定出的多肽数占总多肽数的 61.70%, 较其他 3 种优化方案有一定优势。所用多肽样品量为 8 个乙腈浓度梯度分离法的 30%, 但鉴定总谱图数高达 8 个浓度梯度分离法的 55.9%, 非冗余多肽数占 85.2%, 蛋白数占 78.3%。与反相高效液相色谱分离法相比, 优化后方案鉴定蛋白数占其 67.0%, 鉴定效果稍差。但此法更快速简单, 蛋白用量少, 适用于少量样品分析。此外, 经过重复实验, 优化后方案重复性良好, 耗时短, 可为后续应用离线反相色谱分离少量且复杂多肽混合物提供可行性参考。

该结果是在 Thermo Pierce 公司提供的反相

C18 固相萃取小柱分离人的海马多肽混合物特定条件下提出的,并非通用于其他反相 C18 分离系统或其他组织样品,但仍具有一定的借鉴作用。此外,多种分离分析方法整合可促进多肽的鉴定,本研究所用离线反相 C18 固相萃取小柱 4 种浓度梯度分离可与强阳或强阴离子交换分离法相结合,使反相液相色谱在蛋白质组学研究领域得到更广泛的应用^[18-19]。

REFERENCES

- [1] Zhou H, Dai J, Sheng QH, et al. A fully automated 2-D LC-MS method utilizing online continuous pH and RP gradients for global proteome analysis. *Electrophoresis*, 2007, 28(23): 4311–4319.
- [2] Dai J, Jin WH, Sheng QH, et al. Protein phosphorylation and expression profiling by Yin-Yang multidimensional liquid chromatography (Yin-yang MDLC) mass spectrometry. *J Proteome Res*, 2007, 6(1): 250–262.
- [3] Zanivan S, Gnad F, Wickström SA, et al. Solid tumor proteome and phosphoproteome analysis by high resolution mass spectrometry. *J Proteome Res*, 2008, 7(12): 5314–5326.
- [4] Qian WJ, Jacobs JM, Camp DG, et al. Comparative proteome analyses of human plasma following in vivo lipopolysaccharide administration using multidimensional separations coupled with tandem mass spectrometry. *Proteomics*, 2005, 5(2): 572–584.
- [5] Wang YX, Yang F, Gritsenko MA, et al. Reversed-phase chromatography with multiple fraction concatenation strategy for proteome profiling of human MCF10A cells. *Proteomics*, 2011, 11(10): 2019–2026.
- [6] Phillips HL, Williamson JC, van Elburg KA, et al. Shotgun proteome analysis utilising mixed mode (reversed phase-anion exchange chromatography) in conjunction with reversed phase liquid chromatography mass spectrometry analysis. *Proteomics*, 2010, 10(16): 2950–2960.
- [7] Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 359–362.
- [8] Slebos RJC, Brock JWC, Winters NF, et al. Evaluation of strong cation exchange versus isoelectric focusing of peptides for multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Proteome Res*, 2008, 7(12): 5286–5294.
- [9] Zhou F, Sikorski TW, Ficarro SB, et al. Online nanoflow reversed phase-strong anion exchange-reversed phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry platform for efficient and in-depth proteome sequence analysis of complex organisms. *Anal Chem*, 2011, 83(18): 6996–7005.
- [10] Wang L, Zhou LL, Qian XH, et al. Optimization of conditions for the separation of peptide mixtures using strong cation exchange chromatography. *Chin J Chromatogr*, 2010, 28(4): 368–373 (in Chinese).
王璐, 周兰兰, 钱小红, 等. 强阳离子交换色谱分离多肽混合物的条件优化. *色谱*, 2010, 28(4): 368–373.
- [11] Nakamura T, Kuromitsu J, Oda Y. Evaluation of comprehensive multidimensional separations using reversed-phase, reversed-phase liquid chromatography/mass spectrometry for shotgun proteomics. *J Proteome Res*, 2008, 7(3): 1007–1011.
- [12] Delmotte N, Lasaosa M, Tholey A, et al. Two-dimensional reversed-phase x ion-pair reversed-phase HPLC: an alternative approach to high-resolution peptide separation for shotgun proteome analysis. *J Proteome Res*, 2007, 6(11): 4363–4373.
- [13] Wang H, Hanash S. Multi-dimensional liquid phase based separations in proteomics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2003, 787(1): 11–18.
- [14] Di Pala S, Hennrich ML, Heck AJ, et al. Recent advances in peptide separation by multidimensional

- liquid chromatography for proteome analysis. *J Proteomics*, 2012, 75(13): 3791–3813.
- [15] Hong GF, Gao MX, Yan GQ, et al. Optimization of two-dimensional high performance liquid chromatographic columns for highly efficient separation of intact proteins. *Chin J Chromatogr*, 2010, 28(2): 158–162 (in Chinese).
洪广峰, 高明霞, 晏国全, 等. 蛋白质高效分离两位色谱柱的选择优化. *色谱*, 2010, 28(2): 158–162.
- [16] Sandra K, Moshir M, Dhondt F, et al. Highly efficient peptide separations in proteomics. Part 2: bi-and multidimensional liquid-based separation techniques. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009, 877(11/12): 1019–1039.
- [17] Donato P, Cacciola F, Sommella E, et al. Online comprehensive RPLC×RPLC with mass spectrometry detection for the analysis of proteome samples. *Anal Chem*, 2011, 83(7): 2485–2491.
- [18] Wiśniewski JR, Zougman A, Mann M. Combination of FASP and StageTip-based fractionation allows in-depth analysis of the hippocampal membrane proteome. *J Proteome Res*, 2009, 8(12): 5674–5678.
- [19] Dai J, Wang LS, Wu YB, et al. Fully automatic separation and identification of phosphopeptides by continuous pH-gradient anion exchange online coupled with reversed-phase liquid chromatography mass spectrometry. *J Proteome Res*, 2009, 8(1): 133–141.

(本文责编 郝丽芳)