

蛋白质分离和鉴定的新技术新方法研究进展

杨开广^{1,2,3}, 张丽华^{1,2,3}, 张玉奎^{1,2,3}

- (1. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023;
2. 中国科学院分离分析化学重点实验室, 辽宁 大连 116023;
3. 国家色谱研究分析中心, 辽宁 大连 116023)

摘要:综述了国家重大科学研究计划“蛋白质分离和鉴定新技术新方法”课题的研究进展:高丰度蛋白质去除方面,采用强阳离子交换色谱(SCX)和反相色谱(RPLC),构建二维液相色谱分离系统;利用分子印迹技术制备高丰度蛋白质印迹聚合物.低丰度蛋白分离富集方面,采用新型功能材料磷酸化蛋白质/多肽、糖基化蛋白质/多肽、蛋白质/多肽实现对低丰度蛋白质的选择性富集.多维、多模式、阵列式的蛋白质高效分离方面,利用循环分离体积排阻色谱(csrSEC)和RPLC的联用构建多维分离系统;构建弱阴弱阳离子混合色谱-固定化酶反应器-RPLC-电喷雾质谱系统.高灵敏鉴定新技术新方法方面,发展液质联用接口技术,以中空纤维膜为根本,设计以此为核心的集成化样品预处理装置;新发展多肽衍生试剂,能够将肽段在质谱的检测灵敏度提高1—2个数量级;在靶体材料方面,采用复合核壳纳米功能靶体材料;在质谱数据处理方法方面,基于遗传算法发展筛选标准优化策略.这些新技术和新方法为蛋白质组研究提供了有效的方法.选择性吸附材料的研制为蛋白质组学研究中高丰度蛋白质去除和低丰度蛋白质富集提供了新的途径,进而避免了复杂体系对目标蛋白质鉴定的干扰.以多维、多模式、阵列式的蛋白质高效分离技术为核心构建的平台,实现了蛋白质组的高效、高通量、高可靠性分离;以液相色谱/质谱联用为核心的高灵敏鉴定的新技术新方法的发展,提高了低丰度蛋白质的质谱鉴定灵敏度和准确度.

关键词:蛋白质组;高丰度蛋白去除;低丰度蛋白富集;色谱分离;质谱鉴定

中图分类号:Q503;O658 **文献标志码:**A **DOI:**10.3969/j.issn.2095-476X.2012.05.001

Recent advances of technique and method on the protein separation and identification in the proteomic studies

YANG Kai-guang^{1,2,3}, ZHANG Li-hua^{1,2,3}, ZHANG Yu-kui^{1,2,3}

- (1. Dalian Inst. of Chem. Physics, Chinese Academy of Sci., Dalian 116023, China;
2. Key Lab. of Separation Sci. for Analytical Chemistry, Dalian 116023, China;
3. National Chromatographic R&A Center, Dalian 116023, China)

Abstract: The new techniques and methods of protein separation and identification in the program "Novel

收稿日期:2012-07-30

基金项目:国家重大科学研究计划项目(2007CB914100)

作者简介:杨开广(1981—),男,山东省淄博市人,中国科学院大连化学物理研究所副研究员,主要研究方向为分子印迹材料、蛋白质富集与分离新材料.

通信作者:张玉奎(1942—),男,河北省保定市人,中国科学院院士,中国科学院大连化学物理研究所研究员,博士生导师,现任973交叉领域专家、蛋白质研究重大科学研究计划专家组成员、中国分析测试协会副理事长、中国化学会色谱专业委员会主任,主要研究方向为蛋白质的分离与检测.

Techniques and Methods for Protein Separation and Identification", supported by "National Basic Research Program of China", were reviewed. For high-abundance proteins depletion, strong cation exchange (SCX) chromatography was coupled with reversed phase liquid chromatography (RPLC) to develop two dimensional liquid chromatography, and high abundance proteins were applied as the templates to developed molecularly imprinted materials. For low abundance protein enrichment selectively, novel functional materials were developed for selectively capturing significant post-translated proteins, such as phosphopeptides/proteins and glycopeptides/proteins. For multidimensional, multi-mode and array protein separation, column switch recycling size exclusion chromatography (csrSEC) was coupled with RPLC to develop multidimensional liquid chromatography, and weak anion and cation exchange chromatography mixed-bed microcolumn were integrated with the immobilized trypsin reactor and RPLC-ESI/MS/MS to develop at high-throughput proteome platform. During the study of high-sensitive identification techniques, an online integrated platform for sample pretreatment, which was based on the hollow fiber membrane interface for solvent exchange, was established. New reagents were developed for the peptide derivatization, which decreased the limit of detection of peptide on the mass spectrum by 10 - 100 times. Core-shell nanoparticles were employed on the plate materials directly for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass (MALDI). A predictive genetic algorithm was implemented for the optimization of filtering criteria to maximize the number of identified peptides for mass spectrum database searching. The new technology and new method for proteomic study provides an effective method. The development of selective adsorption materials provides a new way for high abundance protein depletion and low abundance proteins enrichment of proteomics research, and avoids the interference of the target protein identification in complex system. The platform of multidimensional and mode, array type of protein efficient separation technology as the core is constructed and realized the protein group of high efficiency, high flux, high reliability separation. With the new technology and new method development of high performance liquid chromatography/mass spectrometry as the core of high sensitive identification, the sensitivity and accuracy of low abundance protein mass spectrum identification are improved.

Key words: proteome; high abundance protein depletion; low abundance protein enrichment; chromatography based separation; mass spectrum based identification

0 引言

生命活动的功能执行体是蛋白质,对蛋白质进行深入系统的研究不仅有助于全景式地揭示生命活动的本质,而且有些关键蛋白质也是研究疾病机理和诊治药物等的直接靶体库^[1-2].对蛋白质复杂多样的结构功能、相互作用和动态变化的深入研究,以期在分子、细胞和生物体等多个层次上全面揭示生命现象的本质,是后基因组时代的主要科研任务^[3].同时,蛋白质组学研究成果将催生一系列新的生物技术,带动医药、农业和绿色产业的发展,引领未来生物经济.

生命科学的快速发展得益于技术革新和方法进步.众所周知,人类基因组测序计划的提前完成主要依赖于创新技术支撑平台——96通道毛细管电泳测序技术^[3].在蛋白质组学的研究中,人体内

的蛋白质和蛋白质复合物的数量达数百万种,其表达量具有很宽的动态范围,理化性能也存在很大的差异;高丰度蛋白质因表达量大而易于被分离鉴定,但中低丰度蛋白质由于数量庞大、组成复杂而不易被研究;并且高丰度蛋白质也会掩盖、屏蔽、结合大量的低丰度蛋白质,给具有潜在生物学意义的中低丰度蛋白质的分离鉴定造成极大的困难^[4].本文就国家重大科学研究计划“蛋白质分离和鉴定的新技术新方法”课题的核心——高丰度蛋白质去除和低丰度蛋白质分离富集新技术及多维、多模式、阵列式的蛋白质高效分离和高灵敏度鉴定技术等进行综述.

1 痕量蛋白分析中高丰度蛋白质去除新技术

组织、细胞、体液等复杂生物体系中存在大量

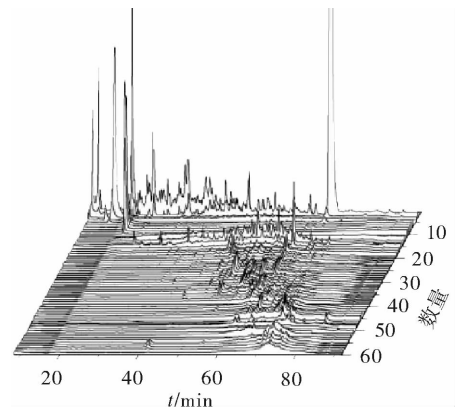
的高丰度蛋白质,它们的存在掩盖了数目众多、且具有重要生物功能的中低丰度蛋白质,使得这些蛋白质的分离鉴定极为困难^[5]. 因此发展通用型高丰度蛋白质的去除技术,对生物样品中大量高丰度蛋白质定点、选择性地去除,是蛋白质分离鉴定急需解决的重要技术难题之一. 在生物学中,传统的高丰度蛋白质去除方法为抗体法,但是该方法存在抗体来源有限、使用和保存条件苛刻、无法重复使用、成本较高等明显缺点^[6]. 最近从色谱联用和人工抗体的角度发展了许多痕量蛋白分析中高丰度蛋白质去除新技术.

在色谱联用方面,以强阳离子交换色谱(SCX)作为第一维分离,反相色谱(RPLC)作为第二维分离,构建二维液相色谱分离系统,通过在第二维分离中选择阵列色谱模式以提高分析效率^[7-8]. 通过对液相色谱柱的种类、上样量、梯度条件以及蛋白质的分辨率和回收率等参数的系统筛选,大幅提升了系统对蛋白质,特别是对中低丰度疏水性蛋白质的分辨率,改善了高丰度蛋白质的拖尾现象,对大量高丰度蛋白质的去除能力得到显著提高. 以正常人肝脏蛋白质组为对象(如图1所示),对人肝脏蛋白质组进行高效的分离,可以一次性去除58种高丰度蛋白质,鉴定到的中低丰度蛋白质数目为未经去除样品的3倍^[8]. 该方法是目前技术方法中一次去除高丰度蛋白质、未知高丰度蛋白质数量最多、成本最低且通用性最强的方法. 同时该方法可针对不同样品的高丰度蛋白质进行精确的色谱定位,并可根据下游实验需要,有针对性地去掉目标蛋白质^[7],因此该方法具有很强的灵活性和实际应用潜力.

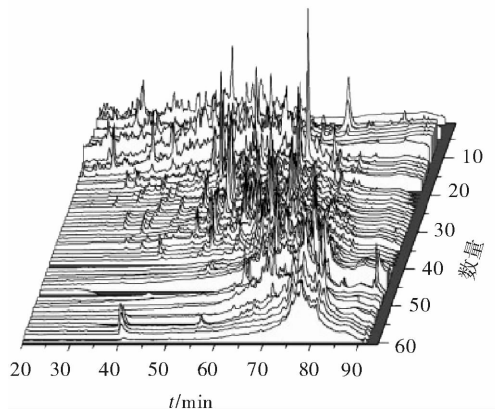
在人工抗体方面,利用分子印迹技术制备高丰度蛋白质印迹聚合物(包括磁性材料、介孔材料、整体材料和温敏材料),并用于高丰度蛋白质去除,可将中低丰度蛋白质的鉴定数量提高20%^[9-11]. 这种通过合成制备的人工抗体,具有操作简单、选择性高、价格低廉(成本低于抗体柱1%),且具有多次重复使用的特点,有望成为广谱性高丰度蛋白质去除材料^[12].

2 复杂生物体系中低丰度蛋白分离富集新技术

生命过程中的功能蛋白、重大疾病的靶标蛋白往往都是低丰度蛋白质,发展高效的低丰度蛋白质富集技术不仅有助于重大疾病的诊断,更为揭示生



a) 人肝脏蛋白质组(62组分)



b) 去除高丰度蛋白后

图1 SCX-RPLC 二维色谱分离图

命活动重要规律提供技术支持. 当前一般采用新型功能材料实现对低丰度蛋白质的选择性富集,针对的对象一般有翻译后修饰蛋白质/多肽或者内源性肽.

在磷酸化蛋白质/多肽选择性富集材料和技术方面,通过溶胶凝胶法制备的二氧化钛气凝胶材料,富集容量达到 $490.7 \text{ m}^2/\text{g}$,是当前商品化二氧化钛微球富集容量的10倍,利用该材料从鼠肝线粒体中鉴定的磷酸化肽段数目是商品化的1.6倍^[13-14]. 最近发展的基于有机-无机杂化硅胶整体柱的新型 Ti^{4+} -固定化金属亲和色谱(IMAC)材料,用于鼠肝线粒体富集组分酶解产物中磷酸化肽的选择性富集,可鉴定到226条磷酸化肽,246个磷酸化位点,148个磷酸化蛋白质簇(protein group)^[15]. 以三磷酸腺苷二钠为配体的固定化金属离子磁性材料,在BSA与 β -Casin在摩尔比为5000:1的情况下,仍然能够富集到 β -Casin酶解产物中的磷酸化肽段;并且利用该材料可以从鼠肝线粒体中鉴定到406条磷酸化肽,538个磷酸化位点

和 313 个磷酸化蛋白质簇^[16]. 磷酸酯锆纳米磁珠材料也是最近发展起来的用于磷酸化肽富集的材料, 与国际上常用的 Fe^{3+} -IMAC 相比, Ti^{4+} -IMAC, Zr^{4+} -IMAC 可以从鼠肝蛋白质中分别多鉴定 4.6 倍和 3.9 倍的磷酸肽^[17].

在糖基化蛋白质/多肽选择性富集材料和技术方面, 通过蒸馏沉淀聚合合法以甲基丙烯酸 (MAA)、乙烯基苯硼酸 (VPBA) 为单体, N'-N-亚甲基双丙烯酰胺为交联剂, 制备了核壳结构的硼酸基质聚合物微球 Poly(MBA-co-MAA)@VPBA. 利用硼亲和策略在糖蛋白/糖肽的捕集中操作简便、不破坏糖链结构且与质谱兼容的特点, 能够富集到辣根过氧化氢酶 (HRP) 中 18 条糖基化肽段, 且检测限可低至 5 nmol^[18]. 为了缩短整个样品预处理时间, 简化操作步骤, 进而提高位点鉴定的灵敏度, 以亲水作用色谱 (HILIC) 为富集手段, 以 SCX 为溶剂交换接口, 串联糖基肽酶固定化酶反应器 (PNGase F-IMER), 构建了 nL 级集成化平台, 实现了糖肽预处理过程中的富集、解离一体化, 使整个糖基化位点鉴定预处理过程在 1 h 内完成, 系统的灵敏度可低至 5 fmol. 实际样品分析中, 上样 6 μ g 鼠脑蛋白酶解产物, 鉴定到 N-连接糖基化位点 195 个, 糖蛋白 121 个^[19].

在蛋白质/多肽普适性富集材料和技术方面, 利用聚醚砜中空纤维膜微透析技术, 实现蛋白质/多肽富集, 使蛋白质的检测灵敏度提高 30 倍以上^[20]; 利用磁性氧化硅介孔材料为富集材料, 用于鼠脑中内源性肽段的富集, 可从鼠脑中鉴定到 60 条不同的内源性肽段^[21]; 利用新型铜离子螯合的功能化磁性介孔材料, 用于内源性肽的富集, 能够将内源性肽段的检测灵敏度提高约 35 倍, 并已经成功用

于富集人血清和尿样样品中 800 ~ 3 500 Da 的内源性肽段^[22].

3 多维、多模式、阵列式的蛋白质高效分离新技术

在多维、多模式、阵列式多维分离系统方面, 采用离子交换色谱作为第一维分离模式, 18 支 (可扩展) RPLC 作为第二维分离模式, 建立了多维阵列式色谱分离系统, 并研制了与之配套的组成 18 通道阵列蛋白质富集预柱, 对馏分进行富集、除盐、转移, 结合蛋白质馏分质谱靶上快速酶解新技术, 可在 5 min 内对分离的数千个蛋白质馏分同时酶解, 并行质谱鉴定分析, 该系统是目前国际上最快的多维色谱分离系统^[23]. H. M. Yuan 等^[24] 利用循环分离体积排阻色谱 (csrSEC) 和 RPLC 的联用构建了多维分离系统 (见图 2), csrSEC 分离可以提高蛋白质的分辨率和分离度, 与 RPLC 的联用相当于三维液相的分离效果, 系统峰容量达到 3 600, 与目前国际上蛋白质分辨率最高的分离技术 2D-PAGE 相当, 同时有效克服了 2D-PAGE 的歧视效应. C. Y. Hou 等^[25] 构建了弱阴弱阳离子混合色谱 - 固定化酶反应器 - RPLC - 电喷雾质谱 (WAX/WCX-IMER-RPLC-ESI/MS/MS) 系统, 实现蛋白质分离与多肽的分离的在线联用. 此方法不仅解决了传统离线方法分析时间长、样品易丢失和污染、重现性差等问题, 还克服了传统鸟枪法技术分辨率不足的缺点, 通过分析细胞提取蛋白质, 采用该方法可鉴定 284 种蛋白, 是传统鸟枪法的 1.3 倍, 同时分析时间也缩短了 20 h, 为蛋白质组分析提供了一种高效、高通量的技术平台. 将具有高度正交性和高分辨率的二维液相色谱 (RP-RP) 与所发展的一种 Ti^{4+} -IMAC 富集磷酸肽的

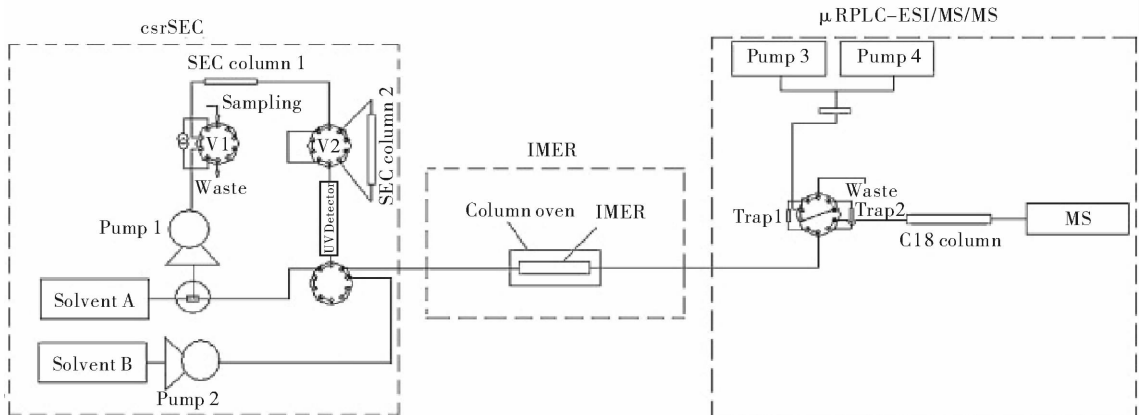


图 2 集成化蛋白质分析平台的搭建

方法相结合,利用高质量精度质谱(Orbitrap)鉴定和自主研发的数据处理平台(Armone)对正常人肝组织中磷酸化位点进行规模化鉴定,在严格控制假阳性率($FDR < 1\%$)的情况下,从40 mg人肝组织蛋白中鉴定了3 149个非冗余磷酸化蛋白,10 681个非冗余磷酸化肽段,9 995个非冗余磷酸化位点,这是目前为止人类肝脏蛋白质组学磷酸化蛋白研究中的最大数据库之一,为该策略应用于磷酸化蛋白质组学规模化的定量分析奠定了基础^[26-28]。

酶的固定化是通过各种方式,如共价、吸附、交联、包埋等,将酶固定在一定的载体上。其目的是为了更加方便地发挥酶的生物催化功能,相比于自由的酶分子,经过固定化的酶分子易于和底物分离;可以重复使用,降低成本;可大大降低酶的自降解,提高酶解的通量;易于实现酶解的自动化,为多维、多模式、阵列式的蛋白质高效分离提供重要单元部件^[29]。在微酶反应器新技术方面,已实现在有机-无机杂合材料制备整体柱基质固载胰蛋白酶,此新型IMER能够在100 s内获得蛋白质在自由溶液中12 h以上的酶解效果^[30]。不同性能的IMER也陆续出现:亲水性基质的IMER有效地降低了蛋白质的残留情况,改善了低丰度蛋白质酶解^[31];可再生型的IMER,可用于不同蛋白酶的固定化,并且可以多次重复使用^[32];基于磁性纳米微球的IMER,不仅可以显著提高了酶固载量和酶活性,还有利于离线操作时的简便操作,更大大加速了反应速度与通量,消除了酶自降解造成的复杂背景,提高低丰度蛋白质的酶解与鉴定的能力,能够高效、简便地实现多维色谱分离后数以千计的蛋白质组分快速靶上酶解。此外,针对磁性纳米微球的IMER,还发展出了多种快速酶解新技术与新方法,包括微波辅助酶解新方法和红外激光(808 nm)辅助酶解,前者15 s完成酶解过程,后者可将酶解时间缩短到5 s,达到溶液中12 h以上的酶解效果,在肝脏蛋白质组初步应用中,该方法在酶解效率方面具有明显优势^[33-35]。

4 液质联用高灵敏鉴定新技术新方法

当前基于质谱的蛋白质组学研究中,任何样品经分离后都需送入质谱进行鉴定才能获得其结构信息。为获得更好的分离效果,通常需要在样品或多维分离系统中添加必要的变性剂、添加剂等,其中有些盐类会严重干扰质谱的检测信号,因此,发展液质联用接口技术、提高质谱的离子化以及发展

新的质谱数据处理方法对蛋白质组学鉴定灵敏度和准确度至关重要。

在液质联用接口方面,以中空纤维膜为根本,设计了以此为核心的集成化样品预处理装置,能够实现样品的在线除盐、调节pH、调节有机相浓度以及蛋白质富集等功能,将盐浓度降低2个数量级,蛋白质检测信号提高10倍以上^[36]。

在细内径色谱柱/质谱联用技术方面,新开发的电喷雾喷针一体化超细内径毛细管整体柱,能使系统的分离峰容量提高12.8%,可靠定量信息的蛋白数目增加130%^[37]。此外,新开发的电喷雾喷针一体化的混合型毛细管色谱柱,鉴定到的蛋白数和肽段数目也比常规一体化柱提高20.1%和21.6%^[38];以磷酸钼键合的开管毛细管柱,对磷酸肽的检测限可达到 10^{-8} M^[39]。

在质谱离子化技术方面,新发展的多肽衍生试剂,能够将肽段在质谱的检测灵敏度提高1—2个数量级^[40];新出现的蛋白质衍生试剂,可将蛋白质的检测限降低到12.8 nM,比直接紫外检测和商品化的苯异硫氰酸酯标记后荧光检测的检测限降低了约100倍和40倍^[41]。

在靶体材料方面,复合核壳纳米功能靶体材料,能够将蛋白质/多肽在MALDI-TOFMS上的检测信号提高1—3个数量级,应用于人类大肠癌蛋白质组研究,发现了8个未报道的低丰度蛋白^[42];制备的硼酸修饰纳米金球靶体,可将糖肽的富集、杂质的洗脱以及质谱鉴定在一个MALDI靶板上完成,蛋白质检测限可达到fmol/ μ L级^[43]。

在质谱数据处理方法方面,基于遗传算法发展了筛选标准优化策略,可以应用于不同的样品数据,并提供优化的筛选标准,进而提高了蛋白质鉴定的灵敏度和准确性^[44];X. N. Jiang等^[45]2008年发展了基于 MS^2/MS^3 匹配的自动磷酸肽鉴定方法,克服了磷酸肽鉴定时为了提高鉴定结果的准确性而采用的手工校正的繁杂性;同年发展了一种利用局部概率计算肽段正确鉴定概率的方法,可以显著地提高肽段的和蛋白质的鉴定数目,从而提高了质谱鉴定的准确性和灵敏度,为进一步的差异性分析和功能注释提供了数据保证^[46]。G. H. Han等^[47]发展了一种基于改进的目标-伪数据库用于数据检索,来高灵敏、可靠地鉴定简单磷酸化蛋白样品的磷酸化位点信息的方法,应用于人体十分重要的磷酸化激酶PKA的磷酸化位点分析,从PKA的4个

亚基中共鉴定到 17 个磷酸化位点,其中 5 个磷酸化位点是从未报道过的. X. N. Jiang 等^[48]2010 年发展了分类筛选磷酸化肽鉴定的新方法,提高了磷酸化肽段鉴定的覆盖率和灵敏度,与 MS²/MS³ 方法相比,使用分类筛选的方法可显著地增加鉴定结果的数目,增幅在 19%~33% 之间.

5 结语

综上所述,蛋白质分离和鉴定的新技术发展为蛋白质组学研究提供了有效的方法. 选择性吸附材料的研制为蛋白质组学研究中高丰度蛋白质去除和低丰度蛋白质富集提供了新的途径,进而避免了复杂体系对目标蛋白质鉴定的干扰;以多维、多模式、阵列式的蛋白质高效分离技术为核心构建的平台,实现了蛋白质组的高效、高通量、高可靠性分离;以液相色谱/质谱联用为核心的高灵敏鉴定的新技术新方法的发展,提高了低丰度蛋白质的质谱鉴定灵敏度和准确度. 尽管如此,当前生物系统的蛋白质组定量仍处于半定量水平,随着蛋白质科学向纵深发展,对蛋白质组学新方法新技术的研究提出了新的要求,蛋白质组定量新方法及相关技术的发展势在必行,它不仅对研究生物样本蛋白质组在不同状态下表达和翻译后修饰的动态变化进行规模化分析有重要意义,而且能够从更高精确度、高覆盖率和高分辨通量的角度发现重要生物功能的蛋白质、筛选与疾病相关的生物标志物以及寻找药物的靶标.

致谢:感谢科技部国家重大科学研究计划项目团队中邹汉法研究员课题组(中科院大连化学物理研究所),何锡文教授课题组(南开大学),杨芄原教授、张祥民教授、陆豪杰教授课题组(复旦大学),邓玉林教授、曲峰教授课题组(北京理工大学).

参考文献:

- [1] Phizicky E, Bastiaens P I H, Zhu H, et al. Protein analysis on a proteomic scale [J]. *Nature*, 2003, 422: 208.
- [2] Cesari F. Proteomics getting the numbers right [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009(10): 577.
- [3] Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics [J]. *Nature*, 2003, 422: 193.
- [4] Issaq H J, Xiao Z, Veenstra T D. Serum and plasma proteomics [J]. *Chem Rev*, 2007, 107: 3601.
- [5] Blow N. Proteins and proteomics: Life on the surface [J]. *Nat Meth*, 2009(6): 389.
- [6] Carter P J. Potent antibody therapeutics by design [J]. *Nat Rev Immunol*, 2006(6): 343.
- [7] Gao M X, Zhang J, Deng C H, et al. Novel strategy of high-abundance protein depletion using multidimensional liquid chromatography [J]. *J Proteome Res*, 2006(5): 2853.
- [8] Gao M X, Deng C H, Yu W J, et al. Large scale depletion of the high-abundance proteins and analysis of middle-and low-abundance proteins in human liver proteome by multidimensional liquid chromatography [J]. *Proteomics*, 2008(8): 939.
- [9] Liu J X, Deng Q L, Yang K G, et al. Macroporous molecularly imprinted monolithic polymer columns for protein recognition by liquid chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2010, 33: 2757.
- [10] Liu J X, Yang K G, Deng Q L, et al. Preparation of a new type of affinity materials combining metal coordination with molecular imprinting [J]. *Chem Commun*, 2011, 47: 3969.
- [11] Yang K G, Zhang L H, Liang Z, et al. Protein-imprinted materials: rational design, application and challenges [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 403: 2173.
- [12] Qin L, He X-W, Zhang W, et al. Surface-modified polystyrene beads as photografting imprinted polymer matrix for chromatographic separation of proteins [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 807.
- [13] Zhang L Y, Liang Z, Yang K G, et al. Mesoporous TiO₂ aerogel for selective enrichment of phosphopeptides in rat liver mitochondria [J]. *Anal Chim Acta*, 2012, 729: 26.
- [14] Zhang L Y, Xu J, Sun L L, et al. Zirconium oxide aerogel for effective enrichment of phosphopeptides with high binding capacity [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 399: 3399.
- [15] Hou C Y, Ma J F, Tao D Y, et al. Organic-inorganic hybrid silica monolith based immobilized titanium ion affinity chromatography column for analysis of mitochondrial phosphoproteome [J]. *J Proteome Res*, 2010(9): 4093.
- [16] Zhang L Y, Zhao Q, Liang Z, et al. Synthesis of adenosine functionalized metal immobilized magnetic nanoparticles for highly selective and sensitive enrichment of phosphopeptides [J]. *Chem Commun*, 2012, 48: 6274.
- [17] Zhao L A, Wu R A, Han G H, et al. The highly selective capture of phosphopeptides by zirconium phosphonate-modified magnetic nanoparticles for phosphoproteome analysis [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2008, 19: 1176.
- [18] Qu Y, Liu J, Yang K, et al. Boronic acid functionalized core-shell polymer nanoparticles prepared by distillation precipitation polymerization for glycopeptide enrichment [J]. *Chem—A European J*, 2012, 18: 9056.
- [19] Qu Y, Xia S, Yuan H, et al. Integrated sample pretreat-

- ment system for N-linked glycosylation site profiling with combination of hydrophilic interaction chromatography and PNGase F immobilized enzymatic reactor via a strong cation exchange precolumn[J]. *Anal Chem*, 2011, 83:7457.
- [20] Qiao X Q, Sun L L, Wang L, et al. High sensitive protein detection by hollow fiber membrane interface based protein enrichment and in situ fluorescence derivatization [J]. *J of Chromatography B—Analytical Techs in the Biomedical and Life Sci*, 2011, 879:1439.
- [21] Chen H M, Liu S S, Yang H L, et al. Selective separation and enrichment of peptides for MS analysis using the microspheres composed of Fe_3O_4 @ SiO_2 core and perpendicularly aligned mesoporous SiO_2 shell [J]. *Proteomics*, 2010(10):930.
- [22] Liu S S, Chen H M, Lu X H, et al. Facile synthesis of copper(II) immobilized on magnetic mesoporous silica microspheres for selective enrichment of peptides for mass spectrometry analysis [J]. *Angewandte Chemie-Int Edition*, 2010, 49:7557.
- [23] Gu X, Deng C H, Yan G Q, et al. Capillary array reversed-phase liquid chromatography-based multidimensional separation system coupled with MALDI-TOF-TOF-MS detection for high-throughput proteome analysis[J]. *J Proteome Res*, 2006(5):3186.
- [24] Yuan H M, Zhang L H, Zhang W B, et al. Columns switch recycling size exclusion chromatography for high resolution protein separation [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216:7024.
- [25] Hou C Y, Yuan H M, Qiao X Q, et al. Weak anion and cation exchange mixed-bed microcolumn for protein separation[J]. *J Sep Sci*, 2010, 33:3299.
- [26] Jiang X N, Ye M L, Cheng K, et al. ArMone: A software suite specially designed for processing and analysis of phosphoproteome data[J]. *J Proteome Res*, 2010(9):2743.
- [27] Song C X, Ye M L, Han G H, et al. Reversed-phase-reversed-phase liquid chromatography approach with high orthogonality for multidimensional separation of phosphopeptides[J]. *Anal Chem*, 2010, 82:53.
- [28] Wang F J, Song C X, Cheng K, et al. Perspectives of comprehensive phosphoproteome analysis using shotgun strategy[J]. *Anal Chem*, 2011, 83:8078.
- [29] Ma J F, Zhang L H, Liang Z, et al. Immobilized enzyme reactors in proteomics [J]. *Trac-Trends in Analytical Chem*, 2011, 30:691.
- [30] Ma J F, Hou C Y, Liang Y, et al. Efficient proteolysis using a regenerable metalion chelate immobilized enzyme reactor supported on organic-inorganic hybrid silica monolith[J]. *Proteomics*, 2011(11):991.
- [31] Liang Y, Tao D Y, Ma J F, et al. Hydrophilic monolith based immobilized enzyme reactors in capillary and on microchip for high-throughput proteomic analysis [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218:2898.
- [32] Wu S, Sun L, Ma J, et al. High throughput tryptic digestion via poly (acrylamide-co-methylenebisacrylamide) monolith based immobilized enzyme reactor[J]. *Talanta*, 2011, 83:1748.
- [33] Gao M X, Deng C H, Zhang X M. Magnetic nanoparticles-based digestion and enrichment methods in proteomics analysis[J]. *Expert Rev Proteomics*, 2011, 8:379.
- [34] Lin S, Yun D, Qi D W, et al. Novel microwave-assisted digestion by trypsin-immobilized magnetic nanoparticles for proteomic analysis [J]. *J Proteome Res*, 2008(7):1297.
- [35] Liu J Y, Lin S, Qi D W, et al. On-chip enzymatic microreactor using trypsin-immobilized superparamagnetic nanoparticles for highly efficient proteolysis[J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1176:169.
- [36] Yuan H M, Zhou Y, Xia S M, et al. Integrated platform for proteome profiling with combination of microreversed phase based protein and peptide separation via online solvent exchange and protein digestion [J]. *Anal Chem*, 2012, 84:5124.
- [37] Wang F J, Ye M L, Dong J, et al. Improvement of performance in label-free quantitative proteome analysis with monolithic electrospray ionization emitter [J]. *J Sep Sci*, 2008, 31:2589.
- [38] Wang F J, Dong J, Ye M L, et al. Integration of monolithic frit into the particulate capillary (IMFPC) column in shotgun proteome analysis [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 652:324.
- [39] Xue Y F, Wei J Y, Han H H, et al. Application of open tubular capillary columns coated with zirconium phosphonate for enrichment of phosphopeptides [J]. *J of Chromatography B—Analytical Tech in the Biomedical and Life Sci*, 2009, 877:757.
- [40] Qiao X Q, Sun L L, Chen L F, et al. Piperazines for peptide carboxyl group derivatization: Effect of derivatization reagents and properties of peptides on signal enhancement in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011, 25:639.
- [41] Qiao X Q, Wang L, Ma J F, et al. High sensitivity analysis of water-soluble, cyanine dye labeled proteins by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 640:114.

2009,44(5):400.

- [14] Marc J E C, Isabelle C, Euverink G W, et al. A novel thermoreversible gelling product made by enzymatic modification of starch[J]. *Starch*, 2005, 57: 465.
- [15] Park J H, Park H K. Physicochemical properties of enzymatically modified maize starch using 4- α -glucanotransferase[J]. *Food Sci and Biotech*, 2007, 16(6):902.
- [16] Oh E J, Choi S J, Lee S J. Modification of granular corn starch with 4- α -glucanotransferase from *Thermotoga maritima*: Effects on structural and physical properties[J]. *J of Food Sci*, 2008, 73(3):C158.
- [17] Ueda H. Physicochemical properties and complex formation abilities of large-ring cyclodextrins[J]. *J of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2002, 44: 53.
- [18] Kin L L. Large cyclodextrins[J]. *J of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2002, 43:1.
- [19] Lee C K, Le Q T, Kim Y H. Enzymatic synthesis and properties of highly branched rice starch amylose and amylopectin cluster[J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(1):126.
- [20] Kajiura H, Kakutani R, Akiyama T, et al. A novel enzymatic process for glycogen production[J]. *Biocatal Biotransform*, 2008, 26:133.
- [21] Shim J H, Seo N S, Roh S A, et al. Improved bread-baking process using *Saccharomyces cerevisiae* displayed with engineered cyclodextrin glucanotransferase[J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55:4735.
- [22] Seo N S, Roh S A, Auh J H, et al. Structural characterization of rice starch in rice cake modified by *Thermus scoto-ductus* 4- α -glucanotransferase (TS α GTase)[J]. *J of Food Sci*, 2007, 72(6):C331.
- [23] Mun S, Kim Y L, Kang C G, et al. Development of reduced-fat mayonnaise using 4- α -GTase-modified rice starch and xanthan gum[J]. *Int J of Biological Macromolecules*, 2009, 44: 400.
- [24] 方继前, 郭亚平, 谢练武. 生物转化法定向结构改造难溶性药物[J]. *现代化工*, 2010, 30(8):32.
- [25] Li D, Roh S A, Shim J H, et al. Glycosylation of genistin into soluble inclusion complex form of cyclic glucans by enzymatic modification[J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(16):6516.
- [26] Chung M J, Kang A Y, Lee K M, et al. Water-soluble genistin glycoside isoflavones up-regulate antioxidant metallothionein expression and scavenge free radicals[J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54: 3819.
- [27] Li D, Park S H, Shim J H, et al. In vitro enzymatic modification of puerarin to puerarin glycosides by maltogenic amylase[J]. *Carbohydrate Research*, 2004, 339: 2789.
- [28] Chung M J, Sung N J, Park C S, et al. Antioxidative and hypocholesterolemic activities of water-soluble puerarin glycosides in HepG2 cells and in C57 BL/6J mice[J]. *European J of Pharmacology*, 2008, 578: 159.
- [29] Abelyan V A, Balayan A M, Ghochikyan V T. Transglycosylation of stevioside by cyclodextrin glucanotransferases of various groups of microorganisms[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2004, 40(2):129.
- [30] Markosyan A A, Abelyan L A, Adamyan M O. Transglycosylation of L-ascorbic acid[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2007, 43(1):36.

(上接第7页)

- [42] Shen W W, Xiong H M, Xu Y, et al. ZnO-poly(methyl methacrylate) nanobeads for enriching and desalting low-abundant proteins followed by directly MALDI-TOF MS analysis[J]. *Anal Chem*, 2008, 80:6758.
- [43] Tang J, Liu Y C, Qi D W, et al. On-plate-selective enrichment of glycopeptides using boronic acid-modified gold nanoparticles for direct MALDI-QIT-TOF MS analysis[J]. *Proteomics*, 2009(9):5046.
- [44] Jiang X N, Jiang X G, Han G H, et al. Optimization of filtering criterion for SEQUEST database searching to improve proteome coverage in shotgun proteomics[J]. *BMC Bioinformatics*, 2007(8):323.
- [45] Jiang X N, Han G H, Feng S, et al. Automatic validation of phosphopeptide identifications by the MS²/MS³ target-decoy search strategy[J]. *J Proteome Res*, 2008(7):1640.
- [46] Jiang X N, Dong X L, Ye M L, et al. Instance based algorithm for posterior probability calculation by target-decoy strategy to improve protein identifications[J]. *Anal Chem*, 2008, 80:9326.
- [47] Han G H, Ye M L, Jiang X N, et al. Comprehensive and reliable phosphorylation site mapping of individual phosphoproteins by combination of multiple stage mass spectrometric analysis with a target-decoy database search[J]. *Anal Chem*, 2009, 81:5794.
- [48] Jiang X N, Ye M L, Han G H, et al. Classification filtering strategy to improve the coverage and sensitivity of phosphoproteome analysis[J]. *Anal Chem*, 2010, 82:6168.