

## 二维阵列色谱分离系统及其在血浆蛋白质组中的应用

黄志<sup>1</sup> 邓楠<sup>2</sup> 晏国全<sup>1</sup> 高明霞<sup>1</sup> 梁振<sup>2</sup>  
张丽华<sup>\* 2</sup> 张祥民<sup>\* 1</sup> 张玉奎<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(复旦大学化学系, 生物医学研究院, 上海 200433)

<sup>2</sup>(中国科学院大连化学物理研究所分离分析化学重点实验室, 大连 116023)

**摘 要** 本研究发展了在线二维阵列式液相色谱系统, 对血浆蛋白质进行分离分析。在线二维阵列式液相色谱系统进行血浆样品的蛋白质水平分离, 整个分离过程仅需 4 h, 并能进行高丰度蛋白质的快速定位。相比于高丰度蛋白质馏分的直接鉴定, 经蛋白质均衡器材料富集后, 鉴定得到的低丰度蛋白质数量提高了 10 倍, 低丰度蛋白质的损失大幅度减少。本研究将二维阵列色谱分离系统对血浆样品进行完整的分离分析, 共鉴定到了 1474 种蛋白质, 蛋白质浓度动态范围达到了 7 个数量级。高丰度蛋白质馏分中共鉴定到 252 种蛋白质, 其中有 61 种为高丰度蛋白质。结果表明, 在线二维阵列式液相色谱系统实现了血浆样品中高丰度蛋白质的快速去除和高丰度蛋白质馏分中低丰度蛋白质的富集, 显著提高了血浆蛋白质的鉴定能力, 在其它复杂样品的分离分析中具有一定的应用前景。

**关键词** 多维色谱; 阵列色谱; 高丰度蛋白质; 蛋白质均衡器; 血浆

### 1 引 言

在人类基因组计划完成后, 生命科学研究领域进入了功能基因组时代<sup>[1]</sup>。血浆是临床医学中最为常用的检测样本, 因而成为蛋白质组学研究的热点对象。但在血浆样品中, 蛋白质的浓度分布超过 10 个数量级, 20 种高丰度蛋白质的含量占总蛋白质的 99% 以上<sup>[2, 3]</sup>。由于低丰度蛋白质在质谱鉴定中易受高丰度蛋白质掩盖效应的影响, 因此必须对血浆样品中的高丰度蛋白质进行去除, 以提高低丰度蛋白质的鉴定能力<sup>[4, 5]</sup>。

相较于免疫亲和柱去除高丰度蛋白质<sup>[6~9]</sup>, 基于多维液相色谱去除高丰度蛋白质是一种通用型的样品预处理技术, 一次运行可以去除数十种未知的高丰度蛋白质<sup>[10, 11]</sup>。采用基于该技术原理的强阳离子交换色谱-反相高效液相色谱(SCX-RPLC)二维分离系统, 成功对鼠肝样品进行了蛋白质水平的高效分离, 一次性去除了 58 种高丰度蛋白质, 鉴定得到的中低丰度蛋白质数提升了 3 倍<sup>[10]</sup>。本课题组最新构建的在线阵列式二维常规柱液相色谱系统, 已成功应用于在蛋白质水平上进行血浆样品完整蛋白质的分离, 大幅缩短了样品的全二维分离时间, 对血浆样品中高丰度蛋白质的去除以及血浆样品的深入研究具有较高的应用潜力<sup>[12]</sup>。

无论采用何种高丰度蛋白质去除方法, 在去除的高丰度蛋白质馏分中都会夹带一部分与高丰度蛋白质有相互作用的低丰度蛋白质。因此, 从高丰度蛋白质馏分中富集低丰度蛋白质仍是一个难题<sup>[13]</sup>。蛋白质均衡器技术<sup>[14]</sup>具有与各种蛋白质相互作用的能力和机会均等的特点, 从而可降低馏分中高丰度蛋白质的范围, 实现低丰度蛋白质的富集。血浆样品经过蛋白质均衡器材料 Ampholine@ PM 处理后, 鉴定得到的蛋白质数目提高了 1 倍<sup>[15]</sup>。

本研究采用在线二维阵列式液相色谱系统对血浆样品进行蛋白质水平的分离, 大幅缩短降低二维分离时间, 实现高通量快速分离。针对低丰度蛋白质在质谱鉴定中易被高丰度蛋白质掩盖的问题, 血浆样品在在线二维阵列式色谱分离时, 对高丰度蛋白质进行了快速定位并将高丰度蛋白质馏分和低丰度蛋白质馏分分别进行后续处理。为了进一步提高低丰度蛋白质的鉴定效果, 采用均衡器材料进行高丰

2015-05-15-收稿; 2015-06-01 接受

本文系国家高技术研究发展计划( No. 2012AA020202) 科技部基础研究计划项目( No. 2012CB910604) , 国家自然科学基金资助项目( Nos. 21027002, 21175026, 21275034) 资助

\* E-mail: lihuazhang@dicp.ac.cn; xmzhang@fudan.edu.cn

度蛋白质馏分中低丰度蛋白质的富集, 为发现血浆蛋白质组中新的疾病诊断标志物和药物靶标蛋白质提供更为简便和有潜力的技术方法。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

二维阵列液相色谱系统(图 1) 在岛津 2010A 色谱系统(日本岛津科技公司)基础上进行构建。六通切换阀、十通电动顺序切换阀、三通、八通分流器均购于美国 Valco Instruments 公司。第一维 SAX 柱 ProPac™ SAX-10 柱(250 mm × 4.0 mm, 10 μm) 与保护柱(10 mm × 4.0 mm, 10 μm) 均购自美国 Thermo 公司; 第二维阵列分离柱 Xtimate™ C<sub>8</sub> 柱(250 mm × 2.1 mm, 5 μm, 30 nm) 与保护柱(10 mm × 2.1 mm, 5 μm, 30 nm) 均购于上海月旭材料科技有限公司。馏分收集采用 Probot LC Packing 馏分收集装置(美国 Dionex 公司), BCA 染色测定仪为 Epoch 超微量微孔板酶标仪(美国 BioTek 公司)。

三氟乙酸(TFA)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、二硫苏糖醇(DTT)、碘代乙酸钠(IAA)、经 TPCK 处理过的胰蛋白酶(Trypsin) 购于美国 Sigma 公司; 乙腈(ACN, 德国 Merck 公司); BCA 蛋白质浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司); 其它试剂为国产分析纯试剂。实验用高纯水经 Millipore 纯水系统(美国 Millipore 公司) 制备。

人血浆取自上海华山医院检验科的正常人血浆。血浆经 2000 g、4℃ 离心 15 min 取上清液, 分装, 于 -80℃ 保存待用。血浆通过 BCA 浓度测定法所得浓度为 61.2 mg/mL。

### 2.2 血浆的阵列式二维色谱分离

**2.2.1 血浆样品 SAX 分离** 流动相 A: 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 流动相 B: 10 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, pH 8.0。血浆用 A 相稀释 6 倍后进样 100 μL。流速为 0.5 mL/min, 紫外检测波长为 215 nm。第一维 SAX 分离梯度为: 0 min, 0% B; 5 min, 0% B; 15 min, 10% B; 45 min, 26% B; 70 min, 40% B; 90 min, 67% B; 90.1 min, 100% B; 100 min, 100% B; 100.1 min, 0% B; 150 min, 0% B。SAX 分离得到的馏分通过十通阀转移到第二维反相预柱上, 阀切换程序为: 0 ~ 19 min, 反相柱 1 (Col. 1); 19 ~ 35 min, 反相柱 5 (Col. 5); 35 ~ 68 min, 反相柱 2 (Col. 2); 68 ~ 73 min, 反相柱 6 (Col. 6); 73 ~ 78 min, 反相柱 7 (Col. 7); 78 ~ 83 min, 反相柱 8 (Col. 8); 83 ~ 100 min, 反相柱 3 (Col. 3); 100 ~ 130 min, 反相柱 4 (Col. 4)。

**2.2.2 SAX 馏分 RP 分离** 流动相 A: 5% ACN, 95% H<sub>2</sub>O, 0.1% TFA; 流动相 B: 95% ACN, 5% H<sub>2</sub>O, 0.1% TFA。流速为 1.6 mL/min。第二维 RP 分离梯度为: 0 min, 0% B; 5 min, 0% B; 15 min, 25% B; 25 min, 33% B; 60 min, 40% B; 80 min, 54% B; 85 min, 67% B; 85.1 min, 100% B; 95 min, 100% B; 95.1 min, 0% B; 110 min, 0% B。馏分收集于 96 孔板上, 间隔为 1 min。

### 2.3 馏分的 BCA 蛋白质定量分析

按照 BCA 定量试剂盒说明配制 BCA 染色液, 向第二维馏分中加入 100 μL BCA 染色液/孔, 37℃ 下反应 30 min 后用酶标仪进行定量检测。

### 2.4 均衡器材料处理高丰度蛋白质馏分

根据 BCA 染色液显色结果, 选取 3 个高丰度蛋白质区域分别合并后进行 ampholine@ PM 材料实验。ampholine@ PM 材料处理馏分的方法在文献[14]基础上进行优化。3 mg ampholine@ PM 材料加入到溶液中, 室温振荡 2 h。离心除去上清液, 用 1 mL 10 mmol/L PBS 清洗材料 3 次, 每次振荡 5 min, 离心 5 min。先加入 1 mL 2 mol/L NaCl, 再加入 1 mL 100 mmol/L Gly-HCl (pH = 3.0), 最后加入 1 mL 0.1% TFA/80% 乙腈溶液, 每次振荡 20 min, 离心 5 min, 重复 3 次, 收集合并上清液, 即为洗脱液。

### 2.5 馏分酶解鉴定

第二维剩余馏分根据染色结果合并为 20 个馏分, 与均衡器材料所得洗脱液分别冻干后用 25 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 溶解, 加入 1 mg/mL DTT, 60℃ 下反应 90 min, 冷却至室温后加入 IAA 使其浓度为 20 mmol/L, 在室温下避光反应 30 min, 最后加入 1 μg/μL Trypsin, 37℃ 过夜酶解。

Nano-LC-MS/MS 分析的色谱分离为微纳 Acquity UPLC 系统(美国 Waters 公司), 质谱仪为 LTQ

Orbitrap XL 质谱仪(德国 Thermo Scientific 公司)。流动相 A:0.1% 甲酸( $\text{H}_2\text{O}$ ); B:0.1% 甲酸(ACN)。样品首先在 Acclaim PepMap C<sub>18</sub> 柱(75  $\mu\text{m}$   $\times$  15 cm, Thermo Scientific 公司)上进行梯度分离。线性梯度:0~90 min 5%~45% B, 流速为 300 nL/min。喷雾电压为 1.9 kV。质谱采用数据依赖型采样模式,选取最强的 10 个峰进行 MS/MS 分析。每次扫描的 MS 范围为 385~2000 Da, Orbitrap 的质量分辨率为 100000。肽段碎裂碰撞能量为 35% 动态排阻范围为 90 s。Xcalibur (version 2.0.7) 软件进行质谱图的采集。

## 2.6 数据库检索

肽段的数据库搜索用 Mascot Daemon 软件(Version 2.3.0, 英国 Matrix Science 公司)对 UniProtKB/Swiss-Prot 数据库(Taxonomy: Homo sapiens; Released 2014.04.10, with 20264 entries)进行搜索。选取包含反向序列的 Decoy 数据库以降低假阳性的鉴定结果。肽段电荷数为 +2, +3, +4。酶解方式为 Full trypsin (KR) cleavage, 漏切位点为至多两个。氨基酸的固定修饰为半胱氨酸的脲甲基化(Carbamidomethylation)可变修饰为甲硫氨酸的氧化(Oxidation)。碎片离子的偏差设为 0.8 Da, 母离子偏差设为 10 ppm。错误发现率(FDR)低于 1%。蛋白质鉴定结果为红色加粗方采信,以提高鉴定的可靠性。对于肽段鉴定,可信度大于 95% 可认为成功鉴定;对于蛋白质鉴定,可信度大于 95% 以及得分超过 20 可认为成功鉴定。

# 3 结果与讨论

## 3.1 在线二维阵列式液相色谱系统

如图 1 所示,在本研究中,针对血浆蛋白质组组成复杂的特点,在线二维阵列式常规柱液相色谱系统采用了蛋白质负载量更大的 ProPac<sup>TM</sup> SAX-I0 常规色谱柱作为第一维分离柱,以提高血浆样品的上样量,从而增加了单次分析中低丰度蛋白质的含量,使其更容易被鉴定发现。为了能将第二维分离得到的蛋白质进行后续更深入的研究,第二维分离柱采用 8 根 2.1 mm 内径的 Xtimate<sup>TM</sup> C<sub>8</sub> 反相常规柱,不仅可以提高第二维的分离效率,实现了高通量快速分离,同时也可以与后续的馏分收集相匹配,更有利于第二维分离得到的馏分进行后续更深入的研究。经过二维色谱分离后,高丰度蛋白质被分离到有限的组分中,其它馏分中高丰度蛋白质的浓度相对大大降低,从而降低了高丰度蛋白质对低丰度蛋白质产生的质谱抑制效应,提高了低丰度蛋白质得到鉴定的可能性。

相对于 scFv@M13@MM 材料<sup>[16]</sup>, Ampholine@PM 均衡器材料具有较大的蛋白质负载量,保存使用也更为简便。而相比于免疫亲和柱, Ampholine@PM 均衡器材料不仅可以去除最高的 9 种高丰度蛋白质,同时也可以从高丰度蛋白质馏分中富集得到低丰度蛋白质。因而,将二维阵列式液相色谱系统分离得到的高丰度蛋白质馏分,用 Ampholine@PM 均衡器材料进行处理,以富集馏分中的低丰度蛋白质,从而进一步增加低丰度蛋白质被鉴定得到的可能性。

## 3.2 二维阵列式液相色谱系统重现性

二维阵列式液相色谱系统良好的重现性是进行分离分析的首要基础。对第一维 SAX 和第二维 RP 分别选用血浆样品进行 3 次重复实验,并对所得谱图的保留时间和峰面积进行分析。从 SAX 色谱图(图 2)中选取 7 个色谱峰进行重现性考察,计算得到的色谱峰保留时间 RSD = 0.59%, 峰面积 RSD = 6.4%。从 RP 色谱图(图 3)选取 7 个色谱峰进行重现性考察,计算得到的色谱峰保留时间 RSD = 0.14%, 色谱峰面积 RSD = 1.7%。这些结果表明,第一维和第二维色谱分离具有优良的重现性,为后续实际血浆样品的分离鉴定奠定了良好的基础。

## 3.3 在线二维阵列色谱分离去除血浆样品中的高丰度蛋白质

用二维阵列色谱对血浆样品进行了二维分离,图 2 为血浆样品的第一维分离色谱图。为了降低高丰度蛋白质在第二维分离过程中对低丰度蛋白质的干扰,对第一维馏分切割程序进行了优化,以保证高丰度蛋白质和其它蛋白质尽可能转移到不同的预柱上。图 4 为血浆样品第一维馏分的阵列 RPLC 色谱图。相对于单一度的分离,血浆蛋白质经过二维分离后可以得到更多的色谱峰,具有更高的分辨率。与此同时,阵列式色谱分离亦可以显著降低第二维分离所需的时间,大大提高系统的通量。高丰度蛋白质

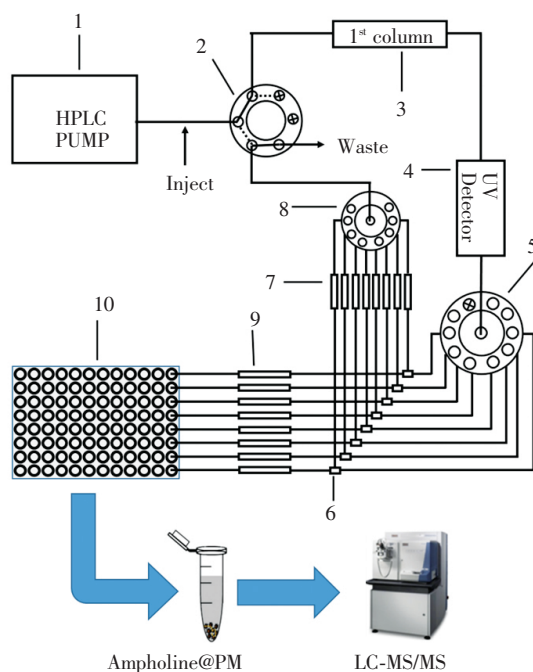


图 1 在线二维阵列式液相色谱系统—蛋白质均衡器技术联用原理图

Fig.1 Schematic diagram of 2D On-line Conventional Array LC system coupled with ampholine@ PM protein equalizer technology

1: HPLC 梯度泵 2: 六通阀; 3: 第一维分离柱; 4: 紫外检测器; 5: 10 通道顺序切换阀; 6: 三通; 7: 第二维阵列预柱; 8: 8 通道分流器; 9: 第二维阵列分离柱; 10: 96 孔板。

1: HPLC gradient pump; 2: 6-port valve; 3: 1<sup>st</sup> column; 4: UV detector; 5: 10-port fraction switch valve; 6: 3-port valve; 7: 2<sup>nd</sup> precolumnf array; 8: 8-channel splitter; 9: 2<sup>nd</sup> column array; 10: 96-well plate.

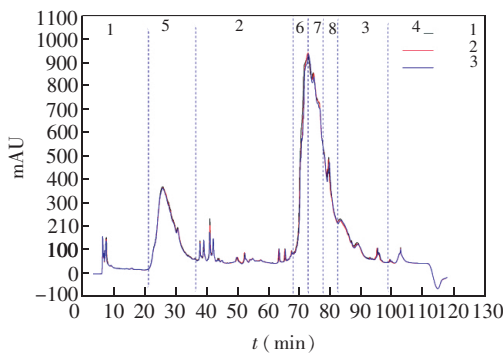


图 2 血浆样品的 3 次 SAX 重复进样图谱

Fig. 2 Repeated SAX separation chromatograms of human plasma for 3 times

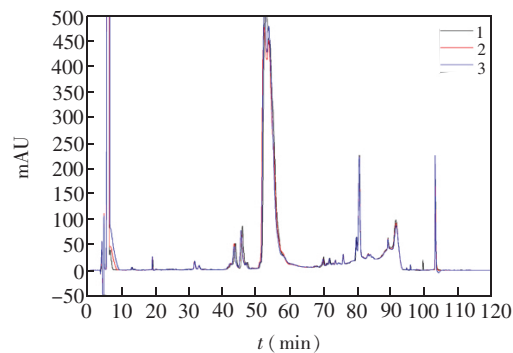


图 3 血浆样品的 3 次 RPLC 重复进样图谱

Fig. 3 Repeated RPLC separation chromatograms of human plasma for 3 times

在第二维反相色谱分离中具有较为集中的出峰位置,因而可以运用二维阵列色谱进行血浆样品中高丰度蛋白质的去除。

3.4 均衡器材料对高丰度蛋白质馏分中低丰度蛋白质的富集

血浆样品经过阵列式二维色谱分离,一共收集得到 880 个馏分点。选取了图 5 中 3 个强度存在明显差异的高丰度蛋白质区域(分别记为区域 A、B、C)进行 Ampholine@ PM 均衡器材料实验。采用 LC-MS 分别对 3 个高丰度蛋白质区域进行了对比鉴定,结果列于表 1。区域 A 未经过 Ampholine@ PM 均衡器材料处理共鉴定到 5 个低丰度蛋白质,而经过 Ampholine@ PM 材料处理后鉴定得到的低丰度蛋白质

数量为 59 个,为未经处理的 11.8 倍。区域 B 未经过 Ampholine@ PM 均衡器材料处理共鉴定得到 5 个低丰度蛋白质,而经过 Ampholine@ PM 材料处理后鉴定得到的低丰度蛋白质数量为 34 个,为未经处理的 6.8 倍。区域 C 未经过 Ampholine@ PM 均衡器材料处理共鉴定得到 3 个低丰度蛋白质,而经过 Ampholine@ PM 材料处理后鉴定得到的低丰度蛋白质数量为 50 个,为未经处理的 16.7 倍。经过 Ampholine@ PM 均衡器材料处理后 3 个高丰度蛋白质区域一共鉴定到 148 个非冗余蛋白质,其中 48 个为高丰度蛋白质,100 个为低丰度蛋白质。与未经处理的结果对比,采用 Ampholine@ PM 均衡器材料处理后,所富集得到的低丰度蛋白质数量提高了 10 倍,大幅度减少了高丰度蛋白质馏分中低丰度蛋白质的损失。

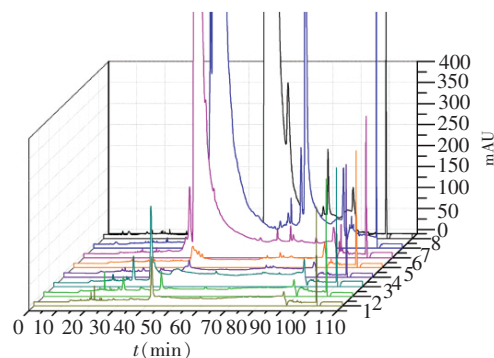


图 4 血浆样品第一维 SAX 馏分的阵列 RPLC 色谱图  
Fig. 4 Array RPLC separation chromatogram of SAX fractions of human plasma

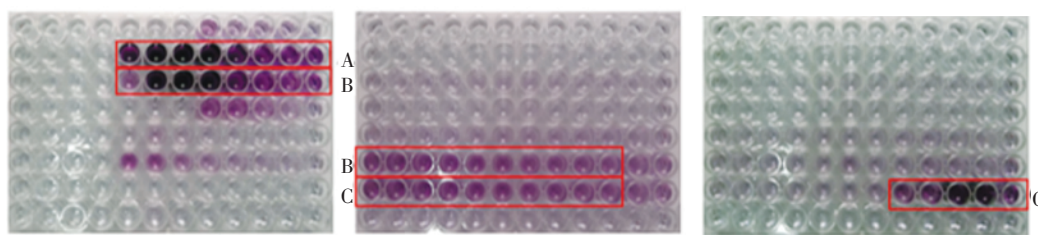


图 5 第二维分离所得馏分的 BCA 染色图。区域 A、B、C 为蛋白质浓度较高的区域

Fig. 5 BCA photograph of fractions collected in the second dimensional separation. Zone A, B and C refer to the high protein concentration zones

表 1 均衡器材料去除高丰度蛋白质各个馏分中鉴定的蛋白质数目。(a) 高丰度蛋白质列表引用文献[10]

Table 1 Identified protein amount of HAP fractions treated by ampholine@ PM. (a) HAP results according to ref [10]

| 区域<br>Zone No.               | 未经均衡器去除 Untreated          |               |                  | 均衡器去除后 Treated by ampholine@ PM |               |                  |
|------------------------------|----------------------------|---------------|------------------|---------------------------------|---------------|------------------|
|                              | 高丰度蛋白质<br>HAP <sup>a</sup> | 低丰度蛋白质<br>LAP | 蛋白质鉴定总数<br>Total | 高丰度蛋白质<br>HAP <sup>a</sup>      | 低丰度蛋白质<br>LAP | 蛋白质鉴定总数<br>TOTAL |
| A                            | 14                         | 5             | 19               | 26                              | 59            | 85               |
| B                            | 7                          | 5             | 12               | 33                              | 34            | 67               |
| C                            | 1                          | 3             | 4                | 26                              | 50            | 76               |
| 去冗余后总计<br>Nonredundant total | 17                         | 10            | 27               | 48                              | 100           | 148              |

HAP: High abundance protein; LAP: Low abundance protein.

### 3.5 血浆样品的高丰度蛋白质去除及低丰度蛋白质富集

离线二维液相色谱在蛋白质水平进行高丰度蛋白质的大规模高效分离和去除,整个过程离线处理操作多,通量小,所需时间超过了 179 h,大大降低了其在复杂样品中应用的可能性<sup>[10]</sup>。血浆样品经过在线阵列式二维色谱分离,整个过程仅需要 4 h,大幅缩短了复杂样品的分离时间,实现了血浆样品的高通量快速分离,并实现了高丰度蛋白质的快速定位。分离得到的 55 种高丰度蛋白质馏分,经过均衡器材料处理后,一共鉴定出 252 种非冗余蛋白质,其中 61 种为高丰度蛋白质,191 种为低丰度蛋白质,进一步提高了血浆蛋白质组中低丰度蛋白质的鉴定效果。其它中低丰度蛋白质馏分一共鉴定得到了 1376 种蛋白质,其中有 25 种高丰度蛋白质在高丰度蛋白质馏分中亦有存在。Ueda 等<sup>[17]</sup>曾对血浆样品进行了 RP-RP 分离,经过 24 h 二维色谱分离以及 12 天的 LC-MS 分析,一共鉴定得到了 1126 种蛋白质。与之相比,血浆样品经过二维色谱分离及 ampholine@ PM 均衡器材料处理后,一共鉴定得到了 1474 种蛋白质,蛋白质浓度动态范围达到了 7 种数量级,蛋白质丰度最低的蛋白质为 prothrombin

(1.2 ng/mL)<sup>[18]</sup>。由此可见,二维阵列式色谱进行血浆样品的分离分析,不仅可以大幅缩短分离鉴定的时间,同时也能得到更好的蛋白质鉴定效果,展现了其在复杂样品分析中巨大的应用前景。

## 4 结 论

综上所述,在线二维阵列式液相色谱系统可以对血浆样品进行蛋白质水平的分离,整个分离时间由 179 h 大幅缩短为 4 h,并实现了高丰度蛋白质的快速定位。相比于高丰度蛋白质馏分直接鉴定,经蛋白质均衡器材料处理后,富集得到的低丰度蛋白质数量提高了 10 倍,从而大幅度减少了低丰度蛋白质的损失。将这种方法对血浆样品进行完整的分析,共鉴定到 1474 种蛋白质,蛋白质浓度动态范围达到了 7 种数量级。结果表明,血浆样品的二维阵列色谱分离可以实现高丰度蛋白质的快速定位和去除。高丰度蛋白质馏分运用蛋白质均衡器材料处理,可以实现低丰度蛋白质的富集。二维阵列式液相色谱系统展现了较高的分离通量和较强的低丰度蛋白质富集能力,从而显著提高了血浆蛋白质组的鉴定能力,可以应用于其它复杂样品的分离分析中。

## References

- 1 Hieter P, Boguski M. *Science*, **1997**, 278(5338): 601–602
- 2 Issaq H J, Xiao Z, Veenstra T D. *Chem. Rev.*, **2007**, 107(8): 3601–3620
- 3 Liu T, Qian W, Gritsenko M A, Xiao W, Moldawer L L, Kaushal A, Monroe M E, Varnum M A, Moore R J, Purvine S O, Maier R V, Davis R W, Tompkins R G, Camp II D G, Smith R D. *Mol. Cell. Proteomics*, **2006**, 5(10): 1899–1913
- 4 Anderson N L, Anderson N G. *Mol. Cell. Proteomics*, **2002**, 1(11): 845–867
- 5 ZHANG Wei. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2014**, 42(12): 1859–1868  
张 伟. 分析化学, **2014**, 42(12): 1859–1868
- 6 Gundry R L, White M Y, Nogee J, Tchernyshyov I, van Eyk J E. *Proteomics*, **2009**, 9(7): 2021–2028
- 7 Stempfer R, Kubicek M, Lang I M, Christa N, Gerner C. *Electrophoresis*, **2008**, 29(21): 4316–4323
- 8 Ichibangase T, Moriya K, Koike K, Imai K. *Biomed. Chromatogr.*, **2009**, 23(5): 480–487
- 9 Kullolli M, Warren J, Arampatzidou M, Pitteri S J. *J. Chromatogr. B*, **2013**, 939: 10–16
- 10 Gao M, Deng C, Yu W, Zhang Y, Yang P, Zhang X. *Proteomics*, **2008**, 8(5): 939–947
- 11 Zhu S, Zhang X, Gao M, Hong G, Yan G, Zhang X. *Proteomics*, **2012**, 12(23–24): 3451–3463
- 12 HUANG Zhi, HONG Guang-Feng, GAO Ming-Xia, ZHANG Xiang-Min. *Chinese J. Chromatogr.*, **2014**, 32(4): 343–348  
黄 志, 洪广峰, 高明霞, 张祥民. 色谱, **2014**, 32(4): 343–348
- 13 Boschetti E, Righetti P G. *J. Proteomics*, **2008**, 71(3): 255–64
- 14 Righetti P G, Boschetti E, Lomas L, Citterio A. *Proteomics*, **2006**, 6(14): 3980–3992
- 15 Deng N, Zhu G, Chen Y, Wu Q, Liang Z, Sui Z, Zhang L, Yang K, Zhang Y. *Anal. Chim. Acta*, **2014**, 826: 43–50
- 16 Zhu G, Zhao P, Deng N, Tao D, Sun L, Liang Z, Zhang L, Zhang Y. *Anal. Chem.*, **2012**, 84(18): 7633–7637
- 17 Ueda K, Tatsuguchi A, Saichi N, Toyama A, Tamura K, Furihata M, Takata R, Akamatsu S, Igarashi M, Nakayama M, Sato T, Ogawa O, Fujioka T, Shuin T, Nakamura Y, Nakagawa H. *J. Proteome. Res.*, **2013**, 12(10): 4497–4506
- 18 Chow A, Her Z, Ong E K, Chen J M, Dimatatac F, Kwek D J, Barkham T, Yang H, Rénia L, Leo Y S, Ng L F. *J. Infect. Dis.*, **2011**, 203(2): 149–157

## Array-Based Two Dimensional Liquid Chromatography System for Proteomic Analysis of Human Plasma

HUANG Zhi<sup>1</sup>, DENG Nan<sup>2</sup>, Yan Guo-Quan<sup>1</sup>, GAO Ming-Xia<sup>1</sup>, LIANG Zhen<sup>2</sup>, ZHANG Li-Hua<sup>\* 2</sup>,  
ZHANG Xiang-Min<sup>\* 1</sup>, ZHANG Yu-Kui<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(*Department of Chemistry & Institutes of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China*)

<sup>2</sup>(*Key Laboratory of Separation Science for Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics,  
Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China*)

**Abstract** Human plasma proteome has the characteristics of complexity in component and large dynamic range of protein concentrations. Herein, we developed an array-based online two dimensional liquid chromatography system combined with protein equalizer technology for the large-scale depletion of high abundance proteins and enrichment of low abundance proteins in human plasma. The array-based online two dimensional liquid chromatography system could separate the plasma at the intact protein level with the merits of good reproducibility and high throughput. The total separation time was only 4 h and the fast location of high abundance proteins was also achieved. After the high abundance protein fractions was treated by ampholine@PM polymer microsphere, the number of the identified low abundance proteins increased tenfold, which significantly decreased the loss of low abundance proteins in high abundance protein fractions. The techniques were then applied to perform the proteomic analysis of human plasma sample. The total number of identified proteins was 1474 and the dynamic range of protein concentration was 7. Meanwhile, 252 proteins were identified in high abundance protein fractions, among which 61 proteins belong to high abundance proteins. These results demonstrated that an array-based online two dimensional liquid chromatography system combined with protein equalizer technology could efficiently achieve the large-scale depletion of high abundance proteins and enrichment of low abundance proteins in human plasma, with a remarkable improvement in protein identification and a great prospect in the proteomic research of other complex samples.

**Keywords** Multidimensional liquid chromatography; Array-based column system; High abundance protein; Protein equalizer technology; Human plasma

( Received 15 May 2015; accepted 1 June 2015)

This work was supported by the National High Technology Research and Development Program of China ( No. 2012AA020202) and the National Natural Science Foundation of China ( Nos. Nos. 21027002, 21175026, 21275034)