

# 多维液相色谱技术的进展

高明霞, 张祥民\*

复旦大学化学系, 上海 200433

\* 通讯作者, E-mail: xmzhang@fudan.edu.cn

收稿日期: 2009-05-31; 接受日期: 2009-06-25

**摘要** 与一维分离模式相比, 多维色谱分离技术的最大特点是可极大地提高峰容量. 近几年, 随着蛋白质组学的出现尤其是表达谱的开展, 对分离技术提出更高的要求. 多维高效液相色谱系统以其快速、高效、自动化程度高以及易与质谱等其他技术联用等优势再一次成为研究应用的热点. 本文结合本课题组在多维色谱方面的工作介绍了多维色谱技术的发展及应用, 重点介绍在蛋白质组学平台中的应用.

## 关键词

多维色谱  
蛋白质组学  
质谱  
一维分离

## 1 引言

多维分离技术, 即采用不同的分离模式, 通过在线或离线的方式进行偶联, 从而实现对复杂样品的分离. 该技术因其潜在的高峰容量, 在复杂样品的分离分析中备受关注. 早在 20 世纪 80 年代, Giddings 就建立了多维分离系统的数学模型<sup>[1,2]</sup>, 指出满足一定的条件下, 多维分离系统的峰容量应为各单维分离模式峰容量的乘积, 即如果联用的  $n$  维分离模式的峰容量分别为  $N_1, N_2 \dots N_n$ , 则总峰容量为  $N_1 \times N_2 \dots N_n$ . 我国科学家早在 90 年代, 对多维气相色谱进行了研究, 对双柱系统分析未知样品能提供交叉信息进行了试验, 采用模糊数学方法和领域专家的逻辑, 编制智能定性软件, 对包括重叠峰在内的流出峰进行定性, 通过空气毒物卤代烃化合物对双柱智能定性方法进行了验证<sup>[3]</sup>. 并针对复杂混合物样品分离应采用统一方法、多柱系统, 提出了智能多柱系统的概念, 探讨了智能多柱系统选择性优化原则和多柱系统选择性优化方法<sup>[4]</sup>. 在液相色谱的多维分离系统的研究方面, 起步较早而且比较成功的是 Jorgenson 和其合作者, Jorgenson 等人早在 1990 年在研究“中心切割”技术的基础上第一次实现了“全

二维切割”<sup>[5]</sup>, 他们用两个定量管和一个八通阀实现了离子交换色谱(IE)和体积排阻色谱(SEC)的在线连接. 自此, 以八通阀<sup>[5,6]</sup>、四通阀<sup>[7]</sup>、十通阀<sup>[8]</sup>为代表的接口模式偶联的全二维或多维色谱模式纷纷被设计运用. 然而, 随着微量样品的分析需要特别是毛细管柱的使用, 大体积样品管已经不能满足需要, 人们开始探索新的接口和新的多维模式. 20 世纪 90 年代, 作为功能基因组学的重要支柱——蛋白质组学的出现, 使得多维色谱的研究再次成为色谱学家研究的热点.

本文以本课题组在多维液相色谱方面的研究作为主线, 评述了多种多维色谱模式及其在从小分子到大分子分离分析上的应用, 重点是在蛋白质组学中的应用.

## 2 反相高效液相色谱-毛细管电泳

毛细管电泳(CE)技术因其具有快速和所需样品量少等优点在多维色谱偶联中经常被用作第二维分离模式, 接口技术是影响高效液相色谱(HPLC)与 CE 联用的关键技术之一. 各种针对接口的研究相继出现, 例如 Jorgenson 等设计的光门阀<sup>[9]</sup>与流动阀<sup>[10]</sup>. 我们在发展反相高效液相色谱(RPLC)和 CE 联用分离

平台方面也进行了许多成功的尝试,设计了一种动态脉冲接触式接口技术<sup>[11]</sup>,在设计原理上有新的突破.以两根毛细管的接触实现进样,该设计提高了进样效率,缩短了样品的冲洗时间,减少谱带展宽,以此接口为核心的 RPLC-CE 二维分离系统在对中药提取物的分离中展现了高的分离效能.另一种新型的样品堆积式接口<sup>[12,13]</sup>用来连接毛细管反相液相色谱(cRPLC)和 CE,从而对中药中成百上千个组分进行高效分离.为了隔绝第二维电泳所使用的万伏正高压对第一维分离的影响而设计研发了重力进样接口<sup>[14]</sup>,如图 1 所示.该接口可保证第一维流出组分稳定地进到 CE,同时为了实现 CE 与基质辅助激光解吸离子化(MALDI)质谱的联用,设计了 CE-MALDI 样品沉积接口,凭借重力进样接口和 CE-MALDI-MS 接口构建了(HPLC-CE-MALDI-MS)二维分离系统,并使用该系统分析了鼠肝蛋白质样品.

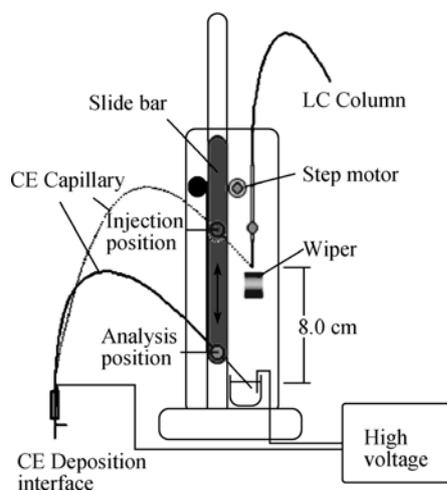


图 1 RPLC-CE 重力进样接口示意图<sup>[14]</sup>

微流控电泳芯片以其适合微量样品的操作,满足快速分析的要求等特点成为近年来研究的热点,同时实现高效液相色谱与微流控芯片电泳联用又是一个新挑战.我们在芯片上设计了微孔作为两维分离的口,直接将第一维的毛细管色谱柱插入该微孔,同时利用微流控芯片的进样方式,通过电压在两个状态间的反复切换使样品从第一维到第二维进行转移和分离,从而实现 RPLC 与微流控芯片电泳的在线联用<sup>[15,16]</sup>.该二维分离系统采用激光诱导荧光(LIF)

为检测器,对异硫氰酸(FITC)荧光素标记的肽段混合物进行了成功分离,证明了该体系强大的分离能力.

RPLC-CE 二维分离系统在快速蛋白质组学研究中显示了优越性,但是在系统通量方面还存在不足,可以通过发展并行的多维分离方法,例如液相色谱毛细管柱阵列与芯片上的电泳阵列相结合,从而实现快速且高通量的分离分析平台.

### 3 反相高效液相色谱-毛细管等电聚焦

等电聚焦(IEF)是重要的分离技术之一,用于分离 pH 梯度中不同等电点的两性离子分子.蛋白质分子属于两性分子,因此 IEF 在蛋白质组学领域得到广泛应用.毛细管等电聚焦(CIEF)结合了常规凝胶 IEF 的高分离能力和现代毛细管电泳的特点.由于小内径可较平板凝胶更为有效地散热,可以施加高电场,使分离时间缩短,分离效率得到很大提高.另外,CIEF 实验中使用的 pH 环境与 CE 模式相比也比较温和,以便使样品都得到离子化.这些独特之处使 CIEF 技术近年来获得了迅速发展.随着涂层技术的成熟、两性电解质质量的提高以及管径的进一步减小,CIEF 的分离效率也将进一步提高<sup>[17]</sup>.激光诱导荧光是一种非常灵敏的检测方法,在极端条件下,甚至可以进行单分子检测.而且,荧光分析的动态线性范围较宽,可进行定量分析,在定量蛋白质组学研究方面有很大的潜力<sup>[18]</sup>.

我们将毛细管反相液相色谱和 CIEF 偶联,结合 LIF 检测组成一个全二维系统<sup>[19]</sup>,二者分离机理正交,对蛋白质有极高的分辨能力,能将蛋白聚焦在极窄的条带内,使样品浓缩几个数量级.这个特点使 CIEF 非常适合于作为多维分离体系的最后一维,当样品在前一维被稀释后,通过 CIEF 得到浓缩,极大地提高灵敏度.另外,CIEF 的样品容量较其他毛细管电泳模式大得多,进样时整根毛细管充满样品,有利于低浓度组分的聚焦,而且与 cRPLC 的流出体积匹配.全柱成像激光诱导荧光检测(WCID)能避免检测时移动带来的问题,使 CIEF 的分辨率不会损失在检测过程中,是近年来在 CIEF 中应用较多的检测技术<sup>[20]</sup>.对多维系统来说,阵列技术在提高系统通量上作为第二维是最佳选择.基于以上方面考虑,我们自行设计并制作了用于阵列毛细管的扫描式全柱成像 LIF 检

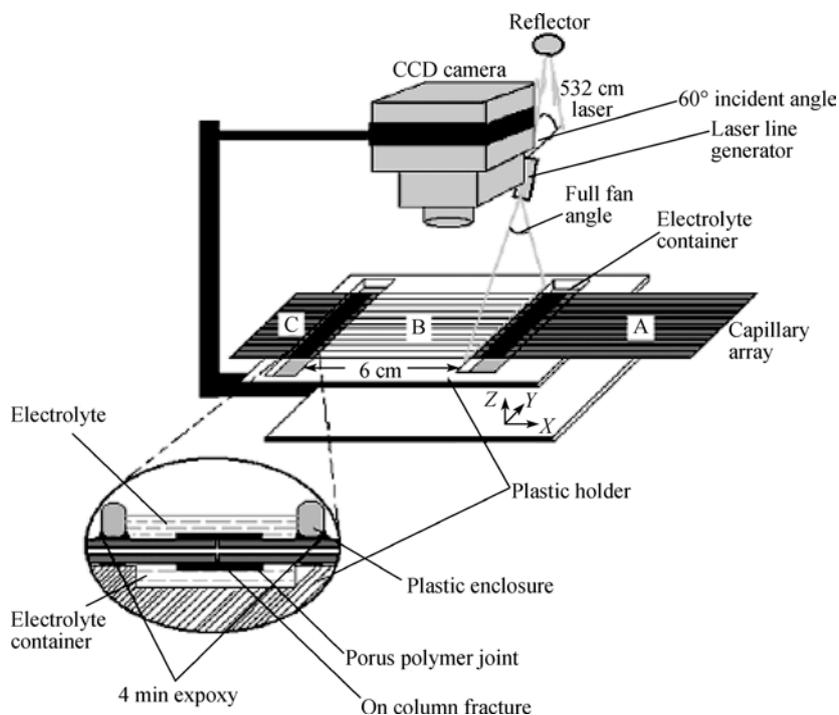


图 2 阵列毛细管的扫描式全柱成像 LIF 检测装置示意图<sup>[21]</sup>

测装置, 如图 2 所示, 研制开发了多用途的激光诱导荧光检测器, 发展了基于 RPLC-CIEF 和全柱检测荧光技术的二维分离检测平台, 对复杂的蛋白质样品进行了高效、快速的分离鉴定<sup>[21]</sup>. 该体系有望在比较蛋白质组学和定量蛋白质组学研究中发挥潜力. 我们进一步发展了靶上酶解技术, 成功地将分离系统与 MALDI 质谱进行联用, 为蛋白质组学研究增添了新的思路和手段<sup>[22]</sup>.

#### 4 多维高效液相色谱

目前 HPLC 在蛋白质组学研究中占有十分重要的地位, 是一种主导技术, 因为 HPLC 在可靠性、重现性和使用范围方面有明显优势<sup>[23,24]</sup>. 反相液相色谱具有分析速度快、分离效率高、流动相组分与质谱匹配等优点, 通常被选为多维色谱分离中最后一维的分离模式. 而多种不同的 HPLC 模式(IE、SEC、亲和色谱(AC))等可以作为样品的预分离模式.

Shotgun 技术是蛋白质组学中应用很广的典型的多维液相技术, 开创了多维直接蛋白质鉴定技术(MUDPIT)的先河. Yates 等人设计组装制成双向柱

(biphase)<sup>[25,26]</sup>, 将强阳离子交换填料和反相色谱的填料装填在一根色谱柱内, 采用迭代的方式对样品进行分离检测. 该技术的中心理念是先将蛋白质酶解成肽段, 然后经过双向柱分离, 分离后的肽段通过质谱得到串级信息, 最后数据库搜索匹配得到蛋白质信息. 美国戴安公司将这一技术做成了商品化仪器即 LC-Packings 纳升级二维 HPLC 系统, 并推广到各实验室, 在近几年的蛋白质鉴定研究中发挥了重大作用. 我们进一步优化了系统分离条件, 并将这一系统运用到肝癌高转移潜能的 C57 鼠模型(LCI-D20, 即将转移性肿瘤切块接种到鼠肝并培育 20 天后的鼠模型)等组织样品的蛋白质组学研究中<sup>[27-30]</sup>. 在原有的二维分离之前增加一维预分离也是提高分离效率的手段之一, 我们进一步详细考察了二维与三维分离效果以及预分离前后的酶解时机对最后鉴定结果的影响, 得到大量有价值的实验数据与经验<sup>[31]</sup>. 为了提高系统性能、降低成本, 实验室自行研制了大口径颗粒固定化型无塞整体预柱, 被接在反相柱的柱前, 进行肽段馏分的在线除盐与浓缩<sup>[32,33]</sup>. 由于这些自制预柱不仅制作工艺简便易行、机械强度高、通透性好,

而且样品负载量大、回收率高, 非常适合于在线样品预处理. 在线富集时, 短而粗的预柱更能和较高富集流速相匹配, 样品洗脱时也不会引起过高的柱压降. 通过比较, 我们认为实验室自制预柱在富集性能及重现性方面完全可代替商业产品, 应用在实际样品测定中, 分析不同样品使用不同预柱, 可防止样品间相互污染, 而且成本低. 目前, 我们大多采用自制的预富集柱和自行填充的毛细管反相分析柱<sup>[16]</sup>, 不仅大大降低了研究成本, 而且因为我们对自行制作的分析柱填料和性能充分了解, 更加提高了实验的可靠性和灵活性.

在蛋白质组学研究中, 质谱是最主要的检测手段, 原因在于它可以提供蛋白质的结构信息(氨基酸序列)以进行特异性较高的蛋白质鉴定. 电喷雾离子化(ESI)和 MALDI 是两种常用的针对蛋白质或肽段等生物大分子的软电离技术. 二者离子化机理不同, 对氨基酸组成和排列顺序不同的肽段的电离偏好不同, 因此二者可提供互补信息. 鉴于此, 我们实验室发展了 ESI 和 MALDI 联合使用的并行分析策略, 并将之与二维液相色谱分离平台联用对复杂蛋白质样品进行鉴定<sup>[34]</sup>, 相对于单独的 ESI 或 MALDI 鉴定, 在未重复分离过程和延长实验时间的前提下能够提供更全面、置信度更高的样品信息, 提高了可信度. 在蛋白质鉴定方面提出了“四步法”, 即依次按照以下四步鉴定蛋白: PMF, 串级, 离子强度得分以及色谱保留时间<sup>[35,36]</sup>. 因为肽段在反相液相色谱的保留时间主要与组成肽段的氨基酸的疏水性质有关, 因此通过对肽段的氨基酸的疏水残基的保留时间求和, 就可以预测它的保留时间. 通过增加预测保留时间这一辅助信息可以提高鉴定蛋白的数量和可信度.

蛋白质组学的样品通常都是复杂样品体系, 其组分种类多、含量差别大、已知信息量少. 以人类细胞为例, 从组织和细胞中直接提取的蛋白质, 种类高达上万种, 而高丰度蛋白质与低丰度蛋白质在浓度范围上相差六个数量级甚至更高, 与疾病相关的低丰度蛋白质含量少, 有的低于仪器的最低检测限, 造成低丰度蛋白质难以检测. 增大上样量是解决该问题最直接的方法, 但是增大上样量的同时, 样品中高丰度蛋白质的量也随之增加, 这势必造成其信号压制低丰度蛋白质的信号, 损失了仪器的分辨能力. 实

验证明如果不将高丰度蛋白质在检测之前除掉, 中低丰度蛋白质在其信号压制下很难检测. 因此从复杂样品中将高丰度蛋白质去除是检测低丰度蛋白质的一个前提条件. 一个理想的去除高丰度蛋白质的研究技术平台应当具有三方面的功能: (1) 最大限度的除去高丰度蛋白质; (2) 富集检测中低丰度蛋白质; (3) 具有通用性、低成本和快速灵活的特点. 目前蛋白质组学通常所采用的免疫亲和技术因其可作用的对象范围窄、成本高等局限性不能满足以上需要, 新技术和新方法的突破成为众望所归. 我们提出并建立了基于多维色谱分离的方法去除高丰度蛋白质的新技术平台<sup>[37,38]</sup>. 首先使用鼠肝为对象对蛋白质提取条件作了对比研究<sup>[39]</sup>, 然后采用可溶性的蛋白质样品对系统的可行性进行验证, 并初步优化试验条件, 进一步运用到人肝蛋白质中高丰度蛋白质的去除工作中. 图 3 是分离鼠肝可溶性蛋白质的二维拟合图, 图上标示了部分高丰度蛋白质. 只有将高丰度蛋白质分离之后, 中低丰度的蛋白质才有机会得以检测分析.

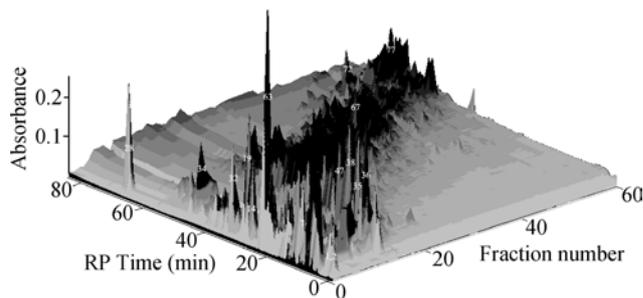


图 3 二维液相分离鼠肝可溶性蛋白质拟合图<sup>[37]</sup>

现有的多维液相色谱分离模式在蛋白质组学的研究中发挥了重大作用, 然而也存在自身缺点. 因为每一维分离模式都是采用单根柱子进行分离, 也就是说下一维只有对上一个一维馏分分离完毕, 才能接下来对下一个馏分进行分离, 如此循环, 直至将所有馏分分离完毕. 所以这种单根串联模式势必限制了系统的通量, 造成分离时间的延长. 相反, 如果第二维采用阵列并行式分离, 将第一维的馏分依次洗脱到第二维的多根分离柱头, 让这些并行的第二维分离柱同时完成分离任务, 无疑大大缩短了分离时间, 提高了系统通量. 据此, 我们自行搭建了阵列式

二维液相色谱分离-质谱检测技术平台<sup>[40,41]</sup>, 实物图照片如图 4 所示. 该平台以 SCX 为第一维色谱分离模式, 以并行的 18 根 cRPLC 为第二维分离模式, SCX 柱采用阶梯式盐梯度洗脱, 洗脱下来的组分通过两个十通阀的切换被依次保留在 18 个自制预富集柱的柱头, 进行样品的浓缩和除盐, 再反冲到相应的反相色谱柱头, 然后利用多通道式接口在并行式 18 根反相色谱柱上同时完成色谱分离. 色谱流出物通过一个自行设计加工的接口并行式点样到 MAIDI 靶板上, 进行质谱鉴定. 该系统使分离时间缩短了 18 倍, 实现真正的蛋白质组学研究所需的高通量分析.

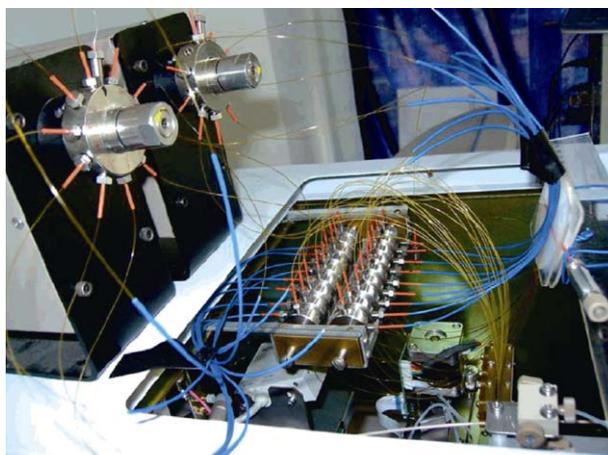


图 4 阵列式二维液相色谱系统实物图照片<sup>[41]</sup>

目前以 shot-gun 技术为中心发展起来的 MUDPIT, 都是先将蛋白质酶解成肽段, 然后经过多维分离, 质谱鉴定, 即 bottom-up 路线. 这条路线在大规模鉴定未知蛋白质方面发挥了巨大作用, 尤其在鉴定低丰度蛋白质方面成绩突出. 然而, 相比双向凝胶电泳为代表的“top-down”技术路线, 前者也有着固有的缺点, 因为这项技术完全以酶解后肽段的串级信息为基础进行蛋白质鉴定, 因而损失了关于完整蛋白质的分子信息, 尤其在翻译后修饰 (PTMs) 方面提供的信息量少. 酶解产生的更为复杂的肽段不仅

给色谱分离造成困难, 而且对质谱扫描速度提出挑战. 因此, 如何利用多维液相色谱模式分离完整蛋白质成为大家关注的焦点之一. 目前, 国际上仅几个课题组报道液相色谱模式分离完整蛋白质<sup>[42,43]</sup>. 我们在已有多维色谱平台研究的基础上, 进一步构建了 SCX/cRPLC 全二维液相色谱平台, 用于完整蛋白质的分离<sup>[44]</sup>, 同时发展快速靶上酶解技术, 实现液相色谱分离与质谱鉴定的耦合. 该技术已在人肝蛋白质组学中得到运用. 酶解技术是连接分离和质谱鉴定的桥梁和关键, 该平台采用离线的靶上酶解. 我们还发展了以磁性纳米球为基体的固定酶技术<sup>[45,46]</sup>. 这些离线的酶解技术一般与 MALDI 质谱联用. 为了缩短分析时间, 在线酶解技术成为新的目标, 于是以整体柱微反应器为代表的新酶解技术应运而生<sup>[47-49]</sup>. 然而要真正实现在线酶解, 还有一些具体的技术壁垒需要克服, 比如, 酶解需要的碱性 pH 值与液相分离时的酸性环境不匹配, 酶解微反应器的记忆效应等. 随着技术进步和工艺改进, 真正的在线酶解耦合电喷雾质谱鉴定将成为可能. 我们在原有的阵列式二维液相色谱分离肽段的基础上加紧研究制作的新工艺新方法, 把阵列式二维分离平台拓展运用到完整蛋白质样品的分离中, 目前已经取得阶段性成果.

## 5 结束语

多维液相色谱技术已经广泛的运用到从小分子到大分子的分离分析中. 在仪器硬件方面, 商品化的色谱仪器日益完善, 但目前以进口为主, 如何研制我们自己的有自主知识产权的关键设备同时开发相应的分离分析方法已成为当下关注的焦点之一, 也是提高我国科技能力的一个重要方面. 在技术方法方面, 尽管新技术新方法不断涌现, 但是还不能完全满足实际应用的需要, 尤其是缺少与蛋白质组学中的临床疾病相关的技术方法. 然而, 随着多维色谱分离技术的提高, 分离方法的不断进步, 具有高通量高分离能力的多维液相色谱必将在蛋白质组学等领域发挥更大作用.

致谢 本工作得到国家重点基础研究发展计划 (编号: 2007CB914100/3)、国家高技术研究发展计划 (编号: 2006AA02A308) 和国家自然科学基金 (批准号: 20705006) 项目资助, 特此一并致谢.

## 参考文献

- 1 Giddings J C. Two-dimensional separations-concept and promise. *Anal Chem*, 1984, 56: 1258A
- 2 Giddings J C. Concepts and comparisons in multi-dimensional chromatography. *J High Resolut Chromatogr*, 1987, 10: 319—323
- 3 张祥民, 卢佩章. 色谱双柱系统智能定性方法. *化学学报*, 1996, 54: 906—910
- 4 张祥民, 王文领, 邓家祺. 色谱智能多柱系统选择性优化. *色谱*, 1995, 13(5): 329—333
- 5 Bushey M M, Jorgenson J W. Automated instrumentation for comprehensive 2-dimensional high-performance liquid-chromatography of proteins. *Anal Chem*, 1990, 62: 161—167
- 6 Opiteck G J, Lewis K C, Jorgenson J W. Comprehensive on-line LC/LC/MS of proteins. *Anal Chem*, 1997, 69: 1518—1524
- 7 Opiteck G J, Ramirez S M, Jorgenson J W. Comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography for the isolation of overexpressed proteins and proteome mapping. *Anal Biochem*, 1998, 258: 349—361
- 8 Wagner K, Miliotis T, Marko-Varga G, Bischoff R, Unger K K. An automated on-line multidimensional HPLC system for protein and peptide mapping with integrated sample preparation. *Anal Chem*, 2002, 74: 809—820
- 9 Moore Jr A W, Jorgenson J W. Rapid comprehensive 2-dimensional separations of peptides via RPLC optically gated capillary zone electrophoresis. *Anal Chem*, 1995, 67: 3448—3455
- 10 Hooler T F, Jorgenson J W. A transparent flow gating interface for the coupling of microcolumn LC with CZE in a comprehensive two-dimensional system. *Anal Chem*, 1997, 69: 4134—4142
- 11 黄爽, 徐韶瑛, 张祥民. 毛细管高效液相色谱-毛细管电泳二维分离接口的优化. *分析化学*, 2000, 28(12): 1467—1471
- 12 Zhang X M, Hu H L, Xu S, Yang X H, Zhang J. Comprehensive two-dimensional capillary LC and CE for resolution of neutral components in traditional chinese medicines. *J Sep Sci*, 2001, 24: 385—391
- 13 Hu H, Yang P, Zhang X. A novel method for separation of components in traditional chinese medicines using comprehensive two-dimensional micro-chromatography. *Anal Sci*, 2001, 17: supplement a427—429
- 14 Zhang J, Hu H L, Gao M X, Yang P Y, Zhang X M. Comprehensive two-dimensional chromatography and capillary electrophoresis coupled with tandem time-of-flight mass spectrometry for high-speed proteome analysis. *Electrophoresis*, 2004, 25(14): 2374—2383
- 15 Yang X H, Zhang X M, Li A Z, Zhu S Y, Huang Y P. Comprehensive two-dimensional separations based on capillary high-performance liquid chromatography and microchip electrophoresis. *Electrophoresis*, 2003, 24(9): 1451—1457
- 16 Zhang X M, Huang S. Single step on-column frit making for capillary high performance liquid chromatography using sol-gel technology. *J Chromatogr A*, 2001, 910: 13—18
- 17 Shen Y, Xiang F, Veenstra T D, Fung E N, Smith R D. High-resolution capillary isoelectric focusing of complex protein mixtures from lysates of microorganisms. *Anal Chem*, 1999, 71: 5348—5353
- 18 Yang X, Wang X, Zhang X. Capillary zone electrophoresis separation of low concentration stimulants in human urine with laser induced fluorescence detection. *Anal Chim Acta*, 2005, 549: 81—87
- 19 Mao Y, Zhang X M. Comprehensive two-dimensional separation system by coupling capillary reverse-phase liquid chromatography to capillary isoelectric focusing for peptide and protein mapping with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*, 2003, 24(18): 3289—3295
- 20 张祥民, 毛煜. 全柱成像激光诱导荧光微阵列芯片检测器高等学校化学学报. *高等学校化学学报*, 2004, 25(suppl): 68—69
- 21 Mao Y, Li Y, Zhang X M. Array based capillary IEF with a whole column image of laser-induced fluorescence in coupling to capillary RPLC as a comprehensive 2-D separation system for proteome analysis. *Proteomics*, 2006, 6(2): 420—426
- 22 Yu W J, Li Y, Deng C H, Zhang X M. Comprehensive two-dimensional separation in coupling of reversed-phase chromatography with capillary isoelectric focusing followed by MALDI-MS identification using on-target digestion for intact protein analysis. *Electrophoresis*, 2006, 27(11): 2100—2110
- 23 Tang J, Gao M X, Deng C H, Zhang X M. Recent development of multi-dimensional chromatography strategies in proteome research. *J Chromatogr B*, 2008, 866(1-2): 123—132
- 24 Gao M, Jin H, Yang P, Zhang X M. Chromatographic prefractionation prior to two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry identifies: Application to the complex proteome analysis in rat liver. *Anal Chim Acta*, 2005, 553: 83—92

- 25 Link A J, Eng J, Schieltz D M, Carmack E, Mize G J, Morris D R, Garvik B M, Yates J R. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol*, 1999, 17: 676—682
- 26 Washburn M P, Wolters D, Yates J R. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol*, 2001, 19: 242—247
- 27 Wang Y, Zhang J, Liu C, Gu X, Zhang X M. Nano flow multidimensional liquid chromatography with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry for proteome analysis of Hepatocellular Carcinoma. *Anal Chim Acta*, 2005, 530: 227—235
- 28 王彦, 高明霞, 谷雪, 张祥民. 鼠肝蛋白质组的纳升级多维液相色谱分离. *色谱*, 2005, 23(1): 41—45
- 29 Zhang J, Xu X Q, Zhang X M. Analysis of nuclear proteome in C57 mouse liver tissue by a nano-flow 2-D -LC-ESI-MS/MS approach. *J Sep Sci*, 2006, 29: 2635—2646
- 30 Shen H L, Cheng G, Fan H Z, Zhang J, Zhang X M, Lu H J, Liu C L, Sun F X, Jin H, Xu X J, Xu G B, Wang S, Fang C Y, Bao H M, Wang Y, Wang J, Zhang H, Yu Z I, Liu Y K, Tang Z Y, Yang P Y. Expressed proteome analysis of human hepatocellular carcinoma in nude mice (LCI-D20) with high metastasis potential. *Proteomics*, 2006, 6 (2), 528—537
- 31 Zhang J, Xu X Q, Gao M X, Zhang X M. Comparison of 2-D LC and 3-D LC with post- and pre-tryptic-digestion SEC fractionation for proteome analysis of normal human liver tissue. *Proteomics*, 2007, 7(4): 500—512
- 32 Gu X, Wang Y, Zhang X M. Large-bore particle-entrapped monolithic precolumns prepared by a sol-gel method for on-line peptides trapping and preconcentration in multidimensional liquid chromatography system for proteome analysis. *J Chromatogr A*, 2005, 1072(2): 223—232
- 33 Gu X, Wang Y, Zhang X M. Preparation and characterization of sol-gel SE-30-coated silica stationary phase for capillary liquid chromatography. *Chromatographia*, 2005, 62: 483—491
- 34 Zhang J, Gao M X, Tang J, Zhang X M. Improvements in protein identification confidence and proteome coverage for human liver proteome study by coupling a parallel mass spectrometry/mass spectrometry analysis with multi-dimensional chromatography separation. *Anal Chim Acta*, 2006, 566(2): 147—156
- 35 Wang Y, Zhang J, Gu X, Zhang X M. Protein identification assisted by the prediction of retention time in liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*, 2005, 826: 122—128
- 36 Wang Y, Gu X, Zhang J, Zhang X M. Prediction of peptide retention in RP-LC. *Chromatographia*, 2005, 62(7-8): 385—392
- 37 Gao M X, Zhang J, Deng C H, Yang P Y, Zhang X M. Novel strategy of high-abundance protein depletion using multidimensional liquid chromatography. *J Proteome Res*, 2006, 5(10): 2853—2860
- 38 Gao M X, Deng C H, Yu W J, Zhang Y, Yang P Y, Zhang X M. Large scale depletion of the high-abundance proteins and analysis of middle- and low-abundance proteins in human liver proteome by multidimensional liquid chromatography. *Proteomics*, 2008, 8(5): 939—947
- 39 Gao M X, Li N, Zhang J, Yang P Y, Zhang X M. The study of three extraction methods for pre-separation and enrichment: Application to the complex proteome separation in rat liver. *Sep Puri Tech*, 2006, 42: 170—176
- 40 Zhang X M, Liu C, Wang Y, Zhang J, Mao Y, Yang P Y. Multi-dimensional liquid chromatography with parallel capillary columns followed by mass spectrometry for high throughput proteomic studies. HUPPO 2nd Annual & IUBMB World Congress, Montreal, Canada: Molecular & Cellular Proteomics, 2003, 2(9): 692
- 41 Gu X, Deng C, Yan G, Zhang X M. Capillary array reversed-phase liquid chromatography-based multidimensional separation system coupled with MALDI-TOF-TOF-MS detection for high-throughput proteome analysis. *J Proteome Res*, 2006, 5: 3186—3196
- 42 VerBerkmoes N C, Bundy J L, Hauser L, Asano K G, Razumovskaya J, Larimer F, Hettich R, Stephenson Jr J L. Integrating “Top-Down” and “Bottom-Up” mass spectrometric approaches for proteomic analysis of *shewanella oneidensis*. *J Proteome Res*, 2002, 1: 239—252
- 43 Millea K M, Krull I S, Cohen S A, Gebler J C, Berger S J. Integration of multidimensional chromatographic protein separations with a combined “Top-Down” and “Bottom-Up” proteomic strategy. *J Proteome Res*, 2006, 5: 135—146
- 44 Gao M X, Yu W J, Zhang Y, Zhang X M. Integrated strong cation exchange/capillary reversed-phase liquid chromatography/on-target digestion coupled with mass spectrometry for identification of intact human liver tissue proteins. *Analyst*, 2008, 133(9): 1261—1267
- 45 Li Y, Yan B, Deng C, Tang J, Liu J Y, Zhang X M. On-plate digestion of proteins using novel trypsin-immobilized magnetic nanospheres for MALDI-TOF-MS analysis. *Proteomics*, 2007, 7: 3661—3671
- 46 Lin S, Yao G, Qi D, Li Y, Deng C H, Yang P Y, Zhang X M. Fast and efficient proteolysis by microwave-assisted protein digestion

- using trypsin-immobilized magnetic silica microspheres. *Anal Chem*, 2008, 80: 3655—3665
- 47 Gao M, Zhang P, Hong G, Guan X, Yan G Q, Deng C H, Zhang X M. Novel monolithic enzymatic microreactor based on single-enzyme nanoparticles for highly efficient proteolysis and its application in multidimensional liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 2009, doi:10.1016/j.chroma.2009.05.003
- 48 Feng S, Ye M, Jiang X, Jiang X, Jin W, Zou H. Coupling the immobilized trypsin microreactor of monolithic capillary with  $\mu$ RPLC-MS/MS for shotgun proteome analysis. *J Proteome Res*, 2006, 5: 422—428
- 49 Duan J, Sun L, Liang Z, Zhang J, Wang H, Zhang L, Zhang W, Zhang Y. Rapid protein digestion and identification using monolithic enzymatic microreactor coupled with nano-liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2006, 1106: 165—174

## The development of multidimensional liquid chromatography

GAO MingXia & ZHANG XiangMin\*

Chemistry Department, Fudan University, Shanghai 200433, China

**Abstract:** Compared to the one-dimensional separation mode, the greatest advantage of multidimensional liquid chromatography is to achieve a higher peak capacity. With the advance of proteome and the development of expression profiling, the new separation technology with high-throughput becomes more and more important. The multidimensional high performance liquid chromatography is getting attractive due to its advantages, such as high speed and efficiency, automation and easy combination with other technologies. This review introduces technological progress on the multi-dimensional liquid chromatography and its applications. Significant contributions from our research are focused, especially in the field of proteome.

**Keywords:** multidimensional chromatography, proteome, mass spectrometer, review