

蛋白质组研究中的多维液相色谱技术

王智聪^{1, 2}, 张庆合^{1, 2}, 李 彤¹, 赵中一², 张维冰¹

(1. 中国科学院大连化学物理研究所 大连依利特分析仪器有限公司, 辽宁 大连 116011;

2. 中国地质大学 材料与工程学院, 湖北 武汉 430074)

摘 要: 对近年来蛋白质组研究中的多维液相色谱技术进行了系统综述, 详细介绍了在线及离线式阀切换接口的 DALPC(direct analysis of large protein complexes) 技术及整体式无接口的 MudPIT(multidimensional protein identification technology) 系统, 也系统阐述了其在蛋白质组研究中的应用。引用文献 50 篇。

关键词: 蛋白质组; 多维液相色谱; DALPC; MudPIT

中图分类号: O657. 72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004- 4957(2005) 05- 0130- 06

The Multidimensional Liquid Chromatography Technology in Proteomics

WANG Zhi_cong^{1, 2}, ZHANG Qing_he^{1, 2}, LI Tong¹, ZHAO Zhong_yi², ZHANG Wei_bing¹

(1. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Science, Dalian Elite Analytical Instruments Co., Ltd.,

Dalian 116011, China; 2. Faculty of Material Science and Chemical Engineering, China University of Geosciences, Wuhan 430074, China)

Abstract: Multidimensional liquid chromatography technology in proteomics with 50 references was reviewed. The technology of online and offline direct analysis of large protein complexes(DALPC) based on the valve interface and the integrated multidimensional protein identification technology(MudPIT) with no interface and their applications on proteomics were outlined.

Key words: Proteomics; Multidimensional liquid chromatography; DALPC; MudPIT

蛋白质组技术是后基因时代研究基因功能的重要内容^[1], 其中二维凝胶电泳(2D- GE) 结合质谱是目前蛋白质组研究中分离和识别蛋白使用最广泛的方法^[2~ 7]。在 2D- GE 中, 蛋白质混合物首先根据等电点的不同在第一维等电聚焦电泳中分离, 进而根据相对分子质量的大小在第二维中通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 虽然 2D- GE 技术在一次分析中可以识别上千种蛋白质, 但整个过程包括对 2D- GE 分离的蛋白质点进行切割、蛋白水解提取多肽混合物、进一步质谱分析等多步手工操作, 自动化程度低, 重复性较差且耗时长。同时也较难识别极端等电点(*PI*) 和相对分子质量(*M_r*)、低丰度及疏水性膜相关蛋白等。而近年来在蛋白质组研究中新颖的多维液相色谱(MD- LC) 技术, 因便于接口控制、歧视效应小、易与质谱连接、自动化程度高等优势, 作为与 2D- GE 互补的技术在大规模蛋白质组研究中已发挥了重要作用。

多维液相色谱利用两种或多种不同分离机理组合不同模式的色谱进行样品的正交分离。Giddings 等^[8~ 10]指出, 多维液相色谱系统的峰容量是其构成的各个一维色谱峰容量的乘积, 因此能大大提高分离复杂样品的能力。不同的液相色谱模式如尺寸排阻色谱(SEC)、亲和色谱(AC)、离子交换色谱(IEC) (包括阳离子交换色谱 SCX 和阴离子交换色谱 AE)、疏水作用色谱(HIC)、反相色谱(RP) 等都可以用来组合、构建多维液相色谱。在近年蛋白质组研究的多维液相色谱中, SEC 常用于样品的预处理, AC 较多用于同位素亲和标记技术(ICAT) 中特定组分的分离, 而常用的是 2D IEC/ RP 模式, 其中 2D SCX/ RP 最为常见。

本文在介绍多维色谱原理的基础上, 主要针对近年来蛋白质组研究中大规模蛋白质混合物直接分析技术(direct analysis of large protein complexes, DALPC)、多维蛋白质识别技术(multidimensional protein identification technology, MudPIT) 等多维液相色谱技术进展进行了系统综述, 详细介绍了常见的接口技术, 在线及离线式阀切换接口的 DALPC 技术及整体式无接口的 MudPIT 系统, 并说明其在蛋白质组研究中的应用。

收稿日期: 2004- 09- 16 修回日期: 2005- 05- 12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20375040)

作者简介: 王智聪(1977-), 男, 内蒙古和林格尔人, 硕士研究生; 李 彤, 联系人, Tel: 0411- 83632109,

E- mail: tongli@elitehplc.com

1 多维液相色谱中的接口技术

多维液相色谱依次使用几种不同分离机理的色谱模式。SCX 因高柱容量常作为第一维系统, 根据样品组分带电性质的差异进行分离; 由于 RP 色谱与 SCX 的流动相兼容, 对第一维洗脱产物脱盐后方便与质谱连接, 因此常作为第二维系统, 根据样品极性的差异进一步分离。多维液相色谱技术的核心是将第一维洗脱的样品有效导入到第二维中, 因此切换接口是整个系统的关键。王智聪等^[11]对二维液相色谱中常用的样品环储存、平行柱分析以及捕集柱捕集等接口技术进行了比较。使用两个样品环储存及平行柱分析形式接口的关键是交替储存、分析第一维洗脱产物, 其中一只样品环(或分析柱)在储存(或捕集)第一维洗脱产物的同时, 另一只样品环(或分析柱)内储存的一维洗脱产物进行第二维分析, 通过切换阀进行控制, 实现样品的有效转移。在这两种接口技术中, 第二维色谱的总分析时间不能大于储存或捕集第一维洗脱产物的时间, 因此要求第二维色谱实现快速分析。而第二维的高速分析又不利于提高峰容量, 因此导致整个系统峰容量偏低, 虽然理论峰容量能达到 2 500, 但实际上识别的蛋白质数目一般小于 50^[12~15]。在大规模、高通量蛋白质组分析中, 样品环储存及平行柱分析这两种接口构成的二维液相色谱因较低的系统峰容量限制了其应用。

而使用较多的 DALPC 技术通常使用捕集柱形式的接口, 将第一维洗脱产物捕集并储存, 脱盐后进一步导入第二维色谱中继续分析。第二维色谱不受分析速度的限制, 也可以使用较缓的梯度速率进行低流速洗脱分析, 并且易与质谱连接, 大大提高了整个系统的分辨率和峰容量。同时捕集柱形式的接口也使不同规格的 SCX 和 RP 更容易匹配, 第一维 SCX 可以采用柱容量较大的色谱柱(如 2.1 mm I.D.), 有利于提高低丰度蛋白的检测能力, 样品通过捕集柱接口转移进入第二维系统, 第二维色谱柱可以采用内径较细的色谱柱以提高检出限。另外, DALPC 技术中可以采用将 SCX 洗脱产物直接导入捕集柱及 RP 进行分析的在线方式, 也可以采用收集 SCX 洗脱的产物之后再进入 RP 分析的离线方式, 方法灵活方便。近年来也出现了整体式无接口的 MudPIT 系统, 其关键是在一支色谱柱内依次填充两种或多种不同分离机理的色谱填料, 不需要切换阀等, 简化了仪器设备。本文根据接口形式的不同将蛋白质组中的多维液相色谱技术分为 DALPC 和 MudPIT 来讨论。

2 DALPC 技术

2.1 在线式 DALPC 技术

DALPC 技术分别以 SCX(或 AE)及 RP 作第一和第二维色谱系统, 接口采用带捕集柱形式的 10 通、8 通、6 通等切换阀。在 DALPC 分析中, 经过预处理的蛋白水解液进入 SCX 中, 采用多步台阶式或较缓的线性梯度逐步增加盐的浓度对 SCX 吸附的肽进行多步洗脱, 并将洗脱产物捕集在捕集柱中, 每一步捕集的肽片断脱盐后再进行乙腈梯度洗脱分离, 质谱检测。整个系统自动化程度较高, 样品进入 SCX 后无需切割或收集而直接在线分析。根据样品的复杂程度决定盐洗脱的次数, 一般进行 5~20 次的多步洗脱。

Schwartz 等^[16]第一维采用 50 mm×1 mm I.D. 的 SCX, 第二维采用 150 mm×0.075 mm I.D. 的反相柱, 捕集柱采用 1 mm×0.3 mm I.D. 的反相柱, 识别出 47 个 39S 线粒体核糖蛋白中的 46 个。通过调整该 2D 系统分析 *S. oncidensis* 蛋白质组, 第一维使用 15 mm×0.5 mm I.D. 的 SCX, 增加盐浓度方式以 15 步洗脱到捕集柱(5 mm×0.3 mm I.D.), 每步通过切换阀将样品导入反相柱(150 mm×0.075 mm I.D.) 分离, 识别出 1 819 个蛋白^[17]。Mitulovic 等^[18]也使用 UltiMate™ 二维系统分析 *Jurkat* 细胞提取蛋白的水解产物, 识别出 174 个蛋白, 而 2D-GE 的方法只识别出 94 个。Link 等^[19]使用 DALPC 技术识别出 78 个 80S 核糖体蛋白中的 75 个, 而 1D RP 只能识别出 56 个。采用 21 步增加盐浓度的洗脱方式对总酵母细胞提取物进行分析, 识别出 78 个 80S 核糖体蛋白中的 71 个。

Maynard 等^[20]使用 DALPC 技术分析 *Saccharomyces cerevisiae* 蛋白质组, 仅用 20 μg 样品就识别出 459 个蛋白。样品经预处理后进入 SCX, 6 步盐溶液洗脱, 使用六路切换阀分别捕集在 6 个捕集柱(0.5 mm×2 mm I.D.) 中, 脱盐后进入 RP 及质谱分析、检测。实验比较了不同进样量对识别肽数的影响, 在

小于 20 μg 的进样量时, 识别的肽数随着进样量的增加而增加, 而当进样量大于 20 μg 时, 识别的肽数基本不再增加。4 次进样肽保留时间的相对标准偏差在 0.5% ~ 2% 之间, 系统重现性较好。

根据样品带电性质的情况, 也可以组建 AE/RP 模式的二维液相色谱。Mawuenyega 等^[21] 采用 35 mm $\times$ 2 mm I. D. 的阴离子交换色谱柱作第一维, 100 mm $\times$ 0.32 mm I. D. 的反相色谱柱作第二维, 捕集柱尺寸为 5 mm $\times$ 1.0 mm I. D., 分 10 步增加盐浓度洗脱的方式利用 DALPC 技术分析 *Caenorhabditis elegans* 蛋白质组, 识别出 1 616 个蛋白, 其中包括 242 个常规方法较难识别的不溶性的转膜蛋白。采用 2D-GE 技术识别的蛋白质相对分子质量和等电点范围为 6~ 139 ku 和 3.48~ 12.41, 而 DALPC 技术无上述歧视效应, 比 2D-GE 技术宽。2D-GE 技术也不能识别低丰度的蛋白, 而 DALPC 技术识别了 549 个 CAI (Codon adaptation index) 值小于 0.5 的低丰度蛋白, 占 3.4%。同时, DALPC 技术也识别了一些后转移修饰的肽, 如 N 端乙酰化作用和磷酸化作用的肽。

Jiang 等^[22] 构建的 2D-LC-MS/MS 系统分析鼠肝亚细胞蛋白质组, 共识别出 564 个蛋白, 识别的蛋白中无论相对分子质量还是等电点范围均比 2D-GE 技术宽, 其中 $M < 10$ ku 的占 3.2%, 最小的为 1.3 ku, 而 $M > 100$ ku 的占 8.5%; 等电点范围在 3.6~ 12.6 之间, 其中 $PI < 4.3$ 的蛋白有 2.5%, $PI > 10$ 的蛋白有 11.5%。Zeng 等^[23] 使用 DALPC 技术和 1D-GE 分析 SARS 病毒蛋白质结构, 识别了 Nucleo capsid (N), Spike (S), Membrane (M) 和 Envelope (E) 等共 4 种病毒蛋白。比较两种技术发现, 在病毒感染细胞及原细胞溶液中使用 DALPC 技术能识别 M、S 和 N 蛋白, 而没有检测到低丰度、疏水性较强的 E 蛋白。在识别 N 蛋白中, 2D 方法达到 85.03% 的序列匹配, 而 1D 方法只获得 68.41%。结合两种方法, 获得了 S 蛋白氨基酸 30.19% 的序列信息。2D 方法能识别 M 蛋白的全部 6 个肽, 而 1D 的方法只能识别 2 个, 进一步证实了两种方法是蛋白质组研究中相互补充的技术。

Vollmer 等^[24] 分析乳糖和葡萄糖提取的 *E. coli* 蛋白质组, 分别识别出 305 和 450 个蛋白。而 Nagele 等^[25] 分析 *E. coli* 蛋白质组, 也识别出 500 多个蛋白, 其中包括疏水性的膜蛋白、相对分子质量极大和极小的蛋白, 以及极端酸性和碱性蛋白。

2.2 离线式 DALPC 技术

在线式 DALPC 技术是将 SCX 洗脱的肽片段直接捕集在捕集柱上再反冲进入 RP 进一步分析, 大多采用台阶式逐步增加盐浓度洗脱的方式, 实现对 SCX 的多步切割, 其最大的优点是易于自动化。而离线式 DALPC 技术是收集 SCX 洗脱液, 然后再进样到 RP 柱上继续分析。与在线方式相比, 离线式 DALPC 技术中 SCX 可以采用大于 20% 乙腈的缓冲液进行洗脱, 同时可以采用线性梯度方式洗脱, 可以有效提高 SCX 的分离能力; 另外, 离线方式不受切割次数的限制(如 10~ 150 次), 能够任意切割 SCX 洗脱产物或选择分析其中感兴趣的部分, 也可以对收集洗脱液进一步处理。此外, 离线式 DALPC 技术可以不使用捕集柱或切换阀, 将收集的 SCX 肽片段直接进入 RP 分析, 进一步简化了仪器设备。

Davis 等^[26] 使用常规尺寸的色谱柱组成二维系统, 分析人肺纤维原细胞及人脑神经胶质瘤细胞提取蛋白的水解物, 一维 SCX(50 mm $\times$ 2.1 mm I. D.) 洗脱的产物捕集在捕集柱(50 mm $\times$ 2.1 mm I. D.) 中, 离线收集捕集柱洗脱的产物, 再进入第二维 RP(250 mm $\times$ 1.0 mm I. D.) 分析, 2D DALPC 技术比 1D RP 的方法多识别 43.9% 的蛋白。

Blonder 等^[27] 利用离线式 DALPC 技术分析 Murine Natural Killer Cell Microsomal 蛋白, 经处理后的样品首先进入 SCX(200 mm $\times$ 2.1 mm I. D.), 盐溶液线性梯度洗脱并切割成 96 个部分, 收集切割部分并离线处理, 再进入反相柱(100 mm $\times$ 0.075 mm I. D.) 及质谱分析检测, 整个系统识别出 2 563 个蛋白, 其中含有 34% (876) 的膜或膜相关蛋白, 而传统的 2D-GE 的方法较难识别这些蛋白。

Fujii 等^[28] 首先进样到 SCX(25 mm $\times$ 0.5 $\rightarrow$ 2.0 mm I. D.), 再以 8 步增加盐浓度的缓冲液洗脱, 分别收集 SCX 洗脱液再进样到捕集柱(2.0 mm $\times$ 0.5 mm I. D.) 脱盐, 利用 10 通阀切换进入 RP(50 mm $\times$ 0.2 mm I. D.) 梯度分析。用该系统对去除人血清白蛋白(HSA)和免疫球蛋白 G(IgG)的血浆样品进行分析, 仅用 1 μL 血浆样品检测出 174 个蛋白。Adkins 等^[29] 对人血浆蛋白质组进行了研究, 首先使用蛋白 A/G 去除血浆样品中的免疫球蛋白, 再水解样品, 经 SCX 分离, 离线收集 120 个切割部分, 再进样到 600 mm $\times$ 0.15 mm I. D. 的 RP 分析柱, 质谱检测, 识别出 490 个蛋白, 占人类蛋白质组组织(the human pro-

teomics organization, UHPO) 计划的 5 000 个目标蛋白质的近 10%。

Peng 等^[30] 利用离线 2D DALPC 技术分析酵母 *S. cerevisiae* 蛋白质组。首先进样到 200 mm×2.1 mm I.D. 的 SCX, 洗脱收集得到 80 个切割片断, 然后真空浓缩, 再对每一部分进行 RP 分析。当对 80 个片断全部分析时, 总共可以识别 1 504 个蛋白。同时也证明随着对 SCX 切割片断数目的增加, 识别的蛋白数目也增加。当只分析其中一半的收集片断时, 虽然节省了一半的分析时间但只能识别其中 84% 的蛋白, 如只分析其中三分之一的片断时, 能节省三分之二的分析时间但只能识别其中 74% 的蛋白。Vollmer 等^[31] 分析 *E. coli* 蛋白质组, 进一步证实了这个结论, SCX 切割成 49 个片断(SCX 120 min 梯度) 识别的肽数是 SCX 切割成 7 个片断(SCX 15 min 梯度) 识别肽数的 2.22 倍, 说明在分析复杂样品时, 随着 SCX 切割片断数目的增加, 2D 方法识别的肽数也增加。

Jacobs 等^[32] 利用 DALPC 技术组建了三维色谱, 首先用 SEC 对整体蛋白进行分离, 对切割收集的部分(5~6 个) 进一步水解, 再进入 SCX 分析, 根据 SEC 产物的复杂程度, 对 SCX 洗脱产物再进行 15~30 次的切割, 总共得到 114 个馏分, 然后进行 RP 分析。分析人记忆上皮细胞(HMEC), 共识别出 1 574 个蛋白。

3 MudPIT 技术

灵活方便的 DALPC 技术在蛋白质组的大规模、高通量分析中显示出了优越的分离能力, 但是离线式 DALPC 技术中样品容易受到污染和浪费, 同时操作费时费力; 在线式 DALPC 技术虽然容易自动化控制, 但有系统复杂等缺点。近年出现的多维蛋白质组识别技术(MudPIT), 不需要切换阀, 采用无接口的整体模式实现自动化分析。MudPIT 采用两相或多相式色谱柱, 即在一支色谱柱内依次填充两种或多种不同分离机理的色谱填料, 如填充 SCX 和 RP 填料实现正交的二维分离。色谱柱的末端经过特殊处理直接与质谱连接, 减小了与质谱接口的死体积, 由于采用取消了切换阀和柱间连接的无接口模式也进一步减小了系统的死体积, 降低了系统的检出限。同 DALPC 技术一样, MudPIT 也采用增加盐浓度洗脱 SCX、脱盐、梯度 RP 分析的多步洗脱技术。MudPIT 系统不使用捕集柱接口, SCX 洗脱的流动相经过 RP 分析柱, 因此不仅要注意流动相的兼容情况, 也要保证 SCX 洗脱的同时不影响 RP 的捕集, 因此精确控制流动相洗脱是 MudPIT 的关键。Wolters 等^[33] 在使用 MudPIT 系统分析 *S. cerevisiae* 蛋白质组中, 验证了 SCX 根据电荷作用分离机理的特性, 通过分析磷酸化酶 B 多肽的数据, 结果显示 *PI* 值低的肽在盐浓度较低的 SCX 洗脱液中出现, 而 *PI* 值高的肽在盐浓度较高的 SCX 洗脱液中出现, 说明可以通过逐步增加盐浓度洗脱的方法实现对 SCX 的切割分离。Lin 等^[34] 描述 MudPIT 试验主要由 4 步组成, 一是样品预处理, 二是两相式毛细管色谱柱的制作及搭建二维分析平台, 三是 2D-LC-MS/MS 分离样品, 四是数据分析处理。其中 2D 分离又包括进样、平衡色谱柱、盐洗脱 SCX、脱盐、反相梯度分析、平衡色谱柱等 6 步, 每次逐步增加盐浓度, 多步洗脱完成 2D 分离。

Link 等^[19] 在 DALPC 技术的基础上, 首次使用 MudPIT 系统识别了 32 个 40S 核糖体蛋白中的 30 个, 与 1D RP 相比, 2D MudPIT 系统识别的肽数增加, 与 DALPC 技术相比, 检出限由 1 000 fmol 降低到 10 fmol。Wolters 等^[33] 改进了 Link 等^[19] 的 MudPIT 系统, 用醋酸铵代替 KCl, 用离子对试剂七氟丁酸(HFBA) 代替醋酸, 分析 *S. cerevisiae* 蛋白质组, 识别出 630 个蛋白。Washburn 等^[35] 进一步改进了该系统, 将样品分成 3 部分, 分别进行 2D 分析, 从 5 540 个肽中识别出 1 484 个蛋白。而使用 2D-GE 技术最多只能识别 279 个蛋白^[36]。其中极端 *PI* 值(如 *PI*> 10) 及极端相对分子质量(如 *M_r*> 180 ku) 的蛋白、低丰度蛋白、膜蛋白在 2D-GE 技术中报道较少。而 Washburn 等^[35] 的 MudPIT 系统没有这些歧视效应, 识别了 12 个 *PI*< 4.3 的酸性蛋白, 最低的 RPL1A(YDL081C) 蛋白的 *PI* 值是 3.82; 识别了 29 个 *PI*> 11 的碱性蛋白, 最高的 RPL39(YJL189W) 蛋白的 *PI* 值是 12.55; 另外, 也识别了 *M_r*< 10 000 和 *M_r*> 190 000 的蛋白, 如相对分子质量高达 558 942 的 YLR106C 蛋白; 同时识别了 72 个膜蛋白; 识别了 791 个 *CAI*< 0.2 的低丰度蛋白, 而近来的研究也表明单独使用 2D-PAGE 不能检测这些低丰度的蛋白^[37]。

近年 Kislinger 等^[38] 组建了哺乳动物细胞、组织蛋白质组大规模分析的系统平台 PRISM(proteomic investigation strategy for mammals), 其中 2D MudPIT 是分离复杂组分的核心技术。他们对成年鼠肺及鼠肝蛋

白质组进行研究,共识别出 2 106 个蛋白,其中鼠肺中识别出 1 460 个,鼠肝中识别出 1 358 个。Werner 等^[39]使用 MudPIT 系统分析人脑室的脑脊髓流体(CSF)蛋白质组,利用 13 步增加盐浓度的洗脱方式进行二维分析,识别出 249 个蛋白。此外,Koller 等^[40]利用 MudPIT 系统在稻米蛋白质组中识别出 2 363 个蛋白,Florens 等^[41]在 Plasmodium 蛋白质组中识别出 2 415 个蛋白。

McDonald 等^[42]结合 DALPC 技术中捕集柱接口脱盐方便的特点,改进了 2D MudPIT 系统,在一支色谱柱内依次填充 RP、SCX、RP 填料(6.5 cm RP+ 3.0 cm SCX+ 3.0 cm RP,新增加的 3.0 cm RP 起到脱盐的作用),组成三相式 MudPIT 系统,分析 bovine brain microtubules,并与 1D RP 及 2D MudPIT 系统进行了比较。1D RP 及 2D MudPIT 系统分别识别出 26 与 55 个蛋白,而三相式 MudPIT 系统识别了 62 个蛋白,显示出在复杂组分分析中的优势。

4 展 望

多维液相色谱技术因其分辨率高、歧视效应小、应用范围广、自动化程度高等优势正在成为继 2D-GE 技术之后蛋白质组研究的最重要的方法。多维液相色谱中实现样品的有效切割转移是关键,因此优化接口设计、完善切换控制及其自动化对于改善多维系统性能至关重要;除了目前应用较多的 SCX/RP 模式外,针对样品特点建立其它模式也是目前多维色谱研究的重点,如亲和色谱与多维分离的偶联也将进一步扩展到蛋白质组的应用^[43~45],而同位素亲和标记法(ICAT)选择分析蛋白质组中某些特定的目标组分,可以大大降低样品基质的干扰;多维色谱因歧视效应小,在膜蛋白及膜相关蛋白分析的应用也会越来越广泛^[46~48]。另外,作为多维色谱最重要的检测手段,质谱与色谱的结合及色谱流动相与质谱检测器兼容性问题的研究,在蛋白质组研究中也越来越重要^[48~50]。

参考文献:

- [1] TYERS M, MANN M. [J]. Nature, 2003, 422: 193– 197.
- [2] PANDEY A, MANN M. [J]. Nature, 2000, 405: 837– 846.
- [3] HANASH S M. [J]. Electrophoresis, 2000, 21: 275– 281.
- [4] RABILLOU D. [J]. Proteomics, 2002, 2: 3– 10.
- [5] PIEPER R, GATTLIN C L, MAKUSKY A J, *et al.* [J]. Proteomics, 2003, 3: 1345– 1364.
- [6] STERGAARD O, FINNIE C, LAUGESEN S, *et al.* [J]. Proteomics, 2004, 4: 2437– 2447.
- [7] CORIHALS G L, WASINGER V C, HOCHSTRASSER D F, *et al.* [J]. Electrophoresis, 2000, 21: 1104– 1115.
- [8] GIDDINGS J C. [J]. Anal Chem, 1984, 56: 1258A– 1270A.
- [9] GIDDINGS J C. [J]. J High Resolution Chromatography, 1987, 10: 319– 323.
- [10] CORTES H J. Multidimensional Chromatography Techniques and Applications[M]. New York: Marcel Dekker, Inc., 1990. 1– 40.
- [11] WANG Zhicong, ZHANG Qinghe, ZHAO Zhongyi, *et al.* [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry(王智聪, 张庆合, 赵中一, 等. [J]. 分析化学), 2005, 33(4): 437– 441.
- [12] BUSHEY M M, JORGENSEN J W. [J]. Anal Chem, 1990, 62: 161– 167.
- [13] OPITECK G J, LEWIS K C, JORGENSEN J W. [J]. Anal Chem, 1997, 69: 1518– 1524.
- [14] OPITECK G J, JORGENSEN J W. [J]. Anal Chem, 1997, 69: 2283– 2291.
- [15] WAGNER K, RACAIYTE K, UNGER K K, *et al.* [J]. J Chromatogr, A, 2000, 893: 293– 305.
- [16] SCHWARTZ H, SOEST R, SWART R, *et al.* [J]. American Genomic/Proteomic Technology, 2002, May/June: 34– 39.
- [17] SCHWARTZ H, MITULOVIC G, SOEST R, *et al.* [J]. LC– GC, 2002, July/August: 42– 50.
- [18] MITULOVIC G, STINGL C, SMOLUCH M, *et al.* [J]. Proteomics, 2004, 4: 2545– 2557.
- [19] LINK A J, ENG J, SCHIELTZ D M, *et al.* [J]. Nature Biotechnology, 1999, 17: 676– 682.
- [20] MAYNARD D M, MASUDA J, YANG X Y, *et al.* [J]. J Chromatogr, B, 2004, 810: 69– 76.
- [21] MAWUENYEGA K G, KAJIH, YAMAUCHI Y, *et al.* [J]. Journal of Proteome Research, 2003, 2: 23– 35.
- [22] JIANG X S, ZHOU H, ZHANG L, *et al.* [J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2004, 3: 441– 455.
- [23] ZENG R, RUAN H Q, JIANG X S, *et al.* [J]. Journal of Proteome Research, 2004, 3: 549– 555.
- [24] VOLLMER M, NÄGELE E, HÖRTH P. [J]. Journal of Biomolecular Techniques, 2003, 14: 128– 135.
- [25] NÄGELE E, VOLLMER M, HÖRTH P. [J]. J Chromatogr, A, 2003, 1009: 197– 205.
- [26] DAVIS M T, BEIERLE J, BURES E T, *et al.* [J]. J Chromatogr, B, 2001, 752: 281– 291.
- [27] BLONDER J, RODRIGUEZ M C, CHAN K C, *et al.* [J]. Journal of Proteome Research, 2004, 3: 862– 870.
- [28] FUJII K, NAKANO T, KAWAMURA T, *et al.* [J]. Journal of Proteome Research, 2004, 3: 712– 718.
- [29] ADKINS J N, VARNUM S M, AUBERRY K J, *et al.* [J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2002, 1: 947– 955.

- [30] PENG J M, ELIAS J E, THOREEN C C, *et al.* [J]. *Journal of Proteome Research*, 2003, 2: 43– 50.
- [31] VOLLMER M, HORTH P, NAGELE E. [J]. *Anal Chem*, 2004, 76: 5180– 5185.
- [32] JACOBS J M, MOTTAZ H M, YU L R, *et al.* [J]. *Journal of Proteome Research*, 2004, 3: 68– 75.
- [33] WOLTERS D A, WASHBURN M P, YATES J R. [J]. *Anal Chem*, 2001, 73: 5683– 5690.
- [34] LIN D, ALPERT A J, YATES J R. [J]. *American Genomic /Proteomic Technology*, 2001, Aug.
- [35] WASHBURN M P, WOLTERS D, YATES J R. [J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19: 242– 247.
- [36] PERROT M, SAGLIOCCO F, MINI T, *et al.* [J]. *Electrophoresis*, 1999, 20: 2280– 2298.
- [37] GYGI S P, CORTHALS G L, ZHANG Y, *et al.* [J]. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 2000, 97: 9390– 9395.
- [38] KISLINGER T, RAHMAN K, RADULOVIC D, *et al.* [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2003, 2: 96– 106.
- [39] WENNER B R, LOVELL M A, LYNN B C. [J]. *Journal of Proteome Research*, 2004, 3: 97– 103.
- [40] KOLLER A, WASHBURN M P, LANGE B M, *et al.* [J]. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 2002, 99: 11969– 11974.
- [41] FLORENS L, WASHBURN M P, RAINE J D, *et al.* [J]. *Nature*, 2002, 419: 520– 526.
- [42] MCDONALD W H, OHI R, MIYAMOTO D T, *et al.* [J]. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2002, 219: 245– 251.
- [43] GYGI S P, RIST B, GRIFFIN T J, *et al.* [J]. *Journal of Proteome Research*, 2002, 1: 47– 54.
- [44] SANDERS S L, JENNINGS J, CANUTESCU A, *et al.* [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2002, July: 4723– 4738.
- [45] GRAUMANN J, DUNIPACE L A, SEOL J H, *et al.* [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2004, 3: 226– 237.
- [46] WU C C, MACCOSS M J, HOWELL K E, *et al.* [J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21: 532– 537.
- [47] ZHANG N, LI N, LI L. [J]. *Journal of Proteome Research*, 2004, 3: 719– 727.
- [48] WU C C, YATES J R. [J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21: 262– 267.
- [49] ROMIJN E P, KRIJGSVELD J, ALBERT J R, *et al.* [J]. *J Chromatogr, A*, 2003, 1000: 589– 608.
- [50] AEBERSOLD R, MANN M. [J]. *Nature*, 2003, 422: 198– 207.

欢迎订阅 欢迎投稿 欢迎刊登广告

2006年《色谱》征订启事

《色谱》是中国化学会主办、中科院大连化学物理研究所和国家色谱研究分析中心承办、科学出版社出版、国内外公开发行的专业性学术期刊,于1984年创刊。重点报道色谱学科的学术理论、色谱仪器与部件的研制开发、色谱及其相关技术在各领域应用的原始性和创新性科研成果。适合于从事色谱理论研究及分析工作的化学分析工作者、大专院校相关专业的师生、色谱仪器开发单位的有关人员阅读。本刊常设研究报告、研究快报、专论与综述、研究简报、技术与应用等多种栏目,并不定期刊登有关色谱领域热点及重点的专题论文;另有与色谱相关的书讯、色谱仪器及相关产品广告等内容。

《色谱》是中文核心期刊,曾获中国科学院优秀期刊二等奖、中国科协优秀期刊三等奖、辽宁省一级期刊,并被国内外数据库及文摘收录:

美国《化学文摘》(CA),俄罗斯《文摘杂志》(AJ),英国《分析文摘》(AA),美国《医学索引》(IM),《中国科学引文数据库》,《中国科技期刊精品数据库》,《中国学术期刊文摘》,《中国科技论文统计与分析》,《中国期刊全文数据库》,《中国学术期刊综合评价数据库》,《中文科技期刊数据库》,《万方数据-数字化期刊群》,《中国生物学文摘》,《中国生物学文献数据库》,《台湾华艺的中文电子期刊服务数据库》

《色谱》为双月刊,每期96页,大16开,单价15元,全年90元。国际标准刊号ISSN 1000– 8713,国际期刊CODEN编码SEPUER,国内统一刊号CN 21– 1185/O6。国内读者请通过全国各地邮局订购,邮发代号8– 43。国外读者请通过中国出版对外贸易总公司(北京782信箱)订购,发行代号DK21010。漏订的读者可直接与《色谱》编辑部联系补订。

另外,《色谱》自创刊以来至2004年共计22卷的全文检索光盘(DVD 1张)也正在发售之中。在该光盘中可以通过关键词(可以论文中出现的任意词作为关键词)、作者、作者单位、文题、卷号、期号、栏目等项目方便快捷地检索并阅读、下载1984年到2004年《色谱》发表的全部论文。需要者请直接与《色谱》编辑部联系。该光盘售价为150元。

《色谱》编辑部地址:大连市中山路457号,邮编116023,电话:(0411)84379021,传真:(0411)84379600, E-mail: sepu@dicp.ac.cn, 网址: <http://www.chrom-china.com>