

硼酸功能化介孔纳米材料的制备及其对糖肽的富集研究

刘丽婷 张莹 焦竞 杨芃原 陆豪杰*

(复旦大学化学系和生物医学研究院 上海 200433)

摘要 制备了一种硼酸功能化介孔纳米材料,利用硼酸基团可以和糖肽中糖链上的顺式邻位或间位羟基发生反应形成环状二酯对糖肽进行富集,考察并比较了不同的孵育时间、孵育缓冲液、清洗方式以及洗脱液对糖肽富集的影响,优化了该材料富集糖肽的条件,建立了一种硼酸功能化介孔纳米材料用于选择性富集糖肽并用基质辅助激光解吸/电离-四极离子阱-飞行时间质谱(MALDI-QIT-MS)进行糖肽分析的方法。

关键词 糖蛋白质; 硼酸功能化介孔纳米材料; 富集; 质谱

Preparation of Boronic Acid-Functionalized Mesoporous Nanomaterial and Its Application in Enrichment of Glycopeptides

Liu, Liting Zhang, Ying Jiao, Jing Yang, Pengyuan Lu, Haojie*

(Department of Chemistry and Institutes of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract A boronic acid-functionalized mesoporous nanomaterial was prepared by using a two-step post-grafting method. Firstly, the 3-glycidyloxypropyltrimethoxysilane (GLYMO) and 3-aminophenylboronic acid monohydrate (APB) were reacted in oxyhydrogen sodium solution (pH 9.18) to prepare boronic-acid bonded GLYMO (denoted as GLYMO-APB). Secondly, the MCM-41 was added into the prepared GLYMO-APB solution to prepare the final product of boronic acid functionalized MCM-41 (denoted as MCM-41-GLYMO-APB). This as-prepared material was characterized by FT-IR and the results showed that the boronic acid groups were successfully grafted to MCM-41. Glycopeptides can be enriched with high selectivity and high efficiency based on the formation of a cyclic diester between boronic hydroxyl and *cis*-diol on the glycan chain. The conditions of enriching glycopeptides in mixed digests of standard proteins by MCM-41-GLYMO-APB were compared and optimized. The incubation time, incubation solutions, washing ways and eluents used in the enrichment of glycopeptides were investigated. When using the ammonium bicarbonate buffer (100 mmol/L, pH 8.0) as the incubation solution and incubated for 1 h, the maximum number of enriched glycopeptides from horseradish peroxidase (HRP) digests could be obtained. After enrichment, washing the prepared material with the incubation solution twice for 5 min, nonglycopeptides interference can be in a large extent removed. The enriched glycopeptides binding to the surface of MCM-41-GLYMO-APB could be released when using 1% trifluoroacetic acid containing 2,5-dihydroxybenzoic acid as the eluent, the operating steps could be simplified when using this optimized eluent because there was no need of adding the MALDI matrix solution afterwards. Therefore, this optimized protocol provided a reference for the glycopeptide enrichment with boronic acid-functionalized materials, and it also laid the foundation for the research of utilizing boronic acid-based chemical method to the glycopeptide enrichment in biological samples. Meanwhile, the highly ordered hexagonal cylindrical mesoporous structure of MCM-41-GLYMO-APB provided the possibility of being used for the research of glycopeptidome in biological samples.

Keywords glycoproteins; boronic acid-functionalized mesoporous nanomaterial; enrichment; mass spectrometry

1 引言

糖基化作为蛋白质最常见、最重要和最复杂的翻译后修饰之一,具有极其重要的生物学意义。糖基化修饰可影响蛋白质三维空间结构或决定蛋白质在细胞内的转送方向等,在细胞与基质间的识别、信号转导、发育与分化过程中都起着重要作用^[1-3]。研究表明,糖链的变化与肿瘤的发生与发展密切相关,目前发现的超过一

半的癌症相关生物标志物都是糖基化蛋白质和糖基化多肽^[4]。因此,糖蛋白和糖肽的研究对于临床疾病的早期诊断以及生物标志物的发现等具有极其重要的意义。

然而,尽管哺乳动物蛋白质中超过 50%发生了糖基化,但是糖基化肽段却仅占到蛋白质酶解肽段的 2%~5%^[5],并且糖链的微观不均一性进一步减少了糖肽的相对量和降低了检测的灵敏度;在质谱分析的过程中,

* E-mail: luhaojie@fudan.edu.cn; Tel.: 0086-021-54237618; Fax: 0086-021-54237961

Received February 4, 2013; published March 15, 2013.

Project supported by the National Program on Key Basic Research Project (Nos. 2012CB910602, 2012AA020203), National Natural Science Foundation of China (Nos. 21025519, 21005020, 31070732), Shanghai Projects (11XD1400800, Eastern Scholar, B109 and 20114Y167).

项目受国家重点基础研究发展计划(2012CB910602 和 2012AA020203)、国家自然科学基金(Nos. 21025519, 21005020, 31070732)、上海市(No. 11XD1400800, 东方学者, B109 和 20114Y167)资助。

糖肽的质谱信号很容易受到非糖肽的抑制, 因此糖基化的研究充满挑战. 如何将糖肽从复杂体系中高选择性的分离出来并达到质谱可以检测的水平, 是糖蛋白质组研究首先要解决的一个关键问题.

目前已经发展了多种方法用于糖蛋白/糖肽的富集, 最常见的有凝集素亲和法、胍化学法、硼酸法、亲水作用法等. 然而凝集素亲和法只能用于捕获与凝集素类型相应的一部分糖蛋白质^[6~8]. 胍化学法因为需要氧化步骤, 因此增加了实验时间和操作的复杂度^[9]. 其它如基于亲水色谱原理的分离方法利用糖链部分的亲水性导致糖肽比非糖肽有相对较强的亲水性^[10,11]或者基于体积排阻色谱原理的分离方法利用带有糖链的糖肽比非糖肽尺寸相对较大^[5], 都普遍具有选择性不好的问题. 硼酸功能化的材料已经被用于分离和检测糖类或者顺式二醇化合物^[12~18]. 利用硼酸基团可以和糖肽中糖链上的顺式邻位或间位羟基发生可逆反应形成环状二酯的原理可以对糖蛋白/糖肽进行分离富集, 这类富集方法具有普适性强、能特异性富集所有类型糖型(包括 *N*-糖、*O*-糖和其它糖型)的特点^[19]. 最近, 已经报道^[20~27]了几种硼酸功能化的纳米材料用于特异性富集糖肽. 例如, 介孔材料 FDU-12 硼酸功能化后对糖肽显示了良好的选择性^[24].

介孔材料 MCM-41 更适合作为硼酸基团改性修饰的基底材料, 这是因为它具有更大的比表面积($\approx 1000 \text{ m}^2/\text{g}$), 约为 FDU-12 比表面积的两倍($569 \text{ m}^2/\text{g}$)^[28]. 而且, 介孔材料 MCM-41 的孔道尺寸($2.1\sim 2.7 \text{ nm}$)略小于 FDU-12 (5 nm)^[24], 与 FDU-12 具有笼状、内部连通的孔结构相比^[28], MCM-41 具有的六方柱状孔道结构使其适合于肽组学的研究^[29], 硼酸功能化 MCM-41 则为其应用于生物样品中糖肽组学的研究提供了可能. 本文选取介孔纳米材料 MCM-41 作为基底材料, 对其进行硼酸功能化表面改性和表征, 并对其用于糖肽富集的条件进行了考察和优化, 最终建立了一种硼酸功能化介孔纳米材料用于选择性富集糖肽并用基质辅助激光解吸电离-四极离子阱-飞行时间质谱(MALDI-QIT-MS)进行糖肽分析的方法.

2 结果与讨论

2.1 硼酸功能化介孔纳米材料的合成和表征

硼酸功能化介孔纳米材料的合成步骤如图 1 所示. 首先, 将 3-(2,3-环氧丙氧)丙基三甲氧基硅烷(GLYMO)与 3-氨基苯硼酸单水合物(APB)反应, 得到 GLYMO-APB. 然后再将 GLYMO-APB 修饰至 MCM-41 表面, 得到硼酸功能化的介孔纳米材料 MCM-41-GLYMO-APB. 在合成时需要注意以下几点: 第一, 为了防止 GLYMO 的水解, 混合前 APB 与 GLYMO 需要分别放入冰浴中使其充分冷却. 第二, 滴加 GLYMO 时要缓慢, 并且滴加后充分搅拌使之与 APB 溶液充分混合. 第三, 温度对

反应影响很大, 温度过高则 GLYMO 大量水解, 溶液中出现大量白色混浊物, 阻碍了反应的进一步进行, 因此控制整个反应过程的温度十分重要.

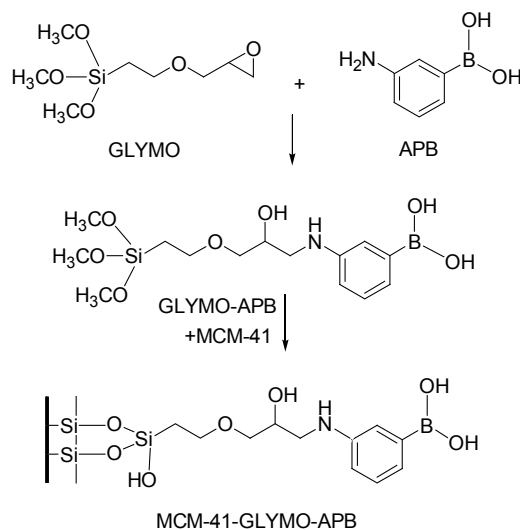


图 1 硼酸功能化介孔纳米材料的合成示意图

Figure 1 Overview of the preparation of boronic acid-functionalized MCM-41 mesoporous nanomaterial

利用傅里叶变换红外光谱(FT-IR)分别对修饰前后的材料进行表征, 结果如图 2 所示. 图 2 中, 1602 , 1576 , 709 cm^{-1} 分别为苯环的吸收峰; 2942 , 2881 cm^{-1} 为亚甲基的吸收峰; 1437 cm^{-1} 为 B—C 的吸收峰, 1360 cm^{-1} 为 B—O 吸收峰. 这些新出现的吸收峰均说明 GLYMO-APB 通过反应修饰至 MCM-41 材料表面.

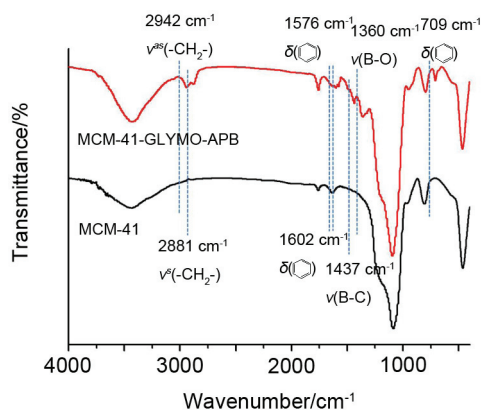


图 2 硼酸功能化介孔纳米材料的红外图谱

Figure 2 FT-IR spectra of boronic acid-functionalized MCM-41 mesoporous nanomaterial

2.2 硼酸功能化介孔纳米材料富集糖肽的条件优化

2.2.1 硼酸功能化介孔纳米材料对糖肽的富集效果

为了考察硼酸功能化介孔纳米材料 MCM-41-GLYMO-APB 对糖肽的富集效果, 将其与不经过任何处理的 MCM-41 进行对比. 将标准蛋白马心机红蛋白

(Myo)和标准糖蛋白辣根过氧化物酶(HRP)各自的酶解肽段以质量比 1 : 1 混合(肽段总量分别为 100 ng, 总体积为 100 μ L), 用硼酸功能化前后的两种材料对此样品分别进行富集, 其它条件与本文第 4.4 节部分中所述一致, 结果如图 3 所示. 对照样品为 1 μ L Myo 肽段(40 ng/ μ L)与 1 μ L HRP 肽段(40 ng/ μ L)混合后未经富集直接上样, 富集之前没有任何糖肽的信号可以被检测到(图 3a, 3b). 经 MCM-41-GLYMO-APB 富集之后, 图 3d 显示 4 个主要的 HRP 酶解糖肽的质谱峰可以被成功地观察到(“*”代表糖肽的碎片峰), m/z 值为 2592, 3355, 3895 和 4984 的质谱峰可分别归属于这 4 条糖肽: $N_{298}\text{Hex}_3\text{HexNAc}_2\text{dHex}_1\text{Pent}_1$ (225~236), $N_{298}\text{Hex}_3\text{HexNAc}_2\text{dHex}_1\text{Pent}_1$ (295~313), $N_{87}\text{Hex}_3\text{HexNAc}_2\text{dHex}_1\text{Pent}_1$ (69~92), N_{216} 和 $N_{228}\text{Hex}_3\text{HexNAc}_2\text{dHex}_1\text{Pent}_1$ (214~236)^[24,30]. 同样也使用 MCM-41 进行富集(图 3e, 3f), 没有检测到任何糖肽的峰, 说明成功接枝到 MCM-41 表面的硼酸基团可以特异地富集糖肽.

2.2.2 孵育时间的选择

为了考察此制备材料对糖肽富集的最优时间, 我们选择了不同的材料孵育时间 15, 30 min, 1 h 和 2 h, 分别对 100 μ L Myo 和 HRP 酶解肽段的混合物溶液(肽段质量分别为 100 ng)进行富集, 其它条件与本文第 4.4 节部

分中所述一致, 结果如图 4 所示. 由图 4a, 4b 可看出, 孵育 15 min 或 30 min 后图中没有任何 HRP 糖肽的质谱峰信号, 而孵育 1 h 或 2 h 后(图 4c, 4d), 4 条 HRP 糖肽的质谱峰均可以被成功地观察到(“*”代表糖肽的碎片峰, m/z 值分别为 2592, 3355, 3895 和 4984). 这说明 1 h 时糖肽即可被富集, 一般富集时间越长效果越好, 但由于 2 h 时糖肽没有显著性增加, 基于实验操作简便性考虑, 因此本文选择 1 h 为最佳孵育时间. 硼酸功能化 FDU-12 在富集糖肽时, 15 min 即可获得一定的糖肽质谱信号, 1 h 时信号达到最强且富集效果最好. 相比之下, 硼酸功能化 MCM-41 获得糖肽质谱信号的孵育时间略长, 这可能是因为 MCM-41 的孔径(2.1~2.7 nm)小于 FDU-12(5 nm)^[24], 糖肽扩散进入孔道内所需的时间更长.

2.2.3 孵育缓冲液的选择

在弱碱性条件下, 糖肽中糖链上的顺式邻位或间位羟基与硼酸基团反应形成环状二酯, 从而特异性将糖肽捕获至材料表面. 我们考察了两种具有相同 pH 的不同缓冲液对糖肽富集的影响. 分别选用碳酸氢铵缓冲液(100 mmol/L, pH 8.0)和磷酸盐缓冲液(50 mmol/L, pH 8.0), 对 100 μ L Myo 和 HRP 酶解肽段的混合物溶液(肽段质量分别为 100 ng)进行富集, 其它条件与本文第 4.4 节部分中所述一致, 结果如图 5 所示. 用碳酸氢铵缓冲

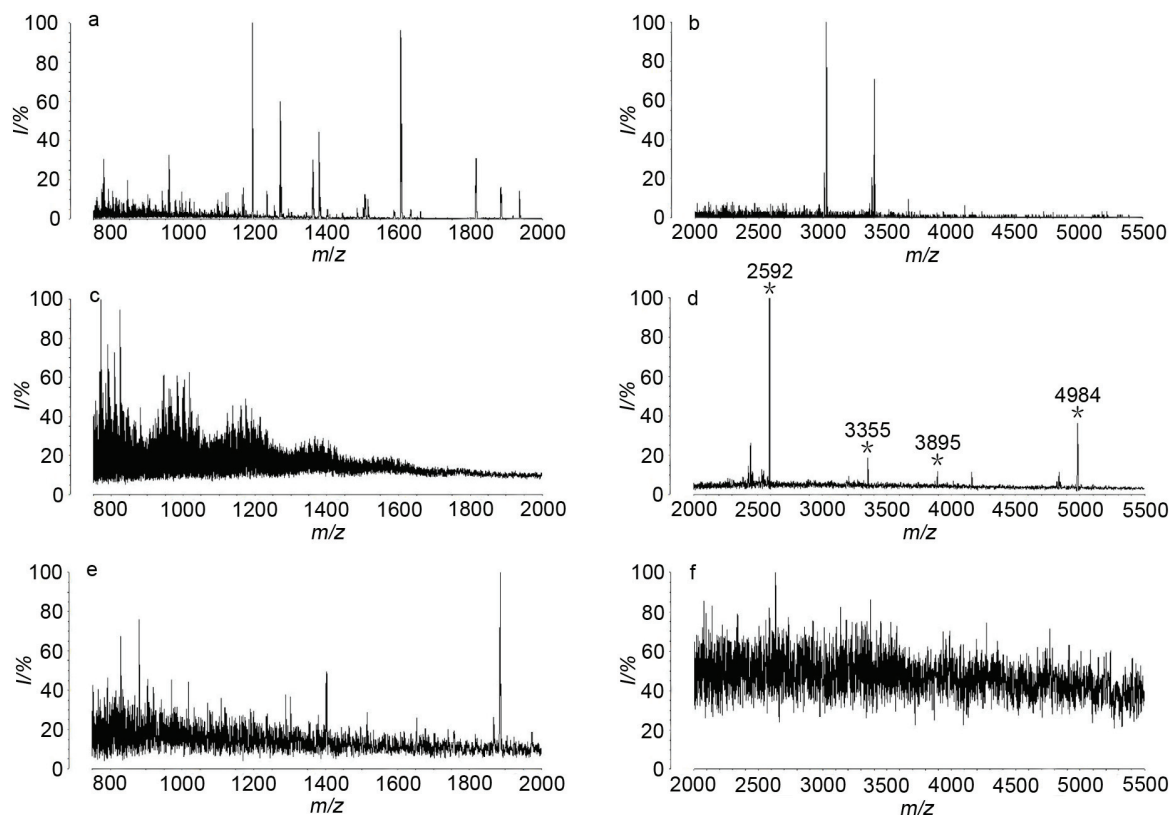


图 3 Myo 和 HRP 酶解肽段混合物溶液未富集(a, b)以及分别被 MCM-41-GLYMO-APB(c, d)和 MCM-41(e, f)富集后的 MALDI-TOF 质谱图
Figure 3 MALDI-TOF mass spectra of tryptic HRP and Myo before (a, b) and after enrichment by MCM-41-GLYMO-APB (c, d) and MCM-41 (e, f), respectively

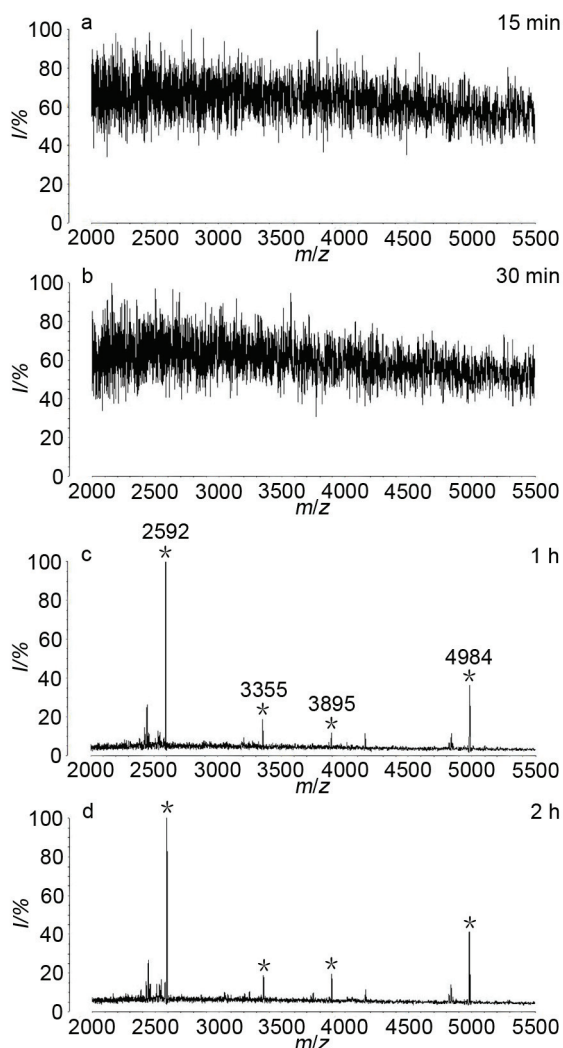


图4 选用不同孵育时间MCM-41-GLYMO-APB对Myo和HRP酶解肽段混合物溶液富集的MALDI-TOF质谱图

Figure 4 MALDI-TOF mass spectra of tryptic HRP and Myo after enrichment by MCM-41-GLYMO-APB with different incubation time

液孵育时(图5a), 4条HRP的糖肽均被富集(m/z 值分别为2592, 3355, 3895和4984), 且非糖肽峰较少。用磷酸盐缓冲液孵育时(图5b), 只有3条HRP的糖肽被富集(m/z 值分别为2592, 3673和4984), 其中 m/z 值为3673的质谱峰归属于糖肽 $N_{285}\text{Hex}_3\text{HexNAc}_2\text{dHex}_1\text{Pent}_1$ (272~294)。在碳酸氢铵缓冲液中富集的效果优于磷酸盐缓冲液。可能是因为磷酸盐为非挥发性盐, 少量残留在样品中的磷酸盐不易除去, 在分析时干扰质谱的检测信号; 而碳酸氢铵为挥发性盐, 在样品干燥结晶过程或者质谱进样抽真空时可以挥发一部分, 因而对质谱信号影响较小。

2.2.4 清洗方式的选择

尽管MCM-41的表面已经被硼酸功能化, 但是仍然残留着未反应的硅羟基, 非糖肽会非特异性地吸附在材料表面。利用材料在溶液体系中进行富集时, 一般通过

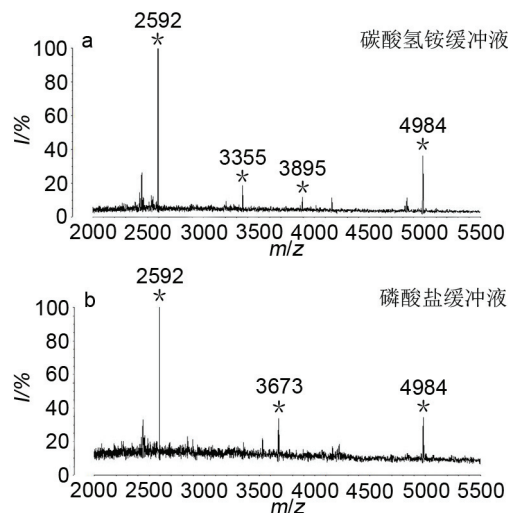


图5 选用不同孵育缓冲液MCM-41-GLYMO-APB对Myo和HRP酶解肽段混合物溶液富集的MALDI-TOF质谱图

Figure 5 MALDI-TOF mass spectra of tryptic HRP and Myo after enrichment by MCM-41-GLYMO-APB with different incubation solutions

离心除去孵育溶液, 但是非特异性吸附在材料表面的非糖肽却不能除去, 并且仍然会有少量含有肽段的孵育溶液残留在材料表面和孔道内。因此我们考察了不同清洗方式对富集效果的影响。对100 μL Myo和HRP酶解肽段的混合物溶液(肽段质量分别为100 ng)在碳酸氢铵缓冲液(100 mmol/L, pH 8.0)中孵育后, 用碳酸氢铵缓冲液依次清洗材料2次(每次5 min, 50 μL)或者孵育后不清洗材料表面, 其它条件与本文第4.4节部分中所述一致, 结果如图6所示。当清洗为2次(每次5 min)时(图6a, 6b), 高分子量范围(2000 Da+)富集到4条糖肽, 且非糖肽很少, 在低分子量范围(750 Da+)也无非糖肽峰信号。而不清洗材料表面时(图6c, 6d), 高分子量范围内也富集到4条糖肽, 但是非糖肽较清洗时略微增多, 且在低分子量范围有较多非糖肽。故用材料孵育后再用孵育缓冲液连续清洗2次材料的富集效果更好。

2.2.5 洗脱溶液的选择

为了对富集后的糖肽进行质谱分析, 需要选择一定酸度的溶液将富集在材料上的糖肽洗脱下来, 这是利用硼酸基团和糖肽中糖链上的顺式邻位或间位羟基形成的环状二酯在酸性条件下会可逆反应进行水解, 从而将糖肽释放下来。DHB是基质辅助激光解吸电离质谱中采用的传统基质, 易与样品分子发生共结晶, 在洗脱液中加入DHB考察其是否可以提高糖肽的质谱信号。选用两种不同的洗脱溶液1% TFA和1% TFA+DHB (10 mg/mL), 对100 μL Myo和HRP酶解肽段的混合物溶液(肽段质量分别为100 ng)经MCM-41-GLYMO-APB富集后的材料进行洗脱, 其它条件与本文第4.4节部分中所述一致, 结果如图7所示。通过图7a, 7b对比可看出, 谱图中均有4条HRP糖肽的质谱峰(m/z 值分别为2592,

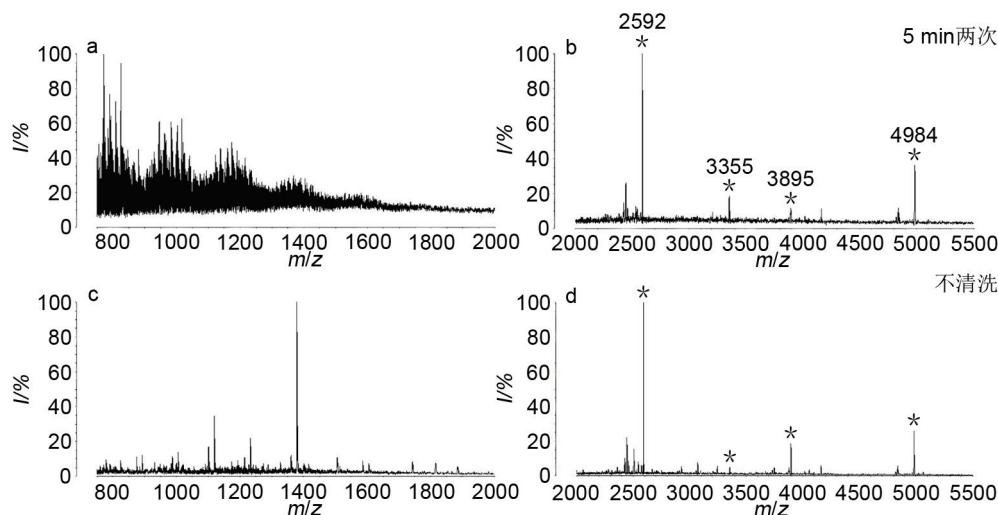


图6 选用不同清洗方式 MCM-41-GLYMO-APB 对 Myo 和 HRP 酶解肽段混合物溶液富集的 MALDI-TOF 质谱图
Figure 6 MALDI-TOF mass spectra of tryptic HRP and Myo after enrichment by MCM-41-GLYMO-APB with different washing ways

3355, 3895 和 4984), 质谱信号的强度无明显差异. 这说明两种洗脱液均可将 HRP 糖肽从材料中有效的解离并洗脱下来.

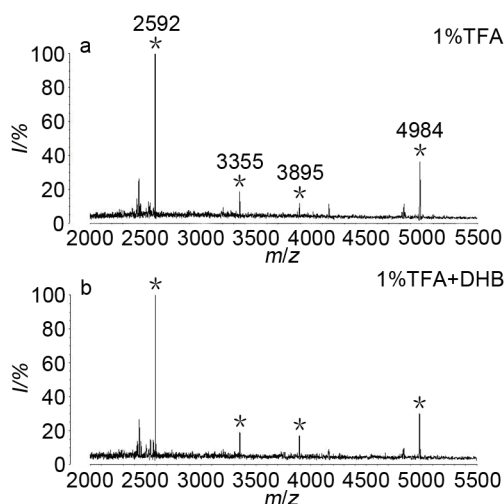


图7 选用不同洗脱溶液 MCM-41-GLYMO-APB 对 Myo 和 HRP 酶解肽段混合物溶液富集的 MALDI-TOF 质谱图
Figure 7 MALDI-TOF mass spectra of tryptic HRP and Myo after enrichment by MCM-41-GLYMO-APB with different eluents

3 结论

本文通过后合成法制备了一种硼酸功能化介孔纳米材料, 并通过红外表征证明氨基苯硼酸被成功接枝于 MCM-41 材料表面, 使其可以在非糖肽干扰下选择性富集糖肽. 通过系统考察硼酸功能化介孔纳米材料富集糖肽时的条件, 包括孵育时间、孵育缓冲液、清洗方式和洗脱液条件, 得到糖肽富集优化条件, 为利用硼酸化学法对生物样品中糖肽富集的研究奠定了基础.

4 实验部分

4.1 试剂与仪器

有序介孔硅材料 MCM-41(孔径 2.1~2.7 nm, 比表面积 $\approx 1000 \text{ m}^2/\text{g}$), 3-(2,3-环氧丙氧)丙基三甲氧基硅烷 (GLYMO)、3-氨基苯硼酸单水合物 (APB)、辣根过氧化物酶 (HRP)、马心肌红蛋白 (Myo)、胰蛋白酶、2,5-二羟基苯甲酸 (DHB) 和碳酸氢铵均购自 Sigma 公司 (St. Louis, MO); 磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氢氧化钠购自国药集团化学试剂有限公司. 柠檬酸铵购于上海生工生物工程有限公司. 乙腈 (ACN, 色谱级) 购自 Merck 公司 (Darmstadt, Germany). 所有试剂均为分析纯或更高纯度级别, 所用水均为去离子水 ($18.4 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$), 由 Milli-Q (Millipore, Bedford, MA) 系统制得.

红外光谱 (FT-IR) 实验采用 KBr 压片, 在 NICOLET NEXUS 470 红外光谱仪 (USA) 上进行. 质谱仪器为 MALDI AXIMA-QIT, 该仪器采用波长为 337 nm 的氮激光器, 购自 Shimadzu Biotech (Japan).

4.2 硼酸功能化介孔纳米材料的合成

MCM-41 表面硼酸功能化的嫁接通过两步反应来实现^[24]. 首先, 将 GLYMO 与 APB 反应, 得到 GLYMO-APB. 将 50 mg APB 溶于 20 mL 去离子水中, 用 NaOH 溶液将其 pH 值调为 9.18, 将调好 pH 值的 APB 与 GLYMO 分别放入冰浴中使溶液温度降至 0 °C. 在磁力搅拌下, 将 40 μL GLYMO 缓慢滴加入 APB 溶液中. 将混合液加热至 40 °C, 在搅拌下反应 4 h 后, 将溶液放入冰浴中冷却至 0 °C, 再将 40 μL GLYMO 依前法加入溶液中继续反应 4 h. 反应后, 将 GLYMO-APB 溶液取出后离心以除掉 GLYMO 因水解而产生的沉淀, 在上层清液中加入 10 mg MCM-41 材料, 加热至 70 °C, 反应 24 h

后, 弃去上层清液. 清洗材料表面残余的 GLYMO 水解产物, 即得到硼酸功能化的介孔纳米材料 MCM-41-GLYMO-APB, 用去离子水配置成 10 mg/mL 备用.

4.3 标准非糖蛋白 Myo 和标准糖蛋白 HRP 的酶解

分别取标准蛋白质 Myo 或 HRP 溶于 25 mmol/L 碳酸氢铵溶液中, 浓度为 1 mg/mL. 将上述溶液于沸水中加热 5 min 使蛋白质变性, 冷却至室温, 以底物/蛋白酶质量比 40:1 的比例加入胰蛋白酶的溶液, 37 °C 下恒温反应 12 h, 反应完毕, 将产物用去离子水稀释至 100 ng/ μ L, -20 °C 下保存备用.

4.4 糖基化多肽的富集

以标准非糖蛋白 Myo (100 ng/ μ L) 和标准糖蛋白 HRP 酶解肽段(100 ng/ μ L)为研究对象, 分别选择不同的孵育时间、孵育缓冲液、清洗方式以及洗脱液进行实验操作. 以考察不同的孵育时间, 碳酸氢铵缓冲液(100 mmol/L, pH 8.0)为孵育缓冲液, 1% TFA (含 10 mg/mL DHB)溶液为洗脱溶液为例, 具体操作步骤如下: 将 1 μ L Myo 肽段(100 ng/ μ L)与 1 μ L HRP 肽段(100 ng/ μ L)混合后, 加入 100 μ L 100 mmol/L 碳酸氢铵缓冲液, 混匀后加入 7.5 μ L 硼酸功能化介孔纳米材料溶液(10 mg/mL), 分别室温孵育 15, 30 min, 1 h 和 2 h. 离心后(16400 r/min, 5 min)弃去上层清液, 依次用 50 μ L 100 mmol/L 碳酸氢铵缓冲液清洗两次后, 用 5 μ L 洗脱液(1% TFA, 含 10 mg/mL DHB)提取肽段. 实验中每个样品平行操作 3 次. 考察糖肽富集的其他条件时, 每次只改变其中一个条件, 其它条件和操作不变.

4.5 MALDI 质谱检测

取富集后的洗脱液 2 μ L 置于 QIT 靶板样品池中, 在干燥仪中快速干燥后送进 QIT 进行测定. 激光强度保持为 55 IU (internal unit), 质量扫描范围分别为 750~2000, 2000~5500 Da, 每个样品质谱重复扫描 3 次.

References

- [1] Helenius, A.; Aeby, M. *Science* **2001**, *291*, 2364.
- [2] Haltiwanger, R. S.; Lowe, J. B. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 491.
- [3] Walsh, G.; Jefferis, R. *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1241.
- [4] Ohtsubo, K.; Marth, J. D. *Cell* **2006**, *126*, 855.
- [5] Alvarez-Manilla, G.; Atwood III, J.; Guo, Y.; Warren, N. L.; Orlando, R.; Pierce, M. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 701.
- [6] Yang, Z.; Hancock, W. S. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1053*, 79.
- [7] Zhao, J.; Simeone, D. M.; Heidt, D.; Anderson, M. A.; Lubman, D. M. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 1792.
- [8] Drake, R. R.; Schwegler, E. E.; Malik, G.; Diaz, J.; Block, T.; Mehta, A.; Semmes, O. J. *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, *5*, 1957.
- [9] Zhang, H.; Li, X.; Martin, D. B.; Aebersold, R. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 660.
- [10] Wührer, M.; Koeleman, C. A. M.; Hokke, C. H.; Deelder, A. M. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 886.
- [11] Ding, W.; Hill, J. J.; Kelly, J. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 8891.
- [12] Ren, L.; Liu, Y.; Dong, M.; Liu, Z. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 8421.
- [13] Tan, J.; Wang, H.; Yan, X. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 5273.
- [14] Liu, Y.; Ren, L.; Liu, Z. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5067.
- [15] Dou, P.; Liu, Z. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 3423.
- [16] Li, H.; Wang, H.; Liu, Y.; Liu, Z. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 4115.
- [17] Chen, M.; Lu, Y.; Ma, Q.; Guo, L.; Feng, Y. *Analyst* **2009**, *134*, 2158.
- [18] Lin, Z.; Zheng, J.; Lin, F.; Zhang, L.; Cai, Z.; Chen, G. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 518.
- [19] Rawn, J. D.; Lienhard, G. E. *Biochemistry* **1974**, *13*, 3124.
- [20] Zhang, L.; Xu, Y.; Yao, H.; Xie, L.; Yao, J.; Lu, H.; Yang, P. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 10158.
- [21] Shen, W.; Ma, C.; Wang, S.; Xiong, H.; Lu, H.; Yang, P. *Chem. Asian J.* **2010**, *5*, 1185.
- [22] Qi, D.; Zhang, H.; Tang, J.; Deng, C.; Zhang, X. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 9221.
- [23] Tang, J.; Liu, Y.; Qi, D.; Yao, G.; Deng, C.; Zhang, X. *Proteomics* **2009**, *9*, 5046.
- [24] Xu, Y.; Wu, Z.; Zhang, L.; Lu, H.; Yang, P.; Webley, P.; Zhao, D. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 503.
- [25] Frantzen, F.; Grimsrud, K.; Heggli, D. E.; Sundrehagen, E. *J. Chromatogr. B* **1995**, *670*, 37.
- [26] Ren, L.; Liu, Z.; Liu, Y.; Dou, P.; Chen, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 6704.
- [27] Liu, L.; Zhang, Y.; Zhang, L.; Yan, G.; Yao, J.; Yang, P.; Lu, H. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *753*, 64.
- [28] Fan, J.; Yu, C.; Gao, F.; Lei, J.; Tian, B.; Wang, L.; Luo, Q.; Tu, B.; Zhou, W.; Zhao, D. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 3146.
- [29] Tian, R.; Zhang, H.; Ye, M.; Jiang, X.; Hu, L.; Li, X.; Bao, X.; Zou, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 962.
- [30] Wührer, M.; Hokke, C. H.; Deelder, A. M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 1741.

(Qin, X.)