

生物技术与方法

短胶法预处理含高浓度去垢剂的蛋白样品

马首智¹, 张涛^{2,3}, 翟琳辉^{2,3}, 孙玉琳¹, 徐平^{2,3}, 赵晓航^{1,4}

1 北京协和医学院 中国医学科学院肿瘤医院 分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021

2 军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850

3 北京蛋白质组研究中心, 北京 102206

4 海军总医院基础医学研究中心, 北京 100048

马首智, 张涛, 翟琳辉, 等. 短胶法预处理含高浓度去垢剂的蛋白样品. 生物工程学报, 2014, 30(9): 1446–1453.

Ma SZ, Zhang T, Zhai LH, et al. Short gel method for pretreatment of protein samples with high concentration of detergent. Chin J Biotech, 2014, 30(9): 1446–1453.

摘要: 蛋白质组学研究中常使用含高浓度去垢剂的缓冲液以提高蛋白提取效率, 但这种缓冲液会对下游蛋白定量、酶解、质谱分析等步骤造成干扰。短胶法可用于含高浓度去垢剂样品的预处理, 文中进一步评价了短胶法 (Short gel) 用于含高去垢剂的蛋白样品定量和预处理的效果。使用牛血清白蛋白作为标准蛋白分析了短胶法定量的线性范围, 结果发现短胶法定量的线性范围为 1–8 μg , 提示可对这一范围内的样品蛋白进行定量检测。对标准蛋白定量的线性度达到 0.999, 且重复性好, 不容易受到蛋白表达模式变化的影响, 结果可靠。短胶法定量的蛋白可通过胶内酶解, 直接进行液相色谱-质谱联用 (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 分析, 质谱信号较好。结果提示直接用短胶法预处理含高浓度去垢剂的蛋白样品, 值得在蛋白质组学研究中推广。

关键词: 短胶法, 液质联用, 蛋白质组学, 蛋白定量

Received: December 19, 2013; **Accepted:** March 10, 2014

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2012AA020206), National Natural Science Foundation of China (Nos. 31070673, 31170780, 91029725, 81321091), Beijing Municipal Natural Science Foundation (No. 5112012).

Corresponding author: Xiaohang Zhao. Tel: +86-10-67709015; E-mail: zhaoxh@cicams.ac.cn

Ping Xu. Tel: +86-10-80727777; E-mail: xupingghy@gmail.com

国家高技术发展计划 (863 计划) (No. 2012AA020206), 国家自然科学基金 (Nos. 31070673, 31170780, 91029725, 81321091), 北京市自然科学基金 (No. 5112012) 资助。

网络出版时间: 2014-05-13

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.130649.html>

Short gel method for pretreatment of protein samples with high concentration of detergent

Shouzhi Ma¹, Tao Zhang^{2,3}, Linhui Zhai^{2,3}, Yulin Sun¹, Ping Xu^{2,3}, and Xiaohang Zhao^{1,4}

1 State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Hospital & Institute, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China

2 Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

3 Beijing Proteome Research Center, Beijing 102206, China

4 Center of Basic Medical Science, Navy General Hospital, Beijing 100048, China

Abstract: In proteomic research, to improve protein solubility of membrane proteins and nuclear proteins, buffers containing high concentration of detergent, such as 4% SDS, were widely used. However, high concentration of detergent might severely interfere with the downstream proteomic analysis, including protein quantitation and trypsin digestion. To improve the proteomic compatibility of buffers with high concentration of detergent, we used short gel method to pretreat buffers containing detergent. Protein samples were first separated by a short (2–2.5 mm) SDS-PAGE electrophoresis, and proteins were quantitated by comparing with bovine serum albumin standards via optical density analysis. The gel was then cut and peptides were recovered using in-gel digestion. The quantitative linearity range of this method was 1 to 8 μg . The quantitation was accurate and reproducible. After short gel analysis, recovered peptides generated high mass spectrometry signals. In conclusion, short gel method eliminated the interference of high concentration detergent in the proteomics analysis, and it was suitable for protein samples' pretreatment, and was worth to apply in proteomic research.

Keywords: short gel, LC-MS/MS, proteomics, protein quantitation

质谱分析前蛋白样品预处理是蛋白质组学研究的关键环节之一。目前普遍认为, 含高浓度去垢剂的缓冲液有助于充分抽提蛋白, 含有 4% SDS、0.1 mol/L DTT 去垢剂的缓冲液的使用越来越广泛。但高浓度去垢剂会对下游的蛋白定量、酶解等步骤造成干扰, 常用的蛋白定量方法, 如 BCA (Bcinchoninic acid) 法和 Bradford 法 (又名考马斯亮蓝法、CBB 法) 都不适用。甚至可用于双向电泳蛋白样品预处理的 2-D quant 试剂盒^[1]都无法耐受 4% 的 SDS。因此, 急需发展耐受高浓度去垢剂的蛋白样品预处理方法。

对于含高浓度去垢剂的蛋白样品, 主要有两种预处理方法, 包括超滤辅助样品制备 (Filter

aided sample preparation methods, FASP)^[2-6]和短胶法 (Short gel)^[7]。与其他方法相比, 短胶法在分析微量蛋白样品时更有优势^[8]。与常规 SDS-PAGE 分析不同, 短胶法只进行短距离 (2–25 mm) 凝胶电泳, 减弱样品蛋白的稀释程度。

本实验室前期研究发现, 短胶法同样可以用于蛋白定量^[9]。但短胶法定量的线性范围还不清楚。本研究分析了短胶法定量的线性范围, 并将短胶法用于质谱前蛋白样品预处理。结果表明, 短胶法在 1–8 μg BSA 范围内有极高线性度, 且定量重复性较好, 与下游技术兼容, 定量后的蛋白可直接进行蛋白质组学分析, 是一种值得推广的蛋白样品预处理方法。

1 材料与方法

1.1 材料

敲降靶蛋白的食管癌 KYSE140 细胞由本室构建, 培养于 RPMI 1640 培养基中, 含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素, 于 37 °C、含 5% 二氧化碳的孵箱中培养。蛋白提取缓冲液为 100 mmol/L Tris, pH 7.5; 4% SDS; 100 mmol/L DTT 和蛋白酶抑制剂等。转膜液为 25 mmol/L Tris; 195 mmol/L 甘氨酸和 20% 甲醇。蛋白抽提液为 5% 甲酸和 50% 乙腈。鸡尾酒式蛋白酶抑制剂购自美国 Roche 公司。胰蛋白酶购自美国 Promega 公司。牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 标准品和小鼠抗人 β -actin 抗体购自美国 Sigma 公司。辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠二抗购自中杉金桥生物技术公司。ECL 发光试剂盒购自普利莱公司。UPLC 液相色谱系统为美国 Agilent 公司产品, LTQ-Obitrap Velos 质谱系统为美国 Thermo Fisher 公司产品。LAS 4000 图像采集仪为日本富士公司产品。

1.2 蛋白提取

对照细胞和 siRNA 处理的细胞培养至 90% 汇合度, 将细胞置于冰上, 加预冷的磷酸盐缓冲液洗两遍。加入蛋白提取缓冲液, 用细胞刮刀将细胞刮下, 冰上孵育 30 min。超声破碎后 12 000 r/min、4 °C 离心 15 min。上清分装后储存于 -80 °C 冰箱备用。

1.3 短胶法蛋白定量

配制不同浓度的 BSA 标准蛋白并准备适当体积的待测样品蛋白。加入 SDS-PAGE 上样缓冲液后, 80 °C 加热 10 min。室温高速离心 5 min, 保留上清。制备浓缩胶和分离胶, 上样后恒压

80 V 电泳至溴酚蓝前沿进入分离胶 2 mm 即停止电泳。加入考马斯亮蓝 G250 进行凝胶染色, 脱色至凝胶背景清晰。使用图像采集仪扫描凝胶图相, 并用 Scion image 软件分析图像灰度值。根据标准蛋白的灰度值建立标准曲线, 根据样品蛋白的灰度值计算待测蛋白含量。

1.4 常规 SDS-PAGE 凝胶法蛋白定量

制备浓缩胶和分离胶, 蛋白样品上样后 80 V 恒压电泳至溴酚蓝前沿出分离胶后停止。考马斯亮蓝 G250 凝胶染色, 脱色至凝胶背景清晰。使用图像采集仪扫描凝胶图相, 并采用 Scion image 软件进行灰度值分析。

1.5 蛋白印迹定量

采用长胶法分离蛋白, 电泳后的凝胶浸泡在转膜液中平衡。安装滤纸、PVDF 膜、凝胶等转膜三明治, 用玻璃棒去除气泡。4 °C 冷室中 110 V 恒压电转 1 h。含有蛋白信息的 PVDF 膜浸泡于 10% 牛奶中室温封闭 1 h 后, 加入 1 : 5 000 稀释的 β -actin 抗体, 4 °C 孵育过夜。洗膜后加 1 : 3 000 稀释的二抗, 室温孵育 1 h。洗膜后加入 ECL 发光液, LAS4000 图像采集仪中采集图像。

1.6 胶内酶解

短胶电泳后对凝胶染色, 切取蛋白条带。将蛋白条带切为小块, 加入脱色液脱色至无色后加入乙腈脱水并旋转蒸发干燥。加入酶解缓冲液, 37 °C 避光孵育 12 h。蛋白消化结束后加入蛋白抽提液抽提, 旋转蒸发干燥后的多肽储存于 -80 °C 冰箱备用。

1.7 LC-MS/MS

首先配制流动相, 流动相 A 为 2% 乙腈溶于 98% 超纯水, 另外添加 0.1% 甲酸; 流动相 B 为

2%超纯水溶于 98%乙腈, 另外添加 0.1%甲酸。酶解后的多肽溶于 100%的流动相 A, 自动上样, 梯度洗脱。液相梯度设定为在 30 min 内逐渐由 100%的流动相 A 过渡到 100%的流动相 B。质谱条件设定为: 扫描质荷比 400–1 800 的离子, 喷雾电压设定为 2 000 V, 选取一级质谱中最高的 10 个离子进行 HCD 碎裂并进行二级质谱扫描, 一级质谱分辨率为 30 000, 二级质谱分辨率为 7 500, 动态排除时间为 45 s。动态排除窗口为正负 0.005 Da。每个多肽峰进行一次二级质谱扫描。

2 结果与分析

2.1 短胶法分析标准样品蛋白

BSA 标准蛋白短胶电泳结果表明, 随着蛋白含量升高, 标准蛋白染色深度也逐渐加深。

线性回归分析表明在 0.5–16 μg BSA 范围内 R^2 达到 0.983, 与我们的前期结果一致^[9]。其中, 绝对线性范围大约为 1–8 μg BSA, R^2 达到 0.999, 高于或低于这一范围线性度都会降低 (图 1)。

2.2 短胶法测定样本蛋白含量

用短胶法基于建立的 BSA 标准曲线, 测定两种待测样品, 即 siRNA 处理细胞和对照 RNA 处理细胞的蛋白含量, 计算 3 个样品蛋白的上样量均为 1.47 μg , 在短胶法定量的线性范围内, 可使用短胶法进行定量 (图 2)。重复上样的蛋白样品含量无差异, 说明短胶法的重复性较好。

使用蛋白印迹法对短胶法测定的蛋白浓度进行分析, 结果表明, 免疫印迹与短胶法测定的结果不一致。蛋白印迹方法测定的蛋白样品中, 两个 siRNA 处理后的管家蛋白含量偏高 (图 2)。

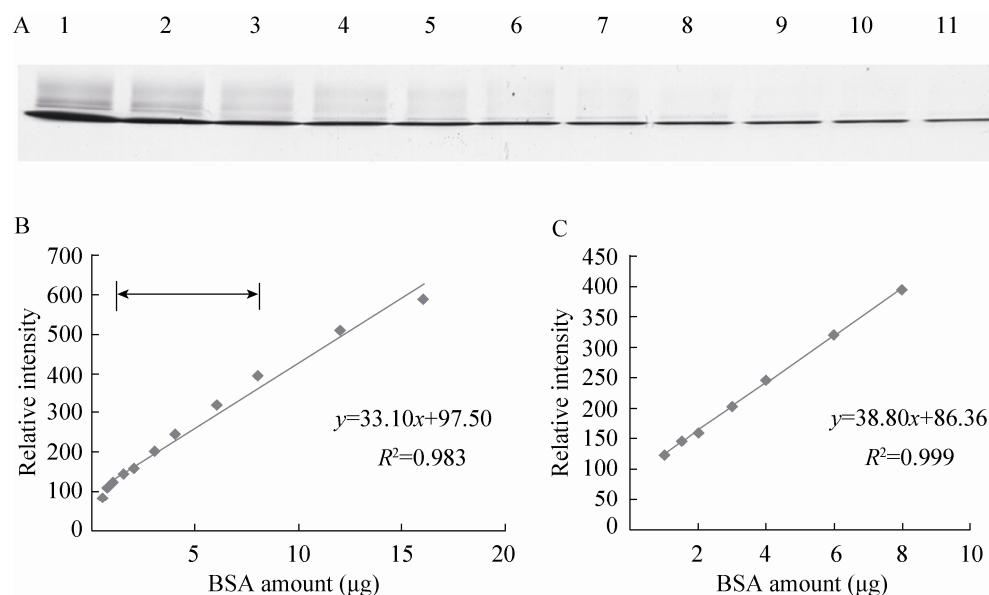


图 1 BSA 标准蛋白短胶电泳分析

Fig. 1 Short gel analysis of BSA protein. (A) Shot gel electrophoresis of BSA. From 1 to 11 wells, the amount of BSA was 12, 8, 6, 4, 3, 2, 1.5, 1, 0.75 and 0.5 μg per well respectively. (B) Relationship between BSA amount (0.5–16 μg) and band intensity. (C) Relationship between BSA amount (1–8 μg) and band intensity.

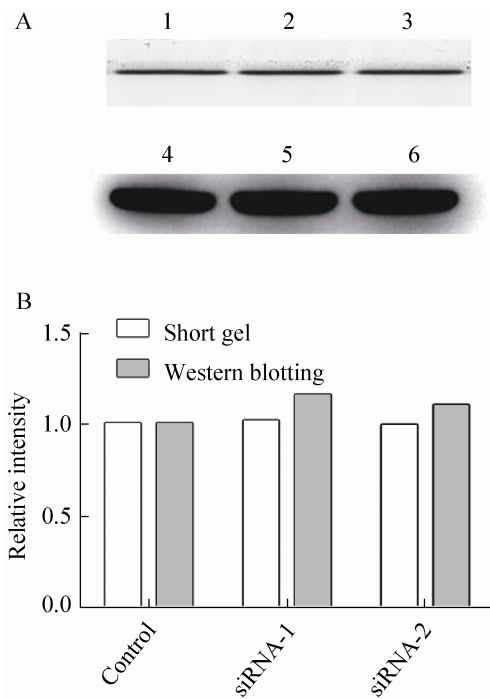


图2 短胶法测定样本蛋白

Fig. 2 Quantitation of sample proteins with short gel method. (A) Gel images from short gel (lines 1, 2 and 3) and Western blotting (line 4, 5 and 6 were β -actin) assays. 1 and 4 were loaded the control protein; 2 and 3, and 5 and 6 were loaded the same sample as the same amounts as control (two repeats of siRNA treated proteins). (B) Relative intensity compared between the two assays.

2.3 常规 SDS-PAGE 分析样本蛋白

为了分析导致两种定量方法差异的原因, 采用常规 SDS-PAGE 凝胶电泳分析了对照蛋白和 siRNA 处理后蛋白表达模式 (图 3)。结果显示, 对照蛋白与 siRNA 处理蛋白表达模式明显不同。对照蛋白在 50 kDa 左右有明显染色加深的条带, 这两个蛋白的表达水平接近 β -actin 等内参蛋白, 而这两个条带在 siRNA 处理的蛋白中消失了。

2.4 LC-MS/MS 分析样本蛋白

短胶定量后的蛋白采用胶内酶解法消化并

进行质谱分析 (图 4)。结果显示, 样本质谱信号在 $1E8$ 左右, 质谱信号较好。三个样本的峰形不同, 对照样本最高峰的信号低于 siRNA 处理样本, 但对照细胞中高强度峰的数量多于 siRNA 处理细胞。说明对照样品高丰度蛋白数量较多, 但每个蛋白的含量较少, 与常规 SDS-PAGE 法分析结果一致。

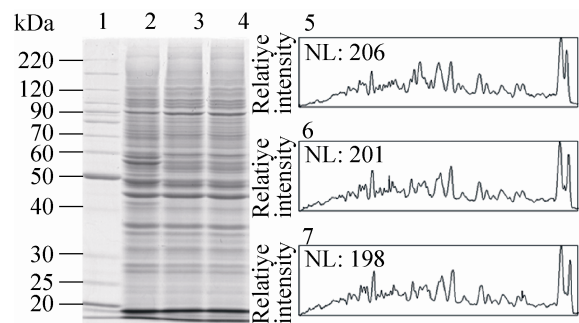


图3 蛋白样品常规 SDS-PAGE 凝胶电泳分析

Fig. 3 Samples analyzed by regular SDS-PAGE. Line 2 was loaded control protein, line 3 and 4 were loaded siRNA treated proteins as the same amounts. Line 1 was protein molecular weight marker. The band intensities were included controls (5) and siRNA treated proteins (6 and 7, two repeats). NL: normalized protein levels.

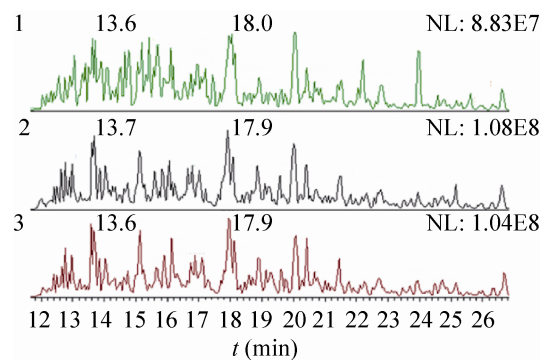


图4 样品蛋白的 LC-MS/MS 法分析

Fig. 4 LC-MS/MS analysis of peptides of samples. Peptides derived from control protein (1), siRNA treated proteins (2 and 3, two repeats); NL: normalized protein levels.

3 讨论

蛋白质预处理是蛋白质组学研究的重要技术。使用较高浓度的去垢剂和还原剂可以更有效地提取蛋白^[10]。如本研究中使用的蛋白提取缓冲液含有 4% 的 SDS 和 100 mmol/L 的 DTT, 目前被国内外主流蛋白质组学实验室广泛使用^[11-15]。标准的 FASP 法对含这种缓冲液的样品酶解后进行多肽水平定量。但由于现有的蛋白定量方法对高浓度去垢剂的兼容性问题, 目前还没有很好的方法进行蛋白水平的定量。

我们的结果表明, 使用 BSA 作为标准蛋白, 短胶法定量的理论线性度可以达到 0.999, 当样品蛋白在这个浓度范围内时, 即可使用短胶法进行蛋白含量测定。但这种高线性度只存在于 1-8 μg 标准蛋白 BSA 的条件下, 当 BSA 的含量高于或低于这个范围时, 短胶法定量的线性度会发生偏差。BSA 是被各种定量方法广泛使用的蛋白标准品, 但蛋白质组分析的样品复杂度很高, 部分蛋白性质可能与 BSA 有差异, 可能导致定量结果出现偏差。所有的定量方法都有其线性区间。如 Bradford 法按照使用的试剂不同, 线性区间分别在 10-100 μg 或 1-10 μg 之间^[16]。短胶法定量蛋白的线性区间在 1-8 μg 间, 需要的蛋白量较少, 与通常条件下蛋白提取量一致, 而且避免了去垢剂、还原剂等杂质的干扰, 更适用于蛋白定量分析。

最近, 曹嵩等对进入浓缩胶中的蛋白进行考马斯亮蓝凝胶染色后使用近红外成像进行定量, 发现在 1-10 μg 范围内线性度最高可达 0.993^[17]。与这种方法相比, 短胶法在线性范围大致相当的情况下, 线性度更高, 不需要大型仪器。而且定量的蛋白可以直接进行后续胶内

酶解和质谱分析, 节省样品。

蛋白印迹也是常用的蛋白相对定量方法之一。这种方法首先采用 SDS-PAGE 分离蛋白, 分离后的蛋白转印到膜上, 并与带标记的抗体共孵育, 采用化学发光法检测蛋白含量^[18]。由于这种方法在第一步也采用 SDS-PAGE, 所以也不容易受到样品中去垢剂等杂质的影响。但蛋白印迹的方法通常需要选用一两个内参蛋白作为上样量的对照。在内参蛋白的选择中可能带来人为因素的影响。在一些条件下, 内参蛋白的含量会发生变化, 与总蛋白的含量变化并不一致。例如, 在本研究中, siRNA 处理的细胞中有两个高丰度蛋白表达下降。由于这两个高丰度蛋白的含量减少, 间接提高了 β -actin 在对照细胞蛋白中所占的比例。从而使总蛋白含量相同的情况下, β -actin 的含量升高。这种情况下, 使用蛋白印迹法测定高丰度蛋白含量并作为内参会导致结果出现偏差。使用短胶定量可能是一个更好的选择, 因为短胶定量时所有蛋白都混合在一起进行染色和分析, 单个蛋白表达量的变化并不会影响总蛋白定量的准确性。

在基于凝胶的蛋白质组学研究中, 双向电泳^[19]与常规 SDS-PAGE 凝胶电泳常用于蛋白质分析步骤中。而蛋白分子在长距离电泳时, 蛋白分子迁移率与实际的分子量并非完全一致^[20]。长距离电泳时, 不同的蛋白彼此分开, 灵敏度下降, 而且不同蛋白对考马斯亮蓝染料的响应也不同^[21]。为了达到好的显色效果, 需要的蛋白量也大大增加, 也更容易引入人为干扰, 不适合作为蛋白质样品预处理的方法。

短胶法处理的蛋白可以有效地进行酶解并进行质谱分析^[22-24]。常用的酶解方法是胶内酶

解^[25], 胶内酶解后再抽提多肽进行质谱分析。本研究中短胶浓缩的蛋白经过胰蛋白酶酶解后, 使用 LC-MS/MS 进行半定量分析, 质谱结果显示, 质谱峰的信号较好, 达到 1E8 水平, 提示样本蛋白得到了充分的消化和抽提。提示短胶法分析的蛋白可以方便地用于下游蛋白质组学研究。siRNA 处理的蛋白单个峰的信号强度更高, 但峰的数量更少。说明由于对照细胞中存在高丰度蛋白, 对其他蛋白产生稀释作用, 短胶法测定的蛋白含量更接近真实情况。

本研究分析了短胶定量的线性范围, 并使用短胶法进行蛋白定量和质谱前样品预处理。结果表明短胶法是一种准确、可靠的蛋白质预处理方法, 可以与高浓度去垢剂缓冲液相兼容, 也不容易受蛋白表达差异的影响。短胶法可以同时完成蛋白定量、胶内酶解及后续的质谱鉴定等步骤, 可以方便地用于蛋白质组学研究, 值得推广。

REFERENCES

- [1] 2-D Quant Kit [EB OL]. [2009-04-01]. <http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/productById/zh/GELifeSciences-us/80648356>.
- [2] Tanca A, Biosa G, Pagnozzi D, et al. Comparison of detergent-based sample preparation workflows for LTQ-Orbitrap analysis of the *Escherichia coli* proteome. *Proteomics*, 2013, 13(17): 2597–2607.
- [3] Sharma R, Dill BD, Chourey K, et al. Coupling a detergent lysis/cleanup methodology with intact protein fractionation for enhanced proteome characterization. *J Proteome Res*, 2012, 11(12): 6008–6018.
- [4] Liebler DC, Ham AJ. Spin filter-based sample preparation for shotgun proteomics. *Nat Methods*, 2009, 6(11): 785–786.
- [5] Zhang H, Liu Q, Zimmerman LJ, et al. Methods for peptide and protein quantitation by liquid chromatography-multiple reaction monitoring mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 2011, 10(6): M110. 006593.
- [6] Wisniewski JR, Ostasiewicz P, Mann M. High recovery FASP applied to the proteomic analysis of microdissected formalin fixed paraffin embedded cancer tissues retrieves known colon cancer markers. *J Proteome Res*, 2011, 10(7): 3040–3049.
- [7] Lapierre LA, Avant KM, Caldwell CM, et al. Characterization of immunisolated human gastric parietal cells tubulovesicles: identification of regulators of apical recycling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 292(5): 1249–1262.
- [8] Thakur D, Rejtar T, Wang D, et al. Microproteomic analysis of 10,000 laser captured microdissected breast tumor cells using short-range sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and porous layer open tubular liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(45): 8168–8174.
- [9] Xu P, Duong DM, Peng J. Systematical optimization of reverse-phase chromatography for shotgun proteomics. *J Proteome Res*, 2009, 8(8): 3944–3950.
- [10] Shevchenko G, Musunuri S, Wetterhall M, et al. Comparison of extraction methods for the comprehensive analysis of mouse brain proteome using shotgun-based mass spectrometry. *J Proteome Res*, 2012, 11(4): 2441–2451.
- [11] Wiśniewski JR, Zougman A, Nagara N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 359–362.
- [12] Zanivan S, Krueger M, Mann M. *In vivo* quantitative proteomics: the SILAC mouse. *Methods Mol Biol*, 2012, 893: 435–450.
- [13] Stein DR, Hu X, McCorrister SJ, et al. High pH reversed-phase chromatography as a superior fractionation scheme compared to off-gel isoelectric focusing for complex proteome analysis. *Proteomics*, 2013, 13(20): 2956–2966.
- [14] Konzer A, Ruhs A, Braun T, et al. Global protein quantification of mouse heart tissue based on the

- SILAC mouse. *Methods Mol Biol*, 2013, 1005: 39–52.
- [15] Weston LA, Bauer KM, Hummon AB. Comparison of bottom-up proteomic approaches for LC-MS analysis of complex proteomes. *Anal Methods*, 2013, 5(18): 4615–4621.
- [16] Walker JM. *The Protein Protocols Handbook*. Berlin: Springer, 1996: 15–18.
- [17] Cao S, Deng WW, Zhu XT, et al. Protein quantitation in pre two-dimensional electrophoresis by near infrared imaging of coomassie brilliant blue on gels. *Chin J Cell Biol*. 2013, 35(6): 848–851 (in Chinese).
曹嵩, 邓文文, 朱欣婷, 等. 考马斯亮蓝凝胶染色联合近红外成像用于双向电泳前的蛋白质定量. *中国细胞生物学学报*, 2013, 35(6): 848–851.
- [18] AkhavanTafti H, DeSilva R, Arghavani Z, et al. Characterization of acridancarboxylic acid derivatives as chemiluminescent peroxidase substrates. *J Org Chem*, 1998, 63(4): 930–937.
- [19] Klose J, Kobalz U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis*, 1995, 16(1): 1034–1059.
- [20] Kaufmann E, Geisler N, Weber K. SDS-PAGE strongly overestimates the molecular masses of the neurofilament proteins. *FEBS Lett*, 1984, 170(1): 81–84.
- [21] Read S, Northcote D. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal Biochem*, 1981, 116(1): 53–64.
- [22] Fernandez J, Gharahdaghi F, Mische SM. Routine identification of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels or polyvinyl difluoride membranes using matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *Electrophoresis*, 1998, 19(6): 1036–1045.
- [23] Liang X, Bai J, Liu YH, et al. Characterization of SDS--PAGE-separated proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, 1996, 68(6): 1012–1018.
- [24] Hellman U. Sample preparation by SDS/PAGE and in-gel digestion. *Exs*, 2000, 88: 43–54.
- [25] Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*, 2006, 1(6): 2856–2860.

(本文责编 陈宏宇)