

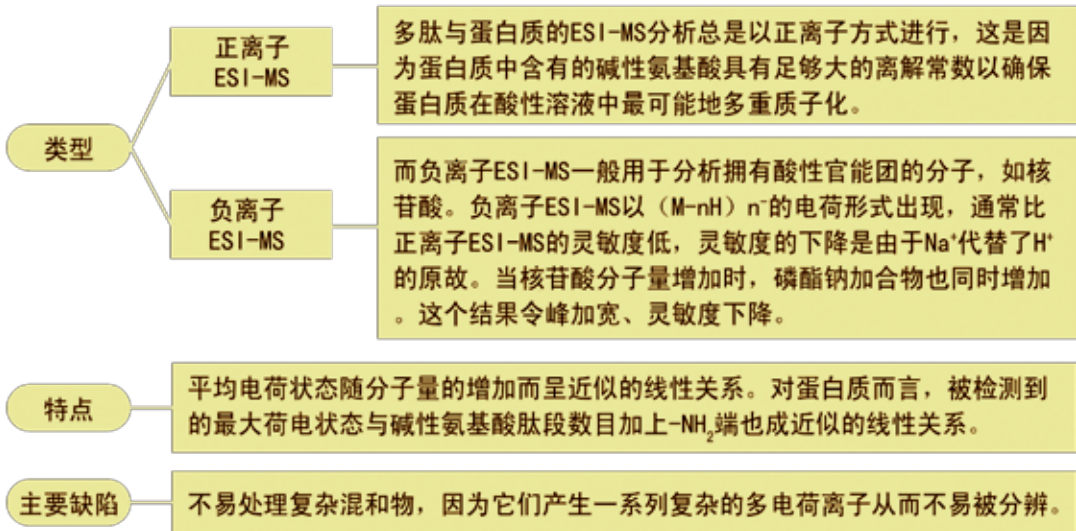
II 人类蛋白质相互作用的研究策略

1 大规模蛋白质质谱分析^[1, 2]

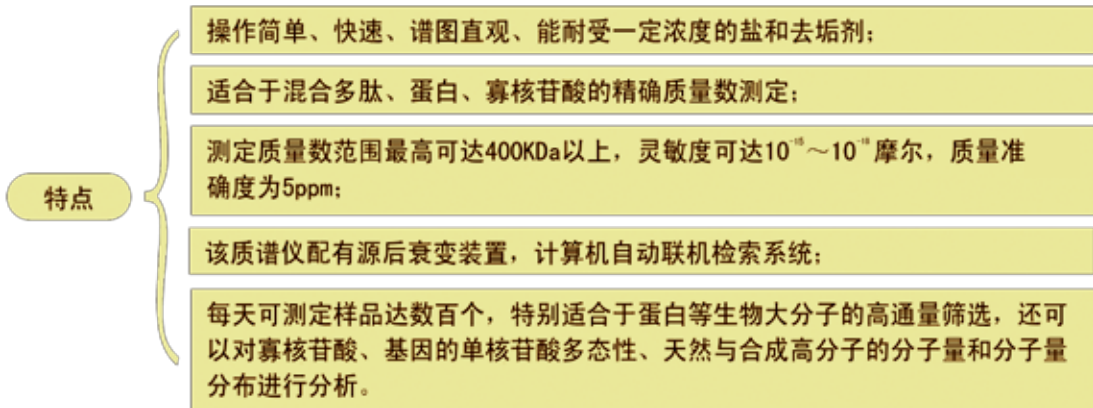
质谱分析用于蛋白质的研究具有许多优点^[3]，如灵敏度高，能为极微量的样品提供信息；与色谱联用，适用于复杂体系中痕量物质的鉴定或结构测定。总的来说，质谱分析具有准确性高、操作简易、快速等优点。

1.1 质谱分析的方法主要有以下几种：

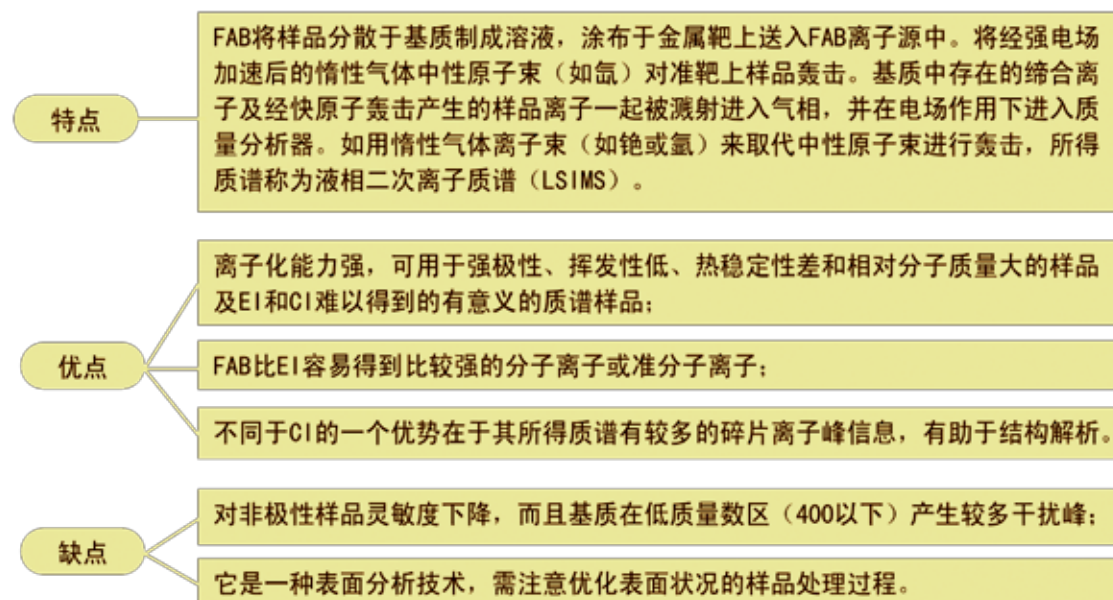
电喷雾电离质谱 (ESI-MS) ^[4]



基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) ^[5, 6]



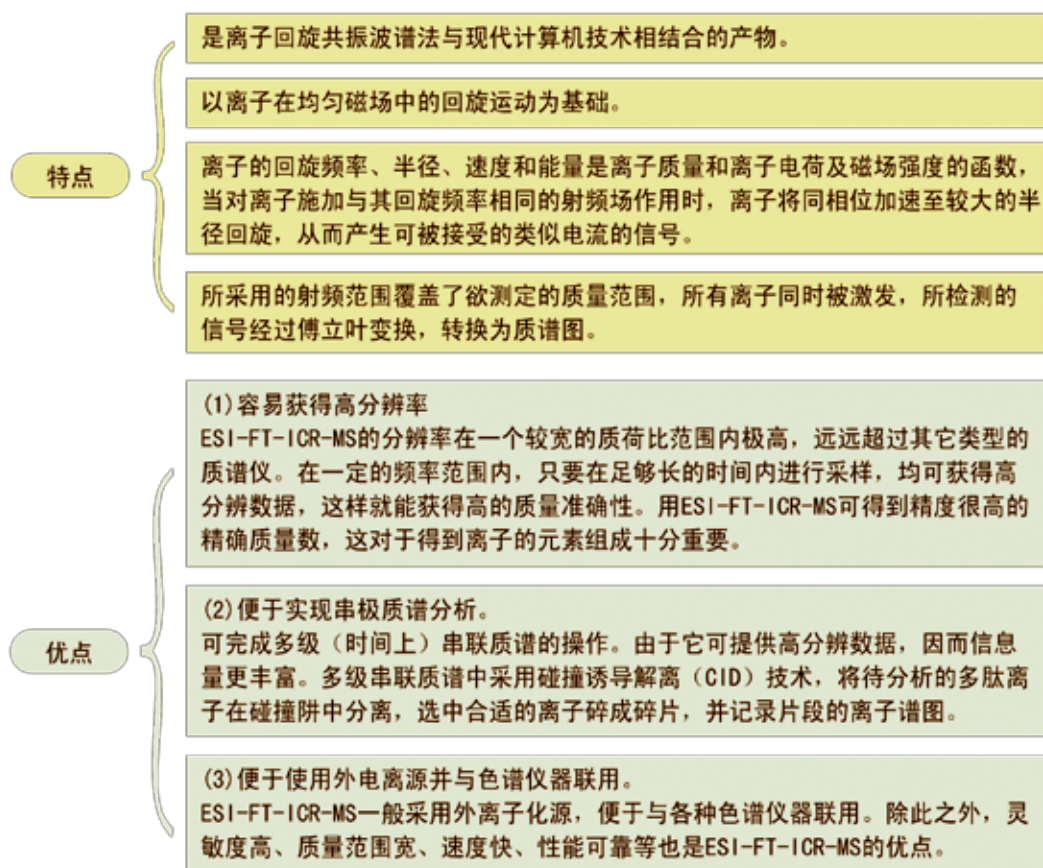
快原子轰击质谱 (FAB) [7-12]



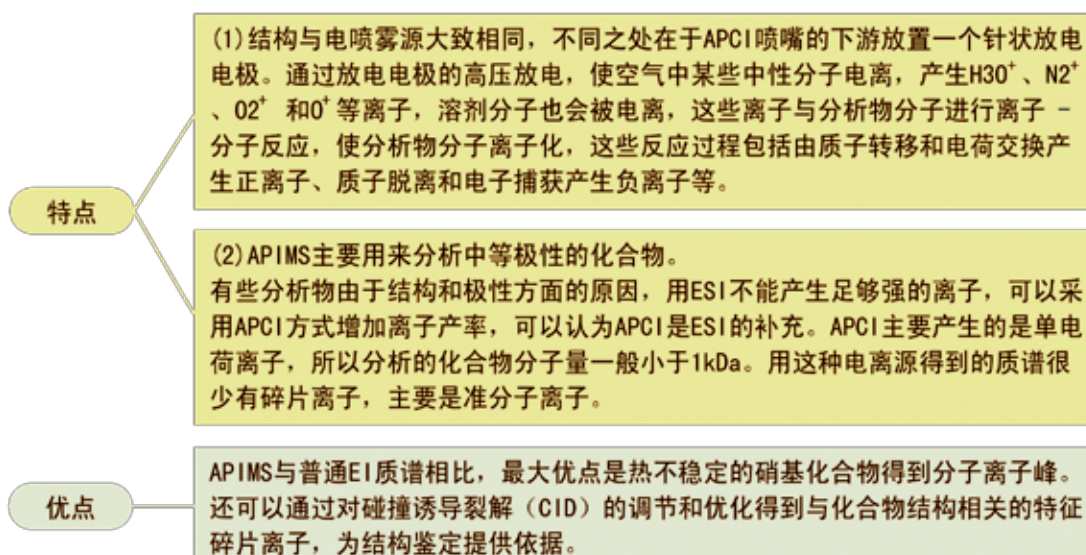
样品分子可以与碱金属离子加合，如 $[M+Na]$ 和 $[M+K]$ ，这种加合方式有助于形成离子，而这种现象则有助于生物分子的离子化。

因此，使用氯化钠溶液对样品表面进行处理有助于提高加合离子的得率。在分析过程中加热样品也有助于提高得率。在FAB离子化过程中，可同时生成正负两种离子，这两种离子都可以进行质谱分析。样品分子如带有强电子捕获结构，特别是带有卤素原子，则可以产生大量的负离子。

电喷雾傅立叶变换离子回旋共振高分辨质谱 (ESI-FT-ICR-MS) [13, 14]



大气压电离质谱 (APIMS) [15, 16]



在上述技术中, 对于前三种技术的研究最为深入, 应用范围也最为广泛。

1.2 质谱分析的方法主要有以下几种:

1.2.1 蛋白质样品的准备 [17,18]

样品制备是双向电泳中最为关键的一步, 这一步的操作将直接影响2-DE的结果。但是, 目前并没有形成一个通用的制备方法。尽管处理方法多种多样, 但都遵循下面几个基本原则:

- 尽可能提高样品蛋白的溶解度, 抽提最大量的总蛋白, 减少蛋白质的损失;
- 减少对蛋白质的人为修饰;
- 破坏蛋白质与其它生物大分子之间的相互作用, 并使蛋白质处于完全变性状态。

根据以上原则, 样品制备需要四种主要试剂:

- 变性剂, 主要包括尿素和硫脲;
- 表面活性剂, 常使用NP-40、TritonX -100、CHAPS与Zwittergent系列等两性离子去垢剂;
- 还原剂, 最常用的是二硫苏糖醇, 其它可供选用的还原剂还有二硫赤藓糖醇、磷酸三丁酯等。此外, 也可以选择性地加入三羟甲基氨基甲烷、蛋白酶抑制剂如EDTA、PMSF或蛋白酶抑制剂cocktails以及核酸酶等。

样品的来源不同，所使用的裂解缓冲液也不尽相同。通过不同试剂的合理组合，以达到对样品蛋白的最大抽提率。在对样品蛋白质提取的过程中，必须考虑到去除影响蛋白质可溶性和2-DE 重复性的物质，比如核酸、脂、多糖等大分子以及盐类小分子。大分子的存在会阻塞凝胶孔径，盐浓度过高则会降低等电聚焦的电压，甚至会损坏IPG胶条，这些都会造成2-DE的失败。而样品制备的失败是很难通过后续工作的完善或改进来弥补的。

核酸的去除可采用超声或核酸酶处理，超声处理应控制好条件，并防止泡沫产生；而加入的外源核酸酶则会出现现在最终的2-DE胶上。脂类和多糖都可以通过超速离心除去。降低盐浓度可以采用透析，但需时过长；此外，也可以采取凝胶过滤或沉淀/重悬法脱盐，但该方法会造成蛋白质的部分损失。因此，处理方法必须根据不同的样品、所处的状态以及实验的目的和要求进行选择，以获得最佳的实验结果。

1.2.2 蛋白质双向电泳

双向电泳（2-DE）是蛋白质组学研究的三大核心技术之一。2-DE在蛋白质组学研究中处于非常重要的位置，它可用于蛋白质转录及转录后的修饰研究、蛋白质组的比较和蛋白质间的相互作用、细胞分化凋亡研究等许多方面。由于该技术具有较高的分辨率和灵敏度，目前已成为分析复杂蛋白混合物的基本工具。现正，研究人员还在不断改进2-DE，使得这一技术日趋完善。

2-DE首先进行等电聚焦电泳（IEF），然后采用十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）对蛋白质进行第二向电泳；在 IEF中，蛋白质因等电点不同而被分离。

在 SDS-PAGE 中，蛋白质则因具有不同的分子量而被分离开，之后再考马斯亮兰或银染进行显色，便可以借助Pdquest等软件对结果进行比对分析了。

由于蛋白质具有等电点和分子量这两个彼此不相关但又非常重要的性质，2-DE可同时利用这两个性质的差异来分离蛋白质，因此2-DE对于蛋白质的

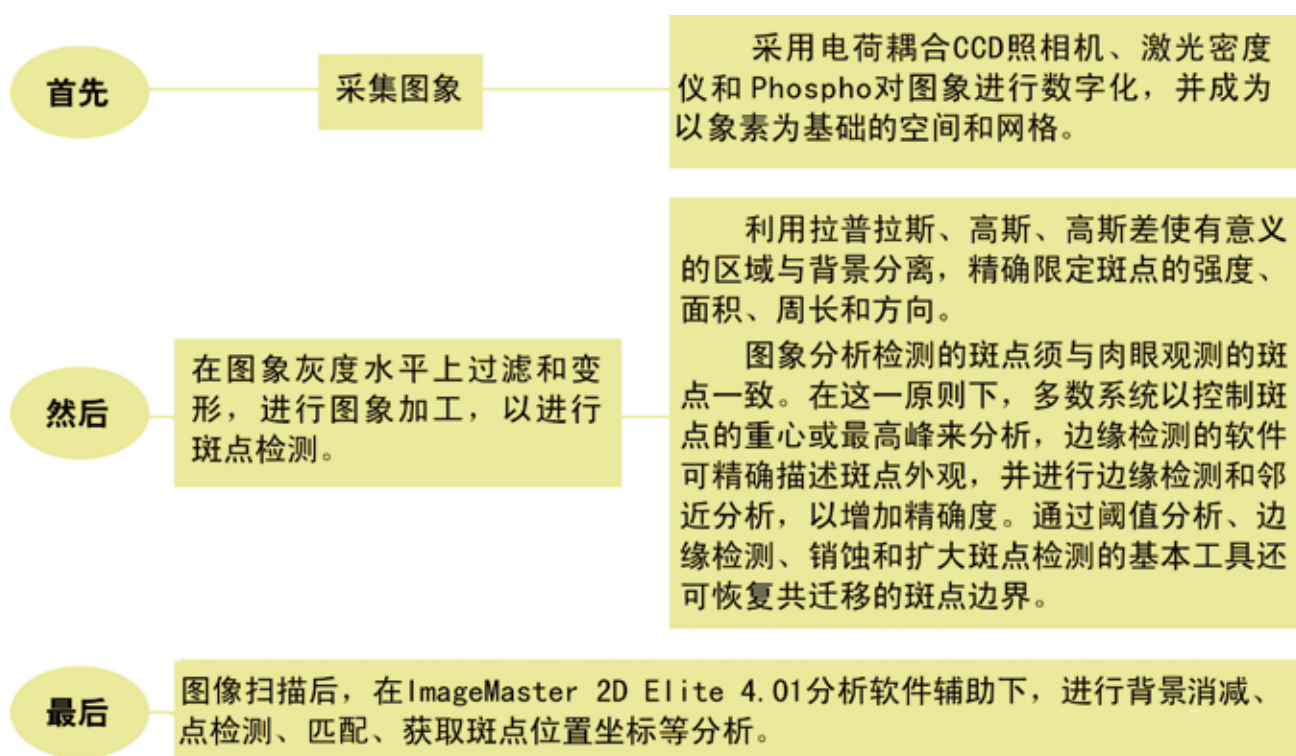
分离可以达到极高的分辨率和灵敏度，该技术甚至能分离细胞中多达5000种的蛋白。

2-DE在分离蛋白质混合样品、比较差异方面具有不可替代的作用。该技术通过与质谱鉴定技术相结合，还可鉴定出大型蛋白复合物的各组分；与其它生物学技术如分子生物学、分子遗传工程、免疫学、微量蛋白质的自动氨基酸序列分析相结合，可以快速准确地发现和鉴定新蛋白。

双向电泳的第一向IEF电泳采用IPGphor^[19]，将使分离操作变得轻松简单。IPGphor由半导体温控系统（18℃ -25℃）和程序化电源（8000V, 1.5mA）两部分组成。可采用普通型胶条槽一步完成胶条的水化、上样和电泳，从而大大减少操作步骤。IPGphor一次可进行12个胶条槽的电泳（7、11、13、18、24cm），此外，由于所采用的是高电压（8000V），可大大缩短聚焦时间。最新推出的通用型杯上样胶条槽因采用可移动的上样杯和电极，适合任何长度的IPG胶条，尤其适合极性等电点蛋白的分离。

1.2.3 图象分析

2-DE图谱分析不能依靠本能的直觉，因为每一个图象上斑点的上调、下调及出现、消失，都可能在生理和病理状态下产生，所以必须依靠计算机为基础的数据处理，进行定量分析。在具备一系列高质量的2-DE凝胶（低背景染色，高度的重复性）的前提下，图象分析包括斑点检测、背景消减、斑点配比和数据库构建。



1.2.4 质谱分析（图4）

首先，对银染蛋白点进行胶内酶切、脱色、还原、烷基化、酶解（用胰蛋白酶）、萃取及冻干；然后，将制备好的样品置于质谱仪上进行分析。该技术采用线性模式、正离子谱测定，离子源加速电压为20kV，离子延迟提取500ns，质谱信号单次扫描累加50次，以多肽质量标准为外标。

1.2.4.1 肽质指纹术（PMF）

该技术用酶（最常用的是胰酶）对由2-DE分离的蛋白在胶上或在膜上于精氨酸或赖氨酸的C-末端处进行断裂，断裂所产生的蛋白片段的精确分子量通过质谱来测量（MALDI-TOF-MS或ESI-MS），采用这一技术所获得的肽段的质量可精确至0.1个分子量单位。

所有肽段质量最后与数据库中理论肽段质量相比（理论肽是由实验所用的酶来“断裂”蛋白产生的）。

配比的结果是按照数据库中肽片段与未知蛋白共有的肽片段数目作一个“排行榜”，“冠军”肽片段可能代表一个未知蛋白。若冠亚军之间的肽片段存在较大差异，且这个蛋白可与实验所示的肽片段覆盖良好，则说明鉴定正确的可能性较大。

1.2.4.2 肽片段的部分测序

肽质指纹术本身并不能揭示所衍生的肽片段或蛋白质。为进一步鉴定蛋白质，出现了一系列质谱分析方法，可用来描述肽片段。用酶或化学方法从N-末端或C-末端按顺序除去氨基酸，便形成梯形肽片段。

以一种可控制的化学模式从N-末端降解，可产生大小不同的一系列的梯形肽片段，而且所得一定数目的

肽质量可由MALDI-TOF-MS测量。另一种方法涉及羧基肽酶的应用，该方法从C-末端除去不同数目的氨基酸后便形成肽片段。化学法和酶法可产生相对较长的序列，其分子量非常精确，以至于连赖氨酸（128.09）和谷氨酰胺（128.06）这两个分子量相差无几的氨基酸都能细致区分。或者，在质谱仪内应用源后衰变（PSD）和碰撞诱导解离（CID）技术，目的是产生包含有仅异于一个氨基酸残基质量的一系列肽峰的质谱。因此，可以基于此来推测肽序列。而且，在MALDI反应器上分析肽片段PSD就能产生部分序列信息。

- 首先进行肽质指纹鉴定；
- 然后，一个有意义的肽片段在质谱仪被选作“母离子”，在飞至离子反应器的过程中降解为“子离子”。

在反应器中，用逐渐降低的电压可测量至检测器的不同大小的片段。但经常产生不完全的片段。

目前采用肽片段来测序的方法始于70年代末的CID，可以在一个三联四级质谱ESI-MS或MALDI-TOF-MS联合碰撞器内完成。在ESI-MS中，由电雾源产生的肽离子在质谱仪的第一个四级质谱中测量，有意义的肽片段被送至第二个四级质谱中，经惰性气体轰击而成为碎片，所得产物在第三个四级质谱中测量。

与MALDI-PSD相比，CID稳定、强健、普遍，肽离子片段基本沿着酰胺键的主架被轰击产生梯形序列。连续的片段间差异决定此序列在那一点的氨基酸的质量。由此，序列可被推测。由CID图谱还可获得的几个序列的残基，叫做“肽序列标签”。这样，联合肽片段母离子的分子量和肽片段距N-末端、C-末端的距离将足以鉴定一个蛋白质。

1.2.4.3 氨基酸组分分析

氨基酸组分分析于1977年首次作为鉴定蛋白质的一种工具，是一种独特的“脚印”技术。

该技术利用了蛋白质异质性的氨基酸组分特征，使之作为一种独立于序列的属性，且不同于肽质量或序列标签。Latter首次表明关于氨基酸组分的数据能用于在2-DE凝胶上鉴定蛋白质。通过使用具有放射标记的氨基酸来测定蛋白质的组分，或者将蛋白质印迹到PVDF膜上，并在155℃进行酸性水解1h，采用这一简单步骤来提取氨基酸，所得每一样品的氨基酸在40min内自动衍生并由色谱分离，常规分析为100个蛋白质/周。依据代表两组分间数目差异的分数，对数据库中的蛋白质进行排榜，“冠军”蛋白质具有与未知蛋白质最相近的组分，考虑到冠亚军蛋白质分数之间的差异，仅冠军蛋白质的可信度大。

目前网络上有多程序可用于氨基酸组分的分析，如AAComplident、ASA、FINDER、AAC-PI、PROP-SEARCH等。其中，在PROP-SEARCH中，组分、序列和氨基酸的位置被用来检索同源蛋白质。但改程序仍存在一些缺点，如由于酸性水解的不足或者部分降解，会产生氨基酸的变异，故应联合其它的蛋白质属性进行鉴定。

质谱的准确性对测定结果有很大影响，因此质谱测序现在仍很难应用于对未知蛋白序列的测定。肽和蛋白的质谱序列测定方法具有快速、用量少、易操作、所需样品量小等优点，这些都非常适合现在科学研究的需要。

我们相信，随着各种衍生化方法和酶解方法的不断改进，2-DE的应用以及质谱技术的不断完善，质谱将会成为多肽和蛋白质分析最为有效的工具之一。

1.2.5 肽质量指纹图谱的数据库查询（图4）

将结果通过软件进行肽质量指纹图谱（PMF）查询。在数据库中选择SWISS-PORT/TrEMBL，PMF中的肽片段质量控制在1—5 kDa，肽片段分子质量最大容许误差控制在 ± 0.5 u之间，选择胰酶，酶解片段不完全选择为1个，物种来源选择人类，离子选择[M+H]⁺加和平均，固定修饰选择脲甲基半胱氨酸。

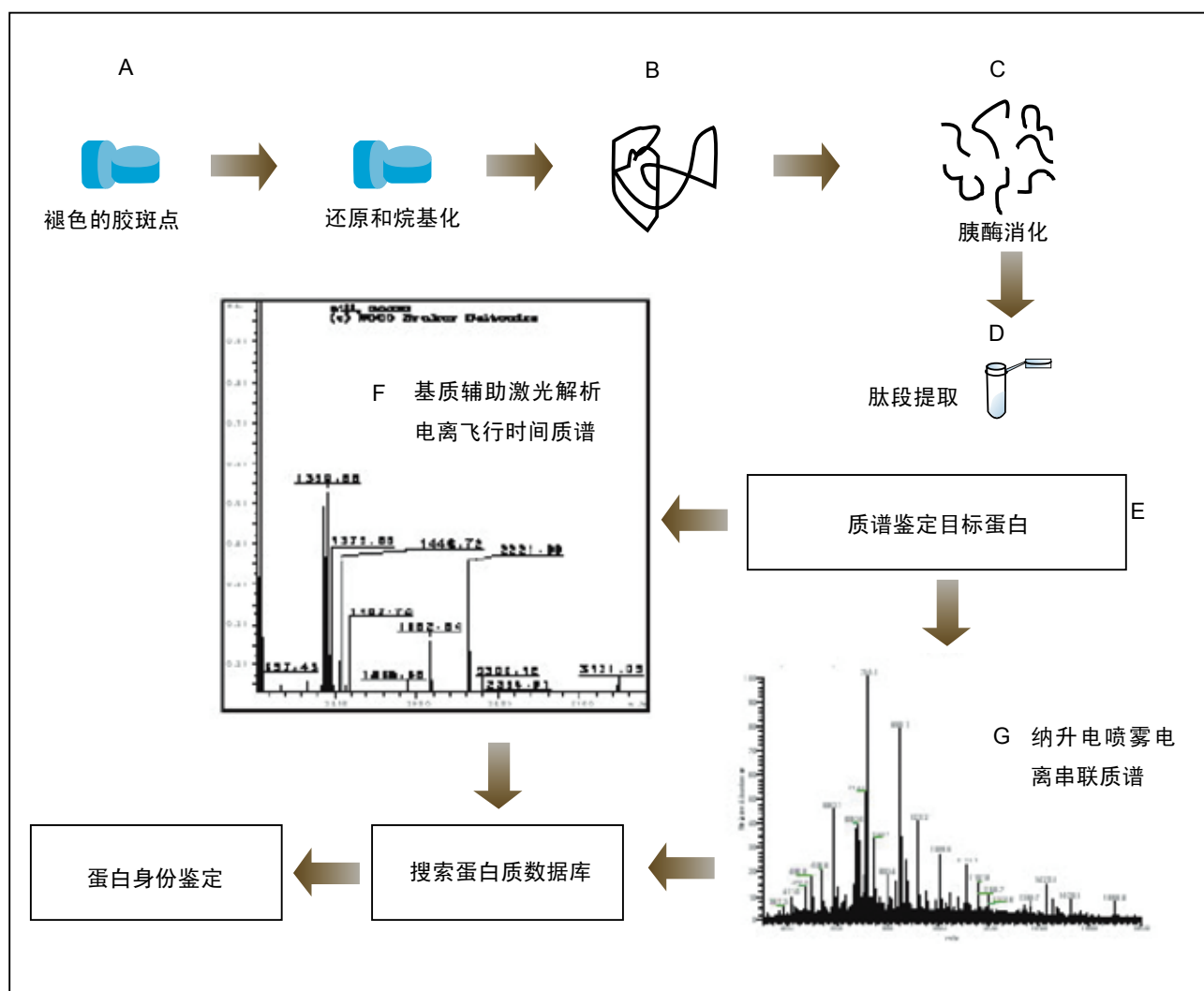


图4 蛋白质质谱分析流程

1.2.6 微量测序

蛋白质的微量测序已成为蛋白质分析和鉴定的基石，可以为相关研究提供充足的信息。尽管氨基酸组分分析和肽质指纹谱（PMF）可鉴定由2-DE分离的蛋白，但最普通的N-末端Edman降解仍然是鉴定的主要技术。目前已实现蛋白质微量测序的自动化。首先，使经凝胶分离的蛋白质直接印迹在PVDF膜或玻璃纤维膜上，再进行染色、切割，然后直接置于测序仪中，这样就可用于亚皮摩尔（subpicomole）水平的蛋白质的鉴定。近来，应用自动

但有一点需注意

Edman降解很缓慢，序列以每40 min 1个氨基酸的速率产生；

与质谱相比，Edman降解消耗大；

试剂昂贵，每个氨基酸花费3~4\$；

以上说明泛化的Edman降解蛋白质不适合分析成百上千的蛋白质。然而，如果在一个凝胶上仅有几个有意义的蛋白质，或者如果其它技术无法测定而克隆其基因是必需的，则需要进行泛化的Edman降解测序。

化的Edman降解,可产生短的N-末端序列标签,这是将质谱的序列标签概念用于Edman降解,而且业已成为一种强有力的蛋白质鉴定策略。当对Edman的硬件进行简单改进后,可以迅速产生N-末端序列标签达10~20个/d,序列检签将适于在较小的蛋白质组中进行鉴定。若联合其它蛋白质属性,如氨基酸组分分析、肽质质量、表现蛋白质分子量、等电点等,则鉴定出的蛋白质会更加可信。选择BLAST程序,可与数据库相比对。目前,采用一种名为TagIdent的检索程序,既可以进行种间比较鉴定,又提高了其在蛋白质组研究中的作用。

由于质谱实验过程中有多种因素的影响,例如质谱中存在着大量的物理噪声、化学噪声,不规则碎裂的离子谱峰、部分离子谱峰缺失、谱峰重叠等复杂现象,这导致直接在原始质谱数据上识别肽序列存在着很多的干扰信号。我们通过对大量串联质谱图的观察和研究分析,发现其中的同位素峰具有稳定的模式可以加以利用。众所周知,多肽主要是

由C、H、N、O、S、P元素组成,它们在天然情况下存在着稳定的同位素,不同元素组成的肽,存在着不同的同位素分布,我们称之为同位素模式,如图8。这些同位素模式有助于判断是否存在谱峰重叠现象。有效的多肽碎片离子会存在一系列有规律的同位素,噪声则不然。因此首先可以应用同位素模式来识别质谱中的有效峰和噪音。

根据质谱中的同位素模式信息,作者提出了一种利用同位素模式来预测离子分子式的新算法——FFP^[1]。根据C、H、N、O、S、P元素的天然稳定分布,可以计算出一个分子式的理论同位素模式,与实验谱中的模式距离最小的分子式认为是正确的,加上对一个有效分子式的线性约束,可将分子式预测问题建模为一个二次规划问题。通过求解该问题,同时结合数据库中的统计规则,可以高精度确定Q-TOF型质谱500u以下谱峰所对应的离子分子式。在50组Q-TOF数据上对0~300u范围内的离子进行分离(图5)。

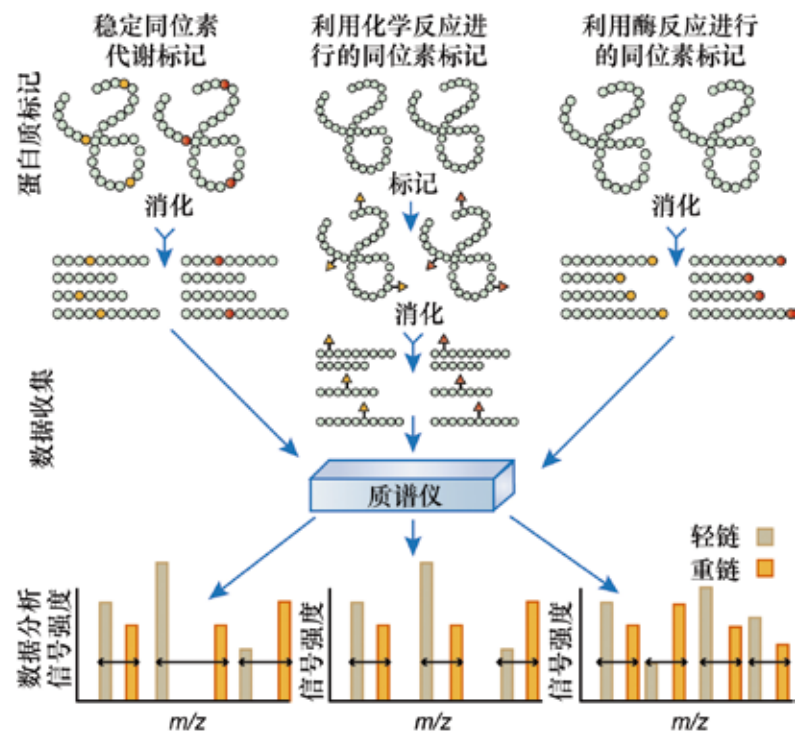


图5 同位素标记的蛋白质质谱分析

许多研究证明了质谱能成功用于蛋白质结构的研究^[20-26],即一级结构(构成蛋白质的单元氨基酸通过肽键连接形成的线性序列)、二级结构(α螺旋、β折叠、β转角、π螺旋、随机卷曲等基本结构单元)、三级结构(蛋白质在二级结构形式的基础上进一步盘曲、折叠而形成特定格式的三级结构)及四级结构(蛋白质多条多肽链之间相互作用所形成的更为复杂的聚合物,并具有一定功能的结构形式)。但目前为止,质谱在蛋白组学中的应用主要还是集中于对一级结构的研究。

2 酵母双杂交系统：猎物与诱饵

酵母双杂交技术是研究蛋白质相互作用的一种重要方法。基因的功能由其编码的蛋白质来实现，蛋白质是基因功能的执行者，而蛋白质功能的发挥是通过蛋白质与小分子底物、蛋白质与核酸以及蛋白质与蛋白质之间相互作用而实现的。所以，通过研究已知功能蛋白质和未知功能蛋白质之间是否具有相互作用，便可了解未知蛋白质的功能。酵母双杂交技术就是基于研究蛋白质是否相互作用而建立的，该技术建立十多年来，已广泛用于研究蛋白质与蛋白质的相互作用，并向大规模、自动化、高通量方向发展且日趋成熟。近几年对一些模式生物的几乎全部ORF之间相互作用的研究，为大规模研究蛋白质与蛋白质相互作用，以及了解更多蛋白质的生物学作用和细胞的复杂分子系统提供了范例。

2.1 酵母双杂交技术原理

1989年，Fields S等人^[27]报道了一种检测蛋白质与蛋白质相互作用的遗传方法——酵母双杂交技术。它是利用转录激活因子GAL4的特性而建立的。GAL4由两个结构域组成，一个是N端的DNA结合域（DBD），一个是C端的转录激活域（AD）。二者可以从核酸一级结构上分开并独立表达出有功能的结构域；而当二者在物理空间上靠近时可重新获得完整的转录因子活性。它与自然表达转录激活因子GAL4一样，可结合其顺式元件UASG，并激活信号途径下游半乳糖苷酶基因的转录。

用目的蛋白X的核酸序列同DBD的核酸序列融合可以表达DBD-X，用目的蛋白Y的核酸序列同AD的核酸序列融合可以表达AD-Y。如果X和Y相互作用，则使DBD和AD两结构域在物理空间上靠近，而重显完整的转录激活因子功能，激活其下游基因表达。因此，检测GAL4调控的半乳糖苷酶的活性就可判断X、Y是否相互作用。

由此可见，酵母双杂交技术研究蛋白质之间的相互作用是细胞内实验，即不需提纯蛋白便可研究蛋白的相互作用，消除了提纯过程引起的蛋白变性，因而研究的是有生物活性的蛋白与蛋白之间的相互作用，反映了体内的真实作用情况。因此该技术受到了许多科学工作者的关注和应用，并促使其应用于大规模蛋白质与蛋白质相互作用的研究。

2.2 大规模酵母双杂交技术的发展基础

大规模双杂交技术的发展与许多因素有关，其中一些技术的发展和应用于酵母双杂交技术向大规模、自动化方向发展打下了基础。

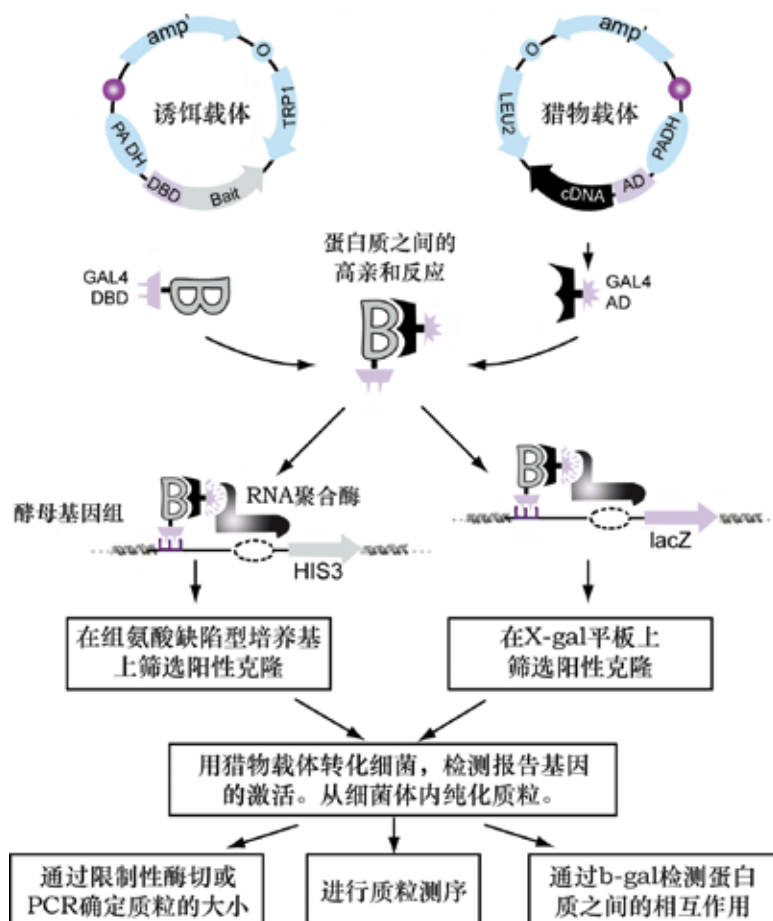


图6 酵母双杂交系统分析流程

表达文库构建技术

它的出现较酵母双杂交技术早。

到酵母双杂交技术出现时表达文库构建技术已基本成熟。因此，把表达文库应用于酵母双杂交筛选蛋白质相互作用得到了研究——单个诱饵对猎物cDNA文库/基因组文库筛选蛋白相互作用、或诱饵文库（cDNA文库/基因组文库）对猎物文库（cDNA文库/基因组文库）筛选蛋白相互作用，结果大大提高了相互作用蛋白的筛选效率和规模，促进了酵母双杂交技术研究蛋白质相互作用向大规模方向发展。

Gateway克隆技术

它是利用 λ 噬菌体DNA自然条件下可与其宿主大肠杆菌DNA发生位点特异性重组整合和可逆切割分离这一机制并加以改进创建的。

相对酶切构建载体来说，该技术具有需时短、操作简单、易于各实验室交流的特点，即只需通过简单、高效的BP和LR反应就可实现把PCR产物定向转入克隆质粒和表达质粒，实现PCR产物在各种质粒间的转移。

另外，这一技术得到了一些大生物公司的重视，不但有BP Clonase、LR Clonase和各种构建好的质粒载体出售，还有利用该技术建好的各种全长ORF克隆、全长cDNA文库等供选购，直接购买应用可简化准备工作。

PCR技术和测序技术

该技术已经实现大规模和自动化。

因此，使诱饵对文库的筛选或文库对文库的筛选的阳性克隆测序和鉴定变得容易、快速。

另外，两项技术的发展使全基因组测序成为现实，产生了许多物种的基因组序列及预测的ORF。因此，使人们对一种生物的所有预测ORF所编码蛋白进行大规模相互作用研究成为可能。

酵母交配技术

酵母单倍体菌株有两种相反的交配型，可交配形成二倍体酵母。因此，可把DBD-X转化入一种单倍体，AD-Y转化入另一种单倍体，然后把分别含DBD-X、AD-Y的两种单倍体共接种到液体培养基培养、交配后再接种到二缺板上培养，这样只有含DBD-X和AD-Y的二倍体菌株生长，然后作表型鉴定判断X、Y有无相互作用（图6）。

显而易见，这个过程相对顺序转化或共转化来说，不但显得简单、高效，而且易于大规模和自动化。

另外，适合阵列筛选的配套仪器已经出现，如HiGro摇床、Beckman自动加样工作站、Genetix公司MegaMate装置等，使大规模酵母双杂交技术变成现实。

2.3 大规模酵母双杂交技术的应用及筛选方式

随着技术的发展、进步和基因组测序的实现，酵母双杂交技术用于大规模研究蛋白质与蛋白质相互作用的报道逐渐增多。研究人员研究了从简单到复杂物种的蛋白质相互作用，结果获得了大量宝贵的相互作用数据，建立了一些物种的相互作用网络，再现和拓展了许多生物通路规律，揭示了许多未知蛋白的功能和已知蛋白的新功能。

2.4 大规模酵母双杂交技术的局限性

酵母双杂交筛系统虽因其优点而广泛用于研究蛋白质相互作用，但也有其自身固有的缺点，如实验设计、结果处理和分析时都要考虑的假阳性和假阴性问题。

2.4.1 假阴性产生的原因

- 有些蛋白由于细胞定位特性可出现假阴性结果。
如细胞内定位不在细胞核的蛋白，尤其定位细胞膜和通过分泌泡分泌到细胞外的蛋白，则难以检测；
- 蛋白未能正确修饰和折叠；
融合表达可能会影响蛋白修饰和折叠，尤其在酵母双杂交系统中研究异源蛋白相互作用时，蛋白不一定能正确修饰和折叠，另外，还可能水解异源蛋白；
- 有的蛋白对酵母菌株有毒性或抑制菌株生长。

2.4.2 假阳性产生的原因

- DBD-X的自激活作用；
- 一些AD-Y融合蛋白中的Y可能结合DBD或启动子附近序列或蛋白，并能激活转录；
- DBD-X与AD-Y并非通过DBD-X—Y-AD直接激活转录，而是通过第3种蛋白或多蛋白的复合体把X、Y募集到一起，然后激活转录；
- 非特异DBD-X—Y-AD相互作用，因为有的蛋白表面具有成簇的疏水氨基酸或其它可引起X、Y非特异作用的结构；
- 有些蛋白不激活转录，但可以改变酵母生长活性、通透性、生长速率来使LacZ检测呈现阳性；
- 酵母菌株的一些适应性改变可导致无相互作用的菌株在营养缺陷选择培养基上生长；
酵母双杂交技术具有操作相对简单、无需提纯蛋白、属于体内实验等优点，被广泛用于蛋白质相互作用研究。

迄今为止，该技术是用于大规模研究蛋白质相互作用最多的方法。虽然酵母双杂交实现了大规模筛选，有了自动工作站，但整个流程自动化程度还不高，还需要大量人力辅助。因此，探索和改进大规模酵母双杂交自动化筛选过程的研究仍在进行。另外，酵母双杂交技术大规模筛选的结果存在假阴性和假阳性高及重复性差的问题。

为此，人们从实验规程到系统改进和结果处理等多方面进行考虑，如：

- 诱饵需经自激活检验来决定，无自激活的才可作为诱饵筛库；
- 开发了一些新的酵母双杂交系统，如分离泛素系统、SOS招募系统等；
- 选取酵母双杂交筛选所得的部分相互作用作亲和纯化验证以评估所得全部相互作用的可靠性；
- 收集已有的蛋白相互作用来验证结果。

但这些只在一定程度上解决了问题。所以，如果条件合适，应同时开展其它大规模蛋白相互作用研究或验证，如大规模CO-IP、TAP、共定位实验、哺乳动物双杂交系统实验。只有这样，才有利于验证和拓展相互作用结果而构建规模更大、可信度更高的相互作用网络图，并最终使我们能更好地了解细胞内复杂的分子系统联系特征及其工作机制。

1. Encarnación, S., Hernández, M., Martínez-Batallar, G., et al. (2005) Comparative proteomics using 2-D gel electrophoresis and mass spectrometry as tools to dissect stimulons and regulons in bacteria with sequenced or partially sequenced genomes, *Biol. Proced. Online* 7, 117-135.
2. Aebersold, R., and Mann, M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics, *Nature* 422, 198-207.
3. Page, J. S., Masselon, C. D., and Smith, R. D. (2004) FTICR mass spectrometry for qualitative and quantitative bioanalyses, *Current opinion in biotechnology* 15, 3-11.
4. Wang, H. X., and Yang, S. C. (2001) [The development of electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) in studies of non-covalent protein complexes], *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica* 36, 315-320.
5. Chen, S. H., Liao, H. K., Chang, C. Y., et al. (2007) Targeted protein quantitation and profiling using PVDF affinity probe and MALDI-TOF MS, *Proteomics* 7, 3038-3050.
6. Perlman, D. H., Huang, H., Dauly, C., et al. (2007) Coupling of protein HPLC to MALDI-TOF MS using an on-target device for fraction collection, concentration, digestion, desalting, and matrix/analyte cocrystallization, *Analytical chemistry* 79, 2058-2066.
7. Newton, R. P. (2000) Quantitation of nucleotidyl cyclase and cyclic nucleotide-sensitive protein kinase activities by fast-atom bombardment mass spectrometry. A paradigm for multiple component monitoring in enzyme incubations by quantitative mass spectrometry, *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J 146, 369-386.
8. Newton, R. P., Evans, A. M., Langridge, J. I., et al. (1995) Assay of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase activity by quantitative fast atom bombardment mass spectrometry, *Analytical biochemistry* 224, 32-38.
9. Newton, R. P., Khan, J. A., Brenton, A. G., et al. (1992) Quantitation by fast-atom bombardment mass spectrometry: assay of cytidine 3',5'-cyclic monophosphate-responsive protein kinase, *Rapid Commun Mass Spectrom* 6, 601-607.
10. Evans, A. M., Harris, F. M., Walton, T. J., et al. (1992) Determination of cyclic nucleotide-responsive protein kinase activity by quantitative fast atom bombardment mass spectrometry, *Biochemical Society transactions* 20, 152S.
11. Egestad, B., Estonius, M., Danielsson, O., et al. (1990) Fast atom bombardment mass spectrometry and chemical analysis in determinations of acyl-blocked protein structures, *FEBS letters* 269, 194-196.
12. Henzel, W. J., Bourell, J. H., and Stults, J. T. (1990) Analysis of protein digests by capillary high-performance liquid chromatography and on-line fast atom bombardment mass spectrometry, *Analytical biochemistry* 187, 228-233.
13. Li, H., Song, F., Zheng, Z., et al. (2008) Characterization of saccharides and phenolic acids in the Chinese herb Tanshen by ESI-FT-ICR-MS and HPLC, *J Mass Spectrom*.
14. Wu, W., Song, F., Yan, C., et al. (2005) Structural analyses of protoberberine alkaloids in medicine herbs by using ESI-FT-ICR-MS and HPLC-ESI-MS(n), *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 37, 437-446.
15. König, S., Kollas, O., and Dreisewerd, K. (2007) Generation of highly charged peptide and protein ions by atmospheric pressure matrix-assisted infrared laser desorption/ionization ion trap mass spectrometry, *Analytical chemistry* 79, 5484-5488.
16. Cristoni, S., Bernardi, L. R., Biunno, I., et al. (2002) Analysis of protein ions in the range 3000-12000 Th under partial (no discharge) atmospheric pressure chemical ionization conditions using ion trap mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom* 16, 1153-1159.
17. Hirano, M., Rakwal, R., Shibato, J., et al. (2006) New protein extraction/solubilization protocol for gel-based proteomics of rat (female) whole brain and brain regions, *Molecules and cells* 22, 119-125.
18. Selber, K., Collen, A., Hyytiä, T., et al. (2001) Parameters influencing protein extraction for whole broths in detergent based aqueous two-phase systems, *Bioseparation* 10, 229-236.
19. Craven, R. A., Jackson, D. H., Selby, P. J., et al. (2002) Increased protein entry together with improved focussing using a combined IPGphor/MultiPhor approach, *Proteomics* 2, 1061-1063.
20. Jin Lee, Y. (2008) Mass spectrometric analysis of cross-linking sites for the structure of proteins and protein complexes, *Molecular bioSystems* 4, 816-823.
21. Cheng, G., Basha, E., Wysocki, V. H., et al. (2008) Insights into small heat shock protein and substrate structure during chaperone action derived from hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry, *The Journal of biological chemistry*.
22. Mouradov, D., King, G., Ross, I. L., et al. (2008) Protein structure determination using a combination of cross-linking, mass spectrometry, and molecular modeling, *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J 426, 459-474.
23. Konermann, L., Tong, X., and Pan, Y. (2008) Protein structure and dynamics studied by mass spectrometry: H/D exchange, hydroxyl radical labeling, and related approaches, *J Mass Spectrom* 43, 1021-1036.
24. Gardner, M. W., Vasicek, L. A., Shabbir, S., et al. (2008) Chromogenic cross-linker for the characterization of protein structure by infrared multiphoton dissociation mass spectrometry, *Analytical chemistry* 80, 4807-4819.
25. Scholten, A., Aye, T. T., and Heck, A. J. (2008) A multi-angular mass spectrometric view at cyclic nucleotide dependent protein kinases: in vivo characterization and structure/function relationships, *Mass spectrometry reviews* 27, 331-353.
26. McClintock, C., Kertesz, V., and Hettich, R. L. (2008) Development of an electrochemical oxidation method for probing higher order protein structure with mass spectrometry, *Analytical chemistry* 80, 3304-3317.
27. Fields, S., and Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions, *Nature* 340, 245-246.