

## 다양한 조건에서 펩타이드의 Guanidination 변형 효율 비교 연구

박수진 · 구건모<sup>1</sup> · 김진희 · 김정권<sup>\*</sup>

충남대학교 화학과, <sup>1</sup>KAIST

(2011. 10. 27. 접수, 2011. 12. 14. 수정, 2012. 2. 23. 승인)

### Comparison of peptide guanidination efficiency using various reaction conditions

Sujin Park, Kun Mo Koo<sup>1</sup>, Jinhee Kim and Jeongkwon Kim<sup>\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

<sup>2</sup>KAIST, Daejeon 305-701, Korea

(Received October 27, 2011; Revised December 14, 2011; Accepted February 23, 2012)

**요약:** 펩타이드의 정성 분석에서, O-Methylisourea는 펩타이드의 특정 아미노산(예. 라이신)에 화학결합하여 해당 펩타이드의 신호를 증진시키기 때문에 펩타이드를 matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI-MS) 분석하기 위해 흔히 사용되는데, 이러한 과정은 guanidination이라고 불린다. Guanidination은 반응 조건에 따라 효율이 변하게 된다. 본 연구에서는 트립신으로 가수분해된 미오글로빈 단백질을 세 가지 다른 반응시약 (O-methylisourea, S-methylisothiourea, 2-methyl-2-imidazoline)을 사용하여 65 °C 에서 1 시간 동안 다양한 pH 조건 (pH 4.0, 7.0 및 10.5)에서 guanidination 반응을 수행하였는데, 실험 결과 O-methylisourea와 pH 10.5이 가장 좋은 효율을 나타내었다. 다음으로 O-methylisourea 와 pH 10.5의 반응 조건을 이용하여 열, 마이크로파, 초음파 등과 같은 다양한 조건에서 시간을 변화시켜 가면서 guanidination을 연구하였는데, 열을 이용하여 60 분 동안 반응시키는 것이 가장 효과적이었다. 결론적으로 O-methylisourea를 이용하여 pH 10.5 용액에서 열을 이용하여 1 시간 동안 65 °C 에서 가열하는 것이 guanidination을 위한 최적의 조건이었다.

**Abstract:** For the qualitative analysis of peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI-MS), O-methylisourea, which is chemically bound to a specific site of an amino acid (e.g. lysine) of peptides and improves the intensities of the modified peptides, is frequently used prior to the MALDI-MS analysis of peptides, where the process is called guanidination. The reaction efficiency of guanidination varies depending on the reaction conditions. We investigated the efficiencies of guanidination of tryptically digested myoglobin using three different reagents (O-methylisourea, S-methylisothiourea, and 2-methyl-2-imidazoline) at 65 °C for 1 h with various pH conditions (pH 4.0, 7.0, and 10.5), where O-methylisourea and pH 10.5 were found to be most effective. The guanidination with O-methylisourea at pH 10.5 were then applied with different reaction conditions such as heating, microwave and ultrasound at various times, where heating for 60 min was found to be most effective. Conclusively, guanidination with O-methylisourea at 65 °C for 1 h at pH 10.5 was found to be the optimized condition.

**Key words:** O-methylisourea, S-methylisourea, 2-methyl-2-imidazoline, guanidination, mass spectrometry, MALDI-MS

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)42-821-5477 Fax : +82-(0)42-821-8896

E-mail : jkkm48105@cnu.ac.kr

## 1. 서 론

단백질을 질량분석으로 분석하기 위해서 단백질을 트립신 (trypsin)과 같은 가수분해 효소를 이용하여 펩타이드 형태로 가수분해한 후 질량분석으로 질량을 측정하는 분석 기술이 널리 사용되고 있다.<sup>1</sup> 트립신을 이용하게 되면 arginine과 lysine 아미노산의 C-말단부분을 절단하게 된다. 질량 분석 실험으로 얻은 펩타이드의 질량값과 데이터베이스의 이론적 펩타이드의 질량값을 비교하므로 단백질을 확인하는 방법을 펩타이드 질량 지문 추적법 (peptide mass fingerprinting)이라고 하는데,<sup>2</sup> 이러한 방법을 이용하여 단백질 동정이 가능한 Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry (MALDI-MS)와 같은 질량분석 기술은 높은 관심을 얻으며 빠르게 성장하고 있다. MALDI-MS 질량분석에서는 시료를 matrix와 함께 섞어서 MALDI 판 위에 올린 후 레이저를 조사하여 시료를 이온화시킨다. 여기서 matrix는 레이저의 에너지를 시료에 전달하여 시료의 이온화를 돕는 역할을 한다. 일반적으로 matrix는 벤젠고리를 포함한 유기산시료를 이용하는데, 시료 종류에 따라 특정 matrix를 선택하여 분석하게 된다. 예를 들어 단백질의 경우, sinapinic acid를 사용하고, 펩타이드는  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)를 사용한다. 2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHB) matrix의 경우, 단백질 혹은 펩타이드<sup>3</sup> 혹은 합성고분자 분석<sup>4</sup>에 사용되고 특히 인산화된 시료 분석에 사용된다.<sup>5</sup> MALDI-MS의 신호를 증진시키기 위한 여러 가지 노력이 있어 왔는데, CHCA와 2,5-DHB를 혼합하여 binary matrix로 사용하여 증진된 효과를 나타내기도 하였고,<sup>6</sup> 유기산 matrix에 염기성 물질을 첨가하여 ionic liquid matrix를 제조하여 사용하기도 하였다.<sup>7</sup>

MALDI-MS에서 lysine을 포함한 펩타이드들은 arginine을 포함하는 펩타이드들보다 상대적으로 낮은 신호를 나타낸다.<sup>3</sup> 따라서 lysine이 포함된 펩타이드들의 감도를 증가시키기 위해 lysine을 homoarginine으로 변형시키는 과정을 guanidination이라고 하는데, 이러한 변형을 통하여 질량분석에서의 검출 신호를 향상시킬 수 있게 된다.<sup>8,9</sup> Guanidination이 펩타이드의 MALDI-MS에서 신호를 증진시키는 효과는 lysine의 염기성을 arginine의 염기성만큼 향상시키는 것에 기인한다. 이렇게 하여 더 효율적인 protonation을 통해 이온화 효율이 향상될 것이고, 결과적으로 더 많은 정보를 MALDI-MS 스펙트럼을 통해 얻을 수 있게 된다.

일반적으로 화학반응을 일으킬 때, 열을 많이 이용

하지만, 최근에는 마이크로파(microwave)<sup>10</sup> 혹은 초음파 (ultrasound)<sup>11</sup>를 이용한 연구가 발표되고 있다. 특히 마이크로파<sup>12</sup> 혹은 초음파<sup>13</sup>를 이용하여 단백질 가수분해 효소의 활성을 증가시키는 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구에서는 guanidination은 세 가지 다른 반응시약 (O-methylisourea, S-methylisothiurea, 2-methyl-2-imidazoline)을 사용하여 여러 pH 상태에서 열을 이용하여 어느 반응시약과 어느 pH 상태가 가장 효과적인 반응 조건인지를 알아내고자 한다. 또한, 다양한 반응 조건(열, 마이크로파, 초음파 등)을 이용하여 반응 시간을 변화시켜 가면서 반응을 수행하여 어느 반응 조건과 반응 시간이 guanidination 반응을 위한 최적의 조건인지를 확인하고자 한다.

## 2. 실험

### 2.1. 시료

대부분의 시료는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 다른 곳에서 구입한 시료는 논문에서 별도로 언급하였다.

### 2.2. 단백질의 효소 가수 분해

표준 단백질 (horse heart myoglobin) 10 mg을 1 mL 물에 용해하여 stock solution을 제조한다. Stock solution에서 17  $\mu$ L (170  $\mu$ g)을 취하고 762  $\mu$ L의 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 과 혼합한 후, 6.8  $\mu$ L 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L 트립신 (Promega, Madison, WI, USA)을 가한 후, 30 초간 교반하고 30 초간 원심분리한 후, 37 °C에서 18 시간 가량 조금씩 흔들면서 가수분해한다. 이렇게 하여 100  $\mu$ L의 100 pmol/ $\mu$ L 가수분해 펩타이드 용액을 만들게 된다.

### 2.3. Guanidination

Guanidination을 위해서 세 개의 다른 시약을 이용하였다. Fig. 1은 본 실험에서 사용된 세 개의 시약을 보여주고 있다. 각 반응 시약 50  $\mu$ mol을 100  $\mu$ L 증류수에 용해시켜서 0.5 M 용액을 만든다. 가수분해 펩타이드 용액 20  $\mu$ L, 반응 시약 20  $\mu$ L를 0.6 mL tube에 넣고 5% trifluoroacetic acid (TFA), 증류수, 25%  $\text{NH}_4\text{OH}$  용액을 이용하여 각각 pH 4.0, pH 7.0, pH 10.5인 100  $\mu$ L 혼합용액을 각각의 반응 시약에 대해 제조한다. 이렇게 하면 총 9 개 시료가 준비되고 각각의 시료에서 펩타이드의 농도는 20 pmol/ $\mu$ L이 된다. 준비된 시료를 30 초간 교반 후, 30 초간 원심분리하고, 65 °C에서 10, 20, 30, 40, 50, 60 분 동안 각각 반

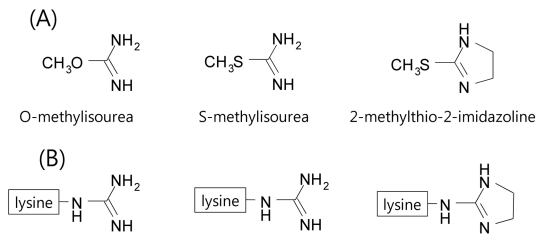


Fig. 1. Chemical structures of (A) three chemicals used for guanidination and (B) their derivatized forms with a lysine residue.

응시킨다. 마이크로파와 초음파를 이용하여도 위와 같은 시간 동안 반응시킨다. 마이크로파를 가해 주기 위해서는 일반 가정용 전자레인지 (Electrolux)를 이용하였고, 초음파를 가해주기 위해서는 실험실용 초음파 세척기 (WiseClean SD-300H (200W, 40 kHz), Daihan Scientific, Seoul, Korea)를 이용하였다.

#### 2.4. 질량분석 및 서열 확인

MALDI 질량분석을 위한 Matrix 용액은 20 mg의 2,5-DHB을 50% Acetonitrile (ACN), 0.1% TFA 수용액 1  $\mu$ L에 용해시켜 제조한다. 깨끗한 MALDI plate에 제조된 matrix 용액 1  $\mu$ L 올린 후, 건조시킨다. 다음으로, guanidination된 펩타이드 용액을 matrix 용액으로 3배 희석시킨 후, 먼저 올린 matrix 위에 1  $\mu$ L를 올린 후 건조시킨다. 본 실험에 사용된 MALDI 질량분석기는 Axima CFR Time-of-flight mass spectrometer (Kratos, Manchester, UK)로 337 nm  $N_2$  레이저 광원이 장착되어 있고 본 실험을 위하여 양이온 reflectron 방식으로 측정하였다. 사용된 표준 단백질 (horse heart myoglobin)의 서열은 Protein Knowledgebase (UniProtKB) (<http://www.uniprot.org/uniprot/>)에서 얻어졌으며, P68082 혹은 MYG\_HORSE를 이용하여 서열을 확인하였다. 트립신으로 myoglobin 표준 단백질을 효소 가수분해하였을 때 나타나는 이론적인 펩타이드의 서열 및 질량값은 ExPASy-PeptideMass ([http://web.expasy.org/peptide\\_mass/](http://web.expasy.org/peptide_mass/))를 이용하였고, 실험적으로 얻어진 질량값들을 이론값과 비교하기 위하여서는 ExPASy-FindPept (<http://web.expasy.org/findpept/>)을 이용하였는데, 이때 mass tolerance는  $\pm 2.0$  Da를 이용하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. Guanidination 후 생성물

Guanidination의 효과는 lysine의 염기성을 arginine

의 염기성만큼 향상시키는 것이다. 염기성이 커짐에 따라, proton과 결합을 더욱 강하게 하여, MALDI-MS 분석에서 향상된 이온화 효율을 나타내게 되고, 결과적으로 MALDI-MS를 통해서 얻어지는 질량 분석 스펙트럼에서 더욱 정확한 펩타이드 정보를 얻을 수 있게 된다. Lysine의 염기성은 그 잔기에 있는  $\epsilon$ -amine에 guanidino group를 도입함으로써 증가시킬 수 있게 된다. Fig. 1은 guanidination을 위해서 본 실험에서 사용된 세 개의 반응 시약 (O-methylisourea, S-methylisourea, 2-methyl-2-imidazoline)과, guanidination 후 변형된 lysine의 구조를 보여주고 있다.

O-methylisourea를 이용한 guanidination의 경우, 이탈기는 methoxy group ( $CH_3O-$ )이 되며, lysine의 분자량은 42.0 Da ( $CN_2H_2$ ) 만큼 증가하게 된다. S-methylisourea를 이용한 경우에는, 이탈기는 thiomethoxy group ( $CH_3S-$ )이 되며, lysine의 분자량은 O-methylisourea와 마찬가지로 42.0 Da ( $CN_2H_2$ ) 만큼 증가하게 된다. 2-methyl-2-imidazoline를 반응 시약으로 이용할 경우에는, 이탈기는 thiomethoxy group ( $CH_3S-$ )이 되며, lysine의 분자량은 68.1 Da ( $C_3N_2H_4$ ) 만큼 증가하게 된다.

Lysine 잔기에 존재하는  $\epsilon$ -amine의 pKa 값은 약 10.3 이고, 펩타이드의 N-말단에 존재하는 amine의 pKa 값은 대략 10보다 작기 때문에, pH 10.5 조건에서 두 부분 모두 guanidination이 일어날 수 있지만, 입체 장애의 의해 대부분의 guanidination 반응은 Lysine 잔기에 존재하는  $\epsilon$ -amine에 일어나게 된다.<sup>3</sup>

#### 3.2. Guanidination 반응 시약의 성능 비교

세 개의 guanidination 반응 시약 (O-methylisourea, S-methylisourea, 2-methyl-2-imidazoline)의 효율을 비교하기 위하여 세 개의 다른 pH 조건 (pH 4.0, 7.0, 10.5)을 이용하여, 65  $^{\circ}C$ 에서 한 시간 동안 반응을 진행하였다. 현재까지의 guanidination은 O-methylisourea를 이용하여 수행되었는데, 본 연구에서는 두 가지 유사 물질을 도입하여 반응 효율을 비교해 보고자 하였다. Fig. 2는 반응 후 생성된 생성물의 질량분석 스펙트럼이다. 실험 결과를 보면, 모든 반응 시약에 대해서 pH 10.5일 때, guanidination 효율이 가장 크게 측정됨을 알 수 있다. pH 4.0일 경우에는 guanidination이 거의 진행되지 않았고, pH 7.0일 경우에는 guanidination이 약간 진행된 것을 확인할 수 있었다. Table 1은 이론적인 monoisotopic  $[M+H]^+$  이온의 m/z 값과, pH 10.5 조건에서 guanidination시킨 경우 나타나는 실험적인



Table 1. Theoretical monoisotopic m/z values for [M+H]<sup>+</sup> ions of unguanidinated and guanidinated peptides and experimental m/z values obtained from the guanidination at pH 10.5 for 60 min with three different guanidination agents

Peptide Sequences	Theoretical monoisotopic [M+H] <sup>+</sup> values			Experimentally observed [M+H] <sup>+</sup> values			
	peptides	+ 42 Da	+ 42×2 Da	+ 68 Da	O-MIU	S-MITU	2M2I
47-51	672.4						
44-48	684.4				685.0	685.0	
135-140	748.4				748.8	748.8	748.8
98-103	735.5	777.5	819.5		820.0	777.0	
147-154	941.5	983.5			984.0		
33-43	1271.7	1313.7		1339.7	1314.2	1314.2	1271.0
							1340.0
65-78	1378.8	1420.9		1446.9	1421.3	1379.1	1379.3
						1421.2	1447.0
135-146	1360.8	1402.8			1401.0	1401.2	1401.4
47-57	1361.7	1403.8	1445.8		1443.4	1444.3	
120-134	1502.7	1544.8			1545.0	1545.0	
18-32	1606.9				1607.3	1607.2	1607.4
89-103	1669.0						1670.3
135-148	1651.9	1693.9			1693.0	1693.0	
2-17	1815.9	1857.9			1859.2	1816.6	1816.3
						1859.2	
104-119	1885.0			1953.1	1885.9	1886.2	1886.3
							1954.0
81-97	1854.0			1923.1			1923.0
49-64	1858.0	1900			1901.0		
104-119	1885.0	1927			1928.4	1928.4	
33-48	1937.0			2005.1	1939.0	1939.0	2006.0
80-97	1982.1			2050.1			1983.0
							2051.0
47-63	2005.0						
80-97	1982.1	2024.1	2066.1			2025.6	
						2067.0	
79-97	2110.2				2109.7		

O-MIU (O-methylisourea), S-MITU (S-methylisothiourea), 2M2I (2-methyl-2-imidazoline)

가 반응 시간에 따라 어떻게 변하는지를 관찰한 그림이 Fig. 3에 나타내었다. 세 개 펩타이드는 아미노산 서열 33-43 (LFTGHPETLEK, m/z 1271.7), 서열 65-78 (HGTVLTALGILK, m/z 1378.8), 서열 2-17 (GLSDGEWQVLNVWGK, m/z 1815.9)이다. 이 세 개 펩타이드는 O-methylisourea에 의한 guanidiation에 의해 42.0 Da이 증가하게 되어 각각 m/z 1313.7, m/z 1420.8, m/z 1857.9에서 관찰되게 된다. 단, 여기에 표시된 m/z 값들은 [M+H]<sup>+</sup> 이온의 monoisotopic mass이다. 전반적으로 반응시간이 증가함에 따라 guanidination 되지 않은 펩타이드의 세기는 작아지고 guanidination 된 펩타이드의 세기는 커짐이 관찰되었다. 60분 이상도 반응을 실시하였으나 큰 향상을 얻지

못했다. 반응 온도를 65 °C로 진행하기 때문에 분자량이 1.0 Da 커지는 deamidation이 가능한데, 위의 세 펩타이드에서는 관찰되지 않았다. Table 1에서 보는 바와 같이 저분자량에서도 deamidation은 관찰되지 않았고, 고분자량에서는 deamidation으로 의심되는 펩타이드들이 있었으나 본 연구에 사용된 질량분석기의 성능으로는 deamidation 존재의 확인이 불가능하였다.

### 3.3. 마이크로파와 초음파마이크로파를 이용한 Guanidination

마이크로파는 분자의 활성을 증가시키기 때문에 유기합성에서 흔히 사용된다.<sup>10</sup> 마이크로파를 이용하여 guanidiantion을 진행한 경우, 20 분 이하에서는 극심

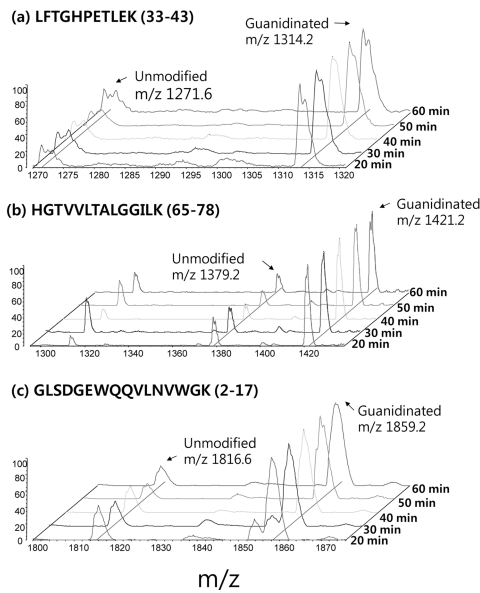


Fig. 3. Comparison of the mass spectra for unmodified and corresponding guanidinated peptides of (a) LFTGHPETLEK, (b) HGTVVLTALGGILK, and (c) GLSDGEWQQVLNVWGK. Guanidination was performed with O-methylisourea at 65 °C for various time durations.

한 잡음이 생겨서 질량분석 스펙트럼을 확인하기가 어려웠고, 그 이후에서는 120 분까지 반응을 하였지만, guanidination 반응 효율이 10% 미만으로 나타나 열을 이용한 반응보다 훨씬 낮은 반응 효율을 보였다.

초음파는 세포 막을 파괴하는 방법으로 사용되었는데 최근에는 단백질 가수분해에 소개되어 사용되고 있다.<sup>13</sup> 본 실험에서 시료를 열로 가열하는 대신 초음파를 가해 준 경우 guanidination 반응 효율이 3% 미만으로 매우 낮았고, 시간 증가에 따른 반응 효율의 경향성을 찾기가 어려웠다.

Fig. 4는 열, 초음파, 마이크로파 등 세 가지 guani-

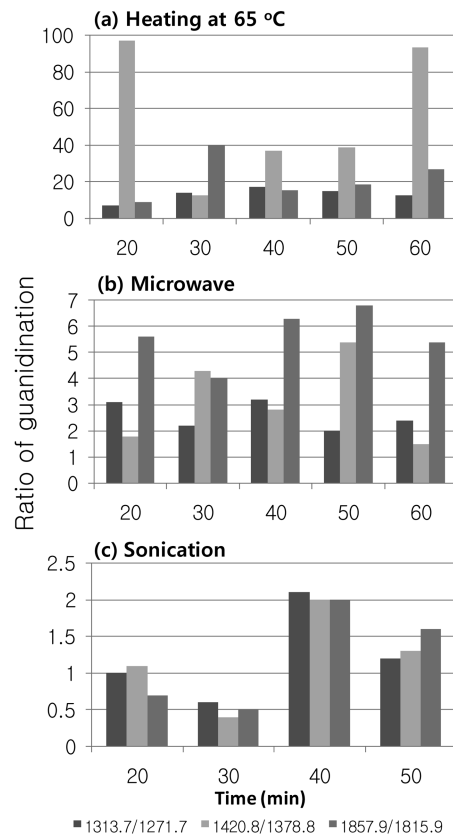


Fig. 4. Comparison of guanidination efficiencies of three different conditions (heating, microwave, and sonication) at different reaction times for three peptides. Y-axis shows the ratio of guanidination, which was calculated by the intensity of a guanidinated peptide divided by the intensity of the corresponding unguanidinated peptide.

dination 반응 조건에서 시간 변화에 따른 반응 효율을 비교하여 나타내고 있다. 그림에서 보는 바와 같이 열을 이용하였을 경우 가장 반응 효율이 좋았으며, 다음으로 마이크로파, 그리고 가장 효율이 낮은 것은 초음

Table 2. Comparison of the peak intensities of three peptides from tryptic digestion of myoglobin prior to and after guanidination with O-methylisourea using three different method, (a) heating at 65 °C, (b) microwave, and (c) sonication for various reaction times

(a)

Heating Duration (min)	Intensity (mV)		Ratio		Intensity (mV)		Ratio		Intensity (mV)		Ratio	
	1271.7	1313.7	1271.7	1313.7	1378.8	1420.8	1378.8	1420.8	1815.9	1857.9	1815.9	1857.9
20	3	22	1	7.3	0.7	68	1	97.1	17	148	1	8.7
30	3.4	47	1	13.8	4.5	56	1	12.4	3.8	153	1	40.3
40	6.1	106	1	17.4	3.8	141	1	37.1	12	183	1	15.3
50	2.9	43	1	14.8	3	116	1	38.7	5.7	106	1	18.6
60	2.4	30	1	12.5	2.3	215	1	93.5	4.2	113	1	26.9

Table 2. Continued  
(b)

Microwave Duration (min)	Intensity (mV)		Ratio		Intensity (mV)		Ratio		Intensity (mV)		Ratio	
	1271.7	1313.7	1271.7	1313.7	1378.8	1420.8	1378.8	1420.8	1815.9	1857.9	1815.9	1857.9
20	3.9	12	1	3.1	12	22	1	1.8	7	39	1	5.6
30	2.2	4.9	1	2.2	4.9	21	1	4.3	10	40	1	4
40	2.1	6.8	1	3.2	6.8	19	1	2.8	1.6	10	1	6.3
50	5.1	10	1	2	10	54	1	5.4	3.8	26	1	6.8
60	5.4	13	1	2.4	13	20	1	1.5	3.9	21	1	5.4

(c)

Sonication Duration (min)	Intensity (mV)		Ratio		Intensity (mV)		Ratio		Intensity (mV)		Ratio	
	1271.7	1313.7	1271.7	1313.7	1378.8	1420.8	1378.8	1420.8	1815.9	1857.9	1815.9	1857.9
20	6.5	6.7	1	1	73	78	1	1.1	95	71	1	0.7
30	6.3	3.7	1	0.6	49	22	1	0.4	41	22	1	0.5
40	10	21	1	2.1	45	91	1	2	34	67	1	2
50	49	57	1	1.2	41	54	1	1.3	27	42	1	1.6

파로 관찰되었다.

#### 4. 결 론

pH 변화에 따른 guanidination 효율을 비교한 결과 pH 10.5에서 가장 좋은 효율을 나타내었다. 세 가지 다른 반응 시약 중 O-methylisourea를 사용하였을 때, 가장 큰 guanidination 효율을 보였다. 여러가지 반응 매체를 이용한 실험에서는 마이크로파로 실험한 경우, 극심한 잡음으로 인해 신호의 확인이 불가능 하였고, 초음파의 경우 신호의 확인은 가능하였으나, 실험마다 결과가 재현성 없이 나타났고, 반응 시간을 길게 하여 실험하여도 시간에 따른 반응 효율의 경향성을 일반화하기 어려웠다. 결론적으로 펩타이드의 guanidination은 pH 10.5의 조건과 반응시약 O-methylisourea를 사용하여 65 °C에서 1 시간 반응 시킬 때, 가장 좋은 효율을 얻을 수 있었다.

#### 감사의 글

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국과학창의재단의 지원을 받아 수행된 URP 과제임(No. 2009-04-053).

#### 참고문헌

1. J. R. Yates, 3rd, *J. Mass Spectrom.*, **33**, 1-19 (1998).
2. Q. Luo, K. Tang, F. Yang, A. Elias, Y. Shen, R. J.

Moore, R. Zhao, K. K. Hixson, S. S. Rossie and R. D. Smith, *J. Proteome Res.*, **5**, 1091-1097 (2006).

3. H. Han, S. Nho, A. Lee and J. Kim, *B. Korean Chem. Soc.*, **31**, 1527-1534 (2010).
4. A. Lee, H. J. Yang, Y. Kim and J. Kim, *B. Korean Chem. Soc.*, **30**, 1127-1130 (2009).
5. A. Lee, H. J. Yang, E. S. Lim, J. Kim and Y. Kim, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **22**, 2561-2564 (2008).
6. S. Laugesen and P. Roepstorff, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, **14**, 992-1002 (2003).
7. A. Tholey and E. Heinzle, *Anal. Bioanal. Chem.*, **386**, 24-37 (2006).
8. R. L. Beardsley and J. P. Reilly, *Anal. Chem.*, **74**, 1884-1890 (2002).
9. J. E. Hale, J. P. Butler, M. D. Knierman and G. W. Becker, *Anal. Biochem.*, **287**, 110-117 (2000).
10. C. O. Kappe, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **43**, 6250-6284 (2004).
11. M. Galesio, D. V. Vieira, R. Rial-Otero, C. Lodeiro, I. Moura and J. L. Capelo, *J. Proteome Res.*, **7**, 2097-2106 (2008).
12. H. F. Juan, S. C. Chang, H. C. Huang and S. T. Chen, *Proteomics*, **5**, 840-842 (2005).
13. S. Shin, H. J. Yang, J. Kim and J. Kim, *Anal. Biochem.*, **414**, 125-130 (2011).
14. F. L. Brancia, S. G. Oliver and S. J. Gaskell, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **14**, 2070-2073 (2000).