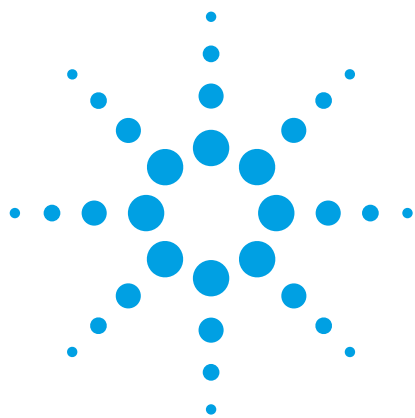




自动化蛋白质沉淀样品制备实现高通量生物分析

应用简报

生物医药

作者

Mike Chang
Agilent Technologies, Inc.
25200 Commercentre Drive
Lake Forest, CA 92630

摘要

对于生物基质中化合物的液质分析，样品前处理的蛋白质去除步骤是必不可少的。蛋白质沉淀及离心是最常见的蛋白质除技术之一。然而，由于涉及多个手工操作步骤，它不适合高通量分析。基于 96 孔板的全自动蛋白质沉淀系统能够显著减少高通量分析实验室进行样品制备所需的时间、成本和人力资源。

安捷伦推出了全新的无液滴技术的蛋白质沉淀过滤板 Captiva ND，它操作简单，特别设计的过滤材料能够有效地保留用于沉淀的有机溶剂，且不产生液滴。这种设计防止了样品损失，能够运行可靠的自动化方法。只需简单地在孔中依次加入有机溶剂和生物样品，充分混合，然后加真空将蛋白质过滤掉。在几分钟内就可以得到不含颗粒、不含蛋白质的样品，比传统的离心方法快 5 倍。



Agilent Technologies

方法和材料

试剂和溶液

在 10 mL 乙腈中加入 10 μ L 甲酸，制成含 0.1%甲酸的乙腈蛋白质沉淀溶剂。

使用 Captiva ND 进行样品前处理

固相萃取：安捷伦 Captiva ND 96 孔板, 0.45 μ m, 10 mg (p/n A5969045)。

图 1. 使用 Captiva ND 进行样品前处理的流程。

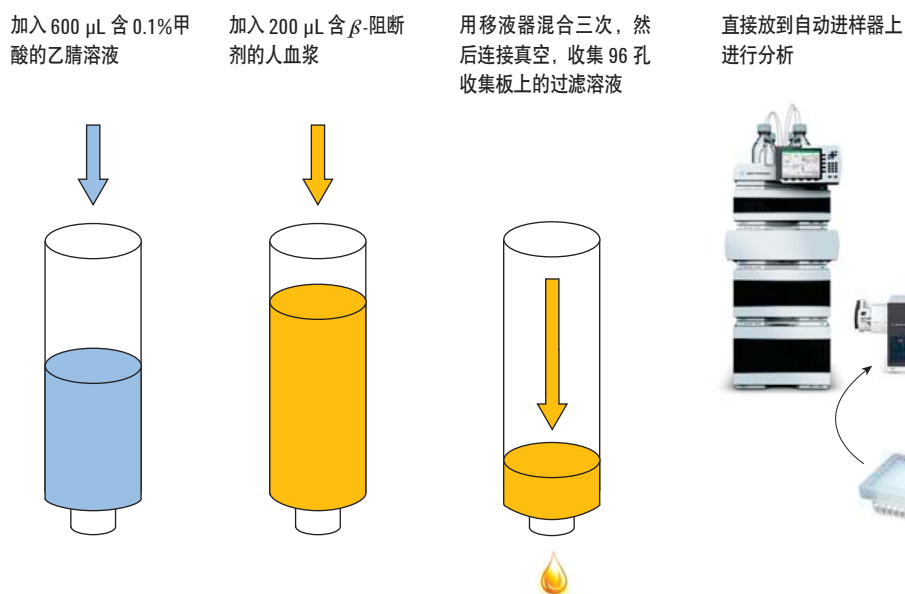


图 1. Captiva ND 用于样品前处理的流程图

离心进行蛋白质沉淀的样品前处理

离心机：Eppendorf 离心机 5424，配置 24 位离心管支架

1. 加入 600 μ L 含 0.1%甲酸的乙腈和 200 μ L 添加 β -阻断剂的人血浆
2. 在 10000 RPM 下，离心 10 分钟以上
3. 如果需要，过滤上清液
4. 小心地将（过滤的）上清液转移至自动进样器的样品瓶进行分析

液相色谱条件

色谱柱	安捷伦 ZORBAX Eclipse Plus RRHD C18, 2.1 × 5.0 mm, 1.8 μm (p/n 959757-902)	
LC/MS/MS	安捷伦 1290 Infinity UHPLC 与普通质谱系统联用	
流动相 A	0.1%甲酸水溶液	
流动相 B	0.1%甲酸乙腈溶液	
流速	0.5 mL/min	
进样体积	1 μL	
梯度	时间 (min)	%B
	0	30
	1.0	90
	1.1	30
	1.5	30
柱温	室温	
离子源	ESI+	
干燥气温度	300 °C	
干燥气压力	18 psi	
雾化气压力	55 psi	
涡旋气温度	300 °C	
涡旋气压力	25 psi	
毛细管电压	4000 V	
CID 气体压力	1.5 mTorr	

表 1. 样品

	pKa	log P	MS/MS 离子对	碰撞 能量	毛细管
纳多洛尔	9.67	0.81	310.4 → 254.0	15.5	120
普萘洛尔	9.42	3.48	260.3 → 115.9	15.0	120
吲哚洛尔	9.25	1.75	249.3 → 115.9	17.5	120
美托洛尔	9.70	1.90	268.4 → 115.9	18.0	120

结果与讨论

验证生物样品洁净度的最简单有效的方式是对样品进行连续长时间进样分析。对 Captiva ND 处理过的样品进行了长期稳定性实验 (5000 次进样)，监测保留时间、峰面积和背压的变化 (图 2 到图 4)。

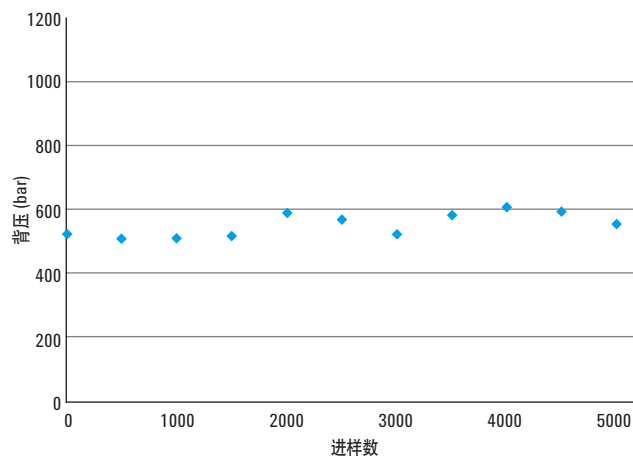


图 2. Captiva ND 样品前处理的长期稳定性实验中的系统背压数据

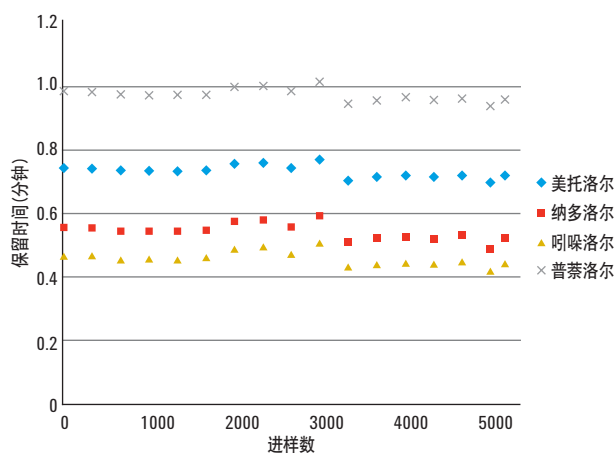


图 3. 样品经 Captiva ND 净化之后，5000 次连续进样的保留时间的数据

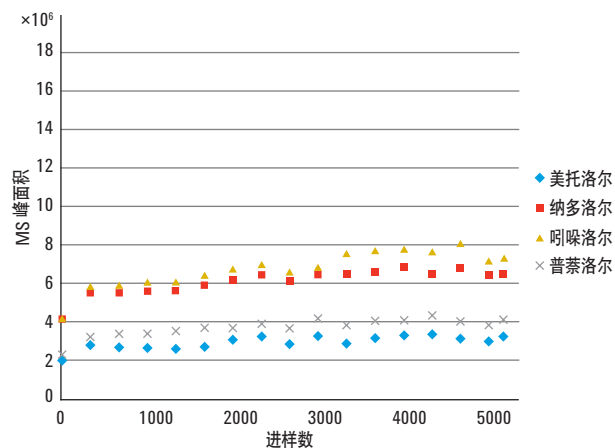


图 4. 含 β 阻断剂的人血浆样品经 Captiva ND 净化之后的峰面积稳定性数据

上述背压、保留时间和峰面积稳定性结果（图 2 至图 4）表明，Captiva ND 在蛋白质去除方面具有优异的性能，能够为生物样品提供优异的净化效果。5000 次进样的长期稳定性实验已经证明，Captiva ND 是高通量分析，尤其是采用亚二微米色谱柱的超高效液相色谱的理想选择。Captiva ND 和传统的离心蛋白沉淀样品前处理的比较结果见表 2。

表 2. Captiva ND 和传统的离心蛋白沉淀样品前处理的时间比较

离心蛋白沉淀	时间（分钟）	Captiva ND*	时间（分钟）
加 0.2 mL 添加 β 阻断剂的血浆和 0.6 mL 含 0.1% 甲酸的乙腈至离心管或 96 孔板	5	加 0.2 mL 添加 β 阻断剂的血浆和 0.6 mL 含 0.1% 甲酸的乙腈至 Captiva ND 96 孔板	5
10000 RPM 下离心 10 分钟	11	用移液器混合 5 次，接真空	
将上清液转移至 2 mL 的样品瓶(如使用试管)或者新的 96 孔板（如使用微孔板）进行分析	10	直接转移进样板进行分析	0
样品前处理需要的总时间	26	样品前处理需要的总时间	5

* 采用自动化系统，如 Tomtec 或 Hamilton。

总时间降低约 80%。从离心蛋白沉淀方法转移到 Captiva ND 节约了时间、金钱和培训费用。

结论

Captiva ND 板是适合高通量分析行业的最佳解决方案。只需几分钟就可以处理大量的样品，方法极其简单。长期稳定性研究的三个主要参数——背压、保留时间和峰面积结果表明，Captiva ND 具有优异、稳定的样品净化性能。

更多信息

这些数据代表典型结果。更多有关产品和服务的信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦不对本文可能存在的错误或由于提供、展示或使用本文所造成的间接损失承担任何责任。

本文中的信息、描述和指标如有更改，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2011
2011 年 9 月 9 日，中国印刷
5990-9030CHCN



Agilent Technologies