

EVOSEP ONE

Система ВЭЖХ для клинической протеомики

Введение

Система ВЭЖХ Evosep One разработана специально для использования в клинической протеомике – области, в которой помимо хорошей чувствительности и высокого разрешения требуются высокая производительность оборудования и возможность работы с «грязными» образцами без длительной пробоподготовки.

Особенностью системы Evosep One является использование наконечников Evotip, внутри которых находится обращенная фаза C18. Наконечники по сути являются одноразовыми концентрирующими колонками, в которых происходят обессоливание и очистка образцов.

Использование наконечников Evotip позволяет не тратить время на традиционные шаги по разведению, высушиванию и повторному разбавлению. Вместо этого наконечники Evotip с образцами загружаются прямо в систему Evosep One для автоматического анализа. Такой механизм работы приводит к существенному уменьшению потерь образца и упрощению всей процедуры анализа. Система Evosep One вмещает до 6 штативов на 96 наконечников каждый, что дает 576 чистых образцов, готовых для быстрого анализа.

Анализ начинается с того, что манипулятор размещает наконечник Evotip (с образцом) на пути потока подвижной фазы (рисунок 1).

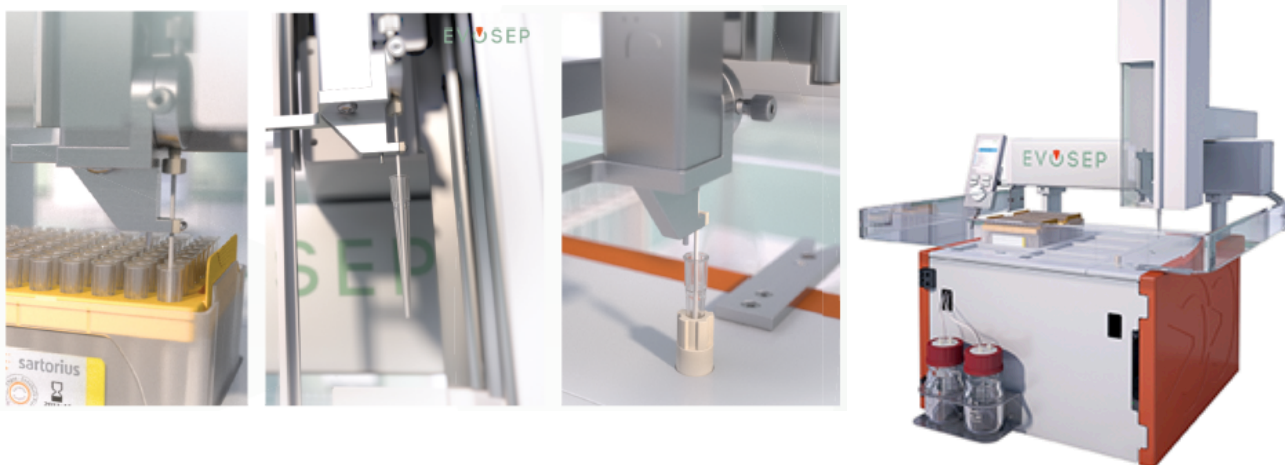


Рисунок 1. Система Evosep One и перенос наконечника Evotip из штатива в инъекционный порт

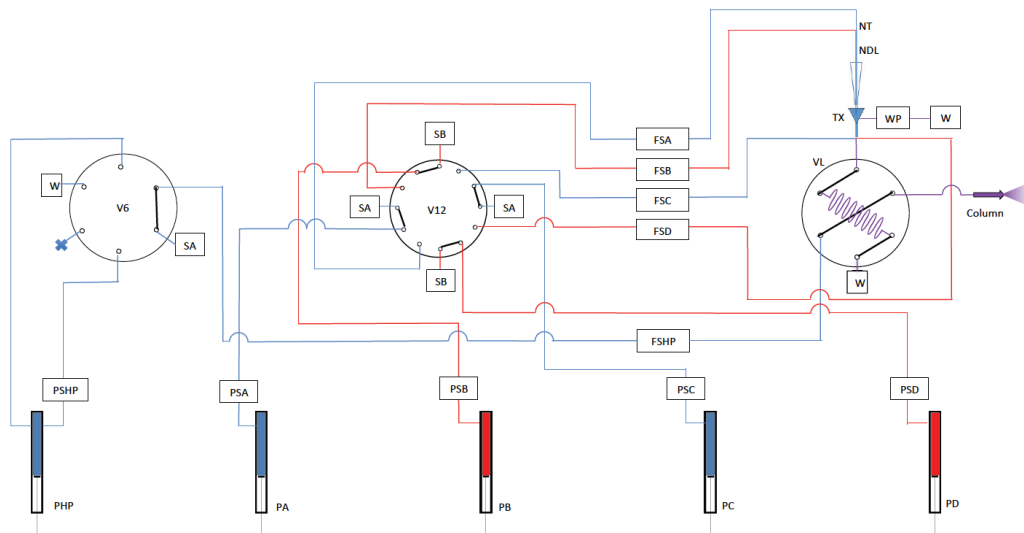


Рисунок 2. Схема Evosep One. HP: насос высокого давления, PSx: датчики давления, FSx: датчики потока, WP: сливной насос, Sx: растворитель x, W: слив, V6: кран высокого давления, V12: кран низкого давления, VL: кран, в который устанавливается петля, NT: тройник для соединения с иглой, NDL: игла, TX: инъекционный порт

Поток подвижной фазы из насосов А и В, проходит через наконечник и вымывает адсорбированные в нем соединения. Далее к элюированным соединениям добавляется поток от насосов С и D, изменяющий состав фазы А/В с созданием градиентного смещения, которое обеспечивает оптимальное хроматографическое разделение на аналитической колонке (рисунок 3). Насосы А+В создают поток с содержанием ацетонитрила от 0 до 35%, что достаточно для того, чтобы представляющие интерес соединения постепенно смывались, а

высокомолекулярные компоненты матрицы оставались в наконечнике и утилизировались вместе с ним по завершению анализа. Промывка системы органическим растворителем (с помощью насоса D) идет в обход наконечника и эффективно очищает аналитическую колонку. Процесс создания первичного градиента и итогового градиента с предварительно разделенными аналитами и их перемещение в петлю (ID 100 мкм, 30 мкл) занимает приблизительно минуту при скорости потока 20-40 мкл/мин и давлении не более 20 бар (рисунок 3).

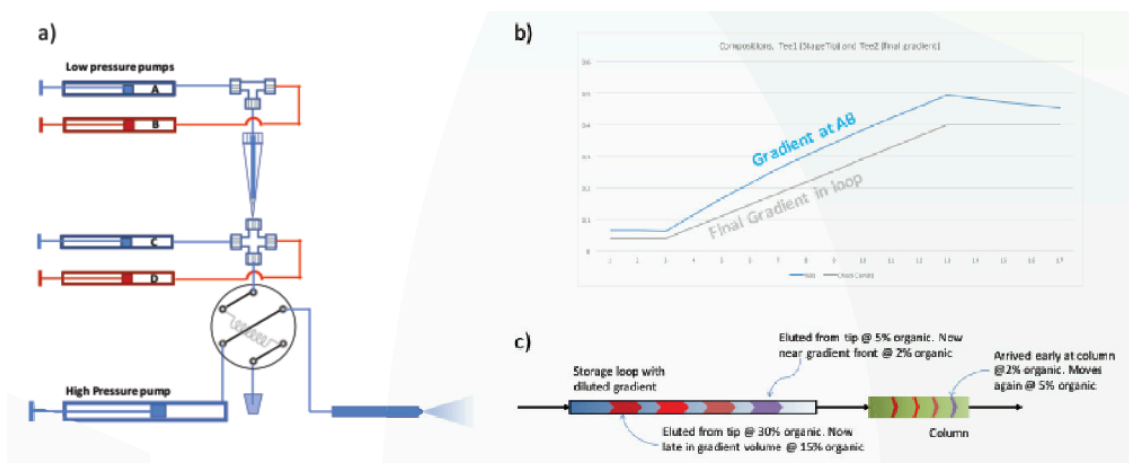


Рисунок 3. Evosep One. а) Схема Evosep One. б) Фаза с первичным градиентом А/В, проходящая через наконечник, и фаза с модифицированным градиентом С/Д, обеспечивающим оптимальную фокусировку соединений при прохождении через аналитическую колонку. в) Схематичное изображение содержимого петли с предварительно разделенными аналитами и подвижной фазой с итоговым градиентом.

После заполнения петли происходит переключение крана, в который установлена петля, содержащая итоговый градиент с предварительно разделенными аналитами, и насос высокого давления начинает продвигать содержимое петли на аналитическую колонку. Благодаря подобранному составу

итогового градиента аналиты достигают аналитической колонки в фазе с более низким содержанием органики по сравнению с фазой, в которой они выходили из наконечника Evotip. Это позволяет каждому аналиту при прохождении аналитической колонки сфокусироваться в узкий пик (рисунок 2с).

Производительность	Длительность анализа	Длительность градиента	Длительность подготовки образца для анализа	Скорость потока
количество образцов в день	минуты	минуты	минуты	мкл/мин
300	4,8	3	1,8	2,0
200	7,2	5	2,2	1,5
100	14,4	12	2,4	1,2
60	24,0	21	3,0	1,0
30	48,0	45	3,0	0,6

Таблица 1: Методы работы Evosep One (могут быть изменены)

Система Evosep One поставляется с готовыми методами, с помощью которых легко добиться оптимального разделения (таблица 1).

Почему система Evosep One устойчива к загрязнениям и не требует частого обслуживания:

1. Частичное элюирование соединений с наконечника Evotip не дает высокомолекулярным компонентам матрицы попасть в аналитическую колонку и далее в масс-спектрометр. Все примеси и соединения, способные загрязнить ВЭЖХ/МС систему, утилизируются вместе с наконечником.
 - а. Это значительно увеличивает срок жизни аналитической колонки до нескольких тысяч инъекций.
 - б. Это также уменьшает загрязнение масс-спектрометра, увеличивая время между его чистками.
2. Все шаги по созданию градиента выполняются при высоких скоростях, но при низком давлении, что влечет за собой меньше проблем с герметичностью системы и упрощает ее обслуживание.
3. Простая реализация с единственным насосом высокого давления.
4. Аналитические потоки 1-2 мкл/мин для лучшей стабильности спрея.
5. Умная система подготовки анализа и диагностики

Почему система Evosep One обладает высокой производительностью:

1. Удаление солей из образца происходит в наконечниках Evotip, помещенных в центрифугу, до их перемещения в систему Evosep One, что значительно уменьшает время анализа.
2. Смыв аналита с наконечника и формирование градиента происходят при низком давлении (менее 20 бар) и высоких скоростях потока (20 – 40 мкл/мин).

В чем преимущества системы Evosep One:

1. Использование одноразовых наконечников Evotip минимизирует неполное элюирование.
2. Изменение градиента на входе в аналитическую колонку оптимизирует ее функциональность, а также позволяет работать с относительно короткими колонками (рисунок 4).
3. Уменьшение работы по пробоподготовке позволяет минимизировать потерю образца и вероятность ошибок (рисунок 4).

Основные компоненты системы работают при низком давлении (рисунок 2). Благодаря этому гарантируется продолжительное время эксплуатации системы, сверхточное управление потоками и низкий риск поломок.

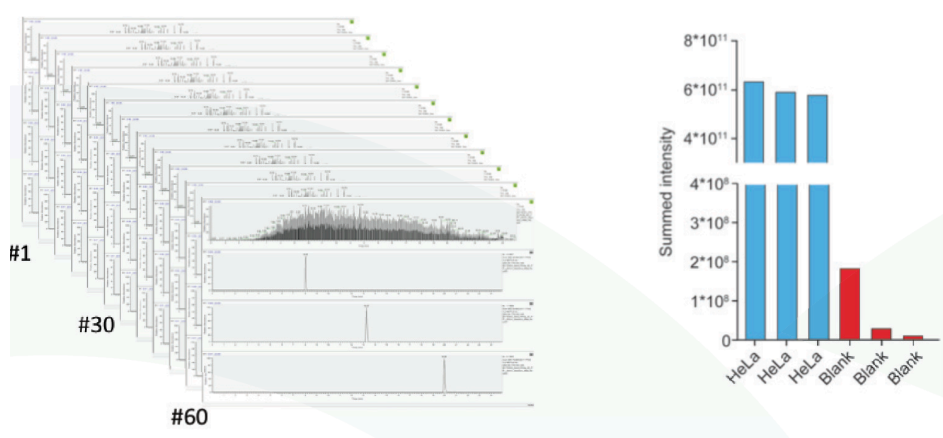


Рисунок 4. Данные, полученные с помощью Evosep One: а) 60 образцов в день, расщепленные трипсином белки из клеточной линии *HeLa*, 21-минутный градиент, окно выхода 17 мин, пиковая (разделительная) емкость (4σ) = 120, пиковая (разделительная) емкость (FWHM) = 170. б) Перекрестное загрязнение, расщепленные трипсином белки из клеточной линии *HeLa* (1 мкг) = 0,03% - 0,06%. Данные предоставлены Филиппом Гейером, Институт Макса Планка, Мартинсрид, Германия.

Заключение:

Система Evosep One создана для клинических исследований, требующих высокой чувствительности, производительности и надежности, на которую не должна влиять чистота образцов. Использование наконечников Evotip для удаления солей, очистки образцов и их предварительного концентрирования позволяет интегрировать пробоподготовку в сам анализ. Такой

подход значительно уменьшает потери образца и снижает вероятности ошибок. Использование наконечников Evotip позволяет снизить перекрестное загрязнение до менее чем 0,05% для расщепленных трипсином белков из клеточной линии *HeLa* и образцов плазмы крови и позволяет анализировать тысячи образцов без остановки системы.