

带喷头混合型毛细管色谱柱的制备及其在蛋白质组分离分析中的应用

张养军^{①†}, 谢晶鑫^{②†}, 王璐^①, 钱小红^{①*}

① 蛋白质组学国家重点实验室, 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京蛋白质组研究中心, 北京 102206;

② 沈阳药科大学, 沈阳 110015

† 同等贡献作者,

* 通讯作者, E-mail: qianxh1@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-06-15; 接受日期: 2009-07-08

摘要 本研究制备了一种应用于液-质联用(LC-MS)系统中的带喷头混合型毛细管色谱柱. 用标准蛋白和酵母蛋白胰蛋白酶酶切溶液考察了其在 LC-MS 中的离子化效率、毛细管色谱柱分离性能和寿命, 并与直接填充型毛细管色谱柱的色谱性能进行比较, 未见显著性差异. 将制备的带喷头混合型毛细管色谱柱应用于鼠肝蛋白组的分析, 在假阳性率为 1% 的条件下鉴定到 1262 个肽段, 归属于 513 个蛋白簇. 通过对鉴定蛋白质理化性能的统计分析, 其等电点和分子量分布高于一般二维凝胶电泳的范围. 实验结果还表明该混合型毛细管色谱柱在肽段的理化性能上没有偏性, 可以广泛应用于蛋白质组学的研究中.

关键词

蛋白质组学
多肽分离
毛细管色谱柱
液-质联用系统

1 引言

蛋白质组学方法中的关键技术, 即高效分离和高灵敏鉴定方法的研究是目前分析化学所面临的巨大挑战之一. 而该技术的核心之一便是分离方法的发展, 这也是今后蛋白质组学方法研究中需要继续努力的一种方向^[1,2]. 由于绝大多数基于液相色谱-质谱联用(LC-MS)的蛋白质组分析方法中所采用的分离系统是毛细管液相色谱, 因此, 毛细管色谱柱的选择和制备便成为目前研究的技术关键. 为了有效提高蛋白质组鉴定的覆盖率和蛋白质鉴定的序列的覆盖率, LC-MS 系统中带喷头毛细管色谱柱的使用已经成为一种普遍的选择, 但这种毛细管色谱柱存在的主要问题是出口端的筛板是由喷头部位填料颗粒间的“桥形”支撑作用形成, 其缺点是随

着填料承受压力的逐渐增大和使用时间的延长, 靠近喷头部位的填料颗粒会因挤压, 使颗粒间的“桥形”支撑形成的不稳定筛板填料破碎, 堵塞柱头, 或连同毛细管柱中的填料一起被冲出管外. 其结果是或者影响色谱柱对样本分离的重现性, 或者导致色谱柱的使用寿命降低或报废. 为了有效解决上述问题, 在本研究中, 我们制备了一种带喷头的混合型毛细管色谱柱, 使其既能保证筛板与填充柱整体性能尽可能一致, 又能解决带喷头毛细管色谱柱的填料脱出及堵塞问题. 虽然现在已有商品化的带喷头的填充型毛细管色谱柱, 但因其筛板制作存在缺陷, 寻求更好的制备条件及探索新型的、具有更好分离性能的毛细管色谱柱制备方法的研究仍然具有重要的意义^[3-7].

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

毛细管液-质联用系统由 Surveyor 二维毛细管液相色谱仪、LCQ DECA XPplus 离子阱质谱仪以及控制软件 Xcalibur V1.3 和搜索软件 Bioworks V3.2 组成(美国 Thermo Finnigan 公司). 其中 Surveyor 二维毛细管液相色谱包括一台四元低压混合泵用于配合自动进样器进样, 另一台四元低压混合泵用于反相液相色谱的梯度洗脱. 所用反相预柱规格为 $300\ \mu\text{m} \times 5\ \text{mm}$, $300\ \text{\AA}$; P230 色谱仪由高压恒流双泵及紫外检测器组成(大连依利特公司), 并连接一台自动馏分收集器.

其他小型辅助仪器包括: 恒温水浴箱(北京精科华瑞仪器有限公司), 超声清洗仪(昆山市超声仪器有限公司), GL-88B 涡旋混合仪(其林贝尔仪器制造有限公司), 分析天平(Sartorius Co., Ltd, Germany), 紫外-可见光分光光度计(Smartspec 3000 型, 美国 Bio-Rad 公司), 真空离心干燥机(SC100A Speedvac Plus, MODULYOD-230, Thermo Savant 公司), 固相脱盐小柱(美国 Pierce 公司).

不同规格的石英毛细管购自河北永年锐沅色谱器件有限公司; C18 反相色谱填料(ODS, $5\ \mu\text{m}$, $300\ \text{\AA}$)购于北京金欧亚公司.

实验所用主要试剂包括: 二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO 99.5%)、乙二醇二甲基丙烯酸酯(ethylene dimethacrylate, EDMA)、三氟乙酸(trifluoroacetic acid, 99%)、甲醇、乙腈及试验用酵母均购自美国 SIGMA 公司; 十二醇(95%, Fluka, 瑞士); 十六醇、十八醇购自北京化学试剂公司; 1,4-丁二醇(1,4-butanediol, 99%, Aldrich); γ -甲基丙烯酰氧丙基三甲氧基硅烷(3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate, γ -MAPS, 98%)和甲基丙烯酸月桂酯(lauryl methacrylate, LMA 96%)购自 Acros 公司; 偶氮二异丁腈(azobisisobutylnitrile, AIBN, 分析纯)、盐酸、氢氧化钠均购自北京化工厂; 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、胰蛋白酶(trypsin)、二硫苏糖(dithiothreitol, DTT)购于美国 Promega 公司, 碘乙酰胺(iodoacetamide, IAA)为比利时 Acros 公司产品; 试验用水均为超纯水, 由 Milli-Q 纯水系统(美国

Millipore 公司)制备; 实验用 C57 小鼠由军事医学科学院提供.

裂解液(20 mL)配方: 8 M urea; 0.1% DTT; Cocktail 200 μL .

PBS (pH 7.4)缓冲液配方(1 L):

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
NaHPO ₄ ·12H ₂ O	3.9 g
Cocktail	200 μL

其作用是以接近体液的配方并加入蛋白酶抑制剂(cocktail)以确保提取的过程中蛋白不降解.

2.2 鼠肝全蛋白提取方法

购买 8~9 周的 C₅₇ 小鼠, 同龄, 雄性. 实验前 16 h 禁食, 自由饮水. 断颈处死后迅速取出肝脏, 浸入冰冷的 PBS 缓冲液中, 洗净残血, 去除结缔组织, 称重. 将肝脏组织剪碎后, 加入 5 倍体积的裂解液, 并用 A、B 杵分别匀浆 10 次, 达到充分碎裂细胞的目的. 将样品加入 15 mL 离心管中, 在 4°C 条件下混旋 15 min 后进行超声提取及离心. 超声仪设置为脉冲工作模式, 即工作 1 s, 间隔 1 s, 总时间为 30 s, 循环 8 次. 4°C 下混悬 30 min, 使蛋白充分溶解, 最后在 10°C 下以 40000 r/min 离心 1 h, 取上清液测量蛋白浓度后备用. 需注意在超声过程中超声波探头需深入液面以下, 且不与管壁接触.

2.3 带喷头混合型毛细管色谱柱的制备

毛细管(内径均为 $75\ \mu\text{m}$, 外径为 $365\ \mu\text{m} \pm 15\ \mu\text{m}$)内壁的预处理: 首先将 0.1 mol/L 盐酸、水、0.1 mol/L 氢氧化钠、水、甲醇依次通过毛细管, 分别冲洗 1 h; 然后通入氮气吹干毛细管; 再将 50%的 γ -甲基丙烯酰氧丙基三甲氧基硅烷/甲醇溶液混匀超声后充满处理后的毛细管, 两端封口后, 在 45°C 恒温水浴中孵育 24 h; 最后用甲醇冲洗毛细管, 氮气吹干后用硅橡胶封口备用. 带有喷头的毛细管放入专用盒内保存, 避免喷头部位因碰撞损坏.

带喷头混合型毛细管色谱柱的制备方法: 由于毛细管带有喷头一端内径一般小于 $15\ \mu\text{m}$, 容易碰碎或损坏, 不能用硅橡胶封口, 故将反应液^[8](单体与交联剂的比例为 50% : 50%, 单体+交联剂: 致孔剂=30%

: 70%)虹吸至毛细管的标记高度(约 1 cm)后, 将平头端用硅橡胶封口, 而尖端部分插入充满反应混合液的软塑料套管中, 密封后在 70°C 水浴进行加热 24 h. 完成聚合反应后同样用甲醇冲洗, 除去致孔剂和未反应的单体后制备出带有筛板和喷头的毛细管. 装填毛细管柱时, 首先称取 10 mg 的 ODS 颗粒, 置于约 5 mL 的塑料管中, 加入 2.5 mL 甲醇, 并在底端放入磁子, 然后将该塑料管放入一密封的专用装柱的装置中, 在磁力搅拌器搅拌下将 ODS 溶液混悬均匀, 利用氮气加压将匀浆液压入毛细管中, 直至 ODS 颗粒充满剩余的毛细管柱体. 并在 P230 高压恒流色谱泵上冲洗、压实后, 截取 11 cm 备用, 其结构示意图如图 1 所示. 对照实验采用同样方法装填带喷头的毛细管柱, 只是在毛细管喷头部位的筛板是由填料颗粒间“桥形”支撑形成的不稳定筛板.

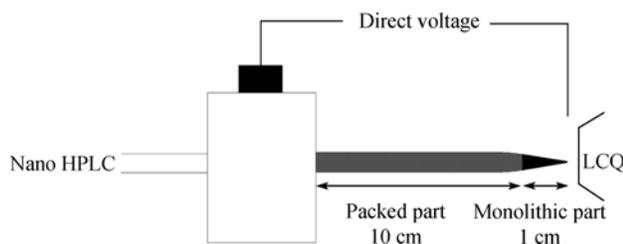


图 1 带喷头混合型毛细管色谱柱的结构和装置示意图

3 结果与讨论

3.1 带喷头混合型毛细管色谱柱的制备方法

带喷头混合型毛细管色谱柱是在柱的喷头端通过由自由基引发聚合反应而形成了网状簇结构的整体材料作为筛板, 其在混合型毛细管色谱柱中除了发挥筛板作用、防止 ODS 颗粒脱出外, 还具有一定的反相色谱分离作用. 采用整体材料作为筛板, 省略了大多数毛细管色谱柱采用烧结法制备筛板的过程, 并使筛板的性质与填充的填料的色谱保留行为接近, 避免了可能的出现的不可逆吸附问题. 另外, 整体材料筛板不仅具有化学性能稳定、反相压力低的特点, 而且具有宽的 pH 范围, 可适应不同反相色谱填料类型的毛细管色谱柱色谱的制作.

由于毛细管内径较小, 通常使用的毛细管色

柱的内径只有 75 μm , 会产生虹吸现象, 使液体充入管内. 我们正是利用毛细管的这一特性, 在制备平头混合毛细管色谱柱的筛板时, 将聚合物反应混合液虹吸入适当长度, 并做好标记, 吸入后对毛细管进行硅橡胶封口处理, 并将带有溶液的一端插入水浴中加热反应. 但在聚合反应过程中, 由于聚合物是通过相分离的作用形成的, 故在合成前后存在材料的纵向收缩, 在平头柱前后两端会产生小段的空隙, 我们可以通过反应后截去柱出口端部分空毛细管, 以避免空管引起的柱后死体积的增大而降低色谱柱的分离效率. 在制备带喷头毛细管色谱柱筛板的过程中, 既不能用上述的硅橡胶封闭方式, 又不能将反应后将尖端未反应的部分截去. 于是我们在制备带有喷头的混合型毛细管色谱柱时, 首先将平头端用硅橡胶封口, 然后将喷头端插入反应液, 利用虹吸原理吸入反应液并利用气压的平衡将虹吸作用终止, 以控制吸入反应液高度. 此后将喷头端插入一个带有相同反应液的、另一端封闭的塑料套管中, 利用喷头插入液面部分的方式来起到密封的作用, 使喷头端的反应液与空气隔绝, 以避免空气中的氧气影响自由基引发的聚合反应, 并确保喷头位置全部参与反应, 防止柱后死体积的产生.

反应完成后在毛细管色谱柱的一端形成了整体材料, 将这一端标记为毛细管色谱柱的出口端, 用氮气加压匀浆装填方法将混悬在甲醇中的 ODS 颗粒填充到剩余的空间里(见图 1). 由于填充时的压力由 0.2 MPa 逐渐上升到 2.0 MPa, 所以刚刚填充好的色谱柱中的 ODS 颗粒还较为松弛, 需要在 P230 高压恒流色谱泵上通过梯度流速, 即先大流速冲洗后, 逐渐降低流速进行冲洗, 直到最后将填料颗粒压实, 色谱系统压力稳定. 一般毛细管色谱柱的装填部分比需要的长度略长, 在整个制备过程完成后, 截掉多余部分, 得到所需的带喷头混合型毛细管色谱柱.

3.2 带喷头混合型毛细管色谱柱与直接填充型毛细管色谱柱的柱效比较

将所制备的带喷头混合毛细管色谱柱与直接填充型毛细管色谱柱分别用于分离标准蛋白酶切液与酵母全蛋白提取液的分离分析, 并以峰容量、蛋白质鉴定的覆盖率、信号强度作为特征参数, 比较两种色

谱柱的性能差异, 评价带喷头的混合型毛细管色谱柱的性能.

如图 2 所示, 将两种毛细管色谱柱用于牛血清白蛋白(BSA)酶切液的分, 即在完全相同的实验条件

下, 样品的上样量为 10 pmol 时, 带喷头的混合毛细管色谱柱与直接填充型毛细管色谱柱的峰容量没有显著差异; 直接填充毛细管色谱柱与 LCQ 质谱联用鉴定三次的 BSA 的覆盖率均值为 64.36%, RSD=

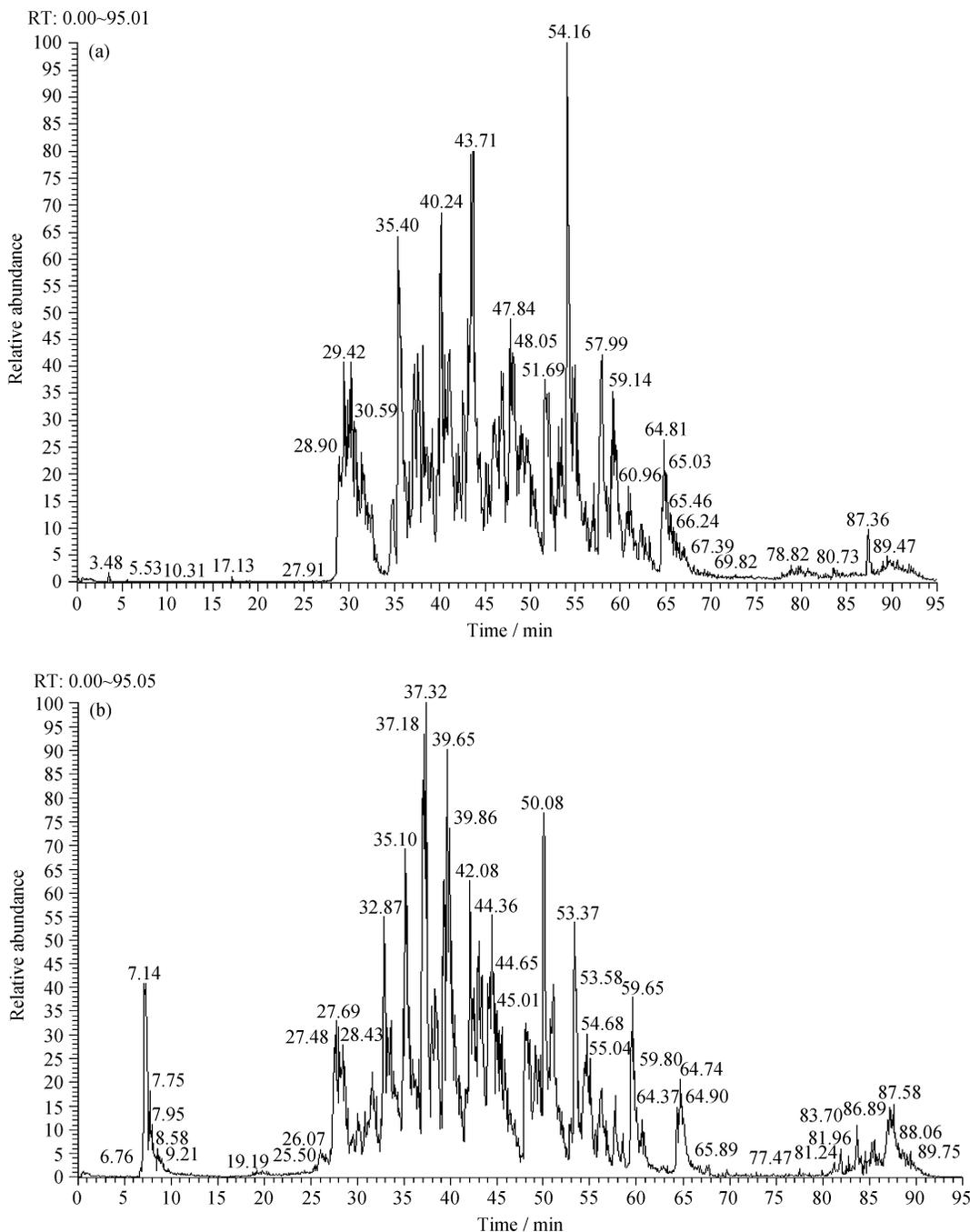


图 2 直接填充型毛细管柱(a)与带喷头混合型毛细管色谱柱(b)分离 BSA 胰蛋白酶酶切液相色谱图

两种毛细管色谱柱规格: (11 cm × 75 μm); 流速: 300 nL/min; 洗脱梯度: 0~60 min: 0~45% B; 60~65 min: 45%~100% B; 65~75 min: 100% B; 75~80 min: 100%~0 B

2.62%; 信号强度均值为 $9.39E9$; 而采用带喷头混合型毛细管色谱柱后三次鉴定的BSA覆盖率均值为 58.90%, $RSD = 0.81\%$; 信号强度均值为 8.81×10^9 . 实验结果表明虽然后者略差, 但没有显著差异, 其原因可能是不同时间的实验误差, 是我们可接受的范围.

为进一步比较混合毛细管色谱柱与直接填充型毛细管色谱柱的柱效, 我们将这两种毛细管色谱柱分别与 LCQ 离子阱质谱联用, 分析了酵母全蛋白提取液. 即将定量好的酵母样本进行胰酶酶切, 酶切样本浓度为 $0.05 \text{ pmol}/\mu\text{L}$, 三次实验的上样量分别为 $10 \mu\text{L}$ 时, 直接填充型毛细管色谱柱所检测到的肽段数分别为 246, 233, 230, 而混合型毛细管色谱柱检测到的肽段数分别为 244, 248, 235. 结果表明直接填充型毛细管色谱柱与混合型毛细管色谱柱的肽段鉴定覆盖率未见显著性差异, 进一步说明两种毛细管色谱柱能够获得接近的分离效果.

3.3 带喷头混合型毛细管色谱柱的稳定性

分 3 批依照同样的方法制备带喷头混合型毛细管色谱柱, 分别依照完全相同的分离条件分析 BSA 胰蛋白酶酶切样本, 选取 BSA 酶切的肽段混合物中相应强度较高的 m/z 1163.5 为特征肽段, 分别记录其保留时间及信号强度, 作为考察色谱柱稳定性的指标, 如表 1 所示, 结果显示所制备的混合型毛细管色谱柱具有良好的稳定性.

表 1 不同批次混合型混合型毛细管色谱柱的稳定性

制备批次	保留时间/min (m/z 1163.5)	信号强度 ($\times 10^8$)
1st	43.61	4.69
2nd	43.55	5.43
3rd	43.04	6.28

3.4 带喷头混合型毛细管色谱柱寿命

实验中采用酵母的胰蛋白酶酶切样本测定混合型毛细管色谱柱的柱寿命, 即通过增加进样次数, 考察混合型毛细管色谱柱的反向压力的变化, 以此作为柱寿命的指标. 如图 3 所示, 从绘制柱压随上样次数的趋势图可以看出, 混合型毛细管色谱柱的平均柱压低于相同进样次数后直接填充型毛细管柱的柱

压, 两种毛细管色谱柱在上样 30 次时均能显示出比较稳定的柱压. 但直接填充型毛细管色谱柱的压力上升趋势要略大于带喷头混合型毛细管色谱柱压上升趋势, 其柱寿命将会较短.

通过以上对所制备的混合型毛细管色谱柱进行柱效评价、重现性考察、以及将其与直接填充型毛细管色谱柱柱压变化趋势进行比较之后表明, 在总体上, 制备的带喷头混合型毛细管色谱柱具有与直接填充型毛细管色谱柱具有相近的性能, 但具有较长的柱寿命.

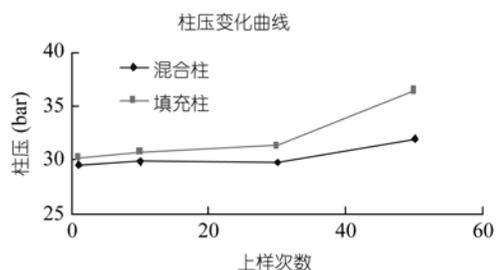


图 3 两种毛细管色谱柱的柱压随上样次数增加变化趋势图

3.5 带喷头混合型毛细管色谱柱的应用

为了进一步考察带喷头混合型毛细管色谱柱的性能, 将其应用于鼠肝蛋白质组的分离分析.

3.5.1 样本的强阳离子交换色谱法预分离

在实际样本的分离分析中, 由于鼠肝全蛋白的胰蛋白酶酶切样本极为复杂, 很难直接通过液-质联用系统的分析而获得较好的鉴定结果. 离子交换色谱法以温和的盐水体系作为流动相, 利用样本与固定相之间的静电作用不同来完成分离, 在蛋白与肽段混合物的分离中广泛应用. 所以, 我们首先选用离线强阳离子交换色谱法(强阳离子交换柱为分析型 Hypersil SCX 柱, 规格为: $25 \text{ cm} \times 4.6 \text{ mm i.d.}$, Thermo-Keystone 公司)方式对鼠肝全蛋白的胰蛋白酶酶切样本进行预分离, 以获得较高的分离效率. 如图 4 所示, 在实验中我们采用了盐梯度洗脱, 并依照每两分钟收集一个馏分的方法共得到 28 个馏分. 将此 28 个馏分分别做浓缩处理, 并最后通过冷冻干燥机将其冻干, 再通过加入适当体积的溶剂溶解, 依据

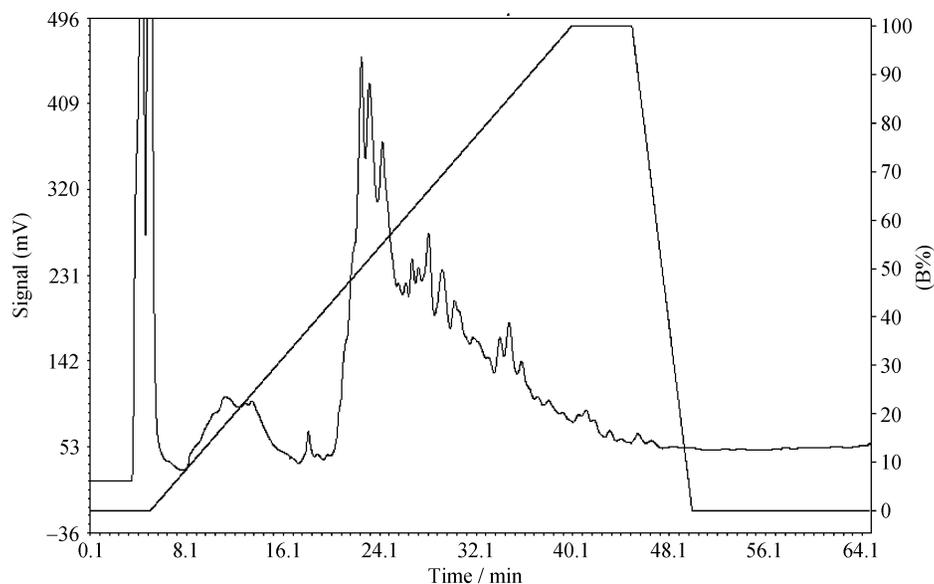


图 4 在 P230 色谱系统上进行的鼠肝全蛋白胰蛋白酶切样本强阳离子交换色谱图

Mobile phase A: 5 mmol/L NH₄Cl (pH 3.0)+25% ACN; Mobile phase B: 500 mmol/L NH₄Cl (pH 3.0)+25% ACN; Analytical SCX column: 25 cm×4.6 mm i.d. (Hypersil); Flow rate: 0.75 mL/min; Wavelength: 214 nm; Gradient elution: 0~5 min, 100% A; 5~65 min, 0~60% B; 65~85 min, 60%~100% B; 85~115 min, 100% B; 115~125 min, 100% A

稀释的体积来估算浓度, 以确定反相毛细管色谱-质谱联用分离分析时的上样量。

3.5.2 鼠肝全蛋白表达谱

强阳离子交换预分离所获得的 28 个鼠肝全蛋白酶切液馏分分别用带有喷头混合型毛细管色谱柱-LCQ 质谱的联用系统进行分析。由于样本在酶切时加入了盐成分, 为了尽量避免采用小柱脱盐所造成的样本损失, 故采用将样体积稀释, 增大上样体积而总上样量不变的方法, 通过十通阀的交替上样, 用预柱在线去除样本中所含的盐类。

按强阳离子交换色谱对鼠肝全蛋白酶切液的预分离时, 依照梯度从 1 min 开始一直收集到 56 min 的馏分次序上样, 将液-质联用获得的数据分别采用 Thermo Finnigan Bioworks 3.2 检索系统进行检索, 用 pFind 进行检索结果合并, 输出鉴定结果时设定假阳性率为 1% 的卡值进行过滤^[9], 鼠肝样本的一次全分析所鉴定到的非冗余肽段数量为 1262 个, 归结于 513 个蛋白簇。通过对所鉴定蛋白质理化性能分析, 如图 5 所示, 蛋白质的 pI 分布范围为: 3.99~12.01, 并以 pI 6.0 和 9.0 为中心, 形成“驼峰”分布, 符合蛋白 pI 值

分布规律。另外, 如图 6 所示, 能够鉴定到蛋白质组的分子量范围为: 4814.6~390, 4053 Da, 其中大于 100 kDa 的蛋白质占到所鉴定蛋白质的 7.2%。实验结果表明此类带喷头的混合型毛细管色谱柱在分离分析中不具有偏性, 可以用于液-质联用系统对组织、细胞或体液等复杂蛋白质组表达谱的构建或比较蛋白质组的研究。

4 结论

本研究提出了一种带喷头混合型毛细管色谱柱

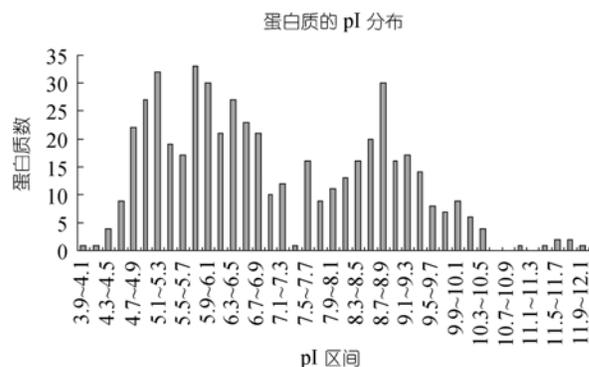


图 5 鉴定的鼠肝蛋白质组的 pI 的分布

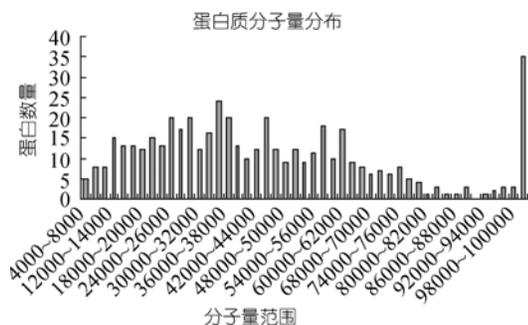


图6 鉴定的鼠肝蛋白质组分子量的分布

的制备方法,即在毛细管色谱柱的出口端制备一定长度的整体材料之后,在剩余的毛细管中填充反相填料,结合了填充柱高效并克服依靠填料颗粒间“桥形”支撑形成的不稳定筛板填料的缺点.将其应用于

纳升级液-质联用系统中,通过分离标准蛋白来考察柱效,并与直接填充毛细管色谱柱进行比较,表明了混合型毛细管色谱柱与所对应的直接填充型毛细管色谱柱分离方面未有显著差异,但在寿命方面具有优势.另外还解决了部分毛细管色谱柱采用烧结法制备筛板,与柱整体性能不一致的问题.将带喷头混合柱毛细管色谱与质谱联用于分离分析鼠肝全蛋白胰酶酶切混合液的强阳离子交换色谱的28个馏分,在假阳性率为1%的条件下鉴定到1262个肽段,归属于513个蛋白簇.进一步对这些蛋白质簇的理化性能分析表明此类混合柱毛细管色谱柱在分离分析的应用中没有偏性,可以在液-质联用系统中用于复杂组织、细胞或体液等复杂蛋白质组表达谱的构建或比较蛋白质组的研究.

致谢 本工作得到国家重点基础研究发展计划(编号:2006CB910803,2007CB914104)、国家高技术研究发展计划(编号:2006AA02A308)和国家自然科学基金(批准号:30621063,20635010,20735005,20875101)项目资助,特此一并致谢.

参考文献

- Link A J, Eng J, Schieltz D M, Carmack E, Mize G J, Morris D R, Garvik B M, Yates J R. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(7): 676—682 [\[DOI\]](#)
- Washburn M P, Wolters D, Yates J R. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(3): 242—247 [\[DOI\]](#)
- Jiang X G, Dong J, Wang F G, Feng S, Ye M L, Zou H F. Automation of nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry for proteome and peptide profiling analysis by using a monolithic analytical capillary column. *Electrophoresis*, 2008, 29: 1612—1618 [\[DOI\]](#)
- Premstaller A, Oberacher H, Walcher W, Timperio A M, Zolla L, Chervet J P, Cavusoglu N, Dorsselaer A V, Huber C G. High-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using monolithic capillary columns for proteomic studies. *Anal Chem*, 2001, 73: 2390—2396 [\[DOI\]](#)
- Ro K W, Liu J, Busman M, Knapp D R. Capillary high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using monolithic columns and carbon fiber electrospray ionization emitters. *J Chromatogr A*, 2004, 1047: 49—57 [\[DOI\]](#)
- Kelly R T, Page J S, Luo Q Z, Moore R J, Orton D J, Tang K Q, Smith R D. Chemically etched open tubular and monolithic emitters for nanoelectrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, 2006, 78: 7796—7801 [\[DOI\]](#)
- Luo Q Z, Page J S, Tang K Q, Smith R D. MicroSPE-nanoLC-ESI-MS/MS using 10- μ m-i.d. silica-based monolithic columns for proteomics. *Anal Chem*, 2007, 79: 540—545 [\[DOI\]](#)
- Xie J X, Bi K S, Qian X H, Zhang Y J. Preparation of an reversed-phase capillary monolithic column and its application in the separation of polypeptide mixture. *Chin J Chromatogr*, 2009, 27(2): 186—190
- Li D Q, Fu Y, Sun R X, Ling C X, Wei Y G, Zhou H, Zeng R, Yang Q, He S M, Gao W. pFind: A novel database-searching software system for automated peptide and protein identification via tandem mass spectrometry. *Bioinformatics*, 2005, 21(13): 3049—3050 [\[DOI\]](#)

Preparation for a packed capillary column with a monolithic emitter and its application in the analysis of proteome

ZHANG YangJun¹, XIE JingXin² & QIAN XiaoHong¹

1. State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing, 102206, China;

2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang, 110015, China

Abstract: A capillary chromatographic column with an emitter at one end is prepared with monolithic material in the emitter as a cribellum for the capillary column by using lauryl methacrylate-ethylene dimethacrylate (LMA-EDMA), and then the other empty part of the capillary column with an emitter is packed with octadecylsilica particles(ODS). The property of monolithic part of the capillary column is similar to that of reversed-phase packing materials packed in the capillary column and benefits the improvement on separation efficiency and prevents the clogging problem of the capillary column in the tapered tip during its use. The performances of the packing material-mixed-column such as peak capacity, ionization efficiency, signal intensity and the coverage of identified peptides or proteins are examined on a nano-high performance liquid chromatography-mass spectrometry. We also evaluate the mixed-capillary column by analyzing tryptically digested proteins extracted from mouse livers. The results show that the capillary columns newly prepared possess a satisfied performance and will play an important role in proteomics researches in the future.

Keywords: proteomics, peptide separation, capillary chromatographic column, nano-high performance liquid chromatography-mass spectrometry