

## **Руководство пользователя**

### **Общее описание**

- Капиллярные колонки Peaky™ предназначены для разделения пептидных смесей в хромато-масс-спектрометрическом протеомном анализе методом обращено-фазовой хроматографии при низком pH.
- Если не указано иное, колонки Peaky™ представляют собой капилляры из плавленного кварца, покрытые полиимидной пленкой, с внешним диаметром 360 мкм и внутренним диаметром 75 мкм. Длина колонок варьирует от 15 до 75 см в зависимости от модели.
- Внутри дистального конца колонки находится интегрированный стеклянный фильтр, препятствующий выходу сорбента. Проксимальный конец колонки НЕ имеет интегрированного фильтра. Соответственно, подключение колонки в противоположном указанному на колонке направлению приведет к выбиванию сорбента из колонки и выходу колонки из строя.
- Если не указано иное, ни проксимальный, ни дистальный конец колонки не имеют каких-либо предустановленных соединений.
- По умолчанию, колонки Peaky™ набиваются цельно-пористым сферическим сорбентом 1.9 мкм ReprosilPur™ C18 AQ 1.9 um (Dr. Maisch GMBH).

### **Эффективность разделения и Тестирование колонок**

Каждая индивидуальная колонка Peaky™ НЕ ТЕСТИРУЕТСЯ на эффективность разделения. Тестирование колонки может быть заказано отдельно. Гарантированные характеристики колонок Peaky™ приведены в Таблице 1. Эффективность разделения колонки при первом подключении колонки к хроматографу хуже заявленных в Таблице 1 параметров является основанием для замены колонки на новую.

### **Меры предосторожности при работе с колонками**

Колонки представляют собой тонкий стеклянный капилляр. Мы рекомендуем использовать разумные меры предосторожности, предотвращающие возможность попадания тонких концов колонок в глаза. Мы РЕКОМЕНДУЕМ, по

возможности, НЕ ИСПОЛЬЗОВАТЬ ПЕРЧАТКИ при работе с колонками Peaky™ для сохранения тактильных ощущений при работе с тонкими капиллярами.

Колонки заполнены мелким сорбентом на основе силикагеля. Используемое количество сорбента в одной колонке недостаточно для вызывания каких-либо патологических состояний при вдыхании, однако мы рекомендуем избегать попадания частиц сухого сорбента в легкие.

При работе с хроматографией должны соблюдаться требования техники безопасности, соответствующие уровню опасности используемых растворителей.

### **Использование колонок**

Колонки имеют ТОЛЬКО ОДНО направление разделения, указанное на этикетке колонки. Менять направление потока категорически нельзя.

Новая колонка поставляется в сухом состоянии. Для приведения колонки в рабочее состояние требуется прокачать через колонку органический элюент (фаза Б) обращено фазовой хроматографической системы в течение 10-15 мин (до установления стабильного давления на колонке) при скорости потока 300 мкл/мин. После этого новая колонка должна быть уравновешена 3-4 последовательными заколами на коротком градиенте (15 мин) простой тестовой смеси (стандартный раствор пептидов, например гидролизат BSA (кат. номер BSAAd-Stand), закол по 50-100 fmol).

Колонки Peaky™ совместимы со всеми органическими растворителями и водой. Сорбент предназначен для работы в диапазоне pH от 2.5 до 7. Рекомендуемый рабочий pH в протеомных экспериментах составляет 2.5-3.5 (достигается при использовании в качестве буферной добавки 0.1% муравьиной кислоты).

Избегайте использование колонок при температуре выше 70°C.

Колонки рекомендуется переводить в незабуференную органическую фазу в случае отсоединения колонки от ВЭЖХ системы в случае использования TFA или щелочного буфера для разделения. При использовании в качестве буферной добавки 0.1% FA переводить колонку в незабуференный растворитель не обязательно.

При отключении колонки от ВЭЖХ системы рекомендуется хранить колонку полностью погруженной в 10% этиловый спирт (для хранения могут быть использованы герметичные полипропиленовые контейнеры с резиновой прокладкой). В случае пересыхания колонки во время хранения, перед использованием колонку требуется уравновесить органической фазой, как перед первым использованием. Перед разделением сложных смесей необходимо проверить колонку заколом стандартной простой смеси пептидов (гидролизат BSA).

В случае, если колонка не используется для разделения, но подсоединена к ВЭЖХ системе, для увеличения продолжительности жизни колонки рекомендуется постоянно поддерживать на ней минимальную скорость потока 50 нл/мин при соотношении буферов А/Б 50/50.

Физическое подключение колонки к ВЭЖХ системе осуществляется любым подходящим под линейные размеры и характеристики колонки способом. Более подробная информация о вариантах подсоединения колонок Peaky к хромато-масс-спектрометрической системе может быть найдена в Руководстве «Варианты подключения капиллярных колонок серии Peaky™ к хроматографической системе и к источнику ионизации масс-спектрометра».

При переподключении колонки к системе ВЭЖХ необходимо проверять целостность концов колонки. Фронтальный конец колонки, в случае необходимости (повреждение капилляра, физическая забивка входа в колонку нерастворимыми частицами), может быть подрезан на 5-10 мм без существенного падения эффективности разделения. Подрезание капилляра из плавленого кварца осуществляется с использованием специально предназначенного для этого инструмента (НЕ ДОПУСКАЕТСЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГИЛЬОТИНЫ). Для подрезания капилляров мы рекомендуем нож от NewObjective (Diamond-chip bladed scribe).

## Использование колонки для разделения сложных пептидных смесей в протеомном анализе

Капиллярные колонки Peaky™ предназначены для разделения пептидных смесей после гидролиза белков, эндогенных или синтетических пептидов в рамках высокочувствительного протеомного анализа методом хромато-масс-спектрометрии. Исходя из характеристик сорбента, используемого в производстве колонок Peaky™, и внутреннего диаметра колонок 75 мкм, эффективной скоростью потока для разделения является диапазон от 250 до 350 нл/мин. Для колонок с внутренним диаметром 100 мкм рабочая скорость потока составляет 450-500 нл/мин. Стандартной системой растворителей является вода-ацетонитрил с добавлением 0.1% муравьиной кислоты в качестве буферизующей добавки.

Рабочее давление на колонке при 98% буфере А (вода, 0/1% FA) составляет ~490 бар для колонки длиной 30 см (при температуре 25-30°C). Рабочее давление для колонок другой длины приведено в таблице.

Таблица 1. Рабочее давление капиллярных хроматографических колонок Peaky (98% буфер А).

Длина, см	Рабочее давление, бар
15	250
30	490
50	800*

\*Для работы с колонками длиной 50 см рекомендуется использование колоночного термостата с нагревом до 45-60°C.

Если рабочее давление в системе отличается от ожидаемого более, чем на 10% в меньшую/большую сторону, необходимо проверить герметичность/отсутствие блокировки соединений и капилляров и соответствие скорости потока ВЭЖХ системы заявленному.