

# 使用 Opentrons 蛋白质纯化工作站 进行基于 Ni-NTA 磁珠的蛋白质纯化



## 作者

Boren Lin, PhD<sup>1</sup>, Kinnari Watson, PhD<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Opentrons Labworks, Inc.

## 摘要

本次测试研究的是在 Opentrons OT-2 自动化移液工作站上进行基于磁珠的固定化金属亲和层析法 (IMAC)。我们使用 Pierce™ Ni-NTA 磁性琼脂糖珠 (Thermo Fisher Scientific, USA) 测试了该方案, 用于在 OT-2 上提取目标蛋白 (带有 His 标签的 GAPDH), 使用裂解缓冲液稀释的重组 GAPDH 蛋白、HEp-2 细胞裂解液和菌细胞制备的样品。

## 关键发现

在 Opentrons 蛋白质纯化工作站上可使用 Ni-NTA 磁珠进行重组 GAPDH 蛋白纯化。

- 实验结果证明所得蛋白为目标蛋白, 具有良好的一致性和特异性。
- 该方案可以处理多达 96 个样品, 并最大限度地减少需要手动操作的时间。

## 简介

蛋白质纯化的目的是为了获得高纯度的稳定活性蛋白质, 以供下游分析、研究或治疗使用。固定化金属亲和层析法 (IMAC) 利用金属离子提取具有基因工程标签的重组蛋白, 能够螯合金属离子的肽链。镍-三乙醇胺四乙酸 (Ni-NTA) 与琼脂糖树脂或磁珠结合是常用的 IMAC 工具, 用于纯化多组氨酸 (His) 标记的蛋白质。由于 His 残基可以整合镍离子 ( $\text{Ni}^{2+}$ ), His 标记的蛋白对固定了  $\text{Ni}^{2+}$  的载体表现出很强的亲和力。

在 Opentrons 蛋白质纯化工作站上使用 Pierce Ni-NTA 琼脂糖磁珠提取带有 His 标签的 GAPDH。

## 材料和方法

### IMAC Protocol 实验流程概述

IMAC protocol 的流程分为几个部分:

**第一部分: 样品/磁珠混合物的制备。**目标捕获部分不在 OT-2 平台上进行。

**第二部分: 洗涤和洗脱。**具体流程如图 1 所示。

第一部分和第二部分都在 OT-2 上执行。针对 96 个样品, 第一部分运行时间为 57 分钟, 随后在摇床上进行 30 分钟的目标捕获。第二部分需要 78 分钟完成。

### OT-2 平台上的 Ni-NTA 实验流程

第一部分和第二部分的设备布局图如下 (见图 2)。协议的第一部分和第二部分均在 OT-2 平台上进行, 并使用磁珠纯化模块将磁珠从溶液中分离出来。样品处理过程中, 将 500  $\mu\text{L}$  来源 His 标记的 GAPDH 溶液与 12.5  $\mu\text{L}$  沉淀的磁珠混合, 并在室温下以 800 rpm 的速度孵育 30 分钟。经过 2 个洗涤步骤后, 目标蛋白在 250  $\mu\text{L}$  洗脱缓冲液中以 800 rpm 和室温的条件在摇床上洗脱 10 分钟。取 20  $\mu\text{L}$  洗脱物进行 SDS-PAGE 和 Western Blot 分析, 使用单克隆抗-GAPDH 抗体 (Thermo Fisher Scientific, USA) 和与荧光染料偶联的二抗 (LI-COR Biosciences, USA) 进行检测。



图1: Opentrons 蛋白质纯化工作站上基于 Ni-NTA 磁珠的蛋白质纯化工作流程概述

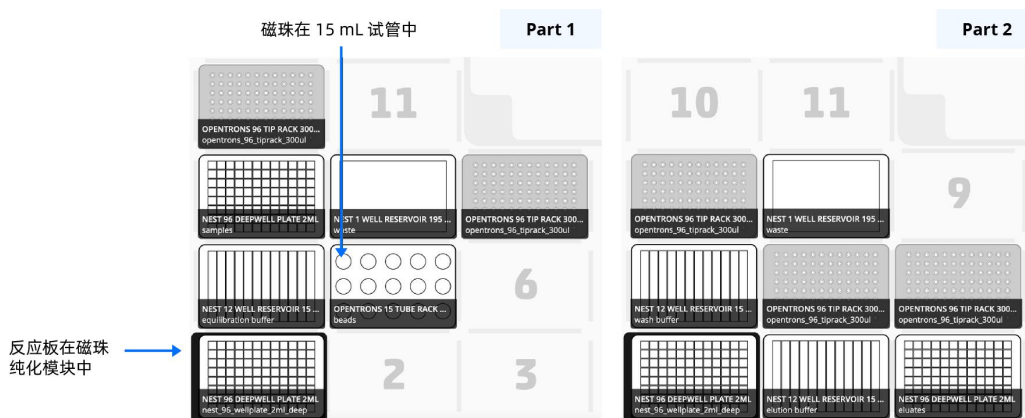


图2: Opentrons 蛋白质纯化工作站上运行 Ni-NTA 应用协议的甲板布局图

## 结果

GAPDH在重复实验中提取得到一致的样品处理结果（通过 Western blot 分析的蛋白带信号测定，CV = 6%）（图3）。部分提取物通过使用 Qubit™ 蛋白质分析（Thermo Fisher Scientific, USA）进行定量，证明了高蛋白质产量（图4A）。此外，使用 Opentrons 蛋白质纯化工作站进行的蛋白质纯化过程不会破坏蛋白质的酶活性，这是通过 GAPDH 活性分析（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）检测得出的（图4B）。



图3: His标记的GAPDH提取结果符合预期

Ni-NTA 介导的敲低实验对于在细胞或组织样本中分离外源表达的 His 标记蛋白质非常有用。上一个方案用于纯化 200  $\mu$ L Hep-2 细胞裂解液中的 His 标记 GAPDH。结果再次证明 His-GAPDH 成功被提取，并且与非标记蛋白的结合相比，Ni-NTA 磁珠的亲合力特异性非常高（图5）。在大规模蛋白质生产中，常用大肠杆菌进行重组蛋白表达。通过裂解带有或不带 IPTG 诱导的 His 标记 GAPDH 表达的细菌细胞来制备细胞裂解液。结果进一步确认了该方案成功地使用 Ni-NTA 磁珠进行了带有 His 标记的蛋白质纯化（图6）。在这项研究中处理了 96 个样本，显示的结果仅为在 96 孔样品板的最后一列中的 8 个样品。同时，实验结果也对不同样本规模的运行时间进行了评估（图7）。

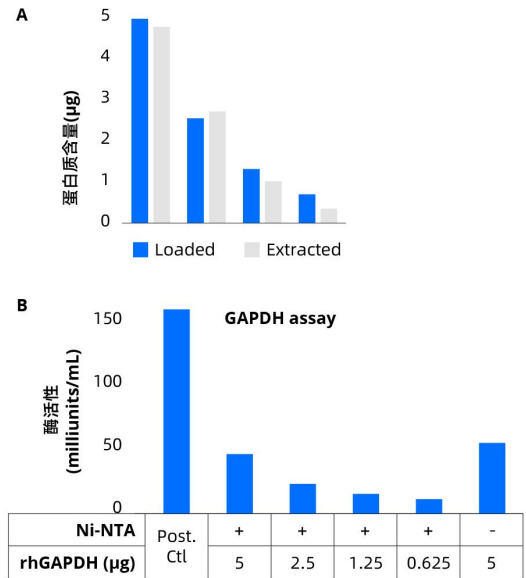


图 4: Qubit 蛋白质测定结果显示，实验产出的蛋白质质量高，并且保留了其酶活性

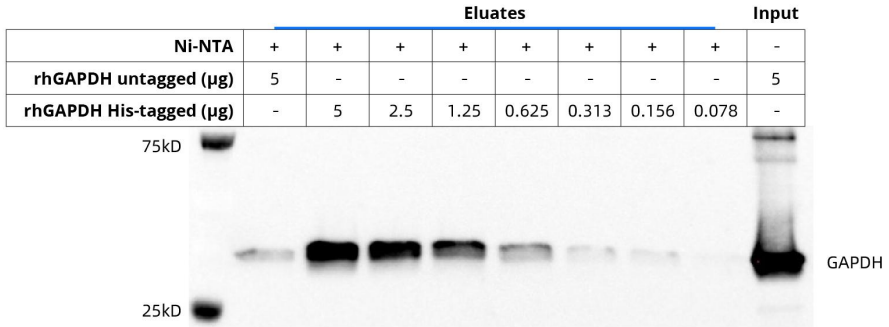


图 5: 以高特异性成功从 Hep-2 细胞裂解液中提取 His-GAPDH

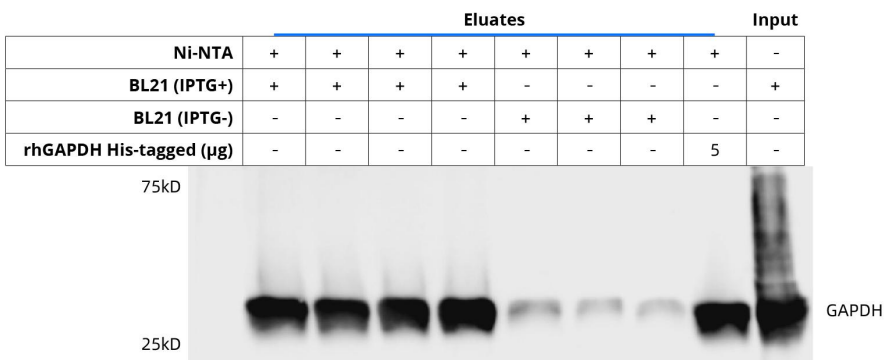
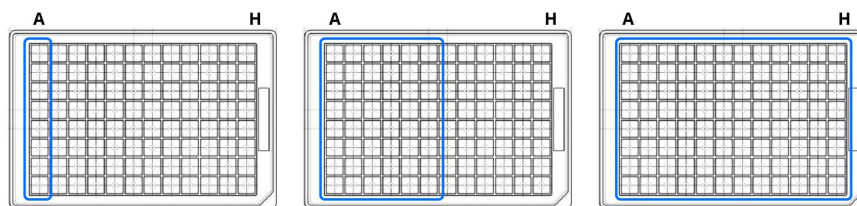


图 6: His-GAPDH 在细菌培养物中表达并成功被提取出来



	8 个样品		48 个样品		96 个样品	
Protocol	运行时间 (分钟)	吸头 (盒)	运行时间 (分钟)	吸头 (盒)	运行时间 (分钟)	吸头 (盒)
<b>第1部分</b>	11	1	31	1	57	2
<b>孵育</b>	30	-	30	-	30	-
<b>第2部分 (1次洗脱)</b>	28	3	54	3	78	3
<b>总计</b>	69	4	115	4	165	5
<b>第1部分</b>	11	1	31	1	57	2
<b>孵育</b>	30	-	30	-	30	-
<b>第2部分 (2次洗脱)</b>	41	3	81	3	104	3
<b>总计</b>	82	4	142	4	191	5

图7: 运行时间和所需的吸头数量 (一次洗脱 vs 两次洗脱)

## 结论

本次研究在 Opentrons 蛋白质纯化工作站上运行了一种基于磁珠的 His 标记重组 GAPDH 蛋白质纯化的自动化实验流程解决方案。实验证明, Opentrons 蛋白质纯化工作站可以在中到高通量的设置中稳定高效地处理样本, 减少操作时间, 同时提供符合预期的可重复性的产出。