

# 在 OT-2 上使用 Thermo Fisher Dynabeads 进行免疫沉淀



## 作者

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

## 摘要

本次研究在Opentrons OT-2自动化移液工作站上进行了自动化的磁珠法免疫沉淀测试，实验流程可处理多达96个样品，并最大限度地减少人工操作时间。我们用裂解缓冲液稀释重组 GAPDH 蛋白或者直接使用 HEp-2 细胞裂解产物进行样本制备，并偶联蛋白G或者蛋白A，然后在 Thermo Fisher Dynabeads™ 上进行免疫沉淀实验(蛋白G和蛋白A可与可溶性抗体结合，进而促进随后与目标蛋白 GAPDH 的结合)。蛋白质分析结果显示，目标蛋白质成功地从样品溶液中提取出来，并符合预期效果的一致性，证明了 OT-2 具备自动化进行免疫沉淀实验的能力。

## 简介

免疫沉淀是一种常见的实验方法，利用抗体在分子混合物中捕获目标蛋白质。抗体可以预先连接到固相基质（如琼脂糖树脂或磁珠）上，然后与目标蛋白质接触，或者直接与样品一起加入相应的固相基质。由于孵育时间取决于抗体与目标蛋白质的亲和力，不同的目标捕获蛋白所需的孵育时间也会不一样。使用磁珠提取，抗体-蛋白质-磁珠复合物会通过离心或磁力的方式进行沉淀收集。

Dynabeads™ (Thermo Fisher Scientific, USA) 是一款可以根据需求调整以获得不同功能的超顺磁珠。例如，重组的蛋白G或蛋白A可以共价地结合到磁珠表面。蛋白G和蛋白A都是细菌蛋白，对单克隆或多克隆 IgG 型抗体的 Fc 区域表现出高亲和力。Dynabeads™-蛋白 G 或 Dynabeads™-蛋白 A 可作为抗体的固相支持材料。Opentrons 以 Dynabeads™ 为基础设计了高效自动化的实验程序进行免疫沉淀实验，每次实验可处理最多96个样品，样品之间具有良好的重复性。

## 材料和方法

实验步骤包括以下内容：

第一部分是磁珠、抗体和样品的混合制备；由用户确定的抗体/目标蛋白的孵育时间；

第二部分是洗涤和洗脱步骤（图1）。

第一部分和第二部分在 OT-2 上进行，使用磁珠纯化模块将磁珠从溶液中分离出来，并使用温控模块制备变性蛋白的洗脱液进行 SDS-PAGE。孵育过程在热振荡仪（选配）上进行。

免疫沉淀实验的第一部分和第二部分的 OT-2 装载布局如图 2 所示。这个流程旨在将试剂直接从 15 mL 离心管转移到工作板上进行磁珠分离。

另外，在 OT-2 上使用自动化程序预填充试剂板，可以减少实验时间。抗体与目标蛋白的结合是免疫沉淀成功的最关键步骤，这取决于抗体的亲和力。对于结合亲和力低或丰度较低的抗体，建议在样品溶液中进行预孵育。



图1: 这是 OT-2 上蛋白纯化的三个主要步骤的概述

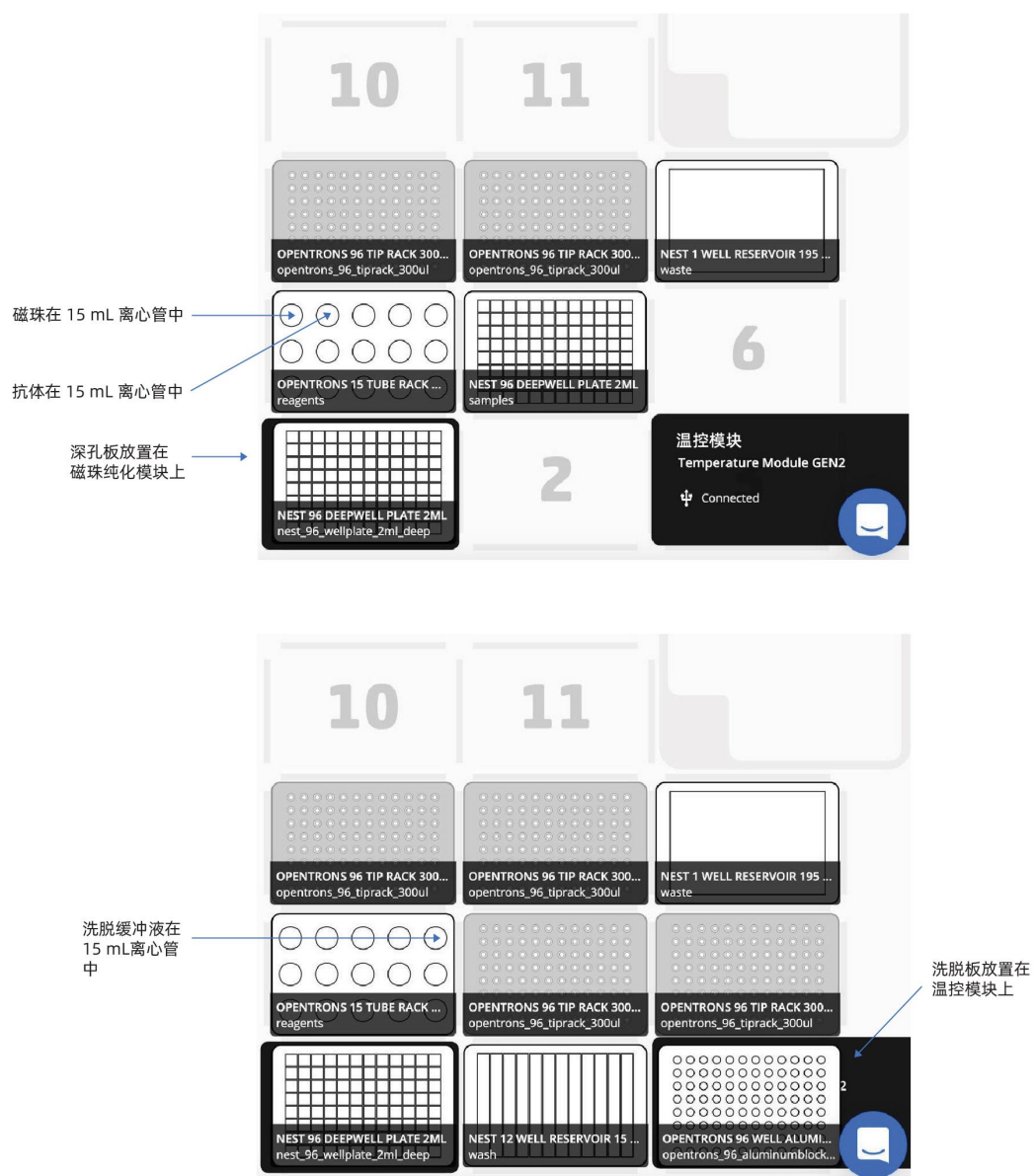


图2: 实验室耗材和模块甲板摆放示意图

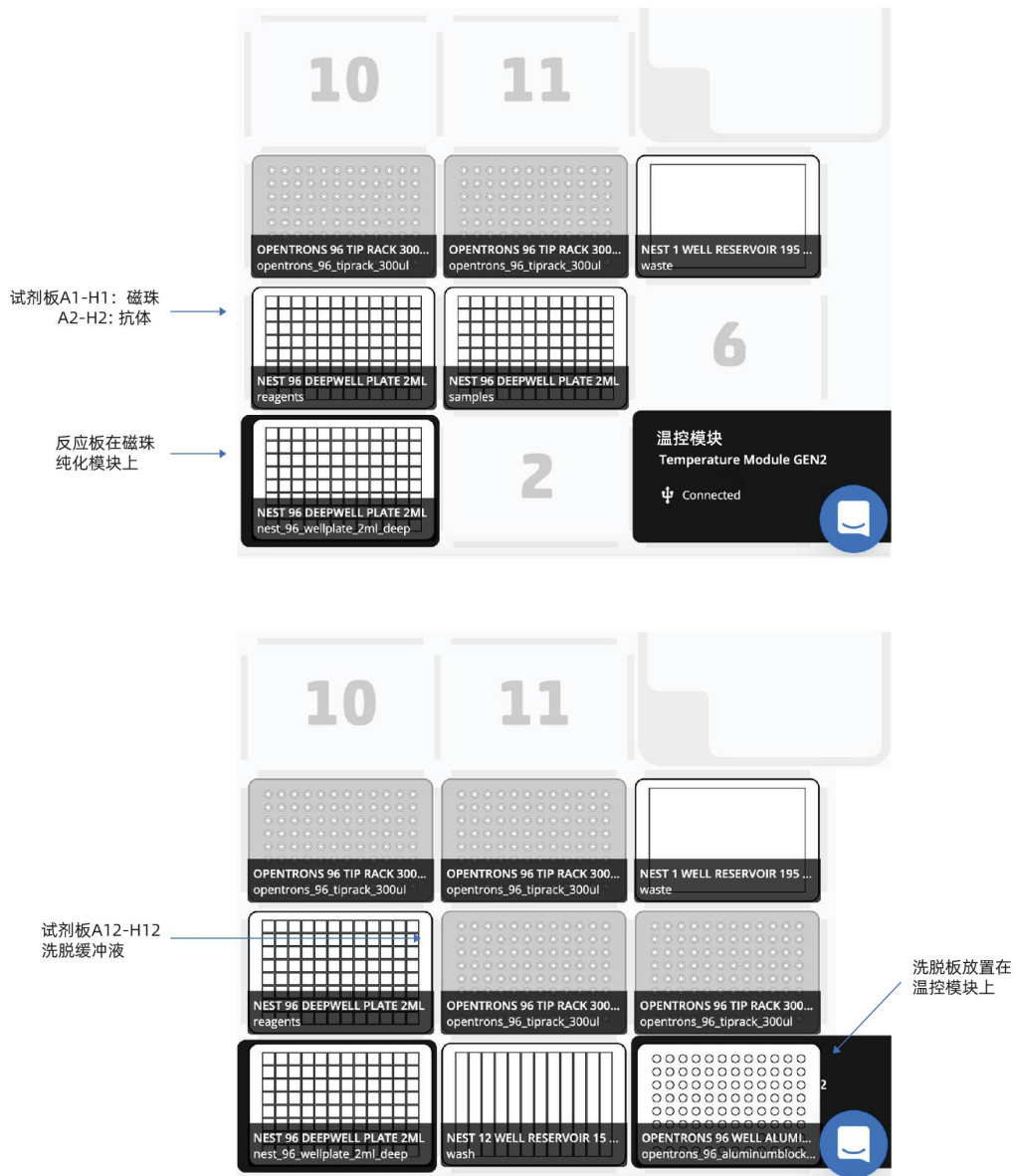
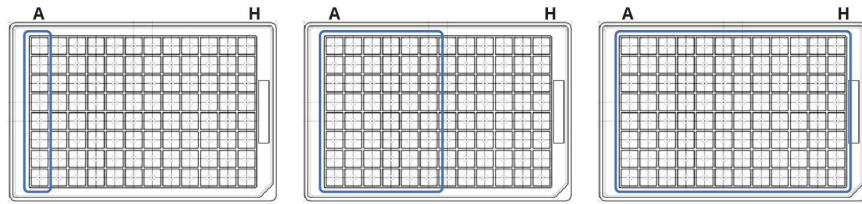


图3：实验室耗材和模块甲板摆放示意图



Protocol		8 个样本		48 个样本		96 个样本	
		运行时间 (min)	吸头(盒)	运行时间 (min)	吸头(盒)	运行时间 (min)	吸头(盒)
试管里的试剂	Part 1	7	1	20	1	37	2
	Part 2	15	2	39	3	68	4
	合计	22	3	59	4	105	6
孔板里的试剂	Part 1	4	1	12	1	20	2
	Part 2	13	2	34	3	64	4
	合计	17	3	46	4	84	6

图4：试管里的试剂和孔板里的试剂所需的运行时间和盒装吸头数量。

## 结果

兔子 IgG 对 蛋白 G 和蛋白 A 都具有高亲和性，为了确认抗体与 Dynabeads™ 的相互作用，我们使用了抗 GAPDH 的免多克隆 IgG 抗体(ProteintechRosemont,IL, USA)。在 OT-2 上，将 50μL 的磁珠悬液与含有 2.5μg GAPDH 抗体的 200μL PBS 混合，然后室温下于振荡器上 800 rpm 混匀 10 分钟。随后，在 OT-2 上用 0.1% Tween 20 的磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS-T) 洗涤 3 次。70°C 加热 10 分钟、使用 Laemmli 样品缓冲液 (Bio-Rad, USA) 洗脱结合的 GAPDH 抗体。然后，对其进行 SDS-PAGE 分离，再用近红外发光染料 (IRDye 680RD) 偶联的山羊抗兔 IgG 抗体 (LI-COR Biosciences, USA) 进行探针探测。Western Blot 分析结果显示，当进行四次重复操作时，无论是蛋白 G 还是蛋白 A 磁珠都能够与 GAPDH 抗体结合 (图 5A)，且结合具备可重复性。

为了进行 GAPDH 的免疫沉淀，我们在 OT-2 上使用含有重组人 GAPDH 蛋白 (rhGAPDH, Thermo Fisher Scientific, USA) 的样品进行免疫沉淀处理。同时使用结合了 GAPDH 抗体的 Dynabeads™-蛋白G和蛋白A的 GAPDH 抗体进行测试。Western Blot 结果显示 GAPDH 的存在，验证了 OT-2 具备运行自动化免疫沉淀的能力 (图 5B)。

该方法还针对培养细胞中内源性 GAPDH 进行了自动化免疫沉淀评估。HEp-2 细胞在含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 Gibco™ 最低基础培养基 (Thermo Fisher Scientific, USA) 中培养，在 5% CO2 和 37°C 条件下进行。为了准备测试的细胞裂解液，收集了  $4 \times 10^6$  个 HEp-2 细胞，并在 200μL Pierce™ IP 的裂解缓冲液中进行裂解，该缓冲液中还加入了 Thermo Fisher Scientific 提供的蛋白酶抑制剂混合物。使用 Dynabeads™-蛋白A 在 OT-2 平台上进行免疫沉淀实验，OT-2 移液平台搭载了磁珠纯化模块和温控模块。为了让抗体与目标蛋白结合有足够的时间，将混合物放置于 4°C 热振荡仪上，在 800 rpm 的转速下孵育过夜。最后通过 Western Blot 定量，结果进一步证明了本次免疫沉淀实验成功具有良好的重复性 (图 6)。本次实验处理了 96 个样本，免疫沉淀的细胞裂解液加载在 96 孔样品板的最后一列，而样品板的其余位置只装载了裂解缓冲液。

## 结论

OT-2 在中高通量工作流程中利用 Dynabeads™ 进行自动化免疫沉淀具备较好的能力和实用性。我们开发的应用协议能够替代手动程序，并减少了操作时间，同时提供了优秀的重复性。

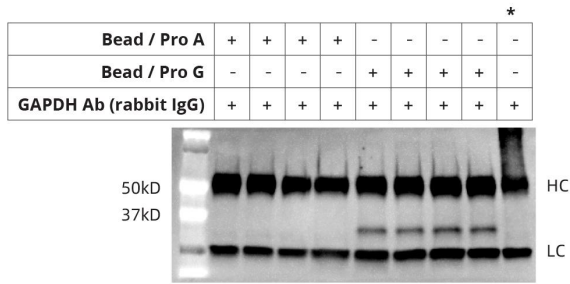


图5A: 蛋白G和蛋白A磁珠能够与抗体结合, 并且在四次重复实验中对样品的处理具有良好的一致性。

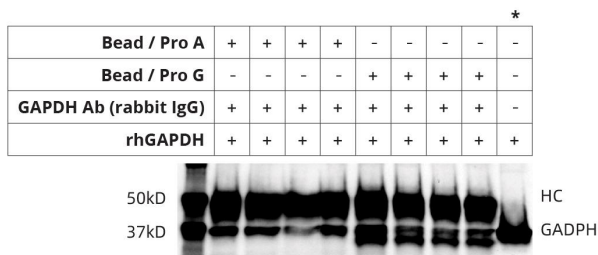


图5B: Western Blot 结果显示存在被结合的 GAPDH, 并确认了 OT-2 运行自动化免疫沉淀的能力。

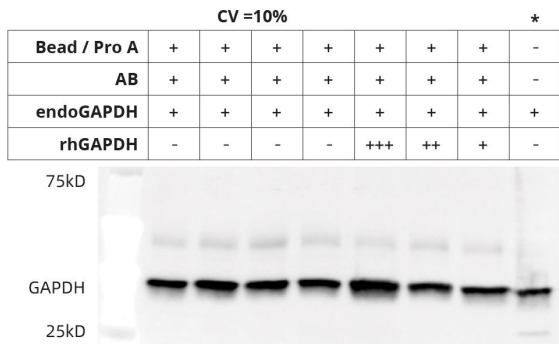


图6: Western Blot 结果显示存在被结合的 GAPDH, 并确认了 OT-2 自动化免疫沉淀的能力。通过密度分析和计算 CV 值测定内源GAPDH (1、1.26、1.26、1.1、1.1) 的相对蛋白水平。