

LC-MS 样品制备:在 Opentrons Flex® 自动化移液工作站上实现自动化蛋白质纯化



作者:
Opentrons Labworks, Inc,

引言

在自下而上的液相色谱-质谱 (LC-MS) 蛋白质组学分析中,需将蛋白质酶解为肽段,经液相色谱 (LC) 分离后,再利用质谱 (MS) 进行鉴定。该流程通常涉及多个上游样品制备步骤 (图1),包括目标蛋白的分离纯化、定量、归一化处理、蛋白质酶解及样品纯化。

这些步骤虽至关重要,却耗费研究人员大量时间和人力。通过自动化技术处理上述流程,不仅能显著提升实验效率与通量,还可提高结果的可重复性。本研究基于 Opentrons Flex 自动化移液工作站,实现了单克隆抗体 (mAb) 样本的磁珠法蛋白质纯化,最终获得的纯化样品可直接用于后续 LC-MS 分析。

方法与结果

样品处理:取三份来自 HeLa 细胞培养上清的分泌单克隆抗体 (mAb) (细胞均表达兔源 IgG 与 GFP,参见图 2),分别加入 96 孔板的三个独立垂直列中 (每孔 250 μ L, 每列 8 孔)



图 1. Opentrons Flex 自动化样品制备工作流程示意图。

本应用笔记将重点详述该流程的第一步——蛋白质纯化。关于蛋白质定量与归一化、蛋白质酶解及样品纯化的自动化方案,请参阅本系列其他应用笔记。

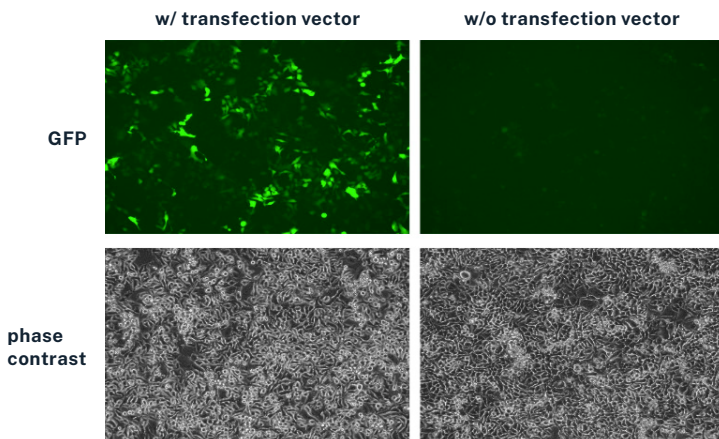


图 2. HeLa 细胞转染示意图。

细胞通过携带兔源 IgG 和 GFP cDNA 的载体转染 72 小时,通过荧光显微镜观察 GFP 表达确认两者共表达。

在 Opentrons Flex 上执行了自动化蛋白质纯化 (图 3)。首先使用平衡缓冲液 (200 μ L) 漂洗 Dynabeads™ Protein G 磁珠悬液 (50 μ L, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), 随后将其与各样品 (每份 200 μ L) 混合。将混合液置于集成式加热振荡模块上振荡两小时以捕获目标 mAb。接下来,使用洗涤缓冲液 (200 μ L) 对 Dynabeads-蛋白复合物进行两次洗涤,最后用洗脱缓冲液 (50 μ L) 洗脱蛋白。



- 板位 D1 - 热振荡模块及适配器(放置NEST 96孔深孔板, 2 mL)
- 板位 D2 - NEST 单孔储液槽 (290 mL)
- 板位 D3 - 温控模块及适配器(放置NEST 96孔深孔板, 2 mL) (若最终产物不立即进行 SDS-PAGE 分析)
- 板位 C1 - 环形磁力架
- 板位 C2 - Opentrons Flex 96 孔滤芯吸头盒 (1000 µL)
- 板位 C3 - NEST 12 孔储液槽 (15 mL) (1 号孔:磁珠悬液, 2 号孔:抗体溶液, 3 号孔:洗脱缓冲液)
- 板位 B1 - NEST 12 孔储液槽 (15 mL)
- 板位 B2 - NEST 96 孔深孔板 (2 mL)
- 板位 B3 - Opentrons Flex 96 孔滤芯吸头盒 (1000 µL)
- 板位 A1 - Opentrons Flex 96 孔滤芯吸头盒 (1000 µL)
- 板位 A2 - Opentrons Flex 96 孔滤芯吸头盒 (1000 µL)

图 3. Opentrons Flex 自动化蛋白质纯化方案的甲板布局示意图。从同一细胞培养物收集的洗脱液经合并后, 进行 SDS-PAGE 及 Western blot 分析。结果显示目标蛋白成功富集(图 4 上图), 并证实了 mAb 的存在(图 4 下图)。

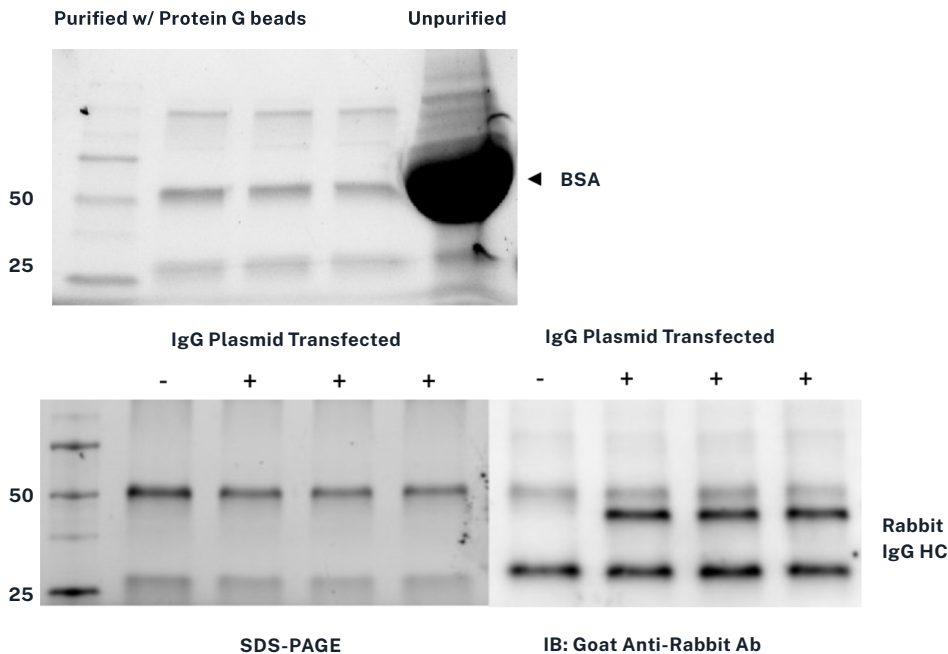


图 4. 通过 SDS-PAGE 和 Western blot 确认各洗脱液中纯化的兔源 IgG。纯化后, 非靶标蛋白水平显著降低(上图)。使用 IRDye® 680RD 山羊抗兔 IgG 二抗(LI-COR Biosciences, Lincoln, NE)检测兔源 IgG 的存在(下图)。

结论

Opentrons Flex 自动化移液工作站及其开源协议可用于实现蛋白质纯化的自动化流程, 包括收集来自蛋白表达系统的重组单克隆抗体(mAb), 以用于研究或临床应用。自动化方案为常规实验任务提供了便捷的解决方案, 既可显著降低人力需求, 亦可支持在基于 LC-MS 的蛋白质组学分析中集成复杂的工作流程。

www.opentrons.com.cn

☎ 0755-26417273

☎ 18098952246

✉ Marketing.china@opentrons.com

