

LC-MS 样品制备： 基于Opentrons Flex®的 自动化蛋白质酶解与纯化



作者

Opentrons Labworks, Inc.

引言

液相色谱-质谱联用技术 (LC-MS) 是表征蛋白质组的关键工具。然而, 其工作流程 (包括将蛋白质酶解为肽段、通过液相色谱进行分离以及利用质谱进行鉴定) 通常耗时且技术要求较高。在完成纯化、定量及均一化步骤后, 需对蛋白质进行酶解及样本纯化, 以制备适用于LC-MS分析的样本 (图1)。自动化这些工作流程可显著提升通量和可重复性。本研究采用 Opentrons Flex 自动化移液工作站的两套流程, 实现了蛋白质酶解及SP3样本纯化步骤的自动化。

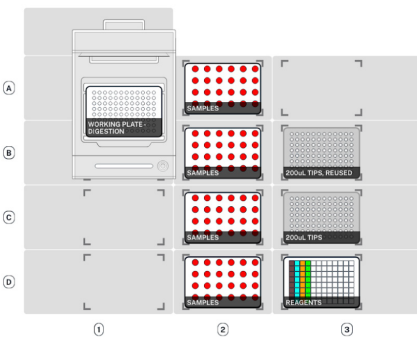
方法与结果

采用两个公开的运行程序, 在 Opentrons Flex 平台上实现了胰蛋白酶酶解及样本纯化的自动化操作 (图2)。蛋白质酶解方案首先将10 µg单克隆抗体 (溶于100 µL 100 mM 碳酸氢铵的纯化重组兔 IgG) 与10 µL二硫苏糖醇 (DTT; 60 mM) 混合, 随后在仪器搭载的热循环模块中于55°C孵育30分钟使蛋白质样本变性。继而向每个样本中加入10 µL碘乙酰胺 (IAA; 187.5 mM), 并于室温下再次孵育30分钟以完成烷基化反应。最后向每个样本中加入10 µL质谱级胰蛋白酶 (MS-grade trypsin; 0.2 µg/µL), 在热循环模块中于37°C孵育16小时进行溶液内胰蛋白酶酶解。



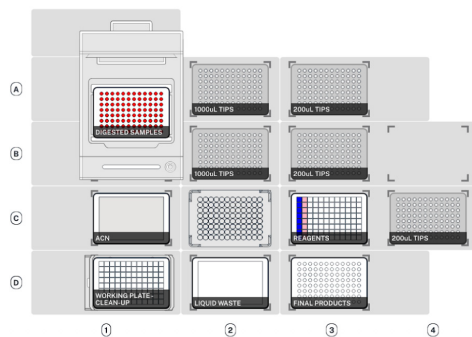
Figure 1. Opentrons Flex 自动化样品制备工作流程示意图。

本应用笔记重点阐述了该流程中的第三步: 蛋白质酶解与纯化。关于蛋白质纯化以及蛋白质定量与均一化的更多详情, 请参阅本系列其他应用笔记。



基于Opentrons Flex的胰蛋白酶酶解工作流程的甲板布局示意图

- 板位A1与B1 - Opentrons Tough 96 孔全裙边PCR板 (200 µL) 的热循环模块
- 板位A2至D2 - Opentrons 24 孔离心管架 (搭配 NEST 1.5 mL 离心管, 24×4) 或者
- 板位A2 - Opentrons Tough 96 孔全裙边PCR板 (200 µL)
- 板位B3 - Opentrons Flex 96 孔滤芯吸头盒 (200 µL)
- 板位C3 - Opentrons Flex 96 孔滤芯吸头盒 (200 µL)
- 板位D3 - NEST 96 孔深孔板 (2 mL)



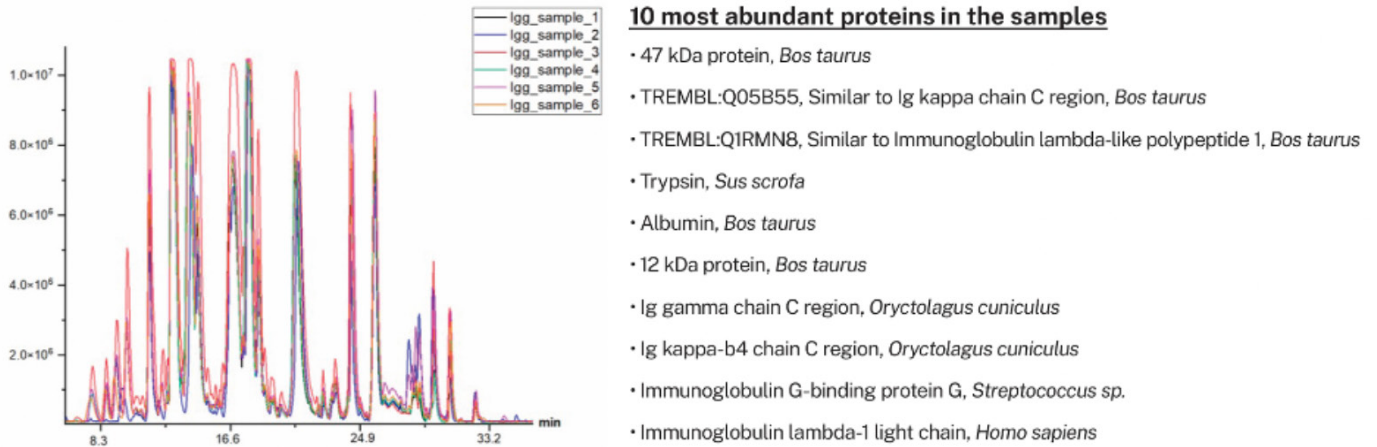
基于Opentrons Flex的酶解后样本纯化工作流程的甲板布局示意图

- 板位A1与B1 - 搭载Opentrons Tough 96 孔全裙边PCR板 (200 µL) (含酶解后样本) 的热循环模块
- 板位C1 - NEST 单孔储液槽 (290 mL)
- 板位D1 - 热振荡模块, 搭载Opentrons 96孔深孔板适配器及NEST 96孔深孔板 (2 mL)
- 板位A2 - Opentrons Flex 96 孔滤芯吸头盒 (1000 µL)
- 板位B2 - Opentrons Flex 96 孔滤芯吸头盒 (1000 µL)
- 板位C2 - 环形磁力架
- 板位D2 - NEST 单孔储液槽 (290 mL)
- 板位A3 - Opentrons Flex 96 孔滤芯吸头盒 (200 µL)
- 板位B3 - Opentrons Flex 96 孔滤芯吸头盒 (200 µL)
- 板位C4 - Opentrons Flex 96 孔滤芯吸头盒 (200 µL)
- 板位C3 - Opentrons Flex 96 孔滤芯吸头盒 (200 µL)

Figure 2. Opentrons Flex 自动化蛋白质酶解与纯化的甲板布局示意图

基于 Opentrons Flex 的自动化 SP3 脱盐流程与 LC-MS 分析结果

蛋白质酶解完成后, Opentrons Flex 即刻执行了自动化 SP3 脱盐方案。简言之, 酶解后样本从热循环模块转移至热振荡模块上的新工作板中, 并与10 μ L磁珠悬液(Cytiva Sera-Mag 羧基修饰磁珠; 50 μ g/ μ L)及乙腈(ACN, 1292 μ L)混合以实现肽段捕获。通过磁分离收集磁珠, 随后使用ACN(1000 μ L)进行洗涤。肽段在2% DMSO(80 μ L)中被洗脱。最终产物在仪器外进行真空干燥。LC-MS分析显示, 在各样品间基峰离子色谱图模式高度一致, 并且能够可靠地检测到与兔IgG亚基相关的蛋白质。(图3)。



Number of Proteins Detected						
	Sample #1	Sample #2	Sample #3	Sample #4	Sample #5	Sample #6
	33	37	41	34	34	39
<i>Oryctolagus cuniculus</i> IgG subunit						
	Score					
Ig gamma chain C region	403	529	554	507	360	442
Ig gamma chain C region	65	413	497	356	181	262

表 3.

三批经纯化与均一化的单克隆抗体样本进行酶解与脱盐处理(样本 #1 和 #4、#2 和 #5、#3 和 #6 分别为同一批次的一式两份), 并于纽约市立大学高级科学研究中心的 Bruker maXis-II ETD ESI-QqTOF/Dionex Ultimate-3000 LC 系统进行分析。图中展示了基峰强度色谱图(离子流强度 vs. 保留时间)(左上)及检测到的蛋白质(右上)。

总结

Opentrons Flex 自动化移液工作站及公开可用的实验方案可用于实现蛋白质酶解与 SP3 样本纯化的自动化操作, 并获得理想的样本处理质量。该方法为常规实验任务提供了便捷的解决方案, 有助于降低人力需求, 或将其整合到基于 LC-MS 的蛋白质组学分析的复杂工作流程当中。

www.opentrons.com.cn

☎ 0755-26417273

☎ 18098952246

✉ Marketing.china@opentrons.com

