

LC-MS 样品制备： 基于 Opentrons Flex® 的自动化蛋 白质浓度定量与均一化处理

作者
Opentrons Labworks, Inc,

引言

样品中目标蛋白的纯化与鉴定是蛋白质组学研究的基石。分离后，总蛋白的浓度定量与均一化处理可为后续液相色谱-质谱 (LC-MS) 分析的样品酶解及纯化步骤建立基准 (图1)。自动化完成这些必要步骤中的重复移液操作，可显著提升实验通量并为研究人员节省宝贵时间。本研究作为自下而上蛋白质组学完整工作流程的关键环节，采用 Opentrons Flex 自动化移液工作站的两套流程，实现了已纯化的单克隆抗体的自动化定量与均一化处理。

方法与结果

使用两个公开的运行程序自动执行单克隆抗体样品的定量和均一化 (图2)。将从三种细胞培养物中收集的纯化单克隆抗体 (六个复孔)、两倍稀释的 BSA 标准品以及 BCA 试剂 (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 手动加载到 Opentrons Flex 平台上。工作站执行了 BCA 工作液的制备以及工作液与样品或标准品的混合 (每个反应 200 μ L 工作液 + 25 μ L 样品/标准品)，随后在热振荡模块上进行短暂振荡并在 37°C 孵育 30 分钟。然后通过板式吸光度读数器模块在 562 nm 处测量吸光度。生成标准曲线并估算三种纯化单克隆抗体的浓度 (图3)。

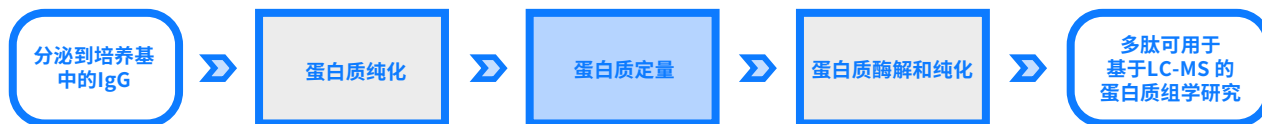
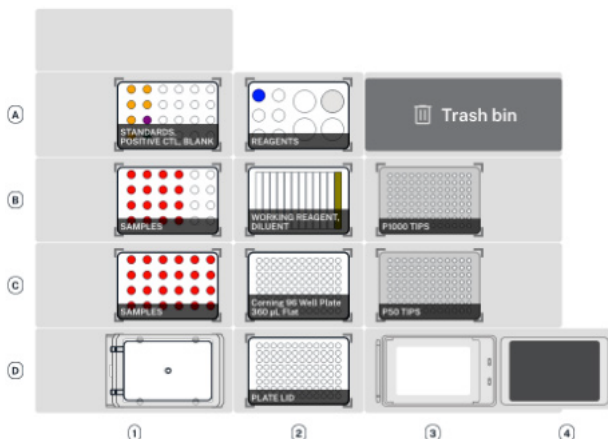


图 1. Opentrons Flex 自动化样品制备工作流程示意图。

本应用笔记将重点详述该流程的第二步——蛋白质浓度定量与均一化处理。关于蛋白质纯化及蛋白质酶解与纯化的详细信息，请参阅本系列其他应用笔记。

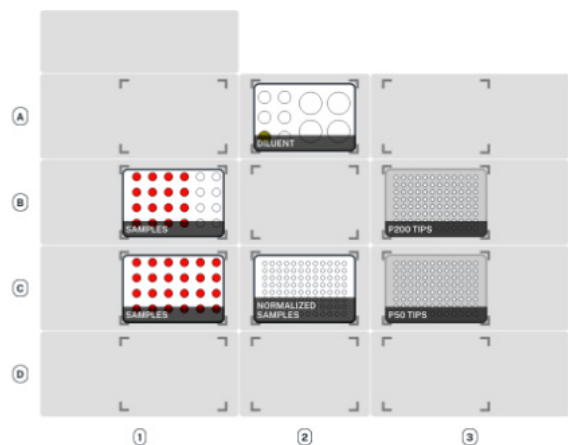
蛋白质浓度定量与均一化处理 - 第一部分： Pierce BCA 蛋白浓度检测



- 板位 C2 - Corning 96 孔平底板 360 μ L 或类似耗材
- 板位 D2 - Corning 96 孔平底板 360 μ L 或类似耗材的板盖
- 板位 D1 - 热振荡模块 (搭配通用平底适配器)
- 板位 C1 - Opentrons 24 孔离心管架 (搭配 NEST 1.5 mL 离心管, 最多 24 个样品) 或 NEST 96 孔深孔板 (2 mL)
- 板位 B1 - Opentrons 24 孔离心管架 (搭配 NEST 1.5 mL 离心管) (若样本数 > 24)
- 板位 A1 - Opentrons 24 孔离心管架 (搭配 NEST 1.5 mL 离心管) 或 Opentrons Tough 96 孔全裙边 PCR 板 (200 μ L) 或 NEST 96 孔深孔板 (2 mL)
- 板位 A2 - Opentrons 10 孔离心管架 (搭配 NEST 4 \times 5 0 mL 及 6 \times 15 mL 离心管)
- 板位 C3 - Opentrons Flex 96 孔滤芯吸头盒 (50 μ L)
- 板位 B3 - Opentrons Flex 96 孔滤芯吸头盒 (1000 μ L)
- 板位 D3 - 板式吸光度读数器模块

图 2. Opentrons Flex 自动化蛋白质定量和均一化的甲板布局示意图。

蛋白质浓度定量与均一化处理 - 第二部分： 均一化样本制备



- 板位 C2 - Opentrons Tough 96 孔全裙边PCR板 (200 μ L)
- 板位 C1 - Opentrons 24 孔离心管架 (搭配 NEST 1.5 mL 离心管 (最多 24 个样品) 或 NEST 96 孔深孔板 (2 mL))
- 板位 B1 - Opentrons 24 孔离心管架 (搭配 NEST 1.5 mL 离心管) (若样本数 > 24)
- 板位 A2 - Opentrons 10 孔离心管架 (搭配 NEST 4 \times 50 mL 及 6 \times 15 mL 离心管)
- 板位 C3 - Opentrons Flex 96 孔滤芯吸头盒 (50 μ L)
- 板位 B3 - Opentrons Flex 96 孔滤芯吸头盒 (200 μ L)

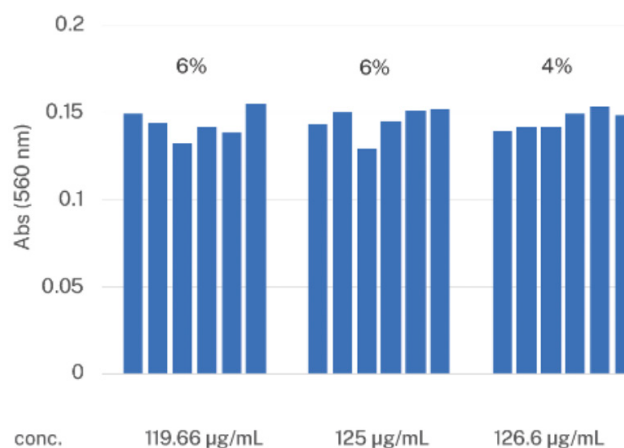
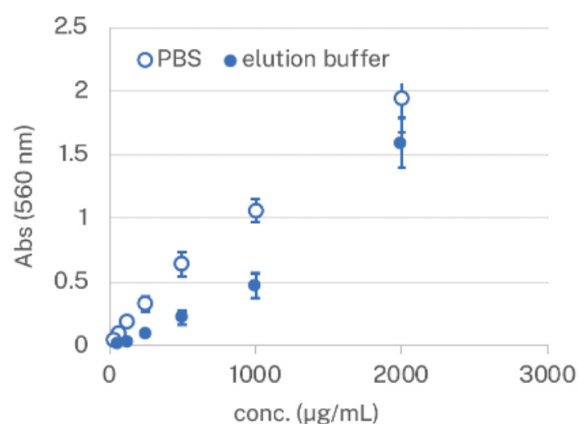


Figure 3. 通过BCA法蛋白浓度检测估算纯化产物中的IgG浓度。

实验首先采用牛血清白蛋白 (BSA) 在 PBS 或洗脱缓冲液中进行连续两倍梯度稀释 (左图, 起始浓度: 2000 μ g/mL, n=4) 以建立标准曲线, 随后将各样本的吸光度值拟合至该标准曲线 (右图, n=6)

均一化流程计算了样本与稀释液 (100 mM 碳酸氢铵) 所需体积, 并通过移液制备含有均一浓度单克隆抗体 (100 ng/ μ L) 的新微孔板。

结论

Opentrons Flex 自动化移液工作站及公开可用的实验方案可用于自动化蛋白质定量 (例如 BCA 检测) 及均一化处理, 从而将目标蛋白稀释至所需浓度。这种自动化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

