

自动化工作流程： 用于多重LC-MS分析的蛋白质 酶解、串联质谱标签 (TMT) 标记与纯化处理

作者

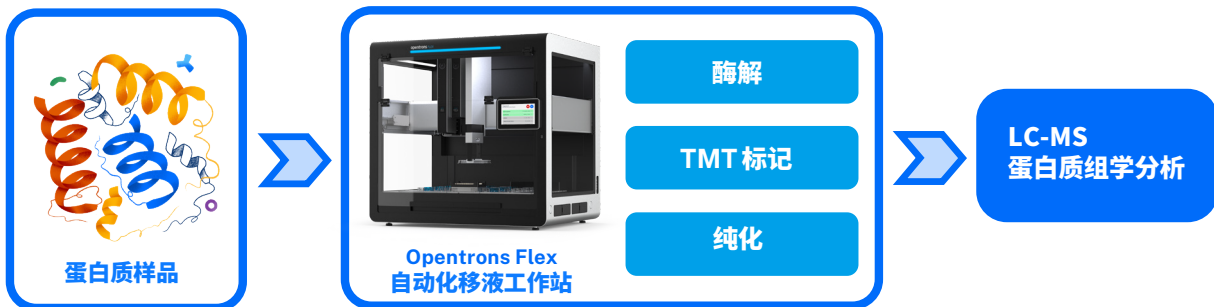
Boren Lin and Kinnari Watson, Ph.D.

Opentrons Labworks Inc., 45-18 Court Square W., New York, NY 11101, USA

引言

蛋白质酶解与纯化处理是基于质谱 (MS) 的蛋白质组学研究中获得高质量肽段的关键步骤。该过程耗时耗力。为了能够实现多样本同步分析、提高通量并减少批次间差异, 有时候会使用串联质谱标签 (TMT) 进行样本多重标记, 这进一步增加了实验台操作的复杂性。

肽段样本制备的实验室自动化可显著减少手动操作时间, 最大限度降低人为错误风险, 并提高通量。本文介绍一种在 Opentrons Flex® 平台上实现的全自动工作流程, 用于胰蛋白酶/Lys-C 介导的蛋白质酶解、基于磁珠的纯化处理, 以及使用市售试剂盒进行 TMT 标记。



方法

1. 将样品 (纯化的牛血清白蛋白 BSA 或 HeLa 细胞裂解液)、试剂 (EasyPep Magnetic MS Sample Prep Kit 和 TMT Mass Tagging Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 以及配套耗材手动装载至 Opentrons Flex® 移液工作站上。
2. 在配备全集成式热循环模块 (提供精确温度控制) 的 Opentrons Flex® 平台上, 开发并优化了两个操作流程:
 - 流程 #1: 蛋白质酶解与 TMT 标记 (图1)
 - 流程 #2: 样本纯化处理 (图2)
3. 通过 LC-MS 分析评估最终产物的质量。

Sample Prep for MS (EasyPep Digestion and TMT Labeling)

[DOWNLOAD](#)
[SHARE](#)
[PRINT](#)

This protocol performs protein digestion by using EasyPep Magnetic MS Sample Preparation Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and peptides labeled by using TMT Mass Tagging Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), for proteomic MS analysis, followed by sample clean-up: [Sample Prep for MS \(EasyPep Cleanup\)](#)

https://library.opentrons.com/p/easypep_digest_tmt

Sample Prep for MS (EasyPep Cleanup)

[DOWNLOAD](#)
[SHARE](#)
[PRINT](#)

This protocol performs sample clean-up by using EasyPep Magnetic MS Sample Preparation Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for proteomic MS analysis, following protein digestion and TMT labeling: [Sample Prep for MS \(EasyPep Digestion and TMT Labeling\)](#)

https://library.opentrons.com/p/easypep_cleanup

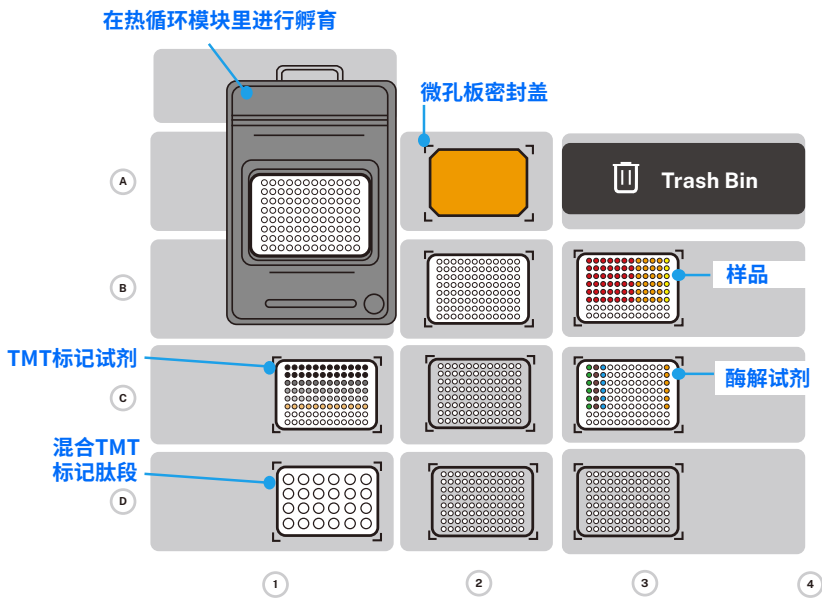


图 1. 流程 1: 蛋白质酶解和 TMT 标记。Flex 甲板布局 (左) 和工作流程 (右)。

蛋白质酶解

- 加入还原试剂
- 加入烷基化试剂
- 50°C 孵育
- 加注酶试剂
- 37°C 孵育

TMT 标记

- 加注TMT试剂
- 室温孵育
- 加注5%轻胺
- 室温孵育

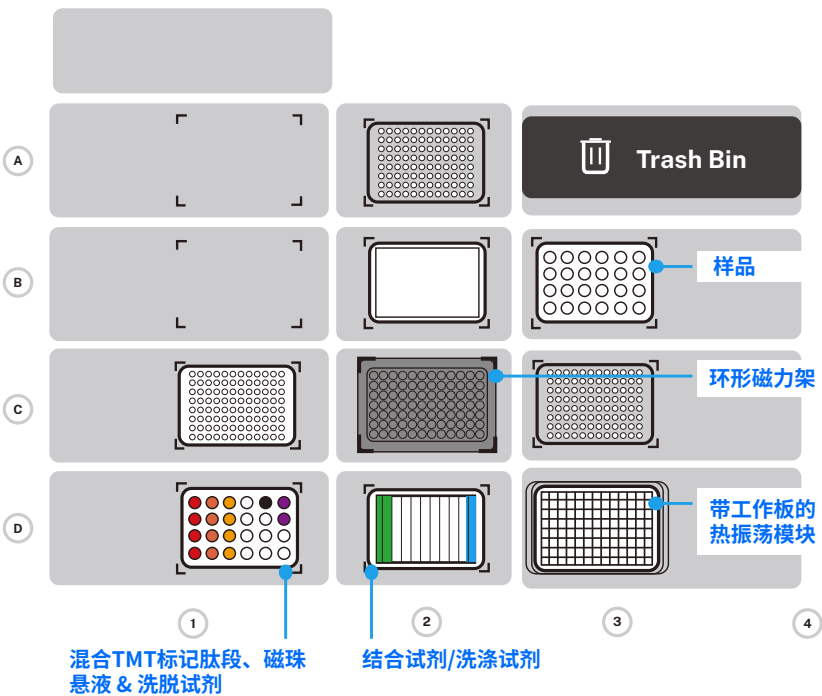


图 2. 流程 2: 样品纯化。Flex 甲板布局 (左) 和工作流程 (右)。

样品纯化

- 洗涤磁珠
- 结合肽段
- 洗涤肽段
- 洗脱肽段

结果

使用BSA进行流程验证(图3)

1. 每个样本中,纯化的牛血清白蛋白(BSA)经酶解后,分别用TMT2-126或TMT2-127等质量的同位素标记,按1:1比例混合,并经脱盐处理后进行LC-MS分析。
2. 通过Opentrons Flex进行的三次独立测试数据显示,TMT标记效率保持稳定均一(127/126比值平均值为1.039),与标准手动操作流程结果相当。

127/126 ratio	
Flex #1	0.926
Flex #2	1.045
Flex #3	1.145
手动操作	0.98

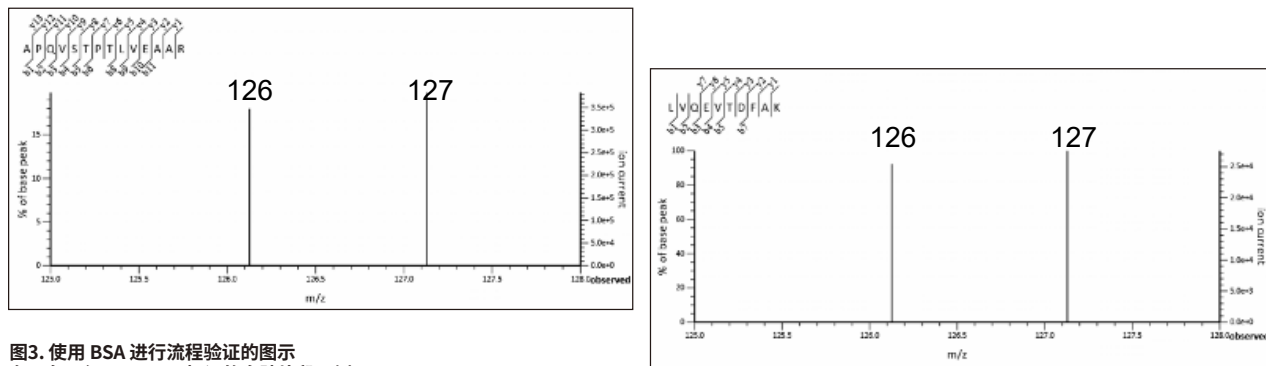


图3. 使用 BSA 进行流程验证的图示

左下角: 经不同 TMT 标记的多肽片段示例;

右上角: 通过 Opentrons Flex 处理的3次测试 (Flex #1-#3) 及按供应商方案手动处理的1次测试中, TMT2-127 与 TMT2-126 标记的 BSA 酶解产物比值对比

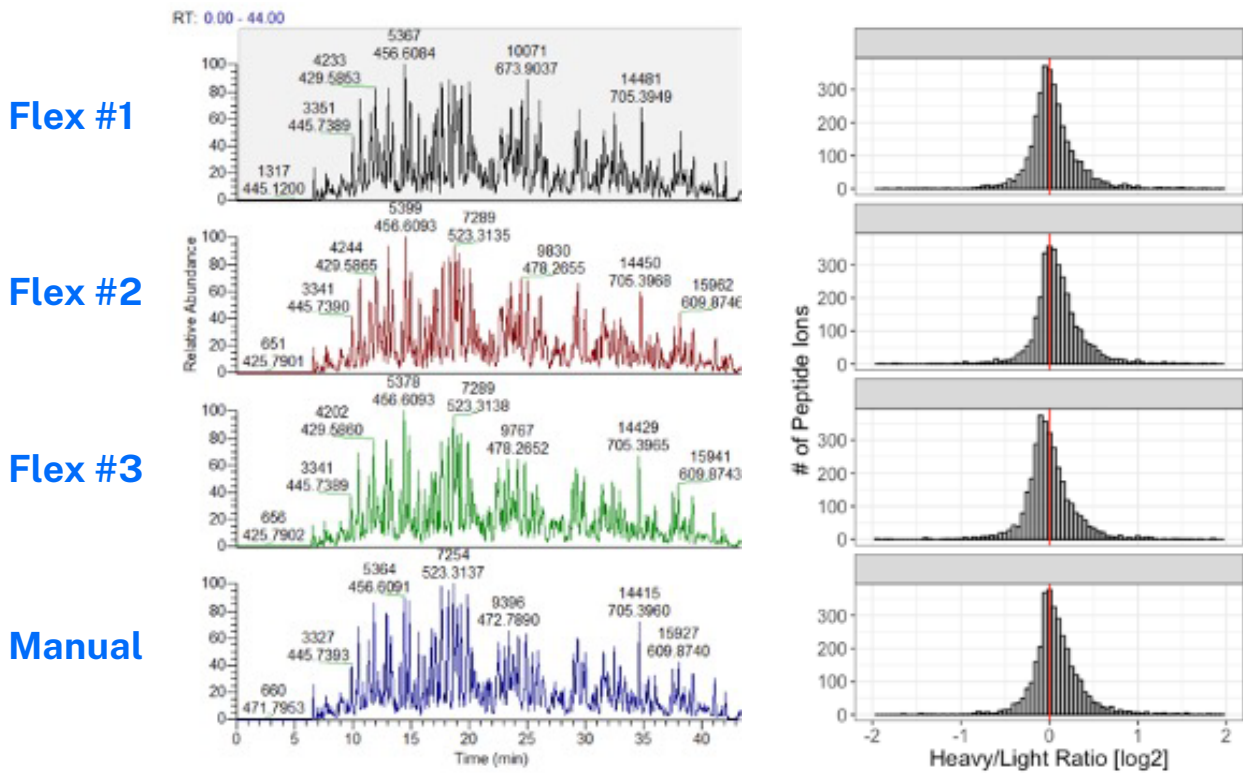
结果

HeLa 细胞裂解物的样品制备(图 4)

每个样品取两批 HeLa 细胞裂解物(100 μ g) 进行酶解, 分别用 TMT6-127 和 TMTzero 同位素标签标记, 按 1:1 比例混合后脱盐, 随后进行 LC-MS 分析。

酶解后的肽段被两种同位素 TMT 完全标记(标记效率 99%), 且两种标记的比例接近 1:1(重标 / 轻标比例 \approx 1)。

在 3 次独立实验中(均使用 Opentrons Flex 处理样品), 基峰色谱图的良好对齐及包括多重标记效率在内的其他数据均保持一致。数据与手动操作流程相当, 表明该自动化工作流程具有较高准确性。



		前体离子计数			
		Flex #1	Flex #2	Flex #3	手动操作
TMT6-127	完全标记	3009	2932	3111	3032
	部分标记	25	31	27	29
	未标记	0	0	0	0
	标记效率	99%	99%	99%	99%
TMTzero	完全标记	3086	3218	3124	3214
	部分标记	21	20	17	21
	未标记	10	5	6	7
	标记效率	99%	99%	99%	99%

图4. HeLa 细胞裂解液样本制备结果。

左上：基峰色谱图；右上：两种 TMT 标记肽段比值（TMT6-127：重标；TMTzero-126：轻标）；右下：使用 Opentrons Flex 处理的3次测试（Flex #1-#3）及按供应商方案手动处理的1次测试的标记效率对比。

结论

基于 Opentrons Flex® 开发的完整肽段制备工作流程，实现了 TMT 辅助多重 LC-MS 分析的全自动化操作，具备良好的一致性、更高通量及优质样本处理能力。该自动化方案显著减少了手动操作时间，只需小于10分钟的试剂准备和耗材装载，大大节省了宝贵的实验台时间。

www.opentrons.com.cn

☎ 18098952246

✉ Marketing.china@opentrons.com



Trademarks: Opentrons®, Opentrons Flex®, Opentrons drop logo (Opentrons Labworks, Inc.). Registered names, trademarks, etc. used in this document, even when not specifically marked as such, are not to be considered unprotected by law. MAY 2025 © OPENTRONS 2025. ALL RIGHTS RESERVED