在Hamilton® Microlab STAR™工作站上集成复杂多方法工作流程——基于INtip™化学技术的应用

Todd Mullis[1], Michael Walla[1], Jingyun Lee[2], Cristina Furdui[2], Casey Snodgrass[3], Qian Wang[1], L. Andrew Lee[4*]

[1]University of South Carolina, Department of Chemistry and Biochemistry, Columbia, SC; [2]Proteomics and Metabolomics Shared Resource, Wake Forest School of Medicine, Winston-Salem, [3]Hamilton Company, Reno, Nevada; [4]Integrated Micro-Chromatography Systems, Inc., Irmo, SC

引言

将复杂的多步骤方法自动化需要具备实验室科学、机器人编程技能和实验设计专业知识的人员。必须投入大量时间来规划工作流程，并将该方法转移至自动化平台，而获取这些资源可能颇具挑战性。

在此以复杂的磷酸肽富集方法为例，将从粗提细胞裂解液开始，到液相色谱-质谱(LC-MS)分析处理好的样品的整个过程实现全流程自动化：

- 自动化细胞裂解液处理
- 支持小规模（8+样本）至大规模样本的连续处理
- 基于 INtip 化学技术的多步固相萃取流程
- 图形用户界面（GUI）提供的可选功能与变量设置
- 模块化预编程方案：支持蛋白质酶解、肽段脱盐及磷酸化肽段富集步骤的全流程运行或三阶段独立运行

方法

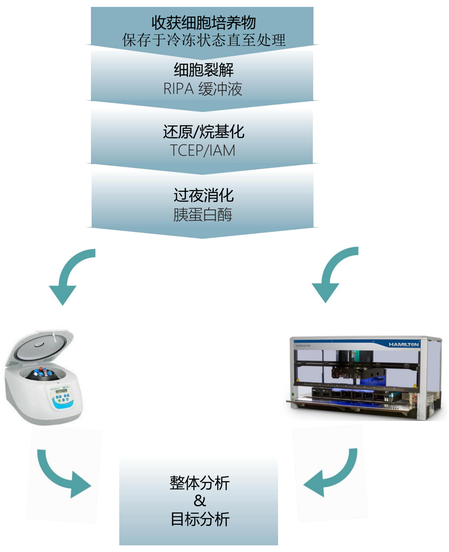


图1 脱盐和磷酸肽富集的一般工作流程

- HCT116细胞培养于Gibco™ DMEM/F-12培养基（含15 mM HEPES，并添加10%胎牛血清）
- **细胞传代**：当细胞融合度达80-90%时，使用胰蛋白酶/EDTA消化处理.
- **预处理**：细胞至少传代5次后，用10 mM H_2O_2或H_2O_2/Na_3VO_4处理30分钟
- **细胞裂解**：使用含蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物的RIPA裂解液裂解细胞.
- **蛋白质还原与烷基化**：加入10 mM TCEP，56°C 还原 30 分钟；随后加入 25 mM 碘乙酰胺，避光烷基化 30 分钟；最后以 1:50（酶:蛋白）的比例加入胰蛋白酶，37°C 过夜酶解。
- **磷酸化肽段富集**：采用 TiO_2 基质的离心柱法，按厂商推荐流程操作
- **自动化样本处理**：
  - ›在 Hamilton Microlab STAR 工作站上，使用填充聚苯乙烯-二乙烯基苯聚合物（PS-DVB）的 IMCStip 进行脱盐；
  - ›随后使用 300 µL IMCStip（填充两种磷酸化肽段富集树脂：ZrO_2、PolyTi及1:1 PolyTi /ZrO_2混合模式）进行富集。

表1 磷酸肽的质谱分析

	Global Analysis	Targeted Analysis
Mass spectrometer	Orbitrap Velos Pro, Thermo Fisher	TSQEndura
Liquid chromatography	Ultimate 3000 nano-UHPLC	Vanquish UHPLC
Mobile phase A	0.1% formic acid in water	0.1% formic acid in water
Mobile phase B	0.1% formic acid in 80% acetonitrile	0.1% formic acid in acetonitrile
LC gradient	2% - 30% B for 60 min	2%-35% for 10 min
Analytical column	50-cm in-house packed column [360 µm OD x 75 µm inner diameter (ID)] with C18 resin (2.2 µm, 100 A; Michrom Bioresources)	Waters BEH C18 (100 x 2.1 mm, 1.7 µm)
Column oven temperature	50°C	40°C

Global Analysis 整体分析

- **质谱（MS）**：采用数据依赖性扫描模式，对全扫描（Full MS）中强度最高的15个离子进行MS/MS碎裂分析，并设置动态排除时间为10秒。
- **数据库检索**：使用 Proteome Discoverer v2.2（Thermo Scientific）软件中的 Sequest HT算法，结合 UniProt人类蛋白质FASTA数据库（2017年3月版，20,119条条目）进行谱图检索。
- **仪器类型**：FT-trap（傅里叶变换离子阱）
- **母离子质量误差**：10 ppm
- **碎片离子质量误差**：0.02 Da（单同位素质量）
- **可变修饰**：
  - ›甲硫氨酸氧化（+15.995 Da）
  - ›丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸磷酸化（+79.966 Da）
- **固定修饰**：半胱氨酸氨基甲酰化（+57.021 Da）

Targeted Analysis 靶向分析

- **磷酸化肽段富集验证**：
  - ›在胰蛋白酶消化的牛血清白蛋白（BSA）样本中，加入 3种标准磷酸化肽段 进行富集。
  - ›重复性测试：每周进行 8次重复分析，持续3周，且每周重新执行富集流程。

RESULTS



图2. 分散移液萃取（DPE）是一种固相萃取技术，通过移液枪头内的湍流混合实现高效固相萃取。其工作原理如下：

（A）枪头内松散填充的树脂 在液体样本吸入时

（B）分散悬浮，从而增大接触面积。

（C）Hamilton Microlab STAR 工作站上的 IMCStips 可实现高通量固相萃取，配套脚本提供直观的图形用户界面（GUI）以实现自动化操作：

（D）主界面：提供缓冲液分装、肽段脱盐及磷酸化肽段富集的选项。

（E）参数设置页：可调整磷酸化肽段富集各步骤的溶液体积和混合循环次数。

（F）自动化方法的台面布局：显示运行脚本前耗材（如IMCStips、试剂板）的放置位置。

流程优化细节：缓冲液分装功能将批量试剂转移至96孔板，无需手动移液。

肽段脱盐通常在磷酸化肽段捕获前进行，该方法支持独立运行。

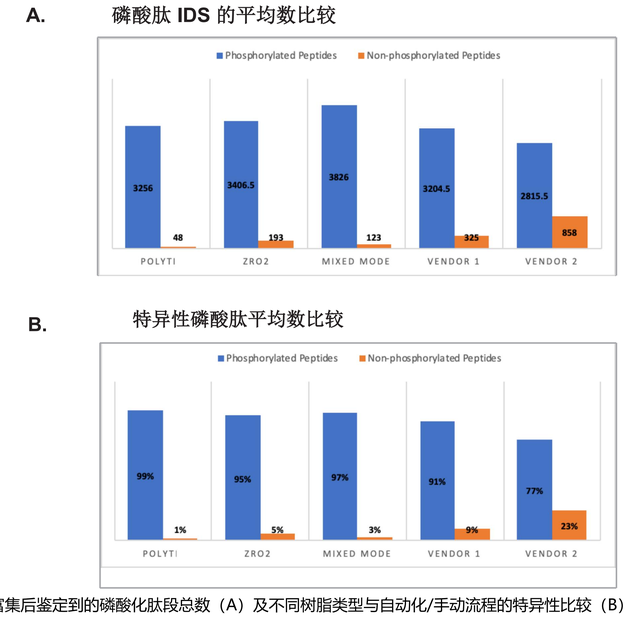


图3. 富集后鉴定到的磷酸化肽段总数（A）及不同树脂类型与自动化/手动流程的特异性比较（B）

- 自动化流程：样本 POLYTI、ZRO2、MIXED MODE 使用 IMCStips 通过自动化磷酸化肽段富集方法处理。
- 手动流程：样本 VENDOR 1 和 VENDOR 2 按厂商推荐方案操作。
- 重复实验：所有样本均进行 双重复分析，图中数据为两次运行的平均值。

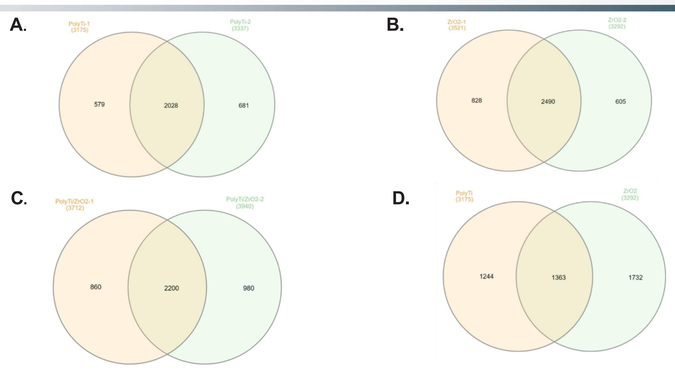


图4. 重复样本富集的磷酸化肽段重叠情况韦恩图

重复样本富集结果：(A)PolyTi树脂（B）ZrO_2树脂 (C) 混合树脂（D）PolyTi 与 ZrO_2树脂间比较

重复样本间磷酸化肽段平均重叠率：依次为76%、78%、71%。树脂间比较 仅显示48%的磷酸化肽段重叠率。

预期差异说明：由于两种树脂对单磷酸化和双磷酸化肽段的富集偏好不同，这一重叠率的降低符合预期。

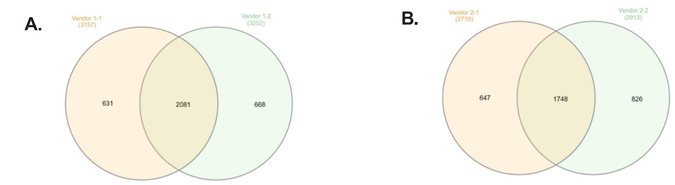


图5. 使用离心柱重复富集的磷酸化肽段重叠情况韦恩图

复样本富集结果显示：(A) SC1（B) SC2

重复样本间磷酸化肽段平均重叠率：依次为76%、70%。

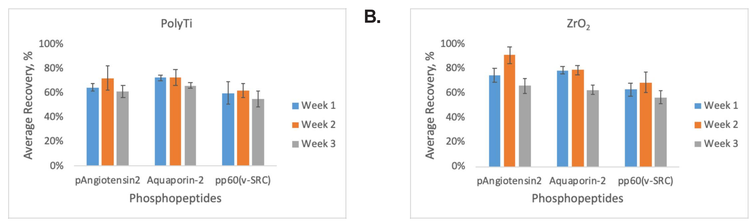


图6. 三种不同磷酸化肽段的平均回收率及MRM检测结果

（基于每周一次的实验，持续三周，分别使用：(A) PolyTi树脂和(B) ZrO_2树脂，每周n=8）

结论

我们开发了一种基于两种树脂的 IMCStips 的全自动磷酸化肽段富集方法，能够实现从细胞裂解液到磷酸化肽段样本的可重复制备。该方法可直接整合至Hamilton Microlab STAR工作站，无需额外硬件支持。

- 鉴定超过3000种磷酸化肽段
- 磷酸化肽段特异性>90%
- 样本间重叠率>70%
- 通过MRM检测获得可重复的定量结果

该自动化方案为复杂多步骤实验建立了标准化流程，具有以下优势：

- 操作一致性 - 确保实验可重复性
- 使用便捷性 - 研究人员可专注于数据分析和实验设计
- 技术替代性 - 有效替代繁琐的手工操作流程

REFERENCES

1. *Ardito, F.; Giuliani, M.; Perrone, D.; Troiano, G.; Lo Muzio, L., The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). Int J Mol Med 2017, 40 (2), 271-280.*
2. *Riley, N. M.; Coon, J. J., Phosphoproteomics in the Age of Rapid and Deep Proteome Profiling. Anal Chem 2016, 88 (1), 74-94.*
3. *Richardson, B. M.; Soderblom, E. J.; Thompson, J. W.; Moseley, M. A., Automated, reproducible, titania-based phosphopeptide enrichment strategy for label-free quantitative phosphoproteomics. J Biomol Tech 2013, 24 (1), 8-16.*
4. *Matheron, L.; van den Toorn, H.; Heck, A. J.; Mohammed, S., Characterization of biases in phosphopeptide enrichment by Ti(4+)-immobilized metal affinity chromatography and TiO2 using a massive synthetic library and human cell digests. Anal. Chem. 2014, (86), p8312—8320.*
5. *Negroni, L.; Claverol, S.; Rosenbaum, J.; Chevet, E.; Bonneu, M.; Schmitter, J. M., Comparison of IMAC and MOAC forphosphopeptide enrichment by column chromatography. J Chromatogr BAnalyt Technol Biomed Life Sci 2012, 891-892, 109-12.*

**Contact: Todd Mullis, Graduate student. – Todd.Mullis@imcstips.com*

Artwork and layout created by Sarah Woods and Cassie Benzinger.

© 2019 IMCS, Inc. All rights reserved. IMCSzyme is a registered trademark of Integrated Micro-Chromatography Systems, Inc.