

Application Note

EVUSEP

A complete, automated Opentrons OT-2 loading protocol for **simplified sample loading of Evotip Pure**

1. 引言

随着高通量蛋白质组学的发展，人们对标准化和简化的工作流程的需求日益增长。通过自动化操作可以消除人为误差并减少数据差异。Opentrons OT-2 (OT-2) 样品前处理仪器是一个低成本和开源的仪器平台，它轻松实现End to End工作流程的开发和联用。其他前处理仪器通常价格昂贵，且独特的设计限制了仪器只能在特定应用中使用。为了迈向End to End工作流程，我们开发了一个简单且易于自动化的Evotips样品加载流程，该流程采用“分层三明治”的方法，在层之间有气隙（图1）。然后使用OT-2移液器将其推出Evotip，持续100秒，而后在Evosep One上进行上样。自动装样方案依赖于确定的样品体积为20 μL 和溶剂A体积分别为15 μL 和150 μL ，以保持夹层的完整。该流程方法已转换为易于使用的HTML表单，可生成在Opentrons应用中使用的完整python脚本。它允许用户在单次运行中加载8到288个Evotips。

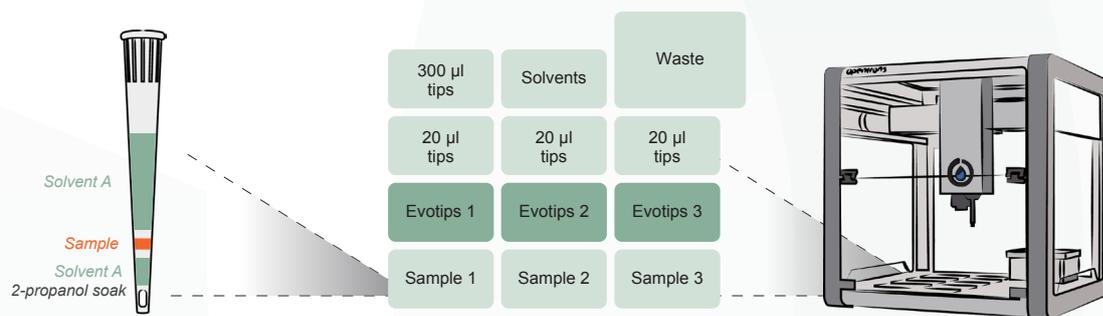


图1：用于自动化Evotip Pure样品加载的OT-2前处理仪器对应位置。

2. 方法详述

HeLa细胞在DMEM培养基中培养，而后在沸腾的5%十二烷基硫酸钠（SDS）缓冲液中灭活。样品制备采用磁珠的蛋白质富集捕获（PAC），随后在磁珠上进行胰蛋白酶酶解消化。肽段浓度使用NanoDrop A280 nm进行估算。将30 μ L的样品转移到96孔板（Eppendorf, 0030129512）中的所有孔中。根据Evotips的加载数量，最多可以将三个板放置分别在OT-2的4、5和6位置。在位置11中的12孔储液器中（USA Scientific, 1061-8150）放置了一个溶剂板。将18 ml的溶剂A转移到溶剂板中的第1列，以确保可以加载一盒Evotip的量。当样品加载量增加到两盒时，将18 ml的溶剂A转移到第2列和第3列，依次类推。对于2-丙醇，加载1、2和3盒Evotip，分别向第12、11和10列中添加了6 ml。使用Evotip加载套件（OT-2）适配器托盘（Evosep, EV1144）将相应的Evotips放置在位置1、2和3上。Opentrons 300 μ L枪头（Opentrons, 999-00009）放在位置10，而Opentrons 20 μ L枪头（Opentrons, 999-00007）放在位置7-9。使用P20 8通道移液器GEN2（Opentrons, 999-00005）放置样品，使用P300 8通道移液器GEN2（Opentrons, 999-00006）进行液体转移并推动“夹层三明治”液体通过Evotips。使用Aurora Elite色谱柱（IonOpticks, AUR3-15075C18-CSI）柱温50°C进行Whisper 40 SPD方法的稀释曲线测定。使用EV1109色谱柱（Evosep）在40°C进行100 SPD方法来测定两个Opentrons仪器的平行性，使用EV1107色谱柱（Evosep）在室温下进行500 SPD方法的稳健性研究。所有样品均在timsTOF Pro 2质谱仪（Bruker）上进行分析，采用dia-PASEF并使用DIA-NN（版本1.8.1）在library-free模式下针对经过审核的人体蛋白质组（UniProt, 2021年11月，20,360条条目，不包括异构体）进行分析，使用trypsin/P作为消化酶并启用MBR。

3. 灵敏度

我们将OT-2样品加载流程与常规使用离心机的流程方法下处理的样本进行上机检测，对比灵敏度的差异，使用这两种方法分别加载了1、5、10、20和50 ng HeLa肽段，各四个重复样本，并使用Whisper 40 SPD方法进行验证。这两个加载流程在不同上样量的情况下进行对比，得到了相似的蛋白组数量，从1 ng肽段中检测平均3,100个蛋白，从50 ng肽段中检测到7,000个蛋白。这表明与手动加载前处理流程相比，自动化样品前处理加载流程具有类似的灵敏度（图2）。

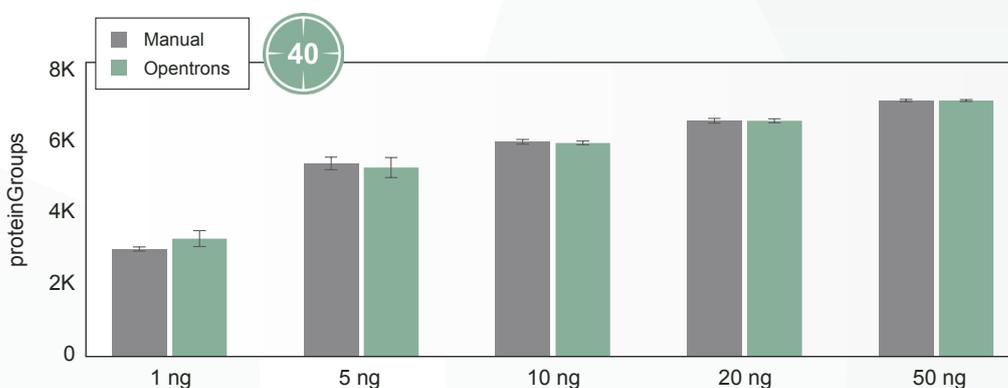


图2： OT-2与常规使用离心机的样品加载流程流程下处理的样本灵敏度对比。

4. 稳健性

接下来，我们在OT-2上进行288个Evotips的操作，评估了该流程的稳健性和重复性。使用自动化上样50 ng HeLa的Evotips，并用我们目前最快的方法进行分析(每天处理500个样品)。数据显示，在288个Evotips中平均识别得到2,500个蛋白质组，表明OT-2稳健的蛋白质组覆盖水平。(图3)。此外，数据中没有观察到较大差异。

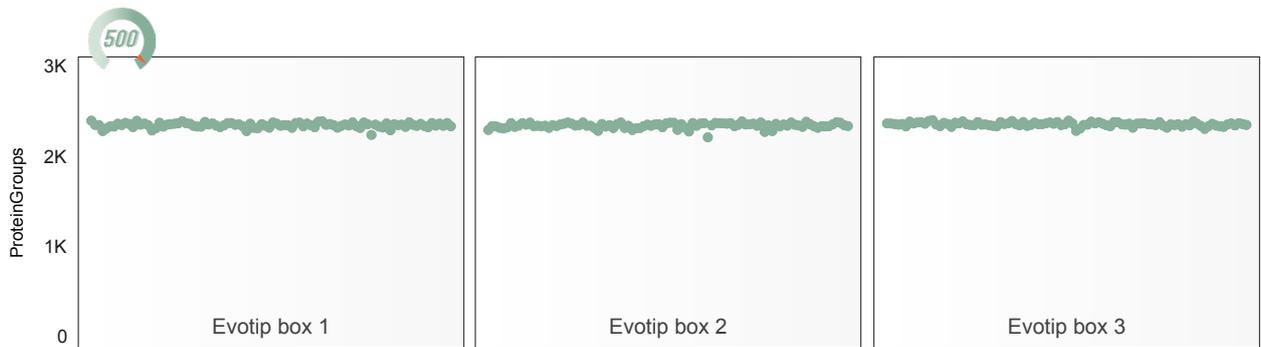


图3： 使用OT-2自动化上样的三盒Evotips以评判其稳健性。

5. 仪器之间的重复性

由于在一台OT-2上观察到了很好的稳健性和重复性，我们检测另一台OT-2是否也是如此。使用两台不同的OT-2进行有样本自动加载流程，HeLa上样量50 ng，6个重复样本，并使用100 SPD方法进行分析。可以看出在OT-2的两台平行仪器上，平均识别了33,000个前体物(图4)。比较表明，两个OT-2仪器之间的处理差异低于10%，表明不同的OT-2上可重复加载Evotips，进行稳健的样本前处理。

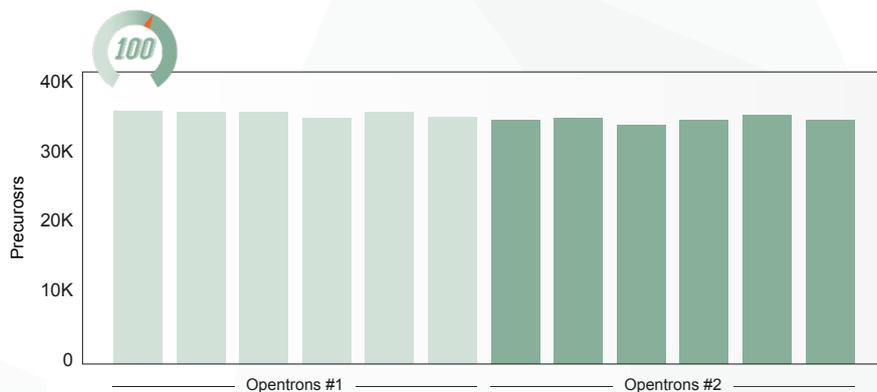


图4： 使用50 ng HeLa和100 SPD方法比较两台OT-2前处理仪器。

6. 结论

使用OT-2进行的自动加载流程与Evosep One的连用，使高通量分析中的稳健性和可重复性更高。数据显示，自动化上样流程是对Evotip Pure进行稳健和可重复上样的有效方案。我们展示了自动加载流程具有出色的灵敏性，使用Whisper 40 SPD方法在Bruker timsTOF Pro2上从1 ng肽段中检测到3,100个蛋白质，从50 ng肽段中检测到7,000个蛋白质，结果与手动加载方法相似。自动加载流程一次运行可同时操作高达288个Evotip（3盒Evotip），并具有很高的可重复性。最后，比较不同前处理仪器之间的重复性时，我们发现两个OT-2平台之间已识别前体物的差异低于10%。这种自动加载流程不仅有助于标准化样品前处理，还为End to End工作流程打开了大门。

Opentrons-2自动上样流程的获取

运行该协议需要Evotip加载套件适配器和托盘（Evosep，EV1144）。可以在一次运行中加载多达三盒Evotip。流程生成器允许您选择相应加载的Evotip数量、样品吸头位置以及是否重复使用它们，最后是溶剂吸头位置。生成的流程可以导入并通过Opentrons应用程序运行。生成器和相关信息可以在www.evosep.com/support/automation网站上获取。