

LABORWELT

Nr. 1 / 2007 - Vol. 8

Das BioTechnologie -Themenheft

Analyse: Einfluss von Kunststoffprodukten auf Assay-Resultate

Automatisierter Protein-in Gel-Verdau für MALDI-TOF-MS

Labor-Automation

Automationslösung für die Herstellung synthetischer Gene

**Marktübersicht:
Workstations**

Vollautomatische DNA- und Protein-Aufreinigung

Herausforderungen an das siRNA-Design

Verbessertes System für die ultraschnelle DNA-Sequenzierung



BIOCOM AG

Automatisierter Protein-In-Gel-Verdau für MALDI-TOF-MS

Olaf Jahn, Dörte Hesse, Thomas Liepold, Marina Reinelt, Hartmut D. Kratzin,
Arbeitsgruppe Proteomics, Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen

Eine Grundlagentechnik der modernen Proteomforschung ist die 2D-Gelelektrophorese mit nachgeschaltetem proteolytischen In-Gel-Verdau der separierten Proteine und Peptidanalyse mittels Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS). Der In-Gel-Verdau ist ein Engpass für Proteomanalysen in größerem Maßstab und bietet sich daher für eine Automationslösung an, wobei sehr hohe Anforderungen an Setup und Validierung gestellt werden. Wir haben zusammen mit Tecan auf Basis des Pipettierroboters Genesis ProTeam 150 eine innovative Automationslösung entwickelt (siehe Abb. 1, 2), bei der ein hierfür konstruierter In-Gel-Verdau-Stack mit einer speziellen 96-well-Proteinverdauplatte von ABgene/Thermo Fisher Scientific zum Einsatz kommt (siehe Abb. 3). Das System automatisiert den In-Gel-Verdau, die Extraktion der proteolytischen Peptide und die Probenvorbereitung für die MALDI-TOF-MS auf einer einzigen Pipettierplattform (2-in-1 Roboterplattform).

Ziel war es, mit der Automationslösung die gleiche Ergebnisqualität wie mit der manuellen Methode zu erreichen und dabei die Hands-On-Zeit auf ein Minimum zu reduzieren, nämlich auf die Vorbereitung des Pipettierroboters. Neben der Vermeidung von Fehlpipettierungen und Verwechslungen bietet die Automation für die Proteomforschung den entscheidenden Vorteil, das Risiko der Kontamination mit Keratin aus Haaren und Haut zu minimieren und damit die Maskierung der Zielproteine durch den Keratin-Background bei der Massenspektrometrie zu vermeiden.

Beim In-Gel-Verdau ist das Liquid Handling eine große technische Herausforderung, da oft sehr kleine Flüssigkeitsvolumina hinzugefügt und wieder entfernt werden müssen, was leicht zu Probenverlusten und zum Verstopfen der Pipettiernadeln führen kann. Wir haben deshalb zusammen mit Tecan einen speziellen Stack für den In-Gel-Verdau entwickelt, der ein berührungsfreies Pipettieren der Reagenzien ermöglicht. Unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Referenzproteingemisches haben wir das System im Bereich von Picomol- bis Femtomol-Proteinkonzentrationen

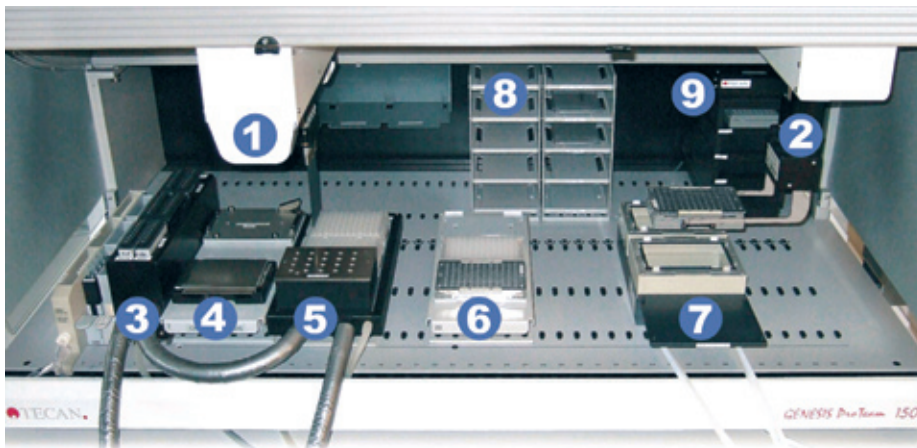


Abb. 1: Tecan-Pipettierroboter Genesis ProTeam 150 mit Setup zum automatisierten In-Gel-Verdau und Probenspotting auf MALDI-Targets. 1: Liquid-Handling-Arm mit acht Pipettiernadeln, 2: Roboter-Manipulator-Arm mit In-Gel-Verdau-Stack (Detail s. Abb. 3a), 3: Kühlrack für Verbrauchsreagenzien mit Abdeckung, 4: Carrier für MALDI-Target (vorne) und Downholder-Position für Trennung des In-Gel-Verdau-Stacks (hinten), 5: Kühlrack für Mikroplatten (hinten) und Reagenzienröhrchen (vorne, Deckel mit Silikonmatte als Kontaminations- und Verdunstungsschutz), 6: Carrier mit Ablageflächen für Metalldeckel, 7: Tecan Te-VacTM Vakuum-Separationsmodul, 8: Mikroplatten-Hotel, 9: Mikroplatten-Inkubator mit Temperaturkontrolle (hier mit entdeckeltem In-Gel-Verdau-Stack im obersten Einschub)

validiert (siehe unten) und so beschrieben, dass die Methode zum Benchmarking benutzt und von anderen Labors reproduziert und implementiert werden kann (siehe Literatur).

Technisches Setup für den automatisierten In-Gel-Verdau

Das wichtigste Element unserer Innovation ist der In-Gel-Verdau-Stack, der aus vier stapelartig angeordneten Komponenten aufgebaut ist (Abb. 3a). Die aus dem 2D-Gel gestanzten 1,5 mm großen Plugs werden in eine spezielle, von ABgene/Thermo Fisher Scientific für diesen Zweck entwickelte 96-well-Proteinverdauplatte SP-0954 eingebracht (www.abgene.com). In jedem Well sind mittels Laser zwei 250 µm große Löcher exzentrisch appliziert. Der Gel-Plug liegt zentriert zwischen den beiden Löchern, so dass ein Absaugen von Reagenzien mittels des Tecan Te-VacTM Vakuum-Separationsmoduls möglich ist, auf das der Stack aufgesetzt wird. Durch die berührungsfreie Aspiration der Flüssigkeiten wird ein Probenverlust nahezu ausgeschlossen und das Verstopfen der Pipettiernadeln verhindert. Die Proteinverdauplatte wird in einen Halter eingesetzt und dieser auf einem Rahmen plaziert. Sie wird mit einer schweren Metallplatte abgedeckt, die 96 Bohrungen enthält und auf der Unterseite eine vorperforierte Silikonmatte trägt, welche die Proben vor Verdunstung und Kontamination schützt und von den Pipettiernadeln durchstoßen werden kann. Das hohe Eigengewicht des Metalldeckels verhindert ein Anheben des Stacks beim Zurückziehen der Pipettiernadeln. Dadurch können alle Pipettierschritte auf dem Vakuummodul ohne weitere mechanische Fixierung durchgeführt werden. Alle Pipettierschritte erfolgen mittels eines Liquid Handling-Arms mit acht Pipettiernadeln, die nach jedem Pipettierschritt gewaschen werden (s. Abb. 1). Jede Einzelkomponente (Metalldeckel, Verdauplatte im Halter, Basisrahmen) und der gesamte Stack können vom Roboter-Manipulator-Arm gegriffen und an die verschiedenen Positionen auf der Arbeitsfläche bewegt werden (s. Abb. 1). Zwei Kühlracks mit Abdeckungen zum Schutz vor Verdunstungen gewährleisten, dass die Verbrauchsreagenzien gekühlt vorgehalten werden. Ein Mikroplatten-Inkubator ermöglicht es, bestimmte Inkubationsschritte bei 45 °C oder 50 °C durchführen zu können.

Automation von In-Gel-Verdau, Peptidextraktion und MALDI-Spotting

Die Gel-Plugs werden aus den mit Coomassie Brilliant Blue G-250 angefärbten Proteinbanden ausgestanzt, in die Proteinverdauplatte eingebracht und diese im Stack plaziert (Abb.

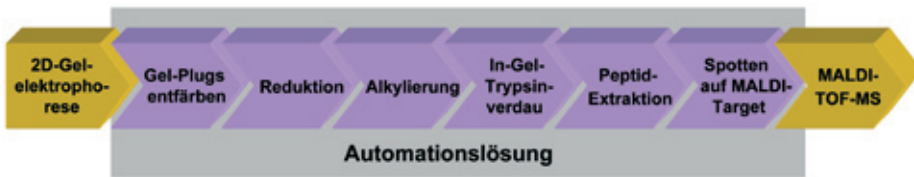


Abb. 2: Schema der Automationslösung

3b). Die Plugs werden mit Ammoniumbikarbonat entfärbt, mit Acetonitril dehydriert, bei 50 °C getrocknet und mit Dithiothreitol (DTT) reduziert. Anschließend wird mit Iodacetamid im Dunkeln alkyliert, gewaschen, dehydriert und erneut getrocknet, um eine optimale Aufnahme der Trypsinlösung zu gewährleisten. Der Trypsinverdau wird zwei Stunden lang bei 45 °C durchgeführt und durch Ansäuern mit Trifluoressigsäure gestoppt. Die Extraktion der tryptischen Peptide erfolgt durch passive Elution. Für diesen Schritt der quantitativen Rückgewinnung des Eluats wird der obere Teil des Stacks (Abb. 3a, Nr. 1-3) per Roboter-Manipulator-Arm vom Basisrahmen (Abb. 3a, Nr. 4) getrennt und auf das Tecan Te-VacS™ Vakuum-Separationsmodul gesetzt (Abb. 1, Nr. 7), in das zuvor – ebenfalls automatisch – eine 96-well-Sammelplatte eingesetzt wurde. Die in einer Sammelplatte aufgefangenen Peptideluats (s. Abb. 3c) werden auf eine MALDI-Targetplatte (Bruker Daltonics AnchorChip 600/384) gespottet, die mit einer mikrokristallinen CHCA-Dünnschicht präpariert ist (CHCA = α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure). Die Methode ist für den Einsatz der genannten MALDI-Targets optimiert, wodurch das kosten- und zeitaufwendige Entsalzen der Proben mittels Reversed-Phase-Chromatographie entfällt. Sie kann aber grundsätzlich auch auf andere Targets angepasst werden. Der gesamte Ablauf wird mit einer flexibel programmierbaren Tecan-Software gesteuert. Der gesamte technische Setup kann auch auf

der neuen Tecan Freedom Evo®-Pipettierplattform installiert werden.

Methodenentwicklung und Validierung

Um den Einfluss proteinspezifischer Effekte zu minimieren, wird zur Methodenentwicklung und Validierung nicht ein einzelnes Protein, sondern ein Proteingemisch von sechs Molekulargewichtsmarkern im Größenbereich 14,4 bis 97 kDa (GE Healthcare) verwendet. Dieses Proteingemisch enthält die Referenzproteine Phosphorylase b (aus Kaninchenmuskel, 97 kDa), Albumin (aus Rinderserum, BSA, 66 kDa), Ovalbumin (aus Hühnerei, 45 kDa), Carboanhydrase (aus Rindererythrozyten, 30 kDa), Trypsin-inhibitor (aus Sojabohnen, 20,1 kDa) und α -Lactalbumin (aus Kuhmilch, 14,4 kDa) und wird in drei verschiedenen Verdünnungen eingesetzt. Nach gelelektrophoretischer Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE werden Proben mit Proteinmengen von 8 ng bis 1,5 μ g Protein pro Bande entsprechend 29 fmol bis 34 pmol Protein pro Gel-Plug erhalten (2 Gel-Plugs pro Bande). Alle genannten Schritte werden zur Kontrolle auch manuell durchgeführt. Hierzu werden aus jeder Gelbande zwei Gel-Plugs ausgestochen, wobei einer dem automatisierten In-Gel-Verdau und der nachfolgenden automatisierten Probenvorbereitung zugeführt wird, während der andere in analoger Weise manuell prozessiert wird. Wird die Sequenzabdeckung der Peptid-

massen-Fingerprints als Qualitätskriterium zugrunde gelegt, so zeigt sich, dass die Effizienz der Automation im Vergleich zur manuellen Methode mindestens gleichwertig ist (Abb. 4). Zur beispielhaften Darstellung haben wir hier zusätzlich zum häufig verwendeten Referenzprotein BSA das Ovalbumin ausgewählt, weil dieses aufgrund seiner Hy-

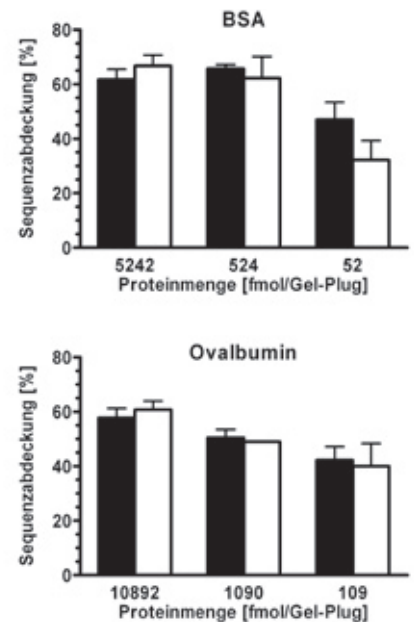


Abb. 4: Validierung des automatisierten In-Gel-Verdau. Vergleich der automatisierten Methode (schwarze Balken) mit der manuellen Methode (weiße Balken). Gezeigt werden die Daten von zwei der sechs benutzten Standardproteine, BSA (66 kDa) und Ovalbumin (45 kDa), in drei verschiedenen Proteinkonzentrationen. Die Balken repräsentieren die durchschnittliche prozentuale Sequenzabdeckung aus zwei unabhängigen In-Gel-Verdau und Probenpräparationen mit Doppelproben (n=4). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

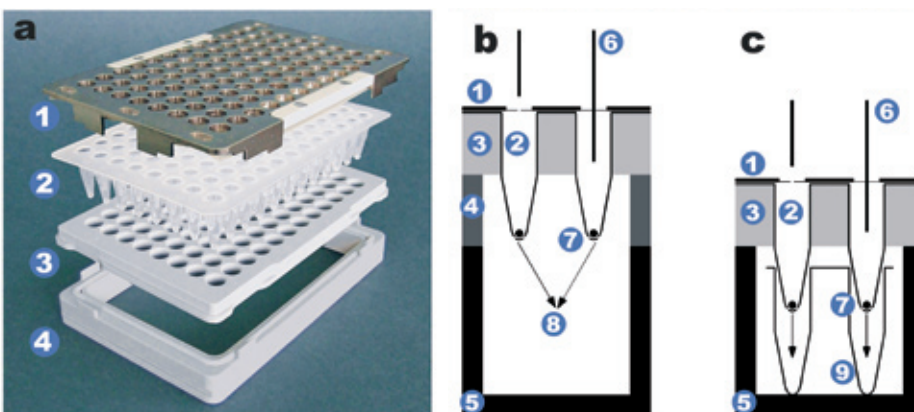


Abb. 3: Stack für den automatisierten In-Gel-Verdau. a: Sandwich-Aufbau, b: Stack-Konfiguration auf dem Vakuummodul zum Pipettieren und Absaugen von Reagenzien, c: Stack-Konfiguration auf dem Vakuummodul zur Elution von tryptischen Peptiden in die Sammelplatte,

- 1: Mikroplatten-Abdeckplatte mit Silikonmatte (Kontaminations- u. Verdunstungsschutz).
- 2: 96-well-Proteinverdauplatte mit gelaserten Löchern (ABgene/Thermo Fisher Scientific).
- 3: Halter für Proteinverdauplatte, 4: Basisrahmen, 5: Tecan Te-VacS™ Vakuum-Separationsmodul, 6: Pipettieradeln, 7: Gel-Plug, 8: Abfall, 9: 96-well-Sammelplatte für Peptid-Eluate

drophobizität gemeinhin als schwer durch In-Gel-Verdau zu erfassendes Protein gilt. Auf der Basis dieser Ergebnisse kann der Prozess als erfolgreich automatisiert betrachtet werden, insbesondere unter dem Gesichtspunkt, dass die für die manuelle Prozedur typischen Sichtkontrollen der Pipettierprozesse und der Positionierung der Gel-Plugs innerhalb des automatisierten Ablaufes nicht erfolgen.

Leistungsdaten der Methode

Mit der Kombination aus dem hier beschriebenen System zur Probenvorbereitung und der Peptidanalyse mittels eines Ultraflex I MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometers (Bruker Daltonics) erreichen wir Proteinidentifikationen mit einer Sensitivität von 50-100 fmol Protein pro Gel-Plug. Durch die Aufnahme von Fingerprint- und Fragmentationsspektren (MS/MS) basieren die Proteinidentifikationen dabei nicht nur auf Peptidmassen-, sondern

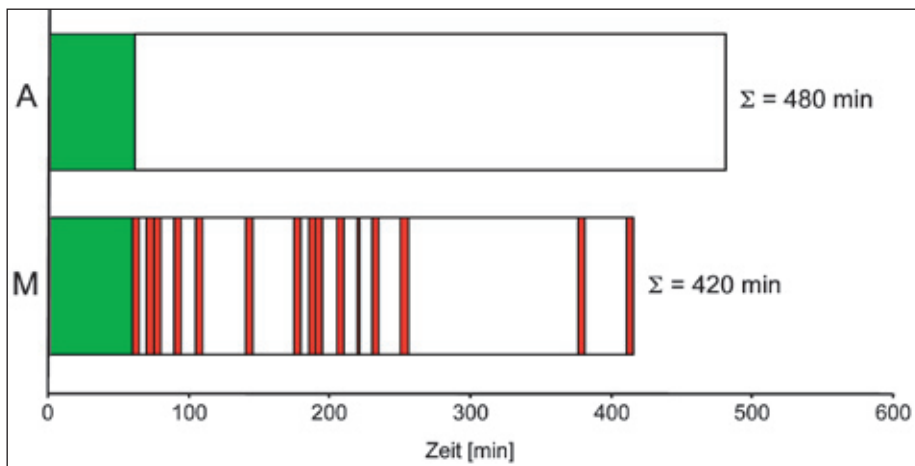


Abb. 5: Zeitbedarf für 192 In-Gel-Verdauproben. Sowohl die automatisierte (A) als auch die manuelle (M) Abarbeitung benötigen ca. 1 h Vorbereitungszeit (grün). Im Gegensatz zur Automationslösung kommt es danach bei der manuellen Methode zu weiteren Hands-On-Zeiten (rot).

auch auf Sequenz-Informationen. Wir können derzeit automatisch 192 In-Gel-Verdauproben in acht Stunden prozessieren. Aufgrund der Waschschriffe für die Pipettieradeln erhöht sich zwar der Gesamtzeitbedarf gegenüber der manuellen Methode um eine Stunde, aber nach einer für beide Methoden gleichen Vorbereitungszeit von etwa einer Stunde gibt es bei der automatisierten Lösung keine weitere Hands-On-Zeit, während die manuelle Durchführung des In-Gel-Verdaus eine Arbeitskraft rund sieben Stunden nahezu vollständig bindet (Abb. 5). Die effektive Arbeitersparnis gegenüber der manuellen Methode ist also erheblich. Für das Spotting von 192 Proben und 48 Kalibranten auf das MALDI-Target benötigt das System aufgrund der sorgfältigen Waschschriffe für die Pipettieradeln drei Stunden. Der sehr präzise arbeitende Liquid-Handling-Arm sorgt dabei für eine exakte Platzierung der Proben auf dem MALDI-Target. Durch diese Probenvorbereitung auf absolut gleichmäßig beschichteten MALDI-Targets (s. Literatur) werden sehr homogene Präparationen erzielt, was sich positiv auf die Messergebnisse und

deren Reproduzierbarkeit auswirkt. Aufgrund der Verwendung von Standard-Proteinverdauplattens und der einfachen Probenentsalzung ist die Methode sehr kostensparend. Durch Einsatz einer Scheduling-Software ließe sich der Durchsatz ohne Änderung des technischen Setups noch steigern und an einen höheren Durchsatzbedarf anpassen. Durch die Methode der automatisierten Probenvorbereitung in Verbindung mit der MALDI-TOF-MS-Analyse sind in der Routineanwendung Proteinidentifikationen sehr zuverlässig und einfach möglich geworden. Unser System liefert automatisierte und validierte High-Throughput-Proteomanalysen mit hoher Aussagekraft und Reproduzierbarkeit und lässt sich prinzipiell in jedem Labor implementieren. Nach der erfolgreichen Entwicklung und Validierung der Methode führen wir momentan Proteomanalysen von diversen biologischen Probenmaterialien wie zum Beispiel Myelin aus Maushirn, Froschoozyten und Peroxysomen aus Pflanzenblättern in größerem Maßstab durch. Die hier vorgestellte Automationslösung erweist sich dabei als praxis- und routinetauglich.

Vorteile der neuen Methode

2-in-1 Roboterplattform für automatisierten In-Gel-Verdau und MALDI-Spotting auf einer Pipettierplattform

ermöglicht automatisierte und validierte High-Throughput-Proteomanalysen

Vermeidung von Keratin-Kontaminationen und Materialverlusten durch berührungsfreies Pipettieren

wesentlich höhere Laboreffizienz durch Verminderung der Hands-On-Zeit

hoher Durchsatz
(192 In-Gel-Verdau-Proben in 8 h)

hohe Sensitivität
(50-100 fmol Protein pro Gel-Plug)

kostensparend durch Verwendung von Standard-Proteinverdauplattens und einfacher Probenentsalzung

flexibles und skalierbares Design, das sich auf verschiedenen Plattformgrößen etablieren lässt

Literatur

Olaf Jahn, Dörte Hesse, Marina Reinelt, Hartmut D. Kratzin: Technical innovations for the automated identification of gel-separated proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* (2006) 386: 92–103.

Korrespondenzadresse

Dr. Olaf Jahn
Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin – Arbeitsgruppe Proteomics
Hermann-Rein-Str. 3
37075 Göttingen
Tel./Fax: +49-(0)551-3899-313/ -323
eMail: jahn@em.mpg.de

Produktinformationen und Implementierungsberatung: digest@tecan.com