



Automatisierter Proteinverdau für die MS-basierte Proteomik

Dr. Martin Technau, Ulf Sengutta

CEM GmbH

Einleitung

Proteine bzw. Peptide spielen für die physiologische und biochemische Funktion lebender Organismen eine herausragende Rolle. Peptide und Peptidomimetika kommen z.B. auch als Wirkstoffe mit potenter Wirksamkeit in Frage, was schnelle Synthesemöglichkeiten für die Forschung interessant macht; oder Proteine sind selbst Ziel von Wirksubstanzen z.B. in Form von Enzymhemmern. Daher ist die Sequenz- und Struktur-Analyse von Proteinen ein weiteres wichtiges Aufgabenfeld.

Analytik mittels Massenspektrometrie

Die auf der Massenspektrometrie (MS) basierende Proteomik ist ein unverzichtbares Werkzeug für Biologen, Biochemiker und für die medizinische Grundlagenforschung. Mit ihrer Hilfe lassen sich biochemische Signaltransduktionswege aufklären, molekulare Ursachen von Krankheiten verstehen, Wirkungsmechanismen bereits bekannter Arzneistoffe erkennen sowie neue Targets für Diagnostika und Medikamente entdecken.

Für die massenspektrometrische Analyse müssen die zu untersuchenden, hochkomplexen Proteingemische zunächst aufgetrennt werden. Eines der kostengünstigsten Verfahren hierfür ist die zweidimensionale Gelelektrophorese; sie trennt die Proteine in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt und in der zweiten Dimension nach ihrer Größe (Molekülmasse) und erlaubt die Separierung von Tausenden von Proteinen in einem Durchgang.

In jüngster Zeit kommt allerdings flüchtigkeitschromatographischen Trennmethode eine immer wichtigere Rolle zu.



Abb 1: **DigestPro** – Proteinverdau, Probenaufräumung und MALDI-Spotting auf einer Plattform.

Bei beiden Ansätzen müssen die Proteine vor der Analyse am Massenspektrometer enzymatisch in kürzere und leichter zu handhabende Peptide gespalten werden. Wegen der Sequenzspezifität der verwendeten Proteasen ergibt sich ein charakteristisches Peptidgemisch. Mit den erhaltenen Massenspektren werden Proteindatenbanken wie **UniProt** oder **Expasy** computergestützt durchsucht. Anhand der Übereinstimmung zwischen den experimentell erhaltenen und den theoretisch ermittelten Peptidmassen lassen sich Proteine mit hoher Wahrscheinlichkeit identifizieren.

Zum kompletten Ablauf eines Proteinverdau gehören auch die Reduktion intramolekularer Disulfidbrücken, die anschließende Alkylierung der entstandenen Cysteine, sowie bei Gel-basierten Methoden Wasch- und Entfärbungsschritte sowie die abschließende Extraktion der Proben aus dem Gel. Der gesamte Verdauprozess ist damit arbeitsaufwändig, sodass die manuelle Durchführung solcher Experimente den Probendurchsatz limitiert und außerdem

das Risiko von Kontaminationen birgt. Die Methode muss daher automatisiert werden, um die sichere Identifizierung von Proteinen in hohem Durchsatz zu ermöglichen.

Automatisierte Proteinverdau-Protokolle

Mit dem **DigestPro** Verdauautomaten (Abbildung 1) bietet die Firma CEM eine Komplettlösung zur Automatisierung von Proteinverdau-Methoden sowie nachfolgenden Techniken zur Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie. Das auf der Basis von der Firma Intavis vertriebene Gerät ist seit mehr als 20 Jahren bewährt und optimiert für den Einsatz in der MS-basierten Proteom-Forschung. Der **DigestPro** lässt sich an individuelle Labor-Anforderungen anpassen, da unterschiedliche Module eine freie Anpassung der Geräte-Konfiguration erlauben (Abbildung 2).

Beliebige Verdauprotokolle, egal ob In-Gel oder in Lösung lassen sich unter präzise kontrollierten und reproduzierbaren Bedingungen automatisieren. Für den Verdau in Lösung lassen sich je nach Anforderung unterschiedliche Formate

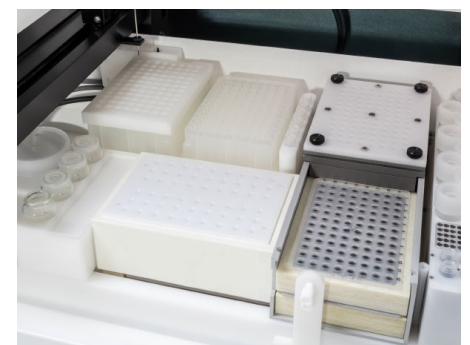


Abb. 2: Modularer Aufbau der **DigestPro**-Arbeitsfläche: Freie Anpassung der Geräte-Konfiguration an individuelle Anforderungen.

verwenden, zum Beispiel 96-well Platten, Autosampler-Vials oder verschiedene Mikro-Reaktionsgefäße. So können bis zu 96 Proben parallel verarbeitet werden. Für den In-Gel-Verdau wird ein speziell entwickeltes, ventillos Verfahren eingesetzt. Der Verdau findet in 96-well PCR-Platten statt, was ebenfalls die Bearbeitung von bis zu 96 Gelstücken in einem Lauf ermöglicht und den einfachen Transfer zu anderen Geräten erlaubt.

Beim Proteinverdau muss jede Kontamination mit Staub oder Hautschuppen des Benutzers vermieden werden. Am DigestPro werden die Reaktionsgefäße daher durch eine Dichtungsmembran abgedeckt, die nur ein kleines Loch für die Dosierkanüle frei lässt. Durch feine Löcher im Boden der Gefäße lassen sich Reagenzien ausblasen. Dazu wird die spezielle Kanüle so tief in die Membran gefahren, dass sie in dem Loch abdichtet. Über einen separaten Kanal können nun die Flüssigkeiten durch die Löcher im Boden ausgeblasen werden (Abbildung 3).

Neue Reagenzien werden ohne Druck zudosiert und durch Oberflächenspannung im Reaktionsgefäß gehalten. Die Inkubation mit verschiedenen Puffern und Reagenzien für definierte Zeiträume lässt sich so leicht und zuverlässig durchführen. Durch die Membran wird die Verdunstung von Reagenzien verhindert. Da das Gelstück nie mit der Kanüle in Berührung kommt, ist ein Verlust ausgeschlossen und das Risiko der Kontamination gegenüber offenen Systemen drastisch reduziert.

Die zum Verdau benutzte Reaktionsplatte ist in einem verschiebbaren Heizblock montiert. Nach der Zugabe von Enzym wird der Block aus der Ablaufposition auf die Elutionsposition geschoben, um die Peptidlösungen in einer sauberen PCR-Platte auffangen zu können. Auch hier bewährt sich das ventillose Reaktionsgefäß: es gibt keine Spalten, Ventile oder Toträume und der Überstand lässt sich vollständig in die Auffangplatte übertragen. Das Gelstück wird in jedem Fall zurückgehalten.

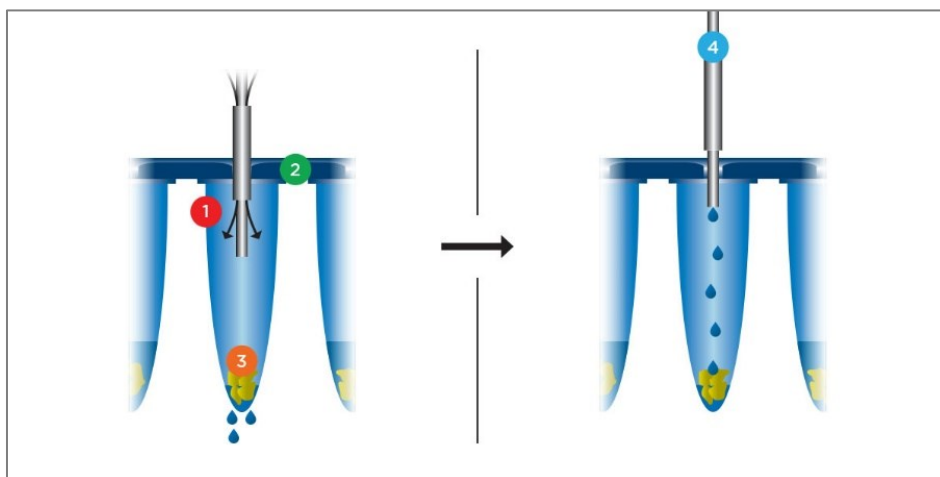


Abb.3: In-Gel-Verdau. Für den In-Gel-Verdau verwendet der DigestPro eine 2-Kanal-Nadel. Zum Ausblasen des Reaktionsgefäßes über den Luftkanal, dichtet die Nadel in der Dichtungsmembran ab. Die Flüssigkeitszugabe neuer Reagenzien erfolgt über die innere Nadel. Durch dieses Prinzip ist ein robuster und präziser Flüssigkeitsaustausch gewährleistet ohne das Risiko von Kontaminationen oder eines Verlusts von Gelstücken.
(1 – Ausblasen über Luftkanal, 2 – Dichtungsmembran, 3 – Gelstücke, 4 – Flüssigkeitszugabe)

Der DigestPro erlaubt eine freie Temperaturregelung mit Heiztemperaturen bis zu 65°C, sowie im Anschluss an den Verdau eine Kühlung der Peptidgemische auf 8°C.

Optionale Proben-Aufreinigung und MALDI-Spotting

Über den Proteinverdau hinaus erlaubt der DigestPro die Automatisierung weiterer Probenvorbereitungsschritte. Für die einfache und effektive Proben-Entsalzung und Aufkonzentrierung kann am Gerät die Verwendung von ZipTips® (Millipore®) oder kompatiblen reversed phase tips automatisiert werden. Die C-18-Pipettenspitzen werden dabei auf der Arbeitsfläche vorgelegt, von wo aus sie durch die Pipettierkanüle aufgenommen und für einen erneuten Zugang wieder abgelegt werden können.

Die an das C-18 Substrat gebundenen Peptide erlauben Waschschritte direkt in der Pipettenspitze und eine Elution in einem reduzierten Volumen in beliebige frische Reaktionsgefäße (Platten oder Vials). Das automatisierte Spitzen-Handling führt zu deutlich besseren Resultaten und einer erhöhten Reproduzierbarkeit der ZipTip-Methode im Vergleich zur manuellen Verwendung. Das liegt vor allem daran, dass Flüssigkeiten direkt durch das C-18-Material in die

Pipettierkanüle aufgenommen werden können, wodurch das Totvolumen verringert und präzise Flussraten erreicht werden. Die direkte Abgabe von Flüssigkeiten durch die Nadel über die Innenseite des C-18-Materials, erlaubt darüber hinaus die Verwendung von Pipettenspitzen mit erhöhtem Gegendruck (z.B. selbst gefertigte STAGE-Tips).

Optional können die Proben am DigestPro auch direkt auf MALDI Target-Platten aufgetragen werden. Hierfür lassen sich unterschiedliche MALDI-Spotting-Methoden anpassen (z.B. direktes Spotten mit ZipTips, "dried droplet"-Methoden, Sandwich-Methoden, AnchorChip-Targets). Dabei können beliebige MALDI-Target Formate am Gerät verwendet werden.

Zusammenfassung

Die Identifikation von Proteinen über Massenspektrometrie (MS) erfordert die Zerlegung in definierte Peptidfragmente durch enzymatischen oder chemischen Verdau. Die manuelle Durchführung solcher Experimente limitiert den Probendurchsatz und birgt das Risiko von Kontaminationen. Eine Automatisierung dieser komplexen Protokolle mit Hilfe des kompakten DigestPro Vollautomaten erhöht nicht nur den Probendurchsatz.

Die geschlossene Bauweise und ein speziell entwickeltes Verfahren zum Reagenzien-Austausch garantieren auch ein kontaminationsfreies Arbeiten. Im DigestPro können sowohl für In-Gel- als auch In-Lösung-Protokolle bis zu 96 Proben simultan gewaschen, reduziert, alkyliert und verdaut werden. Im Anschluss an den Verdau können die Peptide optional unter Verwendung von Reverse-Phase-Pipettenspitzen vollautomatisch entsalzen und aufkonzentriert werden. Weitere Optionen sind das Überführen in Autosampler-Vials oder das Spotten auf MALDI-Targets. Durch die Verwendung laboreigener Puffer und Lösungen entstehen keine zusätzlichen laufenden Kosten. Der DigestPro wird durch eine intuitiv bedienbare Software gesteuert, die eine individuelle Anpassung eigener Protokolle erlaubt. Einen komfortablen Einstieg in die Automatisierung ermöglichen vorinstallierte Standardprotokolle.

Literatur

[1] Houthaeve, T., Gausepohl, H., Mann, M., and Ashman, K.; *FEBS Letters* (1995), 376, 91–94.

[2] Ashman K., Houthaeve T., Clayton J., Wilm M., Podteleynikov A., Jensen O.N., Mann M.; *Letters in Peptide Science* (1997) 4: 57–65