

iTRAQ[®]实验标准操作流程

FASP (Filter Aided Sample Preparation) 方法

实验目的: iTRAQ[®] (Isobaric tags for relative and absolute quantitation) 技术是由美国应用生物系统公司 (AB SCIEX 公司的前身) 2004 年开发的一种同重同位素标记技术, 可用于相对和绝对定量。现在 AB SCIEX 公司可提供四标及八标两种试剂盒, 分别可同时标记多达四种或八种样品进行定量分析。本实验标准操作流程的目的是, 总结 AB SCIEX 公司上海亚太应用技术支持中心进行大量 iTRAQ[®] 实验后建立的稳定实用的实验流程, 帮助用户尽快的掌握 iTRAQ[®] 实验过程和操作要点, 顺利将 iTRAQ[®] 实验应用于科学研究。本操作流程分为酶解、标记、分级、质谱分析四个步骤, 用户可以根据不同的实验需求, 灵活的加以选用。

(一) 酶解步骤:

所需时间: 1天(建议过夜酶解)

小型仪器:

- 1、涡旋振荡器
- 2、离心机
- 3、恒温孵浴器

所需的试剂及耗材:

- 1、 iTRAQ[®]试剂盒中的Reducing Reagent (AB Sciex, PN: 4381664)
- 2、 iTRAQ[®]试剂盒中的Cysteine-Blocking Reagent (AB Sciex, PN: 4381664)
- 3、 iTRAQ[®]试剂盒中的Dissolution Buffer (AB Sciex, PN: 4381664)
- 4、 胰蛋白酶 (AB Sciex, PN: 4370285, 4352157), 溶于Dissolution Buffer

5、 10K超滤管 (Sartorius, PN: VN01H02)

实验步骤:

- 1、 蛋白定量后取200 μg 蛋白溶液置于离心管中¹;
- 2、 加入4 μl Reducing Reagent, 60度反应1小时²;
- 3、 加入2 μl Cysteine-Blocking Reagent, 室温10分钟;
- 4、 将还原烷基化后的蛋白溶液加入10K的超滤管中, 12,000转离心20分钟, 弃掉收集管底部溶液³;
- 5、 加入iTRAQ[®]试剂盒中的Dissolution Buffer 100 μl , 12,000转离心20分钟, 弃掉收集管底部溶液, 重复3次 (为节省试剂, 这一步可以将Dissolution Buffer用水稀释1倍后使用);
- 6、 更换新的收集管, 在超滤管中加入胰蛋白酶, 总量2-4 μg (与蛋白质量比1:50-100), 体积50 μl , 37摄氏度反应过夜⁴;
- 7、 次日, 12,000转离心20分钟, 酶解消化后的肽段溶液离心于收集管底部;
- 8、 在超滤管中加入50 μl Dissolution Buffer⁵, 12,000转再次离心20分钟, 与上步合并, 收集管底部共得到100 μl 酶解后的样品⁶。

注意事项:

- 1、 iTRAQ[®]标记试剂一次可以标记100 μg 蛋白, 200 μg 蛋白为标记两次的蛋白量, 一次性酶解200 μg 蛋白目的是便于进行实验重复性检测。**注意蛋白溶液中不能含有硫醇类 (如DTT和巯基乙醇), 会干扰半胱氨酸封闭步骤。**
- 2、 如果样品中含有尿素, 加热温度改为37度1小时。

- 3、 离心的标准为超滤膜上没有过剩的液体，转速设置不超过使用的超滤管的最高值，时间可根据实际情况进行调整。
- 4、 使用Parafilm将超滤管与管盖密封，避免溶液因蒸发而造成损失，影响酶解效率。
- 5、 此步也可以再次加酶反应，酶的量大概在1 μg 左右，体积也是50 μl ，反应时间2小时左右。
- 6、 如果体积有损失，加入Dissolution Buffer调至100 μl 。

(二) 标记步骤:

所需时间: 1天 (其中样品干燥约需4小时)

小型仪器:

- 1、 涡旋振荡器
- 2、 离心机
- 3、 真空冷冻干燥机

所需的试剂及耗材:

- 1、 4标或8标iTRAQ[®]试剂盒 (详见附录一)
- 2、 Ziptip (Millipore, PN: ZTC18S096 (5 μg) 或ZTC18M096 (2 μg))

实验步骤:

- 1、 从冰箱中取出iTRAQ[®]试剂，平衡到室温，将iTRAQ[®]试剂离心至管底¹;
- 2、 向每管iTRAQ[®]试剂中加入150 μl 有机溶剂 (注意4标试剂为乙醇，8标试剂为异丙醇)，涡旋振荡，离心至管底²;

- 3、 取50 μl 样品（100 μg 酶解产物）转移到新的离心管中；
- 4、 将iTRAQ[®]试剂添加到样品中，涡旋振荡，离心至管底³，室温反应2小时；
- 5、 加入100 μl 水终止反应⁴；
- 6、 为了检测标记效率及定量准确性，从4组样品中各取出1 μl 混合，用Ziptip脱盐后进行MALDI鉴定，确认标记反应良好⁵；
- 7、 混合标记后的样品，涡旋振荡，离心至管底；
- 8、 真空冷冻离心干燥；
- 9、 抽干后的样品冷冻保存待用。

注意事项：

- 1、 检查iTRAQ[®]试剂的体积，约为25 μl 左右。
- 2、 加入有机溶液的体积可以根据样品体积进行调整，保证其终浓度为70%以上。
- 3、 使用iTRAQ[®]进行标记时，检测溶液的pH，如果pH小于7.5，可以加入5微升Dissolution Buffer。
- 4、 此步骤目的是水解过剩的iTRAQ[®]试剂，避免混合后交叉标记。
- 5、 此步骤也可使用TripleTOF[™] 5600上样后进行检测。

(三) 高 pH 反相分级

所需时间：1 天（其中样品干燥约需 4 小时）

小型仪器：

- 1、 涡旋振荡器

- 2、离心机
- 3、真空冷冻干燥机
- 4、ekspert™ ultraLC 100 或 ekspert™ ultraLC 100-XL

所需的试剂及耗材:

- 1、 柱子: Durashell-C18 4.6 mm×250 mm, 5 μm 100 Å¹
(Agela, Catalog Number: DC952505-0)

或

柱子: Gemini-NX C18 4.6 mm x 250 mm, 5 μm 110 Å (Phenomenex,
PN: 00G-4454-E0)

SecurityGuard Guard Cartridge Kit (保护柱套) : (Phenomenex, PN:
KJ0-4282)

SecurityGuard Cartridges(柱芯) : Gemini-NX C18 3.0 mm x 4 mm
(Phenomenex, PN: AJ0-8368)
- 2、 储液: 200 mM 甲酸胺 (pH 10)

流动相 A: 20 mM 甲酸胺 (pH 10)

流动相 B: 20 mM 甲酸胺 (pH 10), 80% ACN

实验步骤: (柱温可控制在 40°C-luo)

- 1、 使用 400 μg 多肽段混合物或者 E. coli 蛋白抽提物进行分离, 检测系
统情况²;
- 2、 将标记抽干后的样品用 150 μl 流动相 A 复溶, 涡旋振荡, 12,000 转离
心 20 分钟, 吸取上清上样;
- 3、 准备 48 个空白 1.5 ml 离心管, 依次标记为 1-48, 用于收集分离得到

的组份 1-48;

4、 流速 0.8 ml/min, 分离梯度如下:

时间 (分钟)	B%
0	5
5	5
30	15
45	38
46	90
54.5	90
55	5
65	5

5、 从第 5 分钟开始, 依次收集每分钟洗脱物到 1-48 号离心管中;

6、 真空冷冻离心干燥;

7、 抽干后的样品冷冻保存待用。

注意事项:

1、 所选用的柱子要求在 pH 10 的稳定性好。

2、 此步骤的目的是根据紫外监测优化梯度条件, 及时发现液相系统可能存在的问题。

(四) 纳升级反相色谱-TripleTOF™ 5600 进行蛋白质分析

所需时间: 1.5 天 (包含 30 分钟 -gal 校正仪器和 wash 步骤)

小型仪器:

1、 涡旋振荡器

2、 离心机

所需的试剂及耗材:

- 1、 流动相A: 2% ACN, 0.1% FA
 流动相B: 98% ACN, 0.1% FA
- 2、 进样瓶 (Agilent, 5183-2072)
- 3、 瓶盖 (Agilent, 5185-5829)
- 4、 内称管 (Agilent, 5182-0549)
- 5、 喷针 (New Objective, PN: FS360-20-10-N-20-C12)

实验步骤:

- 1、 根据紫外监测情况, 将高pH反相分离得到的48个组份合并为10个组份¹, 合并时采用30 μ l 2% ACN, 0.1% FA, 加入第一个离心管, 涡旋振荡并离心后, 转入第二个离心管, 依次直至合并组份最后一管;
- 2、 12,000转离心10分钟, 吸取上清上样;
- 3、 上样体积8 μ l, 采取夹心法上样²;
- 4、 Loading Pump 流速2 μ l/min, 15分钟³;
- 5、 分离流速0.3 μ l/min, 注意: 分离梯度根据组份1-4和5-10稍作调整, 具体梯度如下⁴:

时间 (分钟)	B% (组份 1-4)	B% (组份 5-10)
0	5	5
0.1	10	6
60	25	22
85	48	43
86	80	80
90	80	80
91	5	5

6、质谱参数设置:

a) **源气参数** (根据不同仪器状态进行优化⁵), 以下为建议值:

Ion spray voltage: 2.3 kv;

GS1: 4;

Curtain gas: 30或35;

DP: 100或80;

b) **TOF MS:**

m/z: 350-1250;

accumulation time: 0.25 s;

c) **product ion scan:**

IDA number: 30;

m/z: 100-1500;

accumulation time: 0.1 s;

Dynamic exclusion time: 25 s;

Rolling CE: enabled;

Adjust CE when using iTRAQ[®] reagent: enabled;

CES: 5;

注意事项:

- 1、组份合并原则为, 组份 1-48 靠近梯度开始和终止的组份进行合并, 例如 1、2 与 47、48 进行合并, 依次向中间进行; 此外, 根据紫外检测情况, 调节合并的管数, 尽量使合并后的组份肽段含量比较一致。

- 2、夹心法三步的总体积要小于自动上样注射器的体积，如注射器为 25 μl ，则三步总体积要小于 25 μl ；最后一步吸取流动相 A 的体积略大于上样针到 loop 环的管路体积，例如上样针到 loop 环的体积为 2.4 μl ，则设为 2.5 μl ；loop 环体积与上样针到 loop 环的管路体积的总和，要大于吸取样品和最后一步吸取流动相 A 的体积总和，例如 loop 环的体积为 10 μl ，上样针到 loop 环的体积为 2.4 μl ，最后一步吸取流动相 A 的体积为 2.5 μl ，则样品上样体积要小于 9.9 μl ；如果样品浓度较小，需要增加上样体积，则可先将样品在 Trap 柱进行富集，再次吸取样品上样。
- 3、此步骤的主要目的是将 loop 环中的样品富集至 Trap 柱；延长时间同时可起到除盐的作用。
- 4、梯度和时间需要根据样品实际情况进行优化。
- 5、根据喷雾状况和水相离子峰高度优化具体参数；喷雾电压建议从 2.1kV 开始逐渐增加，过高易致喷针老化。

附录一 iTRAQ® 试剂盒货号和包含产品列表

Part Number	Kit Contents
4352135	<p>iTRAQ® Reagents Multiplex Kit Contains iTRAQ® reagents 114, 115, 116, 117, the appropriate buffers and reagents for 10 two-plex or 6 three-plex or 5 four-plex assays. 10-pk trypsin is sold separately. Each individual reagent capable of labeling up to 100 ug of protein.</p> <p>多重定量 iTRAQ® 试剂盒</p> <p>含 iTRAQ® 114, 115, 116, 117 (满足 5 次 4 标实验), 相关缓冲液。</p>
4352157	<p>Trypsin, TPCK treated, 10-Pack A modified (TPCK treated) serine protease that specifically hydrolyzes peptide bonds at the carboxyl side of lysine and arginine residues which contains Calcium Chloride which may improve consistency in digestion. Modified trypsin is treated with N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK) to inactivate extraneous chymotryptic activity. Each package contains 10 vials containing 25 µg in each vial, sufficient for 12 duplex, 8 three-plex, 6 four-plex and 3 eight-plex when using 100 ug of sample. For serum/plasma experiments we recommend labeling 50 ug of protein per sample (therefore you will need only half as much trypsin).</p> <p>TPCK 处理的胰蛋白酶 10 管</p> <p>10 管 25 微克 TPCK 处理的胰蛋白酶, 满足 6 次 4 标或 3 次 8 标实验。</p>
4352160	<p>iTRAQ® Reagents Methods Development Kit Contains iTRAQ® reagents 114, 117, test sample, buffers and reagents to develop a robust enzymatic digestion and peptide labeling protocol for up to three separate analyses. Each individual reagent is capable of labeling up to 100 ug of protein. Included: Starter Kit - Hardware, Cation Exchange Buffer Pack and Cation Exchange Cartridge, Protocol, iTRAQ® Reagent Kit.</p> <p>方法开发 iTRAQ® 试剂盒</p>

含 iTRAQ® 114, 117 (满足 3 次 2 标实验), 相关缓冲液, 测试标准品, 启动包。

4369561 iTRAQ® Reagents 3-Assay Duplex Trial Kit
Contains iTRAQ® Reagents 114 and 117 and the sufficient material to develop a robust protocol and verify that your sample preparation protocol does not interfere with labeling and digestion. Kit contains reagent, cation-exchange buffers, cartridges, reaction solution and test mixture.

iTRAQ®试剂 3 次 2 标试剂盒

含 iTRAQ® 114, 117, 试剂, 阳离子交换缓冲液, 阳离子交换小柱, 反应溶液, 测试标准品。

4370280 iTRAQ® Reagents Application Kit-Plasma
Contains sufficient reaction solutions and iTRAQ® Reagents 114, 115, 116 and 117 for 8 duplex or 4 four-plex experiments based on 50 ug of protein per sample

血浆样品专用 iTRAQ®试剂盒

含 iTRAQ® 114, 115, 116, 117 (满足 4 次 4 标实验, 每个样品 50 微克蛋白)。

4370285 Trypsin, TPCK treated, 8-Pack
A modified (TPCK treated) serine protease that specifically hydrolyzes peptide bonds at the carboxyl side of lysine and arginine residues. Modified trypsin is treated with N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK) to inactivate extraneous chymotryptic activity. Each package contains 8 vials containing 25 µg in each vial, sufficient for 10 duplex, 6 three-plex, 5 four-plex, or 2.5 eight-plex experiments when using 100 ug of sample. For serum/plasma experiments we recommend labeling 50 ug of protein per sample (therefore you will need only half as much trypsin).

TPCK 处理的胰蛋白酶 8 管

10 管 25 微克 TPCK 处理的胰蛋白酶, 满足 5 次 4 标或 2.5 次 8

标实验。

4374321 iTRAQ® Reagents Application Kit - Protein
Contains sufficient reaction solutions, test mixture and iTRAQ® Reagents 114, 115, 116 and 117 (for 25 ug protein) to label 10 duplex, 6 three-plex or 5 four-plex experiments.

蛋白样品专用 iTRAQ® 试剂盒

含缓冲液，测试混合物，含 iTRAQ® 114, 115, 116, 117(满足 5 次 4 标实验，每个样品 25 微克蛋白)。

4381664 iTRAQ® Reagent- Multiplex Buffer Kit
Includes SDS – Denaturant, TCEP Reducing Reagent, MMTS cysteine blocking reagent, TEAB buffer and Isopropanol, enough for 2 multiplex kits.

iTRAQ® 试剂多种缓冲液试剂盒

含有 SDS 变性剂, TCEP 还原剂, MMTS 半胱氨酸封闭剂, TEAB 缓冲液和异丙醇，满足 2 个多重试剂盒的用量。

4390811 iTRAQ® Reagent-8Plex One Assay Kit
Contains iTRAQ® Reagents 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 and 121 and sufficient material to develop a robust protocol and verify that sample preparation procedures do not interfere with labeling and digestion. Also included are SDS – Denaturant, TCEP Reducing Reagent , MMTS cysteine blocking reagent , TEAB buffer, Isopropanol.

8 标 1 次实验 iTRAQ® 试剂盒

含 iTRAQ® 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 和 121, 相关缓冲液。

4390812 iTRAQ® Reagent-8Plex Multiplex Kit
Contains iTRAQ® Reagents 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 and 121 and sufficient material for Five, 8plex assays. Multiplex Buffer kit (PN 4381664) to be ordered separately.

8 标多重实验 iTRAQ® 试剂盒

含 iTRAQ® 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 和 121 (满足 5 次 8

标实验), 不含缓冲液 (PN 4381664)。

4393528 iTRAQ[®] Reagent - 8Plex 25 U bulk pack
Includes, 8 tubes (each tube contains 25 units of an individual
8plex reagent).

8 标 25 单位大包装 iTRAQ[®]试剂

含 8 管, 每管 25 单位有一种 8 标试剂。

4393529 iTRAQ[®] Reagent - 8Plex 50 U bulk pack
Includes, 8 tubes (each tube contains 50 units of an individual
8plex reagent).

8 标 50 单位大包装 iTRAQ[®]试剂

含 8 管, 每管 50 单位有一种 8 标试剂。

附录二 AB Sciex iTRAQ®试剂产品说明书列表

Part Number	Kit Contents
4350832	iTRAQ® Reagents 4plex Quick Reference Card iTRAQ®试剂 4 标产品快速指南卡
4383502	iTRAQ® Reagents 8plex Quick Reference Card iTRAQ®试剂 8 标产品快速指南卡
4350831	iTRAQ® Reagents 4plex Protocol iTRAQ®试剂 4 标产品说明书
4375249	iTRAQ® Reagents 8plex Protocol iTRAQ®试剂 8 标产品说明书
4370075	iTRAQ® Reagents Protein Protocol 蛋白样品专用 iTRAQ®试剂盒产品说明书
4368870	iTRAQ® Reagents Plasma Protocol 血浆样品专用 iTRAQ®试剂盒产品说明书