

# 串联亲和纯化技术及其应用

洪奇华 陈安国 \*

(浙江大学动物科学学院, 杭州 310029)

**摘要** 串联亲和纯化(tandem affinity purification, TAP)是一种能快速研究体内蛋白质相互作用的新技术, 经过两步特异性亲和纯化, 可快速得到生理条件下与靶蛋白质存在真实相互作用的蛋白质。TAP方法最初用于酵母中, 因其具通用性、高效性、高纯度及假阳性低等特点得到了快速发展, 至今已成功运用于许多其他生物。现主要介绍TAP方法的原理、TAP标签及其在不同物种中的应用。

**关键词** 蛋白质相互作用; 串联亲和纯化; 标签; 应用

细胞内蛋白质间相互作用的分析是蛋白质组学研究的一个重要内容。近年发展起来的高分辨率质谱技术为蛋白质复合体的鉴定提供了有力工具, 因此确定蛋白质复合体的限制因素不是蛋白质鉴定, 而是蛋白质复合体纯化。寻求一种快速、方法可信和标准的蛋白质复合体纯化方法非常重要。

用传统方法(如亲和层析或免疫共沉淀)难以得到接近天然状态的蛋白质复合体, 尤其是细胞中存在的一些低丰度蛋白质复合体(它们可能在生命过程中起重要的调节作用)。Rigaut等<sup>[1]</sup>首先提出了一种研究蛋白质相互作用的新方法——串联亲和纯化(tandem affinity purification, TAP)技术, 特别适用于研究蛋白质在生理条件下的相互作用。该技术通过在靶蛋白质一端嵌入一个特殊的蛋白质标签(TAP tag), 不破坏靶蛋白质调控序列, 且靶蛋白质表达量与体内水平相当; 经过两步连续的亲和纯化获得接近自然条件的特定蛋白质复合体, 后用质谱技术或Edman降解法进行蛋白质鉴定。与传统的研究蛋白质相互作用的技术相比, TAP技术具有周期短、假阳性结果少等优点<sup>[1,2]</sup>。TAP技术最初用于酵母, 近年来得到了快速发展, 至今已成功运用于细菌、病毒、昆虫、植物和哺乳动物等物种。本文就TAP方法的原理、TAP标签及其在不同物种中的应用作一介绍。

## 1 TAP技术的原理和方法

TAP方法的流程主要包括将TAP标签与靶蛋白质融合、构建好的载体转入细胞得到稳定表达的细胞或组织、准备细胞抽提物、TAP和分析鉴定<sup>[1-3]</sup>。

### 1.1 TAP标签与靶蛋白质融合

最初由Rigaut等<sup>[1]</sup>设计的TAP标签主要由金黄色葡萄球菌蛋白A的两个IgG结合域(ProtA)和一个钙调蛋白结合肽(calmodulin-binding peptide, CBP)构成, 中间被一个TEV (tobacco etch virus)蛋白酶的酶切位点隔开。应保证靶蛋白质和TAP标签融合后正确表达。

### 1.2 得到稳定表达的细胞或组织

将编码蛋白质标记的基因直接导入内源性编码靶蛋白基因的特定部位进行原位表达, 或将融合基因构建在合适的表达质粒中后导入细胞或生物体内。最终使融合TAP标签的靶蛋白表达量维持或接近天然表达水平。

### 1.3 细胞抽提物的准备

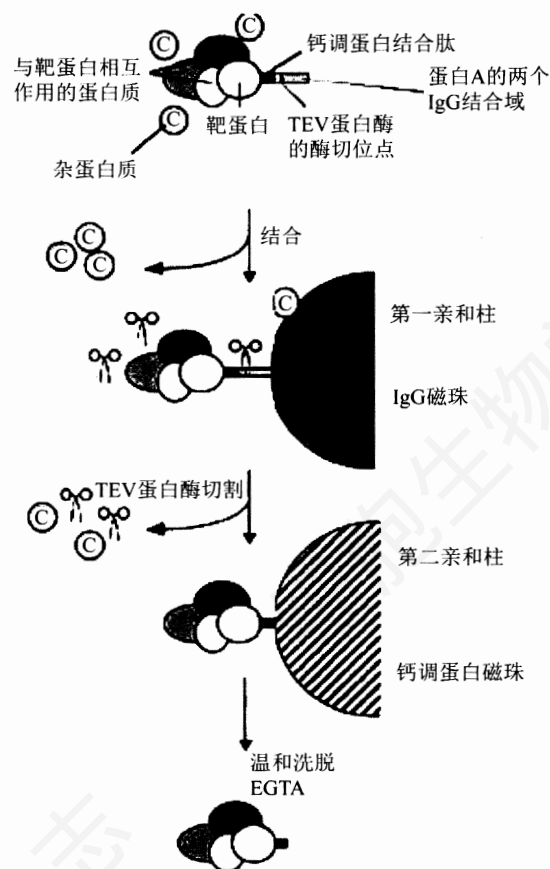
可用各种准备细胞抽提物的策略, 应尽可能不破坏天然存在的相互作用。

### 1.4 TAP (图1)

将细胞抽提物加入IgG亲和柱, 复合物中的靶蛋白通过ProtA标签与亲和柱上的IgG紧密结合, 洗去杂蛋白质后再用TEV蛋白酶切割标签, 然后将洗脱下来的带CBP标签的蛋白质复合体与偶联有钙调蛋白的亲和柱混合, 在钙离子存在下, CBP就会与钙调蛋白紧密结合, 最后用含有EGTA的温和的洗脱条件洗脱, 即可得到高纯度的天然构象的靶蛋白复合物。两个亲和纯化步骤可互换, 但互换后会有TEV蛋白酶的污染。

收稿日期: 2005-12-31 接受日期: 2006-06-15

\* 通讯作者。Tel: 0571-86971425, Fax: 0571-86971099, E-mail: hongdangwang@zju.edu.cn

图1 串联亲和纯化策略示意图<sup>[1]</sup>

### 1.5 蛋白质复合体的鉴定和分析

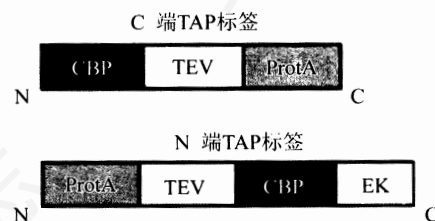
将最后一步洗脱得到的复合物在 SDS-PAGE 或二维电泳上分离, 然后用质谱或者蛋白质测序来鉴定与靶蛋白相互作用的蛋白质, 也可对纯化的蛋白质复合物进行体外活性测定, 或通过电镜观察复合物结构等。

## 2 TAP标签

在蛋白质复合体的纯化中, 应尽量选用在低蛋白质浓度下高效纯化融合蛋白质且不损害蛋白质功能的标签, 如 ProtA、FLAG、链霉亲和素、6×His、CBP、几丁质结合域(chitin-binding domain, CBD)等。

### 2.1 C端TAP标签和N端TAP标签

最初, Rigaut 等<sup>[11]</sup>用 C 端 TAP 标签, 如图 2 所示, CBP 在标签的 N 端, 而 ProtA 在 C 端。有时在 C 端引入融合标签会损害一些靶蛋白的功能, 产生生长缺陷甚至致死。此时, 可用 N 端 TAP 标签,

图2 TAP标签(C端和N端标签的主要区别在于ProtA和CBP模体顺序进行了互换)<sup>[11]</sup>

其模体顺序与 C 端相反, 因为在标签中 ProtA 模体必需位于远离靶蛋白一侧。N 端 TAP 标签基因后紧接靶基因, 同时, 在 N 末端 TAP 标签的 CBP 模体后加入一肠激酶(EK)切位点, 便于从融合蛋白中去除标签残基。

### 2.2 差减式标签(subtraction tag)<sup>[12]</sup>

若两个复合物共享一个亚基, 但只对其中一个复合物感兴趣时, 可采用差减式标签策略。将两种复合物的共同亚基与 TAP 标签融合, 而不想要的复合物中的一个特异蛋白质仅与 ProtA 标签(无 TEV 切点和 CBP)融合。因此, 在第一次亲和纯化后, 仅有靶复合物被洗脱, 不想要的复合物因仍结合于 IgG 亲和柱。

### 2.3 分裂式标签(split tag)<sup>[12]</sup>

其策略是将 TAP 标签分别融合于一个特定复合体的两个亚基, 即一个亚基同 ProtA 和 TEV 融合, 而另一个和 CBP 融合。在第一次亲和纯化时, 仅包括 CBP 的非特定复合物因不能结合 IgG 珠而被除去, 只有含两个亚基相互作用的靶复合物才能经过两次亲和纯化得到分离。在大多数靶蛋白质呈自由状态或与其他复合物结合, 而只有一小部分结合在特定复合物中时, 利用该方法可将含量很低的特定复合物分离出来。

### 2.4 顺序肽亲和和标签(sequential peptide affinity tag, SPA)

Zeghouf 等<sup>[14]</sup>发展了一种 SPA 标签, 将 ProtA 置换成 3×FLAG, 其他模体不变, 并用 λ 噬菌体的同源重组系统将 SPA 标签整合到大肠杆菌靶蛋白基因的 C 端, 再用来大规模研究大肠杆菌体内蛋白质相互作用网络。研究表明, 可能由于 3×FLAG 比 ProtA 小得多, 有时成功率会更高些。

### 2.5 定位及串联亲和纯化标签(localization and tandem affinity purification tag, LAP)

Cheeseman 等<sup>[15]</sup>开发了便于在后生动物中蛋白质

复合体定位和纯化的 LAP 方法。他们将绿色荧光蛋白(GFP)和 S 蛋白基因串联,中间插入 TEV 酶切位点。这样, GFP 既可用于体内定位融合蛋白和动态监测,又可作为 TAP 的第一个纯化标签,即将蛋白质复合体体内定位和纯化技术进行了整合。

## 2.6 多重亲和纯化标签(multiple affinity purification tag, MAFT)

Honey 等<sup>[6]</sup>构建了 CBP、6×His 和 3× 红血球凝集素(hemagglutinin, HA)组成的标签,用来标记酵母 Clb2 基因。经过串联纯化,得到纯度很高的 Clb2-Cdc28 激酶复合体,并用质谱鉴定了相互作用的蛋白质。Rubio 等<sup>[7]</sup>用低温活性的人鼻病毒 3C 蛋白酶酶切位点替代了 TEV 酶切位点,使得标签能在 4℃ 时得到有效切割;并用 6×His 和 9×Myc 替代了 CBP 模体,避免使用 EGTA,稳定了复合体结构和活性,并可发展成“三联亲和纯化”。

其他许多标签也可用来纯化复合体,但有的标签因为亲和力低、背景水平高等原因仍未被广泛采用。TAP 标签的不断改进,将会大大促进 TAP 技术的发展。

## 3 TAP 技术在不同物种中蛋白质相互作用研究中的应用

TAP 技术在低浓度情况下,也能高效富集目的蛋白,并且纯化多在温和天然条件下进行,可用于相互作用蛋白质鉴定、蛋白质复合体活性检测及结构分析。运用 TAP 技术研究蛋白质相互作用主要包括以下方面:(1)鉴定传统的研究蛋白质相互作用技术检测出来的组分<sup>[8,9]</sup>;(2)发现新的蛋白质复合体<sup>[10-13]</sup>;(3)鉴定已发现蛋白质复合体中的新组分。其中利用 TAP 技术鉴定已发现蛋白质复合体中的新组分是目前 TAP 技术应用的热点。

### 3.1 在酵母蛋白相互作用研究中的应用

TAP 技术首先是在芽殖和裂殖酵母中得到应用的,因为酵母同源重组具有高效性,可通过 PCR 技术直接将 TAP 标签整合到单倍体酵母基因组中,使融合蛋白在内源启动子的调控下表达。Gavin 等<sup>[4]</sup>在酵母细胞中用 TAP 标签标记了 1 739 个(约 1/4 酵母蛋白)编码基因,最后通过串联纯化得到 589 个标记的靶蛋白,其中 78% 有相互作用蛋白质,并对其中的 232 个蛋白质复合体进行了鉴定。结果发现, TAP/MS(质谱)方法的敏感性很高,甚至能鉴别 15 拷贝/细胞的蛋白质;特异性和可靠性等方面

也远远超过了酵母双杂交等研究蛋白质相互作用的传统技术。另外,获得的这些蛋白质复合体通过共用组分相互联系在一起,形成一个网络。

### 3.2 在细菌蛋白相互作用研究中的应用

目前, TAP/MS 已用于大肠杆菌等细菌的蛋白质复合体鉴定中。Gully 等<sup>[15]</sup>首先将该技术用于原核生物生理条件下蛋白质复合体的纯化,并阐明了其可信性。他们分别在酰基载体蛋白(ACP)的 N 端和 C 端加上 TAP 标签,纯化后鉴定了一些已知的与 ACP 相互作用的蛋白质,重新发现了 ACP/MukB 和 ACP/IscS 这两个以前被认为是污染的蛋白质的特异性相互作用。研究认为, TAP 方法能用于原核生物中研究新蛋白质的功能。后来,他们又用分裂式标签方法纯化了同时与 ACP 和 YbgC 相互作用的蛋白质,并描述了可能与磷脂代谢协调有关的完整的蛋白质相互作用网络<sup>[16]</sup>。

Kumar 等<sup>[17]</sup>用 TAP/MS 方法在大肠杆菌中鉴定了 80 个硫氧还蛋白的相互作用蛋白质,认为硫氧还蛋白涉及到至少 26 个不同的细胞过程,显示了该方法在鉴定体内蛋白质功能方面的重要作用。Butland 等<sup>[18]</sup>用 TAP 和 SPA 标记了 1 000 个大肠杆菌 ORF(约占基因组的 23%,有 857 个蛋白质被成功标记,包括 198 个非常保守的可溶性非核糖体蛋白质),648 个蛋白质被纯化并用质谱鉴定了它们的相互作用蛋白质,展示了大肠杆菌内蛋白质相互作用的网络图。

### 3.3 在病毒蛋白相互作用研究中的应用

Mayer 等<sup>[19]</sup>在感染 BDV (Borna disease virus)病毒的细胞中表达了用 TAP 标记的核蛋白。被标记的诱饵能有效地整合到病毒核糖核蛋白复合物(RNP)中,且不影响 BDV 的复制和包装。经两步亲和纯化,从被感染细胞中纯化靶蛋白复合体,得到了一些病毒蛋白。除病毒蛋白外, RT-PCR 分析表明还存在病毒基因组 RNA。研究结果表明,纯化 TAP 标记的病毒 RNP 是可能并有效的,提供了这些复合体生化功能研究的新途径。

### 3.4 在昆虫蛋白相互作用研究中的应用

Flöler 等<sup>[20]</sup>发展了 iTAP 策略,将 TAP 技术与 RNA 干扰(RNAi)技术联用,避免了内源性未标记靶蛋白竞争复合体,增加了纯化的特异性和有效性。他们将表达带 TAP 融合标签的靶蛋白的质粒稳定转染到果蝇的 S2 细胞中。在纯化前数天,用 RNAi 方法抑制未标记的相应内源蛋白的表达。iTAP 在果蝇中的尝试应用,为 TAP 在高等真核生物中的充分

运用提供了更广阔的前景。Siomi 等<sup>[21]</sup>用 TAP 方法在果蝇 S2 细胞中分离 RNA 介导的沉默复合体(RISC)以鉴定 RNAi 途径成分。Veraksa 等<sup>[22]</sup>在果蝇细胞和胚胎中标记了 Notch 信号途径中的一些组分, 用 TAP/MS 方法验证了该通路组分的一些相互作用蛋白质, 并发现了许多新的潜在的蛋白质相互作用, 后者用遗传学和生化方法进行了验证。研究表明, TAP/MS 方法可成为果蝇蛋白质组研究的有效方法。而 Walgraffe 等<sup>[23]</sup>已将 TAP 方法用于布氏锥虫蛋白质复合体的研究。

### 3.5 在植物蛋白相互作用研究中的应用

Rohila 等<sup>[24]</sup>从烟草叶上分离得到蛋白质复合体。Rubio 等<sup>[7]</sup>将 TAP 标签改进成 TAPa (alternative TAP)后, 与 CSN(COP9 signalosome) 3 融合表达分析, 纯化出了 CSN 复合体。另外标记了拟南芥中一些光信号通路调控子, 突变体补偿分析表明大多 TAPa 融合蛋白保留了野生型蛋白质功能。研究表明, TAPa 系统适于在稳定转染的拟南芥中有效分离多蛋白质复合体。

### 3.6 在哺乳动物蛋白相互作用研究中的应用

哺乳动物中细胞抽提液复杂性很高, 纯化和鉴定蛋白质比较困难。Knuesel 等<sup>[25]</sup>构建了逆转录表达载体, 使 TAP 标记的人类蛋白质 SMAD3 和 SMAD4 在接近其生理条件下稳定表达, 纯化出了 SMAD3 蛋白复合体。发现在体内 SMAD3 而不是 SMAD1 与 HSP70 结合, 并验证了 TAP 纯化方法。研究表明该方法适合于任何一个蛋白质, 并为纯化哺乳动物细胞抽提液中所有功能未知的蛋白质提供了一种有效的方法。Bouwmeester 等<sup>[26]</sup>报道用 TAP/MS 和 RNAi 方法构建了人类 TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B 途径中约 32 个已知和候选蛋白质的相互作用网络图。他们鉴定了 221 个结合蛋白和 80 个未知的相互作用的蛋白质, 其中 10 个是该途径的功能调控子。此方法能让研究者更深入地理解 TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B 途径, 同时可应用于与人类疾病相关的其他途径。

## 4 TAP 技术存在的问题和展望

TAP 技术与其他标签融合方法一样具局限性。首先, 标签的引入会影响蛋白质表达、蛋白质性质、复合体的稳定性和组分, 改变标签的位置(N

端或 C 端)也许会解决此问题。另一问题是靶蛋白属于几个复合体, 这时可用差减标签或分裂标签。其他可能存在的问题是: 用来切割标签的蛋白酶也许会切割靶蛋白或与它结合的相互作用的蛋白质; 细胞裂解时有时会破坏 TAP 标签; 内源性钙调蛋白会结合到 TAP 标签的 CBP 基团上, 影响融合标签与 CBP 亲和柱的结合; 纯化中 EGTA 或其他溶剂的使用会干扰复合体的完整性和活性; 未能提供复合体不同位置的信息。

尽管 TAP 技术存在一些局限性, 但 TAP 技术具有鉴定在生理条件下所有相互作用蛋白质、假阳性和假阴性水平低、通用性以及自动化等优势, 与质谱等其他技术联用, 能大规模地研究细胞内蛋白质分子之间的相互作用网络。今后随着质谱灵敏性和高通量的发展, 以及更好的融合标签的开发, TAP/MS 也许会成为不同物种体内蛋白质研究的重要工具。

### 参考文献(References)

- [1] Rigaut G et al. *Nat Biotechnol*, 1999, **17**: 1030
- [2] Puig O et al. *Methods*, 2001, **24**: 218
- [3] Tasto JJ et al. *Yeast*, 2001, **18**: 657
- [4] Zeghouf M et al. *J Proteome Res*, 2004, **3**: 463
- [5] Cheeseman IM et al. *Sci STKE*, 2005, **266**: p11
- [6] Honey S et al. *Nucleic Acids Res*, 2001, **29**: E24
- [7] Rubio V et al. *Plant J*, 2005, **41**: 767
- [8] Krogan NJ et al. *Mol Cell Biol*, 2001, **21**: 8203
- [9] Bouveret E et al. *EMBO J*, 2000, **19**: 1661
- [10] Vo LT et al. *Mol Cell Biol*, 2001, **21**: 8346
- [11] Kufel J et al. *Mol Cell Biol*, 2002, **22**: 5248
- [12] Li J et al. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 49383
- [13] Yoon HJ et al. *Curr Biol*, 2002, **12**: 2048
- [14] Gavin AC et al. *Nature*, 2002, **415**: 141
- [15] Gully D et al. *FEBS Lett*, 2003, **548**: 90
- [16] Gully D et al. *Proteomics*, 2006, **6**: 282
- [17] Kumar JK et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 3759
- [18] Butland G et al. *Nature*, 2005, **433**: 531
- [19] Mayer D et al. *Proteomics*, 2005, **5**: 4483
- [20] Forler D et al. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**: 89
- [21] Siomi MC et al. *Methods Mol Biol*, 2005, **309**: 1
- [22] Veraksa A et al. *Dev Dyn*, 2005, **232**: 827
- [23] Walgraffe D et al. *Mol Biochem Parasitol*, 2005, **139**: 249
- [24] Rohila JS et al. *Plant J*, 2004, **38**: 172
- [25] Knuesel M et al. *Mol Cell Proteomics*, 2003, **2**: 1225
- [26] Bouwmeester T et al. *Nat Cell Biol*, 2004, **6**: 97

## Tandem Affinity Purification and Its Application

Qi-Hua Hong, An-Guo Chen\*

(College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract** Tandem affinity purification (TAP) is a new method developed recently for the purification of protein complex under native condition. Proteins purified through two successive affinity chromatography steps can be identified directly by mass spectrometry. The TAP strategy was originally developed using yeast protein complexes as a model system and has been successfully applied in many other organisms. This review focuses on the principle of TAP, the TAP tags and its application in various cells or organisms so far.

**Key words** protein interaction; tandem affinity purification; application

---

Received: December 31, 2005

Accepted: June 15, 2006

\*Corresponding author. Tel: 86-571-86971425, Fax: 86-571-86971099, E-mail: hongandwang@zju.edu.cn