

新技术讲座

串联亲和纯化(TAP)技术在蛋白质组学中的应用*

程永升 刘进元**

(清华大学生物科学与技术系分子生物学实验室, 北京 100084)

摘要 蛋白质是各种生命活动的主要执行者, 因此构建蛋白质相互作用的网络图对于准确理解蛋白质功能、揭开各种细胞活动的奥秘十分重要. 串联亲和纯化(TAP), 是近年来发展出来的一种能够快速研究在生理条件下蛋白质相互作用, 揭示蛋白质复合体相互作用网络的新技术, 已成为研究蛋白质组学的一个重要工具. 随着该技术的不断完善, TAP技术在认识蛋白质相互作用的过程中必将发挥越来越重要的作用.

关键词 TAP, 蛋白质组学, 蛋白质相互作用, 网络图

学科分类号 Q81

随着基因组计划^[1]的突飞猛进, 人们获得了众多物种的基因组序列信息^[2,3], 但这些序列信息只是DNA分子的结构图, 并不足以解析生命活动的主要执行者蛋白质是如何赋予细胞的种种生命特征. 要诠释细胞生命现象, 除了DNA序列信息外, 还需要更高层次的信息, 包括细胞全蛋白的表达谱、翻译后修饰谱、定位谱和相互作用网络图(蛋白质与蛋白质、核酸等之间)等, 而要完成这些图谱的制作是一项异常复杂的工程. 尽管在基因组中某些蛋白质编码基因的拷贝数可能基本相同, 但不同基因的蛋白质表达水平往往有着很大的差异, 甚至有几个数量级的差异. 因此围绕蛋白质展开系统研究理所当然地成为当今生命科学的研究热点.

近年来崛起的质谱技术为蛋白质的鉴定提供了灵敏、快速、高效的技术平台^[4]. 目前质谱技术主要用于分析在二维电泳或串联色谱中分离出来的蛋白质或其混合物^[5]. 但得到鉴定的只能是细胞中大量表达的蛋白质. 近来质谱技术也开始应用于蛋白质复合体的鉴定, 但是要得到足够量的蛋白质复合体是相当困难的. 传统的制备蛋白质复合体的方法有亲和层析和免疫共沉淀. 虽然已有一些成功的个案, 但这些纯化复合体的方案都不具有普遍性, 而且步骤繁琐费时, 往往只适用于特定的蛋白质复合体.

作为一种传统的纯化生物大分子的方法——亲和层析, 可被用来纯化蛋白质复合体, 研究蛋白质相互作用^[6]. 将存在相互作用的其中一种蛋白质固定在基质上作为诱饵, 然后让含有与之相互作用的蛋白质的细胞裂解液或细胞组分通过层析柱, 就

能纯化出足够量的与诱饵相互作用的蛋白质. 这种方法的先决条件是能够得到足够多的保持蛋白质活性的重组蛋白作为诱饵. 运用这种方法研究蛋白质相互作用会碰到内源性诱饵蛋白的表达以及非特异性结合蛋白质的干扰.

免疫共沉淀也是研究蛋白质相互作用非常有效的一种方法^[7], 与其他研究方法最大的区别在于, 这种方法研究的是在生理条件下蛋白质之间的相互作用. 但是运用免疫共沉淀技术研究蛋白质之间相互作用仍存在很大的限制: 首先还是这种技术只能研究表达量相当高的蛋白质; 其次是制备高质量的多克隆抗体或者单克隆抗体比较困难; 最后是受免疫球蛋白的干扰较大.

最近, 德国和法国的两家实验室开发出一套新的研究蛋白质相互作用的方法——串联亲和纯化(tandem affinity purification, TAP)^[8,9], 特别适用于研究蛋白质在生理条件下的相互作用. TAP技术通过嵌入一段蛋白质标记(TAP Tag), 在目的蛋白的一端或中部导入蛋白质标记^[8], 这样便在没有破坏目的蛋白调控序列的基础上, 使得被标记的目标蛋白其表达量能够与其在细胞中自然表达水平相当, 避免了由于过量表达导致非自然条件下的蛋白质相互作用. 经过特异性的两步亲和纯化, 在生理条件下与目标蛋白发生真实作用的蛋白质便可一起

* 国家自然科学基金资助项目(30170080, 30270753), 国家高技术“863”计划(2001AA222053, 2002AA212051, 2002AA207006)和国家重点基础研究发展规划项目(973)(2002CB111301).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62772243, E-mail: liujy@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2003-09-03, 接受日期: 2003-10-15

被洗脱下来, 这样得到的蛋白质复合体接着可以用质谱技术或 Edman 降解法进行鉴定^[8,9]. 此种研究蛋白质相互作用的方法集成了经典的亲和纯化和免疫共沉淀这两种技术的优点, 既吸收了经典亲和纯化可以得到高纯度低拷贝数的蛋白质复合体, 也继承了免疫共沉淀中运用特异性的标记蛋白与亲和柱之间的相互作用, 可快速地得到生理条件下与目标蛋白存在真实相互作用的蛋白质. TAP 技术可以说是在研究蛋白质相互作用的方法学上获得了巨大的突破^[8-10].

1 TAP 的原理与方法

运用 TAP 技术纯化蛋白质复合体的流程主要包括构建表达标记蛋白的细胞或组织、准备细胞抽提物、串联亲和纯化和分析鉴定^[8-10].

1.1 蛋白质标记

蛋白质标记主要由蛋白 A 的 IgG 结合区 (ProtA) 和钙调蛋白结合区 (calmodulin-binding peptide, CBP) 构成, 中间被一个 TEV 蛋白酶的酶切位点隔开 (图 1), 当蛋白质标记在目标蛋白的两端时, 这两段结合区的顺序有所不同, 但始终要保证最终表达的融合蛋白中蛋白 A 的 IgG 结合区在外端.

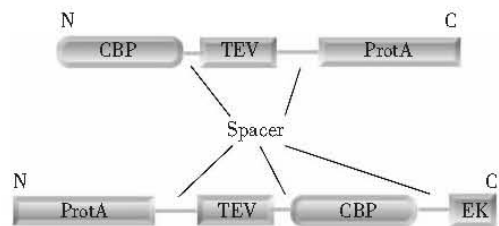


Fig. 1 The N terminal and C terminal TAP tag of target protein

图 1 目标蛋白 N 端和 C 端的 TAP 标记示意图
CBP 代表钙调蛋白结合肽, TEV 代表 TEV 蛋白酶酶切位点, ProtA 代表蛋白 A 的 IgG 结合区, Spacer 表示连接区, EK 表示肠蛋白酶酶切位点.

1.2 构建表达标记蛋白的细胞或组织

通常, 普通的分子克隆技术就可以将这一段编码蛋白质标记的基因片段导入目标蛋白编码基因的特定部位. 将带有标记基因的载体导入感受态细胞, 并通过基因重组将内源性的目标蛋白基因置换为标记基因, 其结果不仅可以在生理条件下得到标记蛋白及与之作用的蛋白质, 而且标记蛋白的表达量与其在自然条件下的表达量相当, 会避免由于过量表达导致非自然条件下的蛋白质相互作用.

1.3 细胞抽提物的准备

各种准备细胞抽提物的策略都可以应用于串联亲和纯化, 但是有一点需要注意的是: 各种不同的纯化策略都必须尽量保证能够降低非特异性相互作用的干扰, 同时尽可能不要破坏自然存在的相互作用. 另外, 提取细胞抽提物时还应加以考虑的一点是, 不同细胞器内的蛋白质有可能会因为细胞破碎后混在一起, 形成非自然的蛋白质降解, 这种情况可以通过降低温度, 缩短破碎时间, 加入各种各样的蛋白酶抑制剂来避免.

1.4 串联亲和纯化 (TAP)

如图 2 所示, 将细胞抽提物加入 IgG 亲和柱, 标记蛋白一端的 ProtA 结合区就会与亲和柱上的 IgG 形成很强的结合, 即使用比较严谨的洗脱条件, 也不会使标记蛋白及与其作用的蛋白质所形成的蛋白质复合体被洗脱下来. 这样就降低了非特异性的蛋白质相互作用, 同时也保留了绝大部分自然存在的相互作用. 接着用含有 TEV 蛋白酶的洗脱液清洗亲和柱, 就可以将蛋白质复合体洗脱下来; 然后将洗脱下来的蛋白质复合体与偶联有钙调蛋白

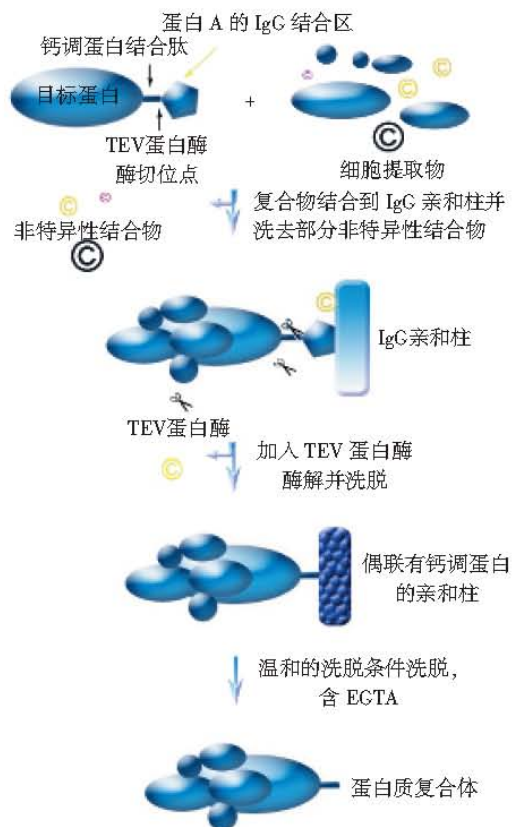


Fig. 2 Protein complex purification through TAP strategy

图 2 TAP 技术纯化蛋白质复合体的简易流程

的亲柱混合,在钙离子参与下,钙调蛋白结合区(CBP)就会与钙调蛋白紧密结合,再用比较温和的洗脱条件(含有EGTA)洗脱,这样又可以进一步去除非特异作用的蛋白质,最终纯化出含有目的蛋白的蛋白质复合体。

1.5 蛋白质复合体的鉴定

可以对通过串联亲和和纯化得到的蛋白质复合体进行各种分析。一般可以将最后一步洗脱得到的复合体在SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(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复合体的各个组分。另外还可以对蛋白质复合体进行体外活性测定,以及通过电镜观察复合体结构等。通过TAP技术最终可以发现细胞中新的蛋白质复合体或者鉴定已发现复合体中新的组分。

TAP技术能够向我们提供大量蛋白质复合体的信息,随着积累的蛋白质复合体的数据增加,还可以建立蛋白质复合体相互作用的网络,建立这种网络的前提是认为含有共同组分的蛋白质复合体之间一定存在功能上的联系,而且研究者们越来越认为很多细胞功能是由蛋白质复合体或者通过蛋白质复合体相互作用共同实现的^[11],因此这种方法建立起来的蛋白质组水平上的相互作用网络图,能够代表细胞各种生命行为的物质基础。

2 TAP在蛋白质组学研究中的应用

目前,TAP技术与质谱技术的联用,以及质谱技术的自动化,使得大规模地分析相互作用的蛋白质在技术上成为可能^[12]。这样大规模、全细胞地分析蛋白质之间的相互作用可以向人们展示出细胞内蛋白质复合体之间的相互作用网络图。这种相互作用的网络图是我们准确理解蛋白质功能,揭开各种细胞运营生命奥秘的又一重要信息平台。目前TAP技术虽然仅在下面几个方面得到了应用,但随着该技术的不断发展完善,其应用的前景会越来越广阔^[13]。

2.1 用于研究蛋白质的相互作用

运用TAP技术研究蛋白质相互作用的两个基本方面是:a.鉴定新的蛋白质复合体^[14,15];b.鉴定已发现蛋白质复合体中的新组分^[16~19]。而利用TAP技术鉴定已经发现的蛋白质复合体中的新组分是目前TAP技术应用的热点。TAP技术与其他研究蛋白质相互作用技术的不同之处,在于它可以鉴定出在空间上非直接物理相互作用的蛋白质分子,而这种情况在蛋白质复合体中又是非常常见的。这

样,运用TAP技术不但可以鉴定出传统的研究蛋白质相互作用的技术能够检测出来的组分,而且还可以帮助我们找出传统方法所不能鉴定出的新组分。比如Yoon等^[19]运用TAP技术分析发现了APC复合体中有13个组分,而传统的遗传和生化技术只鉴定出了11种组分。运用TAP技术发现新的复合体也是目前TAP应用的另一重要方面,如Bouveret等^[15]通过这种技术发现了一种新的类Sm蛋白质复合体,这种复合体参与mRNA的降解过程。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。通过这种方法鉴定出的蛋白质相互作用能真实地反映细胞中蛋白质分子之间的联系,实验结果更加接近真实情况,而且TAP技术还特别适用于蛋白质组水平上的大规模研究。

2.2 在酵母蛋白质组学中的应用

TAP技术首先是在酵母细胞中试验成功的。由于这种技术不同于传统的蛋白质标记技术,它可以通过同源重组达到快速、大量的标记效果,因此Gavin等^[12]运用TAP技术标记了1739个酵母细胞的蛋白质分子,大约占酵母蛋白种类的1/4。最后

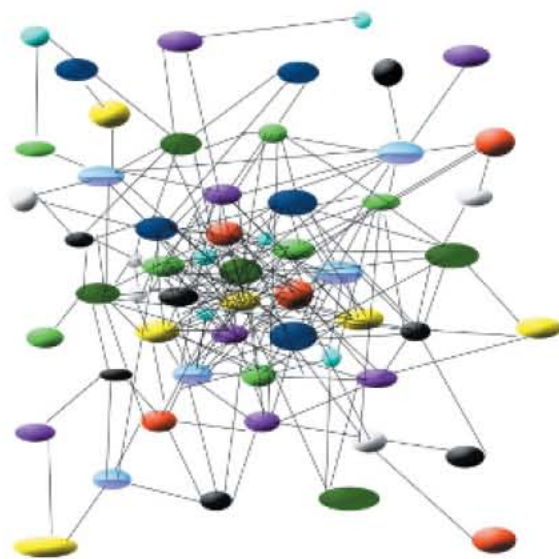


Fig.3 The protein complex interaction network in yeast cell

图3 酵母细胞中部分蛋白质复合体相互作用网络示意图
图中连线代表两个蛋白质复合体至少有一个共同的组分,不同的颜色代表与不同细胞功能相关的蛋白质复合体:红色代表细胞周期相关;绿色代表信号转导相关;紫色代表转录, DNA 稳定和染色体结构相关;蓝绿代表蛋白质和RNA 转运相关;黄色和灰白分别代表蛋白质合成和降解相关;深绿代表细胞极性和结构相关;深蓝代表中间体和能量代谢相关;浅蓝代表膜的生成和转运相关。

通过 TAP 技术纯化得到 589 个蛋白质复合体, 并对其中的 232 个蛋白质复合体进行了鉴定. 结果发现, 用这种技术鉴定得到的蛋白质相互作用不论在灵敏度、特异性和可靠性等方面都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. 另一方面, 这种技术还展示出细胞中的蛋白质复合体组分的动态变化. 研究者们还发现: 这些蛋白质复合体之间有时会有共同的组分, 这意味着在细胞内部, 这些蛋白质复合体有可能通过共享某个组分而产生功能上的联系, 最终形成细胞内部的生物学功能网络 (图 3). 这种蛋白质复合体相互作用网络向人们展示了细胞中各种功能的物质基础, 为最近越来越引起科学家注意的系统生物学提供了佐证. 而且还给了人们这样一个启示: 今后在蛋白质组的研究过程中, TAP 有可能开拓一个新的研究方向——系统生物学, 从蛋白质网络相互作用的基础上揭示生命奥妙这一生命科学的终极目标.

2.3 用于研究高等真核生物蛋白质的相互作用

虽然 TAP 技术能够对酵母细胞蛋白质的相互作用进行大规模地研究, 但在高等真核细胞中的应用却受到限制, 这是因为在高等真核细胞中难以进行原位蛋白标记, 以及存在内源表达的蛋白质干扰, 和蛋白质翻译后调控机制的不同等因素. 最近 Forler 等^[13]将 TAP 技术与 RNAi 技术联用, 发现可以很大程度上降低上述问题的影响. 只要在用 TAP 技术对目的蛋白参与形成的复合体进行纯化前数天, 将其反义 RNA 分子导入, 阻止与目的蛋白相应的内源性蛋白表达, 而细胞的目的蛋白是通过转染外源 cDNA 进入细胞表达, 因而不会受小 RNA 分子的影响而顺利表达. 目前这种联用的技术被称为 iTAP^[13], 而且已经在果蝇的 S2 细胞中得到了成功的应用. 通过 RNAi 技术的介入, TAP 技术越来越发挥出其巨大的应用前景, 从一开始的低等生物——酵母, 到如今的高等真核生物, TAP 技术正在一步一步扩大其应用范围, 为人们了解蛋白质相互作用提供了更为广阔的空间. 这也是利用 iTAP 技术大规模研究高等真核生物的蛋白质相互作用网络和蛋白质组学的良好开端, 为研究高等真核生物的蛋白质相互作用网络和蛋白质组学提供了新方法.

3 展 望

随着 TAP 技术自身的发展以及与其他技术联用之后所发挥出的巨大生命力, TAP 技术作为一种

研究在生理条件下蛋白质相互作用的技术已经越来越受到研究者的青睐^[14~19], 它在研究蛋白质相互作用的各个方面都比传统方法有所突破, 更加能真实地反映细胞内部的客观世界. 这项技术同时也向人们展示了细胞内部蛋白质分子之间的相互作用网络, 进一步加深了人们对于蛋白质如何执行细胞功能的认识, 也许在细胞内的所有蛋白质分子就像一个社会一样, 每一个蛋白质分子都和其他的蛋白质分子或者其他生物大分子无时无刻不在发生各种各样的关联, 以感受细胞外各种各样的环境变化, 并相应地做出恰如其分的反应, 协调细胞内外平衡, 维持生命活动. 因此 TAP 技术在认识蛋白质相互作用——这一蛋白质组学的重要内容——的过程中必将发挥越来越重要的作用.

参 考 文 献

- 1 Wildner M. Aristotle and the human genome project. *Lancet*, 2000, **356** (9238): 1360
- 2 Adams M D, Celniker S E, Holt R A, *et al.* The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 2000, **287** (5461): 2185 ~ 2195
- 3 Wood V, Gwilliam R, Rajandream M A, *et al.* The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, 2002, **415** (6874): 871 ~ 880
- 4 Fenselau C. MALDI MS and strategies for protein analysis. *Anal Chem*, 1997, **69** (21): A661 ~ A665
- 5 Gevaert K, Vandekerckhove J. Protein identification methods in proteomics. *Electrophoresis*, 2000, **21** (6): 1145 ~ 1154
- 6 Gupta S, Suresh M. Affinity chromatography and co-chromatography of bispecific monoclonal antibody immunoconjugates. *J Biochem Biophys Methods*, 2002, **51** (3): 203 ~ 216
- 7 Johnson K D, Bresnick E H. Dissecting long-range transcriptional mechanisms by chromatin immunoprecipitation. *Methods*, 2002, **26** (1): 27 ~ 36
- 8 Puig O, Caspary F, Rigaut G, *et al.* The tandem affinity purification (TAP) method: A general procedure of protein complex purification. *Methods*, 2001, **24** (3): 218 ~ 229
- 9 Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, *et al.* A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature Biotechnology*, 1999, **17** (10): 1030 ~ 1032
- 10 Tasto J J, Carnahan R H, McDonald W H, *et al.* Vectors and gene targeting modules for tandem affinity purification in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, 2001, **18** (7): 657 ~ 662
- 11 Abbott A. Proteomics: the society of proteins. *Nature*, 2002, **417** (6892): 894 ~ 896
- 12 Gavin A C, Bosche M, Krause R, *et al.* Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*, 2002, **415** (6868): 141 ~ 147
- 13 Forler D, Kocher T, Rode M, *et al.* An efficient protein complex purification method for functional proteomics in higher eukaryotes. *Nature Biotechnology*, 2003, **21** (1): 89 ~ 92
- 14 Krogan N J, Greenblatt J F. Characterization of a six-subunit holo-elongator complex required for the regulated expression of a group of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*,

- 2001, **21** (23): 8203 ~ 8212
- 15 Bouveret E, Rigaut G, Shevchenko A, *et al.* A Sm-like protein complex that participates in mRNA degradation. *Embo Journal*, 2000, **19** (7): 1661 ~ 1671
 - 16 Vo L T A, Minet M, Schmitter J M, *et al.* Mpe1, a zinc knuckle protein, is an essential component of yeast cleavage and polyadenylation factor required for the cleavage and polyadenylation of mRNA. *Molecular and Cellular Biology*, 2001, **21** (24): 8346 ~ 8356
 - 17 Kufel J, Allmang C, Verdone L, *et al.* Lsm proteins are required for normal processing of pre-tRNAs and their efficient association with La-homologous protein Lhp1p15. *Molecular and Cellular Biology*, 2002, **22** (14): 5248 ~ 5256
 - 18 Li J X, Moazed D, Gygi S P. Association of the histone methyltransferase Set2 with RNA polymerase II plays a role in transcription elongation12. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, **277** (51): 49383 ~ 49388
 - 19 Yoon H J, Feoktistova A, Wolfe B A, *et al.* Proteomics analysis identifies new components of the fission and budding yeast anaphase-promoting complexes. *Current Biology*, 2002, **12** (23): 2048 ~ 2054

Tandem Affinity Purification Technique and Its Application in Proteomics *

CHENG Yong-Sheng, LIU Jin-Yuan **

(Department Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract Proteins are core executors of biological activity inside cells, therefore, construction of protein-protein interaction network is so important to interpret protein function and decipher the secret of various cellular phenomena. Tandem affinity purification (TAP) is recent advance in technology made over past few years now enables the study of protein-protein interaction *in vivo* and the knowledge gathered from such methods will decipher the protein complexes network. Now, it is also a powerful tool available for proteomics research. This new technology will continue to be developed as it is now became extraordinary valuable to study protein-protein interaction.

Key words TAP (tandem affinity purification), proteomics, protein-protein interaction, network

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30170080, 30270753), State "863" High Technology R & D Project of China (2001AA222053, 2002AA212051, 2002AA207006) and The Special Funds for Major State Basic Research of China (2002CB111301).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62772243, E-mail: liujy@mail.tsinghua.edu.cn

Received: September 3, 2003 Accepted: October 15, 2003