

串联亲和纯化技术

串联亲和纯化 (tandem affinity purification , TAP) 是一种能快速研究体内蛋白相互作用的技术, 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, 因其具有通用性、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 (哺乳动物、植物等) 相互作用的研究。

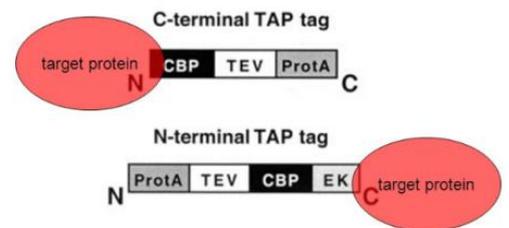
产生背景

蛋白质相互作用的研究是阐释基因功能的重要手段, 近年来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强有力的工具, 因此确定蛋白质间相互作用的限制因素不是蛋白质鉴定, 而是蛋白质复合体的纯化。传统的纯化方法 (如亲和层析或免疫共沉淀) 难以得到接近天然状态的蛋白复合物, 且实验结果可能存在假阳性。为了得到接近天然状态下的蛋白复合物, Rigaut 等人发明了串联亲和纯化技术。

串联亲和纯化原理

利用串联亲和纯化检测蛋白质间相互作用的原理是在靶蛋白质一端嵌入一个特殊的蛋白标签 (TAP tag), 不破坏靶蛋白质调控序列。将构建好的靶蛋白质粒转入靶细胞内进行表达, 如果靶细胞内存在相互作用蛋白, 则会与靶蛋白结合形成蛋白复合物。利用 TAP 标签进行两步连续的亲和纯化获得接近天然条件的靶蛋白复合物。随后用质谱等技术对靶蛋白复合物进行鉴定, 从而达到研究蛋白质间相互作用的目的。

最初设计的 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 蛋白酶的酶切位点隔开 (见右图)。



第一轮亲和纯化

用 IgG 亲和柱进行亲和纯化, ProtA 与亲和柱紧密结合, 洗去未结合的杂蛋白。再用 TEV 蛋白酶酶切, 获得 CBP-融合蛋白。

第二轮亲和纯化

将酶切后获得的 CBP-融合蛋白与偶联有钙调蛋白的亲和柱混合进行第二轮亲和纯化。在钙离子存在下, CBP 就会与钙调蛋白紧密结合, 用含有 EGTA 的洗脱液进行温和洗脱, 即可得到高纯度的靶蛋白 (如果靶细胞内存在相互作用

用蛋白，则获会得靶蛋白复合物)。

两轮亲和纯化顺序为先利用 IgG 亲和柱进行纯化，再利用钙调蛋白偶联亲和柱进行纯化。如果纯化的顺序互换，可能存在 TEV 酶污染的问题。

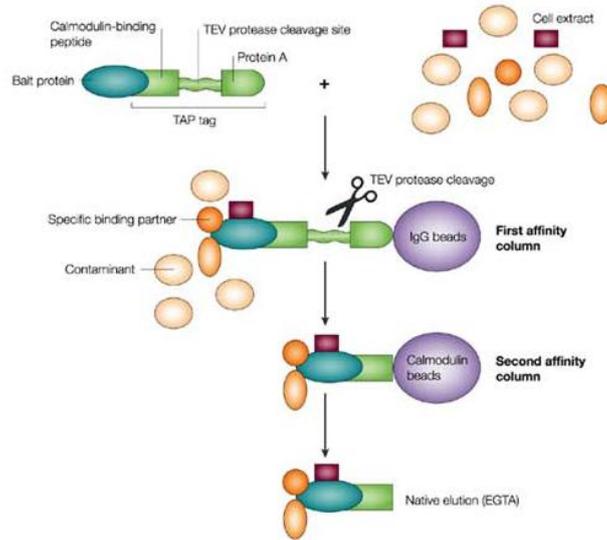


图 2：串联亲和纯化 (TAP) 原理

TAP 检测相互作用实验流程

1. 得到稳定表达的细胞或组织

构建 TAP 标签-蛋白质粒导入到细胞或生物体内。获得可正常表达的融合 TAP 标签蛋白。

2. 细胞抽提物的获得

转染后，获得细胞抽提物。需要注意的是：各无论何种抽提策略，都必须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。

3. 串联亲和纯化

- IgG 亲和柱进行第一轮纯化，ProtA 与亲和柱紧密结合，洗去杂蛋白；
- TEV 蛋白酶酶切，获得 CBP-融合蛋白/CBP-融合蛋白复合物；
- 钙调蛋白亲和柱进行第二轮亲和纯化。获得 CBP-融合蛋白复合物。

4. 质谱检测

TAP 技术优点

- 可以在细胞生理状态或者接近生理状态下，真实地反映蛋白质在生物体内的行为；
- 经过两次洗脱，降低了非特异蛋白量，更少的假阳性；
- 适用于大规模的蛋白质相互作用研究；
- 可以反应复杂的蛋白相关性，除了鉴定到直接结合蛋白，也能检测到非直接结合蛋白，甚至捕捉到除蛋白质以外的小分子物质。
- TAP 标签种类多样，能根据研究需要选择和设计标签，技术适用广泛且实用性强；

TAP 技术局限性

- TAP 标签本身对蛋白质结构可能存在影响；
- TAP 标签可能会影响蛋白的表达水平（通过改变标签的位置对解决这个问题有一定的帮助）；
- 由于组分之间的亲和力不同，复合体中结合比较松的组分可能会在纯化的漂洗过程中丢失；

TAP 技术发展

随着 TAP 技术的发展，越来越多的标签供不同串联组合，常见的 TAP 标签有 FLAG 标签、金黄色葡萄球菌蛋白 A 的 2 个 IgG 结合域 (ProtA)、Strep 标签、His 标签、钙调蛋白结合肽 (calmodulin2binding peptide, CBP) 以及角质素结合结构域 (chitin2binding domain, CBD) 等。在选择串联标签时应综合考虑纯化回收率、纯度、对融合蛋白的结构和生物学的影响以及成本等因素。

在两亲和纯化标签之间存在酶切位点，该位点以烟草蚀纹病毒酶切点 (TEV) 最为常见，原因是 TEV 蛋白酶高效特异，基本不含其它细胞蛋白识别点，使用 TEV 蛋白酶切掉相关蛋白质的概率极低。

标签融合的位置 融合标签可以加在靶蛋白的 N 端也可以加在靶蛋白的 C 端，通常推荐使用 C-端 TAP 标签，这样可以使融合蛋白的表达在天然启动子的控制下，蛋白表达不受影响（有的蛋白当其 C 端加上其它肽段后会影晌该蛋白的功能，此时应利用 N 端 TAP 标签）。如果不知如何选择标签，可以在实验初始设计两条融合蛋白（标签位置一条在 N 端，一条在 C 端），以应对无法顺利表达的问题。

更多阅读

[酵母双杂交系统检测蛋白相互作用](#)

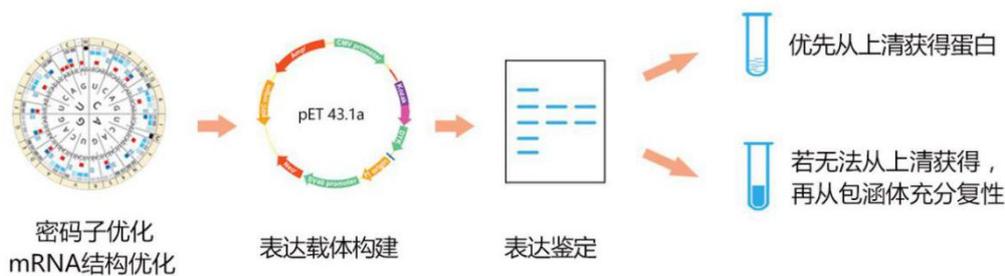
[免疫荧光共振检测蛋白相互作用](#)

南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

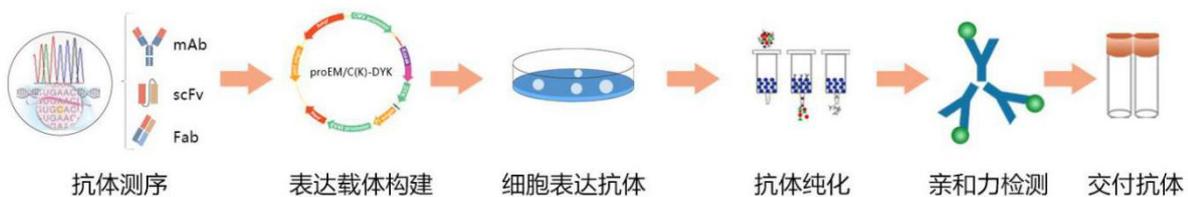
一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



二、蛋白表达（大肠杆菌表达）成功率>95%，不成功不收费，成功有保障



三、重组抗体表达 若想改造一个抗体，可以试试重组表达



四、稳定细胞系构建 研究级细胞系构建 & 高表达细胞株开发

