

重组人肿瘤坏死因子蛋白 TNF- α 的纯化与功能鉴定

孔超^{1,2}, 李丹², 袁晓君¹, 李斌²

1. 上海大学生命科学学院, 上海市能源作物育种及应用重点实验室, 上海 200444
2. 中国科学院上海巴斯德研究所分子病毒与免疫重点实验室, 上海 200031

摘要 串联亲和纯化系统(TAP)是近年来广泛使用的一种可在接近于生理条件下探究蛋白间相互作用的生化纯化方法。目前许多关于TAP的研究报道均使用细胞内转录因子为目标蛋白,探索细胞内与其相互作用的蛋白分子。本文尝试建立一种细胞外配体-受体刺激介导的信号转导初始复合体的纯化体系,为此选择了一种多功能的免疫分子配体蛋白——肿瘤坏死因子蛋白超家族(TNFSF)中的核心成员 TNF- α 。TNF- α 是一个强效促炎因子,可介导炎症反应、细胞凋亡和激活等生理效应,是至今研究最多的TNFSF成员。利用原核表达系统纯化出了一种带有多个标签的重组人源TNF- α 蛋白,通过检测其受体下游信号通路鉴定该蛋白与天然TNF- α 蛋白的生理活性相似,从而证明该蛋白可以用于胞外TAP系统探究TNFR下游信号通路,为配体-受体刺激介导的信号转导初始复合体的胞外串联亲和纯化系统的建立奠定了基础。

关键词 串联亲和纯化;肿瘤坏死因子;蛋白纯化

串联亲和纯化(Tandem affinity purification, TAP)于1999年被Reagall^[1]等报道,是一种可在接近于生理条件下纯化出与目标蛋白相互作用的蛋白或蛋白复合体的生化纯化方法,它基于抗原-抗体的免疫亲和原理,利用目标重组蛋白上的不同标签分两步法或多步法将与目标重组蛋白产生相互作用的蛋白组分纯化,与质谱法偶联后可以精确探究与该蛋白有直接或间接相互作用的蛋白分子组成,近些年来被人们广泛使用。本课题组先前利用该系统鉴定出诸如Stub1、DBC1等与FOXP3蛋白有直接相互作用的蛋白分子,用于调节性T细胞在炎症条件下的功能与分子机制研究^[2-3]。尽管利用TAP系统的研究有很多^[4-6],这些应用方法却几乎都是以胞内蛋白转录因子为目标蛋白,纯化出细胞内与之相互作用的其他组分(包括未知组分);对于胞外配体蛋白介导的受体下游信号转导复合体的纯化应用则很少^[7],这导致对胞外配体受体结合触发的信号转导起始过程不甚了解。因此,依据同样的系统,想建立一种基于配体-受体结合激活的受体下游信号转导复合体的串联亲和纯化方法,纯化出一个常见的多功能的重要蛋白配体,融合入串联亲和纯化系统组成重组蛋白配体,利用受体与配体的亲和力纯化出受体介导的信号转导

初始复合体。

肿瘤坏死因子超家族是细胞因子中的一大家族,可介导急慢性炎症反应、病原体细胞凋亡等,对人体免疫系统清除病原微生物、维持自身免疫耐受和内环境稳态等生理过程有着不可或缺的作用^[8-9]。该蛋白家族包括:TNF- α 、GITRL、OX40L、4-1BBL、FASL等,其中TNF- α 的功能研究得最清楚, TNF- α 由激活的巨噬细胞和T细胞产生,有25KD的跨膜型(Transmembrane TNF- α , tTNF- α)和17KD的可溶型(soluble TNF- α , sTNF- α)2种形式,并可以不同的亲和力结合不同的TNFR^[10-12]。目前为止,研究较为透彻的是TNF- α 与TNFR1信号通路。TNF- α 结合到TNFR1后,可以激活受体招募接头蛋白——肿瘤坏死因子受体相关的死亡结构域蛋白(TNFR associated death domain, TRADD), TRADD通过自身死亡结构域与Fas相关的死亡结构域蛋白(Fas-associated death domain protein, FADD)直接结合,通过caspase级联信号通路介导细胞的凋亡^[13-14]。此外,TRADD还可与TNFR相关蛋白因子2(TNFR associated factor protein 2, TRAF2)相互作用,并相继招募受体反应蛋白(Receptor interacting protein, RIP)、转化生长因子 β 激活激酶1(TGF- β -activated kinase 1, TAK1)及

收稿日期:2016-04-22;修回日期:2016-09-17

基金项目:国家重点基础研究计划(973计划)项目(2014CB541803);中国博士后科学基金项目(2012M520946);国家自然科学基金重点项目(81330072)

作者简介:孔超,硕士研究生,研究方向为分子免疫,电子邮箱:ckong@ips.ac.cn;李斌(通信作者),教授,研究方向为分子免疫,电子邮箱:binli@sibs.ac.cn

引用格式:孔超,李丹,袁晓君,等.重组人肿瘤坏死因子蛋白TNF- α 的纯化与功能鉴定[J].科技导报,2017,35(8):70-74;doi:10.3981/j.issn.1000-7857.2017.08.008

I κ B激酶(I κ B kinase, IKK)等形成复合体^[15-16]。IKK复合体继而磷酸化I κ B导致其降解,引起NF- κ B向核内转移,从而激活诸如趋化因子、白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)、IL-8、IL-18等在内的效应分子的表达,引起炎症效应^[15, 17]。除了诱导细胞凋亡, TNF α 结合到TNFR1后,还可通过TRADD、TRAF2-RIP、MEKK1、MKK7、JNK等转录因子诱导激活蛋白1(activator protein-1, AP-1)的表达,起到抑制细胞凋亡和激活细胞增殖的作用^[9, 18-19]。

鉴于TNF- α 在免疫系统中的重要作用,笔者研究组拟纯化出带有多个标签的人源重组TNF- α 蛋白,使用该重组蛋白建立胞外亲和纯化系统。本文利用原核表达系统纯化出人源重组TNF- α 蛋白,并初步检测了该重组蛋白的活性,从而为初步建立胞外配体-受体介导的信号转导复合体的串联亲和纯化系统奠定基础。

1 实验设计

TAP方法至今绝大多数运用于与细胞内转录因子蛋白相互作用的蛋白复合体的纯化中,而胞外配体蛋白介导的受体激活引起的信号转导复合体的纯化则很少有研究涉及。本实验旨在设计一种带有多个标签的重组人源TNF- α 配体蛋白,利用原核细胞表达系统表达出该重组蛋白,并检测该蛋白是否与天然TNF- α 相同,可以介导TNFR信号转导,从而判定建立胞外串联亲和纯化系统的可能性。

2 材料与方法

2.1 试剂

普通PCR试剂盒、DNA连接酶试剂盒、RT-PCR试剂盒购自宝日生物技术有限公司(Takara Bio Inc)公司,日本;质粒小提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,中国;淋巴细胞分离液购自通用电气医疗公司,美国;Trizol试剂购自Life Technology公司,美国;牛肉膏、蛋白胨购自Sigma-Aldrich公司,美国;二硫苏糖醇(DTT)、尿素、CHAPS、Pharmlyte、溴酚蓝、十二烷基磺酸钠(SDS)、过硫酸铵和TEMED购自Amersham Pharmacia公司,美国;丙烯酰胺、N,N-甲叉双丙烯酰胺购自上海生工,中国;RPMI 1640和DMEM购自Gibco公司,美国;I κ B抗体、磷酸化I κ B抗体购自CST公司,美国;考马斯亮蓝染色、氯化钠等常用试剂购自国药集团化学试剂有限公司,中国。

2.2 仪器

BIO-RAD T100 TM Thermal Cycler, Tanon-5500 Western Blot显色仪, Eppendorf离心机, 摇床, 超声破碎仪等。

2.3 Jurkat细胞系

Jurkat T细胞购自美国ATCC公司,是一种急性T细胞白血病细胞系,属于CD4⁺T细胞系,高表达MHC II类分子。用含10%胎牛血清的1640培养基培养传代。

2.4 人外周血单核细胞(PBMC)分离

将去除血浆后的人外周血组分和等体积PBS混匀。取

新的50 mL离心管,加入适量Ficoll淋巴细胞分离液,将稀释好的外周血组分沿离心管壁缓慢加入,现象为液体自然分层。将离心管平衡,1600 r/(m \cdot min) 4 $^{\circ}$ C离心25 min,升速加速度为3,降速加速度为0。离心后液体分为4层,从上至下依次为PBS、PBMC、淋巴细胞分离液、红细胞。缓慢收集中间层PBMC细胞,加入适量PBS,离心弃上清,获得PBMC细胞。

2.5 原核细胞表达系统

利用多种限制性内切酶将TNF- α 基因片段与原核表达载体pET28 α 连接,构成完整的pET28 α -His-2 \times FLAG-TCS-CBP-TNF- α 原核表达系统。

2.6 His亲和纯化

将诱导好的Rosetta细胞裂解,离心取上清用适量Ni-NTA agarose和适当浓度的咪唑孵育3 h,并用BIO-RAD的Poly-prep柱过滤,用含80 mmol咪唑的磷酸缓冲液清洗Ni-NTA agarose 3次,用含300 mmol咪唑的磷酸缓冲液洗脱,并用新鲜磷酸缓冲液透析,-80 $^{\circ}$ C保存。

2.7 免疫印迹

分别用适当浓度的重组TNF- α 和天然TNF- α 刺激Jurkat细胞,RIPA裂解液裂解细胞30 min后12000 r/(m \cdot min) 4 $^{\circ}$ C离心取上清,SDS缓冲液变性,100 $^{\circ}$ C煮样10 min,进行SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳,并将样品转于硝酸纤维素膜上,后用含5%牛奶的1 \times TBST封闭1 h,一抗孵育过夜,二抗孵育1 h,显色检测I κ B的磷酸化水平。

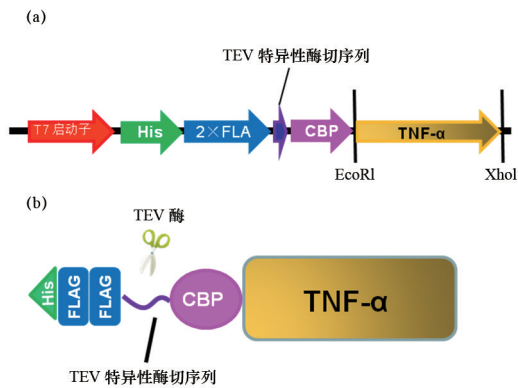
3 结果

3.1 原核细胞纯化系统的建立

通过查询TNF- α 在人体组织细胞中的表达情况,发现人外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)高表达TNF- α 。依据TNF- α 的编码区设计引物,以PBMCs cDNA为模板,克隆TNF- α 基因,并利用EcoRI、XhoI等限制性内切酶位点将该基因插入已有的原核表达质粒pET28 α ,构建了含有His、FLAG、CBP等多个标签蛋白的重组TNF- α 原核表达系统,如图1(a)所示。图1(b)示重组TNF- α 蛋白的标签组成,其中His标签含有6个连续的组氨酸,可用该重组蛋白在原核表达系统中的His亲和纯化;2个FLAG标签蛋白紧邻His标签之后,用于串联亲和纯化中的第一步免疫亲和纯化;CBP(Calmodulin binding protein)是钙调蛋白结合蛋白,用于第二步免疫亲和纯化;FLAG标签和CBP之间由一个特异的TCS(TEV cleavage site)氨基酸序列所连接,可被烟草蚀纹病毒(Tobacco Etch Virus)的蛋白酶特异性识别并切割。

3.2 重组TNF- α 蛋白的纯化

为了表达出有活性的重组TNF- α ,将分子伴侣热休克蛋白pGEX-HSP90质粒与pET28 α -His-2 \times FLAG-TCS-CBP质粒共转到Rosetta中,用卡那霉素和氨基青霉素筛选单克隆,37 $^{\circ}$ C条件下用SOC培养基将Rosetta培养至光密度值约0.6~0.7,随即加入0.5 mmol/L的IPTG,于18 $^{\circ}$ C条件下诱导16 h。取少量细胞裂解后进行考马斯亮蓝染色和免疫印迹实验,如

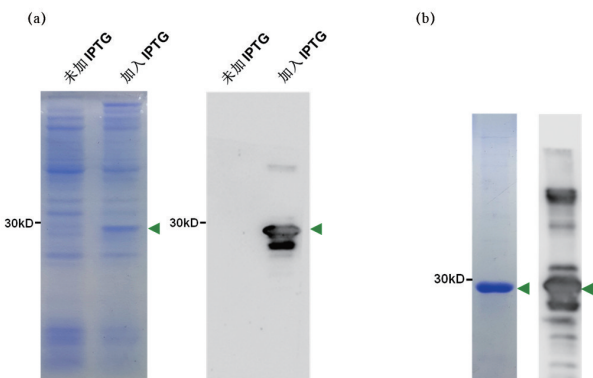


(a) 重组 TNF- α 的原核表达系统 pET28 α -His-2 \times FLAG-TCS-CBP-TNF- α ; (b) 重组 TNF- α 蛋白示意图, 其中 His 标签用于该重组蛋白在原核系统的纯化, FLAG 标签用于第一步亲和纯化, TEV 特异性酶切序列可以被 TEV 酶特异性切开, 使得重组 TNF- α 丢失 His 和 FLAG 标签, 只带有 CBP 标签的 TNF- α 可进一步用于第二步的钙调蛋白高亲和力纯化

图 1 原核细胞纯化系统的建立

Fig. 1 Establishment of prokaryotic purification system

图 2(a), 发现 Rosetta 高表达可溶的重组 TNF- α , 且显示较好的特异性。随后大量诱导 Rosetta 细胞进行蛋白表达, 磷酸裂解液裂解细胞后, 将裂解产物与 Ni-NTA agarose 和 50 mmol/L 咪唑孵育 3 h, 后用含 80 mmol/L 咪唑的磷酸裂解液洗杂, 用含 400 mmol/L 咪唑的磷酸裂解液洗脱目的蛋白, 配置新鲜磷酸缓冲液透析, -80 $^{\circ}$ C 保存。取少量重组蛋白用 SDS 上样缓冲液变性, 100 $^{\circ}$ C 煮样 10 min, 进行 SDS 凝胶电泳后进行考马斯亮蓝染色和免疫印迹(抗 FLAG 抗体)。如图 2(b) 考马斯亮蓝染色表明纯化的重组 TNF- α 纯度很高, 抗 FLAG 抗体的免疫印记显示很强的特异性。



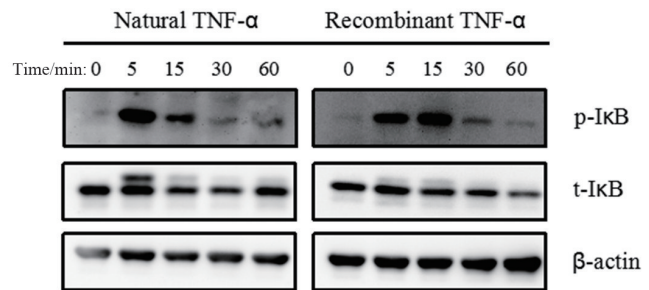
(a) 选择 Rosetta 原核表达菌株, 将重组 TNF- α 质粒与分子伴侣蛋白 HSP90 质粒共转入 Rosetta 菌株, IPTG 诱导蛋白表达, 发现条件为 IPTG 浓度 0.5 mmol/L、温度为 18 $^{\circ}$ C、诱导时长为 16 h 时可较好诱导该蛋白表达, 左图示考马斯亮蓝染色结果, 右图示免疫印迹结果(anti-FLAG 抗体); (b) His 亲和纯化, 考马斯亮蓝染色与免疫印迹检测蛋白纯度。左图示考马斯亮蓝染色结果, 右图示免疫印迹结果(anti-FLAG 抗体)

图 2 重组融合蛋白的纯化

Fig. 2 Purification of recombinant TNF- α

3.3 重组 TNF- α 蛋白的活性检测

已知 TNF- α 结合到 TNFR1 后可以引起受体三聚化, 从而招募下游 TRADD 蛋白和 FADD 蛋白, 并相继招募和活化 RIP、TAK1、IKK 复合体等, IKK 接着磷酸化 I κ B 导致其降解, 使得 NF- κ B 入核, 激活下游基因转录。已知 Jurkat T 细胞表达 TNFR1 受体, 而低浓度的天然 TNF- α 可以在短时间内刺激 Jurkat T 细胞中 NF- κ B 的入核(并不导致细胞凋亡)。因此, 为了检测纯化的重组 TNF- α 是否与天然 TNF- α 具有相同或相似活性, 将 Jurkat T 细胞分为 2 组, 一组用 50 ng/mL 的天然 TNF- α 处理, 一组用约相同浓度的重组 TNF- α 处理, 分别刺激细胞 5、15、30、60、120 min, 细胞裂解后进行免疫印迹检测, 图 3 显示天然 TNF- α 处理组的细胞在 5 min 时 I κ B 的磷酸化水平达到最高, 相比较而言, 重组 TNF- α 也可以引起 I κ B 磷酸化, 但其磷酸化进程有一定延滞, 可能与重组 TNF- α 的多个标签有关。由此可以得出结论: 重组 TNF- α 与天然 TNF- α 具有相似的活性, 均可引起 TNFR 发生激活, 触发 NF- κ B 信号通路, 从而说明串联亲和纯化系统适用于胞外配体受体介导的信号转导初始复合物的纯化。



相似浓度的天然 TNF- α 与重组 TNF- α 分别刺激 Jurkat 细胞不同时间, 免疫印迹检测 I κ B 的磷酸化水平, p-I κ B: 磷酸化 I κ B 蛋白; t-I κ B: 总 I κ B 蛋白; β -actin: β 肌动蛋白, 为内参蛋白

图 3 重组 TNF- α 蛋白的功能检测

Fig. 3 Bio-activity identification of recombinant TNF- α

4 讨论与结论

串联亲和纯化是研究蛋白-蛋白间相互作用的有效方法, 与酵母杂交系统等方法相比, 其可在接近于生理条件下探究蛋白分子间相互作用, 与质谱法联用后可以鉴定出与目标蛋白相互作用的多种蛋白组分, 是一种鉴定目标蛋白的“一对多”作用甚至鉴定未知组分的强有力手段。2009 年, Haas 等^[7]利用 TAP 系统纯化出重组 TNF- α , 并利用该重组 TNF- α 钓出 TNFR1 下游复合体, 完善了 TNFR1 信号通路。目前我们已知在 TNFR1 信号通路中, 起到核心作用的是 RIPK1 等的翻译后修饰过程, 不同细胞应答于不同的刺激, 发生不同的信号转导和翻译后修饰过程, 介导多种细胞效应的发生。而这些细胞内的特异蛋白因子的翻译后修饰是一个极度动态的连续过程, 以至于在配体刺激了不同时间时, 细

胞中可以发生不同的修饰变化。为了探究这个问题,本文尝试利用不同的标签建立一套基于胞外配体-跨膜受体结合介导的初始信号转导复合体的串联亲和纯化体系,可通过配体与受体间亲和力纯化出细胞在接受TNF- α 刺激后的不同时间段里的动态下游信号转导复合体,为理解信号初始转导的完整过程提供手段。鉴于TNF- α /TNFR信号通路的复杂性和多变性,目前对该信号通路的研究还有许多尚未解决的问题,虽然TNFR1介导的信号转导过程已经比较清楚,但TNFR2受体下游的信号转导过程有哪些蛋白组分参与仍然所知甚少;值得一提的是,在不同的环境条件中TNFR1可以介导不同的信号,发生不同甚至完全相反的生理效应,而当细胞同时存在着TNFR1和TNFR2时,后者经常扮演着TNFR1的“阻拦者”角色;此外单独的TNFR2信号通路在HIV感染^[20]、调节性T细胞功能^[21]和人体免疫稳态^[22]等方面也有非常重要的作用。关于这些生理效应的分子机制仍然不清楚,为了尝试解决这些问题,拟建立一套胞外串联亲和纯化系统,在接近于生理条件下利用免疫亲和纯化的方法研究TNFR1和TNFR2信号通路,以及两者之间的存在的协作或拮抗关系。通过分子克隆和生化等方法构建并纯化了带有多个标签的重组TNF- α 蛋白,并将用于TAP纯化的多个标签表达于蛋白的N端,为了验证该标签是否会影响TNF- α 的功能,比较了重组TNF- α 与天然TNF- α 的活性,发现该重组蛋白可以介导与天然TNF- α 相同的信号转导活动,即用于TAP系统的多个标签不会影响该蛋白的功能,因此有理由相信该EX-TAP系统的可行性。至于该系统的效率如何,仍然需要进一步验证。需要说明的是,该系统的建立只是第一步,在不同的刺激条件下应用该系统研究TNFR1和TNFR2的信号通路是下一步的目标。

致谢: 本文研究在上海大学与中国科学院上海巴斯德研究所联合培养硕士研究生项目基础上完成,并得到了林芳、殷淑英等的帮助。

参考文献(References)

- [1] Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, et al. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration [J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(10): 1030-1032.
- [2] Chen Z, Barbi J, Bu S, et al. The ubiquitin ligase Stub1 negatively modulates regulatory T cell suppressive activity by promoting degradation of the transcription factor Foxp3[J]. *Immunity*, 2013, 39(2): 272-285.
- [3] Gao Y, Tang J, Chen W, et al. Inflammation negatively regulates FOXP3 and regulatory T-cell function via DBC1[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(25): E3246-3254.
- [4] Gavin A C, Bosche M, Krause R, et al. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes[J]. *Nature*, 2002, 415(6868): 141-147.
- [5] Forler D, Kocher T, Rode M, et al. An efficient protein complex purification method for functional proteomics in higher eukaryotes[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(1): 89-92.
- [6] Burckstummer T, Bennett K L, Preradovic A, et al. An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells[J]. *Nature Methods*, 2006, 3(12): 1013-1019.
- [7] Haas T L, Emmerich C H, Gerlach B, et al. Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction[J]. *Molecular Cell*, 2009, 36(5): 831-844.
- [8] Herbein G, O'Brien W A. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF receptors in viral pathogenesis[J]. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine*, 2000, 223(3): 241-257.
- [9] Brenner D, Blaser H, Mak T W. Regulation of tumour necrosis factor signalling: Live or let die[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2015, 15(6): 362-374.
- [10] Black R A, Rauch C T, Kozlosky C J, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells[J]. *Nature*, 1997, 385(6618): 729-733.
- [11] Grell M, Douni E, Wajant H, et al. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor[J]. *Cell*, 1995, 83(5): 793-802.
- [12] Grell M, Wajant H, Zimmermann G, et al. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(2): 570-575.
- [13] Hsu H, Xiong J, Goeddel D V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation[J]. *Cell*, 1995, 81(4): 495-504.
- [14] Hsu H, Shu H B, Pan M G, et al. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways[J]. *Cell*, 1996, 84(2): 299-308.
- [15] DiDonato J A, Hayakawa M, Rothwarf D M, et al. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B[J]. *Nature*, 1997, 388(6642): 548-554.
- [16] Mercurio F, Zhu H, Murray B W, et al. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation[J]. *Science*, 1997, 278(5339): 860-866.
- [17] Devin A, Cook A, Lin Y, et al. The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation[J]. *Immunity*, 2000, 12(4): 419-429.
- [18] Natoli G, Costanzo A, Moretti F, et al. Tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 signaling downstream of TNF receptor-associated factor 2. Nuclear factor κ B (NF κ B)-inducing kinase requirement for activation of activating protein 1 and NF κ B but not of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(42): 26079-26082.
- [19] Dondelinger Y, Jouan-Lanhouet S, Divert T, et al. NF- κ B-independent role of IKK α /IKK β in preventing RIPK1 kinase-dependent apoptotic and necroptotic cell death during TNF Signaling[J]. *Molecular Cell*, 2015, 60(1): 63-76.
- [20] Herbein G, Montaner L J, Gordon S. Tumor necrosis factor alpha inhibits entry of human immunodeficiency virus type 1 into primary human macrophages: A selective role for the 75-kilodalton receptor[J]. *Journal of Virology*, 1996, 70(11): 7388-7397.
- [21] Minigo G, Woodberry T, Piera K A, et al. Parasite-dependent expansion of TNF receptor II-positive regulatory T cells with enhanced sup-

pressive activity in adults with severe malaria[J]. *PLoS Pathogens*, 2009, 5(4): e1000402.
[22] Venkatesh D, Hernandez T, Rosetti F, et al. Endothelial TNF receptor

2 induces IRF1 transcription factor-dependent interferon-beta autocrine signaling to promote monocyte recruitment[J]. *Immunity*, 2013, 38(5): 1025-1037.

Purification and functional analysis of human recombinant tumor necrosis factor- α

KONG Chao^{1,2}, LI Dan², YUAN Xiaojun¹, LI Bin²

1. Shanghai Key Laboratory of Bio-energy Crops, College of Life Science, Shanghai University, Shanghai 200444, China

2. Key Laboratory of Molecular Virology & Immunology, Institute Pasteur of Shanghai, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China

Abstract The Tandem Affinity Purification (TAP) is a powerful tool for the investigation of the protein-protein interactions under physiological or similar conditions. Many previous studies including our group's identified massive protein-protein interactions by manipulating the TAP system. However, almost all of these studies were focused on the interactions between the endocellular transcription factors, not so much on the extracellular ligand-transmembrane receptor mediated signal transduction process. This paper establishes an EX-TAP system for analyzing the extracellular ligand-transmembrane receptor mediated signal initial transduction process, constructs a prokaryotic recombinant protein expressing system and purifies a multi-tagged recombinant TNF- α from bacteria. The TNF- α is a pleiotropic pro-inflammatory factor which triggers the initial inflammation in vivo and is well defined in the past few decades, which is helpful for the identification of the feasibility of our EX-TAP system. By testing the phosphorylation of the inhibitor of the transcription factor κ B, under the TNFR pathway, our recombinant TNF- α is determined biologically similar to the natural TNF- α and is functionally available to the EX-TAP system.

Keywords tandem affinity purification; protein purification; TNF- α /TNFR

(责任编辑 刘志远)