

pCMV-N-Flag-AirID (邻近蛋白生物素标记质粒)

产品编号	产品名称	包装
D3027-1 μ g	pCMV-N-Flag-AirID (邻近蛋白生物素标记质粒)	1 μ g
D3027-100 μ g	pCMV-N-Flag-AirID (邻近蛋白生物素标记质粒)	100 μ g

产品简介:

- pCMV-N-Flag-AirID (邻近蛋白生物素标记质粒)是碧云天自行研发生产的一种用于在哺乳动物细胞中表达N端融合3X Flag标签和AirID的目的蛋白以用于生物素标记与其相互作用的目的蛋白的质粒。在ATP和生物素(Biotin)存在的条件下, AirID融合蛋白根据其是否保留linker, 能对10nm或35nm半径内无论是直接相互作用的蛋白还是邻近的蛋白任意暴露在外的赖氨酸残基进行生物素标记, 后续可通过Streptavidin磁珠或凝胶从细胞裂解液中分离纯化生物素标记蛋白, 并通过质谱(Mass spectrometry, MS)鉴定相互作用的蛋白(图1)。邻近蛋白生物素标记质粒在筛选和鉴定生物体内的蛋白与蛋白相互作用和探索相关功能方面发挥着至关重要的作用[1-3]。

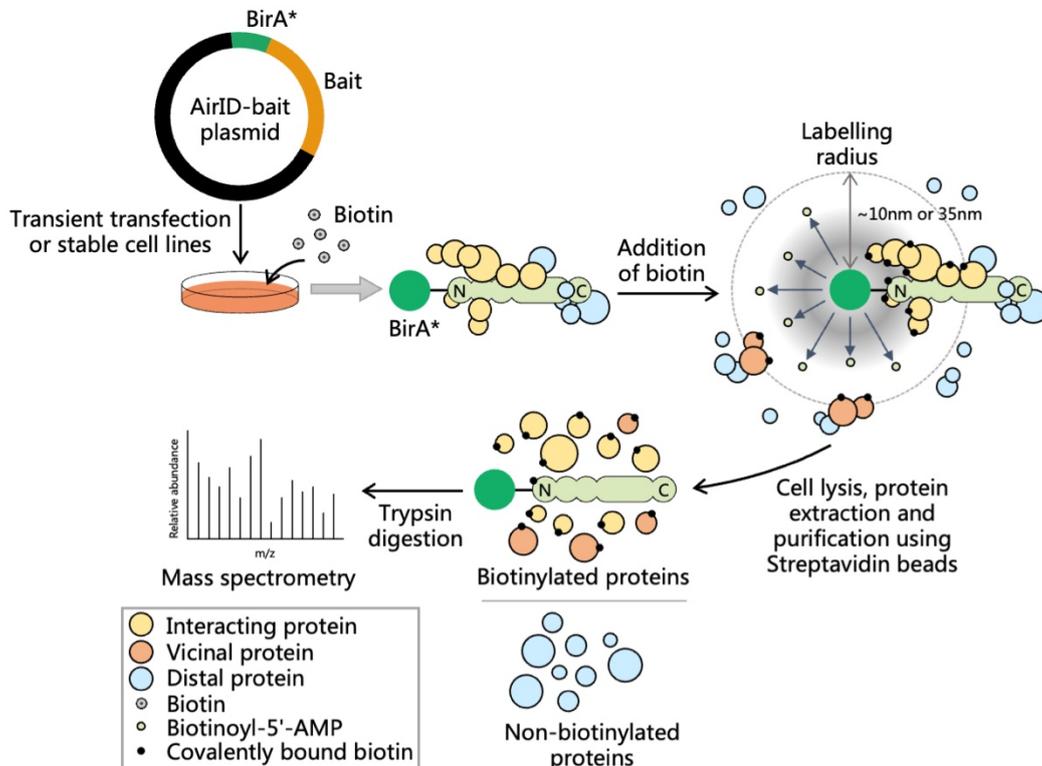


图1. 碧云天邻近蛋白生物素标记质粒的工作原理图。

- 邻近依赖的生物素标记鉴定(Proximity-dependent biotin identification, BioID)技术是基于来源于*E.coli*生物素连接酶(Biotin ligase, BirA)的R118G突变体BirA*。BirA可在ATP存在的条件下, 高效活化生物素(D-Biotin)形成生物素酰-5'腺苷酸(Biotinoyl-5'-AMP), 并特异性地将生物素连接到Avi标签(GLNDIFEAQKIEWHE)的赖氨酸残基上, 从而对目的蛋白进行快捷、高效的生物素标记; 但由于来源于大肠杆菌的BirA*发生R118G突变, 其活化的生物素酰-5'腺苷酸不再特异性修饰Avi标签的赖氨酸残基, 而是可以对与其邻近的(~10nm)任意暴露在外的蛋白赖氨酸残基进行生物素标记。
- **BioID具有如下优点:** ①**适用范围广:** BioID融合蛋白可以在大部分细胞中表达, 除了直接相互作用的蛋白, 一定范围内邻近的蛋白也会被生物素标记, 便于研究天然情况下目标蛋白与周围蛋白的相互作用; 适合空间和时间上细胞的动态过程的研究, 还可以提供动力学数据。②**敏感性高:** BioID可以有效识别无法通过酵母双杂交(Yeast two hybrid, Y2H)或亲和纯化检测的体内蛋白与蛋白之间微弱、短暂的相互作用。③**克服溶解度难题:** BioID特别适合研究在酵母双杂交中可溶性差或较难纯化的蛋白。④**标记的蛋白易纯化、背景低:** 蛋白经BioID标记生物素后与Streptavidin磁珠或凝胶结合紧密, 可用强去垢剂(可耐受2% SDS)洗涤, 消除非特异性结合蛋白, 降低背景。
- **本产品中采用的AirID (Ancestral BirA for proximity-dependent biotin identification)是BioID的改进增强版本。** AirID是基于*E.coli*生物素连接酶利用祖先酶重建算法(Ancestral enzyme reconstruction algorithm)和宏基因组学(Metagenomics)人工改造获

得的新型生物素连接酶，同样被称为BirA*。

- **AirID技术和BioID相比具有多方面的优点。**
 - ①**更灵活的生物素标记半径：**在质粒构建时可通过选择不同的酶切位点，在AirID和诱饵蛋白之间调节是否表达linker (13X GGGGS repeats, ~25nm)控制邻近蛋白生物素标记的半径，不表达linker的AirID融合蛋白生物素标记半径为~10nm，而表达linker的AirID融合蛋白生物素标记半径为~35nm (图2)。这种生物素标记半径选择的灵活性，适合研究体积较大的蛋白和较大的蛋白复合物。
 - ②**更小的细胞毒性：**AirID长时间表达对细胞的毒性较小，适用于筛选生物体内蛋白的相互作用。
 - ③**更低的生物素浓度：**BioID需在生物素浓度高于50μM的条件下才能有效标记相互作用的蛋白质，而AirID在0.05-5μM生物素的范围内都可以有效标记相互作用的蛋白。AirID所需生物素用量更少，降低了生物素对细胞功能的潜在影响。
 - ④**更高的生物素连接酶活性：**BioID通常需要16小时才能有效标记相互作用的蛋白质，而AirID只需要3小时就可以达到相似的效果。
 - ⑤**更宽的反应温度范围：**BioID反应温度低于37°C时酶活明显降低，而AirID在26°C-37°C都具有良好的生物素标记活性[4]。

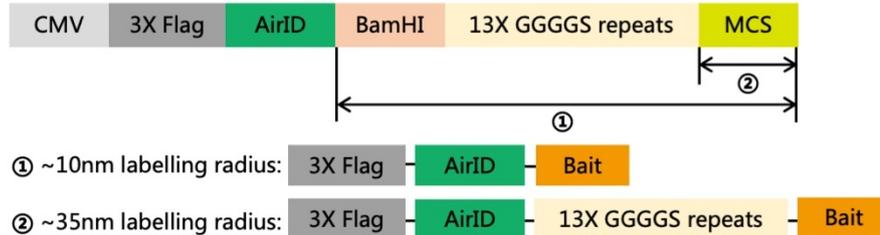
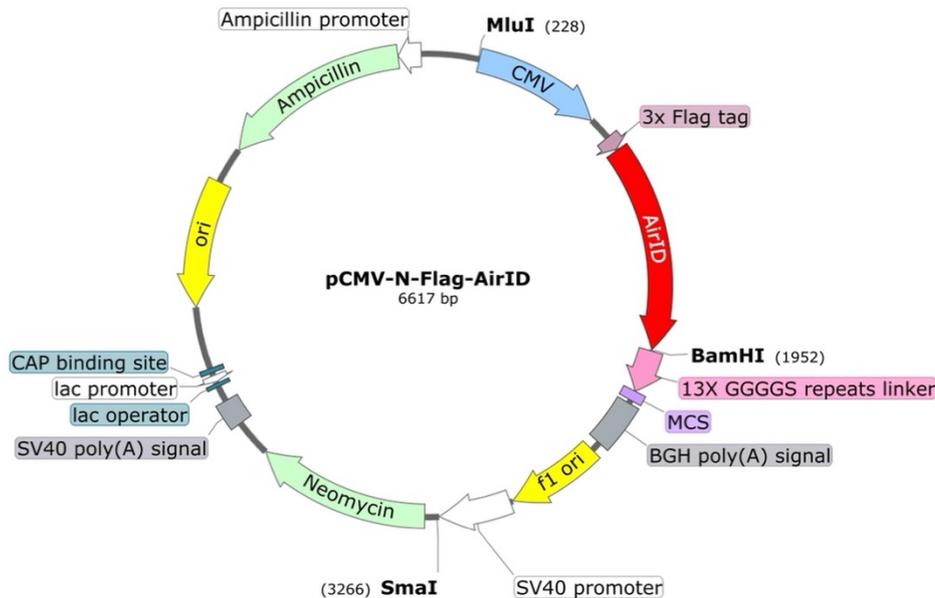


图2. 碧云天pCMV-N-Flag-AirID质粒灵活的生物素标记半径原理图。①和②不同的酶切位点形成不同的生物素标记半径。

- 碧云天各种邻近蛋白生物素标记质粒的比较和选择，请参考 <https://www.beyotime.com/support/BioID.htm>
- 本质粒含有CMV启动子，可以高效启动目的蛋白在细胞中的表达；表达的融合蛋白带有3X Flag标签便于检测；带有氨苄青霉素(Ampicillin)抗性和新霉素(Neomycin)抗性，可利用其氨苄青霉素抗性转化大肠杆菌后筛选阳性菌；转染哺乳动物细胞后，可使用G418 (ST081)筛选稳定表达目的蛋白的细胞株，G418和新霉素效果一致，但G418的细胞毒性更低。
- pCMV-N-Flag-AirID质粒(6617bp)的图谱如下：



- pCMV-N-Flag-AirID质粒的主要信息如下：

Feature	Nucleotide	Position
CMV promoter		235-818
3X Flag Tag		926-991
AirID		998-1951
13X GGGGS repeats linker		1958-2155
Multiple Cloning Sites		2156-2191
BGH poly(A) signal		2217-2441
f1 ori		2487-2951
SV40 promoter		2929-3258
Neomycin resistance gene		3325-4119
SV40 poly(A) signal		4293-4414
lac operator		4487-4503
CAP binding site		4556-4577

ori	4865-5450
Ampicillin resistance gene	5621-6481
Ampicillin promoter	6482-6586

➤ pCMV-N-Flag-AirID表达基因的详细图谱如下:

```

CMV Promoter
801 GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA CTGCTTACTG
    CAGATATATT CGTCTCGAGA GACCGATTGA TCTCTTGGGT GACGAATGAC

851 GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGC
    CGAATAGCTT TAATTATGCT GAGTGATATC CCTCTGGGTT CGACCGATCG

                                3X Flag Tag
901 GTTTAAACTT AAGCTTGCCA CCATGGACTA CAAGGACCAC GACGGCGACT
    CAAATTTGAA TTCGAACGGT GGTACCTGAT GTTCTTGGTG CTGCCGCTGA

                                                                AirID
951 ACAAGGACCA CGACATCGAC TACAAGGACG ACGACGACAA GGGCGGCAAG
    TGTTCCTGGT GCTGTAGCTG ATGTTCTCTG TGCTGCTGTT CCCGCCGTTT

1001 GACAACACCG TTCCGCTCAC GCTTATCTCT ATCCTTGCTG -----
    CTGTTGTGGC AAGGCGAGTG CGAATAGAGA TAGGAACGAC -----

1901 GACGGTGTGA TTAAGCCTTG GATTGGAGGT GAGATCAGCC TCAGATCTGC
    CTGCCACACT AATTCCGGAAC CTAACCTCCA CTCTAGTCGG AGTCTAGACG
    BamHI 13X GGGGS repeats Linker
1951 TGGATCCGGT GGAGGCGGGT CTGGAGGCGG GGGTAGTGGC GGGGGTGGAA
    ACCTAGGCCA CCTCCGCCCA GACCTCCGCC CCCATCACCG CCCCCACCTT

2001 GCGGGGGTGG AGGCGGGTCG GGTGGCGGAG GTAGCGGAGG -----
    CGCCCCCACC TCCGCCCAGC CCACCGCCTC CATCGCCTCC -----

2101 CGGAGGTAGC GGAGGCGGGT GAAGTGGTGG CGGAGGTAGC GGAGGCGGGT
    GCCTCCATCG CCTCCGCCAC CTTACCACC GCCTCCATCG CCTCCGCCAC
    KpnI      EcoRV      XhoI      ApaI
2151 GATCGGGTAC CGATATCGAA TTCCTCGAGT CTAGAGGGCC CGTTTAAACC
    CTAGCCCATG GCTATAGCTT AAGGAGCTCA GATCTCCCGG GCAAATTTGG
    BGH Poly(A) signal
2201 CGCTGATCAG CCTCGACTGT GCCTTCTAGT TGCCAGCCAT CTGTTGTTTG
    GCGACTAGTC GGAGCTGACA CGGAAGATCA ACGGTCGGTA GACAACAAC

```

➤ pCMV-N-Flag-AirID中没有的酶切位点包括:

AarI	AbsI	AccIII	AccB7I	AcvI	AfeI	AgeI
AjiI	AjuI	Aor13HI	Aor51HI	AscI	AsiGI	AsiSI
AxyI	BaeI	BarI	BbrPI	BlpI	BmgBI	BoxI
Bpu1102I	Bse21I	BseAI	BsgI	BshTI	BsiWI	BsmBI
Bsp13I	Bsp1407I	Bsp1720I	BspEI	BsrGI	BstAUI	BstEII
BstHPI	BstPI	BstPAI	Bsu36I	BtrI	CciNI	CelII
Cfr42I	CspAI	Eco47III	Eco72I	Eco81I	Eco91I	EcoO65I
Esp3I	FseI	FspAI	HpaI	I-CeuI	I-PpoI	I-SceI
KflI	Kpn2I	KspI	KspAI	MauBI	MreI	MroI
NotI	PacI	PalAI	PaqCI	PasI	Pfl123II	PflMI
PI-PspI	PI-SceI	PinAI	PmaCI	PmlI	PshAI	PspCI
PspEI	PspLI	PsrI	RgaI	RigI	SacII	SanDI
SbfI	SdaI	SfaAI	SfiI	Sfr303I	SgfI	SgrAI
SgrBI	SgsI	SmiI	SrfI	Sse8387I	SspBI	SstII
SwaI	Van91I	XcmI				

➤ pCMV-N-Flag-AirID中的单酶切位点包括:

AflII	AhdI	AleI	ApaI	AvrII	BamHI	BbsI
BsaBI	BsmI	BssHII	BstBI	BstZ17I	DraIII	EagI
EcoNI	EcoRI	EcoRV	HindIII	KasI	KpnI	MfeI
MscI	NarI	NdeI	NheI	NruI	PciI	PflFI
PluTI	PpuMI	PstI	PvuI	RsrII	SacI	ScaI

SfoI SgrDI SmaI SnaBI SpeI SspI StuI
 Tth111I XhoI XmaI

- pCMV-N-Flag-AirID质粒中推荐使用的测序引物序列如下：
 CMV-F (769-789): 5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'
 BGH-R (2228-2211): 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'
- pCMV-N-Flag-AirID的全序列信息请参考碧云天网站上该质粒的信息。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
D3027-1μg	pCMV-N-Flag-AirID	1μg
D3027-100μg	pCMV-N-Flag-AirID	100μg
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存。

注意事项：

- 本质粒未经碧云天书面许可不得用于任何商业用途，也不得移交给订货人所在实验室外的任何个人或单位。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

- 首次使用1μg包装的本产品时，请先取少量本质粒转化大肠杆菌，进行质粒小量、中量或大量抽提后再用于后续用途。抽提获得的质粒可以通过酶切电泳进行鉴定，或通过测序进行鉴定。
- 100μg包装的本产品质粒浓度为0.25μg/μl，共400μl。可以直接用于酶切或者转染细胞。
- 质粒构建。**

- 如果在多克隆位点(Multiple cloning sites, MCS)中选择1个限制性内切酶切位点和BamHI (GGATCC)限制性内切酶切位点，双酶切插入诱饵蛋白(Bait)的基因片段，则表达的融合有3X Flag-AirID的诱饵蛋白生物素标记半径为~10nm。
- 如果在多克隆位点(Multiple cloning sites, MCS)中选择1或2个限制性内切酶位点插入诱饵蛋白的基因片段，则表达的3X Flag-AirID和诱饵蛋白之间因有linker (13X GGGGS repeats, ~25nm)连接，诱饵蛋白生物素标记半径为~35nm。

注：克隆时须保持AirID与诱饵蛋白的碱基序列在同一阅读框中，避免因移码突变导致的诱饵蛋白不表达。

4. 检测诱饵蛋白表达、细胞定位和活性。

为获得最理想的实验效果，需选择适合的细胞类型用于3X Flag-AirID融合诱饵蛋白的适度表达，3X Flag-AirID融合诱饵蛋白的过量表达会导致假阳性的出现，因此在大规模表达3X Flag-AirID融合诱饵蛋白用于蛋白与蛋白相互作用鉴定时，建议少量转染细胞通过免疫荧光(Immunofluorescence)和蛋白质免疫印迹法(Immunoblot)评估、优化3X Flag-AirID融合诱饵蛋白的表达、定位和活性(图3)。

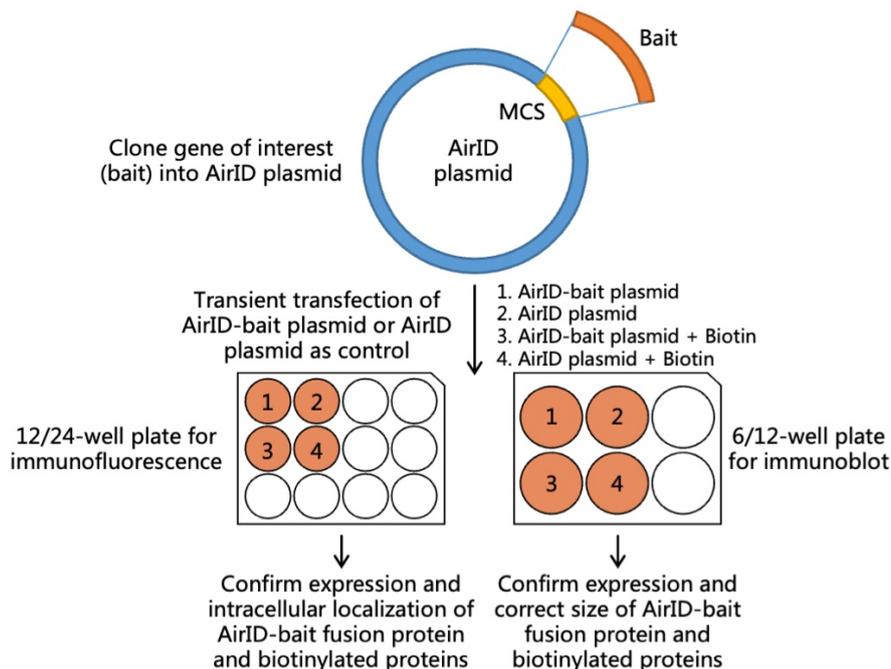


图3. 碧云天pCMV-N-Flag-AirID质粒推荐的使用流程图。

- 在转染前一天将适量细胞(具体的细胞数量根据细胞类型、大小和细胞生长速度等确定)分别接种到12孔板(用于

Immunofluorescence)和6孔板(用于Immunoblot)内进行培养,使第二天细胞密度能达到约70-80%。

- b. 使用合适的转染试剂例如Lipo8000™或Lipo6000™分别将克隆有诱饵蛋白质粒(pCMV-N-Flag-AirID-Bait)或阴性对照质粒(pCMV-AirID-Flag) (D3030)转染到细胞中。
- c. 在转染3-4小时后补充加入终浓度为0.05-50μM的生物素(图3, 3、4孔)或不补充加入生物素(图3, 1、2孔),继续培养1-24小时。

注1: 一般情况下, AirID在生物素终浓度为0.5μM的条件下就可以有效标记相互作用的蛋白,但还是建议在0.05-50μM范围内设置梯度,以寻找最适合的生物素使用浓度。

注2: AirID的酶活力很强,一般情况下, AirID只需要3小时就可以有效标记相互作用的蛋白,但还是建议在1-24小时范围内设置梯度,以寻找最适合的生物素标记时间。

- d. 免疫荧光(Immunofluorescence)检测融合有3X Flag-AirID的诱饵蛋白和被生物素标记的蛋白。
 - (a) 去除12孔板中的培养液,加入1-2ml冰浴预冷的PBS (C0221A),洗涤细胞,去除PBS,尽量确保没有液体残留。
 - (b) 加入0.5ml免疫染色固定液(P0098)或4%多聚甲醛固定液(P0099),固定细胞10分钟或更长时间(可4℃固定过夜)。

注: 也可以根据特定的一抗或样品采用有效成分为乙醇、甲醇或其它类型的固定液。
 - (c) 去除固定液,用免疫染色洗涤液(P0106)或TBSTx (ST675)洗涤3次,每次3-5分钟。洗涤时宜用摇床,或手动晃动数次。去除洗涤液,尽量确保没有液体残留。
 - (d) 用免疫染色封闭液(P0102/P0260)或含5% BSA的TBSTx溶液封闭60分钟,请置于摇床上轻轻摇动。
 - (e) 去除封闭液,选用合适的一抗对融合有3X Flag-AirID的诱饵蛋白进行免疫荧光染色,孵育60分钟或在摇床上轻轻摇动孵育60分钟,为增强与一抗的结合,可以在4℃孵育过夜。可同时使用DAPI染色液(C1005)或Hoechst (C1011/C1017/C1018)对细胞核染色,荧光探针标记的Streptavidin可以对生物素标记的蛋白进行荧光染色。

注: 推荐使用免疫染色一抗稀释液(P0103/P0262)或5% BSA的TBSTx溶液作为一抗稀释液。
 - (f) 去除一抗,用免疫染色洗涤液(P0106)或TBSTx (ST675)洗涤3-5次,每次3-5分钟。洗涤时宜用摇床,或手动晃动数次。
 - (g) 去除洗涤液,选用合适的荧光标记的二抗避光孵育60分钟或在摇床上轻轻摇动孵育60分钟。

注: 推荐使用免疫荧光染色二抗稀释液(P0108/P0265)或5% BSA的TBSTx溶液作为二抗稀释液。
 - (h) 用洗涤液洗涤3-5次,每次3-5分钟,期间注意避光。每次洗涤时都可以在摇床上轻轻摇动。
 - (i) 使用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察3X Flag-AirID融合诱饵蛋白的表达、定位以及被生物素标记的蛋白。
- e. 免疫印迹法(Immunoblot)检测融合有3X Flag-AirID的诱饵蛋白和被生物素标记的蛋白。

6孔板用于通过免疫印迹法检测3X Flag-AirID融合诱饵蛋白的表达和被生物素标记的蛋白。具体实验操作方法可参照碧云天网站的Western实验步骤: <https://www.beyotime.com/support/western.htm>

5. 3X Flag-AirID融合诱饵蛋白相互作用的蛋白质的生物素标记与鉴定。

可以使用稳定表达3X Flag-AirID融合诱饵蛋白和阴性对照(表达AirID-Flag)的稳转细胞株,但是为了避免假阳性的出现,需保证3X Flag-AirID融合诱饵蛋白的适度表达,或采用瞬时转染质粒的方式。后续通过Streptavidin磁珠(ST675)或凝胶从细胞裂解液中分离纯化生物素标记蛋白,用于质谱鉴定生物素标记蛋白。所需要使用的细胞量,需根据被生物素标记蛋白在所使用细胞中的表达量和被生物素标记的效率进行调整。此处以2个10cm细胞培养皿的稳转细胞株为例进行说明。

- a. 生物素标记。
 - (a) 分别将适量的稳定表达3X Flag-AirID融合诱饵蛋白和阴性对照(表达AirID-Flag)的细胞(具体的细胞数量据细胞类型、大小和细胞生长速度等而定)接种到2个10cm细胞培养皿内进行培养,使第二天细胞密度能达到约70-80%。
 - (b) 18-24小时后,吸尽培养液,更换为含有0.05-50μM生物素的完全培养液,继续培养1-24小时。

注: 加入生物素的终浓度和后培养时间可根据实验目的进行调整。
 - (c) 去除培养液,用预冷的PBS洗涤细胞2次,去除PBS,尽量确保没有液体残留。
- b. 细胞裂解。
 - (a) 选择合适的裂解液,用于制备细胞裂解液。推荐使用Western及IP细胞裂解液用于细胞(P0013)。如有必要,也可以使用RIPA裂解液(P0013B/P0013C/P0013D)用于样品的制备。如果使用自行配制的裂解液,需要确保裂解液的pH为6-8。
 - (b) 具体的细胞裂解液的制备步骤请参考相应裂解液的使用说明。制备好的裂解液上清置于冰上或4℃存放,随后即可用于免疫沉淀。新鲜制备好的样品,建议尽量当天完成免疫沉淀等后续操作,但如果样品不能当天使用,也可以适当分装后-80℃冻存。
- c. 免疫沉淀(Pull Down)生物素标记蛋白。

推荐使用BeyoMag™ Streptavidin Magnetic Beads (链霉亲和素磁珠) (P2151),具体的免疫沉淀步骤请参考链霉亲和素磁珠的使用说明。
- d. 质谱(Mass Spectrometry)鉴定。

样品SDS-PAGE电泳后对凝胶进行考染或银染,切割感兴趣的条带进行质谱检测;也可以通过二维电泳后寻找差异点进行质谱分析;或者直接进行基于质谱的蛋白质组分析。

参考文献:

1. Varnaité R, MacNeill SA. Proteomics. 2016. 16(19):2503-2518.
2. Valerie LS, Alessandro C, Andrew JM. Cell Biol. 2016. 73:17.19.1-17.19.12.

3. Kim DI, Jensen SC, Noble KA, Kc B, Roux KH, et al. Mol Biol Cell. 2016. 27(8):1188-96.
4. Kido K, Yamanaka S, Nakano S. eLife, 2020, 9:e54983.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D3021-1μg	pCMV-N-Flag-BioID2 (邻近蛋白生物素标记质粒)	1μg
D3021-100μg	pCMV-N-Flag-BioID2 (邻近蛋白生物素标记质粒)	100μg
D3023-1μg	pCMV-C-BioID2-Flag (邻近蛋白生物素标记质粒)	1μg
D3023-100μg	pCMV-C-BioID2-Flag (邻近蛋白生物素标记质粒)	100μg
D3025-1μg	pCMV-BioID2-Flag (阴性对照质粒)	1μg
D3025-100μg	pCMV-BioID2-Flag (阴性对照质粒)	100μg
D3027-1μg	pCMV-N-Flag-AirID (邻近蛋白生物素标记质粒)	1μg
D3027-100μg	pCMV-N-Flag-AirID (邻近蛋白生物素标记质粒)	100μg
D3029-1μg	pCMV-C-AirID-Flag (邻近蛋白生物素标记质粒)	1μg
D3029-100μg	pCMV-C-AirID-Flag (邻近蛋白生物素标记质粒)	100μg
D3030-1μg	pCMV-AirID-Flag (阴性对照质粒)	1μg
D3030-100μg	pCMV-AirID-Flag (阴性对照质粒)	100μg
D3034-1μg	pCMV-N-Flag-miniTurboID (邻近蛋白生物素标记质粒)	1μg
D3034-100μg	pCMV-N-Flag-miniTurboID (邻近蛋白生物素标记质粒)	100μg
D3035-1μg	pCMV-C-miniTurboID-Flag (邻近蛋白生物素标记质粒)	1μg
D3035-100μg	pCMV-C-miniTurboID-Flag (邻近蛋白生物素标记质粒)	100μg
D3037-1μg	pCMV-miniTurboID-Flag (阴性对照质粒)	1μg
D3037-100μg	pCMV-miniTurboID-Flag (阴性对照质粒)	100μg
D3039-1μg	pCMV-λN-NES-miniTurbo-Flag (RaPID质粒)	1μg
D3039-100μg	pCMV-λN-NES-miniTurbo-Flag (RaPID质粒)	100μg
D3040-1μg	pCMV-EGFP-BoxB-RNAmotif-BoxB (RaPID质粒)	1μg
D3040-100μg	pCMV-EGFP-BoxB-RNAmotif-BoxB (RaPID质粒)	100μg
D3042-1μg	pCMV-EGFP-BoxB-EDEN15-BoxB (RaPID阳性对照质粒)	1μg
D3042-100μg	pCMV-EGFP-BoxB-EDEN15-BoxB (RaPID阳性对照质粒)	100μg
D3044-1μg	pCMV-N-NES-Flag-APEX2 (邻近蛋白生物素标记质粒)	1μg
D3044-100μg	pCMV-N-NES-Flag-APEX2 (邻近蛋白生物素标记质粒)	100μg
D3047-1μg	pCMV-N-mito-Flag-APEX2 (线粒体邻近蛋白生物素标记质粒)	1μg
D3047-100μg	pCMV-N-mito-Flag-APEX2 (线粒体邻近蛋白生物素标记质粒)	100μg
P2151-200μl	BeyoMag™ Streptavidin Magnetic Beads (链霉亲和素磁珠)	200μl
P2151-1ml	BeyoMag™ Streptavidin Magnetic Beads (链霉亲和素磁珠)	1ml
P2151-5ml	BeyoMag™ Streptavidin Magnetic Beads (链霉亲和素磁珠)	5ml

Version 2022.10.09