

pCMV- λ N-NES-miniTurbo-Flag (RaPID质粒)

产品编号	产品名称	包装
D3039-1 μ g	pCMV- λ N-NES-miniTurbo-Flag (RaPID质粒)	1 μ g
D3039-100 μ g	pCMV- λ N-NES-miniTurbo-Flag (RaPID质粒)	100 μ g

产品简介:

- pCMV- λ N-NES-miniTurbo-Flag (RaPID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融合表达 λ N肽段、核外运信号和生物素连接酶(miniTurbo)的以用于生物素标记与RNA诱饵片段相互作用的目的蛋白的质粒。RaPID (RNA-Protein Interaction Detection)是在活细胞内(in Vivo)以RNA为中心(RNA-centric), 利用生物素连接酶对与RNA诱饵片段相互作用的蛋白质进行生物素标记, 后续通过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)或Western鉴定RNA-蛋白质间相互作用的技术(图1)。RaPID在筛选和鉴定活细胞内非编码RNA序列(Noncoding RNA sequence): 包括长链非编码RNA (Long noncoding RNA, lncRNA)、小核仁RNA (Small nucleolar RNA, snoRNA)和非翻译mRNA区域(Untranslated mRNA region), 与RNA结合蛋白(RNA-binding protein, RBP)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]。

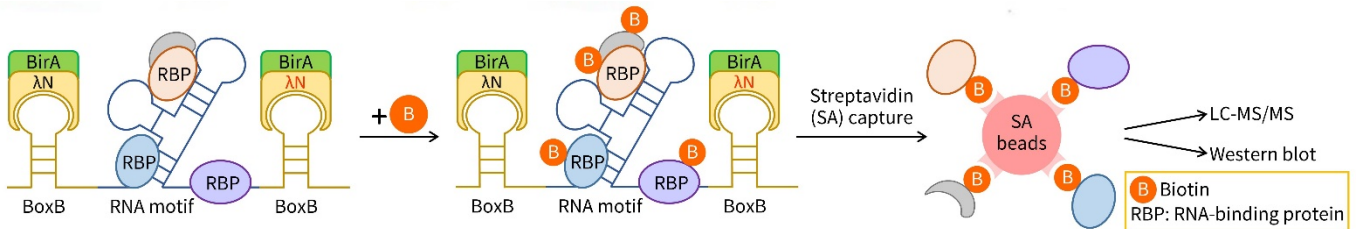


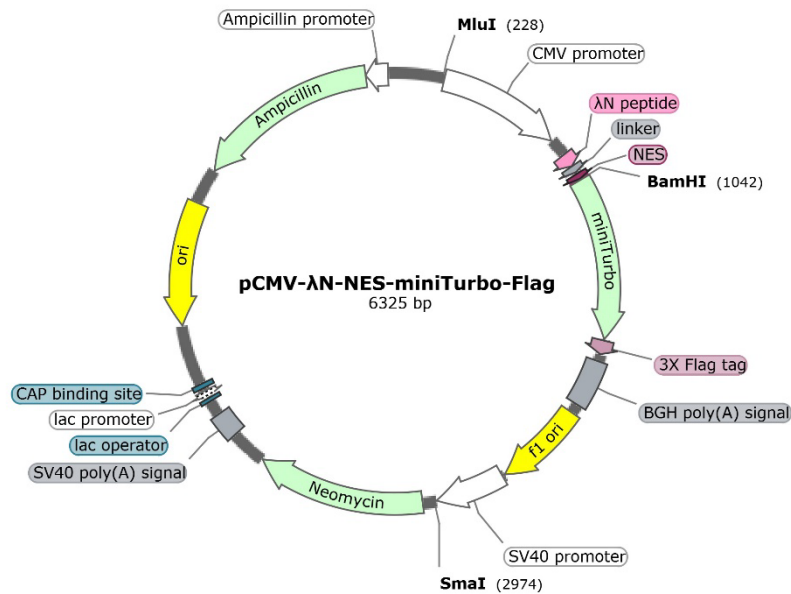
图1. 碧云天RaPID (RNA-Protein Interaction Detection)生物素标记质粒的工作原理图。

- **RaPID具有如下优点:** ①**活细胞内标记:** 适合空间和时间上对细胞内RNA-蛋白质间的相互作用动态过程的研究, 如亚细胞定位、翻译后修饰或蛋白质浓度变化导致的影响, 还可以提供动力学数据。②**不需要交联:** RaPID无需交联, 传统的甲醛或紫外光照射交联不仅对细胞影响较大, 而且交联效率较低。③**敏感性高:** RaPID可以有效识别RNA与蛋白之间微弱、短暂的相互作用。④**所需细胞数目少:** 相比于常见的ChIRP (Chromatin Isolation by RNA Purification)技术需要 $1-5 \times 10^8$ 个细胞, RaPID只需要 $2-5 \times 10^6$ 个细胞。⑤**适用RNA种类多:** 对RNA结构没有限定, 具有二级结构和无特定结构均可, 而且可以研究 <50 nt的小RNA片段。⑥**反应速度快:** 加入生物素后, miniTurbo最快10分钟就可以完成对RNA结合蛋白的生物素标记。
- **RaPID包括2个质粒:** RaPID生物素连接酶载体(pCMV- λ N-NES-miniTurbo-Flag) (本产品), 即RaPID protein; 和RNA诱饵载体(pCMV-EGFP-BoxB-RNA motif-BoxB) (D3040), 即RNA component。
- pCMV- λ N-NES-miniTurbo-Flag (RaPID质粒)可在哺乳动物细胞中融合表达 λ N肽段、核外运信号和生物素连接酶(miniTurbo): λ N肽段(MNARTRRRERRAEKQAQWKAAN, 22aa)能够将miniTurbo定位结合到RNA诱饵片段旁的BoxB茎环结构上; 核外运信号(Nuclear Export Signal, NES) 辅助miniTurbo进入细胞质中; miniTurbo是利用酵母表面展示(Yeast surface display)基于*E. coli*生物素连接酶(BirA)人工改造获得的新型生物素连接酶, 在ATP存在的条件下, miniTurbo可以高效活化生物素(D-Biotin)形成生物素酰-5'腺苷酸(Biotinoyl-5'-AMP), 对与其邻近的(~ 10 nm)任意暴露在外的蛋白赖氨酸残基进行生物素标记, 从而对与RNA诱饵片段相互作用的蛋白质进行生物素标记。
- pCMV-EGFP-BoxB-RNA motif-BoxB (D3040)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RNA诱饵片段的载体, RNA诱饵片段被2个 λ 噬菌体(Bacteriophage lambda)的BoxB RNA茎环结构夹在中间, 其中BoxB茎环结构与 λ N肽段具有极高的亲和力。
- 本质粒含有CMV启动子, 可以高效启动 λ N-NES-miniTurbo-Flag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- λ N-NES-miniTurbo-Flag质粒的主要信息如下:

Feature Nucleotide	Position
CMV promoter	235-818
λ N peptide	907-972

linker	973-1005
NES,Nuclear Export Signal	1015-1041
miniTurbo	1048-1818
3X Flag Tag	1825-1890
BGH poly(A) signal	1925-2149
f1 ori	2195-2623
SV40 promoter	2637-2966
Neomycin resistance gene	3033-3827
SV40 poly(A) signal	4001-4122
lac operator	4195-4211
CAP binding site	4264-4285
ori	4573-5158
Ampicillin resistance gene	5329-6189
Ampicillin promoter	6190-6294

➤ pCMV-λN-NES-miniTurbo-Flag质粒(6325bp)的图谱如下:



➤ pCMV-λN-NES-miniTurbo-Flag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

λN peptide

901 GCCACCATGA ACGCACGAAC ACGACGACGT GAGCGTCGCG CTGAGAAACA
CGGTGGTACT TGCGTGCTTG TGCTGCTGCA CTCGCAGCGC GACTCTTTGT

linker

951 AGCTCAATGG AAAGCTGCAA ACTCAGGAGG CGGTGGGTCT GGTGGCGGGA
TCGAGTTACC TTTCGACGTT TGAGTCCTCC GCCACCCAGA CCACCGCCCT

NES,Nuclear Export Signal

1001 GCGGCCGCCT GCAGCTGCCC CCCCTGGAGC GCCTGACCCT GGGATCCATC
CGCCGGCGGA CGTCGACGGG GGGGACCTCG CGGACTGGGA CCCTAGGTAG

miniTurbo

1051 CCCCTGCTGA ACGCCAAACA GATCCTGGGC CAGCTGGACG GCGGCTCCGT
GGGGACGACT TGCGGTTTGT CTAGGACCCG GTCGACCTGC CGCCGAGGCA

1101 GGCTGTTTCTG CCCGTGGTGG ATAGCACCAA CCAGTACCTG -----
CCGACAAGAC GGGCACCACC TATCGTGGTT GGT CATGGAC -----

1751 TGCTGGAGCA GGACGGAGTG ATCAAGCCCT GGATGGGCGG CGAGATCAGC
ACGACCTCGT CCTGCCTCAC TAGTTCGGGA CCTACCCGCC GCTCTAGTCG

3X Flag Tag

1801 CTGAGAAGCG CCGAGAAGGG CGGCGACTAC AAGGACCACG ACGGCGACTA
GACTCTTCGC GGCTCTTCCC GCCGCTGATG TTCCTGGTGC TGCCGCTGAT

1851 CAAGGACCAC GACATCGACT ACAAGGACGA CGACGACAAG TAAGGGCCCC
GTTCCCTGGTG CTGTAGCTGA TGTTCCCTGCT GCTGCTGTTC ATTCCCGGGC

➤ pCMV-λN-NES-miniTurbo-Flag中没有的酶切位点包括:

AarI	AbsI	AccIII	Acc65I	AcvI	AfeI	AflII
AgeI	AjuI	AleI	Aor13HI	Aor51HI	AscI	AsiGI
AsiSI	Asp718I	AxyI	BaeI	BarI	BbrPI	BfrI
BlpI	BoxI	Bpu1102I	Bse21I	BseAI	BsgI	BshTI
BsiWI	BsmBI	Bsp13I	Bsp1407I	Bsp1720I	BspEI	BspTI
BsrGI	Bst98I	BstAFI	BstAUI	BstEII	BstHPI	BstPI
BstPAI	Bsu36I	CelII	Cfr42I	CspAI	Eco32I	Eco47III
Eco72I	Eco81I	Eco91I	EcoO65I	EcoRI	EcoRV	Esp3I
FseI	FspAI	HindIII	HpaI	I-CeuI	I-PpoI	I-SceI
KflI	KpnI	Kpn2I	KspI	KspAI	MauBI	MreI
MroI	MspCI	OliI	PacI	Paer7I	PalAI	PaqCI
Pfl23II	PI-PspI	PI-SceI	PinAI	PmaCI	PmlI	PpuMI
PshAI	Psp5II	PspCI	PspEI	PspLI	PspPPI	PspXI
PsrI	RgaI	RigI	SacII	SanDI	SfaAI	SfiI
Sfr274I	Sfr303I	SgfI	SgrBI	SgsI	SlaI	SmiI
SrfI	SspBI	SstII	SwaI	TstI	Vha464I	XbaI
XhoI						

➤ pCMV-λN-NES-miniTurbo-Flag中的单酶切位点包括:

AhdI	AvaI	AvrII	BamHI	BbsI	BbvCI	BglII
BmeT110I	BmgBI	BmtI	BsmI	BsoBI	BspDI	BssHII
BstBI	BstXI	BstZ17I	ClaI	CsiI	DraIII	Eco53kI
EcoNI	MfeI	MluI	NdeI	NheI	NotI	NruI
PasI	PciI	PflFI	PflMI	PfoI	PmeI	PvuI
RsrII	SacI	ScaI	SexAI	SgrAI	SgrDI	SmaI
SnaBI	SpeI	SspI	TspMI	Tth111I	XmaI	

➤ pCMV-λN-NES-miniTurbo-Flag质粒中推荐的测序引物序列如下:

CMV-F (769-789): 5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'

BGH-R (1936-1919): 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'

➤ pCMV-λN-NES-miniTurbo-Flag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
D3039-1μg	pCMV-λN-NES-miniTurbo-Flag	1μg
D3039-100μg	pCMV-λN-NES-miniTurbo-Flag	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。
- 构建RNA诱饵载体。**
通过BsmBI限制性内切酶对RNA诱饵载体(pCMV-EGFP-BoxB-RNAmotif-BoxB) (D3040)进行酶切,将RNA诱饵片段插入2个BoxB茎环结构夹之间。具体使用方法参见(pCMV-EGFP-BoxB-RNAmotif-BoxB) (D3040)使用说明。
- RNA诱饵载体与RaPID生物素连接酶载体质粒共转染细胞。**
 - 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)接种到6孔板内进行培养,使第二天细胞密度能达到约70-80%。
 - 使用合适的转染试剂例如Lipo8000™或Lipo6000™将RaPID生物素连接酶载体(pCMV-λN-NES-miniTurbo-Flag) (D3039)分别与插入有RNA诱饵片段的载体、阴性对照质粒(pCMV-EGFP-BoxB-RNAmotif-BoxB) (D3040)和阳性对照质粒(pCMV-EGFP-BoxB-EDEN15-BoxB) (D3042)共转染到细胞中。

注： RaPID生物素连接酶载体与RNA诱饵载体的使用比例，建议按照1:5-10进行摸索。

- c. 在转染12-48小时后，吸尽培养液，更换为含有0.05-500 μ M的生物素的完全培养液(图2, 4-6孔)或不含有生物素的完全培养液(图2, 1-3孔)，继续培养10分钟-18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。一般情况下， miniTurboID在生物素终浓度为500 μ M的条件下， 10-60分钟就可以有效标记相互作用的蛋白， 但还是建议在0.05-500 μ M和10分钟-18小时范围内设置梯度， 以寻找最适合的生物素使用浓度和标记时间。

- d. 可通过荧光显微镜观察细胞表达EGFP绿色荧光的情况， 以确定诱饵RNA诱饵片段的表达情况。
e. 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。

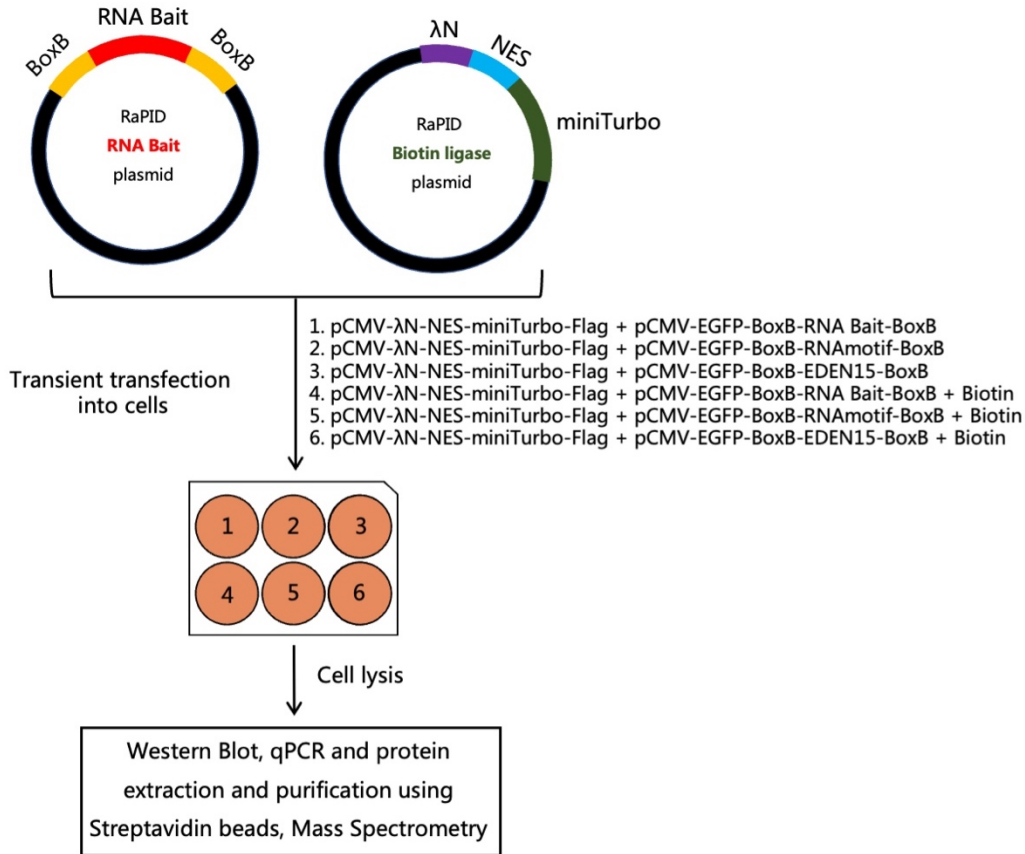


图2. 碧云天pCMV- λ N-NES-miniTurbo-Flag (RaPID质粒)推荐的使用流程图。

5. 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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C冻存。

6. 免疫印迹法(Immunoblot)。

免疫印迹法检测 λ N-NES-miniTurbo-Flag蛋白的表达和被生物素标记的RNA结合蛋白。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>

7. 诱饵RNA的qPCR定量(选做)。

在RNA诱饵载体中BoxB-RNA motif-BoxB在EGFP的3' UTR端，因此可以通过如下引物对诱饵RNA的拷贝数进行定量。

EGFP-F: 5'-GAAGCAGCAGACTTCTTCAA-3'

EGFP-R: 5'-AAGTCGATGCCCTTCAGCTC-3'

8. 免疫沉淀(Pull Down)生物素标记蛋白。

推荐使用BeyoMagTM 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。

9. 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. Ramanathan M, Majzoub K, Rao DS, Neela PH, Zarnegar BJ, et al. Nat Methods. 2018. 15(3):207-212.
2. Ramanathan M, Porter DF, Khavari PA. Nat Methods. 2019. 16(3):225-234.

3. Branon TC, Bosch JA, Sanchez AD, Udeshi ND, Svinkina T, et al. Nat Biotechnol. 2018. 36(9):880-887.

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