

pCMV-AirID-Flag (阴性对照质粒)

产品编号	产品名称	包装
D3030-1 μ g	pCMV-AirID-Flag (阴性对照质粒)	1 μ g
D3030-100 μ g	pCMV-AirID-Flag (阴性对照质粒)	100 μ g

产品简介:

- pCMV-AirID-Flag (阴性对照质粒)是碧云天自行研发生产的邻近蛋白生物素标记质粒pCMV-N-Flag-AirID (D3027)和pCMV-C-AirID-Flag (D3029)的阴性对照质粒。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]。

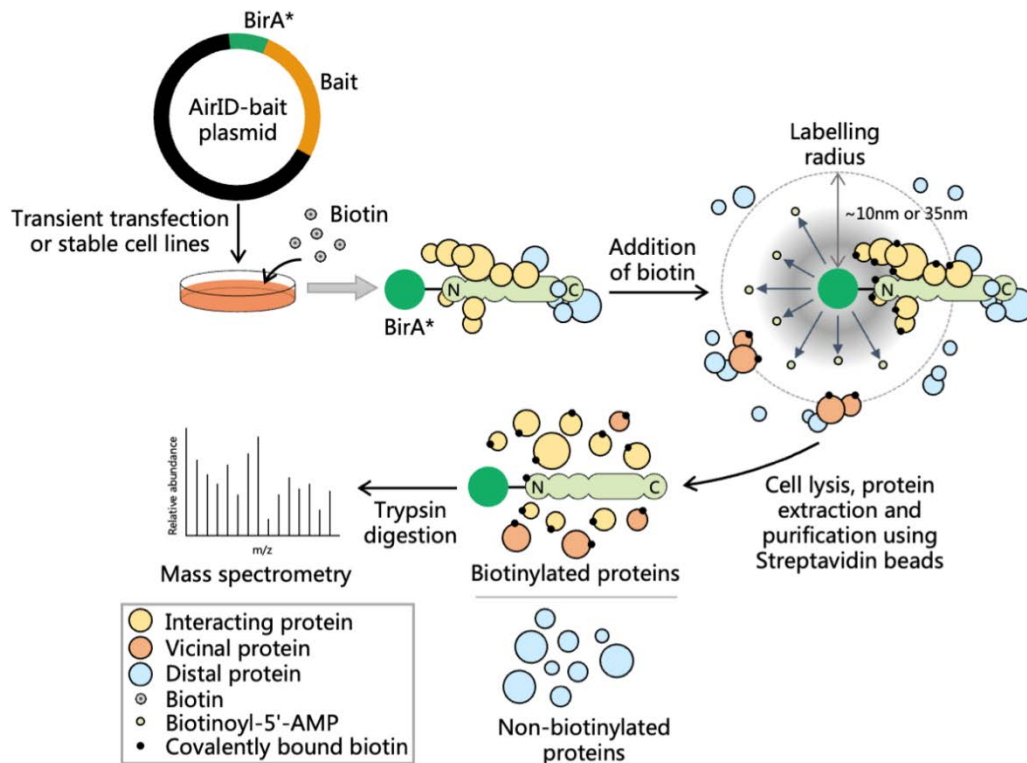


图1. 碧云天邻近蛋白生物素标记质粒的工作原理图。

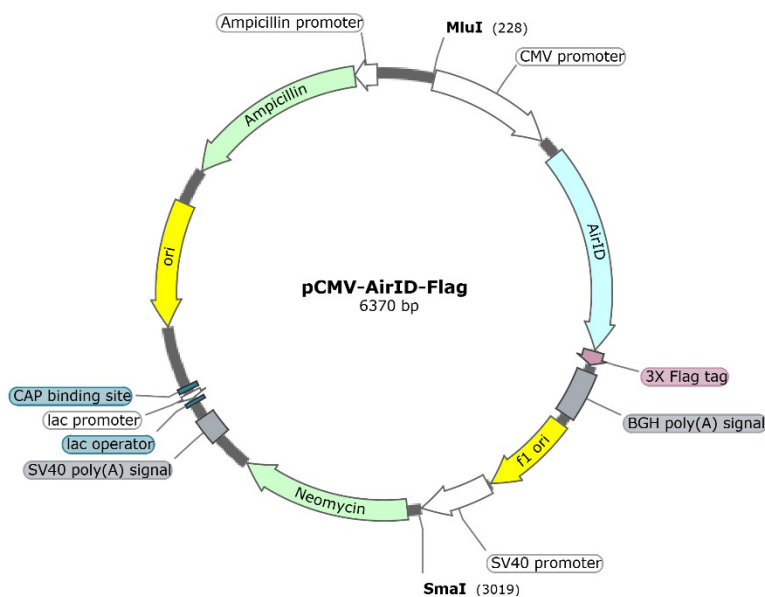
- 邻近依赖的生物素标记鉴定(Proximity-dependent biotin identification, BioID)技术是基于来源于*E.coli*生物素连接酶(Biotin ligase, BirA)的R118G突变体BirA*。BirA可在ATP存在的条件下, 高效活化生物素(D-Biotin)形成生物素酰-5'腺苷酸(Biotinoyl-5'-AMP), 并特异性地将生物素连接到Avi标签(GLNDIFEAQKIEWHE)的赖氨酸残基上, 从而对目的蛋白进行快捷、高效的生物素标记; 但由于来源于大肠杆菌的BirA*发生R118G突变, 其活化的生物素酰-5'腺苷酸不再特异性修饰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, 一定范围内相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。
- 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。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50 μ M的条件下才能有效标记相互作用的蛋白质，而AirID在0.05-5 μ M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 $^{\circ}$ C时酶活明显降低，而AirID在26 $^{\circ}$ C-37 $^{\circ}$ C都具有良好的生物素标记活性[4]。

- 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-AirID-Flag质粒的主要信息如下：

Feature	Nucleotide	Position
CMV promoter		235-818
AirID		907-1863
3X Flag Tag		1870-1935
BGH poly(A) signal		1970-2194
f1 ori		2240-2668
SV40 promoter		2682-3011
Neomycin resistance gene		3078-3872
SV40 poly(A) signal		4046-4167
lac operator		4240-4256
lac promoter		4266-4294
CAP binding site		4309-4330
ori		4618-5203
Ampicillin resistance gene		5374-6234
Ampicillin promoter		6235-6339

- pCMV-AirID-Flag质粒(6370bp)的图谱如下：



- pCMV-AirID-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
```

AirID

```
901 GCCACCATGA AGGACAACAC CGTTCCGCTC ACGCTTATCT CTATCCTTGC
    CGGTGGTACT TCCTGTTGTG GCAAGGCGAG TGCGAATAGA GATAGGAACG
```

```

951  TGATGGTGAG  TTCCACTCTG  GTGAACAACT  TGGAGAGCAG  -----
      ACTACCACTC  AAGGTGAGAC  CACTTGTTGA  ACCTCTCGTC  -----

1801  TTGCTTGAGC  AGGACGGTGT  GATTAAGCCT  TGGATTGAG  GTGAGATCAG
      AACGAACTCG  TCCTGCCACA  CTAATTCGGA  ACCTAACCTC  CACTCTAGTC

          3X Flag Tag

1851  CCTCAGATCT  GCTGGCGGCG  ACTACAAGGA  CCACGACGGC  GACTACAAGG
      GGAGTCTAGA  CGACCGCCGC  TGATGTTCCT  GGTGCTGCCG  CTGATGTTCC

1901  ACCACGACAT  CGACTACAAG  GACGACGACG  ACAAGTAAGG  GCCCGTTTAA
      TGGTGCTGTA  GCTGATGTTC  CTGCTGCTGC  TGTTCATTCC  CGGGCAAATT

          BGH poly(A) signal

1951  ACCCGCTGAT  CAGCCTCGAC  TGTGCCTTCT  AGTTGCCAGC  CATCTGTTGT
      TGGGCGACTA  GTCGGAGCTG  ACACGGAAGA  TCAACGGTGC  GTAGACAACA

```

➤ pCMV-AirID-Flag中没有的酶切位点包括:

AarI	AbsI	AccIII	Acc65I	AccB7I	AcvI	AfeI
AflII	AgeI	AjiI	AjuI	Aor13HI	Aor51HI	AscI
AsiGI	AsiSI	Asp718I	AxyI	BaeI	BamHI	BarI
BbrPI	BfrI	BlpI	BmgBI	BoxI	Bpu1102I	Bse21I
BseAI	BsgI	BshTI	BsiWI	BsmBI	Bsp13I	Bsp1407I
Bsp1720I	BspEI	BspTI	BsrGI	Bst98I	BstAFI	BstAUI
BstEII	BstHPI	BstPI	BstPAI	Bsu36I	BtrI	CciNI
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
NotI	PacI	PaeR7I	PalAI	PasI	Pfl123II	PflMI
PI-PspI	PI-SceI	PinAI	PmaCI	PmlI	PshAI	PspCI
PspEI	PspLI	PspXI	PsrI	RgaI	RigI	SacII
SanDI	SbfI	SdaI	SfaAI	SfiI	Sfr274I	Sfr303I
SgfI	SgrAI	SgrBI	SgsI	SlaI	SmiI	SrfI
Sse8387I	SspBI	SstII	SwaI	Van91I	Vha464I	XcmI
XhoI						

➤ pCMV-AirID-Flag中的单酶切位点包括:

AhdI	AleI	ApaI	AvaI	AvrII	BbsI	BmeT110I
BmtI	BsaBI	BseRI	BsmI	BsoBI	BssHII	BstBI
BstZ17I	DraIII	EagI	Eco53kI	EcoNI	KasI	MfeI
MluI	MscI	NarI	NdeI	NheI	NruI	PciI
PflFI	PfoI	PluTI	PmeI	PpuMI	PspOMI	PstI
PvuI	RsrII	SacI	ScaI	SexAI	SfoI	SgrDI
SmaI	SnaBI	SpeI	SspI	StuI	TspMI	Tth111I
XbaI	XmaI					

➤ pCMV-AirID-Flag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 (1964-1981): 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'

➤ pCMV-AirID-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
D3030-1μg	pCMV-AirID-Flag	1μg
D3030-100μg	pCMV-AirID-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1 μ g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。
- 100 μ g包装的本产品质粒浓度为0.25 μ g/ μ l, 共400 μ l。可以直接用于酶切或者转染细胞。

参考文献:

- Varnaitè R, MacNeill SA. Proteomics. 2016. 16(19):2503-2518.
- Valerie LS, Alessandro C, Andrew JM. Cell Biol. 2016. 73:17.19.1-17.19.12.
- Kim DI, Jensen SC, Noble KA, Kc B, Roux KH, Motamedchaboki K, Roux KJ. Mol Biol Cell. 2016. 27(8):1188-96.
- Kido K, Yamanaka S, Nakano S, Motani K, Shinohara S, Nozawa A, Kosako H, Ito S, Sawasaki T. Elife. 2020. 9:e54983.

相关产品:

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