

## pCMV-EGFP-BoxB-RNAmotif-BoxB (RaPID质粒)

产品编号	产品名称	包装
D3040-1μg	pCMV-EGFP-BoxB-RNAmotif-BoxB (RaPID质粒)	1μg
D3040-100μg	pCMV-EGFP-BoxB-RNAmotif-BoxB (RaPID质粒)	100μg

### 产品简介:

- pCMV-EGFP-BoxB-RNAmotif-BoxB (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λN肽段具有极高的亲和力。
- 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]。

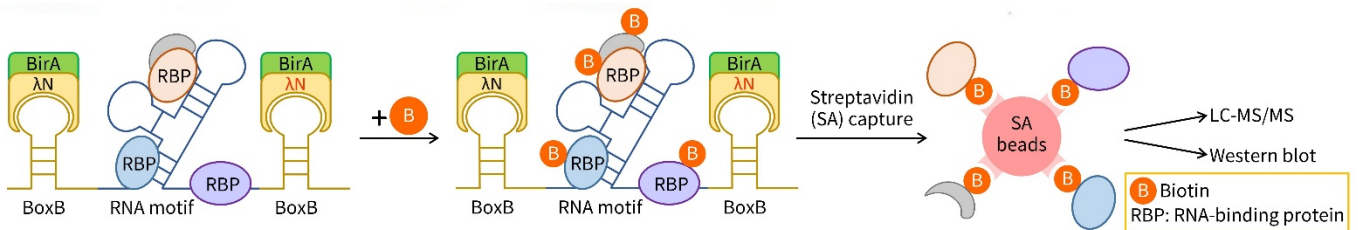


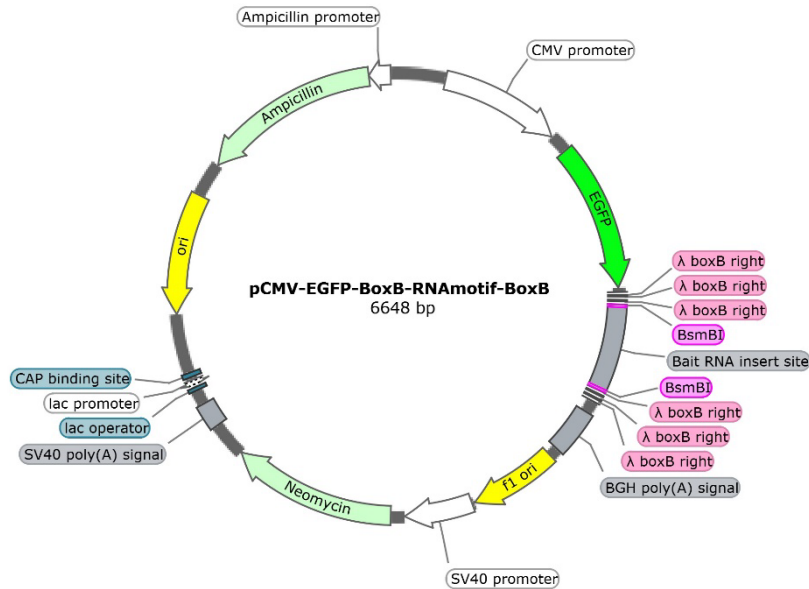
图1. 碧云天RaPID (RNA-Protein Interaction Detection)生物素标记质粒的工作原理图。

- **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<50nt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:** RNA诱饵载体(pCMV-EGFP-BoxB-RNAmotif-BoxB) (本产品), 即RNA component; 和RaPID生物素连接酶载体(pCMV-λN-NES-miniTurbo-Flag) (D3039), 即RaPID protein。
- pCMV-λN-NES-miniTurbo-Flag (D3039) 可在哺乳动物细胞中融合表达λN肽段、核外运信号和生物素连接酶(miniTurbo): λN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(~10nm)任意暴露在外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。
- 本质粒含有CMV启动子, 可以高效启动RNA诱饵片段在细胞中的表达; 可通过荧光显微镜观察细胞表达EGFP绿色荧光的情况, 以确定在EGFP的3' UTR端诱饵RNA诱饵片段的表达情况; 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-EGFP-BoxB-RNAmotif-BoxB质粒的主要信息如下:

Feature Nucleotide	Position
CMV promoter	235-818
EGFP	907-1626
3X λ boxB right	1648-1706
Bait RNA insert site	1720-2114

3X $\lambda$ boxB right	2129-2187
BGH poly(A) signal	2248-2472
f1 ori	2518-2946
SV40 promoter	2960-3289
Neomycin resistance gene	3356-4150
SV40 poly(A) signal	4324-4445
lac operator	4518-4534
CAP binding site	4587-4608
ori	4896-5481
Ampicillin resistance gene	5652-6512
Ampicillin promoter	6513-6617

➤ pCMV-EGFP-BoxB-RNAmotif-BoxB质粒(6648bp)的图谱如下:



➤ pCMV-EGFP-BoxB-RNAmotif-BoxB表达基因的详细图谱如下:

CMV Promoter

801 GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA CTGCTTACTG  
CAGATATATT CGTCTCGAGA GACCGATTGA TCTCTGGGT GACGAATGAC

851 GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCAA GCTGGCTAGC  
CGAATAGCTT TAATTATGCT GAGTGATATC CCTCTGGGTT CGACCGATCG  
EGFP

901 GCCACC**ATGG** TGAGCAAGGG CGAGGAGCTG TTCACCGGGG TGGTGCCCAT  
CGGTGGTACC ACTCGTTCCC GTCCTCGAC AAGTGGCCCC ACCACGGGTA

951 CCTGGTCGAG CTGGACGGCG ACGTAAACGG CCACAAGTTC -----  
GGACCAGCTC GACCTGCCGC TGCATTTGCC GGTGTTCAAG -----

1551 GCGCGATCAC ATGGTCCTGC TGGAGTTCGT GACCGCCGCC GGGATCACTC  
CGCGCTAGTG TACCAGGACG ACCTCAAGCA CTGGCGGCGG CCCTAGTGAG

1601 TCGGCATGGA CGAGCTGTAC AAG**TAG**GAAT TCCTTCCCTA AGTCCAAGCC  
AGCCGTACCT GCTCGACATG TTCATCCTTA AGGAAGGGAT TCAGGTTCCG  
 $\lambda$  boxB right  $\lambda$  boxB right  $\lambda$  boxB right

1651 CTGAAAAAGG GCAAGCTTGG CCCTGAAAAA GGGCAAGCTT GGCCCTGAAA  
GACTTTTTTCC CGTTCGAACC GGGACTTTTT CCCGTTTCGAA CCGGGACTTT  
BsmBI Bait RNA insert site

1701 AAGGGCAAGC TTGGAGACGG TAAATGAGCA CACAAAATAC -----  
TTCCCGTT**CG** **AA**CTCTGCC ATTTACTCGT GTGTTTTATG -----







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°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°C冻存。

#### 6. 免疫印迹法(Immunoblot)。

免疫印迹法检测λN-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-RNAmotif-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'-GAAGCAGCAGCACTTCTTCAA-3'

EGFP-R: 5'-AAGTCGATGCCCTTCAGCTC-3'

#### 8. 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。

#### 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