

## pCMV-miniTurboID-Flag (阴性对照质粒)

产品编号	产品名称	包装
D3037-1 $\mu$ g	pCMV-miniTurboID-Flag (阴性对照质粒)	1 $\mu$ g
D3037-100 $\mu$ g	pCMV-miniTurboID-Flag (阴性对照质粒)	100 $\mu$ g

### 产品简介:

- pCMV-miniTurboID-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-miniTurboID (D3034)和pCMV-C-miniTurboID-Flag (D3035)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]。

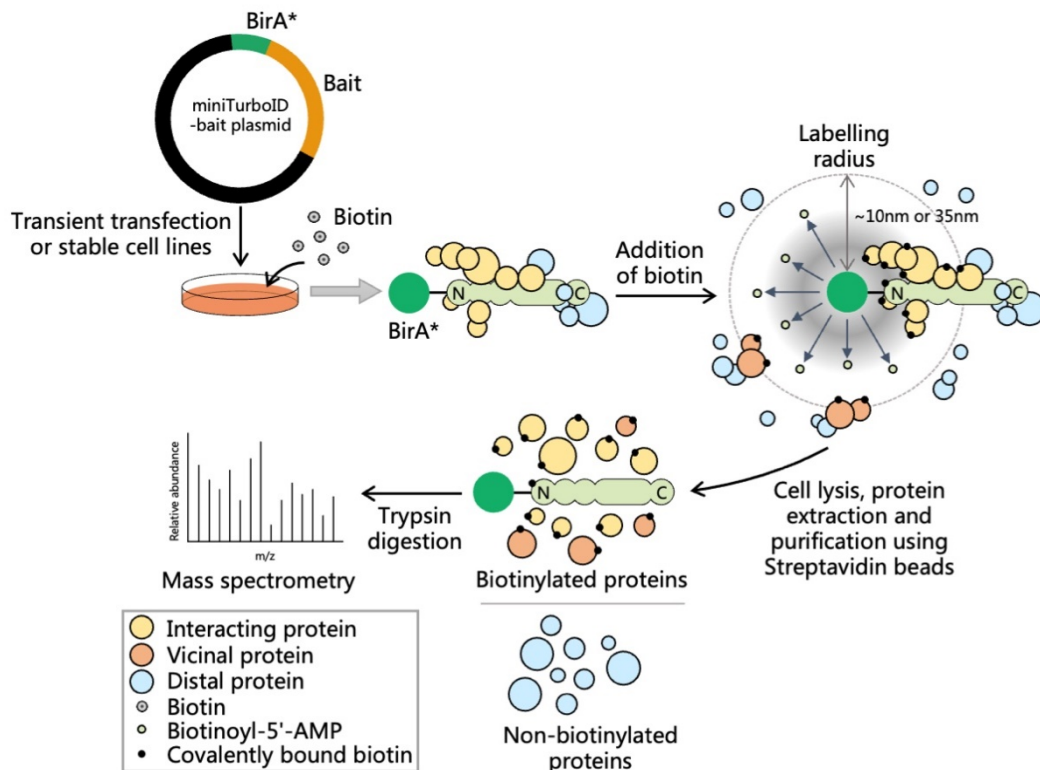


图1. 碧云天邻近蛋白生物素标记质粒的工作原理图。

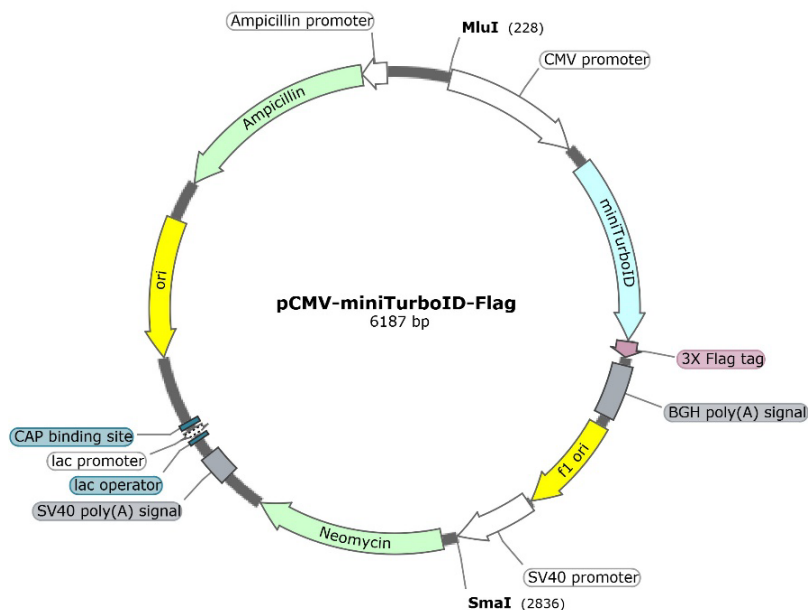
- 邻近依赖的生物素标记鉴定(Proximity-dependent biotinylation, BioID)技术是基于来源于*E.coli*生物素连接酶(Biotin ligase, BirA)的R118G突变体BirA\*。BirA可在ATP存在的条件下, 高效活化生物素(D-Biotin)形成生物素酰-5'腺苷酸(Biotinoyl-5'-AMP), 并特异性地将生物素连接到Avi标签(GLNDIFEAQKIEWHE)的赖氨酸残基上, 从而对目的蛋白进行快捷、高效的生物素标记; 但由于来源于大肠杆菌的BirA\*发生R118G突变, 其活化的生物素酰-5'腺苷酸不再特异性修饰Avi标签的赖氨酸残基, 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miniTurboID是BioID的改进增强版本。** miniTurboID是利用酵母表面展示(Yeast surface display)基于*E.coli*生物素连接酶人工改造获得的TurboID的基础上, 进一步截短、突变得到的新型生物素连接酶。**miniTurboID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miniTurboID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miniTurboID融合蛋白生物素标记半径为~10nm, 而表达linker的miniTurboID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**更好的生物素标记效果**：BioID分子量约35kDa，而miniTurboID分子量仅约28kDa，因此miniTurboID对融合蛋白功能的影响更小，空间位阻也更小，更容易接近被标记蛋白并产生更好的标记效果。③**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miniTurboID最快10分钟就可以达到相似的效果。④**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，虽然miniTurboID的最佳反应温度为30°C，但是miniTurboID在16°C-37°C也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-miniTurboID-Flag质粒的主要信息如下：

Feature	Nucleotide	Position
CMV promoter		235-818
miniTurboID		907-1680
3X Flag Tag		1687-1752
BGH poly(A) signal		1787-2011
f1 ori		2057-2485
SV40 promoter		2499-2828
Neomycin resistance gene		2895-3689
SV40 poly(A) signal		3863-3984
lac operator		4057-4073
lac promoter		4081-4111
CAP binding site		4126-4147
ori		4435-5020
Ampicillin resistance gene		5191-6051
Ampicillin promoter		6052-6156

- pCMV-miniTurboID-Flag质粒(6187bp)的图谱如下：



- pCMV-miniTurboID-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
    miniTurboID
901 GCCACCATGA TCCCCCTGCT GAACGCCAAA CAGATCCTGG GCCAGCTGGA
    CGGTGGTACT AGGGGGACGA CTTGCGGTTT GTCTAGGACC CGGTTCGACCT
  
```

```

951 CGGCGGCTCC GTGGCTGTTC TGCCCGTGGT GGATAGCACC -----
    GCCGCCGAGG CACCGACAAG ACGGCACCA CCTATCGTGG -----

1601 AGGGCGCCCT GCTGCTGGAG CAGGACGGAG TGATCAAGCC CTGGATGGGC
    TCCCGCGGGA CGACGACCTC GTCCTGCCTC ACTAGTTCGG GACCTACCCG
                                     3X Flag Tag

1651 GGCGAGATCA GCCTGAGAAG CGCCGAGAAG GGCGGCGACT ACAAGGACCA
    CCGCTCTAGT CGGACTCTTC GCGGCTCTTC CCGCCGCTGA TGTTCCTGGT

1701 CGACGGCGAC TACAAGGACC ACGACATCGA CTACAAGGAC GACGACGACA
    GCTGCCGCTG ATGTTCCCTG TGCTGTAGCT GATGTTCTTG CTGCTGCTGT
                                     BGH poly(A) signal

1751 AGTAAGGGCC CGTTTAAACC CGCTGATCAG CCTCGACTGT GCCTTCTAGT
    TCATTCCCGG GCAAATTTGG GCGACTAGTC GGAGCTGACA CGGAAGATCA

```

➤ pCMV-miniTurboID-Flag中没有的酶切位点包括:

AarI	AbsI	AccIII	Acc65I	AcvI	AfeI	AflII
AgeI	AjiI	AjuI	AleI	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	OliI	PacI	Paer7I	PalAI	PasI	Pfl123II
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-miniTurboID-Flag中的单酶切位点包括:

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

➤ pCMV-miniTurboID-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 (1781-1798): 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'

➤ pCMV-miniTurboID-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
D3037-1μg	pCMV-miniTurboID-Flag	1μg
D3037-100μg	pCMV-miniTurboID-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。

#### 参考文献：

- Varnaité R, MacNeill SA. Proteomics. 2016. 16(19):2503-2518.
- Valerie LS, Alessandro C, Andrew JM. Cell Biology. 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.
- Branon TC, Bosch JA, Sanchez AD, Udeshi ND, Svinkina T, Carr SA, Feldman JL, Perrimon N, Ting AY. 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