

pCMV-EGFP-BoxB-EDEN15-BoxB (RaPID阳性对照质粒)

产品编号	产品名称	包装
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

产品简介:

- pCMV-EGFP-BoxB-EDEN15-BoxB (RaPID阳性对照质粒)是碧云天自行研发生产的RaPID质粒对中RNA诱饵载体(pCMV-EGFP-BoxB-RNAmotif-BoxB) (D3040)的阳性对照质粒。EDEN15是一段富含UG的RNA序列,可以高效结合分子量大小约50kDa的CELF1 (CUGBP Elav-Like Family Member 1)。
- 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]。

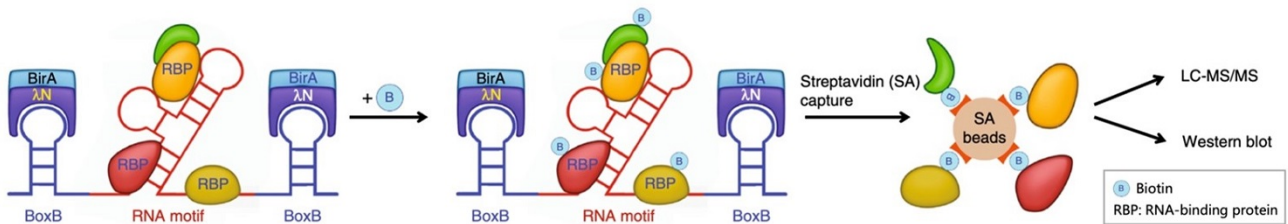


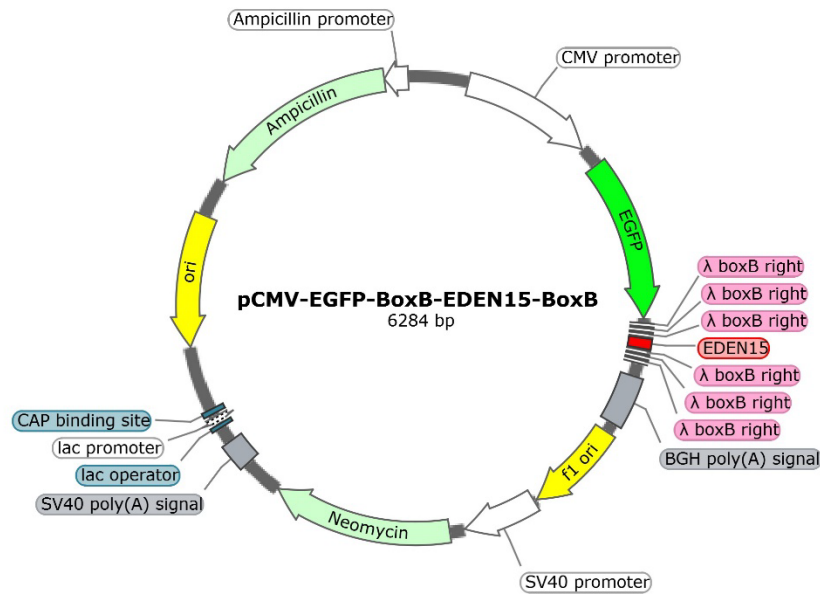
图1. 碧云天RaPID (RNA-Protein Interaction Detection)生物素标记质粒的工作原理图[1]。

- **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:** RaPID生物素连接酶载体(pCMV- λ N-NES-miniTurbo-Flag) (D3039),即RaPID protein;和RNA诱饵载体(pCMV-EGFP-BoxB-RNAmotif-BoxB) (D3040),即RNA component。
- pCMV- λ N-NES-miniTurbo-Flag (D3039)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(~10nm)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-RNAmotif-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EDEN15 RNA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EDEN15 RNA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-EDEN15-BoxB质粒的主要信息如下:

Feature	Position
CMV promoter	235-818

EGFP	907-1626
3X λ boxB right	1648-1706
EDEN15	1713-1757
3X λ boxB right	1765-1823
BGH poly(A) signal	1884-2108
f1 ori	2154-2582
SV40 promoter	2596-2925
Neomycin resistance gene	2992-3786
SV40 poly(A) signal	3960-4081
lac operator	4154-4170
CAP binding site	4223-4244
ori	4532-5117
Ampicillin resistance gene	5288-6148
Ampicillin promoter	6149-6253

➤ pCMV-EGFP-BoxB-EDEN15-BoxB质粒(6284bp)的图谱如下:



➤ pCMV-EGFP-BoxB-EDEN15-BoxB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 GGAGACCAA GCTGGCTAGC
CGAATAGCTT TAATTATGCT GAGTGATATC CCTCTGGGT 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
λ boxB right λ boxB right λ boxB right

1651 CTGAAAAAGG GCAAGCTTGG CCCTGAAAAA GGGCAAGCTT GGCCCTGAAA
GACTTTTTCC CGTTCGAACC GGGACTTTTT CCCGTTTCGAA CCGGGACTTT

EDEN15

1701 AAGGGCAAGC TTTGTTTGTG TGTGTTGTTG TTGTTTGTTC GTTGTGTTGTT
 TTCCCGTTCG AAACAAACAA ACAAACAACA AACAAACAAA CAACAAACAA
 λ boxB right λ boxB right

1751 TGTGTTGTTG TCTTGCCCTG AAAAAGGGCA GCTCTTGCCC TGAAAAAGGG
 ACAAACATCG AGAACGGGAC TTTTTCCTCGT CGAGAACGGG ACTTTTTTCCC
 λ boxB right

1801 CAGCTCTTGC CCTGAAAAAG GGCTATCGAG GATATTATCT CGAGGTGAAT
 GTCGAGAACG GGACTTTTTTC CCGATAGCTC CTATAATAGA GCTCCACTTA

➤ pCMV-EGFP-BoxB-EDEN15-BoxB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	BamHI	BanIII	BarI
BbrPI	BbvCI	BfrI	BlpI	BmgBI	BoxI	Bpu1102I
Bsa29I	Bse21I	BseAI	BseCI	BshVI	BshTI	BsiWI
Bsp13I	Bsp1720I	BspDI	BspEI	BspTI	BspXI	Bst98I
BstAFI	BstEII	BstHPI	BstPI	BstPAI	BstXI	Bsu15I
Bsu36I	BsuTUI	BtrI	CciNI	CelII	Cfr42I	ClaI
CspAI	DraII	Eco32I	Eco47III	Eco72I	Eco81I	Eco91I
EcoO65I	EcoO109I	EcoRV	FseI	FspAI	HpaI	I-CeuI
I-PpoI	I-SceI	KflI	KpnI	Kpn2I	KspI	KspAI
MauBI	MreI	MroI	MspCI	Nb.BbvCI	NotI	Nt.BbvCI
PacI	PalAI	PaqCI	PasI	Pf123II	PflMI	PI-PspI
PI-SceI	PinAI	PmaCI	PmlI	PpuMI	PshAI	Psp5II
PspCI	PspEI	PspLI	PspPPI	PspXI	PsrI	RgaI
RigI	SacII	SanDI	SbfI	SdaI	SfaAI	SfiI
Sfr303I	SgfI	SgrAI	SgrBI	SgsI	SmiI	SrfI
Sse8387I	SstII	SwaI	TstI	Van91I	Vha464I	XbaI
XcmI						

➤ pCMV-EGFP-BoxB-EDEN15-BoxB中的单酶切位点包括:

AhdI	ApaI	AvrII	BbsI	BglII	BmtI	BsaBI
BsmI	BsrGI	BssHII	BstBI	BstZ17I	CsiI	DraIII
EagI	Eco53kI	KasI	MfeI	MluI	MscI	NarI
NdeI	NheI	NruI	Paer7I	PciI	PflFI	PluTI
PmeI	PspOMI	PstI	PvuI	RsrII	SacI	ScaI
SexAI	SfoI	SgrDI	SmaI	SnaBI	SpeI	SspI
StuI	TspMI	Tth111I	XhoI	XmaI		

➤ pCMV-EGFP-BoxB-EDEN15-BoxB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 (1895-1878): 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'

➤ pCMV-EGFP-BoxB-EDEN15-BoxB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
D3042-1μg	pCMV-EGFP-BoxB-EDEN15-BoxB	1μg
D3042-100μg	pCMV-EGFP-BoxB-EDEN15-BoxB	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:

1. 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。
2. 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:

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 2022.10.08