



版本号：DE251017

# Bimolecular Fluorescence Complementary Kit

## 双分子荧光互补瞬转试剂盒

(BiFC/烟草系统)

产品编号：MH201

### 产品内容：

产品货号	产品组成	类型	规格 (1 Set)	储存条件
MH001-1	5×农杆菌侵染液	溶液	80 mL	4°C
SL9513	乙酰丁香酮 (100 mM)	溶液	400 µL	-20°C, 避光
VT148	p1300-SCYNE	空载质粒	10 µg	-20°C
VT149	p1300-SCYCE	空载质粒	10 µg	-20°C
VT168	p1300-SCYNE-SOE	阳性对照质粒	10 µg	-20°C
VT169	p1300-SCYCE-SCL30a	阳性对照质粒	10 µg	-20°C

### 运输及储存条件：

1. 本试剂盒中各组分均为蓝冰运输。
2. 各组分按照产品内容表中保存温度要求进行储存。



## 产品介绍:

双分子荧光互补实验 (Bimolecular fluorescence complementation, 简称 BiFC) 是一种可视化活细胞中蛋白质-蛋白质相互作用和定位的技术。黄色荧光蛋白 (YFP) 被人为分为 N 端和 C 端两部分, 单独的两个片段不能自发地重组和发挥功能。只有当两片段分别被融合到相互作用的两个目标蛋白上时, 会因目标蛋白的相互作用力而被拉近、发生互补从而重新构建完整的具有活性的荧光蛋白分子并在激发光下产生荧光 (图 1)。在植物中, 通过农杆菌瞬时转化, 可以直观、快速在烟草叶片中进行蛋白之间的互作检测<sup>[1-3]</sup>。

本试剂盒提供了一套简单高效, 适用于烟草的双分子荧光互补实验的瞬转方法。采用本公司独家研制的侵染缓冲液, 广泛适用的表达载体和阳性对照质粒, 可以快速通过 BiFC 实验检测蛋白之间的互作。

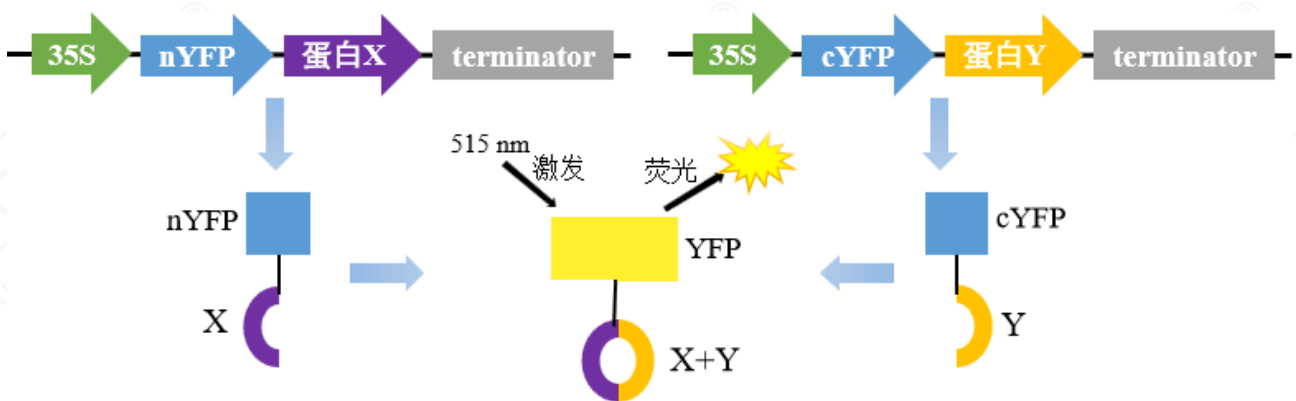


图 1 试剂盒原理示意图

## 产品特点:

1. 本产品可用于在烟草细胞中研究蛋白质-蛋白质相互作用。
2. 本产品提供了利用烟草瞬转系统进行 BiFC 实验所需的载体及农杆菌侵染试剂, 并且提供了实验全流程方案及实验中可能遇到的问题及解决方案, 帮助研究人员方便、快捷的完成实验。
3. 本试剂盒提供了 2 个空载质粒, YFP 的 N 端片段 (173 个氨基酸) 的 p1300-SCYNE 载体、包含 YFP 的 C 端片段 (84 个氨基酸) 的 p1300-SCYCE 载体。
4. 本产品额外提供了一对阳性对照质粒 (p1300-SCYNE-SOE 和 p1300-SCYCE-SCL30a), 采用了已知互作的 SOE 和 SCL30a 蛋白组合<sup>[4]</sup>, 在本系统中已经过验证, 可用于证明系统的可靠性与稳定性。



## 注意事项：

1. 实验中所需全部试剂均可在本司单独购买，详情可查阅本司官网或来电咨询。
2. 第一次使用本产品质粒时，建议重新转化大肠杆菌克隆菌株（如 DH5 $\alpha$ 、TOP10）扩繁，提取质粒后使用。如有必要，请将关键区域测序后使用。
3. 可编辑的质粒图谱文件请购买产品后联系我司获取。
4. BiFC 实验受到较多因素的影响，本产品仅提供 BiFC 的基础实验方案，在采用本实验方案结果不理想的情况下，则需要根据自己试验的效果，通过说明书各项提示或查阅相关文献等对实验方案进行优化调整，且需多次重复实验才能确认最终结果。
5. 由于蛋白和蛋白互作的差异性较大，本产品阳性对照的实验效果不代表使用本产品研究任何蛋白互作时都能做出相同的效果（如荧光强度，效率等）。由于 BiFC 系统的固有特点，阴性对照能观察到光会偶然发生，属于正常现象（解决方案见后文）。
6. 初次实验，建议以阳性对照做预实验，确定各项实验条件无误后再开始正式实验。

## 操作步骤：（在开始操作前请先阅读注意事项）

### 一、载体构建

#### 1. 质粒基本信息

质粒名称	质粒大小	携带抗性	使用说明
p1300-SCYNE	10359 bp	Kan <sup>R</sup>	空载质粒
p1300-SCYCE	10098 bp	Kan <sup>R</sup>	
p1300-SCYNE-SOE	11341 bp	Kan <sup>R</sup>	阳性互作对照质粒 <sup>[4]</sup>
p1300-SCYCE-SCL30a	10849 bp	Kan <sup>R</sup>	

注：BiFC 验证 SOE 和 SCL30a 互作，定位于细胞核中。

附表：测序引物序列：

载体	测序引物名称	测序引物序列 5'-3'
p1300-SCYNE 系列	NE-CX-F	TCAAGGACGACGGCAACT
	NE-CX-R	GATAATCATCGCAAGACC
p1300-SCYCE 系列	CE-CX-F	GACCACTACCAGCAGAACAC
	CE-CX-R	同 NE-CX-R

注：以上仅供参考，可根据需要自行设计测序引物。



## 2. 重组载体构建

将所研究的两个目标蛋白的 CDS 序列 X 和 Y（保留起始和终止密码子）分别构建到 p1300-SCYNE 载体的 nYFP 区域的下游 MCS 处和 p1300-SCYCE 载体的 cYFP 区域的下游 MCS 处，得到两个实验组质粒：p1300-SCYNE-X、p1300-SCYCE-Y 或 p1300-SCYNE-Y、p1300-SCYCE-X。可用的酶切位点如图 2 所示（更多序列信息请查看载体图谱）。

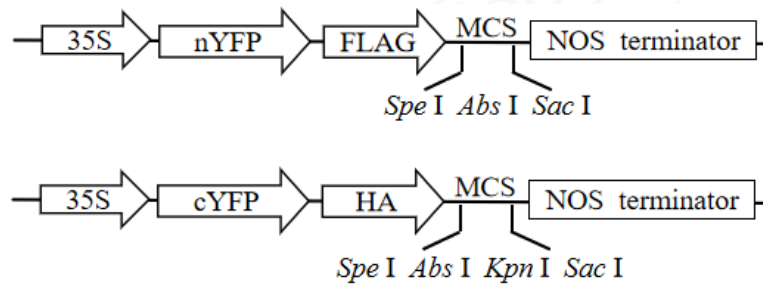


图 2 实验组载体构建示意图

注 1：载体构建时要保证插入片段与 nYFP 或 cYFP 保持同一阅读框，保证插入片段融合表达。

注 2：蛋白 X 和 Y 具体构建到 nYFP 还是 cYFP 载体上没有固定规律，必要时可试验两种情况下的效果。

注 3：FLAG 与 HA 标签可用于验证融合蛋白是否正常表达。

采用同源重组法构建质粒（#CR101），可使用下述双酶切位点及引物同源臂序列，也可自行选择酶切位点和设计引物：

载体	同源臂名称	同源臂序列 5'-3'	酶切位点
p1300-SCYNE	SCYNE-F	ATGACAAGGGGCCAGGCCT	Spe I 和 Sac I
	SCYNE-R	TGAACGATCGGGGAAATTCG	
p1300-SCYCE	SCYCE-F	ATTACGCTGGGCCAGGCCT	Spe I 和 Sac I
	SCYCE-R	TGAACGATCGGGGAAATTCG	

## 二、瞬时转化

### 1. 转化农杆菌：

将质粒转化农杆菌 GV3101 感受态（#CC405），按照感受态说明书方法操作，涂布在含 50 μg/mL Kan、25 μg/mL Rif 的 LB 平板上，28°C 培养大约 2-3 天至长出单菌落。

注 1：一般情况下，无需菌 p 即可直接挑菌进行后续实验；如有必要，请对平板上的单菌落进行菌 p 鉴定阳性克隆后进行后续实验。

注 2：GV3101（pSoup-p19）菌株可以辅助异源蛋白在植物中的瞬时表达。如果蛋白表达效率不佳时，可尝试转化 GV3101（pSoup-p19）后实验，在大部分情况下使用 GV3101 菌株也可取到良好的实验效果。

### 2. 小摇菌：

从上一步得到的平板上挑取直径约 1-2 mm 农杆菌单菌落到 1-3 mL 的 LB 液体培养基中（含 50 μg/mL Kan 和 25 μg/mL Rif），在 28°C，200 rpm 的条件下培养过夜至 1d 左右至菌液浑浊。



### 3. 扩大培养：

转移 1 mL 上一步培养的农杆菌菌液至 20 mL 的 LB 液体培养基中（含有 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Kan 和 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Rif）扩大培养，在 28  $^{\circ}\text{C}$ ，200 rpm 的条件下培养至农杆菌生长的对数期（ $\text{OD}_{600} = 0.5-0.6$ ）。

注：实际操作时可根据后续实验需要，扩大或缩小摇菌体积。

### 4. 配制重悬液：

首先在无菌条件下，用无菌去离子水将 5 $\times$ 农杆菌侵染液稀释为 1x 工作液（稀释后的农杆菌侵染液可于 4 $^{\circ}\text{C}$  保存）。以配制 10 mL 重悬液为例：在无菌条件下，取农杆菌侵染液（1x）10 mL，加入 10  $\mu\text{L}$  的 100 mM 乙酰丁香酮混匀备用（乙酰丁香酮终浓度为 100  $\mu\text{M}$ ）。

注：重悬液需要现配现用，根据实验需要配置合适体积的重悬液。

### 5. 收集/重悬菌体：

取一定体积的农杆菌菌液，4000  $\times g$  离心 10 min 收集菌体，弃去上清，用上一步配制好的重悬液重悬菌体，调至菌液  $\text{OD}_{600}=0.5-1.0$ 。

注：重悬后菌液的  $\text{OD}_{600}$  值是需要自己摸索的一个参数，适合的菌液浓度受基因及烟草状态的影响，高浓度可能导致叶片死亡，或者影响定位结果，建议设置不同浓度梯度进行比较，在可以获得荧光信号的前提下尽量采用低浓度的菌液。

### 6. 混菌：

初次进行实验时，一般情况下可以设置如图 3 所示的四个组合。在离心管中按 1: 1 体积混合上一步调整好浓度的两种菌体，黑暗下静置 2-3 h（至少 0.5 h，至多不超过 3 h）。

注：实验对照组可以参考文献进行设计，图 3 所示的对照组非实验所必须的；阳性对照组仅用于检验整个实验过程无误，排除实验失误的影响，往往在实验结果中不需要放置阳性对照组；在阴性对照组出现荧光的情况下，可能需要重新设置更为合理的阴性对照（参考常见问题及解决方案或相关文献<sup>[5,6]</sup>）

### 7. 注射法侵染烟草叶片：

使用 1 mL 无菌注射器吸取上一步得到的重悬液；避开烟草叶脉，确认要注射的区域（如图 3 所示），先用注射器针头在要注射的区域中间轻微划一下，造成“微创”，注意不要划破叶片；左手抵在叶片的正面，右手将注射器（不带针头）垂直压在叶片的背面，右手拇指慢慢推压注射器，观察菌液在表皮下扩散到一定范围（如图 3 圆圈所示区域，具体范围视烟草叶片大小而定，务必使不同处理组合在一片叶子上的扩散范围互不影响）。

注射完毕后放在 23 $^{\circ}\text{C}$  环境中培养 2d 后观察。

每次试验建议将互为对照的组合注射到同一片叶子上（图 3）。同一株烟草选取完全展开的 2-3 个叶片进行注射。同一批试验建议至少注射 3 株烟草。



**注：**最好选择 4-5 周龄处于壮年的健康的本氏烟进行注射（幼嫩或皱缩叶片不易注射，衰老叶片表达效率较低）。不同株烟草，同一株烟草不同叶片，同一叶片的不同部位蛋白表达效率都有可能不同，故而每次实验时需要选择适量的不同株烟草的不同叶片作为重复，而且需要重复多次实验（换不同批次的烟草）才能确认结果。

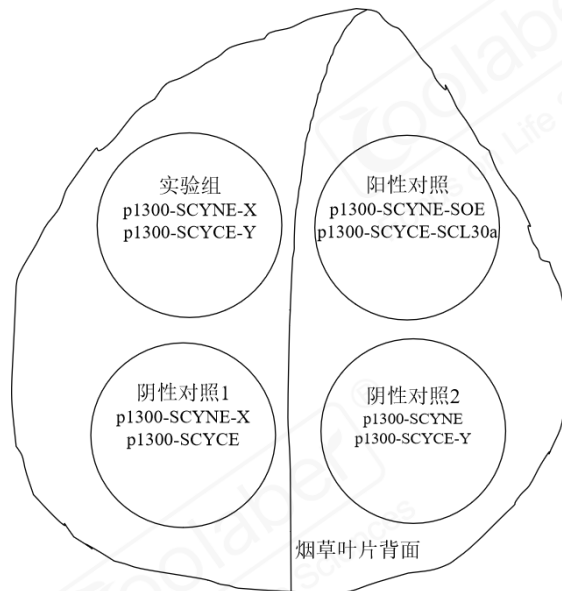


图 3 注射法侵染烟草示意图

### 三、结果观察

培养 2d 后观察烟草注射农杆菌的区域有无荧光。使用打孔器取烟草叶片标记区域，叶片背面朝上放在载玻片上（叶片背面表皮细胞层较好观察，也可撕取叶片背面表皮细胞），然后在叶片背面滴一滴灭菌双蒸水，盖上盖玻片（此步骤尽量减少气泡的产生），多余的水用吸水纸擦干，放在**激光共聚焦显微镜**下进行荧光的成像。

**注 1：**注射完成后可将烟草放置于黑暗环境下过夜培养后再转移到正常条件培养，可以增加侵染效果。

**注 2：**注射后的植株通常在 2 d 之后观察，但不同基因表达的时间可能在 1-7 天不等。

**注 3：**黄色荧光蛋白（YFP）的最大激发波长为 515 nm，选择最接近的激发波长即可。通常可直接使用仪器预设的 YFP 观察参数。不同仪器设置方法有所不同，仪器操作方法可自行询问老师和同学，确保仪器使用无误，以免影响观察。



## 常见问题及解决方案：

### Q：出现假阳性信号的解决方案

BiFC 系统的最大局限性在于荧光蛋白不可逆的非特异性组装。由于 BiFC 技术涉及到在细胞中瞬时过表达，当 YFP 的 2 个片段（nYFP 和 cYFP）在同一亚细胞区室中浓度达到一定阈值时，即使两个蛋白不互作，也能导致荧光蛋白发光。另外，荧光片段之间也可以通过体内随机的碰撞而重组，这同样会导致假阳性结果。所以在一些情况下，空载与空载组合，或者空载与非空组合（如图 3 阴性对照）会出现假阳性信号，假阳性信号通常表现为无规律、非特异性的荧光斑点或整体背景增强，而非特定发光位置（如细胞膜、细胞核等）。可能到的解决方案如下：

#### 1. 设置合适的对照

- 最严格的对照是将其中一种蛋白质与其互作蛋白的突变形式组合，且被突变的位点或结构域是两者互作所必须的，但有时候可能得不到突变形式作为阴性对照。
- 还可以选择与其中一个目的蛋白定位在同一细胞区室中的蛋白，且这种不相关的蛋白要被报道能够与 BiFC 实验中的另一种蛋白相互作用。
- 参考文献选择合适的阴性对照蛋白，如常用的 GUS-nYFP 或 GUS-cYFP<sup>[6]</sup>。

2. 调整侵染时菌液的浓度，在实验组可以获得荧光信号的前提下尽量采用低浓度的菌液。

3. 选择合适的观察时间，不同基因最佳观察时间不同，时间越长，假阳性信号出现的概率越大。

4. 确认组与组之间是否相互串样，重复实验，排除操作失误的可能性。

### Q：在其它系统中验证互作的组合在 BiFC 系统中不发光或阳性对照不发光

1. 通过测序确认载体构建是否有误，目的蛋白基因需与 nYFP 或 cYFP 在同一编码框下，保证融合表达。

2. 转化农杆菌后，通过菌 p 验证阳性克隆，确保农杆菌中带有目的质粒。

3. 烟草状态对瞬时表达影响很大（常见影响因素），需选择最佳适合瞬时表达的烟草状态。

4. 农杆菌侵染效率低：采用新鲜的农杆菌菌液且在对数期（OD<sub>600</sub>=0.5-0.6），重悬后调整菌液浓度至合适范围，尝试不同的重悬菌液浓度。

5. 侵染后在较低温度培养（21-25℃）有利于蛋白互作。



6. 确定最佳的观察时间，通常在注射 2 天之后观察，但不同基因表达的时间可能在 1-7 天不等。可以分不同时间段采集样本观察。
7. 确认仪器参数设置或使用是否有误。
8. 目的蛋白影响了 nYFP 和 cYFP 的重组，尝试将两个蛋白连接的载体互换。
9. 通过亚细胞定位实验确认两个蛋白能在受体细胞中正常表达且定位在同一细胞区室。
10. 必要时可通过 RT-qPCR 确认互作蛋白在同一细胞区室、组织、细胞类型和环境条件下能共表达。
11. 必要时可利用载体上的 FLAG 与 HA 标签验证融合蛋白是否正常表达。
12. 以上都没有什么问题，多次重复实验确认不发光，说明在这个系统中两个目的蛋白确实无法验证互作，建议采用其它系统结果辅助判断，BiFC 实验非验证蛋白互作的必须结果。

### 参考文献：

- [1] Hu C D , Chinenov Y , Kerppola T K. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation.[J]. Molecular Cell, 2002, 9(4):789-798. DOI:10.1016/S1097-2765(02)00496-3.
- [2] Kodama Y , Hu C D. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): a 5-year update and future perspectives.[J]. Biotechniques, 2012, 53(5):285-298. DOI:10.2144/000113943.
- [3] Meng Yuan, 纯珏 许. 烟草体系 BiFC[J]. BIO-PROTOCOL, 2018. DOI:10.21769/BioProtoc.1010133.
- [4] Zhao R , Wu W A , Huang Y H, et al. An RRM domain protein SOE suppresses transgene silencing in rice[J]. New Phytologist, 2024, 243(5):18. DOI:10.1111/nph.19686.
- [5] Kudla J , Bock R. Lighting the Way to Protein-Protein Interactions: Recommendations on Best Practices for Bimolecular Fluorescence Complementation Analyses.[J]. Plant Cell, 2016, 28(5):1002. DOI:10.1105/tpc.16.00043.
- [6] Asih P Y , Yuka O , Shojiro T, et al. The 14-3-3 Protein GF14c Acts as a Negative Regulator of F lowering in Rice by Interacting with the Florigen Hd3a[J]. Plant & Cell Physiology, 2009(3):429. DOI:10.1093/pcp/pcp012.