

## RhoA/Rac1/Cdc42 Pulldown 活化检测试剂盒

英文名称: RhoA/Rac1/Cdc42 Pulldown Activation Assay Kit

规格: 3x10 Assays

货号: NL27086

尊敬的客户:

感谢您选用本公司 G 蛋白活化检测试剂盒系列产品。近几年来测定细胞或组织中的小 G 蛋白的活性已经成为信号转导研究者广泛应用的技术。本公司研发出了能够特异性识别 GTP 结合状态的三聚体 G 蛋白或者小 G 蛋白的单克隆抗体, 利用组装好的 IP-WB 试剂盒, 能够迅速检测出 G 蛋白是否处于激活状态。该方法除了具有简单、易操作、灵敏度高等优点以外, 还有一个最为吸引人的优势: 具有捕捉到被固定的细胞内的 G 蛋白的活化状态的可能性。使用前请仔细阅读说明书, 如有疑问请咨询 武汉纽莱生物科技有限公司, Tel: 027-65563553 Email: sale@newlif.com.cn

本试剂盒仅供体外研究使用, 不用于临床诊断。

## 一. 用途

- 研究 Rac1 ,RhoA,和 Cdc42 信号通路之间的细胞型特异性串扰。
- 研究Rho 家族 小G 蛋白激活 对其他信号通路的影响。
- 体内 Rac1/RhoA/Cdc42 激活水平的分析。
- 检测增强 Rac1/RhoA/Cdc42 活性的化合物和蛋白质。
- 检测抑制 Rac1/RhoA/Cdc42 活性的化合物和蛋白质。
- 对细胞(组织) 中的Rac1/RhoA/Cdc42 的活性进行定位,定量,定性分析。

## 二. 产品说明

小G蛋白家族中最重要的是Rho家族蛋白种的Rac1、RhoA和Cdc42,这三种蛋白相互协调、相互依赖,共同调节骨架蛋白的结构重组和形成。RhoA和Rac1/Cdc42的作用相反,Rac1/Cdc42对神经元的发生、迁移、生长、维持等起到促进作用,而RhoA对神经元的形成和维持起到抑制作用。体内Rho有两种形式,即GDP结合的无活性状态与GTP结合的活性状态。并且,通过体内三类蛋白,即鸟苷酸转换因子(guaninenucleotide exchange factor,GEF)、GTPase 激活因子(GTPase activating protein,GAP)与鸟甘酸解离抑制子(guanine nucleotide dissociation inhibitor,GDI),有序地调控Rho蛋白活性状态的转换。它还参与许多生理活动,包括细胞迁移、粘附、胞质分裂、增殖、分化和凋亡,并在更大程度上参与细胞转化。

在肌动蛋白细胞中,Cdc42,Rho,Rac在信号传导的过程中起着重要的作用。学习他们之间的串扰和互相之间的反馈对研究他们之间的相互反应可以提出很多不错的建议。同时,对Rho蛋白家族的时空动力学的观测可以为空间极性和Cdc42/Rac和Rho提供证据。而武汉莱生物科技有限公司推出的 Rac1 /RhoA/Cdc42 活性检测试剂盒主要是依据单克隆抗体能够异性的识别特殊构象的 GTP 结合蛋白,而不识别 GDP 结合蛋白,进而快速的进行 Rac1 / RhoA/Cdc42 活性检测。每个试剂盒可以对Rac1/RhoA/Cdc42 各进行10次免疫亲和沉淀。同时试剂盒中的Rac 1/RhoA/Cdc42 识别GTP 空间构象的单克隆抗体也可以通过免疫组化和免疫荧光对细胞(组织中)的Rac1/RhoA/Cdc42 的活性进行监测。

## 三. 检测原理

武汉纽莱生物科技有限公司的 Rac1/RhoA/Cdc42 活性检测试剂盒主要是利用识别蛋白特异构象的GTP 单克隆抗体特异性的去检测细胞提取物或者体外的(样品需要进行 GTP $\gamma$ S 活化处理)活性蛋白的GTP 的水平。简言之,特异性识别活化构象的鼠单克隆抗体可以特异性结合细胞裂解液中的 GTP 活性蛋白,然后利用 Protein A/G 将抗原抗体的结合物吸附下来,再分别利用识别 Rac1/RhoA /Cdc42的兔多克隆 抗体进行免疫印迹分析进行检测。

#### 四、试剂盒组份及保存

名称	货号	规格	储存温度
Anti-active Rac1 mouse Monoclonal antibody	Cat.#NL23001	1x12ul	-20℃
Anti-active RhoA mouse Monoclonal antibody	Cat.#NL23002	1x12ul	4℃
Anti-active Cdc42 mouse Monoclonal antibody	Cat.#NL23003	1x12ul	4℃
Anti-Rac1 Rabbit polyclonal antibody	Cat.#NL24001	1x20ul	-20℃
Anti-RhoA Rabbit polyclonal antibody	Cat.#NL24002	1x20ul	-20℃
Anti-Cdc42 Rabbit polyclonal antibody	Cat.#NL24003	1x20ul	-20℃
HRP-Goat anti-Rabbit IgG	Cat.#NL29002	1x50ul	-20℃
Protein A/G Agarose	Cat.#NL30301	1x600ul	4℃
5xAssay/ lysis Buffer	Cat.#NL30303	1x30ml	4℃
100xGTP-rS	Cat.#NL30302	1x50ul	-80℃
100XGDP	Cat.#NL30304	1x50ul	-80℃

**注意：**使用前应将100xGTP-rs和100xGDP 分装成10管/5ul/每管，并立即放入 -80℃ 冻存，避免反复 冻融

#### 五、试剂盒所需自备物品

1. 刺激和未刺激的细胞裂解物；
2. 蛋白酶抑制剂；
3. 4℃ 摇杆或者摇床；
4. 0.5 M EDTA (pH 8.0)；
5. 1 M MgCl<sub>2</sub>；
6. 2X reducing SDS-PAGE sample buffer；
7. 电泳和免疫印迹相关试剂；
8. 免疫印迹缓冲液 TBST (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween-20)；
9. 免疫印迹封闭缓冲液 (TBST containing 5% 脱脂奶粉 or 3% BSA)；
10. ECL 检测试剂；

## 六、试剂盒注意事项

- 1、收到试剂盒后如不立即使用，请将试剂盒组分按照标签说明存储在相应的温度，100xGTP-rs和 100xGDP 分装成10管/5ul/每管，并立即放入 -80°C 冻存，避免反复冻融。
- 2、Protein A/G Agarose使用前请稍微离心甩一下，因管壁上可能残留，而且是用20%乙醇保存的，如果乙醇挥发，体积较少时很难将Agarose吹散，所以请补充20%乙醇等于Agarose的体积。
- 3、使用50%的Protein A/G Agarose前先用枪将其吹匀，一个反应管使用20 ul的50%的Protein A/G Agarose足够。
- 4、将50%的Protein A/G Agarose加入反应管前先用1×Assay/Lysis Buffer洗涤3遍，以去除其中的乙醇，最后一遍用合适体积的1×Assay/Lysis Buffer悬浮Agarose，再分装于反应管，保证每管参与反应的50%的Protein A/G Agarose有20 ul。
- 5、为了减少50%的Protein A/G Agarose的损失，可以先在反应管中加入适当体积的1×Assay/Lysis Buffer。
- 6、反应管中试剂加入顺序建议，先1×Assay/Lysis Buffer，然后是用Buffer稀释的Protein A/G Agarose，细胞裂解液和活性抗体，总体积建议0.5ml-1ml
7. 活性抗体的加入量请适当做调整，如可以加入0.5ug、1ug或者2ug。
8. 孵育反应在4°C 360度摇床进行。
9. 反应完毕，洗涤Agarose时候，尽量避免吸走Agarose。

## 七、实验操作步骤

### A 试剂制备

1X Assay/Lysis Buffer: 实验前用去离子水将 5X 的 Assay/Lysis 缓冲液稀释成 1X 的缓冲液，并在 使用前加入蛋白酶抑制剂如 1 mM PMSF, 10 µg/mL leupeptin(亮肽素), 或 10 µg/mLaprotinin(抑肽酶)。

### B 样品处理

#### 贴壁细胞

- 1.培养细胞密度达到大约80%-90%之间(直径10cm培养皿，~107个细胞)，并用活性剂或抑制剂进行处理。
2. 吸去培养基并用冰冷的 PBS 洗涤两次。
3. 向细胞中加入 1X Assay/Lysis 缓冲液(每个直径 10cm 的组织培养皿中加入 0.5-1mL)。
4. 将培养皿放置于冰上处理 10-20 分钟。
5. 用细胞刮棒把细胞从培养皿下分离下来。
6. 将细胞裂解物转入合适的管中并放置于冰上。
7. 如果核发生裂解，细胞裂解物可能会变得非常的粘稠并且难以吸取。当这种情况出现时，将细胞裂解物用 27½的注射器针头来回吸取 3-4 次，以破坏基因组DNA，从而避免上述情况的出现。
8. 4°C 12000 g, 离心 10 min.
9. 收集上清(~1-2 mg 总蛋白)并放置于冰上使用。如果样品不立即使用，请将处理后的样品存放于-70°C 条件下。

## 悬浮细胞

1. 培养细胞并用活化剂或抑制剂进行处理。
2. 计数细胞后离心。
3. 吸去培养基并用冰冷的 PBS 洗涤两次。
4. 向细胞中加入 1X Assay/Lysis 缓冲液(每个直径 10cm 的组织培养皿中加入 0.5-1mL)。
5. 反复吹打细胞进行裂解。
6. 将细胞裂解物转入合适的管中并放置于冰上。
7. 如果核发生裂解, 细胞裂解物可能会变得非常的粘稠并且难以吸取。当这种情况出现时, 将细胞裂解物用 27½ 的注射器针头来回吸取 3-4 次, 以破坏基因组DNA,从而避免上述情况的出现。
8. 4°C 12000 g, 离心 10 min。
9. 收集上清(~1-2 mg 总蛋白)并放置于冰上使用。如果样品不立即使用, 请将处理后的样品存放于-70°C 条件下。

## C. 体外用 GTPγS/GDP 处理蛋白以用作阳性和阴性的对照(可选)

**注意:** 在细胞体内环境条件下大约有 10%的 Rac1/RhoA/Cdc42 被激活, 而在体外用 GTPγS 处理大约有90% 的 Rac1/RhoA/Cdc42 被激活。

1. 准备六个离心管,并标记 #1- #6, #1 #2 两个管中各加入 0.5 mL 包含目的蛋白Rac1的细胞提取物或者1ug Rac1纯蛋白, #3,#4 两个管中各加入 0.5 mL 包含目的蛋白RhoA的细胞提取物或者1ug RhoA 纯蛋白。 #5, #6 两个管中各加入 0.5 mL 包含目的蛋白Cdc42的细胞提取物或者1ug cdc42 纯蛋白。
2. 每个管中加入20ul 0.5M EDTA (终浓度即为 20 mM)。
3. #1,#3,#6 管中加入 5ul 的 100X GTPγS (终浓度即为 100 uM)作为阳性对照。 #2,#4,#5 管中加入 5ul 的 100X GDP (终浓度即为 1 mM)作为阴性对照。
4. 将六个离心管置于 30°C 条件下反应 30 min 并不断搅动。
5. 终止反应: 将六个离心管置于冰上并加入 32.5ul 1M MgCl<sub>2</sub> (终浓度即为 60mM)

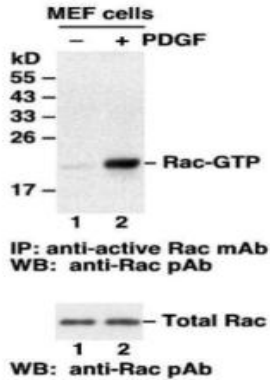
## D. 激活 Rac1/ RhoA/Cdc42 的亲亲和沉淀.

1. 准备三个离心管并标记 #7- #9, #7 管中加入 0.5-1ml 包含目的蛋白Rac1的细胞提取物, #8管中加入 0.5-1ml 包含目的蛋白RhoA 的细胞提取物. #9 管中加入0.5-1ml 包含目的蛋白cdc42 的细胞提取物。
2. 用 1X Assay/Lysis 缓冲液。把每个管中的体积调整到1ml
3. 向#7-#9 三管中依次加入1ul 活性的 Rac1 (NL23001) RhoA (NL23002) Cdc42 (NL23003) 的单克隆抗体
4. 用涡旋振荡仪将 protein A/G 凝胶柱充分混匀,
5. 然后快速的吸出 20ul 悬浮珠浆液加入#7-#9 三个离心管
6. 将管置于 4°C 条件下孵育1小时, 并轻轻的进行摇动。
7. 5000g, 离心 1 分钟。
8. 弃上清, 这一步要非常小心以避免珠子的损失。
9. 用 0.5 mL 的 1X Assay/Lysis 缓冲液洗涤珠子三次, 离心并弃去上清。
10. 最后一次洗涤后, 小心的移去所有的上清。
11. 用 20ul 的 2X SDS-PAGE 样品缓冲液重悬样品。
12. 样品煮沸 5min。
13. 5000g, 离心 10s。

## E. 蛋白印迹实验

1. 取 15ul 样品/孔上样 17%配体胶。
2. 按照制造商的说明进行 SDS-PAGE。
3. 按照制造商的说明将凝胶蛋白转到 PVDF 或硝化纤维素膜。
4. 将 PVDF 膜浸入 100%甲醇 15s, 然后在室温放置 5 min 晾干, 注意: 如果使用的是硝化纤维素膜, 此步省略
5. 封闭; 用 TBST 缓冲液配制 5%的脱脂牛奶或者 3%BSA 在室温下孵育 1小时进行封闭, 并需要 恒定振荡。
6. 用 TBST 缓冲液洗涤膜三次/5min。
7. 孵育一抗: 在孵育一抗前, 应把膜裁剪成三份 (以区分 #7 #8 #9) 用 TBST 缓冲液配制的 5%脱脂牛奶或 3%BSA 稀释兔多抗 (NL23001, NL24002, NL24003) 按照 (1: 1000, 稀释) 分开进行孵育。4°C 孵育一个小时, 或者过夜。
8. 用 TBST 缓冲液洗涤三次/膜/5min。
9. 孵育二抗: (例如羊抗兔 IgG-HRP)用 TBST 缓冲液配制的 5%脱脂牛奶或 3%BSA 按1:1000 稀 释比例稀释后使用, 室温下孵育 1 小时并恒定振荡。
10. 用 TBST 缓冲液洗涤三次/膜/5min。
11. 使用实验者所选择的检测方法进行显色如 ECL 显色法

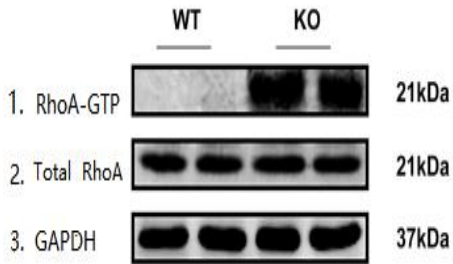
### Rac1 激活示例结果



Top lane1: MEF 细胞裂解物 (500ul,1mg/ml) 与 ProteinA/G 和 Anti-Rac1-GTP Monoclonal Antibody (1ul,1mg/ml Cat # NL23001) 进行孵育, 用Anti Rac1 rabbit polyclonal antibody (稀释比例, 1:1000, Cat # NL24001) 进行蛋白印迹分析。

Top lane2: PDGF 处理的MEF 细胞裂解物 (500ul,1mg/ml) 与 ProteinA/G 和 Anti-Rac1-GTP Monoclonal Antibody (1ul,1mg/ml Cat# NL23001)进行孵育, 用 Anti Rac1 rabbit polyclonal antibody (稀释, 1:1000, Cat #NL24001)进行蛋白印迹分析。

The bottom panel(1,2): MEF 细胞裂解物 (25ul,1mg/ml), 用Anti Rac1 rabbit polyclonal antibody (稀释1:1000, Cat# NL24001) 进行蛋白印迹分析。

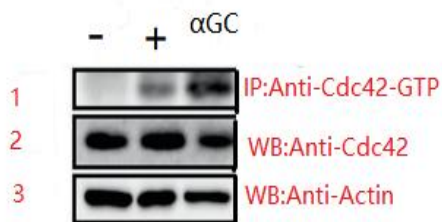


图一: WT 细胞裂解物/Ko细胞裂解物 (500ul,1mg/ml) 与 ProteinA/G 和 Anti-RhoA-GTP Antibody (1ul,1mg/ml Cat#NL23002), 进行孵育, 用 Anti RhoA rabbit polyclonal antibody (稀释比例, 1:1000, Cat #NL24002) 进行蛋白印迹分析。

图二: WT 细胞裂解物 (20ul,1mg/ml), 用 Anti RhoA rabbit polyclonal antibody (稀释比例, 1:1000, Cat #NL24002) 进行蛋白印迹分析。

图三: WT 细胞裂解物 (20ul,1mg/ml), 用 Anti GAPDH rabbit polyclonal antibody (稀释比例, 1:1000, Cat #NL28001)进行蛋白印迹分析。

### Cdc42 激活示例结果



图一: alphaGC处理的细胞裂解物 (500ul,1mg/ml) 与 ProteinA/G 和 Anti- Cdc42-GTP Monoclonal Antibody (1ul,1mg/ml Cat #NL23003), 进行孵育, 用 Anti- Cdc42 rabbit polyclonal antibody (稀释比例, 1:1000, Cat #NL24003)进行蛋白印迹分析

图二:细胞裂解物 (25ul,1mg/ml), 用 Anti- Cdc42 rabbit polyclonal antibody (稀释1:1000, Cat.NL24003) 进行蛋白印迹分析。

图三: 细胞裂解物 (25ul,1mg/ml), 用 Anti- Actin rabbit polyclonal antibody (稀释1:1000, Cat #NL28002)进行蛋白印迹分析。