

RhoA Pulldown 活化检测试剂盒

英文名称: RhoA Pulldown Activation Assay kit

规格: 30 Assays

货号: NL27002

用途

体内 RhoA 激活水平的分析。

检测增强 RhoA 活性的化合物和蛋白质。

检测抑制 RhoA 活性的化合物和蛋白质。

对细胞 (组织) 中的 RhoA 活性进行定位、定性、定量研究。

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 电话: 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、产品说明

小G蛋白是从属于细胞调节因子中的一个超家族。Rho家族是小G蛋白中的一个亚家族，它在细胞运动、细胞分裂以及基因转录中发挥主要作用。而本试剂盒中的RhoA就属于Rho亚家族中的一种，RhoA参与生理活动过程中其分子结构会呈现出2种相互转换的形式：与GTP结合的激活状态和与GDP结合的非活性状态。

目前RhoA蛋白活性的检测主要是依据小GTP酶RhoA可以与RhoA效应蛋白(Rhotekin)的RBD区域结合，使RhoA效应蛋白活化从而发挥生物学功能，进而间接的进行RhoA活性功能的监测。然而此方法在检测过程中存在着一定的局限性比如GTP水解成GDP的速度过快以及RhoA-GTP结合蛋白与RBD结合区域之间较低的亲和力，导致这种检测方法的重复性较差。而本公司推出的RhoA活性检测试剂盒主要是依据单克隆抗体能够特异性的识别特殊构象的RhoA-GTP结合蛋白，而不识别RhoA-GDP结合蛋白，进而简单并且快速的进行RhoA的活性检测。每个试剂盒可以进行30次免疫亲和沉淀检测。同时试剂盒中的RhoA-GTP单克隆抗体也可以通过免疫组化和免荧光对细胞和组织中RhoA的活性进行监测。

二、检测原理

武汉纽莱生物技术有限公司的RhoA活性检测试剂盒主要是利用识别蛋白特异形态的RhoA-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 γ S活化处理）活性RhoA-GTP的水平。简言之，特异性识别RhoA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RhoA-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，再利用识别RhoA兔多克隆抗体进行免疫印迹分析进行检测。

三、试剂盒组份及保存

名称	货号	规格	储存温度
Anti-active RhoA mouse Monoclonal antibody	Cat.#NL23002	1x35ul	-20°C
Protein A/G Agarose	Cat.#NL30301	1x600ul	4°C
5xAssay/ lysis Buffer	Cat.#NL30303	1x30ml	4°C
Anti-RhoA Rabbit polyclonal antibody	Cat.#NL24002	1x50ul	-20°C
100xGTP-rS	Cat.#NL30302	1x50ul	-80°C
100XGDP	Cat.#NL30304	1x50ul	-80°C
HRP-Goat anti-Rabbit IgG	Cat.#NL29002	1x50ul	-20°C

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°C冻存，避免反复冻融。

四、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 °C 摇杆或者摇床;
4. 0.5 M EDTA (pH 8.0);
5. 1 M MgCl₂;
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;

五、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。

六、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 10 cm 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 GTP γ S/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RhoA被激活，而在体外用 GTP γ S 处理大约有90%的RhoA 被激活。

1. 准备两个离心管，每个管中各加入 0.5 mL 的细胞提取物（如果是纯的RhoA蛋白则每个管中加入的蛋白量为 1 μ g）。
2. 每个管中加入 20 μ l 0.5M EDTA(终浓度即为 20 mM)。
3. 一个管中加入 5 μ l 的 100X GTP γ S（终浓度即为 100 μ M）作为阳性对照。另一个管中加入 5 μ l 的 100X GDP（终浓度即为 1 mM）作为阴性对照。
4. 将离心管置于 30 $^{\circ}$ C 条件下反应 30 min 并不断搅动。
5. 终止反应：将管置于冰上并加入 32.5 μ l 1M MgCl₂(终浓度即为 60mM)。

D. 激活RhoA的亲合沉淀

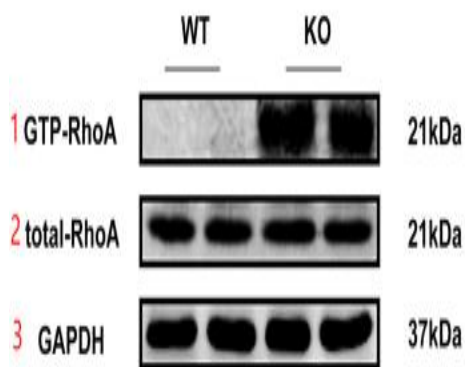
1. 加入 0.5-1 mL(总蛋白的含量大约为 1mg)的细胞裂解物至微量离心管中。
2. 用 1X Assay/Lysis 缓冲液。把每个样品的体积调整到1ml
3. 向管中加入 1 μ l 的活性 RhoA 单克隆抗体。(Cat.#NL23002)
4. 用涡旋振荡仪将 protein A/G 凝胶柱充分混匀，
5. 然后快速的吸出 20 μ l 悬浮珠浆液加入离心管中。
6. 将管置于 4 $^{\circ}$ C 条件下孵育1小时，并轻轻的进行摇动。
7. 5000g，离心 1 分钟。
8. 弃上清，这一步要非常小心以避免珠子的损失。
9. 用 0.5 mL 的 1X Assay/Lysis 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 20 μ l 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: 用 TBST 缓冲液配制的 5%脱脂牛奶或 3%BSA 稀释Anti-RhoA pAb(Cat.#NL24002),稀释比例为 1:500-1:1000, 主要根据样品中含有的RhoA蛋白的量) 室温下孵育 1-2 小时, 或者 4°C 条件下过夜孵育。
8. 用 TBST 缓冲液洗涤膜三次/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 缓冲液洗涤膜三次/5min。
11. 使用实验者所选择的检测方法进行显色如 ECL 显色法。

示例结果

下图展示的是本公司的 RhoA 活性试剂盒的典型结果。下面的数据仅供参考



图一：WT 细胞裂解物 (500ul,1mg/ml) 与 ProteinA/G 和 Anti-RhoA-GTP Monoclonal 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.

KO 细胞裂解物 (500ul,1mg/ml)与 ProteinA/G 和 Anti-RhoA-GTP Monoclonal 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.

与传统的 GST- pull down 方法相比, 该试剂盒具有以下明显优势

1. 灵敏度高; 诱导蛋白与目标蛋白中的结合对蛋白量的要求比较高。而抗体与蛋白的结合对样本中蛋白的要求比较少。
2. 特异性强; 因为诱饵蛋白是需要加上GST标签的重组蛋白, 所以是非生理状态下的验证, 蛋白质的结构和形式可能与天然状态下存在一定差异, 而抗体与目标蛋白的结合, 活细胞状态下蛋白质之间的相互作用被保持, 所以其反映的是细胞中真实的蛋白情况。
3. 应用更为广泛; 试剂盒中能够特异性识别GTP结合状态的三聚体G蛋白或者小G蛋白的单克隆抗体, 适应各种种属 (Human, Mouse, Rat, Rice plants, Pig Cotton, bacteria, Escherichia coli等) 应用范围非常广泛 (IP ,WB ,IHC IF ICF,ICC,IHF.FC, 等) 随着这些应用的普及, G 蛋白信号转导的研究进展, 必将进一步加快。