

Arf6 Pulldown 活化检测试剂盒

英文名称: Arf6 Pulldown Activation Assay kit

规格: 30 Assays

货号: NL27008

用途

体内 Arf6 激活水平的分析。

检测增强 Arf6 活性的化合物和蛋白质。

检测抑制 Arf6 活性的化合物和蛋白质。

对细胞 (组织) 中的 Arf6 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

ADP 核糖基化因子 (Arfs) 是真核细胞中广泛表达的且是高度保守GTP结合蛋白家族, 是Ras超级家族之一。Arfs 蛋白可以分为三类, 第一类包括Arf1,Arf2 ,Arf3; 第二类包括Arf4和Arf5 第三类只有Arf6 与其他的 GTP 结合蛋白一样, 在非活性 GDP 结合状态和活性 GTP 结合状态之间循环。效应蛋白与 GTP 结合优先于 Arf6 的 GDP 结合状态, 为 Arf6 在细胞中的功能提供了基础, Arf6 是唯一在细胞质膜上发挥功能的Arf 蛋白 GTP 结合的Arf6 调节内吞膜的运输同时调节细胞外周的细胞骨架变化, 因此分析监测Arf6 的激活对研究Arf6 的功能提供了重要的依据。

目前市面上常用的是利用效应蛋白 GGA3 (高尔基体定位的含 γ 耳Arf 结合蛋白 3) 的 Arf6 蛋白结构域 (PBD), 该蛋白已被证明可特异性结合 GTP 结合形式Arf6我们结合纯化的 GGA3-PBD, “下拉” Arf6-GTP 并使用 Arf6 特异性抗体通过随后的蛋白质印迹步骤量化活性 Arf6 的水平。

二、检测原理

武汉纽莱生物技术有限公司的Arf6活性检测试剂盒主要是利用识别蛋白特异形态的Arf6-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Arf6-GTP的水平。简言之, 特异性识别Arf6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Arf6-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Arf6 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 Arf6 Mouse Monoclonal antibody	Cat.#NL23008	1x35ul	-20°C
Protein A/G Agarose	Cat.#NL30301	1x600ul	4°C
5xAssay/ lysis Buffer	Cat.#NL30303	1x30ml	4°C
Anti- Arf6 Rabbit polyclonal antibody	Cat.#NL24008	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 μ g/mL leupeptin (亮肽素)，或 10 μ g/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， \sim 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 27 $\frac{1}{2}$ 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 (\sim 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 27 $\frac{1}{2}$ 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 (\sim 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Arf6被激活，而在体外用 GTP γ S 处理大约有90%的Arf6 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Arf6蛋白则每个管中加入的蛋白量为 1ug）。
2. 每个管中加入 20ul 0.5M EDTA(终浓度即为 20 mM)。
3. 一个管中加入 5ul 的 100X GTP γ S（终浓度即为 100 uM）作为阳性对照。另一个管中加入 5ul 的 100X GDP（终浓度即为 1 mM）作为阴性对照。
4. 将离心管置于 30°C 条件下反应 30 min 并不断搅动。
5. 终止反应：将管置于冰上并加入 32.5ul 1M MgCl₂(终浓度即为 60mM)。

D. 激活Arf6的亲合沉淀

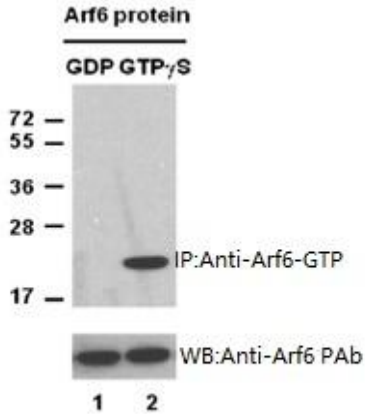
1. 加入 0.5-1 mL(总蛋白的含量大约为 1mg)的细胞裂解物至微量离心管中。
2. 用 1X Assay/Lysis 缓冲液。把每个样品的体积调整到1ml
3. 向管中加入 1ul 的活性 Arf6 单克隆抗体。（Cat.#NL23008）
4. 用涡旋振荡仪将 protein A/G 凝胶柱充分混匀，
5. 然后快速的吸出 20ul 悬浮珠浆液加入离心管中。
6. 将管置于 4°C 条件下孵育1小时，并轻轻的进行摇动。
7. 5000g，离心 1 分钟。
8. 弃上清，这一步要非常小心以避免珠子的损失。
9. 用 0.5 mL 的 1X Assay/Lysis 缓冲液洗涤珠子三次，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：用 TBST 缓冲液配制的 5%脱脂牛奶或 3%BSA 稀释Anti-Arf6 pAb(Cat.#NL24008),稀释比例为 1:500-1:1000， 主要根据样品中含有的Arf6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 Arf6 活性试剂盒的典型结果。下面的数据仅供参考



Top: 纯化的 Arf6 蛋白用 GDP 处理 (lane 1) 或 GTP γ S (lane 2) 与 Protein A/G 和 Anti-Arf6-GTP Monoclonal Antibody (1 μ l, 1 mg/ml Cat # NL23008) 进行孵育, 用 Anti-Arf6 rabbit polyclonal antibody (稀释比例, 1:1000, Cat # NL24008) 进行蛋白印迹分析.

Bottom: 纯化的 Arf6 蛋白用 Anti-Arf6 rabbit polyclonal antibody (稀释比例, 1:1000 Cat # NL24008) 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, 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。