

Active Rho Pull-down and Detection Kit

产品编号	产品名称	包装
P2065S	Active Rho Pull-down and Detection Kit	50次
P2065M	Active Rho Pull-down and Detection Kit	250次

产品简介:

- 碧云天生产的Active Rho Pull-down and Detection Kit, 也称活性Rho结合沉淀与检测试剂盒, 是一种便捷、高效的用于定量检测组织或细胞裂解液中激活状态(Active state) Rho蛋白(包括RhoA、RhoB和RhoC)的试剂盒。本试剂盒基于Rhotekin-RBD Agarose (活性Rho结合琼脂糖凝胶)特异性地结合沉淀(Pull-down)激活状态的Rho蛋白, 然后通过Western检测Rho蛋白的激活水平(图1)。

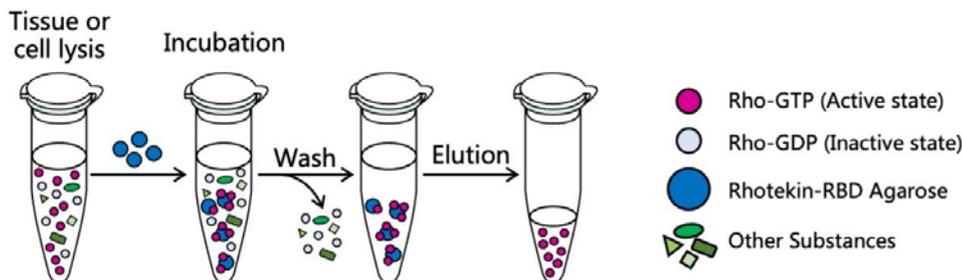


图1. 碧云天Active Rho Pull-down and Detection Kit (P2065)的Pull-down工作原理图。洗脱产物后续可以用于Western检测。

- Rhotekin是与Rho蛋白(包括RhoA、RhoB和RhoC)相互作用的一种下游效应蛋白(Effector protein), 可控制神经前体细胞的增殖、神经突的生长和突触形成等多种细胞活动。Rhotekin中的‘teki’来源于日语‘目标’。Rhotekin全长563个氨基酸, 理论分子量为61kDa, 含有4个结构域: 激活状态Rho的结合结构域(Active Rho-binding domain, RBD)、PH结构域(Pleckstrin homology)和2个脯氨酸富含区结构域(Proline-rich motifs)。Rhotekin的RBD结构域可以特异性的识别并结合激活状态的Rho蛋白, 但不结合静息状态的Rho蛋白, 因此Rhotekin-RBD重组蛋白可用于检测激活状态的Rho蛋白, 在体内或体外也可以作为Rho蛋白的抑制剂使用[1]。
- 小GTP酶(Small GTPase), 也称Small G-proteins、Ras superfamily, 是调节真核细胞信号转导、细胞增殖、细胞骨架重组和细胞内膜转运等过程的分子开关, 小GTP酶通过结合和水解GTP, 在‘激活’和‘静息’状态之间循环: 在外界信号的刺激下, 鸟苷酸交换因子(Guanine nucleotide-exchange factors, GEFs)辅助小GTP酶将结合的GDP置换为GTP, 小GTP酶结合GTP进入激活状态(Active state); 激活状态的小GTP酶与下游效应蛋白(Effector protein)相互作用, 从而刺激细胞发生相应的响应; GTP酶激活蛋白(GTPase-activating proteins, GAPs)催化小GTP酶结合的GTP水解为GDP, 并释放自由磷酸盐(Free phosphate, Pi), 此时小GTP酶结合GDP进入静息状态(Inactive state), 鸟嘌呤核苷酸解离抑制蛋白(Guanine nucleotide dissociation inhibitors, GDIs)抑制小GTP酶释放GDP, 直到GEFs受到刺激信号再次开启新一轮的循环(图2) [2-3]。

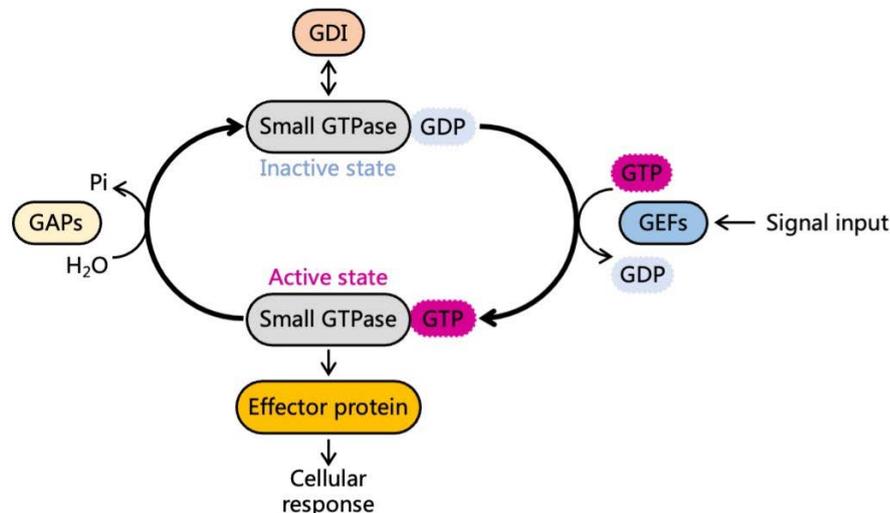


图2. 小GTP酶在‘激活’和‘静息’状态之间循环的原理图。

- 小GTP酶在人类中已发现超过150个家族成员，在果蝇(*Drosophila*)、秀丽隐杆线虫(*C. elegans*)、酿酒酵母(*S. cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*S. pombe*)、黏菌(*Dictyostelium*)和植物中也发现了保守的同源物。小GTP酶根据结构和功能被分为5个家族分支：Ras家族、Rho家族、Ran家族、Rab家族和Arf家族。Ras家族本身又被分为6个亚家族：Ras亚家族、Ral亚家族、Rit亚家族、Rap亚家族、Rheb亚家族和Rad亚家族[4]。
- Rho家族(Ras homologous GTPases)在真核生物中高度保守，是调节肌动蛋白重组的关键因子，因此在细胞迁移、伤口愈合、细胞粘附、细胞极性、膜转运和细胞分裂等过程中发挥着重要作用。目前有21个成员被发现，被分为8亚家族(见下表)，其中RhoA、Rac1和Cdc42研究的最为广泛[5]。

Subfamily	Rho	Rac	Cdc42	RhoH	RhoBTB	RhoUV	Rnd	RhoF
Rho family members	RhoA RhoB RhoC	Rac1 Rac2 Rac3 RhoG	Cdc42 RhoQ (TC10) RhoJ (TCL)	RhoH	RhoBTB1 RhoBTB2 RhoBTB3	RhoU (Wrch) RhoV (Chp)	Rnd1 Rnd2 Rnd3 (RhoE)	RhoD RhoF (Rif)

- 本试剂盒检测NIH 3T3细胞内源性激活状态RhoA蛋白的效果见图3。实验采用GppNHp (鸟苷酰亚胺二磷酸锂)作为GTP替代物，GppNHp与GTPyS类似，都是一种不可水解的GTP类似物[6]。

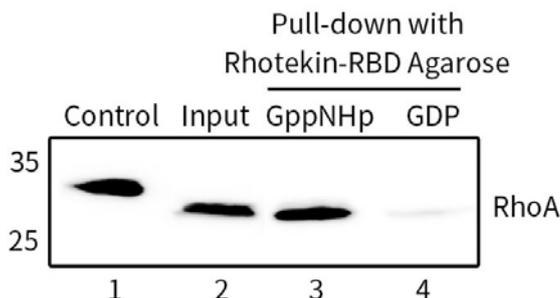


图3. 碧云天Active Rho Pull-down and Detection Kit (P2065)用于检测NIH 3T3细胞内源性激活状态RhoA蛋白的效果图。NIH 3T3细胞裂解液分别加入终浓度为1mM GppNHp或GDP使RhoA蛋白处于激活状态(Active state)或静息状态(Inactive state)，随后加入20μl Rhotekin-RBD Agarose，置于旋转混合仪上，4°C孵育1小时。后经离心，洗涤，加入1X SDS-PAGE上样缓冲液95°C加热5分钟，经BeyoGel™ Plus PAGE预制胶(Tris-Gly, 4-20%, 10孔) (P0468)电泳后进行Western检测，使用RhoA Rabbit Monoclonal Antibody孵育。Western印迹成像使用BeyoImager™ 600化学发光成像系统完成(EI600)。Control为10ng Recombinant Human RhoA (泳道1，分子量略大于其它泳道的小鼠样品)，Input为NIH 3T3细胞裂解液(泳道2)。本试剂盒可特异地结合并Pull-down激活状态的RhoA蛋白(RhoA-GppNHp) (泳道3)，但不结合静息状态的RhoA蛋白(RhoA-GDP) (泳道4)。实际结果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

- **Rhotekin-RBD Agarose储存溶液:** 50mM HEPES (pH7.4), 150mM NaCl, 5mM MgCl₂, 0.5% Triton X-100, 1mM DTT, 10% glycerol.
- 按照单次使用20μl Rhotekin-RBD Agarose计算，本产品的小包装和中包装分别用于50次和250次实验。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
P2065S-1	Rhotekin-RBD Agarose	1ml
P2065S-2	Recombinant Human RhoA (10ng/μl)	10μl
P2065S-3	RhoA Rabbit Monoclonal Antibody (1000X)	20μl
P2065S-4	GppNHp (100X)	20μl
P2065S-5	GDP (100X)	20μl
P2065S-6	Cell Lysis Buffer	50ml
P2065S-7	Wash Buffer	50ml
P2065S-8	100mM EDTA (pH8.0)	200μl
P2065S-9	60mM MgCl ₂	200μl
P2065S-10	Protease Inhibitor Cocktail (100X)	100μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P2065M-1	Rhotekin-RBD Agarose	5ml
P2065M-2	Recombinant Human RhoA (10ng/μl)	50μl
P2065M-3	RhoA Rabbit Monoclonal Antibody (1000X)	100μl
P2065M-4	GppNHp (100X)	100μl
P2065M-5	GDP (100X)	100μl

P2065M-6	Cell Lysis Buffer	250ml
P2065M-7	Wash Buffer	250ml
P2065M-8	100mM EDTA (pH8.0)	1ml
P2065M-9	60mM MgCl ₂	1ml
P2065M-10	Protease Inhibitor Cocktail (100X)	500μl
—	说明书	1份

保存条件：

-80°C保存，一年有效。除Rhotekin-RBD Agarose外，-20°C保存，一年有效。Rhotekin-RBD Agarose，-20°C保存3个月内有效，4°C保存一个月内有有效。Cell Lysis Buffer、Wash Buffer、100mM EDTA (pH8.0)、60mM MgCl₂，4°C保存3个月内有效。

注意事项：

- Rhotekin-RBD Agarose到货后推荐-80°C冻存，冻融两次有效，避免反复冻融，第一次使用可适当分装。其余试剂可以-20°C冻存。
- 本试剂盒的使用次数按照单次使用20μl或50μl Rhotekin-RBD Agarose来设置。当使用不同量Rhotekin-RBD Agarose时，其它试剂用量也需要相应按比例进行调整。
- 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. 试剂盒的准备。

- a. **含抑制剂裂解液的配制。**按照每50-100万细胞使用100-200μl含抑制剂裂解液，配制适量的含抑制剂裂解液。将Cell Lysis Buffer与Protease Inhibitor Cocktail (100X)按照100:1的比例混合，例如在1ml的Lysis Buffer中加入10μl Protease Inhibitor Cocktail (100X)，即得1ml含抑制剂裂解液(Cell Lysis Buffer with Protease Inhibitor Cocktail)。配制好的含抑制剂裂解液置冰浴或4°C。

注：含抑制剂裂解液宜现用现配，不宜配制后冻存并留作后续使用。如果有特殊需求，可以尝试碧云天的其它多种蛋白酶、磷酸酶和去乙酰化酶抑制剂混合物：<https://www.beyotime.com/support/lysis-inhibitor-cocktail.htm>。

- b. **1X TBS的配制。**由于Mg²⁺参与Rho蛋白与GTP和GDP的结合，使用含有磷酸根的缓冲液(如PBS)会生成难溶于水的磷酸镁影响后续Pull-down实验。推荐使用碧云天TBS (10X) (ST661)，免除磷酸根的干扰。用超纯水将TBS稀释至1X备用，例如取1ml TBS (10X)加入9ml超纯水，混匀后即即为1X TBS。

- c. **Rhotekin-RBD Agarose的准备。**由于Rhotekin-RBD Agarose储存在保护液中，所以需要在加入样品前适当洗涤。

(a) 轻轻重悬Rhotekin-RBD Agarose，尽量形成均匀的凝胶悬浊液，按照通常每200μl细胞或组织裂解液中加入20μl混合均匀的凝胶悬浊液，取适量Rhotekin-RBD Agarose至一洁净离心管中，按照每20μl凝胶悬浊液加入约100-180μl Cell Lysis Buffer的比例，加入Cell Lysis Buffer进行洗涤。

注：建议使用大孔径吸头(如用剪刀剪去部分吸头)吸取凝胶悬浊液，减少机械剪切力对凝胶的损伤。

(b) 轻轻重悬Rhotekin-RBD Agarose，6000×g在4°C离心30秒，小心去除上清，不要吸到凝胶。重复上述步骤三次。

(c) 按照初始的凝胶悬浊液的体积，用Cell Lysis Buffer重悬Rhotekin-RBD Agarose。

- d. **SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1X)的配制。**推荐直接使用SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(1X) (P0015A)，或将适量SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(P0015/P0015B/P0015F/P0015L)用超纯水稀释至1X后再使用。

2. 细胞或组织样品的裂解和准备。

注1：样品裂解后宜立即进行Pull-down，如果不能立即进行后续的实验，样品应尽快分装，用液氮速冻后-80°C冻存，请勿反复冻融。

注2：裂解和Pull-down实验过程中需时刻保证样品在冰浴或4°C操作，以尽量减少蛋白降解的可能性。

注3：样品准备好后，留取一定量作为Input，用于后续的Western检测。

注4：裂解后会出现少量不溶性物质，主要为基因组DNA等，离心后会产生沉淀物。

注5：如有待测的激活剂或抑制剂可提前对样品进行处理。

- a. **悬浮细胞的样品裂解和准备。**250×g室温离心5分钟收集细胞，用4°C预冷的1X TBS洗涤一次，然后吸净残留的液体。轻轻vortex或者弹击管底把细胞尽量分散开。按照每50-100万细胞的比例加入100-200μl 4°C预冷的含抑制剂裂解液。轻弹管底或适当吹打，使裂解液与细胞充分接触，以充分裂解细胞。充分裂解后应没有明显的细胞沉淀。如果细胞量较多，建议分装成50-100万细胞/管，然后再裂解。大团的细胞较难裂解充分，而少量的细胞由于裂解液易与细胞充分接触，相对比较容易裂解充分。充分裂解后，14,000×g在4°C离心5分钟，取上清，即可进行后续的Pull-down实验。

- b. **贴壁细胞样品的裂解和准备。**吸除培养液。用4°C预冷的1X TBS洗涤一次，然后吸净残留的液体。按照每50-100万细胞(相当于6孔板的一个孔)加入100-200μl 4°C预冷的含抑制剂裂解液，适当吹打，使裂解液与细胞充分接触。通常裂解液接触动物细胞1-2秒后，细胞就会被裂解。充分裂解后，14,000×g在4°C离心5分钟，取上清，即可进行后续的Pull-down实验。注：1X TBS的残留可能会影响后续实验，因此建议在吸净1X TBS后，将细胞培养皿在冰上以一定角度倾斜静置1分钟后，以彻底吸净残留的液体。

- c. **组织样品的裂解和准备。**

- (a) 把组织剪切成细小的碎片。如果组织样品本身非常细小，也可以不再进行剪切。
- (b) 按照每10-20mg组织加入100-200μl 4°C预冷的含抑制剂裂解液。**注：**如果裂解不充分可以使用更多4°C预冷的含抑制剂裂解液，如果需要高浓度的蛋白样品，可以适当减少裂解液的用量。
- (c) 用玻璃匀浆器匀浆，或使用碧云天生产的TissueMaster™手持式组织研磨仪(E6600)或TissueMaster™高通量组织研磨仪(1.5/2ml×48)(E6618)研磨，直至充分裂解。也可以把组织样品冷冻后液氮研磨，研磨充分后加入4°C预冷的含抑制剂裂解液进行裂解。
- (d) 充分裂解后，14,000×g在4°C离心5分钟，取上清，即可进行后续的Pull-down实验。每20mg冻存的小鼠肝脏组织用200μl含抑制剂裂解液裂解后获得的上清，其蛋白浓度约为15-25mg/ml，不同状态的不同组织有所不同。

3. 对照组的设置。

本实验一般设置Control组、Input组、GppNHp处理组(阳性对照组)、GDP处理组(阴性对照组)，如有待测的激活剂或抑制剂可设为样品处理组。

a. Recombinant Human RhoA组 (Control组)。

本试剂盒提供Recombinant Human RhoA (10ng/μl)作为Western检测的阳性对照，也可以作为衡量内源性Rho蛋白表达量的参照。通常约10ng Recombinant Human RhoA足够在Western检测中能得到较好信号。**注：**Rho蛋白(包括RhoA、RhoB和RhoC)理论分子量为20-25kDa，Recombinant Human RhoA因带有Flag标签比内源性RhoA蛋白分子量偏大(约30kDa)。

b. 细胞或组织裂解液GppNHp/GDP处理组(阳性/阴性对照组)。

为准确检测细胞或组织裂解液中激活状态的Rho蛋白，保证Pull-down实验的正确操作，建议每次实验额外准备2组样品，分别加入GppNHp或GDP使裂解液中全部Rho蛋白分别处于激活状态(阳性对照)或静息状态(阴性对照)。

- (a) 向200μl的细胞或组织裂解液样品中加入20μl 100mM EDTA (pH8.0)，螯合细胞或组织裂解液样品中的Mg²⁺，使裂解液中的Rho蛋白释放其本身结合的GTP或GDP，轻轻吹打混匀。
- (b) 根据阳性对照和阴性对照的设置，加入2μl GppNHp (100X)或GDP (100X)，轻轻吹打混匀，置于侧摆摇床或旋转混合仪上，室温孵育15-30分钟。
注：小包装和中包装中的GppNHp (100X)和GDP (100X)分别提供10次和50次。
- (c) 加入20μl 60mM MgCl₂将GppNHp或GDP锁定在Rho蛋白上。
- (d) 后续操作同实验组，即步骤4。

4. Pull-down激活状态Rho蛋白。

- a. 向200μl的细胞或组织裂解液样品中加入20μl经Cell Lysis Buffer洗涤过的Rhotekin-RBD Agarose，置于侧摆摇床或旋转混合仪上，4°C孵育1-2小时。
注：Rhotekin-RBD Agarose的投入量可适当进行调整，例如投入量为20-50μl。相同的样品，不同投入量的Rhotekin-RBD Agarose可能导致不同的结果。如果Rhotekin-RBD Agarose投入量过低，可能无法有效并充分地Pull-down激活状态的Rho蛋白；如果Rhotekin-RBD Agarose投入量过高，可能导致Rhotekin-RBD Agarose非特异性结合静息状态的Rho蛋白，导致假阳性的出现；通常20-50μl Rhotekin-RBD Agarose能得到较好的效果，但是仍需要根据实际情况调整Rhotekin-RBD Agarose的用量。但为了方便起见，更建议固定Rhotekin-RBD Agarose的用量不变，而适当调整样品裂解液的用量或浓度。裂解液中激活状态Rho蛋白过多时，可能会使Rhotekin-RBD Agarose饱和，从而超出检测范围。如果样品的信号低于添加了GppNHp的阳性对照的信号，说明Rhotekin-RBD Agarose并未饱和，检测结果仍然在可信范围内。
- b. 6000×g在4°C离心30秒，小心去除上清，注意不要吸到凝胶。
- c. 加入250μl 4°C预冷的Wash Buffer，上下颠倒重悬凝胶，6000×g在4°C离心30秒，小心去除上清，注意不要吸到凝胶。重复本步骤三次。
- d. 加入50μl SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1X)，95°C加热5分钟。样品可直接上样SDS-PAGE胶进行电泳，如果不能立即进行后续的实验，可以-20°C冻存。

5. Western检测。

- a. 蛋白样品平衡到室温后，取10-30μl Pull-down后的各组样品(Control组、Input组、阳性对照组、阴性对照组、样品处理组)上样至SDS-PAGE凝胶(P0468)进行电泳，随后进行转膜。
注1：推荐选用PVDF膜(FFP24/FFP26/FFP28/FFP32/FFP33/FFP36/FFP39)，其中最优先推荐使用PVDF膜(进口分装，6.6×8.5cm，0.2μm)(FFP24/FFP26)。PVDF膜在使用前须经浸润和活化，推荐使用碧云天生产的安全无毒的PVDF膜浸润活化液(P0021S)。也可以使用硝酸纤维素膜(NC膜)(FFN02/FFN03/FFN05/FFN060/FFN61/FFN063/FFN08)，但硝酸纤维素膜比较脆，在操作过程中特别是用镊子夹取等过程中容易裂开。转膜完毕后，立即把蛋白膜放置到预先加入Western洗涤液(P0023C/P0023C3/P0023C6)的Western洗膜盒(FFX050/FFX052/FFX055)中，漂洗1-2分钟，以洗去膜上的转膜液。
注2：转膜完毕后所有的步骤，一定要注意膜的保湿，避免膜的干燥，否则极易产生较高的背景。
- b. 用微型台式真空泵(E0110/E0111/E0112/E0113/E0114/E0115)或滴管等吸尽洗涤液，优先推荐加入适量的QuickBlock™ Western封闭液(P0252)，在摇床上缓慢摇动，室温封闭10分钟；也可以加入Western封闭液(P0023B)，在摇床上缓慢摇动，室温封闭60分钟。
- c. 吸尽封闭液，立即加入按照1:1000比例用QuickBlock™ Western一抗稀释液(P0256)或Western一抗稀释液(P0023A)稀释的RhoA Rabbit Monoclonal Antibody，4°C在侧摆摇床上缓慢摇动孵育过夜。
- d. 回收一抗。加入Western洗涤液，在侧摆摇床上缓慢摇动洗涤5-10分钟，重复洗涤3次。
注：如果结果背景较高可以适当延长洗涤时间并增加洗涤次数。

- e. 按照适当比例用QuickBlock™ Western二抗稀释液(P0258)或Western二抗稀释液(P0023D)稀释辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗, 推荐使用辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L) (A0208)。室温或4°C在侧摆摇床上缓慢摇动孵育一小时。
- f. 回收二抗。加入Western洗涤液, 在侧摆摇床上缓慢摇动洗涤5-10分钟, 重复洗涤3次。
注: 如果结果背景较高可以适当延长洗涤时间并增加洗涤次数。
- g. 使用BeyoECL Star (P0018A)或BeyoECL Moon (P0018F)等ECL类试剂来检测蛋白。
注: Rho蛋白(包括RhoA、RhoB和RhoC)理论分子量为20-25kDa。

参考文献:

1. Sheng M, Sala C. Annu Rev Neurosci. 2001. 24:1-29.
2. Vernoud V, Horton AC, Yang Z, Nielsen E. Plant Physiol. 2003. 131(3):1191-208.
3. Ito H, Morishita R, Nagata KI. Int J Mol Sci. 2018. 19(7):2121.
4. Goitre L, Trapani E, Trabalzini L, Retta SF. Methods Mol Biol. 2014. 1120:1-18.
5. Hall A. Biochem Soc Trans. 2012. 40(6):1378-82.
6. Mann D, Güldenhaupt J, Schartner J, Gerwert K, Kötting C. J Biol Chem. 2018. 293(11):3871-9.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
A0208	辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)	1ml
AF2179	RhoA Rabbit Monoclonal Antibody	50µl
P0015B	SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(2X)	5ml
P0023A-100ml	Western一抗稀释液	100ml
P0023A-500ml	Western一抗稀释液	500ml
P0023	Western溶液套装	共400ml
P0025B	Western一抗二抗去除液(弱碱性)	250ml
P0025S	Western一抗二抗去除液(酸性)	250ml
P0025N	Western一抗二抗去除液(中性)	250ml
P0025-250ml	Western一抗二抗去除液(强碱性)	250ml
P0025-1L	Western一抗二抗去除液(强碱性)	1L
P0239	QuickBlock™ Western溶液套装	共400ml
P0256-100ml	QuickBlock™ Western一抗稀释液	100ml
P0256-500ml	QuickBlock™ Western一抗稀释液	500ml
P2061-1ml	Rhotekin-RBD Agarose (活性Rho结合琼脂糖凝胶)	1ml
P0262	QuickBlock™免疫染色一抗稀释液	100ml
P2063-10µg	Recombinant Human RhoA (Flag-Tag)	10µg
P2063-100µg	Recombinant Human RhoA (Flag-Tag)	100µg
P2063-1mg	Recombinant Human RhoA (Flag-Tag)	1mg
P2065S	Active Rho Pull-down and Detection Kit	50次
P2065M	Active Rho Pull-down and Detection Kit	250次
P0272-100ml	SignalUp™ Western检测增敏剂	100ml
P0272-500ml	SignalUp™ Western检测增敏剂	500ml
P0273-100ml	SignalUp™ Western一抗稀释液	100ml
P0273-500ml	SignalUp™ Western一抗稀释液	500ml
P0277-100ml	SignalUp™免疫染色一抗稀释液	100ml
P0277-500ml	SignalUp™免疫染色一抗稀释液	500ml
L19945	RHOA基因敲除质粒	5µg
L19946	RHOA基因敲除慢病毒	10KU
L19947	RHOA基因敲除HEK293T细胞	1支/瓶
L19948	RHOA基因敲除HEK293T细胞RIPA裂解液	100µg
L19949	RHOA基因敲除HEK293T细胞Trizol裂解液	500µl

Version 2023.08.16