



—A helping hand for your research

---

产品手册

# RhoA 活性检测试剂盒

商品编号：80601

# 目录

|                           |   |
|---------------------------|---|
| 产品说明.....                 | 3 |
| 检测原理.....                 | 3 |
| 试剂盒成分.....                | 3 |
| 储存条件.....                 | 4 |
| 试剂（试剂盒内不提供，由实验者自行配置）..... | 4 |
| 试剂制备.....                 | 5 |
| 样品处理.....                 | 5 |
| 检测步骤.....                 | 6 |
| 示例结果.....                 | 8 |

此试剂盒仅限科研使用，不可从事于诊断程序。

## 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。

而武汉纽斯特生物技术有限公司推出的 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。同时试剂盒中的 RhoA-GTP 单克隆抗体也可以进行免疫组化实验中细胞和组织中 RhoA 的活性监测。

每套试剂盒可以进行 20 次检测。

## 检测原理

武汉纽斯特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构象的 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 $\gamma$ 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，再利用特异性识别 RhoA 活化构象的兔多克隆抗体进行免疫印迹分析进行检测。

## 试剂盒成分

1. 特异性识别 RhoA 活性构象的鼠单克隆抗体（Anti-active RhoA, Mouse Monoclonal Antibody (Catalog No. 26904)）：小管装--30ul (抗体浓度是 1mg/ml)，抗体溶于 PBS (pH 7.4) 并包含 50%的甘油和 0.05%的叠氮化钠。此抗体可以特异性识别所有脊椎动物中的

RhoA-GTP。

2. Protein A/G agarose (Catalog No. 30301) : 小管装—400ul 包含 200ul Protein A/G agarose 和 200ul 20% 乙醇溶液。(使用时溶液需要充分混匀, 再吸取)
3. 5X Assay/Lysis Buffer (Catalog No. 30303): 小瓶装—30mL 包含 250 mM Tris-HCl (pH 8.0), 750 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EDTA, 5% Triton X-100。
4. 特异性识别 RhoA 活性构象的兔多克隆抗体 (Anti-RhoA, Rabbit Polyclonal Antibody (Catalog No.21009)): 小管装--30ul (抗体浓度是 1mg/ml), 抗体溶于 PBS (pH 7.4) 并包含有 50%的甘油。
5. 100 X GTP $\gamma$ S (Catalog No. 30302) : 小管装—100ul (10 mM) , 实验中 0.5mL 细胞裂解液使用 5ul GTP $\gamma$ S 标记。
6. 100 X GDP (Catalog No. 30304) : 小管装—100ul (100 mM) , 实验中 0.5mL 细胞裂解液使用 5ul GDP 标记。

## 储存条件

试剂盒的成分在试剂盒的有效期限内必须存放于 4°C 条件下保存。

## 试剂 (试剂盒内不提供, 由实验者自行配置)

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 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. PVDF 或硝酸纤维素膜;

11. 二抗;
12. ECL 检测试剂;

## 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/mL aprotinin (抑肽酶)。

## 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,  $\sim 10^7$  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。

#### 体外用 GTP $\gamma$ S/GDP 处理蛋白以用作阳性和阴性的对照

**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 $\gamma$ 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 $\mu$ g)。
2. 每个管中加入 20 $\mu$ l 0.5M EDTA (终浓度即为 20 mM)。
3. 一个管中加入 5 $\mu$ l 的 100X GTP $\gamma$ S (终浓度即为 100  $\mu$ M) 作为阳性对照。另一个管中加入 5 $\mu$ 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°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 $\mu$ l 1M MgCl<sub>2</sub> (终浓度即为 60mM)。

## 检测步骤

### I. 活性 RhoA Pull-Down 实验

1. 等分 0.5-1 mL 的细胞裂解物至微量离心管中。
2. 向管中加入 1mL 的 1X Assay/Lysis 缓冲液。
3. 向管中加入 1 $\mu$ l 的活性 RhoA 单克隆抗体。
4. 用涡旋振荡仪将 protein A/G 凝胶柱充分混匀, 然后快速的吸出 20 $\mu$ l 悬浮珠浆液加入离心管中。
5. 将管置于 4°C 条件下孵育 1H, 并轻轻的进行摇动。
6. 5000g, 离心 1 分钟。

7. 弃上清，这一步要非常小心以避免珠子的损失。
8. 用 0.5 mL 的 1X Assay/Lysis 缓冲液洗涤珠子三次，离心并弃去上清。
9. 最后一次洗涤后，小心的移去所有的上清。
10. 用 20ul 的 2X SDS-PAGE 样品缓冲液重悬样品。
11. 样品煮沸 5min。
12. 5000g，离心 10s。

## II. 电泳和转膜

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。

## III. 免疫印迹反应和检测（所有步骤都是在室温下进行，并不断搅拌）

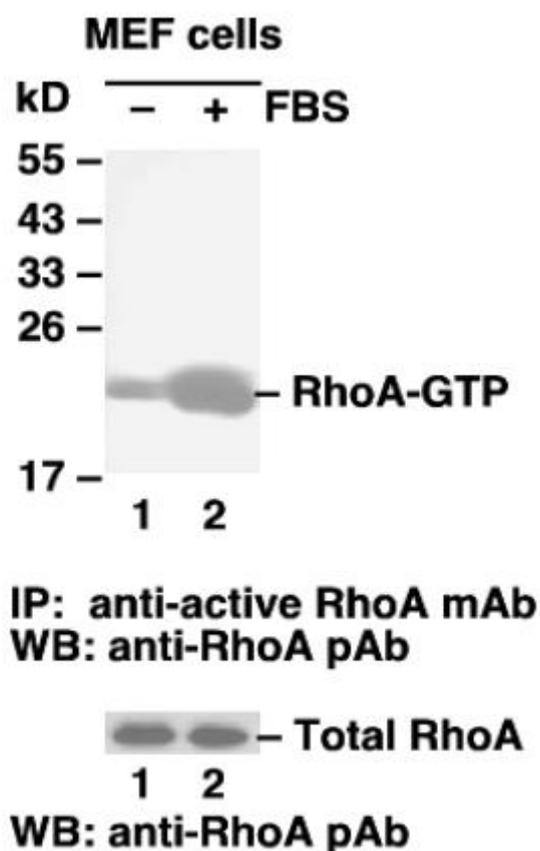
1. 将 PVDF 膜浸入 100%甲醇 15s，然后在室温放置 5 min 晾干。

注意：如果使用的是硝化纤维素膜，此步省略。

2. 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 1H 进行封闭，并需要恒定振荡。
3. 孵育一抗：用 TBST 缓冲液配制的 5%脱脂牛奶或 3%BSA 稀释特异性识别 RhoA 活性构象的兔多克隆抗体（稀释比例为 1:50-1:1000，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。
4. 用 TBST 缓冲液洗涤膜三次/5min。
5. 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。
6. 用 TBST 缓冲液洗涤膜三次/5min。
7. 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

下图展示的是武汉纽斯特生物技术有限公司的 RhoA 活性试剂盒的典型结果。下面的数据仅供参考。



Rho 活性分析。小鼠胚胎成纤维细胞（MEF）用血小板衍生因子（PDGF）处理（Lane 2）和未处理（Lane 1）。细胞裂解物用特异性识别 RhoA 活性构象的鼠单克隆抗体(Cat. # 26904) 孵育(上图)。活性 RhoA 珠子颗粒用特异性识别 RhoA 活性构象的兔多克隆抗体(Cat # 21009) 进行免疫印迹实验。底部的图展示的是细胞裂解液的活性 RhoA 的 Western blot 实验结果。