

Rheb Pulldown 活化检测试剂盒

英文名称： Rheb Pulldown Activation Assay kit

规格： 30 Assays

货号： NL27007

用途

体内 Rheb激活水平的分析。

检测增强 Rheb活性的化合物和蛋白质。

检测抑制 Rheb活性的化合物和蛋白质。

对细胞（组织）中的 Rheb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。使用前请详细阅读说明书，如有疑问请咨询 电话：18674031376 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GTPases是细胞信号调节因子的一个超级 家族。Rheb是ras超家族GTPases的成员 。Rheb已被证明与C-Raf、哺乳动物雷帕霉素靶点(mTOR)、TSC2、毛细血管扩张共济失调突变(ATM)、KIAA1303和毛细血管扩张共济失调和Rad3相关相互作用。目前尚无直接测定Rheb GTPases活性的方法。

武汉纽莱生物技术有限公司推出的Rheb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Rheb- GTP结合蛋白，而不识别Rheb- GDP结合蛋白，进而简单并且快速的进行Rheb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 Rheb - GTP 单克隆抗体也可以通过免疫组化和免疫荧光对细胞和组织中 Rheb 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 Rheb 活性检测试剂盒主要是利用识别蛋白特异构象的 Rheb - 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 GTPγS 活化处理）活性 Rheb-GTP的水平。简言之，特异性识别 Rheb 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 Rheb-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 Rheb 的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 Rheb mouse Monoclonal antibody	Cat.#NL23007	1x35ul	-20℃
Protein A/G Agarose	Cat.# NL30301	1x600ul	4℃
5xAssay/ lysis Buffer	Cat.# NL30303	1x30ml	4℃
Anti- RhebRabbit polyclonal antibody	Cat.#NL24007	1x50ul	-20℃
100xGTP-rS	Cat.# NL30302	1x50ul	-80℃
100XGDP	Cat.# NL30304	1x50ul	-80℃
HRP-Goat anti-Rabbit IgG	Cat.# NL29002	1x50ul	-20℃

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。

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℃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Protein A/G Agarose 前先用枪将其吹匀，一个反应管使用20 ul的Protein A/G Agarose足够。
4. 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Protein A/G Agarose有20 ul。
5. 为了减少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. 孵育反应在4℃ 360度摇床进行。
7. 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GTPYS/GDP处理蛋白以用作阳性和阴性的对照可选：

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Rheb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 GTPyS（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 1 M MgCl₂(终浓度即为 60mM)。

D. 激活Rheb的亲合沉淀

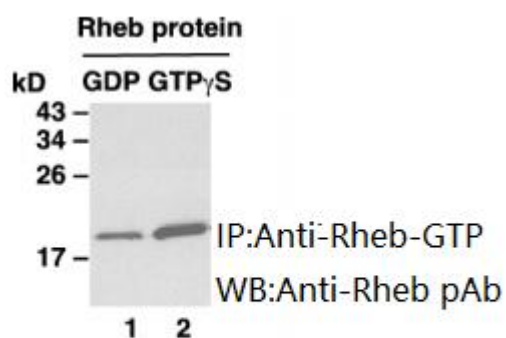
1. 加入 0.5-1 mL(总蛋白的含量大约为 1mg)的细胞裂解物至微量离心管中。
2. 向管中加入 1ul 的活性 Rheb 单克隆抗体。(Cat.#NL23007) 4°C 360摇床孵育过夜
4. 用涡旋振荡仪将 protein A/G 凝胶柱充分混匀，
- 5 .然后快速的吸出 20ul 悬浮珠浆液加入离心管中。
6. 将管置于 4°C 条件下孵育2-3小时，并轻轻的进行摇动。
7. 5000g，离心 1 分钟。
8. 弃上清，这一步要非常小心以避免珠子的损失。
9. 用 0.5 mL 的 1X Assay/Lysis 缓冲液洗涤珠子三次，离心并弃去上清。
10. 最后一次洗涤后，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

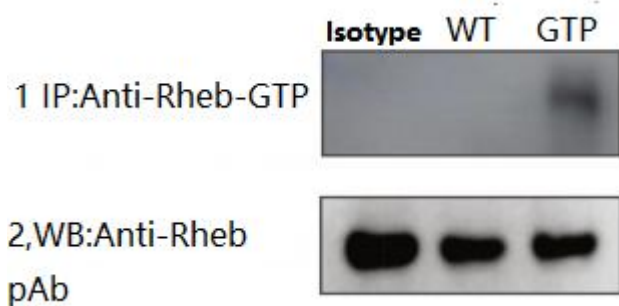
1. 取 20 ul 样品/孔上样 17%配体胶。
2. 按照制造商的说明进行 SDS-PAGE。
3. 按照制造商的说明将凝胶蛋白转到 PVDF 或硝化纤维素膜。
4. 将 PVDF 膜浸入100%甲醇15s , 然后在室温放置 5 min 晾干。 注意：如果使用的是硝化纤维素膜，此步省略。
5. 封闭； 用TBST 缓冲液配制5%的脱脂牛奶或者 3%BSA 在室温下孵育 1小时进行封闭，并需要恒定振荡。
- 6 用 TBST 缓冲液洗涤膜三次/5min。
7. 孵育一抗：用 TBST 缓冲液配制的 5%脱脂牛奶或 3%BSA 稀释Anti-Rheb pAb(Cat.# NL24007),稀释比例为 1:500-1:1000，主要根据样品中含有的Rheb蛋白的量) 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 Rheb 活性试剂盒的典型结果。下面的数据仅供参考



纯化的 Rheb 蛋白用GDP处理 (lane 1) 或 GTP γ S (lane 2) 与 ProteinA/G 和 Anti-Rheb-GTP Monoclonal Antibody (1ul,1mg/ml Cat # NL23007) 进行孵育, 用 Anti-Rheb rabbit polyclonal antibody (稀释比例, 1:1000, Cat # NL24007) 进行蛋白印迹分析.



图一：细胞裂解物 (500ul,1mg/ml) 分别用GTP 处理) 与 ProteinA/G 和 Anti-Rheb-GTP Monoclonal Antibody (1ul,1mg/ml Cat # NL23007) 进行孵育, 用 Anti- Rheb rabbit polyclonal antibody (稀释比例, 1:1000, Cat # NL24007) 进行蛋白印迹分析.

图二：细胞裂解物 (20ul,1mg/ml) 用 Anti- Rheb rabbit polyclonal antibody (稀释比例, 1:1000, Cat # NL24007) 进行蛋白印迹分