

# 活化 Rac1 pull-down及检测试剂盒

## Activated Rac1 Pull-down and Dection Kit

注:本产品干冰运输;试剂按说明书分别保存于4°C及-20°C,保质期12个月。

序号	试剂	货号及规格	储存
		IPP035 (6T)	
01	GST-human Pak1-RBD	1.2mL	-80°C
02	Anti-Rac1 Antibody	10μL	-20°C
03	Glutathione Resin	0.6 mL	4°C
04	GDP (100X)	10μL	-80°C / -20°C
05	GTPγS (100X)	10μL	-80°C / -20°C
06	2X SDS Sample Buffer	0.3 mL	4°C
07	1X Lysis/Binding/Wash Buffer	20 mL	4°C
08	Spin Cups	6 个	室温
09	Collection Tubes	18 个	室温

注意: 谷胱甘肽琼脂糖树脂为 50% 混悬液, 使用前需充分涡旋混匀, 避免琼脂糖树脂沉降。

## 产品简介/Product Description

本试剂盒是检测 Rac1 小 GTP 酶活化水平的专用工具，基于 GST-human Pak1-PBD 与活化型 Rac1-GTP 的特异性结合原理实现目标蛋白的 pull-down 富集，搭配 Rac1 抗体完成 Western blot 检测，同时提供 GTP  $\gamma$ S（阳性对照）和 GDP（阴性对照）核苷酸，可体外制备活化 / 失活 Rac1 对照样品，实验操作简便、结果特异性高且重复性好。

Rac1 小 GTP 酶（约 22kDa）是细胞信号转导中的关键分子开关，与 GTP 结合时为活化状态（Rac1-GTP），核心调控肌动蛋白丝网络组装和膜皱褶形成，同时参与细胞转化、凋亡及迁移过程；与 GDP 结合时为失活状态（Rac1-GDP），无生物学活性。本试剂盒中的 GST-human Pak1-PBD（人源 p21 活化蛋白激酶 1 的 p21 结合域）可特异性识别并结合人、小鼠、犬、大鼠、鸡等物种的活化型 Rac1-GTP，通过谷胱甘肽琼脂糖树脂的亲亲和吸附作用将其从细胞裂解液中分离，再经 Western blot 定量检测，实现 Rac1 活化水平的精准分析。

## 技术路线/Technology mapping

- ①细胞裂解：用含蛋白酶抑制剂的 Lysis/Binding/Wash Buffer 处理贴壁 / 悬浮细胞，提取全细胞裂解液；
- ②体外核苷酸处理（可选）：用 GTP $\gamma$ S/GDP 分别处理裂解液，制备活化 / 失活 Rac1 阳性 / 阴性对照；
- ③琼脂糖树脂平衡：谷胱甘肽琼脂糖树脂经缓冲液洗涤平衡，去除保存液杂质；
- ④亲和富集活化 Rac1：将 GST-human Pak1-RBD、细胞裂解液与平衡后的琼脂糖树脂共孵育，形成“琼脂糖树脂 - 谷胱甘肽 - GST-human Pak1-RBD-Rac1-GTP”复合物，洗涤去除非特异性结合蛋白；
- ⑤复合物洗脱：用 SDS Sample Buffer 洗脱琼脂糖树脂结合的蛋白复合物；
- ⑥Western blot 检测：经 SDS-PAGE 电泳、转膜后，用 Rac1 一抗和 HRP 标记二抗进行免疫检测，通过化学发光法显影，分析 Rac1 活化水平。

## 使用流程/Procedure

### 1. 试剂预处理

- ①Lysis/Binding/Wash Buffer：使用前加入蛋白酶抑制剂，现配现用；
- ②2 $\times$  SDS Sample Buffer：按 1:20 体积比加入  $\beta$ - 巯基乙醇（或加 DTT 至终浓度 200mM），现配现用；
- ③GST-human Pak1-RBD：冰上解冻，立即分装为单次用量，分装后放回 - 80 $^{\circ}$ C 保存，避免反复冻融；
- ④GTP $\gamma$ S/GDP：首次使用时分装，避免反复冻融，使用前冰上解冻。

### 2. 细胞裂解

#### (1) 贴壁细胞

- ①小心吸弃细胞培养液，用预冷的 TBS 轻轻洗涤细胞 1 次；
- ②按 75cm<sup>2</sup> 培养瓶加 0.5-1.0mL Lysis/Binding/Wash Buffer、100mm 培养皿（80-90% 融合度）加 0.3-0.5mL Lysis/Binding/Wash Buffer 的比例加入预处理后的缓冲液；
- ③用细胞刮刮取细胞，转移至 1.5mL EP 管，短暂涡旋后冰浴孵育 5min；
- ④4 $^{\circ}$ C、16000 g 离心 15min，将上清（全细胞裂解液）转移至新管，冰上保存。

#### (2) 悬浮细胞

- ①取 75cm<sup>2</sup> 培养瓶的悬浮细胞（约 1-2 $\times$ 10<sup>7</sup> 个），100g 离心 5min 收集细胞，用 10mL 预冷 TBS 重悬；
- ②100 g 离心 5min，小心吸弃 TBS；
- ③向细胞沉淀中加入 0.5-1.0mL 预处理后的 Lysis/Binding/Wash Buffer，充分重悬；
- ④转移至 1.5mL EP 管，冰浴孵育 5min；
- ⑤4 $^{\circ}$ C、16000 g 离心 15min，将上清（全细胞裂解液）转移至新管，冰上保存。

### 3. 体外 GTPγS/GDP 处理 (可选, 制备对照样品)

- ①本步骤用于验证实验体系有效性, 每份处理使用 500μg 细胞裂解液, 操作如下:
- ②取 500μL 裂解液, 加入 10μL 0.5M EDTA (pH8.0), 终浓度 10mM, 涡旋混匀;
- ③加入 5μL 100×GTPγS (终浓度 0.1mM, 阳性对照) 或 5μL 100×GDP (终浓度 1mM, 阴性对照), 涡旋混匀;
- ④30°C 恒温孵育 15min, 全程持续振荡;
- ⑤立即将样品置于冰上, 加入 32μL 1M MgCl<sub>2</sub> (终浓度 60mM), 涡旋混匀终止反应, 冰上备用。

### 4. 活化 Ras 的亲亲和富集 (琼脂糖树脂法)

- ①取少量细胞裂解液, 用 BCA 或 660nm 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 剩余裂解液冰上保存;
- ②为每个样品准备 1 个离心管, 置于收集管中;
- ③充分涡旋混匀谷胱甘肽琼脂糖树脂, 向每个离心管中加入 100μL 50% 琼脂糖树脂混悬液, 6000g 离心 10-30s, 弃上清;
- ④加入 400μL 1× Lysis/Binding/Wash Buffer, 轻轻颠倒离心管数次, 6000g 离心 10-30s, 弃上清, 完成琼脂糖树脂平衡;
- ⑤向平衡后的琼脂糖树脂中加入 80μg GST-Raf1-RBD 融合蛋白, 轻轻混匀;
- ⑥立即加入最多 700μL 细胞裂解液 (含至少 500μg 总蛋白, 若为体外处理后的对照样品直接加入), 盖紧管盖并涡旋混匀;
- ⑦用封口膜密封收集管盖 (防止裂解液中去垢剂导致漏液), 再次涡旋混匀;
- ⑧4°C 摇床轻摇孵育 1h, 使琼脂糖树脂、融合蛋白与活化 Rac1 充分结合;
- ⑨6000g 离心 10-30s, 弃上清;
- ⑩去除封口膜, 将离心管转移至新的收集管中;
- ⑪加入 400μL 1× Lysis/Binding/Wash Buffer, 颠倒离心管 3 次, 6000g 离心 10-30s, 弃洗涤液; 重复洗涤步骤 2 次, 共洗涤 3 次;
- ⑫将离心管转移至新的收集管中, 加入 50μL 2× SDS Sample Buffer, 涡旋混匀后室温孵育 2min;
- ⑬6000 g 离心 2min, 弃含琼脂糖树脂的离心管, 收集洗脱液 (含活化 Rac1 蛋白复合物);
- ⑭将洗脱液 95-100°C 加热 5min, 可立即进行 SDS-PAGE 电泳, 或 -20°C 保存备用;
- ⑮上样: 每孔加入至少 25μL 洗脱样品 (12% 聚丙烯酰胺凝胶分离效果最佳)。

### 5. Western blot 检测

本步骤经化学发光底物 (SuperSignal West Pico) 优化, 全程振荡孵育, 操作如下:

- ①将洗脱样品与蛋白 Marker 进行 SDS-PAGE 电泳, 结束后将蛋白转移至 PVDF 膜;
- ②用含 3% BSA 的 TBS 缓冲液室温封闭膜 2h (禁止使用脱脂奶粉封闭, 会显著降低 Rac1 信号);
- ③用含 0.05% Tween-20 的 TBS (TBST) 洗涤膜 5min, 弃洗涤液;
- ④配制一抗工作液: 10mL 含 3% BSA 的 TBST 中加入 10μL Rac1 一抗 (1:1000 稀释), 充分混匀;
- ⑤将膜浸入一抗工作液中, 4°C 孵育过夜;
- ⑥用 TBST 洗涤膜 5 次, 每次 5min, 充分洗去未结合一抗;
- ⑦) 配制二抗工作液: 10mL 含 5% 脱脂奶粉的 TBST 中加入 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG, 稀释比例为 1:20000-1:100000;
- ⑧将膜浸入二抗工作液中, 室温孵育 1h;
- ⑨用 TBST 洗涤膜 5 次, 每次 5min, 充分洗去未结合二抗;
- ⑩将膜浸入化学发光底物中, 室温孵育适当时间;
- ⑪立即用成像仪检测, Rac1 目标条带分子量约 22kDa。

### 注意事项/Notes

1. 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;

2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 处理琼脂糖树脂时使用宽口吸头，防止树脂吸附在吸头内壁造成损失；
4. Rac1-GTP 易水解为 Rac1-GDP，建议使用新鲜制备的裂解液进行实验，避免长时间放置导致活化型 Rac1 降解
5. GST-human Pak1-PBD 需 -20°C 保存，冰上解冻后立即分装，未使用的分装液可 -80°C 长期保存，确保蛋白结合活性；
6. 谷胱甘肽琼脂糖树脂为 50% 混悬液，含 0.05% 叠氮化钠作为防腐剂，4°C 保存即可，避免冻融，使用前必须充分涡旋混匀；
7. 一抗工作液中加入的叠氮化钠具有毒性，操作时需格外小心，避免吸入或皮肤接触；
8. 所有缓冲液均需按要求储存，含蛋白酶抑制剂的缓冲液现配现用，避免长时间放置导致抑制剂失效；
9. 实验全程保持样品在冰上（除指定孵育温度外），减少蛋白降解和 Rac1-GTP 水解；离心操作均为 4°C 预冷离心机，避免温度升高影响蛋白活性；
10. 二抗稀释比例需严格控制，过高易导致背景偏高，过低可能无信号，建议首次实验按 1:50000-1:100000 梯度优化。

