

# 活化 Ras pull-down及检测试剂盒

## Activated Ras 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
		IPP034 (6T)	
01	GST-Raf1-RBD	1mL	-80°C
02	Anti-Ras Antibody	15μL	-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 Ras 小 GTP 酶活化水平的专用工具，基于 GST-Raf1-RBD 与活化型 Ras-GTP 的特异性结合原理实现目标蛋白的 pull-down 富集，搭配专属 Ras 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 Ras 对照样品，实验操作简便、结果特异性高且重复性好。

Ras 小 GTP 酶（约 21kDa）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（Ras-GTP），是细胞生长的核心调控因子，参与肿瘤发生、侵袭及形态发生过程（约 30% 人类肿瘤存在 Ras 激活突变）；与 GDP 结合时为失活状态（Ras-GDP），无生物学活性。本试剂盒中的 GST-Raf1-RBD（Raf1 蛋白的 Ras 结合域）可特异性识别并结合人、小鼠等哺乳动物的活化型 Ras-GTP，通过谷胱甘肽琼脂糖树脂的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 Ras 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 Ras 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 Ras：将 GST-Raf1-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-Raf1-RBD-Ras-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 Ras 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 Ras 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-Raf1-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 $^2$  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 $^2$  培养瓶的悬浮细胞（约 1-2 $\times$ 10 $^7$  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 Ras 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 Ras 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 Ras 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 50μL Ras (1:200 稀释) 一抗, 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, Ras 目标条带分子量约 24kDa。

### 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. Ras-GTP 易水解为 Ras-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 Ras 降解；
5. GST-Raf1-RBD 需 -80°C 低温保存，冰上解冻后立即分装，未使用的分装液不可再次解冻，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 Ras-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。

