

Rhotekin-RBD Agarose (活性Rho结合琼脂糖凝胶)

产品编号	产品名称	包装
P2061-1ml	Rhotekin-RBD Agarose (活性Rho结合琼脂糖凝胶)	1ml

产品简介:

- 碧云天生产的Rhotekin-RBD Agarose (活性Rho结合琼脂糖凝胶), 也称Rhotekin-RBD琼脂糖凝胶, 是一种将*E.coli*重组表达GST-tag融合人源Rhotekin的RBD结构域蛋白与谷胱甘肽琼脂糖凝胶(GST agarose)结合制备成的用于活性Rho结合(Active Rho Pull-down)的琼脂糖凝胶。本产品可用于结合、沉淀或拉下(Pull-down)激活状态(Active state)的Rho蛋白(包括RhoA、RhoB和RhoC), 即Active Rho Pull-down, 从而在体外检测Rho蛋白激活状态与静息状态(Inactive state)的比例, 还可用于组织或细胞裂解液中激活状态Rho蛋白的定量检测。
- 本产品能弥补缺少区分激活状态与静息状态Rho蛋白抗体的空白。本产品的工作原理如图1所示。

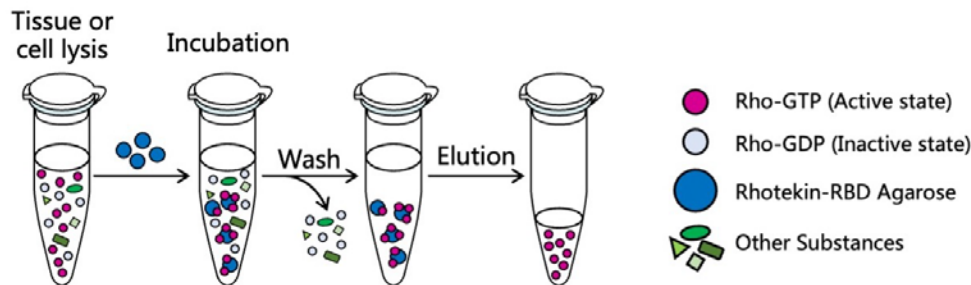


图1. 碧云天生产的Rhotekin-RBD Agarose (活性Rho结合琼脂糖凝胶) (P2061)的工作原理图。

- 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]。

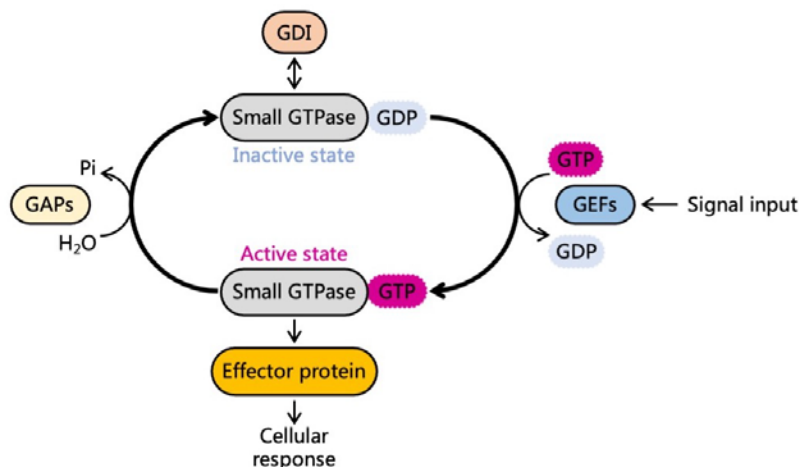


图2. 小GTP酶在“激活”和“静息”状态之间循环的原理图。

- 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*)和植物中也都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)

- 本产品Pull-down激活状态RhoA蛋白的效果图如下。实验采用GppNHp (鸟苷酰亚胺二磷酸锂)作为GTP替代物，GppNHp是一种不可水解的GTP类似物[6]。

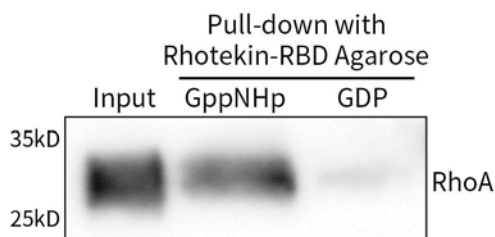


图3. 碧云天Rhotekin-RBD Agarose (活性Rho结合琼脂糖凝胶) (P2061) Pull-down激活状态RhoA蛋白的效果图。在100 μ l反应体系中，加入终浓度为1mM GppNHp或GDP、40 μ g Recombinant Human RhoA (Flag-Tag) (P2063)和25 μ l Rhotekin-RBD Agarose，置于旋转混合仪上，4 $^{\circ}$ C孵育1小时。后经离心，洗涤，加入25 μ l 1X SDS-PAGE上样缓冲液95 $^{\circ}$ C加热5分钟，BeyoGel™ Plus PAGE预制胶(Tris-Gly, 4-20%, 10孔) (P0468)电泳后进行Western检测，使用Flag Tag Mouse Monoclonal Antibody (HRP Conjugated) (AF2855)孵育。可观察到本产品可以特异性地识别并结合激活状态的RhoA蛋白(RhoA-GppNHp)，但不结合静息状态的RhoA蛋白(RhoA-GDP)。Western印迹成像使用BeyoImager™ 600化学发光成像系统完成(EI600)。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.
- **Lysis Buffer:** 50mM Tris (pH7.4), 1% Triton X-100, 0.5% Sodium Deoxycholate, 0.1% SDS, 500mM NaCl, 10mM MgCl₂, 10 μ g/ml Leupeptin, 10 μ g/ml Aprotinin, 1mM PMSF.
- **Wash Buffer:** 50mM Tris (pH7.4), 40mM NaCl, 30mM MgCl₂.
- 本产品包装体积为1ml，凝胶沉淀体积占50%，共结合约1.5mg GST-Rhotekin-RBD重组蛋白，如果按照每个Pull-down反应使用20-50 μ l Rhotekin-RBD Agarose悬浊液来计算，本产品每1ml可用于20-50次反应。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
P2061-1ml	Rhotekin-RBD Agarose	1ml
—	说明书	1份

保存条件:

-80 $^{\circ}$ C保存，一年有效。4 $^{\circ}$ C保存，一个月有效。

注意事项:

- 到货后-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ 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。
- 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:

具体操作步骤，请参考碧云天Active Rho Pull-down and Detection Kit (P2065)说明书。

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, Guldenhaupt 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
AF519	Flag抗体(小鼠单抗)	>40次
AF2179	RhoA Rabbit Monoclonal Antibody	50µl
A0208	辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)	1ml
A0216	辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(H+L)	1ml
L19945	RHOA基因敲除质粒	5µg
L19947	RHOA基因敲除HEK293T细胞	1支/瓶
L19946	RHOA基因敲除慢病毒	10KU
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
P0015B	SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(2X)	5ml
P2061-1ml	Rhotekin-RBD Agarose (活性Rho结合琼脂糖凝胶)	1ml
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	20次
P2065M	Active Rho Pull-down and Detection Kit	100次
ST038-100ml	DMSO	100ml
ST038-500ml	DMSO	500ml

Version 2022.09.25