

产品说明书

26 版

基本信息

产品编号:	T10446
产品名称:	罗丹明标记鬼笔环肽 微丝红色荧光探针

产品简介:

鬼笔环肽 (Phalloidin) 是一种来源于毒蕈类鬼笔鹅膏 (*Amanita phalloides*) 的环状七肽毒素, 以高亲和力 ($K_d = 20 \text{ nM}$) 选择性结合于丝状肌动蛋白 F-actin, 而不会与单体肌动蛋白 G-actin 结合。鬼笔环肽衍生物也以相近的亲和力结合于大小纤维, 无论是动植物来源的肌肉细胞或非肌肉细胞, 按照每一个肌动蛋白亚基约与一个鬼笔环肽分子的计量比结合, 且非特异性结合几乎可忽略, 染色区域和非染色区域辨识度非常明显, 因此, 鬼笔环肽衍生物特别适合替代肌动蛋白 (Actin) 抗体进行相关研究。另外, 鬼笔环肽 (Phalloidin) 的结合可以阻止丝状肌动蛋白 (微丝) 的解离, 稳定微丝结构, 从而破坏微丝的聚合-去聚合的动态平衡。此特性使得肌动蛋白聚合发生的临界浓度 (CC) 降至 $< 1 \mu\text{g/mL}$, 因此, 可用作一种聚合促进剂。此外, 鬼笔环肽还可抑制 F-actin 的 ATP 水解活性。

鬼笔环肽及其衍生物在纳摩尔浓度即可对 F-actin 染色, 是非常实用和方便的探针, 通常用于组织切片或细胞培养物中 F-actin 的特异性荧光染色。

另外, 鬼笔环肽及其衍生物很小, 直径约 $1.2\text{--}1.5\text{nm}$, 分子量 $< 2000 \text{ Da}$, 经标记后的 F-actin 仍维持许多标记前的功能。比如, 标记的甘油抽提肌纤维仍能收缩; 标记的肌动蛋白丝仍能在固相肌球蛋白基质中移动。

本品为 TRITC (四甲基异硫氰酸罗丹明) 标记的鬼笔环肽, 染色反应特异性强, 对比性高, 具有比 Actin 抗体更好的染色效果, 适合用作 F-actin 的定性和定量检测。另外, 经本品结合后的 F-actin 仍能维持 actin 自身具有的许多生物学特性。且本品的结合没有物种差异性, 适用性广泛。本产品以冻干粉形式提供, 最大激发/发射波长 (Ex/Em): Ex540–546nm, Em565–575nm。

自备材料:

1: 甲醇
2: $1\times$ PBS 缓冲液, pH 7.4, 细胞培养级别
3: 固定液 4%多聚甲醛 (溶于 PBS 缓冲液)
4: 丙酮或透化液 0.5% Triton X-100 (溶于 PBS 缓冲液)
5: Fluoromount-GTM 水溶性封片剂 (不含 DAPI), DAPI
6: DAPI Fluoromount-GTM 水溶性封片剂 (含 DAPI)
7: BSA, 标准级别
8: 载玻片和盖玻片
9: 盖玻片周围密封液 (如透明指甲油)
10: 组装有 TRITC 激发/发射滤片, 以及 DAPI 激发/发射滤片的荧光显微镜或共聚焦显微镜。

操作步骤 (供参考):

一: 染色液的配置
1: 母液的配置: 使用前将本品回温至室温并简短离心, 加入 $30\mu\text{L}$ DMSO 使其充分溶解, 混匀即可获得 $1000\times$ TRITC 标记鬼笔环肽母液。根据实验情况, 对其分装并于 -20°C 避光干燥保存。
2: 工作液的配置: 吸取 $1\mu\text{L}$ 以上 TRITC 标记鬼笔环肽母液至 1mL PBS (含 1%BSA) 缓冲液中即可得到 $1\times$ 工作液。



不同的细胞染色情况不同，相应 TRITC 鬼笔环肽用量也需根据不同情况而定。推荐工作浓度为：80-200 nM。工作液现配现用。

二：染色步骤

1：细胞爬片生长>24h，使其密度达到 50-60%汇合度。

2：吸掉培养液，37℃预热的 1×PBS (pH 7.4) 清洗细胞 2 次。

3：使用溶于 PBS 的 4%甲醛溶液进行细胞固定，室温固定 10-30min。避免固定剂中含有甲醇成分，因为甲醇在固定过程中可能破坏肌动蛋白。

4：室温条件下，用 PBS 清洗细胞 2-3 次，每次 10min。

5：室温条件下，用丙酮 (≤-20℃) 脱水或者用 0.5% Triton X-100 溶液透化处理 5min。

6：室温条件下，用 PBS 清洗细胞 2-3 次，每次 10min。

7：取 100 μL/孔 (96 孔板) 配制好的 TRITC 标记鬼笔环肽工作液，覆盖住盖玻片上的细胞，室温避光孵育 30min (通常情况下，4℃-37℃孵育皆可)。

注意：为了降低背景，可于 TRITC 标记的鬼笔环肽工作液内加入 1% BSA；另外，孵育过程中为了避免溶液挥发，可将盖玻片转移到一个密封的容器内。

8：用 PBS 清洗盖玻片 3 次，每次 5min。

9：使用 100 μL/孔 (96 孔板) 即用型 DAPI 溶液 (浓度：100 nM) 对细胞核进行复染，约 30s。

10：用 PBS 清洗盖玻片，然后倒置在已经滴有一滴 Fluoromount-GTM 水溶性封片剂的载玻片上。使用纸巾轻轻擦掉多余封片剂，然后用指甲油永久封片。

此法制备的标本玻片可置于 4℃避光保存，通常 6 个月内可继续做 F-actin 染色分析。

11：荧光显微镜或者共聚焦显微镜下进行荧光观察，选择 TRITC 激发/发射滤片 (Ex/Em=545/570 nm) 和 DAPI 激发/发射滤片 (Ex/Em=364/454 nm)。

注意事项：

1：荧光标记鬼笔环肽的一个单位 (T) 的定义：按照推荐工作液浓度 200 nM，每次用量为 100 μL 染色工作液时，可以检测的次数 300 次；按照工作液浓度 100 nM，每次用量为 200 μL 染色工作液时，可以检测的次数也是 300 次。

2：鬼笔环肽具有毒性，需小心操作。

3：本产品为冻干粉形式，微量不易观察 使用前瞬时离心，加溶剂溶解后使用，溶解后接近无色。

4：产品仅限于专业人员用于生命科学研究，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。

储存： -20℃, 避光干燥, 有效期 12 个月。

