

TRITC Phalloidin 标记鬼笔环肽

Actin-Tracker Red-Rhodamine (微丝红色荧光探针)

产品说明书

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 $1.2 \sim 1.5 \text{ nm}$, 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。本产品是冻干粉形式。

试剂盒组份:

Cat No	Product Name	Size	Storage
JXF40201 - 300T	TRITC Phalloidin 标记鬼笔环肽 Actin-Tracker Red-Rhodamine (微丝红色荧光探针)	300T	-20°C Protect from light 1 year
CAS#915013-10-4		MW: 1231.4	
最大激发/发射波长（Ex/Em）		Ex540～546nm； Em565～575nm	
外观（Appearance		红色粉末（冻干粉）	
溶解性（Solubility）		溶于 DMSO、DMF、甲醇或者乙腈水溶液（20%）	
多肽序列（Sequence） TRITC-bicyclic(Ala-DThr-Cys-cis-4-hydroxy-Pro-Ala-2-mercapto-Trp-4-hydroxy-5-amino-L eu)(S-3 to 6)			

操作步骤

1. 染色液的配置

- 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。
- 工作液的配置: 吸取 $1 \mu\text{L}$ 以上 **TRITC** 标记鬼笔环肽母液至 1 mL **PBS** (含 $1\% \text{ BSA}$) 缓冲液中即可得到 $1 \times$ 工作液。

【注】: 不同的细胞染色情况不同, 相应 **TRITC** 鬼笔环肽使用量也需根据不同情况而定。推荐工作浓度为: $80 \sim 200 \text{ nM}$ 。工作液现配现用。

2. 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。
注意: 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 ($\leq -20^{\circ}\text{C}$) 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°C ~ 37°C 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°C 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)

需要自备材料

- 1) 甲醇
- 2) 1×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 FITC 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。

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 200nM, 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 100nM, 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, 不得存放于普通住宅。
5. 产品必须由合格专业技术人员操作同时佩戴口罩/手套/实验服并遵守生物实验室安全操作规程!

官方网址: www.genesion.com.cn

订货热线: 4006-169-114、020-84224925

Email: whiga22@126.com

