

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合力结合于大小纤维，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

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 μL 以上 TRITC 标记鬼笔环肽母液至 1 mL PBS（含 1%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：80~200 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 $\times$ 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℃~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）

需要自备材料

- 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 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: <http://www.gcnexion.com.cn>

订货热线: 4006169114、020-842249255

Email: whiga22@126.com

