



TRITC Phalloidin 罗丹明标记鬼笔环肽说明书

货号: CA1610

规格: 300T

保存: -20°C避光干燥保存, 有效期 1 年。

产品说明:

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, 通常用来标记组织切片, 细胞培养物或无细胞体系中的 F-actin, 从而对 F-actin 进行定性和定量分析。另外, 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。

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。另外鬼笔环肽衍生物很小, 直径约 12-15Å, 分子量 < 2000 Daltons, 经标记后的 F-actin 仍维持许多标记前的功能。比如, 同肌动蛋白结合蛋白如肌球蛋白, 原肌球蛋白, DNase I 等仍能发生反应; 鬼笔环肽标记的纤维丝仍可穿透固相肌球蛋白基质; 以及甘油抽提的肌纤维标记后仍可收缩等。

鬼笔环肽 (Phalloidin) 的结合阻止丝状肌动蛋白 (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 < 1μg/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。

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。

产品性质:

CAS#	915013-10-4
分子式 (Molecular Formula)	$\text{C}_{60}\text{H}_{70}\text{N}_{12}\text{O}_{13}\text{S}_2$
分子量 (Molecular Weight)	1231.4
最大激发/发射波长 (Ex/Em)	540~546/565~575nm
多肽序列 (Sequence)	TRITC-bicyclic(Ala-DThr-Cys-cis-4-hydroxy-Pro-Ala-2-mercapto-Trp-4-hydroxy-5-amino-Leu)(S-3 to 6)
外观 (Appearance)	紫色液体

需要自备材料:

1. (可选) 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-G 水溶性封片剂（不含 DAPI），DAPI
6. （可选）DAPI Fluoromount-G 水溶性封片剂（含 DAPI）
7. （可选）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:

1. 工作液准备

本品以溶于甲醇的 20 μ M 储存液形式提供。建议收到产品后，根据单次使用量，对母液进行小量分装，-20 $^{\circ}$ C 避光冻存，一年稳定。开始实验前，使用 1 $\times$ PBS 缓冲液稀释储存液到需要的工作浓度。推荐工作浓度为：80~100nM。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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ 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 μ l/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 $^{\circ}$ C~37 $^{\circ}$ 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 μ l/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-G 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 $^{\circ}$ C 避光保存，通常 6 个月内可继续做 F-actin 染色分析。

注意：也可以直接使用含有 DAPI 的抗荧光淬灭封片剂合并步骤 9) 10)，简化步骤。

- 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=540/570nm）和 DAPI 激发/发射滤片（Ex/Em=364/454nm）。

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 μ L 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 μ L 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. 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。
4. 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！

相关文献:

- [1] Xiaojiao Sun,Dechao Zhao,Fangping Lu,et al. Hydrogen Sulfide Regulates Muscle RING Finger-1 Protein S-Sulfhydryl-oxidation at Cys44 to Prevent Cardiac Structural Damage in Diabetic Cardiomyopathy. British Journal of Pharmacology banner. February 2019. (IF 6.810)
- [2] Fan Wu,Jingqi Zheng,Zhixiong Li,et al. Halloysite nanotubes coated 3D printed PLA pattern for guiding human mesenchymal stem cells (hMSCs) orientation. Chemical Engineering Journal. March 2019. (IF 8.355)

注：更多使用本产品的文献请参考索莱宝官网。

