

鬼笔环肽标记系列产品说明书

货号	产品名称	规格	Ex/Em
AC10880	SF488 标记鬼笔环肽（绿色）	300T	490/515
AC10881	SF680R标记鬼笔环肽（远红）	300T	681/698
AC10882	SF555标记鬼笔环肽（橙红）	300T	555/565
AC10883	SF633标记鬼笔环肽（远红）	300T	630/650
AC10884	SF594 标记鬼笔环肽（橘红）	300T	593/614

保存： -20℃干燥、避光保存，有效期一年。若配制成水溶液，请小量分装保存，避免反复冻融。

注意： 本产品为冻干粉形式，使用前请瞬时离心，加适当溶剂溶解后使用。

产品介绍：

鬼笔环肽是从致命的伞形毒蕈蘑菇中分离出来的一种毒素。它是特异性结合于F-肌动蛋白的双环肽(1)。因此用荧光染料标记的鬼笔环肽可以非常方便的研究F-肌动蛋白的分布。鬼笔环肽内部，在半胱氨酸和色氨酸之间含有不常见的硫醚桥形成内环结构。在pH升高时，该硫醚被裂解，鬼笔环肽失去对肌动蛋白的亲合力。

荧光标记的鬼笔环肽可在纳摩尔水平染色F-肌动蛋白(1-3)。在各种植物细胞或动物细胞中，标记的鬼笔环肽对大、小细丝具有相似的亲和力，平均每个肌动蛋白亚基结合一个鬼笔环肽分子。不同于抗体，鬼笔环肽与肌动蛋白的结合亲和力在不同物种间没有显著变化。非特异性染色可以忽略不计，染色和未染色区域之间的对比度非常大。鬼笔环肽将单体/聚合物的平衡转向聚合状态，将聚合临界浓度降低至30倍(3,4)。Phallotoxins可通过抑制细胞松弛素的解聚，碘化钾和升高的温度，稳定F-肌动蛋白。因为鬼笔环肽缀合物很小，大约直径12-15埃，分子量<2000道尔顿，多种肌动蛋白结合蛋白，包括肌球蛋白，原肌球蛋白和后肌钙蛋白依然可以和鬼笔环肽标记的肌动蛋白结合。更重要的是，鬼笔环肽标记的肌动蛋白丝保持功能，标记甘油肌纤维仍然收缩，标记的肌动蛋白丝仍然可以继续移动(5,6)。而且荧光标记的鬼笔环肽也可用于对细胞中F-肌动蛋白进行定量研究(7,8)。

实验方法：

1. 储液制备：

荧光染料标记的鬼笔环肽：取适量甲醇或无菌水溶解棕色管中冻干的粉末，制备成200U/mL的储液（300T规格染料加入1.5mL的液体）。

荧光标记的标记鬼笔环肽的一个单位（T）的定义是染色一个加载细胞的载玻片所用染料的量。使用时的推荐稀释比例为1:40-1:200，一个单位相当于200μL总染色体积中加入1-5μL 200U /mL储备溶液。

注：稀释比例可以根据实际染色效果进行适当调整。

2. 细胞染色：

A. 固定细胞染色

以下方案是针对生长在玻璃盖玻片或8孔室玻片上的贴壁细胞的染色步骤。鬼笔环肽也可用于染色固定的冷冻或石蜡组织切片。

1. 用PBS清洗细胞3次。
2. 用含有3.75%甲醛的PBS溶液固定细胞，冰上固定15 min。
3. 注意：甲醇可以在固定过程中破坏肌动蛋白。因此最好避免含有任何甲醇的固定剂。优选的固定剂是不含甲醇的甲醛。
4. 用PBS清洗细胞3次。
5. 用含0.5% Triton X-100的PBS溶液在室温下透化细胞10 min。
6. 用PBS清洗细胞3次。
7. 用200 μ L PBS稀释1-5 μ L荧光标记的鬼笔环肽储液，加入一个盖玻片或孔中，室温孵育20 min，进行染色。
8. 注：染色体积可根据样本情况进行调节。孵育过程中为避免染液挥发，可将盖玻片放于密封容器内。
9. 用PBS清洗细胞2-3次。
10. 荧光显微镜观察。此产品具有很好的光稳定，样品可以在PBS中成像，但为了效果最佳，也可以使用抗荧光淬灭剂观察。

B. 活细胞染色

荧光标记的鬼笔环肽不具有细胞透性，因此没有被广范用于活细胞标记。然而，有报道称活细胞可能通过胞饮或未知机制进行标记（9-12）。一般来说，染色活细胞时需要更多的染料。或者荧光标记的鬼笔环肽也可被注入到细胞中用于监测肌动蛋白分布和细胞运动（13-16）。

参考文献：

1. Wieland, T. in Phallotoxins, Springer-Verlag, New York (1986)
2. J Muscle Res Cell Motil 9, 370 (1988)
3. Methods Enzymol 85, 514 (1982)
4. Eur J Biochem 165, 125 (1987)
5. Nature 326, 805 (1987)
6. Proc Natl Acad Sci USA 83, 6272 (1986)
7. Blood 69, 945 (1987)
8. Anal Biochem 200, 199 (1992)
9. J Cell Biol 105, 1473 (1987)
10. Proc Natl Acad Sci USA 77, 980 (1980)
11. Nature 284, 405 (1980)
12. CRC Crit Rev Biochem 5, 185 (1978)
13. J Cell Biol 106, 1229 (1988)
14. J Cell Biol 103, 265a (1986)
15. Eur J Cell Biol 24, 176 (1981)
16. Proc Natl Acad Sci USA 74, 5613 (1977)