

FITC标记鬼笔环肽

货号: AC10878

规格: 300T

保存: -20℃避光干燥保存, 1年有效。

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。另外鬼笔环肽衍生物很小, 直径约 12-15Å, 分子量 < 2000 Daltons, 未标记肌动蛋白 (Actin) 的许多生理特性都得以维持, 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 FITC 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:

分子式 (Molecular Formula)	C ₅₆ H ₆₀ N ₁₀ O ₁₅ S ₂
分子量 (Molecular Weight)	1177.3
最大激发/发射波长 (Ex/Em)	495~496/513~516nm
多肽序列 (Sequence)	FITC-bicyclic(Ala-DThr-Cys-cis-4-hydroxy-Pro-Ala-2-mercapto-Trp-4-hydroxy-5-amino-Leu)(S-3 to 6)
外观 (Appearance)	黄色粉末 (冻干粉)
溶解性 (Solubility)	溶于 DMSO、DMF、甲醇或者乙腈水溶液 (20%)

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-GTM 水溶性封片剂 (不含 DAPI), DAPI
6. (可选) DAPI Fluoromount-GTM 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。

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，总量为300 μ l。按照100 nM的工作液浓度来换算，可制备总量为60 ml的工作液。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：80~200nM。现配现用。

2. 染色步骤

- 1) 细胞爬片生长24h，使其密度达到50%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10min。
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200 μ l配制好的 FITC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FITC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200 μ l 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 $^{\circ}$ 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FITC激发/发射滤片（Ex/Em=496/516nm）和DAPI激发/发射滤片（Ex/Em=364/454nm）。