

TRITC Phalloidin 罗丹明标记鬼笔环肽说明书

货号:AC10877

规格:300T (300 μ L)

保存:-20 $^{\circ}$ C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 12-15 \AA ,分子量 $<2000\text{ Daltons}$,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 $<1\mu\text{g/mL}$,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。

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:

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 \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. (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 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, 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 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 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 TRITC 激发/发射滤片 (Ex/Em=540/570nm) 和 DAPI 激发/发射滤片 (Ex/Em=364/454nm)。

相关文献:

- [1] Xiaojiao Sun, Dechao Zhao, Fangping Lu, et al. Hydrogen Sulfide Regulates Muscle RING Finger-1 Protein S-Sulfhydrylation 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)