

## TRITC Phalloidin

产品编号: MB5936

包装规格: 300T

### 基本信息

分子量 (Molecular Weight)	1231.4
最大激发/发射波长 (Ex/Em)	Ex 540-546nm; Em 565-575nm
溶解性 (Solvent)	溶于 DMSO、DMF、甲醇或者乙腈水溶液 (20%)
产品外观	红色粉末 (冻干粉)
储存条件:	-20℃避光

**简介:** 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和力结合于大小纤维, 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 (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 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。

### 使用方法:

#### 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 $^{\circ}\text{C}$  避光干燥保存。

2) 工作液的配置: 吸取 1  $\mu\text{L}$  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：**80-200nM**，工作液现用现配。

## 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×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 (≤-20℃) 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 100μL/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 溶液对细胞核进行复染。
- 10) 用 PBS 清洗盖玻片，滴加封片剂。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=545/570nm) 和 DAPI 激发/发射滤片 (Ex/Em=364/454nm)。

### 需要自备材料

- 1) 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) DAPI
- 6) 封片剂
- 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 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。

#### 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 $\mu$ L 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  $\mu$ 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. 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!