

## Alexa Fluor 488 Phalloidin

产品编号: MB5967

包装规格: 300T

产品形式: 粉末

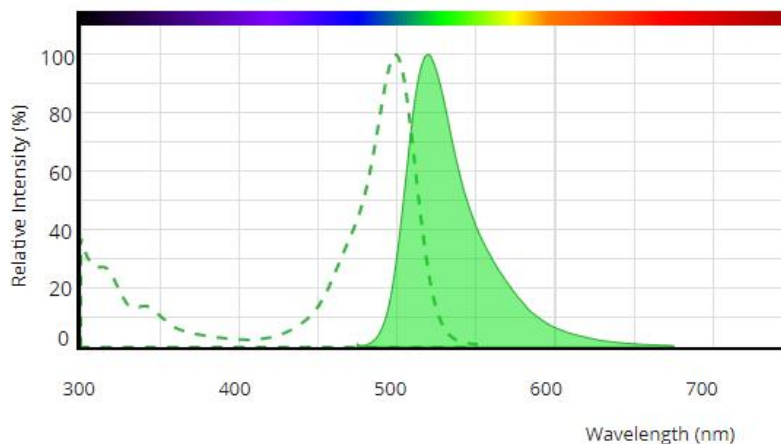
### 基本信息

分子量 (Molecular Weight)	~1900
最大激发/发射波长 (Ex/Em)	490/515nm
溶解性 (Solubility)	溶于 DMSO
储存条件	-20℃
产品形式	黄色粉末 (冻干粉)

**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, 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。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 <  $1 \mu\text{g/mL}$ , 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 SuperFluor488 标记的鬼笔环肽, 染色反应特异性强, 对比度高, 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。



### 操作步骤

## 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 $\mu$ L DMSO 使其充分溶解，混匀即可获得 1000 $\times$ SuperFluor488 标记鬼笔环肽母液。根据实验 情况，对其分装并于-20 $^{\circ}$ C 避光干燥保存。

2) 工作液的配置：吸取 1  $\mu$ L 以上 SuperFluor488 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 SuperFluor488 鬼笔环肽使用量也需根据不同情况而定。

## 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 $\mu$ L/孔（96 孔板）配制好的 SuperFluor488 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 SuperFluor488 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  $\mu$ 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-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。

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）。

## 需要自备材料

1) 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) DAPI Fluoromount-GTM 水溶性封片剂（含 DAPI）

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 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。

**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  $\mu$ 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  $\mu$ 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!