

TRITC Phalloidin 罗丹明标记鬼笔环肽

产品信息

产品名称	产品编号	规格
TRITC Phalloidin 罗丹明标记鬼笔环肽	40734ES75	300 T
	40734ES80	1 mg

背景描述

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 < 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。

我司分别提供冻干粉形式 (货号: 40734ES80) 和储存液形式 (货号: 40734ES75, 浓度为 20 μM) 的 TRITC 标记鬼笔环肽, 用户根据自身需求选择。建议使用浓度为 80~200 nM。

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)	540~546/565~575 nm
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)	紫色粉末 (冻干粉)
溶解性 (Solubility)	溶于 DMSO、DMF、甲醇或者乙腈水溶液 (20%)

运输与保存方法

冰袋运输。-20°C 避光干燥保存, 1 年有效。

注意事项

- 鬼笔环肽具有毒性, 需小心操作 (对人的半数致死剂量 LD50 约 2 mg/kg)。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 本产品仅作科研用途!

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 (货号: 41403ES76)
- 3) 固定液 4%多聚甲醛 (溶于 PBS 缓冲液) (货号: 60536ES60)
- 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) (货号: 36307ES08), DAPI (货号: 40727ES10)
- 6) (可选) DAPI Fluoromount-GTM 水溶性封片剂 (含 DAPI) (货号: 36308ES11)
- 7) (可选) BSA, 标准级别 (货号: 36101ES25)
- 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

1) 对于 TRITC 标记鬼笔环肽 (货号: 40734ES75, 300 T)

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°C 避光冻存, 一年稳定。

开始实验前, 使用 1×PBS 缓冲液稀释储存液到需要的工作浓度。推荐工作浓度为: 80~200 nM。工作液现配现用。

2) 对于 TRITC 标记鬼笔环肽 (货号: 40734ES80, 1 mg)

本品以冻干粉形式提供, 分子量为 1231.4, 总量为 1 mg。可先用甲醇或者 DMSO 充分溶解配制成 20~100 μ M 的储存液。如, 加入 8.1208 mL 甲醇到 1 mg 鬼笔环肽即得到 100 μ M 等量的储存液, 根据单次使用量, 进行小量分装, -20°C 避光冻存, 一年稳定。

开始实验前, 使用 1×PBS 缓冲液稀释储存液到需要的工作浓度。推荐工作浓度为: 80~200 nM。工作液现配现用。

2. 染色步骤

1) 细胞爬片生长 24 h, 使其密度达到 50%汇合度。

2) 吸掉培养液, 37°C 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 min。

【注】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 10 min。

5) 室温条件下, 用丙酮 (\leq -20°C) 脱水或者用 0.5% Triton X-100 溶液透化处理 5 min。

6) 室温条件下, 用 PBS 清洗细胞 2~3 次, 每次 10 min。

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 30 min (通常情况下, 4°C~37°C 孵育皆可)。

【注】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 5 min。

9) 使用 200 μ L DAPI 溶液 (浓度: 100 nM) 对细胞核进行复染, 约 30 s。

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°C 避光保存, 通常 6 个月内可继续做 F-actin 染色分析。

【注】也可以直接使用含有 DAPI 的抗荧光淬灭封片剂 (货号: 36308ES11) 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=545/570 nm) 和 DAPI 激发/发射滤片 (Ex/Em=364/454 nm)。