

TRITC Phalloidin

产品信息

| 产品名称 | 编号 | 规格 |
|------------------|---------|-------|
| TRITC Phalloidin | DY50302 | 300 T |

产品描述

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 ($K_d=20$ 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 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。

保存方式

-20°C避光干燥保存, 1 年有效。

产品性质

分子量: 1231.4

最大激发/发射波长 (Ex/Em) : 540 ~ 546nm/565 ~ 575nm

多肽序列 (Sequence) : TRITC-bicyclic(Ala-DThr-Cys-cis-4-hydroxy-Pro-Ala-2-mercapto-Trp-4-hydroxy-5-amino-L eu)(S-3 to 6)

溶解性 (Solubility) : 溶于 DMSO、DMF、甲醇或者乙腈水溶液 (20%)

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 μ 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 $^{\circ}$ C 避光干燥保存。

2) 工作液的配置：吸取 1 μ 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，TRITC 鬼笔环肽用量也需根据不同情况而定。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 > 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 μ L/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 $^{\circ}$ 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 100 μ 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=545/570 nm) 和 DAPI 激发/发射滤片 (Ex/Em=364/454nm)。

注意事项：

1. 鬼笔环肽具有毒性，需小心操作。

2. 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。

本产品仅作科研用途