

## Phalloidin-Cy5 Conjugate

### 1. 产品描述

Phalloidin-Cy5 Conjugate是由荧光染料Cyanine 5与鬼笔环肽（货号B7678）偶联的鬼笔环肽荧光探针，用于标记丝状肌动蛋白（F-actin）。Phalloidin-Cy5 Conjugate提供远红色荧光（Ex / Em = 650/668 nm）。

Phalloidin（鬼笔环肽）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（Kd= 20 nM）选择性地结合丝状肌动蛋白（F-actin），而不会与单体肌动蛋白（G-actin）结合。肌动蛋白以两种形式存在，即单体和多聚体。肌动蛋白单体为球形，其表面上有一 ATP 结合位点。肌动蛋白单体一个接一个连成一串肌动蛋白链，两串这样的肌动蛋白链互相缠绕扭曲成一股微丝。这种肌动蛋白多聚体又被称为丝状肌动蛋白。鬼笔环肽与丝状肌动蛋白（微丝）的结合，阻止了微丝的解离，稳定了微丝结构，破坏了微丝的聚合和解聚的动态平衡。

将荧光染料与鬼笔环肽进行偶联，偶联物常用在组织切片、固定细胞、透化的细胞和无细胞的实验中选择性地标记 F-actin，广泛应用于微丝骨架在细胞中的成像。标记后的鬼笔环肽对大细丝和小细丝具有相似的亲和力，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。这种成像优于抗体染色：鬼笔环肽无物种限制，且几乎不存在非特异性染色，染色区和非染色区域对比极其明显。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。由于它们不与单体 G-actin 发生结合，这与某些抗肌动蛋白的抗体有所不同。

### 2. 产品信息

产品名称	规格	浓度
Phalloidin-Cy5 Conjugate	300 tests (solution)	1 mg/ml

### 3. 使用方法

#### （1）工作液配制

该产品是 1000× Phalloidin-Cy5偶联物 DMSO 储存液，开始实验前，使用 1×PBS 缓冲液稀释储存液，制备成1×的 Phalloidin-Cy5偶联物工作液。为了降低非特异性背景染色，使用含 1% BSA 的 PBS 缓冲液稀释储存液。工作液现配现用。

#### （2）染色

1) 细胞爬片制备：将干燥的玻片放入培养孔板中。取细胞悬液加入孔板中，培养至少 24 小时，使细胞密度达到50%。

2) 吸掉培养液，用37℃预热的1×PBS (pH 7.4) 清洗爬片2次。轻轻晃动，避免将细胞冲掉。

3) 加入溶于PBS的4%多聚甲醛溶液，室温固定 10-30 min。注意爬片的细胞面向上。

【注】避免使用任何含甲醇的固定剂，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)(可选)室温条件下,用丙酮( $\leq -20^{\circ}\text{C}$ )脱水或者用0.5% Triton X-100溶液透化处理5min。室温条件下,用PBS清洗细胞 2~3次,每次10min。
- 6) 取适量Phalloidin-Cy5偶联物工作液,覆盖住盖玻片上的细胞,室温避光孵育20-90 min (通常情况下,  $4^{\circ}\text{C}\sim 37^{\circ}\text{C}$  孵育皆可)。
- 7) 用PBS清洗盖玻片3次,每次5min。
- 8) (可选)加入适量 DAPI 溶液(浓度100 nM)对细胞核进行复染,约30s。
- 9) 用PBS清洗盖玻片,细胞面朝下,盖在已经滴有一滴抗荧光猝灭封片剂的载玻片上。用无纺布轻轻按压盖玻片以去除多余封片剂。若样本需长久保存,使用指甲油对盖玻片四周进行密封。
- 10) 在荧光显微镜或者共聚焦显微镜下进行荧光观察 (Ex / Em = 650/668 nm)。

注意事项:

- 1) 鬼笔环肽具有毒性,需小心操作(对人的半数致死剂量 $\text{LD}_{50}$ 约2mg/kg)。
- 2) 为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。