

## Phalloidin-Tetramethylrhodamine Conjugate

### 1. 产品描述

Phalloidin-Tetramethylrhodamine Conjugate 是由荧光染料 Tetramethylrhodamine (四甲基罗丹明)与鬼笔环肽(货号 B7678)偶联的橙色鬼笔环肽荧光探针,用于标记丝状肌动蛋白(F-actin)。四甲基罗丹明提供橙色荧光 (Ex / Em = 546/575 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

货号	产品名称	规格
C4233	Phalloidin-Tetramethylrhodamine Conjugate	300 tests (solution)

### 3. 使用方法

#### (1) 工作液配制

该产品是 1000×Phalloidin-四甲基罗丹明偶联物 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-四甲基罗丹明偶联物工作液。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) 取适量鬼笔环肽四甲基罗丹明偶联物工作液, 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 = 546/575 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 LD50 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。