

## Phalloidin-AMCA Conjugate

### 1. 产品描述

Phalloidin-AMCA Conjugate 是由荧光染料 AMCA (7-氨基-4-甲基香豆素-3-乙酸) 与鬼笔环肽 (货号 B7678) 偶联的蓝色鬼笔环肽荧光探针, 用于标记丝状肌动蛋白 (F-actin)。AMCA 提供稳定且明亮的蓝色荧光 (Ex / Em max=350 / 450 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[2], 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
C4332	Phalloidin-AMCA Conjugate	300 tests (solution)

### 3. 使用方法

#### (1) 工作液配制

该产品是 1000×Phalloidin-AMCA 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-AMCA 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°C 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 AMCA 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) 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。
- 9) 在荧光显微镜或者共聚焦显微镜下进行荧光观察 (Ex / Em max=350 / 450 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。