

AF 555 Phalloidin

Cat# CF0203

产品概述

鬼笔环肽（Phalloidin）是一种二环肽，是从致命的毒蕈类鬼笔鹅膏（Amanita phalloides）中分离出的毒素家族。荧光标记的 Phalloidin 与丝状肌动蛋白 F-actin 具有纳米级亲和力，而不会与单体肌动蛋白 G-actin 结合，并且鬼笔环肽是水溶性的，因此可方便地用于标记、鉴定和量化冷冻组织切片、细胞培养或无细胞实验中的 F-actin。

由于 Phalloidin 共轭物尺寸较小（直径约 12-15Å，分子量<2000 道尔顿），多种肌动蛋白结合蛋白，包括肌球蛋白，原肌球蛋白和肌钙蛋白依然能与鬼笔环肽标记的肌动蛋白结合。此外，Phalloidin 染色的肌动蛋白纤维依然具有功能性；标记的甘油化肌肉纤维仍然可以收缩，标记的肌动蛋白纤维仍然可在固相肌动蛋白基质上移动。而且荧光标记的鬼笔环肽也可用于对细胞中 F-actin 进行定量研究。Phalloidin 探针的光谱特征见表 1。

表 1 Phalloidin 探针的光谱特征

产品编号	产品名称	Ex	Em	MW
CF0201	Rhodamine Phalloidin	540 nm	565 nm	1250 Da
CF0202	AF 488 Phalloidin	495 nm	518 nm	1320 Da
CF0203	AF 555 Phalloidin	555 nm	565 nm	1910 Da
CF0204	AF 633 Phalloidin	632 nm	647 nm	1900 Da

在许多不同种类的动物和植物的肌肉和非肌肉细胞中，荧光标记的 Phalloidin 对任何大小的纤维都具有相似的亲和力，每个肌动蛋白亚基结合一个 Phalloidin 分子。与抗体不同，不同种类或来源的肌动蛋白的结合亲和力没有明显变化。非特异性染色可以忽略不计，染色区域和未染色区域之间的对比很高。Phalloidin 将单体/聚合物的平衡向聚合物转移，并将聚合的临界浓度降低了 30 倍。此外，Phalloidin 还能稳定 F-actin，抑制细胞松弛素、碘化钾和高温的解聚。

本品为 AF 555 标记鬼笔环肽（橙红），可发出高亮度、发光稳定的橙红色荧光。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。其次，AF 555 标记鬼笔环肽（橙红）染色与用于细胞分析的其他荧光染色完全兼容。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。

产品/组分信息

产品名称	货号	规格
AF 555 Phalloidin	CF0203-300T	300 T

储存方式

-25~-15℃；干燥避光保存；避免反复冻融。

使用说明

制备 Phalloidin 原液

【注】：鬼笔环肽具有毒性，使用时需小心操作（对人的半数致死剂量 LD₅₀ 约 2 mg/kg）。

1. 本产品为冻干粉形式，微量不易观察。使用前请瞬时离心至管底，以确保试剂在试剂管底部。
2. Phalloidin 原液制备，选用下列方法之一制备即可。

【注】：在培养细胞的标准实验条件下，与醇类溶剂和水溶液相比，在无水 DMSO 中制备原液可获得更好的染色强度并更好地保留 F-actin 的结构完整性。

2.1 （推荐）DMSO 原液：将小瓶内冻干粉溶解在 150 μ L 无水 DMSO 中，得到 400X 原液，浓度为 2000 次/mL，相当于约 66 μ M。

【注】：

1. 1 单位/次荧光 Phalloidin 相当于 0.5 μ L DMSO 原液。

2. DMSO 溶解的 Phalloidin 原液在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 储存至少可稳定 1 年。如需多次以上的冷冻/解冻循环，请对原液进行分装储存。

2.2 甲醇原液：将小瓶内冻干粉溶解在 1.5 mL 甲醇中，得到浓度为 200 次/mL 的 40X 原液，相当于约 6.6 μ M。

【注】：1 单位/次荧光 Phalloidin 相当于 5 μ L 甲醇原液。

细胞染色

甲醛固定细胞染色

本方案描述了在盖玻片上生长的贴壁细胞的染色过程。

【注】：鬼笔环肽也可用于染色固定的冰冻组织切片，不推荐染色石蜡组织切片。此处描述的染色方案与用于 ICC, IHC 或 FISH 的大多数信号放大技术兼容。

1. 用预热的 PBS 洗涤样品 2 次。
2. 室温下，在 3.7% 甲醛的 PBS 溶液（无甲醇）中固定样品 15 min。

【注】：避免使用含甲醇的固定液！因为甲醇可以在固定过程中破坏肌动蛋白，所以建议使用不含甲醇的甲醛。

3. 用 PBS 洗涤样品 3 次。
4. 在 0.1% Triton X-100 PBS 溶液中渗透样品 15 min。

【注】：某些样品可能需要在玻璃培养皿中 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 的丙酮溶液中进行渗透。

5. 用 PBS 洗涤样品 3 次。
6. （可选）当与抗体进行多路复用时，将样品在 BlockAid 阻断溶液中孵育或在含有 1% BSA 的类似阻断溶液中室温孵育 30-45 min。
7. （可选）在 Image-iT FX 信号增强器中孵育样品 20-30 min，以增强信号。

【注】：如果需要抗体染色，则在步骤 7 和步骤 8 之间分别进行一抗和二抗孵育，用 Phalloidin 标记样品可以结合二抗染色。确保在染色溶液中每种试剂的正确稀释度。

8. 配制 Phalloidin 染色液：稀释原液。对于 DMSO 原液，使用 200 μ L PBS 稀释 0.5 μ L 400X 原液，用于每个盖玻片染色。对于甲醇原液，使用 200 μ L PBS 稀释 5 μ L 的 40X 甲醇原液，用于每个盖玻片染色。加入 1% 牛血清白蛋白（BSA）以减少非特异性背景染色。

【注】：当染色多个盖玻片时，需调整相应的染液用量。为了获得更强的信号，可以每个盖玻片使用 2-3 倍的染色溶液。

9. 将荧光性 Phalloidin 染色液加至盖玻片上，室温孵育 30-60 min（将盖玻片放在有盖的容器中，以防止孵育过程中蒸发）。
10. （可选）如果需要，添加 DNA 复染剂用于固定细胞或死细胞。
11. 用 PBS 洗涤样品 3 次。
12. 如需长期储存，可将样品放置在固化/硬化的水性封片剂中。以这种方式制备的标本在 $2-6^{\circ}\text{C}$ 避光保存时，可保持肌动蛋白染色至少 6 个月。

【注】：

1. 不要使用含有有机溶剂的封片剂。

2. 如果样品没有封片或非固化封片，强烈建议立即进行细胞成像实验。Phalloidin 偶联物会随着储存时间的增加而失去信号强度。存储期间的信号损失率会根据所使用的共轭类型、封片剂或存储温度的类型而有所不同。

同时固定，渗透和染色细胞

在 4% 甲醛固定缓冲液中，Phalloidin 仅在短时间内稳定。本方案描述了快速一步固定，渗透和标记程序。

【注】：我们建议使用荧光 Phalloidin 甲醇原液。有关制备甲醇原液的信息，请参阅“制备 Phalloidin 原液”。

1. 制备含 50-100 $\mu\text{g/mL}$ 1-棕榈酰-sn-甘油-3-磷脂胆碱（CAS No. 17364-16-8）和 3.7% 无甲醇甲醛的 1 mL 溶液，然后加入 25-50 μL 荧光 Phalloidin 甲醇原液。
2. 将溶液加入样品中，在 4°C 下孵育 20 min。
3. 用 PBS 快速洗涤样品 3 次。
4. 装上盖子，然后进行细胞成像。

活细胞染色

Phalloidin 通常不具有细胞渗透性，但是已有报道用 Phalloidin 偶联物标记活细胞。活细胞可能通过胞饮或未知机制进行标记。一般来说，染色活细胞需要更大量的 Phalloidin 偶联物。Rhodamine Phalloidin 已被微注射到成纤维细胞中，并没有明显的形状变化或褶皱。在活细胞中注射 Phalloidin 似乎可以改变肌动蛋白的分布和细胞运动。如果需要，请查阅文献，找出适合您的实验的染色程序。

Technical Support

Copyright © 2023 CYTOCH, All Rights Reserved. The CYTOCH logo is a registered trademark.

To place an order or to obtain a product information, please go to: www.cytoch.com.

Or contact us by:

E-mail: support@cytoch.com

Tel: 400-969-8881

For research use only.

