

# iFluor™ 488 phalloidin

## iFluor™ 488 标记鬼笔环肽（绿色，即用型）

### Cat NO: IMFP-B001

#### 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（ $K_d=20\text{nM}$ ）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和力结合于大小纤维，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。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。

#### 产品信息

表 1. 组成信息

产品名称	产品规格	储存条件	保质期
<b>iFluor™ 488 phalloidin</b>	20T/50T/100T	-20℃	12 个月
<b>iFluor™ 488 标记鬼笔环肽（绿色，即用型）</b>			



## 产品优势

本品为 iFluor™ 488 荧光标记的鬼笔环肽，可发出高亮度、稳定荧光,染色反应特异性强,对比性高,适合用作 F-actin 的定性和定量检测。与 Actin 抗体比较, iFluor™ 488 鬼笔环肽具有如下优点:1、与 actin 亚单位一比一结合,并且不与 G-actin 结合,具有比 Actin 抗体更好的染色效果;2、且本品的结合没有物种差异性,适用性广泛;3、鬼笔环肽标记的非特异性信号可忽略,因而图像的反差较好;4、染色与用于细胞分析的其他荧光染色完全兼容,包括荧光蛋白、Qdot 纳米晶体和其他 iFluor 偶联物(包含 iFluor 偶联二抗);5、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。

## 使用说明

### 一、需要自备材料

- 1、1×PBS 缓冲液, pH 7.4, 细胞培养级别
- 2、固定液(4%多聚甲醛溶于 PBS 缓冲液,pH 7.0)
- 3、破膜液 (Triton X-100 溶于 PBS 缓冲液 0.5%)
- 4、BSA, 标准级别
- 5、DAPI 染液 (即用型)
- 6、黑框/透明底的 96 孔细胞培养板

### 二、操作步骤

#### 1、母液及工作液配制

母液准备: 对于 iFluor™ 488 标记鬼笔环肽。本品以 50ul/300ul 形式提供, 建议根据单次使用量, 对母液进行小量分装, -20℃ 避光冻存, 一年稳定。4℃ 避光保存, 3 个月稳定。

工作液准备: 开始实验前, 使用 1×PBS 缓冲液稀释储存液到需要的工作浓度。推荐工作浓度为: 1:40~1:200。工作液现配现用。按照 1: 200 比例来计算, 即 1uL 体积的 iFluor™ 488 标记鬼笔环肽溶液中加入 200uL 的 1×PBS 缓冲液浓度, 可进行 300 次细胞染色。

**【注】:** 稀释比可根据实际实验效果适当调整。

#### 2、染色步骤



(1) 细胞爬片生长 24h，使其密度达到 50%汇合度。

(2) 吸掉培养液，37℃预热的 1×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 10min。

**【注】**：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 (≤-20℃) 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 200μL 配制好的 iFluor<sup>™</sup> 488 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℃~37℃孵育皆可)。

**【注】**：为了降低背景，可于 iFluor<sup>™</sup> 488 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 200μL 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℃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 iFluor 750 激发/发射滤片 (Ex/Em=750/777 nm) 和 DAPI 激发/发射滤片 (Ex/Em=364/454nm)。

## 注意事项

- 1、本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。
- 2、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 3、荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
- 4、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)。

