

鬼笔环肽（绿色）

Actin-Tracker Green-488（微丝绿色荧光探针）

1. 产品简介：

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。

本品为 SuperFluor488 标记的鬼笔环肽，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。本产品是冻干粉形式。

操作步骤**1. 染色液的配置**

1) 母液的配置：使用前将本品回温至室温并简短离心，加入 30uL DMSO 使其充分溶解，混匀即可获得 1000×SuperFluor488 标记鬼笔环肽母液。根据实验情况，对其分装并于 -20℃ 避光干燥保存。

2) 工作液的配置：吸取 1 μL 以上 SuperFluor488 标记鬼笔环肽母液至 1 mL PBS（含 1%BSA）缓冲液中即可得到 1×工作液。

【注】：不同的细胞染色情况不同，相应 SuperFluor488 鬼笔环肽使用量也需根据不同情况而定。

2. 染色步骤

1) 细胞爬片生长 > 24h，使其密度达到 50~60% 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 10~30min。

注意：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 ($\leq -20^{\circ}\text{C}$) 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 100 μL /孔 (96 孔板) 配制好的 SuperFluor488 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°C ~ 37°C 孵育皆可)。

注意：为了降低背景，可于 SuperFluor488 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 100 μL /孔 (96 孔板) 即用型 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°C 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 FITC 激发/发射滤片 (Ex/Em=496/516nm) 和 DAPI 激发/发射滤片 (Ex/Em=364/454nm)。

需要自备材料

- 1) 甲醇
- 2) 1 \times PBS 缓冲液，pH 7.4，细胞培养级别
- 3) 固定液 4%多聚甲醛 (溶于 PBS 缓冲液)
- 4) 丙酮或透化液 0.5% Triton X-100 (溶于 PBS 缓冲液)
- 5) Fluoromount-GTM 水溶性封片剂 (不含 DAPI) ， DAPI
- 6) DAPI Fluoromount-GTM 水溶性封片剂 (含 DAPI)
- 7) BSA，标准级别
- 8) 载玻片和盖玻片
- 9) 盖玻片周围密封液 (如透明指甲油)
- 10) 组装有 FITC 激发/发射滤片，以及 DAPI 激发/发射滤片的荧光显微镜或共聚焦显微镜。

注意事项：

1. 荧光标记鬼笔环肽的一个单位 (T) 的定义：按照推荐工作液浓度 200nM ，每次用量为 100 μ L 染色工作液时，可以检测的次数 300 次；按照工作液浓度 100nM ，每次用量为 200 μ L 染色工作液时，可以检测的次数也是 300 次。
2. 鬼笔环肽具有毒性，需小心操作。
3. 本产品为冻干粉形式，微量不易观察 使用前瞬时离心，加溶剂溶解后使用，溶解后接近无色。
4. 产品仅限于专业人员用于生命科学研究，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅。
5. 产品必须由合格专业技术人员操作同时佩戴口罩/手套/实验服并遵守生物实验室安全操作规程！