

AF488-鬼笔环肽 (绿色)

(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

-20°C干燥、避光保存, 有效期见外包装。若配制成水溶液, 应少量分装保存。

产品编号	名称	规格
YFXCA10	AF488-鬼笔环肽 (绿色)	50T/ 300T

一、产品说明

鬼笔环肽是从致命的伞形毒蕈蘑菇中分离出来的一种毒素。它是特异性结合于 F-肌动蛋白的双环肽。因此用荧光染料 标记的鬼笔环肽可以非常方便的研究 F-肌动蛋白的分布。鬼笔环肽内部, 在半胱氨酸和色氨酸之间含有不常见的硫醚桥形 成内环结构。在 pH 升高时, 该硫醚被裂解, 鬼笔环肽失去对肌动蛋白的亲合力。

荧光标记的鬼笔环肽可在纳摩尔水平染色 F-肌动蛋白。在各种植物细胞或动物细胞中, 标记的鬼笔环肽对大、小细丝具有相似的亲和力, 平均每个肌动蛋白亚基结合一个鬼笔环肽分子。

不同于抗体, 鬼笔环肽与肌动蛋白的结合亲和力在不同物种间没有显著变化。非特异性染色可以忽略不计, 染色和未染色区域之间的对比度非常大。鬼笔环肽将单体/聚合物的平衡转向聚合状态, 将聚合临界浓度降低至 30 倍。鬼笔毒肽类 (Phallotoxins) 可通过抑制细胞松弛素的解聚, 碘化钾和升高的温度, 稳定 F-肌动蛋白。因为鬼笔环肽缀合物很小, 大约直径 12-15 埃, 分子量 < 2000 kDa, 多种肌动蛋白结合蛋白, 包括肌球蛋白, 原肌球蛋白和后肌钙蛋白依然可以和鬼笔环肽标记的肌动蛋白结合。更重要的是, 鬼笔环肽标记的肌动蛋白丝保持功能, 标记甘油肌纤维仍然收缩, 标记的肌动蛋白丝仍然可以继续移动。而且荧光标记的鬼笔环肽也可用于对细胞中 F-肌动蛋白进行定量研究。

二、操作步骤

1、准备工作液

1、取适量甲醇或无菌水溶解棕色管中冻干的 AF488-鬼笔环肽粉末, 制备成 200T/mL 的储液 (300T 规格染料加入 1.5 mL 的液体, 50T 规格染料加入 0.25 mL 的液体即可)。

2、AF488-鬼笔环肽的一个单位 (T) 的定义是染色一个加载细胞的载玻片所用染料的量。使用时的推荐稀释比例为 1: 40-1: 200, 一个单位相当于 200 μ L 总染色体积中加入 1-5 μ L 200T/mL 储备溶液。

注: 稀释比例可以根据实际染色效果进行适当调整。

2、固定细胞染色

以下方案是针对生长在玻璃盖玻片或 8 孔室玻片上的贴壁细胞的染色步骤。鬼笔环肽也可用于染色固定的冷冻或石蜡 组织切片。

2.1、用 PBS 清洗细胞 3 次。

2.2 用含有 3.75% 甲醛的 PBS 溶液固定细胞, 冰上固定 15 min。

注: 甲醇可以在固定过程中破坏肌动蛋白。因此最好避免含有任何甲醇的固定剂。优选的固定剂是不含甲醇的甲醛。

2.3 用 PBS 清洗细胞 3 次。

2.4 用含 0.5% Triton X-100 的 PBS 溶液在室温下透化细胞 10 min。

2.5 用 PBS 清洗细胞 3 次。

2.6 用 200 μ L PBS 稀释 1-5 μ L 荧光标记的鬼笔环肽储液, 加入一个盖玻片或孔中, 室温孵育 20 min, 进行染色。

注: 染色体积可根据样本情况进行调节。孵育过程中为避免染液挥发, 可将盖玻片放于密封容器内。

2.7 用 PBS 清洗细胞 2-3 次。

2.8 荧光显微镜观察。标记的鬼笔环肽具有很好的光稳定, 样品可以在 PBS 中成像, 但为了效果最佳, 也可以使用抗荧光淬灭剂观察。

3、活细胞染色

荧光标记的鬼笔环肽不具有细胞透性, 因此没有被广泛用于活细胞标记。然而, 有报道称活细胞可能通过胞饮或未知机制进行标记。一般来说, 染色活细胞时需要更多的染料。或者, 荧光标记的鬼笔环肽也可被注入到细胞中用于监测肌动蛋白分布和细胞运动。

三、注意事项

- 1、使用前请将产品瞬时离心至管底, 再进行后续实验。
- 2、本产品为冻干粉形式, 微量不易观察, 使用前请瞬时离心, 加适当溶剂溶解后使用, 溶解后的溶液近乎透明色。

附录

附表 1. EdU 培养基及染色反应液的参考使用量

	96 孔板	48 孔板	24 孔板	12 孔板	6 孔板	5.5 cm 小皿
EdU 培养基	100 μ L	150 μ L	200 μ L	500 μ L	1 mL	2 mL
染色反应液	100 μ L	150 μ L	200 μ L	500 μ L	1 mL	2 mL

附表 2. EdU 的参考孵育时间

细胞系	人胚胎细胞	酵母细胞	鼠成纤维细胞	人宫颈癌细胞	人胚肾细胞系	人神经细胞
细胞周期	-30 min	-3 h	-18 h	-21 h	-25 h	-5 d
孵育时间	5 min	20 min	2 h	2 h	2 h	1 d

注: (1) EdU 孵育时间取决于细胞周期, 一般为细胞周期的 1/10 至 1/5, 但大多数细胞系均可采用 2 h 孵育时间;
(2) 考虑到细胞培养基、温度、湿度、光线等其他因素的影响, 细胞周期会有所变化。

附表 3. 文献中 EdU 孵育浓度及时间

PubMed ID	Reference	Cell Line	Concentration	Time
18272492	Salic A, <i>et al.</i> PNAS.2008	NIH3T3, HeLa	10 nM-10 μ M	1 h
18521918	Cappella P, <i>et al.</i> Cytometry A.2008	HL-60, A2780, U2OS	1-10 μ M	0.5 h
18996411	Chehehasa F, <i>et al.</i> Neurosci Methods.2009	Neurospheres	1-20 μ M	24 h
19179371	Limsirichaikul S, <i>et al.</i> Nucleic Acids Res.2009	Primary fibroblasts	10 μ M	1, 2, 4 h
19253396	Warren M, <i>et al.</i> Dev Dyn.2009	Chick embryos	10 μ M-2 mM	4 h
19647746	Yu Y, <i>et al.</i> J Immunol Methods.2009	Spleen cells	50 μ M	24 h
19544417	Momicilovic O, <i>et al.</i> Stem Cells.2009	Human ES cells	10 μ M	0.5 h
20080700	Cinquin O, <i>et al.</i> PNAS.2010	emb-30	1 μ M	12 h
20025889	Han W, <i>et al.</i> Life Sci.2009	VSMC	50 μ M	2 h
20659708	Huang C, <i>et al.</i> J Genet Genomics.2010	ESC	50 μ M	2 h
21310713	Hua H, <i>et al.</i> Nucleic Acids Res.2011	Fission yeast strains	10 μ M	3 h
20824490	Lv L, <i>et al.</i> Mol Cell Biochem.2011	EJ cells	50 μ M	4 h
21248284	Yang S, <i>et al.</i> Biol Reprod.2011	GC cells	50 μ M	2 h
21227924	Zhang YW, <i>et al.</i> Nucleic Acids Res.2011	U2OS, HT29	30 μ M	1.5 h
21829621	Guo T, <i>et al.</i> PloS One. 2011	HIT-T15	50 μ M	4 h
21980430	Zeng T, <i>et al.</i> PloS One. 2011	MCF-10A	25 μ M	2 h
22012572	Ding D, <i>et al.</i> Int Orthop.2011	C3H10T1/2	10 μ M	24 h
22000787	Zeng W, <i>et al.</i> Biomaterials.2011	EPC	50 μ M	4 h
21913215	Xue Z, <i>et al.</i> J Cell Biochem.2011	SGC7901	25 μ M	24 h
22016038	Peng F, <i>et al.</i> Lasera Med Sci.2011	MSC	50 μ M	2 h
21878637	Li D, <i>et al.</i> J Biol Chem.2011	HCC	50 μ M	2 h