

AF594 鬼笔环肽 (红色)

(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

-20℃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	产品名称	产品规格
YFXCA11	AF594-鬼笔环肽 (红色)	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合力, 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合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、储液准备:

取适量甲醇或无菌水溶解棕色管中冻干的 AF594-鬼笔环肽粉末, 制备成 200T/mL 的储液 (50T 规格染料加入 0.25mL 液体; 300T 规格染料加入 1.5mL 液体)。

AF594-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 的 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组织切片, 但不推荐染色石蜡组织切片:

A. 用 PBS 洗涤细胞 3 次。

B. 用含有 4%多聚甲醛的 PBS 溶液, 室温固定细胞 20min。

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。

C. 用 PBS 洗涤细胞 3 次。

D. 用含有 0.4% Triton X-100 的 PBS 溶液在室温下透化细胞 10min。

E. 用 PBS 洗涤细胞 3 次。

F. 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。

G. 用 PBS 洗涤细胞 3 次。

H. 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。
- 3、若出现染色效果不佳时, 采用含 1% BSA 的 PBS 溶液预孵育 20-30min, 可以改善染色效果。