

One-Step BF™ Phalloidin/Nucleibblue Double Staining Kit

即用型细胞微丝双标试剂盒，15 min 快速染色，清晰展现形态与分布

产品货号： C21715、C21716、C21717、C21718、C21719、C21720

产品规格： 50 T，300 T

储运条件： 4 °C避光保存，冰袋运输

产品简介：

One-Step BF™ Phalloidin/Nucleibblue Double Staining Kit是一款可同时实现F-肌动蛋白与细胞核特异性双标染色的即用型试剂盒，核心组分为BF™ Phalloidin与Nucleibblue，专为解决细胞骨架与细胞核共定位分析的实验需求设计。本产品的核心原理为：

(1) BF™ Phalloidin作为鬼笔环肽衍生物，可与真核生物细胞内的丝状肌动蛋白(F-actin)发生高亲和力特异性结合，且不与单体G-肌动蛋白结合，能精准标记细胞骨架微丝结构；

(2) Nucleibblue作为高特异性核荧光染料，可与细胞核DNA特异性结合，实现细胞核的清晰荧光标记，二者协同作用可完成F-肌动蛋白与细胞核的同步染色。

相较于传统的分开配制型肌动蛋白与核染色试剂，本产品为即用型预混体系，无需实验人员自行稀释、配比，大幅节省实验操作时间，且试剂配比经过优化，非特异性染色可忽略不计；同时BF™ Phalloidin分子量小，与F-actin结合后不影响肌动蛋白结合蛋白的相互作用，进一步保留F-actin生物学功能；BF™染料是我司开发的一系列新一代荧光染料，与其他荧光染料相比，在亮度，光稳定性和水溶性方面具有综合优势。其中BF™ Phalloidin可稳定F-actin结构，阻止其解聚，保证微丝形态的完整呈现，且对不同物种的F-actin结合亲和力无显著差异，基本不影响F-actin的功能，标记后的肌动蛋白丝仍保持正常功能，标记的肌纤维能够收缩，标记的肌球蛋白可继续移动，同时在各类植物、动物细胞中，对大、小微丝具有相似的亲和力，以 1 : 1 的化学计量比与肌动蛋白亚基结合，可直接用于细胞中F-actin的定量研究；Nucleibblue荧光信号亮度高、光稳定性强，背景干扰极低，可清晰显示细胞核的形态、位置及数量变化。多重优势让定量与定性分析均可高效实现。本产品可广泛应用于荧光显微镜（含激光共聚焦显微镜）观察、流式细胞术检测，同时适用于细胞生物学基础研究、细胞骨架动态变化分析等实验场景。

肌动蛋白作为细胞骨架的核心组成部分，其丝状形式F-actin的形态、分布与细胞核的结构变化密切关联，是反映细胞迁移及形态重塑的重要指标，而鬼笔环肽因对F-actin的特异性结合特性，成为肌动蛋白染色的经典工具，Nucleibblue则是新一代高特异性细胞核荧光染色试剂，凭借优异的染色性能成为细胞核标记的优选工具，二者联用是细胞形态与亚细胞结构分析的核心方法。

本试剂盒在该科学背景下，将BF™ Phalloidin与Nucleibblue进行一体化优化配制，且BF™ Phalloidin兼具标记精准、功能保留与定量适配的特性，在荧光显微镜观察中可清晰呈现F-肌动蛋白的微丝分布与细胞核的位置关系，实现亚细胞结构的精准共定位分析；在流式细胞术中可同时对F-actin表达水平进行精准定量检测；在药物筛选研究中，可快速检测药物处理后细胞骨架的重塑与细胞核的形态改变，为药物的作用机制研究提供直观的形态学依据；在细胞生物学基础研究中，可用于分析细胞迁移、侵袭、分化过程中F-actin与细胞核的动态变化，且能在保留F-actin生理功能的前提下开展相关研究，最大程度还原细胞真实生理状态。本产品以高特异性、高稳定性、高便捷性与强功能性为核心优势，为实验人员提供了高效、准确的细胞骨架-细胞核双标分析工具。

应用范围： 细胞、冷冻组织切片、酵母及真菌的 F-actin 的标记、免疫荧光兼容

产品特点：

- **双标一体，即用型配方：** 预混 BF™ Phalloidin 与 Nucleibblue 染色试剂，开盖即用，无需稀释、混合与滴定，一步完成 F-actin 与细胞核染色，大幅简化实验流程。
- **信号精准，共定位准：** BF™ Phalloidin 高特异性结合 F-actin，不识别 G-肌动蛋白；Nucleibblue 精准标记细胞核，信号明亮、背景低。



仅限体外科研用途 不得用于临床诊断或治疗
技术咨询 Contact@probelives.com
订购咨询 Sales@probelives.com

中文网址 www.probelives.cn
英文网址 www.probelives.com
Suzhou Probelives Technology CO., LTD.

- **广泛适用，新手友好：**省时省力，精简实验步骤与耗材消耗；新手易上手，适配爬片、常规镜检、批量样本、96孔板、高内涵筛选及自动化实验平台，适配高通量与各类常规科研实验。
- **不区分种属：**不同于抗体，鬼笔环肽与 F-actin 的结合力在不同物种间没有显著变化，非特异性染色基本可以忽略；
- **保留功能，支持定量：**基本不影响 F-actin 生理功能，标记后肌纤维仍可收缩、肌球蛋白可正常运动；对各类细胞微丝亲和力一致，1：1 结合肌动蛋白亚基，可用于 F-actin 定量研究。
- **结果稳定，成像精准：**染料配比固定、体系环境统一，批次与人员操作差异小，染色重复性强；同步染色规避先后孵育造成的细胞位移、洗脱问题，共定位结果更准确，信噪比优异，成像均一稳定。

产品参数：

- **BF™ 488 Phalloidin Ex/Em:** 490/515 nm;
- **BF™ 555 Phalloidin Ex/Em:** 555/565 nm;
- **BF™ 594 Phalloidin Ex/Em:** 590/617 nm;
- **BF™ 633 Phalloidin Ex/Em:** 630/650 nm;
- **BF™ 680 Phalloidin Ex/Em:** 681/698 nm;
- **Rhodamine Phalloidin Ex/Em:** 546/575 nm;
- **Nucleiblu Ex/Em:** 345~355/460~470 nm。

产品组分：

One-Step BF™ Phalloidin/Nucleiblu Double Staining Kit				
货号	规格	50 T	300 T	BF™ Ex/Em
	组分			
C21715	One-Step BF™ 488 Phalloidin/Nucleiblu Double Staining Kit	5 mL	30 mL	490/515 nm
C21716	One-Step BF™ 555 Phalloidin/Nucleiblu Double Staining Kit	5 mL	30 mL	555/565 nm
C21717	One-Step BF™ 594 Phalloidin/Nucleiblu Double Staining Kit	5 mL	30 mL	590/617 nm
C21718	One-Step BF™ 633 Phalloidin/Nucleiblu Double Staining Kit	5 mL	30 mL	630/650 nm
C21719	One-Step BF™ 680 Phalloidin/Nucleiblu Double Staining Kit	5 mL	30 mL	681/698 nm
C21720	One-Step Rhodamine Phalloidin/Nucleiblu Double Staining Kit	5 mL	30 mL	546/575 nm

注：试剂盒使用次数为贴壁细胞进行 96 孔板荧光显微镜检测时可检测的微孔总数。

注意事项：

- Phalloidin 有一定毒性(LD₅₀ 为 2 mg/kg 体重)，使用时请注意适当防护。
- 建议在实验中设置单染色的对照组，流式检测中用于调节补偿。
- 试剂盒中荧光染料应避免光保存。
- 建议在免疫标记后进行鬼笔环肽染色。
- 对液体培养的酵母进行染色时，对数期细胞的染色效果远优于稳定期细胞。
- 本产品仅限于科研用途并且不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请遵循您所在常规实验室安全规定。

使用说明：（以 C21715 为例）

一、实验前准备

1. 试剂准备：



仅限体外科研用途 不得用于临床诊断或治疗
 技术咨询 Contact@probelives.com
 订购咨询 Sales@probelives.com

中文网址 www.probelives.cn
 英文网址 www.probelives.com
 Suzhou Probelives Technology CO., LTD.

- 将试剂盒各组分恢复至室温，准备足量PBS缓冲液、4%多聚甲醛、Triton X-100。

2. 仪器准备：

荧光显微镜：激发/发射波长 Ex/Em：490/515 nm、555/565 nm、590/617 nm、630/650 nm、681/698 nm、546/575 nm、345~355/460~470 nm；

流式细胞仪：检测通道激发/发射波长 Ex/Em：490/515 nm、555/565 nm、590/617 nm、630/650 nm、681/698 nm、546/575 nm、345~355/460~470 nm；

3. 细胞准备：

- 根据实验设计，对细胞进行相应的药物处理。

二、操作步骤

方案一：荧光显微镜检测（适用于悬浮细胞）

1. 收集与洗涤细胞：

- (1) 收集待测悬浮细胞悬液至离心管中。
- (2) 1000 rpm，室温离心 5 min，小心吸弃上清液。

2. 细胞重悬与计数：

- (1) 使用 PBS 重悬并细胞计数。
- (2) 取 5×10^5 个细胞于新的离心管中，1000 rpm 低速离心 5 min，去除 PBS。

注：显微镜法对细胞密度要求不严格，只要实验组与对照组密度一致即可。具体可根据样本种类与实验条件灵活调整，以显微镜下视野中细胞分布清晰可辨为宜。

3. 细胞固定：

- (1) 加入适当体积的4%多聚甲醛固定液，室温固定细胞15 min，PBS洗涤2~3次。

注：甲醇或其他有机溶剂会在固定过程中破坏肌动蛋白结构，推荐使用无甲醇的甲醛作为固定剂。

4. 细胞透化

- (1) （可选）：室温条件下，用溶于PBS的0.4% Triton X-100溶液透化处理15 min，从而增加其通透性。
- (2) PBS洗涤2~3次。

注：针对固定透化细胞收集，可提高转速。

5. 细胞染色：

- (1) 加入500 μ L染色工作液(One-Step BFTTM 488 Phalloidin/Nucleibblue Double Staining Kit)。

样品数量	1	5	10
One-Step BFT TM 488 Phalloidin/Nucleibblue Double Staining Kit	500 μ L	2500 μ L	5000 μ L

- (2) 室温避光孵育15 min（孵育时间可根据预实验结果优化）。

注：染料的孵育时长、加样量可以根据实验所用的不同细胞种类、预实验结果或实验条件设置的使用量进行调整。

6. 洗涤：

- (1) 孵育结束后，吸弃染色工作液。
- (2) 加入PBS清洗细胞2-3次。

7. 显微镜观察与拍照：

- (1) 96孔板法：将100 μ L细胞悬液加入96孔板中，静置片刻，待细胞自然沉降贴底后，置于荧光显微镜下观察。

注：细胞悬液使用量可以根据细胞计数的数量自行调整，显微镜视野中细胞分布 70%~80%为最佳。

- (2) 载玻片法：取20~30 μ L细胞悬液滴加于洁净载玻片上，轻轻盖上盖玻片，避免产生气泡，置于荧光显微镜下观察。
- (3) 分别在预设的滤光片条件下，寻找并分别拍摄。

方案二：荧光显微镜检测（适用于贴壁细胞）

1. 细胞处理：

- (1) 提前一天在孔板中接种细胞，使得细胞汇合度达到70%~85%，待细胞贴壁后按照实验设计处理细胞。

2. 细胞清洗：

- (1) 直接在培养板中吸弃细胞培养液。



(2) 根据培养板规格, 加入对应体积的PBS轻柔洗涤细胞2~3次(例如: 96孔板加100 μ L/孔, 48孔板加150 μ L/孔, 24孔板加250 μ L/孔, 12孔板加500 μ L/孔, 6孔板加1 mL/孔)。洗涤后吸净PBS。

3. 细胞固定:

(1) 加入适当体积的4%多聚甲醛固定液, 室温固定细胞15分钟, PBS洗涤2-3次。

注: 甲醇或其他有机溶剂会在固定过程中破坏肌动蛋白结构, 推荐使用无甲醇的甲醛作为固定剂。

4. 细胞透化

(1) (可选): 室温条件下, 用溶于PBS的0.4% Triton X-100溶液透化处理15 min, 从而增加其通透性。

(2) PBS洗涤2~3次。

5. 细胞染色:

(1) 向各孔中加入对应体积的染色工作液(One-Step BF™ 488 Phalloidin/Nucleiblu Double Staining Kit)(体积同步步骤1, 例如: 96孔板加100 μ L/孔, 48孔板加150 μ L/孔, 24孔板加250 μ L/孔, 12孔板加500 μ L/孔, 6孔板加1 mL/孔)。

样品数量 (96 孔板)	1	5	10
One-Step BF™ 488 Phalloidin/Nucleiblu Double Staining Kit	100 μ L	500 μ L	1000 μ L

(2) 室温避光孵育15 min (孵育时间可根据预实验结果优化)。

注: 染料的孵育时长、加样量可以根据实验所用的不同细胞种类、预实验结果或实验条件设置的使用量进行调整。

6. 洗涤:

(1) 孵育结束后, 吸弃各孔中的染色工作液。

(2) 按步骤2的体积, 加入PBS清洗细胞2~3次。

7. 显微镜观察与拍照:

(1) 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。

注: 若样本未进行封片, 强烈建议立即成像; 为获得最佳结果, 染色后的样本应置于适宜的封片液中, 于4℃避光保存。

方案三: 流式细胞仪检测 (适用于悬浮与贴壁细胞)

1. 收集与制备单细胞悬液:

● 悬浮细胞: 同方案一, 最终取 $4 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5$ 个细胞。

● 贴壁细胞:

a. 加入适量胰酶消化液消化细胞。

注: 胰酶使用量、消化时间、消化温度根据各自实验室的经验操作。

b. 关键: 加入终止细胞培养基, 终止消化。

c. 将细胞悬液转移至合适的离心管, 1000 rpm, 室温离心 5 min, 吸弃上清。

d. 用 PBS 重悬细胞并进行细胞计数;

e. 取 $4 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5$ 个细胞, 1000 rpm, 室温离心 5 min, 吸弃上清;

f. PBS 清洗细胞, 1000 rpm, 室温离心 5 min, 吸弃上清;

2. 细胞固定:

(1) 加入适当体积的4%多聚甲醛固定液, 室温固定细胞15分钟, PBS洗涤2-3次。

注: 甲醇或其他有机溶剂会在固定过程中破坏肌动蛋白结构, 推荐使用无甲醇的甲醛作为固定剂。

3. 细胞透化

(1) (可选): 室温条件下, 用溶于PBS的0.4% Triton X-100溶液透化处理15 min, 从而增加其通透性。

(2) PBS洗涤2~3次。

注: 针对固定透化细胞收集, 可提高转速。

4. 细胞染色。

(1) 加入0.5 ml染色工作液, 重悬为单细胞悬液。室温避光孵育15 min。

注: 孵育后也可用 PBS 清洗 1~3 次。

样品数量	1	5	10
One-Step BF™ 488 Phalloidin/Nucleiblu Double Staining Kit	500 μ L	2500 μ L	5000 μ L

注: 染料的孵育时长、加样量可以根据实验所用的不同细胞种类、预实验结果或实验条件设置的使用量进行调整。



5. 检测

- (1) 重要：染色完成后1 h内进行流式检测，以保证荧光信号稳定。
- (2) 用流式细胞仪在预设的检测通道下进行分析。
- (3) 首先通过空白对照（未染色细胞）调节电压，使细胞群位于坐标系左下角。
- (4) 然后检测阴性对照和阳性对照，确认实验体系成立。
- (5) 最后检测实验样品，记录并分析细胞的平均荧光强度。

方案四：荧光显微镜检测（适用于组织切片）

1. 切片清洗

- (1) 用PBS洗涤组织切片2次。

2. 固定

- (1) 用PBS配制的3.7%甲醛溶液室温固定细胞或组织切片约10~20 min。

注意：甲醇可以破坏 actin，因此不能选用含有甲醇的固定液，并且尽量使用不含甲醇的甲醛。

- (2) 用含0.1% Triton X-100的PBS洗涤2~4次，每次5 min。

3. 染色并清洗

- (1) 把染色工作液按照每个片子200 μ L的比例滴加到片子上，室温避光孵育30~60 min。为防止蒸发，孵育时最好将片子置于载玻片染色盒中。

样品数量	1	5	10
One-Step BFTM 488 Phalloidin/Nucleibblue Double Staining Kit	200 μ L	1000 μ L	2000 μ L

注：染料的孵育时长、加样量可以根据实验所用的不同组织切片种类、预实验结果或实验条件设置的使用量进行调整。

- (2) 用0.1% Triton X-100的PBS洗涤2~4次，每次5 min。

4. 显微镜观察与拍照：

- (1) 随后可以直接用荧光显微镜进行观察。

注：为长期保存，可以在片子自然干燥后封片并于4 $^{\circ}$ C避光保存，保存时间可长达6个月左右。

三、结果判读：

1. 定性分析（显微镜）：

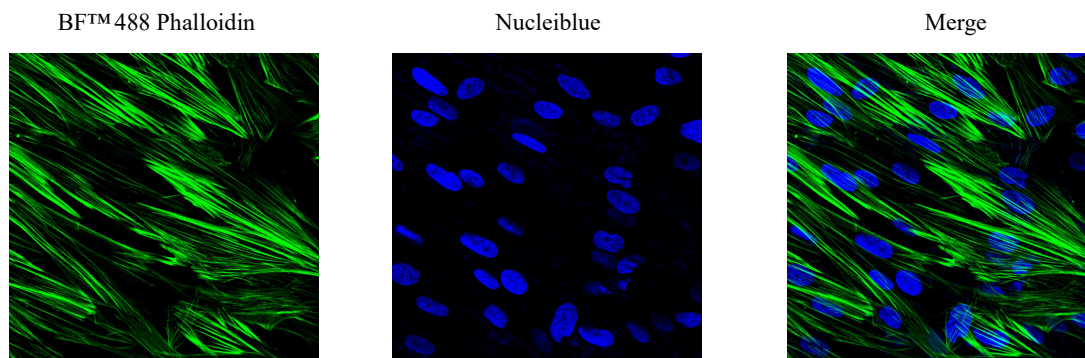


图 1. One-Step BFTM 488 Phalloidin/Nucleibblue Double Staining Kit 荧光镜检拍照

结果判读：

常温孵育染色后，BFTM 488 Phalloidin 染色的小鼠肺冰冻切片可特异性结合细胞微丝（F-肌动蛋白），微丝纤维结构完整、排布清晰；Nucleibblue 靶向标记细胞核，核形态规整。融合图像信号分区明确，无明显非特异染色与荧光串色，双染显色均衡。

注：实际检测结果可能因检测仪器、操作条件、细胞类型等差异产生不同，本示例仅供参考。

常见疑问与解答：

- 问：鬼笔环肽染色细胞骨架过程中，能使用甲醇固定细胞吗？

答：甲醇会破坏 Actin 蛋白，因此不能使用含有甲醇的固定液，并且使用不含甲醇的甲醛。



- 问：本产品是否可以用于染色石蜡切片？

答：不可以。有石蜡切片中的包埋试剂会对肌动蛋白 F-actin 造成破坏，会出现染色不上的情况。

- 问：活细胞样本经固定后未进行通透可以染上骨架，但只能染上部分细胞是为什么？

答：经 4% 多聚甲醛固定的细胞，虽细胞形态和结构仍可保持，但因固定剂的溶脂特性导致细胞膜的通透性发生改变，所以导致 BF™ 标记鬼笔环肽可以进入到细胞对 F-actin 进行染色。又因未进行 Triton X-100 通透，所以导致部分细胞被染上。解决方法是：固定且通透。

