

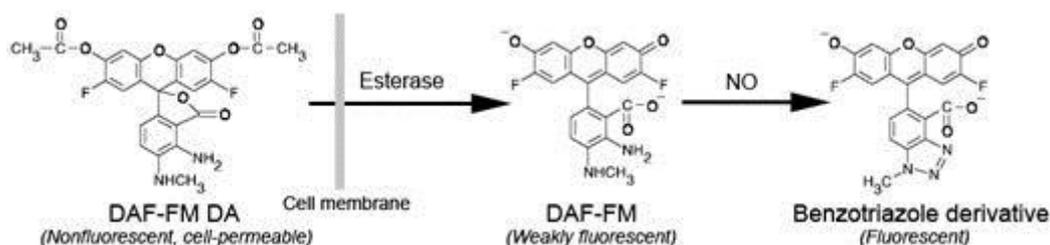
## DAF-FM DA

### NO 荧光探针

产品编号	产品名称	规格
BL767A	DAF-FM DA(NO荧光探针)	100T

#### 产品简介:

DAF-FM DA 即 3-Amino,4-aminomethyl-2',7'-difluorescein, diacetate, 也称 DAF-FM diacetate 或 4-Amino,5-aminomethyl-2',7'-difluorescein, diacetate。DAF-FM DA 是最新一代用于一氧化氮定量检测的荧光探针, 比以前比较常用的一氧化氮荧光检测探针 DAF-2 diacetate 有多方面的改进。首先, DAF-FM DA 和 DAF-2 diacetate 相比, 最后和一氧化氮反应形成的荧光产物受 pH 值的影响小, 在 pH 值大于 5.5 时不受 pH 值的影响。其次, DAF-FM DA 和 DAF-2 diacetate 相比, 前者产生的荧光更加稳定, 不容易淬灭, 这样更加便于检测。另外, DAF-FM DA 和 DAF-2 diacetate 相比, 前者对一氧化氮的检测灵敏度更高, 相同条件下检测灵敏度可以提高接近 2 倍, 最低检测浓度可以达到 3nM。



DAF-FM DA 可以穿过细胞膜(cell-permeable), 进入细胞后可以被细胞内的酯酶催化形成不能穿过细胞膜的 DAF-FM。DAF-FM 本身仅有很弱的荧光, 但在和一氧化氮反应后可以产生强烈荧光, 激发波长为 495nm, 发射波长为 515nm。DAF-FM DA 检测一氧化氮的机制可以参考上图。任何可以检测 fluorescein 的仪器, 包括荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、流式细胞仪、荧光分光光度计或荧光酶标仪都可以用于该荧光探针的检测。右图为 DAF-FM 在不同浓度一氧化氮存在时的发射荧光扫描图谱(fluorescence emission spectra)。DAF-FM DA 的分子量为 496.4, 分子式为  $C_{25}H_{18}F_2N_2O_7$ , HPLC 分析纯度大于 98%。本 DAF-FM DA 为溶解于 DMSO 的淡黄色溶液, 浓度为 5mM。

本荧光探针适合于检测细胞内的一氧化氮水平, 可以进行实时检测。如果收集细胞后再装载探针, 通常至少可以检测 100 个样品。

#### 产品组成:

组分	名称	规格	保存
BL767A	NO 荧光探针	20 $\mu$ l	-20 $^{\circ}$ C避光

#### 使用方法:

##### 一、制备工作液

工作液必须新鲜配制, 实验结束即可丢弃稀释过的多余探针, 染料在水溶液中更容易氧化分解, 请尽快用完。本试剂盒提供的探针, 可以满足切片或悬浮细胞(设置加载孵育液体体积每个反应不超过 0.5mL 的情况下)至少 100tests。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.  
注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。



## 二、 装载探针

对于刺激时间较短(通常为 2 小时以内)的细胞,先装载探针,后用适当的阳性对照及自己感兴趣的药物刺激细胞。对于细胞刺激时间较长(通常为 6 小时以上)的细胞,先用适当的阳性对照及自己感兴趣的药物刺激细胞,后装载探针。

**原位装载探针:** 本方法仅适用于贴壁培养细胞。按照 1:1000 比例,用合适的新鲜培养基(不含血清和酚红)稀释 DAF-FM DA,使终浓度为 5 微摩尔/升。去除细胞培养液,加入适当体积稀释好的 DAF-FM DA。加入的体积以能充分盖住细胞为宜,通常对于六孔板的一个孔加入稀释好的 DAF-FM DA 的体积为 1 毫升。37°C 细胞培养箱内孵育 20 分钟。用 PBS(pH7.4)洗涤细胞三次,以充分去除未进入细胞内的 DAF-FM DA。

**收集细胞后装载探针:** 按照 1:1000 比例,用合适的新鲜培养基(不含血清和酚红)稀释 DAF-FM DA,使终浓度为 5 微摩尔/升。细胞收集后,用稀释好的 DAF-FM DA 重悬细胞,细胞浓度为二百万至二千万/毫升,37°C 细胞培养箱内孵育 20 分钟。上述操作可以在离心管内进行。每隔 3-5 分钟颠倒混匀一下,使探针和细胞充分接触。用 PBS(pH7.4)洗涤细胞三次,以充分去除未进入细胞内的 DAF-FM DA。直接用适当的阳性对照或自己感兴趣的药物刺激细胞,或把细胞等分成若干份后再刺激细胞。

**注:** 一般来说,只要能获得足够的荧光信号即可,尽量选择最小浓度的探针染料,尽量减少酯的水解副产物(甲醛和乙酸)的富集。加载条件的选择尽可能考虑原有细胞的自然生长条件。一些研究者给出的建议是:生理温度较之室温对于染料的加载效果更好。第一次使用时请分装成小包装后-20°C 保存,以避免反复冻融。

## 三、 检测

对于原位装载探针的样品可以用激光共聚焦显微镜直接观察(用普通的荧光显微镜观察效果相对较差),或收集细胞后用荧光分光光度计、荧光酶标仪或流式细胞仪检测。对于收集细胞后装载探针的样品可以用荧光分光光度计、荧光酶标仪或流式细胞仪检测,用激光共聚焦显微镜直接观察也可以。

### 参数设置

使用 495nm 激发波长,515nm 发射波长,实时、逐时间点或单时间点检测刺激前后荧光的强弱。DAF-FM 和一氧化氮反应产物的荧光光谱和 fluorescein 非常相似,可以用检测 fluorescein 的参数设置进行检测,用检测 FITC 的参数设置进行检测也可以。

## 四、 其它说明

上述推荐的 DAF-FM DA 的工作浓度为 5 微摩尔/升,对于某些细胞,如果发现没有刺激的阴性对照细胞荧光也比较强,可以按照 1:2000-1:5000 的比例稀释 DAF-FM DA,使装载时 DAF-FM DA 的浓度为 1-2.5 微摩尔/升。相反,如果发现用感兴趣的药物刺激后荧光较弱,可以把 DAF-FM DA 的工作浓度为调整为 10 微摩尔/升,以提高检测的灵敏度。另外,探针装载的时间也可以根据情况在 15-60 分钟内适当进行调整。

## 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。

## 有效期:

-20°C 避光保存六个月。

