

DAF-FM DA (NO 荧光探针) 说明书

货号: D6550

规格: 100T (以 96 孔板为例)

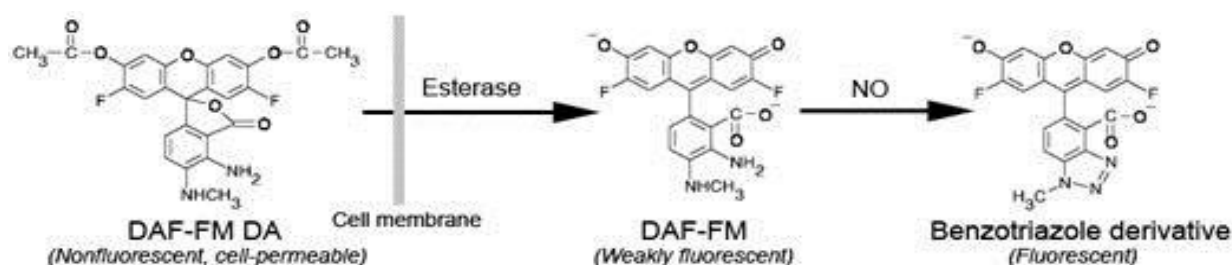
保存: -20°C避光保存,有效期 1 年。

产品内容:

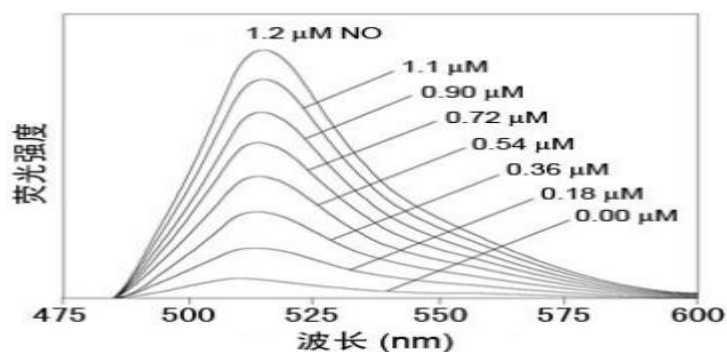
产品名称	规格
DAF-FM DA (NO 荧光探针) 5mM	20 μ l
DAF-FM DA 稀释液	50ml

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是最新一代用于检测一氧化氮荧光探针,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。下图为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)。



分子量：496.4

分子式： $C_{25}H_{18}F_2N_2O_7$

纯度： $\geq 98\%$

性质：溶解于DMSO的淡黄色溶液，浓度为5mM

应用范围：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。

操作步骤：

1. 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，用本试剂盒提供的DAF-FM DA稀释液稀释DAF-FM DA，使终浓度为5 μ M。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1ml。37 $^{\circ}$ C细胞培养箱内孵育20分钟。用PBS，(PH7.2-7.4)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，用本试剂盒提供的DAF-FM DA稀释液稀释DAF-FM DA，使终浓度为5 μ M。细胞收集后，用稀释好的DAF-FM DA重悬细胞，细胞浓度为 1×10^6 - 2×10^7 /ml，37 $^{\circ}$ 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。

2. 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。

3. 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。

4. 其它说明

上述推荐的DAF-FM DA的工作浓度为5uM，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，使装载探针时DAF-FM DA的浓度为1-2.5uM。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10uM，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. BSA和酚红(phenol red)对本荧光探针的检测有干扰，需避免。
2. 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。
3. 荧光探针应随用随配。配制好的探针工作液应立即使用，不能以后再用。
4. 用PBS, (PH=7.2-7.4)充分清洗细胞直至去除多余探针，更换新鲜缓冲液再孵育15-30min，使得细胞内脂酶能将探针充分去酯化。
5. DAF-FM DA在4° C、冰浴等较低温度情况下会凝固而粘在离心管管底、管壁或管盖内，可以20-25° C水浴温育片刻至全部融解后使用。
6. 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，不得存放于普通住宅内。
7. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。