

DAF-FM DA(NO 荧光探针)

产品编号	产品名称	包装
MA0200	DAF-FM DA(NO 荧光探针)	100T

产品简介:

DAF-FM DA 即 4-Amino-5-Methylamino-2,7-Difluorofluorescein Diacetate, 也称 DAF-FM Diacetate, 是用于一氧化氮 (nitric oxide, NO) 定量检测的探针, 其检测原理为: DAF-FM DA 可以穿过活细胞膜, 进入细胞后可以被胞浆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, 但在与 NO 反应后会生成荧光素-苯并三氮唑 (benzotriazole), 可以产生强烈绿色荧光。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。

DAF-FM DA 新一代 NO 检测探针, 与以往的一氧化氮荧光检测探针 DAF-2 DA 相比较, 主要有以下优势: 一是 DAF-FM DA 和 NO 反应形成的荧光产物在 pH5.5 以上不受 pH 影响; 二是反应产物荧光更加稳定, 不容易淬灭, 更加便于检测; 三是 DAF-FM DA 的最低检测浓度可达到 3nM, 与 DAF-2 DA 相比最低检测浓度提高近 2 倍。

本 DAF-FM DA 为溶解于 DMSO 的淡黄色溶液, 浓度为 5mM。通常至少可以检测 100 个样品。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
1	DAF-FM DA(NO 荧光探针)	20 μ l
2	DAF-FM DA(NO 荧光探针)稀释液	50ml
3	说明书	1份

保存条件:

-20℃ 保存, DAF-FM DA 需避光保存, 1 年有效。

使用说明:

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/L。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℃ 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/L。细胞收集后, 用稀释好的 DAF-FM DA 重悬细胞, 细胞浓度为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ cell/mL, 37℃ 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 5 μ M/L，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 1-2.5 μ M/L。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 μ M/L，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 和酚红对该荧光探针的检测有干扰，需避免。
- 2、第一次使用前请将本品分装并于-20 $^{\circ}$ C冻存，避免反复冻存；荧光探针工作液需立刻使用，不能长时间保存。
- 3、DAF-FM DA 在 4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C温浴片刻至全部融解后使用。
- 4、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。