

## 一氧化氮检测试剂盒 (DAF-FM DA)

产品编号: MA0656 规格: 100T/500T

### 产品内容

产品组成	MA0656-1	MA0656-2
DAF-FM DA (5mM)	20 $\mu$ L	100 $\mu$ L
检测缓冲液	50mL	250mL
NOup (200 $\times$ )	20 $\mu$ L	100 $\mu$ L
说明书	1 份	1 份

### 产品简介

一氧化氮检测试剂盒 (DAF-FM DA) 是以 DAF-AM DA 为荧光探针, 快速高灵敏地检测培养的细胞内一氧化氮含量变化的试剂盒。

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, 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 pH 5.5 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。

DAF-FM DA 检测 NO 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。

本试剂盒提供的 DAF-FM DA 为 5mM 储存液。DAF-FM DA 的终浓度通常为 1-10 $\mu$ M, 最优先的推荐终浓度为 5 $\mu$ M。外源性添加的 NOup (200 $\times$ ), 推荐终浓度为 0.5-2 $\times$ , 最优先的推荐终浓度为 1 $\times$ 。本试剂盒可使用荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、流式细胞仪、荧光酶标仪等荧光检测设备进行检测。同时, 本试剂盒提供了检测缓冲液及阳性对照 NOup, 使用更便捷。

本试剂盒适合用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, 通常小包装至少可以检测 40 个样品, 中包装至少可以检测 200 个样品。6 孔板每孔检测体系的体积为 1mL 时, 小包装和中包装分别约可以检测 20 和 100 次。48 孔板每孔检测体系为 200 $\mu$ L 时, 分别可以检测 100 次和 500 次。96 孔板每孔检测体系为 100 $\mu$ L 时, 分别可以检测 200 次和 1000 次。

### 使用方法

#### (一) 阳性对照的设置:

- 1、在设置为阳性对照的孔中提前 30min 加入 NOup (200 $\times$ ), 使用完全培养基稀释即可。
- 2、吸出培养基, 在离心管中用检测缓冲液将 DAF-FM DA 稀释 1000 倍, 同时再加入 1/200 的



NOup, 混合均匀后, 加入孔中。37°C 孵育 20min。

3、PBS 洗涤 2-3 次后, 显微镜下观察拍照。

## (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, 用本试剂盒提供的检测缓冲液稀释 DAF-FM DA, 使终浓度为 5 $\mu$ M。去除细胞培养液, PBS 洗涤 2 次后, 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°C 细胞培养箱内孵育 20min。用 PBS 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, 用本试剂盒提供的检测缓冲液稀释 DAF-FM DA, 使终浓度为 5 $\mu$ M。离心收集细胞, PBS 洗涤 2 次后, 用稀释好的 DAF-FM DA 重悬细胞, 细胞浓度为  $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$  个/mL, 37°C 细胞培养箱内孵育 20min。上述操作可以在离心管内进行。每隔 3-5min 颠倒混匀一下, 使探针和细胞充分接触。用 PBS 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。

## (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。

## (四) 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。

## (五) 其它说明:

上述推荐的 DAF-FM DA 的工作浓度为 5 $\mu$ M, 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 $\mu$ M。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 的工作浓度调整为 10 $\mu$ M, 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 15-60min 内适当进行调整。

## 保存条件

-20°C 避光密闭保存, 自生产之日起 12 个月有效。

## 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℃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 2-8℃、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℃温浴片刻至全部融解后使用。
- 4、仅在阳性对照孔中加入 NOup 作为阳性对照，其余孔不必加入 NOup。
- 5、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

