

DAF-FM DA Solution (5mM in DMSO) 一氧化氮检测探针

产品信息

产品名称	产品编号	规格
DAF-FM DA Solution (5mM in DMSO) 一氧化氮检测探针	40769ES60	100 T

产品描述

DAF-FM DA 即 4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein Diacetate, 也称 DAF-FM Diacetate, 是最新一代用于一氧化氮 (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 (cell-permeable), 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, 光量子约 0.005, 但在与 NO 反应后生成荧光素-苯并三氮唑 (benzotriazole), 发强烈绿色荧光, 光量子约 0.81。Ex~495 nm, Em~515 nm。任何可以检测荧光素 (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。

DAF-FM DA 是最新一代 NO 检测探针, 与以往最成功且应用最广泛的一氧化氮荧光检测探针 DAF-2 Diacetate 相比较, 具有多方面的改进: 1) DAF-FM DA 和 NO 加合反应形成的荧光产物在 pH5.5 以上不受 pH 影响; 2) DAF-FM DA 和 NO 加合反应形成的产物荧光更加稳定, 不容易淬灭, 这样更加便于检测; 3) DAF-FM DA 对一氧化氮的检测灵敏度更高, 其最低检测浓度可达到 3 nM, 而 DAF-2 Diacetate 的最低检测浓度约为 5 nM。

本品为溶解于 DMSO 的淡黄色溶液, 浓度为 5 mM。本品适用于检测细胞内的一氧化氮水平, 推荐工作浓度为 1-10 μ M。如果收集细胞后再装载探针, 通常至少可以检测 100 个样品。

产品性质

英文别名 (English Synonym) 4-Amino-5-(N-methylamino)-3',6'-bis(acetyloxy); Diaminofluorescein-FM diacetate; 3-Amino,4-aminomethyl-2',7'-difluorescein, diacetate; 4-Amino-5-(N-methylamino)-3',6'-bis(acetyloxy)-2',7'-difluoro-spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one;

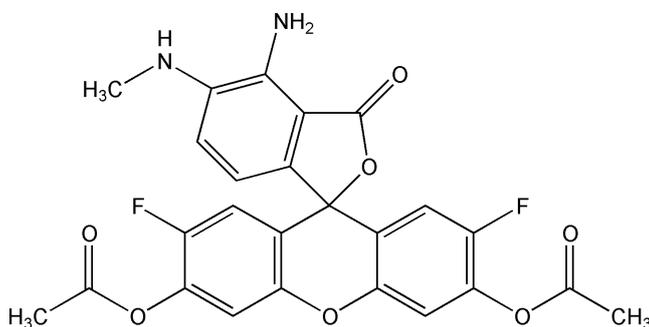
CAS 号 (CAS NO.) 254109-22-3

分子式 (Formula) C₂₅H₁₈F₂N₂O₇

分子量 (Molecular Weight) 496.42

纯度 (Purity) >98%

结构式 (Structure)



产品组分

组分编号	组分名称	规格	保存方式
40769-A	DAF-FM DA 储存液 DAF-FM DA Solution (5 mM)	20 μ L	-20°C 避光保存
40769-B	DAF-FM DA 稀释液 DAF-FM DA Diluent	50 mL	-20°C 保存

运输和保存方法

冰袋运输。-20℃保存，DAF-FM DA 需避光保存，一年有效。

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) 使用前请将本品分装成小规格于-20℃冻存，以避免反复冻存；
- 3) 荧光探针工作液需现配现用。
- 4) DAF-FM DA 在 4℃、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℃温浴片刻至全部溶解后使用。
- 5) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用方法

1. 装载探针

【注意】:

- a, 对于刺激时间较短（通常为 2 h 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 h 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。
- b, DAF-FM DA 探针的推荐使用浓度为 1-10 μM ，初次使用需根据自身实验体系来进行加载浓度，孵育时间和温度的优化。原则上来说，以最低浓度探针检测且产生足量信噪比的荧光信号为宜。另缩短孵育时间可减少亚细胞区室化现象。
- c, 以下步骤使用的工作浓度（1:1000 倍稀释，即 5 μM ）和孵育时间（37℃，20 min）仅做为参考，可根据实际情况来调整。比如，对于某些细胞，如果发现未被刺激的阴性对照细胞荧光也比较强，可降低 DAF-FM DA 的加载浓度至 1-2.5 μM 。相反，如果发现用感兴趣的药物刺激后荧光较弱，可升高 DAF-FM DA 的加载浓度为 10 μM ，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 min 内适当进行调整，孵育温度在 4℃-37℃内调整。

1.1 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 DAF-FM DA 稀释液稀释 DAF-FM DA（5 mM），即终浓度为 5 μM 。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，通常情况下六孔板内单孔需要约 1 mL 的 DAF-FM DA 工作液。37℃孵育 20 min。PBS，pH7.4 洗涤细胞三次，以充分去除未进入细胞内的 DAF-FM DA。

1.2 收集细胞后装载探针：本方法适用于贴壁细胞和悬浮培养细胞。

按照 1:1000 比例，用 DAF-FM DA 稀释液稀释 DAF-FM DA（5 mM），即终浓度为 5 μM 。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℃孵育 20 min。上述操作可以在离心管内进行。每隔 3-5 min 颠倒混匀一下，使探针和细胞充分接触。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

- 2.1 对于原位装载探针的样品可以用激光共聚焦显微镜或普通的荧光显微镜直接观察，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。
- 2.2 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，也可用激光共聚焦显微镜直接观察。

3. 参数设置

使用 $E_x=495 \text{ nm}$ ， $E_m=515 \text{ nm}$ ，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 NO 反应产物的荧光光谱和荧光素（fluorescein）非常相似，可以用检测荧光素（fluorescein）的参数设置进行检测，也可用检测 FITC 的参数设置进行检测。