

DAF-FM DA (5mM in DMSO)一氧化氮 (NO) 荧光探针

产品编号	产品名称	包装规格
NBS5935-100T	DAF-FM DA (5mM in DMSO)一氧化氮 (NO) 荧光探针	100T

产品简介:

DAF-FM DA, 也称为 DAF-FM Diacetate, 或 4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein Diacetate, 是新一代用于检测和定量一氧化氮 (Nitric oxide, NO) 的荧光探针。具有细胞膜渗透性, 无荧光。一旦进入细胞后, 被细胞内的酯酶催化形成不具有膜渗透性的 DAF-FM。DAF-FM 本身仅有弱荧光, 但和 NO 反应后可产生强烈荧光, 最大激发波长为 495nm, 最大发射波长为 515nm。任何可以检测荧光素的仪器都能检测, 包括流式细胞仪、荧光显微镜、荧光酶标板和荧光计。

与传统的 NO 荧光探针—DAF-2 DA 相比, DAF-FM DA 具有以下重要优势: a) DAF-FM-NO 加合物的光谱特性在 pH 5.5 以上不受 pH 影响; b) DAF-FM-NO 加合物具有更显著的光稳定性, 意味其提供更多的时间来捕捉图像; c) DAF-FM 对 NO 的检测灵敏度更高, 前者的检测下限~3nM; 而 DAF-2 的检测下限~5nM。

本品以溶于 DMSO 的储存液形式提供, 浓度为 5mM。使用简单, 只需用合适的生理缓冲液或培养基稀释到相应的工作浓度即可。建议起始工作浓度范围是 1-10 μ M。

本品适合细胞内 NO 的检测, 可以进行实时检测。若收集细胞后再装载探针, 通常至少能检测 100 个样品。

产品特性

1) CAS NO.: 254109-22-3

2) 化学名:

3',6'-bis(acetyloxy)-4-amino-2',7'-difluoro-5-(methylamino)-spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H] xanthen]-3-one

3) 英文同义名: DAF-FM Diacetate; 4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein Diacetate; 3-Amino, 4-aminomethyl-2',7'-difluorofluorescein Diacetate; Diaminofluorescein-FM diacetate;

- 4) 中文同义名: DAF-FM 二乙酸盐; 二氨基荧光素-FM 二乙酸盐; 4-氨基-5-甲氨基-2',7'-二氟荧光素二乙酸盐; 3-氨基, 4-甲氨基-2',7'-二氟荧光素二乙酸盐;
- 5) 分子式: C₂₅H₁₈F₂N₂O₇
- 6) 分子量: 496.42
- 7) 纯度: ≥98% (HPLC)
- 8) 外观: 无色至淡黄色溶液
- 9) Ex/Em: ~495/515 nm (DAF-FM)

保存条件:

-20°C避光干燥保存, 1 年有效。

产品组成:

组分	名称	规格	保存条件
NBS5935-A	DAF-FM DA (5mM in DMSO)	20μl	-20°C 避光
NBS5935-B	Dilution Buffer 稀释缓冲液	50ml	-20°C 或+4°C

产品使用:

一、工作液制备

取适量的母液用本试剂盒提供的稀释缓冲液或自行准备的新鲜培养基 (不含血清和酚红) 稀释到工作浓度, 比如取 5μl DAF-FM DA(5mM)按照 1: 1000 的比例稀释到 5ml DAF-FM DA(5μM)工作液, 充分混匀。

【注意】工作液必须现配现用, 实验结束后需丢弃多余探针。由于染料在水溶液中更容易氧化分解, 为此, 请尽快用完。

【注意】探针的最佳工作浓度需根据自身的细胞类型或实验条件来摸索, 或参考文献。一般情况下, 在保证获得足量荧光信号的前提下, 尽量选择最小浓度的探针, 这样可尽量减少酯的水解副产物如甲醛和乙酸的富集。

二、探针装载

对于刺激时间较短 (通常为 2h 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 6h 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。

2.1 探针原位装载 (仅适用于贴壁细胞)

a) 去除细胞培养液，加入适当体积准备好的 DAF-FM DA 工作液（比如按 1: 1000 倍稀释后的工作液）。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工作液体积为 1ml。

b) 37°C 孵育 20min。

c) 用 PBS, pH7.4 洗涤细胞 3 次，以充分去除未进入细胞内的 DAF-FM DA。

2.2 收集细胞后探针装载

a) 细胞收集后，用适当体积准备好的 DAF-FM DA 工作液（比如按 1: 1000 倍稀释后的工作液）重悬细胞，使得细胞浓度为二百万至二千万/毫升。

b) 37°C 孵育 20min。以上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。c) 用 PBS, pH7.4 洗涤细胞 3 次，以充分去除未进入细胞内的 DAF-FM DA。

d) 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、荧光检测

3.1 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。

3.2 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，用激光共聚焦显微镜直接观察也可以。

3.3 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-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、其他说明

4.1 上述步骤推荐 DAF-FM DA 的工作浓度为 5 μ 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 的工作浓度为 1-2.5 μ 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 的工作浓度为调整为 10 μ M，以提高检测的灵敏度。

4.2 探针装载的时间可以根据情况在 15-60min 内适当进行调整。

注意事项：

1. DAF-FM DA 在 4°C、冰浴等较低温度下会凝固而粘附在离心管管底、管壁或管盖内，可在 25°C 温育片刻直至完全溶解后再使用。
2. 第一次使用本品，请置于室温或 25°C 温育片刻直至完全溶解后，低速离心后，根据单次用量分成小包装后 -20°C 避光干燥保存，避免反复冻融。

3. BSA 和酚红对 DAF-FM 的荧光检测有干扰, 请避免体系内含有这些组分。
4. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

本产品仅用于生命科学研究, 不得用于医学诊断及其它用途!

相关产品:

产品编号	产品名称	用途
NBS5870-5mg	Carboxy-PTIO (cPTIO) 一氧化氮 (NO) 清除剂	一氧化氮 (NO) 清除剂
NBS5933-25mg	PTIO 一氧化氮 (NO) 清除剂	一氧化氮 (NO) 清除剂
NBS5934-50ug	DAF-FM DA 一氧化氮 (NO) 荧光探针 (固体粉末)	细胞水平的一氧化氮 (NO) 荧光探针
NBS5935-100T	DAF-FM DA (5mM in DMSO) 一氧化氮 (NO) 荧光探针	细胞水平的一氧化氮 (NO) 荧光探针
NBS5936-100ug	DAF-2 DA 一氧化氮 (NO) 荧光探针	细胞水平的一氧化氮 (NO) 荧光探针
NBS5937-100ug	DAF-2 一氧化氮 (NO) 荧光探针	溶液体系的一氧化氮 (NO) 荧光探针
NBS5938-100ml	Lysis Buffer for Nitric Oxide Assay	一氧化氮 (NO) 分析专用裂解液
NBS5939-500T	Nitric Oxide Colorimetric Assay Kit	一氧化氮 (NO) (显色法), 定量检测细胞、组织或培养液内的亚硝酸盐量, 间接反映一氧化氮水平。
NBS5940-50T	Total Nitric Oxide Colorimetric Assay Kit	总一氧化氮 (NO) (显色法), 定量检测细胞、组织或培养液内的亚硝酸盐量, 间接反映总一氧化氮水平。
NBS5941-25g	Sodium Nitroprusside (SNP)	一氧化氮 (NO) 供体
NBS5942-5mg	S-Nitrosoglutathione (GSNO)	一氧化氮 (NO) 供体