

## DAF-2 DA (4,5-Diaminofluorescein diacetate)

### 一氧化氮检测探针

#### 产品信息

产品名称	产品编号	规格
DAF-2 DA (4,5-Diaminofluorescein diacetate) 一氧化氮检测探针	40770ES60	100 µg

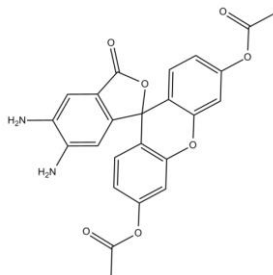
#### 产品描述

DAF-2 DA 即 4,5-Diaminofluorescein diacetate 4,5-二氨基荧光素衍生物，是一种用于检测一氧化氮（NO）的荧光探针。DAF-2 DA 具有细胞通透性，进入细胞后被细胞内的酯酶催化形成不能穿过细胞膜的 DAF-2。DAF-2 本身具有很弱的荧光，当氧气存在时，DAF-2 与 NO 反应生成强荧光的三唑荧光素（DAF-2T），激发波长为 491 nm，发射波长为 513 nm。可以通过荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、流式细胞仪、酶标仪等仪器检测探针的荧光强度。DAF-2 DA 是一种较灵敏的荧光探针，中性 pH 下 NO 的检测下限可达到 2-5 nM。

将该产品用 DMSO 配置成液体，100 µg 的 DAF-2 DA 溶于 200 µL 的 DMSO 中，浓度是：1 mM。

#### 产品性质

中文别名 (Chinese Synonym)	4,5-二氨基荧光素衍生物
产品名称 (English Synonym)	DAF-2 DA (4,5-Diaminofluorescein diacetate)
CAS 号 (CAS NO.)	205391-02-2
分子式 (Formula)	C <sub>24</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
分子量 (Molecular Weight)	446.41
激发和发射 (E <sub>x</sub> 和 E <sub>m</sub> )	E <sub>x</sub> = 491 nm 和 E <sub>m</sub> = 513 nm
溶解性 (Solubility)	易溶于 DMSO (≥5 mM)
结构式 (Structure)	



#### 运输和保存方法

冰袋运输。-20 °C 避光保存，避免反复冻融，有效期一年。

#### 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) DAF-2 DA 在低温环境中，可能会凝固，使用前可以放在 2--25 °C 水浴锅中加热一段时间，使其全部溶解后再使用。
- 3) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 4) 溶解前请先短暂离心，以保证产品全在管底。
- 5) 本产品仅用于科研用途，禁止用于人身上。

#### 使用说明

## 1. 装载探针

### 注意:

- 拿到产品溶液后, 建议先分装, 避光保存在-20 °C冰箱中。稀释后的工作液要现配现用。
- 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。
- DAF-2 DA 探针的推荐使用浓度为 1-10  $\mu\text{M}$ , 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。
- 以下步骤使用的工作浓度(5  $\mu\text{M}$ )和孵育时间(37 °C, 20 min)仅做参考, 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-2 DA 的加载浓度至 1-2.5  $\mu\text{M}$ 。相反, 如果发现用感兴趣的药物刺激后荧光较弱, 可升高 DAF-2 DA 的加载浓度为 10  $\mu\text{M}$ , 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 15-60 min 内适当进行调整, 孵育温度在 4 °C-37 °C 内调整。

### 1.1 原位装载探针: 本方法仅适用于贴壁细胞

按照 1:200 的比例, 用适当的缓冲溶液(PBS、HBSS、DPBS、无血清的培养基)稀释 DAF-2 DA (1 mM) 母液, 即终浓度为 5  $\mu\text{M}$  的工作液。去除细胞培养液, 加入适当体积稀释好的 DAF-2 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-2 DA 工作液。37 °C 孵育 20 min。然后用 PBS (pH 7.4) 洗涤细胞三次, 以充分去除未进入细胞内的 DAF-2 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细胞

按照 1:200 比例, 用适当的缓冲溶液(PBS、HBSS、DPBS、无血清的培养基)稀释 DAF-2 DA (5 mM), 即终浓度为 5  $\mu\text{M}$  的工作液。细胞收集后, 用稀释好的 DAF-2 DA 重悬细胞, 细胞浓度为  $1 \times 10^6$ - $2 \times 10^7$ /mL, 37 °C 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。然后用 PBS (pH 7.4) 洗涤细胞三次, 以充分去除未进入细胞内的 DAF-2 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。
- 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

在激发和发射波长分别为 491 nm 和 513 nm 处, 实时、逐时间点或单时间点检测刺激前后荧光的强弱。根据荧光强弱的变换, 来分析判断细胞中一氧化氮(NO)的含量高低。