

## 一氧化氮检测试剂盒(DAF-FM DA)

产品编号	产品名称	包装
S0020S	一氧化氮检测试剂盒(DAF-FM DA)	>100次
S0020M	一氧化氮检测试剂盒(DAF-FM DA)	>500次

### 产品简介:

- 碧云天生产的一氧化氮检测试剂盒(DAF-FM DA) (Nitric Oxide Assay Kit with DAF-FM DA), 是一种以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。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。
- 一氧化氮(Nitric oxide)是一种无机氮氧化物, 作为一种反应性自由基, 因其分子量小且具有亲脂性, 可快速扩散通过生物膜, 可作为信号分子将一个细胞产生的信号传递给周围的细胞, 具有舒张血管、调节免疫、抑制炎症反应、参与调节神经元兴奋性和神经递质的释放、DNA的修复和保护等功能, 在神经系统、免疫系统、心血管系统、细胞凋亡等重要生理过程中发挥着不可或缺的作用[1-3]。
- DAF-FM DA, 即 3-Amino,4 aminomethyl 2',7'-difluorescein, diacetate, 也称 DAF-FM diacetate 或 4-Amino,5 aminomethyl-2',7'-difluorescein, diacetate。DAF-FM DA是新一代用于一氧化氮定量检测的荧光探针, 比以前比较常用的一氧化氮荧光检测探针DAF-2 diacetate有多方面的改进。首先, DAF-FM DA和DAF-2 diacetate相比, 最后和一氧化氮反应形成的荧光产物受pH值的影响小, 在pH值大于5.5时不受pH值的影响。其次, DAF-FM DA和DAF-2 diacetate相比, 前者产生的荧光更加稳定, 不容易淬灭, 这样更加便于检测。另外, DAF-FM DA和DAF-2 diacetate相比, 前者对一氧化氮的检测灵敏度更高, 相同条件下检测灵敏度可以提高接近2倍, 最低检测浓度可以达到3nM [4,5]。
- 本试剂盒检测一氧化氮的原理如图1所示。DAF-FM DA可以穿过细胞膜(Cell-permeable), 进入细胞后可以被细胞内的酯酶催化形成不能穿过细胞膜的DAF-FM。DAF-FM本身仅有微弱的荧光, 但在和一氧化氮反应后可以产生强烈荧光, 激发波长为495nm, 发射波长为515nm。任何可以检测Fluorescein绿色荧光的仪器, 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本荧光探针的检测。

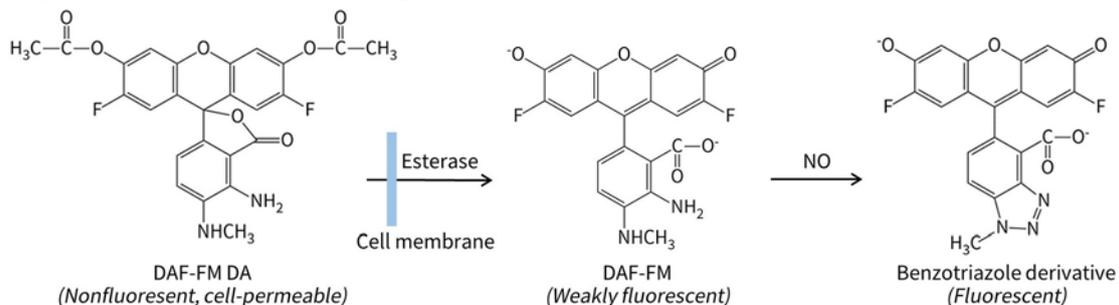


图1. 碧云天一氧化氮检测试剂盒(DAF-FM DA) (S0020)检测原理图。

- 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。
- 本试剂盒提供了诱导细胞产生一氧化氮的阳性对照试剂NOup。本试剂盒提供的NOup是一种200X的混合物(Compound mixture), 推荐终浓度为0.5-2X, 最优先的推荐终浓度为1X。同时, 本试剂盒提供了检测缓冲液, 使用更便捷。使用本试剂盒检测NRK-52E (大鼠肾小管上皮细胞)细胞内一氧化氮的效果参考图2。

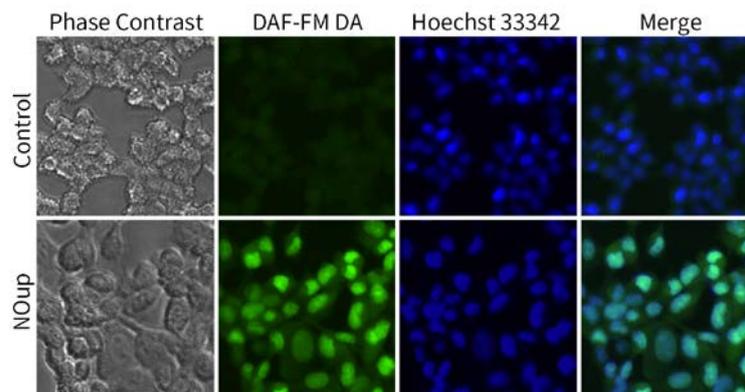


图2. 碧云天一氧化氮检测试剂盒(DAF-FM DA) (S0020)检测NRK-52E (大鼠肾小管上皮细胞)一氧化氮的效果图。NRK-52E细胞不处理或用阳性对照试剂NOup处理后, 使用本试剂盒和Hoechst 33342进行染色。正常的NRK-52E细胞中DAF-FM DA被细胞内的酯酶催化形成DAF-FM, 细胞中的绿色荧光非常弱; 使用一氧化氮阳性对照试剂NOup处理使细胞内一氧化氮水平快速升高, DAF-FM与一氧化氮反应, 细胞中的绿色荧光显著增强。蓝色荧光为Hoechst 33342染色的细胞核。本试剂盒中不提供Hoechst 33342, 如有需要, 可根据实际情况向碧云天选购Hoechst 33342染色液相关产品(C1022/C1025-C1029)。实际结果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中效果仅供参考。

- 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100个样品, 中包装至少可以检测500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100和500次。

### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
S0020S-1	DAF-FM DA (5mM)	20μl
S0020S-2	检测缓冲液	50ml
S0020S-3	NOup (200X)	20μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
S0020M-1	DAF-FM DA (5mM)	100μl
S0020M-2	检测缓冲液	250ml
S0020M-3	NOup (200X)	100μl
—	说明书	1份

### 保存条件:

-20°C保存, 一年有效。其中DAF-FM DA (5mM)须避光保存。

### 注意事项:

- DAF-FM DA (5mM)和NOup (200X)第一次使用时请分装成小包装后-20°C保存, 避免反复冻融。
- 荧光探针应随用随配。配制好的DAF-FM DA染色工作液应立即使用, 不能以后再用。
- DAF-FM DA (5mM)在4°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°C水浴温育片刻至全部融解后使用。
- BSA和酚红(Phenol red)对DAF-FM DA的检测有干扰, 需避免。
- 荧光染料均存在淬灭问题, 请尽量注意避光, 以减缓荧光淬灭。
- 本试剂盒仅限于进行存活的细胞或组织的检测, 不可用于固定或冻存的细胞或组织样品的检测。
- 检测缓冲液经过过滤除菌处理, 在使用时须注意避免微生物污染, 否则很可能影响染色效果。如果检测缓冲液发生浑浊等明显的微生物污染, 就不能继续使用。
- 荧光酶标仪检测时须使用适合荧光检测的黑板或白板, 推荐使用碧云天BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装)(FCP966)或BeyoGold™黑色透明底96孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装)(FCP965)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 使用说明:

#### 1. DAF-FM DA染色工作液的配制:

96孔板每孔和6孔板每孔所需DAF-FM DA染色工作液的量为分别为0.1ml和1ml, 其它培养器皿的DAF-FM DA染色工作液的用量以此类推; 对于细胞悬液每50-100万细胞需0.5ml DAF-FM DA染色工作液。取适量DAF-FM DA (5mM), 按照每1μl DAF-FM DA (5mM)加入1ml检测缓冲液的比例稀释DAF-FM DA, 混匀后即即为DAF-FM DA染色工作液。

注1: 配制DAF-FM DA染色工作液时注意避光, 且须现配现用。

注2: DAF-FM DA染色工作液中DAF-FM DA的最终浓度可以根据不同细胞系和实验体系通过预实验进行优化。DAF-FM DA的推荐工作浓度为5μM, 可以在1-10μM范围内摸索最佳工作浓度。

#### 2. 阳性对照的设置:

把试剂盒中提供的NOup (200X)推荐按照1:200的比例加入到细胞培养液中, 处理细胞24小时。随后按照步骤3或4加入DAF-FM DA染色工作液, 进行一氧化氮的检测。对于大多数细胞, 通常NOup (1X)处理24小时后一氧化氮含量会大量增加, DAF-FM DA染色后观察应呈绿色荧光; 而正常的细胞经DAF-FM DA染色后应几乎无荧光或显示微弱的绿色荧光。对于特定的细胞, NOup作用浓度和作用时间可能有所不同, 需自行摸索最佳工作浓度。也可以使用其它验证过的化合物或处理方法作为阳性对照。

注1: 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。

注2: Noup可能对某些细胞效果微弱或者完全没有效果。

#### 3. DAF-FM DA探针的装载:

对于刺激时间较短(通常为2小时以内)的细胞, 先装载DAF-FM DA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如NOup及自己感兴趣的药物刺激细胞,后装载DAF-FM DA探针。

**a. 原位装载探针:** 本方法仅适用于贴壁培养细胞。

- 去除细胞培养液,加入适量步骤1中配制好的DAF-FM DA染色工作液。加入的体积以能充分盖住细胞为宜。
- 37°C细胞培养箱内孵育20分钟。孵育时间可以在15-60分钟内适当调整,不同的细胞最佳孵育时间不同。可以以20分钟作为初始孵育时间,对孵育时间进行适当优化以得到最佳的效果。
- 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。如有需要,此时可以直接用适当的阳性对照或自己感兴趣的药物刺激细胞。

**b. 收集细胞后装载探针:**

- 细胞收集后,用适量步骤1中配制好的DAF-FM DA染色工作液重悬细胞,使细胞密度为100万-2000万/ml。
- 37°C细胞培养箱内孵育20分钟。孵育时间可以在15-60分钟内适当调整,不同的细胞最佳孵育时间不同。可以以20分钟作为初始孵育时间,根据作用细胞对孵育时间进行适当优化以得到最佳的效果。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。
- 37°C孵育结束后,600×g 4°C离心3-4分钟,沉淀细胞。弃上清,注意尽量不要吸除细胞。
- 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。如有需要,此时可以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。

#### 4. 检测:

对于原位装载探针的样品可以用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜直接观察,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,用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜直接观察也可以。

#### 5. 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。

#### 6. 其它说明:

上述推荐的DAF-FM DA的工作浓度为5μM,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1-2.5μM。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10μM,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。

#### 参考文献:

- Yeh JL, Whitney EG, Lamb S, Brophy CM. 1996. 119(1):104-9.
- Cossenza M, Socodato R, Portugal CC, Domith IC, Gladulich LF, et al. Vitam Horm. 2014. 96:79-125.
- Sahebnaasagh A, Saghafi F, Negintaji S, Hu T, Shabani-Borujeni M, et al. 2022. 29(9):1561-1595.
- Kojima H, Urano Y, Kikuchi K, Higuchi T, Hirata Y, et al. Angew Chem Int Ed Engl. 1999. 38(21):3209-3212.
- Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, et al. Anal Chem. 1998. 70(13):2446-2453.

#### 相关产品:

产品编号	产品名称	包装
S0006	L-NAME (eNOS抑制剂)	200mg
S0007	L-Canavanine (iNOS抑制剂)	20mg
S0008-100mg	SMT (iNOS抑制剂)	100mg
S0008-1g	SMT (iNOS抑制剂)	1g
S0009	1400W (iNOS抑制剂)	2mg
S0010	Spermidine (nNOS抑制剂)	200mg
S0011	L-NMMA (总NOS抑制剂)	5mg
S0012	L-Arginine (NO前体)	5g
S0015	SNP (NO供体)	1g
S0016	L-Citrulline (NO中间体)	1g
S0017	Hemoglobin (NO清除剂)	1g
S0019S	DAF-FM DA (NO荧光探针)	>100次
S0019M	DAF-FM DA (NO荧光探针)	>500次
S0020S	一氧化氮检测试剂盒(DAF-FM DA)	>100次
S0020M	一氧化氮检测试剂盒(DAF-FM DA)	>500次
S0021S	一氧化氮检测试剂盒	500次
S0021M	一氧化氮检测试剂盒	2500次
S0023	总一氧化氮检测试剂盒	50次

S0024	总一氧化氮检测试剂盒	200次
S0025	一氧化氮合成酶检测试剂盒(荧光法)	100次
S1546	Carboxy-PTIO (一氧化氮清除剂)	5mg
S1547	Carboxy-PTIO (一氧化氮清除剂)	50mg
S3090	细胞与组织裂解液(一氧化氮检测用)	100ml
ST1555-500mg	L-NAME ( $\geq 98\%$ , Reagent grade)	500mg
ST1555-2g	L-NAME ( $\geq 98\%$ , Reagent grade)	2g
ST1555-10g	L-NAME ( $\geq 98\%$ , Reagent grade)	10g

Version 2024.05.24