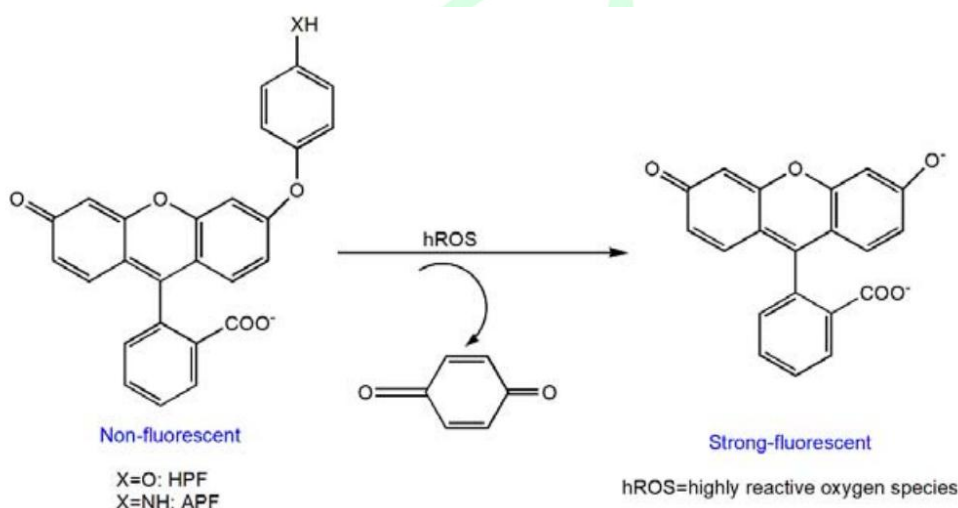


ROS Probe, HPF

产品描述:

氨基苯基荧光素 (APF) 和羟苯基荧光素 (HPF) 是由 T. Nagano 开发的两种活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 指示剂, 比 H₂DCFDA (DCFH-DA, DCFH) 具更优秀的特异性和稳定性。APF 和 HPF 显示有限的非选择性反应, 和相对较高的光诱导氧化抗性。APF 和 HPF 具细胞膜渗透性, 本身无荧光, 能够与高活性氧物质 (hROS), 比如: 羟基自由基、过氧亚硝基阴离子反应, 产生强绿色荧光 (Ex/Em, ~490/515nm) (作用机理见 Fig. 1), 可用荧光显微镜、高通量成像仪、荧光酶标板或流式细胞仪检测。由于 HPF 不会与一氧化氮、超氧化物和过氧化氢反应, 可以用 HPF 来检测不同于一氧化氮和超氧化物的过氧亚硝基水平。



本品以粉末形式提供, 可直接溶于无水 DMF 配制成 5mM 储存液, 常用工作浓度范围 1-10 μ M, 需根据自身的实验体系或参考文献进行优化。

使用方法:

一、储存液制备

将低温保存的 1mg 粉末置于室温回温至少 20min, 之后加入 471 μ l 无水 DMF 配置成 5mM 储存液。充分溶解和混匀后, 按照单次用量分装, -20 $^{\circ}$ C 避光干燥保存, 避免反复冻融。

【注①】: HPF 能溶于 DMSO (10mM), 但有数据显示 DMSO 是羟基自



由基的淬灭剂，会干扰检测和降低灵敏性。因此，建议用 DMF 作为溶剂。

【注②】：与 DMSO 相比，DMF 的细胞毒性相对较高，建议用户在使用过程中，在达到理想荧光信号的前提下使用最低浓度的探针。如果待检细胞在培养的过程中就发现比较敏感（或不好培养），建议在使用 HPF 之前，先做一组溶剂对照组来观察细胞对 DMF 的敏感程度（比如，HPF 建议工作浓度为 1-10 μ M，则溶剂对照组可设置：含 0.02%、0.05%、0.1% 或 0.2% DMF 的生理缓冲液）。若待测细胞对 DMF 很是敏感，建议用无酚红培养基或含钙镁的生理缓冲液来加载探针；贴壁细胞接种在明胶或多聚赖氨酸等细胞外基质包被的培养板上，或更换待测细胞。以上条件都受限制的情况下，或选择 DMSO 作为 HPF 的有机溶剂，尽量降低 DMSO 残留，最大程度降低 DMSO 可能引起的羟基淬灭导致荧光信号降低。

二、溶液体系检测

正式实验前，取一管 HPF 储存液置于室温回温，使其充分融解。之后用合适的缓冲液，pH 7.0-7.5（比如 HHBS 缓冲液，PBS 缓冲液）稀释到所需的工作浓度。建议起始浓度为 1-10 μ M，需根据自身的实验体系或参考文献进行优化。

三、细胞体系检测

以下实验步骤仅做参考，最佳的工作浓度、孵育时间和温度需根据实际情况进行调整。总的来说，最好的状态是在达到理想荧光信号的前提下使用最低浓度的探针。通过降低探针的孵育温度能降低亚细胞区室化现象。在加入 HPF 工作液之前按需处理细胞。

- 1) 根据具体用量，将 DMF 储存液用 HHBS 缓冲液或其他生理缓冲液，pH 7.0-7.5（比如：含钙镁的 PBS，无酚红培养基）稀释成 1-10 μ M 工作液。
- 2) 根据实验设计处理细胞（比如，RASM 细胞用 50-100nM 血管紧张素 II 处理 3-5h）。
- 3) 取步骤 1) 准备的 1-10 μ M 工作液加入细胞，4-37 $^{\circ}$ C 孵育 20-60min。
- 4) 吸掉染色工作液，用 HHBS 或其他生理缓冲液清洗去除多余的探针。之后替换为新鲜的生理缓冲液或培养基。
- 5) 用合适的荧光仪器（Ex/Em=492/515nm）来检测。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

【注①】：BSA、酚红、胺类化合物可能会影响荧光，需谨慎使用。

【注②】：HPF 和 APF 能用于溶液体系或胞内 ROS 检测。

【注③】：稀释后的工作液需现配现用。

注意事项：

- 1) APF 和 HPF 仅用于科研研究，不可用于体外诊断研究。
- 2) APF 和 HPF 产生的荧光相对于其他活性氧探针比如 DCFH 弱很多，这是探针本身的特性决定的。
- 3) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

保存条件：-20℃ 避光干燥保存。

有效期：一年。

