



2',7'-二氯荧光素二乙酸酯

简介:

H2DCFDA(DCFH-DA),英文全名2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetate,中文全名2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯,是一种通用的氧化应激指示剂。具细胞膜渗透性,本身无荧光。一旦进入细胞后,被细胞酯酶水解生成2',7'-二氯二氢荧光素(2',7'-Dichlorodihydrofluorescein,DCFH),之后被快速氧化生成强荧光产物2',7'-二氯荧光素(2',7'-dichlorofluorescein,DCF),可用荧光光谱检测(Ex/Em=504/529nm)。适用于检测活性氧(ROS)和一氧化氮($\cdot$ NO),以及确定总的氧化应激水平。普遍用来监测细胞氧化还原过程。

本品以粉末形式提供,可直接溶于无水DMSO配制成1-10mM储存液,常用工作浓度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:

以下步骤是来源于大量文献总结的简易操作流程,仅作参考。用户需根据特定的应用和敏感性来做调整。

1) 将低温保存的冻干粉取出回至室温,低速离心使粉末落到瓶底。之后加入适量无水DMSO 或其他有机溶剂配制成1-10mM 储存液。未用完的DMSO 储存液需分装 并避光冻存在-20 $^{\circ}$ C,避免反复冻融。

2) 于正式实验前,用生理盐缓冲液(比如: PBS,HBSS,HEPES)稀释到工作浓度1-10 μ M。需根据具体应用来调整合适的工作浓度。

3) 吸走培养液,加入步骤2)配制的染色工作液到细胞内,室温或30 $^{\circ}$ C孵育5~60min。

4) 吸走染色工作液,用预热的生理缓冲液或细胞培养液清洗一遍。重新加入预热的生理缓冲液或细胞培养液,在适宜温度内孵育。对于二乙酸酯衍生物,需要短暂复原时间让细胞内酯酶将其水解,从而让染料对氧化应激产生反应。最佳的复原时间范围很广,由于某些细胞类型通常显示极其低水平的酯酶活性。

5) 将细胞暴露于实验刺激物之前,先测定加载细胞的背景荧光强度。

6) 根据以下情况评估阴性对照 (Negative control),



6.1绿色发射光谱内检查未染色细胞的自荧光情况。

6.2对于流式分析, 查明染料加载和处理后细胞的前向角散射和侧向角散射是不变。细胞尺寸的变化可能与起泡或萎缩有关, 由于处理或有毒反应引起的。

6.3对包含和不包含刺激物的染料和缓冲液/培养基的无细胞混合物进行荧光检测。在不含细胞外酯酶和其他氧化酶的情况下, 随着时间荧光的逐渐增加可能与瞬间水解、空气氧化、和/或光诱导氧化有关。

6.4检查培养在生长培养液或简单缓冲液内的未处理加载细胞(对照)的荧光。在健康细胞内, 细胞内酶和/或天然抗氧化剂会清除这些氧自由基。经过染料加载复原时间后, 健康细胞应该表现出低水平的荧光信号, 且在整个实验期间相对稳定。然而, 逐渐增加(由于自氧化)或降低(由于细胞内染料丧失或光淬灭)也有可能观察到。在不含任何刺激物或诱导剂的体系内, 健康和未处理细胞突然发现强荧光, 表明细胞发生死亡或一些其他的氧化事件。

7) 建立阳性对照 (Positive control), 可能用以下方法刺激氧化活性:

7.1肿瘤促进剂 (PMA, 工作浓度100pM~10μM)

7.2 H₂O₂或TBHP (终浓度~100μM) (根据细胞本身对其的灵敏度和反应性来提高或降低浓度)

8) 确保刺激药物或化合物不会引起染料荧光淬灭。检查化合物的吸收光谱, 确定化合物的吸收峰不会与氧化后染料的最大激发或发射光谱发生重叠。

注意事项:

1) 有机溶剂如DMSO储存液需分装成单次用量后, -20℃避光保存, 避免反复冻融。

2) 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℃保存。