

## 2,7-Dichlorodihydrofluorescein diacetate

### 1. 产品描述

2,7-Dichlorodihydrofluorescein diacetate，中文名称为 2,7-二氯二氢荧光素二乙酸酯，也称为 H2DCFDA 或 DCFH-DA。DCFH-DA 是一种细胞膜渗透性的活性氧 (ROS) 检测探针。DCFH-DA 本身没有荧光，一旦进入细胞内后，可以被细胞内的酯酶脱酯化生成 DCFH (2,7-二氯二氢荧光素)，而 DCFH 不会透过细胞膜，因此积聚在细胞内。无荧光的 DCFH 被细胞内的活性氧氧化成有荧光的 DCF (2,7-二氯荧光素)。绿色荧光强度与活性氧的水平成正比。可使用共聚焦显微镜，荧光显微镜和流式细胞仪等仪器检测荧光信号。Ex/Em (nm): 485/527。

### 2. 产品信息

货号	产品名称	规格
C3890	2,7-Dichlorodihydrofluorescein diacetate	50mg/100mg/250mg/500mg

### 3. 使用方法

#### (1) 工作液配制

1) 储存液配制：产品以粉末形式提供，开盖前需要经过瞬时离心。如果产品是从冰箱中取出则需要先置于室温进行回温。取 4.8 mg DCFH-DA 粉末于 1.5 mL 离心管中，加入 985  $\mu$ L DMSO，室温颠倒混匀使其充分溶解，即得到浓度为 10 mM 的储存液。储存液配置的浓度可以根据实验需求进行调整。使用者需要根据单次用量将溶液分装成小量储存于 -20 $^{\circ}$ C，避免反复冻融。

2) 工作液配制：将冻存的储存液置于室温充分融化和回温，之后用适宜的缓冲液如 PBS 或者无酚红培养液（不含血清）直接稀释储存液到需要的工作液浓度，充分混匀。具体的工作液浓度要根据实验需求进行调整和配置。血清或培养基颜色并不影响 DCFH-DA 及细胞内荧光产生，但可能会影响荧光显微镜观察，干扰荧光分光光度计、荧光酶标仪或流式细胞仪荧光测定，这依赖于使用何种荧光设备进行测定。

#### (2) 装载探针

对于刺激时间较短（通常为 2 小时以内）的细胞，先装载探针，后用活性氧阳性对照或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，先用活性氧阳性对照或自己感兴趣的药物刺激细胞，后装载探针。

#### 原位装载探针（仅适用于贴壁细胞）

1) 细胞准备：检测前一天进行细胞铺板，确保检测时细胞汇合度达到 50~70%。【注】：必须保证细胞状态健康，且检测时不会过度生长。

2) 药物诱导：选择感兴趣的药物根据特定的步骤刺激细胞。具体诱导时间和药物处理浓度根据药物本身特性，以及细胞类型来决定。

3) 探针装载：吸除诱导用药物，加入适当体积 DCFH-DA 工作液。加入的体积以能充分盖住细胞为宜。例如：对于 6 孔板通常不少于 1000  $\mu$ L，对于 96 孔板通常不少于 100  $\mu$ L。37 $^{\circ}$ C 细

胞培养箱内避光孵育 30 min。对不同的细胞和处理, DCFH-DA 工作浓度可为 100 nm~20 μM, 需进行预实验或参考相关文献确定合适的浓度。【注意】: 实验过程中控制好总体稀释倍数, DMSO 在培养液中的浓度不能超过 0.1%, 以避免 DMSO 对细胞的影响。37°C 孵育细胞 30 min~至几个小时, 通常 30-60min 即可。孵育时间长短与细胞类型、刺激条件、DCFH-DA 浓度有关。

4) 细胞清洗: 用无血清细胞培养液洗涤细胞 1~2 次, 以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。

### 收集细胞后装载探针 (适用于贴壁细胞和悬浮细胞)

1) 细胞准备: 按照标准方法培养细胞, 必须保证检测用细胞状态健康。按照适当方法, 清洗并收集足量的细胞。

2) 探针装载: 收集好的细胞加入适当 DCFH-DA 工作液, 使其细胞密度为  $1.0 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^7$ 。

【注】: 细胞密度需根据后续的检测体系, 检测方法, 以及检测总量来进行调整。如, 对于流式分析, 单管检测内细胞数目不少于  $10^4$ , 也不可多于  $10^6$ 。37°C 细胞培养箱内孵育 20 分钟。每隔 3-5 min 颠倒混匀一下, 使探针和细胞充分接触。

3) 细胞清洗: 用无血清细胞培养液洗涤细胞 1~2 次, 以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。

4) 药物诱导: 直接用活性氧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刺激细胞。于 37°C 细胞培养箱内避光孵育, 具体诱导时间根据药物本身特性, 以及细胞类型来决定。

### (3) 检测

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, 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, 用激光共聚焦显微镜直接观察也可以。

### (4) 参数设置

使用 488nm 激发波长, 525nm 发射波长, 实时或逐时间点检测刺激前后荧光的强弱。DCF 的荧光光谱和 FITC 非常相似, 可以用 FITC 的参数设置检测 DCF。

### (5) 其他说明

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, 可以进一步稀释 DCFH-DA 工作液浓度。

### 注意事项

1) 探针装载后, 一定要洗净残余的未进入细胞内的探针, 否则会导致背景较高。

2) 探针装载完毕并洗净残余探针后, 可以进行激发波长的扫描和发射波长的扫描, 以确认探针的装载情况是否良好。

3) 尽量缩短探针装载后到测定所用的时间 (刺激时间除外), 以减少各种可能的误差。

4) 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。