

**【产品编号】** 2698289

**【英文名称】** NP3, Fluorescent probe, for ONOO<sup>-</sup> detection

**【中文名称】** 过氧化亚硝酰阴离子荧光探针

**【产品内容】** 2MG, 5MG

**【保存条件】** 2 - 8 °C 干燥避光保存, 有效期两年。

**【产品概述】** NP3 是可以透过细胞膜和血脑屏障的荧光染料, 适用于检测活细胞或活体动物中硝化应激现象。NP3 本身没有荧光, 但结构中具有与硝化应激代表性物质 ONOO<sup>-</sup> 发生特异性生物正交智能反应的触发器, 并在反应后呈现强荧光, 从而实现硝化应激现象的示踪。NP3 具有优异的特异性, 高灵敏度。最大激发波长为 375nm, 最大发射波长为 470 nm。实际检测时推荐使用的激发波长为 405 nm 左右, 发射波长为 420~480 nm。可适用于激光共聚焦显微镜及双光子显微镜。

#### **【自备材料】**

•5 mM NP3/DMSO

**配制方法:** 1mg NP3 溶于 552 $\mu$ L DMSO。

•Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

•Fetal bovine serum (FBS)

•Phosphate buffer saline (PBS)

**配制组分:** 10mM PBS, 将 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 g NaCl, 0.2 g KCl 溶于 800 mL 蒸馏水, 用 HCl 调 pH 到 7.4, 加蒸馏水定容至 1L。

#### **【实验步骤】**

##### 一、 NP3 活细胞中检测 ONOO<sup>-</sup>

1. 将工作细胞接种于玻片, 于含 10%胎牛血清的 DMEM 全培养液中培养 24h, 加入 ONOO<sup>-</sup> 或 ONOO<sup>-</sup> 供体处理 6h, 换液。
2. 配置 NP3/DMSO 溶液, 加入含有 5 $\mu$ M 探针的培养液, 37°C 培养 30 min。
3. 固定, 透膜, PBS 洗 3 次, 随后进行细胞核定位 PI 染色, 封片。
4. 加入 5 倍体积的含有 1%胎牛血清的 HBSS, 继续培养 40min。
5. 采用激光共聚焦荧光显微镜拍照观察。

注: 分别采用激发波长 405 nm 和 543 nm 激光波长激发 NP3 和 PI。

##### 二、 NP3 糖氧剥夺细胞中检测 ONOO<sup>-</sup>

1. OGD 处理工作细胞 3h。
2. 如一中 2 所述方法加入探针与细胞孵育。
3. 固定, 透膜, 染色, 封片。
4. 采用激光共聚焦荧光显微镜拍照观察。

注: 分别采用激发波长 405nm 和 543nm 激光波长激发 NP3 和 PI。

**注意: 标记的条件因细胞种类而异, 每次实验前, 请先确定最佳条件。**