

ROS 活性氧检测试剂盒

产品组成：

成分	产品名称	包装	保存
A 液	H2DCFH-DA (10mM)	0.1mL	-20℃避光保存，有效期一年
B 液	活性氧阳性对照 (Rosup, 50mg/mL)	1mL	

产品简介：

活性氧检测试剂盒 (Reactive Oxygen Species Assay Kit) 是一种利用荧光探针H2DCFH-DA进行活性氧检测的试剂盒。H2DCFH-DA本身没有荧光，可以自由穿过细胞膜，进入细胞内后，可以被细胞内的酯酶水解生成DCFH。而DCFH不能通透细胞膜，从而使探针很容易被装载到细胞内。细胞内的活性氧可以氧化无荧光的DCFH生成有荧光的DCF。检测DCF的荧光就可以知道细胞内活性氧的水平。根据活细胞中荧光的产生，可以判断细胞活性氧的含量和变化。用流式细胞仪或荧光显微镜可直接观察，是一种经典的组织或活细胞中活性氧检测方法。本试剂盒提供了活性氧阳性对照试剂Rosup，以便于活性氧的检测。Rosup是一种混合物，浓度为50mg/mL。Rosup 为活性氧阳性诱导药物，根据其荧光信号强度，可分析活性氧的真正水平。

本试剂盒本底低，灵敏度高，线性范围宽，使用方便。本试剂盒可以测定1000个样品1000T(96孔板)。

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. 阳性对照Rosup 一般使用浓度为100 μ M (推荐浓度100-400 μ M，具体依细胞类型而定)。通常刺激后0.5-4h可观察到显著的活性氧水平升高。对于不同的细胞，活性氧阳性对照的效果可能有较大的差别。如果在刺激后30min内观察不到活性氧的升高，可延长诱导时间或适当提高活性氧阳性对照的浓度。如果活性氧升高得过快，可缩短诱导时间或适当降低活性氧阳性对照的浓度。
3. 对于某些特别的细胞，实验过程中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稀释DCFH-DA，使DCFH-DA的终浓度为2-5 μ M。探针装载的时间也可以根据情况在15-60min内适当进行调整。
4. 活性氧阳性对照 (Rosup) 仅仅用于作为阳性对照的样品，并不是在每个样品中都需加入活性氧阳性对照。
5. 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。
6. 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。
7. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

8. 定量的话要作标准曲线，先做一个不同浓度H₂O₂氧化DCFA荧光值，做一条标准曲线，X轴为H₂O₂浓度，y轴是荧光值，得出一个方程，在看你样品的荧光值即Y值是多少，对应的X值就是。
9. 有的细胞装载探针后细胞容易漂起来，洗细胞时实验组会吸走一部分细胞。所以种细胞时细胞量增加一倍，这样细胞紧密连接，贴壁比较牢，实验组的荧光值就高。另外的H₂DCFDA很敏感，工作液浓度要低一些，一般1-2 μM就够，浓度太高容易有非特异性染色。这个探针很不稳定，一旦氧化了本底荧光值就会升高，最好工作液现用现配。

使用说明：

1. 装载ROS探针

1.1 原位装载探针(仅适用于贴壁细胞)

- a) 细胞准备：检测前一天进行细胞铺板，确保检测时细胞数量小于 5×10^5 /ml。
- b) 药物诱导：去除细胞培养液，加入无血清培养基稀释的药物处理，于37℃细胞培养箱内避光孵育，实际诱导时间由药物特性和细胞类型决定。
- c) (可选) 阳性对照：先用无血清培养基等稀释阳性对照 (Rosup, 100mM) 到常用工作浓度100 μM，加入细胞，37℃ 避光孵育0.5~4h，以提高活性氧水平，不同细胞类型存在差异。例如：HeLa细胞需孵育30-60min，MRC5人胚胎成纤维细胞则需孵育90min。
- d) ROS探针准备：探针装载前按照1:1000用无血清培养液稀释DCFH-DA，使其终浓度为10 μM。
- e) ROS探针装载：吸除处理药物，加入适当体积稀释好的DCFH-DA工作液。加入的体积需充分盖住细胞。例如：6孔板通常不少于1000 μL，对于96孔板通常不少于100 μL。37℃细胞培养箱内避光孵育30min。
- f) 细胞清洗：用无血清培养液洗涤细胞1~2次，以充分去除未进入细胞内的DCFH-DA。

1.2 收集细胞后装载探针(适用于贴壁细胞和悬浮细胞)

- a) 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。按照适当方法，清洗并收集足量的细胞。
- b) 药物诱导：将收集好的细胞悬浮于适量稀释好的药物，于37℃细胞培养箱内避光孵育，实际诱导时间由药物特性和细胞类型决定。
- c) (可选) 阳性对照：先用无血清培养基稀释阳性对照 (Rosup, 100 mM) 到常用工作浓度100 μM，加入细胞，37℃避光孵育0.5~4 h 以提高活性氧水平，不同细胞类型存在差异。例如：HeLa细胞需孵育30-60 min，MRC5 人胚胎成纤维细胞则需孵育90min。
- d) ROS 探针准备：探针装载前，按照1:1000 用无血清培养液稀释DCFH-DA，使其终浓度为10 μM。
- e) 探针装载：除去细胞内药物，离心收集细胞，加入稀释好的探针，使其细胞密度为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 。

注意：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。例如：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 。

f) 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。

2. 荧光显微照相操作方法

a) 对贴壁生长细胞或活组织，可直接在荧光显微镜下观察；对悬浮生长细胞，取25-50 μ L细胞悬液滴到一张显微载玻片上，再盖上一张盖玻片。

b) 荧光显微镜下，选用FITC滤光片观察荧光，去除背景观察荧光的变化。

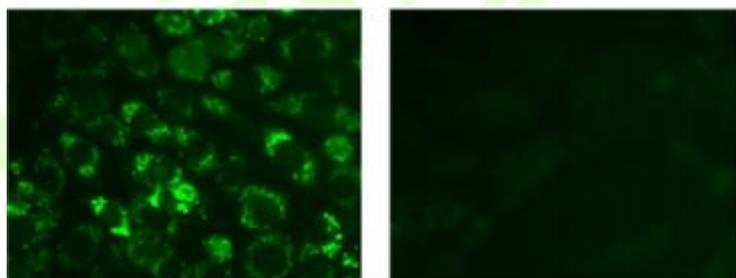
3. 流式细胞分析操作方法

a) 对贴壁生长细胞，用胰酶消化制备成单细胞悬液；对悬浮生长细胞，直接收集细胞。用0.5-1mL PBS重悬细胞($0.5 \sim 1 \times 10^5$ /ml)。

b) 选择流式细胞仪FL1或BL1通道，488nm激发，测定530nm的发射，细胞应可分成两个亚群：ROS阴性细胞仅有很低的荧光强度，ROS阳性细胞有较强的绿色荧光。

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。DCF的激发光谱和发射光谱参考下图。



使用活性氧检测试剂盒(Reactive oxygen species assay kit)显示CHO细胞内活性氧荧光。左图：CHO细胞用试剂盒配备的活性氧阳性对照处理；右图：正常CHO细胞。绿色荧光表明细胞活性氧急剧增加，并能显示其定位。

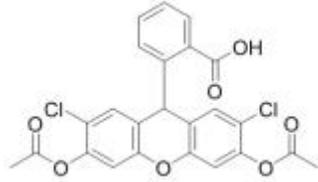
H₂DCFDA 活性氧 (ROS) 探针

H₂DCFDA 是可渗透细胞，用于检测细胞内活性氧 (ROS) 的探针。

别名： H₂DCFH-DA; 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate;

分子量 C₂₄H₁₆Cl₂O₇=487.29; CAS#4091-99-0; HPLC purity>99% UltraPure 超纯级

保存运输： Store at -20°C protected from light. Product is shipped at ambient temperature.



生物活性： H₂DCFDA 是可渗透细胞，用于检测细胞内活性氧 (ROS) 的探针。

ROS测量：

将 1 mg H₂DCFDA 溶解在 0.2 mL DMSO 中以获得 10mM 储备溶液，并在使用前进一步稀释。

为了检测细胞内ROS水平，使用 ROS 敏感性探针 H₂DCFDA。将贴壁细胞 (ESC, difESC, eMSC, HeLa, U118) 与 PBS 中的 5 μM 染色溶液在 37°C 下在黑暗中孵育 30 分钟，然后用 0.05% 胰蛋白酶-EDTA 溶液收获，悬浮在新鲜培养基中，并且用流式细胞仪立即分析。将对照和PHA活化的淋巴细胞重悬浮于PBS中，与5 μM H₂DCFDA在黑暗中于37°C温育30分钟，并立即分析。

不同实验动物依据体表面积等效剂量转换表 (数据来源于 FDA 指南)

	小鼠	大鼠	兔	豚鼠	仓鼠	狗
重量 (kg)	0.02	0.15	1.8	0.4	0.08	10
体表面积 (m ²)	0.007	0.025	0.15	0.05	0.02	0.5
Km 系数	3	6	12	8	5	20

$$\text{动物 A (mg/kg)} = \text{动物 B} \times \frac{\text{动物 B 的 Km 系数}}{\text{动物 A 的 Km 系数}}$$

例如，依据体表面积折算法，将白藜芦醇用于小鼠的剂量 22.4 mg/kg 换算成大鼠的剂量，需要将 22.4 mg/kg 乘以小鼠的 Km 系数 (3)，再除以大鼠的 Km 系数 (6)，得到白藜芦醇用于大鼠的等效剂量为 11.2 mg/kg。