

活性氧 (ROS) 检测试剂盒说明书

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 DCFH-DA 进行活性氧检测的试剂盒。DCFH-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 的荧光强度就可以知道细胞内活性氧的水平。

本试剂盒提供了活性氧阳性对照试剂 Rosup, 浓度为 50mg/mL。

本试剂盒本底低, 灵敏度高, 线性范围宽, 使用方便。

包装清单

组份	100T	500T
A 液: DCFH-DA (10mM)	0.1mL	0.1mL×5
B 液: 活性氧阳性对照(Rosup,)	1mL	1mL×5

保存条件

-20°C 避光保存, 有效期一年。

试剂准备

1、DCFH-DA 用无血清培养液稀释适当倍数使用。对于不同的处理步骤, DCFH-DA 工作浓度可为 100nM-20 μ M, 需进行预实验确定合适的浓度。总体稀释倍数应在 1: 500-1: 1000 以上以避免 DMSO 对细胞的影响, 推荐初始浓度为 10 μ M。另外, 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, 可以按照 1:2000-5000 稀释 DCFH-DA, 使装载探针时 DCFH-DA 的浓度为 2-5 μ M。探针装载的时间也可以根据情况在 15-60 分钟内调整。

2、阳性对照可以按 1:1000 的比例使用。例如装载好探针的细胞共 1mL, 可以加入 1 μ L 的阳性对照刺激(通常刺激后 20-30 分钟内可以观察到非常显著的活性氧水平升高)。对于不同细胞。活性氧对照的效果可能有较大的差异。如果在刺激后 30 分钟内观察不到活性氧的升高, 可以适当提高活性氧阳性对照的浓度, 反之如果活性氧升高过快则可以适当降低它的浓度。活性氧阳性对照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。

组织样本操作步骤 (可用激光共聚焦显微镜观察, 也可用流式细胞仪、荧光酶标仪、

荧光分光光度计测定)

1、制备单细胞悬液：

方法 1、采用单细胞悬液制备仪制备单细胞悬液。

方法 2、酶消化法：

①、新鲜组织立即放入预冷的 PBS 中，清洗血迹及其它污染物。去除组织块中的块死成分、纤维、脂肪及血管（专门制备相关细胞时除外）。

②、用眼科剪将组织块剪成 1mm^3 左右小块，放在预冷的 PBS 中并进行漂洗，洗去剪碎的细胞碎片。

③、加入适量酶消化液， 37°C 恒温水浴消化 20~30min，期间进行间断振荡或吹打细胞。

④、用 PBS 终止消化，用 300 目尼龙网过滤除去组织团块，收集滤过的细胞，500g 离心 10min，去上清留沉淀，并用 PBS 洗 1~2 次。

方法 3、机械法（网搓法）：

①、前处理同酶消化法①、②步。

②、将 300 目尼龙网扎在小烧杯上，将剪碎的组织放在网上，以眼科镊或刮刀轻搓组织块，边搓边用 PBS 冲洗，直至将组织搓完。

③、500g 离心 10min，去上清留沉淀，并用 PBS 洗 1~2 次，收集细胞悬液，。

2、加入荧光探针：

①、取不进行任何处理的细胞用 0.01M PBS 重悬，设为阴性对照管。阳性对照管：用稀释好的 DCFH-DA 重悬细胞沉淀，同时加入活性氧供氢体诱导细胞。

②、样本管：用稀释好的 DCFH-DA 重悬细胞沉淀，细胞密度一般要求 $1 \times 10^6 - 2 \times 10^7/\text{mL}$ 。

③、 37°C 孵育细胞 30min~几小时，每隔 3-5 分钟颠倒混匀一下，使探针与细胞充分接触。通常为 20~60min 即可，孵育时间长短与细胞类型、刺激条件以及 DCFH-DA 浓度有关。

④、收集孵育（探针标记）后的单细胞悬液，1000g，离心 5~10 分钟，去上清收集细胞沉淀，用 PBS 洗涤 1~2 次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。离心收集细胞沉淀用于荧光检测；

3、荧光检测：

①、将上述收集好的细胞沉淀用 PBS 重悬，并用于检测；

②、波长设置：最佳激发波长 488nm，最佳发射波长 525nm。也可按 FITC 荧光检测条件检测。

③、结果以荧光强度值表示（注意：如果用显微镜观察，实验做到⑥步骤后，进行细胞滴片，

直接显微镜拍照记录即可)。

细胞样本操作步骤 (可用激光共聚焦显微镜观察, 也可用流式细胞仪、荧光酶标仪、荧光分光光度计测定)

1、直接将探针加入培养液中(该方法只适用于贴壁细胞):

①、直接将 DCFH-DA 探针加入无血清培养基中: 一般按照 1: 1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA(终浓度为 $10\mu\text{M}$)。细胞去除培养液后, 加入适当体积稀释好的 DCFH-DA。加入的体积以能充分盖住细胞为宜, 通常对于 6 孔板的一个孔加入稀释好的 DCFH-DA 不少于 1mL。

②、取一份不加探针, 只加入培养基的细胞设为阴性对照管。阳性对照管: 取一份已加入探针的细胞, 同时加入活性氧供氢体诱导细胞。

③、 37°C 孵育细胞 20min~几小时(每隔 3~5 分钟颠倒混匀一下, 使探针和细胞充分接触, 通常为 20min, 孵育时间长短与细胞类型、刺激条件、DCFH-DA 浓度有关。一般阳性对照在刺激细胞 20~30 分钟后, 即可观察到明显的绿色荧光。

④、吸去培养液, 利用无血清培养液反复吹打, 肉眼观察瓶底由半透明(细胞单层连接成片)转为透明, 细胞层几乎全部吹打到无血清培养液中。

⑤、将细胞悬液全部收集到 1.5mL 离心管中。用无血清培养液洗涤 2 次, 以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。1000rpm/min, 离心 5min, 吸净上清后加入 PBS 重新悬浮细胞进行测定。

⑥、波长设置: 最佳激发波长 488nm, 最佳发射波长 525nm。也可按照 FITC 荧光检测条件检测。

⑦、结果以荧光强度值表示 (注意: 如果用显微镜观察, 实验做到③步骤后, 轻轻用无血清培养液洗涤 3 次, 直接显微镜拍照记录即可)。

2、先收集细胞, 制备成细胞悬液后测定(该方法适用于贴壁细胞及悬浮细胞)

①、细胞收集:

a、贴壁细胞, 吸去培养液, 利用无血清培养液反复吹打, 肉眼观察孔板底部(瓶底)由半透明(细胞单层连接成片)转为透明, 细胞层几乎全部吹打到无血清培养液中。

b、将细胞悬液全部收集到 1.5mL 离心管中。用无血清培养液洗涤 2 次, 1000rpm/min, 离心 5min, 吸净上清, 留细胞沉淀用于测定。

c、悬浮细胞按照常规方法离心(2000rpm/min, 离心 5min), 收集细胞沉淀, 用无血清培养液洗涤 2 次, 1000rpm/min, 离心 5min, 吸净上清, 留细胞沉淀用于测定。

②、细胞重悬: 细胞密度一般要求 $1\times 10^6-2\times 10^7/\text{mL}$, 一般有两种方法:

a、先加入无血清培养液重悬细胞, 然后根据加入培养液体积, 按照 $10\mu\text{M}$ 的初始浓度(最好做

预实验确定自身样本适合浓度)加入探针(适用于预实验及少量样本的情况)。

b、先按照 10 μ M 的浓度将探针用无血清培养液先稀释好，然后用稀释好的探针重悬上述细胞沉淀，制备成细胞悬液，(适用于样本较多的情况)

③、取一份不加探针，只加入培养基细胞设为阴性对照管。阳性对照管：取一份已加入探针的细胞悬液，同时加入活性氧供氢体诱导细胞。

④、37 $^{\circ}$ C 孵育细胞 20min~几小时，通常为 20~60min 即可，孵育时间长短与细胞类型、刺激条件、DCFH-DA 浓度有关；每隔 3-5 分钟颠倒混匀一下，使探针与细胞充分接触。

⑤、收集孵育(探针标记)后的单细胞悬液，1000rpm/min，离心 5min，吸净上清，用 PBS 洗涤 1~2 次，离心收集细胞沉淀物用于荧光检测。

⑥、将上述收集好的细胞沉淀用 PBS 重悬，并用于检测。

⑦、波长设置：最佳激发波长 488nm，最佳发射波长 525nm。也可按照 FITC 荧光检测条件检测。

⑧、结果以荧光强度值表示(注意：如果用显微镜观察，实验做到⑥步骤后，进行细胞滴片，直接显微镜拍照记录即可)。

相关注意事项

1、荧光探针标记后，一定要洗净残余的未进入细胞内的探针，否则会导致背景不干净荧光值偏高。

2、重悬的细胞密度可根据细胞的荧光强弱进行调整，如荧光较强可将细胞密度调小，如荧光较弱可将细胞密度调大，但所有样本的细胞密度应保持一致。

3、测定细胞样本时，对于药物作用时间在 2 小时以内的细胞，一般建议先标记探针，然后再用药物刺激细胞，对于药物作用时间需要在 6 小时以上的细胞，可以先用活性氧阳性对照及药物刺激细胞，然后再标记探针。

4、同时取部分单细胞悬液经过超声或匀浆破碎处理，用于总蛋白的测定(推荐本公司 BCA 总蛋白定量检测试剂盒)，用于结果计算表示为荧光强度值/毫克蛋白。

5、本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。