

## 活性氧检测试剂盒

### (Reactive Oxygen Species Assay Kit, ROS Assay Kit)

(本试剂盒仅供科研使用)

#### 产品包装

产品编号	产品名称	试剂盒组成	规格	储存条件
YFX0707	A 液	DCFH-DA (10mM)	0.1mL	-20°C
	B 液	活性氧阳性对照 (Rosup, 50mg/mL)	1mL	-20°C

#### 一、产品介绍

翼飞雪活性氧检测试剂盒 (Reactive Oxygen Species Assay Kit, 也称 ROS 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, 以便于活性氧的检测。Rosup 是一种混合物, 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。

本试剂盒可以测定 100~500 个样品。

#### 二、操作步骤

##### 1、装载探针

对于刺激时间较短 (通常为 2 小时之内) 的细胞, 先装载探针, 然后用活性氧阳性对照或自己感兴趣的药物刺激细胞; 对于刺激时间较长 (通常为 6 小时之上) 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, 然后装载探针。

**1.1 原位装载探针:** 本方法适用于贴壁细胞。按照 1 : 1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA, 使终浓度为 10 $\mu$ mol/L。去除细胞培养液, 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, 通常对于六孔板的一个孔加入稀释好的 DCFH-DA 不少于 1ml。37°C 细胞培养箱内孵育 20min。用无血清细胞培养液洗涤细胞三次, 以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。通常活性氧阳性对照在刺激细胞 20~30min 后可以显著提高活性氧水平。

**1.2 收集细胞后装载探针:** 按照 1 : 1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA, 使终浓度为 10 $\mu$ mol/L。细胞收集后悬浮于稀释好的 DCFH-DA 中, 细胞浓度为二百万至二千万/mL, 37°C 细胞培养箱内孵育 20min。每隔 3 ~ 5min 颠倒混匀一下, 使探针和细胞充分接触。用无血清细胞培养液洗涤细胞三次, 以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。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。

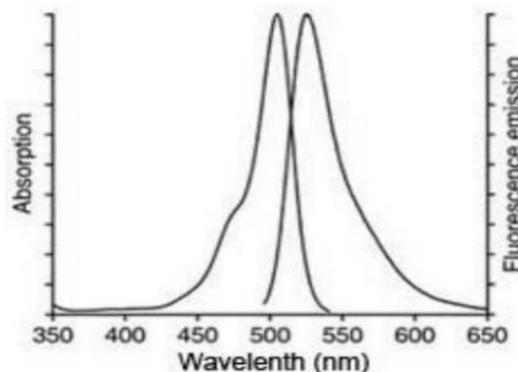
**注: 仅在阳性对照孔中加入 Rosup 作为阳性对照, 其余孔不必加入 Rosup。**

## 2、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,也可以用激光共聚焦显微镜直接观察。

## 3、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。



## 4、其他说明

阳性对照可以按照 1 :1000 的比例使用。例如装载好探针的细胞共 1ml, 可以加入 1 $\mu$ l 的阳性对照刺激。通常刺激后 20~30min 内可以观察到非常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, 可以适当提高活性氧阳性对照的浓度。如果活性氧升高得过快, 可以适当降低活性氧阳性对照的浓度。

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 : 2000~1 : 5000 稀释 DCFH-DA, 使装载探针时 DCFH-DA 的浓度为 2~5 $\mu$ mol/L。探针装载的时间也可以根据情况在 15~60min 内适当进行调整。

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、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。DCF 的激发光谱和发射光谱请参考上图。
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。