

ROS 活性氧检测试剂盒

Reactive Oxygen Species Assay Kit

产品信息

| 产品名称 | 产品编号 | 规格 |
|--------------|---------|-------|
| ROS 活性氧检测试剂盒 | DY10507 | 1000T |

产品描述

活性氧检测试剂盒 (Reactive Oxygen Species Assay Kit) 是一种利用荧光探针 HDCFH-DA 进行活性氧定量检测的试剂盒。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。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 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。

产品组成

| | 组分名称 | 规格 |
|-----|-------------------------|-------|
| A 液 | DCFH-DA(10mM) | 0.1ml |
| B 液 | 活性氧阳性对照 (Rosup, 500 mM) | 1ml |

保存方式

-20°C避光干燥保存, 有效期一年。

使用方法

1. 装载 ROS 探针

1.1 原位装载探针(仅适用于贴壁细胞)

- 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。
- 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°C 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。
- (可选) 阳性对照: 先用无血清培养基等稀释阳性对照 (Rosup, 500 mM) 到常用工作浓度 100 μ M, 加入细胞, 37°C 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 90 min。
- 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 μ M。
- 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 μ L, 对于 96 孔板通常不少于 100 μ L。37°C 细胞培养箱内避光孵育 30 min。
- 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°C 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, 500 mM) 到常用工作浓度 100 μ M，加入细胞，37°C 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 μ M。
- e) 探针装载：除去细胞内药物，离心收集细胞，使其细胞密度为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 。然后又加入稀释好的探针，37°C 细胞培养箱内避光孵育 30 min。
- 【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 0.5-1 mL 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。

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. 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了。另外 DCFH-DA 很敏感，工作液浓度要低一些，1-2 μ M 即可，浓度太高容易有非特异性染色。此探针很不稳定，一旦氧化了本底荧光值就会升高，工作液最好现用现配。

本产品仅作科研用途