

## ROS活性氧检测试剂盒

产品货号: BA2959

产品规格: 100 tests

### 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。DCFHDA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。利用合适的激发光源可以很方便地在各种检测平台上观察测量,如流式细胞仪、荧光酶标仪和荧光显微镜。由于染料很容易受到光氧化,在进行实验时必须全程注意避光。

本试剂盒提供了活性氧阳性刺激试剂ROS Control,以便于活性氧的检测。ROS control是一种混合物(compound mixture)。本试剂盒灵敏度高、线性范围宽、使用方便。Ex/Em=488nm/525nm,可使用FITC的参数设置检测。

### 产品组成:

组分	100 tests	保存条件
10mM DCFH-DA	100 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C, 避光
活性氧阳性刺激试剂 ROS Control	1mL	-20 $^{\circ}$ C, 避光

### 试剂盒以外自备仪器和试剂:

流式细胞仪或荧光显微镜; 低速离心机;

1.5mL Microtube; 盖玻片(荧光显微镜观察需用); PBS; 胰酶消化液。

### 注意事项:

1. 本产品需避光保存,避免影响实验结果。
2. 仅在阳性对照孔中加入阳性刺激试剂作为阳性对照,其余孔不必加入阳性刺激试剂。
3. 产品初次使用可进行分装保存,尽量避免反复冻融,保证探针染色效果。
4. 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。
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. 为确保所加药物或化合物不会对染料有淬灭效应,应该检查化合物或者药物的吸收光谱,是否与探针的激发和发射光谱重叠。
8. 为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 操作步骤:

1. 装载探针
  - (1) 对于刺激处理时间较短(通常为2h以内)的细胞样本,先装载探针,后用活性氧阳性刺激试剂 ROS Control 或自己感兴趣的药物刺激细胞。对于细胞刺激时间较长(通常为6h以上)的细胞,先用活性氧阳性刺激试剂或自己感兴趣的药物刺激细胞,后装载探针。
  - (2) 原位装载探针:本方法仅适用于贴壁培养细胞。用 PBS 或者 HBSS 稀释 10mM DCFH-DA,按照 1:1000 稀释比例制成 DCFH-DA 加载工作液,使其终浓度为 10 $\mu$ M。制备细胞样本量在 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 个细胞/mL 左右,去除细胞培养基,使用 PBS 清洗 2 次,即可加入稀释好的 DCFH-DA 加载工作液,加入的体积以能充分盖住细胞为宜,通常对于六孔板的



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

一个孔加入稀释好的 DCFH-DA 工作液不少于 1mL。37°C 细胞培养箱内孵育 20min，去除 DCFH-DA 工作液，使用不含血清的培养基洗涤细胞 3 次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA，即可显微镜观察。

- (3) 收集细胞后装载探针: 本方法适用于悬浮细胞及消化后收集的贴壁细胞。用 PBS 或者 HBSS 稀释 10mM 的 DCFH-DA 原液，按照 1:1000 稀释比例制成 DCFH-DA 加载工作液，使其终浓度为 10 $\mu$ M。制备细胞样本量在 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 个细胞/mL 左右，加入稀释好的 DCFH-DA 加载工作液，混悬均匀，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。200-300 $\times$ g 离心 3min 去除 DCFH-DA 工作液，使用不含血清的培养基洗涤细胞 3 次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA（一般来说，只要能获得足够的荧光信号即可，尽量选择最小浓度的 DCFH-DA，尽量减少 DCFH-DA 的水解副产物（甲醛和乙酸）的富集。这里，含有氨基酸或者含有伯、仲胺的缓冲液都是必须避免的。因为脂肪胺可以促成 DCFH-DA 的水解而阻止其加载到细胞内，并维持胞外的最低程度的 DCFH-DA 水解。另外，血清等可能含有内源性酯酶活性的物质也必须避免，直到细胞加载 DCFH-DA 完成之后。
2. 阳性对照设置：选择试剂盒配备的活性氧阳性刺激试剂 ROS Control 或者您感兴趣的阳性化合物刺激细胞。
  - (1) 阳性刺激试剂可以按 1:1000 比例使用。例如装载好探针的细胞共 1mL，可以加入 1 $\mu$ L 的阳性对照刺激试剂。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。
  - (2) 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 1:2000-1:5000 稀释 DCFH-DA，使装载探针时 DCFH-DA 的浓度为 2-5 $\mu$ 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。
3. 阴性对照设置
  - (1) 确定未染色细胞的自发荧光在绿色荧光发射范围内。
  - (2) 对于流式细胞仪检测来说，确定该细胞的正向和侧向散射光在染料加载前后保持不变。细胞尺寸大小的变化可能牵涉到细胞毒性处理造成的细胞出泡和收缩。
  - (3) 确定无细胞的染料缓冲液在有诱导剂或刺激化合物前后的荧光强度。在没有胞外酯酶或者其他氧化酶存在条件下，ROS 探针应表现出随着时间推移荧光强度逐渐增加，这可能是由于染料自身的水解，大气氧化和光诱导的氧化。
  - (4) 确定未处理的加载细胞在生长培养基或者缓冲液中的荧光强度。在健康细胞中，氧自由基可以通过细胞酶和天然的抗氧化剂消除。随着染料加载，健康细胞实验进行的过程中会持续稳定地表现出低荧光发射水平，然而，随着自发氧化的进行，会表现出一个逐渐增加的荧光发射水平。
4. 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，用激光共聚焦显微镜直接观察也可以。
5. 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。

#### 实验范例：

人胚胎肾细胞 HEK293T 细胞和人急性髓母白血病 Kasumi1 细胞培养至合适的细胞量，收集至 1.5mLEP 管中，台盼蓝计活 >95%，PBS 调整密度至 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 个细胞/mL，取 1mL 细胞悬液，200-300 $\times$ g 离心 3min 后弃上清。用 500 $\mu$ L 将 DCFH-DA 工作液重悬细胞，置于 37°C，5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 30min 后，200-300 $\times$ g 离心 3min 后弃上清，PBS 洗涤 1 次，使用 500 $\mu$ L 活性氧阳性刺激试剂 ROS Control 工作液重悬细胞，置于 37°C，5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 30min，流式细胞仪检测 ROS 的生成情况，结果如下图所示。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

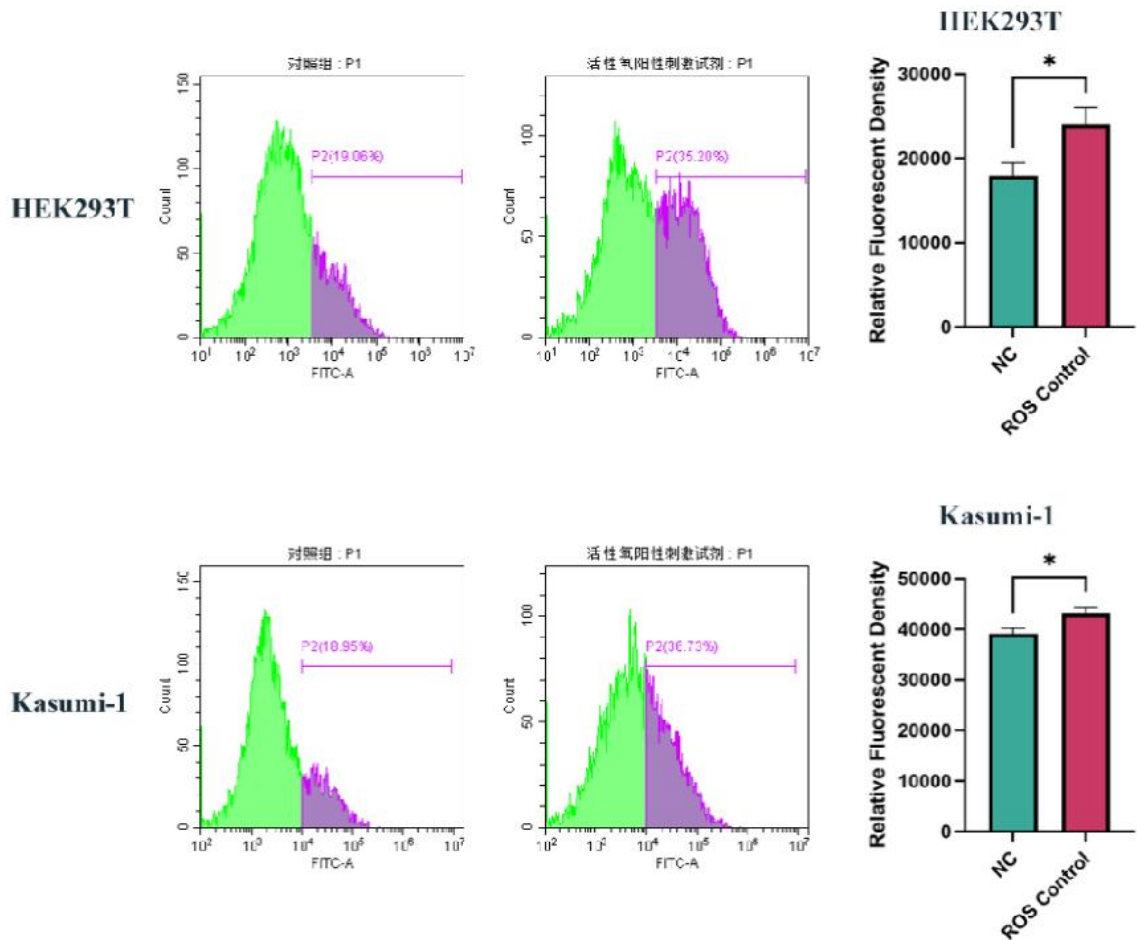


图1. HEK293T细胞用本试剂盒染色后流式细胞仪检测效果图。HEK293T和Kasumi-1细胞经活性氧阳性刺激试剂ROS Control处理30min。从图中可以看出，与对照组相比，ROS control处理后的两种细胞内ROS表达显著增加。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com