

## 活性氧检测试剂盒

### 包装规格

产品编号：Ros100、Ros300、Ros500

规格：100次、300次、500次

### 储存条件

2-8°C 保存，一年有效；-20°C 保存，二年有效；

### 产品组成：

产品编号	产品名称	规格
Ros-1	DCFH-DA ( 10mM )	0.1mL
Ros-2	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 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。

### 使用说明：

#### 1. 装载探针

对于刺激时间较短（通常为2小时以内）的细胞，先装载探针，后用活性氧阳性对照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6小时以上）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，后装载探针。

**原位装载探针：**本方法仅适用于贴壁培养细胞。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20分钟。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20~30分钟后可以显著提高活性氧水平。

**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20分钟。每隔3~5分钟颠倒混匀一下，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。通常活性氧阳性对照在刺激细胞20~30分钟后可以显著提高活性氧水平。

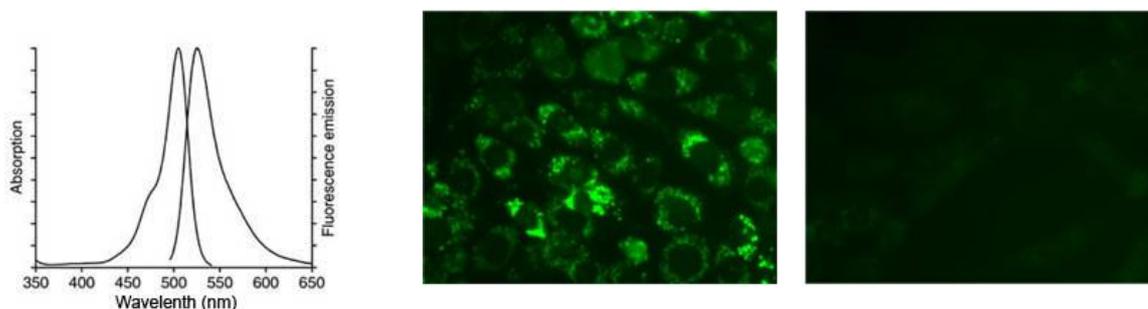
**说明：**仅在阳性对照孔中加入Rosup作为阳性对照，其余孔不必加入Rosup。

## 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。



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。

## 4. 其它说明

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20~30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。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15~60分钟内适当进行调整。

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。

### 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。
5. 定量的话要作标准曲线吧。先做一个不同浓度 $H_2O_2$ 氧化DCFA荧光值，做一条标准曲线，X轴为 $H_2O_2$ 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。
6. 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。另外的H2DCFDA很敏感，工作液浓度要低一些，1-2 $\mu$ M就够啦，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。

**仅供科学研究使用，禁止用于它用**