

## 活性氧检测试剂盒 Reactive oxygen species assay kit

货号：RK1002

规格：100T

保存条件：-20℃避光保存，有效期一年

产品内容：

A 液	DCFH-DA (10 mM)	0.1 ml	-20℃ 保存
B 液	活性氧阳性对照 (Rosup, 50mg/mL)	1 ml	-20℃ 保存
	说明书	1 份	

### 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。

本试剂盒本底低，灵敏度高，线性范围宽，使用方便。100T试剂盒可以测定 100-500 个样品。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。

### 操作步骤：

#### 一、 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  $10 \mu\text{mol/L}$ 。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℃ 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  $10 \mu\text{mol/L}$ 。细胞收集后悬浮于稀释好的 DCFH-DA 中，细胞浓度为 一百万至二千万/mL，37℃ 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。

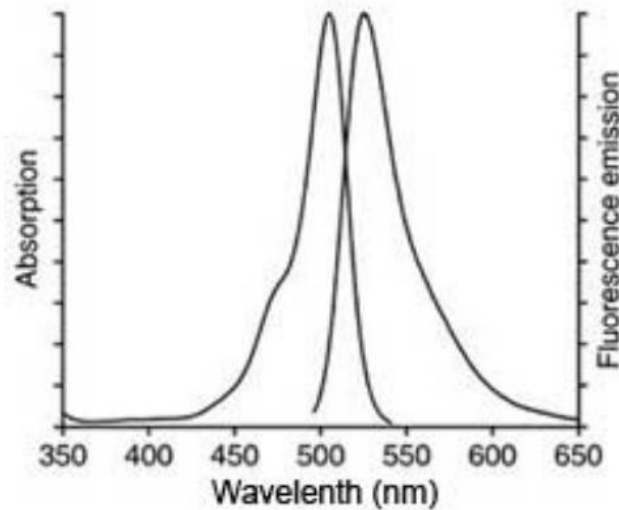
**说明：** 仅在阳性对照孔中加入 Rosup 作为阳性对照，其余孔不必加入 Rosup。

#### 二、 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。

### 三、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。



### 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。