

产品说明书

产品名称：ROS 活性氧检测试剂盒

英文名称：Reactive Oxygen Species Assay Kit

产品货号：BN16033

产品规格：1000T（96孔板）

产品内容：

组分	规格
A. DCFH-DA (10 mM)	0.1 mL
B. 活性氧阳性对照 (Rosup 100 mM)	1 mL

产品参数

Ex/Em: 504/529 nm

贮存条件

-20℃避光保存，有效期见外包装。

产品介绍

DCFH-DA (二氯二氢荧光素-乙醚乙酸酯) 本身无荧光，可自由透过活细胞膜进入细胞内，并被细胞内的酯酶水解，形成 DCFH，DCFH 无荧光且不能通透细胞膜，从而被细胞内的活性氧化生成有荧光的 DCF。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。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。

实验步骤

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℃ 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, 100 mM) 到常用工作浓度 100 μ M，加入细胞，37℃ 避光孵育 30 min-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。

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) 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℃ 细胞培养箱内避光孵育 30 min。

f) 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)

- 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。
- 药物诱导：将收集好的细胞悬浮于适量稀释好的药物，于 37℃ 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：先用无血清培养基稀释阳性对照

(Rosup, 100 mM)到常用工作浓度 100 μ M, 加入细胞, 37°C 避光孵育 30 min-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, 加入稀释好的探针, 使其细胞密度为 1.0×10^6 - 2.0×10^7 。

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

($0.5-1 \times 10^5$ /ml)。

b) 选择流式细胞仪 FL1 或 BL1 通道, 488nm 激发, 测定 530 nm 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. 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 30 min-4 h 可以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 30 min 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。

2. 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 15-60 min 内适当进行调整。

3. 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。

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。