

## Reactive Oxygen Species Assay Kit 活性氧检测试剂盒

### 产品描述

活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 包括超氧自由基、过氧化氢、及其下游产物过氧化物和羟化物等, 参与细胞生长增殖、发育分化、衰老和凋亡以及许多生理和病理过程。活性氧检测试剂盒 (Reactive Oxygen Species Assay Kit, 或 ROS Assay Kit) 是一种利用荧光染料 DCFH-DA (2,7-Dichlorodihydrofluorescein diacetate) 进行细胞内活性氧水平检测的常用方法。检测原理在于 DCFH-DA 本身无荧光, 能自由穿过细胞膜, 一旦进入细胞后, 被胞内的酯酶水解生成无荧光的 DCFH。DCFH 不能穿透细胞膜, 从而保留在胞内。此时胞内的活性氧可以氧化 DCFH 生成有荧光的 DCF。通过 DCF 荧光的强弱即可反映活性氧的水平。

本试剂盒包含活性氧阳性对照 Rosup, 利于活性氧的检测。Rosup 是一种混合物, 浓度为 50mg/ml。因检测对象和反应体系的不同, 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 1000 个样品 1000T(96 孔板)。

### 产品组成

名称	编号	FS1176S-1000T 活性氧 (ROS) 检测试剂盒	Storage
试剂(A):活性氧探针 DCFH-DA		0.1ml (10mM)	-20℃
试剂(B):活性氧阳性对照 Rosup		1ml (50mg/ml)	-20℃
使用说明书		1 份	

### 使用方法

#### 1. 装载探针

【注意】: 对于刺激时间较短 (通常 2h 以内) 的细胞, 先装载探针, 后用活性氧阳性对照 Rosup 和/或待研究药物刺激细胞; 对于刺激时间较长 (通常 6h 以上) 的细胞, 先用活性氧阳性对照 Rosup 或待研究药物刺激细胞, 后装载探针。

##### 1.1 原位装载探针 (仅适用于贴壁细胞)

1) 检测前一天进行细胞铺板, 确保活性氧检测当天细胞汇合率达到 50~70%。  
2) 吸出细胞培养液, 加入适量体积以及浓度的待研究药物, 于 37°C 细胞培养箱内孵育, 具体诱导时间根据细胞类型和药物自身特性决定。

【可选】阳性对照 Rosup: 先用无血清培养液按照 1:1000 比例稀释阳性对照, 通常 37°C 培养箱内刺激 20~30min 可以观察到显著的活性氧水平提高, 但依细胞类型会有比较明显差异【刺激时间可参考文献或实验经验来调整】。如果刺激后 30min 内未观察到活性氧水平升高, 可以适当提高 Rosup 的工作浓度; 反之, 如果活性氧升高过快, 则适当降低 Rosup 的工作浓度。

3) 按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA (10mM), 使其终浓度为 10 μ M。吸出细胞培养液, 加入适当体积 DCFH-DA 工作液。【注意】: 加入体积以能充分盖住细胞为宜。对于 6 孔板, 每个孔加入 DCFH-DA 工作液不少于 1ml。对于 96 孔板, 每个孔加入 DCFH-DA 工作液不少于 0.1ml。

4) 37°C 细胞培养箱内孵育 20min。

5) 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。

## 1.2 收集细胞后装载探针

- 1) 按照常规方法，清洗并收集足量的细胞。【注意】：保证细胞的状态健康。
- 2) 用适量体积以及浓度的待研究药物重新悬浮细胞，于 37°C 细胞培养箱内孵育，具体诱导时间根据细胞类型和药物自身特性决定。【可选】阳性对照 Rosup：先用无血清培养液按照 1:1000 比例稀释阳性对照，通常 37°C 培养箱内刺激 20~30min 可以观察到显著的活性氧水平提高，但依细胞类型会有比较明显差异【刺激时间可参考文献或实验经验来调整】。如果刺激后 30min 内未观察到活性氧水平升高，可以适当提高 Rosup 的工作浓度；反之，如果活性氧升高过快，则适当降低 Rosup 的工作浓度。
- 3) 探针装载前，按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA (10mM)，使其终浓度为 10 μM。
- 4) 离心，吸出细胞内刺激药物，之后用适量 DCFH-DA 工作液重悬细胞，使得细胞密度为  $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ /ml。【注意】：细胞密度需根据后续检测体系，检测方法，以及检测总量来调整。例如，对于流式分析，单管检测内细胞数目控制在 104~106 之间。
- 5) 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。
- 6) 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。

## 2. 检测

### 2.1 原位装载法

可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。

### 2.2 收集细胞后装载法

可用荧光分光光度计、荧光酶标仪或流式细胞仪检测，也可用激光共聚焦显微镜直接观察。

#### 荧光显微照相操作方法

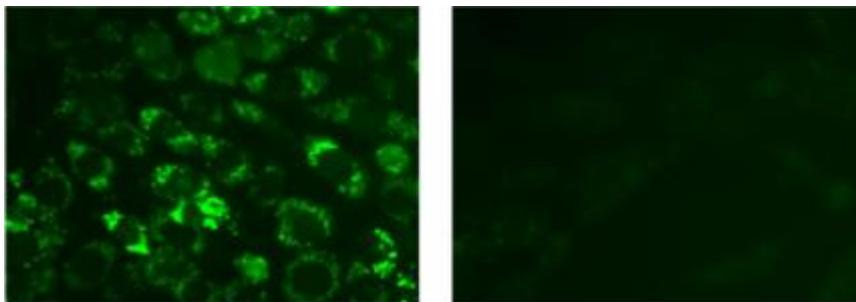
- a) 对贴壁生长细胞或活组织，可直接在荧光显微镜下观察；对悬浮生长细胞，取 25-50 μL 细胞悬液滴到一张显微载玻片上，再盖上一张盖玻片。
- b) 荧光显微镜下，选用 FITC 滤光片观察荧光，去除背景观察荧光的变化。

#### 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。

## 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，可用 FITC 的参数设置检测 DCF。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。



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. 其他说明

- 1) 对于某些细胞，若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 的工作浓度为 2~5  $\mu$  M。探针装载时间也可依情况在 15~60min 内适当进行调整。

2) 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 Rosup 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。
- 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。

