



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

活性氧检测试剂盒（ROS检测试剂盒）（红色荧光）

保存条件:

-20℃保存，一年有效。

产品组成:

组成	试剂名称	规格
A液	DHE红色荧光染料（5mM）	0.2mL
B液	活性氧阳性对照（Rosup, 50mg/mL）	1 ml

产品简介:

活性氧(Reactiveoxygenspecies,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（ReactiveOxygenSpeciesAssayKit）是一种利用荧光探针进行活性氧检测的试剂盒。二氢乙锭 DHE(Dihydroethidium)，可自由透过活细胞膜进入细胞内，并被细胞内的 ROS氧化，形成氧化乙锭；氧化乙锭可掺入染色体 DNA中，产生红色荧光。根据活细胞中红色荧光的产生，可以判断细胞 ROS含量的多少和变化。DHE在细胞内主要被超氧阴离子型 ROS氧化，用流式细胞仪或荧光显微镜可直接观察。

二氢乙锭本身为蓝色荧光，最大激发波长为 370nm，最大发射波长为 420 nm，脱氢后与 RNA或 DNA结合产生红色荧光，最大激发波长为 488~535nm（最适激发波长是 518nm），最大发射波长为 610nm。

本试剂盒只可以用于细胞的活性氧检测，本底低，灵敏度高，线性范围宽，使用方便。本试剂盒可以测定 200个样品 200T(96孔板)。

自备器材:

激光共聚焦显微镜或荧光分光光度计或荧光酶标仪激发波长 488~535nm，发射波长 610nm。离心机，移液器，PBS/ HBSS/ HEPES缓冲液（不含酚红和钙镁）等相关仪器。

使用说明（仅供参考）：



贴壁细胞染色:

(1)使用前用 PBS或者无血清培养基稀释母液至所需工作浓度, 通常 5~20 μ M (按染色液: 稀释液的比例为 1:1000到 1: 250) 就可以满足实验需求, 具体的浓度要根据实验需要进行进一步的调整。

(2)以 96孔板为例, 细胞量在每孔 1×10^5 - 6×10^5 时, 加入的染色量 200 μ l, 工作液浓度在 5-20 μ M, 室温避光孵育 60min或 37°C孵育 30-40min。

(3)去除染色液, 用 1xPBS浸洗 2次后, 显微镜检测。

悬浮细胞染色:

(1)收集悬浮细胞, 离心弃掉培养基, 用 PBS/ HBSS/ HEPES缓冲液 (不含酚红和钙镁) 将细胞调整为 1×10^5 - 6×10^5 /ml的细胞悬液。

(2) 200 μ L的细胞悬液里面加入 1-2 μ L的红色荧光染料原液 (5mM), 吹打混合均匀, 室温避光孵育 60min或 37°C孵育 30-40min。

(3)孵育后, 250-500g离心 5min-10min, 去除染色液, 用 PBS清洗 2次, 显微镜检测。

阳性对照:

阳性对照 Rosup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 μ L的阳性对照刺激。通常刺激后 0.5-4h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 0.5h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。

对于某些特别的细胞, 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 1:2500-1:1000稀释探针的终浓度为 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。

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)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。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

3)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,实验组的荧光值可能会升高。另外有的细胞对探针很敏感,建议工作液浓度适当低到 $1-2\mu\text{M}$ 。浓度太高容易有非特异性染色。

4)探针经稀释后很不稳定,一旦氧化,本底荧光值就会升高,工作液建议现用现配。

5)染色液为 DMSO溶液,气温较低时为凝固状态,极易粘附在管壁、吸头壁。注意需要充分融解后使用,变成液体状态后离心至管底部再开盖。

6)结果处理,推荐表示细胞活性氧强度 = 荧光强度/蛋白 (mg), 并且结合相关文献数据进行计算。

7)如果是流式检测,推荐贴壁细胞用胰酶消化制备成单细胞悬液;悬浮生长细胞,直接收集细胞。用 PBS重悬细胞 $1 \times 10^5-6$ /ml。

8)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。

9)定量的话要作标准曲线。先做一个推荐不同浓度 H_2O_2 ($100-400\mu\text{M}$) 氧化荧光值,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,计算出对应的 X值就是。

10)为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。