



活性氧(ROS)检测试剂盒(DCFH-DA荧光法)

产品简介:

活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)包括超氧化物、过氧化氢、羟自由基以及具有高氧化活性的活性氧代谢产物。活性氧主要由中性粒细胞、巨噬细胞、单核细胞为代表的免疫细胞受到刺激后产生, 其它体细胞在应激条件下线粒体电子传递异常也会产生活性氧。免疫细胞产生的活性氧能够抵御微生物的感染。在病理条件下, 过度产生的活性氧也会导致机体损伤和引发各种疾病。

活性氧检测试剂盒(Reactive Oxygen Species Assay Kit, 也称ROS 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, 通过检测DCF的荧光就可以知道细胞内活性氧的水平, 从而用于病理生理研究或药物筛选。用流式细胞仪或荧光显微镜可直接观察, 是一种经典活细胞中活性氧的检测方法。本试剂盒利用能够刺激多种免疫细胞产生活性氧的佛波酯(PMA)为阳性对照, 灵敏度高, 线性范围宽, 使用方便。本产品仅用于科研领域, 不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

名称 \ 编号	R42218 100T	R42218 500T	Storage
试剂(A): DCFH-DA 溶液(10mM)	0.1ml	0.5ml	-20℃ 避光
试剂(B): PMA 溶液(1000 ×)	0.05ml	0.3ml	-20℃ 避光
使用说明书	1 份		

自备材料:

- 1、细胞、纯化的线粒体、细胞培养用 PBS 或无血清细胞培养液
- 2、系列可调节量程移液器及吸头、离心管、24 孔板、细胞培养箱
- 3、流式细胞仪、荧光酶标仪、荧光分光光度计、激光共聚焦显微镜、荧光显微镜等
- 4、操作步骤(仅供参考):

一、装载ROS探针

1. 原位装载探针(仅适用于贴壁细胞)。

(a)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。

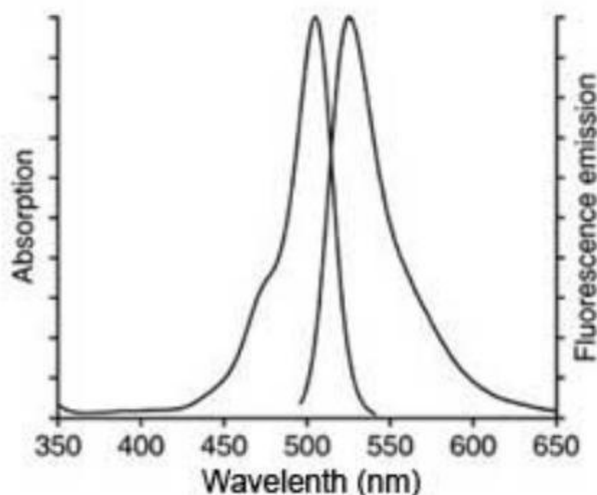


- (b)药物诱导: 去除细胞培养液, 加入适当浓度的药物处理, 于37°C细胞培养箱内避光孵育, 实际诱导时间由药物特性和细胞类型决定。
- (c)阳性对照(可选): 先用无血清培养基按1: 1000比例稀释阳性对照PMA溶液(1000×), 加入细胞, 37°C避光孵育0.5-4h, 以提高活性氧水平, 不同细胞类型存在差异。例如: HeLa细胞需孵育30-60min, MRC5人胚胎成纤维细胞则需孵育90min。
- (d)ROS探针准备: 探针装载前按照1:1000用无血清培养液稀释DCFH-DA, 使其终浓度为10μM。
- (e)ROS探针装载: 吸除处理药物, 加入适当体积稀释好的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1000μl, 对于96孔板通常不少于100μl。37°C细胞培养箱内避光孵育30min。
- (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。用PBS覆盖细胞用于ROS检测。
- 2.收集细胞后装载探针(适用于贴壁细胞和悬浮细胞)
- (a)细胞准备: 按照标准方法培养细胞, 必须保证检测用的细胞状态。按照适当方法, 清洗并收集足量的细胞。
- (b)药物诱导: 将收集好的细胞悬浮于适量稀释好的药物, 于37°C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。
- (c)阳性对照(可选): 先用无血清培养基按1: 1000比例稀释阳性对照PMA溶液(1000×), 加入细胞, 37°C避光孵育0.5-4h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30-60min, 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10μM。
- (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 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ /ml, 37°C细胞培养箱内避光孵育30min。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。用PBS重悬细胞用于ROS检测。

二、观察与分析

- 1、对于原位装载探针的样品可以用激光共聚焦显微镜或荧光显微镜直接观察, 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、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、荧光显微镜观察操作方法: 对于贴壁细胞, 可直接在荧光显微镜下观察; 对于悬浮细胞, 取25-50 μ l细胞悬液滴到一张载玻片上, 再盖上一张盖玻片。DCF的荧光光谱和FITC非常相似, 可以用FITC的参数设置检测。激发波长为488nm, 发射波长为525nm, 荧光显微镜下, 选用FITC滤光片观察DCF荧光, 去除背景观察荧光的变化。DCF的激发光谱和发射光谱参考下图:



- 4、流式细胞分析操作方法: 对于贴壁细胞, 用胰酶消化制备成单细胞悬液; 对于悬浮细胞, 直接收集细胞; 用0.5-1ml PBS重悬细胞($0.5 \sim 1 \times 10^5$ /ml)。选择流式细胞仪FL1或BL1通道, 实时或逐时间点检测刺激前后荧光的强弱。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。
- 5、荧光分光光度计或荧光酶标仪检测方法: 机器开机预热30min以上, 调节激发波长为488nm, 发射波长为525nm, 在黑色不透光的比色皿或96孔板中加入细胞悬液, 测定并记录10min内的荧光值变化。

注意事项:

- 1、初次使用试剂时, 请适当离心后使用。
- 2、活性氧阳性对照(PMA)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。
- 3、初次测定活性氧, 可取小鼠骨髓细胞, 1×10^6 细胞/孔, 接种到24孔板中, 加入1ml无血清培养基稀释1000倍的DCFH-DA, 然后再加入1 μ l PMA溶液(1000 $\times$)刺激30-60min, 检测活性氧作为阳性对照。通常刺激后0.5-4h可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30min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。



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

- 4、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 μ M。探针装载的时间也可以根据情况在15-60min内适当进行调整。
- 5、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。
- 6、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。
- 7、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。
- 8、荧光酶标仪检测时须使用适合荧光检测的黑板或白板。
- 9、如果定量的话需要制作标准曲线。先做一个不同浓度H₂O₂氧化DCFA荧光值，做一条标准曲线，X轴为H₂O₂浓度，Y轴是荧光值，得出一个方程，再看样品的荧光值即Y值是多少，对应的X值即对应的H₂O₂浓度。
- 10、实验组荧光值不高可能是在装载探针后有的细胞容易漂起来，洗细胞时一部分细胞会被吸走。所以在种细胞时可以把细胞量增加一倍，这样细胞紧密连接，贴壁比较牢，荧光值就高了。
- 11、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期：12个月有效。低温运输，-20℃避光保存。

源叶