



细胞活性氧(ROS)荧光法测定试剂盒(绿色)

荧光法

货号: R45137-48S/96S

产品简介:

在正常的生命过程中, 活性氧是维护生命所必需, 在体内处于一种不断产生、不断清除的动态平衡中, 始终维持在一个正常的水平, 可以说是机体的一种有效的防御系统。活性氧的生理功能为参与体内的电子转移、杀菌和物质代谢。

利用化学荧光指示剂即荧光探针: 2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate,(DCFH-DA) 检测细胞内的活性氧。DCFH 可以被各种活性氧所氧化, 转变成一种可以产生荧光信号的物质即二氯荧光素(2',7'-Dichlorofluorescein,DCF), 所得到的DCF 荧光信号并不是被某种单一的活性氧氧化所产生, 所以用这种荧光指示剂测定的活性氧, 反映的是所有活性氧的总的氧化能力。这种荧光信号在激发波长488nm 和发射波长525nm 处有最大波峰, 其荧光强度和活性氧水平成正比。

试剂盒的组成和配制:

试剂名称	R45137-48S	R45137-96S	保存要求	备注
试剂一	液体mL×1支	液体mL×1支	-20℃保存	临用前解冻至室温, 低温时易结晶, 使用前可在25℃水浴至全部融解后使用。
试剂二	液体mL×1瓶	液体mL×2瓶	4℃保存	

所需的仪器和用品:

荧光酶标仪、台式离心机、可调式移液器、黑色96孔板。

活性氧 (ROS) 测定:

建议正式实验前选取2个样本做预测定, 了解本批样品和实验流程, 避免样本和试剂浪费!

1、样本制备:



①贴壁细胞: 吸去培养液, 利用无血清培养液或者0.01M 的 PBS 反复吹打, 肉眼观察孔板底部(瓶底)由半透明(细胞单层连接成片)转为透明, 细胞层几乎全部吹打到 PBS 中。将细胞悬液全部收集到离心管中。用无血清培养液或者0.01M 的 PBS 洗涤2次, 1000rpm, 室温离心5min, 吸净上清, 留细胞沉淀用于测定。

②悬浮细胞: 按常规方法离心(2000rpm, 室温离心5min), 收集细胞沉淀, 用无血清培养液或者0.01M 的 PBS 洗涤2次, 1000rpm, 室温离心5min, 吸净上清, 留细胞沉淀用于测定。

2、上机检测:

①酶标仪预热30min, 调节波长。

②所有试剂解冻至室温(25℃)。混合液制备: 用前将试剂一: 试剂二=1:100制成混合液(现配现用, 用多少配多少)。

③在EP管中依次加入(整个过程尽量避光):

试剂名称(μL)	测定管	空白管(仅做一次)
	细胞沉淀	
混合液	1mL	1mL
混匀, 37℃孵育30min(每隔3-5min颠倒混匀一次), 1000g离心5min, 去上清, 留沉淀。		
试剂二	1mL	1mL
混匀, 取200μL测定管和200μL空白管分别至黑色96孔板中于激发波长488nm,发射波长525nm处读取荧光值F测定和F空白。荧光强度=F测定-F空白。		

结果计算:

1、按照细胞数量计算:

活性氧强度定义: 每万细胞每分钟产生的荧光强度定义为活性氧强度。

活性氧强度(RFU/min/10⁴cell)= 荧光强度/T/500

500---细胞数量, 万;

T--- 反应时间, 30 min。