



植物活性氧（ROS）检测试剂盒

产品内容:

产品货号	产品组分	规格（100 T）	储存温度
R45833-1	DCFH-DA (1 mM)	1 mL	-20℃，避光
R45833-2	探针稀释液	100 mL	-20℃
R45833-3	洗涤液	100 mL×2	-20℃

运输及储存条件：蓝冰运输；-20℃储存，保质期 12 个月。

产品介绍:

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是细胞代谢中的一类天然副产物，主要包括超氧阴离子自由基($\bullet\text{O}_2^-$)、羟基自由基($\bullet\text{OH}$)、单线态氧($^1\text{O}_2$)及过氧化氢(H_2O_2)等，具有较强的氧化能力。DCFH-DA（2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯）是一种可渗透细胞的 ROS 荧光检测探针，主要用于检测细胞内的活性氧。DCFH DA 本身没有荧光，可自由穿过细胞膜进入细胞，被细胞内的酯酶水解生成 DCFH（2',7'-二氯二氢荧光素），而 DCFH 不能透过细胞膜从而被积聚在细胞内，从而被细胞内活性氧氧化成有荧光的 DCF，可用荧光显微镜、流式细胞仪或荧光酶标仪等设备对细胞内活性氧指标进行检测，通过 DCF 强度反应细胞内 ROS 水平及时空分布。

操作步骤:（仅供参考）

一、植物组织（以烟草叶片为例）：

1. 取适量 DCFH-DA (1 mM)母液，用探针稀释液稀释 100 倍，至 10 μM 。
2. 取实验组与对照组相同部位组织（如叶片、根尖）等，用剪刀剪成 1 cm*1 cm 的小块。
3. 将组织迅速浸入 10 μM 的 DCFH-DA 溶液，抽真空 5 min（15 Hg/50 kpa/0.5 N/cm²），然后室温避光孵育 10 min。注：若没有真空泵可适当延长室温孵育时间。



4. 孵育结束后用镊子将组织取出, 然后用洗涤液充分冲洗叶片, 去除未进入细胞残留的 DCFH-DA 探针染料。5. 将组织至于载玻片上。用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜(设置参数: 激发光 488 nm, 发射光 530 nm)对组织进行荧光观察。

二、原生质体(以烟草原生质体为例):

1. 用烟草原生质体制备试剂盒, 分离烟草原生质体。
2. 在 100 μ L 的原生质体细胞中, 加入 1 μ L DCFH-DA (1 mM)母液, 室温孵育 5 min。
3. 150 $\times$ g, 室温离心 5 分钟, 升速 3, 降速 3, 小心吸除液体。
4. 加入 200 μ L 洗涤液, 用切尖的枪头小心重悬原生质体, 避免损伤原生质体。
5. 重复步骤 3、4 一次, 去除未进入细胞残留的 DCFH-DA 探针染料。
6. 用 100 μ L 的洗涤液重悬原生质体, 轻轻混匀。
7. 取 10 μ L 原生质体于载玻片, 用用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜(设置参数: 激发光 488 nm, 发射光 530 nm)对细胞进行荧光观察。

注意事项:

1. DCFH-DA 检测的是总 ROS 水平, 不能区分具体种类。
2. 建议与其他更特异的检测方法联用, 如检测 H_2O_2 的植物组织活性氧检测试剂盒(DAB 法)、检测 O_2^- 的植物组织活性氧检测试剂盒(NBT 法)等。
3. 孵育后建议充分洗涤, 以除去未进入细胞的探针, 否则可能导致背景荧光过高。
4. DCFH-DA 的使用浓度、孵育时间, 需根据具体实验设计进行预试验优化。
5. 使用前建议将 DCFH-DA (1 mM)母液分装成小份, -20 $^{\circ}$ C避光保存, 避免反复冻融。
6. 探针及氧化后的产物对光敏感, 试剂保存及实验操作需避光。