



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 400-666-5481 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: 3008007435@qq.com

植物活性氧（ROS）定量检测试剂盒

货号: R45834-100T

产品内容:

产品货号	产品组分	规格（100 T）	储存
R45834-1	DCFH-DA	0.25 mL	-20℃,避光
R45834-2	提取液	110 mL	-20℃
R45834-3	酶标板（黑）	1 个	常温

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($\cdot\text{O}_2^-$)、羟基自由基($\cdot\text{OH}$)、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, 这种荧光信号在激发波长 488 nm 和发射波长 525 nm 处有最大波峰, 其荧光强度和活性氧水平成正比。

自备仪器耗材:

冰、研磨仪（液氮、研钵/匀浆机）、离心机、移液枪、荧光酶标仪

操作步骤（仅供参考）:

建议正式实验前选取两个差异大的样本做预实验, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费。

1. 实验准备:

(1) 打开酶标仪预热 30 min, 调节波长（激发光 488 nm、发射光 525 nm）。



(2) 将试剂从-20℃冰箱取出，常温水浴解冻。

2. 样本制备:

(1) 组织样本: 先把研磨模块提前放到-20℃预冷，称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液，加入适量预冷的提取液、钢珠，按照研磨仪要求设定参数，难磨样本可以提高震荡频率、延长时间或者多次反复研磨。12000 rpm，4℃离心 10 min，取上清置于冰上待测。

注 1: 若增加样本量，可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5-1: 10 的比例进行提取。2: 若没有研磨仪也可以使用研钵进行冰浴匀浆或液氮研磨，将样本研磨成粉末并称取到离心管中，加入适量提取液，振荡混匀。

(2) 液体样本: 澄清液体样本直接检测，若浑浊则 12000 rpm 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

3. 上机检测: 按照下表在黑色酶标板中依次加入各组分 (整个过程尽量避光)

。

试剂名称	测定组	空白组
DCFH-DA	2 μL	2 μL
样本	200 μL	
提取液		200 μL

混匀后，37℃避光孵育 30 min，于激发波长 488 nm，发射波长 525 nm 处读取荧光值 F。荧光强度 $\Delta F = F_{\text{测定}} - F_{\text{空白}}$ ，空白组只需做 1-2 次。

注: 若荧光值较小，可以增加 37℃孵育反应时间 T 或增加 DCFH-DA 溶液用量; 若荧光值较大，可以减少 37℃孵育反应时间或稀释 DCFH-DA 使用。

4. 结果计算:

(1) 按样本质量计算:

活性氧强度定义: 每克组织每分钟产生的荧光强度。

活性氧强度 = 荧光强度 $\Delta F \div T \div W \div (V1 \div V)$

(2) 按样本蛋白浓度计算:

活性氧强度定义: 每毫克组织蛋白每分钟产生的荧光强度。



活性氧强度=荧光强度 $\Delta F \div T \div Cpr \div (V1 \div V)$

(3) 按液体体积计算:

活性氧强度定义: 每毫升液体每分钟产生的荧光强度。

活性氧强度=荧光强度 $\Delta F \div T \div V1$

注: 数据与质量和蛋白浓度的单位无关。

W—样品质量, g;

T—反应时间, 30 min;

V1—样本加入体积, 0.2 mL;

V—加入提取液体积, 1 mL;

Cpr—上清液蛋白浓度, g/L;

注意事项:

1. DCFH-DA 检测的是总ROS 水平, 不能区分具体种类。
2. 使用前建议将 DCFH-DA 溶液分装成小份, -20℃避光保存, 避免反复冻融。
3. 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。

保存条件:

-20℃避光, 12个月