

线粒体活性氧产生速率 (ROS) 检测试剂盒（荧光法）

货号：PMK1883

保存：-20℃避光保存 12 个月

规格：48T/96T

适用样本：组织、细胞

产品简介

活性氧(Reactive oxygen species, 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，研究表明，机体 95% 以上的活性氧 (ROS) 都来自于线粒体，其失衡所致的氧化应激与细胞生长增殖、发育分化、衰老和凋亡以及许多生理和病理过程有关。正常情况下，细胞内抗氧化防御系统与氧自由基处于平衡状态，细胞内活性氧 (ROS) 水平维持在较低的生理范围；在病理情况下，细胞内抗氧化系统与氧自由基的平衡被打破，细胞内活性氧水平过多，就可破坏线粒体酶类、脂类和核酸，使机体出现氧化应激，同时，活性氧还可攻击线粒体 DNA 产生氧化损伤，导致线粒体 ATP 合成减少、线粒体膜电位破坏等结构和功能变化。因此，通过检测活性氧的变化来判断线粒体的功能是否正常具有重要意义。本试剂盒提供了一荧光测定法，用于直接定量检测线粒体 ROS 产生速率。其原理是荧光探针-还原型二氯荧光素 (2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) 可扩散通过线粒体膜，在线粒体内被酯酶水解，形成无荧光的 DCFH，DCFH 迅速与 ROS 反应生成荧光物-氧化型二氯荧光素 (2', 7'-dichlorofluorescein, DCF)。将荧光强度随时间变化的数据点拟合，线性回归直线斜率与 ROS 产生的速率呈正比。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
试剂一	60mL	120mL	4℃ 保存
试剂二	25mL	50mL	4℃ 保存
试剂三	1mL	2mL	-20℃ 避光保存
试剂四	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	4℃ 保存
试剂五	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	4℃ 保存
试剂六	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	4℃ 保存
试剂七	25 μL	50 μL	-20℃ 避光保存

自备耗材

荧光酶标仪或多功能酶标仪、恒温培养箱、分析天平
全黑 96 孔板、可调节式移液枪及枪头
低温离心机、制冰机
去离子水
匀浆器或研钵

试剂准备

注意：小管试剂开盖前，请先低速离心。

试剂一：即用型；4℃ 保存。

试剂二：即用型；4℃ 保存。

试剂三：即用型；4℃ 保存。

产品说明书

试剂四：临用前 48T 加入 3mL 试剂二；96T 加入 6mL 试剂二充分溶解；4℃ 保存。

试剂五：临用前 48T 加入 3mL 试剂二；96T 加入 6mL 试剂二充分溶解；4℃ 保存。

试剂六：临用前 48T 加入 3mL 试剂二；96T 加入 6mL 试剂二充分溶解；4℃ 保存。

试剂七：临用前用试剂二稀释 300 倍后使用；根据样本数量计算需要的量，现用现配；-20℃ 避光保存。

样本制备

线粒体提取：

1. 准确称取 0.1g 组织或收集 500 万细胞，加入 1mL 试剂一和 10μL 试剂三，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。

2. 将上述匀浆液于 600g，4℃ 离心 5min。

3. 弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃ 离心 10min。

4. 弃上清，沉淀中加入 200 μL 试剂二重悬。

注意：推荐使用新鲜样本，以保证酶的活力。如需测定蛋白浓度，推荐使用 Bradford 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 荧光酶标仪或多功能酶标仪预热 30min 以上，调节激发光 499nm，发射光 521nm。

2. 样本测定（在全黑 96 孔板中依次加入下列试剂）：

试剂名称	测定孔（μL）	空白孔（μL）
样本线粒体悬液	20	0
试剂二	0	20
试剂四	50	50
试剂五	50	50
试剂六	50	50
试剂七	30	30

充分混匀，37℃ 避光孵育 15min。孵育完成后，在 37℃ 测定 10min 内的荧光强度，激发波长 499nm，发射波长 521nm，记录 10min 内荧光值变化。空白孔只需做 1 个

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果线性不好且荧光值较高，可适当减少样本量进行检测，计算公式中调整样本鲜重 W。

结果计算

ROS 产生速率计算：

对采样数据点即荧光强度随时间的变化进行线性回归拟合处理，计算出回归系数，即直线斜率（k）。实际线粒体 ROS 产生速率等于样本荧光强度随时间变化的数据点线性回归直线斜率（ $k_{\text{测定}}$ ）减去本底荧光强度随时间变化的数据点线性回归直线斜率（ $k_{\text{空白}}$ ）。

1. 按样本鲜重计算：每 g 组织线粒体每秒钟荧光单位的变化，即 u/s/g 鲜重

ROS 产生速率 (u/s/g 鲜重) = $(k_{\text{测定}} - k_{\text{空白}}) / (V_{\text{样}} \div V_{\text{总}} \times W) = 10 \times (k_{\text{测定}} - k_{\text{空白}}) \div W$

2. 按样本蛋白浓度计算：每毫克蛋白线粒体每秒钟荧光单位的变化，即 u/s/mg prot

ROS 产生速率 (u/s/mg prot) = $(k_{\text{测定}} - k_{\text{空白}}) / (V_{\text{样}} \div V_{\text{总}} \times \text{Cpr}) = 10 \times (k_{\text{测定}} - k_{\text{空白}}) \div \text{Cpr}$

$V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.02mL； $V_{\text{样总}}$ ：悬液体积，0.2mL；W：样本鲜重，g；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL。

注意事项

- 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
- 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
- 本试剂盒应在有效期内使用，并严格按照说明书进行存储。
- 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
- 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

产品说明书

相关产品：

PMK0859 ROS 活性氧检测试剂盒

PMK1052 羟自由基清除能力检测试剂盒（微量法）

PMK1036 超氧化物歧化酶（SOD）检测试剂盒（微量法）

PMK1038 过氧化物酶（POD）检测试剂盒（微量法）

PMK1041 黄嘌呤氧化酶（XO）检测试剂盒（微量法）

PMK1037 过氧化氢酶（CAT）检测试剂盒（微量法）

PMK1061 超氧阴离子清除能力检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

