

# ROS 活性氧检测试剂盒

货号：PMK0859。

保存：-20℃避光保存 12 个月。

规格：1000T。

用途：可以判断细胞活性氧的含量和变化，是一种经典的活细胞中活性氧检测方法。

## 产品简介

ROS 活性氧检测试剂盒是一种利用荧光探针 H<sub>2</sub>DCFH-DA 进行活性氧检测的试剂盒。H<sub>2</sub>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。检测 DCF 的荧光就可以知道细胞内活性氧的水平。根据活细胞中荧光的产生，可以判断细胞活性氧的含量和变化。用流式细胞仪或荧光显微镜可直接观察，是一种经典的组织或活细胞中活性氧检测方法。本试剂盒提供了活性氧阳性对照试剂 Rosup，以便于活性氧的检测。Rosup 是一种混合物，浓度为 50mg/mL。Rosup 为活性氧阳性诱导药物，根据其荧光信号强度，可分析活性氧的真正水平。

本试剂盒本底低，灵敏度高，线性范围宽，使用方便。

本试剂盒可以测定 1000 个样品（以 96 孔板为标准）。

## 产品内容

产品组分	规格	保存条件
A 液:H <sub>2</sub> DCFH-DA(10mM)	0.1ml	-20℃避光保存
B 液:活性氧阳性对照(Rosup,50mg/ml)	0.1ml	-20℃避光保存

## 操作步骤：

### 一. 装载 ROS 探针

#### 1. 原位装载探针(仅适用于贴壁细胞)

- 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  $5 \times 10^5$ /ml。
- 药物诱导：去除细胞培养液，加入无血清培养基稀释的药物处理，于 37℃ 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。
- (可选) 阳性对照：先用无血清培养基等稀释阳性对照 (Rosup, 100 mM) 到常用工作浓度 100  $\mu$ M，加入细胞，37℃ 避光孵育 0.5~4 h，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 30-60 min，MRC5 人胚胎成纤维细胞则需孵育 90 min。
- ROS 探针准备：探针装载前按照 1:1000 用无血清培养液稀释 H<sub>2</sub>DCFH-DA，使其终浓度为 10  $\mu$ M。
- ROS 探针装载：吸除处理药物，加入适当体积稀释好的 H<sub>2</sub>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 1000  $\mu$ L，对于 96 孔板通常不少于 100  $\mu$ L。37℃ 细胞培养箱内避光孵育 30 min。
- 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 H<sub>2</sub>DCFH-DA。

#### 2. 收集细胞后装载探针(适用于贴壁细胞和悬浮细胞)

- 细胞准备：按照标准方法培养细胞，必须保证检测用细胞状态。按照适当方法，清洗并收集足量的细胞。
- 药物诱导：将收集好的细胞悬浮于适量稀释好的药物，于 37℃ 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。
- (可选) 阳性对照：先用无血清培养基稀释阳性对照 (Rosup, 100 mM) 到常用工作浓度 100  $\mu$ M，加入细胞，37℃ 避光孵育 0.5~4 h 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 30-60 min，MRC5 人胚胎成纤维细胞则需孵育 90min。
- ROS 探针准备：探针装载前，按照 1:1000 用无血清培养液稀释 H<sub>2</sub>DCFH-DA，使其终浓度为 10  $\mu$ M。
- 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  $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 。

## 产品说明书

注意：细胞密度需根据后续的检测体系，检测方法，以及检测总量来进行调整。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  $H_2DCFH-DA$ 。

### 二. 荧光显微照相操作方法

1. 对贴壁生长细胞或活组织，可直接在荧光显微镜下观察；对悬浮生长细胞，取 25-50  $\mu L$  细胞悬液滴到一张显微载玻片上，再盖上一张盖玻片。

2. 荧光显微镜下，选用 FITC 滤光片观察荧光，去除背景观察荧光的变化。

### 三. 流式细胞分析操作方法

1. 对贴壁生长细胞，用胰酶消化制备成单细胞悬液；对悬浮生长细胞，直接收集细胞。用 0.5-1 mL PBS 重悬细胞( $0.5 \sim 1 \times 10^5/ml$ )。

2. 选择流式细胞仪 FL1 或 BL1 通道，488nm 激发，测定 530nm 的发射，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。

### 四. 参数设置

使用 488nm 激发波长，525nm 发射波长，实时或逐时间点检测刺激前后荧光的强弱。DCF 的荧光光谱和 FITC 非常相似，可以用 FITC 的参数设置检测 DCF。

### 注意事项：

1. 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。

2. 阳性对照 Rosup 一般使用浓度为 100uM (推荐浓度 100-400uM，具体依细胞类型而定)。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，可延长诱导时间或适当提高活性氧阳性对照的浓度。如果活性氧升高得过快，可缩短诱导时间或适当降低活性氧阳性对照的浓度。

3. 对于某些特别的细胞，实验过程中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  $H_2DCFH-DA$ ，使  $H_2DCFH-DA$  的终浓度为 2-5 uM。探针装载的时间也可以根据情况在 15-60 min 内适当进行调整。

4. 活性氧阳性对照(Rosup) 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。

5. 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。DCF 的激发光谱和发射光谱请参考上图。

6. 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。

7. 如需定量，需制作标准曲线。通过测定不同浓度的  $H_2O_2$  氧化  $H_2DCFDA$  的荧光值做标准曲线，X 轴为  $H_2O_2$  浓度，Y 轴是荧光值。根据样品的荧光值即 Y 值，计算 X 值即对应的  $H_2O_2$  浓度

8. 有的细胞装载探针后细胞容易漂起来，洗细胞时实验组会吸走一部分细胞。所以种细胞时细胞量增加一倍，这样细胞紧密连接，贴壁比较牢，实验组的荧光值就高了。另外的  $H_2DCFDA$  很敏感，工作液浓度要低一些，1-2uM 就够啦，浓度太高容易有非特异性染色。这个探针很不稳定，一旦氧化了本底荧光值就会升高，最好工作液现用现配。

9. 为了您的安全和健康，操作时必须戴口罩/手套/实验服和其它生化实验室防护措施。

10. 本产品仅限于专业人员用于生命科学研究，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅。

### 相关产品：

PMK1300 考马斯亮蓝蛋白胶快速染色液

PMK053 GAPDHmAb-HRP conjugated

PMK0312 抗体稀释液 PMK1700PBST 缓冲液

PMK1020 IPTG 溶液 (50mg/ml)

PMK1010 30%丙烯酰胺 (29:1)

PMK1070 5×Tris-甘氨酸电泳缓冲液

PMK0012 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒

更多产品详情了解，请关注公众号：

