



细胞内 ROS 检测试剂盒 (绿色荧光)

| 产品货号 | 产品名称 | 包装 |
|--------|----------------------|------|
| DW0014 | 细胞内 ROS 检测试剂盒 (绿色荧光) | 100T |

产品介绍:

活性氧检测试剂盒(Reactive Oxygen Species Assay Kit)是一种基于荧光染料 DCFH-DA (2,7-Dichlorodi-hydrofluorescein diacetate)的荧光强度变化, 定量检测细胞内活性氧水平的最常用方法。

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 不会通透细胞膜, 因此探针很容易被积聚在细胞内。细胞内的活性氧能够氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF。绿色荧光强度与活性氧的水平成正比。在最大激发波长 480 nm, 最大发射波长 525 nm 处, 使用荧光显微镜、流式细胞仪或激光共聚焦显微镜等检测荧光信号。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。

以 96 孔板每孔加样量为标准, 本试剂盒可测定约 1000 次。

操作过程

1. 装载探针

1.1 原位装载探针 (仅适用于贴壁细胞)

1.1.1 细胞准备: 检测前一天进行细胞铺板, 确保检测时细胞汇合度达到 50~70%。

【注】: 必须保证细胞状态健康, 且检测时不会过度生长。

1.1.2 药物诱导: 去除细胞培养液, 加入适量经合适的缓冲液或无血清培养基稀释到工作浓度的药物, 于 37°C 细胞培养箱内避光孵育, 具体诱导时间根据药物本身特性, 以及细胞类型来决定。

(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 μ M, 加入细胞, 一般 37°C 避光孵育 30 min-4 h 可显著看到活性氧水平提高, 但依细胞类型会有比较明显差异。【如 HeLa 细胞孵育 30 min; MRC5 人胚胎成纤维细胞 1.5 h】

1.1.3 探针准备: 探针装载前按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA, 使其终浓度为 10 μ M。

1.1.4 探针装载: 吸除诱导用药物, 加入适当体积稀释好的 DCFH-DA 工作液。加入的体积以能充分盖住细胞为宜。例如, 对于 6 孔板通常不少于 1000 μ L, 对于 96 孔板通常不少于 100 μ L。37°C 细胞培养箱内避光孵育 30 min。

1.1.5 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 DCFH-DA。

1.2 收集细胞后装载探针: 适用于贴壁细胞和悬浮细胞。

1.2.1 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健康。按照适当方法, 清洗并收集足量的细胞。

1.2.2 药物诱导: 将收集好的细胞悬浮于适量稀释好的药物, 于 37°C 细胞培养箱内避光孵育, 具体诱导时间根据药物本身特性, 以及细胞类型来决定。

(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 μ M, 加入细胞, 一般 37°C 避光孵育 30 min-4 h 可显著看到活性氧水平提高, 但依细胞类型会有比较明显差异。【如 HeLa 细胞孵育 30 min; MRC5 人胚胎成纤维细胞 1.5 h】

1.2.3 探针准备: 探针装载前, 按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA, 使其终浓度为 10 μ M。

1.2.4 探针装载: 去除细胞内药物, 离心收集细胞, 加入适当稀释好的探针, 使其细胞密度为 $1.0 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^7$ 。【注】: 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。如对于流式分析, 单管检测内细胞数目不少于 104, 也不可多于 106。每隔 3-5 min 颠倒混匀一下, 使探针和细胞充分接触。

1.2.5 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 DCFH-DA。



2. 检测

2.1 原位装载探针法：激光共聚焦显微镜直接观察，或收集细胞后用荧光分光光度计、荧光酶标仪或流式细胞仪检测。

2.2 收集细胞后装载探针：用荧光分光光度计、荧光酶标仪或流式细胞仪检测，也可以用激光共聚焦显微镜直接观察。

3. 参数设置

使用 488 nm 激发波长，525 nm 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。

其他事项说明

1. 对于刺激时间较短（通常 2 h 以内）的细胞，也可先装载探针，后用活性氧阳性对照和/或感兴趣药物刺激细胞，如阳性对照刺激，应先加入适量探针于 37°C 避光孵育 30 min；然后再加入等体积 2×阳性对照 Rosup 溶液(200 μM)，37°C 避光诱导 30 min-4 h；

2. 阳性对照 Rosup 通常浓度为 100 μM。通常刺激后 30 min-4 h 可以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 30 min 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. 对于某些细胞，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 DCFH-DA，使装载探针时 DCFH-DA 的浓度为 2 ~ 5 μM。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。

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. 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。

3. 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。

4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

5. 本产品仅作科研用途！

本产品文章中的写法：

英文：Dowobio (Shanghai, China)

中文：上海多沃生物科技有限公司 Dowobio, 上海