上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话：021-61312973　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：shyysw@sina.com

活性氧检测试剂盒

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，参与细胞生长增殖、发育分化、衰老和凋亡以及许多生理和病理过程。

源叶活性氧检测试剂盒(Meilun 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 不能通透细胞膜，从而使探针很容易被标记到细胞内。在活性氧存在的条件下，DCFH 被氧化生成荧光物质 DCF，绿色荧光强度与细胞内活性氧水平成正比，检测 DCF 的荧光就可以知道细胞内活性氧的水平。在激发波长 502 nm，发射波长 530 nm 附近，使用荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、荧光分光光度计、荧光酶标仪、流式细胞仪等检测 DCF 荧光，从而测定细胞内活性氧水平。

本试剂盒背景低、灵敏度高、线性范围宽、使用方便，可以用于各种真核培养细胞的检测。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。以 96 孔板每孔加样量为标准，R22380-100T 可测定约 100 次。

产品组成：

产品编号	产品名称	100T	1000T
R22380	DCFH-DA (10mM)	0.1ml	1ml
	活性氧阳性对照 (Rosup, 50mg/ml)	1ml	10ml
—	说明书	1 份	1 份

保存条件：

-20° C 保存，一年有效。

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。DCF 的激发光谱和发射光谱请参考上页图谱。

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，操作时请穿着实验服并佩戴一次性手套。

使用说明：

1.装载探针

对于刺激时间较短（通常为 2 小时以内）的细胞，先装载探针，后用活性氧阳性对照或自己感兴趣的药物刺激细胞。对于细胞刺激时间较长（通常为 6 小时以上）的细胞，先用活性氧阳性对照或自己感兴趣的药物刺激细胞，后装载探针。

1.1 原位装载探针（仅适用于贴壁细胞）

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。

②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 10μM。

③探针装载：吸除细胞培养液，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，如，对于 6 孔板通常不少于 1000 μL，对于 96 孔板通常不少于 100μL。37℃细胞培养箱内避光孵育 20~30 min。

④细胞清洗：用无血清培养液洗涤细胞 3 次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。

⑤药物诱导：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℃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 1:1000 稀释阳性对照（ Rosup, 50mg/ml），加入细胞，一般 37℃避光孵育 20~30 min 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 收集细胞后装载探针（适用于贴壁细胞和悬浮细胞）

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。

②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 μM。

③探针装载：细胞收集后悬浮于加入适当体积稀释好的 DCFH-DA 工作液，使其细胞密度为 1.0×10 ~2.0×10 /mL，37℃细胞培养箱内避光孵育 20~30 min，每隔 3-5 min 颠倒混匀一下，使探针和细胞充分接触。

【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 10，也不可多于 10。

④细胞清洗：用无血清培养液洗涤细胞 3 次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。

⑤药物诱导：将细胞悬浮于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中，或把细胞等分成若干份后再进行药物刺激，于 37℃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 1:1000 稀释阳性对照（Rosup, 50mg/ml），加入细胞，一般 37℃避光孵育 20~30 min 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）

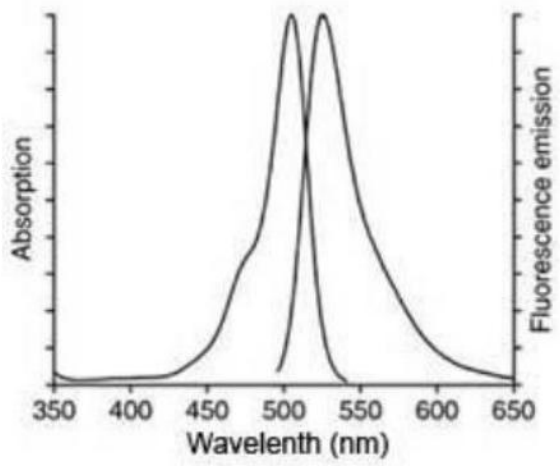
2.检测

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。

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。DCF 的激发光谱和发射光谱参考下图。



其他事项说明：

1. 阳性对照 Rosup 通常按照 1:1000 的比例使用。通常刺激后 20~30 min 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。

2. 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。

3. 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。