



## ROS 活性氧检测试剂盒

版本号: V1.0-202206

### 一、产品规格

产品组成	BLGE296-100T
ROS 活性氧检测试剂盒	100T
说明书	1 份

### 二、产品情况

活性氧检测试剂盒 (Reactive Oxygen Species Assay Kit, 也称 ROS Assay Kit) 是一种利用荧光探针 DCFH-DA 进行活性氧检测的试剂盒。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。

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 (compound mixture), 浓度为 50mg/ml。

本试剂盒本底低, 灵敏度高, 线性范围宽, 使用方便。

### 三、储存运输

-20°C 保存, 一年有效。

### 四、注意事项

1. 探针装载后, 请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. 为了您的健康安全, 请穿戴实验服且佩戴一次性手套进行操作。

### 五、使用方法

#### 1. 装载探针

对于刺激时间较短 (通常为 2h 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 6h 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。

原位装载探针: 本方法仅适用于贴壁培养细胞。按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA, 使终浓度为 10 $\mu$ mol/L。去除细胞培养液, 加入适当体积稀释好的 DCFH-DA。加入的体积以能充



分盖住细胞为宜，通常对于六孔板的一个孔加入稀释好的 DCFH-DA 不少于 1mL。37°C 细胞培养箱内孵育 20min。用无血清细胞培养液洗涤细胞三次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。通常活性氧阳性对照在刺激细胞 20-30min 后可以显著提高活性氧水平。

收集细胞后装载探针：按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA，使终浓度为 10 $\mu$ mol/L。细胞收集后悬浮于稀释好的 DCFH-DA 中，细胞浓度为 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 至 2 $\times$ 10<sup>7</sup>/mL，37°C 细胞培养箱内孵育 20min。每隔 3-5min 颠倒混匀一下，使探针和细胞充分接触。用无血清细胞培养液洗涤细胞三次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。直接用活性氧阳性对照或自己感兴趣的药物刺激细胞，或把细胞等分成若干份后刺激细胞。通常活性氧阳性对照在刺激细胞 20-30min 后可以显著提高活性氧水平。

说明：仅在阳性对照孔中加入 Rosup 作为阳性对照，其余孔不必加入 Rosup。

## 2. 检测

对于原位装载探针的样品可以用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。对于收集细胞后装载探针的样品可以用荧光分光光度计、荧光酶标仪或流式细胞仪检测，用激光共聚焦显微镜直接观察也可以。

## 3. 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。

## 4. 其它说明

阳性对照可以按照 1:1000 的比例使用。例如装载好探针的细胞共 1mL，可以加入 1 $\mu$ L 的阳性对照刺激。通常刺激后 20-30min 内可以观察到非常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，可以适当提高活性氧阳性对照的浓度。如果活性氧升高得过快，可以适当降低活性氧阳性对照的浓度。

另外，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  $\mu$ mol/L。

探针装载的时间也可以根据情况在 15-60min 内适当进行调整。

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。

**本产品仅供科研使用，不得用于临床诊断！**