



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 μ 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 μ mol/L。细胞收集后悬浮于稀释好的 DCFH-DA 中，细胞浓度为 1 \times 10⁶ 至 2 \times 10⁷/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 μ 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 μ 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！