

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DCFH-DA。

2. 荧光显微镜操作方法

a) 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 μL 细胞悬液滴到一张显微载玻片上, 再盖上一张盖玻片。

b) 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。

3. 流式细胞分析操作方法

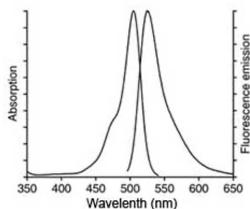
a) 对贴壁生长细胞, 用胰酶消化制备成单细胞悬液; 对悬浮生长细胞, 直接收集细胞。用0.5-1 mL PBS 重悬细胞(0.5~1 x 10⁵/ml)。

b) 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。

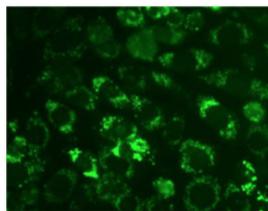
4. 参数设置

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。DCF的激发光谱和发射光谱参考附件左图。

附件:



左图



中图



右图

使用活性氧检测试剂盒(Reactive oxygen species assay kit)显示CHO细胞内活性氧荧光。

中图: CHO细胞用试剂盒配备的活性氧阳性对照处理;

右图: 正常CHO细胞。绿色荧光表明细胞活性氧急剧增加, 并能显示其定位。



Toll-free:400-611-2007

Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com



版本号:2022-04-03

活性氧ROS检测试剂盒

Reactive Oxygen Species Assay Kit

目录号: ZP329

试剂盒组成 1000T (96孔板)	包装	保存
H2DCFH-DA(10mM)	0.1 ml	-20°C避光保存
阳性对照 (Ros, 100 mM)	1 ml	

注: ① 尽量避光即可。 ② 4°C保存半年, -20°C保存两年以上。

■ 产品简介

活性氧ROS检测试剂盒 (Reactive Oxygen Species Assay Kit) 是一种利用荧光探针H2DCFH-DA进行活性氧检测的试剂盒。H2DCFH-DA本身无荧光, 可自由穿过细胞膜, 进入细胞后, 可以被细胞内的酯酶水解生成DCFH。而DCFH不能透过细胞膜, 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的荧光就可知道细胞内活性氧的水平。根据活细胞中荧光, 可以判断细胞活性氧的含量和变化。可使用流式细胞仪检测或荧光显微镜直接观察; 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Ros (50mg/mL), 以便于活性氧的检测。Ros 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。

本试剂盒使用方便, 本底低, 灵敏度高, 线性范围宽。1000T(96孔板)可以测定1000个样品。

实验室使用, 仅用于科研

北京庄盟国际生物基因科技有限公司
Beijing Zoman Biotechnology Co.,Ltd.

■ 注意事项

本公司所有产品仅限用于研发，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。

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Ros 一般使用浓度为100 μM （推荐浓度100-400 μM ，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DCFH-DA，使DCFH-DA 的终浓度为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(Ros) 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附件左图。
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. 定量的话要作标准曲线。先做一个不同浓度H₂O₂氧化DCFA荧光值，做一条标准曲线，X轴为H₂O₂浓度，y轴是荧光值。
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H₂DCFDA很敏感，工作液浓度1-10 μM ，浓度太高可能有非特异性染色。此探针很不稳定，一旦氧化了本底荧光值就会升高，最好工作液现用现配。

■ 使用说明:

1、装载ROS 探针

1.1 原位装载探针(仅适用于贴壁细胞)

- a) **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 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 。
- b) **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°C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。
- c) **(可选) 阳性对照:** 先用无血清培养基等稀释阳性对照 (Ros, 100 mM) 到常用工作浓度100 μM ，加入细胞，37°C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。
- d) **ROS 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 。
- e) **ROS 探针装载:** 吸除处理药物，加入适当体积稀释好的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 μL ，对于96孔板通常不少于100 μL 。37°C细胞培养箱内避光孵育30 min。
- f) **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)

- a) **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。
- b) **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，实际诱导时间由药物特性和细胞类型决定。
- c) **(可选) 阳性对照:** 先用无血清培养基稀释阳性对照 (Ros, 100 mM) 到常用工作浓度100 μM ，加入细胞，37°C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。
- d) **ROS 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 。
- e) **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 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 。

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 。