

产品说明书

ROS 活性氧检测试剂盒

产品货号: R6033

产品规格: 1000T

产品内容:

组分	规格
A. DCFH-DA (10 mM)	0.1 mL
B. 活性氧阳性对照 (Rosup 100 mM)	1 mL

产品参数

Ex/Em: 504/529 nm

储存条件

-20°C避光保存, 有效期见外包装。

产品介绍

DCFH-DA (二氯二氢荧光素-乙酰乙酸酯) 本身无荧光, 可自由透过活细胞膜进入细胞内, 并被细胞内的酯酶水解, 形成 DCFH, DCFH 无荧光且不能通透细胞膜, 从而被细胞内的活性氧化生成有荧光的 DCF。根据活细胞中荧光的产生, 可以判断细胞活性氧的含量和变化。用流式细胞仪或荧光显微镜可直接观察, 是一种经典的组织或活细胞中活性氧检测方法。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。

使用方法

1. 装载ROS探针

(1) 原位装载探针(仅适用于贴壁细胞)

- 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 5×10^5 /mL。
- 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。

- (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, 37°C避光孵育30 min-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 μ M。

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1 mL, 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。

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。

(2) 收集细胞后装载探针 (适用于贴壁细胞和悬浮细胞)

- 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。
- 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。
- (可选) 阳性对照: 先用无血清培养基稀释阳性对照 (Rosup, 100 mM) 到常用工作浓度100 μ M, 加入细胞, 37°C



避光孵育30 min-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 μ M。

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 1.0×10^6 - 2.0×10^7 。

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 。

f. 细胞清洗：用 $1 \times$ PBS洗涤细胞1-2次，以充分去除未进入细胞内的DCFH-DA。

2. 荧光显微镜检测

(1) 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 μ L 细胞悬液滴到一张显微载玻片上，再盖上一张盖玻片。

(2) 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. 流式细胞仪分析

(1) 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

($0.5-1 \times 10^5$ /mL)。

(2) 选择流式细胞仪 FL1 或 BL1 通道，488 nm 激发，测定 530 nm 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。

注意事项

1. 阳性对照 Rosup 一般使用浓度为 100 μ M（推荐浓度 100-400 μ M，具体依细胞类型而定）。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。

2. 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 μ M。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。

4. 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。

