

ROS 活性氧检测试剂盒

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。

应用范围

活性氧检测

产品货号

R6033

储运条件

-20°C 避光保存, 有效期见外包装; 冰袋运输。

产品特点

稳定性好: 荧光亮度高且抗淬灭性好;

批间差小: 产品为公司自研, 批间差控制的好。

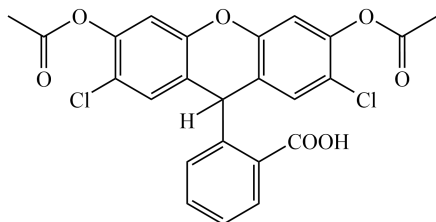
产品组分

组分	1000T
A. DCFH-DA (10 mM)	0.1 mL
B. 活性氧阳性对照(Rosup 100 mM)	1 mL

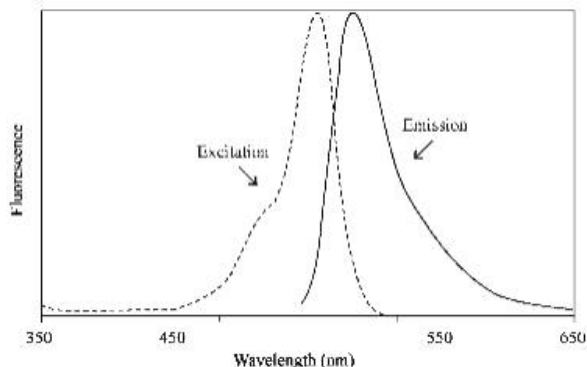
产品参数

Ex/Em: 504/529 nm

分子结构图:



光谱图:



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。
5. 若样本为组织, 可以检测组织的原代培养细胞或者制备成单细胞悬液检测。
6. 本产品仅限于科研, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
7. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

自备材料

1. 耗材
细胞培养板
2. 试剂
无血清细胞培养基

操作步骤

1. 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。

2. 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。

3. 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。

4. 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

1) 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。

2) 组织样本, 采用标准方法制备单细胞悬液。

(2) 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。

(3) (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。

(4) 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。

(5)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 $1.0 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^7$ 。

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。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 。

(6)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。

5. 检测设备的选择

(1)荧光显微镜检测

1)对贴壁生长细胞，可直接在荧光显微镜下观察；对悬浮生长细胞或单细胞悬液，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。

(2)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($0.5 \sim 1 \times 10^5$ /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。

FAQ

1. 问：为什么没有刺激的阴性对照细胞荧光也比较强呢？

答：可以降低一下染料的浓度和染料孵育时间；按照 1: 2000~1: 5000 稀释，孵育时间在 15~60 min 内适当进行调整。

同系列产品

产品货号	产品名称	选购指南
R6033	ROS 活性氧检测试剂盒	活性氧检测试剂盒，并且配套阳性刺激药物，方便老师做阳性对照
D1008	ROS 荧光探针-DHE	该染料氧化前后颜色有明显区别，可很好定量 ROS 含量
D1002	H2DCFDA(DCFH-DA) 活性氧荧光探针	R6033 单体染料固体形式，可稳定保存
D1004	Dihydroethidium (Hydroethidine, 二氢乙锭)	D1008 固体粉末形式，可稳定保存