

活性氧 (ROS) 检测试剂盒 (化学荧光法)

2ml WLA070a

仅用于科学研究,不能用于诊断



产品信息

产品名称

活性氧 (ROS) 检测试剂盒 (化学荧光法)

产品概述

活性氧检测试剂盒 (Reactive Oxygen Species Assay Kit) 是一种利用探针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生成强绿色荧光物DCF,其荧光在激发波长502nm,发射波长530nm附近有最大波峰,强度与细胞内活性氧水平成正比。本试剂盒本底低,灵敏度高,线性范围宽,使用方便;可以测定100-500个样品。

包装信息

试剂名称	WLA070a	保存条件
DCFH-DA (1mM) in DMSO	1ml	-20°C, 避光
活性氧供氢体 (12mM)	1ml	-20°C, 避光

注意事项

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. 尽量缩短探针装载后测定所用的时间 (刺激时间除外), 以减少各种可能的误差。
3. 血清或培养基颜色并不影响DCFH-DA及细胞内荧光产生, 但可能影响荧光显微镜观察。
4. 阳性对照为活性氧供氢体。
5. 整个实验应该避光操作, 检测时应用不透光的96孔板。

操作流程

装载探针

对于药物处理时间较短 (< 2h) 的细胞或预计ROS效应较弱, 可先或同时装载DCFH-DA探针。反之, 对于细胞药物处理时间较长 (> 6h) 的细胞或预计产生ROS效应较强, 可后装载探针DCFH-DA。

1. 培养细胞的测定:

(1) 加入荧光探针

①、在暗室中加入 DCFH-DA 于培养基, 对不同的细胞或处理, DCFH-DA 工作浓度可为 100 nM-20 μ M, 需要进行预实验确定合适的浓度, 总体稀释倍数应在1:500-1:1000以上, 避免DMSO对细胞的影响。

②、37°C 孵育细胞30min-几小时, 通常为30min-60min。

③、细胞收集:

悬浮细胞: 1000g离心5-10min收集细胞, 用PBS洗涤1-2次, 离心收集细胞沉淀物用于荧光检测。

贴壁细胞: 用胰酶消化细胞 (0.25%胰酶消化2-3min), 加入培养基终止消化, 制成细胞悬浮, 1000g离心5-10min收集细胞, 用PBS洗涤1-2次, 离心收集细胞沉淀物用于荧光检测。

(2) 荧光检测

①、将收集好的细胞用PBS进行重悬, 并检测。

②、波长设置: 最佳激发波长为500、485 (500 \pm 15nm), 最佳发射波长525 (530 \pm 20nm) 。

2. 组织样本的测定: (可用于荧光酶标仪以及荧光分光光度计测定)

(1) 单细胞悬液制备:

酶消化法:

①、选取的组织立即放入预冷的组织培养液或PBS中, 清洗血迹及污染物。去除组织块中的坏死成分、纤维、脂肪及血管。

②、用眼科剪将组织块剪成1mm³左右小块, 放在预冷的组织培养液或PBS中并进行漂洗, 洗去剪碎的细胞碎片。

活性氧 (ROS) 检测试剂盒 (化学荧光法)

2ml WLA070a



仅用于科学研究,不能用于诊断

产品信息

③、加入适量酶消化液, 37°C 恒温水浴消化20~30min, 期间进行间断振荡或吹打细胞。

④、用冷培养液或PBS终止消化, 用300目尼龙网过滤去除组织团块, 收集滤过的细胞, 500g离心10min去上清, 并用PBS洗1~2次, 并重悬制备单细胞悬液, 细胞计数总数不少于 10^6 个细胞。

机械法:

①、前处理同酶消化法①、②步。

②、将300目尼龙网扎在小烧杯上, 将剪碎的组织放在尼龙网上, 以眼科镊轻搓组织块, 边搓边PBS冲洗, 直至将组织搓完。

③、收集细胞悬液, 500g离心10min去上清, 并用PBS洗1~2次, 并重悬制备单细胞悬液, 细胞计数总数不少于 10^6 个细胞。

(2) 加入荧光探针: 操作如下:

①、将以上制备好的单细胞悬液中加入DCFH-DA, 推荐浓度是 $10\mu\text{M}$ 。对不同处理步骤, DCFH-DA工作浓度。总体稀释倍数应在1:500~1:1000以上, 避免DMSO对细胞的影响。

②、37°C 孵育细胞30min~几个小时, 通常为30~60min。

③、收集探针标记后的单细胞悬液, 1000g离心5~10min, 用PBS洗涤1~2次, 离心收集沉淀物用于检测。

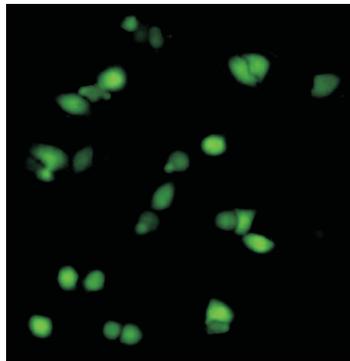
(3) 荧光检测

①、波长设置: 最佳激发波长为500、485 ($500\pm 15\text{nm}$), 最佳发射波长525 ($530\pm 20\text{nm}$), 测定其荧光强度。

②、测定结果以荧光强度/毫克蛋白表示。

[注]: 重悬细胞密度以细胞的荧光强弱来定, 如荧光强度较弱可以将细胞的密度增大, 如荧光强度较强可以将细胞的密度减小, 所有的样本细胞密度要保持一致。

产品图片



A549细胞用 $1.5\mu\text{M}$ 顺铂处理16h后ROS荧光检测图