

活性氧（ROS）检测试剂盒

2ml WLA131a

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

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,激发波长488nm,发射波长525nm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。DCF的荧光光谱与FITC特别相似,流式检测时,可以用FITC的参数设置检测DCF。

包装信息

试剂名称	WLA131a	保存条件	有效期
DCFH-DA (1mM) in DMSO	1ml	-20°C, 避光	一年
活性氧阳性对照药 (1%TBHP)	1ml	-20°C, 避光	一年

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. 整个实验应该避光操作。
4. 试剂开封后请尽快使用,以防影响后续实验效果。

操作流程

1. 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在暗室中加入 DCFH-DA 于无血清培养液,推荐初始工作浓度为 $2\mu\text{M}$ 。对不同的细胞或处理,DCFH-DA 工作浓度可为 $2\mu\text{M}$ - $10\mu\text{M}$,需要进行预实验确定合适的浓度,总体稀释倍数应在1:100-1:500以上,避免DMSO对细胞的影响。

②37°C孵育细胞20min-30min。

2. 细胞收集

悬浮细胞:细胞收集后重悬于稀释好的DCFH-DA中,细胞密度为 10^5 - 10^6 个/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。300g离心5min (1500 rpm/min),用PBS洗涤1-2次。

贴壁细胞: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。用胰酶消化细胞(0.25%胰酶),加入完全培养基终止消化,制成细胞悬液。300g离心5min (1500rpm/min),用PBS洗涤1-2次。

3. 组织样本

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。

活性氧（ROS）检测试剂盒

2ml WLA131a

仅用于科学研究,不能用于诊断

产品信息



- ②用眼科剪将组织块剪成1 mm³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。
- ③将300目尼龙网扎在烧杯上，将剪碎的组织放在网上，以眼科镊或刮刀轻搓组织块，边搓边以PBS冲洗，直至将组织搓完。
- ④收集细胞悬液，500 g离心10 min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10⁶个细胞。

说明：仅在阳性对照孔中加入TBHP作为阳性对照，其余孔不必加入TBHP。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。

4. 检测

- ①对于原位装载探针的细胞样本可以用荧光显微镜直接观察拍照。
- ②收集细胞后可以用荧光酶标仪检测。
- ③收集细胞后也可以用流式细胞仪检测。

备注:

(1) 阳性对照可以按照1:200-1:500的比例使用。例如装载好探针的细胞共1ml，可以加入2μl-5μl的阳性对照刺激。通常刺激后20-30分钟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。

(2) 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，可以按照更大比例稀释DCFH-DA。探针装载的时间也可以根据情况在15-60min内适当进行调整。

产品图片

