

## Reactive Oxygen Species Assay Kit

### 产品描述

活性氧检测试剂盒（Reactive Oxygen Species Assay Kit）是一种通过荧光探针DCFH-DA对活性氧进行检测的试剂盒。DCFH-DA是一种细胞渗透性的活性氧荧光探针，本身无荧光，但是进入细胞后可以被细胞内的酯酶水解成DCFH并滞留在细胞内。细胞中的活性氧可以氧化无荧光的DCFH生成绿色荧光的DCF。通过检测DCF荧光强度的变化就可以分析细胞内活性氧的水平。本试剂盒适合用于活细胞的活性氧检测。本试剂盒提供Rosup作为活性氧阳性对照。Rosup为一种混合物，本试剂盒提供的Rosup浓度为50 mg/mL。

### 组分和储存条件

| Components      | K2065-100 T | K2065-500 T |
|-----------------|-------------|-------------|
| DCFH-DA (10 mM) | 0.1 mL      | 0.5 mL      |
| Rosup           | 1 mL        | 5 mL        |

-20°C 保存，1 年有效。其中 DCFH-DA 需要-20°C 避光保存，避免反复冻融。

### 实验操作

对于药物刺激时间较短（2 h 以内）的细胞，建议先装载探针，后用感兴趣的药物或活性氧阳性对照Rosup刺激细胞；对于药物刺激时间比较长（6 h 以上）的细胞，建议先用感兴趣的药物或活性氧阳性对照Rosup刺激细胞，然后再装载探针。此处以第二种处理方式为例。

- 1. 制备DCFH-DA工作液：**用无血清培养基按1：1000稀释DCFH-DA (10 mM)成10  $\mu$ M的DCFH-DA工作液。工作液不稳定，必须现配现用。

**\*Note:** 工作液的浓度可以根据具体实验进行调整，一般在 1-10  $\mu$ M 范围内。

#### 2. 装载DCFH-DA探针：

##### A. 对于贴壁细胞

贴壁细胞如果需要用荧光分光光度计或流式细胞仪检测，可以先消化收集细胞，重悬后参考悬浮细胞操作步骤进行。

- 1) 药物诱导：**用感兴趣的药物处理实验组细胞，药物刺激的时间因具体使用药物不同而不同。
- 2) 阳性对照（可选）：**用无血清培养基按1：1000稀释阳性对照Rosup（1 mL无血清培养基+1  $\mu$ L Rosup）即为阳性对照工作液。对于阳性对照组，去除细胞培养基，加入阳性对照工作液处理细胞诱导ROS产生。一般6孔板每孔加入至少1 mL的阳性对照工作液。Rosup按1：1000使用时，一般20-30 min内就可以显著的升高活性氧水平。

- 3) **装载探针：**去除细胞培养基，用无血清培养基洗涤细胞1-2次，随后每孔加入适当DCFH-DA工作液充分覆盖细胞。一般6孔板每孔加入至少1 mL的工作液。37°C避光孵育30 min，期间每5 min摇晃混匀一次（使探针与细胞充分接触）。

**\*Note:** 探针孵育时间可以根据具体实验进行调整。

- 4) **洗涤：**孵育结束后用无血清培养基洗涤细胞数次，加入适量PBS或其他合适缓冲液后使用荧光显微镜进行原位检测。

## B. 对于悬浮细胞

- 1) **药物诱导：**用感兴趣的药物处理实验组细胞，药物刺激的时间因具体使用药物不同而不同。
- 5) **阳性对照（可选）：**用无血清培养基按1：1000稀释阳性对照Rosup（1 mL无血清培养基+1 μL Rosup）即为阳性对照工作液。对于阳性对照组，离心去除细胞培养基，加入适量阳性对照工作液重悬细胞诱导ROS产生。Rosup按1：1000使用时，一般20-30 min内就可以显著的升高活性氧水平。
- 2) **装载探针：**离心去除处理药物，用无血清培养基洗涤细胞1-2次。离心收集细胞，随后每孔加入适当DCFH-DA工作液重悬细胞至细胞密度为 $1 \times 10^6$  -  $2 \times 10^7$  cells/mL。37°C避光孵育30 min，期间每5 min颠倒混匀一次（使探针与细胞充分接触）。

**\*Note:** 探针孵育时间可以根据具体实验进行调整。

- 3) **洗涤：**孵育结束后用无血清培养基洗涤数次，加入适量PBS或其他合适缓冲液重悬细胞后使用荧光分光光度计、荧光酶标仪或流式细胞仪进行检测，也可取适量细胞悬液制成涂片后用荧光显微镜进行检测。

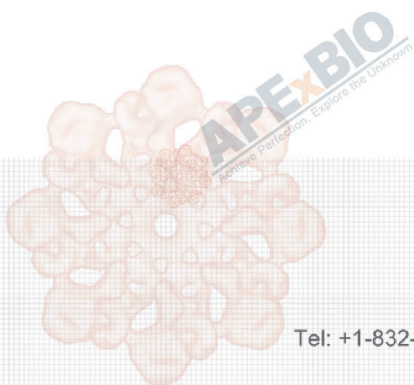
3. **检测：**检测时可使用488 nm激发波长，525 nm发射波长。也可以直接使用FITC参数检测。

## ■ 注意事项

1. DCFH-DA应尽量避免反复冻融，必要时可进行分装保存。
2. 探针孵育结束后一定要尽可能去除残留的探针，否则会导致背景过高。
3. DCF荧光容易淬灭，应尽量缩短探针孵育后到检测所需的时间，以免检测效果不佳。
4. 本试剂盒适合活细胞的活性氧检测，对于新鲜组织，可以制备成单细胞悬液后进行检测。
5. 活性氧阳性对照Rosup按1：1000使用时，一般20-30 min内就可以显著的升高活性氧水平。但是对于不同的细胞，Rosup的效果可能不太相同，可以根据具体的实验调整其用量。
6. 如发现没有刺激的阴性对照的荧光也比较强，可以按1：2000-1：5000稀释DCFH-DA，使DCFH-DA的终浓度为2-5 μM。
7. 对于药物刺激时间较短（2 h以内）的细胞，建议先装载探针，后用感兴趣的药物或活性氧阳性对照Rosup刺激细胞；对于药物刺激时间比较长（6 h以上）的细胞，建议先用感兴趣的药物或活性氧阳性对照Rosup刺激细胞，然后再装载探针。

8. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

9. 本产品仅限于科研使用，不得用于临床诊断或治疗。



**APExBIO Technology**

**[www.apexbt.com](http://www.apexbt.com)**

7505 Fannin street, Suite 410, Houston, TX 77054.

Tel: +1-832-696-8203 | Fax: +1-832-641-3177 | Email: [info@apexbt.com](mailto:info@apexbt.com)