

# 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
DCFH-DA (1mM) in DMSO	1ml	-20°C, 避光
活性氧阳性对照药 (1%TBHP)	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. 整个实验应该避光操作。

### 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2μM。对不同的细胞或处理,DCFH-DA 工作浓度可为2μM-10μM,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。

②用眼科剪将组织块剪成1 mm<sup>3</sup>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 $10^6$ 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。

# 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

Wanleibio



### 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2 $\mu$ l-5 $\mu$ l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。如果活性氧升高得很快, 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。

(3) 活性氧阳性对照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。

## 产品图片

