

## 活性氧检测试剂盒 Reactive oxygen species assay kit

货号: AC10875

规格: 100T/500T

保存: -20 °C避光保存, 有效期一年。

产品内容:

组份	100T	500T
A 液: DCFH-DA (10 mM)	0.1 mL	0.1mL×5
B 液: 活性氧阳性对照 (Rosup, 50mg/mL )	1 mL	1 mL×5

产品简介:

活性氧检测试剂盒 (Reactive Oxygen Species Assay Kit) 是一种利用荧光探针 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 生成有荧光的 DCF。检测 DCF 的荧光就可以知道细胞内活性氧的水平。

本试剂盒提供了活性氧阳性对照试剂 Rosup, 以便于活性氧的检测。Rosup 是一种混合物, 浓度为 50mg/mL。

本试剂盒本底低, 灵敏度高, 线性范围宽, 使用方便。

操作步骤 (仅供参考):

一、装载探针:

对于刺激时间较短 (通常为 2 小时以内) 的细胞, 先装载探针, 后用活性氧阳性对照或自己感兴趣的药物刺激细胞。对于细胞刺激时间较长 (通常为 6 小时以上) 的细胞, 先用活性氧阳性对照或自己感兴趣的药物刺激细胞, 后装载探针。

**原位装载探针:** 本方法仅适用于贴壁培养细胞。按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA, 使终浓度为 10 $\mu$ mol/L。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 20 分钟。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。通常活性氧阳性对照在刺激细胞 20~30 分钟后可以显著提高活性氧水平。

**收集细胞后装载探针:** 按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA, 使终浓度为 10 $\mu$ mol/L。细胞收集后悬浮于稀释好的 DCFH-DA 中, 细胞浓度为二百万至二千万/mL, 37°C 细胞培养箱内孵育 20 分钟。每隔 3~5 分钟颠倒混匀一下, 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。直接用活性氧阳性对照或自己感兴趣的药物刺激细胞, 或把细胞等分成若干份后刺激细胞。通常活性氧阳性对照在刺激细胞 20~30 分钟后可以显著提高活性氧水平。

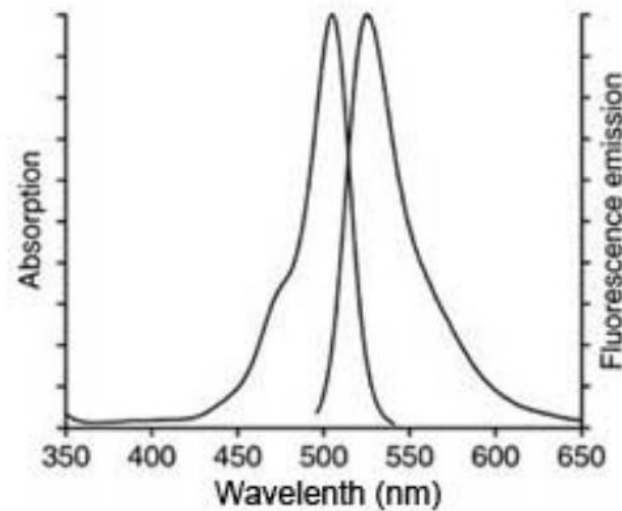
**说明:** 仅在阳性对照孔中加入 Rosup 作为阳性对照, 其余孔不必加入 Rosup。

## 二、检测：

对于原位装载探针的样品可以用激光共聚焦显微镜直接观察，或收集细胞后用荧光分光光度计、荧光酶标仪或流式细胞仪检测。对于收集细胞后装载探针的样品可以用荧光分光光度计、荧光酶标仪或流式细胞仪检测，也可以用激光共聚焦显微镜直接观察。

## 三、参数设置

使用 488nm 激发波长，525nm 发射波长，实时或逐时间点检测刺激前后荧光的强弱。DCF 的荧光光谱和 FITC 非常相似，可以用 FITC 的参数设置检测 DCF。DCF 的激发光谱和发射光谱参考下图。



## 其它说明：

阳性对照可以按照 1：1000 的比例使用。例如装载好探针的细胞共 1mL，可以加入 1  $\mu$ 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 30 分钟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。

另外，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 1：2000~1：5000 稀释 DCFH-DA，使装载探针时 DCFH-DA 的浓度为 2~5  $\mu$ mol/L。探针装载的时间也可以根据情况在 15~60 分钟内适当进行调整。

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。

## 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. 探针装载完毕并洗净残余探针后，可以进行激发波长的扫描和发射波长的扫描，以确认探针的装载情况是否良好。DCF 的激发光谱和发射光谱请参考上图。
3. 尽量缩短探针装载后到测定所用的时间（刺激时间除外），以减少各种可能的误差。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 相关文献：

- [1] Jie Zhang, Shakil Ahmad, Lanying Wang, et al. Cell death induced by  $\alpha$ -terthienyl via reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the midgut of *Aedes aegypti* larvae. *Free Radical Biology*

and Medicine. June 2019;137:87-98. (IF 5.657)

- [2] YingJuan Liu,Zhenzhen Deng,Lihua Geng,et al. In vitro evaluation of the neuroprotective effect of oligo- porphyran from *Porphyra yezoensis* in PC12 cells. Journal of Applied Phycology. January 2019. (IF 2.635)