

Cat. NO: ZC-G46190

Size: 100T

组织活性氧(ROS)检测试剂盒说明书

DHE 荧光法

一、产品介绍:

本试剂盒是一种以 DHE (Dihydroethidium) 为荧光探针, 快速灵敏地检测组织内超氧阴离子活性氧的试剂盒。DHE 探针在组织中活性氧存在的条件下, 被氧化生成溴化乙锭, 溴化乙锭可以与细胞内核酸结合, 产生红色荧光, 红色荧光强度与组织内活性氧水平成正比, 可间接判断组织内活性氧的水平, 同时也可用于细胞的活性氧检测。DHE 本身为蓝色荧光, Ex 为 355nm, Em 为 420nm; 当 DHE 脱氢和核酸结合后显示为红色荧光, Ex 为 520nm, Em 为 605 nm。细胞样本染色后可使用荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、流式细胞仪、荧光酶标仪等荧光检测系统进行检测; 组织样本需裂解后, 使用酶标仪进行检测。

二、试剂的组成和配置:

Component Number	Component	ZC-G46190 -100T
ZC-G46190	DHE 探针 (500×)	20 μ L
ZC-G46190	匀浆缓冲液	100mL
产品说明书		1 份

三、操作步骤

● 组织检测

100×DHE 染色液配制: 取 2 μ L DHE 探针 (500×) 与 8 μ L PBS 缓冲液充分混匀, 配制成 100 ×DHE 染色液备用。

(一) 组织样本处理:

1. 取新鲜的组织样本, 用 PBS 洗涤干净。
2. 50mg 组织中加入 450 μ L 匀浆液 (可按比例增减), 充分匀浆。
3. 10000 g, 4℃离心 10min, 弃沉淀, 取上清 (建议立即检测, 或-80℃保存)。

(二) 样本检测

1. 在黑色 96 孔板 中加入 90 μ L 匀浆缓冲液。
2. 加入 10 μ L 组织匀浆上清。
3. 加入 1 μ L 100 \times DHE 染色液。
4. 37 $^{\circ}$ C避光孵育 20min，酶标仪设置激发波长 520nm，发射波长设置 605nm 检测。
5. 数据分析：以荧光强度（RFU）/蛋白质量（蛋白浓度*加入样本的体积），表示组织活性氧强度。

● 活细胞检测

DHE 染色工作液配制：取 2 μ L DHE 探针（500 \times ）与 1mL PBS 充分混匀，配制成 1 \times DHE 染色工作液备用。

1. 细胞染色（以下为贴壁细胞 6 孔板方案，悬浮细胞换液需要离心操作）正常或处理过后的细胞，用 PBS 洗涤 2-3 次。
2. 加入 1mL 1 \times DHE 染色工作液，37 $^{\circ}$ C避光孵育 30min（不同细胞孵育时间存在差异，可在 10-60min 范围内调整）。
3. 用 PBS 洗涤细胞 2-3 次。
4. 用荧光显微镜可直接观察，选择 DsRed 通道即可激发；若用酶标仪检测，推荐使用黑底不透明发光板检测，设置激发波长 520nm，发射波长 605nm；流式细胞仪检测，选择 PE 通道。

四、注意事项

1. 如每次使用的 DHE 探针较少, 请视情况分装, 尽量避免 DHE 探针反复冻融, -20°C 或 -80°C 避光保存。
2. 本产品对光敏感, 操作过程尽量避免强光接触。
3. 尽量使用新鲜组织样本, 或匀浆后短期保存于 -80°C 的样本。
4. 冰冻细胞样本, 可采取组织样本的方式, 匀浆后进行检测。
5. 组织样本检测时, 如果结果与预期存在较大差别, 可以将组织匀浆液稀释做标曲, 在线性范围内选择 合适的稀释度进行检测。
6. 操作时请穿实验服, 佩戴一次性手套。

五、储存与运输

冰袋(wet ice)运输; -20°C 保存; 6 个月有效。