

活性氧（ROS）检测试剂盒说明书

探针法

检测背景：

● 活性氧（Reactive Oxygen Species）是指生物体内与氧代谢有关的含氧自由基和易形成自由基的过氧化物的总称。常见氧化损伤的活性氧有超氧阴离子，氢过氧基，过氧化氢，羟自由基，R-氧基（烷氧基），R-过氧基（烷过氧基），R-氢过氧化物等。

● 活性氧与机体氧化损伤密切相关，人体的许多生理和病理发生过程中活性氧都参与并扮演重要角色，包括信号转到，衰老，肿瘤发生，动脉硬化症，黄斑变性，败血症，各种神经衰退性疾病（如阿尔茨海默氏病，帕金森病）和糖尿病。一旦细胞内产生活性氧自由基，就会损伤一系列的细胞组分包括蛋白，脂质，DNA等。

产品描述：

● 活性氧检测试剂盒(Reactive Oxygen Species Assay Kit)是一种基于荧光染料DCFH-DA (2, 7-Dichlorodihydrofluorescein diacetate)的荧光强度变化，定量检测细胞内活性氧水平的最常用方法。检测原理在于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不会通透细胞膜，因此探针很容易被积聚在细胞内。细胞内的活性氧能够氧化无荧光的DCFH生成有荧光的DCF。绿色荧光强度与活性氧的水平成正比。

试剂盒成分：

组分	名称	规格	保存方法
A	活性氧探针DCFH-DA (10mM)	0.1 mL	-20℃，避光保存
B	活性氧阳性对照 (Rosup, 50mg/mL)	1.0 mL	-20℃，避光保存
	产品说明书		1份

本试剂盒包含活性氧阳性对照（Rosup），利于活性氧检测。Rosup是一种混合物，浓度为50mg/mL。因检测对象和检测体系不同，本试剂盒可以检测100-500个样品。

检测步骤：

1) 装载探针

对于刺激时间较短(通常2小时以内)的细胞，先装载探针，后用活性氧阳性对照及感兴趣药物刺激细胞。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Rosup及待研究药物刺激细胞，后装载探针。

● **原位装载探针：**仅适用于贴壁细胞。

(1) 检测前一天进行细胞铺板，确保活性氧检测当天细胞汇合率达到50%-70%。

(2) 吸出细胞培养液，加入适量体积以及浓度的待研究药物，于37℃细胞培养箱内孵育，具体诱导时间根据细胞类型和药物自身特性决定。

(3) (备选)：阳性对照（Rosup）先用无血清培养液按照1:1000稀释阳性对照品，通常37℃细胞培养箱内刺激20-30min，可以观察到显著的活性氧水平升高，但因细胞类型不同会有明显差异。如果刺激30分钟后未观察到活性氧水平升高，可以适当提高Rosup的工作浓度，反之，如果活性氧水平升高过快，可以适当降低Rosup的工作浓度。

(4) 按照1:1000用无血清培养液稀释DCFH-DA，终浓度为10 μmol/L。

(5) 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，对于六孔板通常不少于100ul。

(6) 37℃细胞培养箱内孵育20 min。用无血清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20-30min后可以显著提高活性氧水平。

● **收集细胞后装载探针：**适用于贴壁细胞和悬浮细胞。

(1) 按照常规方法，清洗并收集足量的细胞。

(2) 用适量体积以及浓度的待研究药物重新悬浮细胞，具体诱导时间根据细胞类型和药物自身特性决定。

(3) (备选)：阳性对照(Rosup)先用无血清培养液按照1:1000稀释阳性对照品，通常37℃细胞培养箱内刺激20-30min，可以观察到显著的活性氧水平升高，但因细胞类型不同会有明显差异。如果刺激30分钟后未观察到活性氧水平升高，可以适当提高Rosup的工作浓度，反之，如果活性氧水平升高过快，可以适当降低Rosup的工作浓度。

(4) 装载探针前，按照1:1000用无血清培养液稀释DCFH-DA，终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 。

(5) 离心，吸出细胞内刺激药物，之后用适当DCFH-DA工作液重悬细胞，使得细胞密度为 $1.0 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^7$ 。(注意)：细胞密度根据后续检测体系，检测方法，以及检测总量来调整。例如对于流式分析，单管检测内细胞数目控制在104-106之间。

(6) 37℃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。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。

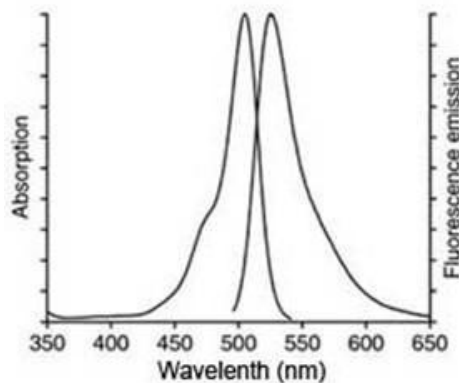
2) 检测

● **原位装载探针法：**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。

● **收集细胞后装载探针：**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。

3) 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图。



4) 其他说明：

(1) 对于某些细胞，若发现没有刺激的阴性对照，细胞荧光也比较强，可按照1:2000-1:5000稀释DCFH-DA，使DCFH-DA工作液浓度为2-5 μM 。探针装载时间也可依情况在15-60min内适当调整。

(2) 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Rosup阳性对照。

5) 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，以确认探针的装载情况是否良好。
- (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。

保存和运输方法：

保存：-20℃保存，有效期一年。

运输：低温冰

