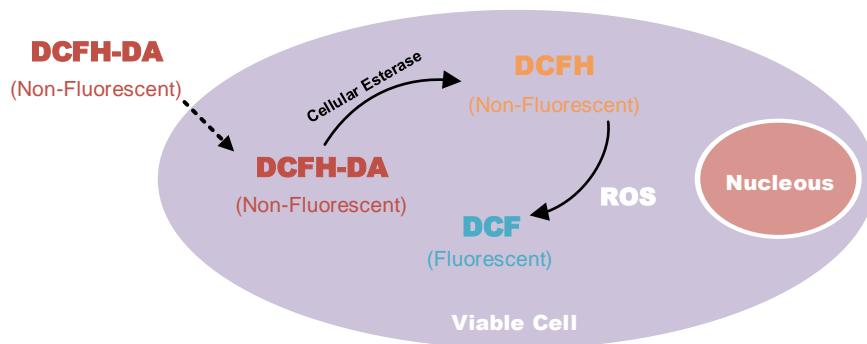




活性氧检测试剂盒

Reactive Oxygen Species Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



活性氧检测试剂盒

Reactive Oxygen Species Assay Kit

一、产品描述

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, 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。

利用荧光探针 DCFH-DA 进行活性氧检测是一种基于荧光强度变化, 定量检测细胞内活性氧水平的最常用方法, DCFH-DA 本身没有荧光, 可以自由穿过细胞膜, 进入细胞内后, 被细胞内的酯酶水解生成 DCFH, 而 DCFH 不能通透细胞膜, 从而使探针易于装载至细胞内, 细胞内的活性氧可以氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF, 在最大激发波长 480nm, 最大发射波长 525nm 处, 使用荧光显微镜, 流式细胞仪或激光共聚焦显微镜等检测荧光信号, 并根据阳性对照 Rosup (浓度为 50 mg/mL) 的荧光信号来分析活性氧的真正水平。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件
DCFH-DA (10 mM)	液体 0.1 mL×1 支	-20°C保存
Rosup (50mg/mL)	液体 1 mL×1 支	-20°C保存

三、产品使用说明

1. 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药物刺激细胞, 后装载探针。

(1) 原位装载探针 (仅适用于贴壁培养细胞)

- ①按照1:1000用无血清培养液稀释DCFH-DA, 使终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$;
- ②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1 mL;
- ③37°C细胞培养箱内孵育20 min; 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 min后可以显著提高活性氧水平。

(2) 收集细胞后装载探针 (适用于贴壁细胞和悬浮细胞)

- ①按照1:1000用无血清培养液稀释DCFH-DA, 使终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$;
- ②细胞收集后悬浮于稀释好的DCFH-DA中, 细胞浓度为 1×10^6 - 2×10^7 /mL;
- ③37°C细胞培养箱内孵育20 min, 每隔3-5 min颠倒混匀一次, 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 min后可以显著提高活性氧水平。

2. 检测

①**原位装载探针法:** 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。

②**收集细胞后装载探针:** 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。

3. 参数设置

使用488 nm激发波长, 525 nm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。

4. 其它说明

①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1 mL, 可以加入1 μL 的Rosup刺激, 通常刺激后20-30 min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, Rosup的效果可能有较大的差别, 如果在刺激后30 min内观察不到活性氧的升高, 可以适当提高Rosup的浓度; 如果活性氧升高得过快, 可以适当降低Rosup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1:(2000-5000)稀释DCFH-DA, 使装载探针时DCFH-DA的浓度为2-5 $\mu\text{mol/L}$, 探针装载的时间也可以根据情况在15-60 min内适当进行调整;

③ Rosup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。

四、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；
- 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；
- ⑤为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取2-3个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedure.

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.

Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

