

活性氧 (ROS) 检测试剂盒

Reactive Oxygen Species (ROS) Assay Kit

产品编号	产品名称	包装规格
NBS6701	活性氧 (ROS) 检测试剂盒	1000T

产品简介:

活性氧检测试剂盒 (Reactive Oxygen Species Assay Kit, 简称 ROS Assay Kit) 是一种基于荧光染料 DCFH-DA (2,7-二氯二氢荧光素二乙酸酯) 检测细胞内活性氧水平的常用方法。DCFH-DA 本身无荧光, 能够自由穿透细胞膜。进入细胞后, 它会被细胞内的酯酶水解, 生成无荧光的 DCFH。由于 DCFH 无法穿透细胞膜, 因此会保留在细胞内。此时, 细胞内的活性氧会氧化 DCFH, 生成具有荧光的 DCF。通过检测 DCF 的荧光强度, 可以反映细胞内活性氧的水平。

本试剂盒包含活性氧阳性对照 Rosup, 便于进行活性氧的检测。Rosup 是一种浓度为 50mg/ml 的混合物。根据检测对象和反应体系的不同, 本试剂盒可检测 1000 个样品。

保存条件:

-20°C保存 (一年有效)

产品组成:

组分	名称	规格	保存
NBS6701-1	活性氧探针 DCFH-DA	0.1ml	-20°C避光
NBS6701-2	活性氧阳性对照 (Rosup, 50mg/ml)	1ml	-20°C

产品使用:

1. 装载探针:

【注意】:对于刺激时间较短 (通常 2h 以内) 的细胞, 先装载探针, 后用活性氧阳性对照 Rosup 和/或待研究药物刺激细胞; 对于刺激时间较长 (通常 6h 以上) 的细胞, 先用活性氧阳性对照 Rosup 或待研究药物刺激细胞, 后装载探针。

1.1 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°C 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。

【可选】阳性对照 Rosup：先用无血清培养液按照 1:1000 比例稀释阳性对照，通常 37°C 培养箱内刺激 20-30min 可以观察到显著的活性氧水平提高，但依细胞类型会有比较明显差异

【刺激时间可参考文献或实验经验来调整】。如果刺激后 30min 内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，如果活性氧升高过快，则适当降低 Rosup 的工作浓度。

- 3) 按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA (10mM)，使其终浓度为 10 μ M。吸出细胞培养液，加入适当体积 DCFH-DA 工作液。【注意】：加入体积以能充分盖住细胞为宜。对于 6 孔板，每个孔加入 DCFH-DA 工作液不少于 1ml。对于 96 孔板，每个孔加入 DCFH-DA 工作液不少于 0.1ml。
- 4) 37°C 细胞培养箱内孵育 20min。
- 5) 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。

1.2 收集细胞后装载探针：

- 1) 按照常规方法，清洗并收集足量的细胞。【注意】：保证细胞的状态健康。
- 2) 用适量体积以及浓度的待研究药物重新悬浮细胞，于 37°C 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。【可选】阳性对照 Rosup：先用无血清培养液按照 1:1000 比例稀释阳性对照，通常 37°C 培养箱内刺激 20~30min 可以观察到显著的活性氧水平提高，但依细胞类型会有比较明显差异【刺激时间可参考文献或实验经验来调整】。如果刺激后 30min 内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，如果活性氧升高过快，则适当降低 Rosup 的工作浓度。
- 3) 探针装载前，按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA (10mM)，使其终浓度为 10 μ M。
- 4) 离心，吸出细胞内刺激药物，之后用适量 DCFH-DA 工作液重悬细胞，使得细胞密度为 1 $\times 10^6$ -2 $\times 10^7$ /ml。【注意】：细胞密度需根据后续检测体系，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 1 $\times 10^4$ -10 6 之间。
- 5) 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。
- 6) 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。

2. 检测：

2.1 原位装载法

可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。

2.2 收集细胞后装载法

可用荧光分光光度计、荧光酶标仪或流式细胞仪检测，也可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，可用 FITC 的参数设置检测 DCF。

4. 其他：

- 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，可以按照 1:2000-1:5000 稀释 DCFH-DA，使 DCFH-DA 的工作浓度为 2-5 μ M。探针装载时间也可依情况在 15-60min 内适当进行调整。
- 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。

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。

本产品仅用于生命科学研究，不得用于医学诊断及其他用途！

附表 1 活性氧探针 (HPF, APF, DCFH) 对各种活性氧物质的反应特异性

ROS	ROS 产生方法	HPF (NBS6705)	APF (NBS6704)	DCFH (NBS6702)
HO•	100 μ M 高氯酸亚铁(II)+1 mM H ₂ O ₂	730	1200	7400
ONOO ⁻	3 μ M (终浓度) ONOO ⁻	120	560	6600
OCI ⁻	3 μ M (终浓度) OCI ⁻	6	3600	86
1O ₂	100 μ M 3-(1,4-dihydro-1,4-epidioxy-1-naphthyl) propionic acid	5	9	26
•O ₂ ⁻	100 μ M KO ₂	8	6	67
H ₂ O ₂	100 μ M of H ₂ O ₂	2	< 1	190
NO	100 μ M NOC-7	6	< 1	150
ROO•	100 μ M AAPH	17	2	710
Autoxidation	荧光光照 2.5h	< 1	< 1	2000

相关产品

货号	名称
<u>NBS6701</u>	<u>Reactive Oxygen Species (ROS) Assay Kit 活性氧 (ROS) 检测试剂盒</u>
<u>NBS6702</u>	<u>H2DCFDA (DCFH-DA, DCFH) 活性氧 (ROS) 荧光探针</u>
<u>NBS6703</u>	<u>Dihydrorhodamine 123 (DHR 123) 二氢罗丹明 123</u>
<u>NBS6704</u>	<u>Aminophenyl fluorescein (APF) 氨基苯基荧光素</u>
<u>NBS6705</u>	<u>Hydroxyphenyl fluorescein (HPF) 羟苯基荧光素</u>