

活性氧(ROS)测定试剂盒

(货号: BC005 化学荧光法)

一、测定原理

本试剂盒采用的DCFH-DA(2,7-Dichlorofluorescein Diacetate)探针, 是迄今最常用、最灵敏的细胞内活性氧检测探针。DCFH-DA本身没有荧光, 可以自由穿过细胞膜, 当其进入细胞内后, 会被细胞内的相关酯酶水解为DCFH(Dichlorofluorescein)。而DCFH不能通透细胞膜, 从而使探针很容易被标记到细胞内。当细胞内有活性氧存在时, DCFH被氧化为强绿色荧光DCF(Dichlorofluorescein)其荧光在激发波长502nm,发射波长530nm附近有最大波峰, 其荧光强度与细胞内活性氧水平成正比。

二、试剂组成及保存(100T-500T):

- 1、0.1ml 10mM DCFH-DA in DMSO,-20℃保存。
- 2、1ml活性氧供氢体, 4-8℃保存。

三、组织样本操作步骤 (可用激光共聚焦显微镜观察, 也可用于流式细胞仪、荧光酶标仪、荧光分光光度计测定)

1、单细胞悬液制备:

方法1、采用单细胞悬液制备仪制备单细胞悬液。

方法2、酶消化法:

方法3、机械法(网搓法):

2、加入荧光探针:

①、取不进行任何处理的细胞用0.01MPBS重悬, 设为阴性对照管。阳性对照管: 用稀释好的DCFH-DA重悬细胞沉淀, 同时加入活性氧供氢体诱导细胞, 推荐该试剂的工作浓度为20~100 μ M。

②、样本管: 用稀释好的DCFH-DA重悬细胞沉淀, 细胞密度一般要求 1×10^6 - 2×10^7 /mle

③、37℃孵育细胞30min~几小时。通常为30~60min即可。

④、收集孵育(探针标记)后的单细胞悬液, 1000g,离心5~10分钟, 去上清收集细胞沉淀, 用PBS洗涤1~2次。离心收集细胞沉淀用于荧光检测;

3、荧光检测:

①、将上述收集好的细胞沉淀用PBS重悬, 并用于检测;

②、波长设置: 最佳激发波长500(500 \pm 15nm),最佳发射波长525(530 \pm 20nm)。也可按照FITC荧光检测条件检测。

③、结果以荧光度值表示。

四、细胞样本操作步骤: (可用激光共聚焦显微镜观察, 也可用于流式细胞仪、荧光酶标仪、荧光分光光度计测定)

1、直接将探针加入培养液中:

①、直接将DCFH-DA探针加入无血清培养基中: 一般按照1:1000用无血清培养液 稀释 DCFH-DA(终浓度为10 μ M)。去除培养液后, 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6孔板的一个孔加入稀释好的DCFH-DA不少于1ml。

②、取一份不加探针, 只加入培养基的细胞设为阴性对照管。阳性对照管。取一份已加入



探针的细胞，同时加入活性氧供氢体诱导细胞，推荐该试剂的工作浓度为20~100 μ M。

③、37 $^{\circ}$ C孵育细胞30min~几小时，通常为30~60min即可，孵育时间长短与细胞类型、刺激条件、DCFH-DA浓度有关。一般阳性对照在刺激细胞30分钟左右，即可观察到明显的绿色荧光。

④、吸去培养液，利用无血清培养液或者0.01MPBS反复吹打，肉眼观察瓶底由半透明(细胞单层连接成片)转为透明，细胞层几乎全部吹打到PBS中。

⑤、将细胞悬液全部收集到1.5ml离心管中。用无血清培养液或者PBS洗涤2次，以充分去除未进入细胞内的DCFH-DA。1000rpm/min,5min,吸净上清后加入PBS重新悬浮细胞进行测定。

⑥、波长设置：最佳激发波长500(500 \pm 15nm),最佳发射波长525(530 \pm 20nm)。也可按照FITC荧光检测条件检测。

⑦、结果以荧光度值表示。

2、先收集细胞，制备成细胞悬液后测定

①、细胞收集：

a、贴壁细胞，吸去培养液，利用无血清培养液或者0.01MPBS反复吹打，肉眼观察孔板底部(瓶底)由半透明(细胞单层连接成片)转为透明，细胞层几乎全部吹打到PBS中。

b、将细胞悬液全部收集到1.5ml离心管中。用无血清培养液或者0.01MPBS洗涤2次，1000rpm/min,离心5min,吸净上清，留细胞沉淀用于测定。

c、悬浮细胞按照常规方法离心(2000rpm/min,离心5min),收集细胞沉淀，用无血清培养液或者0.01MPBS洗涤2次，1000rpm/min,离心5min,吸净上清，留细胞沉淀用于测定。

②、细胞重悬：细胞密度一般要求 1×10^6 - 2×10^7 /ml,一般有两种方法：

a、先加入无血清培养液或者PBS重悬细胞，然后根据加入培养液或者PBS的体积，按照10 μ M的初始浓度(最好做预实验确定自身样本适合浓度)加入探针，

b、先按照10 μ M的浓度将探针用无血清培养液或者PBS先稀释好，然后用稀释好的探针重悬上述细胞沉淀，制备成细胞悬液，

③、取一份不加探针，只加入培养基或PBS的细胞设为阴性对照管。阳性对照管：取一份已加入探针的细胞悬液，同时加入活性氧供氢体诱导细胞，推荐该试剂的工作浓度为20~100 μ M。

④、37 $^{\circ}$ C孵育细胞30min~几小时，通常为30~60min即可，孵育时间长短与细胞类型、刺激条件、DCFH-DA浓度有关；每隔3-5分钟颠倒混匀一下，使探针与细胞充分接触。

⑤、收集孵育(探针标记)后的单细胞悬液，1000rpm/min,离心5min,吸净上清，用PBS洗涤1~2次，离心收集细胞沉淀物用于荧光检测。

⑥、将上述收集好的细胞沉淀用PBS重悬，并用于检测。

⑦、波长设置：最佳激发波长500(500 \pm 15nm),最佳发射波长525(530+20 nm)。也可按照FITC荧光检测条件检测。

⑧、结果以荧光度值表示。

