

产品说明书

ROS 活性氧检测试剂盒

产品货号：R6033

产品规格：1000T

产品内容：

组分	规格
A. DCFH-DA (10 mM)	0.1 mL
B. 活性氧阳性对照 (Rosup 100 mM)	1 mL

产品参数

Ex/Em: 504/529 nm

储存条件

-20℃避光保存，有效期见外包装。

产品介绍

DCFH-DA(二氯二氢荧光素-乙酰乙酸酯)本身无荧光，可自由透过活细胞膜进入细胞内，并被细胞内的酯酶水解，形成 DCFH，DCFH 无荧光且不能通透细胞膜，从而被细胞内的活性氧化生成有荧光的 DCF。根据活细胞中荧光的产生，可以判断细胞活性氧的含量和变化。用流式细胞仪或荧光显微镜可直接观察，是一种经典的组织或活细胞中活性氧检测方法。Rosup 为活性氧阳性诱导药物，根据其荧光信号强度，可分析活性氧的真正水平。

使用方法

1. 装载ROS探针

(1) 原位装载探针(仅适用于贴壁细胞)

- 细胞准备：检测前一天进行细胞铺板，确保检测时细胞数量小于 5×10^5 /mL。
- 药物诱导：去除细胞培养液，加入无血清培养基稀释的药物处理，于37℃细胞培养箱内避光孵育，实际诱导时间由

药物特性和细胞类型决定。

- (可选) 阳性对照：先用无血清培养基等稀释阳性对照 (Rosup, 100 mM)到常用工作浓度100 μ M，加入细胞，37℃避光孵育30 min-4 h，以提高活性氧水平，不同细胞类型存在差异。例如：HeLa细胞需孵育30-60 min，MRC5人胚胎成纤维细胞则需孵育90 min。
- ROS探针准备：探针装载前按照1:1000用无血清培养液稀释DCFH-DA，使其终浓度为10 μ M。
- ROS探针装载：吸除处理药物，加入适当体积稀释好的 DCFH-DA工作液。加入的体积需充分盖住细胞。例如：6孔板通常不少于1 mL，对于96孔板通常不少于100 μ L。37℃细胞培养箱内避光孵育30 min。
- 细胞清洗：用无血清培养液洗涤细胞1-2次，以充分去除未进入细胞内的DCFH-DA。
(2) 收集细胞后装载探针(适用于贴壁细胞和悬浮细胞)
 - 细胞准备：按照标准方法培养细胞，必须保证检测用细胞状态。按照适当方法，清洗并收集足量的细胞。
 - 药物诱导：将收集好的细胞悬浮于适量稀释好的药物，于37℃细胞培养箱内避光孵育，实际诱导时间由药物特性和细胞类型决定。
 - (可选) 阳性对照：先用无血清培养基稀释阳性对照 (Rosup, 100 mM)到常用工作浓度100 μ M，加入细胞，37℃避光孵育30 min-4 h以提高活性氧水平，不同细胞类型存在



差异。例如：HeLa细胞需孵育30-60 min，MRC5人胚胎成纤维细胞则需孵育90 min。

d. ROS探针准备：探针装载前，按照1:1000用无血清培养液稀释DCFH-DA，使其终浓度为10 μ M。

e. 探针装载：除去细胞内药物，离心收集细胞，加入稀释好的探针，使其细胞密度为 1.0×10^6 - 2.0×10^7 。

注意：细胞密度需根据后续的检测体系，检测方法，以及检测总量来进行调整。例如：对于流式分析，单管检测内细胞数目不少于 10^4 ，也不可多于 10^6 。

f. 细胞清洗：用无血清细胞培养液洗涤细胞1-2次，以充分去除未进入细胞内的DCFH-DA。

2. 荧光显微镜检测

(1) 对贴壁生长细胞或活组织，可直接在荧光显微镜下观察；对悬浮生长细胞，取25-50 μ L细胞悬液滴到一张显微载玻片上，再盖上一张盖玻片。

(2) 荧光显微镜下，选用FITC滤光片观察荧光，去除背景观察荧光的变化。

3. 流式细胞仪分析

(1) 对贴壁生长细胞，用胰酶消化制备成单细胞悬液；对悬浮生长细胞，直接收集细胞。用0.5-1 mL PBS重悬细胞($0.5-1 \times 10^5$ /mL)。

(2) 选择流式细胞仪FL1或BL1通道，488 nm激发，测定530 nm的发射，细胞应可分成两个亚群：ROS阴性细胞仅有很低的荧光强度，ROS阳性细胞有较强的绿色荧光。

注意事项

1. 阳性对照Rosup一般使用浓度为100 μ M（推荐浓度100-400 μ M，具体依细胞类型而定）。通常刺激后30 min-4 h可以观察到显著的活性氧水平升高。对于不同的细胞，活性氧阳性对照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，可延长诱导时间或适当提高活性氧阳性对照的浓度。如果活性氧升高得过快，可缩短诱导时间或适当降低活性氧阳性对照的浓度。

2. 实验过程中，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1:2000-1:5000稀释DCFH-DA，使DCFH-DA的终浓度为2-5 μ M。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. 活性氧阳性对照(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活性氧阳性对照。

4. 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。

