

**细胞活性氧检测试剂盒 (ROS)**

产品编号	产品名称	规格
CG-HY-01	细胞活性氧检测试剂盒(ROS)	100T

**产品简介**

细胞活性氧检测试剂盒(ROS)是一种利用荧光探针 DCFH-DA 进行活性氧检测的试剂盒。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。

**试剂盒组成**

组份编号	组份名称	规格(100T)	数量
CG-HY-01a	DCFH-DA (10 mM)	10 $\mu$ L	1
CG-HY-01b	活性氧阳性对照(Rosup100mM)	100 $\mu$ L	1

**储存条件**

-20℃避光保存,两年有效。

**注意事项**

1. 阳性对照 Rosup 一般使用浓度为 100  $\mu$ M (推荐浓度 100~400  $\mu$ M,具体依细胞类型而定)。通常刺激后 30min~4h 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 30min 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. 若样本为组织,可以检测组织的原代培养细胞或者制备成单细胞悬液检测。
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. 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  $\mu$ M。探针装载的时间也可以根据情况在 15~60min 内适当进行调整。
5. 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。
6. 本产品仅限专业人员用于科学研究,不得用于临床诊断或治疗,不得用于食品或药品。
7. 为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 使用说明

### 1. 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  $\mu$ M。

### 2. 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 1mL，对于 96 孔板通常不少于 100  $\mu$ L。37°C 细胞培养箱内避光孵育 30min。

### 3. 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。

### 4. 收集细胞后装载探针（适用于贴壁细胞和悬浮细胞）

#### （1）细胞准备

1) 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。

2) 组织样本，采用标准方法制备单细胞悬液。

#### （2）药物诱导

将收集好的细胞悬浮于适量稀释好的药物，于 37°C 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。

#### （3）（可选）阳性对照

先用无血清培养基稀释阳性对照(Rosup, 100mM)到常用工作浓度 100  $\mu$ M，加入细胞，37°C 避光孵育 30min~4h 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 30~60min，MRC5 人胚胎成纤维细胞则需孵育 90min。

#### （4）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  $\mu$ M。

#### （5）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  $1.0 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^7$ 。

注：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  $10^6$ 。

#### （6）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。

### 5. 检测设备的选择

#### （1）荧光显微镜检测

1) 对贴壁生长细胞，可直接在荧光显微镜下观察；对悬浮生长细胞或单细胞悬液，取 25~50  $\mu$ 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。

(2) 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 0.5~1mL PBS 重悬细胞( $0.5 \sim 1 \times 10^5/\text{mL}$ )。

2) 选择流式细胞仪 FL1 或 BL1 通道，488nm 激发，测定 530nm 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。