

ROS 实验报告

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
立式冷藏柜	海尔	SC-332
台式高速冷冻离心机	湖南恒诺仪器设备有限公司	2-16R
超净工作台	苏净安泰	SW-CJ-1FD
CO ₂ 细胞培养箱	Thermo	4131
电热恒温水浴锅	恩谊	HH-48
涡旋混匀仪	JOANLAB	VM-500S
倒置荧光显微镜	徕卡	DMi8
实验室超纯水机	砾鼎	MT-VF-20
全自动雪花制冰机	常熟市雪科电器	IMS-40

2、主要实验试剂及耗材

耗材	厂家	货号
1.5 ml 离心管	安徽科兔生物科技有限公司	KTL-15-W
2 ml 研磨管	安徽科兔生物科技有限公司	KTL-20-W
10 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-10
100 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-100
200 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-200
1000 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-1000
5000 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-5000
T25	安徽科兔生物科技有限公司	KTP-25-T
胰酶	安徽科兔生物科技有限公司	RG-CE-18
PBS 缓冲液	安徽科兔生物科技有限公司	RG-RT-01
DMEM 培养基	安徽科兔生物科技有限公司	RG-CE-2



血清	安徽科兔生物科技有限公司	CG-SR-02
6 孔板	安徽科兔生物科技有限公司	KTB-6
Hoechst 33342	碧云天	C1022
ROS 试剂盒	碧云天	S0033M

二、实验步骤

- 1、细胞密度达到 80-90%，收集细胞，并用 1 mL DMEM 培养基重悬成细胞悬液，并用移液器轻轻吹打，确保形成单一细胞悬液，无细胞团块。向 6 孔板中加入适量的细胞悬液，使细胞密度在 60%左右。轻轻前后左右十字晃动孔板，使细胞均匀分布在孔底。将细胞放入 37°C、5% CO₂的恒温培养箱中培养至细胞贴壁。
- 2、按照实验设计，细胞贴壁后更换新鲜培养基，装载探针：按照 1:1000 用 PBS 溶液稀释 DCFH-DA，使终浓度为 10 微摩尔/升。去除细胞培养液，6 孔板每孔加入 1ml 稀释好的 DCFH-DA。37°C 细胞培养箱内孵育 20 分钟。用 PBS 溶液洗涤细胞 3 次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。
- 3、加入适当量 Hoechst 33342 工作液，终浓度为 1X，必须充分覆盖住待染色的样品，6 孔板每孔需加入 1mL 工作液，培养箱培养 10-15 min。
- 4、37°C 孵育结束后，吸除上清，用 PBS 涤 3 次，加入 2ml PBS，荧光显微镜下观察。

三、结果判读：

绿色荧光越强，说明细胞内 ROS 水平越高；绿色荧光越弱，说明 ROS 水平越低。

四、注意事项：

- 1、细胞状态要好，贴壁均匀，各组细胞密度接近
- 2、染色时间过短，线粒体信号不足；时间过长，背景升高，细胞状态可能受影响
- 3、DCFH-DA 通常用无血清培养基、HBSS 或 PBS 稀释。
- 4、染色结束后一般用预温培养基、PBS 或 HBSS 轻轻洗涤 2-3 次。