



## 流式 ROS 检测实验报告

### 一、实验器材及试剂

#### 1、实验器材

名称	厂家	型号
离心机	恒诺仪器设备有限公司	2-16R
流式细胞仪	BD	Celesta
1.5mL 离心管	科兔生物	KTL-15-P
流式管	康宁	5ml

#### 2、主要实验试剂

试剂名称	厂家	货号
PBS	科兔生物	RG-CE-10
活性氧检测试剂盒	Beyotime	S0033M

### 二、流式 ROS 检测实验步骤

#### 1、装载探针

对于刺激时间较短(通常为 2 小时以内)的细胞,先装载探针,后用活性氧阳性对照或自己感兴趣的药物刺激细胞。对于细胞刺激时间较长(通常为 6 小时以上)的细胞,先用活性氧阳性对照或自己感兴趣的药物刺激细胞,后装载探针。

原位装载探针:本方法仅适用于贴壁培养细胞。按照 1:1000 用细胞外液(C0216)或酌情使用 PBS、HBSS 等适当溶液稀释 DCFH-DA,使终浓度为 10 微摩尔/升。去除细胞培养液,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,通常对于六孔板的一个孔加入稀释好的 DCFH-DA 不少于 1 毫升。37°C 细胞培养箱内孵育 20 分钟。用细胞外液(C0216)或酌情使用 PBS、HBSS、无血清细胞培养液等适当溶液洗涤细胞三次,以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。通常活性氧阳性对照在刺激细胞 20-30 分钟后可以显著提高活性氧水平。

收集细胞后装载探针:按照 1:1000 用细胞外液(C0216)或酌情使用 PBS、HBSS 等适当溶液稀释 DCFH-DA,使终浓度为 10 微摩尔/升。细胞收集后悬浮于稀释好的 DCFH-DA 中,细胞浓度为二百万至二千万/毫升,37°C 细胞培养箱内孵育 20 分钟。每隔 3-5 分钟颠倒混匀



一下，使探针和细胞充分接触。用细胞外液(C0216)或酌情使用 PBS、HBSS、无血清细胞培养液等适当溶液洗涤细胞三次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。直接用活性氧阳性对照或自己感兴趣的药物刺激细胞，或把细胞等分成若干份后刺激细胞。通常活性氧阳性对照在刺激细胞 20-30 分钟后可以显著提高活性氧水平。

## 2、检测

对于原位装载探针的样品可以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。对于收集细胞后装载探针的样品可以用荧光分光光度计、荧光酶标仪或流式细胞仪检测，用激光共聚焦显微镜直接观察也可以。

## 三、流式检测

流式细胞仪使用激发波长 488nm，发射波长  $525\pm 20\text{nm}$  进行检测，用 FlowJo 软件分析细胞 ROS 水平。

## 四、数据处理

检测完成后可以直接利用流式细胞仪自带软件处理数据,生成 PDF 文件,然后截屏需要的流式细胞图,并对凋亡细胞比例进行统计分析;另外可以保存 FCS 文件,利用 Flowio 等流式数据处理软件对流式细胞图进行处理，如下图所示。

仅供科研用途，不可用于临床诊断！