

本试剂盒仅用于科研、实验室

活性氧（ROS）测定试剂盒说明书

（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物质 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 $1 \times 10^6 - 2 \times 10^7$ /ml。

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 ± 15 nm），最佳发射波长 525（ 530 ± 20 nm）。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 $20\sim 100\ \mu\text{M}$ 。

③、 37°C 孵育细胞 $30\text{min}\sim$ 几小时，通常为 $30\sim 60\text{min}$ 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。 $1000\text{rpm}/\text{min}$ ，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 $500\ (500\pm 15\text{nm})$ ，最佳发射波长 $525\ (530\pm 20\text{nm})$ 。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， $1000\text{rpm}/\text{min}$ ，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（ $2000\text{rpm}/\text{min}$ ，离心 5min），收集细胞沉淀，用无血清培养液或者 0.01MPBS 洗涤 2 次， $1000\text{rpm}/\text{min}$ ，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 $1\times 10^6\sim 2\times 10^7/\text{ml}$ ，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 $10\ \mu\text{M}$ 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 $10\ \mu\text{M}$ 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 $20\sim 100\ \mu\text{M}$ 。

④、 37°C 孵育细胞 $30\text{min}\sim$ 几小时，通常为 $30\sim 60\text{min}$ 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， $1000\text{rpm}/\text{min}$ ，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 $500\ (500\pm 15\text{nm})$ ，最佳发射波长 $525\ (530\pm 20\text{nm})$ 。也可按照 FITC 荧光检测条件检测。

⑧、结果以荧光度值表示。