

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

## 活性氧测定试剂盒

# Reactive Oxygen Species (ROS) Assay Kit

产品货号: BC00009

产品规格: 100T

**使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们:**

✉ 邮箱 (销售)      [order@enkilife.cn](mailto:order@enkilife.cn)

✉ 邮箱 (技术支持)      [tech@enkilife.cn](mailto:tech@enkilife.cn)

☎ 公司电话      027-87002838

🌐 网址      [www.enkilife.cn](http://www.enkilife.cn)



订阅微信公众号  
获取更多技术  
信息及前沿动态

保质期: 请见试剂盒外包装标签。

技术支持: 为了更好地给您提供服务, 联系时请告知产品外包装标签上批号。

## 基本信息

产品中文名称	活性氧测定试剂盒
产品英文名称	Reactive Oxygen Species (ROS) Assay Kit
检测方法	Fluorescent
样品类型	细胞（包括贴壁细胞、悬浮细胞）、组织
检测类型	Cell-based (quantitative)
检测仪器及波长	<b>荧光酶标仪</b> （测定 488 nm 激发波长和 525 nm 发射波长的荧光值。） <b>流式细胞仪</b> （设置激发波长为 488 nm，检测波长 525 nm，DCF 的荧光光谱和 FITC 非常相似，可以用 FITC 的参数设置检测 DCF，检测时细胞数量可选 $10^4 - 10^5$ ) <b>激光共聚焦显微镜</b>

## 产品简介

活性氧 (Reactive Oxygen Species, 简称 ROS) 是一类具有高反应活性的含氧物种，包括氧的一电子产物氧负离子 ( $O^{2-}$ )、二电子产物过氧化氢 ( $H_2O_2$ )、三电子产物羟基自由基 ( $OH\cdot$ ) 和一氧化氮等。活性氧在生物体内扮演着复杂的角色，从正常生理功能的调节到疾病的发生发展都与之密切相关。

## 产品特点

- ★ 本底低，灵敏度高，线性范围宽，使用方便。

## 检测原理

活性氧测定试剂盒是一种利用荧光探针 DCFH-DA 进行活性氧检测的试剂盒。探针 DCFH-DA 本身没有荧光，可以自由穿过细胞膜，进入细胞内后，可以被细胞内的酯酶水解生成 DCFH。而 DCFH 不能通透细胞膜，从而使探针很容易被装载到细胞内。细胞内的活性氧可以氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF。检测 DCF 的荧光就可以知道细胞内活性氧的水平。

## 产品组分

对于 6 孔板培养的细胞，本试剂盒可进行 100-500 次检测。

编号	产品名称	规格 (100T-500T)	保存方式
试剂一	DCFH-DA (10mM)	0.1ml	-20°C, 避光, 开瓶后 4°C保存, 6 个月有效。
试剂二	活性氧阳性对照 (Rosup, 50mg/ml)	1ml	-20°C, 避光, 开瓶后 4°C保存, 6 个月有效。

## 保存条件

未拆封的试剂盒可在 -20°C保存 6 个月。

## 操作流程

### 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。

#### (1) 原位装载探针 (本方法仅适用于贴壁培养细胞)

- 按照 1:1000 用无血清培养液稀释 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。
- 用无血清细胞培养液洗涤细胞三次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。

#### (2) 收集细胞后装载探针

- 按照 1:1000 用无血清培养液稀释 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，细胞浓度为一百万至二千万/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。
- 用无血清细胞培养液洗涤细胞三次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。

### (3) 阳性对照的使用说明

- A. 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。
- B. 阳性对照可以按照 1:1000 的比例使用。例如装载好探针的细胞共 1 毫升，可以加入 1 微升的阳性对照刺激。
- C. 通常刺激后 20-30 分钟内可以观察到非常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 分钟内观察不到活性氧的升高，可以适当提高活性氧阳性对照的浓度。如果活性氧升高得过快，可以适当降低活性氧阳性对照的浓度。
- D. 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) 本试剂盒也可以检测组织样品中的活性氧，处理方法如下。组织样品按照每 5-10 mg 组织加入 100-200  $\mu$ L 裂解液的比例进行匀浆。4 $^{\circ}$ C 约 12000g 离心 3-5 分钟，取上清进行后续实验，以上所有操作均需在 4 $^{\circ}$ C 或冰上操作。制备好的组织样品如果不立即测定，可以 -20 $^{\circ}$ C 冻存。装载探针时，向上清中按照 1:1000 或 1:10000 加入 DCFH-DA，使终浓度为 10  $\mu$ mol/L 或 1  $\mu$ mol/L (可根据预实验结果调整探针浓度)。混匀后 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 分钟后进行检测(可根据预实验结果调整孵育时间)。

## 2. 检测

### (1) 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。

### (2) 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，也可以用激光共聚焦显微镜直接观察。

## 3. 参数设置

使用 488nm 激发波长，525nm 发射波长，实时或逐时间点检测刺激前后荧光的强弱。DCF

的荧光光谱和 FITC 非常相似，可以用 FITC 的参数设置检测 DCF。

#### **4. 其它说明**

对于某些细胞，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，使装载探针时 DCFH-DA 的浓度为 2-5 微摩尔/升。

探针装载的时间也可以根据情况在 15-60 分钟内适当进行调整。

#### **注意事项**

1. 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。
2. 探针装载完毕并洗净残余探针后，可以进行激发波长的扫描和发射波长的扫描，以确认探针的装载情况是否良好。
3. 尽量缩短探针装载后到测定所用的时间(刺激时间除外)，以减少各种可能的误差。
4. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。