

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

增强型活性氧测定试剂盒

Enhanced Reactive Oxygen Species (ROS) Assay Kit

产品货号: BC00010

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

✉ 邮箱 (技术支持) tech@enkilife.cn

☎ 公司电话 027-87002838

🌐 网址 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	增强型活性氧测定试剂盒
产品英文名称	Enhanced 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	荧光酶标仪（测定 488 nm 激发波长和 525 nm 发射波长的荧光值。） 流式细胞仪（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 104 -105 ） 激光共聚焦显微镜

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（O²⁻）、二电子产物过氧化氢（H₂O₂）、三电子产物羟基自由基（OH[·]）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

★ 与普通版活性氧测定试剂盒（BC00009）使用的 DCFH-DA 相比，羧基 H2DCF-DA 被水解和氧化后的产物带有额外的负电荷，阻碍其渗出细胞，因此具有更低的背景和更好的荧光信号。

检测原理

增强型活性氧测定试剂盒是一种利用荧光探针羧基 H2DCF-DA 进行活性氧检测的试剂盒。探针羧基 H2DCF-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和 ROS 氧化，转化为绿色荧光形式，检测 DCF 的荧光就可以知道细胞内活性氧

的水平。本试剂盒提供了活性氧阳性对照试剂 Rosup，以便于活性氧的检测。

产品组分

编号	产品名称	规格 (100T-500T)	保存方式
试剂一	羧基 H2DCF-DA	0.1ml	-20℃, 避光, 开瓶后 4℃保存, 6 个月有效。
试剂二	活性氧阳性对照 (Rosup, 50mg/ml)	1ml	-20℃, 避光, 开瓶后 4℃保存, 6 个月有效。

保存条件

未拆封的试剂盒可在 -20℃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）

- A. 按照 1:1000 用无血清培养液稀释羧基 H2DCF-DA，使终浓度为 10 微摩尔/升。
- B. 去除细胞培养液，加入适当体积稀释好的羧基 H2DCF-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羧基 H2DCF-DA 不少于 1 毫升。
- C. 37℃ 细胞培养箱内孵育 20 分钟。
- D. 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羧基 H2DCF-DA。

(2) 收集细胞后装载探针

- A. 按照 1:1000 用无血清培养液稀释羧基 H2DCF-DA，使终浓度为 10 微摩尔/升。
- B. 细胞收集后悬浮于稀释好的羧基 H2DCF-DA 中，细胞浓度为二百万至二千万/毫升。
- C. 37℃ 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。

D. 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羧基 H2DCF-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 μ L 裂解液的比例进行匀浆。4℃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℃或冰上操作。制备好的组织样品如果不立即测定，可以-20℃冻存。装载探针时，向上清中按照 1:1000 或 1:10000 加入羧基 H2DCF-DA，使终浓度为 10 μ mol/L 或 1 μ mol/L 可根据预实验结果调整探针浓度)。混匀后 37℃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。反应产物的荧光光谱和 FITC 非常相似，可以用 FITC 的参数设置检测。

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 稀释羧基 H2DCF-DA，使装载探针时羧基 H2DCF-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。