

活性氧检测试剂盒

ROS Detection Kit

说明书修订日期: 2015.07.13

Cat number: KGT010-1

Store at -20°C for 6 months, protected from light

For Research Use Only (科研专用)

一、试剂盒说明

活性氧检测试剂盒(Reactive Oxygen Species Assay Kit)是一种利用荧光探针DCFH-DA进行活性氧检测的试剂盒。DCFHDA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。

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。Rosup是一种混合物(compound mixture),浓度为50mg/ml。

本试剂盒本底低,灵敏度高,线性范围宽,使用方便。

本试剂盒可以测定100-500个样品。

二、试剂盒组份

组份	Cat: KGT010-1 100 assays	储存条件
DCFH-DA (10mM)	0.1ml	-20°C, 避光
活性氧阳性对照(50mg/ml)	1.0ml	

三、试剂盒以外自备仪器和试剂

流式细胞仪或荧光显微镜、低速离心机、微量移液器

1.5ml Microtube、载玻片、盖玻片(荧光显微镜观察需用)、PBS、不含EDTA的胰酶消化液

四、使用注意事项

- 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。DCF的激发光谱和发射光谱请参考下页图谱。
- 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.为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。

五、操作方法

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℃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。通常活性氧阳性对照在刺激细胞10-20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，细胞浓度为二百万至二千万/毫升，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。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。

加药刺激：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10-20分钟后可以显著提高活性氧水平。

说明：仅在阳性对照孔中加入阳性刺激物作为阳性对照，其余孔不必加入阳性刺激物。

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。

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。DCF的激发光谱和发射光谱参考下图。

4. 其它说明

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。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。

另外，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。

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。

使用本产品的文献

1. Jia SJ, Jiang DJ, Hu CP, Zhang XH, Deng HW, Li YJ.

Lysophosphatidylcholine-induced elevation of asymmetric dimethylarginine level by the NADPH oxidase pathway in endothelial cells.

Vascul Pharmacol. 2005 Nov 22;

2. Li JJ, Tang Q, Li Y, Hu BR, Ming ZY, Fu Q, Qian JQ, Xiang JZ.

Role of oxidative stress in the apoptosis of hepatocellular carcinoma induced by combination of arsenic trioxide and ascorbic acid.

Acta Pharmacol Sin. 2006 Aug;27(8):1078-84.

3. Tian YY, An LJ, Jiang L, Duan YL, Chen J, Jiang B.

Catalpol protects dopaminergic neurons from LPS-induced neurotoxicity in mesencephalic neuron-glia cultures.

Life Sci. 2006 Dec 23;80(3):193-9.

4. Man Y, Ding L, Guo H, Wang L, Wang S, Li J.

In vitro experiment of danshen root and carthamus tinctorius extract in the protection of endothelial cells from oxidative damage.

Chin J Clin Rehab. 2006; 10(39):119-122.

凯基相关产品（详见凯基网站 <http://www.keygentec.com.cn>）

细胞株、细胞提取物及细胞培养产品

- 人类肿瘤细胞株 动物肿瘤细胞株 正常细胞株 肿瘤耐药细胞株
- 细胞提取物（RNA/DNA/蛋白）
- 细胞培养相关产品

细胞凋亡

一、细胞凋亡研究试剂盒

- Annexin V-FITC/ EGFP/PE 细胞凋亡检测试剂盒
- TUNEL 凋亡原位检测系列试剂盒
- Caspase(2、3、6、8、9)系列细胞凋亡检测试剂盒
- 线粒体膜电位检测试剂盒（JC-1）
- TRAP-PCR 端粒酶活性检测试剂盒
- DNA Ladder 检测试剂盒

二、细胞凋亡相关抗体

三、凋亡诱导剂、抑制剂

四、氧化应激损伤检测试剂盒

五、细胞凋亡研究辅助试剂

细胞增殖/毒性/活力与细胞周期

- 凯基细胞周期检测试剂盒
- MTT、XTT、WST-1、CCK-8 等系列细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒

细胞染色产品

- 活细胞/凋亡细胞/坏死细胞鉴别试剂盒（AO/EB 法、荧光显微镜）
- 凯基细胞凋亡形态学检测试剂盒
- 罗丹明 123、DAPI、PI、7-AAD、Hoechst 33258、EB、吖啶橙染色试剂盒

亚细胞组分制备

- 细胞核、线粒体制备试剂盒
- 细胞悬液制备试剂盒（组织消化试剂盒）