

## 活性氧检测试剂盒(DCFH-DA 荧光法)

### 产品简介:

活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)包括超氧化物、过氧化氢、羟自由基以及具有高氧化活性的活性氧代谢产物。活性氧主要由中性粒细胞、巨噬细胞、单核细胞为代表的免疫细胞受到刺激后产生,其它体细胞在应激条件下线粒体电子传递异常也会产生活性氧。免疫细胞产生的活性氧能够抵御微生物的感染。在病理条件下,过度产生的活性氧也会导致机体损伤和引发各种疾病。

活性氧检测试剂盒(Reactive Oxygen Species Assay Kit, 也称 ROS Assay Kit)是一种利用荧光探针 DCFH-DA 进行活性氧检测的试剂盒。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,通过检测 DCF 的荧光就可以知道细胞内活性氧的水平,从而用于病理生理研究或药物筛选。用流式细胞仪或荧光显微镜可直接观察,是一种经典活细胞中活性氧的检测方法。本试剂盒利用能够刺激多种免疫细胞产生活性氧的佛波酯(PMA)为阳性对照,灵敏度高,线性范围宽,使用方便。本产品仅用于科研领域,不适用于临床诊断或其他用途。

### 产品组成:

名称	编号	TO0205 20T	Storage
试剂(A): DCFH-DA 溶液(10mM)		20µl	-20°C 避光
试剂(B): PMA 溶液(1000×)		10µl	-20°C 避光
使用说明书		1 份	

### 自备材料:

- 1、细胞、纯化的线粒体、细胞培养用 PBS 或无血清细胞培养液
- 2、系列可调节量程移液器及吸头、离心管、24 孔板、细胞培养箱
- 3、流式细胞仪、荧光酶标仪、荧光分光光度计、激光共聚焦显微镜、荧光显微镜等

### 操作步骤(仅供参考):

#### 一、装载 ROS 探针

1. 原位装载探针(仅适用于贴壁细胞)。

(a)细胞准备: 检测前一天进行细胞铺板, 确保检测时细胞数量小于  $5 \times 10^5$ /ml。

(b)药物诱导: 去除细胞培养液, 加入适当浓度的药物处理, 于 37°C 细胞培养箱内避光孵育,

实际诱导时间由药物特性和细胞类型决定。

(c)阳性对照(可选)：先用无血清培养基按 1:1000 比例稀释阳性对照 PMA 溶液(1000×)，加入细胞，37°C避光孵育 0.5-4h，以提高活性氧水平，不同细胞类型存在差异。例如：HeLa 细胞需孵育 30-60min，MRC5 人胚胎成纤维细胞则需孵 90min。

(d)ROS 探针准备：探针装载前按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA，使其终浓度为 10μM。

(e)ROS 探针装载：吸除处理药物，加入适当体积稀释好的 DCFH-DA 工作液。加入的体积需充分盖住细胞。例如：6 孔板通常不少于 1000μl，对于 96 孔板通常不少于 100μl。37°C 细胞培养箱内避光孵育 30min。

(f)细胞清洗：用无血清培养液洗涤细胞 1~2 次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。用 PBS 覆盖细胞用于 ROS 检测。

## 2.收集细胞后装载探针（适用于贴壁细胞和悬浮细胞）

(a)细胞准备：按照标准方法培养细胞，必须保证检测用的细胞状态。按照适当方法，清洗并收集足量的细胞。

(b)药物诱导：将收集好的细胞悬浮于适量稀释好的药物，于 37°C细胞培养箱内避光孵育，实际诱导时间由药物特性和细胞类型决定。

(c)阳性对照(可选)：先用无血清培养基按 1:1000 比例稀释阳性对照 PMA 溶液(1000×)，加入细胞，37°C避光孵育 0.5-4h 以提高活性氧水平，不同细胞类型存在差异。例如：HeLa 细胞需孵育 30-60min，MRC5 人胚胎成纤维细胞则需孵育 90min。

(d)ROS 探针准备：探针装载前，按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA，使其终浓度为 10μM。

(e)探针装载：除去细胞内药物，离心收集细胞，加入稀释好的探针，使其细胞密度为  $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ /ml，37°C细胞培养箱内避光孵育 30min。注意：细胞密度需根据后续的检测体系、检测方法，以及检测总量来进行调整。例如：对于流式分析，单管检测内细胞数目不少于  $10^4$ ，也不可多于  $10^6$ 。

(f)细胞清洗：用无血清细胞培养液洗涤细胞 1-2 次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。用 PBS 重悬细胞用于 ROS 检测。

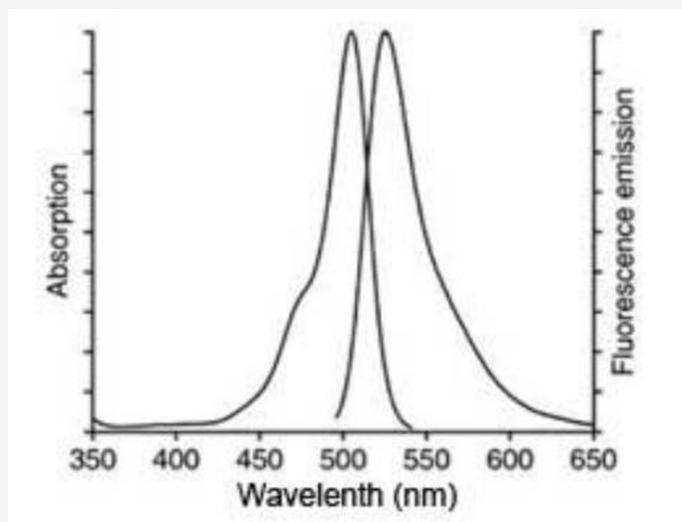
## 二、观察与分析

1、对于原位装载探针的样品可以用激光共聚焦显微镜或荧光显微镜直接观察，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、荧光显微镜观察操作方法：对于贴壁细胞，可直接在荧光显微镜下观察；对于悬浮细胞，取 25-50μl 细胞悬液滴到一张载玻片上，再盖上一张盖玻片。DCF 的荧光光谱和 FITC 非

常相似，可以用 FITC 的参数设置检测。激发波长为 488nm，发射波长为 525nm，荧光显微镜下，选用 FITC 滤光片观察 DCF 荧光，去除背景观察荧光的变化。DCF 的激发光谱和发射光谱参考下图：



- 4、流式细胞分析操作方法：对于贴壁细胞，用胰酶消化制备成单细胞悬液；对于悬浮细胞，直接收集细胞；用 0.5-1ml PBS 重悬细胞( $0.5 \sim 1 \times 10^5$ /ml)。选择流式细胞仪 FL1 或 BL1 通道，实时或逐时间点检测刺激前后荧光的强弱。细胞应可分成两个亚群：ROS 阴性细胞仅有很低的荧光强度，ROS 阳性细胞有较强的绿色荧光。
- 5、荧光分光光度计或荧光酶标仪检测方法：机器开机预热 30min 以上，调节激发波长为 488nm，发射波长为 525nm，在黑色不透光的比色皿或 96 孔板中加入细胞悬液，测定并记录 10min 内的荧光值变化。

#### 注意事项：

- 1、初次使用试剂时，请适当离心后使用。
- 2、活性氧阳性对照(PMA)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。
- 3、初次测定活性氧，可取小鼠骨髓细胞， $1 \times 10^6$  细胞/孔，接种到 24 孔板中，加入 1ml 无血清培养基稀释 1000 倍的 DCFH-DA，然后再加入 1ul PMA 溶液(1000 $\times$ )刺激 30-60min，检测活性氧作为阳性对照。通常刺激后 0.5-4h 可观察到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 30min 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。
- 4、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 $\mu$ M。探针装载的时间也可以根据情况在 15-60min 内适当进行调整。

- 5、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。
- 6、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。
- 7、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。
- 8、荧光酶标仪检测时须使用适合荧光检测的黑板或白板。
- 9、如果定量的话需要制作标准曲线。先做一个不同浓度  $H_2O_2$  氧化 DCFA 荧光值，做一条标准曲线，X 轴为  $H_2O_2$  浓度，Y 轴是荧光值，得出一个方程，再看样品的荧光值即 Y 值是多少，对应的 X 值即对应的  $H_2O_2$  浓度。
- 10、实验组荧光值不高可能是因为装载探针后有的细胞容易漂起来，洗细胞时一部分细胞会被吸走。所以在种细胞时可以把细胞量增加一倍，这样细胞紧密连接，贴壁比较牢，荧光值就高了。
- 11、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

**有效期：** 12 个月有效。低温运输， $-20^{\circ}C$  避光保存。

**相关产品：**

产品编号	产品名称
CA0075	青霉素-链霉素混合溶液(100×双抗)
DA0041	细胞自噬染色检测试剂盒(MDC 法)
PE0600	彩色预染蛋白分子量标准(10-180kD)
PS0013	RIPA 裂解液(强)
PT0001	BCA 蛋白定量试剂盒
TC0670	植物可溶性糖检测试剂盒(蒽酮微板法)
TC0751	丙酮酸检测试剂盒(二硝基苯肼比色法)
TC1015	铁检测试剂盒(亚铁嗉微板法)
TC1211	总胆固醇(TC)检测试剂盒(COD-PAP 单试剂微板法)
TC6108	甲醛检测试剂盒(乙酰丙酮比色法)
TE0251	单胺氧化酶(MAO)检测试剂盒(醛苯胺微板法)
TE0727	总超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(黄嘌呤氧化酶微板法)
TO1001	总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒(ABTS 微板法)
TO1075	过氧化氢( $H_2O_2$ )检测试剂盒(硫酸钛微板法)
TO1141	DPPH 自由基清除率检测试剂盒(微板法)
TP1013	植物根系活力检测试剂盒(萘胺比色法)
TP1121	植物总酚(TP)检测试剂盒(微板法)