

## ROS 活性氧检测试剂盒（红色荧光）

货号：CA1420

保存：-20℃避光保存

有效期：1 年

产品内容：

组成	试剂名称	规格
A 液	DHE 红色荧光染料（5mM）	0.2mL
B 液	活性氧阳性对照（Rosup, 50mg/mL）	1 ml

产品简介：

活性氧(Reactive oxygen species,ROS)包括超氧自由基、过氧化氢、及其下游产物过氧化物和羟化物等，参与细胞生长增殖、发育分化、衰老和凋亡以及许多生理和病理过程。活性氧检测试剂盒（Reactive Oxygen Species Assay Kit）是一种利用荧光探针进行活性氧检测的试剂盒。二氢乙锭 DHE (Dihydroethidium)，可自由透过活细胞膜进入细胞内，并被细胞内的 ROS 氧化，形成氧化乙锭；氧化乙锭可掺入染色体 DNA 中，产生红色荧光。根据活细胞中红色荧光的产生，可以判断细胞 ROS 含量的多少和变化。DHE 在细胞内主要被超氧阴离子型 ROS 氧化，用流式细胞仪或荧光显微镜可直接观察。

二氢乙锭本身为蓝色荧光，最大激发波长为 370 nm，最大发射波长为 420 nm，脱氢后与 RNA 或 DNA 结合产生红色荧光，最大激发波长为 488~535nm（最适激发波长是 518nm），最大发射波长为 610 nm。

本试剂盒只可以用于细胞的活性氧检测，本底低，灵敏度高，线性范围宽，使用方便。本试剂盒可以测定 **200 个样品 200T(96 孔板)**。

自备器材：

激光共聚焦显微镜或荧光分光光度计或荧光酶标仪激发波长 488~535nm，发射波长 610nm。离心机，移液器，PBS/ HBSS/ HEPES 缓冲液（不含酚红和钙镁）等相关仪器。

使用说明（仅供参考）：

贴壁细胞染色：

- (1) 使用前用 PBS 或者无血清培养基稀释母液至所需工作浓度，通常 5~20 $\mu$ M（按染色液：稀释液的比例为 1:1000 到 1: 250）就可以满足实验需求，**具体的浓度要根据实验需要进行进一步的调整。**
- (2) 以 96 孔板为例，细胞量在每孔  $1 \times 10^5 \sim 6$  时，加入的染色量 200 $\mu$ l，工作液浓度在 5-20 $\mu$ M，室温避光孵育 60min 或 37℃ 孵育 30-40min。
- (3) 去除染色液，用 1xPBS 浸洗 2 次后，显微镜检测。

悬浮细胞染色：

- (1) 收集悬浮细胞，离心弃掉培养基，用 PBS/ HBSS/ HEPES 缓冲液（不含酚红和钙镁）将细胞调整为  $1 \times 10^5-6/ml$  的细胞悬液。
- (2) 200 $\mu$ L 的细胞悬液里面加入 1-2 $\mu$ L 的红色荧光染料原液（5mM），吹打混合均匀，室温避光孵育 60min 或 37 $^{\circ}$ C 孵育 30-40min。
- (3) 孵育后，250-500g 离心 5min-10min，去除染色液，用 PBS 清洗 2 次，显微镜检测。

#### 阳性对照：

阳性对照 Rosup 可以按照 1: 1000 的比例使用。例如装载好探针的细胞共 1mL, 可以加入 1 $\mu$ L 的阳性对照刺激。通常刺激后 0.5-4h 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 0.5h 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。

对于某些特别的细胞，实验过程中如果发现没有刺激的阴性对照细胞荧光也比较强，可以 1:2500-1:1000 稀释探针的终浓度为 2-5 $\mu$ M。探针装载的时间也可以根据情况在 15-60 min 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) 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。
- 3) 有的细胞装载探针后细胞容易漂起来，洗细胞时实验组会吸走一部分细胞。所以种细胞时细胞量增加一倍，这样细胞紧密连接，贴壁比较牢，实验组的荧光值可能会升高。另外有的细胞对探针很敏感，建议工作液浓度适当低到 1-2 $\mu$ M。浓度太高容易有非特异性染色。
- 4) 探针经稀释后很不稳定，一旦氧化，本底荧光值就会升高，工作液建议现用现配。
- 5) 染色液为 DMSO 溶液，气温较低时为凝固状态，极易粘附在管壁、吸头壁。注意需要充分融解后使用，变成液体状态后离心至管底部再开盖。
- 6) 结果处理，推荐表示细胞活性氧强度=荧光强度/蛋白（mg），并且结合相关文献数据进行计算。
- 7) 如果是流式检测，推荐贴壁细胞用胰酶消化制备成单细胞悬液；悬浮生长细胞，直接收集细胞。用 PBS 重悬细胞  $1 \times 10^5-6/ml$ 。
- 8) 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。
- 9) 定量的话要作标准曲线。先做一个推荐不同浓度  $H_2O_2$ （100-400 $\mu$ M）氧化荧光值，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，在看你样品的荧光值即 Y 值是多少，计算出对应的 X 值就是。
- 10) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。