

# 活性氧 (ROS) 测定试剂盒说明书(精简版)

(货号:E004-1-1 化学荧光法 100T-500T)

**免责声明: 测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!**

## 一、测定意义:

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。本试剂盒采用的 DCFH-DA(2, 7-Dichlorofluorescein Diacetate)探针, 是迄今最常用、最灵敏的细胞内活性氧检测探针。DCFH-DA 本身没有荧光, 可以自由穿过细胞膜, 当其进入细胞内后, 会被细胞内的相关酯酶水解为 DCFH (Dichlorofluorescein)。而 DCFH 不能通透细胞膜, 从而使探针很容易被标记到细胞内。当细胞内有活性氧存在时, DCFH 被氧化为强绿色荧光物质 DCF (Dichlorofluorescein), 其荧光在激发波长 488nm, 发射波长 525nm 附近有最大波峰, 其荧光强度与细胞内活性氧水平成正比。一般细胞内活性氧的升高是细胞凋亡的标志之一。该活性氧检测系统本底低, 灵敏度高, 重复性好, 操作简便。

**工作波长:** 最佳激发波长 488, 最佳发射波长 525 (530±20 nm)。也可按照 FITC 荧光检测条件检测。

## 二、试剂组成及保存:

1、0.1mL 10mM DCFH-DA in DMSO, 4-8℃ 保存。

2、1mL 活性氧阳性对照(Rousp,50mg/mL), 4-8℃ 保存。

## 三、试剂准备:

1、可将 **DCFH-DA** 稀释于适宜的缓冲液, 如无血清培养液或者 0.01M PBS。对于不同的处理步骤, DCFH-DA 工作浓度可为 100nM~20μM, 需进行预实验确定合适的浓度。总体稀释倍数应在 1: 500~1: 1000 以上以避免 DMSO 对细胞的影响, 推荐初始浓度为 10μM。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 1:2000~5000 稀释 DCFH-DA, 使装载探针时 DCFH-DA 的浓度为 2~5μmol/L。探针装载的时间也可以根据情况在 15~60 分钟内调整。

2、**阳性对照**可以按 1:1000 的比例使用。例如装载好探针的细胞共 1mL, 可以加入 1μL 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)。对于不同细胞。活性氧对照的效果可能有较大的差异。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, 反之如果活性氧升高过快则可以适当降低它的浓度。**活性氧阳性对照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。如果用户熟悉 ROS 荧光或实验没有必要采用阳性对照管, 如荧光显微镜检测也可以不加该试剂。**

## 四、组织样本操作步骤: (可用激光共聚焦显微镜观察, 也可用于流式细胞仪、荧光酶标仪、荧光分光光度计测定)

### 1、制备单细胞悬液:

**方法 1、采用单细胞悬液制备仪制备单细胞悬液。**

**方法 2、酶消化法:**

- ①、选取的组织立即放入预冷的组织培养液或 PBS 中, 清洗血迹及其它污染物。去除组织块中的块死成分、纤维、脂肪及血管 (专门制备相关细胞时除外)。
- ②、用眼科剪将组织块剪成 1mm<sup>3</sup> 左右小块, 放在预冷的组织培养液或 PBS 中并进行漂洗, 洗去剪碎的细胞碎片。
- ③、加入适量酶消化液, 37℃ 恒温水浴消化 20~30min, 期间进行间断振荡或吹打细胞。
- ④、用组织培养液或 PBS 终止消化, 用 300 目尼龙网过滤除去组织团块, 收集滤过的细胞, 500g 离心 10min, 去上清留沉淀, 并用 PBS 洗 1~2 次。

**方法 3、机械法 (网搓法):**

- ①、前处理同酶消化法(1)、(2)步。
- ②、将 300 目尼龙网扎在小烧杯上, 将剪碎的组织放在网上, 以眼科镊或刮刀轻搓组织块, 边搓边用 PBS 冲洗, 直至将组织搓完。
- ③、收集细胞悬液, 500g 离心 10min, 去上清留沉淀, 并用 PBS 洗 1~2 次。

### 2、加入荧光探针:

- ①、取不进行任何处理的细胞用 0.01M PBS 重悬, 设为**阴性对照管**。**阳性对照管:** 用稀释好的 DCFH-DA 重悬细胞沉淀, 同时加入活性氧供氢体诱导细胞。
- ②、**样本管:** 用稀释好的 DCFH-DA 重悬细胞沉淀, 细胞密度一般要求  $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ /mL。
- ③、37℃ 孵育细胞 30min~几小时, 每隔 3~5 分钟颠倒混匀一下, 使探针与细胞充分接触。通常为 20~60min 即可, 孵育时间长短与细胞类型、刺激条件以及 DCFH-DA 浓度有关。
- ④、收集孵育 (探针标记) 后的单细胞悬液, 1000g, 离心 5~10 分钟, 去上清收集细胞沉淀, 用 PBS 洗涤 1~2 次, 以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。离心收集细胞沉淀用于荧光检测;

### 3、荧光检测:

- ①、将上述收集好的细胞沉淀用 PBS 重悬, 并用于检测;
- ②、**波长设置:** 最佳激发波长 488nm, 最佳发射波长 525nm。也可按 FITC 荧光检测条件检测。
- ③、结果以荧光度值表示。

### 五、细胞样本操作步骤:(可用激光共聚焦显微镜观察, 也可用于流式细胞仪、荧光酶标仪、荧光分光光度计测定)

#### 1、直接将探针加入培养液中(该方法只适用于贴壁细胞):

- ①、直接将 DCFH-DA 探针加入无血清培养基中: 一般按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA(终浓度为 10 $\mu$ M)。去除培养液后, 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 6 孔板的一个孔加入稀释好的 DCFH-DA 不少于 1mL。
- ②、取一份不加探针, 只加入培养基的细胞设为**阴性对照管**。**阳性对照管:** 取一份已加入探针的细胞, 同时加入活性氧供氢体诱导细胞。
- ③、37 $^{\circ}$ C 孵育细胞 20min~几小时(每隔 3~5 分钟颠倒混匀一下, 使探针和细胞充分接触), 通常为 20min, 孵育时间长短与细胞类型、刺激条件、DCFH-DA 浓度有关。一般阳性对照在刺激细胞 20~30 分钟后, 即可观察到明显的绿色荧光。
- ④、吸去培养液, 利用无血清培养液或者 0.01MPBS 反复吹打, 肉眼观察瓶底由半透明(细胞单层连接成片)转为透明, 细胞层几乎全部吹打到 PBS 中。
- ⑤、将细胞悬液全部收集到 1.5mL 离心管中。用无血清培养液或者 PBS 洗涤 2 次, 以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。1000rpm/min, 5min, 吸净上清后加入 PBS 重新悬浮细胞进行测定。
- ⑥、**波长设置:** 最佳激发波长 488nm, 最佳发射波长 525nm。也可按照 FITC 荧光检测条件检测。
- ⑦、结果以荧光度值表示。

#### 2、先收集细胞, 制备成细胞悬液后测定(该方法适用于贴壁细胞及悬浮细胞)

##### ①、细胞收集:

- a、**贴壁细胞**, 吸去培养液, 利用无血清培养液或者 0.01MPBS 反复吹打, 肉眼观察孔板底部(瓶底)由半透明(细胞单层连接成片)转为透明, 细胞层几乎全部吹打到 PBS 中。
- b、将细胞悬液全部收集到 1.5mL 离心管中。用无血清培养液或者 0.01MPBS 洗涤 2 次, 1000rpm/min, 离心 5min, 吸净上清, **留细胞沉淀用于测定**。
- c、**悬浮细胞**按照常规方法离心(2000rpm/min, 离心 5min), 收集细胞沉淀, 用无血清培养液或者 0.01M PBS 洗涤 2 次, 1000rpm/min, 离心 5min, 吸净上清, **留细胞沉淀用于测定**。

##### ②、细胞重悬: 细胞密度一般要求 1 $\times$ 10<sup>6</sup>-2 $\times$ 10<sup>7</sup>/mL, 一般有两种方法:

- a、先加入无血清培养液或者 PBS 重悬细胞, 然后根据加入培养液或者 PBS 的体积, 按照 10 $\mu$ M 的初始浓度(最好做预实验确定自身样本适合浓度)加入探针, (**适用于预实验及少量样本的情况**)
- b、先按照 10 $\mu$ M 的浓度将探针用无血清培养液或者 PBS 先稀释好, 然后用稀释好的探针重悬上述细胞沉淀, 制备成细胞悬液, (**适用于样本较多的情况**)

- ③、取一份不加探针, 只加入培养基或 PBS 的细胞设为**阴性对照管**。**阳性对照管:** 取一份已加入探针的细胞悬液, 同时加入活性氧供氢体诱导细胞。
- ④、37 $^{\circ}$ C 孵育细胞 20min~几小时, 通常为 20~60min 即可, 孵育时间长短与细胞类型、刺激条件、DCFH-DA 浓度有关; 每隔 3~5 分钟颠倒混匀一下, 使探针与细胞充分接触。
- ⑤、**收集**孵育(探针标记)后的单细胞悬液, 1000rpm/min, 离心 5min, 吸净上清, 用 PBS 洗涤 1~2 次, 离心收集细胞沉淀物用于荧光检测。
- ⑥、将上述收集好的细胞沉淀用 PBS 重悬, 并用于**检测**。
- ⑦、**波长设置:** 最佳激发波长 488nm, 最佳发射波长 525nm。也可按照 FITC 荧光检测条件检测。
- ⑧、结果以荧光度值表示。

### 六、相关注意事项

- 1、悬浮荧光探针标记后, 一定要洗净残余的未进入细胞内的探针, 否则会导致背景不干净荧光值偏高。
- 2、重悬的细胞密度可根据细胞的荧光强弱进行调整, 如荧光较强可将细胞密度调小, 如荧光较弱可将细胞密度调大, 但所有样本的细胞密度应保持一致。
- 3、测定细胞样本时, 对于药物作用时间在 2 小时以内的细胞, 一般建议先标记探针, 然后再用药物刺激细胞, 对于药物作用时间需要在 6 小时以上的细胞, 可以先用活性氧阳性对照及药物刺激细胞, 然后再标记探针。
- 4、同时取部分单细胞悬液经过超声或匀浆破碎处理, 用于蛋白的测定(蛋白定量试剂盒本所有售, 推荐 A045-2 考马斯亮蓝法蛋白定量试剂盒、A045-3 BCA 法蛋白定量试剂盒), 用于结果计算表示为**荧光度值/毫克蛋白**。
- 5、荧光一般是用荧光发射的强度, 不过由于不同的仪器表示方法不一样, 有的用光能量, 有的用光子计数, 不同的仪器测定值之间没有可比性, 一般都用相对值表示。因此其单位是**任意单位(Arbitrary Unit, AU)**。