

Technical literature is available at: www.mesgenbio.com. E-mail MesGen Technical Services if you have questions on use of this system: tech@mesgenbio.com

MESGENTM
INNOVATION BIOTECHNOLOGY

产品简介

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。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。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,浓度为50mg/mL。

试剂盒组成

产品组成	100-500 tests	1000-5000 tests
Solution A (DCFH-DA (10mM))	1×0.1mL	10×0.1mL
Solution B (Rosup, 50mg/mL)	1×1.0mL	10×1.0mL

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 μ mol/L。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1mL。37 $^{\circ}$ C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20~30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 μ mol/L。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/mL,37 $^{\circ}$ C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。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20~30分钟后可以显著提高活性氧水平。

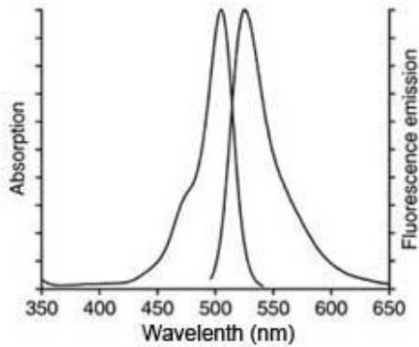
说明:仅在阳性对照孔中加入Rosup作为阳性对照,其余孔不必加入Rosup。

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,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。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 1mL，可以加入 1 μ L 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 μ mol/L。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。

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上图。
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。

储存条件

-20 $^{\circ}$ C 避光保存，有效期一年。

仅供科学研究，不得用于临床治疗