

For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures

Version 2.0

活性氧测定试剂盒

Reactive Oxygen Species Assay Kit

Cat.No.MG790

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

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50 mg/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。

试剂盒组成

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

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 $\mu\text{mol/L}$ 。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 1 mL。37 $^{\circ}\text{C}$ 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。

Do not eat Store at -20 $^{\circ}\text{C}$ & in the dark

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 $\mu\text{mol/L}$ 。细胞收集后悬浮于稀释好的 DCFH-DA 中,细胞浓度为 1×10^6 至 $2 \times 10^7/\text{mL}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 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。

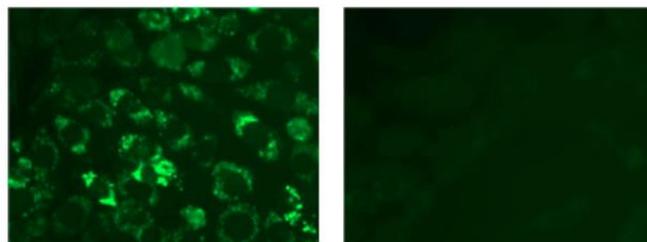
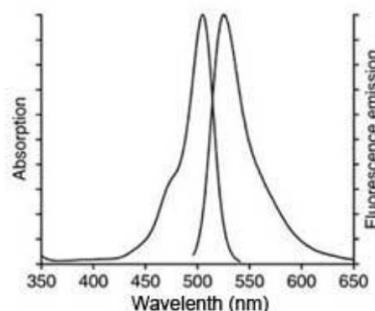
说明: 仅在阳性对照孔中加入 Rosup 作为阳性对照,其余孔不必加入 Rosup。

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。



使用活性氧检测试剂盒(Reactive oxygen species assay kit)显示CHO细胞内活性氧荧光。左图: CHO细胞用试剂盒配备的活性氧阳性对照处理;右图: 正常CHO细胞。绿色荧光表明细胞活性氧急剧增加,并显示其定位。

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 mL, 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. 定量建议请按照标准曲线进行。即先做不同浓度 H_2O_2 氧化 DCFA 荧光值, 产生标准曲线, X轴为 H_2O_2 浓度, Y轴是荧光值, 得出一个正比例方程。特定样品的荧光值即Y值对应的X值即样品浓度。

储存条件

-20 $^{\circ}$ C 避光保存, 有效期1年。

产品仅供科学研究 禁止用于临床诊断、治疗

For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures.