**活性氧检测试剂盒说明书**

**一、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，可以被细胞内酯酶水解生成DCFH。而DCFH不能通透细胞膜，从而使探针被保留在细胞内。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荧光强弱就可以定性/定量评估细胞内活性氧水平。本试剂盒提供了一种混合物Rosup（50 mg/mL）作为活性氧阳性对照试剂，以便于活性氧的检测。

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。

**二、包装说明**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 产品编号 | 产品名称 | 包装 | 保存 |
| MR1008A  MR1008B | DCFH-DA（10 mM）  活性氧阳性对照（Rosup，50 mg/mL） | 0.1 mL  1 mL | -20℃  -20℃ |

**三、使用说明**

**1、装载探针**

对于刺激时间较短（2小时以内）的细胞，先装载探针，后用活性氧阳性对照试剂或自己感兴趣的药物刺激细胞；对于刺激时间较长（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 μM的工作液。去除细胞培养液，加入适当体积DCFH-DA工作液。加入的体积以能充分盖住细胞为宜，通常对于6孔板的每个孔加入DCFH-DA工作液不少于1 mL。37℃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试剂在刺激细胞20～30分钟后即可显著引起活性氧水平升高。

**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 μM的工作液。细胞收集后悬浮于DCFH-DA工作液中，细胞浓度为1×106～2×107/mL，37℃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试剂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试剂在刺激细胞20～30分钟后即可显著引起活性氧水平升高。

**说明：**只在阳性对照孔中加入Rosup作为阳性对照，其余孔不要加入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、检测参数**

使用488 nm激发波长，525 nm发射波长，实时或在设定的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图1。

**图1 DCF的激发光谱和发射光谱**



图2显示使用本试剂盒PC12细胞内活性氧荧光强弱表现。左图：PC12细胞用活性氧阳性对照Rosup试剂处理；右图：正常PC12细胞。绿色荧光表明细胞活性氧急剧增加，并能显示其定位。

**4. 其他说明：**

阳性对照可以按照1:1000的比例使用。例如装载

了探针的细胞共1 mL，可以加入1 μL的阳性对照Rosup **图2 PC12细胞内活性氧荧光强弱表现**

试剂刺激，经20～30分钟后可以观察到非常显著的活性氧水平升高。对于不同的细胞，活性氧阳性对照的刺激效果可能有比较大的差别。如果在刺激后30分钟内观察不到活性氧水平升高，可以适当提高活性氧阳性对照的浓度；若活性氧升高得过快，可以适当降低活性氧阳性对照的浓度。

另外，对于某些细胞，如果观察到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浓度为2～5 μM的工作液。探针装载时间也可以根据情况在15～60分钟内作适当调整。活性氧阳性对照Rosup试剂仅用于作为阳性对照样品，不需要在每个样品中都加入活性氧阳性对照试剂。

**四、保存条件：**

-20℃避光保存，有效期一年。

**五、注意事项**

1、DCFH-DA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图1。

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。

5、定量的话要作标准曲线吧。先做一个不同浓度H2O2氧化DCFA荧光值，做一条标准曲线，X轴为H2O2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，对应的X值就是。

6、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，实验组的荧光值就高了。另外的DCFH-DA很敏感，工作液浓度要低一些，1-2 μM就够啦，浓度太高容易有非特异性染色。这个探针很不稳定，一旦氧化了本底荧光值就会升高，建议工作液现配现用。

**南京善本生物科技有限公司**

**网址：http://www.sciben.com**

**电话：025-85300038**

**产品订购：sales@sciben.com**

**技术支持：support@sciben.com**

**产品编号：MR1008**

**生产批号：**