



活性氧（ROS）检测试剂盒

包装清单

Cat No.	组分	包装规格-100T
MCK-0037	活性氧阳性对照 (Rosup, 50mg/mL)	1 mL
	DCFH-DA (10 mM)	0.1 mL
	说明书	1 份

产品简介

活性氧检测试剂盒利用荧光探针 DCFH-DA 进行活性氧检测。检测原理为 DCFH-DA 初始无荧光，可透过细胞膜进入细胞并被细胞内的酯酶水解生成不可透过细胞膜的 DCFH，细胞内的活性氧可以氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF，通过使用荧光显微镜、流式细胞仪或激光共聚焦显微镜等来检测 DCF 的荧光信号来分析细胞内活性氧的水平。

活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)主要是由有氧呼吸过程中氧气还原或细胞内各种酶系反应生成。在生理状态下，ROS 有助于细胞信号传递和宿主防御。然而，当 ROS 的生成超出生物系统的解毒能力时，就会引发氧化应激，导致细胞损伤。细胞受损主要由 ROS 改变大分子结构所致，如膜脂中的多不饱和脂肪酸、关键蛋白质或 DNA。此外，ROS 与阿尔茨海默病、帕金森病、癌症和衰老等多种疾病的发生发展密切相关。

默科的活性氧检测试剂盒具有如下优点：

1. 阳性对照：提供活性氧阳性对照试剂(Rosup, 50 mg/mL)。
2. 灵敏度高：灵敏度高、本底低，线性范围宽。

保存条件

-20℃，有效期 1 年，避免反复冻融。

注意事项

1. 探针装载后，尽量充分洗净残余的未进入细胞内的探针，以免造成高背景。
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。
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. 使用荧光酶标仪检测时建议使用适合荧光检测的黑板或白板。
5. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
6. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明

装载 ROS 荧光探针

提供两种装载探针方案，可依据实验类型进行选择。

注：刺激时间较短 (< 2 h) 的细胞建议选择原位装载，即先装载探针后用阳性对照或药物刺激细胞；刺激时间较长 (> 6 h) 则建议先用阳性对照或药物刺激 细胞再装载探针)

1. 原位装载（仅适用于贴壁细胞）

(1) 细胞准备：检测前一天进行细胞铺板，确保检测时细胞汇合度达到 50-70%。

(2) 药物刺激：去除细胞培养液，根据实验需要加入适当浓度的药物，于 37℃ 细胞培养箱内避光孵育，诱导刺激时间根据药物特性以及细胞类型来决定。

阳性对照（可选）：按照 1:1000 用完全培养液稀释活性氧阳性对照试剂 (Rosup, 50 mg/mL)，使其终浓度为 50μg/mL。加入到细胞中，于 37℃ 细胞培养箱内避光孵育 0.5 - 4 h 以提高活性氧水平。

(3) 探针准备：按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA，使其终浓度为 10μM。

(4) 探针装载：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 6 孔板每孔 ≥ 1 mL，96 孔板每孔 ≥ 100μL。37℃ 细胞培养箱内孵育 20 - 30 min。

(5) 细胞清洗：用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。

2. 收集细胞后装载探针（适用于贴壁细胞和悬浮细胞）

(1) 细胞准备：按照常规方法培养细胞，清洗并收集足量细胞。

(2) 药物刺激：将收集的细胞重新悬浮于稀释好的药物中，于 37℃ 细胞培养箱内避光孵育，诱导刺激时间根据药物特性以及细胞类型来决定。

阳性对照（可选）：按照 1:1000 用完全培养液稀释活性氧阳性对照试剂 (Rosup, 50 mg/mL)，使其终浓度为 50μg/mL。加入到细胞中，于 37℃ 细胞培养箱内避光孵育 0.5 - 4 h 以提高活性氧水平。

(3) 探针准备：按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA，使其终浓度为 10μM。



(4) 探针装载: 去除细胞培养液, 离心收集细胞。加入适当体积稀释好的 DCFH-DA。使其细胞密度为 $1.0 \times 10^6 - 2.0 \times 10^7/\text{mL}$ 。
37°C 细胞培养箱内孵育 20 min。每隔 3-5 min 颠倒混匀使探针和细胞充分接触。

(5) 细胞清洗: 用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次, 以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。

检测

1. **原位装载:** 直接用激光共聚焦显微镜观察, 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。

2. **收集细胞后装载探针:** 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。

注: 设置激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm 检测荧光强度。也可用 FITC 的参数设置检测。

说明:

(1) 仅在阳性对照孔中加入 Rosup 作为阳性对照, 其余孔无需加 Rosup。

(2) 不同类型细胞阳性对照刺激细胞孵育时间存在差异, 如 HeLa 细胞需 0.5-1 h, MRC5 人胚胎成纤维细胞需要 1.5 h, 可根据细胞类型调整孵育时间。

(3) 通常活性氧阳性对照在刺激细胞 20-30 min 后可以显著提高活性氧水平。如果在刺激后 30 min 内未明显观察到活性氧的升高, 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, 则适当降低活性氧阳性对照的浓度。

(4) 如果没有刺激的阴性对照细胞荧光也比较强, 可按照 1:2000-1:5000 的比例稀释 DCFH-DA, 使装载探针时 DCFH-DA 的浓度为 2-5 μM。探针装载的时间也可以根据情况在 15-60 min 内进行调整。