

活性氧检测试剂盒 (Reactive Oxygen Species Assay Kit) C1300

描述: 活性氧包括超氧自由基($O_2\cdot^-$)、过氧化氢(H_2O_2)、羟基自由基($\cdot OH$)、过氧亚硝基($ONOO^-$)、一氧化氮($\cdot NO$)等, 它们参与了细胞增殖生长、发育分化、衰老和凋亡等许多生理和病理过程。试剂盒采用 DCFH-DA (2,7-dichlorofluorescein diacetate) 探针方法, 是迄今最常用、最灵敏的细胞内活性氧检测探针。DCFH-DA 没有荧光, 进入细胞后可以被酯酶水解为不能透过细胞膜的 DCFH (dichlorofluorescein), 当活性氧存在时, DCFH 被氧化为强绿色荧光物质 DCF(dichlorofluorescein), 荧光在激发波长 502 nm, 发射波长 530 nm 附近有最大波峰, 荧光水平与细胞内活性氧水平成正比。本试剂盒提供的活性氧检测系统本底水平低, 灵敏度高, 重复性好, 操作简便。

适用范围: 贴壁细胞、悬浮细胞、新鲜动物组织

工作波长: 最佳激发波长 500 (500 ± 15 nm), 最佳发射波长 525 (530 ± 20 nm)。也可按照 FITC 荧光检测条件检测。

组成: (1) 0.1 ml, 10 mM DCFH-DA, $-20^\circ C$ 避光保存 一年有效

(2) 1 ml 活性氧供体, $-20^\circ C$ 避光保存 一年有效

所需设备: 流式细胞仪、荧光酶标仪、激光共聚焦显微镜、荧光分光光度计等

操作步骤:

一、细胞样本:

1. 收集细胞, 进行活性氧测定

1.1 细胞收集: **悬浮细胞:** 2000rpm, 离心 5min, 收集沉淀, 用 0.01M PBS 或无血清培养液洗涤 2 次, 1000rpm, 离心 5min, 弃上清, 取细胞沉淀; **贴壁细胞:** 吸去培养液, 用 0.01M PBS 或无血清培养液反复吹打, 使细胞层全部进入 PBS 或培养液中, 收集细胞悬液, 用 0.01M PBS 或无血清培养液洗涤 2 次, 1000rpm, 离心 5min, 弃上清, 取细胞沉淀;

1.2 加入 DCFH-DA 探针, 同时设置阴性对照、阳性对照管

样本管: 用稀释好的 DCFH-DA 荧光探针重悬细胞沉淀, 一般情况下, 细胞密度要求 1×10^6 - 2×10^7 /ml, 推荐探针初始工作浓度为 10 μM (DCFH-DA 工作浓度可在 100 nM~20 μM 范围内, 这需进行预实验确定最适浓度)。

阴性对照: 不加探针, 只加入 PBS 或培养基的细胞。

阳性对照: 已加入 DCFH-DA 荧光探针, 并加入活性氧供体的细胞悬液, 推荐试剂工作浓度 20-100 μM 。

1.3 $37^\circ C$ 孵育细胞 30 分钟~几个小时。通常情况下, 30-60 分钟即可。注意: 孵育时间长短与细胞类型、刺激条件、DCFH-DA 浓度等有关。可以每隔 5min 颠倒混匀一下, 使探针与样本充分接触。

1.4 1000g, 离心 5min, 去上清收集细胞沉淀, 用 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 重悬细胞。

1.5 进行荧光检测, 以荧光度数值表示结果。

2. 不收集细胞, 直接将探针加入培养基测定

2.1 加入 DCFH-DA 探针，同时设置阴性对照、阳性对照管

样本管：去除细胞培养基上清，加入用无血清培养液稀释好的 DCFH-DA 探针（推荐探针终浓度为 10 μ M），加入探针的体积以能盖住细胞为宜，通常 6 孔板单孔不少于 1ml。

阴性对照：不加探针，只加入培养基的细胞。

阳性对照：已加入 DCFH-DA 荧光探针，并加入活性氧供体的细胞，推荐试剂工作浓度 20-100 μ M。

2.2 37 $^{\circ}$ C 孵育细胞 30 分钟~几个小时。通常情况下，30-60 分钟即可。注意：孵育时间长短与细胞类型、刺激条件、DCFH-DA 浓度等有关。可以每隔 5min 颠倒混匀一下，使探针与样本充分接触。

2.3 弃去上层培养液，用无血清培养液或 0.01M PBS 反复吹打，使细胞层全部进入 PBS 或培养液中。

2.4 收集细胞悬液，用 0.01M PBS 或无血清培养液洗涤 2 次，去除未进入细胞内的探针，1000rpm，离心 5min，弃上清，收集细胞沉淀，用 PBS 缓冲液洗涤 2 次，重悬细胞。

2.5 进行荧光检测，以荧光度数值表示结果。

二、动物组织样本

1.1 细胞悬液制备：可采用单细胞悬液制备仪或传统的组织处理方法如：酶解法、研磨法等制备单细胞悬液；

1.2 加入 DCFH-DA 探针，同时设置阴性对照、阳性对照管

样本管：用稀释好的 DCFH-DA 荧光探针重悬细胞沉淀，一般情况下，细胞密度要求 1×10^6 - 2×10^7 /ml，推荐探针初始工作浓度为 10 μ M（DCFH-DA 工作浓度可在 100 nM~20 μ M 范围内，这需进行预实验确定最适浓度）。

阴性对照：不加探针，只用 0.01M PBS 重悬的细胞。

阳性对照：已加入 DCFH-DA 荧光探针，并加入活性氧供体的细胞悬液，推荐试剂工作浓度 20-100 μ M。

1.3 37 $^{\circ}$ C 孵育细胞 30 分钟~几个小时。通常情况下，30-60 分钟即可。注意：孵育时间长短与细胞类型、刺激条件、DCFH-DA 浓度等有关。可以每隔 5min 颠倒混匀一下，使探针与样本充分接触。

1.4 1000g，离心 5min，去上清收集细胞沉淀，用 PBS 缓冲液洗涤 2 次，重悬细胞

1.5 进行荧光检测，以荧光度数值表示结果。

注意事项：

1. 本试剂盒特别适用于贴壁细胞和悬浮细胞活性氧的检测。对于动物组织样本而言，应尽量选择新鲜组织，匀浆操作应尽量快速，以减少实验误差，如果样本已经冻存，则无法保证检测结果的可靠性。

2. DCFH-DA 可稀释于培养基或缓冲液中。血清或培养基的颜色并不会影响 DCFH-DA 及细胞内荧光的产生，但可能会影响荧光显微镜观察，干扰荧光分光光度计、荧光酶标仪或流式细胞仪的荧光测定。如果用上述仪器进行测定时，可将 DCFH-DA 稀释于无酚红培养基或适宜的缓冲液如 PBS 中。

3. 加入 DCFH-DA 的时机和孵育时间, 以最终能顺利检测细胞内活性氧为目的。当细胞药物处理时间较短(如<2 小时)或预计 ROS 效应较弱时, 可将 DCFH-DA 在药物处理之前或者与药物同时加入到细胞培养基中; 反之, 当药物处理时间较长(如>6 小时)或预计产生 ROS 效应较强时, 可将 DCFH-DA 在药物处理之后再加入。

4. 活性氧供体内含高纯度 12 mM 的 H₂O₂。加入细胞后可使 DCFH-DA 氧化为 DCF 呈现强绿色荧光。推荐该试剂的细胞工作浓度为 20-100 μM 或更低浓度, 当其浓度超过 200μM 时, 将产生细胞毒性。如果用户熟悉 ROS 荧光或实验没有必要采用阳性对照, 可以不加该试剂。一般情况下, 活性氧供体加入到细胞 30min 左右即可产生明显的绿色荧光。

以下仅仅列举部分使用北京普利莱基因技术公司活性氧检测试剂盒发表的 SCI 研究论文:

1. Liu Xin, Sun Jiao, 2010. Endothelial cells dysfunction induced by silica nanoparticles through oxidative stress via JNK/P53 and NF-κB pathways. *Biomaterials*, 31(32): 8198-8209.
2. Yuan Shaopeng, Fu Yan, Wang Xiaofeng, Shi Hubing, Huang Yujie, Song Xiaomin, Li Ling, Song Nan, Luo Yongzhang, 2008. Voltage-dependent anion channel 1 is involved in endostatin-induced endothelial cell apoptosis. *The FASEB Journal*, 22: 2809-2820.
3. Deng Sanming, Yang Ye, Han Yong, Li Xiaofei, Wang Xiaoping, Li Xueyong, Zhang Zhipei, Wang Yunjie, 2012. UCP2 Inhibits ROS-Mediated Apoptosis in A549 under Hypoxic Conditions. *PLoS ONE*, 7(1): e30714. doi:10.1371/journal.pone.0030714.
4. Zhuo Wei, Song Xiaomin, Zhou Hao, Luo Yongzhang, 2011. Arginine deiminase modulates endothelial tip cells via excessive synthesis of reactive oxygen species. *Biochemical Society Transactions*, 39: 1376-1381.
5. Yue Yang, Zhou Huafeng, Liu Guanlan, Li Yan, Yan Zemin, Duan Mingxing, 2010. The advantages of a novel CoQ10 delivery system in skin photo-protection. *International Journal of Pharmaceutics*, 392(1-2): 57-63.
6. Zhong Z-M, Bai L, Chen J-T, 2009. Advanced Oxidation Protein Products Inhibit Proliferation and Differentiation of Rat Osteoblast-like Cells via NF-κB Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 24(1-2): 105-114.
7. Chen Guozhu, Zhang Xuhui, Zhao Ming, Wang Yan, Cheng Xiang, Wang Di, Xu Yuanji, Du Zhiyan, Yu Xiaodan, 2011. Celastrol targets mitochondrial respiratory chain complex I to induce reactive oxygen species-dependent cytotoxicity in tumor cells. *BMC Cancer*, 11:170. doi:10.1186/1471-2407-11-170.
8. Zhao Hong, Liu GuoLiang, Wang QiuYue, Ding LiYing, Cai Hui, Jiang HaiHong, Xin ZhongQiu, 2007. Effect of ghrelin on human endothelial cells apoptosis induced by high glucose. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362(3): 677-681.