

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

**描述:** 本试剂盒利用荧光探针 DHE 进行活性氧检测。DHE 可自由透过活细胞膜进入细胞内, 在细胞质中呈蓝色荧光, 被细胞内的 ROS 氧化后形成氧化乙啶掺入染色体 DNA 中, 使细胞核呈现明亮的红色荧光。在激发波长 535nm, 发射波长 610nm 附近, 使用荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、荧光分光光度计、荧光酶标仪、流式细胞仪等检测荧光强度, 测定细胞内活性氧水平。具有背景低、灵敏度高、线性范围宽、使用方便等优点, 是一种快速简便的组织或培养活细胞中 ROS 经典检测方法。

**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 480-535nm, 最佳发射波长 590-610nm

**组成:** 0.2 ml, 5 mM DHE, -20 °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 DHE 探针: 用稀释好的 DHE 荧光探针重悬细胞沉淀, 一般情况下, 细胞密度要求  $1 \times 10^6$ - $2 \times 10^7$ /ml, 推荐探针初始工作浓度为 10  $\mu$ M (DHE 工作浓度可在 1 $\mu$ M~100  $\mu$ M 范围内, 需进行预实验确定最适浓度)。

1.3 37 °C 孵育细胞 10 分钟~90 分钟。通常情况下, 10-30 分钟即可。注意: 孵育时间长短与细胞类型、刺激条件、DHE 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 DHE 探针: 去除细胞培养基上清, 加入用无血清培养液稀释好的 DHE 探针 (推荐探针终浓度为 10  $\mu$ 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 500  $\mu$ l。

2.2 37 °C 孵育细胞 10 分钟~90 分钟。通常情况下, 10-30 分钟即可。注意: 孵育时间长短与细胞类型、刺激条件、DHE 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 DHE 探针，加入 DHE 探针：去除细胞培养基上清，加入用无血清培养液稀释好的 DHE 探针（推荐探针终浓度为 10  $\mu$ M）。

1.3 37  $^{\circ}$ C 孵育细胞 10 分钟~90 分钟。通常情况下，10-30 分钟即可。注意：孵育时间长短与细胞类型、刺激条件、DHE 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) 开盖前请短暂离心，将盖内壁上的液体收集于管底，避免开盖时染液损失。
- (2) 要设有无 DHE 孵育的对照，即不加探针，只用 0.01M PBS 重悬的细胞。
- (3) 荧光探针标记后，一定要洗净残余的未进入细胞内的探针，以避免背景升高。多次清洗时注意操作规范，避免将细胞洗掉。
- (4) 对于药物处理（孵育）时间较短的细胞（2 小时以内、也有建议 4 小时以内），可以先用荧光染料进行标记，后用药物刺激细胞后。对于药物处理时间较长的细胞（超过 4 小时或 6 小时以上），建议先用药物处理（刺激）细胞，后用探针标记。
- (5) DHE 在光照和空气中易被氧化，保存和操作中应注意避光。
- (6) 对不同的细胞和组织，应选择合适的孵育时间和浓度，以观察 ROS 的变化。
- (7) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。