

活性氧 (ROS) 检测试剂盒

产品组成:

产品名称	包装	保存
H2DCFH-DA (10mM)	0.1mL	-20°C避光保存, 有效期一年
活性氧阳性对照 (Rosup, 50mg/mL)	1mL	

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 H2DCFH-DA 进行活性氧检测的试剂盒。H2DCFH-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。根据活细胞中荧光的产生, 可以判断细胞活性氧的含量和变化。用流式细胞仪或荧光显微镜可直接观察, 是一种经典的组织或活细胞中活性氧检测方法。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 50mg/mL。Rosup 为活性氧阳性诱导药物, 根据其荧光信号强度, 可分析活性氧的真正水平。

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 1000 个样品 1000T(96 孔板)。

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. 阳性对照 Rosup 一般使用浓度为 100 μM (推荐浓度 100-400 μM , 具体依细胞类型而定)。通常刺激后 0.5-4h 可观察到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 30min 内观察不到活性氧的升高, 可延长诱导时间或适当提高活性氧阳性对照的浓度。如果活性氧升高得过快, 可缩短诱导时间或适当降低活性氧阳性对照的浓度。
3. 对于某些特别的细胞, 实验过程中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 DCFH-DA 的终浓度为 2-5 μM 。探针装载的时间也可以根据情况在 15-60 min 内适当进行调整。
4. 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。
5. 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。
6. 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。
7. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
8. 定量的话要作标准曲线吧。先做一个不同浓度 H_2O_2 氧化 DCFA 荧光值, 做一条标准曲线, X 轴为 H_2O_2 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。
9. 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 H2DCFDA 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, 最好工作液现用现配。

使用说明:

1. 装载 ROS 探针

1.1 原位装载探针(仅适用于贴壁细胞)

- 细胞准备：检测前一天进行细胞铺板，确保检测时细胞数量小于 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 。
- 药物诱导：去除细胞培养液，加入无血清培养基稀释的药物处理，于 37°C 细胞培养箱内避光孵育，实际诱导时间由药物特性和细胞类型决定。
- (可选) 阳性对照：先用无血清培养基等稀释阳性对照 (Rosup, 100 mM) 到常用工作浓度 $100 \mu\text{M}$ ，加入细胞， 37°C 避光孵育 $0.5 \sim 4 \text{ h}$ ，以提高活性氧水平，不同细胞类型存在差异。例如：HeLa 细胞需孵育 30-60 min，MRC5 人胚胎成纤维细胞则需孵育 90 min。
- ROS 探针准备：探针装载前按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA，使其终浓度为 $10 \mu\text{M}$ 。
- ROS 探针装载：吸除处理药物，加入适当体积稀释好的 DCFH-DA 工作液。加入的体积需充分盖住细胞。例如：6 孔板通常不少于 $1000 \mu\text{L}$ ，对于 96 孔板通常不少于 $100 \mu\text{L}$ 。 37°C 细胞培养箱内避光孵育 30 min。
- 细胞清洗：用无血清培养液洗涤细胞 1~2 次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。

1.2 收集细胞后装载探针(适用于贴壁细胞和悬浮细胞)

- 细胞准备：按照标准方法培养细胞，必须保证检测用细胞状态。按照适当方法，清洗并收集足量的细胞。
- 药物诱导：将收集好的细胞悬浮于适量稀释好的药物，于 37°C 细胞培养箱内避光孵育，实际诱导时间由药物特性和细胞类型决定。
- (可选) 阳性对照：先用无血清培养基稀释阳性对照 (Rosup, 100 mM) 到常用工作浓度 $100 \mu\text{M}$ ，加入细胞， 37°C 避光孵育 $0.5 \sim 4 \text{ h}$ 以提高活性氧水平，不同细胞类型存在差异。例如：HeLa 细胞需孵育 30-60 min，MRC5 人胚胎成纤维细胞则需孵育 90min。
- ROS 探针准备：探针装载前，按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA，使其终浓度为 $10 \mu\text{M}$ 。
- 探针装载：除去细胞内药物，离心收集细胞，加入稀释好的探针，使其细胞密度为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 。
注意：细胞密度需根据后续的检测体系、检测方法，以及检测总量来调整。例如：对于流式分析，单管检测内细胞数目不少于 10^4 ，也不可多于 10^6 。
- 细胞清洗：用无血清细胞培养液洗涤细胞 1-2 次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。

2. 荧光显微照相操作方法

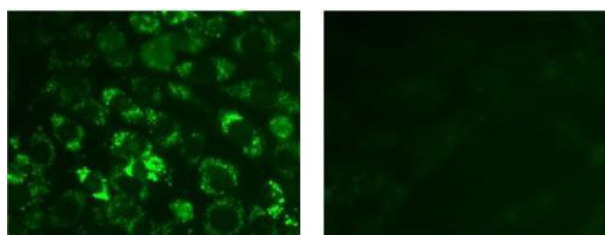
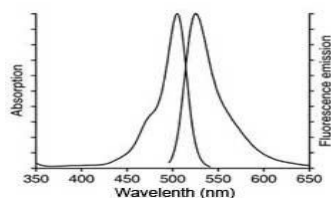
- 对贴壁生长细胞或活组织，可直接在荧光显微镜下观察；对悬浮生长细胞，取 $25\text{-}50 \mu\text{L}$ 细胞悬液滴到一张显微载玻片上，再盖上一张盖玻片。
- 荧光显微镜下，选用 FITC 滤光片观察荧光，去除背景观察荧光的变化。

3. 流式细胞分析操作方法

- 对贴壁生长细胞，用胰酶消化制备成单细胞悬液；对悬浮生长细胞，直接收集细胞。用 $0.5\text{-}1 \text{ mL}$ PBS 重悬细胞 ($0.5 \sim 1 \times 10^5/\text{ml}$)。
- 选择流式细胞仪 FL1 或 BL1 通道， 488nm 激发，测定 530nm 的发射，细胞应可分成两个亚群：ROS 阴性细胞仅有很低的荧光强度，ROS 阳性细胞有较强的绿色荧光。

4. 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，并能显示其定位。

Reactive Oxygen Species Detection Kit

Kit Contents :

	Name	Package
JX013-1	H2DCFDA (10mM) in DMSO	0.1mL
JX013-2	Reactive oxygen control (Rosup, 50mg/mL)	1mL

Introduction :

The Reactive Oxygen Species (ROS) Detection Kit provides the key reagents necessary for the detection of ROS in live cells. The assay is based on H2DCFDA, a reliable fluorogenic marker for ROS in live cells. We also provide the common inducer of ROS production Reactive oxygen control (Component B, Rosup), as a positive control. Using this combination of dyes according to the optimized protocol provided here, oxidatively stressed and nonstressed cells are reliably distinguished by fluorescence microscopy. Generation of ROS is inevitable for aerobic organisms, and, in healthy cells, occurs at a controlled rate. Under conditions of oxidative stress, ROS production is dramatically increased, resulting in subsequent alteration of membrane lipids, proteins, and nucleic acids. Oxidative damage of these biomolecules is associated with a variety of pathological events including atherosclerosis, carcinogenesis, ischemic reperfusion injury, neurodegenerative disorders and with aging.

We utilize H2DCFDA, a unique cell-permeable fluorogenic probe, compatible with phenol red, FBS and BSA to detect reactive oxygen species in live cells. Upon the cell entry, H2DCFDA is modified by cellular esterases to form a non-fluorescent H2DCF. Oxidation of H2DCF by intracellular ROS yields highly a fluorescent product that can be detected by FACS, microplate reader, or fluorescence microscope (Ex/Em 495/529 nm). The fluorescence intensity is proportional to the ROS levels. Our kit provides a simple and specific assay for the real-time measurement of global levels of ROS in living cells. We include sufficient reagents to perform 100 assays and a common ROS inducer as a control for measurement of ROS levels or antioxidant activity with high sensitivity, specificity and accuracy.

Materials Recommended but Not Provided :

Fluorescence microscope, Flow cytometer (FL-1 channel) and Microplate reader capable of measuring Ex/Em 495/529 nm spectra. Most live-cell buffering systems are suitable for the kit, the Hank's balanced salt solution (HBSS/Ca/Mg) is recommended.

Storage:

Component A: Store at -20°C protected from light, avoid multiple freeze/thaw cycles. Stable for 12 months after received.
Component B: Store at -20°C protected from light. Warm to room temperature before use.

ROS Detection Assay Protocol:

The protocol was developed using live bovine pulmonary artery endothelial cells (BPAEC) and MRC5 human lung fibroblasts adhering to coverslips, but is amenable for use with other cell types. An additional protocol is provided for the use of (Component B, Rosup) as a positive control for the induction of ROS, which, if desired, must be performed before labeling with H2DCFDA.

1. Labeling with H₂DCFDA

- 1.1 The Component A (H2DCFDA (10mM) in DMSO) is thoroughly thawed at room temperature (about 25°C)
- 1.2 Prepare 25 μM carboxy-H2DCFDA working solution. Add 5.0 μL of the 10 mM H2DCFDA stock solution (prepared in step 1.1) to 2.0 mL of warm HBSS/Ca/Mg or other suitable buffer.
- 1.3 Wash cells. Gently wash cells once with warm HBSS/Ca/Mg or other suitable buffer.
- 1.4 Label cells. Apply a sufficient amount of the 25 μM H2DCFDA working solution (prepared in step 1.2) to cover the cells adhering to the coverslip(s). Incubate for 30 minutes at 37°C, protected from light.
- 1.5 Wash cells. Gently wash the coverslips three times in warm HBSS/Ca/Mg or other suitable buffer.
- 1.6 Mount in warm buffer and image immediately. Best results are obtained when imaging takes place immediately after washing and mounting the sample.

2. Induction of Cellular ROS Production with Component B(Rosup):

- 2.1 Make 100 μM working solution of Rosup.
Dilute the Component B 1:5000 in appropriate complete growth media to produce a 100 μM working solution. For example, add 1 μL Component B to 5 mL of complete media. to make 5.0 mL of 100 μM Rosup working solution,
- 2.2 Induce ROS production in cells. Apply a sufficient amount of the 100 μM Rosup working solution (prepared in step 2.1) to the cells adhering to the coverslip(s). Incubate the coverslip(s) at 37°C and 5% CO₂. During development of the product using BPAEC and MRC5 cells, a 60–90 minute incubation period was required. Appropriate incubation periods for ROS production in other cell lines should be determined empirically. After induction, label the cells with H2DCFDA starting with step 1.1, above
- 2.3 Wash cells. Gently wash the coverslips twice in warm HBSS/ Ca/Mg or other suitable buffer. After washing, label the cells with H2DCFDA starting with step 1.1, above.

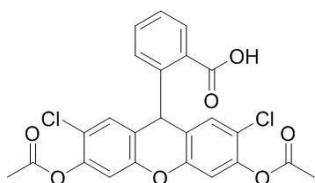
H2DCFDA 活性氧(ROS)探针

H2DCFDA 是可渗透细胞，用于检测细胞内活性氧 (ROS) 的探针。

别名：H2DCFH-DA; 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate；

分子量 $C_{24}H_{16}Cl_2O_7=487.29$ ；CAS#4091-99-0；HPLC purity>99% UltraPure 超纯级

保存运输: Store at -20°C protected from light. Product is shipped at ambient temperature.



生物活性: H2DCFDA 是可渗透细胞，用于检测细胞内活性氧 (ROS) 的探针。

ROS 测量

将 1 mg H2DCFDA 溶解在 0.2 mL DMSO 中以获得 10mM 储备溶液，并在使用前进一步稀释。为了检测细胞内 ROS 水平，使用 ROS 敏感性探针 H2DCFDA。将贴壁细胞 (ESC · difESC · eMSC · HeLa · U118) 与 PBS 中的 5 μ M 染色溶液在 37°C 下在黑暗中孵育 30 分钟，然后用 0.05% 胰蛋白酶-EDTA 溶液收获，悬浮在新鲜培养基中，并且用流式细胞仪立即分析。将对照和 PHA 活化的淋巴细胞重悬浮于 PBS 中，与 5 μ M H2DCFDA 在黑暗中于 37°C 温育 30 分钟，并立即分析。

不同实验动物依据体表面积等效剂量转换表 (数据来源于 FDA 指南)

	小鼠	大鼠	兔	豚鼠	仓鼠	狗
重量 (kg)	0.02	0.15	1.8	0.4	0.08	10
体表面积 (m ²)	0.007	0.025	0.15	0.05	0.02	0.5
Km 系数	3	6	12	8	5	20

$$\text{动物 A (mg/kg)} = \text{动物 B} \times \frac{\text{动物 B 的 Km 系数}}{\text{动物 A 的 Km 系数}}$$

例如，依据体表面积折算法，将白藜芦醇用于小鼠的剂量 22.4 mg/kg 换算成大鼠的剂量，需要将 22.4 mg/kg 乘以小鼠的 Km 系数 (3)，再除以大鼠的 Km 系数 (6)，得到白藜芦醇用于大鼠的等效剂量为 11.2 mg/kg。



广州晶欣生物科技有限公司
Guangzhou Genxion Biotechnology Co., Ltd