

## 活性氧（ROS）测定试剂盒说明书（简化版）

化学荧光法 100T-500T

### 一、测定原理：

本试剂盒采用的 DCFH-DA(2, 7-Dichlorofluorescein Diacetate)探针，是迄今最常用、最灵敏的细胞内活性氧检测探针。DCFH-DA 本身没有荧光，可以自由穿过细胞膜，当其进入细胞内后，会被细胞内的相关酯酶水解为 DCFH (Dichlorofluorescein)。而 DCFH 不能通透细胞膜，从而使探针很容易被标记到细胞内。当细胞内有活性氧存在时，DCFH 被氧化为强绿色荧光物质 DCF (Dichlorofluorescein)，其荧光在激发波长 502nm，发射波长 530nm 附近有最大波峰，其荧光强度与细胞内活性氧水平成正比。

### 二、试剂组成及保存：

- 1、0.1ml 10mM DCFH-DA in DMSO，20℃保存。
- 2、1ml 活性氧供氢体，4-8℃保存。

三、组织样本操作步骤：（可用激光共聚焦显微镜观察，也可用于流式细胞仪、荧光酶标仪、荧光分光光度计测定）

#### 1、单细胞悬液制备：

方法 1、采用单细胞悬液制备仪制备单细胞悬液。

方法 2、酶消化法：

方法 3、机械法（网搓法）：

#### 2、加入荧光探针：

- ①、取不进行任何处理的细胞用 0.01M PBS 重悬，设为阴性对照管。阳性对照管：用稀释好的 DCFH-DA 重悬细胞沉淀，同时加入活性氧供氢体诱导细胞，推荐该试剂的工作浓度为 20~100 $\mu$ M。
- ②、样本管：用稀释好的 DCFH-DA 重悬细胞沉淀，细胞密度一般要求  $1 \times 10^6$ - $2 \times 10^7$ /ml。
- ③、37℃ 孵育细胞 30min~几小时。通常为 30~60min 即可。
- ④、收集孵育（探针标记）后的单细胞悬液，1000g，离心 5~10 分钟，去上清收集细胞沉淀，用 PBS 洗涤 1~2 次。离心收集细胞沉淀用于荧光检测；

#### 3、荧光检测：

- ①、将上述收集好的细胞沉淀用 PBS 重悬，并用于检测；
- ②、波长设置：最佳激发波长 500(500 $\pm$ 15nm)，最佳发射波长 525 (530 $\pm$ 20 nm)。也可按照 FITC 荧光检测条件检测。
- ③、结果以荧光度值表示。

四、细胞样本操作步骤：（可用激光共聚焦显微镜观察，也可用于流式细胞仪、荧光酶标仪、荧光分光光度计测定）

### 1、直接将探针加入培养液中：

- ①、直接将 DCFH-DA 探针加入无血清培养基中：一般按照 1 : 1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA(终浓度为 10 $\mu$ M)。去除培养液后，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，通常对于 6 孔板的一个孔加入稀释好的 DCFH-DA 不少于 1ml。
- ②、取一份不加探针，只加入培养基的细胞设为阴性对照管。阳性对照管：取一份已加入探针的细胞，同时加入活性氧供氢体诱导细胞，推荐该试剂的工作浓度为 20~100 $\mu$ M。
- ③、37 $^{\circ}$ C 孵育细胞 30min~几小时，通常为 30~60min 即可，孵育时间长短与细胞类型、刺激条件、DCFH-DA 浓度有关。一般阳性对照在刺激细胞 30 分钟左右，即可观察到明显的绿色荧光。
- ④、吸去培养液，利用无血清培养液或者 0.01MPBS 反复吹打，肉眼观察瓶底由半透明(细胞单层连接成片)转为透明，细胞层几乎全部吹打到 PBS 中。
- ⑤、将细胞悬液全部收集到 1.5ml 离心管中。用无血清培养液或者 PBS 洗涤 2 次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。1000rpm/min，5min，吸净上清后加入 PBS 重新悬浮细胞进行测定。
- ⑥、波长设置：最佳激发波长 500(500 $\pm$ 15nm)，最佳发射波长 525 (530 $\pm$ 20 nm)。也可按照 FITC 荧光检测条件检测。
- ⑦、结果以荧光度值表示。

### 2、先收集细胞，制备成细胞悬液后测定

#### ①、细胞收集：

- a、贴壁细胞，吸去培养液，利用无血清培养液或者 0.01MPBS 反复吹打，肉眼观察孔板底部(瓶底)由半透明(细胞单层连接成片)转为透明，细胞层几乎全部吹打到 PBS 中。
- b、将细胞悬液全部收集到 1.5ml 离心管中。用无血清培养液或者 0.01MPBS 洗涤 2 次，1000rpm/min，离心 5min，吸净上清，留细胞沉淀用于测定。
- c、悬浮细胞按照常规方法离心(2000rpm/min，离心 5min)，收集细胞沉淀，用无血清培养液或者 0.01MPBS 洗涤 2 次，1000rpm/min，离心 5min，吸净上清，留细胞沉淀用于测定。

#### ②、细胞重悬：细胞密度一般要求 1 $\times$ 10<sup>6</sup>-2 $\times$ 10<sup>7</sup>/ml，一般有两种方法：

- a、先加入无血清培养液或者 PBS 重悬细胞，然后根据加入培养液或者 PBS 的体积，按照 10 $\mu$ M 的初始浓度(最好做预实验确定自身样本适合浓度)加入探针，
- b、先按照 10 $\mu$ M 的浓度将探针用无血清培养液或者 PBS 先稀释好，然后用稀释好的探针重悬上述细胞沉淀，制备成细胞悬液，

- ③、取一份不加探针，只加入培养基或 PBS 的细胞设为阴性对照管。阳性对照管：取一份已加入探针的细胞悬液，同时加入活性氧供氢体诱导细胞，推荐该试剂的工作浓度为 20~100 $\mu$ M。
- ④、37 $^{\circ}$ C 孵育细胞 30min~几小时，通常为 30~60min 即可，孵育时间长短与细胞类型、刺激条件、DCFH-DA 浓度有关；每隔 3-5 分钟颠倒混匀一下，使探针与细胞充分接触。
- ⑤、收集孵育（探针标记）后的单细胞悬液，1000rpm/min，离心 5min，吸净上清，用 PBS 洗涤 1~2 次，离心收集细胞沉淀物用于荧光检测。
- ⑥、将上述收集好的细胞沉淀用 PBS 重悬，并用于检测。
- ⑦、波长设置：最佳激发波长 500(500 $\pm$ 15nm)，最佳发射波长 525 (530 $\pm$ 20 nm)。也可按照 FITC 荧光检测条件检测。
- ⑧、结果以荧光度值表示。