Reactive Oxygen Species Detection Kit {活性氧检测试剂盒}

货号：BRK0045

规格：100 T

◆ 产品描述

本产品是一种利用荧光探针 DCFH-DA 进行活性氧检测的试剂盒。DCFH-DA 本身没有荧光，可以自由穿过细胞膜，进入细胞内后，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。同时，细胞内的活性氧可以氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF。通过检测 DCF 的荧光信号便可间接反应细胞内活性氧的水平，利用合适的激发光源可以在各种检测平台上观察测量，如流式细胞仪、荧光显微镜等。由于染料很容易受到光氧化，因此，在进行实验时必须全程注意避光。

本试剂盒提供活性氧阳性对照品，用于阳性对照组的刺激诱导。产品具有灵敏度高、线性范围宽、使用便捷等特点。在选择流式细胞仪或荧光显微镜进行荧光信号的检测时，可采用 FITC 的通道参数设置。

◆ 产品组分

产品编号	产品名称	组分体积	保存条件
BRK0045-1	DCFH-DA（10 mM）	100 μL	-25 ~ -15℃，Protect from Light
BRK0045-2	活性氧阳性对照品	1 mL	

◆ 保质期

冰袋运输。-25 ~ -15℃避光保存，有效期 12 个月。

◆ 产品应用

细胞活性氧检测

◆ 注意事项

1. 本产品仅限科研使用，不用于临床诊断。
2. 本产品初次使用时可进行分装保存，尽量避免反复冻融，以保证产品的检测效果。
3. 探针装载完成后，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。
4. 尽量缩短探针装载后到测定所用的时间（刺激诱导时间除外），以减少各种可能的实验误差。
5. 由于染料很容易受到光氧化，因此，在进行实验时必须全程注意避光。
6. 仅需在阳性对照孔中加入活性氧阳性对照品进行刺激诱导，其余孔不必加入活性氧阳性对照品。
7. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

◆ 实验流程

1. 装载探针

对于药物刺激诱导处理时间较短（通常为 2 h 以内）的细胞样本，先装载探针，后用活性氧阳性对照品或自己感兴趣的药物刺激诱导细胞。对于细胞刺激诱导时间较长（通常为 6 h 以上）的细胞样本，先用活性氧阳性对照品或自己感兴趣的药物刺激诱导细胞，后装载探针。

注：活性氧阳性对照品可以按 1:1000 比例稀释使用。例如装载好探针的细胞共 1 mL，可以加入 1 μL 的活性氧阳性对照品。通常刺激诱导后 20-30 min 内可以观察到非常显著的活性氧水平升高。对于不同的细胞，活性氧阳性对照品的效果可能有较大的差别。如果在刺激后 30 min 内观察不到活性氧的升高，可以适当提高活性氧阳性对照品的工作浓度。如果活性氧升高得过快，可以适当降低活性氧阳性对照品的工作浓度。

1.1 **原位装载探针：**本方法仅适用于贴壁培养的细胞。用 PBS 或者 HBSS 稀释 DCFH-DA（10 mM）的探针母液，按照 1:1000 稀释比例配制成 DCFH-DA 装载工作液，使其终浓度为 10 μM。去除细胞培养基，使用 PBS 清洗 2 次。加入稀释好的 DCFH-DA 装载工作液，使加入的工作液体积以能充分盖住细胞为宜，通常对于六孔板的一个孔加入的 DCFH-DA 装载工作液不少于 1 mL。置于 37℃细胞培养箱内孵育 20 min，去除 DCFH-DA 装载工作液，使用不含血清的基础培养基洗涤细胞 3 次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA，即可立即消化收集细胞流式上机检测或原位荧光显微镜观察拍照。

1.2 **收集细胞后装载探针：**本方法适用于悬浮细胞及消化后收集的贴壁细胞样本。用 PBS 或者 HBSS 稀释 DCFH-DA（10 mM）的探针母液，按照 1:1000 稀释比例配制成 DCFH-DA 装载工作液，使其终浓度为 10 μM。细胞收集后重悬于稀释好的 DCFH-DA 装载工作液中，使细胞浓度在 1×10^6 个细胞/mL 左右。置于 37℃细胞培养箱内孵育 20 min，每隔 3-5 min 颠倒混匀一下或轻柔吹打混匀一下，使探针和细胞充分接触。200-300 g 离心 3 min 以去除 DCFH-DA 装载工作液，使用不含血清的基础培养基洗涤细胞 3 次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA，即可立即收集细胞样本流式上机检测。

注：①对于某些细胞类型，如果发现没有刺激的阴性对照组细胞荧光也比较强，可以按 1:2000-1:5000 的比例稀释 DCFH-DA 母液，使装载探针时 DCFH-DA 的终浓度为 2-5 μM。另外，探针装载的时间也可以根据实际具体情况在 15-60 min 内适当进行合理的调整。

②实验完成后，需要立即进行检测以获得准确的实验结果，不可中途停顿耽误检测时间。

③一般来说，只要能获得足够的荧光信号即可，尽量选择最小浓度的 DCFH-DA 装载工作液，尽量减少 DCFH-DA 的水解副产物（甲醛和乙酸）的富集。

④含有氨基酸或者含有伯、仲胺的缓冲液都是必须避免的。因为脂肪胺可以促成 DCFH-DA 的水解而阻止其加载到细胞内，并维持胞外的最低程度的 DCFH-DA 水解。另外，血清等可能含有内源性酯酶活性的物质也必须避免，直到细胞装载 DCFH-DA 完成。