

## 活性氧检测试剂盒

Cat #:GK3611

### 一、试剂盒组成、规格、储存:

成分	>100T	储存
DCFH-DA (10mM)	0.1ml	-20℃
活性氧阳性对照(2mM)	1ml	4℃

### 二、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 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,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。绿色荧光强度与细胞内活性氧水平成正比。在激发波长 502nm,发射波长 530nm 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 DCF 荧光,从而测定细胞内活性氧水平。

本试剂盒提供了活性氧阳性对照试剂,以便于活性氧检测。DCFH-DA 检测系统本底低,灵敏度高,线性范围宽,使用方便。

本试剂盒可以测定 100-500 个样品。

### 三、实验前试剂准备:

- 1、推荐 CDFH-DA 1:1000 稀释即初始工作浓度为 10  $\mu$  M。针对不同的细胞和刺激, CDFH-DA 有效工作浓度可在 100nM-20  $\mu$  M 宽范围内变动,因此需要进行预实验确定合适浓度。
- 2、CDFH-DA 可稀释于培养基或缓冲液中。但如果培养基颜色或血清干扰荧光测定,需将 CDFH-DA 稀释于无酚红无血清培养基或适宜的缓冲液如 PBS 中。
- 3、活性氧阳性对照的工作浓度约为 100  $\mu$  M,超过 200  $\mu$  M 将产生细胞毒性。

### 四、储存条件:

DCFH-DA (10mM), -20℃ 保存。活性氧阳性对照, 4℃ 保存。用前 1:1000-1:10000 倍稀释。一年有效。

### 五、使用方法(仅供参考):

#### 1、装载荧光探针:

**原位装载探针:** 本方法仅适用于贴壁培养细胞。按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA, 使终浓度为 10  $\mu$  M。去除细胞培养液, 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, 通常对于六孔板的一个孔加入稀释好的 DCFH-DA 不少于 1ml。37℃ 细胞培养箱内孵育 20min 至几个小时(根据不同细胞调整)。无血清细胞培养液洗涤细胞三次, 以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。

**收集细胞后装载探针:** 按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA, 使终浓度为 10  $\mu$  M。细胞收集后悬浮于稀释好的 DCFH-DA 中, 细胞浓度为二百万至二千万 /ml, 37℃ 细胞培养箱内孵育 20min 几个小时(根据不同细胞调整)。每隔 3-5min 颠倒混匀一下, 使探针和细胞充分接触。用无血清细胞培养液洗涤细胞三次, 以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。

如果检测药物处理对细胞内活性氧的影响, 药物刺激时间较短(2h 以内)或效应较弱的细胞, 可先加或同时加入 DCFH-DA, 后用活性氧阳性对照或目标药物刺激细胞。反之, 刺激时间较长(6h 以内)或效应较强的细胞, 应该后加 DCFH-DA。

#### 2、检测:

对于原位装载探针的样品可以用激光共聚焦显微镜直接观察, 或集细胞后用荧光分光光度计、荧光酶标仪或流式细胞仪检测。对于收集细胞后装载探针的样品可以用荧光分光光度计、荧光酶标仪或流式细胞仪检测, 用激光共聚焦显微镜直接观察也可以。

### 六、注意事项:

- 1、装载后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、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。
- 3、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。
- 4、使用前请低速离心。