

M5 HiPer Reactive Oxygen Species Assay Kit

活性氧检测试剂盒使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 活性氧检测试剂盒	50T	MF457-T
M5 活性氧检测试剂盒	100T	MF457-01

【储存条件】

-20℃保存

【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。检测 DCF 的荧光就可以知道细胞内活性氧的水平。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(compound mixture),浓度为 50mg/ml。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 100-500 个样品。

【产品组份】

	MF457-T	MF457-01
DCFH-DA (10mM)	50ul	100ul
活性氧阳性对照 (Rosup, 50mg/ml)	0.5ml	1ml

【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、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下页图谱。
- 3、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。
- 4、本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 5、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

【使用方法】

1. 装载探针

对于刺激时间较短(通常为 2 小时以内)的细胞，先装载探针，后用活性氧阳性对照或自己感兴趣的药物刺激细胞。对于细胞刺激时间较长(通常为 6 小时以上)的细胞，先用活性氧阳性对照或自己感兴趣的药物刺激细胞，后装载探针。

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 微摩尔/升。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 1 毫升。37℃细胞培养箱内孵育 20 分钟。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。通常活性氧阳性对照在刺激细胞 20-30 分钟后可以显著提高活性氧水平。

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 微摩尔/升。细胞收集后悬浮于稀释好的 DCFH-DA 中，细胞浓度为 10 万至 20 万/毫升，37℃ 细胞培养箱内孵育 20 分钟。每隔 3-5 分钟颠倒混匀一下，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。直接用活性氧阳性对照或自己感兴趣的药物刺激细胞，或把细胞等分成若干份后刺激细胞。通常活性氧阳性对照在刺激细胞 20-30 分钟后可以显著提高活性氧水平。

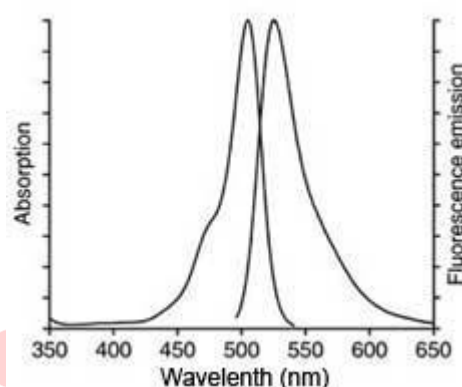
说明：仅在阳性对照孔中加入 Rosup 作为阳性对照，其余孔不必加入 Rosup。

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，或收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。

3. 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。



4. 其它说明

阳性对照可以按照 1:1000 的比例使用。例如装载好探针的细胞共 1 毫升，可以加入 1 微升的阳性对照刺激。通常刺激后 20-30 分钟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，活性氧阳性对照的效果可能有较大的差别。如果在刺激后 30 分钟内观察不到活性氧的升高，可以适当提高活性氧阳性对照的浓度。如果活性氧升高得过快，可以适当降低活性氧阳性对照的浓度。

另外，对于某些细胞，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，使装载探针时 DCFH-DA 的浓度为 2-5 微摩尔/升。

探针装载的时间也可以根据情况在 15-60 分钟内适当进行调整。

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。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。