

使用说明书

Instruction Manual

TargetMol
YOUR TARGET MOLECULES

活性氧检测试剂盒

Reactive Oxygen Species Assay Kit

产品描述

TargetMol 活性氧检测试剂盒是一种以 DCFH-DA 为荧光探针，用于检测细胞内活性氧（ROS）水平的试剂盒。ROS 是一类由氧衍生而来、具有高度化学反应活性的分子或离子，包括过氧化氢（ H_2O_2 ）、超氧阴离子及羟自由基等。在生理浓度下，ROS 作为重要信号分子，参与机体免疫防御等多种重要生理过程；而当 ROS 产生过多、超出机体抗氧化系统的清除能力时，则会引发氧化应激，造成 DNA 与蛋白质损伤，进而诱发疾病。

DCFH-DA (2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate) 是一种亲脂性荧光探针，其分子结构中含有两个乙酸酯基团，这使得它能够自由穿过细胞膜进入细胞。在细胞内，DCFH-DA 首先被非特异性酯酶水解，去除乙酸酯基团，生成无荧光的 2',7'-二氯二氢荧光素 (DCFH)。DCFH 不能自由穿过细胞膜，因而可以留在细胞内。当细胞内存在 ROS 时，DCFH 会被氧化成 2',7'-二氯荧光素 (DCF)。DCF 不能穿透细胞膜，其被激发后发明亮的绿色荧光（激发波长为 488 nm，发射波长为 525 nm），荧光强度与细胞内活性氧水平成正比。因此，通过检测 DCF 的荧光强度，可以定量分析细胞内活性氧的水平。

本试剂盒适用于荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、荧光分光光度计及流式细胞仪等多种检测仪器。本试剂盒若用于 6 孔板，每孔检测体积为 1 mL，则可检测 100 次；若用于 96 孔板，每孔检测体积为 100 μ L，则可检测 1000 次。

产品信息

100 T 规格的产品组成如下：

产品编号	产品名称	规格
C0177-1	DCFH-DA (1000 $\times$)	100 μ L
C0177-2	Rosup (1000 $\times$)	100 μ L

产品特点

1. 灵敏度高。
2. 对照体系完善。
3. 适用于多种样本类型。
4. 兼容多种检测仪器。
5. 实验重复性好。
6. 操作简便。

产品应用

氧化应激信号通路研究、细胞代谢调控研究、抗氧化药物筛选、药物毒性检测。

使用说明

一、探针装载

根据刺激时长选择合适的探针装载方式：

短时间刺激（通常 ≤ 2 h）：建议先装载探针，再使用活性氧阳性对照（Rosup）或实验药物刺激细胞。

长时间刺激（通常 ≥ 6 h）：建议先进行药物处理或 Rosup 刺激，后装载探针。

A. 原位装载法（适用于贴壁细胞）

1. 实验前一天将细胞接种于合适培养板中，确保检测时细胞融合度达到 50–70%。
2. 去除培养液，根据实验设计加入适当浓度的药物，在 37°C 避光孵育，刺激时间根据药物特性与细胞类型而定。
阳性对照（可选）：按 1:1000 稀释 Rosup（1000 $\times$ ），终浓度为 1 $\times$ 。加入细胞后于 37°C 避光孵育 0.5–4 h。
3. 按 1:1000 用适宜稀释液（无血清培养基、PBS 或 HBSS）稀释 DCFH-DA，终浓度为 1 $\times$ 。
4. 去除细胞培养液，加入足量稀释后的 DCFH-DA 工作液，确保液体完全覆盖细胞。以六孔板为例，单孔推荐加入 ≥ 1 mL。于 37°C 培养箱中孵育 20–30 min。
5. 孵育结束后，使用适宜稀释液（无血清培养基、PBS 或 HBSS）洗涤细胞 3 次，以去除未进入细胞的多余探针。

B. 细胞收集后装载法（适用于贴壁细胞与悬浮细胞）

1. 按常规方法培养细胞，收集并洗涤后获得足量细胞悬液。
2. 根据实验设计加入适当浓度的药物，在 37°C 避光孵育，刺激时间根据药物特性与细胞类型而定。
阳性对照（可选）：按 1:1000 稀释 Rosup（1000 $\times$ ），终浓度为 1 $\times$ 。加入细胞后于 37°C 避光孵育 0.5–4 h。
3. 按 1:1000 用适宜稀释液（无血清培养基、PBS 或 HBSS）稀释 DCFH-DA，终浓度为 1 $\times$ 。
4. 收集细胞后，重悬于稀释后的 DCFH-DA 溶液中，调整细胞密度为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 个/mL。于 37°C 培养箱中孵育 20–30 min，期间每隔 3–5 min 轻轻颠倒混匀，以促进探针进入细胞。
5. 孵育后，使用适宜稀释液（无血清培养基、PBS 或 HBSS）洗涤细胞 3 次，以去除未进入细胞的多余探针。
6. 洗涤完成后，可直接进行药物或阳性对照刺激，或将细胞分组后进行刺激处理。

二、荧光检测

A. 原位装载样品：可直接使用激光共聚焦显微镜观察，或收集细胞后使用荧光分光光度计、荧光酶标仪或流式细胞仪进行检测。

B. 收集后装载样品：适用于荧光分光光度计、荧光酶标仪、流式细胞仪检测，也可直接观察荧光显微图像。

注：激发波长（Ex）：488 nm，发射波长（Em）：525 nm。可进行实时监测或多时间点采样，对比刺激前后的荧光强度变化。

储存条件

-20°C 避光保存，一年有效。

注意事项

1. 对于不同的细胞，Rosup 的效果可能有较大的差别，可能对某些细胞效果较弱或者完全没有效果。可以根据预实验结果适当调整阳性对照的浓度。
2. 由于样本类型和实验环境的不同均会影响染色效率，建议通过预实验来优化探针工作液浓度和染色时间。
3. 若发现没有刺激的阴性对照细胞荧光也比较强，可以适当降低探针浓度。
4. 结果检测前重悬细胞的密度由细胞荧光强度决定，如果荧光强，则降低细胞密度，减少用于重悬的无血清培养基体积，反之亦是。同时应保证所有处理组样本的细胞密度保持一致。
5. DCF 荧光容易淬灭，染色完成的样本尽量在 2 h 内检测。操作过程应注意避光。
6. 本品仅适用于专业科研用途，严禁用于临床诊断、治疗、食品或药品领域，且不得存放于住宅等非专业场所。
7. 为保障操作安全与人员健康，操作时请务必穿戴实验服并佩戴一次性手套。

