

使用说明书

Instruction Manual

超氧阴离子活性氧检测试剂盒 (DHE)

Reactive Oxygen Species Assay Kit for Superoxide Anion (DHE)

产品描述

TargetMol 超氧阴离子活性氧检测试剂盒 (DHE) 是一种以 DHE 为荧光探针, 用于检测细胞内超氧阴离子水平的试剂盒。超氧阴离子 ($\cdot\text{O}_2^-$) 是氧分子获得一个电子后形成的带负电荷活性氧, 属于强氧化剂, 可与多种生物大分子发生反应。在生物体内, 它主要由线粒体呼吸链的代谢过程及 NADPH 氧化酶等介导的酶促反应产生, 也可由 UV、药物代谢等环境刺激因素诱发。超氧阴离子水平适量时参与免疫防御、细胞信号传导等正常生理活动, 过量则会引发氧化应激, 造成细胞损伤, 与多种疾病的发生相关。

二氢乙锭 (Dihydroethidium, DHE) 是一种脂溶性荧光探针, 能自由穿过细胞膜进入细胞内。DHE 检测超氧阴离子的原理为: DHE 未与超氧阴离子结合时, 本身发微弱的蓝色荧光 (最大激发波长为 370nm, 最大发射波长为 420nm)。当与细胞内的超氧阴离子结合后, DHE 会发生特异性氧化反应, 被氧化生成具有强荧光特性的 Ethidium。Ethidium 能够与 DNA 或 RNA 结合, 被激发后发红色荧光 (最大激发波长为 300nm, 最大发射波长为 610nm, 实际观察时可使用 535nm 作为激发波长)。红色荧光强度与超氧阴离子浓度呈正相关, 通过检测荧光强度可对细胞内超氧化物阴离子水平进行分析。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 μL , 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
C0179-1	DHE (1000 $\times$)	100 μL
C0179-2	Rosup (1000 $\times$)	50 μL

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。

产品应用

细胞内氧化应激检测、氧化还原信号通路研究、氧化应激相关药物研发、环境毒理学评估。

使用说明

一、阳性对照的设置

建议使用试剂盒提供的超氧阴离子阳性对照 Rosup (1000 $\times$), 按 1:1000 稀释。加入细胞后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 0.5–2 h, 具体孵育时间可根据细胞类型进行优化。在阳性对照处理结束后, 按照后续检测方法加入 DHE 染色液进行染色与检测。

二、DHE 工作液配制

用适宜稀释液（无血清培养基或 PBS）将 DHE 储备液稀释成浓度为 1×的工作液。

注：DHE 易被空气中的氧气氧化，在操作中应尽量减少其与空气的接触，DHE 工作液需现配现用，避免因长时间暴露于空气中导致试剂失效。

三、荧光显微镜检测

1. 将细胞接种于 96 孔板、细胞培养皿或载玻片上，待细胞稳定后按实验方案处理。

2. （可选）贴壁细胞：吸除培养液，用 PBS 洗涤一次。悬浮细胞：250–1000×g 离心 5 min，弃上清后用 PBS 洗涤一次。

注：若使用含酚红或血清的培养基，建议充分吸除培养液，以减少背景干扰。

3. 加入足量稀释后的 DHE 工作液，确保液体完全覆盖细胞。以 96 孔板为例，单孔推荐加入 ≥100 μL。于 37°C 培养箱中孵育 20 min（可根据实际情况在 10–30 min 内调整）。

4. 孵育后可直接在荧光显微镜下观察。若背景荧光偏高，可酌情用 PBS 洗涤 1–3 次后再观察。DHE 荧光参数：Ex/Em = 535/610 nm。

四、流式细胞仪检测

1. 将细胞接种于 6 孔板或培养皿中，待细胞稳定后按实验方案处理。

2. 贴壁细胞用胰酶消化，PBS 洗涤一次；悬浮细胞 250–1000×g 离心 5 min，弃上清后用 PBS 洗涤一次。建议每组准备约 1×10⁶ 个细胞。

3. 将细胞重悬于 1 mL DHE 染色液中，形成单细胞悬液。于 37°C 培养箱中孵育 20 min（可根据实际情况在 20–30 min 内调整），期间每隔 3–5 min 轻轻颠倒混匀，以促进探针进入细胞。孵育后可使用适宜稀释液（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。

4. 可直接上机进行流式检测，或离心后重悬于 0.5 mL 检测缓冲液中进行检测。DHE 荧光参数：Ex/Em = 535/610 nm。

注：流式检测灵敏度较高，染料使用浓度可适当降低，请根据细胞类型调整 DHE 浓度或稀释倍数。

五、荧光酶标仪检测

1. 将细胞接种于黑色透明底 96 孔板，每孔接种 100–10,000 个细胞，推荐范围为 2000–5000 个。按实验方案处理细胞。

2. （可选）贴壁细胞：吸除培养液，用 PBS 洗涤一次。悬浮细胞：250–1000×g 离心 5 min，弃上清后用 PBS 洗涤一次。

3. 加入 100 μL 稀释后的 DHE 工作液，确保液体完全覆盖细胞。于 37°C 培养箱中孵育 20 min（可根据实际情况在 10–30 min 内调整）。

4. 孵育后可直接使用荧光酶标仪进行检测，若背景荧光偏高，可酌情用 PBS 洗涤 1–3 次后再观察。DHE 荧光参数：Ex/Em = 535/610 nm。通过比较对照组和处理组的 RFU 值（相对荧光强度）评估活性氧变化水平。

储存条件

-20°C 避光保存，一年有效。本品易被氧化，尽量避免暴露于空气中。

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. 光照易导致荧光淬灭，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。

