（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K138-F

产品规格：96T

检测仪器：荧光酶标仪 (激发波长 485-515 nm，发射波长 510-550 nm)

Elabscience®活性氧(ROS)荧光法测试盒(绿色)

Reactive Oxygen Species (ROS) Fluorometric Assay Kit (Green)

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100
邮箱：biochemical@elabscience.cn
网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测组织细胞，培养细胞中的活性氧。

检测原理

DCFH-DA（2,7-dichlorofuorescin diacetate）是一种可以自由穿过细胞膜的荧光探针，自身没有荧光，进入细胞内后，可以被细胞内的酯酶水解生成DCFH（dichlorofluorescin）。在活性氧存在时 DCFH 被氧化为不能透过细胞膜的强绿色荧光物质 DCF（dichlorofluorescein），其荧光在激发波长 502 nm，发射波长 530 nm 附近有最大波峰，强度与细胞内活性氧水平成正比。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	10 mmol/L DCFH-DA (10 mmol/L DCFH-DA)	0.1 mL×1 支	-20℃避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	阳性对照 (Positive Control)	1 mL×1 支	-20℃避光 保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	96 孔×2 块	无要求
	96 孔覆膜	4 张	
	样本位置标记表	2 张	

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：荧光酶标仪（Ex/Em=488 nm/525 nm）、流式细胞仪或荧光显微镜

试剂：双蒸水、PBS（0.01 M，pH 7.4）、无血清细胞培养液

试剂准备

① 试剂一工作液的配制：

将试剂一用无血清细胞培养液稀释，现配现用。推荐初始工作浓度为 10 μM，对于不同的样本和处理，试剂一工作液浓度可为 0.1-20 μM，需进行预实验确定合适的浓度。试剂一稀释倍数应在 500 倍以上以避免 DMSO 对细胞的影响

② 试剂一工作液的使用：

加入试剂一工作液的时机或孵育时间，以最终能顺利检测细胞内活性氧为目的。药物处理时间较短（< 2 小时）或预计 ROS 效应较弱，可先加或同时加入试剂一工作液。反之，药物处理时间较长（> 6 小时）或预计产生 ROS 效应较强，可后加试剂一工作液。

③ 试剂二工作液的配制：

试剂二（含 10 mM TBHP）用无血清细胞培养液稀释来制备阳性对照工作液（含 50-250 μM TBHP）。工作液每次都要新鲜，不要储存以备将来使用（储存可能导致 TBHP 降解。TBHP 也可用不含酚红的 10% FBS 完全培养基稀释）。

④ 试剂二工作液的使用：

实验时，设置的阳性对照孔中加入试剂二工作液，推荐初始工作浓度为 50 μM，刺激时间 2 h。对于不同的细胞，其对阳性对照的敏感度不同，阳性对照加入时间与浓度存在不一样，如果在刺激后 2 h 内观察不到活性氧的升高，可以适当提高阳性对照的浓度或增加刺激时间。如果活性氧升高得过快，可以适当降低阳性对照的浓度或缩短刺激时间。

注：仅在阳性对照孔中加入试剂二工作液作为阳性对照，其余孔不必加入。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。

实验关键点

① 探针孵育后，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 尽量缩短探针孵育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。

③ 避免 DCFH-DA 反复冻融。

④ 必须使用活细胞。

⑤ 设置阳性对照孔（加试剂二工作液）和阴性对照孔（只有细胞不加试剂一工作液）。

⑥ DCF 容易淬灭，孵育完成后的样本最好的 2 h 之内进行测定，防止荧光减弱。

操作步骤

荧光酶标仪和流式细胞仪的操作过程

检测仪器部分参数设置	
荧光酶标仪检测	测定 488 nm 激发波长和 525 nm 发射波长的荧光值。
流式细胞仪检测	DCF 的荧光光谱和 FITC 非常相似，可以用 FITC 的参数设置检测 DCF，检测时细胞数量可选 10^4-10^5

悬浮细胞

① 根据实验设计进行细胞培养，确保细胞健康且不会过度生长。

② 设置阳性对照孔（加试剂二工作液）和阴性对照孔（只有细胞不加试剂一工作液）。

③ 1000 × g 离心 5～10 min 收集细胞，重悬于试剂一工作液中，细胞浓度为 1×10^5-1×10^6/mL。

④ 37℃，避光孵育细胞 30 min～几小时，通常为 30～60 min 即可，每隔 3～5 min 混匀一下，使探针和细胞充分接触。孵育时间长短与细胞类型、刺激条件、DCFH-DA 浓度有关。

⑤ 1000 × g 离心 5～10 min 收集细胞，用无血清细胞培养液洗涤 2-3 次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。

⑥ 将收集好的细胞沉淀物用无血清细胞培养液重悬，并用于检测。

⑦ 检测。

贴壁细胞

a. 原位装载探针的测定

① 按适合您细胞的培养基中根据所需方案培养细胞，确保细胞健康且不会过度生长。

② 设置阳性对照孔（加试剂二应用液）和阴形对照孔（只有细胞不加试剂一工作液）

③ 去除细胞培养液，细胞用无血清细胞培养液洗涤一次（注意：不要直接对着细胞吹打，否则细胞会脱落）

④ 加入适当体积试剂一工作液，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试剂一工作液不少于 1 毫升。

⑤ 37℃，避光孵育细胞 30 min～几小时，通常为 30～60 min 即可，孵育时间长短与细胞类型、刺激条件、DCFH-DA 浓度有关。

⑥ 去除试剂一工作液，用无血清细胞培养液洗涤 2-3 次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA

⑦ 用胰酶消化细胞（推荐 0.25%的胰酶消化 2～3 分钟），加入含血清的培养基终止消化，制成细胞悬液，1000 × g 离心 5～10 min 收集细胞；

⑧ 将收集好的细胞沉淀用无血清细胞培养液重悬，并用于检测。

b. 收集细胞后装载探针的测定

① 用胰酶消化细胞，加入含血清的培养基终止消化，制成细胞悬液，

② 1000 × g 离心 5～10 min 收集细胞后，用无血清细胞培养液洗涤 1-2 次。

③ 检测过程按悬浮细胞处理（从步骤③开始）。

组织

① 制备单细胞悬液

② 将单细胞悬液加入试剂一工作液。

③ 37℃，避光孵育细胞 30 min～几小时，通常为 30～60 min 即可，每隔 3～5 min 混匀一下，使探针和细胞充分接触。孵育时间长短与细胞类型、刺激条件、DCFH-DA 浓度有关。

④ 1000 × g 离心 5～10 min 收集细胞，用无血清细胞培养液洗涤 2-3 次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。

⑤ 将收集好的细胞沉淀物用无血清细胞培养液重悬，并用于检测。

⑥ 检测。

单细胞悬液的制备方法

1. 采用单细胞悬液制备仪制备单细胞悬液。

2. 酶消化法：

① 选取的组织立即放入预冷的 PBS（0.01 M，pH 7.4）中，清洗血迹及其它污染物。去除组织块中的坏死成分、纤维、脂肪及血管（专门制备相关细胞时除外）。

② 用眼科剪将组织块剪成 1 mm^3 左右小块，放在预冷 PBS（0.01 M，pH 7.4）中并进行漂洗，洗去剪碎的细胞碎片。

③ 加入适量酶消化液，37℃恒温水浴消化 20～30 min，期间进行间断振荡或吹打细胞。

④ 加入含血清的培养基终止消化，用 300 目尼龙网过滤除去组织团块，收集滤过的细胞，500 × g 离心 10 min 后去上清，并用 PBS（0.01 M，pH 7.4）洗 1～2 次，并重悬制备单细胞悬液，细胞计数总数不少于 10^6 个细胞。

3. 机械法（网搓法）：

① 前处理同酶消化法①、②步。

② 将 300 目尼龙网扎在小烧杯上，将剪碎的组织放在网上，以眼科镊或刮刀轻搓组织块，边搓边以 PBS（0.01 M，pH 7.4）冲洗，直至将组织搓完。

③ 收集细胞悬液，500 × g 离心 10 min 后去上清，并用 PBS（0.01 M，pH 7.4）洗 1～2 次，并重悬制备单细胞悬液，细胞计数总数不少于 10^6 个细胞。

荧光显微镜检测（适用于贴壁细胞）

① 细胞接种：细胞培养板中铺入细胞爬片，再加入细胞，在最适合您细胞的培养基中按照所需方案培养细胞，确保细胞健康且不会过度生长。

② 设置阳性对照孔（加试剂二工作液）和阴性对照孔（只有未处理细胞不加试剂一工作液）。

③ 去除细胞培养液，细胞用无血清细胞培养液洗涤一次（注意：不要直接对着细胞吹打，否则细胞会脱落）

④ 加入适当体积试剂一工作液，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试剂一工作液不少于 1 毫升。

⑤ 37℃，避光孵育细胞 30 min～几小时，通常为 30～60 min 即可，孵育时间长短与细胞类型、刺激条件、DCFH-DA 浓度有关。

⑥ 去除试剂一工作液，用无血清细胞培养液洗涤 2-3 次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。

⑦ 取出细胞爬片，放到载玻片上直接在荧光显微镜下进行检测。

⑧ 检测波长设置：选择激发波长 488 nm，根据所观察的荧光强度设置曝光时间（参考 200 ms-600 ms），在同一参数下测定所有样本。

附录1 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
没有检测到荧光或荧光度值低	细胞密度不够	增加细胞密度
	DCFH-DA 浓度不是最佳	增加 DCFH-DA 浓度
背景高	DCFH-DA 未洗净	增加洗涤次数
阳性对照没有值	阳性对照孔未加入细胞	加入细胞
	刺激浓度或时间不够	增加试剂二应用液的浓度或刺激时间

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

附录2 客户发表文献

1. Bi Y Y , Chen Q , Yang M Y ,et al.Nanoparticles targeting mutant p53 overcome chemoresistance and tumor recurrence in non-small cell lung cancer[J].Nature Communications, 2024, 15(1):18.DOI:10.1038/s41467-024-47080-3.

2. Qiu C, Tang C, Tang Y, et al. RGS5+ lymphatic endothelial cells facilitate metastasis and acquired drug resistance of breast cancer through oxidative stress-sensing mechanism[J]. Drug Resistance Updates, 2024, 77: 101149.

3. Yang Y , Feng K , Yuan L ,et al.Compound Danshen Dripping Pill inhibits hypercholesterolemia/atherosclerosis-induced heart failure in ApoE and LDLR dual deficient mice via multiple mechanisms[J], 2023, 13(3):1036-1052.

4. Di Y , Zhang X , Wen X ,et al.MAPK Signaling‐Mediated RFNG Phosphorylation and Nuclear Translocation Restrain Oxaliplatin‐Induced Apoptosis and Ferroptosis[J].Advanced Science, 2024, 11(38).DOI:10.1002/advs.202402795.

5. Wu Z, Chen K, Mo W, et al. Multimodal enhancement of ferroptosis for synergistic cascade colorectal cancer therapy[J]. Chemical Engineering Journal, 2024, 498: 155048.

6. Wang R , Dong Y , Zhang J ,et al.A multifunctional nanoplatform with dual-targeted antibacterial and cascaded immunomodulatory strategy for the treatment of bacterial keratitis[J].Chemical Engineering Journal, 2024, 498(000):17.DOI:10.1016/j.cej.2024.155323.