（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	2 板	
	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. Du S, Zhou N, Xie G, et al. Surface-engineered triboelectric nanogenerator patches with drug loading and electrical stimulation capabilities: Toward promoting infected wounds healing[J]. Nano Energy, 2021, 85:106004. IF:17.087
2. Bartolini D, Arato I, Mancuso F, et al. Melatonin modulates Nrf2 activity to protect porcine pre-pubertal Sertoli cells from the abnormal H_2O_2 generation and reductive stress effects of cadmium. J Pineal Res. 2022;73 (1):e12806. IF:13.007
3. Yang Z, Wang J, Ai S, et al. Self-generating oxygen enhanced mitochondrion-targeted photodynamic therapy for tumor treatment with hypoxia scavenging[J]. Theranostics, 2019, 9(23): 6809. IF:11.556
4. Wan Q, Cao R, Wen G, et al. Sequential use of UV-LEDs irradiation and chlorine to disinfect waterborne fungal spores: Efficiency, mechanism and photoreactivation[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 423:127102-. IF:10.588
5. Tian J, Wang L, Hui S, et al. Cadmium accumulation regulated by a rice heavy-metal importer is harmful for host plant and leaf bacteria. J Adv Res. 2022. IF:10.479
6. Jg A, Jie S B, Jy B, et al. Comparative toxicity reduction potential of UV/sodium percarbonate and UV/hydrogen peroxide treatments for bisphenol A in water: An integrated analysis using chemical, computational, biological, and metabolomic approaches[J]. Water Research, 2020, 190. IF:9.702
7. Yang X X, Xu X, Wang M F, et al. A nanoreactor boosts chemodynamic therapy and ferroptosis for synergistic cancer therapy using molecular amplifier dihydroartemisinin[J]. Journal of Nanobiotechnology, 2022, 20(1):1-19. IF:9.464
8. Liu Z, Liu X, Yang Q, et al. Neutrophil membrane-enveloped nanoparticles for the amelioration of renal ischemia-reperfusion injury in mice[J]. Acta Biomaterialia, 2020, 104: 158-166. IF:8.947
9. Huang S, Le H, Hong G, et al. An all-in-one biomimetic iron-small interfering RNA nanoplatform induces ferroptosis for cancer therapy. Acta Biomater. 2022;148:244-257. IF:8.291
10. Alharbi YM, Sakr SS, Albarrak SM, et al. Antioxidative, Antidiabetic, and Hypolipidemic Properties of Probiotic-Enriched Fermented Camel Milk Combined with Salvia officinalis Leaves Hydroalcoholic Extract in Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. Antioxidants (Basel). 2022;11 (4):. IF:7.675
11. Wang H, Huang Q, Zhang Z, et al. Transient post-operative overexpression of CXCR2 on

monocytes of traumatic brain injury patients drives monocyte chemotaxis toward cerebrospinal fluid and enhances monocyte-mediated immunogenic cell death of neurons in vitro[J]. Journal of Neuroinflammation, 2022. IF:7.573

12. Liu P, Yin Z, Chen M, et al. Cytotoxicity of adducts formed between quercetin and methylglyoxal in PC-12 cells[J]. Food Chemistry, 2021, 352(2):129424. IF:7.514
13. Adhikari B, Adhikari M, Ghimire B, et al. Cold plasma seed priming modulates growth, redox homeostasis and stress response by inducing reactive species in tomato (Solanum lycopersicum)[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2020, 156: 57-69. IF:7.376
14. Zhao X, Wang C,Dai S, et al. Quercetin Protects Ethanol-Induced Hepatocyte Pyroptosis via Scavenging Mitochondrial ROS and Promoting PGC-1 α -Regulated Mitochondrial Homeostasis in L02 Cells. Oxid Med Cell Longev. 2022;2022:4591134. IF:7.31
15. Chagas TQ, Freitas ÍN, Montalvão MF, Nobrega RH, Machado MRF, Charlie-Silva I, Araújo APDC, Guimarães ATB, Alvarez TGDS, Malafaia G. Multiple endpoints of polylactic acid biomicroplastic toxicity in adult zebrafish (Danio rerio)[J]. Chemosphere. 2021 Aug;277:130279. IF:7.086
16. Mlindeli Gamede, Lindokuhle Mabuza, Phikelelani Ngubane, et al. Preventing the onset of diabetes-induced chronic kidney disease during prediabetes: The effects of oleanolic acid on selected markers of chronic kidney disease in a diet-induced prediabetic rat model[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy.2021 Jul;139:111570. IF:6.529
17. Yang H, Zhu Y, Ye Y, et al. Nitric oxide protects against cochlear hair cell damage and noise-induced hearing loss through glucose metabolic reprogramming.[J]. Free radical biology & medicine, 2021. IF:6.525
18. Rao M J, Xu Y, Tang X, et al. CsCYT75B1, a Citrus CYTOCHROME P450 Gene, Is Involved in Accumulation of Antioxidant Flavonoids and Induces Drought Tolerance in Transgenic Arabidopsis[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2020, 9(2):161. IF:6.313
19. Liou G G, Hsieh C C, Lee Y J, et al. N-Acetyl Cysteine Overdose Inducing Hepatic Steatosis and Systemic Inflammation in Both Propacetamol-Induced Hepatotoxic and Normal Mice[J]. Antioxidants, 2021, 10(3):442. IF:6.312
20. Wang Y, Chi H, Xu F, et al. Cadmium chloride-induced apoptosis of HK-2 cells via interfering with mitochondrial respiratory chain[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2022, 236:113494-. IF:6.233
21. Obaid QA, Al-Shammari AM, Khudair KK. Glucose Deprivation Induced by Acarbose and Oncolytic Newcastle Disease Virus Promote Metabolic Oxidative Stress and Cell

Death in a Breast Cancer Model. Front Mol Biosci. 2022;9:816510. IF:6.113

22. Abdel-Wahab BA, Walbi IA, Albarqi HA, Ali FEM, Hassanein EHM. Roflumilast protects from cisplatin-induced testicular toxicity in male rats and enhances its cytotoxicity in prostate cancer cell line. Role of NF-κB-p65, cAMP/PKA and Nrf2/HO-1, NQO1 signaling[J]. Food Chem Toxicol. 2021 May;151:112133. IF:6.023
23. Aljutaily T. Evaluating the Nutritional and Immune Potentiating Characteristics of Unfermented and Fermented Turmeric Camel Milk in Cyclophosphamide-Induced Immunosuppression in Rats. Antioxidants (Basel). 2022;11 (4):. IF:5.952
24. Jabbari N, Nawaz M, Rezaie J. Ionizing Radiation Increases the Activity of Exosomal Secretory Pathway in MCF-7 Human Breast Cancer Cells: A Possible Way to Communicate Resistance against Radiotherapy[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(15):3649-. IF:5.923
25. Shanmugarajan D, Girish C, Harivenkatesh N, et al. Antihypertensive and pleiotropic effects of Phyllanthus emblica extract as an add-on therapy in patients with essential hypertension—A randomized double-blind placebo-controlled trial[J]. Phytotherapy Research, 2021. IF:5.878
26. Short-Chain Fatty Acid, Sodium Propionate, in Patients on Maintenance Hemodialysis: Beneficial Effects on Inflammatory Parameters and Gut-Derived Uremic Toxins, A Pilot Study (PLAN Study)[J]. Journal of Clinical Medicine, 2018. IF:5.688
27. Peng J, Pan J, Mo J, et al. MPO/HOCl Facilitates Apoptosis and Ferroptosis in the SOD1 G93A Motor Neuron of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Oxid Med Cell Longev. 2022;2022:8217663. IF:5.604
28. Treadmill Exercise Alleviates Brain Iron Dyshomeostasis Accelerating Neuronal Amyloid-β Production, Neuronal Cell Death, and Cognitive Impairment in Transgenic Mice Model of Alzheimer's Disease[J]. Molecular neurobiology, 2021, 58(7):3208-3223. IF:5.59
29. Aboulhoda, B. E., Rashed, L. A., Ahmed, H., et al. Hydrogen sulfide and mesenchymal stem cells-extracted microvesicles attenuate LPS-induced Alzheimer's disease[J]. Journal of Cellular Physiology, 2021, 236(8):5994-6010 IF:5.546
30. Liu W, Jia H, Guan M, et al. Discovery of novel tubulin inhibitors targeting the colchicine binding site via virtual screening, structural optimization and antitumor evaluation. Bioorg Chem. 2022;118:105486. IF:5.508