

(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-dichlorofluorescein 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 (dichlorofluorescein)。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	2-8℃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。总体稀释倍数应在 1: 500-1: 1000 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 $1000 \times g$ 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°C ，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 $1000 \times g$ 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）和阴性对照孔（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°C，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°C，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°C 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， $500\times\text{g}$ 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， $500\times\text{g}$ 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°C，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 H₂O₂ 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 nanoplatfrom 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- κ B-p65, cAMP/PKA and Nrf2/HO-1, NQO1 signaling[J]. *Food Chem Toxicol.* 2021 May;151:112133. IF:6.023
23. Aljaitaily 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