

(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-F005

产品规格: 96T

检测仪器: 荧光酶标仪, 流式细胞仪, 荧光显微镜

Elabscience® 活性氧(ROS)荧光法测试盒 (红色)
Reactive Oxygen Species (ROS)
Fluorometric Assay Kit (Red)

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细胞中活性氧(ROS)的水平。

检测原理

活性氧是指机体内或者自然环境中由氧组成，含氧并且性质活泼的物质的总称：主要有一种激发态的氧分子，即一重态氧分子或称单线态氧分子，3种含氧的自由基，即超氧阴离子自由基、羟自由基和氢过氧自由基，2种过氧化物，即过氧化氢和过氧化脂质以及一种含氮的氧化物等。二氢乙锭可以穿过细胞膜进入细胞内与DNA或RNA结合，形成氢乙锭产生红色荧光。二氢乙锭在细胞内主要被超氧阴离子型活性氧化。

二氢乙锭本身为蓝色荧光，最大激发波长为370 nm，最大发射波长为420 nm，脱氢后与RNA或DNA结合产生红色荧光，激发波长为300 nm或518 nm，发射波长为610 nm。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式(Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer)	50 mL×2 瓶	-20°C 保存6个月
试剂二 (Reagent 2)	10 mmol/L 探针 (10 mmol/L Probe)	0.15 mL×1 支	-20°C 避光 保存6个月
试剂三 (Reagent 3)	100 mmol/L 阳性对照 (100 mmol/L Positive Control)	0.2 mL×1 支	-20°C 避光 保存6个月
	96 孔黑色酶标板	1 板	
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 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、流式细胞仪或荧光显微镜

试剂准备

① 各试剂平衡至室温，试剂二和试剂三使用前 $300 \times g$ 离心2 min，试剂二可分装后 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存，避免反复冻融。

② 试剂一工作液的配制：

按照试剂一：双蒸水=1:9的比例稀释得到试剂一工作液。（试剂一工作液可使用无血清培养基代替）

③ 试剂二工作液的配制：

试剂二使用试剂一工作液稀释到所需浓度得到试剂二工作液，推荐的浓度为 $1-10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 左右，可根据实验效果进行调整。现配现用，避光备用，2 h内使用有效。

④ 试剂三工作液的配制：

试剂三使用试剂一工作液稀释到所需浓度得到试剂三工作液，推荐使用的浓度为 $10-200\text{ }\mu\text{mol/L}$ 左右。现配现用，避光备用，2 h内使用有效。

实验关键点

- ① 若使用试剂一工作液进行细胞洗涤和孵育，需要在实验前配制足量的试剂一工作液。
- ② 试剂二避免反复冻融，使用前注意需要充分融解后使用，变成液体状态后离心直至液体都到管底部再开盖，试剂二工作液建议现用现配。
- ③ 生成的荧光物质容易淬灭，孵育完成后最好在2 h之内进行测定，防止荧光减弱。

操作步骤

操作过程:

检测仪器部分参数设置	
荧光酶标仪	Excitation: 300 nm 或 488 nm; Emission: 610 nm
流式细胞仪	可以用 PE 的参数设置检测。
荧光显微镜	Cy3 Filter, TexasRed 或 RFP

- ① 根据实验设计进行细胞培养，将 2×10^5 个细胞接种至板孔中，培养过夜确保细胞健康且不会过度生长。
- ② 悬浮细胞：将细胞转移至 2 mL EP 管中， $300 \times g$ 离心 5 min 后除去培养基，用试剂一工作液洗涤细胞 2-3 次。
贴壁细胞：除去培养基，用试剂一工作液洗涤细胞 2-3 次。
- ③ 设置空白组(只有正常细胞)，对照组(只有正常细胞，并装载探针)，阳性对照组(细胞经试剂三工作液处理，并装载探针)和实验组(细胞经药物处理，并装载探针)。
- ④ 空白组用试剂一工作液。对照组，阳性对照组和实验组装载探针，根据细胞培养容器选择适当的试剂二工作液体积。通常每 2×10^5 个细胞加入 200 μL -500 μL 试剂二工作液，推荐试剂二工作液的浓度为 1-10 $\mu\text{mol/L}$ 。
37°C，避光孵育细胞 30-60 min。(此过程孵育时间长短与细胞类型、荧光探针浓度有关，各组加入液体体积保持一致)
- ⑤ 用试剂一工作液洗涤细胞 2-3 次，以充分去除未进入细胞内的荧光探针。
- ⑥ 空白组，对照组加入试剂一工作液。阳性对照组进行阳性刺激：阳性对照使用试剂三工作液进行刺激处理(阳性对照组)，根据细胞培养容器选择适当的试剂三工作液体积，通常 2×10^5 个细胞加入 200 μL -500 μL 试剂三工作液，推荐试剂三工作液的浓度为 10-200 $\mu\text{mol/L}$ ，刺激时间为 30-90 min。实验组进行药物处理过程：实验组根据自身实验需求选择药物处理的条件。(此过程孵育时间长短与细胞类型、阳性刺激和药物浓度有关，各组加入液体体积保持一致。)

- ⑦ 用试剂一工作液洗涤细胞 2-3 次，以充分去除阳性刺激组多余的阳性刺激和实验组多余的药物。每管悬浮细胞需要再次加入 100 μL -200 μL 试剂一工作液重悬细胞，转移至检测载体中并用于检测。贴壁细胞可以直接装载载玻片进行检测。

注：实验过程也可以先进行药物处理和阳性刺激，再装载探针。整个实验过程中，可用无血清培养液代替试剂一工作液。

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。

