

活性氧 ROS 分析试剂盒 H₂DCFDA

说明书修订日期: 2021.11.17

Cat number: KGAF018

Store at -20°C for 6months, 避光

For Research Use Only (科研专用)

一、产品描述

我们提供还原型具有细胞膜透性的 ROS 荧光探针衍生物。还原型与乙酰化形式的 2', 7'-二氯荧光素 (DCF) 是无荧光的乙酸酯基团, 在胞内可以被酯酶氧化或水解, 从而脱去, 生成带电荷形式的探针。利用合适的激发光源可以很方便地在各种检测平台上观察测量, 如流式细胞仪、荧光酶标仪和荧光显微镜。由于染料很容易受到光氧化, 在进行实验时必须必须全程注意避光 (Ex/Em=488/525nm)

相比较其非羧基衍生物, 羧基-H₂DCFDA 带有额外的负电荷。羧基-H₂DCFDA SE 是带有一个氨基活性的琥珀酰亚胺酯基团, 可与与胞内成分以共价形式更持久的结合。

二、产品包装

组 份	Cat: KGAF018 1000 T	储存条件
H ₂ DCFDA 储液	10mM in 无水 DMSO, 200 μ L	-20°C, 避光

三、操作说明

制备储液

工作液必须新鲜配制, 实验结束即可丢弃稀释过的多余探针, 染料在水溶液中更容易氧化分解, 请尽快用完。在最低探针加载浓度的条件下, 本试剂盒提供的探针, 可以满足切片或悬浮细胞 (设置加载孵育液体积每个反应不超过 2mL 的情况下) 至少 1000 TESTS。

一般注意事项

一般来说, 只要能获得足够的荧光信号即可, 尽量选择最小浓度的 AM 酯, 尽量减少 AM 酯的水解副产物 (甲醛和乙酸) 的富集。

加载条件的选择尽可能考虑原有细胞的自然生长条件。一些研究者给出的建议是: 生理温度较之室温对于染料的加载效果更好。综合考虑, 我们推荐您在进行 ROS 检测时, 优先使用具有细胞膜透性的 ROS 探针, 如羧基-DCFDA 或者荧光素二醋酸 (FDA)。

加载探针

1.1 制备活细胞悬浮液 (10⁶ 细胞/mL)。注意: 对象是贴壁细胞的话, 条件与悬浮细胞类似。用 PBS 稀释 AM 加载溶液 (参见步骤 2) 浸没贴壁细胞 (或细胞爬片)。

1.2 用 PBS 或者 HBSS 稀释 10mM 的 AM 原液, 制成 AM 加载工作溶液 (终浓度为 1~10 μ M)。一般来说, 只要能获得足够的荧光信号即可, 尽量选择最小浓度的 AM 酯, 尽量减少 AM 酯的水解副产物 (甲醛和乙酸) 的富集。这里, 含有氨基酸或者含有伯、仲胺的缓冲液都是必须避免的。因为脂肪胺可以促成 AM 酯的水解而阻止其加载到细胞内, 并维持胞外的最低程度的 AM 酯水解。另外, 血清等可能含有内源性酯酶活性的物质也必须避免。直到细胞加载 AM 酯完成之后。

1.3 按体积比 1:1 将 AM 酯加入到细胞悬液中, 4 度~37 度孵育 5~60 分钟。

1.4 去掉加载液，以预热的新鲜培养基或合适缓冲液孵育 30 分钟，确保 AM 酯溶液在胞内充分脱酯新鲜培养基洗涤细胞两次。

1.5 确定细胞加载前的荧光强度作为基线。如果使用琥珀酰亚胺酯衍生物，可以使用台盼蓝（0.0025% w/V）来淬灭胞外未结合的染料。从而更好地使荧光信号响应细胞内的 ROS 活性。

1.6 阴性对照设置：

a) 确定未染色细胞的自发荧光在绿色荧光发射范围内。

b) 对于流式细胞仪检测来说，确定该细胞的正向和侧向散射光在染料加载前后保持不变。细胞尺寸大小的变化可能牵涉到细胞毒性处理造成的细胞出泡和收缩。

c) 确定无细胞的染料缓冲液在有诱导剂或刺激药物前后的荧光强度。在没有胞外酯酶或者其他氧化酶存在条件下，ROS 探针应表现出随着时间推移荧光强度逐渐增加，这可能是由于染料自身的水解，大气氧化和光诱导的氧化。

d) 确定未处理的加载细胞在生长培养基或者缓冲液中的荧光强度。在健康细胞中，氧自由基可以通过细胞酶和天然的抗氧化剂消除。随着染料加载，健康细胞实验进行的过程中会持续稳定地表现出低荧光发射水平，然而，随着自发氧化的进行，会表现出一个逐渐增加的荧光发射水平。

1.7 建立阳性对照，氧化活性可以用：

a) 肿瘤促进子 4b-12-肉豆蔻佛波醇 13-醋酸酯（PMA，储液浓度 1mM in DMF，工作浓度：100pM! 10 μ M）；

b) 细菌趋化肽 N-乙酰基-L-甲硫氨酸-L-亮氨酸-L-苯丙氨酸（fMLP，储液浓度是 1mM in DMF，工作浓度 1~10 μ M）；

c) 双氧水或者叔丁基氢过氧化物（TBHP），以终浓度为 100 μ M 处理。

1.8 为确保所加药物或化合物不会对染料有淬灭效应，应该检查化合物或者药物的吸收光谱，是否与探针的激发和发射光谱重叠。