组织活性氧(ROS)检测试剂盒

保存:2～8℃,避光,有效期1年。

简要说明:

本制品是一种利用新型荧光探针BaIBoxiprobe O13进行组织活性氧检测的试剂盒。本试剂盒中的BaIBoxiprobe O13 ROS探针为红色荧光的活性氧探针,具有516nm/606nm的最大激发/发射波长。

检测原理:

BaIBoxiprobe O13 ROS探针在组织中活性氧存在的条件下,被氧化生成红色荧光物质,红色荧光强度与组织内活性氧水平成正比,检测O13产物的荧光强度就可以知道组织内活性氧的水平。在激发波长510nm,发射波长610nm附近,使用荧光分光光度计、荧光酶标仪等仪器检测O13产物荧光强度,从而测定组织内活性氧水平。

产品特点:

> 使用方便:可用荧光分光光度计、荧光酶标仪检测;
> 背景低， 灵敏度高;
> 线性范围宽,使用方便。

产品组成:

组分	50T	100T	保存
匀浆缓冲液A	100mL	100mL×2	4℃
BaIBoxiprobe O13活性氧探针	200μL	200μL×2	_20℃,避光

保存事项:

1·探针长期不用可以_20℃保存。避免反复冻融。需要长期保存可以根据需要分装后避光冻存。

2·有效期为试剂盒未拆封前按要求条件保存的有效期,试剂拆封后请尽快使用完。

特别说明:

1·正怯实验前请选取几个样本做预实验,以优化实验条件,取得最佳实验效果。

2·螺旋盖微量试剂管装的试剂在开盖前请短暂离心,将盖和管内壁上的液体离心至管底,避免开盖时试剂损失。

3·禁止与其他品牌的试剂混用,否则会影响使用效果。

4·样品或试剂被细菌或真菌污染或试剂交叉污染可能会导致错误的结果。

5·最好使用一次性吸头、管、瓶或玻璃器皿,可重复使用的玻璃器皿必须在使用前清洗并彻底清除残留清洁剂。

6·实验后完成后所有样品及接触过的器皿应按照规定程序处理。

样本要求:

一般最好使用新鲜组织样本检测活性氧,反映的是组织当时的活性氧状态。冻存的组织样本的ROS在长期冻存过程中会损失掉,有条件的话就使用新鲜样本,不建议使用冻存的组织样本。 已经冻存的组织样本中残余的ROS也可以用本试剂盒检测。

用户自备:

> 仪器准备:激光共聚焦显微镜或荧光分光光度计或荧光酶标仪(激发波长488~535nm,发射波长606nm)、匀浆机或匀浆器、离心机、移液器、冰箱、冰盒。
> 试剂准备:pBS缓冲液(PH7·4, 10mM)或HBSS(含钙镁无酚红)、BCA蛋白定量试剂。
> 耗材准备:离心管、吸头、一次性手套、黑色96孔板。

注意事项:

1．BaiBoxiProbe O13活性氧探针为DMSO溶液,冬季气温较低时为凝固状态,极易粘附在管壁、吸头壁。注意需要加热融解,变成液体状态后离心至管底部再开盖。可以用手捂住使其融解或37℃短时间水浴。吸头也需要放在培养箱预热,否者容易再次凝固在吸头内壁产生损耗。
2. 使用前,先将本品取出回温至室温,并对其进行简短离心使DMSO溶液集中于管底。
3. 尽量缩短探针标记后到测定所用的时间,以减少各种可能的误差。
4. 必须使用荧光检测专用的黑色96孔板。

试剂准备:

根据样本数量,用纯水将O13探针10倍稀释。充分混匀,备用。
◆不可以一次性将探针全部稀释。
◆现配现用。
◆微量操作时,注意探针要有效加入匀浆液,避免没有加入。
◆以下步骤使用的O13探针为此步骤稀释过的探针。

样本处理:

1．刚取得的新鲜组织样本用PBS洗净。
2. 准确称取50mg或100mg组织样本,加入500μL~1 mL匀浆缓冲液A,用匀浆机/匀浆器充分匀浆。
3. 在100 × g,4℃离心5分钟,取上清备用。

检测步骤:

1．在96孔板中加入190微升匀浆上清液、10微升O13探针,用移液器吹打,使之充分混匀。
◆不同样本的活性氧差您较大,需要根据预实验结果调整探针用量。 一般加入2~10 μL探针,染色终浓度按试剂盒中探针母液的200~1000倍稀释,200倍稀释适合大多数样本。
◆ 如果荧光强度太强,超过了检测仪器的量程,可以减少探针用量。保证所有样本探针用量一致即可。
◆以酶标仪检测为例。也可以用荧光分光光度计检测,根据所使用仪器决定匀浆液体积和染色容器。
2. 在37℃避光孵育20~30分钟。
3. 置于酶标仪中，激发波长为488~535nm、发射波长606nm检测荧光强度。
◆ 或使用荧光光度计等其它荧光检测设备。
◆ 必须使用荧光检测专用的黑色96孔板。
◆ 如果荧光强度太强,超过了仪器的检测范围,可以将孵育后的匀浆上清液稀释后再检测。一般稀释s~s0倍。

蛋白定量:

1．另取50微升上清匀浆液,用PBS大约稀释30倍。
2. 取100微升进行蛋白定量。

结果处理:

以荧光强度(RFU) /蛋白浓度(毫克蛋白)表示组织活性氧强度。
◆ 数据与蛋白浓度的单位无关。
◆此处以蛋白浓度数据作为校正系数,对不同样品进行均一化处理。
◆ 荧光强度强则活性氧(ROS)含量高。
◆可以用实验中对照样本的荧光强度值为基准,待测组样本的荧光强度值占对照样本的百分比来比较活性氧 (ROS)程度差您。