组织活性氧（ROS）荧光法测试盒（绿色）说明书

（荧光法 96 样）

一、产品简介：

在正常的生命过程中，活性氧是维护生命所必需，在体内处于一种不断产生、不断清除的动态平衡中，始终维持在一个正常的水平，可以说是机体的一种有效的防御系统。活性氧的生理功能为参与体内的电子转移、杀菌和物质代谢。

利用化学荧光指示剂即荧光探针：2',7'-Dichlorofluorescin Diacetate，（DCFH-DA）检测组织内的活性氧。DCFH 可以被各种活性氧所氧化，转变成一种可以产生荧光信号的物质即二氯荧光素（2',7'-Dichlorofluorescein ，DCF），所得到的 DCF 荧光信号并不是被某种单一的活性氧氧化所产生，所以用这种荧光指示剂测定的活性氧，反映的是所有活性氧的总的氧化能力。这种荧光信号在激发波长 488nm 和发射波长 525nm 处有最大波峰，其荧光强度和活性氧水平成正比。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 110mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体μL×1 支	-20℃保存	低温时易结晶，使用前可在 25℃水浴至全部融解后使用。

三、所需的仪器和用品：

荧光酶标仪、台式离心机、可调式移液器、黑色 96 孔板、研钵和冰。

四、活性氧（ROS）测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm，4℃离心 10min，取上清待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取

② 液体样品：澄清液体样本直接检测，若浑浊则 12000rpm，离心 10min 取上清液待测。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min，调节波长。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）。

③ 在黑色 96 孔板中依次加入（整个过程尽量避光）：

试剂名称（μL）	测定管	空白管
试剂一	2	2
样本	200	
提取液		200
混匀，37℃避光孵育 30min 后于激发波长 488nm，发射波长 525nm 处读取荧光值 F。荧光强度=F 测定-F 空白		

【注】1.若荧光值较小，可以增加 37℃孵育反应时间 T（如增至 1 小时）,或增加试剂一（由 2μL 增至 5μL）；改变后的 T 需代入公式重新计算。

2.若荧光值较大，可以减少 37℃孵育反应时间 T（如减至 10min）,或稀释试剂一（稀释 5~10 倍）；改变后的 T 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按照样本质量计算：

活性氧强度定义：每克组织每分钟产生的荧光强度定义为活性氧强度。

活性氧强度(RFU/min/g)=荧光强度÷T÷W×V

2、按照样本蛋白浓度计算：

活性氧强度定义：每毫克组织蛋白每分钟产生的荧光强度定义为活性氧强度。

活性氧强度(RFU/min/mg prot)=荧光强度÷T÷Cpr×V

3、按照液体体积计算：

活性氧强度定义：每毫升液体每分钟产生的荧光强度定义为活性氧强度。

活性氧强度(RFU/min/mL)=荧光强度÷T÷V1

【注】数据与质量和蛋白浓度的单位无关

W---样品质量，g；　　T---反应时间，30 min；

V1---样本加入体积，0.2mL；　　V---加入提取液体积，1 mL；

Cpr---上清液蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。