# 细胞活性氧（ROS）荧光法测试盒（绿色）说明书

（荧光法 48 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）检测细胞内的活性氧。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 |
|---|---|---|---|
| 试剂一 | 液体 mL×1 支 | -20℃保存 | 临用前解冻至室温，低温时易结晶，使用前可在 25℃水浴至全部融解后使用。 |
| 试剂二 | 液体 mL×1 瓶 | 4℃保存 | |

## 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。

## 四、活性氧（ROS）测定：

**建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品和实验流程，避免样本和试剂浪费！**

### 1、样本制备：

① 贴壁细胞，吸去培养液，利用无血清培养液或者 0.01MPBS 反复吹打，肉眼观察孔板底部(瓶底)由半透明(细胞单层连接成片)转为透明，细胞层几乎全部吹打到 PBS 中。将细胞悬液全部收集到离心管中。用无血清培养液或者 0.01MPBS 洗涤 2 次，1000rpm，室温离心 5min，吸净上清，留细胞沉淀用于测定。

② 悬浮细胞：按常规方法离心(2000rpm，室温离心 5min)，收集细胞沉淀，用无血清培养液或者 0.01MPBS 洗涤 2 次，1000rpm，室温离心 5min，吸净上清，留细胞沉淀用于测定。

### 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℃）。**混合液**制备：用前将试剂一：试剂二=1:100 制成混合液（现配现用，用多少配多少）。

③ 在 EP 管中依次加入（整个过程尽量避光）：

| 试剂名称（μL） | 测定管 | 空白管（仅做一次） |
|---|---|---|
| | 细胞沉淀 | |
| **混合液** | 1mL | 1mL |
| 混匀，37℃孵育 30min（每隔 3-5min 颠倒混匀一次），1000g 离心 5min，去上清，留沉淀。 | | |
| 试剂二 | 1mL | 1mL |
| 混匀，取 200μL 测定管和 200μL 混合液分别至黑色 96 孔板中于激发波长 488nm，发射波长 525nm 处读取荧 | | |

光值 F 测定和 F 空白。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）,或增加试剂一与试剂二比例浓度（如试剂一：试剂二 1:50）；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），改变后的 T 需代入公式重新计算。

## 五、结果计算：

1、按照细胞数量计算：

活性氧强度定义：每万细胞每分钟产生的荧光强度定义为活性氧强度。

活性氧强度=荧光强度/T/500

500---细胞数量，万；　　T---反应时间，30 min。