



## 活性氧检测试剂盒 (红色荧光 DHE) Reactive Oxygen Species Assay Kit (Red Fluorescence DHE)

C1300-2

**描述:** 活性氧包括超氧自由基 ( $O_2^{\cdot-}$ )、过氧化氢 ( $H_2O_2$ )、羟基自由基 ( $\cdot OH$ )、过氧亚硝基 ( $ONOO^-$ )、一氧化氮 ( $\cdot NO$ ) 等, 参与了细胞增殖、发育分化、衰老和凋亡等多种生理和病理过程, 涉及到氧化应激、细胞凋亡和衰老、铁死亡等多种代谢通路。试剂盒利用荧光探针DHE进行活性氧检测。DHE可自由透过活细胞膜进入细胞内, 在细胞质中呈蓝色荧光 ( $Ex/Em=370/420nm$ ), 当被细胞内的ROS氧化后, 脱氢形成溴化乙锭。溴化乙锭可以与RNA或DNA结合产生红色荧光, 使细胞核呈现明亮的红色 ( $Ex/Em=518/610nm$ ), 荧光水平与细胞内活性氧水平成正比。

**适用:** 检测贴壁细胞、悬浮细胞、新鲜动物组织中的活性氧水平

**工作波长:** 最佳激发波长518nm (也可以535nm), 最佳发射波长610nm, 也可按照PE或FL2通道检测。

**所需设备:** 流式细胞仪、荧光酶标仪、激光共聚焦显微镜等。

**组成:**

组份	规格	储存和效期
DHE (5mM)	0.2ml	-20°C 避光保存, 一年有效
活性氧供体 (12mM $H_2O_2$ )	0.5ml	-20°C 避光保存, 一年有效

**操作步骤:**

### 一. 细胞样本

#### 1. 细胞收集:

**悬浮细胞:** 2000rpm, 离心5min, 收集沉淀, 用1\* PBS或无血清培养液洗涤2次, 1000rpm 离心5min, 弃上清, 取细胞沉淀。

**贴壁细胞:** 吸去培养液, 用1\* PBS或无血清培养液反复吹打, 使细胞层全部进入PBS或培养液中, 收集细胞悬液, 用1\*PBS或无血清培养液洗涤2次, 1000rpm 离心5min, 弃上清, 取细胞沉淀; 也可胰酶消化小计细胞。

2. 加入DHE探针, 同时设置阴性对照、阳性对照管。

**样本管:** 用1\* PBS或无血清培养液稀释DHE探针重悬细胞沉淀, 一般情况下, 细胞密度要求 $1 \times 10^6$ - $2 \times 10^7/ml$ , 推荐探针初始工作浓度为10uM (建议DHE工作浓度可在1uM~100uM范围内, 需预实验确定最适浓度)。

**阴性对照:** 不加探针, 只加用1\* PBS或无血清培养液重悬的细胞。

**阳性对照:** 加入DHE荧光探针同时加入活性氧供体的细胞悬液, 推荐活性氧供体工作浓度20-100uM。

3. 37°C避光孵育细胞20分钟~90分钟。通常情况下, 20-60分钟即可。**注意:** 孵育时间长短与细胞类型、刺激条件、DHE浓度等有关。可每隔5min颠倒混匀一次, 使探针与样本充分接触。

4. 1000g, 离心5min, 去上清收集细胞沉淀, 用1\* PBS洗涤2次并重悬细胞。

5. 使用流式细胞仪、荧光酶标仪、激光共聚焦显微镜进行荧光检测, 以荧光度数值表示结果。



## 二、动物组织样本

1. 单细胞悬液制备: 采用单细胞悬液制备仪或传统的组织处理方法如: 酶解法、研磨法等制备单细胞悬液;
2. 加入DHE探针, 同时设置阴性对照、阳性对照管。

**样本管:** 用1\* PBS或无血清培养液稀释DHE探针重悬细胞沉淀, 一般情况下, 细胞密度要求 $1 \times 10^6$ - $2 \times 10^7$ /ml, 推荐探针初始工作浓度为10uM (建议DHE工作浓度可在1uM~100uM范围内, 需预实验确定最适浓度)。

**阴性对照:** 不加探针, 只加用1\* PBS或无血清培养液重悬的细胞。

**阳性对照:** 加入DHE荧光探针同时加入活性氧供体的细胞悬液, 推荐活性氧供体工作浓度20-100uM。

3. 37°C避光孵育细胞20分钟~90分钟。通常情况下, 20-60分钟即可。**注意: 孵育时间长短与细胞类型、刺激条件、DHE浓度等有关。可每隔5min颠倒混匀一次, 使探针与样本充分接触。**
4. 1000g, 离心5min, 去上清收集细胞沉淀, 用1\* PBS洗涤2次并重悬细胞。
5. 使用流式细胞仪、荧光酶标仪、激光共聚焦显微镜进行荧光检测, 以荧光度数值表示结果。

### 说明:

1. 本试剂盒特别适用于贴壁细胞和悬浮细胞活性氧的检测。动物组织样本应尽量选择新鲜组织, 如样本已经冻存, 无法保证检测结果的可靠性。
2. 稀释DHE可1\* PBS或无酚红培养基。血清或培养基的颜色并不会影响DHE及细胞内荧光的产生, 但可能会影响荧光显微镜观察, 干扰荧光分光光度计、荧光酶标仪或流式细胞仪的荧光测定。
3. 加入DHE的时机和孵育时间, 以最终能顺利检测细胞内活性氧为目的, 当细胞药物处理时间较短(如<2小时)或预计ROS效应较弱时, 可将DHE在药物处理之前或者与药物同时加入到细胞培养基中; 反之当药物处理时间较长(如>6小时)或预计产生ROS效应较强时, 可将DHE在药物处理之后再加入。
4. 活性氧供体的细胞工作浓度为20-100uM或更低, 当其浓度超过200uM时将产生细胞毒性。如果用户熟悉ROS荧光或实验没有必要采用阳性对照, 可以不加该试剂。

相关产品推荐	
C1300-1	活性氧 ROS 检测试剂盒 (绿色荧光 DCFH)
E1046	组织细胞亚铁离子含量检测试剂盒
E1030	一氧化氮 NO 含量检测试剂盒
E2073	组织细胞氧化型谷胱甘肽 GSSG 含量测定试剂盒